

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11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21406008

研究課題名（和文）日本住血吸虫症流行撲滅を目指した新規サーベイランスツールの開発戦略

研究課題名（英文）Development of surveillance tools for eradication of schistosomiasis japonica applicable for the endemic areas in China.

研究代表者

太田 伸生（OHTA 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（和文）：中国の日本住血吸虫症の流行撲滅のために必要な新規の対策ツールを検証した。感度、特異性に優れた検査法として LAMP による遺伝子検査は従来法で見逃した感染を検出し、且つ流行現場で実施可能であることを実地調査で確認した。また、中間宿主貝の分布予測とリスク評価への GIS の有用性を検討し、モニタリング効率改善に有用であることが確認出来た。以上、簡便な新規対策ツールを応用した流行終息に不可欠な疾病対策戦略モデルを構築した。

研究成果の概要（英文）：New surveillance tools for schistosomiasis control were developed and tested in endemic foci in China. LAMP method was confirmed to be an easy method of high sensitivity and specificity, which could be applied for on-site use without special equipments. Together with those simple and reliable tools, epidemiological surveillance using GIS for evaluating risk factors of bleeding snail hosts should be introduced especially for big endemic fields like those in China. By the use of those new tools, more effective strategy for eliminating schistosomiasis japonica was proposed for endemic foci in China.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

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：蠕虫、日本住血吸虫、DNA 診断、LAMP、*Oncomelania*

1. 研究開始当初の背景

(1)中国の日本住血吸虫症対策は近未来の中国国内からの流行根絶を目指して様々な施策が採られているが、流行監視のための方法の多くは今日なお古典的なものにとどまっているため、今後、流行終息を正確に確認するための新しいサーベイランス法の確立が必要であった。

(2)住血吸虫症対策の国際的標準では正確な case detection による治療対応が求められるが、従来の検出方法では感度が著しく低く、正確な流行状況把握に基づいた対策の集中投入地域の特定が困難であった。

(3)中国のように流行地区面積が広大な地域では、疾病対策のための限られた人的および資金面のリソースを如何に有効活用するか

が問われ、対策事業の効率化が急務であった。

2. 研究の目的

中国の日本住血吸虫症流行地において、近年流行再興さえも報告される原因は正確な case-detection と流行変動予測とが困難であることにある。その課題に鑑みて、流行現場での活用が可能な対策ツールの開発と実用化を通じた新たな住血吸虫症対策戦略の構築をめざす。

(1) 新規技術を駆使して流行地域でヒト、家畜動物、中間宿主貝のより正確な感染動態を把握できる体制構築を進める。日本住血吸虫感染検出の信頼性を高めた方法である PCR 法や LAMP 法などの遺伝子診断や新規抗原補足法の流行現場での応用の可能性を試みる。

(2) 流行動態分析をリアルタイムで簡便に実施できるシステムとして GIS による中間宿主貝のモニタリングを推進し、重点監視対象地区を絞った日本住血吸虫症流行の監視効率改善をめざす。

3. 研究の方法

(1) Case-detection 効率化を目指して、水牛など保虫宿主動物または *Oncomelania* 属中間宿主貝から日本住血吸虫 28S rDNA の検出を検討する。日本国内での予備実験の後、現地サンプルを用いた検討は中国安徽省及び浙江省寄生虫病研究所で実施した。PCR 法検査には以下のプライマーを用いた。

F: 5'-GGTTTGACTATTATTGTTGAGC-3',

R: 5'-TCTCACCTTAGTTCGG ACTGA-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法のプライマーセットは以下の通りとした。F3プライマー: 5'-TTTCGTAACGCCCA ATGA-3', FIPプライマー: 5'-ACGCAACTGCC AACGTGACATACTGGTCGGCTTGTTACTAG C-3', BIPプライマー: 5'-TGGTAGACGATCCA CCTGACCCCTCGCGCACATGTTAAACTC-3'。

① 流行状況が異なる安徽省内調査地域を選び、各地域に分布する *Oncomelania* 属貝を個々に観察する従来方法ではなく、一定個体数から抽出したDNAを用いてLAMP法で感染の有無を判定し、陽性貝分布状況の判断に必要な新規の検査プロトコルを検討した。

② 国策として実施中の流行地からの保虫宿主駆除事業の効果が地域内の *Oncomelania* 属貝の感染率減少として観察できるかを安徽省内の流行地を選定してLAMP法やPCRにより調査した。

③ ヒトや水牛の試料を用いたPCRやLAMP法による診断実用化を検討する予備実験として、流行地内で飼育されている任意の水牛30頭の血液試料用いて行った。ラテックスイムノ

クロマト法で検査した抗日本住血吸虫抗体は14頭(46.7%)で陽性と判定された。

(2) 新しいサーベイランスツールとして、簡便で正確な流行動態及びリスク評価法を導入するため、中国国内の流行地の人工衛星画像も応用してデジタルマップ上で検討を試みた。

① *Oncomelania* 属貝の簡便な生息状況調査法として日本国内で有用性が確認されている生息密度測定システムを応用して中国の流行地での感染リスク評価を試みた。

② GIS/GPSによる中間宿主貝の生息分布のモニタリング結果を、気温、洪水による冠水期間、植生などの因子との相関解析に応用し、中国国内の流行地変動予測への応用の可能性を検討した。

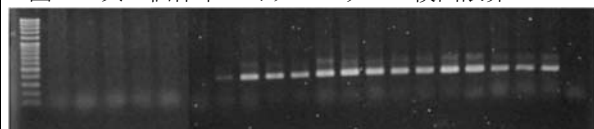
以上を総括して、中国における日本住血吸虫の流行監視と予防に関する新規のツールとして整理し、効果的な疫学監視戦略として提案する事をめざす。

4. 研究成果

(1) 感染宿主(中間宿主及び終宿主)検出法としての各種遺伝子検出法の流行現場への応用性について、中国の流行地域由来サンプルを用いて検討した。

① PCR 法または LAMP 法を用いた感染貝検出技術の流行モニタリングへの実用性に関する基礎データ取得: 従来方法である貝個々を破碎してセルカリアを顕微鏡的に確認する方法では作業効率が著しく低く、また、貝体内でセルカリアにまで成長していない段階の幼虫は検出が困難である欠点を持っていた。その改善のために遺伝子検出法が貝体内での幼虫の発育状況と無関係で感度よく感染有無の判定を行う事、および LAMP による遺伝子検出法が on-site でも実用できる点等について検討した。

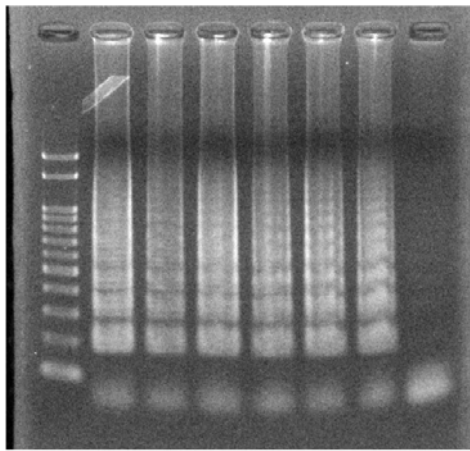
Oncomelania 属貝 1 個体にミラシジウムを感染させ、それを PCR で検出する場合の検出限界を検討した。その結果、貝 1 個体中に 1 匹のミラシジウムが存在すれば PCR 法で陽性と判定可能であることが確認できた(図-1)。より定量的には、10ml 溶液中にミラシジウムが 1 匹存在すれば検出は可能であった。図-1 貝 1 個体中のミラシジウムの検出限界



② LAMP 法による効率的な感染貝検出: 中国国内流行地の多くでは中間宿主貝の感染率が 1%以下にまで低下していることから、一定

数以上の貝を一緒にして DNA を抽出し、1 回の LAMP 法で同時に試験して、検査した貝の個体群中に感染貝が存在するか否かを判定した。例えば 100 個体由来の DNA 試料で陰性であれば、その地域の貝の感染率は 1% 未満であると推定できる。そこで、日本の実験室で維持している日本産 *O. h. nosophora* を用いて、感染貝を非感染貝に様々な比率で混合したものから DNA を抽出し、28S rDNA の検出を LAMP 法で試みた。その結果、貝 100 個中、感染貝が 1 個混入(1.0%)していれば LAMP 法にて日本住血吸虫遺伝子を検出できる事を確認した(図-2)。さらに 0.5%でも検出可能であることも確認できたが、さらに低混入率でも可能であると推定されたものの、検出限界は確定できなかった。

図-2 感染貝：非感染貝混合比の検討



1:100 :50 :25 :10 :5 :1 :0

③LAMP 法検査の流行現場での実施の可能性について：LAMP 法は特別な機器を用いる必要のない遺伝子増幅反応系であり、流行現場の検査室レベルで実施可能な検査システムであることが期待される。今回、流行現場の保健所検査室レベルの環境で検査を実施した。その結果、末端の保健所レベルの環境でも反応を得ることが可能であった。問題点としては LAMP 法の感度が高すぎることによるコンタミネーションであり、複数サンプルを同一の検査室で実施する場合には防止策が必要なことが今後の課題である。

④中国の対策事業の実効性評価への遺伝子検査法の応用：保虫宿主動物の駆除が流行改善効果を持つか否かの判定として PCR 法による検査を実施した。実施前の安慶市(A)と実施済みの銅陵市(B,C)で比較した結果、後者、特に C 地域で中間宿主貝の感染率がすべて陰性であることが確認できた(表-2)。

表-2 対策実施による効果の検証

地区	A(実施前)	B(実施中)	C(実施中)
顕微鏡法	4.2%	2.7%	0%
PCR 法	9.6%	2.7%	0%

⑤LAMP 法の応用による中間宿主貝監視効率の向上：安徽省内流行地のうち、流行制圧事業が進行中の揚子江流域の 5 地点(図-3)を選定して、その地域由来の *Oncomelania* サンプルを収集し、近隣の保健所の検査室での LAMP 法検査に供した。

図-3 安徽省揚子江流域 5 地点での調査



多数個体を同時に検査することにより検査が集約化できるが、中間宿主貝の感染率はあくまでも推定値になるため、その信頼度の確認を試みた。各地域で採集した 200 個の貝を 4 群に分け、各 50 個の貝から抽出した DNA を 1 回の LAMP 法検査に供した。同時に貝 1 個 1 個を破碎してセルカリアの遊出を顕微鏡的に観察する従来の検出法および個々の貝から抽出した DNA を鋳型にした PCR 法による検出を行い、その結果を相互に比較したものを表-2 に示した。

表-2 野外採集貝の検査法による比較

安徽省調査地	従来の顕微鏡検査法	貝 1 個毎の PCR 法	貝 50 個毎の LAMP 法
1. 東至	0/200 (0%)	1/200 (0.5%)	3/4 (1-2%)
2. 東至	0/200 (0%)	0/200 (0%)	0/4 (<0.5%)
3. 石台	2/200 (1%)	4/200 (2%)	4/4 (>2%)
4. 石台	1/200 (0.5%)	1/200 (0.5%)	3/4 (1-2%)
5. 無為	3/200 (1.5%)	2/200 (1%)	2/4 (0.5-1.5%)

調査 5 地点のうち、地点 2 (東至県)については PCR、LAMP 法ともに感染貝が検出されず、同地区の貝の感染は実際に低下していることが確認され、今後のモニタリングでも DNA ソースである *Oncomelania* 属貝を 1 群 100 個体以上に増加させて抽出した DNA の LAMP 法検査がより効率的であると考えられた。また、従来法でも一定の感染率が確認された地点 3 (石台县)については 50 個体からの抽出 DNA による LAMP 検査でも全例で陽性であり、当面は DNA 抽出に用いる貝の個体数を 50 個体未満に減らした LAMP 検査で監視していくことが適切であると考えた。一方、従来法では貝の感染率がゼロと判定されていた地点 1 (東至県)の貝 50 個体由来の DNA による LAMP 法が 4 検体中 3 検体

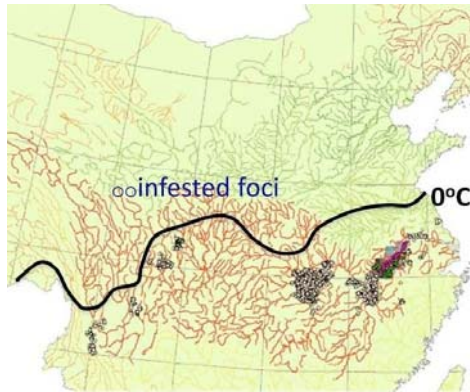
で陽性であることから、当面はより **intensive** に監視を継続する必要があることが示された。また、貝個別の **PCR** 検査よりも **LAMP** 法の方が感度は高いと考えられた。

②終宿主動物からの **LAMP** 法による日本住血吸虫感染の確認：中国ではヒトの他に水牛が重要な保虫宿主であるが、水牛の場合に糞便検査による感染検出の感度が低いことから遺伝子診断の実用化が望まれていた。本研究では採血濾紙により採集した水牛の血清試料を用いた **LAMP** 法による感染検出を試みた。水牛 30 個体を用いた検討では、**LAMP** 法による陽性個体は 6 頭だけであり、一致率は 21.4%にとどまった。一致率が低い理由は不明であるが、水牛血清中の **LAMP** 反応阻害活性によるものか、水牛の血中に存在する住血吸虫の DNA 濃度が検出感度以下であるためかについて今後検討を継続する必要がある。

(2)GIS による新たなサーベイランス法の導入に関する検討を行った。

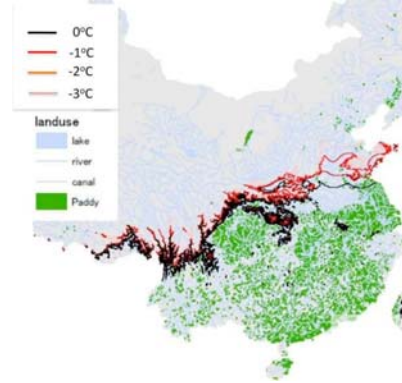
①中国国内流行地における *Oncomelania* 属貝生息環境の特徴：調査した安徽省は中国国内の流行地でも比較的中間宿主貝の生息密度の濃い地域である (図-4)。

図-4 揚子江水系に沿って分布する貝生息地



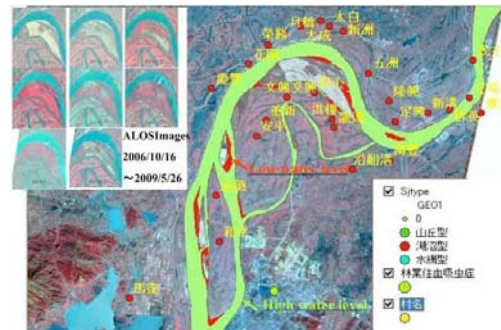
O. h. hupensis の生息に関する温度環境は比較的確確に規定できており、生存可能温度域は 0~32°C、至適生存温度は 15.17°C、最低発育温度は 5.87°C である。揚子江水系は一部を除いて年間気温が 0°C 以上にあり、温度環境としては中間宿主貝の生存・発育を許容できると考えられる。しかし、中間宿主貝の生存は温度環境以外に植生が重要であり、日本の旧流行地の例に倣うならば、水田が最も好適な貝の生息環境を提供する。実際に、中国国内の最寒月温度が 0°C 以上の分布域をプロットすると、それは水田としての土地利用域とほぼ一致した (図-5)。このことから、揚子江流域の温度環境と植生・土地利用環境は *Oncomelania* 属貝の生存環境を提供するものであり、貝の分布域に関する監視が重要である。

図-5 中国の最寒月等温分布と植生利用



②安徽省内流行地のリスク評価：安徽省内の流行地は揚子江に沿って分布するため、貝の生息及び疾病伝播は揚子江の季節感水位の変動と関係している。そこで、安徽省内の流行地である銅陵市の中間宿主貝生息地と揚子江水位の変動状況を人工衛星画像で観察した (図-6)。

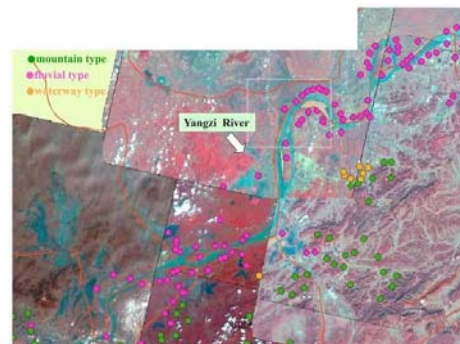
図-6 銅陵市の揚子江水位の季節間変動



図中、左上の写真で赤色は草地を示すが、揚子江の季節間水位変動により、*Oncomelania* 属貝が繁殖する草地面積も大きく変動することが明瞭である。この情報をもとに、貝の繁殖地域を特定し、感染リスク地域として対策を集中投入することが望まれる。

③流行地の地理的特徴と揚子江との関係の解析：揚子江流域でも、流行地の地理的条件により、貝の繁殖相が異なる。安徽省内の流行地についても、人工衛星画像にデジタルマップを重ねることにより、流行地パターンの分布がプロットでき、対策の集中投入の戦略が容易になることが考えられた (図-7)。

図-7 流行地パターンの人工衛星画像へのプロット



日本に次いで日本住血吸虫症の流行終息を目指す中国において、今後必要となる疾病対策ツールの検証が確認でき、更にそれらを活用する対象地域を絞り込むGISによる疫学解析ツールの応用性も検証することが出来た。日本住血吸虫症に限らず、感染症は流行コントロール状態から根絶に移行する時点で大きな困難に直面するが、ここで明らかにした新規ツールの効率的な活用を基に、新しい疾病対策戦略が展開され、中国の流行地で確実に流行根絶が進むとともに、それらの検証を通じて他の住血吸虫症流行地域への波及を推進していくことが必要である。

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9件)

- ① Seki T, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infect Immun*, 査読有り 80:159-68, 2012.
- ② Kong QM, Lu SH, Tong QB, Lou D, Chen R, Zheng B, Kumagai T, Wen LY, Ohta N, Zhou XN. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): early detection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasit Vectors*, 査読有り Jan 3, 5:2, 2012.
- ③ Taniguchi T, Kumagai T, Shimogawara R, Ichinose S, Hiramoto A, Sato A, Morita M, Nojima M, Kim HS, Wataya Y, Ohta N. Schistosomicidal and anti-fecundity effects of oral treatment of synthetic endoperoxide compound N-89. *Parasitol Int*, 査読有り 60:231-6, 2011.
- ④ Nihei N, Komagata O, Kobayashi M, Ohta N, Saitoh Y, Mochizuki K, Chen R, Lu SH, Wen LY, Wang TP. Using ALOS satellite images to develop efficient measures against vector-borne diseases – Regional differences in outbreak risk for schistosomiasis in China. *Proc. Int Congress for the 4th ALOS PI Symposium*, 査読無し pp.PI082-1-6, 2011.
- ⑤ Imai K, Koibuchi T, Kumagai T, Maeda T, Osada Y, Ohta N, Koga M, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, Fujii T. Cerebral schistosomiasis due to *Schistosoma haematobium* confirmed by PCR analysis of brain specimen. *J Clin Microbiol*, 査読有り 49:3703-6, 2011.
- ⑥ Kumagai T, Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu SH, Chen R, Wen LY, Ohta N. Detection of potential infections of *Schistosoma japonicum* in the intermediate host snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Am J Trop Med Hyg* 査読有り 83:542-8, 2010.
- ⑦ Anyan WK, Kumagai T, Shimogawara R, Seki T, Akao N, Obata K, Bentum BK, Bosompem BK, Boakye DA, Wilson MD, Karasuyama H, Ohta N. Schistosome eggs have a direct role in the induction of basophils capable of a high level of IL-4 production: Comparative study of single- and bisexual infection of *Schistosoma mansoni* in vivo. *Trop Med Health*, 査読有り 38:1-12, 2010.
- ⑧ 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, Japan. *Jpn J Infect Dis*, 査読有り 62: 125-32, 2009.

[学会発表] (計9件)

- ① 太田伸生、熊谷 貴、陸 紹紅、王 天平、温 礼永：中国の *Oncomelania* 属貝と日本住血吸虫症の動向 第64回日本衛生動物学会シンポジウム, 2012年3月、上田市
- ② Seki T, Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, AnyanWK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N. IL-4/IL-13 suppress excessive granulomatous inflammation in schistosomiasis japonica. Joint SATREPS Workshop on Climate-Ecosystem Changes, Global Health and Human Wellbeing in West Africa. Dec. 3, 2011, Legos, Ghana.
- ③ Ohta N. Neglected tropical diseases: New challenges for research promotion. XIIth International Congress for Parasitology, Aug. 2010, Melbourne
- ④ Nihei N, Tokiwa T, Kobayashi M, Akao N, Ohta N. Climate change and infectious diseases: Probable influences on disease-transmitting vectors in Japan. 2nd International Conference on Climate Change and Neglected Tropical Diseases 2010. Oct. 2010, Dhakka.
- ⑤ Ohta N. Schistosomiasis research in Japan: Overview of current situation. 10th Conference of RNAS (Regional Network for Asian Schistosomiasis)+ Nov. 2010, Wuxi, China.
- ⑥ Nihei N, Komagata O, Kobayashi M, Ohta N, Saitoh Y, Mochizuki K, Chen R, Lu SH, Wen LY, Wang TP. Using ALOS satellite images to develop efficient measures

against vector-borne diseases – Regional differences in outbreak risk for schistosomiasis japonica in China. 4th ALOS Joint PI Symposium of ALOS Data Nodes. Nov. 2010, Tokyo.

⑦ Ohta N. Advances in biological research of tropical medicine and its role for global control of NTD. 51st Korean Soc Parasitol, Oct. 2009, Seoul.

⑧ Ohta N. Surveillance for schistosomiasis after the interruption of transmission in Japan. 第51回日本熱帯医学会総会 2009年10月、宜野湾市

〔図書〕(計1件)

①太田伸生、保阪幸男：日本における伝染病との闘いの歴史(菅又昌実編著)科学評論社、2010年、東京

〔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、谷口斎恵

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：PCT/JP2009/61698

取得年月日：平成21年6月

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 伸生 (OHTA 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) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

二瓶 直子 (NIHEI NAOKO)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・客員研究員

研究者番号：70425677

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