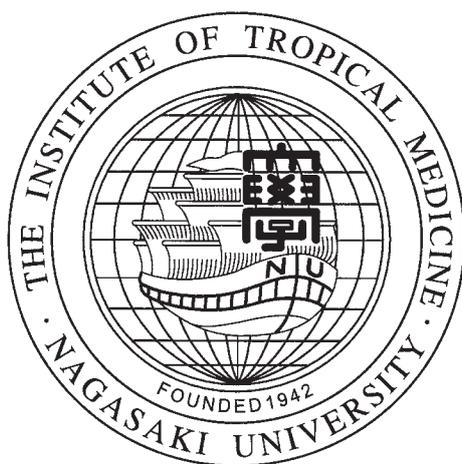


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和5年度
(2023)



長崎大学熱帯医学研究所

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ました。私の専門であるマラリアについても、新型コロナウイルス・パンデミックによる医療崩壊により、減少していた世界の感染者数は 20 年前のレベルまで戻り、アフリカでは 20 年前より増えてしまいました。

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標とします。

1. 国内外の研究基盤を活用した共同研究

先端的研究設備・機器やアジア・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協議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. トランスポゾンシーケンシングにより選択したビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の機能解析
代表者：柏本 孝茂（北里大学 獣医公衆衛生学 准教授） 1
2. 赤痢アメーバ由来レクチン Igl および抗原タンパク質の結晶構造解析
代表者：海野 英昭（長崎大学大学院 工学研究科 准教授） 6
3. 無症候性マラリア伝播の統合的理解に向けたコホート研究
代表者：Chim Wai Chan（大阪公立大学 講師） 13
4. 透明化技術を用いた住血吸虫感染員の解析
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） 19
5. サルモネラ感染マウス脾臓組織のFixed RNA Profilingによる単一細胞解析
代表者：奥崎 大介（大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授） 25
6. 結核菌の硫黄代謝メカニズムの解明
代表者：松尾 祐一（熊本大学大学院 生命科学研究部 助教） 32
7. サルモネラ全身感染メカニズムの解明と薬剤耐性菌治療への応用
代表者：羽田 健（北里大学 薬学部 講師） 37
8. SFTS ウイルスの免疫細胞内増殖機構の解明
代表者：宮本 翔（国立感染症研究所 感染病理部 研究員） 43
9. Discovery of anti-parasitic hits from the UFRN synthetic compound library
代表者：Alessandro Kappel Jordão (Associate Professor, Pharmacy Department,
Federal University of Rio Grande do Norte(UFRN)) 50
10. リーシュマニア感染に果たす宿主RP105/MD-1複合体の機能解析
代表者：高木 秀和（愛知医科大学 准教授（特任）） 57
11. Isolation of treponemal DNA from household insects in villages endemic with yaws in Ghana
代表者：Yotsu Rie Roselyne (Associate Professor, School of Public Health and
Tropical Medicine, Tulane University New Orleans United States of America) 63
12. ヒト iPS 由来肝細胞および肝オルガノイドを用いた熱帯熱マラリア原虫の感染特性の解析
代表者：片上 幸美（信州大学 公正研究推進講座 助教） 67
13. 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 病院薬剤部 教授） 75
14. サルモネラの宿主特異的全身感染に寄与する遺伝子の機能解析
代表者：岡村 雅史（帯広畜産大学 教授） 79

15. 原虫鉄利用を標的とした内臓型リーシュマニア症治療薬の開発	
代表者：後藤 康之（東京大学 大学院農学生命科学研究科 教授）	85
16. アスコフラノン産生真菌経口投与によるトリパノソーマ症予防法の確立	
代表者：菅沼 啓輔（帯広畜産大学 准教授）	90
17. 熱帯由来感染症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および単離・構造決定	
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）	95
18. コンゴ民主共和国におけるM痘ウイルス株の系統解析及び欧米蔓延株との比較	
代表者：安河内 彦輝（関西医科大学 附属生命医学研究所 講師）	101
19. Profile of Plasmodium species composition and its impact on school performance under COVID-19 issues among school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo	
代表者：NUNDU SABITI SABIN (Medical researcher, National Institute for Biomedical Research (INRB), Kinshasa, Congo, DR)	106
20. 亜熱帯植物・海洋生物等の天然資源由来の新規抗マalaria活性成分の探索	
代表者：松浪 勝義（広島大学大学院 医科学研究所 生薬学 教授）	110
21. マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝に関する研究：SmSUOXの寄生虫生活環における発現プロファイル解析	
代表者：河津 信一郎（帯広畜産大学 原虫病研究センター 教授）	114

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）	123
2. 日本顧みられない熱帯病アライアンス・ネットワークの維持管理とその運用	
代表者：平山 謙二（長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科 教授）	134

第3部 海外拠点連携共同研究

1. ベトナムにおける下痢症起因細菌のフィールド研究	
代表者：井口 純（宮崎大学 農学部 畜産草地科学科 准教授）	139
2. 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（大分大学 教授）	143
3. ケニアにおけるマイコトキシン産生菌の地理的分布に関する研究	
代表者：矢口 貴志（千葉大学 真菌医学研究センター 准教授）	148
4. アフリカ辺境地域における潜在性結核の実態と発症リスクの予測手法の構築	
代表者：風 幸世（東京女子医科大学 助教）	153
(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿	159

令和5（2023）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り選択したビブリオ バルニフィカスの生体内増殖必須遺伝子の機能解析

課 題 番 号：2023-Ippan-1

2. 代 表 者：北里大学 獣医公衆衛生 准教授 柏本 孝茂
共同研究者：長崎大学 細菌学分野 教授 児玉 年央
北里大学 獣医公衆衛生 講師 山崎 浩平
北里大学 獣医公衆衛生 学生 川手 真仁
北里大学 獣医公衆衛生 学生 樋口 究

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

研究の最終目標は抗生剤と併用可能な新規治療法の開発である。そのため、本研究計画では、死につながる重要なファクターである感染局所の筋肉内菌数を抑制するため、感染局所の皮下から筋肉内への *V.v.* の侵入機構における走化性受容体 (MCP) の機能を解明する。Tn-seq 法により同定した *V.v.* の皮下から筋肉内への侵入・増殖に必要と考えられた MCP 遺伝子の欠損株とその相補株を作成し、創傷感染モデルマウスに接種して致死への影響および皮下・筋肉内、および全身循環内での増殖に与える影響を野生株と比較解析する。加えて、MCP に対するリガンドの同定と濃度上昇機構の解明に取り組むと共に、リガンドをマウスに接種して、感染動態やマウスの致死に与える影響を解析する。また、Tn-seq の結果から、MCP 以外にも、感染制御に有用と思われる好中球からの逃避機に重要な遺伝子が検出されているため、並行して好中球逃避機構の解明にも取り組んでいきたい。

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。既に、Tn-seq 法により選抜された走化性受容体(MCP)のリガンド同定や、当該 MCP のべん毛運動への影響の解析法について、既に有用なアドバイスをいただいている。

<研究計画> 具体的には、昨年度、Tn-seq 法により同定した *V.v.* の持つ生体内増殖に必須の遺伝子の中から、致死要因となる筋肉内への侵入・増殖に寄与していると考えられた MCP 遺伝子を選抜し、以下の機能解析を行う。1) 選抜した当該 MCP をノックアウトした MCP 欠損株 (Δmcp) や、その相補株(*pmcp*)を作成し、マウスの致死性、皮下から筋肉内への侵入、皮下・筋肉内、および全身循環内での増殖に与える影響を野生株と比較解析する。2) 影響があった場合、MCP に対するリガンドの同定を試みる。3) 同定されたリガンドの濃度上昇機構を解明すると共に、リガ

ンドをマウスに接種して、感染動態やマウスの致死に与える影響を解析する。これらの研究結果から、抗生物質と併用可能な本菌の新規生体内増殖制御法の開発へと繋げる。

③ 予想される成果

これまで、*V.v.*のマウス創傷感染モデルを確立し、病態発生と菌の体内動態との関連性を詳細に解析して、感染局所の筋肉内での増殖がその後の致死へと繋がることを明らかにしてきた。加えて、網羅的病原遺伝子同定法により、筋肉内への侵入・増殖に重要な遺伝子を同定し、特定の走化性受容体(MCP)を見出した。本年度は、*V.v.*が感染局所の筋肉内への侵入に必要とするMCPのリガンドやリガンド濃度上昇機構を明らかにする。MCPに対するリガンドをマウスに接種することにより、菌の生体内における挙動を制御できる可能性がある。既に、創傷感染モデルマウスを用いた解析から、標的MCPの欠損により感染マウスの致死時間が延長することを見出している。本研究計画により得られる成果は、生体内増殖があまりに早く、抗生物質治療も効を奏さない、**本菌感染症の新規増殖制御法の開発に繋がる。**

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

申請計画通り、Tn-Seq法により同定した *V.v.* の持つ生体内増殖に必須の遺伝子である走化性受容体 *McpM* の機能解析および生体内における感染上の役割について解析した。*McpM* 遺伝子の完全欠損株である $\Delta mcpM$ を作出するとともに、べん毛は発現しているが、その回転制御機構の破壊により走化性が完全に失われている変異株 $\Delta cheY$ も作出し、これをコントロールとして以下の解析を行った。1) *In vivo imaging system (IVIS)* を用いて、感染局所の皮下において *McpM* が菌の増殖と拡散に果たす役割を解析した。2) 感染局所の筋肉を採取し、筋肉組織中菌数をカウントすることで感染局所の軟部組織深部への侵入における役割を解析した。3) 最少培地に各種アミノ酸を個別に添加し、菌の増殖を指標として *McpM* に対するリガンドの探索を行った。4) 創傷感染モデルにおける宿主（マウス）の致死性に対する影響を解析した。

② 成果（結果＋考察）

1) *IVIS* による解析の結果、野生株(WT)の発光シグナルは皮下組織において拡散後、消失した。走化性変異株である $\Delta cheY$ のシグナルの拡散範囲は狭く、WT よりも早く消失した。これらに対し、 $\Delta mcpM$ のシグナルは皮下組織を拡散後、上記2つの株よりも長時間皮下に留まっていた。

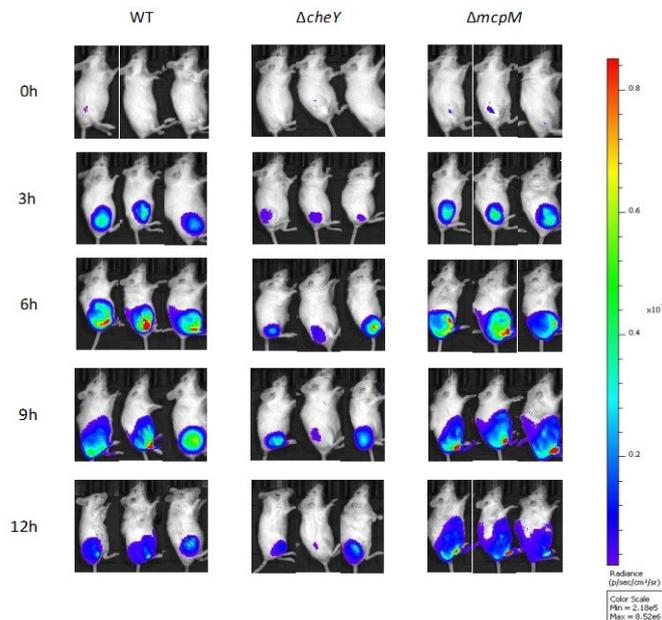


図 1. 軟部組織中の *V.v.* の拡散
IVIS 法によって検出した WT、 $\Delta cheY$ および $\Delta mcpM$ の発光シグナル ($n = 3/\text{group}$)。

2) WT に感染したマウスの筋肉中菌数と比較して、 $\Delta cheY$ および $\Delta mcpM$ に感染したマウスの筋肉中菌数は有意に少なかった。これら感染局所における解析の結果から、*McpM* は感染局所における皮下から筋肉内への効率的な侵入に必須であることが明らかとなった。

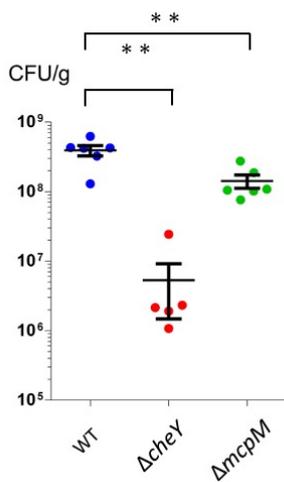


図 2: *V. vulnificans* 感染マウスの筋肉中菌数

マウスに皮下接種した WT、 $\Delta cheY$ 、および $\Delta mcpM$ の感染 12 時間後の筋肉中菌数 ($n = 6/\text{group}$)。各点は筋肉 1g 当たりから検出された C.F.U.を、エラーバーは S.E.M を示す。*** $P < 0.01$; Dunn's multiple comparison test

3) McpM がどのような物質を感知し、筋肉内へ侵入しているのかを明らかにするため、最少培地に 19 種のアミノ酸を個別に添加し、菌の増殖を指標としてリガンドの探索を行った。その結果、システインの添加により WT は増殖したが、 $\Delta mcpM$ の増殖は抑制された。この結果は *V.v.*が McpM によりシステインを感知することで、皮下から筋肉内へ侵入し、増殖していることを示唆している。

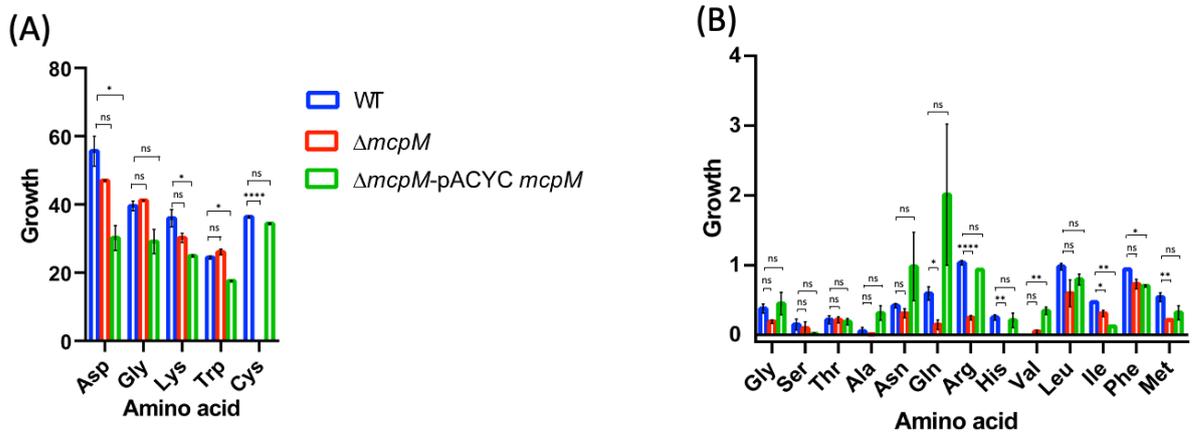


図 3: 走化性受容体のリガンドスクリーニング

(A および B) WT、 $\Delta mcpM$ 、および相補株 $\Delta mcpM$ pACYC-*mcpM* 1xflag のアミノ酸添加 M9 液体培地における培養前後の濁度 (O.D.₆₀₀ 値) の比。アミノ酸無添加の培地における WT の培養前後の O.D.の比が 20 未満(A)および 20 以上(B)。各エラーバーは S.E.M を示す。* $P < 0.1$ 、** $P < 0.01$ 、**** $P < 0.0001$; t-test

4) McpM 依存的な筋肉内侵入と増殖が致死性に及ぼす影響を調べるため、WT、 $\Delta cheY$ 、および $\Delta mcpM$ をマウスの右大腿部皮下に接種し、致死率と致死時間を比較した。 $\Delta mcpM$ に感染したマウスは全て死亡したが、WT に感染したマウスよりも生存時間が延長した。本研究により、走化性受容体 McpM は *V.v.*の示す致死性に不可欠な筋肉内への侵入という感染動態に関与していることが明らかとなった。

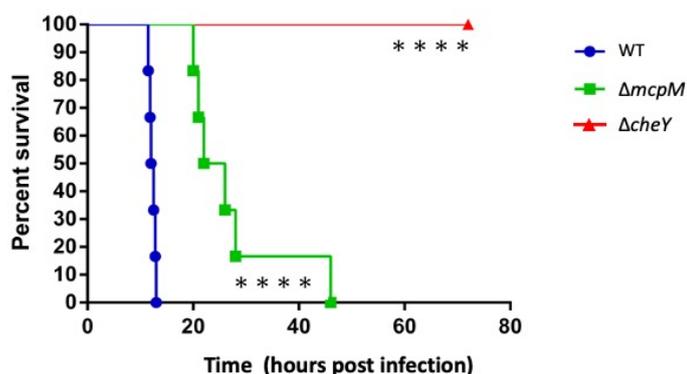


図 4. *V.v.*感染マウスの生存時間

WT、 $\Delta cheY$ および $\Delta mcpM$ を皮下接種したマウス ($n = 6/\text{group}$) のKaplan-Meier生存曲線。**** $P < 0.0001$; log-rank test

③ 成果の公表

機能解明が終了していないため、成果は公表していない。

6. 自己評価

V. v. は、30種以上の走化性受容体遺伝子を持っているが、それらのうちのひとつの走化性受容体により、創傷感染に影響を及ぼすことが明らかにできた。*V. v.* の走化性受容体 *McpM* は *V.v.* の示す致死性に不可欠である、感染局所における皮下から筋肉内への侵入に関与していることが明らかとなった。今後、生体内における *V.v.* の走化性機構の全貌を解明することで、病態の進行を遅らせ、感染を制御可能な治療法の確立に繋がることを期待される。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の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)
- IV (予想以上の成果を挙げられた)

評価を下した理由

走化性受容体のリガンドを推定するに留まり、特定するに至らなかった点

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：赤痢アメーバ由来レクチン Ig1 および抗原タンパク質の結晶構造解析
課題番号：2023-Ippan-03

2. 代表者：長崎大学大学院 工学研究科 准教授 海野 英昭
共同研究者：長崎大学 熱帯医学研究所 生態疫学分野 助教 加藤 健太郎
長崎大学大学院 工学研究科 教授 畠山 智充
長崎大学 工学部工学科化学 物質工学コース B4 松田 玲菜

3. 決定額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

1) Ig1 の構造解析研究

赤痢アメーバは腸粘膜に潰瘍をつくる事で大腸炎を発症させるが、その傷害発生機構の詳細は不明であった。長崎大学熱帯医学研究所の加藤らによって、世界で初めて赤痢アメーバのもつレクチン Ig1 に溶血活性および細胞傷害活性を確認され、Ig1 が関わる病原性発現機構が明らかになりつつある(K. Kato, *et al*, *Scientific Reports*, **5**, 13901, (2015))。

この Ig1 の持つレクチン活性および細胞傷害活性機構を、X 線結晶構造解析により明らかにする本研究は、アメーバ赤痢の病原性を解明する鍵となる中心課題であると言える。Ig1 は他の機能既知タンパク質とは相同性を示さないことから、その立体構造および作用メカニズムは非常にユニークなものである事が予想され、この研究成果はこれまでに類似研究の報告がない世界的に卓越したものになると考えている。

2) Hg1 の構造解析研究

Hg1 は上記 Ig1 と複合体を形成し、その糖結合活性によりターゲットとなるヒト細胞への接着に関与している。Hg1 の糖結合活性は、それに含まれる糖認識ドメイン(CRD)によるものであるが、この Hg1 の CRD は既知のレクチンには見られないユニークな DPN モチーフを有し、その糖鎖認識機構の詳細は不明である。本研究では、Hg1 の CRD ドメインの機能解析および結晶構造解析を行うことで、赤痢アメーバの Hg1 が持つユニークな糖鎖認識機構を明らかにする。

3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質の構造解析研究

赤痢アメーバのワクチン開発においては、赤痢アメーバ細胞表面に存在し感染に関与する膜結合型タンパク質がワクチン抗原の重要な候補となる。その候補には上記の Ig1 および Hg1 が含まれ、またその他の候補として、9 種類の赤痢アメーバ由

来タンパク質 (EhCP4, PDI, Thioredoxin, Ehub, EhCRT, EhMIF, Actin, EhADH2, EhADH3) が注目されているが、そのいずれも詳細な立体構造は不明である (N. Jasni et al., *Membranes*, **12**, 1079, (2022))。本研究では、これら 9 種類の結晶構造解析を行い、それらの機能の構造的基盤を明らかにする。さらに、それらタンパク質の活性部位の詳細構造を明らかにすることで、その部位をターゲットとするワクチン開発および創薬への応用を目指す。

② 研究内容

本研究対象である赤痢アメーバ由来 Ig1 の機能については、これまでに長崎大学熱帯医学研究所の加藤らによりその詳細な研究が行われ、Ig1 の有するユニークなレクチン活性および細胞障害活性等が明らかにされてきた (K. Kato, et al, *Scientific Reports*, **5**, 13901, (2015))。本研究は、Ig1 研究に関する遺伝子資源および豊富な技術的知見を有する熱研の加藤氏との綿密な共同研究体制の元に、畠山が Ig1 の細胞障害活性を引き起こすと推定している Ig1 のペプチダーゼ活性の機能解析、海野が Ig1 の結晶構造解析を行う共同研究プロジェクトである。

さらに 2023 年度は、この共同研究体制の発展的展開として、2) Hg1 の構造・機能解析研究、および 3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質類の構造・機能解析研究をスタートさせる。抗原タンパク質類の遺伝子クローニングについては、熱研の加藤が担当する。以下に各プロジェクトの研究内容を示す。

1) Ig1 の構造解析研究

Ig1 全長領域の大腸菌を用いた発現・精製を行い、得られた精製タンパク質を用いてクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行う。Ig1 はその領域の多くがフレキシブル構造を有していると推定しており、その動的な構造の知見がクライオ電顕解析により明らかとなることが予想される。一方、Ig1-b(914-1083)領域は、比較的構造の揺らぎが少ないと推定している領域であり、これまでの研究により安定してタンパク質精製を行う条件が確立できている。この領域については結晶化を試み、得られた結晶の構造解析を行う。

2) Hg1 の構造・機能解析研究

赤痢アメーバ由来 Hg1 は CRD ドメインを有し、その CRD ドメインの糖結合活性と感染への関与が確認されているが、その立体構造および糖鎖認識機構の詳細は明らかではない。本研究では、Hg1 の CRD ドメインについて、大腸菌を用いた発現系の構築、精製、およびその結晶構造解析を行う事で、その糖鎖認識機構の詳細を明らかにする。

3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質類の構造・機能解析研究

9 種類の赤痢アメーバ由来タンパク質 (EhCP4, PDI, Thioredoxin, Ehub, EhCRT, EhMIF, Actin, EhADH2, EhADH3) について、それぞれ大腸菌を用いた発現系の構築

を行う。その後、その発現系を用いてタンパク質の発現、精製、機能解析、および結晶構造解析を行う。赤痢アメーバの有するこれらタンパク質のユニークな構造と機能の詳細を明らかにすることで、その後のワクチン開発への応用を目指す。

③ 予想される成果

本研究により Ig1 の詳細な機能および立体構造が明らかになる事で、赤痢アメーバが Ig1 を利用して人体に感染するメカニズムを構造の立場から明らかにできると考えている。これらの知見は、そのメカニズムの解明のみならず、Ig1 の詳細な機能と構造情報を用いて阻害剤を設計する事で、赤痢アメーバ症特異的治療薬の設計および開発が可能となる。この治療薬開発は、現在発展途上国に蔓延している赤痢アメーバ症の根絶を目指すために達成すべき課題である。加えて、近年は先進国においても、性感染症としてアメーバ赤痢の感染者数が年々増加している。以上の事から本研究は、タンパク質構造解析技術を利用して、熱帯医学および国際保健の両面において重要である赤痢アメーバ感染症の問題を解決に導く、分野横断的研究プロジェクト、と位置付ける事ができる。

また、本年度から研究を開始するテーマ 2) および 3) では、赤痢アメーバの感染で重要な役割を有するタンパク質類の活性部位の構造を明らかにすることで、その部位をターゲットとするワクチン開発および創薬に向けての大きな前進が期待できる。

本研究に参画する大学院生は、タンパク質の機能・構造解析研究に関わる、高度なタンパク質精製/解析技術、および遺伝子工学技術を習得し、またその研究成果を国際誌・国際学会等で発表する事で、高い教育効果が期待できる。

5. 実施報告

①令和 5（2023）年度実施計画に対する実施状況

- 1) Ig1 の構造解析研究については、全長 Ig1 (F-Ig1) の大腸菌を用いた組替え型タンパク質の発現と精製を行い、得られたモノマー画分およびオリゴマー画分それぞれについて、クライオ電顕測定を行った。加えて、抗 F-Ig1 抗体と F-Ig1 との複合体を調製し、そのクライオ EM 測定を同様に行った。
- 2) Hg1 の構造・機能解析研究については、Hg1 の糖結合ドメインである CRD について、その大腸菌を用いた組替え型の発現および精製条件の検討を行った。
- 3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質類の構造・機能解析研究については、赤痢アメーバ由来の細胞膜表面上に発現し、創薬のターゲットとして有望な EhCP4、EhPDI、および EhTrx について発現用ベクターの構築、および大腸菌を用いたそれらの組替え型タンパク質の発現、および精製条件の検討を行った。

②成果（結果＋考察）

1) Ig1 の構造解析研究については、全長 Ig1 (F-Ig1) の大腸菌を用いた組替え型タンパク質の発現と精製を行い、ゲル濾過クロマトグラフィーにより F-Ig1 のモノマー画分およびオリゴマー画分をそれぞれ精製した (図 1)。得られた両画分は、SDS-PAGE にて十分な純度であることを確認し (図 2)、それらについて動的光散乱測定を行うことで、各画分の溶液中の分子サイズを確認した (図 3)。それらの分子サイズは、オリゴマーおよびモノマー相当の推定のサイズを反映した大きさとなっており、またそれらの鋭いピークは、タンパク質の状態が構造解析に適した単分散の状態である事を示す知見であった。

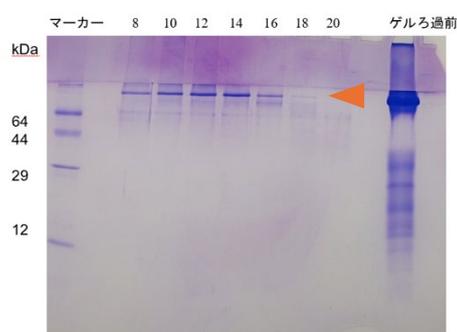
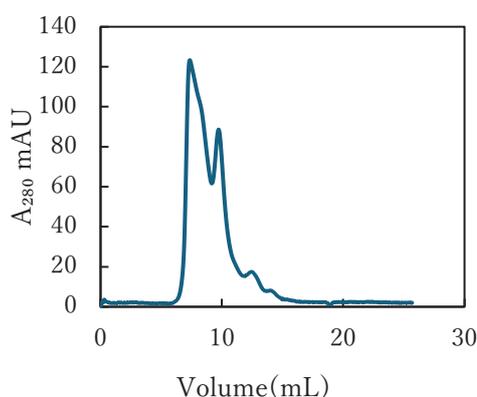


図 1. F-Ig1 のゲル濾過クロマトグラフィー 図 2. F-Ig1 の SDS-PAGE

これらの F-Ig1 のクライオ EM 測定を行い、また F-Ig1 特異的抗体との複合体を調製し、その F-Ig1-抗体複合体のクライオ EM 測定を同様に行なった。その結果、モノマー画分の測定とその二次元平均化により単量体構造らしき構造 (図 3a) が得られた。オリゴマー画分の測定では、各モノマー成分が数珠状につながったオリゴマー形状の画像を取得した (図 3b)。現在、それらの画像の解析を進めている所であるが、構造に揺らぎが含まれている事が推定され、十分な分解能の構造情報が得られていない。今後は電顕測定用グリッドへの展開条件の検討を行い、分解能向上を目指す予定である。抗体との複合体については、明確な抗体との複合体構造を得るには至らなかった。その理由として、測定の最適条件の検討が必要と考えられ、タンパク質濃度調整、抗体の安定性の確認、および F-Ig1 との結合の確認などを行う必要があると判断した。F-Ig1 との複合体形成能を有する抗体は他にも複数種類準備可能であり、今後は使用する抗体の検討、および複合体形成条件の検討を行う必要がある。

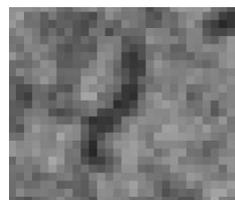


図 3. F-IgI のクライオ EM 画像 a : F-IgI モノマー構造 b : F-IgI オリゴマー構造

2) Hg1 の構造・機能解析研究については、Hg1 の糖結合ドメインである CRD について、その大腸菌を用いた組替え型の発現および精製条件の検討を行った。

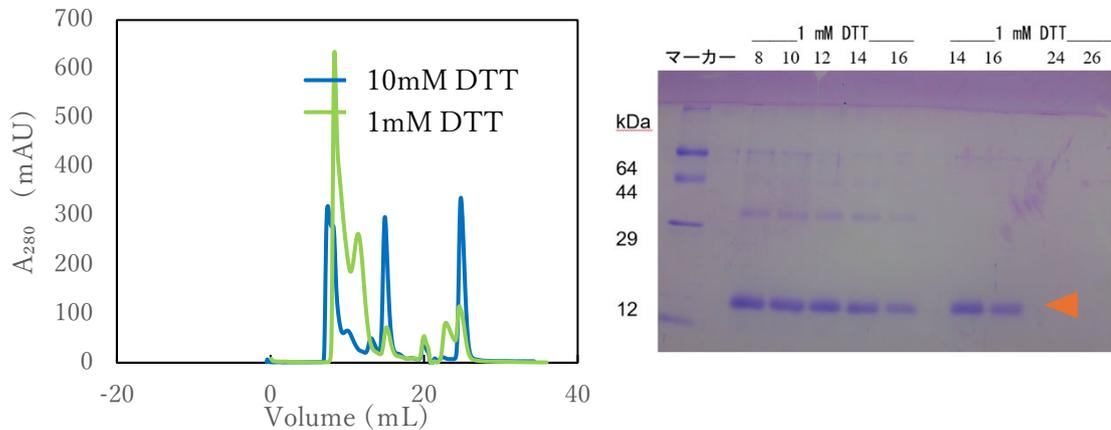
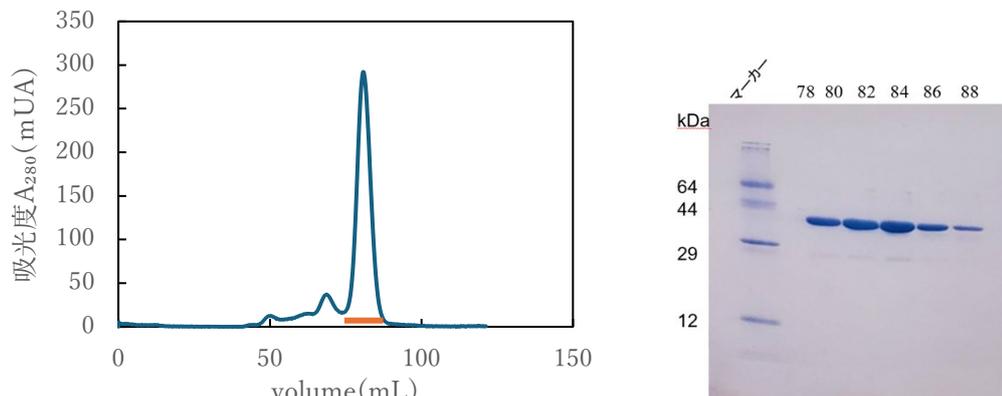


図 5. Hg1-CRD のゲル濾過クロマトグラフィー(左)およびそのピーク画分の SDS-PAGE

10 mM DTT を添加した条件で行なったゲル濾過クロマトグラフィー (図 4) にて、ピーク 2 溶出画分 (矢印) にて目的の Hg1-CRD が凝集を生じずに精製することが出来た。ただ、その後の構造解析を進めるにはサンプル量が十分ではないため、その収量向上の検討を行ったが現時点では安定かつ十分量が得られる生成条件の確立には至っていない。今後は、Hg1-CRD の十分な安定性を有する溶液条件の検討が必要であると考えられた。

3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質類の構造・機能解析研究については、赤痢アメーバ由来の細胞膜表面上に発現し、創薬のターゲットとして有望な EhCP4, EhPDI, および EhTrx について、大腸菌組替え型発現ベクターの構築、大腸菌を用いた上記タンパク質の発現、および精製条件の検討を行った。EhPDI, および EhTrx については、ゲル濾過クロマトグラフィーおよびそのピーク画分の SDS-PAGE の結果、安定な状態かつ良好な収率でこれらのタンパク質が得られた事を確認した(図



6, 7)。今後は、本タンパク質の活性測定および構造解析へと進めたいと考えている。

図6. EhPDI のゲルろ過クロマトグラフィー（左）およびその SDS-PAGE（右）

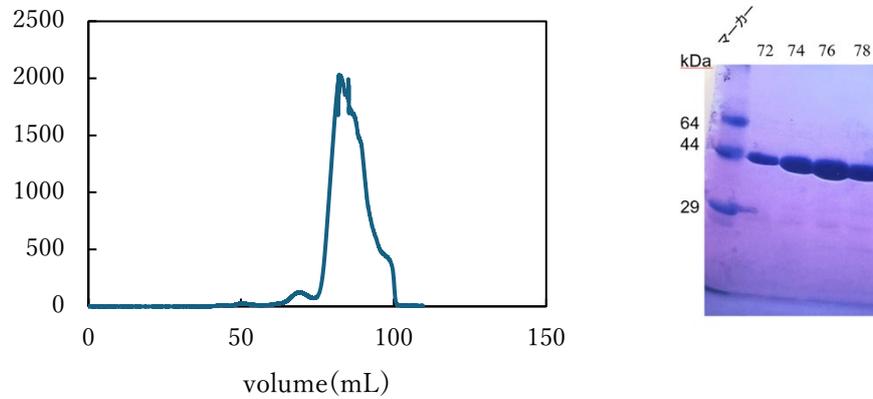


図7. EhTrx のゲルろ過クロマトグラフィー（左）およびその SDS-PAGE（右）

③成果の公表

2023 年度 工学部工学科 化学・物質工学コース 松田 玲菜 卒業論文
赤痢アメーバ由来 Ig1 および膜結合タンパク質の構造と機能に関する研究

6. 自己評価

本年度の研究では、F-Ig1 および F-Ig1-抗体複合体のクライオ電顕解析、Hgl-CRD の発現・精製条件の検討、EhTrx および EhPDI の発現・精製条件の検討を行った。それらの結果、F-Ig1 については、クライオ EM 測定によりモノマー構造およびオリゴマー構造を得る事ができたが、構造に揺らぎが含まれているためか十分な分解能での構造解析には至らなかった。本年度の目標であった F-Ig1 の構造決定には至らず、さらなる測定条件およびサンプル調製条件の検討が必要と思われる。Hgl-CRD は、本年度において精製条件の確立および結晶化の実施までを目標としていたが、精製条件の一部確立に留まった。精製条件の確立には、収量と安定性の向上が必要であり、それらの検討が今後必要と思われた。EhTrx および EhPDI については、十分な収量と安定性が確認でき、目的が達成された。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

1) F-Ig1 の構造解析研究、および 2) Hgl-CRD の構造解析研究については、達成度 II（不満は残るが一応の成果を挙げられた）、3) 赤痢アメーバ由来抗原タンパク質類の構造・機能解析研究については、達成度 III（予想通りの成果を挙げられた）。以上を総合的に評価し、本研究課題の本年度達成度は II（不満は残るが一応の成果を挙げられた）と判断した。

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：無症候性マラリア伝播の統合的理解に向けたコホート研究
課 題 番 号：2023-Ippan-05

2. 代 表 者：大阪公立大学 講師 Chim Wai Chan
共同研究者：長崎大学 教授 皆川昇
長崎大学 助教 加賀谷渉
大阪公立大学 特任教授 金子明
マウントケニア大学 部門長 Jesse Gitaka
ストックホルム大学 教授 Noushin Emami

3. 決 定 額：500 千円

4. 研究計画

① 研究目的

1955年に開始された最初の世界マラリア根絶計画は、1969年に「マラリア対策において魔法の弾丸はない」という教訓を残して終了した。以降、世界的なマラリア撲滅に向けては継続的なイノベーションの開発が必須であるということが共通理解となっている[WHO, Global Technical Strategy for Malaria 2016-2030, 2021 Update]。現在、世界的なマラリア撲滅の最も大きな障壁となっている無症候性・顕微鏡検出限界以下の感染に取り組むための新しいツールや戦略を開発するため、本研究ではそれらの感染がどのように伝播・維持されているのかを原虫、ヒト、媒介蚊という3種の生物とそれらを包括する環境を見据えたシステム生物学的アプローチにより理解することを目指す。

マラリア原虫による感染は、無症候から致死的なものまで様々な転帰をもたらすが、流行地では多くのマラリア感染者が無症候である。これら無症候性感染は、顕微鏡で検出される原虫濃度のものと顕微鏡検出限界以下の低い原虫濃度（顕微鏡検査では陰性だがPCRでは陽性）のものに分けられる。我々が2012年よりケニア西部・ヴィクトリア湖周辺地域において継続的に実施した横断的マラリア調査では、マラリア原虫感染率は、顕微鏡検査で19.9%に対し、PCRでは37.1%と推定され、PCRで検出された3,867人のマラリア感染のうち、91.8%が無症候性、50.3%が顕微鏡検出限界以下、47.3%が無症候性かつ顕微鏡検出限界以下であった[Idris Md et al., Sci Rep 2017]。さらにLLIN、室内残留型殺虫剤噴霧（IRS）、集団投薬（MDA）といった効果的な対策プログラムによってマラリア感染が大幅に減少した場合においても、相当数の無症候性ならびに顕微鏡検出限界以下感染が残存し、その後の伝播再興に寄与していることを明らかにしてきた[Kagaya W et al, Sci Rep 2019]。こうした感染を持つ者は症状が無いため医療施設を訪れず、万が一検査を受けたとしても一般臨床で用いられる顕微鏡やRDTでは診断されないため、治療もなされない。その

結果、媒介蚊へのガメトサイト期原虫の大きな供給源となり、残存する伝播を下支えすることとなる[Andolina C et al., Lancet Infect Dis 2021]。マラリア制圧という課題において、この無症候性・低原虫濃度マラリア感染の理解と対策は決定的なカギとなっている。

こうした低濃度感染はしばしば頻回の感染による獲得免疫によって説明されており[Bachmann A et al., PLoS Pathog. 2019]、効果的な対策プログラムの下で原虫感染率が低下すると、原虫に対する免疫獲得の機会が損なわれ、高濃度原虫血症や重症化が起りやすいと予想される。しかし、実際には低度流行地では逆説的に低原虫濃度感染の割合が高いことが報告されており[Okell L et al., Nat Commun 2012]、無症候性、顕微鏡検出限界以下感染といった低濃度感染は獲得免疫に加えて未知の要因によって制御されている可能性が示唆される。特に、マラリア原虫に感染したヒトは媒介蚊に対する誘引物質を産生し、媒介蚊の吸血行動を変化させるが[Emami N et al, Science 2017]、この誘引強度が無症候性感染者と有症感染者の間で異なることが示唆されており[Emami N et al, unpublished data]、伝播効率の違いによりそれらの感染が維持されている可能性が考えられる。無症候性・顕微鏡検出限界以下の低濃度マラリア原虫感染はどのようにしてその原虫濃度が制御され、効率的に伝播されているのか、これが本研究課題の中心的な問いである。

マラリア伝播はマラリア原虫、宿主（ヒト）、媒介昆虫（ハマダラカ）という三者が相互に関係しながら維持される。特にマラリア原虫は、寄生宿主、寄生組織に応じてそのステージを変化させ、生物学的特徴も大きく変化させる。そして、ヒト、ハマダラカの生存する環境、疫学的地域特性も三者の生存戦略に影響を与えながら伝播の維持に大きく寄与している。このように異なる生物種の複雑な生命現象が絡み合って維持されるマラリア伝播を理解するうえでは、個別の生物内現象だけでなく、生物間相互作用も視野に入れた観察、解析を実施するシステム生物学的アプローチが必要である。

② 研究内容

本研究は、ケニア・ヴィクトリア湖周辺地域に設定する前向きコホートを対象として、無症候性・顕微鏡検出限界以下感染の（１）生態疫学的リスク因子、（２）伝播に関わる媒介蚊因子、（３）原虫側遺伝学的規定因子、（４）免疫学的因子を同定し、統合的理解を目指すものである。本共同研究費はこのうち特に、（１）（２）に関わる部分に充てる。前向きコホートはケニア・ホマベイ郡のスバ南部地域のマラリア高度流行地（RDT 陽性率 30%、PCR 陽性率 60%前後）に住む 500 名程度を対象とする。全年齢層を対象とし、2 週間ごとの聞き取り調査、ならびに月 1 回の血液サンプリングを行うことで、成人で多く観察される無症候性感染から小児を中心にみられる有症例、重症例まで多様な病態の異なる病期の把握を目指す。さらに、地元施設の保健師によるマラリア臨床例の報告による受動的サーベイランスも実施し、網羅的な臨床像の把握を目指す。

本年度はコホートによるサンプル収集と基礎的データの整備に注力し、翌年度以降、1 年間を通じて収集されたデータ・サンプルに基づく解析を展開していく。

(1) 生態疫学：顕微鏡、RDT ならびに定量 PCR によってマラリア原虫感染の有無、原虫濃度、伝播に関わる ガメトサイト期原虫の濃度を明らかにするとともに、同時に収集する環境、人口動態に関わる情報さらに媒介蚊の分布、数、種類、原虫保有率から、地理的、あるいは環境的危険因子を一般化加法モデル (GAM)、一般化混合線形モデル (GLMM) などの統計疫学的解析によって明らかにする。これらの情報は、媒介蚊・原虫・ヒト免疫因子の解析において実験室解析データを解釈する際にも参照するデータとなる。

(2) 媒介蚊誘引因子解析：Emami らの先行研究から、原虫はヒト宿主感染時に化学物質 HMBPP を産生し、宿主から産生されるにおい物質を変化させることで、ハマダラカの吸血行動を変化させ、自身の効率的な伝播を可能にするということが明らかになっている。本研究では、無症候性・顕微鏡検出限界以下の感染の、有症・高原虫濃度の感染に比したより効率良い伝播に、このにおい物質を介した媒介蚊吸血行動変容が寄与しているのではないかとこの仮説を検証する。異なる臨床像を示したコホート集団内の感染者を対象として、誘引物質候補の収集と GC-MS による解析、ならびに感染原虫のメタボローム解析を行う。

媒介蚊に関連する解析は、長崎大学ケニア拠点キシアン昆虫学ラボを活用する。また、フィールドデータ収集は、原則として大阪公立大学の SATREPS ビタ拠点を活用するが、必要に応じて長崎大学ビタ拠点とも連携をとる。原虫の分子生物学的解析はマウントケニア大学の施設を活用する。

③ 予想される成果

本研究では、流行地に設定する前向きコホートによってマラリア感染の多様な臨床像を豊富なデータとともに観察し、これまでの横断的研究では限界のあった病原性、原虫増殖、伝播に関わる要因を多面的に明らかにする。臨床・疫学データに紐づくマルチオミクスデータの解析は、将来的にシステム生物学的視座へと広がる可能性を秘める。また、マラリア伝播を構成する原虫、ヒト、媒介蚊の三者の各視点、生存戦略を取り入れて無症候性・顕微鏡検出限界以下感染の理解を目指す点も本研究提案の特徴である。こうして得られた研究成果は無症候性・顕微鏡検出限界以下感染の制御を通じた新たなマラリア対策戦略の構築に貢献する。

無症候性感染に支えられる残存する伝播をいかに制御し、疾患撲滅を達成するかは、マラリアに限らず、他の感染症にも共通する問題であり、特に近年では新型コロナウイルス感染症の制御においても問題となるテーマである [Richterman A et al., JAMA 2020, Pung R et al., Sci Rep 2021]。効果的な対策ツールが広く展開されていながらも持続するマラリアの伝播ダイナミクスについて、システム生物学的アプローチからこれを理解することは、様々な感染症の制御、制圧につながる知見が得られる可能性がある。

加えて、本提案では、フィールドからラボ、そしてフィールドへという流れを可能な限りケニアで展開することを試みる。Gitaka の研究室はケニアでも有数の高度技術を備えた

実験室を持つことが計画されており、サンプリングから時間を置くことなくその解析実施、また解析結果に基づいたフィールドへの情報還元が可能なセッティングとなる。こうした活動からケニアの科学技術の質向上と共に、KEMRI-長崎大学のチャンネルだけでなく、日本との複数の並列ネットワーク強化にもつながる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

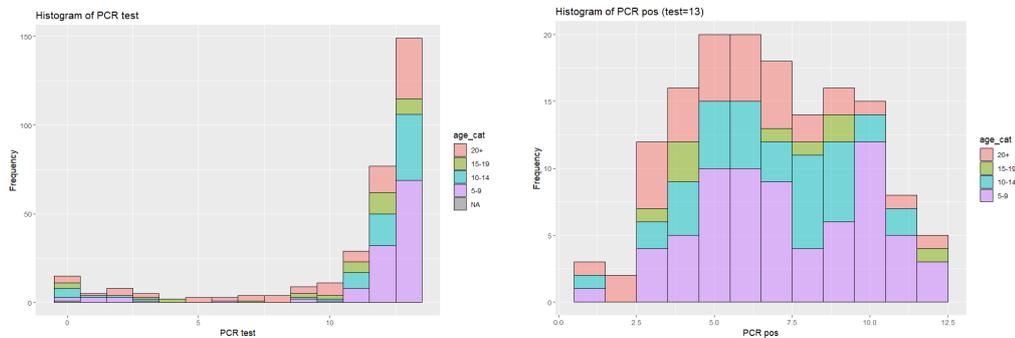
我々は、2022年11月から、ケニア・ヴィクトリア湖周辺地域の高度マラリア流行地 Suba South 地区内に位置する Nyagwethe、Ngeri 村において、流行地住民324名を対象に、一年間の前向きコホートを設定、積極的感染調査により、無症候性感染も含めたマラリア感染の追跡調査を行った。コホートは別事業においてすでに開始されており、本研究計画で補完するかたちで進められた。2019年の最新の国勢調査では、Suba South 地区は634.1 km²で、人口は122,383人、世帯数27,769とされる。人口の大部分はルオ族に属しており、一部スバ族もみられる。湖での漁業と農業が主な職業であり、主な住居は通常、泥の壁とトタンの屋根で作られている。一般的に、ビクトリア湖地域は年に2回の雨期があり、3月から6月までの大雨期と、8月から10月までの小雨期に分かれるが、近年の気候変動により不規則なパターンが観察されている。マラリアの発生は雨期の1~2か月後にピークに達する。この地域の主な媒介蚊は、*Anopheles gambiae* s. s.、*An. arabiensis*、および *An. funestus* である。

前向きコホートの選択基準は、(1) 5歳から65歳、(2) 研究地域を離れる予定がないこと、(3) 研究期間全体にわたって研究地域外での長期滞在（1か月以上）の予定がないこと、(4) 明示的な同意を提供すること、とし、除外基準は(1) 重篤な疾患の徴候があること、(2) 既知の慢性疾患または免疫不全（HIV感染を含む）があること、(3) 登録時に妊娠していること、とした。サンプリングは2週間おきの聞き取り調査と一ヶ月おきの採血調査によって実施された。2週間ごとに、Community health volunteer（CHV）と呼ばれるローカルスタッフがコホート参加者の自宅を訪問し、Research Electronic Data Capture（REDCap）アプリケーションを使用して作成されたアンケートを、Androidベースのタブレットに準備し、過去2週間の発熱、マラリア発症、地元の保健施設への訪問、および渡航歴を収集した。採血調査は、毎月、特定の検査技師スタッフがCHVとともにコホート参加者の自宅訪問に同行し実施した。指頭血と静脈穿刺による血液採取は、月次訪問ごとに交互に行われ、血液サンプルは、マラリアの迅速診断（RDT）、顕微鏡検査、PCR検査、およびHb測定によってマラリア感染状態を判定するために使用される。RDTはParaCheck-Pf（Orchid Biomedical Systems, India）によって実施し、PCRは先行研究の手法に従い、4種のマラリア原虫のcox3遺伝子を標的として実施した。さらに、全血（指頭血500μlあるいは静脈血の3ml）をEDTAチューブに採取し、ホマベイ郡病院の実験室において、PBMC、血清、感染赤血球に分け-80℃で保管している。加えて、Nyagwethe health center においては、コホート対象者の発症時の受診行動並びにその際のマラリア診断結果も能動的検査として記録し

ており、積極的検査と組み合わせ継続的な感染状態をトレースすることで、これまでの横断的マラリア調査では定義されなかった真の無症候性マラリア感染、顕微鏡検出限界以下の感染を定義することが可能になる。コホートの対照家屋からランダムに選択された 50 軒ほどの家屋では CDC light trap により、媒介蚊の採取も同時に行われた。

② 成果（結果＋考察）

対象地において、324 人（男性 163、女性 161）を対象として前向きコホート調査を開始した。年齢の中央値は 12 歳（第 1 四分位：8 歳、第 3 四分位：24 歳）であった。13 回あった採血タイミングのうち、すべての採血が実施された対象者が 149 人（46.0%）、少なくとも 11 回の採血が実施された対象者が 256 人（79.0%）であり、高い参加率が達成された（下・左図）。13 回すべての採血が実施された対象者のみに絞り、その PCR 陽性頻度をみると、事前の予想に一致して、年齢群が上がるほど感染頻度が低下する傾向が認められ、これは獲得免疫によつて了承される。一方で、5-9 歳の年齢群に着目すると、同等の年齢群で同等の感染暴露歴が予想されるにもかかわらず、その感染頻度には大きなばらつきがあることが確認された（下・右図）。このことは、年齢非依存的な何らかの因子によつてこの感染頻度の差が生じていることを示唆する。今後、得られている原虫サンプル並びにヒトサンプルを用いて、感染頻度の差に寄与する生物学的因子の探索を計画している。また PCR の陽性陰性のみならず、保健施設での受動的感染調査の結果と組み合わせた症候性・無症候性マラリア感染の頻度についてもあわせて検討を進めている。



また、原虫種ごとの感染頻度に着目すると、隔月で実施した 7 回の静脈血採血検査のうち、Pf については 1 度しか陽性にならなかったにもかかわらず、Pm あるいは Po に対して高頻度（7 回、あるいは 5 回）で陽性となった住民が数名同定された。さらにこうした不均一な感染頻度を示した個人は、同じヴィクトリア湖畔の別の地区で 2016 年、2021 年に実施していた複数のコホート集団の中からも同等の頻度で見出された。集団の中で原虫種としては Pf が圧倒的な多数を占めていること、また対象地に存在する媒介蚊 *Anopheles gambiae*, *An funestus* はどの原虫種も同様に媒介すると考えられていることを鑑みると、この観察結果は既知の伝播メカニズムからは了解し得ず、何らかの固有な伝播様式が介在していると考え

られる。

③ 成果の公表

【学会発表】

加賀谷 渉 「Insights from observational and interventional studies on malaria in the Lake Victoria Basin of Kenya」、第 93 回日本寄生虫学会大会、2024 年 3 月 9-10 日、東京

6. 自己評価

研究基盤となる流行地でのサンプル、データ収集、またそれに基づく疫学解析ならびに媒介昆虫の解析は計画通りに進めることができた。疫学的解析からは、特に原虫種間の感染頻度に関わる非常に興味深い結果を得ることができたため、次年度以降、さらに検証を進めていくこととした。媒介蚊誘引物質の解析に関しては、サンプル収集の環境を期間内に整えることができず、今後、別事業での検討を進めていく。

7. 達成度（何れかに○）

I (所期の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)

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」に記載のため省略

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：透明化技術を用いた住血吸虫感染員の解析

課 題 番 号：2023-Ippan-09

2. 代 表 者：奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 准教授 王寺 幸輝
共同研究者：奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学 教務職員 島田 賢子
長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 技術職員 濱崎 めぐみ
長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 助教 中村 梨沙
長崎大学 熱帯医学研究所 寄生虫学 教授 濱野 真二郎

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

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一つである。「住血吸虫」は、淡水に生息する巻貝を中間宿主とし、終宿主に経皮感染する。世界的には特效薬プラジカンテル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、完全制圧するには、かつて本邦で日本住血吸虫症が撲滅された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と考えられる。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が、特に重要と考えられる。我々は、本申請研究にて、マンスン住血吸虫の感染員を時間的、空間的に解析し、幼虫の発育環境を精査することで、住血吸虫の幼虫発育に必須の環境、因子を特定し、中間宿主内での発育抑制を最終的な目的とした。

② 研究内容

住血吸虫モデルとして、マンスン住血吸虫 *S. mansoni* および中間宿主の巻貝 *B. glabrata* を用いて、実験室内で動物（ICR マウス）に感染させ、基盤となるライフサイクルを維持する。*S. mansoni* 感染後の *B. glabrata* 内での幼虫の発育過程（スポロシスト、娘スポロシスト、セルカリア）を経時的にサンプリングし、固定後、透明化技術（CDB 法、CUBIC 法など）により感染員の透明化を行う。また、住血吸虫特異的な検出を行うため、抗体免疫染色法を透明化過程で行い、最適条件を探ることで最適プロトコル化を行う。感染員の透明化後、蛍光免疫染色により貝全体における住血吸虫の分布解析と、経時的サンプル評価により、動態・幼虫発育に必須の条件（ターゲットとする貝臓器の特定、時間的な臓器・因子）を解析する。さらに、上記で得られた成績をもとに、*B. glabrata* より細胞抽出成分（BGP）を調製し、*S. mansoni* 感染マウスより誘導したスポロシストに BGP を添加することで、*in vitro* 培養系で幼虫発育

への影響 (viability、運動性、発育性等) を精査し、住血吸虫発育への影響を解析する。なお、感染貝の解析は、奈良県立医科大学および長崎大学 熱研・寄生虫学で維持されている *S. mansoni* および *B. glabrata* を用いることで、普遍的データを収集し、また、研究進捗状況の打ち合わせを長崎大学・熱研および奈良県立医科大学で行う予定である。

③ 予想される成果

ヒトへの感染形態であるセルカリアの発育メカニズムの解明は、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、透明化技術を用いた中間宿主内の新規動態解析は、発育に必要なターゲット因子の発見、更には、住血吸虫の発育を阻止可能な因子を見出すことが可能と考えられ、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を予想される。これまでに、我々の成果を含めて感染貝の切片を用いた解析についての報告はあるものの、本研究計画のように感染貝を透明化することで4次元解析 (時間的、空間的な解析) する研究は、世界的にみても例がない。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、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を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 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

■ 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*) のライフサイクルは以下の様に維持された。まず *S. mansoni* ミラシジウムを感染させた淡水巻貝 (*B. glabrata*) より遊出したセルカリアを ICR マウスに感染させ、8 週間後、麻酔下に安楽死させたマウスより肝臓を摘出、酵素で処理し、*S. mansoni* 虫卵を回収した。次いで、同虫卵を滅菌水に浸し、孵化したミラシジウムを、*B. glabrata* に感染させた。

■ 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、SeeDB 法あるいは CUBIC 法にて透明化を行った。透明化後の感染貝は、実体顕微鏡により観察を行った。

■ 感染貝におけるマンソン住血吸虫の分布解析

S. mansoni 感染貝を固定、透明化後、抗マンソン住血吸虫抗体を用いた免疫染色により貝内における *S. mansoni* スポロシトの分布を蛍光実体顕微鏡および蛍光顕微鏡により解析した。

■ 貝由来抽出物 (BGP) を用いたマンソン住血吸虫の *in vitro* 培養

未感染 *B. glabrata* より各臓器（頭足 HF、櫛鰓 Ct、心臓 Hr、肝臓・卵精巣 HPOT）を単離後、セラミックビーズにより組織粉碎し、遠心分離した上清分画を貝由来抽出物 (BGP) とした。

S. mansoni 感染マウスより摘出した肝臓から、虫卵を精製し、滅菌水に浸すことで孵化したミラシジウムを、*in vitro* で培養した。*S. mansoni* スポロシトの *in vitro* 培養は、Bge-M 培養液に各臓器由来 BGP を添加し、28°C の温度で行った。

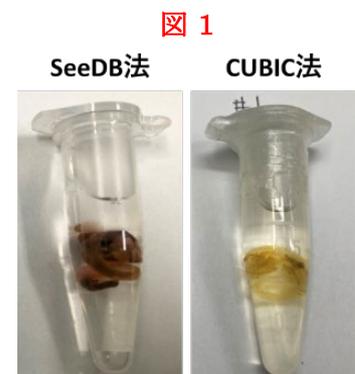
② 成果（結果＋考察）

■ 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 感染貝を用いて、SeeDB 法あるいは CUBIC 法による透明化の至適条件を検討した。CUBIC 法を用いた場合、より透明度が高く、内部構造の観察に適していることが明らかとなった（ 1）

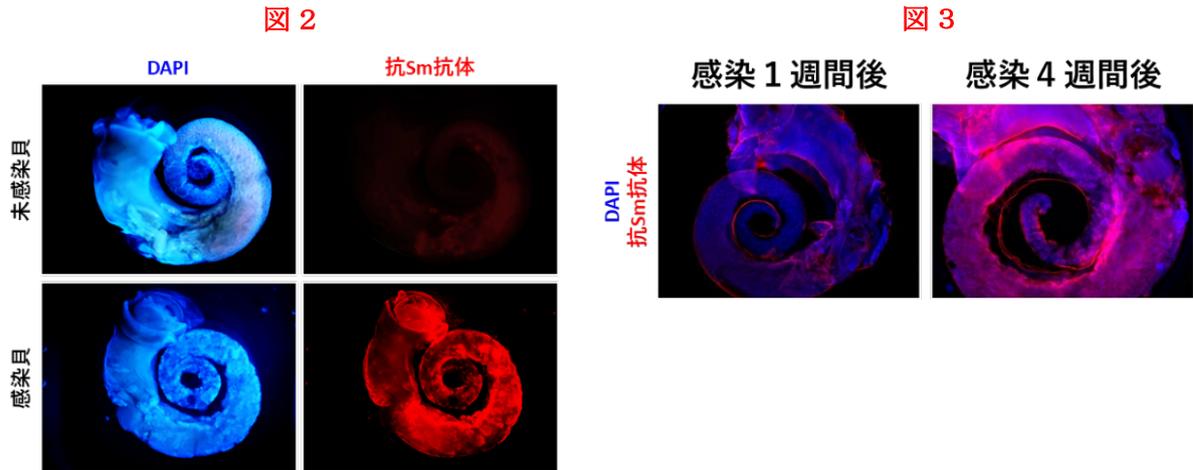
■ 感染貝におけるマンソン住血吸虫の分布解析

S. mansoni 感染させ、1～4 週間飼育後の貝を固定し、CUBIC 法による透明化を行い、抗マンソン住血吸虫抗体（抗 Sm 抗体）を用いた免疫染色を行



った。蛍光実体顕微鏡を用いて観察したところ、未感染貝内では陽性反応は認められず、一方、感染貝については強い蛍光を認めた（**図 2**）。本法により、連続性が維持された標品を用いることで *S. mansoni* の感染貝内分布が解析可能であることが明らかとなった。

さらに、蛍光顕微鏡を用いて詳細な観察を行った結果、感染初期（感染 1 週間目）と感染後期（感染 4 週間目）では明らかに *S. mansoni* の貝内分布が異なることが明らかとなった（**図 3**）。



■ 貝由来抽出物 (BGP) を用いたマンソン住血吸虫の *in vitro* 培養

透明化感染貝における *S. mansoni* の分布情報をもとに、*in vitro* 培養系への展開を行った。未感染 *B. glabrata* より抽出した各臓器 BGP を用いて *S. mansoni* スポロシストの *in vitro* 培養を行った結果、HF 添加では、長期の viability の維持に、HPOT の添加では発育の促進に働くことが示唆された。

③ 成果の公表

1. 王寺幸輝¹、濱崎めぐみ²、三須政康¹、北村知嵩¹、西村知子¹、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)

透明化技術を用いた住血吸虫感染貝の解析

第 93 回 日本寄生虫学会 (2024 年 3 月、東京)

2. 王寺幸輝

2023 年に経験した寄生虫症疑い? について

第 32 回 寄生虫疾患臨床検討会 (2024 年 3 月、東京)

3. 笠松（西村）知子、北村知嵩、三須政康、吉川正英、王寺幸輝.
Catch you!!! 寄生虫 救急医もおさえておきたい寄生虫感染症 トキソカラ症
救急医学 48(3) 2024.

4. 西村知子、三須政康、北村知嵩、王寺幸輝、笠原敬、吉川正英.
ウシガエルとスッポンの生食が原因と考えられた顎口虫症疑いの1例
Clinical Parasitology, 34(1), 52-54 (2023).

5. 西村知子^{1,2}、三須政康¹、北村知嵩¹、王寺幸輝¹、笠原敬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奈良県立医科大学 感染制御内科)
生シラスの生食歴があり、顎口虫への感染が疑われた1例
日本臨床寄生虫学会大会 (2023年6月、東京)

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維持するには、中間宿主および終宿主に加えて、感染実験など、多くのプロセス・操作が必要である。我々は、住血吸虫をモデルとした *in vitro* ライフサイクルの確立を目指して、中間宿主（貝）を使用しない培養系における至適発育条件の解明を試みている。そのためには、中間宿主体内における寄生虫の発育動態の情報が有用である。しかしながら、貝体内での発育動態の観察や解析は容易ではない。本研究では、上記培養系確立への応用を図るための基礎情報収集を目的として、感染貝体内での寄生虫の発育動態を解析した。

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切片解析を必要とする。今回、透明化技術を用いることで切片を作成することなく、連続的且つ貝全体的に分析することを目指した。その結果、CUBIC 法を用いた透明化と蛍光免疫染色を組み合わせることで、感染幼虫の同定、感染動態の時空間解析に世界で初めて成功した。さらにそれらの知見を基に、*S. mansoni* スポロシストの *in vitro* 培養に貝由来抽出物 (BGP) を用いたところ、HF (頭足部位) 由来 BGP は長期の *viability* の維持に、HPOT (肝臓・卵精巣) 由来 BGP は、幼虫発育の促進に働くことを立証することができた。

本研究より、*S. mansoni* 感染貝の透明化は、貝感染後の発育メカニズムの解明に大いに寄与し、さらに、*B. glabrata* 由来抽出物は *S. mansoni* 幼虫の維持や発育に関わる重要因子を含んでいることを明らかにすることができた。

7. 達成度（何れかに○）

I (所期の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)

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」で述べてあれば省略可）

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：サルモネラ感染マウス脾臓組織の Fixed RNA Profiling による単一細胞解析

課 題 番 号：2023-Ippan-10

2. 代 表 者：大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授

奥崎 大介

共同研究者：大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教 劉 祐誠

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教 石川 昌和

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任研究員

Mohamad Al kadi

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 技術職員 山下 舞花

長崎大学 熱帯医学研究所 准教授 日吉 大貴

長崎大学 熱帯医学研究所 教授 児玉 年央

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

私たちの体には多種多様に分化した免疫細胞により、体内に侵入した病原体や異物を排除するための免疫機構が備わっている。そのために起きる免疫反応は複雑かつ緻密に制御されており、その全容はこれまでの技術だけでは解明することは困難である。そこで本共同研究では、新規のシングセル RNA シーケンス解析 (scRNA-seq) 法 (Fixed RNA Profiling) を行うことで、サルモネラ感染マウスモデルにおけるマウス組織内の免疫細胞の異種性 (heterogeneity) や免疫反応を 1 細胞レベルかつ網羅的に解析し、感染症による免疫機構について新たな知見を得ることを目指す。

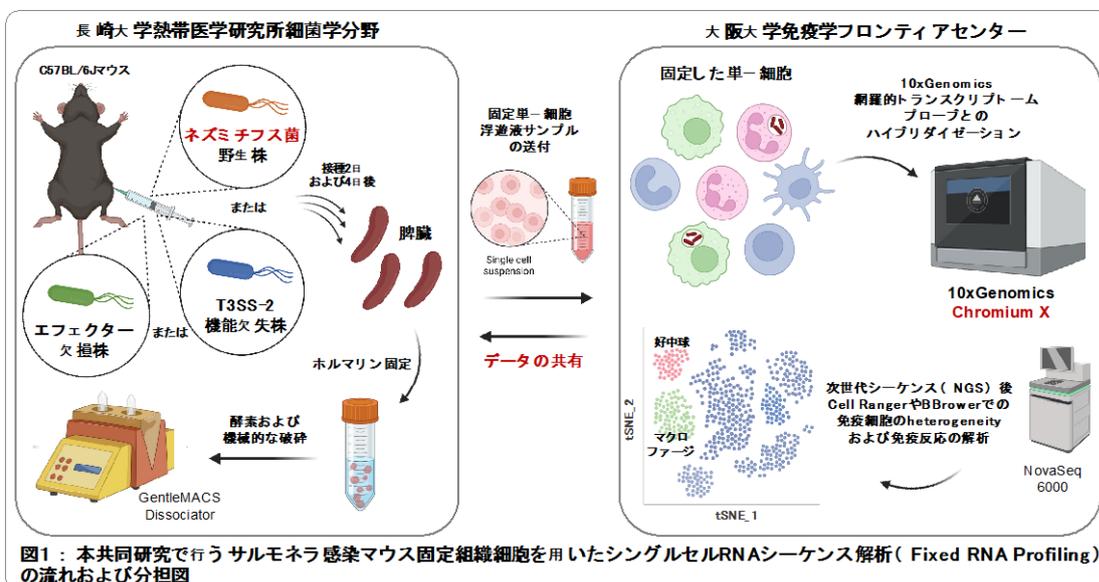
食中毒起因菌のサルモネラ (*Salmonella enterica* spp.) による感染症は、いまだ世界で年間累計 1.8 億人と多い (Hiyoshi et al., *FEMS Microbiol Rev.* 2018)。感染者ほとんどは下痢や胃腸炎などの局所的な症状にとどまるが、主に 5 歳以下の幼児や免疫不全の患者、もしくは菌の血清型によっては菌血症や敗血症など重篤な侵襲感染を引き起こす。そして世界で年間約 130 万人といわれるサルモネラ感染者による死亡者の大部分 (88%) は侵襲感染によるものである (Hiyoshi et al., *FEMS Microbiol Rev.* 2018)。さらに現在、2016 年パキスタンでアウトブレイクを起こしたフルオロキノロン耐性のチフス菌や、サハラ以南のアフリカ諸国で猛威を振るった ST313 多剤耐性ネズミチフス菌など「薬剤耐性サルモネラ」の発生が問題となってきた。薬剤耐性サルモネラによる侵襲感染の致命率は 10-47%にのぼり (Morpeth et al., *Clin Infect Dis.* 2009)、WHO はその世界的伝播を懸念し、2017 年に優先的に対処すべき病原体に指定した。以上のことから、今後ますます抗生物質に頼らないサルモネラ侵襲感染症の新規治療法の開発に向けた創薬基盤研究が必要

になってくると考えられる。

サルモネラの侵襲性発揮メカニズムや宿主免疫との相互作用を解析する *in vivo* モデルとして、伝統的に「**ネズミチフス菌**」を用いたマウス感染モデルが使われる。これまでそのマウス感染モデルにより、サルモネラ病原性遺伝子島 2 (SPI-2) にコードされた「**III 型分泌装置 (T3SS-2)**」が、侵襲感染に重要な病原因子として特定されている (Ochman et al., *PNAS*. 1996)。T3SS-2 の侵襲感染における役割は、細胞内寄生菌であるサルモネラがマクロファージ内で生存・増殖することであると長い間考えられてきた。しかし共同研究者の日吉らのグループにより、サルモネラは浸潤してきた「好中球」も増殖の場として利用できること、そして T3SS-2 により誘導されるエフェロサイトーシスが好中球内の殺菌活性回避に重要であることを明らかにされた (Hiyoshi et al., *Cell Host Microbe*. 2022)。好中球とサルモネラの相互関係および T3SS-2 の好中球殺菌機構への役割について詳細な解析が今後必要であると考ええる。

感染宿主組織内の免疫細胞の heterogeneity や免疫反応を調べる場合、標的となる組織の細胞に対し Fluorescence-activated cell sorting (FACS) や定量 PCR (qPCR) を組み合わせた解析が今のところ主流である。しかし特定の細胞種の免疫反応を見たい場合、抗体に頼った免疫細胞の選出が必須であり、組織バルクでの単一免疫細胞の発現解析を行うことは非常に困難である。そのため近年では、組織全体の包括的なバルク解析に向け「**シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq) 解析**」技術を活用したトランスクリプトーム解析が感染症学においても注目されており、我々の研究グループも日本で先駆けてこの技術を習得しておりその共同成果を発表してきた (Yokoi et al., *PNAS*. 2023; Shibata et al., *Nat Commun*. 2022; Yamaguchi et al., *JCI Insight*. 2022; Namkoong et al., *Nature*. 2022; Yasumizu et al., *Nat Commun*. 2022; Chaya et al., *J Biol Chem*. 2022; Kidani et al., *PNAS*. 2022)。

サルモネラのマウス感染モデルにおける scRNA-seq 解析報告は現状ほぼ無いが、サルモネラ感染で見られるマクロファージのうち特殊なサブセット (CD11b⁺CD9⁺) を scRNA-seq 解析により見出し、その中で特にサルモネラが増殖していることが明らかにされた (Hoffman et al., *Immunity*. 2021)。



このように scRNA-seq は組織内に存在する少量サブセットの特定に優れた技術ではあるが、解析に新鮮な生細胞が要求されることから、壊れやすい好中球や感染した細胞の解析には向かない。その脆弱性を補うために、本共同研究では 2022 年度に 10xGenomics 社から発表された Chromium X を用いて、ホルマリンで固定した細胞の scRNA-seq (Fixed RNA Profiling) 解析を進める (図 1)。Fixed RNA Profiling により、壊れやすい細胞の解析だけでなく長期のサンプル保存や異なる研究機関への安定したサンプル送付が可能になる。このように本共同研究の達成によって、新規 scRNA-seq 解析技術の発展、サルモネラの感染性発症メカニズムの解明および創薬基盤研究に向けた一歩につながると考える。

② 研究内容

予備試験により Fixed RNA Profiling 解析の有用性が確認されたため、本研究ではサルモネラの侵襲感染に重要な T3SS-2 や分泌されるエフェクター欠損株を感染したマウス脾臓組織をサンプルに用いて長崎大学と大阪大学において分担で解析を行い (図 1)、サルモネラの感染性発症メカニズムの解明に迫る。

方法として、長崎大学において熱帯医学研究所細菌学分野において、C57BL/6J の 8-9 週齢♀マウスに 10^4 CFU のネズミチフス菌野生株、T3SS-2 機能欠失株、T3SS-2 エフェクター欠損株または DPBS を腹腔内に接種し、感染 2 日および 4 日後に脾臓細胞を回収する。そのうち 25 mg は scRNA-seq サンプルとして液体窒素で急速冷凍し、残りの脾臓からサルモネラ CFU を測定することで侵襲感染を確認する。冷凍した固定脾臓組織は 10xGenomics が作成したプロトコールに従いホルマリン固定、GentleMACS による細胞分散した後、大阪大学の免疫学フロンティア研究センターに送付する (図 1)。その後サンプルは、我々の研究グループにおいて Chromium X により単一細胞をドロップレットで単離、専用のマウス固定細胞用のトランスクリプトームプロロービングおよび次世代シーケンサー NovaSeq6000 により単一細胞内の RNA シーケンス配列を解読する (図 1)。シーケンス配列データは Cell Ranger (10xGenomics) や BBrower (BioTuring) 等で免疫細胞の heterogeneity や免疫反応を詳細かつ網羅的に解析することで、サルモネラの T3SS-2 を用いた感染性発症に関わる免疫細胞サブセットや免疫反応を特定する (図 1)。初年度でサルモネラ感染に関わる何からの因子が特定された場合は、共同研究を継続してそれらの感染における役割を K0 マウスや分子生物学的な手法を用いて解明することを目指す。

③ 予想される成果

全世界の細菌感染症に関連した死亡者数は、2019 年の調査によると虚血性心疾患の次に多く、それは全死亡者の 1/8 (13.6%) の原因に当たる (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, *Lancet*. 2022)。サルモネラ侵襲感染もその多くを占めており、15 歳以下への感染傾向が特に高いことから YLLs (years of life lost: 早死にすることによって失われた年数) の合計は、黄色ブドウ球菌、肺炎双球菌、クレブシエラなど他の主要な細菌感染症起因菌と肩を並べる。またこれらの薬剤耐性菌の増加は顕著であり、WHO の報告によると侵襲感染を起こしたサルモネラの薬剤耐性出現率に関していえば、2017 年から 2020

年で少なくとも 15%上昇した。今後さらに細菌感染症に関連した死因の増加が懸念されており、薬剤耐性菌を出さない新規治療薬がますます要求されている。そのための創薬開発研究の基盤として、細菌感染症に対し宿主免疫反応がどのように働くのか詳細を理解することが必要である。

このようなことから本研究では、サルモネラに感染したマウスの免疫反応を単一細胞レベルで解読するとともに、サルモネラの侵襲感染に重要な病原因子がどうそれに影響するのか解析する。初年度で、予定されている解析データを獲得し、それについて議論を重ねることでその後の方針を決定していく。これによりサルモネラ感染メカニズムの解明に近づくだけでなく、好中球や感染細胞を含めた宿主免疫反応の単一細胞トランスクリプトーム解析ツールとして Fixed RNA Profiling 解析が有用であることを示すことができる。このような最新技術と感染症学が融合した研究成果は前例が無いことから、本共同研究の達成による成果は日本だけでなく世界的にも大きな影響を与えることが予想される。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

当初の計画通り、ネズミチフス菌野生株（wt）、T3SS-2 機能欠失株（*spiB*）および T3SS-2 エフェクター SpvB 欠損株（*spvB*）を接種した C57BL/6J から、サルモネラの増殖の場である脾臓を回収し、それを scRNA-seq の解析サンプルとした。SpvB は、T3SS-2 から分泌される 30 以上のエフェクターの中でも侵襲感染の増悪化に必須あり（図 2）（Chen et al., *Cell Host Microbe* 2021）、申請者が発見したエフェロサイトーシスを介した好中球内生戦略（Hiyoshi et al., *Cell Host Microbe* 2022）にも寄与することから（未発表）、本研究で解析する対象に加えた。

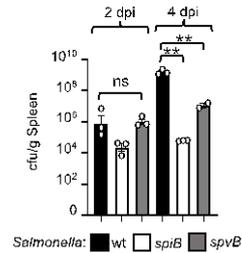


図2：T3SS-2エフェクターSpvBはサルモネラの侵襲感染性に寄与する 9週齢のC57BL/6Jに10⁴ cfuのネズミチフス菌野生型（wt）、T3SS-2機能欠失株（*spiB*）、SpvB欠損株（*spvB*）を接種後、2日と4日目の脾臓内菌数。**, $P < 0.01$; ns, $P > 0.05$

② 成果（結果+考察）

サルモネラ感染4日目、菌株種に関わらず、ほぼ全ての主要な免疫細胞種は脾臓内から検出されたが、感染した菌株により免疫細胞の heterogeneity に明らかな違いが認められた（図 3A and 3B）。

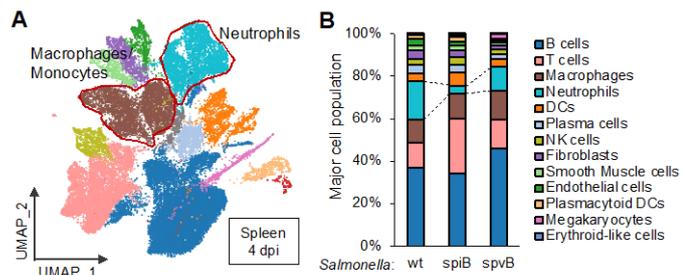


図3：scRNA-seq (Fixed RNA profiling; Flex) を用いた主要な免疫細胞種の heterogeneity 解析 (A) サルモネラ感染4日後の脾臓内の主要な免疫細胞種を、scRNA-seq解析により二次元上にプロットしたUMAP像。(B) それぞれの感染における主要な免疫細胞の割合。

本研究では 10xGenomics 社の固定組織を用いた scRNA-seq 技術 (Fixed RNA Profiling; Flex) により、RNA が分解されやす

い感染細胞や好中球を高感度に出来るよう設定されている。その期待通り、脾臓内の菌数と関連した好中球数の違いが検出された（図 3A and 3B）。さらに、好中球を 3 つのサブセットにクラスタリングすると、接種した菌株間においてサブセットの割合が異なることが明らかになった（図 4A and 4B）。これら好中球の成熟度 (Maturation score) を関連する 50 遺伝子の発現量より比較解析した結果 (Xie et al., *Nat Immun* 2020)、サルモネラ野生株 (wt) 感染 において有意に成熟度

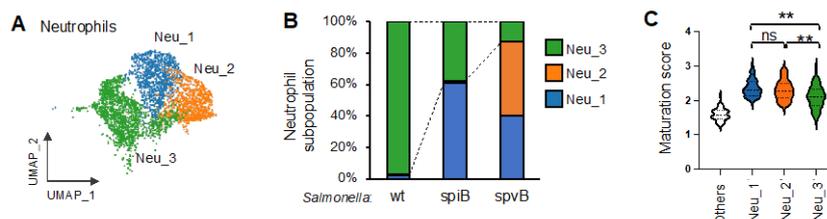


図4：サルモネラはT3SS-2を用いて好中球のサブセットを再構成する (A) 好中球のサブセットを、scRNA-seqにより大きく3つにクラスタリングしたUMAP像。(B) それぞれの感染における好中球サブセットの割合。(C) 好中球の成熟度を、好中球サブセット (Neu_1 - 3) および好中球以外の免疫細胞 (Others) に対して行った比較解析。**, $P < 0.01$; ns, $P > 0.05$

の低いサブセット (Neu_3) が浸潤していることが分かった（図 4B and 4C）。また、サルモネラが主に寄生するマクローファージ

と単球について 5 つのサブセットにクラスタリングした結果、好中球と同様に接種した菌株間で heterogeneity に違いが認められた (図 5A and 5B)。中でも classical monocytes (CMs) から派生したサブセットにおいて割合の違いが大きく、wt 感染では iNOS Macs (Itgam⁺Ccr2⁻Nos2⁺) の顕著な蓄積が認められ、CMs (tgam⁺Ccr2⁺) や non-classical monocytes (NCMs; Itgam⁺Ccr2⁺Ace⁺) は、他の菌株の感染と比較して少なかった (図 5B)。興味深いことに、iNOS Macs は脾臓内においてサルモネラが主に寄生しているマクロファージサブセットであること、その

反対に CMs や NDMs はサルモ

ネラの増殖を制限する活性があることが報告されている (Goldberg et al., *Immunity* 2018; Hoffman et al., *Immunity* 2021; Pham et al., *Sci Adv* 2023)。以上のことから、サルモネラ (ネズミチフス菌) は、T3SS-2 もしくはエフェクター-SpvB 単体により、好中球やマクロファージサブセットを好みの環境にリプログラミング (再構成) することで侵襲感染性を高めていることが、Fixed RNA Profiling を用いた解析によって明らかになってきた。

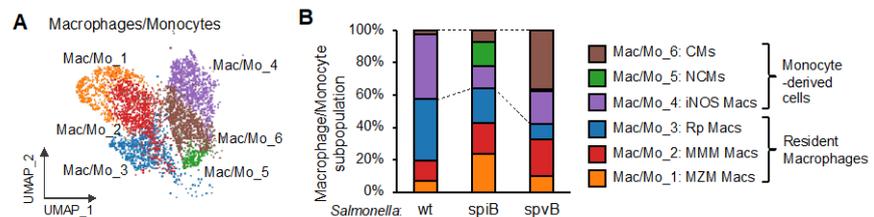


図5: サルモネラ野生株と変異株接種におけるマクロファージおよび単球のheterogeneity (A) マクロファージ・単球のサブセットを5つにクラスタリングしUMAPによりプロットした図。(B) それぞれの感染におけるマクロファージ・単球サブセットの割合。

③ 成果の公表

ここまでの成果は、現在進行中の結果と合わせ、国内外の学会や論文で近いうちに広く公表する予定である。

6. 自己評価

申請当初に計画していた実験を滞りなく遂行することが出来た。また公表前のため、ここでは全てを紹介できないが、サルモネラの T3SS-2 および T3SS-2 エフェクター依存的に、ユニークな好中球サブセットが出現することを本研究では見出している。このようなことから、貴拠点共同研究で得られた成果は非常に高いものであると思われる。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期の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)

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」で述べてあれば省略可)

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：結核菌の硫黄代謝メカニズムの解明
課 題 番 号：2023-Ippan-13
2. 代 表 者：熊本大学大学院 生命科学研究部 助教 松尾 祐一
共 同 研 究 者：長崎大学 熱帯医学研究所 感染生化学分野 教授 北 潔
長崎大学 熱帯医学研究所 分子感染ダイナミクス解析分野 教授 稲岡 健ダニエル
長崎大学 熱帯医学研究所 分子感染ダイナミクス解析分野 助教 佐倉 孝哉

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

硫化水素は、一酸化窒素、一酸化炭素に続く第3のガス状メッセンジャーとして注目されており、ヒトにおいては神経機能調節、血管平滑筋弛緩、細胞保護などの多様な生理作用を有することが報告されている。そして、結核菌において、硫化水素は結核菌の休眠期への誘導と、病原性発現に関わることが報告されている。しかし、結核菌の硫黄代謝メカニズムについては未だに明らかになっていない。本研究では、硫化水素を基質とし、エネルギー代謝に役割を果たす Sulfide:quinone oxidoreductase (SQOR) に注目して解析を進め、硫黄代謝とエネルギー代謝における SQOR の生理的役割を明らかにすることを目的としている。X線構造解析により、SQOR の反応機構を原子レベルで明らかにするとともに、SQOR の阻害剤を同定する。さらに、阻害剤を用いた解析により、エネルギー代謝における役割を明らかにする。

② 研究内容

1. 結核菌 SQOR の X線構造解析

タンパク質結晶化条件を最適化することで、X線構造解析に適した良質な結晶を得る。そして、結核菌 SQOR の反応機構を原子レベルで明らかにする。SQOR の活性中心には2つのシステインを配位しており、システインのチオール基同士がジスルフィド結合している。そして、基質である硫化水素が、1つのシステインのチオール基に硫黄原子を受け渡しポリスルフィド化することで反応中間体を形成し、690nm 付近に特徴的な吸収波長をもつことが報告されている。精製した結核菌 SQOR と硫化水素を反応させ、分光計により反応中間体の解析を行ったが、中間体を検出することはできなかった。理由として、中間体の形成が一瞬であるか、または中間体を形成しないということが考えられる。構造解析により、反応機構を原子レベルで明らかにするとともに、これまでに報告がある SQOR との構造生物学的な特徴について解析を進

める。

2. SQOR 阻害剤の同定

SQOR 組換えタンパク質を用いて、阻害剤の同定を行う。阻害剤ライブラリーは、感染生化学分野の北教授が保有する呼吸鎖酵素に対する阻害剤ライブラリーを用いる。

【次年度以降の研究計画】

3. SQOR 欠損株の表現型解析

硫化水素で休眠期へと誘導した結核菌を酸素環境へと曝露すると、早期に増殖期へと移行することが報告されている。そこで、本研究では SQOR 欠損株を用いて、休眠期への移行と酸素曝露との相関を明らかにする。

4. メタボローム解析

結核菌から代謝物を抽出した後に、質量分析器により代謝物の定量解析を行う。SQOR はエネルギー代謝と硫黄代謝に関わることから、解糖系および TCA 回路の代謝物と硫黄代謝物を中心に解析を進めることにより、SQOR が関わる代謝経路を明らかとする。

5. 代謝フラックス解析

細胞外フラックスアナライザーを用いて、生きた結核菌を用いて SQOR のエネルギー代謝における役割を明らかとする。細胞外フラックスアナライザーは、培地中の酸素消費量を測定することで酸素呼吸を評価し、乳酸による pH の変動を測定することで解糖系を評価することができる。SQOR 阻害剤を用いることで、SQOR が与えるエネルギー代謝への影響を解析する。

6. 阻害剤の作用機序の解析

SQOR と同定した阻害剤の共結晶を得ることで、原子レベルで阻害剤の作用機序を明らかにする。

③ 予想される成果

ヒトにおける硫化水素の生理的役割については報告されているが、細菌における生理的役割については未だに明らかとなっていないことから、本研究の学術的意義は大きい。また、硫化水素を基質とする SQOR は結核菌の病原性に関わる重要な分子であり、共同研究で SQOR 阻害剤を同定することは、将来的に創薬研究への応用が期待できる。多剤耐性結核菌は公衆衛生上の課題であり、新規薬剤開発は強く望まれており、本研究課題の社会的意義は大きい。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

1. 結核菌 SQOR の結晶構造解析

ヒト SQOR では、基質である硫化水素と中間反応体を形成することが明らかとなっているが、結核菌 SQOR では中間反応体の存在を明らかにすることはできなかった。つまり、結核菌 SQOR の酵素反応機構は、ヒト SQOR とは異なることが示唆されていた。そのため、本研究では X 線結晶構造解析により原子レベルでの結核菌 SQOR 反応化機構の解明に取り組んだ。

2. 結核菌 SQOR の阻害剤の探索

SSP-4 を用いた結核菌 SQOR のプローブアッセイ系を構築した後に、共同研究者である北教授が保有する呼吸鎖酵素に対する阻害剤ライブラリーを用いて、結核菌 SQOR を試みた。そして、プローブアッセイで得られた結核菌 SQOR の阻害については、さらに基質であるキノンの還元を指標とした、キノ還元アッセイにより、各阻害剤の IC₅₀ を解析した。

② 成果（結果＋考察）

1. 結核菌 SQOR の結晶構造解析

本研究では、2.18 Å の解像度で結核菌 SQOR の結晶構造を得ることができた（図 1）。その結果、結核菌 SQOR の Flavin adenine dinucleotide (FAD) 結合領域を明らかにすることができた。FAD の近傍には、160 番目と 338 番目のシステインが配位していた。そして、2つのシステインをセリンへと置換した変異体では、酵素活性を失ったことから、2つのシステインがキノンの還元において重要であることが明らかになった。また、ヒト SQOR の構造と比較して、結核菌 SQOR は膜結合領域が認められなかったが、周囲は疎水性アミノ酸で構成されることから、膜表面型タンパク質として、結核菌 SQOR は膜領域に局在することが示唆された。

結核菌 SQOR と基質である硫化水素との共結晶を解析した。その結果、160 番目のシステインがもつチオール基に、2つの硫黄原子が付加していることが明らかとなった。さらに、硫化水素とキノンの共結晶では、160 番目と 338 番目のシステインのチオール基が 4つの硫黄原子で結合していることが明らかとなった。このことから、結核菌 SQOR はシステインがもつチオール基のポリスルフィド化により、FAD へと電子を受け渡すことが示唆された。

今回の解析では、結核菌 SQOR の補欠分子族である FAD の結合領域を決定することはできたが、基質であるキノンの結合領域を明らかにすることはできなかった。したがって、今後はキノ結合領域を決定するとともに、変異体を作製し、酵素学および構造生物学的解析を進めることで、酵素反応機構を明らかにしたい。

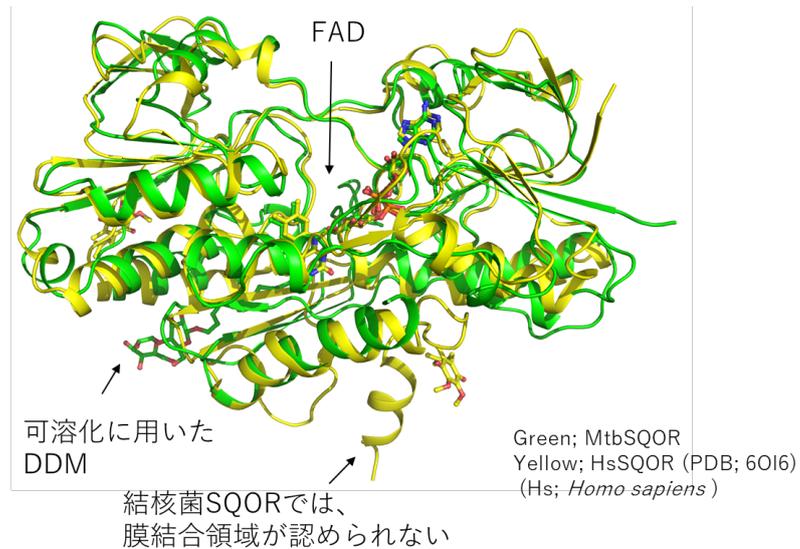


図1：本研究で得られた結核菌SQORの結晶構造

2. 結核菌 SQOR の阻害剤の探索

北教授が保有する呼吸鎖酵素に対する阻害剤ライブラリーを用いて、阻害剤スクリーニングを行った結果、 μM オーダーで結核菌 SQOR を阻害する 3 つの阻害剤を同定することができた (図 2)。そして、化合物 B はすでに抗結核活性が報告されていた。つまり、結核菌 SQOR が薬剤標的分子としての可能性をもつことを示唆している。

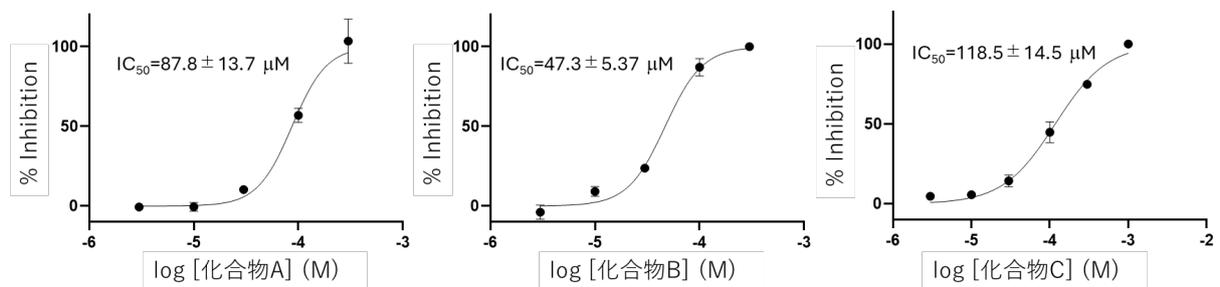


図2：本研究で同定された、3つの結核菌SQOR阻害剤

③ 成果の公表

【学会発表】

1. 松尾祐一、志波智生、伊豫田健次、中井宇響、太田明菜、稲岡健ダニエル、北潔、結核菌 sulfide:quinone oxidoreductase の酵素反応機構
九州微生物フォーラム、2023年9月
2. 松尾祐一、志波智生、伊豫田健次、中井宇響、太田明菜、稲岡健ダニエル、北潔、結核菌 sulfide:quinone oxidoreductase の機能解析
第96回日本生化学会大会、2013年10月

6. 自己評価

当初の計画通りに研究を進め、結核菌 SQOR の結晶構造を明らかにし、阻害剤を同定することができた。本年度の共同研究で見出した結晶化因子を最適化することで、結核菌 SQOR と阻害剤との複合体構造を得ることができれば、創薬研究への基盤となることが期待でき、十分な成果を挙げることができたと考えている。また、今後は遺伝学的手法を用いて感染成立における、結核菌 SQOR の生理学的機能を明らかにすることが重要であると考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の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）
- IV （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

当初の予定通りに、結核菌 SQOR の構造生物学的解析を行い、阻害剤を同定することに同定することができたため。

令和 5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：サルモネラ全身感染メカニズムの解明と薬剤耐性菌治療への応用
課 題 番 号：2023-Ippan-15

2. 代 表 者：北里大学薬学部 講師 羽田健
共 同 研 究 者：長崎大学熱帯医学研究所 細菌学分野 准教授 日吉大貴
北里大学薬学部 学部生 菅野菜穂
北里大学薬学部 学部生 宮崎友梨香
北里大学薬学部 学部生 酒井瑞葵
北里大学薬学部 学部生 白石瑞樹

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

サルモネラ属細菌（サルモネラ）は食中毒の原因菌であり、健康な成人ではその症状は下痢、嘔吐、腹痛など局所にとどまるが、小児や高齢者では菌血症や敗血症などの全身感染を引き起こし、死に至る。近年ではフルオロキノロン耐性、拡張型β-ラクタマーゼ産生などの多剤耐性化が進み、高齢者の増加が続く我が国においても、治療が困難なサルモネラ感染症による死亡者数の増加が懸念される。また、サハラ砂漠以南のアフリカの発展途上国では、サルモネラが侵襲性を示し、成人の死亡率 22-47% に至っている（PMID: 19591599）。そのため、サルモネラ感染症は WHO によって「速やかな研究開発が望まれる感染症」の 1 つに挙げられている（PMID: 29276051）。従来の抗菌薬は主に細胞壁や細胞膜、DNA、リボソームなど菌体が標的であるために、作用部位の変異や菌体外への薬剤の排出、バイオフィルムの形成によって耐性菌が出現しやすい（図 1）。したがって、従来とは異なる標的をもつ抗菌薬を開発するためにも、サルモネラの病原性発現機構を新たな側面から理解することが求められている。

サルモネラの最も重要な病原因子は、独立した 2 つの III 型分泌機構（T3SS-1 および T3SS-2）であり、これらの分泌機構から宿主細胞に直接分泌・注入され、宿主細胞の種々の細胞機能を錯乱するタンパク質（エフェクター）が病原性発現において中心的な役割を担う（PMID: 18026123）。経口的に摂取されたサルモネラは、小腸に到達後、T3SS-1 エフェクターの作用により腸管上皮細胞に積極的に侵入し、宿主の炎症反応が誘導される（局所感染）。ここで炎症を逃れる、または抗原の取り込みに関与する M 細胞から細胞内に侵入したサルモネラは粘膜下組織のマクロファージに食食される。一般にマクロファージに食食された細菌は食胞に包まれ、リソソームと融合することで殺菌消化される。しかしサルモネラは食胞内で T3SS-2 を発現し、マクロファージ細胞質内にエフェクターを分泌する。その結果、菌体はサルモネラ小胞

(SCV) に取り囲まれ、リソソームによる殺菌を逃れる。その後、SCV 内で増殖したサルモネラは、マクロファージを介してリンパ液中または血中へ拡散し、全身感染を惹起する。

このようにサルモネラの全身感染成立には T3SS-2 によるマクロファージ内での増殖が重要であることは明らかであったが、マクロファージ内で生存・増殖したサルモネラがどのようにリンパ液中や血中に拡散するのか不明であった。そこで申請者は T3SS-2 によるマクロファージの細胞死に注目した。

申請者らはこれまでにサルモネラによる全身感染とマクロファージの細胞死誘導性との関連を見出し、マクロファージの細胞死誘導に関わる 5 つの T3SS-2 エフェクターを同定した (PMID: 31235639)。また、サルモネラによるマクロファージ細胞死は好中球に対し、efferocytosis を誘導する「eat-me」シグナルとなり、好中球に貪食されたサルモネラは細胞内でさらに増殖し、全身に拡散することを明らかにした

(PMID: 34951948)。これらのデータはマクロファージの細胞死誘導はサルモネラの全身拡散に極めて重要な過程であり、細胞死の阻害が新たな治療薬の標的となることを示す。現時点では T3SS-2 によるマクロファージの細胞死誘導の分子メカニズムは不明な点が多いが、本研究課題では、T3SS-2 によるマクロファージ細胞死誘導機構を解明することによりサルモネラの全身感染発症機構を紐解く。さらにそこから、T3SS-2 によるサルモネラの新たな生存戦略を明らかにし、サルモネラの病原性発現機構の詳細な理解を実現することを目的とする。これによりサルモネラ感染症に対する治療薬開発の基盤構築につなげることを目指す。

② 研究内容

申請者らのこれまでの実験結果から、サルモネラによる T3SS-2 依存的細胞死は感染 16 時間から 24 時間で誘導されることが明らかになっている。実際にそのタイムフレーム内、もしくはそれ以前に、これまでに特定した 5 つのエフェクターが分泌され、マクロファージの細胞死を誘導するのか、サルモネラを RAW 細胞に感染し、タイムラプスレーザー顕微鏡解析により明らかにしたいと考えている。しかし、サルモネラは BSL-2 レベルの病原体であることから、解析できる顕微鏡が限られている。そこで、サルモネラ研究分野に精通した細菌学分野の日吉大貴准教授の協力のもと、解析が実現できる熱研共同研究利用機器のレーザー顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス) を利用する。解析には、研究代表者が構築した各種 RAW 遺伝子欠損細胞や、サルモネラのエフェクター欠損株を用い、マクロファージの細胞死とエフェクターの関係を経時的に明らかにする。また、適宜蛍光タンパク質使用して、菌体またはエフェクターを標識することで細胞内での局在を示す。

本共同研究ではこれまでにタイムラプスレーザー顕微鏡解析によって、サルモネラによる T3SS-2 依存的細胞死は感染 15 時間以降に誘導されること、また多くの細胞でパイロトーシス様の細胞死が誘導されていることを示した。今年度は、まず *Casp11-KO* RAW 細胞にサルモネラを感染することで、RAW 細胞感染時に観察されたパイロトーシスが認められなくなることを確認する。これにより T3SS-2 依存的に Caspase-11 による非典型パイロトーシスが誘導されていることを証明できる。次に

Casp11-KO 細胞においても細胞死 (Caspase-11 非依存的細胞死) が誘導されることを観察する。また、Caspase-11 非依存的細胞死が誘導されない T1S3 株およびエフェクターX の相補株を感染し、同様の観察を行うことにより、エフェクターX による Caspase-11 非依存的細胞死を視覚的に捉える。

次年度には上記の感染実験に加え、エフェクターを蛍光標識することでエフェクターの細胞内への分泌のタイミングおよび細胞内での挙動を観察する。これにより、サルモネラがどのように Caspase-11 非依存的細胞死を誘導するのかを明らかにする。

③ 予想される成果

タイムラプス蛍光顕微鏡解析のメリットは時間を追って視覚的に説得力のあるデータを得ることができる点にある。2022 年度は実験系を構築するところから開始し、GFP を発現するサルモネラを RAW 細胞に感染し、Propidium Iodide 染色を行うことで T3SS-2 依存的にマクロファージに非典型パイロトシスを誘導することを実際に観察することができた。本年度は *Casp11-KO* RAW 細胞に各種サルモネラの遺伝子変異株を感染し、同様にタイムラプス解析を行う。実験条件、材料など新たに構築する必要がないため、スムーズにデータが得られることが予想される。よって、感染時間の経過に伴って T3SS-2 によりどのような細胞死が起こるのかを明らかにし、またその細胞死に関わるエフェクターを同定することができると考える。

一方で、本研究の最大の疑問は「同定したエフェクターがどのように細胞死を誘導するのか」というところにあり、これを明らかにすることが次年度までの課題となる。

近年、結核菌、ブルセラまたはクラミジアなどの細胞内寄生細菌ではマクロファージや好中球などの食細胞に細胞死を誘導することが明らかとなってきた (PMID: 30787033, 29021973, 32897321)。よってこれらの病原細菌は共通もしくは類似の細胞死誘導機構を感染戦略としてもつことが予想される。つまり、本研究により明らかにされる細胞死誘導機構は、サルモネラ属だけでなく他の病原細菌の病原性解明の重要な情報となる。

T3SS はグラム陰性菌に高度に保存されており、T3SS をターゲットとした創薬研究は多く存在する。サルモネラ感染症においても T3SS-1 の阻害剤はエフェクターの分泌や T3SS-1 をコードする遺伝子群の発現を標的としたものが報告されている (PMID: 33966165)。しかし T3SS-1 欠損株においてもマウスの全身感染性を示すことから、T3SS-1 だけでなく T3SS-2 のような新たな側面からのサルモネラ感染症の制御が今後の課題となる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

マウスマクロファージ様培養 RAW264.7（RAW）細胞またはその Caspase-11 欠損（*Casp11-KO*）細胞を 96-well plate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、翌日 GFP 発現プラスミドを保有するネズミチフス菌 ATCC14028 株由来ナリジクス酸耐性（SH100）株の T3SS-1 欠損（*invA*）株または T3SS-1 および T3SS-2 二重欠損（*invA spiB*）株を 1 細胞あたり 10 cfu (multiple of infection: moi=10) となるように感染し、感染 4 時間後から 24 時間後までキーエンス BZ-X710 によりタイムラプス蛍光顕微鏡観察を行った。死細胞の観察には膜非透過性の核染色剤である Propidium Iodide (PI) を使用した。

RAW 細胞を 24-well plate に 2×10^5 cells/well となるように播種し、翌日 *invA* 株または各種遺伝子変異株を感染 1 細胞あたり 25 cfu (moi=25) となるように感染し、感染 24 時間後に培養上清を回収した。上清は TCA 沈殿により濃縮したのち、SDS サンプルバッファーを加えた。上清を採取した後にウェルに残った培養細胞は SDS サンプルバッファーを添加し溶解した。上清中および細胞溶解液中のタンパク質を SDS-PAGE により展開後、PVDF 膜に転写した。抗 Caspase-11 抗体(ab180673、abcam) を用いたウェスタンブロッティングを行った。

② 成果（結果＋考察）

2022 年度の本共同研究においてタイムラプス蛍光顕微解析によってサルモネラによる T3SS-2 依存的細胞死は感染 15 時間以降に誘導されること、また形態学的特徴からパイロトーシス様の細胞死およびアポトーシス様の細胞死が誘導されることを明らかとした。今年度は、*Casp11-KO* RAW 細胞にサルモネラを感染することで RAW 細胞感染時に観察されたパイロトーシス様細胞死がほとんど認められなくなる一方で、アポトーシス様の細胞死を起こした細胞が多数認められることを確認した（データ不記載）。以上のことから、サルモネラの感染によりマクロファージに誘導される少なくとも 2 種類、すなわち非典型パイロトーシスおよびアポトーシス様の細胞死が誘導されることが示唆された。

次にサルモネラ感染によって Caspase-11 が活性化されることを明らかにするために、T3SS-1⁻ (*invA*) 株または T3SS-1/-2⁻ (*invA spiB*) 株を RAW 細胞に感染し、感染 20 時間後の RAW 細胞のライセートおよび培養上清中のタンパク質について抗 Caspase-11 抗体を用いたイムノブロットを行った。また非典型パイロトーシスの誘導すなわち Caspase-11 の切断のコントロールとして *invA* 株の T3SS-2 エフェクター *SifA* 欠損 (*invA ΔsifA*) 株を感染し 4 時間後の細胞ライセートと培養上清を用いた。*invA ΔsifA* 株はマクロファージ感染後すぐにファゴソームから細胞質に移行し、Caspase-11 を活性化することが知られている。*invA* 株または *invA ΔsifA* を感染した RAW 細胞では培養上清中の Caspase-11 が切断されたが、*invA spiB* 株を感染した場合は切断された Caspase-11 のバンドが見られなかった（図 1）。このことは *invA* 株を感染した RAW 細胞において感染 20 時間後に非典型パイロトーシスが誘導されていることを示す。さらに非典型パイロトーシスを誘導するエフェ

クターを同定するため、これまでに研究代表者らが細胞死の誘導に関わるエフェクターとして同定した SseF、SseJ および SteA に注目した。 *invA* 株の T3SS-2 エフェクター SseF、SseJ および SteA の欠損 (*invA sseF sseJ steA phoN::Ω*) 株またはその SseF の相補 (*invA sseF sseJ steA phoN::SseFΩ*) 株を感染し、上記と同様に Caspase-11 の切断を調べた。その結果、*invA sseF sseJ steA phoN::sseF Ω* 株でのみ Caspase-11 の切断が認められた (図 1)。以上のことから SseF によってマクロファージに非典型ピロトシスが誘導されることが示唆された。

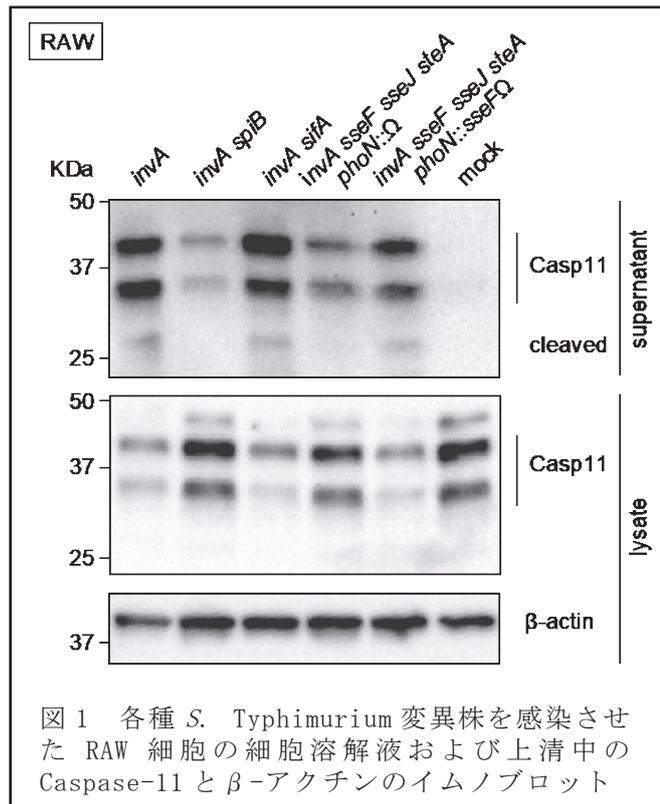


図 1 各種 *S. Typhimurium* 変異株を感染させた RAW 細胞の細胞溶解液および上清中の Caspase-11 と β-アクチンのイムノブロット

③ 成果の公表
論文投稿中

6. 自己評価

本年度は *Casp-11* KO 細胞に *invA* 株を感染すると RAW 細胞に感染した時に見られたピロトシス様細胞死が認められなくなることを示すことができた。ここまでは計画通りに実験が進んだが、その後予定していた各種遺伝子欠損株を感染した *Casp-11* KO 細胞のタイムラプス蛍光顕微鏡解析は実施できなかった。よって本年度の達成度は「不満は残るが一定の成果を挙げられた」とした。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の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)
- 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」で述べてあれば省略可）
「6. 自己評価」に記載したため省略

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：SFTS ウイルスの免疫細胞内増殖機構の解明

課 題 番 号：2023-Ippan-16

2. 代 表 者：国立感染症研究所 感染病理部 研究員

宮本 翔

共同研究者：長崎大学熱帯医学研究所 ウイルス学分野 准教授

高松 由基

長崎大学熱帯医学研究所 ウイルス学分野 博士課程学生

XU QIANG

国立感染症研究所 感染病理部部長

鈴木 忠樹

3. 決 定 額：500 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究は、SFTS 重症患者が免疫不全に陥る機構の解明のため、SFTS ウイルスが B 細胞へ感染と増殖を成立させる機構を明らかにすることを目的としている。本共同研究では B 細胞内ウイルス増殖に必要な宿主・ウイルス因子の同定のため下記の解析を行う。

SFTS ウイルスはヒト末梢血由来の精製 B 細胞に感染は成立するものの、その増殖の程度は限られており、顕著な子孫ウイルス粒子産生は認められなかった(Wada and Miyamoto *et al.* J Infect Dis. 2021)。一方でウイルス感染後に B 細胞の多くは形質芽細胞と類似した大型異型 B 細胞へ分化することを示し、感染をきっかけに B 細胞が臨床上の感染標的細胞へ分化傾向を示すことを示唆した。形質芽球は健康成人末梢血においては 0.5%以下であり (Song *et al.* JCI Insight. 2017)、SFTS ウイルスの増殖においては B 細胞への感染だけでなく形質芽細胞へと分化させる機構があり、分化過程の形質芽細胞がウイルス増殖を促す宿主因子を発現していることが考えられた。これを明らかにするため、ウイルス感染 B 細胞やヒト重症患者の遺伝子発現プロファイルから B 細胞でのウイルス増殖を促す宿主因子や IgG 抗体発現に影響を及ぼす因子を同定することを目指す。また、B 細胞でのウイルス増殖におけるウイルス側の制御因子を探索するため、SFTS ウイルス変異タンパク質の B 細胞における転写・複製・ウイルス粒子形成能の機能解析を行い、ウイルス感受性を示す B 細胞と示さない B 細胞におけるウイルス機能の変化を明らかにする。

② 研究内容

1. B 細胞内ウイルス増殖に必要な因子の探索

B 細胞で SFTS ウイルス増殖効率を上昇させる宿主因子を同定するため、ウイルス感受性を示す B 細胞と示さない B 細胞 (Suzuki *et al.* J Clin Invest. 2020)、*in vitro* 感染で形質芽細胞への分化傾向を示したヒト末梢血細胞 (Wada and Miyamoto *et al.* J Infect Dis. 2021) のトランスクリプトーム解析及び、サイトカイン定量からウイルス増殖の感受性を上昇させる誘導候補因子を同定する。

同時に、臨床検体におけるトランスクリプトーム解析からも重症度や病理組織上での感染細胞数の上昇に寄与する因子を探索し、*in vitro* の細胞側の解析結果と照合する。実際の感染病態を反映する臨床検体との比較から真に重要な候補因子が得られるものと期待される。候補因子群の過剰発現や、ノックダウンを用いてウイルス増殖効率、B細胞の表現型変化や抗体発現に影響をもたらす因子を決定する。

2. B細胞内ウイルス増殖に重要な増殖ステップとウイルス因子の探索

上記の因子に関連したウイルス感受性を示すB細胞条件と感受性の低いB細胞条件における各ウイルス増殖ステップの機能解析からどのステップがB細胞におけるウイルス増殖に必要なのかを明らかにする。ウイルスゲノムの転写・複製を評価するミニゲノムアッセイ、NCアセンブル、粒子アセンブル、および細胞侵入にどのような影響を与えるか評価するウイルス様粒子形成の試験系を構築し、ウイルス感受性細胞や感受性の異なるB細胞におけるウイルス機能の変化を評価することを目指す。また、増殖に関連するNP変異体を探索し、標的のドメインが各細胞において転写・複製、NCアセンブル、粒子アセンブル、細胞侵入にどのような影響を与えるか評価する。

1年目(2023年度)

- 感染B細胞や臨床検体の遺伝子発現解析からウイルス増殖効率を高める因子や抗体発現に影響を及ぼす因子を選定する。候補因子群の過剰発現や、ノックダウンを用いてウイルス増殖効率や抗体発現の変化をもたらす因子を探索する。
- SFTSウイルス機能を評価するミニゲノムアッセイ、NCアセンブル、粒子アセンブル、および細胞侵入にどのような影響を与えるか評価するウイルス様粒子形成のアッセイ系を構築する。

2年目(2024年度)

- 同定したB細胞感染を誘導する宿主因子の影響やウイルスタンパク質の局在を検証することで、ウイルス増殖における意義を明らかにする。
- B細胞におけるSFTSウイルスの各増殖ステップの機能試験からB細胞のウイルス感受性に重要なステップを決める。

ウイルス感受性・非感受性の培養細胞株におけるNP変異体のウイルス機能試験から感受性細胞やB細胞におけるNP機能ドメインを探索する。

③ 予想される成果（申請書「8. 予想される結果」を転記）

これまでの解析で得られたB細胞のウイルス感受性を誘導する候補液性因子（Wada and Miyamoto, *et al.* J Infect Dis. 2021）や遺伝子発現の解析から得られた新規宿主因子を同定し、この因子がB細胞のウイルス増殖サイクルにおけるどのステップに寄与するのかを解明することが期待される。また、B細胞に重要なウイルス増殖ステップやウイルス因子を同定することで、B細胞感染をきっかけとする発病機構の制御に関する知見を得られることが期待される。これらの宿主因子・ウイルス因子は生体内の感染標的細胞の誘導に関与すると考えられるため、これまで不明であったSFTSの発病・重症化機構の解明に繋がり、最終的にSFTS感染症に対する新しい予防・治療法の開発に貢献することが期待される。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

我々は、*in vitro*における健康成人末梢血由来のB細胞において、SFTSウイルス感染によって形質芽球様の活性化B細胞が誘導されることを明らかにした。ウイルス感染をきっかけに、B細胞中の半数以上が活性化B細胞へ誘導され、IL-6やTNF- α が顕著に分泌された。ただし、ウイルス感染細胞はB細胞集団内で1割以下であり、IL-6分泌細胞とは一致しないため、非感染細胞と感染細胞の相互作用が形質芽球の誘導とウイルス増殖に関与していると考えられた。各細胞間の動態やウイルス感受性を評価するため、SFTS患者の急性期における臨床検体末梢血細胞からシングルセルRNA-seqデータを取得し、解析を進めている。また、SFTSウイルスがB細胞に感染するために必要な宿主タンパク質を同定するためにSFTSウイルス粒子表面の糖タンパク質(Gn)との網羅的相互作用(インタラクトーム)解析を実施している

培養細胞におけるウイルス機能の解析については、熱研対応教員のウイルス学分野・高松由基博士と共同研究を進めている。これまでにSFTSウイルスの増殖ステップとして必要な転写・複製を定量するミニゲノムアッセイ、ウイルスタンパク質間の相互作用解析、ウイルス様粒子形成アッセイ等を構築した。さらに、SFTSウイルスの核タンパク質(NP)で広く保存されている機能ドメインを探索するため、NP変異体を構築し、ミニゲノムアッセイによるスクリーニングを進め、いくつかのペプチドモチーフが転写・複製を制御することを見出した。現在、これらのペプチドモチーフがどのような分子機構で転写・複製を制御するか解析を進めている。またGn/Gcをそれぞれ蛍光標識し、その細胞内動態を可視化する系を構築した。今後、インタラクトームで同定された宿主因子との相互作用について、ライブセルイメージング顕微鏡を用いて解析する方針である。

② 成果（結果＋考察）

SFTSウイルス粒子表面の糖タンパク質(Gn)とのインタラクトーム解析

SFTSウイルスがB細胞に感染するために必要な宿主タンパク質を同定するために、SFTSウイルス粒子表面糖タンパク質のレセプター結合領域をもつGnにビオチンリガゼを結合させた組換えタンパク質を構築した。比較対照として、インフルエンザウイルスのHAタンパク質にビオチンリガゼを結合させた組換えタンパク質も構築した。これらをそれぞれSFTSウイルス感受性B細胞株であるPBL-1細胞に発現させ、ビオチン標識を実施した。このビオチン標識タンパク質を免疫沈降により回収し、iTRAQ試薬を用いた相対定量プロテオーム解析を実施した。検出されたペプチドのHA対照群との比較から、有意な宿主タンパク質が複数検出され、Gene Ontology解析から抗体産生ストレス応答に関わるタンパク質群であることがわかった。免疫沈降産物のWestern blottingからもこれらのタンパク質全長がGnとの相互作用を確認された。このタンパク質群の中でSFTSウイルス感染標的細胞である形質芽細胞・形質細胞で高く発現している遺伝子を中心に、阻害薬や阻害抗体を用いてB細胞におけるウイルス増殖関連因子の同定を進めている。

シングルセル遺伝子発現解析用 SFTS ウイルス遺伝子検出プローブの確立

SFTS 感染者 FFPE 臨床検体のシングルセル解析にあたって、10xGenomics Chromium シングルセル遺伝子発現 Flex において SFTS ウイルスゲノムを検出可能なプローブパネルを作製した。SFTS ウイルスゲノム検出プローブについては、Flex での使用条件を満たす他、国内外で利用可能な SFTS ウイルスゲノムを収集し、L 分節 (123 件)、M 分節 (145 件)、S 分節 (198 件) で保存されている領域のプローブセットを設計した。このプローブセットが利用可能であることを確認するために SFTS ウイルスの感染感受性をもつ B 細胞株 PBL-1 細胞に SFTS ウイルスもしくはコントロール培地を接種し、2 日後に固定・包埋を行った FFPE テストサンプルを調整した。SFTS ウイルス L 分節、M 分節および S 分節のプローブは感染 PBL-1 で特異的に検出され、各分節間で発現量が高い正の相関を示したため、これらプローブセットは FFPE 臨床検体で利用可能と考えられた。SFTS ウイルスは一般的にはその mRNA にポリ A テールを持たないために、Chromium 等のオリゴ dT プローブを利用したシングルセル遺伝子発現解析ではその検出が困難である。この特徴が SFTS ウイルス臨床検体のウイルス感染細胞シングルセル遺伝子発現解析の解釈を困難にしているが、本研究によって初めて SFTS ウイルスゲノム量の定量性をもった臨床検体のシングルセル遺伝子発現解析が可能となった。

SFTS 発症者末梢血のシングルセル遺伝子発現解析

SFTS 感染者の末梢血単核球 (PBMC) については、診断 8 日後に採血されたもののうち、血漿の RT-qPCR でウイルス量が高く検出された検体もしくは血液塗抹標本で SFTS ウイルス感染標的である形質芽細胞の割合が高い検体の 4 症例 (A-D 症例) をシングルセル遺伝子発現解析対象とした。各クラスターの細胞種を同定するために、scType を使用し、SFTS 診断 8 日目症例の PBMC 全体においては CD8⁺ T 細胞群、CD4⁺ T 細胞群、単球系に加えて、多様な B 細胞群が同定された。B 細胞群はさらに 4 つに分類し、SFTS 発症者で報告されていた ISG 発現の強い B 細胞群 (ISG-expressing B cells) (Li *et al.* Cell Rep. 2021)、CD38, CD79A, JCHAIN の発現が高い形質細胞様 B 細胞群、CD19 や CD20 の発現が強い Naïve B 細胞群、中間的な発現パターンをもつ活性化 B 細胞群とした。各症例の細胞群の割合は顕著な偏りがあり、ウイルス量の高い A 症例と B 症例においてはほとんどが B 細胞群に分類されており、形質細胞様 B 細胞群が大半を占め、ISG 発現 B 細胞群も検出された。ウイルス量の比較的少なかった C 症例と D 症例においては、形質細胞様 B 細胞群の他に活性化 B 細胞群が顕著に検出され、B 細胞群の他にも単球系や CD8⁺ T 細胞群が多かった。この細胞群の中で、ウイルス量が高い細胞群には形質細胞様 B 細胞群のほかに C 症例と D 症例において活性化 B 細胞群と CD8⁺ T 細胞群がエンリッチされることが明らかとなった。各細胞群のウイルス陽性細胞割合と発現強度を比較すると、形質細胞様 B 細胞群にはウイルス発現が顕著に高い細胞群が含まれることがわかったが、その割合は 50%未満であった。また、XBP1 や JCHAIN などの発現パターンが似ているが ISG の発現が高い ISG 発現 B 細胞ではウイルス量も陽性細胞の割合も顕著に低かった。いずれもこれら B 細胞群は SDC1/CD138 発現割合が低い傾

向にあり、形質細胞への分化が途中の形質芽細胞であることを支持した (Suzuki *et al.* J Clin Invest. 2020)。また、naïve B 細胞や活性化 B 細胞群のウイルス遺伝子発現レベルは低い、特に活性化 B 細胞群ではウイルス陽性割合が高い傾向にあった。これらの結果はこれまでの報告に従い、ウイルス陽性細胞は形質細胞に分化しつつある活性化 B 細胞や形質芽細胞のようなくつかの B 細胞群であることを支持し、分化段階に従いウイルス複製量もしくは感受性が顕著に変化していることを示唆した。一方、ISG 発現 B 細胞群はウイルス感受性細胞群と似た表現型を持つにも関わらず、ウイルス感受性は低い可能性を示した。このような B 細胞群分化の運命をコントロールすることで SFTSV に依存する病態制御ができる可能性を示した。

培養細胞におけるウイルス機能の解析

SFTSV の複製機構を解明するためウイルスタンパク質に着目して培養細胞を用いた実験を進めた。ヌクレオカプシドタンパク質 (NP) は、ウイルスゲノムの転写と複製に極めて重要であるが、これらのプロセスの根底にある分子メカニズムは依然として不明であった。そこで我々は、NP の重要なモチーフや残基に着目することで、ウイルスゲノムの転写と複製の分子メカニズムを明らかにすることを目的に研究を開始した。SFTS と近縁のブニヤウイルスの NP ゲノム配列を比較解析し、ブニヤウイルスで高度に保存されたペプチドモチーフを同定した。同定したペプチド配列にアラニン変異を導入し、レポーターアッセイを用いて転写・複製活性を評価した。さらに、同定した NP モチーフのリボ核タンパク質 (RNP) 集合・輸送における重要性をライブセルイメージングアッセイで、ビリオン形成における重要性をウイルス様粒子アッセイ (VLP) で、ウイルスタンパク質-タンパク質相互作用を免疫染色法、共免疫沈降アッセイおよびライブセルイメージングアッセイで評価した。

NP タンパク質の中で ⁶⁴RGNK_{77,74}KMS_{77,106}RV_{107,126}LPV₁₂₉ に高度に保存された領域を同定した。さらに ³⁰YEG_{L33} と ²⁴²YRN_{L245} の 2 つの YxxL モチーフが SFTSV で特異的に保存されていることを見出した。YxxL モチーフは複数のウイルスの粒子形成と出芽に重要であることが報告されている。³⁰YEG_{L33}, ⁶⁴RGNK_{77,74}KMS_{77,106}RV₁₀₇ のアラニン変異体は、ウイルスゲノムの転写と複製活性を劇的に低下させた。⁴RGNK₇₇ は発現そのものが抑制されており、転写・複製の制御機序はモチーフにより異なることが考えられた。また、免疫沈降法により、これらのモチーフ変異体においても NP-L タンパク質間の相互作用は保持されていることがわかった。我々は特に YxxL モチーフに着目して、より詳細な解析を行い、³⁰YEG_{L33} 変異体の転写・複製を制御するのは 30Y であることを明らかにした。²⁴²YRN_{L245} についてはレポーターアッセイでは著しい機能低下を認めなかったが、ウイルス様粒子の形成効率が悪いことがわかった。そこで、現在、野生型と YxxL モチーフ変異体における RNP およびウイルス様粒子形成機構について、電子顕微鏡解析と原子間力顕微鏡解析を進めている。さらに野生型を用いたリバーシジェネティクス系を構築できたため、YxxL モチーフ変異体を持つウイルスがレスキューできるか確認し、ウイルスの複製における役割を回目したいと考えている。

③ 成果の公表

1. S Miyamoto, T Suzuki. Infection-mediated immune response in SARS-CoV-2 breakthrough infection and implications for next-generation COVID-19 vaccine development. *Vaccine*. 42(6) 1401-1406. 2024.
2. S Miyamoto, T Nishiyama, A Ueno, H Park, T Kanno, N Nakamura, S Ozono, K Aihara, K Takahashi, Y Tsuchihashi, M Ishikane, T Arashiro, S Saito, A Ainai, Y Hirata, S Iida, H Katano, M Tobiume, K Tokunaga, T Fujimoto, M Suzuki, M Nagashima, H Nakagawa, M Narita, Y Kato, H Igari, K Fujita, T Kato, K Hiyama, K Shindou, T Adachi, K Fukushima, F Nakamura-Uchiyama, R Hase, Y Yoshimura, M Yamato, Y Nozaki, N Ohmagari, M Suzuki, T Saito, S Iwami, T Suzuki. Infectious virus shedding duration reflects secretory IgA antibody response latency after SARS-CoV-2 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120(52) e2314808120. 2023.
3. S Miyamoto, Y Kuroda, T Kanno, A Ueno, N Shiwa-Sudo, N Iwata-Yoshikawa, Y Sakai, N Nagata, T Arashiro, A Ainai, S Moriyama, N Kishida, S Watanabe, K Nojima, Y Seki, T Mizukami, H Hasegawa, H Ebihara, S Fukushi, Y Takahashi, K Maeda, T Suzuki. Saturation time of exposure interval for cross-neutralization response to SARS-CoV-2: implications for vaccine dose interval. *iScience*. 26(5) 106694. 2023.
4. Hiromu Osako, Qiang Xu, Takeshi Nabeshima, Jean Claude Balingit, Khine Mya Nwe, Fuxun Yu, Shingo Inoue, Daisuke Hayasaka, Mya Myat Ngwe Tun, Kouichi Morita and Yuki Takamatsu. Clinical Factors Associated with SFTS Diagnosis and Severity in Cats. *Viruses*, 16(6), 874, 2024

6. 自己評価

当初の計画通り、SFTS ウイルスの生体内での主要標的と考えられる B 細胞に対するウイルス侵入因子である Gn タンパク質と相互作用する候補タンパク質群が同定された。これら宿主因子のウイルス学的評価から、生体内ウイルス増殖における B 細胞が標的となる機構が得られる可能性がある。今年度は SFTS 患者臨床検体でのウイルス遺伝子も検出可能なシングルセル遺伝子発現解析系を確立し、ウイルス陽性細胞群をシングルセルレベルで定量的に同定することが可能になった。これら臨床検体や追加検体のより詳細な解析からウイルス増殖との関連因子、感染標的細胞誘導に関わる遺伝子発現経路や細胞間相互作用を今後評価可能である。培養細胞を用いた介入可能な実験室レベルの解析でも、臨床検体を用いた SFTS 感染者そのものの解析でも、両側面から相互に補完可能なオミクスを用いた豊富な情報を取得でき、今後の研究基盤とすることができた。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

Ⓐ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

「自己評価」参照。

2023 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Discovery of anti-parasitic hits from the UFRN synthetic compound library

Project number : 2023 – Ippan – 17

2 . Applicant name : Associate Professor, Pharmacy Department, Federal University of Rio Grande do Norte(UFRN), Alessandro Kappel Jordão

Joint researcher : Associate Professor, Dept of Molecular Infection Dynamics, NEKKEN, Daniel Ken Inaoka

3 . Amount Allotted : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

① Research Purpose

The final goal of this project is to develop an anti-leishmaniasis or anti-trypansomal drug from synthetic compounds. As the initial step towards the drug development, during this project (1 year) we will focus on identification of active synthetic compounds against the clinically important stages of these parasites (intracellular stage of the parasites). Once the active compound is identified, the functional group(s) important for the bioactivity will be further investigated by structural modification.

② Research details

The duration of the project of antiparasitic candidates from organic synthesis is two years, and the detailed research plan as followed:

Year one will be focused on organic synthesis with different scaffolds such as naphthoquinones and triazoles. The synthesis methodologies proposed features have been previously reported in the literature. The reaction steps lead us to believe that it is possible to obtain the planned compounds. After preparation, all compounds will be purified, and their structures characterized by spectroscopic methods.

Year two will be dedicated to evaluating the antiparasitic activity of synthetic compounds. Finally, these compounds that will be confirmed as the responsible for the anti-leishmaniasis or anti-tripanosoma activity observed in the experiments. Next, the structures of the identified molecules will be selected for derivatization at UFRN and to proceed to structure-activity

relationship stage.

Table 1. Research detail.

Year One	
Research Activity	Details
Preparation	Organic Synthesis of compounds
Isolation and purification	Work-up and purification of each synthetic compound
Structural Characterization	Structural determination by spectroscopic methods such as NMR and IR
Anti-trypanosomal primary hits	Screening at NEKKEN, using the Luc2 expressing <i>T. cruzi</i> (Sylvio X10, CL Brener, Tulahuen, and Esmeraldo).
Anti-leishmaniasis primary hits	Screening at NEKKEN, using the RE9h expressing <i>L. major</i> Friedlin strain.
Cytotoxicity evaluation of primary hits	Assay using 3T3, HepG2, and macrophages at NEKKEN.
Evaluation of parasite's mitochondrial ETC as the potential target of the selected hits.	Evaluation of the selected hits against the mitochondrial respiration using live parasites, and <i>in vitro</i> using parasite's mitochondrial fractions and/or recombinant enzymes.
In vivo evaluation of the selected hits	<i>In vivo</i> imaging system using the bioluminescence of <i>T. cruzi</i> and <i>L. major</i> to evaluate the therapeutic efficacy.
Year Two	
Research Activity	Details
Structure-activity relationship of the selected hits (2-3 hit series)	Molecular modeling tools will be used to determinate the important chemical groups in bioactive compounds
Evaluation of anti-trypanosomal activity of newly synthesized derivatives.	Assay at NEKKEN, using the Luc2 expressing <i>T. cruzi</i> (Sylvio X10, CL Brener, Tulahuen, and Esmeraldo).
Evaluation of anti-leishmaniasis activity of newly synthesized derivatives.	Assay at NEKKEN, using the RE9h expressing <i>L. major</i> Friedlin strain.
Cytotoxicity evaluation of newly synthesized derivatives.	Assay using 3T3, HepG2, and macrophages at NEKKEN.
Evaluation of parasite's mitochondrial ETC as the potential target of newly synthesized	Evaluation of the selected hits against the mitochondrial respiration using live

derivatives.	parasites, and in vitro using parasite's mitochondrial fractions and/or recombinant enzymes.
In vivo evaluation of newly synthesized derivatives.	In vivo imaging system using the bioluminescence of <i>T. cruzi</i> and <i>L. major</i> to evaluate the therapeutic efficacy.

The research proposed here is synergized with research activity at Daniel Ken Inaoka's Laboratory (NEKKEN) which had developed several target assay systems. The budget from the current proposal will be used to cover travel expenses to bring and assay the purified compounds to Dr. Daniel Inaoka's laboratory at NEKKEN and support part of the research activities in Brazil. During the visit to NEKKEN, experimental techniques to biological evaluation assay will be learned in order to extend the research capacities at the Federal University of Rio Grande do Norte. All remaining samples will be brought back to Brazil after data collection.

Such kind of integrated international research collaboration proposed herein will advance the scientific knowledge in drug development targeting infectious diseases.

③ Anticipated results

Me and Dr. Daniel Inaoka have started collaboration under the screening of synthetic compounds to identify active compounds against Leishmaniasis and Trypanosoma. An appropriate Material Transfer Agreement, and Technical Cooperation Agreement between UFRN and Nagasaki University is current ongoing.

Furthermore, in order to train young scientist, one of my staff (Rita Yanka Pereira da Silva) is now engaged in Doctorate course in Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN) under Daniel Inaoka's co-supervision. Currently, she is conducting organic synthesis experiments to obtain new candidates to antiparasitic and evaluate, in collaboration with Prof. Daniel Ken Inaoka (Nagasaki University).

Output target for 2 years: publication and student thesis (Doctorate Degree).

5. Implementation Report :

① Circumstances of Implementation against the FY2023 Implementation Plan

In the fiscal year 2023 of joint research, the eighty planned compounds from the UFRN compound library were synthesized satisfactorily with good yields. All compounds were evaluated against intracellular amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* CL Brener strain in NEKKEN according to initial planning. In addition,

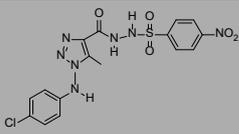
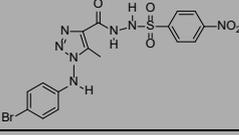
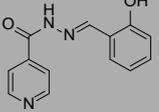
cytotoxicity against HeLa and HepG2 cell lines were also conducted in parallel for all of 80 compounds. Anti-trypanosomal activity against four *T. cruzi* strains (CL Brener, Sylvio X10, Esmeraldo, Tulahuen) by the TRP/AMA assay was also conducted.

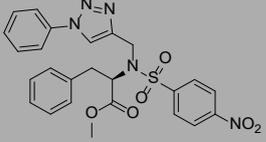
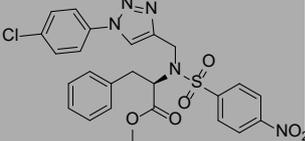
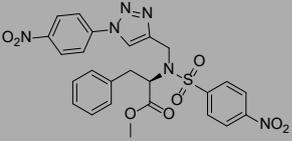
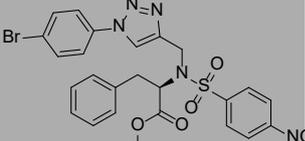
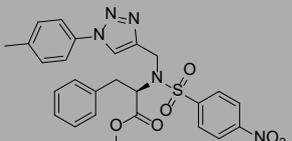
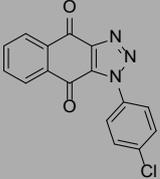
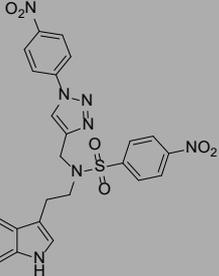
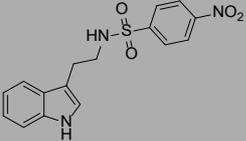
② Results (Results & Observations)

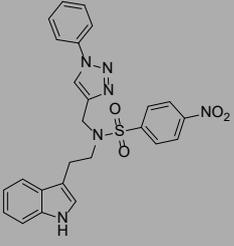
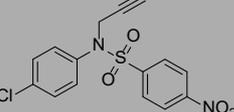
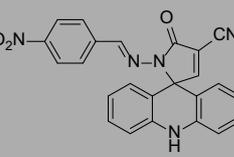
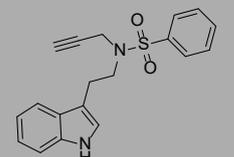
The eighty compounds from the UFRN library were tested against the amastigote form of the *T. cruzi* parasite CL Brener strain using HeLa as the host cell. They were also evaluated for cytotoxicity against two human cell lines (HeLa and HepG2). The fifteen best compounds, which showed low or no toxicity and inhibitory activity against the amastigote stage, were selected and subsequently evaluated for activity against four other strains of *T. cruzi*, (CL Brener, Esmeraldo, SylvioX10 and Tulahuen) by TRP/AMA assay. This assay consists of mixing trypomastigotes with mammalian cells and assess the luminescence after incubation with the compounds for 4 days. Four compounds (40, 43, 44 and 77, highlighted in red in Table 2) showed activity comparable to the standard benznidazole (Table 2) in TRP/AMA assay.

Most of our compounds tested showed lower IC₅₀ values against TRP/AMA assay than in AMA assay. These data suggest higher susceptibility of trypomastigotes (TRP) to our compounds than (AMA). Interestingly, several compounds displayed different degree of sensitivity between the *T. cruzi* strains tested, an undesired trait for drug development.

Table 2: Results of 1st assay against AMA and second assay against TRP/AMA.

Structure	ID	IC ₅₀ μM					
		CL Brener (AMA/(TRP/AMA))	AMA	TRP/AMA			
			CL Brener	CL Brener	Esmeraldo	Sylvio	Tulahuen
	13	0.69	17.1	24.7	> 100	> 100	27.1
	15	0.82	14.1	17.2	> 100	> 100	17.4
	37	4.55	29.6	6.5	10.8	> 100	28.6

	40	36.36	40.0	1.1	4.3	2.2	1.7
	41	1.00	43.5	43.3	> 100	> 100	> 100
	42	1.58	39.3	24.8	49.8	> 100	75.3
	43	23.76	40.4	1.7	3.8	2.6	2.3
	44	47.37	37.9	0.8	2.5	2.5	1.2
	45	0.74	28.0	37.7	2.1	39.6	25.0
	65	14.54	45.1	3.1	2.2	3.6	2.1
	57	1.52	23.3	15.3	17.5	17.1	20.4

	69	4.88	40.5	8.3	4.4	> 100	8.6
	77	30.90	30.9	1.0	0.8	0.9	1.3
	22	0.70	25.6	36.6	3.0	58.4	50.7
	79	5.55	37.2	6.7	9.7	53.8	28.3
	BENZ	0.77	1.0	1.3	1.4	1.9	1.8

③ Announcement of Results

The results are still preliminary, but the expectation is that a publication in a scientific journal in the area of parasitology or medicinal chemistry.

6 . Self-Evaluation

I believe that joint collaboration in this first year lived up to expectations. My participation in the experiments was very active with the planning and synthesis of compounds from the UFRN library. Furthermore, my visit to NEKKEN was very important for carrying out antiparasitic evaluation tests on the compounds. I learned a lot while interacting with researchers from NEKKEN and TMGH at Nagasaki University. I also had the opportunity to present a seminar and publicize my line of research in the search for new compounds against infectious diseases.

Although planned to be conducted in **Year two**, we could not test our compounds against *L. major* strain due to the contamination of the parasite stock. We are planning to re-transfect *L. major* with the plasmid aimed to integrate the RE9h-mNeonGreen gene into the genome of the parasite. Once the transfectants are ready, we are planning to evaluate against the promastigote stage.

7 . Achievement Level (Circle one from I ~ IV below)

- I (Few expected results were achieved.)
- II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)
- III (The expected results were achieved with full satisfaction.)
- IV (Even better than expected results were achieved)

Explain your evaluation

As initial planned, **Year one** was focused on organic synthesis with different scaffolds such as naphthoquinones and triazoles, and the biological activity focused on **Year two**. However, we could prepare the 80 compounds earlier than expected and proceeded to biological evaluation at NEKKEN, which can be summarized as explained below.

T. cruzi: We could assess the activity of our compounds against AMA (Cl Brener) and also TRP/AMA (four strains). In addition, the cytotoxicity of all 80 compounds were investigated and we could obtain 4 best candidates from which 3 are triazole derivatives (40, 43, and 44), and one sulfonamide derivative (77). We did not determine the activity of our best hits against mitochondrial respiration since there were no naphthoquinones amongst the best hits (naphthoquinones, such as atovaquone, are expected to inhibit the mitochondrial respiration). *In vivo* imaging analysis will be carried out after structure-activity relationship study, and scale-up compound synthesis (~50 mg synthesis).

L. major: The activity of our compounds against *L. major* could not be conducted because of potential contamination of parasite stock. NEKKEN's group is currently planning to re-transfect the *L. major* strain with pLEXSY-PAC/RE9h-mNeonGreen aimed for integration in the parasite genome. This activity is planned to be carried out in **Year two**.

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：リーシュマニア感染に果たす宿主 RP105/MD-1 複合体の機能解析
課題番号：2023-Ippan-18

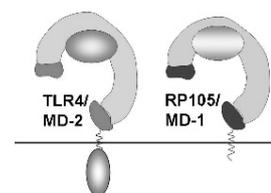
2. 代表者：愛知医科大学 准教授（特任） 高木 秀和

3. 決定額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究では、リーシュマニア原虫 *L. major* 感染時の宿主応答における RP105、MD-1 の機能を明らかにすることにより、*L. major* による病態発現機構の解明を目的とする。そのために、系統の異なる RP105 KO, MD-1 KO マウスやそれら骨髄から誘導したマクロファージへの *L. major* 感染実験を行い、病態、遺伝子発現の変化や細胞応答について解析する。RP105 (Radioprotective 105, CD180 antigen) は B 細胞膜上に発現している 1 回膜貫通型の分子であり、それに対するモノクローナル抗体が B 細胞の増殖を強力に誘導する分子として同定された。そのアミノ酸配列は TLR と相同性があり、TLR4 のアダプター分子である MD-2 と相同性のある MD-1 (lymphocyte antigen 86) と複合体を形成することも知られている（右図）。RP105 が細胞表面に発現するためには、MD-1 の有無が影響することが知られていたが、その複合体形成、および細胞膜表面への発現に MD-1 の糖鎖が影響を与えることがわかった（業績文献 9）。しかし、RP105/MD-1 複合体の生体リガンドはまだ明らかにされておらず、シグナル伝達などの生理機能についても不明な点が多い。また、RP105 はマクロファージにも高発現していることが知られているが、マクロファージにおける機能も不明である。*L. major* を RP105 KO マウスに感染させると、病態が増悪するがその機序も解明されておらず、なぜ RP105 がないと *L. major* 感染による病態が増悪するのか？ RP105 は *L. major* の何かを認識する pattern-recognition receptor (PPR) として機能するのか？ *L. major* 感染時に RP105 は宿主免疫においてどのような役割をするのか？ などさまざまな疑問が出てくる。そこで、RP105 KO, MD-1 KO マウスや骨髄誘導マクロファージに *L. major* を感染させた時の原虫数の変化、サイトカイン産生、集積する免疫細胞の数や種類、宿主細胞の遺伝子発現の変化の解析を行うことによって、*L. major* 感染による病態発現の過程で、RP105/MD-1 複合体の有無による宿主免疫応答の変化を明らかにし、RP105/MD-1 複合体の機能解析を行うとともに、*L. major* の病態発現の機序を解明する。



② 研究内容

本申請研究の熱研対応教員である濱野真二郎教授は *L. major* 感染時における宿主免疫応答に関する研究で、数多くの成果を挙げられている。本申請研究においても、濱野教授の助力を得ることで、熱帯医学研究所にて *L. major* 感染部位に集積する免疫細胞種の解析法や宿主応答に関する種々の実験法に関するノウハウを学び、研究期間内に課題に対する結果を残したいと考えている。

1. RP105 および MD-1 KO マウスを用いた感染実験

現在、愛知医科大学では BALB/c 系統、B6 系統の RP105 KO, MD-1 KO マウスを継代し、実験に用いている。BALB/c 系統では *L. major* 感染により、感染部位が炎症を起こし、潰瘍が形成される。そこで、*L. major* 感染部位での原虫数の変化、潰瘍形成時に集積してくる免疫細胞の数や種類など FACS で解析することで、RP105, MD-1 のあるなしによりどのように変化するか検討する。また、B6 系統のマウスへの *L. major* 感染では、野生型マウスでは治癒することが知られている。そこで、B6 系統の RP105 KO, MD-1 KO マウスに *L. major* を感染させた時の病態（潰瘍の程度）を、これまで報告されている *L. major* 感染時に大きな影響を及ぼす遺伝子と比較することで、RP105, MD-1 が *L. major* の病態発現にどれくらい重要度を持つ遺伝子なのかを検討する。また、B6 系統マウスにおいても同様に、感染部位に集積してくる細胞の数や種類など FACS で解析し、これまで報告と比較することで、RP105, MD-1 の感染時における役割を検証する。また、B 細胞において、RP105 刺激は細胞増殖を誘導すること、BALB/c 系統の RP105 KO マウスでは産生される免疫グロブリンの IgG3 量が減少することが報告されている。一方、*L. major* 感染において IgG の存在が感染部位での原虫数の増多および病態増悪に関与しているとの報告もある。そこで、*L. major* 感染時に誘導される特異的 IgG のサブクラスや抗体量を経時的に測定し、病態増悪との可能性についても検討する。

2. 骨髄誘導マクロファージを用いた感染実験

骨髄から誘導したマクロファージを用い、*L. major* 感染実験を行う。その際、IFN- γ や TNF α などの刺激により、マクロファージ内での *L. major* 生存率、産生されるサイトカイン、活性酸素、シグナル伝達に関するタンパク質のリン酸化の程度などを野生型、RP105 KO, MD-1 KO マウス由来のマクロファージで比較することにより、どのような差異が見られるか検証する。また、RP105 KO や MD-1 KO マウス由来のマクロファージにおいて、これまで炎症反応に関与するとの報告のある遺伝子の発現量変化を RT-qPCR を使って定量し、RP105 KO, MD-1 KO によりどのような変化を示すのか検討する。また、RP105 KO や MD-1 KO マウス由来のマクロファージにおいて、*L. major* 感染により遺伝子発現のパターンがどのような変化を起こすかについてより網羅的な解析を行い、*L. major* 感染時に RP105 KO, MD-1 KO により変化する遺伝子のプロファイルを解析する。

③ 予想される成果

1. *L. major* 感染時の病態増悪に RP105 あるいは MD-1 がどのように関わるかを明らかにすることにより、*L. major* が炎症を引き起こす機構の一面が明らかとなる。
2. これまで不明であったマクロファージにおける RP105, MD-1 の免疫応答の役割が明らかとなる。

3. RP105、MD-1 が *L. major* による炎症反応への関与が示唆されれば、治療薬のターゲットとなる可能性がある。

5. 実施報告

① 令和 5（2023）年度実施計画に対する実施状況

BALB/c 系統の RP105 および MD-1 KO マウスに *L. major* 5-ASKH 株を耳の皮内に感染させ、その病態変化、原虫数の変化、潰瘍形成時に集積してくる免疫細胞の数や種類について解析を行った。また感染時に産生される免疫グロブリン IgM, IgG, IgG3 の変化についても検討した。なお、*L. major* 感染実験を行うにあたり感染時におけるそれぞれの遺伝子の免疫反応の役割について評価するため、RP105 および MD-1KO マウスはそれぞれ littermate の Hetero マウスを比較対象とした。

② 成果（結果+考察）

BALB/c 系統の RP105 KO、Hetero マウスそれぞれに *L. major* 5-ASKH を耳に感染 (5×10^4 parasite/ear) させたところ、KO、Hetero マウスいずれも翌週から感染部位に炎症が見られ始め、週ごとに炎症が進行していったが、その範囲についての差は見られなかった（図 1）。しかし、潰瘍スコア（皮膚組織の潰瘍の大きさ）は、RP105 KO マウスでは Hetero マウスと比べ感染後 2 週目には潰瘍形成が観察され、5 週目までは潰瘍形成速度が早かった（図 2）。MD-1 マウスに *L. major* を感染させた場合は、KO マウスと Hetero マウスとの間に炎症部の大きさや病態（潰瘍形成の程度）に関し、RP105 マウスで見られたような違いを観察することはできなかった。この現象は

Foot pad に *L. major* を感染させた際にも観察されたことであり、RP105 のアクセサリータンパク質として機能していると考えられている MD-1 の存在の有無は *L. major* による病態発生にほとんど関連がないことが示唆された。次に、感染後の耳組織内に寄生する *L. major* の原虫数に違いがある

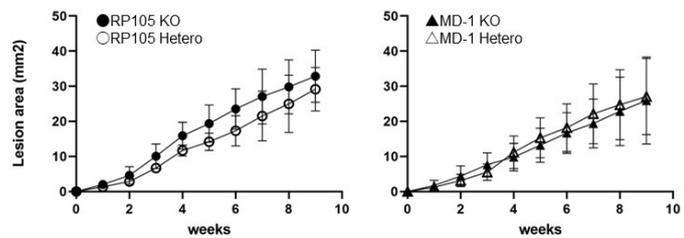


図 1：感染部の炎症部の大きさ

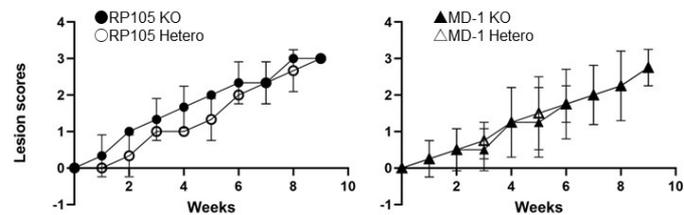


図 2：感染部位の潰瘍の大きさ

かどうかを limiting dilution assay (LDA) を用いて検討した。*L. major* 感染後 4 週目と 8 週目に耳病態部より宿主細胞を単離し、10 日間培養したところ、RP105 KO、Hetero マウス、MD-1 KO、Hetero マウスに関わらず感染部位の原虫感染数に差がないことがわかった。このことから RP105 KO マウスで観察された潰瘍形成の増悪は原虫の増殖の差によるものではないことが示唆された。そこで、*L. major* の感

感染部位に集積してくるリンパ球の種類とその数について検討した。LDA と同様に、*L. major* 感染後 4 週目と 8 週目に耳病態部より単離した細胞を、抗 CD11b, 抗 Ly6C, 抗 Ly6G 抗体を用いて FACS による解析を行った (図 3)。*L. major* を感染させた RP105 KO マウスの耳病態部からはその Hetero マウス、MD-1 KO・Hetero マウスに比べ、CD11 陽性細胞が多く検出された。また、Neutrophil は他の種のマスに比べ多く検出できたが、Monocyte に関しては差が見られなかった。このことから RP105 KO マウスで見られた *L. major* 感染後の潰瘍形成の増悪には、Neutrophil の感染部位の早期の増加が関与している可能性が示唆された。

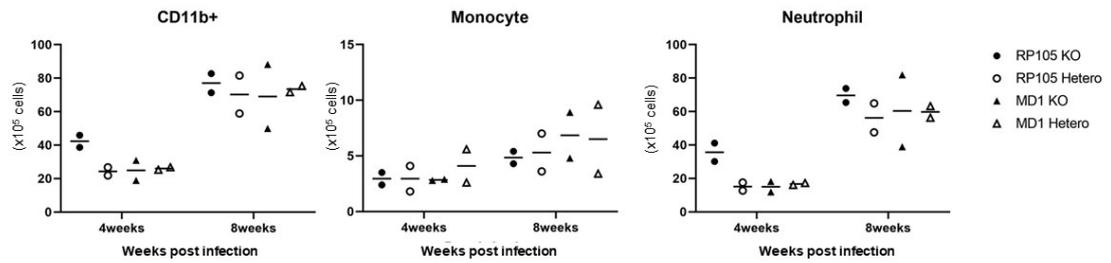


図 3 : 感染部に集積している細胞の FACS による解析

次に RP105 KO マウスでこれまで明らかになっている特徴として誘導される免疫グロブリンの内、IgG3 の産生量が少ないことが知られている。また、*Leishmania* 感染において産生される免疫グロブリンとその病態増悪との関連も示唆されている。そこで、*L. major* 感染後に誘導された特異的 IgM, IgG, IgG3 の定量を試みた。*L. major* 感染後 RP105, MD-1 KO・Hetero マウスそれぞれから採血し、誘導された IgM, IgG 量を測定したところ、それぞれの間には差はなかった。また Balb/C マウスとも比較したが差はなかった。IgG3 に関してはこれまでの報告通り、RP105 KO マウスでは誘導量が低いことが示唆されたが、この現象は MD-1 KO マウスでは観察できなかった (図 4)。

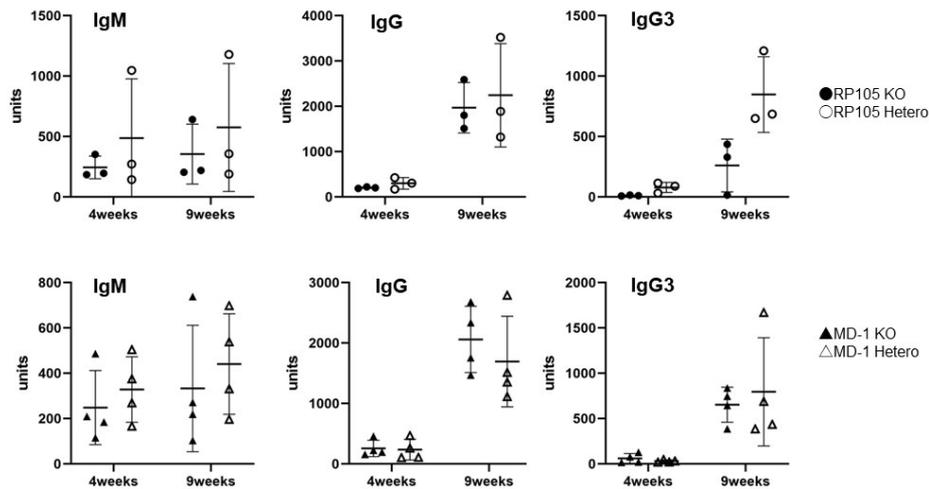


図 4：感染後に誘導された *L. major* 特異的免疫グロブリン

IgG3 と病態の関連性については 4 週目ではすべての種のマウスにおいてその発現がほとんど見られないことから、IgG3 そのものとの関与は否定的かもしれないが、IgG3 が誘導されにくい原因と病態増悪の関連については不明である。

MD-1 は RP105 のアクセサリー分子として発見され、それぞれが TLR4/MD-2 と相同性を持つことから、その機能発現において互いが重要な役割を果たしているものと考えられてきた。しかし、今回行った実験結果において *L. major* 感染によるマウスの病態発現の差や感染部位に集積してくる細胞の種・数の差などからは、RP105/MD-1 複合体形成と免疫機能の間には解離があるように考えられる。また MD-1 KO マスについてはその Hetero マウスあるいは Balb/C マウスとの間で見られる差よりも個体による差が多く、今回の感染モデルでの解析だけでは困難であった。一方、RP105 KO マウスで見られる *L. major* 感染による病態の増悪については、Foot pad でも観察されることから、感染部位での病態増悪過程において RP105 が何らかの役割を果たしていることは明らかであり、感染部位の組織細胞を含め、*L. major* 感染に応答するケモカインやそれに応答する細胞、*L. major* が感染するマクロファージにおける RP105 の役割を細胞レベルで解析する必要があると思われる。

- ③ 成果の公表
なし。

6. 自己評価

病原体に対する免疫反応と RP105/MD-1 複合体の生理機能との関連を明らかにするべく、炎症による病態悪化メカニズムや感染部位の集積細胞を解析できる系としてマウス耳への *L. major* 感染モデルを用い検討した。その結果、RP105 欠損による免疫応答と MD-1 欠損のそれには数々の相違があることが示唆された。このことは、RP105/MD-1 複合体が機能を果たすという考えでは説明がつかないことであり、それぞれがどういった機能を持っているのかを検討する必要があることを示唆している。特に *L. major* 原虫感染時には RP105 欠損だけで病態が悪化することから、感染部位に存在する種々の細胞について RP105 遺伝子の生理機能を検討する必要があることが明らかになったことは評価できるのかもしれない。しかし、研究課題進行において、実験に使用する遺伝子改変マウスの準備計画がずれることがあり、感染実験を行うのに十分な匹数を準備することができなかったこと、更に感染実験を行っている時期に自身の諸事情があり、当初計画していた実験を完遂することができなかったことは大変残念に思っている。

以上のことから、本研究課題の達成度としては「所期の成果はほとんど挙げられなかった」が妥当ではないかと考えている。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の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）
- 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

2023 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Isolation of treponemal DNA from household insects in villages endemic with yaws in Ghana

Project number : 2023 – Ippan – 19

- 2 . Applicant name: Associate Professor, School of Public Health and Tropical Medicine, Tulane University, New Orleans, United States of America, Yotsu Rie Roselyne

Joint researcher(s) :

Professor, International Health & Medical Anthropology Department, Nagasaki University, Taro Yamamoto

Graduate Student, International Health & Medical Anthropology Department, Nagasaki University, Simpson Shirley Victoria

Parasitology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), Ghana, • Charles Quaye

Bacteriology Department, Noguchi Memorial Institute for Medical Research (NMIMR), Ghana, • Kennedy Kwasi Addo

Program Manager, National Buruli ulcer Control & Yaws Eradication Programme, Disease Control & Prevention Department, Ghana Health Service, Ghana • Konama Kotey

Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, Kingsley Asiedu

- 3 . Amount Allotted : 400,000 yen

- 4 . According to documents at time of application

① Research Purpose

Background: Yaws is a highly contagious neglected treponemal disease mostly found in rural settings in warm and humid environments of Africa, Asia, Latin America, and the Pacifics (Asiedu, Fitzpatrick, & Jannin, 2014). There is still a considerable knowledge gap in epidemiology of the disease within Ghana, and no study has been conducted in Aowin municipality in the western north region of the country to date. Recent studies in Tanzania (Knauf et al., 2016) and Papua New Guinea (Houinei et al., 2017) have highlighted the importance to address the role of flies in yaws transmission. We will provide a profile of insects collected over a 3-day period during a cross-sectional survey conducted in villages of Aowin municipality from February to March 2022. The findings from this study are expected to provide a clear justification for the need to give attention to the role of household flying and crawling insects in the transmission and dispersion of TPE. Importantly, this may devise some strategic options in the formulation of preventive and

control policies for yaws eradication.

Objective of the study

In this study, we are exploring the hypothesis that household flying, and crawling insects are mechanical vectors for the transmission of TPE in yaws endemic villages. Our objective is therefore to detect the presence of TP DNA and describe the evolutionary relationship between TP sequences of humans and insects.

② Research details

1. Amplification of Treponema DNA in insects, for confirmation

In this proposed study, we will target three additional genomic loci tp0619 (Godornes, Giacani, Barry, Mitja, & Lukehart, 2017), tp0574 (Marra, Tantalos, Sahi, Dunaway, & Lukehart, 2016) and TprL (Mitja et al., 2018) to achieve high sensitivity and specificity and to firmly confirm the presence of Treponema DNA in these insects that we have collected. This is necessary because, out of the 18 samples collected from the 27 clinically and serologically confirmed participants, we successfully amplified 12 tp0548, 14 tp0619, 6 tp0574 and 15 TprL genetic markers. The TprL gene is the most important as it can discriminate TPE from other Treponema subspecies (Mitja et al., 2018).

All procedures described here will be performed at the Institute of Tropical Medicine (NEKKEN), Nagasaki University.

2. Data analysis

Amplicons from humans and insects will be directly sequenced on an Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA), with Applied Biosystems Big Dye Terminator V3.1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Sequence alignment will be performed with MEGA7 software and compared to respective orthologous sequences (Treponema pallidum subsp. pallidum, TPA and TPE reference strain sequence data) available in GenBank using the standard nucleotide (nt) BLAST search option at the NCBI homepage (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phylogenetic tree reconstruction will be conducted using sequences obtained from insects' samples, human samples as well as TPA and TPE reference strain sequence data in the GenBank.

Data from the study-specific electronic database (the eSkinHealth application) will be transcribed into Epi info for initial analysis. R studio will be used as statistical software. Categorical variables will be expressed as proportions and presented as frequency tables, graphs, and charts where appropriate. Qualitative PCR results obtained from humans and insects' samples according to each gene target will be expressed in proportions and tabulated.

③ Anticipated results

From the results of the initial survey, we have data confirming the presence of

Treponema DNA in humans. If the results of this study can establish evolutionary relationship between TP sequences of humans and insects in these villages, our data will be the first to provide clinical, serological and/or PCR evidence of yaws in patients and the presence of TP DNA in insects collected from their homes. This will provide new insights and a better understanding of yaws transmission; perhaps highlight the need for vector control in its disease control activities. Yaws is the one of only two diseases among the NTD list that are targeted for eradication by WHO (another is Guinea worm). However, this is not easy to reach. There is no preventative measure for yaws other than MDA with azithromycin, and introducing a new control measure - vector control, may push a way forward to reaching this ambitious public health goal.

5 . Implementation Report :

① Circumstances of Implementation against the FY2023 Implementation Plan

With the support of this grant, we conducted PCR targeting gene regions specific to TP and TPE using DNA extracted from insects. We obtained single-band PCR products, which were then subjected to Sanger sequencing with primers specific to these regions. In this study, since we used DNA extracted directly from insects, most of the extracted DNA was of insect origin. As a result, the Sanger sequencing revealed that most of the PCR products were amplifying insect gene regions that closely resembled the TP gene sequences.

② Results (Results & Observations)

An entomologist morphologically classified the types of insects captured at or around the homes of patients who tested positive with the rapid diagnostic kit. The captured insects included Sciaridae, Drosophilidae, Formicidae, Tenebrionidae, Dixidae, Limnephilidae, Curculionidae, Culicidae, Muscidae, Polycentropodidae, Gelechioidea, Alydidae, and Miridae. The number of species captured in a single vial ranged from one to six, suggesting that no specific insect species is necessarily involved in the transmission of bacteria. In this study, DNA was extracted from each vial. While it is not strictly possible to identify the bacterial species attached to each insect species, this finding suggests that the type of insect, particularly the exact species of flies, might not significantly influence the transmission of bacteria among patients. Future studies will explore protocols to detect bacteria attached to the surface of each insect and bacteria present within the insect's body.

We performed PCR and Sanger sequencing using DNA extracted from flies. However, due to the high concentration of fly-derived DNA in the samples, the sequencing of PCR products revealed the amplification of non-target gene sequences. Subsequently, we attempted to detect the TPE genome using next-generation sequencing. We have now obtained the raw data and are currently preparing for analysis.

In the future, we plan to extract DNA not directly from the insects, but from the washing solution used to clean the insects. This approach aims to minimize the

presence of insect-derived DNA and focus on extracting bacterial DNA attached to the insects. From this extracted DNA, we will then attempt to identify bacterial species using next-generation sequencing.

③ Announcement of Results

The research results have not yet been presented at academic conferences or published in academic journals.

6 . Self-Evaluation

Although the Sanger sequencing did not yield appropriate data, we are currently analyzing the data obtained from next-generation sequencing, and we assess that the research is progressing smoothly overall. Furthermore, we have identified areas for improvement, such as the method for washing the insects, and we have gained sufficient knowledge for future steps. Detecting TP genes has been reported to be technically challenging, but we will continue our research to elucidate the transmission mechanisms of TPE, aiming for the eradication of yaws in Ghana.

7 . Achievement Level (Circle one from I ~ IV below)

I (Few expected results were achieved.)

II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)

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

IV (Even better than expected results were achieved)

Explain your evaluation

(If you have already explained this in section 6.Self-evolution, you may skip this question.)

令和 5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ヒト iPS 由来肝細胞および肝オルガノイドを用いた熱帯熱マラリア原虫の感染特性の解析

課 題 番 号：2023-Ippan-20

2. 代 表 者：信州大学 公正研究推進講座 助教 片上幸美
共 同 研 究 者：長崎大学 熱研 細胞環境構築学 教授 徳舛富由樹
長崎大学 熱研 免疫病態制御学 准教授 水上修作
長崎大学 熱研 細胞環境構築学 助教 宮崎真也
長崎大学 熱研 原虫学 助教 宮崎幸子
長崎大学病院 消化器内科 准教授 宮明寿光

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

寄生虫をはじめとする病原微生物の多くは、人体に侵入する最初の段階で肝臓に感染する。マラリア原虫は、蚊の吸血時に皮膚から侵入し、血流に乗って全身に移動するが、感染が成立し増殖できるのは肝臓でのみであり、虫体数では 30%程度にとどまる。病原微生物の感染成立過程で肝臓の役割が大きいことを示す事例は多く、肝臓の脂質代謝異常である脂肪肝がウイルス感染症の重症化要因となることも知られている。その要因を分子レベルで解明すべく、病原微生物が肝細胞に接触・侵入して感染に至る現象を *in vitro* で再現する実験ツールとして、ヒト iPS 細胞を選択した。糖代謝異常の疾患特異的 iPS 細胞から分化誘導した肝細胞で、アルブミンの発現量が低下する現象が観察されたことから、糖代謝に係る一塩基の突然変異が、タンパク質合成にも影響している可能性が考えられた。肝臓における糖質・脂質・タンパク質の代謝システムには相互関係があり、代謝機能の変化で肝細胞の状態が変動し、病原性微生物が肝細胞に侵入する際の反応性に影響することが考えられる。本研究では、健常者および肝臓の代謝異常の患者から樹立した iPS 細胞を用い、そこから分化誘導した肝細胞および肝オルガノイドに対するマラリア原虫の感染特性を評価する。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにすることを目的とする。さらに、肝前駆細胞の凍結保存、解凍と分化誘導の再開～成熟肝細胞作製の技術を確立し、評価に用いるヒト iPS 細胞由来肝細胞の安定供給を目指す。

② 研究内容

本研究では、健常者および肝臓の代謝異常の患者から樹立した iPS 細胞を用い、そこから分化誘導した肝細胞および肝オルガノイドに対するマラリア原虫の感染特性を

評価する。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにしようとするものである。また、肝前駆細胞～成熟肝細胞の分化過程において、肝細胞内環境の変化によりマラリア原虫の感染特性が異なる可能性を実験室で検証し、感染成立に至る要因を解析する。さらに、肝前駆細胞の凍結保存、解凍と分化誘導の再開～成熟肝細胞作製の技術を確立し、評価に用いるヒト iPS 細胞由来肝細胞の安定供給を目指す。

令和 5 年度 (2 年目)

- ・ 非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) の疾患特異的 iPS 細胞株を樹立する。
- ・ 健常者および代謝異常患者由来の iPS 細胞から分化誘導した肝細胞および肝オルガノイドを用い、熱帯熱マラリア原虫を感染させる実験系を樹立する。
- ・ 肝臓モデルにおける熱帯熱マラリア原虫の感染特性および代謝機能との関係を解析する。
- ・ 肝前駆細胞の凍結保存、解凍と分化誘導の再開～成熟肝細胞作製の技術を確立する。

材料

ヒト iPS 細胞

健常者由来 iPS 細胞株

理研 BRC 購入株 ①HPS0063 (登録番号 201B7) ②HPS1046 ③HPS0354 (登録番号 585A1)

熱研樹立株 IR2201-A

疾患特異的 iPS 細胞株

NAFLD 患者由来 iPS 細胞株 本研究実施にあたり樹立予定。

蚊ステージ熱帯熱マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*)

NanoLuc および GFP を恒常的に発現する熱帯熱マラリア原虫レポーターラインを使用する。このレポーターラインが感染したハマダラカの唾液腺からスポロゾイト期原虫を回収する。

方法

ヒト末梢血単核球からの iPS 細胞株樹立

末梢血 9 mL を採取し、Lymphoprep を用いて単核球を分離する。得られた単核球分画を、サイトカインを添加した血球培養培地中で 5 日間前培養する。細胞を回収し、4D-Nuclerfactor (Lonza) を用いて初期化遺伝子を導入後、出現したコロニーをピックアップする。得られた細胞を未分化維持培地で継代培養し、4 代目の細胞について核型解析および Short tandem repeat (STR) 解析を行う (外注)。正常な染色体数およびドナーの遺伝情報を保持している細胞を iPS 細胞株としてストックする。

ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導 (図 1)

ヒト iPS 細胞株のストックを解凍し、未分化培地で 5 日間培養した後に継代する。起眠から 2 代目以降の細胞を 96-well plate に 2×10^4 cells/well で播種し、専用培地を用いて胚性内胚葉細胞に分化させる。得られた細胞を回収し、細胞濃度を変えて再播種した後、肝細胞を分化誘導する。

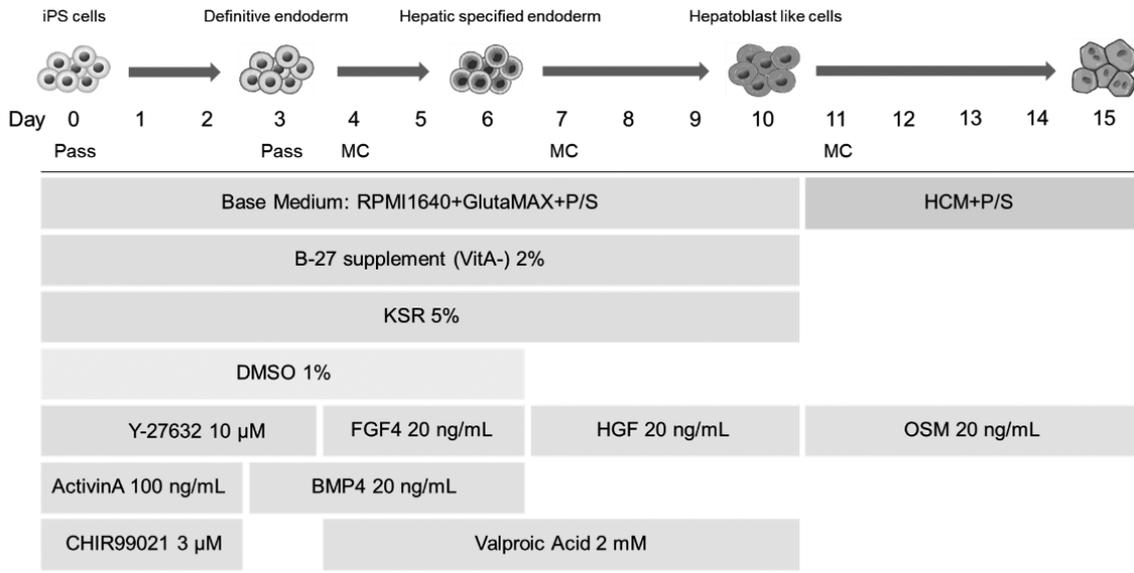


図 1. ヒト iPS 細胞由来肝細胞の作製方法 (Katagami et al., 2020)

代謝性疾患の in vitro 病態モデル構築

① 脂質代謝モデル

肝細胞は、脂質などの細胞外印紙や、組織への物理的刺激などで細胞内の油滴量が増加する。肝細胞の維持培地に濃度および暴露期間を変えてオレイン酸を添加し、細胞内の油滴量を増加させる。中性脂質を染色する蛍光試薬を使用した顕微鏡観察と細胞内脂質量の変化により、オレイン酸への反応を評価する。培養した細胞から、二層分離を利用した FOLCH 法により有機層に存在する脂質を抽出する。酵素法により、総コレステロール、中性脂質、遊離型コレステロールおよび総リン脂質の量を測定し、細胞 1g あたりの脂質量を、健康人由来の iPS 肝細胞と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者由来の iPS 肝細胞とで比較評価し、脂肪肝の病態再現モデルを確立する。

② 糖代謝モデル

肝性内胚葉期まで分化誘導した細胞を、グルコース無添加 DMEM/F12 改変培地で培養し肝細胞に分化させる。グルコースフリーで 5 日間培養した後、グルコース添加濃度を変えて 48 時間継続培養する。得られた細胞を回収し、蛍光染色法により細胞中のグリコーゲン量を定量する。同様に培養した細胞を 4% PFA で固定して PAS 染色し、画像解析によりグリコーゲン量を定量する。

肝オルガノイドの作製 (3D 培養) (図 2)

ヒト iPS 細胞は、ストックから起眠したものを 5 日ごとに継代培養して使用する。分散材を用いて単一細胞としたものを 1×10^5 cells/cm² となるように培養プレートに播種し、専用培地中で 5 日間培養してスフェロイドを形成させる。培養 6 日目に、形成されたスフェロイドを回収し、コーティング剤のドロップに封入して継続培養する。免疫染色により、アルブミンの発現、CD166 陽性肝星細胞様細胞および CD68 陽性クッパー細胞様細胞の存在を確認する。

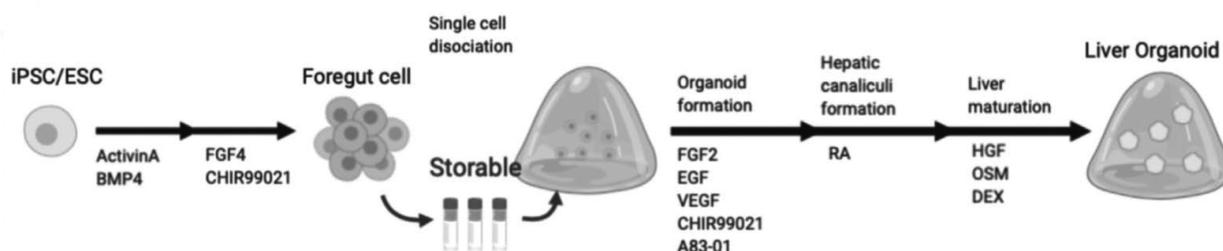


図 2. ヒト iPS 細胞由来肝オルガノイドの作製方法 (Shinozawa et al., 2021)

熱帯熱マラリア原虫スポロゾイトを用いた肝内期の解析

熱帯熱マラリア原虫レポーターラインのガメトサイトをハマダラカに感染させる。感染から 14 日後から 21 日後にハマダラカの唾液腺を解剖し、その中に存在するスポロゾイト期の原虫を回収する。調製したスポロゾイトを上記の方法で作出した肝細胞および肝オルガノイドに感染させる。肝細胞への感染から 1 日後、3 日後、7 日後、10 日後にレポーター遺伝子の発現をモニターし、肝内期の状態を評価する。並行して原虫タンパク質に対する抗体を用いた免疫染色を行い、肝内期原虫の形態や肝内期特異的タンパク質の発現を評価する。

参考文献

Katagami et al., Stem Cell Research (49). 102925. 2020

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102095>

Shinozawa et al., Gastroenterology (160) 831-846. 2021

③ 予想される成果

ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝細胞は、肝臓の基本的な機能を実験室で簡易に再現できるツールとなる。さらに、3次元培養で得られる肝オルガノイドは、平面培養に比べ、より生体に近い状態で肝機能や病原性微生物に対する分子生物学的解析を可能にする。疾患特異的 iPS 細胞からの肝オルガノイド作製、および病態再現は現在のところ実現しておらず、代謝性疾患を *in vitro* で評価するためのモデル構築は、疾患の解析および治療薬の開発において重要な役割を持つ。細胞環境構築学分野では、評価が難しいとされる脂質の蓄積について定量的解析が可能であり、肝オルガノイドにマラリア原虫を感染させ、その後の経過を追跡できることから、世界的評価基準の策定に繋げられる。肝臓の生理状態に起因するマラリア原虫の感染特性の違いや、肝細胞期マラリアと肝臓の代謝機能との関係を明らかにできれば、感染防御の一助となり、治療薬の開発にも繋がる。本研究で構築する肝細胞・肝オルガノイド感染モデルは、他のウイルス性疾患等にも応用範囲を広げることが可能である。研究実施 1 年目に、肝前駆細胞の凍結保存が実現した。分化誘導の再開および成熟肝細胞作製までの時間短縮が可能になり、より効率的な評価系の樹立が期待できる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導

96 well-plate を用いた肝細胞の分化誘導を、複数の細胞株を用いて行った。対象としたのは、標準株 201B7 および HPS1046、熱研で樹立したオリジナル 4 株のうちの IR2201A である。どの株も Katagami らの方法により肝細胞のバイオマーカーを確認できたが、IR2201A は分化誘導開始から他の株より増殖が速く、内胚葉の段階で 1/6 に分けたところ、分化誘導開始 11 日目で重層を形成した。細胞数が多いことを考慮し、開始 3 日目の継代時に細胞数の調整を試みた。

マラリア原虫の感染実験

熱帯熱マラリア原虫を用いた感染実験が実現困難となり、免疫病態制御学分野で維持しているマウスマラリア (*Plasmodium berghei*) を用いて感染実験を行った。マラリア原虫の培養スケジュールから、スポロゾイト採取～暴露のタイミングを肝細胞の培養スケジュールと合わせることを課題であった。チーム間で検討し、スポロゾイト採取時に肝細胞が分化誘導開始から 11 日目～15 日の間になるよう培養開始日を調整した。スポロゾイト採取に関して、使用する溶媒（培地）の検討、ウェルあたりのスポロゾイト数の検討を行った。

その他検討事項

三次元培養については、感染自体が惹起できないため実験系として二次元（平面培養）に移行する研究者が増加しているとの情報を入手したことから、現在感染実験用プラットフォームとして確立しつつある二次元培養系の最適化を優先事項とした。一方、三次元モデルの課題であるオルガノイド中心部の環境改善策として、細胞間隙を確保する培養技術の導入について、情報収集と技術的課題の検討に着手した。

② 成果（結果＋考察）

ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導

分化誘導開始 3 日目に、細胞数が元の 1/6 になるよう希釈して継代した。これは標準的な肝細胞作製手順に従っており、201B7 と HPS1046 はその後平面状に細胞が増加したが、IR2201A は継代後 2 日目から他株より細胞数が多くなった。分化誘導開始 11 日目と 15 日目に蛍光染色を行ったところ、他の株に比べバイオマーカーの発現が早く、肝細胞の指標であるアルブミンの発現が強く見られた。

分化誘導開始から 11 日目に、細胞が重層している様子が観察されたことから、3 日目の継代時に細胞数を調整することにより平面培養を試みた。標準的な方法である 1/6 希釈とともに、1/8、1/10、1/12 となるように培地量を調整しそれぞれに播種したところ、1/12 まで希釈すると 11 日目の時点でウェルの底面に隙間ができ、その後の実験に使用するには細胞数が不足する結果となった。1/8 では一部に重層がみられ、1/10 が最適な細胞濃度と考えられた。11 日目以降も、この細胞株はよく増殖し、蛍光染色でバイオマーカーを確認したところ、他の株よりも早くアルブミンが発現し、成熟肝細胞となりやすいことが示唆された。

以上の結果から、感染実験のプラットフォームとして IR2201A が有望であるとの見解が得られた。この細胞株は熱研オリジナルであり、今後はヒト iPS 細胞としての特性解析を行い、細胞バンクに登録して標準化することを検討する。

マラリア原虫の感染実験

マウスマラリア原虫 (*P. berghei*) の継代開始から 7 日後に、iPS 細胞からの肝細胞分化誘導を開始した。スポロゾイト採取は、分化誘導開始 11 日目に相当し、培地交換と同時となったことから当該培地中に採取したスポロゾイトを懸濁し細胞に暴露した。スポロゾイト採取に通常使用する RPMI1640 no glucose と並行し、分化誘導用の RPMI1640 改変培地および肝細胞倍用培地 HCM が溶媒として利用可能かどうか検討したところ、HCM で問題なくスポロゾイト採取ができることがわかった。以後の実験では、スポロゾイトを直接 HCM に採取しカウント後、適宜希釈してプレートに添加することで細胞にスポロゾイトを暴露した。

1 回目の実験では、96 well-plate に 1000 sporozoite/200 uL/well となるように培地量を調整し、添加から 48 時間、CO₂ インキュベータに静置した。培地をピペットで除去後、DPBS で 2 回洗浄後に蛍光顕微鏡で観察した。プレートには実験開始 6 日前に 4000 cells/well の Huh7 を播種し、同様にスポロゾイトを暴露させこれを Positive Control とした。2 回目の実験では、スポロゾイト数を 6000 sporozoite/200 uL/well とした。顕微鏡観察はウェル全体を低倍率で行い、GFP の光点数をカウントした。感染が確認されたウェル数と検出された光点数から、感染効率を評価した。結果を表 1 および図 3 に示す。

表 1. スポロゾイト感染が確認されたウェル数

Cell line	Exp.1		Exp.2	
	GFP Posi.	Total No.	GFP Posi.	Total No.
Huh-7	24	24	6	6
HPS1046	6	26	-	-
IR2201-A	11	30	46	49

Number of GFP spots

Huh-7... 13±3.8 /well

hiPS-Hep... 1~4 /well

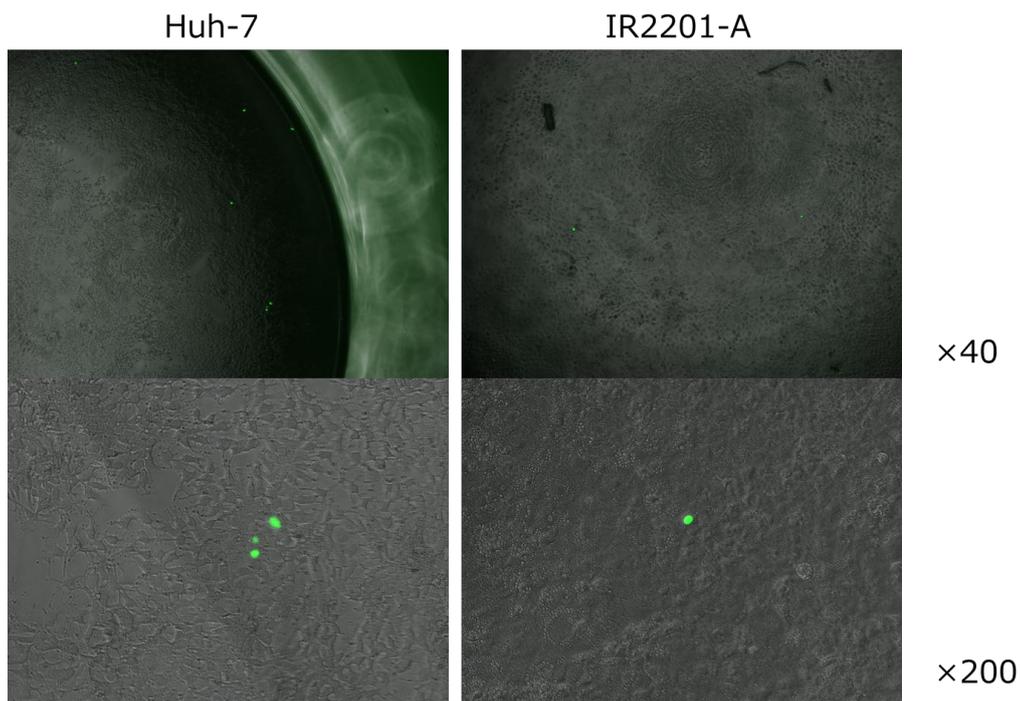


図 3. スポロゾイト暴露 48 時間後の GFP 光点

[考察]

実験の結果から、細胞株 IR2201A が感染実験プラットフォームとして適していることが示唆され、この細胞株を中心に条件を最適化し、感染率を向上させると同時に安定して実験を行えるよう検討することが急務と考える。Huh7 と比較すると感染細胞数が半数～1/3 程度の結果となったが、細胞が多層になっておりスポロゾイトとの接触面積が小さくなったことが原因として考えられ、細胞の培養条件を検討し単層平面とすることで感染率の向上が期待できる。肝細胞分化誘導に使用する培地が *P. berghei* 採取の溶媒として使用可能であったことは、熱帯熱マalariaをはじめ他のマalaria原虫でも同様の条件で感染実験が行えることを示唆している。

③ 成果の公表

第 93 回日本寄生虫学会大会（東京都文京区・2024 年 3 月 9、10 日）において、本研究成果を口頭発表した。

6. 自己評価

ヒト iPS 細胞からの肝細胞分化誘導率が向上し、スポロゾイト暴露実験が実施可能となった。複数の細胞株について評価を行った結果、肝細胞への分化誘導効率、胚葉期の分裂速度、肝前駆細胞から成熟肝細胞に至る時間等が株によって異なり、今後は実験の目的によって使用する細胞株を選択する「使い分け」の有効性が示唆された。マラリア原虫に対する感受性を考慮した場合、より感染効率の高い実験系を構築できる可能性があり、これは今年度の大きな成果である。

研究開始時は、より生体に近い条件を再現するため三次元培養における感染系樹立を目標としたが、二次元培養での感染条件最適化がより効率的であるとの見解に至り、優先順位を変更した。熱帯熱マラリア原虫を用いての実験には至らなかったこと、実験者異動により新規実験室の立ち上げが必要になり実験条件を設定し直す必要性が生じたことが新たな課題となった。今後は、これらを踏まえて、安定して感染実験を実施できるプラットフォーム構築のため細部の検討を進める。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で述べてあれば省略可）

令和5（2023）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：2023-Ippan-21

2. 代 表 者：長崎大学 病院薬剤部 教授 大山 要

共 同 研 究 者：長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 助教 相原希美

3. 決 定 額：350 千円

4. 研究計画

① 研究目的

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。さらに、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。

② 研究内容

目的抗原タンパク質の特定（2021年度共同研究費で実施済み）

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。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（2022年度共同研究費で実施済み）

目的抗原の存在量を LC-MS/MS で一斉に定量する。得られた定量値について、重症・軽症患者間の比較または重症⇒軽症での前後比較を行い、重症度との関連性を確認する。

2023年度共同研究費で実施する内容は以下の通り。

目的抗原のエピトープ特定

捕集した免疫複合体に含まれる目的抗原と抗体が最も近接する部分（エピトープとパラトープ間の距離が炭素鎖 10 個程度の距離）を架橋剤で共有結合する。これをトリプシンで酵素消化し LC-MS/MS 解析で MS/MS スペクトルを得る。

当該研究と熱帯医学研究所との関係性

イムノコンプレキソーム解析法の熱帯感染症患者への応用研究に関し、熱帯医学研究所の平山謙二教授（免疫遺伝学分野）ならびに水上修作准教授（免疫病態制御学分野）と共同で「シャーガス病患者の免疫複合体解析（*Parasite Immunol* 2018）」や「キノン化合物の抗トリパノソーマ活性評価」を展開してきた。当該研究はこの協力基盤を下地に、イムノコンプレキソーム解析で得た SARS-CoV-2 の抗原ならびにエピトープ情報を共有する。

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。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

タンパク質間相互作用に利用される架橋質量分析法を応用し、エピトープとパラトープが近接する想定で、これを架橋剤で結合してエピトープ-パラトープ断片を質量分析装置で検出する方法の検討を検討した。本年度はウイルス由来ならびにヒト由来タンパク質抗原と抗体の複合体に見立てたモデル免疫複合体（標的抗原のエピトープが判明している抗体医薬と標的抗体の複合体）を作製し、下記の実験を行った。

エピトープ配列既知の4つの免疫複合体モデル(TNF α -Adalimumab、TNF α -Infliximab、HER2-Trastuzumab、HER2-Pertuzumab)を作製し、架橋剤の種類長さの異なる3つの架橋剤(BS3、BS2G、CDI)と抗体側架橋部分(パラトープ)の絞り込み配列(相補性決定領域[CDR]、フレームワーク領域[FR])を比較検討した。データ解析にはProteome Discoverer(バージョン2.5)に実装されるXlinkXを用いた。理論値スペクトルは、UniProt Knowledgebaseのタンパク質データベースおよびDrugBankより得た。各モデル免疫複合体のエピトープに関する情報は以下の文献から得た：TNF α -adalimumab[Hu S, J Biol Chem, 288: 27059-27067, 2013]、TNF α -infliximab[Liang S, J Biol Chem, 288: 13799-13807, 2013]、HER2-pertuzumabおよびHER2-trastuzumab[Rockberg J, Mol Oncol, 3: 238-247, 2009]。

② 成果（結果＋考察）

架橋ペプチドのタイプ(抗原-CDRまたは抗原-FR)を比較すると、スペーサーアームが長いBS3は抗原-FRを形成する傾向があり、スペーサーアームが短いCDIは特にHER2-pertuzumabとHER2-trastuzumabで抗原-CDRを形成する傾向があった。FRはCDRよりも立体的にエピトープから遠く、この結果は妥当と考えられる。本研究で検出された架橋ペプチドの抗原配列を、過去の文献でエピトープとして報告されているアミノ酸配列と比較したところ、その多くが合致した。結論として、BS2GとBS3はエピトープとFRを架橋することができ、これらの架橋ペプチドから架橋質量分析法によりエピトープを同定できることがわかった。本法を用いることで、重症患者に特有の免疫複合体からエピトープを特定できる可能性が示された。

③ 成果の公表

国際学術雑誌に論文投稿する予定である。

6. 自己評価

本年度は特定した免疫複合体のエピトープ解析に向けた基礎検討までしか研究が進まなかった。本年度、エピトープ特定に必要な条件設定が整ったため、次年度以降に当該免疫複合体の濃縮と実際の解析が実施できる見込みである。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

IV （予想以上の成果を挙げられた）

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：サルモネラの宿主特異的全身感染に寄与する遺伝子の機能解析
課題番号：2023-Ippan-22

2. 代表者：帯広畜産大学 教授 岡村雅史
共同研究者：帯広畜産大学 准教授 相川知宏
帯広畜産大学 学部6年生 鈴木正太郎

3. 決定額：450千円

4. 研究計画

① 研究目的

サルモネラ (*Salmonella enterica* ssp.) の中には、ヒトの腸チフスやパラチフスの原因菌である Typhi および Paratyphi A-C や、牛の Dublin、鶏の Gallinarum、羊の Abortusovis、馬の Abortusequi、豚の Choleraesuis といった宿主に高い特異性を持つ血清型が存在し、それぞれの宿主において侵襲性の全身感染を引き起こすことが知られている (Uzzau S et al. *Epidemiol Infect.* 2000)。その中でも申請者らは、鶏の急性致死性敗血症性疾患である家禽チフスを引き起こす *S. Gallinarum* (SG) の病原性についてこれまで解析を行ってきた。本疾患は世界中で大きな経済被害をもたらす (Shivaprasad HL *Rev Sci Tech.* 2000) ため、国際獣疫事務局 (OIE) のリスト疾病に含まれ、わが国でも家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されている。鶏は他の家畜と比べて飼料効率が高く、比較的安価であり、さらに鶏肉・鶏卵の喫食が宗教に左右されないことを背景に、その生産・消費・流通が地球規模で増加している。特にタンパク質資源が不足しているアフリカ、中南米、中央～東南アジアの途上国には家禽チフス常在国が多く (OIE-WAHIS)、なかでも鶏の飼育羽数の多いインドネシア、インド、ブラジル、メキシコ、パキスタンなどでひとたび本疾病が流行すると、鶏肉の国内供給量のみならず近隣国を含めた国外への輸出量がさらに低下する恐れがある。これらの背景から、本疾病の制御は熱帯・亜熱帯地域をはじめとした世界規模での食料確保の観点からも喫緊の課題となっている。抗菌剤による治療はひなの敗血症死を低減できるが、完全に菌を排除できず、成鶏に抗菌剤を投与しても菌が卵巣に残り、次世代へと菌が伝播してしまう。そのため、現在常在国では家禽チフスの生ワクチン (9R 株) が用いられているが、その効果が不安定なため、有効な新規ワクチンやそれに代わる予防法の開発が望まれている (Wigley P *Avian Pathol.* 2017)。しかし、その標的となりうる SG の病原因子や家禽チフス発症機序におけるその役割はまだ理解が進んでいない。そこで本研究では、申請者がこれまでに見出した家禽チフスの発症に関わる SG の病原因子の詳細な解析に加え、その病原因子が他の宿主特異的なサルモネラの病原性にも寄与するか評価する。この研究により、宿

主特異的なサルモネラの共通の病原因子を標的とした新たな予防法の開発基盤につながる可能性がある。

② 研究内容

日吉大貴准教授（細菌学分野）は、ヒトのみに強い宿主特異的病原性を有する *Salmonella enterica* 血清型 Typhi（腸チフスの原因菌）を含むサルモネラの病原性解析を研究対象とし、サルモネラ属菌の遺伝子操作技術や病原性解析に精通している（Hiyoshi H et al. *Cell Rep.* 2018, Hiyoshi H et al. *FEMS Microbiol Rev.* 2018, Hiyoshi H et al. *Cell Host Microbe.* 2022, Zhang LF et al. *mBio.* 2022）。本研究では、遺伝子 *X* の宿主特異的病原性における機能解析を行うために、サルモネラの遺伝子欠損株の作製、それらの *in vitro* や *in vivo*（マウス）における病原性解析を計画しているため、日吉准教授の技術指導および助言を含む協力が必須である。

実験 1. *S. Typhimurium* のマウスでの病原性における遺伝子 *X* の寄与の評価(2023)

遺伝子 *X* が SG の鶏における病原性に寄与していることは明らかになったが、宿主特異的な病原性に関与している可能性がある。そこで、これまで研究モデルとして多用されてきた *Salmonella enterica* 血清型 Typhimurium (ST) とマウスにおける遺伝子 *X* の重要性を調べるため、遺伝子 *X* 欠損株を ST でも作製し、マウスで病原性を評価する。

実験 2. 遺伝子 *X* の上皮細胞への接着・侵入能の評価（2023～）

予備実験では遺伝子 *X* 欠損株感染鶏において、野生型感染鶏でみられるような盲腸扁桃の出血や偽好酸球の浸潤を伴う炎症像がほとんど認められなかった。これは、宿主の自然免疫応答惹起に至っていないか、軽度な応答で菌の排除が可能であることを示唆し、遺伝子 *X* 欠損株は腸粘膜上皮細胞への接着が困難である可能性を示す。そこで、遺伝子 *X* が SG の腸粘膜上皮細胞への接着に関与していることを明らかにするため、SG 野生型、遺伝子 *X* 欠損株および相補株を *in vitro* で上皮細胞に感染後、各菌株の細胞接着・侵入能を評価する。

実験 3. タンパク質 *X* が相互作用する宿主上皮細胞側の因子の同定（2024～）

遺伝子 *X* から転写・翻訳されるタンパク質 *X* と相互作用する腸粘膜上皮細胞側の因子は不明である。これを明らかにするため、

- ① タンパク質 *X* あるいはこれを構成する“BIg21”および“invE-AD”の各ドメインの His タグ標識組換えタンパク質を作製する。これを上皮細胞膜の膜タンパク質抽出液と反応させた後、抗 His タグ抗体でプルダウンアッセイを行う。共沈降したタンパク質を LC-MS/MS により同定する。
- ② 同定できたパートナータンパク質について、それぞれの精製タンパク質同士の結合を調べた後、RNAi でその遺伝子をノックダウンした上皮細胞を用いて、SG 野生型の *in vitro* 細胞感染試験を行い、細胞接着の低下を確認する。

③ 予想される成果

サルモネラ属菌には約 2600 種類の血清型があり、ヒトの腸チフスの原因である血清型 Typhi などのチフス性サルモネラとそれ以外の非チフス性サルモネラに分け

られる。サルモネラの病原性は主に、げっ歯類に致死性の敗血症を引き起こす血清型 Typhimurium (ST) をモデルとして研究が進められてきた。その発症過程は、主に菌の腸の粘膜上皮への到達・侵入と血行性の全身伝播の2段階からなり、それぞれサルモネラのゲノム上に共通に存在する *Salmonella Pathogenicity Island* (SPI) -1 および SPI-2 にコードされる3型分泌機構 (T3SS) がいずれも強く寄与している (Hueck CJ et al. *Mol Biol Rev.* 1998)。しかし SG では、SPI-1 欠損株において病原性の低下が見られない (Eswarappa SM et al. *Infect Genet Evol.* 2009) ことから、SG には腸粘膜上皮に到達・侵入する段階に寄与する別の病原因子があると推測される。また、一方で ST 同様にマウスに病原性を示す血清型 Enteritidis (SE) は、SPI-1/2 を保有しているにもかかわらず、鶏に感染しても致死性の敗血症を起こさない (Okamura M et al. *Vaccine* 2007; Okamura M et al. *Avian Dis.* 2012)。このため、家禽チフスの発症機序は SPI 等の既知の病原因子では説明できず、SG だけに存在する新規病原機構の関与が示唆される。

申請者が見出し、本研究で着目した新規病原因子 *X* は、*Yersinia pseudotuberculosis* の接着因子 InvE の C 末端に存在する宿主細胞接着ドメインにあたる *Bacterial Immunoglobulin-like 21* (BIg21) および *invE-Adhesion domain* (AD) の6回繰り返し配列で構成され (Sadana P et al., *Protein Sci.* 2017)、大腸菌の遺伝子 *X* オーソログ (ST の遺伝子 *X* との相同性 49%) は鳥類での大腸菌の病原性への関与が示唆されている (Schouler C et al. *Microbiology* 2004)。すなわち、SG の遺伝子 *X* は腸粘膜上皮への菌の接着に関与することが予想される。

以上のことから、本研究は家禽チフスの発症機序に新知見をもたらす可能性が極めて高い。また、本研究の成果は、①発症機序に関わる新たな病原機構を標的とする 家禽チフスの新規予防法の開発につながる。そして、②敗血症を引き起こす血清型であるヒトの腸チフスやパラチフスの原因菌である血清型 Typhi および Paratyphi A-C のほか、牛の Dublin、羊の Abortusovis、馬の Abortusequi、豚の Choleraesuis なども含め、宿主特異的なサルモネラ感染症全般の発症機序解明の端緒となり、それらの新規予防法の開発に向けた基盤となることが期待される。

5. 実施報告

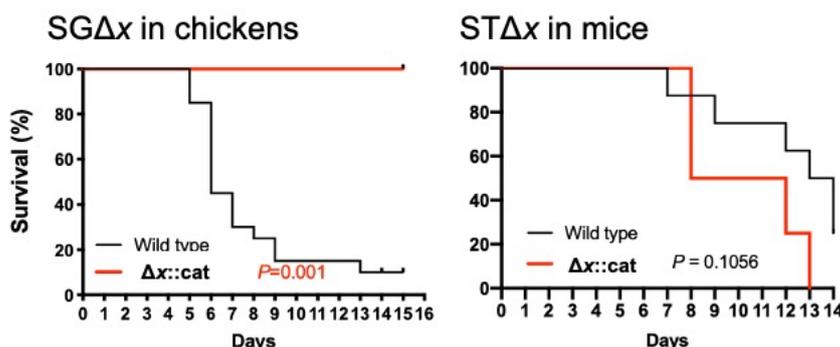
① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

実験1では、ST野生型および遺伝子X欠損株をマウスに接種して生存曲線解析を行った。実験2では、SG野生型および遺伝子X欠損株を培養細胞に接種し、*in vitro*細胞接着・侵入試験を行った。なお、実験3は当初予定に記載の通り2024年度実施を想定していたが、その準備として遺伝子Xがコードするタンパク質を組換え大腸菌を用いて発現させた。

② 成果（結果+考察）

実験1. *S. Typhimurium* のマウスでの病原性における遺伝子Xの寄与の評価

SG野生型（strain 287/91、Wild type）および遺伝子Xを欠損させたSG Δ Xを鶏（ボリスブラウン、メス、20日齢）それぞれ20羽および5羽に 10^6 - 10^7 CFU/headで経口接種した。その結果、接種12~16日後までの生存率は、野生型接種群では10%であったのに対し、SG Δ X接種群では100%であった（図左）。SG Δ X接種群では野生型接種群と比較して生存日数の顕著な延長が認められた（ $P=0.001$ ）。一方、ST野生型（strain SL1344、Wild type）および遺伝子Xを欠損させたST Δ Xをマウス（C57BL6/N、メス、8週齢）それぞれ8匹および4匹に 2.6×10^6 CFU/headで経口

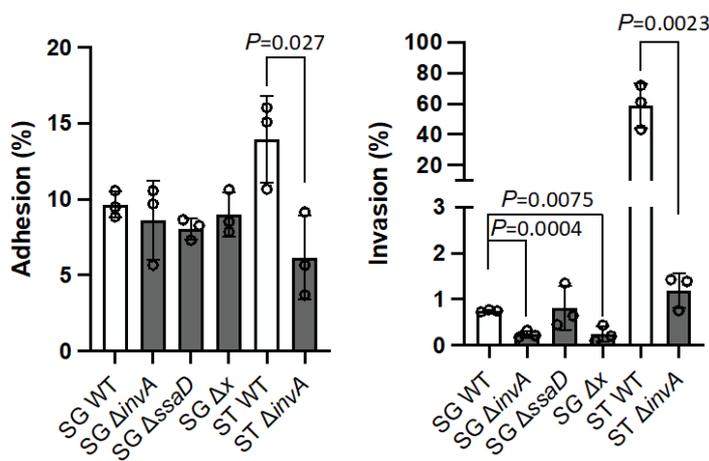


接種した。その結果、接種14日後までの生存率は、野生型接種群では30%であったのに対し、SG Δ X接種群では0%であった（図右）。SG Δ X接種群と

野生型接種群の間で生存日数の顕著な違いはみられなかった（ $P=0.1$ ）。以上の結果から、遺伝子Xは、SGの鶏における宿主特異的な病原性に強く寄与していると考えられた。

実験2. 遺伝子Xの上皮細胞への接着・侵入能の評価

SG野生型（strain 287/91、Wild type; SG WT）およびその遺伝子X欠損株SG Δ Xを鶏肝細胞株LMH/2A細胞に感染させたところ、SG Δ Xの細胞侵入率はSG WTと比べて有意に減少した（図右、 $P=0.0075$ ）。このことから、SGの遺伝子Xは上皮細胞への侵入に寄与していることが示唆された。我々は、SG野生型感染鶏で観察される盲腸扁桃の出血や偽好酸球の浸潤を伴う炎症像がSG Δ X感染鶏ではほとんど認められないことを明らかにしている（未発表）。本研究結果から、この病理所見はSG Δ Xが腸管上皮細胞内へ効率的に侵入出来なかったことに起因していると考えられた。本試験では同時に、ST野生型（strain SL1344、Wild type; ST WT）とその*invA*欠損株ST Δ *invA*の細胞への付着・侵入能も解析した。STの*invA*は、上皮細胞および

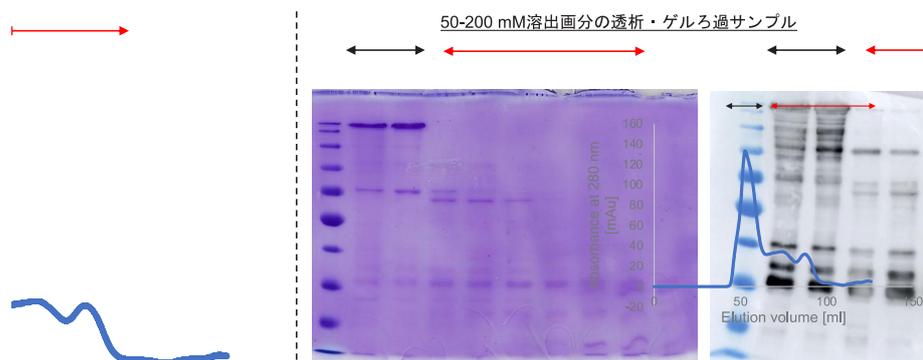


貪食細胞への ST の付着と侵入に寄与することが報告されている (Galan J.E. & Curtiss R. *PNAS* 1989)。本研究においても ST WT と比べて STΔ*invA* の LMH/2A 細胞への付着・侵入率は有意に減少した (図左、それぞれ $P=0.027$ 、 $P=0.0023$)。一方、SG についても Δ*invA* を作製して同様の実験を行ったところ、その細胞

侵入率は SG WT と比べて有意に減少した (図右、 $P=0.0004$)。SG の *invA* の機能についてはこれまで明らかとされていなかったが、本試験の結果から SG の *invA* も ST の *invA* と同様に細胞への侵入に寄与することが示唆された。SG については *ssaD* を欠損させた SGΔ*ssaD* を作製して同様の実験を行ったところ、*invA* とは対照的に、SGΔ*ssaD* の細胞侵入率は SG WT と同程度であった。*ssaD* は貪食細胞の内部で ST が宿主による消化分解を回避するために機能する (Grant A.J. et al. *PLoS Pathog.* 2012)。ST のケースのように、SG の *ssaD* が貪食細胞内での SG の生存に寄与しているかは現在まで明らかではなかったが、少なくとも SG の上皮細胞への侵入には影響しないと考えられた。今後、貪食細胞内での生存能を評価することで、SG *ssaD* の機能についても明らかにしていく予定である。

実験 3. タンパク質 X が相互作用する宿主上皮細胞側の因子の同定 (準備)

遺伝子 X から転写・翻訳されるタンパク質 X と相互作用する宿主の腸粘膜上皮細胞側の因子は不明である。そこで、その宿主細胞側の因子を同定するために、遺伝子 X をクローニングしたベクター pET29b を *E. coli* BL21(DE3) に導入した大腸菌発現系を構築し、



IPTG 存在下で組換えタンパク質 X (rX) を発現させた。これをニッケルカラムで精製後、PBS で透析し、ゲル

濾過によりさらに精製した。今後、rX と相互作用する宿主因子を明らかにする

③ 成果の公表

タンパク質 X と相互作用する宿主因子を明らかにしたのち、学会発表および学術雑誌への投稿を予定している。

6. 自己評価

実験 1 および 2 を計画通り実施でき、概ね予想通りの結果が得られた。ただし、本来は遺伝子欠損株について相補株を作製し、同様の実験によって野生型と類似した表現型が得られるのが理想的である。本研究では相補株の作製も試みていたが、最終的に得られなかった。原因として遺伝子 X が 5598 塩基と比較的大きく、ベクターへのクローニングの成功は確認できているがその先の相同組換えなどを含む工程で何らかの問題があるものと考えられる。なお、タンパク質 X は 1865 アミノ酸から構成される大分子であるが、次年度以降予定している組換えタンパク質の発現には成功した。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で述べてあれば省略可）
省略

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：原虫鉄利用を標的とした内臓型リーシュマニア症治療薬の開発
課題番号：2023-Ippan-23
2. 代表者：東京大学 大学院農学生命科学研究科 教授 後藤 康之
共同研究者：東京大学 大学院農学生命科学研究科 大学院生 伊藤 辰光
3. 決定額：450千円
4. 研究計画

① 研究目的

内臓型リーシュマニア症 (visceral leishmaniasis: VL) は、リーシュマニア原虫によって引き起こされる疾患で、年間 50,000~90,000 人の新規患者が発生し、26,000~65,000 人が死亡していると推定される (WHO)。現在、VL の化学療法には AmBisome や Miltefosine などが用いられているが、薬剤耐性も報告されており、新規治療薬候補の探索は重要な課題である。

リーシュマニア原虫は、哺乳類宿主体内では amastigote という発育形態をとり、マクロファージ (Mφ) に寄生して増殖する。Mφ 内の低栄養や酸化ストレス環境にさらされる amastigote は、独特な分子レパートリーを活用して生存を担保する。そのため、amastigote がもつユニークな分子を標的とした創薬は、高い効果と特異性に繋がると期待される。例えば、熱研・分子感染ダイナミクス解析分野におけるミトコンドリア呼吸鎖の研究も上記の標的型創薬の好例である。

我々は VL を引き起こす *Leishmania donovani* (LD) がもつ Mφ 改変能力に焦点を当てて研究を行っている。LD 感染マウスはヒト VL 患者で見られるような貧血を呈するが、感染マウスの脾臓で血球貪食が誘導される (Morimoto et al., PLOS NTD, 2016)。一般に、脾臓 Mφ は抑制性受容体 SIRPα に介して赤血球の CD47 を認識すると貪食を抑制するが、驚くべきことに LD は感染により SIRPα を低下させることが明らかとなった (Morimoto et al., PLOS NTD, 2019)。また、その赤血球貪食がマクロファージ内での寄生虫生存に有利であることもわかった。原虫による Mφ 改変は SIRPα に留まらず、我々は原虫感染が宿主因子 ATP6V0D2 の発現を上昇させることで赤血球貪食能力の高い多核化 Mφ を誘導することを近年明らかにした (Hong et al., Front Cell Infect Microbiol, 2022)。つまり、原虫は積極的に宿主細胞である Mφ を操り、自己-非自己の認識機構を破綻させていると考えられる。

感染した Mφ が赤血球を取り込むことの利点として、リーシュマニアに寄生する鉄やヘムを供給することが考えられる。鉄は細胞内アマスティゴート (哺乳宿主内発育型) の感染と生存に必須であるが、LD は機能的なヘム生合成経路を持っていない。そのため、LD は宿主から鉄を受け取る必要がある。LD では鉄輸送体やヘム輸送体がいくつか同定されているが、その機能解析は十分になされていない。本プロジェクト

では、遺伝子工学を駆使して原虫の鉄関連因子の特性を明らかにすることで、赤血球由来の鉄を原虫の生存に利用するメカニズムを解明することを目的としている。さらに、これら鉄利用を中心とする原虫生存戦略を標的とした新規薬剤の開発を目指す。

② 研究内容

上記のとおり LD 由来鉄関連候補因子の探索を行い、それら因子については KO 原虫株の作製を行い、細胞内生存への関与を明らかにする。KO 株の作製には既報 (Beneke et al., R Soc Open Sci, 2017、他) のとおり CRISPR/Cas9 を活用する。細胞内生存への関与については、M ϕ を用いた *in vitro* 評価とマウスを用いた *in vivo* 評価の両方を行う。マウスに WT および KO/KD のいずれかのプロマスティゴートを 1×10^7 匹静脈内感染させ、感染後 12 週または 24 週に脾臓および肝臓の寄生虫量を測定する。また、血液中のヘマトクリット値、ヘモグロビン値、赤血球数、脾臓および肝臓の重量を測定する。また、WT 感染マウスの血球貪食の主要な場所である感染脾臓の組織学的分析を行い、鉄輸送体の欠損が臓器内の寄生虫の生存や感染 M ϕ の血球貪食にどのように影響するかも調べる。あわせて、臨床検体からの分離株のうち、薬剤感受性株と薬剤抵抗性株の *in vivo* における鉄取込み能についても比較を行う。前述のとおり、薬剤抵抗性株では宿主細胞内の貯蔵鉄をより多く利用することが示唆されている。薬剤抵抗性がこの鉄取込み能と直接関係するのかを明らかにするため、これら原虫を感染させたマウスの脾臓における宿主・原虫の遺伝子発現を網羅的に解析する。

並行して、候補因子の組換え体を作製し、鉄輸送能や鉄依存的酵素活性など生化学的解析を進めるとともに、スクリーニング創薬に資するハイスループット阻害剤評価系の確立を目指す。鉄輸送能を持つ因子については、鉄含有量の評価は比色試薬を用いて行う。鉄依存酵素については、例として原虫がもつ抗酸化酵素 SOD が挙げられる。原虫 SOD は哺乳類がもつ SOD と異なり中心金属に鉄を必要とし、鉄利用の阻害は M ϕ による殺原虫作用に直結する。抗 SOD 活性の評価系としては、WST-1 などの指示薬を用いたアッセイが可能であると考えられる。評価系が確立されたのちには、長崎大学がもつ化合物ライブラリを用いた候補薬剤の探索も行いたい。

長崎大学では、稲岡・濱野のグループが共同で *in vitro* の HTS と *in vivo* イメージングによる薬剤評価が可能な組換え原虫の作成を進めており、既に red shifted ルシフェラーゼと mNeonGreen (RE9h-mNeonGreen) を融合させた *L. infantum* の作成を完了し、本研究の創薬分野で活用する。

③ 予想される成果

LD の細胞内生存に重要である、鉄輸送能や鉄依存的酵素活性などを持った鉄関連因子が複数同定され、それらの機能を阻害する化合物が複数同定されていることが期待できる。阻害効果に関しては生化学的評価に基づくものが先行すると考えられるが、*in vitro* での評価が確認され次第、*in vivo* での評価も行う予定である。我々が用いるマウス感染実験系が 6 カ月感染と長期にわたるものであることから、*in*

vivo での評価については次年度以降になると思われる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

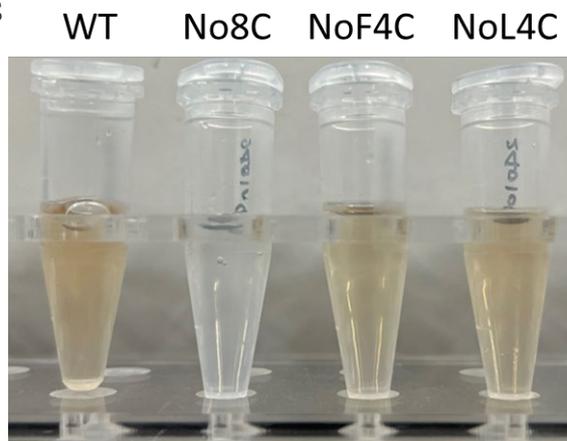
リーシュマニア原虫のゲノム DB である TriTrypDB を用いて、テキスト検索およびモチーフ検索を行い、*L. donovani* ゲノムより鉄関連候補因子を数十個同定した。そのうち、哺乳類オルソログにおいてアポトーシス阻害因子としての機能が報告されている anamorsin、原虫ミトコンドリアにおいて鉄保持機能が示唆されている frataxin について、CRISPR/Cas9 による KO 株の作製を試みた。Guide RNA と Cas9 に加えて薬剤耐性遺伝子をパッケージしたプラスミドを作製し、原虫に遺伝子導入したところ、薬剤耐性は得られたものの、標的遺伝子の KO 株は得られなかった。これらの結果から、これら 2 つの遺伝子は原虫の生存に必須であることが考えられた。そこで、完全 KO ではなく、発現抑制株を作製するべく、anamorsin については episomal vector の作製を行い、過発現株および発現抑制株の作製を行った。現在、これらの原虫株を用いて、細胞内の鉄総量や鉄局在、および Mφ 内の生存力に関して解析を進めている（2023 年度中に完了せず）。

In vitro の HTS と in vivo イメージングによる薬剤評価が可能な組換え原虫の作成を進めており、red shifted ルシフェラーゼと mNeonGreen (RE9h-mNeonGreen) を融合させた *L. infantum* の作製を完了した。現在は同コンストラクトを用いて、別のリーシュマニア原虫種 (*L. donovani*, *L. major*) への遺伝子導入を行い、遺伝子組換え株の樹立を試みている（2023 年度中に完了せず）。

上記の通り、遺伝子組換え原虫株の作製は当初計画より遅れてしまった。その代替として、上記 anamorsin および frataxin に関しては大腸菌組換え体を作製し、鉄保持能について解析を行った（後述）。

② 成果（結果+考察）

データベース解析により鉄関連因子として同定した anamorsin、frataxin ならびに superoxide dismutase 2 種 (SODA, SODB1) に関して、大腸菌組換え体の作製を行った。その結果、anamorsin が茶褐色を呈したが、他の組換え体は色を呈しなかった。Anamorsin はその哺乳類オルソログにおいて Fe-S cluster を形成することが知られているため、次に Fe-S cluster を形成する可能性が高いシステイン残基の変異体を作製した。Anamorsin には 4 つのシステイン残基からなる Fe-S cluster が 2 か所あることが示唆されたため、全てシステイン（計 8 つ）をセリンで置換したもの (No8C)、前者のクラスターのシステインを置換したもの (NoF4C)、後者のクラスターのシステインを置換した



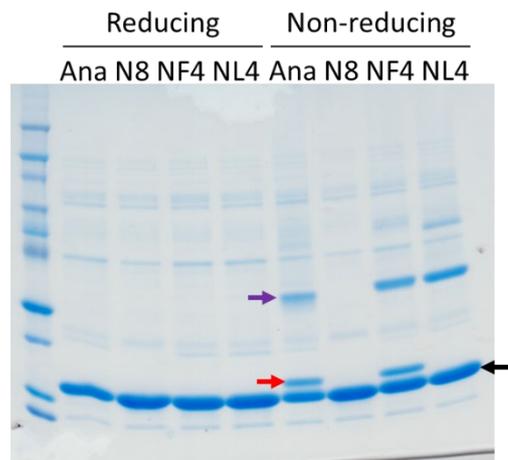
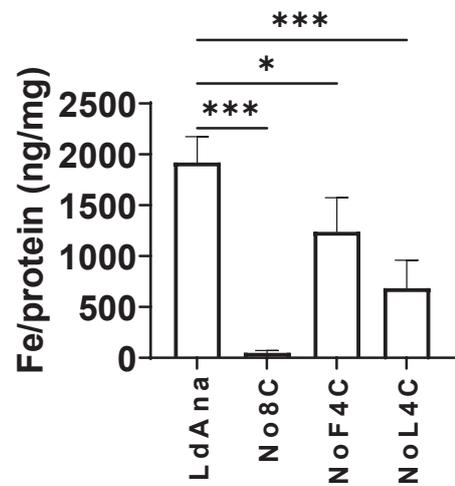
もの (NoL4C) を作製した。その結果、No8C については茶褐色を呈しなかったのに対して、NoF4C および NoL4C では WT と比較すると色が薄いものの茶褐色を呈した。

そこで、タンパク質重量当たりの鉄保持量を測定するため、誘導結合プラズマ質量分析 (IPC-MS) による金属イオンの定量を行った。その結果、他の金属イオンに関しては WT および変異体間で保持量に違いがみられなかった一方、鉄イオンに関しては呈色度に比例する形で有意な違いがみられた。哺乳類オルソログにおいては後者のシステイン残基のみが鉄保持に関与すると報告されているのに対して、リーシュマニア原虫の anamorsin では前者・後者ともに鉄保持に関与することが示唆された。

前者・後者のシステイン残基が鉄保持能に関与する一方、これらはタンパク質の立体構造形成に関しては異なる機能を持つことが示唆された。非還元状態では WT において分子内ジスルフィド結合および分子間ジスルフィド結合 (2 量体) の形成がみられた。それに対して、No8C では分子内・分子間の両方とも観察されなかった。NoF4C では WT 同様に分子内・分子間の両方が観察された一方、NoL4C では分子間ジスルフィド結合のみが観察され、分子内ジスルフィド結合が観察されなかった。これらの結果から分子間ジスルフィド結合には前者・後者のシステイン残基のいずれかがあれば充分であるのに対して、分子内ジスルフィド結合には後者のシステイン残基が関与していることが示唆された。

これまで、リーシュマニア原虫において鉄関連タンパク質の存在は知られている一方、実際に鉄保持能が証明されたタンパク質は存在しない。実際、鉄保持能が示唆されていた frataxin においては鉄保持能が観察されなかったのに対して、本研究で同定した anamorsin は原虫タンパク質の中で初めて実際の鉄保持能が観察されたタンパク質である。

③ 成果の公表
なし



6. 自己評価

データベース解析を通してリーシュマニア原虫より鉄関連因子の候補をいくつか同定することができた一方、当初計画していた CRISPR/Cas9 による KO 原虫の作製は予定通り進まなかった。その結果として、*in vitro* および *in vivo* における KO 株の表現型解析ができなかったことは非常に残念である。

一方で、戦略を変更して大腸菌組換え体の生化学的解析を進めることにしたのは奏功したと言える。ICP-MS による鉄定量を介して、リーシュマニア原虫において高い鉄保持能をもつ *anamorsin* の同定に成功した。現在、*anamorsin* の過発現原虫株ならび発現抑制原虫株の作製を完了し、それぞれにおける鉄保持能について解析を進めている。これらの結果を通して、これまでリーシュマニア原虫において明らかとなっていない鉄貯蔵タンパク質の同定につながることを期待される。リーシュマニア原虫において鉄は生存に必須であり、細胞内鉄が存在することも明らかとなっている。鉄貯蔵タンパク質の解明は抗原虫薬の創薬につながる重要な発見となりうる。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の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）

- 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」で述べてあれば省略可）

令和 5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：アスコフラノン産生真菌経口投与によるトリパノソーマ症予防法の確立

課 題 番 号：2023-Ippan-26

2. 代 表 者：帯広畜産大学 准教授 菅沼 啓輔

共 同 研 究 者：帯広畜産大学 教授 井上 昇

帯広畜産大学 准教授 渡邊 謙一

長崎大学 教授 北 潔

帯広畜産大学 修士課程 山崎 藍

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

トリパノソーマ症の制御および流行地の経済発展のためには、ヒトのみならず感染源であり流行地の経済に重要な家畜動物や、流行地に生息する野生動物に対する対策が必須である。しかし動物に対して低価格で簡便に投薬可能なトリパノソーマ症治療・予防薬は存在しない。共同研究者である貴学の北教授らによって経口投与可能な抗トリパノソーマ化合物であるアスコフラノンを高収量で産生する真菌が作出された (Arakai *et al.*, 2019)。そこで、本研究では低価格なトリパノソーマ症治療・予防薬としての AF 菌の有用性を明らかにし、動物への経口投与が可能な AF 菌配合飼料の開発を研究目的として、「AF 菌の強制経口投与および AF 菌配合餌の自由摂食によるトリパノソーマ感染予防効果の検証」および「AF 菌の強制経口投与および AF 菌配合餌の自由摂食時の AF 血中動態の解析」を実施する。

② 研究内容

下記の実験で用いる AF 菌は貴学・北教授らが独自に作出した菌株であり、本研究ではこの AF 菌の乾熱滅菌粉末を用いてトリパノソーマ感染予防効果の検証、および血中 AF およびグリセリン濃度の解析を進める。なお、乾熱滅菌後も AF の薬剤標的である Trypanosome Alternative Oxidase に対する阻害活性が保たれていることは確認済みである。

- AF 菌強制経口投与および AF 菌配合餌の自由摂食によるトリパノソーマ感染予防効果の検証

供試動物は Balb/c マウス、感染源には各種アフリカトリパノソーマ (*T. congolense*, *T. b. rhodesiense* など) を用いる。AF 菌とグリセリンの投与量は、予備試験の結果を踏まえて複数パターン設定した試験群を準備する。試験期間は 60 日間とし、その間継続的に末梢血中のトリパノソーマ濃度を血球計算盤法で評価し、感染後の血

中原虫数の推移を解析する。実験期間中の人道的エンドポイントを原虫血症による高度の貧血を呈す 10^9 cells/mL とし、この数値を超えた個体は安楽殺する。設定した人道的エンドポイントを踏まえ、感染個体の生存率も合わせて評価する。60日以上生存した個体は安楽殺し、主要臓器を回収して病理学的解析に供する。合わせてこれらの臓器から DNA を抽出し、PCR 法で各臓器におけるトリパノソーマの有無を評価する。これらの試験を 2023/2024 年度にかけて実施し、各種アフリカトリパノソーマに対する AF 菌強制経口投与・配合餌自由摂食による感染予防効果を検証する。

- AF 菌強制経口投与および AF 菌配合餌の自由摂食による血中 AF およびグリセリン濃度の解析

感染予防効果を示した試験群における AF 菌・グリセリン濃度で、血中 AF・グリセリン濃度の推移を検証する。AF 菌・グリセロール投与後一定時間経過後に、麻酔下の Balb/c マウスから心採血を行う。血液から血清を分離し、血中 AF 濃度は HPLC を用いて測定（外注を予定）し、血中グリセリン濃度は測定キットを用いて測定する。

これらの実験は、帯広畜産大学動物実験委員会の倫理審査・承認を得て実施する。

③ 予想される成果

これまでの北教授との共同研究によるマウスを用いた予備実験で、AF 菌の強制経口投与および AF 菌配合餌の継続的な摂食によるトリパノソーマ感染予防効果が示唆されている。本研究では予備実験の結果を踏まえたトリパノソーマ感染予防効果の検証実験を複数回実施するとともに、血中 AF 動態を明らかにする。その成果として、今後 AF 菌経口投与によるトリパノソーマ症予防法の開発と臨床適用のために必須な投与後の血中 AF 動態が明らかとなり、実際にトリパノソーマ感染予防が可能な血中 AF 濃度と投与後経過時間との関連性も明らかにすることができる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

● AF菌強制経口投与およびAF菌配合飼料自由摂食によるアフリカトリパノソーマ感染予防効果の検証

AF菌強制経口投与によるアフリカトリパノソーマ感染予防効果を測定するために、各種濃度に設定したAF菌を経口ゾンデで14日間投与した。またAF菌配合飼料自由摂食におけるアフリカトリパノソーマ感染予防効果を測定するために、各種濃度に設定したAF菌配合飼料を14日間自由摂食させた。これらのAF菌経口投与後7日目に動物アフリカトリパノソーマの一種であり、これまでの研究から各種アフリカトリパノソーマの中で最もAF感受性の低い *Trypanosoma congolense* を腹腔内投与により感染させた。感染後60日間、継続的に血球計算盤を用いて末梢血中のトリパノソーマ濃度を評価し感染後の血中トリパノソーマの感染推移を解析するとともに、マウスの生死を観察した。また、観察期間終了後に生存していたマウス個体の病理学的解析を実施するとともに、各種臓器からDNAを抽出しトリパノソーマを対象としたPCRを実施した。

● 経口投与時の血中AF濃度の推移

経口投与後の血中AF濃度測定のために、Balb/cマウスに対し経口ゾンデを用いて各種濃度のAFを投与後、経時的に採血を行った。採血後に血清を分離し、鎌倉テクノサイエンス社（外注）で血中AF濃度を測定した。

② 成果（結果＋考察）

● AF菌強制経口投与およびAF菌配合飼料自由摂食によるアフリカトリパノソーマ感染予防効果の検証

各種濃度のAF菌強制投与によるアフリカトリパノソーマ症予防効果を表1に示す。AF菌強制投与群全てにおいて、コントロール（AF菌非投与）群に比べて有意な生存率の上昇（ $p=0.09$ ）および血中原虫濃度の抑制が認められた（ $p<0.05$ ）。同一濃度のグリセリン投与群間ではAF濃度依存的に生存率が上昇するとともに、同一用量のAF菌投与群間ではAF濃度依存的に生存率が上昇した。過去の報告でAFによる抗トリパノソーマ活性はグリセリン共投与で増強されることが示されている。AF菌を投与した本研究においても過去の報告と同様に抗トリパノソーマ活性はグリセリンにより増強されることが示された。また、観察期間終了後に生存していたマウス個体の病理学的解析および各種臓器からのPCRの結果から、生存個体で顕著な病理学的異常およびトリパノソーマDNAが検出されなかったことから、本試験条件で生存した個体ではトリパノソーマの感染が予防されたと結論付けた。以上の成果を *Acta Tropica* 誌に発表した（Yamazaki *et al.*, 2023, ③成果の公表1）。

またAF菌配合飼料自由摂食でも、AF菌強制投与と同様にAF濃度依存的なアフリカトリパノソーマ感染予防効果が示唆された。今後実験を繰り返し、AF菌配合飼料自由摂食によるトリパノソーマ症感染予防効果を明らかにするとともに、家畜・野生動物に対するAF経口投与によるアフリカトリパノソーマ予防法の確立を目指す。

● 経口投与時の血中 AF 濃度の推移

経口投与後一過性に血中 AF 濃度が上昇したのち、72 時間経過後に検出限界以下 (<1 ng/mL) まで減少した。この結果はマウスに AF を筋注した場合とほぼ同様の推移であった。一方でウシに AF を筋注した場合、マウスでの試験に比べて血中 AF はより長期間残存することが明らかとなっている。このことから、ウシではマウスに比べてより長期間の予防効果が期待される。

表 1

		AF 菌用量 (AF 用量)	120 mg/kg (31.6 mg/kg)	80 mg/kg (21.0 mg/kg)	40 mg/kg (10.5 mg/kg)	0 mg/kg	
グリセリン 濃度 (グリセリン 用量)	75% (9.45 mg/kg)		Group 1	Group 2	Group 3		
		平均 生存日数	60	60	45	-	$p = 1.00^b$
		個体数	6	5	4		
		p^a	0.009	0.009	0.009		
40% (5.04 mg/kg)			Group 4	Group 5	Group 6		
		平均 生存日数	60	60	20.7	-	$p = 0.39^b$
		個体数	6	6	3		
		p^a	0.009	0.009	0.009		
0%			Group 7	Group 8	Group 9	Group 10	
		平均 生存日数	45.3	38.5	10.5	7	$p < 0.001^b$
		個体数	4	1	0	0	
		p^a	0.009	0.009	0.009		
			$p = 1.00^c$	$p = 0.01^c$	$p < 0.001^c$		

^a ログランク検定による AF 非投与群 (Group 10) と AF 投与群間の比較 (Group 1 - 9)

^b ログランク検定による同一グリセリン用量投与群間 (グリセリン 75%、40%、および 0%) の比較

^c ログランク検定による同一 AF 用量投与群間 (AF 菌 120 mg/kg、80 mg/kg、および 40 mg/kg) の比較

p 値を算出後、Bonferroni 法による補正を行った値を示す。

③ 成果の公表

1. Ai Yamazaki, Yusuke Tanaka, Kenichi Watanabe, Mayu Sato, Shin-ichiro Kawazu, Kiyoshi Kita, Noboru Inoue, Helena D. Janse van Rensburg, David D. N'Da, Keisuke Suganuma, Prophylactic activity of orally administered dry-heat-sterilized *Acremonium egyptiacum* against *Trypanosoma congolense*-induced animal African Trypanosomosis, *Acta Tropica*, 254, 107185, 2024

6. 自己評価

動物を対象としたAF菌経口投与によるアフリカトリパノソーマ症制御法開発に向け、今後投薬対象となる大動物（ウシなど）を用いた研究の礎となる成果が得られた。

7. 達成度（何れかに○）

- I （所期の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）
- Ⓜ （予想通りの成果を挙げられた）
- 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」で述べてあれば省略可）

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯由来感染症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および単離・構造決定

課 題 番 号：2023-Ippan-27

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 大学院生 平田朝陽
広島大学大学院 統合生命科学研究科 大学院生 秋元萌々子
広島大学大学院 統合生命科学研究科 研究員（学部4年生） 藤田葉月
広島大学大学院 統合生命科学研究科 大学院生 Rukman Muslimin
名古屋大学 生命農学研究科 特別研究員 PD 手島愛子
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 兼務教授 平山謙二
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 稲岡健ダニエル
長崎大学 熱帯医学研究所 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

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

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。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および代謝産物の構造解析

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。

なお、2021, 2022 年度一般共同研究において、**67 株の SRB 添加および非添加の培養抽出液（計 134 サンプル）**を調製し、課題 2 において抗マラリア活性に賦した。本年度は残りの微生物株（100 株程度）における SRB 誘導二次代謝ライブラリーの構築を進める。

[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、新たな抗マラリア薬探索のためのスクリーニングを行う。熱帯病感染制御分子の網羅的スクリーニング遂行に関しては、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熱帯熱マラリア原虫が感染したヒト赤血球に添加し培養することにより、**赤血球期マラリア原虫に対する抗原虫活性**を評価する。培養抽出物処理後に、核酸を検出可能な SYBR Green I を含むバッファーを用いて感染赤血球を処理する。SYBR Green I の蛍光量から原虫核酸量を測定し、陽性・陰性コントロールとの比較から、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。また、事前にマウス脳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る。

研究経過でも示した通り、2021, 2022 年度は **67 株の SRB 添加および非添加の培養抽出液（計 134 サンプル）**のうち、**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**。誘導分子 SRB の有無にかかわらず抗マラリア活性を呈する培養抽出液に関しては、誘導分子非依存的な抗マラリア活性化合物の蓄積が示唆される。そこで該当株の大量培養を行い、次いで Sephadex LH20 ゲル濾過、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC 分取などを駆使して活性化合物の単離を行い、ESI-MS, NMR などの分光機器を用いて構造決定を達成する。2022 年度の

解析において、2株における活性成分の構造決定を進めており、現在化学合成を駆使した構造確認を行っている。抗マラリア化合物取得に際し、活性検出を組み合わせながら単離精製を行っていくため、長崎大学・広島大学の密接な共同研究体制によって初めて達成できる研究内容となっている。

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。また、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、他グループの追随を許していない。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 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

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
- ・そのうち、IC₅₀ < 10 μM を呈する 2 株
- ・シグナル分子 SRB の誘導体 C8-SRB（図 1）

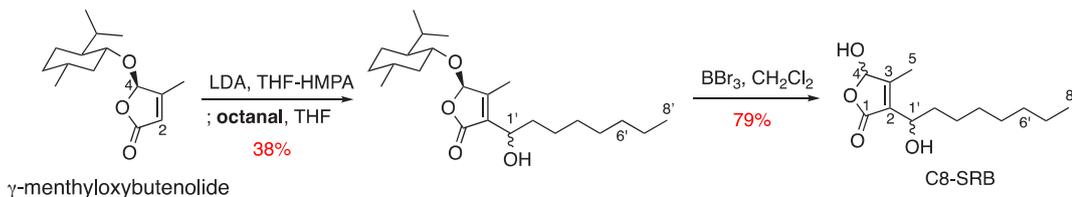


図 1. C8-SRB の合成スキーム

活性試験

- ・抗マラリア活性試験
- ・細胞傷害性試験

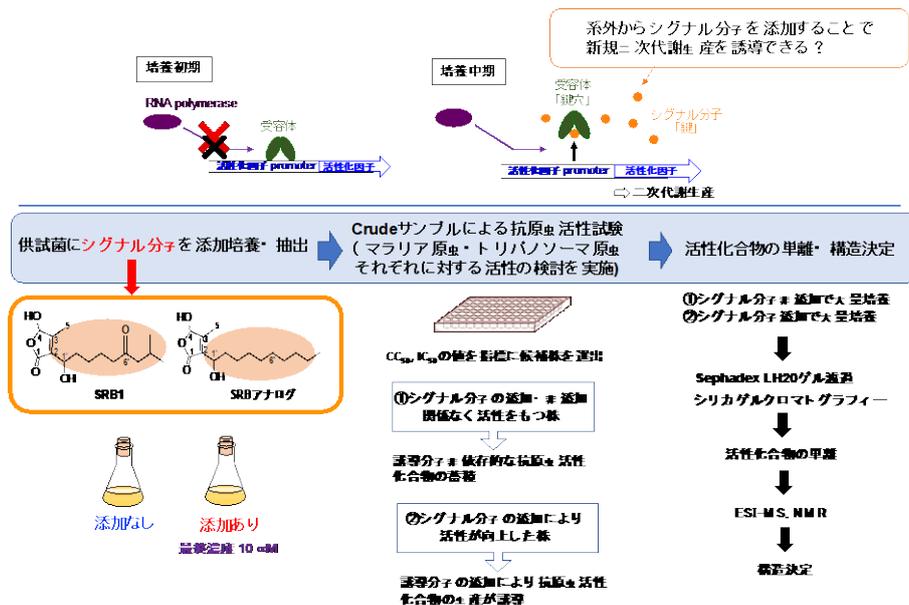


図 2. 本研究のアウトライン

② 成果（結果＋考察）

2021-2023 年度の一般共同研究において、67 株の放線菌培養抽出液を調製し、抗マラリア活性試験 (dose response assay) および細胞傷害性試験 (cytotoxicity assay) に賦したところ、17 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。

まず、HUT 株など *Streptomyces* 属放線菌を中心とした 28 株のスクリーニング

成果について、論文投稿を行った(A. Teklemichael, et al.; 改訂稿投稿中)。残りの株(稀少放線菌など)について、菌株の性状も含めて解析を進めている。

さらに、HUT6035 株については、活性成分を特定した。現在投稿準備中 (A. Teshima, et al.)である。

また、本スクリーニングの過程で 18 員環マクロライド borrelidin (図 3) を単離した。本化合物の抗マラリア活性 (*J. Antibiot.* 2011, 64, 381-384)、さらに化学合成による誘導体化と活性向上について既に他グループから報告されている (*Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013, 23, 2302-2305) もの、我々の放線菌ライブラリーの有用性を如実に示唆している。

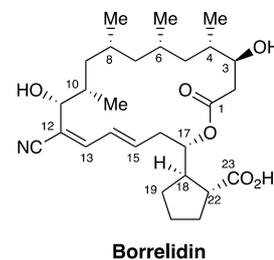


図3. 放線菌ライブラリーから取得した抗マラリア活性化合物 borrelidin

また、図 1 に記載した C8-SRB を添加したところ、57 株中 20 株にて TLC, HPLC などで代謝産物プロファイル変化が認められた。今後、「C8-SRB の添加で誘導生産された菌株のうち、抗マラリア活性の向上が認められた株」を調べていく所存である。

③ 成果の公表

【シンポジウム発表 2 件】

[Hiroshima University–Inha University International Biosymposium 2023 \(302S Hall, Hiroshima University\) \(2023/10/26\)](#)

Extensive screening of anti-malarial compounds from Actinomycetes

[Asahi Hirata](#), Aiko Teshima, Momoko Akimoto, Awet Alem Teklemichael, Mayumi Taniguchi, Shusaku Mizukami, Kenji Arakawa

[University of San Carlos–Hiroshima University International Biosymposium 2023 \(Safad Lecture Hall, Univ. San Carlos, Cebu, Philippines\) \(2023/8/16\)](#)

Extensive investigation of anti-malarial compounds from Actinomycetes

[Asahi Hirata](#), Aiko Teshima, Momoko Akimoto, Awet Alem Teklemichael, Mayumi Taniguchi, Shusaku Mizukami, Kenji Arakawa

また、今後の展開を含めた成果公表の予定については、次項「6. 自己評価」にて記載する

6. 自己評価

現在、抗マラリア活性試験のスクリーニングに関する研究成果 (A. Teklemichael, *et al.*)について、改訂稿を投稿中である。抗マラリア活性を呈した放線菌からの活性化合物の単離・構造決定・生物活性・構造活性相関に関する論文 (A. Teshima, *et al.*)、およびシグナル分子を利用した抗マラリア活性化合物の誘導生産に関する論文 (M. Akimoto, *et al.*) の計 2 編を投稿準備中である。さらに、2023 年度は、水上博士が広島大学にて、荒川博士が長崎大学にて招待講演を行った。本研究の進捗を関係者各位に示すと共に緊密な研究協力体制の構築と本共同研究の拡張性を内外に示せたと考えている。

2024 年度採択課題では、上述の抗マラリア活性化合物の探索に加え、新たな生理活性分子の探索に取り組む。具体的には、対象を、同じ寄生虫感染症の中でも顧みられない熱帯病(NTD)に含まれ、新薬の求められている抗トリパノソーマ活性物質の探索に設定し、共同研究を通じて探索と活性検出を目指し、NTD の問題解決に果敢に取り組む所存である。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期の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)

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」で述べてあれば省略可)

令和 5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：コンゴ民主共和国における M 痘ウイルス株の系統解析及び欧米蔓延株との比較

課 題 番 号：2023-Ippan-28

2. 代 表 者：関西医科大学附属生命医学研究所 講師 安河内 彦輝
共同研究者：DRC 国立生物医学研究所研究員 Nundu Sabiti Sabin
長崎大学 熱帯医学研究所教授 山本太郎
長崎大学 医歯薬学総合研究科大学院生 Paul Kambale Mathe Mowa

3. 決 定 額：700 千円

4. 研究計画

① 研究目的

【学術的背景】

M 痘の疫学的背景：M 痘はオルソポックスウイルス属の M 痘ウイルスによる急性発疹性疾患である。1970 年に現在のコンゴ民主共和国（以下、DRC）で最初のヒトへの感染が確認されて以来、DRC とナイジェリアを中心として散発的に感染例が報告されてきたため、中央アフリカ及び西アフリカの風土病として認識されてきた（図 1）[1]。齧歯類が自然宿主とされており、M 痘ウイルスに感染した齧歯類もしくは感染した他の野生動物との接触によってヒトに感染するため、元来ヒト-ヒト感染はごく稀である。2003 年にはガーナから輸入されたサバンナオニネズミからペット用のプレーリードックを介して全米各地に感染者が広まり、アフリカ外で初めての複数感染者が報告されたが、この際もヒト-ヒト感染は確認されていない[2, 3]。2018 年の英国で、ナイジェリアからの帰国者が M 痘に感染していることが明らかになり治療を受けていたが、医療従事者がさらに感染するヒト-ヒト感染がアフリカ外で初めて

確認された[4]。ヒト-ヒト感染の場合、皮膚接触や汚染されたシーツの共有、接触、近距離での飛沫感染が原因とさ

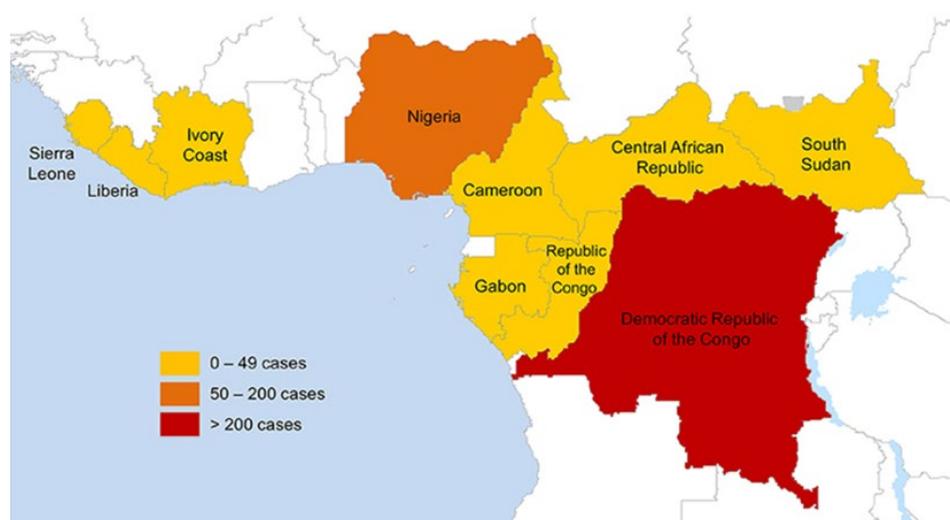


図 1. 中央アフリカと西アフリカの風土病（2018 年 5 月までの報

れている[5]。

2022年、ついにM痘はアフリカと欧米で同時に感染拡大し、日本でも2022年7月には国内1例目の患者が確認された。図2に示す通り、2022年12月末にはM痘報告数が減少しつつあるが、新型コロナウイルスに対する行動規制が世界的に緩和

されているため、ヒト-ヒト感染による第二波、第三波の感染拡大が再度起こる可能性は十分にある。

M痘ウイルスの遺伝学的背景：

M痘ウイルスは遺伝的に、コンゴ盆地型（クレードⅠ）と西アフリカ型（クレードⅡ）の2系統に分類されており、クレードⅡ感染による死亡率が1%程度であるのに対し、クレードⅠ感染による死亡率は10%程度と高いことが報告されている[6]。2003年の米国、2018年の英国、そして2022年の世界的感染拡大では致死率の低いクレードⅡのM痘ウイルスが蔓延していたと報告されているが、2022年にDRCで確認されたM痘患者由来のウイルス系統解析は未だ行われていないため、どのようなウイルス株がDRC国内で感染を広げていたかは明らかになっていない。さらにDRCでは、M痘“疑い”患者が報告の多数を占めており、多くの症例で確定診断すらできていない。少なくとも2022年の世界的な感染拡大に限らず、1970年代から2019年までDRC国内では継続的に感染例が報告されてきたため、2022年のDRC患者にも、致死率の高いクレードⅠに感染していた人々が含まれている可能性は十分にある。

【本研究の目的】

本研究では、2022年にDRC国内でM痘疑いとなった患者由来の検体を用いて分子生物学的にM痘ウイルスを検出し、正確な感染者数およびM痘ウイルスのクレード分布を明らかにする。また各検体と紐づけされた患者情報とM痘ウイルス株の時空間分布を照合し、集団遺伝学的解析手法と併せてDRC国内における感染伝播経路や拡散様式を推定する。さらに、ヒト-ヒト感染を可能にする遺伝子変異は未だ明らかでないことから、欧米株とDRC株のゲノム配列比較によりその原因遺伝子の同定を試みる。特に致死率の高いクレードⅠに対してヒト-ヒト感染に関与する遺伝子変異の調査を実施し、クレードⅠが今後、世界的に感染拡大する可能性があるかを検証する。

Reference

1. Nikola Sklenovská et al. Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. Front Public Health 4;6:241, 2018
2. Mary G Reynolds et al. Spectrum of infection and risk factors for human

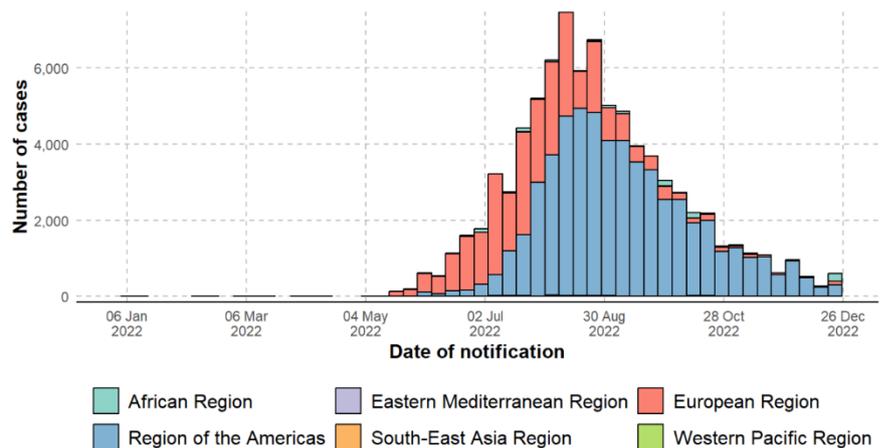


図2. M痘患者数の推移（2022年）：WHO ホームページ参照

- monkeypox, United States, 2003. *Emerg Infect Dis* 13(9):1332-9, 2007
3. Kurt D Reed et al. The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N Engl J Med* 22;350(4):342-50, 2004
 4. Aisling Vaughan et al. Human-to-Human Transmission of Monkeypox Virus, United Kingdom, October 2018. *Emerg Infect Dis* 26(4):782-785, 2020
 5. Andrea M McCollum. Human monkeypox. *Clin Infect Dis* 58(2):260-7, 2014
- Fabio Scarpa. Genetic Variability of the Monkeypox Virus Clade IIb B.1. *J Clin Med* 28;11(21):6388, 2022

② 研究内容

国際保健学分野の有馬助教と DRC 国立生物医学研究所の Nundu Sabiti Sabin 氏は、2022 年に DRC 国内で確認された M 痘患者及び M 痘疑い患者の情報を記述的に取りまとめ、感染者の特性や感染リスク因子を明らかにする。申請者は分子生物学的手法により M 痘疑い患者を含めた正確な M 痘感染者数と DRC 株の系統解析及び欧米蔓延株との比較解析を行う。申請時現在、熱帯医学研究所（6 月）及び DRC 国立生物医学研究所（4 月）の倫理委員会から承認を得る準備を進めている。また、長崎大学リスクマネジメント部門と協働で ABS 手続きを進め、2023 年 9 月に締結を完了する予定である延株との比較解析を行う。

2023 年：

○確定診断及び有病率の算出

DRC 国立生物医学研究所で保管されている 3151 検体(M 痘疑い患者由来) から QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA を抽出し、抽出済 DNA を長崎大学熱帯医学研究所に国際輸送する。M 痘ウイルスを含むオルソポックスウイルス属に共通の *A3L* 遺伝子、*H2R* 遺伝子をターゲットとした PCR でスクリー

遺伝子	プライマー	配列 (5'-3')
<i>A3L</i>	A3L f2	TTGTAACGATGATGATGCGG
	A3Lr3	CGAATGCCATAGAATAAATATCCTTGG
<i>H2R</i>	H2R f3	CGGTTAACGATTGGAAATCATTAAACGG
	H2Rr1	CCTCGCCTAATAGCTTGCG
<i>ATI</i>	ATI-up-1	AATACAAGGAGGATCT
	ATI-low- 1	CTTAACCTTTTTCTTTCTC

表 1. 各遺伝子の検出に用いるプライマー配列

ニングを行い[1]、陽性となった検体を用いて M 痘ウイルス特異的な *ATI* 遺伝子配列を検出する（表 1）。さらに、M 痘ウイルス陽性となった PCR 産物を制限酵素 Xba I で処理し、電気泳動で確認されたバンドサイズによってクレード分類を行う[2]。

2024 年度：

○シーケンス解析による DRC 株の系統分類と欧米株との比較解析

上記確定診断（PCR）で M 痘ウイルス陽性となった検体および既に M 痘ウイルス陽性が確認されている検体からシーケンス解析に用いるサンプルを選択する。DRC の全 26 州において、陽性数が 2 を切っている州からは全検体を、2 以上の州においては検体採取日と採取場所を考慮して 2 検体を採用し、計 40 検体を解析予定である。

クレード I ウイルスが 2022 年の DRC 検体から検出された場合、Illumina NovaSeq 6000

を用いて約 197kb の全配列を決定し、DDBJ もしくは GenBank に登録する。また、クレード I ウイルスが検出できない場合も含め、NCBI Virus データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus>) や GISAID (<https://gisaid.org/>) から全ゲノム配列データ (2023 年 1 月 13 日時点で、NCBI Virus で約 1300 配列、GISAID で 3300 配列が登録) を入手し、系統解析を行う。これらの膨大な情報をもとに、まずクレード II ウイルス、あるいはクレード I と II 株の組み換え体から派生した欧米株が本当に存在しないかを検証する。また、各遺伝子に対して同義・非同義置換速度の比 (d_s/d_n) の算出や頻度スペクトラム解析を行い、どの遺伝子に正の自然選択 (ある有利な突然変異が種・集団内に急速に広がるような自然選択) が生じたかを推定する。さらに全ゲノム配列から、アミノ酸変異に寄与しない中立な変異のみを用いて、分子時計が成り立つことを前提とした系統樹の構築と、その樹形をもとにした分岐年代の推定を行う。これらの解析から、DRC のどの系統株が欧米蔓延株への移行・拡散に関与していたのかを明らかにする。

Reference

1. 国立感染症研究所. 病原体検出マニュアル サル痘ウイルス, 2022
Anna M. Likos et al. A tale of two clades: monkeypox viruses. *Journal of General Virology* 86, 2661-2672, 2005

③ 予想される成果

本研究の成果により、これまで疑い患者だった報告数も含めて、2022 年の DRC における正確な感染者数を報告することができる。また DRC 国内におけるウイルスの感染伝播様式が明らかになることで、今後の M 痘やその他の感染症蔓延防止に貢献することができる。さらに DRC 国内のクレード I が今後の第二波、第三波で感染拡大する可能性があるかを遺伝学的に言及することは、次なる世界的感染拡大について警鐘を鳴らし、各国が対応していくための貴重な政策提言へとつなげる可能性も秘めている。

5. 実施報告

① 令和 5 (2023) 年度実施計画に対する実施状況

共同研究先である DRC 国立生物医学研究所 (INRB) との現地打ち合わせと候補医療機関の視察・調整を行った。南 Kivu 州と Kwango 州において、それぞれ Kamituga general hospital と Kwango general hospital を対象医療機関とすることが決定し、臨床担当者と検体採取や迅速診断キットによる検査、検体の輸送方法を確認した。また、検体の輸送先である INRB では核酸抽出方法や検体の保存方法を調整した。フィールドで収集した検体はウイルス輸送培地にて INRB まで輸送し、INRB 到着後は -20°C で冷凍保存することとした。これら一連の流れを現地の研究者と実際に確認した。核酸抽出キットや PCR 試薬は購入済みであり、倫理承認が得られたのちに INRB に輸送し、実験を開始できる環境を整備する。同意書、質問紙用紙を作成し、INRB 及び熱帯医学研究所での倫理承認を得る準備を進めている。

② 成果（結果＋考察）

当初は INRB に保管されている M 痘疑い患者由来の臨床検体を本研究に活用する予定であったが、共同研究者との協議の結果、倫理承認を得た後に新たに収集した臨床検体を本研究に活用することとなった。そのため、新たに検体を収集する協力医療機関を選定し、Kamituga general hospital と Kwango general hospital で決定した。対象となる南キブ州は政治的混乱が続いている地区であり、日本人研究者が実際にフィールド調査に参加することは避け、INRB から研究員を派遣し医療機関での調査と検体輸送を行う予定である。

また倫理申請内容を再検討する必要性が生じたため、まずは INRB の倫理委員会に申請する準備を行ってきた。協力医療機関と検体輸送方法は調整済みであるため、2024 年に申請予定である。同様に、熱帯医学研究所においても倫理申請を行う準備を進めている。

③ 成果の公表

学会発表や出版物において研究成果は未だ公表していない状況である。

6. 自己評価

本研究に用いる検体を新たに収集する必要性が生じたため、倫理申請内容を修正する必要が生じた。これにより研究の進捗は大きく遅れることとなったが、現地の協力医療機関や共同研究先である INRB との調整は継続しており、本研究を継続することは問題ないと評価している。2024 年度以降、本助成を基に調査研究を展開していく。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で述べてあれば省略可）

2023 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Profile of Plasmodium species composition and its impact on school performance under COVID-19 issues among school-age children in Kinshasa, Democratic Republic of Congo

Project number : 2023 – Ippan – 29

2 . Applicant name : NUNDU SABITI SABIN (Medical researcher. National Institute for Biomedical Research (INRB), Kinshasa, Congo, DR)

Joint researcher(s) :

- Paul Kambale Mathe MOWA (PhD Student, Leading Program, Graduate School of Biomedical Sciences, NEKKEN, Nagasaki University, Nagasaki, Japan)
- Hugo KAVUNGA (Associate Professor, University of Goma, National Institute for Biomedical Research (INRB), Goma, North Kivu, Congo, DR)

3 . Amount Allotted : 600,000 yen

4 . According to documents at time of application

① Research Purpose

The aim of this study was to revisit the prevalence of Plasmodial species including *P. falciparum* in school-aged children four years after the previous survey in the same areas and assess the impact of the COVID-19 pandemic on the burden of asymptomatic malaria infections

Specific objectives

- Determine the prevalence of *Plasmodium* spp., *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections among asymptomatic school children and the proportion of mixed infections.
- Compare the prevalence of *Plasmodium* spp., *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale curtisi* and *P. ovale wallikeri* infections before and after COVID-19

② Research details

The Democratic Republic of Congo (DRC) is the second most malaria-affected country in the world after Nigeria. About 97% of its inhabitants live in perennial malaria transmission zones, in which transmission occurs for 8 to 12 months yearly. In DRC, malaria is still the major cause of morbidity and mortality, accounting for more than 44% of all outpatient visits, and for 22% of deaths among children under 5 years.

We conducted malaria survey in Kinshasa, DRC in 2019 to see the prevalence of malaria among asymptomatic and symptomatic school-age children and we found that malaria prevalence was high in both symptomatic and asymptomatic children.

During COVID-19, many sectors were paralyzed including the healthcare sector. Also, the attention of disease control measures was focused more on the response against COVID-19 forgetting other endemic diseases in the country. Hence efforts to fight malaria should be redoubled to help mitigate the worst impacts of disruptions to malaria services linked to Covid. There was a need to evaluate the prevalence of malaria among children where the survey was previously done.

Also, we used the previous samples to determine the genetic diversity of glutamate-rich protein, potentially a candidate for vaccine development as it has not yet been investigated in DRC. Thus, we aimed to assess the genetic diversity of the immunodominant C-terminal repetitive region (R2) of *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein gene (*pfglurp*) among school-age children living in Kinshasa,

③ Anticipated results

This research was to update the prevalence the prevalence of Plasmodial species including *P. falciparum* in school-aged children four years after the previous survey in the same areas and assess the impact of the COVID-19 pandemic on the burden of asymptomatic malaria infections. This grant made it possible to submit the research proposal to the Ethics committee and to support the Nagasaki-Kinshasa-Nagasaki round-trip plane ticket as well as accommodation and restauration in Kinshasa for Dr Sabin Sabiti Nundu and Paul Mathe, PhD student at NEKKEN. During his stay in Japan, Dr Sabin Nundu helped for final writing of the research protocol and planning of the study. During his stay in Kinshasa, Dr. Paul Mathe explored the study sites and discussed with local authorities and school authorities for the implementation of the study in the same sites where the samples were collected previously and submitted the research proposal to Ethics committee for approval before Data collection. This funding also made it possible to purchase data collection equipment and reagents and pay for *Pfglurp* article for publication. This will provide the basic information necessary for the implementation of the study but also the publication of the *Pfglurp* article will allow local authorities to have an understanding of the genetic variation of the *Pfglurp* gene and its involvement in the production of vaccine targeting the PfGLURP protein in the country.

5 . Implementation Report :

① Circumstances of Implementation against the FY2023 Implementation Plan

- Current study
 - Final writing of the research protocol
 - Submission of the research protocol to Ethics committee
 - Visit of study sites
 - Discussion with health and school authorities
- Previous study
 - Purchase reagents to complete laboratory analysis and sequencing of previous study and
 - Submission and payment of the publication fee.

We conducted nested PCR targeting R2 of *pfglurp* and amplified this region using allele-specific primers. Primary PCR was performed in a 20 µl reaction volume containing 1 µl of DNA, 125 nM primers and 12.5 µl of One Taq® 2× Master Mix (New England Biolabs, Massachusetts, USA). The primary PCR cycling conditions involved an initial denaturation at 95 °C for 5 min followed by a second denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 58 °C for 2 min and extension at 72 °C for 2 min, with a final extension at 72 °C for 5 min. Thirty cycles were performed for nested reactions. Genomic DNA from 3D7 laboratory strains was used in a positive control, and nuclease-free water in a negative control. Amplifications were performed using a ProFlex PCR System (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis at 100 V for 30 min and visualized under a UV light transilluminator after post-staining with Gel Red® (Biotium, Inc., CA, USA) solution for 30 min. Band sizes were determined using a 100 bp DNA ladder (Takara Bio INC., Shiga, Japan). Sequencing analysis and final sample selection Amplicons of samples with a single band confirmed by electrophoresis among *pfglurp*-positive samples were directly sequenced using an Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) with Applied Biosystems Big Dye Terminator V3.1 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Sequence alignment was performed with MEGA7 software, and *P. falciparum* 3D7 GLURP (PF3D7_1035300) was used as a reference sequence. In the case of mixed infections, we considered secondary peaks as true SNPs if the peak height was above 50% of the major peak at a polymorphic locus.

② Results (Results & Observations)

- Research proposal was submitted to Ethics committee
- Study sites were explored and read for data collection
- Previous paper has been published with the following results:

Among the 308 *pfglurp*-positive samples, the mean MOI was 1.32 in symptomatic and 1.20 in asymptomatic children. Among 267 samples for which single bands, the alleles with 1000 bp (47.6%) were predominant followed by 900 bp (21.7%) and 800 bp (17.6%).

Of the 262 samples the Pfglurp-positive samples, Sanger sequencing analysis was performed and of which 221 had strain-identifiable clear waveform data used for diversity analysis. Of these 221 samples, a single strain was detected in 171 samples (77.38%), multiple waveforms in 50 samples (22.62%). Mutations were confirmed at 29 base positions (14.22%) in the 204 bp nucleotide sequence and at 15 amino acid positions (22.06%) in the 68 amino acid sequence. In addition, synonymous mutations were detected at 10 (14.71%) amino acid positions. Deletions at position 882 were confirmed in 2 (0.90%) samples, and one amino acid insertion between amino acid positions 901 and 902 was confirmed in 3 (1.36%) samples.

③ Announcement of Results

- Data collection of the current research proposal has been planned to start in September, 2024
- Previous paper has been published in Parasitology International (Paul KMM, Simpson SV, Nundu SS, Arima H, Yamamoto T. *Genetic diversity of glutamate-rich protein (GLURP) in Plasmodium falciparum isolates from school-age children in Kinshasa, DRC*. Parasitology International. 2024 Jun;100:102866. doi: 10.1016/j.parint.2024.102866. Epub 2024 Feb 11. PMID: 38350548.)

6 . Self-Evaluation

We are quite satisfied to have completed the first step of our current research proposal (submission to Ethics committee) and to publish a previous study on Genetic diversity of glutamate-rich protein (GLURP) in Plasmodium falciparum isolates from school-age children in Kinshasa, DRC which will help have a better understanding of the genetic issue of PfGLURP protein P. falciparum that circulating in the study areas.

7 . Achievement Level (Circle one from I ~ IV below)

- I (Few expected results were achieved.)
- II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)
- III (The expected results were achieved with full satisfaction.)
- IV (Even better than expected results were achieved)

Explain your evaluation

We have not yet implemented the current study but we have successfully published the previous study.

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：亜熱帯植物・海洋生物等の天然資源由来の新規抗マラリア活性成分の探索

課 題 番 号：2023-Ippan-30

2. 代 表 者：広島大学大学院 医系科学研究科 生薬学 教授 松浪 勝義
共同研究者：長崎大学 熱帯医学研究所 原虫学分野 教授 金子 修
長崎大学 熱帯医学研究所 原虫学分野 助教 加藤 知世
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 Walaa Hammand Mohamed Sediek
広島大学大学院医系科学研究科 大学院生 Rabemananjara Miora
広島大学薬学部 学部生 佐原 佑優
広島大学薬学部 学部生 倉田 夏歩
広島大学薬学部 学部生 西本 茉代

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

抗マラリア活性化合物の探索 - 植物、海洋生物および微生物代謝産物を対象に -

マラリアは三大感染症に挙げられるなど特に重要な感染症であり、医学薬学分野の重要な研究対象であるが、当研究室ではマラリア原虫の培養が困難であることから、これまでマラリア原虫を研究対象にすることができなかった。しかし、2019年からの熱研との共同研究により、単離・精製、化学構造解析を当研究室で、抗マラリア活性の評価および学術的な助言を熱研から得ることができるようになり、大きく研究が進展した。実際に2019年からの共同研究で植物の成分について検討を行い、学術論文の発表や学術集会での発表に至った。本新規課題では、新たに海洋生物、および微生物を研究対象に加え、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

①2023 年度(R5)：上述の論文の完成を進めながら、他の植物、海洋生物、および培養サンプルについて化合物の分離・精製を行い、活性本体の単離を目指す。微生物株については海洋研究開発機構(JAMSTEC)から提供された未解析海洋放線菌24種(右写真)、千葉大学真菌医学研究センターや鳥取大学菌類きのこ遺伝資源研究センターから入手したきのこ類の菌株8種、当研究室で土壌より分離した放線菌95種を用いる。また、培地組成により代謝産物が異なることが予想されるため、種々の培地にて培養物を調製し、TLC および HPLC 分析により比較し、特徴的な成分について、

種々のカラムクロマトグラフィーにより活性化合物の単離・精製を目指す。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し（広島大）、適宜、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う（長崎大熱研）。

②2024 年度 (R6)：R5 年度と同様に化学成分の分離（広島大）、熱帯熱マラリア原虫を用いた活性評価を行う（長崎大熱研）。必要に応じて知的財産権の設定を行ったり、得られた研究成果を学会発表、また、国際学術誌への投稿をすすめる。

③2025 年度 (R7)：R6 年度と同様に活性成分の探索を進めるとともに、有用な化合物については、長崎大熱研の対応教員と相談の上、動物実験やメカニズム解析などの検討を行いたい。

③ 予想される成果

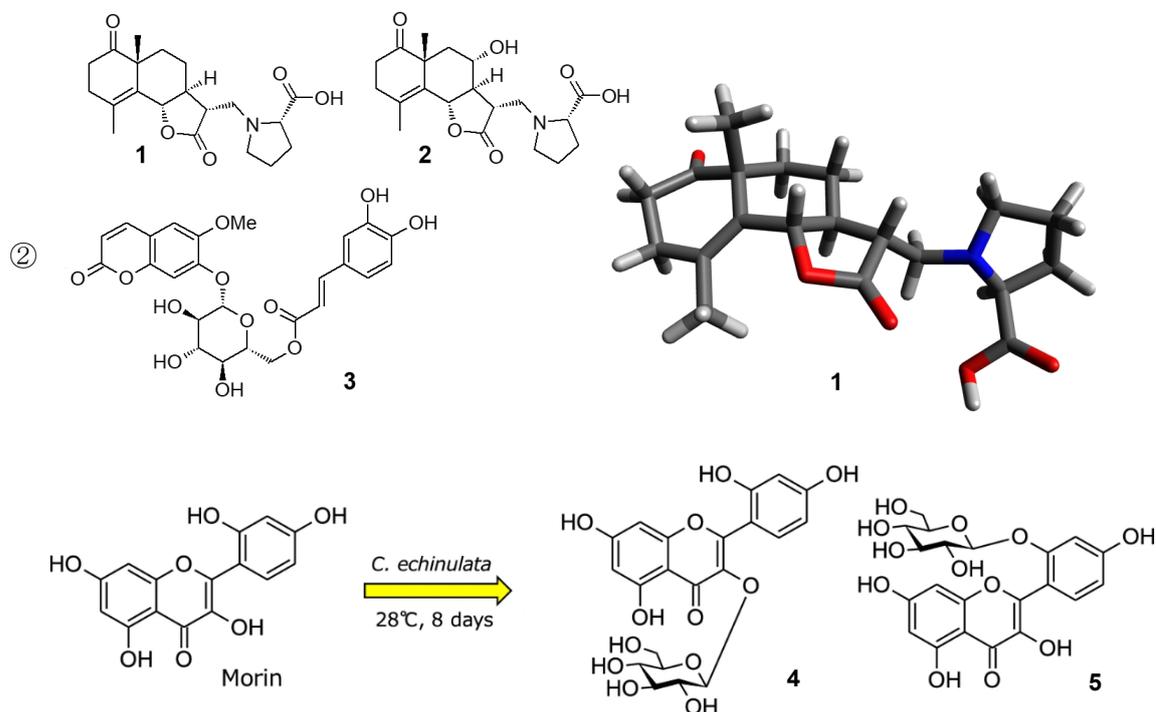
本研究を推進すれば、未解析微生物代謝産物の含有化学成分の詳細や薬学的有用性が明らかになり天然物化学分野の発展に大きな寄与となる。また、単離・精製した化合物から、これまでにない新規医薬品候補化合物の発見ができれば、それをシーズとして創薬展開につながる事が予想され、マラリア原虫等の治療薬の開発に大きな恩恵をもたらすことが期待される。

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。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 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

沖縄亜熱帯植物のモクビャッコウ (*Crossostephium chinense*)、クロイゲ (*Sageretia thea* var. *thea*)、モクセンナ (*Senna surattensis*)、ヤエヤマヒサカキ (*Eurya yaeyamensis*) など 5 種の植物について主要な含有成分の単離精製を行った。その結果、既知化合物に加え、複数の新規化合物を見出し、NMR や MS スペクトルによる解析を行いその化学構造を明らかにした。ここで得られた化合物について、熱帯研にて抗マラリア活性評価を行ったところ複数の成分に活性を見出した。モクビャッコウ (*Crossostephium chinense*) からは以下の新規化合物 (**1**, **2**) が単離され、化学構造、および立体モデルを下図のように決定した。また、新規化合物 **1** および **2** にそれぞれ IC₅₀ 値 (12.1 ± 1.1 および 15.6 ± 1.2 μg/ml) の良好な活性が見られたことから、上記の成果をまとめ、国際学術論文に報告した (*Molecules* 28, no. 12: 4696. <https://doi.org/10.3390/molecules28124696>)。また、その他の上記の植物についてもそれぞれ今年度中に国際学術論文への投稿を順次進めたい。また、微生物代謝物については、以下の新規の化合物 (**4**, **5**) をこれまでに見出しているため、今後、抗マラリア活性を評価し学会や学術論文として公表を予定している。



③ 成果の公表

Two New Cytotoxic Sesquiterpene-Amino Acid Conjugates and a Coumarin-Glucoside from *Crossostephium chinense*. Wang, Zhichao, Ben-Yeddy Abel Chitama, Keisuke Suganuma, Yoshi Yamano, Sachiko Sugimoto, Susumu Kawakami, Osamu Kaneko, Hideaki Otsuka, and Katsuyoshi Matsunami (2023).

6. 自己評価

成分の探索や化学構造決定には時間と労力がある程度かかるので、今年度の成果としては以前からの継続課題の植物からの成果が多く、微生物の培養物に関する研究が相対的に若干の少なさを感じているが、培養装置や実験環境は十分準備できており、今後の研究の遂行にあたって特段の問題は感じていない。今後、興味ある知見が次々に得られると期待している。国際学術論文の共著 (Molecules 28, no. 12: 4696. <https://doi.org/10.3390/molecules28124696>) も公表されたように、成果は順調に出ており、今年度も複数の国際学術誌に共著論文を投稿できると考えているので予想通りの成果を挙げられたとした。

7. 達成度 (何れかに○)

I (所期の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)

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」で述べてあれば省略可)

令和5（2023）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝に関する研究：SmSUOX
の寄生虫生活環における発現プロファイル解析

課 題 番 号：2023-Ippan-32

2. 代 表 者：帯広畜産大学 原虫病研究センター 教授 河津信一郎
共 同 研 究 者：帯広畜産大学 共同獣医学科 学生 小松 航大
帯広畜産大学 共同獣医学科 学生 青木 咲千子
帯広畜産大学 共同獣医学科 学生 川野 眞子
帯広畜産大学 原虫病研究センターJSP 外国人特別研究員
Adrian Macalanda
長崎大学熱帯医学研究所分子感染ダイナミクス解析分野 准教授
稲岡健 ダニエル
長崎大学寄生虫学分野教授 濱野 真二郎
長崎大学感染生化学分野教授 北 潔

3. 決 定 額：300 千円

4. 研究計画

① 研究目的

マンソン住血吸虫症はアフリカ、中東、カリブ海沿岸、南米など世界各地で流行が認められる寄生虫病で、世界保健機関（WHO）はこの病気を顧みられない熱帯病に指定して、積極的な対策を推進している。この寄生虫病の治療にはプラジカンテル（PZQ）が第一選択薬として用いられ、WHOは、PZQ単剤による集団治療（Mass Drug Administration: MDA）を、この寄生虫病の途上国からの排除に向けた対策として推奨しまた推進している。一方、単剤による化学療法には常に耐性の出現がともなうため、新規の住血吸虫症治療薬の開発が求められている。本共同研究では、マンソン住血吸虫のミトコンドリア硫黄代謝において主要な役割を担うと予想されるSmSUOX（サルファイトオキシダーゼ）を研究対象とし、組換え SmSUOX（rSmSUOX）を大腸菌で大量発現・精製し、創薬探索研究の基礎となる生化学的解析及び、生活環における発現プロファイル解析を行う事を目的とする。

② 研究内容

マンソン住血吸虫の生活環各ステージにおける SUOX の時空間的発現（発現時期と発現部位）プロファイルを解析する。

I. SmSUOX 遺伝子の発現プロファイル解析：

（1）寄生虫学分野において実験室内で継代しているマンソン住血吸虫の生活環（貝体内、セルカリア、哺乳類宿主体内及び虫卵）各ステージから mRNA

を調整して、各発育ステージおよび成虫の性における相対的な遺伝子発現を定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) で比較する。

- (2) qRT-PCR での遺伝子発現の定量に使用する検量線は SmSUOX の合成遺伝子をクローニングしたプラスミドを用いて作成し、内部標準には NADH dehydrogenase I 遺伝子(GenBank accession no. AF215860)を使用する。各ステージ間で観察された差異の有意性を Tukey-Kramer 法で検定する。

II. SmSUOX の発現プロファイル解析：

- (1) マンソン住血吸虫の生活環各ステージにおける SUOX の発現を、SmSUOX に対する抗血清を用いたウェスタンブロットで確認する。
- (2) 雌雄ペア成虫体で未固定凍結切片を作製して、SmSUOX に対する抗血清を一次抗体とした免疫組織化学染色で、SUOX の局在を観察する。
- (3) 発注してある SmSUOX のペプチド抗体が rSmSUOX と反応しなかった場合、精製酵素をウサギに免役して抗血清を作製し、SmSUOX に対する抗体を得る。

III. 硫黄代謝の寄生戦略における意義の考察：

- (1) I.及びII.の成績に、感染ダイナミクス解析分野（稲岡健ダニエル准教授）において、これまでに得られているマンソン住血吸虫 SQOR (H_2S -キノノオキシドリダクターゼ) の生化学的解析データ及び文献検索から得られる発現プロファイルデータを加味して考察することで、マンソン住血吸虫の硫黄代謝の全貌とその寄生戦略における意義を推測する。

③ 予想される成果

2022 年度の研究では、組換え SmSUOX を標品として、創薬探索研究の基礎となる酵素学的なデータを取得した。Km 値及び V_{max} 値の測定結果から、SmSUOX の基質 sulfite 及び電子受容体 cytochrome *c* との親和性が、哺乳類の酵素と比較して低いことが解った。低 sulfite 濃度の環境で機能する哺乳類の SUOX とは異なり、マンソン住血吸虫の SUOX では、この吸虫が生息する高濃度の sulfite 環境に適応するために、基質親和性が低くなる、即ち、高濃度の基質存在下で高い酵素活性が得られる適応が生じたと考察された。また、硫黄代謝経路上流の SmSQOR が産生する $S_2O_3^{2-}$ で、SmSUOX の活性が著しく阻害される現象を見出した。SmSQOR の発現には発育ステージ特異性があることが報告されていることから、マンソン住血吸虫は発育期ごとに異なる寄生・生存環境に適応し、最適な H_2S 代謝経路を使い分けている可能性が示唆された。

本共同研究を進める事で予想される結果として、住血吸虫が生物の生存に不適な高濃度 H_2S/SO_3^{2-} 環境への適応を可能にした寄生適応戦略の新たな知見が得られるうえに、SmSUOX に係る基礎解析データの取得が新規抗寄生虫薬開発に繋がる大きな期待できる。また、生物学的には、住血吸虫の各宿主環境適応機構における硫黄代謝の意義と SUOX の役割を理解し、寄生戦略における新しい知見を得ることが期待できる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

- (1) ウェスタンブロットにおいて、マンソン住血吸虫の SUOX (SmSUOX) の発現が、虫卵及び成虫体において確認された。
- (2) 免疫組織化学染色では、雄雌成虫体の柔組織 (parenchyma) に、また雄成虫体においては外被 (tegument) にも SUOX の発現を観察した。
- (3) マンソン住血吸虫での硫黄代謝の寄生戦略における意義を考察した。

② 成果（結果+考察）

(1) マンソン住血吸虫の生活環各ステージにおける SUOX の発現解析

マンソン住血吸虫の虫卵、雌雄の成虫体、及びセルカリアからタンパク質を抽出・調製し、SUOX の発現を、ウサギ抗 SmSUOX 血清を用いたウェスタンブロットで解析した。SUOX の発現が、虫卵及び雌雄の成虫体で観察された (図 9A 及び 9B)。虫卵及び雄の成虫体では、細胞質画分よりもオルガネラ (ミトコンドリア) 濃縮画分において、より強い SUOX のシグナルが観察された。雌の成虫体では、ミトコンドリア濃縮画分においてスメア状のシグナルが観察されたが、細胞質画分と沈殿画分ではシグナルを確認することが出来なかった。セルカリア期における SUOX の発現は認められなかった (図 9A 及び 9B)。ミトコンドリア濃縮画分での SUOX の検出は、この酵素の機能をよく反映した結果と考察することが出来る。

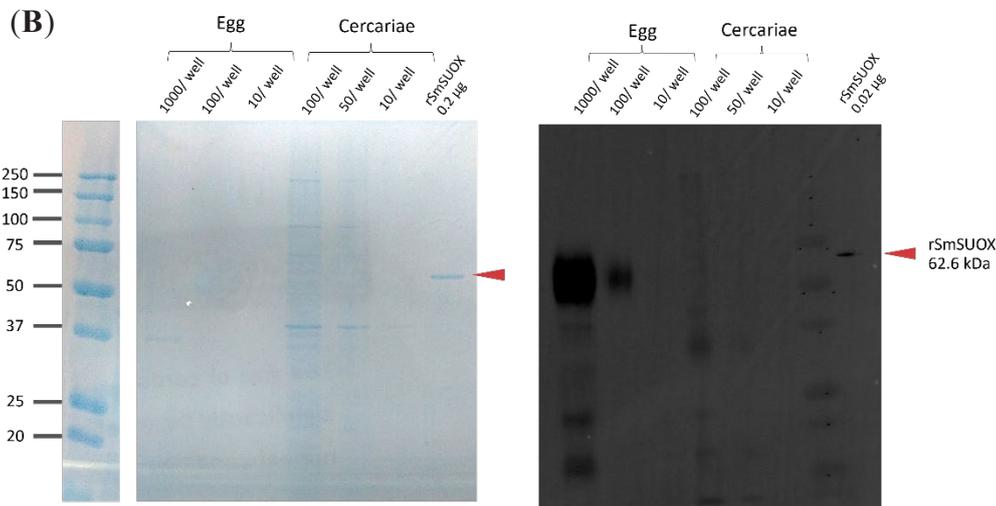
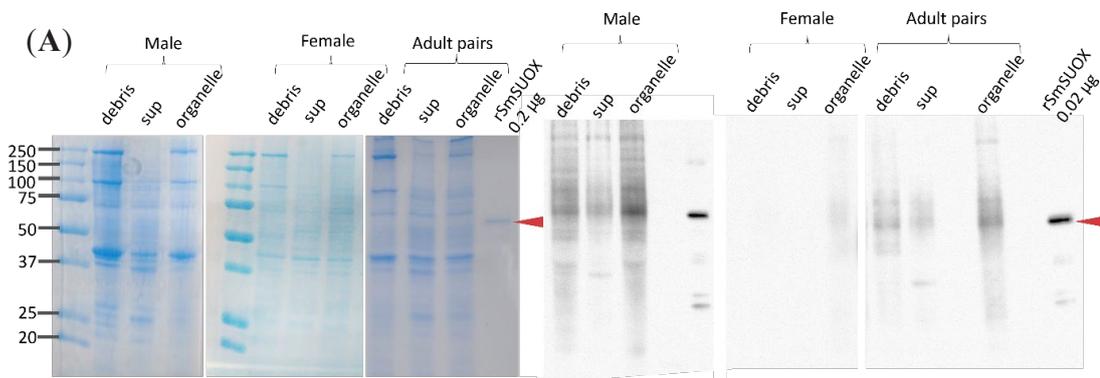
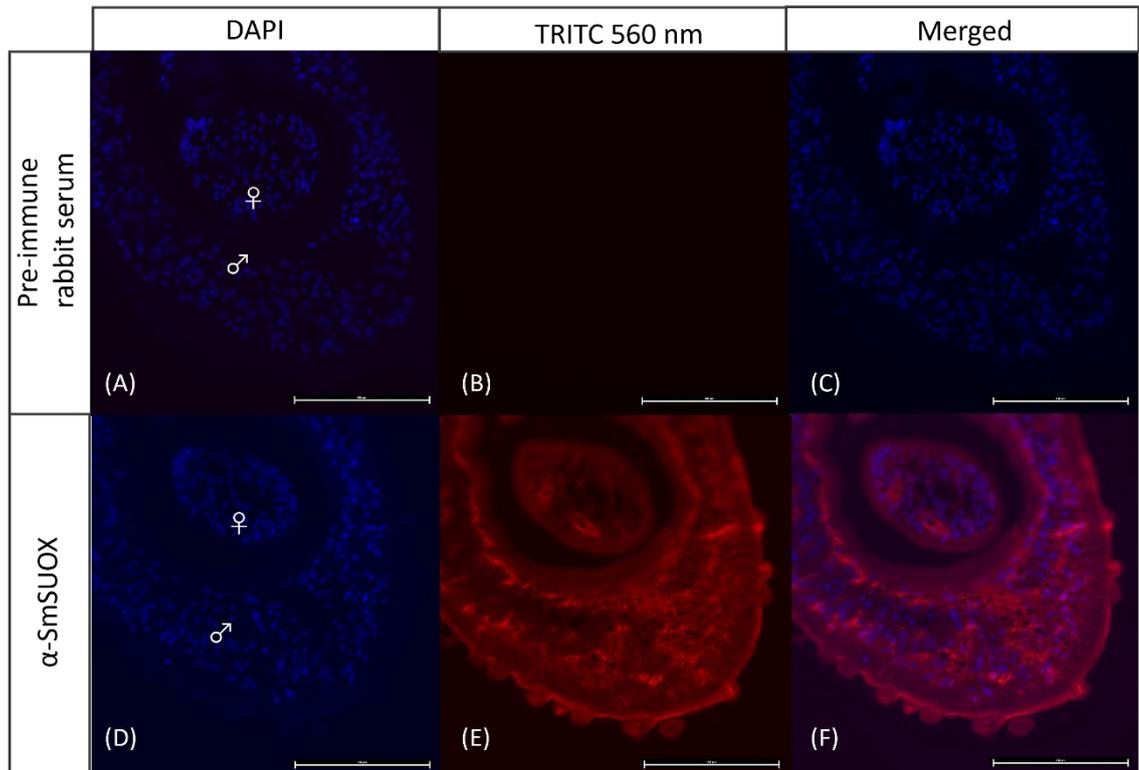


図 9. マンソン住血吸虫の生活環各ステージにおける SUOX の発現解析 (A)成虫 (雄虫体、雌虫体、雌雄ペア成虫体) 及び、(B)虫卵及びセルカリアから抽出・調整したタンパク質の SDS-PAGE (CBB 染色像) とウェスタンブロット像。陽性対照標品として組換え体 SmSUOX タンパク質 (rSmSUOX) を用いた。赤矢印は、分子量 62.6kDa の rSmSUOX に対する陽性反応 (シグナル) を示す。ウェスタンブロットにはウサギ抗 SmSUOX 血清を一次抗体として用いた。各サンプルのホモジネートを 1,000×g で遠心分離した後に得られた沈殿分画を (debris) と表記した。得られた上清をさらに 16,000×g で遠心し、細胞質画分 (Sup) とオルガネラ画分 (organelle) を得た。

(2) 雌雄ペア成虫体における SUOX の局在観察

マンソン住血吸虫の雌雄ペア成虫体から作製した未固定凍結切片標本を用いて、SUOX の局在を観察した。ウサギ抗 SmSUOX 血清を用いた染色像では、雌雄虫体の柔組織 (parenchyma) に SUOX の局在が、広範囲にわたって観察された (図 10E 及び F)。一方、免疫前血清を用いた染色では同様の反応は観察されなかった (図 10B 及び C)。また、雄の外被 (tegument) にも SUOX の局在が観察された (図 10E 及び F)。雄の外被における SUOX の局在は、高濃度の H_2S/SO_3^{2-} 環境への適応に関連したこの酵素の機能をよく反映した結果と考察することが出来る。



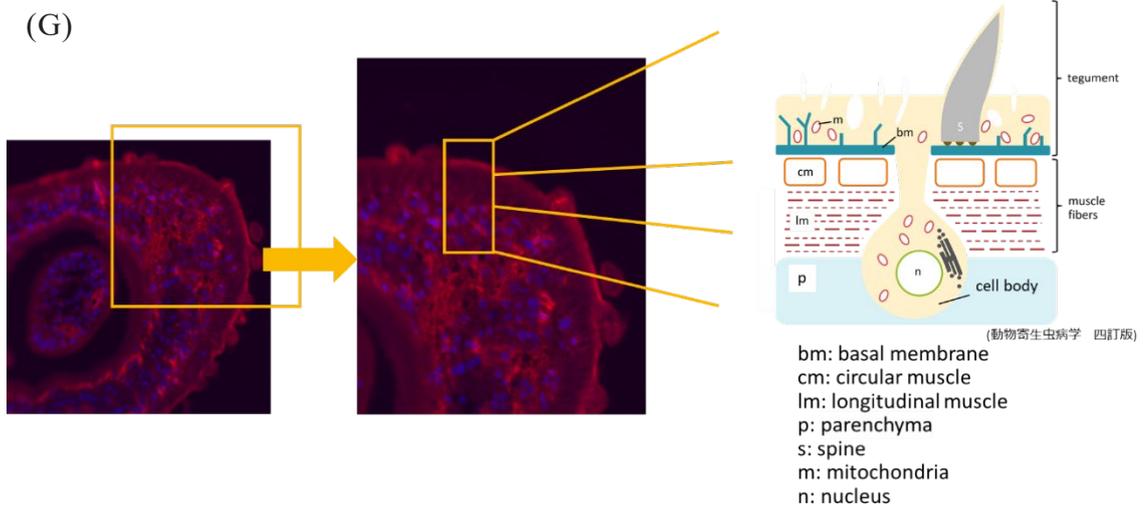


図 10. 雌雄ペア成虫体における SUOX の局在観察。免疫前ウサギ血清 (Pre-immune rabbit serum) (A-C) 及び、ウサギ抗 SmSUOX 血清 (α -SmSUOX) (D-F) を用いて染色した雌雄ペア成虫体の蛍光画像。抗原抗体反応は Alexa 594 (赤色蛍光)、核染色は DAPI (青色蛍光) で可視化した。スケールバー (各パネル右下の白線) は 100 μ m を示す。(G)吸虫類における外被 (tegument) の構造。雄虫体の外被に強い赤色蛍光が観察できる。また、雌虫体では、おそらく二股に分かれた消化管や二つの卵黄腺に強い赤色蛍光が観察される。

(3) マンソン住血吸虫での硫黄代謝の寄生戦略における意義の考察

今回の研究で得られた知見から、マンソン住血吸虫での硫黄代謝に関連して 3 種類の硫化水素 (H_2S) 代謝経路を推定した (図 11)。第一経路では、成虫のように SQOR と SUOX の両方が存在する場合、SQOR は H_2S と亜硫酸イオン (SO_3^{2-}) を利用してチオ硫酸 ($S_2O_3^{2-}$) を産生し、SUOX を阻害して ATP 産生に用いられる電気化学的勾配を効率的に形成すると考えられる。第二経路では、虫卵のように SQOR が発現していないステージにおいて、SUOX が唯一の SO_3^{2-} 酸化酵素として働く。第三経路では、セルカリアのように SUOX が発現していない (または発現量が低い) ステージにおいて、SQOR が好氣的または嫌氣的に $S_2O_3^{2-}$ を酸化する唯一の酵素として働く可能性がある。虫卵での SUOX の高発現は、虫卵 (ミラシジウム) が成長し生存するために必要な環境 (炭素源に乏しいが、硫黄代謝物に富む糞便や自由生活環境) を反映している可能性があり、今回の研究で得られた知見は、少なくとも虫卵のステージにおいて、この寄生虫が SO_3^{2-} を直接エネルギー源として利用する能力を有することを示唆している。

住血吸虫の生存戦略における H_2S や SO_3^{2-} の生理的役割や、異なる環境への適応機構における意義を理解するためには、この寄生虫の硫黄代謝経路について更なる研究が必要であると考えられる。SUOX 各発育ステージでの定量 RT-PCR による遺伝子発現プロファイルについても、今後の課題となる。

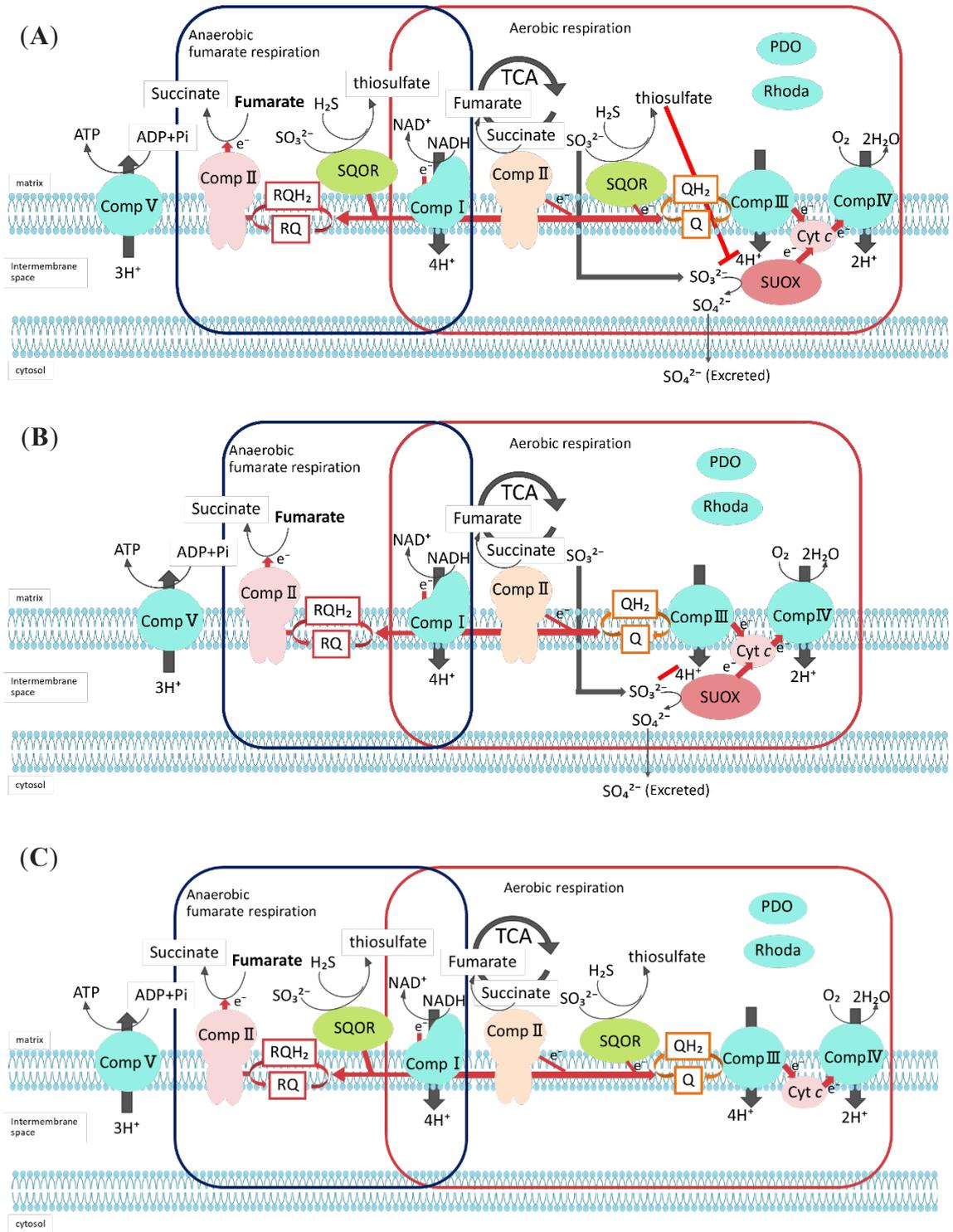


図 11. 今回の研究から推定されたマンソン住血吸虫での 3 種類の硫化水素 (H₂S) 代謝経路。(A) SQOR と SUOX が共発現する第一経路 (成虫のステージ)。(B) SUOX のみが発現する第二経路 (虫卵のステージ)。(C) SQOR のみが発現する第三経路 (セルカリアのステージ)。

③ 成果の公表

(1) 直田紗, Acharjee Rajib, 林下瑞希, 佐倉孝哉, 濱野真二郎, 北 潔, ダニエル健 稲岡, 菅沼啓輔, 井上昇, 河津信一郎, マンソン住血吸虫 sulfite oxidase の酵素学的特徴の解明 第166回日本獣医学会(主催:東京農工大学)オンライン集会, オンデマンド配信, 2023, にて口頭発表.

(2) Ken Daniel Inaoka, Understanding the mechanism of adaptation to environmental sulfide by *Schistosoma mansoni*. U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) U.S.-Japan Parasitic Diseases Joint Panel Meeting, Tokyo, 2024, にて口頭発表.

(3) 紗希 直田, Tshibaka Augustin Kabongo, Rajib Acharjee, 瑞希 林下, 孝哉 佐倉, 雄基 田山, 真二郎 濱野, 潔 北, 信一郎 河津, ダニエル健 稲岡, Characterization of sulfite oxidase from *Schistosoma mansoni*. 日本生体エネルギー研究会・第49回討論会, Yamaguchi, 2023, にて口頭発表.

(4) 紗希 直田, Rajib Acharjee, 瑞希 林下, 孝哉 佐倉, 雄基 田山, 真二郎 濱野, 潔 北, 信一郎 河津, ダニエル健 稲岡, マンソン住血吸虫 sulfite oxidase の生化学的解析. 第96回日本生化学会大会, Fukuoka, 2023, にて口頭発表.

(5) 直田紗希, Rajib Acharjee, 林下瑞希, 佐倉孝哉, 山雄基, 濱野真, 二郎, 河津信一郎, ダニエル健 稲岡, マンソン住血吸虫ミトコンドリアに局在する亜硫酸オキシダーゼの解析. 第29回分子寄生虫学ワークショップ 第19回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム 合同大会, Nagasaki, 2023, にて口頭発表.

6. 自己評価

マンスン住血吸虫の生活環各ステージにおける SUOX の発現解析については、特異血清を用いたイムノプロット法で、雌雄の成虫体と虫卵において発現を確認することができた、また、その局在についても免疫蛍光染色法を用いて興味ある知見を得ることが出来た。SUOX の酵素学的性状解析からのデータも含めた一連の成績を整理することで、マンスン住血吸虫での硫黄代謝の寄生戦略における意義についても一定の考察を得ることが出来た。一方、SUOX 各発育ステージでの定量 RT-PCR による遺伝子発現プロファイルについては、データをまとめることが出来ず、今後の課題となった。

7. 達成度（何れかに○）

- I (所期の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)
- 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」で述べてあれば省略可）

2023 General Joint Research Seminar Report (self-evaluation)

1. Seminar Title : 医学研究のための倫理に関する国際セミナー

Project number : 2023-A-01

Scheduled period : Year 2023 Month 6 Day 28 ~ Year 2023 Month 6 Day 30

2. Principal investigator : 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 Nguyen Tien Huy

3. Amount allotted : 600,000 yen

4. Outline of research seminar

The Declaration of Helsinki, CIOMS, WHO guidelines, and ICH-GCP guidelines are currently applied as global ethical standards in medical research. These guidelines generally stipulate the ethics codes for medical research on human subjects and the ethics codes for individual researchers' personalities as a globally unified Minimum Requirement. However, more detailed consideration is required to apply this spirit to actual research sites, especially in developing countries. This seminar invited experts in medical research ethics, researchers involved in medical research and other fields from several countries, and Nagasaki University students. With the participation of experts in medical research ethics, we discussed various study cases conducted around the world, which took into account differences in culture and customs, and examined future directions. The meeting was also open to the public.

5. Implementation report :

This meeting was co-sponsored with the "International Training Course on Ethics for Medical Research". It was held online for three days from June 28 to June 30, 2023 by nine lecturers (including four from overseas and five from Japan) and 27 participants (including 23 from abroad and 4 from Japan). Cristina Torres (FERCAP-Philippines), Kwanchanok Yimtae (Khon Khen University), Utcharee Intusoma (Prince of Songkla University), Kenji Hirayama (Nagasaki University), Juntra Karbwang (SIDCER-FERCAP Foundation), Tsuyoshi Kihara (Nagasaki University), Konosuke Morimoto (Nagasaki University), Dhoubhabel Bhim Gopal (Nagasaki University), Tien Huy Nguyen (Nagasaki University) gave lectures and motivated group discussion. The lecture contents were the composition, roles, and functions of ethics committees, informed consent (consent form), evaluation of benefits and risks, guidance, and ethical issues in research conduction, especially in developing countries. Participants understood what the consensus is and what

is controversial about medical research ethics today and discussed how to deal with it.

Course description

This international course is an overview of research ethics, focusing on the ethics of health research. This course will cover the following: a) historical background, principles, and guidelines of research ethics; b) structure, roles, and functions of research ethics committees; c) ethical considerations in health research such as those related to informed consent, conflict of interest, and risk and benefit evaluation; and d) ethical issues and methodologies in different health research fields (genetics research, epidemiological and social research and pediatric research) in the context of national, regional, and international collaborative research.

Course objectives

The general objectives of this course are: a) To demonstrate a common understanding of the ethical principles in health research and b) To utilize the ethical principles in reviewing different considerations and issues related to various health research fields.

Course format

This course will (to a large extent) be organized as interactive learning where the participants will work on a number of problem cases. The case studies will illustrate the main points made in the lectures and presentations. It will be a three-day intensive course. English is a common language in the course, however, the lecturers and mentors are able to communicate in other 3 languages, i.e. Japanese, Filipino, and Thai. Comprehensive background materials will be provided to the participants.

Course organizers

Prof. Dr. Juntra Karbwang

President, SIDCER-FERCAP Foundation, Thailand

Prof. Dr. Kenji Hirayama

Professor and Head, Immunogenetics, NEKKEN, Nagasaki University

Course lecturers and moderators

Cristina Torres (FERCAP-Philippines), Kwanchanok Yimtae (Khon Khen University), Chusak Okascharoen (Mahidol University, Thailand), Phanthipa Wongwai (Khon Khen University, Thailand), Kenji Hirayama (Nagasaki University), Juntra Karbwang (SIDCER-FERCAP Foundation),
Facilitators·Tsuyoshi Kihara (Nagasaki University), Konosuke Morimoto (Nagasaki University), Dhoubhabel Bhim Gopal (Nagasaki University), Tien Huy Nguyen (Nagasaki University)

Course venue

Global Health General Research Building in Sakamoto Campus, Nagasaki University

All the lectures and workshops will be conducted via an online system.

Course fee

Free to all participants

The course is financially supported by the Institute of Tropical Medicine (NEKKEN)

Course outline**First Day: June 28, 2023 (Wednesday)**

- 08:45 Inaugural session
 Facilitators: Kenji Hirayama
 Introduction to the workshop
 Presentation of participants
- 09:15 Introduction to research ethics: History and the need of an ethical review system ([Juntra Karbwang, SIDCER-FERCAP Foundation](#))
- 10:00 Break
- 10:30 Roles and functions of research ethics committees ([Sangkae Chamnanvanakij, Mae Fa Luang University, Thailand](#))
- 11:15 Informed consent ([Juntra Karbwang, SIDCER-FERCAP Foundation](#))
- 12:00 Lunch
- 13:00 Conflict of interest ([Kwanchanok Yimtae, Khon Khen University, Thailand](#))
- 13:30 Vulnerability, Risks and benefits evaluation (Cristina Torres, [FERCAP-Philippines](#))
- 14:15 Break
- 14:30 Case Study (3 cases): Group discussion
Facilitators: [Kwanchanok Yimtae](#), [Cristina Torres](#), [Sangkae Chamnan](#) , , [Kenji Hirayama](#), [Juntra Karbwang](#), [Tsuyoshi Kihara](#), [Konosuke Morimoto](#), [Dhoubhabel Bhim Gopal](#), [Nguyen Tien Huy](#)
- 15:30 Case Study: Reporting and Plenary discussion
Moderators: [Juntra Karbwang](#) & [Kwanchanok Yimtae](#)
- 17:00 End of day one

Second Day: June 29, 2023 (Thursday)

- 08:30 Ethical issues in pharmacogenomics research ([Kenji Hirayama, Nagasaki University Japan](#))

09:00 Ethical issues in Emergency Medicine Research (Kwanchanok Yimtae, Khon Khen University, Thailand)

09:45 Ethical issues in epidemiological and social research (Cristina Torres, FERCAP-Philippines)

10:30 Break

11:00 Ethical issues in pediatric research (Sangkae Chamnanvanakij, Mae Fa Luang University, Chiangrai, Thailand)

12:00 Lunch

13:00 Case Study 2: Group discussion
Facilitators: Kwanchanok Yimtae, Cristina Torres, Sangkae Chamnan , , Kenji Hirayama, Juntra Karbwang, Tsuyoshi Kihara, Konosuke Morimoto, Dhoubhabel Bhim Gopal, Nguyen Tien Huy

15:00 Break

15:30 Case Study 2: Reporting and Plenary discussion
Moderators: Juntra Karbwang & Kwanchanok Yimtae

17:00 End of day two

Third Day: June 30, 2023 (Friday)

09:00 Ethical issues in international health research: Study design, informed consent, level of care, post trial benefit (Cristina Torres, FERCAP-Philippines)

10:30 Break

11:00 Plenary discussion (Cristina Torres, Juntra Karbwang, Kwanchanok Yimtae, Sangkae Chamnanvanakij)

12:00 Presentation of certificate (Kenji Hirayama)
End of the course

Course participants

The target participants for this course are postgraduate students, researchers in biomedical sciences (including health social sciences), and members of research ethics committees.

Name	Family Name	Country	Position	Institution	Institution address	「male」 「female」
Ankitha Vadi Velu	Ankitha	India	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
Sailakshmi Iyer	Sailakshmi	India	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
JIANG CHENXU	JIANG	People's Republic of China	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
Sun Huimin	Sun	People's Republic of China	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
CARANFIL EMANUEL	CARANFIL	Romania	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-7-1, Nagasaki, 852-8588, Japan	male
Ralph Jacob M. Elazegui	Elazegui	Republic of the Philippines	Student	Medical and Dental Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-7-1, Nagasaki, 852-8588, Japan	male

Kambale Mathe Mowa Paul	Kambale	Democratic Republic of the Congo	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
XAYAVONG DALOUNY	XAYAVO NG	Lao People's Democratic Republic	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
AHUMIBE ANTHONY	AHUMIB E	Federal Republic of Nigeria	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
WODAH-SEME RICHARD	WODAH- SEME	Republic of Ghana	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
KAPANDJI KASENGA MERVEILLE	KAPAND JI	Democratic Republic of the Congo	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female

				Biomedical Sciences, Nagasaki University		
KOECH LILIAN CHEPNGETICH	KOECH	Republic of Kenya	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
Pham Thi Thu Hang	Pham	Socialist Republic of Viet Nam	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
MATSUOKA Hayato	MATSUO KA	Japan	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
MAMBU MBIKA FABRICE	MAMBU	Democrati c Republic of the Congo	Student	Program for Nurturing Global Leaders in Tropical and Emerging Communicable Diseases, Infection Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1- 12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male

ALHAMID AHMAD	ALHAMID	Syrian Arab Republic	Student	Life Sciences and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	male
Toilybayeva Aliya	Toilybayeva	Republic of Kazakhstan	Student	Life Sciences and Radiation Research, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
Zabirova Aizhan	Zabirova	Republic of Kazakhstan	Student	Advanced Preventive Medical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
TRATSIAKOVA KATSIARYNA	TRATSIAKOVA	Republic of Belarus	Student	Advanced Preventive Medical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
Liu Mengjie	Liu	People's Republic of China	Student	Advanced Preventive Medical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
NGUYEN THI NHUNG	NGUYEN	Socialist Republic of Vietnam	Student	Advanced Preventive Medical Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University	Sakamoto 1-12-4, Nagasaki, 852-8523, Japan	female
Yoshiko Takahashi		Japan		School of Tropical Medicine and Global Health		female
Dr. Jeratkana Janngam, MD		Thailand	Member	Bangkok Metropolitan Administration General Hospital, Human Research Ethics		female

Dr. Kaset Chimplee, MD		Thailand	Vice Chair	School of Medicine, Mae Fah Luang University, Ethics Committee on Human Research		male
Dr. Nuntiput Putthanachote		Thailand	Member	Roi Et Hospital, Ethics Committee in Human Research		male
Mrs. Patcharin Chinnakarnsawas		Thailand	Member	Roi Et Hospital, Ethics Committee in Human Research		female
Prof. Dr. Polpun Boonmak		Thailand	Member	Khon Kaen University, Ethics Committee in Human Research		male
Dr. Sivaporn Sivasinprasasn , PhD		Thailand	Secretary	School of Medicine, Mae Fah Luang University, Ethics Committee on Human Research		female
Dr. Thapanawong Mitsungnern		Thailand	Secretary	Faculty of Medicine Khon Kaen University, Ethics Committee in Human Research		male
Dr. Woranart Ratanakorn		Thailand	Chair	Chonburi Hospital, Institutional Review Board		female
Supatra Porasuphatana		Thailand		Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University		female
Angela A. Du		Philippines	Chair, Institutional Review Board	Manila Doctors Hospital		female

Sonia E. Bongala		Philippine	Chairperson	PHilippine Health Research Ethics Board		female
Evelyn Lacson		Philippine		PHilippine Health Research Ethics Board		female
Manuel Emerson Donaldo		Philippine		Cebu Institute of Medicine		Male
Dr. Roger S. De Venecia		Philippine	Chairman, Research Ethics Board	Capitol Medical Center	Quezon Avenue cor. Scout Magbanua St, Quezon City, Philippines, 1103	Male
John Michael Gabriel T. Zaragoza		Philippine		Corazon Locsin Montelibano Memorial Regional Hospital		male
Lisa R. Amir		Indonesia	Chair of Dental Research Ethics Committee	Faculty of Dentistry Universitas Indonesia		female
Claudia Rossi		Netherlands		University of Leiden, The Netherlands		female

6. Self-evaluation

An international training course on research ethics in English was held online for three days from June 28 to June 30, 2023, with by nine lecturers (including four from overseas and five from Japan) and 39 participants. We gathered 39 people (including 38 from abroad and 1 from Japan) and held a gathering seminar unlike any other in the world. There were many participants from various countries and active discussions were held from an international perspective, demonstrating the characteristics of this workshop. A questionnaire survey of the participants revealed that the content was well received, although there were some difficulties

in using English. This year was the 22rd course, led by Ms. Cristina Torres, FERCAP Coordinator of WHO-TDR Clinical Coordination and Training Center in Thailand. We were also able to discuss trends. The results were better than expected.

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

I (Few expected results were achieved.)

II (Not fully satisfied, but certain results were achieved.)

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

IV (Even better than expected results were attained)

Explain your evaluation (this may be omitted if you have already done so in 6 above)

令和 5（2023）年度研究集会報告（自己評価）

1. 研究集会の名称：日本顧みられない熱帯病アライアンス・ネットワークの維持管理とその運用

課題番号：2023-A-02

開催期間：令和 5 年 4 月 1 日（土）～令和 6 年 3 月 31 日（日）

2. 代表者：長崎大学大学院 熱帯医学・グローバルヘルス研究科 教授 平山謙二
参加人員：太田 伸生、金子 聡、樺澤 靖弘、國井 修、沢辺 京子、鈴木 りえこ、
中谷 香、南里 隆宏、濱野 真二郎、森田 公一、吉岡 浩太

3. 決定額：400 千円

4. 実施計画

我が国は、顧みられない熱帯病（NTDs）の対策に取り組んできた長い歴史があり、その経験をアフリカ開発会議（TICAD）や地球規模課題対応国際科学技術協力（SATREPS）、公益社団法人グローバルヘルス技術振興基金（GHIT Fund）等を通して世界の NTD 制圧に活かしてきました。しかしながら、産官学民が広く参加できるような NTD ネットワークは未だ構築されてはおりませんでした。そのような実情を憂い、2017 年 11 月のグローバルヘルス関連 3 学会（日本熱帯医学会、日本国際保健医療学会、日本渡航医学会）の合同大会におけるシンポジウム、さらには、同年 12 月の UHC フォーラムでの NTD サイドイベントにおいて、日本国内における NTD ネットワークの必要性が議論され、その構築を目指すこと、その事務局は、長崎大学熱帯医学研究所に置くこと、その名称を日本顧みられない熱帯病アライアンス（Japan alliance on Global NTDs（JAGntd））とすることがきまり、2018 年 11 月 9 日に正式に発足しました。JAGntd により、産官学民をネットワーク化し、日本の貢献の見える化の実現、その活動がより効果的なものになるように後押しするとともに、NTD Roadmap に示されたゴールを達成し、「誰一人取り残さない—No one will be left behind」という理念を実現するために活動を継続する必要があります。これまでは、英国の NTDs を国際的にまとめる Uniting Combat to NTDs からの資金支援により活動し、ウェビナーの開催、1 月 30 日の世界顧みられない熱帯病の日のイベント開催、日経 FT 会議 NTD 部会の事務局の運用等、我が国の NTDs のネットワーク化に貢献してきました。今後の活動、ネットワークの維持のため、「熱帯医学研究拠点研究集会または人材育成・研修などの取組」に採択頂けますようお願いいたします。資金は、ネットワークの維持、ウェビナーの開催、世界顧みられない熱帯病の日、キガリ宣言（世界の NTDs に関する宣言）のフォーアアップに活用させて頂く予定です。

5. 実施報告：

申請書「3. 研究集会の概要」（上記において転載）に記載した通り、NTDs に関する

日本国内ネットワークの維持を行うとともに、国際的ネットワークとの連携に関する活動の一部に対し、本事業において配分された予算を有効に活用した。具体的には、以下の2つのイベントと JAGntd のウェブサイトを活用するサーバ費用として、本事業の配分額を利用した。

A) G7 サミット長崎保健大臣会合記念・国際シンポジウムの開催

2023年5月13日(土)と14日(日)の2日間にわたり、出島メッセ長崎において、G7 サミット長崎保健大臣会合を記念して開催した国際シンポジウム「顧みられない熱帯病 (NTDs) に対する研究開発とアクセス&デリバリーの加速化に向けて」(5月12日正午～午後2時、会場：グローバルビュー長崎)の運営・実施に対し、本事業配分の一部当てた。同シンポジウムは、長崎大学、GHIT Fund (公益社団法人グローバルヘルス技術振興基金)、Uniting to Combat Neglected Tropical Diseases (NTDs)による共同開催であり、外務省、厚生労働省、国際協力機構 (JICA) から後援により開催した。シンポジウムでは、以下に関しての検討・意見交換を行った。

1. NTDs の制圧に協力する関係組織・団体が世界から集まり、本学も含めた多くの団体がその制圧に対するコミットメント (約束や責任を果たすこと) を表明した「キガリ宣言」(2022年、アフリカのルワンダで発表)を再認識すること
2. 新型コロナウイルス感染症のパンデミックで停滞したNTDs対策を再活性化するための国際ネットワークを強化すること。

最終的に、世界保健機関、日本製薬工業協会、ビル&メリンダ・ゲイツ財団、DNDi (Drugs for Neglected Disease Initiative) など、世界17か国から231名(会場参加：85名、オンライン参加：146名)が参加し、「長崎アウトカム・ステートメント」の骨子を採択して終了した。同ステートメントの最終版は、世界21機関の参画を得て、2023年7月4日に発表されている。

<https://www.nagasaki-u.ac.jp/ja/guidance/kouhou/press/pdf/20230704-2.pdf>

B) 第一回 顧みられない熱帯病 学生コンテスト」について

1月30日が世界顧みられない熱帯病の日 (World NTDs Day) であることから、「第一回 顧みられない熱帯病 学生コンテスト」を開催し、本事業の配分を一部活用した。コンテストは、中学生から大学院生までの生徒・学生を対象とし、個人もしくは4名までのチーム構成を参加条件とし、二つの応募部門

「A部門：NTDsを分かりやすく伝える ～NTDsを、あなたの言葉で～」

「B部門：私たちができることを考える部門 ～NTDsと私たちの関わり方～」

を設け、全国に広く募集した。応募総数は、A部門20チーム(53名)、B部門15チーム(26名)であり、これらの応募者の中から、世界NTDの日・日本実行委員会による一次選考を通過した5チーム(11名)、6チーム(9名)により最終選考を1月28日に実施した。A部門の最優秀賞は、大分大学医学部5年の学生で、U-18特別賞として、千葉県立幕張総合高等学校看護学科1年のチームが選ばれた。B部門の最優秀賞は、大阪公立大学医学部医学科4年の学生であり、U-18特別賞は、福岡

県立修猷館高等学校 2 年のチームが選ばれた。

A 部門最優秀賞作品：https://youtu.be/vZanSQFi_AU

B 部門最優秀賞作品：<https://youtu.be/6Lxjd1R7PN0>

6. 自己評価

本事業の支援のおかげで、JAGntd の運用、さらには、国内外のネットワークの活性化と関連する事業の展開を達成することができた。

顧みられない熱帯病の国内ならびに国際コミュニティの間では、JAGntd は熱帯医学研究所の運用であるとの認識も広まっており、長崎大学熱帯医学研究所のブランド力の向上に本事業資金が有効に活用されたと認識している。

熱帯医学研究所として、顧みられない熱帯病は重要な疾患群であり、わが国で関係者をまとめ、海外のとの連携を維持できる機関は熱帯医学研究所のみであること、そしてそれが、熱帯医学研究所のブランド力向上に寄与している点から、今後とも、本事業の継続と支援をお願いしたい。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の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)
- ⓐ (予想通りの成果を挙げられた)
- 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」で述べてあれば省略可)

令和 5（2023）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：ベトナムにおける下痢症起因細菌のフィールド研究

課題番号：2023-Kyoten-01

2. 代表者：宮崎大学農学部畜産草地科学科 准教授 井口 純

共同研究者：長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点 教授 長谷部 太

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry 講師

Nguyen Thi Thu Huong

3. 決定額：800 千円

4. 研究計画

① 研究目的

病原性大腸菌はベトナムを含む発展途上国における乳幼児下痢症の主要な原因微生物であり、5歳以下の主な死亡原因にもなっている。さらに流行地域を訪れた旅行者による下痢症の原因にもなる。しかし、汚染源や汚染経路に関する調査はほとんど行われていない。また、先行研究で乳幼児下痢症の原因菌と推定された *E. albertii* の汚染実態も不明である。PE のワンヘルスアプローチにおいて、患者から分離される原因菌だけではなく、その保菌宿主を含めた汚染源や汚染経路を理解することが必要となる。そこで本研究では、ベトナムで流行する PE の特徴を包括的に理解することを目的とし、これまでに実施した臨床株に加え、食品、家畜、環境水などの横断的なサンプルを対象とした PE の調査と研究を行う。

② 研究内容

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

分離・同定：上記試料を、ノボビオシン加 mEC 培地を用いて 42°C で前培養する。複数の腸内細菌科選択分離用寒天培地（DHL、クロモアガー-STECC、XM-G）に培養液を塗抹して培養し、大腸菌様コロニーを各試料から最大 48 コロニー釣菌する。病原遺伝子（*stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st*, *ipaH*, *aggR*）のスクリーニングと大腸菌および *E. albertii* の同定を PCR 法で行う。試料の収集および分離・同定は、井口と Nguyen（参画者）が連携して実施する。必要に応じて、ベトナム拠点およびベトナム国立衛生疫学研究所細菌部スタッフのサポートを受ける。

ゲノム解析：上記スクリーニングで分離した PE の生菌または DNA を精製し、宮崎大学へ輸送する。宮崎大学では、PCR 法により血清型などの詳細を判定し、代表株のゲノム配列を決定する。患者由来株を含めた横断的なゲノム比較解析の結果から、ベトナム国内で汚染・流行している PE の基本的な特徴と関連性を明らかにする。

③ 予想される成果

上述した通り、発展途上国における下痢症の原因となる病原体の汚染源や汚染経路に関する情報は少ない。本研究によって得られるであろう成果は、ベトナムにおける畜・食・医チェーンに潜む PE 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 PE 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 PE と比較することで、細分類された PE 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。

5. 実施報告

① 令和 5（2023）年度実施計画に対する実施状況

当初の計画では、家畜糞便と市販食品（計 20-40 検体）を試料として用いる予定であったが、共同研究者（Nguyen）の指導学生による採材の協力が得られたため、ハノイおよびその周辺地域（計 6 省）に位置する農場から採取した牛、豚、鶏、アヒルの便検体（計 66 検体、表 1）を用いることにした。代表者（井口）は 9 月 5 日から 12 日にかけてベトナム拠点を訪れ、Nguyen およびベトナム拠点のスタッフとともに、材料や方法の調整、予備試験、分離株保管・輸送方法の確認などのセットアップを行なった。

表1. 便検体の採材地と動物種の内訳

Province	Total	Beef	Pig	Duck	Chicken
Dien Bien	11	5	4	2	0
Thai Nguyen	36	14	9	6	7
Phu Tho	4	2	0	1	1
Hai Phong	6	2	2	2	0
Ha Noi	6	2	2	2	0
Cao Bang	3	0	0	1	2
Total	66	25	17	14	10

まず、検体を mEC 培地および mTSB に接種し、その培養液を用いて病原性遺伝子のスクリーニング PCR を行った。また、陽性であった培養液から 3 種類の選択分離培地を用いて陽性株の分離を試みた。分離株（31 株）はベトナム拠点において -80°C で保管し、今後、日本へ輸送して詳細な解析を実施する予定である。

② 成果（結果＋考察）

培養液を用いたスクリーニング PCR の結果、それぞれの病原性遺伝子が 3~22.7 % で検出された（表 2）。志賀毒素産生性大腸菌（STEC）のマーカである *stx1* と *stx2* (*stx2f* を含む) は、それぞれ 4 検体 (6.1%) と 17 検体 (25.8%) で陽性であった。腸管病原性大腸菌 (EPEC) のマーカである *eae* は、4 検体 (6.1%) で陽性であった。腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) のマーカである *estp*、*esth*、*elt* は、それぞれ 9 検体 (13.6%)、5 検体 (7.6%)、5 検体 (6.1%) で陽性であった。腸管付着凝集性大腸菌 (EAEC) のマーカである *aggR* と *E. aalbertii* のマーカ

である Easp1 は、それぞれ 2 検体 (3.1%) で陽性であった。以上の結果より、さまざまな種類の下痢原性大腸菌と *E. albertii* を家畜が保菌していると示唆された。特に、高い割合での STEC の保菌が予想された。

表2. 便培養液を用いた病原性遺伝子のスクリーニングPCRの結果

	Total	Beef	Pig	Duck	Chicken
stx1	4 (6.1%)	4	0	0	0
stx2	15 (22.7%)	10	5	0	0
eae	4 (6.1%)	1	3	0	0
stx2f	2 (3.0%)	1	1	0	0
estp	9 (13.6%)	3	6	0	0
esth	5 (7.6%)	2	3	0	0
elt	4 (6.1%)	3	1	0	0
Easp1	2 (3.0%)	2	0	0	0
aggR	2 (3.05%)	2	0	0	0

次に、上記試験で陽性となった検体の培養液を用いて、陽性株の分離を試みたところ、17 検体から 31 株が分離された。内訳は、*eae* 陽性 STEC が 1 株、*eae* 陰性 STEC が 19 株、EPEC が 11 株であった。STEC はウシとブタからそれぞれ 14 株と 6 株、EPEC はウシ、ブタ、ニワトリからそれぞれ 1 株、5 株、5 株が分離された。残念ながら、ETEC、EAEC、*E. albertii* は分離できなかった。

表3. 分離された下痢原性大腸菌のタイプと由来

マーカー	Total	cattle	pig	chicken	Type
stx1	3	3	0	0	STEC
stx2	14	8	6	0	
stx1+stx2	2	2	0	0	
stx2+eae	1	1	0	0	
eae	11	1	5	5	EPEC

昨年度の調査では、検体を直接、分離培地に塗抹し、生育した複数のコロニーに対してマーカー遺伝子の有無を PCR により確認することで、DEC の分離を行なったが、わずかに 6 株しか分離できなかった。そこで本年度は、まず培養液を用いてスクリーニング PCR を行い、陽性となった培養液のみを用いて 3 種類の選択分離培地 (クロモアガー STEC、DHL、XM-G) で培養し、生育したコロニーに対して分離を試みた。その結果、クロモアガー STEC から 6 株、DHL から 17 株、XM-G から 8 株の計 31 株を分離することができた。以上のように、分離手順を改善することで、多くの DEC を分離することができた。ETEC、EAEC、*E. albertii* も便検体の一部に存在すると予想されることから、今後、手法を工夫して分離を試みたい。

- ③ 成果の公表
該当なし

6. 自己評価

ベトナム拠点スタッフのサポートにより、本研究をスムーズに実施することができた。2022年度には現地の市販食肉（48検体）を用いたDECの汚染調査を実施したが、分離できたDECはわずかに6株であった。2023年度では手法を改善し、共同研究者の協力により、複数の地域・農場を由来とする家畜・家禽の便検体（66検体）を用いて、DEC 31株を分離することができた。現在、2022および2023年度に分離されたDECの宮崎大学への輸送の準備と手続きを、共同研究者の協力により進めている。来年度以降には詳細なゲノム解析を実施し、2021年度までに取得した乳幼児下痢患者由来DECのゲノム情報と比較しながら、横断的な解析へと進展させていく予定である。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で述べてあれば省略可）

令和5（2023）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
課題番号：2023-Kyoten-04

2. 代表者：大分大学 教授 河本 聡志
共同研究者：藤田医科大学 特別研究員 福田 佐織
藤田医科大学 大学院生 畑澤 莉緒奈
藤田医科大学 大学院生 明里 友樹
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 金子 聡
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 井上 真吾

3. 決定額：1,050 千円

4. 研究計画

① 研究目的

ロタウイルス（RV）はヒトをはじめとするほとんどの哺乳動物を宿主とし、重篤な下痢症状を頻繁に引き起こすことから最も主要な胃腸炎ウイルスの一つである。ヒトにおいては、アフリカ・アジアの開発途上国を中心に毎年12万人もの乳幼児が死亡している。このRV胃腸炎に対して2006年に2種の弱毒生ワクチン（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。これらRVワクチンの有効率は先進国ではきわめて高いものの、開発途上国（特にアフリカ・アジア）ではかなり低い。その要因として、アジア・アフリカの開発途上国には、先進国とは異なり特異（非定型的）な遺伝子型を有するRV株が数多く存在すること、動物RV株とヒトRV株間での遺伝子交換（リアソートメント）が頻繁に起きていることなどが推測されるものの未だよくわかっていない。一方で、すでにRVワクチンが導入された国々では、特定のRV遺伝子型が顕著に、また非定型的な遺伝子構成を持つRV株が高頻度に検出されるようになり、分布ヒトRV株の性状に大きな変化が見られるようになった。

本海外拠点連携共同研究では、ケニア拠点でワクチン定期接種の導入以前から継続して収集しているRV下痢症患者の便検体を用いて、RVワクチン接種拡大の前後での分布RV株の遺伝子型の変化、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。本共同研究の成果は、次世代RV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

本研究を実施するために最も重要となるのはケニアでのRV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、申請者が長年の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 Dr. Ernest Apondi Wandera のグループで体制が整っており、ケニア 2 地区 (キアンブ、ビタ) から定期的な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、semi-nested RT-PCR による G/P 遺伝子型の決定といった初期処理については、申請者の技術移転もありケニア拠点/KEMRI で行われており、弱毒生ワクチン導入に伴う RV 遺伝子型の変化についてのデータが着実に蓄積してきた。

本研究では、収集した RV 胃腸炎患者の下痢便検体を用いて、RV ワクチン定期接種が導入される前後でのケニア RV 株の G/P 遺伝子型と遺伝子組合せの変化とそのメカニズム、特にワクチン効果と分布 RV 株の遺伝子型の変化との関連を明らかにすることを旨とする。

研究手法は以下の通りである。

① 急性胃腸炎患者の便検体を収集

共同研究者である Dr. Ernest Apondi Wandera のグループがキアンブ地区、ビタ地区から急性胃腸炎患者の下痢便検体を収集する。RV ワクチン定期接種の導入前後を含む、これまでに収集してきた RV 陽性下痢便検体も本研究で用いる。

② RV G/P 遺伝子型の決定と全ゲノム解析

イーグル最少必須培地 (MEM) で調製した約 20% 便懸濁液から RV ゲノム RNA を抽出し、PAGE 解析で全 11 本からなる分節 RNA ゲノムの泳動パターンを決定する。また、semi-nested RT-PCR により G/P 遺伝子型を決定する。これら 2 つの解析により、ケニアのヒト RV 株について G/P 遺伝子型の変遷が明らかになるとともに、非定型的なヒト RV 株や動物由来のヒト RV 株があれば検出される。

非定型的な RV 株とランダムに選別された定型的 RV 株について、ケニア拠点に設置された次世代シーケンサー (MiSeq) を駆使した全ゲノム解析を行う。得られる次世代シーケンスデータをケニア拠点の専用 PC で解析し、全 11 本の遺伝子分節の各々について系統樹を作成することで、各遺伝子分節の由来を明らかにする。VP7 と VP4 の中和エピトープに大きなアミノ酸変異を持つといった非定型的 RV 株については、MA104 細胞株と回転培養技術を用いてウイルス分離し、RV ワクチン既接種者の血清を用いた中和アッセイを行うことで、RV ワクチンの接種拡大とこれら非定型的 RV 株の出現との関連を明らかにする。

こうして、急性胃腸炎患者の下痢便検体の収集から RV 株のゲノム解析、中和エピトープ解析をケニア拠点で完結させることを旨とするとともに、これら RV 研究における実験・解析の技術と知識の移転も大いに重視したい。

③ 予想される成果

これまでの研究経緯から、ケニアで分布 RV 株の G/P 遺伝子型の変遷を継続して追跡することで、先進国ではほとんど検出されないことのない、動物 RV 由来といった非定型的なヒト RV 株が数多く検出されるものと予想される。特に、ブタやウシといった家畜動物の RV 株由来の遺伝子分節を持つリアソータント株が急性胃腸炎患者から多数検出されると思われる。また、すでに RV1 ワクチンが導入された国々で検出頻度が高くなった DS-1 遺伝子群がケニアでも分布比率を上げてくると思われる。また、

世界レベルで感染拡大している新興のウマ様 (DS-1-like) G3P[8]株が本研究で初めて検出できるかもしれない。実際にこれまでの研究経過で、ケニアでも世界の RV 株変遷と一致してこれまではほとんど検出されることのなかった G3P[8]株の検出頻度が高まっている (Wandera et al., 論文準備中)。ウシ RV 株由来の NSP4 遺伝子を持つ DS-1-like G3P[6]株やブタ RV 株由来の VP1 遺伝子を持つ Wa-like G3P[8]株といった非定型的ヒト RV 株も検出している (Wandera et al., 論文準備中)。中国から報告されてきた新興の G12P[6]株もケニアで検出しており、中国との活発な経済交流に伴い新たな RV 株の侵入も起きていると推測される (Wandera et al., 論文準備中)。ケニアで日々収集されるこうした非定型的ヒト RV 株について、ケニア拠点の次世代シーケンサーMiSeq を用いた全ゲノム解析を実施することで、ケニアひいてはアフリカにおける RV 株の変化と進化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。2020-2022 年は COVID-19 の影響で訪ケできなかったが、2023 年 2 月には実際にケニア拠点で Dr. Ernest Apondi Wandera のグループとの共同研究を実施する。ここで得られた成果を基盤として、2023 年度には、ワクチン効果と分布 RV 株の遺伝子型と性状の変化との関連についての理解が大きく進み、将来に RV 急性胃腸炎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 令和 5 (2023) 年度実施計画に対する実施状況

2024 年 2 月に訪ケして、Dr. Ernest Apondi Wandera とケニア拠点での共同研究を実施した。ケニア拠点/KEMRI で収集していたヒト下痢便検体と動物正常便検体について、これら下痢症患者と動物の背景情報についてディスカッションした後、RV 検出のスクリーニング実験となる PAGE 解析を実施した。申請者、明里大学院生、Dr. Wandera とで便検体からの RV RNA ゲノム抽出、PAGE 解析を行い、ケニア拠点で実施予定の NGS 解析 (ケニア拠点のラボ改修工事で渡航期間中は使用中止) の対象とする便検体の選択を目指した。

一方で、令和 4 年度の海外拠点連携共同研究で検出された、きわめて稀な非定型的ヒト RV である A75 株 (G8P[14]) について、ケニア拠点で Dr. Wandera と論文作成を進めることも目指した。

② 成果 (結果+考察)

ケニア拠点での実験は、日本から持参したキットを用いた RV RNA ゲノム抽出までは順調に進んだものの、PAGE 解析では、ゲル全体が白く濁り、結果を得ることができなかった。Dr. Wandera のグループの PAGE 関連の試薬類に問題があると考え、一部の試薬を更新したところ、良好ではないものの RV RNA ゲノムを検出できるまでには改善された。これは、Dr. Wandera のグループが普段に PAGE 解析を行わなくなったことから試薬類の劣化に気づけなかったことが原因と思われる。次年度は、PAGE 解析に使用する試薬類についても一通りを日本から持参する必要があるように思われる。

これまでの Dr. Wandera との共同研究で検出していた A75 株 (G8P[14]) についての NGS データ解析については、ケニア拠点で大きく進めることができた。A75 株の遺伝子型構成は G8-P[14]-I2-R2-C2-M2-A11-N2-T6-E2-H3 であり、偶蹄類 RV に特徴的であった。VP7 遺伝子はスロベニアのシカ D110-15 株 (G8P[14]) (97.3%)、VP4 遺伝子は南アフリカのバッファロー 4426 株 (G29P[14]) (92.2%)、VP6 は南アフリカのアンテロープ RC-18-08 株 (G6P[14]) (97.6%)、VP1、VP2、NSP2、NSP4 遺伝子はケニアのウシ様ヒト B12 株 (G8P[1]) (各 97.1%、96.9%、98.6%、97.5%)、VP3 遺伝子はタイのウシ A44 株 (G10P[11]) (96.4%)、NSP1 遺伝子はハンガリーのウシ様ヒト Hun5 株 (G6P[14]) (93.8%)、NSP3 遺伝子はアイルランドのキリン GirRV 株 (G10P[11]) (96.4%)、NSP5 遺伝子はガーナのウシ様ヒト M0084 株 (G6P[14]) (96.1%) と最も高い相同性 (%) を示した。さらに、系統樹解析からは、A75 株の 11 遺伝子はいずれもヒト RV よりも偶蹄類 RV に近縁であることが明らかになり、A75 株は偶蹄類からヒトに直接に種間伝播した偶蹄類 RV に由来することが強く示唆された。

ケニアにおいては 2014 年 7 月から弱毒生ヒト RV ワクチン (RV1) が接種導入された。わが国や欧米といった先進国では、接種拡大とともに RV 下痢症患者数は大きく減少したが、アフリカ・アジアの発展途上国の国々では RV は依然として蔓延している。こうした、ワクチン接種率が低くて、RV が蔓延する地域では、人獣共通感染症としての一面も持つ RV がヒトの間、および動物との間で感染伝播を繰り返しており、結果として世界的な新型ヒト RV 流行株が発生する可能性は高くなる。A75 株のような新興株がヒトに適応して感染拡大する可能性が危惧される。ケニア拠点で RV 流行株の性状把握について、注意深く監視を継続する必要がある。

③ 成果の公表

該当なし (A75 株について原著論文を準備中であり、令和 6 年度に海外雑誌に投稿予定である)

6. 自己評価

ケニア拠点において、私たちは10年来の研究交流を通じてELISA、PAGE、RT-PCRによる下痢症患者下痢便のRV検出スクリーニング、Wa/DS-1遺伝子群の判別、G/Pタイピング、次世代シーケンシングを技術移転してきた。しかし、Dr. Wanderaのグループでは中堅の若手研究者が異動したために、これら実験の一部が継続されていないことが明らかになった。これら実験を一連して実施することの重要性を丁寧に説明するとともに、普段も日本から遠隔で研究支援することの重要性を感じた。そこで、大分大学グローバル感染症研究センター共同研究経費により2024年3月にDr. Wanderaに大分大学へ来日してもらい、これらRV研究における基本的な実験手技および、NGS解析についての技術移転を再度実施することで、次年度以降のケニア拠点を活用したRV共同研究を大きく発展させる道筋をつけることができた点には満足している。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で述べてあれば省略可）

令和5（2023）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアにおけるマイコトキシン産生菌の地理的分布に関する研究
課 題 番 号：2023-Kyoten-05

2. 代 表 者：千葉大学 真菌医学研究センター 准教授 矢口 貴志
共 同 研 究 者：千葉大学 真菌医学研究センター 特任研究員 吉岡 育哲

3. 決 定 額：900 千円

4. 研究計画

① 研究目的

代表的なマイコトキシンには、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus parastictus* 等の真菌により産生されるアフラトキシンがあり、収穫したトウモロコシへの汚染が問題となっている。肝毒性をもち、その発がん性も問題となっている。また、小児に対する成長阻害も報告されており、ケニアのみならず、熱帯地域の問題とされている。また、トウモロコシの汚染としては、フモシニンも熱帯地域においては問題とされている。胎児の神経管閉鎖障害、食道がんなどのリスクが報告されている。それ以外にも、コーヒー豆を汚染する *Aspergillus* 属が産生する発がん性を有するオクラトキシンなどマイコトキシンもあり、それらの原因真菌の地理的分布を把握することは、ケニアにおける潜在的健康被害を予防する基礎情報として重要である。

② 研究内容

本研究では、ケニア国内の農地、道路などの環境中のマイコトキシン産生菌の分布調査を実施し、同国におけるマイコトキシンによるリスク評価を行うことを目的とする。

1. ケニア国内の土壌の採集

KEMRI の研究者と共に、ケニア国内の農地などを中心にマイコトキシン産生菌が生息していると予想される土壌を採集し、ケニア国内の許可、植物防疫所の許可を取得して日本国内に輸入する。

2. 土壌からの微生物由来の DNA 抽出および解析

輸入した土壌から DNA 抽出キット（ISOIL（ニッポンジーン社））を使用し、微生物由来の DNA を抽出する。その DNA を原因菌の ITS 領域に特異的な PCR プライマーで増幅し、菌種を決定する。一方でマイコトキシン産生菌と近縁（あるいは同種）であってもその生合成遺伝子に欠失を有することで産生能を示さない菌株が存在する。したがって、検出された原因菌に対してマイコトキシンの生合成遺伝子を対象とした PCR により二重にチェックを行い、汚染リスクを評価する。

3. 土壌からのマイコトキシン産生菌の分離

土壌から抗真菌薬などによる真菌の選択的分離を行う。単離された株について菌種を同定し、DNA データと比較する。

③ 予想される成果

ケニア国内の環境中のマイコトキシン産生菌の地理的分布実態を明らかにすることにより、マイコトキシンによる健康被害の可能性を示すとともに、ケニア国民の健康を守る活動の基礎情報とする。また、マイコトキシン発生株の詳細な検討を行い、新たな真菌、生理活性物質探索の可能性を検討する事が可能となる。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

1. ケニア国内の土壌の採集

KEMRI の共同研究者が、ケニア国内の農地などを中心にアフラトキシン (AF) 産生菌が生息していると予想される土壌を採集した。ケニア国内の輸出許可申請が遅れたため、熱研ケニア拠点において、土壌より DNA を抽出した。

2. *Aspergillus flavus* および近縁種の分子系統

これまでの研究においてケニアの穀物などから分離し、形態的に *A. flavus* と同定された菌株を b-tubulin および calmodulin 遺伝子の塩基配列を決定し Blast 検索を実施した。その結果、*A. flavus*、その関連種である *A. tamarisii*、*A. toxicus*、*A. minisclerotigenes* と同定した。その結果を系統樹に示した（図 1）。

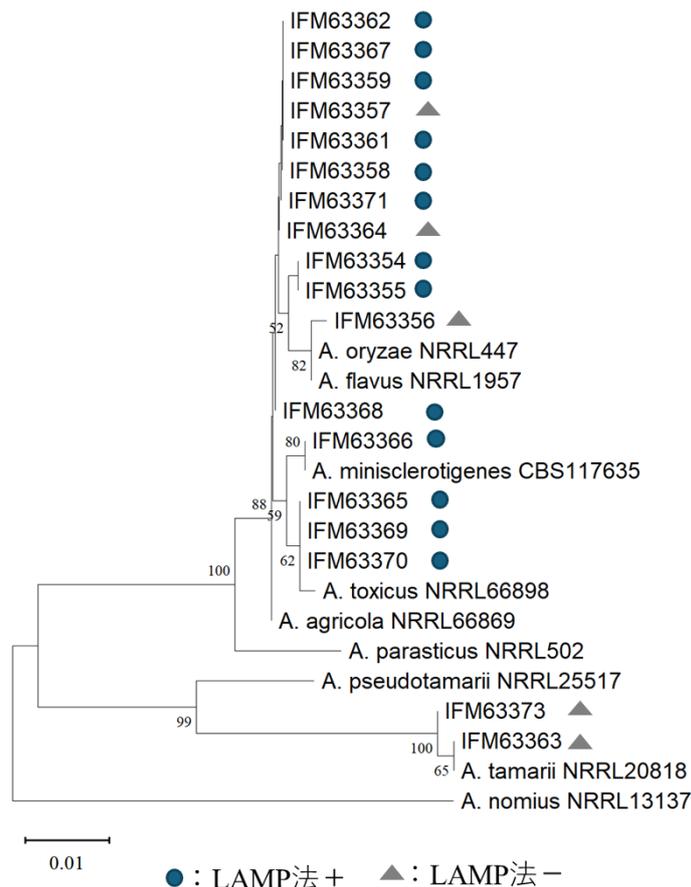


図 1. ケニア産 *Aspergillus flavus* および近縁種の分子系統関係と LAMP 反応による NorA の遺伝子の検出

3. ケニア産 *Aspergillus flavus* および近縁種の AF 産生遺伝子の LAMP 法による検出

AF 生合成における重要な酵素であるノルソロリン酸還元酵素 NorA の遺伝子として *nor1* を特異的に検出するプライマー (表 1) を使用して、ケニア産菌株において LAMP 反応を実施した。その結果、AF 産生遺伝子が *A. flavus*、*A. toxicus*、*A. minisclerotigenes* において検出されたが、醤油の生産に使用される *A. tamaris* からは検出されなかった。また、AF 産生菌として知られている *A. nomius*、*A. parasticus* からは検出することができ、一部の *A. flavus* (IFM 63355、63356、63364) からは検出されなかった (図 1 に表示)。この 3 株においては AF 産生量が 0.001 µg/g (ppm) と非常に低く、*nor1* が欠損している、もしくは大幅に変異が入って生産能を損出したと考えられた。

Primer name	Sequence 5'>3'
F3-nor1 ID8	ACT GCG ACT CGG AAA GYG A
B3-nor1 ID8	GGA CTG CTG CAG CAT CAG
FIP-nor1 ID8	GGC CCA AAG TTC TGC GCC AT-C CAG ACA TTG CGG GAR GA ^a
BIP-nor1 ID8	ACC ATG CCC CTC GAR CAT CT-G CGG GTT GCC TGA AAC AG ^a
LF-nor1 ID92	ACY ACC ACG TCC AAG TGC
LB-nor1 ID92	TGA TGG TCA AYA TGT ATG CTC C

^aHyphen indicates junction between F1c/B1c (left) and F2/B2 (right) parts of FIB/BIP primers.

4. ケニアの土壌からの微生物由来の DNA 抽出および解析

ケニアにおいて土壌から DNA 抽出キット (DNeasy PowerSoil Pro Kits (ニッポンジーン社)) を使用し、微生物由来の DNA を抽出した。その DNA を上記プライマーを使用して LAMP 反応を実施した。その結果、ケニア土壌 20 検体中 5 検体において、AF 産生遺伝子 *nor1* を検出した。これらの土壌には、AF 産生菌が高頻度に分布していて、汚染のリスクが高いと推定された。

② 成果 (結果 + 考察)

KEMRI 所属の研究者と共同で、これまでケニア各地で収集した穀物などにおいて、カビ毒の検出を実施してきた。これまでの解析結果から、アフラトキシンは、中心部のナイロビを含めケニア全体から検出されたが、フモニシンは東部からの検出が、ナイロビ、西部よりも高い傾向があったのは、地域によるカビ毒産生の違いは、気温、降雨量など気候の差によると考えられた。今回、AF の産生が認められた *A. flavus*、それ以外の汚染原因菌および AF の非産生菌の分子系統学的解析を実施し、菌学的な位置づけを確認した。

土壌中に生息する AF 産生菌のリスク評価において、AF 生合成における重要な *nor1* を特異的に検出するプライマーを使用して、土壌から微生物由来の DNA 10 ng あれば、*nor1* を特異的に検出できることを確認した。

③ 成果の公表 なし

6. 自己評価

土壌中に生息する AF 産生菌のリスクを正確に評価するには、AF 産生の報告がある菌種の検出ではなく、AF 産生に関連する遺伝子を有する菌株の検出が重要である。実際に、土壌から微生物由来の DNA 10 ng 抽出できれば、*nor1* を特異的に検出できることを確認した。この結果は、ケニアにおける穀物が土壌由来の AF 産生菌による汚染リスクの評価に応用できる。

しかし、土壌からの AF 産生菌の分離には至らなかったため、II（不満は残るが一応の成果を挙げられた）の達成度と考える。

7. 達成度（何れかに○）

I （所期の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）

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」で記述

令和5（2023）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課題名：アフリカ辺境地域における潜在性結核の実態と発症リスクの予測手法の構築
課題番号：2023-Kyoten-07

2. 代表者：東京女子医科大学 助教 風 幸世
共同研究者：京都府立大学 准教授 岡 真優子
新潟大学 主任教授 松本 壮吉
東京女子医科大学 准講師 岩下 華子
東京農業大 大学院生 木住野 円華
長崎大学 主任教授 金子 聡
長崎大学 助教 日達 真美
長崎大学 主任教授 濱野 真二郎
長崎大学 助教 中村 梨沙

3. 決定額：1,350 千円

4. 研究計画

研究目的

結核は世界人口の 23%にあたる約 17 億人が感染し、年間 130 万人が死亡する深刻な感染症である。結核への感染は結核発病者からの、せきやくしゃみを介した空気感染によって、ヒトが結核菌に曝露することにより成立する。しかし結核菌に感染後、一生涯において発症し感染性を有する活動性結核まで進展するのは全体の約 10%弱であり、残り 90%は無症候性かつ、感染性のない潜在性結核の経過をたどる。多くの成人性肺結核が潜在性結核の再燃に起因するが、未だ結核の発症を事前に捉えることが出来ない。

とくに潜在性結核は臨床症状がなく正確な診断法が確立されていないために、その実態は十分には把握されていない。しかし、膨大な潜在性結核感染者から高発症リスク者の条件を見出すことが出来れば、早期発見・治療による結核伝播の制圧が可能となる。

本研究では、HIV 感染と栄養不良が蔓延する西ケニア辺境ヴィクトリア湖畔のビタ地域において湖岸の漁村と内陸集落に居住する子どもを対象として、1) 結核感染と栄養不良の有病割合を明らかにし、2) 結核感染とそのリスク要因を検証する。さらに 3) 結核感染者から高発症リスク者を予測するため発症フォローアップの基盤構築を目指す。

① 研究内容

本研究では、調査地域の子どもを対象として、結核感染の検出、栄養状況の評価のための各種身体測定、および寄生虫感染の検出を実施した。なお研究同意取得の世帯訪問に際しては、世帯構成員の結核感染の有無などについて質問票を用いた聞き取り調査を実施した。

下記にそれぞれの調査概要を示す。

I. 結核感染の検出

結核感染の判定にはインターフェロン- γ (IFN- γ) 遊離試験 (IGRA) の QuantiFERON TB Gold Plus test (QFT-Plus; QIAGEN 社製) を使用した。陰性コントロール (Nil)、CD4 細胞反応性結核菌抗原 (TB1)、CD8 細胞反応性結核菌抗原 (TB2)、陽性コントロール (Mitogen) の 4 本の試験管に全血 (各 1 mL) を加えたのち、37°C で 16-24 時間培養し、上清中の IFN- γ 量を ELISA 法 (QIAGEN) で定量した。解析には QuantiFERON TB ゴールドプラス解析ソフトウェア Vol. 2.71 を用いて、Nil < 8.0 IU/mL を示した対象者を解析した。QFT 陽性は、TB1 \geq 0.35 IU/mL かつ 25% of Nil、または TB2 \geq 0.35 IU/mL かつ 25% of Nil で、これらを結核感染者とした。一方、QFT 陰性は Mitogen > 0.5 IU/mL であることを条件に TB1 および TB2 共に < 0.35 IU/mL、または TB1 および TB2 共に \geq 0.35 IU/mL かつ < 25% of Nil で、これらを非結核感染者として判定した。

II. 各種身体測定について

本研究では、身体測定として身長、体重、握力、上腕二頭筋周囲径、ふくらはぎ周囲径、体脂肪率、血圧の測定を行った。また身体測定値と各種血液生化学検査結果等との関連を調べるため、血液の採取を併せて実施した。

栄養不良の有病割合は、1) WHO の BMI 基準を用いた栄養評価ならびに、2) WHO Child Growth Standards and the WHO Reference 2007 を基準とした場合の、対年齢身長比 (Height for age Z score: HAZ) と対年齢体重比 (Weight for age Z score: WAZ) について評価を行った。なお対象児の HAZ と WAZ の評価には、WHO AnthroPlus を使用し、5-19 歳を対象とした WHO 基準からそれぞれ -2SD 未満を発育阻害 (stunting)、消耗症 (wasting) と判定した。正確性を期すため年齢は Birth certificate (出生届) による確認を行った。

III. 寄生虫感染の検出について

調査地域において蔓延状況にあることが報告されている主な寄生虫であるマンソン住血吸虫、土壌伝搬蠕虫 (回虫、鉤虫、鞭虫) とマラリア原虫の検出を行った。具体的には、マンソン住血吸虫と土壌伝搬蠕虫の検出は、便サンプル中の虫卵の有無を光学顕微鏡下で観察し判定を行った。なお、虫卵の検出方法には虫卵数の算出が可能な Kato-Katz 法を使用した。マラリア原虫への感染は、イムノクロマト法による迅速診断キットを用い血液中の原虫タンパク検出により熱帯熱マラリアへの感染の有無を判定した。

② 予想される成果

- 1) 西ケニア边境ビタ地域の対象児における潜在性結核の有病割合を明らかにすることができる。
- 2) 対象地域の潜在性結核の有病割合を明らかにすることで、将来的に結核発症の可能性を保持する集団を把握できる。
- 3) 対象地域における結核感染リスクを明らかにすることで、結核対策を行うための政策立案の指針を提示できる。

5. 実施報告

① 令和 5 (2023) 年度実施計画に対する実施状況

2024 年 1-2 月 (14 日間) に、対象地域に居住する子ども 343 名 (女児 : 176 人、男児 : 167 人) を対象として、1) 結核菌感染の診断、2) 各種身体測定、および 3) 寄生虫感染検査を実施した。各項目についての結果は以下の通りである。

② 成果（結果＋考察）

I. 結核感染の検出について

1. BCG ワクチン接種状況を質問表と目視での BCG 接種の癍痕により確認したところ、**BCG ワクチン接種率は、98.5% (338/343)** であった。
2. QFT-Plus テストを実施した対象児の**結核陽性率は 2.3% (8/343)** であった。

WHO による結核陽性率（推計）は、23%であることから、本研究の結核陽性率は WHO の推計値と比較すると非常に低値であった。このことは、小児では免疫応答に重要な役割を果たす胸腺の発達が未熟なため、現在の QuantiFERON 法では結核感染を捉えきれしていない可能性がある。

3. **結核陽性者の内訳は、女児 5 人、男児 3 人であった。**
4. 結核の陽性判定を受けた 8 人の子どもは、すべて同一の小学校に通学していた。そのうち 1 名は、質問表より長期間の咳症状が確認され、現地の医師により活動性結核が疑われたため、児童の家族と共に地域病院で喀痰検査と X 線検査を受け、活動性結核と診断された。その後、児童のみ DOTS（直接服薬確認療法）による治療を開始した。
5. 対象児と同一世帯に陳旧性活動性結核患者がいる割合は、16.5% (20/330) であった。
6. 同一世帯に陳旧性活動性結核患者がいる場合、対象児の結核感染の有病割合は 15%(3/20)、同一世帯に結核感染者がいない場合は、1.6%(5/310)であった。
7. 対象児の結核感染のリスク要因について、結核感染の有無と説明変数の関連をロジスティックス回帰分析で検定した。その結果、結核感染のリスクは、子どもが重度の発育阻害の場合($P=0.035$)と、同一世帯に過去に活動性結核患者がいる場合に高いことが確認できた($P=0.007$)。なお、**年齢や性別による結核感染の差はみられなかった（各 $P=0.618, P=0.216$ ）。**

下記に被説明変数と説明変数の内訳ならびに解析結果を示す。

被説明変数（アウトカム）：結核感染の有無

説明変数（結核感染のリスク要因）：年齢（Age）、性別（Sex）、発育阻害（HAZ）の重症度（発育阻害なし、発育阻害:stunting、重度の発育阻害:sever stunting）、BCG 接種の有無(BCG)、住血吸虫症感染の有無（S. mansoni）、マラリア感染の有無（Malaria）、同一世帯者における結核感染者の有無（TB member）

表 1. 西ケニア边境ビタ地域における 6-16 歳児の結核感染のリスク

		Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)		-21.4605	7041.6859	-0.003	0.99757
Age		0.1330	0.2664	0.499	0.61771
Sex	Male	-1.2627	1.0195	-1.239	0.21551
HAZ	1.stunting	1.3826	1.3489	1.025	0.30538
	2.severstunting	3.4032	1.6159	2.106	0.03520 *
BCG	1.Yes	16.1957	7041.6850	0.002	0.99816
S. mansoni	1.Positive	-0.6836	0.9420	-0.726	0.46804
Malaria	1.Positive	-16.8209	2701.7297	-0.006	0.99503
TB member	1.Yes	2.7885	1.0404	2.680	0.00736 **

II. 各種身体測定の結果について

本研究では、身長と体重の測定値を使用した栄養状況の結果について報告する。

- WHO の BMI 基準を用いた栄養評価では、低栄養（*undernutrition*）の子どものうち、**低体重 (BMI:18.5 未満) の有病割合は 93.6% (321/343)**であった。過栄養のうち 0.3% (1/343) は過体重 (BMI:25.0-29.9) で BMI 値は 25.1 であった。なお、栄養不良でない子ども (BMI:18.5-24.9) は、全体の 6.1% (21/343) であった。
- 図 1 は、WHO Child Growth Standards and the WHO Reference 2007 を標準にした場合の対年齢身長比 (HAZ) の Z スコア分布である。中央の緑色ラインは HAZ 基準値であり、対象児の HAZ 値 (赤色ライン) は全体的に基準値よりマイナス側 (左側) にシフトしている。このことは、調査対象集団では発育障害の子どもが多い傾向を示す。同様に表 2 は、HAZ の Z スコア値を示している。HAZ の全体平均値は負の値 (-0.2) を示しており、発育障害児の占める割合が高い傾向にあることが確認できる。
- 栄養不良のうち慢性的な栄養不良を示す発育障害 (*stunting* : HAZ<-2SD) の有病割合は **8.5%(29/343)**であった。そのうち、2.0%(7/343)が重度の発育障害 (HAZ<-3SD) であった(表 2)。
- 年齢別の発育障害児 (HAZ<-2SD) の割合は 5-9 歳 : 2.0%、10-14 歳 : 10.0%、15-19 歳 : 36.4%であり、年齢が高いほど発育障害の割合が高い傾向が見られた(表 2)。
- 栄養不良のうち年齢に比較して低体重を示す消耗症 (*wasting* : WAZ<-2SD) の有病割合は **6.7%(8/119)^{注)}**であった。注) ただし WHO による消耗症の判断基準では、年齢が 10 歳以内のみ評価可能である。本調査では年齢が 10 歳以内の対象者は 34.7% (119/343) であった。

図 1. WHO Child Growth Standards and the WHO Reference 2007 を標準にした場合の対象者の対年齢身長比 (Height for age Z score: HAZ)

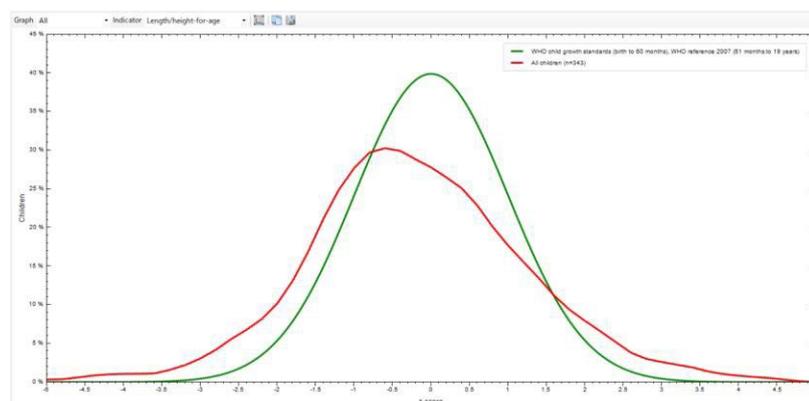


表 2. 対年齢身長比 (Height for age Z score: HAZ)

Age groups		Sample size	Length/height-for-age (HAZ)(%)			
Years	Months		% < -3SD	% < -2SD	Mean	SD
Total (5-19)	(61-228)	343	2.0	8.5	-0.2	1.41
Total (5-9)	(61-119)	102	1.0	2.0	0.59	1.28
Total (10-14)	(120-179)	230	2.2	10.0	-0.49	1.31
Total (15-19)	(180-228)	11	9.1	36.4	-1.47	1.32

III. 寄生虫感染の結果について

1. 調査地域における主要な寄生虫感染の検査を実施したところ、**57.1% (95%信頼区間 [CI] : 51.7-62.4 %)**がマンソン住血吸虫に感染していた。またマラリアの有病割合は、**10.4% (95%CI : 7.1-13.6 %)**であった。そのほか土壌伝搬蠕虫（回虫、鉤虫、鞭虫）の有病割合は 0%であった。
2. 住血吸虫とマラリアの重複感染は 6.4% (95%CI : 3.7-9.0%)であった。また結核菌感染も含め、上記のすべてに感染している子どもはいなかった。

③ 成果の公表

- 1) 日米医学協力計画 抗酸菌症専門部会 日米合同会議 ポスター発表

Mayuko Osada-Oka*, Sachiyo Nagi*, Asena E. Chadeka, Ngetich B. Cheruiyot, Betty Muriithi, Mami Hitachi, Satoshi Kaneko, Shinjiro Hamano, Sohkiichi Matsumoto

Study of Infection Rates with Mycobacterium tuberculosis and nutritional status among school children around Lake Victoria in Kenya, The U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program: Mycobacterial Diseases Panel Meeting 2024, 25-26 April, 2024, Okinawa

- 2) 論文発表（査読有）

Kishino M, Hida A*, Chadeka EA, Inoue M, Osada-Oka M, Matsumoto S, Njenga SM, Hamano S, Nagi S*. Association between diet quality and risk of stunting among school-aged children in *Schistosoma mansoni* endemic area of western Kenya: a cross-sectional study. Trop Med Health. 2024 Jan 17;52(1):12.

6. 自己評価・謝辞

海外拠点連携共同研究では、短期間で西ケニア辺境ヴィクトリア湖畔の対象児における結核の有病割合を明らかにすることができた。

将来的に結核発症の可能性が高い潜在性結核感染の子どもを検出できたことは、対象地域における結核菌感染リスクや結核対策を行うための政策立案につながるため重要である。なかでも今回の調査によって、対象地域における結核感染の伝播経路として世帯内での結核菌曝露が、子どもを通して学校で感染が拡大している可能性を示唆する結果が得られた。このことは、活動性結核発症の早期発見と治療を強化し、さらには高結核発病リスク者の予測を確立する必要性を明示しており、本研究により同地域の結核予防対策につながるエビデンスの提示ができるものと考えている。

本研究対象地域の西ケニア辺境ビタ県は、HIV 感染率が 25.7%とケニア国内で最も高く、ケニアの他地域と比較して結核菌への曝露が高いことが予測される。本調査を足がかりとして、共同研究者とともに潜在性結核児の結核発症リスク予測に取り組み、結核の感染拡大を防ぎたい。

そのため、結核の高発症リスク期間は初感染から 2 年間であるとの知見に基づき、R5 (2023) 年から R7 (2025) 年にかけて、結核発症のフォローアップ実施を計画している。今後、結核の発症リスク予測を確立していくにあたっては、子どもを少なくとも 2025 年まで継続してフォローアップするための現地での支援が欠かせない。このたびの長崎大学ならびに海外拠点の皆さまからの多大なご支援に感謝するとともに、引き続き基盤固めに向けたご高配とご助力を切にお願い申し上げます。

7. 達成度 (何れかに○)

- I (所期の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)
- 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」で述べてあれば省略可)

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（令和5年度）

区分	氏名	所属・職名
学外委員	かわべ しんいちろう 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・センター長
	まつもと そうきち 松本 壮吉	新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授
	◎にしぞの あきら 西園 晃	大分大学医学部・教授（副学長）
	みやざわ たかゆき 宮沢 孝幸	京都大学医生物学研究所・准教授
	あ と まなぶ 阿戸 学	国立感染症研究所・感染制御部・部長
	さ さ き さとし 佐々木 敏	東京大学大学院医学系研究科・教授
	ひ が ゆ き こ 比嘉 由紀子	国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長
	み さ づ ちづる 三砂 ちづる	津田塾大学 学芸学部 多文化・国際協力学科・教授
学内委員	ないとう まり こ 内藤 真理子	長崎大学医歯薬学総合研究科・教授
所内委員	やまもと たろう 山本 太郎	長崎大学熱帯医学研究所（環境医学部門）・教授
	ありよし こうや 有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所（臨床研究部門）・教授
	かねこ さとし 金子 聡	長崎大学熱帯医学研究所（アジア・アフリカ感染症研究施設）・教授
	は せ べ ふとし 長谷部 太	長崎大学熱帯医学研究所（アジア・アフリカ感染症研究施設）・教授
オブザーバー	かねこ おきむ 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・所長
	はまの しんじろう 濱野 真二郎	長崎大学熱帯医学研究所・副所長（運営管理担当）

◎印は議長

長崎大学熱帯医学研究所

令和6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 <https://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/>