

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)

ガーナ由来薬用植物による抗ウイルス及び抗寄生虫活性候補物質の研究

(ガーナ共和国)

平成22年度実施報告書

代表者：山岡 昇司

東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・教授

<平成21年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

ガーナでは先進医療の理解と普及がじゅうぶんでなく HIV、マalaria等の蔓延が深刻化し、治療が立ち遅れている。本プロジェクトは、ウイルス複製、寄生虫増殖を制御できる有用な植物由来抽出物を見出し、その作用機序を解明してガーナの実情を踏まえた感染症治療に有効と考えられる治療法開発に貢献すること、これらをとおしてガーナおよび日本における科学技術の向上と今後の研究を担う人材の育成に寄与することを目標とする。平成21年度は、(1)植物抽出物の抗 HIV 活性評価系を構築、(2)HIV 潜伏感染ヒト T 細胞株をあらたに樹立し、phorbol ester である PMA でプロウイルス発現が誘導されることを確認、(3)アフリカトリパノソーマ原虫の実験室内維持を開始し、herbal product による抗原虫活性をアッセイする系を確立した。平成22年度には、(1)HIV、トリパノソーマに対し抑制活性があることがわかっている物質等を用いて評価系の改良と検証を行った、(2)樹立した複数のレポーター細胞を反応性、結果の安定性、感度などの面から比較検討し、スクリーニングに最も適する細胞を選んだ、(3)採集した植物からの抽出法を開始し、(4)ハーブ抽出物のトリパノソーマに関する試行的バイオアッセイを開始した。これまでの成果として、複数の植物粗抽出物が潜伏感染ウイルスを強力に活性化しうること、抗トリパノソーマ活性を示す植物抽出物候補を見出している。22年度末には導入予定の設備機器がそろい、毒性試験を開始できる見通しである。平成23年度以降、リストアップした植物からの粗抽出物の毒性試験および一次バイオアッセイを行い、期待する効果が得られたサンプルについては分取とバイオアッセイを繰り返すことにより有効成分を解析し、作用機序の解明を行う。

2. 研究グループ別の実施内容

A. 東京医科歯科大学グループ

(1)研究題目:ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目:抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容:ハーブ抽出物の抗 HIV 活性をスクリーニングするためのアッセイ系開発と改良

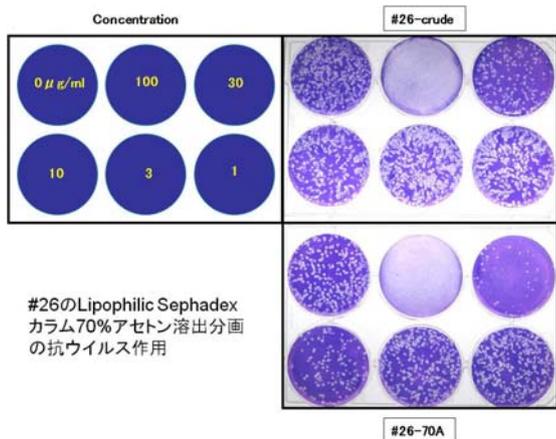
① 研究のねらい

抗 HIV 活性を有するハーブ抽出物をスクリーニングするためには、細胞培養系を利用し試料の毒性と抗 HIV 効果を判別でき、定量化が可能で再現性が高い評価系を開発する必要がある。そのために昨年度にヒト T 細胞株で恒常的に発現しうるレポーター遺伝子発現ユニットを作製し、これをもとに細胞ゲノムに安定に組み込むためのレンチウイルスベクターを構築、Jurkat ほかのヒト T 細胞株にこのベクターを発現するレンチウイルスを感染させ、安定にレポーター遺伝子を発現する細胞株を樹立する。今年度の目標として、この Jurkat 安定細胞株が長期間の培養後も安定にレポーター遺伝子を発現しスクリーニングに使用できるかどうかの検証と、他の4種類のヒト T 細胞株にレポーター遺伝子を導入し安定細胞株を樹立することをめざした。

② 研究実施方法

ヒト T 細胞株への感染

本研究で構築した新規レンチウイルスレポーターベクター pCERp を用いてレンチウイルスを作製し、約 2.0×10^6 個のヒト T 細胞株、CEM、H9、Molt4、SupT1 細胞株に感染させた。CEM、H9 にはレンチウイルスの感染性が低く、EF-1 α promoter で発現誘導されているにもかかわらずじゅうぶんな renilla luciferase 活性が得られなかった。そこで、レンチウイルスレポーターベクター pCERp を感染させた Molt4、SupT1 細胞株を陽性コントロールとしての逆転写阻害剤 AZT で処理し、NL4-3luc (firefly)ウイルスを感染させて、dual luciferase assay



を行った。

アクラ市内薬草市場、CSRPM から購入した伝統医薬中の抗ウイルス活性の解析

5月ガーナ渡航時にアクラ市内薬草マーケットを訪問し、乾燥植物材料を現地名で購入した。さらに CSRPM で販売中の飲用製剤を購入した。

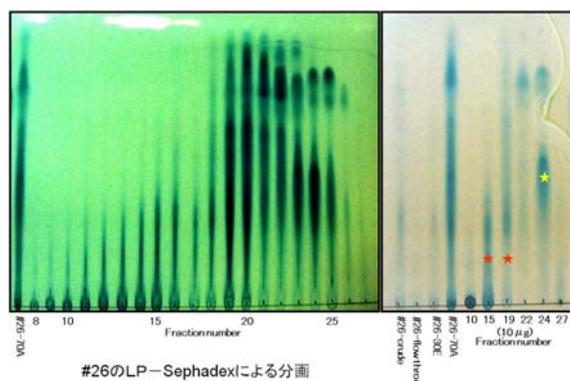
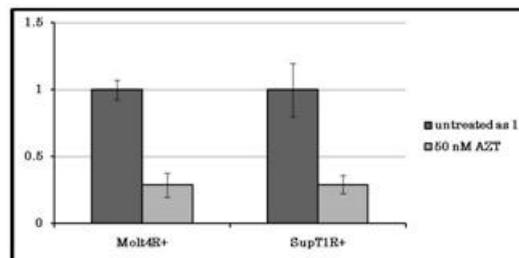
薬材名	ポリフェノール(TLGIによる分析)			抗ウイルス活性 [IC ₅₀ (μl/ml)]	細胞障害 [CTC ₅₀ (μl/ml)]	備考	Indications	今後の予定
	低分子	加水分解型	縮合型					
1			(+)	>25	>25			
2	+	++	(-)	5	25			部分精製済み
3			(+)	>25	>25	25でplaque大		
4			+++	(200μg)	(200μg) ?			部分精製済み
5			(+)	>25	>25	>7.5でplaque大		
6	+		+	0.75	>2.5	0.75では細胞障害なし		部分精製済み
7			+	>25	>25			
8	+		+	1.5	>25	1.5では細胞障害なし		部分精製済み
9								未定
10			+	7.5				要再確認
11								未定
12	-	-	-	—	>0.075	細胞障害強い		部分精製済み
13			++	2		10で増殖障害		部分精製済み
14	(-)		(-)	>25	>25		Heart palpitation	
15	+	++	(-)	0.5	1		Oligospermia	部分精製済み
16	+	++	(-)	1	<10で細胞障害なし		Lumbago	部分精製済み
17	-	-	(-?)	3	10		Ashma	部分精製済み
18	+		+	>25	>25		Pains	
19	(-)		(-)	>25	>25		Cancer	
20	+		++	>25	>25		Diabetes	
21*	++	+	(-)	3	<2.5細胞障害なし		Diarrhoea	部分精製済み
A	+++		++	3	10で細胞障害なし		Spice	部分精製済み
B			(+)	—	>2.5	サポニン		Discard
C			(+)	>25	>25		Spice	
D			(+)	>25	>25		Spice	
E			++	3	30で細胞障害なし		Spice	部分精製済み
21			+	25	>25		Infertility in women	部分精製済み
22	(+)		(+)	>25	>25		Cough	
23	+		+	>25	>25		Constipation	
24	+		+	>25	>25		Jaundice	
25			(+)	>25	>25		Urine retention(BPH)	
26	++		+++	30	>25		Ashma and sexual weakness	部分精製済み
27	(+)		(+)	>25	>25		Ashma	
28	(+)		+	>25	>25		Haemorrhoids	
29	++		+++	>25	>25		Dysmenorrhoea	
30	+		++	>25	>25		Typhoid fever	
31			(+)	>25	>25		Nervous disorder	
32	+		++	2.5	>25		Nausea	要再確認
33	+		++	>25	>25		Sickle cell	
34	+		+	12.5	>25		Numbness in extremities	部分精製済み
35	++		+	>25	25でCPE		Arthritis	
36			(+)	>25	>25		Retention of fluid	
37	++		(+)	>3?	>25でプラーク大	OPE促進、増殖促進	Malaria	部分精製済み
38	++		++	2.5			Anaemia and loss of appetite	要再確認

* 検体の調製は、基本的に10gの資料を20mlの30%エタノールで18時間抽出後、フィルター滅菌した。検体の濃度は不明。
抗ウイルス活性は、SARS-CoVの増殖阻害を測定している。ウイルス吸着阻害は、未だ測定していない。
加水分解型タンニンの存在は現時点では不明。(+)は微量の存在を示す。

これら 1 容の材料を 2 - 5 容の 30%エタノールで抽出し、SARS-Corona ウイルスによるプラークアッセイによってウイルス増殖への影響を調査した。有望と思われるものについてはさらに lipophilic Sephadex (LP Sephadex) カラムにより、flow-through 分画、30%エタノール溶出分画、70%アセトン溶出分画に分けて抗ウイルス活性を調査した。

この中で、我々は CSRPM で購入した#26 に注目してさらに LP Sephadex カラムにより分画、シリカゲル TLC でポリフェノール類を調査、解析した。

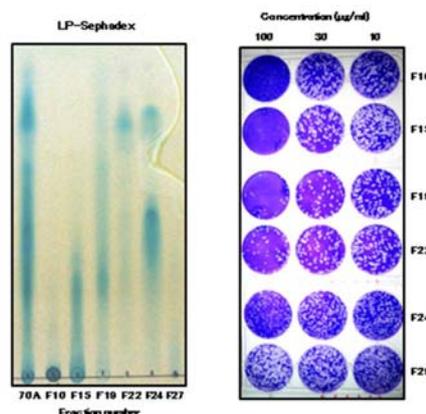
LP Sephadex からの 70%アセトンによる溶出分画をプレートアッセイで調査したところ、意外にも F19、F22 を中心とする比較的分子量域で強い抗ウイルス作用が認められた (下図)。従来の調査では、植物由来成分の抗ウイルス作用は主に F10、F15 に相当する比較的高分子画分に検出されている。従って、この抗ウイルス作用が procyanidins による作用ではない可能性が示唆される。現在、HIV 複製系で抗ウイルス作用をアッセイ中である。#26 の原材料薬用植物の解析を予定している。



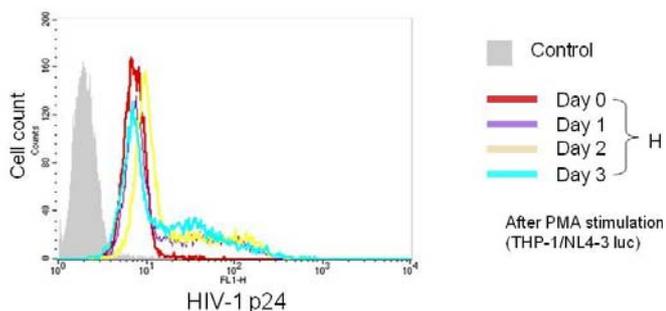
また、単球系細胞株 THP-1 にレポーター遺伝子を含むシールドタイプ HIV-1 を感染させレポーター細胞株を作成した。この細胞株は PMA 刺激によりマクロファージに分化するが、刺激にかかわらず安定的に HIV-1 を発現することを確認した (下図左)。マクロファージに分化させた THP-1 レポーター細胞に LPS を 48h 作用させた場合の抗 HIV-1 活性を Luciferase 活性で評価した結果を示す (下図右)。細胞毒性に関する指標を加えれば、初感染時の HIV-1 転写に対する抑制効果のスクリーニングに使用可能である。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

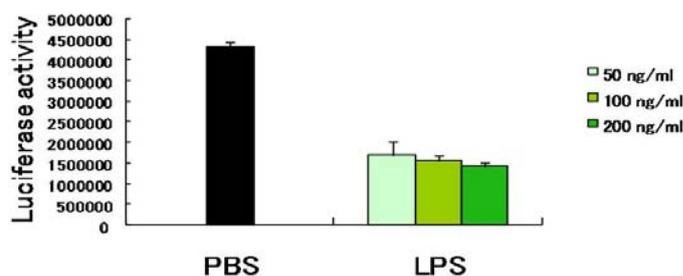
Jurkat 細胞株は3カ月以上安定に *Renilla luciferase* レポーター遺伝子を発現し続けることが、継続培養によってわかった。ヒト T 細胞株の CEM、H9、Molt4、SupT1 細胞株の中で、H9 と CEM 細胞株は Jurkat に比べてレンチウイルス感染感受性がじゅうぶんでないことがわかった。pCERp を感染させた Molt4、SupT1 細胞株を陽性コントロールとしての逆転写阻害剤 AZT で処理したうえで NL4-3luc (firefly)ウイルスを感染させ、dual luciferase assay を行うと、期待通り感染の阻害効果が見られた。現在 Jurkat、Molt4、SupT1 という 3 種類のレ



THP-1レポーター細胞のHIV-1発現



THP-1レポーター細胞によるHIV-1抑制効果の評価



ポーターT細胞株を準備できたことになり、植物抽出物の抗 HIV 活性の検証がより確実に行えることになった。

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)

短期専門家の佐久間、JSTリサーチアソシエイトの魚田らが、昨年度樹立した *Renilla luciferase* レポーター遺伝子を発現する Jurkat 細胞株にガーナ野口研 P3 研究室で NL4-3luc ウイルスに感染させ、dual luciferase assay を行う技術移転を本年8月に実施した。

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

マクロファージに分化し HIV-1 を産生する細胞株の樹立に成功したこと。

(2) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

① 研究のねらい

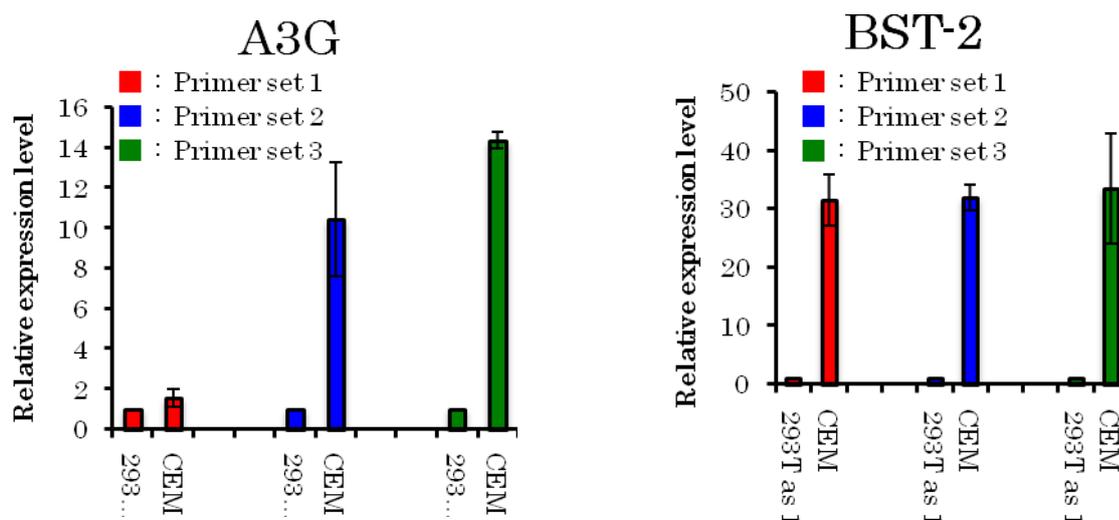
APOBEC3G 及び BST-2/Tetherin はこれまで報告されてきた宿主因子の中で最も強い抗 HIV-1 活性を示すことから、本研究ではこれらの遺伝子発現をガーナ産植物抽出物スクリーニングの第一指標として選出した。前者は、HIV-1 の逆転写産物に G->A 変異を頻発させ感染性を低下する機能を有し、後者はウイルス粒子が細胞表面から出芽するのを阻害する機能を持つ宿主蛋白である。

② 研究実施方法

各々の遺伝子発現 (mRNA 発現) の変化を定量化すべく、リアルタイム RT-PCR によるアッセイ系を確立する。標準曲線作製のためのプラスミド DNA 構築、プライマー及びプローブの設計、PCR サイクルの条件設定等を行う。また内部対照として用いるハウスキーピング遺伝子 (GAPDH 等) についても同様の作業を行う。1 年以内に終了し、野口研で解析を開始できるようセッティングする。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

実験系確立段階で使用する細胞株は、APOBEC3G、BST-2 遺伝子発現が多いとされる CEM 細胞と、少ないとされる 293T 細胞とした。SYBR Green 法を用いることにしたので、プライマーは独自に設定することにした。プライマーの設計には qPCR 検出用の機械 StepOnePlus® に付属していたソフトの PrimerExpress 3.0 を用いた。細胞の全 RNA を Isogen の系によって抽出し、Nanodrop による全 RNA の濃度を定量後、終濃度を 100 ng/μl になるように調整して実験に用いた。この RNA 100 ng をオリゴ dT₂₀ と SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR にて全量 20 μl の系で逆転写した後、この反応液 1 μl を鋳型 DNA として Fast SYBR® Green Master Mix の系にて特異的プライマーと共に qPCR の反応に供した。qPCR の反応及び検出には StepOnePlus® を用いた。なお、内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド 3 磷酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。以下に結果を示す。



以上の結果は、CEM 細胞では 293T 細胞に比べて APOBEC3G と BST-2 の両方共に発現が高いことを示している（但し、A3G のプライマーの組合せ 1 を除く）。APOBEC3G については、この遺伝子が CEM 細胞の亜株から発見されたこと及び他の報告で 293T ではその発現が低いことも一致する。また、BST-2 については、どのプライマーの組合せを用いても再現良く CEM 細胞での高い発現が観察された。今後はこの系の検証をさらに重ね、植物抽出物の内に内在性抗 HIV 因子の発現を高めるものがあるかどうかの探索に用いる予定である。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

10月4日から野口研ウイルス部門の Barnor 博士が来日し、技術指導を行った。

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

ガーナという地理的条件、実験材料の入手や輸送時の安定性の問題から、本事業ではこれまで報告のある Taqman Probe 法ではなく SYBR Green 法を用いることとした。

(3) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：HIV-1 潜伏感染 T 細胞株の樹立

① 研究のねらい

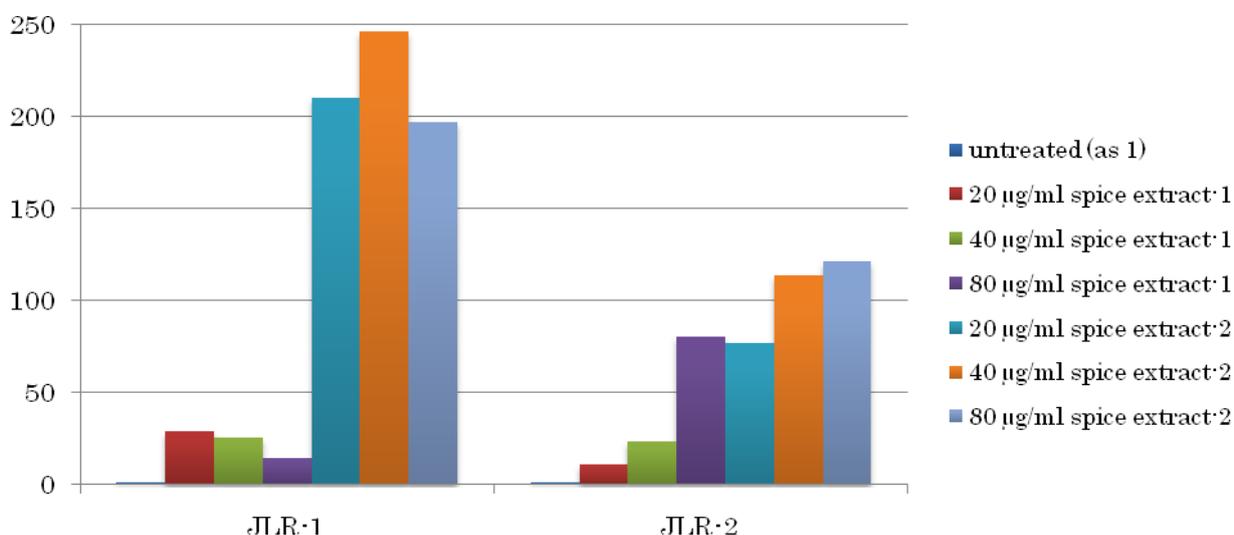
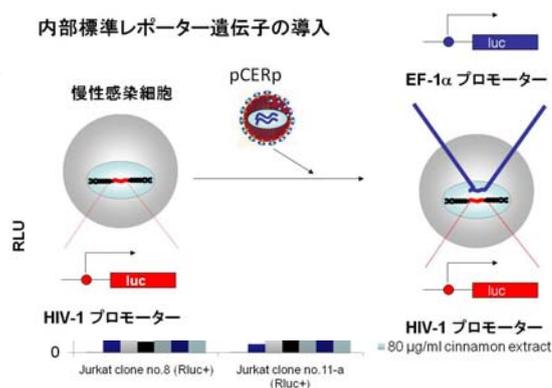
抗レトロウイルス薬物治療(ART)が一定の効果をあげている場合でも、いったん ART を中断すると潜伏感染細胞からウイルスが産生され始め、再びウイルス量が増大してくることが知られている。潜伏感染細胞を駆逐するためには、未感染細胞を ART で守りつつ潜伏感染細胞を刺激してプロウイルス発現を誘導しなければならない。Phorbol esters はプロウイルス発現を誘導できる代表的薬剤であるが、免疫系細胞をいたずらに刺激することなく安全にプロウイルス発現を誘導する物質でなければ臨床的には使用できない。HDAC 阻害剤も同様である。本課題では、このような性質をもつ物質を植物抽出物に見出すことを目的としており、樹立したアッセイ系を用いていくつかの候補植物抽出物についてパイロ

ットスタディーを行うこと、昨年度に樹立したスクリーニングに用いるべきレポーター細胞を改良することを本年度の課題として設定した。さらに、より生体に近い潜伏感染 T 細胞を作成する目的で、抗原特異的 CD4 陽性 T 細胞株の樹立も合わせて試みた。

② 研究実施方法

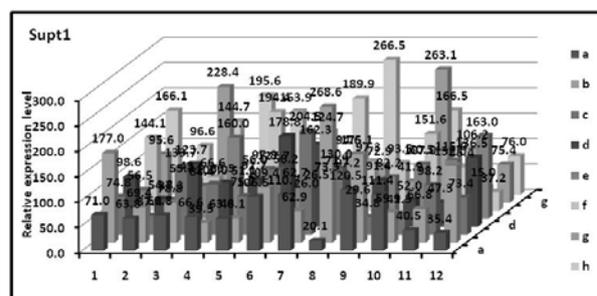
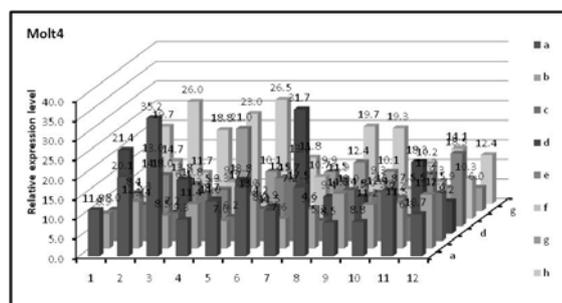
薬用植物抽出物による潜伏プロウイルス活性化

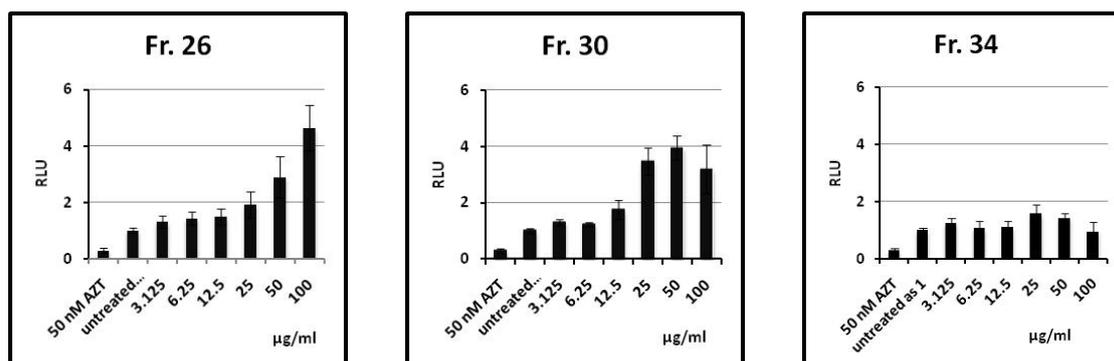
ガーナおよび中東経由地の薬草市場で購入できる乾燥植物材料由来抽出物等による潜伏 HIV-1 プロウイルス活性化を調べた。香辛料 (spice-1 及び-2) に潜伏 HIV-1 プロウイルス活性化能があった (下図)。



pCERp レンチウイルスベクターの導入と安定発現細胞プールの樹立

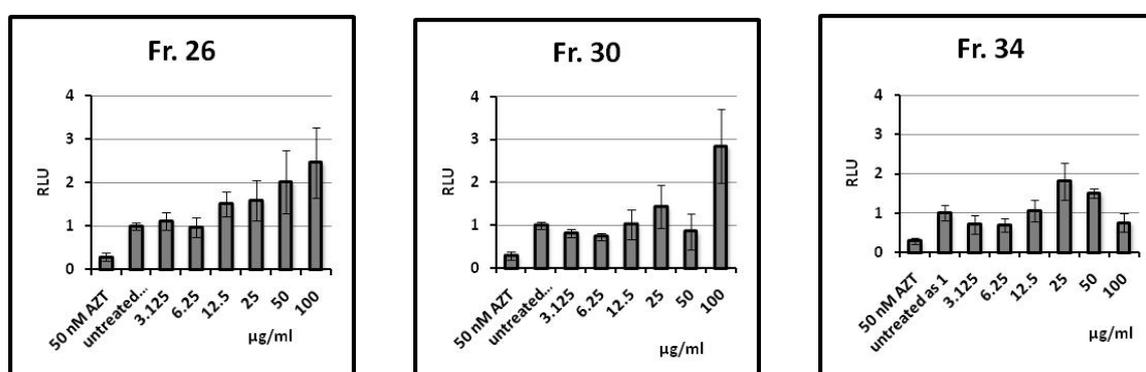
昨年度樹立した潜伏感染細胞に pCERp レンチウイルスベクターを感染させて、恒常的に *Renilla* ルシフェラーゼを発現する細胞プールを樹立した (右図)。この細胞プールを使うことにより、*Renilla* luciferase 活性を内部標準として用いることが可能になった。ホテルおよび *Renilla* ルシフェラーゼ活性は GloMax®-Multi Detection System (Promega) を用いて手引きに従い測定した。同様な細胞株の樹立を、CEM、H9、Molt4、SupT1 でも試みた (下図)。



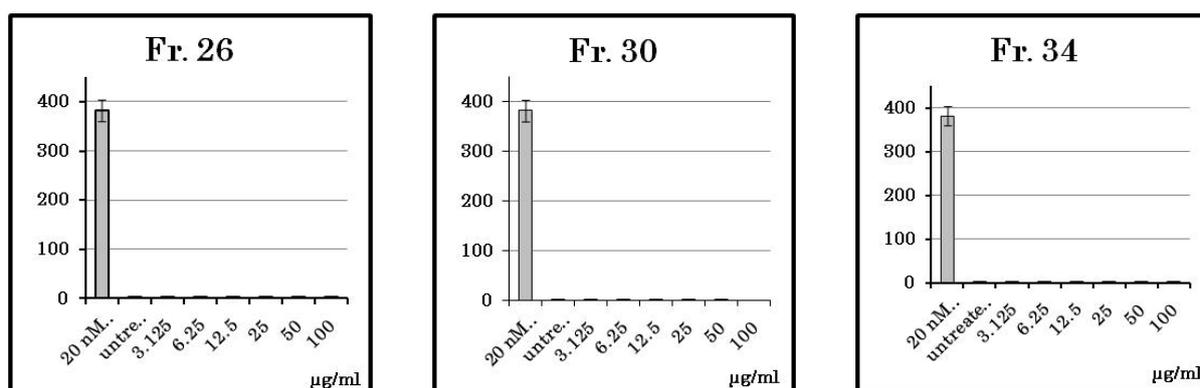


VSV-G シールドタイプ化 NL4-3luc を作製し Molt4R+細胞に 1 時間感染させて後、それぞれの画分について様々な濃度で 9 6 穴皿にて 2 4 時間培養し、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。尚、AZT は HIV-1 の感染を抑制する物質としての陽性対照である。

SupT1R+細胞についても Molt4R+細胞と同様の結果が得られた (下図)。



次に、慢性感染細胞株 J4-3luc/R-1 をそれぞれの画分について様々な濃度で 9 6 穴皿にて 2 4 時間培養し、デュアルルシフェラーゼアッセイを行った。抽出物画分は慢性感染細胞株内のプロウイルス HIV-1 を再活性化しなかった。



今回 Barnor 博士が得た結果は新発見に直接つながるものではなかったが、技術訓練という観点からは十分なものであったと考えられる。今後は野口研での RA の指導、及びこれからの研究活動に大いに役立つものと期待する。

(4) 研究題目：ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

研究項目：抗原虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容：ハーブ抽出物による抗アフリカトリパノソーマ原虫活性スクリーニングシステムの確立と薬効標的の解析に応用するアフィニティクロマトグラフィーシステム開発

① 研究のねらい

西アフリカ地域ではツエツエバエが伝播する原虫 *Trypanosoma brucei gambiense* によるアフリカ睡眠病が流行しており、中枢神経症状を呈して臨床的に重篤化する風土病であるが、典型的な Neglected Tropical Diseases (NTD) として対策の遅れが指摘される疾患でもある。現在でも安全で有効な駆虫薬が開発されていないため、安価で有効かつ安全な治療薬の開発が急務である。本研究では既に報告のあるハーブ抽出物による抗トリパノソーマ原虫効果に関する生物学的機序を解析し、効果を示す物質の薬効機序の解析、薬効物質の精製と構造活性相関に基づくより広範なスクリーニングのシステム確立を目的としている。今年度はすでに立ち上げた実験室内維持トリパノソーマ原虫を用いた殺原虫活性評価システムの検討として簡便で信頼性の高い原虫増殖の評価法を確立し、実際にスクリーニングの運用実験を行うと共に、薬剤標的となり得るトリパノソーマタンパク質に対する植物由来成分のアッセイに用いるアフィニティクロマトグラフィーシステムを確立するための分子標的候補の組み替え分子作製とその抗体作製をおこなって、薬効成分を直接且つ迅速にスクリーニングする方法を検討し、ガーナ・野口研における研究との連携支援の体制整備を進めた。

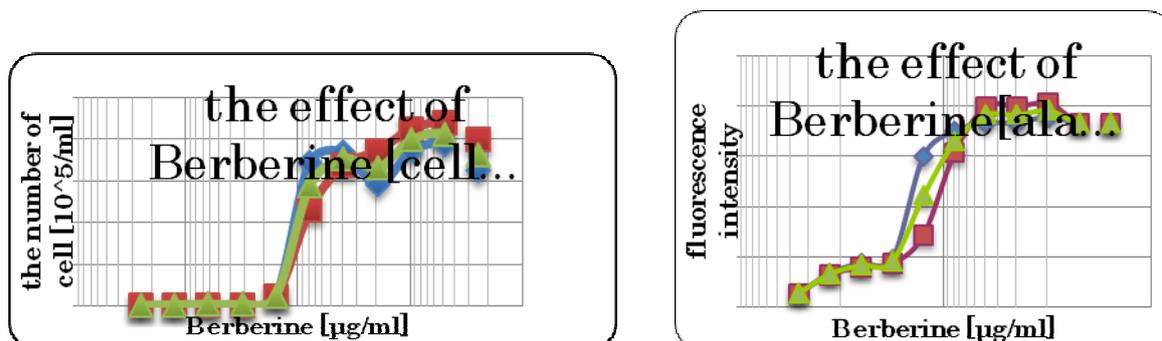
② 研究実施方法

- (1) 原虫株：トリパノソーマ原虫は実験室内維持株 *Trypanosoma brucei brucei* GUTat3.1 株の導入をおこなった。本原虫株は国際的な標準株とされているものの一つであるため、薬効解析を野口研のデータと比較するために *in vitro* の培養法を統一して各種バイオアッセイを行う体制とした。すなわち、血流型原虫を低血清条件での培養、すなわち 5% FBS 添加 Iscove's modified Dalbecco 培地に 200 μ L Lアラニン、100 μ M グリシン、20 μ M L 塩化オルニチン、10 μ M L シトルリンを添加したものに培養を適応させ、5% CO₂、37°Cにて培養した場合の原虫増殖を検討する。
- (2) 薬効アッセイ系：薬効の一次スクリーニングとしては抽出物添加による *in vitro* での殺原虫効果を観察することであるので、*in vitro* 培養原虫に対する各種殺滅効果の指標となる物質を用いて細胞死の判定と細胞死の機序解析に着手した。また、原虫の生死、アポトーシスの動向などは FACS で測定する予定であるので、GUTat 3.1 株を用いて生死判定とアポトーシスの測定を試行した。
- (3) 上記条件の確定の後、ガーナ産・およびガーナ産以外のハーブ抽出物を用いて、パイロットスクリーニングを実施した。
- (4) 薬効標的タンパク質解析のためのアフィニティクロマトグラフィーシステムの開発：トリパノソーマの細胞死誘導に関与する UNC119 や UNC119BP 分子に当面焦点を絞り、薬用植物抽出物との親和性を指標としたアフィニティクロマトグラフィーの開発をおこなうために、リコンビナント分子を作製し、それに対する抗体を作製する計画とした。

③ 当初計画の進捗状況

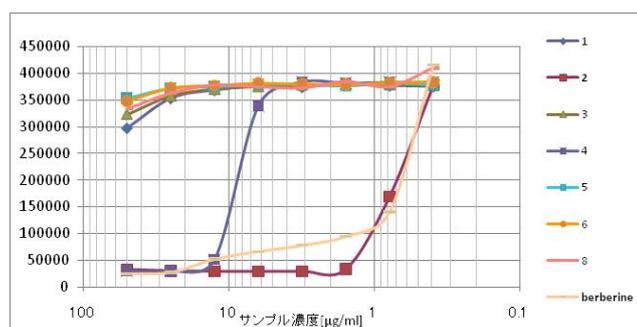
- (1) 低血清培地での原虫増殖効率の検討：上記培地において Serum-plus を含むスタンダード培地よりも増殖が活発であり、バイオアッセイによるスクリーニング系に適した方法であることを確認したのでこの系を野口研に技術移転することとした。
- (2) 薬効のアッセイ系：*In vitro* 培養系において原虫の増殖を阻害する陽性対照として berberine

を用い、原虫の細胞死を Alamar-blue 染色により吸光度測定することで原虫の生細胞カウントと同等の測定結果を得ることを確認した（下図）。



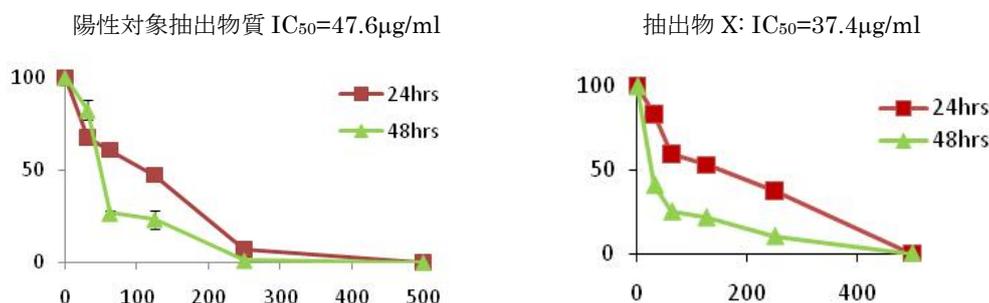
また、FACS による原虫の細胞死測定に問題ないことを確認し、野口研へ技術移転した。

- (3) 薬効物資のパイロットスクリーニング：ガーナ産以外の植物抽出物としてはテナティブに用いた 10 種類の抽出物のうち、1 種類（特許申請の可能性があるので抽出物 2 と表記）が Berberine と同等またはより強い殺原虫活性を示した（下図）。



各種植物抽出液による原虫の増殖阻害効果（#2 が高い阻害効果を示す）

ガーナ産植物抽出物についても試行的スクリーニングを開始した。数種については阻害活性が認められているが、詳細な解析は次年度以降に持ち越している。



- (4) アフィニティカラムの作製：リコンビナント分子は野口研でベクターを作製し、それを用いて国内で大腸菌により作製中である。リコンビナントタンパク質の精製が完了するのを待ってウサギで抗体作製を開始するべく準備中である。

以上、第 2 年次として、ガーナで薬用植物抽出成分が野口研に供給される体制が確立されつつあるので、ガーナ・野口研で行われる解析を補足し、さらに詳細な解析を東京医科歯科大学で行う体制の確立につとめた。国際スタンダードによる培養条件下の原虫の生死判定、アポトーシス関連原虫分子

と反応する植物抽出分子の同定方法の確立など、ほぼ予定通りに進行している状況である。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

平成 22 年 8 月からガーナ・野口研に本課題の専門家（鈴木光子）が派遣されたので、専門家と連携しながらカウンターパートへの技術移転を開始した。野口研寄生虫学部に *Trypanosoma brucei brucei* GUTat3.1 株を導入し、上記培養法下に原虫の増殖を確認したので、その培養を継続して植物抽出液処理による遺伝子発現解析などを技術移転課題としている。カウンターパート研修として野口研の Mr. Kwadwo K. Frempong が平成 23 年 1 月 10 日から平成 23 年 2 月 12 日まで来日し、東京医科歯科大学にて研修した。

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

パイロットスタディーとして試みたガーナ産以外の植物抽出物の殺原虫活性評価にて、新しく発見された物質があるので、その物質の性状解析を行い、同様の成分を持つ可能性についてガーナ産植物にあたってみることにより、プロジェクト目標に有用な情報となる可能性がある。

B. 長崎国際大学グループ

（1）研究題目：ハーブ抽出物の有機化学的研究

①研究のねらい

今年度は、毒性検査、バイオアッセイの対象とする薬用植物候補を選定し、その採集、保管、エキス作製までの方法を確立することを目標とした。

②研究実施方法

日ガ双方での候補植物絞り込みの経緯

平成 22 年 5 月

CSRPM にて、Osafó Mensah 氏に植物エキスの状況について山岡教授が尋ねたところ、今はないとのことで、Anti-HIV と Anti-Trypanosome として知られるハーブから二通りの方法、熱水あるいはアルコール抽出を行うことから始めたいと提案があった。現在、anti-HIV 活性が期待できる植物は 10~20 種類、anti-Trypanosome 活性が期待できる植物は 10~15 種類あり、この他に 1000 種類位の薬用植物がある説明を受けた。CSRPM はマンボン地区に 25 エーカーの併設農園を持ち、この他にガーナ国内に 750 エーカーの農場を持つとのこと。以上より日ガ双方での候補植物の絞り込みが必要と判断した。

平成 22 年 6 月

薬用植物のデータベースについて、CSRPM の Osafó Mensah 氏にプロジェクト調整員の柏原氏が確認を行った。薬用植物のデータは存在するがデータベースは現在開発中とのことであった。データの内容は、ガーナにある薬用植物の名前と伝統医療における使用目的であり、これらの情報の共有については特段問題はないとのこと。また、アクラの保健省より、薬用植物の小冊子（Monographs on Medicinal Plants）を入手し、ガーナ大学内の本屋にて、Ghana Herbal Pharmacopoeia、Useful Plants of Ghana の 2 冊を購入し、候補植物の絞り込みのための情報源とした。

平成 22 年 7 月

長崎国際大学において正山教授選抜による候補植物のデータベースが構築された（Monographs on Medicinal Plants、Ghana Herbal Pharmacopoeia、Useful Plants of Ghana を情報源として使用）。

また、CSRPM の Okine 所長より、List of medicinal plants for HIV-AIDS が提出された。

平成 22 年 8 月

CSRPM の Okine 所長より、Ghanaian plants used in the treatment of trypanosomiasis (sleeping sickness)が提出された。

平成 22 年 9 月

CSRPM において、JICA 短期専門家の森永より、正山教授選抜の抗 HIV 活性、抗 *Trypanosoma* 活性候補植物、Okine 所長選抜の候補植物の双方を合わせた薬用植物リストを Okine 所長に提出し、候補植物に関する討論を行い、候補植物の採取優先順位を決定した。また CSRPM の研究員、森永が CSRPM 併設農園、CSRPM 周辺エリアで植物採取も行った。

平成 23 年 1 月 抗ウイルス作用が報告されている diarylheptanoid 類は抗 HIV ポジティブコントロールとなりうる可能性が予測され、また、diarylheptanoid 類は抗 *Trypanosoma* 活性が知られている curcumin (ウコンの主要成分) と基本骨格が同一であるため、diarylheptanoid 類を高濃度に含有する植物の探索を施行中である。

平成 23 年 2 月

同上植物エキスの分配フラクションについてカラムクロマトにより繰り返し精製中。

平成 23 年 3 月

3 月 8 日～3 月 24 日に宇都がガーナを訪れて、分取用 HPLC のセッティングと実際に植物抽出エキスのサンプルから化合物を分種する段階まで指導する予定である。

現段階での結論

現在、日ガ双方により約 100 種類の候補植物が選抜され、エクセル管理によるデータベースとして情報構築された。Okine 所長も候補植物の種類としては十分だと明言されており、優先順位としては Okine 所長選抜と正山教授選抜とでオーバーラップする 8 種類の植物が第一優先で、以下、Okine 所長選抜、正山教授選抜という優先順位が下された。しかしながら、これらの優先順位は、植物の育成状況、採取場所、入手のし易さ等により、研究員および森永の判断によって変更し、採取することも了承された。データベースの内容は、採取植物の学名、科名、薬用部位、含有成分、薬理活性に加えて、植物の採取日時、採取部位および状態、採取場所、エキスの調製および保存、バイオアッセイへの移行についてで、CSRPM の方で情報を更新した場合は森永までメールにて連絡をするようお願いした。また、植物抽出エキスの調製において、これまで水、エタノールによる 2 通りの抽出物を調製することが予定されていたが、抽出サンプルが 2 倍になるので効率化のため、抽出方法を 50%含水エタノールで行うことを森永より提案し、了承された。ただし、Okine 所長からは 70%エタノールという提案もあった。

今後の方針

平成 22 年 9 月の段階では、17 種類の候補植物（根、葉、樹皮等の部位毎に 1 キロ程度）の採取が終了している。今後の候補植物採取の進め方は、平成 22 年度はアクラ、CSRPM 周辺エリアや併設農園、生薬市場での入手を行い、遠隔地での植物採取は来年度、森永の訪問時期に CSRPM の研究員らと行う計画である。また、エタノールエキス調製に必要なエタノールはすでに CSRPM に搬入済みであり、ロータリーエバポレーターも設置、動作確認が終了しているので、今後は採取した植物を用いて、実際にエキス調製へ移行し、第一グループとして 17 種類の候補植物の 50%エタノールエキスについて野口研 (NMIMR) でバイオアッセイを行う計画である。

④カウンターパートへの技術移転の状況

平成 22 年 9 月 6 日～9 月 24 日（現地活動期間：9 月 7 日～9 月 22 日）に、長崎国際大学薬学部の森永が JICA 短期専門家としてガーナ共和国へ渡航した。その際の活動内容は、（1）長崎国際大学における短期留学生についての相談 （2）同トレーニングを行う者への会談 （3）CSRPM で雇用するリサーチアシスタントの面接 （4）植物抽出エキス調製方法、保存方法の確認及び指導 （5）ターゲット植物（抗 HIV、抗トリパノソーマを目的としたガーナ現地の植物）についての協議 （6）ターゲット植物のリスト管理と指導 （7）生薬市場調査及びサンプリング（CSRPM の研究員同伴で） （8）CSRPM 周辺エリアでの候補植物のサンプリング（CSRPM の研究員同伴で） （9）入手した薬用植物、生薬を用いて実際にエキスを調製し、バイオアッセイに移行する前段階まで完了する （10）1 週間程度の植物サンプリング調査（CSRPM の研究員同伴でのビジネストラベル）を予定していた。これらのうち、（1）、（3）、（4）、（5）、（6）、（8）を達成できた。

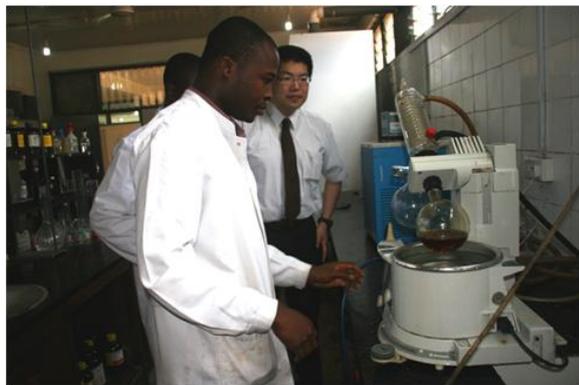
（2）に関しては、現時点において長崎国際大学で短期トレーニングを受ける候補者を決定することが出来ず、会談を行うことは出来なかったが、受け入れ時期、期間としては平成 23 年 4 月以降で 3 ヶ月間と CSRPM の Okine 所長に説明し、了承された。候補者 1 名の選抜に関しては、今後、長崎国際大学側と CSRPM とで協議し決定する予定である。

（7）に関しては、いつでも容易に出向いての購入が可能なので今回は行わなかった。

（9）に関しては、実際に 17 種類の候補植物を採取したが、植物の乾燥に 2 週間程度かかることからデモンストレーションを行うことが出来なかった。しかしながら、エキス調製に必要なエタノールを搬入し、ロータリーエバポレーター、凍結乾燥器も CSRPM 内の Phytochemistry ラボで稼働していることから、プロジェクトに必要なエキス調製は行える状況だと判断した。エキス調製のプロトコルを作成し、Okine 所長、Osaf Mensah 氏へデータ送信した。

（10）に関しては、今後、候補植物リスト記載の植物に関してガーナ国内での生育エリアの特定を Osaf Mensah 氏にお願いし、平成 23 年度に森永が訪問する期間に CSRPM の研究員と共に 1 週間程度のビジネストラベルで植物採取を行う計画である。

今回の渡航では、プロジェクトに必須の候補植物の採取を最優先事項と考えて活動を行い、CSRPM の併設農園及び CSRPM 周辺エリアでの植物サンプリングを計 2 日間行い、17 種類計 27 部位のサンプルを収集できた。また、ロータリーエバポレーターを新規に CSRPM に設置し、組み立て・動作確認を行った。薬用植物データベースの構築とその管理方法の説明、ロータリーエバポレーターの導入及びエキス調製方法の説明等、日本からの技術移転に関して予定通りの活動を行うことができた。



CSRPM内の研究設備のロータリーエバポレーターの動作状況確認。操作は全て手動のため、操作中はその場に長時間拘束されてしまう。



本プロジェクトで新規に導入した最新型のロータリーエバポレーターについて技術移転を行った。従来型（左）と比べ、全ての操作がシステム制御されており、操作中その場に拘束されず、他の作業が出来るメリットが生じた。

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

ガーナでのスクリーニング開始前ではあるが、抗ウイルス物質が含まれている可能性がある植物加工品があるとの連絡を東京医科歯科大学から受け、その成分分析、分取を依頼された。今後、有効成分の分取を目的とした実験を計画している。

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 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 0 件)

(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)「東京医科歯科大学」グループ(研究題目)ハーブによる抗ウイルス・抗寄生虫効果の研究

①研究者グループリーダー名： 山岡 昇司（東京医科歯科大学・教授）

② 研究項目

抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

研究内容： HIV-1 潜伏感染 T 細胞株の樹立

ハーブ抽出物の抗 HIV 活性をスクリーニングするためのアッセイ系開発

抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

抗寄生虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

(2) 「長崎国際大学」グループ(研究題目)ハーブ抽出物の有機化学的研究

① 研究者グループリーダー名: 正山 征洋 (長崎国際大学・教授)

② 研究項目

ハーブ抽出物の有機化学的研究

以上