

主論文

Characterization of *Leishmania* isolates from Nepalese patients with visceral leishmaniasis

(ネパールの内臓リーシュマニア症患者から分離したリーシュマニア原虫の性状)

Kishor Pandey, Testuo Yanagi, Basu Dev Pandey, Arun Kumar Mallik,
Jeevan Bahadur Sherchand, Hiroji Kanbara

(Parasitology Research ・ 第 100 巻 1361 – 1369, 2007 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員 : 金子修 教授)

緒言 :内臓リーシュマニア症は *Leishmania donovani*を病原体とする深刻な感染症で、ネパールの流行地は南部の平野部にあり、隣国インドの流行地へとつながる。流行地のネパール側には 550 万人が住み、公衆衛生上の問題となっている。mini-exon gene, cysteine proteinase b (cpb) gene と rDNA の internal transcribed spacer (ITS)領域を利用して、ネパールで今回分離したリーシュマニア原虫株の分子生物学的性状を調べた。またそれらの分離株をマウスとハムスターに接種し、実験動物への感染も調べた。

対象と方法 :【原虫株の検出と分離培養】ジャナクプール地方病院(J 病院)とスクララジ感染症病院(S 病院)の 2ヶ所で内臓リーシュマニア症と予断した 166 名の腸骨の骨髓穿刺サンプルを収集した。現地で一部は即座にギムザ染色し、残りは MEM 培養チューブに入れ、後日日本へ移送した。【種同定のための PCR】緒言に記した領域をそれぞれ増幅させた。対照としてインドで分離された *L. donovani* 標準株 1 株とケニアでの分離株 *L. donovani* 1 株を使用した。【PCR-RFLP 分析】mini-exon gene の PCR 産物には 3 種類の制限酵素を、cpb region には 5 種類を使用した。【SSCP 分析】PCR 産物は熱処理後ただちに氷上で冷却し、MDE ゲルで電気泳動した。【実験動物への感染試験】すべて 4 週令のメスの BALB/c マウスとヌード・マウスならびに Syrian ハムスターに 10^7 のプロマスティゴート原虫を腹腔内接種した。接種 8 週後に脾臓断面のスタンプ標本をギムザ染色して顕微鏡下で原虫数をカウントし、それぞれの分離株の実験動物に対する感染の大きさを 4 つに分類した。5 視野あたり原虫を見つけない場合を陰性とし、10 原虫数以下を低い感染、11~100 原虫数を中程度の感染、101 原虫数以上を高い感染とした。ヌード・マウスに感染が成立していた場合、破碎脾臓細胞を BALB/c マウスへ腹腔内接種した。マウスには分離 29 株すべてを接種したが、ハムスターには 10 株を接種した。

結果 :【原虫株の検出と分離培養】J病院での 131 検体中 72 検体に, S病院での 35 検体中 25 検体にアマスティゴート原虫を検出した。一方, 29 検体の培養が成功し, リーシュマニア原虫を 29 株分離できた。【PCR による種の同定・PCR-RFLP・SSCP】ネパールで分離した 29 株の mini-exon gene を標的とした PCR 産物はインドの一標準株とケニアの一株とも一致し, ネパール分離株はすべて *L. donovani* と同定した。mini-exon gene, cpb region から得た PCR-RFLP ならびに SSCP の結果はネパールの 29 株がすべて同一であり, これはインド標準株にも一致したが, ケニア株とは相異なっていた。【実験動物への感染試験】ネパールの 29 株中 20 株がヌード・マウスに感染を成立させたが, BALB/c マウスに感染したのは 1 株であった。これら 20 株のうち, 半数が高い感染を示し, 残り半数が中程度の感染を示した。感染が成立した 20 株のヌード・マウスの脾臓を破碎し, BALB/c マウスへ腹腔内接種したところ 10 株に感染成立がみられたが, これら 10 株はヌード・マウスに対して高い感染を示した 10 株に一致していた。BALB/c マウスでの 10 株の感染の程度は 5 株が高く, 3 株が中程度, 2 株が低いものであった。一方, ハムスターへの感染実験は, ヌード・マウスに高い感染を示した 3 株を含めて 10 株接種したが, どれも感染成立を認めなかった。

考察 :【原虫株の検出と分離培養】培養からの原虫分離率はS病院が 25.7%であったのに対し, J病院が 15.2% と低かったのは後者の培養設備の不備(培養液の保存状態, 無菌条件, 培養温度など)に原因があったと考えられる。【遺伝子多型】国境を挟み, 内臓リーシュマニア症流行地は隣り合わせであり, 人々の両国間の行き来が自由なため, 近接するネパール内とインド内の原虫の遺伝子レベルに差異がないと考えられる。【実験動物への感染試験】ネパールで分離した *L. donovani* 原虫 29 株のマウスへの感染実験では株間に感染の大きさに差が生ずることが判明した。内臓リーシュマニア症の実験動物マウスモデルを樹立することができれば, 将来薬剤テストやワクチン開発に応用できる感染モデルとして使用できる。なお, ハムスターに感染が成立しなかったことから, 今回ネパールの内臓リーシュマニア症流行地で分離した *L. donovani* 原虫が人以外に宿主をもたない可能性を印象づけた。