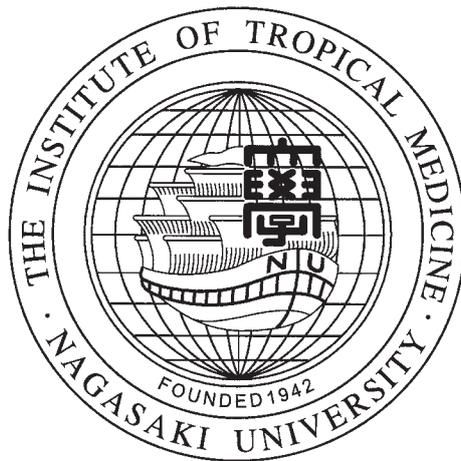


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和2年度
(2020)



長崎大学熱帯医学研究所
(全国共同利用研究所)

はじめに

長崎大学熱帯医学研究所
所長 森田 公一

熱帯地域を中心とした開発途上国では、近年疾病構造の変化がみられるなか依然として古典的な熱帯病は流行を繰り返し、加えてエボラ出血熱などの新興感染症が保健衛生のみならず社会・経済分野においても国内外で重大な脅威となっています。

先進諸国あるいは国際機関、民間支援機関などは、この問題を憂慮し多大な投資をHIV/AIDS、結核、マラリアに対して実施してきました。その結果、特定の分野では目に見える成果が得られ、いくつかの熱帯病・新興感染症の明瞭な減少もみられるようになりました。しかし、最近多くの熱帯病・新興感染症の発生状況や社会背景は、より多様化し複雑化してきています。異常気候、熱帯雨林の環境破壊、難民の増加などの諸問題がさらに感染症の発生状況の混迷度を高めており、これまで順調に進展してきたいくつかの優良な国際感染症対策プログラムさえも後退させている事例が発生しています。加えて令和2年度から始まった新型コロナウイルスのパンデミックによりさらに研究のみならず、疾病対策にも多大な障害が発生している現状です。

このような状況においても、長崎大学熱帯医学研究所は本来の責務である熱帯地域における調査研究に軸足をおき、当該地域における保健衛生問題の解決に資する科学的根拠を提供するための研究開発に加え、人材育成、情報の発信を国内外の研究者と共同で実施していかねばなりません。これらを実現するため、本研究所は全国共同利用・共同研究拠点として海外研究拠点を維持し、以下にあげる活動を通して研究者を糾合し熱帯医学領域の学術の向上と世界的な感染症対策へ寄与することを目標として活動しています。

1. 全国を通しての共同研究

本研究所の大きな研究教育リソースであるアジア・アフリカ研究拠点等を活用し、熱帯病・新興感染症の臨床疫学、公衆衛生学、微生物病学をベースにしたプロジェクトを全国に公募し、研究所内外の専門家により構成される運営委員会により採択された活動を支援します。なお、このプロジェクトには現地の研究者も参加できます。

2. 研究集会

関連研究の情報交換や共同研究の促進のための国際的な研究会や、研究技術の普及のための研修会を、Web開催を含めて公募し支援します。

3. リソースセンター

研究や教育に資するため、病原体や遺伝情報の集積保存、全国配布を行います。

4. 熱帯医学ミュージアム

共同利用研究で得られた知識や科学的新知見を社会に還元するため、サイエンスコミュニケーション、情報発信の中核を担います。

熱帯医学研究拠点である本研究所の特色は、アジア・アフリカ感染症研究施設などの研究基盤を背景として国内外の多様な領域の研究者とともに熱帯地域の現場に根ざした共同研究を遂行することが挙げられます。本拠点が提供する共同研究基盤が、日本の学術コミュニティをさらに活性化し、開発途上国ひいては世界の熱帯病・新興感染症制御に資する新たな知と技の創造につながることを祈念しております。

本研究所が全国共同利用・共同研究拠点の目標を達成できますよう、さらなる関係各位のご支援、ご協力をお願い申し上げます。

目 次

第1部 一般共同研究

1. 包括的モデルによる性感染症の長期的動態の理論研究
代表者：守田 智（静岡大学 工学部 数理システム工学科 教授）----- 1
2. マラリア原虫感染に対するグアニン四重鎖を介した5-アミノレブリン酸治療メカニズムに関する研究
代表者：塩田 倫史（熊本大学 発生医学研究所 ゲノム神経学分野 独立准教授）----- 5
3. Leishmania 原虫固有酵素の機能解明
代表者：佐藤 一樹（東京理科大学 薬学部 生命創薬科学科 助教）----- 10
4. アレナウイルスの細胞内増殖機構に関する研究
代表者：野田 岳志（京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 教授）----- 13
5. マラリア原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析
代表者：正谷 達磨（岐阜大学応用生物科学部 准教授）----- 18
6. ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉
代表者：都野 展子（金沢大学 自然科学研究科 准教授）----- 24
7. ルワンダ共和国における妊婦の歯周病菌保菌状況と早産の関連調査
代表者：福田 英輝（国立保健医療科学院 統括研究官）----- 29
8. ワクチン導入後のケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析
代表者：河本 聡志（藤田医科大学医学部ウイルス・寄生虫学講座 准教授）----- 34
9. マウスモデルを用いた脳炎フラビウイルス感染病態の分子イメージング解析
代表者：早坂 大輔（山口大学 共同獣医学部 獣医微生物学分野 教授）----- 39
10. ベトナムにおける下痢原性大腸菌のワンヘルスアプローチ
代表者：井口 純（宮崎大学 農学部 畜産草地科学科 准教授）----- 45
11. デングウイルス認識抗体の網羅的解析系の構築
代表者：宮内 浩典（国立研究開発法人理化学研究所 生命医科学研究センター
サイトカイン研究チーム 副チームリーダー）----- 50
12. キノン化合物の抗トリパノソーマ活性評価
代表者：大山 要（長崎大学生命医科学域（薬学系） 准教授）----- 54
13. 西アフリカにおけるシングルセル・ゲノミクス技術を駆使したブルーリ潰瘍の伝播・感染経路推定
代表者：星野 仁彦（国立感染症研究所 ハンセン病研究センター 室長）----- 57
14. コンゴ民主共和国の通学児童における不顕性マラリア感染の実態調査とその影響
代表者：美田 敏宏（順天堂大学医学部 熱帯医学・寄生虫病学講座 教授）----- 63
15. コガタアカイエカのウイルス叢と日本脳炎ウイルス媒介能に与える影響の関連解析
代表者：小林 大介（国立感染症研究所 昆虫医科学部 流動研究員）----- 67
16. ベトナムにおける疾病媒介蚊の新規殺虫剤抵抗性変異高効率探索
代表者：糸川健太郎（国立感染症研究所病原体ゲノム解析センター 主任研究官）----- 73
17. 赤痢アメーバシスト形成に伴う細胞変化の電子顕微鏡解析
代表者：見市（三田村）文香（佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野 講師（特定））----- 78

18. 亜熱帯・熱帯植物由来の抗マラリア薬の探索研究	代表者：松浪 勝義 (広島大学 大学院医系科学研究科・生薬学 教授) -----	83
19. Genetic diversity of dengue virus and associated clinical severity among dengue patients	代表者：Neoh Hui Min (Senior Research Fellow, Associate Professor, UKM Medical Molecular Biology Institute (UMBI)) -----	88
20. 住血吸虫の in vitro ライフサイクルの実現に向けて	代表者：王寺 幸輝 (奈良県立医科大学 准教授) -----	94
21. Clinical, serological, virological and molecular characterization of Chikungunya virus in the Philippines	代表者：Mark Pierre Dimamay (Officer-in-Charge, R&B, SLMC, Research and Biotechnology Group (R&B), St. Luke's Medical Center (SLMC)) -----	100
22. ルワンダ共和国における早産児の有病割合、リスク要因と予後の検討	代表者：頼藤 貴志 (岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 疫学・衛生学分野 教授) -----	103
23. Profile of antimalarial drug resistance markers among school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo	代表者：Richard Culleton (Professor, Division of Molecular Parasitology, Proteo-Science Center, Ehime University) -----	107
24. ウイルス感染症の革新的治療薬への応用を目指した合成フラボノイド誘導体の開発	代表者：淵上 剛志 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 衛生化学分野 准教授) -----	111
25. Zika Virus Infection among Pregnant Women and neonates in Mandalay; A Peri-natal Congenital Zika Virus Infection Screening Project in Upper Myanmar (2020-2021)	代表者：Aung Kyaw Kyaw (Deputy Director, Department of Medical Research, Ministry of Health and Sports, Republic of the Union of Myanmar) -----	119
26. Role of other viruses from the forest in dengue-like illness in patients from Sabah	代表者：Kamruddin Ahmed (Professor, Department of Pathobiology and Medical Diagnostics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah) -----	122
27. Arboviral infection in clinically suspected encephalitis patients in Sri Lanka.	代表者：Rohitha Muthugala (Consultant Medical Virologist, National Hospital Kandy, Ministry of Health, Sri Lanka) -----	125
28. ライプイメーシングによるエボラウイルス粒子放出機構の解明	代表者：高松 由基 (国立感染症研究所 主任研究官) -----	128
29. 人獣共通感染性の肝蛭症に対する新規薬剤の探索	代表者：関 まどか (岩手大学 農学部 共同獣医学科 助教) -----	135

第2部 研究集会

1. 医学研究のための倫理に関する国際セミナー

代表者：佐々木 均（長崎大学病院 薬剤部 教授（薬剤部長）） ----- 139

2. 皮膚リーシュマニア症研究会議

代表者：平林 史子（DNDi Japan 理事

長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科 客員研究員） ----- 147

第3部 海外拠点連携共同研究

1. ケニアで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析

（千葉大学真菌医学研究センター） ----- 155

2. ハノイコホートを用いた HIV-1 subtype A/E ウイルス感染症の疫学およびワクチン開発と治療のための基盤研究

（熊本大学ヒトレトロウイルス学共同研究センター） ----- 163

(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿 ----- 169

第 1 部

一 般 共 同 研 究

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：包括的モデルによる性感染症の長期的動態の理論研究
課 題 番 号：2020-Ippan-1

2. 代 表 者：守田 智（静岡大学工学部・教授）
共 同 研 究 者：伊東 啓（長崎大学熱帯医学研究所・助教）
山口 幸（東京女子大学現代教養学部・講師）
田村 和広（静岡大学大学院・博士課程）

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

性感染症は古代から存在する人類の脅威であり、日本における梅毒の症例増加に例を見るように、性感染症の拡散は現代の先進国においても留まるところを知らない。性感染症の効率的な拡散防止戦略をたてるためには、その拡散効率を理解することが肝要であり、拡散数理モデルの構築や性接触のネットワーク特性の理解は大きな意義を持つ。本研究では、数理モデリングによって性感染症の長期的な拡散メカニズムを数理的に明らかにする。まず性感染と母子感染を同時に考慮する数理モデルを構築し、その複雑な人口動態を再現する。ここでは性感染については性接触のネットワークの構造を考慮しつつ、母親から子への母子感染も考慮することで、水平感染と垂直感染がそれぞれ性感染症の拡散にどの程度寄与しているかを理論的に推定する。2020 年度からは特に継続課題として、同性間の性的接触による感染も考慮に入れたモデルを構築し、性感染症の全般に関する総合的な防止戦略の構築を目指す。このように本研究は、地球上のあらゆる人が曝されている性感染症への感染リスクを理論的に検証し、その最終的かつ不可逆的な解決策の提案に取り組むものである。

② 研究内容

疫学分野で広く使用されているコンパートメントモデル（SI モデルもしくは SIS モデル）を発展させ、性感染症の長期的な蔓延挙動を再現する。本研究で用いているモデルは、性接触のネットワークを踏まえた性感染と母子感染を考慮することで複雑な蔓延挙動を表現できる。これまでのモデル（Ito et al. 2019. Appl. Math. Comput. 及び Ito et al. 2019. Sci. Rep.）は異性間の性接触のみを考慮していたが、2020 年度からは HIV で重要な感染経路とみなされた男性間性接触も考慮できるモデルを構築する。その上で、公衆衛生上の重要な指標である基本再生産数に加えてタイプ別再生産数を理論的に定式化する。この解析により、どのタイプ（男性・女性・

同性愛者男性)の再生産数が大きくなるのか判明するので、そこからどのような蔓延防止戦略が長期的に有効かを明らかにする。またシミュレーションを用いて理論の検証を行っていく。同時に性接触のネットワーク構造を理論的に理解するために独自研究資金にてインターネット調査を実施し、現実の性感染経路がどのような特性を持つか検証し、モデルにフィードバックする。

③ 予想される成果

本研究は、従来のモデルと比較してはるかに現実的な性感染症の標準モデルを提供する。このモデルは構想段階で既に、男性から女性への性感染率、女性から男性への性感染率、母子感染率、出生性比、幼児期死亡率といった30を超える変数で構成されるため、その地域や性感染症の種類に基づいた変数を設定することで、その条件に合わせた拡散リスクを用途に合わせて導出することができる。このような汎用性の高い数理モデルはこれまでに存在しない上に、本モデルは世代を超えるような長期(long-term)の蔓延挙動を検証できるため、長期的かつグローバルな展望に立った政策提言や意思決定に貢献できる。例えば、性感染症に対する有効な予防策(ワクチン等)がある場合に、男性と女性のどちらに限りあるリソースを集中投入するかを理論的裏付けから提案することができる。何よりもパラメータを設定すれば全ての性感染症に適用可能で、そのタイプ別再生産数を解析的に導くことができるモデルを開発した研究は、世界中を見回しても本研究のみである。ゆえに本研究は、真の意味で性感染症のユニバーサル・モデルを開発することに他ならず、性感染症の理論研究における金字塔の一つになると期待している。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

世代交代のある SIS モデルを用いて性感染症の長期的な蔓延挙動を再現する。本研究の方法の新しい点は、人ごとの性的活動度と違いを考慮していることと男性同性間の性接触 (MSM) を考慮していることを同時に考慮した点である。前者については、性的活動度分布を仮定してすべての個人が性的活動の多寡を属性として持っているとは仮定して単純化を図った。一方、後者については、男性を異性とのみ性接触するもの (MSW)、男性としか性接触しないもの (MSME)、どちらも性接触するもの (MSMW) の 3 グループに分けモデル化した (図 1 参照)。多くの性感染症比で大きい影響があると考えられている母子感染の効果も考慮してモデルを構築した。比較的影響の少ないと考えられている女性同性間 (WSW) の性接触は無視した。

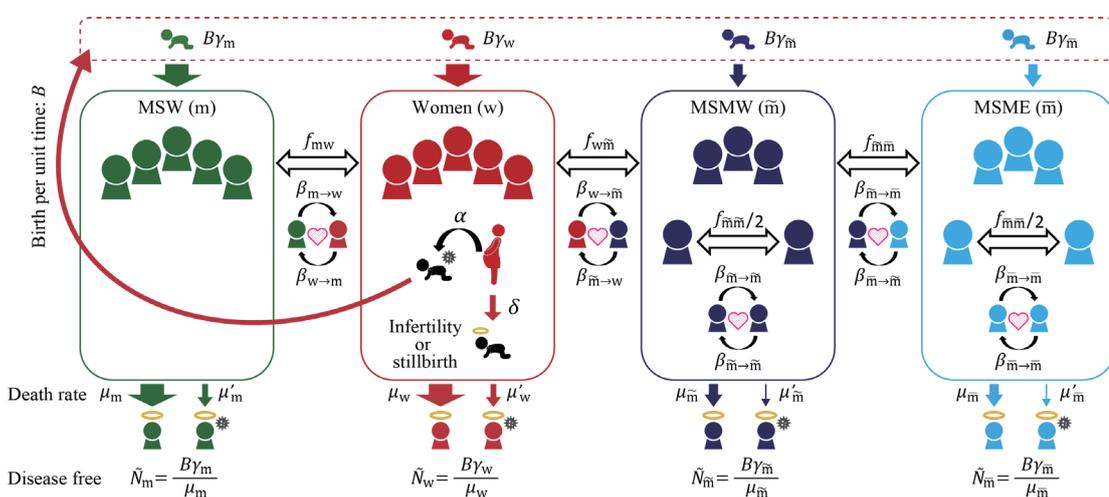


図 1：モデルの概略

② 成果（結果＋考察）

次世代行列を用いた手法でタイプ別再生産数を理論的に導出した。タイプ別再生産数を T とした場合、そのタイプの $1-1/T$ の割合を免疫化すれば感染症の拡大は完全に抑えられる。そのため T の値の大小は感染症対策のターゲットの指標となる。男性同性間の性接触のみでも感染症が蔓延するようなケースには、同性性接触を行うグループ (MSME の割合が大きい場合を除いて MSMW) に感染対策を集中すると良いことが示唆された。一方で異性間の性接触のみでも感染症が蔓延するようなケースでは、女性に対して感染対策を集中すると良いことが示唆された。さらに男性同性間と異性間のどちらの性接触で感染症が蔓延するようなケースでは、上記の両方の対策が必須となる。実際の性感染症に関して本モデルのパラメータ推定を行えば、感染症対策へ提言していけると期待できる良い結果が得られた。

③ 成果の公表

上記の研究成果は代表者を責任著者として下記の内容で現在投稿中である。

Ito H., Yamamoto T., Morita S. “The effect of men who have sex with men (MSM) on the spread of sexually transmitted infections”

6. 自己評価

当初、予定したモデルの構築が完了し解析解も導出できた。研究の過程でモデルが予想以上に複雑化してしまったため、主要論文の出版が若干遅れている。しかしながら1回目査読結果は悪くなくまもなく公開に至ると考えている。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名: マラリア原虫感染に対するグアニン四重鎖を介した 5-アミノレブリン酸治療メカニズムに関する研究

課 題 番 号: 2020-Ippan-02

2. 代 表 者: 塩田 倫史 (熊本大学 発生医学研究所 ゲノム神経学分野・准教授)

共 同 研 究 者: 北 潔 (長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科・教授
宿主病態解析部門 感染生化学分野・教授)

佐倉 孝哉 (長崎大学 熱帯医学研究所

分子感染ダイナミクス解析分野・助教)

3. 決 定 額: 400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

近年、マラリア治療薬の新しい標的部位として、ゲノム上にあるグアニン四重鎖 (G quadruplex; G4) 構造に注目が集まっている。G4 構造は、一般的に知られている DNA の右巻き 2 重らせん構造 (B 型 DNA) 以外の非 B 型 DNA 構造のひとつである。G4 構造は、これまでのバイオインフォマティクス解析で、ヒトゲノム中に 376,000 箇所存在することが予測され、テロメア、遺伝子プロモーター、リボソーム DNA および組換えホットスポットに特に多く見られる。申請者は、G4 構造に結合する安全性の高い薬剤として、5-アミノレブリン酸を同定した (Shioda et al., Nat Med. 2018)。一方、共同研究者である北 潔 博士は、強毒性のネズミマラリア原虫を致死的条件で感染させたマウスを用い、5-アミノレブリン酸を投与したマウスの 60% に治療的効果が認められることを見出した。さらに、感染から治癒したマウスは、治癒後 230 日を超えても同原虫の再感染に抵抗を示し、当該マラリア原虫に対する長期の免疫を獲得していた (Komatsuya et al., J. Biochem. 2013; Suzuki et al., Antimicrob Agents Chemother. 2015)。しかしながら、その薬効メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、マラリア原虫感染に対する 5-アミノレブリン酸の薬効メカニズムにおける G4 構造結合作用の関与について検討することを目的とする。レナウイルス増殖環における膜構造集合体形成の役割や分子機序の解明を目指す。

② 研究内容

これまで、マラリアゲノムにおける G4 構造の位置は明らかにされていない。そこで、G4 構造認識抗体の特異性をマウス脳組織で確認し、それを用いてマラリアサンプルで ChIP-seq を行い、マラリアゲノムにおける G4 構造を同定する。同時に、5-アミノレブリン酸を処置したマラリア原虫のゲノムを用いた ChIP-seq を行い、5-アミノレブリン酸

によるマラリアゲノムにおける G4 構造の変化を解析する。また、バイオインフォマティクス解析により、マラリアゲノム上で G4 構造の変化が見られた周辺遺伝子を同定する。その後、5-アミノレブリン酸処置による遺伝子変動について、リアルタイム PCR 法によるバリデーションを行い、得られた遺伝子のマラリア原虫における機能解析を行う。

③ 予想される成果

これまで、ヒトゲノムにおける G4 構造の生物学的な役割は明らかにされていないが、テロメア構造や組換えホットスポットに特に多く見られることから、生命活動に重要な意味を持つことが示唆されている。一方、マラリアゲノムは 80% 以上が A, T リッチ配列であることが知られており、G4 構造の形成はマラリアの生存にとってヒト以上に大きな意味を持つ可能性がある。本研究により、マラリアゲノムにおける G4 構造の位置とその機能的意義を明らかにすることは、熱帯医学研究におけるマラリア原虫の研究促進に大きく寄与できる。さらに、安全性の高い 5-アミノレブリン酸の新たな治療メカニズムを解明することで、マラリア原虫だけでなく、他の原虫やウイルスに対する G4 構造の生物学的意義やその治療標的としての有用性も世界に向けて発信することができる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

○抗 G-quadruplex 抗体 (BG4) の精製

抗 G4 構造抗体 (BG4) の可変部位配列が挿入された pSANG10-3F プラスミドは Addgene (#55756) から購入した。BG4 は、50 μ g/mL カナマイシンを含む 100 mL Magic Media™ E. coli 発現培地で大腸菌 BL21 (DE3) 株に発現させた。細胞を 4000 g で 4° C, 30 分間遠心分離し、氷上で 5 mL TS バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0 および 20% (wt/vol) スクロース) に再懸濁した。懸濁液にリゾチーム (最終濃度 3 mg/mL) とベンゾナーゼ (最終濃度 250 U/mL) を補充し、氷上で 15 分間インキュベートし、遠心分離 (3000 g、10 分、4° C) 後、上清を採取した。さらに、ペレットを 5 mL の冷滅菌水に再懸濁し、氷上で 15 分間インキュベートし、遠心分離した (3000 g、10 分間、4° C)。上清を採取し、前のステップで得られた上清に加えた。収集した上清を、HIS-Pure コバルトスピンカラム (Sigma-Aldrich) にかけて、BG4 抗体を濃縮した。次に、BG4 抗体画分を Amicon Ultra-4 遠心フィルターデバイス (Millipore) を使用して濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回透析して、過剰なイミダゾールを除去した。得られた BG4 の純度は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のクーマシーブリリアントブルー染色により確認した。

○脳組織の準備

雄性 C57BL/6J マウス (25-30 g、8-10 週齢) を使用した。脳固定のために、マウスをペントバルビタールナトリウム (腹腔内 50 mg/kg) で深麻酔し、上行大動脈を介して 0.01 M PBS、続いて 0.1 M PB の 50 mL 4% PFA を室温で灌流した。電子顕微鏡による免疫標識には、4% PFA と 0.1% グルタルアルデヒドの混合物を含む 0.1 M PB でマウスを灌流した。脳を頭蓋骨から解剖し、固定液で 4° C 一晩保存した。翌日、固定液を 0.01% アジ化ナトリウムを含む PBS に交換した。

免疫組織化学解析

共焦点レーザー顕微鏡による免疫組織化学は、固定された細胞または脳切片を、0.3% Triton X-100 を含む PBS で 30 分間処理した。次に、1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で 1 時間インキュベートし、一次抗体を使用して 4° C で一晩処理し、PBS で洗浄後、二次抗体で 3 時間インキュベートした。BG4 免疫染色では、0.79 mg/mL BG4 in PBS を使用した。G4 構造は、BG4 (1 : 5000、0.16 μ g/mL) の 6xHis エピトープタグを認識する 6xHis 抗体 (1 : 1000; ab18184, Abcam) とのインキュベーション、続いて蛍光色素標識二次抗体とのインキュベーションによって染色した。使用した 1 次抗体は以下である。MAP2 (1 : 1000; AB5622, Millipore)、NeuN (1 : 1000; 26975-1-AP, Proteintech)、GFAP (1 : 1000; 23935-1-AP, Proteintech)、Doublecortin (DCX, 1 : 1000; 13925-1-AP, Proteintech)、Calbindin (1 : 1000; 14479-1-AP, Proteintech)。また、使用した 2 次抗体は以下である。Alexa 594 ロバ抗ウサギ (1 : 500; A-21207, Thermo Fisher Scientific)、Alexa 488 ロバ抗マウス (1 : 500; A-21202, Thermo Fisher Scientific)。核染色のために、4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (R37606; Thermo Fisher

Scientific) を使用した。免疫蛍光画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM710、Zeiss) で分析した。共局在係数は、Zen Software を使用して定量した。

○免疫電子顕微鏡法

背側海馬を含む厚さ 60 マイクロメートルの切片を、BG4 抗体 (1 : 5000、0.16 μ g/mL) および 6 \times His エピトープタグ抗体 (1 : 1000; ab18184、Abcam) を使用して一晩インキュベーションし、その後 1.4 nm-Nanogold-Fab' ヤギ抗マウス IgG (1 : 100、Nanoprobes) で一晩インキュベートした。HQ シルバー (Nanoprobes) を使用してシグナルを増強した後、切片を 1% OsO₄ 水溶液で後固定し、1.5% 酢酸ウラニルで一括染色・脱水し、エポキシ樹脂に埋め込んだ。極薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡 (H-7700、日立) で観察した。

② 成果 (結果+考察)

○成体マウスの脳における G4 構造の細胞内局在

免疫組織化学によって G4 構造の細胞内局在を検討した。G4 構造は、主に嗅球、海馬錐体層、歯状回の顆粒細胞層、および小脳プルキンエ細胞に観察された。G4 構造は、海馬 CA1 領域の MAP2 陽性錐体神経細胞の細胞体および樹状突起にも発現がみられた。一方、G4 構造は GFAP 陽性星状細胞ではほとんど観察されなかった。

神経発生は、胚および周産期の段階だけでなく、中枢神経系の 2 つ領域 (側脳室下帯と海馬歯状回顆粒下帯) でも生涯を通じて見られる。神経前駆細胞マーカー・DCX 陽性細胞と成熟神経細胞マーカー・カルビンジン陽性細胞における G4 構造と DAPI 陽性ヘテロクロマチンの共局在を検討した。G4 構造と DAPI ヘテロクロマチンの共局在シグナルは、海馬歯状回の DCX 陽性神経前駆細胞に比べてカルビンジン陽性成熟神経細胞で有意に増加した。

○成体マウス海馬における G4 構造の電子顕微鏡免疫標識

神経細胞での正確な G4 構造局在を検討するために、海馬 CA1 領域の錐体神経細胞で、電子顕微鏡観察を行った。G4 構造は、核質全体に散在しており、ヘテロクロマチンで特に強く観察された。特に、G4 構造は nucleolus-associated chromosomal domains (NADs) 領域に観察され、核小体には局在していなかった。さらに、G4 構造は細胞質でも検出され、ミトコンドリアなどの特定の細胞小器官では観察されなかった。

本研究では、免疫組織化学を使用してマウスの脳における G4 構造の細胞内局在を明らかにした。G4 構造は主に神経細胞の核内に存在することを示した。さらに、G4 構造は、神経細胞の発達段階に応じて核局在の程度を変化させ、NAD 等のヘテロクロマチンに観察された。NADs 領域は、遺伝子密度の低い領域が濃縮されている。また NADs では H3K9me₃ や H3K27me₃ 等の抑制性ヒストンが濃縮されており、NADs 領域の遺伝子発現は抑制的に支配されている。しかしながら、NAD に関しては研究が始まったばかりで不明な点が多い。これらの成果を活用し、今後、マラリアのゲノムワイドな研究を進める。

③ 成果の公表

該当なし

6. 自己評価

今年度は昨年に引き続き、マラリアでの G4 構造認識抗体を用いた ChIP-seq のプロトコルの最適化のために、使用する抗体の評価に努めた。我々が精製した G4 構造認識抗体はパラレル型・アンチパラレル型・ハイブリット型の全ての G4 構造を同程度のアフィニティーで認識することをゲルシフトアッセイで確認した。また、マウス脳内における G4 の局在を G4 構造認識抗体で検討したところ、特に学習・記憶に重要な海馬の神経細胞と運動機能を制御する小脳プルキンエ細胞の核内に多く局在が見られた。免疫電子顕微鏡法による成熟神経細胞の観察では、G4 は核小体と接しているヘテロクロマチン構造である「Nucleolus associated domain (NADs)」に特に豊富に存在することが明らかになった。興味深いことに、G4 の NADs への集積は未成熟神経細胞では確認できなかった。つまり、G4 は神経発達依存的な動的核酸構造体であることを明らかにした。

G4 構造認識抗体を用いたマラリア原虫の免疫染色により、G4 構造の核内の局在を解析したが、免疫染色法ではマラリアの G4 構造を同定できなかった。おそらく、マラリアゲノムは AT リッチであることが理由と考えられた。今後、ChIP-seq 等による解析を検討する。

7. 達成度

- ① (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : *Leishmania* 原虫固有酵素の機能解明
課 題 番 号 : 2020-Ippan-03
2. 代 表 者 : 佐藤 一樹 (東京理科大学薬学部生命創薬科学科・助教)
共 同 研 究 者 : 和田 猛 (東京理科大学薬学部生命創薬科学科・教授)
村本 一将 (東京理科大学大学院薬学研究科・学生)
3. 決 定 額 : 300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

本研究では、寄生性原虫である *Leishmania* が有する糖衣や糖タンパク質の生合成に必須な酵素の機能解明に焦点を当てる。*Leishmania* は特徴的な β -Gal (1 \rightarrow 4)- α -Man (1-PO₄-6) という繰り返し構造を有し、その生合成には elongating mannosyl phosphate transferase (eMPT) と呼ばれる、種に固有な酵素が関わっている。eMPT は上記の糖鎖を認識して、マンノース 1-リン酸構造を付加する役割を担っている。この eMPT を創薬のターゲットにすることができれば、有効で副作用の少ない医薬の開発につながることを期待される。しかし、eMPT に関する研究例は少なく、その機能に関しては不明な点が多い。本研究では、上記の繰り返し構造やその化学修飾体を合成し、これらの eMPT による認識能を調査することで、eMPT の基質認識機構の解明を目指す。

② 研究内容

上記のように、 β -Gal (1 \rightarrow 4)- α -Man (1-PO₄-6) 繰り返し構造や、その化学修飾体の合成手法を確立している。研究期間内で、繰り返し構造の長さ、及び化学修飾が、eMPT への認識に与える影響を網羅的に調査する。特に、化学修飾体に関しては、リン酸部位 1 つにつき 2 種類の立体異性体が存在するため、n 回の繰り返し構造には 2ⁿ 個の立体異性体が存在する。リン酸部位は eMPT の認識に極めて重要であることが知られており、立体異性体間での認識の違いを評価することによって、eMPT がリン酸部位のどの箇所を認識しているかの解明を行う。具体的には、合成した糖鎖を eMPT を含む *Leishmania* のライセート中で作用させ、HPLC で分析し、マンノース 1-ホスフェート構造の受容能を評価する。

③ 予想される成果

これまで β -Gal (1 \rightarrow 4)- α -Man (1-PO₄-6) 繰り返し構造の鎖長や化学修飾が、eMPT による認識に与える影響について調査がされてきたものの、長い鎖長を持つ誘導体、あるいは立体化学的に純粋な化合物を用いた研究は未だなされていない。これは、こうした誘導体の合成が困難であり、純粋な試料を得ることができなかったことに起因する。本研究では、純度が高い試料の調製が可能であるため、網羅的な研究を始めて可能にする。糖鎖の鎖長や化学修飾体の立体化学が、eMPT の基質認識に与える影響を明らかにすることができれば、eMPT 阻害剤の合理的な分子デザインが可能となり、*Leishmania* 症に対する治療薬の創製に繋がると期待される。*Leishmania* 症の治療薬はこれまでに存在するものの、有効性や副作用の観点で課題があった。本研究で得られた成果を元に eMPT 阻害剤の創薬につながれば、*Leishmania* 症の制圧に向けた大きな前進となる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

本年度は、以下の2点について検討を行った。(1)*Leishmania* が糖衣に有する特徴的な β -Gal (1 \rightarrow 4)- α -Man (1-PO₄-6)構造のリン原子修飾体を、立体選択的に合成し、それぞれを純粋な形で単離する条件の確立、(2)(1)で得られる試料の eMPT による認識能評価に向けた、*Leishmania* の細胞溶出液を用いた予備検討。(1)については、当研究室で確立したオキサザホスホリジン法を用いて検討を行った。(2)については、天然型であるリン酸ジエステル体を合成し、これを細胞溶出液と GDP-マンノースの溶液中で静置し、マンノース-1-リン酸構造を受容するかどうかについて検討を行った。

② 成果（結果+考察）

①(1)について、リン原子修飾体としてボラノ基を有するボラノホスフェートと、硫黄原子を有するホスホロチオエートをそれぞれ合成する検討を行った。結果として、ボラノホスフェートは2糖リン酸の繰り返し構造を1-3か所有する誘導体、ホスホロチオエートは2糖の誘導体について、リン原子の立体化学がすべてR、およびすべてS体である化合物の合成に成功した。

①(2)については、細胞溶出液の量、反応時間、添加剤等の検討を行ったが、マンノース-1-リン酸構造を受容した誘導体の検出には至っていない。これは、eMPT によるマンノース-1-リン酸構造の付加反応が遅く、検出限度以下であることが要因と考えられる。

③ 成果の公表

現在、立体選択的な合成法に関し、学術雑誌に投稿し、revision 対応中となっている。

6. 自己評価

本研究課題は、試料となる β -Gal (1 \rightarrow 4)- α -Man (1-PO₄-6)構造のリン原子修飾体を立体選択的に合成すること、さらにはそれを用いて、*Leishmania* の細胞溶出液中で2020年度に前者を確立し、論文投稿に至ったことで、一定の成果をあげることはできた。一方で、合成したサンプルと *Leishmania* の細胞溶出液を用いた eMPT によるマンノース-1-リン酸構造付加反応の効率に関しては評価系の構築が必要であることから、7.の達成度は II とした。

本課題は来年度も継続することが決定しており、来年度は eMPT による付加反応の基質活性評価を重点的に進め、*Leishmania* に固有の酵素の機能解明を目指す。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：アレナウイルスの細胞内増殖機構に関する研究
課 題 番 号：2020-Ippan-04
2. 代 表 者：野田 岳志 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所・教授)
共 同 研 究 者：浦田 秀造 (長崎大学新興感染症学・准教授)
平林 愛 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所・ポスドク)
梶川 純一 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所・大学院生)
胡 上帆 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所・大学院生)
張 子涵 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所・大学院生)

3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ラッサ熱は、アレナウイルス科マーマアレナウイルス属のラッサウイルスを原因とする人獣共通感染症である。西アフリカー帯で毎年 10-30 万人が感染し、そのうち 5000 人以上がラッサ熱により死亡している (McCormick JB, *et al.* J. Infect. Dis. 1987)。重篤な出血熱症状と高い致死率から、ラッサウイルスの取り扱いにはバイオセーフティーレベル 4 (biosafety level-4 ; BSL-4) 施設が必要であり、ラッサウイルスに関する研究は十分に進んでいない。そのため治療法や予防法が確立しておらず、国際的に対策を要する重要な感染症である。

昨年度、我々はラッサウイルスのマトリックスタンパク質 (Z) が宿主細胞の膜構造を大きく変化させ、核近傍に特徴的な膜構造集合体、特にオートファゴソームやオートリソソーム様の分解系構造を誘導することを見出した。この機構はアレナウイルスのプロトタイプウイルスであるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 感染細胞でも誘導されることから、アレナウイルス全般において重要な役割を果たす可能性が示された。また、本研究で着目する Z タンパク質の構造はアレナウイルスで広く保存されており、本機構の役割および分子機序の解明がアレナウイルス研究の発展および汎アレナウイルス薬開発につながることを期待される。

本研究では、アレナウイルスの Z タンパク質と相互作用する宿主因子の発現抑制や、宿主タンパク質分解系に対する阻害薬を用いた薬剤スクリーニング、また、組換え LCMV を用いた「生化学的・ウイルス学的解析」と超解像顕微鏡や電子顕微鏡を用いた「微細形態学的解析」を組合せ、アレナウイルス増殖環における膜構造集合体形成の役割や分子機序の解明を目指す。

② 研究内容

本研究では、アレナウイルス増殖環における膜構造集合体形成に関して、その役割および分子機序の解明をするため、下記の2点の研究項目を実施する。

1. 膜構造集合体の形成に関わる宿主因子の同定

膜構造集合体の形成に関わると考えられる宿主因子に対する siRNA を宿主細胞へ導入し、膜構造集合体形成能、分解系小胞構造体誘導能、ウイルス粒子形成能、子孫ウイルス産生量への影響を多面的に評価する。発現抑制スクリーニングの評価には、Z タンパク質の発現系における細胞内局在観察や budding assay を用い、感染系においては LCMV を用いてウイルス増殖能への影響や各ウイルスタンパク質の局在や発現量から評価する。

2. 膜構造集合体の形成と持続感染への関与

LCMV 感染細胞で誘導されるオートファゴソームやリソソーム様の分解系構造の機能およびその経路について同定するため、阻害薬を用いた薬剤スクリーニングを行う。薬剤スクリーニングの評価には、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用い、分解系構造の形成の有無を評価する。また LCMV のウイルス増殖能に与える影響やウイルスタンパク質量・RNA 量の変動を多面的に評価する。本研究で分解系経路が同定できた場合、その分解系経路に関与する宿主因子の発現抑制を行い、LCMV のウイルス増殖能に与える影響や持続感染成立の有無について評価する。さらに、本実験では、Z タンパク質を標識した組換え LCMV や Z タンパク質に変異を加えた LCMV をリバーズジェネティクス法で作製し、アレナウイルス増殖環における膜構造集合体形成の役割や分子機序の解明を目指す。

③ 予想される成果

アレナウイルスの Z タンパク質によって誘導される膜構造集合体形成に関連した報告はこれまでに無く、マイナス鎖 RNA ウイルスにおいても同様の報告がないことから、その機構の解明がもたらす学術的進展は大きいものになると考えられる。また、本研究で着目する Z タンパク質はアレナウイルスの増殖に欠かすことのできないタンパク質であり、本機構の解明から、未だに特異的な治療法が確立されていないラッサ熱だけでなく、多様なアレナウイルス疾患に対する汎アレナウイルス薬の開発につながる可能性もあり、流行地である西アフリカ地域の医療の向上や公衆衛生の改善、社会貢献につながるだけでなく、輸入感染症対策やバイオテロ対策を通じて我が国の国民の安全や福祉の向上につながると考えている。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

令和 2 年度の本共同研究費を使用し、光学顕微鏡解析用のマイクロスライド (ibidi 社) を確保した。また、アレナウイルス増殖環における膜構造集合体の形成を同定するため、候補となる宿主タンパク質に対する抗体を購入した。新型コロナウイルス流行の影響から、本年はメールや Zoom を通して、浦田博士、南保博士との研究打ち合わせおよび研究経過報告を行った。

1) 膜構造集合体の形成に関わる宿主因子の同定

オートファジーの誘導に関与する *Atg7* 遺伝子をノックアウトした A549 細胞にアレナウイルスのプロトタイプウイルスである LCMV を感染させ、感染後の細胞内微細構造変化を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した。また、抗 NP 抗体およびオートファゴソーム・オートリソソームのマーカである LC3 の抗体を用いた免疫蛍光染色 (IFA) を行い、感染細胞における細胞内局在変化を観察した。

2) 膜構造集合体の形成と持続感染への関与

野生型の A549 細胞および *Atg7* ノックアウト A549 細胞へ LCMV を感染させ、数日間培養を続けた。野生型の A549 細胞と比較し、LCMV 感染における細胞傷害性および各時間でのウイルス産生量への影響を評価した。

② 成果 (結果+考察)

1) 膜構造集合体の形成に関わる宿主因子の同定

前年度の共同研究から、LCMV 感染が誘導する宿主細胞内の膜構造集合体がオートファゴソーム・オートリソソームである可能性が示唆された。そこで本年は、オートファゴソーム・オートリソソーム形成に必須のタンパク質である *Atg7* 遺伝子をノックアウトした細胞を用い、LCMV 感染が誘導する膜構造集合体の同定を目指した。図 1 に示すように LCMV を感染させた野生型 A549 細胞では、核近傍に NP が集積するとともにオートファジーのマーカータンパク質である LC3 が共局在していた。一方で、*Atg7* ノックアウト細胞では、NP の集積は見られたが LC3 は共局在しておらず、TEM 観察でも野生型 A549 細胞で見られたような膜構造集合体は見られなかった。

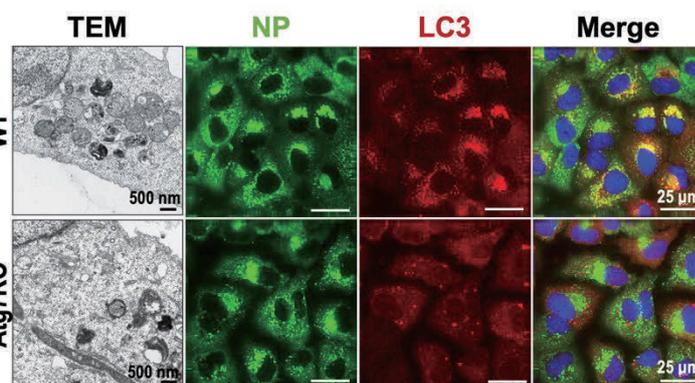


図 1. LCMV 感染による微細構造変化

は、核近傍に NP が集積するとともにオートファジーのマーカータンパク質である LC3 が共局在していた。一方で、*Atg7* ノックアウト細胞では、NP の集積は見られたが LC3 は共局在しておらず、TEM 観察でも野生型 A549 細胞で見られたような膜構造集合体は見られなかった。以上の結果から、LCMV 感染によって誘導される膜構造集合体はオートファジーで形成されるオートファゴソーム・オートリソソームであることが明らかになった。

2) 膜構造集合体の形成と持続感染への関与

上述 1) で示したように、LCMV 感染によってオートファジーが誘導されることが明らかになった。オートファジーは宿主の栄養飢餓時に誘導されることが知られており、細胞の生死の決定にも密接に関与している。そこで次に、LCMV 感染によって誘導されるオートファジーが持続感染に与える影響を評価した。下記図 2A に示すように、Atg7 ノックアウト細胞に LCMV 感染させ、5 日間培養したところ、感染 3 日後から顕著な細胞変性効果が見られた。また、野生型の細胞および Atg7 ノックアウト細胞へ LCMV を感染させ、日毎のウイルス産生量を調べたところ、感染 3 日目以降のウイルス産生量は Atg7 ノックアウト細胞の方が有意に高いことが明らかになった (図 2B)。以上の結果から、LCMV 感染によって誘導されるオートファジーは、LCMV の持続感染成立に関与することが示唆された。

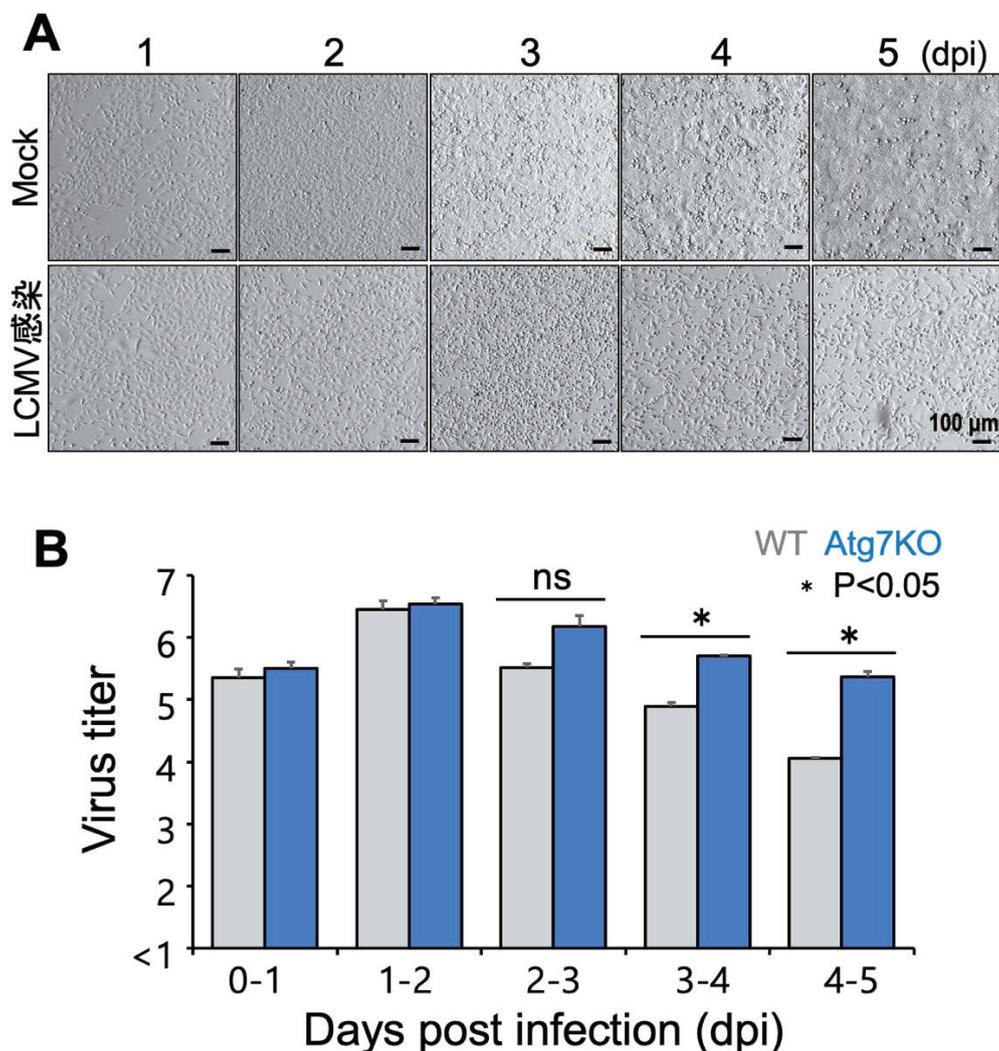


図 2. LCMV 感染細胞における経時的解析

(A) LCMV 感染 Atg7KO 細胞の透過光像、(B) 子孫ウイルス粒子産生量

③ 成果の公表

【学会発表】

1. ○梶川純一. アレナウイルス感染細胞におけるオートファジー誘導を介した細胞死の回避. 第一回高病原性ウイルス研究会. Zoom web meeting. 2021年4月
2. ○胡上帆. Potential role of tight junction protein Claudin-1 in LCMV cell-to-cell transmission. 第一回高病原性ウイルス研究会. Zoom web meeting. 2021年4月
3. ○張子涵. ラッサウイルス侵入阻害薬の探索. 第一回高病原性ウイルス研究会. Zoom web meeting. 2021年4月

6. 自己評価

本研究では昨年度に引き続き、アレナウイルス感染が誘導する宿主細胞内の膜構造集合体に着目し研究を進めていった。当初の計画どおり、LCMV感染が誘導する膜構造集合体がオートファジーで形成されるオートファゴソーム・オートリソソームであることを明らかにし、また、Atg7 ノックアウト細胞を用いた実験から、LCMVの持続感染にオートファジーが関与する結果を得た。一方で、昨年は新型コロナウイルス流行の影響もあり、オートファジー誘導がどのように細胞死の回避に関与しているかというような詳細なメカニズムまで明らかにすることができなかった。現在、CRISPR-Cas9 スクリーニング等の実験も進めており、LCMV感染が誘導するオートファジーと細胞死回避の分子機序について引き続き調べると共に論文投稿への準備を進めている。以上のことから、全体的には納得のいく結果が得られた一方で、少し不満が残るため達成度はIIとした。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マラリア原虫感染による赤血球膜脂質構成変化のナノスケールレベル解析

課 題 番 号：2020-Ippan-05

2. 代 表 者：正谷達膳（岐阜大学応用生物科学部・准教授）

共 同 研 究 者：藤田秋一（鹿児島大学共同獣医学部・教授）

麻田正仁（帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授）

晴希生ハッサン（帯広畜産大学原虫病研究センター・研究員）

金子修（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に感染した赤血球では、原虫側から①原虫の細胞膜、②寄生胞膜、③マウレル裂、④赤血球膜と、多重の膜構造が形成されている。これら膜構造は、原虫が赤血球を自身の発育に有利な環境とするため、赤血球を「改変」することで形成される。これまでの先行研究により、複雑な輸送機構を介して膜構造を経由した原虫由来の蛋白質が赤血球表面に輸送され、これらは栄養取り込み・免疫回避・細胞接着など原虫の発育や病原性の発現に関与することが明らかとなっている。とくに、感染赤血球表面に knob とよばれるコブ状の突起が形成され、血管壁への接着性が増強することは血管塞栓の原因につながる。すなわち、感染赤血球の細胞膜構造変化の詳細を明らかにすることは新規薬剤ターゲットの特定や治療法の開発につながる可能性がある。

これまでの多くの研究では、原虫由来または宿主蛋白質の分布・局在の評価を主に行われてきた。一方、膜構造の脂質に関しては原虫感染赤血球膜の脂質構成が変化するという報告があるものの、原虫による寄生胞膜、マウレル裂など各細胞膜の脂質構成の改変の詳細は明らかとなっておらず、脂質の構成変化が原虫の寄生にとってどのような意味があるのかもわかっていない。感染赤血球の細胞膜構成脂質の組成・局在変化に関する研究が少ない理由として、脂質を化学固定することが困難であり、通常細胞生物学・生化学的手法ではアプローチしにくいことがあげられる。これを可能にする手法として、細胞膜やオルガネラ膜に存在する脂質成分を生きた状態とほぼ変わらない状態で急速に凍結し、さらに生体膜を物理的に固定し電子顕微鏡レベルで解析可能な「急速凍結急速切断レプリカ法(QF-FRL 法)による膜脂質可視化技術」がある(Fujita et al., PNAS, 2009)。本技術は急速に凍結した生体材料を切断し、炭素(C)及び白金(Pt)でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)処理によって余分な生体分子を除去し、レプリカ薄膜へ裏打ちされた脂質分子や蛋白質を特異的プローブにより標識する。さらに、金コロイド標識二次抗体により可視化することで、電子

顕微鏡による分子の局在解析が可能となる。これまでに、本方法と脂質特異的プローブを組み合わせた観察技術によって、藤田を中心に哺乳類細胞や酵母のオルガネラやオートファゴソームに分布する脂質分子の局在が明らかにされてきた。そこで今回、本技術をマalaria原虫感染赤血球に適用することで、感染赤血球膜の脂質構成成分がどのように変化するのか(局在、組成など)を明らかにする。さらに赤血球膜だけでなく、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解明してゆく。

② 研究内容

前年度の研究により、熱帯熱マalaria原虫寄生赤血球において急速凍結・凍結切断レプリカ標識法が実施可能であること、哺乳類細胞と脂質分子の局在が異なる可能性が示された。そこで本年度は、原虫のステージを同調させた上で同様に急速凍結・凍結切断レプリカ標識法を行い、各発育ステージにおける原虫・寄生胞・赤血球膜の脂質分布を詳細に解析するとともに、脂質と蛋白質分子の局在の関係についても解析を行う。

1) マalaria原虫感染赤血球レプリカの作製

P. falciparum 感染赤血球を液体窒素にて急速凍結する。鹿児島大学には *P. falciparum* 培養系が導入されていないため、長崎大学熱帯医学研究所にて実施する。具体的には、熱研対応教員の研究グループによってあらかじめ同調培養した *P. falciparum* 用意し、申請者らが訪問し、銅板及び金箔の間に新鮮な感染赤血球をはさみ、液体窒素に浸漬・急速凍結する。凍結サンプルを液体窒素保存容器に入れた状態で鹿児島大学へ移送し、炭素(C)及び白金(Pt)でできた薄膜へ蒸着することで細胞膜上の脂質分子を固定し、レプリカ薄膜を作る。

2) 脂質プローブを用いたマalaria原虫感染赤血球レプリカ標識

前年度までに揃えた脂質プローブ(GM3、PI4P、PI4,5P₂およびPSに対するもの)を順次、レプリカ薄膜に反応させる。さらにこれらプローブを、金コロイド結合抗体により可視化し、電子顕微鏡により観察する。赤血球膜だけでなく、原虫の細胞膜、寄生胞膜及びマウレル裂の脂質構成とその局在についても解析する。

3) マalaria原虫感染赤血球における膜構成蛋白質の局在解析

膜脂質の局在にならび、レプリカ薄膜を対象として赤血球膜構成蛋白質の局在解析も行う。具体的には、マウレル裂や Sinton and Mulligan's crefts の蛋白質 SBP1 や MAHRP2 に Myc タグを付加した組換えマalaria原虫を用い、抗 Myc 抗体を用いることにより、その局在を観察する。また、脂質プローブと併用することにより、脂質とこれらマウレル裂分子の局在がどのように関係しているのか解析を行う。また赤血球構造を保持するのに重要なスペクトリンや、膜輸送蛋白質としての機能をもつバンド 3 蛋白質などを標識し、電子顕微鏡にて観察する。非感染赤血球と比較してこれら膜蛋白質の局在の変化などを明らかにしてゆく。

③ 予想される成果

マalaria原虫感染赤血球の細胞膜変化について、細胞膜構成脂質の局在を明らかにすることで、

これまでの蛋白質を対象とした研究から得られた知見に、新たに脂質の情報を追加することができる。赤血球膜構成蛋白質の解析結果とあわせることで、膜構造変化メカニズムの詳細を明らかにしていくうえで大きな手がかりを提供しうる。将来的には、原虫由来蛋白質検出系を確立して、原虫細胞膜や寄生胞膜、マウレル裂、Sinton and Mulligan's crefts、knobと言った異なる膜に、各膜系に固有の蛋白質分子がどのようにして輸送されて局在するのか、と言った、現在、よく理解されていない機序について、脂質局在の観点から新たな視点が得られるのではないかと考えている。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

マラリア原虫（3D7A株：パラシテミア 8.03%）感染赤血球を遠心・洗浄した。あらかじめ紙やすりで表面を粗にした金箔及び銅箔で感染血球を挟み、液体窒素で十分冷却した急速凍結装置ではさみ、液体窒素に浸漬することで急速凍結した。液体窒素内で保存しつつ鹿児島大学へ移動し、真空蒸着装置内で割断したのち、ただちに炭素および白金を蒸着しレプリカを作成した。レプリカ薄膜に、真核生物ラフトマーカである GM3 を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) およびホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PI4,5P₂) はともにイノシトールリン脂質に分類される。PI4,5P₂ は細胞膜を構成するだけでなく、シグナル伝達など生理学的な機能をもつ。PI4P は PI4,5P₂ の前駆体であり、ゴルジ装置や細胞膜に存在し脂質輸送などに関わる。原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に、これら脂質を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。ホスファチジルセリンのプローブとしてアネキシン V を原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。

② 成果（結果＋考察）

【ラフトマーカ・GM3 の局在解析】

割断したレプリカ薄膜に、真核生物ラフトマーカである GM3 を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。図1に示すように、GM3 は寄生胞膜外葉 (vEF) および虫体細胞膜の内葉 (pPF、桃色で強調) の両方に見られた。GM3 は哺乳類では内葉に局在しないことがわかっており、マラリア虫体の細胞膜の内葉に局在することは異例であり、注目すべき結果である。

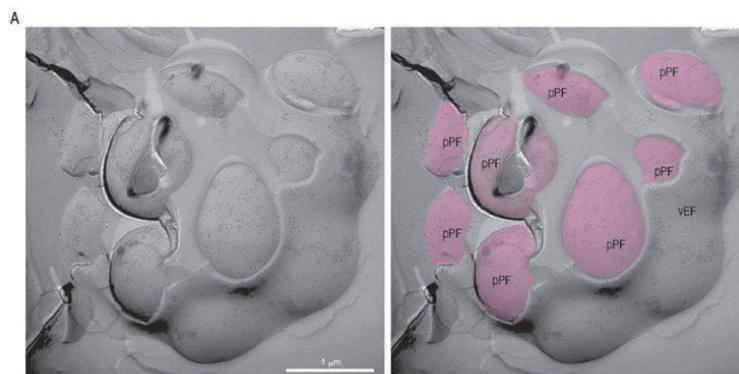


図1 感染赤血球における GM3 分布。

さらに解析を進めた結果、GM3 は原虫細胞膜の外葉 (pEF) にも分布していること、寄生胞膜内葉 (vPF) にも広く分布していた (図 2A および B)。統計学的解析の結果、原虫細胞膜、寄生胞膜のいずれにおいても、それぞれの外葉と内葉の間で分布密度に差は見られなかった (図 2C)。

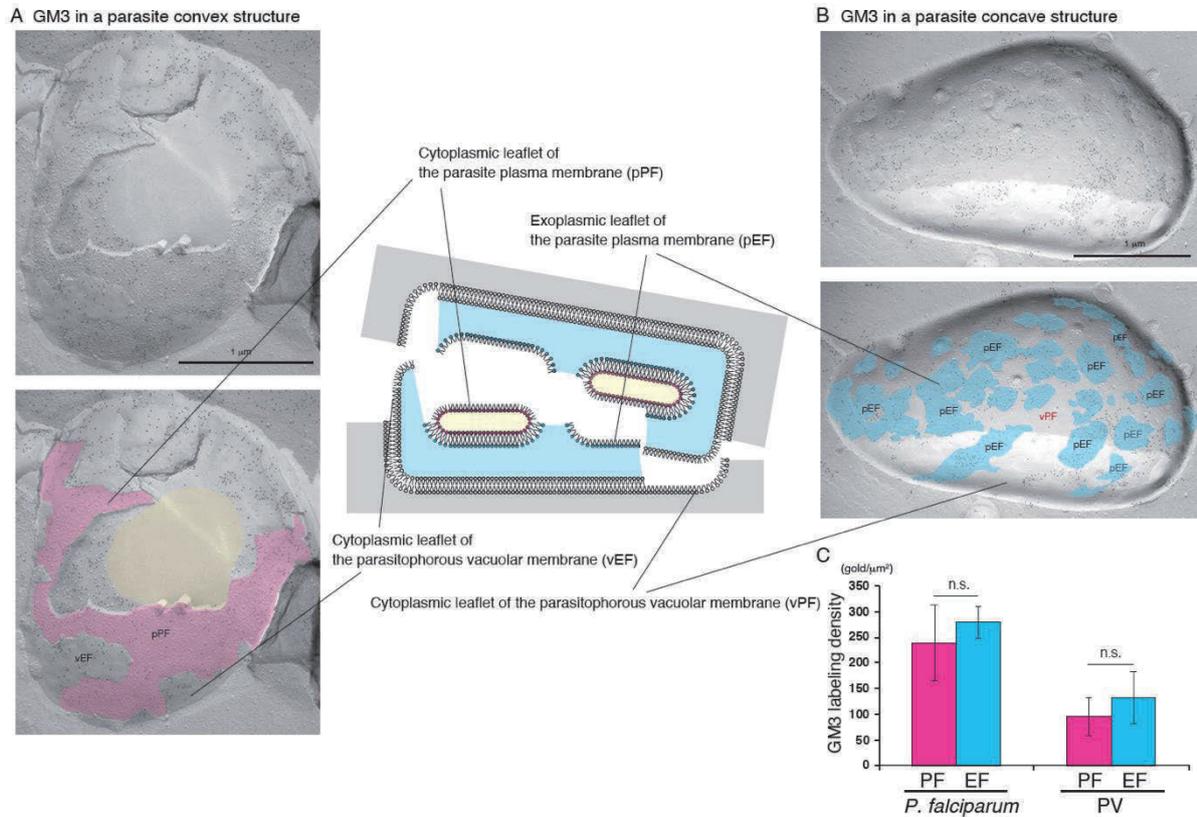


図 2 GM3 の分布解析。A: レプリカ凸面の観察像。B: レプリカ凹面の観察像。C: 原虫細胞膜、寄生胞膜におけるそれぞれの外葉と内葉の間での GM3 分布密度。

【膜構成脂質 PI4,5P₂の局在解析】

ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸(PI4,5P₂)はイノシトールリン脂質に分類される。PI4,5P₂は細胞膜を構成するだけでなく、シグナル伝達など生理学的な機能をもつ。原虫寄生赤血球レプリカ薄膜に、これら脂質を標識するプローブを反応させ、その局在を電子顕微鏡により観察した。PI4,5P₂は、原虫虫体・赤血球膜及び寄生胞膜の内葉にのみ局在していた。通常の哺乳類細胞でもこれらの脂質の局在は同様であり、細胞膜あるいはゴルジ体などの細胞内の内葉に存在することがわかっている。

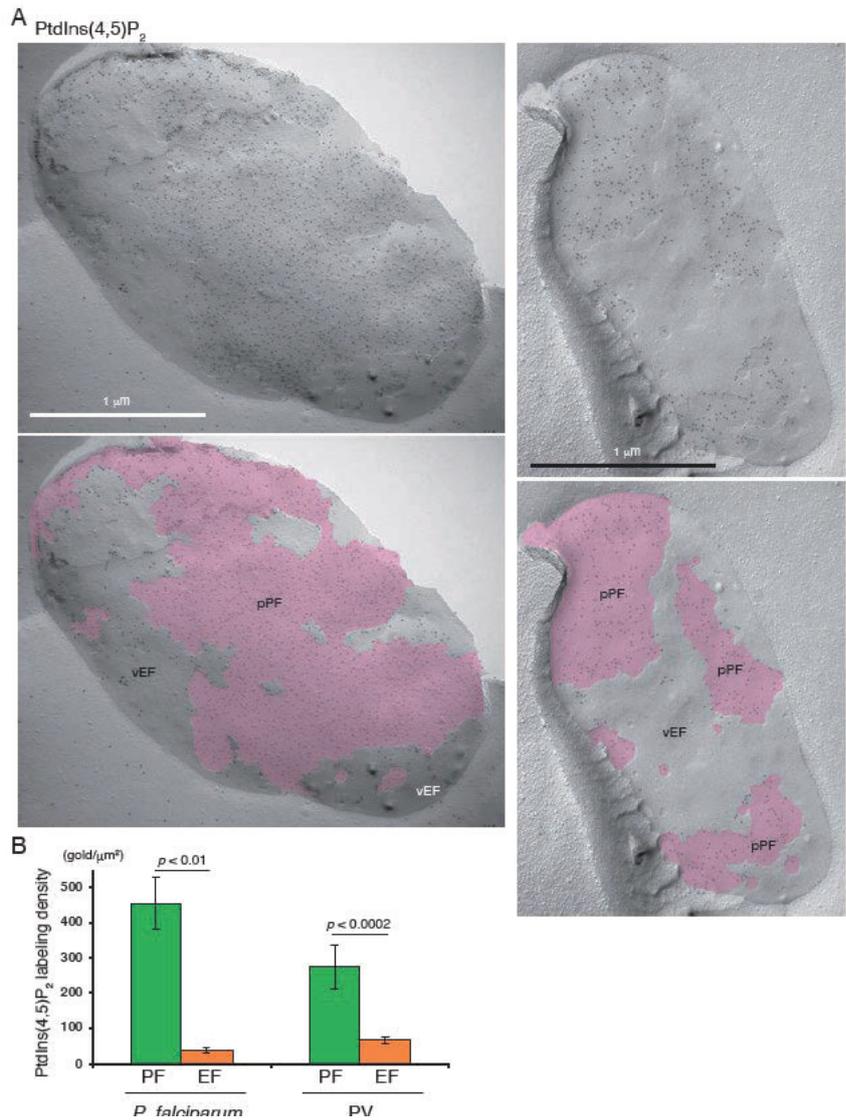


図 3 PI4,5P₂の分布解析。A：観察像。桃色は原虫細胞膜の内葉を示す。B：原虫細胞膜、寄生胞膜におけるそれぞれの外葉と内葉の間での PI4,5P₂分布密度。

③ 成果の公表

なし（現在、論文投稿中）。

自己評価

新型コロナウイルス感染蔓延による緊急事態宣言と、研究代表者の岐阜大学への異動とが重なったため当初数回予定していた熱帯医学研究所への訪問と材料作製を断念することとなった。しかし、2021年4月時点では投稿中の段階ではあるが、2019年度より継続してきた本課題を論文としてまとめることができた。

5. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉

課 題 番 号：2020-Ippan-06

2. 代 表 者：都野展子(金沢大学・准教授)

共 同 研 究 者：砂原俊彦(長崎大学・助教授)

Afroza Sultana (金沢大学・博士課程学生)

3. 決 定 額：400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ヒトスジシマカ *Aedes albopictus* は、デング熱、ジカ熱、チクングニヤ熱などのフラボウイルスを媒介するアジア原産蚊で、1980 年以降北米、ヨーロッパ、南米、アフリカ大陸に侵入、世界中に分布を広げた。侵入先でネッタイシマカなど近縁種との生殖干渉（異種間交雑により主に雌の繁殖能力を低下させる現象）による種の置換を頻繁に起こしている。日本にはヒトスジシマカの近縁種として、リバーシマカとヤマダシマカが存在し、これら 3 種は生息場所が重複するものの自然界では生殖隔離機構が働いていると考えられている。しかし申請者らは最近ヒトスジシマカとヤマダシマカが交雑する可能性を見出しており、ヒトスジシマカと近縁種の生殖干渉を精査する必要がある。さらに、ヒトスジシマカのみが世界に分布拡大するに至った要因を解明するため 3 種の異なる環境条件下でのパフォーマンスを比較研究する。これらの結果を総合し、近縁種の生殖干渉を利用したヒトスジシマカ防除策を新たに提出する。

② 研究内容

令和 2 年度

<調査・実験の概要>

1) ヒトスジシマカとその近縁種の時間的空間的動態の記述：衛生害虫として制御すべきヒトスジシマカが日本の在来近縁種と本来どのような種間関係にあるのか野外調査を行う。

石川県金沢市と輪島市に調査地を詳細に定点観測しヒトスジシマカとヤマダシマカの空間的時間の分布を記述する。平成 30 年度に実施

2) 温度と栄養条件を操作した飼育実験：幼虫期の飼育温度と栄養条件 を操作し、地球温暖化、竹林森林の拡大、がヒトスジシマカとその近縁種の増大にどのような影響をおよぼすのか、飼育実験を行う。温度条件（22 度、25 度、28 度）の温度設定 3 条件と栄養条件（照葉樹林のクスノキ落葉、竹林の竹の落葉、落葉広葉

樹林のアベマキ落葉) を組み合わせ、ヒトスジシマカ、ヤマダシマカ、リバーシマカの幼虫を飼育し、生存率、成長速度、体サイズ、羽化個体の繁殖能力を評価する。平成 30 年度にヒトスジシマカ、ヤマダシマカについて実施

3) ヒトスジシマカとその近縁種の交雑実験: ヒトスジシマカと近縁種は交雑するのか室内実験を行う。ヤマダシマカと共存している日本産のヒトスジシマカ、リバーシマカと共存している日本産のヒトスジシマカ、ヤマダシマカと遭遇したことのない外国産のヒトスジシマカ、リバーシマカと遭遇したことのない外国産のヒトスジシマカの組み合わせをオス・メス双方向で作成し、交尾行動、受精行動、産卵数、卵の孵化率を測定し、生殖干渉、生殖隔離の程度を評価する。

③ 予想される成果

野外調査、飼育実験、交雑実験の結果を総合し、温暖化が進行した場合、また日本で森林面積の拡大や竹林の拡大が、3 種の個体群増大にどのような影響をおよぼすのかシミュレーションを行う。ヒトスジシマカとヤマダシマカあるいはリバーシマカの間には生殖隔離が存在する場合、そのメカニズムについて考察する。現在報告されているネッタシマカとヒトスジシマカの間に北米で短期間で成立したと推定されている生殖隔離のメカニズムは羽を震わせる振幅回数の違いによると推測されている(Bargielowski and Lounibos 2016)。この仮説をヒトスジシマカと日本在来の 2 種にも適用できるか検証する。羽音を測定する設備を利用し、ヒトスジシマカとその近縁種の羽音を測定し、それを利用した生殖隔離システムの応用技術開発へと発展させる。

5. 実施報告

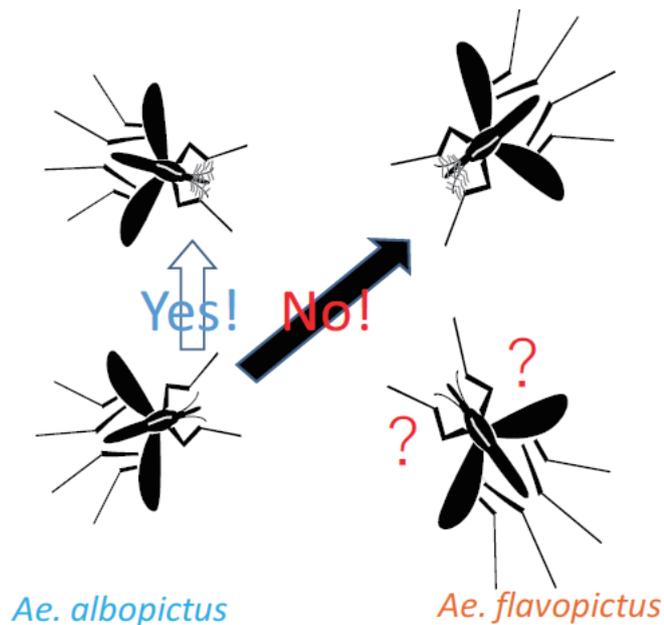
① 研究材料・方法・手続き

ヒトスジシマカとその近縁種間に生殖干渉が存在するかどうかを異種間交尾が交尾時間の長さやその後の繁殖能力に及ぼす影響を調べるために、1) 同種交配 (対照)、2) 異種間交配、3) 二重交配 (すなわち、異種特異的交配とその後の同種交配) の 3 種類の実験を行った。また、幼虫の飼育温度を変えることで体サイズの大きい個体小さい個体を作り、交尾ペアの体サイズの違いが交尾時間や産卵に与える影響を調べた。同種および異種種の交配では、交配ペアのサイズ差のバリエーションを増やすために、小/大の処女雌を大/小の雄と交配させた。二重交配では、最初に小/大の処女雌が異なる種の大小の雄と交配し、すぐに同種の大小の雄と交配した。交尾期間、産卵頻度、産卵数、生卵数 (孵化した産卵数) に及ぼす異種交配と交尾ペア間の体サイズの違いの影響を分析した。この実験には金沢で採集した系統を用いて行った。

② 成果 (結果+考察)

ヒトスジシマカとヤマダシマカがどのように相互作用するかを理解するために、生殖干渉、特に交尾ペア間の体サイズの違いに焦点を当て、体の大きさが異なる

蚊を使用して、交尾期間、産卵、および卵の孵化率に対する、同種、異種特異的および二重交配（すなわち、異種特異的交配の後に同種交配）の影響を調べた。異種の雄のみと交配した雌は、産卵したが産卵数は少なくまた胚発生はほぼ進まなかった。ただしゼロではなく3オスが交雑により成虫まで成長した。つまりヒトスジシマカとヤマダシマカは交尾後の生殖隔離はほぼ完全である。同種交配前に異種の雄と交配すると、同種の雄のみと交配した場合に比べて成虫まで成長した卵の数が低下し、生殖干渉が存在することが明らかとなった。生殖干渉の程度はヒトスジシマカよりもヤマダシマカの受ける影響の方が顕著に大きかったが体サイズの差がメスが相対的に大きい場合は2種の間には差はなくヤマダの被る生殖干渉による負の効果が少なかった。実際にはヤマダシマカのメスはヒトスジシマカのオスより体サイズが相当大きいことが野外では観察されているためヤマダは生殖干渉の負の効果を被っていないだろう。またヒトスジシマカの雌はヤマダシマカのオスを同種オスと区別しているのに対しヤマダシマカは、同種のオスと異種のオスを区別できていなかった。この差は現在ヒトスジシマカが北限を拡大しヤマダシマカと常に遭遇してきているのに対しヤマダシマカは新たな近縁種との同居の歴史が短いためではないかと考え、今後この仮説を検証する計画である。



Ae. albopictus females discriminate between conspecific and heterospecific males but *Ae. flavopictus* females do not.

Their discriminating abilities may reflect the history of their contacts.

Ae. albopictus is expanding its distribution range to the north where *Ae. flavopictus* has already been. Therefore, most *Ae. albopictus* experienced more contacts with *Ae. flavopictus*.

③ 成果の公表

1. Mushegian A A, Neupane N, Batz Z., Mogi M., **Tuno N.**, Toma T., Miyagi I., Ries L., and Armbruster PA. Ecological mechanism of climate-mediated selection in a rapidly evolving invasive species. *Ecology Letters*, (2021) 24: 698–707. doi: 10.1111/ele.13686
2. **Sultana A., Sunahara T.,** Tsurukawa C., **Tuno N.** 2020. Reproductive interference between *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* at a place of their origin. Accepted by *Medical Veterinary and Entomology* DOI: 10.1111/mve.12469
3. **Tuno N.,** Phong TV., Takagi M. 2020. Climate change may restrict the predation efficiency of *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda: Cyclopidae) on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Insects* 2020, 11(5), 307; <https://doi.org/10.3390/insects11050307>.
4. Alam, M.S., and **Tuno, N.** 2020. A study comparing the growth rates of two related species, *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* (Diptera: Culicidae) at different temperature regimes. *Med. Entomol. Zool.* 71(1):25–30. DOI: 10.7601/mez.71.25
5. Mogi M, Armbruster PA, **Tuno N.** 2020. Differences in responses to urbanization between invasive mosquitoes, *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) and *Aedes albopictus*, in their native range, Japan. *J Med Entomol.* 57(1):104-112. doi: 10.1093/jme/tjz145, <https://doi.org/10.1093/jme/tjz145>.
6. Alam, M.S., and **Tuno, N.** 2019. Reduction of reproductive capacity in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in hot, dry summer. *J Med Entomol* 56(6): 1729-33. doi: 10.1093/jme/tjz092.

6. 自己評価

ウイルス性疾病の重要なベクターであるヒトスジシマカは現在汎世界種となっているがもともとはアジア起源で日本にはヒトスジシマカを含め複数の近縁種が共存している。これらの近縁種間が亜種または別種であり、生殖後隔離が成立することは宮城/當間らにより琉球列島の系統について過去に調べられている。しかし生殖前隔離は生殖後隔離ほど強力には確立していないことも報告されていた。私たちの研究でヒトスジシマカのメスがヤマダシマカを識別していることをデータから証明できたことはかなり画期的である。というのは生殖前隔離についてはこれまでオスがメスを見分けているかどうかメスの貯精嚢を解剖し精子の存在を調べることで実証されてきている。つまりオスがメスを見分けるかどうか報告されてきた。こんかいメスの体サイズに変異をつけることで、体サイズが相対的に大きいメスがオスをリジェクトでき、そのことを利用してメスがオスを識別することを実証できたことは実験技法として初めてのやり方である。また材料の収集の段階にすぎないが北海道でヒトスジシマカの分布しないヤマダシマカの生息地を発見したので今後の研究に生かすことができる。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ルワンダ共和国における妊婦の歯周病菌保菌状況と早産の関連調査
課 題 番 号：2020-Ippan-7

2. 代 表 者：福田英輝（国立保健医療科学院・統括研究官）

3. 決 定 額：400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ルワンダの妊婦における歯周病菌の保菌状況（菌量・菌種）を調査し、その口腔内環境が早産・低体重出生に与える影響を解明する。これにより、ルワンダを含めた開発途上国を中心とした新生児死亡率の低下に貢献することを目指す。

●早産・低体重出生による死亡

2017年に5歳未満で死亡した子供は、世界中で約540万人に上ることが報告されている。5歳未満の死亡原因として17.6%もの高い割合を占めているが、早産関連死である。早産とは、妊娠37週未満で生まれてくる早産と体重2500g以下で生まれてくる低体重出生が含まれている。早産児や低出生体重児は体の機能が未発達であることから、生後の迅速で適切なケアが必要となる。先進国では保育器の活用や高度な治療により助かるケースでも、医療環境が整っていない開発途上国では、死亡リスクが最も高い生後1か月を早産で生まれた未熟な体で生き抜くことは難しい。このような要因により、早産関連死が未だに5歳未満児死亡の多くを占める現状にある。

●歯周病が及ぼす妊婦への悪影響

早産・低体重出生を未然に防ぐ手立てがあれば、それは新生児死亡率や母子保健の改善につながる。早産の誘発因子として、前置胎盤、胎児機能不全、子宮頸管無力症や妊娠高血圧、妊娠糖尿病などが挙げられ、加えて歯周病も早産を促す要因であることが示唆されている。1996年に初めて妊娠中の歯周病罹患が早産を誘発している可能性が報告され、現在では日本を始め多くの先進国で妊婦健診に歯科項目が取り入れられている。しかしながら、途上国の多くでは口腔衛生や口腔ケアの重要性が浸透しておらず、今でも多くの早産・低体重出生の原因になっている可能性があるが、その実態は不明である。

●妊婦の口腔内環境が早産・低体重出生に与える影響を解明

そこで我々は、妊婦の歯周病予防が早産・低体重出生を減らす可能性に着目した。ルワンダにおける医師数は人口1万人に対して1.24人であり（日本：1万人あたり21人）、これは2014年時点で103か国中99番目、看護師・助産師の数も85か国中76番目と、医療従事者が少ない。妊娠期の歯周病を予防することは、限られた環境の中で“いま”できる最大の早産対策と成り得る可能性を秘めている。

本研究では、妊婦が保菌している歯周病菌を調査し、出産時の情報（妊娠期間、出生時体重）との関連を分析することで、口腔内環境が早産（妊娠期間）や出生時体重に与える影響を明らかにする。同時に、得られた成果に基づいて、ルワンダの文化や生活慣習に根差した歯周病予防ガイドラインや歯科検診制度の構築につなげることを目指す。

② 研究内容

○歯周病菌 DNA の検出

ミビリジ病院で行った調査時に取得した唾液サンプルから、重度の歯周病と関連が深いとされる Red Complex の 3 菌種 (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) について、引き続きリアルタイム PCR 法による解析を継続する。上記に示した 3 菌種に関する解析を引き続いて実施することに加えて、重要な歯周病菌と認識されている *Prevotella intermedia* についても同様に検証を行う。これらの解析により、被験者妊婦における歯周病菌の保菌状況を明らかにする。なお、リアルタイム PCR による解析法や使用するプライマーは既報の論文を参考とする[2]。

(参考文献)

1. Heeyoung C et al, Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally health Korean young adults, Journal of Periodontal and Impact Science 2008;48:4:261-271.

○歯周病菌の保有状況と妊娠状況との関連解析

先に述べたように、すでに現地にて被験者を対象とした質問票調査を実施しており、妊婦の属性情報や妊娠状況、歯磨き等の実施状況に関する詳細な分析を進めている。そこで、リアルタイム PCR 法による解析にて得られた歯周病菌の保菌量や保菌状況を用いることで、質問票から得られた結果との統計学的解析を行う。この解析は、妊娠期の歯周病罹患や保菌状況と早産や低体重出生との関連性を検証することで、口腔衛生が被験者の早産や母子保健に与える影響を明らかにする。特に、次の項目について解析することを予定している。

- ・妊婦が保有している歯周病菌種と妊娠週数・出生時体重との関連
- ・歯磨き等の実施状況と妊娠週数・出生時体重との関連

○歯周病菌が保有する病原遺伝子の検出とその傾向

リアルタイム PCR 法にて、本研究に参加した被験者集団における歯周病菌の保菌状況が明らかとなる。次に、歯周病菌が保有する病原遺伝子の分布、特に本研究では *P. gingivalis* の病原因子であるジンジパンに着目し、解析する。これまでの研究により、ジンジパンには 2 種（アルギニン切断型とリジン切断型）が存在し、またこれらは *P. gingivalis* の染色体 DNA とプラスミド DNA 上に存在することが知られている。ここでは、保有するジンジパンの種類の違いが早産に与える影響を検証する。

なお、各種ジンジパイン遺伝子を標的とした PCR 法にて *P. gingivalis* が保有するジンジパインの種類を検出し、使用するプライマーは既報の報告に従うものとする。

③ 予想される成果

収集した質問票データと唾液サンプルを解析した結果から、ルワンダ国・ミビリジ地区における妊婦の歯周病菌保菌状況と早産や低体重出生との関連が明らかになる。これまでに口腔清掃が不十分であること、また歯周病菌が検出されていることから、妊娠期間や胎児の発育に影響を与える可能性を示唆する成果を得ることが期待できる。途上国の多くでは妊産婦のみならず、一般住民の口腔ケアに対する意識や認知は低い。また、医療従事者の多くが歯周病と早産との関係性を認識していない。そのため本研究で得られる成果を還元することができれば、ルワンダ国の周産期医療における歯周病の重要性を広く認知する機会となる。途上国では医療資源が限られ、早産児や低出生体重児のケアに困難を極めている現状を考慮すると、歯周病ケアによる早産の予防自体が、新生児死亡率低減への非常に有用な対策となる。ルワンダは近年、教育や母子保健制度の導入、周産期医療に力を入れており、さらに現地大学での歯科医師養成を進めている。今後、自国で養成された歯科医が周産期医療に介入していくことも可能であり、本研究の成果をルワンダ保健省や現地の医療従事者に還元することで、途上国における早産予防策の構築と提唱につなげていくことができる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

2019年から2020年にかけて180名の妊婦を対象とし、質問紙を用いたアンケート調査と唾液の採取を行った。アンケート調査では基本的属性と現在の妊娠状況、過去の妊娠歴、生活習慣、口腔清掃の実施状況等の情報を収集した。唾液サンプルから DNA Blood Mini Kit (Qiagen) によりゲノム DNA を抽出し、歯周病菌の検出を目的としたリアルタイム PCR を行った。対象菌種は、重度の歯周病と最も関連が深いとされる 3 菌種 (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*) と女性ホルモン濃度上昇とその増殖の関連が報告されている 1 菌種 (*Prevotella intermedia*) の計 4 菌種とした。



本研究課題は長崎大学熱帯医学研究所とルワンダ大学の両倫理委員会で承認されている (承認番号: 180921202、No 061/ CMHS IRB2019)。

② 成果（結果＋考察）

ミビリジ地区における妊婦の特徴

本研究にはミビリジ地区に居住する 15 歳から 47 歳の計 180 名の妊婦が参加した。初産妊婦の最高年齢は 36 歳で、また参加者の 32.3%は 35 歳以上の妊婦であった。日本や先進国では妊婦の多くが 20~30 代であるのに対し、ミビリジ地区の妊婦では 10.6%もの妊婦が 40 歳を超えており、高齢での妊娠が多くみられた。参加者の平均妊娠回数は 2.3 回で、最多の妊娠回数は 11 回であった。これらの結果からも、ミビリジ地区では 40 歳を超えても複数回目の妊娠を繰り返していることが伺える。

妊婦の生活習慣として、タバコやアルコール、薬物の摂取状況も質問紙で確認した。妊婦本人らには喫煙者は認められなかったものの、全体の 12.8%の妊婦は家族に喫煙者がおり、受動喫煙をしていた。また妊婦の 46.1%に飲酒経験があり、31.1%は妊娠がわかったあとも飲酒を続けていることが明らかになった。そして 20 代以上の年齢だと、約 5%が妊娠中も違法薬物を使用していた。妊娠のタイミングに関する質問に対しては全体の 40%が予想外と答えている。その割合は年齢が上がるにつれて高くなり、20 代では 25.5%が予期せぬ妊娠と答えたのに対し、40 代では 57.9%にまで上昇している。このように予期せぬ妊娠は妊婦の年齢に関係なく多く見られ、途上国の地方に見られる社会的問題でもある。

調査に参加した妊婦のうち、20 人が早産、低体重出生、死産のいずれかを経験し、全体（180 名）の 11.1%を占めた。不正出血が続き、切迫早産の状態であった 3 件を加えると 12.7%の妊婦が妊娠や出産に何らかの異常をきたした結果となった。これらの妊婦は 15 歳から 47 歳にわたり、特に年齢的特徴はなかった。内訳では特に 7 件（3.9%）の死産が多かった。WHO が報告しているルワンダの新生児死亡率は 2016 年で 16.5（出産 1000 対）であるため、ミビリジにおける今回の結果は、その 2.4 倍に当たる死産であることがわかる。

ミビリジ地区の妊婦における歯周病リスク

参加者の 86.7%に歯科通院経験がなかった。彼女らの 1 日の口腔清掃（歯磨き）回数は平均で 1.5 回であった。1 回しか磨かない割合は年齢が上がると共に増加し、20 代では 70.1%であるのに対し、40 代では 83.3%になった。また、11.4%の妊婦は指を使った歯磨きや水のみでの洗浄など、効果的でない口腔清掃を実施していることが明らかになった。

本研究で検出した歯周病菌のうち、*Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* と *Prevotella intermedia* は年齢に関係なく 90%以上の妊婦で陽性率であったのに対し、*Porphyromonas gingivalis* に関しては年代が上がるにつれて陽性率も上昇した。さらに、これら 4 菌種のうち 0~2 菌種が陽性である妊婦では低出生体重児の出産が見られなかったものの、3 菌種が陽性である妊婦では低出生体重児を出産した割合が 9.6%、4 菌種すべてが陽性の妊婦では 8.2%が低出生体重児を出産した。これらのことから、ミビリジ地区における妊婦の歯周病リスクが高いことと、歯周病菌の保有が低出生

体重児を出産するリスクを増加させている可能性が示唆された。

③ 成果の公表

現在論文を執筆中であり、Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine もしくは Journal of maternal and child health に投稿予定である。さらに、本研究の解析を続ける中で、出生時の性比に関連する新たな知見を見出しつつある。この件についても論文を執筆中で、PLOS ONE に投稿を予定している。

6. 自己評価

対象菌種のうち、*P. intermedia* はこれまで報告されている論文でもプライマー設計に課題があったようで、我々も当初コントロール DNA での増幅が見られない等の問題が発生した。しかし、複数のプライマーとコントロール DNA を組み合わせ、サンプルの解析も行うことができるアッセイ系を確立した。また、多くの歯周病研究において CPI（プロービングや出血傾向）を用いた歯周病の進行度評価を行っているが、本研究では、その原因となる歯周病菌の菌数をリアルタイム PCR により検出している。そのため、これまでも歯磨きの回数と口腔内に常在する歯周病菌数の関連を示すことができており、これらの結果は、現地の妊婦を対象とした衛生指導を行う際に重要なものとなる。本研究費により得た多くの研究結果を元に、今後は論文投稿を進めて知見を公表していくことができたため、ミビリジ地区のみならず、途上国の地方が抱える周産期の課題克服に貢献できるものと考えている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙がらなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ワクチン導入後のケニアにおけるロタウイルスゲノム多様性の解析
課 題 番 号：2020-Ippan-08

2. 代 表 者：河本 聡志（藤田医科大学医学部・准教授）
共 同 研 究 者：畑澤 莉緒奈（藤田医科大学保健学研究科・大学院生）
井手 富彦（藤田医科大学研究支援推進本部・助教）
福田 佐織（藤田医科大学医学部・特別研究員）
金子 聡（長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点長）

3. 決 定 額：600 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ロタウイルス胃腸炎により、年間 20 万人もの乳幼児が死亡しており、その 90%以上はアフリカ・アジアの発展途上国で起きている。2006 年に 2 種の弱毒生ヒトロタウイルスワクチン（ロタリックス（RV1）、ロタテック（RV5））が開発され、現在 130 ヶ国以上で認可され、90 ヶ国以上で定期接種されている。これらワクチンの有効率は、先進国ではきわめて高いが開発途上国ではかなり低い。その要因は、開発途上国では、特異な血清型（遺伝子型）を有するヒトロタウイルス株が流行していること、動物ロタウイルスのヒトへの種間伝播が起きていることなどが考えられている。また、すでにワクチン導入された国々からは、接種開始後に流行ロタウイルス株の遺伝子型が大きく変化したとの報告が相次いでいる。ケニアにおいても、2014 年に RV1 ワクチンが接種開始された。本研究では、ケニアにおけるワクチン導入後の流行ロタウイルス株の遺伝子型の変化とその機構、特に、ワクチン効果と流行ロタウイルス株の遺伝子型との関連を調査検討する。

② 研究内容

ロタウイルス下痢便を収集し、抽出したウイルス RNA ゲノムを用いた、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）による RNA ゲノム泳動パターン（RNA electropherotype）のグルーピングと semi-nested RT-PCR による G/P タイプの決定を行う。これらによって検出される非定型的ロタウイルス株と、ランダムに選別した定型的ロタウイルス株について、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて全ゲノム塩基配列を決定し、全 11 本の遺伝子分節に基づく系統樹解析を行う。これにより、流行ロタウイルス株の G/P タイプとその年次的変遷を把握するとともに、非定型的ロタウイルス株の全 11 本の遺伝子分節それぞれの由来を明らかにする。こうして、ケニアにおけるワクチン導入後のロタウイルスゲノム多様性の実態を明らかにする。

研究手法は以下の通りである。

1. ロタウイルス患者下痢便の収集：ケニア拠点および研究協力者である KEMRI（ケニア国立医学研究所）の研究者由来で乳幼児のロタウイルス下痢便を収集する。
2. a. 10～20%便懸濁液を PBS を用いて調製する。b. 便懸濁液からウイルス RNA ゲノムを抽出する。c. PAGE 解析により RNA electropherotype を決定する。d. semi-nested RT-PCR により G/P タイプを決定する。必要に応じて、VP7/VP4 遺伝子の塩基配列をサンガーシーケンシングにより決定して遺伝子型の確認を行う。e. 非定型的なロタウイルス株について、MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行い、全ゲノム塩基配列を用いて、全 11 本の遺伝子分節の系統樹解析等を行うことで、各遺伝子分節の由来を明らかにする（全ゲノム解析）。

③ 予想される成果

ケニアで流行するロタウイルス株の遺伝子型を解析することにより、動物ロタウイルス株に由来する遺伝子分節を持つ非定型的ロタウイルス株が高頻度に検出できるものと期待される。動物ロタウイルス株そのものがロタウイルス胃腸炎患者から検出されることも予想される。特に、日常生活における濃厚な接触に起因すると考えられる、家畜（ウシ、ブタ）の動物ロタウイルス株由来の遺伝子分節を持つヒトロタウイルス株が多数検出できるものと期待される。さらに、全ゲノム解析によって全 11 本の遺伝子分節それぞれの由来を明確にできることから、こうしたロタウイルスの種間伝播の機構をリアルタイムで明らかにできると思われる。また、RV1 ワクチン導入に伴い、ケニアにおいても非定型的 DS-1-like G1/2/3/8P[8]株が出現する可能性が考えられる。2012 年に RV1 ワクチン導入されたマラウイにおいては、DS-1-like G1P[8]株が間を置かずに出現した。注目すべきは、このマラウイの DS-1-like G1P[8]株の由来は、それまでに報告されていたアジアの DS-1-like G1P[8]株とは異なり、もともとマラウイに分布していた定型的な G1P[8]株と G2P[4]株との間で、稀なリアソータントが起きていた。私たちはすでに、昨年度（2019 年度）の調査でケニア初（アフリカ初）となる DS-1-like G3P[8]株を検出している。サンガーシーケンシングによる VP7/VP4 遺伝子の予備的解析では、これらケニアの DS-1-like G3P[8]株の由来は世界的に流行している DS-1-like G3P[8]株のものとは異なり、もともとケニアに分布するロタウイルス株間のリアソートメントにより出現した可能性がある。今年度に次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行うことで、ケニア（アフリカ）に出現した DS-1-like G3P[8]株の由来を明らかにできるであろう。こうして、ワクチン導入後のケニアで本研究を展開することで、ワクチン選択圧とこれら非定型的ロタウイルス株の出現との関連を、世界的視野に立って明らかにすることができる手掛かりが得られると期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

ケニアのキアンブ地域（首都ナイロビ郊外）において、2019年に乳幼児下痢症患者からロタウイルス抗原（VP6）陽性の便検体を収集した。この収集にあたっては、KEMRI 倫理委員会の承認を得ている。ヒトにおいては非定型的となる G4P[6] 遺伝子型を示した KCH148 株（2019年2月に48月齢児から分離）について MiSeq を用いた次世代シーケンシングを行い、全ゲノムシーケンスに基づく系統関係を調査した。ロタウイルス遺伝子型の決定には Virus Pathogen Resource (ViPR)、系統樹の作成には MEGA7 を使用し、最尤法により行った。

② 成果（結果＋考察）

ロタウイルスは、全 11 本の分節 2 本鎖 RNA をゲノムとして有する。ビリオン最外殻の 2 つのカプシド蛋白質 VP7 と VP4 は独立した感染防御抗原であり、それぞれ G タイプと P タイプを規定する。G タイプは G1～G36、P タイプは P[1]～P[51] と、G/P タイプの多様性は顕著である。さらに、残る 9 本の遺伝子分節にも多様性が認められることから、最近では 11 本の全ての遺伝子型（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。ヒトロタウイルスは Wa-like 遺伝子群と DS-1-like 遺伝子群の 2 つに大別されるが、遺伝子型の組合せはそれぞれ、G1/3/4/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 と G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 と表記される。

昨年度、ケニア拠点における調査で、ヒトでは非定型的となる G4P[6] 遺伝子型を示す KCH148 株が検出された。ヒトでは、G4 は P[8] との組み合わせが一般的であり、内部遺伝子は通常 Wa-like (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) である。そこで今回、非定型的な G4P[6] 遺伝子型を有する KCH148 株について MiSeq シーケンシングを行い、全ゲノムシーケンスを決定した。KCH148 株の遺伝子型の組合せは G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T7-E1-H1 であり、Wa-like ではあるものの、NSP3 遺伝子は T7 遺伝子型となる特徴を示した。T7 はブタロタウイルスに特徴的な遺伝子型である。系統樹解析の結果から、KCH148 株の全 11 本の遺伝子のうち 10 本 (VP7、VP4、VP6、VP1-VP3、NSP1、NSP3-NSP5) は、ヒトロタウイルスよりもブタロタウイルスに近縁であることが明らかになった。残る NSP2 遺伝子については、リファレンスとなるヒトおよびブタのロタウイルス株が不足しており、詳細な由来を決定することはできなかった。興味深いことに、KCH148 株の全 11 本の遺伝子のうち 9 本 (VP7、VP6、VP2、VP3、NSP1-NSP5) はヨーロッパで分離されたブタロタウイルス株やブタ様ヒトロタウイルス株ときわめて近縁であり、これらケニアとヨーロッパのロタウイルス株は共通の祖先を持つと考えられた。これまでに、アフリカから報告されている G4P[6] 株の全ゲノムシーケンスとして、コンゴ民主共和国で分離された KisB332 株 (G4P[6]) が唯一あるが、KCH148 株と KisB332 株とでは、わずか 1 遺伝子分節 (VP4) のみが近縁関係にあり、これら 2 株のアフリカのヒト G4P[6] 株の由来・進化は大きく異なることが示された。

ケニアにおいては、2014年7月からRV1 ワクチンが接種導入された。ワクチン導入が流行ロタウイルス株の遺伝子型に及ぼす影響を慎重に調査しなければならない。すでにワクチン導入された他の国々では、接種拡大とともにロタウイルス患者数は減少するものの、流行ロタウイルス株の性状に大きな変遷が見られる。わが国でも、G2P[4]株の比率が大きく上昇しているほか、これまできわめて稀であった G8P[8]株の検出頻度が顕著に上昇した。このように、ロタウイルスワクチンによる選択圧の影響で、流行ロタウイルス株の性状が変化したかどうか議論となっている。今回解析した KCH148 株 (G4P[6]) も、ケニアに接種導入された RV1 株 (G1P[8]) とは感染防御抗原である G/P タイプのいずれも共通しておらず、RV1 ワクチン導入と関連しているのかもしれない。ワクチン接種導入前後での流行ロタウイルス株の遺伝子型の変化について、注意深く調査を継続する必要がある。

③ 成果の公表

該当なし (すでに原著論文ドラフトを執筆しており、間もなく海外雑誌に投稿予定である)

6. 自己評価

ケニア拠点において、私たちが技術移転した ELISA による下痢症患者便検体からの A 群ロタウイルス抗原 (VP6) 陽性便検体のスクリーニングが順調に稼働している点は十分に評価できる。一方で、semi-nested RT-PCR による G/P タイピングにおいて、ケニアではバックグラウンド高い傾向が認められている。その要因として、RNA 抽出方法とサーマルサイクラーの整備不良が考えられる。当研究室で使用しているものと同じ RNA 抽出キットとサーマルサイクラーのケニアへの導入を 2020 年度に予定していたが、新型コロナウイルス感染症蔓延のために訪ケすることができなかった。早急なこれら試薬、機器の導入を検討したい。ロタウイルスワクチンの定期接種化により、わが国を含めた先進国ではロタウイルス患者数の顕著な減少が相次いで報告されているが、ケニアなどアフリカ諸国では、ワクチン導入にもかかわらず小児科外来は下痢症乳児で溢れている。こうしたワクチン有効性の差異を正確に理解するためには、ワクチン導入前後での流行ロタウイルス株の遺伝子型を長期的に調査する必要がある。当年度内に研究成果を論文として海外雑誌に掲載することができなかった点で不満が残るものの、ケニア人スタッフと緊密に連携して得られた今年度の研究成果を基礎として、次年度にさらに発展させる道筋をつけることができた点には満足している。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マウスモデルを用いた脳炎フラビウイルス感染病態の分子イメージング解析

課 題 番 号：2020-Ippan-09

2. 代 表 者：早坂 大輔（山口大学共同獣医学部 微生物学分野・教授）

共 同 研 究 者：西 広大（原爆後障害医療研究所・助教）

淵上 剛志（医歯薬総合研究科（薬学系） 衛生化学・准教授）

坂井 祐介（山口大学共同獣医学部 病理学分野・助教）

Elizabeth Ajema Chebichi Luvai（医歯薬総合研究科・大学院生）

Mya Myat Ngwe Tun（熱帯医学研究所 ウイルス学分野・助教）

森田 公一（熱帯医学研究所 ウイルス学分野・教授）

3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

実験動物モデルを用いた生体におけるウイルス感染病態の解析においては、一般的に感染と非感染の比較解析が基本となる。しかしながら、実際の臨床現場でのウイルス感染症では、軽症で済む場合と重症化で致死性を示す場合など、その病態進行度にはばらつきがみられるため、感染・非感染の比較から得られる知見だけでは必ずしも十分ではない。

応募者は、ダニ媒介性脳炎（TBE）ウイルスおよび日本脳炎（JE）ウイルス（脳炎フラビウイルス）の感染マウスモデルを用いて、同一条件でウイルスを感染させた場合でも、軽症経過で回復する個体と重症経過で死に至る個体がみられるという現象に着目した独自の解析を進めてきた。

その結果、ウイルス感染個体では、免疫病理的機序による感染応答にばらつきがみられ、これらの応答の違いが軽症・重症経過の違いに関与することを示唆してきた。

そこで、ウイルス感染動物の解析では、個体を安楽死させ病理解析や遺伝子発現解析などを行うが、安楽死時点ではその後の転帰が不明であり、応募者が対象としてきた脳炎ウイルス感染モデルの場合、解析に用いた個体のその後の病態経過の区別は不可能となる。

したがって応募者は、感染～発症～予後に至るまでの病態経過・機序をより詳細に把握するためには、非侵襲的に生体内の病態や感染をリアルタイムにモニタリングする研究が必要であると考えてきた。

ポジトロン断層法（Positron emission tomography: PET）、単一光子放射断層撮

影法 (Single photon emission computed tomography: SPECT) による分子イメージングは、生体内の分子プロセスを非侵襲的に画像化する技術であり、様々な疾患に対する研究が進んでいる。この技術は、生体の代謝機能をターゲットとするため、ウイルス感染時の生体応答に対しても有効な解析技術となることが見込まれる。

しかしながら、ウイルス感染分子イメージングの実施には、測定装置が病原体に応じたバイオセーフティレベル (BSL) 施設内に設置される必要があるが、そのような施設は国内外含め限られており、研究報告は非常に限定的である。そのような状況のなか、長崎大学アイソトープセンターの感染症分子イメージングエリアには、小動物用の PET/SPECT/CT イメージング装置が、国内では唯一 BSL-3 実験室内に設置されており、ウイルス感染動物を用いた分子イメージングを実現できる環境にある。そこで本研究では、熱帯医学研究所で保管、使用している TBE ウイルスおよび JE ウイルスを用いて、分子イメージングセンターの PET/SPECT/CT 装置を利用し、マウスモデルによるフラビウイルス脳炎の重症化に関わる病態経過を、リアルタイム分子イメージングにより明らかにすることを旨とする。

② 研究内容

1. 脳炎フラビウイルス感染マウスの PET, SPECT イメージング

TBE ウイルス、JE ウイルスをマウスに皮下感染させ、経日的な病態経過にあわせて、PET/SPECT イメージングを行う。その際、脳血液循環、血液脳関門、脳脊髄液循環、神経伝達機能などの測定用各種トレーサーを投与し、中枢神経組織におけるトレーサー集積に着目した撮像を行う。

また、応募者らは、JE ウイルス JaTH 株や TBE ウイルス Sofjin 株といった、マウスに高い病原性・致死性を示すウイルス株を用いた解析を行うなかで、これらのウイルス株では著しい脳炎に加えて消化管にも特徴的な激しい病変がみられることを見出してきた。そこで、これらのウイルス株感染については、脳炎以外の病態にも着目し、炎症性マーカー、血流マーカー等のトレーサーとなる $^{201}\text{Tl}-\text{Cl}$ (SPECT) , $^{99\text{m}}\text{Tc}-\text{HSA}-\text{D}$ (SPECT) 等を用い、全身性に PET または SPECT によるイメージングを試みる

感染マウスの経日的な分子イメージングにより、病態変化の指標となる特徴的な生体代謝が見出せた場合、あらためてウイルスを感染させたマウスを用いて、生体代謝がみられるタイミングで病理標本を作成し、病理像観察を行い、病変部位とトレー感染が結合、集積する部位がイメージングできるかを検討する。

上記 1, 2 の解析結果を基に、TBE ウイルスおよび SFTS ウイルス感染マウスモデルにおける分子イメージングの標準モデルとしての確立を試みる。

③ 予想される成果

1. 中枢神経機能を指標としたウイルス脳炎の病態イメージング

TBE ウイルス、JE ウイルス感染による脳炎では、炎症反応に加え、神経細胞死、脳血流循環低下や神経伝達低下などの中枢神経組織の機能障害が起っていると考

られる。そこで、分子イメージングによる中枢神経機能測定には多くの報告が既にあるため、中枢神経機能の変化を指標としたウイルス脳炎のイメージングの実現性は高いと予想される。本研究成果により、ウイルス脳炎でみられる中枢神経機能障害とその障害が現れる時期の特定が期待される。

2. 重症・軽症個体の経日的な病態発現機序の推移の特定

TBE ウイルス（Oshima 株など）、JE ウイルス（S982 株など）の感染マウスでは、軽症経過で回復する個体と重症経過で死に至る個体がみられ、我々は免疫病理的機序による感染応答の関与を示唆してきたが、病態が分かれる決定的な要因は明らかになっていない。

その機序をより詳細に調べるためには、病態発現機序の重症度の違いに関わる要因（きっかけ）と現れる時期を、個体を安楽死することなく生体のまま調べる必要がある。そこで、本研究で行う分子イメージングは正にその目的に合致しており、本研究の試みにより、感染個体が重症化に進む要因の解明につながる有用な結果が期待される。このアプローチは応募者自身のこれまでの成果に基づく着目点であるため、独創性・新規性は高い。

3. ウイルス感染部位の生体イメージング

一般的に、感染動物体内におけるウイルス増殖を調べるためには、動物を安楽死させ臓器・組織を採材してウイルス量を測定するため、経日的な解析の場合、実際には異なる個体の比較をしていることになる。したがって、より詳細な解析では、動物体内におけるウイルス増殖のようすを同じ個体で経日的に観察できることが求められる。そこで、本研究で試みる抗ウイルス抗体の集積を指標とした分子イメージングは正にその目的に合致している。

ただし、生体内において、抗ウイルス抗体が感染組織・細胞中のウイルスにうまく結合し集積するかは、実際に試してみなければわからない面があるため、この実験は挑戦的な試みではあるが、成功すれば、感染個体内のウイルス増殖をリアルタイムに観察できる新しい方法としてブレイクスルーが期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

実験 1：TBE ウイルス Oshima 株マウスを用いたダブルトレースによる SPECT イメージング

- 1) C57BL/6J マウス (5 週齢、雌) に、ダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) Oshima 株をウイルスタイター 10^3 pfu で皮下接種し、体重、病態の経過を観察した。
- 2) 感染 9 日目および 13 日目に、非感染および TBEV Oshima 株感染マウスに、 ^{67}Ga -citrate (クエン酸ガリウム注 NMP、日本メジフィックス) 20MBq 相当量、および $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO (ウルトラテクネカウ、富士フイルム富山化学) 60MBq 相当量を、混合して尾静脈より投与した。13 日目においては体重減少を指標として、重症個体、軽症個体に着目して行った。
- 3) 投与後、イソフルランによる麻酔下で、胴体部および頭部にフォーカスして SPECT 撮像を行い、トレーサー集積の検証を行った。

実験 2：TBE ウイルス Sofjin 株マウスの血流量を指標とした SPECT イメージング

- 1) C57BL/6J マウス (5 週齢、雌) に、TBEV Sofjin 株をウイルスタイター 10^3 pfu で皮下接種し、体重、病態の経過を観察した。ウイルス感染、マウス飼育はアイソトープ実験施設分子イメージングセンターを利用し、
- 2) 感染 9 日目に、非感染および TBEV Sofjin 株感染マウスに、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO 60MBq 相当量を尾静脈より投与した。
- 3) 投与後、イソフルランによる麻酔下で、胴体部および頭部にフォーカスして SPECT 撮像を行い、トレーサー集積の検証を行った。

以上の実験は、いずれもアイソトープ実験施設の分子イメージングセンターを利用し、TBEV は熱帯医学研究所ウイルス学分野で保管・管理しているウイルスを用い、同分野の Mya Myat Ngwe Tun 助教および Elizabeth Ajema Chebichi Luvai 氏の協力を得て感染、その後の観察を実施した。マウスへのトレーサー投与、SPECT 撮像および画像解析は、原爆後障害医療研究所の西広大助教の協力により実施した。

② 成果 (結果+考察)

本研究において、計画当初では ^{201}Tl -Cl (SPECT) , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-D (SPECT) といったトレーサーを考えていたが、協同研究者や原爆後障害医療研究所の工藤崇教授の助言により、 ^{67}Ga -citrate と $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO を用いた検証を行うこととした。

実験 1：TBE ウイルス Oshima 株マウスを用いたダブルトレースによる SPECT イメージング

本実験では、炎症のトレーサーとして利用されている ^{67}Ga -citrate (クエン酸ガリウム) と、脳血流のトレーサーとして利用されている $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMPAO を用いることによって、TBEV 感染マウスにおける中枢神経および全身性の病態観察が出来

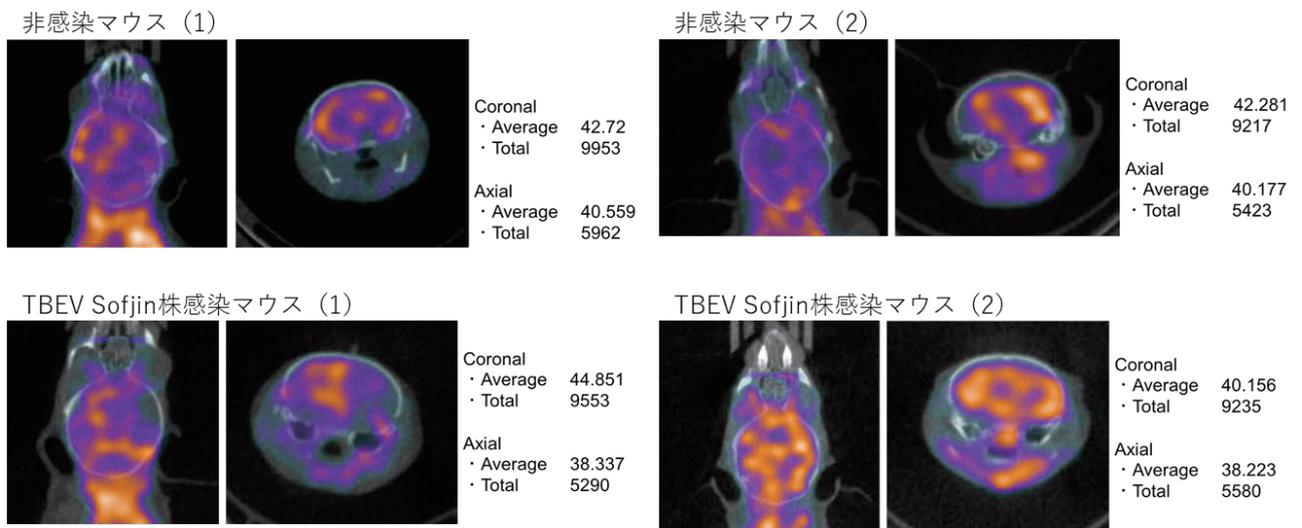
るかを検証する目的で行った。また、ダブルトレーサーが出来るかどうか、および両トレーサーの集積に相関性があるかも検証する目的でもあった。

しかしながら、結果としては、マウスにトレーサーを投与した途端にマウスが死に到るというパターンが多く生じたため、SPECT 撮像は行ったが、生体でできたのは 2 匹（うち 1 匹は撮像後に致死）、その他は生体ではなく斃死個体で行わざるを得なかったこともあり、画像解析によりトレーサー集積が確認できるデータをとることができなかった。

実験 2：TBE ウイルス Sofjin 株マウスの血流量を指標とした SPECT イメージング

実験 1 の結果から、クエン酸ガリウム投与がウイルス感染マウスの致死の原因と考えられたため、血流の指標に着目して、 $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$ をトレーサーとして SPECT イメージングを行った。また、ここでは感染による病態変化を確実に観察する目的で、致死性が高い TBE ウイルス Sofjin 株を用いた。

結果としては、各 N=2 の実験データの比較ではあるが、非感染マウスと TBE ウイルス Sofjin 株マウスの間で、頭部および胴体部におけるトレーサー集積に顕著な差は観察できなかった（下図）。



数値はTissue/Background Ratio（臓器とバックグラウンドのカウント比）

代表者らの以前の実験では、同様に血流の指標として用いられる $^{123}\text{I-IMP}$ を用いた SPECT イメージングでは、有意な差がみられたことから、本トレーサーを用いた検証についても、N 数を増やして引き続き検討する予定である（1日に観察出来るマウス数が 4 匹程度であり、今年度は COVID-19 の影響等で当初の予定回数の実験ができなかったことの影響が大きい）。

③ 成果の公表

2021 年度に引き続き研究を続ける予定であり、成果がまとまり次第、学術集会及び学術論文で発表する予定である。

6. 自己評価

COVID-19 流行による緊急事態宣言等のため、県内外の移動制限や長崎大学における学外者の受入れ制限等により、研究代表者が長崎大学を訪問して実験を実施することが、当初の予定通り進まず、予定回数、実験結果を受けての追加検証などが十分にできない点があった。しかしながら、研究協力者の協力を得ながら、TBEV 感染マウスの脳血流に着目した分子イメージングの試みに関して、一応の実験を行うことができた。

結果として、用いたトレーサーによる中枢神経系での病態イメージングを観察する十分なデータは得られなかったが、実験の目的としての方法の確立、イメージングが出来るかどうかの検証という面では、一応の結果を得ることが出来た。

本研究は、2021 年度も継続して行う予定であり、これまでの結果も含めてさらに検証を重ねることにより、学術論文として発表できる見込みである。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナムにおける下痢原性大腸菌のワンヘルスアプローチ
課 題 番 号：2020-Ippan-10
2. 代 表 者：井口 純（宮崎大学農学部畜産草地科学科 准教授）
共 同 研 究 者：竹村 太地郎（長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点 助教）
Nguyen Thi Thu Huong（宮崎大学大学院農学工学総合研究科
博士後期課程 3 年）
3. 決 定 額：600 千円
4. 申請時書類より

① 研究目的

下痢原性大腸菌（DEC : diarrheagenic *Escherichia coli*）は、発展途上国における乳幼児下痢症や、発展途上国を訪れた旅行者による下痢症の主な原因となる。感染原因は、病原体に汚染した水や食品の飲食であると考えられているが、ベトナムをはじめとする発展途上国における汚染源や汚染経路に関する情報は少ない。DEC のワンヘルスアプローチにおいて、原因となりうる病原体の汚染実態や分離株の特徴を理解することが必要となる。そこで本研究では、ベトナムにおいて家畜や食品に汚染する DEC の特徴を理解することを目的とし、家畜糞便や食品などから DEC の分離を試みるとともに、分離株の病原型（pathotype）と血清型（serotype）の詳細を DNA-base で解析する。本研究における DEC の対象病原型は、腸管病原性大腸菌（マーカータン遺伝子：*eae+*）、腸管毒素原性大腸菌（*lt+* / *st+*）、腸管出血性大腸菌（*stx1+* / *stx2+*）、腸管侵入性大腸菌（*ipaH+*）とする。

次年度以降には、下痢症患者（乳幼児下痢症など）や環境から分離された DEC の調査へと発展させる予定であり、本研究の成果はベトナムにおける DEC 制御に向けたワンヘルスアプローチの基盤になると期待できる。

② 研究内容

試料の収集：ハノイまたはその周辺地域の複数農場において、牛または豚の糞便（計 10-20 検体）を採取する。さらに、市販されている食品（牛肉、豚肉、野菜など、計 10-20 品）を市場などで購入する。以上の 20-40 検体を試料として用いる。

分離・同定：上記試料を、大腸菌選択分離用寒天培地（DHL、クロモアガー-STECC など）に塗抹して培養し、大腸菌様コロニーを各試料から最大 20 コロニー釣菌する。大腸菌の同定と病原遺伝子（*stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st*, *ipaH*）のスクリーニングを既報の PCR 法で行う。

DNA-base の血清型別：上記スクリーニングで分離した DEC について、血清型（O 群 185 種類、H 型 53 種類）を既報のマルチプレックス PCR 法で判定する。また、既

にベトナム拠点で分離された下痢症患者由来 DEC の一部についても、型別の予備解析を行う。

ゲノム解析：特に興味深い DEC（例えば、病原遺伝子ハイブリット型や血清型判定不能株など）が分離された場合は、MiSeq システムなどを用いて全ゲノム配列を決定し、病原遺伝子分布や進化系統の詳細を解析する。

③ 予想される成果

上述した通り、発展途上国における下痢症の原因となる病原体の汚染源や汚染経路に関する情報は少ない。本研究によって得られるであろう成果は、ベトナムにおける畜・食・医チェーンに潜む DEC の一端を明らかにするものと期待され、感染症対策や公衆衛生の向上を図る上での政策の策定に貢献できる。また、ベトナムで分離された DEC の血清型などの情報を、他の発展途上国における乳幼児下痢症や、発展途上国を訪れた旅行者による下痢症から分離された DEC と比較することで、細分類された DEC と疫学的または地理的な特徴がリンクする包括的な理解へと発展させることが可能となる。

さらに、本研究で行う DEC の分離から血清型判定までの一連の操作に関する技術と理論を、ベトナム拠点スタッフと共有することで、ベトナムにおける微生物検査技術の向上に寄与できるものと期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

当初の計画では、家畜の糞便や市販されている生鮮食品から DEC の分離を行い、その特徴解析を実施する予定であったが、新型コロナウイルス感染症流行の影響で、現地への渡航とベトナム国内での移動が制限されたため、計画通りの検体収集が困難となった。そのため、2年目以降に計画していた下痢症患者由来株の解析を先行して実施した。

1) **供試菌株**：ベトナム拠点に保存されていた病原大腸菌（2012 から 2015 年に病院検査室で下痢症患者などから分離され、病原遺伝子の保有が確認された菌株）122 株を培養し、93 株の生育を確認した〔腸管病原性大腸菌（EPEC : enteropathogenic *E. coli*）35 株、腸管毒素原性大腸菌（ETEC : enterotoxigenic *E. coli*）3 株、腸管侵入性大腸菌（EIEC : enteroinvasive *E. coli*）7 株、腸管付着凝集性大腸菌（EAEC : enteroaggregative *E. coli*）48 株〕。それらの DNA を市販キットにより精製した。

2) **手続き**：長崎大学-宮崎大学間での MTA を締結し、精製 DNA（93 株由来 224 サンプル）を宮崎大学に発送した。

3) **遺伝子型と血清型の判定**：宮崎大学において、病原遺伝子（志賀毒素：*stx1*、*stx2*、インチミン：*eae*、易熱性腸管毒：*lt*、耐熱性腸管毒：*st*、細胞侵入因子：*ipaH*、細胞付着因子：*aggR*）の保有を確認すると共に、PCR 法を用いた網羅的血清型別（Og-/Hg-typing）を行なった。

4) **ゲノム解析**：代表的な病原型及び血清型であった 5 株について、MiSeq システムにより全ゲノム配列を決定し、病原遺伝子分布や進化系統の詳細を解析した。

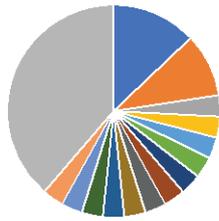
② 成果（結果+考察）

宮崎大学に送付された代表株 93 株のうち 22 株ではいずれの病原遺伝子の保有も確認されなかった。そのため、それらの菌株は以後の研究から除外した。病原遺伝子が確認された 71 株（EPEC 31 株、EAEC 34 株、ETEC 2 株、EIEC 4 株）について血清型の詳細を確認した。EPEC は OgGp7:Hg16（4 株、OgGp7 は O2 と O50 を含む Og グループ）と OgGp9:Hg18（3 株、OgGp9 は O17、O44、O73、O77、O106 を含む Og グループ）を含む 14 種類の Og:Hg タイプが確認され、Og または Hg のいずれかが判定できなかった（UT : untypeable）ものが 12 株であった（図 1）。EAEC では Og130:Hg27（8 株）を含む 14 種類の Og:Hg タイプが確認され、Og または Hg のいずれかが UT であったものが 11 株認められた（図 2）。ETEC は Og101:Hg33 と OgUT:Hg21（それぞれ 1 株）、EIEC は OgUT:Hg16 と OgUT:HgUT（それぞれ 2 株）が確認された。

以上の結果より、ベトナムで流行する各種下痢原性大腸菌（DEC : diarrheagenic *E. coli*）の流行型とその特徴が明らかとなった。特に EPEC と EAEC では多様なタイプが原因細菌となっていることが示された。日本国内で下痢症患者から分離される

EPEC の主要な血清型としては、O55、O128、O119、O8 などが挙げられるが、今回のベトナムで分離された EPEC との関連するタイプは確認されなかった。EAEC については、過去に大阪健康安全基盤研究所と共同して詳細な解析を行っており、日本国内で下痢症患者から分離される EAEC の主要な血清型としては、海外渡航帰国者からは、O175:H31、O176:H34、O86:H2、O92:H33、渡航歴の無い患者からは、O111:H21、O86:H27、O92:H33 が主要な血清型として確認された。海外渡航者から分離された EAEC と、今回ベトナムの患者由来から分離された EAEC との間には、いくつかの共通する血清型が確認され、旅行者における渡航先での流行型株への感染が疑われた。

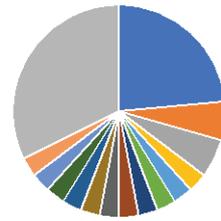
図1. EPEC (eae+)のOg:Hgタイプの分布



■ OgGp7:Hg16 ■ OgGp9:Hg18 ■ Og104:Hg4 ■ Og11:Hg25 ■ OgGp11:Hg18
 ■ Og166:Hg15 ■ Og173:Hg16 ■ Og3:Hg2 ■ Og34:Hg27 ■ Og45:Hg19
 ■ Og49:Hg10 ■ Og51:Hg21 ■ Og99:Hg10 ■ Og99:Hg33 ■ OgUT/HgUT

*OgGp7(O2/O50, OgGp9 (O17/O44/O73/O77/O106),
 OgGp11 (O153/O178)

図2. EAEC (aggR+)のOg:Hgタイプの分布



■ Og130:Hg27 ■ Og86:Hg2 ■ Og175:Hg31 ■ Og104:Hg4 ■ Og11:Hg25
 ■ Og173:Hg6 ■ Og23:Hg15 ■ Og3:Hg2 ■ Og39:Hg49 ■ OgGp9:Hg18
 ■ Og51:Hg7 ■ Og80:Hg27 ■ Og89:Hg45 ■ Og9:Hg21 ■ OgUT/HgUT

*OgGp9 (O17/O44/O73/O77/O106)

次に、EPEC および ETEC の血清型別において主要型となった 5 タイプの代表株 (5 株) 全ゲノム配列を決定し、系統や保有病原性遺伝子の分布を確認した (表 1)。その結果、いずれも異なる系統群 (ST : sequence type) に属した。EPEC では 3 型分泌系に関わる *eae* などの遺伝子、EAEC では *aggR* の保有が確認され、その他の病原型 (pathotype) に関わるマーカー遺伝子の保有は確認されなかった。ただし、EAEC の 2 株では下痢症への関連が疑われる耐熱性腸管毒 (EAST1) をコードした *astA* の保有が確認された。

Strain ID	Marker gene	Pathotype	Og-type	Hg-type	ST	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>stx1/2</i>	<i>it</i>	<i>st</i>	<i>aggR</i>	<i>ipaH</i>	<i>astA</i>
ECV282	<i>eae</i> (+)	EPEC	OgGp7	Hg16	ST10	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ECV613.1	<i>eae</i> (+)	EPEC	OgGp9	Hg18	ST414	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ECV482	<i>aggR</i> (+)	EAEC	Og130	Hg27	ST31	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ECV1017.2	<i>aggR</i> (+)	EAEC	Og86	Hg2	ST349	-	-	-	-	-	-	+	-	+
ECV896.2	<i>aggR</i> (+)	EAEC	Og175	Hg31	ST200	-	-	-	-	-	-	+	-	+

以上の結果は、次年度実施予定の「ベトナムの家畜や食品から分離される下痢原性大腸菌」と比較解析を行う上で重要な基礎データとなった。

③ 成果の公表
 該当なし

6. 自己評価

当初の計画では、家畜の糞便や市販されている生鮮食品から DEC の分離を行い、その特徴解析を実施する予定であったが、新型コロナウイルス感染症流行の影響で、現地への渡航とベトナム国内での移動が制限されたため、計画していた検体収集が困難となった。そのため、共同研究者と相談し、2 年目以降に計画していた「ベトナムで患者から分離された DEC の解析」を先行して実施した。

ベトナムにおける下痢原性大腸菌（特に EPEC と EAEC）の流行状況についてはほとんど知られておらず、今回の研究で血清型の特徴を含めた新たな知見を得ることができた。本年度に得られた結果と、次年度に実施予定の「ベトナムの家畜や食品から分離される下痢原性大腸菌」の解析結果を比較することで、今後、ベトナムにおける DEC の汚染・流行実態の全体像が明らかになるものと期待された。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

計画通りに実施することはできなかったが、次年度以降に予定していた計画の一部を先行して実施し、新たな知見を得ることができた。

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：デングウイルス認識抗体の網羅的解析系の構築
課 題 番 号：2020-Ippan-11
2. 代 表 者：宮内 浩典(国立研究開発法人理化学研究所、生命医科学研究センター
サイトカイン研究チーム・副チームリーダー)
共 同 研 究 者：竹村 太地郎（長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点・助教）
3. 決 定 額：600 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

デングウイルス（DENV）はフラビウイルス科に属し、蚊によって媒介される代表的なアルボウイルスである。世界中の DENV 感染による疾病負荷は甚大であることから、DENV 感染制御手法の開発は国際的に喫緊の課題となっている。しかし、抗体依存性感染増強（ADE）によりワクチン自体が重症化リスクを増大させてしまうことも報告されており、感染制御法の開発には至っていない。デング感染症の重症度と体液性免疫応答には相関があることがこれまでの研究から示唆されているが、どのようなエピトープを認識する抗体が重症化の阻害に寄与しているのかは不明である。また抗体レパトアとウイルス増殖抑制の関連についても不明な点が多い。これらの問題を解決するためには、デングウイルス感染患者におけるウイルス認識 B 細胞のハイスループットな網羅的解析が必要と考えられるが、そのようなシステムは存在しない。そこで本研究ではデングウイルス認識ヒト抗体の網羅的な解析を可能とする、偽ウイルス粒子（VLP）プローブと NGS による BCR 解析法の樹立を目的とする。

② 研究内容

本研究ではまずデングウイルス認識 B 細胞を分離するための VLP プローブの作成を行う。HIV ウイルスの Gag 分子とデングウイルス E タンパク、およびウイルス膜標識 Flag エピトーププローブを HEK293 細胞に共発現させ、膜表面に E タンパクと Flag タグをもつ VLP を作成する。それぞれの分子が VLP 上に共局在していることは、抗 Flag タグ抗体と抗 E タンパク抗体を用いて、共焦点顕微鏡により確認する。次に得られた VLP プローブを用いてデングウイルス感染患者 PBMC より、E タンパク認識 B 細胞を分離し、シングルセル PCR により IgG 遺伝子の H 鎖と L 鎖後、シーケンシングにより塩基配列を決定する。決定した配列をもとに IgG を再構築、発現させ、E タンパクへの結合能を確認する。さらに E タンパク質のアミノ酸配列から 16 アミノ酸程度のオーバーラップペプチドライブラリーもしくは点変異を導入

した偽 DENV を用いて、再構築した IgG のエピトープ決定へと発展させる。

- ③ 予想される成果 Eタンパク結合 B細胞をデングウイルス感染患者 PBMC より簡便に分離し、Eタンパク認識 BCR レパトアと、IgG をハイスループットで解析可能なシステムを構築する。このシステムによりデングウイルス感染患者の DENV を標的とする BCR レパトアと病院から収集する臨床経過情報を相関解析することで、デング熱との重症度の相関を明らかとすることが可能となる。これによって、BCR のレパトアを調べることで、デングウイルス感染時の重症度の予測が可能となる。また、デングウイルス感染者中の IgG 抗体とデング熱の重症度の関係を明らかとできれば、重症化を抑制する IgG のエピトープを同定し、抗体によるデング熱の抑制メカニズムを解明することが期待できる。本研究は拠点のもつデングウイルス感染患者検体より、高感度かつ網羅的にデングウイルス抗体の遺伝子情報を抽出し、デングウイルス認識抗体パネルを作成するための、基盤システムを構築することを目的としている。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

デングウイルス認識 B細胞を分離するためのデングウイルス Eタンパクプローブの作成のために、Eタンパク遺伝子に多量体安定化アミノ酸配列とビオチン化タグアミノ酸配列、ヒスチジンタグアミノ酸配列を導入した発現ベクターを構築した。デングウイルス Eタンパクは膜貫通領域の直前までを含んだ全長タイプと、ドメイン3までで、ステムループを欠損した Short タイプの2種類を作成した。ステムループを含むプローブと含まないプローブを作成することで、この領域を認識する B細胞の選別を試みる予定である。

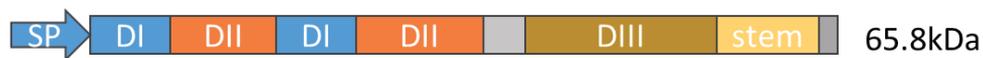
これらの発現ベクターを 293T細胞にトランスフェクションし48時間後にセルライゼートを調整後、抗ヒスチジンタグ抗体を使用したウェスタンブロット法によりヒスチジンタグを導入したリコンビナント Eタンパクの発現を確認したところ、いずれのプラスミドにおいても予想される分子量(全長タイプでは約 65.8kDa、Short タイプでは約 53.8kDa)のリコンビナント Eタンパクの発現が認められた(図1)。つぎにこれらの発現ベクターを HIV-1 の GagPol 遺伝子を有し、mWasabi(緑色蛍光タンパク質)を Vpr の直前に挿入したプラスミドベクター(緑色蛍光タンパク質で標識された HIV-1 コアを供給する)とともに、293T細胞にトランスフェクションすることでデングウイルス Eタンパク VLPベクターを作成した。

② 成果(結果+考察)

当初の計画通り、ビオチン化タグ、ヒスチジンタグおよび多量体安定化配列を付加したデングウイルス Eタンパク質の発現ベクターを構築し、哺乳類細胞でのリコンビナント Eタンパク質の効率的な発現を確認できた(図1)。さらに、これらの発現ベクターと蛍光標識した HIV コア発現ベクターを共トランスフェクション

することにより、VLP プローブを作成した。またこれらの発現ベクターには Biotin 化シグナル配列も導入されており、VLP 化と平行して、E タンパク質を直接 Biotin 化標識することで、デングウイルス特異的 B 細胞をアビジン磁気ビーズで回収可能な、磁気プローブを作成中である。次年度においてはこれらのプローブを使用して、デングウイルス感染者の末梢血より、デングウイルス特異的 B 細胞を分離し、BCR 遺伝子の解析を行う予定である。BCR 遺伝子配列の決定後は重鎖と軽鎖の可変領域をヒト IgG4Fc 発現ベクターに組み込むことによってリコンビナント IgG 抗体を得る。得られたリコンビナント抗体のエピトープを変異導入デングウイルス E タンパク質への結合試験や、既存の抗体との競合試験によって決定することで、デングウイルス特異的抗体の認識エピトープとウイルス中和能ならびに AED 活性との関係を明らかとしていく予定である。

① DENV-E-His



多量体安定化配列-AV/tag-6xHis

② DENV-E-Short-His

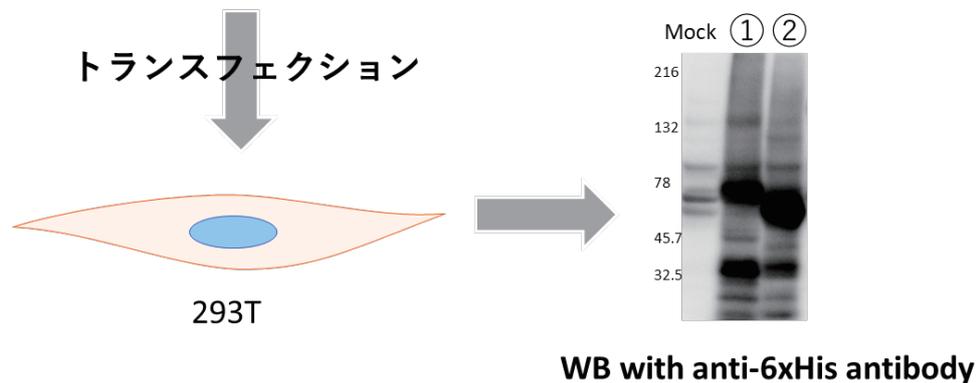


図 1. デングウイルス E タンパクプローブ発現ベクター

③ 成果の公表

現在までのところ学会や論文などでの成果の公表は無い

6. 自己評価

本年度においては予定通り、で Dengue ウイルス E タンパク質プローブを作成することが出来た。これらのプローブはコロナウイルススパイクプローブなどと比較して発現効率が非常に高く、VLP 上に多数の E タンパク質分子を配向できるため、Dengue ウイルス特異的 B 細胞を好感度で検出できる可能性が考えられる。そのため、これらは次年度以降の実際の感染者サンプルを使用した試験に向けて期待がもてる結果であると考えられる。また、同時に開発を進めている Dengue ウイルス E タンパク質磁気プローブについても、高価なソーターを必要とせず、安価に迅速に Dengue ウイルス認識 B 細胞を分離できるため、実用化に向けて研究を進めていきたいと考えている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：キノン化合物の抗トリパノソーマ活性評価
課 題 番 号：2020-Ippan-12
2. 代 表 者：大山 要（長崎大学生命医科学域（薬学系）・准教授）
共 同 研 究 者：中嶋 幹郎（長崎大学生命医科学域（薬学系）・教授）
岸川 直哉（長崎大学生命医科学域（薬学系）・准教授）
栗山 正巳（長崎大学生命医科学域（薬学系）・准教授）
3. 決 定 額：400千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

シャーガス病 (*Trypanosoma cruzi*) の治療薬には現在、Benznidazole と Nifurtimox が使用されている。しかし、これらの薬剤は細胞内型の amastigote には効かず慢性期では効果がないとされている。嶋田らは、天然物の Komaroviquinone が抗トリパノソーマ活性をもつこと、これをリード化合物として合成した類似化合物の抗トリパノソーマ活性の検討結果からキノン構造が活性に重要であることを見出した (Suto & Shimada, Bioorg Med Chem Let 2015)。一方、申請者と共同研究者 (岸川) は vitamin K、ユビキノンやフェナンスレンキノンなどのキノン類を高感度に測定する手法を開発し、この過程で市販品と独自合成品を含め多種類のキノン化合物を保有するに至った。

そこで、本研究では申請者らが保有するキノン化合物群の抗トリパノソーマ活性を調べる。評価系には熱帯医学研究所 (熱研対応教員：平山・水上) が有するアメリカトリパノソーマの *in vitro* 培養システムを使用し、このシステムでキノン化合物の添加が、濃度依存的にトリパノソーマの数を減少させられるかを調べる。具体的には、培養液中への様々なキノン骨格を有する化合物の添加によるトリパノソーマの増減をコントロールと比較して効果判定するとともに、各キノン化合物の細胞障害性もあわせて評価する。

② 研究内容

これまでに検討したキノン化合物は、1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone type、1,4-naphthoquinone type、9,10-anthraquinone type、1,2-diketon type に大別される。これまでの検討で効果が認められたキノン化合物の多くが 1,4-naphthoquinone type であったが、構造上の側鎖の規則性が不明である。来年度はこの共通性を有機化学的に考察し、構造活性相関をもとに、効果と毒性低減に優れた類縁化合物を推定する。

③ 予想される成果

・トリパノソーマに対しては十分な効果を持つ薬剤が未だに少ないため、本研究から抗

トリパノソーマ薬の創薬ターゲットにつながる可能性がある。

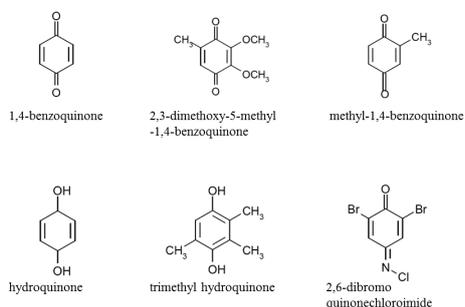
- ・本研究はヒト血流型である *trypomastigote* に加え、細胞内型の *amastigote* への活性も評価するため、これまで問題となってきた慢性期に対する治療薬の開発に発展しうる。
- ・キノン骨格を有する化合物のなかで抗トリパノソーマ活性を有するものに構造活性相関から規則性が見出されれば、活性が認められたキノン化合物をリードに複数の候補化合物を創製できる可能性がある。
- ・フィールド研究に精通する熟研教員（平山・水上）が参加しており、基礎研究の成果の円滑な応用展開が期待できる。

5. 実施報告

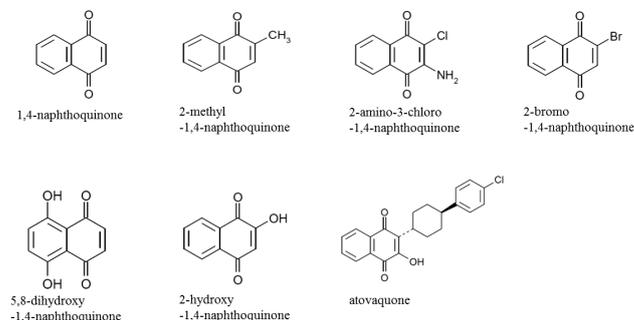
① 研究材料・方法・手続き

1,4-benzoquinones type (5 種), 1,4-hydroquinones type (2 種), 1,4-naphthoquinones type (7 種), 9,10-anthraquinones type (8 種), 1,2-diketones type (4 種) の抗トリパノソーマ活性をヒト血流型である *trypomastigote* を用いて *in vitro* で調べた。96 ウェルプレート内で増殖させた *Trypanosoma cruzi* を含む培養液にキノン化合物を添加し、37°C インキュベーター内で 72 時間培養した。添加群と非添加群の培養液を Alamarblue 染色しそれぞれの蛍光強度を調べた。

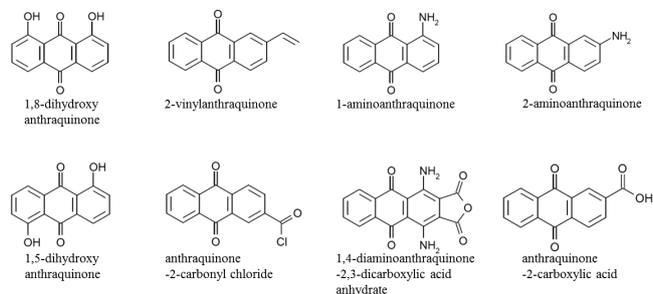
A) 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone type



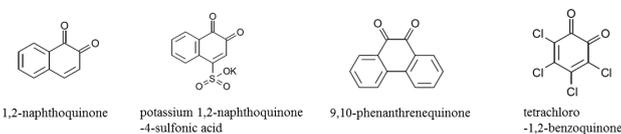
B) 1,4-naphthoquinone type



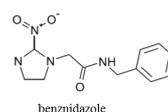
C) 9,10-anthraquinone type



D) 1,2-diketone type



E) control



② 成果（結果＋考察）

in vitro 評価系で使用する AMB 細胞を正常細胞と考え、それに対する障害性を調べ、生体内での細胞障害性 (CC₅₀) も推定した。その結果、4 種類の障害性が低い (CC₅₀>50 μM) ことがわかった。さらに、selective index (IC₅₀/ CC₅₀) から細胞障害性が少なく抗トリパノソーマ活性が高い化合物を絞り込んだところ (selective index>4)、potassium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid、2-methyl-1,4-naphthoquinone および 2-bromo-1,4-naphthoquinone が該当した。1,4-naphthoquinone はこれまでの報告で抗トリパノソーマ活性をもつ化合物として報告されており、本研究でも同じ結果が得られた。一方、これまで注目度が低かった 1,2-naphthoquinone が、本研究では最も高い SI を示した (selective index=4.8)。以上の結果から、sulfonated 1,2-naphthoquinone 骨格が毒性と抗トリパノソーマ活性の両方を満たす有望なリード骨格である可能性が示された。

③ 成果の公表

国際学術雑誌に論文投稿する予定である。

6. 自己評価

本年度は AMB 細胞を使った細胞障害性評価、selective index の算出、構造活性相関をもとに効果と毒性低減にすぐれた類縁化合物の推定を行った。詳細な比較検討の結果から従来とは異なる新たなリード化合物の存在が明らかとなった。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：西アフリカにおけるシングルセル・ゲノミクス技術を駆使したブルーリ潰瘍の伝播・感染経路推定

課 題 番 号：2020-Ippan-13

2. 代 表 者：星野 仁彦（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・室長）
共 同 研 究 者：吉田 光範（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・主任研究官）
深野 華子（国立感染症研究所ハンセン病研究センター・主任研究官）
西川 洋平（国立研究開発法人産業技術総合研究所・特別研究員）
四津 里英（長崎大学熱帯医学グローバルヘルス研究科・助教）
竹山 春子（早稲田大学理工学術院先進理工学部生命医科学科・教授）
山本 太郎（長崎大学熱帯医学研究所国際保健分野・教授）

3. 決 定 額：600 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ブルーリ潰瘍は抗酸菌 *Mycobacterium (M.) ulceran* を病原体とし発症する難治性潰瘍を特徴とする皮膚疾患である。全世界 33 ヶ国以上から報告されるが、その疾病分布は主に西アフリカに集中する。顔面・四肢を好発部位とする大きく深い無痛性の皮膚潰瘍（図 1）を主症状とし、未診断・未治療の場合は重篤な身体後遺症を残すため、ハンセン病と同様に社会的な偏見・差別の原因となっている。抗酸菌症のなかでは結核、ハンセン病に次いで患者数が多いことから、WHO はブルーリ潰瘍を neglected tropical diseases (NTDs：顧みられない熱帯病) 20 疾患の 1 つに定め制圧目標にあげている。全世界で 2002 年から 2018 年の 16 年間で 55,000 症例以上の新患が報告され、そのうち約 75%が西アフリカのコートジボワール共和国およびガーナ共和国

におけるものである（図 1）。最初にブルーリ潰瘍が報告されたオーストラリアでは早期診断法および伝播・感染経路の特定に関する研究が進められているが、最も患者数が多い西アフリカ諸国においてブルーリ潰瘍の感染症対策は不十分であ

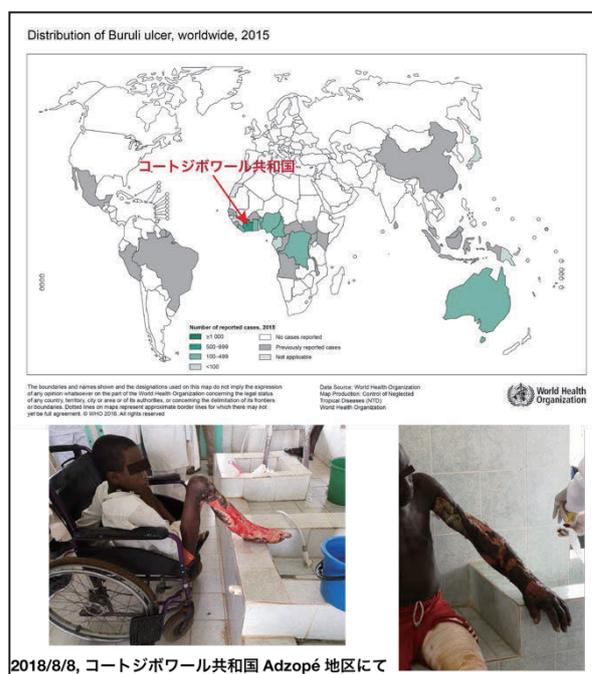


図 1. ブルーリ潰瘍患者の分布と患者像.

る。

医療体制や衛生環境が整っていない地域では、原因菌の感染源を特定し感染経路を遮断することが感染症の予防および拡大防止の観点から特に重要になる。しかしながら、*M. ulcerans* の環境における感染源やヒトへの感染経路はわかっていない。アフリカやオーストラリアでは流れの緩やかな川や池の周辺に患者発生例が多いことから、本菌は主に水系環境においてヒト皮膚に感染すると推察されるが、自然界におけるリザーバーの有無、感染伝播の様式、感染によって生じる皮膚潰瘍の病態機序は現在でも謎に包まれている。オーストラリアではオポッサムなどの有袋類や犬・馬への感染が報告されており、とくにオポッサムの糞便を含んだ汚水中から孵化した蚊を介してヒトを刺すことで感染すると推測されている。一方、アフリカでは *Belostomatidae* などの水性昆虫の関与が推測されているが、詳細は不明である。*M. ulcerans* の伝播・感染経路の解析が難しい原因のひとつに、本菌の人工培養が極度に難しいことがあげられる。抗酸菌培養用の人工培地を使用しても単個菌を分離するまでに数ヶ月から半年程度を要するため、雑菌の多い環境試料から *M. ulcerans* を単離することは困難を極める。これまで、環境試料中の *M. ulcerans* は多コピーの挿入配列 (insertion sequence, IS) 2404 を PCR 増幅することにより検出されてきた (Portaels ら (1999) ; Johnson ら (2007) ; Vandellannoote ら (2010))。しかしながら、この方法は試料中の菌の存在を確認するにとどまり、菌のゲノム情報をもちいた伝播・感染経路の解析は不可能である。本申請研究課題は、コートジボワール共和国・ガーナ共和国においてブルーリ潰瘍患者の住居周辺環境調査をおこない、近年開発されたシングルセル・ゲノミクス技術を応用することで *M. ulcerans* 環境菌のゲノム情報を人工培養を介さずに取得する。その後、同様の方法で患者の皮膚病変部より *M. ulcerans* のゲノム情報を取得して比較する。これらの解析を通して、ブルーリ潰瘍最頻発地域であるコートジボワール共和国・ガーナ共和国における *M. ulcerans* の伝播・感染経路の解明を目指す。

② 研究内容

I. 西アフリカにおける調査サイトの決定

海外共同研究者であるガーナの Dr. Anthony Ablordey およびコートジボワールの Dr. Kouadio Kouame と協議の上で患者発生地域からサンプリングを実施する調査サイトを決定した。申請者が所属する研究グループは、既に協議および現地視察を複数回おこない、ガーナ共和国 Amasaman 地区とコートジボワール共和国 Oume 市 Zangue 地区を調査サイトとして選定した。Amasaman 地区、Zangue 地区は、数多くの小規模 (数百人程度) な集落から構成される。各集落には、治療中あるいは未治療のブルーリ潰瘍患者数名~10 名程度存在する。また、各集落の長、患者、および患者家族は本研究プロジェクトに非常に協力的であり、サンプリング実施に関して問題ないことを確認済みである。

II. *M. ulcerans* 一細胞由来のゲノム情報を取得する系の構築

近年開発されたシングルセル・ゲノミクス技術を応用して、*M. ulcerans* 一細胞由来のゲノム情報を取得する系を構築する。本手法の技術基盤は、油中水滴型微小液滴（ドロップレット）を反応場として一細胞の全ゲノム増幅をおこなう高精度な single amplified genome (SAG) と呼ばれるゲノム情報を得ることである（図 2, step 1-5）。

携帯型マイクロ流体デバイスを持ちいて細胞が封入されたドロップレットを作成することにより、調査サイト現地で一万個以上のシングルセルを対象とした全ゲノム増幅を可能にする。さらに、作成した SAG に対して IS2404 をリアルタイム PCR 法により検出することで、*M. ulcerans* の SAG のみを選別することが可能である（図 2, step 6）。日本国内の河川水、生活用水などに、実験室にて培養した *M. ulcerans* Agy99 株を一定菌数混入させる。これらの水に対して、0.2 μm のフィルター（Sterivex, Merck）を持ちいて繰り返し濾過して水中の菌を捕集したのちに、上記のドロップレットを作成して全ゲノム増幅をおこなう。得られた *M. ulcerans* の SAG に対して次世代シーケンサー（MiSeq, Illumina）による配列解析をおこなう。これらの結果から、*M. ulcerans* 一細胞由来のゲノム情報が取得できることを確認する。なお、本検討には上記技術の開発者のひとりである西川博士が研究協力者として参加する。

III. Amasaman 地区、Zangue 地区におけるサンプリングとシングルセル・ゲノミクス解析

環境試料として、河川の水、沈泥、周辺土壌、動植物を採取する。許可を受けた上で患者自宅の床、生活用水、周辺土壌、家畜、動植物からのサンプル採取を実施する。患者からのサンプリングに関しては、ガーナ共和国・コートジボワール共和国において医師資格をもつ Dr. Kouame および Dr. Bamba の協力のもと患者皮膚潰瘍辺縁部をスワブで擦過して採取する。皮膚生検が可能であれば実施する。

採取した環境検体および臨床検体中に *M. ulcerans* が存在することを IS2404 のリアルタイム PCR 法（Fyfe ら, *Appl Environ Microbiol* (2007)）により確認する。水は 0.2 μm のフィルター（Sterivex, Merck）を用いて水中の菌を捕集する。検体と同量の 2% NaOH-クエン酸ナトリウムにより抗酸菌以外の菌を除去後、抗酸菌捕捉・集菌ビーズ（TB-Beads, 日本 BCG）を用いて濃縮処理を行った後に各種核酸抽出キット等を用いて核酸を抽出する。沈泥、土壌には 1/2 に希釈した同 NaOH-クエン酸ナトリウムに懸濁後上清を、動植物検体は同液中で破碎後上清を用いる。リアルタイム PCR はモバイルリアルタイム PCR 機器（PicoGene, 日本板硝子）を使用する。リアルタイム PCR 陽性となった環境および臨床検体は、アクラにある野口記念医学研究所あるいはアビジャンに位置するパスツール研究所に運搬し、上記の研究計画 II で構築した実験系により *M. ulcerans* の SAG を作成したのちに、

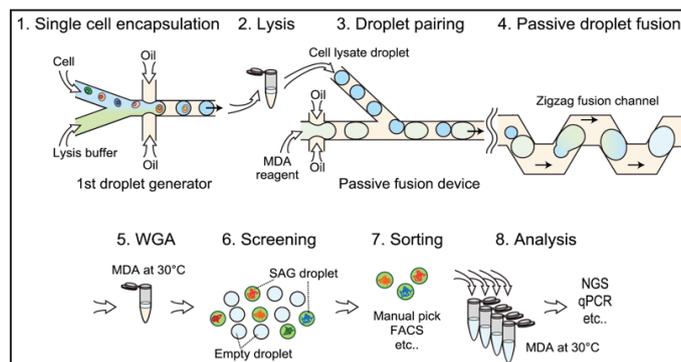


図 2. シングルセル・ゲノミクス技術の概要.
(Hosokawa ら, *Sci Rep* (2017) より)

日本国内で次世代シーケンサーによる配列解析をおこなう。

VI. ゲノム情報解析によるブルーリ潰瘍の伝播・感染経路推定

環境および臨床検体から得られる *M. ulcerans* 一細胞由来のゲノム情報をもちいた一塩基多型 (SNP) 解析をおこなう。まず、ブルーリ潰瘍患者一人あたり、*M. ulcerans* の SAG を 20 個程度取得する。取得した SAG は、*M. ulcerans* Agy99 株の完全ゲノム配列 (Stinear ら, *Genome Res* (2007)) を参照配列としたアライメントをおこない、各細胞の SNP を検出する。上記操作を 3~4 人の患者に対しておこなう。環境検体から得られたすべての *M. ulcerans* 細胞についても同様にして SNP を検出する。すべての一細胞由来ゲノムについて参照配列にアライメントされる共通の配列部位をコア・ゲノムとし、コア・ゲノム配列領域の SNP 個数を算出する。全細胞間の SNP 距離を算出し、同一患者由来の *M. ulcerans* 細胞間の SNP 距離と、環境および患者由来の *M. ulcerans* 細胞間の SNP 距離の関係から、Zangue 地区におけるブルーリ潰瘍の伝播・感染経路を推定する。

③ 予想される成果

申請者が所属する国立感染症研究所ハンセン病研究センターでは、長崎大学熱帯医学グローバルヘルス研究科・助教 四津里英博士らとともに、ガーナ共和国野口記念医学研究所とコートジボワール共和国パスツール研究所と共同し、平成 30 年度より AMED「アフリカにおける顧みられない熱帯病 (NTDs) 対策のための国際共同研究プログラム」を開始している。このプロジェクトにより、すみやかにガーナ共和国・コートジボワール共和国内で患者が発生している地域を選定し、患者およびその住環境へアクセスできる体制が構築できている。これが本研究の大きなアドバンテージであり、ブルーリ潰瘍最頻発地域である西アフリカにおけるブルーリ潰瘍の調査研究を実際に稼働し遂行できる研究チームとして、国内では唯一のポテンシャルをもつと考えている。また、近年開発されたシングルセル・ゲノミクス技術を環境中に存在する難培養性感染症起因菌の伝播・感染経路の解析に応用した例は申請者が知る限りない。環境中の *M. ulcerans* が分離培養することが可能であれば、ブルーリ潰瘍原因菌の伝播・感染経路に関する大きな手掛かりとなることが予想され、30 年間にわたって世界中の研究者が *M. ulcerans* の分離培養を試みてきたが、現時点では 2 本しか論文は発表されていないほど、環境由来の *M. ulcerans* の分離培養は困難であると考えられている。そこで我々は発想の転換を行い、原因菌の環境からの分離培養をやみくもに試みるのではなく、原因菌の全ゲノム情報の取得に専念することとした。もちろんそのアプローチも困難が予想されるが、西川博士が所属する早稲田大学先端生命医科学センター竹山春子研究室では、*E. coli*, *B. subtilis* あるいはその混合のシングルセル・ゲノミクスに成功しており、本研究も成功する可能性が高い。(Hosokawa ら, *Sci Rep* (2017), Kogawa ら, *Sci Rep.* (2018)) 本研究により *M. ulcerans* の伝播・感染経路を解析できれば、本研究は非常に特色のある研究となると思われる。

5. 実施報告

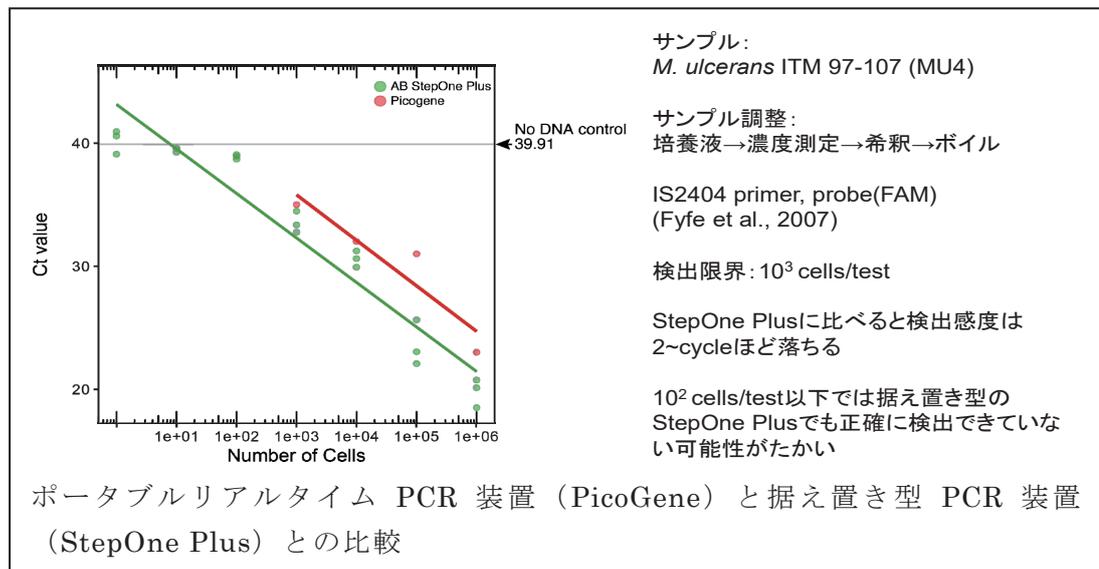
① 研究材料・方法・手続き

2020 年度は COVID-19 パンデミックのため、国家公務員はレベル 3 の国への渡航

は禁じられた。そのため、予定していたアフリカ諸国への渡航は不可能であった。そのため日本国内で、あらかじめ分離していた *M. ulcerans* 基準株を用いて、予備実験を繰り返した。

② 成果（結果＋考察）

ブルーリ潰瘍の原因菌である *M. ulcerans* の環境水からの分離を試みるためには、*M. ulcerans* が含まれる環境水を獲得しなければならない。そのためには、研究所・大学・主要病院から遠く離れたアフリカの環境コホートで、目的とする菌が含まれる環境水を得る必要がある。この目的を達成するために、*M. ulcerans* 基準株を利用して、核酸抽出をすることなく環境水に目的菌が含まれているかどうかを判定する方法を試行した。



まず、販売されている3種類のポータブルリアルタイムPCR装置(PicoGene)をデモンストレーション試用として短期間借り入れ、解析を繰り返したが、据え置き型のリアルタイムPCR装置(StepOne Plus)と比較すると大幅に感度が下がることが判明した。

そこで据え置き型のリアルタイムPCR装置を使用することとして(現地に同型機種があることを確認済み)感度を高めた状態でどのインプットまで測定できるかを解析した。インプットの菌には、研究所周辺の河川水に加えることで環境水の模倣とした。菌量を 10^4 個とした場合 back ground 菌量の増減の影響は少なかったが、菌量が 10 個の場合は back ground 菌量が大きく影響していた。また 10^3 個の菌量で IS2404 シグナルを検出できたが、 10^2 では negative control との区別が困難であった。次いで菌を DW に懸濁してフィルターで濾してリアルタイム PCR で検出を試みたが、この倍も 10^3 個で良好なシグナルを得たが、それ以下では困難であった。LAMP 法と、我々のリアルタイム PCR 法を直接比較したが、同程度の感度であった。最後に濁った池の水に菌を懸濁してフィルターに濾してリアルタイム PCR 法をおこなったが、ポア径 5 μm のフィルターで十分菌はトラップされることが判明した。

環境から抗酸菌を分離する方法を検討し、フィルターによる環境サンプルからの分離方法や、菌数を定量するためのリアルタイム PCR 用増幅酵素の検討や実際に菌を蛍光色素で染色して、リアルタイム定量方法による検出法確立のための条件検討を繰り返した。また、抗酸菌を対象としたシングルセル封入方法、溶菌方法を検討した。加えて、ブルーリ潰瘍原因菌の遺伝情報が不足しているため、所有している菌株の short read sequencing あるいは long read sequencing を行い、比較ゲノム解析を行うことで、次年度以降に行われるアフリカでの臨床分離株や環境分離株の遺伝情報に対する reference 作成を行った。また *M. ulcerans* ShT-P 株をモデルとして微小液滴内での全ゲノム増幅反応を行い、シングルセル由来からのゲノム解析が可能であることを確認した。また、*M. ulcerans* 特異的な遺伝子の検出を行うことにより、多様な細菌集団の中からモデル細菌のゲノム情報を含んだ液滴のみを選択的に回収し、ゲノム解析が可能であることを明らかにした。

③ 成果の公表

現時点ではなし。

6. 自己評価

2020 年度は COVID-19 のパンデミックのために、海外渡航が不可能となり、国際共同研究は困難を極めたが、渡航が可能となる 2021 年度以降のために、日本国内でも可能な研究を継続して実行した。特に環境検体を採取した後に必要となる、検体中の菌量の定量化など、将来必ず establish する予定であったアッセイを中心として、行い、予想外の結果を得ることができた。

もし来年度以降に研究費を獲得することができれば、西アフリカ諸国へ渡航し、本研究費を使用して日本国内で繰り返した、新しいアッセイを現地で試行できると考えている。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

2020 年度は COVID-19 パンデミックのため、西アフリカ現地へ行くことは不可能であったが、日本国内で行えるだけの検討を行い、現地へ渡航できるようになった場合に備えてアッセイを繰り返したため。

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：コンゴ民主共和国の通学児童における不顕性マラリア感染の実態調査
とその影響

課 題 番 号：2020-Ippan-14

2. 代 表 者：美田 敏宏（順天堂大学医学部・教授）
共 同 研 究 者：池田 美恵（順天堂大学医学部・博士研究員）
共 同 研 究 者：Balikagala Betty（順天堂大学医学部・博士研究員）

3. 決 定 額：800 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

コンゴ民主共和国（Democratic Republic of Congo; DRC）は世界で 2 番目にマラリア報告数が多く、世界の年間マラリア発生数の 10%を占める。特に小児にとっては命を脅かす脅威となり、マラリアによる全死亡の約 70%が 5 歳未満児によるものである。近年は特に、薬剤耐性マラリアに加えて、マラリアの不顕性感染が問題視されており、通学により学校と家を往復する学童児が重要な媒介者として機能している可能性が危惧されている。しかし現状では、政情不安や経済的事情、さらには未整備の医療制度などにより、いまだ小児の不顕性感染の実態を正確に把握できておらず、有効なマラリア対策の構築も進んでいない。本研究では DRC の 10 歳前後の通学児童における不顕性マラリア感染の疫学的特徴を明らかにして、マラリア感染の拡大に繋がる要因を多角的に検証することを目的としている。マラリアの蔓延状況が異なる複数の地域で疫学調査を実施し、顕性・非顕性感染者の頻度、マラリア原虫種、種の重複感染の傾向、薬剤耐性について明らかにする。同時に、親権者を対象としたマラリアに対する意識調査の結果により、地域全体でのマラリア対策の重要性を示し、今後の教育活動へ貢献することを目的としている。

② 研究内容

2019 年には、DRC 国内の地理的に異なる 4 つの地区を調査予定地として現地調査を実施した。被験者は、小中学校に通学する児童（各地域で計 800 名）、保護者（各地域で計 800 名）である。児童から、採血と身体計測を実施し、保護者を対象に質問紙を用いた、①被験者（児童）の生活環境に関する調査、②マラリアに対する知識や認識に関する調査を実施した。

2020 年度は、DRC における研究拠点：National Institute of Biomedical Research（以下、仏語略称：INRB）とも密接に連携をとりつつ、下記の二つの手法を用いて研究目的を達成する。

分子疫学的実験：血液検定から原虫 DNA を抽出し、調査地域の子供のマラリアの罹患率、顕性と不顕性感染の割合を明らかにするとともに、同時に感染しているマラリア種の同定や薬剤耐性マーカーを調べることで、地域のマラリアの特徴を明らかにする。

統計解析：フリーソフトである R を使用して、以下の項目について、単変量、もしくは多変量解析にて相関性を検証する。①保護者のマラリアに対する知識と子供の罹患率との相関性、②生活環境や経済状態と子供のマラリア罹患率との相関性、③罹患率、感染しているマラリア種や薬剤耐性マーカーと地域的特性、④マラリア感染を促進する要因の特定とその地域的特性の検証。

③ 予想される成果

Culleton 博士によって 2005 年にコンゴ共和国（DRC の隣国）の首都ブラザビルで実施された調査では、顕微鏡診断での感染率、不顕性患者の割合、薬剤耐性マーカーの値に、都市部とその周辺地域（都市化の進んでいない比較的地方的地域）で差があることが報告されている。しかし、マラリア原虫の遺伝的な集団構造は不明であり、本研究によって都市部と地方の間におけるマラリア原虫の遺伝的集団構造（集団内の遺伝的多様性）の差異が観察されれば、集団遺伝学的にも重要な成果を挙げることができる。特に本研究では、空間的にある程度離れた 3 つのヘルスセンターと 2 つの小中学校で調査を実施しており、空間的差異と集団構造の差異からマラリアの疫学を論じることができると期待している。さらに空間的な差異に注目していけば、我々はウガンダ（これも DRC の隣国）において、アフリカで初めてアルテミシニン耐性原虫を発見しており（Emer Infect Dis, 2018）、耐性原虫の地理的拡散が DRC にまで及んでいるのか否か、という問題の解明にも挑戦していく。これらの成果を足掛かりにして、不顕性感染や耐性マラリアといった公衆衛生上の難題に取り組み、INRB とも連携して有効なマラリア対策の構築を試みる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

2019 年に DRC のキンシャサで行ったフィールド調査で、6-14 歳の通学児童 634 名（427：症状なし、207：症状あり）から血液サンプルを収集した。

今年度はこれらのサンプルを用いた分子疫学的実験を主に進めた。まず、乾燥血液サンプルから、DNA Blood Mini Kit を用いて DNA を抽出した。さらに、ミトコンドリア *cox3* 遺伝子内のマラリア原虫共通配列を標的としたプライマーを用いて PCR を行い、各サンプルの血液がマラリアに感染しているかどうかを判別した。その後、種特異的な配列を標的としたプライマーで Nested PCR を行うことにより、感染しているマラリア種の同定を行った。これらのデータを用いて統計解析を行い、通学児童の間で蔓延しているマラリア種の構成や、都市部と地方での傾向を明らかにした。

本研究課題は、長崎大学熱帯医学研究所とコンゴ民主共和国の国立生物医学研究所、両倫理委員会で承認されている（承認番号：190110208、ESP/CE/042/2019）。

② 成果（結果＋考察）

無症状児童のうち、62.3%がマラリアに感染していた。種別では、58.1%が熱帯熱マラリアに、19.9%が四日熱マラリアに、10.8%が卵形マラリアに感染していた。一方でマラリア症状があった児童では、94.4%がマラリアに感染し、種別では93.2%が熱帯熱マラリアに、12.6%が四日熱マラリアに、15.9%が卵形マラリアにそれぞれ感染していた。

Species	Asymptomatic school-age children (N=427)		Symptomatic school-age children (N=207)	
	Positive number	% (95% CI)	Positive number	% (95% CI)
<i>Plasmodium</i> spp.	266	62.3 (57.5-66.9)	196	94.7 (90.7-97.3)
<i>P. falciparum</i>	248	58.1 (53.2-62.8)	193	93.2 (88.9-96.3)
<i>P. malariae</i>	85	19.9 (16.3-24.1)	26	12.6 (8.4-17.9)
<i>P. ovale</i>	46	10.8 (8.1-14.2)	33	15.9 (11.2-21.7)

不顕性感染を起こしていた児童では、どのマラリア種でも都市部より地方で感染率が高く、マラリア保虫リスクは5倍高いことが明らかになった ($p < 0.001$)。さらに、地方の不顕性感染児童のうち43%が混合感染をしていたものの、都市部における混合感染率は16%で地域差が確認された。

Species	Asymptomatic school-age children (N=266)		Symptomatic school-age children (N=196)	
	Positive number	%	Positive number	%
Single infections	178	66.9	150	76.5
<i>P. falciparum</i>	162	60.9	147	75.0
<i>P. malariae</i>	8	3.0	2	1.0
<i>P. ovale</i>	8	3.0	1	0.5
Mixed infections	88	33.1	46	23.5
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i>	50	18.8	14	7.1
<i>P. falciparum</i> + <i>P. ovale</i>	11	4.1	22	11.2
<i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i>	2	0.8	0	0.0
<i>P. falciparum</i> + <i>P. malariae</i> + <i>P. ovale</i>	25	9.4	10	5.1

DRCにおけるマラリア蔓延対策の中で、通学児童の感染率や保虫率はこれまで重要視されてこなかった。本研究の結果から、通学児童は症候性/無症候性に関わらずマラリア感染のリスクが非常に高く、また保虫者として蔓延の一端を担っている可能性が見出された。DRC 国内において、感染率の高い地域に居住もしくは通学する学童児の継続的かつ体系的なスクリーニングと治療は、マラリア対策の強化に貢献する可能性がある。

③ 成果の公表

本研究による成果をまとめ、既に Malaria Journal に論文を投稿し査読を受けている。さらに、薬剤耐性遺伝子の検出や HRP2 遺伝子の欠失を検出する実験も進めており、今後も DRC におけるマラリア蔓延の実態を疫学的に発表していく。

6. 自己評価

フィールド調査で収集した血液サンプルを用いて、本年度は実際に分子疫学的実験によりマラリアの感染状況を明らかにすることができた。さらに都市部と地方で、通学児童に感染しているマラリア種の構成が異なる事や、混合感染率の違いを明らかにし、疫学的データを得ただけでなくマラリア対策への重要な知見を得ることができた。これまでの成果をまとめた論文を第一報として投稿している。今後も薬剤耐性や RDT キットの陽性率に関わる HRP2 遺伝子の欠失についてもデータをまとめ、専門誌に論文を投稿していく準備が進んでいる。よって、これまでの実験やデータの解析は順調に遂行されている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：コガタアカイエカのウイルス叢と日本脳炎ウイルス媒介能に与える影響の関連解析
課 題 番 号：2020-Ippan-15

2. 代 表 者：小林大介（国立感染症研究所昆虫医科学部・研究員）
共 同 研 究 者：伊澤晴彦（国立感染症研究所昆虫医科学部・室長）
佐々木年則（国立感染症研究所昆虫医科学部・主任研究官）
Astri Nur Faizah（東京大学大学院農学生命研究科・大学院生）
Michael Amoa-Bosompem（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・大学院生）
松村凌（明治大学農学部・学部生）

3. 決 定 額： 300 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

他県と比較して長崎県は、ブタの日本脳炎ウイルス（JEV）に対する抗体の保有状況調査において、毎年高い抗体保有率が示されている。また、JEV 主要媒介蚊のコガタアカイエカを対象とした、長崎県内における我々の継続的な調査においても、ほぼ毎年のように JEV が分離されており、県内における JEV の活動が依然として活発であることが示されている。しかしながら長崎県は、とりわけ JEV の増幅動物となるブタの肥育豚数が多いことや、媒介蚊の発生数が多いといった事実はなく、こういった要因が、JEV の盛んな流行を引き起こしているのかは全く明らかになっていない。

我々はこれまでの研究の過程で、次世代シーケンサー（NGS）を活用することにより、昆虫類が保有するウイルスの網羅的解析法を独自に開発し、野外の吸血性昆虫類の保有する多様なウイルスの存在を明らかにしてきた。この手法を用いて、日本国内各所で捕集したコガタアカイエカのウイルス叢解析を実施した結果、多数の新種の昆虫特異的ウイルス（ISV）と、我が国でこれまでその存在が確認されていなかった多様な ISV が検出された。さらに、そのウイルス叢は地域ごとに異なるという事実が判明し、長崎県内で捕集されたコガタアカイエカに特有の ISV の存在も明らかとなっている。それに加えて我々は、これまでの *in vitro* 環境下での研究において、JEV をはじめとした蚊媒介性ウイルスの増殖を ISV が制御していることを報告してきた。そのため、自然界のコガタアカイエカが保有する ISV が、JEV の流行を制御する要因として働いているというのではないかという発想に至った。

本研究では、コガタアカイエカの保有する ISV が JEV の流行動態に影響を与えているという作業仮説に基づき、

- ①コガタアカイエカのウイルス叢の継続的な調査
 - ②実験室内における ISV と JEV の相互作用解析
- 以上の 2 点について検証することを研究の目的とする。

②研究内容

1. コガタアカイエカの保有するウイルス叢の解析・移植

JEV の流行が最も盛んな 8 月下旬～9 月上旬にかけて、長崎県諫早市の畜舎においてコガタアカイエカの捕集を実施する。捕集されたコガタアカイエカ（本研究では“ドナー”と呼称）は、培養細胞を用いたウイルス分離に供試するとともに、NGS による網羅的なウイルス検出を実施し、それらのウイルス叢を解析する。実験室で継代維持しているコガタアカイエカの系統（本研究では“レシピエント”と呼称）に、ドナーの破砕ろ過液をマイクロインジェクターで接種し、ドナーのウイルス叢を移植する。多様なウイルスをもつレシピエントの系統を樹立するため、長崎県で捕集されたもの以外にも、石川県や鳥取県で捕集された異なるドナーからウイルス叢を移植し、複数のレシピエント系統の樹立を試みる。

2. ウイルス感染実験

樹立したレシピエント系統に対して、JEV を感染させる。JEV は我々がこれまで長崎県内の調査で分離した株を使用する。JEV をウサギ脱繊維血と混合し、レシピエント系統へ経口感染させる。

3. JEV 媒介能と相関解析

それぞれのレシピエント系統における JEV の媒介能を評価する。JEV 感染 7 日、14 日後に解剖を行い、翅・脚・頭部から JEV の検出を行うことで、JEV の蚊体内における dissemination rate を算出する。また、コガタアカイエカから唾液を回収し、唾液に含まれる感染性のある JEV の存在を、培養細胞へ接種することによって確認する。以上のように評価した JEV の媒介能と、それぞれのレシピエント系統のもつ ISV の相関を解析することで、JEV の媒介に抑制的あるいは促進的に作用する ISV を探索する。

③予想される成果

近年の塩基配列解析技術の進歩によって、我々は環境中あるいは生物体内に存在する極めて多くのウイルスの存在を知ることとなった。しかしながら、これらのウイルスが、宿主にどのように影響を与えているのかといった、多様なウイルスの存在意義については、ほとんど明らかとなっていない。本研究は、新たにその存在が明らかとなった JEV の主要媒介蚊のコガタアカイエカが保有する多様なウイルス（ISV）に着目し、それらのウイルスが JEV 流行を制御しているという仮説を検証する初めての試みとなる。本研究によって、JEV の媒介を抑制あるいは促進するウイルスの存在が確認された場合、それらのウイルスは、JEV 流行に対する新しいリスクファクターとなることが期待される。それと同時に、JEV 媒介に抑制的に作用するウイルスが見出された場合、ISV を用いた全く新しい蚊媒介ウイルス制圧の手法が見出される可能性が期待される。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

【蚊の捕集】

2020年8月に長崎県諫早市の畜舎における日本脳炎ウイルス（JEV）の主要媒介蚊であるコガタアカイエカの捕集調査を予定していたが、新型コロナウイルス流行による移動制限のため、当該の調査を中止した。そのために本研究では、前年の2019年8月に長崎県諫早市の畜舎で捕集したコガタアカイエカを用いて、それら蚊におけるJEVの保有状況調査と、コガタアカイエカのRNAウイルス叢解析を実施した。

【コガタアカイエカからのJEVの分離】

2019年8月に捕集されたコガタアカイエカ971頭を、25頭以下を1プールに集約して39プールを作製した。それらを細胞培養液で破碎し、0.45 μmのフィルターでろ過滅菌した後に、ヒトスジシマカ由来培養細胞のC6/36細胞に接種した。28℃、5%CO₂の条件下で1週間培養し、その後2回の盲継代を行い、JEVの分離を試みた。

【コガタアカイエカのRNAウイルス叢解析】

ウイルス分離に用いたフィルターろ過液2プール分を、宿主蚊由来の核酸を分解するためにDNaseおよびRNaseで処理した後に、RNA抽出を行った。その後、cDNAの合成を行い、次世代シーケンス（NGS）解析用のライブラリー作製を実施した。NGSはイリミナ社製のMiniSeqシステムによって解析を行った。得られたリード配列はCLC bio社のCLC Genomics Workbench 20を用いて*de novo*アセンブリを行うことによって、コンティグ配列を生成した。その後、BLAST検索によって、コンティグ配列に含まれるウイルス由来配列を特定した。

②成果（結果+考察）

【野外捕集コガタアカイエカを用いたJEVの分離結果】

2回の盲継代を経た3プールサンプルにおいて、激しい細胞変性効果（CPE）が観察された。これらサンプルの培養上清を回収し、全RNAを抽出後、JEV特異的プライマーを用いたRT-PCRによるJEV遺伝子検出を行った。その結果、この激しいCPEの観察された3サンプルの全てにおいてJEV遺伝子が陽性となった。JEVのエンベロープ（E）遺伝子の塩基配列に基づいたJEV遺伝子型の特定のため、これら分離されたJEVの全E遺伝子をRT-PCRによって増幅し、サンガーシーケンス法によって塩基配列の決定を実施し、近縁ウイルス株との分子系統解析を実施した。その結果、2019年に捕集されたコガタアカイエカから分離されたJEVの3株は、日本を含めた東アジア地域一帯で近年流行している遺伝子型I型であることが判明した（図1）。また今回分離されたJEVは、前年の2018年に同一地域で捕集されたコガタアカイエカから分離された株と極めて近縁であることが明らかとなった（図1）。このことから、長崎県諫早市の調査地においては、JEVの安定した伝播サイクルが存在するものと考えられた。

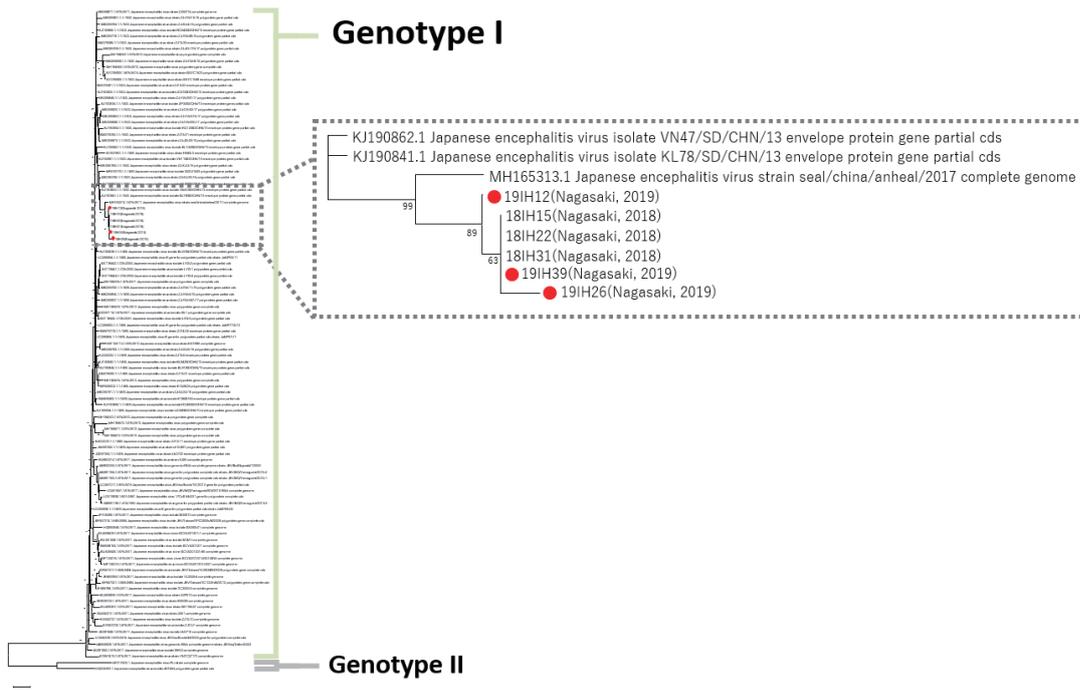


図 1：日本脳炎ウイルス（JEV）の分子系統解析

JEV のエンベロープ遺伝子（1500 塩基）に基づいた、近隣結合法による系統樹。本研究によって分離された JEV を赤丸で示す。

【コガタアカイエカの RNA ウイルス叢解析とその年次変動解析】

NGS 解析の結果、2,137,022 リードが得られ、*de novo* アセンブリを行ったところ、500 塩基以上のコンティグ配列が 123 コンティグ取得された。これら塩基配列を BLASTN および BLASTX を用いて検索することによって、ウイルス配列の特定を行った。その結果、これまでに日本国内のコガタアカイエカから見出されている既知ウイルスが 5 種検出された (Table 1)。

表 1：2019 年捕集のコガタアカイエカの RNA ウイルス叢解析において見出された既知ウイルス

その他、新規のウイルスに由来すると思われるコンティグ配列が複数検出された (表 2)。

配列解析の結果、これらのコンティグ配列は、3 種の新規ウイルス (Ophiovirus 様ウイルス、Qinvirus 様ウイルス、Partitivirus 様ウイルス) に由来するものと考えられた。

No.	Virus name
1	Wenzhou sobemo-like virus 3
2	Culex vishnui subgroup totivirus
3	Bat sobemovirus
4	Culex tritaeniorhynchus flavi-like virus
5	Wenzhou tombus-like virus 11

以上の結果から、2019 年に長崎県諫早市で捕集されたコガタアカイエカには、合計 8 種の RNA ウイルスが存在することが予想された。

表 2 : RNA ウイルス叢解析において見出された新規ウイルス由来コンティグ配列

Contig no.	Length	Total read count	Average coverage	Result of BLASTX search		
				Highest score protein name	identity (%)	e-value
1	1472	134	12.67	hypothetical protein [Beihai sesarimid crab virus 4]	31	2e-38
2	1189	48	5.7	RdRp, partial [Wilkie ophio-like virus 1]	30	5e-17
3	661	52	10.64	RdRp, partial [Wilkie ophio-like virus 1]	50	2e-59
4	838	38	6.16	RdRp, partial [Wilkie ophio-like virus 1]	40	6e-37
5	609	46	10.14	TPA_exp: RNA-dependent RNA polymerase, partial [Tetrodontophora bielensis associated virus 1]	36	2e-29
6	631	16	3.74	RNA-dependent RNA polymerase [Beihai sesarimid crab virus 4]	42	8e-44
7	690	32	6.49	RdRp, partial [Wilkie ophio-like virus 1]	34	4e-32
8	566	20	5.03	hypothetical protein [Hubei qinivirus-like virus 1]	33	1e-12

先行研究において我々は、2017年8月に同一地点で捕集されたコガタアカイエカから12種のウイルスを見出している (Faizah et al., *Viruses*, 12; 264)。2017年のサンプルから見出されたウイルスと、本研究によって検出されたウイルスを比較した結果、2017年に検出されたウイルスのうち5種が2019年も同様に検出されたのに対し、2017年に検出された7種のウイルスは2019年のサンプルからは検出されなかった (図2)。また、2019年のサンプルからは、2017年のサンプルでは見出されなかった3種のウイルスが新たに検出された (図2)。実際、2017年のサンプルはコガタアカイエカ100頭分を用いているのに対し、2019年のサンプルは50頭分であるため、サンプルサイズが異なることにより両年間の直接的な比較はできないものの、コガタアカイエカの保有するRNAウイルス叢は、年単位で大きく変動している可能性が示唆された。

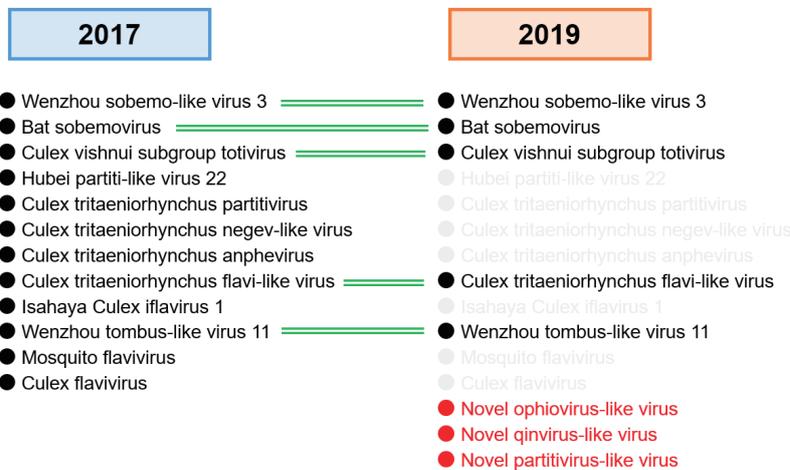


図 2 : 長崎県諫早市で捕集されたコガタアカイエカ RNA ウイルス叢の年次変動解析
2017年および2019年ともに検出されたウイルスを黒字で示す。また2019年に新たに検出されたウイルスは赤字で示した。

③成果の公表
該当なし

6. 自己評価

本研究では、2020年に長崎県諫早市の畜舎におけるコガタアカイエカの捕集調査を計画していたが、新型コロナウイルスの流行という予想外の事態により当初の計画を変更したものの、2019年に同一の地点で捕集されていたコガタアカイエカを解析の対象とすることによって、問題なく研究を進めることができた。本研究の結果として JEV3 株が分離され、その遺伝子解析を行ったところ、それら JEV 分離株は、前年の同一地点で捕集されたコガタアカイエカから分離された JEV 株と極めて近縁であることが判明した。このことから、諫早市の調査地点においては、安定した JEV の感染環が成立していることを本研究によって示すことができた。さらに、2019年に捕集されたコガタアカイエカの RNA ウイルス叢解析の結果、新規のウイルスを含めて 8 種のウイルスが見出された。この結果を、2017年に同時期かつ同一地点で捕集された同種の蚊のウイルス解析結果と比較した結果、コガタアカイエカの RNA ウイルス叢は、年によって大きく変動している可能性があることが、今回の解析から初めて明らかとなった。以上のように、JEV の流行状況やコガタアカイエカのウイルス叢の変動解析については、本研究で一定の成果を挙げることができた。

その一方で、当初計画していたコガタアカイエカ実験室系統への RNA ウイルス叢移植については、マイクロインジェクションの実験系が当初の思惑通りに速やかに確立できず、現在、その実験系を確立している段階にある。そのため、研究計画で予定していたコガタアカイエカのウイルス叢と JEV 感染における関連解析については、今後マイクロインジェクションの実験系を確立した後に、今回解析したサンプルをもとにして順次実施していきたいと考えている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ベトナムにおける疾病媒介蚊の新規殺虫剤抵抗性変異高効率探索
課 題 番 号：2020-Ippan-16
2. 代 表 者：糸川 健太郎（国立感染症研究所・主任研究官）
共 同 研 究 者：前川 芳秀（国立感染症研究所・主任研究官）
共 同 研 究 者：古谷 彰吾（国立感染症研究所・研究員）
3. 決 定 額：1,000 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

殺虫剤は疾病媒介蚊の防除に用いられる最も有効な資材の一つであるが、長年の過度の使用によって野外での抵抗性の選抜が生じることが問題となっている。殺虫剤抵抗性のメカニズムは様々であるが、最もよく用いられるピレスロイド系殺虫剤に関してはその標的タンパクである電位依存性ナトリウムイオンチャンネル（VGSC）の点突然変異による抵抗性（*kdr* 変異）が良く見られる。殺虫剤抵抗性は生物試験を用いて評価されてきたが、抵抗性変異を遺伝学的な観点から調べることににより個体レベルでその実態を詳細にまた把握することができる。

本研究では申請者らが開発した VGSC 遺伝子の高効率全長解析手法（Itokawa et al, 2019）を用いてベトナム都市部における主要な疾病媒介蚊（ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、ネッタイイエカ、等）を解析し、既知の *kdr* 変異の集団内頻度や新規の *kdr* 様変異を発見すること、また既知・新規の *kdr* 変異について野外集団における頻度や選択圧の有無を検証することを目的とする。

② 研究内容

ベトナム都市部において CDC トラップ及びヒト囹法を用いて疾病媒介蚊（ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、ネッタイイエカ、等）を採集する。採集した蚊について個体ごとに DNA を抽出し、インデックス付き NGS ライブラリを作成する。作成した NGS ライブラリについて申請者らがこれまでに開発したハイブリダイゼーションキャプチャープローブ（Itokawa et al, 2019）により VGSC 遺伝子コード領域の配列を選択的に濃縮し、国立感染症研究所の Illumina MiniSeq または iSeq100 を用いてシーケンス解析を行う。得られたリードデータを申請者らが開発した解析パイプライン MoNaS (<https://github.com/ItokawaK/MoNaS>) により解析し、農業害虫・衛生害虫等で特定されている *kdr* 変異のリストを参照し、これまで当該種では発見されていない新規の *kdr* 変異を特定する。また VGSC 遺伝子の SNPs 変異データから extended haplotype homozygosity (EHH) 等による自然選抜の検出といった集団遺伝学的解析を行う。

③ 予想される成果

VGSC 遺伝子は **32** 以上のエクソンからなる複雑な遺伝子であり、これまで *kdr* 変異の解析は既知の変異箇所を含む限られた領域を **PCR** で部分的に増幅して調べる手法が取られていた。そのような従来のアプローチでは、未だ見逃されている抵抗性変異が多く存在する可能性が高い。今回我々が適用する方法は、次世代シーケンサーを用いて **VGSC** の全コード領域を高効率・安価に解析することが可能であり、これまで知られていなかった新規の *kdr* 様変異を発見できると期待される。また、本研究で得られる集団の遺伝子型データは野外での選抜の有無や起源に関する情報を含んでおり、抵抗性発達の実態をより詳細に明らかにできると予想される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

2019 年末より発生した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の影響により、海外への渡航および海外からの入国に関して厳しい制限が課せられるようになった。2020 年 10 月までの時点で、本来の調査地であったベトナム国に関しても年度内における渡航・現地調査が困難であると判断した。そこで、当初の予定を変更し、ハマダラカ属 (*Anopheles*) 用の電位依存型ナトリウムチャンネル (**VGSC**) 遺伝子を効率的にシーケンス解析するためのハイブリダイゼーションプローブの開発とその性能試験を行うことにした。

現在公開されているゲノムアセンブリ *An. gambiae*, *An. farauti*, *An. funestus*, *An. atroparvus*, *An. albimanus* のゲノムアセンブリから、**VGSC** 遺伝子配列を **blast** ホモロジー検索で同定し、**exonerate** によるエクソン領域のより正確な遺伝子予測を行った。

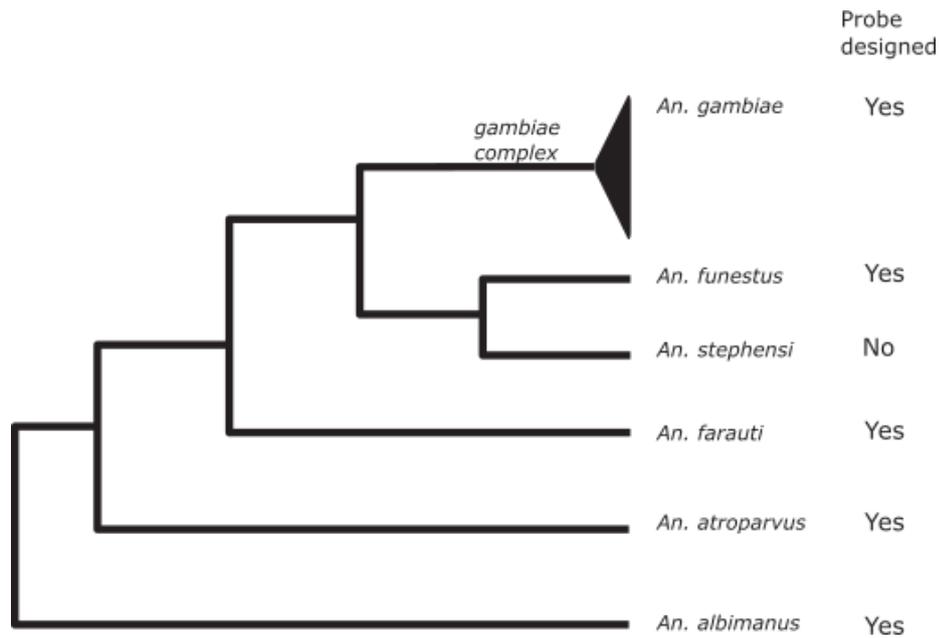


図1 本研究でプローブの設計および検証に使ったハマダラカ属蚊とその系統関係 Neafsey et al. (2015)より改変

ハイブリダイゼーションキャプチャープローブの設計方針としては、まず、*An. gambiae* VGSC 遺伝子の全エクソンをカバーするプローブを設計し、他の種については、*An. gambiae* と比較し、87.5%以上の相同性が無いエクソンについてのみ当該種の配列を基にしたプローブを設計した。また短いエクソン (<60-bp) については相同性の高さに関わらず、周辺のイントロン配列を含めた領域についてプローブを設計した (AnoVGSC.v1)。

プローブの性能を確かめるため、*An. stephensi* の蛹 (国立感染症研究所寄生物部 案浦博士から分与) から個体ごとにゲノム DNA を抽出し NGS ライブラリを作成した。これらのライブラリについて、AnoVGSC.v1 プローブセットを用いたハイブリダイゼーションキャプチャーを行い、シーケンスを行った。

② 成果 (結果+考察)

5種のハマダラカ属のゲノムアセンブリを用い、合計で333本の120-bp ビオチン結合オリゴヌクレオチド DNA プローブ (IDT 社 xGen カスタムプローブ) を設計し合成した。これらのプローブはデザインに用いた reference 種の解析では有効に機能すると期待されるが、その他のハマダラカ属の蚊 (non-reference species) について、VGSC 遺伝子の解析に使用することができるかどうかを検証するため、*An. stephensi* のゲノム DNA について NGS ライブラリの調製、ハイブリダイゼーションキャプチャーによる標的配列の濃縮、シーケンス解析を行った。

図2に示す通り、今回設計したプローブにより、標的とした VGSC 遺伝子が濃縮されていることを確認した。On-target 率は概ね 10-20%程度であった。

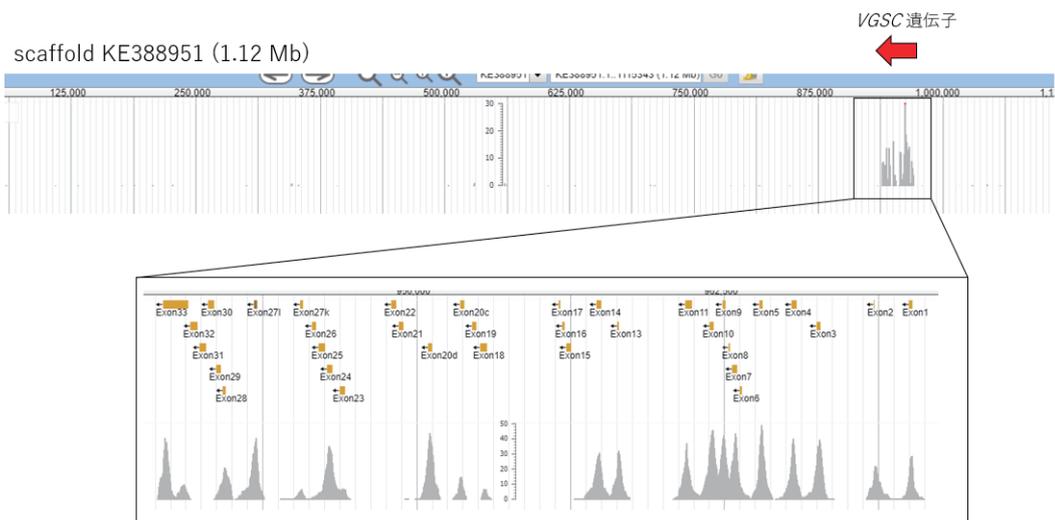


図2 VGSC 遺伝子周辺のアライメントカバレッジ

各エクソンのカバレッジを詳しく調べたところ、半数以上のエクソンについては、遺伝子型を判定するうえで十分なカバレッジが得られていたが、いくつかのエクソンについては、十分な量のリードが得られなかった（図3）。これは、設計に用いたハマダラカ属種と今回検証を行った種（*An. stephensi*）で VGSC 遺伝子の相同性の低さや、エクソン配列長の短さが関係していると考えられる。ハイブリダイゼーション条件の見直しである程度改善すると考えられるが、このようなケースに関しては、今回合成したプローブセットをベースとして、カバレッジが得られないエクソンについてのみスパイクインとして追加のプローブを加えることで解決できるかもしれない。ベースプライマーセットとスパイクイン方式は、様々な異なるハマダラカ属の種を解析する研究プロジェクトにおいて、それぞれの種について全てのプローブを合成するよりも解析コストを削減できると期待される。

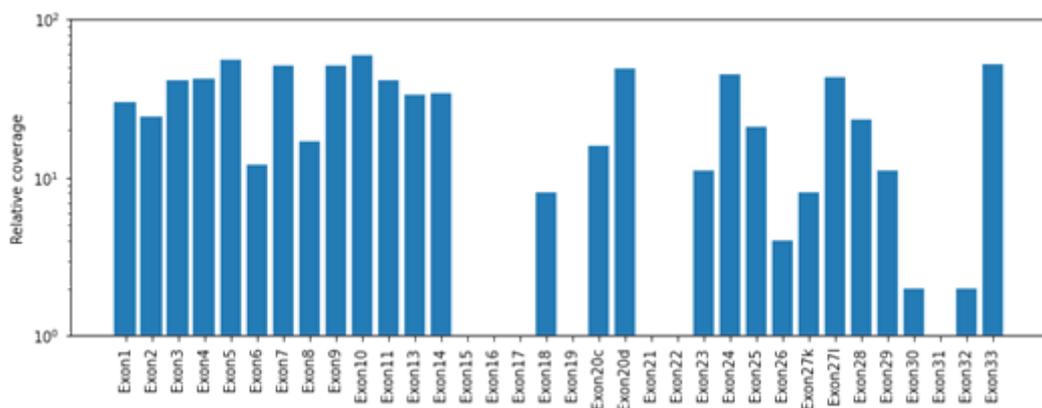


図3 VGSC 遺伝子各エクソンのカバレッジ

③ 成果の公表

無し

6. 自己評価

2019 年末より発生した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の影響により、当初予定していた研究計画を遂行することができなかった。計画を変更してからの期間が短かったとはいえ、今回デザインしたハイブリダイゼーションキャプチャープローブを *An. stephensi* 以外の種でも検証する実験や、ハイブリダイゼーション効率を最適化する実験を行うことができなかったことが悔やまれる。また、今回設計したプローブではキャプチャー効率の悪いエクソンが見られ、まだ改善する余地が残る。

一方で、プロトタイプとして、プローブ非設計参照種への一定以上の有効性が確認できたこと自体はある程度の評価できるだろう。同様のアイデアによる VGSC 遺伝子の解析法はナミカ亜科の蚊では既に実現し、新規の *kdr* 変異の発見に効果的に利用することができている（Itokawa et al, PLoS Negl. Trop. Dis. 2019, Sugimoto et al., Med. Entomol. 2021, Itokawa et al., Pest. Manag. Sci. 2021）。疫学的に重要なハマダラカ属の蚊においても、AnoVGSC.v1 を基により効率的なプローブセットの開発を進めることで殺虫剤抵抗性メカニズムのより詳細な解明につながると期待される。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：赤痢アメーバシスト形成に伴う細胞変化の電子顕微鏡解析
課 題 番 号：2020-Ippan-17
2. 代 表 者：見市（三田村）文香（佐賀大学・講師（特定））
共 同 研 究 者：吉田裕樹（佐賀大学・教授）
濱野真二郎（寄生虫学分野・教授）
坂口美亜子（共同研究室・助教）
3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) は、ヒトの大腸に感染しアメーバ赤痢を引き起こす病原虫である。発展途上国を中心に世界で年間約 5 千万人の感染者、10 万人の死者を出しているにもかかわらず、臨床薬に限られることから、病原性の解明、新規薬剤開発が喫緊の課題である。ヒトへの感染は“シスト”に汚染された食物や水の摂取によって引き起こされる。そのため“シスト形成”は、その阻害が赤痢アメーバの宿主間伝播の阻止、つまり感染拡大防止に繋がることから、治療という応用的側面から注目されてきた。しかしその分子機構はほとんど解明されていない。我々は、シスト形成の分子機構の解明を目指して研究を進めている。これまでにシスト形成の新規制御分子の 1 つとしてコレステロール硫酸 (CS) を見出した (Mi-ichi *et al*, *PNAS*, 2015; *PLoS Pathog*, 2016)。そして CS がシスト形成を制御する分子機構について、シストの形態そのものに影響を与える可能性を見出している (見市、未発表)。さらに、CS 合成経路の主要酵素 APS キナーゼを阻害する化合物 3 種類 (auranofin、A-D-11、A-H-11) を得た。これら各化合物は、原虫内の CS 合成を阻害、その結果シスト形成を停止させることを見出している (Mi-ichi and Ishikawa *et al*, *PLoS NTD*, 2019)。本申請研究では、熱帯医学研究拠点が提供する電子顕微鏡と共同研究室的坂口博士の協力を仰ぎながら、CS のシスト形成における機能解明を目指す。

② 研究内容

[1] シスト形成に伴う細胞の形態ならびに微細構造変化の経時的電子顕微鏡解析

栄養体からシストへの細胞分化過程で起こる形態・微細構造変化を電子顕微鏡により経時的に解析する。同時に、生細胞における変化を細胞集団としてモニターし、電子顕微鏡解析の結果と相関させる。具体的には、モデル生物である *Entamoeba invadens* を用いてシスト形成を誘導、我々が確立した“フローサイトメトリーによるシスト形成のステージ移行を観測する方法”で細胞集団の動きをモニターしながら、細胞を経時的に回収、電子顕微鏡解析を行う。さらに細胞の回収時間の間隔をより細

かくすることにより、生細胞の分化過程に相関して起こる形態ならびに微細構造変化の詳細な解析を行う。

⇒正常なシスト形成に伴う細胞形態ならびに微細構造変化を理解する。

[2] 培地中への CS 添加（細胞内 CS 量上昇を引き起こす）によるシスト形成細胞に与える影響の電子顕微鏡解析

シスト形成を異なる濃度の CS 存在下で進行させ、生細胞分化に与える影響をフローサイトメトリーにより、微細構造変化に与える影響を電子顕微鏡により、それぞれ経時的に解析する。また、添加するタイミングを変化させることにより、細胞内 CS 量増加に伴うシスト形成過程の変化についての知見の蓄積を図る。

[3] 培地中への CS 合成阻害剤（auranofin、A-D-11、A-H-11）の添加（細胞内 CS 量低下を引き起こす）によるシスト形成細胞に与える影響の電子顕微鏡解析

シスト形成を CS 合成阻害剤存在下で進行させ [auranofin、A-D-11、A-H-11 の阻害濃度に関する結果は取得済み（Mi-ichi and Ishikawa *et al*, *PLoS NTD*, 2019）]、[2] と同様フローサイトメトリーと電子顕微鏡解析を併用した経時的な解析により、細胞内 CS 量減少に伴うシスト形成過程の変化についての知見の蓄積を図る。この際、阻害剤処理による細胞内 CS 量の低下を代謝ラベル実験により定量的に確認する。

Auranofin、A-D-11、A-H-11 の阻害剤については、これまでそれぞれの阻害剤存在下でシスト形成を誘導すると、細胞が栄養体のまま 24 時間維持されること、24 時間以降では栄養体の分裂増殖が阻害され、結果的に細胞が死にいたることを見出している。これまで知見を有効に活用することにより、本申請研究目的への迅速な到達を目指す。

③ 予想される成果

我々が確立したフローサイトメトリーを用いたシスト形成過程の解析は、シスト壁の主成分であるキチンと生体膜構造を染色することで、シスト形成に伴い現れる多様な細胞集団を 2 次元展開することを可能にし、シスト形成のステージ移行をリアルタイムで見ることが出来る画期的な手法である。

本課題では、上記方法に電子顕微鏡解析を組み合わせることで、シスト形成に伴う細胞分化の形態変化ならびに微細構造変化を統合的に理解できる。また、細胞内 CS 量を人為的に制御（上昇・減少を引き起こす）できる実験系に乗せることにより CS のシスト形成過程における機能の解明の端緒となる成果が期待できる。

それに加え、CS 合成阻害を引き起こす auranofin、A-D-11、A-H-11 は、標的が赤痢アメーバの APS キナーゼであること、 μM オーダーで阻害効果を示すこと、ヒトの相同分子対して $100 \mu\text{M}$ の濃度で全く阻害効果を示さないこと、そしてその結果としてヒトの培養細胞の増殖に対しても全く影響を与えないことを見出している。以上のことから、選択毒性に優れた化合物であり、新規抗アメーバ赤痢薬創生のリード化合物として期待される（Mi-ichi and Ishikawa *et al*, *PLoS NTD*, 2019）。本申請研究を通して、これらの化合物のシスト形成過程に与える影響について分子論的説明が付与でき、さらには、新規抗アメーバ赤痢薬創生、最終的には世界の国際衛生上の問題で

ある寄生虫疾患対策に資する成果が期待できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

赤痢アメーバの培養株はシスト形成能を失っているため、*E. invadens* の *in vitro* の培養系を用いてシスト形成の解析を行っている。栄養体からシストへの細胞分化過程で起こる形態・微細構造変化を、電子顕微鏡観察により経時的に解析した。細胞の回収時間の間隔を細かくすることにより、生細胞の分化過程に相関して起こる形態ならびに微細構造変化の詳細な解析を行った。同時に、生細胞のステージ変化を我々が確立したフローサイトメトリーによる測定法を用いて観測した。

② 成果（結果+考察）

栄養体からシストへの細胞分化を誘導、4時間ごとに細胞を回収、電子顕微鏡解析を行った。結果、図1のような細胞の形態・微細構造の結果を得ることに成功した。

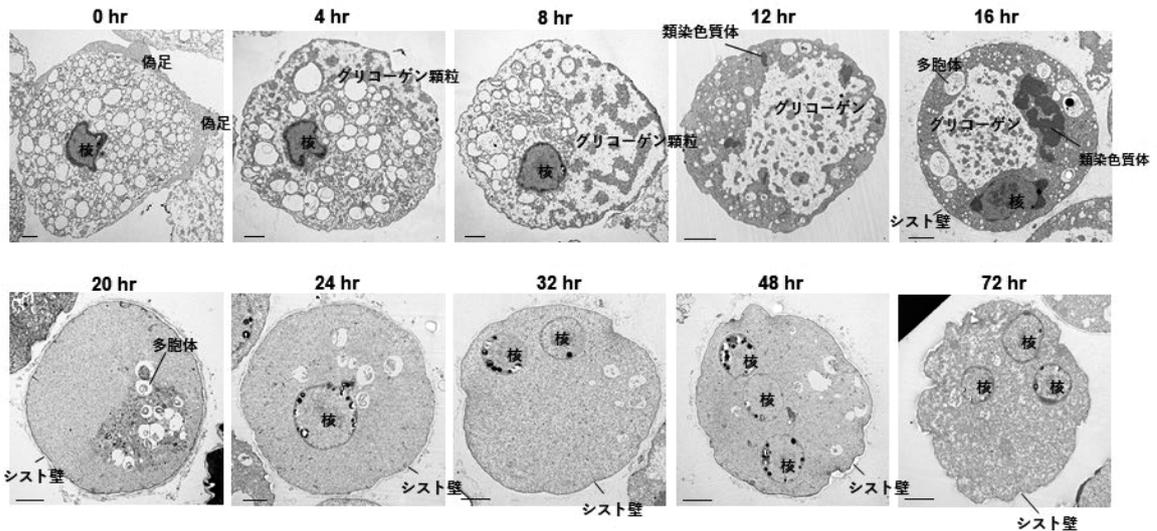


図1 シスト形成に伴う細胞の変化

(Mousa EAA, Sakaguchi M et al., Parasitology, 2020)

同時に生細胞のステージ変化を、フローサイトメトリーにより定量的にモニターした（図2）。

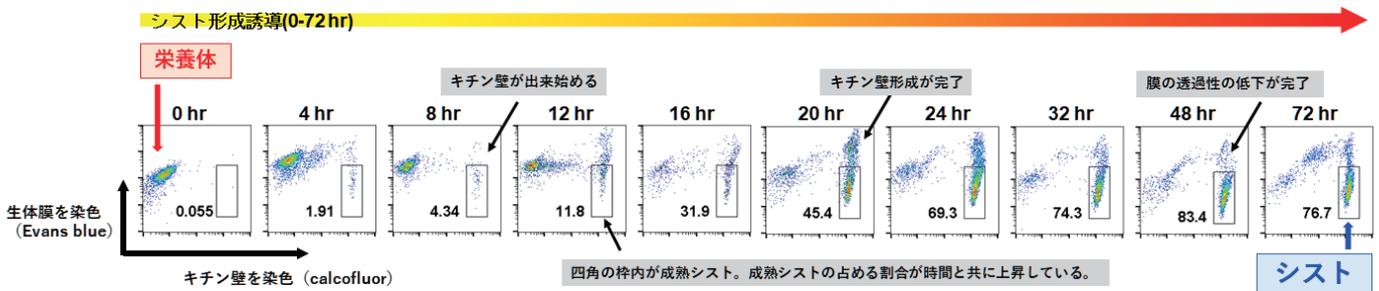
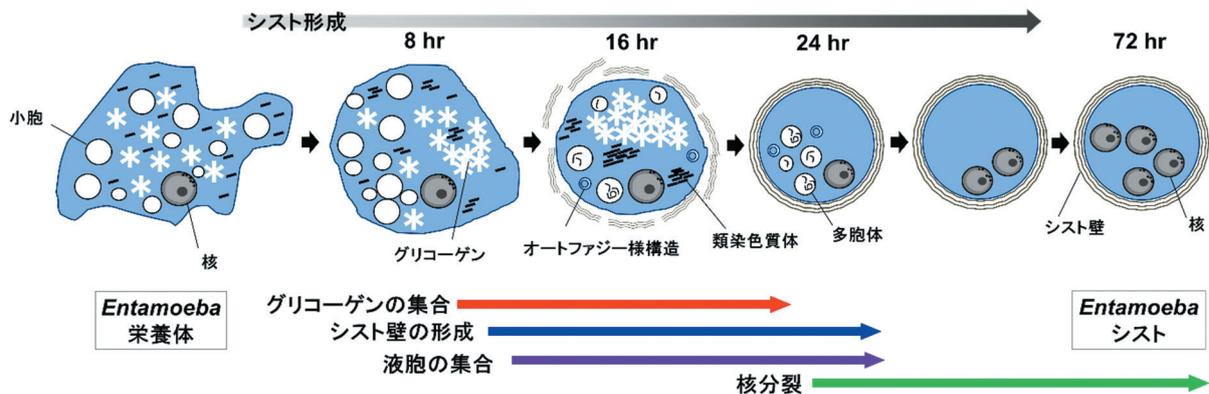


図2 生細胞のステージ変化をフローサイトメトリーにより測定

以上の結果から、グリコーゲン顆粒の集合が誘導 4-8 時間後に開始されること、誘導 8 時間後にキチン繊維が細胞表面に形成され始め、シスト壁の形成が誘導 20 時間後に完了すること、また貪食胞の集合が誘導 8-12 時間後に開始されること、核の分裂が誘導 24 時間後に開始されることを見出した。これらの事象が連続的に起こることで栄養体からシストへのダイナミックな形態変化が成し遂げられていることが明らかになった。



③ 成果の公表

論文

1. Mousa EAA[#], Sakaguchi M[#], Nakamura R, Abdella OH, Yoshida H, Hamano S^{*}, Mi-Ichi F^{*}. The dynamics of ultrastructural changes during *Entamoeba invadens* encystation. *Parasitology*. 147(12):1305-1312.2020. (#Equally contributed to this article) (*Corresponding authors)

学会発表

1. Eman Abdelazeem Abuelwafa Mousa、坂口美亜子、中村梨沙、吉田裕樹、濱野真二郎、見市文香. 「*Entamoeba* シスト形成に伴う形態変化の経時的解析」
第 90 回日本寄生虫学会・第 32 回日本臨床寄生虫学会合同大会 (奈良)
2021 年 4 月 16-17 日

6. 自己評価

これまで断片的な情報のみであった、*Entamoeba* のシスト形成に伴う細胞の微細構造の変化を、回収時間の間隔を細かく経時的に観察することで、細胞内小器官の経時的な変化を明確にすることに成功した。そして栄養体からシストへのダイナミックな形態変化が成し遂げられていることを明らかにした。これらの成果は、学術論文として既に発表済みである (Mousa EAA, Sakaguchi M et al, *Parasitology*, 2020)。さらに、得られた結果を基に、CS がシスト形成に与える影響についても解析を継続している。一方で、新たな研究展開として、新規阻害剤の取得に成功、シスト形成に与える影響を形態学的に解析した (論文投稿中)。以上、十分に満足できる成果が挙げられたと考えている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：亜熱帯・熱帯植物由来の抗マラリア薬の探索研究
課 題 番 号：2020-Ippan-18

2. 代 表 者：松浪 勝義 (広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 教授)
共 同 研 究 者：金子 修 (長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 教授)
矢幡 一英 (長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野 助教)
Ben Yeddy-Abel Chitama (長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野
・特任研究員)
Melanny Ika Sulistyowaty (Airlangga University, Indonesia)
杉本 幸子 (広島大学 大学院医系科学研究科 薬用植物園 准教授)
山野 喜 (広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 助教)
Nguyen Hoang Uyen (広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生)
尾崎 葵 (広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 大学院生)
山口 卓朗 (広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 大学院生)
早川 碧 (広島大学 大学院医系科学研究科 生薬学 大学院生)
大塚 英昭 (安田女子大学薬学部 天然物化学 教授)
川上 晋 (安田女子大学薬学部 天然物化学 助教)
菅沼 啓輔 (帯広畜産大学原虫病研究センター 助教)
麻田 正仁 (帯広畜産大学原虫病研究センター 准教授)

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的：天然資源からの抗マラリア活性化合物の探索

研究対象とする亜熱帯・熱帯植物として、当研究室に保有する沖縄産植物と現在入手準備を進めているマダガスカル産植物を主に使用する。沖縄は早くから周りを海洋に囲まれ、独自の植生が保たれていること、また、温帯域である本州等とは異なり亜熱帯性気候であり、わが国における固有植物種の宝庫となっている。一方、マダガスカルは、東ゴンドワナ大陸から分離後、現在の位置に到達するまで孤立した島であり続けたことから、固有種が 80%以上と世界的に最も重要な植物資源を保有する地域の一つである。そのため、これらの植物資源について詳細に天然物化学的な解析を行うことは新たな有用化合物の発見につながりやすい。これまで、培養の容易なリーシュマニア原虫を用いて活性化合物の探索研究を行ってきたが、世界中の亜熱帯・熱帯地域、特に我々と関係の深い東南アジアで流行しているマラリアの制御は重要な課題である。そのため、共同研究によってマラリアに関する活性評価ができれば両研究グループにとって有益であり、また双方の研究の効率化につなが

ることが期待される。本研究によって医薬品のシード（種）になる化合物を見つけることができれば原虫感染症の制御に大きな役割を果たすことになる。

② 研究内容

①R2: 成分研究に必要な植物資源の確保（広島大）。現在保有する 200 種余りの沖縄産植物のほか、マダガスカル産植物サンプルについては現地の共同研究者と MTA を交わし、ABS 対応（PIC/MAT 申請）を行ったのちに、順次、必要量の入手を継続する。

②R2: 成分研究に必要な量の微生物培養物の用意（広島大）。土壌放線菌やエンドファイトの分離株を 60 余り保有している。これらについても少量培養および成分検索のための大量培養を行う。

③R2-R3: 熱帯熱マラリア原虫を用いたアッセイ系による活性評価（長崎大熱研）。現在保有している 200 種余りの沖縄産植物や入手予定の約 40 種のマダガスカル産植物サンプルについて活性を評価する。熱帯熱マラリア活性評価は長崎大熱研にて行う。

④R2-R3: 化合物の分離・精製、化学構造解析（広島大）

活性試験の結果に基づき分離・精製を行い活性本体の単離を行う。得られた化合物の化学構造は NMR, MS などのスペクトルデータ解析や改良 Mosher 法などの化学的方法により決定する。

③ 予想される成果

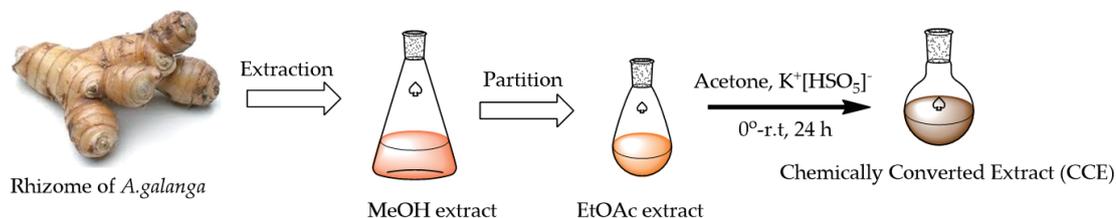
本研究を推進すれば、未解析亜熱帯・熱帯植物の含有化学成分の詳細が明らかになるほか、研究対象植物の薬学的有用性が明らかになる。また、単離・精製した化合物から、これまででない新規医薬品候補化合物の発見ができれば、それをシーズとして多種多様な関連化合物への創薬展開につながることを予想され、マラリア原虫等の治療薬の開発に大きな恩恵をもたらすことが期待される。

現在、日本ではこれらの原虫感染症はほとんど問題にならないが、急速なグローバル化や地球温暖化によるベクター昆虫の北限の拡大により、将来、脅威となる可能性がある。本研究はそれらの脅威への対策として医薬学上の重要性がある。また、現在の主な感染地帯は東南アジア・アフリカなどの熱帯域であり、これらの多くの国は経済発展途上のため、我々先進国の研究者が創薬につながる研究をすることで将来的に多くの患者を救うことにつながれば、国際的貢献の面でも計り知れない波及効果がある。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

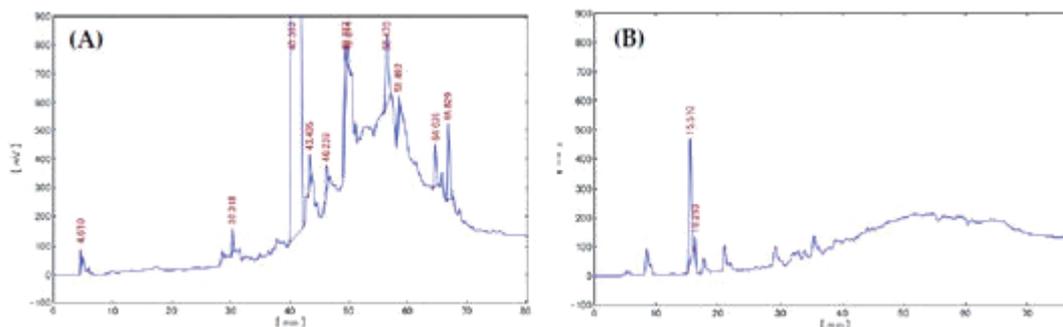
本研究ではショウガ科植物であるナンキョウ（南薑、*Alpinia galanga*）を研究材料とし、その根茎（2.0Kg）を MeOH で抽出、酢酸エチルへと分配し、さらに過硫酸水素カリウムで処理することで化学反応による多様性拡大抽出物を得た（下図）。



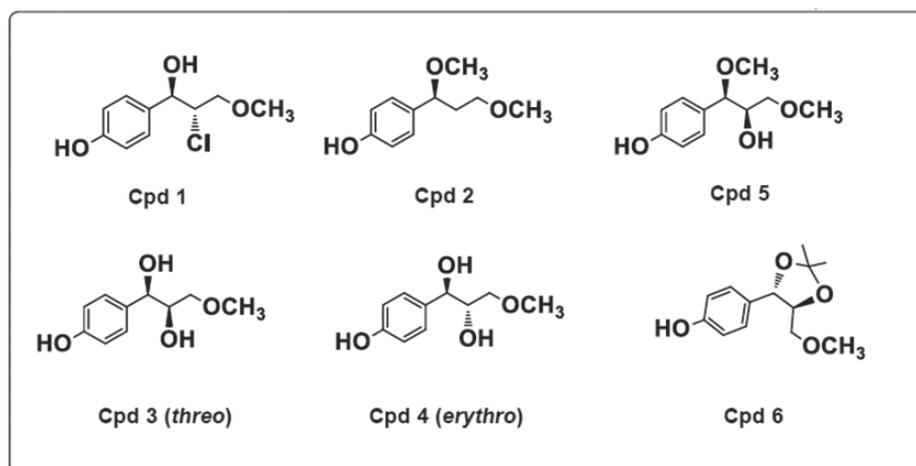
化学成分の単離精製はシリカゲル（Merck）、ODS（ナカライテスク；35×350 mm）、HPLC（GLサイエンス、Inertsil ODS-3, 6×250 mm）、示差屈折率検出器（Jasco RI-930）を使用して行った。単離した化合物のスペクトル測定には、旋光度計（Jasco P-1030）、赤外線吸収スペクトル（Horiba FT-710）、紫外線吸収スペクトル（Jasco V-520）、核磁気共鳴吸収スペクトル（Bruker Ultrashield 600）、高分解能質量分析スペクトル（LTQ Orbitrap XL）を使用した。その他、使用した有機溶媒や試薬類は和光純薬および東京化成から入手した。

② 成果（結果＋考察）

調製した多様性拡大抽出物について、化学反応の前後でリーシュマニア原虫に対する活性を評価したところ、反応後に活性が大きく増強していたことから、生じた誘導体に興味をもたれた。そこで、含有成分を HPLC 分析したところ、下図 (A) 反応前と (B) 反応後で HPLC クロマトグラムが大きく変化しており、何らかの誘導体が生じたことが示された。



活性を指標に種々のカラムクロマトグラフィーにより分画を進め、最終的に 10 種の化合物の単離に成功した。それらの化合物の化学構造を質量分析スペクトル、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトルで解析することで、以下の



6 種の新規化合物と 4 種の既知化合物を単離することに成功した。得られた化合物についてリーシュマニア、トリパノゾーマ、マラリア原虫に対して活性を評価した。

Table 1. IC₅₀ of the isolated compounds against parasites (Mean ± SE, µg/mL, n=3).

Compounds	<i>L. major</i>	<i>T. brucei gambiense</i>	<i>T. brucei rhodesiense</i>	<i>P. falciparum</i>
1	>100	4.20 ± 0.78	5.62 ± 1.46	>100
2	27.83 ± 0.34	23.66 ± 0.87	26.85 ± 2.20	>100
3	>100	79.59 ± 0.90	77.80 ± 11.01	>100
4	>100	71.54 ± 0.52	73.57 ± 1.67	>100
5	70.33 ± 0.10	84.54 ± 1.23	80.44 ± 4.91	>100
6	87.60 ± 1.50	38.84 ± 0.92	40.47 ± 3.36	>100
7	0.37 ± 1.37	3.18 ± 0.09	3.27 ± 0.33	>100
8	51.10 ± 1.19	15.08 ± 0.39	18.01 ± 1.27	>100
9	40.55 ± 0.95	28.37 ± 0.56	30.94 ± 2.28	>100
10	>100	>100	>100	>100
Positive control	7.47 ± 0.30 (Miltefosine)	1.32 ± 0.68 (Nifurtimox)	1.25 ± 0.46 (Nifurtimox)	2.64 ± 0.29 (Dihydroartemisinin)

リーシュマニアやブルース・トリパノゾーマに対してヒドロキノン (7) が良い活性を示し、また、新規化合物 (1) はブルース・トリパノゾーマに対して強い活性を示した。今回単離した化合物にはマラリア原虫に対して活性を示すものはなかったが、トリパノゾーマ科とプラスモジウム科の種差に起因する可能性があり興味深い結果となった。

③ 成果の公表

Six New Phenylpropanoid Derivatives from Chemically Converted Extract of *Alpinia galanga* (L.) and Their Antiparasitic Activities

Melanny Ika Sulistyowaty, Nguyen Hoang Uyen, Keisuke Suganuma, Ben-Yeddy Abel Chitama, Kazuhide Yahata, Osamu Kaneko, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Susumu Kawakami, Hideaki Otsuka and Katsuyoshi Matsunami

Molecules 2021, **26**(6), 1756; <https://doi.org/10.3390/molecules26061756>

6. 自己評価

継続的なコロナウイルス感染症対策のため、研究活動も我慢を強いられる状態が続いているが、本年度は共同研究を行ってきた内容について国際学術論文の掲載をするにいたったことは大いに評価している。また、試行錯誤しつつ進めてきた共同研究の方法も上手く機能しており、今後も大いに期待ができる。R3年度も双方にとって利益ある共同研究ができるものと考えている。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

2020 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Genetic diversity of dengue virus and associated clinical severity among dengue patients

Project number : 2020 – Ippan – 19

- 2 . Principal investigator : (affiliation/position)

Associate Professor Dr. Neoh Hui-min (Universiti Kebangsaan Malaysia / Senior Research Fellow)

Joint researcher(s) : (affiliation/position)

1. Dr. Nor Azila Muhammad Azami (Universiti Kebangsaan Malaysia / Research Fellow)
2. Dr. Petrick Periyasamy (Universiti Kebangsaan Malaysia / Infectious Diseases Physician)
3. Dr. Najma Kori (Universiti Kebangsaan Malaysia / Infectious Diseases Physician)
4. Dr. Mahrnissa Mahadi (Universiti Kebangsaan Malaysia / Postgraduate Registrar)
5. Dr. Sharifah Azura Salleh (Universiti Kebangsaan Malaysia / Pathologist)
6. Associate Professor Dr. Noor Zetti Zainal Rashid (Universiti Kebangsaan Malaysia / Pathologist)
7. Dr. Siti Norlia Othman (Universiti Kebangsaan Malaysia / Pathologist)
8. Dr. Noraidatulakma Abdullah (Universiti Kebangsaan Malaysia / Research Fellow)

- 3 . Amount decided : 600,000 yen

- 4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

Dengue fever is a major public health treat in the tropics. The spectrum of DENV infection ranges from undifferentiated dengue fever, dengue without warning signs, dengue with warning signs to severe dengue. The infection can sometimes lead to fatality. Malaysia is a dengue hyper-endemic country where dengue fever cases continue to increase every year. All four serotypes of DENV (DENV1-4) co-circulate in Malaysia. Recent studies reported that each DENV has distinct clinical manifestation; infection with DENV2 and DENV3 are often associated with severe dengue compared to infection with DENV1 and DENV4. As such, it is hypothesized that virological factors play an important role in dengue pathogenesis.

In UKM Medical Center (UKMMC), our hospital had a total of 2,432 suspected cases of DENV in 2019 alone. As the UKMMC is a major hospital in Malaysia, using our unique cohort, we had previously determined that 15% (365/2432) of the DENV suspected cases were positive for DEN NS1 antigen. However, there is a need to characterize these virus strains. In addition to surveillance to determine the dominant DENV serotype that is in circulation, it is important to determine the virological and molecular characteristics of DENV strains that were causing epidemic in Malaysia and neighboring regions. This study aims to characterize DENV serotypes in Malaysia, and better understand the association between virological factors and dengue clinical manifestations. The study is expected to provide insights on (1) recent dengue situation in Malaysia and (2) the relationship between dengue viral phenotypes/genome sequences and disease outcome (severe vs mild dengue). The results will be relevant towards a better understanding of dengue disease pathogenesis and contribute to disease control strategies in the region.

(2) Research content

<Malaysia Study Site>

a) Research and ethics approval application

Research and ethics approval for this study will be obtained from UKM Medical Research and Innovation Secretariat and UKM Research Ethics Committee.

b) Sample collection

Sample collection will be carried out from July 2020 (on-going sample collection). Plasma samples from UKMMC patients that were tested positive for NS1 antigen will be obtained from the Department of Laboratory Diagnostic Services, UKMMC.

c) Viral RNA isolation, flavivirus screening and DENV serotyping

Viral RNA of dengue virus will be extracted from plasma by using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen Inc., USA). Viral RNA will be screened for arboviruses using heminested reverse transcription-PCR assay (Scaramozzino et al. 2001). DENV serotyping will be performed using sanger sequencing (Ito et. al, 2004).

d) Determination of viral RNA copy number (viral load)

Viral RNA copy number will be determined using quantitative Taqman real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) as published previously (Ito et. al 2004).

e) Data analysis

Phylogenetic relationship between isolated viruses will be determined using the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software (Penn State University, USA). Statistics will be analysed using SPSS (IBM, USA) and GraphPad Prism (GraphPad Software, USA).

<Japan Study Site>

a) Virological characterization of samples.

- (i) Virus isolation using a novel and sensitive cell culture method
- (ii) RNA isolation, cDNA synthesis for molecular analyses
- (iii) viral genome analyses using conventional sequencing method and next generation sequencing
- (iv) viremia titration using real-time PCR and plaque assay

b) Assist in the development of database and providing feedback on the analyzed data

(3) Expected results

This project addresses several issues of central importance to the control of dengue. Those include: (1) the dengue epidemic situation in Malaysia, (2) how viral phenotypes differ in different target cells, (3) how these differences lead to different disease outcomes in some cases but not others (severe disease vs dengue). These studies will show how infection by different viral phenotypes can lead to severe disease, affects factors for the emergence of epidemic, and also will reveal novel strategies for effective vaccines and therapeutics for disease control. The research collaboration between Japan and Malaysia research counterparts is expected to provide a foundation to identify those at risk for severe dengue and to develop relevant strategies relevant.

This is the first study to initiate molecular characterization of DENV serotypes in UKMMC dengue patients. By the end of this study, DENV serotypes in UKMMC patients, their prevalence and associated clinical presentation will be known. This study is the first in a series of dengue molecular surveillance in UKMMC to build a dengue big data base for the hospital and the nation. Through an exchange of scientists, the proposed project is designed for the research counterparts to complement each other and for synergistic collaboration to work on epidemiology, molecular biology, viral genomics, with a final goal of developing innovative strategies for dengue disease control. This proposal focuses on the specialty of each research counterpart, and aims to provide a platform to bring coordinated

efforts and productive interaction by leveraging on the activities of the Asia-Africa Research Center for Infectious Disease, Institute of Tropical Medicine.

5. Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

Research and ethics approval application

Research and ethics approval for this study has been obtained from UKM Medical Research and Innovation Secretariat and UKM Research Ethics Committee (16th April 2020).

Sample collection

Sample collection has been carried out from July 2020 (sample collection is still on-going). Plasma samples from UKMMC patients that were tested positive for NS1 antigen will be obtained from the Department of Laboratory Diagnostic Services, UKMMC.

Viral RNA isolation, flavivirus screening and DENV serotyping

Viral RNA of dengue virus will be extracted from plasma by using the QIAamp Viral RNA kit (Qiagen Inc., USA). Viral RNA was screened for arboviruses using heminested reverse transcription-PCR assay (Scaramozzino et al. 2001).

(2) Results (results & observations)

Ethical approval for this study has been granted by the institutional review and ethics board of Universiti Kebangsaan Malaysia on 16th April 2020 (FF-2020-176). However, due to the COVID-19 pandemic which is still ongoing, the study site for this investigation (UKMMC) has been designated a COVID-19 hospital since March 2020. This causes the transfer of most non-COVID 19 patients, such as those having dengue to other hospitals in the city, and contributed to a delay in sample collection, which is currently on going.

Nevertheless, in a related supplementary study, on differences between seroprevalence of dengue IgG antibody among healthy Malaysia adults living in urban and rural areas, the results from a total of 2598 serum samples (1417 urban samples, 1181 rural samples) showed that the prevalence of dengue was 85.39% in urban areas, and 83.48% in rural areas (Azami et. al 2020). The positive

correlation of age and dengue IgG seropositivity indicates continuous exposure to dengue in the Malaysian adult population. In dengue IgG positive serum samples, 98.3% of the samples had neutralizing antibodies against DENV3, but only 70.97% of them had neutralizing antibodies against DENV4.

In addition, in a separate study investigating the extent of Zika virus infection in healthy Malaysia adults prior to the re-emergence of the zika virus in Asia Pacific before 2016, the seroprevalence of Zika IgG and IgM were 11.50% and 5.26%, respectively (Azami et. al 2021, unpublished). A total of 6 participants were positive for both Zika IgM and IgG antibodies.

Reference

1. Nor Azila Muhammad Azami, Meng Ling Moi, Sharifah Azura Salleh, Hui-min Neoh, Mohd Arman Kamaruddin, Nazihah Abdul Jalal, Norliza Ismail, Tomohiko Takasaki, Ichiro Kurane, Rahman Jamal, Dengue epidemic in Malaysia: urban versus rural comparison of dengue immunoglobulin G seroprevalence among Malaysian adults aged 35–74 years, *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Volume 114, Issue 11, November 2020, Pages 798–811

(3) Announcement of results

As the sample collection is still ongoing, we are not able to generate preliminary results for this project, for now.

6 . Self-evaluation

Due to the current pandemic, UKMMC, designated a COVID-19 hospital, has to cater to COVID-19 patients. Therefore, the sample collection for dengue patients has halted, as dengue patients are not referred to HUKM. Nonetheless, we are constantly reminding the Infectious Diseases Physicians in our research team about the need for sample collection, should any dengue patient be admitted. We will try to catch up on the timeline once the current COVID-19 wave in Malaysia is over.

7. Attainment level

- I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)
- II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)
- III (The expected results were attained with full satisfaction.)
- IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：住血吸虫の *in vitro* ライフサイクルの実現に向けて
課 題 番 号：2020-Ippan-20
2. 代 表 者：王寺 幸輝（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授）
共 同 研 究 者：吉川 正英（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教授）
島田 賢子（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教務職員）
北村 知嵩（奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 大学院生）
濱野 真二郎（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 教授）
3. 決 定 額：800 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

中間宿主を介さない住血吸虫発育法、即ち、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発を本研究の目的とする。住血吸虫症は、世界で 2 億人以上の罹患者を有する世界三大寄生虫病の 1 つである。住血吸虫症の病原体「住血吸虫」は、淡水に生息する巻貝を中間宿主とし、終宿主には経皮感染する。世界的には特効薬プラジカンテル PZQ による集団薬剤投与 MDA と住民への啓発活動による疾患制御策が用いられているが、完全な制圧には本邦での日本住血吸虫症の撲滅にみるように中間宿主に着目し、住血吸虫のライフサイクルを断ち切ることが肝要である。しかるに、中間宿主内における発育機構は未解明な点が多く、ゆえに培養系による中間宿主内発育の具現化は世界でも誰も実現できていない。我々は、本申請研究にて、中間宿主（貝）由来細胞抽出成分を用いることで住血吸虫の中間宿主内発育の *in vitro* 実現を目指す。

② 研究内容

住血吸虫モデルとして Manson 住血吸虫 *S. mansoni* および中間宿主の巻貝 *B. glabrata*（プエルトリコ産）を用い（何れも熱帯医学研究所・寄生虫学分野より入手）、実験室内で動物（ICR マウス）に感染させ、基盤となるライフサイクルを維持する。*B. glabrata* よりタンパク抽出成分（P-BGP）を調整し、*S. mansoni* 感染マウスより誘導したスポロシストに P-BGP を添加することで *in vitro* 培養を行う。スポロシストからセルカリアへの成長を認める条件をスクリーニングすることで、発育促進因子を特定する。また、*B. glabrata* の生育環境が、スポロシストからセルカリア成長に影響するのかを精査するため、各施設（熱研・寄生虫学および奈良医大）で維持されている *B. glabrata* より抽出したタンパク成分（P-NG-BGP、P-NA-BGP）を *in vitro* 培養系へ添加し、それらの再現性、あるいは差異を検証する。更に、ヒ

トと貝の間での感染伝播が実際に成立している環境の *S. mansoni* 媒介貝からもタンパク質を抽出することで、*in vitro* 培養系の検証を行う。具体的には、アジア・アフリカ感染症研究施設の1つであるケニア拠点 (Mbita station) 周辺に存在する *S. mansoni* 媒介貝を採取し、その抽出タンパク (K-BGP) をスポロシストに添加することで同様の (または異なる) 効果を精査する。また、長崎大学動物実験施設内に設置された2光子励起顕微鏡を熱研との共同研究に活用することで、*in vitro* 培養系により発育する *S. mansoni* を精査し、最終的には、*in vitro* で発育させたセルカリア幼虫の感染能をマウスへの感染実験によって立証し、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の確立を目指す。なお、熱研・寄生虫学で維持されている *B. glabrata* より抽出するタンパク成分 (P-NG-BGP) は、熱研との共同研究により実施可能となり、ケニア産感染貝および抽出タンパク質 (K-BGP) の採取には、ケニア拠点 (Mbita station) への渡航・フィールド活動が必要となり、また、研究進捗状況の打ち合わせを長崎大学・熱研および奈良県立医科大学で行う予定である。

③ 予想される成果

現在まで報告されている住血吸虫 (症) の研究は、各幼虫、成虫ステージの形態や遺伝子解析、感染後の免疫を含む病態解析等であり、これらの研究は個々のステージでの解析に限定され、虫体自体の連続的解析は不可能であり、特に無性生殖ステージは“中間宿主”である『巻貝』を用いることが必須の条件となる。ライフサイクルを考えた場合、“中間宿主”は、研究を煩雑にするばかりでなく、ブラックボックス化する傾向もあり、“中間宿主”そのものをターゲットにすること自体が嫌厭されてきた傾向がある。すなわち、本研究で提案する中間宿主を用いずに発育できる方法論にチャレンジした研究報告は、これまで皆無であり、本研究で考案した『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発こそが、住血吸虫の人工的な発育を可能にすると考えた。本開発により、住血吸虫研究を簡素化・透明化し、発育阻害薬剤の開発への手がかりを得、また、貝を駆除せずして感染制御を実現することにも繋がる事が予想される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

■ マンソン住血吸虫ライフサイクルの維持・研究材料

マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) は、*S. mansoni* ミラシジウムを感染させた淡水巻貝 (*B. glabrata*) より遊泳させたセルカリアを ICR マウスに再感染させた。8 週間後、摘出した肝臓より *S. mansoni* 虫卵を回収し、孵化させたミラシジウムを再度、*B. glabrata* に感染させ、実験室レベルでライフサイクルを維持した。なお、全ての感染実験は奈良県立医科大学の感染動物実験施設内で行った。

■ マンソン住血吸虫ミラシジウム／スポロシストの *in vitro* 培養

S. mansoni 感染マウス肝臓より摘出後、虫卵を精製し、ミラシジウムの培養とスポロシストへの転換可能な *in vitro* 条件を試みた。培養条件としては、培養液以外に、CO₂濃度、温度をパラメーターとして検討した。

■ マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物 (BGP) の影響

未感染 *B. glabrata* より全組織あるいは各種臓器 (頭足 HF、櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝臓・卵精巣 HPOT) に分割し (Fig. 1)、セラミックビーズにより組織粉碎し、遠心分離後の上清分画を貝由来抽出物 (BGP) とした。ミラシジウムの *in vitro* 培養系に BGP を添加培養し、培養後のミラシジウムの形態、動態 (viability) を調べることで、BGP の影響を精査した。

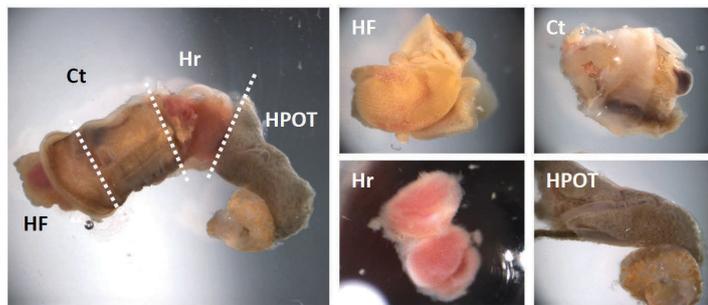


Fig. 1. 貝の臓器分割

■ 蛍光標識マンソン住血吸虫を用いた中間宿主 (貝) 内の動態解析

S. mansoni 虫卵あるいはミラシジウムを種々の蛍光標識剤 (Hoechst33342, PKH-Red, CFSE) を用いて標識後、*B. glabrata* への感染を蛍光実体顕微鏡によりモニターすることで感染動態をリアルタイムで観察・撮影した。

② 成果 (結果+考察)

■ マンソン住血吸虫ミラシジウム／スポロシストの *in vitro* 培養

S. mansoni 感染マウス肝臓より摘出・精製した虫卵から孵化させたミラシジウムを滅菌水 (SW) あるいは種々の培養液 (RPMI、DMEM、BgeM 等) により培養し、スポロシストへの変換を試みた。その結果、BgeM のみが母スポロシストに転換可能であり (Fig. 2)、血清 (FBS) 添加による viability への影響も認めた (至適濃

度は 10%)。また、温度 (20℃～37℃) の違いによりミラシジウムの運動性低下、萎縮を認め、至適温度は 28℃であった。更に、CO₂条件 (7%、5%あるいは大気) を変化させた場合、母スポロシトへの転換や viability に影響は認められなかった。

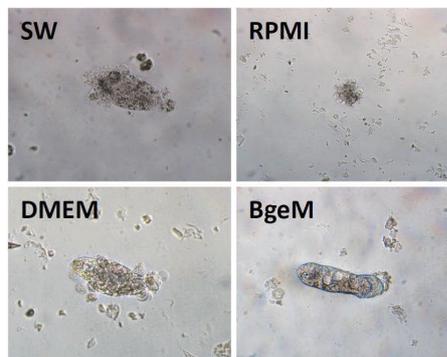


Fig. 2. 種々の培養液による *in vitro* 培養の影響

■ マンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における貝由来抽出物 (BGP) の影響

未感染 *B. glabrata* より全組織 (all) あるいは各種臓器 (頭足 HF、櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝脾臓・卵精巣 HPOT) 由来抽出物 (BGP) を調製し、ミラシジウムの *in vitro* 培養系に各種 BGP を添加培養し、7 日間培養後のミラシジウムの形態を観察した。その結果、無添加 (none) あるいは Ct、Hr 添加では、スポロシトの運動停止、萎縮を認めた。一方で、全組織 (all) あるいは HPOT 由来 BGP では低運動性であったが、HF 由来 BGP では高い運動性を維持し、萎縮も殆ど認められなかった (Fig. 3)。

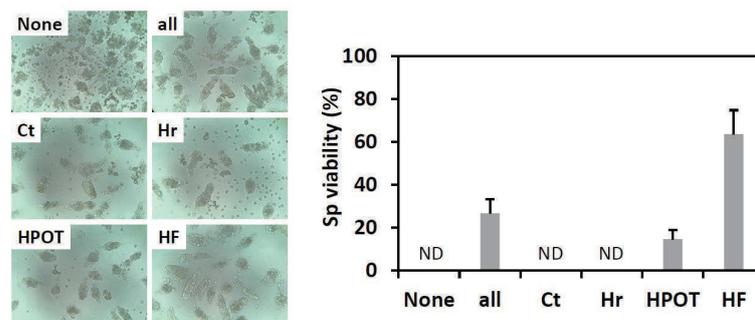


Fig. 3. *in vitro* 培養によるスポロシトの形態と運動率

■ 蛍光標識マンソン住血吸虫を用いた中間宿主 (貝) 内の動態解析

S. mansoni 虫卵あるいはミラシジウムを蛍光標識剤を用いて標識した。その結果、ミラシジウムを CFSE により標識することが最も観察に適していることを明らかにした。また、貝への感染初期をリアルタイムで追跡可能であることも判明し、これまでの知見と同一の成績を得ることができた。

③ 成果の公表

1)

第 90 回 日本寄生虫学会・第 32 回 日本臨床寄生虫学会 合同大会

(2021 年 4 月、奈良市)

「蛍光標識住血吸虫による貝感染におけるリアルタイム可視化の試み」

○王寺幸輝¹、濱崎めぐみ²、三須政康¹、北村知嵩¹、尾崎大輔¹、島田賢子¹、
濱野真二郎²、吉川正英¹ (¹奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学、²長崎大
学 熱帯医学研究所 寄生虫学)

2)

“古くて新しい” 住血吸虫症

王寺幸輝、吉川正英

週間 医学のあゆみ (医歯薬出版株式会社)、2021、in press.

また、上記の成績をまとめ論文執筆を進めている。

6. 自己評価

中間宿主を有する寄生虫のライフサイクルを実験室レベルで実現するには、宿主(中間宿主、終宿主)の維持や感染実験など多数の過程を必要とする。また、一般的に、中間宿主体内における寄生虫の発育状況の観察や解析は容易ではない。我々は本研究において、住血吸虫をモデルとした *in vitro* ライフサイクルの実現を目指して、中間宿主(貝)を使用しない培養系での発育実現を試みた。

まず、住血吸虫の *in vitro* 培養系確立のために、無性生殖ステージのミラシジウムからスポロシストへの変換に高効率の培養条件を検討し、10%FBSを含むBgeMを用い、28℃での培養系が最適であることを明らかにし、再現性も得ることができた。また、*B. glabrata* 由来抽出物(BGP)添加条件により、スポロシストへの変換、運動性等の影響を調べ、HF(頭足部位)由来BGPが最も効果的であり、短期的培養系の実現を可能とした。

当初予定していた各施設(長崎大学ケニア拠点等)由来の貝採取(フィールドワーク)および *B. glabrata* 由来抽出物(BGP)の調製は、新型コロナウイルス(COVID-19)感染拡大により中止せざるを得ない状況であったため、急遽、中間宿主貝内における *S. mansoni* 発育動態を蛍光標識によりリアルタイムで解析可能な系の開発を試みた。その結果、感染時における感染動画の撮影に世界で初めて成功し、感染初期での貝内幼虫分布の追跡・撮影にも成功した。

本研究より得られた以上の成績から *B. glabrata* 由来抽出物は住血吸虫を *in vitro* で維持可能とし、また、蛍光標識住血吸虫を用いた解析は、感染メカニズムの解明に大いに寄与することが示唆された。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

- 6. 自己評価に記載したため省略

2020 General joint research report (self-evaluation)

1. Research project name : Clinical, serological, virological and molecular characterization of Chikungunya virus in the Philippines

Project number : 2020–Ippan–21

2. Principal investigator : Mark Pierre Dimamay (Research and Biotechnology Group, St. Luke's Medical Center [R&B-SLMC]; Associate Director for Basic Science Research)

Joint researcher(s) : Corazon Buerano (R&B-SLMC; Scientist consultant)

Samuel Allan Inovejas (R&B-SLMC; Laboratory manager)

Maria Terrese Dimamay (R&B-SLMC; Research scientist)

Lady-Anne Pangilinan (R&B-SLMC; Technical Assistant)

Nekken Faculty: Meng Ling Moi (Department of Virology, Professor)

Kouichi Morita (Department of Virology, Professor)

3. Amount decided : 600,000 yen

4. According to documents at time of application

(1) Research objectives

The research objectives are (a) to characterize chikungunya virus strains isolated from archived serum samples (1995-2019) and those of the coming years 2020-2022, (b) to analyze the spectrum of disease manifestations in association with the pathogen

(2) Research content

In the Philippines, the research activities will involve screening for CHIKV infection via MAC-ELISA, conventional or real-time PCR, and virus isolation. Next, CHIKV positive samples will be characterized using serological (plaque reduction neutralization test, IgG ELISA), and molecular methods (real-time PCR for copy numbers, sequence and genotyping, phylogenetic analysis). In collaboration with NEKKEN, host-pathogen interactions will be determined by using different types of host cell lines (mosquito vs mammalian, possible in vivo targets). Clinical data will also be analyzed to provide important data for the differential clinical diagnosis of the disease.

In Japan, the following will be done to characterize the virus: (a) Virus isolation by using CHIKV infection permissive cell lines, (b) RNA isolation, cDNA synthesis for molecular analyses, (c) viral genome analyses using conventional sequencing method and next generation sequencing, (d) viremia titration using real-time PCR and plaque assay, (e) identification of host factors associated with viral infection in different host

(mosquito vs mammalian, possible target tissue/cells). Japanese researcher will also assist in the development of database and providing feedback on the analyzed data.

(3) Expected results

a) Determined chikungunya cases from serum samples collected between 1995-2022, b) Characterized CHIKV or CHIKV infection through serological and molecular methods, c) Determined viral determinants responsible for the CHIKV epidemics and degrees of severity of infection in the Philippines, d) Determined host-pathogen (CHIKV) interaction in vitro by using different cell lines, e) Compiled description of the spectrum of disease manifestations associated with CHIKV infection.

5 . Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

Stored serum/plasma samples of febrile patients were checked for negative dengue virus or Japanese encephalitis infection by any of the following: in-house DENV IgM capture ELISA, RT-PCR with flavivirus or dengue consensus primers or Japanese encephalitis virus, and DENV NS1 antigen strip test. Some confirmed non-dengue samples were also subjected to CHIKV and ZIKV IgM-capture ELISAs. Sample positive by ZIKV IgM-capture ELISA was subjected to ZIKV isolation, Zika virus RNA detection, plaque reduction neutralization test and IgG against Zika virus nonstructural protein 1. We are continually putting the data of our non-dengue samples in a database.

(2) Results (results & observations)

From among the patients' sample collections stored in the serum/plasma bank in the Research and Biotechnology, St. Luke's Medical Center serum/plasma bank, 3826 samples were negative by DENV IgM capture ELISA and these were also negative to at least in one of the following tests a) RT-PCR with flavivirus or dengue consensus primers or Japanese encephalitis primers, b) NS1 antigen strip test. Initial tests showed that 13 out of 132 samples were positive by CHIKV IgM ELISA and 1 out of 134 samples was positive by ZIKV IgM ELISA. No ZIKV was isolated from this positive sample, but it was positive by RNA detection,

(3) Announcement of results

One paper as shown below was published in 2020 as an output of the first-year study: Zika virus infection, Philippines, 2012. Buerano CC, Pangilinan LS, Dimamay MTA, Mapua CA, Dimamay MPS, Matias RR, Natividad FF, Daroy ML, Hasebe F, Morita K, Moi ML. *Emerg Infect Dis* 26(9):2300-2301. 2020.

6 . Self-evaluation

Although the first year of the implementation of the project was tough because of the corona virus disease 2019 (COVID-19) pandemic which restricted our movement and research work, we were able to note good results using the same non-dengue samples. This led us to focus our work on an infection caused by another arbovirus, the Zika virus. It enabled us to publish one paper.

7 . Attainment level

I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)

II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

令和 2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ルワンダ共和国における早産児の有病割合、リスク要因と予後の検討
課 題 番 号：2020-Ippan-22
2. 代 表 者：頼藤 貴志（岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科
社会環境生命科学専攻 疫学・衛生学分野 教授）
共 同 研 究 者：アキンティジェ シンバ カリオペ
（医療法人葵鐘会ルワンダ事業プロジェクトマネージャー）
松本 尚美（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 助教）
和田 崇之（大阪市立大学生活科学研究科 教授）

3. 決 定 額：600 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

早産児（在胎期間 37 週未満の児）出生は、新生児期における主要な死亡原因の一つであり、世界中で発生する新生児死亡の 28%を占める（Lawn et al., 2010）。早産児出生の割合は世界中で増加しており（WHO, 2015）、特に低所得国では小児の健康に与える影響が大きい。この現状は、アフリカ諸国でもみられるが（Kinney et al., 2010）、先行調査では都市部に限定された検証にとどまっている。

ルワンダ共和国は、アフリカ諸国においていち早く ICT 産業の発展に取り組み、医療への応用も進められている。妊婦および出生児の健康状況がデータとして一元的に保管されていることから、疫学研究への活用が容易である。本研究ではこうした状況に着目し、上述した早産児出生に関する調査を同国ルシジ地域にて実施する。同地域は西国境に面し、中部アフリカ地域との交流、影響が大きい。熱研国際保健学分野のカウンターパートである公立ミビリジ病院（図 1）において出生した全出生児を対象とし、早産児の出生割合を評価するとともに、そのリスク要因を検討する。また、早産出生児や低出生体重児の予後を評価し、死亡（新生児病棟入院や退院までの死亡）との関連についても検討する。予防医学的には、介入可能と考えられる母体年齢・母体体格・出生前健診といった要因と早産児出生及び低出生体重児の関連を評価する。さらに、出生児の在胎期間や早産児出生と予後（新生児病棟入院や退院までの死亡など）との関連を評価することにより、予後を良好に保つためにはどれぐらいの在胎期間が必要なのかを検証し、当地における分娩管理の資料とする。これらの結果から、熱帯地域（特に中部アフリカ地域）における早産児出生対策および早産児ケアに対する提言を行うことを目的とする。

② 研究内容

今年度は、ミビリジ病院のデータベースと前年度に利用可能となった GIS 情報とのリンクを行い、同地域の大气汚染など既存の地理情報と母子健康のアウトカム（早産出生児及び低出生体重児）との関連の検討を行い、論文化していく。

今後、早産出生児や低出生体重児の予後を観察していくためには、乳幼児期・小児期のデータを取得し、追跡することが必要となってくることが予想される。前年度には、現地の Umuco Mwiza、Kibagabana、Miyobe の各小学校地区に居住している 0～18 歳の児で、2015 年～2019 年の期間内に学校健康診断を受けた児のカルテ情報を、パイロット的に収集した。疫学統計解析の上で信頼性が高い結果を得るためには、対象者数をさらに増やし、またデータ取得する際の測定法などの妥当性の担保を行う必要がある。その為、今年度、現地小中学校の協力を得ながら、健康診断やデータ取得のシステム化を行う。

③ 予想される成果

研究対象とするルシジ地域は、ブルンジ共和国やコンゴ民主共和国と接する農村部を内包しており、中部アフリカ地域の一般社会モデルとして提示できる。アフリカでの先行研究では、地域によって早産児の出生割合に大きなぶれ幅があることが示されているが、リスク要因はほとんど検討されていない状況である。そのため、同地域における早産児出生割合の動向とリスク要因の評価は、ルワンダ国内だけでなく、より広域的な小児医療に重要な示唆を与えうる。

母体の年齢や体格、出生前健診の有無などが早産児出生と関連があるとわかれば、当該地域で早産ハイリスクにあると思われる対象者に介入を行うことが可能になる。また、在胎期間や早産出生と予後の関連を評価することにより、当該地域での分娩管理において貴重な資料になりうると思われる。

将来的に病院のデータベースと地域の小中学校での学校健康診断の情報がリンクできるようになれば、乳幼児期・小児期における健康・成長・発達を追跡することも可能となる。首都キガリでの学校健診事業の整備が整えば、その後の国内への波及効果も大いに期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

研究材料

ルワンダ共和国公立ミビリジ病院において2011年～2016年に出生した全出生児のデータから作成したデータにGIS情報をリンクさせたデータセット

方法・手続き

1. 記述統計による早産児の出生割合・年次別出生割合の変化を評価
2. ロジスティック回帰分析を用いた母体年齢・母体体格・出生前健診などの要因と早産児出生の関連、在胎期間・早産児出生と出生児アウトカム（生存退院・死亡退院）との関連を評価
3. 更に、同地域の大気汚染など既存の情報を上記データセットにリンクさせ、大気汚染と母子健康のアウトカム（特に早産児出生）との関連を評価するためのデータセットを作成し、評価

② 成果（結果＋考察）

記述分析の後、本データより、妊娠中の健診回数が低出生体重児や早産児の発生と、低出生体重児や早産児出生が新生児予後不良と顕著に相関しており、同地域における母子健康および保健に関する重要な知見として利用できる可能性が見出された。本結果について、学術論文に受理、出版された。その後、更なる検証を行っている。

また、大気汚染データを割り振ったデータベースを用い、大気汚染と母子健康のアウトカム（特に早産児出生）との関連を評価する粗解析を行った。現在は、解析の仕方について詳細な検討を行っているところである。

更に、ルワンダ共和国の訪問を検討していたが、新型コロナウイルス感染症の流行を受け、渡航を断念。現地との健康診断実施に関する情報交換を行った。

③ 成果の公表

知見に関して、下記のように報告を行った。

Akintije et al., Antenatal Care Visits and Adverse Pregnancy Outcomes at a Hospital in Rural Western Province, Rwanda. Acta Med Okayama. 2020 Dec;74(6):495-503. doi: 10.18926/AMO/61209.

6. 自己評価

本解析終了、論文も受理、出版も行えた。更に、次の解析に着手できている。しかしながら、情報交換は行えたが新型コロナウイルス感染症の影響で渡航がかなわなかった。よって、評価としては「不満は残るが一応の成果を挙げられた」と思われる。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

2020 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name :

Profile of antimalarial drug resistance markers among school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo
Project number : 2020–Ippan–23

2 . Principal investigator : (affiliation/position)

Richard Culleton (Professor, Division of Molecular Parasitology, Proteo-Science Center, Ehime University)

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

The aim of this research was to determine the profile of antimalarial drug resistance among school-age children which will be useful for government and other stakeholders for adoption of new malaria policies for control, surveillance, and elimination of malaria countrywide.

Specific objectives

To determine the prevalence of markers linked to drug resistance in the following genes:

- *Plasmodium falciparum* Kelch 13 (PfK13)
- *Plasmodium falciparum* multidrug resistance-1 (PfMDR1)
- *Plasmodium falciparum* dihydropteroate synthase (PfDHPS)
- *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (PfDHFR)
- *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance transfer (PfCRT)

(2) Research content

Malaria is the most prevalent and life-threatening human vector borne disease causing more deaths worldwide where there is risk of infection including Democratic Republic of Congo (DRC). The development and the spread of resistance to antimalarial drugs has shown to be one of barriers for malaria control by increasing the mortality and morbidity rate. Here we are looking for markers of antimalarial drug resistance to determine the prevalence of parasites that may be resistant to various antimalarial drugs in Kinshasa, DRC.

(3) Expected results

This research was to identify and determine the prevalence of molecular markers of

drug resistance amongst parasite populations infecting school-aged children in Kinshasa, Republic of Congo. This will provide baseline data to health authorities in the region regarding the potential effectiveness of current drug treatment regimens for malaria. Furthermore, as samples have been collected from a wide range of geographical settings each with its own malaria parasite transmission dynamics, comparison of the prevalence of markers of drug resistance will provide information on the factors that contribute to the emergence and maintenance of drug resistance.

5 . Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

- Research materials

Blood samples were collected from asymptomatic and symptomatic school-age children living in rural and urban areas in Kinshasa, Democratic Republic of Congo, and spotted onto Whatman 903™ filter paper (Whatman plc, UK) for PCR analysis. Whatman 903™ filter papers containing blood samples were dried and stored in individual plastic bags containing desiccant and stored at -20°C before transportation to Nagasaki University for PCR analysis. DNA was extracted using the QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in 50 µL of the provided buffer.

- Methods and Procedures

DNA samples were amplified by nested PCR using primers targeting the *Plasmodium* mitochondrial cytochrome c oxidase III (*cox3*) gene was performed using the protocol described by Isozumi *et al* (1) for identification and genotyping of plasmodium species. PCR products were visualized under UV light on 2% agarose gels run at 100 volts for 30 minutes and stained with Gel Red® solution for 30 minutes.

Plasmodium falciparum positive samples were used for amplification of antimalarial drug resistance markers using Nested PCR.

Each antimalarial drug resistance marker was amplified using specific primers and following procedures described elsewhere: PfK13 (2), PfMDR1 (3), PfCRT (4, 5) PfDHFR and PfDHPS (6, 7).

The PCR products from the amplification reactions were evaluated by electrophoresis on 2% agarose gels.

(2) Results (results & observations)

From 219 samples analyzed, we were able to successfully amplify PfK13 (83.7%),

PfMDR1 (93.3%), PfDHFR (90.3%), PfDHPS (96.7%), PfCRT (78.1%). Those are preliminary results and need to be finalized by sequencing.

The second step will be to sequence them to determine specific markers associated with artemisinin resistance, amodiaquine and chloroquine resistance, and sulfadoxine-pyrimethamine resistance.

(3) Announcement of results

The forthcoming results will be published in a peer-reviewed international journal.

6 . Self-evaluation

At this step, the work was done more than expected.

We successfully amplified all antimalarial drug resistance markers and got preliminary with full satisfaction. Those results will be useful for the second step (sequencing).

7 . Attainment level

I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)

II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

References

1. Isozumi R, Fukui M, Kaneko A, Chan CW, Kawamoto F, Kimura M. Improved detection of malaria cases in island settings of Vanuatu and Kenya by PCR that targets the Plasmodium mitochondrial cytochrome c oxidase III (cox3) gene. Parasitol Int. 2015;64(3):304-8.
2. Didier Ménard & Frédéric Ariey. PCR and sequencing for genotyping of candidate *Plasmodium falciparum* artemisinin resistance SNPs in the Kelch 13 gene v1.0. Institut Pasteur du Cambodge – Institut Pasteur, Paris Procedure.

<https://www.wwarn.org/tools-resources/procedures/pcr-and-sequencing-genotyping-candidate-plasmodium-falciparum-artemisinin>

3. Humphreys GS, Merinopoulos I, Ahmed J, Whitty CJ, Mutabingwa TK, Sutherland CJ, Hallett RL. Amodiaquine and artemether-lumefantrine select distinct alleles of the *Plasmodium falciparum* *mdr1* gene in Tanzanian children treated for uncomplicated malaria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Mar;51(3):991-7.
4. Tinto H, Ouédraogo JB, Erhart A, van Overmeir C, Dujardin JC, van Marck E, Guiguemdé TR, D'Alessandro U: Relationship between the Pfert T76 and the Pfmdr-1 Y86 mutations in *Plasmodium falciparum* and in vitro/in vivo chloroquine resistance in Burkina Faso, West Africa. *Infect Genet Evol* 2003, 3:287–292.
5. Wurtz N, Fall B, Pascual A, Diawara S, Sow K, Baret E, Diatta B, Fall KB, Mbaye PS, Fall F, Diémé Y, Rogier C, Bercion R, Briolant S, Wade B, Pradines B. Prevalence of molecular markers of *Plasmodium falciparum* drug resistance in Dakar, Senegal. *Malar J*. 2012
6. Duraisingh MT, Curtis J, Warhurst DC. *Plasmodium falciparum*: detection of polymorphisms in the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthetase genes by PCR and restriction digestion. *Exp Parasitol*. 1998 May;89(1):1-8.
7. Ruizendaal E, Tahita MC, Traoré-Coulibaly M, Tinto H, Schallig HDFH, Mens PF. Presence of quintuple dhfr N51, C59, S108 - dhps A437, K540 mutations in *Plasmodium falciparum* isolates from pregnant women and the general population in Nanoro, Burkina Faso. *Mol Biochem Parasitol*. 2017 Oct;217:13-15.

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名：ウイルス感染症の革新的治療薬への応用を目指した合成フラボノイド誘導体の開発
課 題 番 号：2020-Ippan-24
2. 代 表 者：淵上 剛志 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 衛生化学分野・准教授)
共 同 研 究 者：Mya Myat Ngwe Tun (長崎大学熱帯医学研究所 ウイルス学分野助教)
吉田 さくら (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 衛生化学分野・助教)
中家 真理 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 衛生化学分野・博士後期課程 2 年)
棚原 悠介 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 衛生化学分野・博士前期課程 1 年)
酒井 樹 (長崎大学薬学部・5 年生)
穴田 悠太 (長崎大学薬学部・4 年生)

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ケルセチンやミリセチンなどのフラボノイド化合物は、抗ウイルス作用を示すことが報告されており (図 1)、新たな抗ウイルス薬としての展開が期待されている(Frabasile, *Sci Rep*, 2017, Zandi, *Virology*, 2011, 8560. Gaudry, *Int J Mol Sci*, 2018)。一方で、それらの化合物のウイルス感染抑制効果やウイルス殺傷作用は数十から数百 μM レベルと抗ウイルス活性が卓越している化合物は見出されていない。また、ハロゲン化クリシンなどのいくつかの合成フラボノイドはデングウイルスやジカウイルスに対して数 μM の細胞へのウイルス感染抑制作用を占めることが報告されており、天然フラボノイドに比べて 20 倍以上の活性を示したことが報告されている (Suroengrit, *Sci Rep*, 2017.)。一方で、強い抗ウイルス活性を有する合成フラボノイドはあまり報告例がないため、更なる構造の最適化研究が望まれる。また、デングウイルスに関しては、標的部位が NS2B-NS3 プロテアーゼであることは報告されているが、ジカウイルスなどその他のウイルスに関しては抗ウイルスのメカニズムはあまりはっきりと明らかにはされていない。さらに、フラボノイド化合物の SFTSV などのフラビウイルス以外のウイルスに対する効果に関してもほとんど報告されていない。

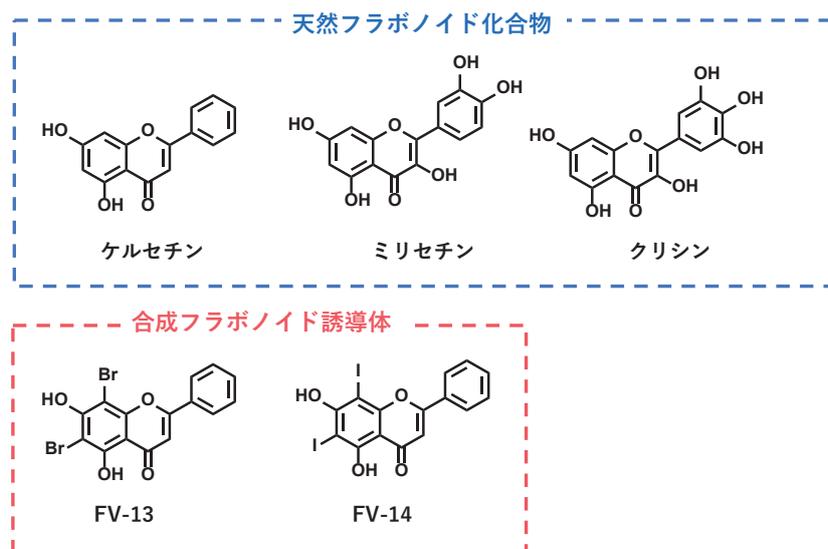


図1 抗ウイルス活性を有するフラボノイド化合物

そこで本研究では、様々な合成フラボノイドを合成し、共同研究者の Tun 博士との共同研究にて、下記に記した 4 種のウイルス感染症を対象として、様々なウイルス感染細胞および感染動物に対する抗ウイルス活性効果を示す化合物のスクリーニングを行い、ウイルス感染症の革新的治療法の開拓を目指す。

- (1) 重症熱性血小板減少症候群ウイルス (SFTSV) --- 出血熱、血小板減少、消化器症状
- (2) デングウイルス (DENV) --- 急性熱性疾患、出血熱
- (3) ジカウイルス (ZIKV) --- 急性熱性疾患、小頭症
- (4) チクングニヤウイルス (CHIKV) --- 急性熱性疾患、脳症

これまでに当研究室では、様々な疾患に対する医薬品への応用を目指し、ハロゲン分子を有する約二百種類フラボノイド誘導体を開発してきた(Fuchigami, *ACS Infect Des*, 2019., Fuchigami, *Sci Rep*, 2015., Fuchigami, *Bioorg Med Chem Lett*, 2015. Fuchigami, *Bioorg Med Chem*, 2014, Kawasaki, *Bioorg Med Chem*, 2017; Ono, *J Med Chem*, 2009; Maya, *Bioconjug Chem*, 2009; Ono, *J Med Chem*, 2005, 特許第 4000352 号, 2007、特許第 4000353 号, 2007. PCT/JP2019/008168.)。それらの化合物は主に A β 、プリオン凝集体、 α -シヌクレインなどのアミロイド凝集体を標的とした脳神経疾患のイメージング剤として展開してきたが、ウイルス感染症などに関連した検討は全く行っていない。そこで、本研究では当研究室所有のフラボノイド誘導体ライブラリーを用いて抗ウイルス作用を有する化合物のスクリーニングを行う。また、ケルセチン、ミリセチン、クリシンなどを母体化合物とした誘導体も併せて開発し、その抗ウイルス剤としての有用性を検討する。

② 研究内容

(1) フラボノイド誘導体を用いた初期スクリーニング

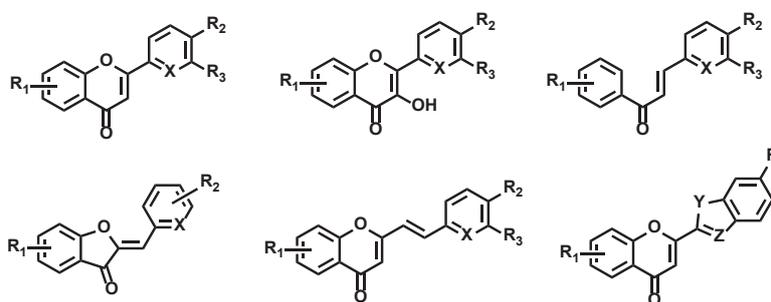
当研究室にて所有している化合物ライブラリーおよび天然フラボノイド化合物 (ケ

ルセチン、ミリセチン、クリシンなど) を用いて DENV, ZIKV, SFTSV, CHIKV に感染させた Vero 細胞へのウイルス増殖抑制効果 (PCR 等) や感染細胞への殺傷効果 (WST アッセイ等) などに関する初期スクリーニングを行い、最適な母体化合物を選出する。なお、ウイルス感染細胞の作製に関しては、既報の手法(Ogawa, *J Infect Chemother*, 2018)を参考にして、ウイルスを human hepatoma Huh7.5.1-8 cells あるいは Vero cell に感染させた病態モデルを作成する。また、NS2B-NS3 などの各種プロテアーゼへの抗体などを用いたプルダウンアッセイなどを用いて標的部位の探索も行う。

(2) 新規フラボノイド誘導体の設計と合成

上記①の検討にて選出した母体化合物を基に、新規フラボノイド誘導体の設計および合成を行う。ハロゲン化フラボノイド誘導体の強い抗ウイルス活性の報告を参

考に、本研究では臭素原子、ヨウ素原子、メチル基、エチル基などを当研究室の化合物ライブラリーあるいは天然のフラボノイド化合物に導入した新たな誘導体(図6)を合成し、純度を含めた詳細な化学構造に関する分析を行う。



R₁, R₂, R₃ = Br, I, CH₃, CH₂CH₃, OH, OMe
X = CH₂, N, Y = O, S, NH, Z = CH₂, N

図6 新規フラボノイド誘導体の設計

(3) 合成フラボノイド誘導体の抗ウイルス活性評価 (*in vitro*)

上記①の検討と同様にウイルス感染細胞を用いた詳細な検討を行う。

(4) ウイルス感染病態モデルマウスの作成

既報のプロトコルに基づき(Shimada, *Virology*, 2015)、IFNARKO マウスに SFTSV (10² ~ 10⁶ ffu) を腹腔内投与し、軽症から重症まで様々な症状の SFTSV 感染マウスを作成する。対照群として IFNARKO マウスに PBS を同様に投与した非感染マウスを作成する。感染マウスに関して、感染後 6, 12, 24, 36, 48, 72 時間の体重、体温を計測し、行動異常の有無を観察する。また、血液サンプルを採取して、血小板数、白血球数を計測し、SFTSV の検出は 定量的 RT-PCR にて行う。非感染マウスについても同様の実験を行う。また、他のウイルス性疾患の病態モデルの作成も Tun 博士の確立した手法に基づき、作成していく。

(5) 合成フラボノイド誘導体の抗ウイルス活性評価 (*in vivo*)

In vitro で抗ウイルス効果が示されたフラボノイド誘導体に関して、種々の時間経過後 の ウイルス感染マウスあるいは非感染マウスへ投与して、ウイルス増殖抑

制能や生存率への効果、体重変化などを詳細に検討する。さらに、それぞれのマウスを安楽死させた後に解剖し、感染組織の同定を行い、NS2B-NS3などの各種プロテアーゼへの抗体などを用いた免疫染色などにより標的部位の同定も試みる。また、これまでに行ってきた¹⁸F-FDG、⁶⁸Ga-citrate、¹¹¹In 標識抗 SFTSV 抗体、あるいは⁶⁸Ga-NOTA-NCS-folateを用いた核医学イメージング評価も併せて行い、治療時における生体機能変化をリアルタイムで捉えることで、治療効果のメカニズムを解析し、最適な投与方法なども含めたさらなる有効な治療法の開発へ結び付けていく。既報の抗ウイルス薬(リバビリン、PF-429242等)、抗ウイルス血清やIgGを用いた検討も行い、フラボノイド誘導体の抗ウイルス効果との比較検討や併用療法の効果を検討する。

③ 予想される成果

今回申請者らの対象としている新興再興感染症は、治療法が最適化されているとはいえず、さらなる有効な治療法の開発が望まれている。そのためには、新たな治療薬候補化合物の探索が必要であると考えられる。フラボノイド化合物は比較的毒性が低く、抗ウイルス活性を示す化合物も多数報告されており、有効な抗ウイルス薬としての展開が期待される。本研究では標的候補に対する抗体を用いた *in vitro* プルダウンアッセイや感染症モデル動物より採取した組織切片を対象とした免疫染色を行うことで、メカニズムの解析を含めた抗ウイルス薬として展開できる新規フラボノイド化合物の開発を行っていく。

なお、我々は最近の検討にて、¹⁸F-FDG や ⁶⁸Ga-citrate を用いた PET/CT イメージングを行い、SFTSV 感染による炎症をリアルタイムで捉えることに成功した。さらに、抗血清療法における治療効果の判定にも使用可能であることが見出された (Hayasaka, *Oncotarget*, 2016., Fuchigami, *ACS Omega*, 2017.)。また、申請者らは、これまでに疾患関連分子を特異的に捉えることのできるフラボノイド骨格を有する新規分子プローブを多数開発してきた (Fuchigami et al.; *Sci Rep* 2015., *Bioorg Med Chem Lett* 2015, *Bioorg Med Chem* 2014 等)。そこで、これまでの経験を活かし、ライブイメージングによる化合物の作用による病態変化のダイナミクス解析も組み合わせることで、ウイルス性疾患の革新的な治療に繋がる新規フラボノイド誘導体を開発していく。さらに、我々のこれまでに行ってきた小動物 PET/SPECT/CT によるウイルス感染動物の治療モニタリングが、治療薬候補化合物等のスクリーニングに有用であるかの検証も本研究で行うことができるため、成功すれば様々な新規医薬品候補化合物の開発研究に繋げることができる。上記のウイルスは BSL-3 あるいは BSL-2 に分類されており、我が国では特に BSL-3 感染動物に関しては本学においてのみこのような小動物 PET/SPECT/CT イメージングによる抗ウイルス薬の効果判定を行うことが可能である。以上、我々の研究室の技術と経験を生かして、様々な新規フラボノイド誘導体の設計や合成が可能であり、熱帯医学研究所における詳細なウイルス感染症モデルを用いた検討により、効率よくウイルス感染症に効果的な新たな医薬品候補化合物の創製に結びつくものと期待される。また、これらの検討に小動物 PET/SPECT/CT によるライブイメージングを組み合わせることにより、革新的かつ独創的な研究成果が多く得られると期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

SFTS ウイルス (SFTSV) 感染細胞の作製

Vero E6 細胞 に SFTSV (NB-13 株)を感染させた後、37°C, 5% CO₂ 下で 36 時間インキュベーションを行った。4% パラホルムアルデヒドによる固定化処理を行った後、NP-40 による膜透過処理を行った。また、膜透過処理を行わずに固定処理のみを行った細胞群の作製も同様に行った。

SFTSV 感染細胞への化合物の結合実験

SFTSV 感染細胞もしくは非感染細胞へ、フラボノイド誘導体をインキュベーションを行ったのち、50%EtOH にて洗浄を行った。

SFTSV の染色として、一次抗体として Anti-mouse SFTSV monoclonal Ab (N-mAb)を用い、二次抗体として Alexa Fluor® 488 標識 anti-mouse IgG を用いた蛍光染色を行った。核染色用色素である DAPI を少量プレートに加え、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

¹¹¹In 標識抗体を用いた細胞結合評価実験

SFTSV 感染細胞あるいは非感染細胞に ¹¹¹In 標識抗体(CIgG; コントロールマウス抗体、N-mAb; 抗 SFTSV マウス抗体) を 6.7-41 kBq を加え、37°Cにて 120 分間インキュベートした。冷へパリン (20 units/mL PBS)にて 2 回洗浄し、Cell Lysis Buffer M (富士フィルム和光純薬)にて細胞を溶解させた。細胞を回収した後、 γ カウンタによる放射能の測定と Bradford 法にてタンパク濃度の測定を行い、細胞タンパク量 1 mg 当たりの放射能の集積率 (% dose/mg-protein)を算出した。

新規フラボノイドの合成

新たな抗ウイルス薬への応用を期待した新規フラボノイド類縁体のベンゾフラニルクロモン誘導体とベンゾオキサゾリルクロモン誘導体の合成を行い、NMR および MS にて構造決定を行った。

② 成果 (結果+考察)

(1) フラボノイド類縁体の SFTSV 感染細胞への結合実験

当研究室の化合物ライブラリーを用いて、数種のフラボノイド類縁体を用いた SFTSV 感染細胞への結合性を評価したが、顕著な結合性を有する化合物は本検討では見出されなかった。今後は化合物の SFTSV 感染細胞や SFTSV 感染動物への暴露による生存能への効果について評価していく予定である。

(2) ¹¹¹In 標識抗体の感染細胞への結合性の検討

用いた抗体の標的抗原である N タンパク質は、細胞内に存在しているタンパク質だが、SFTSV と同じく、マイナス一本鎖 RNA ウイルスかつ、エンベロープを有するウイ

ルスであるエボラウイルスにおいては、感染した細胞内で発現した N タンパク質が、細胞周縁へと集積部位が変化していくことが知られている。また、実際の SFTSV 感染患者血清において抗 N タンパク質抗体を検出することで、感染の確認を行うことができることなどから、感染した細胞において、細胞内にて産生された N タンパク質が、感染の経過により、細胞膜上に露出し、免疫系に直接コンタクトしている可能性は高いと考えられる。

そこで、SFTSV 感染 Vero E6 細胞における、 ^{111}In -N-mAb の 細胞膜表面および細胞内の N タンパク質への結合能に関する検討を行った。そこで、 ^{111}In 標識抗体 (^{111}In -CIgG, ^{111}In -N-mAb) の、SFTSV 感染細胞 (MOI-0.01, MOI-0.1) あるいは非感染細胞への結合実験を行った。感染細胞は、固定化处理のみを行った群および固定化と、膜透過をどちらも行った群を用いた。抗体は通常細胞膜を透過できないことから、膜透過処理を行っていない群では、細胞膜表面の抗原のみを認識していると考えられる (Figure 5)。

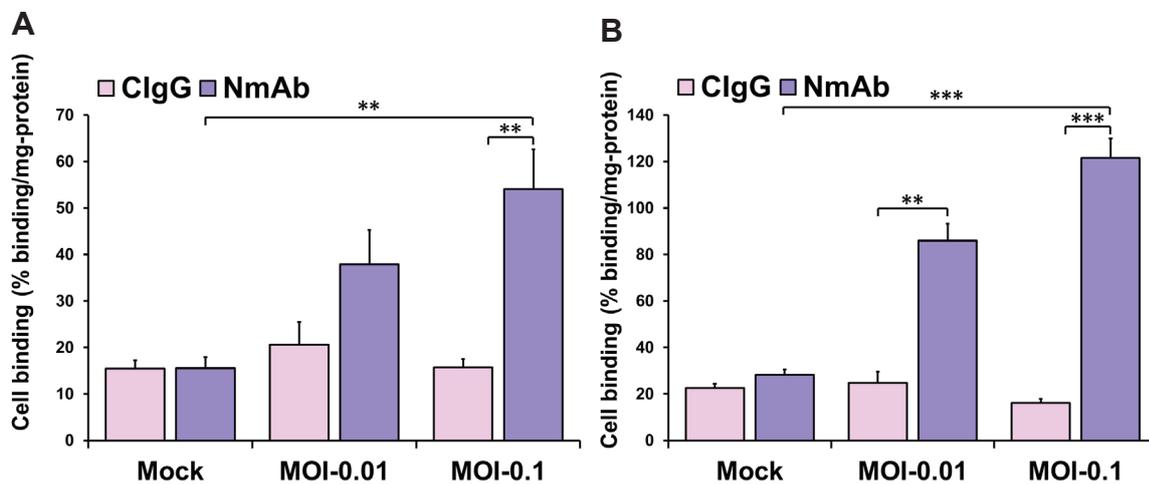


Figure 1. *In vitro* binding of ^{111}In -labeled IgG (^{111}In -CIgG, ^{111}In -N-mAb) in SFTSV-infected (MOI-0.01, MOI-0.1) and mock infected Vero E6 cells. Vero E6 cells were processed only fixation (A) or fixation and permeabilization (B). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (One-way ANOVA and tukey-kramer post-hoc test). Values are mean \pm SEM, $n = 5-10$.

その結果、 ^{111}In -CIgG においては、固定化处理のみ群 (Figure 5A) および固定化・膜透過処理群 (Figure 5B) のいずれに関しても、非感染細胞と SFTSV 感染細胞との間で結合率に大きな変化は見られなかった一方で、 ^{111}In -N-mAb を用いた実験では、感染度合い (MOI) の上昇に依存して細胞への抗体結合率が大きく上昇し、非感染細胞と比較して有意に高い結合を示した。

また、 ^{111}In -N-mAb の非感染細胞における結合率は ^{111}In -CIgG と大きく変わらなかったが、SFTSV 感染細胞においては、 ^{111}In -CIgG の結合率と比較して、有意に高い結合率を示した。従って、 ^{111}In -N-mAb は SFTSV 感染細胞へ特異的に結合していることが示唆された。

また、膜透過処理を行った群 (Figure 5B) における結合率は固定化处理のみの群 (Figure

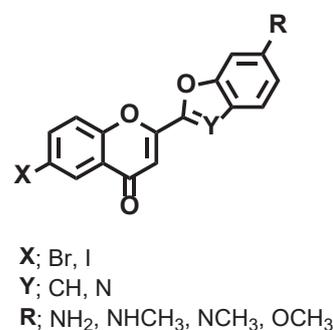
5A)と比較して、高い結合を示したが、固定化処理のみの群においても、非感染細胞と比較した感染細胞への $^{111}\text{In-N-mAb}$ の有意な結合率上昇が確認された。従って、 $^{111}\text{In-N-mAb}$ は感染細胞の表面に露出している N タンパク質を特異的に認識していることが示唆され、*in vivo* イメージング剤への展開の可能性が示された。

これらの結果より、SFTSV においても、N タンパク質は常に細胞内のみが存在しているのではなく、細胞膜上に露出している可能性が高く、露出した N タンパク質へと $^{111}\text{In-N-mAb}$ が生体内でも結合できるものと考えられ、SFTSV 感染症の *in vivo* イメージング剤として N タンパク質への、抗体を用いることの妥当性が示唆された。

実際にどのような機構で細胞膜上等へ露出しているかなどの詳細はいまだ明らかになっていないが、N-mAb を SFTSV イメージング剤として展開するための重要な要素であると考えられるため、今後は露出機構等の詳細なメカニズム解明に関する研究の進展が望まれる。

新規フラボノイドの合成

新たな抗ウイルス薬への応用を期待した先の種々置換基を導入した新規フラボノイド類縁体のベンゾフランクロモン誘導体とベンゾオキサゾリルクロモン誘導体の合成を行い、NMR と MS にて構造決定を行い、目的物の合成が達成されたことを確認した。今後はこれらの化合物を用いて、SFTSV などのウイルスに対して作用する化合物の探索を行っていく予定である。また、N タンパク質などのウイルス由来タンパク質への結合性に関しても詳細に評価していく。



③ 成果の公表

学術論文

Fuchigami T, Kawasaki M, Watanabe H, Nakagaki T, Nishi K, Sano K, Atarashi R, Nakaie M, Yoshida S, Ono M, Nishida N, Nakayama M. Feasibility studies of radioiodinated pyridyl benzofuran derivatives as potential SPECT imaging agents for prion deposits in the brain. *Nucl Med Biol*, **90-91**, 41-48 (2020).

学会発表

1. 淵上 剛志, BSL-3 病原体による感染症の病態の特徴を特異的に捉えるためのイメージング剤の開発戦略, 第 60 回日本核医学会学術総会, 2020 年 11 月, 神戸.

2. 棚原 悠介, 淵上 剛志, 安藤 豪, Mya Myat, Ngwe Tun, 早坂 大輔, 吉田 さくら, 中山 守雄, SFTS ウイルス感染症の SPECT による病態解析を目的とした ^{111}In 標識抗体の開発, 第 60 回日本核医学会学術総会 第 40 回日本核医学技術学会総会学術大会, 2020 年 11 月, 神戸.

3. Tanahara Y, Fuchigami T, Tun MMN, Hayasaka D, Yoshida S, Nakayama M, Development of ^{111}In -labeled anti SFTSV antibodies for pathological analysis of SFTS viral infection by SPECT, 第 15 回日本分子イメージング学会学術集会, 2020 年 5 月, 熊本.

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

SFTSV 感染症の診断や治療への応用の可能性が期待される放射標識抗体の開発には成功したが、当初の目的であった抗ウイルス作用を有するフラボノイド類縁体の同定には至らなかった。

i). A Nanbo, S Watanabe, P Halfmann, Y Kawaoka, The spatio-temporal distribution dynamics of Ebola virus proteins and RNA in infected cells. *Sci Rep*, **2012**, 3, 1206.

2020 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Zika Virus Infection among Pregnant Women and neonates in Mandalay; A Peri-natal Congenital Zika Virus Infection Screening Project in Upper Myanmar (2020-2021)

Project number : 2020–Ippan–25

2 . Principal investigator : Dr Aung Kyaw Kyaw,

(Deputy Director, Department of Medical Research,
Ministry of Health and Sports, Myanmar)

Joint researcher(s) : Dr Mya Myat Ngwe Tun (Assistant Professor, Department of
Virology, Nagasaki University)

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

To identify the epidemiologic, clinical, and laboratory characteristics of pregnant women with confirmed or probable Zika virus infection and to understand the molecular epidemiology of ZKV circulating at the study site.

(2) Research content

We planned to conduct a cross sectional analytic study. Total 1,500 pregnant women who e delivered at Central Women Hospital, Mandalay and all high risks neonates would like to recruit from 2020 April to 2021 March.

Study area: Central Women Hospital, Mandalay and 550-bedded Mandalay Children Hospital, Study population:

(3) Expected results

We expected this study could explore the burden of ZIKV infection among pregnant women and congenital ZIKV infected patients at the study area. Through phylogenetic analysis, we would like to identify the origin of the virus strains circulating in the study area at the time of study period. We expected that this study would provide the data about the congenital birth defect due to ZIKV infection and this study will be the first study in Myanmar.

5 . Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

In 2020, COVID-19 outbreak worldwide and Myanmar also affecting this pandemic. Therefore, restrictions of travelling, and we could not collect blood samples from pregnant women to fulfill the objectives of our proposal. But we could collect the blood samples from acute febrile patients. We collected acute phase serum samples from acute febrile patients who were admitted at 550-bedded Mandalay Children Hospital. Collection was done between July and August during the peak season of DENV infection in Mandalay in 2020. All serum samples were checked the presence of dengue virus infection by the Standard F Dengue (SD Biosensor, Republic of Korea) (Catalogue no. 10DEN10D and 10DEN20D) FDA approval no (632/2018), Batch No FDE1018002-5, Expiry date- March 2021 at the bedside. IgM capture ELISA and IgG capture ELISA (PanBio, Pty., Ltd., Brisbane, Australia) to detect IgM antibodies and IgG antibodies to DENV were done on all serum samples following the instruction of the manufacturer. Viral RNA was extracted directly from serum samples by using Viral RNA Mini kit (InnuPrep Viral RNA Kit, Analytik Jena, Germany). Screening for the presence of DENV was done by Prime Script™ one step RT-PCR Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) using dengue virus specific primer. Serotype-specific DENV primers were used to confirm the serotypes of virus detected sample by one step RT-PCR method. The primers to detect DENV and confirm serotypes of viruses were based from the previous reports.

The above samples will be sent to Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University and now we are arranging to send by World Courier and it is a delay due to some unexpected events in Myanmar. We will check all arboviruses from this samples. We will do virus isolation using C6/36 mosquitoes cell lines and presence of Dengue, Zika infection by specific primers. Moreover, we will continue whole genome sequencing of the isolated viruses and phylogenetic analysis will be done to understand the molecular epidemiology of Dengue and Zika Viruses.

(2) Results (results & observations)

Among 204 patients who were clinically diagnosed to have DENV infection, 111 patients (54.4%) were confirmed as DEN infection in this study. Out of 111 laboratory confirmed patients, 60 (54.1%) patients were male and 51 (45.9%) were female. There was no significant difference in the sex distribution. ($P > 0.05$). Based on the PBU of anti DENV IgG, 58 patients (52.3%) were classified as primary infection and 53 (47.7%) as secondary infection. All four serotypes of DENV were detected in this study and DENV-4 was dominant in 2020. Of the confirmed dengue cases, 10 were serotyped as DENV-1, 11 as DENV-2, 1 as DENV-3 and 15 as DENV-4. Of the DEN confirmed cases, 105 patients (75%) showed positive on IgM capture ELISA.

(3) Announcement of results

In 2020, screening of Dengue infection was done from acute febrile illness patients and only 54.4% were confirmed by both serology and molecular methods. The remaining will be other viral infection such as Zika, Chikungunya, etc which are endemic in Myanmar. This study will explore the proportion of Zika viral infection among those patients.

6 . Self-evaluation

During the study period, we have difficulties to collect the samples from pregnant women and neonates as COVID-19 cases were increasing as the second wave pattern in Myanmar. Therefore, we could not conduct the study according to the protocol submitted for application to the grant. But we collected the samples from pediatric population who presented with febrile illness and rash. We checked the dengue virus infection by both serological and molecular methods. We will continue to check the Zika virus infection among those samples at Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University. Although we could not conduct the study according to the proposal, we can do research on the samples from routine dengue virus surveillance from acute febrile illness patients in Mandalay, Upper Myanmar which is the same study area we proposed at the submission.

7 . Attainment level

I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)

II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

2020 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Role of other viruses from the forest in dengue-like illness in patients from Sabah

Project number : 2020 – Ippan – 26

2 . Principal investigator : Kamruddin Ahmed

(Professor, Department of Pathobiology and Medical Diagnostics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Universiti Malaysia Sabah)

Joint researcher(s) : Kouichi Morita (Dean, Professor, Department of Virology, Nagasaki University), Mya Myat Ngwe Tun (Assistant Professor, Department of Virology, Nagasaki University)

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

To determine the causative agents of patients clinically designated as dengue-like syndrome.

(2) Research content

Totally 188 serum samples were collected from patients with dengue-like syndrome attending in Lahad Datu Hospital and hospital in Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia during 2019-2020.

(3) Expected results

We anticipate that we might detect the following viruses as causative agents of dengue like syndrome:

1. Serological and molecular characterization of dengue virus (DENV) infection in Sabah.
2. Chikungunya virus, which is not yet reported from Sabah but found as a causative agent of dengue-like syndrome in Kuala Lumpur (PLoS NTD. 013. 7:e2331)
3. Zika virus, was reported only during the 2016 Zika virus outbreak (10.1371/currents.outbreaks.73b5c7d110f3bec90d75b2bb4dc9d23c), possibly it is endemic Sabah.
4. Rift valley fever and Alkhumra virus were found in Saudi Arabia Every year a considerable number of Malaysian perform Hajj and can bring the virus to

Malaysia.

5. Ross River virus is endemic in Australia and there is a considerable number of travelers travel from both sides which may bring the virus to Sabah.
6. Novel viruses: The driving factor for arthropod borne virus emergence predominantly center on the arthropod vector and include increased travel and trade, climate change, changes in land use, population increases and poverty. These factors are all present in Sabah. Furthermore, Sabah is blessed with dense forest with animals which harbor novel viruses. Increase human-animal interactions in recent time might transfer some of the new viruses to humans.

5 . Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

The above 188 serum samples sent to Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University in March,2021. By using those samples, in-house DENV IgM and IgG ELISA were performed in Virology department. To isolate virus, all serum samples were inoculated to C6/36 mosquitoes cell. Viral RNA (Quigen, Hliden, Germany) was extracted from infected culture fluid according to manufacture protocols. Screening for the presence of DENV was done by Prime Script™ one step RT-PCR Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) using dengue virus specific primers. To detect others flavi and togaviruses, we will proceed next generation sequencing. Moreover, we will continue whole genome sequencing of the isolated viruses and phylogenetic analysis will be done to understand the molecular epidemiology of flavi and toga viruses.

(2) Results (results & observations)

Out of 188 serum samples from patients, 35 patients (20%) were confirmed as DENV IgM positive and 132 patients (73%) were DENV IgG positive. Preliminary results for virus isolation, we finished 79 samples. Out of 79 samples, we isolated 18 DENV strains. Out of 18 DENV strains, 2 DENV-1, 7 DENV-2 (Cosmopolitan genotype) and 9 DENV-3 (genotype III) were detected.

(3) Announcement of results

The same as above in Results part.

6 . Self-evaluation

During the study period, we have difficulties to collect more samples from patients as COVID-19 cases were increasing as the second wave pattern in Sabah, Malaysia. However, in our preliminary results we could achieve dengue viruses isolated from 79

samples. We will conduct to identify flavi- and togaviruses isolation, molecular analysis on remaining 109 samples.

7 . Attainment level

I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)

II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

2020 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Arboviral infection in clinically suspected encephalitis patients in Sri Lanka

Project number : 2020 – Ippan – 27

2 . Principal investigator : Muthugala, Muthugala Arachchige Rohitha Vishvernath
Consultant Medical Virologist,
National Hospital Kandy, Ministry of Health, Sri Lanka

Joint researcher(s) : Mya Myat Ngwe Tun, Assistant Professor, Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

To determine the positivity rates of arboviruses among clinically suspected CNS infections in Central and Southern Sri Lanka

To characterize causative arboviral agents in clinically suspected patients in Sri Lanka

(2) Research content

Clinically suspected patients with encephalitis admitted to the National Hospital of Kandy and Teaching Hospital Karapitiya and their clustering hospitals will be included in to the study. Case definition is based on WHO case definition on the acute encephalitic syndrome (AES). Patients who given consent for the participation and agreed to utilize their clinical samples (blood and CSF) in to this study will be included. Patients who were diagnosed to have auto-immune encephalitis or infectious encephalitis due to bacterial, fungal, parasitic or other viral infections (herpes viruses, enteroviruses, paramyxoviruses will be excluded from the study.

Left over CSF and blood samples of the recruited clinically suspected patients with encephalitis, which will be received for virological diagnosis to Clinical Virology Laboratories at NH Kandy and TH Karapitiya will be utilized. There will not be collection of additional samples or sample collection for research purpose only.

Aliquot of the CSF sample will be stored at -80 0C following routine diagnostic virology tests for herpes viruses (Realstar®, Altona Diagnostics, Germany), enteroviruses, paramyxoviruses (PathoFinder®, Netherlands) and JE/dengue serology (NIV, Pune).

Clinical, demographic and investigation results will be obtained from the patients clinical records. Investigation results on CSF microbiology, biochemistry and cytology will be obtained and analyzed.

Based on available CSF analysis results samples will be selected for further analysis. Expected

sample number (CSF) will be 750.

All selected CSF samples will be subjected to genomic detection for flavivirus, togavirus and bunyavirus by using in-house RT-PCR assays.

An aliquot of selected CSF samples and blood samples of CSF JE/dengue serology positive patients will be referred to NEKKEN according to the guidelines on international transport of dangerous goods and UN guidelines on biosecurity.

At the NEKKEN, virus isolation will be attempted on mosquito cell lines. Isolated viruses will be identified and characterized by RT-PCR followed by gene sequencing. Phylogenetic analysis will be carried out in detected isolates.

RNA positive CSF samples for arboviruses by in-house RT-PCR assay will be subjected to type specific RT-PCR and gene sequencing to identify the exact virus/ viruses and serotypes/ genotypes.

JE or dengue IgM/ IgG positive CSF samples and respective blood samples will be subjected to virus neutralization assay to confirm the etiology.

Clinical, demographic, CSF analysis data and virological data will be analyzed.

(3) Expected results

Will be able to determine the disease burden of arbovirus causing encephalitis in Sri Lanka.

Determine positive rates of JE virus encephalitis among AES patients, will indicate effectiveness of current preventive strategies.

Will be able to describe clinical and virological characteristics of encephalitis caused by dengue virus.

Will be able to identify other arboviruses causing encephalitis in Sri Lanka. It will provide a better picture of vector borne central nervous system (CNS) infections in the country..

Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

Sample and data collection- 478 patients' samples were collected up to 10th of May 2021 and stored -80 C.

Viral DNA/RNA were extracted, Herpes virus, Enterovirus Flavi and alpha virus PCR conducted

(2) Results (results & observations)

Herpes virus, Enterovirus and Flavi virus genome detected in some of the samples

(3) Announcement of results

Pending

6 . Self-evaluation

Sample and data collection completed satisfactory

Basic laboratory testing/ experiments completed satisfactory, completed molecular testing for most virus groups

Further experiments (virus isolation and genetic characterization) need to be completed and shipment of the samples to NEKKEN pending (due to Covid pandemic situation in Sri Lanka, there was a delay in administrative work)

7 . Attainment level

I (Hardly any of the expected results were attained within the timeframe.)

II (Although not with adequate satisfaction, a certain degree of results were attained.)

III (The expected results were attained with full satisfaction.)

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation

Explanation is as in no.6 above.

R. Mulya

令和2（2020）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ライブイメージングによるエボラウイルス粒子放出機構の解明
課 題 番 号：2020-Ippan-28
2. 代 表 者：高松由基（国立感染症研究所・主任研究官）
共 同 研 究 者：西條政幸（国立感染症研究所・部長）
南保明日香（長崎大学熱帯医学研究所・教授）
3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

エボラ出血熱はエボラウイルス（EBOV）による急性熱性疾患で、血液や体液との接触を介してヒト-ヒト感染し、流行地以外にも感染が拡大する可能性がある。実際に 2014 年に西アフリカで発生した史上最大のエボラ出血熱の流行では、国境や大陸を越えてアメリカやヨーロッパでも EBOV 感染例を認めており、本邦も決して例外ではない。この大流行では最終的に 28,000 人の患者と 11,000 人の死者が報告された。続いて 2017 年からコンゴ民主共和国で新たなエボラ出血熱の流行が起き、既に 2000 人以上が亡くなっているが、まだ収束の目処が立っていない。これまで多くの研究者が対抗策を見出すために尽力しているが、いまだに認可されたワクチンおよび治療法は確立していない。こうした中、申請者はエボラウイルスの生活環を明らかにするための非感染性ライブセルイメージングシステムを構築することに成功した。これによりエボラウイルスの複製の鋳型となるヌクレオカプシドについて、その形成・輸送過程の分子メカニズムを解明することが可能になった。

エボラウイルスのマトリクスタンパク質である VP40 はウイルス粒子の出芽に必須であることがわかっているが、その形成・輸送過程についての詳細は不明である。また、VP40 がどのようにヌクレオカプシドと会合し、ウイルス粒子を形成するのかわかっている。そこで本研究では、エボラウイルスの非感染性ライブセルイメージングシステムを使い、ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質を蛍光タンパク質でそれぞれ標識し、その輸送経路と粒子形成過程を明らかにする。またウイルス様粒子の出芽過程を視覚化することで、どのようにヌクレオカプシドとマトリクスタンパク質が会合するのか、その分子機構を明らかにする。さらに粒子形成・出芽に関わる宿主因子との相互作用を解明することで、エボラウイルス粒子の形成を阻害する新しい治療法開発に貢献したいと考えている。

② 研究内容

エボラウイルスは、感染細胞において、転写・複製の場所である封入体から粒子出芽の場である形質膜まで、細胞質内を長距離移動する。申請者は前駆研究で、エボラウイルスの非感染性ライブセルイメージングシステムを構築することで、ヌクレオカプシドの輸送

過程の分子構造基盤を解明することに成功した。(Takamatsu, et al. PNAS. 2018)。また昨年度の研究で、エボラウイルス近縁の高病原性ウイルスであるマールブルグウイルス(MARV)の輸送過程を視覚化するライブセルイメージングシステムを新たに構築することに成功した(Takamatsu, et al. Virol.J. 2019)。熱研対応教員である南保教授は、エボラウイルスのマトリクスタンパク質 VP40 について、介在する宿主因子を含めて詳細に解析・報告している (Nanbo A, et al. J.I.D. 2018)。本研究では、二つの前駆研究の長所を融合し、ヌクレオカプシドがどのようにマトリクスタンパク質と会合し粒子形成に向かうのか、ライブセルイメージングを用いて解析を進める。前年度に VP40 の単独発現系を用いて、VP40 の合成からオリゴマーを形成して VLP (virus like particle) として出芽する過程を、ライブセルイメージングで視覚化することに成功した。

VP40 内のアミノ酸モチーフとして、L ドメインが EBOV の VLP 放出に関わることが知られている。そこで VP40 の L ドメインに変異を導入し、変異体の動きを野生型と比較することで、L ドメインの VP40 輸送過程における機能を明らかにする。また、L ドメインと相互作用することが知られる ESCRT(endosomal sorting complexes required for transport)タンパク質複合体の一つ Rab11 などの宿主タンパク質が、ウイルス粒子の輸送・放出過程に重要であることが、南保教授の研究により明らかにされた (Nanbo, et al. J.I.D. 2018)。そこで Rab11 を中心とする ESCRT タンパク質と VP40 の相互作用を、多重ラベリングを用いた共局在・共輸送解析により解明したい。

昨年度申請した研究内容は下記の通りである。

①ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質がウイルス粒子を形成する分子機構を解明する。

②粒子形成・出芽に関わる宿主因子との相互作用を解明する。

③他の高病原性ウイルスにライブセルイメージングシステムを応用する。

研究内容①と実験系の最適化は一年目に概ね達成された。また③についても、MARV で同様のアッセイ系を構築することに成功した。以上の成果を踏まえて、今年度は研究内容②と③について、より一層の発展を目指す。

2 年目：1 年目に最適化した実験系を使い、データを収集し解析する。EBOV のマトリクスタンパク質と相互作用する宿主因子を、遺伝子サイレンシング法および特異的阻害薬を用いて抑制し、ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質の輸送過程および VLP 放出過程への影響を明らかにする。L ドメインがヌクレオカプシド様構造と VP40 の輸送過程・相互作用に、どの様に関わるのか明らかにする。昨年度構築したライブセルイメージングシステムを用いて、EBOV と MARV のヌクレオカプシド様構造の輸送過程の違いを解明する。さらに解析データをまとめて、国際科学雑誌へ投稿する。

③ 予想される成果

申請者らが構築したアッセイ系と熱研受け入れ教員である南保博士の技術・知識を融合させることで、これまでわからなかったエボラウイルスの粒子形成過程・出芽過程の分子機構を明らかにすることが可能である。本研究では、複数の蛍光タンパク質とライブセルイメージング顕微鏡を用いてウイルスのライフサイクルを視覚化する (ヌクレオカプシド

タンパク質、マトリクスタンパク質、宿主因子をそれぞれ別の色で標識)。これにより、ウイルス粒子形成に関わるウイルスタンパク質・宿主因子間の相互作用を 4 次元 (時間+3次元空間) で解析できるようになる。これらの成果は、ウイルス因子・宿主因子を介したエボラウイルスの新しい治療薬の開発に貢献することが期待される。

また非感染性ライブセルイメージングを他のウイルスに応用することで、それらのウイルスのライフサイクルを視覚化することが可能になる。したがって、このシステムを用いることで他の高病原性ウイルスについても、ウイルス粒子の形成・輸送・放出を制御する機構を解明し、新しい治療法を開発するための基盤を構築することが期待される。

5. 実施報告

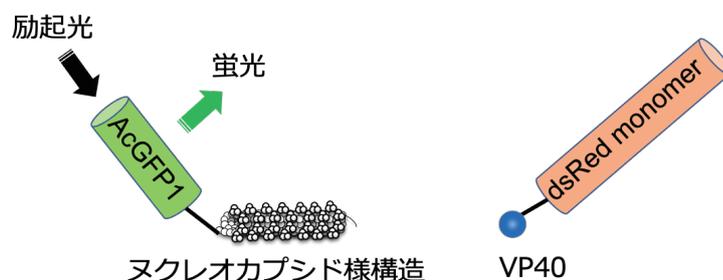
① 研究材料・方法・手続き

エボラウイルスのゲノム複製の足場であるヌクレオカプシドは核周囲のウイルスタンパク質封入体で形成され、ウイルス粒子のアセンブル及び出芽の場である形質膜まで、アクチンを経路として長距離移動することがわかっている。申請者は前駆研究で、エボラウイルスの非感染性ライブセルイメージングシステムを構築し、ヌクレオカプシド様構造（タンパク質発現系を用いたヌクレオカプシドのモデルとなる構造）の形成と輸送に必要なウイルスタンパク質を同定した。またヌクレオカプシド様構造が形質膜の近傍でマトリクスタンパク質 VP40 と会合しウイルス粒子を形成する可能性が高いことを、ライブセルイメージングによる共局在解析で提示した (Takamatsu, *et. al.* PNAS. 2018)。一方で、実際にいつどこでヌクレオカプシド様構造と VP40 が会合するのか、その詳細な分子機構はわかっていなかった。

タンパク質間の相互作用を時空間的に解明するために、FRET(Foerster/fluorescence resonance energy transfer、蛍光共鳴エネルギー移動) は非常にパワフルで有用な方法である。FRET はドナー分子の蛍光を励起することで、共鳴するアクセプター分子の蛍光が励起されることから、観察対象の 2 分子がいつどこで相互作用するかリアルタイムで明らかにすることが可能である。この方法を用いて、ヌクレオカプシド様構造と VP40 の時空間的な相互作用を明らかにすることを目指した(図 1)。

図 1

二分子が時空間的に遠い場合



二分子が時空間的に近い場合

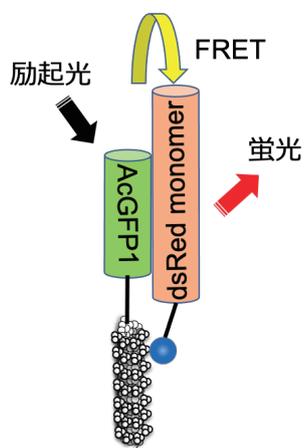
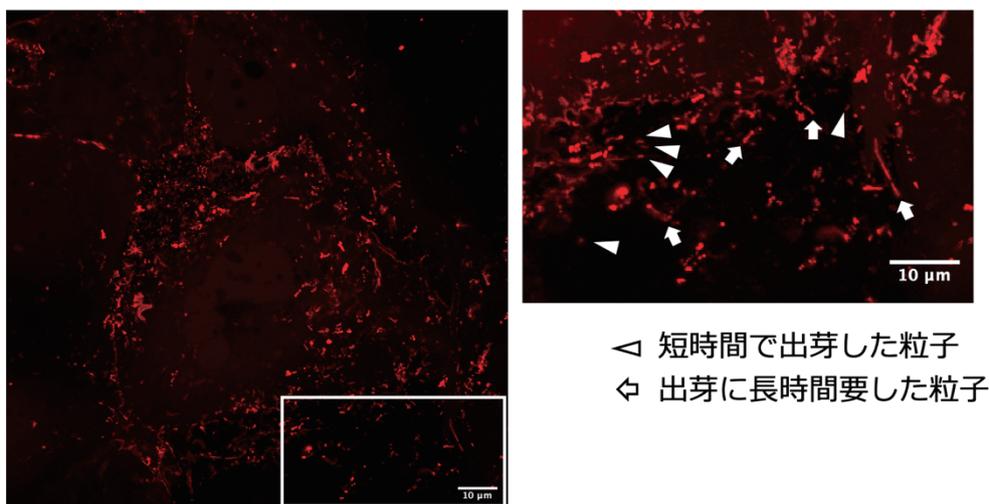


図 1. 蛍光共鳴エネルギー移動FRETを用いて、ヌクレオカプシド様構造とVP40の時空間的な相互作用を明らかにすることを目指した。ヌクレオカプシド様構造にAcGFP1 (dsRedmonomer) を、VP40にdsRed monomer (aAcGFP1)を融合させたプラスミドを構築した。

② 成果（結果＋考察）

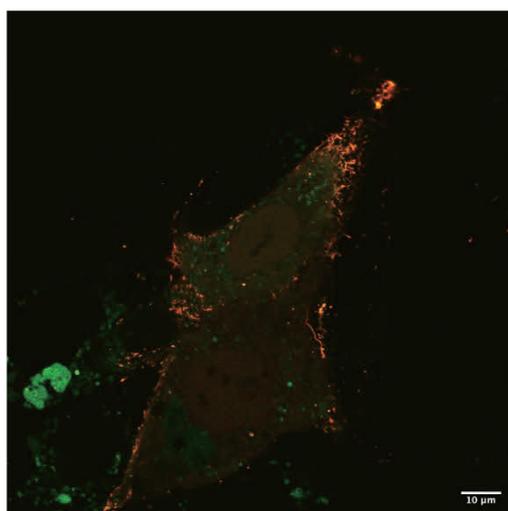
研究内容の「①ヌクレオカプシド様構造とマトリクスタンパク質がウイルス粒子を形成する分子機構を解明する」、「②粒子形成・出芽に関わる宿主因子との相互作用を解明する」について、いくつかの興味深い成果を挙げた。一つは、VP40 が出芽する過程について、共焦点ライブセルイメージング顕微鏡を用いて撮影し、出芽頻度や速度などの3次元データを取得した（図2）。

図2.



VP40-dsRedmonomer過剰発現細胞。48時間後に多数の粒子様構造が形質膜近傍から細胞外部へ出芽する様子を検出した。右下白線部の拡大像を右側に示した。

図3.



VP30-AcGFP1, VP40-dsRedmonomerのFRET解析像。形質膜近傍で特異的にmerge signal (黄～橙色)を検出した。

さらに、FRET解析を可能にする哺乳類細胞発現プラスミドを構築し、ヌクレオカプシド様構造とVP40が形質膜近傍で特異的に相互作用することがわかった（図3）。本アッセイ系のFRETシグナルは時空間的に近接していないと検出されないため、エボラウイルス粒子のアセンブルが形質膜近傍で生じることを示す重要な証拠を世界に先駆けて確認することができた。

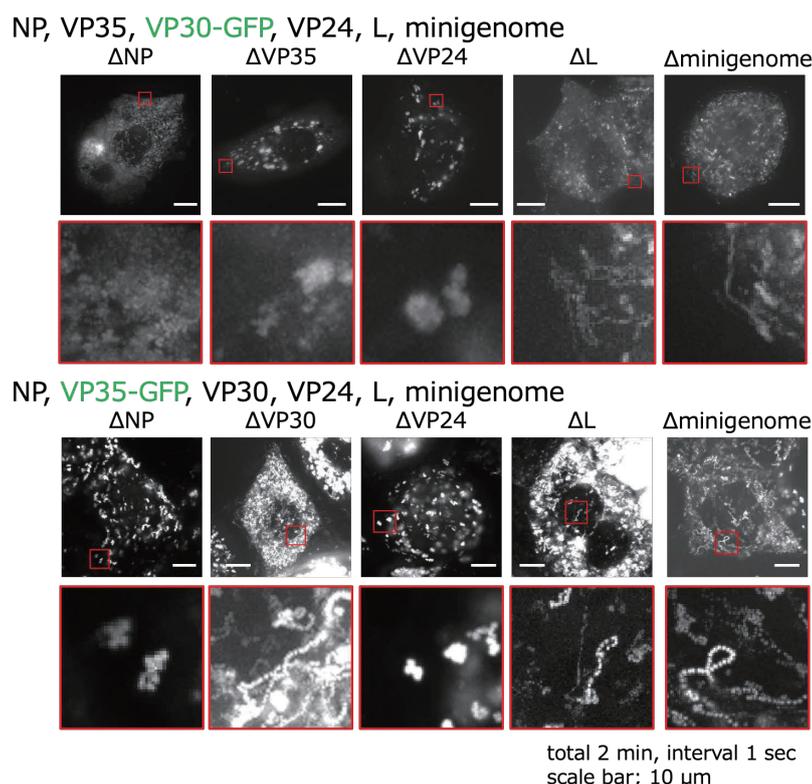
現在、画像解析ソフトを用いて、ヌクレオカプシド様構造の有無でVP40の出芽過程にどのような変化が生じているか定量解析を進めている。

研究内容「③他の高病原性ウイルスに

「ライブセルイメージングシステムを応用する」についても顕著な進捗があった。昨年度報告したタンパク質発現系を用いたマールブルグウイルスのライブセルイメージングシステムを用いて、ヌクレオカプシド様構造の形成と輸送を制御するウイルスタンパク質としてNP, VP35, VP24を同定した。また、その輸送経路がエボラウイルス同様、アクチン重合を介して行われることを明らかにした(Takamatsu, *et al.* in preparation)。興味深いことに、ヌクレオカプシド様構造の形成・輸送機構はエボラウイルス及びマールブルグウイルスで同様であった(図4)。一方で、ウイルスタンパク質(NP, VP35, VP24)をエボラウイルスとマールブルグウイルスの間で一つでも入れ換えると、ヌクレオカプシド様構造の形成・輸送は観察されなかった。したがってヌクレオカプシド様構造はウイルス種特異的に形成されるが、形成されたヌクレオカプシド様構造の輸送過程は共通である可能性が示唆された。今後、フィロウイルスで得られた知見を他の高病原性ウイルスに応用することで、ヌクレオカプシドの輸送過程及びウイルス粒子の形成過程を制御する新しい治療法の開発に貢献したい。

図4.

ヌクレオカプシド構成タンパク質の中でNCLS輸送に必要な要素の同定



NP, VP35, VP24タンパク質の欠如により、長距離輸送されるNCLS(連続する点線)を認めなかった。したがって、この3つのウイルスタンパク質がNCLSの輸送に必須であることが示された。

③ 成果の公表

昨年度公表された論文は無かったが、下記の論文の投稿を準備しており、近い将来に公表されることが期待される。

1) Yuki Takamatsu, Larissa Kolesnikova, Stephan Becker, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shutetsu Fukushi, Masayuki Shimojima, Masayuki Saijo, and Takeshi Noda. The role of VP30 phosphorylation in Ebola virus nucleocapsid assembly and transport.

2) Yuki Takamatsu, Olga Dolnik, Tekeshi Noda, Stephan Becker. Revealing the transport machinery of Marburg virus Nucleocapsid-like structures.

3) Yuki Takamatsu, Asuka Nanbo, Tekeshi Noda, Masayuki Saijo. Visualization of Ebola virus virion assembly and budding processes (仮).

6. 自己評価

申請書で記載した3つの研究内容について、それぞれ著しい進捗を認め、現在上述の3報の論文を作成中である。本共同研究課題を通して、エボラウイルス粒子のアセンブルが形質膜近傍で生じることを示す重要な証拠を世界に先駆けて確認できた事と、マールブルグウイルスのヌクレオカプシド様構造の形成・輸送機構を詳細に解明できた事から、当初の目標を達成できたと自己評価している。また共同研究期間中には、本研究課題以外にも南保先生から様々なアドバイスを頂き、非常に実り多い共同研究ができていると感謝している。今後とも南保先生と高病原性ウイルスの細胞内動態を解明するための共同研究を継続させて頂きたいと考えている。

7. 達成度

I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2 (2020) 年度一般共同研究報告 (自己評価)

1. 課 題 名 : 人獣共通感染性の肝蛭症に対する新規薬剤の探索

課 題 番 号 : 2020-Ippan-29

2. 代 表 者 : 関 まどか (岩手大学 農学部 共同獣医学科)

共 同 研 究 者 : 北 潔 (長崎大学熱帯医学研究所 教授)

稲岡健ダニエル (長崎大学熱帯医学研究所 准教授)

3. 決 定 額 : 500 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

【背景】

肝蛭 (かんてつ) (図 1) は人獣共通感染性の寄生虫である。畜産業には年間 32 億ドル以上という吸虫類では最大の経済被害を与えている。ヒトは水耕野菜や感染動物の生レバーに付着した幼虫を経口的に摂取すると感染し、肝蛭が肝臓に寄生することで重篤な肝障害を引き起こされる。WHO によれば、途上国を中心に世界中で少なくとも 240 万人が肝蛭に感染し、1 億 8000 万人に感染リスクがあると見積もられている。

WHO は治療薬としてトリクラベンダゾールを唯一推奨しているが、ヨーロッパ、オーストラリア、南米など世界各地でトリクラベンダゾール (TCZ) 耐性虫体が出現し問題となっている (Kelley et al. 2016)。耐性の獲得機序は全く解明されていないため、薬剤耐性虫体に対して打つ手がなく、新規薬剤の開発は喫緊の課題である。トリクラベンダゾールに代わる新規薬剤の開発に成功すれば、年間 2 億ドル以上の経済価値が見込まれる。

【目的】

哺乳類はミトコンドリア呼吸鎖で酸素を消費する酸素呼吸によりエネルギーを産生する。一方、哺乳類の体内という低酸素環境に適応した寄生虫は酸素を消費しない嫌気呼吸によりエネルギーを産生する。このような寄生虫特異的な嫌氣的呼吸鎖は、哺乳類のそれとは生化学的特性が大きく異なるので、選択的な化学療法ターゲットとして有望である。そこで、本研究ではミトコンドリア呼吸鎖を標的とする新規薬剤を探索する。



図 1. 肝蛭(成虫)

染色標本 : 実物大

②研究内容

申請者らは、これまでに肝蛭では哺乳類の酸素呼吸とは逆反応のフマル酸呼吸によりエネルギーを産生することを見出した(図2)。さらに、フマル酸呼吸の阻害剤により、*in vitro* 培養系で肝蛭の幼虫を効果的に殺滅できることを見出した(2018年日本生化学会シンポジウム講演、International Congress of Parasitology 2018 口頭発表、論文投稿準備中)。

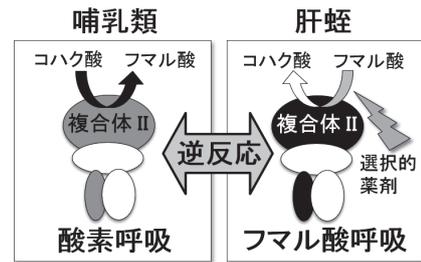


図2. 肝蛭における薬剤標的

【本研究で解決する課題】

- ① フマル酸呼吸を標的とした化合物の中から、最近申請者らが確立した *in vitro* 薬剤スクリーニング系(図3)により、有望な化合物を絞り込む。
- ② 実験動物を用いた *in vivo* 試験により、候補化合物の成虫に対する駆虫効果、および幼虫に対する駆虫効果を解析する。特に、幼虫に対する効果を確認することは感染予防の観点から重要である。

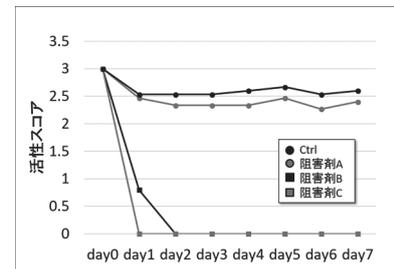


図3. 幼虫を用いた *in vitro* 試験

③予想される成果

【本研究の将来性】

前述したように、世界各地でトリクラベンダゾール耐性肝蛭が出現しており、新規薬剤の開発は喫緊の課題である。トリクラベンダゾールに代わる予防法の開発には2億ドルもの経済価値があると見積もられている。

南米のペルーではトリクラベンダゾール耐性肝蛭の感染が家畜だけでなくヒトからも頻繁に報告されている。申請者は、ペルーで肝蛭症の調査研究を専門とする研究者 Dr. Pedro Ortiz (業績10) や Dr. Daniel Alexis Zarate Rendon と協力関係にあり、新規薬剤の開発を実現した後に、臨床試験を実施する環境が整っている。

【本研究の独創性・発展性】

申請者は肝蛭の生活環を中間宿主巻貝と実験動物を用いて実験室内で維持することに数年間を費やした末に成功した。安定した実験室株を有する研究室は世界的にもほとんど存在しないため、吸虫類の薬剤開発はこれまで進んでこなかった。申請者の実験室系は、肝蛭の薬剤耐性の問題を解決することにとどまらず、世界的に見ても寄生吸虫類の薬剤開発のモデルケースとなる先駆的な研究成果につながるため、そのインパクトは計り知れない。

5. 実施報告：

①研究材料・方法・手続き

令和元年度の本共同研究において、*in vitro* 薬剤スクリーニング系による候補化合物の絞り込みを行った。その結果、アスコフラノン (AF)、アルコフラノン誘導体 (AF-d)、化合物 X が新規薬剤候補として有望であると考えられた。

そこで本年度は、ラットとマウスを用いた *in vivo* 試験を実施して、化合物 X の成虫と幼虫に対する有効性をそれぞれ検討した。

(1) 化合物 X の成虫に対する有効性

Slc: Wistar ラット(雄、6 週齢)に肝蛭(*Fasciola* sp. Wuh15-2: 中国武漢市由来実験室株)のメタセルカリア計 15 個を経口的に感染させた。感染から 12 週間以上経った後に糞便検査を行い、虫卵の検出をもって成虫への発育を確認した。ラットは化合物 X 投与 1 群(100mg/kg)(n=4)、化合物 X 投与 2 群(300mg/kg)(n=4)、TCZ 投与群(10mg/kg)(n=4)、コントロール群(n=4)の 4 群とした。化合物 X の腹腔内投与は、初回の投与日 Day0 から Day3 の計 4 回繰り返した。Day17 に各群のラットを安楽殺後、解剖し、肝臓の肉眼的所見を記録した。また、胆管に寄生する成虫の虫体数を調べた。

(2) 化合物 X の幼虫に対する有効性

Slc: ICR マウス(雄、6 週齢)に肝蛭(*Fasciola* sp. Wuh15-2: 中国武漢市由来実験室株)のメタセルカリア計 15 個を経口的に感染させた。マウスは化合物 X 投与 1 群(100mg/kg)(n=4)、化合物 X 投与 2 群(300mg/kg)(n=4)、TCZ 投与群(10mg/kg)(n=4)、コントロール群(n=4)の 4 群とした。投与は感染から 10 日目(感染日を感染 0 日目とする)に開始した。初回の投与日 Day0(感染後 10 日目)から Day3 の計 4 回繰り返した。Day17 に各群のマウスを安楽殺後、解剖し、肝臓の肉眼的所見を記録した。また、肝臓をピンセットで細切し、幼虫の虫体数を調べた。

②成果(結果+考察)

(1) 化合物 X の成虫に対する有効性

実験中に数匹の個体が死亡したため、解剖時の個体数は化合物 X 投与 1 群が 2 匹、化合物 X 投与 2 群が 3 匹、TCZ 投与群が 4 匹、コントロール群が 3 匹であった。肉眼的には、コントロール群、化合物 X 投与群では、総胆管壁が線維化・肥厚し、虫体の寄生と、胆管内貯留液により、総胆管が著しく膨れ上がっていたが、TCZ 投与群では、総胆管壁の線維化・肥厚は認められたものの、胆管内貯留液の蓄積は認められなかった。コントロール群ではラット 1 匹あたり平均 5.7 匹、化合物 X 投与 1 群では平均 5.5 匹、化合物 X 投与 2 群では平均 5.0 匹の成虫を総胆管内から検出した。一方で、TCZ 投与群はすべてのラットから虫体は検出されなかった。実験 A では各群の解剖個体数の不足のため、有意差検定を行うことができなかった。

(2) 化合物 X の幼虫に対する有効性

実験中に数匹の個体が死亡したため、解剖時の個体数は化合物 X 投与 1 群が 5 匹、化合物 X 投与 2 群は 6 匹、TCZ 投与群が 5 匹、コントロール群が 5 匹であった。肉眼的には、化合物 X 投与群、TCZ 投与群、コントロール群の全てで幼虫の肝臓実質内移行による虫道の形成が認められたが、各群の間に肉眼的な所見の違いは認められなかった。コントロール群ではマウス 1 匹あたり平均 7.0 匹、化合物 X 投与 1 群では平均 8.8 匹、化合物 X 投与 2 群では平均 9.5 匹、TCZ 投与群では平均 8.6 匹の幼虫を肝臓から検出した(図 10、表 3)。各群で検出虫体数に有意差は認められなかった(Kruskal-Wallis 検定、 $p > 0.05$)。

(1)(2)の結果から化合物 X は *in vivo* において肝蛭の成虫・幼虫ともに効果が認められなかった。一方、多包条虫では、化合物 X の経口投与で駆虫効果があったと報告されている。また、マンソン住血吸虫でも駆虫効果が認められた。肝蛭に化合物 X が無効であった原因としては肝蛭、マンソン住血吸虫、多包条虫で寄生部位に違いがあることが挙げられる。さらに、(2)の幼虫の駆虫効果では、コントロール薬剤である TCZ も効果がなかったため、幼虫にも効果がある新規薬剤の必要性が強く示された。今後は、化合物 X について再試を実施するとともに、AF および AF-d について *in vivo* 試験を行う予定である。

③成果の公表

該当なし (論文投稿準備中)

6. 自己評価

化合物 X の *in vivo* 試験を実施し、一定の成果を挙げられたと考えている。予想に反して化合物 X の有効性は確認できなかったが、エキノコックスやマンソン住血吸虫では AF に十分な駆虫効果があったと報告されていることから、今後は化合物 X について再試を行うとともに、AF、AF-d の効果についても検討したい。また、2019 年度の研究業績に関する論文を投稿することも達成したい。

7. 達成度

- I (所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった)
- II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)
- III (予想通りの成果を挙げられた。満点)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

第 2 部

研 究 集 会

令和2(2020)年度研究集会報告(自己評価)

1. 分野名：熱帯医学研究所 免疫遺伝学分野
研究集会の名称：医学研究のための倫理に関する国際セミナー
採択番号：2020-A-01
開催期間：令和2年8月17日(月)～令和2年8月19日(水)
2. 代表者：佐々木 均(長崎大学病院薬剤部・教授)
参加人員：32名
3. 経費：1000 千円

4. 研究集会の概要

①概要

現在医学研究において世界的な倫理基準としてヘルシンキ宣言、CIOMS あるいは WHO ガイドライン、さらに ICH-GCP ガイドラインが適用されている。これらのガイドラインはヒトを対象にした医学研究の倫理規範を一般的に規定したもので、それまでの研究者個々の人格に頼っていた倫理規範を世界的に統一した **Minimum Requirement** として明文化したことに大きな意味がある。しかし、この精神を実際の研究現場で適応していく作業にはもう少し細かい考慮が必要である。そして現況では、この作業なしには、研究の発展はもはや望めない状況にある。本集会では特に途上国における研究開発における倫理問題に焦点を絞り、世界で行われている、様々な事例を挙げながら医学研究倫理の専門家や、各国で医学研究に携わる研究者、及び他分野の専門家も加わって文化や習慣の違いを考慮に入れた検討を行い、今後の方向性について検討した。また、この集会は一般にも公開した。

②予想された成果

参加者が、今日の医学研究倫理に関して何がコンセンサスで、何が論議的なのか、また、その対処の仕方について理解できるようになる。

5. 実施報告

本集会は、「医学研究のための倫理に関する国際研修コース」との共催として、オンラインで、または長崎大学グローバルヘルス総合研究棟にて令和2年8月17日～8月19日の3日間、講師7名(うち外国から4名、国内から3名)と参加者25名(うち外国から10名、国内から15名)を集め開催された。FERCAP-Philippines(フィリピン国)の Cristina Torres, Mae Fah Luang University(タイ国)の Sangkae Chamnanvanakij、Khon

Kaen University (タイ国) の Kwanchanok Yimtae のほか、日本国内の倫理関係の研究者を多数講師として招聘し、質の高い研修コースを運営することができた。取り上げた内容としては、倫理委員会の構成、役割、機能、インフォームド・コンセント (同意書)、利益不利益の評価、誘導、発展途上国での倫理問題である。参加者は今日の医学研究倫理に関して何がコンセンサスで、何が論議の的なのかについて理解し、その対処の仕方について討論した。

<プログラム>

日 時：令和2年8月17日 (月)、8月18日 (火)、8月19日 (水)

場 所：長崎大学グローバルヘルス総合研究棟 (坂本キャンパス) ※オンライン参加可

参加費：参加費無料(宿泊費、食事代、交通費等は各自負担)

ウェブサイト：<http://nile.tm.nagasaki-u.ac.jp/hiraken/>

運営事務局：〒852-8523 長崎市坂本1-12-4

長崎大学熱帯医学研究所・免疫遺伝学分野

教授 平山 謙二

TEL 095-819-7820, FAX 095-819-7821

【研修の目的】

研修参加者は研究倫理についての基本的な考え方を学ぶと同時に、近年の研究倫理に関する国内外における議論を把握することができる。主たる内容は、研究倫理の基本原則、インフォームド・コンセント、リスク・ベネフィット評価、既存資料の利用、国際共同研究における倫理である。これに加えて、子どもを対象とする研究の倫理、コミュニティを対象とする研究の倫理、プラセボ対照試験の倫理、研究と治療の区別、倫理審査委員会の構成や機能等についても学ぶ。

【対象者】

保健医療関係の博士課程大学院生、医学研究者、倫理委員会委員、医学部・保健医療関係の学部生など

【研修方法】

研修は、グループ討論を中心とした相互教育方式で行われる。参加者は各テーマについての入門的な講義を聞いたうえで、関連するケースについてグループで討論し、倫理的問題を分析する力を養う。なお、使用言語は基本的に英語であるが、できる限り日本語でも理解できるようサポートを行う。

【講師陣】

コースディレクター：Juntra Karbwang（長崎大学熱帯医学研究所）、佐々木 均(長崎大学病院薬剤部)、平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所）、木原 毅（長崎大学熱帯医学研究所）

講義担当者：Cristina Torres (FERCAP-Philippines)、
Sangkae Chamnanvanakij (Mae Fah Luang University)
Juntra Karbwang（長崎大学熱帯医学研究所）、
平山 謙二（長崎大学熱帯医学研究所）
Kwanchanok Yimtae（Khon Kaen University）

メンター：Dumre Shyam Prakash（長崎大学熱帯医学研究所）

【研修コースの概要】

(第1日目) 2020年 8月17日(月)

8:30～ 8:45 開会のあいさつ(平山謙二)

オリエンテーションと参加者の自己紹介

8:45～9:30 研究倫理の概論, その歴史的背景と原理 (Juntra Karbwang)

9:30～10:00 研究倫理委員会の役割と機能 (Sangkae Chamnanvanakij)

10:00～10:30 ブレイク

10:30～11:15 製薬関連コミュニティの研究倫理 (木原毅)

11:15～12:00 インフォームド・コンセント (Juntra Karbwang)

12:00～13:00 ランチタイム

13:00～13:30 利益相反 (Kwanchanok Yimtae)

13:30～14:15 リスク・ベネフィット評価 (Cristina Torres)

14:15～14:30 ブレイク

14:30～15:30 Case Study 1: グループ討論

(Cristina Torres, Kwanchanok Yimtae, Sangkae Chamnanvanakij, 佐々木均, 木原毅, Dumre Shyam Prakash, Juntra Karbwang, 平山謙二)

15:30～17:00 Case Study 1: 総合討論 (Juntra Karbwang & Kwanchanok Yimtae)

17:00 End of day one

(第2日目) 2020年 8月18日(火)

8:30～ 9:00 薬理ゲノム学研究における倫理的問題 (平山謙二)
 9:00～ 9:45 救急医療研究における倫理的問題 (Kwanchanok Yimtae)
 9:45～10:30 疫学のおよび社会的研究における倫理問題 (Cristina Torres)
 10:30～11:00 ブレイク
 11:00～12:00 小児科研究における倫理的問題 (Sangkae Chamnanvanakij)
 12:00～13:00 ランチタイム
 13:00～15:00 Case Study 2 : グループ討論
 (Cristina Torres, Kwanchanok Yimtae, Sangkae Chamnanvanakij, 佐々木均, 木原毅, Dumre Shyam Prakash, Juntra Karbwang, 平山謙二)
 15:00～15:30 ブレイク
 15:30～17:00 Case Study 2 : 総合討論 (Juntra Karbwang & Kwanchanok Yimtae)
 17:00 End of day 2

(第3日目) 2020年 8月19日(水)

9:00～10:30 国際保健研究における倫理問題 (Cristina Torres)
 研究方法, インフォームド・コンセント, 治療レベル, 試験後の利益
 10:30～11:00 ブレイク
 11:00～12:00 グループ討論結果の発表 (Cristina Torres & Juntra Karbwang)
 12:00～ 修了式 (平山謙二)
 End of the course

<参加者リスト>

No.	Name	Country	Institution
1	Xcyllea Jasmine Abanilla	Philippines	Department of Health - Single Joint Research Ethics Board
2	Rhodora Estacio	Philippines	Asian Hospital and Medical Center Research Ethics Committee
3	Ma, Fredelita Asuncion	Philippines	San Beda University College of Medicine / Quirino Memorial Medical Center

4	Rhodora Reyes	PHILIPPINES	BATANGAS MEDICAL CENTER RESEARCH ETHICS REVIEW COMMITTEE BATANGAS CITY PHILIPPINES
5	Rosa Gonzales	Philippines	Department of Health - Philippines
6	Barbara Michelle de Guzman	Philippines	Department of Health - Philippines
7	Anacleta P. Valdez	PHILIPPINES	BATANGAS MEDICAL CENTER RESEARCH ETHICS REVIEW COMMITTEE BATANGAS CITY PHILIPPINES
8	ERLYNDA I. MASANGCAY II	PHILIPPINES	BATANGAS MEDICAL CENTER RESEARCH ETHICS REVIEW COMMITTEE BATANGAS CITY PHILIPPINES
9	Benjamin Co	Philippines	
10	Arianne Kamille Bernardo	Philippines	
11	Komuro Ayumi	Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
12	TANG DIYA	China	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
13	Fatima Farhana	Bangladesh	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
14	Tong Ying	China	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

15	Naito Takeo	Japan	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
16	Pillay Micheal Teron	South Africa	Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
17	Amano Murasaki	Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
18	Simpson Shirley Victoria	Ghana	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
19	Too Edwin Kimeli	Kenya	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
20	Fukuta Mizuki	Japan	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
21	Vulu Zimbombe Fabien	Congo (DRC)	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
22	Huang Kai	China	Life Sciences and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

23	Yassouf Mhd Yousuf	Syrian	Life Sciences and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
24	Lina Abdelhamid Abdelhamid Abdelghany	Egypt	Life Sciences and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
25	Wu Jiwen	China	Advanced Preventive Medical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

< 講師・メンターリスト >

No.	Name	Country	Institution
1	Hitoshi Sasaki	Japan	Department of Hospital Pharmacy, Nagasaki University Hospital
2	Kenji Hirayama	Japan	Department of Immunogenetics, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
3	Juntra Karbwang Laothavorn	Thailand	Department of Clinical Product Development, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
4	Tsuyoshi Kihara	Japan	Department of Shionogi Global Infectious Diseases Division of Tropical Medicine, Nagasaki University
5	Cristina Torres	Philippine	FERCAP Coordinator / WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center, Thammasat University, Thailand Thammasat University
6	Sangkae Chamnanvanakij	Thailand	School of Medicine, Mae Fah Luang University
7	Kwanchanok Yimtae	Thailand	Khon Khen University, Thailand

6. 自己評価

令和2年8月17日～8月19日の3日間、オンラインまたは長崎大学において、英語による倫理に関する国際研修コースを開催し、講師7名（うち外国から4名、国内から3名）と参加者25名（うち外国から10名、国内から15名）を集め、世界でも類をみない集会を開催した。アフリカ、アジア等各国から多数の参加者があり、国際的な視野での討論が活発に行われ、この研究集会の特色が示された。参加者のアンケートの結果、英語による困難さはあるものの内容的には好評であった。今年度は、第18回目のコースであったが、タイのWHO-TDR Clinical Coordination and Training CenterのFERCAP Coordinator Cristina Torres 女史を中心に、これまでのスタイルを継承しつつ医学における倫理問題の世界的な動向についても議論することができた。予想以上の成果であった。

7. 達成度

I (予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

令和 2（2020）年度研究集会報告（自己評価）

1. 分野名：熱帯医学研究所 寄生虫学分野

研究集会の名称：皮膚リーシュマニア症研究会議

採択番号：2020 - A - 02

開催期間：令和 2 年 12 月 7 日（月）、令和 3 年 3 月 5 日（金）

2. 代表者：平林史子

（DND*i* Japan 理事/長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科）

3. 決定額： 1,000 千円

4. 研究集会の概要

顧みられない熱帯病（NTDs）である皮膚リーシュマニア症（CL）は各国での研究成果が上がりつつあり、日本でも大学、製薬企業によるプロジェクトが進んでいますが、研究努力は主に内臓リーシュマニア症に向けられており、CLは「最もネグレクトされたNTDs」の状況にあります。数少ない CL の研究に於いて長崎大学熱帯医学研究所は臨床研究、診断薬・ワクチン開発、アジア・アフリカにおける疫学研究など貴重な取り組みを実施してきました。今回、基礎研究、創薬から臨床に至る研究開発プロセス全体を通じて、治療薬開発のみならず、ワクチンや診断法の開発、ベクター研究や疫学など包括的な視点からの検討を深め、日本での CL 研究の加速を目指して皮膚リーシュマニア症研究会議を企画しました。国内外の専門家を招聘し、日本で CL 研究に携わる第一線の研究者に参集いただき最新の研究開発情報と方向性を共有することを目的としています。日本における熱帯病研究の中心的役割を担いケニアに拠点をもつ熱帯医学研究所による将来の貢献と、CL 研究で得られた経験や知見を他の NTDs 研究開発に繋げることも視野に議論を深める機会とします。

予想される成果

1. リーシュマニア研究に携わる研究者、製薬企業等のプラットフォームを構築
2. 会議録と成果の発表
3. 日本での CL 研究成果を基に WHO が進める Skin NTDs への貢献を拡大
4. 日本におけるリーシュマニア症に対する認知度の向上

5. 実施報告：

① 皮膚リーシュマニア症(CL)研究会議 参加人員： 50 人（令和 2 年 12 月 7 日）

本会議は長崎大学熱帯医学研究所と Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DND*i*) の共催にて当初令和 2 年 6 月 30 日に国際文化会館で対面形式の会議として企画されていましたが、COVID-19 感染状況に鑑みリモート開催に変更し ZOOM 会議の利点を最大限生かせるプログラムを再検討しました。

開催日を6月30日から12月7日に変更、国内外の研究者を招待し、リーシュマニア症の研究開発に携わる専門家6名（海外3名、国内3名）にウェブ登壇いただきました。ZOOM開催としたことにより、開催時間が当初予定の1日から2時間に短縮されたため、会議の目標を研究開発に絞り、機密性の高い研究開発情報を可能な限り共有できるよう非公開で開催しました。

東京大学医科学研究所の石井健教授と味の素バイオファーマサービス社の岡松亨氏より CpG-D35 の最新状況を、長崎大学熱帯医学研究所の濱野真二郎教授よりリーシュマニア症ワクチンの開発プロジェクトについて発表いただき、DND*i*の Dr. Charles Mowbray、Dr. Byron Arana、Mr. Olawale Ajose から 基礎研究と創薬、臨床開発、医薬品アクセスの最新状況と方向性についてグローバルの情報が提供されました。ZOOM 開催の利点を活かして海外の研究協力者が飛び入り参加するなど熱心な討議が行われ、DND*i*のアフリカ地域オフィスでCLの治療薬開発に携わるスタッフも参加しました。開会の辞は北潔 長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科 研究科長（東京大学名誉教授）、閉会の辞を山田陽城 DND*i* Japan 理事長（北里環境科学センター理事長、東京薬科大学客員教授、北里大学名誉教授）よりいただきました。

プログラム

日 時 : 令和2年12月7日（月曜日） 15:00-17:00
開催形式 : オンライン ZOOM
主 催 : DND*i*
共 催 : 長崎大学 熱帯医学研究所
運営事務局: 特定非営利活動法人 DND*i* Japan
〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-12-1 パークウエスト 3F
電話 : 03-6258-0303 E-mail : infojapan@dndi.org

【会議の目的】

新規治療薬の基礎研究、創薬から臨床に至る各プロセスのグローバルの研究開発情報と方向性、および日本の研究者によるプロジェクトの最新状況を共有する

【出席者】

国内外のリーシュマニア研究者 : 日本、ケニア、スイス、米国 合計 50 名
出席研究者の主な所属機関 : 大学、製薬企業、研究所、政府、DND*i*

【演者】

Byron Arana, Head of Cutaneous Leishmaniasis, DND*i*
Charles Mowbray, Discovery Director, DND*i*
Ken Ishii, Professor, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
Olawale Ajose, NTD Head of Access, DND*i*

Shinjiro Hamano, Professor, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University
 Toru Okamatsu, Acting General Manager of Business Development, Ajinomoto
 Bio-Pharma Services

【Agenda】

15:00-15:05	Welcome	Ms. Kaori Nakatani/ Head of DND <i>i</i> Japan
15:05-15:10	Opening remarks	Prof. Kiyoshi Kita/ Dean, Nagasaki University, TMGH
15:10-15:25	Cutaneous Leishmaniasis: Current situation and DND <i>i</i> 's approach	Dr. Byron Arana/ DND <i>i</i>
15:25-15:45	CpG-D35 project	Prof. Ken Ishii/ The University of Tokyo
15:45-15:55	Process development, yield improvement, purification process	Mr. Toru Okamatsu/ Ajinomoto Bio-Pharma Services
16:55-16:10	Prospects for new treatments for leishmaniasis	Dr. Charles Mowbray/ DND <i>i</i>
16:10-16:25	CL treatment strategy: the vision and pathway to access	Mr. Olawale Ajose/ DND <i>i</i>
16:25-16:40	Live attenuated prophylactic vaccine for leishmaniasis	Prof. Shinjiro Hamano/ Nagasaki University
16:40-16:55	Q&A	MC/ Prof. Kiyoshi Kita/ Dean, Nagasaki University, TMGH Ms. Fumiko Hirabayashi/ Board member, DND <i>i</i> Japan
16:55-17:00	Closing Remarks	Prof. Haruki Yamada/ Chair of the board, DND <i>i</i> Japan

成果の公表

医薬品研究開発に関わる高い機密性を考慮し会議は非公開で開催されました。同意の得られた講演内容について、発表者と機密保持について再確認後成果の公表を検討しています：

- 会議の書きおこしが終了し、臨床評価誌と議事録掲載について調整を進めています
- DND*i* 本部と長崎大学 TMGH のホームページにサマリーの掲載を検討しています
- 時差の関係で参加できなかった地域の DND*i* スタッフや研究者に、発表者より許可を得た範囲でビデオを共有します

② 皮膚リーシュマニア症(CL)ウェビナー 参加人員：149人（令和3年3月5日）

CL研究会議では有益な情報共有と討議が行われましたが、ZOOM開催による時間の関係で討議は研究開発に焦点を絞って行われました。研究開発のための基本情報として必須である途上国の治療現場のニーズに対する理解を深め、CLの心理社会的病態や人道援助に及ぼす影響の評価を共有するために、CLウェビナーを3月5日に追加開催しました。長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科が主催、長崎大学熱帯医学研究所共催、協力団体として国境なき医師団、DNDiの参加が得られました。12月7日に開催したCL研究会議を補完する形で国内、海外に広く案内の告知を行いました。

演者はオランダ、英国、モロッコ、スイス、日本より6名の専門家をお願いしました。国境なき医師団のDr. Koert Ritmeijerより内戦下における人道援助、Keele大学のProf. Lisa DikomitisとDr. Helen Priceに心理的側面、モロッコ保健省のDr. Issam Bennisから母子保健に対するCLの影響について、その後東京大学の後藤康之准教授とDNDiのDr. Byron Aranaより研究開発について発表いただきました。Dr. Koert Ritmeijer、Prof. Lisa Dikomitis、Dr. Helen Price及びDr. Issam Bennisは日本の組織・大学が企画する会議へ今回初めての参加であり、世界的専門家のプレゼンテーションにより多角的な見地からCLの新薬開発と包括的な疾患対策を検討する貴重な機会となりました。

プログラム

日時	： 令和3年3月5日（金）18:00～19:50
開催形式	： Zoomによるライブ配信
言語	： 英語（日英同時通訳付き）
主催	： 長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科
共催	： 長崎大学熱帯医学研究所
協力	： 国境なき医師団、DNDi
運営事務局	： 長崎大学 NCGM サテライト 〒162-8655 東京都新宿区戸山1丁目21番1号 国立国際医療研究センター 情報センター棟2階 TEL：03-6278-9970 FAX：03-6278-9971

【ウェビナーの目的】

CLが母子保健やメンタルヘルス、紛争状態における人道援助に及ぼす影響を専門家が評価し、必要とされる新しい治療法やワクチンの研究開発に繋げるとともに包括的な疾患対策に対する議論を深め、CLの認知度を向上させることを目指す

【参加者】

180人が登録、日本の他海外25か国から149人の参加がありました：

米国、スペイン、マレーシア、ケニア、スリランカ、アルゼンチン、コロンビア、韓国、スイス、ベネズエラ、ブラジル、ボリビア、カメルーン、ドイツ、フランス、英国、オーストラリア、カナダ、アイルランド、モロッコ、メキシコ、オランダ、

パプアニューギニア、パキスタン、エルサルバドル

【演者と講演内容】

タイトル： Knowledge gaps and challenges in managing patients suffering from CL

1. 紛争状況におけるCL

Dr. Koert Ritmeijer 国境なき医師団 NTDs コーディネーター・DND*i* 科学諮問委員

2. CLとメンタルヘルス：心理社会的影響とCLに関連したスティグマを探る

Prof. Lisa Dikomitis Keele 大学 グローバルヘルスインスティテュート教授

Dr. Helen Price Keele 大学 グローバルヘルスインスティテュート准教授

3. CLと母子保健

Dr. Issam Bennis モロッコ保健省Fez地域局 リーシュマニア症対策プログラム
リサーチャー

4. CL治療薬のギャップ

Dr. Byron Arana DND*i* 皮膚リーシュマニア症研究開発責任者

5. CLに対するワクチン開発への最新アプローチ

後藤康之氏 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

モデレーター：

Dr. Clara van Gulik 国境なき医師団 小児科医&メディカルアドバイザー

平林史子 DND*i* Japan 理事/DND*i* シニアアドバイザー、長崎大学 TMGH

成果の公表

DND*i* 本部、長崎大学の YouTube での公開を検討しています。

【Webinar Announcement】

メールでの告知の他、以下に情報を掲載しました：

- ホームページ - DND*i* 本部、DND*i* Japan, 長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科、長崎大学熱帯医学研究所
- Facebook - 国境なき医師団日本



WEBINAR Cutaneous Leishmaniasis (CL)

皮膚リーシュマニア症(CL)ウェビナー

Knowledge gaps and challenges in managing patients suffering from CL



Dr. Koert Ritmeijer

Médecins Sans Frontières | The Netherlands
国境なき医師団



Dr. Helen Price

Keele University | UK
キール大学



Dr. Issam Bennis

Fez Regional Directorate of Ministry of Health | Morocco
モロッコ保健省 FEZ地域局



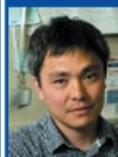
Dr. Byron Arana

DND*i* - Drugs for Neglected Diseases initiative | Switzerland



Prof. Lisa Dikomitis

Keele University | UK
キール大学



Dr. Yasuyuki Goto
後藤康之 氏

The University of Tokyo | Japan
東京大学



Dr. Clara van Gulik

Médecins Sans Frontières
国境なき医師団

Friday, 5 March 2021

(1hr 50 min)

09:00 UK | 10:00 CET | 18:00 Japan

English/Japanese (日英同時通訳あり)



Fumiko Hirabayashi

長崎大学MGH/DND

参加登録

https://us02web.zoom.us/webinar/register/WN_J9iM1mbS5u3It-iYgt0Ng

Organizer

主催

School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University (TMGH)
長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科

Co-organizer

共催

Nagasaki University, Institute of Tropical Medicine
長崎大学 熱帯医学研究所

Cooperation

協力

DND*i* - Drugs for Neglected Diseases initiative / 顧みられない病気の最新開発イニシアティブ
Médecins Sans Frontières / 国境なき医師団

Moderator

モデレーター

Fumiko Hirabayashi (長崎大学TMGH/DND)
Dr. Clara van Gulik (Médecins Sans Frontières 国境なき医師団)

Presentations 演題

1. CL in conflict situations / 紛争状況におけるCL
2. CL and mental health: exploring psychosocial impact and associated stigma (ECLIPSE) / CLとメンタルヘルス: 心理社会的影響とCLに関連したスティグマを探る
3. CL in women and children / CLと母子保健
4. CL treatment gaps / CL治療薬のギャップ
5. Current approaches to the development of a vaccine against CL / CLに対するワクチン開発への最新アプローチ

6. 自己評価

令和2年12月7日にCLの研究開発に携わる基礎研究者、臨床研究者、創薬専門家が参集し皮膚リーシュマニア症（CL）研究会議が開催されました。CLの感染地域で臨床試験を実施する研究者も参加し、最新情報と研究開発の課題や将来の方向性を共有、国際的な視点で討論が行われ連携を進める機会となりました。

CL研究会議での討議に基づき、治療薬開発を広い視野から多角的に検討しCLの認知度を向上させるため、皮膚リーシュマニア症ウェビナーを令和3年3月5日に追加開催しました。CLの心理社会的な影響を適切に評価し、研究開発と繋げて討議を行うことは海外でもまだ機会が少なく、日本では初めての試みとなりました。海外25か国から参加があり、日英同時通訳がつくことにより活発な議論と質疑応答が持たれました。

CL研究会議、ウェビナー共にリモート開催の利点を生かし最大限の成果を得ることができました。準備期間が短く告知が直前となったためスケジュールの重複や時差の関係で出席できなかった方々に対する対応を含め、成果の共有を進めています。また、フォローアップとして、今回明確になった研究開発のニーズと可能性に基づきアカデミア・企業の連携による研究開発を検討する機会を設けること、本会議とウェビナー実施以降の進展や新たな情報を共有してゆくことなどが必要と考えます。

7. 達成度

I (予想した成果はほとんど挙げられなかった)

II (不満は残るが一応の成果を挙げられた)

III (予想通りの成果を挙げられた。満点)

IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

第 3 部

海外拠点連携共同研究

令和2（2020）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ケニアで発生している真菌症・放線菌症の原因菌の収集と形態学的、生理学的、分子生物学的解析

課題番号：2020-Kyoten-1

2. 代表者：笹川千尋（千葉大学真菌医学研究センター・センター長）

共同研究者：矢口貴志（同・准教授）

渡邊 哲（同・准教授）

高橋弘喜（同・准教授）

伴 さやか（同・助教）

Bii C. Christine（Kenya Medical Research Institute (KMRI)・Chief Research Officer）

3. 決定額： 8,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

ケニアにおいて臨床検体より採取される真菌・放線菌、およびカビ毒産生などにより食糧を汚染してヒトに健康被害を及ぼす真菌を単離・培養・保存する。これらの菌種・地域特異性を明らかにし、疫学的研究を進める。また、形態学、生理学、分子生物学的解析を行うことにより、簡便な診断・同定法の開発を検討する。さらに、適切な薬剤の選択・治療法のコンサルテーション等を通して、現地の医療・人々の健康のために貢献し、生活の質（QOL）の向上を図る。単離された菌は、可能な範囲で日本に輸入し、真菌症およびその原因菌種研究のためのリソースとし、この分野の研究の推進に貢献する。

②研究内容

2019年度に引き続き、KEMRI所属の研究者と共同で、これまでにケニア各地のトウモロコシ粉・小麦粉などの穀物、乳製品から分離した真菌株において、遺伝子解析を実施し、汚染菌の分子系統的な位置付けを確定する。特に真菌症の原因となる *Aspergillus niger* 関連種（黒色の *Aspergillus*）において、分子系統的、形態学的解析による分類体系の検証を継続する。また、コーヒー豆上でのカビ毒産生の実態を明らかにするため、汚染カビのカフェイン耐性とカビ毒（オクラトキシン）生産性との関連の検討を実施する。さらに、オクラトキシン生合成遺伝子、薬剤感受性などの結果を統合し、健康に対するリスク評価を実施する。

ケニア国内の *Nocardia* 症の動向について、更に起因菌の検体数を増やして、遺伝子解

析による分子系統的な分類および薬剤感受性などの生理性状を解析する。さらに環境中の真菌症起因菌においても、分子系統的な分類および薬剤感受性を実施する（現在、ケニアからの菌株輸出手続き中）。

③予想される成果

ケニアにおけるカビ毒による主要食糧の汚染の測定結果は、これまでも学会・論文発表以外に一般の新聞、インターネット上、講演会で取り上げられ、現地の人々にカビ毒汚染に対する警鐘を鳴らし、QOLの向上に貢献してきた。今後も、これまでの研究成果や二国間で築き上げた信頼関係を基に汚染カビの収集、マイコトキシン量の測定を継続的に続け対策を探ることにより、ケニアをはじめ日本において、食物のカビ毒汚染、ヒト真菌感染症原因菌の分離、疫学研究を通じて、健康リスクを把握し、その対策に貢献できる。

5. 実施状況報告：

①令和2（2020）年度実施計画に対する実施状況

1. ケニアの穀物から分離された *Aspergillus niger* 関連種の同定と日本の臨床および環境分離株との比較

これまでケニア国で穀物汚染の原因となり、またヒトに有害なカビ毒を産生する *Aspergillus niger* 関連種を分子系統的、形態学的に解析を行ってきた。これまで分類に使用されている calmodulin、b-tubulin 遺伝子では既知種とは区別される分岐に含まれる種があることが判明した。そこで、既知のタイプ株 22 株、ケニアの環境分離株 18 株および千葉大真菌センターで収集した日本の臨床株、環境株 20 株を加えて、全ゲノム解析を実施してきた。今年度は日本産株に焦点をあて、ケニア産株との比較を行った。

2. その他のカビ毒の産生能

KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した穀物において、カビ毒の検出を実施している。重要なカビ毒フモニシンは小麦の病原菌である *Fusarium* が産生し、小麦汚染については世界的に調査されているが、トウモロコシのフモニシン汚染に関する研究はほとんどなされていない。今回、トウモロコシの汚染カビとフモニシンの検出濃度の検討を実施した。

3. 環境から分離された *Penicillium* の同定

ケニア国ナイロビの生活環境中から分離された糸状菌 145 株を入手し、分子系統的な分類検討した。

4. 臨床検体からの分離された細菌の同定

ケニア国内患者の喀痰などの臨床検体から分離された細菌 130 株を入手し、分子系統的な分類検討した。

②成果（結果+考察）

1. ケニアの穀物から分離された *Aspergillus niger* 関連種の同定と日本の臨床および環境分離株との比較

今年度は日本産株に焦点をあて、ケニア産株との比較を行った。その結果、*Aspergillus niger* 関連種の分類・同定に使用されている calmodulin 遺伝子単独による系統樹では、既知種と比較して、分岐が明確ではないが、全ゲノムを用いた系統樹では既知種と明らかに異なる分岐群を形成した (Fig. 1)。また、形態的な相違が確認された (Fig. 2)。そのうちの 1 種は、*A. tubingensis* とは CYA 培地で黄色の菌糸層、分生子の表面に刺状突起を生じる点が異なる (*A. tubingensis* はほぼ滑面)。また、もう 1 種は、*A. niger* とは、CYA、MEA 培地での生育が早い点、分生子の表面に板状突起を生じる点が異なった (*A. niger* は刺状突起)。以上より、既知種とは形態的、分子系統的に異なる新種と考えられる。

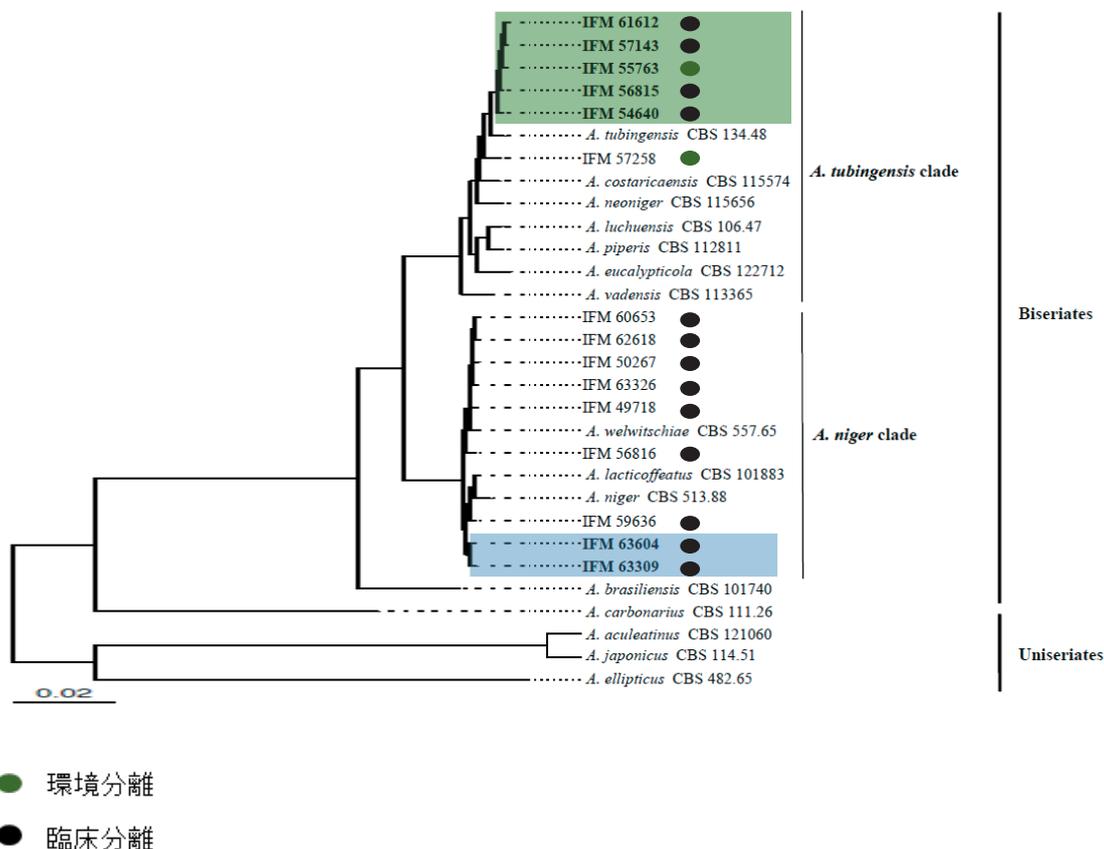


Fig. 1. 日本産株全ゲノムでの系統樹

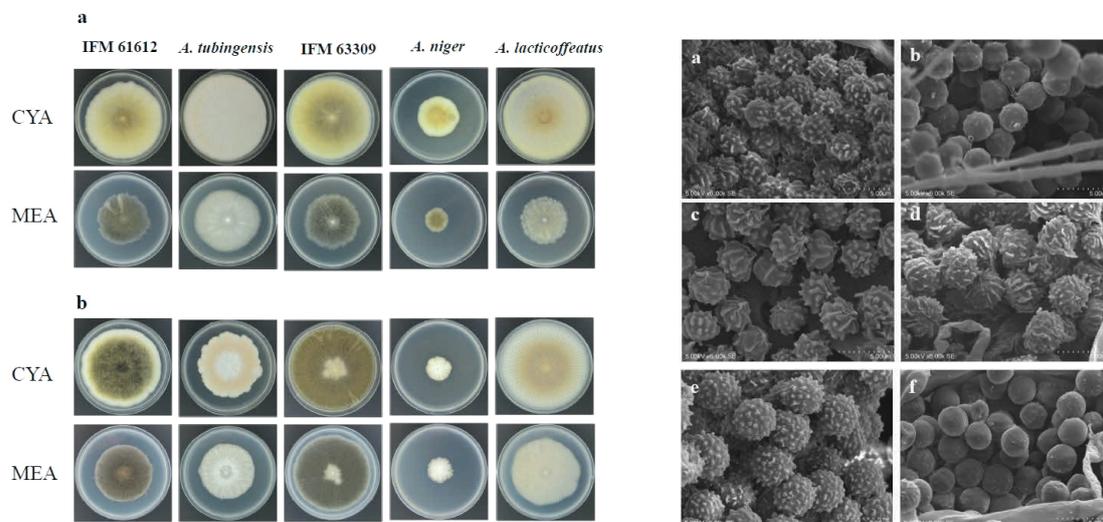


Fig.2. (左) 集落の性状. a: 25°C, b: 37°C.

(右) 分生子の SEM 像. a: IFM 61612, b: *A. tubingensis*, c: IFM 63309, d: IFM 63604, e: *A. niger*, f: *A. lacticafeatus*.

2. その他のカビ毒の産生能

KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集した穀物において、カビ毒の検出を実施している。重要なカビ毒フモニシンは小麦の病原菌である *Fusarium* が産生し、小麦汚染については世界的に調査されているが、トウモロコシのフモニシン汚染に関する研究はほとんどなされていない。今回の結果においても、トウモロコシの汚染カビとしては *Aspergillus* の頻度が最も高く、*Fusarium* は 2 番目で (Table 1)、*F. verticillioides* (トウモロコシ赤カビ病菌) が *Fusarium* 分離株の 80% を占めた (Table 2)。分析された 200 検体のうち、67% の検体でフモニシン濃度は検出レベルを下回り、2% において 4.0 ppm 以上で、降水量が多い東部地域では、リフトバレー地域と比較して、フモニシン検出の割合が高かった (Table 3)。中でも Kitui から、4.0 ppm を超えるもの 50% が分離された (Table 4)。

Table 1: Fungal species isolated from the samples (n = 173)

Variable	Study region		Total	Fisher's Exact test P-value
	Rift Valley	Lower Eastern		
Fungal species	n = 78	n = 95	n = 173	
<i>Fusarium</i>	18 (23.1%)	50 (52.6%)	68 (39.3%)	<0.001
<i>Aspergillus</i>	23 (29.5%)	64 (67.4%)	87 (50.3%)	<0.001
<i>Rhizopus</i>	20 (25.6%)	22 (23.2%)	42 (24.3%)	0.725
<i>Yeast</i>	19 (24.4%)	12 (12.6%)	31 (17.9%)	0.049
<i>Penicillium</i>	18 (23.1%)	22 (23.2%)	40 (23.1%)	>0.999
<i>Mucorales</i>	2 (2.6%)	2 (2.1%)	4 (2.3%)	0.999
<i>Acremonium</i>	5 (6.4%)	0 (0.0%)	5 (2.9%)	0.017
<i>Cladosporium</i>	0 (0.0%)	2 (2.1%)	2 (1.2%)	0.502
Non-sporulating	3 (3.8%)	0 (0.0%)	3 (1.7%)	0.090

Table 2: Fusarium species isolated in the study sites

Fusarium species	Region		Total (n=52)	Fisher's test P-value
	Rift Valley (n=11)	Lower Eastern (n=41)		
<i>Fusarium andiyazi</i>	5 (45.5%)	4 (9.8%)	9 (17.3%)	0.014
<i>Fusarium verticillioides</i>	6 (54.5%)	36 (87.8%)	42 (80.8%)	0.025
<i>Fusarium temperatum</i>	0 (0.0%)	1 (2.4%)	1 (1.9%)	>0.999

Table 3: Fumonisin contamination levels in the study sites

Fumonisin levels	Total (n=200)	Rift Valley (n=99)	Lower Eastern (N=101)	Fishers exact test P value
< LOD	133 (66.5%)	88 (88.9%)	45 (44.5%)	<0.001
0.1- 4.0	63 (31.5%)	10 (10.1%)	53 (52.5%)	<0.001
>4.0	4 (2.0%)	1 (1.0)	3 (3.0%)	<0.001

*Fumonisin values are in ppm

The distribution of fumonisins per county did not show any statistically significant differences (Table 4).

Table 4: Fumonisin contamination levels per county

County	Fumonisins levels			Total
	<LOD	0.1- 4.0 ppm	> 4.0 ppm	
Bomet	35 (26.3%)	7 (11.1%)	0 (0)	42 (21.0%)
Kitui	19 (14.3%)	20 (31.7%)	2 (50.0%)	41 (20.5%)
Machakos	13 (9.7%)	16 (25.4%)	0 (0)	29 (14.5%)
Makueni	13 (9.7%)	17 (27.0%)	1 (25.0%)	31 (15.5%)
Nakuru	27 (20.3%)	0 (0)	0 (0)	27 (13.5%)
Trans Nzoia	26 (19.5%)	3 (4.8%)	1 (25.0%)	30 (15.0%)
Total	133 (100%)	63 (100%)	4 (100%)	200 (100%)

3. 環境から分離された *Penicillium* の同定

ケニア国ナイロビの環境から分離された糸状菌 145 株を分類検討した。その内 *Penicillium* に属する菌株を形態的、分子系統的に同定したところ、*P. crustosum*、*P. chrysogenum*、*P. polonicum* が優先的に分離された (Table 5)。いずれの種もこれまでにカビ毒産生の報告があるため、今後はカビ毒産生能を確認する。同時に分離された *Aspergillus* は *A. luchuensis*、*Fusarium* は *F. oxysporum* が優占種であった (Table 6)。日本国内の環境から分離される菌種の傾向とは異なっていた。

Table 5. 分離された *Penicillium*

菌種	分離数
<i>P. crustosum</i>	59
<i>P. chrysogenum</i>	14
<i>P. polonicum</i>	7
<i>P. lanosocoeruleum</i>	3
<i>P. rubens</i>	3
<i>P. griseofulvum</i>	2
<i>P. glabrum</i>	1
	89

Table 6. 分離された *Fusarium*

菌種	分離数
<i>F. oxysporum</i>	16
<i>F. chlamydosporum</i>	2
<i>F. keratoplasticum</i>	2
<i>F. equiseti</i>	2
<i>F. pseudonygamai</i>	1
<i>F. solani</i>	1
<i>F. temperatum</i>	1
	25

4. 臨床検体からの分離された細菌の同定

ケニアの喀痰などの臨床検体から分離された細菌 130 株を同定した。*Bacillus safensis*、*Bacillus velezensis*、*Proteus mirabilis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia marcescens*、*Stenotrophomonas maltophilia* が優先的に分離された。今後、薬剤感受性試験結果を勘案し、詳細な検討の必要性を検討する。

Table 7. 分離菌種と薬剤感受性

菌種	株数	薬剤感受性 ペーパーディスク法 (mm)								
		PIP	CAZ	CFX	IPM	AZT	AMK	EM	CL	NA
	22	36	38	32	32	48	27	-	-	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13	28	30	-	28	26	25	±	15	18
<i>Bacillus</i>	12	33	31	37	45	-15	32	38	-	33

<i>velezensis</i>										
<i>Bacillus safensis</i>	10	30	(27)	36	49	10	29	39	-	32
<i>Bacillus sp.</i>	7	27	-	19	40	-	30	32(38)	-	26
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	6	36	36	(31)	(34)	(46)	(25)	-	-	28
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	32	35	33	35	41	26	±	15	30
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	35	-	-	31	-	-	-26	-	-

PIP: piperacillin, CAZ: ceftazidime, CFX: cefixime, IPM: imipenem, AZT: aztreonam, AMK: amikacin, EM: erythromycin, CL: colistin, NA: nalidixic acid.

③成果の公表

Koskei P, Karanja S, Mashedi O, Matsuzawa T, Gono T, Yaguchi T, Bii C. Isolation and characterization of *Fusarium* species and fumonisins contamination in maize from lower eastern and rift valley regions of Kenya. *Afri J Educa Sci Technol*, 6 (1): 19-28, 2020.

Yaguchi T. Classification of *Aspergillus fumigatus* and relative species and their antifungal susceptibilities in Japan. Symposium MEM-11. International Union of Microbiological Societies, 2020. 12th – 16th October 2020 in Daejeon, Korea.

6. 自己評価

本年度は主として、日本産の臨床、環境由来の *Aspergillus niger* 関連種において、分子系統的、生理性状的に *A. niger* 関連種全体の分類の再検討を実施し、ケニア産菌株との比較を検討実施した。その結果、これまで未報告の種が見いだされ、今後それらの健康リスク評価は重要と考える。また、KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集したトウモロコシを使用し、重要なカビ毒フモニシンの検出を行った。フモニシンの小麦汚染については世界的に調査されているが、トウモロコシ汚染に関する研究はほとんどなされていない。今回のトウモロコシ汚染の知見は、ケニアの地域ごとの穀物汚染におけるリスク評価につながる。さらに、新たに入手した環境中の *Fusarium*、*Penicillium* において今後、重要なカビ毒の産生能を検討する予定である。

コロナ禍により、予定していたケニアへの渡航が出来なかったが、ケニア国内の手続きを踏んだ新たな菌株を送っていただき、その解析が進展していることから、本プロジェクトは実施計画どおり進展していると考えられる。

7. 実施度

- I (実施計画を実施していない。)
- II (実施計画どおり進展していない。)
- III (実施計画どおり進展している。)
- IV (実施計画以上の成果が得られている。)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

8. 令和2(2020)年度執行状況調査

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備考
	千円	千円	千円	
(人件費)	0	1,199,025	1,199,025	
(運営費)	0	1,901,135	1,901,135	
(設備費)	0	4,899,840	4,899,840	超低温フリーザー、安全キャビネット
計	0	8,000,000	8,000,000	

令和2（2020）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ハノイコホートをを用いた HIV-1 subtype A/E ウイルス感染症の疫学およびワクチン開発と治療のための基盤研究

課題番号：2020-Kyoten-02

2. 代表者：

滝口 雅文（熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター・シニア教授）

共同研究者：

前田 洋助（熊本大学 大学院生命科学研究部・准教授）

村越 勇人（熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任准教授）

近田 貴敬（熊本大学 ヒトレトロウイルス学共同研究センター・特任講師）

3. 決定額：7,000 千円

4. 申請時書類より

①研究目的

東南アジアで流行している HIV-1 CRF01_AE（subtype A/E）は、日本で流行している subtype B の HIV-1 とは構造や機能が異なっており、これらの HIV-1 に対するワクチンや治療薬の開発は subtype B に対するものとは異なってくると考えられる。そこでまだ十分解明されていない subtype A/E の構造・機能解析やこのウイルスに対する細胞傷害性 T 細胞の反応、HLA の病態進行に及ぼす影響等を、ベトナムのハノイにある国立熱帯病病院でのコホートでリクルートした患者を用いて、疫学的、ウイルス学的、免疫学的方法により解析する。これらの基盤的研究成果を基に、subtype A/E に対するエイズワクチンや治療開発の研究に発展できるような研究を進展させる。

②研究内容

1. ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与えるHLAに関連する細胞傷害性T細胞の解析：

(1) 今までに解析してある HIV-1 subtype A/E overlap peptides に対する T 細胞反応のデータから、HLA 拘束分子別に protective epitopes を含んでいる overlapping peptides を明らかにできた。そこで2020年度は、protective epitopes を含んでいる overlapping peptides 数が多い3つの HLA alleles の内、HLA-A*11:01 に焦点を当て、以下の解析をする。

1) overlapping peptides 内に含まれている HLA-A*11:01 に拘束した epitopes を同定する。

2) HLA-A*11:01 を持っている感染者で、同定した epitope 特異的な T 細胞の有無を ELISPOT assay で検出し、血漿ウイルス量（pVL）および CD4T 細胞数（CD4数）との相関を調べ、protective epitopes であるか明らかにする。

3) 同定したprotective epitopesに特異的なT cell linesを作製し、HIV-1増殖抑制能などを調べる。

(2) 日本の HIV-1 subtype B 感染コホートでは、HLA-B*52:01-C*12:02 のハプロタイプを持った感染者のエイズ進行が遅れることが知られており、また我々のハノイコホートでの解析で HLA-C*12:02 を持った感染者でもエイズ進行遅延を確認している。そこで、既に日本のコホートで報告されている HLA-C*12:02 もしくは HLA-B*52:01 拘束性 protective epitopes を、これらの HLA を持っているハノイコホートの感染者で解析し、これらの epitopes 特異的 CTL の有無と pVL および CD4 数との相関を解析し、進行遅延に参与する T 細胞を明らかにする。もしハノイコホートでの進行遅延の機序が解明されない場合は、subtype A/E での新たな protective epitopes の同定とその特異的 T 細胞の役割を解析する。

2. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析:

(1) ベトナムで分離された X4 ウイルスがなぜ感染個体内でその感染性を保持しながらマイナー集団として存在しているかを明らかにするため、分離された X4 ウイルスの HIV-1 感染性クローンを作製し、その塩基配列と感染性を確認して、そのウイルス学的性質を明らかにする。

(2) 前年度に引き続き、HIV-1 感染血漿から vRNA を抽出し、ベトナムに多いとされる CRF01_AE のコレセプター利用性と病態との関連について解析する。マイナー集団としてコレセプター利用性が異なる HIV-1 が存在する混合感染例については、次世代シーケンサーによる解析を長崎大学ベトナム拠点と一緒に行う。

③予想される成果

1. ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与えるHLAに関連する細胞傷害性T細胞の解析:

以下にも記載してあるように、すでに我々は HIV-1 subtype A/E overlap peptides に対する T 細胞反応のデータから、protective epitopes を含んでいる overlap peptides を明らかにしている。2020 年度は、HLA-A*11:01 に拘束した protective epitopes の同定を試みるが、すでに我々は、日本のコホートを同じような方法を用いて他の HLA に拘束する protective epitopes の同定に成功しており、複数の HLA-A*11:01 に拘束した protective epitopes の同定ができると考えられる。HLA-C*12:02 と HLA-B*52:01 拘束性 protective epitopes 特異的 T 細胞に関しては、すでに subtype A/E 由来の 6 種類のペプチドを合成してあり、解析ができる状況にあるので、速やかにデータが得られる。

2. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析:

ベトナムで流行している HIV-1 のコレセプター利用性の解析を行い、ベトナムでは X4 ウイルスの頻度が他の国より高いこと、また HIV-1 感染個体の血漿中に存在している CCR5 を使用する R5 ウイルス以外に、一部の症例ではわずかながら存在している CXCR4 を利用する X4 ウイルスが血漿から分離されることをベトナムの感染血漿を使用して明らかにしてきた（以下の成果参照）。このことは、ウイルスのコレセプター利用性のスイッチが起こる症例では複数種のウイルスが個体内で共存・維持されていて、その中でそれぞれの個体内環境に適応しているウイルスが選択されているのではと考えられた。我々はすでにその証拠を集めつつあるが、今回解析症例数を増やすことにより、この事実を確実にすることができ、またその機序の解明に迫ることができると考えられる。

5. 実施状況報告：

①令和2（2020）年度実施計画に対する実施状況

1. エイズ進行遅延に関与する HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞エピトープの同定

我々は昨年度ハノイの無治療コホートで、396名の subtype A/E 感染者に対する Gag, Pol, Nef 領域の overlapping peptides を用いた解析を行い、HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞にエイズの進行を遅延する T 細胞 (protective epitope 特異的 T 細胞) を多く含んでいることを明らかにした。そこでハノイのコホートを用いて、HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞の同定を試みた。

2. エイズ進行遅延に関与する HLA-C*12:02 および HLA-B*52:01 拘束性 T 細胞の解析

ハノイの無治療コホートで、subtype B virus でエイズ進行遅延に関与する HLA-C*12:02 により提示される 4 つのエピトープ部分に関する遺伝子解析を行い、subtype A/E ウイルスでのこのエピトープ部位への T 細胞の反応を調べ、これらの 4 つの部位が subtype A/E ウイルス感染においてもエピトープとして認識されるかを明らかにした。さらに、subtype B virus でエイズ進行遅延に関与する GagRI8 特異的 T 細胞に関して解析を行った。

3. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析

ベトナムの HIV-1 感染者の中で、麻薬常用者の感染者に焦点をあて、その感染血漿 vRNA から cDNA を合成し、HIV-1 の V3 領域を PCR で増幅し、そのアミノ酸配列を決定した。さらに組み換え HIV-1 を作製し、そのコレセプター利用性を決定した。

②成果（結果＋考察）

1. エイズ進行遅延に関与する HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞エピトープの同定

185名の HLA-A*11:01 陽性者の 17-mer peptide cocktail に対する反応を調べたところ、19個のカクテルペプチドに対する反応に関して、反応が見られた者 (Responders) には pVL の低下もしくは CD4T 細胞の上昇、あるいはその両方が見られた (表 1)。このことから、この 19個のカクテルペプチドに含まれるエピトープを認識する HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞のなかに、エイズ進行遅延に関与する T 細胞があると予想された。そこで ELISPOT assay で、これらの 19個のカクテルペプチドに対して陽性の反応を示した HLA-A*11:01 陽性者の PBMC をカクテルペプチドで刺激し培養した細胞中に、これらのカクテルペプチドに対して HLA-A*11:01 拘束性に反応する T 細胞が誘導しているかを、ICS アッセイにより調べた。その結果、10種類のカクテルペプチドに対して HLA-A*11:01 拘束性に反応する T 細胞が誘導していることが明らかになった。今後これらの T 細胞が認識する HLA-A*11:01 拘束性エピトープを同定し、これらの T 細胞の HIV-1 増殖抑制能を検討する。

2. エイズ進行遅延に関与する HLA-C*12:02 および HLA-B*52:01 拘束性 T 細胞の解析

Subtype B virus で同定されている 4 つの HLA-C*12:02 拘束性エピトープ部分 (GagTH9, PolVL9, PolIY11, NefMY9) に関する遺伝子解析を行った。その結果、この 4 つのエピトープ部位のシークエンスは、Subtype A/E と Subtype B の間ではすべて異なっていることが明らかになり、subtype A/E の consensus sequence 以外にも、GagTH9, PolVL9, PolIY11, NefMY9 はそれぞれ、2, 3, 1, 2 個の変異シークエンスが見られた。subtype A/E の consensus sequence を持ったペプチドと変異シークエンスを持ったペプチドを用いて、ELISPOT アッセイを用いてこれらのペプチドに対する T 細胞の反応を 17名の HLA-C*12:02 陽性感染者で調べたところ、GagTH9, PolVL9, PolIY11, NefMY9

およびその変異ペプチドに対して、それぞれ6名、0名、3名、4名でこれらのペプチドに対する反応が見られた。これらの事から、Subtype A/E 感染症においても PolV19 を除いた3つのエピトープはT細胞に認識されるエピトープであると考えられた。今後これらの3つのエピトープを認識するT細胞が、Subtype A/E 感染症でも HIV-1 の増殖抑制に関与しているかを明らかにしていく予定である。

また subtype B virus でエイズ進行遅延に関与する GagRI8 (RMYSPTSI) 特異的 T細胞に関して解析を行った。Subtype A/E ウイルスではこの部分の consensus sequence は RMYSPVSI (RI8-6V) であり、Subtype B ではこの変異は逃避変異である。ベトナムのコホートで RI8-6V に対する T細胞の誘導を調べたところ、効率的に RI8-6V に対する T細胞が誘導されていることが明らかになった。この RI8-6V 特異的 T細胞は、RI8 を認識できなかった。ベトナムでは、HLA-B*52:01 の頻度が日本と比べて低く、この RI8-6V 特異的 T細胞がベトナム人で HIV-1 の増殖抑制にどの程度関与しているかは、不明である。

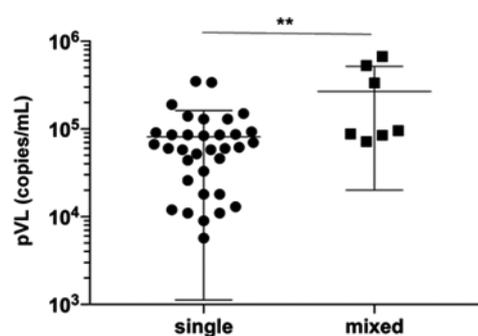
3. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析

麻薬常用感染者の41例中 CXCR4 利用性ウイルスが検出されたのは19例(46%)、そのうち7例が混合感染 (R5+X4) 症例で、全体の17%、CXCR4 利用性ウイルス中では37%と高率であった。また混合感染症例が単独感染症例に比較してウイルス量が有意に高いことが示された(図1)。このことは X4 ウイルスと R5 ウイルスが同一個体の異なるコンパートメントに感染し、ウイルス量が増大する可能性を示唆している。

表1 185名の HLA-A*11:01 陽性者の 17-mer peptide に対する反応

HLA	cocktail	frequency		pVL		CD4		p-value		q-value	
		res	non-res	res	non-res	res	non-res	pVL	CD4	pVL	CD4
A1101	nef4	23	162	19200	31650	463	383	0.1320	0.0118	0.54929	0.54639
	gag2	26	159	19400	28900	467	389	0.0943	0.0096	0.54929	0.54639
	gag3	15	170	13700	29750	485	390	0.0338	0.0355	0.54929	0.54639
	gag4	38	147	12400	34900	398	393	0.0226	0.9539	0.54929	1.01815
	gag6	40	145	11100	40700	442	389	0.0016	0.0060	0.18333	0.54639
	gag8	32	153	5775	34900	470	389	0.0008	0.0094	0.16369	0.54639
	gag10	8	177	4985	28900	496	392	0.0037	0.2205	0.28323	0.57732
	pol1	10	175	5720	28900	496	392	0.0158	0.2099	0.54623	0.56744
	pol4	47	138	9730	43500	463	383	0.0001	0.0134	0.08991	0.54639
	pol6	56	129	14400	44600	455	376	0.0008	0.0074	0.16369	0.54639
	pol9	21	164	7200	31650	473	391	0.0106	0.0763	0.49441	0.54639
	pol10	21	164	19700	27900	466	389	0.4982	0.0417	0.79743	0.54639
	pol11	43	142	11100	41650	451	391	0.0012	0.1199	0.16781	0.54639
	pol12	17	168	19800	28800	492	390	0.0875	0.0116	0.54929	0.54639
	pol14	25	160	13100	29750	412	392	0.0151	0.5186	0.54547	0.82071
	pol17	19	166	17300	29750	485	391	0.0188	0.0657	0.54929	0.54639
pol19	27	158	13700	34850	433	391	0.0465	0.1057	0.54929	0.54639	
pol20	6	179	8775	28700	496	392	0.0306	0.0889	0.54929	0.54639	

図1 混合感染と単独感染の血中ウイルス量の比較



③成果の公表

論文発表

1. Maeda, Y., Takemura, T., Chikata, T., Kuwata, T., Terasawa, H., Fujimoto, R., Kuse, N., Akahoshi, T., Murakoshi, H., Trang, G. V., Zhang, Y., Pham, C. H., Pham, A. H. Q., Monde, K., Sawa, T., Matsushita, S., Nguyen, T. V., Nguen, K. V., Hasebe, F., Yamashiro, T., Takiguchi, M. Existence of replication-competent minor variants with different coreceptor usage in plasma from HIV-1-infected individuals, **J. Virol** 94: e00193-20, 2020

2. Zhang, Y., Murakoshi, H., Chikata, T., Akahoshi, T., Tran, G.V., Nguyen, T.V., Nguyen, Gatanaga, H., Nguyen, K.V., Oka, S., Kuse, N., and Takiguchi, M., Effect of difference in consensus sequence between HIV-1 subtype A/E and subtype B viruses on elicitation of Gag-specific CD8⁺ T cells and accumulation of HLA-associated escape mutations, **J. Virol** 95: e02061-20, 2021

6. 自己評価

ハノイ無治療コホートでのエイズ進行に影響を与える HLA に関連する細胞傷害性 T 細胞の解析では、エイズ進行遅延に関与することが期待される HLA-A*11:01 拘束性エピトープ候補 10 種類を明らかにできた。またエイズ進行遅延に関与する HLA-C*12:02 が提示する 3 種類の subtypeA/E エピトープを同定でき、エイズ進行遅延影に関与する細胞傷害性 T 細胞の同定に近づいた。またコレセプター利用性の解析の解析では、麻薬常用感染者の高い CXCR4 利用性ウイルスの検出がされ、麻薬常用感染者の病態進行の機序の解明の手掛かりがつかめた。これらの事から、令和 2 年度の研究はほぼ予定通り進んでおり、これらの成果をもとに令和 3 年度はさらなる研究の進展が期待される。

7. 実施度

- I (実施計画を実施していない。)
- II (実施計画どおり進展していない。)
- III (実施計画どおり進展している。)
- IV (実施計画以上の成果が得られている。)

評価を下した理由

6. 自己評価に記載したため省略

8. 令和2（2020）年度執行状況調査

経費区分	学内負担額	運営交付金	執行額	備考
	千円	千円	千円	
(人件費)	0	2,360	2,360	
(運営費)	3,000	4,108	7,108	
(設備費)	0	532	532	
計	3,000	7,000	10,000	

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（令和2年度）

所 属	職 名	氏 名
[学外委員]		
大分大学	副学長	◎西園 晃
帯広畜産大学原虫病研究センター	教 授	河津 信一郎
新潟大学大学院医歯学総合研究科	教 授	松本 壮吉
京都大学ウイルス・再生医科学研究所	准教授	宮沢 孝幸
国立感染症研究所・感染制御部	部 長	阿戸 学
東京大学大学院医学系研究科	教 授	佐々木 敏
国立感染症研究所・昆虫医科学部	室 長	比嘉 由紀子
津田塾大学 学芸学部 多文化・国際協力学科	教 授	三砂 ちづる
[学内委員]		
長崎大学生命医科学域	教 授	由井 克之
[所内委員]		
熱帯医学研究所（環境医学部門）	教 授（支援室長）	山本 太郎
熱帯医学研究所（臨床研究部門）	教 授	有吉 紅也
熱帯医学研究所 （アジア・アフリカ感染症研究施設）	教 授	金子 聰
熱帯医学研究所 （アジア・アフリカ感染症研究施設）	教 授	長谷部 太
[オブザーバー]		
熱帯医学研究所	所 長	森田 公一
熱帯医学研究所	副所長	金子 修
熱帯医学研究所	副所長	濱野 真二郎

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

令和3年10月発行

〒852-8523 長崎市坂本1丁目12-4

電話番号 (095)819-7803

F A X (095)819-7892

ホームページ <http://www.tm.nagasaki-u.ac.jp>