

令和元年6月21日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05278

研究課題名(和文) フィリピンの住血吸虫性肝線維化症ハイリスク集団における早期診断及び予防法の確立

研究課題名(英文) Development of diagnostic tool for early stage of Schistosomal liver fibrosis in high risk population in Philippines.

研究代表者

菊池 三穂子 (KIKUCHI, Mihoko)

長崎大学・熱帯医学研究所・講師

研究者番号：40336186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：フィリピンの日本住血吸虫は、未だに81州中の28州に有病地が存在し、年間1200万人が感染のリスクがある。日本住血吸虫に繰り返し感染する事によって発症する肝線維化症は重篤な症状を示すが、未だに有効な治療法や予防法は確立されていない。ハイリスク集団であるレイテ島の対象者に便中虫卵検査、血中抗虫卵抗体検査、腹部超音波検査を行った。肝臓の肝線維化症の重症度により3群に分類した。各群の対象者に対し血清中の生理活性物質やmiRNAの発現動態について解析を行った。この結果、肝線維化症マーカーとして、miRNA-150-5p、miRNA-93-5p、ヒアルロン酸などの有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

住血吸虫感染後、数年を経てから発症する進行した肝線維化症は不可逆性であり、フィリピンの高度浸淫地における健康問題、経済的損失は多大である。肝線維化症憎悪に関係する早期診断用バイオマーカーを開発しようという試みは独創的である。本研究の結果、いくつかのバイオマーカーが有用である事が示唆された。実用化には、今後さらに検討を重ねる必要があるが、この成果は、日本住血吸虫症だけではなくメコン住血吸虫感染後に発症する肝線維化症対策に応用可能であると考えている。ツールとしての肝線維化症簡便診断法が開発される事で、治療法あるいは予防法における画期的な進展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In Philippines still have 28 state of Schistosoma japonica endemic area in 81 state and 12,000,000 people have risk of infection. Schistosomiasis is a parasitic disease caused by blood flukes. After Repeated infection was induced severe clinical form for liver fibrosis. There are no effective treatments to liver fibrosis except to inhibit to infection in the present state. In this study, a total of 75 individuals were recruited for the longitudinal study from the initial 895 people examined in the cross-sectional study in Lyte, the Philippines. At baseline, 31 patients had typical network Liver fibrosis (T3), 17 had mild and atypical hepatic fibrosis (T1&2), and 27 had no ultrasound detectable fibrosis in the liver (T0). It was analyzed physiologically active substance in the serum and expression kinetics of miRNA on each group. These results was suggested that possibility of miRNA-150-5p, miRNA-93-5p and a hyaluronic acid as a marker for Schistosomal liver fibrosis.

研究分野：寄生虫学

キーワード：日本住血吸虫症 肝線維化症 フィリピン共和国 レイテ島 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

日本住血吸虫症は中国、フィリピン、インドネシアなどに分布し、その慢性期症状である肝線維化症は、徐々に症状が進行し衰弱をもたらすことから、経済的な損失や健康への障害等の被害は甚大である。中国などでは経済の発展に伴い農業の機械化や環境改善が進み、新規感染者数をここ数年で激減させることに成功したが、フィリピンやインドネシアでは経済的な問題からコントロールには時間がかかるだろうと予測されている(Zhou XN. et al. the Regional Network on Asian Schistosomiasis and Other Helminth Zoonosis (RNAS+) workshop report, 2013)。特に日本住血吸虫は人畜共通寄生虫であることから、固有宿主である水牛や家豚への感染を防御する必要がある。このような状況下において、感染防御ワクチンが待望されているが、現況では実用に耐えうるようなワクチンは開発されていない(William HEG. et al. Parasite Immunology. 2012)。従って、現時点においてはプラジカンテルによる駆虫以外に対処する方法はない。

日本住血吸虫性肝線維化症の早期診断、発症予防法や治療法を確立する為には、解決すべき様々な問題点がある。住血吸虫感染頻度や強度を正確に把握する為には、検出感度が低い便中虫卵検査に変わりうる活動性感染の簡易診断法や、特殊技能や高価な機械が必要となる超音波診断よりも簡便で、早期病態変化を検出可能とする血中に存在するバイオマーカーを指標とした肝線維化症の診断法などの開発が必要となる。住血吸虫性肝線維化症は、一般的な肝硬変と異なる病態を示し、一般肝臓用生化学的検査では病態は把握できない。近年になって、肝線維化症の重症度を診断する方法として、血中サイトケラチン 18 や tissue inhibitor of matrix-metallo-protease-1 (TIMP-1) (Manivannan B et al. Infection and Immunity, 2011, Xin-ya H, Ellis MK, International J. Parasitology, 2011) または、その他の生理活性物質がバイオマーカーとして有用だと報告や、重症化阻止に用いるプラジカンテル投与方法(Abdel-Hafeez EH, et. al., Parasitol Res., 2012) などが主にマンスン住血吸虫症で報告されているが、日本住血吸虫症での知見を集積していく必要がある。住血吸虫のコントロールはプラジカンテルの集団投与、中間宿主の宮入員の駆除などによる対策により新規感染を無くすことに成功したとしても、住血吸虫性肝線維化症は完治することはない。

フィリピンにおける若年性での住血吸虫性肝線維化症の実態調査(科研基盤B海外学術;平成22~24年)のため、高度浸淫地であるフィリピン国ルソン島南端ソルソゴン州の浸淫地に点在する16の小学校の内、小学5、6年生1200名を対象として、血中抗体価検査、糞便虫卵検査、腹部超音波検査を施行した結果、血中抗体価陽性率が学童の20%以上を示す小学校が7校、10%以上が5校存在していた。特にTulay小学校は90%の抗体価陽性率を示した。50歳以上になると60%以上が肝線維化症を発症していた。ソルソゴンでは2011年から、プラジカンテルによる集団治療が開始されているが、便中虫卵検査の結果では、虫卵陽性者が散見し、Tulay小学校では24%の非常に高い再感染率を示した(Kato-Hayashi, N., et al., JPN.J. Vet. Parasitol.)。この結果、Tulay地域のような高度浸淫地では、住血吸虫性肝線維化症に対するハイリスク集団が存在することが明らかとなった。このような地域では、プラジカンテルによる年1回の集団治療だけでは対策が不十分であること、感染員対策、保有宿主対策などの総合的な日本住血吸虫対策や適切なインターバルでの薬剤投与が必要であることを示唆している。さらに、従来の対策に加えて肝線維化症発症に対する早期診断や発症予防法、重症化阻止、治療法などの対策を講じない限り10数年後も同様な状況が継続されることは明らかであり、早急な対策を講じる必要がある。

2. 研究の目的

フィリピンの日本住血吸虫は、未だに81州中の28州に有病地が存在し、年間1200万人が感染のリスクがあるが、プラジカンテルによる集団治療以外の有効な対策はとられていない。これまでの研究代表者らの調査により、フィリピンの日本住血吸虫症浸淫地での30歳以下の若年性肝線維化症には、免疫応答に関わる遺伝要因や、高い再感染率が発症要因になっていることが明らかとなった。日本住血吸虫に繰り返し感染する事によって発症する肝線維化症は重篤な症状を示すが、未だに有効な治療法や予防法は確立されていない。本研究は、肝線維化症ハイリスク集団を対象とした4年間のコホート研究により患者の病態解析及び発症に関わる免疫応答性を検討し早期診断、発症予防法や治療法の開発を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

フィリピン、ルソン・ソルソゴン州、東ミンドロ州、東ビサヤ州の高度浸淫地で疫学調査(便中虫卵検査、血中抗体価、超音波診断)を行い対象者のスクリーニングを行った。

超音波診断は、ポータブル超音波診断器 (Vscan Pocket Ultrasound, GE Healthcare, United Kingdom) を用いて行った。診断は大前ら (Ohmae *et al.* 1992) の方法に従い、WHO の推奨による些少な変更を加え、治療前、プラジカンテルによる治療後 12 か月に行った。

肝臓の超音波診断画像は、エコジェネティックパターンと門脈の肥厚化の程度により、以下の 3 病型に分類した。(1) 正常または、タイプ 0: 肝臓に病変を認めず、門脈の肥厚化も認められない。(2) 軽度肝線維化、またはタイプ 1, 2: 肝臓に線状または管状の病変を認め、門脈のわずかな肥厚化 (6mm) を認める。(3) 線維化症または、タイプ 3: 顕著なエコジェネティックバンドによる隔壁により、3個以上の幾何学ブロックが形成される。

また、クライテリアに従い、開始時またはフォローアップ期間中に肝線維化症の進行の程度を観察し、開始時には、正常であったが、12 か月後に線維化症を示した場合には、進行性肝線維化症 (DF) 変化が認められなかった場合には、恒常的肝線維化症 (PF) 軽度肝線維化症であったが、さらに重度の肝線維化症を示した場合には進行性肝線維化症 (PrF) 重度肝線維化症から改善が認められた場合に可逆性肝線維化症 (RF) とした。

対象者の血清から miRNeasy serum/plasma kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出したトータル RNA から、Quantitative PCR 法により標的とした miRNA の発現量を測定した。miRNA の発現量は内在恒常発現遺伝子である SNORD95 を用いて標準化し、 $2^{-\Delta Ct}$ 法を用いて算出した ($Ct_{(miRNA \text{ of interest})} - Ct_{(reference \text{ gene})}$)。

4. 研究成果

コホート調査研究により、ハイリスク集団と考えられたレイテ島 (サン・ビンセント、サン・アントニオ地区) のインフォームドコンセントが得られた 895 名のスクリーニング結果から、110 名の対象者に便中虫卵検査、血中抗虫卵抗体検査、腹部超音波検査を行った。腹部超音波検査結果から、肝臓の肝線維化症の重症度により以下の 3 グループに分類した。(1) 正常または、タイプ 0: 肝臓に病変を認めず、門脈の肥厚化も認められない。(2) 軽度肝線維化、またはタイプ 1, 2: 肝臓に線状または管状の病変を認め、門脈のわずかな肥厚化 (6mm) を認める。(3) 線維化症または、タイプ 3: 顕著なエコジェネティックバンドによる隔壁により、3 個以上の幾何学ブロックが形成される。

対象者に対し追跡調査を行い、最終的に 75 名の対象者に対し、血中生理活性物質による肝線維化マーカー、血清中 miRNA の発現動態が認められるかについて解析を行った。(Table 1. 2)

Table 1. Clinical characteristics of participants in the longitudinal study (N=75).

Fibrosis Grade	Type 0 (n = 27)	Type 1, 2 (n= 17)	Type 3 (n=31)
Sex M/F	18/9	12/5	17/14
Age, years: Mean \pm SD	36.9 \pm 6.9	36.7 \pm 5.6	37.8 \pm 6.4
AST, IUL NS	21 \pm 8.7	18 \pm 6.3	25 \pm 8.9
Abnormal (%)	7.4	5.7	6.5
ALT, IUL NS	35 \pm 7.2	29 \pm 11.2	32 \pm 7.2
Abnormal (%)	11.1	11.8	12.9
Kato-Katz (+)	17	10	18
Mild (1-99 EPG)	12	7	11
Moderate (100-399 EPG)	5	2	5
Heavy (>400 EPG)	0	1	2

P values were determined using a one-way ANOVA test (NS = no significant difference, * = $P < 0.05$); EPG egg per gram. AST; Aspartate aminotransferase, ALT; Alanine aminotransferase.

Table 2. Dynamics of hepatic fibrosis severity (type) at baseline and at 12 months after praziquantel treatment among patients enrolled in the prospective longitudinal study.

Hepatic fibrosis, baseline ¹	Hepatic fibrosis, after 12 months ¹			Total (n)	DF (%)	PF (%)	PrF (%)	RF (%)
	T0	T1, 2	T3					
T0	23	5	0	27	5 (18.5)	-	-	-
T1, 2	11	4	2	17	-	4 (23.5)	2 (11.8)	11 (64.7)
T3	0	0	31	31	-	31 (100)	-	0 (0)
Total (n)	34	10	33	75	5	35	2	11

Abbreviations: Developed fibrosis (DF), Persistent fibrosis (PF), Progressive fibrosis (PrF), Reversed Fibrosis (RF), Hepatic fibrosis Types 0 (T0), 1 and 2 (T1, 2) and 3 (T3)

この結果、対象患者血中の miRNA-150-5p は正常患者で肝線維化症患者に比較して有意に発現量が増加し、miRNA-93-5p は、有意に低下していた。miR-122 は最も肝臓での発現量の多い miRNA であり、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス感染、あるいは薬による肝線維症を持つ患者では、血清中の miR-122 の発現量が減少する事が報告されている。しかし、住血吸虫性肝線維化症患者で、肝線維化症を認めない患者との間に発現量の増減は認められなかった。(Figure 1)

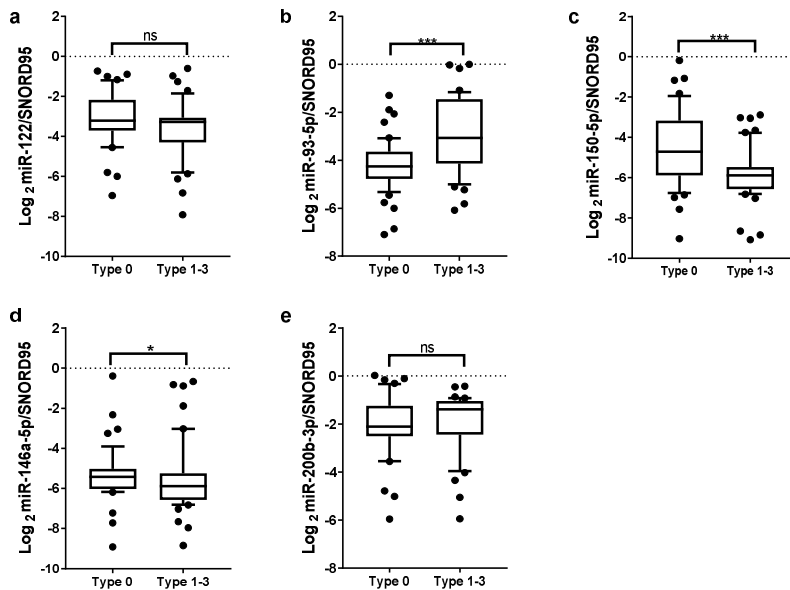


Figure 1. Expression levels of the candidate miRNAs in serum of schistosomiasis japonica patients without (Type 0) and with (Type 1-3) ultrasound detectable hepatic fibrosis. Boxes represent the interquartile range of the data with lines across the boxes indicate the median values. The hash marks above and below the boxes indicate the 90th and 10th percentiles, respectively. *P* values were determined using a Mann-Whitney *U* test (ns=no significant difference, **P*<0.05, ***=*P*<0.001).

この事は、住血吸虫病患者では、肝炎ウイルスによる肝線維化症とは異なり、肝細胞の壊死によるものではない事が原因と考えられた。miR-150 は、腎臓および心臓の線維症で発現量の増減が認められるという報告がある。それは、miR-150 の発現により integrinβ3、燐酸化された Smad3、および COL1A1 の発現を調節して線維芽細胞の反線維化症効果に影響を及ぼしたと考えられた。miRNA-93-5p は IL-8、vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現に関わる事や大腸癌で発現量が減少する事が報告されているが、住血吸虫性肝線維化症での機能的な関与については明らかではない。miRNA-146a、miRNA-122 は有意な増減は認められなかった。12 か月後の対象者においても、同様の傾向が認められた。

また、血中肝線維化マーカーや肝線維化症に関わる生理活性物質としては、血清中のヒアルロン酸レベルは正常患者で肝線維化症患者に比較して有意に高かった(*P*<0.0001)。(Figure 2)

これらの結果から、肝線維化症マーカーとして、miRNA-150-5p、miRNA-93-5p、ヒアルロン酸などを用いる事の可能性が示唆された。しかし、マンノース結合レクチン (MBL) のレベルには、有意差が認められなかった。

住血吸虫症感染後、数年を経てから発症する進行した肝線維化症は不可逆性であり、フィリピンの高度浸淫地における健康問題、経済的損失は多大である。肝線維化症憎悪に関係する早期診断用バイオマーカーの開発は重要な課題である。

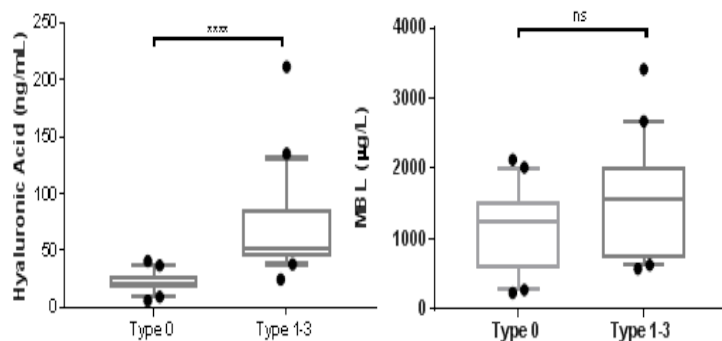


Figure 2. Serum levels of hyaluronic acid (a) and mannose binding lectin (b) in schistosomiasis japonica patients without (Type 0) and with (Type 1-3) ultrasound detectable hepatic fibrosis. Boxes represent the interquartile range of the data with lines across the boxes indicate the median values. The hash marks above and below the boxes indicate the 90th and 10th percentiles, respectively. *P* values were determined using a Mann-Whitney *U* test (ns = no significant difference, **** = *P* < 0.0001).

本研究の結果、いくつかのバイオマーカーが有用である事が示唆された。実用化には、今後さらに検討を重ねる必要があるが、本研究で得られた成果は、日本住血吸虫症だけでなくメコン住血吸虫感染後に発症する肝線維化症対策に応用可能であると考えている。

ツールとしての肝線維化症簡便診断法の開発が可能となれば、治療あるいは予防法における画期的な進展が期待でき、フィリピンの高度浸淫地におけるハイリスク集団への早期診断、発症予防法や治療法などの確立は、浸淫地の十数年後にどのような未来をもたらせるか？という意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Sato MO, Rafalimanantsoa A, Ramarokoto C, Rahetilahy AM, Ravoniarimbina P, Kawai S, Minamoto T, Sato M, Kirinoki M, Rasolofo V, De Calan M, Chigusa Y. Usefulness of environmental DNA for detecting *Schistosoma mansoni* occurrence sites in Madagascar. *Int J Infect Dis.* 2018;76:130-136. 査読有

Moendeg KJ, Angeles JMM, Nakao R, Leonardo LR, Fontanilla IKC, Goto Y, Kirinoki M, Villacorte EA, Rivera PT, Inoue N, Chigusa Y, Kawazu SI. Geographic strain differentiation of *Schistosoma japonicum* in the Philippines using microsatellite markers. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jul 10;11(7):e0005749. doi: 10.1371/journal.pntd.0005749. 査読有

Chua JC., Tabios IK., Tamayo PGP., Leonardo LR., Fantanilla IKC., Fornillos RJC., Chaves ERC., Agatsuma T., Kikuchi M., Kato-Hyashi N., Chigusa Y. Genetic comparison of *Oncomelania hupensis quadrasi* (Gastropoda: Pomatiopsidae), The intermediate host of *Schistosoma japonicum* in the Philippines, based on 16S ribosomal RNA sequence. *Science Diliman.* 2017; 29(2) 32-50. 査読有

Deloer S, Nakamura R, Kikuchi M, Moriyasu T, Kalenda YDJ, Mohammed ES, Senba M, Iwakura Y, Yoshida H, Hamano S. IL-17A contributes to reducing IFN- γ /IL-4 ratio and persistence of *Entamoeba histolytica* during intestinal amebiasis. *Parasitol Int.* 2017;66(6):817-823. 査読有

Chadeka EA, Nagi S, Sunahara T, Cheruiyot NB, Bahati F, Ozeki Y, Inoue M, Osada-Oka M, Okabe M, Hirayama Y, Changoma M, Adachi K, Mwendu F, Kikuchi M, Nakamura R, Kalenda YDJ, Kaneko S, Hirayama K, Shimada M, Ichinose Y, Njenga SM, Matsumoto S, Hamano S. Spatial distribution and risk factors of *Schistosoma haematobium* and hookworm infections among schoolchildren in Kwale, Kenya. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017, 11(9):e0005872. 査読有

Ke XD, Shen S, Song LJ, Yu CX, Kikuchi M, Hirayama K, Gao H, Wang J, Yin X, Yao Y, Liu Q, Zhou W. Characterization of *Schistosoma japonicum* CP1412 protein as a novel member of the ribonuclease T2 molecule family with immune regulatory function. *Parasites & Vectors.* 2017, 10(1):89. 査読有

Leonardo LR, Chigusa Y, Kikuchi M, Kato-Hayashi N, Kawazu S, Angeles JM, Fontanilla IK, Tabios IK, Moendeg K, Goto Y, Fornillos RJ, Tamayo PG, Chua JC. Review. Schistosomiasis in the Philippines: challenges and some successes in control. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 2016, 47(4): 651-666 査読有

Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MN, Apin J, Agsolid LM, Chua JC, Villacorte EA, Kirinoki M, Kikuchi M, Ohmae H, Haruki K, Chigusa Y. Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of *Schistosoma japonicum* in highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. Acta Trop. 2015, 141(Pt B):178-83. 査読有

Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, Furushima-Shimogawara R, Cherif MS, Mizukami S, Kikuchi M, Huy NT, Ohta N, Sasaki H, Hirayama K. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. Parasitol Int. 2015, 64(4):24-31. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

千種 雄一

CHIGUSA, Yuichi

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：20171936

中村 梨沙

NAKAMURA, Risa

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：50645801

本間 季里

HONMA, Kiri

長崎大学・医歯薬総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：70307940

(2)研究協力者

リディア レオナルド

Lydia, Leonardo

キムイアン タビオス

Kim Ian, Tabios

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。