

# 論 文 要 旨

Development of a PCR Assay for Diagnosing Trematode (*Opisthorchis* and  
*Haplorchis*) Infections in Human Stools

(ヒトの便を用いた PCR 法による吸虫類の鑑別法の開発)

関西医科大学公衆衛生学講座  
(指導：西山 利正 教授)

Lamingao Pheophet

## 【はじめに】

ラオスでは淡水魚を生で食べる習慣があり、これによる寄生虫感染症が公衆衛生上の問題となっている。タイ肝吸虫 (*Opisthorchis viverrini*, O. v.) もその一つで慢性的な感染により胆管癌を引き起こすことが報告されている。一方異形 (腸内) 吸虫 (*Haplorchis taichui*, H. t.) による感染は比較的軽微であることが多いが、重篤な病理的变化を引き起こすことがあり懸念が残る。従来から寄生虫感染の診断は便中に存在する虫卵を顕微鏡下で観察し同定する方法で行われている。しかしながら、虫卵の形状が酷似している両者の寄生虫の鑑別はかなりの熟練が必要であり、しばしば「*Opisthorchis* 様の虫卵」とだけ記述され、鑑別できていないのが実情である。そこで2種の寄生虫を鑑別する方法を確立することは地域における胆管癌の予防に役立つと考えた。

一方、近年寄生虫卵の鑑別法として PCR 法などを用いた分子レベルでの解析が行われているが、検体に糞便を使用するため抽出した寄生虫卵由来の DNA が微量であること、また糞便中に存在する PCR 阻害物質が混入していること等が原因で感度が低いなどの問題が生じていた。そこで我々はこれらの寄生虫のミトコンドリア DNA のうち cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) 遺伝子中の相同性の高い領域にプライマーをデザインし通常の PCR を行った後、O. v.、H. t. それぞれの特異的プライマーを用いて RealTime PCR を行い、melting curve analysis 法にて解析を行うという新たな combined PCR 法を考案し、O. v. と H. t. との鑑別を試みた。

## 【研究方法】

ラオス国ビエンチャンにあるマホソット病院において寄生虫症疑いの患者 50 人から便を採取し厚層塗抹法にて顕微鏡による検査を行った。そのうち 34 人が *Opisthorchis* 様の虫卵「陽性」と判定され、残り 16 検体は *Opisthorchis* 様の虫卵「陰性」と判定された。また、1 人の患者で複数種類の虫卵が検出されたケースもあった。糞便 2g を生理食塩水で懸濁し、遠心分離と洗浄を行なうことで虫卵を回収した。回収した虫卵からゲノム DNA を抽出、精製し 100ng の gDNA を用いて *COI* 遺伝子のうちホモロジーの高い領域をターゲットとしてユニバーサルプライマー (MCOI-A, MCOI-B) をデザインし PCR を行った。その後、増幅した PCR 産物をテンプレートとして、O. v. に特異的プライマーである PKZ1613F, PKZ1613R を、H. t. に特異的プライマーである QV301F, QV301R をそれぞれ用いて qPCR SYBR Green I- based assay を行い、増幅曲線と melting curve analysis から解析を行った。

## 【結果】

厚層塗抹法による顕微鏡による虫卵検査を行った結果、「*Opisthorchis* 様の虫卵」が検出された 34 人の患者のうち combined PCR 法を用いて検討した結果、24 人 (71%) が O. v. に陽性、31 人 (91%) が H. t. に対して陽性であった。さらに 21 人

(62%)の患者においてはこの両方に陽性であった。このときのmelting curve analysisの結果からT<sub>m</sub>のピーク値は O. v. は83.11(±0.12)°C、H. t. は 82.09(±0.06)°Cであり、明確に鑑別することが可能であった(Table 2, Fig. 2C)。また、顕微鏡による検査で寄生虫卵が検出されなかった検体及びO. v. とH. t. 以外の寄生虫卵が検出された16人の検体を用いてcombined PCR法を行った結果、O. v. は1人、H. t. は4人が陽性であることが分かった(Table 3)。

#### 【考察】

検体に糞便を使用したPCR法による鑑別法にはPCR反応を阻害する要因が糞便中に含まれることが挙げられる。我々の開発したPCR法とqPCR SYBR Green I- based assay を連結したcombined PCR法は顕微鏡を用いた虫卵検査では検出できなかった検体においても検出可能であり、さらに酷似した虫卵の形態を示す2種類の寄生虫O. v. とH. t. が混在する地域において感度、特異度とも高い非常に有用な鑑別法であると考えられる。