課題番号	22 独先 09

【様式 5 独創的・先駆的研究】

学術研究助成金〔独創的・先駆的研究〕
実　績　報　告　書

令和　6　年　5　月　7　日

氏　　名：　　早川　　智

所属・資格：　医学部・　教授

実施研究所：　医学部・総合医学研究所

1　研究課題

新興感染症・再興感染症に対するレジリエンスを目的とした国際的・学際的研究拠点形成

2　研究期間

令和　　4 年度　～　令和　　5 年度

※令和　　年度　～　令和　　年度（※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること）

3　研究組織

研究代表者及び研究分担者

	氏　　名	部科校・資格	役割分担
研究代表者	早川　智 （30238084）	医学部・教授 医学博士	研究の総括．感染研究拠点形成と病原体，免疫応答の解析
研究分担者	泉福　英信 （20250186）	松戸歯学部・教授 博士（歯学）	医科歯科領域の病原体解析と分子疫学
	福田　充 （20316508）	危機管理学部.･教授　博士（政治学）	社会危機としての感染症に対する指針とその評価
	権　　赫旭 （80361856）	経済学部・教授 博士（経済学）	感染症の社会．経済に与える影響の解析と対応
	森岡　一朗 （80437467）	医学部・教授 博士（医学）	小児感染症の臨床的解析
	本田　和也 （30199567） 令和 5 年退職	歯学部・特任教授 歯学博士	途上国における遠隔診断と医療協力
	蜂巣　浩生 （30228481）	理工学部・教授 博士（工学）	感染症に対し耐性のある建築と都市設計
	佐藤　秀一 （50225942）	歯学部・教授 博士（歯学）	口腔感染症と下気道感染症の関連

課題番号	22 独先 09

	川名　敬 （60311627）	医学部・教授 博士（医学）	COVID-19 母子感染の解析，HPV 発がん
	木下　浩作 （90260968）	医学部・教授 医学博士	救命救急，重症者の全身管理
	佐藤　真伍 （60708593）	生物資源科学部・准教授 博士（獣医学）	人獣共通感染症の制御
	高山忠輝 （10366601）	医学部・教授 医学博士	COVID-19 のより優れた管理法の臨床的評価
	武市　収 （10277460）	歯学部・教授 歯学博士	口腔感染症と自己免疫疾患の関連 ウイルス・細菌相互作用
	合計 13 名		

連携組織

組　織　名	役　割　分　担
明海大学歯学部	環境中の COVID-19 検出 LAMP 法による新規分子診断法
国立感染症研究所	COVID-19 感染胎盤の解析
チェンマイ大学	臨床検体の採集と分子疫学的解析
ハンヤン大学	細菌と環境の相互作用

※**ホームページ等での公開（☑可・☐否）**いずれかをチェックしてください。
否の場合は，理由書を別途添付のこと。

課題番号	22 独先 09

【様式 5 独創的・先駆的研究】

4　現在までの達成度

当初の研究目的に対する達成度について研究期間全体を 100%として，以下の区分より自己評価を行ってください。
＜区分＞①当初の計画以上に進展している。②概ね順調に進展している。③やや遅れている。

【区分：　①　　】・【達成度：　100　　%】

5　研究目的

本研究の目的は，多分野の研究者が参画する感染症研究拠点を日本大学に形成することである．そのためには医歯系，理工系，文系学部が協力し，海外の大学や研究所と共に，総合的な研究を進める必要がある．COVID-19 の終息後も同様のパンデミックがいつまた生じるかわからず，感染性や致死率によってはさらなる混乱が生じる可能性があるからである．日本大学が新興・再興感染症の研究拠点を形成し，感染症予防と啓発の中心となること，ならびに感染症による社会への影響を抑え，レジリエンスの高い社会を構築する「知のセンター」となることを目指し，研究成果をもとに，重篤な感染症の病態を病原体，宿主，社会環境と法的背景から解析し，新たな検査法とワクチン開発ならびに普及を行ことで国際貢献に尽力する．そのために，日本大学の複数学部が各々の背景を生かして有機的なコンソーシアムを形成し，社会に発信するとともに，留学生の派遣や受け入れ，在外研究者の協力を得て次世代の研究者を育成する．

6　研究概要

1）二つの附属病院で実際に患者を診察する医学部，また独自の病院を有する歯学部，松戸歯学部，生物資源科学部さらに関連病院で COVID-19 に限らず様々な感染症の先端的な診療を通じて臨床的研究を行うとともに，臨床検体を収集し BSL3 実験施設のある医学部板橋キャンパスで病原体の解析を行う．また動物モデルや分子生物学的解析を行う．

2）共同研究体制を構築している国内他施設（国立感染症研究所，国立国際医療センター，東京大学，明海大学，埼玉医科大学）並びに海外では　ハンヤン大学（韓国），チェンマイ大学（タイ王国），ダッカ大学（バングラデシュ），UCLA，City of Hope 研究所（米国）と共同研究を進める．これらの大学から留学生を集めるとともに，海外での医学研究を志す若者を送り出す．

3）次世代の日本大学を担う学部学生や大学院生，研修医を積極的に研究に参画させ，彼ら彼女らの名前で査読付き英文論文を発表する．

4）研究成果をもとに，国の指針に参画しアカデミアからの情報発信を行う．

5）研究成果をできるだけ IF の高い英文雑誌に投稿するとともに特許を取得する．

6）基盤 B 以上の大型科研費と，AMED や CREST などの公的研究費に加え，企業からの委託研究や寄付講座，奨学寄付金などの外部資金を獲得する．

課題番号	22 独先 09

7　研究結果（4,000 字以上記入のこと）

Part　I　医学領域の研究成果（歯科医学，獣医学を含む）

I　早川　智（医学部）：感染症の分子病理の解明

1）ウイルス母子感染における胎盤関門の役割

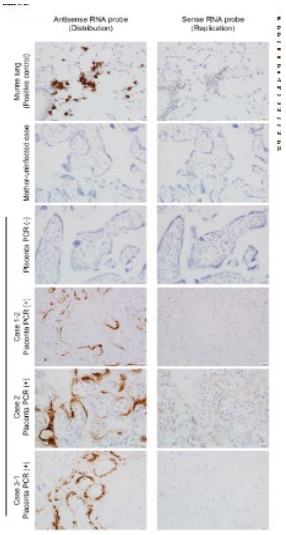
医学部病態病理学系微生物学分野
早川　智，相澤（小峯）志保子，Trinh Duy Quang，髙田和秀，高野智圭，並木貴宏

【概要】

妊娠母体は様々な感染性病原体に暴露する．子宮内の胎児は外界から守られているが，上行性あるいは血行性に到達するウイルスは卵膜や胎盤を潜り抜けて児に到達し，子宮内感染による流早産や奇形，場合によっては死産の原因となる．しかし，奇形を起こしやすいいわゆる TORCH 症候群でも全例に子宮内感染がみられるわけではない．我々はかつて，HIV 母子感染の解析から胎盤における防御因子 H11/HSPB8（Kudoh A, Miyakawa K, Matsunaga S, Matsushima Y, Kosugi I, Kimura H, Hayakawa S, Sawasaki T, Ryo A. H11/HSPB8 Restricts HIV-2 Vpx to Restore the Anti-Viral Activity of SAMHD1. Front Microbiol. 2016 Jun 13;7:883.）を同定したが，本研究では，他のウイルスに対し，どのような分子機構が存在するのかを解析した．

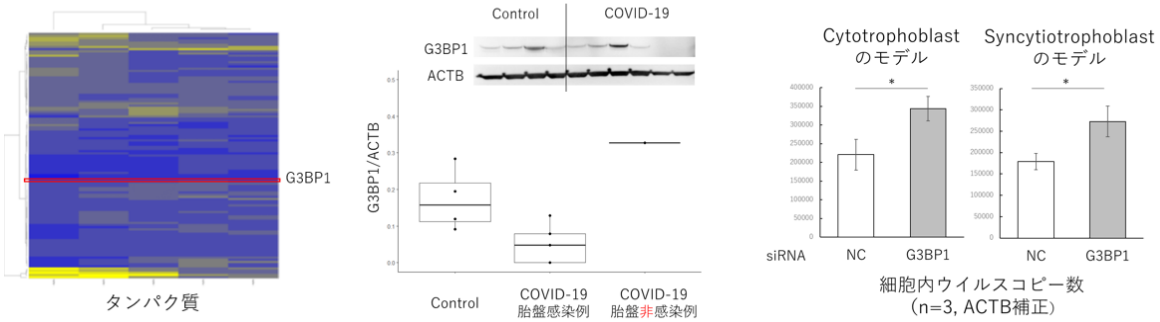
1－1）SARS-CoV-2 の母児感染と胎盤関門　（髙田和秀・相澤（小峯）志保子・早川智）

SARS-CoV-2 はしばしばヒトの胎盤組織に感染するが，垂直感染はまれである．従って胎盤には胎児へのウイルス感染を抑制するバリアが存在する可能性がある．SARS-CoV-2 感染妊婦の胎盤を用いてスパイクタンパク質を標的としたアンチセンスプローブを用いた in situ ハイブリダイゼーションを行った．ヒト胎盤組織における SARS-CoV-2 ゲノムの存在を確認できたが，複製は途中で止まっていた．いわゆる abortive infection が SARS-CoV2 に対する胎盤バリアの本態である可能性がある．さらに，COVID-19 感染妊婦の胎盤に発現する複数のタンパクを解析し，　G3BP1 が強発現する症例では母子感染が起きないことを明らかにした．これを確認するために in vitro の系でその発現をノックダウンするとウイルス複製が生じることを明らかにした．（Takada K　投稿中）



課題番号	22 独先 09

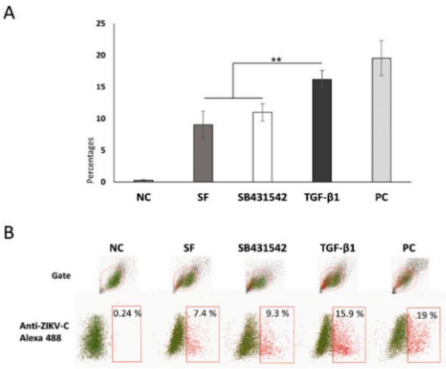
〔7　研究結果（つづき）〕



Takada K, Shimodai-Yamada S, Suzuki M, Trinh QD, Takano C, Kawakami K, Asai-Sato M, Komatsu A, Okahashi A, Nagano N, Misawa T, Yamaguchi K, Suzuki T, Kawana K, Morioka I, Yamada H, Hayakawa S, Hao H, Komine-Aizawa S. Restriction of SARS-CoV-2 replication in the human placenta. Placenta. 2022 Sep;127:73-76. doi: 10.1016/j.placenta.2022.07.010. Epub 2022 Jul 19. PMID: 35973367; PMCID: PMC9293377.

1－2）ジカ熱の母児感染と胎盤関門　（Trinh　Duy Quang・早川　智）

ジカウイルス（ZIKV）は，妊娠中に感染すると先天性ジカ症候群を引き起こすが胎盤バリアを通過するメカニズムは不明である．我々は脱落膜局所における母児免疫寛容に関与する TGF-β1 が母子感染に重要な役割を果たすことを明らかにした．不死化ヒト絨毛細胞，Swan.71 を TGF-β1（10ng/mL）で 2 日間処理すると ZIKV の感染促進が見られた．この反応は TGF-β/Smad シグナル伝達経路の阻害剤である SB431542 または SB525334 で抑制された．TGF-β1 はレセプター遺伝子 Tyro3 および AXL の発現増強を来すことが判明した．



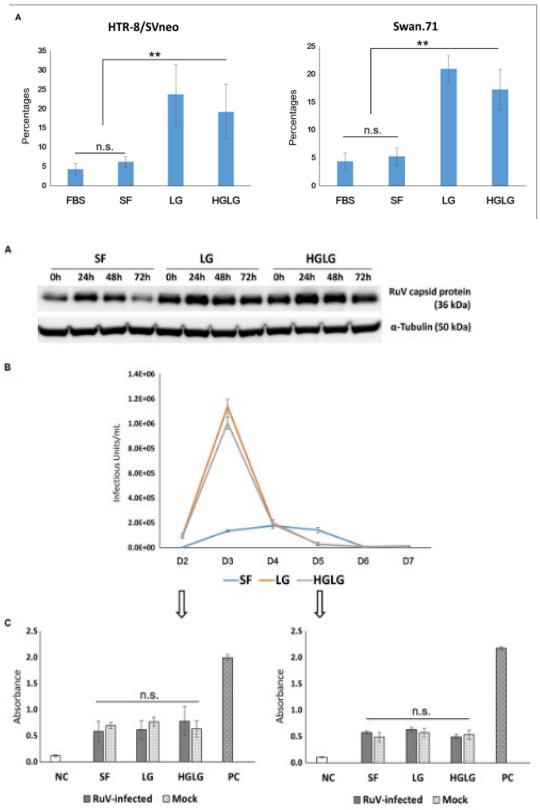
1.　Trinh QD, Pham NTK, Takada K, Takano C, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. TGF-β1 Promotes Zika Virus Infection in Immortalized Human First-Trimester Trophoblasts via the Smad Pathway. Cells. 2022 Sep 27;11(19):3026. doi: 10.3390/cells11193026. PMID: 36230987; PMCID: PMC9562857.

2.　Trinh QD, Pham NTK, Takada K, Ushijima H, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Roles of TGF-β1 in Viral Infection during Pregnancy: Research Update and Perspectives. Int J Mol Sci. 2023 Mar 30;24(7):6489. doi: 10.3390/ijms24076489. PMID: 37047462; PMCID: PMC10095195.

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

1－3）風疹の母子感染と胎盤関門（Trinh　Duy Quang・高野智圭・並木貴宏・相澤（小峯）志保子・早川　智）



妊娠初期の風疹ウイルス（RuV）感染は，先天性風疹症候群（CRS）を引き起こす可能性がある．しかし，胎児の RuV 感染のメカニズムは完全には解明されておらず，従来の報告では胎盤の絨毛細胞は RuV に低感受性と言われてきた．一方ではコントロール不良の妊娠糖尿病は先天性ウイルス感染症の危険因子であるとされる．我々は不死化したヒト初期絨毛細胞 HTR-8/SVneo および Swan.71 を用いて，低血糖による小胞体ストレスが感受性を誘導することを明らかにした．RuV カプシドタンパク質の細胞内局在に加え，上清中への放出が認められた．LG ストレスを受けた細胞では，ウイルス結合が約 5 倍増加したが，その機序は不明であり，未知のレセプターを介する可能性がある．[1, 2]　次に，不幸にして先天風疹症候群を発症した小児の予後因子を解析した．先天性風疹症候群（CRS）は，妊娠初期の母体風疹ウイルス感染に起因する．過去に少数の CRS 患者において神経画像異常所見が解析されているが，その臨床的意義は十分に検討されていない．そこで，過去の研究から CRS 患者 31 名の神経画像所見を調査した．最も多い所見は実質石灰化であり，31 人中 18 人（58.1%）に認められた．多変量ロジスティック回帰モデルにより，精神運動または精神遅滞との関連が示され（$p = 0.018$），CRS における脳実質石灰化は予後因子となりうることが示唆された．[3]

1.　Trinh QD, Takada K, Pham NTK, Takano C, Namiki T, Ikuta R, Hayashida S, Okitsu S, Ushijima H, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Enhancement of Rubella Virus Infection in Immortalized Human First-Trimester Trophoblasts Under Low-Glucose Stress Conditions. Front Microbiol. 2022 Jul 8;13:904189. doi: 10.3389/fmicb.2022.904189. PMID: 35875557; PMCID: PMC9304883.

2.　Pham NTK, Trinh QD, Takada K, Komine-Aizawa S, Hayakawa S. Low Susceptibility of Rubella Virus in First-Trimester Trophoblast Cell Lines. Viruses. 2022 May 27;14(6):1169. doi: 10.3390/v14061169. PMID: 35746641; PMCID: PMC9228130.

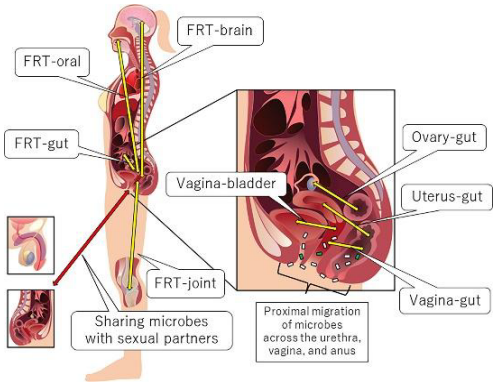
3.　Namiki T, Takano C, Aoki R, Trinh QD, Morioka I, Hayakawa S. Parenchymal calcification is associated with the neurological prognosis in patients with congenital rubella syndrome. Congenit Anom (Kyoto). 2022 Jan;62(1):38-41. doi: 10.1111/cga.12442. Epub 2021 Aug 23. PMID: 34396588.

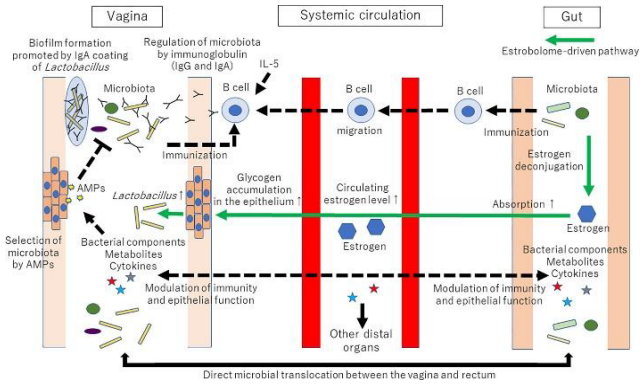
課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

2）女性生殖器の粘膜免疫と細菌叢　（高田和秀，　早川　智）　ロシアとの国際共同研究

女性生殖器（FRT）と体内の各種臓器は双方向のコミュニケーションを共有している．我々は "FRT-organ axes "というパラダイムを提唱した．すなわち，膣-腸軸，子宮-腸軸，卵巣-腸軸，

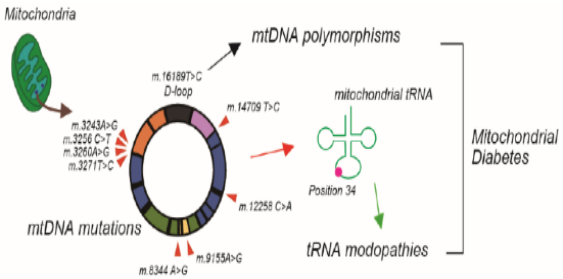




膣-膀胱軸，膣-口腔軸，子宮-口腔軸，
膣-脳軸，子宮-脳軸，膣-関節軸といった関連で様々な病態を説明できる．膣に存在する微生物叢が FRT-organ 軸の主役であり，乳酸桿菌が重要であるが，宿主の免疫能が深く関与する．FRT-organ 軸の検討から女性の身体の恒常性維持機構を理解し，新たな治療法を見出すためのヒントを与えてくれる可能性がある．

Takada K, Melnikov VG, Kobayashi R, Komine-Aizawa S, Tsuji NM, Hayakawa S. Female reproductive tract-organ axes. Front Immunol. 2023 Jan 31;14:1110001. doi: 10.3389/fimmu.2023.1110001. PMID: 36798125; PMCID: PMC9927230.

3）　ミトコンドリア：太古の昔に共生した微生物（高野）



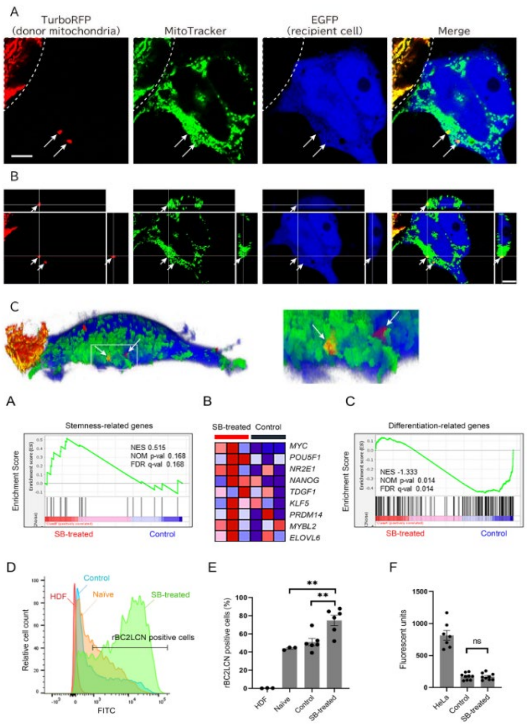
ミトコンドリア糖尿病（MD）は，一般に β 細胞の遺伝子異常として分類される．主な病態は，ミトコンドリアの ATP 産生障害による膵臓 β 細胞のインスリン分泌不全である．しかし，いくつかの報告では，MD の臨床的特徴として，インスリン抵抗性（IR）の存在に言及している．ミトコンドリア機能障害は IR を引き起こす重要な因子の一つであり，MD のもう一つの病態生理として IR に注目する必要がある．我々は本論文[1]で IR のインスリンシグナルと分子機構について概説し，次に，現在確認されている病原性ミトコンドリア DNA（mtDNA）変異について，MITOMAP データベースから概観した．糖尿病を引き起こす変異体は，ほとんどがミトコンドリアゲノムのトランスファーRNA（tRNA）の点変異であった．第三に，最近報告された「tRNA モドパチー」につながるこれらの変異体に焦点を当て，糖尿病患者の臨床的特徴について概説した．最後に，mtDNA 変異による MD の病態生理を考察し，IR の発症の基礎となる可能性のあるメカニズムを探った．2 型糖尿病の病態の一部にミトコンドリア異常が関与することから，今後新たな創薬のターゲットとなる可能性がある．[1]

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

ミトコンドリア輸送：近年，細胞間ミトコンドリア移動が注目されている．健康な幹細胞からミトコンドリア機能障害を持つ細胞へ，ミトコンドリアを輸送する新たな幹細胞治療が開発できる可能性がある．我々は二重蛍光標識システムを用いてドナー細胞およびレシピエント細胞のミトコンドリアを染色し羊膜上皮細胞から TurboRFP 標識された健常なミトコンドリアが，ミトコンドリアが損傷したレシピエント細胞に正常に移植され，膜電位の変化を来しえることを明らかにした．ミトコンドリアは太古の昔に，古細菌に近い我々の細胞に寄生した好気性菌に由来するが現在でもダイナミックな移送とある種の細胞間感染が生じることを明らかにした．[2]

羊膜由来胎盤幹細胞の分化転換（高野智圭，三木敏生）：



胎盤幹細胞の一種であるヒト羊膜上皮細胞（hAECs）は，幹細胞マーカー遺伝子を発現し，適切な培養条件下で 3 つの胚葉に分化することができる．hAECs は TGF-β 依存性の上皮間葉転換（EMT）を起こすことが知られているが，EMT が hAECs の幹や分化に与える影響はまだ明らかにされていない．今回，我々は，hAECs が初代培養開始直後に EMT を起こすことを初めて確認した．RNA-seq による網羅的なトランスクリプトーム解析により，TGF-β 依存性の EMT を抑制することで，hAECs の NANOG や POU5F1 などの幹性関連遺伝子の発現が維持されることがわかった．さらに，幹性の維持は hAECs の非腫瘍原性特性に影響を与えなかった．我々は，TGF-β 依存性 EMT が hAECs の幹性に悪影響を及ぼすことを初めて示し，胎盤幹細胞の細胞プロセスに関する新しい知見を明らかにした．

1. Takano C, Ogawa E, Hayakawa S. Insulin Resistance in Mitochondrial Diabetes. Biomolecules. 2023 Jan 7;13(1):126. doi: 10.3390/biom13010126. PMID: 36671511; PMCID: PMC9855690.

2. Taiko I, Takano C, Nomoto M, Hayashida S, Kanemaru K, Miki T. Selection of red fluorescent protein for genetic labeling of mitochondria and intercellular transfer of viable mitochondria. Sci Rep. 2022 Nov 18;12(1):19841. doi: 10.1038/s41598-022-24297-0. PMID: 36400807; PMCID: PMC9674635.

3. Takano C, Horie M, Taiko I, Trinh QD, Kanemaru K, Komine-Aizawa S, Hayakawa S, Miki T. Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition Maintains Stemness in Human Amniotic Epithelial Cells. Stem Cell Rev Rep. 2022 Dec;18(8):3083-3091. doi: 10.1007/s12015-022-10420-1. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35931939; PMCID: PMC9622541.

〔7　研究結果（つづき）〕

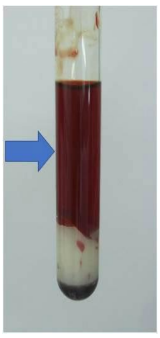
4）非定型インフルエンザ菌（NTHi）による突然死小児の解析　（高野智圭）

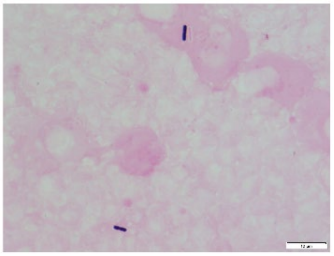
非定型インフルエンザ菌（NTHi）感染は致死的になることは少ないが，侵襲性 NTHi 感染症は世界的に増加している．我々は免疫グロブリン G2（IgG2）欠乏症が基礎にある 2 歳 7 ヶ月の男児小児において，侵襲性 NTHi 感染症による突然死を経験した．剖検の結果，諸臓器うっ血のみがみられ，組織学的には主要臓器の血管内に好中球が認められた．一方，微小膿瘍の形成は確認できなかった．血液培養の結果，*Haemophilus Influenzae* が陽性であった．本症例は NTHi による菌血症とうつ伏せ寝による高熱を併発による窒息死と考えられた．本菌種は弱毒菌であるが免疫不全の小児にとって，突然死のリスクをもたらす可能性がある．

Abe Y, Takano C, Tie J, Isobe E, Ohirabaru A, Isahai I, Nishiyama H, Jike T, Masuda S, Okuda T. Sudden death of a child associated with invasive non-typeable Haemophilus influenzae infection with underlying IgG_2 subclass deficiency. Leg Med (Tokyo). 2023 May;62:102240. doi: 10.1016/j.legalmed.2023.102240. Epub 2023 Mar 13. PMID: 36958272.

5）*Chlostridium perfringens(CP)*による菌血症と劇症型溶血の病態　（早川　智・須﨑　愛）

CP による菌血症は，発症率は非常に低いものの，半数は重症化し死に至る．我々が経験した 6 症例を含む過去 50 年の 106 例の報告の解析から予後因子を解析した．劇症型溶血例は若く，男性に多い傾向があったが，分離菌の毒素型や遺伝子に差はなかった．Massive intravascular hemolysis （MIH）症例では，臨床分離菌の培養上清中の θ-toxin レベルは，末梢血中の炎症性サイトカイン産生量に比例し，激しいサイトカインストームの発生が示唆された．MIH は進行が非常に早く予後も悪いため，迅速な診断と治療が必要である．しかし，十分な症例解析がなされていないため，信頼できる診断と治療の基準がまだ確立されていない．進化生物学的には重症で全身性の溶血は，細菌が赤血球から鉄の利用という利益を得る前に宿主を死に至らしめるため，進化的不適応と考えられる．





1） Suzaki A, Komine-Aizawa S, Nishiyama H, Hayakawa S. Massive intravascular hemolysis is an important factor in Clostridium perfringens-induced bacteremia. Intern Emerg Med. 2022 Oct;17(7):1959-1967

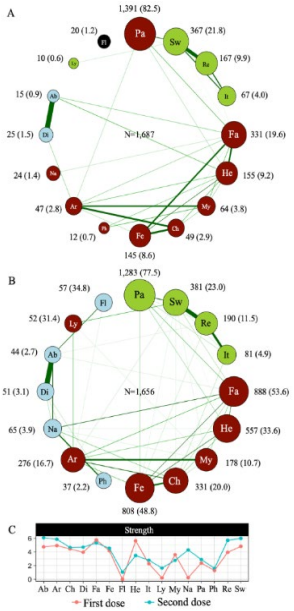
2）Suzaki A, Hayakawa S. Clinical and Microbiological Features of Fulminant Haemolysis Caused by *Clostridium perfringens* Bacteraemia: Unknown Pathogenesis. Microorganisms. 2023 Mar 23;11(4):824. doi: 10.3390/microorganisms11040824. PMID: 37110247; PMCID: PMC10143116.

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

6）COVID-19 ワクチン副反応調査　（相澤（小峯）志保子，並木貴宏，早川　智）

COVID-19 ワクチンの接種は重症化予防に有用であるが，副反応からこれを拒絶する人もいる．日本人のワクチン接種後の副反応を調査するため，医学部および附属病院の医師，看護師，その他の医療スタッフ，医学部教職員，学生を含む医療従事者を対象にオンラインで調査を実施した．また，ネットワーク分析により，さまざまな有害事象と個々の要因（年齢，性別など）との関連性を分析した．若年齢と女性は，しばしばより重篤な有害事象の危険因子と考えられているが，回帰モデルの結果，本研究では，年齢も性別も 2 回目の接種後の局所の副反応と関連していなかった．局所反応とは対照的に，全身性の有害事象は若年者および女性に多く認められた．ネットワーク解析の結果，筋肉痛は関節痛との関連があった．また，1 回目と 2 回目の両方のワクチン接種後に生じた全身性事象は年齢と関連しなかった．



Namiki T, Komine-Aizawa S, Takada K, Takano C, Trinh QD, Hayakawa S. Adverse events after BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccination in health care workers and medical students in Japan. J Infect Chemother. 2022 Aug;28(8):1220-1224. doi: 10.1016/j.jiac.2022.05.002.

7）COVID-19 ワクチンが女性の月経周期に与える影響

（相澤（小峯）志保子，並木貴宏，早川智

COVID-19 ワクチンと月経不順や不正出血などの婦人科系有害事象が報告されているため，その頻度と重症度を解析した．日本国内の一施設で接種を受けた男女にアンケート調査を実施した．回答は 819 件で，女性からの回答は 424 件であった．異常出血の頻度は，初回，2 回目，3 回目でそれぞれ 0.6%，1.0%，3.0%であった．月経不順は，初回，2 回目，3 回目でそれぞれ 1.9%，4.9%，6.6%であった．ネットワーク解析の結果，異常出血および月経不順は，他の副作用と関連していないことが判明した．本研究により COVID-19 ワクチン接種による月経への影響は一定の頻度で見られるが，限定的であることが示された．

TABLE 2 Comparison of the incidence of abnormal bleeding and irregular menstrual cycles after each dose of the BNT162b2 vaccine

Comparison	*p*-Value	Odds ratio	95% confidence interval
Abnormal bleeding			
1st vs. 2nd	1.000	153.5	38.2–616.5
1st vs. 3rd	0.047*	148.0	36.8–594.6
2nd vs. 3rd	0.105	98.7	31.6–307.7
Irregular menstrual cycle			
1st vs. 2nd	0.006*	48.3	21.5–108.5
1st vs. 3rd	0.006*	47.5	21.2–106.6
2nd vs. 3rd	0.424	19.0	11.3–31.9

*Statistically significant.

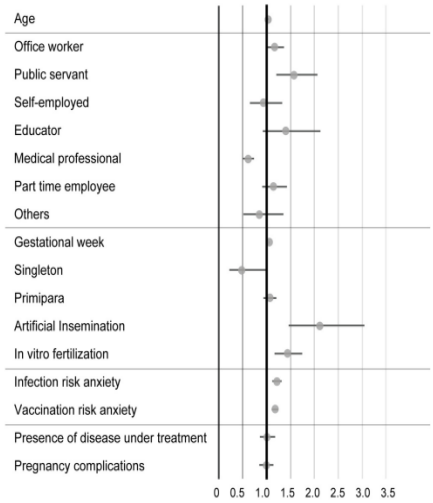
Namiki T, Komine-Aizawa S, Takada K, Takano C, Trinh QD, Hayakawa S. The association of three doses of the BNT162b2 mRNA vaccine with abnormal bleeding and an irregular menstrual cycle among premenopausal females: A single institute observation study. J Obstet Gynaecol Res. 2022 Nov;48(11):2903-2910. doi: 10.1111/jog.15400.

〔7　研究結果（つづき）〕

II　相澤（小峯）志保子（医学部病態病理学系微生物学分野）

1）我国の妊婦におけるワクチン情報収集法の解析（福田充，相澤（小峯）志保子）

妊婦が COVID-19 に関する情報をどこから収集し，行動にどのように影響するかは重要な問題である．実際，インフォデミックが妊婦におけるワクチン忌避の原因となっている可能性がある．本研究は，妊婦が COVID-19 および COVID-19 ワクチン接種に関する情報をどのように収集しているかを調査することを目的とした．2021 年 10 月 5 日から 11 月 22 日の間に妊婦を対象にオンラインアンケート調査を実施した．1179 名の不十分な回答を除外した上で，4962 名の回答を得た．年齢，職業，感染リスク不安が，情報を得るためのメディアの選択に影響を与えていることが判明した．年齢が高い妊婦，医療従事者，公務員，教育関係者は医療専門サイトを利用する傾向があり，主婦はマスメディア，ソーシャルメディア，科学的根拠が不確かな情報源を利用する傾向があった．さらに，妊娠週数や妊娠方法（自然妊娠か生殖補助医療か）がメディアの選択に影響を与えた．妊婦が COVID-19 の情報にアクセスしやすいかどうかは，社会的背景や妊娠の状態によって決定された．医療関係者や情報を提供する側は，妊婦とその家族が適切な情報を容易に入手できるよう，今後も努力を続けていく必要がある．



Komine-Aizawa S, Yamada N, Haruyama Y, Deguchi M, Fukuda M, Kawana K, Kobashi G, Miyagi E, Yamada H, Sugiyama T, Hayakawa S. The Factors Influencing Pregnant Women's Selection of Media Sources to Obtain Information on COVID-19 in Japan in 2021. Vaccines (Basel). 2023 Apr 6;11(4):805. doi: 10.3390/vaccines11040805. PMID: 37112717; PMCID: PMC10143418.

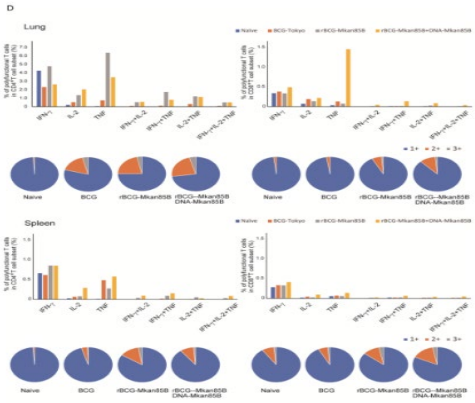
2）非結核性抗酸菌に対する新たなワクチン開発（相澤（小峯）志保子，早川 智）

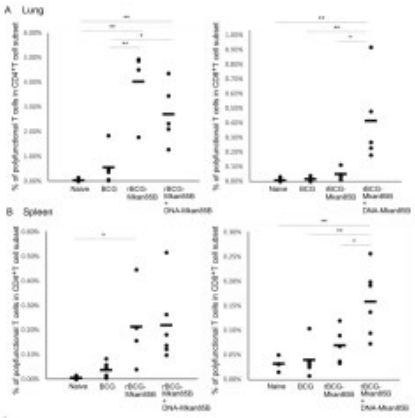
【概要】結核はいまだに多くの人々の生命を脅かす感染症である．さらに近年抗菌薬耐性が大きな問題となっておるが現在唯一の結核ワクチンである BCG は成人に対してはその効果が必ずしも十分とは言えない．我々は BCG に日結核抗酸菌の遺伝子を組み込むことによってより強い免疫原性のある新規ワクチンを開発した．

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

1）結核菌（*Mycobacterium tuberculosis:* Mtb）感染は，依然として世界的に大きな健康問題である．BCG ワクチンは結核予防のために 20 世紀の初めから最も広く用いられているワクチンであるが，その有効性は限定的である．我々は以前，*M. kansasii* の Ag85B タンパク質（Mkan85B）をコードする新しい組換え BCG（rBCG）ベースのワクチン（rBCG-Mkan85B と呼ぶ）を開発した．また，DNA ワクチンとして Ag85B 遺伝子を発現するプラスミド DNA（DNA-Mkan85B）を作製し，rBCG-Mkan85B 接種後に DNA-Mkan85B をブースト接種するプライム-ブーストの接種プロトコルを開発した．rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B プライムブーストワクチン接種プロトコルは CB6F1 マウスにおいて，*M. kansasii* 感染防御に有効であった．本研究では，rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B ワクチンの結核防御効果をマウスモデルを用いて検討した．CB6F1 マウスに既存の BCG，もしくは rBCG-Mkan85B 単独接種，rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B プライムブーストプロトコル接種し，6 週間後に Mtb Erdman 株を吸入感染させた．BCG および rBCG-Mkan85B 単独接種と比較して，rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B プライムブーストワクチン接種は，肺のコロニー形成単位（CFU）数を著しく減少させた．さらに，rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B プライムブーストワクチン接種は，抗原特異的な CD4+および CD8+ T 細胞を誘導した．rBCG-Mkan85B/DNA-Mkan85B プライムブースト接種は新たな結核ワクチン候補となり得る．さらに，組換え BCG の手法は結核に限らず，新たなワクチン開発のストラテジーとして有効である．





Komine-Aizawa S, Mizuno S, Kawano A, Hayakawa S, Matsuo K, Honda M. The Induction of Antigen 85B-Specific CD8+ T Cells by Recombinant BCG Protects against Mycobacterial Infection in Mice. Int J Mol Sci. 2023 Jan 4;24(2):966. doi: 10.3390/ijms24020966. PMID: 36674484; PMCID: PMC9862620.

〔7　研究結果（つづき)〕

III　牛島　廣治：　臨床，食物，環境水検体を用いた急性胃腸炎ウイルスの分子疫学的解析

（牛島廣治 [1]，沖津祥子 [1]，Sheikh Ariful Hoque[1,2]，Pham Thi Kim Ngan[1,3]，恩田優子 [1]，早川智 [1]1 日本大学医学部病態病理学系微生物学，2 ダッカ大学先端科学研究所，3 日本大学生産工学部応用分子科学科）

【概要】臨床検体，食品，環境水検体から急性胃腸炎を起こすウイルスを検出しその配列解析を行い，胃腸炎起因ウイルスの流行を調べた．2020 年初め，COVID-19 が日本へ流入し，そのパンデミックへの環境対策のために，2020 年 7 月～2022 年 6 月の 1 年間では臨床検体数が減少し，検出ウイルスも減少した．一方環境水ではその間でもウイルスは検出された．サポウイルスの流行，ロタウイルス遺伝子型の変遷，流行しているノロウイルスの組換え体，アストロウイルスのアウトブレイクを調べた．淡水産貝類からロタウイルスが検出された．このように臨床検体に加え環境検体，食品からウイルスを検出することはウイルスの流行解析のために有効である．

A．はじめに

グローバル化の進んだ現代においては地域における感染症の流行（エピデミック）が，きわめて短い間に世界的流行（パンデミック）となることは，COVID-19 の流行を見ても明らかであり，国を超えてのサーベイランスが重要である．ウイルスによる急性胃腸炎（AGE）は今でも全世界的に大きな健康問題である．日本でも死亡は少ないものの，乳幼児の感染が多く見られ，その原因ウイルスはさまざまである．日本では，重症の乳幼児 AGE の原因となるロタウイルス(RVA)に対する 2 種類のワクチンが 2011 年から任意接種，そして 2020 年 10 月から定期接種化され，RVA による下痢症は減少したが，それ以外のウイルス性 AGE は減少していない．ここでは臨床検体，環境水検体を用いて，AGE を起こすウイルスの流行を調べ，COVID-19 流行の影響，ロタウイルスワクチン接種の影響についても調べることを目的とする．さらに食中毒の原因となる貝からのウイルス検出を行う．

B．対象および方法

わが国の複数の医療機関（小児科外来)，東北と関西の 2 カ所の下水処理施設から日本大学医学部倫理委員会の承認を受けて，検体を採取した．日本大学医学部で検体から核酸を抽出，RT-PCR 並びにダイレクトシークエンス法によってウイルスの同定を行った．また PCR 産物の核酸配列の解析を行った．食品検体ではリアルタイム PCR 法を用いてウイルスの定量を行った．

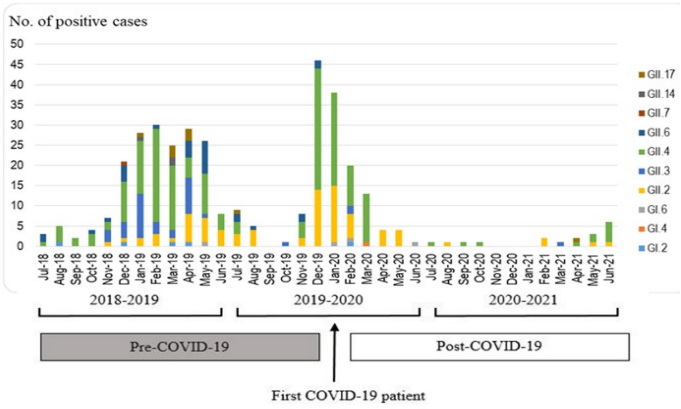
C．　結果

①ノロウイルス（NoV）による乳幼児 AGE の分子疫学解析

NoV は現在乳幼児 AGE の原因ウイルスとして最も検出頻度の高いウイルスである．2018 年 7 月～2021 年 6 月までの 3 年間に 6 つの都道府県の小児科外来を訪れた小児から 1175 検体を採取し，NoV を 355 検体(30.2%)検出した．このうち genogroup I が 11(0.9%)，genogroup II が 344（29.4%）であった．GI では GI.2，GI.3，GI.4，GI.6 が，GII では GII.2，GII.3，GII.4，GII.6，GII.7，GII.14，GII.17 と多様な遺伝子型が検出された．　最頻出株は GII.4 で 193 検体（56.4%）であった．NoV の月別同定数を調べたところ，2020 年 7 月～2021 年 6 月では

〔7　研究結果（つづき）〕

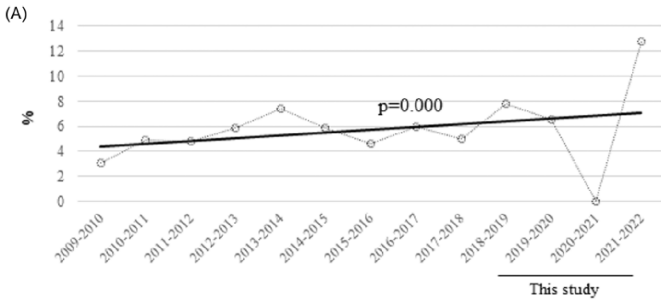
検体数，検出率ともに前年度に比べて減少していた



これは COVID-19 流行による影響と考えられた．NoVGI および GII の ORF1/ORF2 結合領域の配列決定を行い，これまでのカプシドによる遺伝子型だけでなく RdRp の遺伝子型を同定したところ，GI では 4 種類，GII では 10 種類の異なった遺伝子型を持つ組換え体が検出された．このうち GII.4[P31]が 44 検体と最も多く，ついで GII.2[P16]の 28 検体であった [1]．

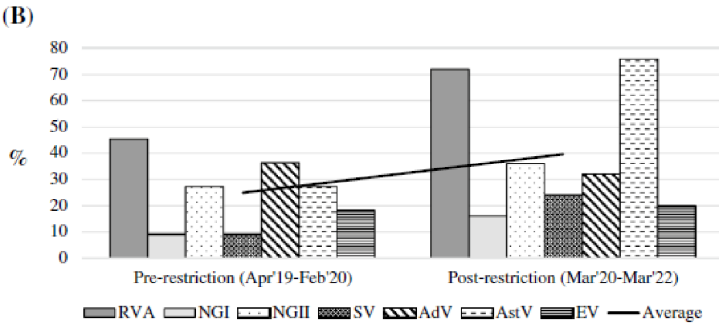
②乳幼児 AGE におけるサポウイルス(SaV)の感染状況

SaV は NoV と同じくカリシウイルス科に属するウイルスで，乳幼児で散発例の AGE を起こすが，集団発生や食中毒の原因ともなる．わが国では 2009 年以降，特にロタウイルスワクチン導入後に乳幼児における SaV 感染症の増加傾向が指摘されている．加えて COVID-19パンデミック後のライフスタイルの変化が流行により影響を与えるか注目される．本研究では 2019～2022 年までの 3 年間の疫学調査を行った．961 検体中 SaV 陽性は 80 検体（8.3%）で，各年度では 6.5%，0%，12.8%で上昇傾向にあった．日本の小児における SaV 感染傾向は統計学的有意差を持って上昇傾向（$p<0.05$）にあった．主な遺伝子型は GI.1(75%)で，この GI.1 株は京都で大流行となり，各地でアウトブレイクを起こした株と遺伝的で同一であり，広く拡散していることが明らかとなった [2]．



③下水処理施設の採取水からの下痢症ウイルスの検出

下水処理施設からのウイルス疫学は地域社会における感染流行を調べるための強力な手段であることが明らかとなっている [3]．とくに COVID-19 パンデミック下では感染対策として登校の休止，施設閉鎖やライフスタイルの変化が認められた．感染防御のためのクリニックへの受診差し控えによって下痢症ウイルス検索の検体数の減少が認められた．



ここでは 2019 年 4 月～2023 年 3 月まで秋田県の下水処理施設に流入する排水を 1 ヵ月に 1 回採取し，ポリエチレングリコール処理後，ウイルスの検出を行った．最頻出ウイルスはロタウ

〔7　研究結果（つづき）〕

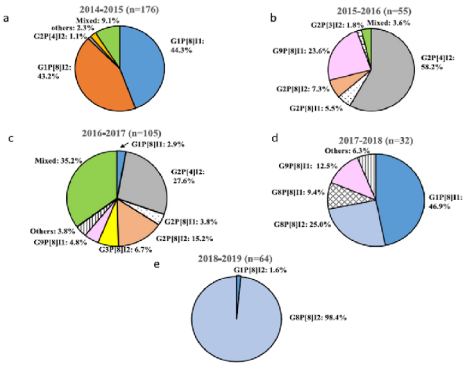
イルス（RVA）（63.8%），以下アストロウイルス（61.1%），NoVGII とアデノウイルス（33.3%），SaV(25.0%)，エンテロウイルス（19.4%），NoVGI (13.9%)であった．このようにクリニックへの患者の受診制限が見られる COVID-19 パンデミック下においてもウイルス検出は減少していないこと，そして多様なウイルスの存在が明らかとなった．臨床データの蓄積が制限される状況では排水中からのウイルス検出が地域のウイルス流行を知るための重要な手段であることが確認された [4].

④京都におけるアストロウイルス(HAstV)地域流行の解析

HAstV は乳幼児 AGE の主要な原因ウイルスの一つである．2021 年の COVID-19 パンデミック下に京都で発生した小児の AGE のアウトブレイクにおける HAstV の分子疫学的解析を行った．2021 年 7 月～10 月にかけて京都府舞鶴市の一小児科外来を受診した AGE 小児 61 例の中で，HAstV の単独感染 20 例，NoV との混合感染 15 例，RVA との混合感染が 1 例あった．この 36 株の HAstV の遺伝子型は HAstV1 が 29 株，MLB2 が 7 株であった．さらに HA s t V1 の遺伝子配列を詳細に調べたところ，すべて HA s t V1a 亜型で非常に均一であり，2021 年にタイ，日本で検出された株と近縁であった．一方 MLB2 型 HAstV の遺伝子配列は 2016 年と 2018 年に中国で検出された株に近縁であった．なお組換えは検出されなかった．COVID-19 パンデミック後の 2021 年の中頃の日本では幼稚園，学校が再開されていた．この時期に小規模な対象者の中で HA s t V のアウトブレイクが観察された．このことから，パンデミックに対する規制措置が緩和されてくると，包括的なサーベイランスが必要となることがわかった [5].

⑤日本におけるロタウイルス（RVA）遺伝子型の経年変化

RVA は世界の乳幼児の重症 AGE の主たる原因である．上述のように日本では 2011 年に RVA の 2 種類のワクチンが任意接種として，そして 2020 年 10 月には定期接種として導入された．任意接種期間中の 2014 年 7 月～2020 年 6 月の日本国内の一小児科外来を受診した AGE の患者から検体を採取し，RVA の検出率とその分子的特徴を検討した．検出率は 2014 年～2015 年の 44.7%から 2018～2019 年には 35.4%に減少し，2019～2020 年には検出されなかった．この年は COVID-19 パンデミックの影響で検体数も減少した．この 6 年間にロタウイルスワクチンの接種率は 32.4%から 62.2%に上昇した．本地域における RVA の G 遺伝子型〔(VP7)，P 遺伝子型（VP4)，I 遺伝子型(VP6)の分布は年々変化しており，主な遺伝子型の組み合わせは，2014～2015 年は G1P[8]I1 と G1P[8]I2，2015～2016 年は G2P[4]I2 と G9P[8]I1，2017～2018 年は G1P[8]I1 と G8P[8]I2，2018～2019 年は G8P[8]I2 であった．系統解析の結果，G1 の VP7 核酸配列は，本研究の他の G 遺伝子型のものと比較して遺伝的に多様であることが示された．一方，まれな G2P[8]I1，G2P[8]I2 および混合 P 遺伝子型の優勢は 2016～2017 年にのみ観察され，2017～2018 年には引き継がれなかった．G3 は 2016～2017 年にのみ検出された．以上

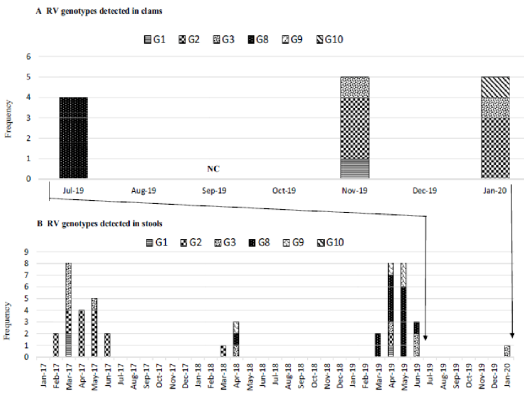


〔7　研究結果（つづき）〕

の結果から RVA 遺伝子型の多様性と組み合わせの変化が年々認められ，これはワクチン接種の影響と海外を含む他の地域からの流行株の流入などの要因が関与していると考えられた[6].

⑥淡水産貝類（シジミ）からの RVA の検出

アサリやカキなどの二枚貝は，水中の汚染物質を体内の消化器官内で生物学的に濃縮するため，食中毒の深刻な脅威となることが知られている．2019 年 7 月～2020 年 1 月にかけて川崎市の河川敷で採取されたシジミ検体から野生型の RVA およびロタウイルスワクチン（Rotarix と RotaTeq）を検出し，近隣の診療所の AGE 患者の RVA の遺伝子型と比較を行った．シジミ 96 個中 62 個（64.6%）から野生型 RVA が検出された．一方ワクチン株は Rotateq が 1 検体で検出され，Rotarix は検出されなかった．G 遺伝子型では G2（42.9%）が最も多く，以下 G8(28.6%)，G3(14.3%)，G1(7.1%), G10(7.1%)であった．この結果を近隣の臨床検体での遺伝子型流行と比較したところ，同様の結果が認められた．しかし G10 遺伝子型 RVA は臨床検体では認められなかった．これは無症候性感染者の存在，あるいはこの RVA が遠隔地から持ち込まれた可能性がある[7].



D. 考察

この 4 年間の COVID-19 流行を見るように，グローバル化の進んだ現代では地域における感染症の流行（エピデミック）はきわめて短い期間に世界的流行（パンデミック）に移行する危険がある．特に変異の速い RNA ウイルスは地域におけるワクチン接種の影響を受けやすく病原体のサーベイランスが重要である．臨床検体，食品検体，環境から得た検体による分子疫学的サーベイランスがきわめて有効であることがわかった．

E. 参考文献

1. Pham NTK, et al., Arch Virol., 2023; 168:231.
2. Hoque. SA., et al., J Med Virol., 2023; 95: e29023.
3. Hoque SA., et al, Food Environ Virol., 2023; 15: 176-191.
4. Hoque SA., et al., Food Environ Virol., 2023; 15:342-354.
5. Ushijima H. et al., J Infect Public Health, 2023; 16: 1301-1305.
6. Okitsu S., et al. J Infect Public Health, 2022;15: 816-825.
7. Hoque SA, et al. Food Environ Virol., 2022; 14: 94-100.

〔7　研究結果（つづき）〕

Publication list

1. **Okitsu S, Khamrin P., Hikita T, Onda Y, Pham TKN, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Remarkable increase in the detection and molecular characterization of adenovirus F41 in children with acute gastroenteritis in Japan, 2017-2023. J Med Virol 2024; 96: (4); e29615. doi: 10.1002/jmv.29615**

2. **Ushijima H, Hoque SA, Akari Y, Pham NTK, Phan T, Nishimura S, Kobayashi M, Sugita K, Okitsu S, Komoto S, Thongprachum A, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S. Molecular Evolution of GII.P31/GII.4_Sydney_2012 norovirus 2 over a decade in a clinic in Japan. Int. J. Mol. Sci. 2024: 25; 3619. doi:10.3390/ijms25073619**

3. **Ushijima H, Pham NTK, Hoque SA, Nomura A, Kumthip K, Shimizu-Onda Y, Okitsu S, Kawata K, Hanaoka N, Muller WEG, Maneekarn N, Hayakawa S, Khamrin P. Evaluation of a novel triplex immunochromatographic test for rapid simultaneous detection of norovirus, rotavirus, and adenovirus on a single strip test. J Infect Public Health. 2024; 17: 619-623. doi: 10.1016/j.jiph.2024.02.010**

4. Hoque SA, Saito H, Akino W, Kotaki T, Okitsu S, Onda Y, Kobayashi T, Hossian T, Khamrin P, Motomura K, Maneekarn N, Hayakawa S, Ushijima H. The emergence and widespread circulation of enteric viruses throughout the COVID-19 pandemic: A Wastewater-based Evidence. Food Environ Virol. 2023;15(4): 342-354. doi: 10.1007/s12560-023-09566-z.

5. **Pham NTK, Khamrin P, Shimizu-Onda Y, Hoque SA, Trinh QD, Komine-Aizawa S, Okitsu S, Maneekarn N, Hayakawa S, Yoshimune K, Ushijima H. Genetic Diversity and Declining Norovirus Prevalence in Infants and Children during Japan's COVID-19 Pa10.1007/s00705-023-05856-w**

6. **Hoque, SA, Pham NTK, Onda-Shimizu, Y., Nishimura S, Sugita K, Kobayashi M, Islam MTndemic: A Three-Year Molecular Surveillance. Arch Virol 2023; 168:231. doi: 10.1002/jmv.29023.**

7. **Okitsu S, Khamrin P, Maneekarn N, Hayakawa S. Ushijima H. Sapovirus infections in Japan before and after the emergence of the COVID-19 pandemic: an alarming update. J Med Virol. 2023;95(8):e29023. doi: 10.1002/jmv.29023.**

〔7　研究結果（つづき）〕

7.　Ushijima H., Nishimura S., Shimizu-Onda Y., Pham NTK., Trinh QD., Okitsu S., Takano C., Kumthip K., Hoque SA., Komine-Aizawa S., Maneekarn N., Hayakawa S, Khamrin P. Outbreak of human astrovirus 1 and Melbourne 2 in acute gastroenteritis pediatric patients in Japan during the COVID-19 pandemic, 2021. J Infect Public Health, 2023; 16: 1301-1305. doi: 10.1016/j.jiph.2023.05.034.

8.　Okitsu S, Khamrin P, Hikita T, Yuko Shimizu-Onda, Thongprachum A, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Molecular epidemiology of classic, MLB, and VA astroviruses in children with acute gastroenteritis, 2014-2021: Emergence of MLB3 strain in Japan. Microbiol Spectrum 2023 11(3); e0070023. doi: 10.1128/spectrum.00700-23

9.　Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Genotype Diversity of Enteric Viruses in Wastewater Amid the COVID-19 Pandemic. Food Environ Virol. 2023; 15:176-191. doi: 10.1007/s12560-023-09553-4.

10.　Hoque SA, Kotaki T, Pham NTK, Onda Y, Okitsu S, Sato S, Yuki Y, Kobayashi T, Maneekarn N, Kiyono H, Hayakawa S, Ushijima H. Abundance of viral gastroenteritis before and after the emergence of COVID-19: Molecular evidence on wastewater. J Infect. 2023;86(2): 220-223. doi: 10.1016/j.jinf.2022.11.007.

11.　Hoque SA, Wakana A, Shimizu H, Takanashi S, Okitsu S, Anwar KS, Hayakawa S, Maneekarn N. Okabe N, Ushijima H. Detection of rotavirus strains in freshwater clams in Japan. Food Environ Virol. 2022;14(1): 94-100. doi:10.1007/s12560-021-09505-w

VI　川名　敬：子宮頚部がん特に頸部腺がんにおけるＨＰＶ関与の分子機構

iPS 細胞を使用した HPV18 型子宮頸部腺癌の単一細胞マルチオミクス遺伝子解析

日本大学医学部産婦人科学教室（鎌田早紀，川名敬）

【概要】子宮頸癌の原因の大部分はハイリスク(HPV16 型，18 型等)のヒトパピローマウイルス(HPV)の感染である．HPV18 型子宮頸癌は他の型と比較して，悪性度が高く，治療が難航する子宮頸部腺癌の割合が多いとされる．本研究では，子宮頸癌の発生母地である子宮頸部リザーブ細胞様細胞を iPS 細胞から作製し，これに HPV16, 18 型を導入することで発癌機序に模倣した系を用いた．この細胞で in vitro，in vivo 実験を行い，空間的単一細胞マルチオミクス解析を用いることで，早期腺癌マーカーや腺癌の標的分子を同定した．

(背景)

先進国では，HPV ワクチンの普及により若年者の子宮頸がん罹患率は減少しているが，特に中低所得国では HPV ワクチンの導入はまだ不完全であり，子宮頸癌の完全撲滅はまだ遠い．

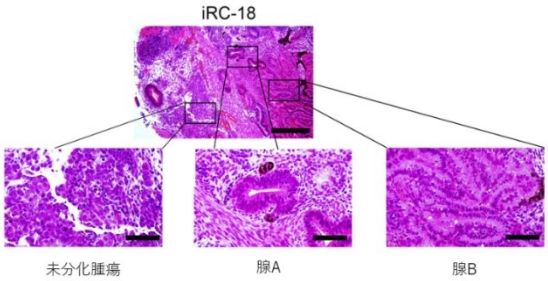
〔7　研究結果（つづき）〕

HPV 関連発癌の分子メカニズムはよく知られており，すべての HPV 関連癌に共通している．子宮頸癌の 95%以上は HPV 感染によって引き起こされ，特に HPV16 型と 18 型は子宮頸癌で検出される HPV 遺伝子型の 70%を占める．HPV のゲノムは約 8000 塩基対の環状二本鎖 DNA からなる．初期遺伝子領域には，ウイルス複製に何らかの役割を果たす 6 つの遺伝子（E1，E2，E4，E5，E6，E7）がコードされている．このうち，E6 タンパク質は p53 を不活性化し，E7 タンパク質は Rb を不活性化する．HPV が持続感染すると，HPV ゲノムはヒトゲノムに組み込まれ，HPV 由来の E6 と E7 が持続的に発現するようになる．また，がん遺伝子の増幅や染色体再配列など，さまざまな遺伝的変化を引き起こす．HPV に感染した細胞は最終的に子宮頸がんに進展する．HPV16 は子宮頸癌の約半数を占めるが，HPV18 は 10～20%に過ぎない．扁平上皮癌は HPV 関連癌の約 70%を占めるが，腺癌も子宮頸部に発生し，症例の 20%以上を占める．日本における腺癌の発生率は近年増加している．予後は組織型により異なり，腺癌は扁平上皮癌より予後不良である．原因となる HPV の型は癌の組織型と関連しており，HPV18 は HPV16 よりも腺癌に進展しやすく，子宮頸部腺癌の 40%が HPV18 と関連している．同様に，HPV18 発癌は子宮頸癌において腺癌を発症するリスクが高い．しかし，組織学的分化の基礎となる細胞内分子機序はまだ解明されていない．HPV 関連子宮頸癌および子宮頸部上皮内腫瘍（CIN）は，子宮頸部の扁平上皮接合部（SCJ）または移行部で発生することが知られている．したがって，HPV は SCJ の多能性予備細胞に優先的に感染する．子宮頸がんと同様に，肛門管がんや副鼻腔がんも組織移行部で発生する．SCJ 細胞は，HPV に感染した細胞で誘導されると考えられている「扁平上皮化生」を起こすことがあり，HPV は層状扁平上皮の分化とともに複製し，潜伏と複製を繰り返して持続感染を確立する．SCJ から発生するがん細胞は，「がん幹細胞」の特徴を持つ可能性がある．がん幹細胞の多能性を考慮すると，HPV 関連子宮頸がんは，CIN から浸潤がんに段階的に進展する扁平上皮がんと，異型腺上皮から浸潤がんに直接移行する腺がんの 2 つの発がん形態をとる可能性がある．私たちの以前の研究では，iPS 細胞から iRC を樹立した．この iPS 細胞から樹立された iRC は，幹細胞マーカーと SCJ マーカーに陽性であり，3 次元培養において腺上皮と層状扁平上皮に分化することができた．本研究では，HPV18 E6/E7 を導入した iRC を用いてモデルマウスを製し，空間解析と単一細胞マルチオミクス解析を統合することにより，HPV18 誘導性腺がんの分子メカニズムを検討した．

(結果)

HPV18 のがん遺伝子 E6 および E7 を iRC に導入し，iRC＋HPV18 E6/E7（iRC-18）を作製した．コロニー形成アッセイでは，iRC-18 は iRC-cont（iRC＋レンチウイルスベクターのみ）に比べてコロニー数が有意に増加した．細胞増殖曲線は，iRC-18 が iRC-cont よりも有意に速く増殖することを示した（$P=3.3\times10^{4}$）．iRC-18 を用いてマウス腫瘍を作製した場合，生着率は 100%であり，iRC-18 は平均 95.1 日で腫瘍体積 2000 mm^3 に達した．病理学的には，iRC-18 腫瘍は未分化と腺成分（腺 A と腺 B）の混合物であった．腺 A は分泌物を伴う高分化型腺病変を示したが，腺 B は乳頭状の増殖パターンを示し，中分化型腺病変と考えられた．腺 A は

〔7　研究結果（つづき）〕



PAS 陽性であったが，腺 B は PAS 陰性であった．免疫組織学的評価により，腺 A は CDH1 陽性であったが，腺 B は陰性であった．子宮頸部腺がんで陽性となる KRT8, KRT18，CLDN7，ERBB3，FOXA1, FOXA2 の発現は，腺 A ではすべて陽性であったが，腺 B ではみられなかった．腺 A は HPV 陽性腺癌の免疫組織化学的特徴と類似しているので，次に各成分における p16INK4A と HPV18 E7 の発現を評価した．腺 A，腺 B および未分化腫瘍の組織はすべて，HPV 関連癌の特徴である CDKN2A(p16INK4A)が陽性であった．

iRC-18 腫瘍における 2 つの腺構造と未分化成分の分子生物学的性質を同定するために，マイクロダイセクションに基づく空間トランスクリプトーム解析を行った．発現プロファイルに基づく主成分分析とヒートマップを用いたクラスタリングにより，遺伝子発現パターンが組織型間で異なっていることが確認された．DEG 解析により，未分化腫瘍と腺 A，未分化腫瘍と腺 B，腺 A と B の間で，それぞれ 2460，3799，3047 の有意差のある遺伝子が明らかになった．腺 A では，FOXA2，KRT8，KRT18，MUC2，CLDN4，CLDN7 などの子宮頸部腺がんマーカーの発現上昇が認められた．未分化腫瘍と腺 A は腺 B よりも CDKN2A（p16INK4A）の発現が高かった．KEGG パスウェイ解析によると，腺 A ではいくつかの代謝経路が有意に上昇していた．これらの遺伝子群やパスウェイは腸管組織の遺伝子プロファイルと類似しており，子宮頸癌の中でも腸管型腺癌の遺伝子群と類似している可能性があった．一方，腺 B は腺 A よりも「Wnt 経路」と「TGF-β 経路」に関連する遺伝子の発現が高かった．未分化腫瘍のパスウェイ解析では，神経に特徴的な高増殖性である可能性が示唆された．細胞分化に関与する細胞内メカニズムを単一細胞レベルで解明するために，iRC-18 腫瘍の単一細胞マルチオミクス解析（RNA-seq＋ATAC-seq）を行った．単一細胞 RNA-seq データに基づくクラスタリングにより，6 つの独立したクラスターが同定された．単一細胞解析と空間トランスクリプトーム解析を統合すると，未分化腫瘍は主にクラスター2 に，腺 A はクラスター5 に，腺 B はクラスター4 に一致した．クラスター2 で有意に発現が上昇した遺伝子は，主にニューロン関連であった．クラスター4 では，Wnt シグナル伝達および TGF-β/BMP 関連分子に関連する遺伝子および MAPK1 や ERBB4 などのがん関連遺伝子が発現上昇していた．クラスター5 では，Ca チャネル遺伝子群の高発現が観察され，また CDH1 の発現上昇が認められた．次に HPV 由来遺伝子の発現に注目したところ，HPV18 E6 と E7 の発現がクラスター0，1，2 で散見され，クラスター5 で発現が有意に増加した．4 つの HPV 陽性クラスターでは CDKN2A（p16INK4a）が強く陽性であった．これらを総合すると，腺 A は HPV 陽性の腺癌であり，腺 B は HPV 陰性の腺癌であり，未分化腫瘍は神経系の性質を持つ HPV 陽性成分であることが示唆された．続いて，HPV 陽性の子宮頸部腺がん関連遺伝子（FOXA1, FOXA2, ERBB3）と腺構造に関連する遺伝子（KRT8, KRT18, CLDN7）の発現を評価した．KRT8 と KRT18 はクラスター1 と 5 で高発現し，FOXA1,

〔7　研究結果（つづき）〕

FOXA2，CLDN7 はクラスター5 で特異的に発現した．マイクロダイセクションベースの空間トランスクリプトームデータと単一細胞 RNA-seq の統合解析により，各組織型に対応する細胞を単一細胞レベルで同定することができた．単細胞 ATAC-seq データに基づいて次元削減を行い，遺伝子発現に基づくクラスターを ATAC ベースの UMAP に反映させた．各発現クラスターに属する細胞は，ATAC ベースの UMAP では近くに位置していた．各クラスターの特徴的遺伝子のクロマチンアクセシビリティを評価したところ，クロマチンアクセシビリティの変化は遺伝子発現の変化よりも小さかった．しかし，HPV 陽性の子宮頸部腺がん関連遺伝子（FOXA2 と FOXA1）のクロマチンアクセシビリティは，クラスター5 特異的に上昇した．腺 A の遺伝子発現プロファイルは HPV 陽性腺癌と類似していたが，腺 B の遺伝子発現プロファイルは HPV 陰性子宮頸癌と関連していた．各組織成分の臨床的特徴を明らかにするために，The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースの子宮頸がんデータセットを用いて，未分化腫瘍，腺 A，腺 B クラスターの特徴的な遺伝子セット（それぞれ Cluster 2，Cluster 5，Cluster 4）に基づいて，Gene Set Enrichment Analysis（GSEA）を行った．HPV18 陽性腺癌，その他の HPV 陽性腺癌，HPV 陰性腺癌，HPV18 陽性扁平上皮癌，その他の HPV 陽性扁平上皮癌，HPV 陰性扁平上皮癌の遺伝子セットを比較した．クラスター2 は組織型に関係なく HPV 陽性子宮頸がんで高発現していた．一方，クラスター5 の遺伝子セットは HPV 陽性子宮頸部腺がんで高発現していた．一方，クラスター4 の遺伝子セットは，組織型に関係なく HPV 陰性の子宮頸がんで高発現していた．各クラススコアに基づく予後解析から，クラスター4 スコアの高い癌は有意に予後不良であることが明らかになった．

空間トランスクリプトーム解析から，幹細胞マーカーである ALDH1A1 が腺 A 細胞で発現上昇していることが示された．ALDH1A1，CD44，PROM1，SOX2 は，子宮頸癌の幹細胞マーカーとしてよく知られており，薬剤耐性や放射線治療耐性との関連が注目されているが，組織学的分化と幹細胞マーカー発現との関係はまだ明らかではない．iPS 由来の予備細胞を用いるというこのモデルの特異性から，組織分化における幹細胞マーカーの発現制御について検討した．興味深いことに，幹細胞マーカーの発現パターンは組織分化によって異なっていた．例えば，POU5F1 と LGR5 はクラスター2 で高発現し，ALDH1A1 はクラスター5 に特異的に高発現し，ITGA6 と PROM1 はクラスター4 で発現した．さらに，PROM1 は腺構造（腺 A および腺 B）で高発現していたが，POU5F1 の発現は腺 A でダウンレギュレートされていた．クロマチンアクセシビリティの変化は，ALDH1A では腺 A クラスターで，LGR5 と PROM1 では腺 B クラスターでより強く，遺伝子発現の変化とある程度相関していたが，その差は遺伝子発現ほど顕著ではなかった．続いて，幹細胞マーカーの発現と組織型および感染 HPV 遺伝子型との関係を，TCGA データベースを用いて評価した．iRC-18 の幹細胞マーカーの不均一性と同様に，ALDH1A1 は HPV18 陽性腺癌で高発現しており，PROM1 の発現は HPV 感染に関係なく腺癌で有意に高かった．対照的に，CD44 は扁平上皮細胞で高発現していた．これらの結果から，幹細胞マーカーの発現プロファイルは，HPV 陽性，遺伝子型，組織型によって異なることが示唆された．子宮頸癌の臨床サンプルを用いて，ALDH1A1 の発現を免疫組織化学的に解析した．

〔7　研究結果（つづき）〕

50 例の扁平上皮癌と 28 例の腺癌を本研究に組み入れた．ALDH1A1 陽性率は扁平上皮癌よりも腺癌で有意に高く（96%対 28%，$P = 2.6 \times 10^{8}$）ALDH1A1 が HPV 関連腺癌の特徴であることが確認された．

(考察)

本研究では，HPV18 癌遺伝子 E6 および E7 を iPS 細胞に導入することにより，HPV 関連子宮頸部腺癌モデルを作製することに成功した．子宮頸部予備細胞は iPS 細胞由来であった．空間解析単一細胞マルチオミクス解析を統合することにより，HPV 関連子宮頸部腺癌のクラスター特性を同定した．HPV 関連子宮頸部腺癌に特徴的なクラスターを同定し，そのクロマチン変化を解明した．さらに，子宮頸がんにおける幹細胞マーカー発現と組織型および HPV 感染との関係を明らかにした．HPV に関連した子宮頸癌モデルは，長い間研究されてきた．先行研究では，HeLa のような子宮頸癌細胞株が用いられてきた．しかし，これらの研究は分化細胞を用いたものであり，子宮頸部腺癌への分化の検討は困難であった．SCJ には扁平上皮細胞や円柱上皮細胞に分化できる幹細胞が含まれている．近年，SCJ オルガノイドや SCJ 細胞株を用いた子宮頸癌モデルの開発が試みられているが，腫瘍形成には HPV 遺伝子に加えて KRAS などの癌遺伝子の導入が必要であり，HPV 感染による組織分化を評価することは困難であった．SCJ 細胞を用いた子宮頸がんモデルには限界があり，後者はがん遺伝子の導入の影響を受けるため，我々は iRC を用いた子宮頸がんモデルを作製した．iRC の多能性は，HPV による組織分化を評価するのに適したモデルとなる．iRC-18 は不均一な腫瘍であったが，HPV 関連腺癌の特徴を持つ腺癌を誘導することに成功し，HPV 関連子宮頸部腺癌の発生を解析することが可能となった．さらに，われわれのモデルには，患者由来モデルと比較して再現性が高いというもう一つの利点があった．iRC-18 腫瘍は不均一で，未分化構造と 2 種類の腺構造が混在していた．空間トランスクリプトーム解析と単一細胞マルチオミクス解析を統合することで，それぞれの組織型に対応する遺伝子発現とクロマチンアクセシビリティを単一細胞レベルで同時に評価することができた．統合解析の結果，腺 A は HPV 関連腺がんに類似した遺伝子発現プロファイルを持つこと，FOXA1 や FOXA2 などいくつかの HPV 関連腺がん遺伝子の発現上昇はクロマチン構造の変化を伴うことが明らかになった．FOXA1 および FOXA2 に加えて，Wnt-β-カテニン経路は，発生過程において子宮頸部の腺構造を誘導するのに重要であることが知られている．Wnt 関連遺伝子（MAPK10，DKK2，NKD1 など）が腺 B クラスターで高発現したことから，腺 B 細胞は HPV 非依存的に Wnt 経路の活性化を介して腺構造に分化することが示唆された．腺 B における Wnt 受容体 FZD3 の発現増加は，クロマチン構造の変化も伴っており，子宮頸部の組織学的変化はクロマチン構造の変化を伴っていることが示唆された．組織分化に関与する遺伝子に加えて，単細胞解析から，HPV 関連腺癌の特徴である CACNA1A などのイオンチャネル関連分子が腺 A で発現上昇していることが明らかになった．Ca チャネルは，白血病，卵巣がん，肉腫などいくつかのがん種で発現が上昇しており，がん細胞の増殖や薬剤耐性に関与していることが報告されていることから，Ca チャネルの発現上昇が HPV 関連子宮頸部腺がんの発症に関連している可能性が示唆された．ALDH1，CD44，PROM1，p63 は子宮頸癌の幹細胞マーカーとし

〔7　研究結果（つづき)〕

て知られているが，これらが発現する組織型の特徴や HPV 感染との関連についてはほとんど知られていない．TCGA のデータを解析した結果，幹細胞マーカーの発現パターンは組織型や HPV 感染状態によって異なることが明らかになった．本研究で用いた iRC は幹細胞様のプロフィールを有し，組織分化を介した幹細胞マーカー発現制御機構を検討するのに適したモデルである．iRC-18 腫瘍において，各組織型における幹細胞マーカーの発現プロファイルは，TCGA のデータで示されたものと一致しており，HPV 陽性腺管構造（腺 A）では ALDH1A1 が，腺管構造（腺 A および腺 B）では PROM1 が，HPV 感染にかかわらず高発現していた．この結果から，同じ細胞由来成分であっても，組織学的分化や HPV の状態によって，異なる幹細胞マーカーを発現していることが示された．HPV 関連腺がんに特徴的な ALDH1A1 は，USP28/MYC, HIF1A/ VEGF，Wnt/β カテニン経路など様々な経路を活性化するだけでなく，代謝調節を介して細胞の分化, 増殖, 薬剤耐性にも関与することが報告されている. 我々の結果は, ALDH1A1 が HPV 関連腺癌の分化と発癌において中心的な役割を果たしていることを示唆した．今後，ALDH1A1 が子宮頸部腺癌の発生と分化にどのように関係しているのか，また，有効な治療標的となるかどうかについての研究が進めば，子宮頸部腺癌の病態解明と治療戦略の開発に役立つであろう．（投稿中）

V　森岡一朗：小児感染症の臨床的解析

1）新型コロナウイルス感染妊婦から出生した新生児の診療・管理方法および社会的影響に関する調査　（医学部小児科学系小児科学分野　森岡一朗）

全国の小児科標榜 894 施設を対象に第 6 波時点での SARS-CoV-2 感染妊婦から出生した新生児の診療・管理方法および，その社会的影響を調べた．SARS-CoV-2 感染新生児は極めて少ない状況であることが明らかとなった（29/2,373 人, 1.2%）．その一方，病院全体の感染管理により，本来の新生児医療にとって不可欠な面会や母乳育児，母子同室が大きく制限されている現状が続いていた．このことは，両親と児の愛着形成や両親の心理面に影響を及ぼす可能性があるので，注意を要する．（森岡一朗ら，日本小児科学会雑誌，127（3），519-529，2023）

2）新生児早発型細菌感染症におけるプロカルシトニンに基づく抗菌薬使用：介入前後臨床研究

【目的】我々は早発型細菌感染症の診断に，早期産児では血清プロカルシトニン(PCT)基準曲線の 95%ile カットオフ値が，また正期産児では PCT 値基準曲線の 95%ile カットオフ値と CRP，白血球数，IgM の組み合わせが有用であることを報告した（*Diagnostics*, 2020）．今回新たな診断方法の導入前後の比較を行い，その有用性を検証した.

【方法】2018 年 3 月 6 日から 2022 年 3 月 5 日の期間に当院 NICU に入院し，生後 72 時間以内に血液検査を行った新生児を対象とした．2018 年 3 月 6 日から 2020 年 3 月 5 日の期間に入院した介入前群と 2020 年 3 月 6 日から 2022 年 3 月 5 日の期間に入院し，新たな診断方法を導入した介入後群の 2 群に分類した．入院後 7 日までの 1000 入院日あたりの抗菌薬の使用日

〔7　研究結果（つづき）〕

数，使用人数と早発型細菌感染症の発症率や死亡数を介入前後で比較した．

【結果】介入前群は 742 人，介入後群は 687 人であった．1000 入院日あたりの抗菌薬の使用日数と使用人数は，介入前群：218.2 日，284 人（38%），介入後群：85.5 日，80 人(12%)であり，介入後群でそれぞれ有意に減少した(p<0.01)．早発型細菌感染症の発症率は，介入前群 15 人（2%）と介入後群 14 人（2%）で差を認めず（p=0.98），死亡例は両群とも認めなかった．

【結論】PCT 値基準曲線の 95%ile カットオフ値を用いた新たな早発型細菌感染症の診断方法により，安全に抗菌薬使用日数，使用人数を減少できた．

（Go H, Morioka I, et al. *Antibiotics.* 2023;12(9):1426.）

3）乳幼児インフルエンザに対するバロキサビルの有熱期間に関する検討

【緒言と目的】

従来，我が国のインフルエンザ治療薬はオセルタミビルを代表するノイラミダーゼ阻害薬のみであったが，2018 年 2 月 23 日にウィルスメッセンジャーRNA 合成を阻害するキャップ依存性エンドヌクレアーゼ阻害薬（バロキサビル）が承認され，実臨床で使用できるようになっている．バロキサビルにはたった一回のみの服用で治療が完結するという特徴もあり，服薬が難しい小児においては非常に有益であったが，乳幼児インフルエンザに対するバロキサビルの臨床研究は限られている．そこで，有効性の一つの指標として有熱期間に着目して，オセルタミビルとの比較検討を行った．

【対象と方法】対象は 2015 から 2018 シーズンにインフルエンザと診断された 1410 人のうち，0～6 歳の 1111 人．臨床研究倫理審査委員会の承認を得て（RK-190910-10），後方視的検討を行った．①対象をバロキサビル投与群とオセルタミビル投与群に分け，年齢（歳），性別，発症から投与までの時間，投与開始から解熱までの日数，発症から投与までの時間，インフルエンザ型，ワクチン接種の有無に分け単変量解析，②バロキサビル群とオセルタミビル群で解熱日数のログランク検定，③解熱日数と関連する臨床因子につき多変量解析を行った．

【結果】①バロキサビル群 555 人とオセルタミビル群 556 人であった．バロキサビル群とオセルタミビル群の比較では，年齢（3 歳 vs.2 歳），インフルエンザ A 型（99% vs.47%），投与開始から解熱までの日数（1 日 vs.2 日），ワクチン接種（41% vs.65%）で有意差があった（p＜0.01）．②投与 1 日後の解熱者は，バロキサビル群が 99.6%，オセルタミビル群が 1.1%であった（p＜0.01）．③有熱期間と関連する臨床因子として抗インフルエンザ薬の種類（バロキサビル）が唯一独立した有意な臨床因子として抽出された（オッズ比 50201，p＜0.01）．

【結論】乳幼児インフルエンザにおいて，バロキサビルはオセルタミビルより有熱期間が有意に短かった．（Nezu K, Morioka I, et al. *Medicina.* 2023;59(9):1543.）

1）森岡一朗，戸石悟司，和田友香，荒堀仁美，落合正行，久保井　徹，佐藤義朗，高橋尚人，長屋　建，福原里恵，松本　敦，宮沢篤生，山田恭聖，山田洋輔，東海林宏道，日下隆，大西　聡，飛彈麻里子，水野克己：新型コロナウイルス感染妊婦から出生した新生児

〔7　研究結果（つづき）〕

の診療・管理方法および社会的影響に関する調査，日本小児科学会雑誌，127（3），519-529，2023

2）Hidetoshi Go, Nobuhiko Nagano, Yuki Sato, Daichi Katayama, Koichiro Hara, Takuya Akimoto, Takayuki Imaizumi, Ryoji Aoki, Midori Hijikata, Ayako Seimiya, Aya Okahashi, Ichiro Morioka: Procalcitonin-based antibiotic use for neonatal early-onset bacterial infections: Pre- and post-intervention clinical study. *Antibiotics.* 2023;12(9):1426.

3）　Keiko Nezu, Shingo Hayashida, Nobuhiko Nagano, Seiichi Udagawa, Ichiro Morioka: Early fever resolution in early childhood influenza treated with baloxavir marboxil: a retrospective study compared to those with oseltamivir. *Medicina.* 2023;59(9):1543.

VI　木下浩作　高山忠輝　権寧博　：COVID-19 に関する臨床的解析

中等症・重症 COVID-19 重症肺炎に対する治療プロトコール～COVID-19 肺炎に対する薬物療法の効果

【概要】Severe acute respiratory syndrome coronavirus -2（SARS-Cov-2）は 2019 年後半から世界的大流行し，無症候性感染，上気道炎症性疾患や死亡に至る重度の肺炎まで様々な病態を併発する　．特に Coronavirus disease 2019 （COVID-19）肺炎は，急性呼吸窮迫症候群や致命的な臓器不全など重篤な病態(3)が報告されているが，未だ定まった治療法はない．COVID-19 肺炎のステロイド治療は，いくつかのプロトコールが示されているが，その最適な投与量は不明 なままである．現在の COVID-19 肺炎に対するステロイド療法は，respiratory syncytial virus（RSV），インフルエンザ，severe acute respiratory syndrome coronavirus（SARS-CoV）や，middle east respiratory syndrome coronavirus（MERS-CoV）による呼吸器感染症での死亡率や二次感染症発症率増加，ウイルスのクリアランス障害などから，COVID-19 肺炎患者へのステロイドの使用は転帰を改善させないとの報告もある ．しかも COVID-19 肺炎に対するステロイドパルス療法は，投与のタイミングや量，効果的な患者群の詳細は明でなく，合併する Acute Respiratory Distress Syndrome （ARDS）に対するメチルプレドニゾロンによるステロイドパルス療法が，人工呼吸器管理患者の院内死亡リスクの低下と関連する報告もある．一方 COVID-19 重症肺炎そのものに対してのステロイドパルス療法（メチルプレドニゾロン 1000 mg / 日を 3 日間投与）についての研究はほとんどない ．本研究の目的は，COVID-19 重症肺炎に対するデキサメタゾンを含む従来の治療に反応しなかった症例に対して，ステロイドパルス療法の臨床的効果と有効性を明らかにし，COVID-19 重症肺炎に対する治療プロトコールへの組み入れの可能性を検討することである．

【方法と結果】

当院で診療した症例のうち，ステロイド薬を治療に用いた COVID-19 重症肺炎患者（高濃度酸素投与：リザーバー付き酸素マスク 6 L / min 以上，もしくは high flow nasal cannula oxygen therapy （HFNCO），人工呼吸器管理が必要であった患者）76 例を対象とした．終末期疾患（呼吸器疾患，心疾患，悪性腫瘍）患者，早期死亡患者（入院もしくは救命救急センター入室 4 日以内の死亡もしくはステロイドパルス療法施行後 1 日以内での死亡）は除外した．

〔7　研究結果（つづき)〕

退院時もしくは転院時の最終転帰（生存：生存群）で患者を 2 群に分け，ステロイドパルス療法との関係を評価した．次に，全体をステロイドパルス療法施行群と非施行群の 2 群に分け臨床的特徴を評価し，経時的なデータ推移に関しても検討した．最終転帰で二群に分けると，死亡群の年齢中央値は 73.0 歳，生存群は 59.0 歳であり，入院時の P / F ratio と SOFA スコアの中央値は両群間に有意差を認めなかった．しかし，死亡群でステロイドパルス療法を施行されている割合（死亡群 82.6 % VS. 生存群 49.1 %）が高く（P< 0.01），二次感染症発症（P <0.01）とステロイドパルス療法は転帰死亡の独立因子（P < 0.0001）であった．P / F ratio は，経時的にステロイドパルス療法施行直前からステロイドパルス療法 1 週間後（P< 0.01）の経過で有意に改善したが，SOFA スコアの改善はみられなかった．

【考察】COVID-19 肺炎は，集中治療室での治療によっても死亡率が高く，死亡率は 7.5%に達する．特に extracorporeal membrane oxygenation（ECMO）開始後 90 日以内の院内死亡率は 37.4%とされるが，重症化を防止するため確立した治療プロトコールはなく，各施設で決定している．そのため中等症から重症化する症例の呼吸障害の悪化を防止し，呼吸障害の進展に応じた新たな治療戦略を構築する必要がある．中等症以上の COVID-19 肺炎に対して数々の治療法が報告され，COVID-19 肺炎に対するステロイド療法の効果については，通常量で患者転帰を改善させることが報告されている．一方，中等症以上の COVID-19 肺炎に対してステロイドパルス療法が行われることがあるが，効果や有効性に関する研究はなく，未だ世界各国の COVID-19 肺炎のガイドラインでも推奨が不明確である．急性呼吸窮迫症候群（ARDS)に関して早期の通常量ステロイド療法は人工呼吸器持続時間と死亡率を低下させるとの報告もあるが，ステロイド治療の開始時期や投与量などの検討が必要である．本研究から，高濃度酸素投与が必要な COVID-19 重症肺炎患者に対して，デキサメタゾンを含む従来の治療に反応しなかった場合にステロイドパルス療法（メチルプレドニゾロン 1000 mg / 日を 3 日間投与）は，P / F ratio の改善に関連するが SOFA スコアの改善はみられず，最終転帰に寄与しなかった．COVID-19 肺炎の重症化の頻度は低下しているが，酸素化改善を目指した新たな治療プロトコールとして COVID-19 重症肺炎再流行時の治療の一助になると考えられた．

VII　関みつ子：Loop-mediated Isothermal Amplification （ LAMP）法の臨床応用

明海大学歯学部小児歯科学教室　　関　みつ子

【概要】Loop-mediated Isothermal Amplification （ LAMP）法は我が国において開発された遺伝子増幅法で，標的遺伝子の 6 つの領域に対して 4 種類のプライマーを設定し，鎖置換反応を利用して一定温度で反応させることが可能である．増幅効率が高く，比較的粗抽出の DNA サンプルから 15 分～1 時間で 10^9～10^{10} 倍に増幅することが可能である．PCR 同様に特異性が高く，増幅産物から肉眼あるいは比較濁度計，蛍光分析計などで標的遺伝子配列の有無の判定のみならず定量が可能である．本法を用いて，環境感染症，臨床検体の迅速診断，抗菌薬耐性の診断法開発を行った．

〔7　研究結果（つづき）〕

1　**小児歯科排水からの SARS-CoV-2 検出（論文投稿中）**

背景・目的：2023 年 5 月，WHO は，COVID-19 の国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態宣言を解除し，わが国も COVID-19 の感染症法上の位置づけを，2 類から 5 類感染症へと移行し，社会情勢も変化する中，小児歯科外来においても，ウィズコロナ時代の新たな診療体制構築が求められている．成人に比べ，小児はワクチン接種率が非常に低く，小児の COVID-19 は未だ増加傾向にあり，今後も，まれに生じる重症例や，小児からの感染拡大に注意を要する．しかし，無症状から軽症がほとんどの小児患者の感染実態，特に不顕性感染実態は，未だ不明確である．他方，COVID-19 流行期には，小児歯科診療ユニット排水に，無症状の小児口腔から SARS-CoV-2 RNA を含む唾液などが排出されると考える．そこで，小児の不顕性感染実態を明らかにするべく，小児歯科排水から SARS-CoV-2 RNA 検出を行った．

方法：本研究は前向きの縦断観察研究である．明海大学病院は埼玉県中心部に位置する県内唯一の歯科病院で，小児歯科診療室の患者のほとんどは 10 歳未満である．研究期間中，COVID-19 症状を有する者あるいは濃厚接触者の受診は無い．2021 年から 2022 年の約 15 か月間に渡り，明海大学病院小児歯科外来の排水を週 1 回収集し，地域流行情報収集の為に行われている下水からの SARS-CoV-2 検出法を歯科排水に応用し，歯科排水からの SARS-CoV-2 RNA の検出を試みた．陽性のサンプルは，変異株か否かについて検討した．得られた結果は，埼玉県 10 歳未満の週毎の新規感染者数との関連について検討した（明海大学歯学部倫理審査委員会　承認番号　A2029）．

結果：世界で初めて，歯科排水からの SARS-CoV-2 RNA 検出に成功した．収集した排水 60 サンプル中の 2 サンプルは，サンプリングの失敗およびプロセスコントロールでの検出なしの為，解析から除外し，合計 58 サンプルについて解析を行った（96.7%, 58/60）．その結果，合計 17 サンプルが陽性(30.5%，17/58)，41 サンプルが陰性(69.5%，41/58)であった．陽性サンプルのうち，2022 年の第 8 週においてオミクロン株に特異的な変異（G339D）を認めた．研究期間中，国内では 3 つの流行波（第 4，5，6 波：主要流行株；アルファ株，デルタ株，オミクロン株）が認められた．しかし，埼玉県の 10 歳未満小児では，第 4 波と同時期に，流行波と判定される新規感染者数の増加は認められず，第 5 および第 6 波において，新規感染者数の急激な増加を認めた（第 5 波，2021 年の第 29～39 週；第 6 波，2022 年の第 3～21 週）．この 2 つの流行波は，歯科廃水中の SARS-CoV-2 RNA の検出時期（2021 年の第 29～42 週および 2022 年の第 8～21 週）とほぼ同時期であり，埼玉県 10 歳未満の新規感染者数増加と歯科排水中の SARS-CoV-2 RNA の検出時期は統計学的にも有意な関連を認めた（Fisher's exact test, $p<0.001$）．

考察：わが国では，COVID-19 患者の年齢的特徴は，流行波ごとに異なり，当初は 70 歳以上の感染者割合が最も高かったが，徐々に減少し，第 2～5 波では 20～50 歳代が顕著に増加し，第 6 波では，19 歳未満が急増した．ワクチン接種対象外の年齢層が症例数増加の要因のひとつと考えられるが，世界的にもデルタ株とオミクロン株（特に後者）流行時に，小児例の急増が報告されている．各変異株の特徴が症例数の主な決定要因と示唆される．本研究でも，アルファ株流行時の第 4 波では，新規感染者数の増加を認めず，歯科排水中の SARS-CoV-2 RNA 検

〔7　研究結果（つづき)〕

出も無く，デルタ株流行時の第 5 波とオミクロン株流行時の第 6 波で，新規感染者数の急増と歯科排水中の SARS-CoV-2 RNA の検出を認めており，小児歯科排水からの SARS-CoV-2 RNA 検出データは，不顕性感染の小児に関する重要な情報を提供すると考えられた.

2　RT-LAMP 法と生物発光アッセイを組み合わせた RT-LAMP-BART 法を用いた SARS-CoV-2 の遺伝子変異の新規検出法開発（米国 Wayne State University，明海大学との共同研究）

背景・目的：SARS-CoV-2 の 3 主要変異株（アルファ，デルタ，およびオミクロン）は，それぞれ *S* 遺伝子に N501Y，L452R および Q493R/Q498R 変異を有する． COVID-19 制御には，SARS-CoV-2 だけでなく，その変異株も迅速かつ確実に検出する必要がある．我々は RT-LAMP 法と生物発光アッセイ（BART 法）を組み合わせて N501Y，L452R および Q493R/Q498R 変異の検出法を開発した.

方法: N501Y ，L452R と Q493R/Q498R を検出するための LAMP プライマーとペプチド核酸プローブ(PNA プローブ)を設計し，検出特異性と感度を評価した．さらに，標的 RNA をスパイクした臨床サンプル（鼻咽頭スワブおよび唾液）を使用して，臨床サンプルによる反応阻害を検討した.

結果: RT-LAMP-BART 法は，N501Y ，L452R と Q493R/Q498R を正しく識別し，30 分以内に最大 100 ～ 200 コピーの標的遺伝子を検出した． 他方，real-time RT-PCR 法は 130 分を必要とし，感度は最大 500～3,000 コピーで，驚いたことにオミクロン株の N501Y 変異を検出できなかった．臨床検体に含まれる反応阻害物質の影響も，RT-LAMP-BART 法は real-time RT-PCR 法に比較して軽度だった.

考察：新しい RT-LAMP-BART アッセイは，特異性が高く，我々が使用した従来の real-time RT-PCR 法よりも感度が高い． 新しいアッセイは，簡易・安価・迅速であり，SARS-CoV-2 の VOC 株（Variant of Concern）を特定するに有用である.

〔7　研究結果（つづき）〕

Iijima T, Sakai J, Kanamori D, Ando S, Nomura T, Tisi L, Kilgore PE, Percy N, Kohase H, Hayakawa S, Maesaki S, Hoshino T, Seki M. A New Method to Detect Variants of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Bioluminescent Assay in Real Time (RT-LAMP-BART). Int J Mol Sci. 2023 Jun 27;24(13):10698. doi: 10.3390/ijms241310698. PMID: 37445876; PMCID: PMC10341676.

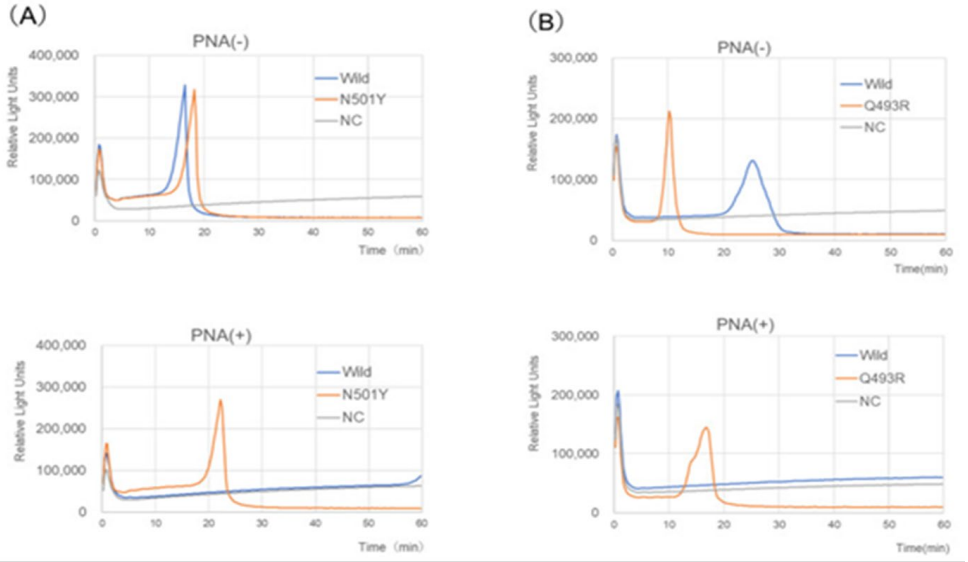


Figure 1. N501Y-RT-LAMP-BART (A) and Q493R-RT-LAMP-BART (B) assay data with PNA and without PNA derived via real-time monitoring of the lights on the tube using the 3M™ Molecular Detection Instrument (MDS100, 3M, USA). Assayed samples were synthetic *S* gene RNA of SARS-CoV-2 with a point mutation, N501Y (A1501U) for N501Y-RT-LAMP-BART, and Q493R (A1478G) and Q498R (A1493G) for Q493R-RT-LAMP-BART (positive control, 5 × 10^4 RNA copies), SARS-CoV-2 RNA (wild-type, JPN/AI/1-004, 5 × 10^6 RNA copies), and DW.

TABLE 4　Detection limits of the PCR and LAMP assays used to detect bla_{KPC}, bla_{NDM-1}, bla_{IMP-1} and bla_{VIM} in DNA-spiked specimens.

	Detection limit							
	bla_{KPC}		bla_{NDM-1}		bla_{IMP-1}		bla_{VIM}	
	PCR	LAMP	PCR	LAMP	PCR	LAMP	PCR	LAMP
Purified DNA	10^4 copies[a]	10^2	10^3	10^2	10^2	10^2	10	10
DNA spiked specimens								
Urine[b]	10^4	10^2	10^4	10^2	10^2	10^2	10^2	10
Sputum[c]	10^4	10^2	10^4	10^2	10^2	10^2	10^2	10
Blood[c]	10^4	10^2	10^4	10^2	10^4	10^2	10^3	10

[a]Amount of DNA per reaction;
[b]Supernatant data obtained after boiling and centrifugation;
[c]Samples prepared via Loopamp™ PURE DNA extraction kit (Eiken Chemical Co.).

3　グラム陰性菌における抗菌薬遺伝子の迅速検出法．（韓国ハンヤン大学，米国 Wayne State University，明海大学との共同研究）

背景・目的：カルバペネマーゼやメタロ-β-ラクタマーゼを保有するグラム陰性菌による院内感染症の治療において，抗菌薬感受性の迅速な評価は重要である．我々は，4 種類の β-ラクタマーゼ遺伝子（*bla* KPC, *bla* NDM-1, *bla* IMP-1 group, *bla* VIM）に対する LAMP 検出法を開発した．

方法：上記 4 種類の β-ラクタマーゼ遺伝子を検出する LAMP プライマーを設計し，6 種類の β-ラクタマーゼ遺伝子を有する 8 種類の基準菌株（*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter bereziniae*）と次世代シーケンサー（NGS）により完全に遺伝的背景が明らかになった緑膿菌臨床分離株 47 株を含む計 55 株のグラム陰性臨床分離

〔7　研究結果（つづき）〕

株を用いて，開発した LAMP 検出法を評価した．精製 DNA を鋳型として用いた場合と，標的とする DNA を混入した尿，喀痰および血液検体を鋳型とした場合の検出感度を評価し，臨床サンプルによる反応阻害を検討した．その結果を従来法である PCR 法の結果と比較した．

結果：LAMP 法の検出特異度は良好で，PCR 法の検出感度は遺伝子 10～10^4 コピーの感度であったのに対し，LAMP 法は 10～100 コピーと検出感度において優れていた．LAMP 法では，精製 DNA を鋳型として用いた場合と，標的とする DNA を混入した尿，喀痰および血液検体において，同程度の感度で検出を認めたのに対し，PCR 法では臨床検体による反応阻害が認められ，DNA を混入した尿，喀痰および血液を鋳型として用いた場合には 1～100 倍の検出感度の低下が認められた．

考察：LAMP 法は 4 種類の β-ラクタマーゼを検出するための適切なツールであることが証明された．

Kim EJ, Lee J, Yoon Y, Lee D, Baek Y, Takano C, Sakai J, Iijima T, Kanamori D, Gardner H, McLaughlin RE, Kilgore PE, Nakamura A, Ogihara T, Hayakawa S, Hoshino T, Kim DW, Seki M.　Front Cell Infect Microbiol. 2023 Jan 12;12:1000445. doi: 10.3389/fcimb.2022.1000445. eCollection 2022.PMID: 36710975

4　グラム陰性菌における抗菌薬遺伝子の迅速検出法 II.（韓国ハンヤン大学，明海大学との共同研究）（論文作成中）

背景・目的：メタロ-β-ラクタマーゼを保有するグラム陰性菌による院内感染症の治療において，抗菌薬感受性の迅速な評価は重要である．本研究では，前報（Front Cell Infect Microbiol. 2023）に加え，4 種類の β-ラクタマーゼ遺伝子（*bla* $_{\text{IMP-13}}$ group, *bla* $_{\text{IMP-15}}$ group, *bla* $_{\text{IMP-18}}$ group, *bla* $_{\text{VIM-7}}$）に対する LAMP 検出法を開発した．

方法： 新たに上記 4 種類の β-ラクタマーゼ遺伝子を検出する LAMP プライマーを設計し，次世代シーケンサー（NGS）により完全に遺伝的背景が明らかになった緑膿菌臨床分離株 47 株を含む計 55 株のグラム陰性臨床分離株を用いて，開発した LAMP 検出法を評価した．精製 DNA を鋳型として用いた場合と，標的とする DNA を混入した尿および血液検体を鋳型として用いた場合の，検出感度を比較した．

結果：新たに開発された LAMP 検出法の特異度は良好で，100DNA コピーまでの検出感度を有し，標的とする DNA を混入した臨床検体を用いた検出感度との比較では，精製された DNA を使用した場合とほぼ同等の結果を得た．

考察：LAMP 法は迅速・簡便・安価で，臨床サンプルによる反応阻害に対しても安定した結果を示し，4 種類の β-ラクタマーゼを検出するための適切なツールであることが証明された．

5　PCV13 や PPSV23 の広範な使用後に出現することが予測される non-vaccine type （ワクチンに含まれない血清型の肺炎球菌）の LAMP 法による血清型別（韓国ハンヤン大学，米国 Wayne State University，明海大学との共同研究）（論文作成中）

背景・目的：肺炎球菌は，主に呼吸器感染症を引き起こすグラム陽性球菌で，菌表層の莢膜ポ

〔7　研究結果（つづき）〕

リサッカライド（capsular polysaccharide: CPS）は宿主免疫からの逃避にかかわる最も重要な病原因子であるとともに，血清型を決定する抗原でもあり，現在までに少なくとも 100 種の血清型が知られている．肺炎球菌の血清型別は従来から莢膜膨化法が用いられ，近年では multiplex PCR 法（PCR 法）による血清型別も開発されているが，LAMP 法は従来法に比べ，迅速・簡便・安価である．我々は，既に PCV13 および PPSV23 に含まれる肺炎球菌が持つ血清型特異的配列に対し，LAMP プライマーを設計し，その有用性について検証を行った（Sci Rep 2019, PLoS ONE 2021）．本研究では PCV13 や PPSV23 の広範な使用後に出現が予測される non-vaccine type（ワクチンに含まれない血清型の肺炎球菌；6C, 7C, 13, 15A, 16F, 21, 23A, 23B, 24F, 31, 34, 35B, 35F, 38, 39）の LAMP 法による血清型別について開発を行った．

方法：はじめに感染研にて莢膜膨化法により血清型の確認を行い，標的および関連する血清型を有する肺炎球菌株を用いて，開発された方法の検出感度および検出特異度を従来法の PCR 法と比較し，検討した．さらに，臨床応用に向けて臨床検体に目的の血清型ゲノム DNA を混入し，検出感度を評価した．

結果：肺炎球菌株を用いた評価では，LAMP 法の特異度は良好で，ワクチンターゲット以外の血清型との交差反応を認めなかった．LAMP 法の検出感度は血清型により異なり，反応当たり 10-100 DNA コピーで，10-10^6DNA コピーの PCR 法と同等，もしくはそれ以上の感度を認めた．DNA をスパイクした臨床検体を用いた検出感度の評価では，LAMP 法は精製された DNA を使用した場合と同等の結果を得たが， PCR 法では検出感度の減少傾向を認めた．

考察：LAMP 法は迅速・簡便・安価で，臨床サンプルによる反応阻害に対しても安定した結果を示している．途上国や設備の不十分な検査室でも使用できる可能性があり，肺炎球菌血清型の疫学的研究を促進することが期待される．

VIII　丸山聡一，佐藤真伍　：人獣共通感染症，特に *Bartonella quintana* の解析

ゲノム解析から読み解く *Bartonella quintana* の遺伝子系統とその病原性

佐藤真伍（日本大学生物資源科学部獣医衛生学研究室）

【概要】　*Bartonella quintana* は，塹壕熱の原因で，コロモジラミによって媒介される．本菌は，コロモジラミの糞中に含まれ，傷口から経皮的に侵入し，人の血管内皮細胞に感染する．内皮細胞で増殖した *B. quintana* は，血流中に遊出し，赤血球内で持続感染する．免疫機構が正常な者が本症に罹患すると，発熱，頭痛，倦怠感，回帰性の菌血症，腓骨の痛み等を呈する．一方，免疫抑制状態の患者が *B. quintana* に感染すると，細菌性血管腫や心内膜炎を併発することがある．本症は，第一次世界大戦中に塹壕内で活動する欧州の兵士内で大流行し，推定 100 万人超の感染者が報告されている．第二次世界大戦時にも塹壕熱は散発的に発生していたが，シラミ駆除剤 “DDT”が積極的に使用されたことで，戦争終結とともに本症の流行は終息していった．

近年になると，都市部の路上生活者に塹壕熱の流行が再び見られ始め，“都市型塹壕熱”として注目されている．米国のサンフランシスコやシアトル，フランス共和国のマルセイユ，ロシアのモスクワなどでは，感染者の血液から *B. quintana* や本菌に対する抗体が検出されている．マルセイユ市内の病院に搬送された *B. quintana* 陽性の路上生活者を調べた研究によると，78 週に亘

〔7　研究結果（つづき）〕

って菌血症が持続していた患者も報告されている．わが国では，東京や大阪の路上生活者から *B. quintana* 抗体や寄生していたコロモジラミから本菌の DNA がそれぞれ検出されている．

1993 年に Spach らは米国内のヒト免疫不全ウイルス陽性患者から *B. quintana* を分離し，本菌が心内膜炎を引き起こすことを初めて報告した．わが国でも *B. quintana* 感染が原因の心内膜炎は発生しており，心弁膜の疣贅物から本菌の DNA が検出されている．興味深いことに，患者の血中や心弁膜から *B. quintana* の DNA や抗体は検出されるものの，菌分離されるケースは稀である（Blood culture-negative endocarditis）．また，心内膜炎を引き起こす *B. quintana* 株のゲノム性状については国内外を問わず，ほとんど検討されていない．

近年になると，非ヒト霊長目の *Macaca* 属サルも *B. quintana* を保菌していることが疫学的に示された．中国では，研究施設内のアカゲザルやカニクイザルから *B. quintana* が高率に分離され，わが国では野生のニホンザルから分離（13.3%：6/45 頭）されている．いずれのサルも無症状であったことから，*B. quintana* の自然宿主は，ヒトや *Macaca* 属のサルを含む霊長目であると示され，現在ではサル由来 *B. quintana* の病原性や媒介するベクターについても研究が進められている．Arvand らは，本菌の 9 つのハウスキーピング遺伝子を用いた Multi-Locus Sequence Typing（MLST）法を開発し，旧ユーゴスラビア，ロシア，米国，フランス，ドイツおよびオーストラリアの患者から分離した *B. quintana* 株のゲノム性状を解析することで，計 7 つの Sequence type（ST）を同定している．その後，Li らは MLST 法によりアカゲザルやカニクイザル由来株を解析し，それぞれ 7 つの ST を同定している．同様に，我々はニホンザル由来株を解析し，異なる新規の ST を報告している．これらの成績に基づくと，*B. quintana* は動物種ごとに系統分類されると考えられる．そこで本プロジェクトでは，1）*B. quintana* 感染が原因となった心内膜炎患者を対象に，原因菌のゲノム性状から ST との関連性を検討するとともに，2）全ゲノム配列情報を用いてヒトとサルが保有する *B. quintana* の病原性の差異を検討した．

1）中東およびアフリカの心内膜炎患者における *Bartonella quintana* の分子疫学

【材料と方法】イスラエル国内の病院に入院していた心内膜炎患者 11 名を対象とした．全ての患者が心内膜炎に起因する弁機能障害を有していたため，外科的処置を受けていた．5 名は Save a Child's Heart 基金活動の一環としてアフリカ東部（エチオピアおよびルワンダ）から，1 名は移民としてエチオピアから入国した患者で，残り 5 名は過去数年間に亘ってイスラエル国内に在住していた患者であった（表 1）．患者 10 名から心組織を採取後，PCR 法によって *B. quintana* 感染をスクリーニング検査し，残り 1 名から血液を採取し，本菌の分離を試みた．続いて，前述の MLST 法を用いて患者由来の *B. quintana* 株の ST を決定し，既報のヒト患者由来株（STs 1〜7），アカゲザル，カニクイザル，ニホンザル由来株（STs 8〜22）とともに系統解析した．

【結果と考察】患者 11 名に由来する 11 株は，8 つの ST に分類され，5 つが新規の STs 23〜27 であった．これらの株のうち，エチオピアの患者から検出された EA1 株，EA3 株および EA6 株は ST2 に分類された．先行研究では，心内膜炎患者から ST1（フランス由来の 1 株），ST2（フランスとドイツ由来の 2 株），ST7（オーストラリア由来の 1 株）の *B. quintana* が同定されており，本研究の結果を考慮すると，ST2 の *B. quintana* が心内膜炎と最も関連性が高いと考えられ

〔7　研究結果（つづき）〕

た．9 つの遺伝子を連結した系統樹で解析すると，新規の STs 23～27 は，既報の STs 1～7 の株とともに単一のクラスターを形成した（図 1）．Minimum spanning tree の解析においても，ヒト由来の ST のみで単一の系統（Human lineage）を形成し，とりわけ ST26 は 1945 年に旧ユーゴスラビアで分離された Fuller 株の ST5 と僅か 1 つの遺伝子座が異なるのみであった（図 2）．さらに，ST26 は STs 3，4 および 27 とも 1 つの遺伝子座が異なるのみであった．これらの成績から，ST26 は Human lineage を構成する *B. quintana* 株の中で最も祖先的な ST であると推測された．

表 1．本研究に用いた心内膜炎患者の基本情報と検出された *B. quintana* の株名

患者#	年齢／性別	*B. quintana* に感染したと推定される国	材料	診断された年	株名
1	9/F	エチオピア	心組織	2014	EA1
2	7/F	エチオピア	心組織	2014	EA3
3	12/F	エチオピア	心組織	2014	EA4
4	16/F	エチオピア	心組織	2015	EA5
5	20/M	エチオピア	心組織	2003	EA6
6	11/M	ルワンダ	心組織	2019	EA7
7	28/M	イスラエル	心組織	2014	EA2
8	32/M	イスラエル	心組織	2003	ISEA
9	75/M	イスラエル	心組織	2015	IS2
10	65/M	イスラエル	心組織	2016	IS3
11	67/M	イスラエル	血液	2005	IS1/Bq-TA7

【論文】Shingo Sato, Lev Shapira, Diana Tasher, Soichi Maruyama, Michael Giladi
Molecular epidemiology of *Bartonella quintana* endocarditis in patients from Israel and Eastern Africa
BMC Infect Dis. 2023 Mar 7;23(1):142. doi: 10.1186/s12879-023-08099-x

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

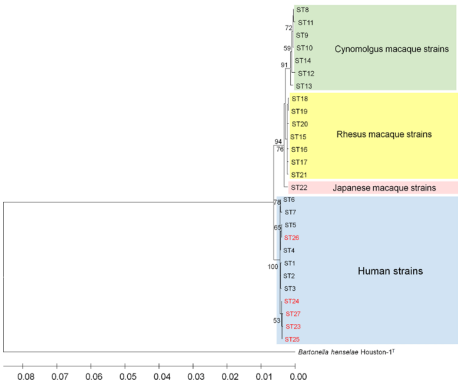


図 1. 連結配列に基づく系統樹
STs 1～7，23～27：ヒト由来株，STs 8～14：カニクイザル由来株，STs 15～21：アカゲザル由来株，ST22：ニホンザル由来株を表す．赤字の ST は，今回新たに同定された新規の番号を表す．

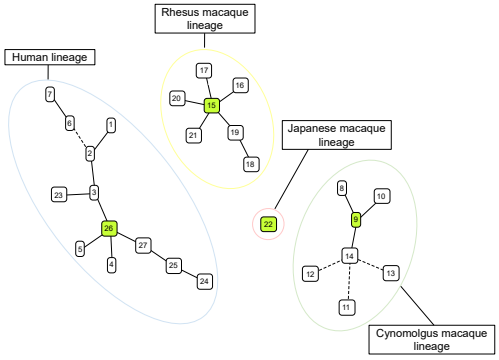


図 2. Minimum spanning tree による系統解析
STs 1～7，23～27：ヒト由来株，STs 8～14：カニクイザル由来株，STs 15～21：アカゲザル由来株，ST22：ニホンザル由来株を表す．解析に用いた遺伝子座 9 つのうち，1 つ異なる場合には黒い実線で，2 つ以上異なる場合には破線で ST 間をそれぞれ連結した．黄緑色の ST は，各 Lineage の祖先型を表す．

2）全ゲノム配列情報を用いた *Bartonella quintana* の比較ゲノム解析

【材料と方法】　ニホンザル由来 *B. quintana* 株の完全長ゲノム配列を決定するために，和歌山県の野生ニホンザルから分離した MF1-1 株を用いた．菌株からゲノム DNA を抽出し，DNA ライブラリーを作製した後，次世代シーケンサーPacBio RSII（ロングリード方式）と HiSeq2500（ショートリード方式）を併用し，当該株のゲノム配列を決定した．ロングリード方式の配列データから得られたドラフト配列に対して，ショートリード方式の配列データをマッピングし，完全長ゲノム配列を構築した．続いて，遺伝子アノテーションプログラム DFAST を用いて，完全長ゲノム配列から rRNA と tRNA のコピー数，GC%，アミノ酸のコード領域（Coding Sequence：CDS）数をそれぞれ推定した．MF1-1 株とヒト由来 Toulouse 株およびアカゲザル由来 RM-11 株の CDS を機能分類（Clusters of orthologous groups of proteins：COG 分類）し，3 株間で比較した．Dot blot 解析によって MF1-1 株に特異的な構造多型を探索するとともに，主要な病原性関連遺伝子群である VirB/D4 オペロンと Trw オペロンを 3 株間でそれぞれ比較した．

【結果と考察】　解析した MF1-1 株のゲノムサイズは 1,588,683bp で，rRNA と tRNA のコピー数はそれぞれ 6 コピー，42 コピー，CDS 数は 1,179 個であった（図 1）．COG 分類の結果，菌の

課題番号	22 独先 09

【様式 5 独創的・先駆的研究】

〔7　研究結果（つづき）〕

分裂増殖，遺伝子の転写や翻訳，エネルギー代謝に関与する CDS 数は，3 株間でほとんど差異はみられなかった（図 2）．ゲノムの構造多型を検討したところ，MF1-1 株は Toulouse 株や RM-11 株と異なり，約 700kb の逆位配列が確認された．MF1-1 株の VirB/D4 オペロンでは，抗アポトーシス作用の責任遺伝子である *bepA1* および *bepA2*，Trw オペロンでは，赤血球への接着因子である *trwL2*，*trwL4* および *trwL6* がそれぞれ欠失していた（図 3 および 4）．以上から，ニホンザル由来 *B. quintana* のゲノムには，宿主と共進化する過程において大規模なゲノム再編成が生じ，病原性に関わる遺伝子の一部が失われた可能性が推察された．

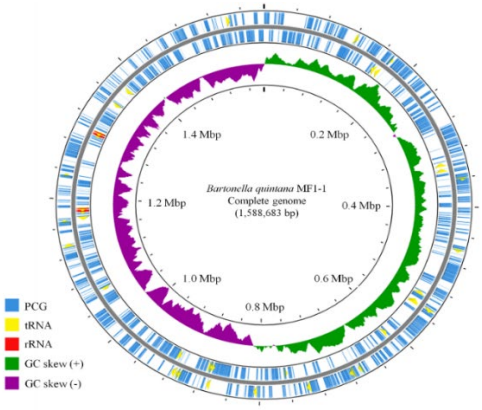


図1．*Bartonella quintana* MF1-1株の環状ゲノムマップ

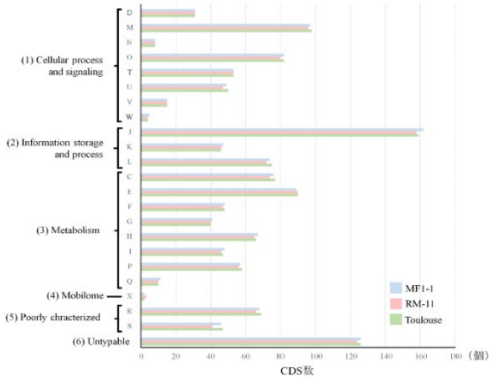


図2．MF1-1株，RM-11株，Toulouse株のCDSを用いたCOG分類

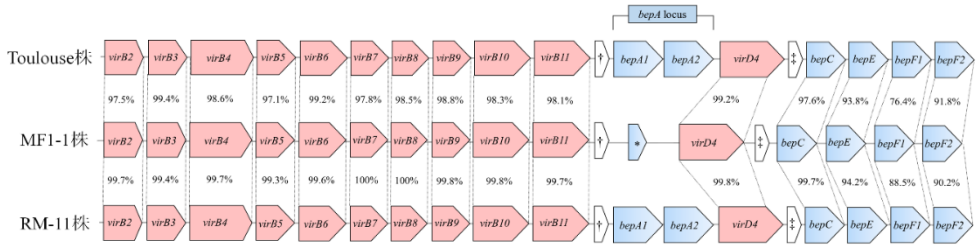


図3．Toulouse株，MF1-1株およびRM-11株間でのVirB/D4オペロンの構造比較

† 偽遺伝子，‡ 機能不明な遺伝子，* *bepA2*の塩基配列の断片をそれぞれ表す。数値は，相同な遺伝子間のSequence identity値（%）を表す。IV型分泌機構の構造タンパクの遺伝子を赤色，エフェクター蛋白の遺伝子を青色でハイライトした。

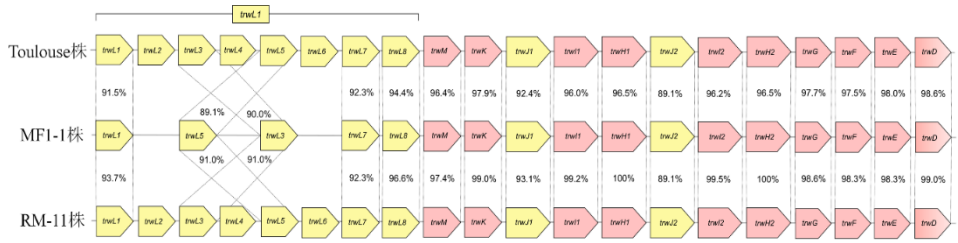


図4．Toulouse株，MF1-1株およびRM-11株間でのTrwオペロンの構造比較

数値は，相同な遺伝子間のSequence identity値（%）を表す。赤血球と接着する分子をコードする遺伝子を黄色，それ以外を赤色でハイライトした。

【論文】Shingo Sato, Emu Nishioka, Hidenori Kabeya, and Soichi Maruyama

Genomic properties of *Bartonella quintana* strains from Japanese macaques (*Macaca fuscata*) based on comparative microbial genomics. 投稿中（Scientific Reports）

〔7　研究結果（つづき）〕

IX　佐藤秀一：口腔感染と全身感染特に誤嚥性肺炎と敗血症

***Fusobacterium nucleatum*　がヒト気管支上皮細胞層とマウス肺のタイトジャンクション破壊に及ぼす影響　日本大学歯学部歯科保存学第 III 講座　佐藤秀一**

【概要】呼吸器上皮細胞に局在するタイトジャンクションは,上皮細胞同士を機械的に繋ぐことでバリアを形成し,細菌やその病原因子およびウイルスの侵入を防ぐなど, 感染防御において重要な役割を果たしている．一方で,細菌感染が呼吸器上皮のタイトジャンクションに及ぼす影響はわかっていない．歯周病原菌が呼吸器上皮のタイトジャンクション機能に影響を及ぼしているのではないかと推察し, 管支上皮細胞およびマウスを用いて実験を行った．その結果, Fusobacterium nucleatum は CLDN1 や JAM-A などの遺伝子発現を抑制させることにより, 呼吸器上皮のタイトジャンクションを破壊していることが明らかとなった．歯周病原菌の誤嚥が, 肺のバリア機能の低下を介して呼吸器疾患の重症化に影響を及ぼしていることが示唆された.

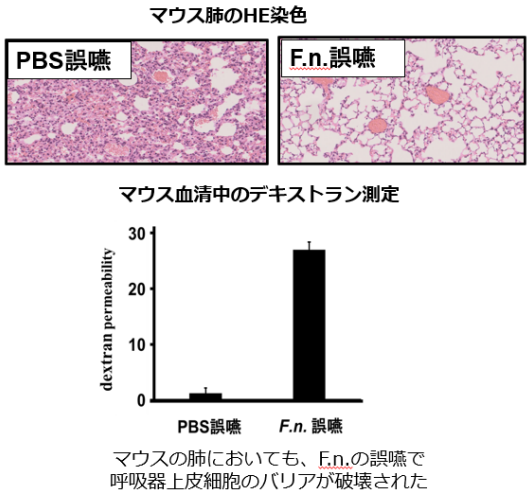
１．はじめに

歯周病は歯を喪失する最も大きな要因となるだけでなく, 肺炎などの呼吸器疾患, 糖尿病, 及び低体重児出産など様々な全身疾患の誘因となることもわかってきた．したがって，歯周病予防は口腔の健康のみならず全身の健康維持にも重要との考え方が広まっている．特に誤嚥性肺炎や慢性閉塞性肺疾患（chronic obstructive pulmonary disease: COPD）に代表される呼吸器疾患と歯周病との関連を示す臨床研究は多く報告されており，4 mm 以上の歯周ポケットが 10 歯以上ある人は，歯周ポケットが正常な人に比べ肺炎により死亡する危険性が約 4 倍高いことや，重度の歯周病罹患者はそうでない者に比べ，COPD を発症する割合が 3.5 倍高いことなどが示されている．一方，口腔健康管理が呼吸器疾患予防に有効であることもわかっており，周術期や高齢者施設等において呼吸器疾患予防を目的とした口腔衛生管理と口腔機能管理が積極的に行われている．最近，歯周病原菌が呼吸器疾患の発症と進行に及ぼす影響が分子レベルで解明されつつある．これまでに，*Fusobacterium nucleatum* や *Porphyromonas gingivalis* などが呼吸器上皮細胞に作用し，炎症性サイトカインの産生と肺炎起因菌の受容体発現を誘導することや，ムチンの過剰産生を引き起こすことが報告されている．呼吸器上皮細胞に局在するタイトジャンクションは，上皮細胞同士を機械的に繋ぐことでバリアを形成し，細菌やその病原因子およびウイルスの侵入を防ぐなど，感染防御において重要な役割を果たしている．肺炎や COPD 罹患者では，炎症性サイトカインや酸化ストレス等が呼吸器上皮細胞のタイトジャンクションを破壊する結果，細菌やウイルスの 2 次感染が起こり，呼吸器疾患が重症化することが知られている．しかし，細菌感染が呼吸器上皮のタイトジャンクションに及ぼす影響はわかっていない．そこで本研究では，歯周病原菌が呼吸器上皮のタイトジャンクション機能に影響を及ぼしているのではないかと推察し，気管支上皮細胞およびマウスを用いて実験を行った．

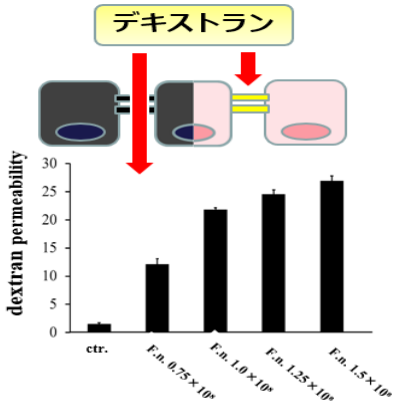
〔7　研究結果（つづき）〕

2．方法

実験には, 気管支上皮細胞株 (16HBE 細胞) とヒト気管支由来のプライマリー上皮細胞に, *F. nucleatum* (ATCC 25586 株) を添加することで行った．はじめに, 上皮組織における細胞間結合の強さを調べるために, 二層構造のトランスウェルプレートを用い, 上層に細胞を下層には培地のみを用意し, 上層と下層の経上皮電気抵抗値 (transepithelial electric resistance: TER) を 3 日間測定した．TER は, バリア機能を評価する指標として用いられている．TER 測定後, プレート上層に蛍光標識したデキストランを滴下した後, 下層に透過するデキストラン量を吸光度計 (OD: 535 nm) にて測定することにより, 実際にタイトジャンクションが破壊されているか否かを検討した．気管支上皮細胞のタイトジャンクション形成にかかわる遺伝子とその相互作用を網羅的に検索するために, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway Database 内の tight junction reference pathway から入手したデータセットと, ソフトウェア Cytoscape (NIH) を用いてコンピュータシュミレーション解析を行った．本解析で判明したタイトジャンクション形成に関わる遺伝子への *F. nucleatum* の影響は, 細胞抽出液を回収した後に real-time PCR 法にて検討した．また, マウスの呼吸器に対する影響を調べるために, C57BL/6 マウスをイソフルランにて麻酔後, *F. nucleatum* (1×10^8 CFU) もしくは PBS を気管内に 3 日間連続投与した．その後, 蛍光標識されたデキストランを気管内投与し, 1 時間後にマウスの血液と肺を回収, 血液においてはデキストラン透過性を, 肺においては遺伝子発現を検討した．さらに, 肺胞の破壊程度を調べるために, 肺組織切片を作成後 H-E 染色を行い, 肺胞 50 個の平均肺胞間距離を測定することにより, 肺胞腔の大きさを定量した．



マウスの肺においても、F.n.の誤嚥で
呼吸器上皮細胞のバリアが破壊された



F.n. によりタイトジャンクションが破壊され
デキストランの更新が認められた

3．結果

実験の結果, *F. nucleatum* は菌量依存的に 16HBE 細胞の TER を低下させることがわかった．プライマリー気管支上皮細胞においても同様の結果が得られたことから, *F. nucleatum* は気管支上皮においてタイトジャンクション機能を減弱させていることが示唆された．そこで, デキストラン透過性解析を行った結果, *F. nucleatum* 添加群においては, 16HBE 細胞におけるデキストランの透過性が大幅に亢進したことから, 実際にタイトジャンクションが破壊されているこ

〔7　研究結果（つづき)〕

とが明らかとなった．次に, KEGG Pathway Database と Cytoscape を用いたシュミレーション解析から, 気管支上皮細胞においては, claudin1 (CLDN1), ZO-1, ZO-2, occludin, E-cadherin および junctional adhesion molecule A (JAM-A) などが, タイトジャンクションの構成や細胞間結合に重要な役割を演じていることがわかった．そこで, *F. nucleatum* がこれら遺伝子に及ぼす影響を調べた結果, *F. nucleatum* は特に CLDN1, JAM-A, ZO-2 および occludin の遺伝子発現を有意に低下させた．*F. nucleatum* を気管内投与したマウスの肺においても, CLDN1 と JAM-A の遺伝子発現の低下が認められた．さらに, *F. nucleatum* 投与マウス肺では, 好中球の浸潤とともに肺胞腔の拡大が認められた．デキストランの誤嚥実験においても, *F. nucleatum* 投与群においては, 血清中に大量のデキストランが漏洩していることが認められたことから, *F. nucleatum* は実際にマウス肺のタイトジャンクションを破壊していることがわかった．以上の結果より，*F. nucleatum* は CLDN1 や JAM-A などの遺伝子発現を抑制させることにより，呼吸器上皮のタイトジャンクションを破壊していることが初めて明らかとなった．肺におけるバリア機能の低下は，肺炎起因菌や COPD を増悪させる呼吸器ウイルスのさらなる感染を招く．本研究から，歯周病原菌の誤嚥が，肺のバリア機能の低下を介して呼吸器疾患の重症化に影響を及ぼしていることが示唆された.

1. Karahashi Y, Cueno ME, Kamio N, Takahashi Y, Takeshita I, Soda K, Maruoka S, Gon Y, Sato S, Imai K. (2024) *Fusobacterium nucleatum* putatively affects the alveoli by disrupting the alveolar epithelial cell tight junction, enlarging the alveolar space, and increasing paracellular permeability. Biochem Biophys Res Commun, 682: 216-222.
2. Karahashi Y, Cueno ME, Kamio N, Takahashi Y, Takeshita I, Soda K, Maruoka S, Gon Y, Sato S, Imai K. (2024) *Fusobacterium nucleatum* putatively affects the alveoli by disrupting the alveolar epithelial cell tight junction, enlarging the alveolar space, and increasing paracellular permeability. Biochem Biophys Res Commun, 682: 216-222.
3. Yokoe S, Hasuike A, Watanabe N, Tanaka H, Karahashi H, Wakuda S, Takeichi O, Kawato T, Takai H, Ogata Y, Sato S, Imai K. (2022) Epstein-Barr Virus Promotes the Production of Inflammatory Cytokines in Gingival Fibroblasts and RANKL-Induced Osteoclast Differentiation in RAW264.7 Cells. Int J Mol Sci., 23(2), 809.
4. Imai K, Iinuma T, Sato S. (2021) Relationship between the oral cavity and respiratory diseases: Aspiration of oral bacteria possibly contributes to the progression of lower airway inflammation. Jap. Dent. Sci. Rev. 57, 224-230.

X　武市　収：口腔炎症における細菌・ウイルス相互作用
歯根肉芽種中の Epstein-Barr ウイルス感染が炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響
日本大学歯学部歯科保存学第II講座　武市　収

【概要】歯根肉芽種中の Epstein-Barr ウイルス感染が炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響を検討し，EBV が難治性根尖性歯周炎関連細菌により再活性化し，骨吸収誘導性サイトカインの発現を促すことで，歯根周囲の歯槽骨吸収に関与することを明らかにした

〔7　研究結果（つづき）〕

1　研究課題

歯根肉芽種中の Epstein-Barr ウイルス感染が炎症性サイトカインの発現に及ぼす影響

2　研究目的

ヒトヘルペスウイルス 4 型である Epstein-Barr ウイルス（EBV）は，ヒトに感染したのち直ちに病原性を示さず，潜伏感染する．しかし，ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤の存在下で再活性化し，病原性を発揮する．本研究の目的は，HDAC 阻害剤の一つである酪酸に着目し，酪酸を産生する難治性根尖性歯周炎関連細菌が EBV を再活性化したのち，炎症性サイトカインの発現を誘導する可能性について明らかにすることである．なお，本研究は日本大学歯学部倫理委員会の承認（倫許 EP21D012）のもとに実施した．

3　研究概要

1）供試試料：難治性根尖性歯周炎と診断された患者で，外科処置が適応とされた患者 65 名から根尖病変組織を摘出し，直ちに 3 分割したのち，それぞれパラフィン切片作製，DNA および RNA 抽出に使用した．

2）病理組織学的検索：パラフィン切片を用いてヘマトキシリンーエオジン染色を行い，歯根肉芽種と病理診断された試料を以下の研究に供した．

3）EBV および難治性根尖性歯周炎関連細菌の検出：歯根肉芽種から抽出した DNA から，real-time PCR 法を用いて EBV，*Fusobacterium nucleatum*，*Prevotella intermedia*，*Candida albicans*，*Enterococcus faecalis* および *Pseudoramibacter alactolytics* の定量的検出を行った．

4）難治性根尖性歯周炎関連細菌による酪酸産生：*F. nucleatum*，*P. intermedia*，*C. albicans*，*E. faecalis* および *P. alactolytics* の培養上清中の酪酸量を，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で定量した．

5）酪酸による EBV の再活性化誘導の検索：BZLF-1 遺伝子を組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを遺伝子導入し，B-95-8-221 luc 細胞を作製した．市販の酪酸または難治性根尖性歯周炎関連細菌の培養液を回収し，ルシフェラーゼアッセイを行った．

6）再活性化 EBV とサイトカイン発現の分子生物学的検索：BZLF-1，IL-1β，IL-6，RANKL の real-time PCR 法を行い，サイトカイン mRNA 発現を定量した．

7）再活性化 EBV とサイトカイン発現の免疫組織学的検索：ZEBRA，IL-1β，IL-6，RANKL の二重免疫染色法を行い，サイトカインタンパク発現を検出した．

8）統計分析：ピアソンの相関係数および Mann-Whitney *U*-test を用いて，有意水準 5%で統計分析を行った．

4　結　果

1）病理組織学的検索：65 名の患者から摘出した試料のうち，50 例が歯根肉芽腫であった．残りの 15 例は歯根嚢胞と病理診断し，本研究から除外した．

2）難治性根尖性歯周炎関連細菌の検出：*F. nucleatum* が有意に検出され，*P. intermedia*，*C. albicans*，*E. faecalis* および *P. alactolytics* も検出された．

3）*P. alactolyticus* の酪酸産生量：*P. alactolyticus* 培養上清中の酪酸産生量は 3.58ｍＭであった．

4) 酪酸による EBV の再活性化：ルシフェラーゼアッセイを行ったところ，市販の酪酸（1.0 および 1.5 mM）または *P. alactolyticus* の培養上清の添加により BZLF-1 の発現量が上昇した（図 1）．

〔7　研究結果（つづき）〕

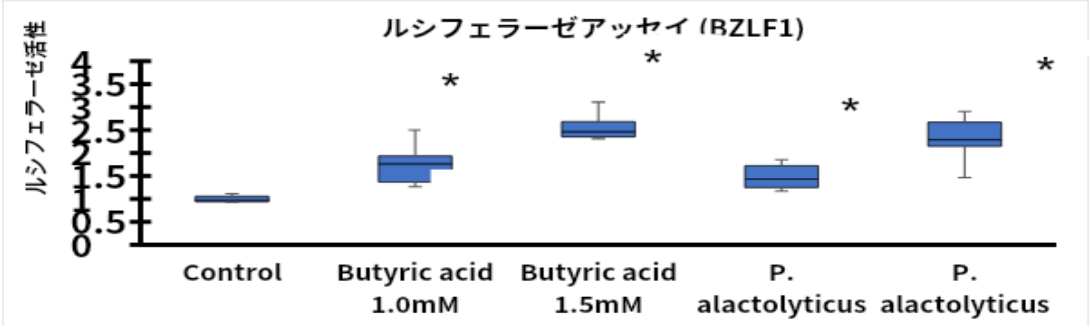


図 1：BZLF-1 ルシフェラーゼアッセイ

5) 免疫組織学的検索：蛍光二重免疫染色法を行ったところ，ZEBRA を発現する細胞は IL-1β，IL-6 または RANKL を共発現していた（図 2：IL-1β との共発現例）.

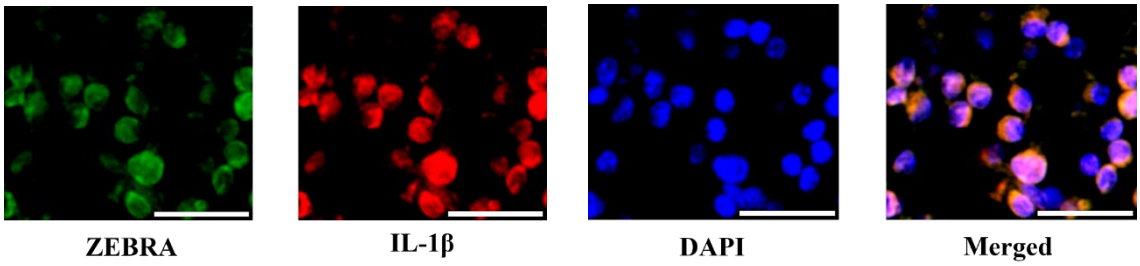


図 2：歯根肉芽腫中の B 細胞による ZEBRA と IL-1β の共発現

歯根肉芽腫中の細胞による ZEBRA と IL-1β，IL-6 または RANKL の共発現の割合は，それぞれ 23.7%（図 3），34.2%または 24.9%であった．なお，健常歯肉組織を同様に検索した結果，ZEBRA およびサイトカインの発現は認められなかった.

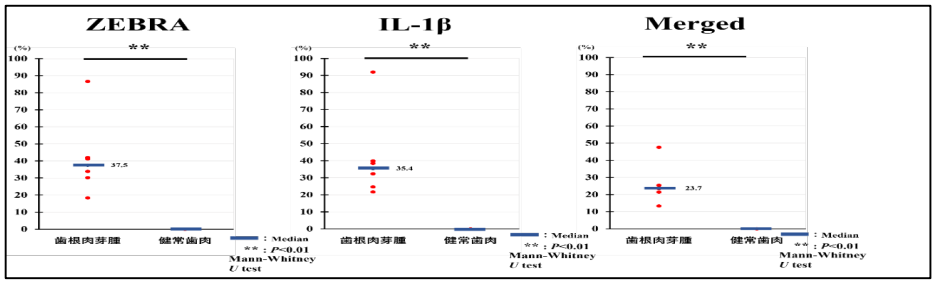


図 3：歯根肉芽腫および健常歯肉中の ZEBRA と IL-1β，IL-6 または RANKL の共発現

〔7　研究結果（つづき）〕

6）再活性化 EBV の検索：歯根肉芽腫から有意に BZLF-1 mRNA 発現を認めたが，健常歯肉からの発現は認められなかった（図 4）.

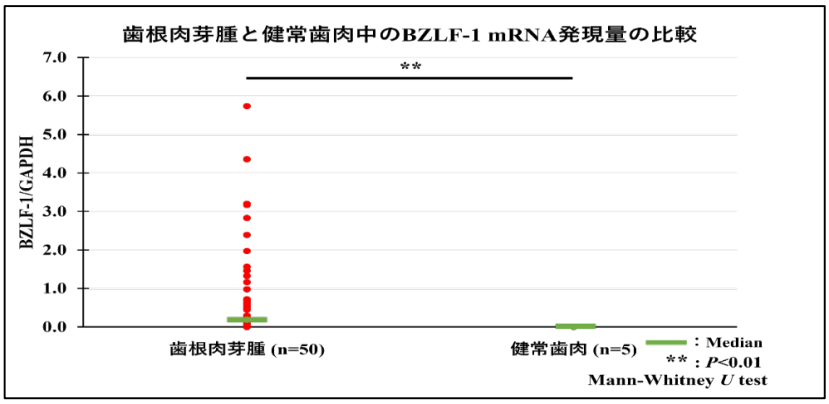


図 4：歯根肉芽腫 50 例および健常歯肉 5 例を用いた BZLF-1 mRNA の発現量

7）再活性化 EBV とサイトカイン発現量およびその相関性の検索：real-time PCR 法を行ったところ，歯根肉芽腫から IL-1β（図 5），IL-6 または RANKL mRNA の発現を確認した．なお，健常歯肉組織から BZLF-1 およびサイトカインの遺伝子発現は検出されなかった.

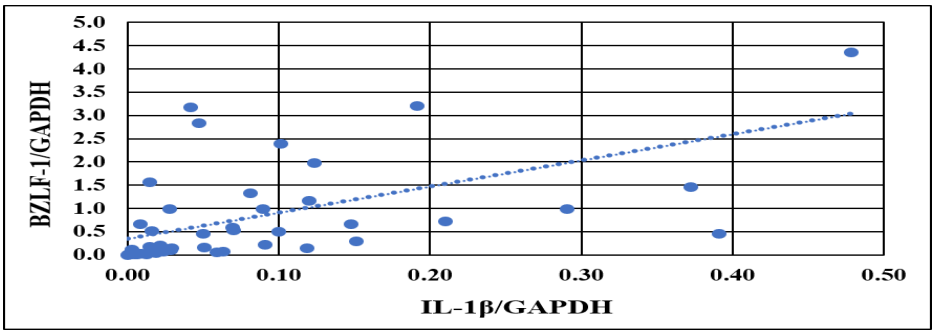


図 5：歯根肉芽腫 50 例を用いた BZLF-1 と IL-1β mRNA の発現量：同一患者ごとの BZLF-1（上段）および IL-1β（下段）mRNA の発現量を示す.

BZLF-1 および IL-1β の発現量をピアソンの相関係数を用いて検討した結果，R^2=0.24471，*P*=0.00025 と正の相関性を認めた（図 6）.

また，BZLF-1 と IL-6 または RANKL の相関性を検索した結果，それぞれ R^2=0.21220，*P*=0.00073 および R^2=0.19313，*P*=0.00137 と正の相関性を認めた.

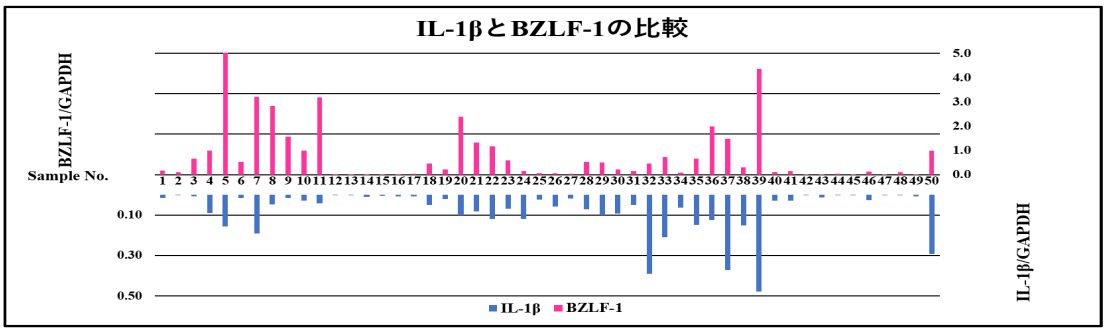


図 6：歯根肉芽腫中の BZLF-1 と IL-1β mRNA 発現量の相関性

〔7　研究結果（つづき)〕

以上の結果を，以下のように総括した.

1） 歯根肉芽腫中の B 細胞に EBV が潜伏感染していた.
2） 歯根肉芽腫中に感染した *F. nucleatum*，*P. intermedia* および *P. alactolytics* は酪酸を産生し，EBV を再活性化する可能性が示唆された.
3） 再活性化した EBV は，歯根肉芽腫中の B 細胞による IL-1β，IL-6 または RANKL の　発現を誘導する可能性が示唆された.

５　結　論

歯根肉芽腫中に潜伏感染した EBV は難治性根尖性歯周炎関連細菌により再活性化し，骨吸収誘導性サイトカインの発現を促すことで，歯根周囲の歯槽骨吸収を誘発する可能性が示唆された.

XI　泉福英信（日本大学松戸歯学部）：ウイルス感染における好中球機能の解析

好中球のネト-シスによる SARS-CoV-2 感染防御機構の検討

松戸歯学部　感染免疫学講座　　泉福英信，瀧澤智美

研究目的

COVID-19 患者の予後を規定する因子の一つに NETs（ネト-シス，neutrophil extracellular traps）の過剰生成がある．NETs は好中球が 特定の刺激に反応して細胞外へ放出する核成分から成る網目状構造物であり，その強い殺菌作用は自然免疫による細菌およびウイルス感染防御機構として重要である．歯科領域においてはバイオフィルムによる歯周病発症関与することが報告されている．NETs は生体内に侵入したウイルス・ 微生物に対する感染防御の役割を果たす一方，過剰産生は組織を傷害する．興味深いことに唾液中のラクトフェリンは NETs の過剰活性化を制御するが，食品にも含まれるため経口投与が可能である．そこで分担研究として,これらの生体分子によるネットワークの解明から，病原体に対する自然免疫による先制制御法を確立し，SARS-CoV-2 感染阻害と抗微生薬耐性ならびにワクチンエスケープ変異発生回避を図る.

研究概要

7.5%カゼイン溶液 1mL をマウス腹腔に投与し 24 時間後に腹腔浸出細胞と骨髄を回収する．Percoll（63%）を用いて好中球を濃縮分離する．1×10^6 個/mL の濃度で培養プレートに播種する．37℃，5%CO_2 で 30 分間プレ培養した後に，100nM の PMA を添加し，4 時間培養しネトーシスを誘導する．マウスの腹腔浸出細胞から分離した好中球濃縮分画を 10，50，100nM の PMA で 4 時間処理し，ネトーシスのマーカーの発現をフローサイトメーターで分析する．NETs を起こした好中球の表層マーカーとしては DNA，抗菌物質である myeloperoxidase（MPO)，シトルリン化ヒストン H3 などが知られている．DNA に結合する HelixNPGreen，MPO に結合する PE 標識抗 MPO 抗体，APC 標識抗ヒストン H3 抗体（シトルリン化ヒストン H3 抗体では実施していない）を用いて，フローサイトメーターにてネト-シス細胞について検討した．その結果，マウス腹腔浸出細を PMA を用い 4 時間処理した場合に，ネトーシスのマーカーである，細胞外 DNA，MPO，ヒストン H3 が最も高い割合でフローサイトメーターで検出できることが示された．SARS-CoV-2 を NETs 細胞に加

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

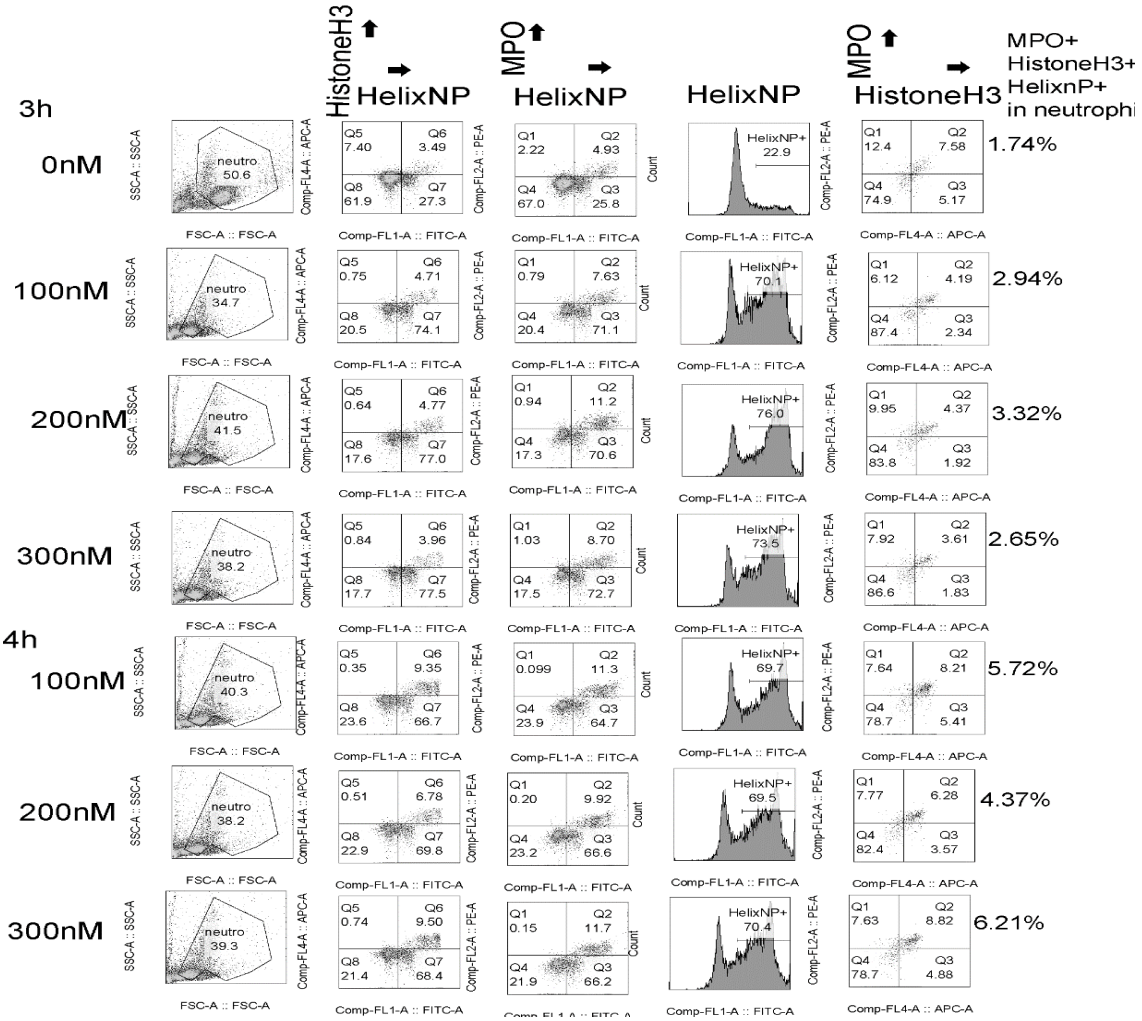
え，NETs による抗ウイルス効果について Vero 細胞を用いて検討した．

研究結果

マウス腹腔浸出細胞から Percoll（63%）を用いて好中球を濃縮分離し，1×10^6 個/mL の濃度で培養プレートに播種する．37℃，5%CO_2 で 30 分間プレ培養した後に，100nM の PMA を用い 4 時間処理した場合に，NETs のマーカーである，細胞外 DNA，MPO，ヒストン H3 がフ最も高い割合でフローサイトメーターで検出できることが示された（図 1）．

本年度は，SARS-CoV-2 を NETs 細胞に加え，NETs による抗ウイルス効果について Vero 細胞を用いて検討する．

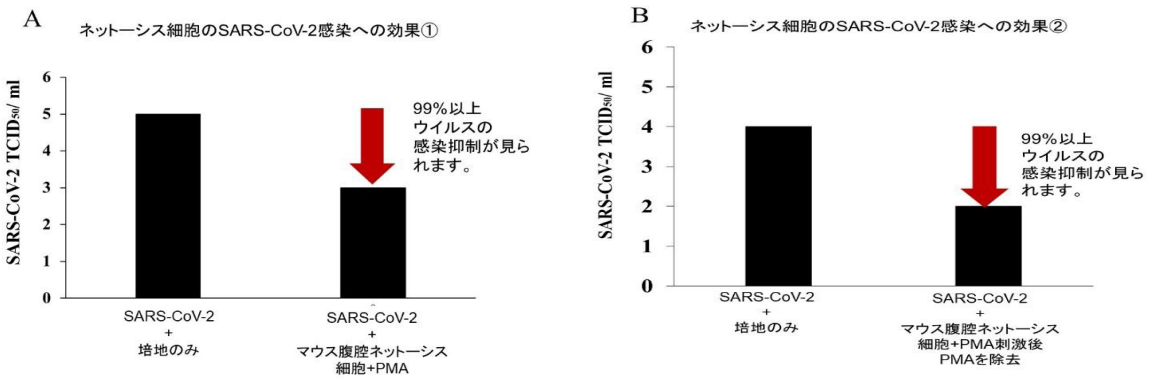
図 1　マウス腹腔細胞からネトーシスの誘導



課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

図 2 マウス腹腔細胞から NETs による SARS-CoV-2 感染阻害



マウスの腹腔浸出細胞から分離した好中球

を PMA にて NETs を誘導した．その細胞に SARS-CoV-2 を加え 20 分間培養し，感染阻害するか検討を行った．その結果，PMA で誘導された好中球の NETs は SARS-CoV-2 の感染を阻害した（図２A）PMA が存在することで，SARS-CoV-2 の感染に影響が出る可能性があるので，遠心により PMA を除き，新鮮な培地で再懸濁した NETs 細胞と SARS-CoV-2 を混ぜて感染実験を行った．その結果，PMA を除いても好中球の NETs は SARS-CoV-2 の感染を阻害した（図２B）.

考察

NETs は，SARS-CoV-2 感染阻害と抗微生薬耐性ならびにワクチンエスケープ変異発生回避に有効であることが考えられた.

業績

1. Senpuku H, Yoshimura K, Takai H, Maruoka Y, Yamashita E, Tominaga A, Ogata Y. Role of macrophage colony-stimulating factor for Staphylococcal infection in the oral cavity. J Clin Med. 2023, 12(18):5825.

2. Nakao R, Hirayama S, Senpuku H, Hasegawa H, Suzuki T, Akeda Y, Ohnishi M. A bivalent outer membrane vesicle-based intranasal vaccine to prevent infection of periodontopathic bacteria. Vaccine, 2023, 41(30):4369-4383.

3. Tanaka J, Senpuku H, Ogawa M, Takamatsu K, Watanabe T, Mabuchi Y, Nakamura S, Ohnuma S, Ishida S, Yasuhara R, et al. Human salivary gland organoids generated from pluripotent stem cell model SARS-CoV-2 infection and replication. Nature Cell Biology, 2022, 24(11):1595-1605.

4. Nakamura T, Yonezawa H, Kawarai T, Narisawa N, Senpuku H. Inhibitory effect of the combination of xylitol and funoran on *Streptococcus mutans* biofilm formation on the uncoated surface. Archives of Microbiology, 2022, 204(12):723.

5. Tabe S, Nakayama Y, Kobayashi R, Oyama K, Kitano D, Ogihara J, Senpuku H, Ogata Y. Association between dietary habit and clinical parameters in patients with chronic periodontitis undergoing supportive periodontal therapy. Nutrients, 2022, 14(23)4993.

課題番号	22 独先 09

【様式 5 独創的・先駆的研究】

〔7　研究結果（つづき）〕

Part II　人文・理工系領域の研究成果

I　日本大学危機管理学部　　福田　充

「新型コロナウイルスに対する市民の意識と対応行動に関する社会調査」

【概要】本研究は，2023 年 1 月時点の新型コロナウイルス(COVID-19)の流行下における日本人の感染予防行動や政治・行政の対応策への評価，情報の充実性，メディア利用，リスク認知やリスク不安など，パンデミックにおけるリスクコミュニケーションを検討するものである．とりわけ，社会調査という手法上，市民は新型コロナウイルスに対してどのような認知を有していたのか，それに伴い，市民はどのような感染予防行動を実施していたのか，そしてこれらの認知や行動と新型コロナウイルスの感染との関係性について検証する社会調査を行った．

【対象と方法】

本調査は日本国籍を有する 18 歳から 79 歳までの男女 1000 名を対象としたインターネット・オンライン調査である．標本抽出は，株式会社サーベイリサーチセンターのモニター登録者の中から，令和 2 年実施の国勢調査の結果を基に，性別と年齢層で層化抽出及び都道府県を 6 つのブロック(北海道東北ブロック・中部北信越ブロック・関東圏ブロック・関西圏ブロック・中国四国ブロック・九州沖縄ブロック)に分け，各ブロックの性別比と年齢構成に即す形で割り当てを実施した．本調査における割付案は以下の表 1 の通りである．

	□ □	18□ 29□		30□ 39□		40□ 49□		50□ 59□		60□ □ □ (70□ □ □ □ □ □	
	□ □	□	□	□	□	□	□	□	□	□	□
北海道東北ブロック	113	8	7	8	8	10	10	10	10	20	22
関東圏ブロック	350	28	27	28	26	36	34	32	31	52	56
中部北信越ブロック	165	12	11	12	11	16	16	15	14	28	30
関西圏ブロック	175	13	13	12	12	17	17	15	16	28	32
中国・四国ブロック	86	6	6	6	6	8	8	7	7	15	17
九州・沖縄ブロック	111	8	8	8	8	10	10	9	10	19	21
全体	1000	75	72	74	71	97	95	88	88	162	178

表 1　本調査における割付案（1000 人）

以下に調査結果の一部を紹介する．人々が実際に行っていた公衆衛生行動について概観していきたい．図 1 は，公衆衛生行動の実行頻度に関する単純集計結果である．図 1 のように「マスクを着用している」を「必ず実行している」と答えた回答者は 78%であり，どの公衆衛生行動と比較しても圧倒的に実行率が高い傾向にあった．その次に「体調不良の際の外出を控えている」を「必ず実行している」と答えた回答者は 55.2%であり，およそ 22 ポイント差があるものの，二番目に実行率が高かった．「必ず実行している」と答えた回答者が多い傾向にあるのは「大人数での飲食を控えている」(47.7%)と「こまめに手洗い・うがいをしている」(44.6%)であった．しかしこの二つの項目については，「概ね実行している」と答えた回答者と合わせた場合，「こまめに手洗い・うがいをしている」と答えた回答者の方が多い傾向にある

〔7　研究結果（つづき）〕

（44.6+40.3=84.9%）.

この結果から，回答者の多くが基本的な公衆衛生行動を行っていたことがわかる．しかし，マスクを着用する効果が議論される中で，手洗い・うがいやアルコール消毒を「必ず実行している」回答者の割合が少ない点には注意が必要であろう．新型コロナウイルス感染症は，エアロゾル感染や飛沫感染の可能性からマスク着用に焦点があたる傾向にあった．そのため，手洗い・うがいに関するリスクコミュニケーションが足りなかった可能性が示唆される．また，アルコール消毒の割合が低かった点については，学校機関や企業で周知され家庭に浸透していなかった可能性などが考えられる．

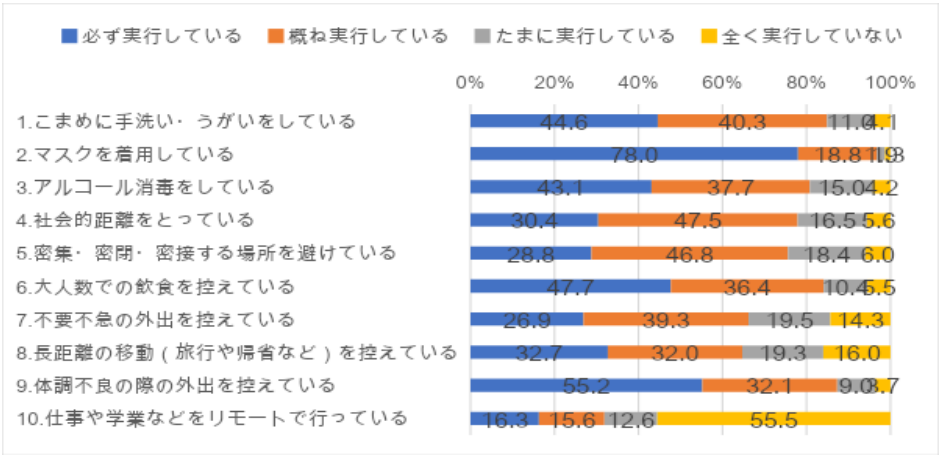


図 1　日本人の公衆衛生行動の実行頻度（%）N=1000

続いて，三密の回避やソーシャルディスタンスに関する項目は，「必ず実行している」回答者よりも「概ね実行している」回答者がより多い傾向にあった．具体的な数値は「社会的距離を取っている」とした回答者が 77.9%であり，そのうちの 47.5%が「概ね実行している」という結果となった．

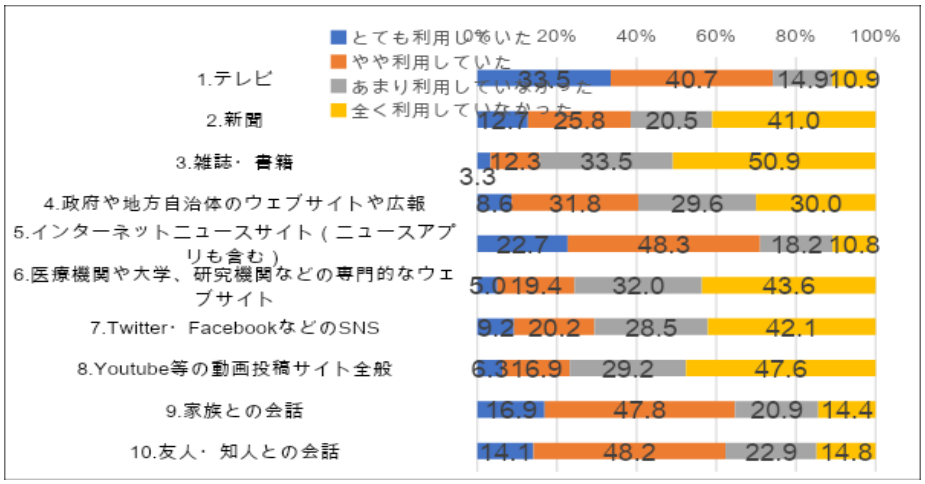


図 2　メディア利用の実態（%）N=1000

〔7　研究結果（つづき）〕

次に，新型コロナウイルスに関するリスク情報を収集する際に使用されたメディアの実態は，図２の通りである．最も多く利用されていたメディアは「テレビ」(74.2%)であり，どのメディアよりも利用される傾向にあった．しかし，テレビ全般の信頼度が低いため，市民はテレビニュース報道を重要な情報源として認識していない可能性が高い．その次に多かったのが「インターネットニュースサイト」(71.0%)であり，「家族との会話」(64.7%)であった．テレビとインターネットニュースの利用頻度の高さから，その信頼度の改善や質的・量的な検討を行うことでパンデミック下におけるリスクコミュニケーションをより効率的に実施することができることが示唆された．しかし，パーソナルメディアを介したコミュニケーションの二段階の流れが生じることで，伝言ゲーム的な情報伝達が行われるという懸念もある．それはデマや誤情報の温床となる可能性がある．

また，政府や専門機関などのウェブサイトにアクセスする傾向もやや少ない傾向にあった．「政府や地方自治体のウェブサイトや広報」は 40.4%の回答者が利用しており，「医療機関や大学，研究機関などの専門的なウェブサイト」は 24.4%の回答者が利用していた．

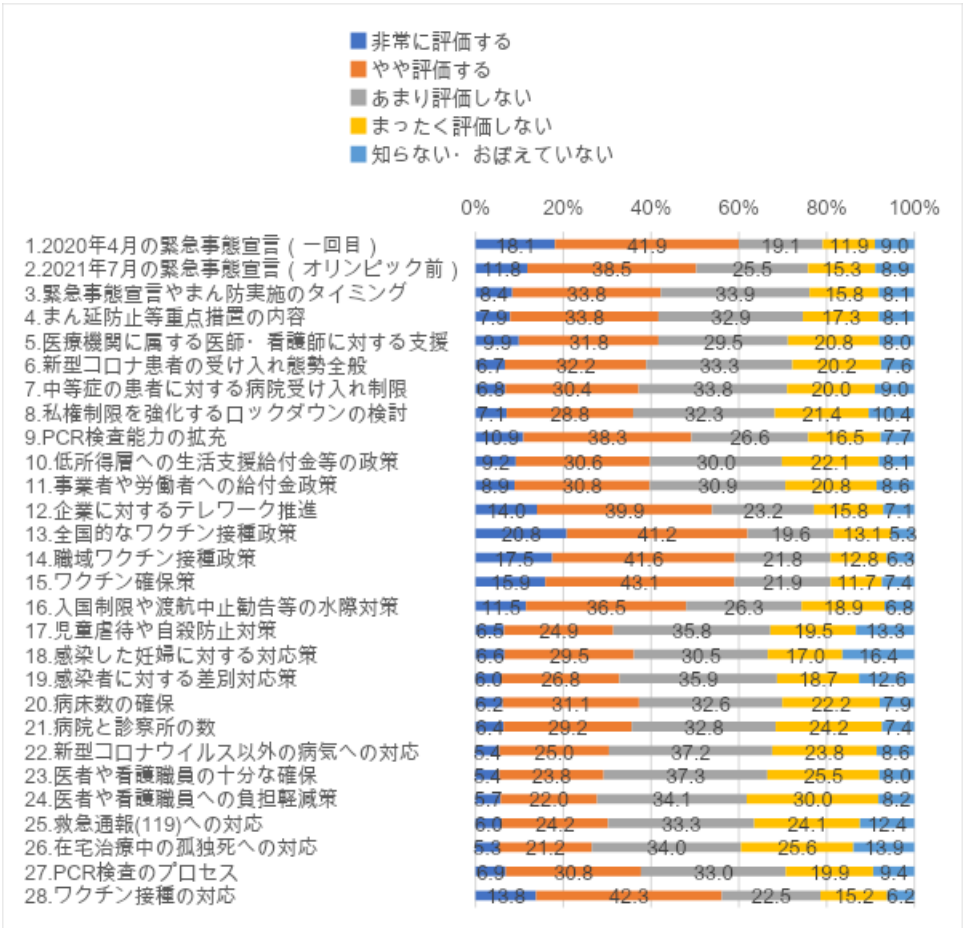


図３　政府による医療体制構築に関する政策への評価(%) N=1000

〔7　研究結果（つづき）〕

新型コロナウイルス対策への評価に関する結果であるが，図３のように最も評価されたのは，「全国的なワクチン接種策」であり，回答者の 62%が評価する傾向にあった．その次に評価されたのは，「2020 年 4 月の緊急事態宣言」であり，60%が評価していた．オリンピック前に発令された緊急事態宣言は 50.3%が評価しており，9.7 ポイント下がっていた．これは時間経過とともに緊急事態宣言に対する評価が下がることを意味しており，そこで推奨されている外出自粛などの各種要請が評価されず，遵守行動がとられなくなる可能性を示唆している．また，「まん延防止等重点措置の内容」に関しても評価する回答者が 41.7%であったため，5 割以上の回答者は評価しない傾向にあった．加えて，緊急事態宣言やまん延防止等重点措置の発令のタイミングに関しても，42.2%が評価する一方で，評価しないが 5 割弱存在した．第一回目の宣言以外，政府が発令した新型コロナウイルス関連の制限措置は評価されない傾向にあった．他方で「ロックダウンの検討」が全く評価されない傾向があることから，回答者の多くは私権制限を伴う政策の議論が反発される傾向があると捉えることができる．

次に，「職域ワクチン接種政策」は 59.1%の評価を得ており，それ以前に実施された「ワクチン確保策」は 59%が評価していた．「ワクチン接種の対応」は回答者の 56.1%が評価していた．評価傾向にあった上位 5 位の政策の内，4 つの政策が新型コロナウイルスのワクチンに関連する政策であった．このことから，日本政府による一連の新型コロナウイルスワクチン政策は一定の評価を得ていたことが明らかとなった．しかし，最大でも 6 割弱の評価にとどまるため，多くの政策に対する評価は国論を分断していたことがわかる．

2023 年 5 月に，新型コロナウイルスは感染症 5 類に変更され，社会における特別な危機対応の一連の政策は終了した．2020 年 1 月に日本国内で感染例が発生してから，3 年と 4 カ月後のことである．この間に，日本社会では様々な政策が実施され，人々の社会生活は大きな影響を受けた．そうした政策に対して，人々はどのように評価し，どのように対応したのか．本調査でその実態を明らかにした．

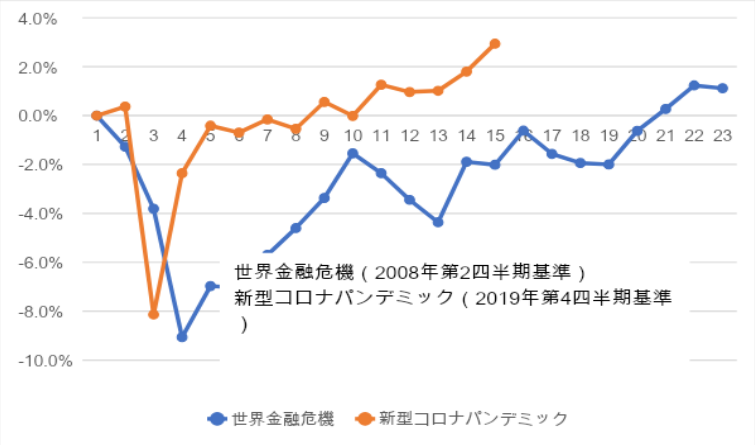
本調査結果のデータから，新型コロナウイルスに関する日本の市民のメディア利用の状況，感染予防行動の実施率，アクターへの信頼度，政策評価などの実態が明らかとなった．これは，新型コロナウイルスという感染症対策に必須となる，感染症リスクコミュニケーションのメカニズムの解明につながる．日本の市民の中で，新型コロナウイルスに関するメディア利用はインターネットや SNS よりもテレビや新聞などの従来のマスメディアが主流であったことが明らかになった．これまでの大震災などの危機的状況においても NHK を中心にテレビや新聞などの従来メディアが広く活用されたように，新感染症パンデミックにおいても同様の現象がみられた．また，感染予防行動に関して，手洗い・マスク・手指消毒などの感染予防策から三密回避，ソーシャルディスタンスなどの公衆衛生的予防策まで，日本の市民の間では幅広く実施率が高かったことが明らかとなった．このような市民の感染予防行動の徹底，協力が日本の感染者数・死者数を相対的に低く抑えられていることにつながっていると考えられる．日本の感染症リスクコミュニケーションは全体的に見て有効に機能したといえるだろう．

〔7　研究結果（つづき）〕

II　権赫旭（日本大学経済学部）:新型コロナウイルスの経済・教育への影響

1.　マクロ経済への影響

図表 1. 世界金融危機と新型コロナによるパンデミックの時の実質 GDP の推移

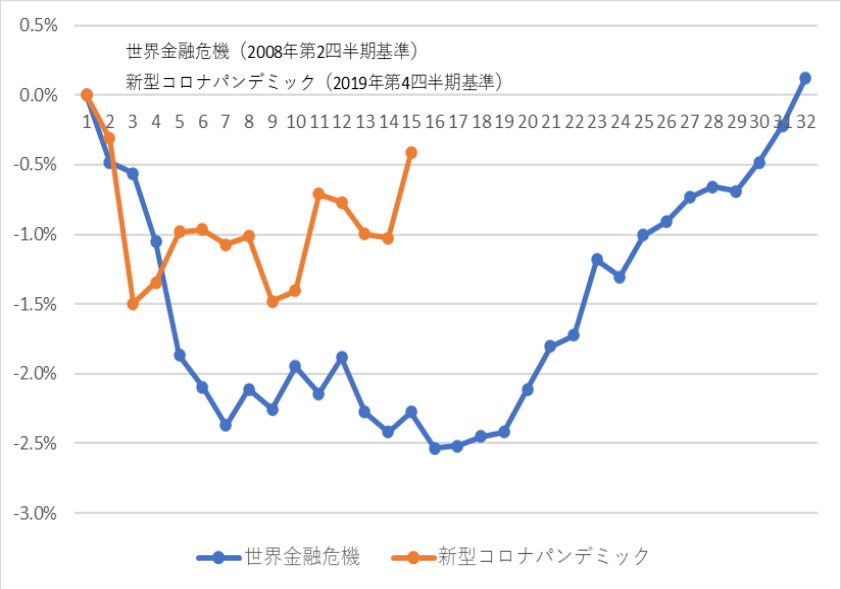


2020 年 3 月以降の新型コロナウイルス感染症の世界的流行により，世界経済だけではなく，日本経済に大きな打撃を与えた．

出所）荻島（2024）

図表 1 では世界金融危機と新型コロナによるパンデミックが起きた時点に戻るのにかかる期間を比べてものである．図表が示しているとおりに，世界金融危機から回復するのに相応の時間がかかったが，新型コロナによるパンデミックの影響は長引かず，2021 年第 4 四半期には以前の水準に戻ったことが確認できる．

図表 2. 世界金融危機と新型コロナによるパンデミックの時の就業者数の推移



出所）荻島（2024）

図表 2 は従業者数の推移を世界金融危機と新型コロナパンデミック時期と比較した結果である．就業者数においても，実質 GDP と同様に世界金融危機と比べて新型コロナパンデミック時期のほうの回復が早いことが確認できる．

〔7　研究結果（つづき）〕

新型コロナパンデミック時期に経済と雇用が早く回復した主要な要因として考えられることは国内需要が大きく下落している中で生産と雇用確保の主体である企業の倒産を最小限に抑えた支援政策であると考えられる．

2.　**産業への影響**

日本は，新型コロナ感染拡大を抑えるためのいくつかの非医療介入対策を講じてきた．2020 年 4 月には日本政府が外出自粛（自主的ロックダウン）要請を出した．これには在宅勤務要請，必要不可欠な事業以外の休業要請，多くの人が集まるコンサートやスポーツ試合の中止要請が含まれた．また，日本政府は海外からの渡航者の入国制限も果たした．このような非医療介入対策によって前節でみたように大きな GDP の減少と雇用喪失があった．外出自粛，移動制限などの非医療介入政策の影響が全産業に一様ではなく産業差があることは言うまでもない．人の集まりや移動を制限する非医療介入政策はサービス産業，特に宿泊業，飲食業，運輸業などに大きな負荷をかける一方で，テレワーク可能な金融業，教育などには負の影響が少なくなることが考えられる．

図表 3．産業別パンデミックの影響

パンデミックの時期にTFP上昇率が高い10産業	
武器製造業	0.1196
石炭製品	0.0726
社会保険・社会福祉	0.0555
水産食料品	0.0542
金融業	0.0480
無機化学基礎製品	0.0421
郵便業	0.0415
教育	**0.0405**
有機化学製品	0.0379
電子応用装置・電気計測器	0.0372
パンデミックの時期にTFP上昇率が低い10産業	
航空運輸業	−0.3326
鉄道業	−0.2269
宿泊業	−0.1129
その他運輸業・梱包	−0.1049
時計製造業	−0.0753
化学繊維	−0.0747
娯楽業	−0.0614
たばこ	−0.0600
飲食サービス業	−0.0599
道路運送業	−0.0444

出所）JIP データベースから筆者作成

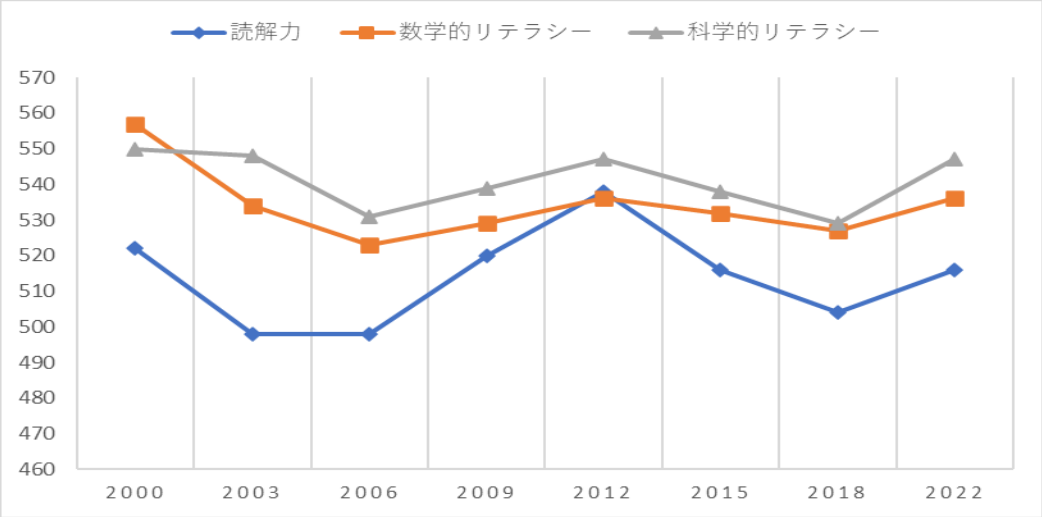
図表 3 は 2018 年から 2020 年までの経済成長の源泉である全要素生産性（TFP）の上昇率

〔7　研究結果（つづき）〕

の高かった産業と低かった産業を各々10 産業に分けて示したものである．予想通り，オンサイト性が強い運輸業，宿泊業，娯楽業，飲食サービス業の TFP 上昇率の落ち込みが大きかった一方で，テレワークである程度対応できたり，コミュニケーション強度が少ない産業である金融業，教育，水産食料品，石炭製品などの産業の TFP 上昇率は堅調なプラスであることがわかる．

3.　**教育成果への影響**

図表 4．国際学力調査（PISA）における日本成績（平均得点）の推移



図表 4 は国際学力調査における日本成績の推移を示している．新型コロナウイルスによるパンデミックの時期に OECD に加盟し調査に参加した 37 か国の平均得点は前回に比べて大幅に下落したが，日本の成績が上昇している．新型コロナの影響で教育産業の生産性が落ちなかった傾向と同様に生徒の成績も下落しなかったことを示唆する．

1．荻島駿・権赫旭・児玉直美「職業特性によるテレワークの可能性とコロナ以降の企業行動」慶應義塾大学出版会・『コロナ禍における個人と企業の変容：働き方・生活・格差と支援策』第 4 章，95 - 116.

2．荻島駿・権赫旭・児玉直美「コロナ禍でどのような企業が新技術導入を行ったか」慶應義塾大学出版会・『検証・コロナ期日本の働き方：意識・行動変化と雇用政策の課題』第 10 章，215 - 247.

III　　蜂巣　浩生（ 日本大学理工学部建築学科）

感染に強い建築と都市計画

【概要】本研究では新型コロナ感染症による被害と同等以上の事態の発生が将来懸念されることから，新興感染症・再興感染症の流行に備えた建築単体及び都市計画のそれぞれの視点から感染症の拡大に対抗するための方策について調査・検討を行った．

課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

1．建築単体での対策

建築は，それを利用する人々に快適かつ安全で衛生的な環境と健康的に過ごせる空間を提供するものでなければならない．しかし，新型コロナ感染症の流行に見られたように，ひとたび感染症が流行すると建築物が感染を拡大させる場所となってしまう場合がある．よって，これからの建築には病原体の侵入を完全に防ぐことができないまでも，病原体の拡散を抑え，感染リスクを軽減できる平面計画，設備計画，抗菌・抗ウイルス素材・建材の活用を必須とすべきであると考える．

建築種類別の特徴を踏まえて対策を検討する．対象とする建築種は，家庭内感染が問題になった住宅，集団での生活が中心でありクラスターの発生が多数報告された高齢者施設，公共交通機関を利用する人が多く滞在する時間も長いオフィスビル，感染者や一般患者の治療を行っている医療施設とした．

◆住宅：　住宅建築は元々家庭内感染を想定していないため最も対応が難しい．一般的な平面計画では病原体が容易に持ち込まれてしまうことは避けられない．外で付着した病原体を生活空間の奥にまで持ち込むことを極力避けるために，玄関付近に洗面所，手洗い場を設けることや，共用部手前に抗菌クローゼットを設置するなどが必要である．また，光触媒や漆喰などの抗ウイルス作用のある建築資材の応用も感染防御に有効な可能性があり、実験もしくは医療機関における実地検証が必要である。自宅療養の際の家庭内感染を防ぐために容易に設置可能な間仕切りや簡易陰圧テントの準備なども考慮しておかなくてはならない．



図　玄関に手洗いを設けた住宅の



図　感染対策に配慮した住宅メーカーの提案

◆高齢者施設：　抵抗力の落ちている高齢者が集団で食事やレクリエーションを行うことや，入居者と介護者・介助者との接触が密にならざるを得ないためにクラスター感染となりやすい点がある．また認知症の入居者の場合にはマスクの着用などの感染症対策を徹底させることが難しい上に徘徊を伴う場合もあるため，更に感染症対策は難しいものとなる．対策としては，エントランスと居住域を直接繋ぐのではなく，エントランスと居住域との間に空間を一つ設け，空調による室圧制御によって居住域内から施設外部へと空気の流れを

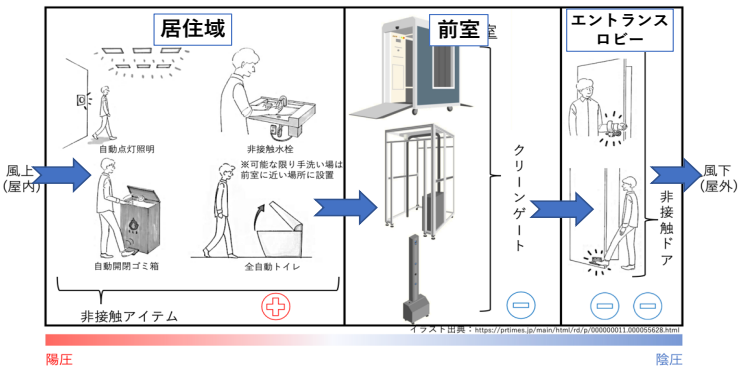


図　高齢者施設における空気の流れ

〔7　研究結果（つづき）〕

一方向にすることで，病原体の施設内への流入を防ぐことが可能になる．

◆オフィスビル：　通勤で 3 密が生じやすい公共交通機関を利用することで病原体付着の可能性の高い人が多数出入りし長時間同じ空間で活動する点が挙げられる．対策として，高齢者施設と同様にクリーンゲートを各階のオフィス入口前に設置することや床吹出し空調方式を採用して室空間の空気の流れを下から上に作り，天井面から吸込んで屋外へ排出することで，オフィス内での病原体の拡散を防ぐことが期待できる．



（スパテクノ株式会社）

図　クリーンゲートの例

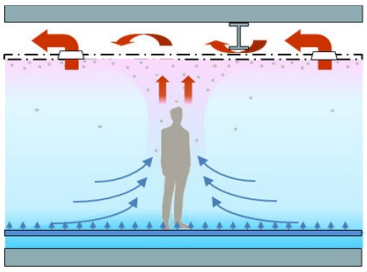


図　床吹出し空調方式

◆医療機関：　一般外来患者と感染者の動線を分ける必要があるが，開業医（無床診療所）の多くでスペースの確保が難しい．動線確保にはある程度の規模が必要となるが，今後建てられる規模の小さい診療所の建築計画には前もって想定しておくことが求められる．大規模病院では平時の動線を非常時には迅速に部分的・物理的に閉鎖し，一般患者と感染症患者を分離できるような平面計画・断面計画・建築設備を取り入れ，一般外来患者用ルートと感染者用ルートの 2 ルートを確保しておくことにより感染拡大のリスクを低減できる．院内の気圧コントロールが十分ではない一般病院や診療所では，簡易陰圧ブースなどを適宜導入することにより，院内感染を抑制しつつ感染者の診察・受入れを行うことができる．また感染症病床増設のために一般病床を感染症病床へ容易に転換できる空調制御システムや感染防止クリーンベッドなどの機器・機材の導入も考慮した病院施設の設計・計画が求められる．

２．都市計画的対策

新型コロナ感染症により医療崩壊寸前にまで至ったことは衝撃的であった．このような事態を回避するためには，各医療施設間での機能の分担・連携の推進し，地域全体で切れ目なく必要な医療を提供できる体制が必要になると考える．医療崩壊を起こすことなく，通常診療も感染治療も滞りなく行う体制を維持するためにも野戦病院の活用を検討すべきである．

２－１　二次保健医療圏の利用　野戦病院設置場所は，自然災害時の安全性や道路交通網・路線図，人口分布を考慮し，二次保険医療圏を基本とすることが妥当と考える．東京都を例に 23 区内と 23 区外，島しょ部について特定機能病院及び地域医療支援病院の位置を確認するとともに，野戦病院の候補地を検討した．野戦病院の設置は特定機能病院・地域医療支援病院の駐車場の利用，近隣大学の体育館やグラウンド，スタジアムの利用，ゴルフ場，大型公園等が適していると考えられるが，大規模な野戦病院は東京西部に配置することが適当である．ただし，野戦病院の



課題番号	22 独先 09

〔7　研究結果（つづき）〕

設置には災害時にも機能できるようにハザードマップとの照らし合わせが重要であり、同様の

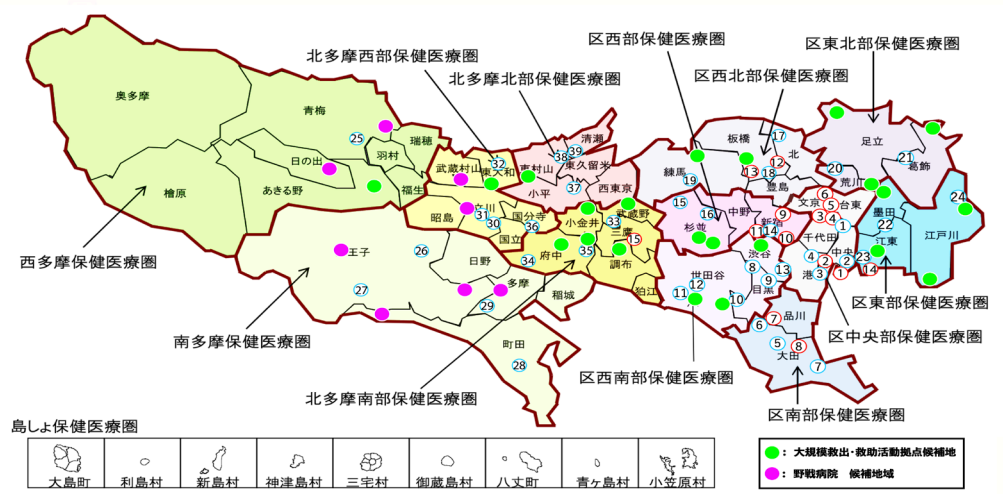


図　東京都の二次保健医療圏及び医療施設の配置と野戦病院・大規模救助活動拠点候補地

考え方を用いることで他の道府県においても都市部とその郊外や農村部・山間部など人口の粗密に応じて応用ができるものと考える．そこで，東京都と隣接し人口も東京都に次いで二番目に多い神奈川県と，可住地面積 100km² 当たりの一般病院数が 47 都道府県の中で最も少ない秋田県を対象同様の検討を行った．神奈川県は，人口の密集する横浜北部，横浜南部や相模原の西部に基幹となる医療施設が配置されていないことが分かる．この地域に野戦病院を設置することによって逼迫する医療を補える可能性がある．しかし，秋田県では少ない基幹医療施設と人口のバラツキによる極端な医療の偏在が確認できる．このような地域では医療施設同士の連携が難しいと考えられ，野戦病院の設置場所を慎重に検討する必要がある．

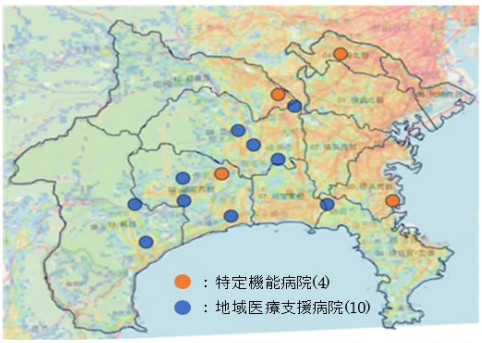


図　神奈川県の医療施設の配置と人口分布



図　秋田県の医療施設の配置と人口分布

２－２　コンパクトシティ政策への適用人口減少・高齢者の増加，市街地の拡散という現状を踏まえ，国土交通省はコンパクトシティを提唱している．都市の持続可能性と利便性を向上させることを目指しているものであるが，その中で医療・福祉等の生活サービスの維持・向上をコンパクトシティ化の効果の一つとして挙げている．富山市はコンパクトシティ化に成功している例として取り上げられことが多い自治体である．その富山市を含む富山県全体を基幹医療施設の立地状況と照らし合わせると，生活圏と医療施設が必ずしも近接している状況ではないこと

〔7　研究結果（つづき）〕

から，感染拡大への対応に苦慮する可能性がある．

国土交通省はそのコンパクトシティ構想の中で，医療・福祉等の生活サービスの維持・向上のためには一定の人口集積が不可欠だと説明している．現在のところ都市計画分野では様々な方面からコンパクトシティの評価や提言が行われているが，基幹病院を中心に据えた「まちづくり」を一つの方向性として推進することを提案する．

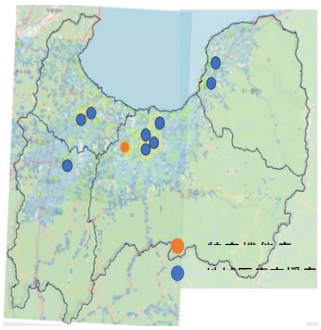


図　富山県の医療施設の配置

3．まとめ

建築は特定の分野を除き感染症への配慮・対策を欠いているのが一般的である．新型コロナ感染症による経験・知見を整理し，今後の計画・設計に生かしていく努力が求められる．また，その建築の集合体である都市の在り様についても，感染症に対抗していける施策を継続的に検討していく必要がある．

おわりに

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）もオミクロン株への置き換わりとワクチン接種の普及により，生命にかかわる重症者は減少傾向にある．しかしながら一方では梅毒の爆発的流行，麻疹と風疹の再流行，トリ型インフルエンザのヒトへの感染さらに抗菌薬耐性の広がりと新たな問題が起きてきている。2021 年の PNAS 論文では，1600 年から現在に至るまでパンデミックの発生頻度は 0.11 から 0.89%/ 年であり今回のような事態は半世紀に一度あるかないかだが、環境変化に伴う動物感染源からの疾病出現率の増加を考える今後数十年の間に年間発生リスクは最大 3 倍まで増加する可能性があるという。（Marani M, Katul GG, Pan WK, Parolari AJ. Intensity and frequency of extreme novel epidemics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2021 Aug 31;118(35):e2105482118.）従って 30 年以内に次のパンデミックが起きる可能性が高い。
我々は今回の教訓を生かして「治にあって乱を忘れず（易経）」今後いつ生じるかわからない次の感染症に備える必要がある．2 年間という短い期間ではあったが、日本大学より多額の研究費をいただき、複数学部の研究者によって多面的に感染制御の研究ができたことは望外の喜びであり、ご参加いただいた諸先生に心から御礼申し上げたい。本研究を通して形成できた学内学外の先生方のネットワークが今後も「感染症との闘い」に日本大学が全学的に取り組む基盤となることを切に願うものである。

（研究代表者　早川　智）