

地球規模保健課題推進研究事業（国際医学協力研究事業）

「寄生虫疾患の病態解明及びその予防・治療をめざした研究」

研究協力者 報告書

フィラリア症の疫学研究（診断法の開発と野外応用）

研究協力者 愛知医科大学医学部 伊藤 誠

## 研究要旨

これまでに開発した尿免疫診断法に改良を加えることにより、測定の手続きを減らし、抗体あるいは抗原結合プレート常温で長期間保存できるようにした。LAMP 法による媒介蚊中のフィラリア由来 DNA 検出法を定量化し、フィラリア伝播調査の精度を上げることができた。これまでの調査地以外でも、尿診断法がフィラリア症対策の評価に有用であることを示すことができた。尿診断法と LAMP 法は「住民に優しい」フィラリア症制圧のための疫学調査を可能にする。

### A. 研究目的

WHO 主導による「フィラリア症制圧プログラム」は、リンパ系フィラリア症流行地の多くで 5 回の集団治療を完了し、有病率は激減した。現在、征圧確認のための方法の選択ならびに、再燃の早期発見のための監視機構の構築が重要な課題となっている。

感染者がほとんど無くなった地域では、従来の夜間採血による末梢血中のミクロフィラリア検出法は住民の協力が得難く、活動を続けるのは容易でない（大規模な集団検血などはますます困難になるであろう）。そこで、住民に迷惑をかけずにフィラリア症の感染・伝搬情報を収集するために、これまでに開発した方法の改良を図ること、また、これまでの調査地域外のフィラリア症流行地にも調査範囲を広げることを目的とした。

新たなフィラリア症感染の阻止だけでなく、象皮病などの症状を軽減するための対策も同時に進行させる。

### B. 研究方法

「住民に優しい」疫学調査の実施法を確立する

小学生を対象とする尿免疫診断と、媒介蚊の調査を基本とし、これらの結果に基づいて必要な地域を選定し住民検査（採血も含む）を実施する。

尿免疫診断法の改良

従来の尿 ELISA および目視判定できるビーズ法の野外応用を容易にするために、常温で長期間保存可能な抗原あるいは抗体吸着プレートを作成する。

媒介蚊調査

ルフナ大学チームと共同し、トラップによる媒介蚊の採集、LAMP 法を用いた媒介蚊のフィラリア感染率調査を実施する。また、フィラリア DNA の定量化を行う。

尿による調査地域の拡大

尿による調査地域はこれまで長い協力関係にあるスリランカが中心であった。しかし

WHO 主導の集団駆虫 (MDA) によるフィラリア症対策はアジアの国々を含む多くの地域で実施されており、これらの地域での尿診断法の応用は有益である。ベトナムへも調査地を拡大し、この方法の有用性を確かめる。

象皮病に関する研究 (従来のテーマ継続)

スリランカのルフナ大学チームにより、登録された象皮病患者 (約 100 人) の治療が継続中である。また、発症に関わる遺伝的因子の解明を行う。

(倫理面への配慮)

本研究は、愛知医科大学倫理委員会の審査を経て実施された。スリランカ、バングラデシュ、ベトナムにおける共同研究者は、その所属機関において同様の審査・承認を得ている。被検者には十分な説明を行い同意を得ている。

## C. 結果

「住民に優しい」疫学調査の実施法の確立

小学生を対象とした調査は今年度は実施できなかったが、そのための尿診断法や LAMP 法の改良を重点的に行った。

尿免疫診断法の改良

流行地での ELISA やビーズ法の実施のためには、用いる材料が常温で、できるだけ長期間保存できることが必要である。ELISA 用には *Wuchereria bancrofti* のリコンビナント抗原、SXP1、を結合させた ELISA プレート、またビーズ法のためには抗ヒト IgG4 抗体を結合させたプレートを作成、種々のコーティング剤で処理したのちに 4 あるいは 37 で保存し、反応性を継続的に検討した。その結果、37 で少なくとも半年は性能の低下なく保存可能な抗原結合プレートと、抗体結合プレートを作成することができた。

媒介蚊調査

CDC Gravid Trap をスリランカの調査地に設置し、効率よく吸血蚊を採取するための条件を模索中である。媒介蚊 (*Culex quinquefasciatus*) から *W. bancrofti* 幼虫を検出する高感度な LAMP 法はすでに開発済みであり、今回さらに定量的 LAMP 法を用いることにより、蚊に含まれるフィラリアの DNA 量を測定することが可能となった。蚊の採取ができ次第調査できる準備を整えることができた。

尿による調査地域の拡大

尿によるフィラリア症の診断法を、これまでの調査地 (スリランカ、中国) 以外でも利用するために、ベトナムからの尿検体について、抗体検査をした。かつての流行地であるカンホア省 (ミクロフィラリア陽性率が 5% 以上、1998 年のデータ) からの尿 415 検体を調べたところ、尿中抗体陽性率は 5.1% (21 検体) と低いものであった。5 歳以下の陽性者がいたことから、感染が完全にはなくなっただけではないが、この地域におけるフィラリア症対策は進んでいるものと考えられた。

象皮病に関する研究

スリランカにおいてこれまでに登録された象皮病患者の治療が継続され、症状の軽減と QL の向上が観察された。

## D. 考察

フィラリア尿診断法の改良

診断法は感度・特異性を保ちつつ、できるだけ簡便な方がより実用的である。マイクロタイタープレートへの抗原や抗体をあらかじめ結合しておくことは、測定の手数を減らすのみならず、冷蔵あるいは冷凍すべき試薬数を減らすことになる。今回行った研究から、抗原あるいは抗体結合プレートが Cold chain の確保が難しい場所でも長期間保存できるようになった。

媒介蚊調査

媒介蚊中にフィラリアの DNA を LAMP 法で検出する方法は既に報告している。今回、リアルタイム濁度測定装置を用いることにより、filaria 由来 DNA を LAMP 法で定量することができた。媒介蚊中のフィラリア幼虫をさらに精度よく定量できる可能性が示された。

#### フィラリア症調査地域の拡大

フィラリア症の MDA 対策をいつやめるとの判断には、夜間採血によるミクロフィラリアの検査、あるいは ICT による血液中のフィラリア由来抗原の検査による調査が用いられてきている。我々が開発した尿診断法は、これまでに、スリランカや中国において、MDA 対策の評価に住民に受け入れやすい方法として使えることを示すことができた。この方法をベトナムのかつての流行地に適用し、これまで通りの成果を上げることができた。さらに応用範囲を拡大する予定である。

#### 象皮病に関する研究

フィラリアの感染がなくなった後にも、象皮病に苦しむ患者のケアは重要なフィラリア症対策である。現在スリランカで進行中の象皮病研究を通じて得られる情報は、今後の象皮病対策に役立つものと期待される。

#### E. 結論

日本発の尿診断法とフィラリア伝播の確認のための、これも日本発の LAMP 法は、「住民に優しい」フィラリア症制圧のための疫学調査を可能にする。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

##### 英文論文

Gass K, Beau de Rochars MV, Boakye D, Bradley M, Fischer PU, Gyapong J, Itoh M, Ituaso-Conway N, Joseph H, Kyelem D, Laney SJ, Legrand AM, Liyanage TS, Melrose

W, Mohammed K, Pilotte N, Ottesen EA, Plichart C, Ramaiah K, Rao RU, Talbot J, Weil GJ, Williams SA, Won KY, Lammie P. A multicenter evaluation of diagnostic tools to define endpoints for programs to eliminate bancroftian filariasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 January; 6(1): e1479.

Islam MZ, Itoh M, Islam MA, Saifuddin Ekram AR, Rahman MA, Takagi H, Takesue A, Hashiguchi Y, Kimura E. ELISA with recombinant rKRP42 antigen using urine samples: a tool for predicting clinical visceral leishmaniasis cases and its outbreak. *Am J Trop Med Hyg*. 2012 Aug 6. [Epub ahead of print]

Alam MS, Kato H, Fukushige M, Wagatsuma Y, Itoh M. Application of RFLP-PCR-Based Identification for Sand Fly Surveillance in an Area Endemic for Kala-Azar in Mymensingh, Bangladesh. *J Parasitol Res*. doi:10.1155/2012/467821. 2012

Nagaoka F, Itoh M, Samad MS, Takagi H, Weerasooriya MV, Yahathugoda TC, Hossain M, Moji K, Kimura E. Visual detection of filaria-specific IgG4 in urine using red-colored high density latex beads. *Parasitol Int*. 62:32-35. 2013

Shintoku Y, Kadosaka T, Kimura e, Takagi H, Kondo S, Itoh M. Intestinal mast cells and eosinophils in relation to *Strongyloides ratti* adult expulsion from the small and large intestines of rats. *Parasitology*. Doi:10.1017/S0031182012001837. 2013

##### 2. 学会発表

Makoto Itoh. Using anti-P. knowlesi antibodies for epidemiological surveys. The 2nd International Symposium on Human and Monkey Malaria in

Vietnam, "Forest Malaria: from Monkey to Man".  
March 6-7. 2012. Nha trang City, Vietnam

Makoto Itoh. Mass-survey of parasitic diseases  
with urine samples. 第一回「寄生虫学臨床研究  
ワークショップ」2012年6月

Mohammad Sohel Samad, Makoto Itoh, Kazuhiko  
Moji, Moazzem Hossain, Dinesh Mondal,  
Mohammad Shafiul Alam, Eisaku Kimura.  
Application of ELISA to detect urinary IgG4 for  
the mass-survey of lymphatic filariasis in  
Bangladesh. 12th Asian-Pacific Congress for  
Parasitic Zoonosis. Oct 6-7. 2012. Kobe

伊藤 誠、砂原俊彦、Zahidul Mohammad Islam、  
Mohammad Sohel Samad、木村英作 Analysis  
of location of visceral leishmaniasis by SATscan.  
兵庫医科大学 第81回日本寄生虫学会、2012  
年3月23-24日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし