

[17–20]. The worm reduction rates (WRR) were 77.5–99.5% when *S. japonicum*-infected mice (300 mg/kg), rabbits (20–40 mg/kg) and dogs (30 mg/kg) were orally administrated with artesunate once each week for 4 consecutive weeks [21]. Patients infected with *S. japonicum* in endemic areas of China were treated with praziquantel, and then divided into one group that was inoculated with 6 mg/kg of artesunate and another that received a placebo [22]. The protective rates of artesunate were 83.9–100% and 68.2% in areas of light to moderate, and heavy endemic infection, respectively. Recently, artesunate has also been reported to be effective against *S. mekongi* infection [23].

The efficacy of artesunate against infection with *S. mansoni* as opposed to *S. japonicum* remains controversial. An early study by Araujo et al. showed that artesunate obviously modified the reproductive organs of *S. mansoni* [24]. The results of our preliminary study showed that artesunate was therapeutically effective against *S. mansoni* infection in mice. We investigated details of the prophylactic and therapeutic aspects of artesunate against *S. mansoni* infection with a view of expanding the use of this drug. Since recent report has suggested that artesunate is less effective against *S. mansoni* than artemether, we attempted to reproduce these findings [25]. Chronic *S. mansoni* infection is associated with a latent iron-deficiency and iron is thought to be important for the activities of artemisinin-derivatives [26–28]. We therefore studied the effects of artesunate against *S. mansoni* infection in iron-deficient and in normal mice.

2. Materials and methods

2.1. Parasites and infection of mice

Cercariae of Puerto Rican strain of *S. mansoni* were released from *Biomphalaria glabrata* snails after exposure to artificial light for 3–5 h. BALB/c female mice weighting about 20 g (SRL, Hamamatsu, Japan) were infected with 200 cercariae by the tail dipping method. Developmental stages of the parasites were divided into the following: pre-lung stage at <7 days after infection, lung stage at 7–8 days after infection, post-lung stage at 2–3 weeks after infection, young adult stage at 4–5 weeks after infection, and adult stage at 6 or more weeks after infection. The Ethical Committee for Animal Experiments, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, approved our experimental protocol.

2.2. Treatment protocol

Artesunate provided by the Guilin Pharmaceutical Corp (lot #021205) (Guilin, China) was suspended in 1% sodium carbonyl methylcellulose (CMC-Na) for treatment of *S. mansoni*-infected mice. Mice were administrated orally with the aid of stainless stomach tube attached to a syringe. In each experiment, there was a control group(s) being administrated with 1% CMC-Na alone. In all experiments described below, one group contained 6 or 7 mice.

The first experiment was to determine which developmental stage of the parasite was most susceptible to artesunate. Five

groups, each of which contained 7 mice, were orally administrated with dose of 300 mg/kg for 2 consecutive days on the day 7–8, 14–15, 21–22, 28–29, or 35–36 post infection (PI). This covered different developmental stages (7–36 days) of the parasite. Adult worms were collected by perfusion method 56 days PI. The dosage of 300 mg/kg was referenced from our previous results from testing *S. japonicum* and *S. mansoni* [19,24].

In the second experiment, 6 groups, each of which again contained 6 or 7 mice, were treated orally in different time schedule at the dose of 300 mg/kg. Comparisons were made for three points: start of treatment (14 or 21 days PI), frequency of treatment (3 or 4 times), and interval of treatment (every 2 weeks or 3 weeks). Adult worms were collected by perfusion method 70 days PI.

For electron microscopic observation and for in vitro oviposition study, we prepared mice with sub-optimal artesunate treatment, because full-dose treatment of artesunate eliminated almost all worms. For this purpose, mice were treated orally with 100 mg/kg of artesunate on 14 days PI, followed by two consecutive treatments on day 28 and 42. Adult worms were collected by perfusion method 56 days PI.

2.3. Iron-deficient mice

To test the efficacy of artesunate in the iron-deficient host animals, 2 groups had been fed with normal or iron-deficient feeding for 7 weeks, and we tested the iron concentration in serum every week by Fe-IC diagnostic kit (Wako, Osaka, Japan). After Fe level in the serum decreased significantly, groups of mice were infected with *S. mansoni*, and then given the drug on day 14 PI at dose of 300 mg/kg once a week for 4 consecutive weeks. WRR were compared between the two groups as described below.

2.4. Assessment of the therapeutic effects

Mice were sacrificed and worms were recovered by portal perfusion with phosphate-buffered saline (PBS). The reduction rates of total and female worms were calculated by comparing the mean worm number with that of control group. The whole small intestine and almost all of the liver, from which a small part was removed for histological examination, were digested in 4% KOH overnight at 37 °C in separate tubes. The number of eggs were counted after centrifugation and washing. The fecundity of female worm was assessed by the parameter of eggs per female worm calculated as follows: total number of eggs recovered from mice was divided by the number of female worms. Paraffin-embedded sections of the liver were examined histologically to assess the hepatic lesions due to *S. mansoni* infection. Wet weight of the liver from each mouse was measured.

2.5. Scanning electron microscopic analysis

Adult worms obtained from the group treated with artesunate and from the corresponding control group were

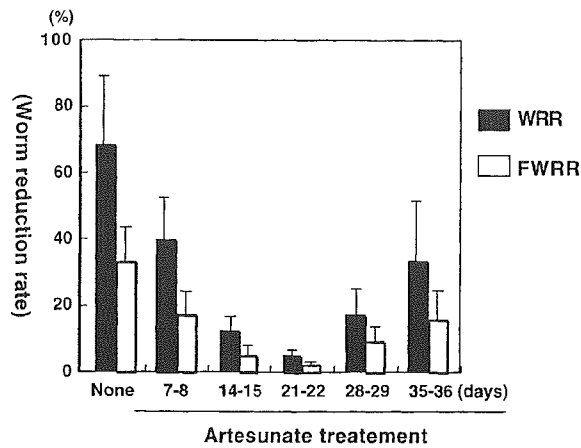


Fig. 1. Optimal time for artesunate prophylaxis against *S. mansoni* infection. Artesunate was orally administered at the dose of 300 mg/kg to infected mice at different times from day 7/8 to day 35/36 after infection. Parasites were collected by perfusion 8 weeks after infection. WRR was highest at 21 days after infection.

tested for electron microscopic observation. The worms were collected by perfusion method 56 days PI, and processed for scanning electron microscopic analysis according to standard methods [18]. Briefly, samples were fixed with 1–2% glutaraldehyde, washed, and post fixed in 0.1 M osmium tetroxide, dehydrated using ethanol, coated with gold-palladium and then examined with a scanning electron microscope (S-4800, Hitachi, Japan).

2.6. In vitro evaluation of artesunate on oviposition by adult worms

Adult *S. mansoni* pairs of 8 weeks PI were obtained from control or artesunate-treated mice, and were cultured in vitro to compare their egg production in vitro. Two worm pairs were dispensed to each well of 24 well plates (Nunc, Roskilde, Denmark) in RPMI 1640 (Sigma, St Louis, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO BRL, Rockville, USA) and 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 20 mM L-glutamine (GIBCO). After incubation for 3 days with 50 µg/ml of hemin in CO₂ incubator at 37 °C, produced eggs were collected and compared microscopically between the worms

Table 1
Effect of artesunate (300 mg/kg) with different regimens against *S. mansoni* infection

Group	N	Administration (days)	Total worms ±SD	WRR (%)	Female worm ±SD	FWRR (%)
1	7	–	25.0 ± 11.2		6.43 ± 2.63	
2	6	14–28–42	3.17 ± 3.58* [#]	87	1.67 ± 1.77*	73
3	6	14–35–56	4.16 ± 2.61* [#]	83	2.33 ± 1.89*	63
4	6	14–28–42–56	0.67 ± 0.90*	97	0.33 ± 0.51*	95
5	6	21–35–49	4.83 ± 2.90* [§]	81	2.17 ± 1.48*	66
6	6	21–42–63	8.50 ± 4.17* [§]	66	3.16 ± 1.91*	50
7	6	21–35–49–63	1.00 ± 1.63*	96	0.50 ± 0.80*	92

All mice were sacrificed 70 days PI.

* $p < 0.01$ (vs Group 1), [#] $p < 0.05$ (vs Group 4), and [§] $p < 0.05$ (vs Group 7).

WRR: worm reduction rate, percent reduction in worm burden compared with Group 1.

FWRR: female worm reduction rate, percent reduction in female worm burden compared with Group 1.

Table 2
Effect of artesunate (300 mg/kg) with different regimens on oviposition and hepatomegaly in *S. mansoni* infection

Group	N	Administration (days)	Eggs/female ^a ±SD	Mean liver weight (g) ±SD
1	6	–	4449 ± 641	2.00 ± 0.40
2	5	14–28–42	448 ± 91*	1.14 ± 0.02*
3	4	14–35–56	155 ± 26*	1.15 ± 0.01*
4	4	14–28–42–56	270 ± 33*	1.28 ± 0.11*
5	5	21–35–49	702 ± 226*	1.17 ± 0.04*
6	6	21–42–63	1339 ± 320*	1.28 ± 0.13*
7	6	21–35–49–63	684 ± 150*	1.23 ± 0.16*
Cont ^b	4	–	–	1.10 ± 0.01*

^a Number of eggs deposited in the intestine and the liver divided by number of female worms recovered.

^b Cont: Age-matched no infection control.

* $p < 0.01$ (vs Group 1).

from artesunate-treated and non-treated mice. Results were shown as mean egg number per one worm pair.

2.7. Statistical analysis

Student's *t*-test was employed to assess the statistical difference between treatment group and control group. Differences were considered when *p* values were < 0.05 .

3. Results

3.1. Susceptible stages of *S. mansoni*

Fig. 1 shows the susceptibility of *S. mansoni* at various developmental stages to artesunate in mice. The anthelmintic effect was significant at a WRR of 41% in the group administered with artesunate at the lung stage (days 7–8 PI), and reached a maximum of 93% WRR in the group medicated at the post-lung stage (days 14–15 and 21–22 PI). The efficacy decreased when mice were treated after day 21 PI, but the effect against the young adult stage remained significant (days 35–36 PI) at a WRR of 46% ($p < 0.01$).

3.2. Optimal protocol for artesunate treatment

To identify a suitable treatment schedule, groups of mice were initially given artesunate on either of day 14 or 21 PI, and

repeatedly medicated at different frequencies and intervals. The WRR and FWRR were highest in mice given 4 doses of artesunate at 2-week intervals (Groups 4 and 7), regardless of whether drug administration was started 14 or 21 days PI (Table 1). The WRR values for the groups given 4 consecutive doses were significantly elevated compared with given 3 consecutive doses ($p < 0.05$). Artesunate was more effective when administered at 2-week than at 3-week intervals, although the difference was not statistically significant. The reduction in oviposition of all groups given artesunate was statistically significant compared with the control group (Table 2) ($p < 0.01$). The diminished egg production indicated a pathological improvement, because morbidity is mainly due to eggs being deposited in the liver and other organs. Mice that did not receive artesunate developed apparent hepatomegaly, whereas no changes were evident in infected mice given artesunate compared with uninfected mice (Table 2). Histological observations revealed that liver sections from mice treated with artesunate contained neither eggs nor circumoval granuloma (data not shown).

3.3. Efficacy of artesunate in iron-deficient mice

After 50 days of feeding with an iron-deficient diet, the mean serum iron concentration in mice decreased to $63 \pm 12 \mu\text{g}/\text{dl}$, compared with $272 \pm 19.9 \mu\text{g}/\text{dl}$ in mice fed with a normal diet.

Table 3 shows that worms were not recovered from either normal or iron-deficient groups treated with artesunate, while the worm burden was high in non-treated mice. The worm burdens in mice fed with iron-deficient and normal control diets did not differ. These results indicated that a serum iron-deficiency at the level tested here did not influence the efficacy of artesunate against *S. mansoni* infection.

3.4. Electron microscopic observation

Scanning electron microscopy revealed that artesunate induced damage mainly on the worm tegument. Fig. 2a and b shows normal tubercles with small sharp spines on the tegument of control 8-week-old adult worms and alterations on the tubercles of 8-week-old adult worms treated with artesunate, respectively. The tubercles on the surface of male worms were retracted and small, and the sharp spines were shortened or absent, although the sensory structures were unaffected. The suckers of both male and female worms were damaged and collapsed (Fig. 2c) and the tegument ridges were focally swollen and fused (Fig. 2d). Host leukocytes adhered to the damaged tegument, although cellular characterization of those leukocytes was not clarified (Fig. 2e).

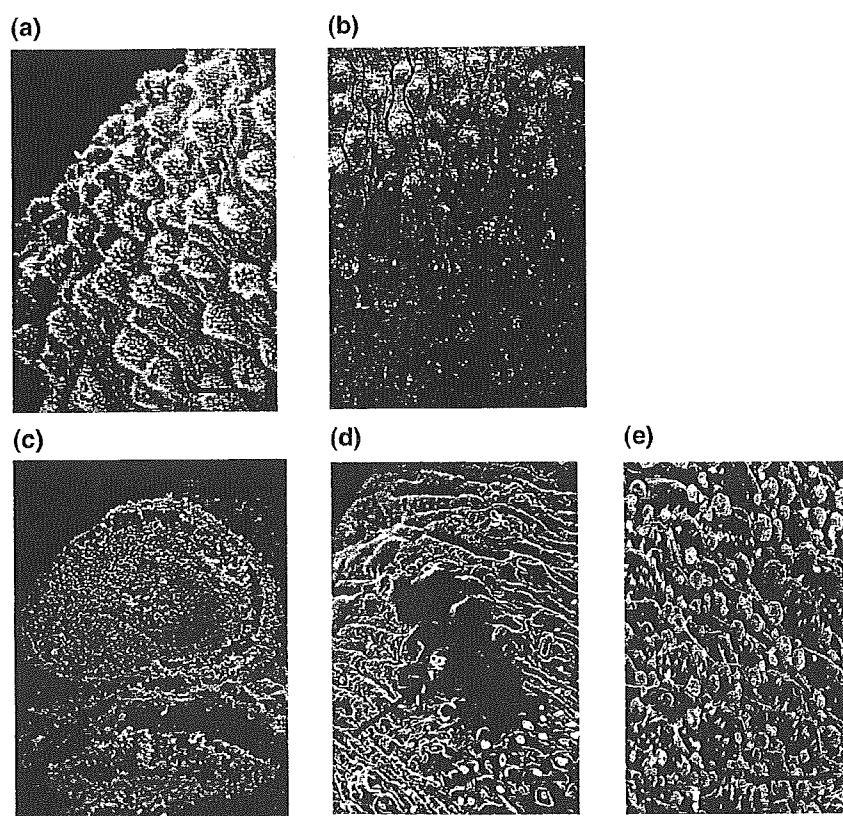


Fig. 2. Morphological damage observed by scanning electron microscopy. Worms were collected 8 weeks after infection from mice treated with artesunate at sub-optimal dose (100 mg/kg) on 14 days PI. (a) Normal tubercles on tegument of male worms from control group. (b) Alterations on tubercles of male worms from group given artesunate. (c) Damage to the oral sucker of treated group. (d) Focal swelling and fusion of tegumental ridges of treatment group (arrow). (e) Host leukocytes adhered to surface of parasites treated with artesunate, although cells were not characterized. Bars: 100 μm .

Table 3
Effect of artesunate on *S. mansoni* infection in iron-deficient or normal mice

Group	N	Fe-deficient	Artesunate ^a	Total worms recovered	WRR (%)	No. of female worms	FWRR (%)
F-1	6	+	–	24.8±3.9		13.3±2.3	
F-2	6	+	+	0*	100	0	100
N-1	6	–	–	28.8±9.1		14.0±4.0	
N-2	6	–	+	0*	100	0	100

All mice were sacrificed 70 days PI.

^a Artesunate was treated at the dose of 300 mg/kg on day 14–21–28–35 PI.

* $p < 0.01$ vs artesunate non-treated groups.

3.5. Inhibitory effects of artesunate on egg production in vitro

The number of eggs and degree of egg maturation were compared between adult pairs of *S. mansoni* recovered from mice with or without artesunate treatment. Worm pairs from control mice produced significantly more eggs in vitro than those from mice given a sub-optimal dose of artesunate (45.0±3.6 vs 12.3±1.8 eggs/pair, $p < 0.01$). Over 80% of eggs produced by worms from control mice were mature and/or normally developed, whereas worms from mice treated with artesunate did not produce any mature eggs in vitro.

4. Discussion

The present study found that artesunate prominently affected the immature stages of both *S. mansoni* and *S. japonicum* but at different levels of efficacy, since *S. mansoni* was the most susceptible to artesunate 1 or 2 weeks later than *S. japonicum* in a previous study in mice [21]. The lung stage schistosomula of *S. japonicum* were the most susceptible to artesunate [21], whereas immature adult *S. mansoni* worms at the post-lung stage were most affected by the drug. This coincides with their growth profiles: *S. mansoni* takes approximately one week longer than *S. japonicum* to develop from the schistosomula to the adult stage. A common metabolic profile, which is sensitive to artesunate, might be expressed in the highest level at a particular developmental stage of schistosome parasites, but there might be a time lag of one week between the two parasite species. Our results regarding the effectiveness of artesunate are equal to the efficacy of artemether reported by Xiao et al. [29]. The difference in developmental time course could explain the different time schedule for effective drug prescription between *S. mansoni* and *S. japonicum*. To combat *S. japonicum* infection, the first medication should be given 7 days after infection and 3 consecutive administrations once a week are recommended [21], although early diagnosis method should be developed when we implement the protocol. For *S. mansoni*, drug administration starting 14 or 21 days after infection followed by 3 repeated doses at 2-week intervals provided optimal protection. Considering the lengthy exposure period in heavy endemic areas, a treatment regimen with long intervals might be practical for field application. Other morphological observations have shown that damage caused by a single administration of artemether recovers within one week [24], indicating a need for repeated administration.

In addition to immature worms, artesunate also seems to kill mature adults, because the WRR was enhanced when additional doses were administered at 8 or 9 weeks after infection (Group 4 vs Group 2, or Group 7 vs Group 5: Table 1). The mechanism of the effects of artesunate has not been defined. Electron microscopy showed that artesunate caused morphological changes in *S. mansoni*, especially tegument damage similar to that caused by artemether [18,20,30]. The adhesion of host leukocytes to the surface of the parasites suggests that parasite antigen is released and these cells could cause immune-mediated damage, although no direct evidence is available.

Artesunate not only diminished the number of eggs produced, but also retarded their maturation. Although the reduced worm burden and inhibition of sexual maturation might be responsible for preventing the development of hepatic lesion, one study has shown that artesunate protects against liver injury induced by acetaminophen and carbon tetrachloride by stimulating hepatic-metabolizing enzymes [31]. Artesunate also inhibits the growth of hepatocellular carcinoma by inducing cancer cells to undergo apoptosis and by increasing topoisomerase activities [32,33]. We speculate that the schistosomicidal effects suppressed hepatic lesions, but an additional mechanism of hepatic cell protection conferred by artesunate could not be ruled out.

Iron-dependent free radicals generated by interaction between artemisinin and a high concentration of heme generated by extensive hemoglobin digestion might be toxic for the parasite [26]. Iron is an important factor for artesunate action. Mansour et al. suggested that chronic *S. mansoni* infection is associated with a high incidence of latent iron-deficiency [34]. Artesunate exerted striking schistosomicidal effects against *S. mansoni* in iron-deficient mice at levels comparable to those in control mice with normal iron levels. We thus conclude that even a severe iron-deficiency would not influence the efficacy of the artesunate.

Among several artemisinin derivatives, artesunate and artemether are usually used as anti-malarial drugs. Artesunate is less toxic than artemether [35], but a recent study has reported that artemether is more effective than artesunate against *S. mansoni* [25], although the experimental design in these studies and artesunate lots in the present study differed. Further studies are required to conclude which should be recommended for use as an anti-schistosome drug in humans.

In conclusion, artesunate is a promising prophylactic and therapeutic agent with which to combat *S. mansoni* infection,

and human trials should be implemented in the near future. In view of the short half-life of artesunate, parasite will probably not develop tolerance or resistance. Nevertheless, artesunate should be extensively applied in areas where malaria and schistosomiasis are co-endemic to minimize any latent risk of resistance.

Acknowledgements

We would like to thank the Guilin Pharmaceutical Corp. for the provision of artesunate. We also thank Prof. Wu Linjuan, Dr. Shi Junfan and Ms. Mariko Hato for helpful discussion and kind assistance. This study was supported in part by Grant-in-Aid for Scientific Research (#15390137), Japan Society for promotion of Science, a grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare (H15-Shinko-8), a grant from the Nakajima Heiwa Foundation (2005), and by a grant from the WHO cooperative programme (CHN/MVP/1.2/001/01.03.01).

References

- [1] Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Trop* 2000;77:41–5.
- [2] Utzinger J, Xiao S, Keiser J, Chen M, Zheng J, Tanner M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. *Curr Med Chem* 2001;8:1841–59.
- [3] Cioli D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol Today* 1998;14:418–22.
- [4] Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infection of different ages. *Exp Parasitol* 1986;61:294–303.
- [5] Kusel J, Hangan P. Praziquantel — its use, cost and possible development of resistance. *Parasitol Today* 1999;15:352–4.
- [6] Cioli D. Praziquantel: is there real resistance and there alternatives? *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:659–63.
- [7] Stellma FF, Talla I, Polmac K, Niang M, Sturrock RF, Deelder AM, et al. Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infections in a recently exposed community in northern Senegal. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:701–6.
- [8] Ismail M, Botros D, Metwally A, William S, Farghaly A, Tao LF, et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:932–5.
- [9] Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol* 2001;31:1227–35.
- [10] William S, Botros D, Ismail M, Farghaly A, Day TA, Bennetee JL. Praziquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. *Parasitology* 2001;122:63–6.
- [11] Bergquist NR, Colley DG. Schistosomiasis vaccine development: research to development. *Parasitol Today* 1998;14:99–104.
- [12] Li GQ, Guo XB, Fu LC, Jian HX, Wang XX. Clinical trials of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria in China. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88(Suppl 1):5–6.
- [13] Vikas DK, Rao V, Narasu ML. Current status of artemisinin and its derivatives as antimalaria drugs. *Life Sci* 2000;66:279–300.
- [14] Liu X. The research in antimalarial artesunate. *Prog Pharm Sci* 1999;23:46–52.
- [15] Guo Y, Wu LJ, Xu PS. Safety of artesunate in a long-term administration in rats. *Acta Acad Med Zhejiang* 1998;36:17–9.
- [16] Li S, Wu L, Liu Z, Hu L, Xu P, Zuan Y, et al. Studies on prophylactic effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Chin Med J* 1996;109:848–50.
- [17] Wu LJ, Xuan YX, Guo Y. Studies on the effect of artesunate on activity of enzymes in schistosomula. *Chin J Schistosomiasis Control* 1996;8:267–9.
- [18] Guo Y, Xu PS, Xuan YX. Observation of the effect of artesunate on ultrastructure of schistosomula. *Chin J Schistosomiasis Control* 1997;9:34–5.
- [19] Xiao S, Shen B, Chollet J, Utzinger J, Tanner M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *J Parasitol* 2000;86:1125–32.
- [20] Xiao S, Shen B, Utzinger J, Chollet J, Tanner M. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:717–24.
- [21] Wu LJ, Xu PS, Xuan YX. Experimental studies on oral administration of artesunate for early treatment to prevent schistosomiasis japonica. *Chin J Schistosomiasis Control* 1995;7:129–33.
- [22] Zhang SJ, Lin DD, Liu YM. Clinic trials on prevention effect of artesunate on schistosomiasis japonica. *Mod Diagn Treat* 2000;11:68–72.
- [23] Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Rengrojitak R, Kangwanrangsan K. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol Int* 2005;54:177–83.
- [24] Araujo N, Kohn A, Katz N. Therapeutic evaluation of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999;32:7–12.
- [25] Utzinger J, Chollet J, Tu Z, Xiao S, Tanner M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002;96:319–23.
- [26] Krungkrai SR, Yuthavong Y. The antimalarial action on *Plasmodium falciparum* of Qinghaosu and artesunate in combination with agents which modulate oxidant stress. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:710–4.
- [27] Xiao S, Chollet J, Utzinger J, Matile H, Mei J, Tanner M. Artemether administered together with haemin damages schistosome in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:67–71.
- [28] Pradines B, Rolain JM, Ramiandraso F, Fusai T, Mosnier J, Rogier C, et al. Iron chelators as antimalarial agents: in vitro activity of dicaticholate against *Plasmodium falciparum*. *J Antimicrob Chem* 2002;50:177–87.
- [29] Xiao S, Chollet J, Weiss NA, Berquist RN, Tanner M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 2000;49:19–24.
- [30] Xiao S, Binggui S, Chollet J, Utzinger J, Tanner M. Tegumental alternation in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters following artemether treatment. *Parasitol Int* 2001;50:175–83.
- [31] Chen CY, Yuan MJ, Tang GQ. Studies on the protective effects of artesunate against experimental liver injuries in mice. *Chin Pharmacol Bull* 1990;6:382–4.
- [32] Chen ZT, Huang ZY, Wu LN. Experimental investigation of apoptosis of hepatoma mediated by artesunate. *Chin J Integ Trad West Med* 2000;10:23–5.
- [33] Efferth T, Benakis A, Romero MR, Tomicic M, Rauh R, Steinbach D, et al. Enhancement of cytotoxicity of artemisinins toward cancer cells by ferrous iron. *Free Radic Biol Med* 2004;37:998–1009.
- [34] Mansour MM, Francis WM, Farid Z. Prevalence of latent iron deficiency in patients with chronic *S. mansoni* infection. *Trop Geogr Med* 1985;37:124–8.
- [35] Xu M. The progress on prophylactic studies of artemisinin, artemether and artesunate against schistosomiasis japonica. *Chin J Schistosomiasis Control* 1998;10:251–3.

中国における住血吸虫症

太田伸生

はじめに

住血吸虫症の歴史を訪ねてみると、今日残されている古代文明の遺産の中にヒトと住血吸虫症の関わりを見ることができる。中国大陸は人類の歴史が地球上で最も早い時期から残されてきた地域の一つであるが、私たちはその中にもこの病気の存在を見いだせるのである。中国にかつて蔓延していた日本住血吸虫症は、やがて近代医学の導入により、原因究明、診断・治療法の確立、予防対策の実施などを経て、ようやく 21 世紀になって制圧のゴールが見えてきた感がある。

住血吸虫症は風土病であり、その流行を支える背景には社会的要因の関与が大きい。古来、中国大陸を舞台にして、多くの国家、政治体制が勃興したが、それぞれの時代背景によって住血吸虫症の流行にも少なからぬ影響が見られたであろう。感染症対策の成否に社会制度の関与が大きいことは広く認められる事実である。本稿は、中国の日本住血吸虫症の歴史から今日の問題点、さらに近い将来の状況予測まで含めて、筆者の知るところを概括的に論じてみたいと思う。

1. 歴史の中の住血吸虫症

中国における住血吸虫症は悠久な揚子江の流れとともに興ったものである。揚子江流域は、黄河流域と並んで中国で最も早く人類文明が勃興した地域であるが、恐らくはこの地域への人類の定着の早い時期から住血吸虫症も共にあったものと思われる。中国国内の住血吸虫症流行地は揚子江中～下流域の低湿地に特徴的な湖沼型と四川省や雲南省など海拔 2,000 m 以上の高地まで広がる山丘型の 2 型に分けられるが、揚子江流域には湖沼型流行地が湖南省、湖北省、江西省、安徽省、江蘇省など広範囲にわたって点在している。この地域に古来、日本住血吸虫症が存在した確実な証拠としては湖南省長沙市にある馬王堆遺跡から 1972 年に出土した女性の遺体から得られたものがある。紀元前 200 年前後の西漢時代と推定されるその遺体は、まるで前日に亡くなったと言ってよいほどの保存状態で出土し、病理解剖の結果、夏期に心筋梗塞で死亡したことも判明している。そして、その女性の直腸粘膜から多数の日本住血吸虫卵が検出されたのである^{1,2)}。

三国志のハイライトの一つ、赤壁の戦いは西暦 208 年の出来事とされ、湖北省と湖南省の境に位置する揚子江一帯がその古戦場跡である(写真 1)。曹操率いる魏の水軍が予想外の大敗を喫したことで知られるが、そこは近年まで日本住血吸虫症の濃厚流行地として知られた場所であった。当時もまた流行地であったと考えられている。諸葛孔明の策略もさることながら、史家の多くは、魏の兵士たちの大半が住血吸虫症とは無縁の北方出身者であって、免疫のない彼らが揚子江の水に接したために急性住血吸虫症を病み、その結果、戦力が大幅に低下したことが敗因の一つと論じている。

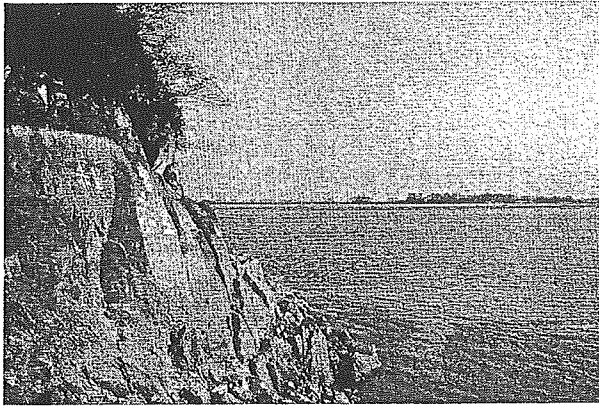


写真 1 赤壁の古戦場

三国志で知られる赤壁の闘いは湖南省、湖北省境界の揚子江を舞台とし、日本住血吸虫感染も大きく影響した。

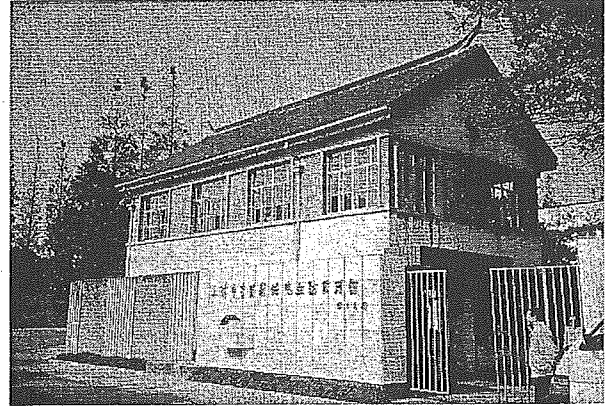


写真 2 青浦の住血吸虫制圧記念館

上海近郊の記念館であるが、近年上海市内でも流行再興が懸念されている。

近年に眼を向けると、中国で日本住血吸虫が科学的に検証されたのは 20 世紀に入ってからであった。湖南省洞庭湖沿いの周家口の町で米国人 Logan が 1905 年にヒト患者から虫体を発見している³⁾。これは日本における桂田、藤浪の発見に遅れることわずか 1 年であったが、もしも中国での発見が早ければ日本住血吸虫の学名はなかったことになる。前世紀の激動の中国史を飾るのは毛沢東による共産革命であろうが、毛沢東と住血吸虫症の戦いも歴史的な逸話になりつつある。毛沢東は湖南省韶山の出身で、青年時代は流行地である長沙市内の師範学校で学んだ。彼を一時支えた劉少奇も湖南省の出身であり、中国革命発祥の地、江西省南昌市も住血吸虫症の濃厚流行地であったことなど、毛沢東の青年期には住血吸虫症が常に身近にあったと思われる。その影響もあって住血吸虫症には関心が高かったらしく、革命直後の 1955 年には住血吸虫症制圧を党の重要政策に据えた。上海近郊の青浦にある住血吸虫制圧記念館(写真 2)の資料によれば、この病気で全村壊滅の悲劇が中国国内各所で見られたことは事実である。恐怖の病気であった住血吸虫症に対する彼の想いが「送瘟神」という詩に謳われている。毛沢東はその中で古来人民を苦しめた住血吸虫症が今や制圧に至ったことを高らかに讃えているが、実際には彼の存命中に揚子江流域で、制圧はさほど成功していなかった。

2. 中国の日本住血吸虫症、疫学的な特徴

中国の流行地は広大で多様である。そのことが本症の対策を困難にしている最大要因になっている。中国の流行地の各種指標を表 1 にまとめた^{4,5)}。患者数、中間宿主貝の生息面積、保虫宿主の種類と数など、わが国のかつての流行地と比較して、その規模の違いは歴然である。中国の住血吸虫症流行の特徴を知るために、いくつかの重要なポイントについて説明を加えてみよう。

1) 湖沼型流行地と山丘型流行地

前述の通り、低湿地に広がる湖沼型 (Marshland type) と比較的標高の高い地域に広がる山丘型 (Hilly type) の 2 型に中国の流行地は分類されている(表 2)。流行地の大半は湖沼型であり、揚子江や洞庭湖、鄱陽湖など河川、湖沼に沿って中間宿主貝が生息し、そこでヒトや家畜動物の感染がおこる。中

表1 中国の日本住血吸虫症流行の現状 (2003年)

流行域	7省 413行政区 (江蘇・安徽・江西・湖北・湖南・四川・雲南省):	
	感染者	総数
	急性患者	1,114名
	慢性患者	817,453名
	末期患者	24,440名
中間宿主貝生息域		31,321.5 ha

表2 中国の2つの流行地パターン

	湖沼型	山丘型
分布	江蘇, 安徽 江西, 湖南, 湖北	四川, 雲南
流行地居住人口	1,080万人	493万人
流行村落群	7,200	3,200
感染率	11.5%	7.6%
主な職業	農業, 漁業, 船員 商工業, 軍人, 学生など	農業, 学生など
中間宿主貝分布	29,760 ha	1,380 ha

間宿主貝は *Oncomelania hupensis* であり, 日本のミヤイリガイ (*O. nosophora*) よりもやや大型で殻も硬い。その生息面積はきわめて広く, 感染者も小児, 農民, 漁民, 河川敷で働く季節労働者, 洪水対策や警備などに当たる軍人などハイリスク集団が多数を占める。自然環境による流行への影響がきわめて大きい, その理由は揚子江の水位差が乾季と増水期とで 10 m 以上に及ぶためである。すなわち, 乾季には広大な草地が広がることになり, そこで中間宿主貝が繁殖して感染の場となる。そこで貝の対策を実施しても, やがて増水期には冠水してしまい, 対策の効果はまさに水泡に帰るのである。

一方, 山丘型は分布が四川省や雲南省の山岳地域にあり, 標高も海拔 2,000 m 以上に及ぶなど高く, かなり冷涼な地域である。中間宿主は *O. robertosomi* も含み, これは日本のミヤイリガイと形態的に類似している。山間の小河川に沿って貝が生息し, 社会インフラが未整備なため, 洗濯, 炊事など家事労働の際に感染する(写真3)。かつてのわが国の流行地とも似通った印象を受ける光景である。経済的に恵まれない少数民族の居住地にあることも対策を困難にしている。この型の流行地は面積としては多くないものの, 中国でも辺境地域に広がり, 社会インフラ整備の遅れもあって対策上困難な点が目立っている。



写真3 四川省西昌市郊外の山丘型流行地
小河川に生活用水を頼るため, 日本住血吸虫感染を途絶することが困難である。

2) 保虫宿主動物

日本住血吸虫は人獣共通寄生虫で、ヒト以外にも多くのほ乳類動物が終宿主になりうるものがマンスン住血吸虫やビルハルツ住血吸虫などとの大きな違いである。しかし、保虫宿主動物の構成はアジアの流行地間で異なり、地域ごとの特徴がある^{6,7)}。中国では水牛、ブタ、ヒツジなどが重要な保虫宿主であり、特に水牛は感染感受性が高い(表3)。野鼠も重要な保虫宿主であるが、中国ではそのデータが整理されていない。中国内陸部では水牛が依然として農業に活用され、それが農閑期である冬場の渇水期に揚子江河畔などに放牧される。そこで繁殖している中間宿主貝と接触することになる。同じ水牛でもフィリピンでは日本住血吸虫には抵抗性であるとされるが、その理由は生物学的に解明されていない。保虫宿主の多さのために、日本住血吸虫症は他の住血吸虫症に比べて対策が明らかに困難であり、中国でもヒトと水牛の両者の対策が重要であることが各種シミュレーションで明らかにされている。

表3 中国の保虫宿主動物

動物	陽性率	(湖沼型 / 山丘型)
黄牛	16.5%	(17.0% / 16.5%)
水牛	12.3%	(16.6% / 5.5%)
ブタ	3.1%	(4.0% / 2.1%)
ヒツジ	10.4%	(43.6% / 0.4%)
イヌ	2.6%	(34.2% / 2.1%)

3. 中国における住血吸虫症制圧の試み

前項で述べたとおり、中国の住血吸虫症制圧の取り組みは中国共産党による革命後に精力的に実施が図られるようになった。対策が緒についた1950年頃の日本住血吸虫症の流行域は揚子江流域以南に広く分布しており、感染者および *Oncomelania* 貝の生息域は中国全土12市・省にみられた。当時は検便以外に診断法はなく、また診断したとしても安全で効果的な治療薬はなかったため、疾病対策の方法としては中間宿主貝の駆除に主眼を置かざるを得なかった。もっとも初期の対策法は中間宿主貝を土中に埋めることで、小河川に沿った貝の生息地の場合、並行して新しく水路を作り、その土砂でもとの小河川を埋める手法が取られた。しかし効果は局所的なものにとどまったようである。その後、貝の対策としてはわが国でも取られたように、火炎放射器による焼却や殺貝剤の使用が始められた。殺貝剤の使用でもっとも問題となるのは魚毒性などの環境毒性で、その点では多くの殺貝剤の使用には制限が加えられた。1970年代から Na-PCP が使われるようになり、殺貝効果は高かったが、環境毒性が高く、2000年までに完全に使用が打ち切られた⁸⁾。続いて使用されるようになったのは Niclosamid で、魚毒性がやや認められるものの、今日なお中国国内で使用される標準的な殺貝剤の地位を保っている。しかし、これら殺貝剤の使用によっても、中国の中間宿主貝の生息面積は広大であり、揚子江の水位差による薬効の不安定さもあって、殺貝の効果は限られたものに止まっている。

中国の住血吸虫症対策として取られた方法は、基本的にはわが国と同様に mass-screening と mass-chemotherapy である。対策の国家計画にある組織を図1に示した。中国では住血吸虫のことを血吸

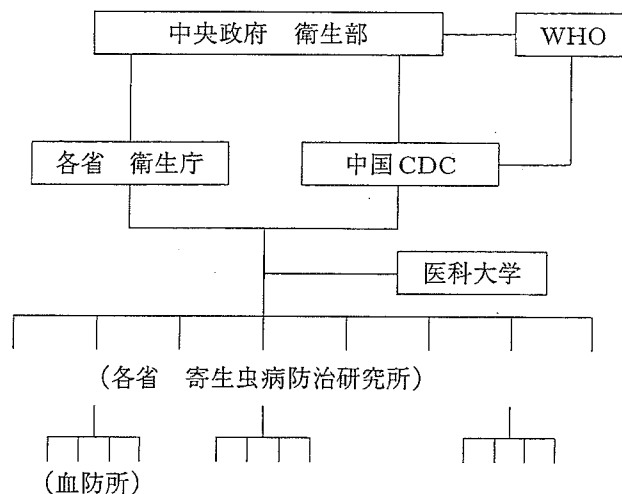


図1 中国の住血吸虫症対策組織図

中央政府、各省政府で政策を決定し、実施機関として省の寄生虫病防治研究所が機能している。フロントラインには血防所が設置されている。

虫と呼ぶのにちなみ、流行地のフロントラインには「血防所」と称する住血吸虫症対策ステーションが設置されている(写真4)。そこでは規模の大小はあるものの、日本住血吸虫症の診断、外来及び入院治療を行うことになっている。すべてに医師が常駐しているものではないが、最低限の医療サービスを施すことができる。その上位病院は各地域の中核都市の市中病院ということになるが、流行地では一定規模以上の病院に住血吸虫症の専門医をおいていることが多い。さらに流行地の各省ごとに衛生庁直属機関として「寄生虫病防治研究所」が置かれている。日本の地方衛研を想起すればよいが、診断のレファレンス、診断法開発や疫学サーベイ、殺貝剤研究、さらに住血吸虫症対策活動の実施主体にもなるなど、中国の住血吸虫症対策で最も重要な役割を担っている。それらの情報を整理して、北京政府への提言を行い、国家レベルの政策実施などに責任を負うのが上海の中国 CDC である。近年、中国の国家体制の見直しが進んでおり、各地の「寄生虫病防治研究所」も整理統合の動きが盛んであるが、現在は湖南省、湖北省、江西省、江蘇省、四川省など住血吸虫症流行地を抱える地域では従来の形で組織が残されている。住血吸虫症対策が政治問題としても重要な意味を持つものだろう、と旧知の中国人研究者は述べているが、実際はどうであろうか。



写真4 血防所風景

流行のフロントラインに設置された血防所が医療サービスの最前線を担っている。

4. 中国の日本住血吸虫症流行の現状

中国国内の日本住血吸虫症に関する全国レベルの疫学サーベイは過去2回実施されている。1989

年に第1回の全国サーベイが行われて、詳細な報告書が刊行された⁷⁾。文化大革命による国家的疲弊から回復して、政治運営が安定しかけた時期的背景下の住血吸虫症流行実態である。この時期は寄生虫研究者の数は少なくないものの、流行地の大半は外国人の立ち入りを制限する地域に指定されていたこともあって、住血吸虫対策をめぐる国外の研究者との接点もごく限られたものに留まらざるを得なかった。研究面でも国際レベルの研究を推進するまでの国力回復には至っておらず、一部の大学を除いて研究成果の国際誌への投稿はほとんどなされていない。しかし、図1に示した組織は機能しており、定期的な住民検診と集団駆虫、地域の流行状況把握は整備されていた。住民検診では Kato-Katz 法とミラシジウム遊出法による糞便検査、ELISA による血清診断、触診などによる臨床的検査をセットにして行うのが通例であった。それにもかかわらず、社会インフラがかなり劣悪であったことから、対策の効果としては十分に上がっていなかった頃である。

中国の住血吸虫症対策の実効が飛躍的に上がってきたのは1990年代以降である。1996年に第2回の全国サーベイが実施され、各種パラメータには大きな改善が見られている⁴⁾。この時期の効果が上がった理由の一つは、世界銀行による住血吸虫症対策のための融資が1992年から10年間実施されたことである。それにより、流行地では住民の検診とプラジカンテル投与による治療が原則として無料で実施できるようになり、対策事業の住民コンプライアンスが向上した。各種社会インフラ整備も遅々とはあるが進んだことも影響しているであろう。この間、国家目標としてヒトと家畜の感染率を4割減らすこと、及び貝の生息域面積を半減させることを掲げている。中国全土のうち7省413地域に流行地が残っているが、流行地の状況は「流行継続 (Transmission areas)」, 「流行制圧 (Transmission-controlled areas)」および「流行途絶 (Transmission-interrupted areas)」の3つに分けられ、そのうち「流行途絶」の地域は全体の60%を占めるようになった一方で、全体の25.4%が「流行継続」のまま残されている。現在、中国国内の63ヵ所が「流行制圧」になっており、さらに「流行途絶」に至ることを目指している。一般に「流行制圧」に持っていきただけならば中国の国力を以てすれば困難なことではないが、これを次に進めるためには多くの困難を伴う。日本住血吸虫やマンスン住血吸虫など intestinal schistosomiasis は不定愁訴が前面に出る病気であるため、感染者が早期に自らの病気を自覚することが少ない。従って、より正確な case detection 法を確立して水牛など保虫宿主をも網羅した感染宿主の治療が必要になる。流行が軽減するとともに住民のモチベーションは一般に低下することはやむを得ないことであり、今後の対策推進の継続が課題である。

この数年の中国国内の状況にはいくつかの懸念材料が現れてきている。それは住血吸虫症の再興である。第1に指摘されているのは過去数年の揚子江の大洪水による影響である。わが国でも報道があったように、揚子江中流域で1990年代後半以降毎年のように大洪水が発生し、冠水地域の拡大が見られている。その結果、新たな中間宿主貝の分布域拡大が発見されており(表4)、急性患者の報

表4 湖南省内の洪水による貝生息域の変化

調査村落	1996年洪水前		1996年洪水後		1997年	
	貝の生息面積(万 m ²)	陽性率	貝の生息面積(万 m ²)	陽性率	貝の生息面積(万 m ²)	陽性率
A村	0	0%	305.0	0%	0	0%
B村	0	0	0.4	0	0.4	0
C村	19.7	0	244.2	0	44.2	0
D村	0	0	26.2	0	26.2	0
E村	0	0	38.0	0	38.0	0

告数も 2003 年度には 1,114 名を数え、前年度報告数を 22% 上回った。7 省 38 地区で住血吸虫症の再興が見られたほか、貝の生息分布にも変動が見られ、湖南省、湖北省を中心にかなり広域化している。上海市域でも感染貝が再び発見されたとの報告がある⁵⁾。他方、新たな流行地の報告がこの 2-3 年増加してきた。湖南省では従来、無病地であった南東部の湘江流域地区で 2002 年になって *O. hupensis* と感染者が発見されている。その地域は洪水の影響があった地区とは離れた山間部にあり、なぜ中間宿主貝の生息が移行してきたのかわかっていない。

中国における日本住血吸虫症の再興は一部で真剣に懸念されていたことである。その理由は前述の世界銀行融資が 2002 年で終了した結果、検診事業と感染者の治療薬投与が原則として受益者負担になったことにある。世界銀行融資で年間 2 億元の予算で行っていた対策が、融資終了後は 7,000 万元に激減したからである。湖南省の事例では 1 回のプラジカンテル処方代金を 20 元(日本円で約 300 円)に設定した結果、農民の自主的な受診が激減した。そのように、流行地での対策事業に対する住民のコンプライアンスは急激に低下している。さらに血防所の職員に対する給料遅配が日常化し、対策従事者のインセンティブの点でも大きな問題が生じたのである。さらに、揚子江中流域の夏期の酷暑は有名であるが、流行軽減に伴って住民や学校教師のモチベーションが低下した結果、学童が河川水で水泳をすることなどを地域が放置するようになったことも問題視されている。そのような事態を受けて、上海の中国 CDC では、急遽 2004 年に第 3 回の全国サーベイを実施することを決定し、2004 年 10 月から本格調査が実施されることになっている。さらに北京政府への提言を行い、その結果、2004 年度から住血吸虫症対策のための国家予算として世界銀行からの毎年の融資額に匹敵する 2 億元が決定された。対策システムの再構築を含む今後の改善が期待される。

5. 中国の住血吸虫症流行に影響する環境影響、特に三峡ダムの影響を中心にして

揚子江中流域の観光資源として名高い三峡にダム建設の計画が正式に承認されたのは 1992 年のことである。中国の現政府樹立後最大の国家プロジェクトの一つであると言ってよい。ダム建設の主な目的は電力開発と揚子江中流域の治水で、2009 年の完成をめざして工事が進んでいる。三峡の一帯は日本住血吸虫症の流行地ではないが、上流と下流には流行地が存在している。そのために、ダム完成後の住血吸虫症流行状況に変化が生じることが案じられている⁹⁾。ダムの建設に伴う住血吸虫症の流行拡大事例としては、エジプトのアスワンハイダムの経験が語られるが、三峡ダムに関する議論はそれとは異なっている。マンソン住血吸虫やビルハルツ住血吸虫の中間宿主貝である *Biomphalaria* 属や *Blimus* 属の貝は完全な水棲貝であるため、ダムによる広大な人造湖がそのまま貝の繁殖池になった。アスワンハイダム以外でも農業灌漑の整備事業に伴ってビルハルツ住血吸虫症の流行拡大が各所で報告されている。一方、*Oncomelania* 属は半水棲貝であり、好適な生息環境は湿潤な草地帯である。従って、ダム建設による水没面積の拡大が問題なのではなく、揚子江の特殊事情である大きな季節間水位差の解消が問題になると考えられるのである。当面の予想として、ダムの下流域には広大な草地帯が年間を通じて安定的に出現し、それが揚子江の増水によって冠水することがなくなるとされている。すなわち、*Oncomelania* 属貝の安定的な繁殖環境が通年的に確保されることになるとの予測である。多方面からの影響予測がなされているが、現時点では下流域の湖南省と湖北省とでは流行地が拡大し、一方で江西省では減少すると報告されている。三峡ダムが影響を及ぼすのはあくまでも揚子江本流であるので、複雑に入り組んだ支流域の影響についてはダ

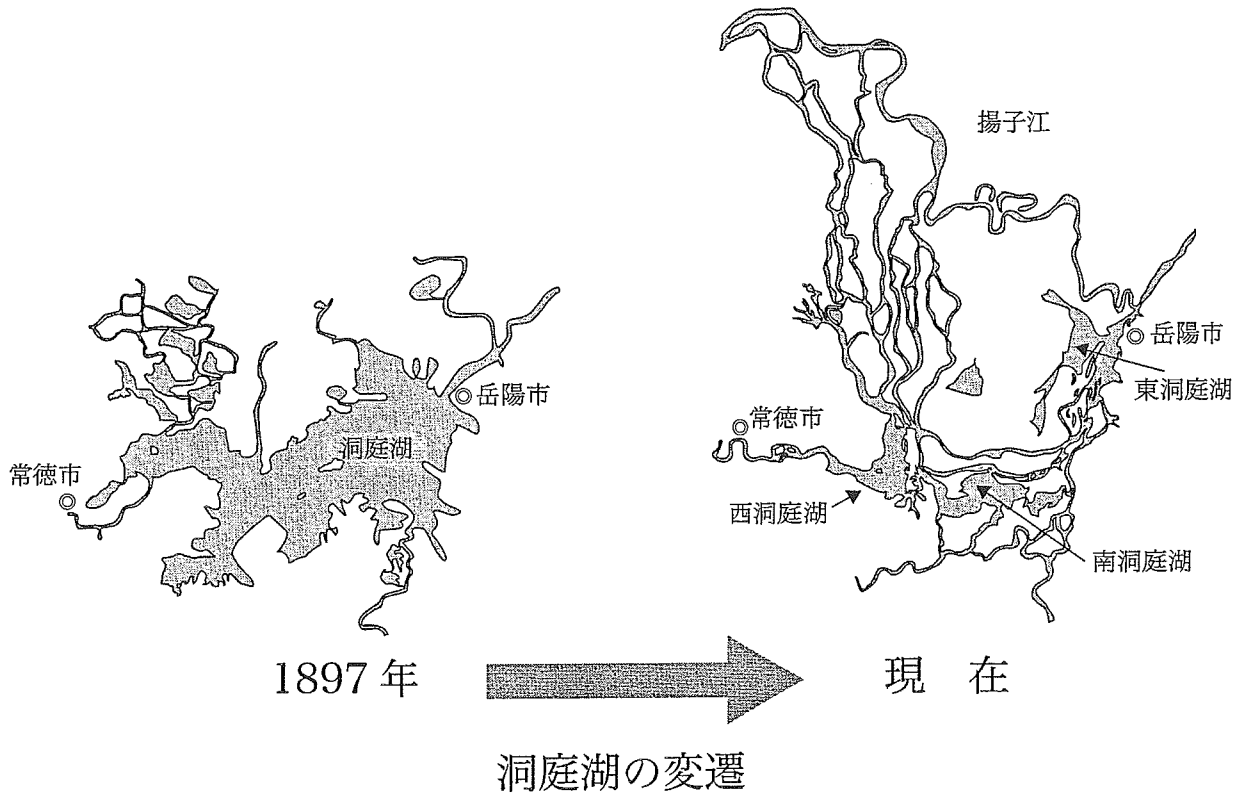


図2 過去100年間の洞庭湖の地勢変化

洞庭湖は揚子江から流入する大量の土砂により縮小してきたが、過去100年間の変化は急速で、単一の湖面を示さなくなっている。

ム完成を見ないと判らない。

土地利用に関する巨大プロジェクトとしては、洞庭湖の浚渫事業がある。洞庭湖は永く、中国最大の淡水湖であった。しかし、20世紀に入ってから急速に面積が縮小し、現在では東、西、南洞庭湖に分割され(図2)、現在の中国最大の淡水湖は鄱陽湖にとって代わられた。洞庭湖には揚子江本流から3本の流入路を経て導水されるほかに湖南省各地から多数の中小河川が流入している。洞庭湖

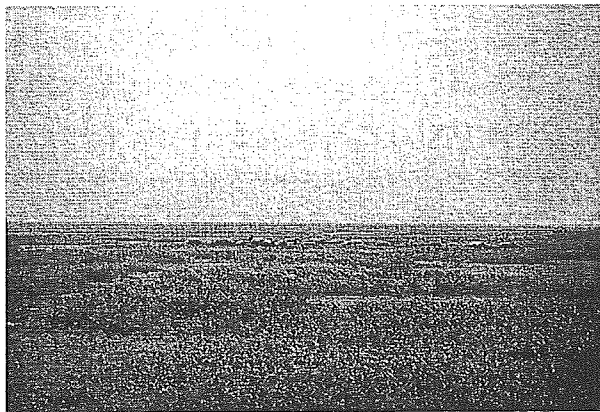


写真5 洞庭湖岸の草地

湖岸でも低湿地は農業には適さず、放置されて草地になっており、中間宿主貝の繁殖地となっている。堤防から湖岸まで2-3 kmに及ぶ。

からの流出は湖南省北部、岳陽市付近の1ヵ所だけで揚子江本流と交通している。そのような地理的な構造から、洞庭湖は揚子江の自然の「水位調節ダム」の役割を担ってきた。「百年河清を待つ」の諺にあるように、黄河のみならず揚子江も中流域以降は激しい濁り水であり、毎年大量の土砂を流している。その結果、揚子江の河川水が大量に流入してくる洞庭湖では毎年8,200万 m³の土砂が沈澱することになり、それが湖水面積の積年の減少に繋がった。湖岸の後退の結果、広大な草地が広がり、その多くは農業用地として利用されているが、草地として放置されているケースも多い(写真5)。そこが *Oncomelania* 属貝の好適繁殖地

であることはすでにくり返して述べてきたことである。大規模浚渫工事によって洞庭湖を再び一つの湖面に戻す試みは、湖岸の土地利用変化を進めることになり、現在放置されて草地になっているところが水面下に没することになれば、中間宿主貝棲息面積の縮小という効果が期待されることになる。

揚子江の導水計画も検討されている。揚子江の豊富な水資源を山東半島や華北地方に導水して農業、工業ほか生活用水としても活用する国家計画であり、2001年に着工して今世紀中の完成を目指して準備が進行している。巨大水路を建設する計画であるが、それが *Oncomelania* 属貝の棲息分布の北進を促すことが一部で懸念されている。環境モニタリングの実施が必要になるが、一旦貝の生息拡大を導くと、そのコントロールは極めて困難なものになろう。

6. 中国の住血吸虫症流行の近未来予測

住血吸虫症の根絶を実現することは可能であるが、そのためには社会システムの総力をあげて、各構成単位が果たすべき役割を十分に実行することが求められる。中国の住血吸虫症は近い未来に根絶できるのであろうか。住血吸虫症根絶のために現在の中国に求められることは何であるのかを考えてみたい。

住血吸虫症対策のためのプロトコールはすでに確立している。すなわち、感染宿主の治療を主体に、水をめぐる生活インフラの整備と中間宿主貝の対策である。多くの途上国にとっては「根絶」は叶わぬことということで、morbidity control に主眼をおくことを WHO は宣言しているが、中国には国力にふさわしい「根絶」を目指すことが期待される。フィリピンやインドネシアの流行がほぼ終息に向かいつつあることから、中国での成功によって地球上から日本住血吸虫症を駆逐することになる。そのために重要なことは国際連携であり、東アジアでは Regional Network for Asian Schistosomiasis (RNAS) という組織が WHO の援助下に組織されており¹⁰⁾、メコン住血吸虫症対策も視野に入れて、疫学、臨床、診断法開発、ワクチン開発など総括的な協力体制確立を進めている。日本住血吸虫症は今では中国とフィリピンだけの問題になっているが、日本、豪州、欧米をも巻き込んだ駆逐を進める努力を期待したい。

日本住血吸虫症が人獣共通寄生虫症である以上、ヒトだけの対策では駆逐に至ることはできない。補助的な対策技術ではあるが、ワクチン実用化を目指す作業も継続されている。これまで Paramyosin や Calpain を用いて水牛やブタなど大型動物での試験が日本や豪州との共同プロジェクトとして試みられている^{11,12,13)}。一方でヒトの対策としては近年になってマラリア治療薬である Artemether / Artesunate が強力な住血吸虫予防効果を持つことが明らかになり^{14,15,16)}、ハイリスクグループの人たちの一時的な感染回避を目的にテストされた結果、ほぼ完全な予防効果が観察されている。日本住血吸虫ではまだ報告はないが、特効薬であるプラジカンテルの耐性出現も常に監視する必要がある。そのような意味で、新規薬剤開発、ワクチン開発などは今後とも精力的に進める必要がある。

有病率が低下した現在であるからこそ、中国の住血吸虫症対策は正念場を迎えている。流行地住民の感染率が3%未満の地域では selected mass-chemotherapy を行うことになっている。そのためには case-detection を正確に行わなくてはならない。現在は糞便検査が依然として golden standard であるが、その感度は決して高くない。スクリーニングとしては感度が高いこと、試料採取が容易

であることが求められるが、PCR 診断¹⁷⁾、循環抗原検出法、非観血的免疫診断法¹⁸⁾などの開発導入が今後必要になる。

おわりに

住血吸虫症が全地球的にはいわゆる Neglected Disease に位置づけられるなかで、中国の住血吸虫症が依然として国家の重要課題として様々な施策の対象になっていることの意義は大きい。中国が国際的な影響力を大きくする中で、住血吸虫症対策に熱心に取り組む様子を世界に示すことは、住血吸虫症流行を抱えた途上国の保健行政にも示唆を与えるからである。そのためにも、中国の住血吸虫症対策がサクセスストーリーとしてアピールできることが必要である。しかし、中国の社会経済発展の多様化に伴って国内の疾病構造が多様化してきている。住血吸虫症に関しては沿岸部の上海市、浙江省などでは根絶に至った一方で、内陸部の湖南省、湖北省などでの困難な状況、というように二分化してきた。今後、住血吸虫症対策をより強力に推進するのか、他の社会資本投資に埋もれてしまうかが注目される。中国の住血吸虫症根絶に向けた闘いは重要なターニングポイントを迎えている。

参考文献

- 1) 馬継興, 馬王堆古医書考釈, 湖南科学術出版社, 1992 (本文中国文)
- 2) 何永康, 西漢古死体内血吸虫の発現与研究, 湖南省防治血吸虫病研究(方金城, 吳昭武編), 湖南人民出版社, 2000, pp. 1-4 (本文中国文)
- 3) Clinical Parasitology, P. C. Beaver, R. D. Jung, E. W. Cupp (eds), Lea & Febiger, 1984, p. 416.
- 4) Jiang, Q. W., Wang, L. Y., Guo, J. G., Chen, M. G., Zhou, X. N., Dirk, E. Morbidity control of schistosomiasis in China. In Proceedings of International Symposium on Schistosomiasis, Ministry of Health, China, 2001, pp. 1-11.
- 5) Zhou XN, Wang TP, Wang LY, Guo JG, Xu J, Wang PB, Chen Z, Jia TW. The current status of schistosomiasis epidemics in China. Zhonghua Liu Ying Bing Xue Za Zhi 25: 555-558, 2004 (Abstract in English).
- 6) Blas BL, Rosales MI, Lipayon IL, Yasuraoka K, Matsuda H, Hayashi M. The schistosomiasis problem in the Philippines: a review. Parasitol Int, 53: 127-134, 2004.
- 7) 中華人民共和国衛生部地方病防治司, 中国血吸虫病流行狀況——1989年全国抽樣調查, 成都科技大学出版社, 1993 (本文中国文)
- 8) 周達人, 湖南省寄生虫病防治研究所建所 40 周年研究資料選編, 湖南省寄生虫病防治研究所, 1990 (本文中国文)
- 9) Zheng J, Gu XG, Xu YL, Ge JH, Yang XX, He CH, Tang C, Cai KP, Jiang QW, Liang YS, Wang TP, Xu XJ, Zhong JH, Yuan HC, Zhou XN. Relationship between the transmission of schistosomiasis japonica and the construction of the Three Gorge Reservoir. Acta Trop, 82: 147-156, 2002.
- 10) Feng, Z. Regional Network on Asian Schistosomiasis (RNAS), Proceedings of the Meeting, Jiangsu Institute of Parasitic Diseases, Wuxi, 2001.
- 11) MacManus D.P. A vaccine against Asian schistosomiasis. Int J Parasitol, 30: 265-271, 2000.
- 12) Chen H. G., Nara T, Zeng XJ, Satoh M, Wu GC, Jiang WS, Hirayama K. Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin against *Schistosoma japonicum* in China. Vaccine 18: 2142-2146, 2000.
- 13) Ohta N, Kumagai T, Maruyama H, Yoshida A, He YK, Zhang RL. Research on calpain of *Schistosoma japonicum* as a vaccine candidate. Parasitol Int, 53: 175-181, 2004.
- 14) 浙江省医学科学院寄生虫病研究所他, Artesunate, 中国広西桂林製薬所, 2000 (一部中国文)

- 15) Utzinger J, Xiao S, N'Goran EK, Bergquist R, Tanner M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *J Parasitol.* 2001 Dec; 31 (14): 1549-62.
- 16) Xiao S, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R, Chen M, Zheng J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop.* 82: 175-81, 2002.
- 17) Rabello A, Pontes LA, Dias-Neto E. Recent advances in the diagnosis of Schistosoma infection: the detection of parasite DNA. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97 (Spl) 1: 171-2, 2002.
- 18) Itoh M, Ohta N, Kanazawa T, Nakajima Y, Sho M, Minai M, Zhou DR, Chen Y, He HB, He YK, Zhong ZA. Sensitized enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: a tool for surveillance of schistosomiasis japonica. *Southeast Asian J Trop Med Pub Health,* 34: 469-472, 2003.

題名：住血吸虫感染症における Th2 シフトとサイトカイン

氏名：太田伸生

Key Words: Schistosoma, soluble egg antigen, Th2, Th2-adjuvant, co-infection

英文題名：Th2-shift and cytokine production during schistosomal infection

英文氏名：Nobuo Ohta, MD, Ph.D.

所属：名古屋市立大学大学院医学研究科宿主・寄生体関係学分野

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄 1

英文所属：Department of Molecular Parasitology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

1.はじめに

生体防御における Th1/Th2 の機能について今日なお十分な解明に至っていないものの、そのバランスがヒトの免疫病因論上重要な役割を担うことは多くの状況証拠が示すところである。一般に Th1 応答が生体防御に重要な機能を担う証拠は得られるが Th2 応答の生体防御における積極的な意義は明らかでない。しかし蠕虫感染では強い Th2 応答が誘導されて、その応答が感染防御や発症機構に重要な関与をしていることが実験的に示される例外的な事例である。生体機能の恒常性を考えた場合、Th1/Th2 の一定のバランスが必要であり、両者の相互調節性は生体防御の重要な因子であるが、Th2 の応答調節機構について今日なお不明の点が多い。

住血吸虫はヒトやマウスの血管内に寄生する蠕虫性病原体であり、その感染では他の蠕虫感染と同様に宿主に強い Th2 応答を誘導されてくる。その Th2 応答は住血吸虫症に特徴的な肝線維症の発症機序因子であることが示されており、その解明には治療的意義も期待されている。住血吸虫は他のヒト寄生蠕虫と異なって実験室内での維持が確立されている蠕虫であるが、そのことを利用して蠕虫感染の免疫生物学研究モデルとして活用が進み、Th2 応答の調節や機能解析に関する詳細な情報蓄積が進んできた。その中には住血吸虫以外の感染症や免疫疾患への臨床応用を予感させる情報も得られてきている。本稿では住血吸虫感染症における宿主応答のサイトカイン産生動態とその制御システムおよびその免疫病因論について、今日明らかになっている情報を解説し、その医学生物学的応用の可能性について論じてみたい。

2.住血吸虫虫卵抗原刺激による宿主応答の Th2 シフト

住血吸虫は水中に遊泳する有尾幼虫(セルカリア)が経皮的に脊椎動物に感染し、循環系を巡って寄生部位の血管内で成虫になる。ヒト寄生の住血吸虫には大きく2種類あり、肝門脈系で成虫になり肝・消化器症状を示す intestinal schistosomiasis と骨盤内静脈で成虫になって泌尿器症状を呈する urinary schistosomiasis がある。前者は日本住血

吸虫やマンソン住血吸虫による症状で、後者はビルハルツ住血吸虫が病原体である。実験室内維持が可能なのは前者に限られるため、本稿でも日本住血吸虫とマンソン住血吸虫を用いた実験データを基本にして論じていくことにしたい。

経皮感染したセルカリアは皮下組織を移行した後、2週後には幼若虫になり3週以降には寄生部位の血管に至って成長を続ける。日本住血吸虫では6週以降、マンソン住血吸虫では7週以降に産卵を開始する。従って感染宿主は感染早期に幼虫抗原、4週以降には成虫抗原、7週以降には成虫抗原と虫卵抗原による刺激を受けることになる。住血吸虫感染に伴う宿主応答のTh1/Th2バランスは感染週令に伴って変化してくるのが特徴であり、その変化をもたらすシグナルは虫卵抗原による刺激である。マンソン住血吸虫感染マウスの血中サイトカイン産生パターンをIFN γ とIL-4で経時的に測定しながら観察すると、早期にはIFN γ 優位であったものが感染6~7週で急激にIL-4優位に変化する¹⁾(図-1)。すなわち感染した住血吸虫が産卵を開始するのを契機に宿主応答がTh2優位になるのであり、虫卵抗原にTh2応答を誘導する成分が含まれることが強く示唆されるのである。実験室で住血吸虫を感染させた場合に雄虫だけの単性寄生になる偶発的な事故が時々みられる。その住血吸虫単性寄生マウスでは感染7週でのTh1/Th2パターンの変換は起こってこない。そのような観察データにもとづけば、住血吸虫感染時の宿主応答のTh2シフトは虫卵抗原中の成分に何らかのシグナルが含まれると考えてよいであろう。

3.住血吸虫の感染免疫におけるTh2応答の機能

虫卵抗原の刺激で誘導されてくるTh2応答がこの寄生虫の感染免疫の中でどのような意味を持つのであろうか。住血吸虫感染の症候論としては虫卵抗原に対するTh2応答こそがその発症機序の本態を担うというのが今日の理解である。Intestinal schistosomiasisにおける慢性症状は血管内で産下された虫卵が毛細血管にトラップされて、その周囲に肉芽腫が形成され、その局所的炎症から腸炎症状や肝線維化などが進行する。その引き金となる虫卵肉芽腫はヌードマウス、抗IL-4抗体投与マウス及び抗CD86抗体投与マウスで見られないことからTh2制御下の宿主応答であると結論されている²⁾。

住血吸虫に対する感染防御の観点からはTh2応答の位置づけについて今日なお議論がある。住血吸虫感染に対するワクチン開発研究の過程で住血吸虫の感染防御に関わるエフェクターが何であるかが検討されてきた。蠕虫感染であるから所謂「二度なし現象」は起こらないが、確かに頻回感染宿主では感染虫数が次第に減少していく。ラットを用いて研究していたグループは好酸球による住血吸虫幼虫の傷害を示し、Th2シフトが感染防御重要であると結論した。一方マウスで研究したグループではIFN γ による活性化マクロファージが幼虫殺滅に関わる観察結果を示しTh1が感染防御に必須であるとした。しかしワクチン接種マウスに抗IFN γ 抗体と抗IL-4抗体のいずれかを投

与して宿主応答の Th1 か Th2 を抑制した場合にもほぼ同等のワクチン効果を誘導できることが示され、感染防御に関わるエフェクター誘導には Th1、Th2 いずれでも構わないというのが当面の解釈である。そうであるならば住血吸虫の側から見た場合、宿主応答が Th1 にも Th2 にもシフトしないのが好都合なのであり”Happy valley hypothesis”と呼ぶことがある³⁾。住血感染による宿主応答の Th2 シフトが防御免疫的には宿主に利することなのか否かはわかっていないが、一定の宿主・寄生体間の平衡状況の結果と考えられよう。

4.住血吸虫感染によるサイトカイン環境と生体防御

住血吸虫感染宿主では Th2 優位の免疫学的環境が誘導される。このことは Th1 応答に抑制的なバイアスが働くことを意味し、生体防御に何らかの影響を及ぼすことが可能であろう。宿主の Th1/Th2 バランス決定におけるヒエラルヒー構造にあつて住血吸虫感染は比較的上位にあり、住血吸虫感染宿主では他の病原体との共存下または免疫刺激条件下で抗原非特異的に Th2 優位の応答が誘導されるからである。担がん宿主では腫瘍排除に Th1 応答が必要であるが住血吸虫感染マウスでは腫瘍抗原特異的 Th1 応答が有意に抑制される。即ち腫瘍を移植されたマウスの脾細胞と腫瘍細胞の *in vitro* 混合培養反応で産生される腫瘍特異的な IFN γ 産生を調べると、マウスにあらかじめマンスン住血吸虫を感染させて置くことによって腫瘍特異的な IL-4 産生の上昇と IFN γ 産生の低下が観察される⁴⁾ (図-2)。同様の現象はウイルスと住血吸虫の重複感染でも見られる現象であると推定され、住血吸虫感染マウスにワクシニアウイルスを感染させた場合にウイルスのクリアランスが遷延する現象がみられる。

これを疫学的現象と比較した場合、住血吸虫症流行地ではがんが多いという従来からの知見を説明することも可能かもしれない。住血吸虫感染による Th2 シフトの結果、がんに対する *immune surveillance* の部分的破綻が起こると考えることは可能である。住血吸虫感染宿主では B または C 型肝炎ウイルス陽性者が多いが、一つの可能性としてウイルス感染防御に対する住血吸虫感染の抑制的な影響の結果という解釈も否定は出来ない。

住血吸虫に限らず宿主に Th2 シフトを誘導する蠕虫感染が見られる集団では医学的に様々な影響が及ぶ可能性がある。例えば遺伝子治療のキャリアとしてワクシニアウイルスのように一般にはヒトに病原性のないとされるウイルスを使うと開発戦略があるが、マウスの実験で示されたようにヒトでも住血吸虫感染宿主でワクシニアウイルスのクリアランスが遷延するならばワクシニアウイルスが完全に無害な担体とは言えず、方法の再考が要求される。さらにがんに対する DNA ワクチンを用いることによってキラー T 細胞応答が可能になるとして検討されているが、住血吸虫感染がある宿主の場合は DNA ワクチンによる Th1 応答が阻害されることが起こりうることである。

5. 虫卵抗原刺激による Th2 シフトの生物学的機序

住血吸虫の虫卵に宿主に Th2 シフトを誘導する分子を同定する研究が進められている。さまざまな機構が提唱されているが、虫卵抗原の糖鎖にその機能を推定するデータが報告されている。住血吸虫卵の粗抗原に含まれる糖鎖のうち主なものは LNFP III (lacto-N-fucopentaose III) であり、それが Th2 応答誘導のアジュバント効果があるとするものである⁵⁾。住血吸虫卵の粗抗原(SEA)を用いてアジュバントなしにマウスの鼻粘膜に添加感作すると SEA 特異的な IgE 産生と鼻粘膜リンパ球の IL-4 や IL-5 産生を誘導することが出来る。しかし SEA にあらかじめ periodate 処理を加えて脱糖鎖化したものを感作に用いると IL-4 産生はほとんど完全に抑制される。しかし同様処理によっても SEA 刺激に対する IFN γ 産生は全く変化しない(図-3)。すなわち SEA の糖鎖は免疫応答の Th1/Th2 バランスの相対比を変化させるのではなく Th2 のみを選択的に調節することが考えられる。その意味では SEA の糖鎖構造が Th2 応答のみを選択的に誘導するアジュバント効果を持つという解釈が一番妥当と考えられる。

しかしながらこの現象にはやや複雑な仕組みが存在している。第一に SEA の Th2 アジュバント効果には宿主の遺伝的背景が関係していることである。マンソン住血吸虫の SEA を検討した場合には BALB/c マウスは強く Th2 応答を示す(高応答性)が C57.BL/6 マウスでは見られない(低応答性)。ところが同様の実験を日本住血吸虫の SEA で行った場合、逆に BALB/c が低応答性であり B6 マウスが高応答性であった。マンソン住血吸虫の SEA と同様に日本住血吸虫 SEA も LNFP III が主要な構成糖鎖であり質的な相違を示すデータはない。そのことから観察されたマウス系統差は一応 H-2 により制御された形質と考えてよい結果が得られている(表-1)。しかしマンソン住血吸虫の SEA で実験した場合には BALB/c と B6 の F1 ではすべて高応答性を示したが日本住血吸虫の SEA の場合は同じ F1 でも父・母の組み合わせによって F1 の表現型が異なり、単純優性遺伝で説明できる形質ではないことが示され、現時点ではその遺伝様式を説明するための十分な情報は得られていない。

SEA のタンパク質成分に Th2 誘導活性を求める検討報告もある。マンソン住血吸虫 SEA からゲルろ過とイオン交換クロマトによる分画を得て好塩基球に添加した場合の IL-4 産生誘導活性を検討した結果、40 k Da の糖タンパク質に活性分子(IPSE)を同定した⁶⁾。その大腸菌によるリコンビナント分子もその活性を持つことからタンパク質がその活性の本体であるとしているが、in vitro のアッセイ系がやや特殊であり、住血吸虫感染に見られる現象を説明することにそのまま応用してよいものか疑問は残っている。

6. おわりに

蠕虫感染における宿主応答の Th2 シフトの機序を解明するのに住血吸虫症は格好の研究モデルを呈するものであるが、その虫卵抗原に強い Th2 応答誘導活性があること