

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19406010

研究課題名 (和文) 非中間宿主貝のミラシジウム誘引力を利用した新しい住血吸虫制御戦略、  
罔貝の研究

研究課題名 (英文) Novel strategy for control of schistosomiasis: Decoy snails that can  
reduce the number of miracidia reaching the intermediate snails

研究代表者

青木 克己 (AOKI YOSHIKI)

長崎大学・大学院国際健康開発研究科・特任教授

研究者番号：90039925

研究成果の概要 (和文)：

ケニアのビルハルツ住血吸虫症の流行地において、開発途上国において有効な新しい対策法として期待される罔貝 (住血吸虫の幼虫ミラシジウムは侵入出来るが感染型幼虫セルカリアまでには発育出来ない貝) となりうる淡水産貝を探し出すための、実験と調査を行った。罔候補貝を探すために下記の 4 種の実験と調査を行った。1. 貝分泌物のミラシジウム誘引力の測定、2. 罔貝へのミラシジウムの侵入確認、3. 実験室における罔貝との共存による中間宿主貝の住血吸虫感染率の低下の観察、4. 罔貝の流行地の川への大量放流による自然界における中間宿主貝の住血吸虫感染率の低下の観察。本研究においては、罔候補として調査地ケニア・クワレ地区に生息する 4 種の貝類、*Cleopatra ferruginea*, *Bellamya unicolor*, *Lanistes ovum*, *Melanoides sp* と中間宿主である *Bulinus globosus* を用い、またミラシジウムは学童の尿中の虫卵を湧き水中で孵化させて用いた。

実験調査結果の概要を記す。1. ミラシジウムを誘引する分泌物を排泄する貝類の検索。*B. globosus* は強力な誘引物質を排泄した。罔候補の中では *L. ovum* が *B. globosus* とほぼ同じ程度の強力な誘引物質を排泄した。*C. ferruginea* も誘引物質を排泄したがその活力は中等度であった。他 2 種の貝類からは誘引物質は分泌されなかった。2. 罔貝へのミラシジウムの侵入の確認。*B. globosus* へのミラシジウムの侵入は PCR により確認出来たが、罔候補の 4 種の貝類へのミラシジウムの侵入は確認出来なかった。3. 実験室における罔貝との共存による中間宿主貝の住血吸虫感染率の低下の観察。罔貝 *C. ferruginea* 30、60、150、300 個体と *B. globosus* 30 個体を飼育した水槽にミラシジウム 300 隻を放流し、*B. globosus* の住血吸虫感染を調べた。水槽中の罔貝の個体数が増えても *B. globosus* の感染率は罔貝が存在しない水槽での感染率、58%、と違いは見られなかった。また方法の異なる別の実験、箸箱の中央に罔貝を、一端に *B. globosus* を置き、他端にミラシジウムを放流し、*B. globosus* の感染率を調べた実験、においても、4 種の貝類の罔効果は見られなかった。4. 罔貝の流行地の川への大量放流による自然界における中間宿主貝の住血吸虫感染率の低下の観察。クワレ地区の Kadingo 川の 3 地点で一年間 *B. globosus* の個体数と住血吸虫感染率を観察した後、観察地点にその推定個体数の 1-3 倍の罔候補 *C. ferruginea* を放流し、その後一年間 *B. globosus* の個体数と住血吸虫感染率の変動を観察した。有意の差は見られなかったが、3 地点全てでわずかではあるが罔候補貝の放流後は *B. globosus* の感染率が低下した。

以上の実験・調査結果は *C. ferruginea* と *L. ovum* が罔貝としての条件を一部満たすことを明らかにした。しかしクワレ地区には強力な罔効果を発揮する貝類は生息していないようである。

研究成果の概要（英文）：

Decoy snails could be used as a new tool for the control of schistosomiasis in the developing countries. The present study was attempted to find the decoy snail candidate in main species of non-susceptible snails at the endemic area of schistosomiasis hematobia, in Kwale, Kenya. We studied 1) miracidial chemotaxis generated by excretion and secretion from snails (snail-conditioned water: SCW), 2) miracidial penetration in snails, 3) assessment of decoy effect in non-susceptible snails in laboratory, and 4) field application of the decoy snail candidate at the transmission sites. The snails used were susceptible snail *Bulinus globosus* and non-susceptible snails *Cleopatra ferruginea*, *Bellamya unicolor*, *Lanistes ovum*, *Melanoides* sp. The miracidia used were from the eggs obtained from the school children in Kwale.

Results: 1) Miracidial chemotaxis generated by SCW. SCW from *B. globosus* elicited the highest miracidial response. The response of miracidia to SCW from *L. ovum* mimicked those generated by *B. globosus*. Miracidia showed slight positive chemotaxis to SCW from *C. ferruginea*. Other two species did not elicit the response. 2) Miracidial penetration in snails. PCR confirmed miracidial penetration in *B. globosus*, but did not show the presence of miracidia in other snails. 3) Assessment of decoy effect in candidate snails in laboratory. We attempted to find whether interposed non-susceptible snails could protect the susceptible snails from infection when susceptible and non-susceptible snails both occupied the same space. In other experiment, non-susceptible snails were placed at the center of the channels. Then *B. globosus* was placed at one end and miracidia were introduced at the other end. In any experiments, we failed to find that interposed non-susceptible snails protected *B. globosus*. 4) Field application of decoy snail candidate at the transmission sites. After one year snail survey at 3 study sites, the population of non-susceptible snail, *C. ferruginea*, was raised to the density 3 times bigger than the original by introduction of huge number of *C. ferruginea* collected from other breeding sites. Then the follow-up snail survey was conducted for one year more. The results showed a slight reduction in the infection rate of *B. globosus* at all sites, but there was no statistical significance.

Discussion: The present study showed that some snails breeding in our study area elicited miracidial response. However, the present study suggests that frequency of infection in a natural environment might not be influenced by the presence and density of non-susceptible snails.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

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：ビルハルトツ住血吸虫、ケニア、対策法、罔貝、ミラシジウム、侵入、走化性運動、

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫症は開発途上国を中心に74ヶ国で流行し、感染者の数は2億人に達し、緊急の対策の必要性が叫ばれている熱帯病の一つである。日本はかつて種々の対策法を活用して住血吸虫症の撲滅に成功した。開発途上国では、しかし、既存の対策法（集団治療、安全水供与、衛生教育、中間宿主対策など）は種々の負の付帯要因（劣悪な生活環境、住民の対策計画への非協力、対策予算・人材の欠如、インフラの未整備、伝統的観念の存在など）により、その効果を発揮できていない。そこで開発途上国に存在する負の要因の存在下に於いても効果を発揮する新しい住血吸虫症対策法の開発が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は住血吸虫症の新しい対策法の候補の一つとして期待される罔貝（住血吸虫の幼虫ミラシジウムは侵入するが、感染型幼虫セルカリアにまで発育出来ない貝）となりうる淡水産貝を住血吸虫症の流行地で探し出すことを目的とする。罔貝はミラシジウムの中間宿主貝への侵入数を激減させるので、流行地への罔貝の大量放流により、中間宿主貝の感染率が低下し、流行地住民の感染の危険性の低下が期待される。

住血吸虫ミラシジウムの貝への感染は、ミラシジウムが貝より分泌される分泌物へ誘引されて貝に近づき、接触して侵入することが解っている。そこで、本研究は流行地に生息する貝の中から候補貝を探し、その罔効果を調べることを目的とする。目的を達成するために、ケニア沿岸州クワレ地区のビルハルトツ住血吸虫症流行地に於いて、下記の4種の調査・実験を行った。

- 1) ケニア・クワレ地区に生息する淡水産貝を採集し、それらの貝の分泌物へのミラシジウムの走化性運動（分泌物のミラシジウム誘引力）を観察した。
- 2) 候補となる罔貝へミラシジウムが侵入するか否かを調べた。
- 3) 中間宿主貝を罔候補貝と一緒に実験室にて飼育し、ミラシジウムを感染させ、中間宿主貝の感染率の低下を観察した。
- 4) 流行地の川に罔貝を大量に放流し、中間宿主貝の住血吸虫感染率の低下を観察した。

上記実験調査結果からケニア・クワレ地区に生息する住血吸虫症対策に活用出来る罔貝候補を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 貝分泌物へのミラシジウムの走化性運動の観察。

ミラシジウムは貝の分泌物に走化性運動を示し、貝の周囲に集合することが報告されている。我々はミラシジウムの集合を定量的に測定出来る方法を開発した。矩形毛細管中にミラシジウムを遊泳させ、毛細管の一端に分泌物を注入し、注入部位に集合するミラシジウムを1分間ビデオに記録し、後日、ミラシジウムの集合の程度を解析した。

貝分泌物への走化性運動はクワレ地区で採集した5種（うち一種はビルハルトツ住血吸虫の中間宿主である *Bulinus globosus*、）に於いて測定した。

2. ミラシジウムの貝への侵入の観察

Humburger et al.(2001)に準じて PCR を用いて貝にミラシジウムが侵入したか否かを判定した。

3. 実験室における罔貝の存在による中間宿

主貝のミラシジウム感染率の低下の観察。下記の2種の実験を行った。

3. 1. 罔貝として *Cleopatra ferruginea* を中間宿主貝 *B.globosus* と 50x30x30cm の水槽と一緒に飼育し、そこにミラシジウムを300隻放流し、39日後に *B. globosus* の感染の有無を、貝からのセルカリアの泳出あるいは貝体内のセルカリアの検索によって調べた。水槽に飼育された *B.globosus* 数は30個体で *C. ferruginea* の数は0-300個体であった。

3. 2. 238x23x10mm の箸箱の中央に金網に閉じ込められた罔貝(1-5個体)を置き、一端に *B. globosus* 一個体を置き、他端にミラシジウム3隻を放流し、*B. globosus* の感染が罔貝の存在により阻止されるか否かを観察した。

4. 流行地の川への罔貝の大量放流が自然界に生息する *B. globosus* の住血吸虫感染率を低下させるか否かの観察。

2007年8月よりクワレ地区の Kadingo 川の6ヶ所で月一回の中間宿主貝 *B.globosus* の個体数と住血吸虫感染率の調査を開始した。2008年8月と2009年8月に罔貝候補として *C.ferruginea* を他の生息地より大量に収集し、観察地の罔貝の生息数の1-3倍の個体数を放流し、罔貝の放流が自然界に於ける *B. globosus* の住血吸虫感染率の低下を起こすかどうかを観察した。貝の自然界に於ける個体数の推測はマーク・アンド・リリース法によった。

なお本実験調査に使用した住血吸虫ミラシジウムはクワレ地区の学童の尿より採集した虫卵を湧き水中で孵化させ、活発に遊泳している孵化して2時間以内のミラシジウムを使用した。

#### 4. 研究の成果

4. 1. 貝分泌物へのミラシジウムの走化性運動の観察。

本実験には中間宿主である *B. globosus* と非中間宿主4種 (*C.ferruginea*, *Bellamyia unicolor*, *Melaroides spp*, *Lanistes ovum*, ) を使用した。

図1に矩形毛細管を用いたミラシジウム貝分泌物への走化性運動の測定法と *B.globosus* へのミラシジウムの反応を示している。分泌物が毛細管の一端(Cの端)に注入されると直ちに毛細管のC部分にミラシジウムが集合する。毛細管を遊泳するミラシジウムの約90%がC部分のみを遊泳ようになる(注入前にはミラシジウムは全ての部分を均等に遊泳するのでC部分を遊泳するミラシジウムは約30%である)。*B. globosus* は強力なミラシジウム誘因物質を分泌することが解る。

図1

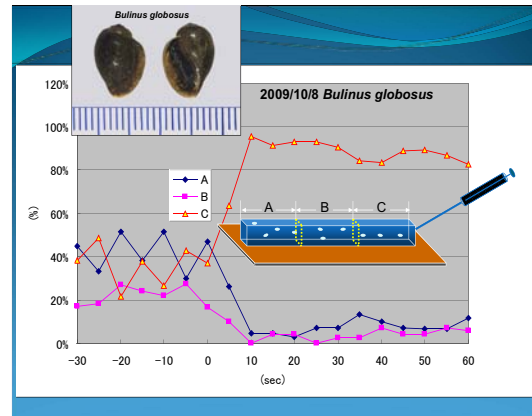


図2は *C.ferruginea* の分泌物へのミラシジウムの集合の様子を示している。強くはないがある程度の誘引力を有している。

図2

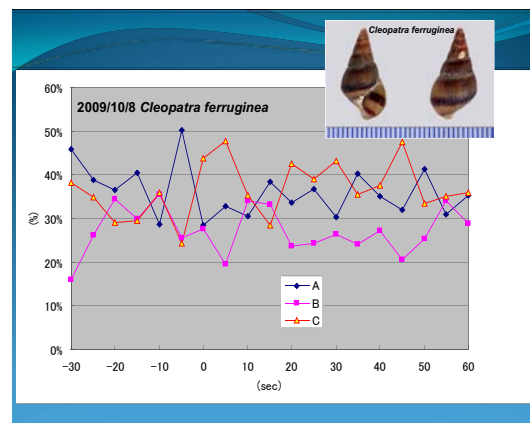
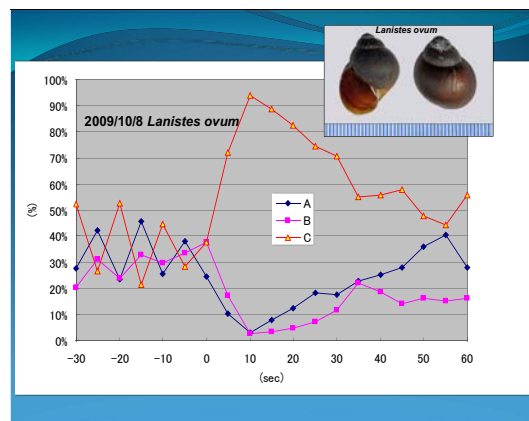


図3は *L.ovum* の分泌物へのミラシジウムの集合の様子を示している。*B. globosus* の分泌物とほぼ同程度の強いミラシジウム誘引力を示している。

図3



他の2種類の貝類の分泌物にはミラシジウムの誘引活性は見られなかった。

#### 4. 2. ミラシジウムの貝への侵入の確認

Humberger et al(2001)の方法は *B.globosus* を用いた実験では貝へミラシジウムが1隻侵入してもその存在を確定出来る方法である。この方法を用いてコップに湧き水を入れ、そこに罔貝候補を1個体飼育し、そこに10隻のミラシジウムを放流し、放流1時間後と3日後にPCRにてその貝へのミラシジウムの侵入を調べた。

実験に用いた罔貝候補は、*B. unicolor*、*L.ovum*、*C.ferruginea*、*Melanoides sp*である。

いずれの種に於いても、ミラシジウム放流後1時間でも、3日後でも、検体(いずれの種でもそれぞれ4個体)からはミラシジウムの特異なDNAバンドは検出されなかった。

#### 4. 3 実験室に於ける罔貝の存在による中間宿主貝のミラシジウム感染率の低下の観察

本実験では下記の2種の実験を行った。

4. 3. 1. 罔貝と *B. globosus* を水槽中に飼育し、そこにミラシジウムを放流し *B.globosus* の感染率が低下するか否かを観察した。結果を表1に示す。*B.globosus* 30個体と同時に飼育する罔貝 *C.ferruginea* の個体数を300に増やしても、*B.globosus* の感染率は52.4%と罔貝が存在しない条件での感染率と変わらない。

表1

No. of <i>B. globosus</i> bred**	No. of <i>C. ferruginea</i> bred**	No. of <i>B. globosus</i> survived	No. of <i>B. globosus</i> infected***	% infection
30	0	19	11	57.9
30	30	23	18	65.2
30	60	24	18	75.0
30	150	21	12	57.1
30	300	21	11	52.4

\* miracidial dose 200  
\*\* They were bred in an aquarium (50x30x20 cm) provided with spring water and fed on brine shrimp  
\*\*\*infection of snails was determined by shedding of cercariae and by examination of cercariae in the snail's stomach. 30 days post-exposure to miracidia

4. 3. 2. 筆箱の中央に罔貝を置き、一端に置いた *B. globosus* が他端で放流されたミラシジウムに感染するかいなかを調べた実験。

罔貝候補として使用した貝は、*C. ferruginea*、*B. unicolor*、*L. ovum*、*Melanoides sp*である。本実験ではこれらの貝を1-5個体罔として用い、ミラシジウムは全ての実験で3隻用いた。

罔貝を使用しない実験では *B. globosus*

9個体中7個体が感染した。

罔貝に *B. globosus* を用いると *B. globosus* は10個体中の2個体しか感染しなかった。

*C. ferruginea* を罔貝として用いた実験では、罔貝の個体数が1、3、5個体で、*B. globosus* の感染個体数は、8/9、6/8、8/10で、*C. ferruginea* の罔効果は見られなかった。

罔貝に *L. ovum*、*B. unicolor*、*Melanoides sp* をそれぞれ1個体用いた実験でも、*B. globosus* の感染個体数は、9/10、7/9、7/9で、罔効果は見られなかった。

#### 4. 4 自然界における罔貝の大量放流が中間宿主貝の住血吸虫感染率に及ぼす影響の観察。

クワレ地区で一年間 *B. globosus* の個体数の変動と住血吸虫感染率の変動を観察した後で、*C.ferruginea* を大量放流し、その後も *B.globosus* の個体数の変動と住血吸虫感染率を観察した。

クワレ地区のKadingo川6ヶ所の観察地点における中間宿主貝 *B.globosus* の個体数と住血吸虫感染率のほぼ2年間の季節変動を表2に示す。調査地の中でSite 4,5,6は川が乾燥して貝が採集されないことが多くまた、感染貝も少なかったため、この地への罔貝の放流はおこなわなかった。

Site 1,2,3においてはほぼ毎月中間宿主貝が採集され、感染貝も採集されている。この地での *B.globosus* の個体数と感染率の季節変動が明らかになった時点で、Site1,2,3に罔貝候補として *C.ferruginea* を2008年8月に大量放流した。Site 1には推定個体数の3倍の4,566個体を、Site2には推定個体数と同数の8,125個体を、Site3には推定個体数の3倍の4,020個体を放流した。*C.ferruginea* の放流前後の一年間の *B.globosus* の個体数と感染貝の数を表2に示している。

表2



表3は表2の結果をまとめた表である。Site 1では罔貝の放流前の一年間の中間宿主貝の感染率は8.7%であったが、罔貝の放流により感染率は5.8%に低下した。同様の結果がSite 2, Site 3でも見られる。しかしこれらの違いには有意の差は見られなかった。

表3

Site 1 : 2007年10月~2008年9月 : 6 / 69 = 8.7%
2008年10月~2009年9月 : 8 / 137 = 5.8%
Site 2 : 2007年10月~2008年9月 : 7 / 171 = 4.1%
2008年10月~2009年9月 : 10 / 295 = 3.4%
Site 3 : 2007年10月~2008年9月 : 5 / 84 = 6.0%
2008年10月~2009年9月 : 5 / 140 = 3.6%
合計 : 2007年10月~2008年9月 : 18 / 324 = 5.6%
2008年10月~2009年9月 : 23 / 572 = 4.0%

上記実験・調査結果はケニア沿岸州クワレ地区において、*C. ferruginea* と *L. ovum* がビルハルツ住血吸虫ミラシジウムの罔貝となりうる条件の一部を有すことを示している。しかし、この地区には中間宿主貝 *B. globosus* の自然界におけるビルハルツ住血吸虫の感染率を低下させることが出来る強力な罔効果をしめす淡水産貝類は生息していないようである。

## 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 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 克己 ( AOKI YOSHIKI )

長崎大学・大学院国際健康開発研究科・特任教授

研究者番号 : 90039925

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

野田 伸一 (NODA SHINICHI)

鹿児島大学・多島圏研究センター・教授  
研究者番号 : 60112439

波部 重久 (HABE SHIGEHISA)

福岡大学・医学部・講師  
研究者番号 : 70037430

堀尾 政博 (HORIO NASAHIRO)

長崎大学・熱帯医学研究所・特任教授  
研究者番号 : 90131937

N. D. Muhoho

ケニア中央医学研究所・主任研究員