

小児感染症発症宿主因子探索システムの開発

実施予定期間：平成 22 年度～平成 24 年度

代表機関：長崎大学熱帯医学研究所

代表者：安波 道郎

国内参画機関：

代表者：

国外参画機関：①国立衛生疫学研究所、②国立ホーチミン市パスツール研究所

代表者：①Dang Duc Anh 副所長、②Tran Ngoc Huu 所長

I. 概要

1. 共同研究の内容

a. 相手国・地域における課題のニーズと社会への適用

日本とベトナム社会民主共和国は 2006 年 8 月 21 日締結の科学技術交流協定の中で、感染症対策を重点課題としている。ベトナムは亜熱帯から熱帯地域に位置し、マラリアやデング熱などの熱帯地域特有の感染性疾患の危険にさらされているが、熱帯感染症以外にもインフルエンザをはじめとする呼吸器感染症、下痢症、手足口病などの感染症流行の勃発がみられる。また先進国ではほぼ解決されたとされている結核症や B 型肝炎が蔓延し、BCG や B 型肝炎ウイルスワクチン接種プログラムが進められている。ベトナムは近年急速な経済発展を遂げているが医療資源はまだ限られていて、感染症は依然として最も高い乳幼児死亡の原因で、解決すべき最重要課題である。

熱帯地域においてはそれぞれの地域で問題となる病原微生物の様相は異なるため、有効な感染症対策には疫学的な実態把握が必要である。申請者らを含む長崎大学・熱帯医学研究所の研究者は、ベトナムにおいて、国立衛生疫学研究所、国立ホーチミン市パスツール研究所などの研究施設や地域の中核拠点医療施設の研究者、医療従事者とともに、地域で問題となっている種々の感染因子と感染症について多方面の学術的アプローチを進めてきた。多くの成果を挙げってきた中で、デング熱や結核症においては感染成立後の運命決定に宿主因子が深く関与することを見いだした。また、B 型肝炎や神経向性エンテロウイルス感染症では、感染成立後不顕性に経過するものから致死的な結末にいたるものまで幅広い症状のスペクトラムを呈し、その背景には宿主因子の強い関与が想定される。感染症重症化の宿主因子としての遺伝子多型の型判定から、個人がどの感染因子に対しての抵抗性に問題があるかを予測できる。

そこで本研究では、最新の感染症抵抗性に関連するヒト宿主遺伝子多型の知識・情報を応用して、感染症重症化リスクの高い個人を出生時に同定する検査法を開発してベトナムの小児感染症予防プログラムに適用できるよう導くことを目標とする。この「個別化」された予防医療プログラムが構築できれば、限られた医療資源の有効活用が可能となり、乳幼児の生命予後を大きく改善させて社会的・医療経済的負荷を軽減させることが期待できる。

b. 研究内容・手法

申請者らは、2006 年以来重症感染症の発症を包括的に捕捉できる臨床疫学フィールドをベトナム中部カンホア県に開拓してきた。同県において中核的な医療施設はカンホア県病院一カ所に限られることからほぼすべての重症感染症の発症を捉えることができる。申請者らは、同地域において 7 万 6 千世帯の世帯調査を実施し、各世帯の各種

感染症リスク因子を把握するとともに、カンホア県病院へ本学から臨床医を常駐させ特に呼吸器感染症を中心とする重症小児感染症を把握してきた。さらに、より精密な疫学データの取得を目指して 2009 年 5 月より同病院で出生した母子を対象に出生コホート登録を開始し、登録時に母親末梢血と新生児臍帯血のサンプリングを行なって、血清および DNA を凍結保存している。カンホア県では出産はほとんどが施設分娩なので、分娩に際しての登録によってサンプリングに偏りのない出生コホートの樹立が可能である。本研究では、この出生コホートから得られた臍帯血由来 DNA 検体を用いて、申請者のこれまでの研究から導かれた感染症重症化ゲノム多型情報を基盤とするスクリーニング検査を実施し、予測マーカーとしてどのくらいの重症感染症発症予測力があるのかを、特にデング出血熱、重症急性呼吸器感染症、重症腸管感染症、髄膜炎、敗血症などの疾患に注目して検証することを目的とする。同時に、現行の定期ワクチン接種プログラムによる免疫応答に対する予測力についても検証する。

本研究課題の対象集団は、2009 年 5 月より 2010 年 3 月までにカンホア病院にて出生した 2000 人であり、2011 年 5 月より小児科医を派遣し 2 歳児検診を実施する予定である。登録者が満 2 歳になった月に本研究課題の資金によって、感染症やワクチン接種免疫応答に関する詳細な情報を収集する。具体的にはその時点までの感染症既往を法的保護者に対する問診で情報収集するとともに拠点病院の診療記録から疾患の種類、重症度の情報と病原体同定を含む検査結果を抽出する。検診時には身体測定で成長・発達状態のチェックを行なうとともに感染症宿主抵抗性の指標となる末梢血抗体価、サイトカイン量と細胞機能解析のために 3ml 程度の採血を行なう。この採血によって上述の重症化予測遺伝子マーカーが 2 歳児の抗体産生能、サイトカイン産生能のどのように影響しているかを検証して、個別化予防医療に際しての対策法の方向付けを可能とする。

発症や重症症状の現れに病原体側と宿主側双方の多様性が要因となっていると考えられるデング熱や神経向性エンテロウイルスについては、感染後に臨床症状が極めて軽微か、あるいは全く無症状に経過して抗体ができる例が相当数あることが明らかであるが、曝露後にどのくらいの割合でそのような経過するかは調べられていない。本コホート研究はその実態を明らかにできる絶好の機会をあたえられ、また同時に、感染症重症化予測遺伝子マーカーがその運命決定に関与するかの検証も可能である。4 つの血清型のデングウイルス・および EV71、コクサッキー A16 を含むエンテロウイルス属のウイルスに対する中和抗体価を 2 歳検診時採血検体について測定することで不顕性感染歴を明らかにする（ホーチミン市パスツール研究所と共同して行なう）。

これまでに感染症重症化に関連する宿主遺伝子多型として、HLA 領域の遺伝子、サイトカインとその受容体遺伝子、パターン認識受容体遺伝子、細胞内信号伝達系遺伝子、蛋白分解酵素とその調節因子の遺伝子、C 型レクチンなど細胞間コミュニケーションに関与する膜蛋白の遺伝子など 200 座位について選定しているので、代表機関に既に設置済みの核酸質量分析高速遺伝子型決定システム Sequenom iPLEX Mass Array を利用して、それらの遺伝子の SNP の型判定を行ない、2000 人のコホートでの感染症発症状況を予測する遺伝子マーカーを評価する。

ベトナム成人のB型肝炎のs抗原陽性率はおよそ1割とされており、コホート集団にも母親からの垂直感染あるいは家族内の保因者からの感染リスクを負っているものが1割以上いると推定される。カンホワでは乳幼児期にDPT三種混合+B型肝炎ワクチンとBCG接種を施行しているため、B型肝炎ワクチンの効果をワクチン抗原(s抗原)に対する抗体価測定で評価できる。B型肝炎については、保因者を母親に持つ場合にワクチン接種による感染防止効果に感染症重症化予測遺伝子マーカーとの関連が見られるかをあわせて検討して、ワクチン応答の予測にも活用できるかを調べる。また、結核菌抗原に対してのIFN- γ 産生は宿主の細胞性免疫、中でもタイプ1ヘルパーTリンパ球の応答性を評価できるので、次に説明する方法で末梢血の全細胞にツベルクリン反応用抗原を添加して、IFN- γ やIFN- γ に誘導されて発現するIP-10などのmRNAの増加を測定する。

末梢血の免疫系細胞の機能を解析するには、単核細胞を分離して培養する方法が一般的であるが、手順が多く同時に多検体を取り扱うことは困難である。本研究計画のように研究のフィールドが微生物学的にクリーンな実験施設から物理的に離れている場合に、細胞を分離することなく全血のまま密封した清潔な容器の中で培養して機能的な測定に適用することは24時間程度の比較的短時間であれば可能で極めて実用的と考える。前述のようにワクチン接種や感染による自然感作によって抗原特異的な細胞性免疫応答が成立していることは、誘導されたIFN- γ 産生やIL-2産生の測定で定量化できるので、これを比較的少量の採血で複数の抗原刺激条件間で比較できるように小スケール化を試みる。実際にはヘパリンナトリウム添加済み採血管に採血した血液約1.5mlを、あらかじめ抗原や細胞刺激剤とともに細胞培養培地を封入した清潔な容器に一定量ずつ確実に注入する系を考案する。また検出も微量の検体で多項目多検体高速mRNA定量ができるナノ流路系先端技術を応用した高集積度リアルタイム定量RT-PCRシステムFluidigm Dynamic Arrayを導入して適用する。本システムは48検体について48種類の定量PCR合計48x48=2304反応を1反応あたり10ナノリットルの微量で同時に行なうことで、大幅な高速化・省力化と試薬コスト節減を、検出感度を落とすことなく可能とするものである。平成22年度(初年度)内に、この感染症フィールド研究に対応した少量検体からの多項目血液細胞細胞性免疫応答評価系を樹立し、翌年度以降の検診時採取検体に適用する。

一方、健常成人ボランティアにおいては末梢血血漿中のサイトカイン量は定常状態で個人差があることがすでに知られているが、それがサイトカイン遺伝子そのものの遺伝子型で規定されるとは限らず感染の既往歴やアレルギーなどある種の過敏状態にも強い影響を受けている可能性がある。小児ではさらに生体応答の発達・発育状態の個人差も関与することが想定される。IL-1 β などのサイトカイン約10種について市販のキット化されているLuminexビーズアレイ法により多項目一括測定して、相互の相関や遺伝子多型との関連を解析することで、サイトカイン量が宿主因子の効果として感染抵抗に関わるかを明らかにする(国立衛生疫学研究所と共同で行なう)。

また、検診時採血によって前述のウイルスの中和抗体価をはかることと並行して、他の複数の病原微生物抗原、ワクチン抗原に対する抗体価を100項目程度Luminexビーズアレイ法により測定する。肺炎球菌の血清型エпитープ糖鎖23種をATCCのリソースバンクから入手できるので、これをビーズ担体に結合させて測定する。蛋白抗原についてはエピトープをペプチドとして合成してビーズ担体に結

合する。

c. 我が国を中心とした科学技術コミュニティの構築と技術の普及・国際標準の創出の可能性

アジア地域における感染症コントロールのリーダーとして我々を含めてわが国の研究者は各国との二国間協力体制を軸に新興再興感染症ネットワークを構築してきた。アジアの国々ではそれぞれの感染症発症の状況が異なるため、すべてに共通した国際標準となるような感染症コントロールの方策を設定することは難しく、それぞれの地域にカスタマイズした標準の創出が現実的な国際標準と考える。したがって、地域的・民族的特徴を十分に考慮する視点を盛り込むことが重要である。

d. 本研究の波及効果

出生時に、2歳までの感染症重症化やワクチン効果が予測できるような宿主遺伝子多型検査の実用性が証明できれば、乳幼児の感染症予防指導やワクチン接種プログラムを「個別化」すること、すなわち感染症重症化リスクの高い個人に早期医療機関受診を強く推奨することや、ワクチン効果の現れにくい個人には強力な接種を行なうことが可能となり、限られた医療費・医療資源を有効に分配し、より有効な予防効果が期待できる方法を策定できる。ヒトゲノム多様性は、地域・民族によって特徴的な分布をとっていることが知られているが、多くの場合は複数の民族集団で、とくに近隣する民族では同様の疾患感受性などの生物学的な意味をもつ。したがって本研究の結果はベトナムに限らず、とくに近隣アジア諸国に直接波及できると思われる。また、感染症予防プログラムを「個別化」すること自体は斬新なアイデアであり、この実現性が証明できれば、このプログラムの概念が全世界へ波及する可能性がある。

2. ネットワーク構築の実現可能性

a. 本提案に関連する国外参画機関との交流実績

代表機関である長崎大学はこれまでに国立衛生疫学研究所、ホーチミン市パスツール研究所から訪問研究員、国費留学生を多数受け入れてきた実績があり、文部科学省新興・再興感染症研究拠点形成プログラム(平成17-21年度)「ベトナムにおける長崎大学感染症研究プロジェクト(代表者・平山謙二)」の支援によって緊密な共同研究体制の構築を進めてきた。

b. (ネットワーク構築のための)直近の準備状況

カンホア県における長崎大学フィールドをベースとした臨床疫学的研究では、すでに論文化された成果が複数報告されており、標的とする感染症の現時点での発症状況のデータもリアルタイムに集積・解析を行なっている。本研究の対象であるコホート参加者の登録も本申請書作成時点でおおよそ8割を完了している。また、デング熱の流行は、以前はホーチミン市を中心とするメコン川流域に集中していたが2008年2009年には北部のハノイ近郊まで広がったことが把握されている。神経向性エンテロウイルス感染の代表的症状である手足口病の疫学調査もホーチミン市パスツール研究所のTu博士らにより実施され論文化されている。参画機関との協定を締結する準備については、「ベトナムにおける長崎大学感染症研究プロジェクト」の研究者会議で本研究の意義を議論し、具体的な実施内容とそれを参画者でどのように分担してすすめるかについて調整済みである。

3. 本制度により取組を支援する必要性

a. ODAによる技術供与、既存の研究開発プログラムなど他の制度ではカバーできないような取組であると判断する根拠については、実用的技術開発と移転を目指すものであることから、本制度が最も適切と考えられる。

- b. 産業界主導で行うべき段階の研究開発活動ではないと判断する根拠については、基づく学術的知識は申請者に独自のもので、産業界に公開されていないためである。
- c. 代表者（安波）は、ホーチミン市の中核医療施設に受診する重症デングウイルス感染症および重症エンテロウイルス感染症を対象とした病因論研究を科学研究費補助金に現在申請中である。これらは「新興再興感染症プロジェクト」によって行なった重症デングウイルス感染症のヒトゲノム研究から得られた結果をさらに深く追求して感染症重症化メカニズムの解明を図る探索的研究である。（この科学研究費補助金申請は採択されなかったが、重症デングウイルス感染症発症予測バイオマーカー早期迅速検出法開発を目的とする研究課題が平成23-24年度に採択された。）分担者（有吉）は、「新興再興感染症プロジェクト」1期（平成17-21年度）2期（平成22-26年度）にてカンホア住民を対象とする病院ベースの急性呼吸器感染症の臨床疫学的研究をすすめている。国立衛生疫学研究所と共同で感染症発症の捕捉を地域の拠点病院で可能であることを実証済みであり、より精密な臨床疫学の基盤整備として出生コホート登録を開始するに至っており、本研究計画の遂行を可能としている。分担者（吉田）は、カンホアに駐在して上記臨床疫学研究の基盤整備の実務を担当している。しかし新興再興感染症プロジェクトでは、呼吸器感染症の把握に重点をおいており、本研究計画のような最新技術の移転や有用性に着目した大規模な遺伝子多型検査までを支援をしていない。

4. 継続性

本研究の支援終了後の国外参画機関等との共同研究の継続、ネットワークの維持・発展の見込みについては、長崎大学と国立衛生疫学研究所、ホーチミン市パスツール研究所は本研究開始前より、人材育成を含めた親密な研究交流を継続しており、終了後も生産的な国際研究ネットワークを維持・発展させることは長崎大学熱帯医学研究所の使

命でもある。

5. 相手国・地域との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

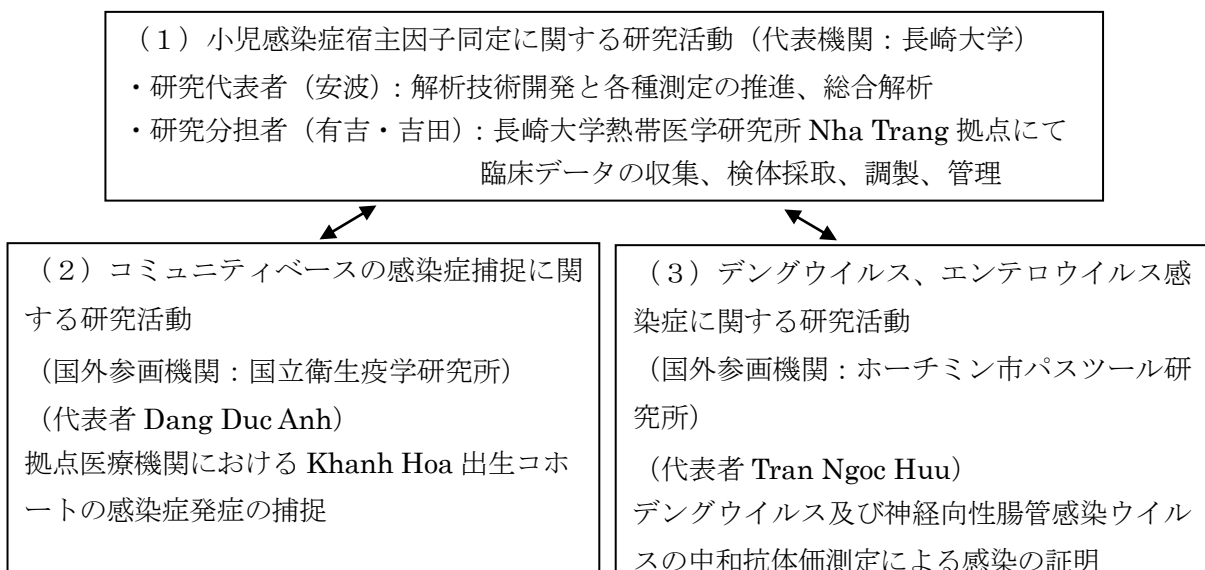
- a. 当該研究計画に関する相手国政府の関心
 二国間「科学技術交流協定」の設定課題のひとつである感染症対策への貢献が見込まれる。相手国参画機関はいずれも国立研究機関であり、感染症対策の国家プロジェクト推進の中心機関である。
- b. 政府レベルでの協力関係への展開構想
 感染症対策として、宿主因子評価に基づいた個別化予防医療プログラム実現に技術的な見通しが立てば、両国政府による国際貢献の一つとして人的・資金的な支援を賜うことを切望する。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

ヒト臨床検体を用いる研究であることから、個人名とゲノム多型の遺伝子型情報など個人の特定につながる情報の漏洩防止につとめる。具体的には情報管理者（研究分担者・吉田）のみが連結情報を参照できる形として、検体の匿名化を図る。検体供与者が受ける侵襲は検診時の約3mlの末梢血採取で、採血時の苦痛の他には影響は無視できるほど軽微と考える。参画機関のすべてにおいてすでに倫理審査委員会が設置・運営されており、本申請提出時にはそれぞれの機関で倫理審査を受ける準備状態にある。出生コホート研究については出生時遺伝子多型研究を含め審査委員会の承認済みであるので、本研究計画が採択され次第、2歳検診とその際の検索についての承認を得る。検体供与者自身は未成年であるので法的な保護者に研究内容を説明し、書面で検体供与への同意を得て検体採取を施行する。（その後、倫理委員会の審査を受け、承認された。）

安全面については、感染性のおそれのある臨床検体の取り扱いには、それぞれの参画研究機関の安全管理体制の枠組みの中で行なう。いずれの機関もBSL3までのレベルの対策が講じられている。

7. 研究実施体制



氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎安波 道郎	熱帯医学研究所・教授	研究統括、 出生時採取 DNA 試料を用いた感染症発症リスク評価のための遺伝子型決定、 末梢血全血培養法による感染抵抗性評価のための生物学的指標測定系開発と測定
有吉 紅也	熱帯医学研究所・教授	感染症発症追跡調査に基づく臨床疫学的解析
吉田 レイミント	熱帯医学研究所・准教授	感染症発症追跡調査における病因論解析、 感染抵抗性およびワクチン効果評価のための検診実施・検体採取、データの管理

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 22 年度

・計画

(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動(代表機関;長崎大学)

末梢血少量全血培養法と高集積度 PCR 法による遺伝子発現測定系の準備 (20.0 百万円)

Khanh Hoa 出生コホートの感染症発症宿主要因遺伝子型検索 (3.0 百万円)

(2) コミュニティベースの感染症捕捉に関する研究活動(国外参画機関;国立衛生疫学研究所)

Khanh Hoa 出生コホートでの感染症発症の追跡調査 (2.0 百万円)

・実績

(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動(代表機関;長崎大学)

末梢血少量全血培養法と高集積度 PCR 法による遺伝子発現測定系の準備:2 歳児検診での限られた量の採血検体を用いての生体応答予備測定系として、LPS 等の刺激下での全血培養後のサイトカイン類遺伝子の反応性の転写誘導の多項目・多検体測定に対応する高集積度リアルタイム定量 RT-PCR システムを整備した。

Khanh Hoa 出生コホートの感染症発症宿主要因遺伝子型検索:2009 年 5 月から 2010 年 5 月にかけての登録時に収集した 2000 名の出生コホートの出生時臍帯血保存検体を用いてゲノム DNA の調整を完了し、対象遺伝子多型遺伝子型検索を開始した。

b. 平成 23 年度

・計画

(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動(代表機関;長崎大学)

Khanh Hoa 出生コホート 2 歳児検診実施と検体採取・調製・保存 (13.0 百万円)

Khanh Hoa 出生コホートの感染症発症宿主要因遺伝子型検索 (4.0 百万円→1.5 百万円)

検診時検体を用いた血漿中抗体・サイトカイン定量と全血培養検体の遺伝子発現定量による宿主応答の評価 (6.0 百万円→3.0 百万円)

(2) コミュニティベースの感染症捕捉に関する研究活動(国外参画機関;国立衛生疫学研究所)

Khanh Hoa 出生コホートでの感染症発症の追跡調査 (2.0 百万円)

(3) デングウイルス、エンテロウイルス感染症に関する研究活動(国外参画機関;国立ホーチミン市パスツール研究所)

検診時採取血漿中の中和抗体価測定による感染既往の分析 (2.0 百万円)

・実績

(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動(代表機関;長崎大学)

平成 23(2011)年 5 月より保護者の同意のもとに出生コホート対象児の健康・発達状況の調査目的での検診を実施し約 65%の受診率を達成した。検診時に予め定めた量の末梢血を採取し、血球数算定・抗体検査のための血漿分離に併せて、宿主応答評価のための少量全血培養を実施し、培養上清と細胞成分を分けてそれぞれを凍結保存した。対象児の満 2 歳誕生日は最年少児が次年度の 5 月であるため次年度 5 月まで検診を実施することとした。

2011 年 5 月から 6 月にかけて実施した少量全血培養の保存検体から RNA を調製し、予定した方法により遺伝子発現の定量的測定が可能であることを確認した。

c. 平成 24 年度

・計画

(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動(代表機関;長崎大学)

Khanh Hoa 出生コホート 2 歳児検診実施と検体採取・調製・保存を 2 か月継続 (0 円→3.0 百万円)

臨床データと実験データの総合解析と研究のまとめ (3.0 百万円)

検診時検体を用いた血漿中抗体・サイトカイン定量と全血培養検体の遺伝子発現定量による宿主応答の評価 (20.0 百万円)

臨床データと実験データの総合解析と研究のまとめ (3.0 百万円)

(3) デングウイルス、エンテロウイルス感染症に関する研究活動(国外参画機関;国立ホーチミン市パスツール研究所)

検診時採取血漿中の中和抗体価測定による感染既往の分析 (2.0 百万円)

9. 年次計画

研究項目	1年度目	2年度目	3年度目
(1) 小児感染症宿主因子同定に関する研究活動 (代表機関；長崎大学)	末梢血少量全血培養法と高集積度 PCR 法による遺伝子発現測定系の準備 ←→ 20.0 百万円	Khanh Hoa 出生コホート 2 歳児検診実施と検体採取・調製・保存 ←→ 13.0 百万円	臨床データと実験データの総合解析と研究のまとめ ←→ 3.0 百万円
	Khanh Hoa 出生症発症宿主要因 ←→ 3.0 百万円	コホートの感染遺伝子型検索 ←→ 1.5 百万円 検診時検体を用いた血漿中抗体サイトカイン定量と全血培養検体の遺伝子発現定量による宿主応答の評価 ←→ 3.0 百万円	←→ 20.0 百万円
(2) コミュニティベースの感染症捕捉に関する研究活動 (国外参画機関；国立衛生疫学研究所)	Khanh Hoa 出生感染症発症の ←→ 2.0 百万円	コホートでの追跡調査 ←→ 2.0 百万円	
(3) デングウイルス、エンテロウイルス感染症に関する研究活動 (国外参画機関；国立ホーチミン市パスツール研究所)		検診時採取血漿測定による ←→ 2.0 百万円	中の中和抗体価感染既往の分析 ←→ 2.0 百万円