

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18406012  
 研究課題名（和文） 中国における再興感染症としての日本住血吸虫症流行の実態調査と効果的対策  
 研究課題名（英文） Schistosomiasis japonica: a re-emerging disease in China and a new approach for disease monitoring and effective control.  
 研究代表者  
 太田 伸生（OTA NOBUO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  
 研究者番号：10143611

**研究成果の概要：**中国における日本住血吸虫症流行地が低下してきている状況に応じて、中間宿主及び終宿主の感染を簡便で効率的な遺伝子検出によって評価するシステムを構築し、中間宿主貝の生態分布の地理生物学的なモニター、及び中間宿主貝と寄生虫の地理分布による適応の差異に関する情報も併せてリスクマップの作製を進め、流行状況が急速に変化してきている中国国内の日本住血吸虫症流行に対する新規対策スキームの開発と応用の可能性を中国との共同研究として実施した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：日本住血吸虫 再興感染症 DNA 診断 *Oncomelania* LAMP 法 PCR

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 中国では揚子江流域を中心に日本住血吸虫症が広範囲に流行していたが、対策事業の推進により流行状況は全般に低下傾向にある。しかし、新規流行フォーカスが発見されたり、対策予算の削減による流行復活など、再興感染症としての懸念が指摘されていた。  
 (2) 日本住血吸虫症の診断は古典的な寄生虫学的手法によっていたので、感度と特異性に問題があるだけでなく、人材と時間の投入量に依存する非効率性がネックであった。  
 (3) 大規模ダム開発など、中間宿主貝の生態環境が変化していて、貝の生息環境や流行フォ

ーカス間で寄生虫と中間宿主貝が移動する可能性があり、虫と中間宿主の寄生適応性の情報解析を行って、中間宿主貝の生態系変動によるリスク評価が必要であった。

## 2. 研究の目的

(1) 住血吸虫症の疾病対策の柱となる Case detection を終宿主、中間宿主個々の試料を従来の古典的な寄生虫学的手法によっておこなうのではなく、遺伝子検出によって行うことにより、専門技術者に頼ることなく、大量検体処理が可能なシステムとし、より簡便で感度に優れた Case detection 法として、そ

の疾病対策への実用化について検討する。

(2)揚子江流域の水系環境の変化により、中間宿主貝の生息環境が変化する状況に応じるために、中国安徽省の流行地をモデルとして、*Oncomelania* 属貝生息地と周辺地区の土壌、植生の情報を加えた地理情報システムにより、貝の生息動向を簡便にモニターするリモートセンシングの応用を検討する。

(3)中間宿主貝や感染者の移動に伴って、流行フォーカス間の感染拡大を監視する必要があるが、そのために日本、中国及びフィリピンの *Oncomelania* 属貝とそれぞれの地域の住血吸虫の感染感受性について検討する。その情報をもとに日本住血吸虫症流行再興に関するリスク評価を試みる。

### 3. 研究の方法

(1)中国で日本住血吸虫の重要な保虫宿主である水牛、げっ歯類哺乳類、及び中間宿主である *Oncomelania* 属貝の感染を寄生虫遺伝子の検出により判定する方法の標準化を行った。

PCR 法による検出：日本住血吸虫の 28S ribosomal DNA を標的として PCR による増幅をおこなった。ゲノム情報に基づいて、プライマーは以下のように設計した。

Sj28S-F: 5'-GGTTTGACTATTATTGTTGAGC-3', Sj28S-R: 5'-TCTCACCTTAGTTCGGACTGA-3'

PCR の条件は(95°C 30sec 55°C 30sec 72°C 30sec) x 35 サイクルである。

LAMP 法による検出：28S ribosomal DNA を標的とし、F3 プライマー：5'-TTTCGTAACGCCAATGA-3'、FIP プライマー：5'-ACGC AACTGCCAACGTGACATACTGGTTCGGC TTGTTACTAGC-3'、BIP プライマー：5'-TGGTAGACGATCCACCTGACCCCT CGCGCACATGTTAAACTC-3'とした。

日本住血吸虫ゲノム DNA、*Oncomelania* 由来、実験感染マウス、感染水牛等から DNA を得て、鋳型 DNA として検討した。その結果を従来の寄生虫学的検出法による結果と比較した。

(2)地理的に異なった流行フォーカスの日本住血吸虫と *Oncomelania* 属貝を用いて、住血吸虫ミラシジウムを貝に感染させた後、経時的に PCR 法により住血吸虫 DNA の存在を検討するとともに、感染 16 週目にセルカリアの遊出を顕微鏡的に調べた。日本住血吸虫は日本・山梨株、中国・江蘇省株および中国・安徽省株を用い、*Oncomelania* 属貝としては *O. hupensis nosophora* 甲府株、同・木更津株、中国の *O. h. hupensis* 安徽省株、湖南省株、江西省株、四川省の *O. robertsoni*、フィリピンの *O. h. quadrasi* をパネルとして用意して組合せて検討した。

(3)中国安徽省の流行地数地点を対象にして *O. h. hupensis* の生息環境を土壌成分、植生の面から調査し、人工衛星写真を用いて流行地の貝生息環境の特徴を解析した。それに基づいて、貝の生息しうる地域を予測し、流行リスクの情報管理システム整備を図った。

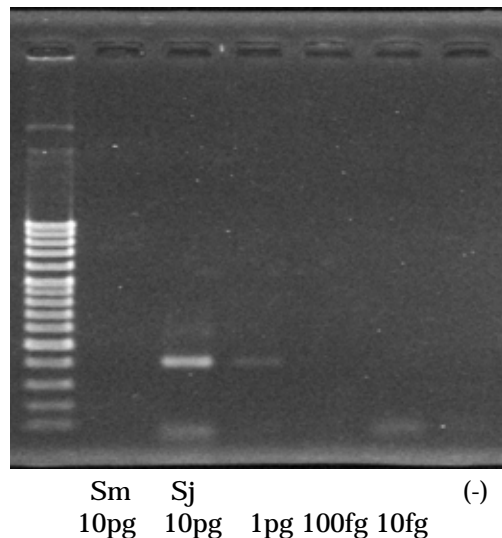
さらに、将来のリモートセンシングによる中間宿主貝動向モニタリングの試行を日本国内の旧流行地の条件を用いて行った。

### 4. 研究成果

(1)中間宿主貝の感染を検出する方法として、PCR 法と LAMP 法を感度、特異性の比較を行った。

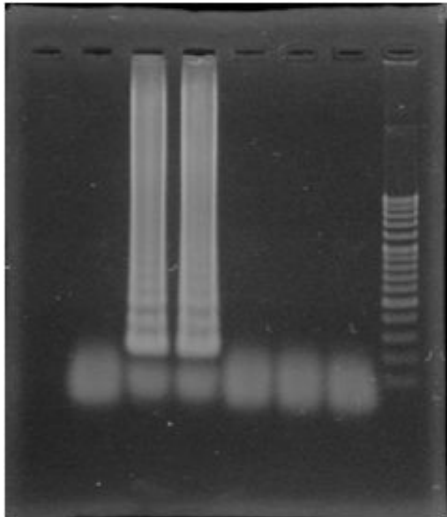
PCR 法による検出：日本住血吸虫のゲノム DNA を用いた場合、試みた条件により 28S ribosomal DNA が 1pg 以上あれば検出できることを確認した(図 1)。この条件でミラシジウム 1 隻を感染させたミヤイリガイは、感染 1 日後から PCR による寄生虫遺伝子の増幅が確認された。同じ条件でマンソン住血吸虫については増幅が観察されなかった。

図 1 PCR による日本住血吸虫 DNA 検出



LAMP 法による検出：LAMP 法による日本住血吸虫遺伝子の検出について検討した結果、寄生虫ゲノム DNA を鋳型とした場合、10fg の DNA で陽性反応が見られ、PCR に比べて 100 倍の感度であることがわかった。マンソン住血吸虫ゲノムは検出しなかった(図 2)。感染貝からの日本住血吸虫 DBA 検査を PCR による結果と比較した場合、LAMP 法は PCR による結果と完全に一致した。

図2 LAMP法による日本住血吸虫 DNA 検出



Sm Sj (-)  
1pg 1pg 100 10 1fg

中国の流行地サンプルへの応用：安徽省の中間宿主貝を顕微鏡によるセルカリアの検出と PCR による検出とで比較した。流行地から任意に採取した貝 240 個をセルカリア検出により感染率を判定した場合は陽性率が 4.2%であったのに比べて、PCR 法による感染率は 9.6%であった。このことは、PCR 法では、中間宿主貝の中で、セルカリアまで成長するまでの段階でも検出することを示すものであった。

検便により感染を確認した中国流行地の水牛の糞便及び血清から PCR による寄生虫遺伝子検出を試みたが、PCR では感度が十分ではなく、終宿主への応用については解決すべき課題が残った。

以上の結果から、流行地の疾病監視としての中間宿主貝のモニタリングには、PCR または LAMP 法を導入することにより、より高い感度で陽性宿主を検出できることが明らかとなった。

(2) *Oncomelania* 属貝が流行フォーカス間で移動が起こった場合の流行拡大の可能性を実験感染により検証した。寄生虫の中間宿主貝への侵入の有無をミラシジウムと接触後 24 時間の時点で PCR 法により検出し、セルカリアまでの生育の有無は 16 週後の幼虫遊出の有無で検討した。

山梨株の日本住血吸虫の各地理分布の貝に対する感受性：山梨株日本住血吸虫は甲府盆地に分布する *O. hupensis nosophora* には高い侵入性を示したが、中国安徽省流行地の *O. h. hupensis* には殆ど侵入できないことがわかった。一方、同じ山梨の日本住血吸虫はフィリピンの *O. h. quadrasi* には中等度の侵入性がみられた。中国には *O. h. hupensis* 以

外に、形態的に山梨のものと類似する *O. h. robertsoni* が四川省に分布するが、山梨株の日本住血吸虫はその亜種の貝には高い侵入性を示した(表 1)。

表 1

Origin	地域	亜種	侵入	成長
日本	甲府	<i>O. h. nosophora</i>	97%	67%
	木更津		97%	ND
中国	安徽-A	<i>O. h. hupensis</i>	0%	0%
	安徽-B		10%	5%
	江西		0%	ND
	四川	<i>O. h. robertsoni</i>	90%	ND
フィリピン	ルソン	<i>O. h. quadrasi</i>	65%	ND
	レイテ		75%	ND
	ボホール		55%	0%
	ミンダナオ		70%	0%

16 週後に貝からのセルカリア回収の有無で比較すると、山梨株寄生虫は甲府盆地の貝で高率に感染幼虫であるセルカリアまで成長するのに対して、フィリピンの *O. h. quadrasi* では発育が確認出来なかった。中国の貝には侵入できなかったため、中国の貝内でミラシジウム侵入後にセルカリアまで発育できるか否かは判定できなかった。

中国株の日本住血吸虫の各地の貝に対する感受性：中国安徽省の日本住血吸虫の各地の *Oncomelania* 属貝への侵入性は一般に低地であり、同じ流行フォーカスの貝に対しても 20-30%程度の値にとどまった。一方、甲府地方の *O. h. nosophora* に対しても中国の貝と同等の侵入率を示し、フィリピンの貝に対しても十分な侵入性があった。

以上の結果から、日本の住血吸虫は日本の貝に対して高い感受性が確立している一方で、中国の日本住血吸虫は *O. h. hupensis* の中国国内の流行フォーカス間株および別種の貝に対しても一定程度の感受性があることが示唆され、中国国内で発見される新規流行フォーカスがこのような生物学的特徴による可能性が示唆された。

(3) 中国流行地の *Oncomelania* 属貝の生息環境評価と生息監視法の開発

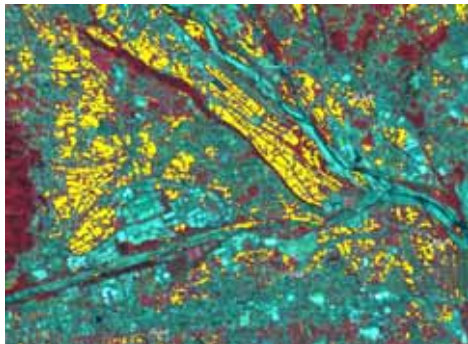
中国の流行地に分布する *O. h. hupensis* 生息フォーカスの土壌と植生：安徽省の揚子江流域に点在する貝の生息地域の土壌を pH、カルシウム含量、窒素含量等を比較して、その環境下の貝の形態的特徴との関係を明ら

かにした。

リモートセンシングによる中間宿主貝の監視システムのモデル開発：中間宿主貝生息地のデジタルマップに人工衛星画像情報による植生環境や土地利用の情報を入力し、簡便なモニタリングシステムを検証した。甲府盆地のALOS人工衛星画像の各種パラメータ指標を実際の植生と比較し、貝の生息定点情報観察データを入力して、パソコン上で簡便に中間宿主貝モニターができるシステムモデルを作製した。

流行地のデジタルマップが入手できる環境では、ALOS画像情報から水田、草地、果樹・畑作などの情報が解析できることが確認できたので、パソコン上で、どの地区のどのポイントでの中間宿主貝の動向を実地検証して入力することにより、対策計画の策定に利用することが確認できた(図3)。

図3 ALOS画像と流行地植生、土地利用の情報



黄色：水田で *O. h. nosophora* 生息(+)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Kumagai T, Osada Y, Ohta N, Kanazawa T. Peroxiredoxin-1 from *Schistosoma japonicum* functions as a scavenger against hydrogen peroxide but not for nitric oxide.

Molecular and Biochemical Parasitology, 164: 26-31, 2009. (査読有)

Nihei N, Komagata O, Kobayashi M, Saitoh Y, Mochizuki K, Nakamura S. Spatial analysis and remote sensing for monitoring systems of *Oncomelania nosophora* following the eradication of schistosomiasis japonica in Yamanashi Prefecture.

Journal of Infectious Diseases, 19: 125-132, 2009. (査読有)

Osada Y, Shimizu S, Kumagai T, Yamada S, Kanazawa T. *Schistosoma mansoni*

infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators. International Journal for Parasitology, 39: 457-464, 2009. (査読有)

Zhou XN, Ohta N, Utzinger J, Berquist R, Olveda RM. RNAS(+): A win-win collaboration to combat neglected tropical diseases in Southeast Asia.

Parasitology International, 57: 243-245, 2008. (査読有)

太田伸生 国内問題としての Neglected diseases.

Clinical Parasitology, 19: 17-20, 2008. (査読なし)

Ohta N, Waikagul J. Disease burden and epidemiology of soil-transmitted helminthiases and schistosomiasis in Asia: the Japanese perspective.

Trends in Parasitology, 23: 30-35, 2007. (査読有)

Kojima S, Aoki Y, Ohta N, Tateno S, Takeuchi T. School-health-based parasite control initiatives: extending successful Japanese policies to Asia and Africa.

Trends in Parasitology, 23: 54-57, 2007. (査読有)

Lu SH, Kumagai T, Ai QH, Yan XL, Ohmae H, Yabu Y, Li SW, Wen LY, Maruyama H, Ohta N. Evaluation of the antihelminthic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols.

Parasitology International, 55: 63-68, 2006. (査読有)

[学会発表](計 8 件)

Ohta N, Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R, Kim HS, Wataya Y. Therapeutic effects of a synthesized compound on schistosomiasis mansoni: two different effects on worm killing and anti-fecundity in murine experimental infection.

17<sup>th</sup> International Congress of Tropical Medicine and Malaria, October 2008, Jeju, Korea.

Zhou XN, Ohta N, Utzinger J, Berquist R, Olveda RM. RNAS(+): A win-win collaboration to combat neglected tropical diseases in Southeast Asia. Ibid.

Shimogawara R, Kumagai T, Itagaki A, Nihei N, Saito Y, Ohta N. The

comparison of susceptibility of *Schistosoma japonicum* Yamanashi strain against *Oncomelania* spp. from various areas.

Ibid

Kumagai T, Shimogawara R, Osada Y, Kanazawa T, Ohta N. Direct gene suppression of peroxiredoxins from *Schistosoma japonicum* in the portal vein by in vivo RNA interference.

Ibid

Ohta N. Surveillance for schistosomiasis after the interruption of transmission in Japan.

WHO Meeting on Schistosomiasis Control 2008, August, 2008, Salvador, Brasil.

Ohta N. New compound of anti-schistosomal effects - Searching a new tool for disease control.

2<sup>nd</sup> Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases, November 2007, Nagasaki, Japan.

Nihei N. Epidemiological analysis of infectious diseases and the establishment of a surveillance system through remote sensing using ALOS images.

1<sup>st</sup> Joint PI Symposium of ALOS Data Nodes for ALOS Science Program, November 2007, Kyoto.

熊谷 貴、下河原理江子、板橋明子、谷口 齋恵、Wang T, Lu S, Wen L、太田伸生 . 日本住血吸虫 DNA 検出を応用したミヤイリガイ感染率判定法の開発

第 48 回日本熱帯医学会、2007 年 10 月、別府

〔図書〕(計 1 件)

太田伸生 感染症と生態防御、分担執筆、2008 年、NHK 出版、東京

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：新規抗住血吸虫剤

発明者：綿矢有佑、金 恵淑、平本晃子、佐藤 聡、太田伸生、熊谷 貴、下河原理江子、谷口齋恵

権利者：岡山大学

番号：100088904

出願年月日：平成 20 年 7 月 1 日

国内外の別：国内

〔その他〕

特記すべき事項なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 伸生 (OTA NOBUO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：10143611

(2)連携研究者

熊谷 貴 (KUMAGAI TAKASHI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40369054

二瓶 直子 (NIHEI NAOKO)

国立感染症研究所・客員研究員

研究者番号：70425677

(3)研究協力者

Wen Liyong

中国浙江省医学アカデミー・寄生虫病研究所・所長

Lu Shaohong

中国浙江省医学アカデミー・寄生虫病研究所・副所長

Wan Tianping

中国安徽省寄生虫病研究所・所長