

地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

結核及びトリパノソーマ症の診断法と治療薬開発

(ザンビア)

平成 24 年度実施報告書

代表者：鈴木 定彦

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター・教授

<平成 20 年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

本プロジェクトのねらい

迅速で低コストの結核診断法および薬剤感受性試験法、迅速で低コストのトリパノソーマ症診断法を開発し、ザンビアにおいて普及させ、同国の結核およびトリパノソーマ症対策に資するとともに、カウンターパートの研究能力向上をも図る。また、有効な新規薬剤開発が必要不可欠と考えられているトリパノソーマ症の治療薬候補物質を合成して、有効なものを選定する。

概要

日本において、LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法ならびに結核の迅速薬剤感受性試験法開発し、ザンビアにおいて同国由来検体を用いて性能を評価する。また、トリパノソーマ症の治療薬候補物質を合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価により開発候補物質を選定する。

進捗状況

平成 23 年度までに日本において LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法を開発し、日本での感度および特異性の評価を終了した。ザンビアにおいては、ヒト由来検体を対象とした結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法に関する倫理承認を受けた。また、ザンビア保健省大学研究教育病院 (UTH) と共同研究に関する合意書を締結して研究体制を整えた。ザンビア人研究者に LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法を技術移転するとともに、臨床検体収集体制を確立した。平成 24 年度は、これを活用した結核迅速遺伝子診断法の評価を実施した。トリパノソーマ症診断においてはザンビア人研究者に迅速遺伝子診断法を技術移転するとともに、臨床検体を用いた評価を行い、ザンビア大学 (UNZA) 内のトリパノソーマ研究室で確実に診断できる体制を整えた。またトリパノソーマ症発生情報のある地域での現地調査を実施し、ザンビア国内での感染リスクの高い地域を明らかにした。また、トリパノソーマ症の治療薬候補物質を 230 種類以上合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価を継続した。

成果

平成 23 年度までの日本における評価試験では LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症遺伝子診断法の感度、特異性はともに高く、臨床検体に応用可能であると考えられた。平成 24 年度は臨床検体の収集を精力的に進め、結核診断では延べ 512 人から 1024 の喀痰検体ならびに 496 の尿検体を収集した。このうち喀痰を対象とした結核遺伝子診断法評価試験を実施した。その結果、塗抹検査と遺伝子診断の結果の一致度が高く、塗抹陽性検体の検査に有用であることが示唆された。一方、トリパノソーマ症診断用 LAMP は既にザンビア人研究者に技術を移転し、臨床検体を用いた評価を行い、UNZA 内のトリパノソーマ研究室で確実に診断できる体制を整えた。またトリパノソーマ症発生情報のある地域での現地調査を実施し、ザンビア国内の感染リスクの高い地域を明らかにした。一方、大学研究教育病院に入院していたトリパノソーマ症疑いの患者の血液ならびに脳脊髄液の LAMP 検査を実施し、確定診断と治療方針決定に重要な病相判定を行った。さらに治療後のフォローアップ検査も同法で実施し、完治したことを確認した。本年度の結核ならびにトリパノソーマ症遺伝子診断法開発における最も重要な進捗は乾燥済みキットの完成にある。平成 25 年度は乾燥済みキットの評価試験を推進する。トリパノソーマ症治療薬候補物質として、新規化合物の合成を継続し、230 種類以上を人工合成、トリパノソーマ培養系を用いて活性を持つリード化合物を選定し、原虫感染マウスに対する治療試験を実施した。また、ヒト培養細胞を用いた細胞毒性試験を実施し、薬剤としての安全性を検討した。更に、同程度の分子量を有する化合物ライブラリーを用い、化合物の造形を規定する要因 (骨格や立体化学) を指標とした構造活性相関研究を実施し、抗トリパノソーマ活性に重要なファルマコフォアの三次元構造に関する新知見を得た。

今後の見通し

結核遺伝子診断法の評価試験は本年8月末に設置したBSL-3 実験施設を活用して研究を加速しており、これを継続する事により、ザンビアに実装する事ができるものと考えられる。トリパノソーマ症診断法の評価試験はも同様に順調に進捗していることから、今後、乾燥済みキットのザンビアにおける評価の後、実装可能と考えられる。候補物質合成および抗トリパノソーマ活性スクリーニングは順調に進捗しているが、有望な候補物質は見つかっていない。今後も合成とスクリーニングのプロセスを継続してゆく必要がある。

2. 研究グループ別の実施内容

2.1. 鈴木グループ (結核迅速診断法開発)

①研究のねらい

多剤耐性結核および超多剤耐性結核の拡大が危惧されている。結核の蔓延を防止するためには、積極的な診断とその結果を踏まえた適切な治療が重要であるが、現状の診断技術ではコストと時間がかかり、適切な治療を早期に開始することは難しい。本研究では、迅速で低コストの結核診断法および薬剤感受性試験法を開発し、これをザンビアにおいて評価し、普及させることにより同国の結核対策に資するとともに、カウンターパートの研究能力向上も図ることを狙いとしている。本研究により開発・評価される方法はザンビアのみならず、他の発展途上国における結核対策にも貢献するものと考えられる。また、同法を用いて人と動物間の結核の伝播の実態を明らかにすることは、人獣共通感染症としての結核の根本的な対策としても重要である。

②研究実施方法

- 1) 安全に結核菌培養試験、薬剤感受性試験、DNA抽出が実施できる様に施設を整備する。
- 2) ヒト臨床試料の収集・保管管理システムを構築し、結核迅速診断法および薬剤感受性試験法の臨床検体を用いた評価体制をする。
- 3) ザンビアにおいて結核菌株を収集し、遺伝子型および薬剤耐性に関する遺伝子変異を調査する。
- 4) 臨床検体を用いて結核遺伝子診断法および薬剤感受性遺伝子試験法の性能を評価する。
- 5) 乾燥済 LAMP キットを完成させる。
- 5) 遺伝子型、薬剤耐性に関する遺伝子変異に関する調査と性能評価結果に応じて技術の簡便化、高精度化を図る。
- 6) 結核迅速診断法および薬剤感受性遺伝子試験法をザンビアで実施できるよう、技術移転する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

- 1) 日本において結核迅速診断法を開発し、その性能評価を予定通り終了した。
- 2) 結核迅速薬剤感受性試験法を開発するために薬剤耐性に関する遺伝子変異に関する情報を網羅的に収集した。
- 3) ザンビアにおいてヒト由来検体を対象とした研究に関する倫理承認を受けた。
- 4) ザンビア保健省大学研究病院と共同研究に関する合意書を締結し、研究体制を整えた。
- 5) 安全に結核菌培養試験、薬剤感受性試験、DNA抽出を実施できる施設の整備を提案しザンビア保健省ならびに JICA から承認を受け、コンテナ型 BSL-3 実験室を設置した。
- 6) 結核遺伝子診断法をザンビアにおいて技術移転した。
- 7) 結核遺伝子診断法のザンビアにおける評価試験を終了した。
 - ・ 安全に研究を遂行できる施設の整備が遅れているため、それ無しでも可能な結核迅速診断法の評価のみが進捗しているが、平成 24 年 8 月末に BSL-3 施設の設置が完了した事により、試験法の評価が可能となった、今後この研究を加速すれば最終目標の達成は可能と考えられる。
- 8) 結核診断用乾燥済 LAMP キットを完成させた。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

カウンターパートに結核の遺伝子診断法(LAMP, PCR)に関して、カウンターパートに対するレクチャー並びにトレーニングを実施し、技術および知識の普及を図った。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

開発中の結核迅速診断法を家畜へ応用し、家畜結核のサーベイランスへの応用が期待される結果を得た。

2.2. 梶野グループ(トリパノソーマ症迅速診断法開発)

①研究のねらい

トリパノソーマ症は重症化すると治療が極めて困難になるため、早期の鑑別診断が重要となっている。また、薬剤耐性トリパノソーマ原虫の発生の可能性も排除できず、新しい抗トリパノソーマ薬の開発は急務といえる。そのため、1) トリパノソーマ症の高感度・迅速診断法としてLAMP法を基盤とした新規診断法をザンビア共和国において実装可能な方法として確立する。さらに、2) ザンビア共和国におけるトリパノソーマ症サーベイランスネットワークを構築して疫学情報を収集し、得られた情報をトリパノソーマ症対策に役立てる。

②研究実施方法

- 1) ヒト臨床試料、動物血液試料、媒介節足動物(ツェツェバエ)試料から DNA を抽出し、LAMP, PCR での原虫検出を行う。ザンビアで実施できるよう、技術移転を行うのに並行し、必要に応じて技術の簡便化、

高精度化を図る。

- 2) 共同研究者から提供される候補化合物の抗トリパノソーマ活性を試験管内で測定し、動物試験に用いる化合物の候補を絞る。
- 3) 患者発生の情報をザンビア政府等から得て、現地調査を実施する。発生地でのヒト、飼育家畜、ツェツェバエでの原虫保有状況を調査する。
- 4) 乾燥済 LAMP キットを完成させる。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

- 1) 項目 2) で収集された試料からの DNA 抽出、PCR、LAMP をカウンターパートと共に実施し、技術移転により UNZA 内のトリパノソーマ研究室では確実に診断できる体制を整えた。また動物接種により原虫を分離し液体窒素内で保管する体制を整備し、リファレンスとなる原虫バンクを構築しつつある。
- 2) カウンターパートが中心になって実施した発生地域(東部州 Mwanza)での現地調査に同行し、試料採取、検体処理等に協力した。当該調査では、現地クリニックに簡易診断ラボを設置し、採血後、マラリアの検査(市販キット)、血液からの DNA 精製と LAMP を実施できる体制を整えた上で、合計 111 体の提供を受けた。うち乳児・小児で診断に十分な血液量を得られなかった検体を除く 74 検体についてヘマトクリット遠心法による原虫検出と LAMP 診断を行った。しかし、極度の高温下(連日 42°C)における試薬の輸送や操作が影響したためか非特異反応が出て確実な検査の実施には至らなかった。このため、発生の最前線となる地方クリニックでの LAMP 実施には、試薬を安定供給できる体制の確立や手法のさらなる簡便化、試薬の安定化(室温保存)や温度耐性の検討を図る必要があると考えられた。また、トリパノソーマ症との鑑別のため、市販の血清診断法によるマラリア診断(イムノクロマト法)も行った。その結果、成人 26、乳幼児 53 の被験者が Plasmodium 陽性を示し、検査陽性患者には治療薬を投与できるように手配を行った。また、Petauke 地域においてツェツェバエの捕獲を行い、採取した唾液腺をマウスに接種することにより、この地域におけるヒト感染性タイプトリパノソーマ原虫の株分離を行った。
- 3) 技術開発は順調に進捗している。
- 4) トリパノソーマ症診断用乾燥済 LAMP キットを完成させた。

④カウンターパートへの技術移転の状況

トリパノソーマ原虫の遺伝子診断法(LAMP、PCR)、原虫の培養と保管、マウスでの感染実験に関して、カウンターパートに対するトレーニング、レクチャー等を実施し、ザンビア側で実施可能な体制を整備した。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

2012 年 1 月に大学研究教育病院に入院していたトリパノソーマ症疑いの患者の血液からトリパノソーマ DNA を検出することにより、確定診断を行った。その際、血液と脳脊髄液を検体として LAMP を実施し、後者では原虫 DNA が検出されなかったことから、原虫は中枢神経系には移行していないことが確認され、治療方針の決定に重要な情報を担当医に提供しえた。治療後の患者検体(血液・脳脊髄液)の検査も実施し、原虫が体内から消滅していることを確認し、再発の危険性がないと判断、担当医に伝えた。これらの一連の検査協力により、当該患者は有効かつ副作用のない治療を受けることができ、無事退院できた。今回の事例はローワザンベジ地域での感染例であったが、当プロジェクトチームは同地域の行政・医療機関を数回にわたり訪問し、トリパノソーマ原虫感染症について啓発活動を実施してきた。その結果、現地クリニックから迅速に大学研究教育病院に患者が迅速に搬送され、LAMP による迅速診断と予後判定につながる事例となった。これまでの調査から人感染性を有するトリパノソーマの分布域が明らかになりつつあり、今後の予防対策を立てる上で重要な情報が蓄積されてきている。

2.3. 大栗グループ(トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング)

①研究のねらい

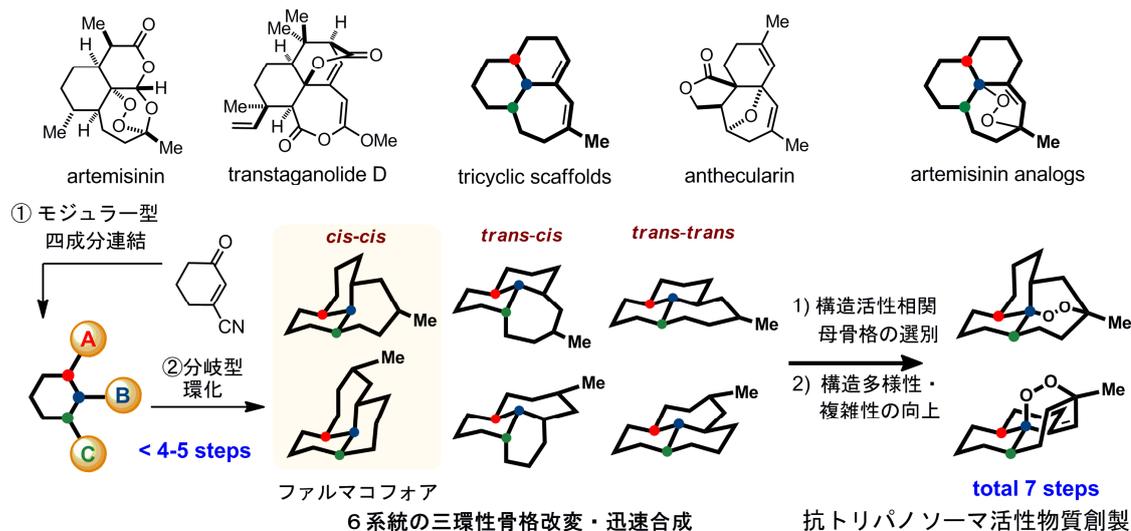
トリパノソーマ原虫は、感染した動物の体内で頻繁に抗原変異を繰り返すため、ワクチン療法の適用が難しい。現在実施されているトリパノソーマ薬投与による治療法についても、重篤な副作用や薬剤耐性の出現という問題が指摘されている。治療を受けずに放置すると死に至る感染症であるにもかかわらず、地球上で最も貧しい地域で蔓延するので、罹患者が切望する治療薬は常に供給不足の状況にある。多くの人々をトリパノソーマの脅威から救い出すため、安全、安価で有効な新しい治療薬の開発が強く望まれている。本プロジェクトでは、既存の抗トリパノソーマ薬とは構造特性が異なる薬剤候補分子群を簡便かつ系統的に合成し、新規治療薬候補物質のスクリーニングを実施する。

②研究実施方法

- 1) 骨格改変合成 - 1 : 抗トリパノソーマ活性物質アンセキュラリン、抗マラリア剤アルテミシニン、

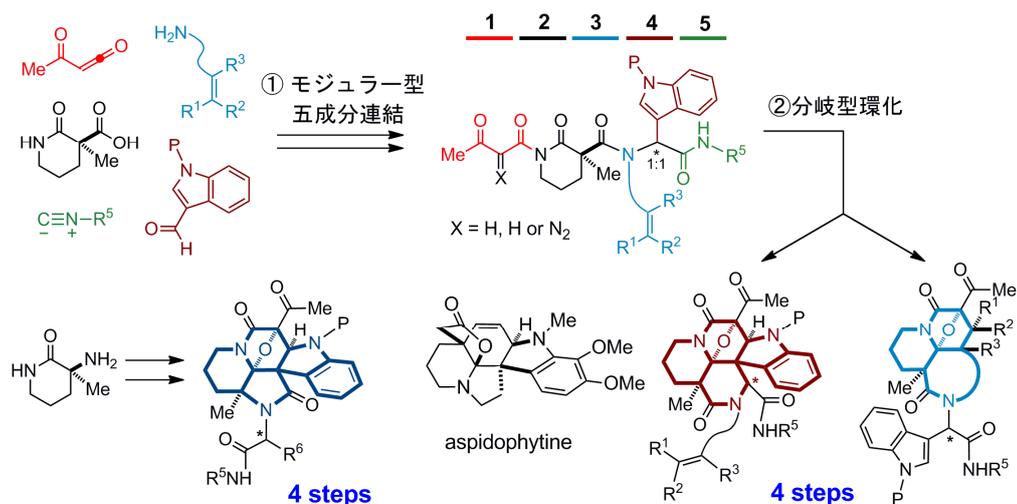
Ca^{2+} -ATPase を阻害するトランスタガノライド等の天然有機化合物の構造と機能の相関を踏まえて、三環性骨格に共役ジエンとメチル基を導入した構造モチーフを設計した。①シクロヘキセンの3位にニトリル基を導入した化合物に三種類の構築ブロックを順次導入しつつ、縮環部に相当する三連続立体化学を改変する合成プロセスを開発する。②環化様式を制御可能な分岐型の合成プロセスで、六系統の三環性骨格を構築する。得られた三環性骨格ライブラリーを活用した *In Vitro* 抗トリパノソーマ活性試験結果に基づいて、活性発現に有望な母骨格の優先順位を決定しながら、ファルマコフォアを把握する。選別した母骨格に更なる官能基変換を施すことで、抗トリパノソーマ活性がより向上した候補化合物を合理的に探索する合成プロセス(<5-7工程)を確立する。

骨格改変合成-1: *Org. Lett.* 2009. *J. Am. Chem. Soc.* 2011.



- 2) 骨格改変合成-2: 顕著な生理活性を発現するインドールアルカロイドに共通する構造特性として、インドール環とピペリジン環を有し、かつ、両者が様々な様式で連結した縮環骨格を持つことに着目した。本研究では、この構造特性を踏まえて天然物類似低分子群を設計し、多環性骨格の多様性指向型合成を検討した。さらに、分岐型前駆体の環化モードを改変する戦略により、四環性あるいは六環性骨格の選択的構築を実現し、低分子ライブラリーの構造多様性を創出する新しいアプローチを検討する。

骨格改変合成-2: *Org. Lett.* 2009. *Beilstein J. Org. Chem.* 2012.



- 3) 上記 1), 2) の方法を駆使して、抗トリパノソーマ活性探索に有効な化合物ライブラリーを構築する。生体高分子へ特異的に相互作用しうる構造特性を付与した化合物群を創製し、より強力な抗トリパノソーマ活性を発現し、かつ、副作用を大幅に低減した候補化合物の創製を目指す。

- 4) 候補化合物の抗トリパノソーマ活性とヒト培養細胞での細胞毒性を試験管内で評価し、動物試験に用いる化合物の候補を絞る。①ヒト培養細胞系を活用した毒性試験と②IC₅₀ 値を比較した定量的な構造活性相関研究に基づいて候補物質の構造を最適化し、抗トリパノソーマ治療薬の開発に直結するリード化合物を合理的に創製する。
- 5) マウスを用いて上記4)で絞り込んだ候補化合物の有効性を評価する。さらに、感畜を用いて候補化合物の有効性を評価する。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

- 1) 骨格改変合成-1:骨格や縮環部立体化学を改変した三環性骨格群(六種類)を迅速(4-6工程)に構築し、*cis-cis* 縮環した三環性ジェン(二種)に顕著な抗トリパノソーマ活性を見出した(北里大学乙黒グループとの共同研究)。選別した母骨格に対して、ジェンの異性化と一重項酸素酸化によりアルテミシニンアナログ群を合成した。エンドペルオキシド導入の位置と立体化学のバリエーションにより、低分子ライブラリーの三次元的な構造多様性を更に増大させるとともに、アルテミシニンや既存の治療薬(スラミン・エフォルニチン)よりも強力な抗トリパノソーマ活性(*in vitro*)を発現するリード化合物の創製に成功した。分子の造形を規定する構造要素を系統的に改変した天然物類似多環性分子群を活用することで、リード化合物探索と同時に構造活性相関研究を実施し、ファルマコフォアの三次元構造を把握できることを実証した。
 - 2) 骨格改変合成-2:ピペリジン型 Scaffold にインドールやジアゾエステルを連結し、Rh 触媒による連続環化で多環性骨格を一挙に構築すべく、インドール環と競合する位置にオレフィンを導入した分岐型環化前駆体を種々合成した。まず、インドール側で環状付加を進行させ、アスピドファイチンに類似した六環性骨格を僅か四工程で構築することに成功した。一方、オレフィン側で環化させることで、構造特性の異なる四環性骨格を合成した。これは、Ca²⁺-ATPase 阻害剤トランスタガノリドDの骨格に良く類似しており、高酸化型セスキテルペン天然物群のアナログとなりうる。生合成の基本戦略(①モジュラー型多成分連結、②分岐型環化による骨格多様性創出)に立脚し、縮環分子の構造を多様化する短工程合成プロセス“骨格改変合成”を開発した。
 - 3) 上記により、230 種類以上の天然物類似化合物群を北海道大学創成機構流動部門ならびに理学研究院化学部門で合成した。
 - 4) 細胞レベルでの抗トリパノソーマ活性を評価する簡便な一次スクリーニング系を構築した。構造新規性を有する天然物類似化合物群(>250種)について、一次スクリーニングを実施し、既存の抗トリパノソーマ治療薬(スラミン・エフォルニチン)と同等かそれ以上の *In Vitro* 抗トリパノソーマ活性を発現する候補化合物(13 種)を創製できた。新規な構造を持つ候補化合物の抗原虫活性を *T. brucei* 3 亜種(*brucei*, *rhodesiense*, *gambiense*)ならびに *T. evansi*を用いて検査を検討している。上記の新規化合物群に対して、抗トリパノソーマ活性発現に重要な化合物の構造要因について重要な知見を得ることができた。
 - 5) 4)で記載したスクリーニングの結果、*in vitro* で効果の高かった 6 種の化合物を用いて、*T. brucei rhodesiense* 感染マウスでの治療試験を実施したが、既存薬を上回る効果は認められなかった。
- 以上のように候補物質合成および抗トリパノソーマ活性スクリーニング法の開発は順調に進捗している。今後更に多くの候補物質の合成と抗トリパノソーマ活性のスクリーニングの継続が必要である。

④カウンターパートへの技術移転の状況

カウンターパートへトリパノソーマ原虫の動物での増殖試験技術を移転した。また、ザンビア大学の研究者を大栗グループに一ヶ月程度短期滞在してもらい、抗トリパノソーマ薬ペンタミジンの類似化合物を実際に合成する実験を実施し、化学合成関連技術移転に向けた基盤の整備に取り組んだ。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

医薬品の構成元素として含有率の高い窒素原子を天然物類似の5/7骨格へワンポットで集積化する新規変換法の開発し、速報で報告した(Chem. Comm. 2010)。この知見に基づきながら、トリパノソーマ症治療薬ペンタミジンの構造をより複雑化・機能化した化合物ライブラリーの迅速合成法(<6工程)の開発にごく最近成功した(投稿準備中)。ペンタミジンは腎臓や肝臓での毒性が高いので、副作用を可能な限り低減し、より顕著な抗トリパノソーマ活性を発現する化合物を創製すべく鋭意検討中である。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 16 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 26 件)
- ③ 論文詳細情報
 1. Mizoguchi H, Oguri H, Tsuge K, Oikawa H. Divergent and Expeditious Access to Fused Skeletons Inspired by Indole Alkaloids and Transtaganolides. *Org. Lett.* 2009, *11*, 3016-3019.
 2. Ishigaki Y, Mahendar V, Oguri H, Oikawa H. (2010) An anti-tetraamination of a 1,3-diene unit via cascade annulations of the azulene scaffold with dicarbonyl azo-compounds. *Chem. Commun.* 46, 3304-3305.
 3. Fukasawa T, Oda N, Wada Y, Tamaru A, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y. (2010) A novel method for the purification of DNA by capturing nucleic acid and magnesium complexes on non-woven fabric filters under alkaline conditions for the gene diagnosis of tuberculosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 246-250.
 4. Nakajima C, Rahim Z, Fukushima Y, Sugawara I, van der Zanden AGM, Tamaru A, Suzuki Y. (2010) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Bangladesh by a Species Distinguishable Multiplex PCR. *BMC Infect. Dis.* 10:118.
 5. Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, Rahim Z, Kim YU, Oguri H, Suzuki Y. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, *55*, 3661-3667.
 6. Oguri H, Hiruma T, Yamagishi Y, Oikawa H, Ishiyama A, Otaguro K, Yamada H, Omura S. Generation of anti-trypanosomal agents through concise synthesis and structural diversification of sesquiterpene analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, *133*, 7096-7105.
 7. Hang'ombe M B, Nakajima C, Ishii A, Fukushima Y, Munyeme M, Matandiko W, Mweene A S, Suzuki Y. (2011) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cattle and Lechwe (*Kobus leche kafuensis*) at the slaughter house. *Vet. Sci. Dev.* 1:e5
 8. Wang J, Zhang C-L, Zhang L-Z, Ji B-Y, Liu Y, Shao Y-Z, Jiang S-L, Suzuki Y, Nakajima C, Fan C-L, Ma Y-P, Tian G-W, Hattori T, Ling H. (2011) Genotypes and characteristics of clustering and drug-susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Heilongjiang Province, China. *J. Clin. Microbiol.* 49:1354-62
 9. Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. (2012) Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(2):697-702.
 10. Kim H, Nakajima C, Kim Y-U, Yokoyama K, Suzuki Y. (2012) Influence of lineage specific amino acid dimorphism in GyrA on the fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Jpn J Infect Dis* 65(1):72-74
 11. Mizoguchi H, Oikawa H, Oguri H. Hg(OTf)₂-Catalyzed Direct Vinylation of Tryptamines and Versatile Applications for Tandem Reactions. *Org. Biomol. Chem.* 2012, 4236-4242.
 12. Oguri H, Mizoguchi H, Oikawa H, Ishiyama A, Iwatsuki M, Otaguro K, Omura S. Parallel and four-step synthesis of natural product-inspired scaffolds through modular assembly and divergent cyclization. *Beilstein J. Org. Chem.* 2012, *8*, 930-940
 13. Siddiqi UR, Leano PSA, Chagan HY, Shiratori B, Naitoh H, Ashino Y, Suzuki Y, Hattori T, Telan E. (2012) Frequent detection of anti-tubercular-glycolipid IgG and IgA antibodies in the healthcare workers with latent tuberculosis infection in the Philippines. *Clin. Develop. Immunol.* 2012: 610707
 14. Siddiqi UR, Shiratori B, Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Usuzawa M, Nakajima C, Suzuki Y, Saitoh H, Hattori T. (2012) Distinct Clinical Features in Nontuberculous Mycobacterial Disease With or Without Latent Tuberculosis Infection. *Tohoku J Exp Med.* 226 (4):313-319

15. Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. (2012) Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: Role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(5):435-439.
16. Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. (2012) Genetic diversity of *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect. Genet. Evolu.* 12(4):846-52
17. Poudel A, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Pandey BD, Maharjan B, Suzuki Y. (2012) Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Nepal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(6):2831-2836
18. Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, Kawahara R, Hu Z, Suzuki Y. (2012) A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting *hspX* for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Jpn J Infect Dis* 65(3):247-251
19. Rudeeaneksin J, Bunchoo S, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Chamnangrom S, Kamolwat A, Thanasripakdeekul P, Taniguchi T, Nakajima C, Suzuki Y, Phetsuksiri B. (2012) Simple and rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC MGIT960 cultures by in-house loop mediated isothermal amplification. *Jpn J Infect Dis* 65(4):306-11
20. RahimZ, Momi SB, Saha SK, Zaman K, Uddin KN, Ashraf Jamil SNA, Nahar N, Azad Khan AK, Cooreman EAWD, Ahmed M, van der Zanden AGM, Nakajima C, Suzuki Y, Endtz HP. (2012) Pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(8):1132-3
21. Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Kawahara R, Maekura R, OzekiY, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. The Dominant Incidence of One Strain of Peculiar Genotype to Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Osaka Prefecture, Japan. *PLoS One* 7(8): e42505
22. Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, Zaman K, Endtz HP, van der Zanden AGM, Suzuki Y. Molecular Mechanism of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *M. tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis* 92 (6): 529-534
23. Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Impact of amino acid substitutions in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. *PLoS Neglect Trop Dis* 6 (10): e1838.
24. Shiratori B, Zhang J, Usami O, Chagan-Yasutan H, Suzuki Y, Nakajima C, Uede T, Hattori T. (2012) Quinolone-induced up-regulation of osteopontin gene promoter activity in human lung epithelial cell line A549. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(6):2868-2872.
25. Hang'ombe BM, Munyeme M, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Matandiko M, Ishii A, Mweene AS, Suzuki Y. (2012) *Mycobacterium bovis* infection at the interface between domestic and wild animals in Zambia. *BMC Veterinary Research* 14 (8): 221.
26. Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y. (2013) Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. *Tuberculosis* 93(1):84-88.

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳 (国内 0 件、海外 0 件、特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数 (国内 0 件、海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 鈴木グループ(結核迅速診断法開発)

① 研究者グループリーダー:鈴木定彦(北海道大学・教授)

② 研究項目

- ・ 検体の収集
- ・ 遺伝子検査法の開発
- ・ 遺伝子検査法のザンビアにおける評価
- ・ 迅速薬剤感受性試験法の開発
- ・ 迅速薬剤感受性試験法のザンビアにおける評価
- ・ 遺伝子検査法と迅速薬剤感受性試験法の実装
- ・ 検体ならびに菌株バンクの構築
- ・ 乾燥済み LAMP キットの創出

(2) 梶野グループ(トリパノソーマ症迅速診断法開発)

① 研究者グループリーダー:梶野喜一(北海道大学・准教授)

② 研究項目

- ・ 検体の収集
- ・ 遺伝子検査法の開発
- ・ 遺伝子検査法のザンビアにおける評価
- ・ 遺伝子検査法の実装
- ・ 検体ならびにトリパノソーマ株バンクの構築
- ・ 乾燥済み LAMP キットの創出

(3) 大栗グループ(トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング)

① 研究者グループリーダー:大栗博毅(北海道大学・准教授)

② 研究項目

- ・ 治療薬候補物質のデザイン
- ・ ケミカルライブラリーの構築
- ・ トリパノソーマ培養系を基盤とした薬効評価系の構築
- ・ トリパノソーマ培養系を用いた薬効評価
- ・ マウスモデルを用いた薬効評価
- ・ 候補物質大量合成系の確立

以上