

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 年度～2011 年度

課題番号：20406010

研究課題名（和文） フィラリア症根絶計画後半の課題とその解決

研究課題名（英文） Problems and their solution in the final stage of the Global Program to Eliminate Lymphatic Filariasis

研究代表者

木村 英作 (Kimura Eisaku)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：70153187

研究成果の概要（和文）：尿を検体とする免疫診断（尿 ELISA）は、フィラリア症（LF）感染率が非常に低い地域でも効率よく感染者を発見できることがわかった。すなわち尿 ELISA は LF の撲滅確認、あるいは再燃発見に有用と考えられる。機器を要する尿 ELISA に代わり、目視判定ができる尿診断法（ビーズ法）を開発した。また、媒介蚊調査のための LAMP 法（フィラリア遺伝子を検出する）を開発した。これらの方法は見落とされている流行地の発見にも有効なので、LF 撲滅計画の最終段階で大きな寄与ができる。

研究成果の概要（英文）：An immunodiagnosis using urine samples (urine ELISA) has been found effective in finding out filaria-infected individuals in very low endemic areas. The method will be useful to confirm elimination of filariasis or detect its resurgence. A new urine-based, visual diagnosis (beads method) has also been developed. It can replace urine ELISA in areas where sophisticated equipment is not available. A LAMP method to detect filarial DNA in mosquito vectors has been developed. These new methods will help discover “hidden” endemic foci, and thus contribute greatly in the final stage of the elimination program.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：フィラリア症、免疫診断、尿、IgG4、LAMP

1. 研究開始当初の背景

WHO の主導による世界リンパ系フィラリア症（LF）根絶計画（GPELF）は、2000 年に開始され 2020 年までの達成をめざす。その戦略は流行地住民の集団治療（MDA）で、年 1

回治療を原則的に 5 回繰り返す。これまで大きな成功を収めており、多くの流行国で感染者数が激減している。しかし、難問が控えている。根絶（撲滅）の確認と、再燃の発見・防止である。これまで以上に感度が良く、能

率的な診断法が必要であるが、現在のところ非常に高価な抗原検出キット ICT test しかない。我々は、血液によらず尿を検体とする免疫診断法（尿 ELISA—IgG4 抗体を検出）を開発し、実用化に向けて研究を進めている。一方、GPELF の進展に伴い、スリランカでは感染率が大幅に減少した。LF に対する住民の認識は弱まり、従来の‘集団採血による診断’に抵抗感を示しつつある。尿免疫診断と媒介蚊調査による疫学調査は住民に受け入れやすい。

2. 研究の目的

- (1) 尿 ELISA は MDA によって感染レベルが低下した流行地において、有用である（感度が高い）ことを確認する。
- (2) 同上の流行地において尿 ELISA による追跡調査を実施し、撲滅あるいは再燃を確認すると同時に、LF が自然消滅に向かう閾値、あるいは再燃をいち早く発見するためのインディケーターを検討する。
- (3) 尿 ELISA の応用により見逃がされている流行地を発見して根絶計画に寄与する。
- (4) 尿 ELISA に代わる新しい尿免疫診断法（機器を要しない方法）を開発し野外応用する。
- (5) フィラリア伝搬の程度を知るため、PCR 法、LAMP 法を導入して媒介蚊の感染率調査を実施する。
- (6) 象皮病患者の治療法の改善、対策法の検討、および象皮病発生の遺伝学的背景に関する研究を行う。

3. 研究の方法

- (1) 感染率が非常に低い流行地（Deniyaya）を選び、小学生を対象にして 5 回の MDA が尿中抗体価に及ぼす影響を追跡した。
- (2) かつて感染率が高かったが、MDA により感染率が激減した地域（Walgama, Ratnapura）を選んで、感染の自然消滅あるいは再燃を観察するための長期追跡調査を行っている。
- (3) LF に特異な症状（象皮病、陰囊水腫）を持つ患者に関する質問票を用い、住民より患者の分布と患者数に関する情報を集めて、隠れた流行地の推定を行い、さらに尿 ELISA を応用して流行の確認を行った。
- (4) 目視判定できる尿免疫診断法（ビーズ法）を開発し、野外調査に応用して感度（ICT test 陽性者を標準、 $n = 51$ ）、特異度（尿 ELISA 陰性者を標準、 $n = 1,066$ ）を得るとともに、小児（ $n = 345$ ）に応用して陽性率を ICT test と比較した。
- (5) 媒介蚊調査のため LAMP 法の開発し、野外調査に応用した。媒介蚊採集法の検討をした。

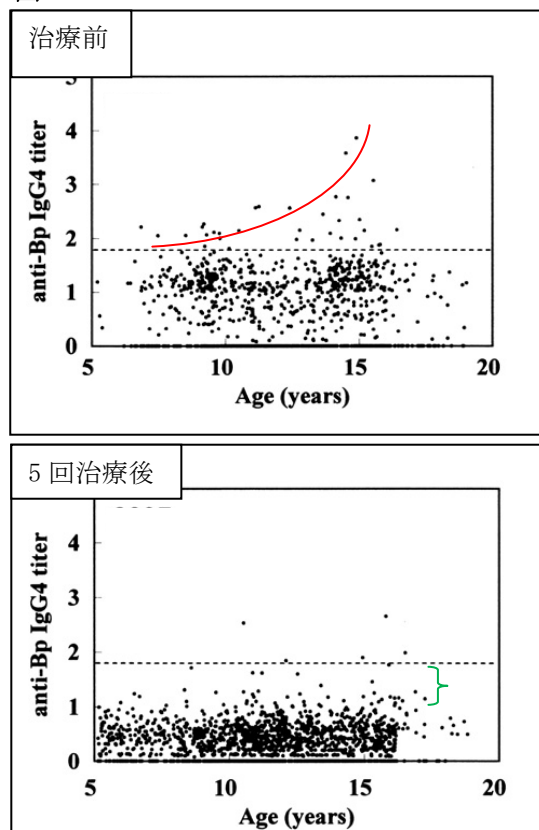
(6) 象皮病患者を登録し、定期訪問をしてケアの指導をおこなった。また、症状発生に関与する遺伝的背景を解析した。

4. 研究成果

(1) 尿診断の有用性

Matara 県 Deniyaya 地方の小学生（7 校、約 1,000 人/年）を 7 年間フォローして尿中抗体価の変動を調べた（図 1）。

図 1

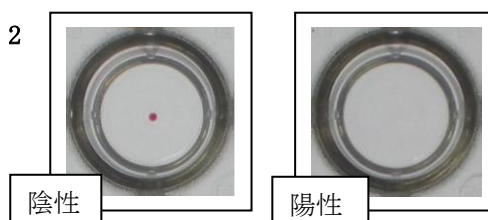


治療前に見られた年齢に伴う抗体価の漸増（赤色）は消失した。また、cutoff 線（横点線）以下の陰性者においても明確な抗体価の減少が認められた（緑色のスペース）。その後の調査で、治療後も抗体陽性だった生徒とその家族は全員、感染の可能性がないことが確認された。

(2) 新しい尿診断：ビーズ法

赤色のラテックス・ビーズを用い、目視で尿中 IgG4 抗体の有無を判定できる（図 2）。

図 2



感度は94.1%、特異度は97.5%であった。また、0～15才の小児を対象にした場合、ビーズ法は、ICT test より有意に高い陽性率（3.2% vs. 0.3%）を示した。ビーズ法は機器を要しないので途上国の野外調査に有用である。

(3) LAMP法の導入

媒介蚊の感染率を知るため、従来は蚊を1匹ずつ顕微鏡下で解剖していた。我々のLAMP法では60匹の蚊の中に1匹のミクロフィラリアが存在すればそのDNAを検出できるので、短時間に多数の蚊を処理して感染率を決定できる。LAMP法を野外調査に応用したところ、MDAにより感染がほとんどなくなった地域よりフィラリア感染蚊が発見された。定量的に効率よく蚊を採集するため、グラビッド・トラップ（図3）を用いた基礎実験が行われている。

図3 CDC Gravid Trap Model 1712

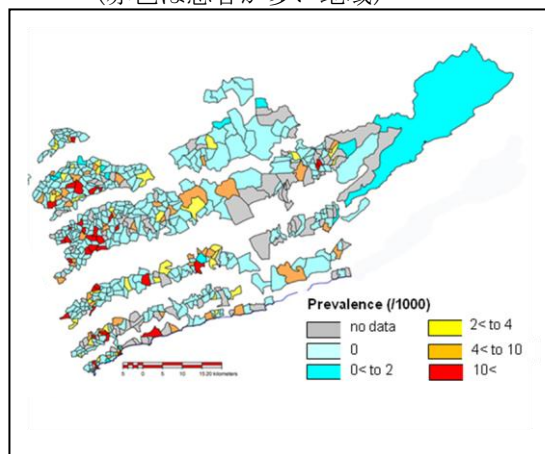


(4) 見逃されている流行地の発見

かつてフィラリア症の報告が無かったRatnapura県でアンケート調査を行ったところ、陰嚢水腫患者の存在が3村より報告されたので25歳以下の住民を対象に尿検体を採取しELISAを実施した(n = 1,785)。両村ともに抗体陽性率は2%以下で、フィラリア症の伝搬は存在しないものと考えられた。アンケート調査の信頼性はHambantota県で既に確認されている。すなわち、576人の村長より質問票で患者情報を得ると共に医師による診察を実施したところ、村長の情報と医師の診察結果はよく一致した（図4）。

一方、かつての紛争地域内での感染調査を実施するための準備が進行中である。

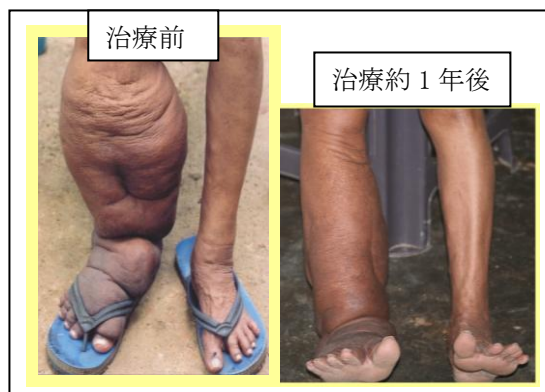
図4 Hambantota県で報告された陰嚢水腫患者数（村長の情報をGISを用いて分析）（赤色は患者が多い地域）



(5) 象皮病とその対策

Matara県の海岸部では、約100人の象皮病/リンパ浮腫患者が登録されており、Ruhuna大学・医学部の共同研究者により定期的な検診・治療・指導を受けている。基本は患部を水と石けんで洗浄し清潔を保つという単純な方法である（図5）。また、患者の血液サンプルの遺伝子解析が行われた。

図5 治療成功例



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12件）

① Weerasooriya MV, Itoh M, Islam MZ, Aoki Y, Samarawickrema WA, Kimura E. Presence and gradual disappearance of filaria-specific urinary IgG4 in babies born to antibody-positive mothers: A 2-year follow-up study. *Parasitology International*. 2008, 57: 386-389. 査

読(有)

②Weerasooriya MV, Isogai Y, Itoh M, Yahathugoda TC, Vidanapathirana KK, Mudalige MP, Kimura E. Distribution of filarial elephantiasis and hydrocele in Matara district, Sri Lanka, as reported by local leaders, and an immunological survey in areas with relatively high clinical rates. *Parasitology International*. 2008, 57: 390-395. 査読(有)

③Islam MZ, Itoh M, Takagi H, Islam AU, Ekram AR, Rahman A, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect urinary antibody against recombinant rKRP42 antigen made from *Leishmania donovani* for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008, 79: 599-604. 査読(有)

④Itoh M, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Takagi H, Samarawickrema WA, Nagaoka F, Kimura E. Effects of 5 rounds of mass drug administration with diethylcarbamazine and albendazole on filaria-specific IgG4 titers in urine: 6-year follow-up study in Sri Lanka. *Parasitology International*. 2011, 60: 393-397. 査読(有)

⑤Takagi H, Itoh M, Kasai S, Yahathugoda TC, Weerasooriya WA, Kimura E. Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. *Parasitology International*. 2011, 60: 493-497. 査読(有)

⑥Del Puerto F, Nishizawa JE, Kikuchi M, 他 8 人, Hirayama K. Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012, Mar;6(3):e1587. doi:10.1371/journal.pntd.0001587 査読(有)

[学会発表] (計 33 件)

①Kimura E. Urine-based immunodiagnosis with children to monitor mass drug administrations, confirm elimination and detect resurgence of filarial infection. 17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Sep.29-Oct.3, 2008. [Jeju, Korea]

②Kimura E. Prediction of clinical visceral leishmaniasis cases in early stages by rKRP42 urine-based ELISA.

17th International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Sep.29-Oct.3, 2008. [Jeju, Korea]

③Kimura E. Immunodiagnosis of lymphatic filariasis using urine samples and its field application in Sri Lanka and China. Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, Oct.13-14, 2008. [Bangkok, Thailand]

④Yahathugoda TC. Evaluation of two monitoring schemes after one year of Community Home-Based Care (CHBC) programme on morbidity control in lymphatic filariasis in three suburbs of Matara. 68th Annual Academic Sessions, Galle Medical Association. Sep.10-12, 2009. [Galle, Sri Lanka]

⑤長岡史晃. 組み換え抗原 SXP-1 結合高比重ラテックスビーズを用いた簡便なフィラリア症診断法の開発. 日本寄生虫学会西日本支部大会. 2009年11月7日. [大阪市立大学]

⑥Yahathugoda TC. A rapid assessment procedure (RAP) to assess distribution of lymphatic filariasis using geographical information systems (GIS). The XIIth International Congress of Parasitology. Aug. 15-20, 2010. [Melbourne, Australia]

⑦伊藤誠. 年一回の集団治療が尿中のフィラリア特異的 IgG4 抗体に及ぼす影響: スリランカにおける 7 年間の追跡調査結果. 第 66 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2010年11月6-7日. [岡山大学]

⑧Kimura E. Evaluation of urine-based IgG4 ELISA for detecting lymphatic filarial infection and the development of a visual diagnostic method with urine samples. 45th Annual Japan-US Joint Conference on Parasitic Diseases. Jan.10-11, 2011. [NIH, Tokyo]

⑨高木秀和. LAMP 法を用いた *Wuchereria bancrofti* DNA 検出法の開発. 第 67 回日本寄生虫学会西日本支部大会. 2011年10月7-8日. [アートシアター石川(金沢市)]

⑩木村英作 フィラリア症対策の過去・未来 ---日本の根絶成功と世界プログラム--- 第 52 回日本熱帯医学会大会・第 26 回日本国際保健医療学会学術大会合同大会 2011年11月4-5日. [東京大学]

[図書] (計 4 件)

①木村英作. 日本臨床社. 日本臨床新領域別症候群シリーズ No.8, 呼吸

器症候群(第2版), イヌ糸状虫症. 2008:
216-218.

②木村英作. 医学書院. 今日の治療指針
52巻, フィラリア症. 2010: 1.

③Itoh M, Takagi H. Springer. Kala Azar in
South Asia (Eds: Jha TK, Noiri E),
Mass-survey using urine and confirmation
by LAMP for control of visceral
leishmaniasis, 2011: 91-98.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 英作 (Kimura Eisaku)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 70153187

(2) 研究分担者

平山 謙二 (Hirayama Kenji)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 60189868

伊藤 誠 (Itoh Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90137117

高木 秀和 (Takagi Hidekazu)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90288522

(3) 研究協力者

Weerasooriya MV
Ruhuna Univ., Faculty of Medicine (Sri
Lanka), Professor
Yahathugoda TC
Ruhuna Univ., Faculty of Medicine (Sri
Lanka), Senior Lecturer

磯貝芳徳
日本福祉大学・情報社会科学学部・教授
菊池三穂子
長崎大学・熱帯医学研究所・講師
長岡史晃
愛知医科大学・医学部・大学院生