

CL hygiene were studied.

Results : A total of 350 patients were investigated, with an average age of 28.0 (9-90) years. *Acanthamoeba* was identified in 85 (24.3%) corneal specimens and *Pseudomonas aeruginosa* in 70 (20.0%) cases. One hundred ninety six (56.0%) patients were frequent replacement soft CL users. Extended wearing of daily-use CLs was found in 77 (22.0%) patients. Only 67 cases maintained good CL hygiene by daily rubbing-washing and the poor CL care situation was reviewed.

Conclusion : The most frequently detected pathogenic microorganism was *Acanthamoeba*, followed by *Pseudomonas aeruginosa*. Our survey showed the importance of keeping good CL hygiene by proper lens care, and improvement of CL-related social regulations is urgently needed.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 115 : 107-115, 2011)

Key words : Contact lens, Microbial keratitis, *Acanthamoeba*, *Pseudomonas aeruginosa*

I 緒 言

コンタクトレンズ(CL)装用における角膜障害には軽度の点状表層角膜症や充血をはじめ多彩なものがあるが、なかでも感染症は高度の視力低下を来たしうる最も重篤な合併症である。近年行われた感染性角膜炎全国サーベイランス¹⁾によると、30歳未満の症例の約9割がCL装用者であり、CLが若年者の視機能を脅かしている現状が浮き彫りとなった。CL関連角膜感染症(CL装用に起因すると考えられる角膜感染症)は緑膿菌を中心とした細菌性のものが主流であるが、近年アカントアメーバによるきわめて難治な感染症も増加しており²⁾³⁾、大きな社会問題といえる。

CL関連角膜感染症の発症にはいくつかの要因が挙げられる。CLは角膜の酸素不足、上皮の障害を起こしうるもので、角膜表面を易感染状態にするものと考えられる。異物や微生物が付着したCLは身のまわりに存在する環境微生物を眼表面に運ぶ、いわばキャリアーとして働く。さらにCLと角結膜の間は涙液によるwash out効果が及びにくくなる⁴⁾。近年CLケアにおいて多目的用剤(multi-purpose solution : MPS)が使用されることが多いが、この際重要なステップであるこすり洗いやすすぎが徹底されていない、CLケースの交換が定期的になされていない、眼科医による定期検査を受けていないなど、装用者側の問題も数多く指摘されるところである。

日本CL学会および日本眼感染症学会は重症CL関連角膜感染症の実態を把握する目的で2年間の全国調査を行った。最初の1年5か月間については中間報告がなされているが⁵⁾、今回、全期間の結果を報告するとともにCL関連角膜感染症の実態さらにはCL装用者の現状について考察してみたい。

II 対象および方法

2007年2月にすべての日本眼科学会専門医制度認定研修施設(1,155施設)に対し、調査協力の可否について問い合わせを行い、参加承諾が得られた224施設(19.4%)で実施した。対象は2007年4月から2009年3月ま

での2年間にCL装用が原因と考えられる角膜感染症で入院加療を必要とした症例である。担当医に対するアンケートと患者用のアンケートを用意し、web上での登録を依頼した。

担当医への調査内容は、性別、年齢、発症眼、自覚症状、初診時視力、前眼部所見、塗抹検鏡所見、分離培養結果、治療薬、外科的処置の有無、3か月後の転帰、3か月後の視力であった。患者に対するアンケート内容はCLの種類、装用時間、週あたりの装用日数、装用方法、消毒の種類、週あたりの洗浄回数、週あたりの消毒の頻度、こすり洗いの有無、レンズケースの交換頻度、定期検査の頻度、1日ディスプレイザブルCLの使用期間、2週間頻回交換ソフトCL(frequent replacement soft CL : FRSCCL)の使用期間、定期交換(1, 3か月)ソフトCL(SCL)の使用期間、装用方法遵守の程度、処方された施設、購入先であった。なお、CLおよびCLケア用品の発売状況を鑑み、患者用アンケート用紙は2008年4月からは一部を改変した。

III 結 果

1. 対象症例数および性別・年齢

対象となった症例は350例で、男性が195例、女性が155例であった。年齢は平均28.0歳(9歳~90歳)であった。

2. 発症眼および自他覚所見

角膜感染症の発症眼が右眼のみであるものが160例(45.7%)、左眼のみが157例(44.9%)、両眼に発症したものが33例(9.4%)であった。自覚症状については表1に示す。眼痛、充血、視力低下が主な症状として挙げられた。初診時矯正視力および初診時の前眼部所見についてはそれぞれ図1、表2に示す。手動弁以下の64例(18.3%)を含め、矯正視力0.09以下が172例(49.1%)であり、高度な視力低下を来していた症例が多くみられた。前眼部所見については毛様充血をはじめ、角膜浸潤あるいは角膜潰瘍、前房内細胞、角膜浮腫が高率に認められた。アカントアメーバ角膜炎に特徴的とされる放射状角膜神経炎は78例(22.3%)にみられた。

表 1 自覚症状

	症例数	%
眼痛	308	88.0
充血	298	85.1
視力低下	238	68.0
流涙	147	42.0
異物感	128	36.6
眼脂	95	27.1
その他	20	5.7

(重複回答可)

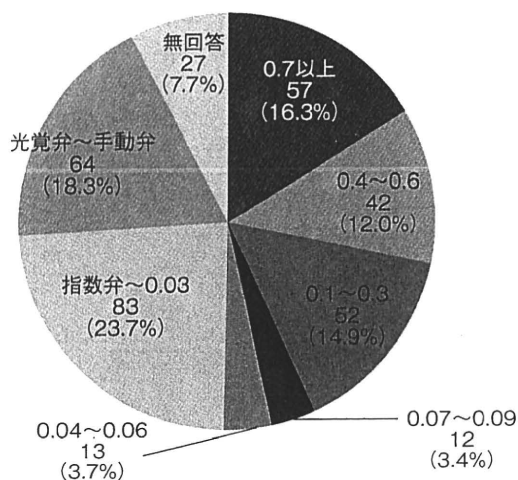


図 1 初診時矯正視力.

3. 細菌学的検査

塗抹検鏡検査が行われたのは 278 例(79.4%)であった。検体の採取部位別の結果を表 3 に示す。角膜病巣から得られた検体からアカントアメーバが 68 例, グラム陰性桿菌が 40 例, グラム陽性球菌が 20 例で確認された。この他, 検鏡陽性数が多かった検体として CL ケースが挙げられる。CL ケースからも角膜病巣と同様にアカントアメーバおよび, グラム陰性桿菌が多く検出されていた。なお, 今回の調査ではどの部位の検体を塗抹検鏡検査に供したかについての情報がなかったため, 検出率についての検討はできなかった。

培養検査は 333 例(95.1%)で施行されていた。うち何らかの微生物が検出されたのが 228 例, 陽性率は 68.5%であった。検体の採取部位別の結果を表 4 に示す。角膜病巣からは緑膿菌が 70 例, アカントアメーバが 56 例で同定されていた。その他, 黄色ブドウ球菌, 表皮ブドウ球菌, セラチアなどもみられたがいずれも数例程度であった。CL ケースからの検出菌としては緑膿菌 39 例の他, セラチア 17 例, その他のグラム陰性桿菌が 34 例とグラム陰性桿菌が多数検出されていた。アカントアメーバも CL ケースから 32 例で検出されていた。なお, 角膜病巣から検鏡・培養のいずれかでアカントアメーバ

表 2 前眼部所見

	症例数	%
毛様充血	318	90.9
角膜浸潤	258	73.7
前房内細胞	237	67.7
角膜浮腫	228	65.1
角膜潰瘍	194	55.4
眼瞼腫脹, 発赤	126	36.0
Descemet 膜皺襞	109	31.1
前房蓄膿	95	27.1
角膜後面沈着物	84	24.0
放射状角膜神経炎	78	22.3
眼脂	83	23.7
角膜膿瘍	82	23.4
輪状浸潤	62	17.7
円板状浸潤	57	16.3
偽樹枝状角膜炎	34	9.7
前房内フィブリン	34	9.7
免疫輪	31	8.9
衛星病巣	11	3.1
endothelial plaque	11	3.1
角膜穿孔	5	1.4
hyphate ulcer	5	1.4
虹彩後癒着	2	0.6

(重複回答可)

が検出された症例は 85 例であった。

4. 治療薬

治療として点眼など眼局所に用いられた薬剤を表 5 に示す。ニューキノロン系の点眼薬および眼軟膏が頻用されており, セフメノキシム・アミノグリコシド系の点眼薬も多く症例で使用されていた。アゾール系薬剤の点眼(自家調整)が全体の約 30% の症例で処方されるなど, ピマリシン点眼・眼軟膏などを含めた抗真菌薬も多く症例で使われていた。

5. 外科的処置および 3 か月後の転帰

調査対象施設受診後 3 か月以内に外科的処置として角膜搔爬は 126 例(36.0%), 角膜移植は 7 例(2.0%)で施行されていた。角膜移植症例のうち角膜擦過物から黄色ブドウ球菌が同定されているものが 1 例, 緑膿菌が 3 例, アカントアメーバが 1 例であった。

3 か月後の転帰について表 6 に示す。治療が継続中であるものが 106 例(30.3%)であった。治癒症例については治癒までの期間についても調査をしているが, 1 か月以上を要しているものが 84 例と治癒症例 145 例中 57.9% を占めていた。

受診 3 か月後の矯正視力について回答の得られた症例は 284 例であり, このうち 0.7 以上確保したものが 177 例(62.3%)であった。しかし, 0.09 以下の矯正視力しかなかった症例も 40 例(14.1%)認められた(図 2)。

6. 発症時使用していた CL の種類および装用方法

角膜感染症発症時使用していた CL の種類を表 7 に示す。2 週間 FRSC が 196 例(56.0%)と過半数を占めて

表 3 塗抹検鏡

菌種	グラム陽性球菌	グラム陽性桿菌	グラム陰性球菌	グラム陰性桿菌	糸状菌	アカントアメーバ
角膜病巣	20	16	5	40	2	68
結膜囊	2	2	0	3	0	0
眼脂	1	0	0	5	0	0
コンタクトレンズ	5	1	2	8	0	6
コンタクトレンズケース	11	9	6	30	3	21
その他	1	0	1	0	0	2

表 4 分離培養にて検出された主要菌

菌種	黄色ブドウ球菌	表皮ブドウ球菌	コリネバクテリウム	緑膿菌	セラチア	その他のグラム陰性桿菌	アスペルギルス	アカントアメーバ
角膜病巣	3	5	6	70	3	4	0	56
結膜囊	1	3	4	3	1	1	0	0
眼脂	0	1	1	8	1	0	0	0
コンタクトレンズ	4	2	2	20	5	13	0	4
コンタクトレンズケース	2	3	5	39	17	34	1	32
その他	0	1	0	5	1	3	0	1

表 5 治療薬(眼局所)

種別	薬剤	症例数	%
抗菌	オフロキサシン 眼軟膏	207	59.1
	レボフロキサシン 点眼	172	49.1
	セフメノキシム 点眼	147	42.0
	アミノグリコシド系 点眼	141	40.3
	ガチフロキサシン 点眼	102	29.1
	モキシフロキサシン 点眼	36	10.3
	その他の抗菌薬(抗生物質) 点眼	26	7.4
	アミノグリコシド系 結膜下注射	26	7.4
	その他の抗菌薬(抗生物質) 眼軟膏	19	5.4
	その他の抗菌薬(抗生物質) 結膜下注射	12	3.4
	その他のニューキノロン系 点眼	10	2.9
抗真菌	トスフロキサシン 点眼	9	2.6
	アゾール系 点眼(自家調整)	107	30.6
	ピマリシン 点眼・眼軟膏	84	24.0
	ミカファンギン 点眼(自家調整)	28	8.0
その他	アトロピン 点眼	128	36.6
	消毒薬 点眼(自家調整)	106	30.3
	ミドリン P® 点眼	69	19.7
	副腎皮質ステロイド 点眼	21	6.0
	その他 点眼	8	2.3
	非ステロイド性抗炎症薬 点眼	6	1.7

いた。続いて症例数の多いものとして定期交換 SCL 56 例(16.0%)、1 日ディスプレイ CL 26 例(7.4%)が挙げられた。

1 日の CL 装用時間および週あたりの CL 装用日数について図 3, 4 にそれぞれ示す。8~16 時間未満の装用が 169 例(48.3%)と最も多かったが、16 時間以上の装用も 121 例(34.6%)みられた。装用日数については毎日装用するものが 263 例(75.1%)であった。連続装用か終日装用かの観点から CL の種類と実際の装用方法につい

て調査した結果が表 8 である。「終日装用の CL を終日装用していた」が 186 例(53.1%)と最も多かったが、「終日装用の CL を連続装用していた」が 77 例(22.0%)と少なからず認められた。

7. 使用していた消毒薬

CL の消毒薬の種類について、回答のあった 227 例のうち MPS を使用していた例が 212 例(93.4%)であった。この他、過酸化水素が 14 例(6.2%)、煮沸消毒が 1 例(0.4%)みられたが、ヨード製剤を用いていたという回答はなかった。

8. ケアの方法

CL を外したのち再装用するまでのケアの方法に関し、CL の洗浄、消毒、こすり洗い、CL ケースの交換についてそれぞれ図 5, 6, 7, 8 に結果を示す。CL の洗浄については、「毎日洗浄していた」は 135 例(38.6%)にとどまっていた。「時々洗浄していた」、「ほとんど洗浄していなかった」、「まったく洗浄していなかった」など、CL の洗浄が十分行われていないと考えられる例も一定数みられていた(図 5)。CL の消毒についても洗浄とほぼ同様の結果であった(図 6)。CL のこすり洗いについては、「毎日こすり洗いしていた」は 67 例(19.1%)であり、「時々こすり洗いしていた」53 例(15.1%)、「ほとんどこすり洗いしていなかった」61 例(17.4%)、「まったくこすり洗いしていなかった」60 例(17.1%)の 3 つを合わせると 174 例(49.7%)にもなった(図 7)。CL ケースの交換については特に交換までの期間を決めていないものが多く、「不定期に交換していた」、「ほとんど交換していなかった」、「まったく交換していなかった」を合わせると 174 例(49.7%)と約半数を占めていた(図 8)。

表 6 3 か月後の転帰

	症例数	%
治療中	106	30.3
治癒	145	41.4

治癒までの期間		
1 週以内	3 (2.1)*	
1~2 週	19 (13.1)	
2 週~1 か月	28 (19.3)	
1~2 か月	42 (29.0)	
2 か月を超える	42 (29.0)	
無回答	11 (7.6)	

転院	53	15.1
来院しなくなった	12	3.4
無回答	34	9.7

* : 括弧内の数字は治癒 145 例中の割合を百分率で表している。

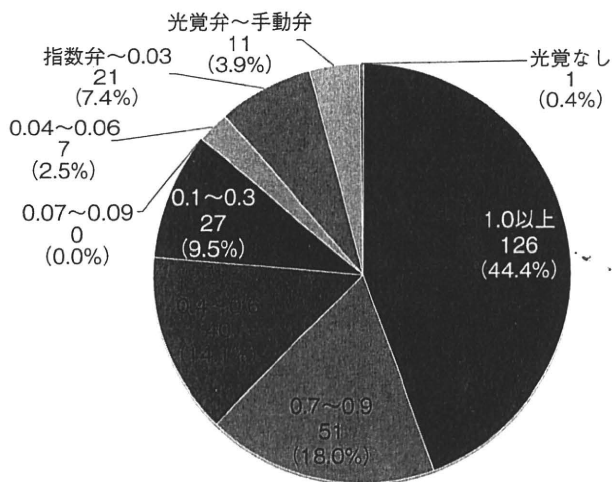


図 2 3 か月後の矯正視力。

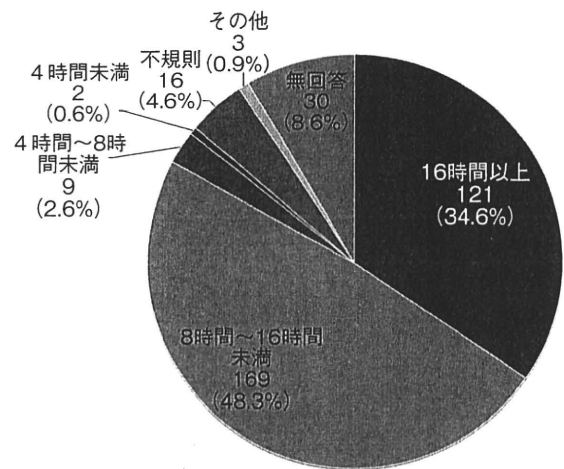


図 3 1 日のコンタクトレンズ(CL)着用時間。

表 7 発症時使用していたコンタクトレンズ(CL)

	症例数	%
1 日デイスポーザブル CL	26	7.4
1 週間連続装用デイスポーザブル CL	4	1.1
2 週間頻回交換ソフト CL (FRSCL)	196	56.0
定期交換 (1 か月, 3 か月) SCL	56	16.0
従来型 SCL	9	2.6
カラー CL	17	4.9
ハード CL	17	4.9
オルソケラトロジーレンズ	2	0.6
無回答	23	6.6

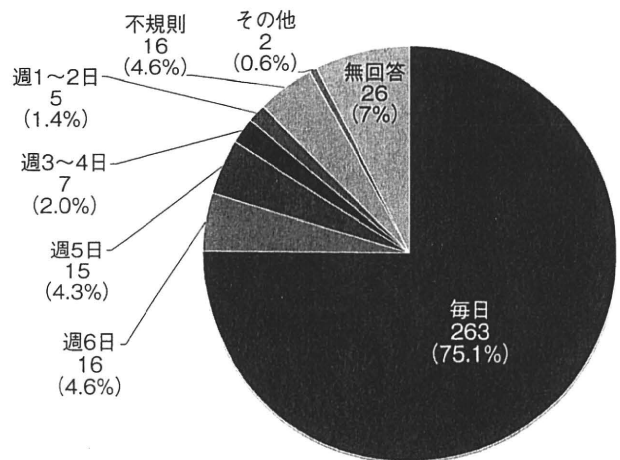


図 4 週あたりの CL 装用日数。

9. 定期検査

CL の定期検査の頻度について図 9 に結果を示す。「不定期に受けていた」、「ほとんど受けていなかった」、「まったく受けていなかった」など、特定の受診間隔を定めていなかった例が 162 例(46.3%)を占めていた。

10. CL の使用期間

SCL は従来型を除き使用期間が定められている。この使用期間が遵守されているかについてレンズのタイプ

別にアンケート結果をまとめた。1 日デイスポーザブル CL 装用者 26 例のうち「1 日」と規定どおりの使用期間を守っていたものは 12 例(46.2%)のみであった(表 9)。同様に 2 週間 FRSCL, 定期交換 SCL についての結果を表 10, 11 にそれぞれ示す。症例数の多い 2 週間 FRSCL

表 8 CL 装用方法

	症例数	%
終日装用の CL を終日装用していた	186	53.1
終日装用の CL を連続装用していた	77	22.0
連続装用可能な CL を終日装用していた	30	8.6
連続装用可能な CL を連続装用していた	16	4.6
無回答	41	11.7

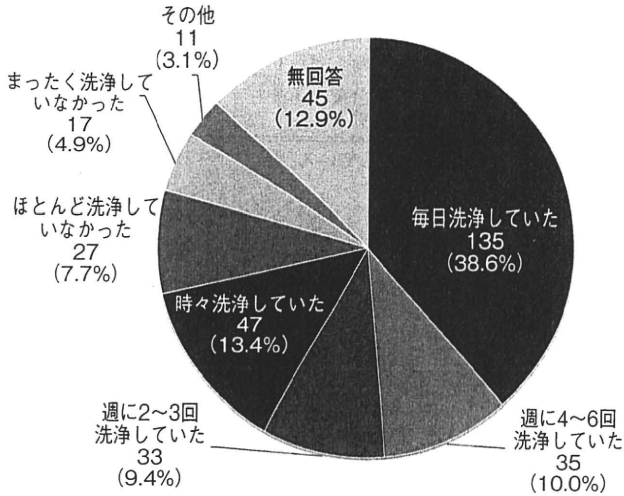


図 5 CL の洗浄.

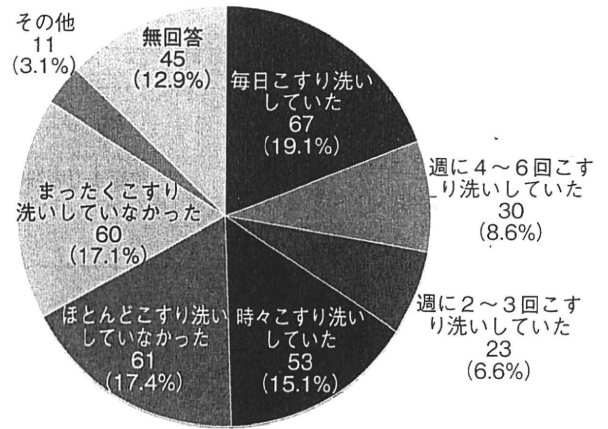


図 7 CL のこすり洗い.

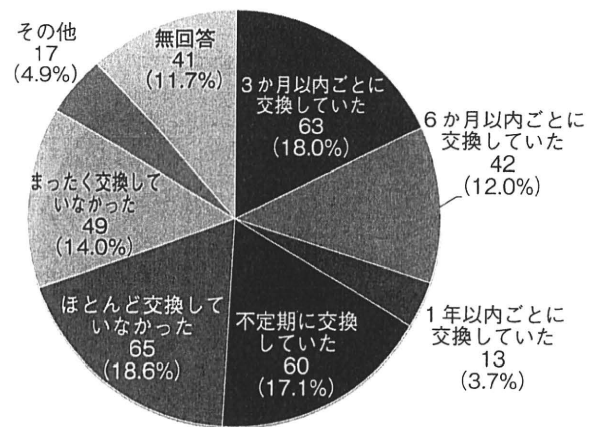


図 8 CL ケースの交換.

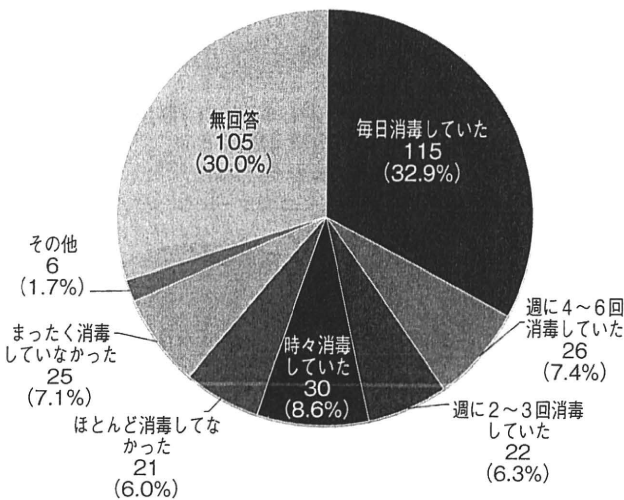


図 6 CL の消毒.

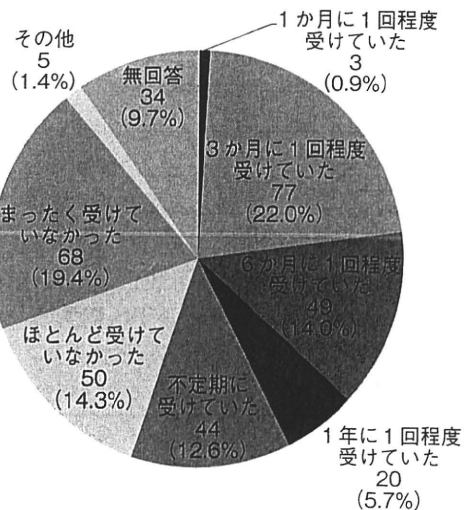


図 9 CL の定期検査.

において「2週間以内」の使用期間であったものは74例であり回答のあった177例のうち41.8%のみという結果であった。

11. CL 装用方法の遵守

「CL 装用方法を守っていたか?」という総括的な質問に対し、「守っていた」あるいは「ほぼ守っていた」と答えたものが合計188例あり、回答のあった273例の68.9%であった(表12)。

12. CL を処方された施設・購入先

CL 処方を受けた施設およびCL 購入先について表13, 14に示す。処方施設として一般眼科診療所が137例(39.1%), CL 量販店に隣接する眼科診療所が112例(32.0%)であった。医師の処方を受けなかったというも

表 9 1 枚の CL 使用期間(1 日ディスプレイ用 CL)

	症例数	%
1 日	12	46.2
2~3 日	6	23.1
4~7 日	1	3.8
1 週間を超え 2 週間以内	1	3.8
2 週間を超え 1 か月以内	3	11.5
1 か月を超える	2	7.7
無回答	1	3.8

表 10 1 枚の CL 使用期間(2 週間 FRS-CL)

	症例数	%
2 週間以内	74	37.8
2 週間を超え 3 週間以内	56	28.6
3 週間を超え 1 か月以内	26	13.3
1 か月を超える	21	10.7
無回答	19	9.7

表 11 1 枚の CL 使用期間(定期交換 SCL)

	症例数	%
決められた使用期間以内	32	57.1
決められた使用期間を超過した期間が 1 週間以内	6	10.7
決められた使用期間を超過した期間が 1 週間を超え 2 週間以内	7	12.5
決められた使用期間を超過した期間が 2 週間を超え 1 か月以内	3	5.4
決められた使用期間を超過した期間が 1 か月を超える	6	10.7
無回答	2	3.6

表 12 CL 装用方法の遵守

	症例数	%
守っていた	66	18.9
ほぼ守っていた	122	34.9
ほとんど守っていなかった	73	20.9
全く守っていなかった	12	3.4
無回答	77	22.0

表 13 CL 処方施設

	症例数	%
一般眼科診療所	137	39.1
CL 量販店に隣接する眼科診療所	112	32.0
眼鏡店内の眼科診療所	34	9.7
一般病院(大学病院を除く)	10	2.9
大学病院	1	0.3
医師の処方を受けなかった	15	4.3
その他	9	2.6
無回答	32	9.1

表 14 CL 購入先

	症例数	%
眼科施設に併設する販売店	172	49.1
CL 量販店	89	25.4
眼鏡店	28	8.0
インターネット販売	16	4.6
通信販売	3	0.9
薬局	2	0.6
外国で購入	2	0.6
譲渡	1	0.3
その他	11	3.1
無回答	26	7.4

のも 15 例(4.3%)認められた。CL 購入先も眼科施設に併設する販売店、CL 量販店が多くを占めていた。

IV 考 按

1980 年代、本邦における角膜感染症のうち CL に関連するものは 10% あるいはそれ以下であるとする報告が散見される^{6)~8)}が、2003 年の 1 年間で調査が行われた感染性角膜炎全国サーベイランス¹⁾では 41.8% の症例が CL 装用者であった。CL 自体の普及、カラー CL など視力補正以外の目的での使用、CL 販売の多様化などにより今後も CL 関連角膜感染症の増加傾向は続くものと考えられる。

本調査は CL 関連角膜感染症のなかでも、入院加療を必要とする重篤な症例に限って行ったものである。本疾患の多くは外来通院で加療されることが多く、これらも網羅する形での調査が理想的である。しかし、比較的軽症な症例において問診を含めた詳細な調査が困難である点を鑑み、十分に時間をかけて問診ができる入院症例に

限定した調査となった。もちろん入院するか否かの判断は病状の重篤性の他、通院の便、治療のコンプライアンスも含めた総合的なものあり、本調査を解釈するうえで注意を要するところであると考えられる。さらに今回の調査は医師が回答する部分と患者が回答する部分に分かれており、CL 装用に関するデータなどは患者の申告をそのまま採用していることにも留意する必要がある。CL の消毒やこすり洗いに対する理解も症例によって大きく異なっており、CL の処方を受けた施設の種類を正確に判断してもらうことも困難なことであろう。患者アンケートに関しては正確性に一定の限界があることを理解したうえで結果の解釈を行っていく必要がある。

CL 関連角膜感染症が他の角膜感染症と大きく異なっている点として、両眼発症症例が 1 割程度と多いことがまず挙げられる。先の感染性角膜炎全国サーベイランス¹⁾において CL を装用していた 109 例のうち両眼発症が 10 例あったとされており、今回の調査でも同様の傾向であることが確認できた。両眼発症症例が高率に認め

られる原因の詳細は不明であるが、装用している CL が両眼とも高度に汚染されているためと考えるのが妥当であろう。さらに片眼発症症例であっても条件によって両眼発症する危険性を持っていたといった推測も可能である。初診時矯正視力が著しく低下している症例が多く、若年者の視機能を脅かす社会的にも重大な疾患であることが認識された。

細菌学的検査において、角膜病巣由来の検体からアカントアメーバと緑膿菌が検出されていた症例が多かった。アカントアメーバ角膜炎はきわめて難治で長期間の加療を要し、治療目的あるいは視力回復を目的とした角膜移植が必要となることも多い疾患である。国内では石橋らの報告⁹⁾にはじまり、まれな疾患として扱われることが多かったが、近年症例数の増加が指摘されている²³⁾。本調査においても緑膿菌に次いで多い検出菌となっていたことは疾患の重篤性を鑑みるときわめて重大な問題であろう。一方、緑膿菌は従来から CL 関連角膜感染症の主要起炎菌として注目されていた細菌である。緑膿菌はセラチアなどのグラム陰性桿菌の一種であり、これらは水回りなどから検出されることが多い環境菌である。本調査における分離培養においても CL あるいは CL ケースから多数のグラム陰性桿菌が検出されており、過去の Bourcier らの報告¹⁰⁾と同様の結果であった。CL が環境菌に汚染されやすく、これを反映した結果、緑膿菌が多く症例の角膜擦過物から検出されたものと思われる。ただし、CL ケースなどからは多種類のグラム陰性桿菌が検出されているものの角膜から分離された菌としては緑膿菌が突出していた。緑膿菌は大腸菌などと比較し角膜上皮への接着性が強いという報告もあり¹¹⁾、この菌固有の特性が大きく関与しているものと推察された。感染性角膜炎全国サーベイランスの報告¹⁾において、FRSCL などレンズケアを必要とする SCL 装用者における感染性角膜炎の起炎菌にはグラム陰性桿菌が多いことが指摘されている。我々の今回の調査では 1 日ディスプレイ CL などの使い捨てレンズを再装用することなく正しく使用していた症例が少なかつたため、CL の種類と検出菌のプロファイルの違いについては検討することができなかった。

CL は FRSCL、さらには 1 日ディスプレイ CL と昨今選択肢が豊富となった。特に 1 日ディスプレイ CL を正しく使用していれば装用する CL の細菌汚染のリスクは大幅に軽減するはずであり、角膜感染症を回避する有力な手段であろう。全国の CL 装用推定人口 1,866 万人のうち、1 日ディスプレイ CL 装用者は 660 万人 (35.4%) 程度とされる¹²⁾。しかし、今回の調査において 1 日ディスプレイ CL を装用していた症例は 26 例と調査対象の 7.4% にとどまっていたことは、このタイプの CL の安全性を示唆するものと考えられる。さらに CL の種類と感染症のリスクを考察するうえで、個々

の装用者がどのような装用方法を実際行っているのかに注目する必要がある。今回対象となった 1 日ディスプレイ CL 装用者のなかで規定どおり 1 日の使用を遵守していた症例は 46.2% にとどまっており、1 週間以上、なかには 1 か月を超えて 1 日ディスプレイ CL を装用するような例があったことは注目する必要がある。

CL のケア(管理)および装用方法についてはかなりさまざまな実態が浮き彫りとなった。終日装用の CL を連続装用していたものが全体の 22% を占めていた。CL の洗浄・消毒・こすり洗いについても「毎日消毒していた」が全体の約 1/3、「毎日こすり洗いしていた」が全体の約 1/5 の症例にとどまっていたことは注目に値する。もちろん 1 日ディスプレイ CL や 1 週間連続装用ディスプレイ CL 装用者ではレンズケアがないため、これらを再装用せずに正しく使用していた症例を除いた検討が適切である。しかし調査対象となった全 350 例中、これに該当する症例は多くないため全体的な傾向として大きな変動はないものと考えられた。2009 年 12 月 16 日国民生活センターが「ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能」という報告を行った。このなかで 18 歳～29 歳の 2 週間頻回交換型ソフトコンタクトレンズを装用している学生 385 名 (平均年齢 21.2 歳) を調査対象として CL のケアの実態を含めた調査が行われた。この調査は角膜感染症を起していない健康者と考えられ、CL ケアに関してはほぼ同じ内容のアンケートが実施されており、比較検討することが可能である。この国民生活センターの調査によると CL のこすり洗いについて、「毎日こすり洗した」が全体の 50.4% を占める一方、「時々こすり洗した」7.0%、「ほとんどこすり洗しなかった」4.9%、「まったくこすり洗しなかった」7.3% にとどまっており、今回の CL 関連角膜感染症全国調査におけるデータと比較して良好な結果であった。同様のことは CL の消毒、CL ケースの交換頻度にも当てはまり、1 枚の CL を使用する期間についても 3 週間を超えたもの(決められた使用期間を 1 週間以上超過したもの)は 5.5% にとどまっていた。調査方法が異なる二つの調査を厳密に比較することはできないが、重症角膜感染症を発症し全国調査の対象となった症例は健康者と比較し CL ケアが正しく行われていない傾向が確認できた。しかしその一方、ケアを規定どおり行っていたとされる症例でも角膜感染症が発症している事実も忘れてはならない。

CL の消毒方法として以前は煮沸消毒が中心であったが、その後過酸化水素によるケアが普及し、最近では MPS を用いるものがその簡便性もあり主流となっている。今回の調査においてもほとんどの症例で MPS が使用されていたことが確認できた。過酸化水素など、他の方法を用いた例が極端に少ないため、消毒薬の違いによる検討は不可能であったが、MPS の消毒効果が十分で

あるかについても注目していく必要がある。MPS の消毒効果は国際標準化機構(International Organization for Standardization : ISO) 14729 の stand alone test がよりどころとなっている。これは 3 種類の細菌(*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*) および 2 種類の真菌(*Candida albicans*, *Fusarium solani*) の滅菌効果の結果が一定基準を満たしていることが要求されている。しかし、この stand alone test では菌の浮遊液に対する MPS の効果のみをみているため、実際の SCL ケアの状況と大きく異なっていることに注目すべきであろう。SCL に付着した菌に対して MPS が十分に効果を発揮するのかについて今後の検討が待たれる。2005 年から 2006 年に米国、東南アジアの SCL 装用者でフザリウム菌による角膜感染症が多発した¹³⁾が、その原因として特定の MPS の濃縮が原因である可能性が指摘された¹⁴⁾。正しい MPS の使用方法では濃縮が起こる可能性は考えにくいですが、SCL ケースの蓋をしない、SCL ケース内の MPS を捨てずに再使用する、新しい MPS を継ぎ足すといったコンプライアンスの低い状況では MPS 本来の消毒効果が発揮できないことが報告されている¹⁵⁾。

CL 装用者の角膜感染症をいかに回避していくか、我々は大変困難な課題に直面している。今回の全国調査の結果を眼科医のみならず、CL ケアの指導にあたる医療スタッフ、CL や各種消毒薬を販売するすべての企業、さらに保健行政に携わる方々に認識していただくことがまず必要であろう。CL 装用者への啓発活動はもちろんのこと、CL に関連する合併症を熟知した眼科医が定期的に CL 装用者の検査ができる環境の整備も必要であろう。CL を装用するにあたり、その安全性を確保するための最低限の責務を義務づけるシステムの構築も必要かもしれない。一方、CL に関連するメーカーには感染症予防の観点からより安全な製品の開発を今後も継続していただくことを改めて要望したい。

本調査は厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)H20-新興-一般-016 の助成を受けた。

利益相反：利益相反公表基準に該当なし

文 献

- 1) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ：感染性角膜炎全国サーベイランス一分離菌・患

- 者背景・治療の現況一。日眼会誌 110 : 961—972, 2006.
- 2) Thebpatiphat N, Hammersmith KM, Rocha FN, Rapuano CJ, Ayres BD, Laibson PR, et al : *Acanthamoeba* keratitis : a parasite on the rise. *Cornea* 26 : 701—706, 2007.
- 3) 篠崎友治, 宇野敏彦, 原 祐子, 山口昌彦, 白石敦, 大橋裕一：最近 11 年間に経験したアcantアメーバ角膜炎 28 例の臨床的検討。あたらしい眼科 27 : 680—686, 2010.
- 4) Liesegang TJ : Contact lens-related microbial keratitis : Part II : Pathophysiology. *Cornea* 16 : 265—273, 1997.
- 5) 福田昌彦：コンタクトレンズ関連角膜感染症の実態と疫学。日本の眼科 80 : 693—698, 2009.
- 6) 北川和子, 都築晴美, 佐々木一之：細菌性角膜感染症の検討。眼紀 37 : 435—439, 1986.
- 7) 杉田美由紀, 田中直彦, 磯部 裕, 平原敦子, 三井啓司：細菌(真菌)性角膜炎の最近 7 年間の統計。臨眼 41 : 629—633, 1987.
- 8) 兼松誠二, 楠島康平, 内藤 毅, 新田敦子, 塩田洋, 三村康男：最近 7 年間における細菌性角膜潰瘍の検討。眼紀 39 : 1743—1747, 1988.
- 9) 石橋康久, 松本雄二郎, 渡辺亮子, 本村幸子, 安羅岡一男, 石井圭一：*Acanthamoeba* keratitis の 1 例—臨床像, 病原体検査法および治療についての検討。日眼会誌 92 : 963—972, 1988.
- 10) Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chaumeil C, Laroche L : Bacterial keratitis : predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. *Br J Ophthalmol* 87 : 834—838, 2003.
- 11) Panjwani N, Clark B, Cohen M, Barza M, Baum J : Differential binding of *P. aeruginosa* and *S. aureus* to corneal epithelium in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 696—701, 1990.
- 12) 稲葉昌丸, 井上幸次, 植田喜一, 宇野敏彦, 江口洋, 大橋裕一, 他：重症コンタクトレンズ関連角膜感染症調査からみた危険因子の解析。日本コンタクトレンズ学会誌 52 : 25—30, 2010.
- 13) Khor WB, Aung T, Saw SM, Wong TY, Tambyah PA, Tan AL, et al : An outbreak of *Fusarium* keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *JAMA* 295 : 2867—2873, 2006.
- 14) Levy B, Heiler D, Norton S : Report on testing from an investigation of *Fusarium* keratitis in contact lens wearers. *Eye & Contact Lens* 32 : 256—261, 2006.
- 15) 今安正樹, 宇野敏彦, 森 理, 大橋裕一：コンプライアンスの低い使用環境における多目的用剤の消毒効果試験。日本コンタクトレンズ学会誌 51 : 36—41, 2009.

国民生活センターのソフトコンタクトレンズ用 消毒剤の消毒性能調査について

鳥取大学医学部視覚病態学 井上幸次

はじめに

筆者は角膜感染症を専門としている関係で、コンタクトレンズ（以下 CL）関連角膜感染症の患者には多くかかっているが、大学にずっといるため CL の処方をも自分で行うこともなく、multipurpose solution（以下 MPS）を含めた CL ケア用品に関して詳細な知識を持ち合わせているわけではない。筆者にとっての CL ケア用品は感染を起こした人のレンズケースの中にある汚れた液体のイメージであり、いささか偏向したものである。

そういうことで、今回この「CL ケア教室」の原稿依頼をいただき、MPS のことについて書いてくれといわれて少し戸惑いがあるが、最近、日本コンタクトレンズ学会と日本眼感染症学会が協力して、CL 関連角膜感染症の対策についての様々な取り組みをしているなかで、昨年、国民生活センターと協力してソフト CL（以下 SCL）用消毒剤の消毒性能調査が行われた。その調査に少しかわりをもつことができ、神奈川県相模原市にある国民生活センターへはるばる出かける機会などもあったので、今回はその調査の概要と、それが発表されたときの反応について書いてみたい。

国民生活センターの調査の概要

1. SCL 用消毒剤のアカントアメーバに関する消毒効果

MPS 8 銘柄（コンプリート[®] アミノモイスト、バイオクレン[®]ゼロ、シードウソフトケア、フレッシュルックケア10ミニッツ、オプティ・フリー[®]プラス、レニュー マルチプラス、エピカコールド[®]、ロート C キューブソフトワン[®]モイスト i）と過酸化水素タイプ 2 銘柄（コンセプトワンステップ、エーオーセプト）、ポビドンヨードタイプ 1 銘柄（バイオクレン[®]エフェール）を対象として、 5×10^6 ml のアカントアメーバ懸濁液（栄養体および 2 週齢シスト）に 100 倍量になるように各消毒薬を加え、25℃ で 2, 4, 8, 24 時間静置した後にアカントアメーバがどの程度減少したかを調べた。

栄養体については、過酸化水素タイプ、ポビドンヨード

タイプでは 2 時間をこえる静置で $1/1,000$ 以下にアカントアメーバが減少した。MPS 8 銘柄は、銘柄間で消毒効果に差があったが、表示された最短消毒時間で過酸化水素タイプ、ポビドンヨードタイプと同じ程度の消毒効果が得られたのは 1 銘柄のみであった。また、夜間消毒することから 8 時間静置する使用者が多いと考えられるが、MPS 8 銘柄中 4 銘柄は 8 時間静置後もアカントアメーバの減少が $1/10$ に及ばず、8 時間静置後に過酸化水素タイプ、ポビドンヨードタイプと同程度の効果を示したのは 2 銘柄のみであった。

2 週齢シストについては、いずれの銘柄も栄養体に対する効果に比べて大幅に低かった。ただし、ポビドンヨードタイプは MPS や過酸化水素タイプに比べて消毒効果が高く、4 時間静置後で $1/400$ 程度減少した。

レンズケースに消毒剤を注ぎ足して使用した場合を想定したテスト、すなわち 10^6 ml のアカントアメーバ懸濁液に 10 倍量の各消毒薬を加え、24 時間で完全に死滅したのかを確認するテストでは、すべての銘柄でアカントアメーバが残存していた。

2. SCL の衛生状態調査

18~29 歳の 2 週間頻回交換型 SCL を装着している学生 385 名を調査対象とした。通常どおりの方法で 2 週間装着し、装着最終日も通常どおりのケアを行ったレンズをレンズケース内のケア用品に浸漬したままの状態での回収し、衛生状態を調べた。また、レンズのケア方法や目のトラブルの経験についてのアンケート調査もあわせて行った。

アカントアメーバについては、培養と real-time polymerase chain reaction（以下 PCR）を行った。培養の結果、2 名からアカントアメーバが検出された。また、real-time PCR では、培養でアカントアメーバが検出された 2 名を含む 40 名（10.4%）からアカントアメーバの DNA が検出された。DNA が検出された例ではそのアカントアメーバがレンズケースの中で生きていたのかどうかは不明だが、ケースがアメーバで汚染されている実態が明らかとなった。

アカントアメーバに汚染された 40 名ではそのうち 70.0% で細菌が検出され、汚染が確認されなかった症例の 58.3%

より高かった。

ポビドンヨードタイプのケア用品を使用している7名ではアカントアメーバ汚染は確認されず、ポビドンヨードタイプがほかの消毒剤に比べてアカントアメーバに対する効果が高いことを反映している可能性が考えられた。

細菌については230名(59.7%)から細菌が検出され、緑膿菌は79名、大腸菌は27名から検出された。消毒薬の種類別でみると、MPS使用者の細菌検出率は61.5%、緑膿菌検出率は21.8%で、過酸化水素タイプの検出率(細菌検出率が45.9%、緑膿菌検出率が8.1%)より有意に高かった。レンズの種別では低含水・非イオン性のグループIのレンズを使用していた人からの細菌検出率(74.7%)はほかのレンズ使用者よりも有意に高く、含水率に反比例するレンズへの細菌接着の影響が考えられた。

レンズケアの方法と衛生状態との関連を調べた。レンズケアにあたって、石けんでの手洗い、レンズのこすり洗いを必ず行い、レンズケースを3カ月以内に交換するという三つの注意点を守ってケアを行っていた人(こちらは32名と人数が少ない)は、守っていなかった人(353名)に比べてアカントアメーバ汚染率、細菌検出率ともに低かった。ただ、正しい方法でケアを行っている人でもアカントアメーバ・細菌が検出されることは、現在のケア用品の限界を示している。

ケア前の手洗いについては、毎回石けんで手洗いをしている人は34.5%であり、手洗いを毎回行っていない、もしくは全くしていない人が3割程度を占めていた。また、こすり洗いについては、毎回行っている人は全体の約半数であり、ほとんどあるいは全くしない人が12.2%いた。また、レンズケースを3カ月以内に交換している人は約3割で、ほとんどあるいは全くしない人が10.7%いた。ケア用品の添付文書などを読んでいない人も8.1%あった。

CLに関する目のトラブルのアンケートでは49.1%の人が異物感・充血など目の調子が悪くなった経験があり、29.1%が医師の診察を受けていた。一方で3カ月に1回以上の定期検査を受けている人は38.4%にとどまった。

3. 結果を受けての提言

これらの結果を受けて以下のような提言がなされた。

1) 消毒者へのアドバイス

- (1) こすり洗いを行わないと消毒剤の消毒効果だけではアカントアメーバを完全に消毒することはできない。消毒剤の種類にかかわらず、石けんでの手洗いやレンズのこすり洗いを毎日行い、レンズケースを定期的に交換するなど、正しい方法でケアを行うようにしよう。
- (2) 定期的に専門医のいる医療機関で検査を受け、目とレンズの状態をチェックしてもらうようにしよう。

2) 業界への要望

- (1) SCL用消毒剤そのもののアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアカントアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を徹底するよう要望する。また、アカントアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法や消毒効果を向上させるような成分の組成を検討するよう要望する。
- (2) 装用者に対し、CLの適切な使用方法の教育・啓発を更に徹底するよう要望する。

3) 行政への要望

- (1) SCL用消毒剤そのもののアカントアメーバに対する消毒効果は限界があると考えられることから、商品にアカントアメーバ角膜感染症を防ぐための注意喚起表示を徹底させるように要望する。また、アカントアメーバ除去に有効なこすり洗いの方法やアカントアメーバに対する消毒効果の試験方法などについて専門家による検討を開始するよう要望する。
- (2) 装用者に対し、CLの適切な使用方法の教育・啓発を更に徹底するよう医師および業界への指導を要望する。

国民生活センターの調査の発表の影響

以上のような報告が2009年12月16日に記者発表された。その日は筆者のところにまでマスコミから問い合わせの電話があったくらいである。当然、国民生活センターもその週はひっきりなしにかかってくる電話への対応に追われたとのことで、かなり大きな反響であったと思われるが、翌日の新聞では、MPSの銘柄によってアカントアメーバによる消毒効果に差があるという部分が強調されて報道されてしまった。更にほかの銘柄よりよかったとされた企業から「うちのは大丈夫である」ととれる文書が出され、宣伝に利用するかのような動きがあったりして、本来ケア用品による消毒には限界があるので、皆で色々な対策をとろうと提言した国民生活センターの意図からずれてしまったのは残念である。マスコミには強い力があるのでうまく利用すれば大きな効果が得られるが、マスコミの好みによるバイアスというものがあるため、それがゆがんだ効果になる危険性もはらんでいることを強く感じた。ただ、この発表後には厚生労働省からも反応があり、企業にも改善策を模索する積極的な機運が生まれたことは歓迎すべきことであり、少しづれたとはいいいながら、ある程度の効果があったのは幸いである。最近、どこの施設の先生方に聞いてもアカントアメーバ角膜炎の症例が一時に比べて減ったように思うとの答えが返ってくる。このように大々的な発表を行ったことの効果があるような形で出てきているのであればそれでよいのだが、こういうことはコンスタントに啓発していかないと徐々にそのインパクトを減じていく可能性

が高い。一時の騒ぎに終わらせないよう、今後も日本コンタクトレンズ学会を中心として、我々眼科医が果たしていかなければならない役割は大きいであろう。

参 考 文 献

- 1) ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能—使用実態調査も踏まえて—。平成21年12月16日，独立行政法人 国民生活センター。

Detection of Early and Single Infections of *Schistosoma japonicum* in the Intermediate Host Snail, *Oncomelania hupensis*, by PCR and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay

Takashi Kumagai,* Rieko Furushima-Shimogawara, Hiroshi Ohmae, Tian-Ping Wang, Shaohong Lu, Rui Chen, Liyong Wen, and Nobuo Ohta

Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan; Anhui Institute of Parasitic Diseases, Wuhu, China; Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, China

Abstract. Polymerase chain reaction (PCR) with the specific primer set amplifying 28S ribosomal DNA (rDNA) of *Schistosoma japonicum* was able to detect genomic DNA of *S. japonicum*, but not *S. mansoni*, at 100 fg. This procedure enabled us to detect the DNA from a single miracidium and a snail infected with one miracidium at just 1 day after infection. We compared these results with those from loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting 28S rDNA and found similar results. The LAMP could amplify the specific DNA from a group of 100 normal snails mixed with one infected snail. A PCR screening of infected snails from endemic regions in Anhui Province revealed schistosomal DNA even in snails found negative by microscopy. PCR and LAMP show promise for monitoring the early infection rate in snails, and they may be useful for predicting the risk of infection in the endemic places.

INTRODUCTION

Schistosomiasis japonica is a relatively neglected tropical disease, and it is a chronic zoonotic parasitic disease in China, the Philippines, and small pockets of Indonesia.¹ In China, the causative organism, *Schistosoma japonicum*, and its intermediate snail host, *Oncomelania hupensis*, are distributed along the Yangtze River valley and recently, in the hilly and mountainous regions of Sichuan Province.² Since the mid-1950s, the People's Republic of China has markedly decreased the prevalence of schistosomiasis through mass-chemotherapeutic treatment and the control of the intermediate snails.^{3,4} However, a complete eradication of this disease is difficult in endemic areas. The estimated prevalence in the provinces of Hunan, Hubei, Jiangxi, Anhui, Yunnan, Sichuan, and Jiangsu was 4.2%, 3.8%, 3.1%, 2.2%, 1.7%, 0.9%, and 0.3%, respectively, in 2004.⁵ A total of 564, 207, 83, and 57 acute cases of *S. japonicum* infection were reported nationwide in 2005, 2006, 2007, and 2008, respectively.⁶ These findings suggest that control measures must be improved among at-risk populations, especially in lake and marshland regions. A new integrated strategy was tested for the control of schistosomiasis in China.^{7,8} It involved the reduction of infectious sources by the replacement of water buffaloes with tractors for agricultural work, improved access to clean water and general sanitation, better livestock management through fencing to isolate schistosomal egg sites, and better feces management using newly constructed latrines on-shore. These strategies markedly reduced the infection rate in both humans and intermediate snails in the pilot areas. Remarkably, the prevalence of infected snails reportedly decreased to almost 0% in some areas.⁸ To maintain these successes, it may be useful to use new snail-monitoring systems in such areas.

Molecular tools such as conventional polymerase chain reaction (PCR) and improved DNA amplification methods have been shown capable of detecting schistosome DNA in a variety of samples. A highly repetitive, 121-base pair (bp) sequence has been used to detect DNA from *S. mansoni* and *S. haematobium* in stool, serum, urine, and plankton samples.^{9–13} Because no similar repetitive sequence has been found in the *S. japonicum* genome, the repetitive non-long terminal repeat (LTR) retrotransposon Sjr2¹⁴ was used for DNA detection as a target sequence.¹⁵ In an experimental rabbit model, the Sjr2 sequence was detected in serum (1 week after infection) and stool samples using a PCR assay, and the 230-bp band of Sjr2 was absent at 10 weeks after treatment with praziquantel,¹⁶ and real-time PCR was applied to the detection of Sjr2 gene from cercaria in an environmental water sample.¹⁷ Alternatively, real-time PCR was also applied to the detection of a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase I gene at low intensity in an infected pig model.¹⁸ Another highly repeated sequence, 28S ribosomal DNA (rDNA), was used for multiplex PCR to detect a distinct *Schistosoma* sp. from human urine samples.¹⁹

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a simple, sensitive, and rapid DNA detection method.²⁰ The LAMP reaction requires only a single enzyme, *Bst* DNA polymerase, that can synthesize a new strand of DNA while simultaneously displacing the former complementary strand, thereby enabling DNA amplification at a single temperature. The LAMP reaction can be achieved using four primers (FIP, BIP, F3, and B3), two of which (F3 and B3) contribute to the formation of a stem-loop structure, whereas the other two (FIP and BIP), designed complementary to the inner sequence of the stem-loop structure, are used for amplification of the target sequence. This provides a higher specificity to the reaction than conventional PCR methods.²⁰ The LAMP assay has been widely applied for diagnosis and detection against several infectious diseases, including *Plasmodium*,²¹ *Trypanosoma*,²² *Leishmania*,²³ and *Taenia*.²⁴ In the present application, LAMP targeting to Sjr2 for detecting the DNA from *S. japonicum* was also reported.²⁵

In the present study, we evaluated the performance of the PCR method by comparing Sjr2 and 28S rDNA from

*Address correspondence to Takashi Kumagai, Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8519, Japan. E-mail: tkuma.vip@tmd.ac.jp

S. japonicum. Next, we detected the schistosomal DNA from experimentally infected snails at 1 day after infection and detected schistosomal DNA from wild snails collected from endemic areas of Anhui Province in China. We also applied a LAMP assay to detect infected snails on-site in endemic local areas. Finally, we developed a simple, rapid, and safe screening method for determining the infection rate of snails in endemic areas after implementation of the above-described integrated strategy and detected infections using the LAMP assay with DNA extracted from a large number of snails.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and snails. *S. japonicum* was maintained using ICR mice as a final host and *O. hupensis nosophora* from a non-endemic area (Yamanashi strain) as an intermediate host. The livers from infected mice were digested with 1 mg/mL collagenase and 0.5 mg/mL actinase, and then, purified eggs were put into water to hatch the miracidia. The collected miracidia were experimentally infected to each snail in a 96-well plate. Wild snails from endemic areas in China (*O. hupensis hupensis*) were collected from three places in Anhui Province as follows: (1) Shankou-city (30.52° N, 116.93° E) in marshland regions of Anquine county, (2) Shun'an town (30.56° N, 117.54° E) in the sand regions of the Yangtze River in Tongling county, and (3) Guanghui City (30.56° N, 117.45° E) in the marshland regions of the Yangtze River in Tongling county. Figure 1 presents detailed locations about each area. The snails were picked up in Anquine in March 2007 and in Tongling in September 2007. The collected snails were crushed and checked for infection under microscopy before preparation for DNA extraction.

DNA extraction. To detect schistosomal DNA by PCR and LAMP assay, we applied the DNA extraction method using heated NaOH.²⁶ Briefly, the counted miracidium was put into a 200- μ L volume of 50 mM NaOH and heated at 95°C for 30 minutes. After centrifugation, the 50- μ L supernatant was recovered and then mixed to an equal volume of 1 M Tris-HCl (pH 8.0). This solution was directly used as a template (1 μ L) for the PCR and LAMP methods. For direct extraction from a single infected snail (non-endemic area), each snail was also put into a distinct tube, and 200 μ L of 50 mM NaOH solution

was added to the tube. After crushing the snail with tweezers, the DNA was extracted using the above procedures. A large-scale DNA extraction from different numbers (100, 50, 25, 10, 5, and 1) of snails from non-endemic area was also performed with 10 mL of 50 mM NaOH in a 50-mL tube that was heated at 95°C for 60 minutes. After neutralization with 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 1 μ L of the solutions was directly used as a template. Genomic DNA of *S. japonicum* was purified from adult worms using the Get-pure DNA Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan), and the concentration of DNA was measured with a spectrometer.

Primer sets. To amplify the specific DNA of *S. japonicum*, the 28S rDNA gene (GenBank Accession No. Z46504) was selected as a target sequence. For the conventional PCR and LAMP methods, we designed specific primer sets (Table 1). As in the previous report, Sjr2 (GenBank Accession No. AF412221) primers were generated for conventional PCR¹⁶ and the LAMP assay²⁵ (Table 1). The LAMP primer sets were prepared to be high performance liquid chromatography (HPLC) purification grade.

PCR and LAMP assay. The PCR solution (20 μ L) was prepared with a standard procedure using Top polymerase (BIONEER, Daejeon, Korea). The reaction consisted of 35 cycles each at 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds. The PCR products were resolved by agarose gel electrophoresis and stained in ethidium bromide. The LAMP method was performed according to the manufacturer's instructions (Eiken Sci, Tokyo, Japan), except for use of the 20- μ L total reaction mixture. The LAMP reaction was performed at a constant 65°C. The amplification of the target gene was confirmed based on the turbidity of magnesium pyrophosphate and by gel electrophoresis.

RESULTS

Sensitivity and specificity of PCR and LAMP assay. To determine the sensitivity of the PCR and LAMP methods, we performed the reactions using *S. japonicum* genomic DNA from 10 pg to 10 fg, respectively, by serial dilution. As shown in Figure 2, PCR using specific primers amplified the band of 405 bp from 28S rDNA, and the PCR method was able to detect more than 100 fg of genomic DNA (Figure 2A). The LAMP assay had the same level of sensitivity as the conventional PCR assay (Figure 2B). Furthermore, both methods amplified only DNA from *S. japonicum* and none from *S. mansoni*. Thus, our methods distinguished the *S. japonicum* species from others. However, PCR using Sjr2 primers detected DNA at the level of 1 pg (Figure 2A), whereas LAMP did not detect the Sjr2 gene at all, contrary to a recent report²⁵ (data not shown). Taken together with these results, we performed the following experiments using 28S rDNA primers as the appropriate targeting genes because of higher sensitivity.

Detection of the schistosomal DNA from miracidia and infected snails. To confirm whether a single miracidium DNA could be detected by the PCR and LAMP assay using 28S rDNA primers, we extracted DNA using the heated NaOH method from one miracidium and performed both methods with 10 independent samples. The PCR and LAMP detected the DNA from one miracidium in all samples (Figure 3A and B), indicating that the total DNA included in a single miracidium was enough to be amplified by both the PCR and LAMP methods. Furthermore, we performed the infection experiment with the intermediate snail with a different number

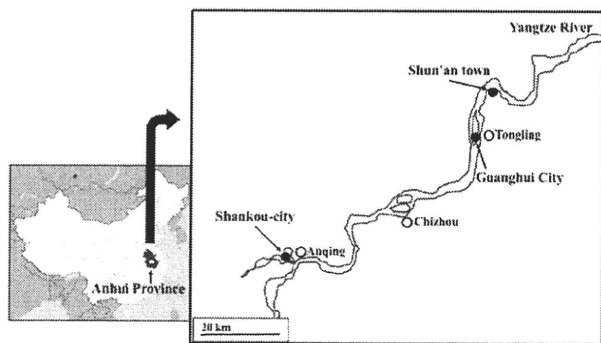


FIGURE 1. Schema of the selective areas for snail sampling in Anhui Province of China. Three points located along the Yangtze River in Anhui Province are shown as closed circles, and the capital of each country is shown as an open circle. Shankou-city in Anquine county and Guanghui City in Tongling county were marshland regions, and Shun'an town in Tongling county was in the sand regions.

TABLE 1
Specific primer sets used in this study

PCR	Sj28S Forward primer; 5'-GGTTTGACTATTATTGTTGAGC-3' Reverse primer; 5'-TCTCACCTTAGTTCGGACTGA-3' SjR2 ¹⁶ Forward primer; 5'-TCTAATGCTATTGGTTTGGAGT-3' Reverse primer; 5'-TTCCTTATTTTACAAGGTGA-3'
LAMP	Sj28S F3 primer; 5'-GCTTTGTCCTTCGGGCATTA-3' B3 primer; 5'-GGTTTCGTAACGCCCAATGA-3' FIP primer; 5'-ACGCAACTGCCAACGTGACATACTGGTCGGCTTGTTACTAGC-3' BIP primer; 5'-TGGTAGACGATCCACCTGACCCCTCGCGACATGTAAACTC-3' SjR2 ²⁵ F3 primer; 5'-GCCGGTTCCTTATTTTACAAGG-3' B3 primer; 5'-CTAACATAATTTTATCGCCTTGCG-3' FIP primer; 5'-CTACGACTCTAGAATCCCGCTCCGCGAATGACTGTGCTTGGATC-3' BIP primer; 5'-CCTACTTGATATAACGTTGCGAACGTATTGGTTTGAGTTCACGAAACGT-3'

of miracidia and extracted total DNA from each snail at 1 day after the infection. As a result, we found four positive samples out of a total of five samples infected with one miracidium, although all samples were positive in the five samples infected

with 5 or 10 miracidia, respectively (Figure 3C). We considered that one negative snail was not penetrated by a miracidium, because not all miracidia could enter the snail. These results showed that the PCR detected the schistosome-specific band

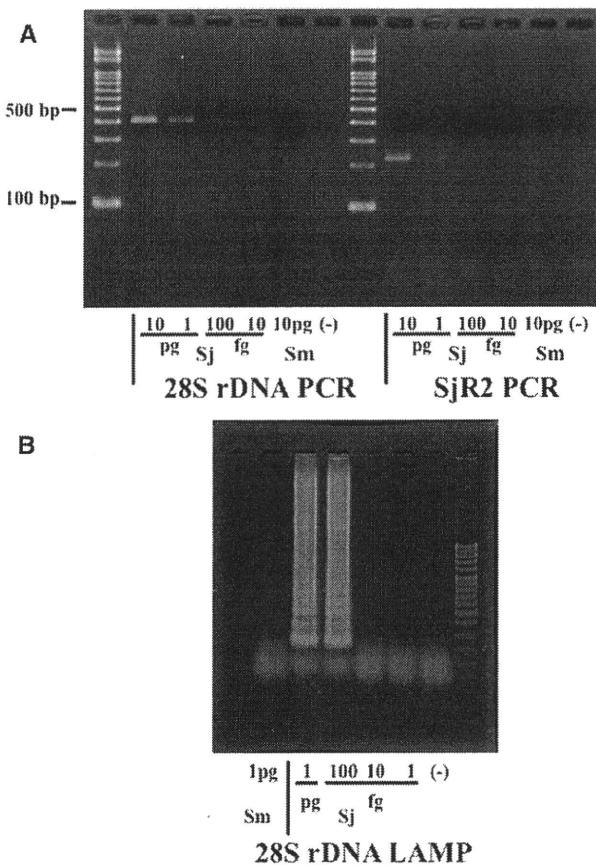


FIGURE 2. Sensitivity of the PCR and LAMP methods using genomic schistosomal DNA comparing 28S rDNA with SjR2 primers. (A) PCR was performed with different weights of genomic DNA, and the 28S rDNA primer set was able to detect 100 fg of DNA from *S. japonicum* but none from *S. mansoni*; the SjR2 primer set was able to detect just 1 pg of DNA. (B) The LAMP assay method showed the same sensitivity (100 fg) as the PCR method. Neither method reacted to DNA from *S. mansoni*, and no template (-) was the negative control.

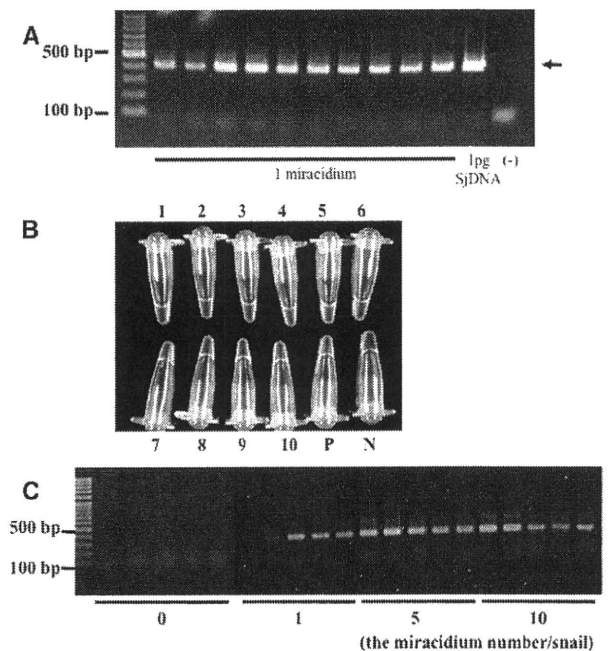


FIGURE 3. Detection of a schistosome-specific band in genomic DNA extracted from naked miracidia and the experimentally infected snail by PCR and LAMP. (A) The DNA extracted from one miracidium was amplified by PCR. PCR detected the specific band (arrow) in each of 10-samples extracted distinctly from one miracidium but not the no-template sample (-). Genomic DNA (1 pg) of *S. japonicum* was used for the positive control. (B) The DNA extracted from one miracidium was amplified by LAMP assay. LAMP showed the positive results as the white turbidity of magnesium pyrophosphate in all 10 samples extracted distinctly from one miracidium (1-10) and Sj DNA (1 pg) as positive control (P) but not the no-template sample (N). (C) Each snail from the non-endemic area was experimentally infected with a different number of miracidia (0, 1, 5, and 10 miracidia/snail), and genomic DNA was extracted from each snail at 1 day after infection. The PCR method detected the schistosome-specific band in DNA from a snail infected with just one miracidium without amplifying DNA from non-infected snails. Each lane represents a distinct snail infected with the same number of miracidia.

TABLE 2
The comparison of detection rate between the PCR assay and microscopy method in wild snails from Anhui Province

	Shankou-city in Anqing		Shun'an town in Tongling		Guanghui city in Tongling	
	Microscopy positive	Microscopy negative	Microscopy positive	Microscopy negative	Microscopy positive	Microscopy negative
PCR positive	10	13	2	0	0	0
PCR negative	0	217	0	72	0	48
Positive rate of microscopic examination		4.2%		2.7%		0%
PCR positive rate		9.6%		2.7%		0%

in the DNA extracted from the infected snail with a single miracidium. Furthermore, using the same DNA prepared from the snails infected with a single miracidium of *S. japonicum*, the result of the LAMP method was consistent with that of the PCR method (data not shown). Thus, the PCR and LAMP methods have the high specificity and sensitivity and detect schistosomal DNA immediately after the infection to the snail host.

Detection of the schistosomal DNA in wild snails collected from endemic areas. To evaluate whether the PCR assay could detect schistosomal DNA from the infected snails in the endemic areas, we collected wild snails from three points, Shankou-city, Shun'an town, and Guanghui City of Anhui Province in China (Figure 1), in which the human infection rate is 4%, 0%, and 1.6%, respectively. As shown in Table 2 in snails collected from Shankou-city during the spring, the PCR method detected more positive snails than did the microscopy method with the observation of *S. japonicum* cercaria. Although all positive snails by microscopy were also positive by PCR, PCR also amplified the DNA of *S. japonicum* in the snails negative by microscopy. This indicates that PCR could detect the infection not only in the matured cercaria but also in the early sporocyst. However, in snails from Tongling collected in the autumn, PCR detected DNA only from the snails positive by microscopy.

Screening with large-scale DNA extraction from the infected snail by LAMP assay. The PCR method is difficult to use in the field in endemic areas because of the expense of the thermal cycler and the impracticality of performing gel electrophoresis and staining. To amplify the specific DNA without such problems, we applied the LAMP method, which can be performed at a constant temperature and the result can be determined without gel electrophoresis. The LAMP detected schistosomal DNA from a single miracidium of *S. japonicum* (Figure 2B) and the snail infected with a single miracidium (data not shown). Thus, the LAMP method should be useful for the detection of specific DNA in the field without the need for a thermal cycler or gel electrophoresis. We also screened the rate of infected snails in local areas using large-scale DNA extraction. Different numbers (99, 49, 24, and 4) of non-infected snails from non-endemic areas were prepared, and a single infected snail (1 day after infection with 10 miracidia) was mixed in each group. The snails were crushed together, genomic DNA was extracted in one tube, and each sample was assayed by the LAMP method. LAMP detected 28S rDNA of *S. japonicum* from all infected groups but not non-infected groups (Figure 4), indicating that it is useful for detecting schistosomal DNA from a large number of snails in the field in endemic areas.

DISCUSSION

Schistosomiasis-control activities in China since the mid-1950s have decreased the prevalence of human infection with

S. japonicum to less than 10%.^{27,28} Furthermore, a new integrated strategy was developed and proven effective in endemic areas.^{7,8} However, the complete eradication of schistosomiasis japonica and the prevention of its reemergence remain difficult. To monitor the infection rate and distribution of infected snails, we developed molecular detection tools based on the amplification of nucleic acid.

PCR targeting 28S rDNA amplified 100 fg of genomic DNA from only *S. japonicum* and none from *S. mansoni*. The ribosomal DNA was known to have a highly repetitive sequence in the genome,^{18,29,30} and each region has been shown to be useful for molecular diagnosis and identification of species

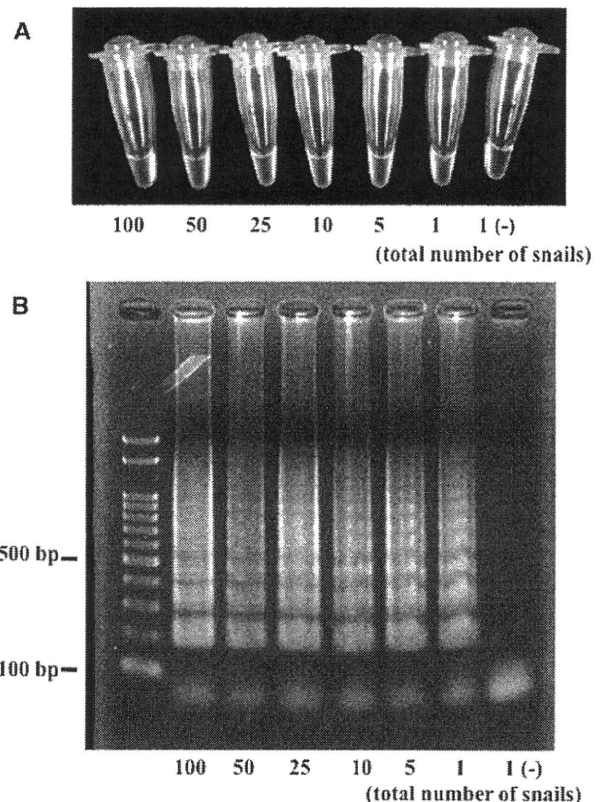


FIGURE 4. Detection of 28S rDNA from *S. japonicum* by LAMP assay in the total DNA from different numbers of non-infected snails artificially contaminated with a single infected snail. The snails infected with 10 miracidium were prepared and mixed with different numbers of snails (99 + 1, 49 + 1, 24 + 1, 9 + 1, 4 + 1, 0 + 1; normal + infected snails). Total DNA was extracted from each group and one non-infected snail (-), and the LAMP assay was performed. The 28S rDNA was amplified from all samples contaminated with the infected snail but not from non-infected snails by the LAMP assay. The results were confirmed based on the white precipitation (Upper) and gel electrophoresis (Lower).

in other infectious diseases.^{31,32} Our designed primer set was suitable for detection of the 28S ribosomal region from *S. japonicum*, and it performed better than had been previously reported, indicating that the sensitivity was 15 pg.¹⁹ Non-LTR retrotransposon, SjR2, was also detected by PCR at a sensitivity of 1 pg, nearly coinciding with the previous result (0.8 pg).¹⁶ Our results indicated that the sensitivity of 28S rDNA is higher than that of SjR2, because R2 sequences were specifically inserted into the 28S ribosomal region and the copy numbers of SjR2 were restricted by that of the target 28S ribosomal DNA.³³

The LAMP assay is a rapid, specific, and convenient assay employing four primers and isothermal DNA polymerase, and this tool can be applied as a new molecular diagnosis in the field in endemic areas. Our results showed that the sensitivity of LAMP was the same as that of conventional PCR. In general, the LAMP method is more sensitive than the PCR method,^{20,22,34,35} although similar sensitivities between the two have also been reported.²⁴ This may reflect the fact that the sensitivity is dependent on the designed primers. However, the present study found that the sensitivity of PCR assay was sufficient to amplify the 28S ribosomal DNA from a single miracidium, and the results between the LAMP and PCR assays were completely consistent. Therefore, the LAMP assay seems capable of detecting a single miracidium rapidly and inexpensively in the field. Recently, Xu and others²⁵ investigated LAMP targeting SjR2 and found that its sensitivity was 0.08 fg. We repeated their experiment using the reported primers,²⁵ but we found that the DNA from *S. japonicum* was not adequately amplified, because each sequence of the reported primers was not identical to the SjR2 regions.

By contrast, PCR, using 28S rDNA primer sets amplifying the *S. japonicum* DNA from the snails infected with a single miracidium at 1 day after infection, was able to detect a single individual of *S. japonicum* throughout the snail stages, whereas conventional microscopy can detect only mature cercaria of *S. japonicum*. Furthermore, PCR is useful for beginners without skill and knowledge, because this method can be specific to *S. japonicum* and can distinguish it from the other species. To evaluate whether our PCR method could be applied in endemic areas, we collected wild snails from endemic areas in Anhui province of China. After crushing the snails and checking for infection by microscopy, total DNA extracted from each snail underwent PCR using 28S rDNA primer sets. PCR amplified the product band from not only snails including the matured cercariae of *S. japonicum* but also snails where cercaria could not be seen by microscopy. This is further support for our hypothesis that PCR could detect the potential infection in the snails with early sporocysts. However, PCR never detected schistosomal DNA from cercaria-negative snails collected from Tongling in the autumn (September). It may be that the differences in the findings between the two areas reflect differences in the timing of new infections in snails as a function of the season and local factors. These areas were part of the marshlands of the Yangtze River where water levels fluctuate markedly because of rainfall and flooding. In autumn, domestic animals exit the marshlands because of the rising water level, which usually reaches the highest level of the year. Thus, transmission of miracidia to snails may be the most difficult in autumn, although domestic animals known to contain hosts of *S. japonicum* were found to be repeatedly infected throughout the year.^{36,37} These data suggested that the

PCR method has the potential to monitor the timing of the infection of snails in endemic areas.

Several previous reports have suggested that LAMP is useful for the detection of the infections in pathogen-carrying vectors.^{38,39} To evaluate the efficiency of the LAMP method for detecting infected snails, a large number of snails contaminated with a single infected snail were crushed together, and the total DNA was extracted in one tube. We then investigated whether LAMP could amplify the schistosomal DNA alone and found that LAMP could detect infection from a snail infected with *S. japonicum* in a group of 100 non-infected snails, indicating its use for detecting infection at a 1% infection rate. If snails (1,000–10,000 individuals) collected from several locations (e.g., 10–100 locations) were assayed, we expect that this method could precisely identify the infection rate in that area. The LAMP assay using 28S rDNA primers may be an effective tool, having the benefits of being rapid, easy, and inexpensive. Although the microscopy method is inexpensive, it is difficult to crush and observe a large number of snails. In particular, the novel LAMP method will make it possible to easily monitor very low infection rates of snails in endemic areas, where the new integrated strategy will be implemented.^{7,8}

In the present study, we evaluated PCR and LAMP assay targeting to 28S rDNA from *S. japonicum*. We found that PCR amplifying 28S rDNA could detect 100 fg of DNA from *S. japonicum* but none from *S. mansoni*. Furthermore, the PCR (and LAMP) method could detect the infection of *S. japonicum* in every stage inside the snail. In fact, PCR could detect potential infection from snails deemed negative for infection by microscopy that were sampled from wild snails collected from endemic areas. LAMP, which is rapid, easy, and safe to use in the field, was able to amplify the schistosomal DNA from a single infected snail in a total of 100 snails without marked inhibitions. PCR and LAMP targeting to 28S rDNA may be useful for monitoring the infection rate of snails in endemic areas and for confirming complete eradications against infected snails in the areas where the new integrated strategy is implemented.

Received January 8, 2010. Accepted for publication April 24, 2010.

Acknowledgments: This work was supported financially by the Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the Japan Society for the Promotion of Science (19790305), Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from the Japan Society for the Promotion of Science (18406012), Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas from the Japan Society for the Promotion of Science (19041049), Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (H18-Shinko-008), Kurozumi Medical Foundation, and the US–Japan Cooperative Medical Science Program.

Authors' addresses: Takashi Kumagai, Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, E-mail: tkuma.vip@tmd.ac.jp. Rieko Furushima-Shimogawara, Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, E-mail: rfuru.vip@tmd.ac.jp. Hiroshi Ohmae, Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo, Japan, E-mail: h-ohmae@nih.go.jp. Tian-Ping Wang, Anhui Institute of Parasitic Diseases, Wuhu, China, E-mail: wangtianping@hotmail.com. Shaohong Lu, Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, China, E-mail: lssh2003@163.com. Rui Chen, Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, China, E-mail: chenrui@163.com. Liyong Wen, Institute of Parasitic Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences,

Hangzhou, China, E-mail: wenliyonghz@hotmail.com. Nobuo Ohta, Section of Environmental Parasitology, Department of International Health Development, Division of Public Health, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, E-mail: matata.vip@tmd.ac.jp.

REFERENCES

- Ross AG, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, McManus DP, 2002. Schistosomiasis. *N Engl J Med* 346: 1212–1219.
- Liang S, Yang C, Zhong B, Qiu D, 2006. Re-emerging schistosomiasis in hilly and mountainous areas of Sichuan, China. *Bull World Health Organ* 84: 139–144.
- Ross AG, Sleight AC, Li Y, Davis GM, Williams GM, Jiang Z, Feng Z, McManus DP, 2001. Schistosomiasis in the People's Republic of China: prospects and challenges for the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 14: 270–295.
- Zhou XN, Wang LY, Chen MG, Wu XH, Jiang QW, Chen XY, Zheng J, Utzinger J, 2005. The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now. *Acta Trop* 96: 97–105.
- Zhou XN, Guo JG, Wu XH, Jiang QW, Zheng J, Dang H, Wang XH, Xu J, Zhu HQ, Wu GL, Li YS, Xu XJ, Chen HG, Wang TP, Zhu YC, Qiu DC, Dong XQ, Zhao GM, Zhang SJ, Zhao NQ, Xia G, Wang LY, Zhang SQ, Lin DD, Chen MG, Hao Y, 2007. Epidemiology of schistosomiasis in the People's Republic of China, 2004. *Emerg Infect Dis* 10: 1470–1477.
- Li SZ, Luz A, Wang XH, Xu LL, Wang Q, Qian YJ, Wu XH, Guo JG, Xia G, Wang LY, Zhou XN, 2009. Schistosomiasis in China: acute infections during 2005–2008. *Chin Med J* 122: 1009–1014.
- Wang LD, Chen HG, Guo JG, Zeng XJ, Hong XL, Xiong JJ, Wu XH, Wang XH, Wang LY, Xia G, Hao Y, Chin DP, Zhou XN, 2009. A strategy to control transmission of *Schistosoma japonicum* in China. *N Engl J Med* 360: 121–128.
- Wang LD, Guo JG, Wu XH, Chen HG, Wang TP, Zhu SP, Zhang ZH, Steinmann P, Yang GJ, Wang SP, Wu ZD, Wang LY, Hao Y, Bergquist R, Utzinger J, Zhou XN, 2009. China's new strategy to block *Schistosoma japonicum* transmission: experiences and impact beyond schistosomiasis. *Trop Med Int Health* 14: 1475–1483.
- Pontes LA, Dias-Neto E, Rabello A, 2002. Detection by polymerase chain reaction of *Schistosoma mansoni* DNA in human serum and feces. *Am J Trop Med Hyg* 66: 157–162.
- Hamburger J, He-Na Abbasi I, Ramzy RM, Jourdane J, Ruppel A, 2001. Polymerase chain reaction assay based on a highly repeated sequence of *Schistosoma haematobium*: a potential tool for monitoring schistosome-infested water. *Am J Trop Med Hyg* 65: 907–911.
- Sandoval N, Siles-Lucas M, Lopez Aban J, Pérez-Arellano JL, Gárate T, Muro A, 2006. *Schistosoma mansoni*: a diagnostic approach to detect acute schistosomiasis infection in a murine model by PCR. *Exp Parasitol* 114: 84–88.
- Hertel J, Kedves K, Hassan AH, Haberl B, Haas W, 2004. Detection of *Schistosoma mansoni* cercariae in plankton samples by PCR. *Acta Trop* 91: 43–46.
- Suzuki T, Osada Y, Kumagai T, Hamada A, Okuzawa E, Kanazawa T, 2006. Early detection of *Schistosoma mansoni* infection by touchdown PCR in a mouse model. *Parasitol Int* 55: 213–218.
- Laha T, Brindley PJ, Smout MJ, Verity CK, McManus DP, Loukas A, 2002. Reverse transcriptase activity and untranslated region sharing of a new RTE-like, non-long terminal repeat retrotransposon from the human blood fluke, *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 32: 1163–1174.
- Driscoll AJ, Kyle JL, Remais J, 2005. Development of a novel PCR assay capable of detecting a single *Schistosoma japonicum* cercaria recovered from *Oncorhynchus mykiss*. *Parasitology* 131: 497–500.
- Xia CM, Rong R, Lu ZX, Shi CJ, Xu J, Zhang HQ, Gong W, Luo W, 2009. *Schistosoma japonicum*: a PCR assay for the early detection and evaluation of treatment in a rabbit model. *Exp Parasitol* 121: 175–179.
- Hung YW, Remais J, 2008. Quantitative detection of *Schistosoma japonicum* cercariae in water by real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e337.
- Lier T, Johansen MV, Hjelmevoll SO, Vennervald BJ, Simonsen GS, 2008. Real-time PCR for detection of low intensity *Schistosoma japonicum* infections in a pig model. *Acta Trop* 105: 74–80.
- Sandoval N, Siles-Lucas M, Pérez-Arellano JL, Carranza C, Puente S, López-Abán J, Muro A, 2006. A new PCR-based approach for the specific amplification of DNA from different *Schistosoma* species applicable to human urine samples. *Parasitology* 133: 581–587.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: E63.
- Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, Jin L, Takeo S, Tsuboi T, 2007. Detection of four *Plasmodium* species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. *J Clin Microbiol* 45: 2521–2528.
- Thekisoe OM, Kuboki N, Nambota A, Fujisaki K, Sugimoto C, Igarashi I, Yasuda J, Inoue N, 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis. *Acta Trop* 102: 182–189.
- Takagi H, Itoh M, Islam MZ, Razaque A, Ekram AR, Hashighuchi Y, Noiri E, Kimura E, 2009. Sensitive, specific, and rapid detection of *Leishmania donovani* DNA by loop-mediated isothermal amplification. *Am J Trop Med Hyg* 81: 578–582.
- Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A, 2009. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of *Taenia* species. *J Clin Microbiol* 47: 168–174.
- Xu J, Rong R, Zhang HQ, Shi CJ, Zhu XQ, Xia CM, 2010. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Int J Parasitol* 40: 327–331.
- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Onoe S, Takahashi Y, Katagiri S, Toen K, Watanabe K, Notomi T, Yamashina H, Matsuzaki S, Minamihashi A, 2004. Rapid sexing of bovine pre-implantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology* 62: 887–896.
- Utzinger J, Zhou XN, Chen MG, Bergquist R, 2005. Conquering schistosomiasis in China: the long march. *Acta Trop* 96: 69–96.
- Zhou XN, Wang LY, Chen MG, Wang TP, Guo JG, Wu XH, Jiang QW, Zheng J, Chen XY, 2005. An economic evaluation of the national schistosomiasis control programme in China from 1992 to 2000. *Acta Trop* 96: 255–265.
- van Keulen H, Loverde PT, Bobek LA, Rekosh DM, 1985. Organization of the ribosomal RNA genes in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol* 15: 215–230.
- Littlewood DT, Johnston DA, 1995. Molecular phylogenetics of the four *Schistosoma* species groups determined with partial 28S ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology* 111: 167–175.
- Das A, Holloway B, Collins WE, Shama VP, Ghosh SK, Sinha S, Hasnain SE, Talwar GP, Lal AA, 1995. Species-specific 18S rRNA gene amplification for the detection of *P. falciparum* and *P. vivax* malaria parasites. *Mol Cell Probes* 9: 161–165.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, Jaffe CL, 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 47: 349–358.
- Kojima KK, Fujiwara H, 2005. Long-term inheritance of the 28S rDNA-specific retrotransposon R2. *Mol Biol Evol* 22: 2157–2165.
- Zhang H, Thekisoe OM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, Nishikawa Y, Zakimi S, Xuan X, 2009. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Exp Parasitol* 122: 47–50.
- Karanis P, Thekisoe O, Kiouptsi K, Ongerth J, Igarashi I, Inoue N, 2007. Development and preliminary evaluation of a loop-mediated isothermal amplification procedure for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal and water samples. *Appl Environ Microbiol* 73: 5660–5662.
- Wang T, Zhang S, Wu W, Zhang G, Lu D, Ornbjerg N, Johansen MV, 2006. Treatment and reinfection of water buffaloes and

- cattle infected with *Schistosoma japonicum* in Yangtze River Valley, Anhui province, China. *J Parasitol* 92: 1088–1091.
37. Wang TP, Johansen MV, Zhang SQ, Wang FF, Wu WD, Zhang GH, Pan XP, Ju Y, Ørnbjerg N, 2005. Transmission of *Schistosoma japonicum* by humans and domestic animals in the Yangtze River valley, Anhui province, China. *Acta Trop* 96: 198–204.
38. Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, Yagi T, Kanuka H, Fukumoto S, 2008. Rapid identification of *Plasmodium*-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. *Biochem Biophys Res Commun* 376: 671–676.
39. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H, 2009. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasit Vectors* 2: 15.

EFFICACY OF SODIUM METAPERIODATE (SMP)-ELISA FOR THE SERODIAGNOSIS OF SCHISTOSOMIASIS MEKONGI

Masashi Kirinoki¹, Yuichi Chigusa¹, Hiroshi Ohmae², Muth Sinuon³, Duong Socheat³, Jun Matsumoto⁴, Viroj Kitikoon⁵ and Hajime Matsuda⁶

¹Laboratory of Tropical Medicine and Parasitology, ⁶Institute of International Educations and Research, Dokkyo Medical University, Mibu, Shimotsuga, Tochigi, Japan; ²Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo, Japan; ³National Center for Parasitology, Entomology and Malaria Control, Ministry of Health, Phnom Penh, Cambodia; ⁴Laboratory of Medical Zoology, Nihon University College of Bioresource Sciences, Kameino, Fujisawa, Kanagawa, Japan; ⁵Faculty of Tropical Medicine, Mahidol University, Bangkok, Thailand

Abstract. Schistosomiasis mekongi is an important public health issue in endemic countries. In this study, we evaluated an indirect immunodiagnostic ELISA method using *Schistosoma mekongi* soluble egg-antigen. Sodium metaperiodate (SMP)-ELISA was utilized in order to remove the glycosylated epitopes responsible for false positive reactions and the results using this method were compared with those using conventional ELISA (conv-ELISA). Forty-two serum samples from schistosomiasis mekongi egg-positive patients and 100 serum samples from schistosomiasis-negative Cambodian subjects were tested using both ELISA methods. The ranges of ELISA values for positive and negative sera were distinct on SMP-ELISA, but the ranges of the two groups of sera overlapped on conv-ELISA. Therefore, diagnostic criteria may be established based on the highest ELISA value on negative sera and the lowest ELISA value on positive sera. In the present study, both the sensitivity and specificity of SMP-ELISA reached 100% using the criteria in which an ELISA value ≥ 0.2 was positive.

Keywords: SMP-ELISA, *Schistosoma mekongi*, diagnosis

INTRODUCTION

Schistosomiasis mekongi is a significant public health problem in Lao PDR and Cambodia. A mass drug administration campaign by the National Center for Para-

sitology, Entomology and Malaria Control (CNM), Ministry of Health, Cambodia, with international cooperation was initiated in 1994 using praziquantel in Kratie Province. At the beginning of the control program, the disease prevalence in primary schools in the Kratie Province, as determined by stool examination using the Kato-Katz method, was 72.9% (Stich *et al*, 1999). As a result of the control program, the prevalence of schistosomiasis decreased dramatically. In 2004, when stool

Correspondence: Masashi Kirinoki, Laboratory of Tropical Medicine and Parasitology, Dokkyo Medical University, Mibu, Shimotsuga, Tochigi, 321-0293, Japan.
Tel: +81-282-87-2134; Fax: +81-282-86-6431
E-mail: kirinoki@dokkyomed.ac.jp

surveys were conducted at five sentinel villages, no schistosome eggs were detected and only three cases of schistosomiasis were reported (Sinuon *et al*, 2007).

Despite the success of the control program, the limited sensitivity of the Kato-Katz method is a matter of concern. The detection of eggs from patient stool has become difficult because the intensity and prevalence of the disease have decreased. Therefore, a more sensitive diagnostic technique is required to determine progress of the schistosomiasis control program (Urbani *et al*, 2002; Fenwick *et al*, 2006). Bergquist *et al* (2009) stated that diagnostic methods need to be continually adapted based on the stage of control. Serological diagnosis, such as using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), is a potential alternative diagnostic method for the schistosomiasis mekongi control program (Ohmae *et al*, 2004).

We previously conducted a seroepidemiological survey of schistosomiasis japonica using circum oval precipitin (COP) tests (Tanaka *et al*, 1987) and ELISA (Matsumoto *et al*, 1999; Chigusa *et al*, 2006) and have studied *Schistosoma mekongi* control in Cambodia (Ohmae *et al*, 2004).

Immunodiagnosis of schistosomiasis mekongi using antigens of *Schistosoma japonicum* (Zhu *et al*, 2005) and keyhole limpet hemocyanin (Ittiprasert *et al*, 2000) have been carried out, but immunological diagnosis using *S. mekongi* antigen has not previously been reported.

In this study, we performed an ELISA using the soluble egg antigen (SEA) of *S. mekongi* and utilized sodium metaperiodate (SMP)-ELISA. The method of Alarcón de Noya *et al* (2000) was used in order to remove the glycosylated epitopes responsible for false positive reactions occurring with immunodiagnosis of

S. mansoni infection. In this study, a comparison between SMP-ELISA and conventional ELISA was performed, and we discuss suitable criteria for the methods.

MATERIALS AND METHODS

Serum samples

A mass drug administration campaign was conducted in Cambodia: individuals in the target population were diagnosed by stool examination and serological testing as part of the National Schistosomiasis Control Program for Cambodia. The 42 positive control sera (Group A) used in this study were collected from schistosome egg-positive residents in 2003 ($n = 34$) and 2009 ($n = 8$) in Kratie Province, Cambodia. The 34 sera collected from *S. mekongi* infected patients in 2003 were pooled and used as the positive reference serum, which was distributed into sample tubes and stored at -40°C until use.

Negative control sera were collected from volunteers without risk for schistosomiasis mekongi infection: 100 Cambodians (Group B) in 2002 and 25 Japanese (Group C) in 2003. Group B was comprised of schoolchildren in Phnom Penh, located more than 120 km away from the endemic area. Furthermore, these subjects had no history of visiting the endemic area. Serum samples were collected by CNM as a part of the parasitic diseases control program.

Individuals in Group C were healthy Japanese volunteers without a history of traveling abroad. The purpose of the study was explained and written informed consent was obtained from all volunteers.

Antigen

Schistosoma mekongi (Laotian strain) was maintained in *Neotricula aperta* snails and mice (ICR strain) at the Laboratory of Tropical Medicine and Parasitology,