

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)

平成 24 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、マラリア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。平成23年度には、(1)複数の植物粗抽出物が潜伏感染ウイルスを活性化することを見出しており、(2)強い抗トリパノソーマ活性を示す4件の植物抽出物を見だし、そのうち一つについて新規構造を有する成分を含む4つの精製標品を得た。作用機序については tubulin 抑制を介した鞭毛形成異常を引き起こすことを明らかにした。(3)ガーナで得られた候補物質の生物活性を日本側で再現し、日本、ガーナで得られた候補物質中の有効成分の部分精製を行い、(4)部分精製標品を用いた活性評価を行った。平成24年度は、(1)潜伏感染ウイルスを活性化する植物粗抽出物から活性画分を抽出した、(2)強い抗トリパノソーマ活性を示す植物粗抽出物が、マウスでトリパノソーマの増殖を抑制することがわかった、(3)同植物から抗トリパノソーマ活性成分(新規物質)を同定し作用メカニズムを解析した。平成25年3月段階で当初リストアップした95種類の植物のうちガーナ国内で可能な植物をすべて採集し終え、部位別に113種類の粗抽出物を作製、ガーナおよび日本で毒性試験、一次および二次バイオアッセイを行った。期待する効果が得られたサンプルについては今後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精製し、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:HIV-1 感染を抑制する植物成分の解析

① 研究のねらい

抗 HIV 活性を有する植物抽出物をスクリーニングすることを目的とする。*Renilla luciferase* を恒常的に発現する Jurkat T 細胞株をレポーター細胞として用いて、HIV-1 急性感染を抑制する植物抽出物のスクリーニングを実施した。

② 研究実施方法

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。そのために平成22年度までにヒト 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した。さらに Jurkat ほかの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し、Jurkat、Molt4、SupT1 ヒト T 細胞株が HIV 急性感染実験に適することがわかった。

平成24年度、ガーナ野口研では主に Jurkat レポーター細胞株を用いて VSVG-pseudotyped NL4-3luc ウイルスベクターの感染実験による1次スクリーニングを実施した。逆転写阻害剤 AZT を陽性コントロールとし、レポーター細胞をウイルス液、様々な濃度の植物抽出物で同時に処理し、24時間培養後デュアルルシフェラーゼアッセイにより植物抽出物の感染性への影響を評価した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

ガーナにおける1次スクリーニングでは、これまでに感染を強く抑制する植物抽出物は見いだされていない。

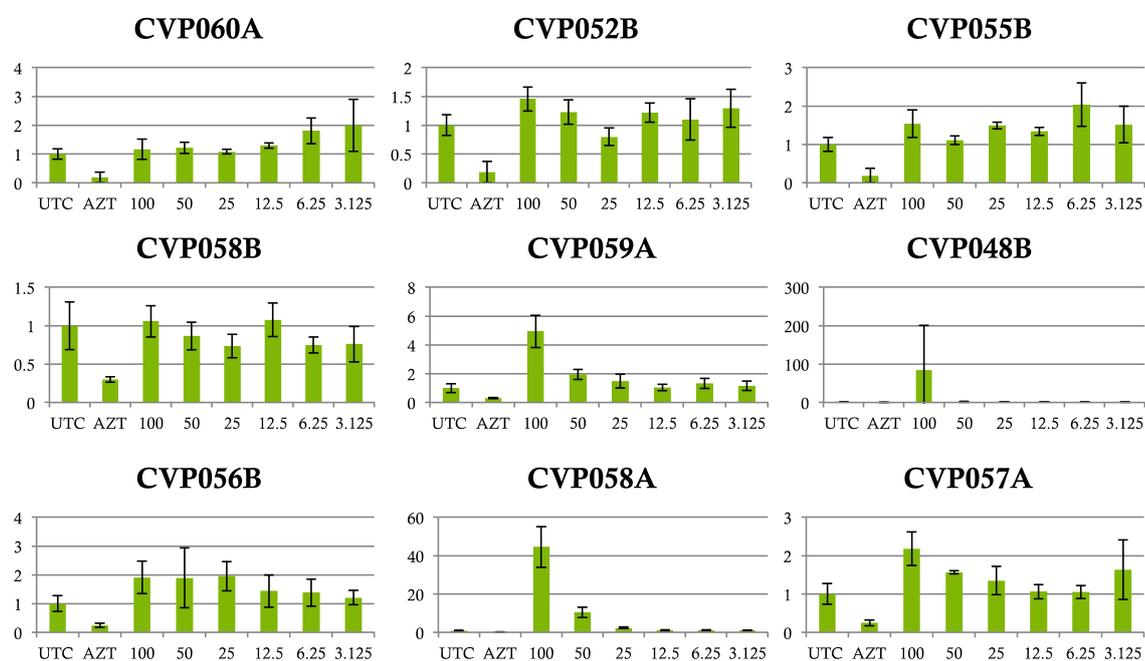


図1 急性感染系の結果の例

NUMBER	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS	NUMBER	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS	NUMBER	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
1	CVP001A	09/10/2012	-	35	CVP020B	13/02/2013	-	69	CVP043B	06/02/2013	-
2	CVP001B	09/10/2012	-	36	CVP023A	13/02/2013	-	70	CVP045B	06/02/2013	-
3	CVP002A	09/10/2012	-	37	CVP016B	13/02/2013	-	71	CVP050A	25/01/2013	-
4	CVP003C	09/10/2012	-	38	CVP019B	13/02/2013	-	72	CVP048B	25/01/2013	-
5	CVP002C	09/10/2012	-	39	CVP023B	13/02/2013	-	73	CVP051A	25/01/2013	-
6	CVP003A	09/10/2012	-	40	CVP025A	13/02/2013	-	74	CVP041B	04/02/2013	-
7	CVP003B	09/10/2012	-	41	CVP024B	13/02/2013	-	75	CVP051B	25/01/2013	-
8	CVP004A	09/10/2012	-	42	CVP027A	04/02/2013	-	76	CVP045C	06/02/2013	-
9	CVP004B	09/10/2012	-	43	CVP016C	14/02/2013	-	77	CVP005C	04/02/2013	-
10	CVP005A	09/10/2012	-	44	CVP028A	04/02/2013	-	78	CVP053A	25/01/2013	-
11	CVP005B	09/10/2012	-	45	CVP029A	04/02/2013	-	79	CVP052A	25/01/2013	-
12	CVP006A	09/10/2012	-	46	CVP030A	04/02/2013	-	80	CVP054A	25/01/2013	-
13	CVP007A	09/10/2012	-	47	CVP031A	04/02/2013	-	81	CVP060A	23/01/2013	-
14	CVP008A	09/10/2012	-	48	CVP032A	04/02/2013	-	82	CVP055A	25/01/2013	-
15	CVP009A	09/10/2012	-	49	CVP033A	04/02/2013	-	83	CVP059A	23/01/2013	-
16	CVP010A	09/10/2012	-	50	CVP034A	04/02/2013	-	84	CVP057A	25/01/2013	-
17	CVP011A	09/10/2012	-	51	CVP026B	14/02/2013	-	85	CVP058A	25/01/2013	-
18	CVP010B	09/10/2029	-	52	CVP035A	04/02/2013	-	86	CVP055B	25/01/2013	-
19	CVP012A	30/10/2012	-	53	CVP036A	04/02/2013	-	87	CVP062A	23/01/2013	-
20	CVP012B	30/10/2012	-	54	CVP037A	04/02/2013	-	88	CVP058B	23/01/2013	+
21	CVP011B	30/10/2012	-	55	CVP038A	04/02/2013	-	89	CVP064A	22/01/2013	-
22	CVP013A	30/10/2012	-	56	CVP039A	04/02/2013	-	90	CVP063A	22/01/2013	-
23	CVP013B	13/02/2013	-	57	CVP033B	04/02/2013	-	91	CVP066A	22/01/2013	-
24	CVP014A	30/10/2012	-	58	CVP040A	04/02/2013	-	92	CVP065A	23/01/2013	-
25	CVP015A	13/02/2013	-	59	CVP031B	04/02/2013	-	93	CVP026C	04/02/2013	-
26	CVP016A	13/02/2013	-	60	CVP041A	04/02/2013	-	94	CVP068A	23/01/2013	-
27	CVP017A	13/02/2013	-	61	CVP042A	06/02/2013	+	95	CVP064B	23/01/2013	-
28	CVP018A	13/02/2013	-	62	CVP043A	06/02/2013	+	96	CVP067A	22/01/2013	-
29	CVP019A	13/02/2013	-	63	CVP044A	06/02/2014	-	97	CVP052B	25/01/2013	-
30	CVP020A	13/02/2013	-	64	CVP045A	06/02/2015	-	98	CVP056B	25/01/2013	-
31	CVP017B	13/02/2013	-	65	CVP044B	06/02/2016	-	99	CVP067B	22/01/2013	-
32	CVP021A	13/02/2013	-	66	CVP046A	06/02/2017	-	100	CVP004C	04/02/2013	-
33	CVP022A	13/02/2013	-	67	CVP047A	25/01/2013	-				
34	CVP021B	13/02/2013	-	68	CVP048A	25/01/2013	-				

% AZT -100
-: ≥ 75 %
+: 50-75%
++: 25-50%
+++: 0-25%

表1 急性感染系で試験した抽出物の感染抑制活性

$$\% \text{ AZT } -100 = \{ (\text{抽出物の値}) / (\text{AZT の値}) \} \times 100 - 100$$

各抽出物にて得られた数値を AZT の値で割って 100 を掛けたものから 100 を引いた値は、AZT の効果にどれだけ近いことを示し、値が小さければ小さいほど抑制効果が AZT に近いことを意味する。AZT よりも抑制が強力である場合は、値がマイナスになる。

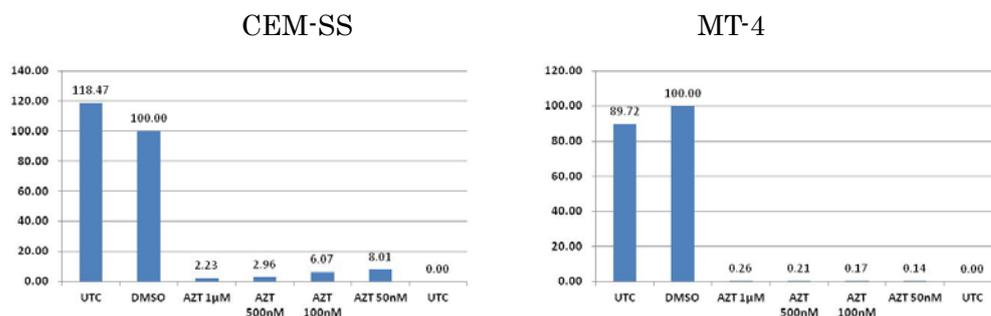
④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

長期専門家として着任した魚田が、ガーナ人若手研究者とともに *Renilla luciferAe* 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 研究室で作製した NL4-3luc ウイルスを感染させ、dual luciferase assay を行った。野口研リサーチアシスタント(RA)の交代に伴って急性感染系に関する技術指導を改めて行い、SOP にしたがってウイルス液を作製出来るようになった。感染実験、データ処理等の技術指導も行った。平成 25 年 2 月から 3 月にかけて、野口研 Research Fellow である Odoom 博士を東京医科歯科大学ウイルス制御学教室に 4 週間招聘し、細胞培養、dual luciferase assay、NL4-3luc ウイルス作製など多岐にわたる技術指導を行った。

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

現在使用している Jurkat レポーター細胞では陽性コントロールである AZT の効果が明確に出ないことがあり、現在その点で問題がない別の細胞株(CEM, MT-4)を用いて確認実験をすることをカウンターパ

ートと検討している。



各濃度の AZT を感染 6 時間前に添加して、24 時間後に luciferase activity を測定した。DMSO 処理サンプルを 100 とした場合の比較数値を示す。

2013年2月、BSL3 施設内に設置した本事業用 deep freezer のコンプレッサーが故障し貯蔵していたウイルス液がすべて失われたため、新たに作製しなければならなくなった。

(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 (A3G) 及び BST-2/Tetherin (BST-2) 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 活性を示すことが知られている。本研究では、これらの遺伝子発現を増強するガーナ産植物抽出物を見出すことを目的とする。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質である。

② 研究実施方法

各々の遺伝子発現 (mRNA 発現) の変化を定量化するため、リアルタイム RT-PCR によるアッセイ系を確立した。標準曲線作製のためのプラスミド DNA を構築、プライマー及びプローブの設計、PCR サイクルの条件設定後、以下の要領で植物粗抽出物のスクリーニングを行った。Jurkat T 細胞を植物抽出物の終濃度 100 µg/ml にて 24 時間培養する。細胞回収後、RNA を抽出、逆転写反応後に A3G、BST-2 発現量を定量 PCR で解析した。陽性コントロールとしてインターフェロンガンマ (IFN-gamma) 処理を用い、この検体に対する百分率を求めてその割合に応じて点数化した。

③ 当初の計画 (全体計画) に対する現在の進捗状況

昨年度までに確立した定量 PCR 法を用いて植物抽出物に対するスクリーニングを実施した。これまでに 30 種の 50% ethanol 粗抽出物が試験され、そのうち A3G で 5 検体、BST-2 で 2 検体、それぞれの遺伝子の発現を誘導するものが見出された。今後は他の抽出物についても同様の実験を進め、また再現を取る実験も全三回ずつ行う予定である。

表 2 定量 PCR の系で試験された植物抽出物とその結果 (左 : A3G、右 : BST-2)

	date	% / IFN-g	value		date	% / IFN-g	value
CVP002A	13/07/2012	52.3	++	CVP002A	13/07/2012	25.3	+
CVP003A	13/07/2012	39.3	+	CVP003A	13/07/2012	10.8	-
CVP014A	13/07/2012	0.0	-	CVP014A	13/07/2012	0.0	-
CVP020A	13/07/2012	13.9	-	CVP020A	13/07/2012	0.0	-
CVP026C	13/07/2012	1.7	-	CVP026C	13/07/2012	2.9	-
CVP032A	13/07/2012	49.4	++	CVP032A	13/07/2012	16.7	-
CVP041A	13/07/2012	0.8	-	CVP041A	13/07/2012	0.2	-
CVP043A	13/07/2012	0.0	-	CVP043A	13/07/2012	0.1	-
CVP055B	13/07/2012	46.6	++	CVP055B	13/07/2012	55.3	++
CVP055C	13/07/2012	13.2	-	CVP055C	13/07/2012	6.1	-
CVP057B	13/07/2012	18.1	-	CVP057B	13/07/2012	1.6	-
CVP062A	13/07/2012	4.2	-	CVP062A	13/07/2012	0.4	-
CVP026B	09/08/2012	23.5	-	CVP026B	09/08/2012	24.0	-
CVP044B	09/08/2012	14.4	-	CVP044B	09/08/2012	9.7	-
CVP033A	09/08/2012	6.1	-	CVP033A	09/08/2012	9.2	-
CVP041A	09/08/2012	34.0	+	CVP041A	09/08/2012	13.4	-
CVP043B	09/08/2012	10.2	-	CVP043B	09/08/2012	4.6	-
CVP065A	09/08/2012	39.5	+	CVP065A	09/08/2012	8.3	-
CVP046A	09/08/2012	52.5	++	CVP046A	09/08/2012	35.5	+
CVP049A	09/08/2012	27.7	+	CVP049A	09/08/2012	7.0	-
CVP048B	09/08/2012	2.1	-	CVP048B	09/08/2012	0.9	-
CVP040A	09/08/2012	30.9	+	CVP040A	09/08/2012	27.8	+
CVP033B	09/08/2012	32.0	+	CVP033B	09/08/2012	23.9	-
CVP057A	09/08/2012	10.0	-	CVP057A	09/08/2012	10.8	-
CVP059A	09/08/2012	43.6	+	CVP059A	09/08/2012	38.6	+
CVP005C	09/08/2012	52.7	++	CVP005C	09/08/2012	42.0	+
CVP039A	09/08/2012	45.6	+	CVP039A	09/08/2012	52.1	++
CVP053A	09/08/2012	4.2	-	CVP053A	09/08/2012	3.8	-
CVP052A	09/08/2012	32.9	+	CVP052A	09/08/2012	36.2	+
CVP059A	09/08/2012	8.3	-	CVP059A	09/08/2012	7.2	-

% / IFN-gamma

-: 0 - 25 %

+: 25 - 50 %

++: 50 - 75 %

+++: 75 - 100 %

% / IFN-gamma : IFN-gamma による発現誘導を 100 とした場合の比較数値。

④カウンターパートへの技術移転の状況

魚田専門家が野口研ウイルス部門にてガーナ側に技術指導・移転を行った結果、SOP の手順に従った定量 PCR の実験を行えるようになった。しかし扱うサンプルの volume が小さいことと実験の性質上その結果にばらつきが大きく、再現性のあるデータをとるためにはさらなる指導と修練が必要である。

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

特記事項無し。

(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：潜伏感染 HIV-1 プロウイルスを活性化する植物成分の解析

① 研究のねらい

抗レトロウイルス薬物治療(ART)により血中 HIV-1 RNA 量が減少している場合でも、潜伏感染細胞内にはプロウイルスが残存しており、現行の治療薬ではこれを排除することは困難である。ART が中断された際に潜伏感染細胞からウイルスが産生されることがあり、新たな感染と変異ウイルス出現の原因となりう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 cART 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、免疫系細胞を不必要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。本研究では、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いる。

② 研究実施方法

平成 23 年度までに本事業で作製した HIV-1 潜伏感染細胞株(JLR-1, JLR-2)を用い、PMA を陽性コントロールとして植物成分によるプロウイルス活性化のスクリーニングを行ってきた。JLR-1, JLR-2 は内部標準遺伝子産物として *Renilla luciferase* を恒常的に発現する HIV-潜伏細胞株で、firefly luciferase activity によってプロウイルス遺伝子発現をモニターできる。ガーナ産薬用植物の 1 次スクリーニングでは、100 µg/mL から 3.125 µg/mL までの濃度に調製した 50% EtOH 抽出物を試験した。プロウイルス遺伝子発現が刺激により 100 倍以上誘導されるものを 2 次スクリーニング候補植物とし、CSRPM でヘキサン、クロロホルム、酢酸エチル、水に分画して活性を調べた。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

野口研でのスクリーニング進捗状況

野口研で実施した 1 次スクリーニングが完了し、10 種の候補植物を得て分画による 2 次スクリーニングを開始した。全 113 検体の各抽出物の 1 次スクリーニング結果を表 3 に示す。

表 3 慢性感染系で試験された植物抽出物とその結果

NUMBER	FIRST RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
1	CVP001A	2012/2/2	++
2	CVP001B	2012/1/2	-
3	CVP002A	2012/1/2	-
4	CVP003C	2012/2/2	+++
5	CVP002C	2012/2/2	-
6	CVP003A	2012/1/2	-
7	CVP003B	2012/2/2	++
8	CVP004A	2012/1/2	-
9	CVP004B	2012/1/2	-
10	CVP005A	20/2/2012	-
11	CVP005B	2012/2/2	-
12	CVP006A	2012/1/2	-
13	CVP007A	2012/1/2	-
14	CVP008A	2012/1/2	-
15	CVP009A	2012/1/2	-
16	CVP010A	2012/3/2	-
17	CVP011A	2012/1/2	-
18	CVP010B	2012/3/2	-
19	CVP012A	2012/1/2	+++
20	CVP012B	2012/3/2	-
21	CVP011B	2012/3/2	-
22	CVP013A	2012/3/2	-
23	CVP013B	2012/3/2	-
24	CVP014A	2012/3/2	-
25	CVP015A	2012/3/2	-
26	CVP016A	2012/3/2	-
27	CVP017A	2012/3/2	-
28	CVP018A	20/2/2012	-
29	CVP019A	20/2/2013	-
30	CVP020A	2012/4/2	-
31	CVP017B	2012/4/2	-
32	CVP021A	2012/4/2	+
33	CVP022A	13/2/2012	-
34	CVP021B	14/2/2012	-
35	CVP020B	14/2/2012	-
36	CVP023A	14/2/2012	+++
37	CVP016B	13/2/2012	-
38	CVP019B	14/2/2012	-

SECOND RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP001A	2012/9/2	++
CVP001B	2012/8/2	-
CVP002A	2012/8/2	-
CVP003C	2012/9/2	+++
CVP002C	2012/4/2	-
CVP003A	2012/2/2	-
CVP003B	2012/8/2	+++
CVP004A	2012/8/2	-
CVP004B	2012/8/2	-
CVP005A	20/2/2012	-
CVP005B	2012/8/2	-
CVP006A	2012/8/2	-
CVP007A	2012/8/2	-
CVP008A	2012/8/2	-
CVP009A	2012/8/2	-
CVP010A	2012/9/2	-
CVP011A	2012/8/2	-
CVP010B	2012/9/2	-
CVP012A	2012/8/2	+++
CVP012B	2012/9/2	-
CVP011B	2012/4/2	-
CVP013A	2012/9/2	-
CVP013B	2012/9/2	-
CVP014A	13/2/2012	-
CVP015A	13/2/2012	-
CVP016A	2012/9/2	-
CVP017A	2012/9/2	-
CVP018A	2012/7/3	-
CVP019A	2012/9/2	-
CVP020A	13/2/2012	-
CVP017B	13/2/2012	-
CVP021A	13/2/2012	-
CVP022A	24/2/2012	-
CVP021B	27/2/2012	-
CVP020B	24/2/2012	-
CVP023A	27/2/2012	-
CVP016B	24/2/2012	-
CVP019B	24/2/2012	-

THIRD RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP001A	2012/9/2	+++
CVP001B	20/2/2012	-
CVP002A	2012/9/2	-
CVP003C	13/2/2012	+++
CVP002C	13/2/2012	-
CVP003A	2012/8/2	-
CVP003B	2012/9/2	+++
CVP004A	13/2/2012	-
CVP004B	2012/9/2	-
CVP005A	29/2/2012	-
CVP005B	20/2/2012	-
CVP006A	20/2/2012	-
CVP007A	20/2/2012	-
CVP008A	20/2/2012	-
CVP009A	20/2/2012	-
CVP010A	13/2/2012	-
CVP011A	2012/8/2	-
CVP010B	13/2/2012	-
CVP012A	20/2/2012	+++
CVP012B	13/2/2012	-
CVP011B	13/2/2012	-
CVP013A	13/2/2012	-
CVP013B	20/2/2012	-
CVP014A	16/3/2012	-
CVP015A	16/3/2012	-
CVP016A	16/3/2012	-
CVP017A	16/3/2012	-
CVP018A	16/3/2012	-
CVP019A	16/3/2012	-
CVP020A	16/3/2012	-
CVP017B	16/3/2012	-
CVP021A	16/3/2012	-
CVP022A	14/3/2012	+++
CVP021B	16/3/2012	-
CVP020B	16/3/2012	-
CVP023A	14/3/2012	+
CVP016B	14/3/2012	-
CVP019B	16/3/2012	-

NUMBER	FIRST RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
39	CVP023B	14/2/2012	+
40	CVP024A	14/2/2012	-
41	CVP025A	14/2/2012	+++
42	CVP026A	14/2/2012	+++
43	CVP024B	14/2/2012	-
45	CVP027A	14/2/2012	-
46	CVP016C	14/2/2012	-
47	CVP028A	14/2/2012	+++
48	CVP029A	14/2/2012	-
49	CVP030A	14/2/2012	-
50	CVP031A	14/2/2012	-
51	CVP032A	14/2/2012	-
52	CVP033A	31/07/12	-
53	CVP034A	25/7/12	-
54	CVP026B	18/7/12	-
55	CVP035A	25/7/12	-
56	CVP036A	25/7/12	-
57	CVP037A	25/7/12	-
58	CVP038A	25/7/12	-
59	CVP039A	25/7/12	-
60	CVP033B	25/7/12	-
61	CVP040A	25/7/12	-
62	CVP031B	25/7/12	-
63	CVP041A	18/7/12	-
64	CVP042A	25/7/12	-
65	CVP020C	2013/8/1	+++
66	CVP043A	18/7/12	-
67	CVP044A	16/7/12	-
68	CVP045A	18/7/12	-
69	CVP044B	18/7/12	-
70	CVP046A	18/7/12	-
71	CVP047A	31/07/12	-
72	CVP048A	16/7/12	+
73	CVP043B	18/7/12	-
74	CVP045B	18/10/2012	-
75	CVP050A	25/7/12	-
76	CVP049A	18/7/12	+++

SECOND RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP023B	27/2/2012	-
CVP024A	29/2/2012	+
CVP025A	24/2/2012	+++
CVP026A	27/2/2012	+++
CVP024B	2012/7/3	-
CVP027A	27/2/2012	-
CVP016C	27/2/2012	-
CVP028A	24/2/2012	+++
CVP029A	2012/7/3	-
CVP030A	27/2/2012	-
CVP031A	29/2/2012	-
CVP032A	2012/7/3	-
CVP033A	27/2/2012	-
CVP034A	2012/9/8	-
CVP026B	2012/9/8	-
CVP035A	14/8/2012	-
CVP036A	14/8/2012	-
CVP037A	14/8/2012	-
CVP038A	14/8/2012	-
CVP039A	14/8/2012	-
CVP033B	14/8/2012	-
CVP040A	14/8/2012	-
CVP031B	14/8/2012	-
CVP041A	2012/9/8	-
CVP042A	4/9/2012	-
CVP020C	16/01/2013	+
CVP043A	14/8/2012	-
CVP044A	14/08/2012	++
CVP045A	18/10/2012	-
CVP044B	2012/6/9	+
CVP046A	2012/9/8	-
CVP047A	18/10/2012	-
CVP048A	5/9/2012	++
CVP043B	2012/6/9	-
CVP045B	2012/1/12	-
CVP050A	14/8/2012	-
CVP049A	14/8/2012	++

THIRD RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP023B	16/3/2012	-
CVP024A	16/3/2012	-
CVP025A	16/3/2012	+++
CVP026A	16/3/2012	+++
CVP024B	16/3/2012	-
CVP027A	14/3/2012	-
CVP016C	14/3/2012	-
CVP028A	14/3/2012	+++
CVP029A	14/3/2012	-
CVP030A	14/3/2012	-
CVP031A	14/3/2012	-
CVP032A	14/3/2012	-
CVP033A	14/3/2012	-
CVP034A	11/9/2012	-
CVP026B	12/9/2012	-
CVP035A	5/9/2012	-
CVP036A	4/9/2012	-
CVP037A	4/9/2012	-
CVP038A	4/9/2012	-
CVP039A	4/9/2012	-
CVP033B	4/9/2012	-
CVP040A	4/9/2012	-
CVP031B	4/9/2012	-
CVP041A	12/9/2012	+
CVP042A	2012/9/8	-
CVP020C	17/01/2013	+
CVP043A	4/9/2012	-
CVP044A	5/9/2012	+++
CVP045A	2012/5/12	-
CVP044B	12/9/2012	+++
CVP046A	5/9/2012	-
CVP047A	2012/5/12	-
CVP048A	2012/11/9	-
CVP043B	2012/12/9	++
CVP045B	2012/5/12	-
CVP050A	4/9/2012	-
CVP049A	5/9/2012	+++

NUMBER	FIRST RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
77	CVP048B	18/7/12	+++
78	CVP051A	25/7/12	-
79	CVP041B	18/10/2012	-
80	CVP051B	25/7/12	-
81	CVP045C	18/10/2012	-
82	CVP005C	25/7/12	-
83	CVP053A	25/7/12	-
84	CVP052A	25/7/12	-
85	CVP054A	31/7/12	-
86	CVP061A	25/7/12	-
87	CVP060A	31/7/12	+
88	CVP055A	25/7/12	-
89	CVP059A	25/7/12	-
90	CVP057A	25/7/12	-
91	CVP058A	31/7/12	+++
92	CVP056A	31/7/12	-
93	CVP055B	31/07/12	-
94	CVP062A	31/7/12	+
96	CVP058B	25/7/12	+
97	CVP055C	25/7/12	-
98	CVP064A	31/07/12	-
99	CVP057B	25/7/12	-
100	CVP063A	31/7/12	-
101	CVP066A	31/7/12	-
102	CVP065A	31/7/12	-
103	CVP026C	31/7/12	-
104	CVP068A	18/10/2012	-
105	CVP064B	18/10/2012	-
106	CVP067A	18/10/2012	-
107	CVP052B	18/10/2012	-
108	CVP056B	28/11/2012	-
109	CVP067B	28/11/2012	-
110	CVP004C	28/11/2012	-
111	CVP72A	16/01/2013	-
112	CVP070A	17/01/2014	-
113	CVP71A	16/01/2013	-
114	CVP006B	17/01/2013	-

SECOND RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP048B	14/8/2012	++
CVP051A	14/8/2012	-
CVP041B	28/11/2012	-
CVP051B	2012/9/8	-
CVP045C	28/11/2012	-
CVP005C	14/08/2012	-
CVP053A	14/8/2012	-
CVP052A	14/8/2012	-
CVP054A	2012/6/9	-
CVP061A	5/9/2012	-
CVP060A	22/8/2012	-
CVP055A	14/8/2012	-
CVP059A	14/8/2012	-
CVP057A	14/8/2012	-
CVP058A	22/8/2012	+
CVP056A	22/8/2012	++
CVP055B	14/8/2012	-
CVP062A	22/8/2012	+
CVP058B	14/8/2012	-
CVP055C	22/8/2012	-
CVP064A	22/8/2012	-
CVP057B	14/8/2012	++
CVP063A	22/8/2012	-
CVP066A	22/8/2012	-
CVP065A	22/8/2012	-
CVP026C	22/8/2012	-
CVP068A	28/11/2012	-
CVP064B	28/11/2012	-
CVP067A	2012/1/12	-
CVP052B	28/11/2012	-
CVP056B	2012/11/12	-
CVP067B	28/11/2012	-
CVP004C	2012/11/12	-
CVP72A	17/01/2013	-
CVP070A	18/01/2013	-
CVP71A	17/01/2013	-
CVP006B	18/01/2013	-

THIRD RUN		
SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
CVP048B	5/9/2012	-
CVP051A	4/9/2012	-
CVP041B	2012/5/12	-
CVP051B	11/9/2012	-
CVP045C	2012/5/12	-
CVP005C	4/9/2012	-
CVP053A	2012/4/9	-
CVP052A	2012/4/9	-
CVP054A	12/9/2012	-
CVP061A	2012/12/9	-
CVP060A	12/9/2012	-
CVP055A	4/9/2012	-
CVP059A	4/9/2012	-
CVP057A	4/9/2012	-
CVP058A	4/9/2012	+
CVP056A	2012/9/8	+++
CVP055B	5/9/2012	-
CVP062A	18/10/2012	+++
CVP058B	11/9/2012	-
CVP055C	11/9/2012	-
CVP064A	11/9/2012	-
CVP057B	5/9/2012	+++
CVP063A	11/9/2012	-
CVP066A	11/9/2012	-
CVP065A	12/9/2012	-
CVP026C	12/9/2012	-
CVP068A	2012/5/12	-
CVP064B	2012/5/12	-
CVP067A	2012/5/12	-
CVP052B	2012/11/12	-
CVP056B	2013/3/1	-
CVP067B	2013/3/1	-
CVP004C	2013/3/1	-
CVP72A	18/01/2013	-
CVP070A	30/01/2013	-
CVP71A	18/01/2013	-
CVP006B	30/01/2013	-

Fold induction

-: 0 - 10

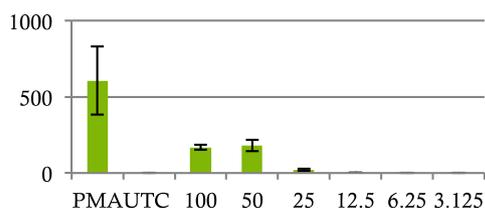
+: 10 - 50

++: 50 - 100

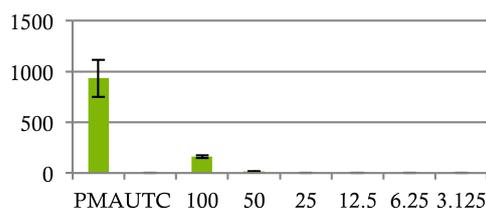
+++: >100

1次スクリーニングの結果、10種に強い刺激作用が認められた。2次スクリーニングでは、ヘキサン(H)、クロロホルム(C)、酢酸エチル(E)、水(A)画分への分画作業をCSRPMへ依頼した。これら10種のうち4種まで分画作業が終了し、野口研まで届けられた。直ちにこの4種16検体を試験し、以下の結果を得た。

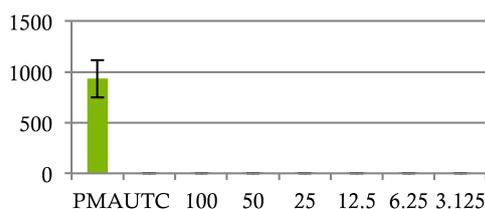
CVP028AA



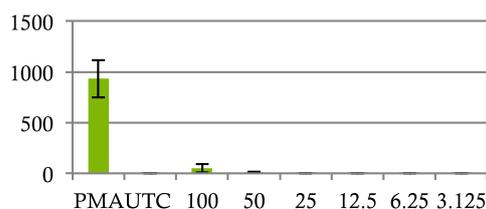
CVP028AE



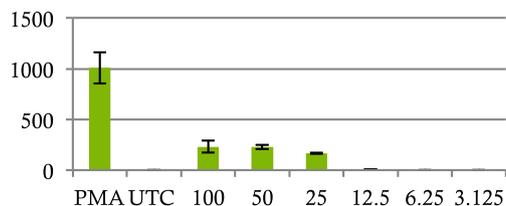
CVP028AC



CVP028AH



CVP028A



検体 CVP028A の例

表 2 分画産物の 2 次スクリーニング試験結果

NUMBER	FIRST RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
1	CVP001A(A)	10/01/2013	-
2	CVP001A(C)	10/01/2013	-
3	CVP001A(E)	10/01/2013	-
4	CVP001A(H)	10/01/2013	-
5	CVP003B(A)	10/01/2013	+++
6	CVP003B(C)	10/01/2013	+++
7	CVP003B(E)	10/01/2013	+
8	CVP003B(H)	10/01/2013	+++
9	CVP028A(A)	10/01/2013	+++
10	CVP028A(C)	10/01/2013	-
11	CVP028A(E)	10/01/2013	+++
12	CVP028A(H)	10/01/2013	+++
13	CVP012A(A)	07/08/2012	++
14	CVP012A(C)	07/08/2012	+++
15	CVP012A(E)	07/08/2012	+++
16	CVP012A(H)	07/08/2012	+++

NUMBER	SECOND RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
1	CVP001A(A)	11/01/2013	-
2	CVP001A(C)	11/01/2013	-
3	CVP001A(E)	11/01/2013	-
4	CVP001A(H)	11/01/2013	-
5	CVP003B(A)	11/01/2013	+++
6	CVP003B(C)	11/01/2013	+++
7	CVP003B(E)	11/01/2013	++
8	CVP003B(H)	11/01/2013	+
9	CVP028A(A)	11/01/2013	+++
10	CVP028A(C)	11/01/2013	-
11	CVP028A(E)	11/01/2013	+++
12	CVP028A(H)	11/01/2013	+++
13	CVP012A(A)	31/01/2013	+++
14	CVP012A(C)	31/01/2013	+++
15	CVP012A(E)	31/01/2013	+++
16	CVP012A(H)	31/01/2013	+++

NUMBER	THIRD RUN		
	SAMPLE ID	DATE TESTED	RESULTS
1	CVP001A(A)	16/01/2013	-
2	CVP001A(C)	16/01/2013	-
3	CVP001A(E)	16/01/2013	-
4	CVP001A(H)	16/01/2013	-
5	CVP003B(A)	16/01/2013	++
6	CVP003B(C)	16/01/2013	+++
7	CVP003B(E)	16/01/2013	+
8	CVP003B(H)	16/01/2013	-
9	CVP028A(A)	16/01/2013	+++
10	CVP028A(C)	16/01/2013	-
11	CVP028A(E)	16/01/2013	+++
12	CVP028A(H)	16/01/2013	++
13	CVP012A(A)	06/02/2013	+++
14	CVP012A(C)	06/02/2013	+++
15	CVP012A(E)	06/02/2013	+++
16	CVP012A(H)	06/02/2013	+++

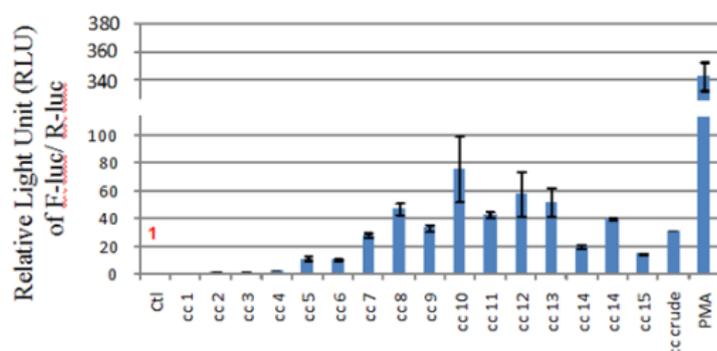
分画された 4 種の抽出物のうち、3 種で分画中に活性が確認された。今後はカラム分画や HPLC 等を用いて更なる分画を進め、活性物質の単離同定をめざす。

日本側での植物抽出物による潜伏プロウイルス活性化

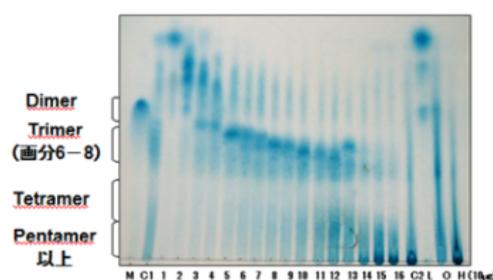
平成23年度までに、植物Aの抽出物を更に精製、分離することでどのような画分に刺激する作用があるのかを検討してきた。材料としてスリランカ産の未発酵の乾燥植物Aを用い、候補化合物Bの重合度別に抽出して得られた画分で潜伏感染細胞株 JLR 細胞を処理し、レポーター遺伝子発現と western blotting でプロウイルス遺伝子発現誘導能を調べたところ、3量体以上で強い活性が認められた。さらに、植物A由来成分によるプロウイルス発現誘導に転写因子 NF- κ B が関与することを、NF- κ B 特異的阻害蛋白質 Super repressor form of I κ B α (SR)を発現する JLR-2 を用いて明らかにした。

平成24年度は、植物A抽出物中のプロウイルス遺伝子の発現を誘導する成分を特定する目的で更なる精製、分離を行った。先の2次スクリーニングで活性が見られた水分画に含まれる候補化合物Bを重合度に基づいて精製するため、長崎国際大学にてサイズ排除クロマトグラフィーにより16の画分に分離した。潜伏感染モデル細胞をこれら分画で刺激すると、分画5以上で刺激した際プロウイルス遺伝子の発現が認められた(図1a)。薄層クロマトグラフィーを行い各分画に含まれる候補化合物B重合体の分布を確認した所、分画5-8は細胞内への吸収が期待できる三量体を多く含んでいる事が確認された(図1b)。

図1 a

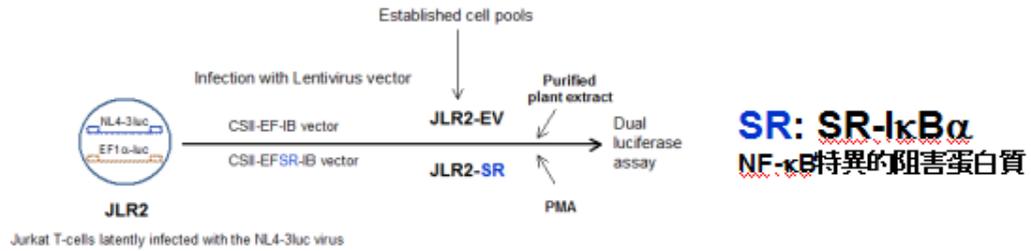


b

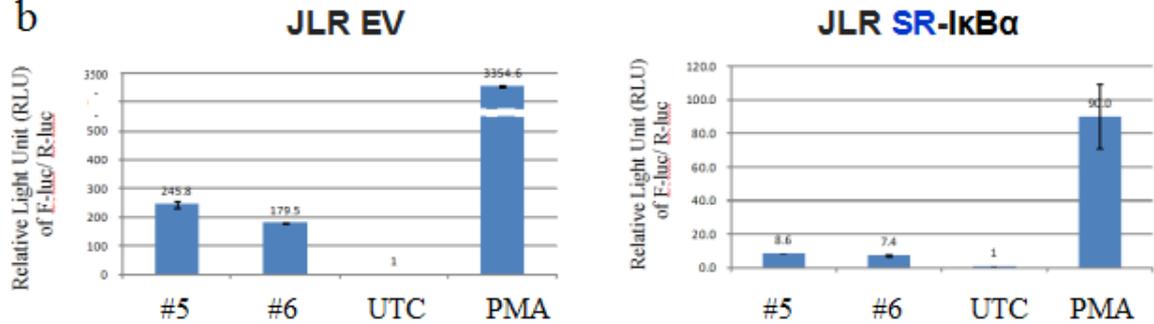


活性分画によるプロウイルス遺伝子の発現誘導に転写因子 NF- κ B 活性が重要か検討するため、潜伏感染モデル細胞に NF- κ B 特異的阻害蛋白質 (SR) の発現ベクターを導入した(図2a)。SR 導入細胞では、抽出物(分画5, 6)で刺激した際にプロウイルス遺伝子の発現が著しく低下することから、転写因子 NF- κ B が活性分画によるプロウイルス遺伝子発現誘導に重要な役割を果たしている事が示唆された(図2b)。

図 2 a

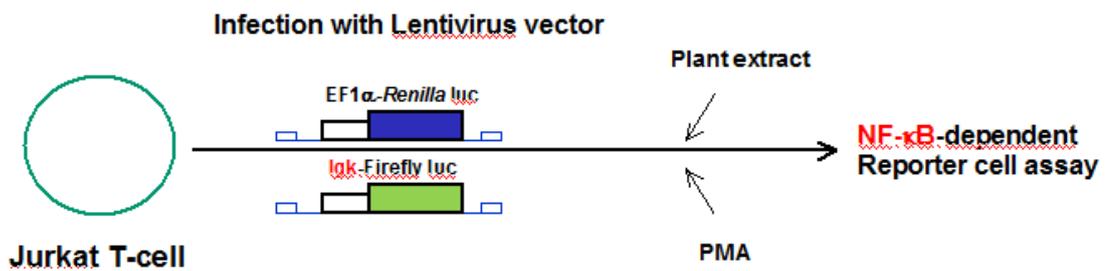


b

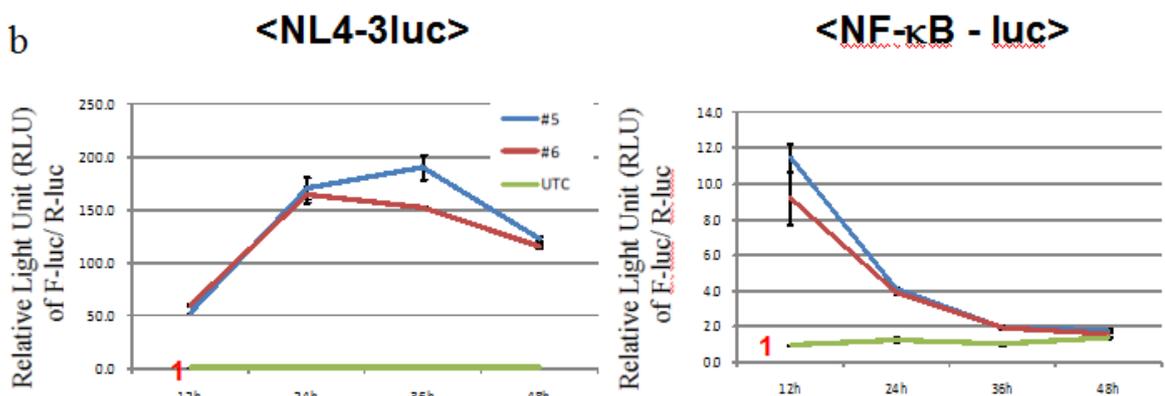


NF-κB により発現が制御される遺伝子産物には炎症性サイトカインも含まれ、NF-κB の持続的な活性化はサイトカインストームの原因となりうる。非感染細胞内での活性分画による NF-κB 依存的遺伝子発現を解析するため、レポーター細胞を作成した(図 3a)。潜伏感染モデル細胞とこのレポーター細胞を抽出物(活性分画)で刺激し、レポーター遺伝子の発現動態を比較したところ、潜伏感染モデル細胞でのプロウイルス内レポーター遺伝子の発現誘導は持続的であったが、NF-κB 依存的レポーター遺伝子の発現誘導は一過性であった(図 3b)。植物 A 抽出物による持続的なプロウイルスの持続的発現誘導は、刺激後初期に発現した HIV-1 遺伝子産物 Tat による LTR からの mRNA 伸長促進の影響を強く受けているためと考えられる。

図 3 a

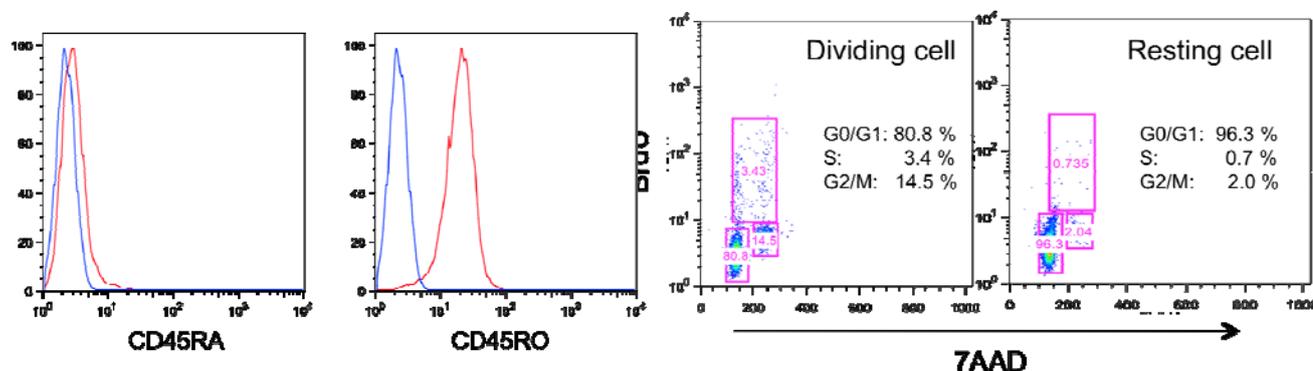


b



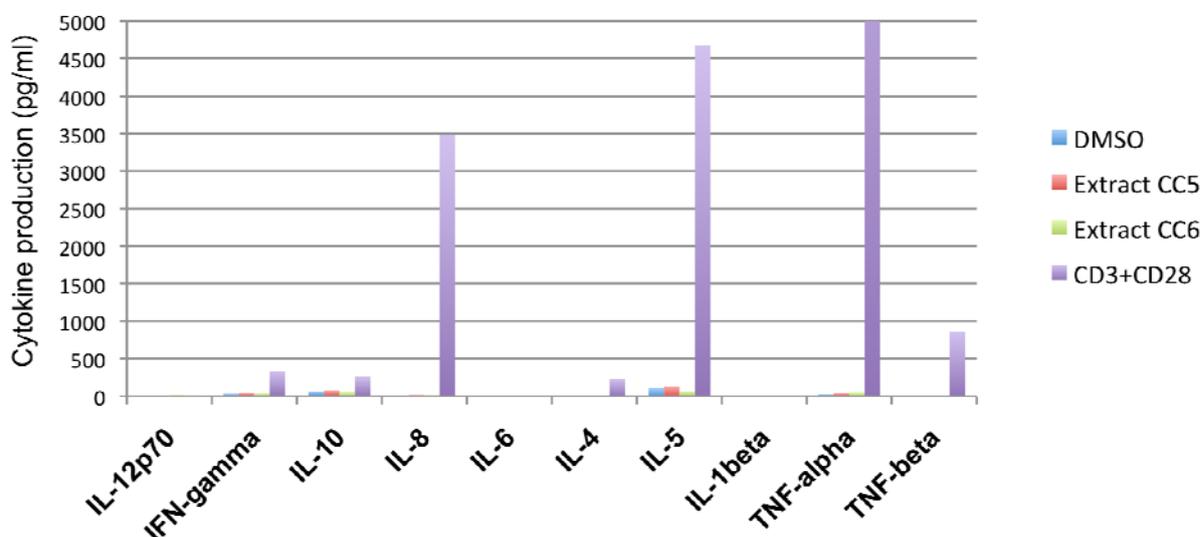
健常人末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞株の樹立と解析

昨年度までに樹立した健常人末梢血由来の IL-2 依存性 CD4 陽性 T 細胞株（株名 LTiT）は、CD45RA(-)CD45RO(+)のメモリーT細胞の形質を持ち長期の培養に耐え維持可能である。LTiT細胞は無刺激の状態では増殖が遅く CD3/CD28 刺激に応じて増殖が再開することから、機能性の抗原特異的 T 細胞株と考えられる。この細胞株に VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 を感染させると、リンフェラーゼ活性が検出され、HIV-1 感染感受性であることが分かった。また、CD3 刺激によりリンフェラーゼ活性は増強し、T 細胞受容体の抗原刺激に応じて HIV-1 発現の増加をモニターできることが分かった。平成 24 年度は、この細胞株を用いて、HIV-1 潜在感染 T 細胞の特徴とされる静止期のメモリーT細胞の状態を誘導する条件を検討し、細胞周期を静止させることに成功しその成果を第 60 回ウイルス学会で報告した（下図）。現在 LTiT 細胞に VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 を感染させ、静止期および増殖期の HIV-1 発現状態をモニターしている。



また、ハーブ抽出物の影響を調べる際、細胞毒性や過剰なサイトカイン産生が問題となる可能性があるため、LTiT細胞のサイトカイン産生を調べた。その結果、LTiT細胞は、CD3/CD28 抗体刺激によって上清中に高濃度 (3000 pg/ml 以上) の TNF-alpha、IL-5、IL-8、その他 200~800 pg/ml の TNF-beta、IFN-gamma、IL-4、IL-10 を産生した（下図）。しかし、これまでに腫瘍性 T 細胞株のシステムを用いてスクリーニングされたハーブ抽出物候補の植物 A 由来有効画分 (25 µg/mL) を LTiT 細胞に添加したところ、上記のサイトカインの産生はいずれも 200 pg/ml 以下であった（下図）。従って、これらの抽出物は T 細胞に対して過剰なサイトカイン産生は誘発しないことが分かった。

Effects of herb-extracts in non-malignant T cells



今後、静止期、増殖期の LTiT 細胞株への HIV-1 持続感染のカイネティクスおよび HIV-1 遺伝子発現状態の解析を行い、ハーブ抽出物候補の HIV-1 潜在感染 T 細胞に対する効果を、より生体に近い T 細胞で検証したい。

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)

平成24年9月の野口研リサーチアシスタント(RA)交代に伴って潜伏感染実験系に関する技術指導を改めて行い、データ処理等の技術指導も行った。平成25年2月から3月にかけて、野口研 Research Fellow である Odoom 博士を東京医科歯科大学ウイルス制御学教室に4週間招聘し、細胞培養、dual luciferase assay、western blotting など多岐にわたる技術指導を行った。

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

特記事項無し。

(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

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。本研究ではガーナ産薬用植物の抗トリパノソーマ活性に関する生物学的機序を解析し、効果を示す植物の薬効機序の解析、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と新規薬剤開発を視野に入れた有効薬用成分の同定を目的としている。

これまでに、導入された Alamar blue 殺原虫活性評価システム、FACS によるアポトシス、細胞周期解析システム、及び、蛍光免疫染色による形態変化、マーカータンパク質の発現変動観察システムを用いて、日本とガーナ両サイドから上がったスクリーニング候補植物 86 種類、部位別も含め 114 種類についてのスクリーニングを完了した。日本産薬用植物より数種の抗寄生虫活性成分を同定した。可及的に異なるアッセイ系で毒性と抑制効果の比較確認を行うと同時に、有効成分による抑制メカニズムの寄生虫学的解明を目指す。また、プロジェクト終了までに活性成分を用いた小動物前臨床試験（抗寄生虫活性評価、急性毒性）を野口研で行う。残りの前臨床試験については製薬会社等との共同研究による推進を検討する。

② 研究実施方法

- (1) すべての解析データベースを元に、植物候補（部位選定も含め）数種を選定した上で、分画、成分精製、構造解析へ進めること、また、構造を元に構造活性相関を明らかにすることを目標とした。
- (2) 小動物を用いた抗寄生虫活性評価システム構築を目指し、活性成分同定と同時に速やかに前臨床試験に取りかかる環境整備を行うと同時に、ガーナ国内における生薬登録に必要な粗抽出物についてのデータ蓄積を行う。
- (3) 抗寄生虫活性が示された日本産生薬由来成分を用いて小動物評価システム構築、及び、構造活性相関解析のパイロットサンプルにする。

③ 当初計画の進捗状況

(1) 部位別も含め 114 種類の候補植物から 8 種の抗寄生虫粗抽出物を選定した。そのうち 5 種についてその第 1 段階分画サンプル（ヘキサン、クロロホルム、エチルアセテート及び水）を調製し、アッセイを行ったところ、5 種全てにおいてクロロホルム画分にて最も強い活性が検出された（Table. 1）。上記 8 種のガーナ産候補植物のうち 1 種 CVP005B（植物候補 M; Leave）については、長崎国際大学にてさらに分画精製を進め、計 11 種の精製成分を同定したうち、新規化合物 2 種を含む計 4 種の抗寄生虫活性を有する化合物の同定に成功した（Fig. 1）。また、もっとも活性の強かった ML2-3 にて大変強いアポトシス誘導が観察された（Fig. 2）。さらに、植物候補 M の抗寄生虫活性のメカニズムに α -tubulin 発現抑制と鞭毛形成阻害があり、それによって細胞周期異常（G2/M 期細胞の減少：データ非表示）を起こしてアポトシスを誘導していることが強く示唆された（Fig. 3）。各成分の Jurkat 細胞、HL60 細胞における毒性評価を行った結果、寄生虫に対する有意な殺原虫効果であることが明らかとなった。

Table 1 抗寄生虫活性候補植物 5 種からの分画とアッセイデータ

Crude CODE	Fractions	IC50 [μ g/ml]		Activities
CVP005B	Aquios	254.27	265.26	-
	Bthanol	324.9	268.9	-
	Chroloform	1.212	2.565	+++
	EthACE	14.5		++
	Hexan	3.79		+++
CVP046A	Aquios	92999.11	2375	-
	Bthanol	89.59	26.4	+

	Chloroform	15.14	5.58	+++
	EthACE	29.89	5.72	++
	Hexan	13.07	4.21	+++
CVP037A	Aquios	207.06	737	-
	Chloroform	7.35	4.75	+++
	EthACE	35.51	10	++
	Hexan	7.89	8.5	+++
CVP020B	Aquios	90.15	87.94	+
	Chloroform	38.12	8.22	++
	EthACE	61.79	64.5	+
	Hexan	76.72	16.77	++
CVP017B	Hexan	48.46	40158	
	Chloroform	52.66	19.33	++
	EthACE	35.89	23.47	++

Fig. 1 植物候補 M (CVP005B/JJNC008L)からの分画精製ステップ(NIU にて)

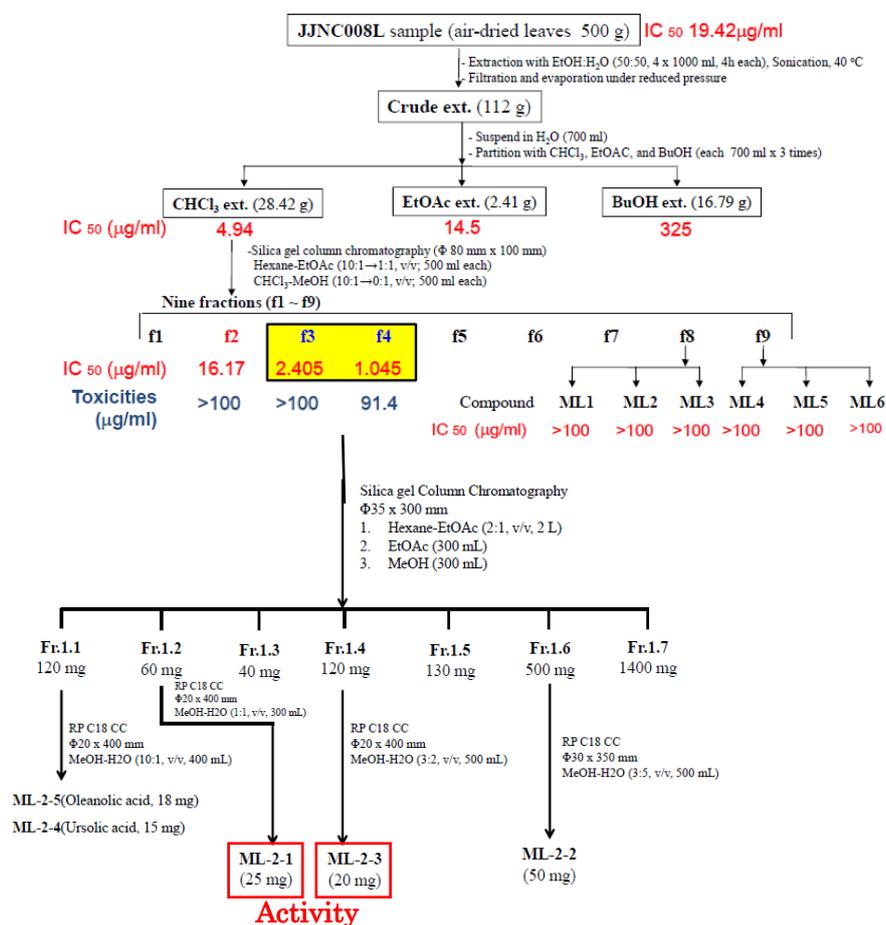


Fig. 2 ML2-2 及び 2-3 のアポトシス誘導解析

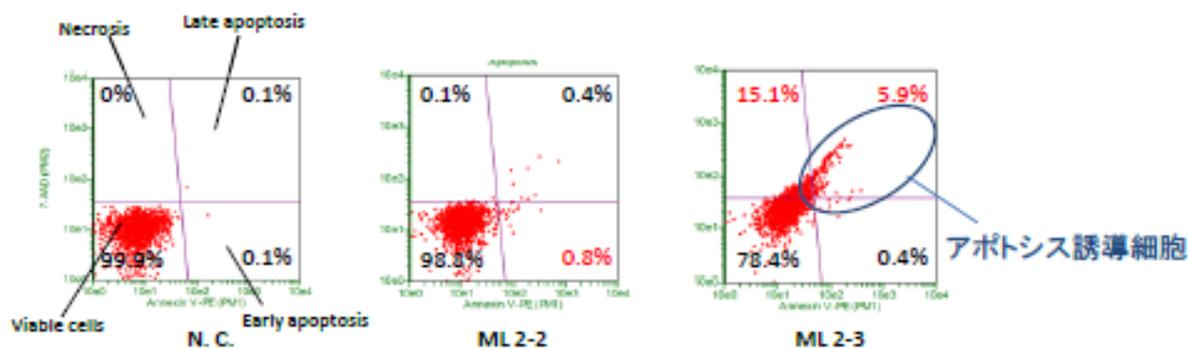
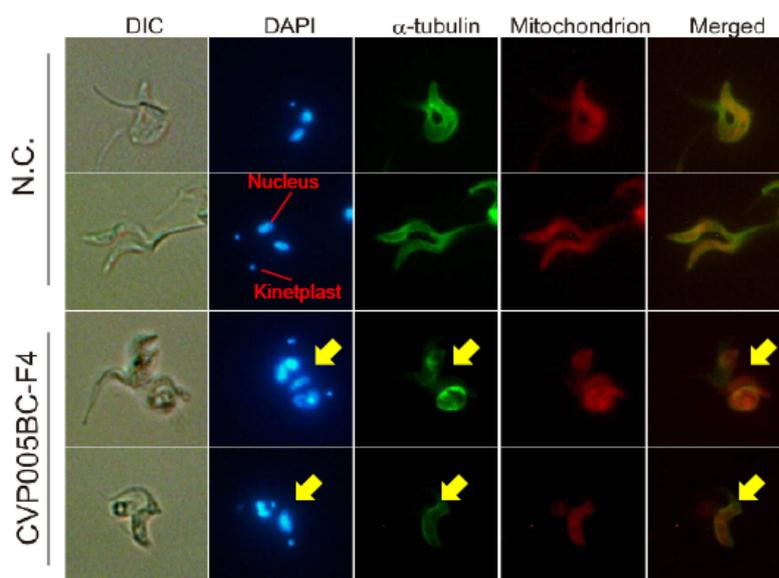


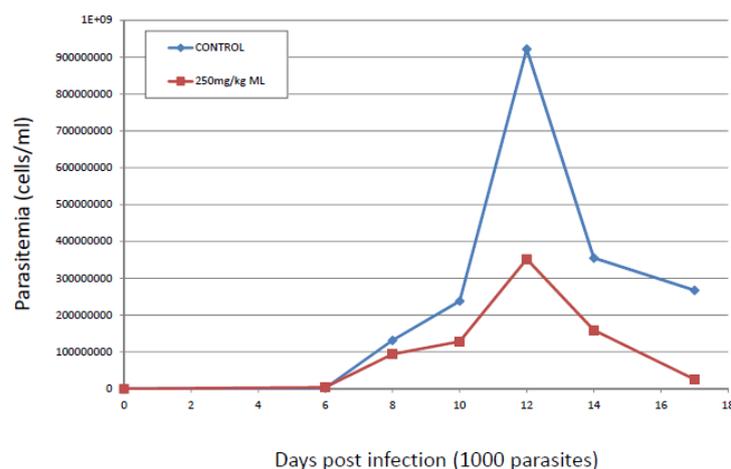
Fig. 3 植物候補 M の抗寄生虫効果のメカニズム解析（表現系とマーカー分子変動の観察）



植物候補 M 粗抽出物の添加によって、鞭毛形成異常によって細胞凝集が起き、細胞増殖が阻害されている。これらの細胞では α -tubulin の発現も抑制されている。

(2) 植物候補 M 粗抽出物について、250 mg/kg 17 日間連続投与（腹腔内投与）で血中トリパノソーマをほぼ完全にクリアすることができ、さらに 5 匹全てが完治する（30 日以上生存確認）ことが明らかとなった(Fig. 4)。現在再現性を確認中である。

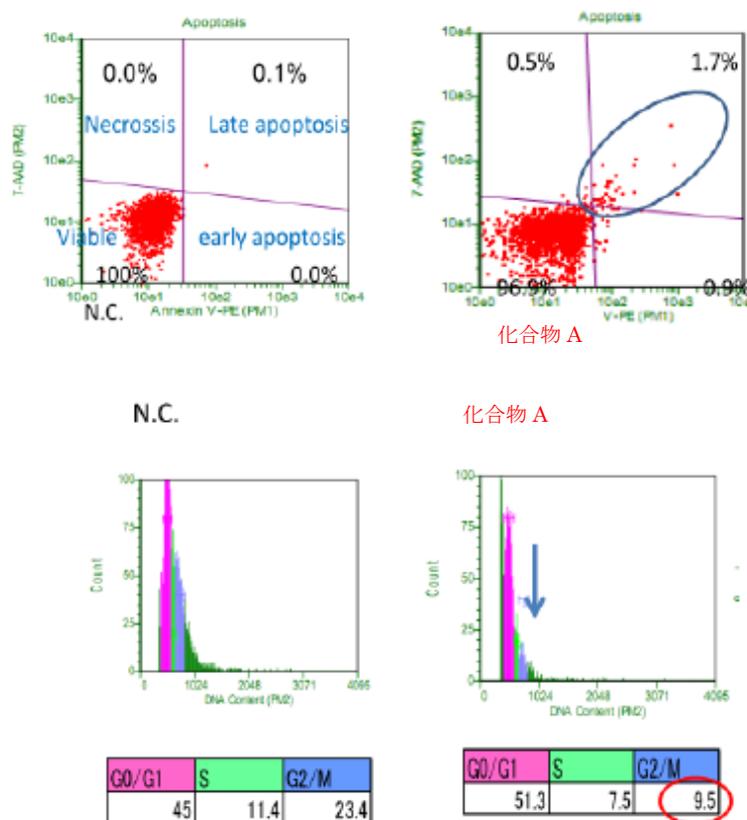
Fig. 4 250 mg/kg 植物候補 M 粗抽出物によるマウストリパノソーマ感染治療実験



ML 粗抽出物を 250 mg/kg daily にてマウス（5 匹）腹腔内投与をトリパノソーマ感染 24 時間前に開始。マウス 5 匹中の parasitemia（血中寄生虫濃度）の平均値にてグラフをプロット。

(3) 日本産植物候補 AJ から 2 種、植物候補 AT から 1 種、植物候補 SA から 3 種の活性成分を得ており、日本産植物候補 AJ で得られた主要活性成分 O を用いて小動物実験評価系構築した。さらに、成分 O に類似の化合物にて抗寄生虫構造活性相関についてのコンピューター解析が進行中である (Fig. 6)。また、植物候補 AT から精製された化合物 A についてアポトシス誘導能と細胞周期異常を検出した (Fig. 7)。さらに蛍光免疫染色による表現系解析によって、血流型トリパノソーマにおいて short stumpy form を誘導することが明らかとなった (Fig. 8)。

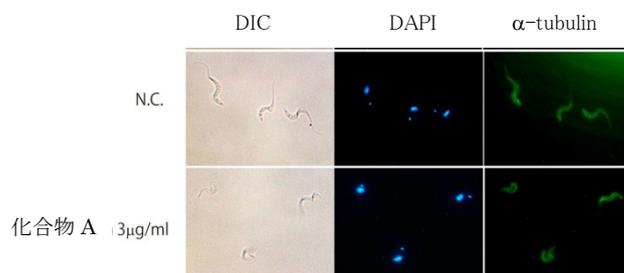
Fig. 7 化合物 A によるアポトシス誘導（上段）と細胞周期異常（下段）



(上段) アポトシス解析—化合物 A 添加 (1µg/ml) によって 2.5% (Late 1.7% +Early 0.9%)

apoptosis)の細胞でアポトシス誘導 (青丸) が観察された
 (下段) 細胞周期解析ー化合物 A 添加 (1 μ g/ml) によって G2/M 期細胞が減少 (青矢印、赤丸)

Fig. 8 化合物 A による short stumpy form トリパノソーマ細胞の誘導



化合物 A 3 μ g/ml 添加後 24 時間の細胞の様子。化合物 A によって、鞭毛が短い形状 (short stumpy form) の細胞が誘導された。short stumpy form 細胞は細胞増殖できないことが知られている。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

野口研に派遣中の本課題の専門家 (鈴木光子) と連携しながらカウンターパートへの技術移転を進めている。上記(1)-(3)で用いた Alamar blue による殺原虫活性評価システム、FACS によるアポトシス、及び細胞周期解析システム、蛍光顕微鏡を用いた蛍光免疫染色の検出システム全てにおいて野口研寄生虫学への導入を完了し、ガーナ産植物を用いたスクリーニングに運用されている状況である。全過程ガーナ人リサーチアシスタント(RA)単独でも進捗させられる技能を有しており、データベースへのデータ集計、管理を全て RA が行っている状況であり、月例進捗リポートおよび月例進捗ミーティングのプレゼンテーションを自力で作成できる。

今年度は動物実験に伴う技術充実を図るため、野口研動物センターより Mr. Believe Ahedor が東京医科歯科大学動物センター及び、国際環境寄生虫病学分野にて主にマウスの組織病理学的解析方法について技術習得を行った。薬剤開発過程において実際に動物を使って効果あるいは毒性を判断する活動 (前臨床試験内容に含まれる) は必須となるが、上記組織学的病理検査に関しては必要な設備としてはパラフィン切片を作成するためのマイクローム (1 台 30 万円程度) と専門的知識さえあれば可能であるにもかかわらず未だ整備されておらず、さらに外注した際は試験 1 回分で約 100 万円もの予算が必要となる。後半のプロジェクト活動に必須の技術であることもさることながら、動物センター、ひいては野口研全体のキャパシティ・ビルディングに大きく貢献することが期待される。

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

今年度に入り、抗寄生虫活性成分の同定に成功した。新規構造を有する化合物でもっとも強い抗寄生虫活性を示し、毒性が少ないこともあり、特許取得の可能性が濃厚となった。元となったガーナ産薬植物候補 M は西アフリカでは大変有名な生薬であり、抗寄生虫活性もすでに報告されている。未だ活性成分は未同定であったが、今年度ナイジェリアのグループより 50% methanol extract によるマウスでの parasitemia 抑制の報告がなされた。一刻も早く有効成分同定の論文発表を行う必要がある状況であるが、論文発表の前の特許取得を考慮すると、関係者の全面的なバックアップを得ながら早急な対応が必要である。

B. 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

研究項目：有効成分の単離精製と構造活性相関解析

①研究のねらい

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すために、リストアップしたガーナ由来薬用植物の採取を進め、各種一次バイオアッセイのために粗抽出粉末調製を行う。期待する効果が得られた植物サンプルについては各種有機溶媒を用いた分画やさらなる精製・単離を行い、バイオアッセイを繰り返すことにより最終的に有効成分の同定を目指す。

【国際共同研究】H21年度は生薬科学研究センター（CSRPM）を視察、予備調査を行い、施設の研究環境整備を行うことを目標とした。H22年度はガーナ由来の伝統生薬から薬用植物候補を選定し、その採集、保管、エキス調製までの方法を確認し、毒性検査及び第一次バイオアッセイを行うためのエキス調製を目標とした。H23年度はH22年度にリストアップした全種類の候補植物採取を進め、さらにバイオアッセイで活性のあった植物サンプルエキス中の活性成分同定に向けて、エキスの画分調製や各種測定機器を用いた活性成分同定法の確立を目標とした。H24年度は薄層クロマトグラフィー（TLC）や高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた植物成分を定性・定量分析するための機器設置・稼働、精製水装置（Elix）の設置・稼働、各種カラムや分取HPLCによる活性成分の精製・分離を行う環境整備を行い、JICA短期専門家による現地での研究指導やガーナ研究者の本邦研修を通して、ガーナ研究者への技術支援・習得を目標に研究を進めた。

【国内研究】

H21年度から引き続き、候補となるハーブの有効成分の特定と構造活性相関解析を目標としている。

②研究実施方法

【国際共同研究】

- 1) 施設環境整備：H21年度に CSRPM を訪問、視察を行い、施設の研究環境整備のための研究機器、試薬等のリストアップを開始した。
- 2) 薬用植物データベースの構築：H22年度は先ず日ガ双方での候補植物絞り込みを行った。長崎国際大学から Monographs on Medicinal Plants、Ghana Herbal Pharmacopoeia、Useful Plants of Ghana 等の書籍を情報源として候補植物を選定し、CSRPM からは List of medicinal plants for HIV-AIDS、Ghanaian plants used in the treatment of trypanosomiasis (sleeping sickness)が提出され、双方を合わせたエクセル管理による薬用植物データベースを構築し、候補植物の採取優先順位を決定した。
- 3) 候補植物の採取、粗エキスの調製：候補植物の採取をガーナ国内で行い（H22年9月から H24年1月まで1～2か月に1度の割合で植物採取可能時季に実施した）、採取されたものから50%エタノールによる植物粗エキス調製を行った。
- 4) 各種有機溶媒での画分調製：採取された植物から順次粗エキス調製を行い、凍結乾燥した粗エ

キス粉末を NMIMR の 3 部門に送り、毒性試験、抗 HIV 活性および抗 *Trypanosoma* 活性評価を行った（第一次スクリーニング）。活性が得られた植物は、水と各種有機溶媒にて順次分配後、画分を調整し、各画分用いて活性評価を行った（第二次スクリーニング）。

5) 植物粗エキスおよび画分のコード化：植物の粗エキス粉末名及び分画粉末名は CSRPM および NMIMR にて二重コード化し、JCC での合意事項に基づき Principal Investigator と位置づけられた野口研所長、CSRPM 所長、チーフアドバイザー、正山のみ閲覧可能とした。

6) 活性が期待される候補植物の第一段階分画の実施：寄生虫病学およびウイルス潜伏感染系において活性が期待される候補植物については、すべて第一段階分画（ヘキサソ、クロロホルム、酢酸エチルと水との分配）を H25 年度以降も CSRPM で実施する。

7) 有効物質の同定：第二次スクリーニングの結果、活性が得られた植物のガーナ国内での再採取を行い、MTA に基づき NIU へ輸送、再分画を行い、NIU で活性成分の精製・分離を実施し、有効物質の同定を行った。その際、新規物質、既知物質の区分、トリパノソーマ、HIV に対する有効性、基原植物の入手容易性、毒性などを NIU で勘案した。H25 年度以降も同様に実施する。

8) 大量活性成分調製：NIU で検証・実施した活性成分の精製・分離方法を CSRPM に技術移転を行い、NMIMR で実験小動物レベルでの毒性試験、抗トリパノソーマ試験を実施するために大量活性成分調製を H25 年度以降は CSRPM で実施する。

9) 分取 HPLC (Agilent 製) を使用した活性成分の精製・分離：植物 A 成分やオープンカラムで単離出来た化合物以外の成分の精製・分離に関して、CSRPM に導入した分取 HPLC は非常に有効である。H25 年度以降は分取 HPLC を使用した活性成分精製・単離を CSRPM で実施する。

【国内研究】

1) 植物 A 粗エキスからの候補化合物 B 重合体の精製・単離および活性評価

山岡らは事業開始前から化合物 B 類の抗ウイルス活性に注目しており、植物 A が候補化合物 B を多く含むことから今後の研究進展には無発酵植物 A の早期入手が不可欠であると考え、アジア熱帯地域の植物研究機関とコンタクトを取り、正山によりスリランカから乾燥無発酵植物 A を入手した。乾燥無発酵植物 A を粉砕後、80%エタノール抽出し、粗エキスを得た。セファデックスを中心としたカラムクロマトを繰り返して、monomer、dimer、trimer、tetramer 等の候補化合物 B 重合体の精製・単離・構造決定を行い、山岡研究室で抗 HIV 活性評価を実施した。さらに、H23 年 12 月、MTA に基づきガーナ産植物 A を NIU へ移送し、ガーナ産植物 A50%エタノール粗エキスを調製し Diaion カラム、ゲルカラムに付し 16 画分を得、山岡研究室で抗 HIV 活性評価を実施した。活性評価後、活性が認められた画分は逆相カラム装着セミ分取 HPLC を用いて単一成分の単離・精製を実施した。

2) 日本産植物候補 AJ 粗エキスからの化合物 D 類の精製・単離および活性評価

抗ウイルス作用が報告されている化合物 D 類は抗 HIV 活性の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、化合物 D 類は抗 *Trypanosoma* 活性が知られている化合物 C（ウコン含有成分）と基本骨格が同一であるため、抗 *Trypanosoma* 活性をも有する可能性があるため、化合物 D 類を高濃度に含有する日本産植物候補 AJ を採取乾燥後、エタノール抽出エキスを調製し、山岡研究室、太田研究室で活性評価を実施した。

3) 駆虫作用を持つ薬用植物を用いた抗 *Trypanosoma* 活性探索研究：植物候補 AT 粗エキスからの

化合物 N 類の精製・単離および活性評価

抗 *Leishmania* 活性が知られている化合物 S を含有する①日本産植物候補 LT と化合物 S の光学活性体である化合物 A を含む②植物候補 AT、1950 年代まで駆虫剤として用いられていた③日本産植物候補 PG、駆虫作用が知られている④日本産植物候補 SH の①～④の 4 種の植物の粗エキスを調製し、太田研究室にて抗 *Trypanosoma* 活性評価を実施した。

また、その他、植物候補 SA 粗エキスから配糖体の精製・単離・構造決定を行い、太田研究室で抗 *Trypanosoma* 活性評価を実施した。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

【候補植物採取状況について】

H 2 2 年 9 月よりリストアップしたガーナ由来薬用植物の採取が開始され、H 2 3 年 8 月の時点では 9 1 種類の候補植物のうち 3 6 種類の植物しか採取されておらず、当初の計画より大幅に遅れていた。そこで、長崎国際大からの短期専門家の訪問時に CSRPM の植物採取担当と話し合い、残り 5 5 種類の植物のうち 32 種類を 2012 年 1 月までに採取完了し、23 植物に関しては市場などで購入することを決定した。ガーナ国内に自生していない 4 種類、入手が極めて困難な 1 種類を除く計 86 種類全ての植物（根、葉、茎、樹皮など各部位毎に採取）を 2013 年 1 月の段階で得ており、植物採取を完了した。

【CSRPM の設備環境整備と研究進捗状況：植物粗エキスおよび分画調製について】

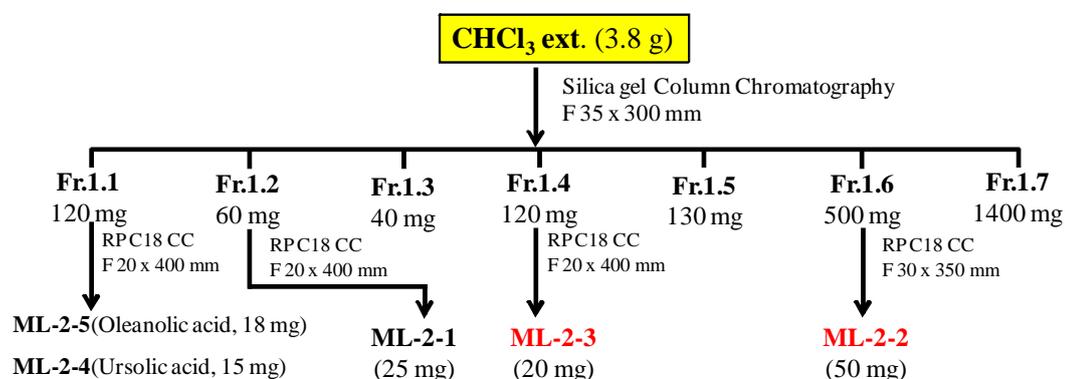
H 2 2 年 9 月、有機溶媒を留去するのに必要なロータリーエバポレーター装置を設置し、翌月から CSRPM において植物粗エキス（50%エタノールエキス）の調製が開始された。しかしながら、粗エキス調製スピードが遅いために NMIMR でのバイオアッセイが遅れ、プロジェクト全体の進行に大きな問題となっていた（3～4 extracts/month）。そこで、短期専門家の現地訪問や CSRPM のフェローの長崎国際大での研修（H 2 3 年 7～9 月）、凍結乾燥装置の導入（H 2 3 年 6 月）により、現地の状況に即した簡便な方法を検討適用した結果、H 2 3 年 9 月以降、バイオアッセイでの初期スクリーニングに必要な十分量を毎月調製することが可能となった（10 extracts/month）。また、NMIMR からの一次スクリーニングの結果、植物粗エキスをヘキサン（H）、クロロホルム（C）、酢酸エチル（E）と水（A）を用いて分配を行い、二次スクリーニング用の H, C, E, A 分画調製を行った（2～3 plants/month）。しかしながら、H 2 4 年 9 月、凍結乾燥機の真空ポンプ故障後は、粗エキス調製は 1～2/month、分画調製は 1 plant/month とスピードが大幅に減少した。そこで、H 2 4 年 9 月、真空ポンプ一台と JCC での合意に基づき二台目となるロータリーエバポレーター装置の本邦調達を進め、H 2 5 年 2 月に真空ポンプ、同年 3 月末ロータリーエバポレーター装置がガーナに到着している。また、H 2 4 年度は、CSRPM の設備環境整備として、分析用 HPLC（東ソー製）、分取 HPLC（Agilent 製）、精製水装置（ミリポア製）を設置し、これら全ての機器の稼働を確認している。

H 2 5 年 1 月時点で、1 1 3 種類の植物粗エキス調製、9 種類の植物の分画調製が完了している。

【有効物質の同定と大量活性成分調製について】

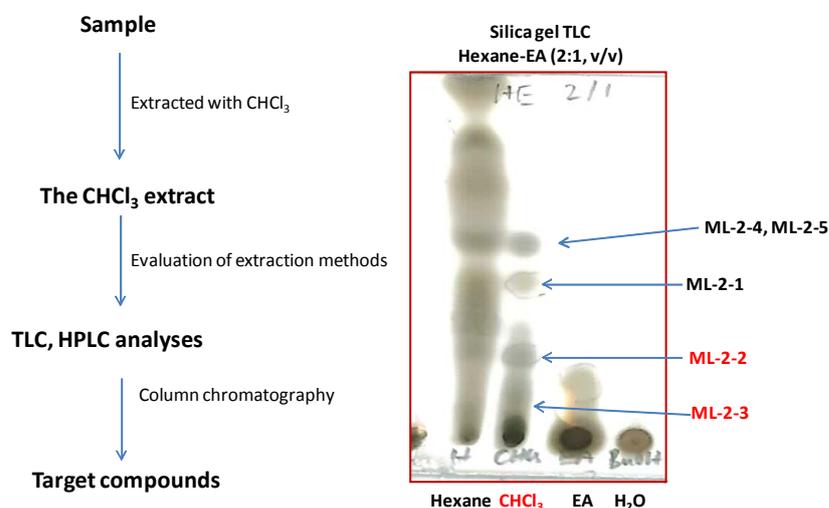
二次スクリーニングの結果、抗 *Trypanosoma* 活性上昇が確認された植物の植物候補 M に関して

は、MTA により乾燥植物粉末を輸送し、NIU にて粗エキスおよび画分調製、順相・逆相ゲルを用いて成分分離・精製を行い、単一成分を得、構造決定を行った（下図参照）。植物候補 M のクロロホルム画分より新規構造を有する 2 種類の化合物（ML-2-2, ML-2-3）を含む 5 種類の単一成分を得た。



植物候補 M クロロホルム画分からの有効物質の分離・精製

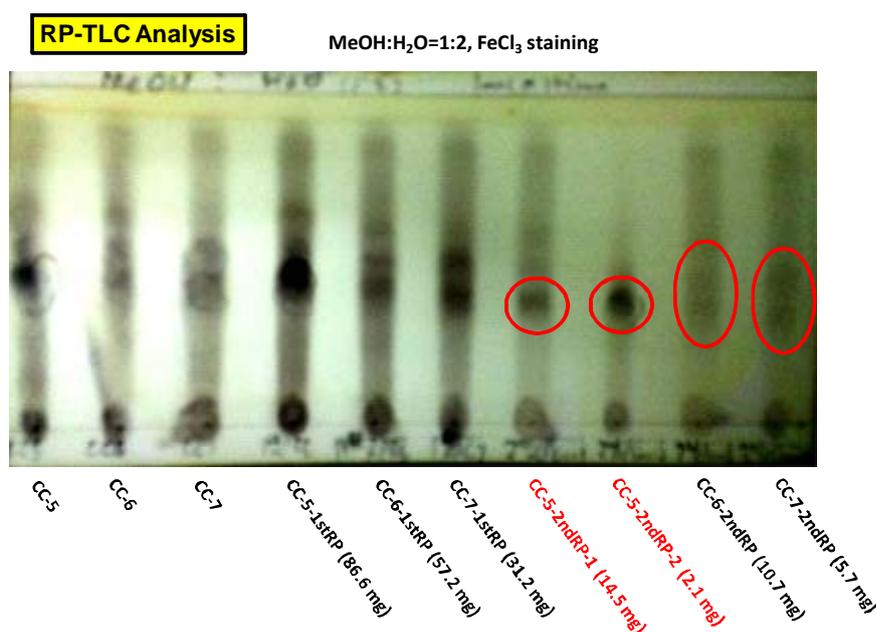
本植物に関しては、大量活性成分調製を CSRPM で実施することを H 2 4 年 1 2 月に決定し、植物再採取、植物粗エキス調製、ヘキサンおよびクロロホルム分画調製を実施完了している（H 2 5 年 3 月）。H 2 5 年 4 月、長崎国際大から 2 名の JICA 短期専門家派遣（Dr.森永および Dr.Tung）を行い、クロロホルム画分からの成分の分離・精製について技術支援を行う。さらに、以下に示す大量精製法を CSRPM で実施し、有効物質の効率的な抽出、分離・精製方法を検討する。



植物候補 M に含まれる有効物質の効率的な大量精製方法

また、MTA により植物 A、CVP046A（全草）を NIU にて抽出、分画を実施し、有効成分の単離・精製、成分同定を進めている。下図は植物 A 粗エキス成分の分離・精製状況で、CC-5~7 はゲルカラム（Toyopearl HW 40F ゲル、オープンカラム使用）による分画、CC-5~7-1stRP は逆相カラム（Synergi 4u Polar-RP 80A）と水-アセトニトリル系溶媒を用いたセミ分取 HPLC による分画、CC-5~7-2ndRP は逆相カラム（Synergi 4u Polar-RP 80A）と水-メタノール系溶媒を用いたセミ分取 HPLC による分画を逆相 TLC で植物 A 由来候補化合物 B を定性分析した結果である。

CC-5-2ndRP-2 では単一成分（今後 NMR 分析を実施予定）、CC-5-2ndRP-1, CC-6-2ndRP, CC-7-2ndRP では複数成分が認められ、さらなる精製の必要性を確認した。アセトニトリルおよびメタノールと溶媒の極性を変えて 2 回の逆相カラムによる精製（1stRP および 2ndRP）を実施したが、植物 A に含まれる候補化合物 B 重合体を分離・精製し、高収量で単一成分を得ることの難しさを昨年度に続き再確認する結果となった。H25 年 2 月に実施した Agilent technologies（東京）での研修から、候補化合物 B の順相カラムでの分離・精製が有効的との知見を得ている。そこで、H25 年度はガーナ産植物 A の再採取、粗エキス調製、順相カラムと分取 HPLC（ガーナ CSRPM に設置済み）を組み合わせた植物 A 由来候補化合物 B の効率的な単離・精製法の確立を目指すと共に、高収量の単一成分の取得を目標に研究を実施する。



植物 A 粗エキスの精製

一方、国内研究による有効成分探索は、1) 植物 A 粗エキスからの候補化合物 B 重合体の単離・精製（スリランカから乾燥無発酵植物 A を入手）、2) 日本産植物候補 AJ 粗エキスからの化合物 D 類の単離・精製（九州大学演習林より日本産植物候補 AJ を分与）、3) 植物候補 AT 粗エキスからの化合物 N 類の単離・精製（ドイツより入手）、4) 植物候補 SA 果実粗エキスから配糖体の単離・精製（タイより入手）、5) その他：日本産植物候補 LT、1950 年代まで駆虫剤として用いられていた日本産植物候補 PG、駆虫作用が知られている日本産植物候補 SH（長崎県下にて採取）の植物粗エキスの調製を行った。これらの植物粗エキス、単一化合物に関しては、東京医科歯科大学および NMIMR にてバイオアッセイ、小動物実験を実施、継続中である。

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）

1) 平成 22 年 9 月：CSRPM への森永短期専門家訪問

(1) 植物抽出エキス調製方法、保存方法の確認及び指導、(2) ターゲット植物（抗 HIV、抗 *Trypanosoma* 活性を目的としたガーナ現地の植物）についての協議、(3) ターゲット植物のリスト管理と指導、(4) 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）など

を主として行った。さらに最新型のロータリーエバポレーターを導入し、その設置、組み立て・動作確認を行った。

2) 平成23年3月：CSRPM への宇都短期専門家訪問

(1)分析用 HPLC (TOSOH 社、Agilent 1120 Compact LC) の立ち上げ、(2)植物エキス調製法の確認と分画法の技術移転、(3)精製水装置導入に向けた現状調査、(4)長崎国際大で研修を受ける研究者の決定と活動内容計画などを主として行った。

3) 平成23年4月

宇都と Dr. George Duker-Eshum (Project Leader of Anti HIV、CSRPM)間のメールで論文等をやり取りし、エキスの画分調整法を検討した。

4) 平成23年5～6月

柏原調整員が CSRPM のスタッフと共に凍結乾燥機の導入を行った。また精製水装置の導入を目指して、本体機器は既にガーナ到着しているので水圧を上げるポンプやプレフィルターの導入を検討した。

5) 平成23年8月：CSRPM への宇都短期専門家訪問

候補植物の採取に関する計画作成とエキス調製のスピードアップを中心に技術指導した。

6) 平成23年8月：CSRPM への森永短期専門家訪問

エキス調製のスピードアップ化と蒸留水装置のセットアップを中心に技術指導した。

7) 平成23年7～9月：Aboagye Frederick Asare 氏が長崎国際大で研修

エキス調製から、分画、成分精製、構造決定まで、植物エキスから精製成分同定までの一連の実験手法を習得した。

8) 平成23年8～12月

森永と Mr.Maxwell、Mr.Richard 間のメールでの毎週の研究内容を確認し、問題点の改善、アドバイス、激励を行い、日-ガ双方での連携強化を目指し、RA への研究指導を行った。

9) 平成23年11月：CSRPM への森永短期専門家訪問

CSRPM 新所長 Edoh 氏への挨拶と分析用 HPLC のセットアップなどを中心に活動した。

10) 平成24年1月：Maxwell Sakiamah 氏が長崎国際大で研修

エキス調製から、分画、成分精製までの実験手法を習得した。

11) 平成24年1～3月：Vincent Tettey 氏が長崎国際大で研修

エキス調製から、分画、成分精製、構造決定まで、植物エキスから精製成分同定までの一連の実験手法を習得した。さらに分析用 HPLC と分取 HPLC の取り扱いを習得した。

12) 平成24年3月：Richard Adegle 氏が長崎国際大で研修

成分精製、構造決定までの実験手法を習得した。

13) 平成24年3月：CSRPM への森永短期専門家訪問

H24年度長崎国際大で研修を受けた CSRPM スタッフの Aboagye Frederick Asare 氏、Vincent Tettey 氏、Maxwell Sakiamah 氏への研修後の技術サポート、CSRPM 研究環境整備(凍結乾燥機、ロータリーエバポレーター、分析用 HPLC のメンテナンスの実施と方法の指導)、Edoh 所長を含む CSRPM 研究プロジェクトメンバーとの現在までの研究進捗状況の確認、H24年度の研究環境整備案についての討論などを中心に活動した。

14) 平成24年7月：CSRPM への宇都短期専門家訪問

昨年度からの懸念事項である精製水装置と分析用 HPLC の稼働を目指し活動を行い、両装置の問題点の抽出を行った。

15) 平成24年8月：CSRPM への森永短期専門家訪問

ソフトウェア等の不良から、分析用 HPLC セットアップが完全ではなかった。TOSOH と対応を協議し、再度セットアップを行い、動作確認を行った。

16) 平成24年10月：CSRPM への森永短期専門家訪問

Agilent 社より、H24年7月に導入・設置された分取 HPLC に関して、Agilent スタッフによる動作確認、CSRPM スタッフ、RA への使用方法説明が不十分であった。そこで、10月の森永専門家のガーナ渡航に合わせてデモンストレーションを再度行うよう Agilent 社に要求を行い、森永専門家立ち合いのもとで実施され、分取 HPLC の稼働を確認した。また、精製水装置の設置、稼働に関して、蛇口直結型加圧ポンプの利用、鈴木専門家の協力のもと実施し、精製水装置が稼働するようになった。

17) 平成25年1～2月：Samuel Kofi Agbeve 氏、Henry Brew Daniels 氏が長崎国際大で研修

分析用 HPLC、セミ分取 HPLC の取り扱い・メンテナンス方法を学び、これらの機器を使用した成分分析、単離・精製技術の一連の流れを習得した。

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(あれば)特になし。

研究項目:ハーブ抽出物及び精製成分の毒性学的研究

①研究のねらい

生薬粗抽出物、分画サンプル及び精製成分を用いて毒性試験を行い、抗ウイルス及び抗寄生虫活性候補物質の使用安全域を確定する。

②研究実施方法

1) サンプル調整と保存

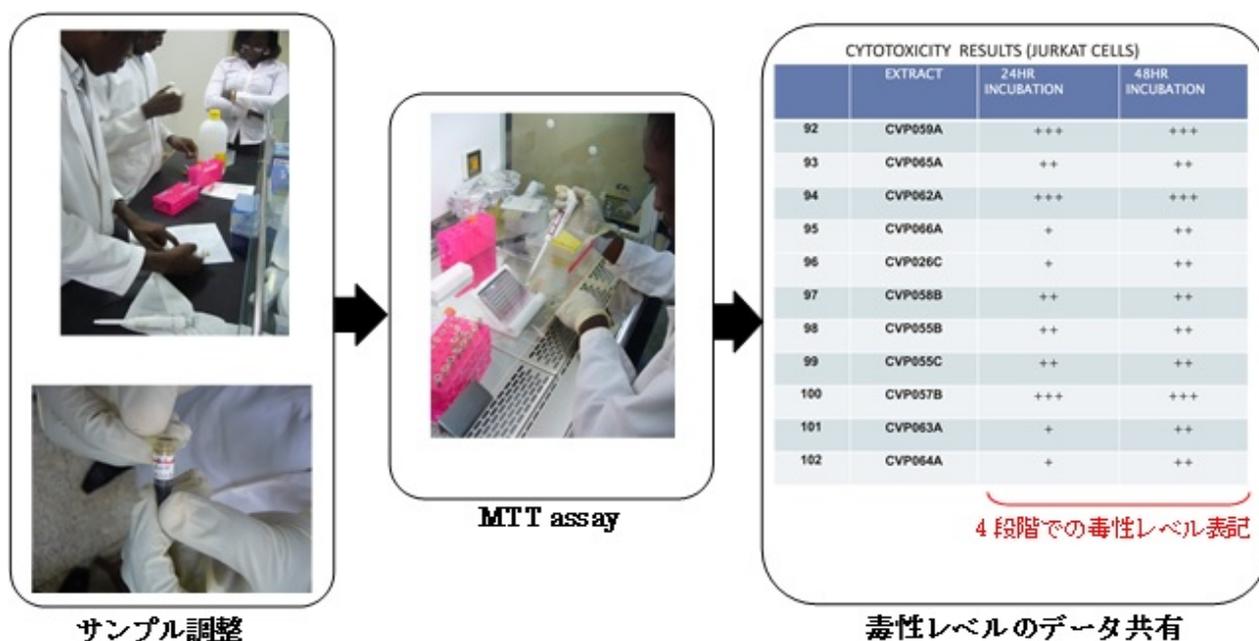
CSRPM より分譲された生薬粗抽出物、分画サンプル及び精製成分を 50% DMSO に溶解し、フィルター滅菌後、保存する。

2) MTT assay

1st スクリーニングにおいてはより迅速な毒性確認のために、Jurkat 細胞のみを用いて行う。96-well plate に播種した Jurkat 細胞(3×10^5 cells/mL)を各サンプル(0-1250 $\mu\text{g/mL}$)で処理し、24 時間及び 48 時間培養後、MTT 法で細胞生存率を測定する。抗ウイルス及び抗寄生虫活性が確認された画分や精製成分においては、接着細胞系を含めた数種のヒト細胞系を用いて毒性試験を行う。

3) データの共有

IC50 値をもとに毒性レベルを 4 段階(100 $\mu\text{g/mL}$ 以下:+++、100~500 $\mu\text{g/mL}$:++, 500~1250 $\mu\text{g/mL}$:+, 1250 $\mu\text{g/mL}$ 以上:-)に分け、Monthly meeting にて他部門とデータを共有する。



③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

プロジェクト開始時は、初期スクリーニングに用いられる50%エタノール抽出エキスの毒性試験を野口研 Clinical pathology 部門にて速やかに行い、寄生虫学及びウイルス学分野にデータを提供しバイオアッセイを行う予定であった。しかしながら、機器調達の遅れ、生薬成分取り扱いの知識不足、不安定なアッセイ系などにより研究進行の遅れが目立った。この状況を解決するために2011年7月の国内研究者ミーティングにおいて、長崎国際大が Clinical pathology 部門をサポートすることになった。決定後、ただちに技術移転に取り組み、日本人短期専門家訪問(2011年8月、12月、2012年7月)及び Clinical pathology 部門4名の長崎国際大での研修(2012年1月～3月、2013年1月～3月)により天然化合物の取り扱いやバイオアッセイ等の技術習得を行った。その結果、安定的なアッセイ系が確保され、毎月10～20サンプルの毒性確認を行えるようになっている。

現在(2013年2月末までの報告)、113の50%エタノール抽出エキス、3分画サンプル、10単一成分の毒性確認を終了している。毒性試験の結果はIC50により4つのレベルに分けられて情報共有されており、Jurkat細胞を用いた113の50%エタノール抽出エキスの初期毒性の結果は、それぞれのサンプルごとに再現性を行っており、全体サンプルの28%(32サンプル)が「+++ (IC50 < 100 µg/mL)」、54%(60サンプル)が「++ (100 < IC50 < 500 µg/mL)」、14%(16サンプル)が「+ (500 < IC50 < 1250 µg/mL)」、4%(5サンプル)が「- (IC50 > 1250 µg/mL)」であった。現在、毒性の高いエキスに関しては、低濃度で毒性レベルを再検討している。

長崎国際大学において抗トリパノソーマ活性のあった植物(植物候補M及び日本産植物候補AJ)から精製成分を得ているが、そのうち一部を毒性確認用として保管し、Clinical pathology 部門から長崎国際大学へ派遣された研究員と共に毒性試験をスタートし(2013年1月～3月)、現在解析を続けている。

今後、Jurkat 以外の細胞系を用いた毒性試験を行う計画であるため、Clinical pathology 部門への細胞株の導入を進めている。日本人短期専門家訪問時、もしくは Clinical pathology 部門4名の長崎国際大での研究後の帰国時において、HL-60、U937、DLD-1、HCT-15、HepG2 のヒト癌細胞株を運搬し、Clinical pathology 部門で増殖後、保存を完了している。

Clinical pathology 部門にプロジェクト開始時に導入された CO2 インキュベーターの CO2 調整機能が故障し、東京医科歯科大より新たに CO2 インキュベーターを導入したが、2013 年 3 月末時点で、電源の不具合が発生し使用できない状況である。細胞培養は寄生虫学部門にて行っており、現在のところ研究進捗には大きな支障はないが、不自由でありコンタミネーションの心配もある。今後の細胞株を増やした毒性試験のためにも、25 年度において早急に新規 CO2 インキュベーターを購入し解決する方針である。

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)

- 1) 2011 年 8 月及び 12 月:日本人短期専門家(長崎国際大・宇都)が訪問し、Clinical pathology 部門での実験系の確立を行った。Clinical pathology 部門と長崎国際大での Protocol の違いを検証し改善するとともに、日本より数種の新たな細胞株を移転することで、安定的にデータを出せるアッセイ系を確保できた。また、機器の作動状況確認と不具合への対応を行った。
- 2) 2012 年 1 月～3 月: Clinical pathology 部門から Dr. Mark Ofosuhen (Research Fellow, 約 2 ヶ月半)、Kofi Baffour-Awuah Owusu (Research Assistant, 2 週間)、Isaac Tuffour (Research Assistant, 2 週間)が長崎国際大学にて研修を行い、浮遊及び接着細胞培養法、各種毒性確認試験、天然化合物の抽出と調整法、Western Blotting、DNA 電気泳動法など多岐に渡る技術指導を行った。
- 3) 2012 年 7 月:日本人短期専門家(長崎国際大・宇都)が訪問し、Clinical pathology 部門にヒト癌細胞株を数種導入し、培養増殖後、保存した。アッセイ系の確認や機器の不具合などを確認し対応した。
- 4) 2013 年 1 月～3 月: Clinical pathology 部門から Abigail Aning (Research Assistant)が長崎国際大学にて研修を行い、浮遊及び接着細胞培養法、各種毒性確認試験等の技術習得を行い、帰国の際に細胞株を運搬し、Clinical pathology 部門で増殖後、保存を進めている。

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(あれば)

特になし

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)
- ③ 論文詳細情報

(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)

① 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：潜伏感染 HIV-1 プロウイルスを活性化する植物成分の解析

抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

HIV-1 感染を抑制する植物成分の解析

抗寄生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の解析

(1) 「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

有効成分の単離精製と構造活性相関解析

ハーブ抽出物及び精製成分の毒性学的研究

以上