

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)

発展途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究・

顧みられない熱帯病対策～

特にカラ・アザールの診断体制の確立とベクター対策研究プロジェクト

(バングラデシュ)

平成 22 年度実施報告書

代表者：野入英世

東京大学医学部附属病院・准教授

<平成22年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

リーシュマニア症はリーシュマニア原虫を病原体とする人獣共通感染症で、吸血性昆虫であるサシチョウバエによって媒介される。最も重篤な内臓型リーシュマニア症（カラ・アザール：kala-azar）は少なくとも 300,000 人/年が罹患しており、スーダンおよびバングラデシュ・インド・ネパールの 4 カ国でその 90%を占める。これらの地域では、最貧困者の病気であるため、NTDs(Neglected Tropical Diseases)として放置されている。バングラデシュでは、少なくとも年間 50,000 人の新規発症患者がいると考えられているが、近隣諸国の中でもバングラデシュは、疾患の診断・治療・予防の全ての観点から最も遅れている。本症は健康への脅威となるだけでなく、社会・経済開発への重大な阻害要因の一つとなっており、バングラデシュ・インド・ネパールの保健相と WHO は 2015 年までに本疾患の発症率を 1/10000 に減じるという目標を掲げ、2005 年に覚書を締結した。しかし、直近のバングラデシュ感染浸淫地域調査では、発症率は 25/10000 と遠く及ばない。本研究課題に先立つ ICDDR, B との 2007～2009 年の 3 年間にわたる上記共同研究プロジェクト（戦略的国際科学技術協力推進事業（振興調整費）アジア科学技術協力の戦略的推進「内臓型リーシュマニア症感染制御のための研究」）で、いわゆる ground level での実用に耐える日本発の診断技術が検討開発された。バングラデシュ政府はこれまでの連携基盤をもとに、さらに共同研究を発展させ、上述の WHO との覚書レベルへ向けた疾患制御を現実化することを希望している。そのためには、我が国の人獣共通感染症専門家や薬理学・薬品分析学専門家による疾患予防策、薬剤耐性及び品質管理に関する研究が必須である。このような状況を踏まえて、相手国研究機関である ICDDR, B は 2009 年 10 月に我が国外務省に対して「Centre of Excellence for Neglected Tropical Diseases」の設置に向けた技術協力プロジェクト要請を提出した。

本研究課題採択を受けて 8 月に国際協力機構の協力の下に詳細策定調査に現地入りし約 2 週間をかけて実施した。また、本プロジェクトへ派遣する若手研究員に対するオリエンテーションを 9 月 24 日より 1 週間現地で実施した。本研究プロジェクトのミニッツへの署名は 11 月に完了し、R/D への署名は 2 月に完了した。全体計画に沿った研究を開始する。

本研究課題では、ICDDR, B との共同研究を通じて浮上した本疾患制御における様々な問題点に科学的根拠を提示することを目的とし、バングラデシュ政府の目標とする WHO との覚書に則した疾患根絶レベル達成をめざす。これにより、日本の協力によるアジア貧困層に発症する疾患撲滅活動の mile stone とする。

2. 研究グループ別の実施内容

(以下に示す記入項目について、研究グループ/研究題目ごとに簡潔にまとめてください。図、表、写真等を含めていただいても結構です。また、本プロジェクトにおいて、相手国側研究機関単独で独自の題目を設定している場合には、相手国側研究機関の活動を題目ごとに簡潔にまとめてください。)

1) カラ・アザール対策グループ

A) 診断法の開発および治療効果判定技術の開発と有用性評価サブグループ

① 研究のねらい

(1) 遺伝子診断法 特に LAMP 法による内臓型リーシュマニア症診断の感染浸淫地域での実用化をめざす。(2) 免疫診断法 現行で普及している rK39 に対してインド亜大陸で最適な免疫診断法樹立をめざす。(3) モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体診断法 内臓型リーシュマニア症確定診

断では病理塗末標本によるが、その診断精度・診断速度を向上する。

② 研究実施方法

(1)遺伝子診断法 i) ヒューマン・エラーによる疑陽性率を下げる計画立案を行うと共に、ii) 感染浸淫地域に適したキット構成の再評価を実施する。iii) 臨床検体のサンプリング方法についての更に検討を進める。(2)免疫診断法 現行使用されている rK39 抗原は南米由来の *L. infantum* の遺伝子情報をもとに作製されたリコンビナント抗原である。本研究ではバングラデシュで分離した *L. donovani* 分離株の遺伝子情報をもとにリコンビナント抗原を作製する。(3)モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体診断法 松本グループの作製したアマスティゴートに対する蛍光標識モノクローナル抗体を作製し、最適なクローンを見出す。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。

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

R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。

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

特記なし。

B) 検尿による診断技術の開発サブグループ

① 研究のねらい

内蔵型リーシュマニア症では初感染診断法は実用化されつつあるが、再感染や疾患活動性診断に関しては手つかずである。尿中バイオマーカーを用いた疾患活動性モニターや薬剤副作用モニター法を樹立する。

② 研究実施方法

バングラデシュ政府公認の内蔵型リーシュマニア症治療プロトコルを受ける症例の臨床検体を経時的に解析すると共に保存する。これにより、カット・オフ値設定や複数指標診断の有用性等を検討する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

振興調整費からの研究継続テーマとして進んでいる。

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

追跡症例中の 50 症例については、1 年目追跡までの尿検体を用いて診断技術移転を試みた。

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

特記なし。

C) 治療プロトコル最適化サブグループ

① 研究のねらい

現行の Kala-azar 治療ガイドラインでは、SAG 20 mg/kg の 30 日連用が推奨されているが、副作用発現率が高くコンプライアンスも悪いうえ、周辺国では耐性株の出現が報告されている。欧米製薬メーカー等により新たな治療薬の投入が検討されている。本研究プロジェクトの研究拠点に投入を表明している海外研究グループと協動的に治療プロトコルを最適化する。

② 研究実施方法

リポソーム化アンホテリシン B (AmBisome) による高用量単回治療法やその他の薬剤による複合薬剤単

回治療法などの実施を評価するとともに、臨床検体の一部を保存・解析する。

- ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況
R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。
- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特記なし。

2) PKDL 対策グループ

A) PKDL 発症機序解明サブグループ

- ① 研究のねらい
PKDL は内蔵型リーシュマニア症に引き続き発症することがあり、頻度 10-20%程度とされているが、明確な前向き調査は存在しないため、この点を解明する。一方、内蔵型リーシュマニア症から PKDL を発症した症例と発症しなかった症例を ICDDR,B コホートから特定し発症機序を解明する。
- ② 研究実施方法
2008-9 年に治療終了した患者 50 症例を血液・尿検体を banking しながら現在追跡中である。また、間隔を長くした形で 150 症例を追跡している。これらのコホートから PKDL 発症者を得られるかどうかを検討し、その臨床情報を解析する。確診症例での PKDL 発症・非発症を明確化できるコホートからのサンプリングにより、この地域での発症機序解明を行う。
- ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況
2010 年度調査を 11, 12 月に行い、GPS 情報と共に収集した。報告書を ICDDR,B 側が作製中である。
- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
追跡症例中の 50 症例については、1 年目追跡までの尿検体を用いて診断技術移転を試みた。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)
特記なし。

B) PKDL 治療プロトコルの最適化サブグループ

- ① 研究のねらい
PKDL 治療の標準プロトコルは、SAG 20 mg/kg の 30 日連用という内蔵型リーシュマニア症治療の標準プロトコルを 3 クール実施するという、極めて積極的なものである。これは、リザーバー根絶思想に基づくもので、WHO も認可している。一方、PKDL には 3 種類の異なった病態があり、その全てがリザーバーとなっているとは考えにくく、厳密に評価されないままに運用されているため貧困な民衆が危機的状況に晒されている可能性が大きい。
- ② 研究実施方法
PKDL の 3 種類の病型が感染のリザーバーとなるかどうかについて、LAMP 法・PCR 法により検討を試みる。また、皮膚病理学的理解を深めることにより、全てが治療すべき病態かどうかに関する専門家会議を実施する。
- ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況
R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
R/D 署名が年度末にかかっており, すすんでいない.
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合, その内容と展開状況(あれば)
特記なし.

C) 薬剤耐性の実態調査と薬剤耐性機序の解明サブグループ

① 研究のねらい

現行の Kala-azar 治療ガイドライン, SAG 20 mg/kg の 30 日連用に対する耐性株の出現が隣国インドで報告されている. 一方で, 薬剤耐性株の定義は国際的にも皆無であるため, 科学的に証明するための基盤作りを行う必要がある.

② 研究実施方法

薬剤耐性の定義検討へ向けたアプローチとして, i) 薬剤耐性株と非耐性株の比較検討を全ゲノムで実施 ii) 薬剤耐性関連遺伝子解析 iii) *Leishmania donovani* 分離株の保管 を通して基盤整備を行うとともに, アウトカムを耐性の基準条項にむけて提案する.

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

R/D 署名が年度末にかかっており, すすんでいない.

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
R/D 署名が年度末にかかっており, すすんでいない.

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合, その内容と展開状況(あれば)
特記なし.

D) 新規薬剤の開発へ向けた検討サブグループ

① 研究のねらい

薬剤耐性の克服に最も重要な事は耐性病原体に有効な新規の薬剤の開発である. 寄生虫特異的な生命維持機構をターゲットとすることにより創薬をめざす.

② 研究実施方法

リーシュマニアの属する鞭毛虫類における新規薬剤標的となる核酸代謝およびエネルギー代謝を含むレドックス調節に関わる酵素群を同定し, 更にリーシュマニアの大量培養法を確立して, 同様な標的酵素を見出す.

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

近縁種であるトリパノソーマでこれらを標的とする化合物をランダムスクリーニングおよび標的酵素の立体構造解析に基づくインシリコスクリーニングから見出している.

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)
R/D 署名が年度末にかかっており, すすんでいない.

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合, その内容と展開状況(あれば)
特記なし.

3) ベクター，リザーバー対策グループ

A) ベクターの同定と分布調査とベクター駆除技術の開発サブグループ

① 研究のねらい

内蔵型リーシュマニア症は，節足動物媒介性感染症であり，ベクター（この場合はサシチョウバエ）コントロールの成否が，本症コントロールの明暗を分ける．WHO の疾患制御目標達成のためにはベクター研究は必須である．

② 研究実施方法

i) バングラデシュにおける真のベクター種の探索，ii) ベクターとなるサシチョウバエの生態を明らかにし，特に季節的消長，産卵場所の特定を行う．また，iii) 有用な殺虫剤の探索と iv) 殺虫剤適用法の探索を行う．

③ 当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

サシチョウバエへの殺虫剤の有効性に関する検討を実施した．

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）

R/D 署名が年度末にかかっており，すすんでいない．

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合，その内容と展開状況（あれば） 特記なし．

B) リザーバーの探索と対策法の確立サブグループ

① 研究のねらい

内蔵型リーシュマニア症は人畜共通感染症として世界の広範囲に分布しているが，インド亜大陸においてはヒト固有の感染症（すなわち，リザーバーは介在しない）と考えられている．このため WHO は「PKDL の患者が浸淫地域における唯一のリザーバーである」との見解を示している．しかし，リザーバー動物の関与に関してはほとんど調査が行われておらず検証を要する．

② 研究実施方法

i) 愛知医大の開発した検尿 DAT システムなど血清疫学的手法を用いた動物特にイヌ，家畜（ブタ，ウシ，水牛，etc）の抗体価の調査を行い，ii) 抗体価の高い動物について寄生虫学的解析により感染の有無を明らかにし，陽性の場合には原虫の分離を試みる．また，iii) PKDL の患者について，原虫の検出を試み，真にリザーバーであるかを明らかにする．

③ 当初の計画（全体計画）に対する現在の進捗状況

振興調整費からの研究継続テーマとして進んでいる．

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

R/D 署名が年度末にかかっており，すすんでいない．

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合，その内容と展開状況（あれば） 特記なし．

4) カラ・アザール研究実施体制の整備グループ

A) 感染浸淫地域拠点形成サブグループ

① 研究のねらい

内蔵型リーシュマニア症の疾患制御に資する臨床検討を実施し，実際の効果を図るためには疾

患に即した標準検査を実施しうる設備を感染浸淫地域に設立する。

② 研究実施方法

感染浸淫地域に適した最新の日本技術による機器を主に選択して設置する。機器及び検査の品質管理向上のために、ICDDR, B 内に同等の Reference Laboratory を設置し、相互交流を図って検査技術向上を図る。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

R/D 締結後初年度投入予定機器選定を実施した。

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)

R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。

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

特記なし。

B) ICDDR, B 及び感染浸淫地域拠点におけるカラ・アザール教育サブグループ

① 研究のねらい

疫学調査研究やベクター制御研究に関しての幅広い教育及び啓蒙活動を実施する。

② 研究実施方法

全体的な研究の進捗に併せたテーマを抽出して定期的な教育活動を ICDDR, B 及び感染浸淫地域拠点において研究期間全体を通して実施する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

振興調整費からの研究継続テーマとして進んでいる。

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

R/D 署名が年度末にかかっており、すすんでいない。

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

特記なし。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 0 件, 国際 12 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件, 海外 12 件)

③ 論文詳細情報

1. Doi K, Noiri E, Sugaya T: Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new renal biomarker in critical care. ***Curr Opin Crit Care***. 2010 Aug 21. [Epub ahead of print] (PMID: 20736829)
2. Doi K, Noiri E, Maeda-Mamiya R, Ishii T, Negishi K, Hamasaki Y, Fujita T, Yahagi N, Koide H, Sugaya T, Nakamura T: Urinary L-type fatty acid-binding protein as a new biomarker of sepsis complicated with acute kidney injury. ***Crit Care Med***. 38:2037-42, 2010. (PMID: 20657273)
3. Kurano M, Iso-O N, Hara M, Noiri E, Koike K, Kadowaki T, Tsukamoto K: Plant Sterols Increased IL-6 and TNF- α Secretion from Macrophages, but to a Lesser Extent than Cholesterol. ***J Atheroscler Thromb***. 2011 Jan 22. [Epub ahead of print] (PMID: 21266789)
4. Ishii T, Doi K, Okamoto K, Imamura M, Dohi M, Yamamoto K, Fujita T, Noiri E: Neutrophil elastase contributes to acute lung injury induced by bilateral nephrectomy. ***Am J Pathol***. 177:1665-73, 2010
5. Ishii T, Ohtake T, Okamoto K, Mochida Y, Ishioka K, Oka M, Maesato K, Ikee R, Moriya H, Hidaka S, Doi K, Noiri E, Fujita T, Kobayashi S: Serum Biological Antioxidant Potential Predicts the Prognosis of Hemodialysis Patients. ***Nephron Clin Pract***. 117:c230-c236, 2010
6. Hanafusa N, Satonaka H, Doi K, Noiri E, Fujita T: Virus removal and eradication by modified double filtration plasmapheresis decreases factor XIII levels. ***Ther Apher Dial***. 14:287-91, 2010
7. Maeda-Mamiya R, Noiri E, Isobe H, Nakanishi W, Okamoto K, Doi K, Sugaya T, Izumi T, Homma T, Nakamura E: In vivo gene delivery by cationic tetraamino fullerene. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 107:5339-44, 2010
8. Okamoto K, Iwasaki N, Nishimura C, Doi K, Noiri E, Nakamura S, Takizawa M, Ogata M, Fujimaki R, Grarup N, Pisinger C, Borch-Johnsen K, Lauritzen T, Sandbaek A, Hansen T, Yasuda K, Osawa H, Nanjo K, Kadowaki T, Kasuga M, Pedersen O, Fujita T, Kamatani N, Iwamoto Y, Tokunaga K: Identification of KCNJ15 as a susceptibility gene in Asian patients with type 2 diabetes mellitus. ***Am J Hum Genet***.86:54-64, 2010
9. Sanjoba C, Özbel Y, Asada M, Osada Y, Gantuya S, Matsumoto Y. Recent collections of *Sergentomyia squamirostris* (Newstead) (Diptera: Psychodidae) in Japan, with descriptions and illustrations. ***Med. Entomol. Zool***. 62(1), 2011, in press.
10. Özbel Y, Sanjoba C, Alten B, Asada M, Depaquit J, Matsumoto Y, Demir S, Siyambalagoda R.R.M.L.R., Rajapakse R.P.V. J., Matsumoto Y. Distribution and Ecological Aspects of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species in Sri Lanka. ***J. Vector Ecolo***. 2011, in press.
11. Sakai S, Takashima Y, Matsumoto Y, Reed SG, Hayashi Y, Matsumoto Y. Intranasal immunization with Leish-111f induces IFN-gamma production and protects mice from Leishmania major infection. ***Vaccine***. 2;28(10):2207-13, 2010
12. Horii T, Shirai H, Jie L, Ishii K, Palacpac N.Q, Tougan T, Hato M, Ohta N, Bobogare A, Arakaki N, Matsumoto Y, Namazue J, Ishikawa T, Ueda S, Takahashi M. Evidences of protection against

blood-stage infection of *Plasmodium falciparum* by the novel protein vaccine SE36. *Parasitology International*. 59(3):380-6, 2010

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件, 海外 0 件, 特許出願した発明数 0 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件, 海外 0 件)

4. プロジェクト実施体制

(1)「カラ・アザール対策」グループ(研究題目)

- ① 研究者グループリーダー名: 野入 英世 (東京大学・准教授)
- ② 研究項目
 - A) 診断法の開発および治療効果判定技術の開発と有用性評価
 - B) 検尿による診断技術の開発
 - C) 治療プロトコルの最適化

(2)「PKDL 対策」グループ(研究題目)

- ① 研究者グループリーダー名: 野入 英世 (東京大学・准教授)
- ② 研究項目
 - A) PKDL 発症機序の解明
 - B) PKDL 治療プロトコルの最適化
 - C) 薬剤耐性の実態調査と薬剤耐性機序の解明
 - D) 新規薬剤の開発へ向けた検討

(3)「ベクター, リザーバー対策」グループ(研究題目)

- ① 研究者グループリーダー名: 松本 芳嗣 (東京大学・教授)
- ② 研究項目
 - A) ベクターの同定と分布調査とベクター駆除技術の開発
 - B) リザーバーの探索と対策法の確立

(4)「カラ・アザール研究実施体制の整備」グループ(研究題目)

- ① 研究者グループリーダー名: 松本 芳嗣 (東京大学・教授)
- ② 研究項目
 - A) 感染浸淫地域拠点形成
 - B) ICDDR, B 及び感染浸淫地域拠点におけるカラ・アザール教育

以上