

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 19 年度博士課程入学

氏名 サンブー ガントゥーヤ

指導教員名 松本 芳嗣

論文題目 : Studies on zoonotic leishmaniasis caused by *Leishmania major* sensu lato  
(*Leishmania major* sensu lato によるリーシュマニア症に関する研究)

皮膚リーシュマニア症は熱帯から温帯地方にかけて世界的に分布し、世界で毎年 150 万人もの新規患者が発生している人獣共通感染症である。ヒトの皮膚リーシュマニア症はその症状により、潰瘍性および結節性の病変が、単独または複数みられる皮膚型リーシュマニア症および鼻粘膜や口腔粘膜組織を冒す皮膚粘膜型リーシュマニア症に大別される。旧世界においては、スナネズミを保虫宿主とする *Leishmania major* が皮膚型リーシュマニア症を引き起こす主要な病原原虫とされている。スナネズミの地理的分布は、アフリカ北部、西、中央アジア、インド北西部、モンゴルおよび中国北部のサバンナ、砂漠、ステップで、本症の分布とほぼ一致している。スナネズミの 1 種であるオオスナネズミ (*Rhombomys opimus*) は主として中央ユーラシアに分布し、*L. major* のみならず *L. turanica* および *L. gerbilli* の自然宿主でもある。しかしながら、実験的に *L. turanica* によるヒトへの感染は報告されているものの、自然界において *L. turanica* および *L. gerbilli* による皮膚型リーシュマニア症の発症は報告されていない。人獣共通感染症である旧世界皮膚型リーシュマニア症に対する防疫策を講ずる上で、保虫宿主におけるリーシュマニア原虫の感染様式、さらにこれら原虫間の相互関係、また宿主・寄生体関係を明らかにすることは重要である。*L. major*、*L. turanica* および *L. gerbilli* 3 種のオオスナネズミ寄生リー

シユマニア原虫の相互関係と宿主であるオオスナネズミとの宿主・寄生体関係を明らかにすることを目的として、本研究では、自然宿主における感染率、解析実験動物への感染性および原虫の免疫学的、遺伝子学的検討を行った。

第一章では、皮膚型リーシユマニア症が報告されている中国およびカザフスタンに隣接するモンゴルの南ゴビ砂漠において、オオスナネズミ (*Rhombomys opimus*:Ro) 62頭を捕獲し、リーシユマニア原虫感染の有無の検索、およびオオスナネズミの血清学的検索を行った。捕獲 Ro 耳介部材料の培養により原虫の分離を試みた結果、Ro 8 (12.9%) に原虫を確認し、うち 2 株 (BZ18、BBU23) が培養株として確立された。捕獲 Ro 脾臓より DNA を抽出しリーシユマニア原虫特異的プライマーを用いた PCR 法による検索では、*N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase* (NAGT) 遺伝子を標的とした結果、Ro 20/57 頭 (35.08%) で、*large subunit ribosomal DNA* (LSUrDNA) 遺伝子を標的とした結果は、Ro 12/57 (21.05%) でバンドが検出された。さらに、捕獲 Ro 血漿を用い *L. major* 粗抗原を使用した ELISA 法による血清学的な解析を行った結果、Ro 血漿の抗体価は 80.6% (50/62) で陽性であった。これらの結果は、オオスナネズミにおけるリーシユマニア原虫感染は自然界において高度に浸淫していることを示した。また、感染 Ro の耳介ならびに脾臓の押捺標本にて顕著な組織反応像および皮膚病変は観察されなかったことより、オオスナネズミに強い病原性を示すことなく、安定した宿主・寄生体関係を有していることを明らかにした。

第二章では、オオスナネズミ寄生リーシユマニア原虫の性状解析を行った。まず、捕獲 Ro 血漿、*L. major* 感染実験マウス *Meriones unguiculatus* (MGS/sea) 血清、および非感染マウス血清を用い *L. major*、*L. turanica*、*L. gerbilli* それぞれの粗抗原を使用した ELISA 法による血清学的な比較解析を行った。その結果、*L. major* 感染実験マウスの抗体価 (1.32~2.08) に対し、捕獲 Ro 血漿の抗体価は低いものの、*L. major*、*L. turanica*、*L. gerbilli* のいずれの抗原に対しても同等の高い値を示した (それぞれ順に 0.14~1.10、0.11~1.27、0.09~1.23)。また、*L. major* 感染実験マウス血清もいずれの抗原に対し、抗体価に差は見られなかった。これらの結果 *L. major*、*L. turanica*、*L. gerbilli* は抗原性が類似しており免疫学的にこれら 3 種を分類することは難しいことが示唆された。このことは *L. major* によるヒトへ皮膚型リーシユマニア症の報告があるのに対し、*L. turanica*、*L. gerbilli* による自然感染の報告がないことを考えると非常に興味深い知見である。

さらに、第一章で樹立した分離株の原虫種の同定を行うため、*actin-encoding* 遺伝子の一部塩基配列を決定 (754bp) し、旧大陸においてヒトリーシユマニア症病原種である既知の *L. major* (MHOM/Iraael/83/LT252)、*L. tropica* (MHOM/TR/98/URFH16)、*L. donovani*

(MHOM/IN/80/DD8)、さらにげっ歯類感染種である *L.turanica* (MRHO/CN/92/QiDai)、*L. gerbilli* (MRHO/CN/60/GERBILLI)との比較解析を行い、分離株 2 株が *L.turanica* であることを確認した。

第三章では、オオスナネズミ分離原虫の実験動物に対する感受性検索のため、*Meriones unguiculatus* (MGS/sea) inbred gerbil および BALB/cA マウスに対する感染実験を行った。モンゴル分離株 *L. turanica* (BZ18) 感染 MGS/sea gerbil では接種部位の footpad は感染後 12 週には 1.7 倍となったが、すべての MGS/sea gerbil (n=5) において 18 週目より症状は消退した。BALB/c マウスにおける同株の感染実験では、接種部位の尾根部に感染 8 週目より結節形成を認め、感染 40 週目には直径 19.5 ~ 19.8 mm (n=2) となり自然治癒することはなかった。本章では MGS/sea gerbil および BALB/c マウスに対する分離株の感染性を証明し、さらに MGS/sea gerbil においては一過性の腫瘍形成後、自然治癒することから、*L. major* に対する交叉免疫、獲得免疫試験等に用いる実験動物モデルが確立された。

第四章では、系統樹解析により *L. major*, *L. turanica*, *L. gerbilli* は遺伝的に近縁であるものの *L. turanica* には種内に遺伝的多様性が存在することを明らかとした。*L. major*, *L. turanica*, *L. gerbilli* につき *NAGT* 遺伝子の一部塩基配列 (417bp) を決定し、さらに *L. tropica* および *L.donovani* との比較解析を行った結果、*L. major*, *L. turanica*, *L. gerbilli* は同一のクレード内に位置した。*Actin-encoding* 遺伝子による系統樹解析でも *L. major*, *L. turanica*, *L. gerbilli* は同一のクレード内に位置する結果が得られ、3 種は遺伝的に非常に近縁であることが示された。しかしながら、*NAGT* 遺伝子解析では *L. turanica* のモンゴル分離株 (MRHO/MN/08/ BZ18) (MRHO/MN/08/BBU23) と中国分離株 (MRHO/CN/92/QiDai) (MRHO/CN/97/KMA2) 間では 3 ないし 4 塩基の相違がみられた。

以上本研究において 1) モンゴル南ゴビ沙漠に棲息するオオスナネズミにおけるリーシュマニア原虫感染は高度に浸淫している。 2) *L. major*, *L. turanica*, *L.gerbilli* は抗原性が類似しており、遺伝的にも近縁である。 3) *L. major* に対する交叉免疫、獲得免疫試験等に用いる実験動物モデルが確立された。 4) 遺伝子解析により *L. major*, *L. turanica*, および *L.gerbilli* はリーシュマニア属内において一つのクレードを形成しており *L. major sensu lato* としてとらえられた。これらの研究結果は *L. major* のみならず、*L. turanica* および *L. gerbilli* の人体への感染の危険性を示唆している。 さらに本研究で得られた原虫分離株と *L. major* の詳細な比較解析により病原性決定因子を明らかとすることで皮膚型リーシュマニア症の発症機序解明の一助となることが期待される。