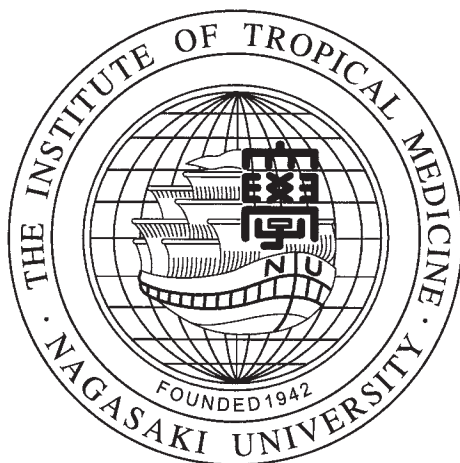


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和3年度
(2021)



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 金子 修

熱帯地域を中心とした開発途上国では、依然として古典的な熱帯性感染症が流行し、加えてウイルス性出血熱や新型コロナウイルス感染症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。加えて近年は、非感染性疾患も問題となってきています。先進諸国あるいは国際機関、民間支援機関などは多大な投資を三大感染症（HIV/AIDS、結核、マラリア）や顧みられない熱帯病などに対して実施し、その結果、いくつかの熱帯病・新興感染症については明瞭な減少も見られるようになりました。しかし、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、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、これまで順調に進展してきた優良な国際プログラムを含め、多くの国々で感染症対策やグローバルヘルス戦略の推進に多大な障害が発生しています。

長崎大学熱帯医学研究所は熱帯医学及び国際保健における先導的研究、及び、それらの応用による熱帯病の防圧と健康増進への国際貢献、それらにかかわる研究者と専門家の育成をミッションとし、アジア・アフリカ感染症研究施設（ケニア拠点、ベトナム拠点）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研究を遂行しています。特に、文部科学省共同利用・共同研究拠点「熱帯医学研究拠点」事業では、以下にあげる活動を通して、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指します。

1. 国内外の研究基盤を活用した共同研究

アジア・アフリカ感染症研究拠点等の本研究所が有する研究基盤を活用し、熱帯病・新興感染症の臨床疫学、公衆衛生学、微生物病学などをベースにした、または、グローバルヘルス領域の基礎・応用研究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、オンライン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、標本、文献資料の集積保存、全国配布を行います。

4. 熱帯医学ミュージアム

共同利用・共同研究など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。

本拠点が提供する共同利用・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，また，グローバルヘルスの向上につながることを祈念しております。

目 次

第1部 一般共同研究

1. ダニ媒介性ウイルスのマダニ感染モデルの構築および感染・増殖機構の解析	
代表者：田仲 哲也（鹿児島大学 共同獣医学部 教授）	1
2. 集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析	
代表者：森田 昌知（国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官）	6
3. ヒト住血吸虫に対する中間宿主巻貝の感染耐性の理解に向けて	
代表者：黒田 玲子（中部大学 先端研究センター 特任教授）	11
4. 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）	15
5. 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）	19
6. 貝環境を模倣した <i>in vitro</i> 住血吸虫発育システムの開発	
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）	25
7. 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）	31
8. Genetic diversity of dengue virus and associated among dengue patients	
代表者：Neoh Hui-min（Associate Professor, Universiti Kebangsaan Malaysia）	36
9. 新規の共役抗マラリア薬を目指したスタチンとエゼチミブの効果の解明	
代表者：早川 枝李（自治医科大学 医学部 感染免疫学講座医動物学部門 助教）	42
10. 赤痢アメーバ“シスト形成”におけるキチナーゼの機能解析	
代表者：見市（三田村）文香（佐賀大学 医学部免疫学分野 講師（特定））	48
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）	55
12. Clinical, serological, virological and molecular characterization of Chikungunya and Zika viruses in the Philippines	
代表者：Mark Pierre Dimamay（Research and Biotechnology Group, St. Luke's Medical Center [R&B-SLMC]; Associate Director for Basic Science Research）	59
13. 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 准教授）	62
14. TDP-43 の凝集体形成に着目したフラビウイルス性脳炎の分子病態の解明	
代表者：小林 進太郎（北海道大学大学院 獣医学研究院 准教授）	68

15. 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染後に出現する抗体が認識するウイルス抗原およびヒトタンパク質についての研究	
代表者：大山 要 (長崎大学生命医科学域 (薬学系) 准教授)	73
16. 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)	77
17. ロタウイルス種間伝播における成人の役割と動物ロタウイルスのヒトロタウイルスへの馴化過程の解明	
代表者：高月 英恵 (宮崎大学 医学部 微生物学分野 助教)	83
18. ナノカーボンコーティングの抗マラリア活性評価	
代表者：羽二生 久夫 (信州大学 バイオメディカル研究所 准教授)	90
19. 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 教授)	95
20. 新型コロナウイルスの細胞内動態の解明	
代表者：高松 由基 (国立感染症研究所 主任研究官)	101
21. 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 助教)	106
22. ケニアにおけるワクチン効果と分布ロタウイルス株の性状との関連の解明	
代表者：河本 聡志 (藤田医科大学 医学部 准教授)	111
23. リーシュマニア症ワクチンにおける組織常在記憶リンパ球の解析	
代表者：前川 洋一 (岐阜大学大学院 医学系研究科 教授)	116
24. 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)	120
25. トランスポゾンシーケンシングによるビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の網羅的解析	
代表者：柏本 孝茂 (北里大学 獣医公衆衛生 准教授)	125
26. パンデミック発生時の 1996 年に出現した腸炎ビブリオ新株の遺伝学的解析	
代表者：中口 義次 (石川県立大学 生物資源環境学部 准教授)	129
27. Evaluation of humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine	
代表者：Shyam Prakash Dumre (Associate Professor, Central Department of Microbiology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal)	132
28. 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：藤田 秋一 (鹿児島大学 共同獣医学部 教授)	151
29. Zika Virus Infection among Acute Febrile Illness Patients and Peri-natal Congenital Zika Virus Infection Screening Project in Upper Myanmar (2021-2022)	
代表者：Aung Kyaw Kyaw (Deputy Director, Department of Medical Research, Ministry of Health and Sports, Myanmar)	157
30. タイムラプスイメージングによる Babesia bovis p200 の機能解析	
代表者：麻田 正仁 (帯広畜産大学 原虫病研究センター 准教授)	161
31. 熱帯病に対する新薬開発を指向した微生物二次代謝産物の網羅的探索	
代表者：荒川 賢治 (広島大学大学院 統合生命科学研究科 准教授)	166

32. 亜熱帯・熱帯植物由来の抗マalaria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）	171
33. 人獣共通病原性の緑藻類 <i>Prototheca</i> 属保存株の再同定	
代表者：伴 さやか（千葉大学 真菌医学研究センター 助教）	175
34. 原虫に共生するウイルスおよびウイルス・原虫間相互作用に関する因子の探索	
代表者：七戸 新太郎（大阪大学 微生物病研究所 助教）	182
35. ウイルス感染症の診断や治療を目的としたセラノスティック薬剤の開発	
代表者：淵上 剛志（大阪大学 微生物病研究所 助教）	190

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：Nguyen Tien Huy（長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科 准教授）	203
2. 世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマ・コース	
代表者：田中義正（先端創薬イノベーションセンター・教授）	210

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)	219
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)	228
(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿	235

第 1 部

一 般 共 同 研 究

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ダニ媒介性ウイルスのマダニ感染モデルの構築および感染・増殖機構の解析

課 題 番 号：2021-Ippan-01

2. 代 表 者：鹿児島大学共同獣医学部・教授・田仲哲也
共 同 研 究 者：長崎大学新興感染症学分野・教授・好井健太郎

3. 決 定 額：400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

世界ではマダニが約 900 種存在し、10%が病原体を伝播する。我が国でもダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスや重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスなどの、マダニが媒介する新たな感染症が報告されるようになっていくとともに、海外からのウイルスの侵入の可能性も指摘されている。TBE や SFTS 等のマダニ媒介性ウイルスのほとんどは治療法が確立されておらず、TBE や SFTS ウイルスを保有したマダニの暴露機会が変わらない限り本質的に患者数は減少しない。また、近年では、シカやイノシシなどの野生動物の増加と人の住環境への侵入事例が多く報告されており、マダニが媒介する感染症の危険性も増加傾向にあると考えられている。しかし、マダニとウイルスの相互関係については疑問点が多く残っている。そこで本研究では、マダニ細胞やフタトゲチマダニマダニを用いて、マダニによって媒介されるウイルスのマダニ体内の臓器局在・増殖能や宿主への媒介能について調べることで、媒介マダニを標的とした感染制御につながる知見を得ることを目的とする。

② 研究内容

(1) ハザラウイルス感染マダニモデルの作製

クリミア・コンゴ出血熱(CCHF)は、エボラ出血熱等とともにウイルス性出血熱のひとつである。CCHF はイボマダニ属のマダニが媒介することが知られている。そこで、熱研で保有している CCHF のモデルとなっているハザラウイルスをマダニ細胞や肛門接種により成ダニ中腸内に感染させる。その後、マダニ細胞やマダニ体内・マダニ臓器(唾液腺、中腸、卵巣、総神経球)中のウイルス価を測定することで、ウイルスの局在や増殖能を調べる。さらに、熱研対応教員が開発中のレポーター遺伝子発現ウイルス様粒子を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* での感染動態のライブイメージング系を構築し、詳細な解析を行う。

(2) ハザラウイルス感染によるマダニ RNAi 関連因子の機能解析

ダニ媒介性ウイルスは経発育・経卵感染によりマダニにおいて長期間感染が維持

されているが、マダニにおけるウイルス持続感染機構は不明である。さらに、dsRNA による遺伝子発現抑制を引き起こす RNAi はマダニを含む無脊椎動物の感染防御に重要とされているが、マダニでは分子動態など不明な点が多い。また、蚊などの昆虫と異なり、マダニは RNA を鋳型に RNA を合成する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRP) を保有することが判明している。一般的に、宿主 RdRP はウイルス RNA を複製することで dsRNA を増やし RNAi を促進すると考えられているが、マダニにおいては実験的に検証された例はない。

そこで本研究では、マダニ細胞やマダニを用いて、マダニの抗ウイルス応答として考えられている RNAi 関連因子と推定される複数の因子 (RdRP、Dicer、Ago) に対する dsRNA を細胞に導入し、ノックダウンの確立を試みる。また、このノックダウン細胞やノックダウンマダニを用いて、レポーターアッセイによる各因子の RNAi 経路への影響やハザラウイルスの増殖能への影響を評価する。

本共同研究は、マダニを用いたウイルス感染症モデルの作製(田仲)とダニ媒介性ウイルスの解明(好井)を行っている双方の専門性の強みを生かしながら遂行する。

③ 予想される成果

(1) マダニは、吸血に際し宿主へウイルスを媒介するベクターとして、公衆衛生上重要な節足動物である。上記で述べたように、申請者らは、マダニ体内のウイルス動態について詳細な解析を展開している。特にマダニとウイルスの相互作用を評価する上で、病原体の中腸バリアの突破、唾液腺および卵巣への侵入が大きな指標となり、本研究で中腸、唾液腺および卵巣の移行が証明できれば、より詳細かつ効率的にベクター体内での病原体動態の観察が可能となることが期待できる。

(2) ハザラウイルスの増殖能を制御するマダニ RNAi 因子を同定することで、CCHF、TBE、LGTV、トゴトウイルス等の増殖能を制御するマダニ RNAi 因子と比較解析することが可能となる。すなわち、これらウイルスの増殖能を制御するマダニ RNAi 因子の違いを見出すことで、マダニの抗ウイルス応答やウイルス持続感染の機構が明らかになることが期待できる。

(3) マダニの飼育には水・餌を供給する必要がなく、世代交代も短時間である。したがって、通常の実験室のような比較的小規模で、何百匹という単位での大規模感染実験が可能である。大量の個体に病原体を感染させられるということは、マダニの遺伝子変異体を大量に用意することで、ウイルスに対する感染防御遺伝子の明確な解析を行うことが可能である。

(4) 申請者らはマダニの EST データベースを構築しており、容易に遺伝子情報を得ることができる。また、マダニ-ウイルスの相互作用に係わる感染防御遺伝子がマダニから同定された場合、哺乳類を用いた研究に迅速にフィードバックできる利点がある。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

1. 本研究は、ダニ媒介性脳炎(TBE)ウイルスの媒介者であるシカダニ由来胚細胞株(ISE6細胞)や、重症熱性血小板減少症候群(SFTS)ウイルスの媒介者でもあるフタトゲチマダニを使用した。そして、TBEウイルスのモデルとなっている病原性の低いランガットウイルスを用い、遺伝子ノックダウン細胞およびマダニのウイルス感染症モデルを作製した。このように、ISE6細胞やフタトゲチマダニを主要な実験材料として、以下のように実施した。

(1) 遺伝子ノックダウン細胞およびマダニの作製を行うために、病原体感染防御後の酸化ストレスを抑制するグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)を標的とする、ダブルストランド(ds)RNAを準備した。

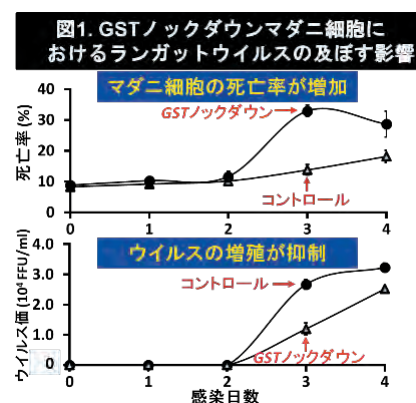
(2) その後、dsRNAをマダニ細胞やマダニへ導入を行い、マダニ細胞およびマダニの生存率を観察し、ノックダウンの状態を確認した。

(3) 作製したノックダウンマダニ細胞をそれぞれ感染させた。その後、マダニ細胞およびマダニの生存率やウイルス増殖率を評価することによって、病原体に対するGSTの役割を明らかにし、病原体伝播を阻止する遺伝子改変マダニ細胞やマダニの創出を目指した。

2. 哺乳類細胞においては、ゲノム編集による遺伝子のノックイン技術がいち早くから報告されてきた。しかし、マダニ細胞において外来遺伝子を標的のゲノム領域内へ選択的に導入するノックイン技術は確立されていない。沢津橋ら(Scientific Rep, 2018)は非相同末端結合修復を利用して遺伝子ノックインを行う手法に改良を加え、遺伝子のノックインのためのドナーベクターの作製の手間を減らし、ランダム挿入ではなく、高効率的に遺伝子のノックインを行う方法(Versatile non-homologous end joining-based knock-in module for genome editing, VIKING法)を開発した。申請者はすでにリポフェクション法やエレクトロポレーション法によって、プラスミドをマダニ細胞やマダニに導入する技術を確認している。そこで、これらの技術に加えて、マダニ細胞およびマダニのゲノム編集にVIKING法を活用することは、本研究の構想に有用であると考えた。

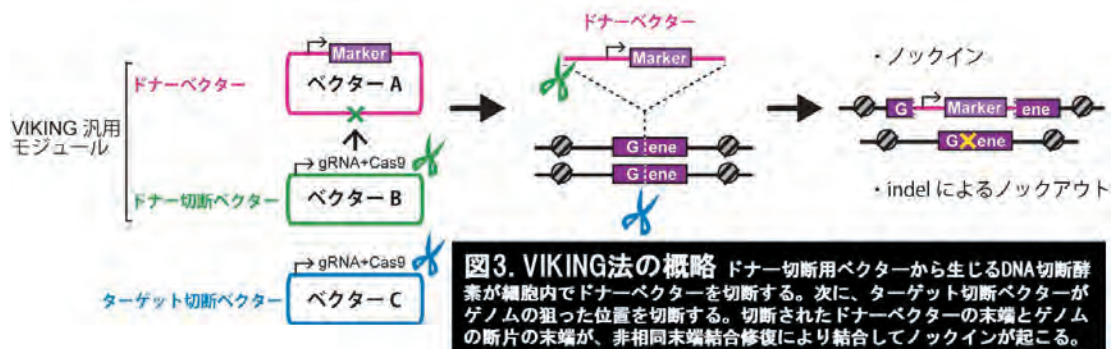
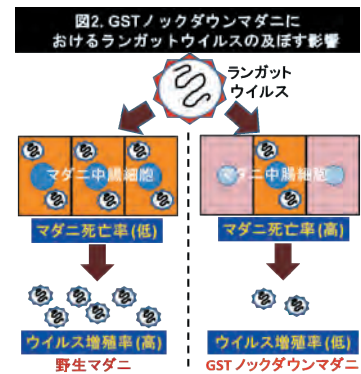
② 成果(結果+考察)

1. マダニ体内でのウイルス感染応答へのGSTの関与を調べるため、マダニ細胞やマダニのGSTにおける、ウイルス増殖に及ぼす影響について検証した。作製したGSTノックダウンマダニ細胞にランガットウイルスを感染させたところ、マダニ細胞の死亡率が増加し、マダニ細胞のウイルス増殖が抑制された(図1)。同様に、GSTノックダウンマダニにランガットウイルスを感染させたところ、マダニの死亡率が増加し、マダニ体内のウイルス増殖が抑制された。以上の結果より、GSTがランガットウイルス



感染後の酸化ストレスを制御することで、マダニ細胞やマダニ体内のウイルス増殖に影響を及ぼすことが明らかとなった。したがって、GSTはマダニ媒介性病原体、特にフラビウウイルスの増殖において重要な鍵をにぎる分子であることが分かった(図2)。

2. 鉄分子を制御することとして知られているフェリチン遺伝子を標的としたgRNAを用いて、ドナーベクター、ドナー切断ベクター、ターゲット切断ベクターを作製した(図3)。今後はこれらのベクターをISE6細胞に導入し、ノックアウトISE6細胞を作製し、フラビウウイルスをこれらの細胞に感染させ、マダニ細胞の生存率やウイルス増殖率を評価する予定である。



③ 成果の公表

該当なし(投稿論文準備中)

6. 自己評価

今年度は抗酸化分子であるGSTがマダニ媒介性病原体、特にフラビウウイルスの増殖において重要な鍵をにぎる分子であることが分かった。

マダニ遺伝子機能の解析ではRNA干渉法による遺伝子破壊が用いられてきたが、ノックアウト・ノックイン技術は確立できていない。そこで、研究代表者らは高効率的に遺伝子改変を行う方法(VIKING法)に着目し、マダニ細胞用いて遺伝子改変技術の確立を試みた。しかし、今年度はVIKING法に用いるベクターの作製のみで、VIKING法におけるマダニ細胞への評価はできなかった。そのため、達成度は「II」とした。今後は、VIKING法を用いてマダニ細胞やマダニのゲノム編集による遺伝子改変技術により簡便化することで、遺伝子改変マダニ細胞やマダニが作製可能となる可能性が高い。その結果、マダニが媒介するウイルスを遺伝子改変マダニ細胞やマダニに感染させることで、ウイルス感染に関わる遺伝子の役割が明らかになる。このように、遺伝子改変マダニ細胞やマダニを活用すれば、マダニ・ウイルスの関係を容易に解析できることが期待される。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期に予想した成果はほとんど挙げられなかった）

Ⓐ （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 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析

課 題 番 号：2021-Ippan-02

2. 代 表 者：森田 昌知（国立感染症研究所細菌第一部・主任研究官）
共 同 研 究 者：児玉 年央（長崎大学熱帯医学研究所細菌学分野・教授）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

Vibrio cholerae に属する細菌のうち、血清型 O1、O139 以外のものはナグビブリオと呼ばれ、発展途上国（インド亜大陸、東南アジア、アフリカ、中南米）などで経口性下痢症の原因菌として日常的に分離される。ナグビブリオは、他の下痢症を引き起こすコレラ菌や腸炎ビブリオなどのビブリオ属細菌とは異なり、病原性関連遺伝子の保有プロファイルに関する報告があるものの、それらの網羅的な探索及び病原性への関与に関する評価は行われておらず病原性機構は不明である。そこで本研究課題では、集団食中毒事例の原因菌として推定されたナグビブリオについて、熱研担当教官の児玉教授が保管する他のナグビブリオやビブリオ属菌を用いたゲノム比較解析することで下痢原性に寄与する因子の同定を試み、さらにその因子の性状解析を行うことでナグビブリオによる下痢症の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

集団食中毒事例から分離されたナグビブリオ血清型 O144 株の全ゲノム解読情報を用いて、ゲノムアセンブリ、アノテーション、パンゲノム解析を行う。血清型 O144 株（10 株）だけでなく、他の血清型のナグビブリオ株（15 株）も患者及び食品から分離されており、全ての分離株を対象とする。また児玉研究室が保有するビブリオ属細菌も解析対象に加える。他の血清型の株はゲノム解読していないため、MiSeq シーケンサーを用いたペアエンド解読を行う。パンゲノム解析から O144 株に特異的な遺伝子を抽出し、病原性関連遺伝子の探索を行う。また、遺伝子の有無だけでなく、コアゲノム上の単一塩基変異（single nucleotide variant, SNV）を検出し、O144 株とそれ以外の差異を確認する。最終的にアミノ酸置換を引き起こす変異や調節遺伝子上の変異等を考慮し、病原性関連遺伝子を得る。

候補となった病原性関連遺伝子の機能解析は、腸炎ビブリオの病原性解析で実績のある児玉年央教授（対応教員）の指導のもと欠損株および遺伝子相補株を作製す

る。また、候補分子のリコンビナントタンパク質発現系を用いて抗血清を作製する。遺伝子欠損株および抗血清は作製でき次第順次、これまで報告された病原性ビブリオ属菌の病原性解析系（ウサギ結紮ループ試験、マウスの腹腔内投与による致死活性、細胞毒性、細胞変性活性、遺伝子発現解析等）で表現型を評価する。病原性ビブリオ属菌の遺伝子欠損株の作製及び病原性解析については、腸炎ビブリオの評価系が本菌にも応用が可能である。特に本研究課題で対象とした血清型 O144 株も PCR による検出で、腸炎ビブリオと類似した 3 型分泌装置関連遺伝子を保有することが明らかとなっている。

児玉教授は、これまで腸炎ビブリオの 3 型分泌装置の機能解析と遺伝子発現機構を分子レベルで明らかにしてきていることや、これまでに集められ保管されている他のナグビブリオ株やビブリオ属菌、抗血清といったバリオソースや病原性解析系は、本研究課題を遂行する上で必須であると考えている。

③ 予想される成果

腸炎ビブリオでは 2 セットの 3 型分泌装置遺伝子群 (T3SS1 と T3SS2) が存在し、それぞれが異なる病態（敗血症と下痢症）に関与していることが明らかとなっている。まず、全ゲノム解読情報からナグビブリオ血清型 O144 株の保有する 3 型分泌装置遺伝子群がどちらに属するのか、どのような共通の遺伝子レパートリーおよびユニークな遺伝子を持つのが明らかとなる。また、児玉研究室がもつ解析系である遺伝子欠損株の作製、ウサギ結紮ループ試験、マウスの腹腔内投与による致死活性、細胞毒性、細胞変性活性、遺伝子発現解析等の試験により、本菌の病原因子の同定および病原性の関与が評価できると考えられる。また、パンゲノム解析を用いた血清型 O144 株に特異的な遺伝子探索では、既知の病原性遺伝子との相同性解析では発見することのできない機能未知な遺伝子を候補とすることができ、下痢症を引き起こすビブリオ属細菌の新たな病原因子の発見につながることを期待できる。これらの知見は長年不明であった本菌の下痢発症メカニズムの解明につながるだけでなく、病原性遺伝子マーカーの発見に直結することから病原性株の新規検出・診断法の開発に応用できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

集団食中毒事例の患者及び食品から分離されたナグビブリオ 25 株について、HiSeq 2500 (Illumina) による全ゲノム解読を実施した。ナグビブリオの血清型の内訳は、O144 : 10 株、O21 : 2 株、O49 : 2 株、O90 : 2 株、O176 : 2 株、O24 : 1 株、O128 : 1 株、O145 : 1 株、O151 : 1 株、O186 : 1 株、Rough 型 : 1 株、型別不能 : 1 株であった。また、血清型 O144 ナグビブリオ 1 株 (V130003 株) については、完全長ゲノム配列決定のため MinION (Oxford Nanopore Technologies) による解読も実施した。得られたドラフトゲノム配列及び完全長ゲノム配列はアノテーションを行った後、パンゲノム解析により血清型 O144 ナグビブリオにのみに特異的な遺伝子を抽出するとともに、コア遺伝子上の単一塩基変異を用いたゲノム疫学解析を行った。また、病原性解析とそれに用いる遺伝子破壊株作製のため、ナグビブリオの分離菌株を関係機関の承認のもと、長崎大学熱帯医学研究所へ送付した。

② 成果（結果＋考察）

コア遺伝子上の単一塩基変異を用いたゲノム疫学解析において、患者および食品由来の血清型 O144 ナグビブリオは同一クラスターを形成した。このクラスターには他の血清型のナグビブリオは含まれなかった (Figure 1)。

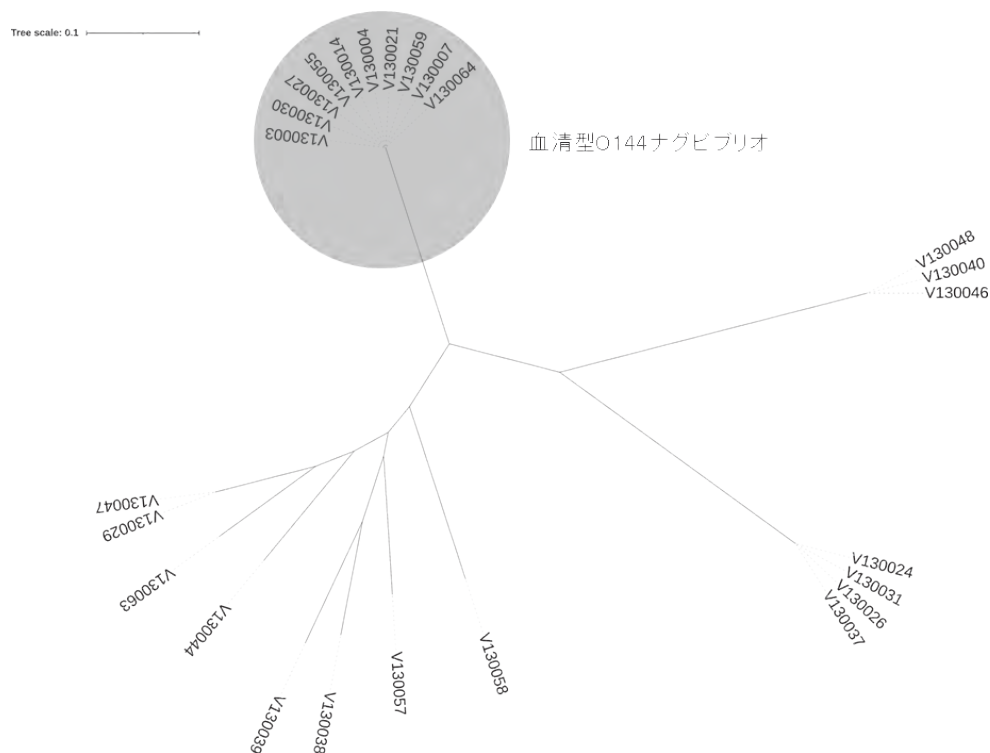


Figure 1. 集団食中毒事例由来ナグビブリオの系統解析

また、パンゲノム解析から血清型 O144 ナグビブリオにのみに特異的な遺伝子として 3 型分泌装置関連遺伝子群が検出された。一方で、ヘモリジン遺伝子は他の血清型を含む全ての分離株が保有していた。このことから、ヒトに対する病原性にヘモリジンは関与していないが 3 型分泌装置が関与していることが示唆される。また、O144 ナグビブリオ V130003 株の完全長ゲノム配列から 3 型分泌装置関連遺伝子群の遺伝子構造を推定したところ、血清型 O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置関連遺伝子群は 37 個の ORF を含む約 30kb からなる genomic island であり、相同性解析から腸炎ビブリオの保有する 2 セットの 3 型分泌装置遺伝子群のうち下痢原性に関与する T3SS2 に類似していることが明らかとなった (Figure 2)。

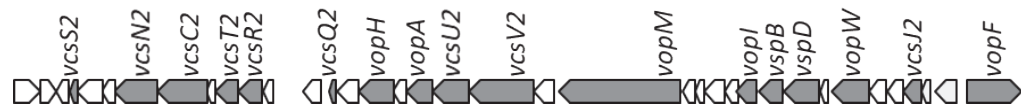


Figure 2. 血清型 O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置関連遺伝子群の遺伝子構造

送付したナグビブリオは発育が確認されたが、これらのナグビブリオはヘモリジン遺伝子を保有しており、下痢原性における T3SS2 の関与を検討するためには、ヘモリジン遺伝子破壊株を作製する必要がある。そこでヘモリジン遺伝子破壊株の作製のためにノックアウトベクターを構築した。今後、構築したノックアウトベクターを用いて、当該遺伝子の破壊株を作製する。さらに 3 型分泌装置遺伝子を破壊し、各種病原性評価系により 3 型分泌装置の病原性への関与を明らかにする予定である。

③ 成果の公表

該当なし

6. 自己評価

本研究課題では全ゲノム解読情報を基盤とする解析により、分離された菌株の中で血清型 O144 ナグビブリオだけが 3 型分泌装置遺伝子群を保有していることを明らかにし、その病原性への関与が示唆された。3 型分泌装置関連遺伝子の破壊株作製のために、その詳細な配列と遺伝子構造の情報が必要となったため、当初予定になかった MinION(Oxford Nanopore Technologies)による全ゲノム解読を実施することとなった。その成果として、血清型 O144 ナグビブリオ 1 株 (V130003 株) の完全長ゲノムを決定することができた。しかしながら、病原性関連遺伝子の機能解析については、ナグビブリオが普遍的に持つヘモリジン遺伝子を病原性解析前に破壊することとなり、計画通りに進まなかった。以上のことから、全ゲノム解析により一定の成果をあげることができたが、病原性関連遺伝子の機能解析では準備段階にとどまったことから、達成度は II とした。

7. 達成度 (何れかに○)

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い)

6. 自己評価に記載したため省略

令和 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ヒト住血吸虫に対する中間宿主巻貝の感染耐性の理解に向けて
課 題 番 号：2021-Ippan-03

2. 代 表 者：黒田玲子（中部大学先端研究センター・特任教授）

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

世界で 2 億人以上が感染する代表的な顧みられない熱帯病（NTDs）であるヒト住血吸虫症の制御を目指す。住血吸虫はまず中間宿主の巻貝に感染し、巻貝の中で変態し、セルカリア幼生となって淡水に泳出し、経皮感染する。巻貝が住血吸虫に感染しなければ、ヒトへの感染が防げる。天然には感染耐性を示す貝の系統があることに着目し、本研究では、感染感受性巻貝と耐性巻貝の違いがどこにあるのかを分子レベルで明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

B. glabrata のゲノム編集を、まず、文献から選択した複数の遺伝子について行う。マイクロインジェクション、人工胚培養など世界初の試みに挑戦するが、遺伝子型が分離、均一となる F2 世代を作成して感染実験を行うまでにはかなりの時間が必要である。そのため、並行して、感染感受性系・耐性系の感染度の相違が巻貝の体内でいつ、どの段階で起こるのかを時間を追った寄生虫の観察実験から明らかにし、候補遺伝子の可能性を狭める。さらに、感受性貝、耐性貝両系統の交配による F1 世代、F1 の自家受精あるいは戻し交配で F2 世代を作り（個別飼育）、感染実験を試みる。感染の評価は、寄生虫の生活環を常時回して感染実験を行い、各種顕微鏡がそろい、専門分野の教職員がおられる貴研究所でなくてはできない。

③ 予想される成果

感染感受性・耐性に関係した候補遺伝子が数多く報告されているが、天然にいる感受性、耐性系統の感染の実態を明らかにすることで、鍵となる候補遺伝子がある程度狭めることが可能になる。また、感染感受性、耐性の差を生む遺伝子の同定には、連続戻し交配実験と連鎖解析を行うのが理想的であるが、膨大な人手と資金、時間が必要であるので、現況では現実的ではない。そこで、感染感受性と耐性巻貝の 2 系統の交配で F1 世代を得、F1 の自家受精あるいは感受性系統との戻し交配による F2 世代を作成し、感染実験を行うことで、感染度に大きな変化が見られた系統を樹立できれば、その後の遺伝子レベル研究に展開できると期待している。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

研究材料：マンソン住血吸虫 (*S. mansoni*) に特異的な中間宿主 *B. glabrata* には、天然由来の感染系統 (M-line) と耐性系統 (BS-90) の 2 つの実験室系統が確立されており、両者を米国公的機関 NIH BEI から MTA を交わして入手し、中部大学黒田研究室で継続維持しており、これを実験対象にした。本研究では、それぞれ RK.M-line, RK.BS-90 と命名した。感染実験は、長崎大学熱帯医学研究所で長らく維持されている M-line (NP.M-line と命名) も併せて行った。

研究方法：

・飼育環境の設定：中部大学においては、まとめ飼育は 5 リットル水槽で行い、投げ込みヒーターで 26℃ に保つこととした。個別飼育は 450ml 容量のタッパウエア中で 200-350ml の飼育水量で行い、26℃ に設定したグロースチャンバー内にて飼育。餌は基本的にサラダ菜。適宜人工飼料 (GEX 金魚元気) を与えた。飼育水は BEI 推奨の APW (artificial pond water)。一方で、感染実験を行う長崎大学では、動物実験棟 (P2) の 26℃ 恒温室内にて大型水槽 (10 リットル) にてまとめ飼育。個別飼育は少容量の使い捨てプラスチックケースを利用。飼育水はタップウォーター (井戸水)、餌は PLECO (低棲草食魚用)、月 1 回マウスの餌と、飼育環境が異なるが、個別飼育の水量以外、大きな問題はないと考えた。

・感染確認実験：長崎大学で伝統的に行われている方法をまず踏襲した。

① 感染マウスより肝臓採取→肝消化→虫卵回収によりミラシジウムを得、② 24well plate に 6 あるいは 10 隻/well 播種し、ミラシジウムが活発に動く様子を顕微鏡観察。③ 貝を 1 匹/well 入れ、顕微鏡観察。④ 24 時間後、well 内に動くミラシジウムおよび死骸がないことを顕微鏡観察にて確認し、貝を大型水槽でまとめ飼育。⑤ 3 週間後に、水槽へ暗幕をかけた。⑥ day32 に、貝ごとにセルカリア游出を確認した。

・巻貝内での寄生虫動態の比較観察：感染群、非感染群の貝を 3 匹ずつ採取、圧平して顕微鏡観察を行い、寄生虫の幼生を確認した。殻をとり、4% パラホルムアルデヒド液に浸漬し、固定した。

・耐性/感受性貝交配実験：RK.BS-90 と RK.M-line とをペアとして交配させた。3 ペア作成。1-2 週間でペアを解消、隔離し、RK.M-line-F0 が産む卵を BS-90/M F1 とし、感染実験を行うとともに、以後の戻し交配実験に使用した。ある程度成熟した BS-90/M F1 と M-pure-F0-1 とを同様に交配し、1-2 週間後に M-pure-F0-1 を分離して産卵させ、BS-90/M F2 とした。採卵した卵塊は個別飼育。成長後、一部 (F1-6, 1-7, 1-8) に対して感染実験を行った。また、F2 の自家受精によって得られた F2self も作成し、感染実験を行った。

人工胚培養 (EOC)：インジェクション無での EOC の実験条件を種々検討した。

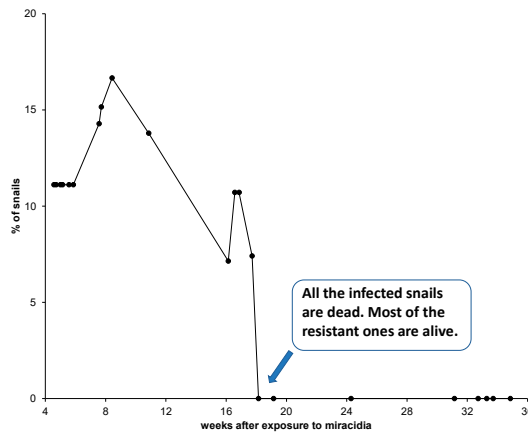
手続き：組換え DNA 実験計画 (P1, P1A レベル) は、中部大学の実験安全委員会の承認済である。感染実験はすべて長崎大学の動物実験施設 (P2) で行った。

② 成果 (結果 + 考察)

交配貝の感染確認実験：感染後 32 日の時点で、セルカリアの遊出を観察した。

(1) RK, BS-90, RK.M-line, NP.M-line の 3 系統を比較した。RK.BS-90 からはセルカリアの遊出が確認されなかった。一方、M-line の 2 系統の遊出量は大きく異なり、感染後 32 日時点における、照光 1 時間後の遊出量は NP.M-line が RK.M-line の 12 倍強であった。

(2) BS-90/M F1: 3 ペアからそれぞれ 6 匹ずつを選択し、感染実験を行った結果、F1 ではセルカリアの遊出が全く見られず、予想通り耐性と思われた。



(3) BS-90/M F2: 感染結果は、耐性: 感受性の貝の割合が 14:1 等と耐性貝が異常に多く、理論上ありえない結果が得られた。RK.M-line 系統に対しては、長崎大学の従来の 32 日後のセルカリア遊出実験だけでは不十分と考え、その後も観察を行ってもらった結果、感染後長く経ってから遊出開始および長期間遊出することを見出だした(図)。RK.M-line 系統に対しては 32 日後のセルカリア遊出で耐性/感受性を判断するのは正しくないと結論付けた。環境(飼育・実験条件)によりセルカリア遊出に差が出ることが報告されているが(B. Fried et al., *J. Helminthology* (2002) 76, 369)、これが原因とは思えない。文献を参照すると、強い感染性などからも長崎大学で維持しているのは、M-line というよりは NMRI 系統ではないかと考えられる。かなり前のことで、由来は不明とのことだった。BS-90/M F2self は長崎大での長期飼育中に 8 割が死亡し、統計の意味をなさなくなってしまう。感染実験が長期間にわたることとなり、我々が使っているような飼育水量の多い容器で個別飼育する必要がある。討議の結果、最適と思われる感染・飼育方法にほぼ合意ができた。これまでの実験計画を変更して継続するとともに、新しく F1 作成から交配実験をやり直すべきと考え、既に開始している。

巻貝内での住血吸虫の挙動: ミラシジウム幼生は感染耐性 BS-90 巻貝の中に侵入すること、スポロシスト(母か娘かは不明)形成前に免疫機構により破壊されている可能性が予備実験で示唆された。

ゲノム編集: ゲノム編集に向けて、人工胚培養技術の開発を試みた。試行錯誤の結果、成功率に極端なばらつきがあるが、RK.M-line, RK.BS-90 両系統ともに、1-2 細胞期胚から開始して成貝まで成長させることに、世界で初めて成功した。

③ 成果の公表

本研究は多くの段階がある長期間にわたる性格のものであり、どの段階も挑戦的である。さらに、世界での競争が大変に厳しくなっている。研究成果の全体像が見えてきたら直ちに公表したいと考えている。

6. 自己評価

感染実験は長崎大学でしか行えない。新型コロナウイルス禍で訪問が制限され、飼育状態など実際に見てみないとわからないことが多く、思うように実験を進められなかったこと、顕微鏡による巻貝内での寄生虫幼生の動態観察のテーマを提案したにもかかわらずほとんど実験に立ち会えなかったことは大変残念であった。耐性貝と感受性貝の交配による F2 世代の感染実験の結果が予想外で、到底ゲノムタイプを反映しているとは考えられなかったために、いろいろ考察した結果、長崎大学と中部大学で維持している巻貝系統は同じ名前が付いているにも関わらず性質が大きく異なるという結論に至った。我々が維持している系統に適した感染実験の条件を決めることからやり直さざるを得なかった。実験をしばらく進めてから感染挙動の違いが明らかとなったために、修復はかなり難しいが、それでも、出来るだけ情報を得るべく、実験計画に変更を加えて実験を続ける予定である。一方で、世代をそろえて交配を最初からやり直すことも重要と考え、既に着手した。感染実験が長期にわたるために、死亡率の少ない個別飼育法が必要である。年度末になったが現地で話し合いができたのはよかった。熱帯医学研究所の濱崎めぐみさんに心から感謝する。

人工胚培養は今のところ世界で成功者が我々しかいない大変に難しい技術である。成功率は極端に低いものの、F0 を成貝まで成長させることに世界で初めて成功したのは、大きな成果であった。

今後の進展に向けてステップが大きく進んだ点には満足している。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

2021 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 : 2021—Ippan—04

2 . Principal investigator : RICHARD CULLETON(Ehime University, Professor)

Joint researcher(s) :

- Nundu Sabiti Sabin(PhD Student Leading Program, Graduate School of Biomedical Sciences, NEKKEN, Nagasaki University)

- Ahuka Steve(Associate Professor University of Kinshasa)

- Kavunga Hugo(Assistant Professor

National Institute for Biomedical Research, Kinshasa, DRC)

3 . Amount decided : 300,000 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

- 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.

From 229 samples analyzed, we were able to successfully amplify PfK13 (83.7%),

PfMDR1 (93.3%), PfDHFR (90.3%), PfDHPS (96.7%), PfCRT (78.1%) and amplicons for *pfprt* K76T (220), *pfmdr1*(151), *pfdhfr* (149), *pfdhps* (153), and *pfk13* (153) genes were successfully sequenced.

(2) Results (results & observations)

The prevalence of the drug-resistance associated mutations *pfprt* K76T, *pfdhps* K540E and *pfmdr1* N86Y was low, being 27%, 20% and 9%, respectively. The prevalence of the drug-resistance associated mutations *pfdhfr* was high, being above 95%. Only two new mutations in *pfk13*, C532S and Q613E were identified in the Democratic Republic of Congo.

(3) Announcement of results

These results have been published in *Parasitology International*
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102541>

6 . Self-evaluation

We are quite satisfied with our results as we were able to amplify all antimalarial drug resistance markers and assess the profile of *pfk13*, *pfmdr1*, *pfdhfr*, *pfdhps* and *pfcr1* gene markers in isolates from asymptomatic school-aged children. and symptoms in Kinshasa.

These results showed the remarkable decrease in chloroquine resistance (CQ) and the return of CQ-sensitive *P. falciparum* 18 years after its withdrawal. Furthermore, the findings have shown the absence of resistance to artemisinin-based combination therapies and low resistance to sulfadoxine-pyrimethamine among the sampled populations.

Our results have been accepted and published in an international peer-reviewed journal.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

- 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3（2021）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：2021-Ippan-05

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（長崎大学熱帯医学研究所・准教授）

平林 愛（京都大学ウイルス・再生医科学研究所・博士研究員）

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：350 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ウイルス性出血熱 4 疾患の一つであるラッサ熱は、毎年西アフリカを中心に流行し、その重篤な症状と効果的な治療法の少なさから、近年でも多くの死者を生み出している（WHO. “Lassa Fever – Nigeria Disease outbreak news”.）。ラッサ熱の原因ウイルスであるラッサウイルスは、アレナウイルス科マーマアレナウイルス属に分類され、同属には、南米出血熱の原因ウイルスであるフニンウイルスやマチュポウイルスも属している。アレナウイルスにはヒトに対して重篤な症状を引き起こすウイルスが数多く存在するが、それらの基礎的な研究が十分に進んでいるとは言い難く、新規治療法や予防法確立のためにも早期の発展が望まれる。

これまでに我々は、アレナウイルスのマトリックスタンパク質（Z）によって、宿主細胞の膜構造が劇的に変化し、核近傍に特徴的な小胞集合体を形成すること、また本機構がアレナウイルスの増殖環に深く関与する可能性を見出してきた。本研究で着目している Z タンパク質は、アレナウイルスで広く保存されており、ウイルス粒子の形成からウイルスゲノムの転写・複製の制御に至るまで幅広い役割を持つ。そのため、本研究の成果は、アレナウイルス研究を発展させるだけでなく、汎アレナウイルス感染症の新規治療法および予防法の足掛かりとなることが期待される。

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、関連宿主因子の阻害薬による機能解析、また、組換えリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（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小胞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、アレナウイルスの増殖環に欠かすことのできない Z タンパク質に着目し、Z タンパク質が宿主細胞へ及ぼす膜構造の変化という観点から、下記 2 点の研究項目を実施する。

1. アレナウイルス粒子形成に関与する宿主タンパク質の作用機序の解明

同定したアレナウイルスの粒子形成に関与する宿主タンパク質の発現抑制によって、ウイルス粒子形成能および感染性 LCMV の増殖能が低下する要因を調べるため、細胞質での Z の局在変化を Live cell imaging 法を用いて解析する。また、細胞膜への集合および粒子形成能を Flotation assay や Z 発現細胞の電子顕微鏡解析で明らかにする。また、熱研対応教員である浦田博士は、昨年度、アレナウイルス Z タンパク質の自己重合を検出する FRET バイオセンサーを開発しており、本研究でもこのツールを利用し、Z の自己重合能への影響も評価する。以上のように多面的な解析を行い、本研究で同定した宿主タンパク質のアレナウイルス増殖環における役割の同定および作用機序の解明を目指す。

2. LCMV 感染細胞のオートファジー誘導と持続感染への関与

LCMV 感染におけるオートファジー誘導と持続感染成立との関連性を明らかにするため、Atg5 および Atg7 ノックアウト細胞でのウイルスタンパク質/RNA の発現量の変化を経時的に解析する。また、ウイルスタンパク質/RNA のみだけでなく、宿主タンパク質/RNA の発現量の変化についても着目し、LCMV の細胞死を回避する分子機構の解明を目指す。また、熱研対応教員である浦田博士は、これまでに Z タンパク質にタグを付加した組換え LCMV の作製や機能既知領域に変異を加えた LCMV を作製するリバースジェネティクス法について熟知しており、前述したような組換え LCMV を作製し、ウイルス増殖能の変化や各ウイルスタンパク質の細胞内局在、また持続感染成立への影響を多面的に評価する。以上のようにアレナウイルス増殖環におけるオートファジー誘導の役割や持続感染成立への分子機構の解明を目指す。

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小胞集合体形成に関連した報告はこれまでに無く、ウイルスの持続感染といった観点から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環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

申請者らはこれまでにアレナウイルスのZタンパク質が宿主オートファジーを誘導すること、また LCMV の持続感染成立には、宿主オートファジーの働きが深く関与する可能性を見出した。本年度は、宿主オートファジーを介した LCMV の持続感染成立機構を明らかにするため、下記の研究項目を実施した。

1) LCMV の持続感染成立に関わる宿主因子の網羅的探索

京都大学ウイルス・再生医科学研究所の遊佐宏介教授（幹細胞遺伝学分野）との共同研究で、CRISPR-Cas9 システムを用いた LCMV の持続感染成立に関わる宿主因子の網羅的解析を実施した(図 1)。

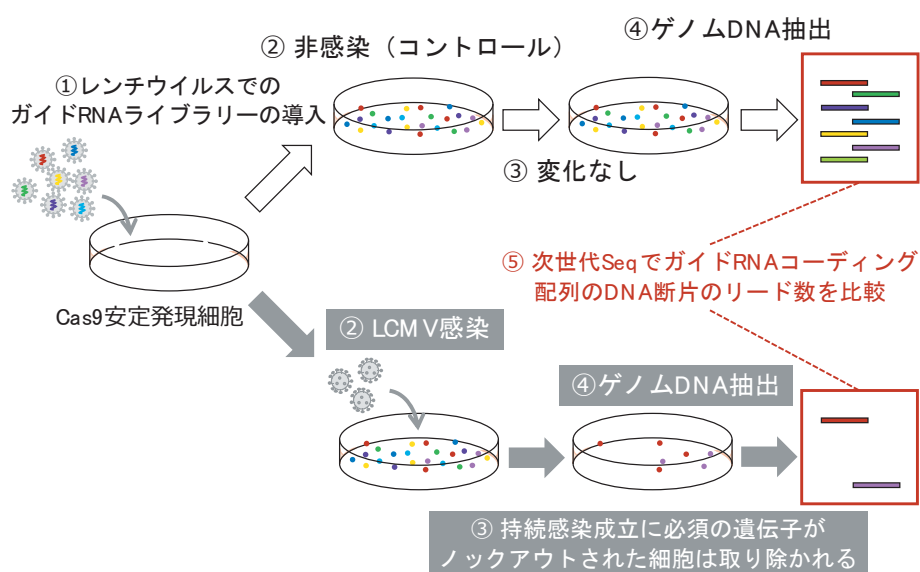


図 1. CRISPR-Cas9 スクリーニングの流れ

2) オートファジー誘導による I 型インターフェロン産生阻害と LCMV 持続感染への関与

オートファジー誘導に必須の遺伝子である Atg5 または Atg7 をノックアウトした A549 細胞に LCMV を感染させ、感染 12, 24, 48, 72 時間後の IFN α および IFN β の mRNA 量を RT-qPCR 法を用いて測定した。またインターフェロン調節因子 3 (IRF3) のリン酸化修飾の有無や二量体形成の有無を抗 IRF3 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により評価した。

② 成果 (結果 + 考察)

1) LCMV の持続感染成立に関わる宿主因子の網羅的探索

CRISPR-Cas9 スクリーニングを実施することで、LCMV の持続感染成立に関わる宿主因子を網羅的に探索した (図 2A)。当初の予想に反して、これらの宿主因子の中にオートファジー関連因子は含まれなかった。一方で興味深いことに、同定した宿主因子の上位は

インターフェロン α/β 受容体 (IFNAR) 下流のシグナル伝達に関与する宿主因子であった。LCMV を培養細胞に感染させた場合、I 型 IFN の産生を強力に抑制することが報告されているが (Pythoud et al. J Virol. 2012, Stott et al. Viruses. 2020)、今回の結果は、続く IFNAR 下流のシグナル伝達が LCMV 感染細胞の細胞死に直結することを示唆している。そこで次に、LCMV 感染細胞に精製 IFN β を添加し、共培養することで LCMV 感染細胞の細胞死が誘導されるかどうかを評価した。非感染細胞では、精製 IFN β 添加による影響は認められなかったが、LCMV 感染細胞では、精製 IFN β 添加により顕著な細胞死が誘導された (図 2B)。以上の結果から、LCMV の持続感染成立には、IFNAR 下流のシグナル伝達依存的な細胞死の回避が重要であることが示唆された。

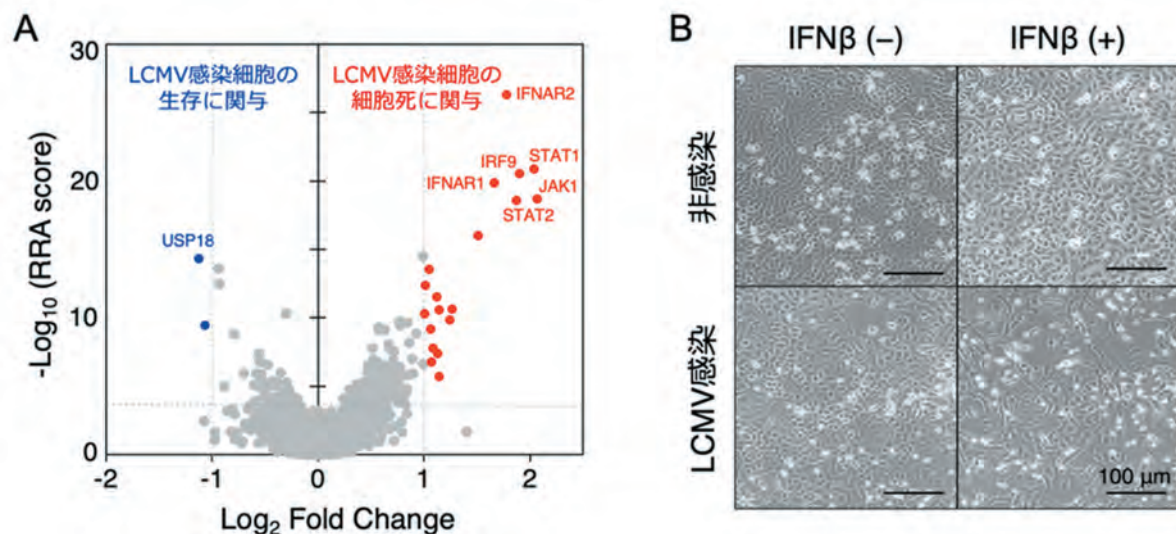


図 2. CRISPR-Cas9 スクリーニングの結果
(A) Volcano plot (LCMV 感染細胞/非感染細胞)、
(B) 精製 IFN β 添加時の LCMV 感染細胞の顕微鏡像

2) オートファジー誘導による I 型インターフェロン産生阻害と LCMV 持続感染への関与
上述 1) のスクリーニングではオートファジー関連因子は同定されなかったが、前年度までの結果を踏まえ、我々は、オートファジーの機能不全によって I 型 IFN 産生が誘導され、続く IFNAR 下流のシグナル伝達によって細胞死が誘導されるのではないかと考えた。

そこでまず、オートファジー誘導に必須の遺伝子である Atg5 または Atg7 をノックアウトした A549 細胞に LCMV を感染させ、IFN α および IFN β の mRNA 量を測定した。野生型の A549 細胞に LCMV を感染させた場合には、過去の報告同様、IFN 産生が認められなかったが、Atg5 または Atg7 をノックアウトした A549 細胞に LCMV を感染させた場合においては、感染 48 時間後に顕著な IFN 産生を認めた (図 3A, B)。このことから LCMV が野生型細胞に感染した場合、オートファジーを誘導することで I 型 IFN 産生を抑制し、続く IFNAR 下流のシグナル伝達依存的な細胞死を回避していると考えられる。

次にオートファジー誘導を介した IFN 産生阻害メカニズムについて明らかにするため、インターフェロン調節因子 3 (IRF3) のリン酸化修飾の有無並びに二量体形成の有無を評

価した (図 3C)。これらの結果から、LCMV 感染細胞におけるオートファジーの誘導は、リン酸化 IRF3 の二量体化形成の阻害に関与する可能性が示唆された。現在、本研究成果をまとめ、海外学術誌への投稿準備を進めている。

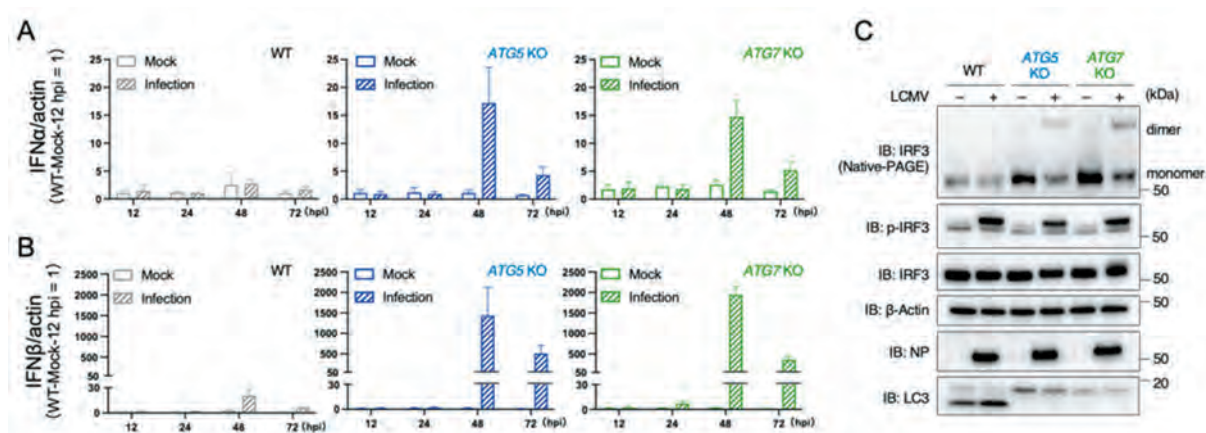


図 3. オートファジー機能不全による I 型 IFN 産生への影響

(A) IFNα の mRNA 発現量、(B) IFNβ の mRNA 発現量、
(C) 抗 IRF3 抗体を用いたウェスタンブロッティング

③ 成果の公表

1. Takenaga T, Zhang Z, Muramoto Y, Fehling SK, Hirabayashi A, Takamatsu Y, Kajikawa J, Miyamoto S, Nakano M, Urata S, Groseth A, Strecker T, Noda T. CP100356 Hydrochloride, a P-Glycoprotein Inhibitor, Inhibits Lassa Virus Entry: Implication of a Candidate Pan-Mammarenavirus Entry Inhibitor. *Viruses*. 2021 Sep 3;13(9):1763. doi: 10.3390/v13091763.
2. 梶川 純一, 平林 愛, 宮本 翔, 高松 由基, 胡 上帆, 野澤 孝志, 中川 一路, 浦田 秀造, 安田 二郎, 遊佐 宏介, 中野 雅博, 村本 裕紀子, 野田 岳志. オートファジー誘導によるリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染細胞の細胞死回避. 第 68 回ウイルス学会学術集会. 神戸・オンライン. 2021 年 11 月
3. 張 子涵, 武長 徹, 村本 裕紀子, Sarah Katharina Fehling, 平林 愛, 高松 由基, 梶川 純一, 宮本 翔, 中野 雅博, 浦田 秀造, Allison Groseth, Thomas Strecker, 野田 岳志. エストロゲン受容体作動薬は ラッサウイルスの細胞侵入を阻害する. 第 68 回ウイルス学会学術集会. 神戸・オンライン. 2021 年 11 月
4. Shangfan Hu, Yoko Fujita, Yukihiro Sugita, Masahiro Nakano, Yukiko Muramoto, Takeshi Noda. Cryo-EM structure of Lloviu cuevavirus nucleoprotein-RNA complex. 第 68 回ウイルス学会学術集会. 神戸・オンライン. 2021 年 11 月
5. 梶川 純一, 野田 岳志. 宿主オートファジーを介したアレナウイルス持続感染機構の解明. ウイルス学若手研究集会 2021. オンライン. 2021 年 12 月

6. 自己評価

本研究では、アレナウイルス Z タンパク質が宿主の膜構造を変化させ、小胞構造を形成する現象に着目して研究を進めてきた。昨年度は、この小胞構造がオートファジー由来のオートファゴソーム・オートリソソームであること、またオートファジーの機能不全は LCMV 感染細胞において顕著な細胞死を誘導することを明らかにした。そこで引き続き本年度は、オートファジーの機能不全がどのように LCMV 感染細胞の細胞死を誘導するか更なる分子メカニズムを明らかにすることを目指し、研究を進めた。CRISPR-Cas9 スクリーニングや Atg ノックアウト細胞を用いた実験から、オートファジーの機能不全によって LCMV 感染細胞で IFN 産生が誘導されること、また、続く IFNAR 下流のシグナル伝達依存的に細胞死が誘導されることが明らかになった。すなわち、宿主オートファジーを介した IFN 産生の抑制が LCMV の持続感染成立に深く関与することを明らかにした。本研究成果は、現在、海外学術誌への投稿に向けて準備を進めている。全体的には納得のいく結果が得られた一方で、当初予定していた計画が全て達成できなかったため、達成度は II とした。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：貝環境を模倣した *in vitro* 住血吸虫発育システムの開発
課 題 番 号：2021-Ippan-06
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）
濱崎 めぐみ（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 技術職員）
中村 梨沙（長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 助教）
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：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

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」は、淡水に生息する巻貝を中間宿主とし、巻貝から遊出したセルカリアが終宿主に経皮感染する。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感染制御策が講じられているが、完全に制圧するには、かつて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。しかしながら、中間宿主（貝）内における住血吸虫の幼虫発育は未解明な点が多く、ヒトへの感染形態であるセルカリアへの発育メカニズムを解明することは特に重要と考えられる。我々は、本申請研究にて、中間宿主（淡水産巻貝）由来抽出物を調製し、完全培養系による住血吸虫幼虫ステージの発育環境を実現させ、発育因子の同定、および発育メカニズムを明らかにすることを目的とした。

② 研究内容

これまでと同様に、住血吸虫モデルとしてマンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* および中間宿主の巻貝 *Biomphalaria 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）、奈良県立医科大学 感染実験室内で動物（ICR マウス）に感染させ、*S. mansoni* のライフサイクルを維持する。

未感染 *B. glabrata* よりタンパク抽出成分（*B. glabrata* protein: BGP）を調製する。*S. mansoni* 感染マウス肝臓より虫卵を採取し、孵化後に誘導したスポロシストより培養を開始し、BGP 添加によって住血吸虫の幼虫ステージでの発育を精査する。この際、各施設（長崎大学 熱研・寄生虫学 Ng および奈良医大 Na）の維持環境に由来する BGP（Ng-BGP、Na-BGP）を調製し、貝が維持されている環境による BGP の再現

性への差異、あるいは普遍性を検証する。発育ステージの解析としては、BGP 添加後の幼虫の *viability* や *mobility* をスコア化し、*S. mansoni* protein kinase C1 (SmPKC1) などの発現解析により各発育ステージ（ミラシジウム、スポロシスト、娘スポロシスト、セルカリア）における変化を経時的に解析する。この際、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として活用する。また、貝の各種臓器（頭足、肝臓、卵精巣など）由来の BGP を添加培養する組み合わせ、添加タイミングを検討し、セルカリアまで成長可能な条件を見出すことで、完全培養系により貝内環境を模倣可能な *in vitro* 培養系の確立を行う。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確認し、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の確立後、これまで貝内環境で観察が不可能であった住血吸虫の幼虫ステージの発育成長を経時的に観察・解析し、各ステージにおけるマーカーの探索と発現比較までを目標として行う予定である。

なお、長崎大学 熱研・寄生虫学で維持されている *B. glabrata* より抽出する BGP (Ng-BGP) は、熱研との共同研究により貝の飼育室を共同利用することで実施可能となる。また、研究進捗状況の打ち合わせをオンライン会議、あるいは長崎大学・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が主であった。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っていた。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と考えられる。また、ヒトへの感染形態であるセルカリアの発育メカニズムを解明することは、住血吸虫のライフサイクルの中でも特に注視すべきステージと考えられる。我々が本研究にて提案する中間宿主を用いずに住血吸虫の発育を実現させる方法論は、これまで報告が無く、『*in vitro* 住血吸虫発育システム』の開発と確立こそが、住血吸虫の発育プロセスの解析や解明を更に加速させ、感染形態であるセルカリアの発生を阻止可能な発育阻害薬剤の開発や、貝を駆除せずして感染制御を実現することにも繋がることが期待される。また、本研究モデルとしては、マンソン住血吸虫をモデルとして扱うが、世界で蔓延するその他の住血吸虫（ビルハルツ住血吸虫、日本住血吸虫、メコン住血吸虫等など）にも応用可能な実験系であり、種々のライフサイクルの解明を念頭に置き、住血吸虫発育のコントロールや発育阻害に対するスクリーニング、また、貝の駆除を行わずに感染コントロールできる可能性も秘めており、生態系を乱すことなく、自然環境への配慮も可能と考えられ、本研究が住血吸虫症の感染制御と防圧に十分貢献できると確信し、申請に至った。

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

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。

■ 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、ミラシジウムに孵化後、*in vitro* 培養を行った。培養は、Bge-M 培養液を用い、28℃の温度で行った。

■ 貝由来抽出物 (BGP) の調製とマンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における影響

未感染 *B. glabrata* より各種臓器 (頭足 HF、櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝臓・卵精巣 HPOT) に分割後、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 の効果を精査した。

■ マンソン住血吸虫感染貝における透明化による可視化

S. mansoni 感染貝を固定後、透明化 (CUBIC 法) を用いて感染貝の透明化を行い、虫体の同定・可視化を行った。

② 成果 (結果+考察)

■ 貝由来抽出物 (BGP) の調製とマンソン住血吸虫の *in vitro* 培養における影響

未感染 *B. glabrata* より全組織 (all) あるいは各種臓器 (櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝臓・卵精巣 HPOT、頭足 HF) 由来抽出物 (BGP) を調製した (Fig. 1)。

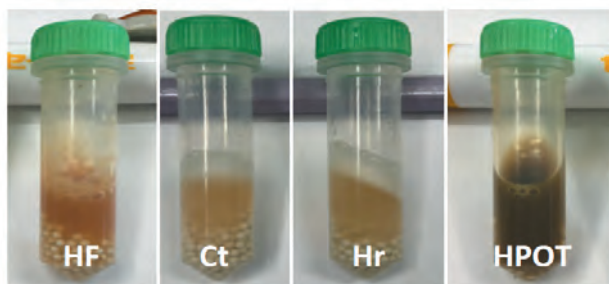


Fig. 1.

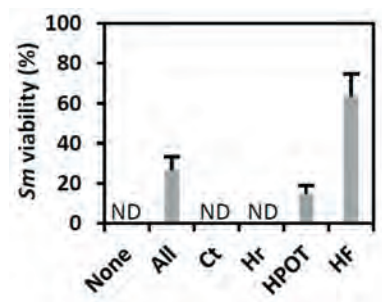


Fig. 2.

ミラシジウムの *in vitro* 培養系に各種 BGP を添加し、7 日間培養した結果、無添加 (None) あるいは Ct、Hr 添加では、スポロシストが萎縮し、一方で、全組織 (all) < HPOT 由来 < HF 由来 BGP の順で、運動性の維持を認めた (Fig. 2)。

さらに、HPOT あるいは HF 由来 BGP を用いて経時的な培養を行ったところ、HF 由来 BGP のみ、長期培養での運動性維持を認め (Fig. 3)、1 カ月以上 (35 日) の長期培養においても、*in vitro* 培養で維持可能であり、形態学的特徴 (大型で多数の胚細胞を有する) を保持し得ることが明らかとなった (Fig. 4)。

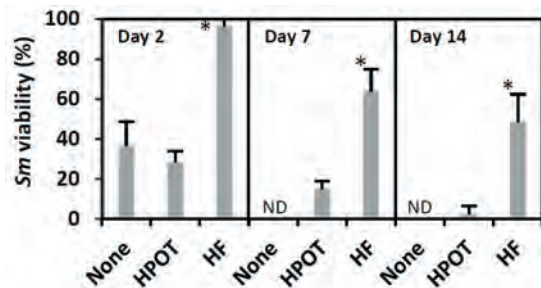


Fig. 3.

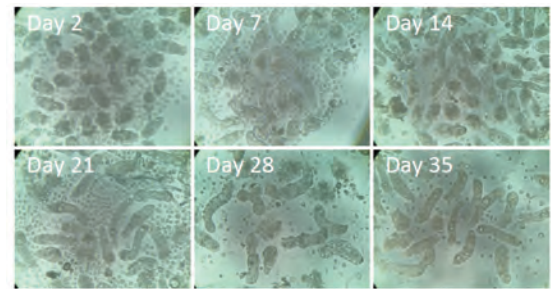


Fig. 4.

■ マンソン住血吸虫感染貝における透明化による可視化

S. mansoni 感染後の *B. glabrata* を固定後、CUBIC 法により透明化し、感染虫体の可視化・同定を試みた。貝の透明化により、透過光のみで全ての臓器の観察を可能とした (Fig. 5)。興味あることに、感染した *S. mansoni* の虫体を未染色で確認可能であり、各臓器 (頭足、心臓、肝脾臓、卵精巣) における分布を観察可能であった。

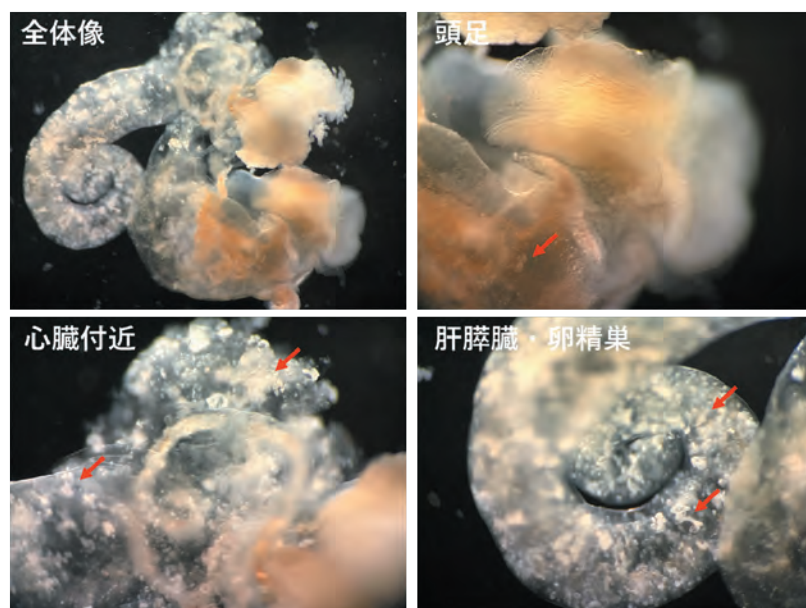


Fig. 5.

③ 成果の公表

1)

王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、尾崎大輔、島田賢子、濱野真二郎、吉川正英

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

Clinical Parasitology, 32(1), 34-36 (2021).

2)

王寺幸輝、吉川正英

“古くて新しい”住血吸虫症

医学のあゆみ（医歯薬出版株式会社），278(12)，1055-1059（2021）.

3)

王寺幸輝¹、北村知嵩¹、三須政康¹、西村知子¹、島田賢子¹、濱崎めぐみ²、中村梨沙²、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）

貝を用いない in vitro 住血吸虫培養システムの開発

第91回 日本寄生虫学会（2022年5月、帯広市 発表予定）

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プロセス・操作が必要である。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。

昨年度得られた成績をもとに、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下（Bge-M 培養液、28℃の培養温度）、各種臓器由来抽出物（BGP）を用いて、スポロシストの長期培養条件を探った。その結果、HPOT（肝臓・卵精巣）あるいはHF（頭足部位）由来 BGP が培養に適していることが明らかとなった。更に、経時的精査を行った結果、HF 由来 BGP を用いた場合、長期的な培養（1 カ月以上）を可能とすることが明らかとなった。

また、感染貝内における住血吸虫の動態解析を行う場合、従来法（凍結切片などを用いた組織学的解析）では、固定後の切片作成による物理的破壊や多数の連続切片を解析する必要があった。透明化技術を用いることで切片を作成することなく、全組織を対象に解析することが可能と考えられ、感染貝の透明化と虫体の観察・同定を試みた。その結果、透過光のみで感染幼虫の同定に世界で初めて成功し、今後の感染貝内幼虫分布の詳細な解析も可能とすることが明らかとなった。

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* で長期的に維持可能とし、また、透明化による感染貝の解析は、貝感染後の発育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（何れかに○）

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）

④ 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3（2021）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：2021-Ippan-07
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）
：小椋 義俊（久留米大学医学部感染医学講座 教授）
：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児・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。さらに、下痢症患者から分離された DEC の解析も行い、ベトナム国内で汚染・流行している DEC の基本的な特徴を明らかにする。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。新型コロナウイルス感染症の影響で井口らによる現地での試料収集が困難となった場合は、ベトナム拠点・竹村やベトナム国立衛生疫学研究所細菌部（特に環境・畜産における薬剤耐性細菌解析グループ）のサポートにより実施する。

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STEC 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*, *aggR*）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。

ゲノム解析：病原遺伝子ハイブリット型や血清型判定不能株などは、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。これまでに詳細な調査が行われていない東南アジア地域においては、既存の型には当てはまらない“新規型”の存在が予想され、DEC の生態や進化を理解する上での興味深い情報が得られると期待される。

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下痢症患者や、発展途上国を訪れた旅行者による下痢症事例から分離された 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、ベトナム国立衛生疫学研究所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、次年度以降に計画していた下痢症患者由来株の詳細なゲノム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 5 才以下の下痢症患者から分離された DEC (2012 から 2015 年に病院検査室で分離され、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、2020 年度に宮崎大学へ分与された (93 株由来 224 サンプル)。分与に際し、長崎大学と宮崎大学の間で MTA を締結した。

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*) の保有を再確認すると共に、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：ゲノム配列は MiSeq システムにより決定し、病原遺伝子と薬剤耐性遺伝子の分布、進化系統、血清型の詳細を解析した。

② 成果 (結果+考察)

宮崎大学に分与された代表株 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ため、以後の研究から除外した。残る 71 株のうち、5 株は 2020 年度にゲノム配列を決定し、66 株は本年度 (2021 年度) に実施を試みた。しかし、10 株は DNA が断片化していたため、利用可能な配列情報を得ることができなかった。結果として、本年度は計 61 株のゲノム配列を用いて網羅的な解析を行った。解析結果まとめを図 1 に示す。

病型を規定する遺伝子マーカーの分布は、*eae* 陽性株が 24 株、*aggR* 陽性株が 33 株、*elt+est* 陽性株が 1 株、*ipaH* 陽性株が 2 株、*elt+est+ipaH* 陽性株が 1 株であった。*eae* 陽性株のうち、4 株は大腸菌の近縁種である *Escherichia albertii* であることが判明した。*E. albertii* は 2003 年に新種として正式に発表された菌種で、近年では国内外で重症事例や集団事例から分離されている。ベトナムにおける下痢症患者からの *E. albertii* の分離はこれまでに報告はなく、下痢症起因細菌として本研究で初めて確認された。

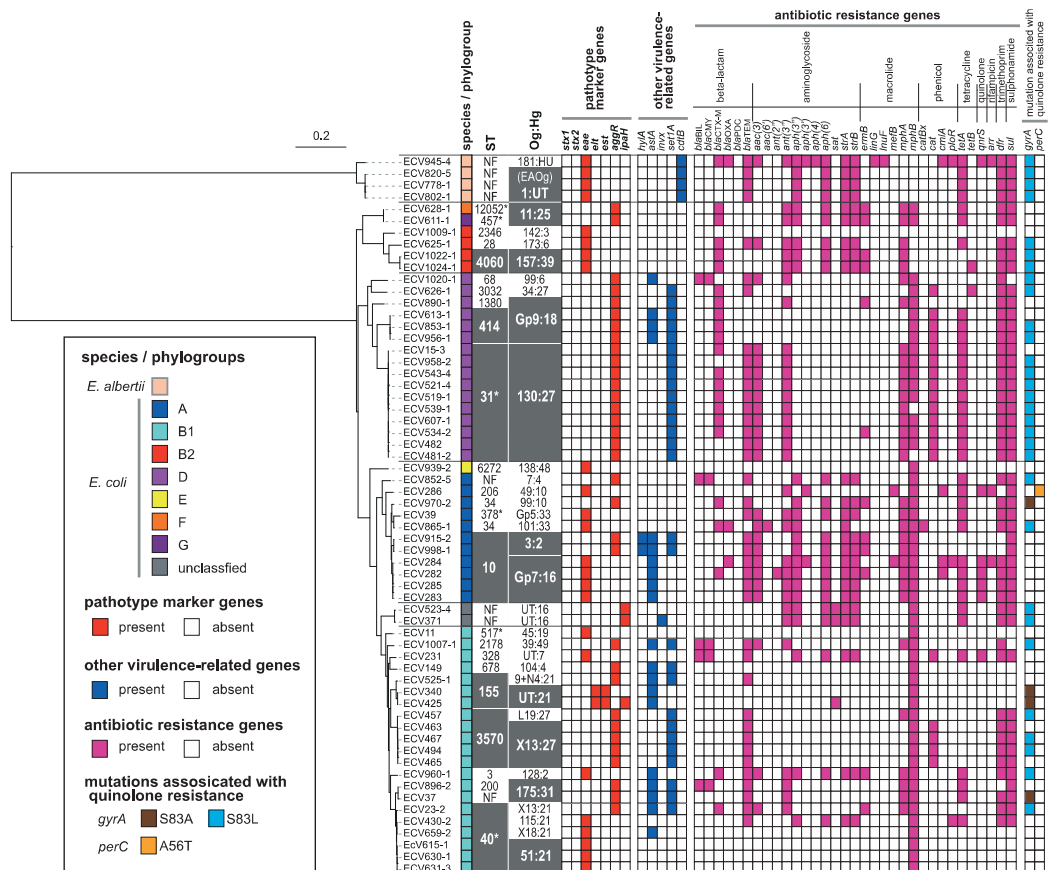


図1. 大腸菌および*E. albertii*の網羅的なゲノム解析の結果

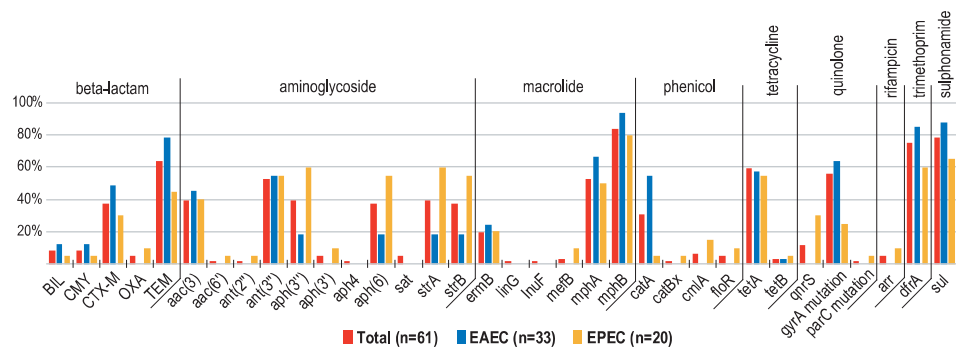


図2. 薬剤耐性遺伝子の保有率

大腸菌の主要なグループ(病型/系統/血清型)は、EAEC/ST31/Og130:Hg27(10株)、EAEC/ST3570/OgX13:Hg27(4株)、EAEC/ST414/OgGp9:Hg18(3株)、EPEC/ST10/OgGp7:Hg16(4株)、EPEC/ST40/Og51:Hg21(3株)であった。上記以外に23種類の血清型が確認された。一方で、*E. albertii*は2種類の血清型(EA0g1とOg181)に分類された。

解析した菌株の89%が複数の薬剤耐性遺伝子を保有していた(図2)。基質特異拡張型 β ラクタマーゼ(ESBL)産生性に関連するCTX-M遺伝子陽性株は大腸菌の39%、*E. albertii*の25%で確認された。ベトナム保健省のガイドライン(2016年)では、小児下痢症の第一選択薬としてニューキノロン系抗菌薬のひとつであるシプロフロ

キサシンの使用を推奨しているが、調査した大腸菌の 61%と、*E. albertii* の 100%で、シプロフロキサシンを含むキノロン系抗菌薬の耐性に関連する *gyrA* または *perC* 上の点突然変異が確認された。このように、ベトナムにおける薬剤耐性 DEC の蔓延状況が明らかとなった。推奨抗菌薬のミスマッチは治療効果に直結するため、今後、行政や医療機関とも情報を共有しながら、改善策などについて検討する必要があると考えられた。

③ 成果の公表

該当なし

6. 自己評価

申請時の計画では、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、その特徴解析して、患者由来株と比較解析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、2020 年度の共同研究で既に宮崎大学へ分与されていた精製 DNA を用いて、次年度以降に計画していた小児患者由来 DEC の詳細なゲノム解析を先行して実施した。その結果、ベトナムにおける新興下痢起因細菌である *E. albertii* の分布やベトナムで流行する DEC の特徴など、新たな知見を得ることができた。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

2021 General joint research report (self-evaluation)

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

Project number : 2021-Ippan-08

- 2 . Principal investigator :

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

Joint researcher(s) :

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. Mahrnunissa 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

(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 June 2021 until January 2022. 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).

(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). A total of 35-positive DEN NS1 patients were recruited from June 2021 until January 2022. A total of 15 patients had primary dengue infection, and 20 patients identified had secondary dengue infection. From 35 patients, 24 patients had monoinfection and 7 patients had concurrent infection and 4 patients were negative for dengue virus during the time of sample collection. Dengue virus type 4 is the most prevalent serotype in our dengue patients. Most of the patients were in critical phase n=21, followed by febrile phase, n=11 and convalescent, n=3. Level of DEN NS1 antigen was found in 17 of the 35 samples during the time of sample collection. We found no significant association between the DENV serotype with the dengue fever clinical manifestation and warning signs. In dengue fever, there was no significant association between serotype with headache (p=1.00),

retro-orbital pain ($p=1.00$), myalgia/arthralgia ($p=0.57$), leukopenia ($p=0.52$), and rashes ($p=0.632$). Additionally, there is no significant association between serotype with any warning signs such as hemorrhagic manifestation ($p=0.518$), abdominal pain ($p=0.649$), persistent vomiting ($p=0.787$), persistent diarrhea ($p=0.518$), third space loss ($p=0.483$), spontaneous bleeding ($p=0.404$), restlessness ($p=0.327$) or liver tenderness ($p=0.518$) and with any particular blood parameter such as levels of thrombocytopenia ($p=0.315$), hemoconcentration ($p=0.062$), high lactate with/without acidosis ($p=0.121$), transaminitis ($p=1.00$), and function impairment ($p=0.303$) or hyponatremia ($p=0.365$).

(3) Announcement of results

This present study reported that DENV4 was the predominant circulating serotype in our dengue patient admitted to our hospital. Due to the small samples size (due to COVID-19 pandemic), we did not find any significant association between serotype and clinical manifestation for dengue fever and dengue fever with warning signs.

6 . Self-evaluation

Due to the COVID-19 pandemic and the low number of patient visiting hospital, we observed decreased number of dengue patient in our hospital, thus we did not able to collect samples in large numbers. However, our samples size is enough for this pilot study and result from this study can be used to conduct study in larger scale.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

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3(2021)年度一般共同研究報告(自己評価)

1. 課 題 名：新規の共役抗マラリア薬を目指したスタチンとエゼチミブの効果の解明
課 題 番 号：2021-Ippan-09
2. 代 表 者：早川枝李（自治医科大学医学部・感染免疫学講座医動物学部門・助教）
共 同 研 究 者：徳舩富由樹（熱帯病研究所・シオノギグローバル感染症連携部門・細胞環境構築学分野・教授）
宮崎真也（熱帯病研究所・シオノギグローバル感染症連携部門・細胞環境構築学分野・助教）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

本件研究の目的は、薬剤耐性マラリア原虫の出現に対抗するため、新規の抗マラリア薬、または、既存の抗マラリア薬と共役的に使用できる化合物の開発の可能性を探索することである。本研究では、原虫にとって必須であるコレステロール代謝系に注目し、種々の抗コレステロール薬を既存の抗マラリア薬（アルテミシニン、クロロキン、プリマキンなど）と一緒に熱帯熱マラリア原虫(in vitro)に投与し、代謝恒常性に影響を与えることで原虫の生存能力、増殖、細胞内構造の維持能力を低下させることができるかを研究する。特にコレステロール合成阻害剤であるスタチンの Pf に対する新規作用機序を明らかにし、脂質代謝に重要な役割をもつアピコプラストの機能への影響を調べる。

② 研究内容

本研究では、アルテミシニン、クロロキン、プリマキンなどの既存の抗マラリア薬添加に対し、種々の抗コレステロール薬（スタチン、エゼチミブ、フィブラート等）を共役的に添加し、熱帯熱マラリア原虫の増殖能、脂質の取り込み、細胞内構造について解析する。また、新たなスタチンの作用機序の可能性として、アピコプラストでの脂肪酸合成に対するスタチンの影響についても調べる。アピコプラストに注目する理由は、スタチンがイソペンティニルピロリン酸(IPP)の合成系（HMG-CoA）を阻害する薬剤であり、マラリアにおける IPP 合成がアピコプラストで行われているためである。

本申請研究の熱研側教員である徳舩富由樹教授（細胞環境構築学分野）は脂質代謝解

析を専門とし、また、マラリア原虫の変異体作成にも成果を上げている。本研究では Pf におけるコレステロールの取り込みとエゼチミブの作用機序をより詳細に解析するため、Pf の持つ PfNCR1 の変異体作成及び各種薬剤存在下での Pf の脂質プロファイリング解析を依頼した。徳舩教授とは現在、熱帯熱マラリア原虫の脂質代謝、生殖母体期の構造解析等について共同研究を行っており、また過去の共同研究についても共著論文を出していることから、本共同研究を遂行する上で問題はない。

③ 予想される成果

過去の実験経過から、エゼチミブは Pf 単独、または Pf と肝臓細胞(HepG2 細胞)との共培養系に添加した場合、Pf の増殖能を有意に低下させており、また、エゼチミブの作用機序が現在使用されている抗マラリア薬（アルテミシニン、クロロキンなど）の作用機序とは異なることから、抗マラリア薬として共役作用的に使用できる高い可能性が期待できる。さらにエゼチミブは、すでに抗コレステロール薬として臨床治療に用いられていることから、将来、ヒト試験に進む際にクリアすべき副作用試験においても敷居が低く、現実的な結果が期待できる。もう 1 つのスタチンの未知の作用の解明として、Squalene synthase が無い Pf にスタチンを添加した結果、Pf の増殖抑制が認められた経緯から、非メバロン酸経路による IPP 産生に対するスタチンの影響が予想される。IPP はコレステロールやユビキノンなど様々な経路で必要な代謝産物であり、メバロン酸経路または非メバロン酸経路により生合成される。Pf の場合、ミトコンドリアではなくアピコプラスト(Ap)で IPP を産生するうえに、IPP がなくなるとマラリア原虫は死に至る。もしスタチンが Ap における IPP 産生を阻害することが明らかになれば、有力な新規抗マラリア薬になると期待できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

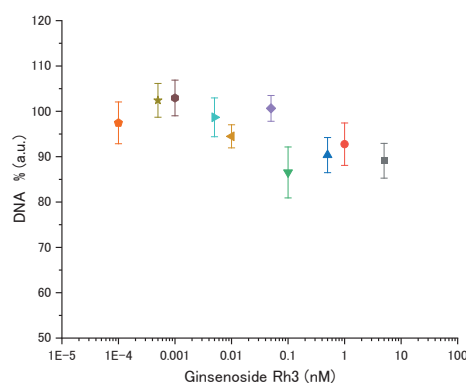
熱帯熱マラリア原虫(3D7 株; Pf)をヘマトクリット 5%、混合ガス(90%-N₂、5%-O₂、5%-CO₂)存在下で培養し、各試薬添加時の Pf の増殖抑制能を測定した。測定方法は Sybre Green Assay(SYBG)を用いた。さらに、コレステロールの取り込みに関係していると考えられる PfNCR1 タンパク質をコンディショナルノックアウトした原虫株を作成し、増殖能、細胞内脂質局在などについて 3D7 株と比較、解析を行った。

② 成果（結果＋考察）

(A) 熱帯熱マラリア原虫のアルテミシン耐性株に対する新たな薬剤の探索として、Pf-3D7 株の増殖能に対する Statin, Ginsenosides Rb3, Sulfasalazine, Manoalide 等の効果を調べた。

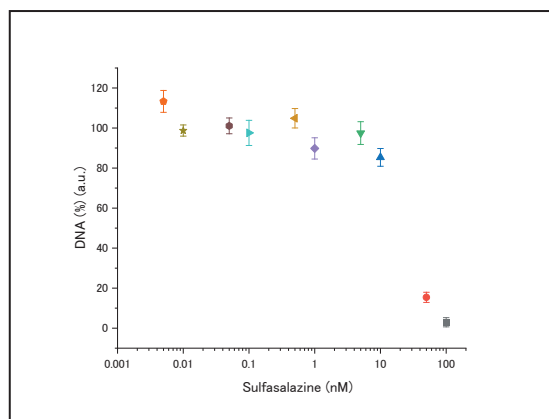
(i) 我々は以前、高濃度の Simvastatin を熱帯熱マラリア原虫 (Pf-3D7) の培養中に添加した場合、Pf の増殖能が低下していることを報告した(Hayakawa et al., 2021, Parasitology International)。この結果から、*de novo* のコレステロール合成経路を持たない Pf に対し、HMG-CoA 還元酵素阻害剤である Simvastatin が未知の作用機序を持つ可能性を示すのではないかと考えた。そこで一般的な抗マラリア薬の IC₅₀ は数 nM 程度であることを踏まえ、今回、statin の 1 つである Rosuvastatin を 0~1000nM(final)濃度になるように添加し、Pf の増殖抑制能について調べた。その結果、本条件では Pf の増殖抑制能はまったく見られなかった。Simvastatin と Rosuvastatin では構造の一部が異なり、さらに分子量 (Simvastatin: 418.5Da, Rosuvastatin-Ca:1001.4 Da) が 2 倍以上違うため、Simvastatin が作用したターゲットの構造ポケットに、Rosuvastatin が入らなかった可能性も考えられる。Statin がマラリア原虫の増殖を抑制するという報告は、少数ではあるが幾つか報告が出ているため、statin のマラリア原虫に対する作用はメバロン酸経路以外の代謝経路、たとえばミトコンドリア内代謝に対する影響など、未知の作用がある可能性を示唆している。

(ii) Ginsenosides Rb3 は、高麗人参由来のサポニンに含まれるジンセノサイドの 1 種である。ジンセノサイドはステロイド配糖体で、高麗人参由来ジンセノサイドはプロトパナキンジオール系、プロトパナキントリオール系、オレアニック酸系の 3 種に大別され、それぞれ、人体に対する効果は研究されている。また、ジンセノサイドはマラリア原虫の増殖抑制効果があるとの報告もあるが、ジンセノサイドが含むどの成分が効果を持つのかなどについては、よくわかっていない。



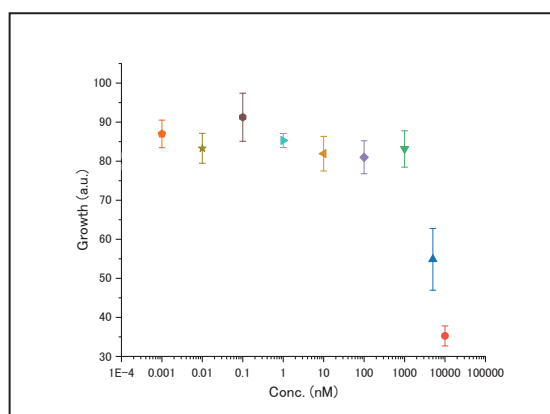
そこで本研究では、Peroxisome Proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) 経路を刺激しアポトーシスを誘導することがわかっている Ginsenosides Rb3 を熱帯 Pf の培養中に添加して、Pf の増殖能に対して調べた。その結果、~10nM までの濃度範囲において若干の抑制がみられた。今後、高濃度の添加条件下での再実験の必要があると考えている。

(iii) Sulfasalazine は関節性リュウマチや潰瘍性大腸炎などの炎症性疾患や、ブルセラ菌感染に対する治療効果が報告されているサルファ剤の 1 種である。本研究では



Sulfasalazine を Pf 培養中に添加し、Pf の増殖能変化について解析した。その結果、100nM (final) の添加時、有意に Pf の増殖が抑制されることをみつけた (IC₅₀=20nM 前後)。Sulfasalazine は炎症反応やアポトーシスなどに関わっている NF- κ B の活性化が作用機序の 1 つとして考えられていることから、今後、この方向でのさらなる研究の展開を検討したい。

(iv) Manoalide は Ca²⁺チャネル遮断薬であり、ホスホリパーゼ A2(PLA2)阻害効果



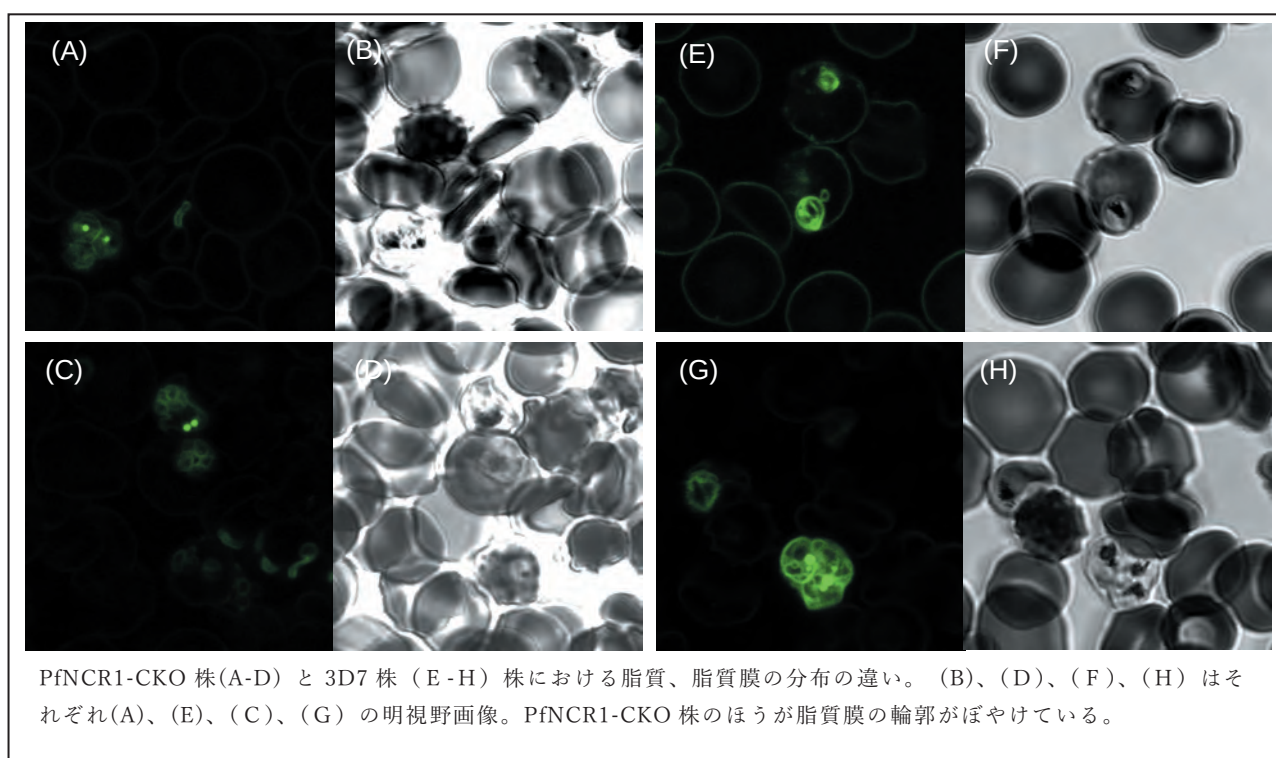
を示す。Pf の各感染ステージや原虫由来タンパク質の機能発現に Ca²⁺が重要な役割を持つことから、Pf の培養中に Manoalide を添加し増殖能に対する効果を調べた。その結果、1000nM(final)において顕著に Pf の増殖が抑制され、且つ、溶血は認められなかったことがスメア像から確認できた。Manoalide も抗炎症作用を示すことから、上記(iii)と同様に、今後、詳細な作用機序について検討を重ねることとする。

以上、これまで抗マalaria薬として調べられていなかった薬剤ではあるが、Pf に対し一定の阻害効果を持つことが明らかにできた。マalaria治療薬の新規開発には時間、経費が膨大にかかり、また新薬の安全性の確保には高いハードルがある。この問題に対しアルテミシニン耐性マalaria原虫に対する有益な解決策と考えている。

(B) Pf は外部から多種多様な脂質やアミノ酸を生存・増殖のために取り込んでいる。中でもコレステロールは必要不可欠であり、Pf はヒトの Niemann Pick C1-Like1(NPC1L1)に相同性をもつタンパク質；PfNCR1 を介してコレステロールを取り込んでいる可能性を、薬剤(ezetimibe)を用いた実験から得ていた。コレステロールの取り込みには、①細胞外⇒感染細胞、②感染赤血球膜・細胞質⇒細胞内マalaria原虫の 2 ステップがあり、それぞれ Active と Passive 機序の存在が考えられる。②において、原虫は赤血球からヘモグロビンを含む細胞質を取り込んで分解しているが、そこ

からコレステロールを原虫細胞質内への取り込む必要があり、その機能を担っていると予想されているのが PfNCR1 である。そこで PfNCR1 を glms システムによりコンディショナルノックダウンした原虫株 (PfNCR1-cKO) を作成し、原虫の増殖能について野生株 (WT-3D7) との比較検討を行った。24 時間ごとに約 120 時間まで増殖能について継続測定した結果、WT-3D7 株と PfNCR1-CKO 株において顕著な差は認められなかった。この結果は、Pf が発現している PfNCR1 は、少なくともコレステロール取り込み阻害剤の標的の 1 つではあるものの、一定量のタンパク質の発現量を低下させるコンディショナルノックダウンでは Passive な取り込み機序の存在のために原虫を死滅させることができなかったと推測される。今後は、コンディショナルノックアウトの系を構築し同様の実験を行うことを計画している。

次に WT-3D7 株と PfNCR1-cKD 株において感染赤血球内の脂質、脂質膜の局在について、脂質膜特異的に蛍光標識する Lipiorder を用いて共焦点顕微鏡により観察を行った。また、WT-3D7 株と PfNCR1-cKD 株において、バイアビリティの違いを確認するため、Pf 原虫体内のミトコンドリアを MitoTracker により標識し、共焦点顕微鏡により観察した。その結果、WT 株-感染赤血球内では、膜構造の輪郭が明瞭に観察できたが、PfNCR1-CKO 株-感染赤血球内では、膜構造の輪郭が不明瞭であった。コレステロールや脂質は、熱帯熱マラリア原虫-感染赤血球内で、「膜」の一部として輸送されている (Hayakawa et al., 2020, Scientific Report) ことから、本結果は、コレステロールの取り込み抑制環境下では、他の脂質を含む膜形成にも影響が出ている可能性が推測される。またミトコンドリアの分布については、PfNCR1-CKO 株のほうが若干、偏在しているように見えるものの、明らかな有意差は認められなかった。



③ 成果の公表

なし

6. 自己評価

新型コロナウイルス感染蔓延による県内外への移動自粛、及び所属機関からの出張自粛命令のため、当初計画していた長崎大学熱研への訪問・実験の回数は1回しか実現できなかった。しかし本申請研究の目的の1つであった“抗マラリア薬に縛られない、既存薬物の再開発を念頭においた阻害剤の探索”は、今後の新展開に期待できる結果となった。

熱帯熱マラリア原虫（Pf）の根本的な生存戦略の1つであるコレステロールの取り込み機序は、今なお世界中で論争が続いており生物学的にも興味深い研究テーマである。本研究結果は、当初予想したPfNCR1限定のコレステロール取り込みではなく、Pfが複数の取り込み経路、または、まったく別の取り込み経路を持つ可能性を初めて明らかにした。この研究テーマは、今回の生物学的解析を発端としてタンパク質の1分子解析、構造解析、分子発現活性/阻害など、今後、物理学、生物物理学、分子生物など、異分野の実験手法と組み合わせて詳細に解析する必要がある、今後、さらに研究を進めることとする。

7. 達成度（何れかに○）

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3（2021）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”におけるキチナーゼの機能解析

課 題 番 号：2021-Ippan-10

2. 代 表 者：佐賀大学医学部免疫学分野・講師（特定）・見市（三田村）文香

共 同 研 究 者：佐賀大学医学部免疫学分野・教授・吉田裕樹

寄生虫学分野・教授・濱野真二郎

共同研究室・助教・坂口美亜子

寄生虫学分野・助教・中村梨沙

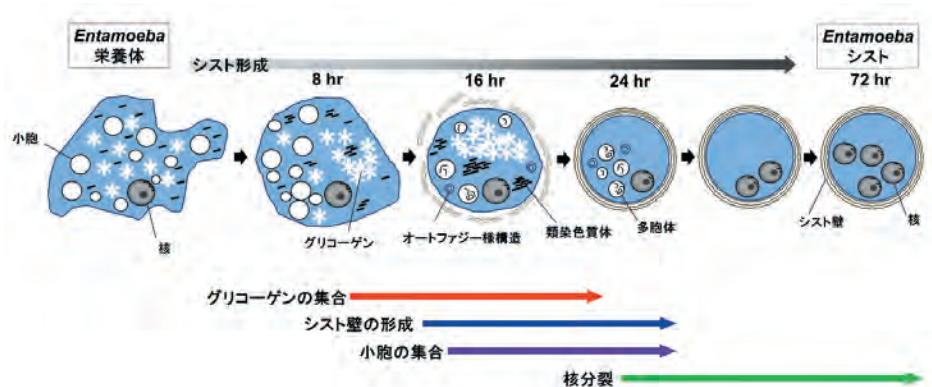
3. 決 定 額：400 千円

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が、その分子機構はほとんど解明されていない。我々は、シスト形成制御機構の全容解明を目指して、研究を進めている。

これまでに、赤痢アメーバのシスト形成モデルである *Entamoeba invadens* を用いて、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る経時的解析を行い、以下の事象（グリコーゲン顆粒の集合、シスト壁の形成、小胞の集合など）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を明らかにすることに成功した（Mousa EAA and Sakaguchi M, *et al*, *Parasitology*, 2020）。



今回我々は、シスト壁の主成分の1つキチンの代謝に焦点をあてる。シスト壁の形成にはキチン分解酵素であるキチナーゼが重要であると考えられている。その証拠として、キチナーゼがシスト壁の主たるタンパク質成分であること (Ali IK *et al*, *PLoS NTD*, 2012)、キチナーゼをコードする遺伝子の転写がシスト形成に伴い上昇することが報告されている (de la Vega H *et al*, *Mol Biochem Parasitol*, 1997)。しかしながら、キチナーゼのシスト形成における重要性および生理機能を示す証拠は乏しい。

本研究では、赤痢アメーバキチナーゼのシスト形成における機能解明を目指し、本酵素の新規阻害剤を探索、得られた化合物を用いて本酵素解析を試みる。さらに、熱帯医学研究拠点が提供する電子顕微鏡と共同研究室の坂口博士の協力を仰ぎながら、キチナーゼ阻害がシスト形成過程に与える影響を形態学的に解析する。具体的な項目は、

[1] 組換え酵素の作製、キチナーゼ活性測定方法の導入

[2] 組み換え酵素の活性を指標とする化合物ライブラリーのスクリーニング

[3] [2]で得られた化合物の培地への添加が与えるシスト形成過程への影響の電子顕微鏡解析

である。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、上記解析にはシスト形成のモデル生物である近縁種 *Entamoeba invadens* を用いる。これらの研究を通して、赤痢アメーバの重要なステージ移行であるシスト形成の分子機構の解明の端緒となる成果を得る。その先には、キチナーゼを標的とするリード化合物提供から新規抗アメーバ赤痢薬創生につなげる目標がある。以上、寄生虫疾患対策に資する学術的成果をあげることが目的とする。

① 研究内容

[計画 1] 組換え酵素の作製、chitinase 酵素活性測定方法の導入

既知の他種生物キチナーゼ阻害剤 (Pentoxifylline など) はシスト形成を阻害しないこと、allosamidin は購入不可能である。このことから *Entamoeba* のキチナーゼ阻害剤の取得は不可欠であると考えた。赤痢アメーバ (*E. histolytica*) のゲノム上には1つ (EhCht)、モデル生物である *E. invadens* のゲノム上には4つのキチナーゼ (EiCht1-4) がコードされている。これら5個全ての組換え酵素を作製、96穴プレート内での組換え酵素のキチナーゼ活性測定系を確立する。

[計画 2] 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

[2-1] 化合物ライブラリー (400化合物および10,000化合物) を既に入手しており、これらを用いて、上記5種類の組み換え酵素 (EhCht, EiCht1-4) のキチナーゼ活性を阻害するものを得る。

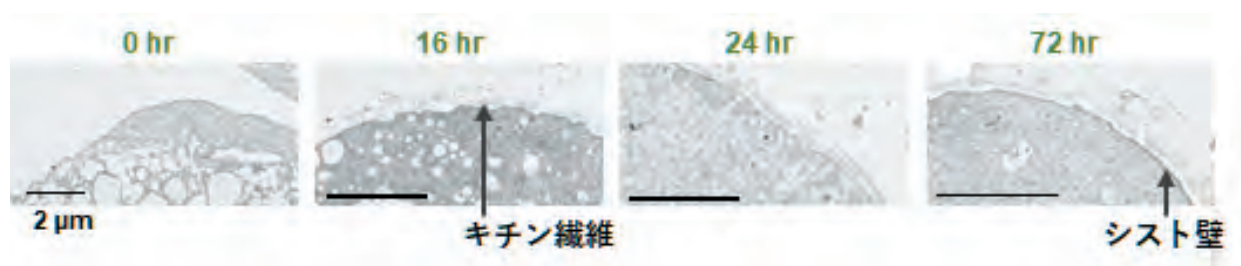
[2-2] シスト形成を誘導した細胞からキチナーゼを精製し、[2-1]で得られた化合物によって活性が阻害されることを確認する。

[計画 3] [2]で取得した化合物の培地への添加が与えるシスト形成細胞への影響の解析

[3-1] [2]で得られた化合物を培地へ添加し、シスト形成を阻害するか否かなど、シスト形成に与える影響をフローサイトメトリーにより解析する。

[3-2] [2]で得られた化合物を培地へ添加し、シスト形成細胞、特にシスト壁形成に与える影響を電子顕微鏡解析する。これまでの研究により、正常なシスト形成に伴い、16時間

でキチン繊維が細胞膜上を覆った後、24 時間から 72 時間まで時間をかけて固いシスト壁が形成されることを見出している（下図、Mousa EAA and Sakaguchi M, *et al*, *Parasitology*, 2020）。この経時変化に与える影響を解析する。



② 予想される成果

キチナーゼのシスト形成における重要性は認識されているが、それを示す直接的な証拠に乏しい。本研究ではキチナーゼに着目、これまでの採択課題で得られた方法論・知見を基盤として新規阻害剤の創出、さらには新たなツールを提示した上でのシスト形成におけるキチナーゼの機能解析を行う。令和 2 年度採択課題で、シスト形成に伴う細胞表面の微細構造の経時変化観察により、シスト壁の形成過程を詳細に解析することが可能になった。加えて、平成 30 年度の成果として、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を確立できた。

シスト形成には多くの代謝経路が連続的・統合的に機能して細胞分化が完結する。シスト壁の形成はその代表的な構造変化であり、キチンはその主成分である。したがって、その代謝経路に含まれるキチナーゼが不可欠であることは十分に想像できるが、実験的証拠に乏しい。本研究では、キチナーゼの新規阻害剤を取得し、それをを用いたシスト形成における機能の解明を行う。したがって、得られた知見は、学術基盤に立脚した新規抗アメーバ赤痢薬創生、そして最終的には国際公衆衛生上の問題である寄生虫疾患対策に資する成果となることが期待できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

1) 組換え酵素の作製、chitinase 酵素活性測定方法の導入

赤痢アメーバ (*E. histolytica*) のゲノム上のキチナーゼ (EhCht)、およびモデル生物である *E. invadens* のゲノム上の 4 つのキチナーゼ (EiCht1-4) の組換え酵素 (His タグ付き) を作製した。精製した組み換え酵素について、キチナーゼ酵素活性を測定した。また、96 穴プレート内での組換え酵素のキチナーゼ活性測定系を確立した。

2) 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

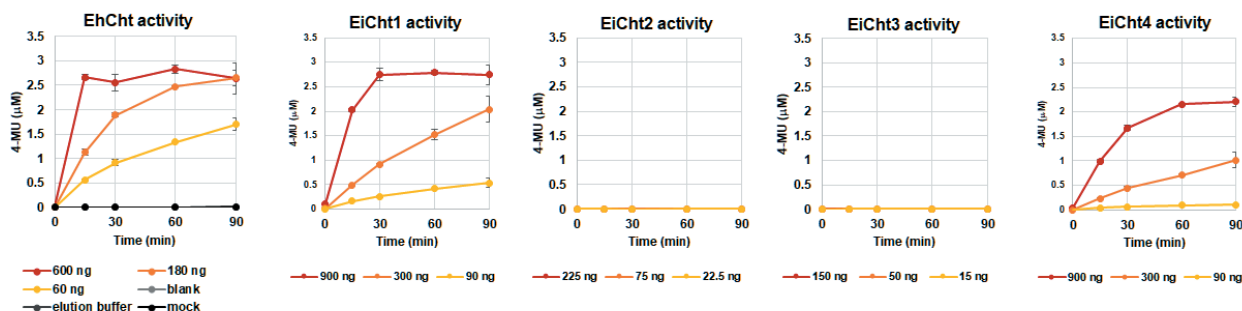
Medicines for Malaria Venture から供与された化合物ライブラリー Pathogen box の 400 化合物を用いてスクリーニングを行った。

3) 取得した化合物の培地への添加が与えるシスト形成細胞への影響の解析

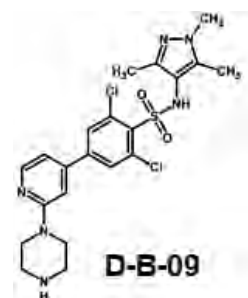
得られた化合物を培地へ添加し、シスト形成を阻害するか否かなど、シスト形成に与える影響をフローサイトメトリーにより解析した。さらにその時のシスト形成細胞、特にシスト壁形成を電子顕微鏡解析した。

② 成果 (結果+考察)

1) EhCht, EiCht1-4 の組換え酵素を作製した。96 穴プレート内での組換え酵素のキチナーゼ活性測定系を確立、キチナーゼ酵素活性を測定したところ、EhCht, EiCht1, EiCht4 の 3 種類について酵素活性が検出出来た (EhCht, 58.0 ± 8.2 mmol/min/mg protein, EiCht1, 11.7 ± 5.3 mmol/min/mg protein, EiCht4, 6.3 ± 1.1 mmol/min/mg protein)。

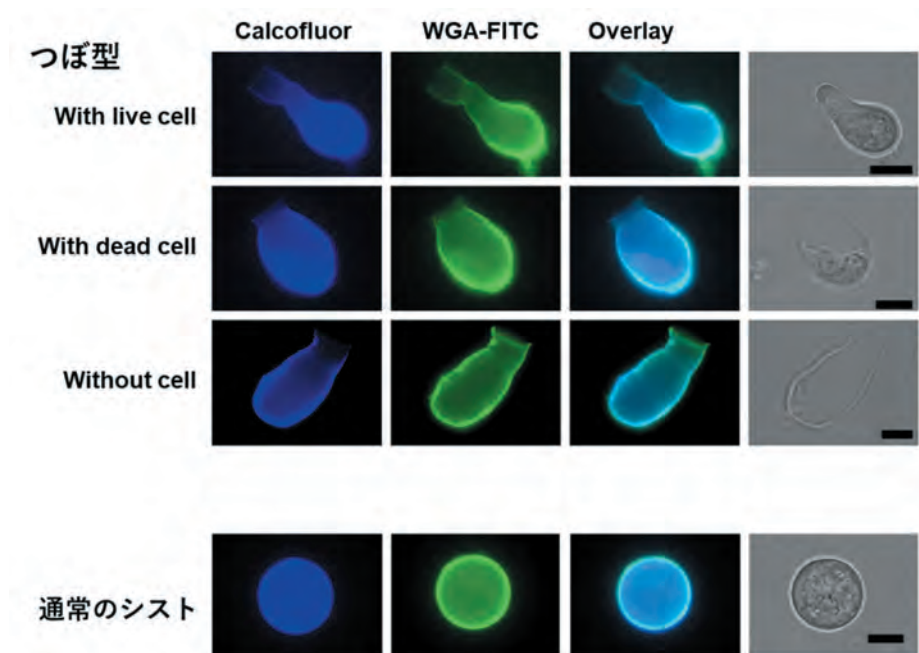


2) Pathogen box の 400 化合物を用いて EhCht, EiCht1, EiCht4 のキチナーゼ酵素活性に対する阻害活性を指標としたスクリーニングを行った結果、D-B-09 (右図) が EhCht, EiCht1, EiCht4 を阻害することを見出した (IC_{50} s, 0.3 ± 0.1 , 0.8 ± 0.2 , and 2.5 ± 1.3 μ M)。また、*E. invadens* のシスト形成を誘導した細胞のキチナーゼ酵素活性も阻害することを見出した (IC_{50} , 0.6 ± 0.2 μ M)。

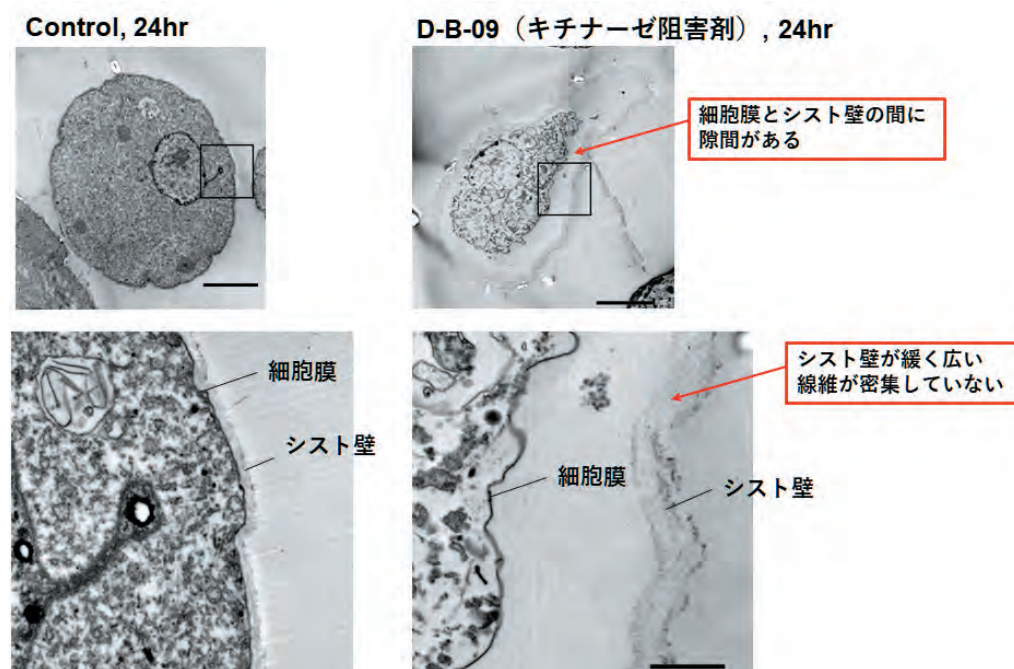


3) 上記化合物（組み替え酵素 EhCht, EiCht1, EiCht の酵素活性を阻害する）D-B-09 によりシスト形成が阻害されることを見出した（ IC_{50} , $1.4 \pm 0.3 \mu M$ ）。

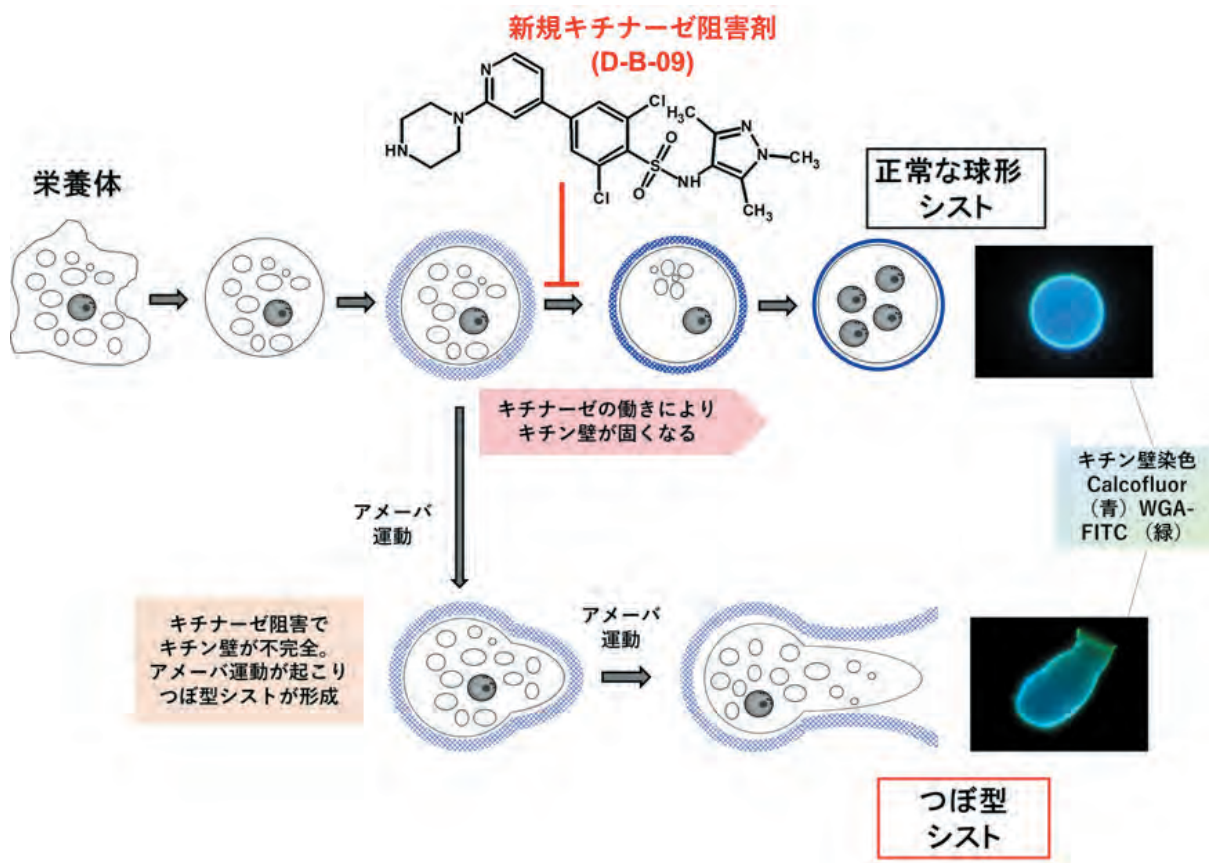
そして D-B-09 存在下でキチナーゼを阻害した状態でシスト形成を誘導すると異常な形のシスト、つぼ型シストが増加することを見出した。（下図。キチンを Calcofluor, WGA-FITC の 2 つの蛍光色素で染色）



この時形成される細胞を電子顕微鏡解析すると、シスト壁のキチン繊維の圧縮が阻害され、キチン繊維が緩く広がったまま（膨張）であることを見出した（下図）。



以上のことから、赤痢アメーバのキチナーゼは正常な球形シストの形成に必須な酵素であり、キチン繊維の圧縮を担っていることが明らかになった。



③ 成果の公表

原著論文

・ Mi-ichi F*, Sakaguchi M, Hamano S, Yoshida H. *Entamoeba* Chitinase is Required for Mature Round Cyst Formation. *Microbiol Spectr.* 9(1):e0051121. 2021.

学会発表

・ 見市文香、坂口美亜子、濱野真二郎、吉田裕樹. 「腸管寄生原虫“赤痢アメーバ”の休眠化機構“シスト形成”におけるキチナーゼの機能解析」第 94 回日本生化学会大会 (オンライン開催) 2021 年 11 月 3-5 日.

・ 見市文香、坂口美亜子、濱野真二郎、吉田裕樹. 「*Entamoeba* シスト形成におけるキチナーゼの機能解析」第 73 回日本寄生虫学会南日本支部大会 (オンライン開催) 2021 年 10 月 31 日-11 月 1 日.

6. 自己評価

これまで重要性および生理機能を示す証拠が乏しかった *Entamoeba* キチナーゼの機能解明を目指し研究を開始した。既知の阻害剤の入手が出来なかったことから、我々自身で阻害剤をスクリーニングすることから始め、*Entamoeba* キチナーゼの新規阻害剤として D-B-09 を得る事が出来た。そして、この阻害剤は、培養細胞に与える影響の解析を可能にした。結果、赤痢アメーバのキチナーゼが正常な“球形”シストの形成に必須な酵素であること、そしてキチン繊維の圧縮を担っていることが明らかとなった。これらの成果は、上記学会発表、さらには学術論文として発表出来た (Fumika M *et al*, *Microbiol Spectr*, 2021)。以上のように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（何れかに○）

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）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由（6の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和 3（2021）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：2021-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 プローブの作成をおこなった。次年度においては、作成したデングウイルス E タンパク質を取り込んだ緑色蛍光 VLP がベトナム拠点にて得られた、ウイルス感染患者の B 細胞を認識することを確認する。VLP に抗原非特異的に結合する B 細胞は、E タンパク質を取り込ませていない赤色蛍光 VLP の蛍光標識を指標として排除する。これらの VLP プローブを用いて、セルソーターによっ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 タンパク質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

前年度において作成したデングウイルス E タンパクプローブの抗デングウイルス E 抗体に対する結合能を患者血清にて確認し、さらに、このプローブによりデングウイルス認識 B 細胞の分離を試みる予定であったが、ヒト検体の使用のための倫理審査に予想より時間を要したため、本年度中にこれらの解析を行うことが困難となった。そこで、まず、同じ方法にて作成された新型コロナウイルススパイクプローブを用いて、抗体産生 B 細胞が分離可能であることを確認することとした。新型コロナウイルススパイ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 293T 細胞にトランスフェクションし 48 時間後にセルライセートを調整後、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新型コロナウイルススパイクプローブの発現を確認した（図 1 左）。つぎにマウスに新型コロナウイルススパイク抗原をアルミニウムアジュバンドと共に免疫することによって、マウスの血清中に抗新型コロナウイルススパイク抗体を誘導した。免疫したマウスより脾臓を摘出し、B 細胞の集団において新型コロナウイルススパイクプローブが結合する細胞が存在するかどうかをフローサイトメトリー法にて解析したところ、脾臓 B 細胞中の約 2.6% の細胞でプローブの結合が認められた（図 1 右）。

② 成果（結果＋考察）

当初の計画通ではデング熱患者血清や PBMC を用いた検討を行う予定であったが、ヒト倫理申請の遅れからこれらの年度内での解析が不可能となったため、同様の手法にて得られた新型コロナウイルススパイクプローブを用いてウイルス抗原特異的 B 細胞の分離試験をおこなった。その結果、抗原を免疫したマウスの脾臓からウイルス抗原産生 B 細胞を分離することに成功した。これらの結果から、すくなくとも新型コロナウイルススパイクプローブについては、抗ウイルス抗体へ

の結合能と B 細胞の分離能があることが確認できた。今後、ヒト倫理審査が完了次第、デングウイルス E タンパク質プローブについてもヒト抗体への結合能と B 細胞の分離能を確認し、デングウイルス中和抗体のスクリーニング系を確立させる予定である。

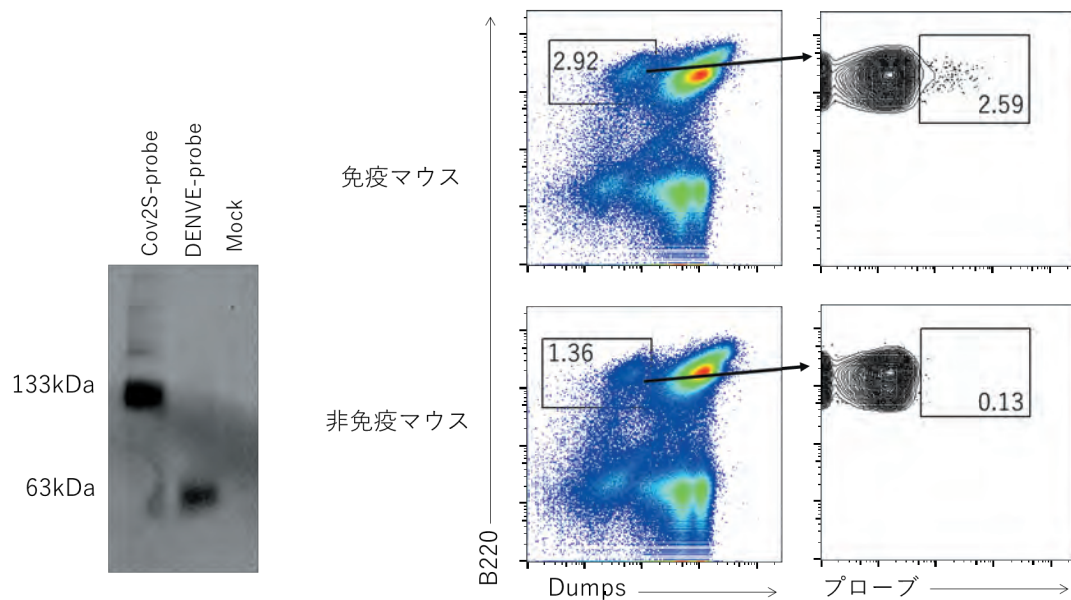


図 1. ウイルスタンパクプローブによる抗体産生細胞の検出

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

本年度においてはヒト倫理申請の遅れから、予定していたデングウイルス E タンパク質プローブの機能評価が出来なかった。しかしながら、同様の方法にて作成された新型コロナウイルスプローブでは抗原特異的 B 細胞の分離に成功したため、デングウイルス E タンパク質プローブも同様の機能を有することが期待できる。今後、早急にデング熱患者サンプルを用いたデングウイルス E タンパク質プローブの機能解析をおこなう予定である。

7. 達成度（何れかに○）

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

2021 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Clinical, serological, virological and molecular characterization of Chikungunya and Zika viruses in the Philippines
Project number : 2021 – Ippan – 12
- 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 specific aims of this proposed study are: (a) to characterize chikungunya and ZIKA virus strains isolated from serum/plasma samples (1995-recent years), (b) to analyze the spectrum of disease manifestations in association with the pathogen.

(2) Research content

In the Philippines, research activities will involve screening for CHIKV and ZIKV infection via MAC-ELISA, conventional or real-time PCR, and virus isolation. Next, CHIKV and ZIKV 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 and ZIKV 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 and Zika cases from serum samples collected between 1995-2022, b) Characterized CHIKV and ZIKV or CHIKV and ZIKV infection through serological and molecular methods, c) Determined viral determinants responsible for the CHIKV/ZIKV epidemics and degrees of severity of infection in the Philippines, d) Determined host-pathogen (CHIKV, ZIKV) interaction in vitro by using different cell lines and e) Compiled description of the spectrum of disease manifestations associated with CHIKV infection

5 . Implementation report :

(1) Research materials, methods, procedures

More than 3000 serum/plasma samples which were still contained in plastic bags were transferred to cryoboxes for easy retrieval and inventory. These were sorted, recorded and arranged according to the code and year of collection. Non-dengue samples were identified based on the negative results by DENV IgM capture ELISA and at least in one of the following tests a) RT-PCR with flavivirus or dengue consensus primers b) NS1 antigen strip test. Samples were selected and were subjected to virus isolation, CHIK RT-PCR and MAC-ELISA

(2) Results (results & observations)

Based on the inventory, non-dengue samples from 1690 patients were available. A total of 234 samples were subjected to virus isolation and CHIKV detection by RT-PCR or MAC-ELISA. There were 20 samples and 13 samples positive by RT-PCR and MAC-ELISA, respectively. Positive CHIK results were noted between the years 2012 and 2016.

(3) Announcement of results

We are currently planning to add additional samples for the detection of CHIKV infection to determine the extent of the infection outbreak between different years/phases and possibly region, in the Philippines. These results will be added to that of the current report for publication in medical journals.

6 . Self-evaluation

Although in the first year of implementation of our project, we were able to publish one paper (Emerg Infect Dis 26(9):2300-2301. 2020), despite the COVID-19 pandemic, the second year of the project was tough for us. The reasons are (a) most members of the team were affected by COVID-19 pandemic either by being a COVID-19 patient, (b) we had limited working hours and some staff worked from home only, (c) the approval of the proposal in our institution was approved only in October, 2021 and funding came late, (d) the limited budget only allowed us to work on the chikungunya virus. With the limited funding and the COVID-19 pandemic, the research activity was concentrated in the Philippines. Even with these limitations we were able to analyze and characterize the samples and, we hope to complete our work at least on Chikungunya using the funding of our institution.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

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 3（2021）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：2021- Ippan－ 13

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 分子感染ダイナミックス
解析分野・助教）

3. 決 定 額：300 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。

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 構造認識抗体は平行型・アンチ平行型・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。本支援は今年度で終了であるが、機会をみて今後 ChIP-seq 等による解析を検討したい。

7. 達成度（何れかに○）

- ☒ I （所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった）
- ☐ 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 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：TDP-43 の凝集体形成に着目したフラビウイルス性脳炎の分子病態の
解明

課 題 番 号：2021-Ippan-14

2. 代 表 者：小林 進太郎（北海道大学大学院獣医学研究院・准教授）
共 同 研 究 者：好井 健太郎（長崎大学熱帯医学研究所新興感染症学分野・教授）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

蚊やダニなどの節足動物により媒介されるウエストナイルウイルスや日本脳炎ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルスなどの神経向性フラビウイルスによる脳炎は致死的であり、病態発症メカニズムも不明な点が多い。神経向性フラビウイルスは脳に侵入後、神経細胞で増殖し、細胞変性および細胞死を誘導する。このウイルス感染による細胞変性を起点にフラビウイルス性脳炎の病態形成が起こることから、脳炎病態の発症機構を明らかにするために、細胞変性メカニズムを理解することは重要である。

申請者はこれまでに、神経向性フラビウイルス感染細胞内におけるユビキチン化されたタンパク質の蓄積が、神経細胞の変性および脳炎病態の重症化に影響することを見出している。本研究計画では、ウイルス感染で認められるユビキチン化タンパク質の同定とその蓄積のメカニズム、ユビキチン化タンパク質の蓄積が神経細胞および脳炎病態形成に与えるメカニズムを明らかにする。本研究は、脳炎の病態形成メカニズムを明らかにすることで、特に熱帯地域で重要な問題となるフラビウイルス感染症に対する治療法の開発のための基盤を形成することを目的とする。

② 研究内容

1. ユビキチン化 TDP-43 の細胞質内蓄積の分子メカニズムの解明

- ▶ 申請者および受入教員の好井健太郎教授が開発したフラビウイルスのリバースジェネティクス技術を用いて、TDP-43 の細胞内蓄積が異なるフラビウイルス間で E タンパク質のアミノ酸を置換した組換えフラビウイルスを作出する。
- ▶ 組換えフラビウイルスを感染させた細胞における TDP-43 の細胞質内蓄積を、熱帯医学研究所の共焦点レーザー顕微鏡やイメージングフローサイトメーターを用いて評価することで、蓄積に重要なウイルス因子を明らかにする。
- ▶ 細胞質内に蓄積した TDP-43 はユビキチン化、リン酸化、タンパク質の切断など様々な修飾を受ける。組換えウイルスを感染させた細胞を用いて、E タンパク質

と TDP-43 の相互作用が TDP-43 の修飾に与える影響について熱帯医学研究所の超解像度顕微鏡を用いて解析する。

2. TDP-43 の細胞質内蓄積によるウイルス増殖および脳炎病態形成への影響の解明

- ▶ 熱帯医学研究所に保管されている様々なフラビウイルスの TDP-43 の細胞質内蓄積の有無を明らかにし、さらにその増殖について TDP-43 の発現を抑制した細胞を用いて比較解析することで、TDP-43 の細胞質内蓄積がフラビウイルスの増殖に与える影響を明らかにする。
- ▶ 組換えフラビウイルスを感染または、変異導入 E タンパク質を発現させた細胞において、TDP-43 の生理学的な機能である mRNA のスプライシングや、核タンパク質の核内への輸送について、熱帯医学研究所の次世代シーケンサーや超解像度顕微鏡を用いて解析することで、ウイルス感染による神経細胞の変性の分子メカニズムを明らかにする。
- ▶ 組換えフラビウイルスをマウスに接種し、生存解析や、熱帯医学研究所の共焦点レーザー顕微鏡やバーチャルスライドスキャナを用いて神経組織の病理組織学的解析を実施することで、E タンパク質と TDP-43 の相互作用が脳炎病態の形成に与える影響について生体レベルで明らかにする。

以上の熱帯医学研究所の機器や熱研対応教員の協力の下で実施する 1、2 により、フラビウイルスの病態形成への関連が示唆される TDP-43 の細胞質内蓄積の分子メカニズムにおけるウイルス因子の役割および、蓄積による脳炎病態発症メカニズムが明らかになる。

③ 予想される成果

神経向性フラビウイルス感染による脳炎病態形成メカニズムを解明する研究において、免疫細胞の浸潤や炎症性サイトカインの反応を含む炎症反応の解析は盛んに実施されているが、ウイルスが感染した神経細胞そのものの細胞病理学的変化を詳細に解析する研究は多くない。申請者はこれまでに、ウイルス感染による神経細胞の病理学的変化が脳炎発症の起点となる研究成果を得ている。これらの結果に基づいて遂行する本研究は、ウイルス性脳炎病態の形成における神経細胞死の重要性の証明につながり、神経向性フラビウイルス感染症に対する治療法開発の新しい切り口となる可能性を有している。

また、本研究の着眼点である神経細胞内におけるユビキチン化タンパク質の蓄積は、ALS などの難治性の神経変性疾患において共通で認められる所見である。フラビウイルス感染においても認められるこのユビキチン化タンパク質の蓄積メカニズムおよび、蓄積による細胞死への影響を明らかにすることは、ウイルス性脳炎だけでなく、タンパク質の細胞内の異常な蓄積が病因である。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

フラビウウイルスのウイルスタンパク質発現プラスミドを導入したヒト神経芽腫由来の SH-SY5Y 細胞を TDP-43 の抗体を用いて免疫染色し、TDP-43 の細胞質内局在を解析することで、TDP-43 の細胞質内蓄積に関連するウイルス因子の特定を目指した。また細胞質内に蓄積した TDP-43 の性状を明らかにするために、フラビウウイルスを感染させた SH-SY5Y 細胞を 1% TritonX-100 を含む溶液で処理し、不溶性分画について 1% SDS を含む溶液で溶解した。溶解液は抗リン酸化 TDP-43 抗体を用いてイムノブロットを実施した。また可溶性の分画を用いて、STMN2 の発現量を解析した。

② 成果（結果＋考察）

1. ユビキチン化 TDP-43 の細胞質内蓄積の分子機構の解明

フラビウウイルスのウイルスタンパク質ゲノムにコードされている 10 個のウイルスタンパク質を C タンパク質、prME タンパク質、NS タンパク質群の 3 つに分けたタンパク質を発現するプラスミドを導入した細胞において、TDP-43 の細胞内局在を観察した。主に核内に局在が認められたコントロール細胞とは異なり、C タンパク質または NS タンパク質群を発現させた細胞の TDP-43 は細胞質に局在が認められた。特に NS タンパク質群を発現させた細胞では、ウイルス感染と同様に、顆粒状の TDP-43 の蓄積が細胞質内で認められた（図 1）。これらの結果から、ウイルス感染でみられる TDP-43 の細胞質内凝集体形成の誘導に NS タンパク質群が重要であることが明らかになった。

また、フラビウウイルス感染細胞により細胞質内に蓄積する TDP-43 について解析した結果、TDP-43 は 1% Triton 溶解液に不溶性で、リン酸化を受けており、一部は切断を受けるが大部分は全長の TDP-43 として存在することが明らかになった（図 2）。これらの多くは ALS で認められる TDP-43 と類似の性状である。今後、TDP-43 の蓄積を誘導するウイルス因子と TDP-43 の性状変化について解析することで、TDP-43 の蓄積が脳炎病態の形成に関わる影響について明らかにする。

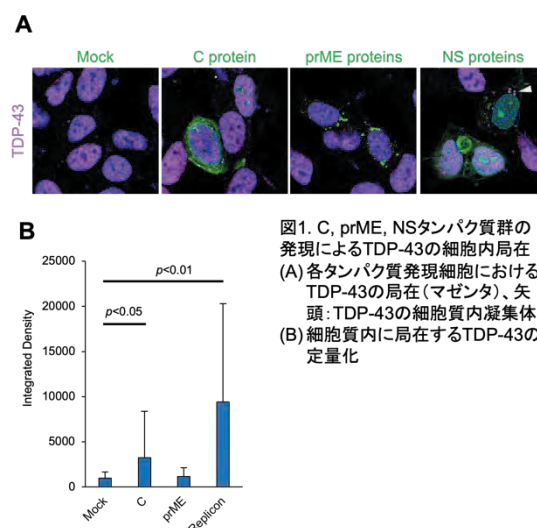


図1. C, prME, NSタンパク質群の発現によるTDP-43の細胞内局在 (A) 各タンパク質発現細胞におけるTDP-43の局在(マゼンタ)、矢頭:TDP-43の細胞質内凝集体 (B) 細胞質内に局在するTDP-43の定量化

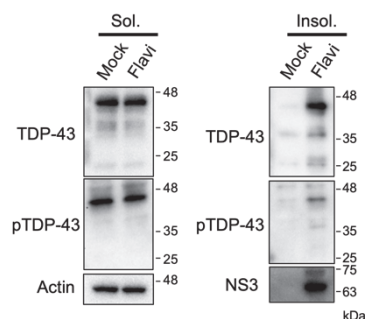


図2. TDP-43の性状解析
Triton可溶化分画(左: Sol)と不溶性分画(右: Insol)におけるTDP-43とリン酸化TDP-43

2. TDP-43 の細胞質内蓄積によるウイルス増殖および脳炎病態形成への影響

TDP-43 は mRNA のスプライシングなど RNA の代謝に関わるタンパク質であり、神経成長因子である STMN2 の発現調節に関わることが報告されている。TDP-43 の細胞質内の凝集体の形成が認められるフラビウイルス感染細胞において、STMN2 の発現量の減少が認められた (図 3)。今後はフラビウイルス感染による STMN2 の発現量の減少の分子機構について、TDP-43 の凝集体形成との関連を解析し、神経細胞死および脳炎病態形成との関連についても明らかにする。

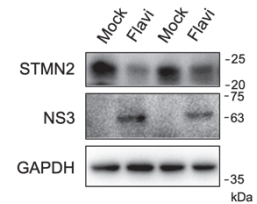


図3. フラビウイルス感染細胞におけるSTMN2の発現量の解析

③ 成果の公表

【学会発表】

1. 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、荏和宏明 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害機構の解析、日本ウイルス学会北海道支部第 54 回夏季シンポジウム、札幌市、2021 年 7 月
2. 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、荏和宏明 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送への影響、第 164 回日本獣医学会学術集会、江別市 (On line)、2021 年 9 月
3. 小林進太郎、好井健太郎、澤洋文、荏和宏明 ウエストナイルウイルス感染によるタンパク質の核内輸送の阻害機構の解明、第 68 回日本ウイルス学会学術集会、神戸市 (On line)、2021 年 11 月
4. 小林進太郎、好井健太郎、松野啓太、澤洋文、荏和宏明 ウエストナイルウイルスが感染した神経細胞で認められる TDP-43 の蓄積機構の解析、第 44 回日本分子生物学会年会、横浜市、2021 年 12 月

6. 自己評価

本研究により、フラビウウイルスの感染は TDP-43 の翻訳後修飾および細胞内局在に影響することが示唆された。また TDP-43 は感染により細胞質内に凝集体を形成するが、フラビウウイルスの NS タンパク質が凝集体の形成に重要であることが明らかになった。TDP-43 の細胞内局在はフラビウウイルス間で異なることがこれまでに明らかになっており、今後は当初の計画の通り、組換えフラビウウイルスを作出することで、TDP-43 の細胞質内蓄積に関わるウイルス因子の特定を目指す。

今年度はウイルス因子の特定に至らず、TDP-43 の蓄積の分子機構や病態形成との関連について解明することはできなかったが、TDP-43 の蓄積によって影響を受ける可能性がある宿主因子が明らかになるなど、一応の成果は挙げられたと考えられる。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）感染後に出現する抗体が認識するウイルス抗原およびヒトタンパク質についての研究

課 題 番 号：2021-Ippan-15

2. 代 表 者：大山 要（採択時：長崎大学生命医科学域（薬学系）・准教授）

共 同 研 究 者：相原希美（採択時：医歯薬学総合研究科・博士課程4年）

3. 決 定 額：300千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

新型コロナウイルス感染者の診療で得られた血清検体を用い、抗体が結合するウイルス抗原（抗原タンパク質の特定、抗原タンパク量の測定、抗原エпитープの特定）に関する研究を行う。

本研究では、LC-MS/MS を使う独自の抗原-抗体複合体（免疫複合体）解析法で患者検体を解析し、軽症患者（治癒後を含む）あるいは重症患者で特徴的に認められる抗体が体内で結合しているウイルス由来抗原（以下、目的抗原）を特定する。次に、目的抗原の量を LC-MS/MS で選択的・高感度に定量する。抗原量は抗体の働きで増減し病勢と相関すると予想されるため、臨床判断の指標となる。

血液中の免疫複合体は、抗原と抗体がそれぞれの構造の一部で相互作用により結合し、その結合点は、それぞれエピトープおよびパラトープと呼ばれる。免疫複合体からエピトープを特定する独自の LC-MS/MS 解析技術を使い、抗体と目的抗原が結合する免疫複合体の解析でエピトープを特定する。このエピトープは、治療・ワクチン開発における直接的な研究標的になる。

② 研究内容

目的抗原タンパク質の特定

目的抗原は以下の2通りの比較解析から、軽症患者（治癒後を含む）あるいは重症患者の血清に特異的または統計的有意差をもって高頻度に検出される目的抗原を特定する。

1)患者間の比較として、重症患者と軽症患者の比較を行う。患者群分けは入院時の診断をもとに行うが、入院後に重症⇒軽症に軽快した患者、軽症⇒重症に増悪した患者については、病態変化時点での検体をそれぞれ軽症群、重症群に組み入れる。なお、重症・軽症の定義は、Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines (NIH) に従う。

2)同一患者内の経時的比較として、重症⇒軽症⇒治癒（退院前）の各段階での抗原を

比較する。

この実験でのウイルス抗原の同定は LC-MS/MS 解析とデータベース検索で行う。具体的には、得られた MS/MS スペクトルを ViralZone または Uniprot に収載されているタンパク質データベースと照合し、体内で抗体と結合し免疫複合体を形成しているウイルスタンパク質を一斉同定する。SARS-CoV-2 については、登録タンパク質情報が随時更新されている状況であることを考慮し、他のコロナ型ウイルス（HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1）タンパク質データベースと混合したものを利用することで偽陽性を可能な限り排除する。また、抗体の交叉反応性を考慮し、定期および任意予防接種対象病原体（結核、日本脳炎、インフルエンザなど）も検索データベースに含める。

目的抗原量の測定

目的抗原の unique 配列（SARS-CoV-2 以外の病原体や宿主が持たないアミノ酸配列）を LC-MS/MS で選択的に測定する。得られた定量値について、重症・軽症患者間の比較、重症⇒軽症または軽症⇒重症での前後比較を行い、相関性を確認する。

③ 予想される成果

新型コロナウイルス感染症の治癒患者や軽症患者には、何らかの中和抗体が存在する可能性がある一方で、抗体が主体となる液性免疫が重症化に関与する可能性が指摘されている。抗体が結合するウイルス由来抗原を治癒患者や重症患者で特定すれば、これがワクチン開発ならび重症患者の治療法開発の研究標的になる。

新型コロナウイルス感染症の今後の更なる拡大と遷延が予想される。本研究では予防・治療研究で重要となる治癒患者や重症患者の抗体免疫の標的抗原とそのエピトープを *in vivo* 解析で正確に特定できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

長崎大学病院臨床研究倫理委員会により承認（許可番号 20051815）を受け、長崎県内・県外の7施設から患者血清（症例数：60、検体数：109）を収集した。解析は以下の通り行なった。血清（10 μ L）から免疫複合体を捕集し、papainで抗体のヒンジ領域を切断して得られた溶液をトリプシン消化した。ペプチド消化物のnano-LC-MS/MS分析で得られたMS/MSスペクトルをヒトおよびウイルスタンパク質データベースと照合し、抗原を同定した。SARS-CoV-2については他のコロナ型ウイルス（HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1）タンパク質データベースと混合したものを利用することで偽陽性を可能な限り排除した。また、抗体の交叉反応性を考慮し、定期および任意予防接種対象病原体（結核、日本脳炎、インフルエンザなど）も検索データベースに含めた。

各症例および検体は米国 Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines (NIH) 分類に従って分類し、critical・severe・moderate・mildで検出された抗原を集計した。抗原は以下の2通りの比較解析から、軽症患者あるいは重症患者の血清に特異的または統計的有意差をもって高頻度に検出される目的抗原を特定した。

② 成果（結果＋考察）

収集した患者60例の重症度内訳は、critical 4例（9検体）、severe 29例（40検体）、moderate 11例（17検体）およびmild 27例（43検体）であった。なお、このうち6例については入院中に重症化あるいは軽快が認められた。109検体の血清解析から1440個の抗原タンパク質が検出された。

重症群（critical および severe）あるいは mild に高頻度に検出されたものを抽出すると、凝固系や補体関係のタンパク質が複数認められた。凝固系タンパク質に対する自己免疫異常は重症患者の主な死因である DAD（びまん性肺胞損傷）や DIC（播種性血管内凝固）の発症と関連しているものと考えられた。また、補体関連因子は別研究で重症化に応じた増加が報告され、我々の結果もこれと一致するものと考えられる。

さらに、重症群（Critical、Severe）と非重症群（Moderate、Mild）で比較したところ、重症群で35%以上の頻度で検出され非重症群との頻度差が20%以上認められる8種類の抗原を特定した。このうち、5種類の抗原を使ったROC曲線から感度と特異度70%以上で重症群を検知できる可能性が示唆された。今後はこの5種類の抗原量を測定し、重症化予測マーカー群としての有用性を検証する予定である。

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、前年度に収集した患者検体から重症群に特徴的な免疫複合体抗原の絞り込みに成功した。この抗原を対象に抗原量定量やエピトープ特定を実施することが可能となったため、当初の目的を達成したと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

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 3（2021）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：2021-Ippan-16
 2. 代 表 者：岩手大学 農学部 共同獣医学科・関 まどか
共 同 研 究 者：長崎大学熱帯医学研究所 教授・北 潔
長崎大学熱帯医学研究所 准教授・稲岡健ダニエル
 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が引き起こされる。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（TCZ）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 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。TCZ 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、選択的な化学療法の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。

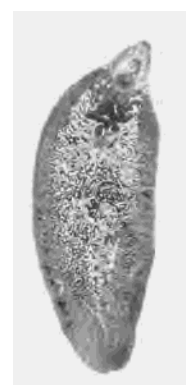


図 1. 肝蛭(成虫)
染色標本：実物大

② 研究内容

昨年度に引き続き、新規薬剤候補化合物について *in vivo* 試験を実施する。今年度は、AF について試験を行うとともに、化合物 X について再試を実施する。昨年度同様の成虫および幼虫を対象とした試験に加えて、予防的投薬の効果も検討する。肝蛭の病害は、感染後、幼虫が宿主肝臓実質に移行し、肝臓の実質が傷害される時期（急性肝蛭症）が最も重症で、濃厚感染の場合は出血により、宿主が死亡することもある。したがって、感染直後の幼虫を効果的に殺滅する投薬プログラムの検討は必須である（図 2）。感染実験は岩手大学で申請者が実施する。熱研対応教員は候補化合物を提供するとともに、試験全体を監督・統括する。

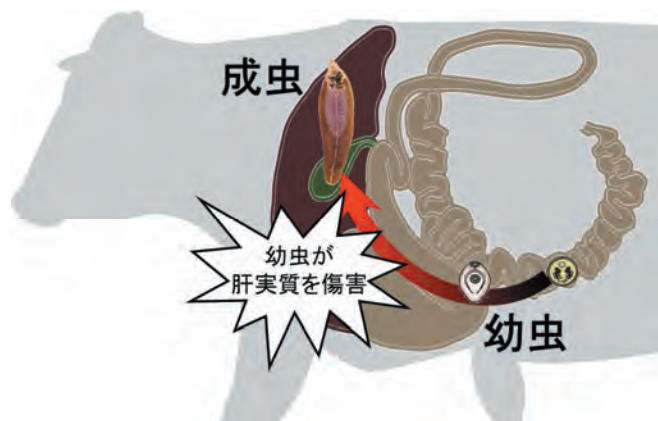


図 2. 肝蛭の体内移行

（1）AF の成虫に対する有効性

昨年度の化合物 X を用いた試験と同様に、100mg/kg と 300mg/kg で wistar ラットを用いて *in vivo* における駆虫効果を検討する。今回は 1 群 6 匹とし、実験終了時の生存個体数を確保する。また、化合物 X についても再試を実施し、解剖個体数を確保し、有意差検定を実施する。

（2）AF の幼虫に対する有効性

昨年度の化合物 X を用いた試験と同様に、100mg/kg と 300mg/kg で ICR マウスを用いて *in vivo* における駆虫効果を検討する。

（3）予防的投薬プログラムの検討

前述のように、肝蛭による病害を防ぐためには、感染直後の幼虫を駆虫することが重要である。そこで、今年度は予防的投薬プログラムの検討を行う。予防効果の検討には、AF と化合物 X の両方を用いる。具体的には、感染 4 日前に投薬を開始し、投薬完了後に肝蛭のメタセルカリアを経口感染させ、予防的投薬による駆虫効果を検討する。

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 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

化合物 X または AF の成虫に対する有効性：以下の 2 つの投与法を検討した

(1) 腹腔内投与

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 または AF 投与 1 群(100mg/kg)(n=6)、2 群(300mg/kg)(n=6)、TCZ 投与群(10mg/kg)(n=6)、コントロール群(n=6)の 4 群とした。各薬剤の腹腔内投与は、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) 経口投与

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 または AF 投与 1 群(100mg/kg)(n=2)、2 群(300mg/kg)(n=2)、TCZ 投与群(10mg/kg)(n=2)、コントロール群(n=2)の 4 群とした。各薬剤の経口投与は、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 成果(結果+考察)

(1) 腹腔内投与

実験中に数匹の個体が死亡したため、解剖時の個体数はコントロール群が 6 匹、TCZ 投与群が 5 匹、化合物 X 投与 1 群が 6 匹、2 群が 6 匹、AF 投与 1 群が 5 匹、2 群が 1 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 6.3 匹、化合物 X 投与 1 群では平均 4.8 匹、2 群では平均 4.7 匹、AF 投与 1 群では平均 5.6 匹、2 群は 1 匹の成虫を総胆管内から検出した。一方で、TCZ 投与群は平均 0.2 匹であった。統計解析に適さない AF の 2 群を除いた検定では、コントロール群と各薬剤投与群との間に有意差が認められなかったことから(Kruskal-Wallis 検定、 $p > 0.05$)、化合物 X と AF は腹腔内投与では無効と考えられた。

(2) 経口投与

腹腔内投与の結果を受けて、投与法を変更し、経口投与による効果を検討した。使用動物数の削減のため、各群 n=2 とした。肉眼所見は経口投与と同様であった。コン

トロール群ではラット 1 匹あたり平均 8 匹、化合物 X 投与 1 群では平均 3.0 匹、2 群では平均 5.5 匹、AF 投与 1 群では平均 6.5 匹、2 群では 5.5 匹の成虫を総胆管内から検出した。一方で、TCZ 投与群からは虫体が検出されなかった。経口投与試験では個体数が少ないため有意差検定はできなかったものの、薬剤投与群でも虫体の検出が認められたため、残念ながら経口投与でも化合物 X と AF は無効と考えられた。

③ 成果の公表

該当なし（論文投稿準備中）

6. 自己評価

AF と化合物 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。

腹腔内投与では、昨年度に続き化合物 X の効果について再試験を行ったが、残念ながら有効性が確認できなかった。また、AF も予想に反して化合物 X の有効性が確認できなかった。両薬剤には *in vitro* では明確な殺滅効果が認められるため、投与方法の変更による drug delivery の改善を試みた。はじめに、経口投与による効果を確認したが、経口投与でも腹腔内投与と同様に有効性が確認できなかった。このため、今年度は幼虫を対象とした試験は中止した。今後、さらに投与方法を検討し、効果的な drug delivery を実現できる条件を検討したい。また、これまで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（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ロタウイルス種間伝播における成人の役割と動物ロタウイルスのヒト
ロタウイルスへの馴化過程の解明

課 題 番 号：2021-Ippan-17

2. 代 表 者：高月 英恵（宮崎大学医学部微生物学分野・助教）
共 同 研 究 者：岩下 華子（東京女子医科大学国際環境・熱帯医学講座・助教）
新 竜一郎（宮崎大学医学部微生物学分野・教授）
バス デヴ パンディ
（長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学・客員教授）
森田 公一（長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学・教授）

3. 決 定 額：600 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ロタウイルスは成人においてもしばしば急性下痢症を引き起こす。しかし、途上国での成人患者における分子疫学情報は少ない。申請者らはネパールの成人下痢症患者における分子疫学調査を行ったところ、世界的に珍しい G11P [25]株を同定した。系統樹解析により G11P[25]株は、VP2 および NSP1 遺伝子を除く 9 つの遺伝子分節がブタもしくは未同定の動物ロタウイルス由来であることが明らかとなった。これは未知の動物 RVA 起源の株が宿主種障壁を越えたことを示す。この結果を受けて本研究はネパールにおける①種間伝播メカニズム、②動物ロタウイルスのヒトロタウイルスへの順応の過程、③種間伝播における成人の役割を明らかにすることを目的として行う。先行研究で確立した検体収集のためのネパールの調査拠点を活用し、成人およびヒトの居住地域に住む動物および家畜で循環するロタウイルスの解析を行う。

② 研究内容

本研究では種間伝播メカニズムおよびの動物ロタウイルスのヒトロタウイルスへの順応の過程を明らかにするとともに、種間伝播における成人の役割を探究する。成人およびヒトの居住地域に住む動物および家畜（水牛、ブタ）で循環するロタウイルスの全ゲノム解析を行う。

研究参画者の Basu Dev Pandey 氏はこれまでに熱帯医学研究所の森田公一教授とともにネパールにおけるデングウイルスの疫学研究を行ってきた。本研究代表者は開発途上国における研究プロジェクトの立ち上げおよびフィールドワークの経験が乏しいため、アジア・アフリカ地域で幅広くウイルス学研究を実施しているウイルス学分野の森田教授に研究活動、検査方法や解析に関する助言を仰ぎたいと考えてい

る。また、設備が不足しているネパールにて解析できなかった試料は、日本国内に輸送し解析することになっており必要が生じた場合に熱帯医学研究所の実験設備を利用させていただくことを希望している。

研究内容を以下に示す。

1) 下痢症患者由来便検体の採取 (2021 年 4 月-2024 年 3 月)

ネパール・カトマンズの熱帯感染症病院にて下痢症患者より便検体を採取する。目標数は 3 年間で 3000 検体とする。問診では家族の下痢症罹患状況および動物との接触歴を調査する。検体は病院と併設する国立公衆衛生研究所内のフリーザーで保管する。2021 年 4 月より検体採取開始予定。

2) 動物 (ブタ・ウシ・水牛) の便検体の採取

カトマンズ盆地の家畜の便検体を採取する。現地の農場の視察はすでに行っており、今後ネパール獣医会の協力を得て、遺伝子資源にアクセスするためのネパール国内法に則り採取を進める予定である。

3) ロタウイルスのスクリーニングおよびウイルス RNA の分離 (検体採取期間随時行う)

ELISA キットはヒトロタウイルスを想定してあるため動物ロタウイルスの検出に不向きである可能性がある。その場合は動物便検体については RNA を抽出し、NSP2 遺伝子の Real-Time PCR を用いたスクリーニングを行う。

4) ロタウイルス G-P 遺伝子型同定 (検体採取期間随時行う)

ロタウイルスにおいて中和抗体を惹起する表面タンパク質をコードする VP7・VP4 遺伝子は病原性および G 遺伝子型・P 遺伝子型を決定している。VP7 遺伝子、VP4 遺伝子を逆転写 PCR によって増幅し、Multiplex PCR (G1, G2, G3, G4, G9, G12 および P[4], P[6], P[8]) を行う。逆転写 PCR によって PCR 産物が得られたサンプルのうち、Multiplex PCR 陰性の検体についてはシーケンスにより塩基配列を決定し、ソフトウェア RotaC を用いて遺伝子型を明らかにする。

5) 非通常株・動物由来株の全ゲノム解析 (抽出 RNA を日本国内に輸送し解析する)

4) で同定された非通常株および 3) の動物由来株の全ゲノム解析を行う。ロタウイルスの 11 本の遺伝子にはそれぞれ遺伝子型が存在し、Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx と並べて表記される。動物のロタウイルスがヒト集団に定着する場合に Wa-like 型の遺伝子型構成 (-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) をとる傾向にあるという報告もあり、動物のロタウイルスのヒトへの馴化過程を理解するためには全遺伝子分節のゲノム解析が必要となる。全遺伝子配列の決定には次世代シーケンサーおよび Nanopore Sequencer を用い、系統樹解析はソフトウェア MEGA6 で行う。

③ 予想される成果

これまでに申請者らは 2007-2008 年にネパールのカトマンズにて成人急性下痢症患者より採取された便検体を解析し、ロタウイルス症例 47 例より 3 例の非通常株を見出した。時期が異なるため正確な比較はできないが、2003-2004 年のネパールの 5 歳以下の

小児における動物ロタウイルスの検出数は112例中1例(0.9%) (Uchida et al, J Clin Microbiol 2006)であることから、成人における動物由来ロタウイルス罹患率6.4%(3/47)という数値は小児を上回ると考えられる。途上国におけるサーベイランスのほとんどは小児を対象としており、これまで成人については注目されていなかったが、ロタウイルスの種間伝播に重要な役割を果たしている可能性がある。また、これまでヒトと動物のロタウイルスの同時監視はほとんど行われておらず、ウイルス馴化過程を明らかにするうえで重要な知見となる。

ネパールは2018年に導入予定であったロタウイルスワクチンも国内事情により見送られている。現在、世界80カ国以上で導入されているロタウイルスワクチンは、途上国の幼児の下痢症による死亡率を減少させている。しかし、動物由来ロタウイルスへのワクチンの効果は不明である。ワクチン導入以前の動物由来ロタウイルスの出現頻度および遺伝子型構成を明らかにすることは、動物由来ロタウイルス株へのロタウイルスワクチンの効果を検証するために必須である。また、得られた動物を起源とするヒトロタウイルス分離株のゲノム情報をもとにリバーシジェネティクスによりリアソータントウイルスを合成し、種間伝播を容易にする遺伝子文節の *in vitro* での解析を将来的に想定している。

近年のウイルス性の新興感染症の中には動物起源のものも存在する。本研究はヒトと動物との接し方を含む社会的要因が感染症の種間伝播に与える影響を理解するための重要な知見となる。本研究で得られた情報を共有し、ワンヘルスアプローチの視点に立った予防対策を提案・構築することはネパールの公衆衛生レベルの向上にとって重要なことを確信している。

5. 実施報告

本研究実施期間中、Covid-19 の流行により日本人研究者のネパールへの渡航が困難であったため、現地共同研究者との研究の定期報告などは全てオンラインミーティングおよび電子メールで行った。

① 研究材料・方法・手続き

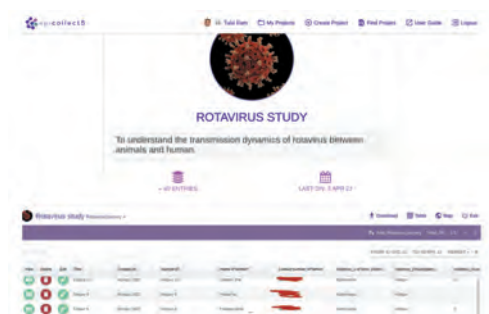
1) 下痢症患者由来便検体の採取

ネパールの倫理委員会 (Nepal Health Research Council: NHRC) に研究計画書を提出し、2021 年 2 月 5 日に承認を受けた。ネパールの成人下痢症患者で流行するロタウイルスの遺伝子型を調べるため、ネパール唯一の感染症専門病院である Sukraraj Tropical and Infectious Diseases Hospital (STIDH) にて下痢症患者の便検体の採取を行った。サンプル収集を開始する前に、一連の準備ミーティングを行った。STIDH の臨床医、検査技師、パラメディカルスタッフと数回 (COVID-19 の症例がないときは毎月 1 回)、ヒトからのサンプル採取を開始することに焦点を当てたラウンドミーティングを実施した。当初、Patan 病院も 2 番目のサンプル収集場所として提案されたが倫理的な問題やロジスティックの問題から実現には至らなかった。STIDH に糞便サンプルの保管のための冷凍庫を設置したほか、検体採取に必要なバイアル、手袋などを STIDH に提供した。問診票では下痢の重症度、家族の下痢症の有無、動物との接触履歴、日常利用する水源、栄養状況、ロタワクチン接種状況などを調査している。

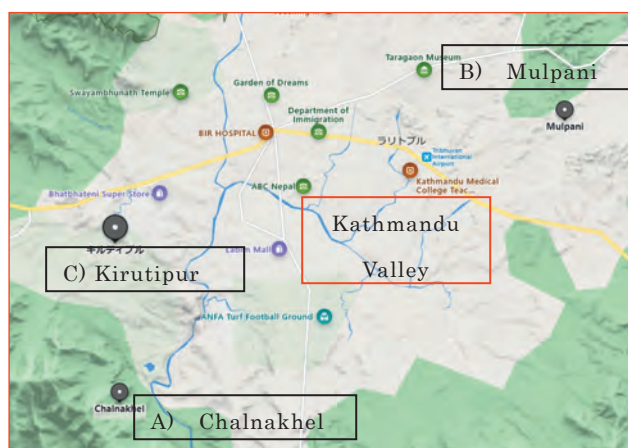
現在も研究に携わるスタッフと定期的にミーティングを行い、検体採取を継続している。

2) 動物 (ブタ・ウシ・水牛) の便検体の採取

ネパール獣医評議会に研究計画書を提出し、2021年11月21日に倫理承認を取得した。農場スタッフへのアンケートは Kishor Pandey 氏が作成した。Tulsi Ram Gombo 氏が構造的質問票を作成するためのアプリ (Epicollect5; 右写真) を開発した。



カトマンズ近郊の3つの農場(Chalnakhel、Mulpani、Kirtipur Municipality：下図)にて便検体の採取を行った。



② 成果（結果＋考察）

1）下痢症患者由来便検体の採取

本研究期間中ネパールの首都カトマンズにおいても Covid-19 の流行のため度重なるロックダウンが行われたほか、本研究の提携病院が Covid-19 の指定病院となり、Covid-19 以外の患者の受診が中断されたため、下痢症患者の便サンプルの採取は遅れている。また、個人の手指衛生が向上した背景を受け、下痢症の患者が減少傾向にあるとの報告もある。提案書では 1 年間で 1000 検体の便を採取する計画になっていたが、1 年間の研究期間中に採取できた便サンプルはわずか 50 検体であった。

現在、病院には下痢患者も徐々に増えつつあるため、今後の採取数は増加すると予想されるが、研究開始時の想定数に達することは難しいと考えられる。

2）動物（ブタ・ウシ・水牛）の便検体の採取

A. Chalnakhel からのサンプル採取

調査地である Chalnakhel は、Dakchinkali Municipality の地方都市である。バグマティ川の河岸に位置し、カトマンズの中でも特に豚の飼育数が多い地域である。合計 23 の糞便サンプルを Chalnakhel 地区で収集した。



B. Mulpani でのサンプル採取

調査地は Kageswori Manohara municipality の Manohara 川の河川敷である。その地域には約 90 の豚の群れ、約 1000 頭の豚が飼育されていた。調査期間中に約 42 頭の豚と 2 頭の牛の糞便サンプルを採取した。

C. Kirtipur Municipality からのサンプル収集

この地域も豚の数が多い地域の 1 つである。この地域からは、調査期間中合計で 10 サンプルを採取した。すべてのサンプルはアイスパックで輸送され、 -20°C で保存した。

農場でのサンプル採取は当初順調であったが、2022 年 5 月にアフリカ豚熱 (ASF) が発生し、すべての農場で大打撃を受けた。現在サンプル採取は中断している。

③ 成果の公表

現時点では採取した検体は未解析のままであり、成果発表等はまだ行えていない。本年度中には予定していた遺伝子解析等に着手するつもりである。

なお、ネパール国内においては 2022 年 3 月 16 日に Pradip Gyawali 氏 (NHRC 事務局長)、Basu Dev Pandey 氏、Meghnath Dhimal 氏（上級科学者）、Kishor Pandey

氏（現地研究協力者）、Namita Ghimire 氏（NHRC 倫理委員）および NHRC の他のスタッフが参加するネパール保健研究評議会で進捗会議を開催し、進捗状況を報告している。

6. 自己評価

Covid-19 流行期に開始した研究であるため、検体数の減少はある程度予想していたのに、代替え案（例えば、病院でのサンプリングを中断せざるを得ない場合には、動物便検体の採取・解析に注力するなど）を出すのが遅く、研究計画の柔軟性が欠けていた。本研究の提携農場で発生したアフリカ豚熱 (ASF) は畜産業界への影響が大きく、研究協力先のラボや日本国内への ASF 汚染を防ぐためにも、後手に回らず、検体の扱いに関して現地獣医師会および日本の農研機構（動物衛生研究部門）の助言を得ながら今後対応する。

研究の進捗は遅れているが、研究を進めるうえで現地の研究協力者とコミュニケーションは十分に取れておりサポートが得られている。下痢症疫学研究を行うための基盤を整えることができたと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- ☒ I （所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった）
- ☐ 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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ナノカーボンコーティングの抗マラリア活性評価
課 題 番 号：2021-Ippan-18
2. 代 表 者：羽二生 久夫（信州大学バイオメディカル研究所・准教授）
共 同 研 究 者：水上 修作（熱帯医学研究所免疫病態制御学分野・准教授）
片上 幸美（医歯薬学総合研究科感染分子解析学分野・特任研究員）
TEKLEMICHAEL AWET ALEM（熱帯医学研究所免疫病態制御学分野・特任研究員）
谷口 真由美（熱帯医学研究所免疫病態制御学分野・技能補佐員）

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

国連およびユニセフの調査により、現在、世界で 22 億人が安全な飲料水にアクセスできず、また農業用水が十分に確保できない等の理由で、8 億人以上が食糧不足にさらされていることが報告されている。熱帯地方では、感染症対策の一環としての水環境問題も大きな課題である。申請者らは、アクア・イノベーション拠点において、水浄化システムに使用される透過膜のナノカーボンによる表面処理技術の開発および製品化のための評価を行っている。信州大学独自の技術であるナノカーボンは、造水・水循環システムの中に組み込まれるフィルター（逆浸透性透過膜）の表面コーティング剤として有力視されている。過去の研究により、ナノカーボンには抗菌作用があり、ナノカーボンによりコーティングされた逆浸透膜にも抗菌性があることがわかっている。2018 年度に、熱帯医学研究拠点一般共同研究としてカーボンナノチューブ（CNT）コーティングの抗病原体試験を行ったところ、この透過膜の存在下でマラリア原虫の増殖が抑制される現象が見られた。この結果は、CNT 膜がマラリア原虫の増殖を阻害する作用を持ち、抗マラリア活性を有する水処理素材として、感染対策に用いられる可能性を示唆している。今回、信州大学では、CNT に加え新たにダイヤモンドライクカーボン（DLC）による透過膜表面コーティングの技術を開発した。DLC は CNT と結晶構造が異なり、膜形成技術にも改良を加え、抗菌性と生体親和性を同時に高めることに成功した。CNT 膜と同様の抗マラリア活性が DLC でも得られれば、水処理膜としてだけでなく、医療分野への応用も可能である。そこで、本研究では、CNT 膜および新たに開発したナノカーボンコーティング膜の抗マラリア活性を評価することを目的とする。

② 研究内容

本共同研究での内容は、製法の異なる数種のカーボン膜の抗マラリア活性を明らかにすることである。熱帯医学研究所免疫病態制御学分野において培養・維持している熱帯熱マラリア原虫を用い、カーボン膜がマラリアの増殖に及ぼす影響を評価する。2018 年度の実験では、赤血球期マラリアの虫体数がコントロール群に比べて優位に減少したことから、赤血球外に出た原虫の感染能が失活あるいは再感染の阻害を受けたことが考えられる。この仮説に従い、各カーボン膜上にマラリア感染赤血球を含む専用培地を置き、一定時間インキュベータ内で培養した後回収して原虫数の変化を評価する。膜材料の評価については、原料粉末を培地中に懸濁して同様に評価を行う。評価方法は、本研究におけるオリジナル手法であり、将来的に水透過膜の原料を検討していくうえでも重要な指針となり得るものである。

③ 予想される成果

カーボン膜の持つ抗菌性、および生体親和性についてのメカニズムは未だ不明である。本研究によりカーボン膜材料の持つ特性を明らかにし、マラリア原虫の表面タンパク質や脂質の変性につながる知見が得られる。水処理のために開発されている素材であるが、汚水の浄化や飲料水確保だけでなく、医療用材料としての用途に繋がられる可能性がある。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

ナノカーボンコーティングを施した PA 膜 (PA/CNT) および DLC コーティングを施したチタンプレート (T/DLC) を信州大学から長崎大学熱帯医学研究所に送付した。プレートサンプルは、あらかじめ直径約 3cm に打ち抜いたものを使用し、膜サンプルは、6 ウェル培養プレートのウェル底のサイズに合わせて無菌環境下で切り抜いた。各サンプルの両面を、実験開始直前に Milli-Q water により洗浄した。

抗マラリア活性評価 (図 1)

(1) 評価には、マラリア原虫 3D7 株を用いた。原虫を、ヒト赤血球を含む専用培地で前培養し、継代のタイミングで試験を開始した。

(2) 膜サンプルを 6 ウェル培養プレートの底面に敷き、マラリア感染赤血球を含む培地を膜上に乗せるように 2 mL/well 添加した。作製したプレートを混合ガス

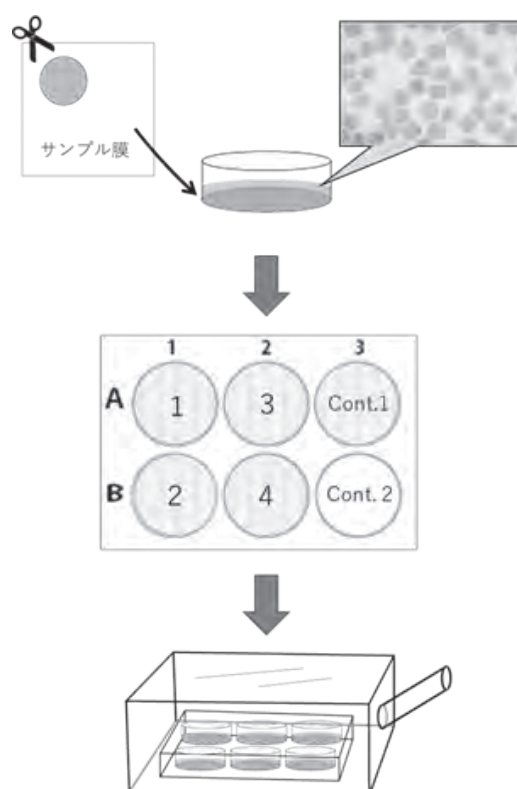


図1. カーボン膜のマラリア原虫接触実験

で満たされたジャーに静置し、37℃のインキュベータ内に静置した。

(3) 24 時間後に、各ウェルから 1mL の培地と赤血球を回収し、TrytonX-100 を混合した PBS を添加してライセートを作製した。96 ウェルプレートに、100uL×9 ウェルずつライセートを分取し、これに SYBR Green を添加し、プレートリーダーで蛍光（522nm）を測定した。

(4) 試験は各サンプル n=4 で行った。コーティングなしの PA 膜を PA/CNT のコントロール、コーティングなしのチタン板を T/DLC のコントロールとした。また、非感染赤血球のみのウェル（Cont. 1）およびサンプルなしのウェル（Cont. 2）を置き、試験の成否を判定した。プレートは、試験日を変えて 2 枚作製し、再現性を確認した。コントロールの測定値を基準に、阻害率を算出した。

② 成果（結果＋考察）

T/DLC の試験結果を図 2 および表 1 に示す。

試験 1 回目に、サンプル DCL88N2 で有意に蛍光強度の低下が見られた（*：p=0.0013）。しかし、2 回目の試験ではコントロールおよびサンプル間に蛍光強度の差は見られず、再現性が得られなかった。サンプル量が限られており、追加実験は実施できなかったため、可能性は残しながらも、1 回目の結果がナノカーボンコーティングの抗マラリア原虫活性とは言い切れない結果となった。コントロールとの差異から算出した阻害活性についても、今回の結果からのみでは判定ができない結果となった。

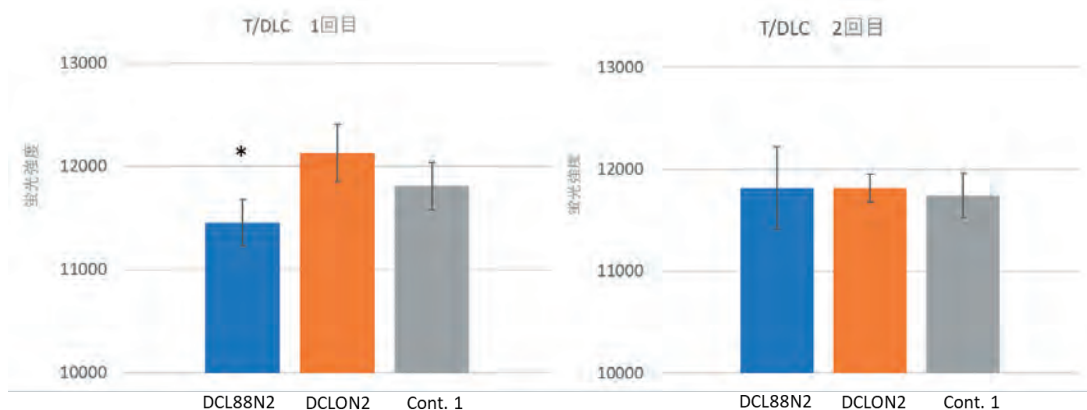


図 2. T/DLC 抗マラリア原虫活性

表 1. 試験 2 回の阻害活性平均値

Average % Inhibition										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Ave
A_DCL88N2	-0.57331	2	0.522389	3	1.738008	4	4.50377	5	1.777336	2.440911
D_DCLON2	-4.32065	-5.34885	-1.9353	-6.01	1.304066	-1.45501	-0.6796	-3.02408	-2.03568	-2.61168

PA/CNT の試験結果を図 3 に示す。

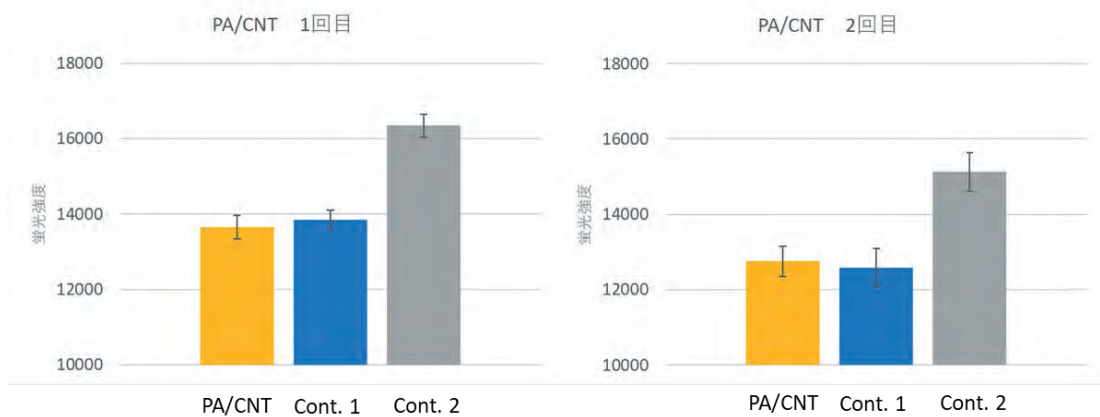


図 3. PA/CNT 抗マラリア原虫活性

試験 1 回目、2 回目とも、PA/CNT コーティングを施した膜とコントロール 1（コーティングなしの PA 膜）で蛍光強度の差は見られなかった。しかし、マラリア原虫のみのウェル（コントロール 2）と比較すると、PA/CNT およびコーティングなし PA 膜ともに、有意に低い結果であった（ $p < 0.001$ ）。これは、ナノカーボンコーティングの効果ではなく、基板となっている PA 膜に抗マラリア原虫活性があった可能性を示している。

③ 成果の公表
なし

6. 自己評価

今回、期待したようなナノカーボンコーティングの抗マラリア原虫活性は確認できなかった。DLC は、コーティング剤としては CNT よりも構造が安定しており、チタンへのコーティングは水処理に利用する上で取り扱いが容易なことに加え、人体に使用する素材としても期待されている。マラリアをはじめとする病原性微生物に抗原虫活性をもつのであれば、医療用素材としての可能性がさらに広がると期待したが、そのようなデータは得られなかった。試験 1 回目と 2 回目で再現性が得られなかった点も、原因を明らかにする必要がある。

PA/CNT では、2018 年度に行った実験において、コーティング膜に接触する環境でマラリア原虫数が有意に減少したことから、同様の現象の確認および活性のメカニズムについて更なる知見を得る予定であった。しかし今回の実験では、コーティングの有無ではなく、基板としている PA 膜に抗マラリア原虫活性がある可能性が示唆され、素材開発時の毒性評価の必要性を再考せざるを得ない。

これらの知見は、水処理膜および医療用素材としての安全性に対し一石を投じたものであるが、当初期待したのとは異なる結果となった。

7. 達成度（何れかに○）

- ☒ 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3（2021）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：2021-Ippan-20

2. 代 表 者：早坂 大輔（山口大学共同獣医学部・教授）
共 同 研 究 者：Mya Myat Ngwe Tun（熱帯医学研究所・准教授）
西 弘大（原爆後障害医療研究所・助教）

3. 決 定 額：350 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

フラビウイルス科に分類されるダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）や日本脳炎ウイルス（JEV）によるウイルス性脳炎は、軽症で経過する場合もあるが、重篤化すると致死率が高く、回復しても深刻な後遺症が残る。しかしながら、脳炎重症化に関わる本質的な病態機序は未解明のままである。

応募者らは、ヒトと同様の中枢神経症状を示す JEV および TBEV 感染マウスモデルを用い、独自のアプローチによる解析を進めてきた。すなわち、一般的には感染個体と非感染個体の比較を基本とするところ、同一のウイルス感染条件下で現れる重症個体と軽症個体を比較するという、単純だが、少なくとも脳炎フラビウイルス研究では知る限り報告のない手法を基盤とした解析を行った。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。

さらに、脳内遺伝子発現量の網羅的解析を行ったところ、軽症個体よりも重症個体において明らかに上昇がみられる、とあるプロテアーゼ X 遺伝子を見出した。なお、ウイルス感染とプロテアーゼ X の関与は報告が全くないため、ここでは具体的な名称は伏せる。

しかしながら、これらの解析は体重減少を指標として病態が進んだ時点での重症・軽症個体間における比較であるため、さらなる解析には生体内の感染～発症～予後に至るまでの病態経過を、非侵襲的にリアルタイムにモニタリングする手法が必要であった。

そこで応募者は、生体内の分子プロセスを非侵襲的に画像化する技術を用いたポジトロン断層法（Positron emission tomography: PET）および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を用いて、脳炎フラビウイルス感染病態のさらなる解析を進めてきた。

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、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。

また、熱帯医学研究所ウイルス学分野では、プロテアーゼ X 遺伝子のノックイン（KI）およびノックアウトマウス（KO）を、国内の研究所から分与を受け維持しているため（応募者が熱帯医学研究所在籍中に進行）、これらのマウスを用いた感染実験が可能な状況にある。

そこで本研究では、熱帯医学研究所で保管、使用しているウイルス（JEV、TBEV）および維持しているマウス（プロテアーゼ X 遺伝子 KI、KO）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、リアルタイム分子イメージングによるフラビウイルス脳炎重症化機序の解明に資する成果創出を目指す。

② 研究内容

1. PET/SPECT/CT イメージングによる脳炎重症化の指標となるトレーサの探索

これまで応募者らが検証してきた ^{18}F -FDG、 ^{123}I -IMP、テクネチウム酸ナトリウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、クエン酸ガリウム（ ^{67}Ga ）以外の中枢神経機能測定（脳血液循環、血液脳関門、脳脊髄液循環、神経伝達機能など）トレーサを対象に、TBEV および JEV 感染マウスモデルを用いて、引き続き、脳炎重症化の指標となるトレーサの検証を進め、脳炎重症化に関わる本質的な病態機序解明に資する分子イメージングの確立を目指す。

実験は、TBEV Sofjin 株、Oshima 株、JEV JaTH 株、S982 株をそれぞれマウスに皮下感染させ、同一個体において、発症前（3～5 日）、発症初期（7～9 日）、重症化進行もしくは回復がみられる時期（13 日～）に PET/SPECT イメージングを行い、病態経過（症状、体重減少など）の違いがみられる個体ごとに、中枢神経組織におけるトレーサ集積を検証する。

2. 消化管病変に着目したウイルス感染分子イメージング

応募者らは、高い致死性を示す TBEV Sofjin 株、JEV JaTH 株感染マウスにおいて、著しい脳炎に加えて消化管にも特徴的な病変がみられ、 ^{18}F -FDG が集積することを見出ししてきた。そこで、消化管病態にも着目し、炎症性マーカー、血流マーカー等のトレーサとなる ^{201}Tl -Cl（SPECT）や $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HSA-D（SPECT）等を用いた分子イメージングにより、消化管における病態形成イメージングを試みる。さらに、感染マウスの経日的な分子イメージングの結果を基に、病態変化がみられるタイミングで病理標本を作成し、病変部位とトレーサの集積部位の関連性を病理学的に明らかにする。

3. プロテアーゼ X 遺伝子に着目した病態解析および分子イメージング解析

TBEV、JEV 感染マウス脳内にみられるプロテアーゼ X 遺伝子発現について、培養細胞およびマウスモデルを用いて、遺伝子発現解析、KI・KO 解析、分子イメージング解析、抗体やアンタゴニスト等による重症化亢進・抑制の影響等により、プロテアーゼ X の機能・役割を明らかにする。

このうち本研究では、マウスモデルを用いた分子イメージング解析を進める（培

養細胞による解析、マウスモデルでの病態解析に関する実験については他の研究費により遂行予定)。

プロテアーゼ X 遺伝子 KI または KO マウスに TBEV、JEV を感染させ、病態、致死性、ウイルス増殖、神経細胞傷害性の解析を行った上で（これらの解析は他の研究費により遂行予定）、これまでの成果および脳炎重症化の指標となるトレーサーの探索で検証した結果から得た脳炎特異的トレーサーを用いて、経日的な分子イメージング解析を行う

③ 予想される成果

1. PET/SPECT/CT イメージングによる脳炎重症化の指標となるトレーサーの探索

ウイルス性脳炎では、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えられ、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考えられる。そこで応募者らは、これまでの検証により ^{123}I -IMP 等の脳炎のマーカーとなり得るトレーサーを見出しており、脳炎の指標となるトレーサーは他にもあると考えている。

本研究では、これまで対象としてきた炎症、脳血流機能に加え、神経伝達機能、脳脊髄液循環機能に着目した検証を進めることで、脳炎イメージングに有用な新たなトレーサーの同定が期待される。

2. 消化管病変に着目したウイルス感染分子イメージング

TBEV Sofjin 株や JEV JaTH 株感染マウスでみられる消化管病変については、ヒト患者においてもみられる症状であるか、脳炎進行との関連性はあるか、などについて不明な点が多いが、応募者は、これらのウイルス感染における重篤化の要因のひとつと考え、生体内における経日的な病態を把握する上で分子イメージングの活用が有用であると考えている。

応募者は、感染マウスの消化管における ^{18}F -FDG の取り込みが顕著にみられることから、別の炎症性マーカー、血流マーカー等についても、同様に消化管病変のイメージングに活用できると予想している。消化管病変に特異的に集積するトレーサーがさらに特定できれば、感染マウス体内における病態経過の把握のみならず、トレーサーの機能と病理解析により、消化管における病変発現機序の解明に資することも期待できる。これらのアプローチは、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. プロテアーゼ X 遺伝子に着目した病態解析および分子イメージング解析

応募者は、感染マウスにおけるプロテアーゼ X 遺伝子発現上昇が、重症化病態形成に何かしらの関与を及ぼしているかと予想しており、プロテアーゼ X 遺伝子 KI・KO マウスを用いた解析によりその解明が進むと考えている。すなわち、プロテアーゼ X が重症化の抑制に関与しているのであれば、ウイルス感染により KI・KO マウスはより重症化に向い、逆に重症化亢進に関与しているのであれば回復傾向が強くなると予想している。

したがって、脳炎の指標となるトレーサーを用いた分子イメージングを、KI・KO マウスにおいて実施すれば、経日的な病態変化のイメージングがより鮮明に把握できる可能性を考えている。さらに、そこでトレーサーの機能と病理解析の結果を解析す

ることで、プロテアーゼ X 遺伝子が関与する病変発現機序の解明に資する成果創出を期待している。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

アイソトープ実験施設分子イメージングセンターの BSL-3 動物実験室にて、C57BL/6j マウス（日本 SLC、5 週齢、雌）に TBEV Sofjin 株を 10^4 pfu 皮下接種し、経口的に体重測定、病態観察を行った。

感染 7 日目に、トレーサーとして ^{123}I -IMP（日本メジフィジックス、パービューザミン®注）を 50MBq/匹で尾静脈投与し、イソフルラン麻酔下で CT/SPECT 撮像を行った。撮像は、感染、非感染それぞれ 3 匹ずつで実施した。

トレーサー投与直後に CT 撮像、次いで SPECT を約 25 分撮像した。撮像条件は、Projection limit: 20sec、Projection count: 64、Rotate Angle: 360° 、再構成条件は MLEM、Iteration 50 で実施した。その後、再構成データを OsiriX MD (pixmeo) で解析した。

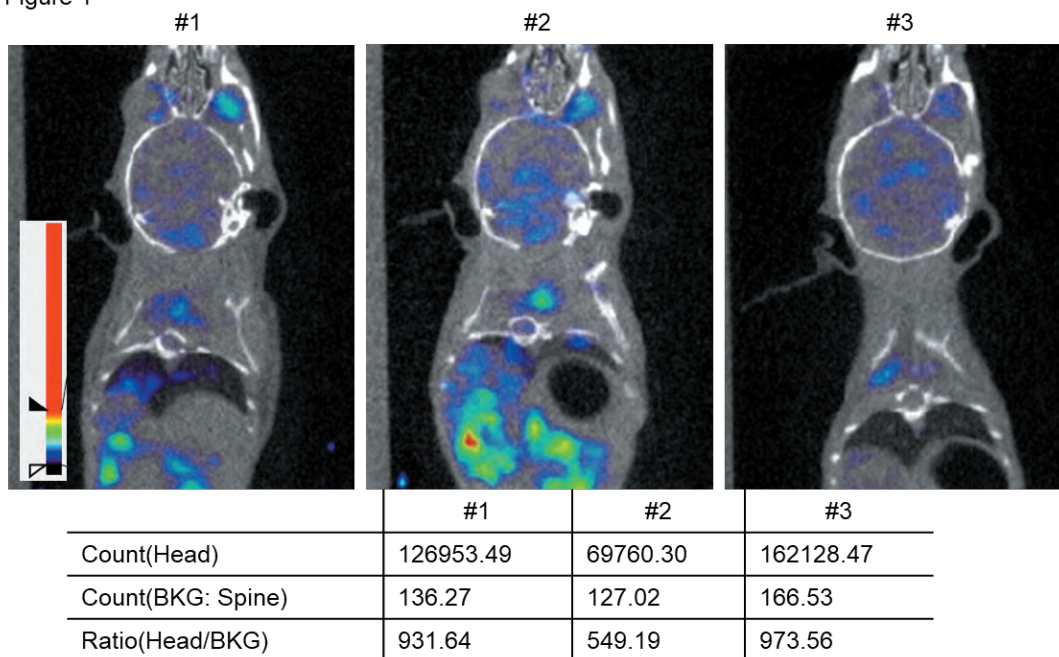
マウスはアイソレーター内で飼育し、ウイルス接種およびトレーサー投与は安全キャビネット内で行った。感染マウスは専用カプセルに収容し撮像に供した。

実験実施に当たっては、長崎大学におけるアイソトープ利用、病原体使用、動物実験に関する申請、承認を受け、実験実施者はそれぞれの教育訓練を受け利用許可を得たうえで実施した。

② 成果（結果＋考察）

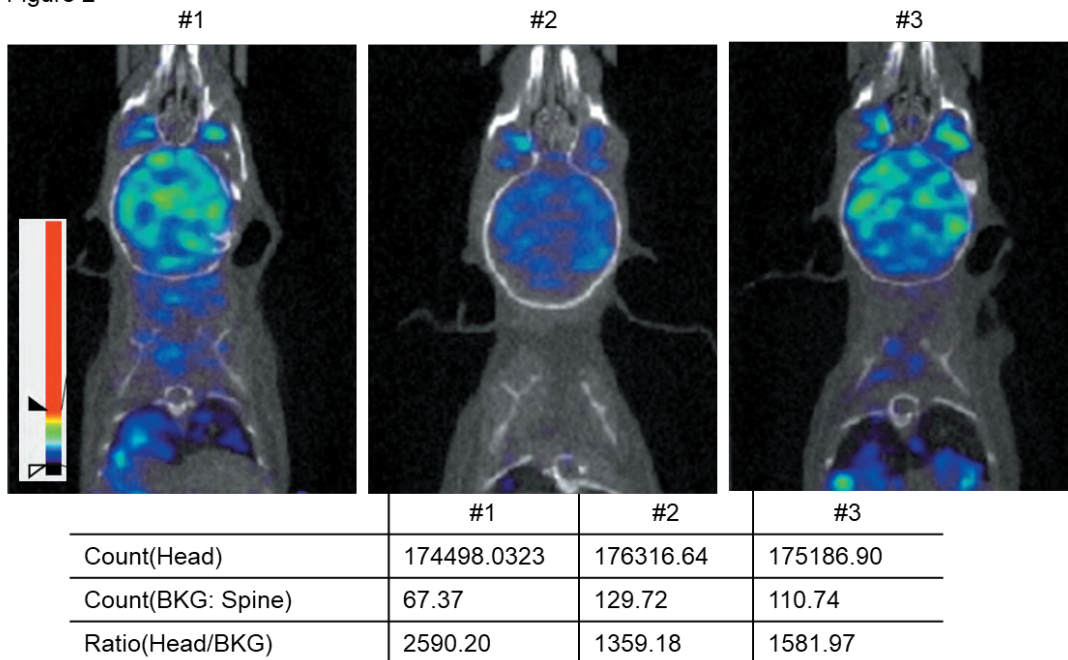
マウスの脳における ^{123}I -IMP の取り込みを、脊柱をバックグラウンドとした Tissue/BKG Ratio として計算したところ、TBEV Sofjin 株感染マウスでは 932.64、549.19、973.56 となった（Figure 1）。

Figure 1



一方、非感染マウスでは 2590.2、1359.18、1581.97 となった (Figure 2)。

Figure 2



これらの結果から、非感染マウスにくらべ、TBEV Sofjin 株感染マウスの脳における ^{123}I -IMP の集積が明らかに低下していることが示された。

^{123}I -IMP は投与後、肺に取り込まれ、その後血液脳関門を通過して初回循環でほぼ 100%が脳組織に取り込まれ、その後徐々に洗い出されることから、脳血流シンチグラフィ（脳血流分布の指標）として用いられている。

したがって、上記の結果は、TBEV Sofjin 株感染マウスの脳における脳血流低下のイメージングを示していると考えられた。

興味深いことに、我々が以前実施した TBEV Oshima 株感染マウスにおける中枢神経組織での ^{123}I -IMP を用いた SPECT イメージングの結果では、非感染マウスにくらべ感染マウスでは脳における ^{123}I -IMP 取り込みの上昇がみられた。したがって、同じ TBEV でも株により ^{123}I -IMP の集積に違いがみられた。

本研究で実施した条件（5 週齢の C57BL/6j マウスに 10^4 pfu 皮下接種）によるマウスモデルでは、TBEV Sofjin 株は早期の重症化、100%の致死率を示すのに対し、TBEV Oshima 株感染では遅い重症化、約 50%の致死率（脳炎はすべての個体で起こっている）を示すことがわかっている（Hayasaka, et al., 2009 Virology, Hayasaka et al., 2010 J Vet Med Sci）。したがって、TBEV Sofjin 株感染では早期の中枢神経障害による脳血流の低下がみられる一方、TBEV Oshima 株感染では炎症による脳血流の上昇を示唆する可能性が考えられた。

これらの結果から、 ^{123}I -IMP は中枢神経組織における脳血流量を反映し、有用な脳炎の指標トレーサーとなることが示された。今後、他のトレーサーとの併用やウイルス種、ウイルス株間によるイメージングの違いなどをより詳細に解析することで脳炎分子イメージングの発展が期待される。

③ 成果の公表

現在、論文作成中。

6. 自己評価

本研究では、2021 年度中に研究代表者が長崎大学の施設を利用して複数回実験を行う想定であったが、COVID-19 の流行による移動制限や大学の受入れ制限等もあり、実験が年度末に近い時期での実施にとどまらざるを得なかった。

それでも、 ^{123}I -IMP を用いた SPECT イメージングの有用性を示す有意義な結果を得ることができ、本研究成果において脳炎イメージングを示せた意義は大きいと考える。

我々は、これまで糖代謝の指標となる ^{18}F -FDG、血流量の指標となるテクネチウム酸ナトリウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、炎症の指標となるクエン酸ガリウム (^{67}Ga) などをトレーサーとして、TBEV、JEV 感染マウスモデルを用いた脳イメージング、消化管イメージングにより病態の指標としての各種トレーサーの有用性も明らかにしている。したがって、本研究の結果も含めた一連の研究成果により、脳炎フラビウイルス感染マウスモデルを用いた分子イメージングによる病態解析法の確立に関し、当初の予定をある程度達成したと自己評価する。

しかしながら、本研究で予定していたプロテアーゼ X 遺伝子 KI・KO マウスを用いた検証については、当該マウスを長崎大学動物実験施設で維持していたが、繁殖維持がうまくできておらず（繁殖した仔マウスをジェノタイピングした結果、KI、KO が確認できず）、KI、KO マウスとも実験に用いることができなかったため、予定していた実験は実施できなかった点は心残りである。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：新型コロナウイルスの細胞内動態の解明
課 題 番 号：2021-Ippan-21
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：南保明日香・長崎大学高度感染症研究センター・教授
3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

本研究では新型コロナウイルス：SARS-CoV2 の細胞内動態・複製における分子機構をライブセルイメージングで詳細に解明することを目指す。SARS-CoV2 の細胞内動態はほとんどわかっておらず、移動に関わる宿主因子も不明である。病原体の細胞内動態を解明することは、侵入経路・輸送経路や介在タンパク質、出芽制御因子を介した治療法を開発するための基盤となることが期待される。

現在最も深刻な公衆衛生上の脅威である新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は、2019 年末に初めて報告されて以降、急速に全世界中に感染が拡大しており、すでに約 1 億人の感染者と 210 万人以上の死者が報告されている（WHO, 1 月 28 日）。SARS-CoV2 に対するワクチン及び治療法の研究が急展開で進められている一方で、そのウイルス学的な基礎研究はほとんど進んでいないため、複製機構と細胞内動態については不明な点が数多く存在する。そこで申請者は病原体の感染細胞内におけるライフサイクルを視覚化することで、新しい機序の治療薬開発に貢献したいと考えた。

申請者は前駆研究で、リボ核タンパク質複合体(RNP)やウイルス粒子などウイルスタンパク質複合体の細胞内での生合成過程・輸送経路を描出するライブセルイメージングシステムを構築し、RNA ウイルスの細胞内動態を描出することに成功した(Takamatsu, et al. PNAS. 2018, Takamatsu, et al. J. Virol. 2020)。本研究では、このシステムを応用し、ライブセルイメージングを用いて SARS-CoV2 の細胞内動態について宿主因子を含めて解明することを目的とする。最終的なゴールはウイルス因子・宿主因子間の相互作用を解明し、病原体の細胞内輸送を制御する新たな作用機序の治療薬開発に貢献することである。

② 研究内容

1 年目

1. 感染性ウイルスを用いたライブセルイメージングシステムの構築

ウイルス粒子の形成に重要なウイルスタンパク質（RNP タンパク質、マトリックスタンパク質など）を蛍光タンパク質で標識し、感染細胞におけるウイルスタンパク質及びタンパク質複合体（RNP やウイルス粒子前駆体・ウイルス粒子）の細胞内動態を可視化する。

2. タンパク質発現系を用いた非感染性ライブセルイメージングシステムの構築

ウイルスタンパク質の哺乳類細胞発現系に、蛍光融合タンパク質を組み合わせ、段階的に RNP の形成・輸送に関わるウイルス側の因子を制限していく。以上から細胞内輸送される最もシンプルな RNP 様構造を構築することが可能になる。こうして準備した RNP 様構造を微細構造解析に供する。

2 年目

3. ウイルスおよび RNP の輸送・出芽経路の同定

多くの細胞内タンパク質の輸送経路である細胞骨格を標的として、形成阻害剤、重合促進剤、重合阻害剤などを用いてウイルスタンパク質および RNP の輸送・出芽経路を限定する。

4. 蛍光発現組み換えウイルスの構築

リバースジェネティクス技術を用いて、蛍光タンパク質を発現する RNP・ウイルス粒子を構築し、宿主細胞への侵入機構をライブイメージングで解明する。

3 年目

5. RNP の侵入・形成・輸送を担う宿主タンパク質の同定

3, 4 で限定した経路（ウイルスの侵入～出芽の各過程）について、介在する宿主細胞因子を同定する。ウイルスの侵入・出芽を介在する宿主因子を同定するために、市販の siRNA ライブラリーをライブイメージングシステムに導入する。また RNP の形成・輸送を介在する宿主因子については、プロテオミクスアプローチで限定する。最終的に遺伝子サイレンシング法などを用いて、介在する宿主因子が RNP の形成・輸送に及ぼす影響を評価する。以上から RNP の侵入・形成・輸送・出芽の各過程を制御することでウイルスの複製を阻害する基盤を構築したい。

③ 予想される成果

本研究を通して、SARS-CoV2 の細胞内動態を可視化し、どのような経路を用いて RNP 及びウイルス粒子が形成・輸送されるか解明することが期待される。その経路自体または介在する宿主タンパク質を制御することで、対象ウイルスの複製を制御する新しい治療薬の開発基盤になると考えられる。例えば、申請者が前駆研究で構築したフィロウイルスのライブセルイメージングシステムでは、サイトカラシン D を用いてアクチン重合を阻害すると、ヌクレオカプシドの輸送が止まり、ウイルスの複製が抑制されることがわかった (Schudt, *et al.* PNAS. 2013, Takamatsu, *et al.* PNAS. 2018)。さらに非感染性のライブセルイメージングシステムを構築することで、一般の実験室で高病原性ウイルスの細胞内動態を解明することが期待される。また、RNP の微細構造解析とタンパク質間相互作用解析を通して、複製を制御するメカニズムを解明することが期待される。

5. 実施報告

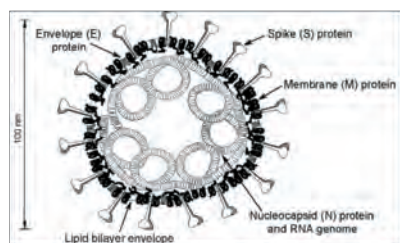
① 研究材料・方法・手続き

本研究の標的である SARS-CoV2 の感染実験は BSL-3 封じ込め施設を必要とするため、ライブセルイメージングを用いた研究は稀であり、細胞内動態についてはほとんど解明されていない。そこで感染性ウイルスを観察するために、高解像度ライブセルイメ

ーシング顕微鏡(Keyence BZ-X810)をBSL3 封じ込め施設内に導入した。この顕微鏡を用いて、SARS-CoV2 の感染性ウイルスを用いたライブセルイメージングシステムを構築した。SARS-CoV2 は四つの構造タンパク質があり、それぞれについて蛍光融合タンパク質の発現系を構築した (図 1)。この発現系を用いて主に二つの解析を行った。

1. 感染細胞におけるウイルスタンパク質の相互作用について
2. 感染細胞におけるウイルスタンパク質とオルガネラの相互作用について

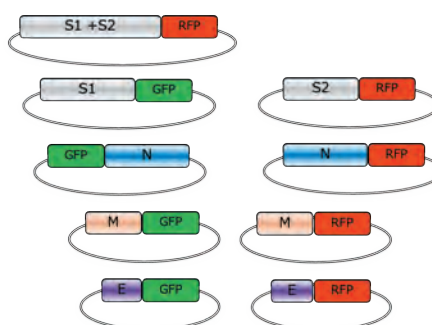
図1 コロナウイルスの構造



Masters, et al. Advances in virus research, 2006

4つの構造タンパク質について、それぞれ蛍光タンパク質で標識した。

蛍光融合タンパク質の構築

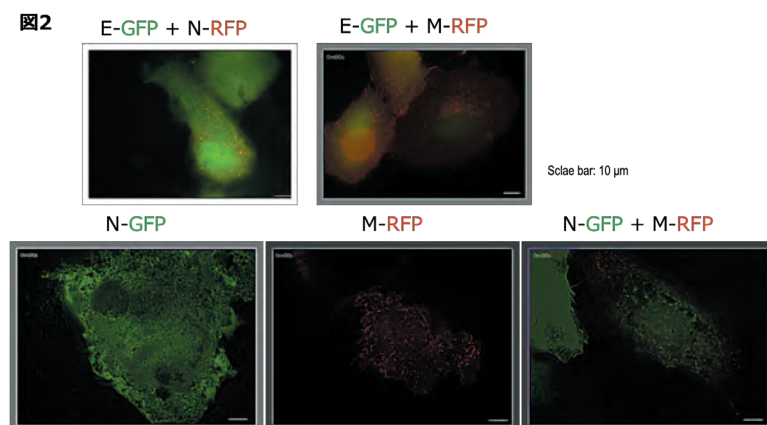


② 成果 (結果+考察)

1. 感染細胞におけるウイルスタンパク質の相互作用について

それぞれのウイルスタンパク質の細胞内動態を比較したところ、N と M が部分的に共局在することがわかった。特に M タンパク質は他のウイルスマトリックスタンパク質と同様、細胞内を単独で自由に移動することがわかった (図 2)。現在、M が N をドライブすることで、ウイルスの RNP 形成及び輸送が促される可能性を考え、二つのウイルスタンパク質の相互作用について研究を進めている。

図2



EとN、EとMはそれぞれ独立して局在していた。

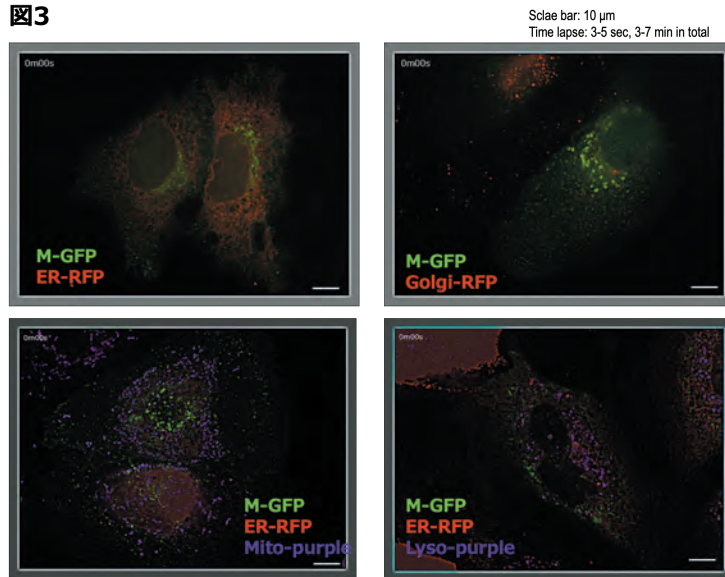
NはMを共発現することで、diffuseな局在から、網目状の局在へ変化した。

2. 感染細胞におけるウイルスタンパク質とオルガネラの相互作用について

ウイルスタンパク質発現系と蛍光標識した宿主タンパク質を組み合わせ、オルガネラとの相互作用を観察した。SARS-CoV2 は粒子形成に至る過程で小胞体、ゴルジ体、ERGIC(ER-Golgi 中間体)、リソソームと共局在することが示唆されている。本研究において、各種宿主因子とウイルスタンパク質の細胞内動態を比較したところ、N 及び M タンパク質が ER, Golgi, ERGIC と共局在すること、一方でミ

トコンドリアやリソソームとの相互作用を認めないことが明らかになった(図 3)。タイムラプス撮影したところ、N, M は感染細胞においてチューブリン骨格を介して移動し、核近傍にクラスターを形成することがわかった。このことから、ウイ

図3



最も動きが見え易かったMを用いて、オルガネラとの細胞内動態比較を行った。ER, Golgi共にMと共局在、共輸送を認めた。ミトコンドリアとリソソームはMタンパク質と共局在、共輸送を認めなかった。

ルスタンパク質は ER 上または ER 近傍の膜構造でアセンブルし、粒子形成に進むと考えられた。現在、この分子機構の解明するための各種変異体構築 (図 4) を進めている。

さらに、非感染細胞においても、感染細胞と同様にウイルスタンパク質間及びウイルスタンパク質・宿主タンパク質間の相互作用が認められることを確認した。したがって、今後はタンパク質発現系を用いてスクリーニングを行い、必要に応じて感染実験で確認するという順序で研究を進めたい。

3. 成果の公表

- Yuki Takamatsu, Tomoki Yoshikawa, Takeshi Kurosu, Shuetsu Fukushi, Noriyo Nagata, Masayuki Shimojima, Hideki Ebihara, Masayuki Saijo, and Takeshi Noda. Role of VP30 phosphorylation in Ebola virus nucleocapsid assembly and transport.
Journal of Virology. under review.
- Yoko Fujita-Fujiharu, Yukiko Sugita, Yuki Takamatsu, Kazuya Houru, Manabu Igarashi, Yukiko Muramoto, Masahiro Nakano, Yugo Tsunoda, Steohan Becker, Takeshi Noda. Structural insight into Marburg virus nucleoprotein-RNA complex formation.
Nature Communications. doi: 10.1038/s41467-022-28802-x., 2022. 13(1):1191. p1-9
- Sandra Kendra Raini, Yuki Takamatsu, Shyam Prakash Dumre, Shuzo Urata, Shusaku Mizukami, Meng Ling Moi, Dasuke Haysaka, Shingo Inoue,

Kouichi Morita, Mya Myat Ngwe Tun. The novel therapeutic target and inhibitory effects of PF-429242 against Zika virus infection.

Antiviral Research. doi: 10.1016/j.antiviral.2021.105121. 192. 2021. p1-13

6. 自己評価

申請書で記載した初年度の二つの研究内容について、それぞれ進捗を認めた。本共同研究課題を通して、コロナウイルスの細胞内動態を可視化するシステムを構築できたため、本年度の目標を達成できたと自己評価している。申請者は2021年度11月から長崎大学に異動したため、共同研究に申請する資格は失ったが、本研究課題については継続して解析を進め、コロナウイルス細胞内動態の解明に貢献したい。

7. 達成度（何れかに○）

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の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

令和3（2021）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：2021-Ippan-22
2. 代 表 者：（東京理科大学薬学部・助教） 佐藤一樹
共 同 研 究 者：（東京理科大学薬学部・教授） 和田猛
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事が期待される。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、及び化学修飾とその立体化学が、*eMPT* への認識に与える影響を網羅的に調査する。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、前年度に引き続き合成した糖鎖を *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-リン酸の転移受容能を評価する。生成物の検出を容易にする蛍光標識などの検討も行う。

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 (図 1 a))のリン原子修飾体を、立体選択的に合成し、その純度を算出する方法

(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、前年度に確立したオキサザホスホリジン法によって得られた試料を逆相 HPLC によって分取し、これを NMR によって分析することとした。オキサザホスホリジンとは不斉補助基を有する、環状のホスホロアミダイト誘導体であり、元々はリン原子修飾核酸の、リン原子の絶対立体配置を制御した合成を可能にするものである。今回はこれを糖 1-リン酸構造の合成に応用している。

(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、マンノシルホスフェート構造を受容するかどうかについて検討を行った。今回は細胞溶出液の膜画分を用いて検討を行った。

a)

b)

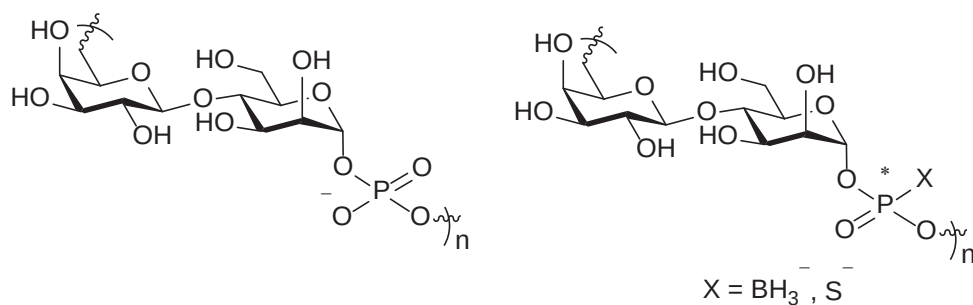


図 1. a) β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6)構造、b)そのリン原子修飾誘導体

② 成果（結果＋考察）

まず図 2 に示すスキームに従い、オキサザホスホリジン法により合成された、リン原子上の立体化学が制御されたホスホロチオエート **3** を逆相 HPLC により分取し、400 MHz の NMR により、微量測定管を使用して解析を行った。

その結果、両立体化学の誘導体においても、逆の立体化学を有する化合物由来のシグナルは観測されず、極めて高い立体化学純度でそれぞれを単離可能であることが明らかとなった (図 3)。

この結果を受け、天然型の β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6) 構造の 2 糖、4 糖、8 糖誘導体を用いて、eMPT によるマンノシルホスフェートの受容能に関して評価を行った。*Leishmania Major* の細胞溶出液膜画分に 24 時間静置することで検討を行ったが、細胞溶出液が紫外吸光を有する夾雑物を多く含んでおり、HPLC のみによる分析が困難であった。そこで、C18 の逆相カートリッジによる簡易精製で夾雑物を除去する検討を行ったが、用いる糖リン酸の親水性が極めて高いために、逆相カートリッジに担持させることができなかった。マンノシルホスフェートのアノマー位のケミカルシフトが特徴的な部分に現れることから、反応させた溶液をメンブレンフィルターでろ過後、重水中で ¹H NMR による解析を試みた。しかし、マンノシルホスフェートのアノマー位由来のシグナル強度が極めて低く、解析が困難であった。

そこで、逆相 HPLC により、マンノシルホスフェートが付加して生成する目的物が溶出すると考えられる部分を広範に分取し、ESI-MS によって解析を行ったところ、2 糖を細胞溶出液にて反応させた混合物に関して、目的物由来の *m/z* と一致するピークが検出された (Calcd for [M - H]⁻, 843.1731, found 843.1722.)。このことから、24 時間の反応時間で eMPT により、マンノシルホスフェートが付加する条件を見出すことができた。

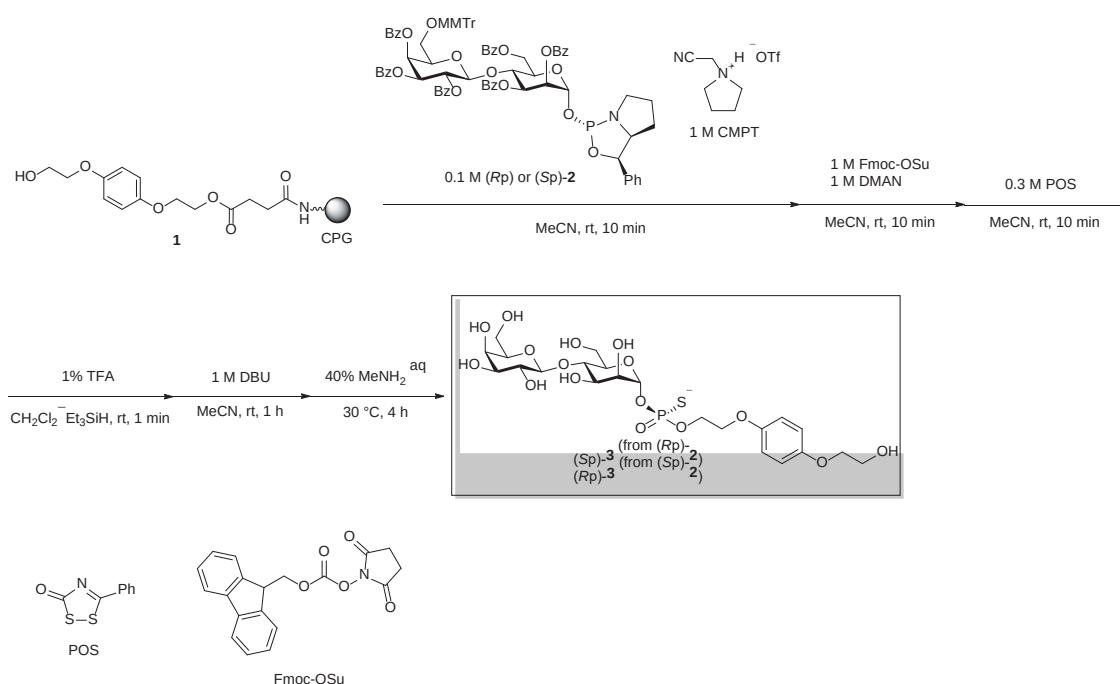


図 2. リン原子修飾 β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6) 構造の合成スキーム (ACS Omega 2021, 6, 20026–20041. より一部スキームを改変の上引用)

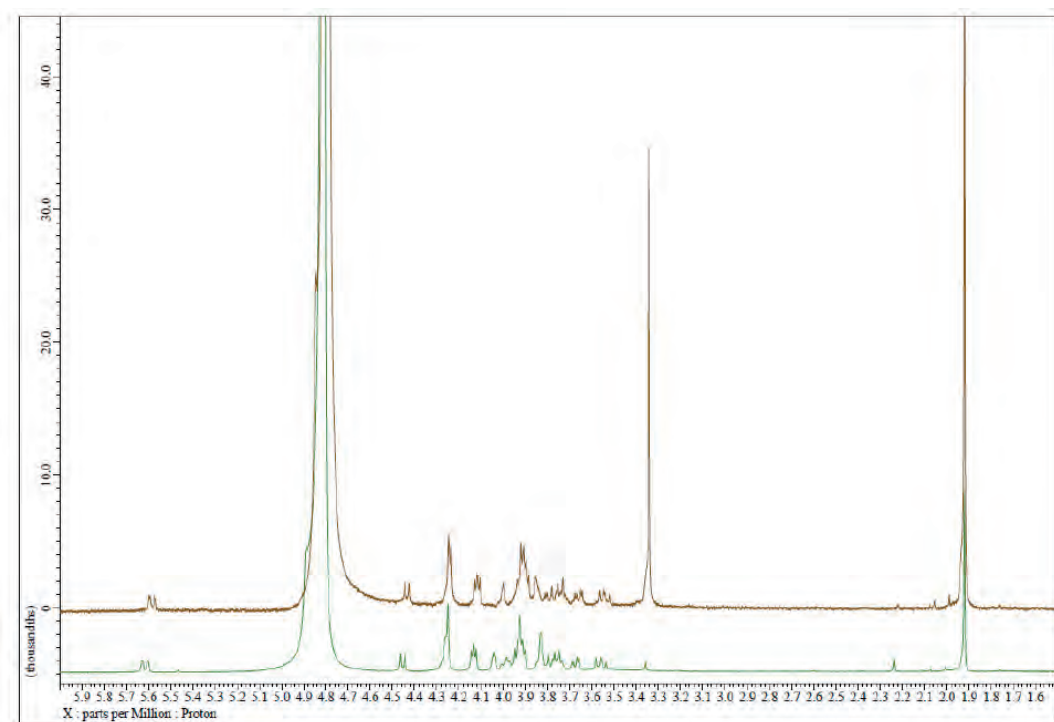
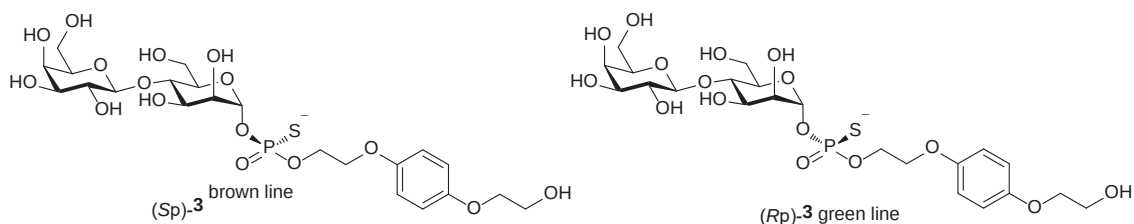


図 3. 単離した化合物 **3** の両立体異性体の ^1H NMR スペクトルの重ね合わせ (ACS Omega **2021**, 6, 20026–20041.より引用)

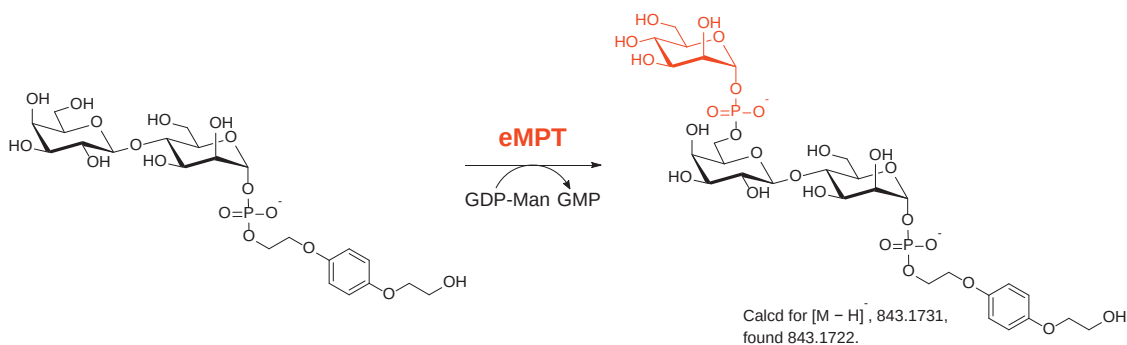


図 4. eMPT によるマンノシルホスフェートの付加と ESI-MS の分析結果

③ 成果の公表

オキサザホスホリジン法によるリン原子の絶対立体配置を制御した β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1- PO_4 -6) 繰り返し構造の固相合成に関する成果を、ACS Omega 誌上で発表した (Sato, K.; Hagio, T.; Sano, M.; Muramoto, K.; Yaoita A.; Noro, M.; Hara, R. I.; Wada, T. ACS Omega **2021**, 6, 20026–20041.).

6. 自己評価

本年度は、立体化学を制御して *Leishmania* のリポスホグリカンにみられる特徴的な β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6) 繰り返し構造の固相合成に関して学術論文を発表した。さらに、得られた化合物の立体化学純度を ¹H NMR で確認することが可能となり、その立体化学純度が高いことを確認した。合成した化合物の性質評価に向け、天然型の β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6) 構造に関し、*Leishmania Major* の細胞溶出液に含まれる eMPT によるマンノシルホスフェート構造受容能について検討した。細胞溶出液中の夾雑物との分離には課題があるものの、マンノシルホスフェートを受容する条件を見出すことができた。

本研究の最終目標である、リン原子の立体化学が制御された、リン原子修飾 β -Gal (1 $\rightarrow$ 4)- α -Man (1-PO₄-6) 構造のマンノシルホスフェート構造受容能に関して評価には至らなかったものの、合成法を確立して論文投稿を行い、受理されたこと、定性的にはあるがマンノシルホスフェート構造受容能評価系を立ち上げることができたことから、達成度に関しては II（不満は残るが一応の成果を挙げられた）とした。

7. 達成度（何れかに○）

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 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアにおけるワクチン効果と分布ロタウイルス株の性状との関連の
解明（Impact of rotavirus vaccination on rotavirus genotype
distribution and diversity in Kenya）

課 題 番 号：2021-Ippan-23

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：福田 佐織（藤田医科大学医学部・特別研究員）
井手 富彦（藤田医科大学研究支援推進本部・助教）
金子 聡（長崎大学熱帯医学研究所・ケニア拠点長）

3. 決 定 額：700 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

ロタウイルス（RV）は乳幼児の急性胃腸炎の病原体で、アフリカ・アジアの開発途上国を中心に毎年 12 万人以上が死亡している。この RV 胃腸炎に対する弱毒生ワクチン（ロタリックス（RV1）、ロタテック（RV5））が開発されて 130 か国以上で認可、90 か国以上で定期接種されている。その有効率は先進国できわめて高いが開発途上国ではかなり低い。その要因として、開発途上国では特異な血清型（遺伝子型）を有する RV 株が分布すること、ヒトと動物の RV 株間での遺伝子交換が頻繁に起きていることなどが挙げられるものの未だよくわかっていない。一方で、すでにワクチン導入された国々では、特定の遺伝子型が顕著に、非定型的な遺伝子構成を有する RV 株が高頻度に検出されるようになり、分布 RV 株の性状に大きな変化が見られるようになった。

本研究では、ケニア拠点で収集されている RV 下痢便を用いて、接種開始前後での分布 RV 株の遺伝子型、遺伝子構成の変化とそのメカニズム、特にワクチン効果と分布 RV 株の性状との関連を明らかにする。本研究の成果は、RV に対する次世代ワクチンの開発が必要となった際の重要な実施基盤の提供を可能にすると期待される。

② 研究内容

本研究課題を実施するにあたり最も重要なのは、胃腸炎患者の下痢便検体であるが、この収集にあたっては申請者らが長期間にわたる研究交流により信頼関係を築いてきたケニア拠点／ケニア国立医学研究所（KEMRI）の Ernest Apondi Wandera 博士のグループで体制が整っており、ケニア国内 2 地区（キアンブ、ビタ）より収集が行われている。下痢便検体からの RV RNA ゲノム抽出、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）解析、逆転写酵素（RT）-PCR による G/P タイプ決定といった初期処理

については、申請者らの技術移転もあり、ケニア拠点ですでに行われている。

本研究では、ケニアにおいてワクチン接種が開始（2014 年 7 月）された前後に収集した胃腸炎患者の下痢便検体を用いて、接種開始前後での RV 遺伝子型、遺伝子構成の変化とそのメカニズム、特にワクチン効果と分布 RV 株の性状の変化との関連を明らかにする。

研究手法は以下の通りである。

①下痢便検体の収集

共同研究者であるケニア拠点／KEMRI の研究者経由で、ケニア国内 2 地区（キアンブ、ピタ）から胃腸炎患者の下痢便検体を収集する。ワクチン定期接種の開始前後を含む、これまでに収集した下痢便検体も本研究で用いる。

②RV 遺伝子の解析

リン酸緩衝液（PBS）で調製した約 20% 便懸濁液からウイルスゲノム RNA を抽出して、PAGE 解析でゲノム RNA の泳動パターンを決定する。また RT-PCR による G/P タイプの決定を行う。これにより、ワクチン接種の導入前後での分布 RV 株の遺伝子型の変遷が明らかになるとともに、非定型的な遺伝子構成を有する RV 株があれば検出される。

非定型的 RV 株とランダムに選別された定型的 RV 株について、ケニア拠点に導入された次世代シーケンサー（MiSeq）を用いた全ゲノムシーケンスの決定を行う。得られた塩基配列データを元に 11 本のゲノム遺伝子分節の各々について系統樹を作成して各遺伝子分節の由来の詳細を明らかにすることで、これら非定型的 RV 株の発生メカニズムを明らかにする。こうして、下痢便検体の収集から RV ゲノムシーケンス決定までをケニア拠点で完結させることを目指す。

③ 予想される成果

胃腸炎患者の下痢便検体の収集にあたっては、ケニア拠点／KEMRI で体制が整っており、2014 年のワクチン開始以前から収集が行われている。下痢便検体からの RV ゲノム抽出、PAGE 解析、RT-PCR による G/P タイプの決定といった初期処理については、申請者らの技術移転もありケニア拠点で行われており、ワクチン接種に伴う分布 RV 株の遺伝子型の変遷についてのデータが着実に蓄積しつつある。特に、ごく最近の 2019-2020 年には、それまでほとんどケニアでは分布していなかった G3P[8] 株の検出が顕著に高まった。RV1 ワクチンが導入された国々で検出が相次いでいる非定型的な DS-1 様 G3P[8] 株がケニアにも出現した可能性がある。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、ケニアの G3P[8] 株の遺伝子構成とその由来の詳細を明らかにできるであろう。一方で、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（特にウシ、ブタ）の動物 RV 株に由来する遺伝子分節を持つヒト RV 株が多数検出できると期待される。2019-2020 年にも G10P[8] や G4P[6] といった、本来はそれぞれウシとブタの RV 株に特徴的な RV 株が下痢症患者から検出されている。これらの非定型的 RV 株についても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、RV の種間伝播のメカニズムをリアルタイムで明らかにできると思われる。こうして、ワクチン接種の開始後に分布 RV 株の性状に大きな変化が見られつつある

ケニアにおいて本研究を実施することで、ワクチン効果と分布 RV 株の性状の変化との関連についての理解が大きく進み、RV に対する次世代ワクチンの開発が必要となった際の重要な実施基盤の提供を可能にすると期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

ケニアのキアンブ地区（首都ナイロビ近郊）において 2019-2020 年に乳幼児下痢症患者から収集した RV 抗原（VP6）陽性の下痢便 229 検体を解析に用いた。この収集にあたっては、KEMRI 倫理委員会の承認を得ている。非定型のおよび定型的な G/P 遺伝子型を示した RV 株のうち興味深い 24 株について MiSeq 次世代シーケンシングを行った。今年度は非定型的な G4P[6]タイプを有する KCH148 株（2019 年 2 月に 48 月齢女児から検出）と、定型的な G3P[8]タイプを有する KCH534 株（2019 年 4 月に 8 月齢男児から検出）、KCH1184 株（2019 年 10 月に 10 月齢男児から検出）、KCH1187 株（2019 年 10 月に 11 月齢男児から検出）について全ゲノムシーケンスに基づく系統関係を詳細に解析した。RV 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）

RV はレオウイルス科に属し、全 11 本の分節 RNA をゲノムとする。2 つの最外殻カプシド蛋白質 VP7 と VP4 は独立した中和抗原であり、それぞれ遺伝子型 G タイプと P タイプを規定する。G タイプは G1～G41、P タイプは P[1]～P[57]と G/P タイプの多様性は顕著である。さらに残る 9 本の遺伝子にも多様性が認められ、近年では 11 本の全ての遺伝子型構成（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。殆どのヒト RV 株は Wa 遺伝子群と DS-1 遺伝子群とに大別されるが、それぞれの遺伝子型構成は 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 である。ヒト以外にも、殆どの哺乳類種と鳥類種にそれぞれ固有の RV が存在し、ブタ、ウシ、サル、イヌ、ネコ、ネズミ、コウモリ、ニワトリ、ハトなどときわめて多様であるが、ヒトと動物間の接触が濃厚な地域では種間伝播が起きる。

上述のようにヒトでは G4 は P[8]との組合せが一般的であり、内部遺伝子は Wa-like (I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) である。ところが、今回検出した KCH148 株は非定型的な G4P[6]の G/P タイプを有していた。そこで次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを決定したところ、KCH148 株の全ゲノム遺伝子型は G4-P[6]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T7-E1-H1 であり、Wa-like のゲノムバックボーンを持つものの、NSP3 遺伝子はブタ RV に特異的な T7 タイプであった。次に、全 11 本のゲノム分節それぞれについて詳細な系統樹解析を行ったところ、10 本（VP7, VP4, VP6, VP1-VP3, NSP1, NSP3-NSP5）はブタ RV に近縁であり、一方で残る NSP2 遺伝子はヒト RV に近縁であることが明らかになった。また、リファレンス株として全ゲノムシーケンスを決定した 3 株の G3P[8]株（KCH534 株、KCH1184 株、KCH1187 株）は全ての遺伝子分節がヒト RV 由来であり KCH148 株とは近縁関係を示さなかった。興味深いことに、

KCH148 株の 9 遺伝子 (VP7, VP6, VP2, VP3, NSP1-NSP5) はヨーロッパの RV 株ときわめて近縁であることから、KCH148 株はヨーロッパの RV 株と共通の祖先を持つと推測された。一方で VP4 遺伝子はアフリカの RV 株と近縁であることから、本株はヨーロッパとアフリカの RV 株間で遺伝子交換を起こした興味深いリアソータント株であると考えられた。KCH148 株はアフリカ G4P[6]株で全ゲノムシーケンスが決定された 2 番目の株であり、アフリカ大陸の G4P[6]株について由来と進化の理解が大きく進んだ。

ケニアにおいては、2014 年 7 月から RV1 ワクチンが定期接種化された。ワクチン導入が分布 RV 株の性状に及ぼす影響を慎重に見極める必要がある。これまでにワクチン導入された国々では、接種拡大とともに RV 胃腸炎患者数が減少する一方で、分布 RV 株の性状には大きな変遷が起きている。ケニアにおいても、それまでこの地域では殆ど分布していなかった G3P[8]株の検出が顕著に高まったことがわかっている (Wandera et al., in preparation)。また、KCH148 株といった、ブタやウシといった動物 RV 株の遺伝子分節を持つ非定型的な RV 株も次々と検出されるようになった (Wandera et al., in preparation)。これら動物 RV 株に由来する RV 株の多くの抗原性は、RV1 ワクチン株のそれとは大きく離れており、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分布 RV 株の性状について、注意深く監視を継続する必要がある。

③ 成果の公表

1. Wandera EA, Hatazawa R, Tsutsui N, Kurokawa N, Kathiiko C, Mumo M, Waithira E, Wachira M, Mwaura B, Nyangao J, Khamadi SA, Njau J, Fukuda S, Murata T, Taniguchi K, Ichinose Y, Kaneko S, Komoto S. Genomic characterization of an African G4P[6] human rotavirus strain identified from a diarrheic child in Kenya: Evidence for porcine-to-human interspecies transmission and reassortment. Infect Genet Evol. 2021 96:105133.

6. 自己評価

ケニア拠点において、私たちがこれまでに技術移転してきた ELISA、PAGE、RT-PCR による下痢症患者下痢便のスクリーニング、Wa/DS-1 遺伝子群の判別、G/P タイプの決定がケニア人スタッフによって順調に稼働している点は十分に評価できる。今年度も SARS-CoV-2 蔓延のため訪ケができなかったが、ケニア拠点に次世代シーケンサーMiSeq が設置されたので、次世代シーケンシングについても技術移転を積極的に進めていきたい。RV ワクチンの接種拡大により、先進国では RV 胃腸炎患者数は顕著に減少しているが、ケニアといったアフリカの国々ではいまだに小児科外来が RV 胃腸炎患児で溢れかえっている。こうした RV ワクチン有効性の差異について理解するためには、分布 RV 株の性状を長期的に監視、解析する必要がある。当年度はケニア人スタッフを筆頭著者とする論文を海外雑誌に掲載することができた点は大いに評価したい。ケニア人スタッフと緊密に連携して得られる多くの研究成果を基礎として、次年度にさらに本共同研究を発展させる道筋をつけることができた点にも満足している。

7. 達成度（何れかに○）

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3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：リーシュマニア症ワクチンにおける組織常在記憶リンパ球の解析
課 題 番 号：2021-Ippan-24

2. 代 表 者：前川 洋一（岐阜大学大学院医学系研究科・教授）
共 同 研 究 者：呉 志良（岐阜大学大学院医学系研究科・講師）
Khueangchiangkhwang Sukhonthip (KhS)
（岐阜大学大学院医学系研究科・博士課程3年生）
久 富 匡 皓（岐阜大学医学部医学科・5年生）
佐 藤 一 穂（岐阜大学医学部医学科・5年生）
中 島 怜（岐阜大学医学部医学科・5年生）
川 原 理 克（岐阜大学医学部医学科・3年生）
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：400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

内臓型リーシュマニア症は非治療では致死性の、また治療後にはPKDLを発症するNTDの一つである。リーシュマニア症治療者には感染抵抗性の免疫記憶が成立すること、また近年遺伝子改変による弱毒リーシュマニア原虫によるワクチンの可能性が報告されるに至り、リーシュマニア症ワクチンが現実のものとなりつつある。種々の寄生虫症に対するワクチンを実現させるためには本弱毒リーシュマニア原虫接種のようなワクチン成功例における免疫現象の詳細な知見を応用することが重要であるが、弱毒リーシュマニア原虫により誘導される抵抗性免疫応答の全容は未だ解明されていない。本申請研究では、弱毒リーシュマニア原虫により誘導される抵抗性免疫応答と免疫記憶の詳細について、特に組織常在リンパ球に焦点をあてて解明することを目的とする。

② 研究内容

CRISPR/Cas 法による遺伝子改変で作出した弱毒リーシュマニア原虫を用いることで効果的な感染抵抗性を付与できることを濱野博士らが報告した (*Nat. commun.*, 2020)。この報告では実際の感染により誘導できる感染抵抗性と遜色のない抵抗性を弱毒リーシュマニア原虫接種で惹起できることを示している。寄生虫疾患での弱毒病原体を用いた数少ないワクチン例であり未だその作動原理などの詳細な知見の蓄積が不十分であるため、本申請研究では特に免疫記憶リンパ球に焦点を当てて検証する。

1) 組織常在リンパ球の関与の検証 (呉, KhS)

動物実験委員会の承認を得た上で実験を行う。マウス皮内に弱毒リーシュマニア原虫(弱毒原虫)接種を行うことにより、原虫特異的リンパ球が接種局所に集簇していることが予想される。接種部位である耳介を切除することにより、2次感染における感染抵抗性がどのような影響を受けるかを検証する。この検証によって、2次感染時に応答する記憶免疫細胞の局在が明らかになる。

2) 組織常在リンパ球の特性の検証 (呉, 久富, 佐藤, 中島)

1) の検証から弱毒原虫接種部位に感染抵抗性組織常在リンパ球が局在しているとの知見が得られると想定している。そこで、感染抵抗性組織常在リンパ球の特性について、接種局所の細胞を分取し、フローサイトメトリー解析や細胞培養、遺伝子発現解析を実施するとともに、所属リンパ節や脾臓に存在する免疫記憶細胞と比較検証する。

3) 訓練免疫の検証 (呉, 川原)

近年、免疫記憶現象は獲得免疫系だけでなく自然免疫系にも存在することが明らかになってきた。リーシュマニア症に対する感染抵抗性は T 細胞が主に担っており、弱毒原虫接種により T 細胞応答が誘導される。しかし、リーシュマニア原虫の感染細胞である貪食系細胞に対しても弱毒原虫接種により免疫記憶が誘導される可能性がある。2)と同様に接種局所、リンパ節、脾臓とともに骨髄でのマクロファージ系細胞について、フローサイトメトリー解析や遺伝子発現解析などを用いて訓練免疫が誘導されているか否かを検証する。

これらの検証を通して、弱毒リーシュマニア原虫接種により誘導される感染抵抗性免疫記憶の詳細を明らかにするとともに、感染により誘導される免疫記憶と比較することで、弱毒原虫ワクチンの更なる評価を行う。

③ 予想される成果

内臓型リーシュマニア症に対する弱毒ワクチンが感染そのものによって獲得することができる感染抵抗性と比較してどのような特徴を持つのかを明らかにできる。これまでウイルス感染症では弱毒ワクチンにより効果的な感染抵抗性を付与できることが明らかになっている。一方、弱毒化した寄生虫(原虫)を用いたワクチンはこれまで確立されていないため、その効果や特性に関する知見を十分に蓄積する必要がある。本申請研究では、濱野博士らが開発した弱毒リーシュマニア原虫により誘導される感染抵抗性を詳細に解析することを通して、当該知見の蓄積に寄与できると考えている。

5. 実施報告

①研究材料・方法・手続き

- *L. major* 株とその維持・継代

本研究では *L. major* Friedlin (FV9) の野生株 *LmWT* および Centrin 遺伝子欠損 *LmCen*^{-/-} 株を使用した。両株は BALB/c マウスの足蹠への定期的な接種・感染で維持し、感染部位から回収したアマスティゴートは M199 培地（10%非働化仔牛血清, 40 mM HEPES (pH 7.4), 0.1 mM アデニン, 5 mg/L ヘミン, 1 mg/L ビオチン, 1 mg/L ビオプテリン, ペニシリン 50 U/ml, ストレプトマイシン 50 mg/ml）で培養した。分化誘導したプロマスティゴートは 27°C で M199 培地で維持し、毎週、新鮮な培地で 40 倍に希釈継代した。

- マウスへの免疫と感染

6~8 週齢の雌 C57BL/6 J マウスの右上腹部に静止期の *LmCen*^{-/-}もしくは *LmWT* プロマスティゴートを 2×10^6 個皮内接種した。ワクチンもしくは感染 15 週後に、同マウスの左上部に 2×10^6 個の *LmWT* プロマスティゴートを皮内接種した（チャレンジ感染）。

- フローサイトメーターを用いた免疫細胞の解析

マウスの皮膚からの T 細胞の単離を以下のプロトコールに従い行なった。マウスを安楽死させた後、脇腹を剃毛し 1cm² 大の皮膚を採取・細切し、collagenase P (2 mg/ml、Roche Diagnostics)と DNAase を存在下で 10%FBS を含む RPMI 培地の中で 37°C で 120 分培養した。その後、組織を gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて MACS C tubes の中で 1 分間ホモジナイズし、組織ホモジネートを 100µm および 70µm nylon strains (Miltenyi Biotec)で濾過し単細胞懸濁液を得た。得られた細胞を以下の抗体で染色しフローサイトメーター (BD Biosciences)で分析後、FlowJo (Treestar)を用いて解析した。用いた抗体は Thermo Fisher Scientific 製の抗マウス CD3 (17A2)、CD44 (IM7)、Thy1.1 (HIS51)、Granzyme B (NGZB)、BD Biosciences 製の抗マウス CD4 (RM4-5)、CD8a (53.6.7)、CD62L (MEL-14)、CD69 (H1.2F3)、CD103 (2E7)、抗 BrdU (B24) である。

②成果

本研究を通して以下の結果を得た。

- *LmCen*^{-/-}ワクチン株接種および野生型 *L. major* 感染によって、皮膚における組織常在メモリーCD4⁺T 細胞 (tissue-resident memory T (TRM) cells) の誘導・存在が確認できた。
- *LmCen*^{-/-}ワクチン株接種および野生型 *L. major* 感染後治癒マウスにおいて、野生型 *L. major* チャレンジ後、速やかに TRM 細胞の集積が確認された。

③成果の公表

上記の結果を精査し、さらに解析を加えて成果の公表を行う予定である。

6. 自己評価

リーシュマニア症はサシチョウバエの吸血を介して伝播するベクター媒介性寄生虫疾患であるが、ヒトに利用可能なワクチンは存在しない。濱野らは Centrin 遺伝子欠損弱毒生 *Leishmania major* 株(*LmCen*^{-/-})原虫が同種および異種のリーシュマニアに対して感染防御を誘導し、同感染防御が IFN (インターフェロン) - γ 分泌性 CD4⁺エフェクターT 細胞およびリーシュマニゼーションに類似した多機能 T 細胞によって媒介されることを実証している。

本研究では、*LmCen*^{-/-}株による免疫後、野生株によるリーシュマニゼーションと同様に皮膚 CD4 陽性 TRM 細胞が誘導されるとの知見を得た。また野生型 *L. major* のチャレンジ感染後、*L. major* に特異的な TRM 細胞は、免疫マウスの感染部位に迅速にリクルートし増殖するとの知見も得つつある。以上のことから本研究は、遺伝子組み換え弱毒化生 *LmCen*^{-/-}原虫ワクチンはリーシュマニゼーションと同等の機能的な CD4 陽性皮膚 TRM 細胞を誘導できることを明らかとし、TRM 細胞がエフェクターT 細胞と共に宿主感染抵抗性において重要な役割を担っている可能性を示すことができた。

7. 達成度 (何れかに○)

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 3（2021）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：2021-Ippan-25
2. 代 表 者：都野 展子（金沢大学自然科学研究科・准教授）
共 同 研 究 者：砂原 俊彦（長崎大学熱帯医学研究所・助教授）
二見 恭子（長崎大学熱帯医学研究所・助教授）
3. 決 定 額：300 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。

研究内容

< 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的分布を記述する。

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。

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

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：

2018年から2020年にかけて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・時間的分布を6月から9月にかけてモニタリングした。

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か評価するための飼育実験を行った。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した。

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。ヤマダシマカとヒトスジシマカのオス・メス双方向で交雑実験を行い、交尾行動、受精、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した。

成果（結果＋考察）

世界各地でデング熱、ジカ熱、チクングニヤ熱などウイルス感染症の媒介動物として問題となっているヒトスジシマカはなぜわずか20年で世界中に分布を拡大できたのだろう。

温度への反応

日本にはヒトスジシマカに近縁なヤマダシマカがより野生的な環境に生息している。拡散するヒトスジシマカとそうならないヤマダシマカの分布や生態について比較調査した。金沢市と能登半島でカ類の採集を実施し外部形態を観察したのち、rDNAのITS領域とmtDNAのCOI領域を調べた。外部形態の特徴と分子生物学的判定は一致せず、ITS領域とCOI領域も矛盾した。2種間に遺伝子浸透が起こっていることが考えられた。市内にヒトスジシマカが、山際にヤマダシマカと隔離した分布をとっていたが、ヒトスジの個体数が増える8月には山際まで分布を拡げた。いろいろな温度で2種を飼育したところヒトスジに比べヤマダは適温が低く適温以外の温度では成長速度が著しく低下した。日周変化のある温度でもヤマダの成長速度は低下した。またヤマダシマカは人工容器には産卵しなかった。ヤマダはヒトスジと比べ適温幅が狭く温度変化に弱いことがわかった。ヒトスジの分布拡大には人工容器に産卵する性質と温度変化に影響されない性質が寄与すると考えられた。

交雑

日本列島においてヒトスジシマカは西南日本には古くから分布しているが、温暖化とともにその分布北限を北上させた。その結果、西南日本には *Stegomyia* 亜属の複数種が分布しているが、東北以北にはヤマダシマカ *Aedes flavopictus* しか分布していない地域やヒトスジシマカが侵入して経過した時間が短い地域など生物の歴史に変異がある。金沢に生息するヒトスジシマカとヤマダシマカの分布と繁殖生態を調べたところ、ヤマダシマカはヒトスジシマカよりも生育適温が低く分布がずれていること、交雑実験の結果ヒトスジシマカのメスは他種を区別していたがヤマダシマカのメスは区別できていないと考えられる結果を得た。本州における2種の共存期間の長さや交雑の起こりやすさの関係を調べるため、金沢に加えさらに北の仙台と南の長崎の2種の各集団を用いて交雑実験を行った。また金沢市と能登半島で採集した2種の外部形態の特徴と塩基配列の特徴から交雑についての定量を試みた。〈結果〉能登半島ではヤマダシマカとヒトスジシマカの2種が同所的に採集される地点がほとんどであり、外部形態の特徴も2種の間代的な特徴を示す個体が多数みられた。すくなくとも能登半島で2種の交雑が進行していることは確実と考えられた。交雑実験の結果、2種のオスは他種のメスを識別しているが、他種のメスに対しても交尾行動が観察され、交配前隔離は不完全であることが3集団すべてで確認された。種間交尾後メスの貯精嚢中に精子はほぼなかった。本研究はヒトスジシマカとヤマダシマカの間には、不完全な交配前生殖隔離とほぼ完全な交配後生殖隔離が複数の集団全てで成立していることを明らかにした。

② 成果の公表

査読付き論文発表

1. Sultana A., **Tuno N.**, Md. Shah Alam 2021. Effect of vegetation on the larval and adult growth performance of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Med. Entomol. Zool.* 72(3): 177–183. DOI <https://doi.org/10.7601/mez.72.177>.
2. 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
3. Sultana A., Sunahara T., Tsurukawa C., **Tuno N.** 2020. Reproductive interference between *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus* at a place of their origin. *Medical Veterinary and Entomology* 35 (1):59-67. DOI: 10.1111/mve.12469
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.

学会発表

7. Md. Sha Alam, Nobuko Tuno. Effects of different temperature regimes on population performance of *Aedes albopictus* and *Aedes flavopictus*. 日本生態学会第 66 回全国大会 (2019 年 3 月神戸市)
8. Md. Sha Alam, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの北陸における分布消長. 第 71 回日本衛生動物学会大会(2019 年 4 月山口市)
9. Afroza Sultana, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの種間交雑への体サイズの影響. 第 71 回日本衛生動物学会大会(2019 年 4 月山口市)
10. Md Shah Alam, 都野展子. ヒトスジシマカとヤマダシマカの生活史特質比較—温度に対する反応—. 第 71 回日本衛生動物学会大会(2019 年 4 月山口市)

6. 自己評価

世界各地でデング熱、ジカ熱、チクングニヤ熱などウイルス感染症の媒介動物として問題となっているヒトスジシマカがなぜわずか 20 年で世界中に分布を拡大できたのだろう。日本にはヒトスジシマカに近縁なヤマダシマカがより野生的な環境に生息している。拡散するヒトスジシマカの種としての特徴を明らかにするため、拡散しないヤマダシマカの分布や生態と比較調査した。ヤマダはヒトスジと比べ適温幅が狭く温度変化に弱いことがわかった。またヤマダシマカは人工容器には産卵しなかった。これらのことからヒトスジの分布拡大には人工容器に産卵する性質と温度変化に影響されにくい性質が寄与すると考えられた。以上の結果はヒトスジシマカの起源地での生態に世界中から関心が集まっているのに関わらず情報の乏しかった状況を改善する世界的にインパクトのある研究であり、査読付き国際誌に 4 報、査読付き雑誌に 2 報発表しさらに査読付き雑誌に 2 報投稿中、査読付き国際誌に 1-2 報を投稿予定である。十分な成果が得られたと評価している。

7. 達成度（何れかに○）

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3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：トランスポゾンシーケンシングによるビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の網羅的解析

課 題 番 号：2021-Ippan-26

2. 代 表 者：柏本 孝茂（北里大学 獣医公衆衛生・准教授）

共 同 研 究 者：児玉 年央（長崎大学 細菌学分野・教授）

山崎 浩平（北里大学 獣医公衆衛生・助教）

3. 決 定 額：400 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

Vibrio vulnificus (*V.v.*)感染症は、致死率の高い新興感染症として問題となっている。*V. vulnificus* は、ヒトに創傷または経口感染して、極短時間内に感染者を敗血症により死に至らしめる。*Vibrio* 属菌は分裂時間が短い特徴を持つが、*V. vulnificus* は、これに加えて自然免疫からの逃避能も併せ持っており、患者体内で急速に増殖するため、抗生物質による治療が追い付かない。研究の最終目標は、*V. vulnificus* の生体内増殖機構を明らかにし、その阻害法を開発することにより、抗生物質に依存しない、あるいは併用可能な新規治療法を開発することにある。本研究計画では、Transposon sequencing (Tn-seq) 法により、*V. vulnificus* の生体内増殖必須遺伝子を網羅的に同定し、重要度の高い遺伝子から *in vitro* と *in vivo* における機能解析を試みる。

② 研究内容

<貴研究所との関係性> 児玉グループは、*Vibrio* に対する遺伝子操作技術とそれを利用した病原性解析のノウハウを蓄積されている。本研究計画により選抜された *V. vulnificus* の生体内増殖必須遺伝子の機能解析を行う際、解析の一部を担当して頂くと共に、技術指導やアドバイスを頂く。

<研究計画> *V. vulnificus* トランスポゾン変異株ライブラリーをインプットとしてマウスの大腿部皮下に接種し、一定時間後に循環血および筋肉中から変異株を回収してアウトプットとする。インプットとアウトプット両方からゲノムを精製し、Tn-seq 法により変異遺伝子を同定すると共にその減少率を比較する。

③ 予想される成果

本研究計画は、感染局所である筋肉と循環血をアウトプットとして、*V. vulnificus* の増殖に必要な遺伝子を網羅的かつ、順位づけて明らかにするものである。したがって、*V. vulnificus* が感染局所と循環血液中のそれぞれにおいて増殖に必要とする遺

伝子を区別して明らかにすることができる。

V. vulnificus は、栄養分や温度等の増殖環境を整えると約 8 分程度で 2 分裂する。この素早い分裂能に加え、細菌感染の主要防御機構である好中球による貪食作用から逃れる能力も併せ持っている。これらの能力により生体内での素早い増殖を可能とし、これが 50-70%と言われる高い致死率に直結している。我々のこれまでの研究から、大腿部に接種された *V. vulnificus* は接種局所の筋肉を含む軟部組織で増殖した後、循環血液中に侵入し、敗血症を引き起こすことを明らかにしている。しかしながら、この一連の創傷感染段階のどの段階でどのような栄養源を必要とし、どのように好中球の貪食から逃避するのか完全には明らかにされていない。**本研究の成果は、各感染段階別の増殖制御法の開発に繋がる。**

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

・実験動物と動物実験承認

5 週齢♀の C57BL/6 をチャールスリバー (Kanagawa, Japan) より購入し、室温 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 40%~60%、照明点灯時間 8:00~20:00 に設定された飼育室で飼育した。飼育期間中、実験動物用固形飼料 MF (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) と水道水は自由に摂取させた。実験に使用した全ての動物実験は北里大学動物実験委員会の審査を経た後、承認を得て実施された (承認番号 18-058)。

・ *V. vulnificus* トランスポゾン (Tn) 変異株ライブラリーの作製

E. coli BW19795 株に pUT mini Tn5 Km2 Tag1 を形質転換し、カナマイシン (最終濃度 $50 \mu\text{g/mL}$) 加 LB 寒天培地でコロニーを選択して、これを pUT mini Tn5 Km2 Tag/BW とした。この *E. coli* を使用して *V. vulnificus* の染色体上へ、接合伝達により Tn を転移させ、*V. vulnificus* CMCP6 株の ORF 数の約 3 倍にあたる約 12,000 クローンからなる *V. vulnificus* Tn 変異株ライブラリーを得た。

・マウスへの *V. vulnificus* Tn 変異株ライブラリーの接種とクロンの回収

上記 12,000 クローンからなる Tn 変異株ライブラリーを Input pool として培養した後、3 匹の C57BL/6 の右大腿部皮下へ、それぞれ、 1.5×10^7 /匹接種した。マウスがエンドポイントに達した後、安楽殺処分し、脾臓をホモジナイズして選択培地へ播種し、生体内で増殖可能な変異株の Output pool を得た。

・次世代シーケンシングによる生体内増殖必須遺伝子の同定とその重要度の決定

Input pool と Output pool のそれぞれからトータルゲノム DNA を精製し、機械的に切断した後、切断端にアダプターリンカーを導入した。このアダプターリンカーに特異的なプライマーと Tag1 特異的プライマーを用いて PCR を行い、増幅断片をリードとして、その配列を *V. vulnificus* CMCP6 株ゲノムデータベースに照合し、Tn の挿入された遺伝子を同定すると共にリード数を解析した。Input pool と Output pool で得られたリード数から、Tn が挿入されることで生体内から消失しやすい (生体内増殖に必要な) 遺伝子を選抜した。

② 成果 (結果+考察)

多くの機能未知の遺伝子が得られたが、それらに加え、これまでに報告のあった生体内増殖に必要と推定されている、莢膜合成に関与する遺伝子、鉄の獲得に関与する遺伝子、および運動性に関与する遺伝子が得られた (下表)。これらのことから、本研究結果は信頼性が高いと考えられた。しかしながら、同定された遺伝子数が極端に少なかったことから、感染系においてボトルネック現象が生じた可能性が考えられた。今後は、Input pool および Output pool に用いる菌数を微調整し、再度、Tn-seq 法を実施して、より多くの遺伝子を選抜する必要がある。

③ 成果の公表

遺伝子の同定に至ったのみであり、成果は公表していない。

6. 自己評価

本研究計画の目的は、Transposon sequencing (Tn-seq) 法により、*V. vulnificus* の生体内増殖必須遺伝子を網羅的に同定し、重要度の高い遺伝子から *in vitro* と *in vivo* における機能解析を試みることであった。我々の研究グループでは、本研究計画に先んじて、Signature tagged transposon based mutagenesis (STM) 法による *V. vulnificus* の生体内増殖必須遺伝子の網羅的同定を実施し、*V. vulnificus* の生体内増殖には、運動性が重要であることを証明している。STM 法の詳細は割愛するが、生体内増殖必須遺伝子の選抜にドットプロットを用いるため、当該遺伝子が重要か重要でないかは、シグナルの有無に依存することとなる。すなわち、遺伝子の選抜が必要か否かの 2 択に近いものとなる。対して、Tn-seq 法では次世代シーケンサを用いて生体内増殖必須遺伝子を選抜するため、得られたリード数により重要度が数値化され、明白に順位化できる利点がある。これが本研究計画で Tn-seq 法を用いた理由である。本研究計画により、Tn-seq 法で得られた結果を STM 法で得られたそれと比較したところ、これまでに、*V. vulnificus* の生体内増殖に必要と推定されている遺伝子の重複が見られた。このことは、Tn-seq 法が機能しており、*V. vulnificus* の生体内増殖必須遺伝子を選抜できていることを示している。しかしながら、一方で、STM 法で上位に選抜された遺伝子が Tn-seq 法にみられないケースも散見された。STM 法による選抜は感度が悪い分、確実性は高いはずであり、STM 法で得られた遺伝子が Tn-seq 法で得られなかったことに対する原因究明は必要と考える。おそらく、接種に用いた変異株プールや生体内からの菌の回収にあたり、適切な菌数が存在すると考えられるが、今回は培養時間を長く取りすぎたため、両菌数が多く、ボトルネック現象が生じてクローンに偏りが生じたと考えられた。この点を改善することにより、確実性および感度において、STM 法を凌ぐ結果が得られるものと思われる。

7. 達成度（何れかに○）

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

- ・当初の目論見通り、*V. vulnificus* が生体内での増殖に必須とする遺伝子を選抜することが出来たため。

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：パンデミック発生時の1996年に出現した腸炎ビブリオ新型株の遺伝学的解析

課 題 番 号：2021-Ippan-27

2. 代 表 者：中口 義次（石川県立大学生物資源環境学部・准教授）

共 同 研 究 者：児玉 年央（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

國田 のどか（石川県立大学生物資源環境学部・学部生）

竹田 莉彩（石川県立大学生物資源環境学部・学部生）

東 愛恵（石川県立大学生物資源環境学部・研究補助員）

日吉 大貴（長崎大学熱帯医学研究所・助教）

3. 決 定 額：300千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

1950年に日本で発見された腸炎ビブリオ感染症は、1996年に南アジア及び東南アジアを起点とした新型株によるパンデミックが確認された。その新型株は、耐熱性溶血毒素の遺伝子を有し、特定の血清型（O3:K6）で同じ遺伝学的背景を有する特徴を示し、パンデミッククローンとよばれた。そして新型株を特異的に検出するGS-PCR法（Group-Specific PCR）が開発され、世界中で容易に新型株を検出することが可能となった（Matsumoto, C. 2000）。一方で、このパンデミッククロンの発生の経緯については、不明な部分が多い。本研究では、パンデミック発生時（1996年）に分離された腸炎ビブリオ菌株について遺伝子型別及び血清型別を実施し、さらに各種の分子疫学解析を通して、パンデミック発生時の世界規模での腸炎ビブリオ感染症のダイナミズムを明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

本研究では、腸炎ビブリオ感染症のパンデミックが始まった1996年に発生地域で分離された臨床分離株（100株以上を収集済）について、病原性因子の遺伝子型別、血清型別及び各種の分子疫学解析を実施して、流行の実態像を明らかにする。現在までに各種の解析を始めているが、さらに多角的に調べるために、熱研細菌学分野の児玉教授グループが研究している腸炎ビブリオの新たな病原性因子（III型分泌装置）についての型別および病原性解析、次いで保有するゲノム解析情報と比較することで、研究の新たな進展が期待できる。また今後、熱研が得意とするベトナム及び申請者がこれまでに実績のある東南アジア各国（タイ、マレーシア、インドネシア）での共同研究に発展させていくことを考えている。

③ 予想される成果

本研究では、腸炎ビブリオ感染症のパンデミックが発生した 1996 年に初期発生地域を中心に世界各地で分離された臨床分離株（100 株以上で収集済）について、遺伝子型別、血清型別及び分子疫学解析を通して、これまでの定説であるパンデミッククローンの特徴を検証し、未だ不明な部分が多いパンデミック発生時の腸炎ビブリオ感染症の実像を明らかにする。これまでの予備実験で、パンデミッククローンの特徴を覆す結果が得られ始めており、さらに大規模に多角的に解析することで、新型株の新たな特徴や起源の解明に繋がり、次に起こると考えられるパンデミックの対策に役立てることができる。さらに、世界的な広がりを見せている魚介類の生食による食中毒の予防及び魚介類の安全性確保に繋げることもできる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

腸炎ビブリオのパンデミック発生時の 1996 年にインド（96 菌株）、タイ（3 菌株）、シンガポール（3 菌株）で分離された 100 菌株の腸炎ビブリオを使用した。それら菌株について、腸炎ビブリオの菌種同定（VP-*toxR*）と 2 つの病原性遺伝子（耐熱性溶血毒（Thermostable direct hemolysin）と TDH 類似溶血毒（TDH-related hemolysin））に対するマルチプレックス PCR 法を実施した。さらに、腸炎ビブリオのパンデミッククローンを同定する GS-PCR（Group-specific PCR）法を実施した。また、それら 100 菌株の血清型別を実施した。その後、分離株のフラグメントレベルでの比較解析を AP-PCR（Arbitrarily primed PCR）法により実施した。

② 成果（結果＋考察）

使用した 100 菌株について遺伝子検査を実施した結果、典型的なパンデミッククローンの特徴（*tdh* 遺伝子陽性、*trh* 遺伝子陰性、GS-PCR 陽性、03:K6 血清型）を示したものは 64 菌株あり、残り 36 菌株は GS-PCR 陰性であった。そして GS-PCR 陽性の 64 菌株は、全て 03:K6 血清型であった。一方で、パンデミッククローンではない GS-PCR 陰性株には、多くの種類の血清型が含まれていた。次に、03:K6 血清型の 65 株（GS-PCR 陽性が 64 株、陰性が 1 株）の分子疫学解析（AP-PCR 法）を実施したところ、少なくとも 2 つのフィンガープリンティングのパターンが確認された。つまり、パンデミッククローンの中で遺伝的背景（ゲノム構造）が異なる 2 つの集団が見出された。1996 年に確認された腸炎ビブリオ感染症のパンデミックは、単一のパンデミッククローンから始まったというのが定説である。しかし、本研究結果では、1996 年に分離されたパンデミッククローンとされる GS-PCR 陽性株の中で、ゲノム構造が異なる少なくとも 2 つのグループが確認され、これまでの定説が覆された。今後、これら 2 つのグループの菌株について、全ゲノム解析を実施することで、未だ明らかにされていない腸炎ビブリオ感染症のパンデミックの解明に繋がることが期待できる。

③ 成果の公表

中口 義次、「次なるパンデミックへの備え：グローバルな脅威としてのビブリオ感染症が襲う「Sushi」と「Sashimi」の安全学」、日本海イノベーション会議「感染症問題への取り組み」（2021 年 10 月 11 日、金沢市）

6. 自己評価

本研究では、1950年に日本で発見された腸炎ビブリオ感染症について、1996年に確認された本菌のパンデミック（世界的大流行）に焦点を当て、その実態解明を目指した。これまで、腸炎ビブリオ感染症のパンデミックは、単一のクローンにより発生したということが定説であったが、本研究結果からは、そのパンデミッククローンに少なくとも2つのグループが確認された。つまり、パンデミックはクローンで発生したのではなく、複数のグループで発生していた可能性が示唆された。本成果は、腸炎ビブリオ感染症の流行の歴史に新たな知見を加える内容になる可能性があり、今後、更なる詳細な解析を通して、腸炎ビブリオ感染症のパンデミックの全容を明らかにしていきたい。

7. 達成度（何れかに○）

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

2021 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : **Evaluation of humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine**

Project number : **2021—Ippan—28**

2 . Principal investigator : Shyam Prakash Dumre, PhD, Associate Professor, Central Department of Microbiology, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal

Joint researcher(s) : Professor Kouichi Morita, and Mya Myat Ngwe Tun, Associate Professor, Department of Virology, NEKKEN

3 . Amount decided : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

(1) Research objectives

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has spread throughout the world and infected over 100 million individuals resulting in over two million deaths (WHO Weekly Epidemiological updates, 2 Feb 2021). One year in the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, the first vaccines are being rolled out in many countries under emergency use authorizations while >50 vaccines are in trials (WHO COVID-19 vaccine landscape, 2021). WHO expects that vaccination of health workers and older people is underway in all countries in the first 100 days of 2021. While the whole world is optimistic on the role of vaccines in ending the pandemic, rapidly evolving newer variants of SARS-CoV-2 are becoming another challenge due to its faster spread, and potential role in protective efficacy of vaccines. SARS-CoV-2 may mutate and evade immunity, with consequences for efficacy of emerging vaccines and antibody therapeutics (Thomson et al., Cell, 22 Jan 2021).

Most individuals after SARS-CoV-2 infection develop neutralizing antibodies that target spike protein, however there are currently limited data on the dynamics of neutralizing antibodies in the months after infection (Crawford et al, J Infect Dis, 30 Sep 2020). On average, neutralizing titers decreased about 4-fold from approximately 30 to >90 days after symptom onset in US population. Moreover, despite the rapidly rolled -out COVID-19 vaccines in many countries, humoral immune response data is not available in the same race (not even for the natural infections). The available data are mostly from the well-resourced countries while the immune response (either due to natural infection or vaccination) may not be the same in all populations/ countries. Low and middle income countries (LMICs) which already overburdened the health care system and are struggling for equitable allocation of limited resources to contain the virus spread. Generating such data to monitor the introduction of new variants and their impacts in transmission, adaptability and in vaccine is

becoming a hard-to-achieve goal for most LMICs, due to lack of advance facilities for humoral response evaluation. Nepal is no exception.

After the first report of COVID-19 on 23 January 2020, Nepal recorded a total 271,707 cases and 2,035 deaths (fatality rate, 0.75%) with 98.6% recovery rate as of 5 February 2021. Nepal is among the few countries which flattened the COVID-19 curve with daily cases brought down to 150-300 from approximately 6000 cases during the peak (Ministry of Health, Nepal: <https://covid19.mohp.gov.np/>). Recently (end of January), Nepal also started vaccinating the front-line workers, while the adequate vaccine coverage is still a distant goal as in other LMICs. Furthermore, the recent introduction of new variant in Nepal also poses added challenges for the prevention of second wave. Because, it is of great concern that these newly emerging variants may escape neutralizing antibodies induced by previous infection and/or vaccination through mutations in the spike protein (Jangra et al., MedRxiv, January 29 2021, doi: 10.1101/2021.01.26.21250543). Unfortunately, no data is available on neutralizing antibody levels in Nepali population after natural infection or vaccination. At this situation, it is important to remain extra vigilant about collecting adequate immune response data from both vaccines as well as SARS-CoV-2 infected individuals to inform scientific community as well as to ensure appropriate policy and strategies, since a second wave may appear at any point of time, disrupting the already weakened health systems.

Therefore, in this study, **we aim to evaluate the humoral immune response induced by SARS-CoV-2 natural infection and vaccine by quantifying both the neutralizing and binding antibody levels in Nepali population.**

(2) Research content

Research details

This study is related to the work/ studies done at NEKKEN and particularly at the Department of Virology, where similar studies have been conducted in other viral diseases (JE, dengue, etc.) for years now. Moreover, the PI (SPD) spent around 5 years at NEKKEN as an Assistant Professor and worked in collaboration with the Virology Department, and recently returned to Nepal. PI has been involved in several COVID-19 related projects in the country and this research support would be a milestone to establish a continued and sustainable collaboration of NEKKEN-alumni with NEKKEN for future research activities. On top of it, this will be a collaborative research support to a developing country in the fight against COVID-19 pandemic from NEKKEN.

Study design and study sites

This will be a prospective cohort study to evaluate the humoral immune response. Two

tertiary care hospitals (one from capital city- Kathmandu and another from Southern terai region) have been selected as sentinel sites (figure 4). Tribhuvan University Teaching Hospital (TUTH) located in Kathmandu is one of the biggest hospitals in Nepal which is designated for COVID-19 treatment and is also a COVID-19 vaccination center. The second site, Bharatpur hospital, is located in Chitwan district which is the major government hospital in the region designated for COVID-19 treatment and vaccination center. Study site selection is also based on other criteria, including catchment area, geographical representation, communication facilities, infrastructure and human resources available for the study.

Study population

There will be two groups of target population. There are, gender, race and ethnicity restrictions for inclusion.

- Group 1: SARS-CoV-2 infected individual (confirmed by real-time RT-PCR) to assess the humoral immunity induced by natural infection
- Group 2: Prospective COVID-19 vaccinees who visit the vaccination center for the first dose of COVID-19 vaccine (COVISHIELD*) to assess the vaccine induced humoral immunity

*ChAdOx1_nCoV-19 Corona Virus Vaccine (Recombinant) developed by Oxford/AstraZeneca and produced by Serum Institute India

Exclusion criteria

The following individuals will be excluded from the study

- History of underlining immunocompromised conditions or autoimmune diseases: These people may have altered humoral immune response and can have impacts on evaluation
- Prior episodes of SARS-CoV-2 infection
- SARS-CoV-2 sero-positive status
- Not agreed for voluntary participation and do not adhere to follow ups

Sample size and participant recruitment

A total 100 individuals (50 participants each from natural infection and vaccination groups) will be enrolled in the study. Individuals will be recruited from both hospitals in parallel until the target sample size is achieved. After taking the informed consent from study participant, he/she will be enrolled as study participant. A questionnaire will be administered to collect sociodemographic information followed by a request for blood collection at the laboratory. Additionally, data will also be archived from medical records (clinical details)/ vaccination card.

Sampling time-frame, sample collection and follow up

Enrollment will start from April 2021 and will be followed up for 6 months (20% loss to follow up expected). For the vaccine group, blood samples will be collected from each participant at 4 different time-points (before COVID-19 vaccination (baseline), 1 month, 3 months and 6 months post-vaccination of first dose).

For the natural infection group, blood samples will be collected from PCR positive individual (at diagnosis, 1 month, 3 months and 6 months post-infection (diagnosis)).

For each visit (each time point), 5 ml of venous blood will be collected from the study participant and allowed to clot for serum separation which will be aliquoted and transferred to CDM, TU laboratory. One aliquot will be used to quantify anti-SARS-CoV-2 IgG antibody by ELISA while the rest aliquots will be stored at -80°C freezers to be shipped to Virology Department, NEKKEN, Nagasaki University, Japan.

Specimen shipping to Japan

Sera will be transported to NEKKEN in a triple packaging system maintaining the cold chain by commercial shipping agency. These sera upon receipt at Virology-NEKKEN will be stored at -80°C until assayed for neutralizing antibody titers.

Neutralization assay

Sampled received at the department of virology will undergo neutralization assay. Each serum sample will be 2-fold serially diluted in culture medium with the first dilution of 1:10 (dilution range of 1:10 to 1:2,560). Serum dilutions will be incubated with virus particles (SARS-CoV-2), and infected to Vero cells to determine the neutralization titers.

Data management and analysis

Data management will be the primary responsibility of the principle investigator (PI) in Nepal in cooperation with NEKKEN investigators. Standard data collection tools will be employed with the provision of unique ID (Code) for each study participant. Furthermore, regular supervision/monitoring/orientation visits to the sentinel sites will ensure quality data from the very beginning.

IBM SPSS version 21 and GraphPad Prism version 9 will be used for data analysis. Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Mann-Whitney-U test will be used as appropriate to assess the difference in geometric mean antibody titers (95% confidence intervals) between the groups, while chi-square test will be used for categorical variables. Also, correlation between the ELISA antibody titres and neutralizing antibody will be assessed.

Ethical approval and informed consent

Ethical approval will be obtained from the Nepal Health Research Council (NHRC), Government of Nepal and Ethics Review Committee (ERC) at NEKKEN. Written informed consent will be obtained from each study participant according to the WHO-ERC guidelines for the informed consent process. Routine management, when needed, will be according to the “*Guidelines for Management of COVID-19 in Nepal*” developed by Government at these hospitals. This will be according to normal routine practice and neither influenced by the study nor supported by this study.

(3) Expected results

- a) Information obtained on humoral immune response (neutralizing antibody) due to SARS-CoV-2 infection in Nepali population.
- b) Humoral immune response (neutralizing antibody) induced by the COVID-19 vaccine (e.g. COVISHIELD) in Nepali population will be uncovered.
- c) Correlation between SARS-CoV-2 specific IgG antibody titre and neutralizing antibody titre (if ELISA can be a proxy of neutralizing antibody assay in resource-limited settings like Nepal).
- d) Any association between socio-demographic/ clinical features and neutralizing antibody levels.
- e) These information help, at large, to the scientific community and also to the government for evidence based policy and strategy making for vaccination as well as disease control during the second wave.

5 . Implementation report* :

(1) Research materials, methods, procedures (as implemented)*

This section is written according to the exact procedures/ methods followed as there have been some changes in the protocol compared to the first submitted proposal.

The conceptual framework of this research project has been illustrated in Figure 1 below.

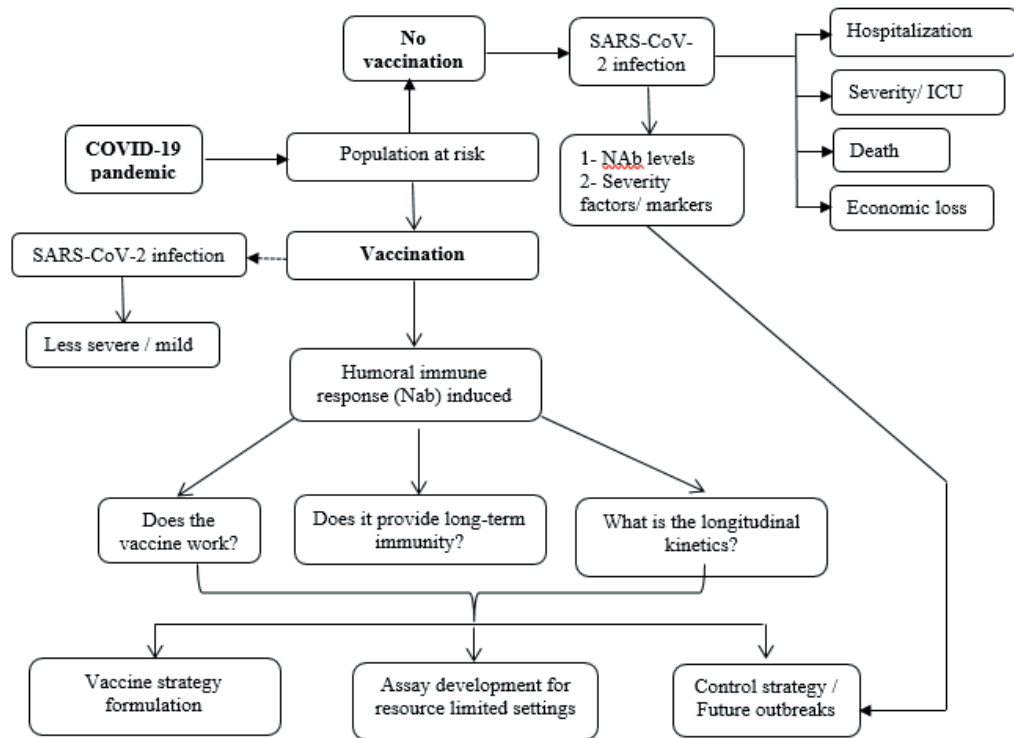


Figure 1. Conceptual framework of the study

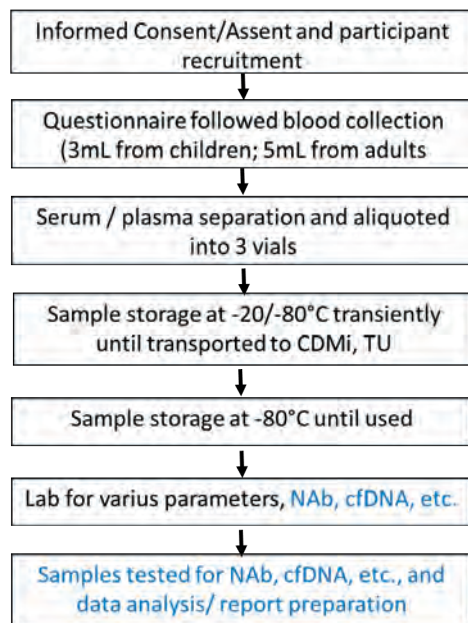


Figure 2. Overall flow diagram of the study. Blue fonts indicate the work partially completed/ in progress/ data being analyzed.

Study design and study sites

This is a prospective cohort study to evaluate the humoral immune response (immunity) of COVID-19 vaccination in Nepali population at community level. One component (arm) of the study is a hospital based and cross-sectional in nature to evaluate the humoral immunity of natural SARS-CoV-2 infection and explore the predictors of severe COVID-19. Therefore, this study has the following two study sites (Figure 3)*:

1. SARS-CoV-2 natural infection study: Province-3, Gangalal Hospital, Bansbari, Kathmandu
2. COVID-19 vaccine study: Province-2, Mithila municipality, Dhanusha

*There has been change in the study sites compared to the initially proposed sites. This modification was made looking at the practical feasibility while executing the project with the limited financial flexibility. Study site selection was based on geographical representation, communication facilities, laboratory infrastructure, ultra-low freezer facility and human resources available for the study.

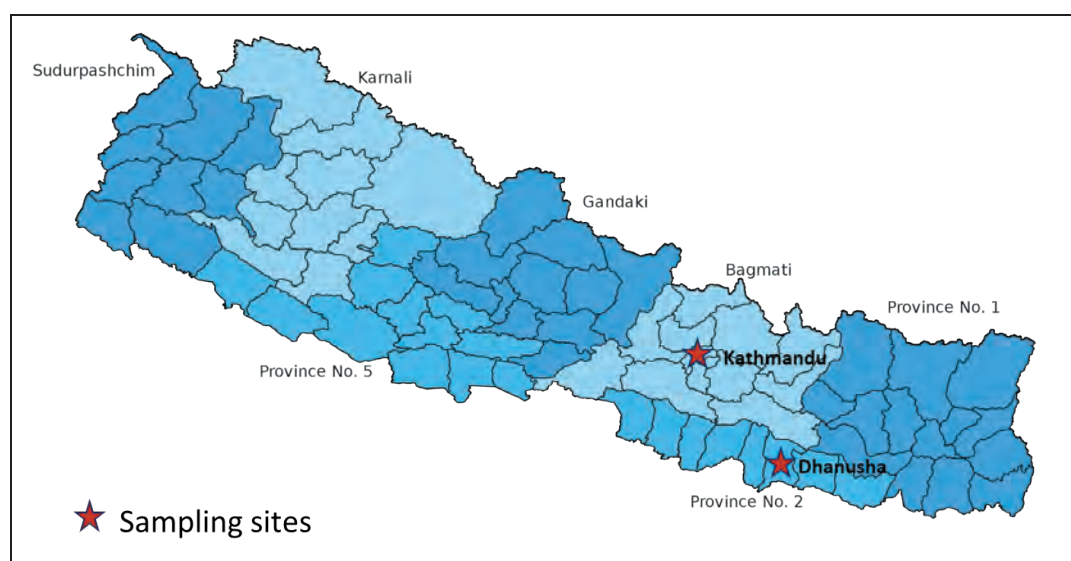


Figure 3. Map of Nepal showing the study sites

Study population

There are two groups of target population. There is no gender, race and ethnicity restrictions for inclusion.

Group 1 (n=110):

- SARS-CoV-2 infected individual (RT-PCR positive) with different severity levels (including healthy controls) to assess the neutralizing antibody (humoral immunity) and factors of COVID-19 severity

Group 2 (n=180):

- Prospective COVID-19 vaccinees who visited the vaccination center (school) for the first dose of mRNA based COVID-19 vaccine called Spyvax (Moderna) to assess the vaccine induced humoral immunity

The type of COVID-19 vaccine was decided based on the vaccine implemented by the government during the study time at the designated study locations.

Sample size and participant recruitment

A total 290 individuals (110 participants including 20 healthy individuals for natural infection group and 180 from vaccination groups) were enrolled in the study. Individuals were recruited from the hospital and community (schools) in parallel until the target sample size is achieved for both arms. After taking the informed consent/assent from study participant, he/she was enrolled as a study participant. A questionnaire was administered to collect sociodemographic information followed by a request for blood collection. Additionally, data were also archived from medical records (laboratory parameters, clinical details, etc.)/ vaccination card.

Sampling strategy (Sampling time-frame, sample collection and follow up)

- **For the vaccine group**
 - Blood samples were (3-months post vaccine follow up collection completed) collected from each participant at 4 different time-points (before COVID-19 vaccination (baseline), 1 month, 3-months and 6-months post-vaccination from the first dose). However, 6-months follow up and sampling will be done this month.
- **For the natural infection group**
 - Blood samples were collected from PCR positive individuals at the time of hospital visit.

Specimen collection, shipping, storage and analysis at CDMi, TU

For each visit (each time point), 5 mL (3mL from children) of venous blood was collected from the study participant and allowed to clot for serum separation which was aliquoted, transiently stored at -80°C freezers at sentinel hospitals (until transported) and transferred to CDMi, TU laboratory. 1-2 aliquots are used to quantify anti-SARS-CoV-2 neutralizing antibody by competitive ELISA while the rest aliquots will be stored at -80°C freezers.

Specimen shipping and analysis at NEKKEN

One aliquot was shipped (some samples shipped, while the rest will be shipped soon) to Virology Department, NEKKEN, Nagasaki University, Japan for confirmatory

estimation of IgG antibodies against SARS-CoV-2 Spike protein by ELISA (SARS-CoV-2 Spike IgG ELISA, Shimane University) and confirmatory assay for virus neutralizing antibodies using cell-culture based methods (micro-titer or PRNT). This neutralizing assay is planned to evaluate neutralizing ability against different variants of SARS-CoV-2. This work at Virology NEKKEN is ongoing now. The joint team at NEKKEN-Virology has been supporting on this part.

Data management and analysis

Data management is the primary responsibility of the principle investigator (PI). Standard data collection tools were/will be employed with the provision of unique ID (code) for each study participant. All the data on patients' clinical and laboratory parameters were/will be transcribed into the spreadsheet (MS Excel), and appropriate data verification and cleaning were (partly done)/ will be performed. Furthermore, regular supervision/ monitoring/ orientation visits to the sentinel sites is expected to ensure quality data from the very beginning.

SPSS for Windows, version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY) and GraphPad Prism version 9 was used for data analysis. Categorical variables were presented as absolute number (n) and percentage (%) as appropriate. Wilcoxon matched-pairs signed rank test or Mann-Whitney-U test was used as appropriate to assess the difference in geometric mean antibody titers (95% confidence intervals) between the groups, while chi-square (or Fisher's exact) test was (partly) used for categorical variables. Regression analysis will be used to identify the COVID-19 severity predictors. p value less than 0.05 has been considered statistically significant.

Ethical approval and informed consent

Ethical approval for this study was obtained from Institutional Review Committee (IRC)-IoST, TU, and Nepal Health Research Council (NHRC), Government of Nepal. Written informed consent was obtained from each study participant according to the WHO-ERC guidelines for the informed consent process. Routine management at hospital, when needed, was according to the "*Guidelines for Management of COVID-19 in Nepal*" developed by Government, and was not the responsibility of the study team. This was according to the normal routine practice and neither influenced by the study nor supported by this study.

(2) Results (results & observations)

A. Findings of the vaccine study

Participants' profile at the first enrollment and pre-vaccination blood sampling:

During the first enrollment (pre-vaccination), a total of 226 study participants were enrolled. Majority of the participants (57.9%) were males with ratio (male: female) of 0.72 (Table 1).

Table 1. Gender distribution of the study participants

Gender	n	%
F	95	42.1
M	131	57.9
Total	226	100.0

Age-wise distribution of study participants

The age of the participants ranged from 13 to 17 years old. The maximum number 84 (37.2%) were from 17 years of age followed by 69 (30.5%) from 16 years (Table 2). Median age (25-75% IQR) of the participants was 16 (15-17) in the pre vaccinated participants (Figure 4).

Table 2. Age-wise distribution of study participants

Age	N	%
13	5	2.2
14	20	8.9
15	48	21.2
16	69	30.5
17	84	37.2
Tota	22	100.
l	6	0

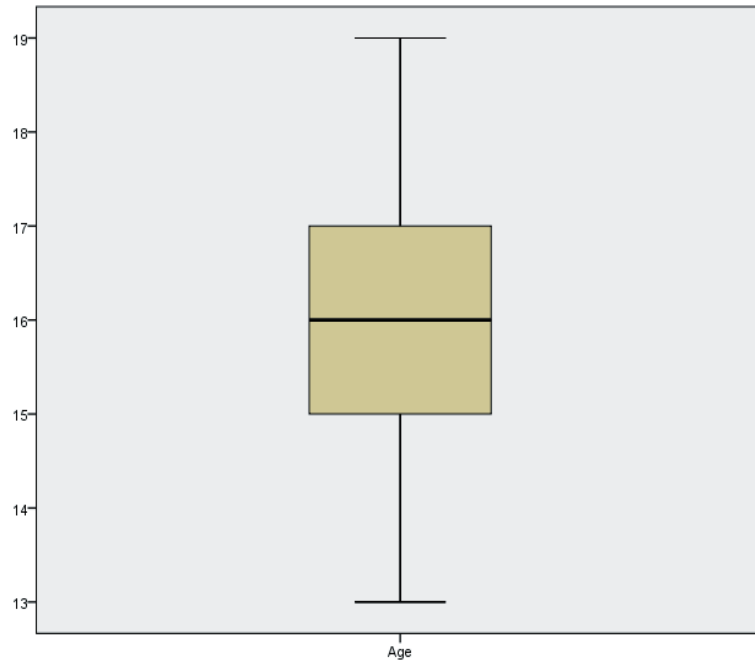


Figure 4. Box-plot showing the age pattern of study participants

BMI profiles of the study participants

BMI of the study participants was in the range of 16.9-38.3 while the median BMI (IQR) was 20.5 (19.3-22.2) showing the overall data skewed towards a lower BMI. There were few obese children (extreme outliers) too.

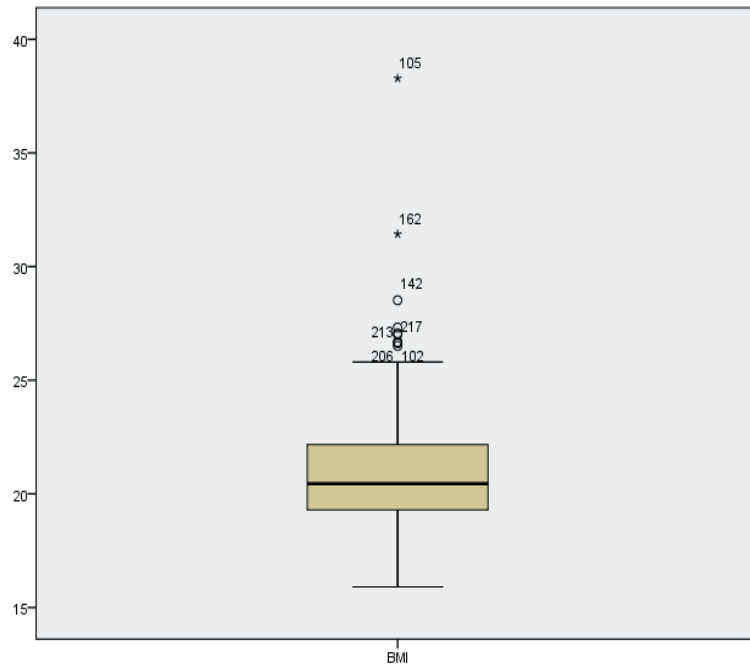


Figure 5. BMI characteristics of the study participants

Ethnicity wise distribution of participants

The vast majority of participants were Madhesi (75.2%) followed by Janajati (14.6) and Brahmins (4.9%) at the time of first enrollment (Table 3).

Table 3. Ethnicity wise distribution of participants

Ethnicity	n	%
Brahmin	11	4.9
Chhetri	5	2.2
Dalit	6	2.7
Janajati	33	14.6
Madhesi	170	75.2
Muslim	1	0.4
Total	226	100.0

Status of post vaccination follow up and sampling

The total samples collected during 1-month post-vaccination follow-up was 203 (89.8%) with 23 (10.2%) participants lost to follow up due to various reasons while in the 3-months follow up sampling, 184 (81.4%) participants completed the follow up sampling with 42 (18.6%) participants missed (Table 4).

Table 4. Status of post-vaccination follow up and sampling

Status	1-month		3-months	
	N	%	n	%
Absent	16	7.1	27*	12.0
Consent withdrawn	4	1.8	7*	3.1
Skipped second dose	-	-	7	3.1
Non-vaccinated	3	1.3	1	0.4
Subtotal of missing	23	10.2	42	18.6
Sampled	203	89.8	184	81.4
Total	226	100.0	226	100.0

Adverse events (AEs) of Moderna vaccine (Spikevax) in Nepalese children

Among all the participants, a total of 171 (84.2%) and 163 (88.6%) individuals reported adverse events after first and second dose of Moderna vaccine, respectively.

No serious adverse events and hospitalizations due to this vaccine were reported. The most common adverse event reported was localized redness or swelling at the injected site (165_{first dose} and 125_{second dose}) followed by systemic adverse events like fever (50_{first dose} and 92_{second dose}) and headache (21_{first dose} and 40_{second dose}) (Figure 6).

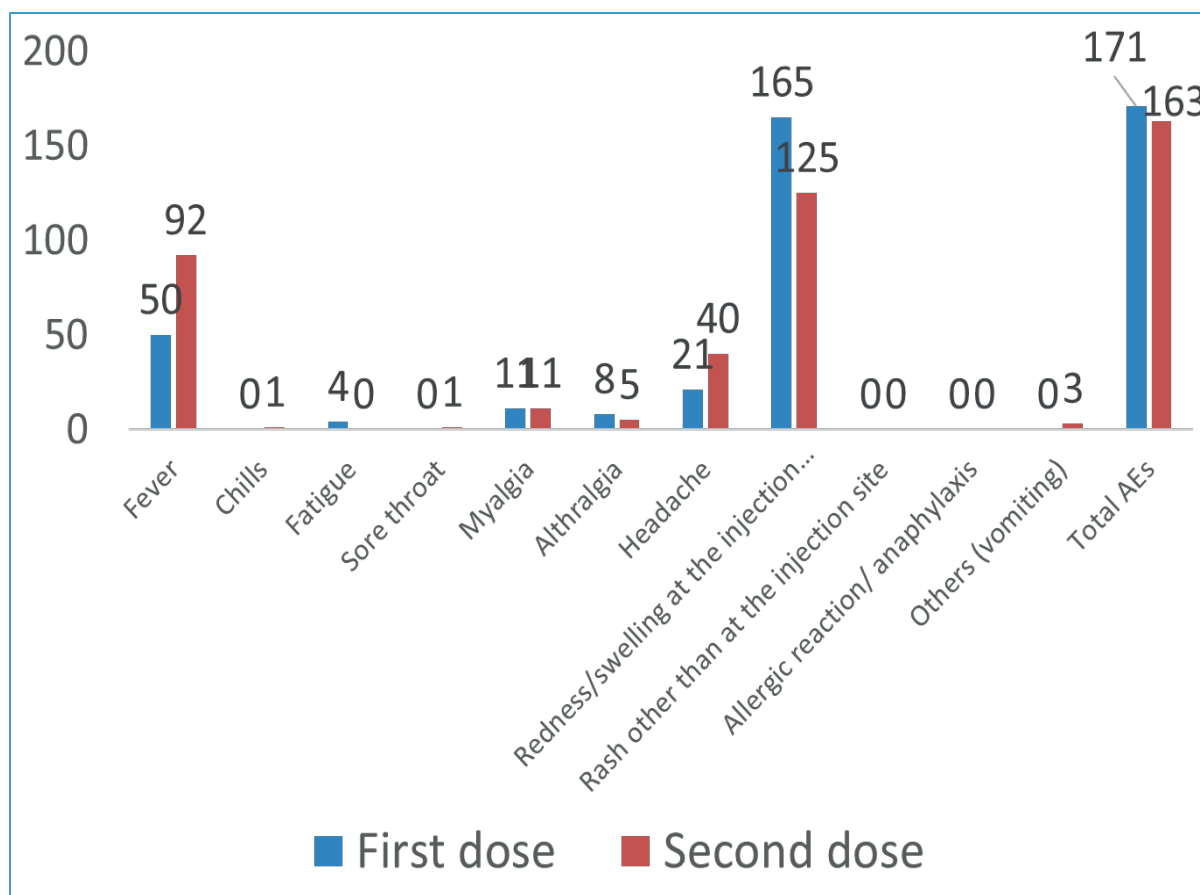


Figure 6. Adverse events of COVID-19 Moderna vaccine among Nepali children

Protective efficacy of Moderna vaccine (Spikevax) in Nepalese children

None of the participants were has infection with SARS-CoV-2 until 3-months post-vaccination suggesting this vaccine was very effective in Nepalese children (12-17 years ols). However, 10 and 3 participants reported COVID-19 like illness such as fever, cough, etc., upto 1-month and 3-months post-vaccination period, respectively.

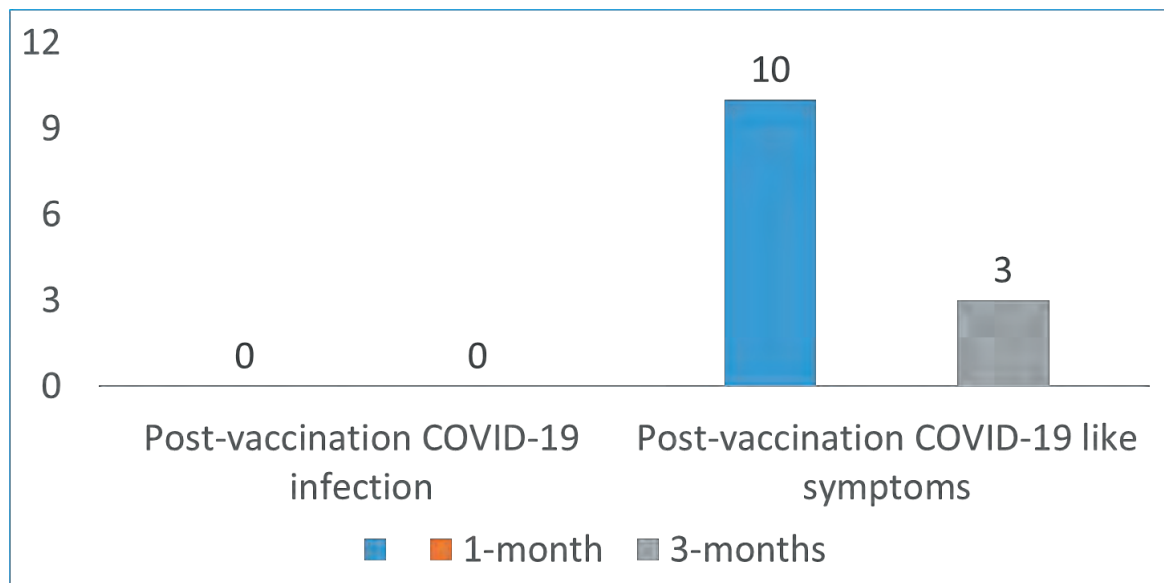


Figure 7. Protective efficacy of COVID-19 Moderna vaccine among Nepali children.
 *COVID-19 like illness was not tested for SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 Spike Protein IgG titers among children vaccinated with Moderna vaccine in Nepal (1-month post vaccination)

Out of the total vaccinees enrolled in this study, randomly selected 91 serum samples were analyzed for anti-SARS-CoV-2 Spike Protein IgG antibodies. This was pilot testing of the samples and the results are quite encouraging. More than 86% (86.2%) vaccinated children developed positive IgG antibody titers while the remaining 13.2% had no positive IgG antibody titers. One-month post-vaccination had a median (IQR) IgG antibody titer of 8.5 (5.0-10.3).

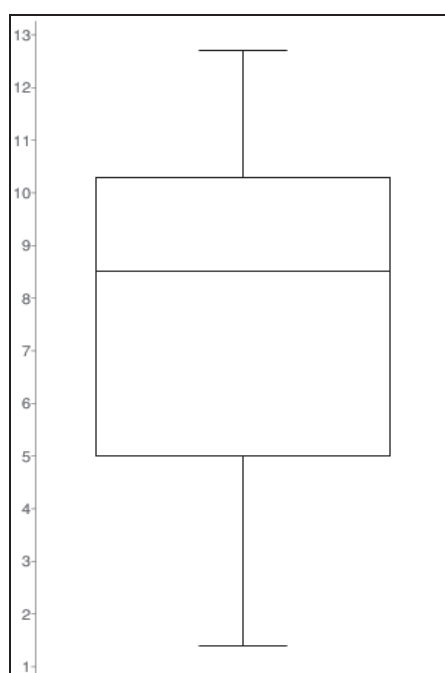


Figure 8. SARS-CoV-2 Spike Protein IgG titers among children vaccinated with Moderna vaccine (positive titer ≥ 3)

SARS-CoV-2 Spike Protein IgG titers in SARS-CoV-2 Natural infection (hospital cohort)

In the natural SARS-CoV-2 infected group, we analyzed the serum samples of 84 patients (44+40) for anti-SARS-CoV-2 Spike Protein IgG. Among these patients, only 33 (39.3%) patients developed positive IgG titers. Among these IgG positive patients, the median (IQR) IgG antibody titer was 5.8 (3.5-8.4).

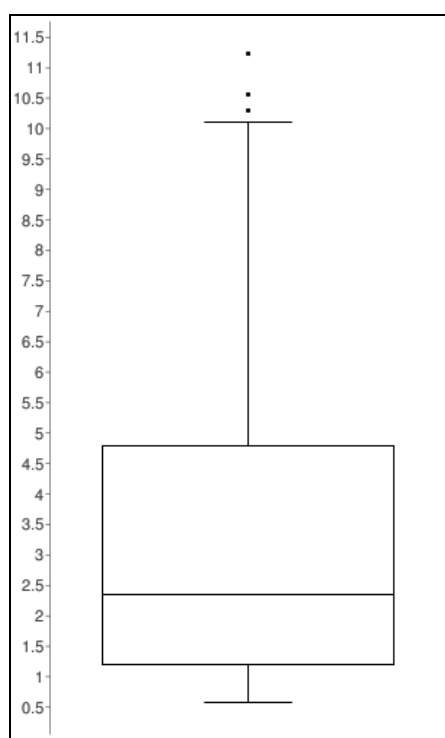


Figure 9. SARS-CoV-2 Spike Protein IgG titers in SARS-CoV-2 Natural infection

(3) Announcement of results

- Baseline information on the anti-SARS-CoV-2 Spike Protein IgG levels among vaccinated population and natural infection in Nepal explored, which demonstrated higher antibody response among vaccinees compared to naturally infected patients.
- Baseline information on the adverse events of COVID-19 vaccine (Moderna's mRNA based vaccine, Spyvax) in Nepali children explored.
- Baseline information on the protective efficacy of COVID-19 vaccine (Moderna's mRNA based vaccine, Spyvax) in Nepali children revealed

6 . Self-evaluation

Due to the mobility restriction (strict lockdown) and the vaccine shortage in the country, the project kick-off was delayed than expected. Therefore, for 2021, we were able to enroll pre-vaccinated children and follow up them for 1-month post vaccination. We were also able to recruit patients for natural infection. Despite this adverse situation, a total of 400 samples collected from the vaccine group (pre and post vaccination) and 100 from natural infection group. All the collected serum samples have been aliquoted and safely shipped (in cold condition) from the community/sentinel hospitals to the Central Department of Microbiology, Tribhuvan University (PI's home institution) and securely stored at -80C freezer.

Due to travel ban to Japan, PI could not visit Japan and bring NT assay kits purchased at NEKKEN. This also halted the shipping of specimens and only 200 samples could be delivered to NEKKEN virology for further analysis (100 each from vaccine and natural infection groups). NEKKEN virology is currently preparing for virus-culture based neutralization assay involving different variants, while we in Nepal are waiting for delivery of the NT kits from NEKKEN. Alternatively, PI is planning to visit NEKKEN with remaining samples and bring back the reagents to Nepal.

Serum samples will be transported to NEKKEN in a triple packaging system maintaining the cold chain by commercial shipping or by PI. These sera upon receipt at Virology-NEKKEN will be stored at -80°C until assayed for neutralizing antibody titers.

In the new continued Joint Research proposal accepted, the PI will visit NEKKEN with all the samples (including 3-months post-vaccination) to analyze anti-spike protein IgG and Neutralizing antibodies soon against the new variants, like Delta and Omicron soon.

To sum up, we have adequately recruited participants in both groups, and collected samples including on follow up to 3 months (6 months follow up will be completed this month), shipped to CDMi. Additionally, sent some samples (vaccine-1 months follow up and hospital-natural infection group) to NEKKEN for further analysis by ELISA (completed for delivered samples) and virus-culture based neutralizing antibody assay against different variants (ongoing at NEKKEN-Virology now). Nevertheless, we revealed the baseline antibody titers after vaccine as well as natural infection in Nepali population and evaluated adverse events after Moderna vaccine and its protective efficacy in Nepali children. We are sending rest samples soon for further analysis in NEKKEN for further analysis. Considering the mobility restriction and lockdown due to COVID-9 in Nepal and travel restriction to Japan from overseas (PI could not travel to NEKKEN), the amount of work completed is **adequately satisfactory** as per PI's evaluation.

7 . Attainment level (circle one of I to IV below)

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 (Important Note)**

Due to Lockdown, PI's travel restriction to Japan, and cold-shipping restriction of reagents from Japan.to Nepal, some results just obtained and yet to be analyzed.

Some glimpses of study (field)



Photograph 1: Participants recruitment and blood sample collection, Mithila municipality, Dhanusha



Photograph 2: Blood sample collected (before centrifugation)



Photograph 3: Serum preparation and aliquots in cryovials



Photograph 4: Transient sample storage at the local study site until transported to CDMi

令和3（2021）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：2021-Ippan-29

2. 代 表 者：藤田 秋一（鹿児島大学共同獣医学部・教授）

共 同 研 究 者：正谷 達膳（岐阜大学応用生物科学部・准教授）

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）

向達 汐美（鹿児島大学共同獣医学部・学生）

金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

3. 決 定 額：350 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 inner membrane complex、②原虫の細胞膜、③寄生胞膜、④マウレル裂、⑤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、通常の細胞生物学・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.*, Nature Protocol, 2010)。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、本技術をマラリア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する。

② 研究内容

前年度の研究により、マラリア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、単一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。

1) マラリア原虫感染赤血球レプリカの作成

液体窒素で冷却した銅板に *P. falciparum* 感染赤血球のペレットを押し当てることにより急速凍結する。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した *P. falciparum* を用意し、申請者らが訪問し、液体窒素によって急速凍結する。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) および白金 (Pt) を蒸着することにより *P. falciparum* 感染赤血球のレプリカ薄膜を作成する。

2) 脂質プローブを用いたマラリア原虫感染赤血球レプリカ薄膜の標識

前年度までに揃えた脂質プローブ (GM3, PtdIns(4)P および PtdIns(4,5)P₂ に対するもの) を順次、レプリカ薄膜を標識する。さらにこれらのプローブを金コロイド結合二次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、寄生胞膜および原虫細胞内の脂質構成とその局在についても解析する。

③ 予想される成果

マラリア原虫感染赤血球の細胞膜変化について、細胞膜構成成分の脂質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。赤血球細胞膜構成蛋白質の解析結果と合わせることで、細胞膜構造変化メカニズムの詳細を明らかにしていく上で大きな手がかりを提供しうる。さらに、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、knob などの異なる膜に、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と予想する。

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。

② 成果 (結果+考察)

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 および図 2)。その結果、GM3 分子は赤血球膜および寄生胞膜 (PV) の外葉 (EF) に局在していた。興味深いことに、GM3 分子は虫体細胞膜の内葉 (PF)・外葉 (EF) の双方に局在がみられた。通常の哺乳類細胞では細胞膜の外葉のみに局在が見られ、内葉には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 (Koudatsu et al. Sci. Report, 2021)。

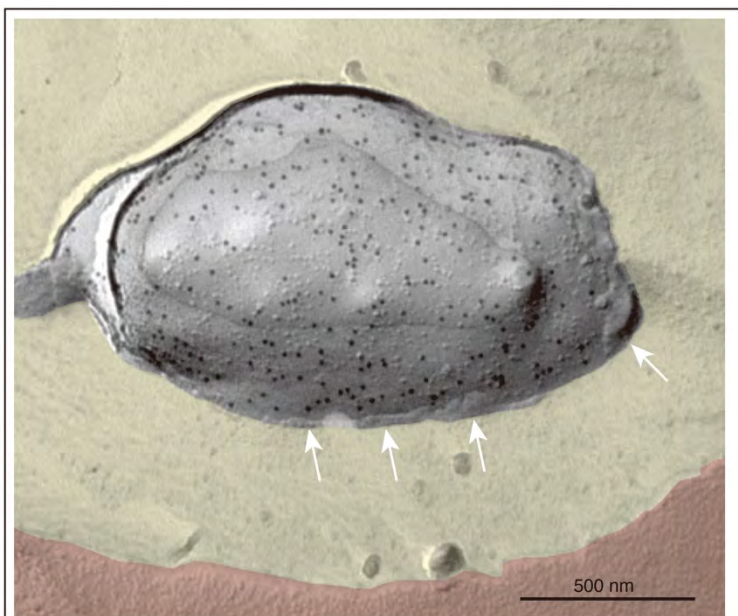
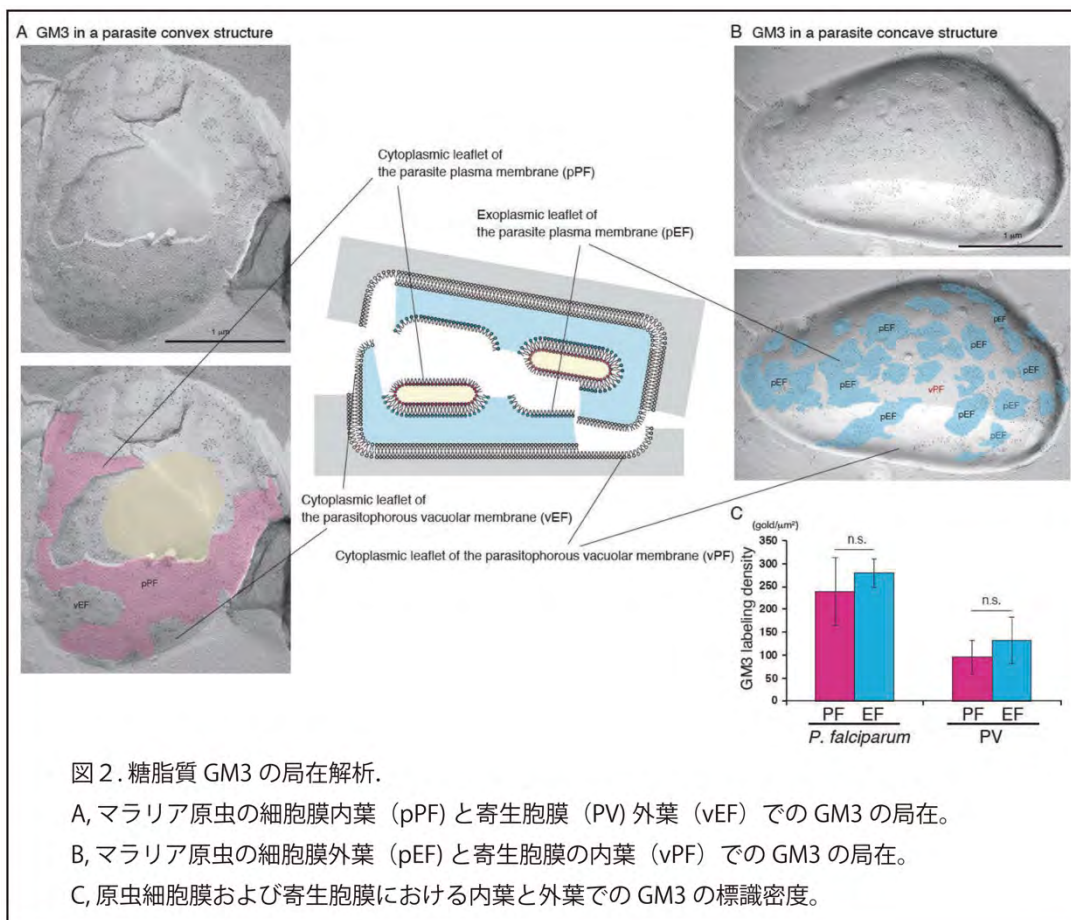


図 1. ヒト赤血球内に寄生するマラリア原虫における糖脂質 GM3 の局在
マラリア原虫において糖脂質の GM3 は細胞膜の内葉にも局在する。
矢印は寄生胞膜を示す。red: 赤血球の細胞膜, yellow: 赤血球の細胞質
Scale bar; 500 nm

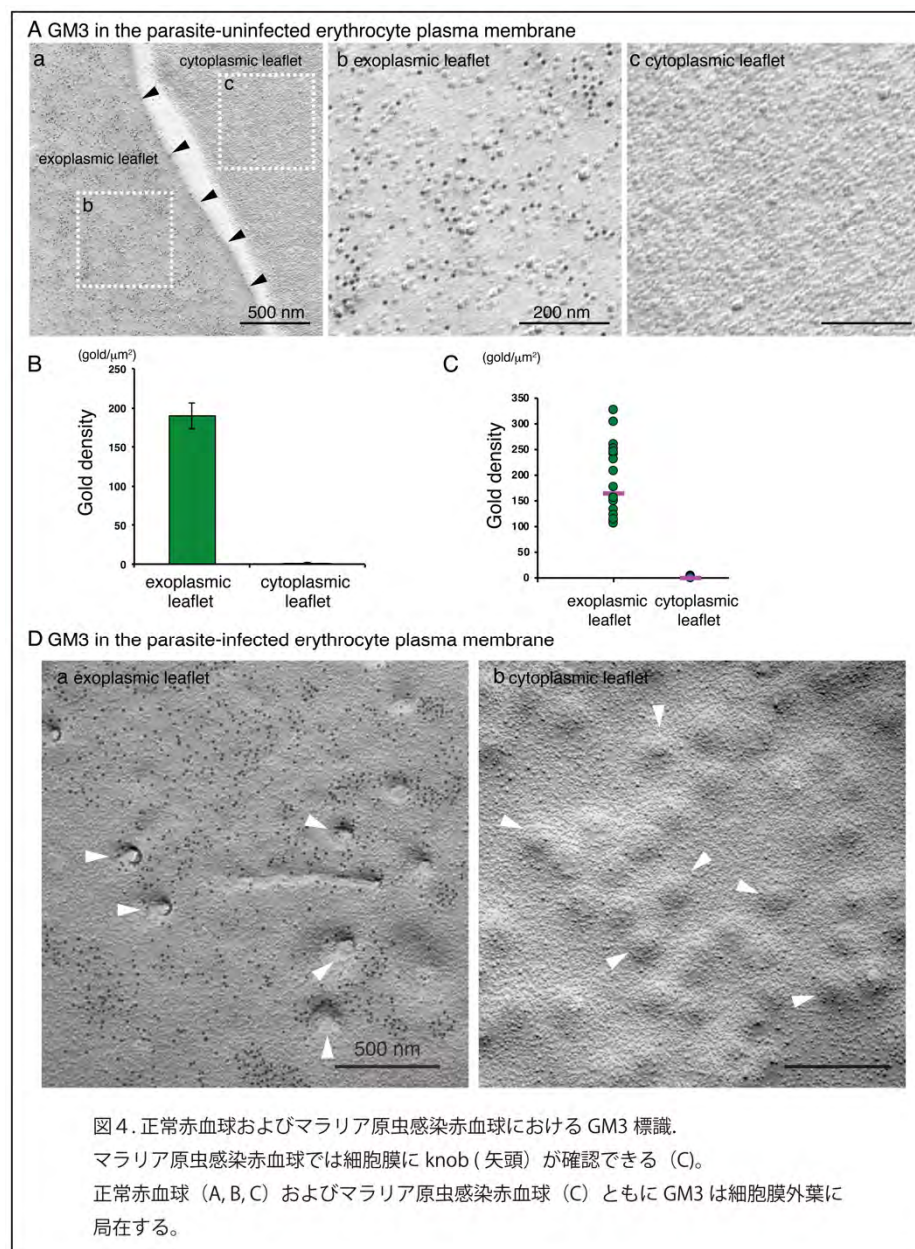
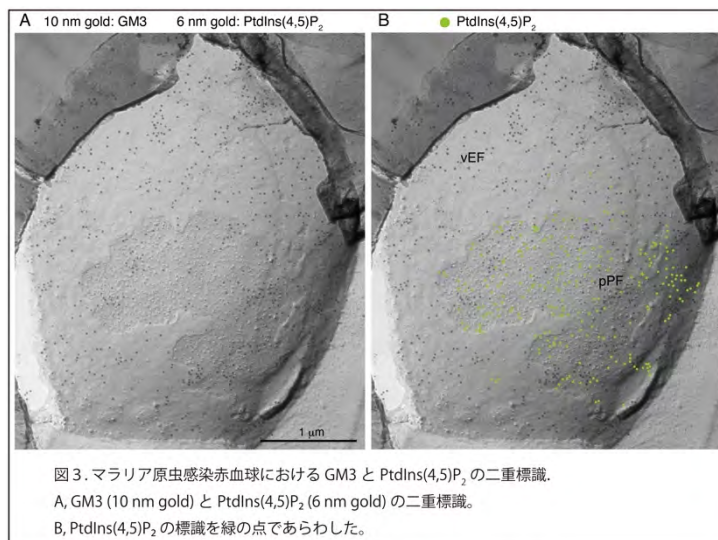
今後は、その形態の詳細がよくわかっている単離・精製したメロゾイトにおいてその微細構造と GM3 の局在を詳細に検討することによりラフトの役割を検討する。また、複雑な生活環を持つことが知られるマラリアの各ステージと比較するべきだと考えられる。

一方、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PtdIns(4)P) およびホスファチジ



ルイノシトール 4,5-ビスリン酸(PtdIns(4,5)P₂)はともにイノシトールリン脂質に分類される。PtdIns(4,5)P₂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。PtdIns(4)P は PtdIns(4,5)P₂ 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。その結果、PtdIns(4)P および PtdIns(4,5)P₂ はいずれも、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。GM3 と PtdIns(4,5)P₂ を二重標識したところ、2つの標識はマラリア原虫の細胞膜内葉 (pPF) で共局在した (図3)。このことから、マラリア原虫の細胞膜において GM3 は確かに細胞膜の内葉に局在することが確認できた。

また、正常赤血球とマラリア原虫感染赤血球 (図4) の細胞膜での GM3 の局在を比較した場合、両方ともに通常の細胞と同様に GM3 は内葉には存在せず、外葉のみに存在した。そして、マラリア原虫は GM3 の構成成分であるシアル酸を合成あるいは利用できないことから、宿主細胞である赤血球より GM3 を搾取し自らの生体膜の構成成分として利用していると考えられる。さらに、寄生胞膜およびマラリア原虫の細胞膜では GM3 は外葉と内葉に存在することより、赤血球より GM3 を搾取した後、寄生胞膜でフィリップ・フロップさせて配列させその後マラリア原虫の細胞膜成分としていることが示唆された。



③ 成果の公表

【論文】

Koudatsu, S., Masatani, T., Konishi, R., Asada, M., Hakimi, H., Kurokawa, Y., Tomioku, K., Kaneko, O., Fujita, A. Glycosphingolipid GM3 is localized in both exoplasmic and cytoplasmic leaflets of *Plasmodium falciparum* malaria parasite plasma membrane. **Sci. Rep.** 11, 14890, 2021. 10.1038/s41598-021-94037-3.

【学会発表】

向達汐美、正谷達膳、小西里可子、黒川夕奈、山口優希、富奥甘奈、福田佳代子、Hakimi Hassan、麻田正仁、金子修、藤田秋一
ヒト malaria 原虫 *Plasmodium falciparum* の細胞膜ではラフト主成分の糖脂質 GM3 は内葉と外葉の両方に局在する, 第 94 回 日本生化学大会, 2021 年 11 月 3 日

6. 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およびまん延防止等特別措置により、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、現在までに得られた解析結果をまとめ、2021 年度に論文投稿し掲載が決定された。

7. 達成度（何れかに○）

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略

2021 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Zika Virus Infection among Acute Febrile Illness Patients and Peri-natal Congenital Zika Virus Infection Screening Project in Upper Myanmar (2021-2022)

Project number : 2021 – Ippan – 30

- 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 (Associate Professor, Department of
Virology, Nagasaki University)

- 3 . Amount decided : 600,000 yen

- 4 . According to documents at time of application

- (1) Research objectives

Thus, this study aimed to identify in the clinical, virological, serological and molecular characteristics of pregnant women with confirmed or probable ZKV infection and AFI patients in Myanmar.

- (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 2021, 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. Moreover, unexpected situation was occurred in February 2021 in Myanmar and hospital shut down was occurred. There was no patients and doctors at study hospitals and we could not collect sample any more. But we performed Zika Virus and Dengue virus infection screening from acute febrile illness 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 TM 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 was sent to Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University and We did virus isolation using C6/36 mosquitoes cell lines and presence of Dengue, Zika infection by specific primers. Furthermore, serological tests of anti-DENV IgM and IgG Ab and anti-Zika IgM IgG Ab by Inhouse IgM and IgG ELISA. DENV genome testing from serum samples using Real time PCr were done and Zika Virus genome testing will continue. 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)

Based on the results done in Myanmar, 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.

According to the results done in Virology Department, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, anti-DENV IgM Ab was positive for 96 AFI patients and anti-Zika IgM Ab was positive for 69 patients. Regarding IgG Ab, anti-DENV IgG Ab was positive for 73 and anti-Zika IgG Ab was positive for 104 patients. Zika Virus genome testing from serum samples is ongoing. According to DENV genome testing using Real time PCR, 110 cases were positive for RT-PCR (25 DENV-1, 14 DENV-2, 28 DENV-3 and 43 DENV-4) respectively. Viral genome levels were high among DENV-1 and DENV-4 infected patients. Virus isolation was done using C6/35 cell lines was done and DENV and Zika Virus testing will be done soon.

(3) Announcement of results

In 2020, screening of Dengue and Zika infection was done from acute febrile illness patients 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 crises and unexpected situations 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 and zika virus infection by both serological and molecular methods. We will continue to check the Zika virus infection (virus isolation, genome testing, whole genome sequencing, etc) 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 (circle one of I to IV below)

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3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：タイムラプスイメージングによる *Babesia bovis* p200 の機能解析
課 題 番 号：2021-Ippan-31
2. 代 表 者：麻田 正仁（帯広畜産大学 原虫病研究センター・准教授）
共 同 研 究 者：金子 修（長崎大学 熱帯医学研究所・教授）
矢幡 一英（長崎大学 熱帯医学研究所・助教）
晴希生 ハッサン（帯広畜産大学 原虫病研究センター・特任研究員）
3. 決 定 額：500 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

マラリア原虫やトキソプラズマと同じアピコンプレクサ門に属する赤血球寄生性のバベシア原虫は、家畜のみならず、ヒトにもバベシア症を引き起こす。マラリア原虫やトキソプラズマでは TRAP 関連分子と呼ばれる一回膜貫通型の接着分子が外部基質に接着し、宿主細胞侵入過程において必須の役割を担うため、ワクチン標的抗原とされている。一方、バベシアも TRAP 関連分子を持ち、ワクチン標的となると考えられるが、複数の TRAP 関連分子を持つため、どれが宿主細胞侵入期に必須の分子か明らかではない。

申請者は近年、p200 と呼ぶ分子を TRAP 関連分子として新たに見出し、遺伝子ノックダウン実験により、同分子が赤血球期増殖に必須の役割を担っていることを明らかにし、本分子を標的とすることで原虫増殖が阻害できる可能性を見出した。そこで、本申請研究ではタイムラプスイメージング解析により、赤血球遊出・滑走・侵入の各ステップへの p200 の関与、および、p200 に対する抗体による阻害効果について詳細な検討を行うことを目的とする。

② 研究内容

I. メロゾイト赤血球侵入試験

p200 が赤血球遊出から侵入のステップに関わることを証明するため、メロゾイト侵入試験を行う。p200 ノックダウン原虫並びにコントロール原虫メロゾイトを感染赤血球から精製し、ウシ赤血球とインキュベートした後原虫感染率を測定する。

II. タイムラプス観察

赤血球遊出・滑走・侵入の各ステップへの p200 の関与についてタイムラプス観察を行う。p200 ノックダウン原虫並びにコントロール原虫について、メロゾイトが遊出するところからタイムラプスイメージングを行う。得られた動画について、解析を

行い、p200 ノックダウンにより影響するステップを明らかにする。本実験は矢幡博士から技術的な助言を得ながら進めるほか、状況に応じ必要な許可を得たうえで、組換え *B. bovis* を熱帯医学研究所に持ち込み、長崎大学-ニコン感染症イメージングコア・ラボラトリーにてタイムラプス解析することを予定している。

III. p200 に対する抗血清作製と中和試験

p200 に特異的な部分配列を組換えタンパク質として作製し、ウサギに免疫することで抗 p200 抗血清を作製する。得られた抗血清をバベシアメロゾイトとインキュベートした後、ウシ赤血球侵入試験、タイムラプスイメージング解析に供し、抗血清が中和能を持つことを明らかにする。

IV. 他アピコンプレクサ門原虫との比較考察

p200 遺伝子はウシのバベシア原虫数種に保存されているほか、ヒトにバベシア症を引き起こす *B. microti* にもオルソログとみられる遺伝子が存在する。一方で、マラリア原虫メロゾイトでは TSR ドメインを 1 つないし 2 つ持つ MTRAP と PTRAMP と呼ばれる 2 つの TRAP 関連分子が発現しているとされ、TSR ドメイン、vWF ドメインの双方を有する TRAP4 種に加え p200 が発現するバベシアとは様相が異なる。本研究で得られたデータを基に、熱帯医学研究所を訪問し、金子博士・矢幡博士とバベシア原虫、さらにはアピコンプレクサ門原虫が TRAP 関連分子をどのように進化させてきたのか考察を行う。

③ 予想される成果

本研究により、バベシアメロゾイトを対象としたワクチン抗原としての p200 の有用性が明らかとなるとともに、その作用起点を明らかにすることができる。また、マラリア原虫はバベシアと同じく赤血球寄生性でありながら、発現している TRAP 関連分子の数やドメイン構造は違っているため、アピコンプレクサ門原虫が TRAP 関連分子をどのように進化させてきたのか考察することが可能となり、同門原虫の宿主細胞侵入メカニズム理解が深まる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

B. bovis p200 遺伝子に glmS リボザイム配列及び Myc タグ配列を挿入した p200 ノックダウン原虫 (Bbp200KD) は本研究開始前に作製された。PCR とその後のシーケンスによる glmS、Myc タグ配列挿入の確認後、クローニングを行い、2 クローンを得た。得られた原虫を用い、間接蛍光抗体法を用い、p200 の局在を観察した。

その上で、p200 のノックダウンは培地中に 10 mM のグルコサミンを添加することによって行い、24 時間後にメロゾイトを精製し、ウエスタンブロッティングに供することで確認を行った。p200 ノックダウンの影響を解析するため、培地中に

10 mM のグルコサミンを添加し、原虫感染率を毎日測定した。

p200 ノックダウンによる原虫の滑走運動並びに侵入能への影響を解析するため、グルコサミン添加 24 時間後の感染赤血球からメロゾイトをフィルターにより精製し、赤血球侵入試験を行うと共に、*in vitro* 培養原虫を用い、共焦点レーザー顕微鏡にてタイムラプス解析を行った。

② 成果（結果＋考察）

クローニングによって得られた Bbp200KD 2 クローン (Tg1, Tg2) について再度 PCR を行い、g1mS、Myc タグ配列、さらに薬剤選択マーカーが挿入されていることを確認した。

抗 Myc 抗体を用いた間接蛍光抗体法により p200 の局在を解析した結果、メロゾイトのアピカル端側に局在が観察された。アピコンプレクサ原虫において一般的に TRAP 関連分子はミクロネームへの局在が知られているため、p200 もミクロネームに局在している可能性が考えられる。

p200 のノックダウンを確認するため Tg1, Tg2 培養液中にグルコサミンを添加し、24 時間後のサンプルをウエスタンブロッティングに供した。抗 Myc 抗体にて p200 を検出した所、予想通り 200 KDa 付近に単一バンドが検出され、ノックダウンを誘導したサンプルではバンドシグナルの低下が見られた (図 1)。本実験を 3 回繰り返し、SBP4 をコントロールとしてバンド濃度の相対定量解析を行ったところ、Tg1, Tg2 とともに平均約 80% の低下が確認され、p200 のノックダウンが確認された。

次に、p200 ノックダウンによる表現型を解析するため、Tg1, Tg2 原虫をグルコサミン存在下で *in vitro*

培養し、原虫感染率を測定した。コントロールとして、グルコサミンを投与していない群では原虫の増殖が見られたのに対し、ノックダウン (グルコサミン投与) 群では、投与 1 日後では原虫感染率の増加は殆ど見られず、2 日目以降は感染率が 0.05% 以下となった (図 2)。

図1. ウエスタンブロッティングによるp200ノックダウンの確認。

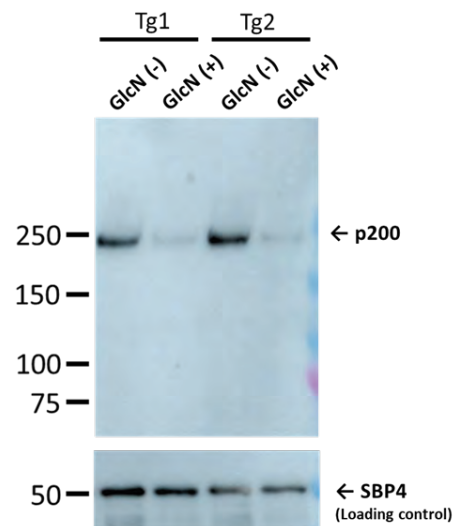
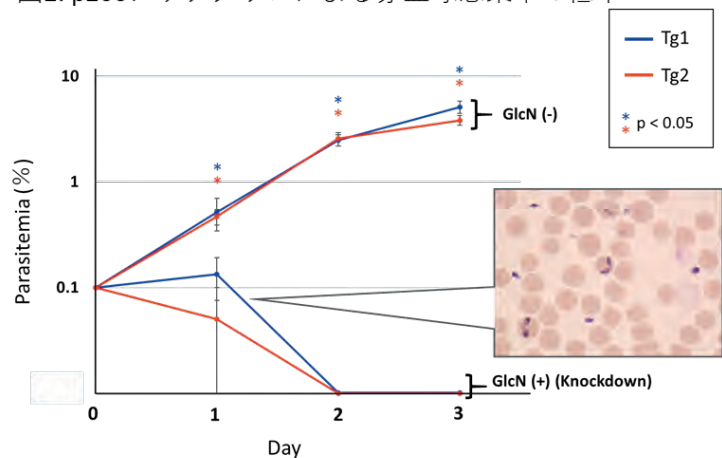


図2. p200ノックダウンによる赤血球感染率の低下



また、ギムザ染色像を観察すると、赤血球外メロゾイトが観察され、メロゾイトの滑走運動や赤血球侵入に影響が出ていることが示唆された。

そこで、精製メロゾイトを使用した赤血球侵入試験を行った。24 時間グルコサミン存在下で培養し、メロゾイトを精製、その後メロゾイト：非感染赤血球が 1:10 となるよう混和の上 1 時間インキュベートし、原虫感染率を測定した。その結果、コントロール群では感染率が 3.0% になったのに対し、ノックダウン群では 1.3% と有意な感染率の低下が見られ、p200 がメロゾイトの赤血球侵入に関わることが明らかとなった (図 3)。また、タイムラプス画像解析を行ったところ、メロゾイトが赤血球より遊出した後、新規赤血球に到達することなく滑走運動を停止するような映像や、赤血球膜が破裂した後、メロゾイトが赤血球外に遊出できないような映像が観察された (図 4)。現在もタイムラプスイメージングと定量的な解析を進めている所である。

図3. p200ノックダウンによる赤血球侵入能の低下

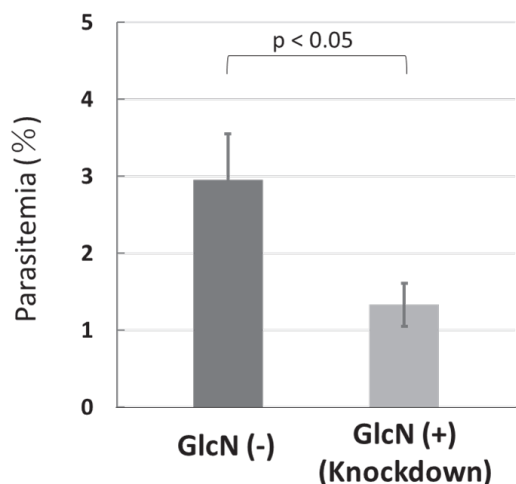
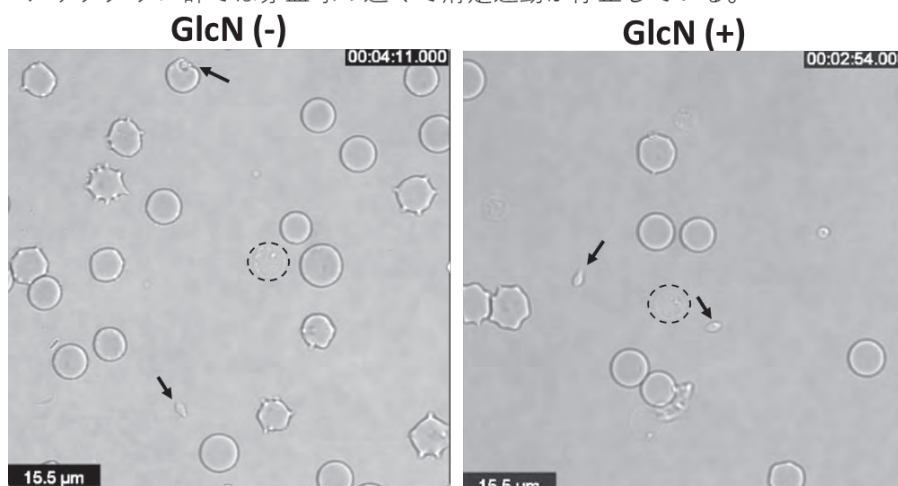


図4. タイムラプス解析像。コントロール群ではメロゾイト(矢印)が遊出した赤血球(点線)から離れた位置まで滑走し、活発に侵入を試みるのに対し、ノックダウン群では赤血球の近くで滑走運動が停止している。



③ 成果の公表

原著論文：

論文準備中

学会発表：

[1] 麻田 正仁、晴希生 ハッサン、金子 修、河津 信一郎. 牛バベシア TRAP 関連分子 p200 は赤血球期増殖に重要な役割を担う. 第 164 回日本獣医学会学術集

会． 2021 年 9 月 (オンライン開催)

6. 自己評価

本研究により、研究代表者が熱帯医学研究所在籍時に見出した p200 がバベシアの滑走運動-赤血球侵入に関わることが初めて明らかとなった。アピコンプレクサ門原虫の TRAP 関連分子は滑走運動や宿主細胞への侵入に重要な役割を持っているとされ、本研究からバベシアも例外でないことが明らかとなった。一方で、これまで代表者は他の 4 つの TRAP 関連分子について遺伝子ノックアウトを行ったが有意な表現型をえることができなかったため、これら 4 つの分子と p200 がどのような機能的な違いを持っているのかは今後の課題である。また、p200 は遺伝子配列の中間部分にリピート配列を持っており、リピート部分以外を用いて検索しても、マラリア原虫の持つ TRAP 関連遺伝子のオルソログは検出されない。同じアピコンプレクサ門の赤血球寄生原虫としてそれぞれの原虫が独自に TRAP 関連分子を進化させて言った点は興味深い。

一方、本研究ではコロナ禍の長期化により長崎大学を訪問する機会に恵まれず、共同研究者(矢幡博士、晴希生博士)の異動が重なり、タイムラプス解析の実施や、中和抗体の作製と阻害実験に関しては当初計画していたほど実験が進まなかった点は不満が残る点である。

7. 達成度 (何れかに○)

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い)

自己評価の通り、p200 がバベシアの滑走運動-赤血球侵入に関わることを初めて明らかにすることができたが、一部計画していた実験まで到達できず、また、熱帯医学研究所への訪問が実現できなかったため。

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯病に対する新薬開発を指向した微生物二次代謝産物の網羅的探索
課 題 番 号：2021-Ippan-32
2. 代 表 者：広島大学大学院統合生命科学研究科・准教授・荒川賢治
共 同 研 究 者：広島大学大学院統合生命科学研究科・特任助教・藤村孝志
広島大学大学院統合生命科学研究科・研究員・手島愛子
広島大学大学院統合生命科学研究科・研究員（学部4年生）・平田朝陽
長崎大学熱帯医学研究所・准教授・水上修作
長崎大学熱帯医学研究所・教授・平山謙二
長崎大学熱帯医学研究所・准教授・稲岡健ダニエル
長崎大学熱帯医学研究所・特任研究員・Awet Alem Teklemichael
長崎大学熱帯医学研究所・技能補佐員・谷口真由美
長崎大学熱帯医学研究所・大学院生・田山雄基

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

微生物は顕著な生理活性作用をもつ天然有機化合物の宝庫であるが、新規化合物の報告例は年々減少傾向にあり、耐性菌対策なども含め、我々の健康長寿の維持増進に資するためには、生物資源の持続的拡大が必要不可欠である。

生物資源の持続的拡大に際し、必要不可欠な目標は「いかに新規骨格を有する未知生理活性物質を獲得できるか」となる。多様な生理活性物質を生産する土壌微生物・放線菌も例外に漏れず、単離報告例は頭打ちになっている。放線菌は1株あたり30種類以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有するが、通常培養条件で発酵生産が認められるのは1-2割程度であるため、約8割はゲノムの中に「埋もれている」といえる。本研究では、その眠った生物資源の覚醒技法（ゲノムマイニングと呼ばれる）の確立を目指し、シグナル分子の代謝誘導系を利用した天然物探索法の開発を提案する。

さらに本共同研究では、放線菌二次代謝産物ライブラリーの徹底的利活用による新たな感染症制御分子の創出を目指す。シャーガス病及び熱帯熱マラリアを対象疾患とし、放線菌二次代謝産物ライブラリーのトリパノソーマ原虫・熱帯熱マラリア原虫に対する生物活性試験を遂行し、新薬創出につながるような知見の獲得を目指す。

② 研究内容

【課題1】SRB型シグナル分子による休眠二次代謝遺伝子の発現誘導

シグナル分子は二次代謝生産における重要な鍵物質であるにもかかわらず、ほと

んどの菌株において構造不明（12 菌株 23 種類の報告例のみ）であり、汎用性誘導因子としての分子基盤が未整備である。そこで、**二次代謝誘導におけるシグナル分子 SRB の汎用性**を見いだすべく、各種単離株もしくは分離前の菌叢に対して SRB を添加し、非添加サンプルとの TLC および HPLC の比較解析を行う。添加有無による代謝プロファイル変化が見られた場合、代謝産物の構造解析に着手する。これにより、**誘導分子存在下でのみ生産しうる二次代謝産物の獲得**が期待できる。

[課題 2] 熱帯由来感染症を指標にした新規感染症治療薬の探索および開発

課題 1 にて得られる二次代謝産物ライブラリーを用い、新たな抗トリパノソーマ薬・抗マラリア薬探索のための**感染症治療薬スクリーニング**を行う。なお本研究では、顧みられない熱帯病 (NTD) に含まれており治療薬も少ない 抗トリパノソーマ薬の探索を優先して 1 年目に行う。熱帯病感染制御分子の網羅的スクリーニング遂行に際しては、熱帯病に習熟した研究者との**共同研究体制が必要不可欠**である。対応教員をはじめとした、熱帯医学研究所に所属する本研究参加者は、これまでに対象疾患に関連した多くの創薬研究を行ってきており、本課題における共同研究者に適任である。

具体的には、課題 1 にて調製した放線菌二次代謝産物ライブラリーをトリパノソーマ原虫を感染させたマウス心筋細胞に添加培養することにより、細胞内に潜伏する**アマスティゴート型原虫に対する抗原虫活性**を評価する。事前にマウス心筋細胞の培養抽出物に対する 50%生存率 (CC50) を評価することで、活性評価物質の動物細胞毒性を抗原虫活性と明確に区別すべく予備実験を実施する。本研究の実験には、ルシフェラーゼ発現原虫を用いる。培養抽出物処理後に、ルシフェラーゼに対する基質を含む溶解バッファーを用いた原虫破碎とルシフェラーゼ活性測定を行う。その結果を陽性・陰性コントロールと比較し、原虫阻害率を計算する。まずは一定濃度での検討を行い、阻害率が高かった抽出物に関しては、50%阻害率 (IC50) の決定を行う。2 年目は、課題 1 にて二次代謝ライブラリーの構築を進めるとともに、課題 2 においては、熱帯熱マラリア原虫に対する活性の検討を行う予定である。

③ 予想される成果

生物資源の遺伝情報の中には**眠った医薬シーズの存在**が示唆され、健康長寿や農林水産業、環境保全など「持続可能な開発目標 (SDGs)」への還元が期待される。本研究では「シグナル分子 SRB の添加有無」の比較プロファイル解析に焦点を当てるため、**通常培養非生産の休眠二次代謝産物の検出と生物活性評価**が可能となる。新薬の開発本手法は、シグナル分子の系外からの添加に基づくため、遺伝子組換えを要しない二次代謝誘導システムである。このことは、屋外（開放系）試験が非制限であることを示しており、海外を含めた大規模利用が可能である。なお、課題 1 「**シグナル分子による代謝活性化**」に用いる SRB は、我々が世界で初めて見いだしたブテノライド型シグナル分子であり、従来のシグナル分子（図 1）と構造が異なる。我々は、SRB に関する構造特性や生化学的性質、さらに誘導体を含めた合成経路を確立しており、他グループの追従を許していない。将来的には、**微生物分離源の開拓**にて

新規性の高い放線菌群を単離し、それらの休眠二次代謝の活性化を組み合わせる、という相乗効果により、新規化合物獲得の可能性が指数関数的に増強できる。その結果、課題2にて新薬候補となる抗原虫活性を有する新規化合物が見いだされることが大いに期待できる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

研究材料

- ・広島大学菌株保存施設(HUT)保存株を中心とした *Streptomyces* 属放線菌 67 株
- ・シグナル分子 SRB の誘導体 C8-SRB (図1)

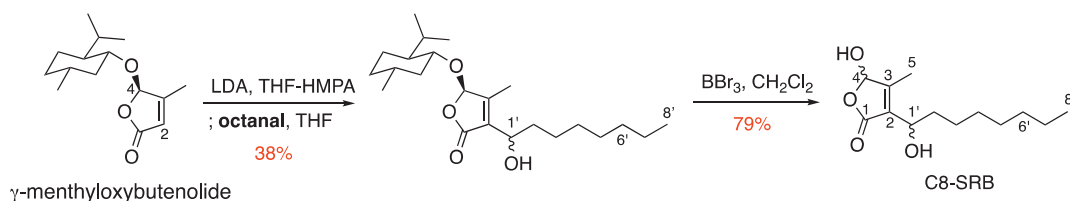


図1. C8-SRB の合成スキーム

活性試験

- ・抗マラリア活性試験
- ・細胞傷害性試験

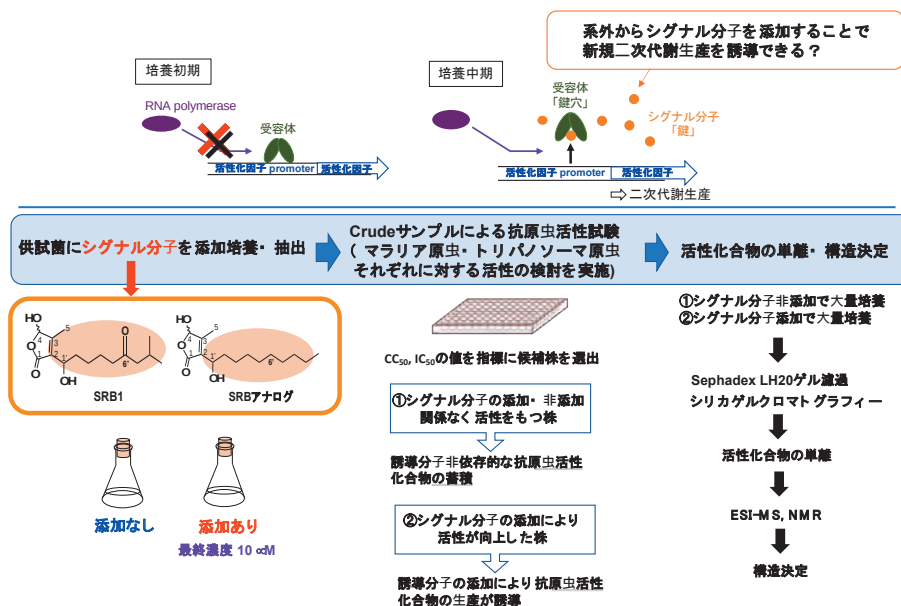


図2. 本研究のアウトライン

② 成果 (結果 + 考察)

67 株の *Streptomyces* 属放線菌について、C8-SRB 添加 (最終濃度 100 μg/ml) およ

び非添加の振盪培養を 28 °C で 3 日間行い、培養上清を同量の酢酸エチルにて抽出した。得られた抽出サンプル（計 134 サンプル）について、抗マラリア活性試験および細胞傷害性試験に賦したところ、34 サンプルにおいて顕著な抗マラリア活性を呈し、なおかつ細胞傷害性を示さなかったため、抗マラリア薬候補として期待できる。また、9 株の SRB 添加サンプルにおいて、抗マラリア活性に顕著な差異が認められた。このことは、SRB 型シグナル分子による代謝誘導が生じていることを示している（表 1）。

Table 1. Summary of antimalarial and cytotoxicity assay

% Inhibition against 3D7 and cell viability using AMB cells. Extraxt #1-134											
# % Inh. % Cell Viable			# % Inh. % Cell Viable			# % Inh. % Cell Viable			# % Inh. % Cell Viable		
1	51.6	109.07	35	88.7	4.38	69	86.4	5.09	103	20	91.37
2	35.6	106.86	36	78.8	3.43	70	87.5	6.53	104	44.4	96.74
3	57.4	108.34	37	82.1	63.27	71	88.8	24.44	105	86.6	70.80
4	34.5	106.91	38	82.9	54.00	72	88.8	27.64	106	32.5	95.02
5	79.5	106.95	39	80.2	107.41	73	87.7	19.01	107	88.6	14.20
6	84.6	104.76	40	80.9	104.36	74	89.4	21.47	108	88.1	11.79
7	32.6	104.10	41	68.2	98.73	75	94.5	3.54	109	83.5	3.36
8	18.5	102.62	42	29.8	104.70	76	91.8	4.42	110	84.2	2.94
9	14.5	105.55	43	4.1	101.58	77	28.1	77.25	111	72.2	87.32
10	24.3	100.48	44	68.2	102.54	78	11.5	99.26	112	83	6.52
11	77.9	3.87	45	34.8	100.07	79	23.4	77.87	113	58.9	3.03
12	79.3	3.48	46	54	102.17	80	11.4	95.80	114	56.2	2.61
13	81.5	3.95	47	11.5	98.55	81	20.1	55.57	115	19.6	3.16
14	44.7	4.50	48	49.7	100.73	82	60.6	64.27	116	26.2	6.03
15	81.5	41.85	49	85.8	95.72	83	33.8	94.75	117	-6.7	93.80
16	59.9	100.48	50	82.6	93.90	84	26.6	92.66	118	81.1	93.53
17	29	106.65	51	46	100.16	85	23.9	94.10	119	81.2	90.71
18	28.4	101.08	52	9.4	98.81	86	14.6	94.07	120	62.2	95.15
19	29.8	102.09	53	48.9	81.63	87	86.8	85.46	121	55.5	95.73
20	42	100.83	54	63.8	99.49	88	70.5	43.10	122	79.4	92.55
21	87.5	108.15	55	85.4	8.14	89	5.9	93.61	123	74.2	86.82
22	88.1	104.34	56	88.8	15.88	90	4.9	103.56	124	77.8	67.10
23	85.4	33.38	57	2.68	105.15	91	32.8	97.24	125	87	3.45
24	80.3	54.42	58	2.4	104.59	92	12.5	100.19	126	87.2	2.79
25	76.8	4.34	59	90.9	17.00	93	10.5	94.38	127	82.2	1.78
26	73.8	2.38	60	89.1	16.20	94	86.9	81.74	128	87.1	4.12
27	91	1.51	61	17.4	99.64	95	88.7	1.40	129	14.9	103.51
28	90.1	12.47	62	13.4	99.45	96	84.1	1.77	130	1.4	101.76
29	92.1	20.51	63	89.2	25.25	97	62.7	94.05	131	24	96.46
30	91.3	20.91	64	88.2	17.54	98	83	1.39	132	12.4	97.62
31	28.3	4.78	65	60.4	41.19	99	18.4	94.95	133	84.4	79.37
32	75.6	8.88	66	25.4	83.72	100	11.9	93.57	134	83.8	86.78
33	86.4	103.40	67	31.3	98.47	101	24.5	92.55			
34	84.7	101.64	68	20.3	92.06	102	44.2	103.19			

The results are average of two independent experiments in duplicate

誘導分子非依存的抗マラリア原虫活性化化合物の獲得を目指し、 $IC_{50} < 10 \mu M$ を呈する株のうち、2 株について大量培養実験を行っている。

③ 成果の公表

現在は論文公表および学会発表は行っていない。上述の 2 株において構造決定などを完了し、その後成果公表を行っていく予定である。

6. 自己評価

総計 134 サンプルについて、抗マラリア原虫活性を免疫病態制御学分野にて測定し、放線菌サンプルに顕著な活性があることを見いだすことが出来、改めて放線菌の生物資源としての有用性を再確認することが出来た。本共同研究の遂行は、両研究グループ・両機関の研究アクティビティの強化のみでなく、医薬品探索の面でも有意義なものであったものと確信している。成果のところには、測定したサンプル数のみ記載しているが、これは実験結果が知財性を有する可能性が有ることからであり、2022 年度の共同研究で活性化合物の構造決定を達成し、活性新規（構造新規であればなおよい）をデータベースにより確認し、論文公表および学会発表にこぎ着け、さらにトリパノソーマに対する活性検討を行う予定である。

7. 達成度（何れかに○）

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3（2021）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： 2021-Ippan-33
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）
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）
早川 碧（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）
王 志超（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）
小川 順也（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）
矢嶋 三央奈（広島大学 大学院医系科学研究科 大学院生）
菅沼 啓輔（帯広畜産大学原虫病研究センター 助教）
3. 決 定 額： 300 千円
4. 申請時書類より
 - ① 研究目的
WHO はマラリアなどの三大感染症や 18 種の Neglected Tropical Diseases (NTDs) を制圧すべき疾患として重要視している。当研究室では、亜熱帯・熱帯植物から種々の活性化合物の探索研究を行っているが、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は最も重要な標的と考えている。そこで、我々が天然から単離した化合物について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、医薬品のシード（種）の発見につながり、マラリア感染症の制御に大きな役割を果たすことになる。本研究では、熱研との共同研究によって新規の抗マラリア活性物質を発見することを目的としている。
 - ② 研究内容
 1. 2021 年度 (R3) は最終年度になるため、研究成果の発表を急ぐ。
 2. また、継続して化合物の分離・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（広島大）。
 3. 得られた化合物について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を行い医薬品シードとなる化合物を見出す（長崎大熱研）。

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や薬学的有用性が明らかになり天然物化学分野の発展に大きな寄与となる。また、単離・精製した化合物から、これまでに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創薬展開につなげることが予想され、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。

マラリアの年間罹患者数は2億人を超え、また40万人以上が死亡している。現在の主な感染地帯は東南アジア・アフリカ・中南米などの亜熱帯・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重要な役割を果たすことができる。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

本研究ではキク科植物であるモクビャッコウ (*Crossostephium chinense*) を研究材料とし、その葉部について含有成分の化学構造と活性評価を行った。まず、含有される化学成分を冷浸法にてMeOHで抽出した。得られたMeOH抽出物からMeOHを留去したのち、極性の異なる溶媒間で分配抽出操作を行い、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水可溶画分を得た。ここで得られた画分のうち、一般的に生物活性成分が多く含まれるとされる酢酸エチル可溶画分についてさらに分離精製を進めることとした。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 Avance500)、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。

また、マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対する活性評価はSYBR Green法にて、熱帯研にして実施した。

② 成果 (結果+考察)

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21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決定し、3種の新規化合物 (1-3) と18種の既知化合物 (4-21) を得た (化学構造式は未発表のため割愛)。

次に、得られた化合物についてマラリア原虫に対して活性を評価したところ、化合物 2, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21 に100μg/mlの終濃度で強い活性が見られたことから、本研究で単離した化合物は有望な医薬品リード化合物になる可能性が示唆された (図1)。

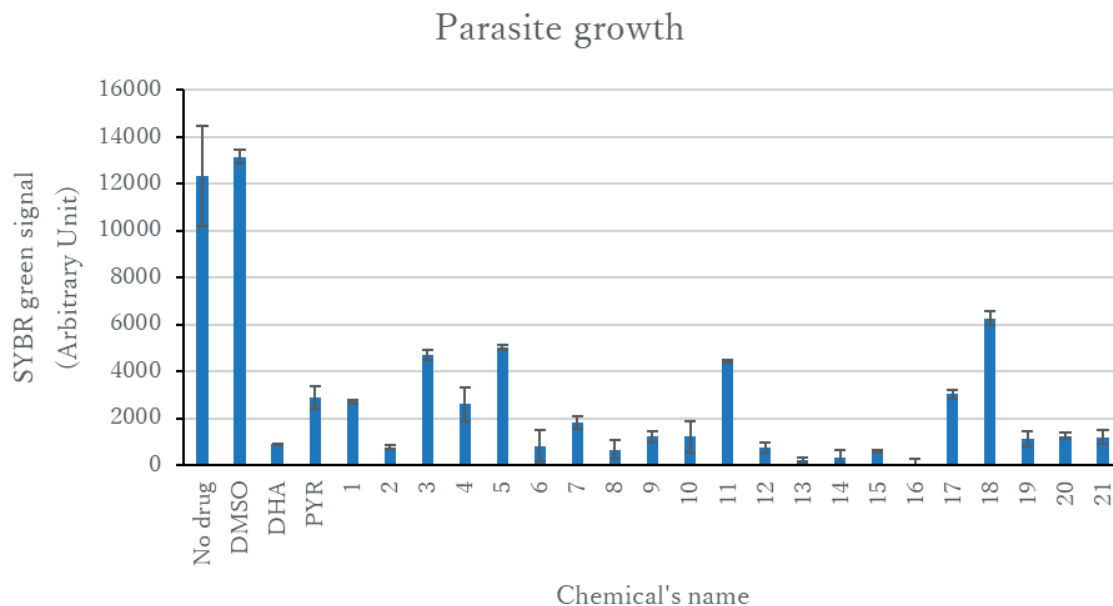


図 1 単離化合物のマラリア原虫 (*P. falciparum*) に対する増殖抑制活性

③ 成果の公表

Two new cytotoxic sesquiterpene-amino acid conjugates and a coumarin glucoside from *Crossostephium chinense*

Zhichao Wang, Ben-Yeddy Abel Chitama, Keisuke Suganuma, Kazuhide Yahata, Sachiko Sugimoto, Yoshi Yamano, Susumu Kawakami, Midori Hayakawa, Junya Ogawa, Miona Yajima, Osamu Kaneko, Hideaki Otsuka and Katsuyoshi Matsunami (in preparation)

6. 自己評価

本共同研究は国際学術論文の投稿がほぼできるところまで進展した。今後は、残る活性試験の一部のデータについて補足実験を行い、学術論文の完成を目指す。本研究では新規化合物 **2** を含め複数の化合物に活性を見出した。研究目標に上げた新規活性化合物の発見に成功していることから、達成度は以下のように III とした。

以上のように、熱帯研共同研究者（金子 修 教授）と連携して進めてきた共同研究により、実りある成果を生み出すことができた。今後も活性評価に関してはご指導いただけると伺っており、双方にとって有益な共同研究を持続発展できる環境が整えられたことも本共同研究の大きな成果と考えている。

5. 達成度（何れかに○）

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 3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：人獣共通病原性の緑藻類 *Prototheca* 属保存株の再同定
課 題 番 号：2021-Ippan-34
2. 代 表 者：伴 さやか（千葉大学真菌医学研究センター・助教）
共 同 研 究 者：Alim Ikerum（千葉大学真菌医学研究センター・博士課程後期）
金子 修（長崎大学熱帯医学研究所・原虫学分野・教授）
風間 真（長崎大学熱帯医学研究所・生物資源室・助教）
3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

プロトテカ属の藻類は、植物界に位置するがクロロフィルを失った生物群である。光合成能は喪失しており、土壌や汚水中の有機物を摂取するほか、ウシ、ネコ、家畜などに感染して栄養を得て、プロトテカ症を引き起こすことがある。ヒトに対しても一般に病原性は弱い、自然界に広く存在しているため暴露の機会も多く、免疫抑制が低下している場合に外傷などから感染して発症に到ることがある。臨床的には肉芽腫、水疱や潰瘍など多様な病変を形成し、感染部位から皮膚・皮下型、関節囊・滑膜型、全身型に大別される。生検組織をサブロー・デキストロース寒天培地等に塗布すると発育し、一般的な酵母と非常によく似たコロニーを形成し、顕微鏡観察では緑色でないことを除けばクロレラとよく似た孢子嚢と内生型の孢子を認める。プロトテカ症は性状解析が進まず、長らく創薬研究も進展が見られていない。有効的な治療薬はなく、抗真菌剤のケトラコナゾール、イトラコナゾール、フルコナゾール、アムホテリシン B やリボソーマル・アムホテリシン B や温熱療法などによる対処療法が行われている¹⁾。

現在、本属は 26 種、そのうち *Prototheca blaschkeae*, *P. bovis*, *P. cookei*, *P. cutis*, *P. miyajii*, *P. wickerhami* 及び *P. zopfii* がヒトのプロトテカ症患者の皮膚組織等から分離されている。主に *P. wickerhami* と *P. zopfii* が病原性を有することが知られている。2019 年に、本属の大幅な分類体系の見直しがあり、9 つの種が新種として追加または修正された²⁾。このうち 2 新種はヒトに対する病原性の評価は十分でない：*P. cookei* はそれまで *P. zopfii* と同定されていた菌株を含んだ系統群、*P. bovis* はウシの症状からの分離株により新種報告がされているが、系統的に *P. zopfii* と近縁である。また、*P. wickerhami* では 1 つの分離株間において rRNA-ITS1/2 及び LSU 遺伝子の多型が著しいが、それらは病原性を含む表現型ではなくの有無よりは、分布地域と関連性に依存することが報告されている³⁾。一方、ウシの乳房炎の原因種として最も検出される頻出な *P. zopfii* には、病原性の有無が

異なる 2 つの rRNA-SSU の遺伝型が報告されている⁴⁾。プロトテカ症が治療困難となる理由は、有効な薬剤の開発が十分でないことに加えて、酵母や細菌による感染症と誤診されて無効な治療を続けてしまうことも挙げられている。分類学的な種の指標遺伝子として、1 株内の多型がないチトクローム b 遺伝子 (*cytB*) が用いられるようになったが、病理診断に有効な同定方法の開発も求められる。

上述したように、2019 年に分類体系が大きく更新されたことを受け、ヒト由来の分離株の種同定を見直し、病原性のある種と非病原性の種を疫学的に整理する必要があることに加え、効率の良い同定手法を（再）開発することも必要である。そこで、本研究では、国内外に保存されている分離株を取り寄せ、種の同定、株間の分子系統解析、病原性と遺伝子型の関係性、培養性状の比較、薬剤感受性試験等を実施することで、プロトテカ症の治療に役立つ基礎情報の収集を目的とする。

文献

- 1) 上田美怜, & 芝岡美枝. (2017). 無葉緑素藻類による難治性皮膚潰瘍：皮膚・皮下型プロトテカシスの 1 例. 創傷, 8, : 27-32.
- 2) Jagielski, T. et al. (2019). The genus *Prototheca* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research*, 43. doi:10.1016/j.algal.2019.101639
- 3) Hirose, N. et al. (2013). Ribosomal internal transcribed spacer of *Prototheca wickerhamii* has characteristic structure useful for identification and genotyping. *PLoS One*, 8, e81223. doi:10.1371/journal.pone.0081223
- 4) Moller, A., Truyen, U., & Roesler, U. (2007). *Prototheca zopfii* genotype 2: the causative agent of bovine protothecal mastitis? *Vet Microbiol*, 120, 370-374. doi:10.1016/j.vetmic.2006.10.039

② 研究内容

1) 分離株の収集

千葉大学真菌医学研究センターには保存されていない種を蒐集するため、国内外の系統保存施設である理化学研究所微生物材料開発室(JCM)、製品評価技術基盤機構(NBRC)、American Type Culture Collection(ATCC)等から本属の株を購入する。

2) 複数の分類学指標遺伝子による遺伝型解析

cytB を含む複数の one copy house-keeping 遺伝子 (RNA ポリメラーゼ 1 及び 2, 伸長因子, β -チューブリン) を解読し、分離株間の分子系統解析を行い、まずは分離保存株の再同定を行う。過去に報告された rRNA 遺伝子による遺伝型と *cytB* による種分類の関連を精査する。

3) 抗真菌剤及びそれ以外の化合物に対する感受性試験

対照区として主要な抗真菌剤の最小生育阻止濃度 (MIC) を計測するとともに、藻類に効果的な新たな物質がないかスクリーニングを試みる。スクリーニングの対象は東京大学創薬機構化合物ライブラリーを想定している。

4) 迅速同定用の MALDI-TOF MS ライブラリーの構築

MALDI-TOF MS を用いた微生物の総タンパク質の解析し、得られる波形のパターンマ

ッティングによる識別方法が開発された。培養検体コロニーをサンプルプレートに塗布して数分で結果を得ることができるため、現在、当該システムは日本国内で 200 以上の施設に導入され、今後も普及が進むと考えられる。臨床現場においても、主要な病原性細菌と酵母の識別に使われる機会が増えた。しかし、真菌、特に糸状菌は結果の不安定さが細菌や酵母よりも大きく、ライブラリーも充実していないことから、現場での実装までに至っていない。

既存の同定用のライブラリーに搭載されている本属種は 1 種 *P. wickerhami* 1 株のみである (Bruker Biotyper 糸状菌ライブラリー version 3.0)。より多くの保存株のタンパク質マスペクトラを解析、データを精査し、ライブラリー化して公開することにより、本法を用いた迅速同定に貢献する。将来的に、例えば現場で酵母として培養されていたとしても、酵母状ならば MALDI-TOF MS 解析にかけられる機会が増えていることから、少なくともそこでプロトテカであることに気づくことができる。

5) 微生物学的基礎情報の整備

至適生育条件、栄養要求性の調査は、生活圏に普遍で日和見感染をするような病原菌を制御するには欠かせない情報である。使用した菌株の分離源情報や患者情報を遡求することにより、生態的または病原性の特徴及び地理分布等の基礎情報と、種または遺伝型の関連性を整理する。これらの情報を総合して、合理的な本属種のリスク評価シートとしてまとめる。

現在、千葉大学真菌医学研究センターと長崎大学熱帯研究所はナショナルバイオリソースプロジェクト (病原真核微生物) において、病原真菌と病原原虫を分担して管理している。プロトテカ属は、正しく病原真核微生物であるが、従来の病原真菌と病原原虫の枠組みから外れた生物である。双方の協力によって遺伝子や性状の比較を行うことで、本共同研究では多角的視点から情報を拾得し、本属のリスク評価のための基礎資料づくりを目指す。

③ 予想される成果

本研究で得られたリスク評価データは、今後増加が予想される本属が原因となる感染症の診断に応用できる。得られた成果は、論文発表 (日本微生物資源学会誌を予定) ならびに、ナショナルバイオリソースプロジェクトのオンラインカタログからの情報発信 (修正を含む) を行う予定。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

[培養及び DNA 解読]

株は千葉大学 IFM に保存されていた株に加えて、国立環境研究所などから収集した。海外産種についてはコロナ禍に伴い航空輸送が停滞したため断念したが、国内で知られる病原性種を全て網羅した 8 種 17 株を供試した。先行研究²⁾に従って rRNA ITS 領域及び *cytB* 遺伝子の配列解読及び系統解析により、4 株 (IFM 57851, 55549, 62861, NBRC 7533) に対しては、最新の分類体系に合わせた学名変更 (再同定) を行った (Table 1)。これらの配列や基本情報は IFM の菌株カタログから公開している。(https://daphne.pf.chiba-u.jp/distribution/catalog)

Table 1 *Prototheca* spp. strains used in this study.

Former Name	Reidentified	Strain No.	Origin
<i>Prototheca cutis</i>	-	IFM 54820	Right arm, cutaneous protothecosis, Japan
<i>P. miyajii</i>	-	IFM 53848 ^T	Skin, systemic protothecosis, Japan
<i>P. portoriensis</i>	<i>P. ciferrii</i>	NIES-2182	Unknown
var. <i>ciferrii</i>		= IFM 66834	
<i>Prototheca</i> sp.	<i>P. wickerhamii</i>	IFM 57851	Protothecosis patient, Japan
	-	IFM 66996	Animal
<i>P. wickerhamii</i>	-	IFM 56379 ^T	Lavatory drain, USA
	-	IFM 5695	Unknown (human patient)
	-	IFM 52823	Erythema and subcutaneous nodules, Japan
	-	IFM 58036	Skin, collagen disease patient, Japan
	-	IFM 58159	Skin, Japan
	-	IFM 62653	Blood, Japan
	-	IFM 62714	Skin ulcer, right arm, Japan
	-	IFM 62715	skin of left leg, Japan
	-	IFM 66277	Canker on hand, Japan
<i>Prototheca zopfii</i>	<i>P. pringsheimii</i>	NBRC 7533	Unknown
		= JCM 9351	
<i>P. zopfii</i> var. <i>hydro</i>	<i>P. bovis</i>	IFM 55549	Sewage sludge, Japan
- <i>carbonea</i>	<i>P. bovis</i>	IFM 62861	Blood, acute lymphocytic leukemia patient, Japan

(略称) IFM: 千葉大学真菌医学研究センター, JCM: 理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室, NBRC: 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター, NIES: 国立環境研究所微生物系統保存施設

[薬剤感受性試験]

原虫感染症の治療薬からメトロニダゾール (MTZ)、ピリメタミン (PYR)、キニーネ (QIN)、クロロキン 2 リン酸塩 (CQD) を選抜して感受性試験を行った。実験は CLSI 法 (真菌) に準拠し、 10^4 cell/mL に調整した細胞を、0.25 から 128 μ g/mL まで PBMI 培地で段階希釈した試薬の濃度区分にそれぞれ添加し、30℃、48 時間培養して、無添加区の 50% 以下に生育が抑えられている区分を観測した。

[MALDI-TOF MS]

PDA 培地、25℃、3 日間培養した菌体の一部から、エタノール-ギ酸処理法により粗タンパク質を抽出した。ギ酸処理 (70%ギ酸:アセトニトリル=1:1) において、細胞破碎を促進するため、ジルコニア・シリカビーズを適量加えミキサーにかけた。上清 1 μ L をサンプルプレートに滴下し、室温にて乾燥後、0.1%トリフルオロ

酢酸水溶液：アセトニトリル=3:7 の混合溶媒で飽和させた α -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)を 1 μ L 重層して結晶化させた。計測は Microflex LT MALDI-TOF spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)を用いて行った。1 サンプルにつき 8 スポット 3 回ずつ、合計 24 回の繰り返し測定し、24 データ/1 株ごとに平均化した Main Spectra (MSPs)によるライブラリデータベースを構築した。

② 成果（結果＋考察）

[プロトテカ属を抑制する薬剤の探索]

現在市販されている抗真菌剤はプロトテカ属に対する生育抑制（抗藻）効果は認められていない。また、これまで原虫用の治療薬がプロトテカ属に検討された知見はなく、治療実績のある化合物から効果を持つ薬の候補を絞ろうと考えた。残念ながら、本研究で選んだ 4 つの治療薬は、対象とした 7 種への抑制効果は認められなかった。唯一、多少なりとも感受性を示した *P. wickerhamii* IFM 56379 でも、最大でピリメタミン 8 μ g/mL であり、実際の治療へ繋がる数値とはいえない。今後は他の治療薬を検討し、候補が見つからなければ化合物ライブラリへと探索を広げていきたい。

Table 2 Minimum inhibition concentration for antiprotozoal drugs (μ g/mL).

Former Name	Strain No.	MTZ	PYR	QIN	CQD
<i>Prototheca bovis</i>	IFM 55549	>128	>128	>128	>128
	IFM 62861	>128	>128	>128	>128
<i>P. ciferrii</i>	IFM 66834	>128	>128	>128	>128
<i>P. cutis</i>	IFM 54820	>128	>128	>128	>128
<i>P. miyajii</i>	IFM 53848 ^T	128	64	128	>128
<i>P. pringsheimii</i>	NBRC 7533	>128	>128	>128	>128
<i>Prototheca</i> sp.	IFM 66996	>128	128	>128	>128
<i>P. wickerhamii</i>	IFM 56379 ^T	128	8	32	128
	IFM 5695	>128	>128	>128	>128
	IFM 52823	>128	>128	>128	>128
	IFM 57851	>128	>128	>128	>128
	IFM 62653	>128	>128	>128	>128
	IFM 62714	>128	>128	>128	>128
	IFM 62715	>128	>128	>128	>128
	IFM 66277	>128	>128	>128	>128

[MALDI-TOF MS を用いた迅速同定用ライブラリ構築]

MSPs によるデンドログラムを Fig. 1 に示す。*cytB* 配列による系統関係(Fig. 2)と概ね相関性のあるデンドログラムが得られた。今後ブラインドサンプルによる同定精度の検証が必要であるものの、種レベルで識別率の良い MSPs が構築できた。

③ 成果の公表

本項目の MALDI-TOF MS ライブラリ構築は、ナショナルバイオリソースプロジェクト基盤整備事業と連動して実施した。本ライブラリは本事業 PJ のウェブサイト (2022 年 9 月頃開設予定) から一般公開される予定。

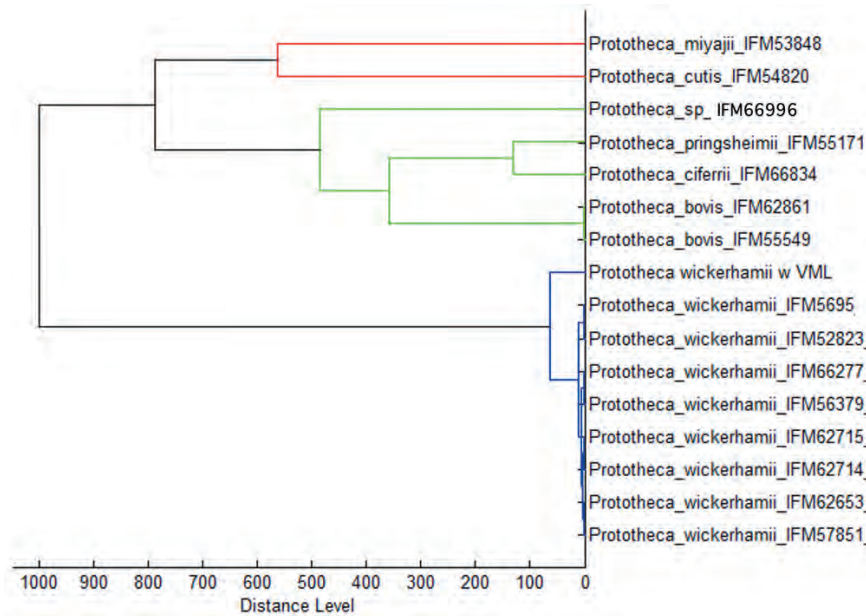


Fig.1 MALDI-TOF MS によるプロトテカ属種の近似デンドログラム (UPGMA 法)

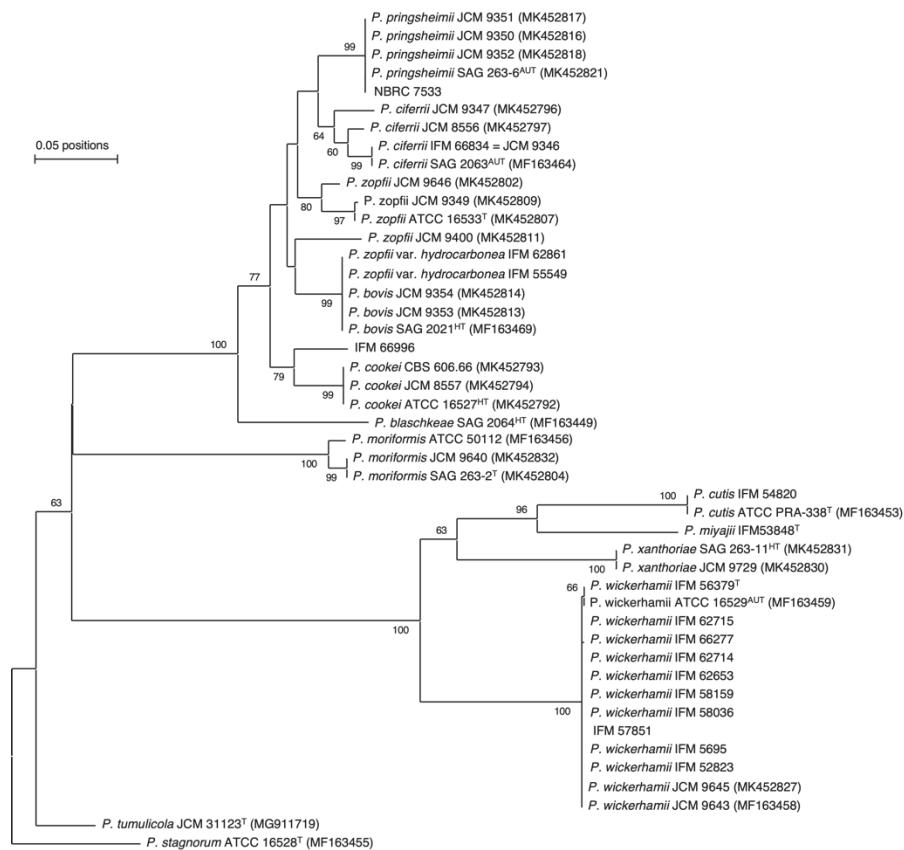


Fig.2 プロトテカ属種の *cytB* 配列による系統樹 (ML 法)

学会発表： 伴さやか，矢口貴志「人獣共通病原性の緑藻類 *Prototheca* 属保存株の再同定」
第 66 回日本医真菌学会総会・学術集会 2022 年 10 月 1-2 日予定

6. 自己評価

今回の共同研究を通じ、菌類でも原虫でもないプロトテカ属の課題に対し、双方の視点から新しいアプローチに取り組むことができた。21種類の原虫用治療薬の中から、費用など考慮し4種類を試験した結果、残念ながらプロトテカ属への生育抑制効果は認められなかった。いずれの薬剤も植物（クロレラ）の生育を抑える作用機序は知られていないため、当然の帰結でもあるが、化合物ライブラリからのスクリーニングと併行して既存薬を試していきたい。

分類学的・疫学的な基本情報の整備は順調に進み、MALDI 用ライブラリの拡充まで実行できた。培養形態が類似する酵母用のライブラリと合わせて実装することで、検査室での誤同定を防ぐことが期待できる。論文投稿まで至らなかったのが減点ポイントである。

7. 達成度（何れかに○）

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の自己評価で述べてあれば省略して良い）

6. 自己評価に記載したため省略。

令和3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：原虫に共生するウイルスおよびウイルス・原虫間相互作用に関する因子の探索

課 題 番 号：2021-Ippan-35

2. 代 表 者：大阪大学微生物病研究所・助教 七戸 新太郎
共 同 研 究 者：帯広畜産大学原虫病研究センター・助教 菅沼 啓輔

3. 決 定 額：300 千円

4. 申請時書類より

① 研究目的

1980 年代に臈トリコモナス (*Trichomonas vaginalis*) から共生ウイルスが発見された (Wang and Wang, PNAS, 1986) のを初めとして、ランブル鞭毛虫 (Miller *et al.*, Mol Biochem Parasitol, 1988) やリーシュマニア (Tarr *et al.*, PNAS, 1988) などの病原性原虫に共生するウイルスが発見されてきた。近年、ゲノムシーケンサーの急速な発展により、これまで知られていなかったウイルスが病原性微生物内やさまざまな環境中に存在することが明らかになってきた (Paez-Espino *et al.*, Nature, 2016)。原虫共生ウイルス発見の頻度は年々増しており、最近では三日熱マラリア原虫 (Charon *et al.*, PLoS Pathog. 2019) やブレコモナス (Grybchuk *et al.*, mBio, 2018) から新たなウイルスが見つかった。原虫ウイルスは *Totiviridae* および *Partitiviridae* の 2 つのウイルス科に属するもののみであったが、この 2 科に分類できない原虫ウイルスも発見されており、原虫との共進化を遂げて多様化している可能性が示唆される。形態的な差異に乏しい原虫種においては、共生ウイルスがタイピングの指標として提案することが期待できる。

原虫ウイルスに関する研究の多くは遺伝子配列を報告したものが多く、原虫ウイルスの機能や宿主原虫との関係性について言及された例はまだ少ない。一部のリーシュマニア (*Leishmania guyanensis* 等) に共生するウイルス (LRV2) は リーシュマニアの病原性を増強することが知られている (Ives *et al.*, Science, 2011)。臈トリコモナスに共生するウイルス (TVV) やランブル鞭毛虫に共生するウイルス (GLV) は 原虫表面の接着分子の発現量を変化させることが知られているが、これが原虫の病原性や生理学的性状に与える影響は十分に明らかになっていない。TVV や GLV に限らず、他の原虫ウイルスにおいても原虫へ与える影響が明らかになっている例は少数である。また、我々も新規原虫ウイルスを検出しているが、その機能や宿主原虫との関係性、病原性への影響はまだ明らかに出来ていない。

本研究では、以下の 2 つを目的として研究を実施する。

A. 新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

熱研生物資源室 (NBRC) や他の研究機関に保管されている原虫株から DNA・RNA ウ

ウイルスを網羅的に探索することによって、原虫に共生するウイルスの多様性を明らかにしていく。特に鞭毛虫類の原虫種には注力したい。たとえば、クルーズトリパノソーマは NBRC で数多くの株が保存されている原虫種の 1 つであるが、共生するウイルスが見つければ、現在の 6 タイプに分類される遺伝子型を見直すタイピング指標になる可能性がある。腔トリコモナスやリーシュマニア、ランブル鞭毛虫では既にウイルス発見例があるものの、産地と採集年月日の情報が付与されている NBRC 株を用いて追加で新規ウイルスを検出できれば、そのウイルスゲノムを用いて進化系統解析データと産地情報を合わせた時空間的解析が可能となる。原虫ウイルスの分類体系を整理する材料になるばかりか、原虫とウイルスとの共進化過程を探る手掛かりになる。

B. オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

これまでに発見した原虫ウイルスを用いて、ウイルス感染原虫とウイルス脱落原虫を作製し、オミックス解析（トランスクリプトーム・プロテオーム）を行うことで、ウイルス感染によって変動する原虫の遺伝子・タンパク質を明らかにする。網羅的に手がかりを探索することで、ウイルスが原虫を制御する因子あるいは抗ウイルス応答に寄与する原虫因子を見出す。このようにウイルス・原虫間相互作用を調べることで、ウイルスと原虫の共進化あるいは単細胞の真核生物における新たな抗ウイルス戦略と言った生物学的課題の解明に展開できる可能性がある。また、共生ウイルスと病原性に関する新知見、共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった医学的課題への展開も期待できる。

② 研究内容

A. 新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

次世代シーケンサー解析（NGS）でウイルスゲノムを探索する際に問題となるのは宿主ゲノムの混入である。宿主ゲノムは微生物ゲノムと比べ量が多いため、微量のウイルスゲノムはシーケンシングで検出できない。したがって、ウイルスゲノムを特異的に検出もしくは宿主ゲノムを除去する必要がある。これまでに DNA ウイルスはショットガン NGS 解析をウイルス精製や宿主 DNA の分解などと組み合わせることで感度を高められてきた。一方、RNA ウイルスは、dsRNA を検出する Fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing（FLDS; Urayama *et al.*, Microbes and Environments, 2016）の開発によって高感度にウイルスゲノムを検出することに成功している。

申請者らのこれまでの研究では RNA ウイルスのみに着手していたが、本研究では DNA ウイルスについても探索を行う。対象とする原虫株は熱研 NBRC に保管されている病原原虫株、また他機関にも分与依頼を行って収集する。熱研 NBRC で保管されている原虫を培養し、ウイルス探索のための試料を準備する。またウイルス探索の結果によっては原虫のクローニングも行う。申請者の七戸は培養・調整された原虫を超音波破碎し、ウイルスを遊離させる。DNase によって宿主（原虫）DNA を分解し、カプシドに守られたウイルス DNA は分解しない。ウイルス粒子からカラム抽出によって DNA を精製し、ショットガン NGS 解析を行う。一方、RNA ウイルスは FLDS を行うため、培養・調整された原虫からフェノール・クロロホルム抽出によって核酸を抽出した後、セルロースカラムによって選択的に dsRNA を精製する。精製 RNA の末端にループプライマー

(またはループアダプター)を付加し、逆転写反応、PCR増幅後にNGS解析を行う。これら双方の解析に取り組むことによって、DNA・RNAウイルスを網羅的に検出する。得られたウイルスゲノム配列とデータベースの配列を用いて、ウイルスゲノムの配列解析および遺伝子系統解析を行い、これまで報告されている原虫ウイルスとの類縁関係について明らかにする。また、宿主の遺伝子型、産地、採集日時、その他性状情報を勘案し、原虫とウイルスの共進化について検討する。

七戸と風間は高感度RNAウイルス検出法であるFLDSを用いてすでに新規ウイルスを発見しており、十分な連携が取れている。臈トリコモナスやランブル鞭毛虫に限らず熱研NBRCでは300株以上の原虫が提供可能な状態で保存されており、網羅的にウイルス探索を行うことによって、他の原虫種においても新たなウイルスが見つかる可能性がある。

B. オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

ウイルスが共生する臈トリコモナスにおいて、表面抗原P270の発現量が変化することが報告されている。P270は臈トリコモナスが生殖器細胞表面に結合するために重要なタンパクとして知られており、臈トリコモナスの細胞への結合や病原性に影響すると考えられている。また、ランブル鞭毛虫において表面タンパクP100の発現量とも関連しているとの報告がある。これらの報告は、共生ウイルスが宿主原虫に能動的に影響を及ぼしている、あるいは、原虫がウイルスを検知して反応している可能性を示している。しかし、これまでの研究では上記にも述べたように、ウイルス存在下における原虫への影響は部分的にしか解析されていない。本申請ではウイルス感染原虫のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析を通して、網羅的にウイルス・原虫間相互作用に関わる因子をスクリーニングする。

これまでの我々の研究では、羊由来のランブル鞭毛虫(UPV株)にSheep Giardia Virusが4種類(SGV1~4)感染していることを見出した。SGV感染ランブル鞭毛虫から得た12個のクローン株において、それぞれに感染するSGVの種類と数に違いがあることを見出した。これはSGV1~4がそれぞれ感染様式や効率が異なる、あるいはウイルスが排除されている可能性、言い換えれば、各ウイルスに対してランブル鞭毛虫の抗ウイルス応答が存在する可能性を示唆している。本研究ではSGV感染ランブル鞭毛虫の更なるクローンを進めてSGVsの種類と数を調整したクローン化株を得た後、各クローンのトランスクリプトーム・プロテオーム解析を行う。これらのオミックス解析は申請者の所属する大阪大学微生物病研究所の中央実験室に依頼する。遺伝子発現は、それぞれのクローンからRNAを回収し、RNA-Seqによって遺伝子発現量を比較する。一方、プロテオーム解析はMS解析によって、発現タンパクの差異を調べる。これらの結果から、ウイルス・原虫間相互作用の一端が明らかになり、単細胞真核生物がウイルスによってどのように進化するのか、あるいは、ウイルスに対してどのような排除機構を持つのかという生物学の根幹にある非常に重要な情報が得られる可能性を秘めている。また、得られる情報は、共生ウイルスと病原性や共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった新しい医学的研究課題につながる基盤情報となる。

③ 予想される成果

A. 新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

これまでの研究で臈トリコモナスとランブル鞭毛虫から複数の新規ウイルスが発見されていることから、その他の原虫においても新規ウイルスが発見される可能性が高い。申請者らが発見したウイルスは、これまで報告されている原虫ウイルスと同じ *Totiviridae* に属するものもあるが、新規のウイルス科として定義され得るものもある。1つの原虫種においてもこのように多様なウイルスが見つかることから、熱研 NBRC に保管されている多様な原虫種を調べればさらに多様なウイルスが見つかる可能性もある。これまでほとんどの原虫ウイルス研究において、RNA ウイルスに着目されてきたが、DNA ウイルスについても発見される可能性がある。発見したウイルスの進化系統解析データと原虫の産地情報を合わせた時空間的解析を行うことにより、共進化過程の手がかりが掴める可能性がある。また、これらの結果を基に、共生ウイルスが原虫種タイピングの指標として提案できるのではないかと期待できる。

B. オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

臈トリコモナスではクローン化した場合でも、TVV や NINJA virus の数は一定であった。しかし、ランブル鞭毛虫においてはクローンによって SGV の数が異なることが明らかになった。これは SGV1~4 がそれぞれ感染様式や効率が異なる、あるいはウイルスが排除されている可能性がある。言い換えれば、ウイルス因子が原虫の転写活性等を制御している、あるいは CRISPR のような細菌におけるウイルス（バクテリオファージ）に対する抗ウイルス応答が存在するように、原虫においてもウイルス排除機構が存在することは想像に難くない。原虫のような単細胞真核生物の抗ウイルス応答を調べることは、高等動物の新たな免疫機構を発見することにもつながる可能性がある。

本研究では SGV とランブル鞭毛虫をモデルシステムとして遺伝子・タンパク発現を網羅的に解析する。SGV とランブル鞭毛虫で起こりうる遺伝子発現の変動を見出すことで、具体的に原虫がどのようなメカニズムで相互作用しているかについて手がかりが掴めると考えられる。得られた結果を基に、将来的に「ウイルスによる宿主細胞制御」なのか「原虫の抗ウイルス応答」なのか明らかにする研究に展開していきたい。また、将来は共生ウイルスによる病原性増強の可能性や、共生ウイルスを標的とした抗原虫薬の開発といった新しい医学的研究課題にも共同研究として取り組みたい。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

・新規ジアルジアウイルス（Noggi virus）の同定と分類

ヒトおよびカモシカ由来のランブル鞭毛虫（WB, IWA, C6, および ISE 株）から、フェノール・クロロホルムを用いて DNA/RNA を抽出した。この DNA/RNA サンプルからセルロースカラムを用いて、dsRNA を精製した。アガロースゲル電気泳動で dsRNA を観察した。dsRNA が確認されたサンプルの末端にループアダプターを付加し、PCR 増幅を経て、ライブラリー構築を行い、次世代シーケンサーによって、全長配列を決定した。決定した塩基配列は、Open Reading Frame Finder (NCBI) を用いて、ORF を推定した。

オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

・SGV 欠損ランブル鞭毛虫の作製

ジアルジアとウイルスの相互作用を調べるため、ウイルス感染・非感染ジアルジアを準備する必要がある。しかしながら、ウイルス感染ランブル鞭毛虫（UPV 株）をクローン化すると、2~4 つの SGV を保持していた。より詳細な解析を行うため、単一の SGV を保持するランブル鞭毛虫を作製する必要がある。そこで、1. SGV 非感染ランブル鞭毛虫にウイルスを感染させる、2. SGV 感染ランブル鞭毛虫からウイルスを除去する、という 2 つの実験を試みた。また、SGV を観察するため、グルタルアルデヒドで SGV 感染ランブル鞭毛虫を固定した切片を、透過型電子顕微鏡（TEM）解析も合わせて行った。

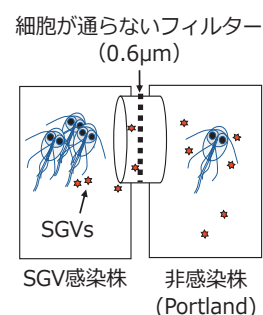


図1. UniWells™を用いたSGV水平伝播試験

- 水平伝播試験：ウイルスは通過するが、ランブル鞭毛虫は通過しないフィルターを間に挟んだ培養ウェル（UniWells™）を用いて、水平伝播試験を行った（図 1）。
- SGV 除去試験：RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）阻害薬であるリバビリンを SGV 感染ランブル鞭毛虫培養液に加えて、継代を行った（図 2）。

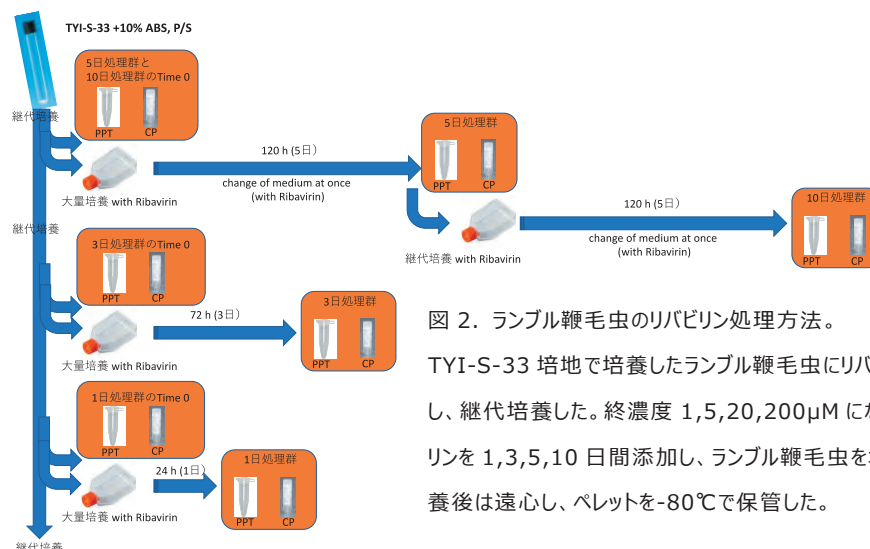


図 2. ランブル鞭毛虫のリバビリン処理方法。

TYI-S-33 培地で培養したランブル鞭毛虫にリバビリンを添加し、継代培養した。終濃度 1,5,20,200μM になるよう、リバビリンを 1,3,5,10 日間添加し、ランブル鞭毛虫を培養した。培養後は遠心し、ペレットを-80℃で保管した。

② 成果（結果＋考察）

新規原虫ウイルスを探索し、原虫ウイルスの分類体系を整理する。

・新規ジアルジアウイルス（Noggi virus）の同定と分類

ヒト糞便検体に含まれるランブル鞭毛虫（ISE 株、Assemblage B）から、約 6kbp の dsRNA が検出された（図 3）。FLDS によって、この dsRNA の全長配列を決定したところ、新たなウイルスゲノム配列（Non-GLV Giardia virus、以下 Noggi virus）を同定した（図 4）。GLV と類似したゲノム長で 2 つの ORF が存在し、インフルエンザ A ウイルスや LRV で見られる +1 ribosomal frameshift によって 2 つのタンパク質（Capsid、RNA dependent RNA polymerase）が発現すると考えられる。ORF2 は RdRp であると推察されるが、この配列を用いた Blast 検索で最も近縁なトティウイルス科に属するウイルスと 40%未満の類似性であった。International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)の基準では、タンパクレベルで 50%未満の配列は新種であるとされ、Noggi virus は新規のトティウイルスであると考えられる。これまで知られているランブル鞭毛虫に感染・共生するウイルスは、GLV (Miller *et al.*, Mol Biochem Parasitol, 1988) および GdRV-2 (Marucci *et al.*, Biomedicines, 2021) であり、Noggi virus はこれらとはゲノム配列が全く異なることから、3 番目のウイルスの発見となるだろう。また、これまでの GLV の報告を見ると、ほとんどが Assemblage A

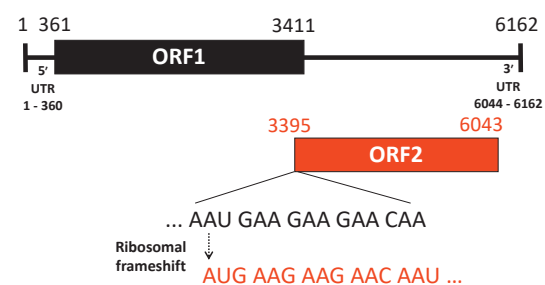


図 4. Noggi virus のゲノム構造。

推定される ORF1（Capsid）および ORF2（RdRp）をそれぞれ示した。RdRp は +1 リボソームフレームシフトが起こると推定される。

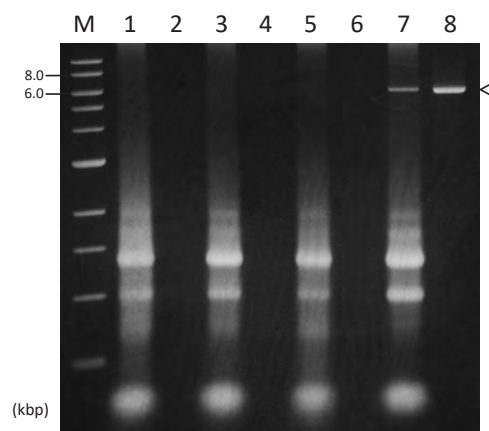


図 3. ジアルジアサンプルから精製した核酸および dsRNA のアガロースゲル電気泳動像。

DNA マーカー（M）、WB 株の全核酸（1）および dsRNA（2）、IWA 株の全核酸（3）および dsRNA（4）、C6 株の全核酸（5）および dsRNA（6）、ISE 株の全核酸（7）および dsRNA（8）。

のランブル鞭毛虫に由来しているように見える。一方で、GdRV-2 は Assemblage E、Noggi virus は Assemblage B のランブル鞭毛虫で発見されており、Assemblage とウイルス種に関連性があり、分類に利用できるかもしれない。しかしながら、この仮説を確かめるには、ウイルスのゲノム配列を同定している報告も少ないことから、引き続きサーベイランスを継続し、十分なデータ数を揃える必要がある。

オミックス解析を用いてウイルス・原虫間相互作用に関わる因子を同定する。

・SGV 欠損ランブル鞭毛虫の作製

TEM 解析を行ったところ、ランブル鞭毛虫から約 120nm の密度の高いウイルス様粒子が放出されている像が確認できた（図 5）。SGV はランブル鞭毛虫外に放出され、水平伝播するかもしれない。次に、ウイルスは通過するが、ランブル鞭毛虫は通過しな

いフィルターを間に挟んだ培養ウェル（UniWells™）を用いて、水平伝播試験を行った。SGV1~4 全てに感染しているクローンから、SGV 陰性株 (Portland) にウイルスは伝播しなかった（表 1）。水平伝播の確認には SGV1~4 を超遠心精製し、直接 Portland の培養液に加える実験も行う必要があるだろう。また、上述したようにランブル鞭毛虫の Assemblage と感染するウイルスの種類に特異性があるかもしれない。Assemblage ごとに特異的なウイルスが存在するのかについては興味深い、現時点では十分な検体数がないため、今後さらなる研究が必要である。

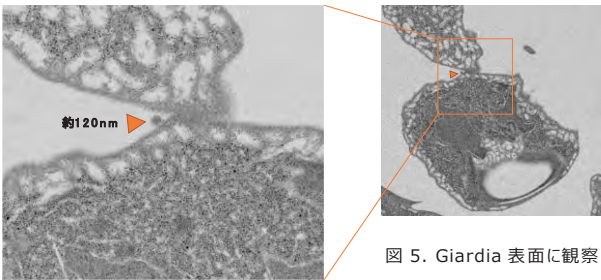


図 5. Giardia 表面に観察されたウイルス様粒子。

表1. UniWells™を用いた水平伝播試験の結果

Giardia	Uniwell	SGV1	SGV2	SGV3	SGV4
UPV	-	+	+	+	+
Portland	-	-	-	-	-
UPV	+	+	+	+	+
Portland	+	-	-	-	-

・ランブル鞭毛虫からの SGV の除去

リバビリンを添加した全てのランブル鞭毛虫サンプルで、SGV は除去されなかった。今後はリバビリンの濃度、暴露時間、継代数等の条件を変化させて適した条件を探るとともに、別の RdRp 阻害薬も用いる。

③ 成果の公表 特になし。

6. 自己評価

本研究では、ヒトの糞便検体から分離された ISE 株 (Assemblage B) から Noggi virus の全長ゲノム配列を同定した。本研究とこれまでの先行研究を包括的に再考した結果、Assemblage とウイルス種の関連性を推測するに至ったが、まだ十分数のエビデンスがないため、今後さらなる研究を要する。しかし、このように原虫ウイルスの分類について、新たな切り口を着想するに至ったことは、今後の研究を展開するために役立つだろう。一方で、新規原虫 DNA ウイルスの探索を十分に行うことができなかったことが悔やまれる。

今回の試験では、Uniwell™ を用いた水平伝播試験および RdRp 阻害剤を用いたウイルス除去試験も実施した。近年のエクソソーム研究の発展に伴う微粒子の試験手法を応用することで、原虫ウイルスの水平伝播試験を行うことができたことは、今後の実験につながると考えられる。また、RdRp 阻害剤を用いたウイルス除去試験でもウイルス除去には至らなかったが、薬剤濃度の調整などの試験条件で検討の余地がある。このように、ウイルス感染・非感染ランブル鞭毛虫クローンの確立に苦慮しているが、このボトルネックを突破できれば、ウイルス・ランブル鞭毛虫間相互作用に関する研究に展開できるため、様々な手法を駆使して解決していきたい。

このように本研究では課題は残るものの、次の研究に展開するために一応の成果は出せたと考えている。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期に予想した成果はほとんど挙げらなかった)

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3（2021）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ウイルス感染症の診断や治療を目的としたセラノスティクス薬剤の開発
課 題 番 号：2021-Ippan-36

2. 代 表 者：淵上 剛志（金沢大学医薬保健研究域薬学系 臨床分析科学研究室
・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
・准教授）

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3年）

野崎 伊織（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）

副島 歩実（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2年）

酒井 樹（長崎大学薬学部・6年生）

穴田 悠太（長崎大学薬学部・4年生）

3. 決 定 額：300 千円

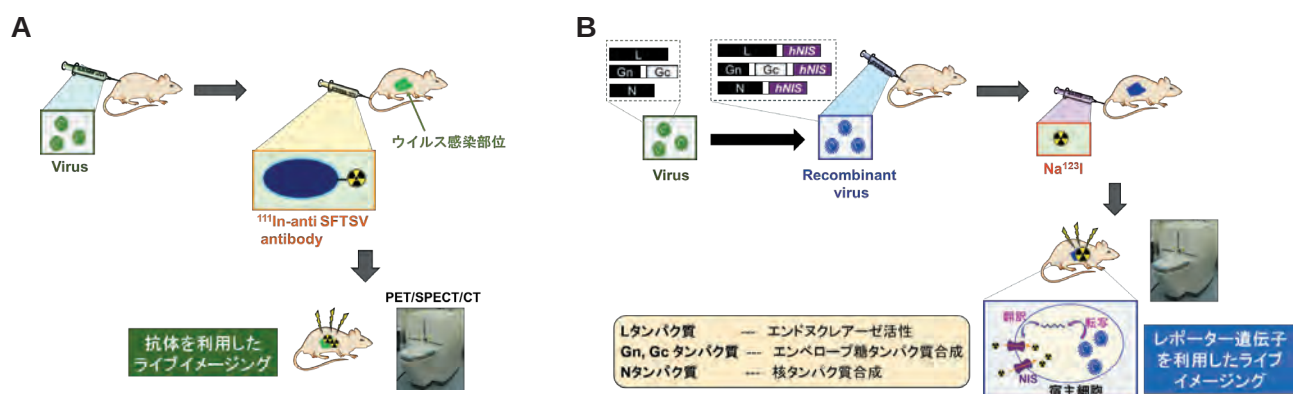
4. 申請時書類より

① 研究目的

Step 1 ウイルス感染症の分子イメージングに関する研究

現在のウイルス感染の病態解析には動物モデルの病理切片を用いた解析が行われているが、詳細な病態進行のメカニズムの多くは不明のままである。そこで、分子イメージングにて生きた個体の病態変化を経時的に評価することで、より正確に生体における感染症の発症経過のダイナミクスを追跡できることが期待される。

具体的には、(1) ウイルス由来タンパク質に極めて特異的な抗体型分子プローブを用いた *in vivo* イメージング (下図 A)、(2) ウイルス感染部位にて酵素やトランスポーターが発現するレポーター遺伝子を利用した *in vivo* イメージング (下図 B) の2つの独自の生体分析手法を開発し、ウイルス感染症の発症過程を特異的に捉えることのできる生体イメージングへの応用の可能性を検証する。本申請課題では、これまでに申請者らが重点的に研究を行ってきた日本でも極めて致死率の高い新興ウイルス感染症である重症熱性血小板減少症候群ウイルス(SFTSV)を対象とした分子イメージング研究にて本コンセプトの妥当性を詳細に評価していく。



Step 2 ウイルス感染症のラジオセラノスティクスに関する研究

近年、治療 (therapeutics) と診断 (diagnosis) を融合した造語であるセラノスティクス (theranostics) が注目されており、個々の患者の病変の位置やその性質を画像診断などで検出し、各個人に適した治療かどうかを判定しながら治療を行うという一貫した診断から治療にて敏速かつ効果的な疾患の治療を目指した試みが盛んにおこなわれている (Keek, et al., *British Journal of Radiology*, 2018, 91,20170926.). 特にこれまでに申請者らが専門として研究開発に取り組んできた放射性薬剤を用いたセラノスティクスはラジオセラノスティクスと呼ばれており、主にがん領域で様々な研究の進歩が報告されているが、ウイルスなどの感染症領域においても本手法は効果的な治療と繋がるものと期待される。しかしながら、細菌などの画像診断法はいくつの特異的な分子プローブを用いた検討がなされているものの、ウイルスの画像診断法に関しては未だに成功例は一部の疾患にて報告されているのが現状であり、それゆえ画像診断情報に基づいて治療を敏速に行う方法論は全く確立していない。そこで本申請課題では、上記 A の基礎検討にて開発するウイルス感染部位に特異的に集積できる ^{111}In 標識抗体などの分子プローブを母体化合物として、そのままの性質を

維持して治療効果を獲得させるため、 ^{90}Y などの治療用放射性核種を導入した新たなセラノスティック薬剤の開発を行い、感染細胞を用いた *in vitro* による抗ウイルス効果から、感染動物モデルを用いた *in vivo* における治療効果に関する研究も進めていく。

② 研究内容

6. 研究内容（当該研究と本研究所との関係性を明記してください。また、2 年以上の研究期間の課題の場合は、次年度以降の計画の概要も記載願います。）

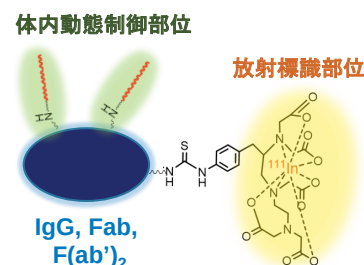
(1) ウイルスタンパク質を標的とした抗体型イメージング剤の開発

^{111}In 標識抗体型イメージング剤の設計

SFSTV 由来タンパク質への IgG やフラグメント抗体を母体として、免疫原性低下、血中滞留性向上、肝腎の滞留抑制などの体内動態を制御したイメージング剤の開発を行う(右図)。

生体イメージングに最適な分子プローブ探索

- i) *In vitro* 評価; 蛍光標識あるいは ^{111}In 標識抗体の SFTSV 感染あるいは非感染の Vero 細胞への結合性を定量的に評価する。
- ii) *In vivo* 評価; 様々な重篤度の感染マウスを作成し、血液サンプルの定量的 RT-PCR や血球数計測、撮像後の組織学的検討なども併せた小動物 SPECT/CT 評価を詳細に行う。



(2) 組換えウイルス感染マウスの SPECT/CT イメージング

組換えウイルスの作成

様々なタンパク質をコードするウイルス遺伝子の C 末端に核医学プローブにてイメージングできるレポーター遺伝子を導入した組換えウイルスを構築する。Vero 細胞などに感染させ、感染性や感染挙動の性質を維持したレポーターウイルス遺伝子の同定を行う。

生体イメージングに最適なレポーターイメージングシステムの構築

- i) *In vitro* 評価; sodium/iodide symporter (NIS) や herpes simplex virus type 1–thymidine kinase (HSV1-tk) を導入した組換えウイルスを Vero 細胞に感染させ、NIS 基質の Na^{123}I や HSV1-TK 基質の ^{123}I -FIAU などのレポータープローブの取り込み量とウイルス感染量との明確な相関性が見られる最適な組換えウイルスと分子プローブの組合せの同定を行う。
- ii) *In vivo* 評価; 最適化した組換えウイルスをマウスに感染させる。さらに (1) の検討と同様に SPECT/CT を用いた評価を行う。併せて、抗体型分子プローブを用いた同様の撮像を行い、どちらの手法がウイルスのダイナミクスを追跡するのに適しているかを比較検討する。

治療用放射性薬剤の抗ウイルス効果に関する検討

(1) ^{90}Y 標識放射性薬剤の設計および合成

上記にて開発した ^{111}In 標識放射性薬剤のうち、特に *in vivo* にて SFTSV タンパク質への選択的に集積する薬剤を選択し、 ^{90}Y 標識放射性薬剤へと展開する。 ^{90}Y は、 ^{111}In と同様にキレート剤の DTPA に強固な結合性を有し、 ^{111}In を ^{90}Y に置き換えることで性質をほとんど

変えることなく、内用放射線治療薬剤へと展開できる。 ^{90}Y は β -線放出核種で、最大エネルギーが 2.3MeV と高く、非常に優れた治療効果が期待できる。

(2) SFTSV 感染細胞への結合性評価、細胞殺傷性に関する *in vitro* 評価

^{90}Y 標識放射性薬剤の SFTSV 感染レベルの異なる種々の Vero 細胞へのウイルス殺傷効果や標的タンパク質の発現の退縮を評価する。また、Vero 細胞自体へのアポトーシス誘導作用や DNA 損傷作用などの副作用に関しても評価し、ウイルスへの高い選択的な毒性を示す放射性薬剤のスクリーニングを行う。

(3) SFTSV 感染マウスを用いた *in vivo* 評価

^{90}Y 標識薬剤の感染レベルの異なった SFTSV 感染マウスへの作用メカニズムを含めたウイルス退縮効果や正常組織への毒性に関する検討を行う。

③ 予想される成果

7. 予想される成果

これまでに ^{18}F -FDG や ^{68}Ga -citrate を用いた PET により、SFTSV を含む様々な感染症の炎症発症過程を経時的に捉えることに成功してきた (ACS Omega, 2017., Oncotarget, 2016., Sci Rep, 2016.)。しかしこれらの分子イメージング法は多くの感染症に共通した炎症症状を捉えているが、各疾患における症状やウイルスの挙動を特異的に捉えているわけではない。そこで、ウイルスタンパク質特異的な抗体イメージング剤を用いることで、ウイルス感染症選択的なイメージング法への応用につながるとの着想を得た。実際に、最近 Tun 博士らとの共同研究にて ^{111}In 標識 SFTSV 抗体 (IgG 型) の開発と基礎評価を行ったところ、明確な SFTSV 感染による脾臓や小腸などへの異常集積が確認されたため、*in vivo* イメージング剤としての有用性が示された (2020 年 11 月の核医学会シンポジウムにて発表)。現在は SPECT/CT にて SFTSV のダイナミクスを追跡できる *in vivo* イメージング法としての有用性を詳細に評価している。

また、組換えウイルスのレポーター遺伝子イメージングは、ルシフェラーゼ発光や蛍光に基づく *in vivo* イメージングにて追跡する研究が行われてきた (Chiem, J Vis Exp, 2019)。一方、NIS や HSV1-tk などのレポーター遺伝子を用いた核医学イメージングは、主にがん遺伝子治療や再生医療などに用いられてきた (Yaghoubi, SS., Theranostics, 2012)。申請者は新しいレポーター遺伝子イメージングシステムを開発している Stanford 大学 Gambhir 研に留学し、新しいイメージング剤の開発を達成する (Mol Imaging Biol, 2020.) とともに、それらシステムの最新技術を習得した。そこで、Tun 博士らとの共同研究にて、組換えウイルスのレポーター遺伝子イメージング法を構築することで、ウイルス選択的な病態解析技術に繋がるとの着想を得た。

本研究は、国内で唯一実験動物を用いた核医学イメージングが可能な BSL-3 施設を利用し、世界にさがけて基本的解析系を構築できる点で優位性がある。加えて本課題は、ウイルス特異的抗体トレーサーの開発やレポーター遺伝子イメージングシステムなどの新たな生体解析技術を開拓する特色あるものであり、幅広いウイルス新興感染症のメカニズム解明や精密診断への応用が期待される。

抗体などを用いた蛍光や二光子イメージングによるウイルス感染症のダイナミクスを

追跡する研究は多く報告されている(Ueki, *Nat Protoc*, 2020.等)が、これらの *in vivo* イメージング法は最大でも数 mm 程度の深部しか観察できない。一方で、PET や SPECT などの核医学イメージングは、からだのどの部分でも可視化することが可能で、定量性も優れている。また、小動物イメージングを臨床画像診断へ応用することができるという利点を有している。

また、ウイルス感染症のラジオセラノスティクスに関する研究は、ほとんど報告例がなく、新たな学問分野の開拓が期待される。また、現在のアイソトープ実験施設では許可申請が行われていないが、本研究の成果は、より核酸への障害効果の強い α 線放出核種を用いた抗ウイルス療法への応用も将来的には応用可能であると考えられる。なお、今後の COVID-19 感染による病態メカニズム解明も望まれており、本研究にて開発する新規セラノスティクス技術は、COVID-19 への有効な対策にもつながっていくと期待される。

5. 実施報告

① 研究材料・方法・手続き

(1) SFTSV の N タンパク質に対するマウス抗体の作成

SFTSV の N タンパク質に対するモノクローナル抗体 (N-mAb) を産生するハイブリドーマの大量培養を行った後に、アフィニティ精製カラム HiTrap Protein G Hp (GE Healthcare) にて抗体を精製した。

(2) 抗体フラグメントの作製

1. F(ab')₂ の作製と精製

マウスコントロール IgG (CIgG) あるいは N-mAb を 0.2 M 酢酸ナトリウムバッファー (pH 3.5) に溶媒置換し、ブタ胃粘膜由来 pepsin の酢酸ナトリウムバッファー溶液を抗体と pepsin の比が 100:1 (w/w) かつ抗体の終濃度が 10 mg/mL となるように加え、37 °C で 100 rpm で振盪しながら 8/16 時間反応させた。反応後 1 M Tris-HCl バッファー (pH 10.4) を加え pH を 8 まで上昇させた。

反応液を Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel (50 kDa or 30 kDa) に加え 14,000g, 10 分間遠心した後 PBS(-) 400 μ L を加えてさらに遠心した。カラムを反対にし、1,000g, 2 分間遠心することで目的物を回収した後、SE-HPLC にて精製した

2. Fab の作製と精製

0.02 M リン酸ナトリウムバッファー + 0.01 M EDTA ナトリウム (pH 7.0) に終濃度 0.02 M となるよう L-cysteine を用時溶解した消化バッファーを作製した。Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel 50 kDa を用いて N-mAb を消化バッファーに溶媒置換し papain の消化バッファー溶液を抗体と papain の比が 100:1 (w/w) かつ抗体の終濃度が 5 mg/mL となるように加え、37 °C で 4 時間反応させた。反応後、直ちに氷冷し SE-HPLC にて精製した。

3. 抗体フラグメントへの DTPA の導入

下記の 2 つの手法にて検討を行った。

1) 2.5 mg/mL p-SCN-Bn-DTPA $\cdot$ 3HCl 水溶液と PBS(-)、0.4 M NaHCO₃ を 1:1:2 (v/v) の比で

混合した DTPA 溶液を作製し、抗体フラグメントを $0.5 \times \text{PBS(-)}$ に溶媒置換し同体積の 0.4 M NaHCO_3 を加えた後、DTPA 溶液を添加し室温にて 1 時間振とうさせた。振とう後、反応液は Amicon Ultra 0.5 mL Ultracel {30 kDa for F(ab')₂, 10 kDa for Fab} を用いて精製した。

2) 0.07 M borate バッファー溶媒置換した抗体フラグメントに 2.5 mg/mL p-SCN-Bn-DTPA·3HCl 水溶液を加え室温にて 13 時間振とうさせた。振とう後は上記と同様の手法にて精製を行った。

4. ^{111}In 標識抗体および抗体フラグメントの標識合成

DTPA-C-IgG ($30 \mu\text{g}$)あるいは DTPA-N-Fab ($10 \mu\text{g}$) へ 0.1 M 酢酸バッファー ($\text{pH } 6.0$) を加えた後、 $[^{111}\text{In}]$ 塩化インジウム注射液 (5 MBq)と混合させ、 37°C にて 30 分間静置した。続いて、Amicon Ultra 0.5 mL Ultracel 10 kDa にて精製を行った後、 γ カウンタ測定及び iTLC にて目的物の放射化学的純度及び放射化学的収率の算出を行った。

5. SFTSV 感染細胞の作製

Vero E6 細胞 (10^4 - 10^5 cell/well) $300 \mu\text{L/well}$ をスライドチャンバーに播種し、 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 下で 24 時間インキュベートを行った。SFTSV (NB-13 株)を細胞内液 $300 \mu\text{L}$ 中 MOI (Multiplicity of infection, 感染多重度)-0.1 の条件にてそれぞれ細胞に感染させた後、 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 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 $200 \mu\text{L/well}$ を加え、 37°C にて 30 分間の固定化处理を行った後、 $200 \mu\text{L/well}$ の $1\% \text{ NP-40}$ を加え、 37°C にて 30 分間の膜透過処理を行った。なお、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。

6. ^{111}In 標識 IgG あるいは抗体フラグメントを用いた細胞結合実験

SFTSV 感染細胞 (MOI-0.01)あるいは非感染細胞に ^{111}In 標識抗体あるいは抗体フラグメント (^{111}In -CIgG, ^{111}In -N-Fab)を 0.25 mL ($6.7 - 41 \text{ kBq}$) 加え、 37°C にて 120 分間インキュベートした。冷ヘパリン (20 units/mL PBS)にて 2 回洗浄し、Cell Lysis Buffer M 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 (% binding/mg-protein) を算出した。

② 成果 (結果 + 考察)

(1) ^{111}In -N-mAb に関する検討

N-mAb を母体とした分子プローブ (^{111}In -N-mAb) 開発を行い、SPECT 評価を行ったところ、SFTSV 感染マウスにおいてのみウイルスが多く存在する脾臓や腸管に高集積を示し、その有用性が見出された (Figure 1) (Fuchigami, *in preparation*)。一方で、体内動態が遅いため、イメージングまでに 3 日かかることから、SFTS のような急激に進行する感染症の評価に使用するためには、体内動態の改善などの課題が残った。そこで続いて、N-mAb のフ

ラグメント抗体を作成してその有用性を検討することとした¹。

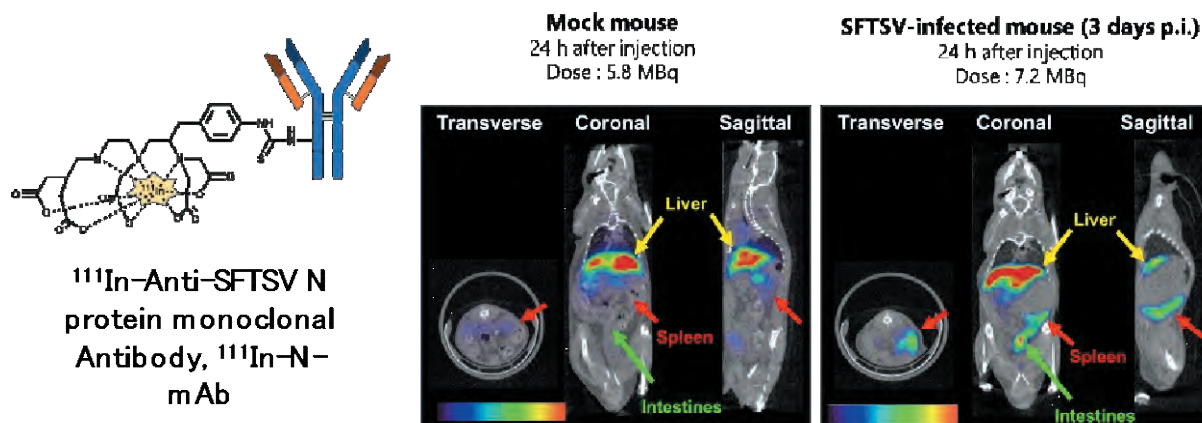


Figure 1. SPECT imaging of STSFV-infected and mock-infected mice using ¹¹¹In-N-mAb.

(2) マウスコントロール F(ab')₂ {C-F(ab')₂}の調製

CIgG をパパイニン処理し、SE-HPLC にて精製後、SDS-PAGE にて目的物とその純度を確認した(Figure)。非還元条件では 150 kDa 付近のバンドのみが確認され、還元条件でも 30 kDa と 25 kDa のバンドのみが存在した。このことから高純度の CF(ab')₂ が得られていることを確認した。

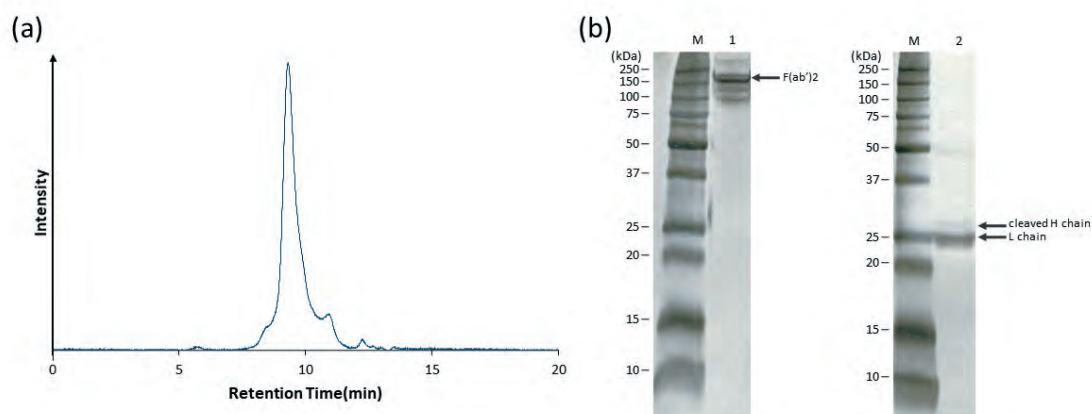


Figure 2. (a) Purification by SE-HPLC of F(ab')₂. Column: TSKgel G3000 SW_{XL} (7.8 × 300 mm), Mobile phase: 0.1 M phosphate buffer + 0.1 M sodium sulfate + 0.05% sodium azide (pH6.70), isocratic, Flow velocity: 1.0mL/min, Detection: UV 280 nm. (b) SDS-PAGE (15%, Silver Staining,). Purified C-F(ab')₂ (non-reducing condition (lane 1) and reducing condition (lane 2)) and molecular weight marker (lane M).

(3) 抗 SFTSV F(ab')₂ {N-F(ab')₂}の調製

N-F(ab')₂ の調製と精製は C-F(ab')₂ と同様に行い、SDS-PAGE にて高純度で得られていることを確認した (Figure 2)。

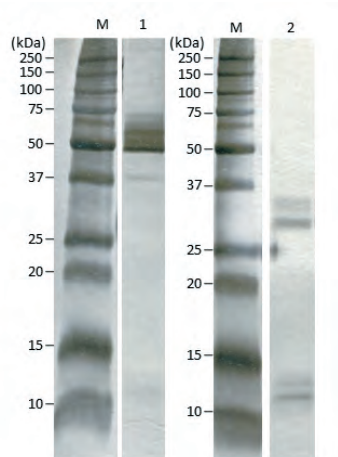


Figure 2. Analysis digested N-mAb by SDS-PAGE (15%, Silver Staining). non-reducing condition (lane 1) and reducing condition (lane 2), and molecular weight marker (lane M).

(4) 抗 SFTSV Fab (N-Fab) の調製

Papainにより N-mAb のヒンジ領域 N 末端側を切断させることで N-Fab の作製を試みた。L-cysteine と EDTA を含むリン酸バッファー中で N-mAb を papain にて消化した後、TSKgel G2000SW_{XL} Column を用いた SE-HPLC にて精製を行い、SDS-PAGE にて解析を行った (**Figure 3**)。その結果、非還元条件、還元条件両方において市販の C-Fab と近似した位置にバンドが確認された。さらに他のバンドが見られないことから N-Fab の生成が確認された。また高い純度で目的物を得ることができたと考えられる。

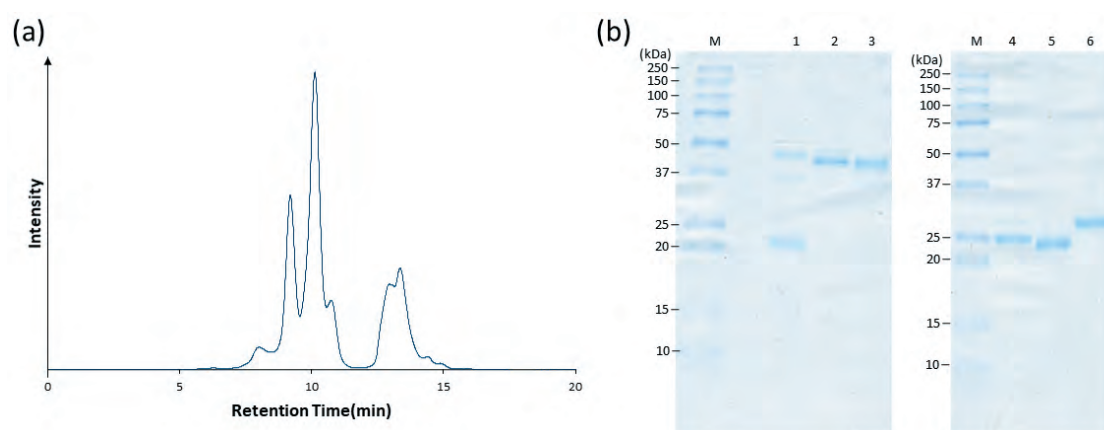


Figure 3. (a) Purification by SE-HPLC of Fab. Column: TSKgel G2000 SW_{XL} (7.8 × 300 mm), Mobile phase: 0.1 M phosphate buffer + 0.1 M sodium sulfate + 0.05% sodium azide (pH6.70), isocratic, Flow velocity: 1.0mL/min, Detection: UV 280 nm. (Retention Time (R_t) of N-mAb = 10.1 min.) (b) SDS-PAGE (15%, CBB Staining, non-reducing condition (lane 1-3) and reducing condition (lane 4-6)). digestion fragments (R_t = 9.2 min) (lane 1, 4), N-mAb Fab (lane 2, 5), CIgG

Fab (purchased from Jackson Immuno Research Laboratories) (lane 3, 6) and molecular weight marker (lane M).

(5) 抗体フラグメントの DTPA 修飾

^{111}In と安定なキレートを形成できる DTPA を抗体のアミノ基へ結合させるため、イソチオシアネート基を持つ *p*-SCN-Bn-DTPA を抗体フラグメントと DTPA の物質量の比が 1:50 にて反応させることで、DTPA 修飾抗体フラグメントの合成を行った (**Figure 4**)。得られた DTPA 修飾抗体フラグメントの分子量は、MALDI-TOF 質量分析にて解析を行った (**Figure 5**)。MALDI-TOF 質量分析の結果 C-F(ab')₂ と DTPA-C-F(ab')₂ の質量電荷比の差は 780.95 であった。また C-Fab と DTPA-Fab の質量電荷比の差は borate buffer 中で 13 時間反応させた方法 1 にて合成した生成物と NaHCO₃ 溶液中で 2 時間反応させた方法 2 にて合成した生成物とでそれぞれ 1180.073、549.455 であったことから、これらの各フラグメント化抗体に *p*-SCN-Bn-DTPA (540.4) が結合していることが確認できた。DTPA-C-Fab について、方法 1 にて合成したものは質量電荷比の C-Fab との差が *p*-SCN-Bn-DTPA 2 分子の質量に相当することから、Fab 1 分子に *p*-SCN-Bn-DTPA が 2 分子結合したものが多く生成していると考えられる。同様に方法 2 にて合成したものは Fab 1 分子に 1 分子の *p*-SCN-Bn-DTPA が結合したものが多く生成していると考えられる。DTPA 修飾 N-mAb も同様に解析してその生成を確認できた。

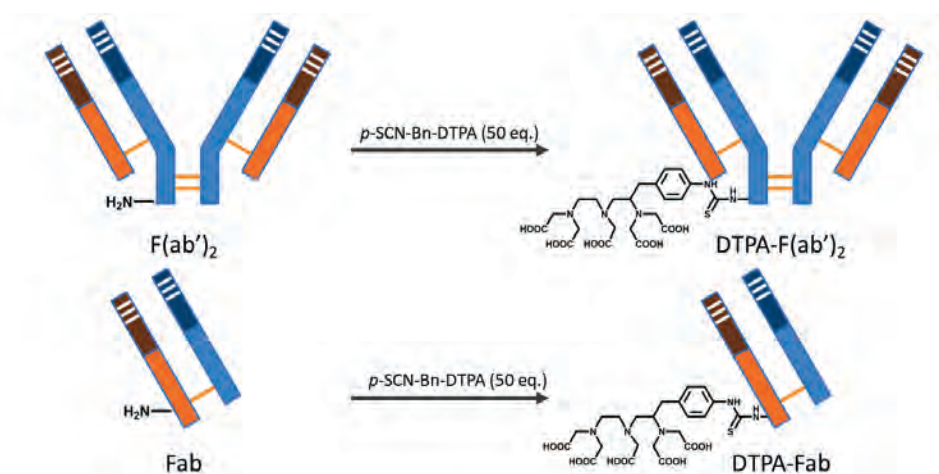


Figure 4. Synthesis of DTPA-F(ab')₂ and DTPA-Fab.

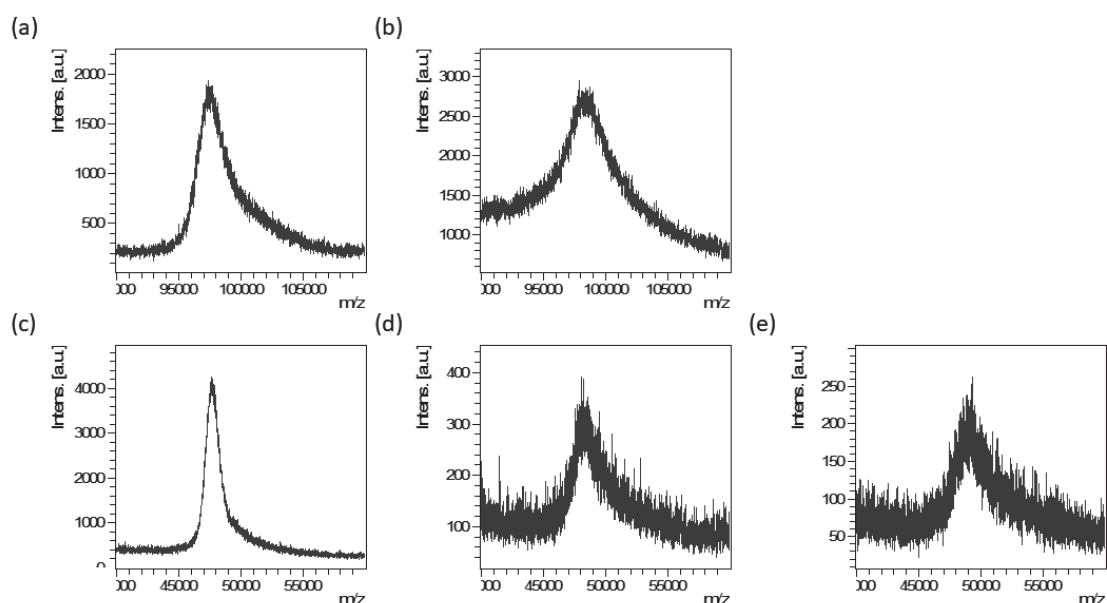


Figure 5. MALDI TOF-MS spectra, displaying singly-protonated ion mass region, C-F(ab')₂ before reaction (a) and after (b), naked C-Fab (c) and DTPA conjugated C-Fab by method 1(d) and method 2(e).

(7) ¹¹¹In 標識 N-Fab の標識合成と SFTSV 感染細胞への結合評価

¹¹¹In 標識 C-IgG および ¹¹¹In 標識 N-Fab の合成は、DTPA-N-Fab を標識前駆体として用い、^{[111]In}Cl₃ を acetate buffer 中で反応させることにより合成を行った (Figure 5)。続いて、SFTSV 感染 Vero E6 細胞 (MOI-0.1) における、¹¹¹In 標識体の 細胞膜表面および細胞内の N タンパク質への結合性に関する検討を行った。感染細胞は、固定化処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。その結果、¹¹¹In-C-IgG においては、固定化処理のみ群および固定化・膜透過処理群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、¹¹¹In-N-Fab は SFTSV 細胞への抗体結合率が ¹¹¹In-C-IgG よりも有意に高く、さらに ¹¹¹In-N-Fab の非感染細胞への結合率と比較しても有意に高い結合を示した。

また、¹¹¹In-N-Fab の非感染細胞における結合率は ¹¹¹In-C-IgG と大きく変わらなかったが、SFTSV 感染細胞においては、¹¹¹In-C-IgG の結合率と比較して、有意に高い結合率を示した。従って、¹¹¹In-N-Fab 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における結合率は固定化処理のみの群と比較して、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 ¹¹¹In-N-Fab の有意な結合率上昇が確認された。従って、¹¹¹In-N-Fab 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に存在しているのではなく、エボラウイルスと同様な挙動もしくは異なった形で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}In -N-Fab 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、 ^{111}In -N-Fab 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。

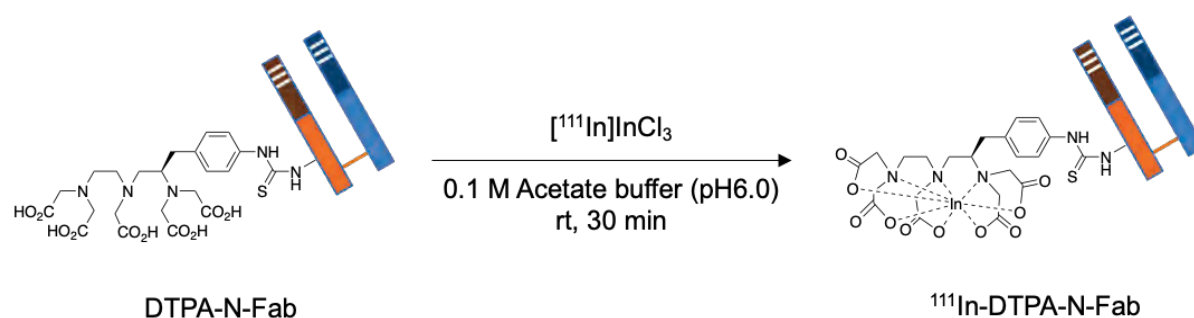


Figure 5. Radiosynthesis of ^{111}In -DTPA-N-Fab.

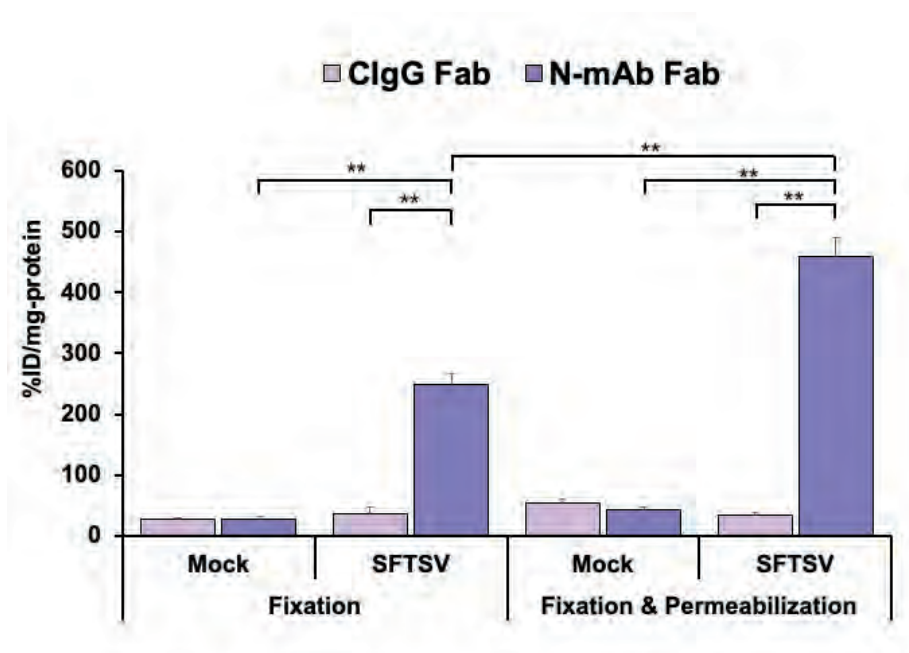


Figure 6. *In vitro* binding of ^{111}In -C-IgG and ^{111}In -N-Fab in SFTSV-infected (MOI-0.1) and mock infected Vero E6 cells. Vero E6 cells were processed only fixation or fixation and

permeabilization. $**P < 0.01$ (One-way ANOVA and tukey-kramer post-hoc test). Values are mean $\pm$ SEM, n = 8.

(8) 病態の治療や診断を目的としたセラノスティクスのための基礎研究

感染症セラノスティクスへの応用を目的としたがんや感染症の標的として期待されるカチオン性リン脂質²、インテグリン³、プリオンタンパク質⁴などを標的とした分子プローブ開発を行い、有用な分子を見出した。

③ 成果の公表

1. 矢野恒夫、淵上剛志、高橋 豊、角永悠一郎、長谷川功紀、加藤弘樹、渡部直史、樺山一哉、山村朝雄、佐藤達彦、平林容子、藤井博史、米倉義晴、深瀬浩一
アルファ線核医学治療のための薬剤開発の考察（その8）最終回

—ウイルス感染症アルファ線核医学治療への挑戦—

PHARM TECH JAPAN, 2022 年 10 月号 (Vol.38 No.13).

2. Fuchigami T, Chiga T, Yoshida S, Oba M, Fukushima Y, Inoue H, Matsuura A, Toriba A, Nakayama M. Synthesis and Characterization of Radiogallium-Labeled Cationic Amphiphilic Peptides as Tumor Imaging Agents. *Cancers*, **13**, 2388 (2021).

3. Echigo H, Mishiro K, Fuchigami T, Shiba K, Kinuya S, Ogawa K. Synthesis and Evaluation of a Dimeric RGD Peptide as a Preliminary Study for Radiotheranostics with Radiohalogens. *Molecules*, **26**, 6107 (2021).

4. Nakaie M, Katayama F, Nakagaki T, Kawasaki M, Yoshida S, Toriba A, Ogawa K, Nishida N, Nakayama M, Fuchigami T. Synthesis and Characterization of Hydroxyethylamino- and Pyridyl-Substituted 2-Vinyl Chromone Derivatives for Detection of Cerebral Abnormal Prion Protein Deposits. *Chem Pharm Bull*, **70**, 211-219 (2022).

6. 自己評価

今年度は $^{111}\text{In-N-Fab}$ の合成法確立と感染細胞を用いた基礎的な評価を行い、その有用性を見出すことができた。一方で、2021 年 6 月に金沢大学へ異動となり、レポーター遺伝子を導入した組換えウイルスの構築や感染マウスを用いた SPECT 評価は達成できなかった。

7. 達成度（何れかに○）

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 3（2021）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：2021-A-01

開催期間：令和 3 年 8 月 16 日（月）～令和 3 年 8 月 18 日（水）

2. 代表者：Nguyen Tien Huy

（長崎大学大学院熱帯医学・グローバルヘルス研究科・准教授）

参加人員：57 名

3. 決定額：1,000 千円

4. 研究集会の概要

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。

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、令和 3 年 8 月 16 日～8 月 18 日の 3 日間、講師 8 名（うち外国から 4 名、国内から 4 名）と参加者 49 名（うち外国から 33 名、国内から 16 名）を集め開催された。FERCAP-Philippines（フィリピン国）の Cristina Torres, Prince of Songkla University（タイ国）の Utcharee Intusoma、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へ講義を依頼し、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 程：令和3年8月16日（月）、8月17日（火）、8月18日（水）

参加費：無料

主 催：長崎大学熱帯医学研究所

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

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

E-mail：hiraken@nagasaki-u.ac.jp

【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 (SIDCER-FERCAP)、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)、
Kwanchanok Yimtae (Khon Khen University)、
森本浩之輔(長崎大学熱帯医学研究所)、Juntra Karbwang (SIDCER-FERCAP)、
平山謙二(長崎大学熱帯医学・グローバスヘルス研究科)

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) 2021年 8月16日(月)

- 9:30～10:00 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
- 10:00～10:45 研究倫理の概論, その歴史的背景と原理 (Juntra Karbwang)
- 10:45～10:55 ブレイク
- 10:55～11:40 研究倫理委員会の役割と機能 (Utcharee Intusoma)
- 11:40～12:25 インフォームド・コンセント (Juntra Karbwang)
- 12:25～13:25 ランチタイム
- 13:25～13:55 利益相反 (Kwanchanok Yimtae)
- 13:55～14:40 リスク・ベネフィット評価 (Cristina Torres)
- 14:40～14:50 ブレイク
- 14:50～15:50 Case Study 1 : グループ討論
(Cristina Torres, Kwanchanok Yimtae, Utcharee Intusoma, 森本浩之輔, Juntra Karbwang, 平山謙二)
- 15:50～17:20 Case Study 1: 総合討論 (Juntra Karbwang, Kwanchanok Yimtae)

(第2日目) 2021年 8月17日(火)

- 9:30～10:00 薬理ゲノム学研究における倫理的問題 (平山謙二)
- 10:00～10:45 救急医療研究における倫理的問題 (Kwanchanok Yimtae)
- 10:45～11:30 疫学のおよび社会的研究における倫理問題 (Cristina Torres)
- 11:30～11:40 ブレイク
- 11:40～12:40 小児科研究における倫理的問題 (Utcharee Intusoma)
- 12:40～13:40 ランチタイム
- 13:40～15:40 Case Study 2 : グループ討論
(Cristina Torres, Kwanchanok Yimtae, Utcharee Intusoma, 森本浩之輔, Juntra Karbwang, 平山謙二)
- 15:40～15:50 ブレイク
- 15:50～17:20 Case Study 2 : 総合討論 (Juntra Karbwang, Kwanchanok Yimtae)

(第3日目) 2021年 8月18日(水)

- 9:30～11:00 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
- 11:00～11:10 ブレイク
- 11:10～12:10 グループ討論結果の発表 (Cristina Torres, Juntra Karbwang)
- 12:10～ 修了式 (平山謙二)

【参加者リスト】（不明箇所は空欄）

	Name	Country	Institution
1	Dr. Maria Salome N. Vios	Phillipines	Philippine Health Research Ethics Board
2	Dr. Myrna Buenaluz-Sedurante	Phillipines	Manila Doctors Hospital - Institutional Review Board
3	Dr. Maria Epifania V. Collantes	Phillipines	Manila Doctors Hospital - Institutional Review Board
4	Dr. Albert B. Albay, Jr.	Phillipines	Manila Doctors Hospital - Institutional Review Board
5	Dr. Maria Karen Luisa Villanueva-Timbol	Phillipines	Manila Doctors Hospital - Institutional Review Board
6	Ptr. Jose Rico S. Domingo	Phillipines	Manila Doctors Hospital - Institutional Review Board
7	Dr. Jacinto Blas Mantaring III	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
8	Dr. Cecilia Jimeno	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
9	Dr. Virginia De Jesus	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
10	Dr. Josefina Tuazon	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
11	Dr. Marilen Balolong	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
12	Dr. Ryner Carrillo	Phillipines	UP Manila Research Ethics Board
13	Dr. Zharlah Gulmatico-Flores	Phillipines	Jose R. Reyes Memorial Medical Center - Institutional Review Board
14	Dr. Ida Marie Tabangay-Lim	Phillipines	Jose R. Reyes Memorial Medical Center - Institutional Review Board
15	Dr. Crismelita Mariñas-Bañez	Phillipines	Jose R. Reyes Memorial Medical Center - Institutional Review Board
16	Dr. Michelle Yau-Otayco	Phillipines	Jose R. Reyes Memorial Medical Center - Institutional Review Board

17	Dr. Pompeyo R. Bautista, Jr.	Phillipines	Jose R. Reyes Memorial Medical Center - Institutional Review Board
18	Dr. Juan Maria Pablo Nañagas	Phillipines	Asian Eye Institute Research Ethics Committee
19	Dr. Gladness Henna Martinez	Phillipines	Asian Eye Institute Research Ethics Committee
20	Prof. Marilyn Crisostomo	Phillipines	Asian Eye Institute Research Ethics Committee
21	Noemi Luz Mojares	Phillipines	Asian Eye Institute Research Ethics Committee
22	Dr. D. Darwin A. Dasig	Phillipines	Makati Medical Center Institutional Review Board
23	Dr. Carolyn A. Butler	Phillipines	Makati Medical Center Institutional Review Board
24	Ms. Imelda Santiago	Phillipines	Makati Medical Center Institutional Review Board
25	Maria Belen A. Balbuena	Phillipines	Department of Science and Technology - Philippine Council for Health Research and Development
26	Reichel Ann P. Refuerzo	Phillipines	Department of Science and Technology - Philippine Council for Health Research and Development
27	Dr. Angela Du	Phillipines	
28	Anothai Pocathikorn	Thailand	Human Research Ethic Committee, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University
29	Jarruphong Noitumyae	Thailand	Faculty of medicine, MD, Naresuan University, Thailand
30	Siriwan Tangjitgamol	Thailand	Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine Vajira Hospital, Navamindradhiraj University

31	NGUYEN THANH VU	Socialist Republic of Viet Nam	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
32	Yudai Ozeki	Japan	Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University A member of Department of Emerging Infectious Diseases, Institute of Tropical Medicine
33	MOSES LORENZO AKYEH	Republic of Ghana	Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
34	NGUYEN THI THANH NGAN	Socialist Republic of Viet Nam	Virology Department, NEKKEN, Nagasaki University
35	MD MAHMUDUL HASAN	People's Republic of Bangladesh	Department of Stem Cell Biology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University
36	Gerald Kiboi Nganga	Republic of Kenya	International Health in KEMRI, Graduate school in Kenya
37	Akihiro Inano	Japan	Clinical Research Center, Fukushima Medical University Hospital
38	Yoshifumi Saijo	Japan	Graduate School of Biomedical Engineering / School of Medicine, Tohoku University
39	Zanaa Ankhjargal		Medical Philosophy and Ethics, Gunma University
40	Chiharu Tateishi	Japan	The executive office of ethics committee, Osaka municipal University
41	Liu Wentao		Nagasaki University
42	Nie Han	China	Nagasaki University
43	Nguyen Van Phu Thang	Socialist Republic of Viet Nam	Department of Tumor and Diagnostic Pathology
44	Dr. Sumonmal Manusirithaya	Thailand	Physician (Gynecologist), and a member of ethics committee at Watchara Hospital, Bangkok, Thailand.
45	Adewuyi Sunbo		Nagasaki University
46	MAO Zhan Qiu		Nagasaki University
47	Xu Qiang		Nagasaki University
48	yarob ibraheem		Nagasaki University
49	Akar Stephen		Nagasaki University

6. 自己評価

令和3年8月16日～8月18日の3日間、オンラインで、英語による倫理に関する国際研修コースを開催し、講師8名（うち外国から4名、国内から4名）と参加者49名（うち外国から33名、国内から16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20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）

④ （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 3（2021）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：世界保健ニーズに応える医薬品研究開発ディプロマ・コース

採択番号：2021-A-02

開催期間：令和 4 年 3 月 14 日（月）～令和 4 年 3 月 18 日（金）

2. 代表者：田中義正（先端創薬イノベーションセンター・教授）

参加人員：39 名（講師 14 名、受講者 25 名）

3. 決定額：1,000 千円

4. 研究集会の概要

薬剤、ワクチン、診断薬などが作り出されるまでには種々の複雑な行程があり、そこには多様な技術が求められます。製薬研究開発に携わる者は常にその全行程を視野に入れ他の行程を請け負う科学者、技術者たちへの配慮が必要です。研究者がある仮説を立ててそこから新たな発見、知識を導き出そうとし、理論を構築してそれを実証します。製薬企業などの開発担当者はその発見、知識を基に市場で需要の高い製品を作り上げる こととなるのです。本来、研究と開発は二つのまったく異なる分野であり、研究者と開発者はまったく異なる価値観と考え方を持っており両者はお互いに接触することもなく、そのため相互に理解することはありません。が、新薬誕生にその二つの分野はいずれも欠くことができません。新薬開発のあらゆるプロセスにかかわる者は、それぞれの責任を認め他のプロセスを実施するものとの連携の中に業務を遂行しなければなりません。表記のディプロマ・コースは、このような現状にある新薬研究開発にかかわる多種の知識を 専門的にひとつの課程にまとめ、修士、博士の学位を授けるものとして発足しました。

5. 実施報告：

<プログラム>

日時：令和 4 年 3 月 14 日（月）～3 月 18 日（金）

場所：zoom 開催

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

【研修の目的】

ディプロマ・コースの目的は新薬研究開発の課程にかかわる基礎知識の授与にあります。化学、毒物学、臨床検査法的規制などが研究開発という一連の過程に相互に影響しあって包括されているという事実を参加者が経験的に知ることでもあります。

【対象者】

ディプロマ・コースは内容の専門性と、講義が英語で行われることから、参加資格を以下のとおりとします。

- ・理科系学部のいずれかにおいて学士を取得している。
- ・英語の講義が理解できる

【研修方法】

「ディプロマ・コース」では、すべての参加学生が製品開発のプロセスの概要を理解できるような共通の授業を受けることになります。約 2 週間のコース全体を 7 つの独立したモジュール(ユニット)に分け、ユニットごとの部分受講も可能です。

【講師陣】

No.	Name	Country	Institution
1	Chitr Sitthi-amorn	Thailand	Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
2	Hiroshi Kato	Japan	Nihon University, Japan
3	Hitoshi Sasaki	Japan	Nagasaki University
4	Ichiro Arai	Japan	Nihon Pharmaceutical University, Japan
5	Juntra Karbwang-Laothaborn	Thailand	Thammasat University, Thailand
6	Kenji Hirayama	Japan	School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University
7	Kesara Na-bangchang	Thailand	Chulabhorn International College of Medicine, Thammasat University
8	Kiichiro Tsutani	Japan	The Institute of Seizon and Life Sciences, Japan
9	Shusaku Mizukami	Japan	School of Tropical Medicine and Global Health, Nagasaki University

10	Shyh-Yuh Liou	Japan	Ono Pharmaceutical Co, Ltd, Japan
11	Sonoda kengo	Japan	KM Biologics Co, Ltd, Japan
12	Tsuyoshi Kihara	Japan	Department of Shionogi Global Infectious Diseases Division of Tropical Medicine, ,Nagasaki University
13	Yamamoto Hiroshi	Japan	Clinical Reserch center, Nagasaki University Hospital, Japan
14	Yoshimasa Tanaka	Japan	Nagasaki University Center for Medical Innovation

【研修コースの概要】

Module 1: Introduction

Recognize the concept needs of PRD in the medical and global view of health

(Day 1) March 14, 2022 (Monday)

09:30–10:00 Welcome address and Objective of the course

Professor Dr. Juntra Karbwang

10:00–11:00 Overview of product research and development and stakeholders

Professor Dr. Juntra Karbwang

11:00–12:00 Key medical and public health issues, and the need for new products

Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan

12:00–13:00 Lunch

Module 2: Drug Discovery and Development

Session 1: Discovery

Describe the pharmacological process for drug discovery. Identify the process to protect intellectual property.

13:00–15:30 History and overview of drug discovery:

History of drug discovery,

Drug target and drug modality,

Conventional small molecule drugs and biomedicines

	The role of biotech companies in drug discovery <i>Professor Dr. Yoshimasa Tanaka, Nagasaki University, Japan</i>
15:30 -15:45	Break
15:45- 17:00	Immune checkpoint inhibitors, Cell-based therapy <i>Professor Dr. Yoshimasa Tanaka, Nagasaki University, Japan</i>

(Day 2) March 15, 2022 (Tuesday)

Session 2: Pre-clinical Development

Describe the process of pharmacological development

9:00- 10:30	Overview: Pre-clinical study requirements for human clinical studies Assessing of Drug Safety: The role of toxicology -Objective and Type of Toxicology -Exploratory Toxicology -Regulatory Toxicology -Toxicity Measures and Toxicity Test <i>Professor Dr. Tsuyoshi Kihara, Nagasaki University, Japan</i>
10:30-10:45	Break
10:45-12:00	Pharmaceutical Development and CMC <i>Professor Dr. Hitoshi Sasaki, Nagasaki University, Japan</i>
12:00-13:00	Lunch
13:00-14:30	Pharmacogenomics -Anticipated Benefits -Polymorphisms in Drug Targets - Polymorphisms in ADME -Pharmacogenomics Testing -Pharmacogenomics in Clinical Trials -Examples <i>Dr. Shyh-Yuh Liou, Adviser of Ono Pharmaceutical Co,Ltd,Japan</i>
14:30-14:45.	Break
14:45-16:15	Biopharmaceuticals -Development of Biopharmaceuticals -Type of Biopharmaceuticals -Issues related to the use of Biopharmaceuticals (Antigenicity, Stability, Drug delivery) <i>Professor Dr. Tsuyoshi Kihara, Nagasaki University, Japan</i>

(Day 3) March 16, 2022 (Wednesday)

Session 3: Clinical Development

- 09:00-09:30 Overview of clinical development
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 09:30-10:00 Investigational Phases of Clinical Research (I - I V) and Study Design
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 10:00-10:30 Clinical Development Plan
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 10:30-10:45 Break
- 10:45-11:15 Regulatory Framework
Professor Dr. Hiroshi Yamamoto Nagasaki University, Japan
- 11:15-12:15 Pharmacokinetics (Non-clinical & Clinical)
Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand
- 12:15-13:15 Lunch
- 13:15-14:45 Patents in Drug Discovery:
-Publication vs Patents, Patent system, Type of Patent
Professor Dr. Hiroshi Kato, Nihon University, Japan
- 14:45-15:00 Break

Session 4: Traditional Medicine

Underline the importance of traditional medicine in PRD

- 15:00-16:00 Introduction of traditional medicine and its role in modern age
Professor Dr. Kiichiro Tsutani, The Institute of Seizon and Life Sciences, Japan
- 16:00-17:00 Regulation for traditional drug development
Professor Dr. Ichiro Arai, Nihon Pharmaceutical University, Japan

(Day 4) March 17, 2022 (Thursday)

Module 3: Vaccine Discovery and Development

Session 1: Discovery

Describe the principles of basic immunology. Describe the process of vaccine Discovery

- 9:00- 10:00 Historical overview of vaccine Discovery, and Vaccines for infection control

Professor Dr. Kenji Hirayama, Nagasaki University, Japan

Session 2: Pre-Clinical Development

Describe the process of pre-clinical development of vaccine

- 10:00-12:00 Vaccine platform Technology and Adjuvant Development
Associate Professor Dr. Shusaku Mizukami, Nagasaki University
- 12:00-13:00 Lunch
- 13:00-14:00 Immunogenicity and protect activity
Safety assessment: Toxicity test in animals: regional complications,
Systemic toxicity
Associate Professor Dr. Shusaku Mizukami, Nagasaki University
- 14:00-14:15. Break

Session 3: Clinical Development

Describe the process of vaccine clinical development

- 14:15-15:00 Assessment of pre-clinical information
Director, Kengo Sonoda, BM Biologicals, Co Kumamoto, Japan
- 15:00-16:00 Clinical development plan
Director, Kengo Sonoda, BM Biologicals, Co Kumamoto, Japan
- 16:00-16:15 Break
- 16:15-17:00 Dose selection and regimen
Director, Kengo Sonoda, BM Biologicals, Co Kumamoto, Japan

(Day 5) March 18, 2022 (Friday)

Module 4: Good Clinical Practice

Describe the concepts of GCP, Recognize the principles of Ethics in research and the functions of the Ethics Committee

- 9:00-10:00 Concept and principles of Good Clinical Practice
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 10:00-10:45 Principles of Research Ethics and Ethics Codes and Guidance
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 10:45-11:00 Break
- 11:00-12:00 Responsibilities: Sponsor, Monitors, DSMB
Professor Dr. Juntra Karbwang, Thammasat University, Thailand
- 12:00-13:00 Lunch
- 13:00-14:00 Clinical Data Management

Professor Dr. Kesara Na-bangchang, Thammasat University, Thailand

Module 5: Post-registration Activities

Describe post-registration activities for medical products

14:00-14:30 Overview

*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand*

14:30 -15:30 Improving the quality of new products in health systems:

An international network of rational use of drugs

*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand*

15:30 -15:45 *Break*

15:45-16:45 Post-marketing product vigilance

*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand*

16:45 -17:30 Stakeholders to be involved in making product development
work for the intended beneficiaries

*Professor Dr. Chitr Sitthi-amorn, Chulalongkorn University,
Bangkok, Thailand*

17:30-17:45 CLOSING CEREMONY

【参加者リスト】

No.	Name
1	Abeer Fawzi Eltuhami Medani
2	ASHURKEVICH ALIAKSEI
3	Awet Alem Teklemichael
4	Dr Krishna Kumar B
5	Elizabeth Ajema Chebichi Luvai
6	Emmanuel John Tabilin
7	Hsu Thinzar Maung
8	Joseph Tee
9	KHINE MYA NWE
10	MOSES LORENZO AKYEH
11	Mutantu Nsele Pierre
12	Ng'etich Japheth Kibet

13	NGUYEN THI THANH TAM
14	Normalita Eka Pravitasari
15	Nundu Sabiti Sabin
16	okino shun
17	Patrick Mukadi
18	Rajib Acharjee
19	Rhanee L. Salvado
20	SICHA SIRATHAMRONGLERT
21	Su Myat Han
22	Thanawat Khongyot
23	Thi Thanh Ngan Nguyen
24	Tomomi ichida
25	Too Edwin Kimeli

6. 自己評価

令和4年3月14日（月）～3月18日（金）の5日間、オンラインで英語によるコースを開催し、講師 14 名（うち外国から 3 名、国内から 11 名）と参加者 25 名を集め、世界でも類をみない集会を開催した。

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

第 3 部

海外拠点連携共同研究

令和3（2021）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：2021-Kyoten-01

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）

研究協力者：渡辺麻衣子（国立医薬品食品衛生研究所）

辺 彩（千葉大真菌センター・学生）

平山美咲（千葉大真菌センター・学生）

3. 決 定 額： 7,500 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、分子系統学的、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。

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 3（2021）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、 β -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、全ゲノムを利用した多遺伝子による系統樹は、calmodulin 遺伝子単独による系統樹では不明瞭であった分岐が明確になり、種の識別が可能となった。ケニア産とは異なる菌種が、日本の環境、臨床から分離された。さらに STACEY（複数の遺伝子の DNA 配列を用いて、種の区分と分岐群の推定）解析を実施したところ、種を 3 種に統合する結果であった。

2. ケニア各地で収集した穀物のカビ毒汚染

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。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たところ、アフラトキシン、フモニシンともに海岸地域での汚染率が高かった。カビ毒の汚染率、量が多くアウトブレイクが疑われる地域 Loitokitok があった。

3. 環境から分離された真菌の同定とカビ毒産生能

ケニア国ナイロビの生活環境中から分離された真菌の同定を実施したところ、*Fusarium*、*Cladosporium*、*Alternaria* の検出率が高かった。カビ毒フモニシンの産生が

認められている *F. oxysporum* からフモニシンの産生株はなかった。

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、これまでの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。

今年度は、Species Tree And Classification Estimation, Yarely (STACEY) 法による、複数の遺伝子の DNA 配列を用いて、種の区分と分岐群の推定を行った。方法の詳細は Fig. 1 に示した。

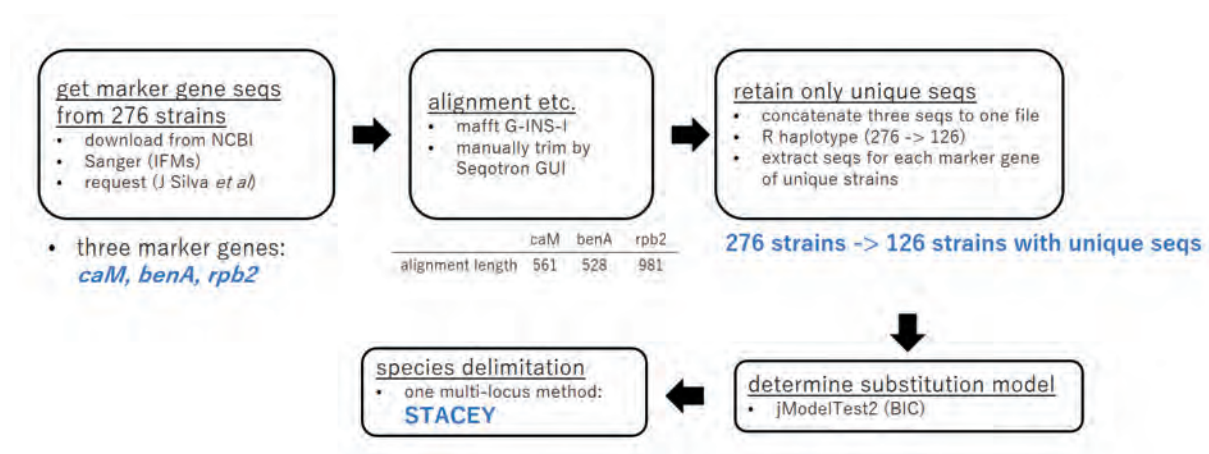


Fig. 1. Species Tree And Classification Estimation, Yarely (STACEY) 法

Varga et. al (2011) は calmodulin 遺伝子による系統解析で *Aspergillus niger* clade を 10 菌種に分類し、その後数種の新種が報告された Silva et al. (2020)。今回、ケニア、日本の分離株 (IFM 株)、NCBI 登録株、Silva et al. の解析株 計 276 株から *caM*, *benA*, *rpb2* 遺伝子配列の重複を除いた 126 株を選択し、jModelTest2 モデルを使用して核酸を置換し、STACEY 法で系統解析を実施した。結果を Fig. 2 に示す。

この結果では、これまで *Aspergillus niger* clade は 10 種 + α と考えられていたが、STACEY 法で系統解析ではこれらの種を 3 種に統合する結果であった。

従来の形態的な特徴で種を識別した場合、集落の色調が黒色と茶褐色、分生子の表面構造が刺状と滑面の相違から、*A. niger* と *A. laticoffeatus* とは識別されていたが、STACEY 法ではこの 2 種は同種と判断された。

今後、さらなる検討が必要と考えられる。

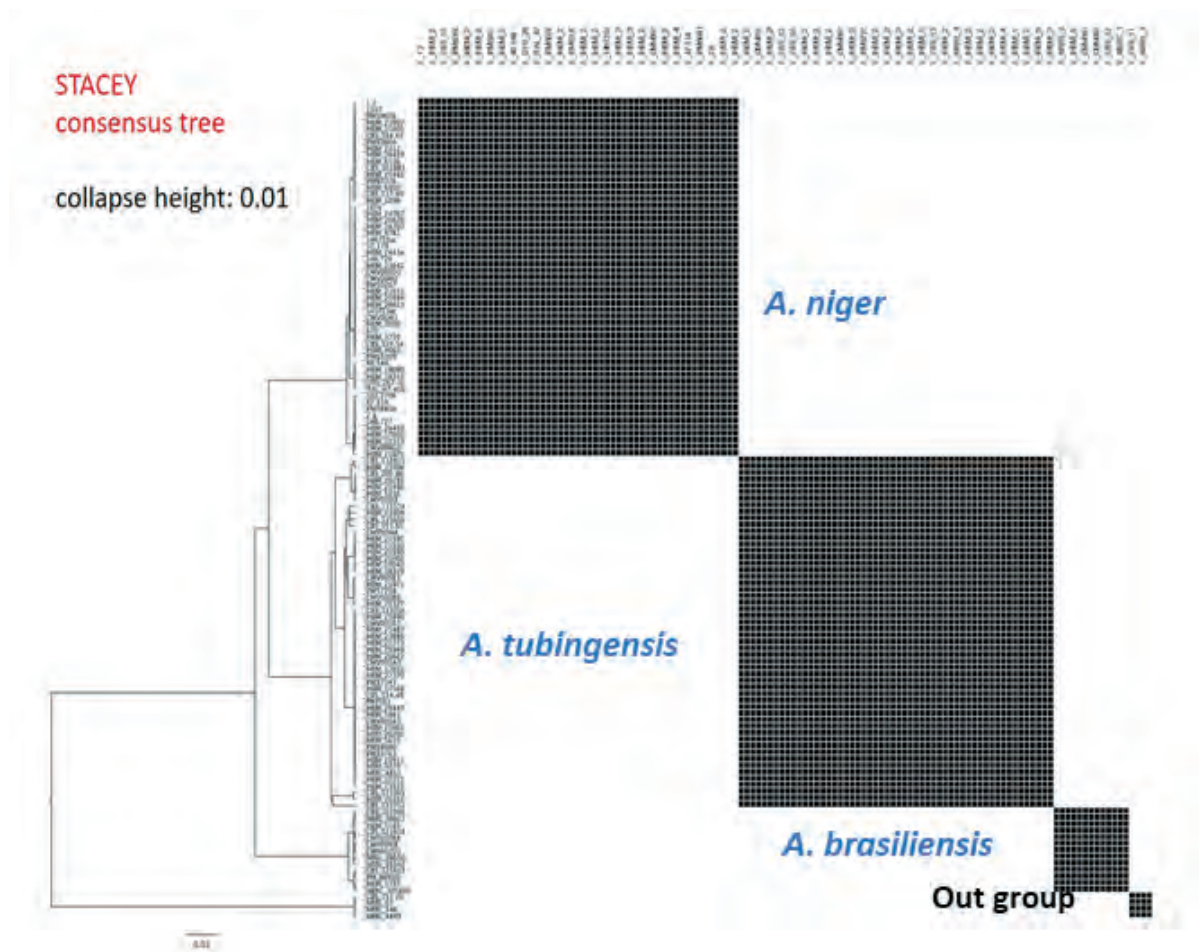


Fig. 2. STACEY 法で系統解析

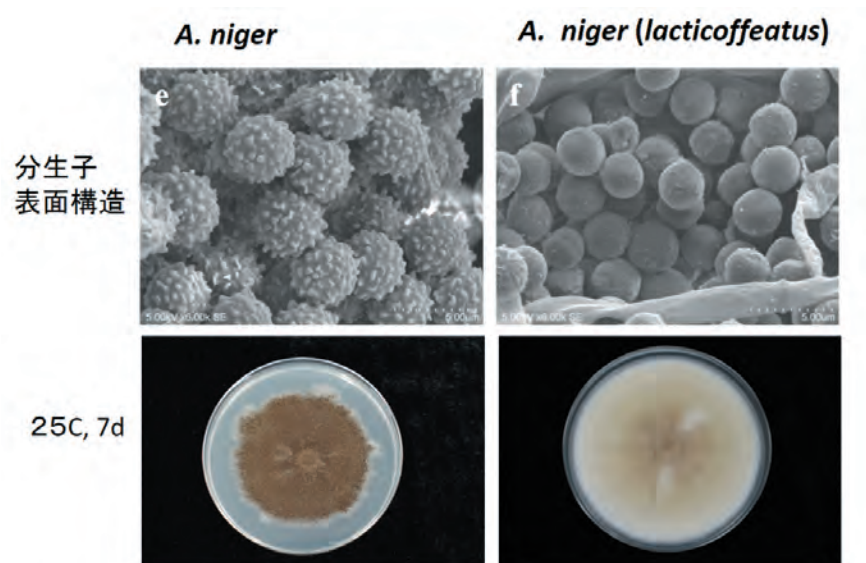


Fig. 3. *Aspergillus niger* と *A. lacticoffeatus* との形態的識別

2. ケニア各地で収集した穀物のカビ毒汚染

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。ケニア各地で収集したシリアルにおいて、アフラトキシン、フモニシンの検出結果を Table 1, 2 に示す。アフラトキシン、フモニシンともに海岸地域での汚染率が高かった。東部地区は年間雨量が多く、湿潤な気候で、西部地区は、年間雨量が少なく、乾燥した気候である。そのため東部地区の方が西部地区よりもカビ毒の汚染率、汚染量が多くなっている。

今回の調査で、アウトブレイクが疑われる地域 Loitokitok があった。この地域では、アフラトキシン、フモニシンとも規制値以上の検出が認められた。

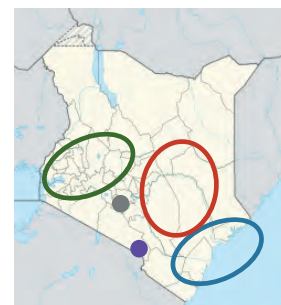


Table 1. シリアル中の Aflatoxin 濃度

地域	検体数	濃度 (ppb)					平均
		LOD	≤ 5	5.1≤10	10.1≤20	≥20	
		検出外	規制値内		規制値以上		
海岸	203	69 (34.0)	27 (13.3)	25 (12.3)	32(15.8)	50 (24.6)	9.6
東部	198	113 (57.1)	24 (12.1)	24 (12.1)	15(7.6)	22 (11.1)	2.96
西部	128	99 (77.3)	10 (7.8)	6 (4.7)	4 (3.1)	9 (7.0)	1.98
Nairobi	128	77 (60.2)	20 (15.6)	19 (14.8)	10 (7.8)	2 (1.6)	3.52
Loitokitok*	21	8 (38.1)	1 (4.8)	2 (9.2)	0	10 (47.6)	15.1
合計	678	366(54.0)	82(12.1)	76(11.2)	61(9.0)	93(13.7)	

Table 2. シリアル中の fumonisin 濃度

地域	検体数	濃度 (ppb)			平均
		LOD	0.1-≤4	>4	
		検出外	規制値内	規制値以上	
海岸	70	56 (80.0)	11 (15.7)	3 (4.30)	0.417
東部	161	69 (42.9)	90 (69.2)	2 (1.2)	0.84
西部	121	111 (91.7)	9 (7.4)	1 (0.8)	0.145
Nairobi	113	94 (83.2)	18 (15.9)	1 (0.9)	0.192
Loitokitok*	21	2 (9.2)	13 (61.9)	5 (23.8)	2.582
合計	486	332 (68.3)	141 (29.0)	7 (1.4)	

3. 環境から分離された真菌の同定とカビ毒産生能

1) 環境から分離された *Fusarium* の同定とフモニシンを産生能

ケニア国ナイロビの住環境から分離された糸状菌を分類検討した。その結果、*Fusarium* が優先的に分離され (Table 3)、*F. oxysporum* (EF α -1 遺伝子配列で同定) が優占種であった (Table 4)。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。

F. oxysporum は、植物病原菌で、真菌症原因菌としても近年、重要であり、カビ毒フモニシンを産生する。そこで、Fumonisin inducing liquid medium 30 mL を 200mL の三角フラスコに入れ、試験菌を接種し、7 日間・25℃で静置培養した (参考; Lopez-Errasquin, et al., J. Microbiol. Meth. 68:312-317, 2007)。培養液をフィルターろ過し、イムノクロマト法で培養液中の総フモニシンの検出を行った。さらに、フモニシン産生遺伝子クラスターにおける *fum6*、*fum8* 遺伝子の検出を行った (参考; Dawidziuk, et al., J. Appl. Microbiol. 116:1607-1620, 2014)。その結果、試験した 16 株中 4 株において *fum6*、*fum8* 遺伝子が検出されたが、フモニシンを産生する株はなかった (Fumo-V Striptest (VICAM) 検出器を使用して定量、検出可能範囲: 0.01 ~ 10 ppm)。

Table 3. 住環境からの真菌の分離

属	頻度 (%)
<i>Fusarium</i>	79.7
<i>Mucor</i>	11.9
<i>Acremonium</i>	54.2
<i>Cladosporium</i>	69.5
<i>Alternaria</i>	66.1
<i>Aspergillus</i>	32.2
<i>Penicillium</i>	27.1
Yeast	47.5

Table 4. 住環境から分離された *Fusarium*

菌種	分離株数
<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

2) 環境から分離した *Penicillium* の同定とカビ毒産生能

ケニア国ナイロビの住環境から分離された *Penicillium* において、パツリン合成の律速となる酵素をコードする *isoeopoxydon dehydrogenase (idh)* 遺伝子の有無を PCR で検出した (Fig. 4)。その結果、*P. griseofulvum* 2 株、*P. polonicum* 3 株において *idh* 遺伝子が検出された。

Table 5. 住環境から分離された *Penicillium*

菌種	分離株数
<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

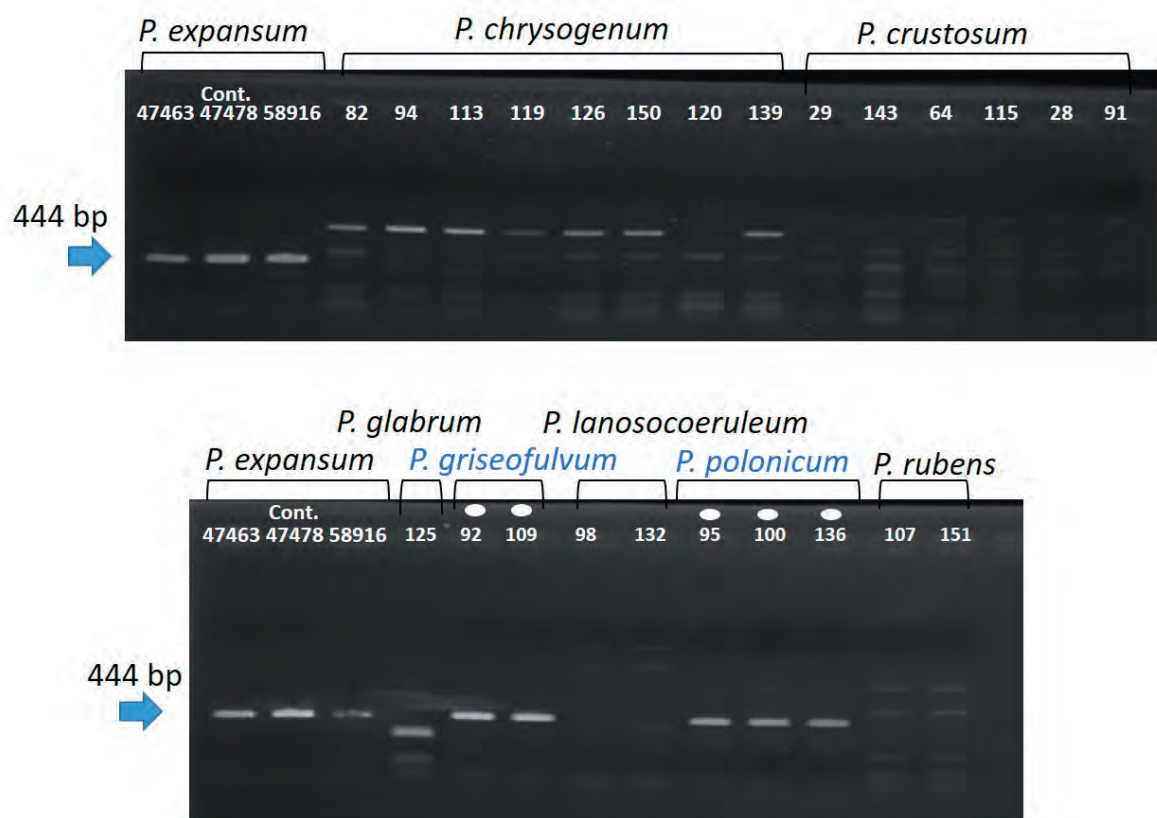


Fig. 4. Isoeopoxydon dehydrogenase (*idh*) 遺伝子の PCR による検出

PDB にマグネシウムを加えた液体培地 30 mL を 200mL の三角フラスコに入れ、試験菌を接種し、5 日間・25℃・220 rpm で振盪培養した（参考；Dmbrink-Kurtzman, et al. Int. J. Food Microbiol., 98:241-248, 2005）。培養液から酢酸エチルで代謝物を抽出し、HPLC にてパツリンの検出を行った。その結果、*P. griseofulvum* 1 株がパツリン 166 ppm を産生していた。

また、Czapek・yeast extract broth 30 mL を 200mL の三角フラスコに入れ、菌を接種し、10 日間・30℃で静置培養した（参考；Kuroda, et al., Toxicology, 311:216-24, 2013）。培養液から酢酸エチルで代謝物を抽出し、HPLC にてシトリニンの検出を行った。その結果、シトリニンを産生する株は見いだせなかった。

③成果の公表

今期は、成果の発表、論文はなかった。

6. 自己評価

本年度は主として、*Aspergillus niger* 関連種において、STACEY 法で系統解析を実施した。この結果では、これまで *Aspergillus niger* clade は 10 種 + α と考えられていたが、STACEY 法で系統解析ではこれらの種を 3 種に統合する結果であった。従来の形態的な特徴で種を識別した場合との相違を今後、さらなる検討が必要と考えられる。

また、KEMRI 所属の研究者と共同で、ケニア各地で収集したシリアルから、重要なカビ毒アフラトキシン、フモニシンの検出を行った。その結果、ケニアの地域ごとにカビ汚染の状況が異なり、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、重要なカビ毒の産生能、カビ毒産生に関わる遺伝子を検討した。

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使用して、その解析を進展させた。本プロジェクトは概ね実施計画どおり進展していると考ええる。

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 の自己評価で述べてあれば省略して良い)

実験等はある程度、順調に実施することができたが、論文作成に至らず、また、予定されていた国際シンポジウム（感染症研究グローバルネットワークフォーラム）がコロナ禍のため中止となり発表に至らなかったため、“実施計画どおり進展していない”と自己評価した。

8. 令和3（2021）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	1,206	1,206	
(運営費)	0	4,437	4,437	
(設備費)	0	1,857	1,857	イオンスパッタ装置、 薬用冷蔵ショーケース
計	0	7,500	7,500	

令和3（2021）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：2021-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）

久世 望（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）

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：7,500 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、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

2021 年度

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 2021 年度は、protective epitopes を含んでいる overlapping peptides 数が多い HLA-A*11:01 を 2020 年度に引き続き解析を行うとともに、同様に多い HLA-B*15:02, HLA-C*08:01 に焦点を当て、以下の解析をする。

1) 2020年度に同定したHLA-A*11:01に拘束したepitopesに対して、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。

2) 同定したHLA-A*11:01拘束性protective epitopes特異的なT cell linesを作製し、HIV-1増殖抑制能などを調べる。

3) overlapping peptides内に含まれているHLA-B*15:02, HLA-C*08:01に拘束したepitopesを同定する。

4) 同定したHLA-B*15:02, HLA-C*08:01に拘束したepitopesに対して、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。

(2) ベトナムで流行する HIV-1 の protective epitopes 内で蓄積する逃避変異の解析

1) 500名の HIV-1 subtype A/E の感染者の血漿を用いて、HLA-A*11:01、HLA-B*15:02, HLA-C*08:01 拘束性 protective epitopes 内のシーケンス解析を行い、変異の蓄積を調べる。これらの変異が特異的 T 細胞からの免疫逃避変異であるかを、それぞれの HLA との相関解析を行い明らかにする。

2) HIV-1 subtype B の感染者で見られる HLA-B*52:01 に相関する Gag280 部位の変異は、HIV-1 subtype A/E の感染者では異なった HLA に相関した変異が見られる。この 2 つの HIV-1 subtype 感染症で、異なった Gag280 部位の変異が蓄積される機序を明らかにするために、この変異が影響を与える T 細胞の解析を行う。

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) 2021 年度は、前年度に引き続き IDU の感染者の血漿 vRNA の V3 領域のコレセプター解析を行うとともに、長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点との共同研究として、混合感染症例における次世代シーケンサーを用いた解析を行う。2) これまでの結果から、R5 と X4 ウイルスの混合感染では、感染している CD4 陽性サブセットが異なる可能性が高いと考えられた。そこで、感染性 X4 ウイルスクローンが樹立された症例から、メジャー集団として存在している R5 ウイルス由来 HIV-1 断片を、血漿 vRNA からクローニングしこの断片と感染性 X4 クローンとのキメラ化を試みる。このキメラ化された R5 ウイルスクローンと元の X4 ウイルスクローンが、どのような CD4 サブセットに感染するかを解析する。これにより、感染する CD4T 細胞と R5/X4 ウイルスとの関連を明らかにする。

2022 年度以降

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

2021 年に明らかにした免疫逃避変異の候補が、実際に特異的 T 細胞の認識に影響を与えるかを、2022 年度に合成変異ペプチドを作成して調べる。また変異ウイルスを作製して、実際に変異ウイルス感染細胞を認識しないか明らかにする。これらの解析から、

ワクチン候補となる抗原部位の特定を行う。

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

2022 年度には、X4 と R5 ウイルスクローンの細胞指向性を決定している env 領域の決定を行う。また IDU 以外の HIV-1 感染症例での R5 と X4 ウイルスの混合感染の頻度を確認し、HIV-1 全体での混合感染の病態への役割を解析していく。またサブタイプ A/E 以外での混合感染の頻度との比較を行う。

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

既に 2020 年度に新たな HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞エピトープを多数同定することができた。2021 年度はまずこれらの中から、感染者の臨床進行指標に影響を与え、エイズ進行遅延に関与する T 細胞(protective epitope 特異的 T 細胞)の同定を試みる。解析するための臨床サンプルも既に収集しており、成果が得られると考えている。一方、HLA-B*15:02, HLA-C*08:01 拘束性 protective epitopes の同定も同じ方法で行うが、既に一部の新規 HLA-B*15:02, HLA-C*08:01 拘束性 epitope の同定ができており、これらも protective epitopes の同定も可能だと考えている。

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

2020 年度の解析からハノイの無治療コホートでの IDU の感染者では、混合感染が多いことが明らかになっている。引き続き 2021 年度も解析数を増やすことにより、混合感染の頻度をより正確に明らかにできる。また、これらの混合感染例の解析から、R5 から X4 ウイルスへの移行の機序を明らかにできることが期待される。

5. 実施状況報告：

①令和 3（2021）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

昨年度 185 名の HLA-A*11:01 陽性者の 17-mer peptide cocktail に対する反応を調べ、19 個のカクテルペプチドに、エイズ進行遅延に関与する HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞がいると予想され、この中で 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 細胞が誘導されていることが明らかになった。今年度は、このカクテル内に含まれる HLA-A*11:01 拘束性 T エピトープを同定した。

2. エイズ進行遅延に関与する HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞エピトープの同定

HLA-A*11:01 エピトープと同様に、エイズ進行遅延に関与する HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞がいると予想されるペプチドカクテルを明らかにし、さらにこれから HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞エピトープの同定を行った。

3. ベトナムで流行する HIV-1 の protective epitopes 内で蓄積する逃避変異の解析

上記で同定した HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞エピトープ部分のウイルスシーケンスを解析し、変異の蓄積がおきているかを明らかにした。さらにこの変異が、T 細胞の認識に与える影響を解析した。

4. ハノイ無治療コホートでのコレセプター利用性の解析

麻薬常用感染者における次世代シーケンサー解析を行い、R5 と X4 ウイルスの共存の解析を、次世代シーケンサーを用いて行う。R5 と X4 ウイルスが共存している症例に関しては、その共存の機序を明らかにする。すでに一部の症例に関しては X4 ウイルス感染性クローンを樹立した。さらにその症例の血漿由来 vRNA から得られた R5 ウイルス断片とのキメラ化を行い、R5 ウイルス感染性クローンも作製する。

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

10 種類のペプチドカクテルに対して HLA-A*11:01 拘束性に反応する T 細胞が誘導されていることが明らかになった bulk T cells を用いて、HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞エピトープの同定を行った。まずペプチドカクテルの中のどの single peptides に反応するかを調べ、反応した single peptides の truncated peptides を作製し、これに対する T 細胞の反応を調べて、エピトープを同定した。その結果、4 種類の Gag peptides と 6 種類の Pol peptides が、HLA-A*11:01 拘束性 T 細胞エピトープであることを明らかにした。またこれらのエピトープ特異的 T 細胞は、HIV-1 subtype AE ウイルスを感染させた細胞を認識できることを明らかにし、ウイルス感染細胞内で同定したエピトープが抗原提示されていることが示された。これらのエピトープに対する反応を、現在約 80 名の HLA-A*11:01 陽性患者で解析をしており、これによりいずれのエピトープ特異的 T 細胞がエイズ進行遅延に関与しているかが、明らかにできると思われる。

2. エイズ進行遅延に関与する HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞エピトープの同定

4 名の HLA-B*15:02 homozygotes の HIV-1 subtype AE ウイルス感染者の PBMC を用いて、Elispot assay を用いて、35 グループのペプチドカクテルに対する反応を調べた。その結果、21 種類のペプチドカクテルに対して少なくとも一人で反応を示した。Elispot assay で陽性を示した PBMC とペプチドカクテルを用いて、PBMC を培養しこれらのペプチドカクテルに対する HLA-B*15:02 拘束性の T 細胞の誘導を試みた。これらのペプチドカクテルに対する反応を ICS assay で検出したところ、5 種類のペプチドカクテルに対して HLA-B*15:02 拘束性 T 細胞を確認できた。次にこれらの T 細胞がどの single peptide に反応しているかを調べ、さらに陽性を示した 17-mer peptides の truncated peptides を作製して、これらのペプチドに対する T 細胞の反応を解析し、エピトープの同定を行った。その結果、2 つの Gag、3 つの Pol (内 2 つは 10-mer と 9-mer の superimposed epitopes)、1 つの Nef エピトープの同定ができた。またこれらのエピトープに特異的な T 細胞は、HIV-1 subtype AE ウイルスを感染させた細胞を認識できることを明らかにし、ウイルス感染細胞内で抗原提示されていることが示された。こ

これらのエピトープに対する反応を、現在約 80 名の HLA-B*15:02 陽性患者で解析しており、これによりいずれのエピトープ特異的 T 細胞がエイズ進行遅延に関与しているかが、明らかにできると考える。

3. ベトナムで流行する HIV-1 の protective epitopes 内で蓄積する逃避変異の解析

ハノイで流行している HIV-1 subtype AE ウイルスに関して、6 つの HLA-B*15:02 拘束性エピトープ部位のシーケンスを解析した。Gag, Pol, Nef のエピトープ部位、それぞれ 359 名、370 名、380 名の解析から、HLA-B*15:02 陽性者と陰性者を比較し、HLA-B*15:02 陽性者に蓄積している変異を同定した。その結果、PolTY9 のエピトープの 5 番目の V が I に変異したものが、HLA-B*15:02 陽性者に蓄積していることが明らかになった (図 1)。この変異エピトープ (PolTY9-5I) にたいする PolTY9 特異的 T 細胞の認識を調べたところ、PolTY9 に対して約 5 倍程度認識が低下することが分かった (図 2)。これらの認識の低下により、この変異ウイルスが選択されると考えられた。

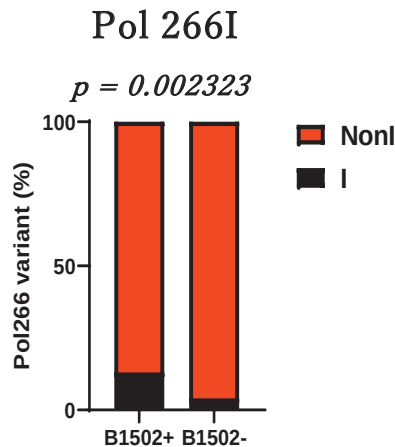


図 1

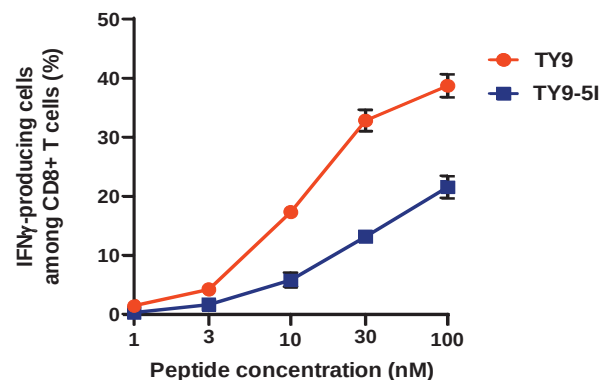


図 2

4. 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 19 例から、混合感染 (R5+X4) 7 例を含む 16 症例を選び、V3 領域の次世代シーケンサー解析を行った。結果、混合感染においてすでに明らかとなっていた配列以外にも、異なる集団として R5 や X4 ウイルス集団が形成されている症例 (図 3) があることが明らかとなった。また、X4 ウイルスのみの集団と考えられた症例でも、マイナー集団として R5 ウイルス集団が存在している例が示された (図 4)。次世代シーケンサーの解析から、HIV-1 は異なる形質を有する集団として形成されており、この中で、もっともその時の生体環境に適応しているものが選択されてメジャー集団となることが示唆された。感染後期における R5 から X4 へのスイッチもこのような機序が関与していることが推察された。

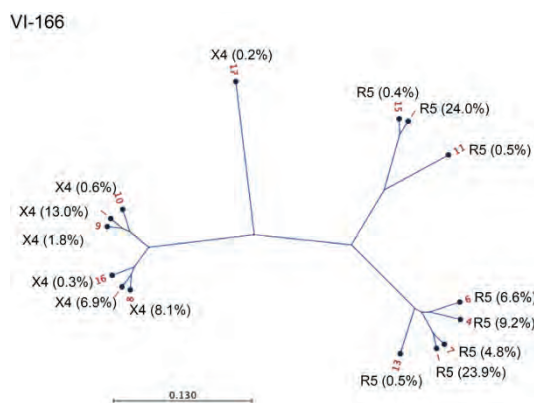


図 3 混合感染

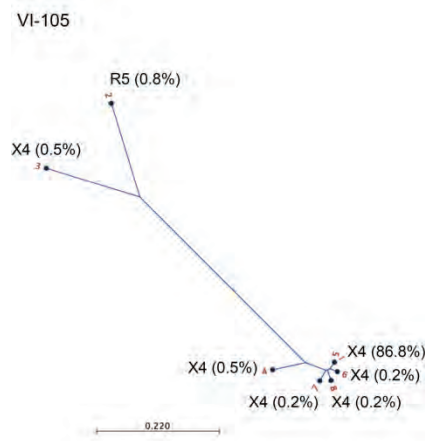


図 4 X4 ウイルス感染症例

③成果の公表

論文発表

1. 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

HIV-1 感染症での HIV-1 特異的 CTL エピトープの同定は、エイズの病態解析だけではなく、エイズワクチン開発、HIV-1 完治療法の開発にも重要である。しかしながら確実なエピトープとして同定されたもの（Best defined epitopes）のほとんどは、HIV-1 subtype B か C 由来のもので、HIV-1 subtype AE 感染地域での解析は非常に少なく、現在までには 17 種類しか報告されていず、Best defined epitopes として報告されているものの 10% 未満である。今回、ベトナムを含めた Subtype AE ウイルスが流行している東南アジアで頻度が多い HLA-A*11:01 および HLA-B*15:02 の拘束性のエピトープを合わせて 16 種類を同定できたことにより、今後この地域での HIV-1 特異的 CTL を用いた研究の環境を整えることができたと考えている。また現在これらのエピトープ特異的 T 細胞の内、どのエピトープに特異的 T 細胞が感染者体内で HIV-1 の増殖を強く抑制できているか解析を行っており、これらの解析により HIV-1 subtype AE 感染者で初めて **protective epitopes** を明らかにできる。このように細胞性免疫の研究領域に関しては実施計画の予定通りの結果が得られた。

コレセプター利用性の解析の解析では、麻薬常用感染者解析で、次世代シーケンサーを用いた解析により、混合感染のより詳細な実態を明らかにしつつあり、今後その詳細な実態を明らかにできると考えている。

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3(2021)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	2,580	2,580	
(運営費)	2,500	4,370	6,870	
(設備費)	0	550	550	
計	2,500	7,500	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3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4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>