P137

*In vitro*培養法によるモンゴルの馬からのバベシア原虫の検出と分離株のEMA-1抗原の遺伝子解析 ○五十嵐郁男¹、玄学南¹、井上昇¹、横山直明¹、浅井宏実²、B. Zayatiin³、B. Gonchigoogin³、藤崎幸蔵¹、長澤秀行¹、鈴木直義¹、見上彪¹（¹帯広大・原虫研、²北里大・獣医・寄生虫、³モンゴル農業大学・獣医免疫研）

ウマバベシア病は赤血球内寄生原虫である *Babesia equi* と *B. caballi* がダニによって馬に伝播され、発熱、貧血、黄疸などの症状を呈する家畜法定伝染病である。感度と特異性が高い診断法の開発のため、我々はこれまでウマバベシア原虫の培養法を確立し、得られた原虫を用いた蛍光抗体法やリコンビナント抗原を用いたELISAに関する基礎的検討を行っている。また、これらの方法により、モンゴルにおけるウマバベシア病の疫学調査を実施し、抗体陽性率が高いことを確認している。本研究ではモンゴルの馬から *in vitro* 培養法によりバベシア原虫を検出し、分離株について遺伝子解析を行ったので報告する。

ウランバートル近郊の牧場の馬20頭より、血液約1mlをEDTA入りの試験管に採取後、血漿を分離し抗体価の測定に用いた。残りの血球はバフィーコートを除き、遠心洗浄後、赤血球の割合が5~10%になるように40%ウマ血清添加RPMI1640あるいはM199を加えて、1mlずつ24穴培養プレートに分注し、37℃、5%O₂、5%CO₂、90%N₂のガス条件下で培養を開始した。24時間毎に培養液を交換し、塗抹標本を作成して赤血球寄生率を算定した。その結果、培養開始時に *B. equi* が1例認められたが、他の19例はバベシア原虫は確認されなかった。しかし、その後の培養により、*B. equi* が14例、*B. caballi* が1例認められた。また、*B. equi* のEMA-1抗原遺伝子をPCRで検出し、遺伝子配列も検討中なので、合わせて報告する。

P138

パラグアイ国のリーシュマニア症皮膚潰瘍病変部バイオプシーを用いたPCR診断について ○松本珠美¹、Rolando Oddone²、橋口義久³、仙道富士郎⁴、佐谷秀行⁵、三森龍之⁵（¹銀杏短大・衛生技術科、²HICS パラグアイ国、³高知医大・寄生虫、⁴山形大・医・免疫・寄生虫、⁵熊本大・腫瘍医学）

リーシュマニア症はWHOの重要指定疾患の一つであり、新大陸においても皮膚型、皮膚粘膜型、内臓型リーシュマニア症の流行が見られ、これらを引き起こす原虫種の違いを感染初期に同定することは重要である。

我々は、リーシュマニア原虫DNAの特異塩基配列にプライマーを設定し、新大陸における皮膚および粘膜潰瘍症状をひき起こす原虫5種を、PCRにより同定することを可能にした。

今回、69回本大会に引き続き、この方法で、南米パラグアイ国のリーシュマニア症患者の皮膚潰瘍部からのホルマリン固定バイオプシー検体を用いてPCR診断を行ったので報告する。得られた83検体のうち、亜属リーシュマニアと同定されたものは42検体で、その原虫種は、*L. (L.) amazonensis* と *L. (L.) mexicana* とが見られた。また、亜属ヴィアニアと同定されたものは27検体で、原虫種として *L. (V.) braziliensis* が確認できた。亜属同定用プライマーで同定できなかった検体は14検体であった。リーシュマニア症のいろいろな種が混在する同一地域で、粘膜型や皮膚型など病変の違う種を同定することは、それぞれに応じた治療法を行う上でも、重要であると思われた。

P139

簡易PCR法による種特異性決定の試み ○白倉 哲郎、松沢 和世、中村 文規（昭和大・医・医動物）

ゲノムプロジェクトの進展により多くの主要な細菌 原生生物類に関する遺伝情報が解明され、それとともに病理組織や感染体中から病原体を分子生物学的手法を用いて特定するプローブおよびPCR用プライマーが容易に作成できるようになった。しかし一方で遺伝子解析に手がつけられていない多くの寄生虫においてはまだ検出するためのプローブやプライマーが確立していないのが実情である。今回、我々は種特異的な塩基配列を特定し、それをプライマーとしてPCR法で検出する方法を見直し、縮小条虫を材料に用い、非コード領域に散在する単純繰り返し構造に注目しPCR法のバンドパターンでの差異が生じ、明らかに種固有のバンドが特定できるプライマーを探索したがM13 coreをプライマーに使用した際、異種生物体のDNAをテンプレートにした時には見られない縮小条虫特有のバンドが増幅されることが判明した。そのバンドをゲルから抽出精製し、マウス、ラット、縮小条虫についてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ縮小条虫にのみバンドが検出された。このバンドの塩基配列決定を行うためにクローニングした。現在、シーケンスを行い塩基配列を決定し、そこから得られた推定アミノ酸配列が、ある種の縮小条虫特異性の蛋白質なのか単なる繰り返し構造なのかを調査中である。

P140

猫における腸管内寄生虫検査と猫回虫症の免疫学的検査法 ○椎橋 孝¹、清水泉太²、神田政宏³、山崎 浩⁴、石井 明⁵、野上貞雄¹、荒木国興⁶（¹日大・獣医・医動物、²川崎医大・寄生虫、³静岡県動物管理指導センター、⁴順天堂・医・寄生虫、⁵浜松医大・寄生虫、⁶公衆衛生院・微生物）

ヒト犬（猫）回虫症の感染経路解明の一環として砂場の犬（猫）回虫卵の調査が行われ、調査結果も報告されているが、砂場での感染が疑われた症例報告は見あたらない。子犬や子猫は室内で飼われることが多く、ヒト犬（猫）回虫症を考える上で犬（猫）回虫の感染状況を把握しておくことが重要である。我々は猫100頭における腸管内寄生虫相を検査するとともに、採取した血清を用いて免疫学的に犬回虫症と猫回虫症との鑑別が可能か否かについても検討したので報告する。

〔寄生虫相の検査〕殺処分された猫を剖検した結果、猫回虫は41頭（41%）から検出された。その他の寄生虫では瓜実条虫（26%）、マンソン裂頭条虫（8%）、鉤虫（6%）、壺形吸虫（2%）などが検出された。〔免疫学的検査〕100頭の血清を酵素抗体法（ELISA）で検査した結果、リン酸緩衝液で抽出した猫回虫抗原に対して33例が陽性になったが、猫回虫感染例は15例のみであり、猫回虫感染例と抗猫回虫抗体陽性例とは必ずしも一致しなかった。ELISAで陽性の血清を寒天ゲル内沈降反応で検査し、沈降線が認められた血清については猫回虫以外の線虫抗原で吸収して犬回虫症との鑑別を試みた。犬回虫抗原と猫回虫抗原を中心にして、左右に他種抗原で吸収した猫血清と犬回虫抗原に対する陽性血清を置いて反応させると沈降線の出現状況から容易に猫回虫症と判定できた。