

地球規模課題対応国際科学技術協力(SATREPS)

感染症分野「感染症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

(相手国:ガーナ共和国)

終了報告書

期間 平成22年4月～平成27年3月

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)

§1 プロジェクト実施の概要

概要

ガーナ生薬科学研究所(Centre for Scientific Research into Plant Medicine, CSRPM)において薬用植物からのスクリーニング用抽出物の作製技術および有効成分の分析・精製技術を定着させ、野口記念医学研究所(野口研)において寄生虫病学的、ウイルス学的なバイオアッセイ技術を確立、定着させた。

日本において HIV-1 急性感染、潜伏感染、宿主因子アッセイ系を確立し、ガーナ野口研で CSRPM によって薬用植物から調製された粗抽出物113サンプルをスクリーニングした。HIV-1 急性感染を抑制する2種類の植物候補分画を見出し、潜伏感染系では構造決定した *Thebroma cacao* 由来 procyanidin3量体ほか2種の植物分画が、特定の細胞内シグナル伝達系を活性化して潜伏プロウイルスを活性化することを明らかにした。

日本で確立した抗トリパノソーマ活性物質スクリーニング法によって、ガーナで 8 粗抽出物について抗トリパノソーマ作用を検出した。その中で、*Morinda lucida* から有効新規成分 ML-2-2, ML-2-3, ML-F52 を精製、構造決定した。ML-2-3, ML-F52 はアポトーシスを誘導すること、これら3化合物の中に、マラリア、リーシュマニア等に効果を示すものがあることを示した。*Morinda lucida* 粗抽出物、ML-2-3とも、予防投与、感染後投与でトリパノソーマ原虫 *T. brucei* GUTat3.1 のマウス体内での増殖を抑制し、生存率を向上させた。

成果

1) 抗HIV活性成分を有するガーナ産植物の探索

1. バイオアッセイ系の確立

抗HIV活性スクリーニングシステムとして、急性感染成立後Firefly luciferase を発現する VSV-G/NL4-3 lucシールドタイプウイルスを用いた感染アッセイ系を確立、*Renilla luciferase* 遺伝子を内部標準遺伝子として持ちFirefly luciferaseをプロウイルス遺伝子内に有し刺激応答性に発現するJurkat T細胞株由来HIV-1潜伏感染細胞株JLR2を樹立、抗HIV-1活性を示す APOBEC3G (A3G) 及びBST-2/Tetherin (BST-2) のmRNA量を定量する逆転写・定量PCRの実験系を確立した。これらをすべてガーナ側に技術移転した。

2. バイオアッセイによるスクリーニング結果

CSRPMが調製した薬用植物由来50%エタノール粗抽出物ライブラリーについて一次スクリーニングを行い、113サンプル中8件に急性感染抑制作用を認め、そのうち2件 (CVP035A, CVP047A) について一次分画された疎水性分画においてHIV-1急性感染抑制効果を見出した。潜伏感染系では10件の2次スクリーニング対象サンプルのいずれにおいても親水性分画に活性を認め、その中から *Thebroma cacao* 由来サンプルに含まれる有効化合物procyanidin3, 4, 5量体の構造を決定した。抗HIV-1宿主因子APOBEC3G (A3G) またはBST-2/Tetherin (BST-2) のmRNA量を増大させる粗抽出物は、残念ながら見いだされなかった。

3. 有効成分の作用機序解析結果

procyanidin3量体(C1)は、Protein kinase C (PKC)活性とは関係なく転写因子NF- κ B、MAPK kinaseに依存しプロウイルス転写を活性化することがわかり、これまで報告されているPhorbol ester類とは異なる作用機序を示した。C1によるNF- κ B依存的な転写活性化はきわめて短時間であるが、HIV-1遺伝子発現は長時間持続すること、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤やPhorbol esterとの相乗効果が認められることがわかった。

4. より生体に近い持続感染系の解析と実験系の確立

より生体に近いHIV-1潜在感染の実験系を樹立する目的で、健常人末梢血由来のIL-2依存性CD4陽性T細胞株LTi4を樹立した。この株は、CD45RA(-)CD45RO(+)のメモリーT細胞の形質を持ち、無刺激の状態では増殖が遅くCD3/CD28刺激に応じて増殖する長期培養が

可能な機能性の抗原特異的 T 細胞株である。この細胞に VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 に感染感受性であり、静止期および増殖期の HIV-1 発現状態をモニターできる。感染後 CD3/CD28 刺激を加えると TNF- α 等のサイトカインが誘導され、HIV-1 レポーター活性も増加することが確認された。

2) 抗寄生虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

1. バイオアッセイ系の確立と改良

抗トリパノソーマ活性スクリーニングシステムとして血流型トリパノソーマ培養系(培養液改良により低血清にて培養可)を用いたハイスループットアッセイ系を確立した。スクリーニングは AlamarBlue アッセイ、FACS によるアポトーシスアッセイ、蛍光顕微鏡による表現系解析で構成され、活性スクリーニングと同時にメカニズム解析が可能となった。

2. バイオアッセイによるスクリーニング結果

113種粗抽出物について2次スクリーニングに選んだ8粗抽出物について抗トリパノソーマ作用を検出した。4種の分画、計32(8粗抽出物 $\times$ 4分画)の分画についてバイオアッセイ実施した結果、1種 (*Morinda lucida*)クロロホルム分画にて高い活性を得た。NIUにて同画分から強い活性を有する成分2種(ML-2-2, ML-2-3)を精製し構造決定した結果、テトラサイクリックイリドイドを基本骨格とする新規成分であることがわかった。また、同植物からより強い抗トリパノソーマ活性を示す新たな新規成分ML-F52を精製、構造決定した。

3. 有効成分の作用機序解析結果、構造活性相関

ML-2-3 と ML-F52 はトリパノソーマにアポトーシスを誘導するが ML-2-2 は誘導しないこと、ML-2-3 は鞭毛マーカーである PFR-a タンパク質の発現を抑制することが明らかになった。マラリアアッセイ系及びブリーシュマニアアッセイ系を新たに確立し、ML-2-2、ML-2-3 及び、ML-F52 のその他抗寄生虫作用について検討した結果、ML-2-2 と ML-2-3 に強い抗マラリア作用を見出した。Ester 類である ML-2-2 と ML-F52 に強い抗ブリーシュマニア作用を検出した。

4. 小動物実験結果

Morinda lucida 粗抽出物、ML-2-3 とも予防投与、感染後投与でトリパノソーマ原虫 *T. brucei* GUTat3.1 のマウス体内での増殖を抑制し生存率を向上させたが、最終的には原虫の増殖を単剤では抑制できなかった。感染後の ML-2-3 投与実験では、経静脈投与より経腹腔投与のほうが有効であることがわかった。

§ 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

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染率は、サハラ以南のアフリカ地域では国によって数%から30%と高く、ガーナでは国民の約1.9%が HIV に感染している。WHO のガイドラインにしたがって2003年導入された抗レトロウイルス治療(ART)についてはある程度期待された効果が見られているという報告はあるものの、HIV 感染者の多くが ART 治療を受けていないこと、ガーナを含む西アフリカでは先進国とは異なる組換え型 HIV 株が流行していること、他の感染症との重複感染例が多いことなどから、今後の感染動向および執るべき有効な治療法ともに不透明である。近代的な医療施設へのアクセスが地理的にも経済的にも限られている非都市部では ART を受けられる人は少なく、他の途上国と同様多くの人がハーブなどによる伝統医療に依拠している。HIV は個体内変異が著しく多くの例で潜伏感染が持続するため、耐性ウイルスや副作用の出現により治療が困難になる。ウイルス由来蛋白質を標的とした治療薬に加えて宿主因子を標的とした治療法開発が急務とされるが、広く治療に応用されるには至っていない。HIV は複製に多くの宿主因子を必要としており、個体や細胞は HIV 複製を抑制する因子を発

現するものの HIV はそれを無力化する対抗手段を有していることがこれまでに報告されている。潜伏感染および再活性化のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

西アフリカで蔓延している寄生虫病は、生体内環境の変化をとおして感染症の病像や治療効果に影響を及ぼしている可能性がある。寄生虫は宿主を取り巻く自然環境および生活習慣等の影響を強く受ける病原体であり、寄生虫疾患の疫学には人間の行動、文化・食習慣など社会的要素の関与が大きい。その病害性は大きい一方でヒトの日常生活に深く浸透して病害性に気づかされることが少ないため、WHO は Neglected Tropical Diseases と位置づけて対策の取り組みの強化を世界に発信している。寄生虫症の治療に生薬を中心とした伝統医療が関わることは世界の多くに地域に見られることであるが、エビデンスに基づく有効活用に関する研究は立ち遅れている。西アフリカではマラリアと並んでアフリカトリパノソーマ病が致死率の高い風土病で、これまで有効な治療薬の開発が進んでいない。

ガーナでは 3000 種を超えるハーブが自生し、その内の約 1000 種は同定されているという。実際に使用されているハーブ等の科学的な解析は十分とは言えない。地域に根ざした伝統医療に西洋医学研究のスタンダードを導入し安全有効に使用できるよう標準化する事は、途上国の医療体制強化に繋がることと期待される。

本研究では、抗ウイルス・寄生虫活性を有するハーブのアッセイ系確立、有効成分と作用機序の解析等を通して、新規、効率的治療法の開発に貢献し、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し、以下の課題を遂行することとした。

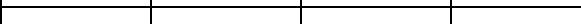
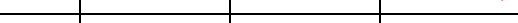
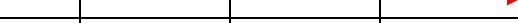
- 1) HIV の複製あるいは寄生虫増殖を抑制する植物由来抽出物のスクリーニングに適するバイオアッセイ系を作出する。
- 2) HIV の複製あるいは寄生虫増殖を抑制する植物由来抽出物を獲得する。
- 3) HIV の複製あるいは寄生虫増殖を抑制する植物由来抽出物中の有効成分を特定する。
- 4) 同有効成分による抑制メカニズムのウイルス学的あるいは寄生虫学的解明。
- 5) HIV 複製を抑制する因子の発現を促進する植物由来抽出物の獲得。
- 6) 潜伏感染細胞内プロウイルスの活性化をもたらす植物抽出物のスクリーニングに適するバイオアッセイ系を作出する。
- 7) 潜伏感染細胞内プロウイルスの活性化をもたらす候補物質の作用機序を明らかにする。

(2)新たに追加・修正など変更したプロジェクト構想

- 1) 当初計画では、ウイルス学で急性感染の抑制、潜伏感染プロウイルスの再活性化、ウイルス複製を制約する宿主因子の発現増強についてのスクリーニングを行う計画であったが、1 次スクリーニングでは前二者でのみ候補抽出物(計7件)が得られたため、それらの高次スクリーニングと活性物質の作用機序解析に注力することとなった。
- 2) 2013 年度のアメリカにおける学会 (ASTMH) に参加した際に製薬関係者と話をする機会があり、現在、NTDs の中ではリーシュマニア等と多剤耐性原虫の出現が深刻化しているマラリアの新規薬剤開発が待たれているという話を受け、*Morinda lucida* から抽出した抗トリパノソーマ新規活性成分のその他寄生虫疾患への影響を調べ、これら成分からの薬剤開発を実現する重要性を高める必要性を認識した。急遽、抗マラリアス薬剤アッセイ系と抗リーシュマニア薬剤アッセイ系 (いずれも *in vitro*) を野口研にて確立しアッセイを行ったところ、それらの病原体の増殖を抑制する化合物があることがわかった。
- 3) 当初計画には含まれていなかった「抗寄生虫活性成分のマウスを用いた動物治療実験」が必要となったため、野口研にて新たに STC 申請を行い実施した。その際、野口研寄生虫学には動物を扱う設備がなかったため、野口研動物センターを新たなカウンターパートとし、動物センターより 1 名を本邦研修へ派遣して技術移転を行い、実験を開始した。
- 4) *Morinda lucida* から単離・精製した有効成分を当初計画には含まれていなかった「抗寄生虫活性成分のマウスを用いた動物治療実験」に使用することになったので、大規模なカラ

ムワークが必要となり、カラムワーク専用ラボスペースの増設を行った。専用スペースにはカラムスタンドを設置し、フラクションコレクターも増設することで、同時に複数のカラムを使用しての単離・精製が可能となり、動物実験に必要とする量の有効成分を CSRPM 単独で調製出来るようになった。

(3) 活動実施スケジュール（実績）

項目	2010年度	2011年度	2012年度	2013年度	2014年度
ガーナ産薬用植物からの新規抗 HIV 活性物質同定と解析					
粗抽出物の調製					
粗抽出物、精製物の安全性試験					
スクリーニング法の確立					
抗 HIV 活性のある粗抽出物の同定					
新規活性物質の精製単離(注1)					
構造活性相関と作用機序の解析					
活性物質を含む植物の育成					
ガーナ産薬用植物からの新規抗トリパノソーマ活性物質同定と解析					
粗抽出物の調製					
粗抽出物、精製物の安全性試験					
スクリーニング法の確立					
抗トリパノソーマ活性のある粗抽出物の同定					
新規活性物質の精製単離(注1)					
構造活性相関と作用機序の解析					
活性物質を含む植物の育成					
研究実施システムの確立					
研究環境のセットアップ(注2)					
課題ごとの SOP の整備					

§ 3 プロジェクト実施体制・投入実績

実施体制

(1)グループ1

【日本側】

グループ リーダー	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間				備考
				開始		終了		
				年	月	年	月	
○	山岡 昇司	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	教授	22	4	27	3	M.D., Ph.D.
	斎藤 愛記	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	助教	22	4	27	3	Ph.D.
	佐久間 龍太	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	助教	22	4	26	7	Ph.D.
	魚田 慎	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	助教	22	4	25	2	Ph.D.
	堀 恭徳	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	D4	23	4	27	3	Ph.D.
	JERRY KWAME NDZINU	東京医科歯科大学大学院 ウイルス制御学	D1	26	10	27	3	D1
	神奈木 真理	東京医科歯科大学大学院 免疫治療学	教授	22	4	27	3	M.D., Ph.D.
	増田 貴夫	東京医科歯科大学大学院 免疫治療学	准教授	22	4	27	3	Ph.D.
	長谷川 温彦	東京医科歯科大学大学院 免疫治療学	助教	22	4	27	3	D.V.M., PhD
	Ahmed Nursarat	東京医科歯科大学大学院 免疫治療学	技術補佐員	24	7	25	9	M.D., Ph.D.
	三浦 和樹	東京医科歯科大学大学院 免疫治療学	M1	25	4	27	3	M1
	太田 伸生	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	教授	22	4	27	3	M.D., Ph.D.
	熊谷 貴	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	助教	22	4	27	3	Ph.D.
	常磐俊大	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	D3	22	4	25	3	D.V.M.
	山邊将史	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	M2	25	3	27	3	M2
	Francis Ekow Dennis	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	D3	24	4	26	9	D3
	下河原理江子	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	非常勤講師	25	3	27	3	Ph.D.
	関 文典	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	助教	23	4	24	3	D4
	関 文典	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	助教	25	3	26	9	D.V.M, Ph.D.
	鈴木 光子	東京医科歯科大学大学院 国際環境寄生虫病学分野	助教	22	4	27	3	D.V.M, Ph.D.

【相手国側】								
グループ リーダー	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間				備考
				開始		終了		
				年	月	年	月	
○	Kwadwo Koram	野口記念医学研究所	所長	24	8	27	3	Ph.D
	Kwabena Bosompem	野口記念医学研究所	副所長	24	8	27	3	Ph.D
	A.K.Nyarko	野口研毒性学	研究員(前所長)	22	4	27	3	Ph.D
	N.A. Ankrah	野口研毒性学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	Regina Appiah-Opong	野口研毒性学	部長	22	4	27	3	Ph.D
	Mark Ofosuhene	野口研毒性学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	Isaac Tuffour	野口研毒性学	RA	22	4	27	3	JICA雇用RA からNMIMR 雇用RAへ
	Abigail Aning	野口研毒性学	RA	25	1	27	3	
	J.A.M. Brandful	野口研ウイルス学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	J.S. Barnor	野口研ウイルス学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	William K. Ampofo	野口研ウイルス学	部長	22	4	27	3	Ph.D
	John Odoom	野口研ウイルス学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	Kofi Bonney	野口研ウイルス学	研究員	25	11	27	3	Ph.D
	Keren Attiku	野口研ウイルス学	RA	22	4	27	3	JICA雇用RA からNMIMR 雇用RAへ
	Irene Ayi	寄生虫病学	部長	22	4	27	3	Ph.D
	William K. Anyan	寄生虫病学	研究員	22	4	27	3	Ph.D
	Daniel A. Boakye	寄生虫病学	研究員(前部長)	22	4	27	3	Ph.D
	Kwadwo Frempong	寄生虫病学	RA	23	1	27	3	D3

(1)グループ2								
【日本側】								
グループ リーダー	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間				備考
				開始		終了		
				年	月	年	月	
○	正山 征洋	長崎国際大学薬学部薬品資源学	教授	22	4	27	3	Ph.D.
	森永 紀	長崎国際大学薬学部薬品資源学	准教授	22	4	27	3	Ph.D.
	宇都 拓洋	長崎国際大学薬学部薬品資源学	助教	22	4	27	3	Ph.D.
	太田恭子	長崎国際大学薬学部薬品資源学	技術補佐員	23	4	26	3	
	市瀬愛海	長崎国際大学薬学部薬品資源学	技術補佐員	23	4	26	3	
	Nguyen Huu Tung	長崎国際大学薬学部薬品資源学	博士研究員	25	3	27	1	Ph.D.
	Xiao-Wei Li	長崎国際大学薬学部薬品資源学	D4	23	4	23	10	
【相手国側】								
グループ リーダー	氏名	所属	役職 (身分)	研究参加期間				備考
				開始		終了		
				年	月	年	月	
○	Dominic Edoh	生薬科学研究所	所長	23	10	27	3	Ph.D
	Laud K.N. Okine	生薬科学研究所	所長(前)	22	4	23	9	退職
	Alfred Appiah Ampomah	生薬科学研究所	副所長	23	10	27	3	Ph.D
	Joseph Adusei Sakodie	生薬科学研究所植物科学部	部長	24	10	25	5	退職
	F.A. Aboagye	生薬科学研究所	プロジェクトリーダー	22	4	25	3	退職
	Maxwell Sakiamah	生薬科学研究所植物科学部	部長	22	4	27	3	JICA雇用RAからCSRPM雇用へ
	Henry Brew Daniels	生薬科学研究所植物科学部	RA	25	1	27	3	
	Vincent Tettey	生薬科学研究所植物科学部	技官	22	4	27	3	
	Samuel Kofi Agbeve	生薬科学研究所植物科学部	技官	25	1	27	3	
	Osafo Mensah	生薬科学研究所	広報	22	4	25	3	退職
	Ofori Lartey	生薬科学研究所植物採取部	技官	22	4	27	3	
	Isaac Ampaw	生薬科学研究所植物採取部	技官	22	4	27	3	

§ 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) CSRPM と長崎国際大学(NIU)で選定した薬用植物からの粗抽出物調製、分画・精製法、活性成分分析法を確立、CSRPM カウンターパートに技術移転した。
- 2) 日本で確立した HIV-1 急性感染評価系、潜伏感染細胞からのプロウイルス活性化評価系、宿主因子発現評価系の技術を野口研カウンターパートに移転した。
- 3) 寄生虫病学分野では、原虫の増殖評価法、FACS による細胞死評価法、免疫染色等の技術移転を行った。動物実験では、マウスを用いた抗トリパノソーマ efficacy test、トリパノソーマ感染マウスの病理解剖学的解析法、病理標本作製法の技術移転を野口研カウンターパートに対して行った。
- 4) CSRPM で調製された抽出物を用いて野口研でバイオアッセイスクリーニングを実施し、寄生虫病学分野で、ガーナ産薬用植物 *Morinda lucida* ほかに由来抽出物に抗トリパノソーマ活性を見出した。NIU にて同活性を有するユニークな新規化合物を *Morinda lucida* から精製、構造決定し、野口研および TMDU での動物実験でその有効性を示し、新規化合物は、トリパノソーマ以外の原虫病原体に対しても増殖抑制効果があることがわかった(米国特許および PCT 国際特許出願済)。
- 5) ウイルス学分野では野口研で実施したバイオアッセイスクリーニングの結果、10種類の植物抽出物に潜伏プロウイルスを活性化する活性を見出し、NIU にて *Thebroma cacao* から単一化合物 procyanidin3 量体 C1 等を精製し、構造を決定した。これまで潜伏プロウイルスを活性化する候補物質として報告されている phorbol ester 類ではなく、潜伏プロウイルス活性化に至る刺激伝達機構も Protein kinase C (PKC) を介さないことがわかった。

(2) 今後期待される効果

- 1) ML-2-3 を用いたマウス感染治療実験では、血中 ML-2-3 濃度が 30 分以内に速やかに排出される状況であるにもかかわらず、血中トリパノソーマを有意に抑制することが示された。体内動態の課題である血中濃度を維持する投与方法の工夫および血中での安定性が向上した誘導体の開発が、治療効果をさらに改善することが期待される。また、トリパノソーマ以外の原虫病原体に対する増殖抑制効果も示されたことは、今後の薬剤開発等の実装化を検討する上で大きな要素となりうる。
- 2) 本プロジェクトで、トリパノソーマアッセイ系、マラリアアッセイ系、リーシュマニアアッセイ系の 3 種のハイスループットアッセイ系を確立した。これによって、これら疾患に対する大規模な創薬開発を可能にする技術が、ガーナに整ったこととなる。これまで科学的解析が進んでいないアフリカ原産薬用植物の原産国自身による大規模スクリーニングが可能となり、将来の薬剤開発、知的財産取得も夢ではなくなった。実際、野口研生薬研間では、今後抗ガン物質探索、抗寄生虫物質探索に本事業で確立したフレームワークを応用する構想が話合われている。
- 3) 潜伏感染 HIV を活性化させるガーナ産植物の探索で得られた Procyanidin C1 は、これまで同種の報告例として多い Phorbol ester 類とは異なり、PKC 活性化を介さずプロウイルスを活性化した。PKC は受容体発現、細胞膜・細胞骨格のリモデリング、遺伝子の転写を制御し、炎症、細胞増殖、接着、分化、細胞死など多彩な生体現象に影響を与える。NF- κ B 依存的転写活性化が PMA に比べて一過性であり PKC 経路を活性化しない Procyanidin C1 は、既知の PKC を介して潜伏プロウイルスを活性化する化合物より生体に及ぼす影響が少ない事が期待される。
- 4) 宿主因子評価系の 1 次スクリーニングでは候補植物を見出すことはできなかったが、同スクリーニングで技術移転した RT-PCR 実験系は、2014 年に近隣国で発生したエボラ出血熱ウイルスの野口研ウイルス部門における検査業務の効率的遂行に大きく貢献している。
- 5) CSRPM に対して、薬用植物の採取、粗エキスを調製、各種有機溶媒による分画、有効成分の精

製等の技術移転を実施したことで、CSRPM の科学的能力が飛躍的に向上した。各種カラムを使用して単一化合物まで薬用植物の有効成分を単離・精製し、科学的エビデンスを得ることが可能となった。今後は、他の国内、国外研究機関とのコラボレーションも期待される。NIU で実施した NMR 装置による構造解析研修の成果により、今後ガーナ大学に導入された NMR 装置の有効活用が期待される。

- 6) 毒性スクリーニングの結果から、強く癌細胞の増殖を抑制する 50%エタノール抽出エキスを見出した。これらの植物には抗癌剤シーズとなる成分が含まれている可能性があり、ガーナ産植物を用いた抗癌剤シーズ発掘に向けた研究展開が期待される。また、プロジェクトをととして構築した癌細胞株及び正常細胞株パネルは野口研における細胞バンクの先駆けとなっており、今後さらに充実させて研究所の中央管理とする構想が生まれている。
- 7) 日ガ共同での研究成果をもとに米国特許および国際特許出願をしたことは、ガーナ側にとって今後知的財産の取り扱いおよび特許出願の先行モデルになっている。

4.1 抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索(東京医科歯科大学ウイルスグループ、野口記念医学研究所ウイルス学部門)

(1)研究実施内容及び成果

《研究のねらい》

A)抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

ガーナ人が国内で安価で手に入れやすい薬用植物からウイルス感染を制御できる有用な植物由来抽出物を見出し、含まれる有効物質の科学的知見にもとづき新規創薬候補物質を得ることをめざす。

B)潜伏感染 HIV を活性化させるガーナ産植物の探索

HIV 感染症の薬物治療が飛躍的に進歩した今日、HIV を体内から駆逐することを目的として、潜伏感染 HIV プロウイルスを外部からの刺激により再活性化させ感染細胞を死滅させる新たな治療法確立が望まれている。本研究では、潜伏感染 HIV プロウイルスを活性化する化合物をガーナ産薬用植物成分の中から見出し、その作用機序を解明する。HIV-1 感染者への HAART 療法施行後にも末梢血に残存する HIV-1 潜在感染細胞は静止期の CD4 陽性メモリー T 細胞とされている。健常人由来 T 細胞株を用いて HIV-1 持続感染系を作出することをめざす。

C) 抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

APOBEC3G 及び BST-2/Tetherin は強力な HIV 複製抑制効果をもつ宿主因子である。これらの遺伝子発現を増強させるようなガーナ産植物抽出物を見出し、HIV 複製を制御することをめざす。

《実施方法》

A)抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

スクリーニングシステムとして、感染成立後 Firefly luciferase を発現する VSV-G/NL4-3luc シュードタイプウイルスと内部標準として恒常的に *Renilla luciferase* 遺伝子を発現する CEM-SS T 細胞株を用いた急性感染アッセイ系を作製した。CEM-SS T 細胞株を植物由来成分で前処理し、感染後 24 時間後に標準化した luciferase の活性を比較評価した。

B)潜伏感染 HIV を活性化させるガーナ産植物の探索

Renilla luciferase 遺伝子を内部標準遺伝子として持ちプロウイルス遺伝子内の Firefly luciferase 遺伝子を刺激応答性に発現する Jurkat T 細胞由来 HIV-1 潜伏感染細胞株 JLR2 を樹立した。JLR2 細胞株を植物由来成分で処理して 24 時間後に標準化した luciferase の活性を比較評価した。生体に近い HIV-1 潜在感染細胞の実験系を作製するため、健常人由来の CD4 陽性 IL-2 依存性メモリータイプ T 細胞株を樹立した。

C) 抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

抗 HIV-1 活性を示す APOBEC3G (A3G) 及び BST-2/Tetherin (BST-2) の発現を増強する植物抽出物を探索するため、A3G、BST-2、内部標準遺伝子として GAPDH の mRNA 量を定量する逆転写・定量 PCR の実験系を確立した。Jurkat T 細胞を植物由来成分で刺激後 24 時間後の A3G、BST-2 mRNA の発現レベルを比較評価した。

《実施内容・成果》

A) 抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

CSRPM が作製した植物抽出物ライブラリー113 種全てについて一次スクリーニングを行った結果、8 種において感染抑制効果が見出され、うち 2 種 (CVP035A, CVP047A) について抽出物の濃度に依存的な感染抑制効果が見られた (図1)。この2種について優先的に解析を進め、一次分画の疎水性分画において感染抑制効果を見出した。

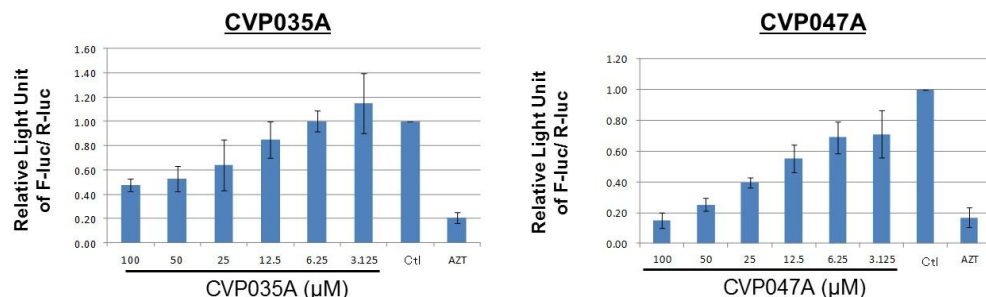


図 1. 候補抽出物CVP035A、CVP047AによるHIV-1感染の抑制

B) 潜伏感染 HIV を活性化させるガーナ産植物の探索

CSRPM が作製した植物抽出物ライブラリー113 種全てについて一次スクリーニングを行った結果、10 種に潜伏プロウイルスの活性化能が見られた。CSRPM で調製した4 分画のバイオアッセイ結果では、いずれも親水性分画にプロウイルス発現誘導活性があることがわかった。候補植物のうち、高い活性をもつ *Thebroma cacao* の親水性画分を NIU で精製した結果、Procyanidin 重合体に強いプロウイルス活性化能が見出された。その中でもっとも活性が高かった既知分子 3 量体 Procyanidin C1 (図 2 a, b) は (i) MAPK 経路を介して転写因子 NF-κB 依存的にプロウイルス発現を誘導すること、(ii) その NF-κB 依存的転写活性化は一過性であること、(iii) Phorbol ester 類に代表される潜伏感染プロウイルス再活性化物質と異なり、PKC 活性化を介さないこと、などが TMDU、NMIMR 双方で行ったメカニズム解析で明らかになった (論文発表)。エピカテキンの単量体、2量体化合物も試験したが、プロウイルス活性化能も同抑制能も認められなかった。その他の候補植物について活性強度、再現性、毒性などを検討した結果、CVP-012A、-28A、-25A、-49A からの有効成分の単離精製を試みた。

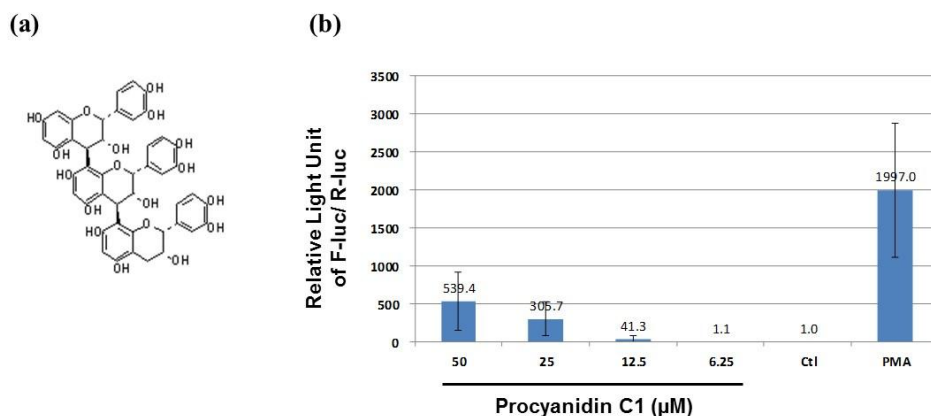


図 2. (a) *Thebroma cacao*より単離精製されたProcyanidin C1の構造、
(b) Procyanidin C1による潜伏HIV-1プロウイルス再活性化

より生体に近い HIV-1 潜在感染の実験系を樹立する目的で、CD3 抗体、CD28 抗体、ATRA (all trans retinoic acid), TGF β 等で刺激した後 IL-2 存在下で長期間培養することにより、一株の T 細胞を維持できた。この細胞株を LTiT4 と名付け、その性状と HIV-1 感受性を調べた。LTiT4 細胞株は高濃度の IL-2 依存性であり、増殖は非常に遅いが CD3/CD28 抗体ビーズによる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。LTiT4 細胞は、CD4(+), CD45RA(-), CD45RO(+) のメモリー T 細胞の形質を持ち(図1左)、数週間ごとに CD3/CD28 刺激を加えることにより、長期の培養に耐え維持可能である。CD3/CD28 刺激の無い状態では徐々に静止期にはいり CD25 陰性であるが、刺激後 CD25 陽性となり(図1右)、上清中に TNF- α 、IL-5、IL-8、その他のサイトカインを産生する。

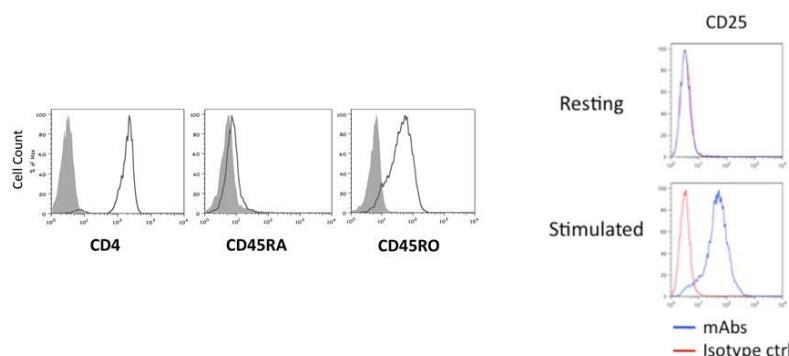


図1 LTiT4細胞のメモリーT細胞表面形質とCD3/CD28刺激に応じた活性化

LTiT4 細胞 HIV-1 感染感受性であり、VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 を感染させるとリソフェラーゼ活性が検出された。感染後1週間以上培養すると、細胞増殖が止まりウイルス発現も徐々に低下した。HIV-1 感染者では I 型 interferon (IFN) 産生や IFN-stimulated gene の発現が増加していることが報告されており、I 型 IFN は HIV-1 抑制効果や細胞周期の抑制効果を持つ事が知られていることから、LTiT4 細胞への IFN- α 添加の影響を調べた。その結果、細胞増殖はさらに抑制され、HIV-1 発現は著しく低下し、HIV-1 潜在感染細胞に類似する状態が誘導された。さらに、LTiT4 細胞に VSV-G/NL4-3luc pseudotype HIV-1 を感染させ1週間以上培養し、IFN- α 処理後またはそのまま、CD3/CD28 刺激を加えると、どちらの場合にもウイルス発現の増加が認められた。

以上から、健常人から樹立された LTiT4 細胞は、HIV-1 感受性の CD4 陽性 IL-2 依存性メモリータイプ T 細胞株であり、IFN- α の添加により細胞周期の停止とウイルス発現の低下を伴う潜在感染状態を再現できることが分かった。また、この HIV-1 潜在状態は T 細胞受容体からの抗原刺激に応じて再活性化することから、LTiT4 細胞は、HIV-1 潜在感染細胞からのウイルス再活性化を Luciferase 活性で評価できる実験系として今後有用である。

C) 抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の探索

CSRPM が作製した植物抽出物ライブラリー113 種全てについて一次スクリーニングを行ったが、残念ながら抗ウイルス因子の発現を増強する抽出物は見いだされなかった。

《カウンターパートへの技術移転の状況》

すべての工程をガーナ国内でも日本と同等に行えるよう技術移転を行った。

- [1] ヒトT細胞 (Jurkat, CEM-SS) およびHEK293T細胞培養
- [2] Transfectionによるレポーターウイルス作製

- [3] dual luciferaseアッセイ
- [4] RT-PCR(インターカレート法)による定量PCR法
- [5] Bradford法によるProtein assay
- [6] SDS PAGEによるタンパク質解析
- [7] Western blot解析

プロジェクトの研修事業を通じ、スクリーニングの実施・評価方法を習得するためにNMIMR ウイルス学部より6名の TMDU での研修を行った。また、得られた化合物による潜伏感染 HIV 活性化についての論文作成指導のため、NMIMR ウイルス学部から1名の研修を受け入れた。

《成果の位置づけや類似研究との比較》

抗レトロウイルス治療薬が飛躍的に進歩して、先進国ではHIV-1感染症が慢性疾患とも認識されるまでになった今日、潜伏感染プロウイルスを活性化してウイルスを体内から排除し治癒をめざす試みが開始されている。現状では当初開発された phorbol ester 類の中で臨床応用に至ったものはなく、現在ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤が検討されている。本事業で見出した procyanidin C1 は炎症を抑制する物質として知られていたが、最近マウス・マクロファージを活性化するという報告がなされている。しかし HIV-1 に関する報告はなく、phorbol ester、HDAC 阻害剤とは作用機序が異なる点でユニークである。

(2)研究成果の今後期待される効果

潜伏感染 HIV を活性化させるガーナ産植物の探索で得られた Procyanidin C1 は Phorbol ester 類とは異なり、PKC 活性化を介さずプロウイルスを活性化した。PKC は受容体発現、細胞膜・細胞骨格のリモデリング、遺伝子の転写を制御し、炎症、細胞増殖、接着、分化、細胞死など多彩な生体現象に影響を与える。NF- κ B 依存的転写活性化が PMA に比べて一過性であり、PKC 経路を活性化しない Procyanidin C1 は、既知の PKC を介して潜伏プロウイルスを活性化する化合物より生体に及ぼす影響が少ない事が期待される。また、宿主因子評価系の1次スクリーニングでは候補植物を見出すことはできなかったが、同スクリーニングで技術移転した RT-PCR 実験系は、2014年に発生したエボラ出血熱ウイルスの野口研ウイルス部門における検査業務の効率的遂行に貢献している。

4. 2 抗寄生虫活性成分を有するガーナ産植物の探索(東京医科歯科大学寄生虫病学グループ、野口記念医学研究所寄生虫病学部門)

(1)研究実施内容及び成果

1. ガーナ産薬用植物の抗トリパノソーマ作用スクリーニングと活性成分の同定

ガーナ産薬用植物大量スクリーニングのため、培養液改良によって低血清にて培養可能なトリパノソーマ培養系(Gutat3.1株)を確立した[1]。スクリーニングシステムは、AlamarBlueアッセイ[2]、FACSによるアポトーシスアッセイ[3]、蛍光顕微鏡による表現系解析[4]で構成され、活性スクリーニングと同時にメカニズムについての知見を得ることが可能となる。

3000種類を超える薬用植物リストから、伝統医療知識に基づき約100種類の候補植物が選択され、計113サンプルの粗抽出物が、CSRPMにて調製された。それら全てについて野口研寄生虫学にて上記スクリーニングシステムを用いたアッセイを行った結果、8粗抽出物がIC₅₀; 10 μ g/ml以下の強い抗トリパノソーマ活性を示した。

1種の有効粗抽出物につき4種の分画がCSRPMにて調製され、計32種(8粗抽出物x4分画)の分画について再度野口研寄生虫学にてバイオアッセイを実施した。その結果、1種(*Morinda lucida*)のクロロホルム分画にて高い活性が得られたため、MTA合意に基づきサンプルがNIUへ送付され、計11種の純粋成分が単離、構造決定された。11種の純粋成分のうち、新規成分2種(ML-2-2, ML-2-3)を含む4成分に抗トリパノソーマ活性を検出した。テト

ラサイクリックイリドイドを基本骨格とする新規成分ML-2-2(エステルグループ)とML-2-3(カルボキシルグループ)は、特に強い抗トリパノソーマ活性を示したため、数種の哺乳類細胞に対する毒性テストを元に、それぞれのセレクトイビティ・インデックス(SI)値を求めた結果、ML-2-3がよりトリパノソーマに対する選択性が強いことが明らかになった(米国特許出願済及び、PCT国際特許出願済)。

2. 新規活性成分の作用機序解析

ML-2-2とML-2-3について詳細な作用機序を明らかにするため、アポトーシス解析[3, 5, 6]、及び、細胞周期解析[7]を行った結果、ML-2-3はトリパノソーマ細胞内にてアポトーシスを誘導し、細胞周期上のG2/M期への移行を阻害することが明らかになった。一方、ML-2-2はアポトーシスも細胞周期異常も誘導しなかった。次に、実際にトリパノソーマ細胞の形態異常あるいは直接のターゲットについての知見を得るため、蛍光免疫染色による表現系解析を行った結果、ML-2-3が、鞭毛で発現するPFR-aタンパク質の発現を強く抑制し、鞭毛形成阻害を引き起こしていることが強く示唆された。さらに、時間経過ごとのアポトーシス解析とPFR-a抗体を用いたWestern blot解析[8-10]の結果から、ML-2-3によるアポトーシス誘導はPFR-a発現抑制とそれに伴う鞭毛形成不全が起因していることが示唆された。

3. マウスを用いた*in vivo*トリパノソーマ感染治療実験

実際に動物体内における候補植物及び、活性成分の有効性を検討するため、マウスを用いたトリパノソーマ感染治療実験[11, 12]を行った。*M. lucida*クロロホルム画分を用いた感染マウス(BALB/c)治療実験では、100 mg/kg/dailyの予防投与(ip)において、感染9日目まで血中原虫濃度を85%抑制するデータが得られた。また、ML-2-3を用いた同実験では、50mg/kg/dailyの感染後投与(ip)において、投与開始6日目まで血中原虫濃度を有意に抑制するデータが得られた。

次に、ML-2-3投与時のマウス体内動態についての知見を得るため、投与(ip)後30分から24時間までの各ポイントのPharmacokineticsアッセイを行った結果[13]、ML-2-3は投与後30分以内に速やかに血中から排除されていることが明らかになった。

4. 新たに精製されたテトラサイクリックイリドイド新規成分ML-F52

*M. lucida*クロロホルム画分から新たに同じテトラサイクリックイリドイドを基本骨格とする新規成分ML-F52(エステルグループ)が精製され、最も強い抗トリパノソーマ活性を示した一方で、哺乳類細胞への毒性は低く、SI値>50という大きな抗トリパノソーマ特異性を示した(PCT出願時追加)。また、ML-2-3同様にトリパノソーマにアポトーシスを誘導することが明らかになった。

5. 抗トリパノソーマ新規成分3種(ML-2-2、ML-2-3及びML-F52)のその他寄生虫疾患への効果

創薬候補成分としての価値を上げるためには、その他寄生虫疾患への効果も大きな要素となる。そこで、まず抗マalaria作用について解析するため、*Plasmodium falciparum* (3D10 strain)培養系にて、FACSを用いたハイスループットアッセイ系を確立し[14]、抗トリパノソーマ活性を示した新規成分3種について解析を行った結果、ML-2-2とML-2-3が強い抗マalaria活性を示す一方で、ML-F52は弱いながらも有意な活性を示すことが明らかになった。

次に、抗リーシュマニア作用を解析するため、*Leishmania hertigi*及び、ガーナVolta川領域で深刻な被害を及ぼしている野生株(*L. 010*)を用いて、リーシュマニアアッセイ系を確立した[15]。解析の結果、ML-2-2とML-F52に強い活性を検出した一方、ML-2-3には活性が見られなかったことから、エステルグループ(ML-2-2とML-F52)のみが抗リーシュマニア作用を有することが明らかになった。また、ML-2-2とML-F52の*L. heitigi*細胞への影響を蛍光免疫染色による表現系解析にて調べたところ、キネトプラストと核の分裂は起きるが細胞分裂が完了せず、二つのキネトプラストと二つの核が共存する細胞(A赤矢印、2N/2K)

の顕著な増殖が見られた。さらに、ML-2-2とML-F52による抗リーシュマニア効果はアポトーシスではなく、主にネクロシスに依存していることが明らかになった。

＜寄生虫学分野で実施された技術移転項目＞

- [1] 培養液改良による低血清培地を用いたトリパノソーマ培養 (Gutat3.1株)
- [2] AlamarBlueアッセイによるトリパノソーマ増殖解析
- [3] FACSを用いたアポトーシスアッセイ
- [4] 蛍光顕微鏡による表現系解析
- [5] FACS及び、Anexin試薬を用いたNexin解析
- [6] FACSを用いたMulticaspase解析
- [7] FACSを用いた細胞周期解析
- [8] Bradford法によるProtein assay
- [9] SDS PAGEによるタンパク質解析
- [10] Western blot解析
- [11] マウスを用いた*in vivo* 抗トリパノソーマefficacy test
- [12] トリパノソーマ感染マウスの病理解剖学的解析法 (macro and micro)
- [13] Pharmacokineticsアッセイ
- [14] FACSを用いた*P. falciparum* (3D10strain)培養系ハイスループット薬剤アッセイ
- [15] FACSを用いたリーシュマニアハイスループット薬剤アッセイ

No.	Plant Code	Activity	29	CVP018A	+	59	CVP031B	-	89	CVP55A	++
1	CVP004A	-	30	CVP017B	+++	60	CVP033B	-	90	CVP59A	+
2	CVP004B	-	31	CVP017A	-	61	CVP037A	+++	91	CVP57A	+
3	CVP001A	-	32	CVP021A	++	62	CVP026B	-	92	CVP56A	++
4	CVP005B	+++	33	CVP023A	-	63	CVP042A	++	93	CVP055B	+++
5	CVP005A	-	34	CVP024A	++	64	CVP043A	+	94	CVP062A	++
6	CVP003A	+	35	CVP016B	-	65	CVP045A	++	95	CVP058B	++
7	CVP008A	-	36	CVP023B	-	66	CVP020C	++	96	CVP055C	++
8	CVP001B	+	37	CVP019B	-	67	CVP044A	+	97	CVP064A	-
9	CVP006A	-	38	CVP022A	+	68	CVP044B	-	98	CVP057B	++
10	CVP007A	-	39	CVP020B	+++	69	CVP048A	-	99	CVP063A	+
11	CVP003B	-	40	CVP025A	+	70	CVP041A	++	100	CVP066A	++
12	CVB003C	+	41	CVP021B	+++	71	CVP046A	+++	101	CVP065A	++
13	CVP002A	+	42	CVP026A	+	72	CVP047A	-	102	CVP026C	++
14	CVP009A	+	43	CVP024B	-	73	CVP043B	+	103	CVP068A	++
15	CVP002C	-	44	CVP029A	++	74	CVP045B	-	104	CVP064B	++
16	CVP010A	-	45	CVP033A	-	75	CVP050A	-	105	CVP067A	++
17	CVP011A	-	46	CVP016C	++	76	CVP049A	-	106	CVP052B	++
18	CVP012A	++	47	CVP030A	-	77	CVP048B	-	107	CVP056B	++
19	CVP010B	-	48	CVP032A	++	78	CVP051A	+	108	CVP067B	+
20	CVP011B	-	49	CVP027A	-	79	CVP041B	++	109	CVP004C	+
21	CVP013A	-	50	CVP026A	-	80	CVP051B	+	110	CVP070A	++
22	CVP012B	-	51	CVP031A	-	81	CVP045C	-	111	CVP71A	++
23	CVP014A	-	52	CVP028A	-	82	CVP005C	++	112	CVP006B	-
24	CVP015A	++	53	CVP034A	-	83	CVP053A	-	113	CVP72A	-
25	CVP016A	++	54	CVP040A	-	84	CV P061A	-			
26	CVP013B	-	55	CVP038A	-	85	CVP060A	-			
27	CVP020A	++	56	CVP035A	-	86	CVP052A	++			
28	CVP019A	++	57	CVP036A	-	87	CVP054A	+++			

+++ : IC₅₀ < 10mg/ml++: 11mg/ml < IC₅₀ < 50mg/ml+: 51mg/ml < IC₅₀ < 100mg/ml-: IC₅₀ > 101mg/ml

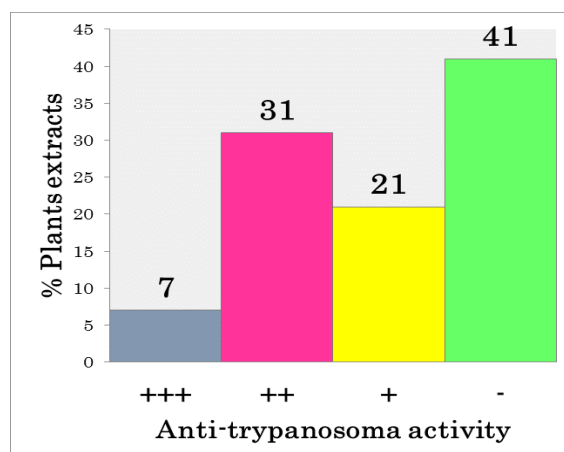


Table 1. ガーナ産生薬粗抽出物113種に対する抗トリパノソーマ活性スクリーニングの結果

(2)研究成果の今後期待される効果

ML-2-3を用いたマウス感染治療実験では、血中 ML-2-3 濃度が 30 分以内に速やかに排出される状況であるにもかかわらず、血中トリパノソーマを有意に抑制することが示された。ML-2-3 より効果の高い ML-F52 により、さらに高い抗トリパノソーマ効果が期待されるため、現在 ML-F52 大量調整に取り組んでいる。また、体内動態の課題である血中濃度を維持する投与方法の工夫と誘導体開発がこれら新規成分の治療効果を改善することが見込まれる。

M. lucida は西アフリカの主要薬用植物の一つであり、その他疾患への効果も含め、これまで多くの報告がなされているにもかかわらず、活性成分の単離には至っていない。その中で、本プロジェクトで活性成分の単離に至ったことは特筆すべき成果であり、今後その他疾患への応用研究も期待される。本プロジェクトにて抗マラリア効果と抗リーシュマニア効果が示されたことで、アフリカ最大の脅威でありながら耐性原虫の出現等で新規薬剤開発が待たれるマラリア、また、NTDs の主要疾患でありガーナ国内でも甚大な被害をもたらしているリーシュマニア症への実装展開が期待される。これらはDNDiおよび製薬会社が現在精力的に新規薬剤の開発を進めている疾患であり、それら製薬関係機関へのアピールポイントとなることが期待される。

本プロジェクトで、トリパノソーマアッセイ系、マラリアアッセイ系、リーシュマニアアッセイ系の 3 種のハイスループットアッセイ系を確立した。これによって、これら疾患に対する大規模な創薬開発を可能にする技術が、ガーナに整ったこととなる。これによって、これまでなかなか科学的解析がなされてこなかったアフリカ原産薬用植物の大規模スクリーニングが可能となり、原産国自身による薬剤開発、知的財産権取得も夢ではなくなった。実際に、野口研、生薬研間で今後の抗ガン、その他寄生虫疾患への本プロジェクトフレームワークの応用が具体的に話し合われている状況である。

名古屋 COP10 以降原産国の権利が重要視されつつある中で、日ガ共同での研究成果をもとに特許出願をしたことは、ガーナ側にとって今後アフリカの薬用植物からの研究開発および特許出願の先行モデルになっている。

4.3 ガーナ産植物抽出物の有機化学的研究(長崎国際大学グループ、ガーナ生薬科学研究所 CSRPM)

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

ストップしたガーナ由来薬用植物の採取を 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、野口研および 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、試薬等をリストアップした。
- 2) 薬用植物データベースの構築: H22年度、日ガ双方での候補薬用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 等の文献をもとに、CSRPM からは List of medicinal plants for HIV-AIDS、Ghanaian plants used in the treatment of trypanosomiasis (sleeping sickness) をもとに候補植物を選定して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野口研の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 (1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 (2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: 野口研所長の提案で、植物の粗エキス粉末名及び分画粉末名は CSRPM および野口研にて二重コード化し、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学での1次スクリーニングで陽性となった26粗抽出物については、すべて第一段階分画 (ヘキサン、クロロホルム、酢酸エチルと水との分配) を CSRPM で実施した。
- 7) 有効物質の同定: 2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。
- 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、平成26年4月)。野口研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、CSRPM で大量活性成分調製を実施した。
- 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。また、NIU にてセミ分取 HPLC による親水性分画からの単一成分の単離・精製を実施した。

【国内研究】

- 1) *Thebroma cacao* 粗エキスからの Procyanidin 重合体の精製・単離および活性評価
山岡らは Procyanidin 類の抗ウイルス活性に注目しており、*Thebroma cacao* が Procyanidin 類を多く含むことから今後の研究進展には *Thebroma cacao* の早期入手が不可欠であると判断し、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 *Thebroma cacao* を入手した。
- 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 TMDU 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: *Alkanna tinctorum* 根粗エキスからの alkannin 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 tinctorum* (紫根; 長崎国際大学生薬標本) と alkannin を含む② *Alkanna tinctorum* (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 (fruit) (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、TMDU にて抗 Trypanosoma 活性評価を実施した。

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、TMDU で抗 Trypanosoma 活性評価を実施した。

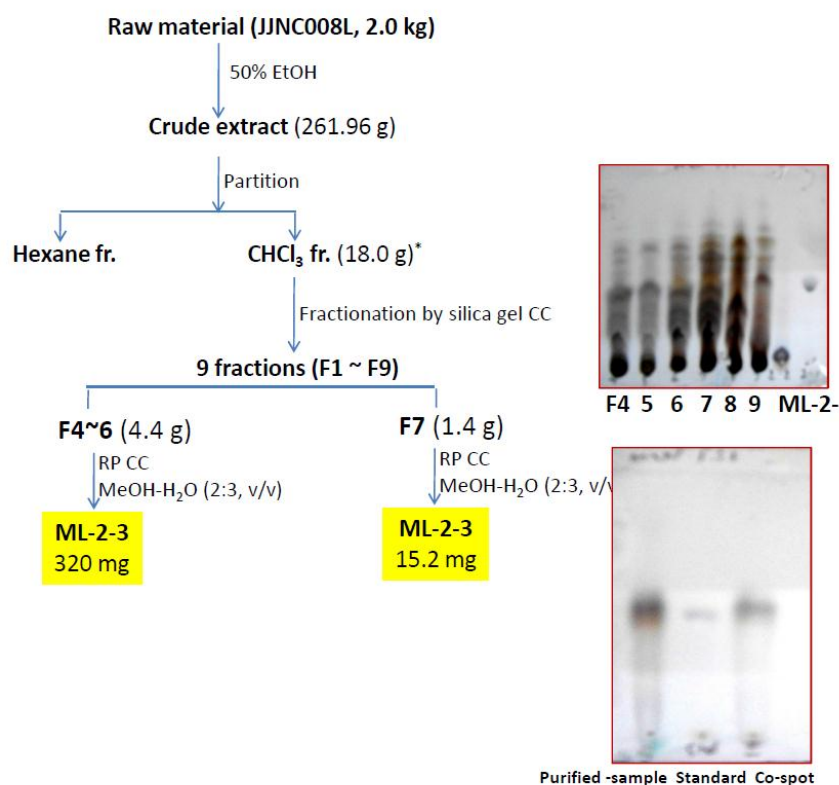
③当初の計画(全体計画)に対する成果の状況

1) 候補植物採取、植物粗エキスおよび分画調製

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種類の植物にとどまり、当初の計画より遅れていた。そこで、長崎国際大からの短期専門家の訪問時に CSRPM の植物採取担当者と話し合い、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とした。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)採取および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 H25年1月に終了した。1次スクリーニングで陽性となった20件(寄生虫病学8件、HIV 急性感染系2件、HIV 潜伏感染系10件)の2次スクリーニングとしてのヘキササン、クロロホルム、エチル酢酸、水による第1段階分画作業が H26年5月に完了した。

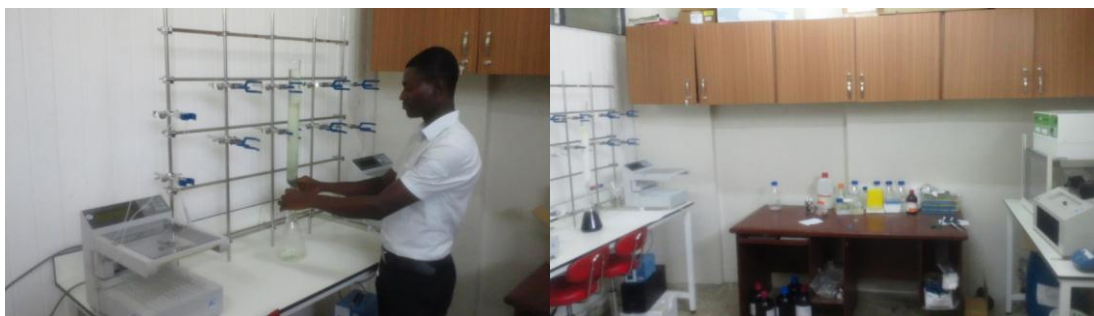
2) 活性成分の大量調製およびカラムワークスペースの整備

2次スクリーニングの結果、抗 Trypanosoma 活性上昇が確認された *Morinda Lucida* 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分画調製、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、*Morinda Lucida* のクロロホルム分画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。*Morinda Lucida* について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、ヘキササンおよびクロロホルム分画調製を実施した。平成25年4月、9月および平成26年4月に NIU から JICA 短期専門家派遣を行い、*Morinda Lucida* の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。具体的には、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。



Morinda Lucida に含まれる有効物質の効率的大量精製方法

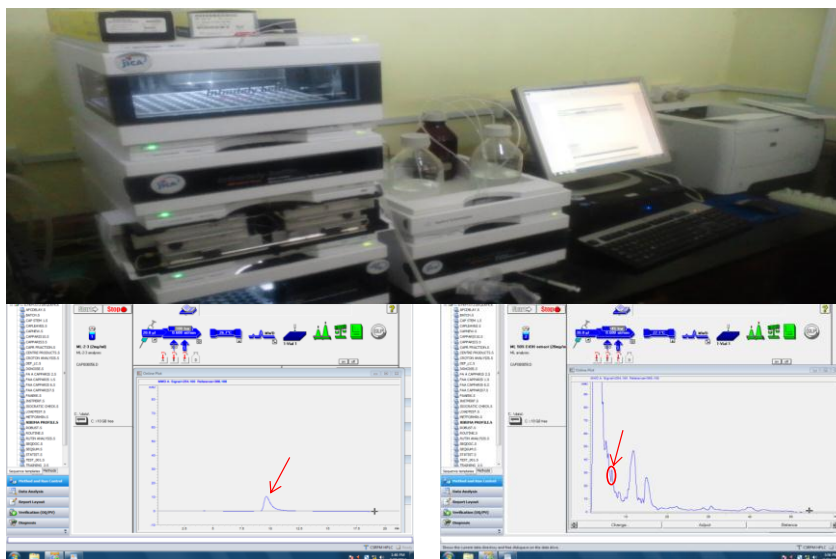
また、新規有効成分2種 (ML-2-2, ML-2-3) について、各種カラムを用いた成分の分離・精製のための研究環境整備を実施し、CSRPM 内に独立ラボスペースを設置し技術移転を実施した。CSRPM における分画精製作業をさらに能率化するために、一度に複数のカラムワークが実施できるカラムスタンドを配置し、2台のフラクションコレクターも設置した。



CSRPM でのカラムワーク実施のための独立ラボスペースの設置

3) HPLC を使用した *Morinda Lucida* 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、*Morinda Lucida* 粗エキス中の ML2-3 の分析を実施し、技術移転を行った。*Morinda Lucida* 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たが、カラムワークの最終段階で ML2-3 の精製状況を HPLC で確認することが出来た。



HPLC を使用した *Morinda Lucida* 粗エキスの ML2-3 の分析
(左下:ML2-3 STD、右下:植物 C 粗エキス)

4) その他のガーナ産植物抽出物中の活性成分探索

Thebroma cacao 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 Procyanidin 重合体の精製・単離・構造決定を行い、TMDU 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 *Thebroma cacao* を NIU へ移送し50%エタノール粗エキスを調製して、Diaion カラム、ゲルカラムに付し16画分を得、TMDU で抗 HIV 活性評価を実施した。プロウイルス活性化能が認められた画分について、スリランカ産 *Thebroma cacao* から単離した各種 Procyanidin 重合体との比較 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 C1(既知化合物)と特定した。

潜伏感染実験系で得られた候補植物 CVP012A, CVP028A, CVP049A について、バイオアッセイで強い活性を示す分画を同定し、NIU で親水分画から各種カラムおよびセミ分取 HPLC による単一化合物への精製を進めた。複数のカラムによる分離を試みたが、これらの候補植物から単一化合物を得るには至らなかった。得られたカラム分画の TLC、HPLC 分析、NMR 解析および過去の文献調査から CVP012A, CVP028A, CVP049A の活性画分はカカオと同様にカテキン重合体(縮合型タンニン)を主要な成分とすることを確認した。候補植物 CVP025A, CVP057B の親水性分画に、プロウイルスを活性化する活性を得た。CSRPM で粗エキスを調製し、NIU で粗エキスの 1 次分画を実施し、分画をバイオアッセイに供した。

急性感染実験系で得られた候補植物 CVP035A, CVP047A の1次分画のうち、非親水分画に急性感染を抑制する活性を得た。CSRPM で粗エキスを調製し、NIU で粗エキスの 1 次分画を実施し、分画をバイオアッセイに供した。

抗寄生虫の候補植物 CVP046A について、バイオアッセイで強い活性を示す分画を同定し、NIU で非親水分画から各種カラムによる単一化合物への精製を進めていく過程で、フラボノイドを主要な成分とすることを確認した。

5) 日本産植物中の活性成分

ハンノキ (*Alnus japonica*) から、主要成分 oregonin、oregonin に類似する diarylheptanoid 類に抗 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。

Alkanna tinctorum 根から精製された化合物 alkannin について抗 Trypanosoma 活性を見出した。*Solanum aceleatissimum* から 3 種の活性成分を得た。

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)平成22年9月:森永専門家

植物抽出エキスを調製方法、保存方法の確認及び指導。ターゲット植物のリスト管理法指導。最新型のロータリーエバポレーターの使用技術移転。

2)平成23年3月:宇都専門家

分析用 HPLC (TOSOH 社、Agilent 1120 Compact LC) の立ち上げ。植物エキスを調製法の確認と分画法の技術移転。

3)平成23年5～6月

凍結乾燥機を導入

4)平成23年8月:宇都専門家

候補植物の採取に関する計画作成とエキスを調製のスピードアップを技術指導。

5)平成23年8月:森永専門家

エキスを調製のスピードアップ化と蒸留水装置のセットアップ。

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

エキスを調製から、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技術指導。

7)平成23年11月:森永専門家

CSRPM で分析用 HPLC をセットアップ。

8)平成24年1月:Maxwell Sakiamah 氏が長崎国際大学で研修

エキスを調製から、分画、成分精製までの実験手法を技術指導。

9)平成24年1～3月: Vincent Tettey 氏が長崎国際大学で研修

エキスを調製から、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技術指導。さらに分析用 HPLC と分取 HPLC の取り扱いを技術指導。

10)平成24年3月: Richard Adegle 氏が長崎国際大学で研修

成分精製、構造決定までの実験手法を技術指導。

11)平成24年3月:森永専門家

H24年度長崎国際大学で研修を受けた CSRPM スタッフの Aboagye Frederick Asare 氏、Vincent Tettey 氏、Maxwell Sakiamah 氏への研修後の発展的技術移転、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)。

12)平成24年7月:宇都専門家

精製水装置と分析用 HPLC の正常稼働に向けた技術指導。

13)平成24年8月:森永専門家

分析用 HPLC ソフトウェア等の不良を改善、動作を確認。

14)平成24年10月:森永専門家

分取 HPLC に関して森永専門家立ち合いのもとで Agilent 社スタッフ、CSRPM 職員と正常稼働を確認。また蛇口直結型加圧ポンプの利用により、精製水装置を稼働させた。

15)平成25年1～2月:Samuel Kofi Agbeve 氏、Henry Brew Daniels 氏が長崎国際大学で研修。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技術指導。

16)平成25年4月:森永、Tung 専門家

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、実験環境整備を実施。

17)平成25年9月: Tung 専門家

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、実験環境整備を実施。

18) 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、抗体染色法を技術移転。また、CSRPM 附属植物園をより適確に運営・管理するために、薬用植物の培養・栽培化に関する技術・知識に関する技術移転も実施。

19) 平成26年3月:森永専門家

カラムワークラボの実験環境整備を行い、能率的カラムワークのための技術移転を実施。
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。

20) 平成26年4月: Tung 専門家

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、実験環境整備を実施。

21) 平成26年5月:宇都専門家

エバポレーター、凍結乾燥機のメンテナンスを技術移転。

22) 平成26年7月～9月:Dr. Alfred Ampomah Appiah 氏が長崎国際大学で研修

複数の性質が異なるゲルを利用したカラムクロマトグラフィーによる、薬用植物の粗エキスからの単一化合物精製および NMR(核磁気共鳴)装置を用いての化合物の構造解析・構造決定に関する技術指導を実施。

(2)研究成果の今後期待される効果

本プロジェクトで薬用植物の採取、粗エキス調製、各種有機溶媒による分画、精製の技術移転を実施したことで、CSRPM の分取精製、分析能力が飛躍的に向上した。今後、各種カラムを使用して単一化合物まで単離・精製出来る研究機関として、薬用植物の有効成分について科学的エビデンスを得ることが可能となった。他の研究機関とのコラボレーションも期待される。

NIU で実施した NMR 装置による構造解析研修により、ガーナ大学に導入された NMR 装置の有効活用が期待される。

CSRPM で製造される熱水抽出薬用植物エキス製品の品質管理に HPLC 分析技術が適用されることが期待される。

4.4 ハーブ抽出物及び精製成分の毒性学的研究（長崎国際大学 正山グループ、野口医学記念研究所 臨床病理学部門）

(1)研究実施内容及び成果

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) サンプル調製と保存管理:CSRPMより分与された50%エタノール抽出エキス、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) 各種ヒト癌細胞株及び正常細胞株の培養と管理:毒性評価に必要な癌細胞株及び正常細胞株パネルを構築する。日本人短期専門家による技術移転の際に随時ヒト癌細胞株及び正常細胞株を移転する。必要に応じて野口記念医学研究所の他部門からも入手する。凍結保存された細胞株のストック数及びコンディション等は RA が管理する。
- 3) *in vitro* 毒性確認試験:ヒト癌細胞株及び正常細胞株パネルを用いて MTT 法にて毒性評価を行う。50%エタノール抽出エキスの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(3×10^5 cells/mL)を各サンプル(0-1250 µg/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。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、より詳細な毒性確認試験を優先して行う。

- 4) 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:IC₅₀ 値をもとに毒性レベルを4段階(100 μ g/mL 以下:+++, 100~500 μ g/mL:++, 500~1250 μ g/mL: +, 1250 μ 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 IC₅₀を決定し、SI 値を確定する。

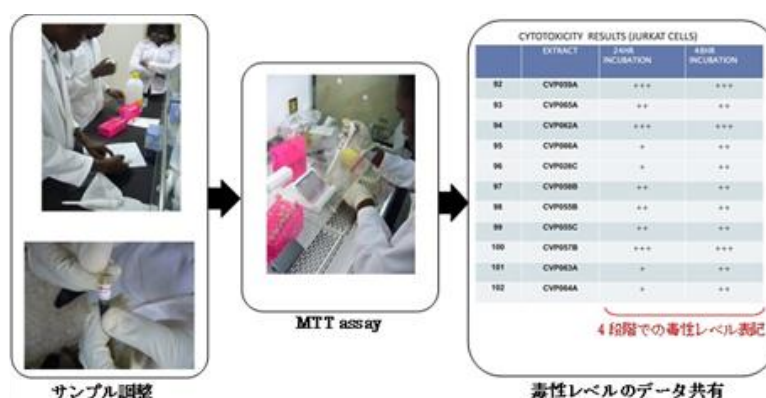


図1. *in vitro* 毒性試験における生薬粗抽出物の毒性評価の流れ

- 5) 50%エタノール抽出エキス及び精製成分の化学的特性の解析:50%エタノール抽出エキス及び精製成分を用いて化学的特性(ラジカルスカベンジング活性及び SOD 様活性)の測定を行う。
- 6) 50%エタノール抽出エキス及び精製成分の毒性誘導機序の解析:スクリーニングの結果、癌細胞株に対して特異的に高い毒性を示した 50%エタノール抽出エキス及び精製成分を用いてアポトーシス誘導能を中心とした毒性誘導機序の解析を行う。

③ 当初の計画(全体計画)に対する成果の状況

- プロジェクト開始時より、機器調達の遅れ、生薬成分取り扱いの知識不足、結果の再現性の問題などにより研究の進行が遅れたため、2011 年 7 月の国内研究者ミーティングにおいて、長崎国際大学正山グループが CSRPM に加えて野口研臨床病理学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かかり、日本人短期専門家訪問及び臨床病理学部門 5 名の長崎国際大学での研修により、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、信頼できる毒性評価が行えるようになった。
- 培養設備環境の向上により、毒性評価のスピードは毎月約 30 サンプルになり大幅にスピードアップされた。
- 2013 年 3 月末、臨床病理学部門に導入した CO₂インキュベーターが故障し、臨床病理学部門で細胞培養を行えない事態になった。2013 年 9 月に新しい CO₂ インキュベーターが導入され、以後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。
- 毒性評価に必要な癌細胞株及び正常細胞株パネルを構築した(下表)。RAによりストック本数及び細胞のコンディションは管理されている。将来的に移転された細胞株は野口記念医学研究所の必要な部門に共有できるように計画しており、長期保存に向けて液体窒素下での管理体制も整えるように進めている。

Cancer cell lines	Normal cell lines
Jurkat (Human T-lymphoblastic leukemia)	MRC-7 (Human normal lung)
HL-60 (Human promyelocytic leukemia)	Chang Liber (Human normal liver)
CEM (Human acute lymphoblastic leukemia)	WRL 68 (Human normal liver)
MCF7 (Human breast cancer)	PNT2 (Human normal prostate)
DLD-1 (Human colon cancer)	Hs 888Lu (Human normal lung)
HCT15 (Human colon cancer)	NB1RGB (Human fibroblasts)
HepG2 (Human liver cancer)	
PC-3 (Human prostate cancer)	
LNCap (Human prostate cancer)	
Caco-2 (Human colon cancer)	
KATO III (Human stomach cancer)	

表1. 野口医学記念研究所臨床病理学部門で管理している細胞株一覧

- 5) 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た。毒性試験の結果は IC_{50} により 4 つのレベルに分けられて他部門と情報共有され、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「+++ ($IC_{50} < 100$ mg/mL)」、58% (65 サンプル) が「++ ($100 < IC_{50} < 500$ mg/mL)」、10% (11 サンプル) が「+ ($500 < IC_{50} < 1250$ mg/mL)」、2% (2 サンプル) が「- ($IC_{50} > 1250$ 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。
 - 6) 抗トリパノソーマ活性のあった *Morinda Lucida* 由来精製成分について、ヒト癌細胞及び正常細胞を用いて活性成分の IC_{50} を決定し、SI 値を確定した。
 - 7) 100 以上のアフリカ産薬用植物由来エキスをを用いて網羅的に毒性評価を行っている研究報告は皆無であることから、現在、本研究結果をまとめた論文を作成中である。
(論文タイトル: Screening of Ghanaian plant extracts for in vitro cytotoxic activity)
 - 8) 抽出エキスの化学的特性(ラジカルスカベンジング活性及び SOD 様活性)測定法の技術移転を行った。50%エタノール抽出エキスのラジカルスカベンジング活性及び SOD 様活性の測定を進めており、毒性との関与を検証する。
 - 9) 抽出エキス及び精製成分によるアポトーシス誘導能解析法を技術移転した。
 - 10) 日本産抗寄生虫成分(*Alnus japonica* 由来 oregonin 及び Hirstanone)を用いてアポトーシス誘導能を解析し、*The American Journal of Chinese Medicine* に受理された。
(論文タイトル: Antiproliferative and Pro-apoptotic Activity of Diarylheptanoids Isolated from the Bark of *Alnus japonica* in Human Leukemia Cell Lines, 2015 年 in press)
- ④ カウンターパートへの技術移転の状況
- 1) 2011 年 8 月及び 12 月: 宇都専門家
臨床病理学部門での実験系の確立。臨床病理学部門と長崎国際大学での 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。また、機器調整・整備についての技術指導を実施。
 - 2) 2012 年 1 月～3 月: 臨床病理学部門から Dr. Mark Ofosuhene (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実施。

- 3) 2012 年 7 月 : 宇都専門家
臨床病理学部門にヒト癌細胞株を数種導入し、培養培養、保存について技術移転。
- 4) 2013 年 1 月～3 月 : 臨床病理学部門から 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移転を実施、帰国の際に細胞株を供与し、臨床病理学部門で増殖後、保存。
- 5) 2013 年 5 月及び 2014 年 1 月 : 宇都専門家
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。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実施。
- 6) 2014 年 1 月～2 月 : 臨床病理学部門から 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技術指導した。
- 7) 2014 年 5 月 : 宇都専門家
化学的特性 (SOD 様活性) の解析法を技術移転。毒性スクリーニング結果の論文化へ向けて論文作成を指導。
- 8) 2014 年 8 月 : 臨床病理学部門から Ebenezer Ofori-Attah (Research Technician) が長崎国際大学にて研修を行い、生薬粗抽出物及び精製成分を用いて化学的特性 (ラジカルスカベンジング活性及び SOD 様活性) の測定法を技術指導した。
- 10) 2014 年 11 月 : 宇都専門家
長期的な細胞株管理体制に向けた技術移転。毒性スクリーニング結果の論文作成指導。

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

- 1) 抗 HIV 及び抗寄生虫活性を持つ 50% エタノール抽出エキス及び精製成分の使用安全域を確定することが本グループの大きな目的であったが、113 件の 50% エタノール抽出エキスの毒性スクリーニングから強い癌細胞増殖能を示すものが見つかった。これらの植物には抗癌剤シーズとなる成分が含まれている可能性がある。
- 2) 本研究遂行のため、癌細胞株及び正常細胞株パネルを構築した。野口記念医学研究所の中で、このような細胞株パネルを保有している部門は他にない。野口記念医学研究所内で本細胞パネルは高く評価されており、他分野を含めた将来的な研究のために、研究所主体で細胞株を管理する動きがある。

(2) 研究成果の今後期待される効果

- ① 成果の今後の展開見込
毒性スクリーニングの結果から、強く癌細胞増殖を抑制する 50% エタノール抽出エキスが見つかった。これらの植物には抗癌剤シーズとなる成分が含まれている可能性があり、ガーナ産植物を用いた抗癌剤シーズ発掘に向けた研究展開が期待される。
- ② 想定される科学技術や社会への波及効果
プロジェクトをととして構築した癌細胞株及び正常細胞株パネルは野口研における細胞バンクの先駆けとなっており、今後さらに充実させて研究所の中央管理とする構想が生まれている。

§ 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 3 件)

Nguyen Huu Tung, Mitsuko Suzuki, Takuhiro Uto, Osamu Morinaga, Kofi D. Kwofie, Naa Ammah, Kwadwo A. Koram, Frederic Aboagye, Dominic Edoh, Taizo Yamashita, Yasuchika Yamaguchi, Takao Setsu, Shoji Yamaoka, Nobuo Ohta and Yukihiro Shoyama:

Anti-trypanosomal Activity of Diarylheptanoids Isolated from the Bark of *Alnus japonica* Steud. *The American Journal of Chinese Medicine*, 42(5):1245-60, 2014.

Takuhiro Uto, Nguyen Huu Tung, Regina Appiah-Opong, Abigail Aning, Osamu Morinaga, Dominic Edoh, Alexander K. Nyarko and Yukihiro Shoyama: Antiproliferative and Pro-apoptotic Activity of Diarylheptanoids Isolated from the Bark of *Alnus japonica* in Human Leukemia Cell Lines. *The American Journal of Chinese Medicine*, 2015. In press.

Takanori Hori, Jacob Barnor, Tung Nguyen Huu, Osamu Morinaga, Akiko Hamano, Jerry Ndzinu, Angela Frimpong, Keren Minta-Asare, Mildred Amoa-Bosompem, James Brandful, John Odoom, Humphry Bonney, Isaac Tuffour, Baffour-Awuah Owusu, Mark Ofosuhen, Philip Atchoglo, Maxwell Sakyiamah, Richard Adegle, Regina Appiah-Opong, William Ampofo, Kwadwo Koram, Alexander Nyarko, Laud Okine, Dominic Edoh, Alfred Appiah, Takuhiro Uto, Yoshiyuki Yoshinaka, Shin Uota, Yukihiro Shoyama, and Shoji Yamaoka: Procyanidin Trimer C1 Derived from *Theobroma cacao* Reactivates Latent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Provirus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press.

T.H. and J.B. contributed equally to this work.

(2) 研修コースや開発されたマニュアル等

(3) その他の著作物(総説、書籍など)

Advances in Medicinal Plants Research in Ghana. One-day workshop on Medicinal Plants Research. Edited by Yoshio FURUYA, Regina APPIAH-OPONG, Irene AYI and Mitsuko SUZUKI. 18th September 2014.

Establishment of Effective Research Network for Infectious Diseases and Medicinal Plants in Ghana. Medicinal Plants One-day Workshop. Edited by Mitsuko SUZUKI. 19 September 2013.

CLIMATE-ECOSYSTEM CHANGES, GLOBAL HEALTH AND HUMAN WELLBEING IN WEST AFRICA: Final Report of the Joint SATREPS Workshop on Improving Human Health Conditions and Resilience to Climate Change in Ghana, editors: Kei Otsuki, Nicholas Turner and Mitsuko Suzuki, March 2012.

IMPROVING HUMAN HEALTH CONDITIONAS AND RESILIANCE TO CLIMATE CHANGE IN GHANA: Climate-Ecosystem Change, Global Health and Human Well-Being in West Africa, Edited by Mitsuko SUZUKI and Effah ANTWI , 2nd December 2011

井戸栄治 山岡昇司： 東京医科歯科大学がガーナ大学野口医学研究所で展開している 2 つの感染症研究プロジェクト ウイルス 第 6 3 巻第 1 号 79-86, 2013

(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 0 件、国際会議 0 件)

1. 発表者(所属)、タイトル、学会名、場所、月日

② 口頭発表 (国内会議 15 件、国際会議 0 件)

堀 恭徳, Jacob S. Barnor, Shin Uota, Tung Nguyen Huu, 森永 紀, Jerry Ndzinu, John K. Odoom, Humphry K. Bonney, William Ampofo, James M. Brandful, 宇都 拓洋, 吉仲 由之, 神奈木 真理, 正山 征洋, 山岡 昇司
 ガーナ産植物由来成分による潜伏 HIV-1 プロウイルス再活性化とサイトカイン産生誘導の解析。第 28 回日本エイズ学会学術集会・総会 2014 年 12 月 3 日 大阪

三浦和樹、長谷川温彦、増田貴夫、山岡昇司、神奈木真理
 Latent HIV Infection and Potential Role of IFN α in CD4 Memory T Cells. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 2014 年 11 月 11 日、横浜

P. K. Atchoglo, K. B-A. Owusu, R. Appiah-Opong, M. Ofosuhene, N-A. Ankrah, A. Nyarko, T. Uto: Cytotoxicity and Antioxidant Activity of Some Ghanaian Medicinal Plants as Antiviral and Antiparasitic Agents. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

K. D. Kwofie, M. Suzuki, N. O. Ammah, K. K. Frempong, W. K. Anyan, I. Ayi, A. K. Nyarko, K. Koram, N. Ohta and D. A. Boakye: Identification Of Compounds With Trypanocidal Activity Against *T. Brucei* From Selected Ghanaian Medicinal Plants Using High-Throughput *In Vitro* System
 Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

Angela Frimpong, Keren Minta-Asare, Jacob Barnor, Shin Uota, Takanori Hori, James Brandful, William Ampofo, John Odoom, Jerry Ndzinu and Shoji Yamaoka: Studies On The Anti-Viral Compounds From Selected Ghanaian Medicinal Plants
 Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

K. B-A. Owusu, P. K. Atchoglo, R. Appiah-Opong, M. Ofosuhene, N-A. Ankrah, A. Nyarko, T. Uto: Toxicological Studies on Some Selected Ghanaian Medicinal Plants Used As Antiviral and Antiparasitic Agents
 Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

Adegle, R., Sarkodie, J.A., Sakyamah, M.M., Tettey, V., Aboagye, F.A., Edoh, D., Tung, N. H., Uto, T., Morinaga, O. and Shoyama, Y.: Purification of Anti-trypanosomal Compounds and Optimization for the Separation of the Target Compound from (JJNC008L)
 Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

Jacob Barnor, Jerry Ndzinu, Angela Frimpong, Keren Minta-Asare, Shin Uota, Takanori Hori, James Brandful, William Ampofo, John Odoom, and Shoji Yamaoka. Model for Screening Ghanaian Herbal Extracts for HIV Provirus Stimulatory Activity. National HIV/AIDS Research Conference (NHARCON), Accra, Ghana, September 10th, 2013.

堀恭徳、Ahmed Nursarat、Guyen Huu Tung、宇都拓洋、森永紀、吉仲由之、神奈木真理、正山征洋、山岡昇司：ガーナ産植物由来成分による潜伏 HIV-1 プロウイルス再活性化とサイトカイン産生誘導の解析、日本エイズ学会、熊本、2013 年 11 月 20 日

William K. Anyan., Mitsuko Suzuki, Kofi D. Kwofie, Naa O. Ammah, Kwadwo K. Frempong, Irene Ayi, Shoji Yamaoka, Alexander K. Nyarko, Daniel Boakye and Nobuo Ohta: Assessing Selected Ghanaian Medicinal Plants for active anti-trypanosomal (*T. brucei*) compounds. Ghana Biomedical Convention, Accra, Ghana, July 31, 2012.

Keren Minta-Asare, Jacob Barnor, Angela Frimpong, Shin Uota, Takanori Hori, James Brandful, William Ampofo, John Odoom, Mildred Amoa-Bosompem and Shoji Yamaoka.: Studies on the anti-viral compounds from selected Ghanaian medicinal plants. College of Health Science Conference, Accra, Ghana, Sep. 26-28, 2012.

Ahmed N., Hasegawa A., Takamori A, Masuda T., Yamaoka S., Kannagi M. Establishment of a human iTreg- like cell line susceptible to HIV-1 infection. 第 60 回 日本ウイルス学会学術集会 2012 年 11 月 15 日, 大阪

堀恭徳、Nguyen Huu Tung、魚田慎、宇都拓洋、森永紀、吉仲由之、正山征洋、神奈木真理、山岡昇司：植物抽出物による潜伏 HIV-1 プロウイルス再活性化メカニズムの解析、日本エイズ学会、東京、2012 年 11 月 24 日

井戸栄治、山岡昇司：東京医科歯科大学がガーナ野口記念医学研究所で展開している 2 つの感染症研究プロジェクト、日本ウイルス学会学術集会、2012 年 11 月、大阪

魚田慎、Nguyen Huu Tung、吉仲由之、神奈木真理、正山征洋、山岡昇司：HIV-1 潜伏感染系を用いたプロウイルスを再活性化する植物抽出物の解析、日本エイズ学会、東京、2011 年 12 月 2 日

ポスター発表 (国内会議 15 件、国際会議 4 件)

Kwafie K. D.., Suzuki M., Tung N. H., Ammah N. O., Frempong K. K., Anyan W. K., Uto T., Morinaga O., Aboagye F., Appia-Opong R., Nyarko A. K., Yamaoka S., Shoyama T., Edoh D., Koram K., Ohta N., Boakye D. A. and Ayi I.: Isolation of Novel Anti-Trypanosomal Compounds from *Morinda lucida* Leaf Extract. American Society of Tropical medicine and Hygiene (ASTMH), New Orleans, USA, 2nd – 6th Nov. 2014

Amoa-Bosompem M., Suzuki M., Kwofie K. D., Adegle R., Tung H. N., Anyan W. K., Yamaoka S., Koram K., Ohta N., Edoh D., Ayi I. and Boakye D. A.: The Efficacy of Three Compounds Isolated from *Morinda Lucida* Leaves Against Field and Laboratory strains of *Leishmania* sp. American Society of Tropical medicine and Hygiene (ASTMH), New Orleans, USA, 2nd – 6th Nov. 2014

Agyapong J., Suzuki M., Awandare G. A., Ofori M., Ayi I., Frimpong E. H. and Boakye D. A.: Anti-Plasmodial Properties of Some Selected Ghanaian Medicinal Plants; Identification of Novel Active Compounds Against *Plasmodium falciparum*. American Society of Tropical medicine and Hygiene (ASTMH), New Orleans, USA, 2nd – 6th Nov. 2014

Frimpong A., Barnor J., Uota S., Holi T., Brandful J., Ampofo W., Odoom J., Bonney J. K.,

Minta-Asare K., Ndsinu J. and Yamaoka S.: Studies on HIV Stimulatory Effects of Compounds in Selected Ghanaian Medicinal Plants in Chronically Infected T-Cells. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Amoa-Bosompem M., Suzuki M., Kwofie K. D., Tung H. N., Adegle R., Mosore M., Puplampu N., Nuako G. K., Anyan W. K., Shoyama Y., Edoh D., Yamaoka S., Koram K., Ohta N., Ayi I. and Boakye D. A.: The *in vitro* Efficacy of Three Compounds Isolated from a Medicinal Plant Against *Trypanosoma brucei* sp. and *Leishmania* spp. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Ndzinu I., Frimpong A., Holi T., Uota S., Minta-Asare K., Barnor J., Brandful J., Odoom J., Bonney J. K., Ampofo W. and Yamaoka S.: Crude Extracts from Selected Ghanaian Medicinal Plants Suppress HIV-1 infection in Human T-Cells. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Tuffour I., Appiah-Opong R., Asante I. K., Safo D. O., Ofori-Attah E., Uto T. and Nyarko A. K.: *Albizia zygia* Inhibits Proliferation of T-Lymphoblast-Like Leukemia Cells by Inducing Apoptosis. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Ayertey F., Martey O. N. K. and Asiedu-Larbi J.: Safety (Chronic) Evaluation of “PRODUCT X”, An Herbal Preparation Used for the Management of HIV/AIDS, Hepatitis, Cancer, Chronic Diseases and Related Diseases in Ghana. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Owusu K. B-A., Atchoglo P. K., Appiah-Opong R., Ofosuhen M., Ankrah N-A., Nyarko A. and Uto T.: Toxicological Studies on Fractions and Compounds Isolated from Selected Ghanaian Medicinal Plants Used as Antiviral and Antiparasitic Agents. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Sakordie JA. and Edoh DA.: Antihyperglycaemic Effects of γ -hydroxy- δ -valerolactone Isolated from Ethanolic Extract of *Adenia lobata* Engl (Passifloraceae). Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 30th July– 1st Aug. 2014

Kwofie K. D., Suzuki M., Ammah N. O., Frempong K. K., Anyan W. K., Ayi I., Nyarko A. K., Koram K., Ohta N and Boakye D. A.: High-Throughput *In Vitro* Screening Of Selected Ghanaian Medicinal Plants For Trypanocidal Activity Against *T. B. Brucei*. American Society of Tropical medicine and Hygiene (ASTMH), Washington DC, USA, 13th – 17th Nov. 2013

P. K. Atchoglo, K. B-A. Owusu¹, T. Uto, M. Ofosuhen, R. Appiah-Opong, N-A. Ankrah, and A. Nyarko: Toxicological Studies on active Fractions and Compounds from Ghanaian Medicinal Plants used as Antiviral and Antiparasitic Agents. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

Ammah N. O., Suzuki M., Kwofie K. D., Frempong K. K., Anyan W. K., Ayi I., Nyarko A. K., Koram K., Ohta N and Boakye D. A.: Establishment Of A High-Throughput *In Vitro* Screening System For Selected Ghanaian Medicinal Plants For Trypanocidal Activity against

T. Brucei. Ghana Biomedical Convention (GBC), Cape Coast, 27th – 29th July 2013

Sakyiamah, M. M., Adegle, R., Tettey, V., Aboagye, F. A., Edoh, D., Tung, N. H., Uto, T., Morinaga, O. and Shoyama, Y.: Isolation and Purification of Anti-Viral and Anti-Parasitic Compounds from the Ghanaian Medicinal Plant, JJNC008L. Ghana Biomedical Convention, Accra, Ghana, July 31, 2012.

Naa O. Ammah, Mitsuko Suzuki, Kofi D. Kwofie, Kwadwo K. Frempong, William K. Anyan, Irene Ayi, Alexander K. Nyarko, Shoji Yamaoka, Nobuo Ohta and Daniel Boakye: Studies of anti-parasitic activity from the selected Ghanaian medicinal plants; *in vitro* screening system for trypanocidal activities against *T. brucei*. Ghana Biomedical Convention, Accra, Ghana, July 31, 2012.

Isaac Tuffour, Kofi Baffour-Awuah Owusu, Joseph Aboagye Kermah, Mark Ofosuhen, Takuhiro Uto, Regina Appiah-Opong, Nii-Ayi Ankrah1, Alexander K. Nyarko.: Toxicological studies on selected Ghanaian medicinal plants used as antiviral and antiparasitic agents. Ghana Biomedical Convention, Accra, Ghana, July 31, 2012.

Adegle, R., Sakyiamah, M. M., Tettey, V., Aboagye, F. A., Edoh, D., Tung, N. H., Uto, T., Morinaga, O. and Shoyama, Y.: Isolation and purification of anti-viral and anti-parasitic compounds from the Ghanaian medicinal plant, JJNC008L. College of Health Science Conference, Accra, Ghana, Sep. 26-28, 2012.

Kwofie K. D., Suzuki M., Ammah N. O., Frempong K. K., Anyan W. K., Ayi I., Nyarko A. K., Ohta N. and Boakye D. A.: Studies of Anti- Parasitic Activity from Selected Ghanaian Medicinal Plants; *In Vitro* Screening System for Trypanocidal Activities against *T. brucei*. College of Health Science Conference, Accra, Ghana, Sep. 26-28, 2012.

Kofi Baffour-Awuah Owusu, Isaac Tuffour, Joseph Aboagye Kermah, Mark Ofosuhen, Takuhiro Uto, Regina Appiah-Opong, Nii-Ayi Ankrah1, Alexander K. Nyarko.: Toxicological studies on selected Ghanaian medicinal plants used as antiviral and antiparasitic agents. College of Health Science Conference, Accra, Ghana, Sep. 26-28, 2012.

(5)知財出願

① 国内出願 (0 件)

② 海外出願 (2 件)

NOVEL COMPOUNDS HAVING A TETRACYCLIC IRIDOID SKELETON AND AN ANTI-TRYPANOSOMAL AGENT COMPRISING THE SAME AS AN ACTIVE INGREDIENT

山岡 昇司、太田 伸夫、鈴木 光子、正山 征洋、森永 紀、宇都 拓洋、Nguyen Huu Tung、Kwadwo Ansah KORAM、Kwabena Mante BOSOMPEN、Alexander Kwadwo NYARKO、Daniel Adjei BOAKYE、Irene AYI、Regina APPIAH- OPONG、Dominic Adotei EDOH、Laud Kenneth Nii-Aitey OKINE、Frederick Asare ABOAGYE

国立大学法人東京医科歯科大学、長崎国際大学、UNIVERSITY OF GHANA
(NOGUCHI MEMORIAL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH)、CENTRE FOR
SCIENTIFIC RESEARCH INTO PLANT MEDICINE

2014 年 1 月 7 日

14/149,262

アメリカ合衆国

NOVEL COMPOUNDS HAVING A TETRACYCLIC IRIDOID SKELETON AND AN
ANTI-TRYPANOSOMAL, ANTI-LEISHMANIAL AND ANTI-PLASMODIAL
AGENTS COMPRISING THE SAME AS AN ACTIVE INGREDIENT

山岡 昇司、太田 伸夫、鈴木 光子、正山 征洋、森永 紀、宇都 拓洋、Nguyen
Huu Tung、Kwadwo Ansah KORAM、Kwabena Mante BOSOMPEM、Alexander
Kwadwo NYARKO、Daniel Adjei BOAKYE、Irene AYI、Regina APPIAH- OPONG、
Dominic Adotei EDOH、Laud Kenneth Nii-Aitey OKINE、Frederick Asare
ABOAGYE

国立大学法人東京医科歯科大学、長崎国際大学、UNIVERSITY OF GHANA
(NOGUCHI MEMORIAL INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH)、CENTRE FOR
SCIENTIFIC RESEARCH INTO PLANT MEDICINE

2015 年 1 月 7 日

PCT/JP2015/050856

③ その他の知的財産権

他に記載すべき知的財産権があればご記入下さい。(実用新案 意匠 プログラム著作権 等)

(6)受賞・報道等

“受賞や新聞報道等について、具体的に記入してください。”

① 受賞

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。)

③ その他

産経新聞—鼓動—「連綿と続く日本の医学支援」2013 年6月 14 日記事

**Ghanaian Times - “NMIMR, others collaborate to network on medicinal plant
research” 10Oct.2013**

Daily Graphic - “Government urged to invest in research” 20 Sep. 2013

内閣府 野口英世アフリカ賞インタビューシリーズ

現代の野口英世博士たちと国際協力

井戸栄治 山岡昇司

<http://www.cao.go.jp/noguchisho/info/interviewprofidoprofyamaoka.html>

(7)成果展開事例

①実用化に向けての展開

《SATREPS の成果として得られた成果が、企業との共同開発、特許実施許諾、ノウハウ供与契約、サンプル提供等、技術移転や実用化に向けた展開、あるいはJSTや NEDO などの実用化プログラムに展開しましたら、記載例を参考にご記入ください。また、記載に当たり却って成果の実施に障害となる部分は、出願番号まで書かずに特許〇件とだけ記載するあるいは非公開例に記載するなど、障害にならないようお気をつけ下さい。さらに、相手国内における成果の展開の事例があれば併せて記載してください。》

<公開可能なもの>

②社会実装(研究成果の社会還元)への展開活動

《SATREPS の成果で、現時点では実用化までの段階には至っていないが社会的に役立っている活動をお書き下さい。》

§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、その他チーム内ミーティング（主なもの）を行った場合、月日、名称、場所、参加人数、目的や内容などを記入。”

なお、チーム内ミーティング等、一般公開でないものは、名称のあとに（非公開）と記載して下さい。

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011 年(参加人数)	Monthly Meeting (非公開)	野口研		プロジェクトの実質的現地運営委員会。各部門のガーナ側部門長またはフェロー、日本側専門家が交代で議長を務め、毎回議事録を作成して野口研所長、CSRPM 所長、TMDU 山岡、NIU 正山と共有した。 毎月の実験結果の報告と議論および運営課題の検討を行った。 ワークショップの企画・準備・運営についてもこの会議が主体となった。
0125				
0329			17	
0427			15	
0524			14	
0628			16	
0726			13	
0927			15	
1025			20	
1103			28	
2012 年				
0131			14	
0327			27	
0424			17	
0529			16	
0724			16	
0815				
0925			16	
1030			19	
1127			17	
2013 年				
0129			17	
0326			25	
0430			18	
0528			18	
0625			17	
0827			17	
0903			14	
1029			17	
1126			14	
2014 年				
0128			16	

0325 0422 0527 0624 0722 0826 0909 1028			11 18 19 20 20 14 14 11	
2010 年 0825	キックオフ meeting (非公開)	野口研	17	野口研所長、CSRPM 所長、各部門部長、フェロー、チーフアドバイザーはじめ日本人専門家が参加。JICA 事業の framework 説明、研究内容の概略説明、物流とその管理、RA 雇用、月例報告の作成と情報共有について協議した。
2012 年 1202 1203	SATREPS Joint Workshop on Improving Human Health Conditions and Resilience to Climate Change in Ghana	野口研	230 200	ガーナにおいて実施される2件のSATREPS 事業が扱う課題、感染症と気候変動は相互に深い関係があると考えられる。双方の日本ガーナ関係者および、若い世代のガーナ人研究者、日本人研究者・学生が延べ430人集まり、両分野を基軸にした新たな研究分野創設に向け意見交換を行った。また、日本ガーナ若手研究者による研究発表の場を提供した。当初の参加予定を大きく上回る参加があり、ガーナの新聞各社に大きく取り上げられ、この分野への人々の関心の高さを示していた。

2013 年 0919	WORKSHOP: “Establishment of Effective Research Network for Infectious Diseases and Medicinal Plants in GHANA”	野口研	182	祝日の開催にもかかわらず大変 高い関心を集め一日で 182 人が 参加する大規模なワークショップ となり、目標であったガーナ国内 の薬用植物研究者間ネットワーク の構築に大きく貢献した。主要研 究機関として、野口研、生薬研、 ガーナ大学、Kwame Nkruma 科学大学(クマシ)、ケープコース と大学が連帯しながらネットワー クを活性化することが約束された。 ガーナ大学から Prof. Gyapong pro-vice Chancellor が参加し、 薬用植物研究に期待する将来的 な benefit について大学としての 関心が寄せられた。当日の様子 は現地で新聞報道され、野口研 からプレスリリースも行われた。参 加者からネットワーク継続の要望 が多く寄せられていることを受け、 平成26年度第 2 回ワークショップ 開催の打ち合わせを開始した。
2014 年 0918 0919	One-day Workshop on Medicinal Plants Research: Advances in Medicinal Plants Research in Ghana	野口研	91 38	ガーナ国内主要研究機関である 野口研、生薬研、ガーナ大学、 Kwame Nkruma 科学大学(クマ シ)、ケープコースト大学、 Development Studies 大学から の口頭発表およびポスター発表 があり、プロジェクト各部門からも 活動内容について発表した。特 筆すべきこととして、President of BIO Ventures for Global Health の Dr. Jennifer Dent の 講演があった。 第2日は、若手研究者(本邦研修 経験者を含む)の成果発表およ び活発な質疑応答が行われた。

--	--	--	--	--

① 合同調整委員会開催記録
(開催日、出席者、議題、協議概要等)

年月日	出席者	議題	概要
2011年 2月16日	野口研究所20名 生薬研究所6名 東京医科歯科大学4名 科学技術振興機構1名 在ガーナ日本国大使館2名 JICA ガーナ事務所4名 ガーナ保健省1名	第一回プロジェクト合同調整委員会(JCC)	プロジェクトの活動レビューと活動方針決定
2012年 2月22日	野口研究所16名 生薬研究所7名 東京医科歯科大学4名 科学技術振興機構1名 在ガーナ日本国大使館1名 JICA ガーナ事務所3名 ガーナ保健省1名	第二回プロジェクト合同調整委員会(JCC)	プロジェクトの活動レビューと活動方針決定
2012年 8月15日	野口研究所24名 生薬研究所8名 東京医科歯科大学3名 科学技術振興機構2名 在ガーナ日本国大使館2名 JICA ガーナ事務所6名 ガーナ保健省1名 中間評価コンサルタント3名	第三回プロジェクト合同調整委員会(JCC)	プロジェクトの活動レビューと活動方針決定 中間評価

2013年 2月20日	野口研究所19名 生薬研究所7名 東京医科歯科大学3名 在ガーナ日本国大使館1名 JICA ガーナ事務所5名 ガーナ保健省 1 名	第四回プロジェクト合同 調整委員会(JCC)	プロジェクトの活動レビュー と活動方針決定
2014年 3月5日	野口研究所24名 生薬研究所8名 東京医科歯科大学3名 在ガーナ日本国大使館1名 JICA ガーナ事務所3名 ガーナ保健省 1 名 ガーナ大学5名	第五回プロジェクト合同 調整委員会(JCC)	プロジェクトの活動レビュー と活動方針決定
2015年1月 23日	野口研究所 24 名 生薬研究所 8 名 東京医科歯科大学 3 名 在ガーナ日本国大使館 1 名 JICA ガーナ事務所 3 名 ガーナ保健省 1 名 ガーナ大学 5 名	第六回プロジェクト合同 調整委員会(JCC)	プロジェクトの総括と今後の 活動について 終了時評価

§ 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。
 - 1) プロジェクト雇用の Research Assistant (RA)も機関雇用の RA も、野口研と CSRPM においてはガーナ国内一流大学を卒業した若い研究者が通過する職位の一段階にすぎず、ともに将来の野口研を支えるフェローとなりうる人材である。フェローはもちろん、これら若手研究者を通じた事業成果の継承を念頭に、技術移転と人材育成をさらに進める必要がある。
 - 2) JICA スキームでは所長が PI となるが、所長は大変忙しく毎月の月例プロジェクト進捗ミーティングに参加することはかなわない。その分、毎月書かれた進捗リポートを必ず送って共有することで進捗を把握いただき、同時に月例ミーティングの議事録も共有し、プロジェクトが抱える諸問題やプロジェクトがどういう状況にあるか、また、プロジェクトメンバーの意見を把握いただくよう努めた。それでも所長がプロジェクトの個別進捗内容と現場の状況やプロジェクトメンバーの意向をリアルタイムで把握することは容易ではなかったと思われる。
 - 3) 西アフリカに位置するガーナはアジア諸国と異なり、インフラ整備の遅れ、精密機器、温度管理品等の物品購入における困難など、生命科学研究を主体とする事業を展開する上では多くの障壁が残されている。例えば、停電が頻発するアフリカにおいて、第一線で活躍するような精密機械を導入すると頻繁に不具合が起き、不具合が起きた時にはその精密性から技術者の協力なしでは解決は望めない。当プロジェクトに於いても機器の故障がプロジェクト活動停止に直結する状況が多々発生した。それは機器選定時に本邦から調達する場合は特に不安定な電圧等に対応できるよう設計考慮されていない

ことが一因であり、また、不具合の場合は必ず日本語で日本の技術者と連絡を取る必要性が出てくる。輸入機器購入にあたっては可能であればガーナ国内に代理店、保全サービスがある業者からの選定が望ましいであろう。

- 4) 本邦、現地調達問わず、調達作業開始から納品までに半年から1年かかる。特に初年度の機材調達遅延はプロジェクトに深刻な影響を及ぼした。急遽、プロトコルの変更等で何とか進捗を確保することで対応した。また、消耗品に関しても JICA スキーム上、年1回の半年以上を要した消耗品調達となるため、年間の消耗品使用を予測し購入することは大変困難な作業となり、研究結果により急遽必要となる試薬等の購入はほぼ不可能な状況であった。その場合は、国内予算を用いた購入と専門家渡航の際の運搬で研究進捗を確保したが、これは大変負担の大きい作業であり、空港にて没収される可能性もある。
 - 5) 消耗品購入時の参考見積もりと契約後見積もりのギャップが大きい。消耗品調達はまず3社参考見積もりから作業が開始されるが、調達希望リスト全ての見積もりを出してくる業者はない状況で契約業者が選定される。その後、正式見積もりにて参考見積もりでは出てこなかった物品が追記されるが、これが希望物品と異なっている場合もあるいは定価をはるかに超える高額な場合でも、この時点での変更は調達作業全てのやり直しを意味し、実質不可能な状況であった。その場合、キャンセルをして緊急調達としてプロジェクト独自で業者と購入作業をすることになるが、さらに時間がかかる結果となる。参考見積もりの時点で全ての物品が含まれていない状況である中、契約後の物品変更の可能性は避けては通れず、今後のシステム見直しが必要と思慮する。また、参考見積もり比較が一つ一つの物品に対して行われ一つ一つの物品をどこから購入するかという選択が可能なシステムが望ましいと思われた。
- ・ 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。
 - 1) カウンターパート特に若手研究者の育成を図り、フェローだけでなくプロジェクト雇用 RA、機関雇用 RA を含めて積極的に月例進捗会議、セミナー、ワークショップ準備への参加や学会発表を促した。若手に対する技術移転を徹底すると同時に、フェローにはその若手を指導する立場で研究をリードし、問題点を解決し、次の方針を立てる機会を多く持った。具体的には、月例報告会での RA によるデータ発表と科学的議論、フェローによる問題点指摘と解決策の提示、指導、毎年関係 RA 全員による国内学会発表のための準備、リハーサル、発表。フェローによる発表内容添削、発表練習時のアドバイスや想定される質問への対応指導、などである。
 - 2) ワークショップ開催により生薬研究知識と技術情報の共有、若手研究者への発表機会の提供およびガーナ国内生薬研究者のネットワーク形成を図った。野口研からワークショップに関してプレスリリースを実施した。
 - 3) 米国特許および国際特許出願に際しては、TMDU 産学連携研究センター、長崎国際大学知財部、ガーナ大学、CSRPM が連携して準備にあたり、日本側研究者、ガーナ側研究者と東京の特許事務所担当者がテレビ会議を重ね共同で出願書類を作成した。ガーナ大学と CSRPM は本件を通じて初めて特許出願作業を経験し、ガーナ大学で知財を担当する Pro-Vice Chancellor の Prof. Gyapong は「ガーナ大学はこれを今後のモデルケースとし、さらに経験を重ねたい」と期待を込めている。
 - ・ 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。

プロジェクトの自立発展性向上のためには、プロジェクトが策定した SOP をもとにカウンターパートが技術移転内容を確実に実行し、事業期間内で得た研究成果を継承することが必要である。そのためには、技術を習得した RA を機関職員として採用定着させるとともに、フェロークラスの研究能力を開発することと研究を継続するための外部資金を獲得することが

必要である。さらに、ガーナ国内の研究者ネットワークを維持発展させることも重要である。

(2) 東京医科歯科大学ウイルス学グループ 野口記念医学研究所ウイルス学部門/抗 HIV 活性成分を有するガーナ産植物の探索

- ・ 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。
 - 1) 野口研ではスタッフの職位による分業が徹底している。フェローの間、RA の間にもそれぞれの細かい職位による分業がある。そのため、実験操作はほとんどがプロジェクト雇用 RA、日本人専門家によって担われ、野口研雇用 RA が参加することもあるが、フェローが実際に実験をすることは稀である。そのこと自体は野口研のシステムでありプロジェクトはそれに従って実施するのであるが、未経験の実験については実験結果の評価能力、問題点を抽出し解決する能力の向上は実験をする中で培われ、それをもとに次の課題を抽出・立案することも可能になる。その点を考慮して、本邦研修で来日したウイルス学フェローには、プロジェクトで実施してきた実験操作と結果の評価、そこで生じた問題点を抽出し解決するという経験を重ねられるよう配慮した。
 - 2) エボラ出血熱が近隣国で発生したことにより、野口研がガーナ国内の疑い例の検査を行うこととなり、同じ P3 実験室を使用するプロジェクトに問題が発生した。検査用血液サンプルは2014年10月頃まではほぼ毎日届けられ、そのたびに1日当たり少なくとも2～3時間程度の立ち入り禁止措置がとられた。検査担当フェローと使用時間調整を行ったが、本プロジェクト HIV-1 実験の進捗に影響が出た。
- ・ 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。
技術移転を実施した若手研究者の研究所への定着を図ること、若手フェロークラスの人材には実際に実験を体験させ、結果の評価能力と問題解決能力の開発・向上を図ることが重要である。

(3) 東京医科歯科大学寄生虫病学グループ、野口記念医学研究所寄生虫病学部門/抗寄生虫活性成分を有するガーナ産植物の探索

- ・ 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。
 - 1) 野口研動物センターにおける飼育動物(マウス、ラット)の供給停止
マウスを用いた抗寄生虫効果の解析を実施し始めてまもなく、野口研動物センターからのマウスの供給が完全にストップするという問題が生じた。これは、ガーナ国内ほぼ全ての動物センターに共通する問題であり、他施設からの動物確保も不可能な状況であったため、急遽 MTA 合意を行い、東京医科歯科大学にて動物実験を継続することとした。

(4) 長崎国際大学グループ、CSRPM/ハーブ抽出物の有機化学的研究:有効成分の単離精製と構造活性相関解析

- ・ 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。
 - 1) CSRPM では頻繁に停電が発生し、また電圧も安定しておらず、ときには300V程度まで上昇し、研究機器への影響が心配された。そのため、電圧安定装置を主要な研究機器には接続し、頻繁に発生する停電には、無停電電源装置(UPS)を接続し、数時間程度の停電時でも研究機器が稼働できる環境整備を整備した。さらにUPSでは対応が難しい大型機器の安定稼働のためにジェネレーターも導入した。電気の問題点は研究機関単独での努力では限界があるが、本プロジェクトで導入、整備した環境が今後も活用されることが期待できる。
 - 2) CSRPM では水道が整備されておらず、普段は井戸水を蒸留して研究に使用しており、精製水製造装置の設置が困難であった。そこで、タンクを外部に設置し、タンク内には購入した

水を満たし、タンクから研究室へ水が供給できる環境整備を CSRPM 主体で実施した。不足する水圧は加圧補助ポンプを追加接続することで、精製水製造装置を設置・稼働することができた。その後、CSRPM の自助努力で地下水をタンクに供給することにより研究所内の全研究室への供給を満たせる量の精製水の製造が可能となり、今後も整備した水環境が適切に活用されることが期待できる。

- ・ 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。

- 1) 相手国研究機関の水、電力事情を事前に把握し、精密機器を守るために必要な設備をあらかじめ導入する。

- ・ 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。

本事業は特定の抗病原体効果を有する薬用植物含有成分の探索研究であるので、今後は研究機関や研究者が積極的に課題を設定し、抗ガン作用や抗糖尿病活性についての成分探索研究等にプロジェクトで修得した技術を活かしていく必要がある。その中で、技術移転の研修を受けた研究者や技術員が中心となって、多くの者に技術指導を行う必要がある。

(5) 長崎国際大学 正山グループ、野口医学記念研究所 臨床病理学部門/ハーブ抽出物及び精製成分の毒性学的研究

- ・ 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。

- 1) 研究を主体として行っているのは Research Fellow ではなく RA である。RA の研究歴は短く技術指導が必要であるが、研究以外の業務で忙しい Research Fellow は RA への指導時間は限られている。これを解決するべく、RA を本邦研修させることで研究技術の基礎を技術移転した。本研修はその後の研究推進に効果的であった。

- 2) 停電が頻繁に発生することや停電による機械トラブルため、培養細胞の安定的な培養・保管が困難であった。使用する CO₂ インキュベーターを増やしたり、細胞保存を1か所ではなく複数のディープフリーザーで保管したりする等の対策を行った。液体窒素による管理費は高価であるが、野口研所長を交えた会議により野口研管理で液体窒素による細胞保存が承認され、計画が進められている。

- ・ 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。

- 1) プロジェクトが要求している研究レベルを周知させることや基礎的な研究技術移転を目的として、プロジェクト開始年度に RA の本邦研修を比較的長期間行うことが効果的であると考え。

- 2) RA や学生等の若手メンバーのモチベーションは非常に高く、技術移転の際はプロジェクトメンバーに限らず常に多くの若手メンバーが参加した。これら若手メンバーのプロジェクト終了後の雇用確保と育成は重要である。

§8 結び

本事業では、抗ウイルス・寄生虫活性を有するハーブの入手、有効成分のスクリーニングと作用機序の解析、有効な化合物の取得と前臨床試験候補の選抜等を通して新規効率的治療法の開発に貢献し、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した。研究対象としてアフリカで問題となっている HIV と *Trypanosoma* を選び、スクリーニングとして HIV で3系統、*Trypanosoma* で1系統を設定した。結果として、ウイルス学分野では潜伏感染 HIV プロウイルスを活性化する化合物を構造決定しその作用機序を論文報告したが、他のウイルス学2系統のスクリーニングでは期間内に有効な化合物を取得するには至らなかった。寄生虫学分野では *Trypanosoma* の増殖を抑制する新規化合物とその類縁体を得て構造決定、動物実験を行って米国特許(2014年1月)および

PCT 国際特許(2015年1月)を出願した。ウイルス学分野における成果物の取得と論文公表あるいは寄生虫学分野での成果物の取得と特許出願という観点からは、目標をほぼ達成することができたと考えている。

ウイルス学分野において *Theobroma cacao* から Procyanidin3 量体である C1 を精製し、潜伏感染 HIV プロウイルスを活性化する化合物として特定したことは、抗レトロウイルス治療薬が進歩し潜伏感染プロウイルスの駆逐が課題となっている今日の HIV 感染症治療において意義あるものと考えている。潜伏感染プロウイルスの活性化を促す薬剤として現在 phorbol ester 類と Histone Deacetylase 阻害剤が候補となっているが、未だ臨床応用されるには至っていない。本事業で見出した Procyanidin C1 は残念ながら新規物質ではなく特許出願対象とはならなかったが、phorbol ester 類と同じく転写因子 NF- κ B を活性化するにもかかわらず汎 Protein Kinase C 阻害剤の影響を受けず、したがって phorbol ester 類や Histone Deacetylase 阻害剤とは異なるプロウイルス活性化機序を有している点がユニークである。単量体であるエピカテキン、2量体である B-2 がいずれも潜伏プロウイルスを活性化しなかったことから、C1 の細胞への作用がどのように開始されるのか興味深い。

寄生虫病学において *Morinda lucida* からテトラサイクリックイリド構造を有する3種類の新規化合物が得られ、*Trypanosoma* だけでなく *Leishmania*、*Plasmodium* に対しても増殖抑制効果が認められたことは、新規薬剤開発におけるリード化合物として有望であると考えている。マウスでの *Trypanosoma* 増殖抑制作用も認めているが血中半減期が短いことから、組織への移行あるいは分解・排泄の可能性を想定して、投与方法の改善、誘導体の作出などを図る必要がある。特許出願についてはガーナ大学、生薬科学研究所ともに初めての経験であり、本事業はそのノウハウを習得する絶好の機会になったとのことであった。JST からの支援を受けて PCT 国際特許出願後、ガーナ側、日本側双方で薬剤開発パートナーを探す試みが進行中である。

生薬科学研究所は、伝統医療知識をもとに生薬を開発し併設する病院で治療薬として使用してきたが、科学的分析結果に基づいた有効成分の研究活動については十分でなかった。本事業による技術移転によって科学的分析能力が飛躍的に向上し、薬用植物から有効成分を精製する技術も定着したことは、今後の持続的発展の強固な基盤となった。生薬科学研究所長以下研究員は継続した支援を熱望しており、引き続き東京医科歯科大学、長崎国際大学からできる限りの支援を行う予定である。

毒性学を担当した野口研 Clinical Pathology 部門には、事業開始前は safety cabinet、CO₂ インキュベーターをはじめとする細胞レベルで毒性を評価する設備と技術がなかったが、本事業での技術移転の結果、多数の正常細胞株、癌細胞株を安定的に培養して毒性評価だけでなく細胞死誘導効果も評価できる設備と能力が備わり、野口研内で高く評価されるようになった。本事業で得られた知見をさらに発展させて、薬用植物成分中に抗癌効果を有するものを探索することも計画されている。

本事業の運営上特に意義深かったことは、毎月開催した月例会議である。野口研の寄生虫学部門(日本人長期専門家を含む)、毒性学部門、ウイルス学部門(日本人長期専門家を含む)および CSRPM から毎月20人前後の若手を中心とした研究者が集まり、議長は回り持ちで実験に携わった若手研究者がスライドを用いて進捗状況を発表し、フェローを含む全員で結果と課題を共有し議論した。この会議は実質的な運営会議の役割を果たし、プロジェクトメンバーが連帯感を醸成する場となった。薬用植物に関する2回のワークショップの企画運営が成功したのは、このような日ガ双方の強固な協力体制があったからと考えている。

ガーナにおける人材育成については、技術と経験の定着を図るため実験活動を担うガーナ人若手研究者の育成に重点を置いた。日本以外の大学院に進学した Research Assistant 3名を除いて、本事業に従事した多くの若手研究者が事業終了時点で所属機関の職員として仕事を継続できる状況にある。2014年度は2名(うち1名が SATREPS 事業に従事)の国費留学生を野口研から TMDU に受け入れ、2015年度には2名を野口研から、1名(SATREPS 事業に

従事)をCSRPMから受け入れる予定であり、今後もガーナ人若手研究者の人材育成を継続的に発展させたいと考えている。日本側では、本事業をとおして若手研究者、大学院学生がガーナ側の若手研究者と交流することができ、途上国の現状と研究の意義について理解と共感が深まったと感じている。本事業に短期専門家としてCSRPMにおける技術移転に多大な貢献をした長崎国際大学のポスドク1名は、2015年1月母国ベトナムの Vietnam National University, School of Medicine and Pharmacy に講師として就職した。

備品・物品の調達ではアフリカ特有の困難な事情があり、その課題については § 7 に記載したとおりである。

最後に研究代表者として、本事業の業務調整員を務めてくださった柏原盛氏、古矢佳男氏、杉山吉信氏、現地で事業を支えてくださった JICA ガーナ事務所、在ガーナ日本大使館の皆さま、JICA 本部、JST の皆さまのご尽力にこころから感謝を申し上げます。

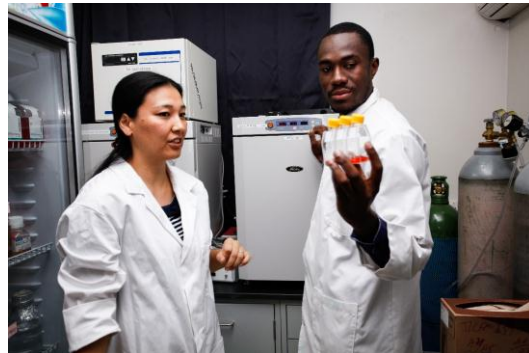


CSRPM での技術移転の様子



CSRPM でカラムワークのために設置された独立スペース





野口記念医学研究所での技術移転の様子



月例進捗会議と学会発表時の様子



2013年9月 Medicinal Plant Workshop



2014 年9月 Medicinal Plant Workshop



2015年1月第6回 JCC 終了時評価

§ 9 PDM の変遷 (該当する場合)

(当初 PDM から終了までのすべての改訂 PDM および PDM 改訂経緯の解説)

以上

研究課題名	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
研究代表者名 (所属機関)	山岡昇司 (東京医科歯科大学)
研究期間	平成22年4月～平成27年3月
相手国名	ガーナ
主要相手国研究機関	野口記念医学研究所

付随的成果

日本政府、社会、産業への貢献	西アフリカ地域における医科学研究発展への貢献。
科学技術の発展	ガーナにおける薬用植物からの有効成分精製、科学的分析能力の定着。
知財の獲得、国際標準化の推進、生物資源へのアクセス等	2014年1月7日 米国特許出願。 2015年1月7日 PCT国際特許出願。 遺伝資源の取り扱いについて、ガーナ環境科学技術省との協議にもとづき、MoUIに明記。
世界で活躍できる日本人人材の育成	助教名でレビュー付雑誌への論文掲載。 講師名でレビュー付雑誌への論文掲載。 助教名で学会発表。
技術及び人的ネットワークの構築	ガーナ国内における薬用植物研究者ネットワークの形成。
成果物(提言書、論文、プログラム、マニュアル、データなど)	論文出版3件。 論文投稿1件。

上位目標

科学的エビデンスに基づく生薬医療によるウイルス、寄生虫感染症の新たな治療法開発

伝統医療システムに科学的エビデンスを付加した、持続可能な治療戦略の確立

抗ウイルス—臨床検体での検証により候補成分の効果が確認される
抗寄生虫—大型動物を用いた感染治療実験

プロジェクト目標

有効な化合物の取得と前臨床試験候補の選抜

HIV複製抑制機構が解明された成分の取得

潜伏感染ウイルスを活性化するメカニズムの解明

抗寄生虫活性のメカニズム解明

抗ウイルス因子の発現を増強するガーナ産植物の取得

100%

In vivo 毒性試験のクリア(使用案全域の確定)

80%

有機化学的に分析された有効成分の取得

有機化学的に分析された有効成分の取得

構造決定した有効成分取得

小型動物感染治療実験

有機化学的に分析された有効成分の取得

60%

分画サンプルでの有効性確認

より生体に近い持続感染系が確立される

分画サンプルでの有効性確認

分画サンプルでの有効性確認

40%

in vitro 毒性試験のクリア(使用安全域の確定)

調製された植物抽出物の取得

既知有効成分により妥当性が検定された実験系の確立

特性が解明された潜伏感染細胞の樹立

抗原虫効果を確認できるスクリーニング系の確立

スクリーニングに適した実験系の確立

20%

0%

HIV急性感染

HIV潜伏感染

トリパノソーマ

宿主因子