

地球規模課題対応国際科学技術協力

感染症分野「開発途上国のニーズを踏まえた感染症対策研究」領域

「レプトスピラ症の予防対策と診断技術の開発」

(相手国:フィリピン)

平成25年度実施報告書

代表者 吉田 真一

九州大学大学院医学研究院・教授

<平成21年度採択>

1. プロジェクト全体の実施の概要

【プロジェクトの目標】

年間 30 万人～50 万人の重症レプトスピラ患者が発生、うち 10-20%が死亡と推測されている。患者発生は熱帯～亜熱帯の多雨地域で多いが、世界各国から報告されている。本プロジェクトは地球規模の課題となっているレプトスピラ感染症のコントロールをめざし、フィリピンをフィールドとし、プロジェクト目標の一つである「共同研究を通じて、CPH-UPM(フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部)のレプトスピラ症予防対策の研究開発能力が強化される。」ことを達成するべく次のような成果目標を設定して始まった。

1. 感染実態の把握:ヒト、家畜、野生ラットおよび野犬の抗体検査等により感染の実態と病態形成のメカニズムを明らかにする。また感染に伴う疾病負担を分析する。
2. 迅速診断キットの開発:臨床診断に頼っている現状では治療が遅れる。ベッドサイドや外来で迅速に簡便に診断できるキットを開発する。
3. DNA ワクチンの開発:血清型の違いを越えて予防できるワクチンを開発する。
4. 感染予防のための啓発活動を行う。
5. レプトスピラ研究拠点として研究室(レプトスピラ症予防対策センター)を設置する。

【これまでのプロジェクトの概要】

目的を達成するために以下のように 4 つのワーキンググループ (WG) を構成した。

グループ A:微生物学的研究(さらに3つのサブグループに分ける)

- サブグループ A1)感染実態の把握
- A2)診断キットの開発と評価
- A3)ワクチンの開発と評価

グループB:レプトスピラ症の疫学と疾病負担

グループC:環境因子の解析

グループD:啓発活動

各グループとサブグループには日本サイドのリーダーと、副リーダーを置き、活動の中心となる。フィリピン側も対応するグループを形成した。

【プロジェクト進捗状況】

2010 年 4 月 1 日より5年間のプロジェクトとして R/D 署名がなされ、7 月 5 日にプロジェクトの Kick Off Meeting を関係機関及び専門家参加のもと開催し実質的活動が開始、各グループの日本側リーダー派遣時に活動計画がグループ毎に作成された。

さらに、プロジェクト正式名称「The Project for Prevention and Control of Leptospirosis in the Philippines」の略称を“LEPCON”とすることが決定された。

2010 年 9 月 3 日には第1回 Joint Coordinating Committee(JCC)を開き、各グループの活動計画案に沿った Plan of Operation 修正案への承認を得た。また 10 月以降、プロジェクト運営管理のための月例の LEPCON Regular Meeting が開かれ情報共有の良い機会となっている。2013 年 03 月までに計 18 回開催済みである。

フィリピン側の研究予算も配置され 2010 年 10 月以降フィリピン側の研究活動も活発に開始。グループ A (A1)

細菌学的疫学グループは、ヒト、動物の感染実態をあきらかにし、論文で発表、またはPCHRDへの報告を行った。グループBとDは共同でマニラ地域の住民(約1,000名)を対象に抗体検査と質問票によるデータ収集を2011年1月に完了し、2012年1月現在、検体のELISA検査とデータ解析から、抗体保有率、感染と関連する因子、DALYsを明らかにした。またグループCでは過去に日本人専門家と保健省により収集された患者データをGIS上にまとめる作業が行われた。

診断キット(A2サブグループ)は免疫クロマトグラフィー法を原理としたdipstick法とlateral flow法による尿中抗原検出キットが試作され、その論文も平成25年5月に発表された。抗体を検出するMicrocapsule agglutination test (MCAT)の試作品もつくられ、マニラ(CPH-UPM)で、特異性、感受性の検討が行われて良い成績が得られた。

ワクチン(A3サブグループ)については、無血清培地を使って死菌ワクチンを製造する作業が行われている。DNAワクチンは九州大学でLipL41, OmpL1とLipL32をターゲットとした3価DNAワクチンの実験をしている。

2012年1月26日には、Leptospirosis Control(“LEPCON”) Laboratoryの落成式が行われ、同日、第2回Joint Coordinating Committee (JCC) Meetingを開き、各グループの活動計画案に沿ったPlan of Operation修正案への承認を得た。さらに、同日午後には、第1回Scientific Symposium on the Prevention and Control of Leptospirosis in the Philippines(LEPCON)”が開催され、日本側から7人、フィリピン側から4人の研究者が、プロジェクト開始からの研究成果を発表した。

新装になったCPHのラボでは、これまで同様、MATによる抗体検査が続けられ、死菌ワクチン作製のための菌の培養が行われている。ハムスターの飼育も行われ、ワクチンの効果が検証されている。

2012年11月-12月にかけてJICAおよびJSTによる中間評価が実施され、第2回Joint Coordinating Committee (JCC) Meetingも開催された。

【プロジェクトの成果】

グループA, サブグループA1からはラット分離株とその抗生物質感受性、環境からのレプトスピラの分離をするための選択培地の開発、環境中のレプトスピラの分布と生態、新種*Leptospira idonii*の発見、についての論文が国際誌に6報掲載された。サブグループA2により作成された迅速診断キットの論文が米国微生物学会誌に受理された。マニラ首都圏地域の患者と危険因子の関連に関する発表を2011年3月に開催されたPCHRD-DOSTのセミナーの席上でグループC代表が行った。

【今後の見通し】

感染実態調査、経済的損失の調査研究、環境因子の研究、啓発活動も日本側とフィリピン側の協力がうまくいっており、成果が上がっている。今後は迅速診断キットの実用化が最も期待される。さらに死菌ワクチンの実用化に目途をつけたい。病態形成の研究では、黄疸、腎不全、出血の成因を明らかにする。

2. 研究グループ別の実施内容

2.1. 細菌学的研究

2.1.1. 感染実態の把握(グループA1)

① 研究のねらい:

レプトスピラ感染症は代表的な人獣共通感染症である。人的被害のみならず、家畜の感染による産業、経済

に与える影響も大きい。グループA(A1)ではヒトのほか、野生ネズミ(レプトスピラを腎臓に保有し尿中に排泄するので最も重要な感染源である)、イヌ(人間の生活に入り込んでいる代表的動物)、家畜(スイギュウ、ブタ)の感染実態を知るための血清抗体検査を行う。そのほか、新たに開発した選択培地を使って、環境水中のレプトスピラの分布を調査する。

② 研究実施方法:

動物から採血しMATにて、血清抗体価を測定した。レプトスピラ感染疑い患者検体の MAT 血清抗体価検査についてはフィリピン全域を研究対象にするのは無理があるため、7つの Regions (NCR, I, III, IV, V, VI, VIII) を主要な対象地域とした。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

フィリピン特にマニラ首都圏における動物の抗体保有率と血清型についてはすでに報告した(表1)。ラット(92%)、スイギュウ(82%)、ブタ(67%)、イヌ(79%)といずれも高率に抗体を保有していることが確認され、主要血清型も明らかにされた。

表1. フィリピンにおけるヒトと動物の血清抗体陽性率と主な血液型(フィリピン)

	血液検 体数	陽性数(率)	主な血液型(例数)
ヒト患者 a	71	53 (75%)	Poi(40), Tarassovi(22), Manilae(9)
野生ラット	106	98 (92%)	Manilae(15), Hebdomadis(11), Lostanos(9)
スイギュウ	190	155 (82%)	Hardjo(37), Tarassovi(27), Hebdomadis(21)
ブタ	45	30 (67%)	Semarang(6), Patoc(4), Hebdomadis(4)
イヌ	109	86 (79%)	Manilae(17), Patoc(10), Autumnalis(8)

a ; 1999 年～2001 年にかけて調べられた感染疑い患者。

ヒト以外の動物の血清は 2006 年～2008 年に調べられた。

その後も 2010 年 8 月から 2012 年 1 月まで野生ネズミ 51 頭、野犬 84 頭、スイギュウ 50 頭、牛 25 頭、豚 12 頭の合計 222 検体について MAT を行った。各動物で最も多く見られた血清型は、野ねずみ(Copenhageni 39.2%)、野犬 (Manilae 27.4%)、スイギュウ(Tarassovi 36.0%)、ウシ(Patoc 36.0%)、ブタ(Poi 58.3%) であった。

ヒトレプトスピラ症疑診患者については、UPM/CPH より PCHRD に報告されたデータを figure 1 (単独血清 Single serum sample のみ)と Table 2 に示す。2010 年 8 月 16 日から 2012 年 2 月 29 日までの約 1 年半の間に集められた 1353 検体の結果である。マニラ首都圏病院(NCR hospital)採取 448 検体では 2/3 が陽性、Region IV-A, V, VI, VIII での採取 187 検体では 約 50%が MAT 陽性であった。

血清型で多いのは Patoc (80.5%), Semarang (27.6%), Copenhageni (26.4%), Poi (19.5%), Manilae (8.9%), Pyrogenes (8.7%) の順であった。

なお、2011 年から 2012 年1月にかけてフィリピン国内で洪水被害が報告された地域 (Region I, III 及び X)において、症状のみられた被災民からの検体計 190 を収集し MAT 検査を実施、うち 92 検体が陽性、その血清型が確認された。

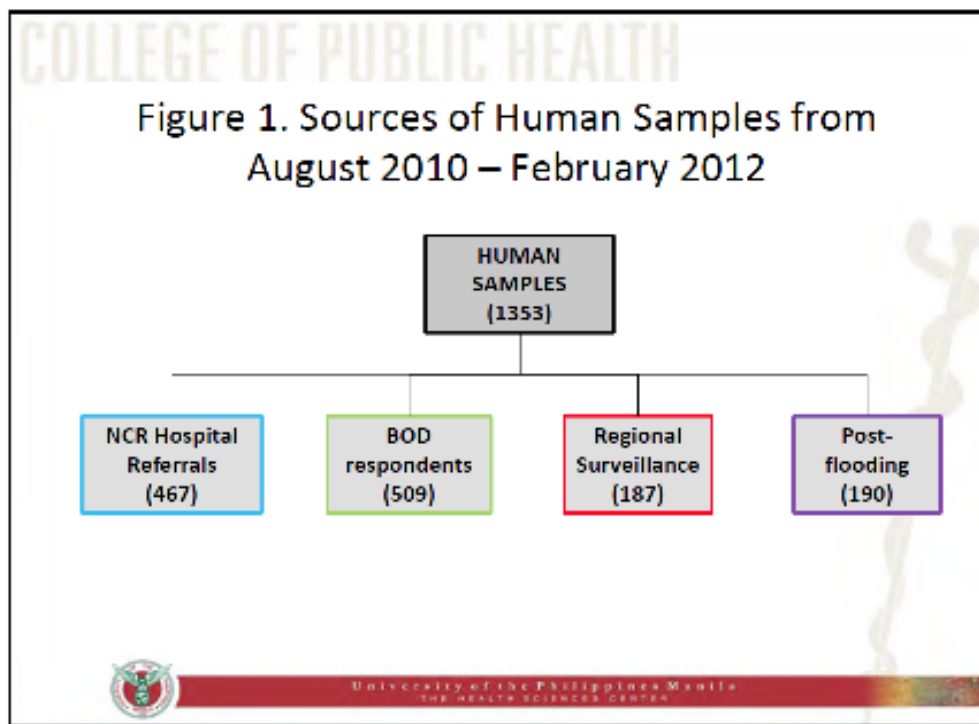


Table 2. Distribution of MAT Result According to Region, Single Serum Samples

Region	MAT-positive N=493		MAT-negative N=825		MAT-positivity per region	
	No.	%	No.	%	No. of positives over total no. of samples the region	%
National Capital Region Hospital Community (BOD)	295	59.8	153	18.5	295/448	65.8
	13	2.6	496	60.1	13/509	2.6
Region I	32	6.5	34	4.1	32/66	48.5
Region III	25	5.1	18	2.2	25/43	58.1
Region IV-A	11	2.2	11	1.3	11/22	50.0
Region V	8	1.6	11	1.3	8/19	42.1
Region VI	73	14.8	45	5.5	73/118	61.9
Region VIII	8	1.6	15	1.8	8/23	34.8
Region X	28	5.7	42	5.1	28/70	40.0
Overall seropositivity					493/1318	37.4

同時に行ったアンケート調査では、症状はこれまでの報告と同様であった (Figure 8) が、私たちにとっては、嘔吐 63.0%、腹痛 58.7%、下痢 36.3% と、消化器症状が多いとの印象を受けた。

④ カウンターパートへの技術移転の状況:

MAT 法、MCAT 法の技術移転を行った。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)

感染実態を理解する上で、環境中のレジオネラの生息分布を知ることは重要である。九大グループはレプトスピラを培養するための選択剤の組合せを考案し発表した。その組合せとは、sulfamethoxazole, trimethoprim, amphotericin B, fosfomycin, 5-fluorouracil であり頭文字をとって STAFF と名付けた。この選択剤の使用により環境中のレプトスピラの分離率が格段によくなり、遺伝学的に病原性がある種も分離できるようになった。さらなる成果として、新種を発見し、井戸泰博士の名前をとって、*Leptospira idonii* と命名し専門誌に発表した。

2. 1. 2. 診断キットの開発と評価(グループ A2)

2. 1. 2. 1 診断法の開発と有用性の評価

① 研究のねらい:

レプトスピラ症は、治療しなければ 5~30%の致死率を示す重篤な感染症である。一方、抗菌薬による治療が可能であり、早期の治療開始が、その予後を決定すると言える。このため迅速簡便な診断法の導入が求められている。低コストで実施可能な汎用的方法として、受身感作凝集反応にもとづくマイクロカプセル凝集試験(MCAT)の開発にほぼ成功したが、その診断精度・感度の評価を継続して行い、実用化を目指す。そのためには、疑診患者のみならず、健常者血清の MCAT 反応性を調べ、陽性陰性のカットオフ値の設定を行うこととした。さらに疑診患者血清については、顕微鏡凝集試験に加えて、ELISA を行い、広く陽性血清を見だし、MCAT の診断成績と比較した。さらに血清診断と比較して、より早期診断が可能なイムノクロマトグラフィーに基づく尿中抗原検出診断法の開発をさらに進めた。

② 研究実施方法:

フィリピン疑診患者 50 検体、健常者血清 25 検体を用いて、MAT、および ELISA によりこれら血清中のレプトスピラ抗体の有無を判定した。MCATにおいて、すべての健常者血清が抗体陰性と判定できる最大希釈倍率を調べ、これを診断のカットオフ値として設定した。疑診患者血清を用いて、MAT と ELISA の診断結果と MCAT の診断結果を比較し、検出感度、精度を求めた。

レプトスピラリポ多糖体(LPS)のコアを認識する単クローン抗体を金コロイド標識抗体、並びにテストライン抗体として用いたイムノクロマトグラフィーを作成し、実験的感染ハムスター尿を用いて、検出感度を評価した。さらに、レプトスピラ患者尿を用いて、検出感度・精度をPCRによる尿中遺伝子検出、並びにMATによる血清抗体検出結果と比較した。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

フィリピンでは健常者血清を得ることが容易でなく、カットオフ値の設定ができずに苦労した。カウンターパートの努力で、使用可能な健常者血清を何とか得ることができた。その血清を用いることで、MCATの診断カットオフ値を600倍に設定できた。これまで疑診患者の診断をMATのみで行っていたが、ELISAを併用することで偽陰性の見逃しが少なくなり、疑診患者をより精度高く診断できるようになった。その診断結果をもとに、MCATの診断感度、精度を評価したところ、それぞれ85%程度であることが判明し、実用に供するに支障のないことが判明した。

また、疑診患者尿を用いた検討で、尿中抗原検出イムノクロマトグラフィーは、PCR並びにMATに比して、十分な感度と精度を有することが判明した。この内容を記した論文はすでに米国微生物学会誌に掲載され、また、特許を出願し登録された。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む) :

MCAT の試作品を提供し、現地での普及を依頼した。ELISA システムの技術移転を行った。

- ⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば) :

フィリピンラボでの MAT の実施手技に問題がある部分が判明し、その改善を提案した。具体的には、抗原として使用する培養菌が、培養中に自然凝集を起こしており、特異抗体による凝集と判別が難しい場面があった。MAT 実施前に、培養液を軽く遠心して自然凝集塊を取り除く操作を加えることで、レプトスピラ凝集の有無の判定が容易になった。現在は、問題なく実施できている。

2.1.2.2 リアルタイム PCR による尿中、血清中レプトスピラ遺伝子の検出

- ① 研究のねらい

これまでマイクロカプセル凝集試験による血清学的診断法、イムノクロマトによる抗原検出診断法の開発を目指していた。これは PCR 等による遺伝子診断は、コストが高く、高価な機器を必要とすることからあえて避けてきた。一方で、近年フィリピンの急速な経済発展により、比較的成本のかかる遺伝子診断の実施も可能な状況となった。そこでより高感度、迅速な診断法としてリアルタイム PCR による遺伝子診断の導入を行った。

- ② 研究実施方法

レプトスピラの鞭毛遺伝子 *flaB* を標的とする SYBR Green リアルタイム PCR 系を確立した。健常人尿に培養レプトスピラを添加して調製した模擬試料、実験的感染犬の尿を材料に検出感度を評価した。また、試験試料としてフィリピンの培養陽性患者尿 6 検体、陰性患者尿 98 検体を用いて、*flaB* Nested PCR と感度を比較した。

- ③ 初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

リアルタイム PCR のプライマー設計、増幅条件の検討、各種尿試料からの検出と Nested PCR による検出感度との比較を行い、実施目標を達成した。一段階増幅のみのリアルタイム PCR の感度は、2 回増幅を行う Nested PCR の感度には及ばなかった。一方、リアルタイム PCR は迅速であり、1 時間ですべての解析が終了することから、有効な診断法となる。

- ④ カウンターパートへの技術移転の状況

フィリピンの研究室に導入されたリアルタイム PCR 機のセットアップ、現地スタッフへの実施方法等の技術指導を行った。とりあえず、現地でリアルタイム PCR を実施できるようになった。フィリピン側では Taqman-リアルタイム PCR の実施を希望している。

- ⑤ 初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況

今回、培養陽性の尿でも遺伝子が検出できないサンプルが見られた。尿サンプルは-30℃で凍結保存されているが、保存中、あるいは凍結融解繰り返しによる DNA の分解も考えられる。新鮮な尿から DNA を調製して検出を検討する必要がある。

2.1.3. ワクチンの開発と評価(グループ A3)

2.1.3.1. 死菌ワクチンと成分ワクチンの開発研究

- ① 研究のねらい:

現時点でもっとも効果的で現実的な予防ワクチンは死菌全菌ワクチンあるいは成分ワクチンである。死菌ワクチンは血清型特異的であり、われわれはフィリピンのマニラ首都圏で流行する主な血清型は *Leptospira*

interrogans serovar Manilae および *L. interrogans* serovar Losbanos であることを明らかにしてきたので、われわれがレプトスピラ病患者より分離したこれら血清型を中心に菌株をワクチン候補株として選択開発する。

全人口の約 20%が集中するマニラ首都圏でのレプトスピラ病抑制はフィリピンのレプトスピラ病抑制に大きく貢献する。

②研究実施方法:

ワクチン株選択:われわれがマニラ首都圏の患者より分離した血清型 Manilae 8 株、血清型 Losbanos 9 株を無蛋白合成培地 (Shenberg, 培地および Bey-Johnson 培地) で継代培養してワクチン株を選択する。

死菌ワクチン:ワクチン候補株を jar fermenter を用い、無蛋白培地、30°C で大量培養して菌をあつめ凍結乾燥し、-80°C 保存する。集めた菌をホルマリンあるいは 56°C、30 分熱処理で死菌として、生理食塩・リン酸緩衝液に懸濁して死菌ワクチン (2.5×10^8 /ml) とする。

成分ワクチン (outer envelope, OE ワクチン):レプトスピラ細胞を NaCl 処理して OE を SDS で可溶化、分離して OE ワクチンとする。

感染防御実験:ハムスターに死菌、OE ワクチンを投与、病原株で攻撃して防御効果を調べる。ワクチンの安全性、安定性などについて確かめる。

③当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

マニラ首都圏のレプトスピラ病患者から分離した血清型 Manilae 8 株、血清型 Losbanos 9 株、合計 17 株を Shenberg の合成培地に接種、継代培養を重ね、大量培養可能な菌株の選択を行っている。Korthof のウサギ血清培地から移植した 1 代目、2 代目培養では殆どの株で良い増殖が見られた。現在実験中であるが、ウサギ血清の影響がほとんどないと思われる 3 代目では、血清型 Manilae で 3 株、血清型 Losbanos 2 株で増殖が見られ、現在 4 代目培養の継続中であり、有望な候補株と思われる。Bey-Johnson 培地による培養実験も開始しているが、まだ結果は出ていない。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

無タンパク培地の作成法とその培地を使った培養法の技術を移転した。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):

DNA ワクチンの開発を先んじて行って来たが、ハムスターモデルでの効果が弱く、すぐれた DNA ワクチンを開発するには時間がかかると考えられるので、基本に戻り、死菌ワクチンを作成する事にした。

2.1.3.2. DNA ワクチン開発グループ

① 研究のねらい:

人間と動物に感染症を引き起こし、死亡の原因となる病原体の根絶は感染症研究の一つの最終目的である。しかし、天然痘ウイルスの根絶のように成功することは現実的に困難である。特にレプトスピラは、自然界に生息し、多くの動物が保有している。このような病原体の場合、ワクチンがもっとも有効な予防方法であり、その開発と実用化は非常に重要である。

レプトスピラには約 230 の血清型が存在する。死菌ワクチンのほか弱毒ワクチンや外膜タンパク、またはリポ多糖体の無細胞ワクチンが、現在抗レプトスピラ症のワクチン候補として想定される。しかし殆どの市販のレプトスピラワクチンは血清型特異的であるため、長期間有効で、かつ血清型の違いを越えて有効なレプトスピラワクチン(ユニバーサルワクチン)の開発が望まれている。

② 研究実施方法:

これまでの研究では病原性レプトスピラによく保存されている外膜タンパク(OMP)がユニバーサルワクチンの

候補としてあがっている。LipL32, Loa22, leptospiral immunoglobulin-like protein A と B (LigA and B), OMPL1, LipL41 などはレプトスピラの病原性に関連すると考えられている。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

以前 *ligA* と *loa22* の DNA ワクチンを開発して、ハムスターでの有効性を検討した。しかし結果はこの 2 つのレプトスピラの OMP に対する抗体は産生されたものの、菌のチャレンジに対して防御免疫は得られなかった。今回 *lipL32*, *lipL41* と *ompL1* の DNA ワクチンを作成しており、これらの三つの DNA ワクチンを”cocktail”(カクテル) ワクチンとしてハムスターに免疫した。途中経過であるが、DNA ワクチン接種群での生残率は、コントロールより高い。LipL32 はレプトスピラがもつ一番多い外膜タンパクであり、OmpL1 と LipL41 は相乗作用をもつと以前報告されている。われわれはこのカクテルワクチンで殆どのレプトスピラの血清型に有効な DNA ワクチンを開発する計画である。さらに、このワクチンの有効性を長期に持続させることも視野に入れて実験を行う。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

DNA ワクチンの作り方、接種法、チャレンジの仕方の技術を移転した。

⑤当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):

DNA ワクチンの開発を先んじて行って来たが、ハムスターモデルでの効果が弱く、すぐれた DNA ワクチンを開発するには抗原の選択、ワクチン接種の time schedule を再検討する必要がある。防御効果が最も強く現れた time schedule での再検を行っているところである。

2. 2. レプトスピラ症の疫学と疾病負担(グループB)

2.2.1. 大都市におけるレプトスピラ症の疾病負担研究グループ

① 研究のねらい:

住民のレプトスピラ抗体検査を行うと共に同じ住民を対象に質問票調査を実施し、罹患危険因子 (Risk factor) との相関関係の解析を行い、レプトスピラ症の感染予防や診断、治療の実態を明らかにし、必要となるそれらの経済的コストの概算を明らかにすると共にマニラ首都圏におけるDALYs(障害調整生存年数)値を換算する。

② 研究実施方法:

2010～2011年にグループDと共に計画しているマニラ地域の360世帯(1,072人分検体)を対象とした抗体保有率調査 (seroprevalence survey) の対象者から得る質問票回答に基づき環境因子データを収集し、地域住民の抗体の有無と感染要因の相関関係を解析した。マニラ首都圏全17市町(729バラングイ)中の16市町にある30のバラングイ(最小行政単位)において全413世帯から検体採取と質問票回答を収集し、そのデータに基づき解析を行った。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況

2010年8月がフィリピン側政府予算研究の開始日となっていたが、実際に運用可能となったのが10月となった。フィールド調査準備作業(質問票開発・プレテスト等)を9月まで行い、10月よりマニラ首都圏中の15市にある30のバラングイを対象に質問票回答と抗体検査用検体の収集を2011年1月までに完了し、データ整理分析を行った。計413世帯(計1,825名の構成員)からELISA検査用の1,136の有効な検体と413名分の質問票回答を得た。

疾病負担調査採取検体について抗体保有率をELISAにて検査した結果”強陽性”は1,136検体中297(26%)であった。

抗体保有率と相関がみられた因子は、1)30才以上、2)汚れた用水路が近くにある、3)蓋のないゴミ集積容

器が家屋近くにある、であった。

DALYs は 25.76/100,000 人であり、デング熱 (21.96) や日本脳炎 (19.2) を上回った。

治療に関する直接費用は (11, 982.44 ペソ) であった。これは、最低賃金の一か月分 11, 076 ペソを上回り、低賃金階級層には自己負担が困難で、公的な支援が必要であることが判明した。

2010-2011 の BOD 報告書は、クロアチアで行われた欧州レプトスピラ会議で報告された。また、最終報告書は、PCHRD ならびに WHO に提出された。

④ カウンターパートへの技術移転の状況 (日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む)

抗体陽性率、リスクファクター、DALYs, seroconversion のデータをまとめて、論文を書くために打合せをする予定である。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況 (あれば)

特になし

2.2.2 疾病負担の経済分析グループ

① 研究のねらい

レプトスピラ感染症の罹患率は、その感染経路から見て、職業や所得階層、教育水準等の社会経済的条件に応じて異なることが予想される。そこで、GIS データに加え、疫学的データの中でも特に患者の社会経済的特性に注目し、そのデータを分析することにより、どのような社会経済的属性をもつ人たちが、レプトスピラ感染症にかかりやすいを明らかにすることで、効率的かつ重点的な予防対策に資する。さらに、この分析結果に基づき、レプトスピラ病がもたらす社会的損失を経済的に評価することで、対策プロジェクトや関連施策に対する効率的予算支出に貢献する。

② 研究実施方法

i) レプトスピラ症の感染者・被害者に対する面接調査、社会経済的損失に関する記述的分析を行う。

ii) 社会経済的損失に関する経済的評価のために、仮想評価法 (CVM) と選択実験によるアンケート調査を実施する。

iii) マニラ首都圏の一般市民に対するレプトスピラ症による経済的損失を評価する。

iv) 社会経済的特性も視野に入れ、疫学的発生率を考慮したレプトスピラ症の経済的損失を評価する。

③ 当初の計画 (全体計画) に対する現在の進捗状況

2011年5月に行われた抗体保有率調査 (seroprevalence survey) の対象者に対する追跡調査に際して、CVM に関する質問票も合わせて配布・調査し、192 人から分析可能な回答を得た。レプトスピラ感染症予防プログラムに対して協力してもよいと考える時間の機会費用に基づき、プログラムの経済価値を推計したところ、年間平均 47 ドル/世帯となった。これにマニラ市の 260 万世帯を乗ずると、同地域においてレプトスピラ感染症予防は年間約 1.23 億ドルの価値を有すると推計された。また、洪水に瀕する危険が高い地域ほど、レプトスピラ感染症に関する知識が多いほど、より高い評価額になることも明らかになった。

他方、2011年8月3日から10月21日までマニラ市内のバラングイ住民でレプトスピラ症に感染した225人を対象者名簿に挙げ、面接調査を試みた。実際に面接できたのは83人であった。現在、このデータをもとに、レプトスピラ症に感染した本人と家族が被った経済的負担及び治療開始に要した時間と社会経済的要因との関係について分析を進め、83 人分の詳細なレポートの大半ができあがった。さらに、選択実験の分析手法を用い、住民が重要と考えるワクチンの特性 (有効期間、接種開始年齢、副作用、価格) とその経済価値についても分析

を進め、国際研究集会で報告を行った。

④カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

Contingent Valuation Survey の技法を移転した。

⑤初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):

なし

2. 3. 環境因子の解析 (グループC)

① 研究のねらい:

フィリピンにおけるレプトスピラ病の流行には様々な要因が挙げられており、解析の一つの手段として地理的情報システム GIS(Geographic Information System) の利用があり、マニラ首都圏のレプトスピラ病患者分布のデジタル地図を作成し、洪水などの要因との相関解析の基礎を確立する。

② 研究実施方法:

日本側研究者(柳原)が1998年から2001年にかけてマニラ首都圏で調査した患者情報(382名分)とフィリピン保健省疫学センターより提供された2003年から2009年のマニラ首都圏の患者情報(3,490名分)の2種のデータを利用しマニラ首都圏における患者分布をデジタル地図化し、2~10年、50~100年周期の洪水多発地帯の衛星写真と重ねることによる洪水や、これら患者住居周辺における調査から得られる環境因子との相関関係を解析する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

1998年から2001年にかけて収集された596名分の患者データのデジタル地図上への登録、並びに2003-2009年分患者データの登録を完了した。1998年-2001年の週間降雨量と月間患者発生との相関を調べ、50mmの降雨で患者が発生する。CPH側研究チームはGISを応用してレプトスピラ症多発と降雨量、河川、洪水多発地帯、発生源との関係をデジタル地図で示した。

またGPSを利用した環境因子フィールド調査を行うことで得られる地形の危険因子情報をデジタル地図上への入力を行った。

④ カウンターパートへの技術移転の状況:

Barangay レベルで患者分布のデジタル地図を作る目的で、患者分布データをフィリピン側に提供した。

⑤初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば):

なし

2. 4. 啓発活動(グループD)

① 研究のねらい:

2009年には台風襲来後のマニラ周辺でのレプトスピラ症流行に伴い、急遽、保健省や州政府により住民へのレプトスピラ症対策に関する啓蒙活動がなされたが、レプトスピラ症に焦点を当て、より効果を上げるのに十分な内容の健康増進プログラムを実施するためには、レプトスピラ症に関しての綿密な情報把握とその分析に基づく確かな活動を戦略性を持って計画することが求められる。そのため関係者や住民を対象にした横断的調査を実施解析し、その結果に基づき啓発活動教材やその利用も含む健康増進プログラムの開発を行い、頻りに洪水被災地となるマニラ市地域でその活動を実施しその効果を測定することが本研究の狙いとなっている。

② 研究実施方法

プロジェクト初年にグループBが計画しているマニラ地域の360世帯(1072名)を対象とした抗体保有率調査

(seroprevalence survey)の対象者から得る質問票回答に基づき地域住民のレプトスピラ症に関する知識・態度・行動(KAP)の様態を明らかにするとともに、多くの環境因子と住民のKAPとの関連性について解析し、効果的な健康増進プログラム開発を考案し計画する。

③ 当初の計画(全体計画)に対する現在の進捗状況:

2010年8月がフィリピン側政府研究予算の運用開始となっていたが、実際に支出可能となったのが10月となった。フィールド調査準備作業(質問票開発・プレテスト等)を9月まで行い、10月22日よりマニラ首都圏の15市にある30のバラングイ(最小行政単位)で計360世帯を対象に質問票回答の収集とそのデータ整理を開始、翌1月までに計413名(世帯)分の質問票回答の収集を終えた。データ整理、解析の結果、KAPについて次の事が明らかとなった。

- ・感染ラットの尿がヒトへの感染源となることはよく知っている。
- ・ウイルスと細菌の区別はつかない予防、治療の知識はある。
- ・環境の清潔、洪水の水に浸からない、長靴を履く、を実行しているのはそれぞれ36%、24%、21%であった。
- ・知識を得た主たる情報源はマスメディア(46%)であった。
- ・一方でビラ、ポスター、チラシ等の印刷物でレプトスピラの情報を得たケースは、それぞれ9.2%、8.5%、6.8%であった。

現在はPCHRD/DOSTへの提出用報告書の推敲中。なお以上の調査結果によれば、地域住民はレプトスピラに関する知識と態度において非常に高いレベルを示しつつも行動面は約40%程度のレベルに留まっている。また、レプトスピラに関する情報源としてはTVラジオ等のマスメディアがほとんどであり、印刷物によるケースがあまり見られなかった。このため地域住民の高い「知識」と「態度」のレベルを保ちつつ、「行動」レベルの改善を図るべく、今回の調査結果に基づき、住民啓蒙用のポスター等の印刷物の開発し、同対象地域での配布とその効果測定を含んだ研究を来年度の活動として計画中である。

九州大学アジア遠隔医療開発センター (Telemedicine Development Center of Asia)はTEMDEC(テムデック)と呼ばれている。アジアを中心に各国の医療機関との間に構築された研究教育用の超高速インターネットを活用し、医療分野におけるその効率的かつ継続的な取り組みの中心的な役割を果たしている。フィリピン大学マニラ校公衆衛生学部(CPH-UPM) Nina Gloriani 学部長、Maridel Borja 教授、Jonathan Guevarra 教授を九州大学に招き、アジア遠隔医療開発センターのこれまでの実績と今後の展開について説明を受けた。TEMDECを用いて2013年に九州で開催されるILS(International Leptospirosis Society)の国際学会を会場とCPH-UPMをつなぎ、テレカンファレンス形式の国際会議にすることを概ね了承された。

2012年6月21日は公衆衛生学部の創立85周年記念の学会が開かれた。Dr. Guevarra による講演がおこなわれ、医師、看護師、主婦、衛生指導員、バラングイの世話人ら総勢65人が参加した。ポスター3000部、うちわ3000部が印刷され配布された。

④ カウンターパートへの技術移転の状況(日本側および相手国側と相互に交換された技術情報を含む):

九州大学藤井准教授の2010年8月派遣時にCPH-UPM側と本グループD分野における長期計画案を検討しP.O.にまとめられた。1-2年目は現在CPHが主体的に実施しているKAP調査とそれに基づく啓発活動計画策定や教材開発が主たる活動となる。2013年に九州で開催されるILS(International Leptospirosis Society)の国際学会開催の際に九州大学とフィリピン総合病院(CPHに隣接)間に設置されている高速光ネットワークを利用しての多くのプロジェクト関係者の遠隔地参加構想について大枠の合意がなされた。

Nina Gloriani 学部長、Maridel Borja 教授、Jonathan Guevarra 教授に対して、公衆衛生情報 2011年5月号(ライフ出版社)を手渡した。この号には、藤井潤が執筆した「レプトスピラ症」の背景、予防対策、診断・治療がコ

ンパクトにまとめられており、これを下にしてフィリピンの医療従事者向けのポケットマニュアルを英語、タガログ語で作成しており、平成 24 年度には製本して、フィリピンの医療施設に配布する予定である。

⑤ 当初計画では想定されていなかった新たな展開があった場合、その内容と展開状況(あれば)：

当初活動計画案(PDM)では、プロジェクト開始直後のKAP調査等において保健医療従事者が対象に計画されていたが、フィリピン側の2010-2011年における、DOST承認がなされ実施された調査内容は住民対象のみ(②参照)となっている。そのため保健従事者対象の研究調査等については住民対象調査の結果とそれに基づき現在計画されている健康増進啓発ポスター配布の状況を見ながら、今後の調査研究を計画する際の対象として検討することとしている。

中間評価の結果を受けて、啓発活動の効果を共同で評価にむけて話し合いが持たれた。H24 年度に作成した啓発活動用の教材を用いて、25 年度に向けて保健医療従事者対象に啓発活動を行い、その効果を評価する合意がおおむね得られた。具体的には、潜在価値や行動要因など、啓発活動効果に影響を与えるか要因分析を行い、新たな啓発活動の戦略策定につなげることを目的とする。また、対象地区のレプトスピラ患者の経費の軽減あるいは患者数の増減に変化が見受けられるか分析することになった。

3. 成果発表等

(1) 原著論文発表

①本年度発表総数(国内0件、国際5件)

②本プロジェクト期間累積件数(国内0件、海外9件)

③論文詳細情報

•Sharon Yvette Angelina M. Villanueva, Hirokazu Ezoe, Rubelia A. Baterna, Yasutake Yanagihara, Maki Muto, Nobuo Koizumi, Takashi Fukui Yoshihiro Okamoto, Toshiyuki Masuzawa, Lolita L. Cavinta, Nina G. Gloriani and Shin-ichi Yoshida.

Serological and Molecular Studies on *Leptospira* and Its Infection Among Rats in the Philippines.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 82(5):889-898, 2010

•Antara Chakraborty*, Satoshi Miyahara, Sharon Y. A. M. Villanueva, Nina G Gloriani and Shin-ichi Yoshida.

In vitro sensitivity and resistance of 46 *Leptospira* strains isolated from rats in the Philippines to 14 antimicrobial agents.”

Antimicrob. Agents Chemother. 54(12):5403-5405, 2010

•Antara Chakraborty, Satoshi Miyahara, Sharon Y.A.M. Villanueva, Mitsumasa Saito, Nina G. Gloriani and Shin-ichi Yoshida

A novel combination of selective agents for isolation of *Leptospira* species

Microbiol. Immunol. 55(7):494-501, 2011

•Antara Chakraborty, Akemi Takade, Sharon Y.A.M. Villanueva, Nina G. Gloriani and Shin-ichi Yoshida

Electron microscopic study of the effects of antimicrobial agents on the cellular architecture of *Leptospira*.

J. Infect. Chemother. Published on line 20 May 2011

•Saito M, Villanueva SY, Chakraborty A, Miyahara S, Segawa T, Asoh T, Ozuru R, Gloriani NG, Yanagihara Y, Yoshida S:

Comparative analysis of *Leptospira* strains isolated from environmental soil and water in the Philippines and

Japan.

Applied and Environmental Microbiology 79(2):601–609, 2013.

•Saito M, Villanueva SY, Kawamura Y, Iida KI, Tomida J, Kanemaru T, Kohno E, Miyahara S, Umeda A, Amako K, Gloriani NG, Yoshida SI:

Leptospira idonii sp. nov., isolated from an environmental water in Fukuoka, Japan.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 63(7):2457–62, 2013.

•Widiyanti D, Koizumi N, Fukui T, Muslich LT, Segatwa T, Villanueva SY, Saito M, Masuzawa T, Gloriani NG, Yoshida S:

Development of Immunochromatography-Based Methods for Detection of Leptospiral Lipopolysaccharide Antigen in Urine.

Clinical and Vaccine Immunology, 20(5):683–690, 2013.

•Arbiol Joseph, Maridel Borja, Mituyasu Yabe, Hisako Nomura, Nina Gloriani, Shin-ichi Yoshida, Valuing Human Leptospirosis Prevention Using the Opportunity Cost of Labor, International Journal of Environmental Research and Public Health, 10(5), pp.1845–1860, 2013.05.

•Sharon Yvette Angelina M. Villanueva^{1#}, Mitsumasa Saito¹, Yutaka Tsutsumi², Takaya Segawa¹, Rubelia A. Baterna³, Antara Chakraborty^{1†}, Tatsuma Asoh¹,

Satoshi Miyahara¹, Yasutake Yanagihara³, Lolita L. Cavinta³, Nina G. Gloriani³, Shin-ichi Yoshida¹

High Virulence in Hamsters of Four Dominantly Prevailing *Leptospira* Serovars Isolated from Rats in the Philippines

Microbiology, 2014 Feb; 160 (Pt 2): 418–28

•Sharon Yvette Angelina M. Villanueva^{a*}, Mitsumasa Saito^a, Rubelia A. Baterna^b, Crystal Amiel M. Estrada^b, Ana Kriselda B. Rivera^b, Micaella C. Dato^b, Takaya Segawa^a, Lolita L. Cavinta^b, Takashi Fukui^c, Toshiyuki Masuzawa^c, Yasutake Yanagihara^c, Nina G. Gloriani^b, Shin-ichi Yoshida^a

A Novel Aspect of *Leptospira*-rat-human relationship in Luzon, Philippines

(under review in Microbes and Infection)

•Segawa T, Nomura KH, Villanueva SYAM, Saito M, Nomura K, Gloriani N, and Yoshida S:

Identification of leptospiral 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase released in the urine of infected hamsters.

BMC Microbiology 2014 submitted

•Muslich LT, Villanueva SYAM, Amran MY, Segawa T, Saito M, and Yoshida S:

Characterization of *Leptospira* infection in suckling and weaning rat pups.

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2014, submitted

•Miyahara S, Saito M, Kanemaru T, Villanueva SYAM, Gloriani N, and Yoshida S:

Destruction of the hepatocyte junction by intercellular invasion of *Leptospira* causes jaundice in a hamster model of Weil's disease.

International Journal of Experimental Pathology 2014, submitted

•Tatsuma Asoh, Mitsumasa Saito, Sharon Y.A.M. Villanueva, Takaaki Kanemaru, Nina Gloriani, and Shin-ichi Yoshida:

Natural Defense by Saliva and Mucosa against Oral Infection by *Leptospira*

Can. L. Microbiol. 2014, submitted

(2) 特許出願

- ① 本年度特許出願内訳(国内 1件、国際 0件、特許出願した発明数 0件)
- ② 本プロジェクト期間累積件数(国内1件、国際 0件)

4. プロジェクト実施体制

(1) 感染実態の把握:グループ A1

- ① 研究者グループリーダー: 吉田 真一(九州大学・教授)
- ② 研究項目: 感染実態の疫学調査
細菌学的・免疫学的調査
分離菌株の病原性検査

(2) 診断キットの開発と評価:グループ A2

- ① 研究者グループリーダー: 増澤 俊幸(千葉科学大学・教授)
- ② 研究項目: 診断法の開発と有用性の評価

(3) ワクチンの開発と評価:グループ A3

- ① 研究者グループリーダー: 吉田 真一(九州大学・教授)
- ② 研究項目: 死菌ワクチンと成分ワクチンの開発
DNA ワクチン開発

(4) レプトスピラ症の疫学と疾病負担:グループ B

- ① 研究者グループリーダー: 矢部 光保(九州大学・教授)
- ② 研究項目: 大都市におけるレプトスピラ症の疾病負担研究
疾病負担の経済分析

(5) 環境因子の解析:グループ C

- ① 研究者グループリーダー: 柳原 保武(静岡県立大学・名誉教授)
- ② 研究項目: レプトスピラ感染症のリスク因子の解析

(6) 啓発活動:グループ D

- ① 研究者グループリーダー: 野村久子(九州大学・講師)
- ② 研究項目: 市民の知識、意識調査
市民への啓発活動

以上