

地球規模課題対応国際科学技術協力

(分野・領域「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」)

研究課題名

「結核及びトリパノソーマ症の診断法と治療薬開発」

終了報告書

期間 平成21年11月～平成25年11月

鈴木 定彦

(北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター・教授)

§1 プロジェクト実施の概要

概要

日本において、LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法ならびに結核の迅速薬剤感受性試験法開発し、ザンビアにおいて同国由来検体を用いて性能を評価した。さらに、結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、ザンビア保健省大学研究教育病院(UTH)に BSL3 施設を導入し、バイオセーフティ上の基準に対応した結核検査体制を構築した。また、トリパノソーマ症の治療薬候補物質を合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価により開発候補物質を選定した。

成果

結核迅速診断法開発

- 1) 日本において 16S リボゾーム RNA 遺伝子をターゲットとして LAMP 法を応用した迅速診断法を開発し、感度および特異性の評価を終了した。日本における評価試験では LAMP 法を応用した結核遺伝子診断法は感度、特異性ともに高く、臨床検体に応用可能であるとの結論に至った。
- 2) 上記結果を受けて、ザンビアにおいては、ヒト由来検体を対象とした迅速診断法研究に関する倫理承認を受けた。また、UTH と共同研究に関する合意書を締結して研究体制を整えた。
- 3) 結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、BSL3 実験室をUTHに導入するとともに、標準手順書を作成して、これに従った BSL3 実験室を活用した検査システムを構築した。これにより、UTHにおいてバイオセーフティの基準に対応した結核検査体制を構築した。更に、BSL3 実験室のセルフメンテナンスを可能とするためにカウンターパート技術者を養成した。
- 4) ザンビアの研究者に結核診断用 LAMP 法を技術移転するとともに、臨床検体収集体制を確立し、これを活用した結核迅速遺伝子診断法の評価を実施した。延べ 512 人から 1024 の喀痰検体ならびに 496 の尿検体を収集した。喀痰を対象とした結核遺伝子診断法評価試験を実施した。その結果、塗抹検査と遺伝子診断の結果の一致率が高く(陽性一致率 97.8%、陰性一致率 98.0%)、塗抹陽性検体の検査に有用であることが示唆された。
- 5) 地方の検査所でも使用できる乾燥タイプ結核遺伝子診断キットを開発した。本キットが室温で長期保存できる事を確認した。
- 6) プロジェクトの結核遺伝子診断キットでは喀痰の処理に遠心分離機を必要とするという難点があったが、TB-ビーズ(結核菌収集用磁気ビーズ)を導入する事により、この問題を解決した。
- 7) 市販の結核遺伝子診断法(栄研化学社製結核 LAMP ならびにセフィード社製 GeneXpert MTB/RIF)とプロジェクトで開発した TB-ビーズと乾燥タイプ結核遺伝子診断キットを組み合わせた方法の性能比較試験を実施し、プロジェクトのシステムが、感度、特異性ともに栄研化学社製結核 LAMP よりもすぐれている事を実証した。セフィード社製 GeneXpert MTB/RIF とはほぼ同等の性能であったが、1検体あたりのコストならびに機械のメンテナンスコストにおいてプロジェクトのシステムが、優位である事を確認した。
- 8) UTH の 3 名の研究者ならびに1名の技術者に結核の遺伝子診断法を技術移転した。プロジェクト終了後も遺伝子診断の継続実施が可能となっている。また、結核診断用乾燥 LAMP キットのザンビア人カウンターパートによる UTH での製造も可能となっている。
- 9) 更に、結核診断法はザンビア共和国での公定法としての承認を受けるための同国政府保健省主導のもと UTH を中心としたチームにより独自の評価試験の段階に入っている。ザンビア共和国の関連団体である Institute for Medical Research and Training (IMReT)より問い合わせも来ており、今後、この団体とも連携していく予定である。

トリパノソーマ症迅速診断法開発

- 1) 日本において LAMP 法を応用した迅速診断法を開発し、感度および特異性の評価を終了した。日本における評価試験では LAMP 法を応用したトリパノソーマ症遺伝子診断法は感度、特異性ともに高く、臨床検体に応用可能であると考えられた。
- 2) ザンビアにおいては、ヒト由来検体を対象とした迅速診断法研究に関する倫理承認を受けた。ザンビア人研究者に LAMP 法を応用したトリパノソーマ症の迅速診断法を技術移転するとともに、臨床検体収集体制を確立し、これを活用したトリパノソーマ症迅速遺伝子診断法の評価を実施した。さらに、ザンビア大学(UNZA)内にトリパノソーマ研究室を設置し、確実にトリパノソーマ症を診断できる体制を整えた。
- 3) 上記システムを活用して、UTHに入院していたトリパノソーマ症疑いの患者の血液ならびに脳脊髄液で LAMP 検査を実施し、確定診断と治療方針決定に重要な病相判定を行った。さらに治療後のフォローアップ

ブ検査も同法で実施し、完治したことを確認した。

- 4) トリパノソーマ症発生情報のある地域での現地調査を実施し、ザンビア国内での感染リスクの高い地域を明らかにした。
- 5) 地方の検査所でも使用できる乾燥タイプトリパノソーマ症遺伝子診断キットを開発した。さらに本キットが室温で長期保存できることを確認した。
- 6) UNZA の 2 名の研究者ならびに 1 名の技術者にトリパノソーマ症の遺伝子診断法を技術移転した。プロジェクト終了後も遺伝子診断の継続実施が可能となっている。また、トリパノソーマ症診断用乾燥 LAMP キットのザンビア人カウンターパートによる UTH での製造も可能となっている。

トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング

- 1) トリパノソーマ症治療薬候補物質として、新規化合物 300 種類以上を人工合成し、トリパノソーマ培養系を用いて活性を持つリード化合物を選定した。ヒト培養細胞を用いた細胞毒性試験を実施し、薬剤としての安全性を検討した。
- 2) 同程度の分子量を有する化合物ライブラリーを用い、化合物の造形を規定する要因(骨格や立体化学)や活性発現に関与すると考えられる官能基の種類を指標とした構造活性相関研究を実施し、抗トリパノソーマ活性に重要なファルマコフォアの三次元的な化学構造に関する新知見を得た。
- 3) 上記の培養系で良い成績が得られたリード化合物を対象として、トリパノソーマ原虫感染マウスモデルを用いて治療試験を実施したが、現時点では有望な化合物は見出せていない。
- 4) 一方、上記の新規化合物の中に感染マウスモデルにおいても抗マalaria活性を有する物質を見出した。

今後の見通し

結核およびトリパノソーマ症遺伝子診断法の評価試験は順調に進捗しており、特に乾燥タイプの LAMP キット作製に成功したことから、UTH に LAMP 法を定着させ、更に UTH 配下の地方病院検査室を手始めにザンビア国内に実装する事ができるものと考えられた。2012 年 8 月末に UTH に設置した BSL-3 実験施設と UNZA に設置したジェネティックアナライザを活用した結核薬剤感受性試験体制の構築を終了し、試験的導入を開始した。抗トリパノソーマ薬候補物質合成およびそれらの活性スクリーニングは順調に進捗している。更にスクリーニングを継続してゆくことにより、動物レベルでも有効な候補物質の絞り込みができるものと考えられる。

§ 2. プロジェクト構想(および構想計画に対する達成状況)

(1) 当初のプロジェクト構想

近年、結核、伝達性ウシ海綿状脳症、SARS、ニパウイルス、ハンタウイルス、ヘンドラウイルスや新型インフルエンザウイルス感染症、エボラ出血熱、肺ペスト、レプトスピラ病などの新興・再興感染症が世界各地で人類を脅かしている。

中でも結核は人類の3分の1が感染し、年間900万人の新規登録患者と140万人の死者を出している疾患であり、その対策が切望されている。特にアジア、アフリカ諸国では数多くの患者が見られ、全世界の結核患者の4分の3がアジア、アフリカ諸国に集中していると言われている。近年、治療困難な多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延も危惧されている。結核治療においては、主要な一次選択薬の内2剤以上が効かないものを多剤耐性結核、さらに、これに加えて特定の二次選択薬の2剤以上、合計4剤以上に耐性のものを超多剤耐性結核と呼んでいるが、一般に多剤耐性結核では、感受性結核に罹患した場合に比べて死亡率が高くなる。また、超多剤耐性結核では、治療法がない場合が多く、患者は社会から完全に隔離され、多くは早期に死亡する。東ヨーロッパ、西アジア地域では既に超多剤耐性結核が増加し、大きな社会問題となっている。一方、中央アジア、東南アジア、アフリカ、中東地域では多剤耐性結核は増加しているが、超多剤耐性結核の報告は少ない。従って、現段階でアジア、アフリカ地域における多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延対策は世界的蔓延防止に重要な意味を持つ。多剤耐性結核および超多剤耐性結核の蔓延を防止するためには、実験室診断を基準にした積極的な調査とその結果を踏まえた適切な対応が重要である。現在、世界的な流行調査はWHO主導で行われているが、現状の診断技術では費用と時間がかかり、包括的な調査は困難なのが実情である。実際、アジア、アフリカ諸国での多剤耐性結核および超多剤耐性結核の調査は不十分なものであると言わざるを得ない。現在の東ヨーロッパ、西アジア地域での超多剤耐性結核の蔓延状況から考えると、中央アジア、東南アジア、アフリカ、中東地域における多剤耐性結核および超多剤耐性結核の流行状況の調査と

その調査結果を踏まえた蔓延防止対策は急務と言える。また、人と動物間の距離が近接しているアジア、アフリカ諸国では、人獣共通感染症としての結核も注目する必要がある。結核の人と動物間の伝播の実態を明らかにすることは、この地域における結核の根本的な対策に重要である。

一方、トリパノソーマ症は高頻度にマalaria等の他の熱性疾患と誤診され、結果として不適切な治療による重篤化につながる例が少なくないため、早期の鑑別診断が重要となっている。

この様な状況下では、安価で簡便な診断法の開発と普及による薬剤耐性結核の迅速な診断とその結果を基にした適切な治療が不可欠であり、かつ急を要する。また、超多剤耐性結核に有効な新規抗結核剤の開発は、多剤耐性結核の蔓延を未然に防ぎ、結核の脅威から人類を守る上で、必要不可欠であるが、これらの要求を満足させることの出来る診断法、新規抗結核剤はないと言わざるを得ないのが現状である。

本研究では北海道大学とザンビア大学および UTH の交流実績を生かして、以下の課題を遂行し、その成就によりザンビア共和国における結核ならびにトリパノソーマ症の制圧を目指した。

- 1) 従来のチール・ネールゼン塗抹染色法による菌の検出に代わる方法として、LAMP法を基盤とした新規迅速診断法をザンビア共和国において実装可能な方法として確立する。
- 2) 従来の培養による薬剤感受性試験法に代わる方法として遺伝子変異検出を基盤とした結核の迅速薬剤感受性試験法をザンビア共和国において実装可能な方法として確立する。
- 3) 本研究を通じてザンビア共和国における結核サーベイランスネットワークを強化し、これを有効に活用して疫学情報を収集し、得られた情報を結核対策に役立てる。
- 4) 従来の血液標本の検鏡によるトリパノソーマ症診断に代わる方法としてLAMP法を基盤とした新規診断法をザンビア共和国において実装可能な方法として確立する。
- 5) トリパノソーマ症に対する新規治療薬候補物質を合成し、日本およびザンビア共和国でそれらの有効性を評価する事により新薬開発へと繋げる。
- 6) ザンビア共和国におけるトリパノソーマ症サーベイランスネットワークを構築して疫学情報を収集し、得られた情報をトリパノソーマ症対策に役立てる。

(2) 新たに追加・修正など変更したプロジェクト構想

- 1) 結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、結核菌の取り扱い上基本とされるBSL3実験室をUTHに導入するとともに、標準手順書を作成して、これに従ったBSL3実験室を活用した検査体制を構築した。これにより、UTHにおいてバイオセーフティーの基準に基づいた結核検査を実現した。
- 2) 当初計画では、液状の溶液を混ぜて実施するLAMPキットを想定していたが、ザンビアの地方の保健所レベルでの実施を可能とするために、乾燥タイプのキット開発を実施項目として追加した。
- 3) 結核臨床検体の処理には遠心分離操作を必要としていたが、結核菌と親和性を有する磁気ビーズ技術の導入により遠心分離操作なしでの喀痰処理を可能とした。
- 4) 当初計画では、結核検査の対象検体を喀痰と想定していたが、小児結核では喀痰を用いた診断が困難な事から、カウンターパートの要請を受けて、尿を対象としたキットを日本において開発した。尿検体を用いて結核の診断が可能となれば、小児のみならず成人の結核診断への応用も可能であり、喀痰を対象としたLAMP検査法との併用により、結核患者の検出率の向上が可能となるものと考えられる。

(3)活動実施スケジュール(実績)

(Plan of Operation に実績のバーチャートを線引きしたもの)

当初の研究計画(→)、実績(→)、追加項目(赤字)

項目	H21 年度 (5ヶ月)	H22 年度	H23 年度	H24 年度	H25 年度 (7ヶ月)
1. 結核迅速診断法開発(鈴木グループ)					
・検体収集	→	→	→	→	→
・遺伝子検査法の開発	→	→			
・乾燥キットの開発				→	→
・遺伝子診断法のザンビアでの評価			→	→	→
・迅速薬剤感受性試験法の開発		→	→		
・迅速薬剤感受性試験法のザンビアでの評価			→	→	→
・遺伝子診断法と迅速感受性試験法の実装				→	→
・検体ならびに結核菌株バンクの構築		→	→	→	→
2. トリパノソーマ症迅速診断法開発(梶野グループ)					
・検体収集	→	→	→	→	→
・遺伝子検査法の開発	→	→			
・乾燥キットの開発				→	→
・遺伝子診断法のザンビアでの評価			→	→	
・遺伝子診断法の実装				→	→
・検体ならびにトリパノソーマ株バンクの構築	→	→	→	→	→
3. トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング(大栗グループ)					
・治療薬候補物質のデザイン	→	→	→	→	→
・ケミカルライブラリーの構築	→	→	→	→	→
・トリパノソーマ培養系を基盤とした薬効評価系の構築	→	→			
・トリパノソーマ培養系を用いた薬効評価	→	→	→		
・マウスモデルを用いた薬効評価			→	→	→
・候補物質大量合成系の確立				→	→
・家畜を用いた薬効ならびに安全性評価					→

§3 プロジェクト実施体制・投入実績

3.1. 実施体制

(1) 鈴木グループ(結核迅速診断法開発)

① 研究参加者

種別	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
				開始		終了	
				年	月	年	月
○	鈴木 定彦	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授	2008	10	2013	11
	有賀 正	北海道大学医学部	教授	2008	10	2013	11
	浅野 喜造	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	特任教授	2010	4	2013	11
	中島 千絵	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	特任助教	2011	4	2013	11
	ミラー 真里	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	特定専門職員	2011	6	2013	11

○	松葉 隆司	鳥取大学医学部	講師	2008	10	2013	11
---	-------	---------	----	------	----	------	----

○	井平 勝	藤田保健衛生大学医療科学部	准教授	2011	8	2013	11
---	------	---------------	-----	------	---	------	----

② 研究項目

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

(2) 梶野グループ(トリパノソーマ症迅速診断法開発)

① 研究参加者

種別	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
				開始		終了	
				年	月	年	月
○	梶野 喜一	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	准教授	2008	10	2013	11
	東 秀明	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授	2012	4	2013	11
	杉本 千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授	2008	10	2012	3
	浅野 喜造	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	特任教授	2010	4	2013	11
	石黒 信久	北海道大学医学部	准教授	2008	10	2013	11

○	井上昇	帯広畜産大学原虫病研究センター	教授	2011	10	2013	7
	林田京子	帯広畜産大学原虫病研究センター	特任研究員	2013	7	2013	11

② 研究項目

- ・ 検体の収集
- ・ 遺伝子検査法の開発

- ・ 遺伝子検査法のザンビアにおける評価
- ・ 遺伝子検査法の実装
- ・ 検体ならびにトリパノソーマ株バンクの構築

(3) 大栗グループ(トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング)

① 研究参加者

種別	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間			
				開始		終了	
				年	月	年	月
○	大栗 博毅	北海道大学大学院理学院化学部門	准教授	2008	10	2013	11
	梶野 喜一	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	准教授	2008	10	2013	11
	杉本 千尋	北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター	教授	2008	10	2012	3
	比留間 貴久	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2013	3
*	Mahendar Velisoju	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2012	9
	和田光弘	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2013	3
	落合恭平	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2013	3
	田村梨恵	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2013	3
	溝口玄樹	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2010	4	2013	3
	南真太郎	北海道大学大学院理学院化学部門	大学院生	2013	1	2013	3

② 研究項目

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

§ 4 プロジェクト実施内容及び成果

4.0 プロジェクト全体

(1) グループを統合した全体の成果

1) 日本において、LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法ならびに結核の迅速薬剤感受性試験法開発し、この技術をザンビアのカウンターパートへ移転した。ザンビアにおいてカウンターパートとともに同国由来検体を用いて性能を評価し、感度、特異性ともに優れており、ザンビアにおいて診断法として臨床実装可能である事を示した。結核迅速診断においては UTH 結核研究室へ定着させた。現在は、結核診断法はザンビア共和国での公定法としての承認を受けるために同国政府保健省主導のもと UTH を中心としたチームにより評価試験の段階に入っている。トリパノソーマ症の迅速診断法はすでに眠り病疑い患者の確定診断に活用されている。今後も UTH と UNZA の現行の協力体制のもと検査を継続することとなっている。

- 2) 結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、UTHにバイオセーフティ上の基準を満たすBSL3 施設を導入し、結核検査体制を実現した。BSL3 施設運転に当たっては、BSL3 施設使用に係る標準手順書を作成し、UTH の安全委員会から承認をうけた。今後、ザンビアにおいてバイオセーフティの考え方の普及が図られる事が期待される。
- 3) トリパノソーマ症の治療薬候補物質を合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価により開発候補物質を選定した。

(2)今後期待される効果

他のいくつかのプロジェクトではWHOの推奨を受けている市販の遺伝子診断キットの導入を試みているが高価であり、サステナビリティの面で問題がある。本プロジェクトでは、乾燥 LAMP キットのザンビアのカウンターパートによる独自作出を可能とするクリーンブースを UTH 結核研究室内に設置し、更に試薬購入ルートも構築している。これらを利用して乾燥 LAMP キットがザンビアで生産されることとなれば、キット作出に要する試薬の価格と人件費は必要であるが、市販キット購入に比べて大幅な費用削減が実現でき、ザンビア保健省予算の大幅な削減となることから、サステナビリティに繋がる。また、本プロジェクトを通じてザンビアでの検査技術が向上するとともに、カウンターパートの検査法開発ならびに新規化合物の抗トリパノソーマ活性の評価能力も向上したものと考えられる。

4.1. 鈴木グループ(結核迅速診断法開発)

①研究のねらい

多剤耐性結核および超多剤耐性結核の感染拡大が危惧されている。結核の蔓延を防止するためには、積極的な診断とその結果を踏まえた適切な治療が重要である。現状の診断技術では費用と時間がかかり、適切な治療を早期に開始することは難しい。本研究では、迅速で低費用の結核診断法および薬剤感受性試験法を開発し、これをザンビアにおいて評価し、普及させることにより同国の結核対策に資するとともに、カウンターパートの研究技術能力向上も図ることを狙いとした。ザンビアは南アフリカを除くサハラ以南アフリカ諸国の間での中心的な役割を演じていることから、本研究により開発・評価される方法が近隣諸国を対象とした技術研修会を開く等によりそれらの国々へ普及させる事が出来れば、それらの国々における結核対策にも貢献するものと考えられる。また、この様な活動を通してヒトでの感染状況を把握し、かつ同法を用いて人と動物間の結核の伝播の実態を明らかにすることは、人獣共通感染症としての結核の根本的な対策としても重要である。

②研究実施方法

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

③当初の計画(全体計画)に対する成果の状況

- 1) 日本において結核迅速診断法を開発し、その性能評価を予定通り終了した。
- 2) 結核迅速薬剤感受性試験法を開発するために薬剤耐性に関与する遺伝子変異に関する情報を網羅的に収集した。
- 3) ザンビアにおいてヒト由来検体を対象とした研究に関する倫理承認を受けた。
- 4) UTHと共同研究に関する合意書を締結し、研究体制を整えた。
- 5) 結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、安全に結核菌培養試験、薬剤感受性試験、DNA抽出を実施できる施設の整備を提案し、ザンビア保健省ならびに JICA からの承認のもと、コンテナ型 BSL-3 実験室 2 基を設置した。標準手順書を作成して、これに従った BSL3 実験室を活用した検査システムを構築した。これにより、UTHにおいてバイオセーフティの基準に則った結核検査実験室を構築できた。
- 6) 結核遺伝子診断法をザンビアにおいて技術移転した。
- 7) 乾燥タイプの結核診断用 LAMP キットの作出に成功した。結核遺伝子診断法のザンビアにおける評価試験を終了し、プロジェクトのシステムが、感度、特異性ともに栄研化学社製結核 LAMP よりもすぐれている。

事を実証した。セフィード社製 GeneXpert MTB/RIF とはほぼ同等の性能であったが、1検体あたりのコストならびに機械のメンテナンスコストにおいてプロジェクトのシステムが、優位である事を確認した。

- 8) 安全に研究を遂行できる施設の整備が遅れているため、それ無しでも可能な結核迅速診断法の評価のみが進捗していたが、平成 24 年 8 月末に BSL-3 施設の設置が完了した事により、迅速薬剤感受性試験法の評価が可能となった。その後の研究加速により、UNZA に設置したジェネティックアナライザを活用して薬剤感受性試験をセットアップした。
- 9) 本プロジェクトでは、乾燥 LAMP キットのザンビアカウンターパートによる独自作出を可能とするクリーンブースを UTH 結核研究室内に設置し、更に試薬購入ルートも構築した。これにより、プロジェクト終了後の継続的な協力により乾燥 LAMP キットをカウンターパートが自国生産出来る様にした。キット作出に要する試薬費と人件費は必要であるが、市販キット購入に比べて大幅な費用削減が実現でき、ザンビア保健省予算の大幅な削減となる。
- 10) 尿を検体とする結核 LAMP キットを作出して塗抹ならびに培養法の結果との比較によりその性能を評価した。感度が低い事から、改良の必要性があるものと考えられた。

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) 結核の遺伝子診断法(LAMP, PCR)に関して、カウンターパートに対するレクチャー並びにトレーニングを実施し、技術および知識の普及を図った。現在、UTH の 3 名の研究者ならびに1名の技術者は結核の遺伝子診断法をマスターしており、プロジェクト終了後も遺伝子診断の継続実施を可能とした。
- 2) 結核診断用乾燥 LAMP キットのザンビア人カウンターパートによる UTH での製造を可能とした。
- 3) カウンターパート2名を米国イーグルソン研究所にて開催されたフィルターメンテナンスの研修会に参加させ、BSL3 実験室のセルフメンテナンスを可能とするための技術者として養成した。今後は研究者代表者の鈴木が定期的にザンビアを訪問して技術者のフォローアップに当たることより、ザンビア人による BSL3 実験室のセルフメンテナンスを確実なものとしてゆく。BSL3 実験室のセルフメンテナンスに係る機材は本プロジェクトで用意しており、資材も4年分は調達・補完してあるが、更に長期にわたる保守管理にはセルフメンテナンスに係る資材調達費が恒常的に必要となる。現在は、これを予算に組み入れる事を保健省に進言している。技術者の養成と予算の確保により、持続的な BSL3 実験室の稼働が可能とする。

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

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

4.2. 梶野グループ(トリパノソーマ症迅速診断法開発)

①研究のねらい

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

②研究実施方法

- 1) ヒト臨床試料、動物血液試料、媒介節足動物(ツェツェバエ)試料から DNA を抽出し、LAMP, PCR での原虫検出を行う。ザンビアで実施できるよう、技術移転を行うのに並行し、必要に応じて技術の簡便化、高精度化を図る。
- 2) 患者発生の情報をザンビア政府等から得て、現地調査を実施する。発生地でのヒト、飼育家畜、ツェツェバエでの原虫保有状況を調査する。

③当初の計画(全体計画)に対する成果の状況

- 1) 上記項目 2) で収集された試料からの DNA 抽出、PCR, LAMP をカウンターパートと共に実施し、技術移転により UNZA 内のトリパノソーマ研究室では確実に診断できる体制を整えた。また動物接種により原虫を分離し液体窒素内で保管する体制を整備し、リファレンスとなる原虫バンクを構築した。
- 2) カウンターパートが中心になって実施した発生地(東部州 Mwanza)での現地調査に同行し、試料採取、検体処理等に協力した。当該調査では、現地クリニックに簡易診断ラボを設置し、採血後、マラリアの検査(市販キット)、血液からの DNA 精製と LAMP を実施できる体制を整えた上で、合計 111 体の提供を受けた。うち乳児・小児で診断に十分な血液量を得られなかった検体を除く 74 検体についてヘマトクリット遠心法による原虫検出と LAMP 診断を行った。また、トリパノソーマ症との鑑別のため、市販の血清診断

法によるマラリア診断(イムノクロマト法)も行った。その結果、成人 26、乳幼児 53 の被験者が Plasmodium 陽性を示し、検査陽性患者には治療薬を投与できるように手配を行った。また、Petauke 地域においてツェツェバエの捕獲を行い、採取した唾液腺をマウスに接種することにより、この地域におけるヒト感染性タイプトリパノソーマ原虫6株の分離に成功した。

- 3) 発生の最前線となる地方クリニックでの LAMP 実施には、試薬を安定供給できる体制の確立や手法のさらなる簡便化、試薬の安定化(室温保存)や温度耐性の検討を図る必要があると考えられたことから、これらの問題を克服できる乾燥タイプの LAMP キットの作出を試みて、これに成功した。さらに、乾燥タイプの LAMP キットの性能評価試験を実施し、良好な結果を得た。

④カウンターパートへの技術移転の状況

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

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

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

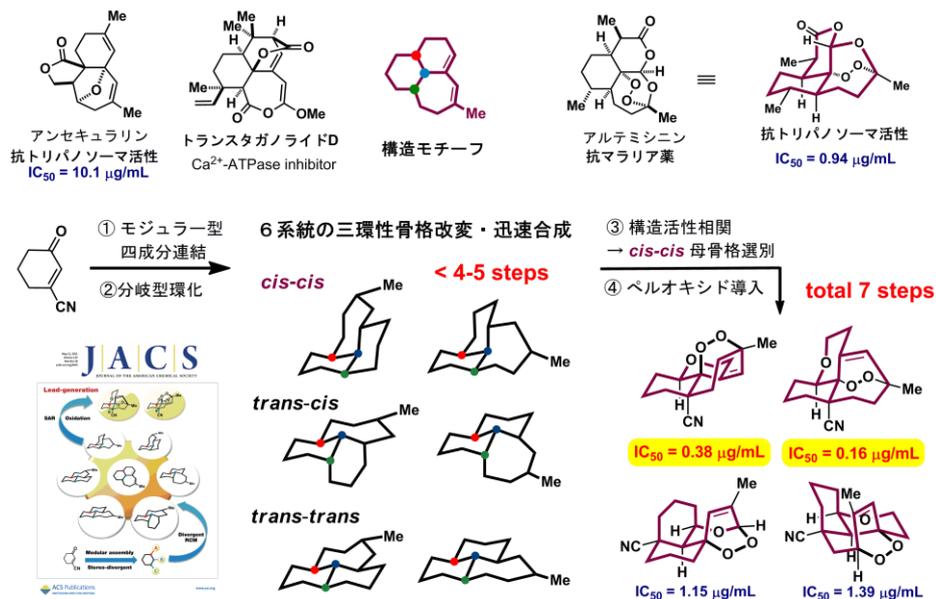
4.3. 大栗グループ(トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング)

①研究のねらい

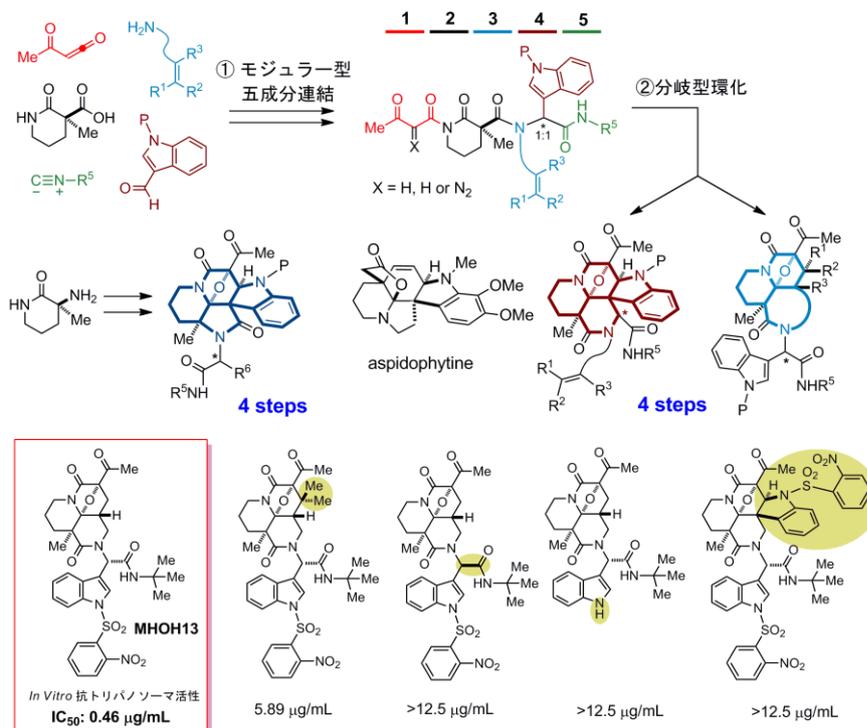
トリパノソーマ原虫は、感染した動物の体内で頻繁に抗原変異を繰り返すため、ワクチン療法の適用が難しい。現在実施されているトリパノソーマ薬投与による治療法についても、重篤な副作用や薬剤耐性の出現という問題が指摘されている。治療を受けずに放置すると死に至る感染症であるにもかかわらず、地球上で最も貧しい地域で蔓延するので、罹患者が切望する治療薬は常に供給不足の状況にある。多くの人々をトリパノソーマの脅威から救い出すため、安全、安価で有効な新しい治療薬の開発が強く望まれている。本プロジェクトでは、既存の抗トリパノソーマ薬とは構造特性が異なる薬剤候補分子群を簡便かつ系統的に合成し、新規治療薬候補物質のスク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

②研究実施方法

- 1) 骨格多様化合成 - 1: 抗トリパノソーマ活性物質アンセキュラリン、抗マラリア剤アルテミシニン、Ca²⁺-ATPase を阻害するトランスタガノライド等の天然有機化合物の構造と機能の相関を踏まえて、三環性骨格に共役ジエンとメチル基を導入した構造モチーフを設計した。①シクロヘキセンの3位にニトリル基を導入した化合物に三種類の構築ブロックを順次導入しつつ、縮環部に相当する三連続立体化学を改変する合成プロセスを開発する。②環化様式を制御可能な分岐型の合成プロセスで、六系統の三環性骨格を構築する。得られた三環性骨格ライブラリーを活用した *In Vitro* 抗トリパノソーマ活性試験結果に基づいて、活性発現に有望な母骨格の優先順位を決定しながら、ファルマコフォアを把握する。選別した母骨格に更なる官能基変換を施すことで、抗トリパノソーマ活性がより向上した候補化合物を合理的に探索する合成プロセス(<5-7工程)を確立する。

図1 骨格多様化合成の概念実証 *Org. Lett.* 2009. *J. Am. Chem. Soc.* 2011.

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

図2: 骨格多様化合成-2: *Org. Lett.* 2009. *Beilstein J. Org. Chem.* 2012.

- 3) 上記 1)-2) の方法を駆使して、抗トリパノソーマ活性探索に有効な化合物ライブラリーを構築する。生体高分子へ特異的に相互作用しうる構造特性を付与した化合物群を創製し、より強力な抗トリパノソーマ活性を発現し、かつ、副作用を大幅に低減した候補化合物の創製を目指す。
- 4) 候補化合物の抗トリパノソーマ活性とヒト培養細胞での細胞毒性を試験管内で評価し、動物試験に用いる化合物の候補を絞る。①ヒト培養細胞系を活用した毒性試験と② IC_{50} 値を比較した定量的な構造活性

関連研究に基づいて候補物質の構造を最適化し、抗トリパノソーマ治療薬の開発に直結するリード化合物を合理的に創製する。

- 5) マウスを用いて上記4)で絞り込んだ候補化合物の有効性を評価する。さらに、感畜を用いて候補化合物の有効性を評価する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する成果の状況

- 1) 骨格多様化合成-1:骨格や縮環部立体化学を改変した三環性骨格群(六種類)を迅速(4-6工程)に構築し、*cis-cis*縮環した三環性ジェン(二種)に顕著な抗トリパノソーマ活性を見出した(北里大学乙黒グループとの共同研究)。選別した母骨格に対して、ジェンの異性化と一重項酸素酸化によりアルテミシニンアナログ群を合成した。エンドペルオキシド導入の位置と立体化学のバリエーションにより、低分子ライブラリーの三次元的な構造多様性を更に増大させるとともに、アルテミシニンや既存の治療薬(スラミン・エフォルニチン)よりも強力な抗トリパノソーマ活性(*in vitro*)を発現するリード化合物の創製に成功した(図1)。分子の造形を規定する構造要素を系統的に改変した天然物類似多環性分子群を活用することで、リード化合物探索と同時に構造活性相関研究を実施し、ファルマコフォアの三次元構造を把握できることを実証した。この知見に基づいて、十分なサンプル量を合成し、*in vivo*での活性を評価した。また、アルテミシニン類の水溶性を向上させながら、多様な類縁体を合成する第2世代の合成プロセスの開発に着手した。この試行錯誤の過程で合成した[OKOH14, 15, 16, 17, 18(5種)]が、*in vitro*で良好な活性(IC₅₀値 <5 μM)を示したので、*T. b. rhodesiense* IL1501に対する*in vivo*活性を評価した。
- 2) 骨格多様化合成-2:ピペリジン型 Scaffold にインドールやジアゾエステルを連結し、Rh触媒による連続環化で多環性骨格を一挙に構築すべく、インドール環と競合する位置にオレフィンを導入した分岐型環化前駆体を種々合成した(図2)。まず、インドール側で環状付加を進行させ、アスピドファイチンに類似した六環性骨格を僅か四工程で構築することに成功した。一方、オレフィン側で環化させることで、構造特性の異なる四環性骨格を合成した。これは、Ca²⁺-ATPase 阻害剤トランスタガノリドDの骨格に良く類似しており、高酸化型セスキテルペン天然物群のアナログとなりうる。生合成の基本戦略(①モジュラー型多成分連結、②分岐型環化による骨格多様性創出)に立脚し、縮環分子の構造を多様化する短工程合成プロセスを実現した。図2の四段階プロセスで合成したトランスタガノライド類似の化合物群の中から、*in vitro*で強力な抗トリパノソーマ活性を示す化合物を見出し、骨格、立体化学や官能基を指標とした構造活性相関を把握した(北里大学乙黒グループとの共同研究)。*in vitro*で活性を示したMHOH13について、十分なサンプル量を再合成して*T. b. rhodesiense* IL1501に対する*in vivo*活性を評価した。*in vivo*で活性を発現する化合物の創製するため、第二世代のインドールアルカロイド群の骨格多様化合成を展開した[Org. Biomol. Chem. 2012 & 2014 (online 公表済)および Nature Chemistry 2014 (online 公表予定 2013/11/25)]。この過程でIn Vitro抗トリパノソーマ活性(IC₅₀値 <5 μM)を発現する5種類の候補化合物を選定することができた。中でもMHOH116は、ヒト培養細胞(MRC-5)への毒性がほとんど無いことが分かった。MHOH116, 131, 134, MTOH11, 60については、*T. b. rhodesiense* IL1501に対する*in vivo*での活性を評価した。
- 3) 上記により、300種類以上の天然物類似化合物群を北海道大学創成機構流動部門ならびに理学研究院化学部門で合成した。
- 4) 細胞レベルでの抗トリパノソーマ活性を評価する簡便な一次スクリーニング系を構築した。構造新規性を有する天然物類似化合物群(>250種)について、一次スクリーニングを実施し、既存の抗トリパノソーマ治療薬(スラミン・エフォルニチン)と同等かそれ以上の*in vitro*抗トリパノソーマ活性を発現する候補化合物(13種)を創製できた。新規な構造を持つ候補化合物の抗原虫活性を*T. brucei* 3亜種(*brucei*, *rhodesiense*, *gambiense*)ならびに*T. evansi*を用いて検査を検討している。上記の新規化合物群に対して、抗トリパノソーマ活性発現に重要な化合物の構造要因について重要な知見を得ることができた。
- 5) 4)で記載したスクリーニングの結果、*in vitro*で効果の高かった13種の化合物[OKOH14, 15, 16, 17, 18(5種)], [MHOH13, 116, 131, 134(4種)], [VMOH11, 12(2種)], [MTOH11, 60(2種)]ならびにペンタミジンのアナログ分子(下記⑤-1参照)[VMOH29, 30, 31, 34, 35(5種)]の合計18種類の化合物を用いて、*T. brucei rhodesiense*感染マウスでの治療試験を検討した。

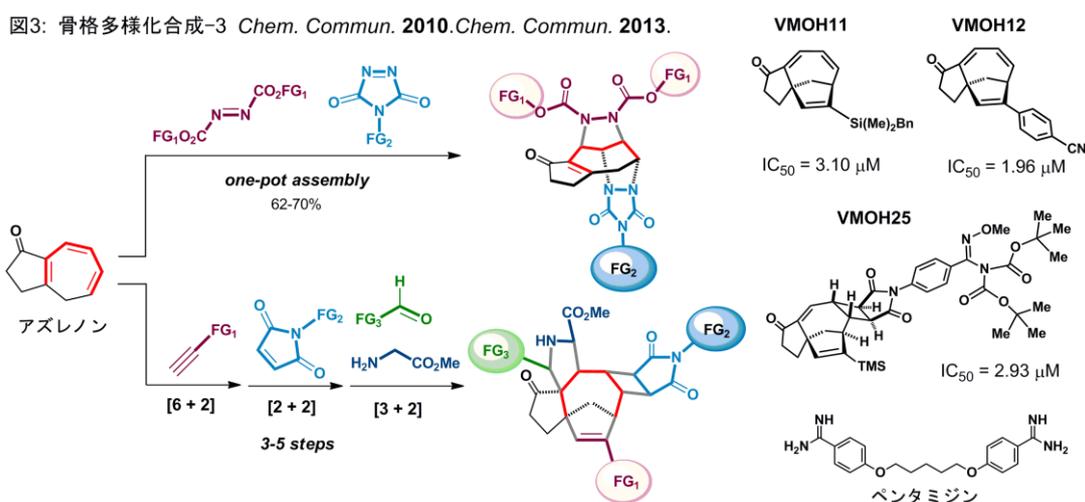
以上のように候補物質合成および抗トリパノソーマ活性スクリーニング法の開発は順調に進捗している。今後更に多くの候補物質の合成と抗トリパノソーマ活性のスクリーニングにより目標は達成できるものと考えられる。

④ カウンターパートへの技術移転の状況

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

④ 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

- 1) 骨格多様化合成-3: 医薬品の構成元素として含有率の高い窒素原子を天然物類似の 5/7 骨格ヘンポットで集積化する新規変換法を開発した(Chem. Commun. 2010)。この知見に基づきながら、トリパノソーマ症治療薬ペンタミジンの構造をより複雑化・機能化した化合物ライブラリーを創製する短段階合成プロセス(<6工程)を開発した(Chem. Commun. 2013)。このアプローチにより、In Vitro の試験で強力な抗トリパノソーマ活性(IC_{50} 値 $< 5 \mu M$)を発現する数種類の候補化合物(VMOH11, 12)を見出した。これらの化合物の In Vivo 試験結果を踏まえて、ペンタミジンの活性発現に重要なベンズアミジン部位を導入し、水溶性の向上が期待される化合物群(VMOH25-37)を合成し、*in vitro* での活性を評価した。十分なサンプル量を合成した[VMOH29, 30, 31, 34, 35 (5種)]については、*in vivo* 試験を実施した。二つのベンズアミジン部位を天然物類似の多環式骨格に連結したペンタミジンは腎臓や肝臓での毒性が高いので、副作用を可能な限り低減し、より顕著な抗トリパノソーマ活性を発現する化合物を創製すべく検討を続けている。



- 2) 生理活性天然物の骨格を多様化する合成アプローチを試行錯誤する過程で、抗マラリア活性を有する化合物を見出した(特許出願中)。

§5 成果発表等

- (1) 原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 33 件)

プロジェクト参加者に下線

1. Mizoguchi H, Oguri H, Tsuge K, Oikawa H. Divergent and Expeditious Access to Fused Skeletons Inspired by Indole Alkaloids and Transtaganolides. *Org. Lett.* 2009, 11, 3016-3019.
2. Ishigaki Y, Mahendar V, Oguri H, Oikawa H. An anti-tetraamination of a 1,3-diene unit via cascade annulations of the azulene scaffold with dicarbonyl azo-compounds. *Chem. Commun.* 2010, 46, 3304-3305.
3. Fukasawa T, Oda N, Wada Y, Tamaru A, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y. (2010) A novel method for the purification of DNA by capturing nucleic acid and magnesium complexes on non-woven fabric filters under alkaline conditions for the gene diagnosis of tuberculosis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Jpn. J. Infect. Dis.* 63: 246-250.
4. Nakajima C, Rahim Z, Fukushima Y, Sugawara I, van der Zanden AGM, Tamaru A, Suzuki Y. (2010) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates in Bangladesh by a Species Distinguishable Multiplex PCR. *BMC Infect. Dis.* 10:118.
5. Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, Rahim Z, Kim YU, Oguri H, Suzuki Y. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011, 55, 3661-3667.
6. Oguri H, Hiruma T, Yamagishi Y, Oikawa H, Ishiyama A, Otaguro K, Yamada H, Omura S. Generation of anti-trypanosomal agents through concise synthesis and structural diversification of sesquiterpene analogs. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 7096-7105.
7. Hang'ombe M B, Nakajima C, Ishii A, Fukushima Y, Munyeme M, Matandiko W, Mweene A S, Suzuki Y.

- (2011) Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Cattle and Lechwe (*Kobus lechwe kafuensis*) at the slaughter house. *Vet. Sci. Dev.* 1:e5
8. Wang J, Zhang C-L, Zhang L-Z, Ji B-Y, Liu Y, Shao Y-Z, Jiang S-L, Suzuki Y, Nakajima C, Fan C-L, Ma Y-P, Tian G-W, Hattori T, Ling H. (2011) Genotypes and characteristics of clustering and drug-susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Heilongjiang Province, China. *J. Clin. Microbiol.* 49:1354-62
 9. Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. (2012) Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(2):697-702.
 10. Kim H, Nakajima C, Kim Y-U, Yokoyama K, Suzuki Y. (2012) Influence of lineage specific amino acid dimorphism in GyrA on the fluoroquinolone resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Jpn J Infect Dis* 65(1):72-74
 11. Mizoguchi H, Oikawa H, Oguri H. Hg(OTf)₂-Catalyzed Direct Vinylation of Tryptamines and Versatile Applications for Tandem Reactions. *Org. Biomol. Chem.* 2012, 4236-4242.
 12. Oguri H, Mizoguchi H, Oikawa H, Ishiyama A, Iwatsuki M, Ootoguro K, Ōmura S. Parallel and four-step synthesis of natural product-inspired scaffolds through modular assembly and divergent cyclization. *Beilstein J. Org. Chem.* 2012, 8, 930-940
 13. Siddiqi UR, Leano PSA, Chagan HY, Shiratori B, Naitoh H, Ashino Y, Suzuki Y, Hattori T, Telan E. (2012) Frequent detection of anti-tubercular-glycolipid IgG and IgA antibodies in the healthcare workers with latent tuberculosis infection in the Philippines. *Clin. Develop. Immunol.* 2012: 610707
 14. Siddiqi UR, Shiratori B, Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Usuzawa M, Nakajima C, Suzuki Y, Saitoh H, Hattori T. (2012) Distinct Clinical Features in Nontuberculous Mycobacterial Disease With or Without Latent Tuberculosis Infection. *Tohoku J Exp Med.* 226 (4):313-319
 15. Suzuki Y, Nakajima C, Tamaru A, Kim H, Matsuba T, Saito H. (2012) Sensitivities of ciprofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates to fluoroquinolones: Role of mutant DNA gyrase subunits in drug resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39(5):435-439.
 16. Iwamoto T, Nakajima C, Nishiuchi Y, Kato T, Yoshida S, Nakanishi N, Tamaru A, Tamura Y, Suzuki Y, Nasu M. (2012) Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect. Genet. Evolu.* 12(4):846-52
 17. Poudel A, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Pandey BD, Maharjan B, Suzuki Y. (2012) Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Nepal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56(6):2831-2836
 18. Bi A, Nakajima C, Fukushima Y, Tamaru A, Sugawara I, Kimura A, Kawahara R, Hu Z, Suzuki Y. (2012) A rapid loop-mediated isothermal amplification assay targeting *hspX* for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Jpn J Infect Dis* 65(3):247-251
 19. Rudeeaneksin J, Bunchoo S, Srisungngam S, Sawanpanyalert P, Chamnangrom S, Kamolwat A, Thanasripakdeekul P, Taniguchi T, Nakajima C, Suzuki Y, Phetsuksiri B. (2012) Simple and rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* in BACTEC MGIT960 cultures by in-house loop mediated isothermal amplification. *Jpn J Infect Dis* 65(4):306-11
 20. Rahim Z, Momi SB, Saha SK, Zaman K, Uddin KN, Ashraf Jamil SNA, Nahar N, Azad Khan AK, Cooreman EAWD, Ahmed M, van der Zanden AGM, Nakajima C, Suzuki Y, Endtz HP. (2012) Pulmonary tuberculosis in patients with diabetes mellitus in Bangladesh. *Int J Tuberc Lung Dis.* 16(8):1132-3
 21. Tamaru A, Nakajima C, Wada T, Kawahara R, Maekura R, Ozeki Y, Ogura H, Kobayashi K, Suzuki Y, Matsumoto S. The Dominant Incidence of One Strain of Peculiar Genotype to Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Osaka Prefecture, Japan. *PLoS One* 7(8): e42505
 22. Hang'ombe BM, Munyeme M, Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki H, Matandiko M, Ishii A, Mweene AS, Suzuki Y. (2012) *Mycobacterium bovis* infection at the interface between domestic and wild animals in Zambia. *BMC Veterinary Research* 14 (8): 221
 23. Rahim Z, Nakajima C, Raqib R, Zaman K, Endtz HP, van der Zanden AGM, Suzuki Y. (2012) Molecular Mechanism of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *M. tuberculosis* from Bangladesh. *Tuberculosis* 92 (6): 529-534
 24. Yokoyama K, Kim H, Mukai T, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. (2012) Impact of amino acid substitutions in B subunit of DNA gyrase in *Mycobacterium leprae* on fluoroquinolone resistance. *PLoS Neglect Trop Dis* 6 (10): e1838
 25. Namangala B, Hachaambwa L, Kajino K, Mweene AS, Hayashida K, Simuunza M, Simukoko H, Choongo K, Chansa P, Lakhi S, Moonga L, Chota A, Ndebe J, Nsakashalo-Senkwe M, Chizema E, Kasonka L, Sugimoto C. (2012) The use of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) to detect the re-emerging Human African Trypanosomiasis (HAT) in the Luangwa and Zambezi valleys. *Parasit Vectors.* 2012 Dec 4;5:282.
 26. Poudel A, Maharjan B, Nakajima C, Fukushima Y, Pandey BD, Beneke A, Suzuki Y. (2013) Characterization of extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Nepal. *Tuberculosis* 93(1):84-88

27. Phetsuksiri B, Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Bunchoo S, Roienthong D, Mukai T, Nakajima C, Hamada S, Suzuki Y. (2013) Applicability of in-house loop-mediated isothermal amplification for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex grown on solid media. *Jpn J Infect Dis* 66 (3):249-251
28. Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Maharjan B, Aye KS, Ling H, Hattori T, Iwamoto T, Fukushima Y, Suzuki H, Suzuki Y, Matsuba T. (2013) A simple multiplex PCR for the identification of Beijing family of *Mycobacterium tuberculosis* with a lineage-specific mutation in *Rv0679c*. *J Clin Microbiol* 51(7):2025-2032
29. Namangala B, Oparaocha E, Kajino K, Hayashida K, Moonga L, Inoue N, Suzuki Y, Sugimoto C. (2013) Preliminary investigation of trypanosomiasis in exotic dog breeds from Zambia's Luangwa and Zambezi valleys using LAMP. *Am J Trop Med Hygiene*. 89(1):116-118
30. Mahendar V, Oikawa H, Oguri H. Sequential [6+2], [2+2], and [3+2] annulations for rapid assembly of multiple fragments. *Chem Commun* 2013, 49(23):2299-2301
31. Mochabo KM, Zhou M, Sukanuma K, Kawazu SI, Suzuki Y, Inoue N. (2013) Expression, immunolocalization and serodiagnostic value of Tc38630 protein from *Trypanosoma congolense*. *Parasitol Res*. 112(9):3357-63.
32. Wada M, Murata, T, Oikawa H, Oguri H. A nickel-catalyzed dimerization of pyrrolidinoindoline scaffold: a systematic access to chimonanthines, folicanchines and (+)-WIN 64821. *Org. Biomol. Chem.* 2014,12(2),298-306.
33. Mizoguchi H, Oikawa H, Oguri H. Biogenetically inspired synthesis and skeletal diversification of indole alkaloids. *Nature Chem.*2014,6(1),57-64.

(2) 研修コースや開発されたマニュアル等

① 研修コース等

1. 第1回迅速診断法ワークショップ(2010/05/10)
 コース目的:LAMP法による結核診断技術の普及を図る。
 対象:保健省大学研究病院研究者、ザンビア大学獣医学部研究者
 参加資格:研究者以上
 修了者数:12名
2. Biosafety training (第1回:2012/08/23、その後は必要に応じて)
 目的:BSL3使用開始にあたり必要な知識と手順を身に付ける。
 対象:保健省大学研究病院結核ラボ技術者
 参加資格:研究者以上
 修了者数:11名
 第2回目以降の研修は3名のC/Pが担当者となり、必要に応じて新スタッフや実習生を対象に実施している。
3. 栄研 LAMP 研修(2013年4月22日～26日)
 目的:栄研 PURE 法と LAMP の手技を習得する。
 対象:保健省大学研究病院結核ラボ技術者
 参加資格:結核ラボ室長と日本人専門家による選考により選ばれた者
 修了者数:3名

② 開発したテキスト・マニュアル類

1. Standard Operating Procedure for Bio Safety Level 3 (BSL3) facility at TB laboratory, University Teaching Hospital, Ministry of Health, Republic of Zambia
2. Standard Operating Procedure for in-house Tuberculosis LAMP
3. Standard Operating Procedure for in-house Trypanosomiasis LAMP
4. Check list for CTL
5. Drainage management flowchart and observation form

(3) その他の著作物(総説、書籍など)

1. 鈴木定彦、飯塚 昌、大栗博毅、杉本千尋. (2010) 地球規模課題対応国際科学技術協力事業 結核及びトリパノソーマ症の診断法と治療薬開発. *環境科学会誌* 23 巻 522-529.
2. 松岡正典、鈴木定彦、牧野正直. (2010) DNAマイクロアレイを用いた薬剤耐性らい菌の簡易検出法の創出と、その開発途上国における有用性. *日本ハンセン病学会誌*.79:257-262
3. 松葉隆司、中島千絵、鈴木定彦. (2010) 結核菌のエンベロップ構造と成分. *細菌学雑誌*. 65:355-368
4. 鈴木定彦、中島千絵、松葉隆司. (2011) 結核 *最新医学* 66:2689-2696.

5. Shiratori B, Saitho H, Umme-Ruman S, Zhao J, Chagan-Yasutan H, Usuzawa M, Nakajima C, Suzuki Y, Hattori T. (2012) Immunological diagnosis of active and latent TB. Cardona P-J (eds.), *Mycobacterium tuberculosis*/Book 1, Intech Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, 分担執筆 p353-378
6. Suzuki Y, Nakajima C, Matsuba T. (2011) Molecular Biological study of *Mycobacterium leprae*. p.56-71 M Makino, M Matsuoka, M. Goto and K hatano (eds.), *Leprosy*, Tokai University Press, Kanagawa, Japan
7. 金玄, 鈴木晴香, 松岡正典, 松葉隆司, 横山和正, 中島千絵, 鈴木定彦(2011) らい菌および結核菌のニューキノロン耐性獲得機構と耐性菌迅速鑑別法. *日本ハンセン病学会誌*. 80:17-27.
8. Koketsu K, Minami A, Watanabe K, Oguri H, Oikawa H. (2012) The Pictet-Spengler mechanism involved in the biosynthesis of tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics: Novel function of non-ribosomal peptide synthetase. *Method Enzymol* 2012, 516, 79-98.
9. Minami A, Oguri H, Watanabe K, Oikawa H. (2013) Biosynthetic machinery of ionophore polyether lasalocid: Enzymatic construction of polyether skeleton. *Curr Opin Chem Biol* 2013, 17, 555-561.

(4)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 3 件、国際会議 6 件)

1. Oguri H. Design and Expedition Synthesis of Natural Product-Inspired Multi-cyclic Scaffolds: Strategies for Fragment Assembly and Skeletal Diversification. 第93日本化学会春季年会 有機化学ディビジョン アジア国際シンポジウム, 2013年3月24日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス
2. Oguri H. Concise synthesis and structural diversification of natural product analogs. 第91日本化学会春季年会 有機化学ディビジョン アジア国際シンポジウム 2011年3月26-29日 神奈川大学横浜キャンパス
3. Oguri H. Concise synthesis and structural diversification of natural product analogs inspired by indole alkaloids and anti-protozoal terpenes. Pacificchem 2010 Organic Division, Session (Diversity-Oriented Synthesis) 2010. 12. 19, Hawaii, USA
4. Oguri H. Expedient Access and Structural Diversification of Natural Product Analogs Inspired by Triostins, Saframycins, Artemisinins, and Indole Alkaloids. Mona Symposium: Natural Products & Medicinal Chemistry, 2010. 1. 5. Kingston, Jamaica
5. 大栗博毅. 生理活性天然物をモチーフとした多環式低分子群の迅速合成と構造多様化. 早稲田大学大学院先進理工学研究科(化学)講演会 2010年5月17日、早稲田、東京
6. Oguri H. Concise Synthesis and Structural Diversification of Natural Product Analogues. MCR2011: The 5th International Conference on Multi-component Reactions and Related Chemistry, 2011. 11.16. Hangzhou, China
7. 鈴木定彦. 人獣共通感染症としての結核. 平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会教育講演. 2011年2月3日. 札幌コンベンションセンター. 札幌
8. Suzuki Y, Nakajima C. Tuberculosis as a zoonosis. 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology. 2012年9月14日、Lotte Resort Buyeo, Buyeo, Korea
9. Suzuki Y. Collaboration on tuberculosis research. Golden Jubilee Celebration, DMR, Lower Myanmar. 2013.6.10, DMR, Lower Myanmar, Yangon, Myanmar
10. Suzuki Y. Current situation of Drug resistant tuberculosis. The 21st Annual Medical Sciences Conference 2013, 2013.6.17, Centra Government Complex, Nontabri, Thailand

② 口頭発表 (国内会議 1 件、国際会議 4 件)

1. 金玄, 中島千絵, 鈴木定彦. 結核菌のニューキノロン高度耐性獲得機構. 第 83 回日本ハンセン病学会総会. 2010年5月28日、鹿児島
2. Kim H, Nakajima C, Suzuki Y. Molecular determinants of high level quinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Boston, USA, July, 13-15, 2010.
3. Suzuki Y. How the mycobacteriology laboratory contributes to a better management of multidrug-resistant tuberculosis? 3rd Asia Pacific Region Conference of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Hongkong, China, July, 10-12, 2011.
4. Nakajima C, Fukushima Y, Suzuki Y. Easy and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* by a newly developed isothermal nucleic-acid amplification method targeting tandem repeat sequences. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.

5. Namangala B, Kajino K, Lisulo M, Mweene AS, Hayashida K, Oparaocha L, Simuunza M, Simukoko H, Choongo K, Moonga L, Chota A, Ndebe J, Chizema E, Kasonka L, Suzuki Y, Sugimoto C, Detection of human-infective trypanosomes in clinical samples from domestic animals and tsetse flies from Zambia's tsetse-infested regions using LAMP. 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health, Copenhagen, Denmark, Sep 10 – 13, 2013
- ③ ポスター発表 (国内 2 件、国際 14 件)
1. 溝口玄樹、大栗博毅、及川英秋. アスピドスペルマ／イボガ型アルカロイド骨格の短段階構築法の開発. 第22回札幌万有シンポジウム 構築的有機合成化学: 医療そして材料科学の未来へ、2010年7月3日、札幌
 2. 比留間貴久、山岸裕、大栗博毅、及川英秋. 抗マラリア剤アルテミシニンに類似した低分子群の短段階合成と構造多様化. 日本ケミカルバイオロジー学会第五回年会、2009年5月18日、神奈川
 3. Nakajima C, Rahim Z, Tamaru A, Fukushima Y, Suzuki Y. Comparison of mutations found in drug-resistance determining region of responsible genes in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates obtained from Bangladeshi and Japanese patients. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Boston, USA, July, 13-15, 2010.
 4. Kim H, Nakajima C, Rahim Z, Suzuki Y. Characterization of a novel mutation in *gyrB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* on resistance against quinolones. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Boston, USA, July, 13-15, 2010.
 5. Matsuba T, Suzuki Y. Dimorphism of the Rv0679c protein in *Mycobacterium tuberculosis*. 45th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, USA, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Boston, July, 13-15, 2010.
 6. Yokoyama K, Kim H, Suzuki H, Matsuoka M, Nakajima C, Suzuki Y. Correlation between quinolone resistance and gene mutations in *Mycobacterium leprae* 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.
 7. Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, Matsuoka Suzuki Y. Enzymatic Characterization of *Mycobacterium leprae* DNA gyrase. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.
 8. Poudel A, Nakajima C, Pandey B D, Maharjan B, Suzuki Y. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Nepal. 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.
 9. Matsuba T, Nakajima C, Tamaru A, Rahim Z, Poudel A, Pandey B D, Suzuki Y. Analysis of Beijing genotype specific envelope protein in *Mycobacterium tuberculosis* 46th Tuberculosis and Leprosy Research Conference, US-Japan Cooperative Medical Science Program. Omiya, Japan, Dec, 6-9, 2011.
 10. Kim H, Nakajima C, Yokoyama K, Rahim Z, Kim YU, Oguri H, Suzuki Y. Impact of the E540V amino acid substitution in GyrB of *Mycobacterium tuberculosis* on quinolone resistance. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (IUMS 2011). Sapporo, Japan, Sep 7-10, 2011.
 11. Habeenzu C, Matsuba T, Nakajima C, Solo E, Bwalya P, Miller M, Kasonka L, Suzuki Y. Evaluation of the in house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of tuberculosis at University Teaching Hospital, Zambia. 43rd Union World Conference on Lung Health, Kuala Lumpur, Malaysia, Nov 12-18, 2012
 12. Miller M, Habeenzu C, Solo E, Kasakwa K, Bwalya P, Mudenda V, Kasonka L, Suzuki Y. Incidence of Multidrug-Resistant Tuberculosis found in ongoing TB and Trypanosomiasis Research Project in Lusaka, Zambia. 43rd Union World Conference on Lung Health, Kuala Lumpur, Malaysia, Nov 12 - 18, 2012
 13. Chulu F, Mbulo G, Habeenzu C, Katemangwe P, Solo E, Bwalya P, Kasonde M, Kasakwa K, Chikambwe L, Miller M, Suzuki Y. Implementation of biosafety – a challenge to laboratory personnel. 1st conference for African Society for Laboratory Medicine, Cape Town, South Africa, Dec 1 – 7, 2012
 14. Miller M, Habeenzu C, Katemangwe P, Solo E, Chulu F, Chikambwe L, Kasonde M, Kasakwa K, Bwalya P, Mudenda V, Kasonka L, Suzuki Y. Evidence of Reduced HIV-TB Co-infection in Lusaka, Zambia. 1st conference for African Society for Laboratory Medicine, Cape Town, South Africa, Dec 1 – 7, 2012
 15. Choongo K, Hayashida K, Velisoju M, Oguri H, Namangala B, Simuunza M, Simkoko H, Mweene A, Kajino K, Suzuki Y, Oikawa H, Sugimoto C, *In Vitro* screening of synthetic compounds for anti-Trypanosomal activity and cytotoxicity to human MRC5 cells. 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health, Copenhagen, Denmark, Sep 10 – 13, 2013
 16. Miller M, Habeenzu C, Solo E, Bwalya P, Matsuba T, Nakajima C, Kasonka L, Suzuki Y. Latest results of ongoing evaluation of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of tuberculosis in University Teaching Hospital (UTH), Zambia. 8th European Congress on Tropical Medicine and International Health, Copenhagen, Denmark, Sep 10 – 13, 2013

(5)知財出願

- ①国内出願 (2件)
- ②海外出願 (0件)
- ③その他の知的財産権(0件)

(6)受賞・報道等

①受賞

大栗博毅. Banyu Chemist Award 2010 “天然物類似低分子群の迅速合成と構造多様性創出の新戦略”

②マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. BSL3の開所式ならびに第3回 Scientific meeting 開催時にマスコミから取材があり、地元新聞、TV、ラジオで式や会議の様、またプロジェクト関係者のインタビューが報道された。(2012年8月)
2. UTHに導入される新規診断法により早期診断が可能となる事が地元新聞により報道された。(2013年9月)

③その他

該当なし

(7)成果展開事例

①実用化に向けての展開

UTHに乾燥タイプ LAMP キットを生産するためのクリーンブースを設置した。また、ザンビアにおけるキット生産のための試薬確保ルートを確立した。更に、結核診断法はザンビア共和国での公定法としての承認を受けるための同国政府保健省主導のもとUTHを中心としたチームにより評価試験の段階に入っている。ザンビア共和国の関連団体である Institute for Medical Research and Training (IMReT)より問い合わせも来ており、今後、この団体とも連携していく予定である。

②社会実装(研究成果の社会還元)への展開活動

プロジェクトが開発した LAMP 法がザンビアのトリパノソーマ症確定診断法の一つとして用いられている。

§6 プロジェクト期間中の主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

① “ワークショップ、シンポジウム、小中高での特別授業、地域での講演、研究機関の一般公開での講演

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011年 7月17日	TB & Tryps project 1st scientific meeting	UTH 大会議室 (ザンビア)	34	結核およびトリパノソーマ症の診断法の開発および応用について実例を交えて紹介
2011年 10月4日	TB & Tryps project 2nd scientific meeting	UTH Cancer hospital 会議室 (ザンビア)	42	ザンビアにおける HIV-結核の現状、遺伝子診断法および免疫学的診断法について紹介
2012年 8月27日	TB & Tryps project 3rd scientific meeting	UTH Cancer hospital 議室(ザンビア)	86	結核、トリパノソーマ症関連の話題について実例を交えて紹介。バイオセーフティの実際について紹介。
2013年 5月13日	北海道大学人獣共通 感染症リサーチセンタ ー市民公開講座	北大百年記念 会館	57	C/P である大学研究教育病院院長による札幌市民を対象とした講話「ザンビア医学分野における日本の貢献」
2013年 5月13日	北海道大学内向け講 演	北大獣医学部 講堂	183	上記院長による学内の教員と学生を対象とした講話「ザンビアの保健事情」
2013年 10月16日	TB & Tryps project 4th scientific meeting	UTH Cancer hospital 議室(ザンビア)	88	結核、トリパノソーマ症診断法開発状況の紹介。トリパノソーマ症治療薬候補物質スクリーニングの進捗状況の紹介。BSL3 ラボ使用ならびにメンテナンス状況の紹介。

② チーム内会議開催記録
(開催日、出席者、議題、協議概要等)

年月日	出席者	議題	概要
2009年12月11日	ザンビア側 PD, PM, PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 29 名	第 1 回プロジェクト合同調整会議(JCC)	プロジェクトの活動方針決定
2010年5月12日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 12 名	第 1 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2010年6月15日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 6 名	第 2 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2010年9月22日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 21 名	BSL3 施設導入案内	BSL3 施設導入導入に係る調整
2010年9月29日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 7 名	第 3 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2011年1月4日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 8 名	第 4 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2011年3月18日	ザンビア側 PI、日本側 PI、プロジェクトメンバー他 18 名	第 5 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2011年6月14日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 9 名	第 6 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2011年6月16日	ザンビア側 PD, PM, PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 29 名	第 2 回プロジェクト合同調整会議(JCC)	プロジェクトの活動方針決定
2011年10月4日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 8 名	第 7 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2012年1月24日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 13 名	第 8 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2012年4月2日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 9 名	第 9 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2012年7月5日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 9 名	第 10 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2012年9月28日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 13 名	第 11 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2012年11月6日	ザンビア側 PD, PM, PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 25 名	第 3 回プロジェクト合同調整会議(JCC)	プロジェクトの活動方針決定
2013年1月18日	ザンビア側 PI、日本側プロジェクトメンバー他 12 名	第 12 回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認

2013年 2月18日	ザンビア側 PI、日本側プロジェクトメンバー他 11名	日本研修、国際会議参加報告会	日本研修参加者の研修内容報告
2013年 4月26日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 10名	第13回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2013年 8月23日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 10名	第14回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2013年 9月20日	ザンビア側 PI、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー他 10名	第15回四半期報告	四半期の進捗状況ならびに次期四半期の活動方針の確認
2013年 10月21日	ザンビア側 PD、プロジェクトメンバーならびに日本側 PI、プロジェクトメンバー、評価団メンバー他 25名	第4回プロジェクト合同調整委員会(JCC)	プロジェクトの進捗状況確認、終了時評価結果の確認、協議

§7 国際共同研究実施上の課題とそれを克服するための工夫、教訓など

(1) 共同研究全体

- プロジェクト全体の現状と課題、相手国側研究機関の状況と問題点、プロジェクト関連分野の現状と課題。ザンビアの保健分野のうち、結核、エイズ、マラリアの分野に多くの国々からのプロジェクトが入り込んでいいる事が一つの問題点と考えられる。本プロジェクトのターゲットの一つである結核では、これが一つの障害となった。
- 各種課題を踏まえ、研究プロジェクトの妥当性・有効性・効率性・自立発展性・インパクトを高めるために実際に行った工夫。
カウンターパート、他国のプロジェクトとの会議を頻繁に開き、連絡を密にする事により、お互いの理解を向上させた。政府高官（保健省次官）との緊密な連絡も功を奏した。
- プロジェクトの自立発展性向上のために、今後相手国（研究機関・研究者）が取り組む必要のある事項。現在保健省に進言中であるが、プロジェクトで導入したラボならびに検査システムを維持するための予算確保が喫緊の課題と考えられる。

(2) 鈴木グループ（結核迅速診断法開発）

- 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活用。
ザンビアの保健分野、特に3大疾病の一つである結核に対してはアメリカ、イギリスを始めとする多数の国からのプロジェクトが入り込んでおり、研究者ならびに検体が取り合いの状態となっていた。他国のプロジェクトでは、インセンティブを用意しており、研究者ならびに検体の獲得において優位であった。本プロジェクトでは、保健省次官との連絡を密に取り、研究者ならびに検体の確保を図った。
- 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
上記の経験から、四半期会議、技術説明会にはプロジェクトリーダーが参加し、カウンターパートとの意思疎通を図る事が重要と考えられた。

(3) 梶野グループ（トリパノソーマ症迅速診断法開発）

- 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活用。
地方での眠り病に対する認識が低く、当初は協力が得られなかった。そのため、カウンターパートとともに地方の病院、保健所に赴き、啓発活動に当たった。その結果、現在では、地方においてトリパノソーマ症疑いの患者が発生した場合にはプロジェクトに連絡が入る様にまでなった。
- 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
プロジェクトの進捗にはネットワーク構築が重要である。そのためには、地道に地方に足を運び、プロジェクトの認知度を上げる必要がある。

(4) 大栗グループ（トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング）

- 相手国側研究機関との共同研究実施状況と問題点、その問題点を克服するための工夫、今後への活

用。

現在のところ日本国内での開発・研究のみであり、該当しない。

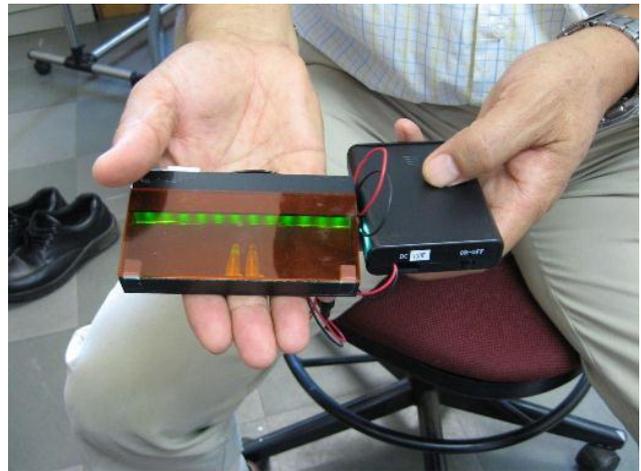
- ・ 類似プロジェクト、類似分野への今後の協力実施にあたっての教訓、提言等。
- ・ 現在のところ日本国内での開発・研究のみであり、該当しない。

§ 8 結び

当初目標としていた日本における LAMP 法を応用した結核およびトリパノソーマ症の迅速診断法ならびに結核の迅速薬剤感受性試験法の開発に成功し、この技術をザンビアのカウンターパートへ移転した。さらにザンビアにおいてカウンターパートとともに同国由来検体を用いて性能を評価し、感度、特異性ともに優れており、ザンビアにおいて診断法として実装可能である事を示した。トリパノソーマ症の迅速診断法はすでに眠り病疑似患者の確定診断に活用されている。今後、ザンビアの結核ならびにトリパノソーマ症の診断のための公定法として登録されるための手続きをしてゆく予定である。公定法の一つとして登録されることとなれば、本プロジェクトの目標を達成したものと考えられる。安価かつ簡便な迅速診断法は、ザンビアを含む途上国一般において非常に有益である。本プロジェクトで開発した乾燥化迅速遺伝子診断キットの実用性は高く、途上国での感染症対策に貢献し、ひいては全世界の感染症対策に資するものと考えられる。

結核検査における実験室内感染のリスクを低減するために、UTH に BSL3 施設を導入し、結核検査室を実現した。更に、カウンターパートを米国イーグルソン研究所にて開催されたフィルターメンテナスの研修会に参加させ、BSL3 実験室のセルフメンテナスを可能とするための技術者を養成した。今後は代表研究者の鈴木が定期的にザンビアを訪問して技術者のフォローアップに当たることより、ザンビア人による BSL3 実験室のセルフメンテナスを確実なものとしてゆく。BSL3 実験室のセルフメンテナスに係る機材は本プロジェクトで用意しており、資材も4年分は調達・保管してあるが、更に長期にわたる保守管理にはセルフメンテナスに係る資材調達費が恒常的に必要となる。現在これを予算に組み入れる事を UTH に進言し、受け入れられた。現在は UTH から保健省への手続きが進行中である。人材ならびに予算確保により、持続的な BSL3 実験室の稼働が可能となる。

トリパノソーマ症の治療薬候補物質を合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価により開発候補物質を選定する過程で抗トリパノソーマ活性に重要なファルマコフォアの三次元化学構造に関する新知見を得たことは今後の抗トリパノソーマ化合物開発に一定の道筋を示すものであり、大きなインパクトを持つものと考えられる。





§ 9 PDM の変遷 (該当する場合)

中間評価時の JCC (2012 年 11 月) において、栄研化学からキットとして発売されている製品とプロジェクトで開発した結核診断用 LAMP の比較試験の実施を PDM に盛り込んだ。

以上