

令和6年度（2024年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2022B03	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	宮原 敏
	所属機関名	産業医科大学 医学部微生物学
	職 名	講師
研究課題名	レプトスピラ症の Point of Care Testing を目指した尿中抗原検査の開発	
研究期間	令和4年度～令和6年度：（3年間）	
本センター担当教員	西園 晃	

令和6年度（2024年度）研究成果の概要

マイクロ流路型 PCR 装置を用いたダイレクト PCR 法の開発

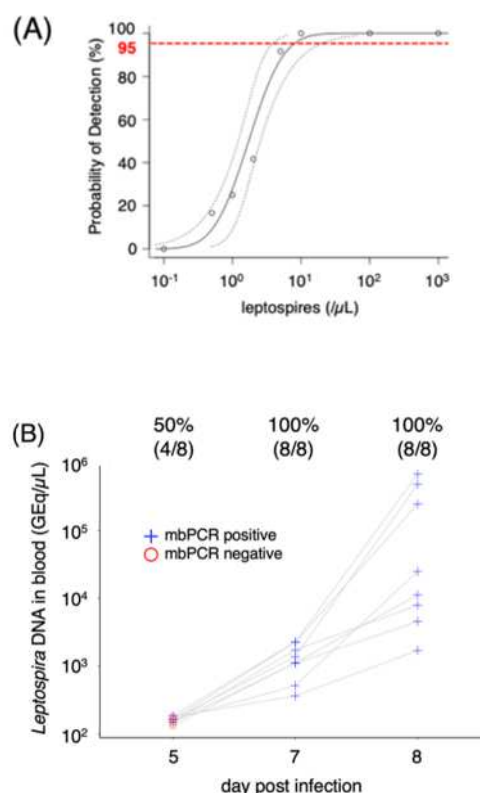
昨年度から継続して、マイクロ流路型 PCR 装置（PicoGene PCR1100）を用いた、血液検体からダイレクトに菌体 DNA を検出する検査法の開発を行った。

まず、*Leptospira interrogans* L495 株から精製した DNA を用いて、検出に使用する PCR 条件を設定した。プライマー、プローブ配列については、16S rRNA 遺伝子をターゲットにする配列が最も感度が高いことがわかった。KAPA 3G Plant PCR kit を使用し、DNA ポリメラーゼ濃度、Mg 濃度、PCR 温度条件について最適化した。この条件下では、病原性レプトスピラ 14 株の DNA に対して PCR 陽性を示し、非病原性レプトスピラ 3 株に対しては PCR 陰性となることが確認された。

次に、DNA 抽出を省略して、菌体自体を PCR 試薬と混ぜて PCR を行うダイレクト PCR の性能を検証した。L495 株の生菌を PBS で段階希釈した菌液を用いてダイレクト PCR を行い、検出限界を Probit 法で推定したところ、7.78 個/μL (95%信頼区間 3.83-15.8 個/μL) であった（図 A）。DNA 抽出を省略しても DNA が検出できる理由として、マイクロ流路内で大部分の菌体が壊れて細胞外に DNA が放出されることが確認された。さらに EDTA 処理したハムスター全血で段階希釈した菌液を用いてダイレクト PCR を行ったところ、100 個/μL までは 100% 検出されることがわかった。また血液からのダイレクト PCR は、ヒトの全血でも同様に検出できること、抗凝固薬（EDTA、ヘパリン、クエン酸ナトリウム）の種類を問わず検出できることが示された。

最後に、ハムスター感染モデルを用いて、血液からのダイレクト PCR の有効性を検証した。4 週齢の雄シリアンハムスター 8 匹に *Leptospira interrogans* L495 株を経皮感染させ、感染 5、7、8 日目に採血し、血液 1 μL を使用するダイレクト PCR と、血液 100 μL から抽出した DNA を使用する従来法のリアルタイム PCR の結果とを比較した（図 B）。ダイレクト PCR を用いて 5 日目は半数の個体（4/8）、7 日目以降では全ての個体からレプトスピラ DNA が検出された（8/8）。従来法のリアルタイム PCR の結果と合わせて、 10^2 個/μL 以上血中に菌体が存在すれば、感染動物の血液 1 μL からダイレクト PCR でレプトスピラが検出できることが明らかとなった。以上の結果より、PicoGene PCR1100 を使用したダイレクト PCR は、迅速で簡便な PCR 検査を可能とするため、将来的にレプトスピラ症の Point-of-care 検査としての活用が期待される。

本研究の遂行にあたり、グローバル感染症研究センター教員の技術的サポートを受けた。実験の一部をセンター所有の PicoGene PCR1100 を借用して行った。



Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2022B04
Name	Mamun Al-Mahtab
Affiliated Organization	Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University (BSMMU), Bangladesh
Job Title	Head, Division of Interventional Hepatology
Research Topic	Analysis of Molecular Mechanism of Severe Disease Caused by the Dengue virus Infection and Development of a Multiple Rapid Diagnostic System
Research Period	FY2022 ~ FY2024 (3year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Sakirul Khan

Summary of Research Results for Fiscal Year 2024

Dengue, a life-threatening mosquito-borne disease caused by the dengue virus (DENV), has become a severe problem in Bangladesh. This study critically analyzes factors contributing to the rising dengue burden and discusses control strategies. Dengue-related deaths have surged since 2021, with 2023 recording the highest fatalities—1,705 deaths, surpassing the total deaths from 2000 to 2022 (853 deaths) (Fig. 1). Over the past three years, Bangladesh has recorded the highest dengue fatality rates among endemic countries. Besides the environmental factors, which are also applicable to many other dengue-endemic countries, there is concern about the failures and mismanagement of authorities to manage dengue patients properly.

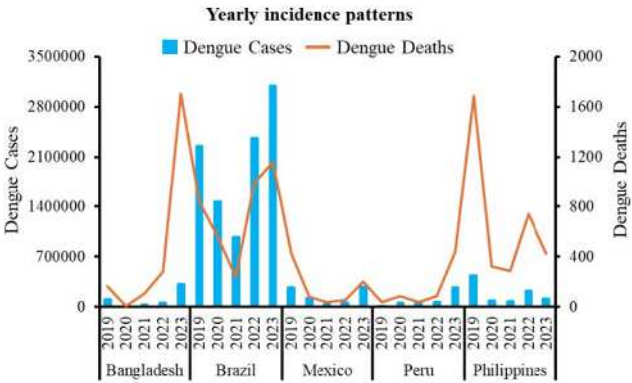


Fig. 1. Bangladesh reported record-high dengue deaths in recent years (Khan et al., IJID Regions, 2024).

For clinical analysis, our cohort study (during 2021–2023) revealed that approximately 50% of dengue patients tested positive for DENV IgG, while more than 80% tested positive for SARS-CoV-2 IgG. This indicates that many dengue patients in Bangladesh had prior DENV and SARS-CoV-2 infections during this time. Patients with both DENV IgG and SARS-CoV-2 IgG exhibited more severe disease than those with only DENV IgG or SARS-CoV-2 IgG (Fig. 2). Notably, a positive correlation ($r = 0.90$) was observed between higher SARS-CoV-2 IgG titers and severe dengue. Additionally, a shift in DENV serotypes was detected during the study period.

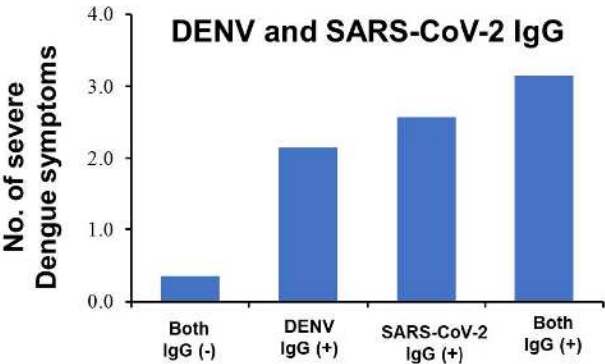


Fig. 2. Correlation between the numbers of presented severe dengue fever symptoms and titers of IgG against N-protein of SARS-CoV-2 and DENV (Manuscript under preparation).

DENV-3 was predominant in 2021 and 2022, while DENV-2 emerged as the dominant serotype in 2023 when Bangladesh recorded the world's highest number of dengue-related deaths. Collectively, altered immunity due to prior DENV and SARS-CoV-2 infections, coupled with shifting DENV serotypes, may have contributed to the severe dengue burden observed in recent years in Bangladesh. Besides these viral-host factors, our preliminary results (Fig. 2 in Form 1) suggest that chronic exposure to high air pollutions to develop severe dengue which will be investigated in Fiscal Year 2025 and 2026.

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2022B05	
申請者(研究代表者)に関する事項	氏 名	川端 重忠
	所属機関名	大阪大学 大学院歯学研究科
	職 名	教授
研究課題名	細胞壁分解酵素が耐性遺伝子の伝播に果たす役割の解明	
研究期間	2022年度～2024年度：(3年間)	
本センター担当教員	三室 仁美, 三好 智博	

令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要

肺炎球菌は、mitis 群のレンサ球菌であり、肺炎や敗血症の主な原因菌の一つとして知られている。肺炎球菌の特徴として、自身の細胞壁分解酵素 LytA などによる自己融解を引き起こすことが挙げられる。本研究計画では、細胞壁分解酵素を含む細胞壁に関連する因子が薬剤耐性や病態に及ぼす影響を明らかにするために解析を行った。

以前に収集したゲノム情報を精査し、肺炎球菌 12,592 株のゲノム情報を用いた細菌ゲノムワイド関連解析を再実施した。その結果、コア遺伝子の 6,643 箇所が存在する SNP とパンゲノム 42,473 遺伝子上の 1,365 遺伝子がそれぞれ侵襲性と有意に関連することが示された。細胞壁分解酵素 LytA および LytB の存在が侵襲性感染症の病態と有意に関連したほか、複数の細胞壁合成経路に関わる遺伝子が病態と関連する遺伝子として複数検出された。本解析の結果から、細胞壁の分解および合成が病態形成に寄与する可能性が示された。

表. 条件間で頻度の有意に異なる変異. もっとも p 値の低い 30 箇所の変異を表示した。各条件における変異頻度の Z-score は、正の値を赤色、負の値を青色、0 付近を白色で表示した。

Variants	p-value	Number of mutated strains						Z-scores	Genes	Descriptions	AA	Ref.	Alt.
		D1_8w	D2_8w	D1_75w	D2_75w	Broth							
12305_G_A	3.88E-43	145	66	108	107	238			spn:SP_0012	hpt; hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	165	R	H
395610_G_T	1.76E-35	322	128	148	168	264			spn:SP_0416	transcriptional regulator, MarR family	129	M	I
972509_CT_C	9.53E-25	96	79	45	58	171							
136998_ATTATT_A	1.40E-23	37	42	38	41	122							
137004_T_A	6.24E-23	38	43	38	42	122							
137005_G_GAATAAA	6.24E-23	38	43	38	42	122							
681405_G_C	3.08E-20	0	0	0	0	26			spn:SP_0715	lctO-2; lactate oxidase	326	V	L
1667520_G_GC	4.20E-16	97	66	67	73	160			spn:SP_1764	glycosyl transferase, family 2	71	A	G
273577_CG_C	3.45E-15	328	196	162	170	274							
625261_T_A	1.76E-13	0	1	0	0	19			spn:SP_0652	conserved hypothetical protein	138	D	E
1323748_T_C	1.92E-13	105	85	19	28	53			spn:SP_1400	putative phosphate ABC transporter, phosphate-binding protein	64	Q	P
701517_G_A	2.89E-13	101	80	21	25	42			spn:SP_0739	transcriptional regulator, MerR family	7	A	T
476408_G_T	5.28E-13	310	183	151	170	269							
1957094_A_T	3.26E-12	2	1	0	1	21			spn:SP_2056	nagA; N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	149	G	G
2110931_G_A	4.14E-12	109	86	24	27	79			spn:SP_2190	cbpA; choline binding protein A	389	A	D
2018330_A_AG	5.28E-12	259	168	140	154	258							
1696085_A_AC	1.42E-11	241	152	143	151	248							
1874983_G_A	1.54E-11	343	210	178	184	274			spn:SP_1967	conserved hypothetical protein	302	Q	K
1695199_G_GT	7.87E-11	234	147	144	147	241							
36116_C_CG	1.44E-10	25	15	25	18	63							
2147570_AGAT_A	1.63E-10	19	28	25	16	63							
168292_TC_T	2.70E-10	336	195	178	194	272			spn:SP_0200	ocs4; competence-induced protein Ccs4	428	S	Y
87527_T_C	5.27E-10	251	148	137	134	236			spn:SP_0082	cell wall surface anchor family protein	410	N	N
2046600_C_T	8.85E-10	113	88	84	75	157							
192435_G_GC	1.74E-09	347	205	176	200	273			spn:SP_0206	hypothetical protein	93	A	A
247805_A_G	1.84E-09	298	184	158	172	266			spn:SP_0272	rpsG; ribosomal protein S7	90	K	E
730678_C_T	4.20E-09	309	173	134	175	242							
2147566_T_TATC	4.89E-09	22	28	24	17	62							
1985217_A_AG	4.97E-09	338	198	181	198	271			spn:SP_2076	pseudogene	758	S	SD
737108_A_G	7.46E-09	334	205	161	179	263			spn:SP_0784	gor; glutathione reductase	382	C	G

さらに、生体への感染が肺炎球菌の遺伝子変異に及ぼす影響を検討するため、以前に実施した培地中での肺炎球菌ならびに感染マウスの肺胞洗浄液に対する細菌シングルセルゲノムシーケンシングのデータを、クオリティチェックののちに再解析した。その結果、一菌体あたりの変異率は培地中と感染 1 日後の若齢マウスの肺胞洗浄液中において低く、感染 1 日後の老齢マウスの肺胞洗浄液中の変異率は有意に高かった。

その一方で、各条件間で変異率の異なる座位を統計学的に抽出したところ、最も p 値の低い 30 座位のうち 27 座位では培地中の変異率が肺胞洗浄液と比べて有意に高かった（表）。細胞壁の分解および合成に関与する遺伝子群における突然変異率に差を認めなかった一方で、**macrolide efflux protein** をコードする同一遺伝子内に培地中に変異率の高い 9 箇所の変異が検出された。以上から、培地中とマウスへの感染過程との間で異なる突然変異プロファイルが、感染や薬剤耐性に寄与する可能性が考えられた。

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2022B06	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	菊池 秀彦
	所属機関名	尚絅大学短期大学部 食物栄養学科
	職 名	教授
研究課題名	腸管マクロファージの活性酸素産生能に及ぼすフィトケミカル類の影響の解明	
研究期間	令和 4 年度 ～ 令和 6 年度：（3 年間）	
本センター担当教員	三室 仁美	
令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要		
単球から分化するマクロファージの活性酸素（スーパーオキシド O_2^-）産生能は、病原細菌感染に対する宿主応答として重要である。海外の一部の国で漢方薬の原料として用いられるウマノスズクサ科の植物が含有するアリストロキア酸 (AA) は重篤な腎障害を起こす毒性物質として知られている一方、ウマノスズクサ科植物を摂食するジャコウアゲハは AA を体内に蓄積することによって鳥等の捕食から逃れているという興味深い報告もある。また、AA には複数の誘導体が存在しているが、誘導体ごとの生理活性については殆ど調べられていない。本年度の研究では、ヒト U937 細胞（マクロファージへの分化能を有する単球系株細胞）の生存率と all-<i>trans</i> レチノイン酸 (ATRA) 誘導性 O_2^- 生成能力に対する 4 種類の AA 誘導体 (AA-A、AA-B、AA-C 及び AA-D) の影響を調査した。AA-A と AA-C は ATRA と併用した場合、細胞生存率を著しく低下させたが、AA-B と AA-D は U937 細胞の生存率にはほとんど影響を与えなかった。一方、4 つの AA 誘導体のうち AA-C のみが ATRA 誘導性 O_2^- 生成能力を劇的にアップレギュレーションした。定量的 RT-PCR および免疫ブロット分析により、AA-C は食細胞の O_2^- 生成能力に必須の因子である gp91-phox の遺伝子発現レベルのアップレギュレーションを介して、ATRA 誘導性 O_2^- 生成能を著しく増強することが示された。これらの知見によって、AA-C が ATRA 増強細胞毒性効果だけでなく、gp91-phox 遺伝子の転写増強を介して ATRA 誘導性 O_2^- 生成能力を著しく高める効果も有することが明らかになった。加えて、本年度は、紅麹による健康被害の原因物質と目されているプベルル酸についても U937 細胞機能に対する影響を調査した。		

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2022B08	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	中川 一路
	所属機関名	京都大学 大学院医学研究科
	職 名	教授
研究課題名	細胞内感染による感染叢のヘテロジェナイティ誘導機構の解析	
研究期間	令和 4 年度 ～ 令和 6 年度：（3 年間）	
本センター担当教員	三室 仁美	

令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要

2024 年度は細菌のゲノム変異を誘導する宿主因子と環境要因についての解析を行った。宿主因子側では 203 年度にすでにオートファジー形成の必須因子である Atg5 及び Atg7 欠損細胞を用いた解析によって変異誘導が起きないことから、宿主内での変異誘導に関わる直接的な因子の解析を行った。オートファジー変異細胞で誘導が起きなかったことから、DNA に直接変異誘導に関わる因子として可能性が高いものとして、宿主細胞内での活性酸素種あるいは過酸化水素の存在の可能性が示唆された。そこで、in vitro の実験系を用いて培地内に過酸化水素存在化での変異誘導の有無および変異部位について次世代型シーケンサーを用いた解析を行った。その結果、臨床分離株に認められたものと同様の変異体が出現し、特に莢膜過剰産生株の出現が見られた。さらに、細胞内に感染させた菌を回収し、その後、好気培養、嫌気培養の条件下で培養したところ、嫌気培養で行った菌では変異がほとんど出現しなかったことから、酸素種への曝露が変異誘導に関与していることが明らかとなった。さらに、培養温度についても解析を加えた。培養温度を 37℃から 28℃に変更したところ、28℃で培養した菌では臨床分離株で認められたのと同様の変異パターンを持つ菌が多数観察された（図 1）。このことから菌の高病原化に関わる因子としては、酸化ストレス、温度双方の因子が必要であることが示された。さらに、オルガノイドを用いた感染実験系の構築を試みた。オルガノイドは、三室教授の専門とするヘリコバクター・ピロリへの感染系の確立として目指したが、胃粘膜を模した粘膜産生が十分に認められず、感染そのものは認められるものの感染細胞数が非常に少なかった。現在用いられているオルガノイドは、呼吸器ウイルス感染では使用可能であるが、細菌感染系の確立には、含まれる細胞種の調整が今後必要になることが予測された。

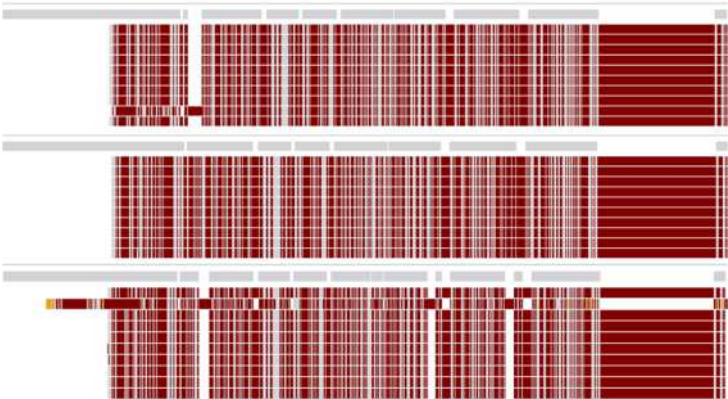


図 1:温度ストレスによる変異導入部位の解析
温度ストレスによって高病原化に関わる多数の変異が導入されるこ

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2022B14
Name	Subsomwong Phawinee
Affiliated Organization	Hirosaki University Graduate School of Medicine
Job Title	Assistant Professor
Research Topic	Identification of protein markers in extracellular vesicles derived from <i>Helicobacter pylori</i> -infected gastric cell lines by using LC-MS/MS
Research Period	FY2022 ~ FY2024 (3years)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yamaoka, Yoshio

Summary of Research Results for Fiscal Year 2024

Helicobacter pylori has been classified as a type I carcinogen and is a major contributor to the high incidence of gastric cancer (GC), especially in Eastern Asia. *H. pylori* virulence factors are associated with disease severity and long-term patient outcomes. Individuals infected with the East-Asian type CagA, vacA s1m1 genotype have a higher risk of developing GC compared to those infected with the CagA-negative vacA s2m2 genotype. Extracellular vesicles (EVs) are membrane-enclosed structures with potential as biomarkers for various cancers and diseases. However, the protein markers in EVs for predicting *H. pylori* infection and GC remain unknown. This study aims to identify proteins within EVs derived from a gastric epithelial cell line (AGS) infected with *H. pylori* by using LC-MS/MS. In FY2023, we identified differentially expressed proteins (DEPs) in AGSEVs-Tx30a vs. AGSEVs-NI and AGSEVs-TN2wt vs. AGSEVs-NI. In AGSEVs-Tx30a, 48 proteins were upregulated and 5 were downregulated compared to AGSEVs-NI. In AGSEVs-TN2wt, 9 proteins were upregulated and 25 proteins were downregulated compared to AGSEVs-NI. Over the past decades, many studies have proposed protein markers for diagnosing gastrointestinal cancers; proteins such as ATP6V0A1, CAP1, FTL, GAPDH, GNA13, GSK3 β , HDAC1, HINT1, PCNA, RBX1, and TUBB have been associated with GC. In FY2024, we focused on candidate protein markers. Bioinformatic analysis of AGSEVs-TN2wt vs. AGSEVs-NI revealed that ATP6V0A1 and RBX1 showed the highest fold changes in up/down-regulation among other DEPs, reaching statistical significance. In the AGSEVs-Tx30a vs. AGSEVs-NI comparison, only HDAC1 reached statistical significance. Based on these findings, we propose ATP6V0A1, RBX1, and HDAC1 as potential GC-related EV biomarkers for *H. pylori* infection. Additionally, we conducted a proteomic analysis of *H. pylori*-derived EVs. The publication of this study can be accessed via PMID: 40033163 or DOI: 10.1111/hel.70022.

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2023B08	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	茂呂 和世
	所属機関名	大阪大学 大学院医学系研究 感染症・免疫学講座 生体防御学教室
	職 名	教授
研究課題名	2 型自然リンパ球による寄生虫感染防御の解明とその応用	
研究期間	2023 年度 ～ 2024 年度：(2 年間)	
本センター担当教員	小林 隆志	

令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要

これまでに、2 型自然リンパ球（ILC2）によって誘導される「Innate IgE」が、抗原に依存せず 2 型免疫応答を増強する機能を持つことを明らかにしてきた。本共同研究では、この機能を活用し、さまざまな寄生虫に対する感染防御効果を持つ革新的なワクチンの創出を目指して、Innate IgE の産生機構の解明を目的としている。

前年度には、B 細胞特異的に TRAF6 を欠損させたマウス（CD19CreTraf6f/f）を用いた解析により、このマウスでは Innate IgE の産生が亢進し、2 型免疫応答の指標である好塩球性炎症が増強されることを見出した。令和 6 年度には、この CD19CreTraf6f/f マウスを用いてより詳細な解析を行った。

定常状態においては、成長とともに血清中に微量ながら Innate IgE が産生される。今回、定常時における Innate IgE 産生の影響を調べたところ、CD19CreTraf6f/f マウスでは顕著な IgE 産生の亢進が確認された。特に、週齢が進むにつれて血清 IgE 濃度は上昇し、34 週齢以降にその上昇は顕著であった（図 1）。さらに、このマウスの好塩基球を解析した結果、定常状態にもかかわらず、通常は活性化時にみられる細胞の肥大化が観察された。これらの結果は、CD19CreTraf6f/f マウスでは IgE 産生が亢進し、それに伴って好塩基球が活性化されていることを示唆している（図 2）。すなわち、Innate IgE の増加が好塩基球の活性化に直結している可能性が示された。次に、Traf6 を標的とすることで Innate IgE の産生亢進および好塩基球のエフェクター機能の活性化が誘導可能かを検証するため、Traf6 阻害剤 CD25-140 を用いた解析を行った。しかしながら、予想に反して IgE 産生には有意な変化が認められなかった。この結果は、Traf6 が多様な細胞で発現していることから、IgE 産生に関しては B 細胞に特異的な Traf6 の抑制が必要であることを示唆している。今後は、CD19CreTraf6f/f マウスにおいて IgE を産生する B 細胞サブセットの同定を進めるとともに、Innate IgE 産生における Traf6 シグナルの役割を詳細に解析していく予定である。

図1：定常時の総IgE（左）、週齢別の総IgE（右）

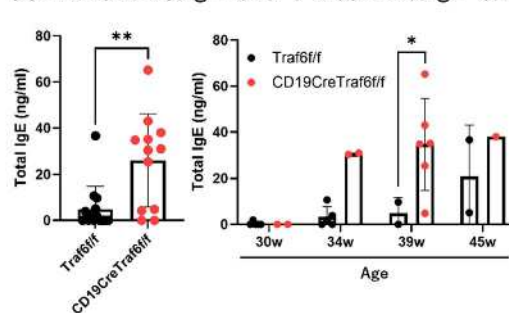
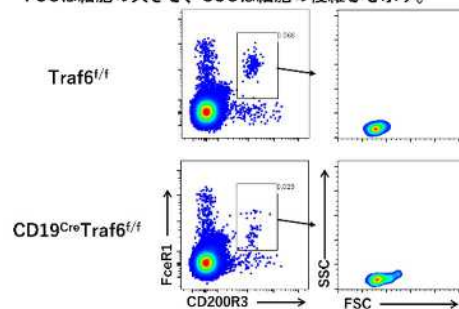


図2：CD19CreTraf6f/fマウスにおける好塩基球の解析
FSCは細胞の大きさ、SSCは細胞の複雑さを示す。



研究打ち合わせおよびセミナー

2025 年 1 月 10 日、大分大学感染予防医学講座 123 号室にて本研究に関する研究打ち合わせを行った。さらに同日、第 35 回グローバル感染症セミナー「エブネル腺導管 IL-33+細胞と舌免疫系ネットワークが織りなす組織バリア調節」を実施した。

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023B09																																					
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	森 大輔																																				
	所属機関名	熊本大学病院 中央検査部																																				
	職 名	臨床検査技師長																																				
研究課題名	マレーシアサバ州における SFTS ウイルスを中心としたダニ媒介感染症の網羅的検索																																					
研究期間	令和 5 年度 ～ 令和 6 年度：（2 年間）																																					
本センター担当教員	八尋 隆明																																					
令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要																																						
本共同研究は、ボルネオ島に位置するマレーシア国サバ州におけるヒトおよび霊長類に対する SFTSV の感染分布を把握し、重症化を制御するための迅速診断システムを構築し普及させることを目的とする。これまで、サバ州における以下の地域もしくは各症例において収集されたヒト血清を用いて、SFTS 抗体の保有の有無について、マレーシア国立サバ大学ボルネオメディカルリサーチセンターにて、今年度は以下 [G] 地区の調査を実施した。抗体検出には、八尋隆明講師および西園晃教授よりご提供頂いた SFTSV 抗体検出法（ELISA 法）を用いた。マレーシア国サバ州での現地調査についても、本申請者と八尋講師で協働して ELISA 法を実施した。 ・山間部にある Kudat 地域において健常人より収集された 2,089 例 [A] ・山間部の Kota Marudu 地域において発熱症状が認められた 400 例 [B] ・日本脳炎流行地域において患者家族等より収集された 63 例 [C] ・ごみ収集関連の業務に携わる職員より収集された 348 例 [D] ・レプトスピラ症発症疑いが認められた 300 例 [E] ・デング熱発症疑いが認められた 102 例 [F] ・海沿いにある Lahad Datu 地域において健常人より収集された 1,420 例 [G] なお、これらのヒト血清はボルネオメディカルリサーチセンターの－80℃において保管されている。以上の症例を用いて実施した結果（陽性数、陽性率(%)）は、以下の通りである。 <table><tr><th>地域・症例</th><th>[A]</th><th>[B]</th><th>[C]</th><th>[D]</th><th>[E]</th><th>[F]</th><th>[G]</th><th>Total</th></tr><tr><td>検査数</td><td>2,089</td><td>400</td><td>63</td><td>348</td><td>300</td><td>102</td><td>1,420</td><td>4,722</td></tr><tr><td>陽性数</td><td>53</td><td>6</td><td>2</td><td>8</td><td>4</td><td>11</td><td>1</td><td>85</td></tr><tr><td>陽性率 (%)</td><td>2.5</td><td>1.5</td><td>3.2</td><td>2.3</td><td>1.3</td><td>10.8</td><td>0.1</td><td>1.8</td></tr></table> これまでの調査では、検査数 4,722 例、陽性数 85 例、陽性率は 1.8%であった。これらの陽性率は、他国と同様な値であったが(PLoS One. 2017 Apr 11;12(4):e0175592.)、山間部地域の住民に高い陽性率の傾向が見受けられた。 これらの抗体検出結果は、現時点では間接的に SFTS ウイルスの存在が証明されたにすぎない。また、非特異的な反応で偽陽性が存在するかもしれないため、[A]地区において抗体陽性であった 53 例について、長崎大学の Myat 准教授に依頼し中和抗体試験を実施した。その結果、6 例において中和試験陽性であった。 以上の結果より、マレーシアサバ州において SFTSV の存在とヒトにおいて感染を引き起こしていることを初めて証明することができ、現在論文投稿準備中である。			地域・症例	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]	[G]	Total	検査数	2,089	400	63	348	300	102	1,420	4,722	陽性数	53	6	2	8	4	11	1	85	陽性率 (%)	2.5	1.5	3.2	2.3	1.3	10.8	0.1	1.8
地域・症例	[A]	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]	[G]	Total																														
検査数	2,089	400	63	348	300	102	1,420	4,722																														
陽性数	53	6	2	8	4	11	1	85																														
陽性率 (%)	2.5	1.5	3.2	2.3	1.3	10.8	0.1	1.8																														

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2023B11	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	金城 徹
	所属機関名	琉球大学病院 光学医療診療部
	職 名	講師
研究課題名	沖縄県離島患者を対象としたヘリコバクター・ピロリのゲノム解析研究	
研究期間	令和 5 年度 ～ 令和 6 年度：(2 年間)	
本センター担当教員	山岡 吉生	
令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要		
本研究は山岡吉生教授の研究とともに行っているものであり、我々は沖縄県の症例に注目して症例を集積している。2025 年 3 月現在、県立宮古病院からは 71 例、琉球大学病院からは 14 例、県立宮古病院からは 8 例の登録をしている。宮古島 23 株、沖縄本島 6 株のピロリ菌については、大分大学グローバル感染症センターにて全ゲノムシーケンス及びゲノム解析を行い、宮古島（hspEAsia-sg6(Okinawa)15 例、hspEAsia-sg7(Hondo)2 例、hspEAsia-sg8(NortheastHondo)1 例、hspEAsia-sg2(Southeast China)1 例、hpEurope 2 例、hspOkinawa 2 例）、沖縄本島（hspEAsia-sg6(Okinawa)2 例、hspEAsia-sg2(Southeast China)1 例、hpEurope 1 例、hspOkinawa 1 例、hpRyukyu 1 例）が判明した。 現在、山岡吉生教授の教室で並行して行われている研究の成果として、日本国内に分布するピロリ菌について、新たに青森県のピロリ菌を加えると共に各地域のピロリ菌株数を増やし集団構造解析（fineSTRUCTURE 解析）を行ったところ、hspEAsia のピロリ菌は、主に北本土型（hspEAsia-sg8）、本土型（hspEAsia-sg7）及び沖縄型（hspEAsia-sg6）に分離した。hspEAsia-sg8 は主に本道北東部の青森県に分布していたのに対し、hspEAsia-sg7 は日本列島のその他の地域で優勢であり、北海道でも優勢であった。 ヒトゲノムにおける本土北東部の祖先遺伝子が日本や朝鮮の古代集団と類似性を示すこと、そして hspEAsia-sg8 が hspEAsia 祖先遺伝子の割合が最も高いことを考慮すると、hspEAsia-sg8 は日本への初期の hspEAsia の流入を示し、本土北東部で他のサブグループと混血することなく分化した可能性がある。CagA を欠損する hspOkinawa は、hspMaori および hspIndigenousAmerica との混合によって形成された可能性が以前の報告で示唆されているが、本研究では、hspOkinawa 株の祖先構成は主に hspEAsia と hpNorthAsia から構成されており、さらなる検証が必要である。もう一つの特定の集団である hpRyukyu は、hpAfrical、hpNEAfrica、hpAsia2、hpNorthAsia、hspUral、および hspEAsia の混合から出現したと示唆されているが、症例数が少ないためさらなる検討が必要である。		

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2023B13	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	伊藤 直人
	所属機関名	岐阜大学 応用生物科学部
	職 名	教授
研究課題名	狂犬病ウイルス街上毒株の脳内動態可視化	
研究期間	令和 5 年度 ～ 令和 6 年度：（2 年間）	
本センター担当教員	西園 晃	

令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要

日本で過去に分離された野外流行株である小松川株、アメリカのウッドチャック由来株である 1088 株（大分大学グローバル感染症研究センター：西園教授らより供与）およびアゼルバイジャン犬由来である Dog 株のゲノム非コード領域（G 遺伝子および L 遺伝子の間隙）に、赤色蛍光蛋白質・mScarlet 遺伝子を挿入したフルゲノムプラスミドの作出に成功した。

これらのうち、1088 株および小松川株のものを T7 ポリメラーゼ恒常発現細胞にトランスフェクションすることにより、mScarlet 発現 1088 株（1088-mScarlet）小松川株（Koma-mScarlet）の作出に成功した。

組織透明化試薬である CUBIC を用いたマウス全脳透明化の最適化を実施した。狂犬病ウイルス固定株である西ヶ原株の G-L 遺伝子間に mScarlet を挿入した Ni-mScarlet 株をマウスに筋肉内接種した。発症したマウスを灌流固定し、透明化試薬である CUBIC を用いて全脳を透明化させた。この脳に対し、神経細胞マーカーである NeuN を蛍光免疫染色することで神経細胞を可視化したのち、自作ライトシート顕微鏡（descSPIM）を用いて観察した。その結果、固定株である西ヶ原株は全脳領域にわたり感染しており、とくにその陽性シグナルは小脳において顕著であった（図 1）。今後、より高い倍率で観察を進めていくとともに、1088-mScarlet 株または Koma-mScarlet 株を接種したマウスでも同様に観察を行っていく。

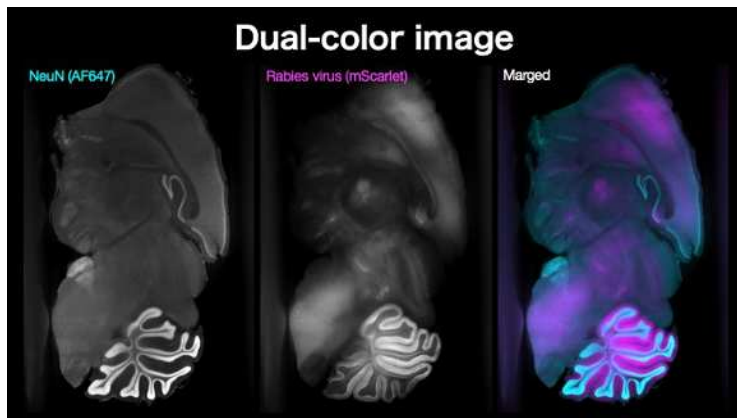


図 1 自作ライトシート顕微鏡を用いた固定株感染脳の観察像
赤色蛍光蛋白質（mScarlet）発現西ヶ原株（マゼンタ）を筋肉内接種し、発症後に灌流固定し脳を透明化した。神経細胞を NeuN（青）で染色し、descSPIM 顕微鏡で観察した。

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2023B19
Name	Ratana Tacharoenmuang
Affiliated Organization	National Institute of Health, Thailand
Job Title	Medical Scientist
Research Topic	Epidemiology and genomics study of rotaviruses in diarrheic human and animal in Thailand
Research Period	FY2023 ~ FY2024 (2years)
Corresponding RCGLID Faculty member	Satoshi Komoto

Summary of Research Results for Fiscal Year 2024

Rotavirus is the leading cause of diarrhea in developed and developing countries, and it can be especially dangerous for infants and young children. Besides causing diarrhea in humans, rotavirus can also cause diarrhea in animals, especially economic animals. Rotavirus genome consists of 11 genes, and reassortment has easily occurred. Currently, the new strains of rotavirus caused by reassortment of rotavirus genes have been found in humans and mammals, especially cows, pigs, and horses, at higher rates than other animals, and the current rotavirus vaccine may not protect against this new strain. This study aims to study the strains and genomic properties of Thai rotavirus causing diarrhea in humans and mammals and to analyze the evolutionary mutation of the rotavirus. Since 1 October 2021 – 28 February 2025, 1,046 stool samples were collected from diarrheic humans, cows, pigs, and horses in Nakhon Pathom, Ratchaburi, Udonthani, and Bangkok provinces. 528 stool were collected from diarrhea cases, and 343, 147, and 28 stool samples were collected from diarrheic cows, pigs, and horses, respectively. All 1,046 samples were subjected to detect rotavirus groups A, B, and C by conventional RT-PCR. There were 118 samples that were positive for rotavirus; 102 samples were group A, and the other 16 samples were group C. The 102 group A rotavirus samples were subject to analysis of the VP7 and VP4 genes by Sanger sequencing. The results showed that G3P[8] was highest found in human samples, follow by G1P[8], G8P[8], and G5P[6], while the rotavirus from cow were G6P[11] and G10P[11], and rotavirus from pig were G9P[13] strain. 10 human G3P[8], 2 human G8P[8], 1 human G1P[8], 10 bovine G6P[11], 3 bovine G10P[11], and 19 porcine G9P[13] were performed whole genome sequencing by Illumina Miseq. Human G3P[8] displayed a Wa-like genotype constellation of G3-P[8]-I1-R1- C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 which originated from human rotavirus, G8P[8] demonstrated a DS-1-like genotype constellation of G8-P[8]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, and the human G1P[8] belong to Wa-like constellation. While the bovine G6P[11] and G10P[11] exhibited the genotype constellation of G6-P[11]-I2-R2- C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 and G10-P[11]-I2-R2- C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 with the VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, and NSP5 genes are from human rotavirus origin. The porcine G9P[13] carries the genotype constellation of G9-P[13]-I5-R1-C1-M1-A8-N1-T7- E1-H1, which originated from porcine rotavirus.

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2024B01
Name	Pattara Khamrin
Affiliated Organization	Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
Job Title	Associate Professor
Research Topic	Molecular Epidemiology of Enteric Viruses in Thailand
Research Period	FY2024 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Satoshi Komoto
Summary of Research Results for Fiscal Year 2024	
During the screening for rotavirus A in stool specimens collected from children hospitalized with diarrhea in Chiang Mai, Thailand, two unusual human rotavirus G3P[10] strains (CMH079/05 and CMH-S015-19) were detected. These strains were further analyzed through full-length genome nucleotide sequencing, supported by a research grant from the "Joint Research Program 2024 of the RCGLID," with Prof. Satoshi Komoto serving as the corresponding RCGLID faculty member. The results revealed that the genetic backgrounds of these unusual human rotavirus strains were highly similar to those of G3P[10] bat-rotavirus strains. Complete genome sequencing showed that the strains were genotyped as G3-P[10]-I8-R3-C3-M3-A9-N3-T3-E3-H6, closely related to the bat G3P[10] rotavirus strain RVA/Bat-tc/CHN/MYAS33/2013/G3P[10], which was isolated in China. These findings indicate that the human G3P[10] rotavirus strains detected in this study contain all eleven genome segments identical or highly similar to those of bat rotavirus strains. The study underscores the role of interspecies transmission of rotavirus strains between bats and humans in natural environments. It also provides compelling evidence that the evolution of human rotaviruses is closely interconnected with that of animal rotaviruses. The full-genome sequence analyses are presented below:	

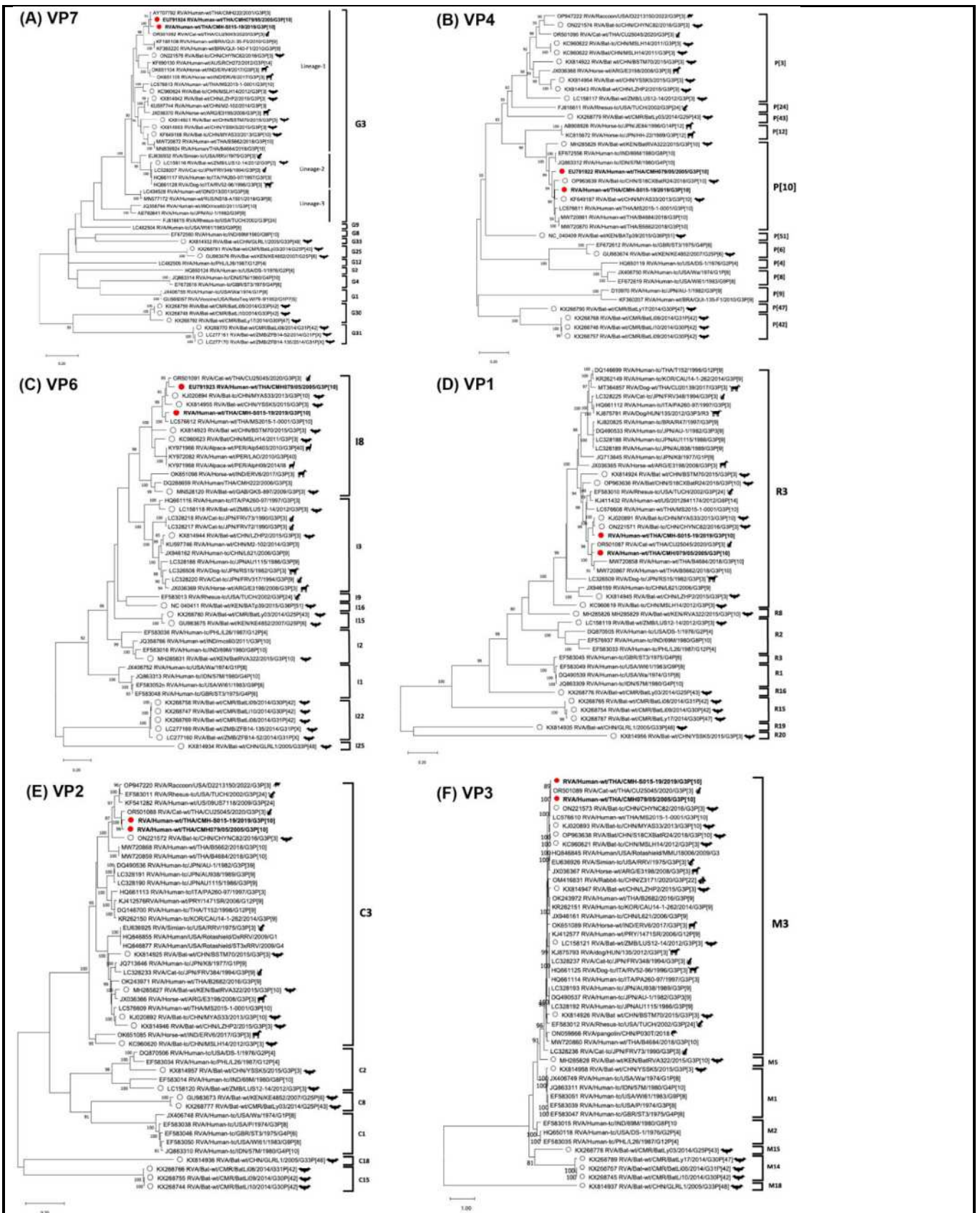


Figure 1. Phylogenetic analyses of structural protein genes based on the nucleotide sequences of VP7 (A), VP4 (B), VP6 (C), VP1 (D), VP2 (E), and VP3 (F) genes. The human RVA CMH079/05 and CMH-S015-19 strains detected in this study were presented by red-filled circles, while those of bat RVA strains are presented by open circles.

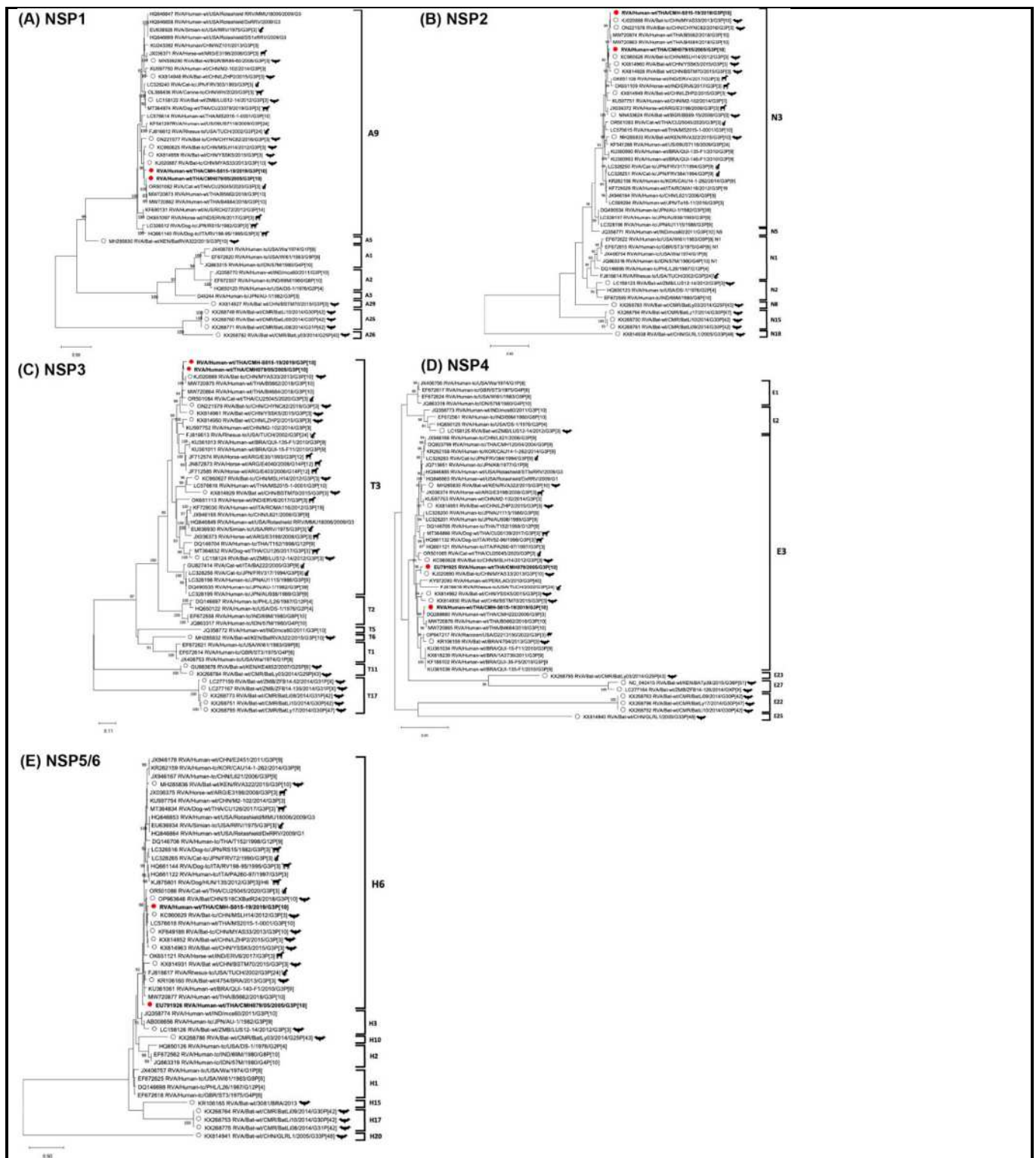


Figure 2. Phylogenetic analyses of nonstructural protein genes based on the nucleotide sequences of NSP1 (A), NSP2 (B), NSP3 (C), NSP4 (D), and NSP5/6 (E) genes. The human RVA CMH-079-05 and CMH-S015-19 strains detected in this study are presented by red-filled circles, while those of bat RVA strains are presented by open circles.

令和6年度（2024年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2024B06	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏名	塩田 拓也
	所属機関名	国立大学法人 宮崎大学 フロンティア科学総合研究センター
	職名	准教授
研究課題名	ヘリコバクター・ピロリの外膜タンパク質輸送機構の解析	
研究期間	2024年度：（1年間）	
本センター担当教員	三室 仁美	

令和6年度（2024年度）研究成果の概要

本研究は、2年間の期間で申請し、1年間として採択された。本研究は、ピロリ菌の外膜タンパク質の輸送機序の解明と、阻害剤の開発を目指した。申請時に開発を進めていた実験手法として、HMMアセンブリーアッセイがある。この方法は、三室教授らが培養したヘリコバクター・ピロリを適切な強度で超音波破碎し、調製した膜画分に対して、報告者が調製した放射性ラベルされたピロリ菌外膜タンパク質を加え、膜への輸送反応を再構築する実験である。支援期間中に、HMMアセンブリーアッセイの技術確立を進め、必要な膜画分の量、放射性ラベルされたタンパク質の添加量を最適化することで、確度の高い実験系を確立した。この実験系を確立し、当初の計画として、2つの目的を設定した。それぞれについて計画及び進捗を記載する。

1. ピロリ菌外膜タンパク質輸送機序の解明

本プロジェクトでは、ピロリ菌の外膜タンパク質の輸送に関わる Beta-barrel Assembly Machinery (BAM) 複合体の全貌解明を目指し、① BAM 複合体の機能解析および、② ピロリ菌の膜画分からの BAM 複合体の精製による構成因子の決定を目指した。①ではHMMアセンブリーアッセイを確立し、ピロリ菌の AlpA という外膜タンパク質を基質とした解析により、最も C 末端側の β ストランドの最後の3アミノ酸に含まれる2つの芳香族アミノ酸が局在化シグナルとして機能することを明らかにした。現在、このシグナル部分の認識機構の解析を進めており、認識部位が決定できれば分子標的薬の開発が可能になる。ピロリ菌の BAM 複合体は、最も研究が進んでいる大腸菌との比較解析によってサブユニットが決定されているのみであり、実際の解析は行われていない。そこで、三室研究室において、ピロリ菌の遺伝子操作により BAM 複合体の主要構成因子である HpBamA にアフィニティ精製可能な FLAG タグ付加組換えタンパク質作製を検討した。三室研究室において、ピロリ菌の外膜タンパク質構築や生育に影響のない BamA 細胞外露部位を同定し（データ未掲載）、相同組換えにより BamA 分子内に FLAG タグ挿入菌株作製を試みたが、外来配列導入部位と CDS 領域外の薬剤耐性遺伝子マーカーと遠位になるために、挿入配列を有する薬剤耐性組換え体を得ることができなかった。そこで、プラスミド過剰発現系での方法に切り替えることで、細胞表層ループに FLAG タグが付与された BamA を得ることができた。塩田が大分大学に出張し、この株から HMM を単離した。FLAG タグを付加した BamA が HMM に存在していること、外膜タンパク質としてきちんと立体構造を形成できていること、さらには複合体を形成していることが確認できた。今後は、FLAG タグによるアフィニティ精製を行い、ピロリ菌の BAM 複合体の構成因子を決定する。

大腸菌を用いた解析では、ピロリ菌にない BamE というサブユニットについて詳細に機能を明らかにし、ピロリ菌のサブユニットと比較したところ、ピロリ菌では BamD が C 末端側に BamE に類似した配列を有し、BamD と BamE 両方の機能を持ったハイブリッドサブユニットであることを明らかにした。本成果はプレプリントにて報告済みであり、現在査読中である。

2. 阻害剤の開発

HMMアセンブリーアッセイを確立した。この方法で宮崎大学で約4000種類を超える化合物からのスクリーニングを実施し単離した化合物が効果的に AlpA の輸送を阻害することを明らかにした（図）。

図：有効化合物（図中の4）が AlpA の輸送を効果的に阻害する様子。AlpA は輸送が成功すると f の位置に SDS-PAGE で泳動される。これが、4を加えると見えなくなることから輸送が阻害されたことが確認できる。



令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2024B07	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	犬塚 義
	所属機関名	京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座
	職 名	特定助教
研究課題名	HBV 感染に関わる宿主因子の網羅的探索	
研究期間	令和 6 年度：(1 年間)	
本センター担当教員	内田 宅郎	
令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要		
申請者は HBV-RFP レポーターウイルスを独自に開発し、ゲノムワイド CRISPR スクリーニング手法を用いて新たな HBV 宿主因子のゲノムスクリーニング法を構築した。本研究は大分大学グローバル感染症研究センターにて令和 6 年 12 月に講演し、本レポーターウイルスを用いた研究については令和 7 年 2 月に論文を投稿し、under review にある。この独自のレポーターウイルスを応用して HBV 感染細胞における網羅的 transcriptome 解析を用いた HBV 宿主因子のゲノムスクリーニング法を施行し、新たな治療標的を探索したいと考えた。 代表的な HBV 感染可能な細胞株であるヒト NTCP (ウイルスレセプター) 強制発現 HepG2 細胞の HepG2NTCP 細胞を HBV-RFP に感染させ、RFP 陽性の感染細胞 (集団の 100%, 25%, 5%) を FACS で RFP 陽性ソーティングした。ソーティングされた細胞を 3 日培養し、HBV 感染実験を行ったところ、5%ソーティングされた細胞は 25%ソーティングされた細胞、100%ソーティングされた細胞 (コントロール) と比較して、それぞれ 1.34 倍、2.02 倍の細胞内 HBV RNA レベルを示した (リアルタイム PCR 法)。以上により、HBV-RFP 感染後の RFP 強陽性のソーティングに伴い、HBV 感染効率の高い細胞集団が回収されることが示された。つまり、HepG2NTCP 細胞と HBV-RFP レポーターウイルスを用いた感染実験+FACS により、HBV 感染に有利な遺伝子発現パターンを有する細胞集団を濃縮することが可能となった。HepG2NTCP 細胞を、HBV-RFP レポーターウイルスに感染させ、RFP 強陽性の感染細胞 (集団の 5%・25%・100%) を FACS ソーティングすることにより、年度内には集団の 5%と 25%と 100%の 3 群間の RNA-seq 解析により、HBV 感染性を有意に上昇させる方向に働く可能性のある upregulation/downregulation された遺伝子 (A) をバイオインフォマティクス解析により同定し、同時に行った HBV-RFP 未感染の negative control 細胞と感染細胞 (100%集団) の RNA-seq 群間比較により、HBV-RFP 感染に伴い変動した遺伝子 (B) を同定し、A の遺伝子リストより B の遺伝子リストを差し引き、候補遺伝子リストを抽出する予定である。		

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

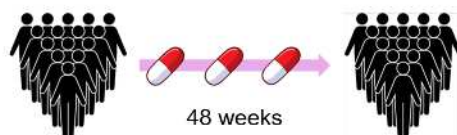
採択番号	2024B11	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	木村 岳史
	所属機関名	信州大学医学部 内科学第二教室（消化器内科）， 肝疾患診療相談センター
	職 名	講師，センター長
研究課題名	脂肪性肝疾患における非侵襲的バイオマーカーの開発	
研究期間	令和 6 年度：（1 年間）	
本センター担当教員	内田 宅郎	

令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要

① B 型肝炎患者における肝細胞癌の予測因子としてのトロンボスポンジン 2

トロンボスポンジン 2（TSP2）はコラーゲンや骨成長、血管密度調整などに関わる重要な分子である。本研究では、B 型慢性肝炎患者を対象に、横断的研究と縦断的研究の 2 つのアプローチで血清 TSP2 の意義を調査した。横断的研究（87 例）では血清 TSP2 と門脈炎症や線維化との明確な関連は認められなかった。一方、縦断的研究（51 例）では核酸アナログ（NA）療法 48 週後に TSP2 値が有意に低下するものの、その 48 週時点で TSP2 が高値（24 ng/mL 以上）を示す群は、その後の肝細胞癌（HCC）発症率が高いことが示唆された。これらの結果から、B 型慢性肝炎患者において NA 療法中の TSP2 測定は将来的な HCC 発生を予測する指標となり得る可能性が示された。

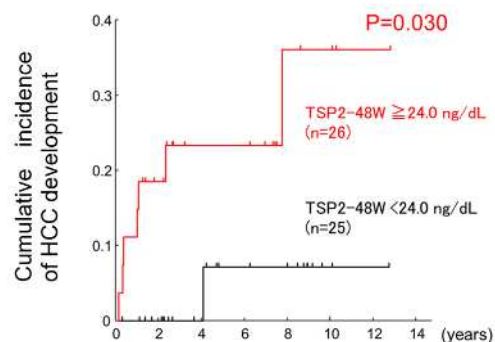
Circulating Thrombospondin 2 as a Predictor of Hepatocellular Carcinoma
in Hepatitis B Patients Undergoing Nucleos(t)ide Analog Therapy



TSP2 0W
32.8 ng/mL
(median)

TSP2 48W
24.1 ng/mL
(median)

$P < 0.001$



Conclusion

Higher TSP2-48W of ≥ 24 ng/mL is a predictive biomarker of HCC occurrence in HBV patients receiving NA therapy.

② C型肝炎患者における肝細胞癌の予測バイオマーカーとしてのトロンスポンジン2

C型肝炎ウイルス（HCV）感染患者に対する直接作用型抗ウイルス薬（DAA）治療中のトロンスポンジン2（TSP2）レベルの変動と、TSP2が肝細胞癌（HCC）の予測マーカーとなり得るかを検討した。134例全員が12週目でウイルス学的著効（SVR12）を達成し、治療前後でTSP2値は有意に低下した（ $p < 0.001$ ）。追跡中央値6年の間に16例（11.9%）がHCCを発症し、SVR12時点でTSP2が32 ng/mL以上の患者群は、それ未満の群と比較してHCC発症リスクが有意に高かった（26.5% vs. 7.0%, $p = 0.0033$ ）。多変量解析では、男性（HR 4.84）、HCC既往（HR 4.61）、TSP2高値（HR 3.93）が独立した危険因子として同定された（C-index = 0.878）。さらに、TSP2高値とFIB-4高値（ ≥ 3.538 ）の両者を満たす場合、特異度と陰性的中率が高く（それぞれ0.941と0.917）、HCC発症率も有意に上昇した（ $p < 0.0001$ ）。これらの結果から、DAA治療後のHCV感染患者におけるHCC個別化サーベイランスのための有用なバイオマーカーとして、TSP2が期待される。

Thrombospondin 2 as a Predictive Biomarker for HCC in Hepatitis C Patients : A Longitudinal Study Following DAA Therapy

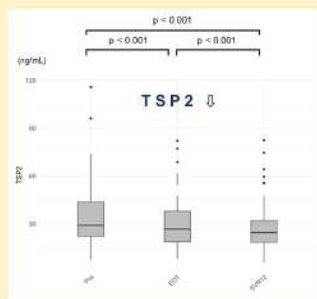
Retrospective Study



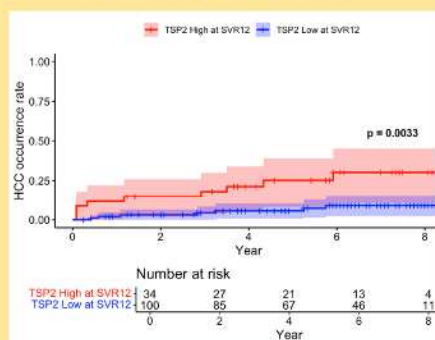
134

HCV
PATIENTS

Treated with DAA



Cumulative HCC occurrence rate



TSP2 holds potential as a valuable biomarker for tailoring HCC monitoring in patients with hepatitis C who have undergone DAA.

Factors associated with HCC occurrence

	Multivariate model		
	HR	95% CI of HR	p-value
Age (≥ 65 years)	1.18	0.23–6.12	0.844
HCC history	4.71	1.32–16.82	0.017
FIB-4 High (≥ 3.538)	1.98	0.51–7.73	0.325
TSP2 High (≥ 32.12 ng/mL)	3.22	1.09–8.28	0.033

令和 6 年度（2024 年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2024B15	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	水野 哲志
	所属機関名	金沢大学 医学系
	職 名	助教
研究課題名	ロタウイルスベクターを用いた経口マラリアワクチンの開発	
研究期間	令和 6 年度：（1 年間）	
本センター担当教員	河本 聡志	
令和 6 年度（2024 年度）研究成果の概要		
アフリカを中心とした熱帯地方において、小児の急性下痢症やマラリアは、出生に伴う合併症、急性肺炎とともに 5 歳以下の小児の主な死因とされている。ロタウイルスは急性下痢症の主要な病原体であり、5 歳以下の死亡者数はロタウイルスで年間約 13 万人、マラリアで年間約 46 万人に上る。予防として、ロタウイルスでは乳児への弱毒化生ワクチン（Rotarix®、RotaTeq®）の経口接種が全世界的に行われている。一方マラリアワクチンは、臨床研究段階ではあるものの、WHO から 2 種類のマラリアワクチンが推奨されている。本課題では、熱帯熱マラリアの抗原遺伝子を組込んだ遺伝子組換えロタウイルスを作製し、ロタウイルスとマラリアの両者に効果を発揮する、経口投与型の新規ハイブリッドワクチンの開発を目指している。 令和 6 年度は以下の項目を達成した。 （1）<u>組換えロタウイルスの作製と性状解析</u> 2 つの熱帯熱マラリア抗原遺伝子を組込んだ組換えロタウイルスを計 4 種類作製した。これらの組み換えウイルスは <i>in-vitro</i> にて良好な増殖およびマラリア抗原の発現を確認した。組換えウイルスの作製および増殖能評価は大分大学グローバル感染症研究センターの施設を用いて実施された。 （2）<u>組換えロタウイルスのワクチン効果の評価</u> 組換えロタウイルスをマウスへ経口投与し、免疫マウスの血清を用いてマラリア抗原に対する免疫応答を ELISA で評価した。その結果、作製したいずれのワクチンにおいても抗原特異的な抗体価の上昇を認めた。 （3）<u>異なる抗原型のロタウイルスによるワクチンの作製</u> 組換えロタウイルスを高用量で接種したマウスは、追加免疫を行ってもマラリア抗原特異的抗体の上昇を認めなかった。これはベクターであるロタウイルス自体への中和抗体が産生されたことによると考えられる。この問題を解決するため、従来の G3 型抗原ロタウイルスに加えて、G12 型ロタウイルスにマラリア抗原を搭載した組換えロタウイルスを作製した。 （4）<u>研究打合せ</u> スケジュールの都合で大分での打ち合わせは開催ができなかったが、令和 6 年 12 月 17 日にオンライン上において、大分大学、藤田医科大学、金沢大学からの参加者により研究の打ち合わせを行なった。		

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2024B19
Name	Timothy Adrian anak Joseph Jinam
Affiliated Organization	Universiti Malaysia Sarawak, Malaysia
Job Title	Senior Lecturer
Research Topic	Screening and molecular characterization of <i>Helicobacter pylori</i> from stool samples collected from rural communities in Sarawak, Malaysia.
Research Period	FY2024 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yamaoka Yoshio
Summary of Research Results for Fiscal Year 2024	
The aim of this project is to assess the prevalence of <i>H. pylori</i> infections in rural communities in Malaysia. During Fiscal Year 2024, we managed to collect samples from four indigenous communities from Sarawak, Malaysia. These are the Iban, Penan, Bidayuh and Orang Ulu groups from Kuching and Kapit Divisions. A total of 360 blood samples and 120 stool samples were collected. Serum was extracted from the blood samples and were used to conduct serology tests for IgG antibodies against <i>H. pylori</i>. Results from 200 samples revealed that both the Orang Ulu and Penan ethnic groups had the highest seroprevalnce of <i>H. pylori</i> at 86%, whereas it was 63% in the Iban and 25% in the Bidayuh ethnic groups. Overall, 72% of the samples had high levels of IgG against <i>H. pylori</i>, suggesting past infection with the bacteria. Higher prevalence was observed in rural communities (Orang Ulu and Penan) compared to the Bidayuh, who are closer to urban areas, suggesting socioeconomic factors and lifestyle factors might contribute the different rates of infection. This is the first report of <i>H. pylori</i> prevalence in the indigenous groups of Sarawak and the very high infection rate underscores the urgent need for targeted public health interventions to prevent associated diseases and reduce transmission. A manuscript is being prepared based on these results. DNA has been extracted from the stool samples using commercial kits, with plans to screen for the presence of the bacteria using PCR. Unfortunately, the PCR screening could not be completed within the 2024 fiscal year due to limited time. Nonetheless, these samples will still be available for any future collaborations with Oita University. Overall, these preliminary serology tests indicate that <i>H. pylori</i> is very prevalent among rural indigenous communities in Sarawak, and molecular characterization of this bacteria may provide interesting clues to the bacteria's and host's evolution.	

令和6年度（2024年度）大分大学グローバル感染症研究センター
共同研究 成果報告書

採択番号	2024B22	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	松尾 祐一
	所属機関名	熊本大学大学院 生命科学研究部
	職 名	助教
研究課題名	ピロリ菌の外膜タンパク質 OipA の機能解析	
研究期間	令和6年度：（1年間）	
本センター担当教員	山岡 吉生	

令和6年度（2024年度）研究成果の概要

- ピロリ菌の外膜タンパク質 OipA の発現実験（和文：600～800 字を目安に記入）図表挿入可
大腸菌を用いた過剰発現系では、*E. coli* BL21（DE）株が広く使用される。しかし、ピロリ菌の Strep タグおよび GST タグを N 末に付加した OipA を発現させると、OipA が細胞毒性を示すことから、*E. coli* BL21（DE3）株は増殖しなかった。そして、細胞毒性を示すタンパク質の過剰発現に適している *E. coli* C41（DE3）株、および *E. coli* C43（DE3）株に OipA を過剰発現させると、大腸菌の増殖は維持されるが、全く発現していなかった。（図 1）さらに、大腸菌抽出液を用いた *in vitro* 発現系を用いて、OipA の発現を試みたが、全く発現していなかった。
- OipA の細胞外領域の発現と精製
AlphaFold2 による構造予測から、OipA には 2 つの細胞外領域が存在する。（図 2）*E. coli* BL21（DE3）株を用いて、GST タグと Strep タグを付加した 2 つの細胞外領域を発現した。その結果、GST タグを付加した OipA 細胞外領域は良好な発現が得られ、精製することができた（図 2）。しかし、Strep タグを付加した場合は、OipA の発現が確認できなかった。
- OipA の細胞外領域を用いた、相互作用分子の探索
GST タグを付加した OipA 細胞外領域と、ヒトの胃癌細胞株（AGS 細胞）を用いて、Pull down assay による、OipA の相互作用分子の同定を試みた。その結果、OipA の細胞外領域との相互作用分子を得ることはできなかった。

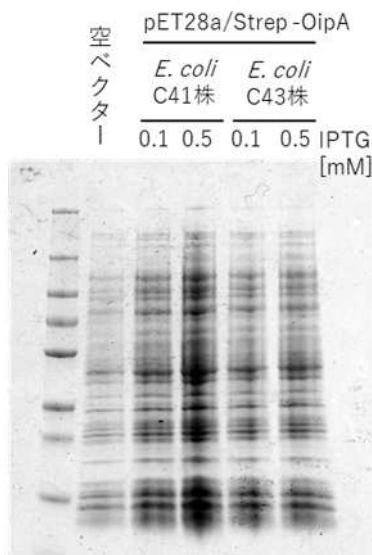


図1: 大腸菌抽出液のSDS-PAGE (CBB染色)

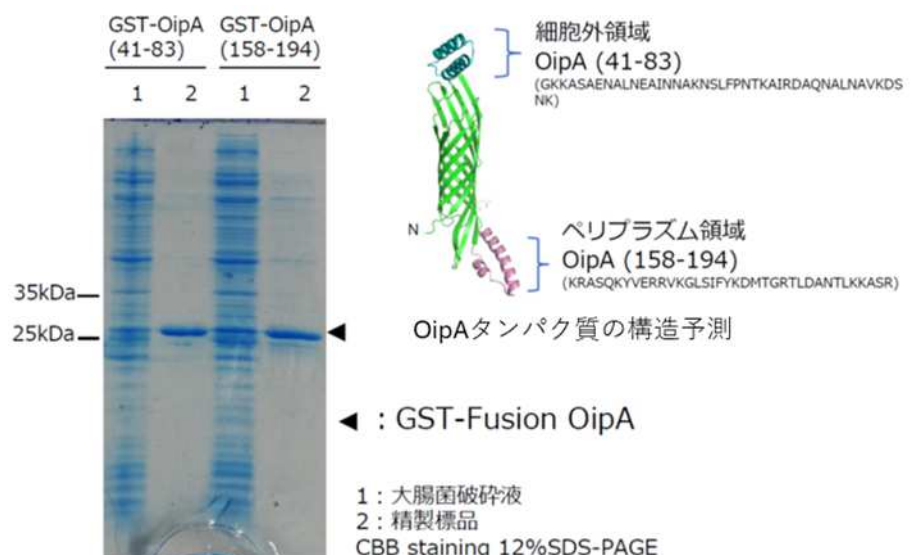


図2: OipAの構造予測とOipA細胞膜外領域の精製

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2024B23
Name	MacIntosh Andrew
Affiliated Organization	Wildlife Research Center, Kyoto University (KUWRC)
Job Title	Specially Appointed Associate Professors
Research Topic	Socio-ecological drivers of <i>Helicobacter</i> species and microbiome diversity in primates of Malaysian Borneo.
Research Period	FY2024 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka
Summary of Research Results for Fiscal Year 2024	
Since the 1980s, <i>Helicobacter</i> species other than <i>H. pylori</i> have been reported to play a role in human gastric diseases and have gradually attracted increasing attention. Notably, considerable interest has been directed toward non-<i>H. pylori</i> <i>Helicobacter</i> species (NHPH), such as the recent isolation of <i>H. suis</i> from patients with gastric MALT lymphoma—believed to result from horizontal transmission from pigs—reported for the first time globally (Rimbara E. et al., PNAS, 2021). Elucidating the genomic composition of both <i>H. pylori</i> and NHPH from wildlife is essential for deepening our understanding of the pathogenicity and co-evolution of <i>Helicobacter</i> spp. with their hosts. Recent advances in genomic technologies have identified <i>H. suis</i>, which naturally infects pigs, and <i>H. acinonychis</i>, which infects large cats, as closely related to the ancestor of <i>H. pylori</i>. However, the evolutionary pathway by which the ancestral strain adapted to infect humans remains unclear. This study will utilize the genomics platform at RCGLID to analyze the microbiome of primates closely related to humans in order to detect the presence of <i>H. pylori</i>, NHPH, and other gastrointestinal parasitic microorganisms. We will then examine the influence of socio-ecological factors on the diversity and transmission of these microorganisms within primate communities, thereby advancing our understanding of the co-evolutionary relationships between pathogenic microbes, non-human primates, and humans. Research conducted under this grant focused on the microbiome of various non-human primates—including Bornean orangutans (<i>Pongo pygmaeus</i>), proboscis monkeys (<i>Nasalis larvatus</i>), long-tailed macaques (<i>Macaca fascicularis</i>), southern pig-tailed macaques (<i>Macaca nemestrina</i>), and silvery lutungs (<i>Trachypithecus cristatus</i>)—to assess the presence and diversity of <i>Helicobacter</i> spp. and strongylid nematodes. We examined both their genomic characteristics and the potential socio-ecological drivers affecting their distribution. These findings contribute to our broader understanding of pathogen co-evolution in primate communities and offer insights into zoonotic spillover risks. The primary achievements during the fiscal year include: • Laboratory Analyses: DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) amplification of the <i>cytochrome b</i> gene were successfully completed for host species confirmation. Additionally, <i>Helicobacter</i> 16S rRNA genes and strongylid ITS2 genes were amplified, with molecular analyses ongoing for the former. • High-Throughput Sequencing (HTS, a.k.a. NGS): Two MiSeq runs were conducted, analyzing 288 samples to characterize the parasite community composition of the primates. • Genetic Characterization of Parasites: A manuscript is currently under co-author review, focusing on the socio-ecological drivers of <i>Oesophagostomum</i> genetic diversity in a Bornean primate community. This work provides novel insights into host–parasite interactions in a multi-host system, and highlighted a dilution effect from primate diversity on <i>Oesophagostomum</i> amplicon sequence variant richness, independently from seasonal and habitat quality effects. • Scientific Dissemination: The above findings were presented at the French-Speaking Primatology Society symposium in Toulouse, France (October 2024), where the research received the Best Poster Presentation Award. The progress made lays the groundwork for expanded research into microbial and parasitic co-evolution in primates and their potential relevance to human health.	

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2024B25
Name	Gulnur Zhunussova
Affiliated Organization	Institute of Genetics and Physiology, Laboratory of Molecular Genetics
Job Title	General Director
Research Topic	Population genetics and epidemiological characterization of <i>Helicobacter pylori</i> microbiota in Kazakhstan though next-generation DNA sequencing
Research Period	FY2024 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka
Summary of Research Results for Fiscal Year 2024	
Our findings from the collaborative research on <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) have provided significant insights into patient characteristics, diagnostic methods, and antibiotic resistance patterns in Almaty City, Kazakhstan. Overall, the study included 147 patients who underwent rapid antigen stool testing. We then obtained gastric biopsy samples from 93 patients, predominantly female (78.4%), with an average age of 44.8 years. Most patients (87%) exhibited atrophic gastritis on endoscopy, while 13% had non-atrophic gastritis. The rapid antigen stool test for <i>H. pylori</i> demonstrated high diagnostic utility, with 25 out of 32 (78.4%) patients testing positive in the pilot phase of the study. <i>H. pylori</i> culture growth was achieved from 69 samples (74% of all cases), and a correlation was observed between positive antigen test results and successful culture growth (60%). However, discrepancies were noted, with some cultures failing to grow despite positive antigen stool results, underscoring the need for further investigation into the test's sensitivity and specificity. Antibiotic resistance patterns revealed alarming trends, particularly for metronidazole, with a 90% resistance rate. Clarithromycin resistance was also significant, affecting 45% of isolates. Up to 30% of cases were resistant to multiple antibiotics, including combinations of metronidazole and clarithromycin. We characterized the genomes of collected <i>H. pylori</i> isolates, specifically focusing on the 20 strains that we cultured. A core genome phylogenetic tree was constructed, incorporating 359 strains, including 252 donor strains and 87 strains from neighboring countries. Fine-scale population structure analysis was conducted using FineSTRUCTURE to identify clusters in relation to the donor strains. The preliminary analysis revealed that the 20 Kazakhstani strains were distributed across six distinct <i>H. pylori</i> populations (Figure 1). Among them, eight strains (40%) clustered with the hspEuropeMiddleEast population, five strains (25%) grouped with hspNEurope, and four strains (20%) formed an independent cluster together with strains from Mongolia and Uzbekistan. Additionally, two strains (10%) were assigned to the hspMongolia population, and one strain (5%) was identified as part of the hspEAsia population. The distribution of CagA types is presented in Figure 2. Our analysis revealed that 75% (15/20) of the strains carried the cagA gene, a prevalence similar to that observed in other European countries but lower than in East Asian countries. The remaining 25% (5/20) of the strains were cagA-negative. As expected, 93.3% (14/15) of the cagA-positive strains were of the Western type, while only 6.7% (1/15) were of the East Asian type. Among Western-type CagA strains, variations containing ABC motifs and ABCC motifs were the most common, observed in 46.7% and 13.3% of strains, respectively. Other variations, including ABCCC, ABCCCCC, ABBC, ACC, and AB motifs, were also detected. The single East Asian-type CagA strain contained ABD motifs.	

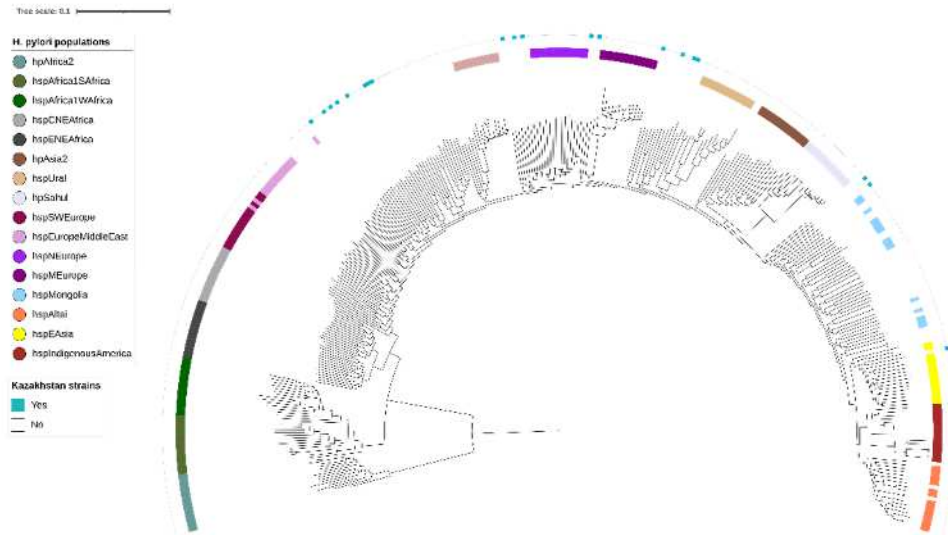


Figure 1. The core genome based Maximum likelihood phylogenetic tree using FastTree. We used 252 strains from 16 subpopulations as donor strains.

The predominant *vacA* genotype identified was s1, which was observed in 75% (15/20) of the strains, while the remaining 25% (5/20) were classified as the s2 genotype. The *vacA* m1 genotype was present in 35% (7/20) of the isolates, whereas *vacA* m2 was found in 65% (13/20). When considering the combination of the s and m regions, the s1m2 genotype was the most prevalent (40%, 8/20), followed by s1m1 (35%, 7/20) and s2m2 (25%, 5/20).

Regarding the combination of *cagA* and *vacA* genotypes, the most predominant profile was *cagA*-positive with *vacA* s1/m2, observed in 40% (8/20) of the strains. This was followed by *cagA*-positive with *vacA* s1/m1 (35%, 7/20) and *cagA*-negative with *vacA* s2/m2 (25%, 5/20).

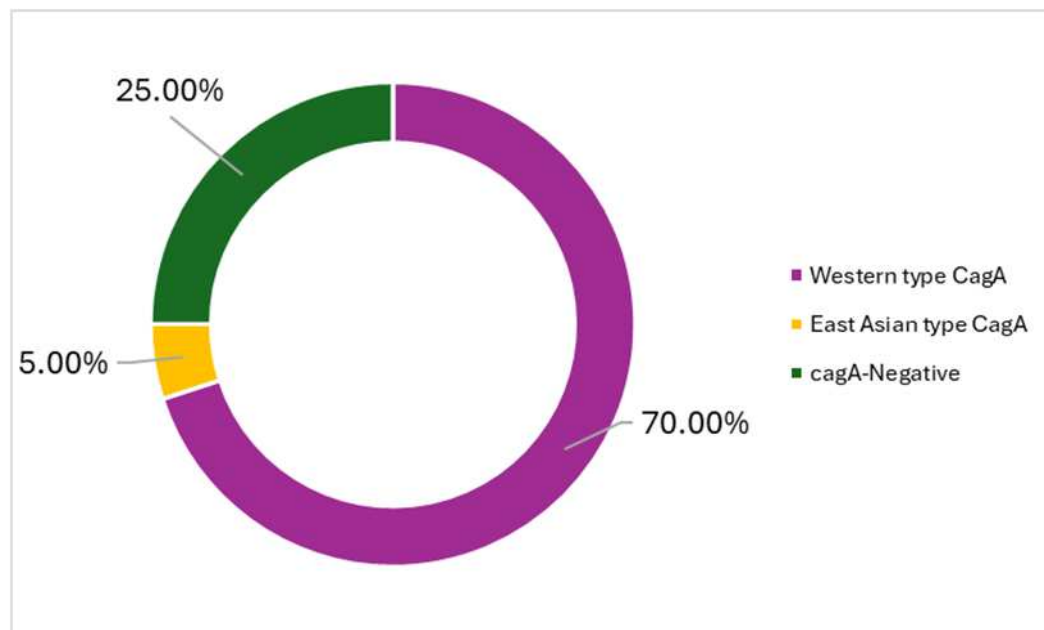


Figure 2. The *cagA* gene status in Kazakhstan isolates (n=20).

We plan to finalize NGS-sequencing and antimicrobial resistance testing for the whole dataset of positive cultured samples (n=69) and continue the rapid antigen stool testing while expanding the sample size to over 200 cultures to enhance statistical reliability, repeating phylogenetic and antibiotic resistance testing following positive culture results. In 2025, a journal article summarizing our findings will be prepared. These steps are essential for understanding *H. pylori* resistance patterns in Kazakhstan and developing more effective diagnostic and treatment strategies. In 2025-2026, NGS analysis and a manuscript will evaluate human migration patterns between Kazakhstan and Japan.

Report for Joint Research Fiscal Year 2024

Adoption number	2024B26
Name	Evariste Tshibangu Kabamba
Affiliated Organization	Department of Internal Medicine, University of Mbuji mayi, Mbuji mayi, DR Congo.
Job Title	General Secretary for Research/ University of Mbuji mayi
Research Topic	Developing a culture-free point-of-care testing flow to embrace antibiotic stewardship for Helicobacter pylori therapies: feasibility study for low-resource settings
Research Period	FY2024 (1year)
Corresponding RCGLID Faculty member	Yoshio Yamaoka
Summary of Research Results for Fiscal Year 2024	
In this study, we successfully developed a targeted amplicon sequencing approach using Oxford Nanopore Technologies (ONT) to detect <i>Helicobacter pylori</i> antimicrobial resistance (AMR) genes and associated mutations. DNA was extracted from 23 culture-positive and 23 culture-negative <i>H. pylori</i> biopsy samples, focusing on genes implicated in resistance to commonly used antibiotics: <i>gyrA</i> and <i>gyrB</i> (quinolones), <i>16S rRNA</i> (tetracyclines), <i>23S rRNA</i> (macrolides), <i>frxA</i> and <i>rdxA</i> (nitroimidazoles), and <i>pbp1A</i> (penicillins). PCR-amplified targets were sequenced using ONT, and reads were mapped to reference genes from the <i>H. pylori</i> 26695 genome for variant calling. Key resistance-associated mutations were identified: - Quinolone resistance: Mutations in the QRDR of <i>gyrA</i> (A92, D91, N87) and <i>gyrB</i> (D481, R484, V437), known to reduce drug binding. - Tetracycline resistance: Mutations at positions 926–928 of the 16S rRNA gene. - Macrolide resistance: A mutation at position 2143 of the 23S rRNA gene. - Penicillin resistance: Variants in <i>pbp1A</i> (E406, S589, G595, V596, I593, N562) affecting the penicillin-binding domain or access pathways. - Nitroimidazole resistance: Nonsense, missense, and frameshift mutations in <i>frxA</i> and <i>rdxA</i>, disrupting drug activation pathways. Variant detection in culture-positive samples was validated against whole genome sequencing (WGS) data with >99.0% concordance, confirming the accuracy and feasibility of this culture-independent method. The workflow delivers results within 48-72 hours, achieving the core objective of rapid, reliable AMR profiling without the need for bacterial isolation. Notably, resistance mutations were detected in both culture-positive and culture-negative samples, suggesting that individuals testing negative by culture may still harbor <i>H. pylori</i> resistance genes. Moreover, we demonstrated the genetic transferability of resistance markers from culture-negative samples to susceptible strains via natural transformation, supporting the hypothesis that these samples can act as reservoirs of resistance. This finding challenges the reliance on culture-based diagnostics in endemic settings and highlights the epidemiological importance of sequencing-based methods for AMR surveillance. We are currently finalizing experiments on the integrity of bacterial DNA in culture-negative biopsies. A manuscript based on this work is currently in preparation, offering novel insights into the clinical and public health significance of residual <i>H. pylori</i> DNA in culture-negative individuals from high-prevalence settings, and demonstrating the utility of ONT sequencing as a tool to address this diagnostic gap.	

令和6年度（2024年度）大分大学グローバル感染症研究センター 共同研究 成果報告書

採択番号	2023C02	
申請者（研究代表者）に関する事項	氏 名	塩屋 幸樹
	所属機関名	長野県立大学 健康発達学部 食健康学科
	職 名	准教授
研究課題名	発酵食品由来のピロリ菌生育阻害因子の探索	
研究期間	令和5年度～令和6年度：（2年間）	
本センター担当教員	三好 智博、三室 仁美	

令和6年度（2024年度）研究成果の概要

発酵食品には酵母、麹菌や乳酸菌をはじめ多種多様な微生物とその代謝物である有機酸、短鎖脂肪酸および原料由来のオリゴ糖などの多くの有用物質を含んでいる。短鎖脂肪酸・オリゴ糖は腸内細菌叢改善など、近年は疾病の予防や改善が期待される食品として注目されている。一方、胃の中にも細菌叢が存在し、特にピロリ菌は胃がんをはじめ様々な疾患に関与していることが報告されている。申請者は、発酵食品の機能に着目し、発酵食品の摂取による胃がんの予防・改善法の確立を目指している。そこで、本研究では発酵食品由来の成分によるピロリ菌の生育やバイオフィーム形成能などに影響を評価した。

まず、麹菌由来の代表的な代謝産物であるコウジ酸を様々な濃度で添加して、ピロリ菌の生育を評価した。その結果、最小発育阻止濃度（MIC）は400 $\mu\text{g/mL}$ 、最小殺菌濃度（MBC）は800 $\mu\text{g/mL}$ であることが判明した（図1）。大腸菌のMICは1600 $\mu\text{g/mL}$ であり、ピロリ菌により効果的に作用することが判明した。さらに、乳酸菌の一種である *Lactiplantibacillus plantarum* および皮膚常在菌である表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* には抗菌活性を示さなかった。

次に、ピロリ菌のバイオフィーム形成へのコウジ酸の影響を評価した。その結果、MICの1/8である50 $\mu\text{g/mL}$ でバイオフィーム形成阻害が確認された（図2）。また、測定したすべての濃度でピロリ菌の生育に影響がなかった。なお、ピロリ菌を用いた実験は、大分大学グローバル感染症研究センターにて、三好先生のご指導のもとに行なった。また、実験手法については三室先生に適宜アドバイスをいただいた。

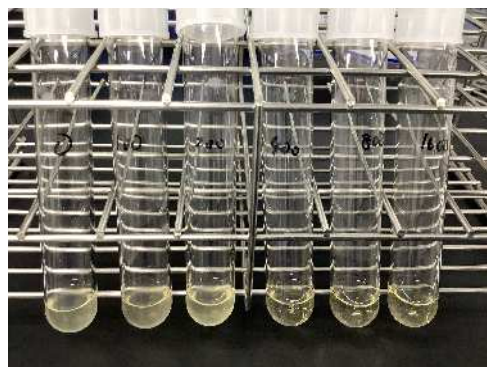


図1 コウジ酸によるピロリ菌生育阻害実験

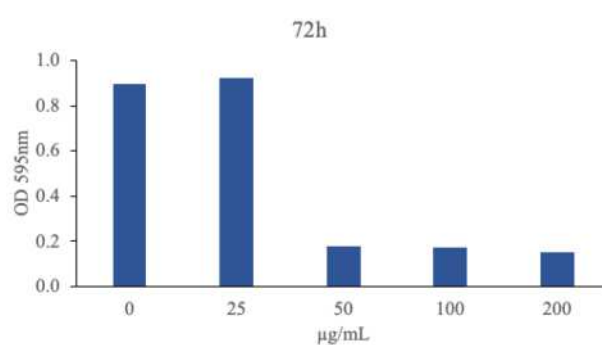


図2 コウジ酸によるバイオフィーム形成阻害実験