

# 地球規模課題対応国際科学技術協力

(感染症研究分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域)

## 結核及びトリパノソーマ症の診断法と治療薬開発

(ザンビア)

平成 23 年度実施報告書

代表者：鈴木 定彦

北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター・教授

<平成 20 年度採択>

## 1. プロジェクト全体の実施の概要

### 本プロジェクトのねらい

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

### 概要

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

### 進捗状況

日本において結核およびトリパノソーマ症の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。また、トリパノソーマ症の治療薬候補物質を 232 種類合成し、トリパノソーマ培養系を用いた有効性評価を継続した。ザンビアにおいては、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。また、大学研究教育病院と共同研究に関する合意書を締結して研究体制を整えた。ザンビア人研究者に結核迅速遺伝子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、これを活用した結核迅速遺伝子診断法評価を実施した。トリパノソーマ症診断においてはザンビア人研究者に迅速遺伝子診断法を技術移転するとともに、臨床検体を用いた評価を行い、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、ザンビア国内でも感染リスクの高い地域を明らかにした。

### 成果

結核およびトリパノソーマ症遺伝子診断法の感度、特異性はともに高く、臨床検体に応用可能であると考えられた。これまでに延べ 256 人から 680 の喀痰および尿検体を収集し、これらを対象とした結核遺伝子診断法評価試験を実施した。その結果、塗抹検査と遺伝子診断の結果の一致度が高く、塗抹陽性検体の検査に有用であることが示唆された。一方、大学研究教育病院に入院していたトリパノソーマ症疑いの患者の血液ならびに脳脊髄液の LAMP 検査を実施し、確定診断と治療方針決定に重要な病相判定を行った。さらに治療後のフォローアップ検査も同法で実施し、完治したことを確認した。トリパノソーマ症治療薬候補物質として、新規化合物 230 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、原虫感染マウスに対する治療試験を開始した。また、ヒト培養細胞を用いた細胞毒性試験を実施し、薬剤としての安全性を検討した。更に、同程度の分子量を有する化合物ライブラリーを用い、化合物の造形を規定する要因(骨格や立体化学)を指標とした構造活性相関研究を実施し、抗トリパノソーマ活性に重要なファルマコフォアの三次元構造に関する新知見を得た。

### 今後の見通し

結核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、これを継続する事により、ザンビアに実装する事ができるものと考えられる。結核薬剤感受性試験は今後BSL-3 実験施設を整備することにより研究を加速すれば、ザンビアにおける評価の後、実装可能と考えられる。候補物質合成および抗トリパノソーマ活性スクリーニングは順調に進捗している。今後、動物実験への移行により候補物質の絞り込みができるものと考えられる。

## 2. 研究グループ別の実施内容

### (1) 結核迅速診断法開発

#### ① 研究のねらい

多剤耐性結核および超多剤耐性結核の拡大が危惧されている。結核の蔓延を防止するためには、積極的な診断とその結果を踏まえた適切な治療が重要であるが、現状の診断技術ではコストと時間がかかり、適切な治療を早期に開始することは難しい。本研究では、迅速で低コストの結核診断法および薬剤感受性試験法を開発し、これをザンビアにおいて評価し、普及させることにより同国の結核対策に資するとともに、カウンターパートの研究能力向上も図ることを狙いとしている。本研究により開発・評価される方法はザンビアのみな

らず、他の発展途上国における結核対策にも貢献するものと考えられる。また、同法を用いて人と動物間の結核の伝播の実態を明らかにすることは、人獣共通感染症としての結核の根本的な対策としても重要である。

## ②研究実施方法

- 1) 安全に結核菌培養試験、薬剤感受性試験、DNA抽出が実施できる様に施設を整備する。
- 2) ヒト臨床試料の収集・保管管理システムを構築し、結核迅速診断法および薬剤感受性試験法の臨床検体を用いた評価体制をする。
- 3) ザンビアにおいて結核菌株を収集し、遺伝子型および薬剤耐性に関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)に対する現在の進捗状況

- 1) 日本において結核迅速診断法を開発し、その性能評価を予定通り終了した。
  - 2) 結核迅速薬剤感受性試験法を開発するために薬剤耐性に関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) ザンビア保健省大学研究病院と共同研究に関する合意書を締結し、研究体制を整えた。
  - 5) 安全に結核菌培養試験、薬剤感受性試験、DNA抽出を実施できる施設の整備を提案しザンビア保健省ならびに JICA から承認を受け、コンテナ型 BSL-3 実験室を発注した。
  - 6) 結核遺伝子診断法をザンビアにおいて技術移転した。
  - 7) 結核遺伝子診断法のザンビアにおける評価試験を開始した。
- ・安全に研究を遂行できる施設の整備が遅れているため、それ無しでも可能な結核迅速診断法の評価のみが進捗しているが、平成 24 年 5 月の BSL-3 実験室により迅速薬剤感受性試験法の評価を加速すれば最終目標の達成は可能と考えられる。

## 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)

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

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

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

## (2)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)トリパノソーマ症に対する合成新規治療薬候補物質をスクリーニングし、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。また、3)ザンビア共和国におけるトリパノソーマ症サーベイランスネットワークを構築して疫学情報を収集し、得られた情報をトリパノソーマ症対策に役立てる。

### ②研究実施方法

- 1) ヒト臨床試料、動物血液試料、媒介節足動物(ツェツェバエ)試料から DNA を抽出し、LAMP, PCR での原虫検出を行う。ザンビアで実施できるよう、技術移転を行うのに並行し、必要に応じて技術の簡便化、高精度化を図る。
- 2) 共同研究者から提供される候補化合物の抗トリパノソーマ活性を試験管内で測定し、動物試験に用いる化合物の候補を絞る。
- 3)患者発生の情報をザンビア政府等から得て、現地調査を実施する。発生地でのヒト、飼育家畜、ツェツェバエでの原虫保有状況を調査する。

### ③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

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

### ④カウンターパートへの技術移転の状況

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

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

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

## (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

### ①研究のねらい

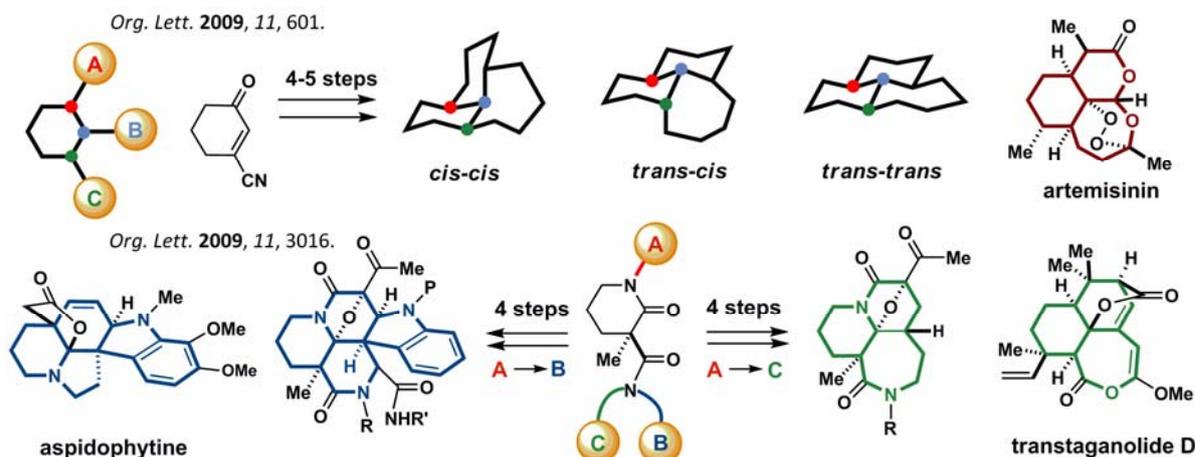
トリパノソーマ原虫は、感染した動物の体内で頻繁に抗原変異を繰り返すため、ワクチン療法の適用が難しい。現在実施されているトリパノソーマ薬投与による治療法についても、重篤な副作用や薬剤耐性の出現という問題が指摘されている。治療を受けずに放置すると死に至る感染症であるにもかかわらず、地球上で最も貧しい地域で蔓延するので、罹患者が切望する治療薬は常に供給不足の状況にある。多くの人々をトリパノソーマの脅威から救い出すため、安全、安価で有効な新しい治療薬の開発が強く望まれている。本プロジェクトでは、既存の抗トリパノソーマ薬とは構造特性が異なる薬剤候補分子群を簡便かつ系統的に合成し、新規治療薬候補物質のスク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

### ②研究実施方法

- 1) 三環性母骨格を迅速に構築する合成プロセス(<五工程)および五環性骨格を四工程でパラレル合成する多様性指向型合成プロセスを確立する。
- 2) 上記 1 の方法を駆使してより多くの候補化合物を合成する。
- 3) 候補化合物の抗トリパノソーマ活性を試験管内で測定し、動物試験に用いる化合物の候補を絞る。
- 4) マウスを用いて上記 3 で絞り込んだ候補化合物の有効性を評価する。
- 5) 感畜を用いて上記 3 で絞り込んだ候補化合物の有効性を評価する。

## ③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

- 1) 細胞レベルでの抗トリパノソーマ活性を評価する一次スクリーニング系を構築した。
- 2) 抗マalaria剤アルテミシニンやCa<sup>2+</sup>-ATPase 阻害剤トランスタガノライドに共通する三環性母骨格を迅速に構築する合成プロセス(<五工程)を開発した (*Org. Lett.* 2009, 11, 601.)。
- 3) ビールディングブロック (A, B and C) の選択により、インドールアルカロイド(アスピドファイチン)の五環性骨格や上記の三環性骨格をそれぞれ僅か四工程でパラレル合成する多様性指向型合成プロセスを確立した (*Org. Lett.* 2009, 11, 3016.)。



- 4) 上記により、230 種類以上の天然物類似化合物群を北海道大学創成機構流動部門で合成した。
- 5) 構造新規性を有する天然物類似化合物群 (>100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)を創製することに成功した。新たに合成した 80 種のリード化合物の抗原虫活性を *T. brucei* 3 亜種(*brucei*, *rhodesiense*, *gambiense*)ならびに *T. evansi*を用いて検査した。スクリーニングの結果、*in vitro*で効果の高かった 6 種の化合物を用いて、*T. brucei rhodesiense* 感染マウスでの治療試験を開始した。
- 6) 上記の新規化合物群に対して、ヒト培養細胞系を活用した毒性試験を実施するとともに、系統的な構造活性相関研究を検討し、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。

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

カウンターパートへトリパノソーマ原虫の動物での増殖試験技術を移転した。

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

医薬品の構成元素として含有率の高い窒素原子を天然物類似の 5/7 骨格へワンポットで集積化する新規変換法の開発に最近成功した。現在この知見を応用して、構造の新規性・複雑性・多様性を兼ね備えた抗トリパノソーマ治療薬候補物質群の簡便な合成を鋭意検討中である。

## 3. 成果発表等

## (1) 原著論文発表

- ① 本年度発表総数(国内 0 件、国際 6 件) :
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件、海外 9 件)
- ③ 論文詳細情報

1. Kim, H.; Nakajima, C.; Yokoyama, K.; Rahim, Z.; Kim, Y. U.; 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.
2. Oguri, H.\*; Hiruma, T.; Yamagishi, Y.; Oikawa, H.; Ishiyama, A.; Otoguro, 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. Selected for the Front Cover.
3. 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
4. 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
5. 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.
6. 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

## (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)
- ① 本プロジェクト期間累積件数 (国内 0 件、海外 0 件)
- ② 特許詳細情報

該当無し

## 4. プロジェクト実施体制

### (1) 鈴木グループ (結核迅速診断法開発)

- ① 研究者グループリーダー名: 鈴木定彦
- ② 研究項目

日本において結核迅速診断法を開発し、性能を評価した。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。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。大学研究病院と共同研究に関する合意書を締結し、研究体制を整え検体を収集した。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ザンビア保健省およびJICAザンビア事務所に提案し、承認された。小児結核の診断への遺伝子診断法応用のための評価体制を整えた。

### (2) 杉本グループ (トリパノソーマ症迅速診断法開発)

- ① 研究者グループリーダー名: 杉本千尋
- ② 研究項目

ザンビアにおけるヒトリパノソーマ感染症患者発生地域に調査に入り、感染リスクの高い野生動物保護区のレインジャー、ツェツェ生息地域の住民の血液検査を実施し結果を被験者に通知した。また同地域で飼育されている家畜 (牛、山羊) の血液を採取すると共にツェツェバエの捕獲を行い、原虫保有状況の調査を行い、

牛からヒト感染性トリパノソーマを見いだした。また UTH との連絡を密にとることにより、疑いのある患者があった場合、直ちに検体を受け付け、UNZA 内の研究室で LAMP 法による診断が直ちにできる体制を確立した。尚、諸事情により平成 24 年度よりグループリーダーが梶野喜一准教授に交代する。

(3) 大栗グループ (トリパノソーマ症新規治療薬候補物質スクリーニング)

① 研究者グループリーダー名: 大栗博毅

② 研究項目

トリパノソーマ症新規治療薬候補物質を迅速かつ確実に供給するため、多様性指向型有機合成プロセスの開発している。H23 年度も新たに、天然物類似低分子群 (80 種) を合成し、これまでに 230 種以上の候補化合物群を合成することができた。杉本グループで抗トリパノソーマ活性を *In vitro* で評価した結果、14 種に抗トリパノソーマ活性が認められた。さらに本年度は、トリパノソーマ症治療薬ペンタミジンの副作用低減を志向したペンタミジンアナログの合成法をほぼ確立することができた。現時点で 20 種類弱の化合物群の合成に成功し、活性評価を検討中である。

以上