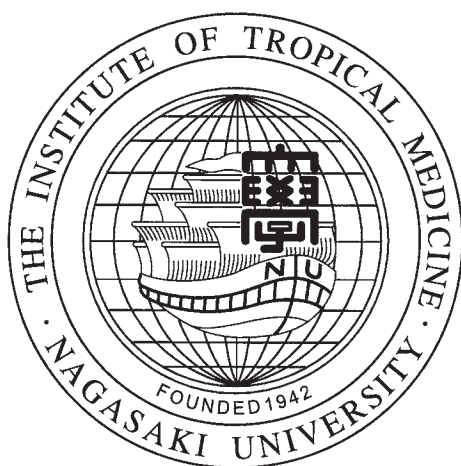


熱帯医学研究拠点共同研究報告集

令和6年度
(2024)



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、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 2000 年の時点より増えてしまいました。さらに、令和 7 年に入り、米国による国際保健分野への拠出金が削減されたことを受け、WHO をはじめとする国際保健機関は、事業の見直しや予算規模の縮小を余儀なくされつつあります。こうした動きは、多国間連携を基盤とする国際保健の枠組みに対する見直しや再構築の機運を高めており、保健分野においても、グローバルな協調体制が必ずしも前提とされない局面が増えつつあることがうかがえます。

長崎大学熱帯医学研究所は熱帯医学及び国際保健における先導的研究、及び、それらの応用による熱帯病の防圧と健康増進への国際貢献、それらにかかわる研究者と専門家の育成をミッションとし、アジア・アフリカ感染症研究施設（ケニア拠点、ベトナム拠点）などの研究基盤を背景として国内外の多様な領域の研究者とともに熱帯地域の現場に根ざした研究を遂行しています。特に、文部科学省共同利用・共同研究拠点「熱帯医学研究拠点」事業では、以下にあげる活動を通して、熱帯医学領域の学術の向上と世界的な感染症対策へ寄与することを目指します。

1. 国内外の研究基盤を活用した共同研究

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。

世界の保健情勢が複雑化し、不確実性が高まっている現在、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少しでも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. サルモネラ感染マウス脾臓組織の scRNA-seq 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）…………… 1
2. 次世代型組換えウイルスベクターを用いた熱帯熱マラリアワクチンの細胞性免疫応答の解明
代表者：山本 祐太郎（金沢大学 助教）…………… 8
3. Discovery of antiparasitic 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)) …………… 14
4. 原虫を認識する免疫受容体の探索とリガンド同定
代表者：三宅 靖延（佐賀大学医学部 分子生命科学講座 准教授）…………… 24
5. 住血吸虫保存系の開発
代表者：王寺 幸輝（奈良県立医科大学病原体・感染防御医学 准教授）…………… 29
6. Salmonella Paratyphi C による腸チフス感染モデルと持続感染因子
代表者：森田 昌知（国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官）…………… 35
7. Evaluation of the effect of OlysetPlus ceiling nets on the containment of
artemisinin-resistant Plasmodium falciparum in Kagera, Tanzania
代表者：Chim Wai Chan (Lecturer, Osaka Metropolitan University) …………… 39
8. ガーナにおけるフランベジア調査研究に向けた遺伝子配列解読プラットフォームの構築
代表者：和田 崇之（大阪公立大学 生活科学研究科 教授）…………… 48
9. デング熱ウイルスワクチン研究開発基盤の確立
代表者：成相 裕子（島根大学新興感染症ワクチン・治療用抗体研究開発センター 助教）… 52
10. 内臓型リーシュマニア症の新規治療薬開発
代表者：後藤 康之（東京大学 教授）…………… 55
11. 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（信州大学医学部公正研究推進講座 助教）…………… 61
12. 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 環境衛生解析学講座 助教）…………… 66
13. コンゴ民主共和国にて採集された殺虫剤抵抗性蚊に対するマイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析
代表者：佐藤 朝光（福岡大学 教授）…………… 71

14. 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（広島大学大学院医系科学研究科生薬学 教授）	76
15. 熱帯病を対象とした創薬開発を指向した微生物資源のケミカルバイオロジー	
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）	80
16. Persistence of immunological memory to malaria infection in the absence of transmission	
代表者：Maria Lourdes M. Macalinao	
(Science Research Specialist II, Research Institute for Tropical Medicine	
Department of Health (RITM-DOH), Philippines,)	87
17. オートファジー関連因子を標的としたシャーガス病の新規治療薬の開発	
代表者：彦坂 健児（千葉大学大学院医学研究院 准教授）	93
18. 集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析 (令和5年度一般共同研究採択課題)	
代表者：森田 昌知（国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官）	99

第2部 研究集会

1. 第15回長崎・シンガポール医学シンポジウム	
代表者：泉川 公一（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授）	103
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国際シンポジウムの開催	
代表者：吉岡 浩太（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）	106
3. 医学公衆衛生学研究のための倫理に関する国際セミナー	
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）	110

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）	113
2. 迅速診断キット（Lateral Flow Device）を用いた狂犬病の分子疫学的研究の検討	
代表者：君付 和範（大分大学医学部微生物学講座 講師）	117
3. ケニアにおけるワンヘルスな視点からのロタウイルス流行株の解析	
代表者：河本 聡志（大分大学グローバル感染症研究センター 教授）	122
4. ケニアのコウモリにおけるフィロウイルス感染症の疫学調査	
代表者：梶原 将大（北海道大学 准教授）	127
5. ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査	
代表者：早坂 大輔（山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 教授）	133
6. 尿路感染症起因菌における mcr 遺伝子および可動性プラスミドの保有実態に関する研究	
代表者：中山 達哉（広島大学大学院統合生命科学研究科 教授）	145

(附) 熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿	151
-----------------------	-----

第 1 部

一 般 共 同 研 究

令和 6（2024）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 scRNA-seq による単一細胞解析
課 題 番 号：2024-Ippan-04
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 特任研究員 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 特任研究員 山下 舞花
長崎大学熱帯医学研究所 教授 児玉 年央
長崎大学熱帯医学研究所 准教授 日吉 大貴

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

食中毒原因菌のサルモネラ (*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)。感染者の大半が人畜共通感染性の非チフス性サルモネラ (non-typhoidal *Salmonella* [NTS]) による下痢や胃腸炎症である一方、最大 130 万人といわれる感染死亡者の大部分 (88%) は、チフス菌 (血清型 Typhi) などの「チフス性サルモネラ (Typhoidal *Salmonella*)」や、一部のネズミチフス菌 (血清型 Typhimurium) などからなる「侵襲性非チフス性サルモネラ (invasive non-typhoidal *Salmonella* [iNTS])」の侵襲感染症によるものである (Hiyoshi et al., *FEMS Microbiol Rev* 2018)。適切な抗生物質治療により、その致死率は 1%程度に抑えられてきたが、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ている。薬剤耐性サルモネラによる侵襲感染の致死率は 10%以上にのぼり、その世界的伝播の脅威から WHO は 2017 年に優先的に対処すべき病原体に指定した。

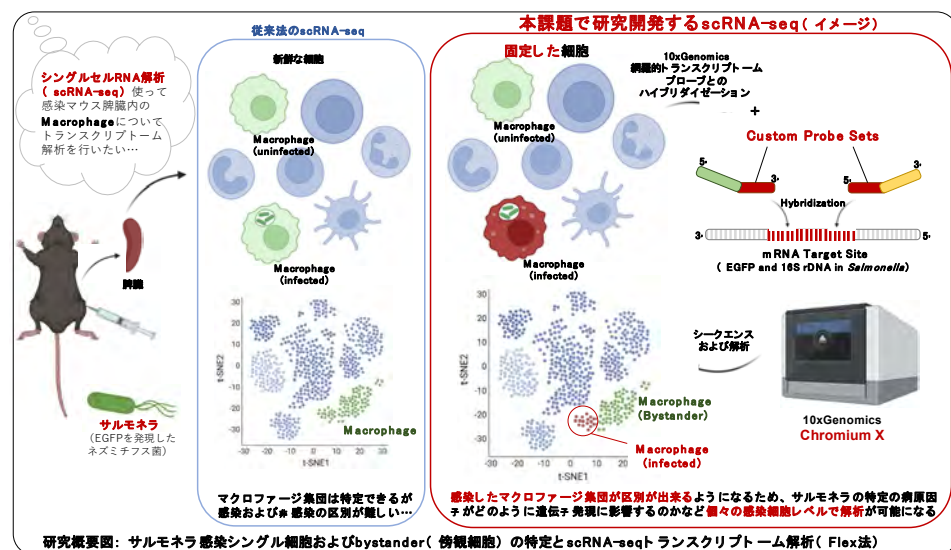
サルモネラの侵襲感染発揮メカニズムや宿主免疫との相互作用を解析する *in vivo* モデルとして、伝統的に「ネズミチフス菌」を用いたマウス感染モデルが使われる。これまでそのマウス感染モデルにより、サルモネラ病原性遺伝子島 2 (SPI-2) にコードされた「III 型分泌装置 (T3SS-2)」が、侵襲感染に重要な病原因子として特定されている (Ochman et al., *PNAS*. 1996)。T3SS-2 の侵襲感染における役割は、細胞内寄生菌であるサルモネラがマクロファージ内で生存・増殖することであると長い間考えられてきた。しかし共同研究者の日吉らのグループによって、サルモネラは浸潤してきた「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

エ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した (Hiyoshi et al., *Cell Host Microbe*. 2022)。このようなことから、好中球を含む免疫細胞とサルモネラの相互関係についてより詳細な解析が必要であると考える。

一般的に感染した宿主免疫細胞の heterogeneity や免疫反応を解析する場合、標的となる組織の細胞を用いた Fluorescence-activated cell sorting (FACS) や定量 PCR (qPCR) を組み合わせた解析が主流であるが、この方法では組織内にある個々の単一免疫細胞のトランスクリプトーム解析を行うことは非常に困難である。このようなことから近年では、組織全体のより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用いた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 の報告は現状ではあまりないが、サルモネラ感染で認められる異なるマクロファージのサブセットのうち特殊なサブセット (CD11b⁺CD9⁺) を scRNA-seq により見出され、その細胞中でサルモネラは選択的に増殖することが明らかにされた (Hoffman et al., *Immunity* 2021)。しかしこの論文でもそうであったが、感染したシングル細胞を scRNA-seq で解析するためには、FACS により組織サンプルから感染細胞をソーティングするステップが必要であった。すなわち (GFP 等を発現した) 標識菌体を指標に感染細胞をソーティングした場合は、結果として感染細胞しか解析できず、一方マクロファージなどの特定の細胞種でソーティングした場合には感染・非感染細胞どちらも解析できるが、組織内 (バルク) に存在する他の免疫細胞のトランスクリプトーム解析は出来ないうえ、抗体の性能に依存した少数サブセットの見落としなど、バイアスが掛かることを意味している。

そこで本研究課題では、サルモネラが感染している細胞種・サブセットをバルクの中からバイアスなく特定し、トランスクリプトーム解析するこ



とを可能にする scRNA-seq 実験系を研究開発する (研究概要図)。これにより、バルクの同一細胞 (たとえばマクロファージ) 集団であっても感染細胞と非感染細胞におけ

る遺伝子発現の比較解析や、サルモネラの特定の病原因子(たとえば T3SS-2 など)が、真に感染している細胞のどのような(もしくは以前に報告ある STAT3 誘導遺伝子など)遺伝子発現に影響をするのかなど個々の感染細胞レベルでの解析が可能になる(研究概要図)。本研究の達成により、サルモネラや他の細胞内寄生菌と宿主免疫系の相互作用を包括的に解析・理解するために役立ち、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大きな一歩につながると考える。

② 研究内容

上記で示したサルモネラ病原因子と好中球を中心とした免疫細胞 heterogeneity の解析に加え、我々はサルモネラが感染したシングル細胞とその周りの bystander (傍観細胞) の区別する方法の開発にも挑戦する(研究概要図)。これまでの多くの scRNA-seq 技術では、真核生物(宿主)のトランスクリプトーム解析に mRNA 3' 末端のポリアデニル化シグナル配列(polyA)を使用する特性から、原核生物(菌)に特異的な mRNA の検出には不向きである。しかし、Flex 法の遺伝子発現を網羅するトランスクリプトームプローブセットは、真核生物 mRNA の polyA に依存しない検出法であるため、サルモネラ特異的に発現される mRNA をターゲットにしたカスタムプローブセットを設計・導入することで菌特異的な mRNA ターゲットを発現している感染シングル細胞を特定する(研究概要図)。

本研究の全体的な流れとして、長崎大学熱帯医学研究所において共同研究者の日吉らのグループが Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)を安定発現するネズミチフス菌を、Fig.1 で示した同様の方法でマウスに感染させる。検出するためのカスタムプローブは EGFP および 16s rDNA の mRNA を標的に設計し、10xGenomics において検証後、Integrated DNA Technologies 社で合成および購入を行う。マウスの脾臓をホルマリン固定・分散したのち専用の溶液中にて-80 度で保存する。それら凍結サンプルおよびカスタムプローブは我々のグループに送付してもらい、Chromium X や NovaSeq6000 を用いて scRNA-seq 解析(Flex 法)を行う。得られたデータは予備試験やこれまでの知見等と照らし合わせて評価する。まず、得られた全細胞数における感染細胞数や感染免疫細胞の種類が、これまでの報告や知見と大きな隔たりや無理がないことを確認し、その後より深い感染細胞と bystander のトランスクリプトーム比較解析を行う予定である。今年度で感染細胞と Bystander 細胞を区別出来ることが確認できた場合、次年度以降ではサルモネラ野生株(wt)、T3SS-2 機能欠失株(*spiB*)、T3SS-2 エフェクター SpvB 欠損株(*spvB*)間で感染・増殖する免疫細胞に違いがあるのか Fig.1 で示したマウス感染実験を用い評価する。

③ 予想される成果

2022 年度から開始している、Flex 法を用いたサルモネラ侵襲感染マウスモデルの解析により、これまで特定できなかった免疫細胞のサブセットが感染時に出現することが分かってきた。このような免疫細胞の解析方法や好中球サブセットの定義については、他の感染現象の解析にも広く通用するものであるため、引き続き解析を行う。また上記で述べたように、本研究では感染シングル細胞と Bystander を見分けるカスタ

マイズした Flex 法の技術革新も構想に入れている。この技術が確立されることで、感染症学における病原体と免疫細胞とのせめぎ合い解析が格段に加速する。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（全死亡者の 13.6%）、その中には多くの薬剤耐性菌感染によるケースが含まれ、今後さらに増加すると予想される（GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, *Lancet* 2022）。本研究構想において、サルモネラ侵襲感染の増悪に関わる細胞サブセットや因子が特定されることにより、それを対象とした宿主細胞を標的とした治療（Host direct therapies）と抗生物質を併用するなど、新規創薬研開発の基盤になると考える。本研究構想を達成した成果は基礎研究としてのインパクトだけでなく、薬剤耐性菌のグローバルな問題に対する創薬開発研究のための革新的なシーズ創出につながる事が期待できる。

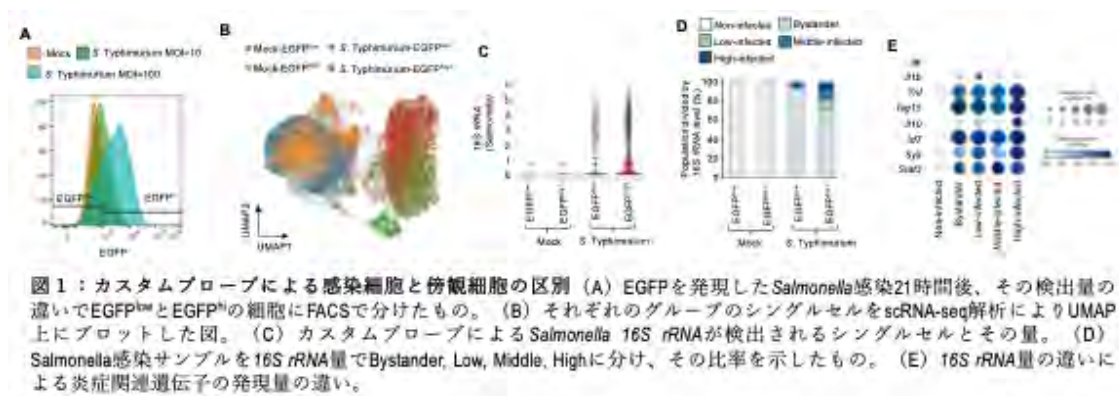
5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

該当年度においては研究計画の②研究内容で記載した通り、サルモネラに対するカスタムプローブを用い、感染細胞と傍観細胞を区別するトランスクリプトーム解析のパイプラインの開発を中心に研究を進めた。また開発の中で、当初予定していたサルモネラ感染マウスの脾臓細胞を用いた解析結果だけでは不十分であると判断し、初めにサルモネラを感染したマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いた *in vitro* における解析項目を追加した。RAW264.7 細胞は EGFP を発現するサルモネラ接種後もしくは未接種後、EGFP を強く発現するグループ (EGFP^{high}) とそうでない細胞 (EGFP^{low}) を FACS で別々に回収し、それら 4 グループを用いて scRNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。その後、このパイプラインを用いてサルモネラ感染マウスの脾臓細胞を解析することで、感染時にユニークな好中球サブセット内で本菌が増殖している可能性を突き止めた。

② 成果（結果＋考察）

通常の scRNA-seq は、ヒトやマウスなど哺乳類を対象としたトランスクリプトーム解析であり、サンプルに含まれる菌の RNA の存在は解析の対象外である。しかし、細胞内寄生菌であるサルモネラは、感染した細胞の遺伝子発現を攪乱することで、感染を成立しやすくできることが報告されており (Pham et al., *Sci Adv*, 2023)、感染細胞とその周囲の傍観細胞を分けて解析する必要がある。そこで私たちは初めに、サルモネラ内にある *16S rRNA* 配列を標的とした probe を設計することで、セルソーティングなどを挟まずに感染細胞と傍観細胞を区別できる、シンプルな scRNA-seq パイプラインの開発を試みた。*In vitro* において、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に異なる MOI で菌を接種し、21 時間後の菌数を検鏡と FACS で確認した (図 1A)。接種量依存的に細胞内の菌量の増加が認められたが、MOI=100 では細胞死が顕著であることから、MOI=10 で感染した細胞を scRNA-seq 解析に供試した。解析の結果、非感染 (Mock) 細胞とサルモネラ感染細胞は UMAP 上で大きく 2 つのクラスターに別れてプロットされた (図 1B)。そして、本研究で作成したカスタムプローブにより、菌が感染しているシングルセルが特定された (図 1C)。サルモネラ感染区の EGFP^{low} と比較して EGFP^{high} の細胞の方が *16S rRNA* 検出率が高いことから、このカスタムプローブの特異性は高いと考え



られた (図 1D)。次に感染細胞と傍観細胞を区別してトランスクリプトーム解析を行ったところ、インターフェロン関連の Interferon-Stimulated Gene 15 (*Isg15*)、Interferon Regulatory Factor 7 (*Irf7*) の発現は、傍観細胞でも認められたが、*I11b* や *I110* の発現は、感染細胞の方が傍観細胞より高く、*I110* においては細胞内の菌量依存的に発現量が上昇していた (図 1E)。これは、サルモネラは病原因子依存的に、感染マクロファージを抗炎症型の M2 に分極化するという報告と一致している (Saliba et al, *Nat Microbiol*, 2016)。以上のことから、本研究で開発した新規 scRNA-seq パイプラインにより、サルモネラ感染細胞と傍観細胞を区別したトランスクリプトーム解析が可能になることが示された。

マクロファージなど他の免疫細胞種についても興味深い解析結果が出ているが、ここでは次に、サルモネラ感染時にマウス脾臓内に浸潤する好中球について解析した結果を紹介する。全体で 11 の好中球サブセット (Neut) に分けられ、非感染や感染 2 日目と比較して、サルモネラ感染 4 日目において細胞数の増加に伴いサブセットの種類也多岐に分かれた (図 2A, B)。In vitro の感染マクロファージの結果と同様に (図 1E)、感染 4 日目の好中球においても *I110* を高発現しているサブセット (Neut_0, 3, 6, 7, and 8) を含む領域が認められた (図 2C)。そして、その領域に含まれる *I110* を発現したシングルセルでは高いレベルの *16S rRNA* 発現が認められた (図 2C)。さらに、*I110* 高発現の好中球サブセットのひとつ (Neu_8) において、好中球では通常発現されない Macrophage Receptor with Collagenous Structure (*Marco*) の発現が検出された (図 2D)。Neut_8 は UMAP 上において、感染 4 日目の好中球クラスターの中心部に位置しているため、マクロファージである可能性は低い (図 2A)。scRNA-seq は性質上、エフェロサイトーシスで取り込んだ細胞 (passenger) の遺伝子も検出することや (Lantz et al, *Science Rep*, 2020)、脾臓内の好中球はサルモネラ感染マクロファージの死細胞を取り込むという我々の以前の報告からも (Hiyoshi et al., *Cell Host Microbe*, 2022)、この好中球サブセット (Neut_8) は死んだ感染マクロファージをエフェロサイトーシスで取り込んでいる好中球であると考えられた。また、FACS においても MARCO 陽性の好中球が、感染 4 日目で増加することが確認できている (図 2E)。以上をまとめると、サルモネラ感染時に誘導される *I110* 陽性の好中球サブセットは、サルモネラ感染の増悪化に関わる可能性が考えられ、今後もこのユニークなサブセットを中心にその発生メカニズムや機能的な役割について解析することを計画している。

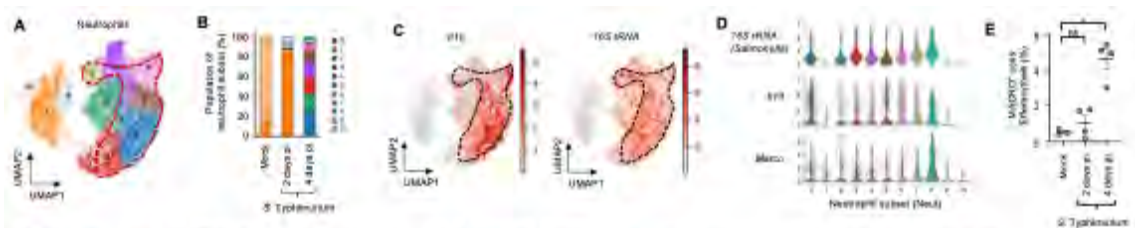


図 2：サルモネラ感染より出現するユニークな好中球サブセット (A) scRNA-seq 解析で得られた好中球サブセットの UMAP。 (B) 感染時による好中球サブセットのダイナミックな変遷。 (C) *I110* および *16S rRNA* 陽性シングルセルを UMAP 上に示したものの。 (D) 好中球サブセットにおける *16S rRNA*, *I110*, *Marco* の発現量。 (E) 脾臓内の MARCO⁺マクロファージをエフェロサイトーシスで取り込んだ Ly-6G⁺好中球の割合。ns, not significant, defined as $p > 0.05$; *, $p < 0.05$

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は、滞りなく遂行することができた。現在、公表前の段階であるため全ての成果をここで紹介することはできないが、本研究においては、サルモネラの病原因子に依存して、ユニークな好中球サブセットが出現することを見出した。このような知見は、感染免疫の理解を進める上で極めて意義深く、貴拠点の共同研究を通じて得られた成果の価値は非常に高いと考えている。

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）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：次世代型組換えウイルスベクターを用いた

熱帯熱マラリアワクチンの細胞性免疫応答の解明

課 題 番 号：2024-Ippan-05

2. 代 表 者：金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 助教 山本 祐太郎

共 同 研 究 者：金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 教授 吉田 栄人

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 仁和 空

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 矢坂 悠人

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 新村 奈帆

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 浅木 悠真

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 大野 愛佳

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 大原 榛華

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 小竹 恵

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 成瀬 響

金沢大学 医薬保健研究域 薬学系 学生 吉原 和花南

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 助教 中前 早百合

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

初年度：

（1）独自開発した熱帯熱マラリア 2 価ワクチン【m8 Δ /AAV1-Pf(s25-CSP)】を BALB/c マウスに免疫し、追加免疫後 4 週間及び 6 ヶ月の脾臓・肝臓リンパ球を用いて誘導される PfCSP 抗原特異的 CD8+Tcell 解析を行う。特に肝臓内 TRM については、経時的な持続性も評価する。

（2）非ヒト臨床試験を現在実施しており、熱帯熱マラリア 2 価ワクチン【m8 Δ /AAV1-Pf(s25-CSP)】免疫サルの PBMC・脾臓・肝臓リンパ球を用いて PfCSP 抗原特異的 CD8+Tcell 解析（特に TRM）を行う。

次年度以降：

（3）追加免疫に用いる AAV には多くの血清型が存在し、各血清型で組織移行性が異なっている。我々は AAV1 という骨格筋に長期間抗原発現する血清型を使用している。しかし近年、肝臓内で PfCSP 抗原を発現することで TRM が活性化されることが明らかになって来ている。

そこで本研究では、(i) 肝細胞で長期間抗原発現する AAV8 を追加免疫に用いる、(ii) AAV1 及び AAV8 の投与経路の違い、において TRM 誘導にどう影響を与えるか評価する。

(4) BALB/c は Th2 (液性免疫) 優勢、C57BL/6 は Th1 (細胞性免疫) 優勢 だが、マウス種差による感染防御メカニズムは解明されていない。その理由の 1 つに C57BL/6 は PfCSP に対する CD8 エピトープを持たない為細胞性免疫応答が評価できないことが挙げられる。そこで C57BL/6 が認識する OVA の CD8 エピトープを導入した m8Δ/AAV-PfCSP-OVA ワクチンを作製し、BALB/c と C57BL/6 に免疫し OVA に対する細胞性免疫応答の違い、C57BL/6 が認識する OVA の CD8 エピトープを導入したネズミマラリア原虫 *P. berghei* を用いた感染防御試験を実施しマウス種差による感染防御メカニズムの解明を行う。

② 研究内容

(1) マウスモデルにおける熱帯熱マラリア 2 価ワクチンの細胞性免疫応答解析 (初年度)

BALB/c (20 匹) に異種プライムブースト法 (初回免疫 m8Δ/追加免疫 AAV1) により熱帯熱マラリア 2 価ワクチンを免疫する。最終免疫 4 週間及び半年後の脾臓・肝臓を用いて PfCSP 抗原特異的 CD8+T cell がどの程度サイトカイン (INF- γ /TNF- α /GranzymeB) を放出するか細胞内サイトカイン染色 ICS (Intracellular Cytokine Staining) を用いて解析する。また肝臓においては経時的な TEM, TCM, TRM の割合を評価し、特に TRM について詳細を追求する。

(2) 非ヒト霊長類モデルにおける熱帯熱マラリア 2 価ワクチンの細胞性免疫応答解析 (初年度)

アカゲザル 4 頭、カニクイザル 6 頭に熱帯熱マラリア 2 価ワクチンを免疫し、経時毎に PBMC 単離、最終免疫 24 週間後に脾臓・肝臓からリンパ球を単離済み。マウスモデル同様に PfCSP 抗原特異的 CD8+T cell がどの程度サイトカイン (INF- γ /TNF- α /GranzymeB) を放出するか ICS にて解析する。肝臓での TRM 解析、経時毎に単離している PBMC を用いて細胞性免疫応答の持続性を評価する。

(3) AAV 血清型 (1 型→8 型) を変えることで細胞性免疫応答に違いが出るのか? (次年度以降)

当該研究室では既に AAV1 だけでなく肝臓にて抗原発現能が高い AAV8 に Pf(s25-CSP) 遺伝子を組み込んだワクチン開発に成功している。BALB/c (20 匹) に初回免疫 m8Δ を行った後、追加免疫で AAV1 または AAV8 を用いて血清型及び投与経路 (i.m. / i.v.) の違いによる TRM 誘導の違いを評価する。

(4) m8Δ/AAV-PfCSP-OVA ワクチンを用いた C57BL/6 の感染防御メカニズム解析 (次年度以降)

既に C57BL/6 が認識する OVA の CD8 エピトープを導入した OVA/Pb 原虫は作製済み、

現在 m8Δ/AAV1 or AAV8-PfCSP-OVA ワクチン開発に取り掛かっており 2023 年度中には完成予定である。BALB/c (15 匹)、C57BL/6 (15 匹) に m8Δ/AAV1 or AAV8-PfCSP-OVA ワクチンを免疫し、最終免疫 4 週間後に各群 10 匹を OVA/Pb 原虫による感染防御試験、各群 5 匹を ICS による細胞性免疫応答評価に用いる。

また本申請課題に関して対応教員である水上、中前と数回綿密な打ち合わせを対面で実施している。全研究過程を長崎大学 熱帯医学研究所にて実施し、ICS での細胞性免疫応答解析、マウスの飼育、遺伝子組換え原虫の使用も熱帯医学研究所が所有するハマダラカ飼育施設を用いて実施することも承認を得ている。

*法令等の遵守への対応

本研究で用いるウイルスベクターは、拡散防止措置 P2 レベルに該当しアデノ随伴ウイルス (BSL2)、ワクシニアウイルス (BSL2) に関しては、長崎大学 組換え DNA 実験安全委員会にも合意している。特に組換えワクシニアウイルス実験に関しては、大臣承認実験としての承認も得る。申請者らはこれまで金沢大学 遺伝子組換え実験安全委員会及び大臣承認も得ている為、同様の手続きを行う計画である。

③ 予想される成果

(1) これまで明らかになっていなかった熱帯熱マラリアワクチン【m8Δ/AAV1-Pf(s25-CSP)】の詳細な細胞性免疫応答が明らかとなる。既に非ヒト霊長類モデルにて実験を開始しており、本共同研究結果が臨床試験と近い結果となる事が予想され、本研究成果は臨床試験に向けて重要なデータとなる。

(2) マラリアワクチン開発はマラリア対策の抜本的な解決策であり、世界的な保健衛生・医学分野の発展に大きく貢献する。提案している 2 価ワクチンは接種した個人だけでなく、蚊への伝播阻止効果によって社会全体を長期的に疾病から予防可能な包括的ワクチンプラットフォームとなり得る。これまで評価出来ていなかった細胞性免疫応答を確認することで、臨床試験への足掛かりとなる。

(3) 既に複数の AAV ベクターが医薬品として承認されており、臨床研究でも重篤な副作用は起きていない。極めて安全なワクチンベクターの有効性など臨床試験に向けて重要なデータが得られる。

(4) 新興・再興感染症のアウトブレイクにも迅速に対応可能なワクチンベクター開発を目指している。研究成果は国内のワクチン開発研究をリードする突破口となり得る。

5. 実施報告

① 令和 6（2024）年度実施計画に対する実施状況

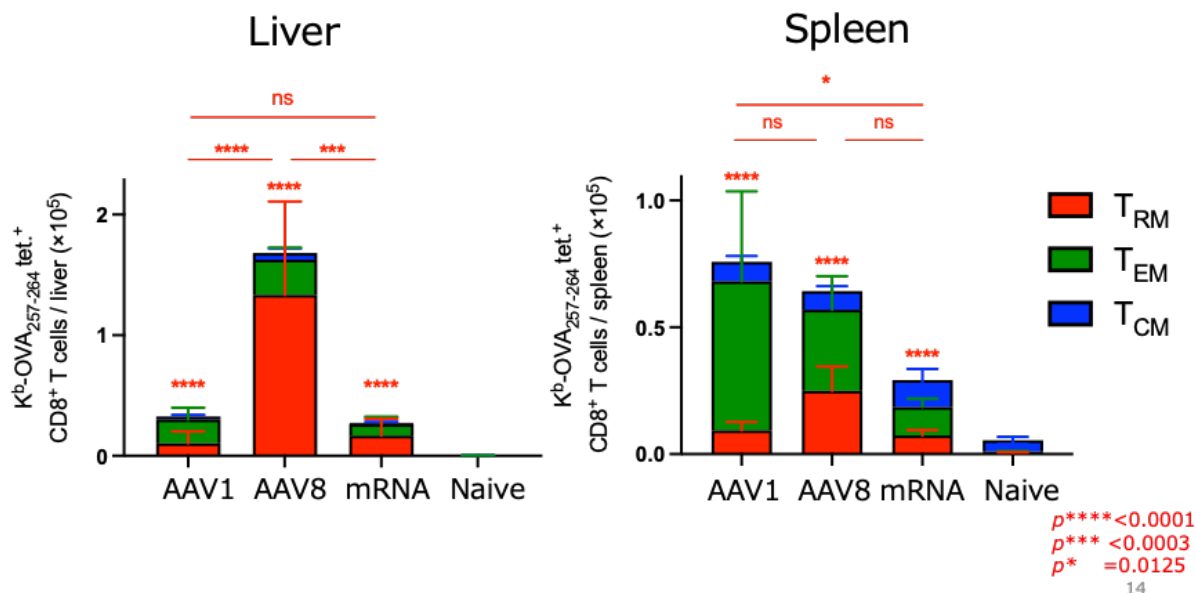
「7. 研究内容」に示している①と③を長崎大学で実施した。

長崎大学へ代表者 山本が4回訪問し、研究を実施し当初の計画を上回る研究を行った。

② 成果（結果＋考察）

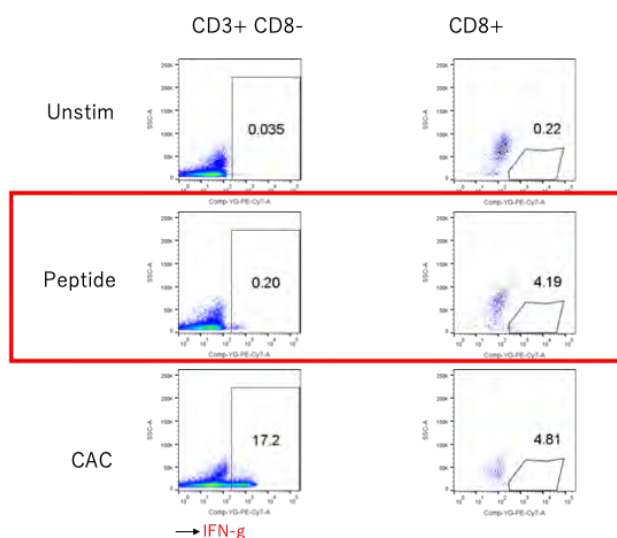
マウスモデルでの研究では、長崎大学にて FACS 解析を実施し、m8 Δ /AAV1-OVA 投与群、m8 Δ /AAV8-OVA 投与群、mRNA 群の 3 群を用いて肝臓内 T_{RM} 誘導能の違いを評価した。その結果、AAV8>>>AAV1>mRNA の順となり、AAV8 を追加免疫に用いることで肝臓特異的 TRM を強誘導できることが明らかとなった。

これは AAV8 が肝臓指向性の高いウイルスベクターであることに由来すると考えられる。その後、金沢大学側で実施した Challenge 試験でも AAV8 群において高い感染防御効果を立証した。令和 7 年度も引き続き研究を進め、論文投稿を行う。

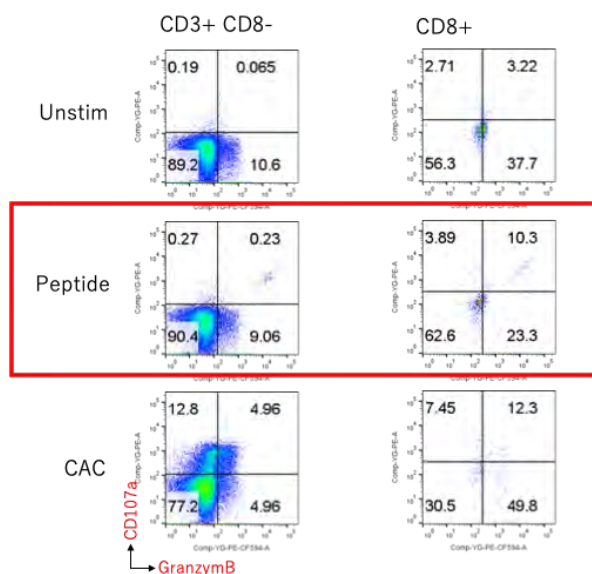


サルモデルを用いた研究では、ワクチン免疫サル脾臓リンパ球を用いた ICS を実施し、サイトカイン放出を確認するための条件検討を実施した。その結果、冷凍したリンパ球の最適な解凍法及びサイトカイン放出 (INF- γ および Granzyme B) を確認できた。令和 7 年度には金沢大学にて研究基盤の立ち上げを実施する。

MF81



MF81



③ 成果の公表

第 145 回日本薬学会年会

2025 年 3 月 30 日

肝臓特異的記憶 T 細胞を惹起する新規マラリアワクチンの開発研究

小竹 恵、仁和 空、大原 榛華、山本 祐太郎、中前 早百合、水上 浩明、志田 壽利、簡 君宇、谷口真由美、水上 修作、松本 眞、川上 茂、吉田 栄人

6. 自己評価

水上准教授らとの共同研究により、我々が解析できていなかったワクチンの細胞性免疫応答解析を実施することができた。長崎大学に4回も訪問することができFACSやICSなどの実験操作・解析法を勉強することができた。計画書に記載した内容以上の結果が得られたと考えており、学会参加も叶った。

令和7年度も継続させていただけるので、引き続き計画に上げた研究を邁進していき、早急に学術論文としてまとめたい。

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）

III （予想通りの成果を挙げられた）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

2024 General joint research report (self-evaluation)

1 . Research project name : Discovery of antiparasitic hits from the UFRN synthetic compound library

Project number : 2024—Ippan—06

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

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

3 . Amount Allotted : 600,000 yen

4 . Research Plan

① Research Purpose

The final goal of this project is to develop an anti-leishmaniasis or anti-trypanosomal drug from synthetic compounds. The initial step towards the drug development, during this project (1 year) we have synthesized and identified active synthetic compounds against the clinically important stages of these parasites (intracellular stage of the parasites). The active compound identified, the functional group(s) important for the bioactivity was investigated by structural modification and further evaluation of new candidates (2 year).

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 (2023 FY) was focused on organic synthesis with different scaffolds such as naphthoquinones and triazoles. The synthesis methodologies proposed features have been previously reported in the literature. After preparation, all planned compounds were purified, and their structures characterized by spectroscopic methods. Synthetic compounds provided by UFRN will be screened against *T. cruzi* and *L. major* strains.

Year two (2024 FY) 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-trypanosomal 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 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 T. cruzi (Sylvio X10, CL Brener, Tulahuen, and Esmeraldo).
Anti-leishmaniasis primary hits	Screening at NEKKEN, using the RE9h expressing L. major 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 in vitro using parasite's mitochondrial fractions and/or recombinant enzymes.
In vivo evaluation of the selected hits	In vivo imaging system using the bioluminescence of T. cruzi and L. major 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 T. cruzi (Sylvio X10, CL Brener, Tulahuen, and Esmeraldo).
Evaluation of anti-leishmaniasis activity of newly synthesized derivatives.	Assay at NEKKEN, using the RE9h expressing L. major 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 derivatives.	Evaluation of the selected hits against the mitochondrial respiration using live 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 Ken 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 was approved. 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 FY2024 Implementation Plan

In the fiscal year 2024 of joint research, the one hundred thirteen planned samples from the UFRN compound library were obtained 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 cell lines were also conducted in parallel for all of 113 compounds.

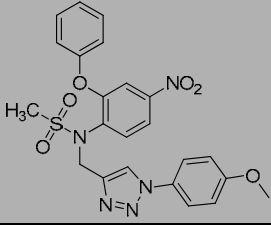
② Results (Results & Observations)

The one hundred thirteen samples, including synthetic compounds, peptides derived from the venom of the *Tityus stigmurus* scorpion and extract of plants and marine microorganisms from the Brazilian Northeast, 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). The best compounds, which showed low or no toxicity and inhibitory activity against the amastigote stage. Although the activity of the four compounds highlighted in Table 2 were the best among those tested, it was not comparable to that of the standard benznidazole (Table 2).

Most of our compounds tested showed high IC₅₀ values (> 100.0 µg.mL⁻¹) against AMA assay.

Table 2: Results of 1st assay against AMA.

Sample	ID	EC ₅₀ µg.mL ⁻¹ AMA CL Brener	CC ₅₀ µg.mL ⁻¹ cytotoxicity assay in HeLa
Synthetic compound	UFRN81	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN82	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN83	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN84	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN85	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN86	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN87	> 100	79.6
Synthetic compound	UFRN88	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN89	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN90	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN91	47.2	96.2
Synthetic compound	UFRN92	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN93	82.7	77.7
Synthetic compound	UFRN94	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN95	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN96	52.5	92.1
Synthetic compound	UFRN97	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN98	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN99	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN100	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN101	54.5	> 100

Synthetic compound	UFRN102	93.3	> 100
Synthetic compound	UFRN103	67.0	> 100
Synthetic compound	UFRN104	112.0	> 100
Synthetic compound	UFRN105	62.0	61.4
Synthetic compound	UFRN106	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN107	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN108	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN109	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN110	61.0	> 100
Synthetic compound	UFRN111	> 100	> 100
Synthetic compound	UFRN112	21.7	72.7
Synthetic compound	UFRN113	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN114	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN115	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN116	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN117	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN118	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN119	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN120	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN121	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN122	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN123	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN124	> 100	N.D.
	UFRN125	45.5	> 100
Synthetic compound	UFRN126	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN127	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN128	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN129	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN130	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN131	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN132	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN133	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN134	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN135	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN136	> 100	N.D.

Synthetic compound	UFRN137	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN138	> 100	N.D.
Synthetic compound	UFRN139	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	Stigmurina	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA6	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA8	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA15	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA16	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA18	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	StigA28	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	TsAP-A16	58.2	> 100
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	TsAP-A33	67.7	> 100
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	TsAP-A34	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	TsAP-A35	> 100	N.D.
Peptide derived from the venom of the <i>Tityus stigmurus</i> scorpion	TsAP-A41	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	Jg/AQ	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	Jg/HE	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	Jm/HE	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	Ipc/HE	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./nBut	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./Met	> 100	N.D.

Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./MeOH/ACT	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./Aq	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./ACT	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	L.F./MEOH	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	APSE/PID	58.9	> 100
Extract of plants from the Brazilian Northeast	ACCC/AQ	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	ACCCE/RES-M	> 100	N.D.
Extract of plants from the Brazilian Northeast	Benzazepine (C4)	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	BD165/Aq	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	BD165/Ac 18	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	BD165/Ac 27	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	Ag7	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	AgD/MH	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	Ag/CIF	> 100	N.D.
Extract of marine microorganisms from the Brazilian Northeast	AgD/E	> 100	N.D.
Synthetic compound	Cz-TAP	> 100	N.D.
Synthetic compound	C12-TAP	> 100	N.D.

Synthetic compound	F-TAP	> 100	N.D.
Synthetic compound	M-TAP	> 100	N.D.
Synthetic compound	O-TAP	> 100	N.D.
Synthetic compound	AP37	> 100	N.D.
Synthetic compound	APCV	> 100	N.D.
Synthetic compound	APCVII	> 100	N.D.
Synthetic compound	pF-TAP	> 100	N.D.
Synthetic compound	1-SB 83	> 100	> 100
Synthetic compound	2-HPCD IVS MAL	> 100	47.0
Synthetic compound	3-IVS MF HCD	> 100	78.5
Synthetic compound	4-IVS MF HCD	> 100	7.6
Synthetic compound	5-MF PEG	> 100	> 100
Synthetic compound	6-MAL PEG	> 100	> 100
Synthetic compound	7-MF PVP	> 100	29.7
Synthetic compound	8-MAL PVP	> 100	36.7
Synthetic compound	9-MF SOL	> 100	> 100
Synthetic compound	10-MF KOL	> 100	54.1
Synthetic compound	11-MALHPM C	> 100	55.5
Synthetic compound	12-MF HPMC	> 100	65.9
Control	BENZ	1.0	> 100

ND: Not determined because they were inactive against intracellular AMA.

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, along with the data obtained in the first year of joint research, will be forthcoming. Also, one of the PhD student involved in this project, Ms. Rita Yanka Pereira da Silva, presented her results in the 3rd Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry, Maceio, Alagoas State, November 12-14, 2024, Brazil, under the title “Synthesis of 1,2,3-Triazole Naphtoquinones Hybrids and Evaluation of Their Trypanocidal Activity”.

Although this project was not granted in the third year, the group led by Alessandro, could secure additional fundings from the Brazilian Government (CAPES). This grant will support the travel and daily expenses for Ms Rita Yanka, to conduct experiments at NEKKEN for 6 months (September 2025 to March 2026) to continue the international

collaboration between the two Institutions (UFRN and NU).

6 . Self-Evaluation

The collaborative efforts in this second year, in my opinion, fulfilled our expectations. My participation in the project was significant, particularly in the planning and synthesis of compounds from the UFRN library. Moreover, Professor Carlos Ramon's visit to NEKKEN proved invaluable for the execution of antiparasitic evaluation tests on the samples and for the essential training of a young researcher to promote the technology transfer to Brazil. During his time at Nagasaki University, Professor Carlos Ramon do Nascimento Brito benefited greatly from his interactions with researchers at NEKKEN and TMGH. He also presented a seminar to the students of TMGH, effectively disseminating his research focus on Chagas disease in an endemic area of Brazil.

Although more than 100 compounds were synthesized and tested at NEKKEN, the chemical space eligible for the SAR study of the naphthoquinone, sulfonamide and triazole derivatives, synthesized in this are still inconclusive since derivatives with increased activity could not be identified, despite the efforts. Such problems highlight the difficulties for drug development targeting Chagas disease faced by several medicinal chemists working on this field.

Despite being scheduled for the second year, the testing of our compounds against the *L. major* strain was hindered by the contamination of the parasite stock conducted at NEKKEN. Our current plan involves re-transfecting *L. major* with the plasmid intended for the integration of the RE9h-mNeonGreen gene into the parasite genome. We anticipate evaluating the resulting transfectants against the promastigote stage upon their readiness.

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) for some selected compounds. In addition, the cytotoxicity of all 80 compounds were investigated and we could obtain 4 best candidates from which 3 are triazole derivatives, and one sulfonamide derivative. 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.

In this second year of joint research, in addition to more synthetic compounds, some of which were designed based on the results obtained in the first year, peptides derived from the venom of the *Tityus stigmurus* scorpion and extracts from native plants and microorganisms of the Brazilian Northeast were evaluated. However, only 4 samples showed slight inhibition of *T. cruzi*, despite their low cytotoxicity.

In these past two years, we've tested nearly two hundred samples and achieved some promising results. We expect to move forward with prospecting new compounds and continue our evaluations to find a hit.

令和6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：原虫を認識する免疫受容体の探索とリガンド同定

課 題 番 号：2024-Ippan-09

2. 代 表 者：佐賀大学医学部 分子生命科学講座 准教授 三宅 靖延

共 同 研 究 者：佐賀大学医学部 分子生命科学講座 教授 吉田 裕樹

佐賀大学医学部 分子生命科学講座 助教 石塚 茂宜

長崎大学熱帯医学研究所 共同研究室 教授 見市 文香

長崎大学熱帯医学研究所 生物資源室 助教 風間 真

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究課題は、原虫由来物質を認識する免疫受容体、およびその物質(リガンド)を網羅的に同定すること、また、原虫感染における免疫活性化、あるいは免疫抑制の観点からこれら受容体とリガンドの役割や生理活性を明らかにすることを目的とする。さらにこの目的のために使用する、レポーター細胞（リガンドと受容体の結合を検出する系）にさまざまな免疫受容体の遺伝子を導入したライブラリーを継続的に拡充していく。レポーター細胞の活性化を指標にしたスクリーニングにより得られた候補物質は、質量分析等の手法で構造解析を行い同定・精製する。同定された物質（＝リガンド）と受容体の組み合わせについて、受容体発現細胞や受容体欠損細胞を用いて、リガンド・原虫生細胞による免疫活性化や免疫抑制機構を明らかにしていく。

これにより、原虫感染における免疫活性化／抑制機構の全体像を明らかにすること、そしてこれらの受容体を標的とした新規感染症治療法や、あるいはアジュバントに応用可能な新規免疫刺激物質の開発に資することを目標とする。

② 研究内容

本研究全体の目的は、自然免疫受容体を刺激する原虫由来リガンドを同定、その受容体とともに機能を解析し、感染時の免疫活性化や抑制におけるその役割を明らかにすることを目的とする。そのうち、本共同研究申請においては、**原虫に結合する受容体群、およびそのリガンドの精製同定、リガンドの解析**を目標とする。

1) 原虫に結合する受容体群の同定

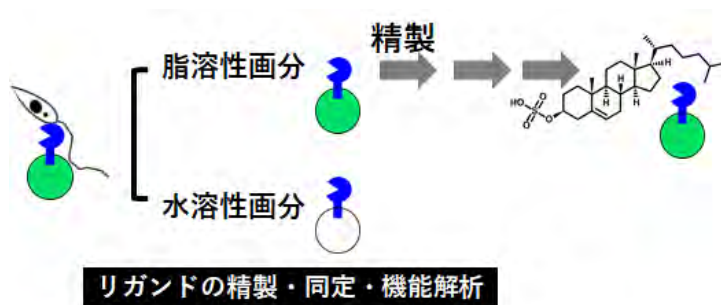
これまで作成してきた、受容体発現ライブラリーを用いて、原虫表面抗原を認識しうる受容体をスクリーニングしていく。原虫は、リーシュマニア、トリパノソーマ、赤痢アメーバから開始し、マラリア原虫やトキソプラズマに展開していく。原虫培

養株は必要に応じて NEKKEN BRC に提供を依頼、導入を進める。最初のスクリーニングは、スループット、および病原体封じ込めを考慮し、同調培養などでステージを揃えた原虫を凍結破碎・固定した試料を用い、得られるデータにより、必要に応じて培養した生きた原虫も用いる。これを用いて受容体発現レポーター細胞の活性化 (=受容体へのリガンドの結合) をスクリーニングする。得られた受容体候補は、その組換えタンパク質が原虫に結合することを確認する。

2) リガンドの精製同定

1) で同定された受容体に対するリガンドを生化学的に精製・同定する。原虫細胞を有機溶媒抽出により水溶性・脂溶性画分に分画、さらにシリカゲルカラムを用いて極性に応じた分画を行なう。それ

ぞれの画分を、薄層クロマトグラフィーで展開、受容体に結合する画分をレポーター細胞の活性化を指標に同定する。得られた画分をさらに分画するなどしてリガンドを単離・精製後、質量分析、および NMR を用いてその構造を決定



する。さらに、精製したリガンドが受容体を発現している免疫細胞を刺激することを確認する。

3) リガンドの原虫側の解析

得られた候補リガンド（あるいは関連代謝産物など）を原虫が合成・発現していることをゲノム情報および代謝解析により確認する。原虫の生化学的解析を行ない、当該リガンドの発現時期、発現場所、発現量、受容体との相互作用について検討を行なう。

研究全体の中で、受容体強制発現細胞や受容体欠損細胞を用いるなどして、当該リガンドによる免疫活性化・抑制作用を分子・細胞レベルで明らかにしていく。また、得られた候補リガンドの合成酵素をコードする遺伝子について、原虫の強制発現株または、欠損株を用いた感染実験により、受容体や当該リガンドの役割を個体レベルで解析していく。

本申請研究の進行では、免疫受容体発現レポーター細胞によるライブラリーの拡充も図っている。また、この申請では原虫に焦点を当てているが、今後研究対象を多細胞の寄生虫である蠕虫にも適応することが可能である。充実したライブラリーを用いた原虫や蠕虫のスクリーニングを進めていくことで、幅広い寄生虫疾患の免疫応答の解明へと展開を図る。

③ 予想される成果

原虫の宿主細胞への侵入、強い免疫抑制など、受容体が関与されると考えられる現象を、分子レベルでの解明に繋げる研究である。原虫表面分子の多様性・特異性、および宿主細胞に接着ののち標的細胞内に侵入するという原虫の特殊性に着目した本研究で、ヒト疾病をもたらす原虫に関して、免疫、特に感染初期における自然免疫の活性化／抑制機構が分子レベルで明らかにされることが期待される。これは、単にこれまで細菌・真菌で成果をあげている系を原虫で試すだけでなく、網羅解析により個々の原虫の特殊性に応じた自然免疫制御機構を明らかにすることを目指すという点で、寄生虫免疫研究のブレークスルーとなる研究成果が期待できる。

さらに、新たな原虫由来物質の同定は、リガンド・受容体を標的とした新規感染治療法や、新規自然免疫賦活物質の同定による新しいアジュバントなどの開発に資する可能性を持つ研究である。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

- （1）使用する原虫種の選択
- （2）原虫に最適化されたスクリーニングシステムの構築
- （3）スクリーニングに使用するレポーター細胞の選抜
- （4）原虫×レポーター細胞による総当たりスクリーニング
- （5）活性が見られた原虫におけるリガンドの探索

② 成果（結果＋考察）

（1）使用する原虫種の選択

培養にかかる労力、回収できる量などを考慮して、以下の6属10種類の原虫を初回のスクリーニング対象とした。

- | | |
|--|--------------------|
| 1. <i>Leishmania major</i> | (promastigote) |
| 2. <i>Leishmania amazonensis</i> | (promastigote) |
| 3. <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> | (bloodstream form) |
| 4. <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i> | (bloodstream form) |
| 5. <i>Trypanosoma cruzi</i> | (trypomastigote) |
| 6. <i>Giardia intestinalis</i> | (trophozoite) |
| 7. <i>Trichomonas vaginalis</i> | (trophozoite) |
| 8. <i>Entamoeba histolytica</i> | (trophozoite) |
| 9. <i>Entamoeba invadens</i> | (cyst) |
| 10. <i>Naegleria fowleri</i> | (trophozoite) |

（2）原虫に最適化されたスクリーニングシステムの構築

原虫とレポーター細胞の培養条件は異なる上に、一部の原虫はレポーター細胞を貪食してしまい解析が困難になる可能性が考えられたため、これまでの細菌・真菌の生菌を用いたスクリーニングとは異なる「原虫に最適化されたスクリーニン

グシステム」の検討を行った。原虫を凍結融解した破碎液を用いることで、原虫によるレポーター細胞の貪食を回避し、レポーター細胞の培養条件にてスクリーニングを行うことを可能とした。それぞれの原虫破碎液に関して、レポーター細胞に対する細胞毒性を示さない最大濃度を検討し、その濃度より段階希釈してスクリーニングを行うこととした。

(3) スクリーニングに使用するレポーター細胞の選抜

準備できた原虫の破碎液量と使用濃度から、スクリーニング可能なレポーター細胞の種類は50程度と考えられた。そこで、所有する受容体レポーター細胞ライブラリー120種類の中から、受容体のリガンド特性やこれまでの細菌や真菌を用いたスクリーニング結果を考慮し、50種類を選抜した。

(4) 原虫×レポーター細胞による総当たりスクリーニング

6属10種類の原虫破碎液と、50種類の受容体レポーター細胞の総当たりによるスクリーニングを行なった（下図、緑色の濃さが認識強度を表す）。一部の原虫では破碎液不足により検討できないレポーター細胞もあった。未発表データのためレポーター細胞の受容体名は非公開とし、番号にて記載した。

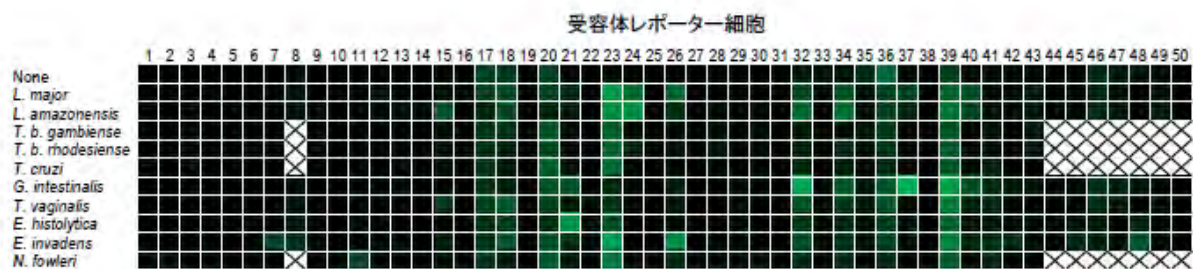


図1: 原虫を認識する受容体のスクリーニング

これまでに報告されていない、原虫を認識しうる受容体が複数特定された。その中には宿主免疫を活性化する受容体だけでなく、抑制する受容体も含まれており、原虫による免疫回避に関与する受容体の可能性も考えられた。

(5) 活性が見られた原虫におけるリガンドの探索

図1のスクリーニング結果において、受容体 No.37 による *G. intestinalis*（下痢性疾患を引き起こす消化管寄生原虫）の認識が最も強かった。No.37 は免疫活性化受容体であり、*G. intestinalis* に対する宿主免疫応答を惹起する受容体である可能性が考えられた。また、No.37 はペア型受容体（高い相同性を有しながら、免疫活性化と免疫抑制化という逆の機能をもつ受容体のペア）であり、No.40 がペアとなる抑制型受容体である。No.40 も *G. intestinalis* を認識したことから、No.37 と No.40 は *G. intestinalis* に対する免疫応答を正と負に制御する、いわばアクセルとブレーキとして機能する可能性が期待されたため、最初の解析対象とした。No.37 と No.40 が認識するリガンド成分が DNA、糖鎖、タンパク質のいずれであるかを明らかにするために、それぞれの分解酵素で *G. intestinalis* の破碎液を処理したところ、タ

ンパク質分解酵素によりリガンド活性が消失したことから、リガンドはタンパク質成分である可能性が示唆された。この情報を元に現在は、リガンドの単離精製するための、カラムを用いた分離精製法を検討中である。

③ 成果の公表

Shigenari Ishizuka, Yasunobu Miyake, Makoto Kazama, Fumika Mi-ichi, and Hiroki Yoshida.

Perspective of screening assay of host immune receptors for protozoa.

The 17th Parasite-Immunology-meeting

February 2025, Shimabara, Japan

6. 自己評価

これまで、細菌と真菌で行ってきた認識受容体のスクリーニングシステムを原虫用に最適化し、ファーストトライアルとして10原虫×50受容体によるスモールスケールでのスクリーニングを行い、原虫認識受容体の候補を複数見出すことに成功した。このことは、本スクリーニングシステムが原虫に対しても有効であることを示しており、探索対象の原虫と受容体を拡大した大規模スクリーニングを行う基盤が整った。また、本研究課題にて見出された原虫認識受容体候補に対する詳細な解析は、「原虫を認識する自然免疫受容体の探索とそのリガンド同定（2025-Ippan-17）」に引き継ぎ進行中である。以上より、本研究課題は実施計画以上に進展したと考えられる。

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）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：住血吸虫保存系の開発

課 題 番 号：2024-Ippan-10

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
奈良県立医科大学病原体 感染防御医学 研究助教 三須 政康
奈良県立医科大学病原体 感染防御医学 助教 笠松 知子
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：500 千円

4. 研究計画

① 研究目的

かつて片山病・水腫張満・奇病と呼ばれた日本住血吸虫症を日本の医学者が精力的に研究し、撲滅へと導いた歴史は世界でも類を見ない。しかし、世界では未だ2億人以上が住血吸虫症に罹患している。この現状を鑑みると、創薬研究を含めた更なる基礎研究が不可欠である。研究に必要な『生きた』住血吸虫を人為的に維持するためには、現時点で、実験動物（終宿主と中間宿主）を用いる必要がある。研究者にとっては、ライフサイクルを中断なく、効率的に維持することが重要であるが、中断・再開を可能とする条件に着目した研究報告は極めて少ない。そこで、本研究では『*in vitro* 保存』という観点から本寄生虫のライフサイクルを計画的に中断・再開可能とする研究を提案する。具体的には、様々なステージのマンソン住血吸虫に対して *in vitro* 保存条件を検討することで、新たに保存法を見出し、ライフサイクルの計画的な中断・再開を可能とし、その維持に繋げることを目的とする。

② 研究内容

本研究計画は、以下の3年間（2024年度～2026年度）による実施を予定している。

【2024年度】

住血吸虫モデルとして、マンソン住血吸虫 *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。保存する対象として、2024年度は虫卵、ミラシジウムを中心に行う。*S. mansoni* 感染マウス肝臓より単離した虫卵サンプルを対象とし、保存条件（温度、保存液、保存期間）を種々検討し、ミラシジウム孵化法により孵化可能な条件を見出す。さらに、ミラシジウム以降の貝への感染能や、その後貝体内で発育したセル

カリアが動物に感染可能かを確認し、正常な感染能を有する保存条件をスクリーニングする。ミラシジウムを保存対象サンプルとした場合も同様の条件検討を行い、条件精査により保存メカニズムを解明する。

【2025 年度以降】

スポロシスト、セルカリア、成虫を保存対象サンプルとし、保存条件（温度、保存液、保存期間）を検討する。保存後の評価として、スポロシストやセルカリアは、動物への感染能を、成虫では生殖能（受精卵産生能）への影響を調べる。さらに、上記で得られた成績をもとに、他種吸虫（肝蛭など）への応用も検討することで、吸虫全般へ展開可能な保存法の研究開発を進める。

なお、感染員の解析は、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

住血吸虫のライフサイクルにおいて、現在まで *in vitro* で保存可能な方法は、いずれのステージでも確立されていない。*In vitro* 保存法の確立はライフサイクルの中断・再開を制御可能とし、住血吸虫研究者にとっても福音となる。また、感染実験の直前ステージまで発育した幼虫を効率的に保存可能であれば、ランニングコストやライフサイクルの安定化にも大いに寄与することが予想される。

本研究では、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、メコン住血吸虫など）にも応用可能な実験系となる。さらに、住血吸虫保存法の確立は、他の吸虫類、延いては蠕虫類への展開も可能な概念であり、寄生虫学および熱帯医学分野において本研究で得られる成果の波及効果は計り知れないと確信し、申請に至った。

5. 実施報告

① 令和6（2024）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して維持された。まず、*S. mansoni* ミラシジウムを感染させた淡水巻貝（*B. glabrata*）よりセルカリア遊出させた。その後、セルカリアを ICR マウスに感染させ、8 週間後、安楽死させたマウスより肝臓を摘出し、酵素処理後、*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、ライフサイクルの維持を行った。

■ マンソン住血吸虫卵を用いた保存法の検討

S. mansoni 感染マウス肝臓より単離したミラシジウム包蔵卵を種々の保存液〔1x、2x、5x、10x PBS(-)〕と保存温度（4℃または 25℃）の条件下で一定期間保存し、保存後の孵化率を次項目に示す評価系により算出した。

■ マンソン住血吸虫卵の評価系の検討

S. mansoni 感染マウス肝臓より単離したミラシジウム包蔵卵を、1 虫卵／ドロップとなるように調製し、ハングリングドロップ法により LED ライトを用いて虫卵孵化実験を実施した（**図 1**）。孵化した虫卵は、孵化率（HR）を算出することで評価した。

図 1



■ 種々の条件下で保存されたマンソン住血吸虫卵の感染能評価

一定期間保存後のマンソン住血吸虫卵より孵化させたミラシジウムを *B. glabrata* に感染させ、中間宿主への感染能を評価した。更に、その感染させた貝を 4 週間飼育後、セルカリアまで生育することを確認し、貝から遊出させたセルカリアを ICR マウスに感染させることにより、宿主動物内における感染能および発育能を評価した。

② 成果（結果＋考察）

■ マンソン住血吸虫卵を用いた保存法の検討

S. mansoni 感染マウス肝臓より単離したミラシジウム包蔵卵を、1x、2x、5x、10x PBS(-) 液中で保存した。25℃で 7 日間の保存すると、何れの条件においても顕著な孵化率（HR）の低下を認めた。いっぽう、4℃で保存すると、1x、2x PBS(-) 保存液中では、虫卵の HR を長期的に維持可能であった（**図 2**）。更に、保存液の交換を行うことで、より高い HR を維持可能であることが明らかとなった。

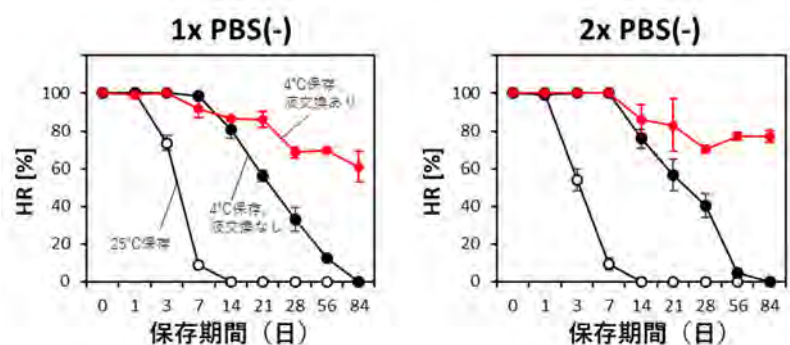


図 2

■ 種々の条件下で保存されたマンスン住血吸虫卵の感染能評価

一定期間保存後のマンスン住血吸虫卵の感染能を評価するため、*B. glabrata* およびマウスへの感染実験を行った。4℃にて、1x、2x PBS(-)液中に、最長 84 日間保存された虫卵から孵化したミラシジウムを *B. glabrata* に感染させたところ、4 週間後、貝よりセルカリアの遊泳を認めた (図 3)。また、そのセルカリアを回収後、マウスに感染させ、8 週間後に肝臓での虫卵結節を多数認めた (図 4)。以上の成績から、本虫卵保存法は、感染能を維持可能とすることが明らかとなった。



図 3



図 4

③ 成果の公表

1. O uji Y, H amasaki M, M isu M, Y oshikawa M, H amano S.

Simple preservation of schistosome eggs with high infectivity up to 12 weeks.

Parasitol Int. 2025 Jun;106:103020. doi: 10.1016/j.parint.2024.103020. Epub 2024 Dec 20.

2. O uji Y, H amasaki M, M isu M, Y oshikawa M, H amano S.

Labeling of miracidium using fluorescent agents to visualize infection of schistosome in intermediate host snails.

Parasitol Int. 2025 Feb;104:102994. doi: 10.1016/j.parint.2024.102994

3. 笠松（西村）知子、三須政康、北村知嵩、吉川正英、王寺幸輝
自家栽培野菜からの感染が疑われた肝蛭症の 1 例
Clinical Parasitology 35:59-62 (2024).
4. 王寺幸輝、濱崎めぐみ、三須政康、北村知嵩、笠松－西村知子、稲岡健ダニエル、
中村梨沙、濱野真二郎、吉川正英
住血吸虫感染貝に対する LED 波長の影響
第 94 回 日本寄生虫学会大会（2025 年 3 月、大阪）
5. 三須政康、阪田幹、笠松－西村知子、北村知嵩、濱野真二郎、関まどか、吉川正
英、王寺幸輝
奈良公園に生息するニホンジカに感染した肝蛭の調査 ―未精製糞便 PCR 法の開
発―
第 94 回 日本寄生虫学会大会（2025 年 3 月、大阪）
6. 阪田幹、三須政康、笠松－西村知子、北村知嵩、濱野真二郎、関まどか、吉川正
英、王寺幸輝
奈良公園に生息するニホンジカの肝蛭感染調査 ―虫卵検査と遺伝子検査によ
る評価―
第 94 回 日本寄生虫学会大会（2025 年 3 月、大阪）
7. 高島康弘、伊藤優春、齋藤大蔵、高須正規、杷野一輝、中川敬介、王寺幸輝
日本産肝蛭（*Fasciola* sp.）中間宿主貝内ステージの *in vitro* 培養
第 167 回 日本獣医学会学術集会（2024 年 9 月、北海道）
8. 西村知子、三須政康、北村知嵩、笠原敬、吉川正英、王寺幸輝
自家栽培野菜からの感染が疑われた肝蛭症の 1 例
第 35 回 日本臨床寄生虫学会大会（2024 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

我々の研究対象とする住血吸虫は、そのライフサイクルを実験室レベルにおいて人工的に繰り返す必要があり、宿主の維持や継続的な感染実験など、多くのプロセス・操作が必要となる。しかしながら、そのサイクルの中断・中止を余儀なくされる事態に備えて、本吸虫が保存可能な条件を見出すことは重要と考えられる。これまでに、住血吸虫を凍結保存する方法は報告されているが、プログラムフリーザーが必要、凍結融解後の生存率が非常に低いなど課題がある。そこで今回我々は、住血吸虫の幼虫包蔵卵に着目し、その評価系の確立と保存方法の検討を行った。

まず、個々の虫卵における孵化率（HR）を簡便かつ正確に算出するため、ハンギングドロップ法を用いた虫卵孵化法を新規に開発した。本評価系を用いることで、虫卵孵化を世界で初めて虫卵 1 個のレベルで評価可能となった。そして、本評価系を用いることで保存条件を検討したところ、*S. mansoni* ミラシジウム包蔵卵を 1x PBS(-)あるいは 2x PBS(-)を用いて 4℃で保存した場合、孵化の長期的に維持を可能とすることが明らかとなった。更に、同条件により長期的保存した虫卵より孵化した幼虫は、*B. glabrata*に感染後セルカリアまで発育することが可能で、宿主動物への感染能と発育能も維持されていることが立証された。

本研究により、感染能を有する住血吸虫卵の長期保存を可能とし、住血吸虫のライフサイクルを長期的に中断することが可能となった。

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）

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名： *Salmonella Paratyphi C* による腸チフス感染モデルと持続感染因子
課 題 番 号：2024-Ippan-11

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

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

腸チフスは、チフス菌（*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhi）によって起こる重篤な全身性感染症である。*S. Typhi* の主要な病原因子は莢膜多糖体である Vi 抗原とされているが、その関与は完全に解明されていない。その要因としては、*S. Typhi* には宿主特異性があり感染源がヒトに限定されることから、これまで動物感染モデルを用いて *S. Typhi* の病原性を直接明らかにすることはできなかったことが挙げられる。*S. Typhi* による全身感染症の感染動物モデルとして *S. Typhimurium* が用いられるが、*S. Typhimurium* は Vi 抗原を持たないことと、ヒトの腸チフスの病態とは異なり急性感染を示す。我々は *S. Typhi* と同様に Vi 抗原を持つ *S. Paratyphi C* の 2 株がそれぞれマウスの腹腔内感染実験において、急性感染と持続感染の異なる感染様式を示すことを見いだした。そこで本研究課題では *S. Paratyphi C* の感染様式の相違に寄与する因子を特定し、腸チフス感染モデルとして *S. Paratyphi C* を利用して *S. Typhi* の病原性メカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

② 研究内容

BAA1715 株と ATCC13428 株の完全長ゲノム配列全ゲノム解読情報を用いたパンゲノム解析を行い、各株に特異的な遺伝子を抽出する。また、遺伝子の分布だけでなく、コアゲノム上の単一塩基変異（single nucleotide variant, SNV）を検出し、アミノ酸置換を引き起こす変異や調節遺伝子上の変異等を考慮し、マウス感染性に寄与する遺伝子を推定する。比較ゲノム解析に加え、RNA-seq を用いた発現解析を行い候補遺伝子の抽出を試みる。候補となった遺伝子については、遺伝子欠損株や相補株を用いた細菌の病原性解析で実績のある児玉年央教授の指導に従い、当該遺伝子の欠損株を作製する。また、作製した各種欠損株に関しては、チフス性サルモネラの食細胞内増殖性に関し菌体表面抗原の機能解析で成果を上げている日吉大貴准教授の指導のもと、マウス感染実験により病原性評価を行う。

③ 予想される成果

本研究で見いだされた *S. Paratyphi C* の BAA1715 株と ATCC13428 株が示すそれぞれ異なる病態は、腸チフスの発症機序を解明する上で有用なツールになる可能性がある。現時点での比較ゲノム解析では、2つの株間で大きな領域の欠失や獲得は見つかっていないが、今後の特異的な遺伝子の抽出、SNV の検出、RNA-seq を用いた発現解析によって株間の遺伝学的な相違が明らかになり、さらに遺伝子欠損株や相補株を用いた病原性解析を行うことで、宿主特異性のためにこれまで解析が不可能であったチフスの病原メカニズムの一端を解明につなげることが期待される。したがって、これまで Vi 抗原だけで考えられていた *S. Typhi* の病原性に関して、複数の遺伝因子の機能から多面的に捉えることができるようになり、その機序の解明につなげ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

S. Paratyphi C によるマウスの腹腔内感染実験において、BAA1715 株は *S. Typhimurium* と同様に急性感染性を示し、感染後1週間以内に全数のマウスが死亡させたが、ATCC13428 株では感染後21日以降もマウスは生存し肝臓及び脾臓から *S. Paratyphi C* が検出されており、持続的な全身感染を引き起こしていた (Fig. 1)。

そこで感染形態の違いをゲノム情報から明らかにすることを考え、上記2株についてショートリードおよびロングリードによる全ゲノム解読を行った。得られたリードはゲノムアセンブリに供して完全長ゲノム配列を得た後、Bakata v1.11 によるアノテーションを行い、各種解析に用いた。

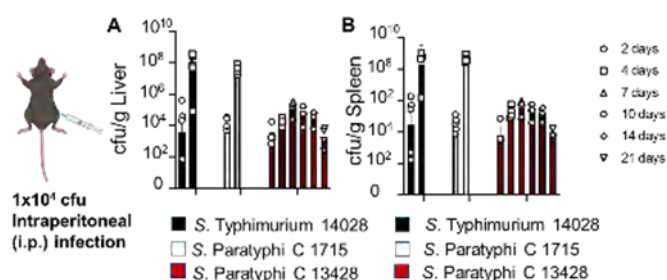


Fig. 1. Differences in infectivity of *S. Paratyphi C* strains against mice.

② 成果（結果＋考察）

2 株の完全長ゲノム配列のアライメント情報から、大規模な逆位が起きていることが明らかとなった (Fig. 2)。また、それぞれの株に特異的な遺伝子を検索するため Panaroo v1.5.2 を用いて paralog が1つの遺伝子クラスタとなるようパンゲノム解を行った。

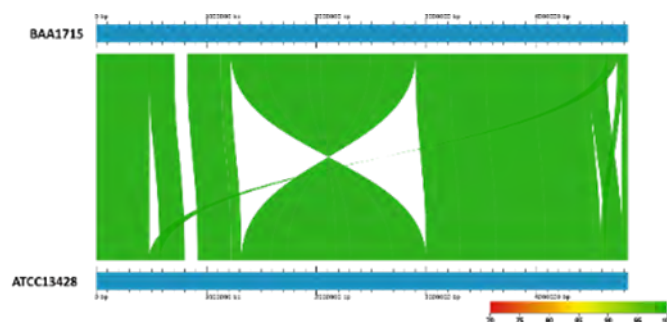


Fig. 2. Whole-genome alignment of complete *S. Paratyphi C* genome sequences.

Table. Annotation of the specific gene in each strain

Strain	Locus	Product
BAA1715	MBDFAM_00450	hypothetical protein
	MBDFAM_01129	Repressor
	MBDFAM_01889	hypothetical protein
	MBDFAM_02101	Integrase
	MBDFAM_03430	AraC family transcriptional regulator
ATCC13428	MDABDI_02213	hypothetical protein
	MDABDI_03525	reactive chlorine-specific transcriptional regulator
	MDABDI_03532	hypothetical protein

その結果、BAA1715 株に特異的な遺伝子が 5 個、ATCC13428 株に特異的な遺伝子が 3 個検出された (Table)。BAA1715 株に特異的な 5 遺伝子中 2 遺伝子、ATCC13428 株に特異的な 3 遺伝子中 2 遺伝子は機能未知タンパク質であった。しかし、いずれの株にも特異的な *regulator* 遺伝子が見いだされたことから、ストレス応答や病原性因子の発現に関して、異なる制御機構を有していることが考えられる。

③ 成果の公表

貴拠点の共同研究で得られた成果は、現在解析中の結果と合わせて国内外の学会や学会誌などで公表する予定である。

6. 自己評価

本研究課題ではマウスに対する感染形態に違いの見られた *S. Paratyphi C* について、その相違に寄与する遺伝因子を特定し、*S. Paratyphi C* を利用した腸チフス感染モデルを用いて Typhi の病原性メカニズムの一端を明らかにすることを目的としている。今年度は *S. Paratyphi C* 株、2 株の完全長ゲノム配列情報から、ゲノム特性の違いとして大規模な逆位が起きていること、それぞれの株に特異的な遺伝子が存在することを明らかにした。しかしながら、マウスへの感染形態に関与していることは明らかにできていない。以上のことから、一定の成果をあげることができたが、当初の計画通りに進捗していないため、今年度の達成度は II とする。

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)

② (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)

2024 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Evaluation of the effect of OlysetPlus ceiling nets on the containment of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* in Kagera, Tanzania

Project number : 2024—Ippan—13

- 2 . Applicant name : Lecturer, Osaka Metropolitan University, Chim Wai Chan

Joint researcher(s) : Assistant Professor, NEKKEN, Wataru Kagaya

- 3 . Amount Allotted : 1,000,000 yen

- 4 . Research Plan

① Research Purpose

The purpose of the research is to evaluate the impact of OlysetPlus ceiling nets on the containment of *P. falciparum* partially resistant to artemisinin in Kagera region, Tanzania. In a controlled trial, OlysetPlus ceiling nets will be installed in 2000 households in addition to LLIN and other standard control interventions in the intervention arm, while 2000 households in the control arm will receive only LLIN and other standard control interventions. Specifically we aim to determine (1) the clinical and parasitological efficacy of artemether-lumefantrine (AL) for the treatment of uncomplicated malaria, (2) the blood concentration of lumefantrine in treated patients on day 7, (3) the frequencies of genetic polymorphisms associated with resistance to artemether and lumefantrine, and (4) the effect of OlysetPlus ceiling nets on the prevalence of *Plasmodium* infections.

② Research details

Background

Malaria remains a major health problem especially in sub-Saharan Africa, where 93.6% of cases and 95.4% of deaths occurred in 2022 (WHO 2023). Over the last 20 years, global investments in malaria control have significantly reduced malaria incidence but the gains against malaria have stalled due to factors including vector resistance to insecticides and spread of *P. falciparum* with histidine-rich protein 2 and 3 (*hrp2/3*) gene deletions that enable escape from detection by rapid diagnostic tests (RDTs). The COVID-19 pandemic further disrupted health services and likely contributed to the increase in malaria incidence since 2020 (WHO 2022).

Artemisinin-based combination therapies (ACTs) are the recommended treatment for uncomplicated *P. falciparum* malaria. ACTs consist of a combination of an artemisinin derivative and a partner antimalarial. The artemisinin derivative rapidly reduces the parasite biomass while the partner drug eliminates the remaining parasites after the artemisinin derivative has been cleared from blood. While six ACTs are currently approved by the WHO, artemether-lumefantrine (AL) is the most widely used, accounting for 85% of ACTs procured by the Global Fund (WHO 2022).

Partial resistance to artemisinin can be defined as delayed clearance after ACT treatment of parasites that harbor one or more mutations validated as associated with delayed clearance. Artemisinin partial resistance appears to affect the *P. falciparum* ring stage, and delayed clearance is associated with mutations in the *P. falciparum* Kelch 13 (*PfKelch13*) gene. Artemisinin partial resistance in *P. falciparum* was first identified in the Greater Mekong Subregion (GMS). In Africa, parasites with partial resistance have been detected in Rwanda, Uganda, and several countries in the Horn of Africa, with validated *PfKelch13* mutations (A469Y, R561H, R622I, and A675V) present at variable frequencies. ACT treatment failure has been reported in other countries in Africa including Angola and the Democratic Republic of the Congo.

ACTs play a crucial role in the management and control of malaria in Africa, as such there is an urgent need to monitor the emergence and respond to the potential spread of artemisinin-resistant *P. falciparum*. A recent survey in Tanzania reported the presence of the *PfKelch13* R561H mutation in parasites from four regions, with the highest frequency (7.7%) in parasites from Kagera region bordering Uganda and Rwanda. Some of those parasites shared an extended haplotype flanking *PfKelch13* with parasites from Rwanda, suggesting cross-border introduction of artemisinin-resistant *P. falciparum* (Juliano et al. 2023).

Effective vector control interventions such as long-lasting insecticidal nets (LLINs) and indoor residual spray (IRS) are crucial to limiting the spread of artemisinin-resistant parasites, however their effectiveness can be compromised by inconsistent use and insecticide resistance in mosquito vectors. House screening has been shown to protect individuals who do not sleep under LLINs. Screens that cover the opening between the roof and the walls (ceiling nets) can impede the entry of mosquitoes. When made with insecticide-treated materials, ceiling nets can kill mosquitoes that habitually rest on walls or ceiling after a blood meal, thus interrupting malaria transmission. Piperonyl butoxide (PBO) is a synergist that restores the insecticidal effect of pyrethroids in resistant mosquitoes by inhibiting enzymes that break down pyrethroids. Ceiling nets treated with pyrethroid insecticide and PBO thus represent a promising tool that can be used in conjunction of LLINs and IRS to further suppress malaria transmission and curtail the spread of artemisinin-resistant parasites.

Hypothesis

We hypothesize that OlysetPlus ceiling nets can limit the spread of *P. falciparum* partially resistant to artemisinin in Kagera region, Tanzania by reducing the transmission and prevalence of *P. falciparum* infections.

Sample size estimations

OlysetPlus ceiling nets as a control intervention

OlysetPlus ceiling nets will be deployed as a rapid response to the emerging spread of artemisinin-resistant *P. falciparum* in Kagera region, Tanzania. As such, the scale of the intervention is determined by the number of OlysetPlus ceiling nets available on hand.

From our remaining stock in Kenya, we determine that approximately 4,000 ceiling nets could be made available immediately, which should cover 2,000 households.

Therapeutic efficacy study of AL

In the pre-intervention phase, we will seek to establish the baseline AL treatment failure rate in the study area. With an expected late parasitological failure rate of 5%, a confidence level of 95%, and a precision level of 5%, a minimum of 73 patients will be enrolled. To account for dropouts during follow-up, we will add 20% for a total of 88 patients.

In the post-intervention phase, we will compare the therapeutic efficacy of AL between the study arms. With an expected difference in late parasitological failure rate of 10% (AL efficacy of 80% in control arm and 90% in treatment arm), a confidence level of 95%, and a precision level of 5%, a minimum of 199 patients in each arm will be required. To account for dropouts during follow-up, we will add 20% for a total of 240 patients in each arm.

Study site

The study will be conducted in Kagera region in northwestern Tanzania. Kagera borders Uganda to the north and Rwanda and Burundi to the west. Frequent cross-border human movements among Kagera, Uganda, and Rwanda pose a substantial risk of the importation of artemisinin-resistant *P. falciparum* to Tanzania. According to the 2022 Tanzania Demographic and Health Survey and Malaria Indicator Survey, Kagera region has the third highest prevalence of malaria in children 6 to 59 months in age in the country, further highlighting the risk of rapid transmission and spread of artemisinin-resistant parasites within Tanzania.

Timing and duration of study

The study will be conducted from April 2024 through December 2026.

Interventions

In a cluster controlled trial, OlysetPlus ceiling nets will be installed in approximately 2000 households. OlysetPlus is manufactured by Sumitomo Chemical (Tokyo, Japan) and contains permethrin and PBO. The primary objective of this study is to determine the effectiveness of OlysetPlus ceiling net as a novel malaria control intervention on limiting the spread of *P. falciparum* partially resistant to artemisinin.

Specific aim 1: Determine the clinical and parasitological efficacy of AL for uncomplicated malaria

We will follow the WHO protocol for therapeutic efficacy studies for antimalarial drugs (WHO 2009) with minor modifications. The study will recruit patients with uncomplicated *P. falciparum* malaria attending health clinics in the study region. Inclusion criteria include age between 6 and 59 months, *P. falciparum* mono-infection confirmed by microscopy, and fever (axillary temperature $\geq 37.5^{\circ}\text{C}$) on examination or during the prior 24 hours. Exclusion criteria include the presence of signs or symptoms of severe malaria, severe malnutrition, presence of febrile illness other than malaria, known HIV infection,

and history of adverse reaction to AL. AL will be administered under direct observation according to dosing guidelines.

Clinical and parasitological responses will be evaluated on days 0, 1, 2, 3, 7, 14, 21, and 28. Clinical evaluation will include observation of danger signs or severe malaria, body weight, and body temperature. Finger-pricked blood samples will be obtained for the determination of hemoglobin level and the presence of parasitemia by microscopy. Additional blood samples will be collected on filter paper as dried blood spots (DBS) for determination of lumefantrine concentration (specific aim 2) and genetic polymorphisms associated with drug resistance (specific aim 3). Treatment outcomes will be classified according to standard WHO definitions for early treatment failure, late clinical failure, late parasitological failure, and adequate clinical and parasitological response. Parasites from recurrent infections detected during the follow-up period will be genotyped for *msh1*, *msh2*, and *glurp* to distinguish recrudescence from reinfection.

PCR-uncorrected and PCR-corrected per-protocol analysis of AL treatment efficacy will be estimated using the Kaplan-Meier method. Cumulative incidence and success/failure rates will be calculated to day 28.

Specific aim 2: Determine the blood concentration of lumefantrine among treated patients
Low day 7 lumefantrine concentration in blood is associated with *P. falciparum* recrudescence after AL treatment (WWARN 2015). Day 7 lumefantrine concentration will be determined using DBS by liquid chromatography tandem mass spectrometry as described previously (Ippolito et al. 2018).











Specific aim 3: Determine the frequencies of polymorphisms associated with resistance to AL


All microscopically confirmed *P. falciparum*-positive samples will be analyzed for polymorphisms associated with resistance to AL. DNA will be extracted from DBS. For resistance to artemether, the BTB/POZ and propeller domains of *PfKelch13* will be amplified by PCR and sequenced using the Sanger method. Outside these two domains, we will also screen for K189T and E252Q mutations that are frequently reported in clinical studies. For resistance to lumefantrine, we will examine the *P. falciparum* multidrug resistance 1 (*Pfmdr1*) N86Y mutation by PCR-RFLP and copy number variation (CNV) by qPCR.


Specific aim 4: Determine the effect of OlysetPlus ceiling nets on the prevalence of *P. falciparum*

We will conduct community-based cross-sectional surveys to determine the prevalence of *P. falciparum* infections in both intervention and control clusters. *P. falciparum* prevalence will be determined at baseline (prior to ceiling net installation), six months, and twelve months after ceiling net installation. Infection status will be determined by microscopy, RDT, and PCR.

Timeline of research plan

	Apr – Jun 2024	Jul – Dec 2024	Jan – Jun 2025	Jul – Dec 2025	Jan – Jun 2026	Jul – Dec 2026
AL therapeutic efficacy						
Lumefantri ne pharmacoki netics						
Resistance markers						
<i>Plasmodiu</i> <i>m</i> prevalence						
OlysetPlus ceiling net installation						

 Pre-intervention

 Post-intervention

How research relates to NEKKEN

Malaria remains a major global infectious disease and more research is urgently needed to counter the recent resurgence and to realize the goal of eradication. Some of the pressing challenges include the spread of insecticide-resistant vectors and artemisinin-resistant parasites in sub-Saharan Africa. This research builds on existing studies on the impact of OlysetPlus (permethrin + PBO) ceiling nets on malaria prevalence to examine whether the intervention can also limit the spread of artemisinin-resistant *P. falciparum*. The current studies are conducted in Kenya, with NEKKEN faculty members Wataru Kagaya and Noboru Minakawa as major contributing partners. In collaboration with NMCP and MUHAS in Tanzania, we plan to deploy OlysetPlus ceiling nets as an emergency intervention in response to emerging artemisinin resistance in Kagera region. This study will involve researchers at various career stages and expertise, including Kenyan PhD students currently based in Japan.

③ Anticipated results (Transcribe "8. Anticipated results " in the application form)

Based on available parasite genetic data, we expect AL to be efficacious in treating uncomplicated falciparum malaria, with a failure rate of <10% currently in the study area. However, due to high transmission and heavy reliance on AL, we expect AL treatment failure and frequencies of alleles associated with drug resistance to increase over the course of the study period. With the deployment of OlysetPlus ceiling nets, we expect to see differences in *Plasmodium* prevalence, AL therapeutic efficacy, and frequencies of drug-resistant alleles between intervention and control arms.

5 . Implementation Report :

① Circumstances of Implementation against the FY2024 Implementation Plan

We applied for and received ethical approval to conduct the study from Muhimbili University of Health and Allied Sciences (MUHAS) and the Ministry of Health in Tanzania. We further sought and received approval from Kyerwa District Council in the Kagera Region (Fig. 1), where the study was to be conducted. Due to budget limitations, we prioritized the installation of ceiling nets as the intervention and study objectives 3 (frequencies of genetic polymorphisms associated with drug resistance) and 4 (prevalence of *P. falciparum* infections) for FY2024.



Fig. 1 Map of the study sites in Kyerwa District, Kagera Region, Tanzania

In September 2024, we discussed with district and village leaders and community representatives to finalize details of the study plan. We invited our Kenyan colleagues who were experienced in ceiling net installations to Tanzania to lead the training of community health workers in Rukuraijo Ward, who would then be responsible for ceiling net installations in the intervention arm of our study.

Rukuraijo Ward has four main villages: Mgorogoro, Mkombozi, Nyabikurungo, and Rukuraijo. Nyabikurungo and Rukuraijo were selected as the intervention (ceiling nets) and the control (no ceiling nets) villages, respectively. Each village has a population of approximately 2,300 and 600 households.

A baseline survey to determine *Plasmodium* prevalence in children was conducted at Nyabikurungo Primary and Rukuraijo Primary in September 2024. Finger-pricked blood samples were collected to determine *Plasmodium* infection status by microscopy and rapid diagnostic test (RDT). Blood spots were also collected on filter paper for detection of infection by PCR and characterization of polymorphisms associated with drug resistance in *P. falciparum*. Hemoglobin level was determined using the Hemocue Hb 201+ system, and axillary temperature was measured using a digital thermometer.

Following the baseline school survey, ceiling nets were installed by community health workers in eligible households in Nyabikurungo. Ceiling nets were installed over a period of nine weeks, from the end of September through November 2024. A field visit was made by our Tanzanian colleagues at MUHAS in December 2024 to assess installation outcome and solicit community feedback regarding the process. In February 2025 we held a

meeting with district and local authorities to provide an update on the study progress and made a brief visit to Nyabikurungo to assess school attendance and ceiling net conditions.

② Results (Results & Observations)

Baseline survey

A baseline survey was conducted at Nyabikurungo Primary and Rukuraijo Primary to determine the pre-intervention prevalence of *Plasmodium* infections, anemia, and fever among children. At the time of the survey (September 2024), each school enrolled about 700 students, and 200 students from each school were enrolled in our survey.

Based on RDT, we observed a higher prevalence of *Plasmodium* infections in Nyabikurungo (43.0%; 86/200) than Rukuraijo (11.5%; 23/200). Anemia status was defined using the WHO standard. Overall, 19.3% (77/400) of the students had either mild or moderate anemia. Anemia was more common among infected students (Table 1). Mean hemoglobin level was significantly ($p < 0.0001$) higher in RDT-negative (12.4 g/dl) than RDT-positive students (11.3 g/dl). Fever, defined as axillary temperature $> 37.5^{\circ}\text{C}$, was not common but the prevalence was higher in Nyabikurungo (5.5%; 11/200) than Rukuraijo (0.5%; 1/200).

Table 1 Frequency of anemia by *Plasmodium* infection status

Infection status by RDT	Non-anemic (%)	Mild anemia (%)	Moderate anemia (%)	Total
Negative	258 (88.7)	22 (7.6)	11 (3.8)	291
Positive	65 (59.6)	24 (22.0)	20 (18.4)	109
	323 (80.8)	46 (11.5)	31 (7.8)	400

Ceiling net coverage in Nyabikurungo

Of a total of 600 households in Nyabikurungo, 576 were eligible and had ceiling nets installed in their residential structures, resulting in a coverage of 96.0%. Since some households had more than one residential structures or structures that were larger, approximately 750 ceiling nets (or 75 bales of nets) were used during the installation.

Ceiling nets were positively received by the community. An informal survey conducted in February 2025 showed that 19 of 20 residents interviewed reported positive sentiment toward ceiling nets. However, two issues were identified by both survey respondents and our own observations. Dust was often trapped by the fine mesh of the ceiling net, with some parents reporting rhinitis among their children after ceiling nets were installed. Damages to ceiling nets caused by rats were reported, potentially reducing the durability and effectiveness of ceiling nets.

School attendance

In our site visit in February 2025, we assessed school attendance at Nyabikurungo Primary. School attendance increased from 54% to 84% after ceiling net installations.

Key challenges

Due to budget limitations, proposed project activities including artemether-lumefantrine therapeutic efficacy and lumefantrine pharmacokinetics were not conducted during

FY2024. The scale of the intervention was also lowered to ensure that other study objectives could be completed in the proposed timeframe.

The original study design was a cluster-randomized controlled trial with Nyabikurungo and Rukuraijo as the intervention and control areas, respectively. We had intended to use a difference-in-difference analysis to demonstrate the effectiveness of the intervention on parasite prevalence. However, our baseline school survey showed that *Plasmodium* infection prevalence differed substantially between the two villages, resulting in a large design effect (22.6) that required an impossibly large sample size for a valid difference-in-difference analysis. We are now considering different approaches to evaluate the effectiveness of ceiling nets. One option is to use interrupted time series (ITS) analysis to examine changes in malaria trends from health facility data in Nyabikurungo. This method would remove the need for a control and allow for adjustments due to seasonality and rainfall. Another option is to strengthen the follow-up survey at Nyabikurungo Primary and use propensity score matching (PSM) to match pre- and post-intervention students based on baseline characteristics. Results from the follow-up survey can then be compared with ITS analysis of health facility data to evaluate the effectiveness of the intervention.

Similar to our previous experience in Homa Bay County, Kenya, many residents in the control (Rukuraijo) and neighboring villages have informally expressed positive views of ceiling nets and requested wider deployment. In addition to data on effectiveness, we are planning to collect data on community perception on ceiling nets. We will share these data with district authorities to explore the possibility of expanded implementations to be partially funded by the district or regional government.

③ Announcement of Results

Results obtained thus far are considered preliminary and have been shared within the research group and with district and regional authorities who had provided the ethical approval to conduct the study.

6 . Self-Evaluation

Some study components could not be conducted due to budget limitations but the essential components of implementing and evaluating ceiling nets as an intervention to combat malaria transmission are being completed. Preliminary results are promising but require full analyses to be completed in the upcoming months.

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)

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ガーナにおけるフランベジア調査研究に向けた遺伝子配列解読
プラットフォームの構築

課 題 番 号：2024-Ippan-14

2. 代 表 者：大阪公立大学 生活科学研究科 教授 和田 崇之
共 同 研 究 者：大阪公立大学 生活科学研究科 大学院生 井上 陽晴
大阪公立大学 生活科学研究科 大学院生 上成 竜雅
ガーナ大学 野口記念医学研究所 教授 Kennedy Kwasi Addo
ガーナ大学 野口記念医学研究所 研究員 Simpson Shirley Victoria
長崎大学 熱帯医学研究所 助教 有馬 弘晃

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究では、移送が容易で高い汎用性を有するポータブル型シーケンサー（ONT MinION）を使用し、実験・検査環境が脆弱な地域でも病原体の遺伝子解析を可能にするワークフローを確立する。解読対象を PCR 産物に限定してランニングコストと PC 解析の負荷を抑え、煩雑な配列解析を必要としないプロトコルを構築する。ここから、試料の移送が難しい地域での感染症調査を実現可能とする研究機能強化と、調査地における診断技術の向上を促す。具体的には、調査地（ガーナ・アオウイン市およびスアマン市）におけるフランベジアを含む皮膚潰瘍の原因菌種鑑別・薬剤耐性変異検出・遺伝多型解析から、公衆衛生、感染症調査の向上に資することを目的とする。

調査国であるガーナは、病原体に汚染された環境水や媒介虫からの感染により、重篤な皮膚潰瘍が高頻度に発生する。本症は、主に *T. pallidum subsp. pertenue* (TPE) を起因菌とするフランベジア（顧みられない感染症 (NTD) の 1 つ）であることが知られているが、それ以外にも *Haemophilus ducreyi* や *Mycobacterium ulcerans* (NTD の 1 つ) をはじめとして、皮膚炎症を引き起こしうる病原体が多数存在し、原因菌種の鑑別は正確な診断・治療において重要である。また、治療抗菌薬の選択は、薬剤耐性菌の蔓延・流行によって大きく変化するため、耐性変異の検出や、遺伝多型解析に基づく分子疫学調査が公衆衛生上不可欠である。

本研究では MinION を用いて、調査地域で集積された皮膚潰瘍（ぬぐい液）試料における DNA 抽出・菌種鑑別のための 16S rDNA 全長配列の解読フローを構築する。次に、TPE における薬剤耐性変異 (23S rDNA 点変異) の検出や、既登録ゲノム配列から抽出される反復多型領域の増幅産物分析を行い、その有用性を確かめる。これらは、関連の倫理審査・試料利用の承認を得た後に、既に日本国内（熱研・国際保健学

分野) に移送済みの試料を用いて実施する。ここから、菌種鑑別による各病原菌種の有病率や、フランベジアにおける感受性検査・分子疫学研究に貢献し、調査地域の公衆衛生向上に寄与することを目的とする。

② 研究内容

本研究は、2年間の研究期間を通して、(1) ポータブル型シーケンサーによる PCR 産物配列解読ワークフローの確立、(2) ガーナにおける皮膚潰瘍症例を対象とした病原体種鑑別、TPE 薬剤耐性変異の検出、および遺伝多型解析を検証する。

【MinION による PCR 産物配列解読ワークフローの確立】

MinION は長鎖配列の解読や RNA の直接解読など、さまざまな新規性が高いデータ出力を特長の一つとする一方、取り扱いには熟練を要し、機器・解析ツールのアップデートが断続的に続く不安定さ、GPU による並列処理を前提としたバイオフィンフォ解析など、さまざまな障壁がある。一方、菌種鑑別や簡易的な変異解析・遺伝多型解析には、膨大な配列データは必ずしも必要でなく、増幅 DNA 産物を正確に、簡便に解読することによって得られる遺伝子配列が感染症分子疫学・公衆衛生において必要十分なことも少なくない。

そこで、PCR 産物の MinION 配列データ取得について、(1) 多検体一括シーケンシング (最大 96 サンプル/ラン) および必要最小限のデータ量検証、(2) 低スペック PC を前提とした解析ワークフローの選定を行う。皮膚潰瘍試料において想定される原因細菌種 (TPE, *H. ducreyi*, および *M. ulcerans*) のコントロール DNA を利用して、配列解読、変異検出、遺伝多型解析ができる高汎用プラットフォームとして構築し、実際の臨床試料への適用に向けたセットアップを行う。

【ガーナにおける皮膚潰瘍症例を対象とした病原体鑑別、薬剤耐性変異・遺伝多型解析】

熱研・国際保健学分野には、ガーナ大学野口記念医学研究所との連携研究における調査地 (Suaman 市および Aowin 市：右図) にて収集された皮膚潰瘍症例の患部スワブ (約 230 検体, 2022 年) から抽出された DNA が輸送・国内保管されている。これらを対象として、遺伝子配列データの取得を試みる。本分析は、ガーナ国内および熱研での倫理審査・承認を経た後に実施する。実施時期は本研究計画 2 年目を想定しているが、承認が得られた場合には研究費が許す限りにおいて速やかに実行する。解析対象は以下の通り。

- (1) 菌種鑑別を目的とした 16S rDNA 配列全長
- (2) (感染菌種が TPE であった場合) アジスロマイシン耐性変異検出 (23S rDNA)
- (3) TPE ゲノム配列 (2024.1.3 の時点で 25 株) 比較に基づく多型領域

(1) および (2) に関しては、既に確立された PCR 条件を利用し、増幅産物のシーケンシングを行う。解読配列量は 1 サンプルあたり数千リードを目安とし、少ないデータ量による解析を徹底する。(3) に関しては、分子系統マーカーの決定、反復多型領域の探索に基づき、プライマー設計から実施する。また、PCR 以外にも、より簡易な LAMP などによる DNA 増幅手法の導入も視野に入れておく。

③ 予想される成果

本研究により、大規模配列データの解析に係るバイオインフォマティクス研究・解析環境を熱研・国際保健学分野に導入することで、海外連携先での遺伝子解析を展開可能とする機能強化が期待できる。現時点ですでに国際連携が進んでいるガーナ／皮膚潰瘍症例の実態解明について、抜本的なデータ取得が期待できる。また、菌種鑑別・薬剤耐性変異検出技術の確立、比較ゲノムに基づく遺伝多型解析領域の選定による分子疫学・分子進化学的解析手法の確立が期待できる。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

本研究では、ガーナにおいて多発する皮膚炎症性疾患の感染菌種同定と薬剤耐性遺伝子（変異）の検出、分子疫学応用に向けて、ポータブル型シーケンサー(ONT MinION) を活用した簡便な遺伝子解読法の整備を目指し、初年度はパイロットスタディとしてサンプル数を限定し、PCR産物に限定した16S rDNA全長(約1.5 kb)の配列解読に向けたプロトコル確立に重点を置いた。

- (1) 本研究では、今後の応用を見越して、任意のPCR産物を簡便に解読できるプロトコルを設計した。これにより、細菌叢解析や菌種鑑別に限定しない基本技法として活用できる。本プロトコルの確立によって、最大96検体まで同時解析数を増加させ、1検体あたりのデータ量を低く抑えることで、PCR産物の配列解読を効率よく実施することができる。操作が簡便なキットを用いた場合でも病原菌種の検出が可能であることが確認された。
- (2) 熱研・国際保健学分野との連携体制により、皮膚疾患症例由来の臨床試料を対象とした試験運用が実施できる環境が整った。現地でサンプリングされた臨床検体を用いることにより、今後の改良に向けた実践的な知見が得られた。

② 成果（結果＋考察）

TPE および *H. ducreyi* に関する PCR 陽性が事前に判明していた臨床検体（6 検体）を対象として、16S rDNA 配列解読を実施した。TPE 陽性検体では、配列データとして当該菌種は検出されず、PCR による高感度検出と並行する必要があると考えられた（図 1(A)）。しかし、一部検体においては A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) による感染が確認され、複数の病原菌種による感染が検出できる可能性が示された。*H. ducreyi* 陽性検体では、当該菌種が検出できた検体以外にも、同属菌種である *H. haemolyticus* が検出された検体を認めた（図 1(B)）。*H. haemolyticus* は一般的に口腔内常在菌として知られ、本菌の検出は試料採取時に雑菌混入が起こっていた可能性を示唆している。一部、ヒトや植物由来 DNA 配列が大量に混入している試料が確認され、現地における試料採取方法における最適化の必要性が明らかとなった。

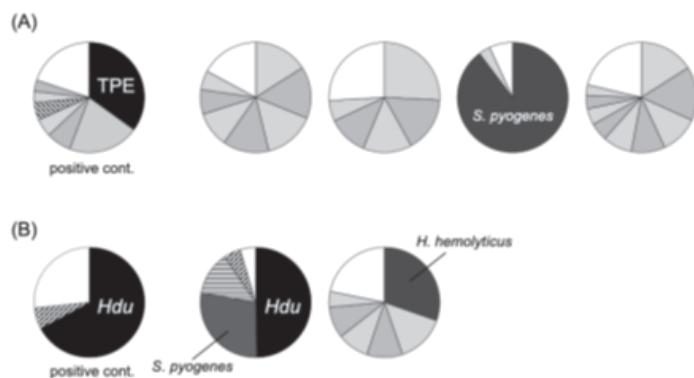


図1 皮膚炎を呈する臨床検体から抽出された DNA を鋳型として、16SrDNA 配列全長を PCR 増幅後、MinION によって解読し、菌叢構成を概算した。(A) TPE 陽性検体、(B) Hdu 陽性検体。雑菌（非病原菌）は灰色で着色し、ヒト由来配列などの混入に起因する配列は斜線で示している。

③ 成果の公表 該当なし

6. 自己評価

当初計画された技術基盤の整備という観点からは、概ね順調に推移している。研究目的の達成に向け、予想通りの成果が得られたと言える。特に、PCR 産物に限定した配列解読のための汎用プロトコルを構築したことにより、今後の臨床応用や分子疫学調査に向けた基礎技術として次年度以降に活用予定である。現地での臨床試料収集における精度管理や、次段階で求められる薬剤耐性遺伝子や分子疫学マーカーの配列解読を進展させることで、全体の目的が達せられると考えている。

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）

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：デング熱ウイルスワクチン研究開発基盤の確立

課 題 番 号：2024-Ippan-15

2. 代 表 者：島根大学新興感染症ワクチン 治療用抗体研究開発センター 助教

成相 裕子

共 同 研 究 者：島根大学新興感染症ワクチン 治療用抗体研究開発センター 特任教授

浦野 健

長崎大学 熱帯医学研究所 教授

森田 公一

3. 決 定 額：450 千円

4. 研究計画

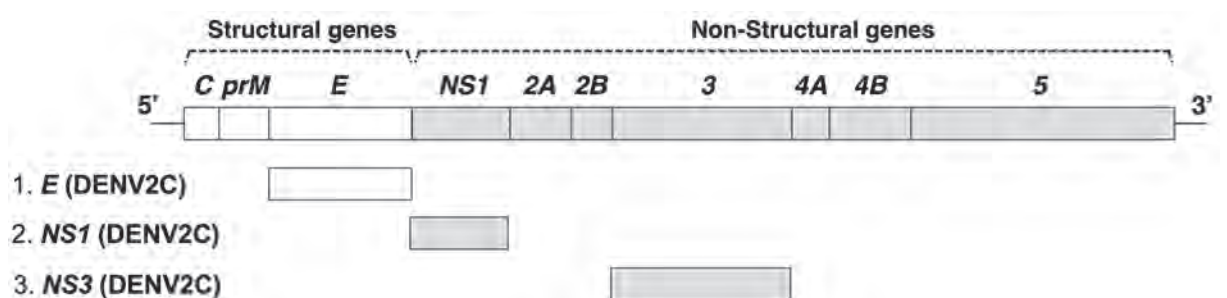
① 研究目的

現行ワクチンの問題点と、申請者らがこれまで行ってきた新型コロナウイルスに対する次世代ワクチン開発の経験を踏まえ、国民の健康維持・経済活動維持とともに、外交、国際貢献や安全保障の観点から、他国の事情に左右されることなく、国内で開発された新規ワクチン送達基材を用いて、4つの血清型すべてに対する高い中和活性および T 細胞応答の効率的な誘導ができる、現在使用中および臨床試験中のデング熱ワクチンを凌ぐ有効性・安全性を持つ次世代ワクチンの研究開発基盤確立のため、ワクチン搭載用のタンパク質を発現精製することが本研究の目的である。

② 研究内容

デング熱ウイルスタンパク質の発現・精製

標的タンパク質は、構造タンパク質エンベロープ（E）と非構造タンパク質 NS1 および NS3 を選択する（下図）。



エンベロープ（E）は、宿主細胞膜上に存在する受容体分子との結合に関与し、膜融合活性を有している。また、非構造タンパク質 NS1 は、血管内皮バリアの破壊に関与し、デング熱の重症化に重要な役割を果たすことが知られている。非構造タンパク質はウイルス粒子の構成要素ではないため、誘導された抗体は感染時に ADE を引き起こすことはない。また、CD8+ T 細胞応答は主に NS3 を標的としているという

報告がある。ともにワクチン開発の有望なターゲットになる可能性はある。
HAナノゲルに包埋する標的は、それぞれのタンパク質をリコンビナントタンパク質とする。エンベロープ（E）は、哺乳動物細胞を用いて分泌タンパク質として、非構造タンパク質NS1 およびNS3 は、細胞内で発現させ回収・精製する。まずは、デングウイルス 2 型（コスモポリタン株）（DENV2C）由来タンパク質から作製を順次開始し、その後、1 型、3 型、そして 4 型へと進めていく。
2 年目には、タンパク質のワクチン有効性の検証実験を熟研において行う予定である。

③ 予想される成果

現時点で、2 つのデング熱ワクチンが承認され、1 つのワクチンが第 3 相臨床試験を完了したところである。しかし、いずれのワクチンにも欠点があり、免疫応答に対する知識が不完全であったことを示唆している。さらに不活化ワクチン、ウイルス様粒子（VLP）ワクチンおよびタンパク質を用いたサブユニットワクチンなどの開発が進められている。新型コロナウイルス感染症に対するワクチン開発で蓄積してきた研究内容を踏まえ、本研究により、免疫組織への優れた送達基材である HA ナノゲルを用いることで、室温で輸送できる、より有効で、より安全性の高い全世界に誇れる次世代のデング熱ワクチンを開発できると考えている。

5. 実施報告

① 令和 6（2024）年度実施計画に対する実施状況

デングウイルス 2 型（コスモポリタン株）DENV2C のエンベロープ（E）タンパク質の作成から着手した。

まず、以下の 4 種類について、分泌シグナルを付加し、ヒトコドンに最適化して人工遺伝子を設計し、作成した。

DENV2N-36 (1-411) Wild type

DENV2N-36 (1-411) 変異 W101H

DENV2N-36 (1-421) Wild type

DENV2N-36 (1-421) 変異 W101H

これらを哺乳動物細胞を用いて分泌タンパク質として、細胞内で発現させ回収・精製を行なっている。また、現在デングウイルス E タンパク検出に使用されているモノクローナル抗体 4G2 のハイブリドーマから遺伝子配列を特定した。

② 成果（結果＋考察）

デングウイルス 2 型（コスモポリタン株）DENV2C のエンベロープ（E）タンパク質発現用人工遺伝子を作成して。哺乳動物細胞を用いて分泌タンパク質として、細胞内で発現させ回収・精製を行なっている途中である。現在デングウイルス E タンパク検出に使用されているモノクローナル抗体 4G2 のハイブリドーマから遺伝子配列を特定した。このリコンビナント抗体を作成していく予定である。

③ 成果の公表

現在はなし

6. 自己評価

デングウイルス 2 型（コスモポリタン株）DENV2C のエンベロープ（E）タンパク質のターゲットを絞るところに時間を要してしまい、遺伝子の設計および研究の進展が遅くなった。タンパク質発現および精製は順調に進行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）

令和6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：内臓型リーシュマニア症の新規治療薬開発

課 題 番 号：2024-Ippan-16

2. 代 表 者：東京大学 教授

後藤 康之

共 同 研 究 者：東京大学 特任研究員

溝渕 悠代

東京大学 大学院生

伊藤 辰光

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 教授

濱野 真二郎

長崎大学 熱帯医学研究所 助教

佐倉 孝哉

長崎大学 熱帯医学研究所 特任研究員

Tagod Mohammed Suliman Omer

長崎大学 熱帯医学研究所 特任研究員

Hong Jing

長崎大学 医歯薬学総合研究科 学生

Ng'etich Japheth Kibet

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

内臓型リーシュマニア症は、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・分子感染ダイナミッ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 改変能力に焦点をあ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; Hirai et al., Pathogens, 2023）。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が、我々は上記 ATP6V0D2 が Mφ 内の鉄貯蔵にも関与することを明らかにしている（Hong et al., *Front Cell Infect Microbiol*, 2024）。

これらを踏まえて、本研究では鉄結合能が予想される原虫タンパク質のリスト化を行い、特に新規のタンパク質に関してその機能を明らかにする研究を進める。現在進行中の熱帯医学研究拠点一般共同研究を通していくつかの候補分子が見つかり、それらの発現解析、鉄結合能試験、ならびに表現型解析を目指したノックアウト原虫の作出を進めているところである。2024 年度の共同研究では、少なくとも 5 つの新規鉄関連因子について解析を進めることとする。

一方、新規治療薬は必ずしも鉄を標的としたものに限定する必要はなく、有望な新規化合物をできるだけ多く開発パイプラインに乗せることが重要である。そこで、長崎大学がもつ生化学的研究や薬剤探索に関するノウハウと、東京大学がもつ *in vitro/in vivo* 抗リーシュマニア試験のキャパシティを融合して、化合物ライブラリから新規治療薬候補を探索する。

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、Mφ 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 Mφ 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* における鉄取り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。薬剤抵抗性はこの鉄取り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。

化合物ライブラリからの新規薬剤探索については、開発中である蛍光・発光ベースの HTS を用いて、化合物のスクリーニングを行う。化合物の候補として、東京大学創薬機構、大阪大学創薬サイエンス研究支援拠点、ならびに DNDi ライブラリなどの使用を検討している。東京大学・後藤グループでは EGFP 遺伝子発現原虫の作出

(Okuno et al., Exp Anim, 2003) をもとに、長年にわたる天然物由来抗原虫物質の探索実績があり (Nakao et al., Mar Drugs, 2004; Ishigami et al., J Org Chem, 2012 他)、HTS を行う環境は整っている。また、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* の作成を完了している。本研究ではこの *L. infantum* を活用するとともに、マウスへの病原性が高い *L. donovani* D10 株についても同様の遺伝子組換え体の作出を行うことで、より高感度で安定した結果が得られる HTS の確立につながる事が期待できる。

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。同様に、抗原虫化合物探索についても複数の新規抗原虫分子の同定が期待できる。前者については生化学的評価ならびに *in vitro* での表現型評価が先行し、その結果が得られ次第 *in vivo* での評価も行う予定である。ただし、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年度内に終了しない可能性が高い。後者に関しても、Mφ 内 amastigote に対する薬剤効果評価など *in vitro* 試験については年度内に成果を得ることが期待できるが、*in vivo* 評価については研究期間内に終了しない可能性がある。

5. 実施報告

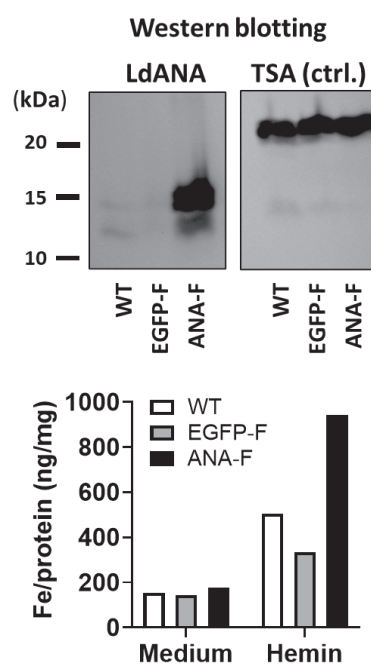
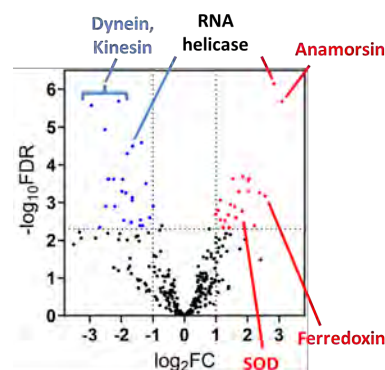
① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

上記のとおり、本研究期間では 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ことを目的としていた。鉄関連タンパク質として最も注目したものは鉄硫黄クラスタータンパク質である **anamorsin** である。本タンパク質は、複数ある鉄関連候補因子のうち、哺乳類宿主体内での発育型である **amastigote** における発現上昇が最も顕著にみられた。そこで、本研究期間では本タンパク質の性状解析を進めることに注力した。結果として、**anamorsin** が高い鉄保持能力を有していることや他の鉄関連遺伝子の発現を制御する能力があることが明らかとなった。一方、当初予定していた KO 株の作製は、CRISPR/Cas9 を活用して作出を試みたが、株の確立にはつなげていない。この理由として、当該遺伝子が生存に不可欠である可能性がある一方、KO 株の作出技術が不十分である可能性も残っている。この点については、今後の検討課題である。また、KO 株作出の遅れと関連して、薬剤開発標的となる鉄関連候補因子の決定が進んでいない。そのため、化合物ライブラリのスクリーニングに移行する代わりに、**anamorsin** の性状解析を進めたという状況である。

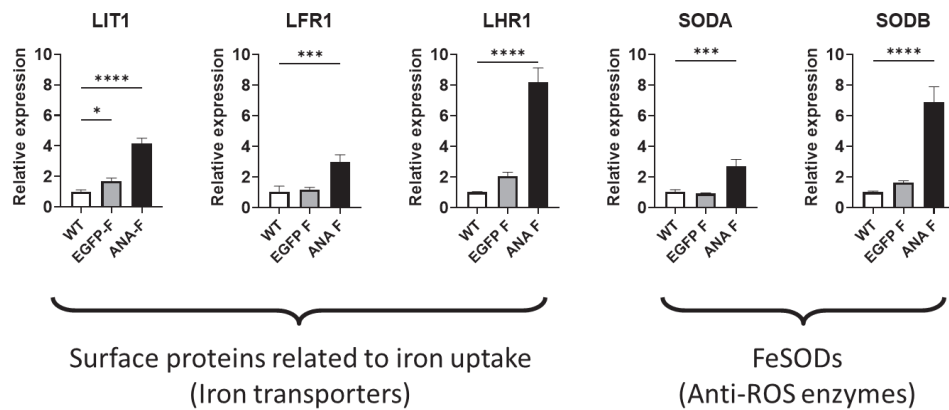
② 成果（結果＋考察）

まず、リーシュマニア原虫の異なる発育期、つまり **promastigote** と **amastigote** における遺伝子発現についてトランスクリプトーム解析を行ったところ、**anamorsin** が鉄関連遺伝子の中で **amastigote** での発現上昇率が最も高かった（右図）。そこで、**anamorsin** を過発現する *L. donovani* を作出して、鉄保持能力や他の鉄関連遺伝子の発現量を解析した。

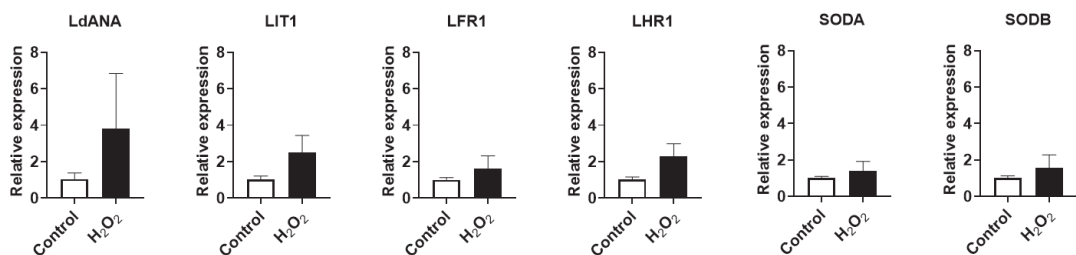
Anamorsin 過発現株（**ANA-F**）では、**anamorsin** の発現が上昇している一方、過酸化水素の分解に関わるタンパク質の一つである **TSA** の発現には大きな変化がなかった（右図）。その過発現株を通常培地または **hemin** 添加培地で培養したところ、**hemin** 添加培地で培養した **ANA-F** の細胞内鉄量が野生型と比較して増加していた（右図）。これらの結果は、**anamorsin** が **hemin** 取り込みにより細胞内に増加した鉄を保持することに機能していることを示している。この現象は無機鉄である FeCl_3 の添加培地では顕著ではなく、**anamorsin** による細胞内鉄保持には鉄の形状や由来が寄与することが示唆された。今後、異なる鉄含有化合物を用いた実験を行い、この点について理解を深める必要がある。



次に、anamorsin が他の鉄関連遺伝子の発現に与える影響について、ANA-F における遺伝子発現解析を行った。鉄の取り込みにかかわる遺伝子 3 種、ならびに鉄を利用した抗酸化応答に関わる遺伝子 2 種について発言を解析したところ、すべての遺伝子において ANA-F での発現上昇が確認された（下図）。鉄取り込みに関しては、ヘム取り込みに関わる LHR1 の発現がとくに顕著であった。上記の通り、ANA-F 株では hemin 添加培地で細胞内鉄が増加していたが、それには LHR1 の発現上昇が関与している可能性、つまり保持能力の上昇だけではなく、取り込み能の上昇が相乗的に影響していることが考えられた。



マクロファージ内の発育期である amastigote は宿主由来の酸化ストレスにさらされており、また鉄関連遺伝子には酸化ストレスに関与するものが複数含まれている。そこで、酸化ストレスの一種である H_2O_2 が anamorsin を含めた鉄関連遺伝子の発現に与える影響について解析を行った。その結果、anamorsin の発現上昇が顕著に確認された一方、他の鉄関連遺伝子については上昇が見られるものがあるものの、上昇率については anamorsin ほどではなかった（下図）。先述の過発現株の解析結果と合わせると、anamorsin は特定の刺激応答に反応して上昇したのちに、他の鉄関連遺伝子の発現を調節することに機能している可能性がある。



③ 成果の公表

【学会発表】

Ito T, Fujii W, Yamagishi J, Sanjoba C, Inaoka DK, Suzuki M, Goto Y. Iron-binding capacity of anamorsin in Leishmania parasites. 第 94 回日本寄生虫学会大会、2025 年 3 月 18 日、大阪大学 コンベンションセンター、大阪。

6. 自己評価

Anamorsin の過発現株を作出することができ、その結果として anamorsin の性状解析が大きく進んだ一方、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ず、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残念な点である。ただし、リーシュマニア原虫における鉄制御がほとんど理解されていない状況で、高い鉄保持能力をもつタンパク質が初めて明らかとなったこと、そしてその anamarsin が他の鉄関連タンパク質の発現を制御する能力をもつことが明らかになったことは、今後の鉄制御研究を進めるうえで非常に大きい成果と言える。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。Anamorsin を中心に据えた鉄制御機構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）

Ⓐ 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 6（2024）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：2024-Ippan-17

2. 代 表 者：信州大学医学部公正研究推進講座 助教 片上 幸美
共 同 研 究 者：長崎大学病院消化器内科 准教授 宮明 寿光
長崎大学熱帯医学研究所免疫病態制御学分野 准教授 水上 修
群馬大学大学院保健学研究科 教授 徳舛 富由樹
長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野 助教 宮崎 真也
長崎大学熱帯医学研究所原虫学分野 助教 宮崎 幸子

3. 決 定 額：350 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。

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。

2024 年度（3 年目）

- ・ ヒト iPS 由来肝細胞へのマラリア原虫感染実験系を最適化する。
- ・ 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。
- ・ 糖代謝異常・脂質代謝異常の in vitro 病態モデルを確立する。
- ・ 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。

1. ヒト iPS 由来肝細胞へのマラリア原虫感染実験系最適化

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。

2. NAFLD 患者由来（脂質代謝異常）の疾患特異的 iPS 細胞株樹立

遺伝子変異が明らかな NAFLD 患者の末梢血から単核球（PBMC）を分離し、京都大学 iPS 細胞研究所（CiRA）のプロトコルに従って初期化遺伝子を導入する。クローニングした 10 個に株番号を付与し各々を細胞株とする。分化誘導実験に供する株は、核型解析（外部委託）、STR 解析、未分化解析および多能性評価を行い、当該患者の iPS 細胞であることを確認して実験に用いる。

3. 糖代謝異常・脂質代謝異常の in vitro 病態モデル確立

糖代謝異常モデルの開発には疾患特異的 iPS 細胞株、脂質代謝異常モデルの開発には 2 で樹立した細胞株を用いる。

(1) 糖代謝疾患モデル

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、グルコースオキシダーゼがグルコースを酸化して生じる過酸化水素を蛍光プローブにより検出するキットを用いて細胞中のグリコーゲン量を定量する。正常肝細胞と疾患特異的 iPS 細胞由来肝細胞のグリコーゲン蓄積量の差を明確に示す実験系を構築し、糖代謝異常の病態再現モデルを確立する。

(2) 脂質代謝疾患モデル

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。脂質の蓄積は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評価する。培養した細胞から FOLCH 法により脂質を抽出する。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リン脂質の量を測定し、細胞 1g あたりの脂質量を、健常人由来の 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。

4. 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、スポロゾイトを回収する。作製したヒト iPS 細胞由来肝細胞に回収したスポロゾイトを感染させ、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蛍光顕微鏡によりモニターし、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。代謝疾患モデルと健常者モデルにおいて、スポロゾイト感染率の差と関連する特性の評価を行う。

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。がん細胞から樹立した細胞株を用いる実験系に比べ、よりヒトの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、ヒト iPS 細胞由来肝細胞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、2 年目にはここから分化誘導を再開し成熟肝細胞を作製することが可能となった。マラリア原虫の感染実験においては、スポロゾイト回収と細胞培養系のタイミングを合わせることがクリアすべき課題であるが、この実験系を最適化することにより効率的な評価の実施が期待できる。また、疾患特異的 iPS 細胞を用いて肝臓の代謝異常を再現することにより、感染に至るメカニズムと肝臓の代謝機能との関係性を解析することが可能になる。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

実験実施に必要な分化誘導途中における長距離細胞移動の検討

研究メンバーの異動および実験環境の変更に伴い、細胞を維持管理するための環境を再整備する必要性が生じた。信州大学バイオメディカル研究所（長野県松本市）において、新規に iPS 細胞の維持培養に要する設備および器具、試薬類の保管場所を確保し、細胞の培養に係るプロセスを信州大学で実施できるよう環境を整備した。信州大学において細胞の維持管理および分化誘導が可能になる目途がついたが、マラリアの感染実験については、設備の問題から信州大学での実施は不可能であり、熱帯医学研究所との連携が不可欠で感染実験等は引き続き長崎大学で実施する。このため、分化誘導途中の細胞を培養状態で長距離移動する可能性が生じ、細胞が温度や CO₂ 濃度といった外的環境の変化に伴うストレスに耐えられるかどうかの確認を行った。また、輸送に伴う振動を想定し、液体培地の減少を抑制しつつガス交換が可能なプレートシールの使用も検討した。まず 96 ウェルプレート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、広く実験に用いられ標準株として認知されている 201B7、過去の分化誘導実験により肝細胞への高い分化率が確認された HPS1046、我々が樹立したオリジナル株から IR2201A の 3 株である。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。この際、単位時間当たりのガス交換が減少するよう元の 1/8 に調整したプレートを同時に作製した。各々を、保温ジェル上に静置・ガス交換なしの条件で 6～10 時間（想定長距離移動時間）保持し、細胞がその後に行う感染実験に耐えられるかどうかを評価した。研究機関間移動に伴う培地漏れを防ぐため、通気性のあるプレートシールを 4 種類準備し、使用可能かどうかを確認した。

② 成果（結果＋考察）

信州大学内で実験可能な環境を得ることができた。信州大学では、学内 2 か所に培養設備を確保し、協力者も得られたことから、ヒト iPS 細胞の培養および実験の手技を伝達し、効率よく研究を進められる環境が整った。共同研究者の各所属機関間において、共同研究ならびに細胞の移動に必要な各種手続きを進めている。分化誘導途中で細胞を長距離移動できるかどうかの検討結果については、継代前培養の 1/6 播種のプレートでは、保温ジェルの温度が 10 時間後には 24℃まで低下したが、速やかに 37℃のインキュベータに戻すことで問題なく細胞は生存し、その後の感染実験も可能であることがわかった。しかし、ガス交換を減少させる目的で細胞数を 1/8 に調整したプレートでは細胞が死滅し、この方法では継続できなかった。よって CO₂ ガス濃度の維持が重要課題であると考えられる。

- ・ CO₂ ガスの補填
- ・ 保温状態の改善（温度変化を少なく、かつ安定させる）
- ・ 振動の減少

を課題とし、通気性プレートシールを採用して移動環境の改善を試みる。

③ 成果の公表

片上幸美、水上修作、中前早百合、谷口真由美、簡君宇、徳舛富由樹、「ヒト iPS 由来肝細胞を用いたマラリア原虫の感染評価」、第 30 回分子寄生虫学ワークショップ、第 20 回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会、千葉、2024 年 8 月 27 日

6. 自己評価

今年度は、実験環境を整えるために時間を要し、特に複数の実験施設において細胞の培養、分化誘導、感染実験を分担するための条件設定に苦慮する結果となった。そのため、新規の実験がほとんど実施できなかったことが大きな反省点である。一方、分化途中の細胞が、想定よりも外部環境の変化によるストレスに耐えうることが判明し、ヒト iPS 細胞の維持管理、分化誘導プロセスと、各段階における感染実験を複数の研究施設で実施する手法を考案できた。このプロトコル確立により、in vitro 実験プラットフォームとして、ヒト iPS 細胞由来肝細胞を広く利用できる希望が高まった。

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）

令和 6（2024）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：2024-Ippan-18

2. 代 表 者：熊本大学大学院 環境衛生解析学講座 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、酸化リン酸化による ATP 合成に関わる呼吸鎖複合体 IV を阻害することで細胞に毒性を示すことが知られる。*Mycobacterium* 属では、硫化水素とキノンを基質とした Sulfide:quinone oxidoreductase (SQOR) と、硫化水素と O-Acetyl-L-serine を基質とした Cysteine synthase (CysK1、CysK2) によるシステイン合成の 2 つの経路により硫化水素は解毒される。興味深いことに、結核菌、およびウシ型結核菌 (*M. bovis*) BCG 株では、この 2 つの硫化水素代謝経路が保存されているが、迅速発育菌である *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*)、および非結核性抗酸菌症の病原菌である *Mycobacterium intracellulare*、*Mycobacterium avium* にはシステイン合成経路のみが保存されており、硫化水素解毒機構は細菌種により異なっている。申請者が行ったこれまでの研究で、結核菌 SQOR の阻害剤を同定し、結晶構造を明らかにしたが、酵素反応機構の詳細は明らかとなっていない。また、結核菌 SQOR がマクロファージ内での生存に重要である酸化ストレス抵抗性に関与することを見出した。本研究では、SQOR の反応機構を明らかにするとともに、SQOR を介した酸化ストレス抵抗性のメカニズムについて明らかにすることを目的とする。さらに、硫黄代謝経路が新たな創薬標的分子候補となり得るのかについて検討を行う。

② 研究内容

1. 結核菌 SQOR の反応機構の解析

非常に高い分解能で結核菌 SQOR の結晶構造を得ることに成功したが、キノンの電子密度が弱いためにキノン結合部位を決定するには至っていない。そこで、本年度は種々のキノンとの共結晶を作製し解析することで、キノン結合部位の決定を行う。そして、基質および共結晶から得られた結果をもとに、結核菌 SQOR の

変異体を作製し、システインのポリスルフィド化に着目して解析を行うことにより、結核菌 SQOR の反応機構を明らかにする。また、SQOR の最終的な硫黄生成物を明らかにする。

2. 阻害剤により結核菌 SQOR 阻害機構の解析

北教授、稲岡准教授が保有するキノン結合部位に対する阻害剤ライブラリーを用いて 5 つの阻害剤を同定することができた。本年度は、阻害剤の阻害機構を生化学的に解析するとともに、原子レベルで阻害機構を明らかにする。

3. 酸化ストレス抵抗性メカニズムの解析

同定した結核菌 SQOR 阻害剤と *M. bovis* BCG 株を用いて、SQOR を阻害した場合のカタラーゼなどの活性酸素を処理する酵素群の発現変動を解析する。さらに、活性酸素を処理する活性硫黄分子を定量することにより、酸化ストレス抵抗性が酵素発現によるものか、それとも硫黄代謝物によるものなのかを明らかにする。

4. 硫黄代謝経路が細胞増殖に与える影響の解析

M. bovis BCG 株を用いて、テトラサイクリンプロモーターにより制御されるスクレアーゼ活性を失った Cas9 による遺伝子ノックダウン株を作製し、表現型の解析を行う。結核菌において、硫黄代謝に関する分子は低酸素環境下で発現誘導されることから、好気環境と低酸素環境での細胞増殖に与える影響を評価する。

③ 予想される成果

2023 年度の成果としては、結核菌 SQOR の結晶構造を明らかにし、熱研対応教員である、北教授、稲岡准教授が保有する実験設備、および阻害剤ライブラリーを用いることにより 5 つの阻害剤を同定することができた。さらに、SQOR が結核菌の酸化ストレス抵抗性に関与することが示唆されることから、結核菌の宿主内生存戦略における新たな知見を得ることができた。本年度は、引き続き酸化ストレス抵抗性に焦点を当てて SQOR の生理的役割について研究を進めるとともに、SQOR の反応機構を原子レベルで明らかにし、阻害剤の阻害機構についても解析を進めていく。さらに、阻害剤と遺伝学的手法により硫黄代謝が創薬標的分子となる得るのかについての検討を進めていく。多剤耐性菌多剤耐性結核菌は公衆衛生上の課題であり、新規抗結核薬の開発は強く望まれている。本研究で、硫黄代謝経路が創薬標的分子となり得ることが示された場合には、本研究成果は創薬研究へ応用する際に重要な基盤となることが期待される。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

1. 結核菌 SQOR の反応機構の解析

結核菌 SQOR のキノン結合部位を同定するために、結核菌 SQOR と Ubiquinone-1 (UQ₁) の複合体結晶の作製を試みた。また、結核菌 SQOR の硫黄生成物を同定するために、質量分析を用いて解析を行った。

2. 阻害剤を用いた結核菌 SQOR 阻害機構の解析

これまでに同定している3つのSQOR阻害剤と結核菌SQORの複合体結晶を作製することを目的として、研究を進めた。阻害剤を含む結晶化溶液に、結核菌SQORのタンパク質結晶を浸すことで、複合体結晶の取得を試みた。

3. 酸化ストレス抵抗性メカニズムの解析

結核菌 SQOR を発現させた *M. smegmatis* は過酸化水素による酸化ストレスに耐性を示す。この酸化ストレス耐性が、過酸化水素の代謝酵素であるカタラーゼによるものかを調べるために、野生株と結核菌 SQOR 発現株のカタラーゼ活性を測定した。

4. 硫黄代謝経路が細胞増殖に与える影響の解析

エンドヌクレアーゼ活性を失った Cas9 を発現する pLJR965 プラスミドに CysK1 遺伝子、CysK2 遺伝子、および SQOR 遺伝子のガイド RNA を組み込み、CRISPR 干渉による遺伝子ノックダウンプラスミドを作成した。そして、これらを用いて *M. bovis* BCG 株の形質転換体を得て、増殖速度を評価した。

硫化水素による3つの遺伝子の発現変動を明らかにするために、硫化水素存在下で培養した *M. bovis* BCG 株から RNA を抽出し、q-PCR により mRNA 発現量を評価した。

② 成果（結果＋考察）

阻害剤を用いた結核菌 SQOR の反応機構の解析を試みたが、阻害剤と結核菌 SQOR との複合体結晶を得ることができなかったことから、結果を得ることができなかった。一方、結核菌 SQOR とキノンの複合体結晶を得ることができ、キノン結合部位を同定することができた。結核菌 SQOR の2つのシステイン残基（160番目、338番目）は、4つの硫黄原子で結合しており、ポリスルフィド化されていた。そして、

UQ₁ は FAD から 4.3 Å と近い位置に配位していることから、システイン間のポリスルフィド化により硫黄原子の求核攻撃により電子が FAD へと受け渡され、UQ₁ へと伝えられることが分かった（図1）。

硫化水素により、結核菌の増殖が促進されることが報告されている。硫化水素代謝が増殖に与える影響を明らかにするために、CRISPR 干渉による *M. bovis* BCG 株の CysK1 遺伝子、CysK2 遺伝子、および SQOR 遺伝子ノックダウンを行った。そ

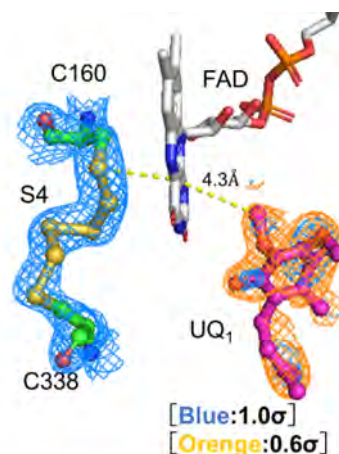


図1：FADとUQ-1の複合体結晶構造

の結果、硫化水素を含まない OADC 添加 7H9 培地において、各遺伝子は増殖に影響を与えなかった。そして、培地中に $5\mu\text{M}$ と $50\mu\text{M}$ の硫化ナトリウムを添加して *M. bovis* BCG 株を培養し、16 時間後の mRNA レベルを解析したところ、硫化ナトリウムを添加しない場合と比べて、いずれの濃度の硫化水素存在下で CysK1 遺伝子と SQOR 遺伝子の mRNA 発現は 5 倍ほど抑制されていたが、CysK2 の mRNA 発現は 1.2 倍ほど亢進していた。つまり、これら遺伝子発現は環境中の硫化水素濃度により制御されており、硫化水素環境下では CysK2 が優位に硫化水素代謝を行うことが示唆された。

M. smegmatis の結核菌 SQOR 発現による H_2O_2 によるストレス耐性機構を明らかにするために、 H_2O_2 を代謝するカタラーゼ活性を測定した。その結果、野生株と SQOR 発現株において、カタラーゼ活性に有意差はみられなかった。そして、結核菌 SQOR の酵素反応液中の硫黄生成物を質量分析により同定した。その結果、結核菌 SQOR の基質である H_2S は消費されており、 H_2S_2 と H_2S_3 が産生されることが分かった (図 2)。産生されていたこれらの分子は超硫黄分子と呼ばれ、活性酸素のスカベンジャーとしての機能をもつ。つまり、*M. smegmatis* の酸化ストレス耐性機構は、カタラーゼによる酵素反応によるものではなく、超硫黄分子による示唆された。しかし、*M. smegmatis* 内で超硫黄分子が増加していることは確認できていないため、さらなる検討が必要である。

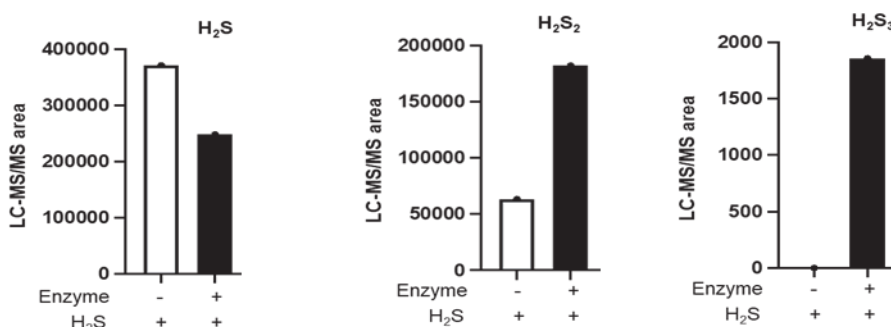


図2：結核菌SQORの硫黄代謝物の質量分析による解析

③ 成果の公表

【学会発表】

1. 結核菌 sulfide:quinone oxidoreductase のポリスルフィド化による酵素反応機構
松尾 祐一, 志波 智夫, 岸川 淳一, 伊豫田 健次, 中井 宇響, 太田 明菜, 澤 智裕, 豊元 柊弥, 北 潔, 稲岡 健ダニエル
第 97 回 日本生化学大会 2024 年 11 月 6 日
2. *Mycobacterium smegmatis* における、Sulfide:quinone oxidoreductase による酸化ストレス耐性機構
松尾 祐一, 志波 智夫, 岸川 淳一, 伊豫田 健次, 中井 宇響, 太田 明菜, 澤 智裕, 豊元 柊弥, 北 潔, 稲岡 健ダニエル
第 97 回 日本細菌学会総会 2024 年 8 月 7 日

6. 自己評価

予定していた実験計画の大部分は遂行することができ、結核菌 SQOR のキノン結合部位を同定することができた。そして、硫化水素が代謝酵素の遺伝子発現を制御することなど、硫化水素代謝に関する新たな知見を得ることができた。しかし、予定していた阻害剤との複合体結晶が得られておらず、さらなる検討を必要とすることから、不満は残路が一応の成果をあげることができたと考えている。

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）

令和6（2024）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て採集された殺虫剤抵抗性蚊に対するマイクロアレイを用いた遺伝子発現の解析

課 題 番 号：2024-Ippan-20

2. 代 表 者：福岡大学 教授 佐藤 朝光
共同研究者：福岡大学 助教 Parinya Wilai
福岡大学 博士課程後期 向井 梨恵
University of Kinshasa Assistant professor Fabien Cedric Vulu
長崎大学 教授 皆川 昇
長崎大学 准教授 二見 恭子

3. 決 定 額：400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

殺虫剤は、疾病媒介蚊の防除のための有効なツールとして多用されている。そして、その多用は、世界各地に殺虫剤抵抗性を獲得した疾病媒介蚊を出現させ、防除の効率を低下させている。実際に、病害動物学分野のファビエン氏は、コンゴ民主共和国（DRC）の南西部地域にて採集されたヒトスジシマカとネッタイシマカが殺虫剤抵抗性を獲得していることを報告している（第72回 日本衛生動物学会 南日本支部大会(2023)）。現在、疾病媒介蚊が殺虫剤抵抗性を獲得することを回避するための対策として、作用点の同じ殺虫剤を継続的に使うのではなく、作用点の異なる殺虫剤を組み合わせ使用するローテーション法が推奨されている。一方、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性の獲得は、①殺虫剤の作用点となるタンパク質の構造変化だけでなく、②クチクラの変化による殺虫剤の透過性低下や③CYPなどの薬物代謝酵素の活性増強などの多様な生体変化が原因となることが知られている。このことは、ローテーション法による殺虫剤の使用だけでは、疾病媒介蚊が殺虫剤抵抗性を獲得することを十分に回避できない可能性を示している。特に、②や③を原因とする殺虫剤抵抗性は交差抵抗性につながり、防除に使用された殺虫剤とは作用点異なる新しい殺虫剤を導入しても、殺虫効力が得られない可能性が生じる。したがって、ローテーション法による殺虫剤を使った防除において、疾病媒介蚊が殺虫剤抵抗性を獲得した場合、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化を包括的に解析し、殺虫剤抵抗性の原因が関与しない機序を持ち、殺虫効力を有する殺虫剤へと速やか変更することが有効な対処法となる。私達は、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化を解析する方法として、マイクロアレイに着目した。本申請課題では、殺虫剤抵抗性を獲得した疾病媒介蚊の遺伝子発現について、マイクロアレイを用いて解析する。そして、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化の情報が、マイクロアレイの

解析によって容易に得られることを確認する。

② 研究内容

本申請では、DRC のキンシャサ大学との MTA によって病害動物学分野が管理しているヒトスジシマカとネッタイシマカの殺虫剤抵抗性系統について、マイクロアレイを用いて発現している遺伝子を解析する。対象の感受性系統は、本学構内で採集されたヒトスジシマカと当研究室がチェンマイ大学から分与される予定のネッタイシマカの Rockefeller 系統を使用する。当研究室では、すでにヒトスジシマカの albo2023 カスタムアレイを所有していることから、これら系統のうち、ヒトスジシマカの系統を優先してマイクロアレイによって解析する。各系統の中でも、成虫雌、成虫雄、4 齢幼虫の順にて解析を行う。マイクロアレイによる解析は、まず、ISOGEN with Spin Column (日本ジーン社)を用いて、各試料から total RNA を抽出する。total RNA の品質は、TapeStation (アジレント社)を用いて確認する。そして、アジレント社の 1 色法のプロトコールに従って total RNA を発色させる。ヒトスジシマカの total RNA の発現量は、albo2023 カスタムアレイにハイブリダイゼーションしたのち、SureScan (アジレント社)を用いてスキャンする。得られたデータは、GeneSpring ソフトウェア (アジレント社)を用いて解析する。そして、殺虫剤抵抗性に関する生体変化を推測する。ネッタイシマカに対するカスタムアレイは、Genbank の核酸情報を利用して、60k のカスタムアレイに新たにデザインする。そして、ヒトスジシマカと同じ方法によって解析する。

③ 予想される成果

前述の通り、ローテーション法による殺虫剤を使った防除において、疾病媒介蚊が殺虫剤抵抗性を獲得した場合、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化を包括的に解析し、殺虫剤抵抗性の原因が関与しない機序を持ち、殺虫効果の期待できる殺虫剤へと速やかに変更することが有効な対処法となる。しかし、実際には、対象となる疾病媒介蚊に殺虫剤抵抗性が確認された場合、病害動物学分野のファビエン氏が報告したように、WHO のテストキットなどを用いた殺虫剤の生物学的試験を実施し、対象蚊の様々な殺虫剤に対する感受性を調査する。そして、対象蚊の感受性が高い殺虫剤を見出し、新たに防除に使用する殺虫剤を検討する。このような生物学的試験の作業過程は簡便であるが、数種類の殺虫剤を曝露する必要がある、多くの労力と時間を必要とする。本申請課題によって、疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化の情報が容易に提供できるようになると、殺虫剤抵抗性の原因が関与しない機序を持ち、殺虫効力を有する殺虫剤を速やかに予測できる可能性がある。そして、その予測が、現在の防除で行われる数多くの殺虫剤の生物学的試験を行う必要性をなくし、その労力と時間を軽減することに貢献することを期待している。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

本申請課題では、病害動物学分野にて継代飼育している殺虫剤抵抗性のヒトスジシマカ 2 系統とネッタイシマカ 1 系統に対し、マイクロアレイによる解析を試みた（表 1）。ヒトスジシマカの感受性系統には、本学構内で採取され、継代飼育された福岡大学系統を用いた。また、ネッタイシマカの感受性系統には、チェンマイ大学から分与される予定であった Rockefeller 系統に代わり、長崎大学にて継代飼育されているシンガポール系統を用いた。各系統の蚊から total RNA を抽出するため、羽化後 3 日目の雌 3 匹を 1 サンプルとしてホモジナイズを行った。そして、ISOGEN with Spin Column (NIPPONGENE) を使用し、total RNA を抽出した。RNA の品質は、TapeStation 4150 (Agilent) を用い確認した。続いて、発現した遺伝子を測定するため、total RNA は、1 色法マイクロアレイのプロトコール (Agilent) に従い蛍光標識した。標識した cRNA はハイブリダイゼーションしたのち、SureScan G2600D (Agilent) を用いスキャンした。ヒトスジシマカの遺伝子発現の解析には、33826 個のプローブを持つ albo 2023 カスタムアレイを用いた。また、ネッタイシマカの遺伝子発現の解析には、新たにデザインした 21455 個のプローブを持つ Aeg 2025 カスタムアレイを用いた。データの解析には、GeneSpring (Agilent) を用いた。

表1 実験に使用した蚊

種	系統	世代	特徴
ヒトスジシマカ	キンシャサ	F3	抵抗性
	マタディ	F3	抵抗性
	福岡大学	F29	感受性
ネッタイシマカ	ランワラ	F5	抵抗性
	シンガポール	F94	感受性

② 成果（結果＋考察）

疾病媒介蚊の抵抗性の獲得に関する遺伝子発現の増減の解析例として、福岡大学系統をコントロールとして、ヒトスジシマカのキンシャサ系統に関する遺伝子発現の増減を Volcano plot にて示した（図 1）。この図に示されるように、殺虫剤の抵抗性を獲得するために、キンシャサ系統は数多くの遺伝子の発現を増減させていることが示された。詳細には、33826 個の遺伝子のうち、発現量が 2 倍以上増加した遺伝子の数は 5981 個であった。また、発現量が 2 倍以上減少した遺伝子の数は 3895 個であった。ヒトスジシマカのキンシャサ系統以外の系統も、殺虫剤抵抗性を獲得するために、数多くの遺伝子の発現が増減していることが示された（表 2）。興味深いことに、ヒトスジシマカのキンシャサ系統とマタディ系統において、発現が増減した遺伝子の数は類似していた。したがって、ヒトスジシマカの 2 系統に共通する発現の増減した遺伝子の数を確認し

図1 ヒトスジシマカのキンシャサ系統における遺伝子発現の変化

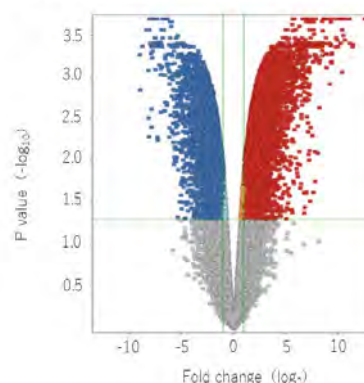
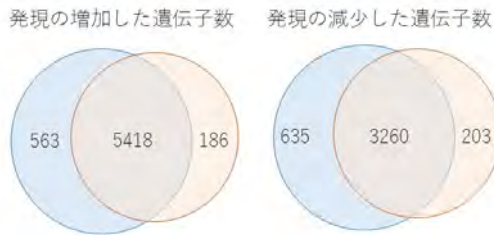


表2 各系統間で発現量が2倍以上変化した遺伝子の数

種	系統	発現量の増加した遺伝子の数	発現量の減少した遺伝子の数
ヒトスジシマカ	キンシャサ	5981	3895
	マタディ	5604	3463
ネッタイシマカ	キンシャサ	860	770

た（図 2）。その結果、キンシャサ系統の発現の増加した 5981 個の遺伝子のうち、5418 個の遺伝子がマタディ系統においても発現を増加させていた。このように発現が増加した遺伝子に見られた高い共通性は、発現が減少した遺伝子においても観察された。以上の結果から、ヒトスジシマカの 2 系統について、

図2 発現変動した遺伝子のヒトスジシマカ系統間における比較



て、遺伝子の発現量の増加した程度も類似しているかもしれないと考えた。したがって、ヒトスジシマカのキンシャサ系統に関し、発現量の増加した上位 10 種類の遺伝子のリストを作成した（表 3）。そして、マタディ系統における同じ遺伝子の発現の増減と比較した。この結果、程度は異なるものの、キンシャサ系統において発現量が大きく増加した遺伝子は、マタディ系統においても大きく増加していることが示された。特に、2 系統は、殺虫剤抵抗性の獲得に伴い、クチクラをコードするタンパク質を強く発現させていることを示した。これは、ヒトスジシマカの 2 系統が CYP などの薬物

表3 ヒトスジシマカにおいて発現量の増加した遺伝子のリスト

GENE ID	Description	FC in キンシャサ	FC in マタディ	
LOC115265701	cuticle protein 64-like	7614	1331	(5)
LOC109432606	uncharacterized	6232	4225	(1)
<u>LOC115265525</u>	adult cuticle protein 1-like	2798	1338	(4)
<u>LOC109421336</u>	adult cuticle protein 1-like	2721	1074	(7)
<u>LOC109432444</u>	adult cuticle protein 1	2275	922	(9)
LOC109425797	uncharacterized	2229	1116	(6)
<u>LOC115265811</u>	adult cuticle protein 1-like	1805	604	(12)
LOC109421224	uncharacterized	1721	301	(31)
<u>LOC109432443</u>	adult cuticle protein 1	1650	780	(11)
LOC109407365	trypsin 3A1-like	1467	567	(15)

カッコ内はマタディ系統における遺伝子の発現量の順位を示す。

今回、DRC で採取されたヒトスジシマカの 2 系統はクチクラを変化させている可能性が

示された。このような殺虫剤抵抗性の機序は交差抵抗性の発達につながり、防除に使用された殺虫剤とは作用点異なる殺虫剤に対しても、殺虫効果が得られない可能性が高い。以前の研究にて、殺虫剤の生物学的試験は、ヒトスジシマカの 2 系統がフェニトロチオンにのみ感受性であることを示した。しかし、私達は、今回のマイクロアレイの結果から、これらヒトスジシマカにフェニトロチオンのみが有効である理由を示すことはできていない。今後、様々な殺虫剤に対する感受性が調べられたヒトスジシマカの系統に対するマイクロアレイの解析を行うことにより、その理由を解明することができるかもしれないと考えている。

③ 成果の公表

本研究成果については、第 77 回日本衛生動物学会大会（長崎、2025 年開催）にて、下記の題目にて報告した。

コンゴ民主共和国にて採集された殺虫剤抵抗性蚊の遺伝子発現

佐藤 朝光¹、向井 梨恵¹、Parinya Wilail¹、江頭 早紀¹、入江 圭一¹、坂本 大輔¹、Vulu Zimbombe Fabien²、二見 恭子³、皆川 昇³、鹿志毛信広¹

（1 福岡大学、2 キンシャサ大学、3 長崎大学・熱研）

6. 自己評価

本申請課題では、マイクロアレイが疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性に関する生体変化を包括的に解析することを示した。また、今後、殺虫剤の生物学的試験を行った殺虫剤抵抗性の疾病媒介蚊に対するマイクロアレイの解析例を増やすことの重要性も示すことができた。そして、殺虫剤抵抗性に関するマイクロアレイ研究の進展により、殺虫剤抵抗性の影響を受けない殺虫剤を速やかに予測することができるようになれば、現在の防除で行われる殺虫剤の生物学的試験に費やされる労力と時間を大きく軽減できることを確信した。

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）

令和 6（2024）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：2024-Ippan-24

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：広島大学大学院医系科学研究科生薬学 大学院生 古川 桃圭
広島大学大学院医系科学研究科生薬学 大学院生 Walaa Hammand Mohamed Sediek
広島大学大学院医系科学研究科生薬学 大学院生 Paul Jazon Ilagan Sarne
広島大学大学院医系科学研究科生薬学 大学院生 Rabemananjara Miora
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特任研究員 加藤 知世

3. 決 定 額：450 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

（1）2024 年度（R6）：本研究課題初年度（2023 年度）で単離・構造決定できた化合物について抗マラリア活性評価を進めていただき、学会および国際学術誌へ投稿していく。また、他の植物、海洋生物、および培養サンプルについて並行して化合物の分離・精製を行い、新たな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）。培養には振盪培養器や恒温槽が必要であり、2023 年度に新たに培養装置を増設したので 2024 年度は微生物代謝物についてさらなる研究の進展が期待できると考えている。

（2）2025 年度 (R7)：R6 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い、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。

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 60 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6（2024）年度実施計画に対する実施状況

本研究ではバラ科植物であるホソバシャリンバイ（*Rhaphiolepis indica* var. *liukiensis*: 以下 RI）、マメ科のモクセンナ（*Senna surattensis*: 以下 SS）、他3種（Ey, ST, CB と略記）を研究材料とし、その葉部について含有成分の化学構造と活性評価を行った。まず、含有される化学成分を冷浸法にて MeOH で抽出した。得られた MeOH 抽出物から MeOH を留去したのち、極性の異なる溶媒間で分配抽出操作を行い、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノール、水可溶画分を得た。ここで得られた画分のうち、一般的に生物活性成分が多く含まれるとされる酢酸エチル可溶画分についてさらに分離精製を進めることとした。化学成分の単離精製はシリカゲル（Merck）、ODS（ナカライテスク; 35×350 mm）、HPLC（GL サイエンス, Inertsil ODS-3, 6×250 mm）、示差屈折率検出器（島津製作所 RID-10A）を使用して行った。単離した化合物のスペクトル測定には、旋光度計（Jasco P-1030）、赤外線吸収スペクトル（Horiba FT-710）、紫外線吸収スペクトル（Jasco V-520）、核磁気共鳴吸収スペクトル（Bruker Avance500）、高分解能質量分析スペクトル（LTQ Orbitrap XL）を使用した。その他、使用した有機溶媒や試薬類は和光純薬および東京化成から入手した。

また、熱帯熱マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）に対する活性評価は SYBR Green 法により、長崎大学熱帯医学研究所（熱研）にて実施した

② 成果（結果＋考察）

種々のカラムクロマトグラフィーにより分画を進め、最終的に RI から4種、SS から26種、その他3種（Ey, ST, CB）の植物サンプルからそれぞれ11, 10, 16種の化合物の単離に成功した。それらの化合物の化学構造を質量分析スペクトル、赤外線吸収スペクトル、核磁気共鳴吸収スペクトルで解析することで決定し、計15種の新規化合物と67種の既知化合物を得た（化学構造式は未発表のため割愛）。

次に、得られた化合物についてマラリア原虫に対して活性を評価したところ、以下に示す RI-cpd1 から CB20 までの24種に 50 μ g/ml で抑制率 50%以上の活性が見られたことから IC₅₀ 値を算出した（図1）。以上の結果より、本研究で単離した化合物は有望な医薬品リード化合物になる可能性が示唆された。

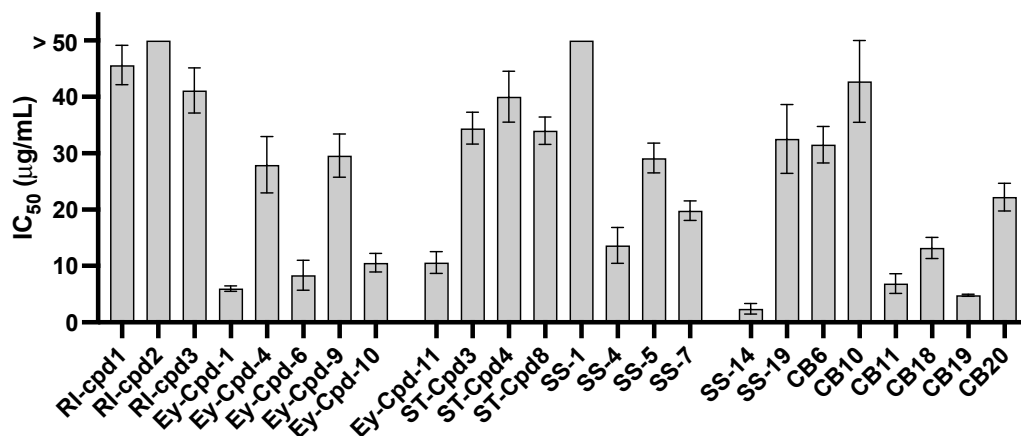


図1 マラリア原虫に対する活性化合物の IC₅₀ 値

③ 成果の公表

クロイゲ (*Sageretia thea*) に含有される新規生物活性成分

佐原 佑優、加藤 知世、金子 修、大塚 英昭、松浪 勝義

日本生薬学会第 71 回年会（熊本）2025 年 9 月 14 日（日）～15 日にて発表予定

6. 自己評価

本共同研究により、5 種の植物から 67 個の化合物を単離・構造決定し、そのうち 15 種は新規の化合物であった。また、複数の新規化合物に活性が見られたことから 4 報程度の複数の国際学術論文への投稿ができる準備が整った。以上のように、研究目標に挙げた新規活性化合物の発見に成功していることから、達成度は III とした。

以上、熱研共同研究者（金子修教授）と連携して進めてきた共同研究により、実りある成果を生み出すことができた。今後もマラリア原虫に対する活性評価に関する協力が得られることとなっており、双方にとって有益な共同研究を持続発展できる環境が整えられたことも本共同研究の大きな成果と考えている。

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6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：熱帯病を対象とした創薬開発を指向した微生物資源のケミカルバイオロジー
課 題 番 号：2024-Ippan-26

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 秋元 萌々子
広島大学大学院統合生命科学研究科 大学院生 Mary Hannah Rose Padayao
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 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 技能補佐員 谷口 真由美

3. 決 定 額：250 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。放線菌は複数のシグナル分子/受容体システムを有しており、我々が初めて見いだした 2,3-二置換ブテノライド型シグナル分子を誘導因子として用いることで、簡便かつハイスループットなゲノムマイニングの実現が期待できる。さらに本共同研究では、通常培養では得られない二次代謝産物のゲノムマイニングも対象にすることで、これら**放線菌二次代謝産物ライブラリーの徹底的利活用による新たな感染症制御分子の創出**を目指す。シャーガス病（クルーズトリパノソーマ感染症）を対象疾患とし、放線菌二次代謝産物ライブラリーのトリパノソーマ原虫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。放線菌ライブラリーに関し、我々が国際共同研究を展開しているインドネシア、フィリピン由来の**熱帯地域生物資源**も追加し、感染症制御分子の探索を行う。

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 **2,3-二置換ブテノライド型シグナル分子 SRB** の汎用性を見いだすべく、各種単離株もしくは分離前の菌叢に対して SRB を添加し、非添加サンプルとの TLC および HPLC の比較解析を行う。添加有無による代謝プロファイル変化が見られた場合、代謝産物の構造解析に着手する。これにより、**誘導分子存在下でのみ**生産しうる二次代謝産物の獲得が期待できる。

【課題 2】 熱帯由来感染症を指標にした新規感染症治療薬の探索および開発

我々が保有している 100 株超の放線菌ライブラリーを用い、新たな**抗トリパノソーマ薬探索**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。熱研対応教員・水上修作博士をはじめとした、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。放線菌ライブラリーに関して、我々が国際共同研究を展開している**インドネシア、フィリピン由来の熱帯地域生物資源** 150 株も追加し、感染症制御分子の探索を行う。

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調製し、トリパノソーマ原虫を感染させたマウス心筋細胞に添加培養することにより、細胞内に潜伏する**アマスティゴート型原虫に対する抗原虫活性**を評価する。事前にマウス心筋細胞の培養抽出物に対する 50%生存率（CC50）を評価することで、活性評価物質の動物細胞毒性を抗原虫活性と明確に区別すべく予備実験を実施する。本研究の実験には、ルシフェラーゼ発現原虫を用いる。培養抽出物処理後に、ルシフェラーゼに対する基質を含む溶解バッファーを用いた原虫破砕とルシフェラーゼ活性測定を行う。その結果を陽性・陰性コントロールと比較し、原虫阻害率を計算する。まずは一定濃度での検討を行い、阻害率が高かった抽出物に関しては、50%阻害率（IC50）の決定を行う。次いで、上記評価の結果有望と考えられた活性評価物質については、エピマスティゴートなど他の形態の原虫に対する活性を検討し、その後、マウスモデルでの評価も行う。

以上、本研究課題では、① シグナル分子による代謝活性化、② インドネシア・フィリピンの熱帯地域生物資源の活用、③ 抗トリパノソーマ活性物質の取得など NTD の問題解決、に軸足を置き、ケミカルバイオロジーの分野から中長期的視野に立った感染症制御分子の探索を行う。

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。さらに、課題 1 で提案するインドネシア・フィリピンを中心とした**熱帯地域生物資源の開拓**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、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6（2024）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、 $IC_{50} < 10 \mu M$ を呈する 2 株
- ・シグナル分子 SRB の誘導体 C8-SRB（図 1）

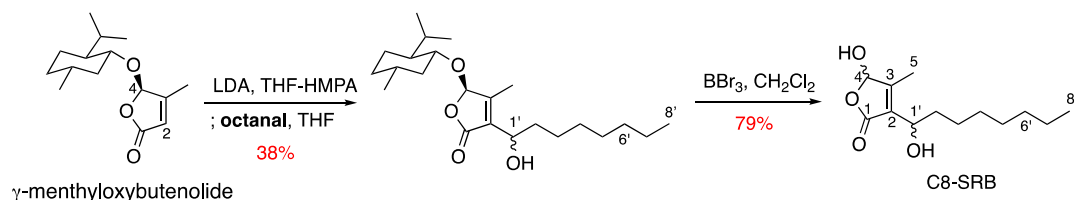


図 1. C8-SRB の合成スキーム

活性試験

- ・抗マラリア活性試験
- ・細胞傷害性試験

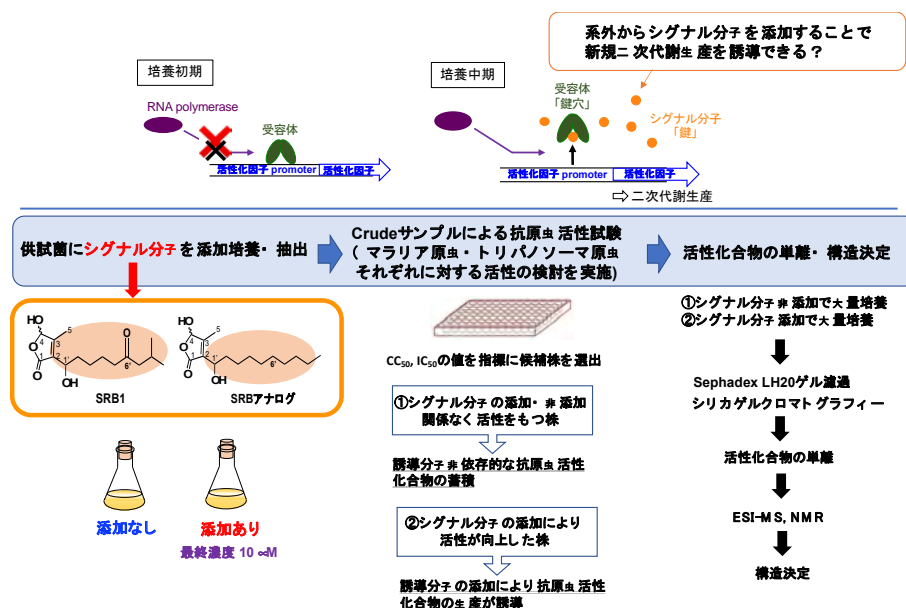


図 2. 本研究のアウトライン

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、③に記載したとおり国際学術雑誌 **Tropical Medicine and Health** に掲載された。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。

③ 成果の公表

【論文公表 1 件】

Teklemichael AA, Teshima A, Hirata A, Akimoto M, Taniguchi M, Khodakaramian G, Fujimura T, Tokumasu F, Arakawa K, Mizukami S. “Discovery of antimalarial drugs from secondary metabolites in actinomycetes culture library”, **Tropical Medicine and Health**, 52, 47 (2024).

【学会/シンポジウム発表 7 件】

2024.11 1st Core-to-Core International Biosymposium 2024 (Hiroshima University)
11/25-26

Overview of genome mining and natural product discovery from Actinomycetes in tropical bioresources, and a concept of JSPS Core-to-Core Program

Kenji Arakawa

Extensive screening of secondary metabolites in marine actinomycetes isolated from mangrove and coral reefs in Cebu, Philippines

Mary Hannah Rose A. Padayao, Carl Raymond Consuegra, Rukman Muslimin, Jonie C. Yee, Kenji Arakawa

Versatile genome mining of “silent” bioactive secondary metabolites using the butenolide-type signaling molecule

Momoko Akimoto, Asahi Hirata, Miho Sumiyoshi, Hazuki Fujita, Mary Hannah Rose A. Padayao, Kotaro Kashiara, Maki Matsuura, Miyuki Otsuka, Aiko Teshima, Kenji Arakawa

Discovery of novel antimalarial drugs utilizing actinomycetes culture libraries -Collaboration between Nagasaki and Hiroshima University-

Shusaku Mizukami

Discovery of novel antimalarial drugs utilizing actinomycetes culture libraries

Mayumi Taniguchi, Aiko Teshima, Asahi Hirata, Awet Alem Teklemichael, Momoko

Akimoto, Gholam Khodakaramian, Takashi Fujimura, Fuyuki Tokumasu, Kenji Arakawa, Shusaku Mizukami.

2024.8 University of San Carlos–Hiroshima University International Biosymposium 2024 (Safad Lecture Hall, Univ. San Carlos, Cebu, Philippines) 8/19

Discovery and functional enhancement of natural products toward healthy-aging and a treatment against tropical infectious diseases

Kenji Arakawa (2024/8/19) (Invited)

Genome mining of bioactive secondary metabolites using the *Streptomyces* butenolide-type signaling molecule SRB

Momoko Akimoto, Asahi Hirata, Miho Sumiyoshi, Toshihiro Suzuki, Aiko Teshima, Kenji Arakawa (2024/8/19)

6. 自己評価

当該年度、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を論文公表した (Teklemichael, *et al*, **Tropical Medicine and Health**, 2024)。本成果は、長崎大学と本学との学術交流として大きな第一歩であると自負している。また、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 (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 (Akimoto, *et al.*) の計 2 編を投稿準備中である。

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。今後我々は、代表者が主導している日本学術振興会・研究拠点形成事業において実施しているインドネシア・フィリピン・ベトナム由来生物資源にも注目し、新たな抗マラリア活性化合物の獲得を目指す。また、本共同研究を漸進的に発展し、活性の評価対象を、同じ寄生虫感染症の中でも顧みられない熱帯病(NTD)に含まれ新薬が強く求められているクルーズトリパノソーマ原虫に拡大する。有望な抗クルーズトリパノソーマ活性物質の取得を目指し、NTD の問題解決に果敢に取り組む所存である。

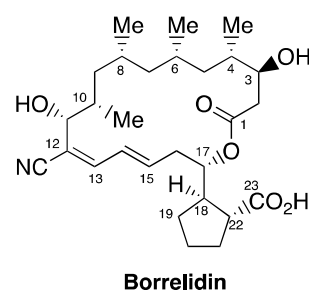


図3. 放線菌ライブラリーから取得した抗マラリア活性化合物borrelidin

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)

2024 General joint research report (self-evaluation)

- 1 . Research project name : Persistence of immunological memory to malaria infection in the absence of transmission
Project number : 2024—Ippan—27
- 2 . Applicant name : Science Research Specialist II, Research Institute for Tropical Medicine – Department of Health (RITM-DOH), Philippines, Maria Lourdes M. Macalinao
Joint researcher(s) : Designated Professor, Shionogi Global Infectious Diseases Division, Nagasaki University (NU), Katsuyuki Yui
- 3 . Amount Allotted : 800,000 yen

4 . Research Plan

① Research Purpose

The primary aim of this study is to investigate the induction and maintenance of immunological memory responses to *Plasmodium falciparum* (Pf) malaria infection in human cohort studies in varying endemic settings in the Philippines.

Specifically, the study has the following specific objectives:

- a. To determine the persistence of memory T and B cells in adult populations in 2 areas of varying malaria endemicity in the Philippines – municipalities with stable transmission (Puerto Princesa and Aborlan, Palawan) and a malaria-free area (Morong, Bataan) .
- b. To inform the development and deployment of intervention strategies for elimination based on the results.

② Research details

The study will focus on the adult age group of 18 years old up for a comparative analysis of the immune responses in the selected populations. A total of 35 participants per site (mixed sex) were recruited. About 25 mL of peripheral blood were collected, PBMC prepared and frozen. Samples from Palawan residents will continue to be collected in 2024. PBMCs will be analyzed by the following assays.

1. AIM assay to determine the frequency of Pf-specific memory CD4⁺ T cells in PBMCs
PBMCs will be cultured in the presence of Pf-infected red blood cell lysates (iRBCs) and uninfected RBCs (uRBCs) as control. They will also be stimulated with Pf antigenic peptides for PfAMA1 and Etramp5 antigens. Two days after culture, supernatant will be collected for ELISA, and cells will be stained for TCR, CD4, CD25,

and OX40 for flow cytometry analysis (AIM assay).

2. ELISA to determine the cytokine produced by activated T cells

ELISA (IFN- γ , IL-2, IL-10) will be performed to determine the production of cytokines after culture (see AIM assay) using ELISA kits.

3. ELISPOT to determine the frequency of Pf-specific memory B cells in PBMCs

PBMC will be stimulated with Pf recombinant proteins, AMA1, MSP1, Etramp etc, and cultured in the presence of R848 and IL-2 for 5 days. Cells will be collected and ELISPOT assay will be conducted in the presence and absence of Pf antigens.

In addition, cellular compositions of PBMCs and their phenotypes before and after stimulation will be evaluated by staining the mononuclear cells with specific antibodies and analyzing them using flow cytometry. To analyze cellular and antigen-specific antibody responses, a multiplex bead-based assay (Luminex system) will be performed using serum or eluted DBS samples.

③ Anticipated results

Preliminary results of the T cell assays on PBMC samples, as discussed in Section 6, have shown the promising results that malaria-specific CD4⁺ T cell responses can be observed in an individual previously infected with malaria. We will accumulate the data of collected samples and determine the frequency of malaria antigen specific T and B cells in 2 areas of varying malaria endemicity. Potentially, we will be able to determine the difference in the longevity of memory T and B cells among distinct malaria antigen-specific T cells and evaluate their contribution to protective immunity. The information is critical to estimate the protective ability of residents in the area of previous malaria-endemic regions.

5 . Implementation Report :

① Circumstances of Implementation against the FY2024 Implementation Plan

This study is an ongoing joint research of RITM-DOH with Nagasaki University (Dr. Katsuyuki Yui) and London School of Hygiene and Tropical Medicine (Dr. Julius Hafalla), which endeavors to provide insights into the immunological memory to malaria in the Philippine setting, to consider how the reduction in local transmission could affect the immunity of endemic populations.

The recruitment of recently malaria-infected individuals for the cohort study in Puerto Princesa and Aborlan, Palawan was continued as planned from April 2024 onwards. The team conducted site visits for sample collection every 2 months to conduct new participant recruitment and follow-ups for the 2nd and 6th month collection. The follow-ups for a total of 45 study participants were completed in November 2024. We aimed for all samples to be collected by mid-2024 to be able to start the assays sooner (samples from all timepoints must be assayed together) but recruitment took longer than expected. Nonetheless, the team continued to perform optimization experiments in preparation for the immunological assays to be conducted while waiting for sample collection to be completed.

For the optimization of the assays, collaborators from NU and LSHTM continued to make visits to the Philippines in 2024, to assist in optimizing the T and B cell assays, as well as transport laboratory reagents and supplies for the study. We also performed a preliminary analysis of the malaria-specific antibody responses of the serum samples using the Luminex assay, the results of which were presented during the RITM Parasitology's Research Stakeholder's Meeting event in Palawan in December 2024.

② Results (Results & Observations)

Cohort study collection

For this observational cohort study of adults from sites with varying transmission levels: Palawan (recently exposed), Bataan (historically exposed), and Manila (malaria-naive), we were able to recruit 90 participants (Manila n=10, Palawan n=45, Bataan n=35) with samples (PBMCs, serum, dried blood spots) from one to three time-points per participant. The study population (60.0% male) had a median age of 42.5 years (range: 18-76). Palawan participants had *Plasmodium falciparum* infections within 6 months pre-recruitment (RDT-positive: 11/45, 24%), while Bataan participants had malaria 32 years prior on average. The IRB protocol was revised in November 2024 to include a third collection for the Bataan participants, based on preliminary assay results suggesting evidence of the maintenance of long-term malaria-specific memory responses in these individuals. This 3rd collection (other timepoints were Month 0 and 16) is scheduled for the 32nd month in April 2025.

Optimization of cellular immunological assays

All assays have been tried in the RITM laboratories, including the culturing of PBMCs with malaria antigen stimulation, B cell ELISpot, T cell activation-induced marker (AIM) assay, and cytokine ELISA. The SOPs for the RITM Parasitology laboratory was updated with the optimized procedures in preparation for the conduct of the assays when we have completed the additional sample collections planned. The department has also identified technical personnel who can help out in the more efficient conduct of the assays when the experiments are up and running.

Flow cytometry work was also performed on the BD FACSLyric housed at the Nagasaki University-San Lazaro Hospital Research laboratory. We updated the fluorescence compensation settings on the machine to ensure optimal performance and minimize potential issues during future use. In January 2025, the team learned about the Thermofisher Bigfoot flow cytometer being housed at the Department of Science and Technology - Industrial Technology Development Institute (DOST-ITDI), which was procured for the Virology and Vaccine Institute of the Philippines (VIP) program in 2023. The DOST-ITDI's Bigfoot has more advanced specifications and features than the BD FACSLyric. Consequently, our team became interested in utilizing it for our assays. The DOST-ITDI team was receptive to establishing an agreement for this, and a memorandum of agreement (MOA) was drafted in March 2025.

Multiplex bead-based serological assay (Luminex)

A multiplex bead-based immunoassay was used to measure antigen-specific antibody (IgG) responses against 6 *Plasmodium falciparum* antigens and tetanus toxoid (TT; positive control). Each serum sample was tested in duplicate, with one set modified by adding guanidine hydrochloride (GuHCl), a chaotropic agent that disrupts the binding of weakly avid antibodies to their targets. The avidity index (AI) was subsequently calculated as the ratio of highly avid antibodies to the total antibody response. This was performed on all serum samples available at the time of the assay (n=170; Manila/malaria-naive = 10; Bataan = 64 from 2 time-points; Palawan = 96 from 3 time-points).

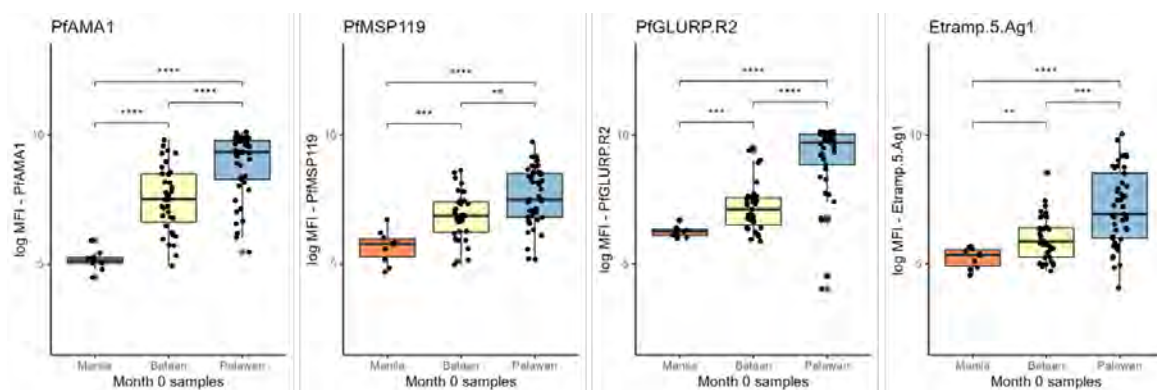


Figure 1. Overall IgG responses against *P. falciparum* antigens PfAMA1, PfMSP1, PfGlurp and Etramp5 in Manila (naïve control), Bataan (historically exposed) and Palawan (recently exposed). Data illustrated as box-and-whisker plots.

It was observed (Figure 1) that individuals recently infected with malaria (Palawan) have higher antibody levels to malaria antigens compared to those who have not been exposed to malaria for the past 30+ years (Bataan). Palawan had the highest antibody levels for both cumulative (AMA1, MSP1) and recent (GlurpR2, Etramp5) exposure markers, with Bataan also exhibiting significantly higher levels than the control/naive group (17x and 4.3x higher than Manila, respectively). Moreover, the observed antibody kinetics reflect the known longevity of the exposure markers. We also observed the varying kinetics of antibody responses in each individual reflecting the historical (PfAMA1, PfMSP1) and recent (PfEtramp5) markers of exposure for recently infected participants from Palawan (Figure 2).

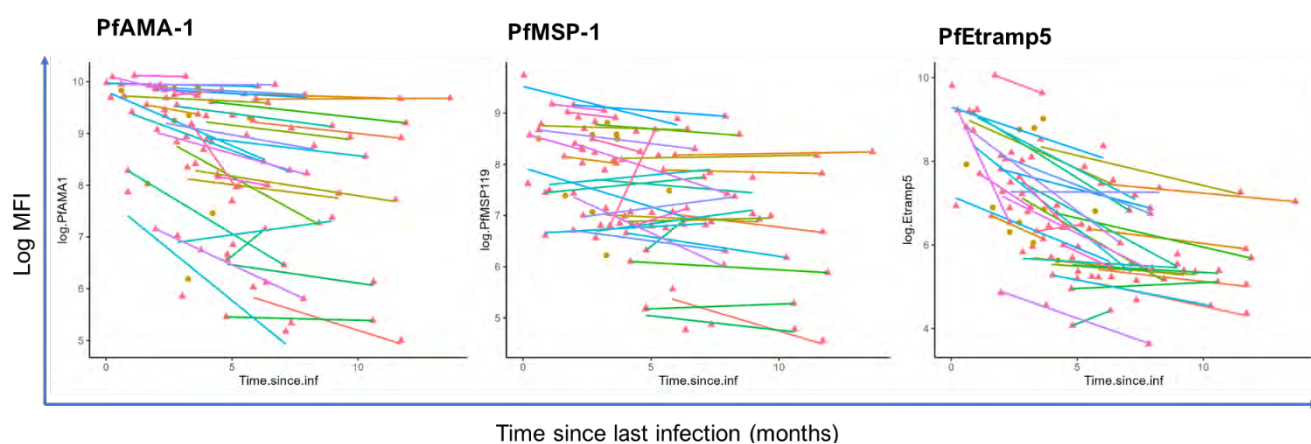


Figure 2. Individual IgG responses (log net MFI levels) of recently malaria-exposed Palawan participants since time of infection.

Moreover, there appears to be no difference in the strength of binding to malaria antigens between antibodies from individuals recently exposed (Palawan) and those historically exposed (Bataan), suggesting the maintenance of antibody responses despite the loss of exposure (Table 1).

Table 1. Average avidity indices for each analyzed antigen per study site and time-point.

Site, time point	Antibody avidity index						
	PfAMA1	PfMSP119	PfGLURP	Etramp5	GexP18	CSP	Tet Tox
Bataan Month 0	41.89	37.13	17.02	20.31	31.69	28.43	68.90
Bataan Month 16	44.78	39.04	19.52	19.75	27.37	30.80	55.88
Palawan Month 0	55.99	40.40	56.45	13.20	20.03	26.83	73.24
Palawan Month 2	52.69	46.39	29.11	14.08	21.52	31.26	72.71
Palawan Month 6	50.59	45.64	16.69	15.60	23.91	31.48	76.62

These findings will be combined with the immunological assays measuring T and B cell memory responses against malaria to better understand long-term immunity in malaria elimination settings.

③ Announcement of Results

Although the results of the multiplex serology assay were preliminary, they were included in the progress presentation of the IMMORTAL project during the RITM Department of Parasitology's Annual Stakeholders' Meeting held in Puerto Princesa City, Palawan last December 2024. Stakeholders from both the national and provincial malaria programs were in attendance during the presentation delivered by Dr. Julius Hafalla of LSHTM. We also plan to submit updated findings for presentation at local scientific conferences, such as the Philippine Society of Parasitology, later this year.

6 . Self-Evaluation

The ongoing joint collaboration has progressed successfully to a certain extent, despite delays arising from factors beyond our control. We were able to complete the cohort sample collection in Palawan, and has scheduled the additional collection for the Bataan study site. The laboratory assays has been confirmed to work in RITM and other facilities to be used in the Philippines, and we will be prepared with the improved SOPs and trained personnel, as well as laboratory equipment and reagents purchased through the grant. The new agreement being established with DOST-ITDI might result in delays due to unavoidable bureaucratic processes; however, the collaborative team maintains regular communication to closely monitor our progress, discuss contingencies, and facilitate continued momentum.

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)

令和 6（2024）年度一般共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：オートファジー関連因子を標的としたシャーガス病の新規治療薬の開発
課 題 番 号：2024-Ippan-29

2. 代 表 者：千葉大学大学院医学研究院 准教授 彦坂 健児
共 同 研 究 者：千葉大学大学院医学研究院 助教 坂本 寛和
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 助教 佐倉 孝哉

3. 決 定 額：800 千円

4. 研究計画

① 研究目的

シャーガス病は顧みられない熱帯病の一つであり、サシガメが媒介する *Trypanosoma cruzi* によって引き起こされる感染症である。世界で年間 600～700 万人の感染者数と約 12,000 人の死者数が推定されており、急性期にはベンズニダゾールやニフルチモックスによる治療が効果的とされるが、慢性期に移行すると治療は困難を極める。これは、慢性期における宿主細胞内原虫発育ステージであるアマスチゴートが増殖しない低代謝状態であることが原因と考えられている。近年、心不全治療の β 遮断薬であるカルベジロールを用いて *T. cruzi* のオートファジーを阻害すると、アマスチゴートを含む各発育ステージの増殖が抑制されることが報告された（Rivero ら、2021）。オートファジーは、真核生物に備わる細胞内の大規模分解系であり、その分解産物であるアミノ酸や脂質をリサイクルすることで飢餓状態などのストレス下での細胞内恒常性の維持に重要な機能を果たす。したがって、オートファジーによる栄養分のリサイクルがアマスチゴートの生存に重要であり、オートファジーがアマスチゴートに対する新たな創薬標的となるのではないかと考えた。

オートファジーの進行には、オートファジー関連因子 ATG8 の膜局在化が必須であり、それには ATG8 と ATG3 との結合が必要である。そこで本研究では、*T. cruzi* ATG8（TcATG8）の TcATG3 結合ポケットを標的とした結合阻害剤の同定を目的とし、以下の実験を計画した。

1. 流行地 *T. cruzi* サンプル採集とそれらを用いた TcATG8 の多型解析
2. in silico ドッキングシミュレーションによる TcATG8 全多型に結合する阻害剤候補のスクリーニング
3. *T. cruzi* 細胞培養系を用いた TcATG8 阻害剤候補の増殖阻害効果の評価

本研究の特色は、薬剤開発の上で問題となる標的因子の多型を先に解析し、それら全ての多型に効果の期待できる化合物をスクリーニングする点にある。本手法は「in silico ドッキングシミュレーション」を用いることで可能になった計画であり、薬剤開発の大幅な効率化が期待される。

② 研究内容

本研究は、*Trypanosoma cruzi* アマスチゴートに対する新たな創薬標的としてオートファジーに着目し、TcATG8 の TcATG3 結合ポケットに対する結合阻害剤の同定を目指す。そのために、まずは TcATG8 の多型解析を実施し、これらの配列情報を考慮した阻害剤の *in silico* スクリーニングを行う。次に、*in silico* で設計した阻害剤の *T. cruzi* 増殖阻害効果を評価し、オートファジーが *T. cruzi* に対する新たな創薬標的であるかの概念実証を目指す。具体的には以下の 3 項目を実施する予定である。

1. 流行地 *T. cruzi* サンプル採集とそれらを用いた TcATG8 の多型解析

T. cruzi の遺伝型は 7 つのタイプ (discrete typing units, DTUs) に分類されている。これらの DTUs をもつ原虫株に効果を示す阻害剤の設計には、TcATG8 の塩基配列の多様度を知る必要があるが、これらの配列情報は極めて少ない。そのため、まずは、多様な *T. cruzi* DTUs の感染が報告されているパラグアイ農村部のサシガメを採集し、*T. cruzi* 感染サシガメの中腸より抽出した DNA を用いて TcATG8 の塩基配列情報を取得する。パラグアイにおけるサシガメの *T. cruzi* の感染率は約 10% と報告があることから、捕獲数の目標は 1,000 個体とし、*T. cruzi* 感染サシガメを 100 個体/年を用いた多型解析を目指す。サシガメの *T. cruzi* 感染は、キネトプラスト DNA の mini circle の塩基配列を標的とした PCR によって検出する。なお、サシガメの採集、中腸 DNA の抽出及び PCR による *T. cruzi* 感染の確認をパラグアイ班が担当し、TcATG8 の塩基配列情報の取得及び多型解析を千葉大学班が担当する。

2. *in silico* ドッキングシミュレーションによる TcATG8 全多型に結合する阻害剤候補のスクリーニング

上記解析で明らかにした TcATG8 の全多型に対して *in silico* ドッキングシミュレーションを実施する。具体的には、TcATG8 がもつ TcATG3 結合ポケットに対して、約 200 万種の仮想化合物ライブラリーを用いたドッキングシミュレーションを実施する。陰性対象としてヒト ATG8 を用い、TcATG8 に特異的に結合が予測された化合物を、結合安定性 (ΔG) でランキングする。なお、本解析は千葉大学班で実施する。

3. *T. cruzi* 細胞培養系を用いた阻害剤候補の増殖阻害効果の評価

上記実験と並行して、オートファジーが可視化できる「GFP-TcATG8 発現 *T. cruzi* 細胞」を作出する。オートファジーが進行すると TcATG8 が細胞質から膜へ局在化するため、オートファジーが正常に進行すると GFP-TcATG8 がドット状に観察される。なお、本実験は熱研班が初年度中に実施する。

次年度：上記スクリーニングの上位ランキング化合物から、合成しやすさや安定性などを考慮して 10~20 種を入手し、*T. cruzi* の *in vitro* 培養系を用いた増殖阻害試験を実施する。なお、本解析は長崎大学熱研班が実施する。

③ 予想される成果

本研究は、これまでに薬剤開発が困難であった *T. cruzi* の細胞内ステージであるアマスチゴートにおけるオートファジーの重要性に着目したものである。本研究によって増殖阻害効果のある化合物が同定されれば、シャーガス病の治療薬開発に新た

な道が開かれ、その波及効果は大きい。また、パラグアイのチャコ地方のサシガメには、野生動物が感染する *T. cruzi* の DTUs も存在することが明らかになっており、本研究によって得られる DNA 配列情報は、今後の再興感染症への対策にも寄与する。本研究では、将来的に、パラグアイ現地におけるサシガメからの *T. cruzi* の単離培養による原虫株の樹立、培養原虫から抽出した DNA を用いた全ゲノム情報の取得も計画しており、日本国内において *T. cruzi* の培養が可能な数少ない研究機関である長崎大学熱研との共同研究も視野に入れているため、シーズ研究発掘課題として併願を希望している。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

本研究の遂行にあたり、2024 年度にパラグアイ・アスンシオン国立大学及び千葉大学の大学間協定を締結した。シャーガス病の持続が報告されている南米チャコ地方（プレシデンテ・アイェス県）で採取したサシガメ 206 匹分より中腸 DNA を抽出した。サシガメ試料の取得及び中腸 DNA の抽出は、さくらサイエンスプロジェクト（「次世代シーケンス技術を利用したパラグアイにおける人獣共通感染症の統合的理解」、JST、2022 年度）による招聘事業により構築した国際共同研究体制（アスンシオン国立大学、カニンデジュ国立大学及び CEDIVET{民間動物検査施設}）によって実施した。これらの DNA 試料を用いて、*T. cruzi* の遺伝子型の決定を目的に、24Sα rRNA 遺伝子及び mini-exon を標的とした PCR を実施した。また、TcATG8 の全長配列を標的とした PCR を実施した。

長崎大学熱帯医学研究所における受け入れ研究室（分子感染ダイナミクス解析分野）では、阻害剤スクリーニングに向けて、CRISPR-Cas9 の系による GFP を付加 *T. cruzi* の作製を行った。

② 成果（結果＋考察）

24Sα rRNA 遺伝子を標的とした PCR では、206 DNA 試料中 65 試料で陽性と考えられるシグナルを検出した（表）。しかし、これらの PCR 産物の塩基配列をサ

表. サシガメ中腸DNAを用いたPCR

標的遺伝子/領域	増幅試料数/全試料数	<i>T. cruzi</i> 特異的増幅/増幅試料数*
24Sα	65/206	0/65
mini-exon	23/206	13/23
ATG8	-	5/13

**T. cruzi* 特異的増幅はサンガー法によるシーケンシングで確認

ンガー法によって決定したところ、*T. cruzi* ゲノムの塩基配列は増幅されておらず、原核生物の配列が増幅されていた。この理由としては、サシガメ中腸に大量に存在する細菌叢ゲノムの一部配列が増幅したものであると考えられた。以上の結果は、ヒトや動物試料からの *T. cruzi* の検出及び遺伝子型の決定によく用いられている 24Sα rRNA 遺伝子は、本研究のようにサシガメの中腸 DNA 試料を用いる際は PCR の標的として適切でないことを示唆する。mini-exon を標的とした PCR では、206 DNA 試料中 23 試料において DNA 断片の増幅が確認された（表）。これらの断片のシーケンシングの結果、*T. cruzi* 特異的 DNA 断片は 23 試料中 13 試料であった。シーケンシングデータのエレクトロフェログラムを確認したところ、検出波のピークが混在する箇所が複数存在した（次頁、図）。これは、サシガメ中腸内に複数の DTUs（discrete typing units、遺伝型）をもつ原虫が存在する可能性を示す。今後は、PCR 産物の大腸菌クローニングによる DTUs の分離が必要と考えられた。*T. cruzi* 陽性であったサシガメの中腸内で主要であると考えられた *T. cruzi* DTU は、

13 試料中 5 試料が IV 型、8 試料が V 型であった。IV 型は野生動物に多く、V 型

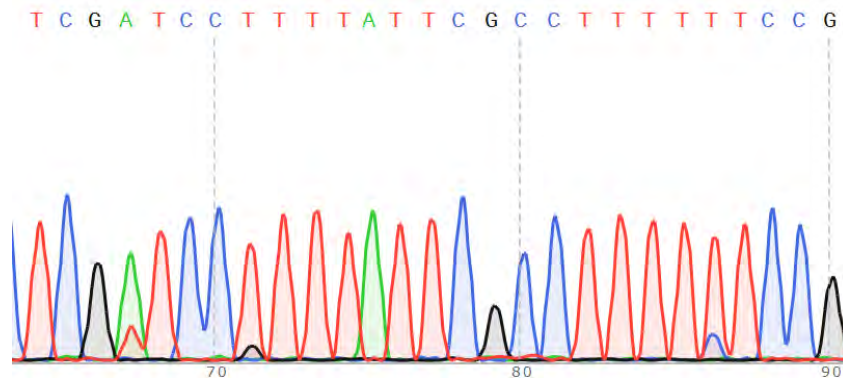


図. mini-exon を標的とした PCR の増幅産物のシーケンシング
エレクトロフェログラム
ここでは、67、71、86 番目の塩基でピークが混在している

はヒトでも多く検出されるタイプであることを考えると、薬剤ターゲットとしての ATG8 の多型を確認するための適切な試料が採取できていると考えられた。本研究の薬剤開発標的タンパク質である ATG8 を標的とした PCR では、上述の 13 試料中 5 試料で増幅が確認された。これらの PCR 産物をシーケンシングしたところ、一部波形データが乱れている領域が存在した。判読可能な部位を BLAST 検索した結果、*T. cruzi* の ATG8 の塩基配列と一致したため、増幅には成功したと考えられるが、今後、さらに明確な塩基配列を決定するためには、プライマーの再設計、または、クローニングによる DNA 配列の分離が必要であるこの PCR で増幅されなかった 8 試料に関しては、PCR に使用したプライマーの配列が合致しなかった可能性が考えられた。こちらもプライマーの再設計によって塩基配列の取得を可能とする計画である。以上のように、「研究目的」で記載した、1. 流行地 *T. cruzi* 感染サシガメ採集とそれらを用いた TcATG8 の多型解析に関しては、解析準備が整いつつある状況である。シャーガス病の薬剤開発に向けた阻害剤スクリーニングの系の準備は、GFP を組み込んだ原虫の準備が整っており、ATG8 阻害剤設計が完了し次第、実施する予定である。

③ 成果の公表
なし

6. 自己評価

本研究は、薬剤標的とする ATG8 のアミノ酸配列の保存性の高さを前提として、化合物設計を行う計画である。しかし、*Trypanosoma cruzi* の塩基配列情報は疫学目的での取得は報告されているものの、公開されている全ゲノム情報は少ない。そこで、本研究では、まず、*T. cruzi* の感染率が高いと考えられている本原虫媒介昆虫のサンガメより DNA を抽出し、原虫 DNA を取得することから始めた。今年度は、原虫 DNA の取得に必須である大学間協定を締結することができ、また、パラグアイより 206 匹分のサンガメの DNA 試料を日本に移動することができた。これらの DNA 試料を用いた PCR では、mini-exon を標的とした PCR で遺伝子型の同定、また、目的の ATG8 の塩基配列の取得が可能となった。以上より、今年度は *T. cruzi* ATG8 の塩基配列情報の取得のための体制を整えた点で評価できると考えている。

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）

Ⓐ （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：集団食中毒事例から分離されたナグビブリオのゲノム特性と病原性解析
課 題 番 号：2023-Ippan-06

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

3. 決 定 額：250 千円

4. 研究計画

① 研究目的

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

② 研究内容

腸炎ビブリオを用いた解析で実績のある児玉年央教授の指導のもと、ウサギ結紮ループ試験を中心に、マウスの腹腔内投与による致死活性、細胞毒性、細胞変性活性といった児玉研究室がもつ解析系を用いて O144 ナグビブリオの病原性解析を実施する。

具体的には、各種病原性解析系により野生型 O144 ナグビブリオと *vcsV2* 欠損 O144 ナグビブリオの表現型を評価し、今後用いる病原性解析系を選定するとともに、O144 ナグビブリオが保有する T3SS の病原性への関与を明らかにする。その後、T3SS によって分泌されるタンパク質（エフェクター）についても欠損株を作製し、選定した解析系で病原性評価を行う。この際、他の血清群のナグビブリオのヘモリジン遺伝子欠損株も対照実験に用いる。また、病原性の関与が認められた遺伝子欠損株については、遺伝子相補株も作製し病原性解析を行う。しかしながら、O144 ナグビブリオの T3SS 関連遺伝子群は 37 個の ORF を含む約 30kb の genomic island であり、それらから欠損の標的とする遺伝子を選定することは困難である。児玉教授は、これ

まで腸炎ビブリオの T3SS の機能解析を分子レベルで明らかにしてきていることから、O144 ナグビブリオの T3SS 欠損株の作製においても、候補とすべき遺伝子の提案を行うことができる。また、児玉教授が使用してきた腸炎ビブリオのエフェクターに対する抗血清は、O144 ナグビブリオのエフェクターの検出にも使用できることから、本研究課題の進捗への寄与は大きい

③ 予想される成果

2021、2022 年度研究課題の成果として、比較ゲノム解析により O144 ナグビブリオに特異的に検出された T3SS 関連遺伝子群を病原因子と推定し、当該遺伝子の欠損株を作製した。さらに、2023 年度研究課題では、O144 ナグビブリオの遺伝子欠損株を用いた病原性解析により、ナグビブリオの持つ T3SS の機能解析と発現機構が分子レベルで明らかとなることが期待され、ナグビブリオの病原性の解明につながる。これらの知見を総括し、2023 年度中に食中毒発生事例から病原因子の特定までを包括的にとらえた論文として投稿する予定である。

また、パンゲノム解析を用いた病原因子探索は、今後も多様な菌叢から病原性細菌を探索する方法として利用され、病原因子の発見につながることを期待できる。その結果、発症メカニズムの解明につながるだけでなく、病原性遺伝子マーカーとして病原性細菌の新規検出・診断法の開発に利用できる可能性がある。

5. 実施報告

① 令和5（2023）年度実施計画に対する実施状況

O144 ナグビブリオの病原性解析について、ウサギ腸管結紮ループ試験を行った。野生型及び各遺伝子欠損 O144 ナグビブリオの菌液を等間隔に結紮したウサギ小腸に接種し、腸管ループの長さ当たりの液体貯留量から下痢誘導活性を評価した。その結果、3 型分泌装置の下痢原性への関与が認められたことから、その他の病原性解析系については実施しなかった。また腸炎ビブリオの 3 型分泌装置関連遺伝子群との相同性検索から O144 ナグビブリオの下痢原性に寄与するエフェクターの候補遺伝子を選定したが、欠損株を作るには至らなかった。

② 成果（結果＋考察）

集団食中毒事例から多様な血清型のナグビブリオが分離されたが、それらの中で原因菌とされた血清型 O144 ナグビブリオだけが 3 型分泌装置遺伝子群を保有していた。このことから 3 型分泌装置の病原性への関与が考えられたため、3 型分泌装置関連遺伝子群の欠損株を用いた解析により、その病原性を評価することを試みた。しかしながら、ビブリオ属細菌は普遍的にヘモリジンを保有しており、3 型分泌装置依存的な病原性を正しく評価するためには、ヘモリジン遺伝子 (*hlyA*) を欠損させたうえで 3 型分泌装置関連遺伝子群を欠損させる必要がある。

昨年度までに *hlyA* 欠損 O144 ナグビブリオ及び *hlyA* 欠損 O144 ナグビブリオをもとに 3 型分泌装置構造体遺伝子 (*vcsV2*) 欠損 O144 ナグビブリオを作製しており、これらの病原性評価をウサギ腸管結紮ループ試験により行った。まず、野生型 O144 ナグビブリオ、*hlyA* 欠損 O144 ナグビブリオ、*hlyAvcsV2* 欠損 O144 ナグビブリオの菌液を 10^9 cfu 接種した。その結果、*hlyAvcsV2* 欠損 O144 ナグビブリオは野生型 O144 ナグビブリオ、*hlyA* 欠損 O144 ナグビブリオと比較して液体貯留量が低下していたものの、下痢誘導活性は消失していなかった。また野生型 O144 ナグビブリオと *hlyA* 欠損 O144 ナグビブリオの下痢誘導活性の比較においてヘモリジンの影響が確認されなかったことから、接種菌量が過剰であることが考えられた。そこで接種菌量を 10^8 cfu として、同様の試験を行った。その結果、*hlyAvcsV2* 欠損 O144 ナグビブリオでは下痢誘導活性が消失し、液体貯留量は未感染部位と同等であった（図）。以上の結果から、O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置が下痢原性に関与していることが示され、今後の病原性解析にはウサギ腸管結紮ループ試験が妥当であると考え

られた。従って、マウスの腹腔内投与による致死活性、細胞毒性、細胞変性活性といった他の病原性解析は実施しなかった。

次に 3 型分泌装

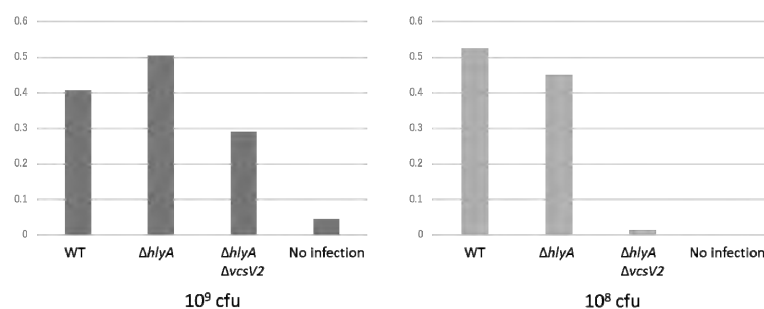


図 *vcsV2* 遺伝子欠損株の下痢誘導活性

置依存的な下痢原性に寄与するエフェクターを、腸炎ビブリオの 3 型分泌装置遺伝子群との配列比較により推定した。これまで腸炎ビブリオの下痢原性に寄与するエフェクターとしては VopV が報告されており、相同性比較から O144 ナグビブリオの VopM が候補としてあげられた。今後、当該遺伝子欠損株の作製を行い、下痢誘導活性を評価する予定である。

③ 成果の公表

該当なし

6. 自己評価

本研究課題では集団食中毒の原因菌である O144 ナグビブリオの持つ 3 型分泌装置の病原性評価を目的としている。ウサギ腸管結紮ループ試験により、O144 ナグビブリオの 3 型分泌装置が下痢原性に関与していることを明らかにすることができた。しかしながら、下痢の発症に寄与する 3 型分泌装置により分泌されるエフェクター分子の欠損株の作製、及びその病原性評価は実施できなかった。以上のことから、一定の成果をあげることができたが、当初の計画通りに進捗していないため、今年度の達成度は II とする。

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）

② （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）

第 2 部

研 究 集 会

令和 6（2024）年度研究集会報告（自己評価）

1. 研究集会の名称：第 15 回長崎・シンガポール医学シンポジウム
課題番号：2024-A-01
開催期間：令和 6 年 7 月 11 日（木）～令和 6 年 7 月 12 日（金）
2. 代 表 者：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 教授 泉川 公一
参加人員：約 110 名
3. 決 定 額：800 千円
4. 実施計画

長崎大学とシンガポール国立大学医学部は、1985 年以来交流を継続しており、最近
は感染症分野に特化して、2 年ごとに双方の大学を訪問し合同医学シンポジウムを開
催しています。今回、長崎で開催する合同シンポジウムは、長崎シナジー拠点
（DIDA/VRDC）、長崎大学医学部および医歯薬学総合研究科が主催、出島特区ワクチン
研究開発拠点、シンガポール協会および長崎大学医師会が共催、熱帯医学研究所およ
び TMGH が協賛となり、「感染と免疫」をテーマに、熱帯病・新興感染症および免疫学
に関する発表を実施し、研究分野の情報交換、学生および研究者の交流、そして感染
症の地球規模制御に関する共同研究の模索を計画しています。

プログラムの内容としては、本学、シンガポール国立大学および国内の教育研究機
関からの研究者による口頭発表セッションと、若手研究者や医歯薬学総合研究科およ
び熱帯医学・グローバルヘルス研究科の大学院生の参加によるポスターセッションの
実施を計画しています。

なお、本申請が採択されれば、抄録集の作成費、会場設営費および旅費の一部
補填への支出を計画します。

5. 実施報告

2024 年 7 月 11 日～12 日、シンガポール国立大学（NUS）より 11 名の感染症、免疫
系の研究者を招へいし、長崎大学医学部、医歯薬学総合研究科及び長崎大学感染症研
究出島特区ワクチン研究開発拠点主催の「第 15 回長崎・シンガポール医学シンポジウ
ム」を長崎大学医学部良順会館にて開催し、国内外よりおよそ 110 名の研究者が参加
しました。

本シンポジウムは、1984 年に当時の長崎県副知事である三村長年氏を団長とした一
行がシンガポールを訪問し、第 1 回が開催されたことに始まります。そして、この交
流実績により、本学医学部とシンガポール国立大学（NUS）医学部は、1985 年に学術

交流協定を結び、現在の医学部間交流に至ります。

2006 年からは、感染症分野に特化して、隔年で双方の大学においてシンポジウムを開催していましたが、2019 年に NUS 主催によるシンガポールでの開催以降、コロナ感染症拡大に伴い開催を中止しており、この度 5 年ぶりに開催しました。

まず、開催 1 日目には、良順会館 2 階ボードインホールにて、永安学長、先方 Nicholas GASCOIGNE 教授、川上医歯薬学研究科長そして池松医学部長による開会の挨拶があり、その後、15 名そして 2 日目には 17 名の研究者による口頭の研究発表が行われました。講演時間が足りない程の素晴らしい発表ばかりで、活発な質疑応答が行われ、感染症分野に関する相互の研究に改めて触れる機会となりました。

また、1 日目夜には、良順会館 1 階専斎ホールにて、30 名の若手研究者によるポスターセッションも行われました。普段、臨床に関わりながら研究を行っている若手研究者にとっても最新の研究成果に触れることができ、いい刺激を得る機会となりました。

今後は、2 年後の 2026 年に、シンガポールで第 16 回を開催する予定です。1984 年に始まり、苦難も乗り越えて開催されてきた歴史ある本シンポジウムを今後も継続し開催できるように、これまで以上にシンガポール大学との研究者間の交流を深めて行く予定です。

6. 自己評価

長崎大学熱帯医学研究所では、感染症およびこれに伴う健康に関する研究を展開していることから、今回のシンポジウムで課題とした、「ポストコロナ時代」の感染症、免疫学、微生物学などの幅広い領域に関する発表、研究分野の情報交換、学生および研究者の交流は、長崎大学熱帯医学研究拠点研究に沿ったものであったと考えます。

上記の実施報告にも記述のとおり、口頭の研究発表では、活発な質疑応答が行われ、感染症分野に関する相互の研究に改めて触れる機会となり、また、ポスターセッションでは普段、臨床に関わりながら研究を行っている若手研究者にとっても最新の研究成果に触れることのできた、刺激ある素晴らしい機会であったと考えます。

本助成金により、抄録集を作成することができ、また会場設営費および旅費の一部を補填頂きましたことから、円滑な運営で可能となり、参加者も有益な発表をできたことから、本共同利用・共同研究拠点の助成趣旨にある、1. 熱帯医学及び国際保健における先導的研究、2. 研究成果の応用による熱帯病の防圧ならびに健康増進への国際貢献そして3. 研究者と専門家の育成に貢献できたと考えます。

達成度としては、口頭の研究発表は当初 30 名前後を想定しており、実際には 32 名の研究者により実施いただいたことから目標を達成したと考えます。ポスター発表についても、30 名前後を想定しており、実際にも 30 名の若手研究者により実施いただいたことから目標を達成できたと思われます。内容としては、口頭発表において、想定講演時間を超えた活発な質疑応答があり、充実したセッションでありました。また、ポスターセッションでも、多くの臨床系の先生方に閲覧および質疑頂き、予想以上の成果を挙げられたと考えます。

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）

令和 6（2024）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
国際シンポジウムの開催

課題番号：2024-A-02

開催期間：令和 6 年 4 月 1 日（火）～令和 7 年 3 月 31 日（月）

2. 代 表 者：熱帯医学・グローバルヘルス研究科 准教授 吉岡 浩太

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、平山 謙二
森田 公一

3. 決 定 額：650 千円

4. 実施計画

日本顧みられない熱帯病アライアンス（Japan alliance on Global NTDs（JAGntd））は、長崎大学熱帯医学研究所が事務局をつとめる顧みられない熱帯病（NTDs）に関する我が国の産官学民をまとめるネットワークである（2018 年 11 月に発足）。熱帯医学研究所では、JAGntd の事務局として、いくつかの国際的なイベントを実施するとともに、NTDs に関する国際ネットワークと国内の団体を繋ぐ活動を実施してきた。これまでは、AMED 予算や英国の NTDs を国際的にまとめる Uniting Combat to NTDs からの財政的支援、長崎大学から配分された NTDi センターへの資金により、国際的 NTD ネットワークへの参加やウェビナーの開催、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た。しかし、一昨年度から活動資金の欠乏にあえいでいる。NTDs は、コロナ禍の影響を受け、国際的活動力が弱体化しており、長崎大学熱帯医学研究所や GHIT Fund が存在する我が国が国際ネットワークをけん引してゆく必要があり、そのような観点から、令和 5 年度には、本事業費の支援を得て、G 7 サミット長崎保健大臣会合の日程に合わせた国際シンポジウムを GHIT Fund、Uniting Combat to NTDs との共催により実施した。令和 6 年度は、11 月に本学が主催する The 8th Global Symposium on Health Systems Research が企画されている。そこにおいて、NTDs に関する国際シンポジウムを開催することを計画している。また、国際保健機関（WHO）による NTD Diagnostic Advisory Group (TAG) 会議への参加とその情報の国内での共有を図る必要があり、今回の予算を一部、同活動に充てることが可能であれば幸いである。今後、熱帯医学研究所として、NTDs に関するネットワークの維持、並びの情報の入手と共有の枠組みは、必須の取り組みと考え、TMGH との共同業務として本事業に申請させていただくこととした。

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。以下、本事業の支援を受けた JAGntd の活動を報告する。

A) NTD Advocacy Meeting「Celebrating Japanese Investments in Neglected Tropical Diseases」の共催

2024 年 9 月 19 日(木曜)13:45～15:00 の間、衆議院第 2 議員会館第 4 会議室(東京都千代田区永田町 2-1-2)において、Bridges to Development が主催するイベント「Celebrating Japanese Investments in Neglected Tropical Diseases」を共催者として開催し、平山謙二教授が代表して参加した。同イベントは、Bridges to Development が Takeda's Global CSR Program の助成を受け、パプアニューギニア、バヌアツにおいて実施してきた NTDs 対策の終了を記念して実施されたイベントである。これまで日本の支援により、フィラリア症対策プロジェクト(PacELF)が実施されてきた経緯もあり、JICA、GHIT Fund、エーザイセー薬や JAGntd が共催して開催された。

B) The 8th Global Symposium on Health Systems Research (HSR2024) での NTDs に関するサイドイベントの実施

HSR2024 は、2024 年 11 月 18 日から 22 日かけ、出島メッセ長崎において、Health Systems Global (HSG) の主催と長崎大学、JICA、WHO などの共催により開催された。世界 112 ヶ国から研究者、政策立案者、実務者、国際機関の関係者(例:WHO、JICA)など、約 1500 名が参加し、保健システムと政策に関する多様な視点から議論を行った。JAGntd は、同イベント初日に「NTDs と保健システム研究」というサイドイベントを実施、ケニアを含む途上国からの後援者を含む 5 名による後援と議論が行われた。特に、GHIT が開発に協力した小児用プラジカンテルの実装にむけて、保健システム分析がどのような貢献ができるかという議論を行った。

C) 第二回 顧みられない熱帯病 学生コンテストについて

1 月 30 日の「世界顧みられない熱帯病の日(World NTDs Day)」に合わせ、当研究所は「第二回 顧みられない熱帯病 学生コンテスト」の開催に協力し、本事業の配分を一部活用した。

本コンテストは、中学生から大学院生までの生徒・学生を対象とし、個人または 4 名までのチームでの参加を募集した。2 つの応募部門:

「A 部門: わかりやすく伝える部門 ～NTDs って知っている?～」

「B 部門: 日本ができることを考える部門 ～NTDs を制圧するために～」

を設け、全国に広く募集した。

応募総数は A 部門 24 作品、B 部門 11 作品であり、一次選考や SNS 審査を経て、

各部門 6 作品が最終選考に進出した。最終選考は 2025 年 1 月 11 日に実施され、1 月 30 日の「世界 NTD の日」に表彰式が行われた。

A 部門の最優秀賞は、滋賀県立守山高等学校 1 年生の 3 名による、NTDs をクイズ形式でわかりやすく紹介する動画作品が受賞した。B 部門の最優秀賞は、鳥取大学熱帯医学研究会に所属する 4 名が、フィリピンでの住血吸虫症に関する現地住民の理解を深めるアクションを企画・実施した報告をまとめた作品が受賞した。また、U-18 特別賞や GHIT 賞、日本製薬工業協会賞なども授与され、若い世代の創造力と行動力が評価された。本コンテストを通じて、NTDs に対する認識を深め、持続可能な開発目標 (SDGs) 達成に向けた取り組みを促進することができた。

D) 第 11 回日経・FT 感染症会議での報告

2024 年 10 月 22 日～23 日の間、開催された第 11 回日経・FT 感染症会議において、同会議 NTD 部会として、JAGntd の運営委員長（平山）が活動報告を行った。NTD 部会の報告は、感染症対策における NTD の重要性を再認識し、国際的な連携と政策形成の強化を促進する上で大きな意義を持つと考えられる。

E) 本事業代表者の World Health Organization (WHO) Working Group on Monitoring, Evaluation and Research (WG MER) reporting to the Strategic and Technical Advisory Group for Neglected Tropical Diseases (STAG-NTD) の参加

JAGntd の活動は、WHO との連携が欠かせないところであり、昨年度も WHO での NTD Diagnostic Advisory Group (TAG) 会議に本学からも 1 名研究者（金子）が参加し、情報収集を行った。その結果、NTD Diagnostic Advisory Group (TAG) の下部組織である Monitoring, Evaluation and Research (MER) というワーキンググループに本事業代表者（吉岡）が参画することとなった。今後、JAGntd の活動を WHO と連携し展開することとしたい。

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）

III （予想通りの成果を挙げられた）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

評価を下した理由

複数のイベントを主催もしくは共催できたこと、さらには、JAGntd を介して、長崎大学熱帯医学研究所の活動の紹介のみならず、その価値を高めることができたこと、さらには、WHO との連携を保つ意味において、NTD DTAG のワーキンググループメンバーに本事業代表者が選ばれ、JAGntd のみならず、長崎大学と WHO との連携の道筋を確保できたことが評価を下した理由である。

令和 6（2024）年度研究集会報告（自己評価）

1. 研究集会の名称：医学公衆衛生学研究のための倫理に関する国際セミナー
課題番号：2024-A-03
開催期間：令和 6 年 6 月 26 日（水）～令和 6 年 6 月 28 日（金）
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：42 名（受講者 34 名、講師 5 名、ファシリテーター 3 名）
3. 決 定 額：550 千円
4. 実施計画
【セミナーの目的】（熱研 HP の教育のセクションにも紹介されている。
<https://www.tm.nagasaki-u.ac.jp/nekken/education/> これまで熱研主催として 22 回開催し多数の人材を育成）
受講者はヒトを対象とした医学・グローバルヘルス分野における研究倫理についての基本的な考え方を学ぶと同時に、近年の研究倫理に関する国内外における議論を把握することができる。主たる内容は、研究倫理の基本原則、インフォームド・コンセント、リスク・ベネフィット評価、既存資料の利用、国際共同研究における倫理である。これに加えて、子どもを対象とする研究の倫理、コミュニティを対象とする研究の倫理、プラセボ対照試験の倫理、研究と治療の区別、倫理審査委員会の構成や機能等についても学ぶ。
【対象者】
保健医療関係の博士課程大学院生、医学研究者、倫理委員会委員、医学部・保健医療関係の学部生など国内外を問わず参加者を公募する。医歯薬学総合研究科博士課程の選択科目およびリーディングプログラムの必修科目となっている（1 単位）。
【研修方法】
研修は、グループ討論を中心とした対面相互教育方式で行われる。参加者は各テーマについての入門的な講義を聞いたうえで、関連するケースについてグループで討論し、倫理的問題を分析する力を養う。なお、使用言語は基本的に英語であるが、できる限り日本語でも理解できるようサポートを行う。
5. 実施報告
2024 年 6 月 26 日～28 日に第 23 回研究倫理セミナーを開催し、学内外から計 34 名（学内 16 名、学外 18 名）が参加した。ヒトを対象とする医学・グローバルヘルス分野における研究倫理をテーマに、講義とケーススタディを組み合わせた対面形式で実施。参加者は 4 グループに分かれて討論し、各グループが倫理的課題を分析・発表した。使用言語は英語を基本とし、必要に応じて日本語による補助も行った。研究倫理の基本原則から国際共同研究、倫理審査委員会の役割まで幅広く学ぶ機会となった。

6. 自己評価

既に確立されたコースとなっているが、学内外から多数参加して活発な議論が行われ、研究倫理の基礎と応用を学ぶ充実したコースになっていると思われる。課題は今後の継続性で、熱研の教員を中心にコース運営やコンテンツの質管理などを習得してもらっている。外来の講師についても順次若返りを図っている。

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）

④ （予想以上の成果を挙げられた）

第 3 部

海外拠点連携共同研究

令和 6 (2024) 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 : 2024-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 : 久留米大学医学部感染医学講座 教授

小椋 義俊

Thai Nguyen University of Agriculture and Forestry 講師

Nguyen Thi Thu Huong

長崎大学熱帯医学研究所ベトナム拠点 教授 長谷部 太

3. 決 定 額 : 650 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新興下痢原性細菌である *E. albertii* の汚染実態も不明である。病原性大腸菌および *Escherichia albertii* (diarrheagenic *Escherichia*: DE) 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 DE 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、家禽、環境水などの横断的なサンプルを対象とした DE の調査と研究を行う。

② 研究内容

試料の収集 : ベトナム北部の複数農場において、牛、豚および家禽の糞便 (計 30-60 検体) を採取する。

分離・同定 : 上記試料を、ノボビオシン加 mEC 培地を用いて 42℃ で前培養する。培養液から精製した DNA を用いて DE マーカー病原遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *eae*, *lt*, *st*, *ipaH*, *aggR*) の PCR を行う。陽性検体の培養液を複数の選択分離培地 (DHL、クロモアガー-STECC、XM-G、mLIA) に塗抹して培養し、大腸菌様コロニーを各検体から最大 48 コロニーを釣菌して、マーカー遺伝子陽性株を PCR 法で特定して分離する。試料の収集および分離・同定は、井口と Nguyen 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 DE を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する。さらに、小椋によりゲノム解析を実

施する。先行研究で既已取得している患者由来 DE 株のゲノム情報を含めた横断的なゲノム比較解析を行い、ベトナム国内で汚染・流行している DE 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 DE 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 DE 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 DE と比較することで、細分類された DE 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6（2024）年度実施計画に対する実施状況

参画者（Nguyen）等の協力により得られた、ベトナム北部のウシ（22）、水牛（7）、ヤギ（11）、ニワトリ（12）、アヒル（11）、ブタ（12）より採取した便検体（計75検体）を用いた。代表者（井口）と参画者（小椋）は9月19日から27日にかけてベトナム拠点を訪問し、ベトナム拠点のスタッフとともに、上記検体を用いた調査や試験、および分離株保管・輸送方法の確認などを行なった。

まず、検体を mEC 培地に接種し、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。次に、いずれかの遺伝子が陽性であった培養液を大腸菌選択分離培地に塗抹して培養し、各検体から11または12コロニーを釣菌して陽性株の分離を試みた。加えて、それぞれの検体から非病原性大腸菌を分離し（各動物種につき16～51株、計186株）、その一部について、23種類の抗菌薬に対する薬剤感受性をディスク法により評価した。全ての分離株はベトナム拠点において-80℃で保管し、日本へ輸送した後に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0～16%で検出された（表）。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、ウシ、水牛、ニワトリで検出され、その他の動物種では検出されなかった。全体の検出率は3～16%であった。また、腸管毒素原性大腸菌（ETEC）のマーカである *estp*、*esth*、*elt* は各動物から検出され、全体の検出率は3～11%であった。以上の結果より、ベトナムの家畜や家禽は、さまざまな種類の DE を保菌していると示唆された。特に、ウシでは STEC の高い保菌（11/22、50%）が確認された。

表1. 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

動物の種類	検体数	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx2f</i>	<i>lt</i>	<i>stp</i>	<i>sth</i>	<i>aggR</i>
Beef	22	8	2	1	2	2	1	0	1	0
Buffalo	7	4	0	0	0	0	0	0	1	0
Goat	11	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Chicken	12	0	0	1	0	1	0	2	1	0
Duck	11	0	0	1	0	0	0	2	0	0
Pig	12	0	0	1	0	0	1	4	0	0
合計	75	12	2	4	2	3	2	8	4	0
陽性率		16%	3%	5%	3%	4%	3%	11%	5%	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が、2検体から5株しか分離することができなかった。内訳は、*stx1*+*stx2* 陽性（*eae* 陰性）STEC が1株と、*stx1* 陽性（*eae* 陰性）STEC が4株（いずれもウシ検体由来）であった。

続いて、ウシ、ブタ、ニワトリから分離した非病原性大腸菌（それぞれ8株）を用いて、21種類の抗菌薬に対する感受性を評価した（図、表2）。ウシ由来株では、ABP、CEZ、CAZ、CTX、MPM、IPM、AMP、CRX、KM、CL、CIP に対して高い耐性率（50%以上）を示した。一方、ブタではABP、CEZ、CTX、TC、CP、AMP、KM、NA、

CIP、ST、ニワトリでは ABP、CEZ、CTX、TC、CP、AMP、CRX、KM、CL、NA、CIP、ST で高い耐性率を示した。

図．動物種別に見た大腸菌の薬剤耐性傾向

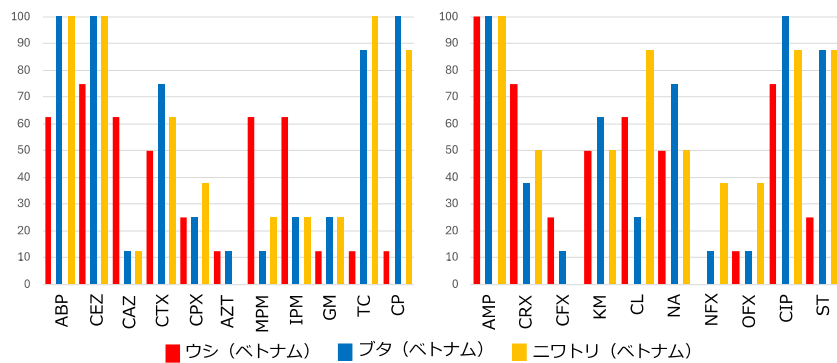


表2. 薬剤感受性試験に用いた抗菌薬

系統	抗菌薬名	略号
ペニシリン系	アンピシリン	ABP
	アモキシシリン	AMP
セファロスポリン系	セファゾリン	CEZ
	セフトリアキソン	CRX
	セフトキシム	CAZ
	セフトキシム	CTX
セファロスポリン系	セフトキシム	CPX
	アストレオナム	AZT
セファロスポリン系	セフトキシム	CFX
カルバペネム系	メロペネム	MPM
	イミペネム	IPM
アミノグリコシド系	カナマイシン	KM
	ゲンタマイシン	GM
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	TC
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP
	コロistin	CL
キノロン系	ナリジクス酸	NA
キノロン系	ノフロキサシン	NFX
	オフロキサシン	OFX
キノロン系	シプロフロキサシン	CIP
	スルファメトキサゾール・トリメトプリム	ST

ベトナム拠点において-80℃で保管されていた、本研究およびこれまでの研究で分離した DE（38 株）と、本研究で分離した非病原性大腸菌（186 株）は、MTA などの適切な手続きを行い、2025 年 3 月に宮崎大学へ移送した。今後、各株のゲノム解析や薬剤感受性試験の詳細な評価を実施する予定である。

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と参画者のサポートにより、本研究をスムーズに実施することができた。これまでの経験により、効率的に DE を分離する手順や手法の検討と改善を行ってきたが、2024 年度の現地調査で分離できた DE はわずかに 5 株であった。以上の状況から、分離法については今後も継続して改善を検討する必要があると考えた。これまでにベトナムで分離された DE 株等を宮崎大学へ移送することができた。既にゲノム解析などの準備を進めており、新たな知見が得られると期待される。

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）
- ② （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6（2024）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：迅速診断キット（Lateral Flow Device）を用いた狂犬病の分子疫学的研究
の検討

課題番号：2024-Kyoten-02

2. 代 表 者：大分大学医学部微生物学講座 講師 君付 和範
共同研究者：大分大学医学部微生物学講座 教授 西園 晃
大分大学医学部先進医療科学科 講師 八尋 隆明
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
ケニアプロジェクト拠点 齊藤 信夫

3. 決 定 額：1,150 千円

4. 研究計画

① 研究目的

本研究の研究目的は、簡易診断方法である Lateral Flow Device (LFD) から抽出したウイルス RNA を用いて狂犬病ウイルスの Whole Genome Sequencing (WGS) 法を確立することである。LFD を用いた狂犬病診断は簡便で、特別な設備が不要ということから、インフラが整備されていない遠隔地域での診断方法として有用である。また、遠隔地で陽性と診断されたキットを冷蔵下あるいは常温で搬送可能という利点もあげられる。もう一つの研究目的は、本法によって得られたウイルス遺伝子情報を基に、ケニアにおける狂犬病ウイルスの分子疫学解析を行うことである。次世代シーケンスによるゲノム解析技術は近年狂犬病ウイルスの遺伝子解析にも応用され、オンライン自動ジェノタイピングツール（RABV-GLUE）を用いることによって、系統群 Clade、linage、sub linage などの系統分類まで可能となっている（Campbell et al 2022）。

② 研究内容

ケニアは年間推定 523 人（95%CI 134, 1,100 人）が狂犬病により死亡している狂犬病流行国の一つである（Chuchu VM et al, 2022）。当該研究では、長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点にて動物狂犬病のサンプル収集および次世代シーケンサー等の遺伝子解析機器を利用することによって、ケニア拠点での本技術の確立を目指す。研究対象は、過去数年あるいは、研究期間中に狂犬病陽性と診断された動物の脳組織の一部で、まずは動物疾病検査室で LFD により狂犬病の有無を確認する。使用済みの LFD は解析に供するまで 4 度で冷蔵保存し、サンプルが集まり次第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ケニアプロジェクト拠点（ケニア拠点）に送付する。ケニア拠点では、LFD から total RNA 抽出、次いで PCR にて狂犬病ウイルスの

遺伝子全長を multiple PCR によって増幅する。プライマーはケニアで流行している狂犬病ウイルスの株を参照として約 400bp のアンプリコンが増幅されるように設計する。ライブラリー調整には Illumina Microbial Amplicon Library Prep (イルミナ株式会社) を用いて、シーケンス解析にはアジア・アフリカ感染症施設 ケニア拠点にある Illumina Miseq (イルミナ株式会社) を用いる。得られた全ゲノム情報は RABV-GLUE (<http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/rabvFastaAnalysis>) を用いてジェノタイピング及び分子疫学解析を行う。

③ 予想される成果

LFD を用いた狂犬病診断は手順や診断が簡便で、特別な設備が不要ということから、インフラが整備されていない地域でも狂犬病の診断が可能である。また、ウイルスのゲノム解析を実施する際、臨床検体（脳組織）は冷凍下で保存・搬送する必要があるが、LFD は遠隔地で陽性と診断されたキットを冷蔵下あるいは常温で搬送可能である。そのため本技術が確立されれば、遠隔地も含めた広範囲のサーベイランスが可能となることが期待される。

また、RABV-GLUE に登録されているケニア分離株は 51 株であるが、これらの多くは N 遺伝子あるいは G 遺伝子の全配列あるいは一部分の配列を参照に分類されている。WGS 解析により解像度の高い分子疫学的研究やウイルス株の分類することで、由来株同定やウイルスの変異を解析することが可能となる。さらに、狂犬病ウイルスの多様性と地理的分布など情報を組み入れることにより、空間的な広がりやその要因についても推察することが可能となる。将来的には地域全体における狂犬病のリスク評価や予防策の戦略的な立案、狂犬病の輸入症例の特定、感染経路の追跡にも役立つことが期待される。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

2025年10月下旬から11月初旬にかけて、長崎大学ケニアプロジェクト拠点を訪問し、狂犬病ウイルスのN遺伝子を標的としたRT-PCR法およびキャピラリーシーケンス法の技術導入を目的とした現地指導を実施した。滞在中は、齊藤准教授および現地研究スタッフとともに、必要な試薬や機器の動作確認を行うとともに、今後の解析手順および研究体制に関する具体的方針を協議した。また、現地関係機関との連携体制の構築を目的として、National Veterinary Reference Laboratories (NVRL, Kenya Center for Veterinary Laboratory) およびナイロビ大学獣医学部公衆衛生薬理毒性学 (Department of Public Health Pharmacology and Toxicology, University of Nairobi) を訪問し、研究の目的と実施内容に関する意見交換を行った。

一方、日本国内では、使用済み迅速診断キット (Lateral Flow Device: LFD) から抽出したRNAを用いた狂犬病ウイルス全ゲノム解析法 (Whole Genome Sequence; WGS) の確立を目指し、別研究において陽性と判定されたLFDから抽出したRNAをテンプレートとしたWGSの試験運用を実施した。

② 成果（結果＋考察）

長崎大学ケニアプロジェクト拠点におけるターゲットシーケンス技術の導入にあたっては、狂犬病ウイルス実験室株 (Challenge Virus Standard: CVS 株) 由来のRNAを鋳型としてcDNAを合成し、RT-PCRおよびキャピラリーシーケンスを実施した。N遺伝子の検出にはLN34プライマーセットを用いたRT-PCRを実施し、目的領域の特異的増幅を確認した。さらに、N遺伝子全長の配列解析を目的としてP1および304プライマーを用いた増幅を行い、全長配列の決定に成功した。本手法は今後、ケニア国内で採取された臨床検体への適用により、地域株の分子疫学的特徴の解析に活用される予定である。

使用済みLFDから抽出したRNAを用いたWGSの確立に関しては、フィリピン国内で狂犬病陽性と判定された使用済みLFD 47検体を対象に検討を行った。RNA抽出後、Illumina Microbial Amplicon Prep (IMAP) によるライブラリー作製を実施し、増幅には東南アジア地域で流行する系統に基づいたプライマーセット (rabvSEasia) を用いたMultiplex PCRを実施した。その結果、全体的にRNA濃度が低い傾向にあったにもかかわらず、30/46検体でアンプリコンの増幅に成功した。

得られたシーケンスリードを既存の参照配列にマッピングしたところ、多くの検体で3' および5' 末端領域ならびにL遺伝子の一部に欠損が見られたものの、全体としてはほぼ全長のゲノム配列が構築可能であった。これらの配列はRABV-GLUE (<http://rabv-glue.cvr.gla.ac.uk/#/rabvFastaAnalysis>) によりジェノタイピングを行い、すべてがフィリピンにおいて報告されている既知系統 (KX148263 および KX148259) と一致した (図1)。

KX148259系統 = RADDL6系統

RADDL1, 4A, 5, 6

KX148259系統 = RADDL1, 4A, 5, 6

③ 成果の公表
該当なし

6. 自己評価

本研究は新規課題ということもあり、令和6年度中にケニア国内での検体収集および解析には至らなかったが、当初の目標であった狂犬病ウイルスのRT-PCR法およびシーケンス解析技術の導入については、ケニア拠点において実施・指導を完了しており、基盤的技術移転を達成した点は一定の成果として評価できる。

さらに、日本国内での研究において、使用済みのLateral Flow Device (LFD) キットから抽出したRNAを用いたWGSを成功させたことは、現場での簡易診断から分子疫学的情報を得る技術として重要な実証成果である。この技術は、今後ケニアにおける検査体制強化および監視体制構築に応用可能であり、次年度以降に向けた展開の礎となる成果と位置付けられる。

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）

令和 6（2024）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアにおけるワンヘルスな視点からのロタウイルス流行株の解析
課 題 番 号：2024-Kyoten-03

2. 代 表 者：大分大学グローバル感染症研究センター 教授 河本 聡志
共 同 研 究 者：大分大学グローバル感染症研究センター 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：1,400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

世界中で 2021 年の時点でも、～500 万人の 5 歳未満の子供が死亡していると推計されている。その殆どがアフリカ・アジアの発展途上国の子供であり、その死亡要因は急性呼吸器感染症（17%）に次いで、下痢症感染症（9%）が多い。ケニアにおいてもこうした感染症は公衆衛生学的に大きな問題であり、貧富の差が大きいこともあり、5 歳未満の死亡率はわが国で 2（出生 1,000 当たり、2019 年）に対してケニアでは 43（同上）となっている。

RV はヒトをはじめとする殆どの哺乳動物種を宿主とし、乳幼児に重篤な胃腸炎症状を頻繁に引き起こすことから、最重要な胃腸炎ウイルスの一つである。この RV 胃腸炎に対して RV ワクチンが開発されて 130 か国以上で認可、90 か国以上で定期接種されている。RV ワクチンの有効性は先進国ではきわめて高いものの、発展途上国ではかなり低い。その要因として、アフリカ・アジアの発展途上国には、先進国とは異なり非定型的な血清型（遺伝子型）を持つ RV 株が数多く存在すること、動物とヒトの間で RV の種間伝播が頻繁に起きていることなどが推測されるものの未だによく分かっていない。こうしたワクチン効果の低い国々では、人獣共通感染症の一面を持つ RV が乳幼児の間、および動物との間で感染伝播を繰り返し、結果として新型のヒト RV 流行株が発生する可能性は高くなる。

本研究課題では、これまでの申請者らとケニア拠点／KEMRI 間の国際学術交流を通して築いた信頼関係をもとに、ケニア側研究者の協力のもと、現地で蔓延する RV について、既存の RV 下痢症患者を対象とするサーベイランスに、ワンヘルスの視点から新たに家畜動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）の検体を加えるとともに、分子疫学およびウイルス学的な解析やデータを付け加える。これにより、疫学的、分子疫学的、およびウイルス学的に RV 流行株の出現・進化を監視するとともに、発生メカニズムについても明らかにする。

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 陽性便検体であるが、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／KEMRI の Ernest Apondi Wandera 博士のグループで体制が整っており、RV 胃腸炎下痢便検体がケニア 2 地区（キアンブ、ビタ）から定期的に収集されている。便検体からのウイルス RNA 抽出、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）、semi-nested RT-PCR による G/P 遺伝子型の決定といったスクリーニング実験については、申請者の技術移転もありナイロビで行われており、ケニアにおけるヒト RV 流行株の G/P 遺伝子型変遷についてのデータが蓄積してきている。さらに、ナロク地区における家畜動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）の便検体採取についても最近始めており、上述のスクリーニング実験が家畜動物の便検体を対象にして同様にナイロビで行われている。

本研究課題では、①ケニア拠点／KEMRI で収集している RV 胃腸炎便検体に、ワンヘルスの視点で新たに家畜動物の便検体を付け加えることで、ケニアにおける RV の挙動の詳細を明らかにすることを目指す。さらに、全ゲノム解析を行うことで、ケニア流行株の起源と進化のメカニズムの詳細を明らかにするとともに、中和エプーブといったウイルス性状についても解析を実施し、ワクチン効果と新型の RV 流行株の出現との関連を解明する。

①RV 陽性便検体の収集（1 年目、2 年度以降）

共同研究者である Ernest Apondi Wandera 博士のグループが、キアンブ地区とビタ地区（急性胃腸炎患者の下痢便）、およびナロク地区（家畜動物の下痢／通常便）で検体収集する。これまでに収集してきた RV 陽性便検体も本研究で用いる。

②RV G/P 遺伝子型の決定と全ゲノム解析（1 年目、2 年度以降）

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 を抽出して、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（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、ヒトおよび家畜動物のケニア RV 流行株について G/P 遺伝子型の変遷が明らかになるとともに、非定型的なヒトあるいは動物の RV 株があれば検出される。

ヒトあるいは家畜動物の非定型的な RV 株とランダムに選別された定型的 RV 株について、ケニア拠点の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シングデータについてもケニア拠点の専用 PC で解析し、全 11 本の遺伝子分節のそれぞれ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。

③ケニア流行株のウイルス学的解析（2 年度以降）

②で全ゲノムシーケンスを決定したケニア流行株のなかで、VP7 と VP4 の中和エプーブに RV1 ワクチン株のものとは大きなアミノ酸の差異があるといったケニア流行株については、MA104 細胞と回転培養技術でウイルス分離し、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非定型的 RV 株の出現との関連を明らかにする。

こうして、便検体採取から RV の全ゲノム解析、中和エピトープ解析をケニア拠点で完結させることを目指すとともに、実験機器の問題でやむを得ずわが国で実施する必要がある実験については、Ernest Apondi Wandera 博士を大分大学に招聘して実施することを検討する。これらによって、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

これまでの研究経過から、ケニアで RV 流行株の G/P 遺伝子型の変遷を継続して調査することで、先進国では殆ど検出されることのない、動物 RV 株由来のヒト RV 株が急性胃腸炎患者から数多く検出されるものと予想される。特に、家畜動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）の RV 株由来の遺伝子分節を有するリアソータント株が多数検出されると思われる。一方で、家畜動物の便検体からは、ヒト RV 株の遺伝子分節を持つリアソータント株、あるいはヒト RV 株そのものが検出されるかもしれない。これまでケニアにおいては（家畜）動物 RV 株の解析は殆どされておらず、きわめて有用な情報が得られると期待される。こうして、人獣共通感染症の一面を持つ RV のケニアにおける実態が明らかになるとともに、ワンヘルスな視点からの RV 胃腸炎のサーベイランス・ネットワークの重要性が示されるであろう。実際にこれまでの研究経過で、ウシ RV 株由来の NSP4 遺伝子を持つ G3P[6]株と G8P[6]株、ブタ RV 由来の VP1 遺伝子を持つ G3P[8]株、全 11 遺伝子がブタ由来の G4P[6]株、全 11 遺伝子がウシ由来の G8P[14]株を RV 胃腸炎患者から検出している。ケニアで日々収集されるこうした非定型的なヒト RV 株に加えて、家畜動物（ウシ、ヒツジ、ヤギ、ブタ）RV 株についても、ケニア拠点で次世代シーケンサー（MiSeq）を駆使し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 流行株の出現・進化のメカニズムを、ワンヘルスの視点からリアルタイムで明らかにできるとと思われる。2024 年 2 月にはケニア拠点で、同 3 月には大分大学で Ernest Apondi Wandera 博士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、2024 年度には、ケニアにおける RV 感染症の実態についての理解が大きく進む。アフリカ・アジアの発展途上国で発生し、次いでわが国を含む世界へと感染拡大する可能性のある新型の RV 流行株をいち早く検出し、さらにその性状の詳細を事前に把握できることから、迅速診断系や次世代ワクチンの開発を目指す研究の推進に繋がることも期待される。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

2025 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（トリ）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に、RV 検出のスクリーニング実験となる PAGE 解析を実施した。明里大学院生と 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 解析の対象とする便検体を選択した。渡航期間中はケニア拠点の MiSeq が使用停止中であったため、次世代シーケンシング実験は大分大学で申請者と明里大学院生とで実施した。

② 成果（結果＋考察）

ヒト便 67 検体と動物便 17 検体について抽出 RNA の PAGE 解析を実施したところ、ヒト 16 検体において RV ゲノムに特徴的な RNA 泳動像が観察された。一方で、動物便検体からは RV が検出されなかった。RV 陽性とされたヒト 16 検体の RNA 泳動像のプロファイルから、NGS で全ゲノム解析する 10 検体を選抜した。ケニア拠点／KEMRI の承認を得たうえでゲノム RNA を日本に持ち帰り、大分大学の MiSeq 機器で次世代シーケンシングを行ったところ、良好な結果を得ることができた。

RV は全 11 本からなる分節 2 本鎖 RNA をゲノムとする。2 つの外殻蛋白質 VP7 と VP4 は独立した中和抗原であり、それぞれ血清型（遺伝子型）G タイプと P タイプを規定する。G タイプが G1～G42、P タイプは P[1]～P[58] と G/P タイプの多様性は顕著である。さらに残る 9 本にも多様性が認められることから、近年では全 11 本の遺伝子型構成（VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5）を表記する。殆どのヒト RV 株は、Wa 遺伝子群と DS-1 遺伝子群とに大別されるが、それぞれの遺伝子型構成は G1/3/9/12-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 と G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2 である。ヒト以外にも、殆どの哺乳類種と鳥類種にそれぞれ固有の RV が存在するが、種の壁は厳密ではなく、ヒトと動物間の接触が濃厚な地域では種間伝播が頻繁に起こる。

本研究の成果として、世界的な RV 流行傾向と一致し、ケニアにおいても G3P[8] 株の検出頻度が顕著に高いことを見出した（15/16 株；94%）。残る 1 株は G3P[6] 株であった。G3P[8] 株を詳しく検討したところ、殆ど（14/15 株）が定型的な Wa-like G3P[8] 株であったが、残る 1 株は世界的な新興株である DS-1-like（ウマ様）G3P[8] 株であると考えられた。ケニアにおいては、ウマ様 G3P[8] 株の全ゲノム解析は未だされておらず、その由来の詳細は不明である。現在、系統樹解析でこのケニアのウマ様 G3P[8] 株の詳細な由来と進化の解明を進めている。

ケニアにおける種間伝播の発生を検討するうえで、現地で流行する動物 RV 株がリファレンス株としてとても重要である。そこで、Dr. Wandera のグループでは年度末にケニア西部のナロク地区に一週間滞在し、野生動物便検体を多数収集してきた。現在、これら動物便検体についてケニア拠点／KEMRI でスクリーニング実験を実施している。RV が蔓延するケニアにおいてヒトと動物の RV 流行株を性状把握

することで、種間伝播による新型ヒト流行株の発生について注意深く監視を継続していきたい。

③ 成果の公表

*Correspondence

1. Wandera EA, Akari Y, Sang C, Njugu P, Khamadi SA, Musundi S, Mutua MM, Fukuda S, Murata T, Inoue S, Kaneko S, Nyangao J, **Komoto S***. Full genome characterization of a Kenyan G8P[14] rotavirus strain suggests artiodactyl-to-human zoonotic transmission. *Trop Med Health*. In press.

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実験、Wa/DS-1遺伝子群の判別、G/Pタイピング、NGSを技術移転してきた。しかし、Dr. Wanderaのグループでは若手研究者の異動で、これら実験の一部がコロナ時期を境にして継続されていないことが昨年度明らかになった。そこで、ケニア拠点/KEMRIで若手研究者に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、当研究室の大学院生が日本から遠隔で研究支援するようにした。これらの成果は出始めており、ケニアの若手研究者からRV研究に関する活発な質問が出てくるようになり、ケニア拠点/KEMRIとの共同研究活動は再活性化してきたと感じる。昨年度までの共同研究で見出していた、偶蹄類からヒトへ種間伝播したと推測される非定型的A75株(G8P[14])の分子疫学的解析を論文として公表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）

令和 6（2024）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアのコウモリにおけるフィロウイルス感染症の疫学調査

課題番号：2024-Kyoten-04

2. 代 表 者：北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 准教授 梶原 将大
共同研究者：北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 助教 小方 翔平
ザンビア大学 准教授 Katendi Changula
マサイマラ大学 環境学部 上級講師 Paul Webala
マサイマラ大学 環境学部 講師 David Wechuli
エルドレット大学 講師 Samuel Kariuki
北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 特任講師 直 亨則
北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 教授 高田 礼人
北海道大学 人獣共通感染症国際共同研究所 助教 尾針 由真
同志社大学 生命医科学部医情報学科 教授 飛龍 志津子
同志社大学 研究開発推進機構 特任准教授 藤岡 慧明
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 安田 二郎
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 井上 真吾
長崎大学 熱帯医学研究所 准教授 齊藤 信夫

3. 決 定 額：1,400 千円

4. 研究計画

① 研究目的

マールブルグウイルス（MARV）はフィロウイルス科に属し、ヒトを含む霊長類に重篤な出血熱を引き起こす。近年の疫学的知見からエジプトルーセットオオコウモリ（ERB）が MARV の自然宿主であると考えられているが、自然界におけるウイルスの生存様式、人間社会への伝播経路については依然多くの謎に包まれている。ケニアは 1980 年代に 2 度のマールブルグ病のアウトブレイクを経験していることに加え、ウガンダおよびタンザニアといったマールブルグ病発生国に隣接していることから、同国においてマールブルグ病が再発生するリスクは極めて高い。一方で、同国における MARV の分布、生態に関する情報は極めて限られている。本研究では、ケニアの ERB を対象にフィロウイルス感染に対する血清ならびに分子疫学調査を実施し、同国における MARV の分布状況、遺伝的多様性を明らかにする。また、ケニア、ガボンを含むアフリカ 5 ヶ国の ERB を対象に集団遺伝学的解析を実施すると共に、バイオロギング調査によりケニアに生息する ERB の活動範囲や越境的移動に関する知見を得る。これらの解析を通して MARV の自然宿主である ERB の生態を理解することで、MARV の自然界における生存様式、人間社会への伝播経路、大陸規模でのウイルス拡散パターンなど、ウイルスの生態を明らかにすることを目的とする。本研究により、効率的な

モニタリング・サーベイランスシステムの構築等に資する知見が得られるなど、マールブルグ病の予防・制御への貢献が期待される。

② 研究内容

本研究ではケニア拠点を活用し、同国に分布する ERB を捕獲し、以下の研究を実施する。

同国の洞窟あるいはフィールドでハープトラップおよびかすみ網を用いて ERB を捕獲し、血清検体を取得する。フィロウイルスの表面糖タンパク質を抗原とする ELISA 法 (Changula, Kajihara et al. 2018 J Infect Dis) を用いて各種フィロウイルスに対する特異抗体のスクリーニングを実施し、ERB 群における MARV を含むフィロウイルスの感染状況を明らかにする。また、口腔・直腸スワブに加え、捕殺可能個体については肝臓・脾臓を含む主要臓器を採取し、フィロウイルス特異的プライマーを用いて MARV を含むフィロウイルスゲノムの検出を試みる。遺伝子増幅が認められた検体については、サンガー法および次世代シーケンス解析によりウイルスゲノムの塩基配列を決定する。得られたウイルスゲノムの塩基配列に基づいて分子系統解析を実施し、ケニアにおける MARV の遺伝的多様性、ケニア国内外で検出されたウイルスとの進化的な関係について考察する。

さらに捕獲したコウモリ（初年度は 8 頭を計画）に GPS データロガーを装着し、夜間の詳細な移動ならびに長期的な生息地域の変遷について観察する。観察対象コウモリの GPS 位置情報を VHF 通信ないし人工衛星を介して回収し、情報学的解析により、コウモリの移動の軌跡、活動時間などを特定し、コウモリの活動範囲、土地選好性、新たな寝ぐら（＝病巣窟）の分布などを明らかにする。以上で得られた知見に基づいて、コウモリの移動に伴う人間社会へのウイルスの侵入および近隣国間の MARV 伝播のリスクについて考察する。

ケニアで捕獲した ERB ならびに長崎大熱研・安田教授がガボンで採取した ERB に加え、申請者が所有するザンビア、ジンバブエおよびコンゴ民主共和国で捕獲した 5 集団 300 個体以上の ERB 検体を対象に、次世代シーケンサー (MiSeq 等) による MIG-seq 法を用いた網羅的なゲノム解析を実施する。ゲノム解析により ERB 群の集団構造や遺伝子流動に関する詳細を明らかにし、各コロニー間の地理的な隔離状況、長距離移動によるコロニー間の遺伝子流入の頻度について明らかにする。

本研究は 3 年の計画で申請を行う予定である。初年度はケニアの現地状況の把握、種々の許可取得等を含む研究体制の構築を実施し、コウモリ捕獲を伴う初回のフィールド調査、コウモリの生態情報（繁殖期等）収集を実施する。2, 3 年目は上記活動を、1 年目とは異なる季節に実施し、調査対象個体数をスケールアップし、解析データのクオリティ向上を図るとともに、各解析で得られたデータならびにザンビアを含む他のアフリカ地域で得られたデータを統合し、アフリカ大陸における ERB および MARV の生態について考察する。

③ 予想される成果

他国で得られた結果と同様に (Changula, Kajihara, et al. J Infect Dis)、ケニアの ERB 群においても MARV に対する抗体保有率が極めて高いことが予想される。これまでの研究結果より、離乳直後の若齢個体の割合がコロニー内で増加する時期に、活発な MARV の個体間伝播が発生していることが示唆されていることから (Kajihara et al. 2019 EID)、生態学的な観察・情報収集に基づく採材時期の調整により、3 年間の調査期間内に MARV を含むフィロウイルス遺伝子を検出することは可能であると考えている。また、継続的なバイオリギング調査によりコウモリの越境的な移動、新たな病巣窟の特定、人口密集地への侵入などのウイルス伝播に関する重要な生態学的な知見が得られる。ウイルスの分子系統解析の結果と併せて考察することで、近隣国で検出された MARV との生態学的な関係性が明らかとなり、自然界における MARV の生存様式の解明に近づく重要な知見が得られる。5 地域からなるアフリカ大陸横断的な ERB 群の集団遺伝学解析により、異なる地域のコウモリ間の遺伝的な隔離状況、遺伝子流動の有無、地質学的タイムスケールでの種の拡散に関する知見が得られる。これらの知見をウイルスの分子系統関係と比較することにより、宿主とウイルスの共進化ならびにアフリカ大陸における MARV の拡散・進出過程についての考察が可能になる。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

令和6年5月14日に長崎大学を訪問し、安田二郎教授と本研究課題に関する打ち合わせを行うとともに、同教授が保有するガボンで捕獲した ERB の組織由来核酸 2 検体の提供を受けた。ゲノム全体にわたる遺伝的多様性を解析する手法として非モデル生物に対しても有効な MIG-seq 法を用いて、すでに保有しているザンビアおよびジンバブエの ERB の集団遺伝学的解析を実施した。その結果、本研究課題に適した集団遺伝学解析手法を確立した。また、ガボンの ERB 検体に加えて、ガーナおよびイスラエルからそれぞれ 33 頭および 50 頭の ERB 検体を入手した。

令和7年1月21日から2月1日にかけて長崎大学ケニア拠点を訪れた。同拠点のバイオセーフティレベル3施設の使用に必須となるバイオセーフティ講習を3名の研究者が受講した。また、本課題のケニア人カウンターパートとなる Paul Webala 博士、David Wechuli 博士および Samuel Kariuki 博士と共に、ケニア北西部の Mount Elgon 国立公園、南西部リフトバレー地域の ススワ山および沿岸部の シモニを訪れた（図1）。計5ヶ所の洞窟を視察し、コウモリの分布状況やアクセスの容易さ、捕獲方法、コールドチェーンの確保方法などを確認・検討した。



図1. ケニア国内における調査地域

② 成果（結果＋考察）

予備実験としてザンビアおよびジンバブエに分布する ERB をそれぞれ 299 頭および 19 頭対象に MIG-seq 法を用いて遺伝的多様性を解析した。その結果、両国の ERB は遺伝的に緩やかなグループを形成するものの、グループ同士の遺伝的な隔離度は僅かであることがわかった（図2）。本結果から、ザンビアおよびジンバブエの ERB コロニーは遺伝的に隔離されておらず、200 km 以上の距離を超えてコロニー間で交雑が生じている可能性が示唆された。すなわち、両国に分布する ERB 群は国境をまたがってメタポピュレーションを形成していることが示唆された。本

予備実験により、非モデル動物でありゲノムデータが限られた ERB に対しても、MIG-seq 法が集団遺伝学解析の有効な方法であることが確認された。今年度の活動では、ザンビアおよびジンバブエに加え、ガボン、ガーナおよびイスラエルからそれぞれ 2 頭、33 頭および

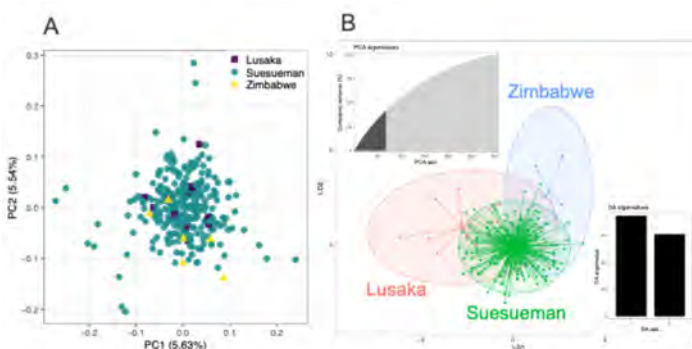


図2. MIG-seq法によるエジプトルーセットオオコウモリの集団遺伝学解析. 対象コウモリの遺伝的構造を主成分分析 (A) および主成分に基づく判別分析 (B) で可視化した。

50 頭の新たな ERB 検体を入手することに成功した。これらの検体に対して、確立した MIG-seq 法を適用することで、アフリカ大陸内外における ERB の集団遺伝学的構造の解明が期待される。

ケニアにおける ERB 採材に適した調査地を特定するため、令和 7 年 1 月 21 日から 2 月 1 日にかけて現地調査を実施し、計 5 ヶ所の洞窟を視察した。最初に訪れた Mount Elgon 国立公園では 3 ヶ所の洞窟を調査した。特に、Kitum cave は、洞窟の訪問と疫学的に関連したマールブルグ病の発生が過去に 2 例報告されているが、今回の調査では ERB は数百頭程度しか確認できず、かつて報告されているような大規模なコロニーは存在しなかった。我々以外にも観光客が頻繁に洞窟を訪れていたことから、ヒトの立ち入りによるコウモリ生息地の遷移が疑われた。同国立公園内では Chepkitale cave において最も大きな ERB コロニーが確認されたが、洞窟が近隣の町から離れた標高約 3,000 m 地点に位置しており、調査地としての利便性に課題が残った。次に、ナイロビから西へ約 60~80 km に位置するスワシ山の洞窟を調査した。本洞窟はアクセスが良く、数十万頭規模のコウモリが確認されたが、対象となる ERB の生息は確認できなかった。最後にケニア沿岸部のシモニにある Giant Sister caves を調査した結果、同洞窟が数十万頭規模の ERB の生息地であることが判明した。幹線道路にも近く、調査環境が優れていることから、来年度以降、本洞窟で採材を伴う本格的な調査を実施する計画を立てた。

③ 成果の公表

・GHIT R&D Forum 2024 (Tokyo, 国際, 2024 年 12 月 5 日) において「Virus Research in Africa for Pandemic Preparedness」というタイトルで口頭発表をした。

6. 自己評価

本年度はコウモリの集団遺伝学的構造の解明に有効な解析手法の確立に成功した。また、これまで全く活動基盤のなかったケニアにおいて、優秀なカウンターパートを確保し、研究チームを発足することに成功した。その結果、同国における大規模な ERB コロニーの存在を、極めて効率的に突き止めることができた。一方で、ケニア以外の国々からはコウモリ検体を入手できたものの、ケニア国内においては各種許可等の取得が間に合わなかったため、検体の採取には至らなかった。来年度は早期に研究許可を取得し、ケニアのコウモリを対象とした疫学調査を開始したい。以上の理由から達成度を II と評価した。

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）

令和 6（2024）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査

課題番号：2024-Kyoten-05

2. 代 表 者：山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 早坂 大輔

共同研究者：山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 下田 宙

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 Lydia Mali

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 及能 和輝

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 Marla Anggita

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 光永 早紀

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 齋藤 由華

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 大久保 毅一

山口大学共同獣医学研究科 獣医微生物学 竹内 友陽

ナイロビ大学獣医学部 Peter Kimeli

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点 井上 真吾

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点 齋藤 信夫

長崎大学熱帯医学研究所ケニア拠点 Elizabeth Ajema Chevichi

長崎大学熱帯医学研究所熱帯性ウイルス医薬品開発学分野

Mya Myat Ngwe Tun

3. 決 定 額：1,150 千円

4. 研究計画

① 研究目的

マダニは、吸血によりヒトや動物に様々な人獣共通感染症の原因となる種々の病原体を媒介する。

アフリカ大陸に分布するマダニ媒介感染症の病原体としては、アフリカダニ熱の原因となるリケッチア・アフリカーゼやクリミア・コンゴ出血熱ウイルスなど、また、家畜や野生動物ではタイレリア（東海岸熱の原因となる *Theileria parvaya* やピロプラズマ等の原虫、アフリカ豚熱ウイルスなどが知られる。

しかしながら、ヒトのマダニ媒介感染症については情報に乏しく、現地の共同研究者によれば、マダニ刺咬により発熱や発疹などの症状を示す例はあっても診断がつかない場合も多いとのことで、実態については不明な点が多い。また、現地のマダニから新規ウイルスも多く見出されてはいるが、ヒトや動物への感染性、病原性については明らかになっていないものも多い。

マダニ媒介感染症の予防において、第一に病原体を保有するマダニに刺されないことが基本対策となる。そのため、媒介マダニにおける病原体の浸淫状況を把握す

ることが、感染予防上の重要な情報源となる。また、既知の病原体に加え、未知・新規の病原体も対象に、診断系や病原体検出法を確立しておくこと、血清疫学調査から感染状況を把握しておくことは、先回り研究としての意義が高い。

そこで本研究では、ケニアにおけるマダニ媒介感染症の疫学調査を実施し、媒介マダニと病原体の保有・分布状況、ヒト・動物を対象とした感染状況の血清疫学情報を得ることで、マダニ媒介感染症の予防対策に寄与する研究成果の創出を目指す。

② 研究内容

井上教授、齊藤准教授の協力のもと、ヒト、動物の血清を用いた血清疫学調査を実施する予定である。また、引き続きマダニからのウイルス検出を行うとともに、ヒト、動物のサンプルからのウイルス検出を試みる。検出・分離されたウイルスについては、次世代シーケンスによりウイルス遺伝子の全長配列を決定する。

1. 血清疫学調査

齊藤准教授の協力の基、病院や関係機関をつてに、ヒト血清サンプル（感染症が疑われるが診断のついていないサンプルを含む）を収集する。動物血清（主にウシ等の家畜）はナイロビ大学獣医学部 Dr. Kimeli らの協力の基、収集する。

抗体測定法（IgM-ELISA、IgG-ELISA、中和アッセイ等）については、フラビウイルス（ダニ媒介性脳炎ウイルス、ランガットウイルス）、フェニユウイルス（SFTSウイルス、カプトマウンテンウイルス）、オルソナイロウイルス（トフラウイルス）については既に確立しており、CCHFV については、国立感染症研究所獣医科学部の協力を得て、組み換えタンパク質を用いた抗体測定（血清診断）系を用いる。

実験は、まずは日本国内の動物（山口大学で所有するウシ、イノシシ、シカ、サル、コウモリ、イヌ、ネコ等）の血清を用いた調査により実験系の確認を行ったうえで、準備した抗原をケニアに持ち込み、KEMRI にて血清サンプルを用いて抗体測定を実施する。

2. マダニ、ヒト・動物サンプルからの病原体検出

計画 1, 2 年目と同様に、NUITM に保管しているマダニから、NUITM の設備を利用して、主にこれまで調べていない地域からマダニを対象に、引き続き各ウイルス遺伝子検出を試みる。ビーズ破砕器を用いてマダニ乳剤を作製し、遠心後、上清および沈殿物の一部を核酸抽出に供し、残りのサンプルは病原体分離に用いる。3 年目は、オルソナイロウイルス、フェニユウイルス、フラビウイルスの各ウイルスに加え、ダニ媒介性細菌のボレリア属、リケッチア属、タイレリア原虫の特異的プライマーを用いて病原体遺伝子検出を試みる。

また、ヒトおよび動物サンプルのうち、特に診断のつかない感染症疑いサンプルを対象に、ウイルスまたは細菌の遺伝子検出を試みる。

病原体遺伝子陽性サンプルについては、NUITM の BSL-2 または BSL-3 実験室にて培養細胞を用いてウイルス分離を試みるとともに、一部は日本に輸入し長崎大学もしくは山口大学においてマウスを用いた分離を試みる。ウイルス分離は、マダニ乳剤を培養細胞（Vero 細胞、BHK 細胞など）に接種して行う。ウイルス分離の作業は時間を要するため応募者および参画者の NUITM 訪問時では終えきれないが、NUITM の

井上教授、Dr. Elizabeth に協力を依頼し引き続きの作業を実施する。CPE が確認された場合、遺伝子検出の結果と併せて、塩基配列を決定し系統解析を行う。

3. 次世代シーケンサーを用いた病原体遺伝子の網羅的検出・系統解析

PCR による既知ウイルス等の遺伝子検出に加え、マダニ由来の核酸を用いて次世代シーケンスにより網羅的な検出を行う。また、病原体分離作業において、培養細胞に CPE が確認されても病原体が同定できなかった場合は、次世代シーケンサーを用いて網羅的な遺伝子検出・解析を試みる。

次世代シーケンスは、井上教授の協力のもとケニア拠点の機器、または熱帯医学研究所の機器・設備を利用し実施する。

また、計画 3 年目においては以下の研究も進めるが、これらの研究は NUITM では実施が難しいため、長崎大学または山口大学にて行い、研究にかかる費用は別予算を想定しているため参考として記載する。

4. マウスを用いた病原体分離

病原体（主にウイルスを想定）によっては培養細胞では分離が難しく、マウスモデルの方が分離に適しているため、国内に輸入したマダニサンプルを対象に、Myat Ngwe Tun 准教授の協力のもと長崎大学の動物実験施設を利用する、もしくは山口大学の動物実験施設を利用して病原体分離作業を進める。

5. 分離された病原体の感染性、病原性解析

分離された病原体については、長崎大学または山口大学の BSL-2、BSL-3 実験室（動物実験施設を含む）を利用して、種々の動物種由来培養細胞やマウスモデルを用いて、哺乳動物への感染性、増殖性を解析する。

③ 予想される成果

8. 予想される成果

1. 2023 年度までにマダニからオルソナイロウイルス属のウイルス遺伝子が検出されているため、これらのウイルスに対する血清疫学調査を行うことで、ヒトや動物での感染状況の把握が予想される。特に、CCHFV の血清調査による CCHFV のケニアにおける侵淫状況の調査は意義が深い。

2. マダニ媒介性のフラビウイルス、フェニユウイルス等のウイルスは世界各地で確認されており、ケニアにおいても同属のウイルスが存在している可能性はある。そこで、マダニからこれらのウイルス検出を引き続き進めるとともに、ヒト、動物を対象とした血清調査により、その分布状況の把握に繋がる成果が予想される。

3. 2023 年度までに行ったウイルス検出に用いたマダニ以外に、ナイバシャやバリンゴ近郊など他の地域で採集したマダニも多く保管していることから、他の地域のマダニからの検出も引き続き行うことで、さらに多くのウイルス検出が予想される。また、3 年目は細菌、原虫も対象とするため、既知・未知も含めて複数の病原体が検出されることが予想される。

4. これまでの成果と併せて、マダニの病原体保有状況やヒト、動物における抗体調査の結果により、ケニアに分布するマダニ種、分布状況、病原体の保有状況の情報が得られると予想され、地域におけるマダニと病原体の分布状況を知る手掛かりと

なることが期待される。

5. 本研究では、熱帯医学を背景に、主にヒトを対象として人獣共通感染症に焦点を当てて、獣医学の立場から動物の感染症も見越して実施する。マダニは家畜の重要な病原体（原虫、ウイルス、細菌）を媒介し、現地では時に深刻な被害を及ぼしている。家畜の被害は、食料問題からヒトの健康に直接影響を及ぼすものであため、家畜の病気も熱帯医学においても重要な研究対象と考えられる。

6. 本研究で行うマダニからの病原体検出や血清診断法診断法は、ケニア側への技術提供をするため、将来的に現地におけるマダニ媒介感染症の診断体制確立に寄与する点で有意義である。

7. Hyalomma 属は CCHFV の主な媒介マダニであるため、CCHFV が検出される可能性も想定される。CCHFV が検出された場合、ウイルス分離とその後の取扱いには BSL-4 施設が必要となるため、将来的に、長崎大学高度感染症研究センターの BSL-4 施設を利用した陽性サンプルの取扱い・解析を、当センターの所属スタッフとの共同研究として進められることが期待される。

5. 実施報告

① 令和 6（2024）年度実施計画に対する実施状況

1. ケニアの動物血清を用いたマダニ媒介ウイルスの抗体調査

山口大学において、重症熱性血小板減少症候群ウイルス（SFTSV）、トフラウイルス（TFLV）を Vero E6 細胞に、ダニ媒介性脳炎ウイルス（TBEV）を BHK 細胞にそれぞれ感染後、細胞を RIPA バッファーで溶解し、遠心後の上清を回収、抗体（IgG）測定用の ELISA 抗原として準備した。

2025 年 1 月 14 日から 1 月 31 日の期間、共同研究者（Lydia Mali、光永早紀、竹内友陽）が NUITM を訪問し、動物血清を対象とした抗マダニ媒介ウイルス抗体検出の実験を行った。研究代表者（早坂大輔）は 1 月 26 日から合流した。ナイロビ大学獣医学部の Dr. Peter Kimeli の保有するケニアで採集されたウシ、ヒツジおよびヤギ血清を対象に、山口大学で準備した上記のウイルス抗原を用いて、NUITM にて IgG ELISA により抗体検出を試みた。

2. マダニからのウイルス遺伝子検出

2022 年度、2023 年度に NUITM において実施した、ケニアで採集されたマダニから検出されたウイルス遺伝子について、井上教授、Dr. Elizabeth Ajema Chevichi の協力により、遺伝子配列の決定を行った。

3. 国内の野生動物を対象としたマダニ媒介ウイルスの血清疫学調査

2023 年度において実施した、TFLV に対する抗体検出として確立した ELISA 系を用いての日本国内の野生動物（山口県で捕獲されたイノシシ 28 頭）を対象にした抗体検出試験に引き続き、2024 年においては、濃縮ウイルス粒子を抗原として TFLV 抗体検出用 ELISA の再検討を行い、国内で捕獲されたイノシシ、シカを対象に検体数を増やして抗体検出を試みた。

4. マダニ検体からのウイルス分離

2022-2023 年度において、予備試験的に国内で採集されたマダニからウイルス遺伝子が検出されたマダニ乳剤サンプル（ウイルス未検出のサンプルを一部含む）を対象に、培養細胞及び I 型インターフェロンレセプター KO マウス（A129 マウス）を用いてウイルス分離を試みた。

また、長崎大学および山口大学においてケニアのマダニからのウイルス分離、次世代シーケンサーによる網羅的解析による病原体検出を試みるために、NUITM に保管してあるマダニを長崎大学熱帯医学研究所に送り冷凍保管した。

② 成果（結果＋考察）

1. ケニアの動物血清を用いたマダニ媒介ウイルスの抗体調査

ナイロビ大学獣医学部の協力の基、ウシ血清を対象に IgG-ELISA による抗体検出を行い、暫定的に OD value 0.2（感染マウス血清で示す値の最低値）以上を陽性とみなした結果、SFTSV で 174 検体中 3 検体、TBEV で 172 検体中 12 検体、TFLV で 115 検体中 5 検体の陽性例が検出された（Fig. 1）。

同様に、ヤギ血清 46 検体を対象に抗体検出を行った結果、SFTSV に対する陽性例はみられず、TBEV で 2 検体、TFLV で 1 検体の陽性例が確認された（Fig. 2）。

一方、ヒツジ血清 46 検体を対象に抗体検出を行った結果では、いずれのウイル

スにおいても陽性例は確認されなかった (Fig. 3) .

Fig. 1

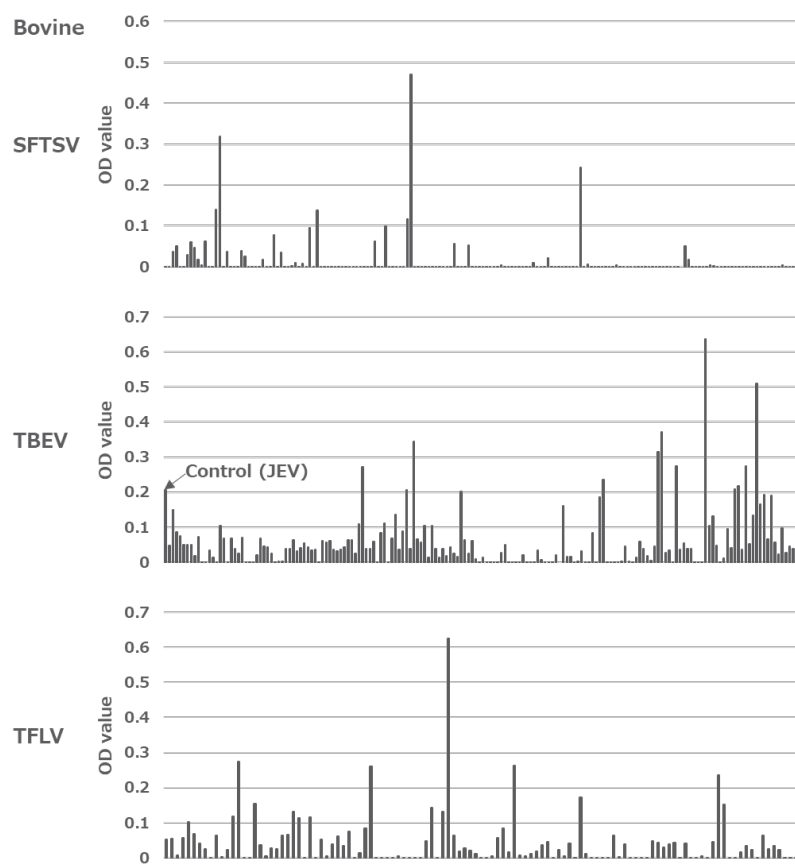


Fig. 2

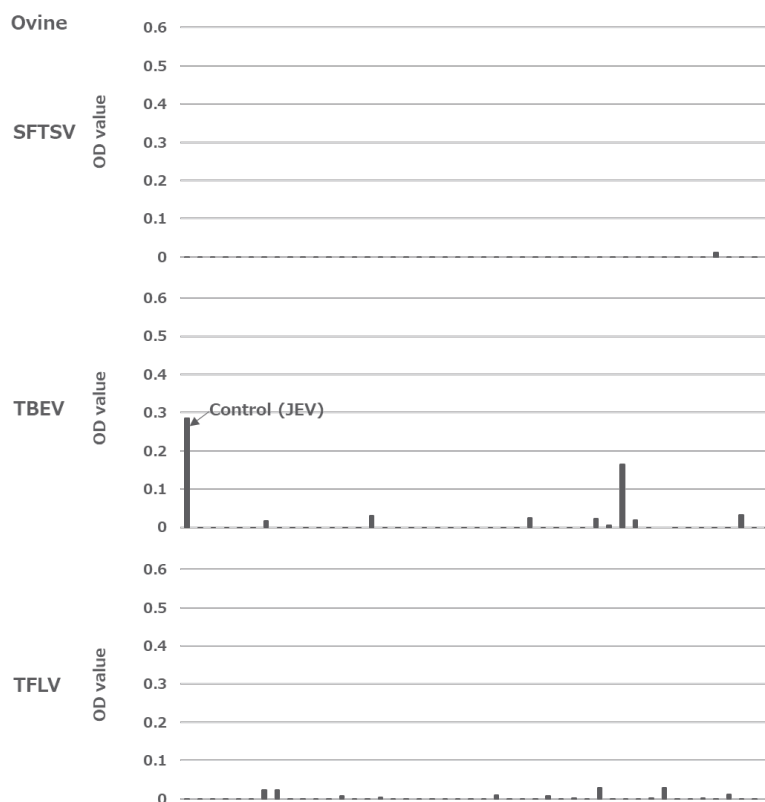
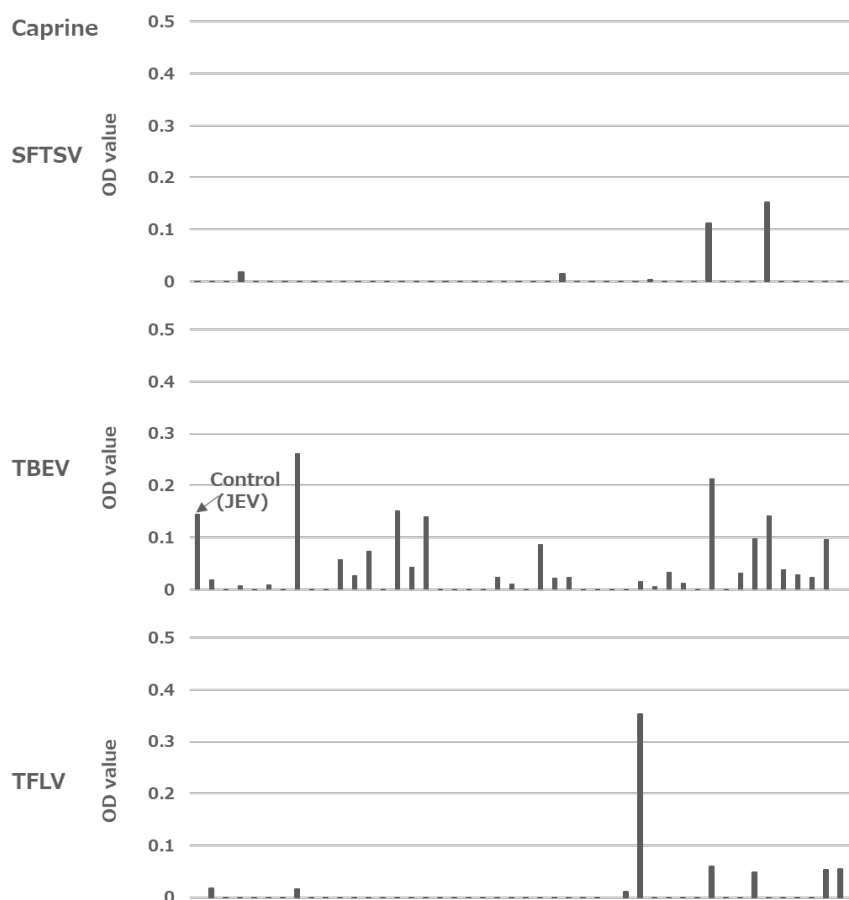


Fig. 3



SFTSV はフェニウウイルス科バンダウイルス属に分類されるウイルスで、中国、日本、韓国をはじめとする東アジアや東南アジアで患者発生報告がある。また、ケニアのヒト血清を対象とした抗 SFTSV 抗体調査により陽性例が報告されており、SFTSV もしくは近縁なウイルスの存在が示唆されている。今回、我々は動物での SFTSV 感染を示唆する結果を得た。ただし、今回用いた ELISA 法では、非特異的な反応やフェニウウイルス科の SFTSV 以外の近縁なウイルスに交差反応を示す可能性があるため、今後、陽性例については中和試験もしくは代替法、IFA 法などにより確認試験が必要となる。次年度以降、確認試験法（IFA 法等）を確立し、引き続き同サンプルを用いて陽性例の確認を実施する予定である。

TBEV はフラビウイルス科オルソフラビウイルス属に分類され、英国、ユーラシア大陸から日本にかけて分布し、TBE 患者報告のあるウイルスである。これまでケニアを含むアフリカにおいて、TBEV の分布や感染報告はないため、今回の結果はアフリカにおける TBEV もしくは近縁なウイルスの存在を示唆する初めての知見となる。TBEV に近縁なマダニ媒介性オルソフラビウイルスはアジア、ヨーロッパ以外からも見つかっており、アフリカには TBEV と抗体交差反応を示す蚊媒介性オルソフラビウイルス（黄熱ウイルス、デングウイルス、ジカウイルス等）が広く分布するため、交差反応の結果の可能性を考慮し、2025 年度以降、ケニアに持ち込

み実施できる確認試験法（IFA 法等）を確立し、引き続き同サンプルを用いて陽性例の確認を実施する予定である。

TFLV はナイロウイルス科オルソナイロウイルス属に分類され、アフリカに分布する CCHFV に近縁で抗体交差反応を示す可能性が高い。そこで、引き続き、CCHFV の組換えタンパク質（感染研から分与済）を用いた試験、および SFTSV、TBEV と同様にケニアに持ち込み実施できる確認試験法（IFA 法等）を確立し、同サンプルを用いて陽性例の確認を実施する予定である。

2. マダニからのウイルス検出

2023 年度において、ケニアのマダニを対象にウイルス検出を行った結果、オルソナイロウイルス、フェニユウイルスの遺伝子陽性が確認されたため、2022 年度に検出され塩基配列が未決定だったサンプルとあわせて、2024 年度において、それらの遺伝子配列を決定した。その結果、2019 年に Baringo でヒツジおよびヤギから採集された *Rhipicephalus appendiculatus* において、4 株のオルソナイロウイルス（Marigat-Orthonairovirus）が確認された。興味深いことに、これらのウイルスはこれまで報告されている他のオルソナイロウイルスのウイルスとのアミノ酸配列の相同性がおおよそ 50–70% 程度で、分子系統的に NSD、Thiafora、Artasha グループに近縁であるが、新規のクラスターを形成した（Figure 4）。

これらの結果から、ケニア（Baringo）において、マダニが保有する新規のオルソナイロウイルスの存在が示唆された。今後、ウイルス分離を試みるとともに、抗体検出系を作製し、動物、ヒトを対象とした血清調査を進めていく予定である。

さらに興味深いことに、2019 年に Baringo でヒツジおよびヤギから採集された *Rhipicephalus appendiculatus* において、オルソナイロウイルスを対象としたプライマーを用いて陽性として検出された 4 プールについては、フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類されるウイルスであった。プライマーの交差性については検討の余地があるが、結果として新規のペスチウイルスの遺伝子が検出されたことになり、これらのウイルス（BLTV4 isolate Marigat）は、Bole tick virus 4（BLTV4）にアミノ酸配列で 75–97% の相同性を示し、分子系統的に近縁なクラスターを形成した（Figure 5A）。BLTV4 はアジア、ヨーロッパ、アフリカに広く分布していることが知られ、ケニアについても検出報告がある。しかしながら、今回検出された BLTV4 isolate Marigat は、分子系統的に BLTV4 の中でもこれまで報告されたケニア株とは別のクラスターを形成していることが明らかになった（Figure 5B）。これらの結果から、ケニア（Baringo）において、マダニが保有する新規の BLTV4 の存在が示唆された。今後、ウイルス分離を試みるとともに、抗体検出系を作製し、動物、ヒトを対象とした血清調査を進めていく予定である。

Figure 4

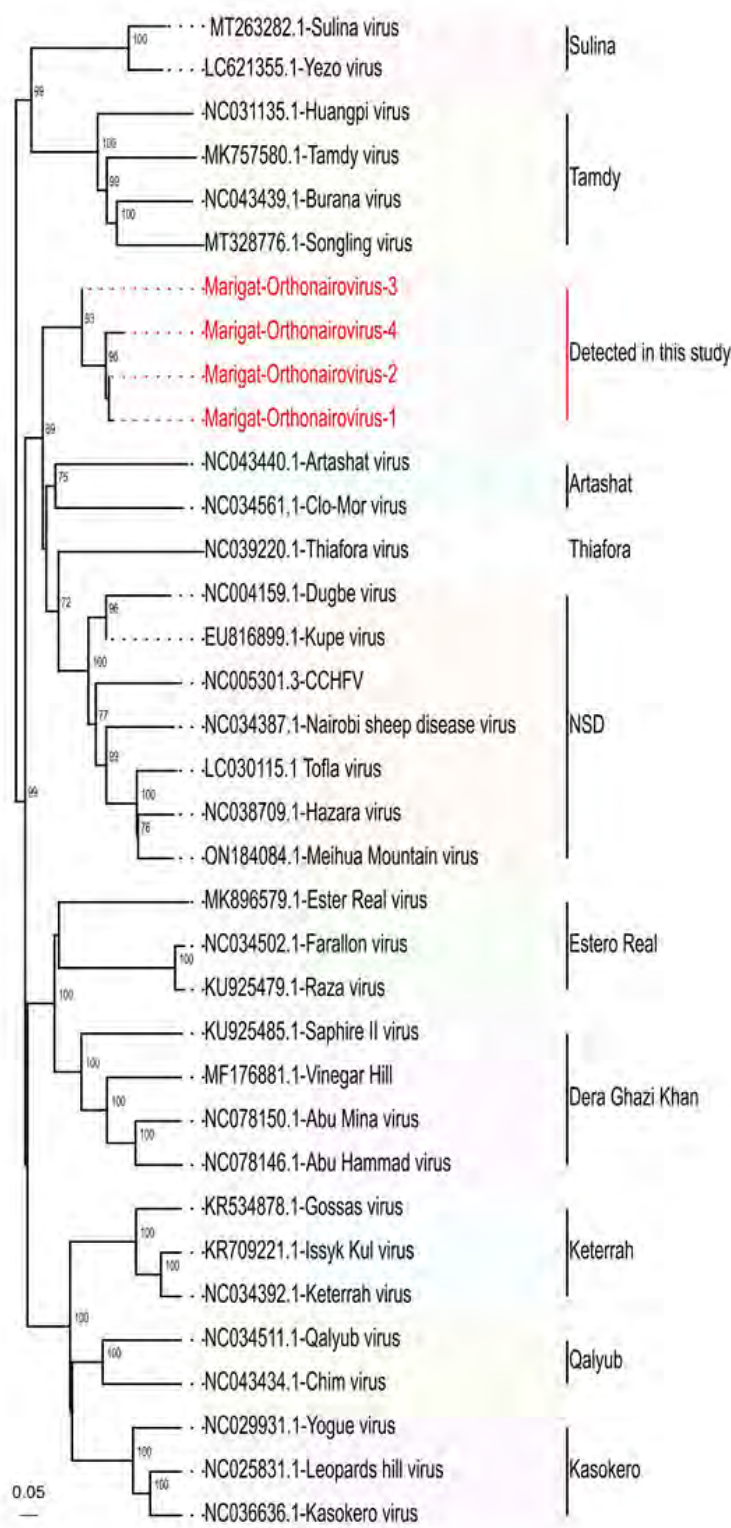
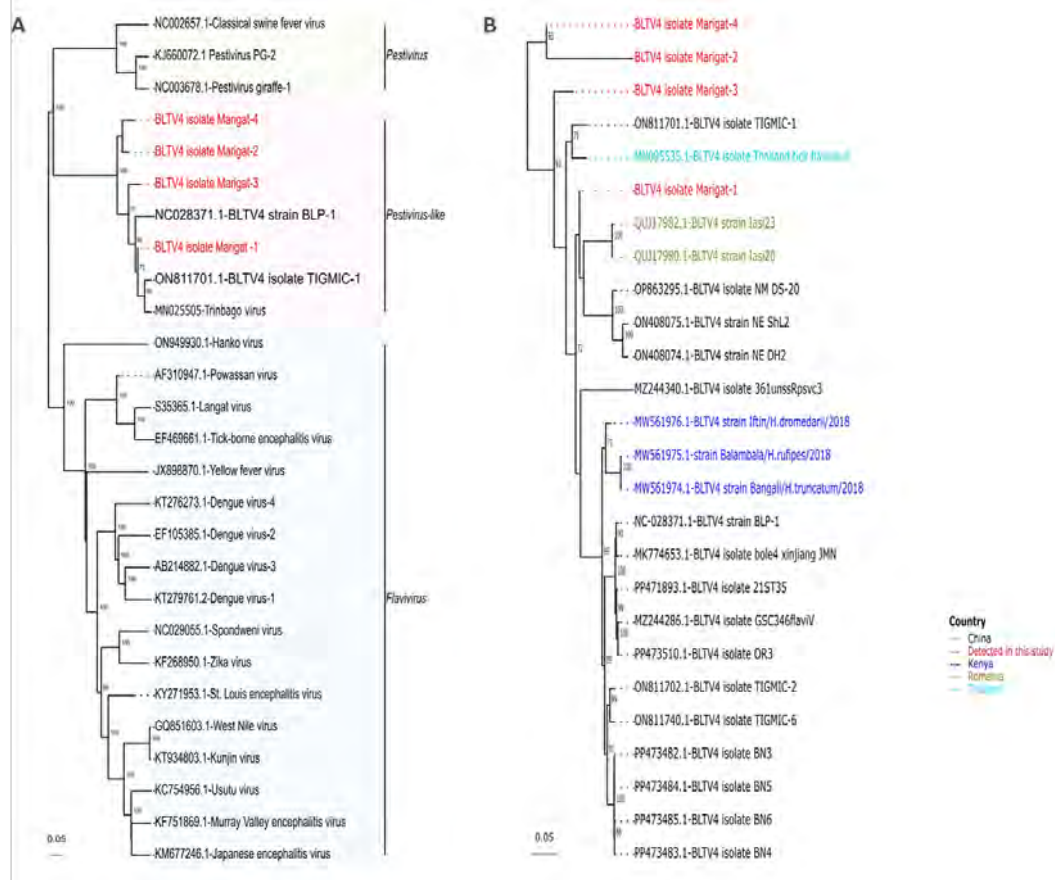


Figure 5



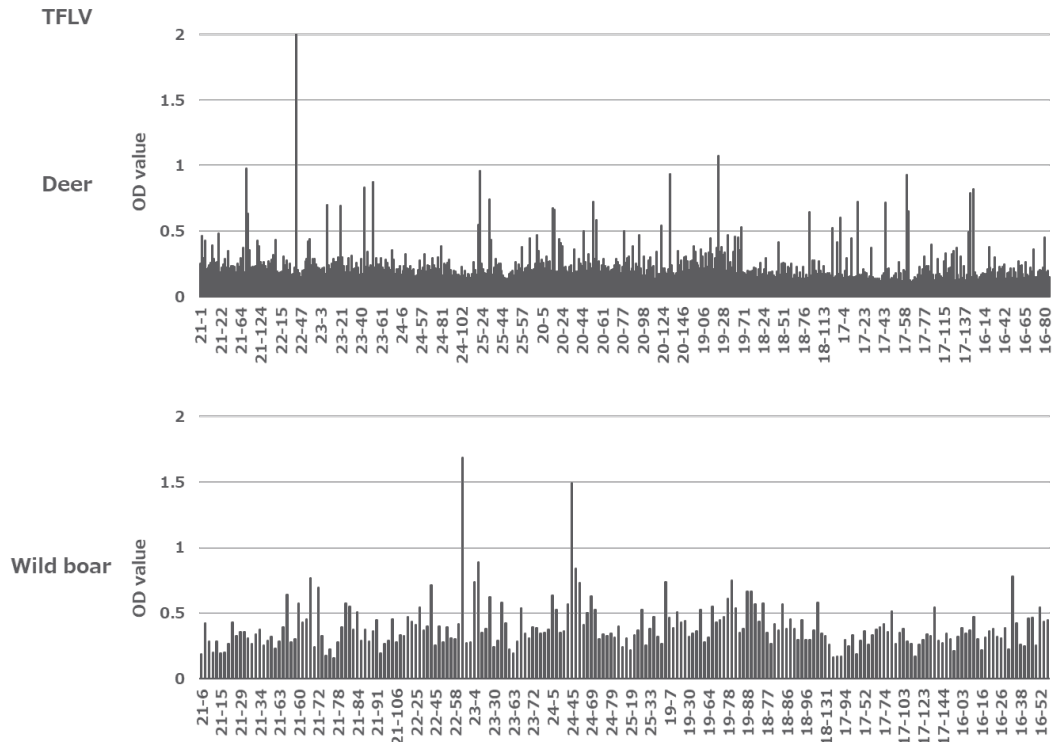
3. 国内の野生動物を対象としたマダニ媒介ウイルスの血清疫学調査

2017年から2025年1月にかけて山口県で捕獲されたシカ550頭、イノシシ218頭の血清を対象に、濃縮ウイルスを抗原として改良した抗TFLV抗体検出IgG-ELISAを用いて抗体検出調査を行った。陰性対照のN値(OD 1.5)を基に3N(OD4.5)をカットオフ値として陽性とみなした結果、シカ38頭(6.9%)、イノシシ52頭(23.9%)で陽性となった(Figure 6)。

陽性サンプルについては、引き続き中和抗体価測定により確認試験を行う予定であるが、国内の動物、特にイノシシにおいてTFLVの感染例が多くみられることが示唆された。今回用いたELISA系は細胞ライセートを用いたものより感度、特異度が高いと思われるため、2025年においては、このELISA系を用いてNUTMにて、ナイロビ大学獣医学部および医学部の保有する動物、ヒト血清を用いた調査を行う予定である。

また、SFTSV、TBEV、その他のウイルス(コロナウイルス等)についても同様に濃縮ウイルスを抗原として用いたELISA系の確立を進めているところであり、2025年度にてケニアのサンプルを対象に調査を進める予定である。

Figure 6



4. マダニ検体からのウイルス分離

予備試験的に国内で採集されたマダニからウイルス分離を試みた結果、マダニ乳剤を接種したマウス 1 匹で著しい体重減少を含む臨床症状を示したため、臓器を回収し臓器乳剤を作製して、再度マウスおよび培養細胞を用いてウイルス分離を試みたが、ウイルスは検出できなかった。2025 年度以降においても、引き続きウイルス分離を試みる予定である。

2024 年 11 月に、ケニアで採集して冷凍保管していたマダニを、熱帯医学研究所に移送することができ、冷凍保管している。今後、山口大学への移送手続きを進めるとともに、2025 年度中に熱帯医学研究所ウイルス学分野、ケニア拠点の協力の基、ウイルス分離を順次進めていく予定である。

③ 成果の公表

ケニアから検出されたウイルス遺伝子の結果については、報告書提出時点で論文作成中であり、準備ができ次第投稿し、2025 年中の発表を目指す。また、研究成果については、2025 年度に開催される学会（日本ウイルス学会、日本獣医学会、日本 SFTS 研究会等）で共同研究者の Lydia Mali が発表予定である。

動物を対象とした血清疫学調査の結果についても、引き続き確認試験を行う予定であり、2025 年度中の発表を目指して論文作成を進める。

6. 自己評価

2024年度は、2022-2024年度の3年間の予定で実施してきたマダニからの病原体検出の最終年度で、NUITMの施設を利用してケニアで採集されたマダニからのウイルス検出を実施してきた結果、新規のオルソナイロウイルス、フェニユイウイルス、ペスチウイルスが確認され、NUITMの研究協力者の協力により遺伝子配列が決定できた。報告書提出時点で、結果をまとめて論文執筆中（2025年中の論文発表を目指す）であり、研究を順調に実施し、有用で興味深い結果を得ることができたと自供評価した。

さらに、ケニアの動物を対象とする血清疫学調査を行うことができた。研究期間において、ナイロビ大学獣医学部との共同研究に発展し、同学部所属のDr. Kimeliが保有する動物血清を利用することができた点は大きい。研究代表者および共同研究者がケニアに渡航しNUITMにて実験をするにあたって、事前に山口大学で抗体検出法を確立し、国内の動物サンプルを対象に予備試験を実施した上で、検出系をNUITMに持ち込み、NUITMの施設を利用してマダニ媒介性ウイルスに対する抗ウイルス抗体検出を実施し、陽性例を見出すことができた。今後、確認試験を行う必要があるが、2025年においても引き続きNUITMにて実験を行う予定であり、順調に成果を挙げられたと自己評価した。

また、研究期間において、NUITMでのウイルス分離の実施は難しいと思われたため、日本に移送してのウイルス分離を見込んでいたが、一方で、ケニアから日本へのマダニ輸入については、輸入許可に関する手続き、実際の移送、日本（長崎大学、山口大学）での実験実施に相当の期間が予想された。しかしながら、2024年度中に移送し、長崎大学熱帯医学研究所に保管することができ、残りのマダニの輸入についても実施する目途がついたため、今後、ウイルス分離を進め、分離された場合、感染性や病原性の解析を国内で実施できる目途がついた点は評価できる。

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 6（2024）年度海外拠点連携共同研究報告（自己評価）

1. 課 題 名：尿路感染症起因菌における *mcr* 遺伝子および可動性プラスミドの保有実態に関する研究

課題番号：2024-Kyoten-08

2. 代 表 者：広島大学大学院統合生命科学研究科 教授 中山 達哉
共同研究者：広島大学大学生物生産学部 4 年生 鹿住 悠貴
長崎大学 熱帯医学研究所 教授 北 潔

3. 決 定 額：650 千円

4. 研究計画

① 研究目的

ベトナムでは薬剤耐性菌が蔓延しており、死者数は毎年数千人と報告されている。その中でも、プラスミド媒介性薬剤耐性菌は、多剤耐性傾向を示し容易に他菌種へ拡散させることから、その動向に注意が必要である。特に、本耐性菌の中でもコリスチン耐性遺伝子 (*mcr* 遺伝子) が近年発見・報告され、注目を浴びている。我々は近年の研究で食品を汚染拡散する *bla*_{CTX-M} および *mcr* 遺伝子の実態を明らかにしてきた。そこで、本研究では UTI 患者起因菌から、最新の *bla*_{CTX-M} を明らかにする。また、*mcr* 保有耐性菌の実態および *mcr* 遺伝子型を明らかにするとともに、可動性プラスミドの構造を明らかにし、食品から UTI 患者起因菌への伝播を検証することを目的とする。本研究は、日本の薬剤耐性ナショナルアクションプラン目標 6「国際協力研究」に沿っており、薬剤耐性菌制御に資する研究である。

② 研究内容

ニャチャンパスツール病院から UTI 起因菌を、最大 100 検体サンプリングを実施する。分離した菌株を PCR 法および 16S rRNA 遺伝子によるシーケンシングによって同定する。同定した分離株はベトナム拠点 (NIHE) および広島大学にて薬剤感受性テストに供し、分離株のアンチバイオグラムを作成するとともに、薬剤耐性遺伝子を Multiplex PCR 法およびシーケンシングによって検出・同定する。多剤耐性傾向を示す特徴的な分離株 (約 10 株) において、プラスミド解析によってプラスミド構造を明らかにするとともに、プラスミド伝播解析を行い、プラスミド伝播能力を評価する。

③ 予想される成果

我々の既往の研究から、食品内で相同性の高い薬剤耐性プラスミドが複数菌種によって保有されること、さらに、特定サイズの *bla*_{CTX-M} をコードするプラスミドが食品・健常者・UTI 患者由来分離株で共通して検出されたことから、耐性遺伝子をコードするプラスミドは、食品・健常者・UTI 患者由来株で伝播していると考ええる。本研究では UTI 患者起因菌を解析することで、患者検体あたりの ESBL 産生菌およびコリスチン耐性菌検出率が明確に

なる。近年のベトナムにおける食品等の耐性菌検出率は以前と比較しても、変化は見られないことから、UTI 患者由来株でも検出率に大差はないと考えられる。遺伝子型では、近年、*bla*_{CTX-M-55}、*bla*_{CTX-M-65} が高頻度で検出されることから、以前とは遺伝子型が違う可能性がある。コリスチン耐性遺伝子 *mcr* に関しては今までに報告はないが、食品から多検出される *mcr-1* の検出が UTI 起因菌株でも最有力である。加えて、今までの食品由来菌のプラスミド解析の結果から、*bla*_{CTX-M} と *mcr* は離れた位置で IS とともにコードされていることから、UTI 患者由来株でも同様のプラスミド構造をしており、また、伝播能力を有していると想定される。

5. 実施報告

① 令和6（2024）年度実施計画に対する実施状況

令和6年4月にニャチャンパスツール研究所（NTPI）側とwebミーティングを行い、本研究計画、研究内容の詳細及び予算決定額に関しての説明をした。5月に再度、webミーティングを行った際に、本研究に関わるNTPI側の必要費用を明示された。

NTPI側の必要予算額が本決定額と同程度であったことから、NTPI側で再度、予算額を減らして、研究を実行できないか？NTPI側で話し合いを持ってもらうことにした。しかしながら、NTPI側から正式に本予算額では研究ができない旨の通知を受けた。これによって、本計画を変更せざる得なくなった。

そこで、対応教員と話し、研究計画変更を行い、以前から共同研究を行っているホーチミン市衛生研究所を相手機関として、相手所長に研究協力を承認して頂いた。ホーチミン市衛生研究所と協議の上、2024年度では、本耐性菌の汚染源である料理から本耐性菌分離を行い、2025年度以降に患者検体からの分離株解析を行い、患者株と比較する計画を立案し了承を得た。

2024年8月にベトナム、ホーチミン市にて、ホーチミン市の露店、スーパーマーケットからバインミー等のReady-to-eat食品69検体を購入して、ホーチミン市衛生研究所において、本耐性菌の分離を行った。分離方法は、食品25gに緩衝ペプトン水225mLと混合し、ストマッカー処理後にセフトキシムを含むMacConkey寒天培地に画線塗抹し、腸内細菌目細菌の定型コロニーを釣菌し、菌株をストックした。

さらに、2024年12月に本耐性菌をホーチミン市衛生研究所において、本分離耐性菌から、微量液体希釈法によって薬剤感受性試験を行い、コリスチン耐性を示した株を選択し、煮沸法によってDNAを抽出した。DNAは16S rRNAによる菌株同定を行った。また、本菌DNAを長崎大学ハノイ拠点に輸送し、拠点にて、マルチプレックスPCRによって、*bla_{CTX-M}*及び*mcr*遺伝子の薬剤耐性遺伝子解析を行った。

② 成果（結果＋考察）

当初、予定していた予算額よりも決定額が大幅に減額されていたこと、さらに円安・物価高によりNTPI側が要求する予算では研究が実施できないことが明らかになった。大幅な研究計画の変更を余儀なくされた結果、NTPIとの共同研究を諦め、ホーチミン市衛生研究所及び長崎大学ハノイ拠点を利用した研究へとシフトした。海外との研究は、国内での研究以上に予定通りに進むことはないと理解しているが、今回のケースは、これまで以上に厳しい状況であった。

その中でも、研究計画変更後に、ホーチミン市の露店、スーパーマーケット等の小売店から、喫食直前のReady-to-eat食品（バインミー等）69検体からコリスチン耐性ESBL産生菌の分離をした結果、10検体からコリスチン耐性を示すESBL産生菌が分離された。分離菌は選択培地の表現系から全て大腸菌ではなく、*Enterobacter cloacae complex*及び*Stenotrophomonas maltophilia*であることが判明した。また、Multiplex PCR法による薬剤耐性遺伝子解析の結果から、*bla_{CTX-M-1/9/TEM}* グループおよび*mcr-5*、*mcr-9*が検出された（表1）。これら本耐性菌が分離された食品は喫食直前の料理であったことから、これら食品が

一定数、プラスミド媒介性薬剤耐性菌によって汚染されていることが、明確となった。さらに、これら分離された耐性菌が喫食によって腸内へと入り、腸内での拡散、さらに尿路感染症へと関わる可能性が示唆される。今後、尿路感染症由来株と比較し、その特徴を明らかにしたいと考えている。

表 1 本研究で分離された耐性菌

菌株名	食品	菌株同定	ESBL-producing	ESBL-related gene	mcr gene
F4-CL-3	サンドウィッチ	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F7-CL-1	バインミー	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F9-CL-2	バインミー	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	<i>bla</i> _{TEM} group	<i>mcr-5</i>
F9-CL-3	バインミー	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F14-CL-1	ブン（米麺）	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F19-CL	サンドウィッチ	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	<i>mcr-5</i>
F22-CL	生春巻き	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F31-CL-3	ハンバーガー	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	<i>bla</i> _{CTX-M-9/TEM} group	
F37-CL-1	巻き寿司	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	-		
F69-CL	生春巻き	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	+	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group	<i>mcr-5/mcr-9</i>

③ 成果の公表

なし

6. 自己評価

研究計画通り実施できなかった点に関しては、私の力不足を感じている。しかしながら、当初予定していたニャチャンでの活動が不可能となった後、ホーチミン市衛生研究所と協議し、協力を得て、研究を進展させ、食品から本研究で標的としている耐性菌を分離した。

途上国での研究は、想定通り研究が進展しない事が多く、その際にリカバリーできる能力は途上国研究において必要だと考えている。この点に関しては、大いに評価できると考えている。予定通り研究が進展しなかった点においては、今後の反省すべき点である。

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）

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿

熱帯医学研究拠点運営協議会委員名簿（令和6年度）

区分	氏名	所属・職名
学 外 委 員	◎ <small>かわづ しんいちろう</small> 河津 信一郎	帯広畜産大学原虫病研究センター・教授
	<small>まつもと そうきち</small> 松本 壮吉	新潟大学大学院医歯学総合研究科・教授
	<small>あ と まなぶ</small> 阿戸 学	国立感染症研究所・感染制御部・部長
	<small>ひ が ゆ き こ</small> 比嘉 由紀子	国立感染症研究所・昆虫医科学部・第一室長
	<small>さいとう れいこ</small> 齋藤 玲子	新潟大学医歯学総合研究科国際保健学分野・教授
	<small>かわぐち やすし</small> 川口 寧	東京大学医科学研究所・教授
	<small>はやさか だいすけ</small> 早坂 大輔	山口大学共同獣医学部・教授
学 内 委 員	<small>ないとう まりこ</small> 内藤 真理子	長崎大学医歯薬学総合研究科・教授
所 内 委 員	○ <small>み いち ふみ か</small> 見市 文香	長崎大学熱帯医学研究所 (共同研究室)・教授
	<small>ありよし こうや</small> 有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所 (臨床研究部門)・教授
	<small>いなおか けん</small> 稲岡 健 <small>ダニエル</small>	長崎大学熱帯医学研究所 (宿主病態解析部門)・教授
	<small>いのうえ しんご</small> 井上 真吾	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
	<small>は せ べ ふとし</small> 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	<small>かねこ おきむ</small> 金子 修	長崎大学熱帯医学研究所・所長
	<small>かねこ さとし</small> 金子 聡	長崎大学熱帯医学研究所・副所長 (管理運営担当)
	<small>はまの しんじろう</small> 濱野 真二郎	長崎大学熱帯医学研究所・副所長 (教育研究担当)

◎議長 ○熱帯医学研究拠点支援室長

長崎大学熱帯医学研究所

令和7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/>