

プロジェクト3：インド

平成 25 年度 分担研究報告書

分担研究課題名：コレラ菌のゲノム進化と病原性

研究分担者	森田昌知	国立感染症研究所	細菌第一部
研究協力者	泉谷秀昌	国立感染症研究所	細菌第一部
	大西 真	国立感染症研究所	細菌第一部

研究要旨

現在アジア地域におけるコレラ流行株として、El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 と Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 が分離されている。それらと過去の流行株の型別のため、ゲノム上の一塩基多型を用いた疫学マーカーの妥当性を検討した。供試菌株はインド国立コレラ及び腸管感染症研究所より提供された *V. cholerae* のゲノム DNA を用いた。El Tor variant 型 *Vibrio cholerae* O1 で見出された 15 ヶ所の一塩基多型の配列は Haitian variant 型 *V. cholerae* O1 と共通であったが、過去の流行株とは異なることから、それらを用いて現在の流行株と過去の流行株の区別が可能であった。

Genetic variation and pathogenicity of *Vibrio cholerae* O1

Masatomo Morita, Hidemasa Izumiya, Makoto Ohnishi

Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases

We validated the availability of single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *Vibrio cholerae* to distinguish between past pandemic strains and current pandemic strains. The tested *V. cholerae* strains were from National Institute of Cholera and Enteric Diseases, India. The sequence of SNPs on El Tor variant and Haitian variant were identical, however different from the past pandemic strains. Therefore, use of these SNPs would allow the differentiation of *V. cholerae* pandemic strains.

A. 研究目的

Vibrio cholerae は 200 以上の血清群に分類され、自然環境中では淡水、海水、汽水域と広く分布している。それらの中でコレラの流行を引き起こす原因菌は、血清群 O1 及び O139 の *V. cholerae* に限定されており、コレラの典型的な症状を引き起こす主要な病原因子はコレラ毒素であることが知られている。また *V. cholerae* O1 には生化学的

性状の違いから classical 型と El Tor 型の生物型が存在する。1961 年にインドネシア、スラウェシ島を発端とする El Tor 型 *V. cholerae* O1 によるコレラの流行は世界中に広がり、現在の世界のコレラはすべて El Tor 型による。

しかしながら 1990 年代以降、アジア地域で分離されるほとんど全ての El Tor 型 *V. cholerae* O1 が、コレラ毒素 B サブユニット遺伝子 (375 bp)

の115番目と203番目の塩基に変異のあるEl Tor型 *V. cholerae* O1 (El Tor variant型 *V. cholerae* O1) であることが明らかとなり、流行株の遷移が確認された。さらには、2010年に起きたハイチにおけるコレラの流行を契機に上記2カ所の変異に加え、58番目の塩基に変異のあるEl Tor型 *V. cholerae* O1 (Haitian variant型 *V. cholerae* O1) が発見された。その後の研究により Haitian variant型 *V. cholerae* O1は2000年代に出現したことが明らかとなり、現在アジア地域においてはEl Tor variant型 *V. cholerae* O1と Haitian variant型 *V. cholerae* O1の両者が分離されている。

このように世界流行の最中において *V. cholerae* O1は変異を繰り返しており、今後も新たなコレラ流行株の出現が予想される。新規コレラ流行株の出現に備え、現在の流行株を的確に検出できる体制を整えておくことは重要である。そこで本研究では、過去の流行株 (classical型 *V. cholerae* O1とEl Tor型 *V. cholerae* O) 1と、現在の流行株 (El Tor variant型 *V. cholerae* O1と Haitian variant型 *V. cholerae* O1) を型別可能な疫学マーカーとして、ゲノム上の一塩基多型 (SNPs) の妥当性を検証した。またコレラの世界流行の中心はベンガル湾であることを鑑み、インド国立コレラ及び腸管感染症研究所 (National Institute of Cholera and Enteric Diseases、NICED) と連携を強化し、情報の共有化を行うことも目的とする。

B. 研究方法

インドで分離された *V. cholerae* O1のゲノムDNAをNICEDより提供してもらい、実験に用いた。PCRにより *ompW* 遺伝子と *ctxAB* 遺伝子の増幅を確認できた試料について、*ctxB* 遺伝子の配列を決定した。*ctxB* 遺伝子の配列から Haitian variant型 *V. cholerae* O1と型別された株について、15ヶ所のSNPsの配列を決定した (Table)。

C. 研究結果

今年度、NICEDより16株のゲノムDNAを受領した。*ctxB* 遺伝子の配列から8株がEl Tor variant型 *V. cholerae* O1であり、8株が Haitian variant型 *V. cholerae* O1であった。Haitian variant型 *V. cholerae* O1と型別された1株について、El Tor variant型 *Vibrio cholerae* O1で見出された15ヶ所のSNPsの配列を決定したところ、全ての遺伝子座において、El Tor variant型 *Vibrio cholerae* O1と同一の配列であった (Table)。

D. 考察

アジア地域における新規コレラ流行株の発生監視のためには、流行地域における現状を把握しなくてはならない。インドにおいては、El Tor variant型 *V. cholerae* O1と Haitian variant型 *V. cholerae* O1が分離され、両者が現在の流行株であると考えられる。しかしながら、現在の流行株に共通な疫学マーカーの報告は無い。そこで現在の流行株の疫学マーカーとして、El Tor variant型 *V. cholerae* O1で見出された15遺伝子座のSNPsの評価を行った。その結果、全てのSNPsにおいて現在の流行株では共通の配列であったが、過去の流行株とは異なる配列であった。今後は、これらのSNPsに対して通常のPCRで検出可能な mismatch amplification mutation assayを適用し、現在の流行株の迅速型別法の整備を行いたい。また、アジア地域におけるコレラ流行株の変遷を明らかにするため、classical型 *V. cholerae* O1、El Tor型 *V. cholerae* O1及びEl Tor variant型 *V. cholerae* O1ですでに実施し、データベース化している multilocus variable number tandem repeat analysisを Haitian variant型 *V. cholerae* O1についても行う予定である。

本研究課題では国際的な共同研究を通じて、NICEDと中長期的な連携体制を築くことを目指している。そのためには、今後も継続してNICED

から研究試料の提供を受け、コレラ流行株の基盤情報の共有化を図りたい。

E. 健康危機情報

特に無し。

F. 研究発表

Morita, M., Yamamoto, S., Hiyoshi, H., Kodama, T., Okura, M., Arakawa, E., Alam, M., Ohnishi, M., Izumiya, H. and Watanabe, H. (2013), Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Immunology*, 57: 334-339.

Table. Positional details of SNPs and sequence of each strain.

SNPs	Gene	El Tor	Classical	Elt-var.	Hai-var.
1	phosphoribosylamine--glycine ligase	g	g	A	A
2	arginine/ornithine antiporter	g	g	A	A
3	DNA mismatch repair protein	t	t	C	C
4	nitroreductase A	c	c	T	T
5	preprotein translocase subunit YajC	g	g	T	T
6	outer membrane protein OmpV	a	a	T	T
7	tetraacyldisaccharide 4'-kinase	c	c	A	A
8	ribonuclease E	t	t	C	C
9	ferrous iron transport protein B	c	c	T	T
10	flagellar capping protein	t	t	C	C
11	2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase	c	c	T	T
12	cholera toxin secretion protein EpsM	g	g	A	A
13	dihydropteridine reductase	g	g	A	A
14	Chitodextrinase	g	g	A	A
15	methyl-accepting chemotaxis protein	g	g	A	A

分担課題名：汎赤痢菌群に対するユニバーサル・ワクチンの共同研究

研究事業名：「アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究」(H23-新興-指定-020)

分担研究者：三戸部治郎 国立感染症研究所・細菌第一部

協力研究者：小泉信夫、志牟田健 国立感染症研究所・細菌第一部

Ritam Sinha, Hemanta Koley インド国立コレラ腸管感染症研究所・細菌部

研究要旨：

毒素蛋白を免疫源としたトキシイドを除いて、多様な血清型で構成される病原菌群に共通に効果を示すワクチンは実用化されていない。分担者は基礎的な研究から、赤痢菌群に共通する病原蛋白の発現が増加する一方、ストレス応答の低下により病原性が低下する変異体を分離した。これが血清型を超えた防御効果を示すユニバーサル・ワクチンとして利用できないか調べるため、アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークを活用し、モルモットの腸管感染モデルを初めて開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所との共同研究を行った。*S. flexneri* で作製したワクチン候補株は、病原性が高度に減少する一方、血清型が異なる強毒株である志賀菌(*S. dysenteriae* type 1)並びに現在の流行株である *S. sonnei* に対し明確な防御効果が認められた。

A. 研究目的

細菌性赤痢は東南アジアを中心に年間9千万人近くが罹患し、小児を中心に約40万人が犠牲になっていると推定されている。赤痢に対して、種々のワクチン候補が開発され、トライアルが行なわれている。これらのワクチン株は赤痢菌に代謝系の変異を導入して弱毒化したものか、赤痢菌の病原遺伝子を欠損させ弱毒化したものである。一般的な細菌に対するワクチンと同様にワクチン株と同じ血清型の菌には防御効果は認められるものの、血清型が異なる赤痢菌に対しては無効で、汎赤痢菌群に有効なワクチンは開発されていない[1]。

その理由として抗原性の高い血清型特異的な表面抗原に対する抗体価は上昇するが、赤痢菌群に共通な病原蛋白抗原は宿主の免疫か

ら逃れている機構が考えられる。ワクチン開発という側面から赤痢菌の病原性発現機構の基礎的な解析は重要であり、分担者は細菌のRNA結合蛋白として知られているHfqが赤痢菌の病原性発現調節に重要な役割を果たしていることを報告した。赤痢菌で*hfq*遺伝子の欠損株を作製したところ、その病原性に必須なType III Secretion system (TTSS)の発現が脱抑制され、TTSSが発現しない低温や低浸透圧の条件でもその発現が起こることが分かった。また、通常TTSSが発現する高温(37°C)ではその発現が増大することで、HeLa細胞に対する侵入性が野生型の5~30倍以上に増加することが示された[2]。

一方、Hfqは細菌のストレス応答に関わる遺伝子群の転写因子である*rpoS*や*rpoE*というシグマ因子の発現に必須であり、赤痢菌以外の

病原細菌であるサルモネラ、コレラ、レジオネラの hfq 欠損株では動物に対する病原性が低下することが報告されている。これは病原性よりもストレス条件下の生存性が低下していることが原因と考えられ、赤痢菌の hfq 欠損株も同様に動物実験における病原性が低下していた[2]。逆にワクチンとしての利用を考えるならば、病原蛋白の発現量が増加するにも関わらず、生存性が低下している hfq 欠損株は、貧食細胞で殺菌されやすく、免疫担当細胞に提示される抗原量が多いため、生ワクチンとして効果が高い可能性がある。

分担者はこれまで、*S. flexneri*血清型2aの hfq 欠損株を用いて*S. sonnei*に対するワクチン効果をモルモットの角結膜炎モデルで評価し有意な防御能を認めた。一方、感染の場が腸管である赤痢菌に対して眼球の感染で評価することは困難であった。赤痢菌はこれまで、腸管感染の動物実験系が確立していなかったが、近年、胃酸を抑制し、盲腸を結索することでモルモット腸管でも赤痢を発症させることができる[3]。当研究ではこの方法を開発したインド国立コレラ・腸管感染症研究所(NICED)のDr. Koleyらと共同で実験を行い、*S. sonnei*のみならず、志賀毒素遺伝子を持ち毒性が強い志賀菌(*S. dysenteriae* Type 1, 以下*Sd1*と表記)に対する効果を調べた。

B. 研究方法

ワクチン候補株とコントロールの野生型株は、細菌第一部よりインド国立コレラ腸管感染症研究所(NICED)に分与した。実験に先立って、NICEDの実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認された。実験はNICEDの動物実験施設のP2A区画で飼育、感染実験を行った。

経口免疫系の再実験として3群計18匹の

6週齢モルモットに、ワクチン候補株である*S. flexneri* 2aの hfq 欠損変異株を 1×10^7 個(6頭)、コントロールとして*S. flexneri* 2aの野生型 1×10^6 個(6頭)、およびPBS(6頭)を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図1)。免疫終了後、開腹下で結腸に*Sd1*株 1×10^9 個を投与したのち、閉腹し48時間症状を観察した。

C. 研究結果

これまで行った予備実験では野生型菌を用いたコントロール群に 1×10^7 個の野生型菌を経口投与したところ、全頭が赤痢症状で死亡したためオーバードーズと考えられた。今年度に行った再実験では野生型株は10%に減量し 1×10^6 個の投与とし、ワクチン候補株はこれまで通り 1×10^7 個を1週間隔で計4回、経口カテーテル下で胃に投与した(図1)。

Hfq 変異による弱毒化は初回免疫時のバイタルサインに明確に現れた。今回は野生型投与群に死亡例は無かったが炎症反応を伴う下痢が激しく、 39.5°C 付近の体温上昇と10%近い体重の減少が観察された。対照的にワクチン投与群は野生型菌の10倍の菌量が投与されているにも関わらず実質的に無症状であった(図2)。

初回免疫後ワクチン株接種群は有意な症状を示さなかったが血清中のtotal IgGは4週目までに野生型投与群と同レベルまで誘導された。またワクチン投与群では液性免疫の誘導を示すインターフェロングammaが免疫期間にわたって増加しており、有効に免疫が誘導されている可能性が示唆された(図3)。

免疫終了後、開腹下で結腸に*Sd1*株 1×10^9 個を注入したのち、閉腹し48時間症状を観察した。PBS投与群は6頭すべてが血性下痢を

発症し48時間以内に死亡した。ワクチン投与群は6頭中1頭(16%)が水様性下痢を発症したが、血性下痢と比較して症状は非常に軽微であり、死亡例はなかった。野生型投与群も同様に6頭中2頭(33%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表1)。

感染後3日間定量した便中の菌量はPBS投与群と比較して免疫群では1000倍以上少なく、期間を通じて減少傾向であった。大腸組織へのコロナイゼーションも免疫群が有意に少なく、その中でもワクチン投与群方が菌量が少ない結果が得られた(図4)。

感染後の大腸の組織像はPBS投与群では上皮構造が破壊され、血性下痢に伴う赤血球が粘膜筋板付近まで認められた。ワクチン及び野生型投与群は正常であったが上皮細胞の液包の発達が目立ち水様下痢に伴う粘液分泌の増加が予想された(未掲載)。

D. 考察

平成24年度に新たに送付したワクチン株はその保存・分離方法を徹底したため、その後の実験では安定した効果を示した。今年度は最終的な実験として経口での免疫効果を観察した。

初回免疫時の観察ではワクチン株は10倍量での免疫でも症状を起こさないこと、体温・体重の推移からも、明らかに*hfq*変異によって病原性が減弱していることが示された。また、今年度は血清中のサイトカインの測定を積極的に行い、血中IgGとIFN- γ の推移から免疫群、特にワクチン接種株で有効に免疫が獲得されていることが示された。

結果的に経口でのワクチネーションでも血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対しても同様なワクチン効果があることが示された。

これまでの結果から、少なくとも臨床的に重要な*Sd1*と現在での流行株である*S. sonnei*に関してこのワクチンは血清型の壁を超えた免疫を誘導するポテンシャルが高い可能性を示している。

E. 結論

汎赤痢菌群に効果があるワクチンの候補として、赤痢菌の病原性発現に関わるRNA結合蛋白遺伝子*hfq*の欠損変異株を用いて、モルモットで効果を判定した。過去に行われた角結膜炎モデルと同様に*hfq*欠損株は免疫時の症状が軽く、全身的な免疫を誘導し血清型が異なる志賀菌*Sd1*に対してワクチン効果が再現された。

F. 健康危機情報

緊急性をもって報告すべき内容は特になし。

G. 研究発表(発表誌名巻号・頁・発行年等)

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

○Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M. 第86回日本細菌学会総会 2013年3月18-20日 幕張メッセ: Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system.

○Mitobe J, Yamamoto S, and Yanagihara I 2013 June. 4-8 3rd Conference on regulating with RNA in bacteria. Wurzburg, Germany. : Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

<参考文献>

1. Kotloff, K.L., et al., *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies*. Bull World Health Organ, 1999. 77(8): p. 651-66.
2. Mitobe, J., et al., *Involvement of RNA-binding protein Hfq in the osmotic-response regulation of invE gene expression in Shigella sonnei*. BMC Microbiol, 2009. 9: p. 110.
3. Barman, S., et al., *Development of a new guinea-pig model of shigellosis*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011. 62(3): p. 304-14.

図 1

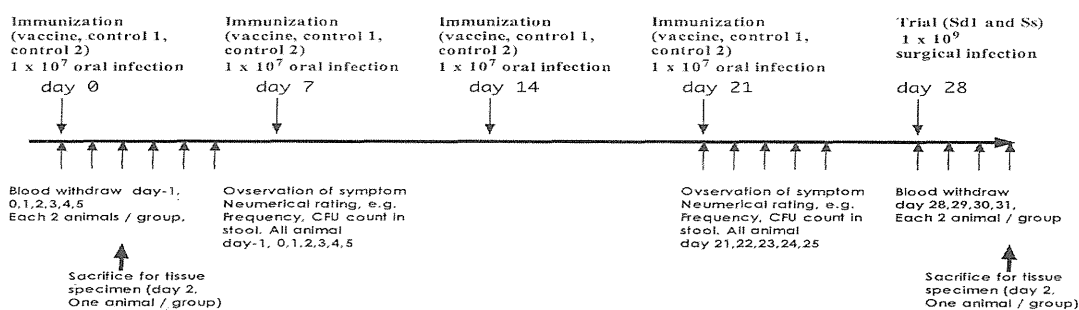
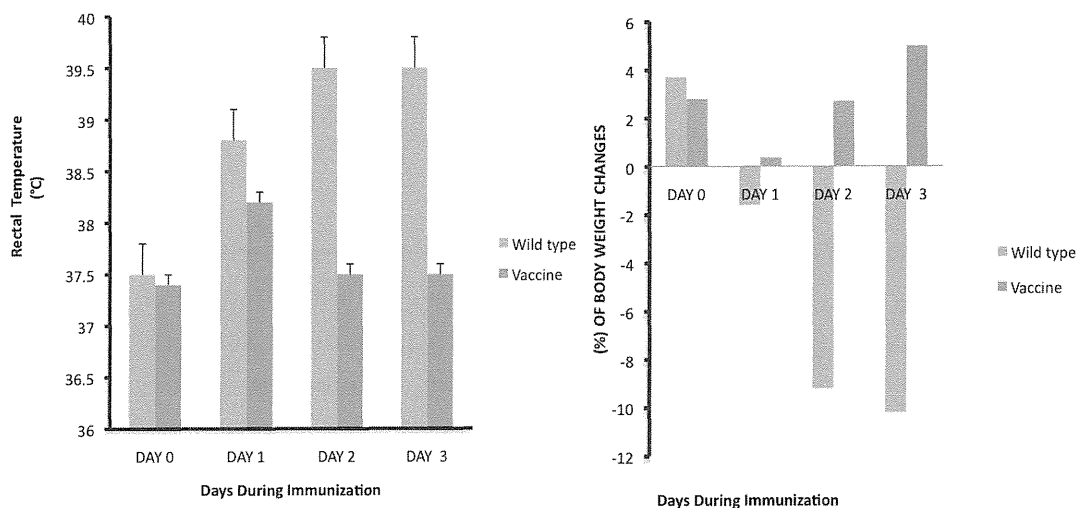


図 2



☒ 3

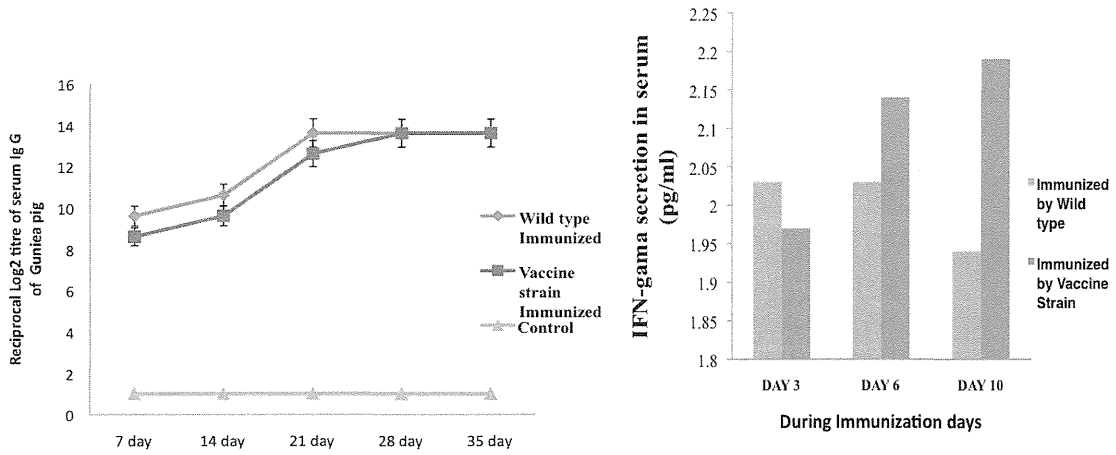
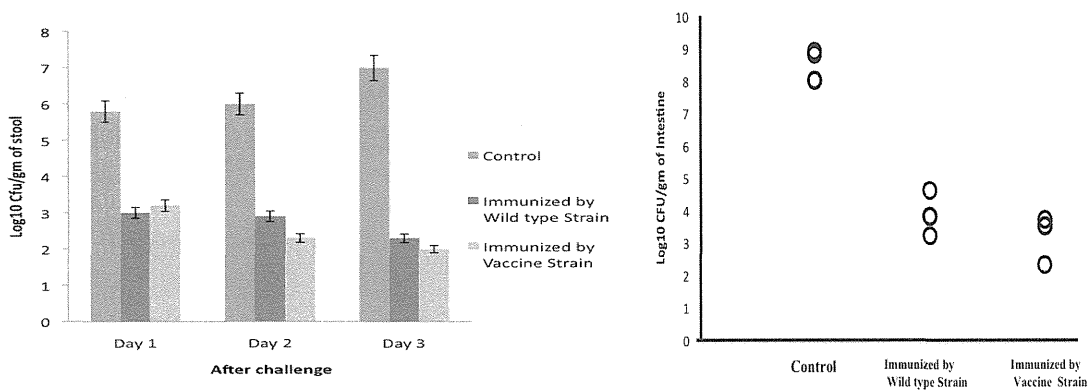


表 1

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	<i>Sd1</i>	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	<i>Sd1</i>	6	16% (1/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	<i>Sd1</i>	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)

☒ 4



厚生科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症 研究事業)
分担研究報告書

腸管系寄生虫症の解析

分担研究者 野崎 智義 国立感染症研究所 部長

研究要旨 ジアルジア症・赤痢アメーバ症・クリプトスポリジウム症はアジア・アフリカにおける重要な腸管寄生原虫症である。本研究はインド NICED との共同研究を通じて、日印の国際共同研究の基盤を確立することを目的に研究を展開している。最終年度は分子疫学的手法を用いた赤痢アメーバ症の分子疫学調査を実施した。詳細な分子疫学手法に基づき、インド赤痢アメーバ分離株の解析を行い、成果を挙げた。

A. 研究目的

腸管感染症は世界の死亡の約 4% (216 万人) を占める重要な感染症である (WHO Report, 2009)。これは HIV/AIDS、結核と同様に極めて重要な死因の一部を占める。腸管感染症のうち原虫症として重要なのは、ジアルジア症、クリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症、マイクロスポリジウム症、イソスポーラ症などであり、これらが原虫が原虫性下痢症の大部分を占める。赤痢アメーバ症が開発途上国を中心として世界の人口の約 1% に感染し、年間 10 万人の死者を生む重要な原虫である。一方、ジアルジア症・クリプトスポリジウム症などは特に途上国での小児の感染率は極めて高いものの、小児の発育・発達に大きな影響を与え、高い DALY の原因となる。

本研究では、インドコルカタにある Indian Council of Medical Research (ICMR) の感染症研究所のひとつである National Institute of Cholera and Enteric Diseases (NICED) と、腸管原虫症に関する共同研究を行った。その目的は、アジア、特に南アジアとの腸管原虫症研究の連携を強化し、情報ネットワークを構築することにある。更に、人的交流を通じてお互いの研究能力の向上と病原体検出の情報の早期収集に有用なネットワークを構築す

ることを目的とする。本年度はインドの赤痢アメーバ臨床株を収集し、遺伝子型別を行い、臨床症状と遺伝子型との相関を抽出した。

B. 研究方法

1. 臨床検体

51 例の赤痢アメーバ検体を解析に用いた。内訳は 26 例の下痢症例、20 例のアメーバ肝膿瘍例、5 の無症状症例であった。

2. 遺伝子型別解析

糞便または肝膿瘍穿刺液から顕微鏡法、抗原捕捉法 (E. histolytica II kit, Techlab) で陽性と診断された検体に関して、DNA stool mini kit で DNA を抽出した。すべての検体に関して Chitinase および tRNA-linked STR (tRNA に挟まれた短反復配列多型 = short tandem repeats) の 3 種の座位 (DA-H, NK2-H, R-R) に関して nested PCR を行った。方法は Escueta-de Caz Parasitol Int 2010 に記述した。得られた PCR 産物を直接シーケンシングにより配列決定した。

2. 配列・クラスター解析

遺伝子配列は Clustal W、MEGA によりアラインし、SeaView Graphical Interface により可視化した後、Epi-Info で評価した。

(倫理面への配慮) 本研究に関わる病原体の取扱いに関する許可、ヒト臨床検体の取り扱いに関する許可は当該研究機関にて得られている。

図2 tRNA-STRのD-A locusの多型を模式的に示した。14DA, 6DA, 5DAは既報、IND2-9DAは今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

C. 研究結果

1. Chitinaseの多様性

51種の臨床検体から13種類の遺伝子型が検出された。

Chitinase (CHI)

■ GAGAAGTCACCAGATCTCTCT ■ GAACTTAAACATGAACTCTCT
■ GAAATTAACACCAGATCTCTCT ■ GAAGTTAAACCAGATCTCTCT

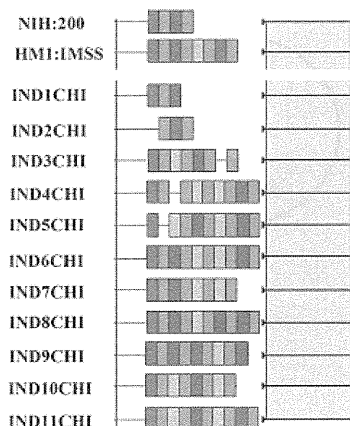


図1 Chitinaseの繰り返し配列部分の多型を模式的に示した。NIH:200, HM1:IMSSは既報、IND1-11CHIは今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

2. tRNA-STRの多型

図2-4に3種のtRNA-STR遺伝子座のパターンを示す。

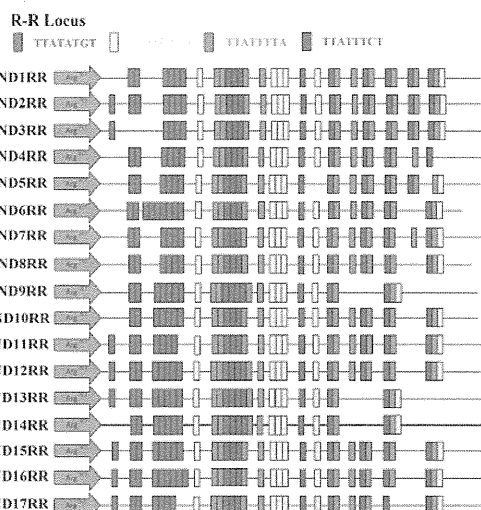
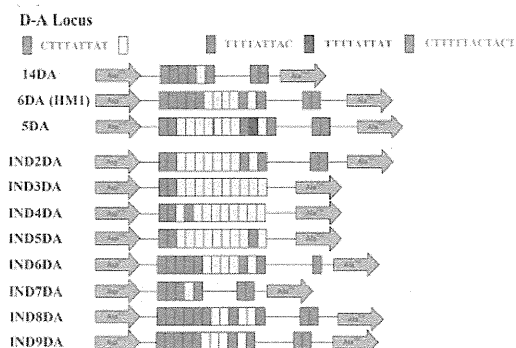


図3 tRNA-STRのR-R locusの多型を模式的に示した。既報の遺伝子型は発見されなかった。

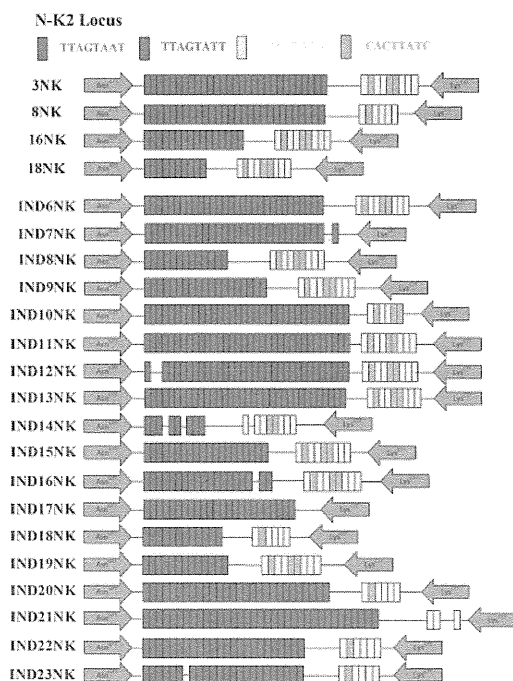


図4 tRNA-STRのNK2 locusの多型を模式的に示した。3NK, 8NK, 16NK, 18NKは既報、IND6-23NKは今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

3. 遺伝子型と病型との相関

上記の4遺伝子座に関して、臨床症状(下痢・肝膿瘍・無症状)と遺伝子型との相関が有意に示されるものを抽出した(表1)。

Loci	Repeat pattern	Liver abscess (LA)	Diarrheal (D)	Asymptomatic (AS)
D-AH	6DA	Co-eff: 0.507 ^a p = 0.0026 ^b	Co-eff: -0.385 ^a p = 0.029 ^b	X ^c
	14DA	Co-eff: 0.403 ^a p = 0.0096 ^b	Co-eff: -0.684 ^a p = 0.000004 ^b	Co-eff: 0.281 ^a p = 0.0026 ^b
N-K2	18NK	Co-eff: -0.404 ^a p = 0.0116 ^b	Co-eff: 0.532 ^a p = 0.0008 ^b	X ^c
R-R	JND11RR	X ^c	Co-eff: -0.619 ^a p = 0.0004 ^b	Co-eff: 0.286 ^a p = 0.0082 ^b
Chitinase (CHI)	NH:200	Co-eff: -0.429 ^a p = 0.0014 ^b	Co-eff: 0.577 ^a p = 0.0001 ^b	X ^c
	HM1:IM55	X ^c	Co-eff: -0.456 ^a p = 0.0173 ^b	X ^c

表1 それぞれの遺伝子座(Loci)に関して特定の遺伝子型(Repeat pattern)が特定の病型と相関を示したものはp値を示した。相関係数がプラスなものは正の相関、マイナスなものは負の相関を示した。”X”は有意差が見られないもの。

4. 遺伝子型と病型のクラスター解析

系統解析を行い、それぞれの遺伝子座における遺伝型と病型をクラスター解析した。代表例(NK locus 及び DA-H locus)だけを示すが、肝膿瘍と無症候性とで共通のクラスターを形成する亜群が存在することが示された(図5)。

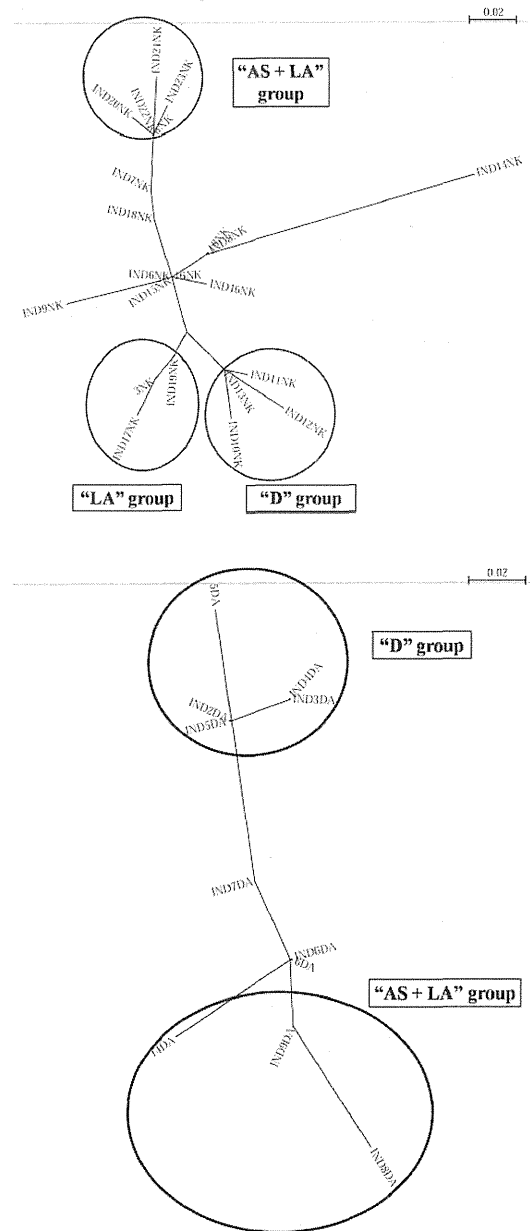


図5 NK2(上)及び DA-H (下)locus の系統解析。

D. 考察及び結論

本研究により、インドにおける赤痢アメーバの臨床株の遺伝的多様性が初めて明らかにされた。インドにおける赤痢アメーバの遺伝的多様性は野崎らが日本のMSM(男性同性愛者)で示した赤痢アメーバ株において示したと同様に、極めて高い遺伝的多様性を示していた。更に、本報告により、

これまで未同定の多くの遺伝子型が発見された。このことは南アジアにおいて特殊な種内分化・多様化が起こった可能性を示している。

本研究における二つ目の重要な成果は、それぞれの遺伝子座の特定の遺伝子型が病型と相関していることを示したことである。しかしながら、病型との相関の見られた遺伝子型をもつ検体数が少ないため、相関は注意深く今後更に検討する必要がある。

以上、最終年度はインドから分離された赤痢アメーバ株の分子疫学の基盤的情報を確立することができた。これらの成果は、NICED との共同研究を更に推し進めるための、必要不可欠な貢献をしたと言える。

E. 健康危険情報 該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Das, K., Mukherjee, A. K., Chowdhury, P., Sehgal, R., Bhattacharya, M. K., Hashimoto, T., Nozaki, T., and Ganguly, S. Multilocus sequence typing system (MLST) reveals a significant association of *Entamoeba histolytica* genetic patterns with disease outcome. *Parasitol Int*, 63, 308-314, 2014.

2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず。
2. 実用新案登録
該当せず

エイズの流行とウイルス変異に関する研究

研究分担者 俣野 哲朗 国立感染症研究所エイズ研究センター長

研究協力者 石川 晃一 国立感染症研究所エイズ研究センター主任研究官

研究要旨

HIV 感染症は世界三大感染症の一つであり、その克服は国際的重要課題である。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症対策において重要である。各 HLA アレル頻度は人種間で異なるため、世界各地域の流行 HIV 株の HLA 関連変異同定が必要である。そこで本研究では、アジアの HIV 感染流行地域の一つであるインド国の国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) との共同研究で、インド国 HIV 感染者の HLA 遺伝子型同定法を確立し、解析を開始した。平成 25 年度は、これまでの解析で見出した比較的頻度の高い HLA-A アレルのうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異候補を HIV gag MA 遺伝子領域に見出した。

A. 研究目的

世界三大感染症の一つである HIV 感染症は、宿主免疫によるウイルス複製抑制が困難で慢性持続感染を呈し、エイズ発症に至る致死感染症である。その克服は国際的重要課題であり、HIV 変異の伝播状況の把握は、HIV 感染拡大抑制に向けた取組みにおいて重要な基盤情報となる。

特に HIV ゲノム塩基配列の解析研究においては、1980 年代から、主に env 領域の解析に基づき各種サブタイプが同定され、HIV の各地域への経時的な伝播についての知見が得られてきた。1990 年代後半の抗 HIV 薬治療導入以降は、主に pol 領域の解析に基づく薬剤耐性変異の同定も進められてきた。さらに近年、HLA 関連変異に関する情報収集の重要性が認識されてきている。HIV 感染病態に最も影響の大きい宿主因子として知られているヒト白血球抗原

HLA (クラス I) の遺伝子型と関連する HIV ゲノム変異であり、HIV 感染者の HLA 遺伝子型と HIV ゲノム変異の両者の解析結果に基づき同定するものである。細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の標的抗原エピトープの提示に関与する HLA 分子の遺伝子型の違いは CTL 標的の違いに直結するので、HLA 関連変異の多くは CTL 逃避変異を反映するものとして解析研究が進められている。

本研究はこの HLA 関連 HIV 変異に着目するものである。CTL 反応は HIV 複製抑制に中心的な役割を担っており、CTL 逃避変異を有する HIV の選択は感染病態に大きく影響しうる。この CTL 逃避変異を反映する HLA 関連 HIV 変異の動向把握は、HIV 感染症対策において重要である。各 HLA アレルの頻度は人種間で大きく異なっているため、世界各地域における流行 HIV 株の HLA 関連変異を同定

することが必要であり、本研究では、アジアにおける HIV 感染流行地域の一つであるインド国の国立コレラ腸管感染症研究所 (NICED) の Sekhar Chakrabarti 博士との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を進めることとした。NICED より十分な数の検体を得ることが困難であったため、平成 25 年度は、これまでのインド HIV 感染者の解析で見出した比較的頻度の高い HLA-A アレルのうち、ベトナムでも頻度の高い HLA-A*11:01 に注目し、この HLA の関連変異の同定を試みた。

B. 研究方法

ベトナムの HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出された DNA を用い、HIV プロウイルスの gag MA 領域の塩基配列解析を行い、HLA-A*11:01 陽性者と陰性者における解析結果をもとに統計学的手法を用いて HLA-A*11:01 関連変異同定を試みた。

(倫理面への配慮)

ヒトサンプルを用いる研究については、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に従い、国立感染症研究所の倫理委員会の承認のもと推進した。また、インドおよびベトナムの共同研究者所属機関の倫理委員会の承認も得ている。

C. 研究結果

インドの HIV 感染者に関するこれまでの我々の解析では、HLA-A アレルのうち、A*11:01/02、A*33:03、A*68:01、A*01:01、A*24:02、A*31:01 が 10% を超える頻度で見出されている。このうち、インドに関する既報 (Immunogenetics 53:1009, 2002) およびベトナムに関する我々の以前の解析で共に 5% 以上の頻度で見出されたものは、A*11:01、A*33:03、A*24:02 であった (表 1)。このうち、まず A*11:01 に焦点を絞り、A*11:01 陽性者と陰性者における HIV gag MA 領域の塩基配列について

統計学的解析に基づき、Gag の第 83 番目のアミノ酸置換を生ずる変異を、HLA-A*11:01 関連 HIV gag 変異候補として同定した。

D. 考察

本研究では、インドおよびベトナムの双方で共通して頻度の高い HLA-A アレルを見出した。さらに、そのうちの一つ HLA-A*11:01 について関連ゲノム変異候補を、HIV gag MA 領域に同定した。このように HLA 関連 HIV ゲノム変異同定システムを構築できたことから、今後、各 HLA アレルに相関する HIV ゲノム変異情報を収集することが可能となった。

HLA 関連変異の蓄積は、CTL による抑制がよりかかりにくい感染病態に結びつき、薬剤による治療効果に影響を及ぼす可能性も危惧される。したがって、本研究のようなアジア HIV 流行地域における HLA 関連変異情報の収集は、日本を含むアジア地域の HIV 感染症の制圧に貢献するものである。

E. 結論

インドおよびベトナムの双方で比較的頻度の高い HLA-A アレルを複数見出し、そのうちの一つである HLA-A*11:01 関連変異候補を HIV gag MA 領域に見出した。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Nakane T, Nomura T, Shi S, Nakamura M, Naruse TK, Kimura A, Matano T, Yamamoto H. Limited impact of passive non-neutralizing antibody immunization in acute SIV infection on viremia control in rhesus macaques. PLoS ONE 8:e73453, 2013.
- (2) Iwamoto N, Takahashi N, Seki S, Nomura T, Yamamoto H, Inoue M, Shu T, Naruse TK,

Kimura A, Matano T. Control of SIV replication by vaccine-induced Gag- and Vif-specific CD8⁺ T cells. *J Virol* 88:425-433, 2013.

(2) 野村拓志、俣野哲朗. SIV 感染制御群における制御維持への Vif および Nef 特異的細胞傷害性 T リンパ球反応の関与に関する研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、神戸、11/12/2013.

2 学会発表

(1) Matano T. Vif can be a promising CD8 T cell target for HIV/SIV control. The 14th Kumamoto AIDS Seminar, Kumamoto, Japan, 10/29/2013.

G. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

表 1. インドおよびベトナムにおける HLA アレル頻度

NICED より提供された インド HIV 感染者検体 HLA-A アレル頻度		インド人 HLA-A アレル頻度 ^a		ベトナム人 HLA-A アレル頻度	
HLA-A	頻度	HLA-A	頻度	HLA-A	頻度
A*11:01/02	25 %	A*24:02	15-20 %	A*11:01/02	25-30 %
A*33:03	18 %	A*11:01	10-15 %	A*33:03	10-15 %
A*68:01	14 %	A*01:01	10-15 %	A*24:02/20	10-15 %
A*01:01	11 %	A*33:03	5-10 %	A*02:01/07/18	5-10 %
A*24:02	11 %	A*02:11	5-10 %	A:02:03	5-10 %
A*31:01	11 %	A*03:01	5-10 %	A*29:01	5-10 %
		A*32:01	5-10 %		

^a Immunogenetics. 53:1009-1019, 2002.

“Laboratory–based collaboration network of infectious diseases in Asia”

Funding Organization: National Institute of Infectious Diseases, *Tokyo, Japan*

Indian Investigators :

Principal Investigators: *Dr. S. Chakrabarti, Director in Charge, National Institute of Cholera and Enteric Diseases, Kolkata*

Co-Investigators:

Dr. Sekhar Chakrabarti, Scientist G

Dr. Banwarilal Sarkar, Scientist E

Dr. Asish K. Mukhopadhyay, Scientist D

Dr. Sandipan Ganguly, Scientist C

Dr. Hemanta Koley, Scientist C

Foreign Investigators :

Principal Investigators: *Dr. Haruo Watanabe, Director General, National Institute of Infectious Diseases, Japan & Ichiro Kurane, Deputy Director-General, National Institute of Infectious Diseases, Japan.*

1. Title of the Research Project :

“Laboratory –based collaboration net work of infectious diseases in Asia”

2. Objectives

The proposal has been developed with a broader objective to understand the evolution of pathogenesis of enteric pathogens and HIV that include phenotypic and genotypic characteristics of identified pathogens from diarrheal specimens as well as identification of novel factors for pathogenesis, to develop potential vaccine and to study mutations in HIV during infection which has an association with different genotypes and might be used as biomarkers; the study objectives will be covered through extensive work under the following areas and each of these areas will be covered by the Co-PIs of the project

- i) *Retrospective analysis on the evolutionary aspects of Vibrio cholerae*
- ii) *Differential pathogenesis of Giardia : Role of Giardia Virus*
- iii) *Development of universal Shigella vaccine based on virulence gene expression.*
- iv) *Analysis of HLA associated HIV-1 mutations in India and Japan.*

3. Summary of the research for fiscal year 2013-14

- 1. *Retrospective analysis on the evolutionary aspects of Vibrio cholera*

Third Year Report

1. Study Title:

Retrospective analysis on the evolutionary aspects of *Vibrio cholerae*

2. Study facility:

National Institute of Cholera and Enteric Diseases
Division of Bacteriology
Kolkata, India

National Institute of Infectious Diseases
Tokyo, Japan

3. PI from Indian Side for this report: Asish K. Mukhopadhyay

Summary:

In recent years, cholera has become endemic in an increasing number of geographical areas. Our previous study on *Vibrio cholerae* strains isolated from Kolkata over 17 years

from 1989 to 2005 depicted that in Kolkata, *V. cholerae* O1 strains with classical allele of *ctxB* have totally replaced seventh pandemic El Tor strains possessing El Tor allele of *ctxB* since 1995. Reports from other various groups revealed that the prototype El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 from the seventh pandemic have been replaced by variants of *V. cholerae* O1 El Tor which produces cholera toxin (CT) of classical type in many parts of the world. Shift of CT genotype 3 to genotype 1 in *V. cholerae* O1 strains and detection of diversity in the CTX phage repressor, *rstR* provided an impetus to analyze CT genotypes along with the CTX prophages in *V. cholerae* strains isolated from Zanzibar to understand whether emerging El Tor variant has disseminated in this isolated region. Detailed molecular analysis of representative strains showed that they are of El Tor biotype that produces classical CT and harboured single CTX prophage. In vitro CT production assay with representative strains showed that significant number of the variant strains produce higher amount of toxin in the highly sensitive beads-ELISA, which is almost equivalent to that of classical strains. To our knowledge, no such report has been made from this small island of Africa focusing the molecular epidemiology of cholera, although recurrent outbreaks have been documented since 1978. An active holistic surveillance system should be in place for tracking the mode of dissemination of the *V. cholerae* O1 El Tor variant strains in naive population using molecular assays, as these strains possess all the potentialities for new pandemic.

The toxin-coregulated-pilus (TCP) is a crucial determinant of the pathogenicity of *Vibrio cholerae*. TCP is essential for intestinal colonization and serves as a receptor for CTX Φ . Whole genome sequence analysis of *V. cholerae* strain isolated from the Haitian cholera outbreak revealed a unique mutation at the 89th amino acid position of the TcpA subunit. In this retrospective analysis, we investigated the emergence and dissemination of this Haitian TCP variant in Kolkata, India. Based on the sequencing analysis of *tcpA*, a new PCR technique was developed for the rapid identification of *V. cholerae* strains carrying Haitian, classical and El Tor alleles of *tcpA*. This assay was subjected to screen 251 *V. cholerae* O1 strains isolated during 2001-2012 in Kolkata for understanding the genesis and spread of the Haitian *tcpA* along with the bioinformatics analysis. Our results showed that Haitian *tcpA* first appeared in Kolkata during October, 2003, and interestingly soon after its appearance; this new variant *tcpA* displaced the canonical El Tor *tcpA* completely in the following years. Our bioinformatics analysis showed that among the three different mutations present in 89th position, only Asparagine to Serine is positively selected. Moreover, this particular mutation is the result of a purine-purine transition, which is conserved natural selection. This finding indicated that Haitian *tcpA* might have originated in Kolkata and then