

地球規模課題対応国際科学技術協力

(分野・領域「感染症・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」

(相手国: バングラデシュ)

平成25年度実施報告書

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 (International Centre for Diarrhoeal Disease Research, Bangladesh)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 2010 年 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同年 11 月に完了し、R/D への署名は 2011 年 2 月に完了した。全体計画に沿った研究を 2011 年 4 月より開始。

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

2. 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、SKKRC (Surya-Kanta Kala-azar Research Centre)）

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。

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. 感染浸淫地域内で、これから感染症発症の生じる可能性がどの場所にどの程度喫緊に迫っているかを、村落内での活動性の高い学童児童に焦点を絞って行い、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 *Leishmania Donovanii* の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

- (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、NTDs に対する安価で効率の良い診断法創出を支援しているスイスの NPO (Non-Profit Organization) である FINDS (Foundation for Innovative New Diagnostics; <http://www.finddiagnostics.org>) が、内蔵型リーシュマニア症診断へ向けた LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)法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. 試作品の完成は、平成 26 年度下半期の目途である. 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定期的に行っている.
- 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)
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している.
- 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
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確立する。

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)

PKDL (Post-Kala-azar Dermal Leishmania) は内蔵型リーシュマニア症発症罹患後に、一定の期間を経た後に発症することがある皮膚型リーシュマニア症を総称している。病型としては、nodular-type, papillary-type, macular-type などに大別され、バングラデシュでは macular-type が多い。

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 発症の評価を行った。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、プロジェクト後半にも繰り返し行う方針である。

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

平成 24 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。特に、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、平成 25 年度より長期派遣専門家として現地赴任し研究展開している。

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 (Sodium Antimony Gluconate) 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や複数回投与方法、多剤併用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

SAG 治療効果に関連しての PKDL 発症率について、バングラデシュにおいて初めて明確にすることができた。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皆無の状況で、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 の効果が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(コピー・プロダクト)における効果が芳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。その結果を踏まえて、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。一方、このコピー・プロダクトはインドではこれまで処方数が高くなかったことなどを受けて、インドのヒンズー大学病院において前向きは無作為割り付け検討により治療効果を検討するとの情報を、研究責任者の Shyam Sundar より得たため、同氏に本薬剤の問題点を国際リーシュマニア学術集会にて情報共有した。

- 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)
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症例の臨床検体と臨床情報を登録して、整備中である。icddr,b では ERC (Ethical Review Committee), RRC (Research Review Committee)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同様の書類対応を行った。

2.2 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 50/200 症例に対して収集できた。その解析により、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つつある。200 症例全体に関しての追跡は、icddr,b が PKDL の追跡調査を SATREPS の枠組みで実施することに前向きではなくなったため、リストを取得することができなくなった。加えて、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、SKKRC は Mymensingh Medical College Hospital 内に設置されており、icddr,b 管轄とはいえないため、保健省側から新たに承認を得よう要請が生じた。
- 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)
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。PKDL 追跡に要する200症例のリストは、Trishal 地域を中心に患者検索活動を草の根レベルで行い、約1年をかけて約180症例まで復旧しつつある。

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リスクを背負わされている状況とも考えられる。

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)

PKDL 及び内蔵型リーシュマニア症の前向き調査を行うために、患者登録システムを構築している。このような臨床データを疫学的に解析することで、ガイドラインの参考とできるデータを見いだせる可能性が高い。

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診断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」の言葉のみが先行しているだけで、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が必要である。

② 研究実施方法

NTDsの実態解明の難しさの一つに、治療評価がある。これは、患者は日雇い労働者のため、体調良好と判断した瞬間に仕事復帰を望むからで、その後に余程体調不良とならなければ、病院へ戻ることはないからである。また、研究チームでは患者脾臓生検の一部を NNN 培地への保存を勧奨しており、年度毎の寄生虫をバンキングできつつあるため、年毎の株を比較することにより薬剤耐性が真に獲得されたかどうかを検証することができ、有機的な解析が可能となる。

③ 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 (banking) 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。

④ 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。その一方でWHO, PATH, DNDiなどによる治療介入方法が複雑化しつつある。

⑤ 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。

⑥ 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 は、国内全域に対して内蔵型リーシュマニア症の専門治療施設として、保健省より周知されたために患者が集中し、中でも治療抵抗性や再発の症例が集まりやすい状況となりつつある。

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-ユビキノン還元酵素複合体)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って研究を進めるべく、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。研究チームは *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薬剤開発に用いて解析を進中である。

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、比活性も研究チームが報告した精製 *T. cruzi* SQR と同程度の高いものであった。結晶化を試みつつ、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っている。

- 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) 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 高い活性を持つ酵素を精製することができたので、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ているところであるが、酵素活性を阻害する事を見出した。さらに最近の実験から *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ことが判った。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ことから実用化への可能性が大いに期待できる。

2.3 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 内における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、サンシ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。結果の解析を経て、今後オリセ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、サンショウバエにも有効であることが確認され、編み目をサンショウバエ用に特別に調整したオリセトネットプラス™3000張りの供与を住友化学より受けて研究が進行中である。

- 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)
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促進する。上記をもとに、SKKRC の入院患者を対象としてオリセトネット™を配布し、院内での昆虫をベクターとした水平感染の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オリセトネットプラス™3000張りの供与を受け、各種通関手続きを経て SKKRC へ保管中である。ホットスポットを見いだし、これを用いたベクター制御を次年度に開始する。

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)と考えられてきた。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
DAT (Direct Aggregation Test; 直接凝集法)は、内蔵型リーシュマニア症診断に以前より用いられてきた定性的な診断法である。従来は、死滅、染色した *L. donovani* の promastigote に対して患者血清を microtiter plate 上で希釈系列を作りながら投入し、一晩後に肉眼で反応を検出する。本方法の診断精度は、報告によってまちまちで、その主な理由は標準化がなされていないことでもある。研究チーム(伊藤グループ)では、microtiter plate や promastigote を標準化し、新たに尿を患者検体として用いることでも充分検出が可能であることを見いだしている。
i) 愛知医大の開発した DAT システムなど血清(尿)疫学的手法を用いた動物特にイヌ、家畜(ブタ、ウシ、水牛、etc)の抗体価の調査や末梢血もしくは脾臓血の LAMP による診断の可能性についての検討を行い、ii) 抗体価の高い動物あるいは LAMP 陽性動物について寄生虫学的解析を詳細に実施すること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 の患者については、SKKRC の医師と協力し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
インド亜大陸での PKDL 発症頻度は、従来 5%程度という定説があったが、東大グループで 2011 年 12 月に実施した調査で、バングラデシュでは 15%程度は発症していることが判明した。そのため、このコホ

ートではSAGによる治療が施されたことが原因であろうと推論されるに至っている。そこで、現在の治療法はアムホテリシン B 更にはリポソーム化アムホテリシン B (AmBisome™) による治療へと変革を遂げている。しかし、これによりザンバーが解決したわけではない。i) ヒト-ヒト感染については、学童における早期疾患発見が感染広がりを抑えうる可能性があると考えて、小学校検診を尿 DAT で実施し、同時に学童の地理的情報を GPS でリンクすることで、今年の症地域予測に取り組んでいる。どの地域の小学校を選択するかについては、研究チームが追跡している内蔵型リーシュマニア症確診症例200の地理情報を正確に収集し、これを手がかりに決定した。ii) この地域の動物-ヒト感染については、従来より松本チームが提唱していたが、これまで証明されたことはない。この点について、icddr,b の研究グループが解析を進め、極めて少数の検討で不確実な検討 (rK39 のみ) ながら、その可能性を示唆する報告を行った。今後、感染浸淫地域内のイヌを捕獲し、イヌの行動範囲と感染の広がりについて発信機を装着して GPS により評価すると共に、イヌの詳細な解析を実施する予定である。

- 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) 研究チームが実施している追跡調査により、バングラデシュにおける標準治療 (SAG) 後に発症する PKDL の割合を、世界で初めて明らかにした。同国における内蔵型リーシュマニア症の治療薬選択を大きく変革することとなった。
- 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 イヌに関する解析を保健省より依頼され、これに対して追加予算が得られたため、加速的に進捗が得られると期待でき、研究計画を現地研究者と立てている。

2. 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 内のエリアに 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 SKKRC に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、現地スタッフ (医師・看護師・臨床検査技士) の教育を行ってきた。
- 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、投入機器が稼働している。技術移転は一度行っただけでは不十分であり、問題点の洗い出しを行って、改善へ向けたチェックリストの導入や LAMP 診断法や PCR 診断法による簡便かつ高速で再現性の高い手法の更なる移転による問題点の克服を検討する。
- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開の効果
SKKRC の拠点化に成功し、全国規模となったことと、icddr,b 内に Reference laboratory エリアを確保出来ない状況を受けて、icddr,b から SKKRC へと拠点としての比重が移りつつある。

B) 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 野入グループ 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感染浸淫地域拠点 SKKRC 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

研究チームでは、バングラデシュ国の内蔵型リーシュマニア症に対する診断能力向上と疾患制御能力の向上を目指しており、その中で教育は極めて重要である。SATREPS 開始に伴い、バングラデシュ国側と共に SKKRC を整備し、同国保健省は内蔵型リーシュマニア症へ臨床的な関わりをもつ医師 3 名を SKKRC へ常駐したことで、SATREPS の専門家との関わりが密接となり、医師をはじめ看護師や技師の専門性は飛躍的に向上した。また、同国保健省は、SKKRC を内蔵型リーシュマニア症治療のための専門医療機関と位置づけられたことで、患者数が大幅に増えたことも重要な要因となっている。SKKRC 職員から、さらに地域のヘルスケアワーカーへの教育や情報共有がなされるようになり、教育波及効果が見られつつある。このような発展的な教育効果を保健省は重く受け止め、2013 年 12 月には Department of Tropical Infectious Disease を国内で初めて Mymensingh Medical College に設立し、そのアカデミックな職責に SKKRC の 3 名を任じた。これにより、NTDs への医学教育や NTDs を専門とする医師の養成が同国で初めて可能となったといえる。このようにして、SATREPS を発端とした教育効果が広がっている。

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)

SKKRC 開所式より、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示すことができた。SKKRC は、内蔵型リーシュマニア症の専門治療施設としての位置づけが確立し、感染浸淫地域の practitioner に対する教育支援を行うようになりつつある。また、SKKRC で加療した症例の報告をジャーナル(Nath PN, Basher A, Harada M, , Sarkar SR, Bhuiyan MR, Selim S, Noiri E: Immediate hypersensitivity reaction following Liposomal Amphotericin-B(AmBisome) Infusion- A case report. Tropical Doctor 2014 [In press])へ投稿し受理された。

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

これまでバングラデシュ国では知識としてのみ専門家は議論してきた内容であったので、保健省関係者、icddr,b 研究者、Mymensingh 医科大学研究者の全員が、いわゆる「本物」の研究とその成果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。バングラデシュ国は、SKKRC での成功を受けて Mymensingh Medical College に Department of Tropical Infectious Disease 講座を同国において初めて設立し、SKKRC に貢献してきた医師がその職責を併任することとなり、Mymensingh Medical College Hospital の Dean が SKKRC の取り組み強化を約束している。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

① 本年度発表総数(国内 1 件、国際 6 件)

② 本プロジェクト期間累積件数(国内 3 件、国際 27件)

③ 論文詳細情報

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) Alam MS, Kato H, Fukushima 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

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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
- 22) 三條場千寿:日本におけるサシチョウバエ研究. 有害生物 9: pp129-140, 2012
- 23) 後藤康之:リーシュマニア症に対するワクチン開発の展望. 獣医寄生虫学雑誌 11:1-7,2012
- 24) 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
- 25) 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
- 26) Synergy of ferrous ion on 5-aminolevulinic acid mediated growth inhibition of *Plasmodium falciparum*.

- Komatsuya, K., Hata, M., Balogun, E. O., Hikosaka, K., Suzuki, S., Takahashi, K., Tanaka, T., Nakajima, M., Ogura, S., Sato, S. and Kita, K. (2013) *J. Biochem.*, 154, 501-504
- 27) 松本芳嗣, 後藤康之, 三條場千寿: 犬のリーシュマニア症. *日本獣医師会雑誌* 66: 5-7, 2013
- 28) Nguyen TT, Zhou M, Ruttayaporn N, Nguyen QD, Nguyen VK, Goto Y, Suzuki Y, Kawazu SI, Inoue N. Diagnostic value of the recombinant tandem repeat antigen TeGM6-4r for surra in water buffaloes. *Vet Parasitol* 201:18-23, 2014
- 29) Mizobuchi H, Yamakoshi S, Omachi S, Osada Y, Sanjoba C, Goto Y, Matsumoto Y. 2014. The accumulation of macrophages expressing myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in the spleen of BALB/cA mice during infection with *Plasmodium berghei*. *Exp Parasitol* 138:1-8.
- 30) Nath PN, Basher A, Harada M, , Sarkar SR, Bhuiyan MR, Selim S, Noiri E: Immediate hypersensitivity reaction following Liposomal Amphotericin-B(AmBisome) Infusion- A case report. *Tropical Doctor* 2014 [In press]

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 0 件、国際 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、国際 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