

# 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)

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

(バングラデシュ)

平成 24 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ヨ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

### 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（東京大学・松本グループ、愛知医科大学 伊藤グループ）

#### 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) 尿診断法 GPS ロガーと結びつけた active survey 法の確立をめざす。
- (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。

## ① 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) 尿診断法 尿診断法はマス・スクリーニングに最適な方法の一つである. 感染の生じている村落の代表的なサンプリングを行い, 潜在的感染者を早期に発見しその局在を GPS により精確に把握することで, 感染の広がり予測と制御が可能となる. (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.

## ② 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

(1) 遺伝子診断法: i) 本研究プロジェクト開始後に研究代表者の野入が Editor で Springer Verlag より発刊した”Kala-Azar in South Asia”において, 研究プロジェクトの LAMP における成果を紹介した. これにより, LAMP が内蔵型リーシュマニア症に有効であることへの awareness が国際的に広がりを見せ, FINDS が内蔵型リーシュマニア症診断へ向けた LAMP の開発を支援することとなり, 栄研がこれを担当することとなった. 即ち, 本研究プロジェクトは振興調整費より引き継いでいるが, その中で栄研の内蔵型リーシュマニア症に対する立場が変容して, 感染浸淫地域への最適化したパッケージを自社開発する方向へ進めることができたため, プロジェクトではその臨床性能評価を担当する方向となっている. 試作品の出来上がりは, 次年度後半の目途である. PCR については, 原虫特異的 mini-exon 遺伝子で検出できることを見出している. ii) SKKRC の親機関は保健省であるが, 実質的な管理は Mymensingh 医科大学へ委任している. 実務上は, Dr. Shyamal Paul が責任者となっており, 同大学では PCR による内蔵型リーシュマニア症診断を担当している. その精度を高め, SKKRC の運用を効果的にする目的で東大へ招聘し, トレーニング及び実務者会議を行った.

## ③ 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)

上記の通り, 内蔵型リーシュマニア症の PCR プロトコルについての確認, 内蔵型リーシュマニア症解析における primer 設定の考え方についての教育を徹底し, Dr. Shyamal Paul の教育職としての立場から, 感染浸淫地域の基幹大学である Mymensingh 医科大学へ指導を徹底することとした.

## 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, その内容と展開の効果

本研究プロジェクトからの発信により, FINDS が内蔵型リーシュマニア症に対する LAMP 開発を栄研に対して支援決定したことは, 予想外の要因であった. 本プロジェクトからは, 伊藤グループが中心となって現場に必要なスペックをアドバイスしており, 日本発の分子生物学的診断法の国際貢献が期待されている.

## B) 検尿による診断技術の開発サブグループ (東京大学 野入グループ, 愛知医科大学 伊藤グループ)

## 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)
  - i). 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。本研究年度 12 月に、追跡症例中 100 症例に対して PKDL 症例の評価を行った。血清・血漿・尿採集を多人数より体系的に採集する手法について技術移転を行った。
  - ii). 尿診断開発に際して必要な ELISA によるアッセイ法について、SKKRC において教育及び技術移転を行った。これらは、次年度も繰り返し行う方針である。ELISA 測定機器は基盤不良により現在使用不能となっており、現地での修理対応検討中。
- 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、その内容と展開の効果  
本年度の現地調査に参加した研究協力者が、GPS 技術による調査研究の専門家であった。その技術投入が、本研究プロジェクトの提案している尿診断法とマッチする可能性がある。これは、行政的に対策をとるうえでも重要な技術となる可能性が高く、次年度以降研究展開する。

#### C)治療プロトコル最適化サブグループ (東京大学 野入グループ)

- 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調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。SAG 治療効果に関連して PKDL 発症率についての検討ができた。VL 確診症例からの前向き検討で PKDL 発症を検証した報告は国際的にもない状況で、意義深いものである。薬剤そのものの質が不十分なために、薬効が期待通りでなく薬剤耐性株が出現している可能性があった。2012 年に既にリポソーム化アンホテリシン B の効果不十分な症例が報告されるようになり、その原因究明に乗り出した。インド製のリポソーム化アンホテリシン B における効果が宜しくないようであるとの現場からの長期専門家のレポートを元に、野入グループでは同薬剤をインドで入手し、本種類の薬剤の代表的な性能と均一性、その構造について詳細に解析した。バングラデシュでは同種薬剤は保健省が選考して各地域へ無料頒布する。その際の品質評価が極めて重要であることを提言した。
- 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)  
現在まで申し出はないが、上記で用いた薬剤性能評価法は、そもそもバングラデシュ国の科学技術レベルを念頭においてプロトコル設定しており、技術移転可能な状況である。
- 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、その内容と展開の効果  
種々のプロトコルで治療された内蔵型リーシュマニア症例の臨床検体と臨床情報を登録して、デー

データベース化運用することを提言している。icddr,b では ERC, RRC において認可が得られたものの実働に向けて行動開始したところ、新たに保健省側での同等の手続きを求められ書類対応を開始した。研究全体の遅延が予想される。

## 2) PKDL 対策グループ

### A) PKDL 発症機序解明サブグループ (東京大学 野入グループ 松本グループ)

#### 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 200 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、前情報を収集した。これをもとに 12 月に PKDL 調査を実施した。現在解析中である。この解析により、従来からの感染のリザーバーに対する考え方の一部は改める必要があることが判明してきている。一方、この継続調査については icddr,b の ERC, RRC からは承認を得たが、保健省側から新たに承認を得るよう要請が生じた。手続きについては、これまでの前提とは異なるものの取得に向けて書類を進めている。

#### 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)

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。PKDL 診断には皮膚生検が必須であるが、同国では PKDL に対する皮膚生検の実績がなかった。当該研究グループの 12 月の調査において、感染症に配慮した安全且つ正確な皮膚生検技術移転を同国医師に対して行うことができた。一方、何を目的にどう考えて検査対象を広げるかへの理解を啓発するのは、まだ難しい。

#### 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、その内容と展開の効果

上記では PKDL がリザーバーであることの認識の改善を一部要するとした。これは、特にバングラデシュを中心に必要で、その取り組みを広げることにより過剰な薬剤投与による行政側の医療負担増を軽減できる可能性が高い。皮膚生検について述べたが、検査過剰となっている可能性があり実態調査が必要と思われる。これは、器具の清潔取り扱いができていない場合、肝炎の二次的な広がりが生じる可能性があるためである。

### B) PKDL 治療プロトコルの最適化サブグループ (東京大学 野入グループ 松本グループ)

#### 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

この調査については icddr,b の ERC, RRC からは承認を得たが、保健省側から新たに承認を得るよう要請が生じた。手続きについては、これまでの前提とは異なるものの取得に向けて書類を進めている。

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、本格的にはすすんでいない。しかし、当該研究グループは12月の調査において、皮膚生検により一定数量の検体を診断用に確保できたため、第一報としての見解あるいは報告を示すことができる可能性が高い。

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、その内容と展開の効果

上記では PKDL がリザーバーであることの認識の改善を一部要するとした。これは、特にバングラデシュを中心に必要で、その取り組みを広げることにより過剰な薬剤投与による行政側の医療負担増を軽減できる可能性が高い。PKDL 分類と分子生物学的手法との正確なマッチングを元にした小規模検討が必要であると考える。

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 (東京大学 松本グループ, 北グループ)

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

当該研究グループの12月の調査において、薬剤感受性群からのゲノム採集は一定数終了している。この調査については icddr,b の ERC, RRC からは承認を得たが、保健省側から新たに承認を得るよう要請が生じた。手続きについては、これまでの前提とは異なるものの取得に向けて書類を進めている。

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)

開所式に向けて松本グループが技術投入し、プロマスティゴートとしての培養技術をお披露目した。これにより本研究アームの意図するところを現地でも認識可能となった。

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、その内容と展開の効果

特記なし。

## D) 新規薬剤の開発へ向けた検討サブグループ (東京大学 北グループ)

## ① 研究のねらい

薬剤耐性を克服する根本的な戦略の一つに耐性原虫に有効な新規抗リーシュマニアの開発がある。東大・医学系研究科生物医化学教室(北)では、ミトコンドリアの呼吸酵素の一つである複合体 II(コハク酸-ユビキノ還元酵素複合体)を薬剤標的の有望な候補として見出した。そこで SBDD (Structure based drug design) の観点から本酵素に焦点を絞り研究を進めるべく、まず正確な立体構造解析に基づく阻害剤開発を行うために必要な充分量の高純度・高活性の酵素標品の精製法を確立する。

## ② 研究実施方法

一般にミトコンドリアに局在する呼吸鎖酵素である複合体 II は 4 つのサブユニットから構成されている。我々は *T. cruzi* の複合体 II が 12 サブユニットであることを見出したが (Morales et al., J. Biol. Chem. 2009, 284, 7255-7263), *T. cruzi* の複合体 II を阻害するアトペニンが原虫の増殖を抑制したことから、複合体 II が格好の薬剤標的である事が明らかになった。実際、この特異的なサブユニット構造はゲノム情報を調べたところ、*T. cruzi* ばかりでなくリーシュマニアも同様であった。しかしヒトに感染する原虫から酵素を大量に精製することは現実的には困難であるため、近縁なリーシュマニアで 10<sup>9</sup>スケールの大量培養が可能な *Leishmania tarentolae* を薬剤開発に用いて解析を進める。

## ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

最初に次世代シーケンサーで *L. tarentolae* の全ゲノムを解析したところ、*T. cruzi* の複合体 II と高い類似性を示すアミノ酸配列を持った 12 のサブユニットが見出された。そこで、*L. tarentolae* の酵素 (LtSQR) の精製を試みた結果、高純度で高比活性の標品を結晶解析可能なスケールで再現性よく得られる系を確立することができた。精製 LtSQR は High Resolution Clear Native 電気泳動上で主要なタンパク質のバンドとして観察され、比活性も我々が報告した精製 *T. cruzi* SQR と同程度の高いものであった。今後、結晶化を試みるとともに精製酵素による東大・創薬オープンイノベーションセンターの 20 万化合物ライブラリーを用いた阻害剤のスクリーニングを行う予定である。

## 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) 現在研究進行中であり、技術移転の段階ではない。

## 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、その内容と展開の効果

高い活性を持つ *L. tarentolae* の酵素を精製する事ができたので、ハイスループットでのスクリーニング系の確立を試みる段階まで来ている。この方法で既存の複合体 II 阻害剤および研究室で保管している阻害剤のライブラリーを用いて検討した所、抗真菌剤として用いられている薬剤が nM オーダーで *L. tarentolae* および *T. cruzi* の酵素活性を阻害する事を見出した。さらについ最近の実験から *T. cruzi* では宿主細胞中のアマスティゴートの増殖を抑える事が判った。この薬剤はすでに市販薬として一般に使われているものであり、安全性などでも問題はない事から実用化への可能性が大いに期待できる。

## 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 (東京大学 松本グループ)

## 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) サシチョウバエの分布に関する調査; ① Trishal 内の4つの Para (Alahori, Magurjora, Kakchar, KaniHari)においてカラ・アザール患者の多い地域(Para あるいは Home レベル), 少ない地域, またいない地域でサシチョウバエの密度を比較検討することにより, サシチョウバエの密度と分布, 患者数との相関性を検討する. ② Home内においてのサシチョウバエの分布(屋内, 屋外, 家畜小屋)を比較検討することによりサシチョウバエの休息場所および産卵場所を予測する. ii) サシチョウバエの嗜好性調査; 専用のテント内に対象となる家畜(牛, ヤギ等)をそれぞれ入れ, 吸血に集まったサシチョウバエを採集する. iii) サシチョウバエの活動時間調査; 夕方5時より翌朝9時まで, 1時間, あるいは2時間ごとに自動的に採集可能な捕虫器を用いて, どの時間帯に最もサシチョウバエが採集できるか検討を行なう. iv) サシチョウバエの行動調査; オイルトラップを壁と屋根の隙間, 床と壁の隙間, 窓等に設置し, 屋内に侵入するサシチョウバエを採集し, 比較検討する. v) 長期残効型蚊帳の評価; WHO 指定の Cone test をオリセットとコントロール (ブランクネット) を用いて各 4 回行う. オリセット, またはコントロールネットを敷いた容器内に 20~30 匹のサシチョウバエを 3 分間入れ, その後, 飼育容器に写し 24 時間後までの生存率を記録する. vi) サシチョウバエ内のプロマスティゴートの検出について検討をすすめており, LSUrDNA をターゲットとすることで PCR により高感度で検出可能であることを見出している. また, プロマスティゴートの同定は ITS1-PCR 後, HaeII で処理することでも検出可能である.

## ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

サシチョウバエの種については700種以上報告があり, その中でリーシュマニア症を媒介する, あるいは, 媒介するだろうと考えられている種は旧大陸だけで20種以上になる. バングラデシュにおいては, 隣国インドで報告された *P.argentipes* が媒介種ではないか, と推測されているが, 未だ証拠はない. また, サシチョウバエの生態には不明なことが多いうえ, 気候や環境によりその生態は異なることから, 今回, 我々は初年度のベクター対策研究として本調査を行なった. 解析を経て, 今後オリセットによるベクター制御活動の実施を検討する予定である. 現在までの解析で, オリセットはマラリア用としてハマダラカに対して開発されたが, サシチョウバエにも有効であることが確認されている.

## 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)

本研究調査により, 昆虫学者による専門性の高い研究手法をバングラデシュ国研究者に示し, 同国の研究のレベル向上を図るべく人事交流を深める方向性である. 上記をもとに, SKKRC の入院患者を対象としてオリセットネットを配布し, 水平感染を制御を開始している. SKKRC 開所式においても高い注目を集めた.

## 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, その内容と展開の効果

住友化学より上記の検討を踏まえて 3,000 張を上限とした. 蚊帳提供の申し出があった. これを用いたベクター制御を次年度に開始するためにバングラデシュ国保健省と交渉をすすめている.

## B) リザーバーの探索と対策法の確立サブグループ (東京大学 松本グループ・野入英世グループ 愛知医科大学 伊藤グループ)

### 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. 当該プロジェクトで 12 月に実施した東大グループの PKDL 調査により, リザーバーとしての可能性に一定の見解を与えることができる可能性がある. i) の家畜等がリザーバーになりうる可能性については, icddr,b の研究グループが解析を早め, 極めて少数の検討であるが, その可能性を示唆する報告を行った.

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

R/D 署名が年度末にかかっており, すすんでいない. しかし, 研究コンセプトを共有したことで icddr,b 側で加速的に実施した.

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

研究計画を共有して協調的に進めることが, 科学的に正確な報告を行うよう指導するうえで重要である. この点について, 指導力を強化していく方針である.

## 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 (東京大学 野入グループ・松本グループ・北グループ)

#### 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. また, 感染浸淫地域の拠点 SK 病院にその中で現地に適した機器を投入する.

#### ③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

R/D 締結後初年度投入予定機器選定を実施した. SKKRC 開所式へ向けて機器整備を行い, 実働可能な状況とした.

#### 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)

SK 病院の拠点整備がすすみ, 機器投入が可能な状況となりつつある. 次年度早々に ICDDR,B より一部の機器を同院へ移設し, 研究実施体制を整備するべく技術移転を実施していく. 2012 年度終了時点では, PCR 法と ELISA アッセイ法について技術移転を行っている現状である.

#### 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, その内容と展開の効果

SKKRC の拠点化に成功したことを受けて, icddr,b から SKKRC への拠点としての比重が移りつつある.

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（東京大学 松本グループ 愛知医科大学 伊藤グループ）

- ① 研究のねらい  
疫学調査研究やベクター制御研究に関する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)  
SKKRC 開所式に向けて、内蔵型リーシュマニア症研究に必要な代表的基盤技術を研究グループはしめすことができた。バングラデシュ国では知識としてのみ議論してきた内容が殆どであったので、保健省関係者、icddr,b 研究者、Mymensingh 医科大学研究者の全員が生の研究に触れることができた点は意義が大きかったと思われる。
- 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、その内容と展開の効果  
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 15 件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内 0 件, 海外 22 件)
- ③ 論文詳細情報
  - 1) Kala Azar in South Asia – current status and challenges ahead (ed. by Jha TK, and Noiri E. Editors).  
*Springer verlag.*
    - ① Matsumoto Y, Sanjoba C, Asada M, Osada Y, Matsumoto Y. 2011. Polymorphism of Leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* s.l. in Asia. 10:101-110.
    - ② Noiri E, Hamasaki Y, Negishi K, Sugaya T, Doi K, Fujita T, Osada Y, Matsumoto Y and Jamil KM. 2011. The Potential of Urinary Tests in the Management of Kala-Azar. 8:69-90.
    - ③ Itoh M, Takagi H. 2011. Mass-Survey Using Urine and Confirmation by LAMP for Control of Visceral Leishmaniasis. 3: 91-98.
    - ④ Hossain M and Jamil KM. 2011. Geographical Distribution of Kala-Azar in South Asia. 1:3-10.
    - ⑤ Hossain M and Jamil KM. 2011. Pathology and Mechanism of Diseases in Kala-Azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis. 1:11-14
    - ⑥ Hossain M and Jamil KM. 2011. Diagnosis and Treatment of Kala-Azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis. 1:15-20.
    - ⑦ Jamil KM. 2011. The Role of Policy Makers in Achieving the Target for Kala-Azar Elimination in South Asia: The Bangladesh Experience. 4:139-146.

- 2) Takagi H, Itoh M, Kasai S, Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Kimura E: Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitol Int.* 60 (4): 493–497, 2011
- 3) Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Takagi H, Samarawickrema WA, Nagaoka F, Kimura E. Effects of 5 rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on filaria-specific IgG4 titers in urine: 6-year follow-up study in Sri Lanka. *Parasitol Int.* 60(4): 393–397, 2011
- 4) Khan MG, Alam MS, Podder MP, Itoh M, Jamil KM, Haque R, Wagatsuma Y: Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. *Parasit Vectors.* Nov 26;3:114, 2010
- 5) Laohasinnarong D, Thekisoe OM, Malele I, Namangala B, Ishii A, Goto Y, Kawazu SI, Sugimoto C, Inoue N. Prevalence of *Trypanosoma* sp. in cattle from Tanzania estimated by conventional PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasitol Res* 109:1735–9, 2011.
- 6) Goto Y, Bhatia A, Raman VS, Liang H, Mohamath R, Picone AF, Vidal SE, Vedvick TS, Howard RF, Reed SG. 2011. KSAC, the First Defined Polyprotein Vaccine Candidate for Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 18:1118–1124, 2011.
- 7) Goto Y, Duthie MS, Kawazu SI, Inoue N, Carter D. Biased cellular locations of tandem repeat antigens in African trypanosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 405:434–438, 2011.
- 8) Sanjoba C, Ozbel 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* 62:71–77, 2011.
- 9) Ozbel Y, Sanjoba C, Alten B, Asada M, Depaquit J, Matsumoto Y, Demir S, Siyambalagoda RRMLR, Rajapakse RPVJ, Matsumoto Y. Distribution and Ecological Aspects of Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Species in Sri Lanka. *J Vector Ecology* 36:S77–S86, 2011.
- 10) Doi K, Negishi K, Ishizu T, Katagiri D, Fujita T, Matsubara T, Yahagi N, Sugaya T, Noiri E: Evaluation of new acute kidney injury biomarkers in mixed ICU. *Crit Care Med* 39:2464–9, 2011.
- 11) Okamoto K, Tokunaga K, Doi K, Fujita T, Suzuki H, Katoh T, Watanabe T, Nishida N, Mabuchi A, Takahashi A, Kubo M, Maeda S, Nakamura E, Noiri E: Common variation in GPC5 is associated with acquired nephrotic syndrome. *Nat Genet* 43:459–63, 2011
- 12) Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K: Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. *Mitochondrion* 11, 273–278, 2011
- 13) Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshim, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N. and Suzuki, T: Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *J Vet Med Sci* 73, 615–621, 2011
- 14) Mori, M., Morimoto, H., Kim, Y-P., Ui, H., Nonaka, K., Masuma, R., Sakamoto, S., Kita, K., Tomoda, H., Shiomi, K. and Ōmura, S: Ukulactones A and B, new NADH-fumarate reductase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FKI-3389. *Tetrahedron*, 67, 6582–6586, 2011

- 15) Hikosaka, K., Watanabe, Y., Kobayashi, F., Waki S., Kita, K. and Tanabe, K: Highly conserved gene arrangement of the mitochondrial genomes of 23 *Plasmodium* species. *Parasitol Int* 60, 175–180, 2011
- 16) Islam MZ, Itoh M, Islam MA, Saifuddin Ekram AR, Rahman MA, Takagi H, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E: ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. *Am J Trop Med Hyg* 87(4):658–62, 2012
- 17) Gass K, Beau de Rochars MV, Boakye D, Bradley M, Fischer PU, Gyapong J, Itoh M, Ituaso-Conway N, Joseph H, Kyelem D, Laney SJ, Legrand AM, Liyanage TS, Melrose W, Mohammed K, Pilotte N, Ottesen EA, Plichart C, Ramaiah K, Rao RU, Talbot J, Weil GJ, Williams SA, Won KY, Lammie P: A multicenter evaluation of diagnostic tools to define endpoints for programs to eliminate bancroftian filariasis. *PLoS Negl Trop Dis* Jan;6(1):e1479, 2012
- 18) Alam MS, Kato H, Fukushige M, Wagatsuma Y, Itoh M: Application of RFLP-PCR-Based Identification for Sand Fly Surveillance in an Area Endemic for Kala-Azar in Mymensingh, Bangladesh. *J Parasitol Res* Volume 2012 (2012), Article ID 467821, 4 pages DOI:10.1155/2012/467821
- 19) Nagaoka F, Itoh M, Samad MS, Takagi H, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Hossain M, Moji K, Kimura E: Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads. *Parasitol Int* 62:32–5, 2012
- 20) Ferdousi F, Alam MS, Hossain MS, Ma E, Itoh M, Mondal D, Haque R, Wagatsuma Y. Visceral leishmaniasis eradication is a reality: data from a community-based active surveillance in Bangladesh. *Tropical Medicine and Health* 40:133–139, 2012
- 21) Doi K, Katagiri D, Negishi K, Hasegawa S, Hamasaki Y, Fujita T, Matsubara T, Ishii T, Yahagi N, Sugaya T, Noiri E: Mild elevation of urinary biomarker in prerenal acute kidney injury. *Kidney Int* 82:1114–1120, 2012
- 22) Hamasaki Y, Doi K, Okamoto K, Ijichi H, Seki G, Maeda-Mamiya R, Fujita T, Noiri E: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor simvastatin ameliorates renal fibrosis through HOXA13-USAG-1 pathway. *Lab Invest* 92:1161–7, 2012
- 23) Katagiri D, Doi K, Honda K, Negishi K, Fujita T, Hisagi M, Ono M, Matsubara T, Yahagi N, Iwagami M, Ohtake T, Kobayashi S, Sugaya T, Noiri E: Combination of two urinary biomarkers predicts acute kidney injury after adult cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 93:577–83, 2012
- 24) Hashimoto, M., Morales, J., Fukai, Y., Suzuki, S., Takamiya, S., Tsubouchi, A., Inoue, S., Inoue, M., Kita, K., Harada, S., Tanaka, A., Aoki, T. and Nara, T: Critical importance of the *de novo* pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 1002–1006, 2012
- 25) Nara, T., Hashimoto, M. Hirawake, H., Liao, C-W., Fukai, Y., Suzuki, S., Tsubouchi, A., Morales, J., Takamiya, S., Fujimura, T., Taka, H., Mineki, R., Fan, C-K., Inaoka, D. K., Inoue, M., Tanaka, A., Harada, S., Kita, K. and Aoki, T: Molecular interaction of the first 3 enzymes of the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* 418, 140–143, 2012

- 26) Tomitsuka, E., Kita, K. and Esumi, H: An anticancer agent, pyrvinium pamoate inhibits the NADH-fumarate reductase system - a unique mitochondrial metabolism in tumor microenvironments. *J Biochem* 152, 171-183, 2012
- 27) Shimizu, H., Osanai, A., Sakamoto, K., Inaoka, D. K., Shiba, T., Harada, S. and Kita, K: Crystal structure of mitochondrial quinol-fumarate reductase from the parasitic nematode *Ascaris suum*. *J Biochem* 151, 589-592, 2012
- 28) Hino, A., Hirai, M., Tanaka, Q. T., Watanabe, Y., Matsuoka, H. and Kita, K: Critical roles of the mitochondrial complex II in oocyst formation of rodent malaria parasite *Plasmodium berghei*. *J Biochem* 152, 259-268, 2012
- 29) Tanaka, Q. T., Hirai, M., Watanabe, Y. and Kita, K: Towards understanding the role of mitochondrial complex II in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*: gene targeting of the Fp subunit. *Parasitol Int* 61, 726-728, 2012
- 30) Tachibana, S., Sullivan, S.A., Kawai, S., Nakamura, S., Kim, H.R., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N.M.Q., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Sutton, P.L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Barnwell, J.W., Escalante, A.A., Carlton, J.M. and Tanabe K: *Plasmodium cynomolgi* genome sequences provide insight into *Plasmodium vivax* and the monkey malaria clade. *Nature Genet* 44, 1051-1055, 2012
- 31) Kitamura, K., Kishi-Itakura, C., Tsuboi, T., Sato, S., Kita, K., Ohta, N. and Mizushima, N: Autophagy-related Atg8 localizes to the apicoplast of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS ONE* 7(8), e42977, 2012
- 32) Hikosaka, K., Tsuji, N., Watanabe, Y., Kishine, H., Horii, T., Igarashi, I., Kita, K. and Tanabe, K: Novel type of linear mitochondrial genomes with dual flip-flop inversion system in apicomplexan parasites, *Babesia microti* and *Babesia rodhaini*. *BMC Genomics* 13, 622, 2012
- 33) Saimoto, H., Kido, Y., Haga, Y., Sakamoto, K. and Kita, K: Pharmacophore identification of ascofuranone, potent inhibitor of cyanide-insensitive alternative oxidase of *Trypanosoma brucei*. *J Biochem* 153, 267-273, 2013
- 34) Goto, M., Amino, H., Nakajima, M., Tsuji, N., Sakamoto, K. and Kita, K: Cloning and characterization of hypoxia-inducible factor-1 subunits from *Ascaris suum* - a parasitic nematode highly adapted to changes of oxygen conditions during its life cycle. *Gene* 516, 39-47, 2013
- 35) Angeles, JM., Kirinoki, M., Goto, Y., Asada, M., Hakimi, H., Leonardo, LR., Tongol-Rivera, P., Villacorte, EA., Inoue, N., Chigusa, Y., Kawazu, SI: Localization and expression profiling of a 31 kDa antigenic repetitive protein Sjp\_0110390 in *Schistosoma japonicum* life stages. *Mol Biochem Parasitol*, 187, 98-102, 2013

## (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) 治療プロトコールの最適化

(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 治療プロトコールの最適化
- 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