

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24406014

研究課題名(和文) 住民負担の少ない尿診断と媒介蚊調査による糸状虫症根絶の確認と再燃の早期発見

研究課題名(英文) Confirmation of the elimination of filariasis and early finding of its recurrence by habitant friendly urine diagnosis and vector mosquito investigation

研究代表者

伊藤 誠 (ITO, MAKOTO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：90137117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：尿を検体とする免疫診断法と媒介蚊の感染を容易に検出できるLAMP法の併用により、最終的には、住民の負担(採血や日常生活の障碍)を最小限に抑え、「尿と蚊」による、フィラリア症の根絶・再燃の確認が出来るシステムを構築することを目的とした。

フィラリア症対策が終了した地区において尿中抗体を指標にした方法と、フィラリア症媒介蚊から効率よく *Wuchereria bancrofti* のDNAを検出する方法を、かつての流行地での調査に応用し、これらの方法が省力的で感度の高い方法であることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to establish a combination system of both immunodiagnosis with urine samples and LAMP with mosquito samples to confirm eliminations and find resurgences of lymphatic filariasis with minimum burden of inhabitants.

The system, which detects anti-filaria antibodies in urine and *Wuchereria bancrofti* DNA in *Culex quinquefasciatus* with LAMP, was applied to former endemic areas, and was shown as resident friendly, labor saving and sensitive.

研究分野：寄生虫学

キーワード：フィラリア症 尿診断 媒介蚊 LAMP

1. 研究開始当初の背景

(1) WHO 主導によるリンパ系フィラリア症根絶計画は 2000 年に開始され 2020 年までの達成を目指す世界規模の壮大なプログラムである。流行地域住民(総計 13 億人)の集団投薬を基本戦略とし、過去 10 年半に 53 ヶ国で 8 億 4500 万人が投薬された[1]。多くの流行国では、予定された投薬が終了し、著しい成果(感染者の減少)をあげているが、「根絶」を如何にして確認するかが最大の課題となっている。さらに、感染の再燃を効率よく発見することも不可欠である。これらに対処すべく、WHO は 2011 年夏に、今後 10 年間の方針・戦略を発表した[2]。その基本は、現在使用されている簡便な診断キットを利用するもので、アメリカ製のフィラリア抗原検出キット(ICT test)に大きく依存している。しかし、ICT test には感度面での問題があり[3]、高価なため世界規模の計画には膨大な費用を要する。

(2) 我々は、尿を検体とするフィラリア免疫診断法(尿 ELISA)を開発した[4]。それらは根絶/再燃の調査に必要な高い感度を持つこと、検体採取が容易で住民の協力が得られ易いことなどから世界的に注目されている。

WHO の新方針・戦略には、媒介蚊の感染(フィラリア伝搬を直接示す)を指標とする根絶確認が含まれていない。蚊の感染を知るためには、従来、蚊を一匹ずつ解剖し、フィラリア幼虫を発見する方法が用いられていた。その後、PCR 法が導入されたが、依然、多大の手間と時間を要する。我々は、媒介蚊 60 匹中に 1 匹のミクロフィラリアが存在すれば確実に検出できる LAMP 法を開発した。高価な器機を要せず、PCR 法より短時間、低コストで結果が得られる[5]。媒介蚊調査は住民に多大の迷惑をかけずに実施可能なことから、根絶確認には有効な手段となるはずである。

2. 研究の目的

世界フィラリア症根絶計画が進行し、感染者数は大きく減少した。この段階に到り、根絶の確認と再燃の早期発見が大きな課題となっている。我々は、尿を検体とする免疫診断法と媒介蚊の感染を容易に検出できる LAMP 法の併用により、最終的には、住民の負担(採血や日常生活の障碍)を最小限に抑え、「尿と蚊」による、フィラリア症の根絶・再燃の確認が出来るシステムを構築することを目指す。尿診断は、疫学調査において多くの利点があるので、今後、より一般的な診断ツールとして様々な分野で発展・利用されると考える。スリランカにおけるフィラリア症の根絶に寄与し、尿診断に基づく成功例を世界にアピールすることが最終目標である。また、尿診断をスリランカ以外の国にも拡大応用する。

3. 研究の方法

(1) 根絶確認あるいは再燃発見に関する調査: 疫学調査は、まずスリランカにおいて、尿診断法と LAMP 法による媒介蚊の感染調査(「尿と蚊」調査)を実施する。予定された集団投薬が終了し、ミクロフィラリア陽性率が 1%以下となった 3-4 地域(定点)において、小学生を対象とする尿診断を実施する。

また、フィラリア症媒介蚊である *C. quinquefasciatus* を Gravid Trap を用いて採集し、PCR 法と、我々の開発した LAMP 法[4]を用いて、フィラリア DNA の検出を試みる。

集団投薬が終了している、ケニア、ベトナム、バングラデシュからの尿検体についても検査・解析する。

(2) 隠れたフィラリア症流行地を発見するための調査: (1)と同様の「尿と蚊」調査を実施する。調査地の選定は既に作成されているフィラリア性陰嚢水腫の推定陽性率を示すマップによる。

4. 研究成果

(1) 尿診断法のフィラリア症対策の評価への応用

バングラデシュ

集団投薬によるフィラリア症制圧計画の評価のための基礎的な調査はこれまでに実施されている[6]。本研究では、集団投薬によるフィラリア症制圧計画が終了した、バングラデシュの北西部のタクルガオン地区で、投薬の住民カバー率の高いところと低いところからそれぞれ選択した小学校の、合計 1,600 人の小学生より集められた尿中のフィラリアに対する抗体を調べた。その結果カバー率の低い地域の小学生で、カバー率の高い地域の小学生に比べて抗体陽性者が有意に多くみられ、尿中の抗体が対策の進み具合を示す良い指標になることがわかった。また、尿の採取は血液採取に比べて容易であり、小学校低学年の児童からの採取も、児童や教師又その親からも積極的な参加が確認できた。

ベトナム

1996 年の調査でミクロフィラリア陽性率が 7.2%との報告があり、その後集団投薬によるフィラリア症制圧計画が終了し、さらにその surveillance も終了しているベトナムのカンホア地区の住民からの尿の抗体を測定した。その結果、21 歳以上では 7.5%が陽性であったが、20 歳以下では 1.3%のみが陽性で、フィラリアの伝播が抑えられているものと考えられた。

ケニア

WHO が推し進めるフィラリア制圧計画が終了している、東海岸に近いクワレ地区の 6 村から採取された尿中の抗体価を測定した。全体で 5.36% (23/408) が陽性となったが、村間で陽性率に 0% ~ 11% と大きな差がみられ、対策の進行具合の差が表れているものと考えられ、尿中抗体が対策の評価につながるものと考えられた。

スリランカ

南部マタラ地区のかつての侵淫地域であり、WHO が推し進めるフィラリア制圧計画が終了している5つの小学校の生徒から尿を採取した。これまでの長い研究協力を通じて、研究協力者であるルフナ大学の Yahathugoda 博士(研究協力者)の協力のもと、ルフナ大学寄生虫学教室に測定施設が設置され、採取された検体はすべて現地で検査する体制を整えることができた。合計728の尿検体中の抗フィラリア IgG4 抗体を測定したところ、19 検体(2.6%)が陽性となったが、その抗体価はすべて cutoff 付近であり、新たな感染の可能性は低いと考えられた。この5校を今後定期的(年1回)調査する予定である。

(2) 媒介蚊中のフィラリア DNA 検出法のフィラリア症対策評価への応用

スリランカのかつてのフィラリア症流行地である南部マタラ地区で、2013年2月から2014年6月まで、毎月1回、Gravid Trap を用い蚊を採取した。媒介蚊である *C. quinquefasciatus* のみを選別し、20 匹を1プールとして DNA を抽出、PCR 法あるいは LAMP 法を用いてフィラリア由来 DNA を検出した。773 プール(蚊の総数 14,266 匹)を検査した結果、陽性率は 5.56% (一匹に換算すると 0.278%) であり、集団駆虫(MDA)による効果目標とされる 0.25% をわずかに上回っていた。同時期に行われた蚊の解剖によるフィラリア幼虫の検出では感染蚊は見つからなかったことから、DNA を検出する方法が省力的であるのみならず感度の高い検査法であることを実際のサンプルを使って示すことができた。また、蚊のフィラリア感染率が、特に雨季の始めに高くなることを明らかにした。これは蚊の吸血行動(産卵行動)と関連している可能性があり、対策上重要な情報である。

(3) 隠れた流行地の調査

ラトナプラ地区において

フィラリア症侵淫地であるゴール地区とマタラ地区に接するラトナプラ地区は、これまでフィラリア症はないとされ、集団投薬の対象とはなっていなかった。スリランカからフィラリア症を制圧するためには、このような場所に隠れた流行地がある可能性を考慮する必要がある。村のリーダーにフィラリア症に関する質問票を郵送して、フィラリア症患者の有無を調べる RAP(Rapid Assessment Procedure)法と、尿中にフィラリアに対する抗体を調べる検査法により、住民に負担をかけない調査ができることを示すことができた[7]。

南部マタラ地区の非流行地において

フィラリア症の流行があるのではないかと住民の情報をもとに、南部マタラ地区の小学校の生徒より尿検体を集め、抗体を測定したところすべてが陰性であり、流行の可能

性を否定することができた。

(4) 他の寄生虫症のスクリーニングへの応用

我々が開発し、本研究で使われた尿を使った診断法は、住民に大きな負担を与えないことから感染症のスクリーニングに適していることを明らかとした。これを多包虫症のスクリーニングへ応用することができた[8]。また、マラリアの疫学調査にも応用できることがわかった。

<引用文献>

[1] WHO, Lymphatic Filariasis: Progress report 2000-2009 and strategic plan 2010-2020, 2010

[2] WHO, Lymphatic Filariasis: Monitoring and epidemiological assessment of mass drug administration, 2011

[3] Dreyer et al., Am J Trop Med Hyg, 78:28-34, 2008

[4] Itoh M, et al., Sensitive and specific ELISA for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection using urine samples. Am. J. Trop. Med. Hyg. 65, 2001, 362-5

[5] Takagi et al., Development of loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Wuchereria bancrofti* DNA in human blood and vector mosquitoes. Parasitol Int. 60, 2011, 493-7

[6] Samad MS, Itoh M, et al., Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection using urine samples and its application in Bangladesh. Parasitol Int. 62, 2013, 564-7

[7] Yahathugoda TC et al., Rapid assessment procedures to detect hidden endemic foci in areas not subjected to mass drug administration in Sri Lanka. Parasitol Int. 63, 2014, 87-93

[8] Itoh M, et al., Immunodiagnosis of alveolar echinococcosis using urine samples. Parasitol Int. 62, 2013, 514-6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, Sunahara T, Kimura E, Samarawickrema WA, Itoh M, Rapid assessment procedures to detect hidden endemic foci in areas not subjected to mass drug administration in Sri Lanka. Parasitol Int. 査読有 Vol 63,

2014, 87-93
10.1016/j.parint.2013.09.008

Fujii Y, Itoh M (15 番目), Hamano S (22 番目), Hirayama K (28 番目), 他 24 名, Serological surveillance development for tropical infectious diseases using simultaneous microsphere-based multiplex assays and finite mixture models. PLoS Negl Trop Dis 査読有 8, 2014, 1-15
10.1371/journal.pntd.0003040

Samad MS, Itoh M, Moji K, Hossain M, Mondal D, Alam MS, Kimura E. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection using urine samples and its application in Bangladesh. Parasitol Int. 査読有 vol 62, 2013, 564-567
10.1016/j.parint.2013.08.007

Nagaoka F, Itoh M, Samad MS, Takagi H, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Hossain M, Moji K, Kimura E. Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads. Parasitol Int. 査読有 vol 62, 2013, 32-5
10.1016/j.parint.2012.09.002

児玉一男, 田代善彦, 吉岡秀人, 伊藤誠, 松岡裕之
ミャンマー中部の病院で実施した陰嚢水腫手術例におけるフィラリア症の検討
Clinical Parasitology 査読無 2012, 46-48
<http://jglobal.jst.go.jp/public/2009042/2/201302222841178570>

〔学会発表〕(計 14 件)

高木秀和, Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, 木村英作, 伊藤誠
スリランカにおける *Wuchereria bancrofti* 媒介蚊の感染率の季節変動. 第 84 回日本寄生虫学会. 2015/3/21・22. 杏林大学

Samad MS, 伊藤誠, 木村英作, Evaluation of lymphatic filariasis elimination program by urine ELISA in Bangladesh, 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014/3/27, 松山(愛媛)

高木秀和, Yahathugoda TC, Weerasooriya MV, 木村英作, 伊藤誠, LAMP 法による流行地で採取した媒介蚊からの *Wuchereria bancrofti* 検出, 第 83 回日本寄生虫学会大会, 2014/3/27, 松山(愛媛)

Rathnapala U, Yahathugoda T C, Weerasoriya M, 砂原俊彦, 木村英作, 伊藤誠, 小林信之, 平山謙二, A predictive model of residual areas of filariasis in

Sri Lanka using remote sensing environmental and topography data, 第 54 回日本熱帯医学会総会, 2013/10/4, 長崎

Itoh M. Human immunity against parasites, JSPS Asia Africa Science Platform Program: The eco-epidemiology of forest and zoonotic malaria; Inuyama PRI symposium Monkey Malaria in Focus: recent perspectives on forest and zoonotic malaria 2012/12/18, 犬山(愛知)

Samad MS, Itoh M, Kimura E (7 番目), (他 4 名) Application of ELISA to detect urinary IgG4 for the mass-survey of lymphatic filariasis in Bangladesh. 12th Asian-Pacific Congress for Parasitic Zoonosis 2012/10/7, 神戸

Samad MS, Itoh M et al. Confirmation of the usefulness of ELISA to detect urinary IgG4 for diagnosis of lymphatic filariasis in Bangladesh. 3rd International Conference on Neglected Tropical Diseases. 2012/9/1, Dhaka (Bangladesh)

〔図書〕(計 2 件)

伊藤誠, 今日の治療指針 2015, 医学書院 2015. 1408-9

木村英作, 伊藤誠, 角坂照貴, 感染症症候群(第 2 版) 上 病原体別感染症編, 原虫症、寄生虫症、フィラリア症, 2013. 693-6

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 誠 (ITOH, Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授
研究者番号: 9 0 1 3 7 1 1 7

(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: 6 0 1 8 9 8 6 8

濱野 真二郎 (HAMANO, Shinjiro)
長崎大学・熱帯医学研究所・教授
研究者番号: 7 0 2 9 4 9 1 5

砂原 俊彦 (SUNAHARA, Toshihiko)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 5 0 2 6 4 1 5 6

高木 秀和 (TAKAGI, Hidekazu)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号: 9 0 2 8 8 5 2 2

(3) 研究協力者

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

長岡 史晃(NAGAOKA Fumiaki)
愛知医科大学・医学部・助手

WEERASOORIYA Mirani V
ルフナ大学(スリランカ)・医学部・教授

YAHATHUGODA Thishan C.
ルフナ大学(スリランカ)・医学部・講師