

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590510

研究課題名(和文) 住血吸虫由来遊離型DNAの活動性感染の診断への応用

研究課題名(英文) Application of cell-free schistosome DNA to a diagnostic for active schistosomiasis

研究代表者

林 尚子 (Kato-Hayashi, Naoko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：宿主の血液・尿・唾液等の体液中に存在する住血吸虫の分泌・代謝物由来のDNA断片「遊離型DNA」について、住血吸虫の活動性感染の診断マーカーとしての有用性を検討した。フィリピンで集団駆虫が実施されている日本住血吸虫症有病地の調査では、遊離型DNAは従来のゴールドスタンダード(糞便検査)の3.5-10倍の検出率であった。難治性輸入ビルハルツ住血吸虫症例では、駆虫後の虫卵消失に反して遊離型DNAは検出され続け、膀胱組織中からは虫卵が確認された。虫卵に依存しない遊離型DNAの検出は活動性感染をより正確に評価できることが期待され、治療効果判定や有病国の感染状況の把握に有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Cell-free schistosome DNA is fragments of parasite-derived DNA exists in the host's bodily fluids (blood, urine, and saliva). We evaluated the usefulness of cell-free schistosome DNA as a diagnostic marker for active schistosomiasis. In schistosomiasis-endemic areas in the Philippines, where the annual mass deworming program has been implemented, the active schistosomiasis detected by cell-free schistosome DNA was 3.5 to 10 times higher than that by stool examination (gold standard). In the case of refractory imported schistosomiasis haematobia, parasite egg rapidly disappeared after anthelmintic administration, whereas, cell-free schistosome DNA remained persistent. This was consistent with the presence of morphologically intact ova in bladder biopsy samples and with the corresponding symptoms. These results suggest that cell-free schistosome DNA, independent for parasite egg, is a promising diagnostic marker for active schistosomiasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：住血吸虫症 活動性感染 検査・診断 遊離型DNA

1. 研究開始当初の背景

住血吸虫症はわが国では 1977 年の新規患者を最後に流行が終息したことで、過去の疾患と考える人が多い。しかしながら、海外では未だにおよそ 2 億人が罹患し、さらに地球上の人口の約 12% にあたる 8 億人が感染の危機に脅かされている状態であり、国際化の昨今では輸入感染症として重要視する必要がある。

住血吸虫症の従来法の診断法は、糞便（尿、組織）中からの虫卵の検出がゴールドスタンダードであり、その他、血清中の特異抗体の検出（ELISA、COPT 等）と超音波検査等による病変の検出がある。図 1 に示すように、従来法は宿主中に生きた虫や虫卵が存在する活動性感染期を必ずしも正確に反映するわけではない。また、本症の重篤な病原性は組織内に栓塞した虫卵に対する過剰な免疫応答に起因することから、従来法では不可能な虫卵産生前の早期診断・治療を実現させることによって重症化を防止することが望まれる。

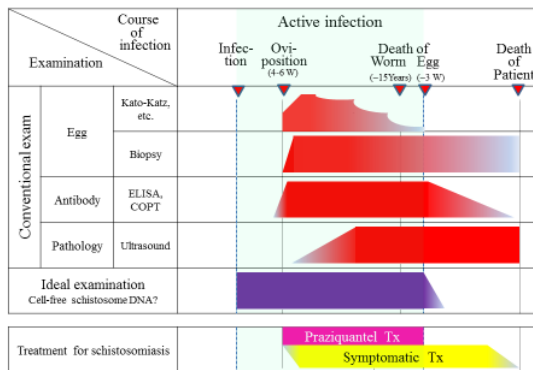


図 1. 住血吸虫症の検査と治療 (発表論文)

住血吸虫症の有病国での対策は、フィリピンを例に挙げると、有病地住民全員を対象にプラジカンテルを投与する集団駆虫 (Mass Drug Administration: MDA) が年に 1 度実施されている。MDA によって発育遅延などの重篤な患者が激減したものの、保虫宿主や中間

宿主に対する対策、衛生対策 (トイレ・上下水道の整備・普及) などが不十分なため、撲滅には至っていない。さらに MDA によって、糞便検査では虫卵が検出困難な低感染の地域が増加し、真の感染状況が把握できない状態となっている。

このような背景から、活動性感染を正確に把握し、虫卵産生前の早期診断が可能な新しい診断マーカーが望まれる。

2. 研究の目的

本研究では宿主の血液・尿・唾液等の体液中に存在する住血吸虫 (虫体・虫卵) の分泌・代謝物由来の DNA 断片、Cell-free circulating DNA (以下、遊離型 DNA) に着目し、新規の診断マーカーとしての有用性を検討する。

さらに、有病地で普及可能な実現性・コストに考慮した方法についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 遊離型 DNA 検出による住血吸虫活動性感染の診断の有用性

輸入住血吸虫症患者またはフィリピンの日本住血吸虫症有病地住民より採取した臨床検体 (血清、尿、唾液) から DNA を抽出し、PCR でミトコンドリア CO1 領域の遊離型 DNA の増幅 (Kato-Hayashi et al., Exp Parasitol 2010) を試みた。結果は従来法 (糞便中の虫卵・血清中の特異抗体・病変の検出) と比較した。

(2) 臨床検体からの遊離型 DNA の検出

臨床検体からの遊離型 DNA の検出率を向上させる目的で、DNA の精製・濃縮 (シークエンスキャプチャー法: 図 2)、PCR 反応試薬の組成 (マグネシウム・dNTPs 濃度など) を検討した。

(3) 有病地での応用のための改良

検体の保存法の検討

電気やコールドチェーンなどの設備が整っていない有病地においても検体中の DNA の失活を抑える保存方法について検討した。

アザイド添加（終濃度~0.02%）または検体の2倍量の70%エタノールを添加（終濃度46.7%）して常温保存した尿検体からDNAを抽出し、PCRで遊離型DNAの検出を試みた。

有病地での多検体解析実施のための改良

有病地での多検体解析に対応する目的でPCR-ELISAの系を作成した。ジゴキシゲニン付加プライマーを用いてPCRで増幅後、PCR産物をビオチン化プローブでハイブリダイゼーションしたものを酵素抗体法（ELISA）で検出した（図3）。

尚、本研究は獨協医科大学の動物実験施設管理委員会（承認番号：0624）組み換えDNA実験安全委員会（承認番号：E10345）および生命倫理委員会（承認番号：1969）から承認を得ている。人への検査はインフォームドコンセントが得られた場合のみ遂行された。

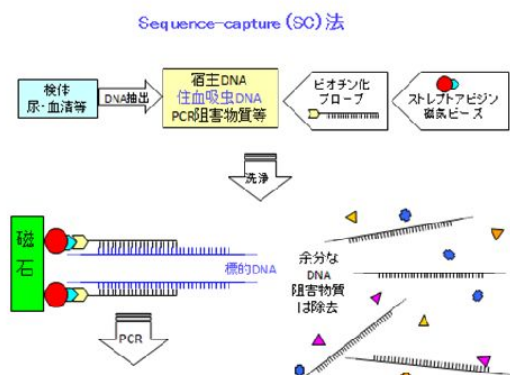


図2. シークエンスクャプチャー法による検体中の標的DNA分子の精製と濃縮

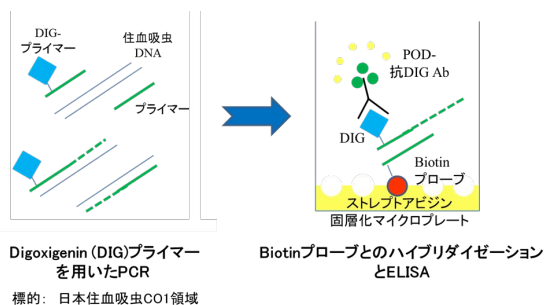


図3. PCR-ELISA の原理

4. 研究成果

(1) 遊離型DNA検出による住血吸虫活動性感染の診断の有用性

輸入ビルハルツ住血吸虫症の例では、プラジカンテル治療によって尿中の虫卵が陰転したが検体中の遊離型DNAは検出され続け、生検で膀胱組織中に石灰化していない虫卵の残存を確認した（発表論文）。フィリピン・ソルソゴン州の日本住血吸虫症高度浸淫地の調査では、遊離型DNAの陽性率は糞便検査陽性率の3.5-10倍であった（発表論文）。以上より、駆虫によって虫卵が検出困難な状態でも遊離型DNAによる活動性感染の診断は可能であることが証明された。虫卵に依存しない住血吸虫活動性感染の診断は、駆虫後の治療効果判定や、集団駆虫後の真の有病率の評価に有用と考えられた。

(2) 臨床検体からの遊離型DNAの検出

DNA検体中の標的DNAの濃縮と精製

フィリピン・カガヤン州の日本住血吸虫症有病地で、肝線維化病変を有する慢性日本住血吸虫症患者（糞便中の虫卵は陰性）の唾液中の遊離型DNAは、粗抽出DNAを鋳型としたPCR（PCR定法）では検出できなかったのに対し、シークエンスクャプチャー法（図2）で精製・濃縮したDNAを鋳型にPCRを行う（sc-PCR法）と26.7%の陽性率に上昇した。また、治療後の輸入ビルハルツ住血吸虫症の例でPCR定法では検出できない場合でもsc-PCR法で遊離型DNAが検出された（発表論文）。以上より、臨床検体中に存在する微量な住血吸虫由来の遊離型DNAは圧倒的な量の宿主由来DNAや検体中に含まれるPCR阻害物質の影響によって増幅が阻害されることが示唆された。

PCR定法における遊離型DNA検出の向上PCR反応試薬中のマグネシウム濃度とdNTP濃度の上昇（タカラバイオ・TaKaRa Ex Taq[®] Hot Start Version 使用の場合：MgCl₂ 3-5mM、dNTPs 各0.4-0.6 μM）や、PCR阻害物質を抑制する増幅試薬（島津製作所・Ampdirect[®] Plus）の使用によって、PCR定法での遊離型DNAの検出率を最大45%向上す

ることが出来た。

(3) 有病地での応用のための改良

検体の保存法の検討

アザイドまたはエタノール添加して常温保存した尿検体から DNA を抽出し PCR を実施した結果、それぞれ 15.3% (9/59)、48.3% (29/60) の遊離型 DNA が検出され、後者で有意な検出率の上昇がみられた ($p < 0.01$)。また、室温保存 6 年経過後のエタノール処理尿からも遊離型 DNA の検出を確認した。

有病地での多検体解析実施のための改良

日本住血吸虫虫体 DNA の希釈系列を用いた例では、PCR-ELISA の結果は PCR 定法(電気泳動)と同等の検出限界 (0.02pg) で、電気泳動の代替として使用可能であることが確認できた。本法は多検体のスクリーニングに適し、また、吸光度の値から半定量的解析も可能である (図 4)。

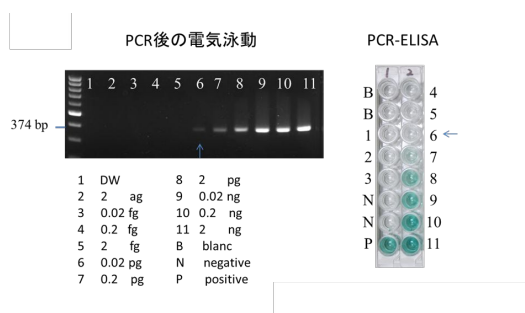


図 4 . PCR-ELISA

電気泳動と同等の結果が得られた

以上より、電気等の生活インフラが整っていない有病地においても実現可能な、ハイテクすぎないコストを抑えた方法で、有病地における住血吸虫の活動性感染状況をより正確に把握できることが見込まれた。本法の応用によって、将来的に住血吸虫症有病地の対策への貢献が期待される。

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 4 件)

林尚子：住血吸虫症の現状と検査・診断

法 . 日本医事新報 4742 : 56-57, 2015 . 査読無

Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MNB, Apin J, Agsorid LM, Chua JC, Villacorte EA, Krinoki M, Kikuchi M, Ohmae H, Haruki K, Chigusa Y: Detection of active schistosome infection by cell-free circulating DNA of schistosoma japonicum highly endemic areas in Sorsogon Province, the Philippines. Acta Trop 141:178-183, 2014. Doi:10.1016/j.actatropica.2014.05.003 査読有

林尚子、菊池三穂子、千種雄一：フィリピンにおける日本住血吸虫症有病地の現状 . 獣医寄生虫学雑誌 12(3)79-86, 2013 . 査読無

Kato-Hayashi N, Yasuda M, Yuasa J, Isaka S, Haruki K, Ohmae H, Osada Y, Kanazawa T, Chigusa Y: Use of cell-free circulating schistosome DNA in serum, urine, semen, and saliva to monitor a case of refractory imported schistosomiasis haematobia. J Clin Microbiol 51(10):3435-3438, 2013. Doi:10.1128/JCM.01219-13 査読有

[学会発表](計 5 件)

林尚子、Tamayo PG, Leonardo AK, Solitario RE, Villacorte EA, 菊池三穂子, Sunico LS, Guaves TF, Ilagan EJ, Leonardo LR, 千種雄一：尿中の住血吸虫遊離型 DNA の検出による治療効果判定から見たフィリピンの住血吸虫症対策 . 第 84 回日本寄生虫学会大会 (東京) 2015 年 3 月 21-22 日

林尚子、桐木雅史、千種雄一：遊離型 DNA 検出による住血吸虫症の診断 (国内例) . 第 83 回日本寄生虫学会大会 (松山) 2014 年 3 月 27-28 日

林尚子、桐木雅史、川合覚、千種雄一：住血吸虫症の遺伝子診断法改良の試み . 第 41 回獨協医学会 (壬生) 2013 年 12 月 1 日

林尚子、Chua JC, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MNB, Agsorid L, 菊池三穂子、大前比呂思、春木宏介、千種雄一：尿中の住血吸虫遊離型 DNA を標的とした活動性感染の検出 . 第 82 回日本寄生虫学会大会 (東京) 2013 年 3 月 29-31 日

Ohmae H, Kato-Hayashi N, Leonardo LR, Arevalo NL, Tagum MNB, Agsorid L, Krinoki M, Kikuchi M, Haruki K, Chigusa Y: A clinical trial for detection of active schistosome infection by cell-free circulating schistosome DNA in chronic patients in the schistosomiasis japonica highly endemic area in the Philippines. The 12th Annual Workshop of the Regional Network on Asian Schistosomiasis and Other Helminth Zoonosis (RNAS+), (Vietnam) 2012 年 11 月 7-9 日

〔図書〕(計3件)

千種雄一：医学書院．今日の診断指針(第7版)．2015．1415-1418．

千種雄一、林尚子：中山書店．アクチュアル脳・神経疾患の臨床 神経感染症を極める．2014.267-272．

千種雄一、林尚子：南江堂．今日の治療と看護(改訂第3版)．2013．974-976．

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

www.dokkyomed.ac.jp/dusm/kousei/2428.html

6．研究組織

(1)研究代表者

林 尚子 (KATO-HAYASHI, Naoko)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50382974

(2)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

(3)連携研究者

なし