

アフリカにおける「顧みられない熱帯病 (NTD)」対策に資する多重感染症の一括診断法の開発

実施予定期間：平成 21 年度～平成 23 年度
代表機関：長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門
代表者：金子 聡
国内参画機関：
代表者：
国外参画機関：ケニア中央医学研究所 (KEMRI) 感染症
寄生虫研究センター
代表者：Matilu Mwau

I. 概要

これまで国内の研究者が蓄積してきた熱帯病病原体の抗体・抗原を新しい技術である multiplex 解析に応用して、「顧みられない熱帯病 (NTD)」の一括診断法を新たに開発する。本技術の開発により少量検体で、同時に 100 種類の抗原・抗体の測定が可能になる。本技術を現場に適用することにより、多くのアフリカ諸国の感染症対策の問題を解決する糸口を見つけることができるだけでなく、NTD の実態把握の国際標準になりうる。

1. 研究の目的

a. 課題の背景

先の G8 北海道洞爺湖サミット首脳宣言においても、述べられている通り (開発・アフリカの保健の項目 f)、アフリカの多くの人々は、「顧みられない熱帯病 (NTD)」と称される各種感染症にたびたび罹患し、しかも、有効かつ容易な診断法が無いことから、適切な診断・治療を受けることができないでいる。有効な対策を実施するためには、数十種類にも及ぶ NTD の実態把握が必要ではあるが、各感染症の実態把握を個別にそれぞれ異なる診断法を用いて行う事は、住民への負担が大きく、資源的にも問題がある。もし、一度の検査で複数の感染症診断が可能になれば、熱帯病流行地域における感染症流行状況の把握が飛躍的に容易になる。昨今、multiplex 解析という新しい手法が開発された。100 種類の抗原・抗体を一度に調べることを可能とする技術である。この新技術を用いることにより、上記問題の解決を行う糸口となることが期待されるが、これまで、アフリカにおける「顧みられない熱帯病 (NTD)」の実態把握に用いられた事例は存在しない。一方、これまで我が国の研究機関は長い年月を費やし熱帯病研究を行い、診断に用いることが可能な病原体抗原や病原に対する抗体が数多く生成されている。これらの研究成果を multiplex 解析という新技術でつなぎ合わせ、一括診断法を開発することにより、新たな熱帯病の実態把握への糸口を見いだすことが可能となる。研究期間内に国内研究機関との協同作業により、複数の感染症に対する一括同時診断の技術の開発、また長崎大学熱帯医学研究所ケニア教育研究拠点のフィールド (西ケニアにおける 5.5 万人の人口動態を追跡している) において、KEMRI と協力しつつ、その技術の応用を行い、その成果を評価する。

b. 提案課題に関連する国内外の取組の実施状況

ケニアをはじめとしたアフリカ各国における感染症の問題は、先進国では見られない感染症に感染する可能性があること、さらには、有効な診断が医療施設においてもなされないこと、その症状が著しく類似していること、さらには、不顕性感染 (症状を呈しない感染) の場合も多く、実

態が不明のままである点にある。また、研究基盤も脆弱であることから、熱帯感染症とくに「顧みられない熱帯病 (NTD)」に関しては、研究基盤の底上げとその結果の実地での応用が必要となる。我が国においては、これまで、国内における寄生虫・感染症対策実施の蓄積、途上国における研究並びに国際協力実施の実績があり、その技術の応用を本課題で提案する新技術と組み合わせることにより、新しい展開を期待することが可能となる。

c. 研究方法

(1) multiplex 解析法の利用

100 種類のマイクロビーズに解析対象と結合する物質 (プローブ) を固定させることにより、少量血液サンプルにより、100 項目を同時に解析する技術で、この技術は既に商品化されている。複数の熱帯感染症の抗体・抗原をマイクロビーズに固定させる物質 (プローブ) として解析を行うことが新しい取り組みである。複数の熱帯感染症の抗体・抗原をマイクロビーズに固定させる技術の開発・研究は進んでいないことから、本研究ではこの点が一つの焦点となる。

(2) 熱帯感染症の抗原・抗体

これまで、国内研究機関に蓄積されている熱帯感染症の抗体・抗原をプローブとして用い、マイクロビーズに固定させ、multiplex 解析法を用いた地域における多重感染状況を明らかにする技術の開発・研究を行う。具体的に対象となる熱帯感染症は、

- | | | |
|----------|---------------------------|--------------|
| ・パラウイルス | ・マラリア | ・リフトバレー熱ウイルス |
| ・住血吸虫 | ・アルボ系ウイルス (黄熱、西ナイル熱、デング熱) | |
| ・赤痢アメーバ | ・インフルエンザ | ・フィラリア |
| ・ポリオ | ・鉤虫 | ・麻疹 |
| ・クリストポリジ | ・ジフテリア | ・流行性耳下腺炎 |
| ・肝吸虫 | ・トリパノソーマ | ・風疹 |
| ・髄膜炎菌 | ・肝炎 | ・HIV |
| ・ロタウイルス | ・結核 | ・ハンタウイルス |

等の病原体を想定している。

d. 期待される先進的技術の改良・普及、国際標準

- (1) 複数感染症の一括同時診断が可能となる。
- (2) 抗体検査、抗原検査が双方を行えば、現在の感染、過去の感染の把握が可能になる。
- (3) さらに、感染負荷の把握が可能となり、治療対象感染症の把握が可能となる (無駄な治療を押し返すことが可能となる)
- (4) アフリカ各国、特に感染症流行地域において、感染症の実態把握の標準的な手技として用いられることが期待できる。すなわち国際標準の創出につながる。

e. 具体的な達成目標

- (1) 期間内に、multiplex 解析法を各種熱帯感染症に応用するためのマイクロビーズへの抗原・抗体固定の手法を確立する。
- (2) 確立した手法を用い、「顧みられない熱帯病」の一括診断用の multiplex 解析用マイクロビーズを作

成する。

- (3)長崎大学熱帯医学研究所ケニア教育研究拠点のフィールドにおいて、住民を対象とした熱帯感染症調査を実施し、開発した一括診断キットの評価を行う。

f. 期待される波及効果

本研究の成果により、少量サンプルによる少ない資源を用いた熱帯感染症の実態把握が可能となり、地域全体の健康増進、感染症克服への波及効果が期待できる。

2. ネットワーク構築の実現可能性

ケニア中央医学研究所（KEMRI）は、KEMRI 創設当時から JICA を介した事業協力並びに、研究協力が継続しており、さらには、2005 年、ナイロビ研究教育拠点の設置に関して長崎大学並びに KEMRI の間で共同研究実施の協定（MOU）の取り交わしが終了している。

当該国外参画機関（ケニア中央医学研究所）とは、すでに各種共同研究を行っており、共同研究体制は、すでに稼働状態に入っている。また、国内の研究者との連絡も密に行っており、現在保有している「顧みられない熱帯病（NTD）」の抗原・抗体の供与についての協議は既に終了している。

ナイロビ研究教育拠点設置の際に、ケニアにおける研究の実施に関しての協定締結は、実施済みである。

長崎大学としても、『海外研究拠点形成を視野に入れた研究等のより多様な研究活動を柔軟に推進できる弾力的研究実施体制の整備』を中期目標として掲げており、長崎大学熱帯医学研究所だけではなく、大学全体として、本課題を支援する体制が整っている。

3. 継続性について

長崎大学は、ケニア中央医学研究所と包括的共同研究実施に関する協定を取り交わしていること、さらには、ナイロビ研究教育拠点を恒常的に維持することを前提に、アフリカにおいて研究の実施を展開しており、本課題支援終了後においても、本研究結果の利用とさらなる発展促進を目指して、研究を続行する。

7. 研究実施体制

(1) multiplex 解析の熱帯感染症診断応用に関する研究と検証（代表機関）

- 国内研究者との調整：抗原・抗体の提供に関する調整
- マイクロビーズへの抗原・抗体固定方法の確立
- 基礎実験の実施：multiplex 解析の予備解析を実験室レベルで実施
- 長崎大学ケニア拠点フィールドでの調査の実施
- 最終解析並びにまとめ



(2) multiplex 解析のフィールド評価実施

（国外参画機関：ケニア中央医学研究所）

長崎大学ケニア教育研究拠点と KEMRI が協同で運営するラボ並びにフィールドにおいて、本課題で開発した診断法の検証を実施する。multiplex 解析機器を同施設内に設置し、実際の解析を行う。

長崎大学としては、『海外研究拠点形成を視野に入れた研究等のより多様な研究活動を柔軟に推進できる弾力的研究実施体制の整備』を中期目標として掲げており、長崎大学熱帯医学研究所だけではなく、大学全体として、本課題を支援する体制が整っている。

4. 課題期間終了後の取組について

長崎大学は、ケニア中央医学研究所と包括的共同研究実施に関する協定を取り交わしていること、さらには、ナイロビ研究教育拠点を恒常的に維持することを前提に、アフリカにおいて研究の実施を展開しており、本課題支援終了後においても、本研究結果の利用とさらなる発展促進を目指して、研究を続行する。

5. アジア・アフリカ諸国等との政府レベルでの協力関係の強化・構築への発展性

アフリカにおける「顧みられない」感染症の対策は、G8 北海道洞爺湖サミットにおいても、述べられているとおり、重要課題である。その課題に対して、有効的な診断と治療をもって、対応するための基礎技術の開発を行う研究であり、本研究の成果が対象国の感染症対策の主力となり、感染症の対策が推進することにより、両国政府間の協力関係が強化されるものと期待できる。

また、本技術が実際に実用段階に入った時点で、2 国間、もしくは多国間の政府協力により、ケニアのみならず、アフリカ全土において、「顧みられない」感染症対策の主力技術となり、アフリカにおける感染症の問題解決に向けての展開が期待される。

6. 生命倫理・安全面への配慮について

診断手技の開発については、特に倫理の規定に抵触することはない。開発診断手技の精度の研究に関しては、実際に人に対する採血ならびに診断行為の実施が発生することから、疫学研究に関する倫理指針の規定に従い、倫理委員会における計画書の審理と許可、並びに個人同意を基本として研究を展開する。

氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
◎金子 聡	長崎大学熱帯医学研究所・教授	研究代表者
森田 公一	長崎大学熱帯医学研究所・教授	ウイルス抗原の精製
一瀬 休生	長崎大学熱帯医学研究所・教授	細菌抗原の精製
濱野 真二郎	長崎大学熱帯医学研究所・教授	抗原の精製・ビーズへの固定と診断系の確立
嶋田 雅暁	長崎大学熱帯医学研究所・教授	ケニアにおける診断の実施
柳 哲雄	長崎大学熱帯医学研究所・助手	原虫抗原の精製
平山 謙二	長崎大学熱帯医学研究所・教授	研究事業支援
上村 春樹	長崎大学熱帯医学研究所・講師	原虫抗原の精製
堀尾 政博	長崎大学熱帯医学研究所・教授	研究事業支援
中山 浩次	長崎大学医歯薬学総合研究科・教授	細菌抗原の精製
山崎 朗子	長崎大学熱帯医学研究所・研究員	抗原の精製・ビーズへの固定と診断系の確立
井上 信吾	長崎大学熱帯医学研究所・助教	ケニアにおける診断の実施
藤井 仁人	長崎大学熱帯医学研究所・助教	細菌抗原の精製
谷川 智洋	長崎大学熱帯医学研究所・研究員	抗原の精製・ビーズへの固定と診断系の確立
木村 英作	愛知医科大学・教授	フィラリアの抗原(抗 SXP-1) の提供
伊藤 誠	愛知医科大学・准教授	フィラリアの抗原(抗 SXP-1) の提供
大原 直也	岡山大学・教授	抗原提供
松本 壮吉	大阪市立大学・教授	結核菌の 3 種の組換えタンパク質 (CFP10、ESAT6 および MDP1) 発現大腸菌の提供
橘 裕司	東海大学・准教授	赤痢アメーバのプラスミドの提供
Mutulu Mwau	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・研究センター長	ケニアにおける診断の実施
James h. Kimotho	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・所長	ケニアにおける診断の実施
CharlesMwandawiro	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・副所長	ケニアにおける研究実施に関する調整
Solomon Mpoke	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・部門長	ケニアにおける研究実施に関する調整
Mohanad Karama	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・主任研究員	ケニアにおける研究実施に関する調整
AnneWanjiru Mwangi	Center for Infectious and Parasitic Diseases Research, Kenya Medical Research Institute・Director of the centre・研究助手	ケニアにおける診断の実施

8. 各年度の計画と実績

a. 平成 21 年度

・計画

(1)抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験

これまで長崎大学熱帯医学研究所、日本の熱帯病研究機関が保有している病原体抗原を精製・収集し、診断開発に用いる抗原を病原体毎に作成する。

その抗原を用いて、マイクロビーズに固定すると共に、これまでの診断方法 (ELISA 法) により、コントロール血清の診断を行い、同じ結果が今回の新診断技術による結果と同じかどうかを検討する。

その後、複数の病原体に対するマイクロビーズを混合し、複数診断の同時実施を試みる。その際、病原体の組み合わせ、条件設定等の最適化を行う。

(2)フィールドの調整並びに作業者の教育

ケニアにおけるラボの準備と担当者の教育を行う。

また、ケニア国内での研究実施に当たり、研究計画書の作成を行う。

・実績

(1)抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験

(a)本診断法を各種熱帯感染症に応用するための抗原の収集と精製

市販されていない病原体抗原については、長崎大学熱帯医学研究所内の各研究室並びに国内の感染症研究施設と協力して精製・収集を行うとともに、市販されている病原体抗原については、その購入を行った。具体的には、アルボウィルス系ウイルス (西ナイル熱、ニバウイルス) に関してウイルス粒子の精製を行い、コレラ菌については、米国からのコレラ毒素の入手手続きを行った。コレラ毒素については、テロ対策の強化により、手続きに時間がかかっている。結核菌については、組換えタンパク質発現大腸菌を大阪市立大学大学院医学研究科 (松本壮吉先生) の協力により入手、長崎大学熱帯医学研究所内において結核菌抗原の精製を行った。赤痢アメーバ抗原については、東海大学 (橘裕司先生) の協力により入手。フィラリアは、愛知医科大学 (伊藤誠先生) の協力によりフィラリア抗原 (抗 SXP-1) を入手した。マンソン住血吸虫は、長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学分野で抗原の精製を行った。マラリア抗原、HIV 抗原については、市販で用いられている診断キットの抗原の購入が可能であるため、抗原の購入を行った。

(b)マイクロビーズへの抗原固定の条件設定の検討

マイクロビーズへの病原体固定条件の検討を行った。ウイルスについては、これまでの診断法で用いているウイルス粒子の精製法 (ホルマリンによる不活化) により提供された抗原のマイクロビーズへの固定は、抗原の表面アミノ基がホルマリンにより包含されることから、ビーズ表面の官能基と反応せず、固定が不完全になることが明らかになった。従って、代替法として、ウイルス培養時の分泌タンパクを用いて再検討を行っているところである。その他の抗原については、フィラリア抗原をマイクロビーズに固定することに成功した。精製・入手のできたその他の病原体抗原に関して、マイクロビーズへの固定の作業を開始し、固定条件の検討を行った。

(c)病原体毎の診断精度の最適化条件の検討

マイクロビーズへの固定の終了した病原体抗原に対して、本診断法とこれまでの従来の診断方法 (ELISA 法) との比較を行い、既存の診断と同じ診断結果が得られることを確認した。最適化条件の設定には、感染症に感染したことがある人間の血清が必要であることから、抗原提供時に血清の提供をお願いしているところではあるが、血清の入手困難な病原体に関しては、ケニア、バングラディッシュ等、海外の研究者の協力により血清の入手の手続きを行った (赤痢アメーバなど)。

(d)個々の病原体で検討した条件を複数の病原体を一括に診断する場合の条件の設定検討

複数の病原体に対するマイクロビーズを混合し、一括診断を行う条件設定の検討の準備を行った。個々の病原体抗原のマイクロビーズへの固定が済み次第、作業を開始できる状態になった。

(e)追加事項

病原体抗原を固定させたマイクロビーズの保存期間の検討も行った。海外において本診断方法を実際に用いるに当たり、抗原を固定した診断用マイクロビーズに、十分な保管期間が保証されている必要がある。保存期間の検討を、追加で行った。長期間の保存には、更なる検討が必要なが明らかとなった。

(2)フィールドの調整並びに作業者の教育

ケニア中央医学研究所診断試薬製造部に、本研究の運用に用いる研究室の場所を確保した。また、本研究で作業を行う研究者、実験技術者の KEMRI スタッフからの選定、研究で用いる機器の確認を行った。

さらに、Multiplex 機器をケニアに搬送し、設置、機器調整を行う手続きを開始した。本機器の日本からの搬送は、ケニア国内への「輸入」に当たることから、ケニア政府に対して、輸入に関する手続きを開始した。

b. 平成 22 年度

・計画

(1)追加抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験とケニアでのフィールド調査の支援

診断用マイクロビーズの作成を継続する。既に作成を終わったものについても、追加での作成が必要である。引き続きこれを行う。また、追加の病原体については 1 年目と同じ行程を実施する。また、複数の病原体に対する複数の診断用ビーズを混合し、同時診断を行うための条件の最適化を行う。

(2)フィールド調査ならびに multiplex 解析の実施

ケニアにおいて、実際のラボの整備と運用体制の確立を行い、実際の診断活動を開始する。

・実績

(1)追加抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験とケニアでのフィールド調査の支援

(a)抗原供給体制の整備 (遺伝子組み換え技術の導入)

当初予定していた国内の研究者からの抗原の供給について、本開発技術に実地試験に向けた検討を行い、各研究者から供給される抗原には、「量的」に限界があることが予想されたことから、大

腸菌を用いた遺伝子組み換えにより抗原を精製する方針に変更を行い、これを行った。平成 22 年度において、この抗原供給体制により、フィラリア、マラリア、HIV、結核、リーシュマニアなどの抗原の精製を継続して行っている。

- (b) 同時診断に向けての検討（理論的裏付けの終了）
初年度に問題となった、マイクロビーズへの抗原の固定条件についても、一から見直し、生化学的検討により固定条件の問題を解決した。さらに、保存期間の問題も、同時に解決に至った。また、複数の病原体の安定供給が可能となったことから、抗原の供給を気にすることなく、複数の病原体の同時診断に向けた安定した検討が可能となった。このことにより、平成 23 年 3 月末の段階で、9 種の病原体（HIV、熱帯熱マラリア、3 日熱マラリア、トキソプラズマ、内蔵リーシュマニア、コレラ、フィラリア（パンクロフト糸状虫）、結核、赤痢アメーバを同時に、一括して診断する技術の開発の完成に至った。複数の病原体を一括に診断する理論的裏付けも取れたことから、対象病原体の数を増やすことに関しては、今後、抗原の供給体制に依存することとなる。

(2) フィールド調査ならびに multiplex 解析の実施

- (a) 機器の搬送（輸出）とケニアでの稼働
長崎大学において開発に使用していた multiplex 機器をケニア国内におけるフィールド採血調査での使用に向けて輸出を行った。通常に輸出をした場合、関税、付加価値税など、高額な課税が課せられることから、ケニア政府と交渉に当たり、数ヶ月の交渉の後、免税の措置を受けるに至った。これを受けて、下記ケニア人研究者の長崎における研修終了の後、輸出作業に取りかかった。平成 23 年 1 月中旬、機器が無事ケニアに到着し、ケ

ニア中央医学研究所内に設置された。設置と同時に、実際の試験運用を行った。当初、問題なく稼働していたところ、2 月に入り、動作状況に問題が発生。3 月 12 日（震災翌日）、成田から、技術者を派遣し、点検修理を実施した。現在、問題なく稼働中。なお、同時診断に向けての検討とその後、国内研究を実施する必要があったことから、輸出時期が多少遅延した。

- (b) ケニア人研究者・技術者の国内研修
実際に Multiplex 機器を扱う担当 2 名を平成 22 年 10 月から 11 月にかけて、1 ヶ月間、研修を行った。
- (c) 研究計画書の倫理審査の通過
フィールド採血調査に関して、研究計画書をケニア中央医学研究、ならびに長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会に提出し、審査の後、承認された。

c. 平成 23 年度

- ・計画
- (1) 追加抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験
(a) 追加して、住血吸虫、チフス菌、ロタウイルス、ジアルジアなどの病原体の追加を検討する。
- (2) 診断用マイクロビーズの作成継続
(a) 継続して、抗原の精製とビーズへの固定によりフィールド採血調査に対する診断用ビーズの生産・供給を行う。
- (3) フィールド調査ならびに multiplex 解析の実施
(a) 実際にフィールドにおいて、感染症調査を実施する。
(b) 一括診断結果の検討
- (4) まとめ
(a) 3 年間の内容をまとめる。

9. 年次計画

研究項目	1年度目	2年度目	3年度目
a. multiplex 解析の熱帯感染症診断応用に関する研究活動 (代表機関)	抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験 	追加抗原・抗体の入手・マイクロビーズへの固定準備並びに予備実験とケニアでのフィールド調査の支援 	とりまとめ
b. multiplex 解析のフィールド評価実施 (ケニア中央医学研究所)	フィールドの調整並びに作業者の教育 	フィールド調査ならびに multiplex 解析の実施 	