

# 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 25 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。

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。

平成 25 年度は、(1) 植物 A から抽出した活性画分から潜伏感染 HIV-1 を活性化する単一分子を精製し、そのメカニズムを解析した、(2)植物粗抽出物から、潜伏感染 HIV-1 を活性化する親水性活性画分 4 件、HIV-1 急性感染を抑制する疎水性活性画分 2 件を抽出した、(3)抗トリパノソーマ活性を有する化合物について米国特許を出願した、(4)さらに強力な抗トリパノソーマ活性を有する化合物を同定した、(4)これらの化合物の一部は抗マalaria、抗リーシュマニア活性を有することを見出した。

## 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 CEM 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。スクリーニングで得られた候補植物について、活性成分の単離のために候補植物の分画試料の感染抑制活性を調べる。

#### 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す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。Jurkat レポーター細胞を使用した際に、陽性コントロールである逆転写酵素阻害剤 AZT の効果が明確に出ないことがあり、平成24年度にその点で問題がない事が判明した別の細胞株(CEM)を用いてスクリーニングを行う事に変更した。

平成25年度は、ガーナ野口研では主に CEM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。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次スクリーニングを終了した結果、感染を抑制する植物抽出物は 113 種中 8 種で見いだされた(Table.1)。8 種中 2 種(CVP035A, CVP047A)について抽出物の濃度に依存的な感染抑制の再現性が見られたため(Fig.1)、この 2 種について優先的に詳細な解析を行っていくこととした。

NO.	SAMPLE ID
1	CVP029A
2	CVP032A
3	<b>CVP035A</b>
4	CVP033B
5	CVP046A
6	<b>CVP047A</b>
7	CVP050A
8	CVP055C

(Table.1) 1 次スクリーニングで感染抑制が観察された検体。

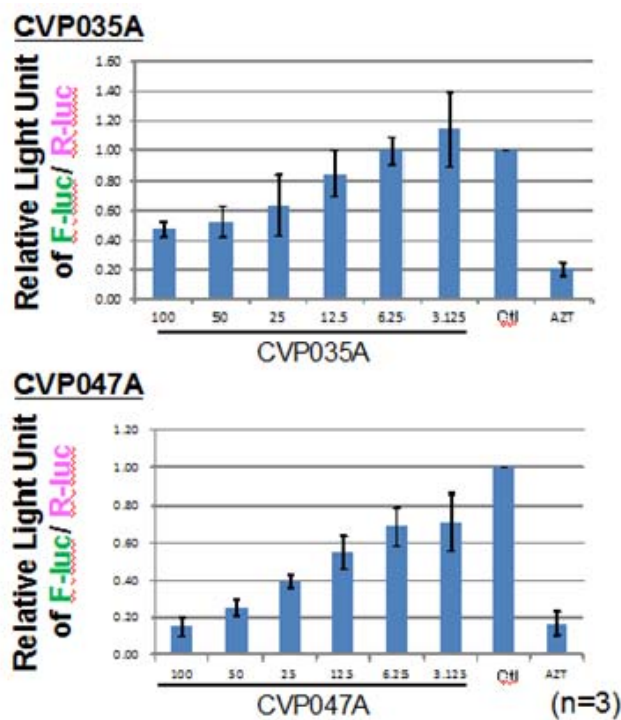
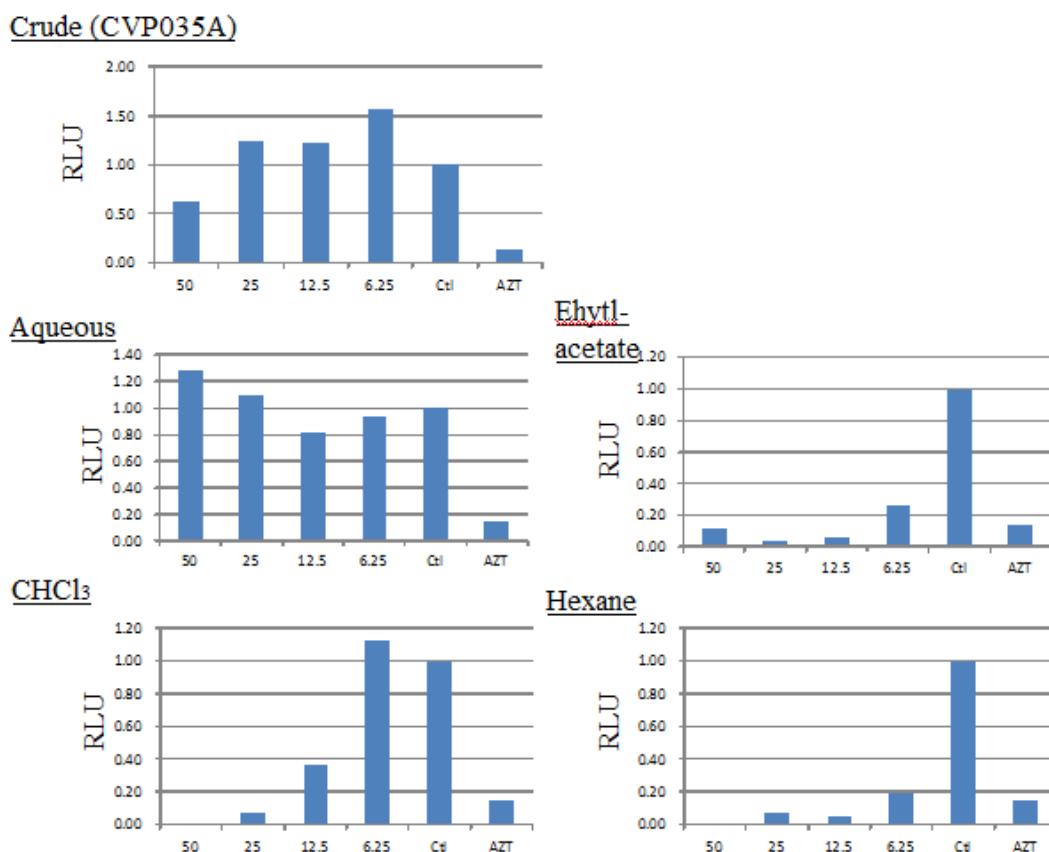


Fig.1 量依存的な感染性抑制を示す CVP035A および CVP047A 粗抽出物。

CSRPMにて画分された CVP035A と CVP047A の1次分画試料の感染抑制活性を調べた所、活性は2種ともより疎水性の分画にある事が示された (Fig.2)。



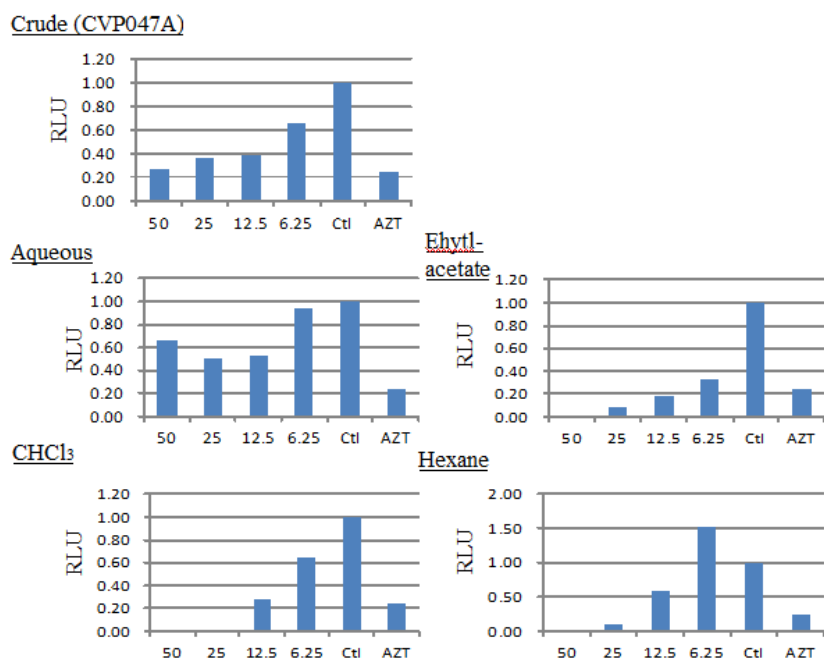


Fig.2 CVP035A および CVP047A の各分画による HIV-1 感染抑制効果。

更なる精製を NIU にて行うために、MTA 作成に向けたデータを取得中である。

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)

長期専門家として着任している堀を中心に、ガーナ人若手研究者とともに CEM レポーター細胞株を用いたスクリーニング系を実施し、現在引き続き分画試料の解析を行っている。25年度は、western blotting を実施できるようマニュアルを作成し技術移転を行った。2013 年 12 月に4週間の日程で来日した野口研カウンターパートとして新規加入した Bonney 博士に対し、TMDU で細胞培養、ウイルス作製、dual luciferase assay、western blotting などの技術移転を実施した。

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

特記すべき事項なし。

(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質である。

平成24年度までの RT-PCR 結果ではサンプルの 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、より再現性のあるデータをとるために刺激する細胞の規模、逆転写・定量 PCR の各反応液の組成を検討・変更した。また GAPDH の定量 PCR について、増幅の際に標準曲線を引く事ができていなかったため、プラ

イマー配列を再検討した。

## ② 研究実施方法

より簡易に各々の遺伝子発現(mRNA 発現)の変化を定量化するため、平成24年度までに確立されていたリアルタイム RT-PCR によるアッセイ系の各段階を検討・変更した。

具体的には(i) 刺激する細胞浮遊液の規模を(0.5 ml 中  $0.3 \times 10^5$  細胞/反応)から(1.0 ml 中  $0.6 \times 10^5$  細胞/反応)に引き上げ、逆転写反応に使用する RNA テンプレート量を 100 ng から 400 ng とした。

実験方法として、Jurkat T 細胞を植物抽出物(50, 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で刺激後 24 時間培養する。細胞回収後、全 RNA を抽出、Oligo dT プライマーを用いた逆転写反応産物から A3G、BST-2 と GAPDH(内部コントロール)の各 mRNA 量を定量 PCR にて算出した。A3G、BST-2 の mRNA 量を GAPDH の mRNA 量で標準化し各試料の相対的な mRNA 量を求めた。陽性コントロールとしてインターフェロンアルファ(IFN-alpha)処理を用いている。

## ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

再検討した GAPDH のプライマーで PCR をした場合、対数増殖的に増幅が行われるか確かめるために、階段希釈を行った GAPDH 発現プライマーをテンプレートに標準曲線を描いた(Fig. 3)。

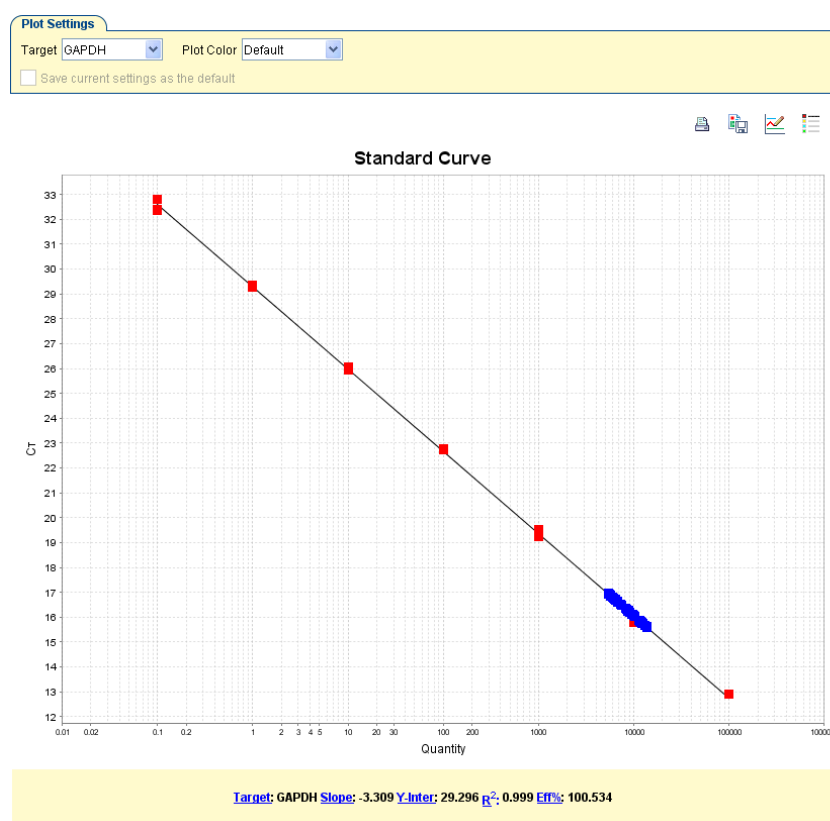


Fig. 3 再検討した GAPDH プライマーを用いて作成した標準曲線 (赤点)。

現在までに植物抽出物 113 種中 84 種類について 1 次スクリーニングを終えているが、まだ陽性検体は得られていない(Table. 2)。

FIRST RUN			FIRST RUN			FIRST RUN		
NUMBER	SAMPLE ID	RESULTS	NUMBER	SAMPLE ID	RESULTS	NUMBER	SAMPLE ID	RESULTS
1	CVP001A	-	39	CVP023B	-	77	CVP051A	-
2	CVP001B	-	40	CVP024A	-	78	CVP051A	-
3	CVP002A	-	41	CVP025A	-	79	CVP041B	-
4	CVP003C	-	42	CVP026A	-	80	CVP051B	-
5	CVP002G	-	43	CVP024B	-	81	CVP045C	-
6	CVP003A	-	44	CVP027A	-	82	CVP005C	-
7	CVP003B	-	45	CVP016C	-	83	CVP053A	-
8	CVP004A	-	46	CVP028A	-	84	CVP052A	-
9	CVP004B	-	47	CVP029A	-	85	CVP054A	-
10	CVP005A	-	48	CVP030A	-	86	CVP061A	-
11	CVP006B	-	49	CVP031A	-	87	CVP060A	-
12	CVP006A	-	50	CVP032A	-	88	CVP055A	-
13	CVP007A	-	51	CVP033A	-	89	CVP059A	-
14	CVP008A	-	52	CVP034A	-	90	CVP057A	-
15	CVP009A	-	53	CVP026B	-	91	CVP058A	-
16	CVP010A	-	54	CVP035A	-	92	CVP056A	-
17	CVP011A	-	55	CVP036A	-	93	CVP055B	-
18	CVP010B	-	56	CVP037A	-	94	CVP062A	-
19	CVP012A	-	57	CVP038A	-	95	CVP058B	-
20	CVP012B	-	58	CVP039A	-	96	CVP055C	-
21	CVP011B	-	59	CVP033B	-	97	CVP064A	-
22	CVP013A	-	60	CVP040A	-	98	CVP057B	-
23	CVP013B	-	61	CVP031B	-	99	CVP063A	-
24	CVP014A	-	62	CVP041A	-	100	CVP066A	-
25	CVP015A	-	63	CVP042A	-	101	CVP065A	-
26	CVP016A	-	64	CVP020G	-	102	CVP026C	-
27	CVP017A	-	65	CVP043A	-	103	CVP068A	-
28	CVP018A	-	66	CVP044A	-	104	CVP064B	-
29	CVP019A	-	67	CVP045A	-	105	CVP067A	-
30	CVP020A	-	68	CVP044B	-	106	CVP052B	-
31	CVP017B	-	69	CVP046A	-	107	CVP056B	-
32	CVP021A	-	70	CVP047A	-	108	CVP067B	-
33	CVP022A	-	71	CVP048A	-	109	CVP004C	-
34	CVP021B	-	72	CVP043B	-	110	CVP 070A	-
35	CVP020B	-	73	CVP045B	-	111	CVP071A	-
36	CVP023A	-	74	CVP050A	-	112	CVP006B	-
37	CVP016B	-	75	CVP049A	-	113	CVP072A	-
38	CVP019B	-	76	CVP048B	-			

Table. 2 A3G、BST-2 の mRNA 量測定結果。粗抽出物の作用によって mRNA 量が増加した場合を+とし、変化がなかった場合を - で示す。

Fig. 4 にスクリーニング結果の一例を示す。一回の実験は triplicate で行っており標準誤差はじゅうぶん小さい。

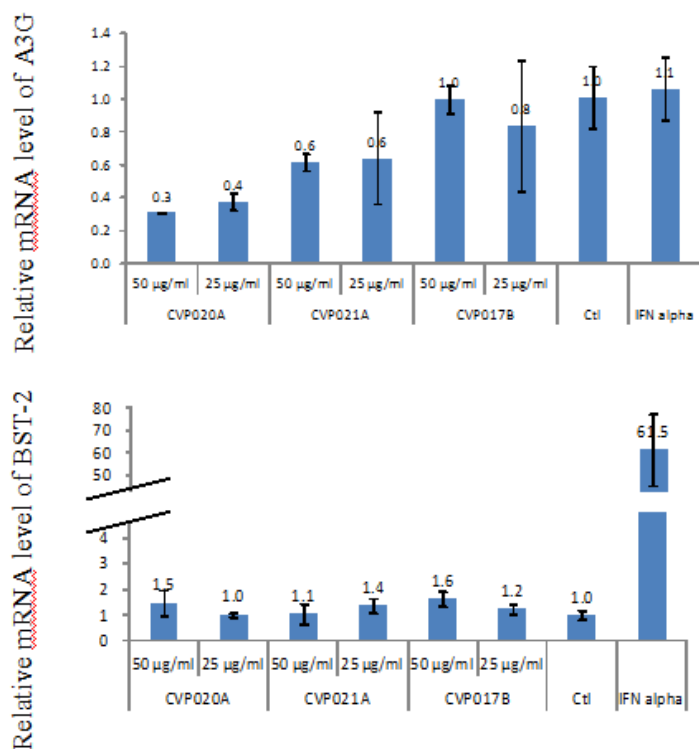


Fig. 4 スクリーニング結果の例。

## ④ カウンターパートへの技術移転の状況

堀を中心に野口研ウイルス部門にて実験系を改良し、ガーナ側に技術指導・移転を行った。抽出後の核酸の安定性について説明し、取り扱いに際してアイスブロックを導入し温度管理を徹底するようにした。

## 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

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、本事業では加水分解プローブ法ではなくインターカレート法を用いているが、現在のスクリーニングにおいて実験の安定性に問題は出ていない。

## (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)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中に見出すことを目的として、(i)潜伏感染細胞株 JLR2 の



プロウイルス量およびプロウイルス発現のエピジェネティックな制御機構についての検討、(ii) ガーナの1次スクリーニングで得られた候補植物から調製した分画についての活性分析、(iii)植物Aから精製した活性物質によるプロウイルス発現誘導における NF-kappaB 以外のシグナル伝達経路の関与解析、を実施した。

## ② 研究実施方法

HIV-1 潜伏感染細胞株 JLR2 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。JLR2 細胞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-1 潜伏感染細胞株で、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2次スクリーニングでは、ヘキササン、クロロホルム、酢酸エチル、水に分画された植物抽出物を 100 mg/mL から 3.125 mg/mL までの濃度に調製し Dual luciferase assay で試験した。

## ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

JLR2 細胞の性質を確認するため、同細胞のゲノムに組み込まれたプロウイルス遺伝子の数を U5-gag 領域に関して quantitative PCR (qPCR)にて検討した。比較対象としてゲノム内のプロウイルスのコピー数が同定されている ACH-2 細胞 (1コピー)と、U1 細胞 (2 コピー)を使用した(Fig.1)。

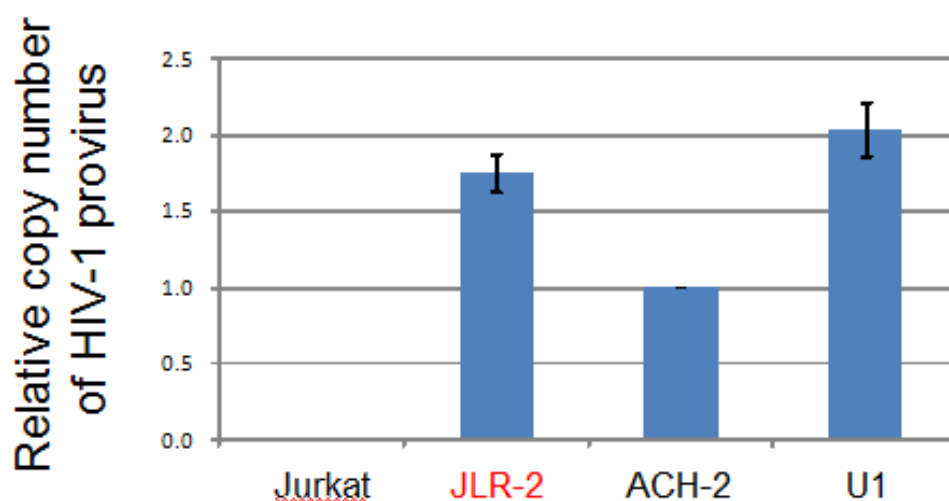


Fig. 5 JLR2, ACH-2, U1 のプロウイルス量比較。Jurkat は陰性コントロールとして用いた。

qPCR の結果より、JLR2 細胞のゲノムには 2 コピーのプロウイルスが組み込まれている事が示唆された。

HIV-1 潜伏感染細胞のプロウイルスの再活性化にはヒストンのリモデリングが関わる事が知られている。Histone deacetylase 1 (HDAC-1)はプロウイルスの Long Terminal Repeat に存在するプロモーター領域に結合してヒストンの脱アセチル化とクロマチンの condensation に影響し、潜伏感染を促進している。JLR2 細胞の潜伏感染に HDAC-1 が関与しているか調べるために、JLR2 細胞を HDAC-1 阻害剤 (Trichostatin A)で処理し、プロウイルス遺伝子の発現を Dual Luciferase Assay で解析した(Fig. 6)。

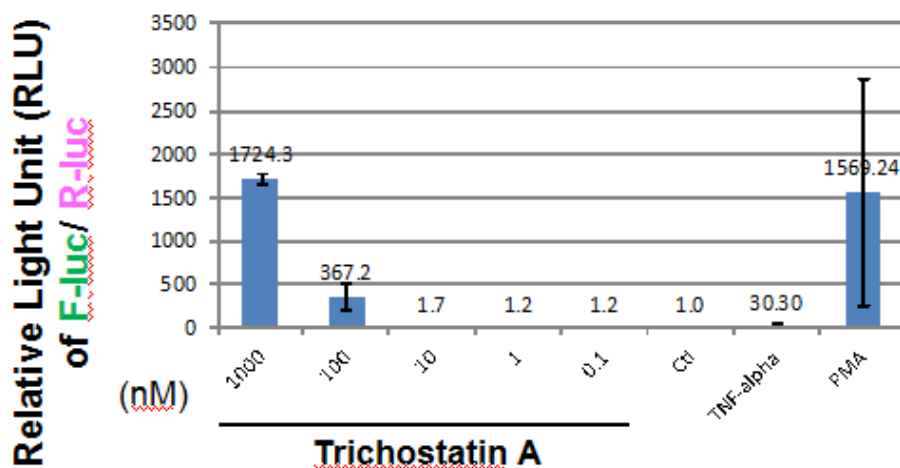


Fig. 6 JLR2 細胞における HDAC 阻害剤 Trichostatin A のプロウイルス誘導効果。

Trichostatin A 処理した JLR2 細胞株ではプロウイルスの発現が上昇した。この結果は JLR2 細胞のプロウイルス遺伝子発現のエピジェネティック制御に HDAC が関わっている事を示唆している。

#### 精製化合物による潜伏プロウイルス活性化作用の解析

長崎国際大学にて精製、分離された植物 A 由来単一分子 (Tc-1) による潜伏感染プロウイルスの再活性化作用を検討した。Tc-1 による JLR2 細胞のプロウイルス Gag 遺伝子 (p24) の発現誘導を Western Blotting でチェックし、ELISA にて定量した (Fig. 7)。HIV-1 Gag タンパク質は、western blotting 上で 55 kDa および 24 kDa の位置に見出される。

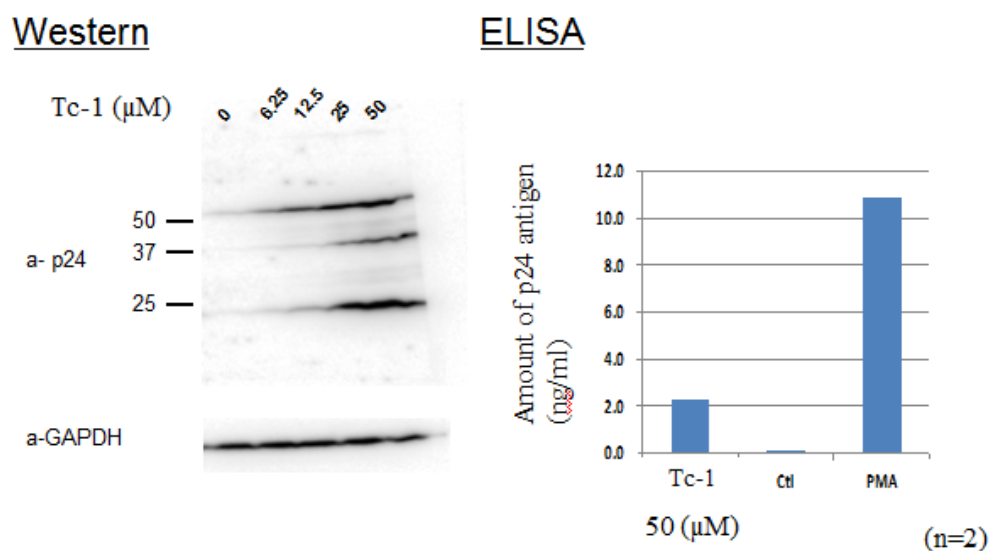


Fig. 7 JLR2 細胞における HIV-1 Gag 発現誘導を、western blotting (左) および ELISA (右) で解析した。

Tc-1 による慢性感染細胞のプロウイルス遺伝子の発現促進が JLR2 細胞特異的ではない事を調べるために、慢性感染細胞株 ACH-2 を用いて p24 発現量を Western Blotting と ELISA で調べた (Fig. 8)。

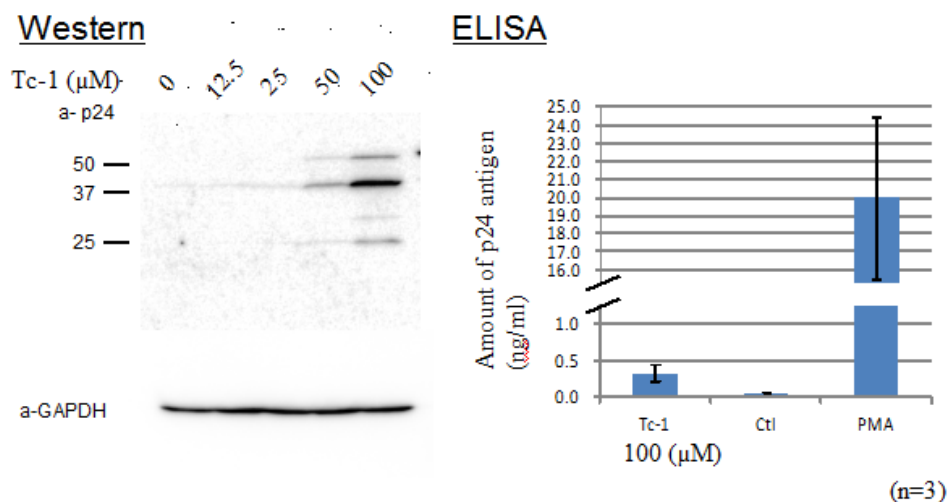


Fig. 8 ACH-2 細胞における HIV-1 Gag 発現誘導を、western blotting(左)および ELISA(右)で解析した。

ACH-2 細胞においても Tc-1 で刺激した場合、ウイルス遺伝子産物(p24, pr55)の発現が上昇した。この結果は Tc-1 による潜伏 HIV-1 プロウイルスの遺伝子発現誘導が細胞種特異的な現象ではない事を示している。

T 細胞の活性化やプロウイルスの再活性化には、NF-κB の他に Mitogen Activating Protein Kinase (MAPK) 経路の活性化も関与する。MAPKK (MEK)の活性化によって MAPK である Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK)のリン酸化が起こり、MEK 特異的阻害剤として U0126 が知られている。精製された試料によるプロウイルス発現誘導に MAPK 経路が関与するか調べる目的で、JLR2 を U0126 もしくは溶媒コントロール(DMSO)で前処理し U0126 による ERK のリン酸化阻害をウエスタンブロッティングで調べた後 (Fig. 9)、Tc-1 の刺激によるプロウイルス発現への影響を Dual Luciferase Assay で調べた (Fig. 10)。濃度は U0126 (10 μM)、PMA (4 nM) とし、DMSO コントロール (Ctl) での値を 1.0 としてある。

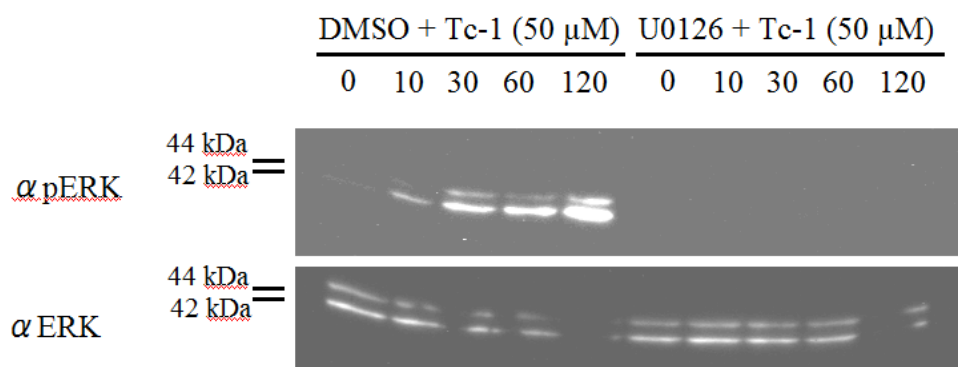


Fig. 9 JLR2 細胞を MEK 阻害剤 U0126 で 1 時間前処理して Tc-1 で図示した時間刺激し、リン酸化 ERK の出現を western blotting で解析した。

Tc-1 刺激により JLR2 細胞内の ERK はリン酸化された (DMSO + Tc-1(50 μM)10min 以降)。また U0126 はそのリン酸化を阻害した(U0126 + Tc-1 (50 μM))。

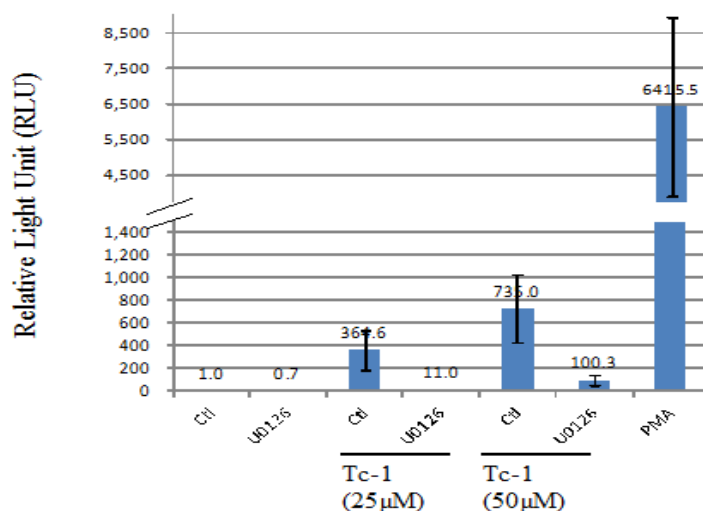


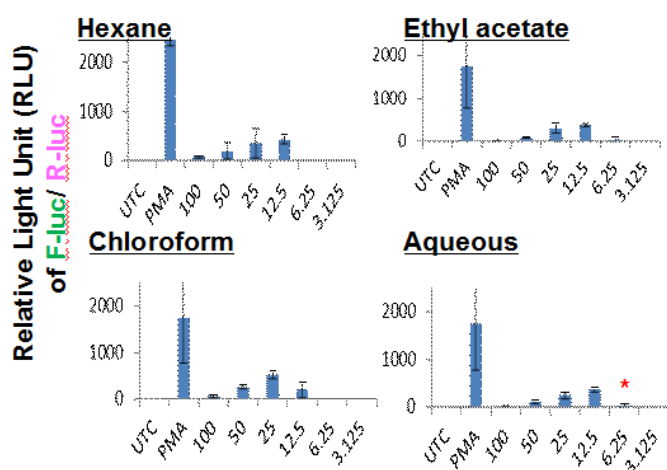
Fig. 10 U0126 が Tc-1 によるプロウイルス発現誘導に及ぼす影響を、レポーターアッセイで解析した。

U0126 により ERK のリン酸化を阻害された JLR2 細胞では、Tc-1 刺激によるプロウイルス遺伝子の発現誘導が著しく減弱していた。これらの結果は MAPK 経路の活性化が特異的に阻害されると Tc-1 によるプロウイルス発現誘導が著しく抑制されることを示唆している。これらの実験は野口研だけでなく東京医科歯科大学でも行われ、同様の結果が得られた。

その他の抽出物のスクリーニング進捗状況

一次スクリーニングにてプロウイルス発現誘導能を見出した植物抽出物について分画抽出を行い、プロウイルス発現誘導活性を調べた。下記に CVP012A の例(Fig. 11)と活性が見出された分画 (Table. 1)を示す。

**CVP012A**



	Fractions activating latent HIV-1 provirus
CVP012A	Aqueous
CVP028A	Aqueous and Butanol
CVP025A	Aqueous
CVP049A	Aqueous
CVP003	Aqueous
CVP056A	Aqueous
CVP057B	Aqueous

Fig. 11 (左) CVP012A の各分画が示すプロウイルス発現誘導活性をレポーターアッセイで示す。

Table 3 (右) 慢性感染系 2 次スクリーニングで試験された植物抽出物と結果。

CVP012A の各分画とも活性能を有しているが、Aqueous phase (親水性分画)がより低濃度でも再活性化誘導能が高かった。候補植物由来分画試料の解析は 10 種類中 9 種について終わっており、活性のほとんどが親水性分画にある事が判った。

### 健康人由来の CD4 陽性 IL-2 依存性メモリータイプ T 細胞株を用いた HIV-1 持続感染系の作出

これまでに健康人由来の CD4 陽性 IL-2 依存性メモリータイプ T 細胞株である LTi4 細胞を用いて、Luciferase 活性で評価できる HIV-1 持続感染系を作成した。さらに、低濃度の Interferon  $\alpha$  の存在下で細胞周期の停止を伴うウイルス発現の低下が誘導され、メモリー T 細胞への潜在感染状態が再現された。持続感染状態においても、潜在感染状態においても、CD3/CD28 抗体刺激によって HIV-1 発現が増大した。

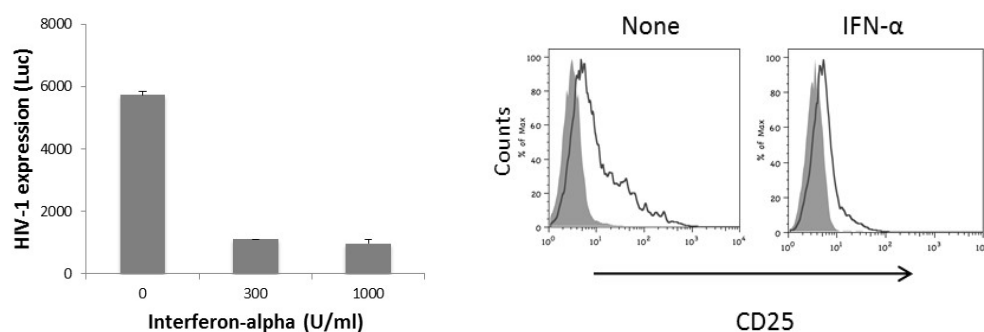


Fig. 12 (左)IFN $\alpha$  で処理した LTi4 細胞での HIV-1 遺伝子発現。(右)IFN $\alpha$  の CD25 発現への影響。

この結果を論文にまとめ投稿中である。(TMDU 国内研究)

#### 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25年12月に、野口研カウンターパートとして新規加入した Bonney 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。野口研では、western blotting 実施マニュアルを作成し、技術移転した。

#### 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 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

サイドから挙げ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) IC<sub>50</sub> 10 mg/ml以下の強い抗トリパノソーマ活性が見られた8種のうち、残り2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、アッセイを行う。分画によってさらに活性が上がったサンプルについては活性が高いものから順次さらに細かく分画を調製し(NIU)、アッセイを実施する(TMDU, NMIMR)。
- 2) ガーナ産植物Cから同定された4種の活性成分について引き続き細胞周期や免疫染色による表現系解析を行い活性メカニズムの知見を得る。強いアポトシス誘導が観察された成分については鞭毛形成阻害が示唆されるため、鞭毛形成に関わる数種の抗体を用いてさらに詳細なターゲット領域(組織あるいは形成過程)を特定する(NMIMR)。
- 3) 上記成分について、表現系や鞭毛形成への影響、さらにアポトシス誘導能や細胞周期への影響等、詳細なメカニズム解析を行う。
- 4) 有効成分2種について大量調整を行い(CSRPM)、マウスを用いた治療実験のサンプルとする。有効性を検証するとともに、投与濃度、投与方法についての知見を得る。
- 5) 有効成分2種について特許出願を行い、急性毒性についての知見が得られた段階でガーナ国内生薬登録を行う。
- 6) 日本産植物4種から同定された(*Alnus japonica* から2種、植物Bから1種、*Solanum aceleatissimum* から3種)活性成分について、ガーナ産候補と同じくアポトシス、細胞周期解析および免疫染色による表現系解析を行い、活性メカニズムの知見を得る。昨年度の動物実験立ち上げ時にパイロットサンプルとして用いた Oregonin について科学的に大変興味深い結果が得られたので、動物治験についての再現性を確認し、上記メカニズム解析の結果とともに日本ガーナ共同研究として論文投稿する。

## ④ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

- 1) IC<sub>50</sub> 10 mg/ml以下の強い抗トリパノソーマ活性が見られた8種のうち、残り2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。これで、候補活性植物8種全ての活性分画を特定した。そのうち、植物C抽出物から新規成分2種を含む、4種の活性成分を得た。
- 2) 植物Cから同定された4種の活性成分のうち、新規成分 ML-2-3 は Caspase シグナリングを介してアポトシスを誘導していることを見出し(Fig. 1)、トリパノソーマ細胞周期のG2/M期への移行を阻害していること(Fig. 2)が明らかになった。また、免疫染色による表現系解析では、新たな鞭毛マーカーである PFRa タンパク質の発現を抑制し、鞭毛の短縮化が見られることを明らかにした(Fig. 3)。

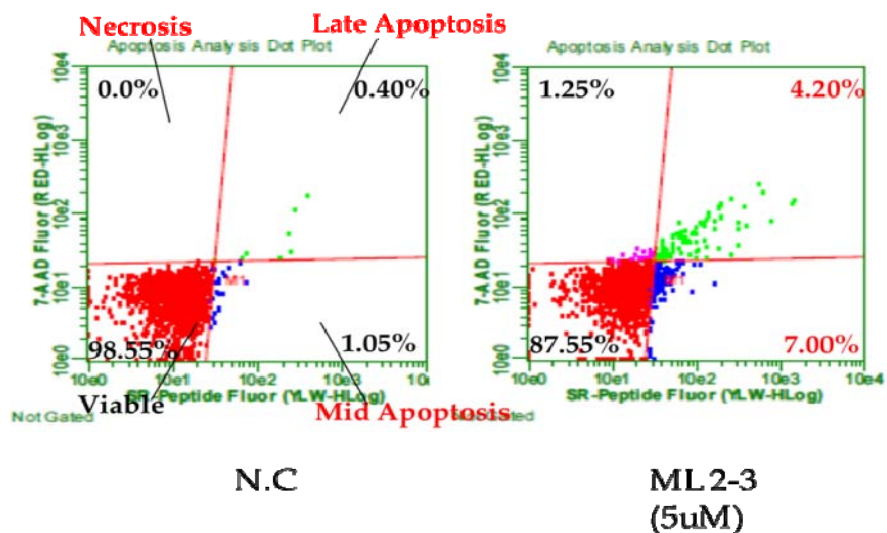


Fig. 1) Detection of multi-caspase signals in ML-2-3-induced apoptotic *Trypanosoma* cells. Dot plots were generated by flow cytometry. N.C. represents negative control (treatment-naïve population).

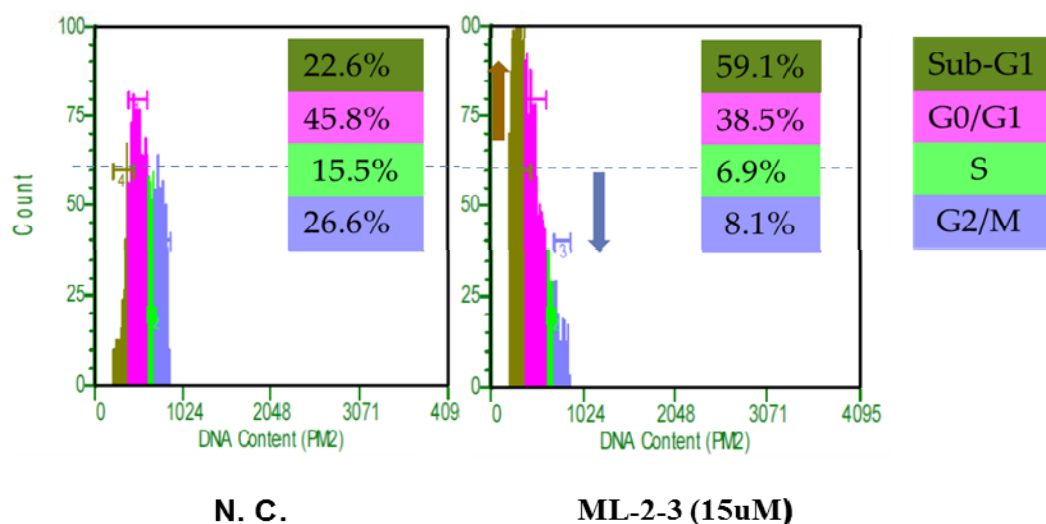


Fig. 2) ML-2-3 causes *Trypanosoma* cell DNA fragmentation. The ratio of cells in the indicated cell-cycle phases was determined by flow cytometry.

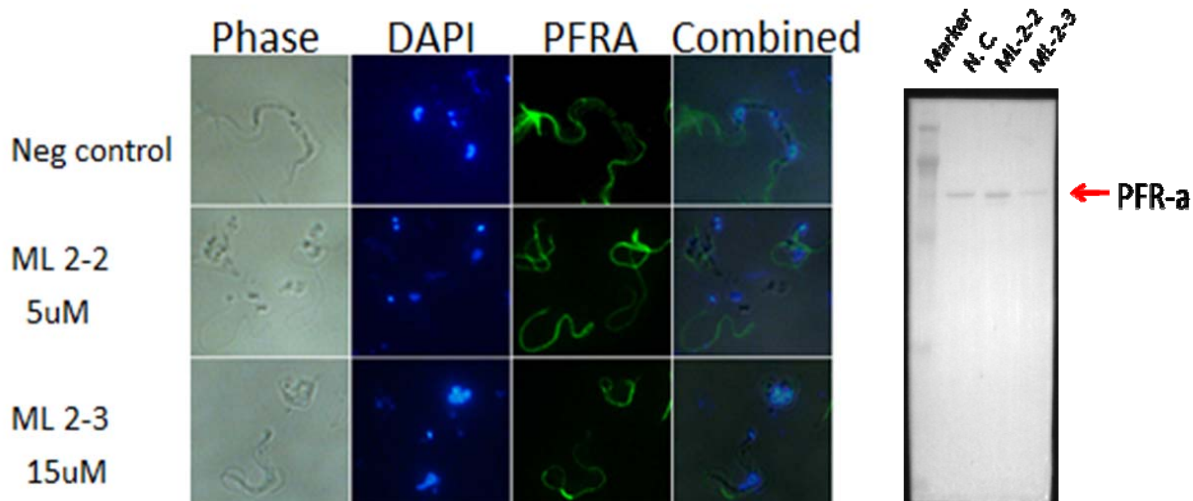


Fig. 3) ML-2-3 induced DNA fragmentation and suppressed the expression of a flagellum marker protein, PFR-a.

- 3) 新規有効成分2種(ML-2-2, ML-2-3)について毎月20キロ植物サンプルからの大量調製を行えるように環境整備を行った。大量サンプルのデリバリー開始と同時にマウスを用いた治療実験を開始した。小動物における有効性について確認はできたが、100%完治に必要な投与量については最終的な確定には至っていない。
- 4) 新規有効成分2種(ML-2-2, ML-2-3)についてガーナ大学と共同で米国特許出願を完了した。現在論文投稿に向けて取り組んでいる。
- 5) 日本産植物から単離された抗トリパノソーマ成分 Oregonin (Fig. 4)について構造活性相関と小動物感染治療実験についての知見を得た。現在、論文投稿に向けて取り組んでいる。



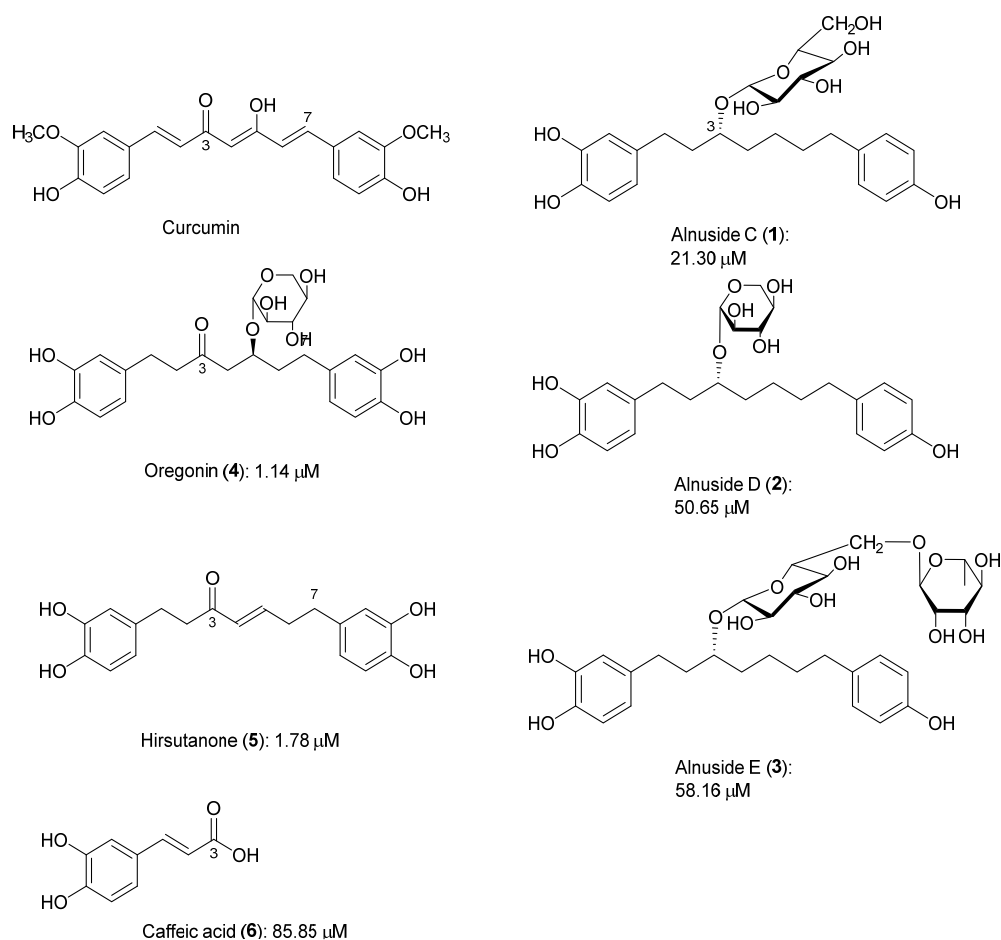


Fig. 4) Structure-activity relationship among diarylheptanoids isolated from *Alnus japonica* and caffeic acid

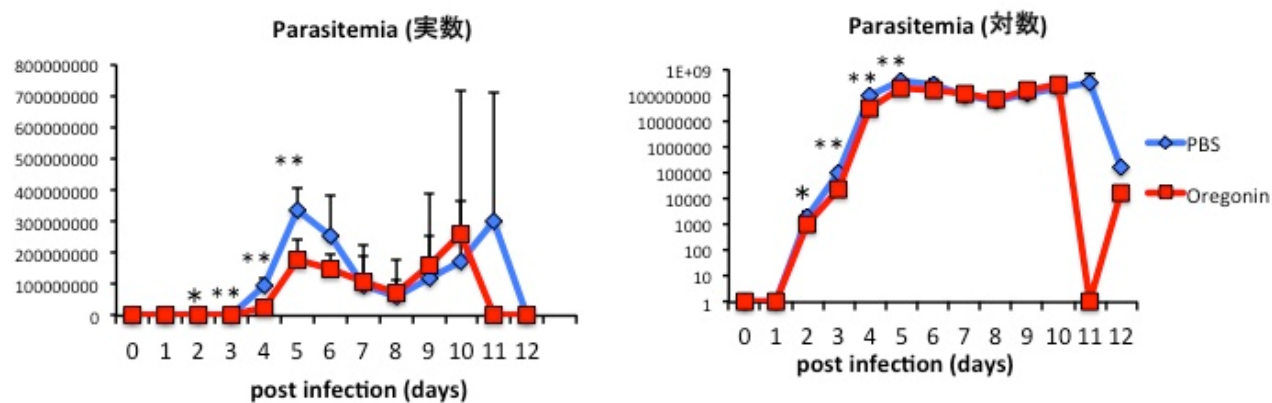


Fig. 5) The growth of *T. brucei* was impaired in Oregonin pretreated animals. Parasitemia was shown as actual number (left) or by logarithmic display (right).

6) CSRPM にて、植物Cから新たな有効成分(新規、ML-F52)の単離に成功し、IC<sub>50</sub> を確定した結果、2種(ML-2-2, ML-2-3)よりも強い活性を示し、哺乳類細胞への毒性と比較し最良のSI 値を得た(Table 1)。また、ML-2-3 同様、強いアポトシス誘導能を示した(Fig. 6)。

Table 1) Comparison of anti-trypanosoma activities and Selectivity Index (SI) values.

Compound	Functional Group	IC <sub>50</sub> (μM)	SI
ML-F52	Ethyl Ester	0.03	>50
ML-2-2	Methyl Ester	1.27	9.54
ML-2-3	Carboxylic Acid	3.75	13.33

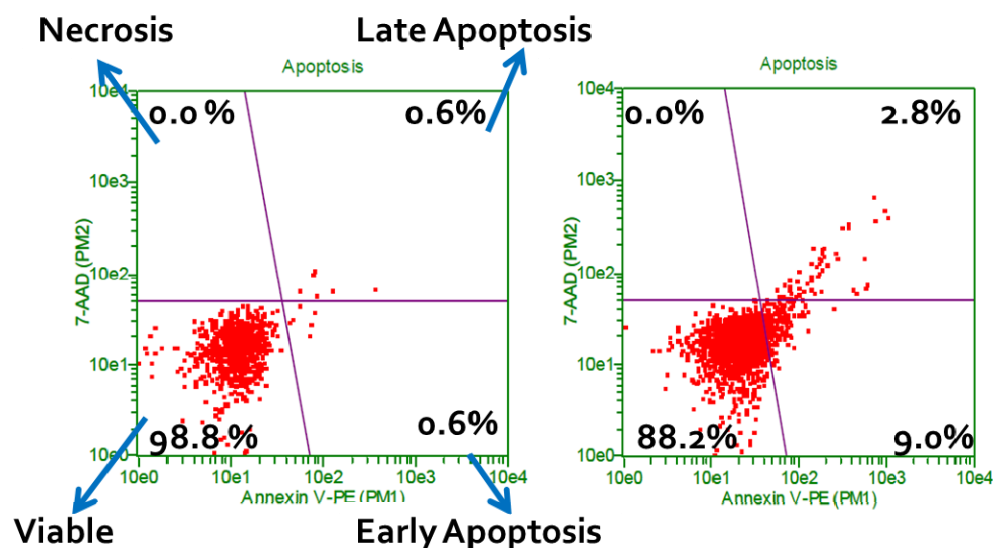


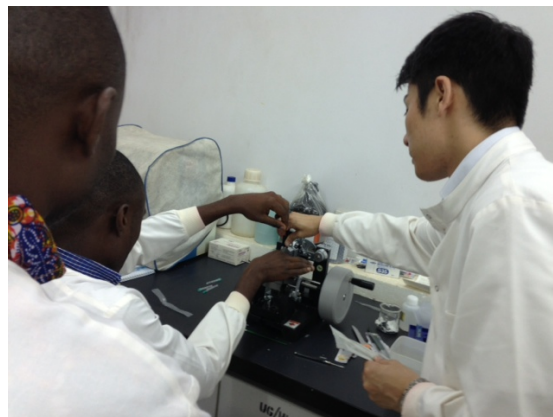
Fig. 6) ML-F52 induced evident apoptosis comparable to ML-2-3

- 7) マラリア、リーシュマニアについてアッセイ系を確立し、抗トリパノソーマ活性成分として得られた ML-2-2, ML-2-3 及び、ML-F52 の抗リーシュマニア、抗マラリア作用についての知見を得た。マラリアドラッグアッセイについて、*Plasmodium falciparum* (3D7 株) 感染赤血球を培養、ring ステージにシンクロナイズ後、活性成分を添加、24 時間後の効果について SYBR Green (DNA 検出試薬) と FACS を用いて解析を行った。その結果、ML-2-2 (IC<sub>50</sub>=2.04 mM) と ML-2-3 (IC<sub>50</sub>=1.42 mM) は強い抗マラリア作用を有することが明らかとなった。一方、ML-F52 (IC<sub>50</sub>=11.98 mM) は明白な効果を示さなかった。リーシュマニアについては研究室継代株 (*L. hertigi*) とフィールド株両者 (いずれも昆虫型) を用いてマニュアルカウント法と FACS (viacount assay) にてアッセイを行った結果、ML-2-2 (研究室継代株 MIC=2.87 mM, フィールド株 MIC=4.17 mM) と ML-F52 (MIC=2.87 mM, 2.60 mM) は抗リーシュマニア活性を示すが、ML-2-3 (MIC= >25 mM, >25 mM) は効果を示さないことが明らかとなった。

#### 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)

##### (1) 病理切片作成・観察のための環境整備

本年度は、野口記念医学研究内において病理切片の作成から観察を実施するための環境整備を実施した。関専門家が渡航して野口記念医学研究所内の動物実験センター内にマイクロームおよび周辺機器を導入し、実験動物センター内で病理切片作製を行う環境整備および技術移転を実施した。



(関専門家による技術移転風景)

## (2) *Trypanosoma brucei* 感染マウスに見られる病理学的変化の観察

*Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) 感染マウスにみられる病理学的変化の解析について、技術移転を行った。*T. brucei* 感染マウスから臓器を回収して肉眼的所見の変化を観察した。また、各臓器より病理切片を作製して病理学的変化の観察、基礎的な病理学のレクチャー、病理学のテキスト(基礎病理学、実験動物病理学・英語版)を導入し、技術移転を実施した。その結果、*T. brucei* 感染 7 日後におけるマウスの肝臓では肝細胞の壊死が観察されることが明らかとなった。この結果は、*T. brucei* 感染マウスを用いた *in vivo* における薬剤効果を判定する際の一つの評価基準となりうることを意味している。今後、肝臓以外の臓器および感染 7 日後以外の時期における病理学的変化について解析を実施する。

## 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)

- 1) 当初の計画では、野口研動物センターにてマウスを用いた感染治療実験を実施し、投与方法、投与量等についての知見を得る予定であったが、動物センターにてマウス飼料の変更に伴い、マウスが死滅するという現象が起こり、約半年動物実験がストップした状況となった。そこで、急遽、ガーナ日本 PI の了承をとり、TMDU 動物センターにて小動物実験を実施するための準備(MTA 等)を行った。文書が整い次第、サンプルを送付し実施予定である。
- 2) CSRPM での活性成分大量調製の際に、ガーナ人研究者自らの力で新たな成分 ML-F52 の精製に成功した。MTA 合意後、NIU へ送付し構造決定を行ったところ、ML-2-2, ML-2-3 と同じグループに属する新規成分であることが明らかとなり、さらに、それらよりも強い活性を示し、これまでの最良の SI 値を得た。このことは CSRPM における成分精製に必要な技術移転がしっかり定着し、機能していることを表している。
- 3) イギリスの製薬会社 GSK 関係者との情報交換により、「現在リーシュマニア、蟬虫類、及びマラリアに対する薬剤開発への関心が高く、抗トリパノソーマ作用のある化合物がこれらの病原体にも作用することがわかれば薬剤開発に向けたインパクトがある」という指摘を受けた。それを受けて、野口研にすでに培養系があるマラリア、リーシュマニアについてアッセイ系を確立し、抗トリパノソーマ活性成分として得られた ML-2-2, ML-2-3 及び、ML-F52 の中に抗リーシュマニア、抗マラリア作用を有するものがあることがわかった。

## 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天然化合物を見出すために、リストアップしたガーナ由来薬用植物の再採取を CSRPM にて進め、植物粗抽出エキス調製、各種有機溶媒を用いた分画、各種カラムを用いた成分の単離・精製を CSRPM と NIU で分担して行い、NMIMR および TMDU で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。

## 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1~2か月に1度の割合で植物採取可能時期に実施)、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。

平成25年度以降

- 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年度も CSRPM で実施した。
- 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年度も同様に実施した。
- 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 に技術移転を行った (平成25年4月、9月。) 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年度は CSRPM で実施した。
- 9) HPLC を使用した活性成分の定性・定量分析および単離・精製: CSRPM に導入した HPLC を使用して、活性成分の定性・定量分析を実施した。さらにカラムワークでの単離・精製が困難な成分の分取について HPLC を使用する方法を検討した (平成25年4月、平成26年3月)。

## 【国内研究】

1) 植物 A 粗エキスからの化合物 A 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 A 類の抗ウイルス活性に注目しており、植物 A が化合物 A 類を多く含むことから今後の研究進展には植物 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植物 A を入手した。植物 A を粉碎後、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 等の化合物 A 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、平成23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。活性が認められた画分はスリランカ産植物 A から単離した各種化合物 A 重合体との TLC 解析を実施し、一部画分は単一成分まで精製・単離を行い、NMR、LC-MS による構造解析を経て、3量体活性成分を Tc-1 と特定した。

2) ハンノキ樹皮粗エキスからの Diarylheptanoid 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 diarylheptanoid 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、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、抗 *Trypanosoma* 活性をも有する可能性があるため、diarylheptanoid 類を高濃度に含有するハンノキ (*Alnus japonica*) を九州大学演習林より分与頂き、その樹皮を採取乾燥後、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、主要成分 oregonin、oregonin に類似の diarylheptanoid 類にて抗 *Trypanosoma* 活性を見出し、抗寄生虫構造活性相関についてのコンピューター解析を実施した。

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 B 粗エキスからの化合物 B の精製・単離および活性評価

抗 Leishmania 活性が知られている shikonin を含有する① *Lysospermum tinctorium* (紫根;長崎国際大学生薬標本)と化合物 B を含む②植物 B (ドイツより入手)、1950年代まで駆虫剤として用いられていた③ *Punica granatum* (石榴皮;長崎国際大学薬草園)、駆虫作用が知られている④ *Stauntonia hexaphylla* (seed)、同 (furit) (ムベ:長崎県下にて採取)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、植物 B から精製された化合物 B について抗 *Trypanosoma* 活性を見出した。

また、その他、*Solanum aceleatissimum* (タイより入手) 果実粗エキスからステロイドアルカロイド配糖体の精製・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、3種の活性成分を得た。

## 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、植物粗エキスおよび分画調製について】

H22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、H23年8月の時点では91種類の候補植物のうち36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55種類の植物のうち32種類を植物採取し、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)を平成25年1月の段階で得ており、植物採取を完了した。

平成25年度

86種類のガーナ産薬用植物からの部位別50%エタノール粗抽出物113サンプルの作製を終了した。2次スク

リーニングとしてのヘキサン、クロロホルム、エチル酢酸、水による第1段階分画作業がCSRPMにおいて能率的に実行可能となり、現在1次スクリーニングで陽性となった20件中19件(寄生虫病学8件、HIV 急性感染系2件、HIV 潜伏感染系9件)の分画が終了している。

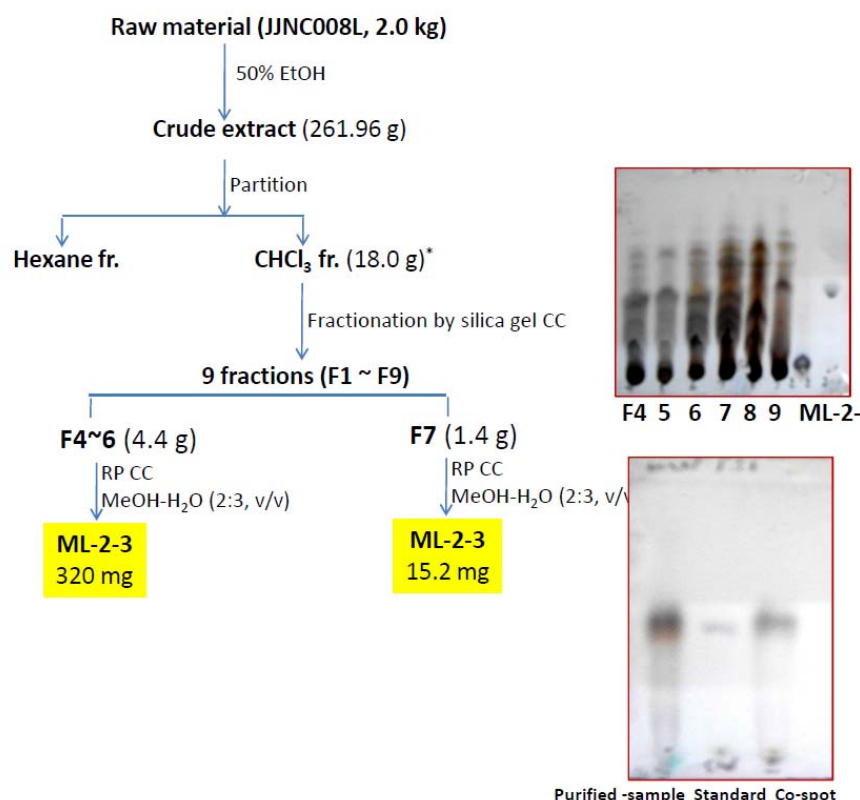
【活性成分の大量調製およびカラムワークスペースの整備について】

2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 C に関しては、平成24年度に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。その結果、植物 C 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。

本植物に関しては、活性成分の大量調製を CSRPM で実施することを平成24年12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(平成25年3月)。

平成25年度

平成25年4月と9月、NIU から JICA 短期専門家派遣を行い、植物粗エキスからの成分の分離・精製について技術移転を行った。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・精製方法の技術移転を行った。



植物 C に含まれる有効物質の効率的な大量精製方法

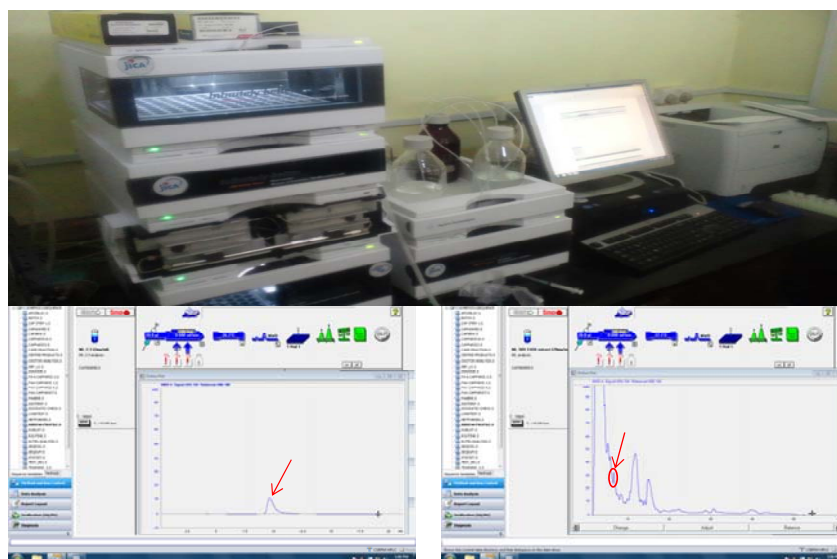
また、新規有効成分2種(ML-2-2, ML-2-3)について、各種カラムを用いた成分の分離・精製のための研究環境整備を実施し、独立ラボスペースの設置と技術移転を実施した。さらに、CSRPM において分画精製作業をさらに能率化するために、一度に複数のカラムワークが実施できるカラムスタンドを配置し、2台のフラクションコレクターも設置した。



CSRPM でのカラムワーク実施のための環境整備

## 【HPLC を使用した植物粗エキス中の活性成分分析について】

CSRPM に導入した HPLC を使用して、植物 C 粗エキス中の ML2-3 の分析を実施し、技術移転を行った。植物粗エキスから直接 HPLC で ML2-3 を分取することは困難であることが判明し、カラムワークの最終段階で ML2-3 を高純度を得るために、HPLC を使用することを検討した。平成26年度も引き続き、HPLC を使用した活性成分の分取に関する技術移転を行う。



HPLC を使用した植物 C 粗エキス中の ML2-3 の分析（左下:ML2-3 STD、右下:植物 C 粗エキス）

## 【ガーナ産植物 A 中の活性成分探索について】

また、平成23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 A 50%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。活性が認められた画分はスリランカ産植物 A から単離した各種化合物 A 重合体との TLC 解析を実施した。

平成25年度

一部画分は単一成分まで精製・単離を行い、NMR、LC-MS による構造解析を経て、活性画分中の主成分 Tc-1 を特定した。しかしながら、Tc-1 は新規化合物ではなく、既知化合物であった。

## 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)

平成 24 年度まで:

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。

平成 25 年度:

#### 18) 平成25年4月:CSRPM への森永、Tung 短期専門家訪問

植物粗エキスからの単一成分の単離・精製に関する技術移転、環境整備を実施した。

#### 19) 平成25年9月:CSRPM への Tung 短期専門家訪問

植物粗エキスからの活性成分の大量調製に関する技術移転、環境整備を実施した。

#### 20) 平成26年1～2月:Maxwell Sakiamah 氏、Prof. Dominic Edoh 氏が長崎国際大で研修

薬用植物の標準化、高品質な原料植物の探索を行うには、分析用 HPLC を用いた有効成分の定量分析技術、さらには、植物有効成分に対するモノクローナル抗体作製を用いた分析法、抗体染色法も修得する必要性があり、これらの定性・定量分析法の研修を実施した。また、CSRPM 付属植物園をより適確に運営・管理するためには、薬用植物の培養・栽培化に関する技術・知識の修得が必要であり、これらに関する研修も実施した。

#### 21) 平成26年3月:CSRPM へ森永短期専門家訪問

カラムワークラボの環境整備を行い、能率的カラムワークのための技術移転を実施した。さらに HPLC を使用した活性成分の定性・定量分析に関する技術移転を実施した。

- ⑥ 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 HIV 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。各部門の活性スクリーニングで抗寄生虫及び抗 HIV 活性が見られた分画サンプル及び精製成分については、分画サンプルまたは精製成分を各部門より毒性学部門に直接受け渡し、毒性確認試験を最優先で行う。

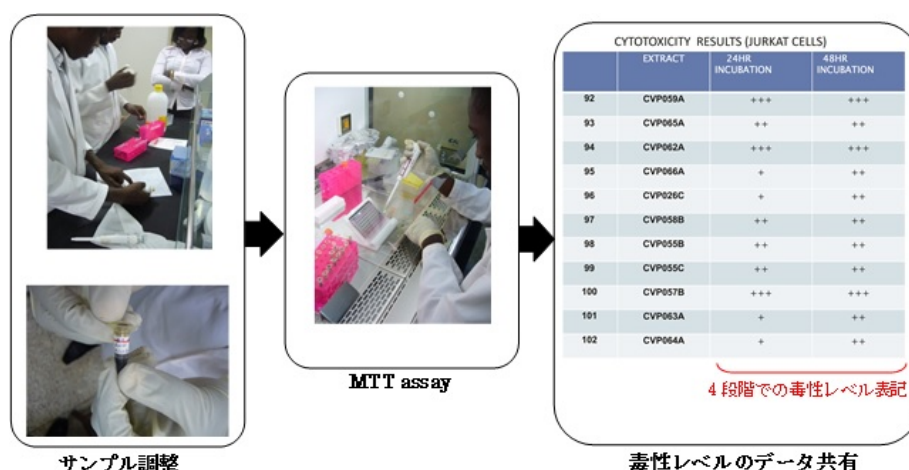
## 2) 毒性確認試験

毒性確認は主として培養細胞株を用いた MTT 法にて行う。生薬粗抽出物の 1 次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( $3 \times 10^5$  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 HIV 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、正常細胞株を含めた数種のヒト細胞系を用いて毒性試験を行う。

## 3) データの共有と SI(セレクトイビティ・インデックス)値の確定

$\text{IC}_{50}$  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。

抗 HIV 及び抗寄生虫活性が確認された精製成分に関しては、活性成分の  $\text{IC}_{50}$  を決定し、SI(セレクトイビティ・インデックス)値を確定する。



## 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5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た。

平成25年度:

日本人短期専門家訪問(2013年5月、2014年1月)においてヒト正常細胞株を含む数種の細胞株を移転し、それらを用いた毒性確認試験を行えるように技術指導した。これにより、現在では Jurkat 以外の細胞株での毒性確認試験をスタートしている。また、RA の技術向上や培養設備環境の向上により、毎月の毒性確認のサンプル数は約30サンプルになっている。

現在(2014年2月末までの報告)、Jurkat 及び CEM 細胞においてすべての50%エタノール抽出エキスの毒性確認を終了している。毒性試験の結果は IC<sub>50</sub> 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50%エタノール抽出エキスの毒性レベルは、全体サンプルの 30%(34 サンプル)が「+++ (IC<sub>50</sub> < 100 mg/mL)」、58%(65 サンプル)が「++ (100 < IC<sub>50</sub> < 500 mg/mL)」、10%(11 サンプル)が「+ (500 < IC<sub>50</sub> < 1250 mg/mL)」、2%(2 サンプル)が「- (IC<sub>50</sub> > 1250 mg/mL)」であった。また、CEM 細胞においては、18%が「+++」、57%が「++」、18%が「+」、7%が「-」であった。

抗トリパノソーマ活性のあった植物から精製した活性成分においては、ヒト癌細胞及び正常細胞を用いて活性成分の IC<sub>50</sub> を決定し、抗トリパノソーマにおける SI(セレクトイビティ・インデックス)値を確定した。

Clinical pathology 部門にプロジェクト開始時に導入された CO<sub>2</sub>インキュベーターの CO<sub>2</sub>調整機能が故障し、東京医科歯科大より新たに CO<sub>2</sub>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ず、細胞培養を他部門で行わなければならないと不自由していた。しかしながら2013年9月に新しい CO<sub>2</sub>インキュベーターが導入され、現在、研究進行の妨げになるような設備及び技術上の問題はすべて解決している。

#### 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)

平成 24 年度まで:

- 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。

平成 25 年度:

- 5) 2013年5月及び2014年1月:日本人短期専門家(長崎国際大・宇都)が訪問し、正常細胞株での毒性確認試験を安定的に行えるように技術移転した。また、将来的に細胞死の作用機序解析等を行うことを目的として、カスパーゼ活性化や Cytochrome c 測定などの技術移転を行った。
- 6) 2014年1月~2月: Clinical pathology 部門から Ebenezer Ofori-Attah (Research Technician)が長崎国際大学にて研修を行い、初代マクロファージ細胞の単離培養法と毒性確認試験法を習得した。

#### 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

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

- 1: 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

- 2: 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

#### (2) 「長崎国際大学」グループ(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)

- ③ 研究項目

- 1: 有効成分の単離精製と構造活性相関解析

- 2: ハーブ抽出物及び精製成分の毒性学的研究

以上