

サシチョウバエからのリーシュマニア原虫検出系および原虫種同定法の確立とその応用

加藤 大智¹ 上里 博² 片倉 賢³ CALVOPINA MANUEL⁴ MARCO JORGE D.⁴
BARROSO PAOLA A.⁴ 三森 龍之⁵ 是永 正敬⁴ 野中 薫雄² 橋口 義久⁴

山口大学 農学部 家畜衛生学教室¹ 琉球大学 医学部 皮膚科学講座²
北海道大学 大学院獣医学研究科 寄生虫学教室³ 高知大学 医学部 寄生虫学教室⁴
熊本大学 医学部 腫瘍医学講座⁵

リーシュマニア症流行地において、分布するリーシュマニア原虫および媒介昆虫であるサシチョウバエの種の同定、サシチョウバエの原虫保有率などの疫学調査は、リーシュマニア症の流行やリスクを予測するうえで重要なことである。現在のところこれらの調査は、実体顕微鏡下で個々のサシチョウバエを解剖し、生物顕微鏡下でサシチョウバエの種を同定、さらに腸管内の原虫の保有を調べることにより行っている。この方法は、生きたサシチョウバエを必要とするばかりでなく、手技の熟練を要し、また、非常に時間がかかる。本研究では、PCR法を用いた簡便な原虫検出系ならびに原虫種同定法の確立を行った。はじめに、様々な種のリーシュマニア原虫、10、1、0.1個体相当のDNAを鋳型に、リーシュマニア原虫minicircle DNA特異的プライマーを用いてPCRを行い、この系の特異性および検出感度を検討した。その結果、種によって多少の検出感度の違いはあるものの、この方法により全ての原虫種を検出することができ、検出感度は0.1 - 1個体であった。また、解剖によりリーシュマニア原虫が陰性あるいは陽性が示されたエタノール固定したサシチョウバエからDNAを抽出し、同様の方法でPCRを行い、原虫陽性個体でのみ特異的なDNA断片が増幅されることを確認した。次に、エクアドル、アンデス高地の流行地で採取、エタノール固定したサシチョウバエからDNAを抽出し、上記の方法により原虫の検出を行ったところ、183匹中6匹(3.3%)で陽性であった。この結果は、流行地での解剖による原虫検出の結果(143匹中5匹; 3.5%)と同程度であった。PCR法により検出された原虫の種を同定するために、これら6匹の原虫陽性サシチョウバエにおいて、最近、原虫種の同定に有用であることが示されたリーシュマニア原虫特異的Cytochrome *b*遺伝子の解析を行った。その結果、minicircle DNA陽性サシチョウバエ6匹中5匹で特異的なDNA断片を増幅することができ、これらの塩基配列を解析したところ、いずれも*Leishmania (Leishmania) mexicana*であることが明らかになった。さらに、リーシュマニア原虫陽性サシチョウバエ18S rRNA遺伝子断片の制限酵素切断断片解析を行い、原虫陽性サシチョウバエは全てアンデス高地に高率に分布する*Lutzomyia ayacuchensis*であることが確認された。本研究で確立されたサシチョウバエからのリーシュマニア原虫の検出系および原虫種同定法は、生きたサシチョウバエを必要とせず、比較的容易に多数の検体を処理することができ、流行地におけるリーシュマニア原虫およびサシチョウバエの疫学調査に有用な方法になると考えられた。

Establishment of a detection and identification method of *Leishmania* species within naturally infected individual sandflies

HIROTOMO KATO

Dpt. of Veterinary Hygiene, Yamaguchi Univ. Yamaguchi, Japan