

図2 Niced より提供された *V. cholerae* 29 菌株の MLVA クラスター解析。各遺伝子座 (VC-1、VC-2、VC-3、VC-5、VC-6、VC-7) のリピート数、分離年及び菌株名を示す。

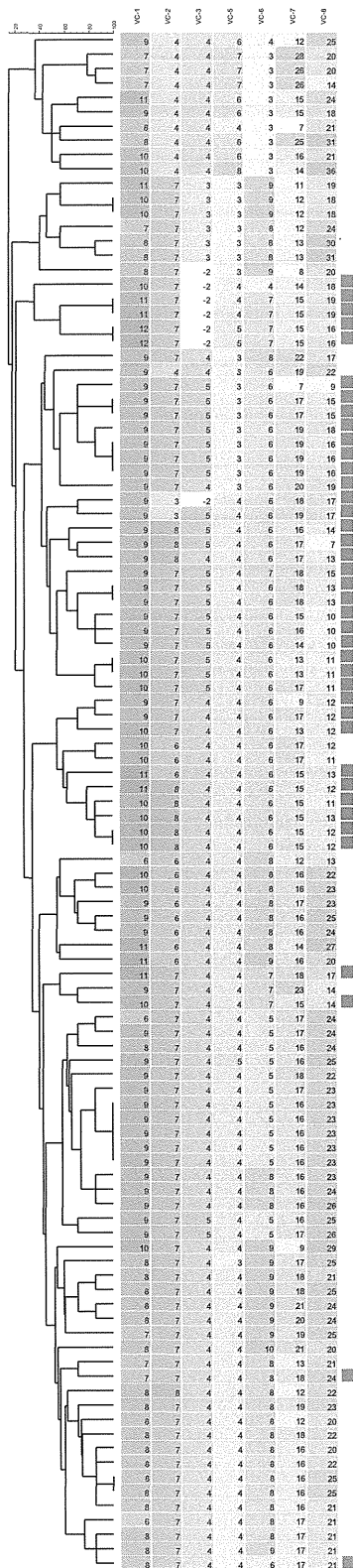


図3 アジア地域由来 *V.cholerae* の MLVA クラスター解析。NICED より提供された菌株を含むインド由来の菌株を四角で示す。

表 SNPs の遺伝子座情報と配列比較

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℃)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 2457T 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。

実験(1) : 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(6頭)、コントロールとして *S. flexneri* 2a の野生型(6頭)、およびPBS(6頭)を二週間隔で 1×10^9 個を計4回、鎮静下で左眼球に投与した(図1)。4週目、鎮静下で右眼球に *Sd1* 株 1×10^9 個を計2回、投与したのち、6日間症状を観察した。さらに全身的な免疫誘導を調べるため、*Sd1* 投与の2週間後、同じ個体に、開腹下で結腸に *S. sonnei* 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(図1)。

実験(2) : 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

平成23年度からNICEDで予備実験を開始したが、ワクチン効果が一定の頻度でばらついていることが判明した。そこで急遽平成24年度初頭に渡印し、ワクチン株の検査を行った。

現地で保存されていたワクチン株は保存が悪く、LBプレート上でコロニーを生育させると小型のS型のコロニーがほとんど出現せず大多数が大型のR型のコロニーを形成した。R型からは、赤痢の病原性プラスミドに存在する *ipaB*, *virF*, *invE* 遺伝子群のPCRが陰性であり、保存中に病原性プラスミドが脱落しており、最終的にストック株から正しいワクチン

株を分離するのは不可能であった。

以上のことより感染研よりワクチン株を再分与し、それをを用いた免疫後の感染実験に立ち会うスケジュール(図1)で免疫してもらい、平成24年11月末に再度渡印し、ワクチン効果を判定した。

* * *

実験(1) : 全身的な免疫誘導を確認し志賀菌(*Sd1*)に対する効果を判定するため、眼球へのワクチネーションと*Sd1*によるチャレンジを再度行った。これまでの予備実験から眼球へのワクチネーションは動物個体に強い免疫を与えることが明らかであり、左眼球に2週間おきに2回ワクチネーションを行い、4週後、右眼球に*Sd1*をチャレンジした。

野性型菌投与群は初回免疫後に全てが角結膜炎を発症した。予想外に、6頭のうち1頭は全身に感染が拡大し2週間後に死亡した。他の3頭は完全に回復し2回目の免疫時の症状は軽微であった。残り2頭は4週間後のチャレンジまで左目の症状が持続した。

ワクチン投与群も角結膜炎を発症したが、野性型と比較して症状は非常に軽微であり、6頭全てで角膜炎の形成と膿汁を含む流涙は認められず、2回目の免疫時には症状は認められなかった。死亡例1頭を含む免疫群計12頭の観察では左目から右目への感染の拡大は見られなかった。

分担者も参加した防御効果判定は免疫した眼球と反対側の右目に*Sd1*の感染を行った。PBS投与群は3日以内に6頭すべてが角結膜炎を発症した。野性型投与群は残った5頭中2頭に軽微な結膜炎が認められた。左目に角結膜炎が持続している2頭を含む残り3頭には肉眼的な症状は認められなかった。ワクチン投与群は6日間に及ぶ観察期間中、6頭全

てに肉眼的な症状は認められなかった(図2)。

さらに*Sd1*の感染の2週間後、全身的な免疫誘導を調べるため、同じ個体に、開腹下で結腸に*S. sonnei*株 1×10^9 個を接種したのち、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2頭(33%)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5頭中2頭(40%)が水様性下痢を発症し死亡例はなかった(表1)。

実験(2) : 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3)。

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かかわらず実質的に無症状であった(図4)。

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 γ 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5)。

免疫終了後、開腹下で結腸に*SdI*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2)。

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の菌量が少ない結果が得られた(図6)。

D. 考察

ワクチン株が保存中に変質したことに対しては、今後薬剤耐性マーカーを病原性プラスミドに挿入するなどの対策が必要だと考えられた。当座の対策として小型のS型コロニーから新たに多数のシードストックを作製し保存することにした。その結果平成24年度に新たに送付したワクチン株は、その後の実験では安定した効果を示した。

ワクチン効果の判定では、以前に感染研で行った両目に免疫した実験のように、免疫後に症状の持続している個体への介入的治療(テトラサイクリンの点眼)は行わなかった。その結果、野生型投与群では予想以上に症状が重く、1頭は全身的な感染に移行し死亡した。このように初回免疫の症状からも*hfq*変異株は病原性が減弱していることが示された。

今回は左目に免疫して*SdI*を用いて右目で判定を行なうことで、血清型が異なる志賀菌*SdI*に対しても局所的ではないワクチン効果

があることが示された。さらに引き続き同一の個体群を用いて血清型が異なる*S. sonnei*の腸管感染実験で防御効果が示されたことから、ワクチン投与群と野生型投与群では全身的な液性免疫が誘導されていることが示された。

経口ワクチネーションの実験(2)でもワクチン効果の再現性と*hfq*変異による高度な病原性の減弱が認められた。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*SdI*に対しても同様なワクチン効果があることが示された。これらの結果から、このワクチンは少なくとも*SdI*と*S. sonnei*に関して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た。

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*SdI*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, Itaru Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M, 2012 Dec.12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

○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

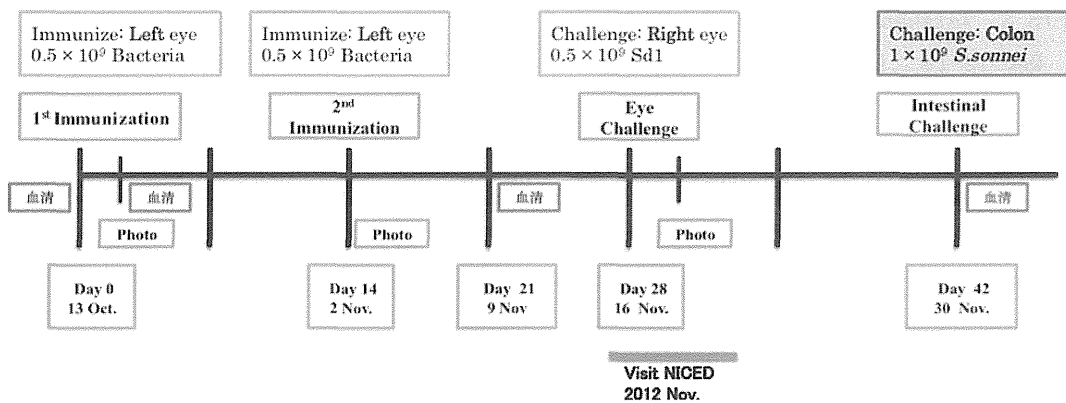
with RNA in bacteria. Wurzburg, Germany. : Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

<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.

☒ 1

CONTROL 1 (PBS): 6 Animals
 CONTROL 2 BY *S. flexneri* 2a wild-type: 6 Animals → 1 dead.
 VACCINATION BY *S. flexneri* 2a Δhfq : 6 Animals



☒ 2

Effect of vaccination (Photo: 3 days after infection)

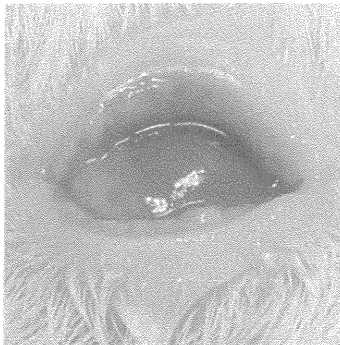
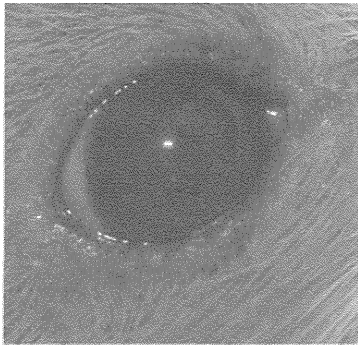
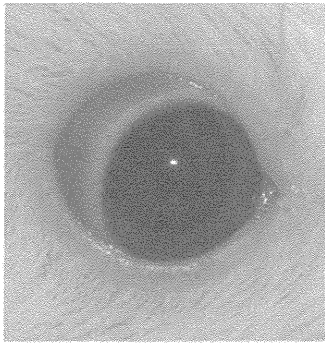
Control 1	Control 2	Vaccine
PBS Sd1	Wild-type <i>S. flexneri</i> Sd1	Δhfq , <i>S. flexneri</i> Sd1
		
6 / 6 +++	2 / 5 + 3 / 5 -	0 / 6 -

表 1

Immunogen	Challenged Strain	Number of animal	Water diarrhea	Bloody diarrhea	% of death
Control 1 PBS	<i>S. sonnei</i>	6	0% (0/6)	100% (6/6)	100% (6/6)
VACCINE	<i>S. sonnei</i>	6	33% (2/6)	0% (0/6)	0% (0/6)
Control 2 Wild-type	<i>S. sonnei</i>	5	40% (2/5)	0% (0/5)	0% (0/5)

图 3

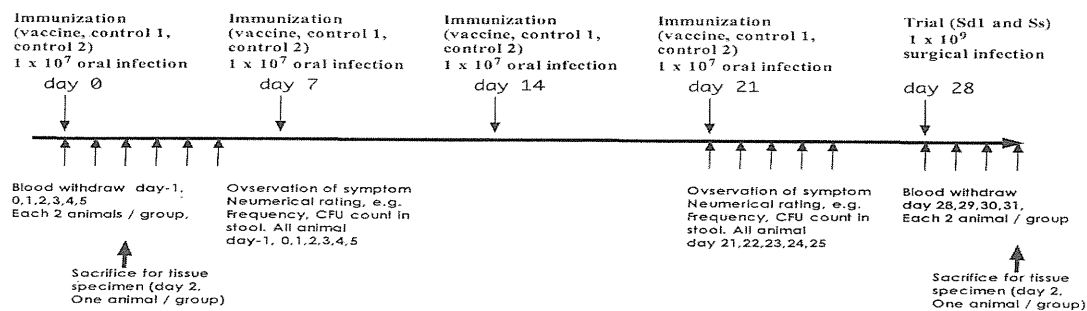
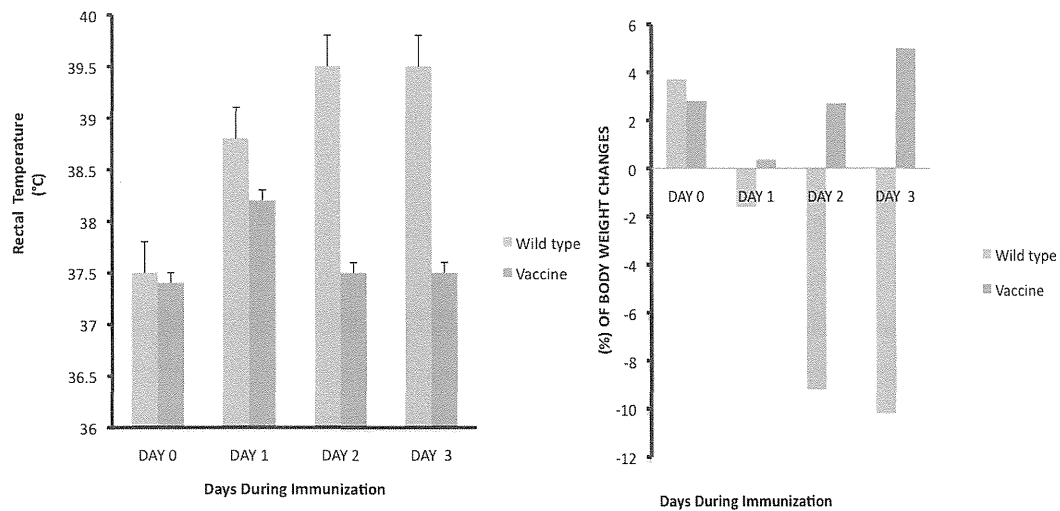


图 4



☒ 5

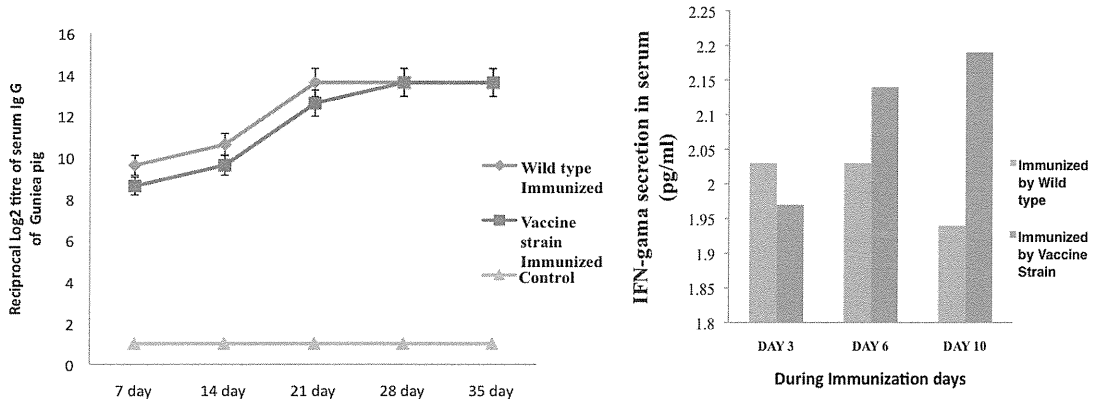
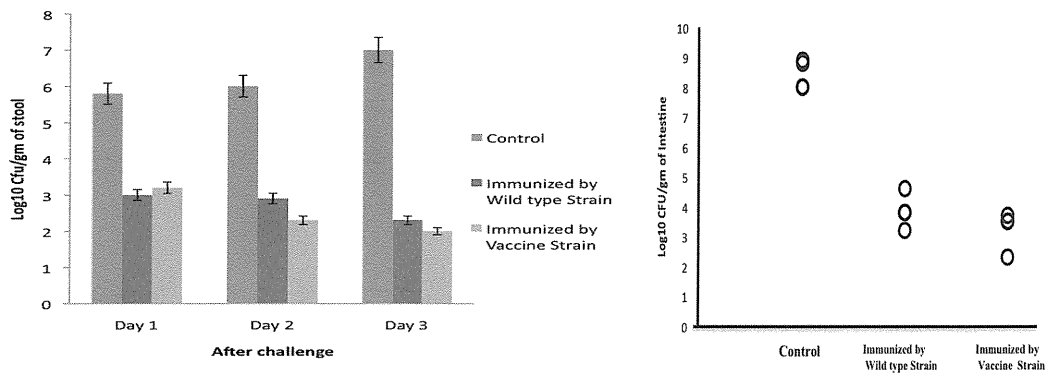


表 2

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)

☒ 6



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)
総合分担研究報告書(23-25 年度分)

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分子疫学、病原・寄生機構等の解明の研究を展開している。初年度はコルカタ、西ベンガル州におけるジアルジア症の感染実態を明らかにするために、疫学・分子疫学的情報を獲得した。本年度の研究成果により、ジアルジア症の感染浸淫度、季節消長、遺伝子多様性、動物由来感染症としての重要性などが明らかにされた。2年度は、ジアルジアからの感染ウイルスの特定を目指すために、西ベンガル州におけるジアルジア症の病原株の確立を目指すと共に、赤痢アメーバにおける抗酸化機構の分子機構を明らかにした。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。本研究では 3 年間に渡って、疫学調査、分子疫学解析、酸化ストレス応答解析といった複数の研究内容について研究を行った。

B. 研究方法

1. 培養

赤痢アメーバ株 HM-1: IMSS cl6(Louis Buddy Diamond の分離による)の培養は常法の無菌培養法に従った。

2. 検体

毎週無作為に抽出された 2 曜日に、NICED に近接する Infectious Disease Hospital (IDH)に、下痢で来院し入院した患者のうち、毎 5 人目の患者、合計 2421 人を対象とし、そのうち

Giardia lamblia 陽性者 253 人のうちの無作為抽出された 30%(58 名)を対象とした。更に、下痢症状のない 58 症例から、同様に 30%(17 名)を抽出した。これらの計 75 の糞便を対象とした。以下の PCR による確認の他に、糞便中抗原を特異的 ELISA(Techlab, Blacksburg)により検出されたことを条件に、確定診断とした。

ウシの便はインド西ベンガル州の酪農場の 180 の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された。更に、51 人の酪農場労働者からも糞便を採取した。下痢症状の有無は聴取しなかった。

赤痢アメーバの遺伝子型別解析に関しては、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。

3. 遺伝子型別解析

糞便からの核酸の抽出は Stool DNA mini kit (Qiagen)を用いた。PCR は Giardia lamblia の beta giardin, glutamate dehydrogenase, triose phosphate isomerase 遺伝子を標的とし、既報のオリゴヌクレオチドプライマーと条件を用いて行った(Khan 2011)。赤痢アメーバの型別解析に関しては 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。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。データの優位性は Student t test、ANOVA、Epi-Info 等にて検定した。

3. 配列・クラスター解析

(倫理面への配慮) 本研究に関わる病原体の取扱に関する許可、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。

4. メタボローム解析

メタボローム解析はキャピラリー電気泳動飛行時間計測型質量分析法(CE-ToFMS)により行った。方法の詳細は Husain J Biol Chem 2010 に詳述した。Anion, Cation モードでの計測で、約 90 の中間代謝産物を定量した。

5. 赤痢アメーバ過剰発現体の作成

Iron sulfur flavoprotein 1 (ISF1) 及び ISF2 遺伝子の ORF の N-末端部分 420bp を pSAP2-Gunma ベクターに挿入し、gene silencing 用プラスミドを作成した。赤痢アメーバ形質転換体の作成はリポフェクションを用い、常法に従った。

C. 研究結果

1. コルカタ地区におけるジアルジアの感染実態調査

コルカタにある感染研様研究所である NICED に併設された IDH に来院した下痢症患者から無作為抽出された計 2421 人の対象のうち、顕微鏡検査、抗原捕捉試験、糞便 PCR のいずれかで Giardia 陽性と判定されたのは 253 人であった。253 人のうち 195 人が有症者、58 人が無症候であった。その年齢内訳、並び年齢別の優位性、Odds Ratio(図 1)は以下の通りである。

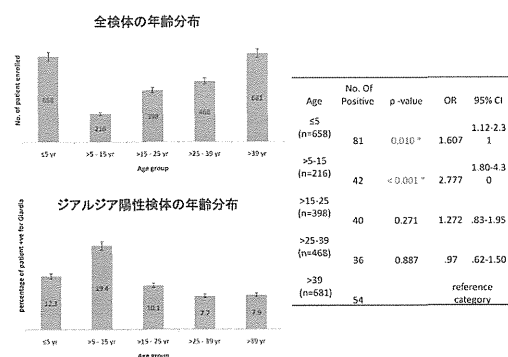


図 1 ジアルジア感染者の年齢分布と

年齢別リスク

月毎の全体のモニター数、そのうち Giardia 陽性者数、陽性者の割合を集計した。6-10月の post-monsoon 期に感染数と感染率の上昇が見られた。

Giardia 感染者の74%に他の細菌或いはウイルスとの混合感染が見られた(図2)。

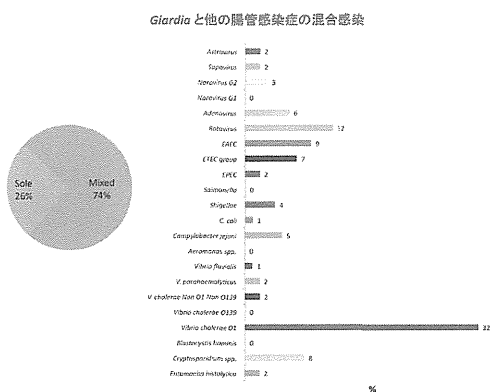


図2 Giardia感染における混合感染

2. コルカタ地区下痢症患者から分離された Giardia 株の遺伝子型別解析

Giardia 陽性者で有症者から無作為抽出された30%(58名)、下痢症状のない58症例から、同様に30%(17名)を抽出し、遺伝子型別を行った(表1)。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A 及び B が検出された。有症例・無症候例いずれからも Assemblage A では All と AIV が、Assemblage B では BIII と BIV が、発見された。サンプルサイズのため特定の遺伝子型への偏りは優位であると証明されなかった。

有症例からの59株

	Assemblages			
	A	B	D	E
No. of Samples	21			
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV
No. of Samples	12	9	29	6

無症例からの17株

	Assemblages			
	A	B	D	E
No. of Samples	6			
Sub assemblage	All	AIV	BIII	BIV
No. of Samples	2	4	7	4

表1 コルカタで分離されたジアルジアの遺伝子型別

3. 西ベンガル州の酪農場での家畜と人の感染実態調査

計180の仔ウシ、未出産の雌ウシ、成ウシから採取された糞便のうち、全体で、7%(12/180)のウシにジアルジア感染が見られた。特に仔ウシに高い感染(20/112, 18%)が見られた。検出された Assemblage は主に Assemblage E であったが、A も発見された。複数の Assemblage の同時感染も3例検出された。

一方酪農場の労働者でも高い感染が見られた(14/51, 27%)。Assemblage は A および、家畜からは発見されなかった B であった。E は発見されなかった。

4. 赤痢アメーバ分離株における 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。

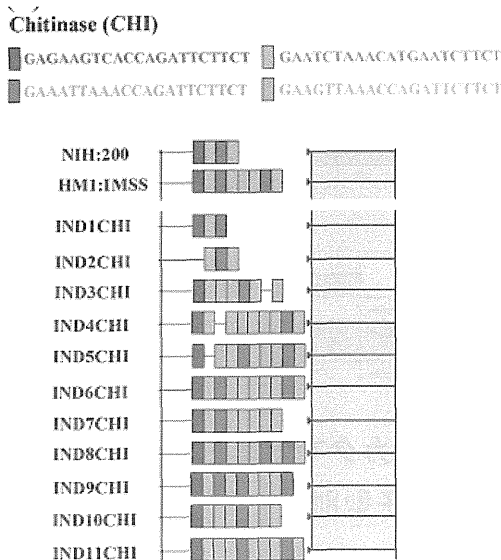


図3 Chitinase の繰り返し配列部分の多型を模式的に示した。NIH:200, HM1:IMSS は既報、IND1-11CHI は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

5. 赤痢アメーバ分離株における tRNA-STR の多型

D-A, R-R, NK2 遺伝子座の遺伝子配列を決定し、反復配列の近似性をもとに分類を行った。代表的な locus NK2 を例に図4に示す。

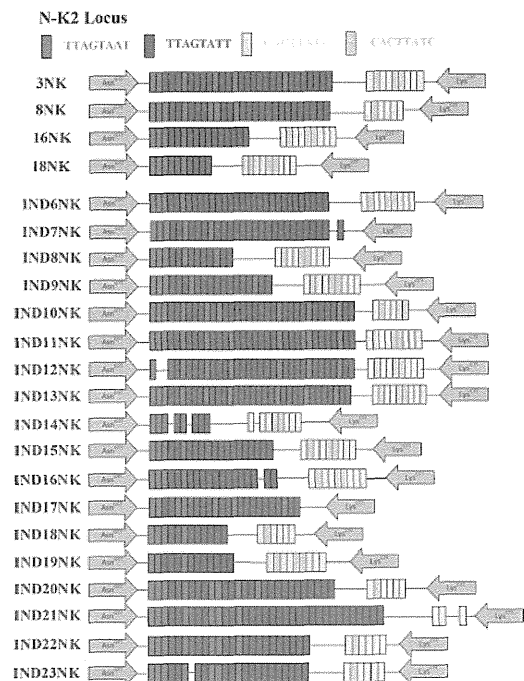


図4 tRNA-STR のNK2 locus の多型を模式的に示した。3NK, 8NK, 16NK, 18NK は既報、IND6-23NK は今回の解析で新しく発見された遺伝子型。

6. 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3)。

Loci	Repeat pattern	Liver abscess (LA)	Diarrheal (D)	Asymptomatic (AS)
D-AI	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 p = 0.0008 ^b	X ^c
R-R	IND11RR	X ^c	Co-eff: -0.619 ^a p = 0.0004 ^b	Co-eff: 0.286 ^a p = 0.0082 ^b
Chitinase (CHI)	NIH:200	Co-eff: -0.429 ^a p = 0.0014 ^b	Co-eff: 0.577 ^a p = 0.00001 ^b	X ^c
	HM1:IMSS	X ^c	Co-eff: -0.456 ^a p = 0.0173 ^b	X ^c

表3 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。

7. 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、肝臓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。

8. 赤痢アメーバにおける酸化ストレスによる細胞死と細胞内活性酸素種の産生

赤痢アメーバにおける酸化ストレス応答をモニターした。パラコートや過酸化水素に対して感受性を示した。更に、1mMのパラコートによる処理により時間依存的に細胞内のROSが上昇することが示された。

9. 代謝産物のプロファイリング

パラコート、過酸化水素を加え、継続的に1, 3, 6, 12時間後の代謝産物を抽出し、CE-ToFMS解析により、全代謝産物を計測した。図5に示すように、パラコート及び過酸化水素の処理により様々な代謝物の増減が観察された。多くの変化はパラコートと過酸化水素に共通していたが、いずれかに選択的に観察された変化も見られた。

図5 計測された全代謝産物の経時的変化(ヒートマップ: time 0を基準に減少を緑で増加を赤で示す)

Control(無処理)、パラコート、過酸化水素処理でそれぞれ1, 3, 6, 12時間後の代謝産物の変化を示す

10. 赤痢アメーバの酸化ストレスによる中心炭素代謝、ヌクレオチドリン酸、エネルギー量への影響

図6に上記データのうち、中心代謝(解糖経路を中心として)を示した。パラコートで過酸化水素に比してより高度な変化が見られたが、増減の方向は多く近似していた。解糖経路の中間代謝物、特に上流の代謝物の多くは、酸化剤への暴露により、上昇した。更に Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)が高度に蓄積した。

N-acetylglucosamine 6-phosphateを始めとして中心代謝は多くキチンの生合成経路にredirectされていた。この傾向は特にパラコート処理により顕著で、酸化ストレスが細胞分化の誘因因子であることが示された。

更に Erythrose 4-phosphate, Sedoheptulose 7-phosphate, Ribose 5-phosphateなどペントースリン酸経路への流入が増加していた。

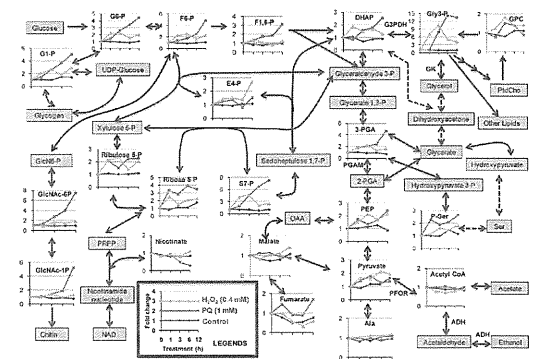
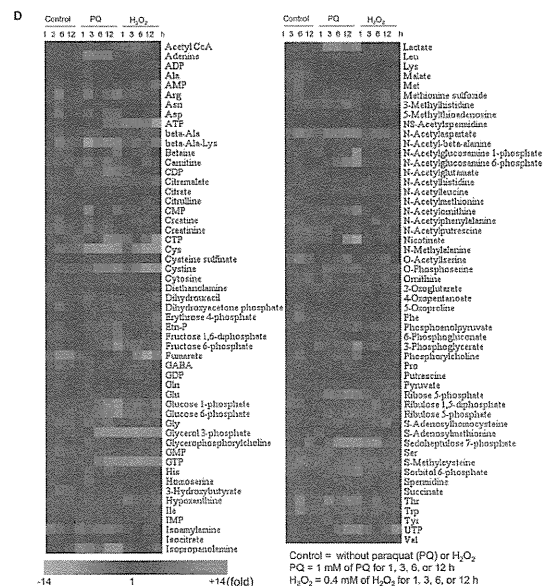


図6 酸化ストレス(赤, パラコート; 緑, 過酸化水素)による中心炭素代謝物の変化を示す

酸化ストレスのヌクレオチドリン酸への影響は、パラコートと過酸化水

素で似ていたが、増減は過酸化水素により、より強く見られた。過酸化水素暴露では、特にATPが増減し、ADP、AMPは時依存的に減少した。同時にEnergy chargeは過酸化水素処理により、40-50%減少し、細胞内でのエネルギーの枯渇が生じていることが確認された。

11. 酸化ストレスによる解糖経路及び発酵に関する酵素の活性、グリセロール、エタノール、酢酸の細胞内濃度への影響

パラコートにより、解糖経路及び発酵（特にエタノール・酢酸発酵）に関する酵素の活性が影響されるか、検証した。特に、Phosphoglycerate mutase 及び Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase が強い活性阻害を受けた。パラコート暴露はエタノール量を約半分に減らした、一方、グリセロールは14倍蓄積した。酢酸量は変化が見られなかった。

D. 考察及び結論

ジアルジア症・クリプトスポリジウム症・赤痢アメーバ症は世界でも国内でも腸管原虫症の中で最も感染者が多く、注視すべき原虫感染症である。しかし、その病原機構・酸化ストレス耐性機構・細胞分化・遺伝子発現制御を始め不明な点が多い。更に、感染後発症を決定する因子・マーカーは特定されていない。従って、分子疫学的解析が極めて重要であり、本研究では東インドコルカタ周辺における腸管原虫症の感染実態を明らかにした。

ジアルジア症に関する重要な知見は第1に、約10%の人の下痢症例からジアルジアが発見され、下痢の主要な原因病原体であった。第2に多くの感染例が他の病原細菌・ウイルスとの混合感染であり、他の病原体の感染の発症や重症度などを修飾する可能性が示唆された。第3に、人の感染は主に15才以下の小児に検出され、小児の栄養不良・身体と知育の成長阻害の

要因となる可能性が確認された。第4に、酪農場のウシ並びに労働者から高い感染が確認され、コルカタ周辺地域でも動物由来感染症としての像が確認された。しかしながらウシから検出された遺伝子型と酪農場労働者から検出された遺伝子型とは大きな偏りがあり、酪農場でもAssemblage A及びBのヒト-ヒト感染が主要であると考えられた。

更に、赤痢アメーバに関する有意義な成果を収めた。特にインドにおける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、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た。

更に、赤痢アメーバのマーカー遺伝子座の特定の遺伝子型が病型と相関していることは画期的な発見であった。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症例数を増やして検討する必要がある。

ジアルジア・赤痢アメーバの病原機構・酸化ストレス耐性機構に関する日印共同で研究を推進した。

CE-ToFMSを用いた代謝産物の網羅的同定により2種類の酸化ストレスに暴露された赤痢アメーバ栄養型から約100の極性を有する代謝物の同定・定量が達成された。代謝物を抽出し、CE-ToFMSを用いて網羅的代謝プロファイリングを行った。これにより、極めて新規性の高い多くの発見をした。第一に、酸化ストレスにより解糖経路が停止し、その代謝フラックスがキチン合成、ペントースリン酸経路へ方向転換されることを発見した。同時に細胞内エネルギー量が減少し、総合すると、酸化ストレスにより、エネルギー

ギーを消費するとともに、新規エネルギー合成を解糖経路で行わなくなることが示された。第二に、酸化ストレスにより、グリセロール 3 リン酸を介したグリセロールの合成、同時に ATP の合成が行われることが明らかとなった。これにより、解糖経路、エタノール発酵による ATP 合成がグリセロール発酵による ATP 発酵に転化されていることが明らかとなった。今後これらの代謝変化が、ジアルジア等他の嫌気的原虫でも見られるかを、同様の方法により、NICED との共同研究により確認することができれば、嫌気的腸管原虫全般における代謝の抗酸化ストレス応答を一般化・普遍化できると予想される。

以上、本研究はジアルジア症・赤痢アメーバ症に関して、疫学・分子疫学・酸化ストレス応答の機構解析など様々な分野で優れた成果を挙げることができた。本研究班により得られた成果を時期研究班で更に発展させることにより、NIID と NICED との原虫症のモニタリングと病原機構解明や代謝解析の基盤的プラットフォームの共有、共同研究の推進を果たしたい。

E. 健康危険情報 該当せず

F. 研究発表

1. 論文発表

- (i) Khan, S. M., Debnath, C., Pramanik, A. K., Xiao, L., Nozaki, T., and Ganguly, S. (2011) Molecular evidence for zoonotic transmission of *Giardia duodenalis* among dairy farm workers in West Bengal, India. *Vet Parasitol.* 178, 342-345.
- (ii) Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T., and Nozaki, T. Dramatic increase in glycerol biosynthesis upon oxidative

stress in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1831, 2012.

- (iii) Mishra, V., Kumar, A., Ali, V., Nozaki, T., Zhang, K. Y., and Bhakuni, V. Novel protein-protein interactions between *Entamoeba histolytica* d-phosphoglycerate dehydrogenase and phosphoserine aminotransferase. *Biochimie.* 94, 1676-1686, 2012.
- (iv) 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 感染症制圧に向けた取組みにおいて重要である。各 HLA アレル頻度は人種間で大きく異なるため、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として重要な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、HLA 関連 HIV 変異同定に向け、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。解析結果では、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルが見出された。このうち、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 感染症制圧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は以下のように進められてきた。

(1) 1980年代からの主に env 領域の解析に基づく多様性に関する研究：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ている。

(2) 1990年代後半の抗レトロウイルス薬治療導入以降の主に pol 領域の解析に基づく薬剤耐性変異に関する研究：逆転写酵素阻害剤やプロテアーゼ阻害剤等の抗レトロウイルス薬に対する耐性変異の同定が進められてきた。

(3) 近年の主に gag 領域の解析に基づく HLA 関連

変異に関する研究：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) の遺伝子型を各々の HIV 感染者について決定し、HIV ゲノム変異の解析結果とあわせて HLA 関連変異を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питープの提示に関与する HLA 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、その解析研究が進められている。特に最近、Gag 抗原特異的 CTL の有効性が示唆されていることから、gag 領域の解析が先行している。

本研究は上記(3)の HLA 関連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。近年、抗 HIV 薬投与により HIV 複製のコントロールが可能となったが、その複製抑制には CTL 反応が不可欠であるこ

とも知られている。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、インドはアジアにおける HIV 感染流行地域の一つとして重要な対象地域である。そこで本研究では、インド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、HLA 遺伝子型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

インド国の HIV 感染者由来の末梢血リンパ球より抽出されたゲノム DNA を用い、HLA タイピング (遺伝子型決定) を行った。また、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った。これらの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

インド国の HIV 感染者 14 名の末梢血リンパ球より得られた DNA を用い、東京医科歯科大学難治疾患研究所の木村先生・成瀬先生の協力のもと HLA-A、HLA-B、HLA-C 遺伝子型を同定した (表 1)。HLA-A アレルでは、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

で見出されたが、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。その中で 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、インド人の HLA 遺伝子型同定法を確立し、HIV 感染者検体を用いた解析で、HLA-A、HLA-B および HLA-C 各々について、比較的頻度の高いアレルを見出した。その中で、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、そのうちの 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。

HIV 流行地域では、HIV 感染者集団における HLA 関連変異蓄積の可能性が示唆されている。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 NICED との共同研究で、インド国 HIV 感染者における HLA 遺伝子型同定を行った。さらに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。