

東へと広がりつつある傾向がある。この地域に生息している齧歯類は、アメリカオオリス等の樹上性リス、イワリス、ジリス、プレーリードッグ、モリネズミ、およびそのほかのネズミ類である。時にこれらの動物の大量死がみられることがあるが、これはペスト感染が原因とみられている。事実、疫学調査ではペスト菌は各種の齧歯類やノミから分離されている。これらペット用に販売されているプレーリードッグはペスト流行地域である州の西部で捕獲されており、州の衛生部等ではペストをはじめとした様々な人獣共通感染症の感染源となる可能性を危惧している。

テキサス州衛生部が行うペストの血清検査は年間約 300-400 検体である。ヒトのペスト症例は発生はあるが希である。また、テキサス州衛生部ではペスト患者およびペスト感染が疑われる患者に対して、次のスケジュールによる投薬を推奨している。

ストレプトマイシン 30 mg/kg/日（二分割投与）筋肉内注射。10 日間連続投与。

ドキシサイクリン 100 mg 一日 2 回 7 日間服用。

プレーリードッグの輸出

アメリカ合衆国では人獣共通感染症の原因となる可能性のある病原体、動物およびベクター（感染性物質、微生物毒素、病原体株、感染実験齧歯類、ゲームハンティング動物、コウモリ、カタツムリ類）の輸入および輸入後の流通・販売は The Public Health Service Foreign Quarantine Regulation (42CFR Section 71.54) によって規制されている。これにより、人獣共通感染症の病原体を保有している（自然感染および実験感染）動物の輸入は公衆衛生当局（Etiologic Agent Import Permit Program Office of Health and Safety, CDC）の許可を必要とする。

一方、動物の輸出に関しては、イヌおよびネコに関しては証明書の添付が義務づけられているが野生動物に対してはその必要はない。このため、輸出検疫等が行われずにプレーリードッグ等の野生動物が輸出されていることは州の衛生部も承知している。

この点に関しては危険性を指摘する公衆衛生専門家は多いが、現時点で法的には問題がない。

1998 年に発生した事例からこの問題に関連する危険性が指摘されている。

事例：ペット用に捕獲されたプレーリードッグ集団に発生したペスト

1998 年 5 月、テキサス州内の動物業者間で輸送されたプレーリードッグ 356 頭のうち 225 頭が到着後に死亡し、CDC によってペスト感染が原因であることが突き止められた。幸い発生後にとられた対策によってほかの動物やヒトへの伝播を防ぐことができた。

プレーリードッグを出荷した業者は動物を捕獲した時点、および動物収容区域および収容動物に対して定期的にノミ駆除剤を用いた駆除作業を行っていた。また、動物はペスト発症を観察するために 10 日間収容しており、12 日以上収容を行う場合には再度ノミ駆除を行っていた。新しく捕獲した動物はすでに収容中の動物とは別の建物に収容していた。一方、受け取り業者もノミ対策を厳格に実行していた。このためプレーリードッグの間でペストが爆発的に伝播した原因についてはいまだ明らかになっていない。

この事例が示すように、現場において厳しいノミ対策が行われたにもかかわらずペストの発生は防ぐことができなかった。今回の事件はプレーリードッグなどの野生動物をペットとして扱うことには危険性が伴うことを浮き彫りにする結果となっている。

ペストの他にもアメリカ合衆国（連邦レベル）ではハンタウイルス肺症候群および野兔病が齧歯類が感染源となる可能性が強い感染症として届け出感染症に指定されている。

D. 考察

プレーリードッグ等、北米から輸入されるげっ歯類によるペストの持ち込みのリスクを明らかにするためには輸出国における調査が不可欠であると考えられた。また、

ペストがノミを媒介動物とする典型的な人獣共通感染症の一つであることから、それに対する対策はペスト以外の人獣共通感染症に対する対策と密接な関わりを有していることが明らかである。また北米から輸出されるプレーリードッグに対する規制等は、他の野生動物に対する米国の輸出入規制と密接な関わりを有していると推測された。

これらの背景から、アメリカ合衆国におけるペスト研究と調査の中心機関である CDC ベクター媒介感染症研究部（コロラド州フォートコリンズ）、わが国へプレーリードッグ等を輸出しているテキサス州における人獣共通感染症対策の中心機関（テキサス州衛生部、テキサス州動物衛生協会、USDA テキサス州事務所）より説明を受け情報を収集し、意見の交換を行った。

おもに以下の 4 点に関して、訪問対象の各機関の役割に応じて情報収集と意見交換を行った。

1. 全米のペスト研究および疫学情報の収集、
2. プレーリードッグおよびその他の野生げっ歯類等におけるペストおよびその他の人獣共通感染症の実態に関する情報の収集、
3. プレーリードッグおよびその他の野生げっ歯類等の輸出入の実態に関する情報の収集、
4. 各種野生動物におけるペストおよびその他の人獣共通感染症に対する州レベルでの対策に関する情報。

なおわが国と同様にプレーリードッグをペットとして飼育する傾向が認められたフランスではペスト感染防止の目的で、北米からのプレーリードッグの輸入を禁止している。しかし、フランスでは他の EU 加盟国を経由してプレーリードッグ、ジリス、アライグマ、コウモリ等のエキゾチックペットの輸入を行うことが可能であるため、今後の対策を検討している。

平成 13 年度研究事業費の補助を受けて、近年 WHO へのペスト発生報告が最も多いマダガスカル共和国での調査を 14 年 2-3 月に予定していた。しかし現地における政

治社会情勢が悪化したために直前になって調査を断念せざるを得なかった。同国が世界のペスト調査の重要地点であることは現在も変わらないため、今後機会をみて、是非調査を行いたいと考えている。

E. 結論

アメリカ合衆国西部のペスト汚染状況、および汚染値からわが国へ輸入されている野生動物に関する調査を行った結果、わが国においては、ヒトに感染した場合に深刻な健康被害を与える人獣共通感染症の原因動物の輸入に対して厳重に監視を行い、法の範囲内で輸入制限を行うなどの措置が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

プレーリードッグの輸出地における感染状況および輸出検疫の状況から、ペスト侵入の危険な状態はなおも持続していると考えられる。

今後とも輸入げっ歯類の感染症罹患状況の調査を継続し厳重に監視する必要がある。

ペット販売などの商業目的の輸入を制限するなどの対策を考慮する必要がある。

G. 研究発表

神山恒夫 エキゾチックアニマルと人獣共通感染症 健康教室 2001、612：76-79.

神山恒夫 ネコひっかき病とバルトネラ感染チャイルドヘルス 2002、5：54-57.

Kamivama, T., Okabayashi, T., and Koura, M. Persistent presence of parasitized erythrocytes in the blood of hosts long after infection with *Babesia microti* followed by loss of infectivity. Third International Conference of Zoonoses, Oct. 12, 2001, The Netherlands.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生科学研究費補助金（新興再興感染症研究事業）
分担研究報告書（平成 13 年度）

病原体レプトスピラ感染種の簡易同定法の確立、輸入・国内発生レプトスピラ感染症例および回帰熱属ボレリア媒介ダニ刺咬症例に関する調査研究、および、レプトスピラ新規診断抗原・ワクチン開発に関する基礎研究。

分担研究者 川端寛樹 国立感染症研究所 細菌部 研究員
協力研究者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌部 研究員

研究要旨

- 1) レプトスピラ病の迅速診断法の確立を目的として、レプトスピラの鞭毛遺伝子(*flaB*)を特異的に増幅するプライマーを用い、その感度・特異性から、病原性レプトスピラの遺伝子検出に有用であることを明らかにした（平成 12 年度）。さらに本年度は、この検出ツールの生体試料への適用を見据えた反応条件・およびサンプル調製法の検討も行った。
- 2) 地震発生後に井戸水を飲んだ事で、レプトスピラに感染し発症した患者一例を報告した。これに付随して、レプトスピラ感染に関する情報を病原微生物検出情報を通じて報告し、医療関係者を中心に注意を促した。（共同研究者：日南病院・青木智宏）
- 3) マレーシア旅行中にレプトスピラに感染し、帰国後発症した患者一例を報告した。これに付随して、レプトスピラ感染に関する情報を病原微生物検出情報を通じて報告し、医療関係者を中心に注意を促した。（共同研究者：国立国際医療センター・石崎有澄美）
- 4) 病原性レプトスピラに特異的な新規診断抗原・ワクチン開発を目的として、感染に伴ってのみ発現が誘導される遺伝子の同定を試みた。このために、まずは従来 of 感染動物モデルに代わる、マウス致死モデルを構築した。このモデルを用いて、感染に伴って発現が誘導されると考えられる遺伝子 44-2 を同定した。この組換えタンパク質を用いた感染防御実験を現在計画中である。
- 5) 回帰熱ボレリア媒介の可能性がある島産ダニ *Ornithodoros capensis* を遺伝学的に同定した。一方ボレリア属に特異的な PCR プライマーを用いダニのボレリア保有の有無を調べたが、増幅産物は得られなかった。（共同研究者：山階鳥類研究所・佐藤文男、鶴見みや古、福山大学・福長将仁）

●感染種迅速同定 PCR 法の臨床適応のための基礎研究

昨年度、本研究班で開発した病原性レプトスピラ感染種同定を迅速診断法へ応用する目的で、健康ヒト血液にレプトスピラを定量的に加えた模擬患者血液を作成、PCR 法の感度を調べた。

【方法】健康ヒト（分担研究者本人）採血の全血にフィリピン患者分離 LT398 株を段階的に希釈したものを加え、PCR の試験品とした。これを従来

の方法、すなわち低回転遠心後、血清画分を分取し PCR を行う方法、または Vacutainer を用いて赤血球画分を取り除いたのち DNA を抽出する方法にて PCR 試験品を作成した。

【結果】従来の方法により 10^2 /ml blood の検出感度が得られた。これは Merien らの方法と同感度であった。一方本研究で試みた Vacutainer を用いた DNA 抽出法では 2×10^1 /ml blood の検出感度であり、従来の方法の約 5 倍の検出感度が得ら

れた。

【考察】レプトスピラ感染症は急性の熱性疾患であることから、臨床上他の疾患との鑑別が極めて難しい。また重症型ワイル病の場合、その病状進行は早く、初期の適切な治療が患者の生死を決定するといっても過言ではない。抗体価上昇が検出できない感染初期には、PCR 等による抗原検出は極めて重要な意義がある。しかしながら既存の方法では検出感度が必ずしも十分ではなかったため、常に偽陰性の可能性が指摘されてきた。本研究で開発した PCR では1) 本邦で見い出される病原体レプトスピラを網羅していること、2) 感染種の同定が可能なこと、3) 従来の方とくらべ感度が約 5 倍に上昇したことから、従来法とくらべ迅速な抗原検出を可能とすることができた。

●自然災害時のレプトスピラ病

—鳥取西部地震による井戸水汚染が原因と考えられるレプトスピラ病の1例—

レプトスピラ病はレプトスピラ属細菌の感染によって起こる人獣共通感染症である。今回我々は、地震により井戸水の汚染がおり、その井戸水を飲んだことが原因でレプトスピラ病を発症したと思われる1例を経験したので報告する。

【症例】48歳、男性。主訴は悪寒、発熱、全身倦怠感、筋肉痛。2000年10月6日に鳥取西部地震が発生し、自宅の水道水が一時的に停止してしまっため少し濁っていた井戸水を飲んでしまった。10月10日より38℃台の発熱が出現し、10/13日に受診、入院となった。入院時体温 39.5℃、脈拍92、整。貧血はなく、眼球結膜に充血を認めず。黄疸なし。表在リンパ節触知せず。胸・腹部異常所見なし。四肢には異常所見認めず。皮膚、粘膜に出血傾向なし。検査所見では、WBC 11,000/ μ l (好中球 88%)、Hb 14.9g/dl、Plt 47,000/ μ l、T.Bil 0.8mg/dl、AST 39 IU/l、ALT 26 IU/l、LDH 176 IU/l、BUN 12.8 mg/dl、Cr 0.69mg/dl、CRP 26.0mg/dl であった。喀痰、血液、尿培養で有意菌は検出されなかった。強い炎症反応、血小板減

少を認めたことから重症感染症の存在を考え、piperacillin sodium 3g/日の投与を開始した。第3病日より眼球結膜の充血、頭痛、腓腹筋痛が著しくなるとともに黄疸が出現したこと、および濁った井戸水を飲んだ既往があることからレプトスピラ病を疑い minocycline 300mg/日を開始した。その後、第5病日には解熱を認め、全身状態は改善し良好な経過をとり11月21日に退院した。10/13、11/16のペア血清を用いた BML でのレプトスピラの凝集検査で、レプトスピラ5血清型全てに4倍以上の抗体価の上昇を認めたが(10倍以下から40倍へ)、最終的な血清型の同定はできなかった。そこで、国立感染症研究所細菌部にて同じペア血清を用いて凝集試験を行なったところ、11/16血清で *Leptospira interrogans* serovar autumnalis に対する抗体が160倍以上と陽性(10/13血清は10倍以下)になり、レプトスピラ病と確定診断した。

【考察】現在、本邦でのレプトスピラ病の発生は沖縄県を除いて稀なものとなっている。しかしながら、我々の調査では、我が国のドブネズミなどが、現在でもレプトスピラを保菌していることが確認されている。したがって、今回の地震の時のような自然災害の発生時には、ネズミの尿に汚染された水などを介して、レプトスピラの感染の機会が増大するものと考えられる。また、東南アジアなどの流行地では、洪水の発生時期のレプトスピラ病の流行が疫学的に確認されている。以上のことから、自然災害時にみられる不明熱を呈する疾患の鑑別にはレプトスピラ病を考慮するべきである。

●ボルネオ島で感染したレプトスピラ病の1例

レプトスピラ病は、レプトスピラ属細菌の感染によって起こる人獣共通感染症である。今回ボルネオ島で感染し、帰国後発症したレプトスピラの輸入感染例を経験した。

【症例】28歳、男性。主訴は発熱。2001年6月13日より19日までボルネオ島に旅行。海水、淡水で

の水泳、洞くつ探索などをする。6月26日に突然40℃台の発熱、全身筋肉痛、頭痛が出現した。近医受診も発熱が続くため、29日に当院転院となった。入院時体温 39.5℃、脈拍 102、整。眼球結膜に貧血・黄染はないが、充血を認めた。全身のリンパ節に腫脹を認める。胸・腹部異常所見なし。皮膚発疹なし。神経学的に異常所見なし。検査所見では WBC 3,800/ μ l、Hb 14.3g/dl、Plt 83,000/ μ l、T.Bil 1.5mg/dl、GOT 267 IU/l、GPT 291 IU/l、LDH 462 IU/l、BUN 17.1mg/dl、Cr 1.4mg/dl、CRP 23.8mg/dl であった。末梢血塗抹標本上マラリア原虫陰性、血液、糞便培養で有意菌は検出されなかった。ボルネオへの旅行後に発熱が見られていること、全身のリンパ節腫脹がみられること、海水、淡水への暴露があることなどより、腸チフス、デング熱、A型肝炎、レプトスピラ病、全身リンパ節腫脹を呈すウイルス感染などを考え、6月30日夕より予防的にシプロキサシ 200mg 4T2X を開始した。7月1日には解熱し、全身状態が改善したため7月3日に退院した。国立感染症研究所細菌部にて6/29、7/17のペア血清を用いてレプトスピラ抗体を測定したところ、*Leptospira interrogans* serover hebdomadis に対する抗体が10倍からへ160倍と上昇して陽性となり、レプトスピラ病と確定診断した。

【考察】現在、本邦でのレプトスピラ病の発生は沖縄県を除いて稀なものとなっているが、海外では全世界的に認められ、特に東南アジアでは大流行している。近年レプトスピラ病の発生の特徴として、水辺のレジャーやスポーツを介するものが目立って来ている（参考：病原微生物検出情報2001年1月）。今回の場合も、淡水中で泳いだことが感染原因と考えられる。したがって、レプトスピラ病の流行地では不用意に水に入らないこと、特に洪水の後には絶対に入らないことが重要である。海外旅行者が年々増加している現在、今後ともこのような事例が増加することが考えられる。旅行者に対するより一層の注意喚起が望まれる。

①新規診断抗原・ワクチン開発の基礎的研究

-感染に伴って発現が誘導される病原性レプトスピラ遺伝子の探索-

これまでにレプトスピラの病原因子と考えられるタンパク質はいくつか報告されているものの、それらだけでレプトスピラの病原性を説明することは不可能で、まだ未知の病原因子の存在が考えられている。これまでの多くの病原細菌の研究から、病原因子の多くは、*in vitro*での培養時にはほとんど、あるいは全く発現しておらず、宿主動物への感染に伴ってその発現が誘導されることが明らかになっている。そこで、病原性レプトスピラの病原因子の探索のため、感染に伴ってのみ発現が誘導される遺伝子の同定を試みた。このために、まずは従来の感染動物モデルに変わる、マウスの致死モデルを構築した。このマウスを使った感染実験系で、半数致死量のレプトスピラを感染後、生き残ったマウスより感染1ヶ月後に血清を採取しこれを感染血清として使用した。また *in-vitro* で培養したレプトスピラからタンパク質を抽出し、これを担体に吸着させたアフィニティーカラムを作製した。このアフィニティーカラムを使って、感染血清中に含まれる *in-vitro* で発現しているレプトスピラのタンパク質に対する抗体を除去した（吸収血清）。この操作によって吸収血清中には、感染時に新たに発現したレプトスピラタンパク質に対する抗体しか含まれていないことになる。この吸収血清を使って病原性レプトスピラ全ゲノムの発現ライブラリーのイムノスクリーニングを行なった。3次スクリーニングまで行い1つの陽性クローン 4-4 を得ることができた。このクローンの全塩基配列を決定したところ3つの ORF が存在したため、それぞれについて大腸菌で GST 融合タンパク質を作製し血清との反応を調査したところ、3つの ORF のうちの1つ 44-2 が感染血清により認識されることが明らかとなった。44-2 はさまざまな病原細菌のタンパク質と、その N 末端側の配列に相同性が見られたが、C 末端側半分には相同性のあるタンパク質は見つからなかった。また

44-2 の N, C 末端半分のみを持つ組換えタンパク質を作製して、感染血清との反応性を調べてた結果、C 末端側半分が抗体より認識される免疫原であることが明らかとなった。さらに 44-2 は、*in-vitro* で培養した菌を免疫して作製した抗血清（免疫血清）には反応しないことから、感染に伴ってその発現が誘導されるものと考えられた。また、サザンブロット解析、PCR によって、44-2 遺伝子は病原性レプトスピラには広く存在するが、非病原性であるレプトスピラには存在しないことも明らかとなった。以上のことから今回同定した 44-2 は、病原性レプトスピラにのみ存在する、感染に伴って誘導される病原因子であることが示唆された。44-2 は、感染動物で抗体産生を引き起こすことから、ワクチンとしての利用も期待される。現在 44-2 組換えタンパク質を大量に調製し、今後この組換えタンパク質を用いて感染防御実験を行なう予定である。

●本邦において回帰熱ボレリア媒介の可能性のあるダニ、クチビルカズキダニの同定と PCR による病原体ボレリア保有の有無

回帰熱ボレリアはオルニソドロス属ダニによって媒介される人畜共通の細菌感染症である。本邦では戦後回帰熱患者発生の報告はないとされている。一方で我々の調査で、伊豆諸島・鳥島では形態学的にオルニソドロス属ダニに分類されるダニクチビルカズキダニ(*Ornithodoros capensis*)が生息していることが明らかになった。そこで本研究では、このダニが遺伝学的に真の *Ornithodoros* 属ダニであるのか否かについて、および回帰熱属ボレリア保有の有無について調査をおこなった。

【方法】使用ダニと DNA 調製：クロアシアホウドリ(*Dimedeia nigripes*)巢より得た未吸血成虫ダニ *O.capensis* 50 個体ならびに陽性対照である北海道産マダニ *Ixodes persulcatus* 10 個体を用いた。各々のダニは液体窒素にて凍結後、破碎・0.02N NaOH にて懸濁し、熱変性後 PCR 調製液とした。(Gylfe et al 2001) 保有ボレリア検索：

鞭毛遺伝子でライム病・回帰熱ボレリア共通の塩基配列をもとに DNAPrimer を合成し PCR に供した。シーケンス反応：増幅 DNA は TA-cloning vector にて単離後、塩基配列を決定した。同様の方法によりダニミトコンドリア DNA の増幅産物・シーケンス反応からダニの同定も行った。

【結果-ボレリア DNA の検出】高感度 nested-PCR を 4 種類のプライマーを用いた。すなわち 1st-set では 449bp, 2nd-set では 343bp の増幅産物が得られる。*I.persulcatus* を対象とした PCR では 3/10 が陽性でありボレリアが検出できたことから、上記系が感度上問題ないことが示された。一方で鳥島産ダニでは、すべてのダニで PCR は陰性であった。

【結果-ダニの同定】形態学的に *Ornithodoros* 属であるクチビルカズキダニはミトコンドリア DNA の塩基配列から、*Carios* 属ダニであることが明らかになった。

【考察】*Carios* 属ダニのボレリア伝播の可能性は不明であるが、nested-PCR によってもボレリア DNA はダニから検出されなかったこと、またこのダニが *Carios* 属であったことから、伊豆諸島における回帰熱浸潤の可能性は極めて低いことが示された。また結果は示さないが、この方法によってアフリカ産ダニからは回帰熱ボレリアが検出できることを確認しており、本邦での危機管理上、有事にはこの方法による調査が応用できることが明らかとなった。

健康危機管理情報

1. 坂本光男, 相楽裕子, 小泉信夫, 渡辺治雄: マレーシア・ボルネオ島で感染したレプトスピラ病の 1 例. 病原微生物検出情報 22(1): 5-6, 2001.
2. 青木智宏, 小泉信夫, 渡辺治雄: 自然災害時のレプトスピラ病. 病原微生物検出情報 22(7): 165, 2001.
3. 小泉信夫, 渡辺治雄, 青山岳子, 木下美由紀, 馬場俊一, 鈴木啓之, 増澤俊幸: 富士山で感染

したライム病患者からのボレリアの分離. 病原微生物検出情報 22(10): 248, 2001.

4. 石崎有澄美, 小泉信夫, 渡辺治雄: ボルネオ島で感染したレプトスピラ病の 1 例. 病原微生物検出情報 22(10): 290, 2001.
5. 小泉信夫, 渡辺治雄. ラテックス凝集試験によるレプトスピラ抗体検査に関する注意の呼びかけ. 病原微生物検出情報 23(1): 13, 2002.

論文発表・著書

1. Kawabata H, Dancel LA, Villanueva SYAM, Yanagihara Y, Koizumi N, Watanabe H: *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiology and Immunology*. 45, 497-496, 2001.
2. Furuta Y, Kawabata H, Ohtani F, Watanabe H.: Western blot analysis for diagnosis of Lyme disease in acute facial palsy. *Laryngoscope*. 111, 719-723, 2001.
3. 川端寛樹, 渡辺治雄. ライム病. ボレリアの病原性. 化学療法の領域. 17, 2118-2126, 2001.
4. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ病. レプトスピラの病原性. 化学療法の領域. 17, 2160-2165, 2001.
5. Iwamura T, Yoneyama M, Koizumi N, Okabe Y, Namiki H, Samuel CE, Fujita T: PACT, a double-stranded RNA binding protein acts as a positive regulator for type I interferon gene induced by Newcastle disease virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282(2): 515-523 2001.
6. 小泉信夫, 渡辺治雄. ワイル病秋やみ混合ワクチン. ワクチンの事典 (印刷中)
7. Tomohiro Aoki, Nobuo Koizumi, and Haruo Watanabe. A case of leptospirosis probably caused by drinking contaminated well-water after an

earthquake. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 54(6), 243-244, 2001.

学会発表・講演

1. Lawrenz MB, Kawabata H, Norris SJ. Plasmid content determines the ability to transform *Borrelia burgdorferi*. *Biology of Spirochete*, Gordon Research Conference, Ventura, CA, USA. Jan. 2002.
2. Kawabata H. Plasmid content determines the ability to transform Lyme disease *Borrelia* - Implication of DNA modification system in *B.burgdorferi* -. UT Pathology Seminar. Houston, TX, USA. Nov. 2001.
3. 岩村智勝, 米山光俊, 小泉信夫, 岡部泰賢, 藤田尚志. 二重鎖 RNA 結合蛋白質 PACT はニューカッスル病ウイルス感染によって誘導される I 型 IFN の産生を増強する. 第 66 回 日本インターフェロン・サイトカイン学会. 平成 13 年 7 月 13, 14 日
4. 青山岳子, 木下美由紀, 馬場俊一, 鈴木啓之, 小泉信夫, 増澤俊幸. 慢性遊走性紅斑からボレリアが培養されたライム病の 1 例. 第 9 回 SADI. 平成 13 年 8 月
5. 青山岳子, 木下美由紀, 馬場俊一, 鈴木啓之, 小泉信夫, 増澤俊幸. 慢性遊走性紅斑からボレリアが培養されたライム病の 1 例. 第 766 回 日本皮膚科学会東京地方会 (城南地区分科会) 平成 13 年 9 月
6. 柳原保武, Sharon YAM Villanueva, Louella A Dancel, 増澤俊幸, 鈴木克枝, 今井康之, 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄. フィリピンでのレプトスピラ病の調査研究. 第 38 回レプトスピラ・シンポジウム. 平成 13 年 4 月
7. 余勤, 藩銘正, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 中村正治, 平良勝也, 今井康之, 増澤俊幸. 台湾, 並びに沖縄由来野鼠血清のライム病ボレリア抗体価の検討. 第 38 回レプトスピラ・シンポジウム. 平成 13 年 4 月

8. 増沢俊幸, 鈴木克枝, 今井康之, 川端寛樹, 小泉信去, 角坂照貴, 後藤郁夫, 中村正治, 平良勝也, Sharon YAM Villanueva, 渡辺治雄, 柳原保武. 日本を含む東アジアにおけるウイル

病病原体レプトスピラの血清学的, 遺伝学的同定. 第38回レプトスピラ・シンポジウム. 平成13年4月

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）
分担研究報告書

名古屋市のネズミ類由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的研究

研究分担者 角坂照貴 愛知医科大学・講師
主任研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授
研究協力者 名古屋市生活衛生センター・感染症調査係

研究要旨

1980年代以降、国内のレプトスピラ病は徐々に減少しているが、今日でもなお全国で散発的な発生をみている。比較的に農業地域で発生する傾向が認められるものの、感染経路、保菌動物から推察すると都心での発生も十分に考えられる。また、海外との交流が盛んになった現在では、海外からの未知血清型の侵入も危惧されるが、ネズミ類の生息密度が高い都心におけるレプトスピラ病の調査は全くなされていらない。そこで、名古屋市内の野鼠のレプトスピラ保有状況を2000年と2001年に毎月調査し、分離された株の遺伝子種および血清型について解析した。

野鼠276匹から分離された14株のレプトスピラは、FlaB遺伝子解析および顕微鏡凝集試験により、6株は *Leptospira interrogans*（血清型 *icterohaemorrhagiae*）、8株は *Leptospira interrogans*（血清型未同定）と同定された。

研究目的

レプトスピラ病の多くは、ネズミ類を感染源に発生していると考えられ、国内では1970年代まで年間数十名のレプトスピラ感染による死亡例が報告されてきた。近年では生活様式の変化等により患者数、死亡例数は減少しているが、今なお全国で毎年のように患者が発生している。

レプトスピラ病は黄疸、出血、蛋白尿の他に多様な症状を呈するため診断が困難な場合もみられる。診断には、型特異的抗原を用いた顕微鏡凝集試験（MAT）が一般的であるが、全世界で250以上の血清型が知られるため、使用する型特異的抗原を誤れば正確な診断ができない。そのため、患者発生地域内に存在する正確な血清型の情報が不可欠となり、国内においても現在までに知られている血清型に加えて、新たな種、血清型の侵入を常に監視する必要がある。

レプトスピラは、多くの動物に感染し多

様な症状を呈するが、ヒトへの感染源として重要なネズミ類においては、無症状であることが多く、これらが保菌動物として重要な役割をはたしている。これらのネズミ類は、山間地に生息するのみならず、人口の密集する都心においても生息密度が高く問題となっているが、都心におけるレプトスピラの分布調査はほとんどなされていない。このため、レプトスピラの分布調査のなされていない名古屋市内でネズミ類からの分離を試みた。

2000年と2001年の調査期間中に276匹のドブネズミ、クマネズミ、アカネズミを捕獲し14株のレプトスピラを分離し、これらについて血清学的、遺伝学的解析を行った。

材料・方法

1. レプトスピラの分離・培養法

2000年の調査では野鼠の腎臓、血液か

ら、2001 年は腎臓から Korthof 培地で分離・培養した。

2. 使用菌株

名古屋市内の公園、マンホールで捕獲されたネズミ類から分離された 14 株の分離株を使用した。

3. レプトスピラ抗血清の作製法

RGA 株 (血清型 *icterohaemorrhagiae*)、AkiyamiA 株 (血清型 *autumnalis*)、AkiyamiB (血清型 *hebdomadis*)、Ballico 株 (血清型 *australis*)、M20 株 (血清型 *copenhageni*)、Hond Utrecht IV 株 (血清型 *canicola*)、Salinem 株 (血清型 *pyrogenes*)、Moskva V 株 (血清型 *grippotyphosa*)、LT398 株 (血清型 *manilae*)、LT101-69 株 (血清型 *losbanos*)、Poi 株 (血清型 *poi*)、Perepelitsin 株 (血清型 *tarassovi*)、10 株 (血清型 *lyme*)、血清型 UP-PNPGH-AB、名古屋由来 AC89 株、AC105 株、AC109 株、AC111 株、AC112 株、AC113 株に対するウサギ抗血清を作製した。レプトスピラ培養液を 56°C、30 分不活性化し抗原液とした。これをウサギ (日本白色家兎) 静脈内に 5 日間隔で 3 回接種、免疫した。

4. FlaB および 16S rRNA 遺伝子配列解析

レプトスピラ抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用い、それぞれの遺伝子の PCR 反応を行った。PCR で増幅した増幅産物を鋳型として、直接サイクルシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

5. 顕微鏡凝集試験 (MAT)

96 穴丸底プレートに PBS で倍々希釈したウサギ抗血清と被検レプトスピラ培養液を加え 37°C、2 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡にて観察し、菌体の 50%以上の凝集を示す最大希釈倍率を力価とした。

6. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

による制限酵素長鎖断片のパターン解析 (large restriction fragment pattern, LRF)

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し、ゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム、Proteinase K 処理後、制限酵素 *Not I* で 37°C、1 晩消化した。このゲルを 200V、パルスタイム 10 秒 5 時間、30 秒 12 時間、60 秒 7 時間の計 24 時間、または 200V、パルスタイム 5 から 100 秒へのランプで 30 時間の条件下でパルスフィールドゲル電気泳動した。

結果

1. ネズミ類からのレプトスピラ分離状況

2000 年 4 月から 2002 年 2 月まで約 2 年間に名古屋市 (中川区、中区、東区、昭和区、港区、南区、熱田区、西区、北区、千種区、名東区、守山区) の公園、マンホールで生け捕り用金網カゴで捕獲された、ドブネズミ *Rattus norvegicus* 262 匹、クマネズミ *Rattus rattus* 9 匹、アカネズミ *Apodemus speciosus* 5 匹から分離を試みた。276 匹中 14 匹のドブネズミの腎臓より 14 株のレプトスピラが分離された (Table 1)。

2. FlaB 遺伝子配列に基づく種の同定

FlaB-PCR により分離株から約 790bp の増幅産物が確認された。増幅産物の塩基配列に基づく系統樹から、名古屋市のネズミより分離された AC89、AC105、AC109、AC111、AC112、AC113、AC158、AC159、AC162、AC165、AC166、ACS-01、AC11-01 は、*L. interrogans* に属する RGA 株、AkiyamiA 株と同一のクラスターを形成し、*L. interrogans* と同定された。

3. MAT に基づく血清型の同定

ネズミ由来の AC89、AC105、AC109、AC111、AC112、AC113 は、 α -RGA (*L. interrogans*

Table 1 名古屋市のネズミ類から分離されたレプトスピラの遺伝子種および血清型

分離株	捕獲地	種類	分離臓器・培地	種	血清型
AC89	中区・公園	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC105	千種区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC109	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC111	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC112	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC113	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	icterohaemorrhagiae
AC158	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC159	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC162	東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC165	北区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC166	北区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC8-01	東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC10-01	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
AC11-01	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定

血清型 icterohaemorrhagiae) と強い反応を示した。試験された他の抗血清、 α -Akiyami A (血清型 autumnalis)、 α -Akiyami B (血清型 hebdomadis)、 α -Ballico (血清型 australis)、 α -M20 (血清型 copenhageni)、 α -Hond UtrechtIV (血清型 canicola)、 α -Salinem (血清型 pyrogenes)、 α -Moskva V (血清型 grippotyphosa)、 α -LT398 (血清型 manilae)、 α -LT101-69 (血清型 losbanos)、 α -Poi (血清型 poi)、 α -Perepelitsin (血清型 tarassovi)、 α -10 株 (血清型 lyme)、 α -UP-PNPGH-AB 株とは反応が見られなかった。

4. LRFV 解析による血清型の確認

MAT の結果を基に、血清型の同定された分離株とその血清型の基準株を並べて泳動した。名古屋のネズミ分離株 AC89、AC105、AC109、AC111、AC112、AC113 は、RGA 株 (血清型 icterohaemorrhagiae) と同一のパターンを示した。AC158、AC165、AC166、AC8-01、AC10-01 株は沖縄由来未同定血清型 OR36 株と同一のパターンを示した。

考察

名古屋市からのネズミ分離株は、FlaB 遺伝子解析により全て *L. interrogans*、と

同定された。それらの血清型は、MAT の結果より 6 株を icterohaemorrhagiae と同定した。血清型 icterohaemorrhagiae は、国内に広く分布する重症型レプトスピラ病 (Weil 病) の起因菌の 1 つで、致死率が高く、他の血清型に比べ都会での発生率が高いことが知られている。名古屋市内の調査でも、これらを裏付けるように血清型 icterohaemorrhagiae が分離される結果となった。分離されたネズミを捕獲した環境は、1 つは市の中心部の公園で、ヒトとの接触が非常に高いと考えられる場所である。他の場所も、人口密度の高い住宅地、飲食店街に設置されたマンホール内で、レプトスピラのヒトへの感染機会が多いと考えられる場所であり、危険性の周知と感染への予防策を考える必要がある。

ネズミ間の感染も常に起きていると考えられ、分離された 4 箇所では接近して複数の株が分離されている。これらは、都心においてもレプトスピラ汚染地点が点在し存在することを示している。これらから、都心で生息密度が高いドブネズミとクマネズミが、保菌動物として重要な役割をはたしていると考えられ、これら保菌動物の駆除もレプトスピラ病の予防策の 1 つとして考える必要がある。

近年、国内のレプトスピラ病は、生活様

式の変化により減少しているが、発症すれば重症化する症例が多く早期診断、早期治療が重要である。現在、日本で使用されている顕微鏡凝集試験用血清診断試薬は *hebdomadis*, *icterohaemorrhagiae*, *autumalis*, *australis*, *canicola* など日本で流行が予想される血清型株が抗原として使用されている。しかし、近隣諸国でレプトスピラ病患者数が増大していることから考えると、これらの流行株が国内に侵入することも十分に考えられ、診断抗原の充実に早期診断法の開発が不可欠である。

研究発表

発表論文

1. Toshiyuki Masuzawa, Ming-Jeng Pan, Teruki Kadosaka, Midori Kudoken, Nobuhiro Takada, Yasuhiro Yano, Yasuyuki Imai, Yasutake Yanagihara: Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen islands. *Microbiol. Immunol.*, 44, 1003-1009 (2000)
2. Toshiyuki Masuzawa, Louella A. Dancel, Masaki Miyake, Yasutake Yanagihara: Serological analysis of human leptospirosis in the Philippines. *Microbiol. Immunol.*, 45, 93-95, (2001)
3. Nobuhiro Takada, Hiromi Fujita, Yasuhiro Yano, Fubito Ishiguro, Hiromichi Iwasaki, Toshiyuki Masuzawa. First record of tick-borne pathogens, *Borrelia*, and spotted fever group rickettsiae in Okinawajima island, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 163-165, (2001)
4. Masuzawa T, Pan MJ, Yu Q, Kadosaka T, Imai Y, Yanagihara Y. Negative incidence of Lyme disease-

related *Borrelia* spp. in Alishan, Taiwan. *Microbiol. Immunol.*;45:387-91 (2001)

学会発表

1. 鈴木克枝、増澤俊幸、川端寛樹、柳原保武、今井康之、渡邊治雄：フィリピン患者由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的同定。第83回日本細菌学会関東支部総会（東京）、抄録 p.55、2000年11月21日
2. 増澤俊幸、鈴木克枝、川端寛樹、渡邊治雄、今井康之、柳原保武。フィリピン患者、並びに野鼠由来レプトスピラの分子生物学的性状。日本薬学会第121年会（札幌）2001年3月29日
3. 増澤俊幸、鈴木克枝、今井康之、川端寛樹、小泉信夫、角坂照貴、後藤郁夫、中村正治、平良勝也、Sharon Y. A. M. Villanueva、渡邊治雄、柳原保武：日本を含む東アジアにおけるウイルス病病原体レプトスピラの血清学的、遺伝学的同定。第38回レプトスピラシンポジウム（岡山）2001年4月1日
4. 余勤、潘銘正、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、中村正治、平良勝也、今井康之、増澤俊幸 台湾、並びに沖繩由来野鼠血清のライム病ボレリアの抗体価の検討。第38回レプトスピラシンポジウム（岡山）2001年4月1日
5. 神徳好美、角坂照貴、邱旭光、ザヒド・イスラム、青柳武法、近藤繁生、伊藤誠、木村英作 自然界のネズミにおける *Strongyloides ratti* の大腸寄生と多数寄生について。第57回日本寄生虫学会西日本支部大会（岐阜）2001年10月26日
6. 増澤俊幸、余勤、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、後藤郁夫、中村正治、

秋山和夫 レプトスピラ保有野鼠の
疫学的全国調査(中間報告).
第39回レプトスピラシンポジウム
(東京)2002年4月7日(予定)

7. 増澤俊幸、橋本直弥、今井康之、角坂
照貴、小泉信夫、川端寛樹、中村正治、
平良勝也 沖縄由来野鼠より見出され
たライム病関連ボレリアの性状と分類.
第39回レプトスピラシンポジウム(東
京)2001年4月7日(予定)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症）
分担研究報告書

沖縄の野鼠由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的研究

研究分担者 角坂照貴 愛知医科大学・医学部・講師
主任研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授
研究分担者 川端寛樹 国立感染症研究所・細菌部・研究員
研究分担者 小泉信夫 国立感染症研究所・細菌部・研究員
研究協力者 藤田博巳 大原総合病院・大原研究所・研究員
研究協力者 中村正治、平良勝也 沖縄県衛生研究所

研究要旨

亜熱帯地域に属する沖縄県では 1999 年夏期に 15 例のレプトスピラ病の集中発生が見られた。そのため、2000 年 10 月に沖縄県八重山諸島と沖縄本島において野鼠からのレプトスピラの分離を試み 3 株を分離した。引き続き行われた 2001 年 11 月の野鼠捕獲調査により沖縄本島で 7 株を分離したので合わせて報告する。

2000 年、2001 年に野鼠から分離された 10 株のレプトスピラは、FlaB 遺伝子解析および顕微鏡凝集試験により、7 株は *Leptospira borgpetersenii* (血清型 javanica)、1 株は *Leptospira interrogans* (血清型 hebdomadis)、1 株は *Leptospira interrogans* (血清型未同定) と同定された。2001 年に分離された 1 株は、*Leptospira borgpetersenii* (血清型 castellanis) である可能性が示唆された。

研究目的

国内のレプトスピラ感染による死亡例は、生活様式の変化等により患者数は減少しているが、今なお毎年死亡症例が報告されている。特に熱帯、亜熱帯地域では患者が多発し早期診断法、予防法の確立が急がれている。このような状況の中で、1999 年 9 月には沖縄県八重山諸島において、十数人のレプトスピラ病が発生した。沖縄は亜熱帯気候に属し、これまでに他県には見られない血清型のレプトスピラが確認され、現在も散発的な患者発生が続いている。沖縄の患者および住民の抗体調査から、県内では血清型 icterohaemorrhagiae、血清型 autumnalis、血清型 australis、血清型 hebdomadis の他に、他県ではあまり見られない血清型 pyrogenes が特に多く存在す

る可能性も示されている。

著者らはこうした他県とは異なる血清型が見られる沖縄のレプトスピラの分布実態を調査するため本島、患者が多発した八重山諸島に加え、2001 年度には住民の抗体保有率が高いとされる伊是名島でも保菌動物である野鼠を捕獲し、レプトスピラの分離を試みた。2000 年と 2001 年の調査期間中に捕獲した野鼠 220 匹中 10 匹よりレプトスピラを分離し、血清学的、遺伝学的解析を行った。

材料・方法

1. レプトスピラの分離・培養法

2000 年の調査では野鼠の腎臓、血液から、2001 年は腎臓から Korthof 培地で分離・培養した。

2. 使用菌株

沖縄県で捕獲された野鼠から分離された10株の分離株を使用した。

3. レプトスピラ抗血清の作製法

Salinem 株 (血清型 pyrogenes)、Moskva V 株 (血清型 grippotyphosa)、沖縄由来 OP77 株、OP81 株、OP83 株、OS39 株、OR36 株に対するウサギ抗血清を作製した。レプトスピラ培養液を 56°C、30 分不活性化し抗原液とした。これをウサギ (日本白色家兔) 静脈内に 5 日間隔で 3 回接種、免疫した。2001 年に分離された 7 株に対する抗血清は現在作成中である。

4. FlaB および 16S rRNA 遺伝子配列解析

レプトスピラ抽出 DNA を鋳型として、特異的プライマーを用い、それぞれの遺伝子の PCR 反応を行った。PCR で増幅した増幅産物を鋳型として、直接サイクルシーケンス反応を行い、塩基配列を決定した。

5. 顕微鏡凝集試験 (MAT)

96 穴丸底プレートに PBS で倍々希釈したウサギ抗血清と被検レプトスピラ培養液を加え 37°C、2 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡にて観察し、菌体の 50% 以上の凝集を示す最大希釈倍率を力価とした。

6. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による制限酵素長鎖断片のパターン解析 (large restriction fragment pattern, LRFP)

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し、ゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム、Proteinase K 処理後、制限酵素 Not I で 37°C、1 晩消化した。このゲルを 200V、パルスタイム 10 秒 5 時間、30 秒 12 時間、60 秒 7 時間の計 24 時間、または 200V、パルスタイム 5 から 100 秒へのランプで 30 時間の条件下でパルスフィールドゲル電気泳動した。

結果

1. 野鼠からのレプトスピラ分離状況

沖縄県八重山諸島 (石垣島、西表島)、沖縄本島 (那覇市、島尻郡、名護市、大宜味村、国頭村、東村)、伊是名島の漁港、豚舎、サトウキビ畑、宅地の石垣等でシャーマントラップおよび生け捕り用金網カゴにより捕獲されたドブネズミ *Rattus norvegicus* 33 匹、クマネズミ *Rattus rattus* 14 匹、ジャコウネズミ *Suncus murinus*、113 匹、オキナワハツカネズミ *Mus caroli* 45 匹、ワタセジネズミ *Crocidura watasei* 14 匹、マングース *Herpestes javanicus* 1 匹から分離を試みた。

220 匹が捕獲され、このうち本島で捕獲された野鼠 10 匹 (*Rattus norvegicus*, *Rattus rattus*, *Mus caroli*, *Suncus murinus*) の腎臓より 10 株のレプトスピラが分離された (Table 1)。

2. FlaB 遺伝子配列に基づく種の同定

FlaB-PCR によりすべての分離株から約 790bp の増幅産物が確認された。増幅産物の塩基配列に基づく系統樹を作成した。野鼠分離株のうち OR63 株、OS39 株は *L. borgpetersenii* に属する Poi 株、Veldrat Bataviae 46 (VB46) 株とクラスタを形成し、*L. borgpetersenii* と同定された。

3. MAT に基づく血清型の同定

OM108 株は α -Akiyami B との強い反応を示し *L. interrogans* 血清型 hebdomadis と同定された。野鼠分離株 OS39 に対する α -OS39 は、FlaB 遺伝子解析にて近傍でクラスタを形成していた *L. borgpetersenii* に属する VB 46 株 (血清型 javanica)、並びに野鼠由来 OS39 株、OR63 株、OM51 株、OR67 株、OS80 株、OR113 株、OR116 株と反応したことから、OS39 株、並びに OR63 株、OM51 株、OR67 株、OS80 株、OR113 株、OR116 株は血清型 javanica と同定された。一方、OR36 株は試験した何れの抗血清型とも反応せず、また α -OR36 は試験した何れの株

Table 1 沖縄県の野鼠から分離されたレプトスピラの遺伝子種および血清型

分離株	捕獲地	種類	分離臓器・培地	種	血清型
OR 63	那覇市・漁港	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OS 39	名護市源河・サトウキビ畑	<i>Suncus murinus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OM 51	名護市源河・サトウキビ畑	<i>Mus caroli</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OR 67	名護市源河・養鶏場	<i>Rattus rattus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OS 80	名護市源河・豚舎	<i>Suncus murinus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OR113	名護市後原・河原	<i>Rattus rattus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OR116	名護市稲嶺・サトウキビ畑	<i>Rattus rattus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i>	javanica
OM108	大宜味村大保・サトウキビ畑	<i>Mus caroli</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	hebdomadis
OR 36	名護市・漁港	<i>Rattus norvegicus</i>	腎臓・Korthof	<i>L. interrogans</i>	未同定
OM130	島尻郡大里村・サトウキビ畑	<i>Mus caroli</i>	腎臓・Korthof	<i>L. borgpetersenii</i> ?	castellonis?

も凝集させず、血清型は同定できなかった。
OM130 株は血清型 castellonis 抗血清と強く反応し、*L. borgpetersenii* (血清型 castellonis) と推定された。これまで沖縄の患者 1 名が本血清型に起因するレプトスピラ病と診断されているが、分離例は初めてである。

4. LRFP 解析による血清型の確認

MAT の結果を基に、血清型の同定された分離株とその血清型の基準株を並べて泳動した。血清型 hebdomadis と同定された OM108 株は Akiyami B 株 (血清型 hebdomadis) と類似したパターンを示した。血清型 javanica と同定された株群は、それぞれ同一のパターンを示した。

今回、著者らの LRFP を Baranton らのデータと比較解析を試みたが、同一血清型に属す株間でも本実験で得られたパターンと違いが見られた。これは、PFGE の泳動条件、すなわち電圧、電流、泳動時間、変動的なパルス時間、使用するアガロースや泳動装置の違い等で誤差が発生してしまうこと、また、同一血清型に属す株間でもプラスミドの有無によりパターンが変わる可能性、さらには血清型以上に LRFP が多様であり、ひとつの血清型に属す株間でのパターンが異なる可能性が理由として考えられる。

考察

沖縄県内で分離された野鼠分離株は、FlaB 遺伝子解析により *L. interrogans*、*L. borgpetersenii* と同定された。それらは MAT の結果より、血清型 javanica が 7 株、血清型 hebdomadis が 1 株、血清型未同定 (OR36 株) が 1 株であった。さらに、当初は同定が困難であった OM130 株は、その後の試験で *Leptospira borgpetersenii* (血清型 castellonis) で有る可能性が示唆された。OR36 株は試験した何れの抗血清型とも反応せず、また α -OR36 は試験した何れの株も凝集させず、血清型は同定できなかった。

野鼠から多くの株が分離された県北部地域のイノシシの抗体調査では、他の株に加えて野鼠から分離された血清型 javanica、血清型 hebdomadis の存在が示されている。血清型 javanica は、今回の調査結果でも示されるように、県内の動物に広く分布し、また、人からの分離例も知られる沖縄県特有の血清型と考えられていたが、今回の調査の過程で北海道の野鼠から血清型 javanica 株を見出したことから、この血清型は沖縄固有というわけでもない可能性が示された。血清型 hebdomadis は、沖縄を含め、国内に広く分布していると考えられる。

沖縄県環境衛生研究所の調査によると、沖縄本島の抗体保有者は血清型 pyrogenes に集中し、石垣市では血清型 australis、

血清型 icterohaemorrhagiae が多いことが報告されている。今回、野鼠より多く分離された血清型 javanica は、県内において患者から分離された例も知られているが、その詳細については検討されておらず、その実態は不明である。

また、現在日本で使用されている血清診断には hebdomadis、icterohaemorrhagiae、autumalis、australis、canicola、pyrogenes など日本で流行が予想される血清型株を抗原として使用されている。しかし、沖縄の患者、野鼠から分離された血清型 grippotyphosa、血清型 castellanis 並びに血清型 javanica には全く対応がなされていない。今後はこれら血清型に対する対策も視野に入れ、MAT の他に血清型特異的ではない検査法によるレプトスピラ抗体保有状況の調査も必要である。

研究発表

発表論文

1. Toshiyuki Masuzawa, Ming-Jeng Pan, Teruki Kadosaka, Midori Kudeken, Nobuhiro Takada, Yasuhiro Yano, Yasuyuki Imai, Yasutake Yanagihara: Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen islands. *Microbiol. Immunol.*, 44, 1003-1009 (2000)
 2. Toshiyuki Masuzawa, Louella A. Dancel, Masaki Miyake, Yasutake Yanagihara: Serological analysis of human Leptospirosis in the Philippines. *Microbiol. Immunol.*, 45, 93-95, (2001)
 3. Nobuhiro Takada, Hiromi Fujita, Yasuhiro Yano, Fuhito Ishiguro, Hiromichi Iwasaki, Toshiyuki Masuzawa. First record of tick-borne pathogens, *Borrelia*, and spotted fever group rickettsiae in Okinawajima island, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 163-165, (2001)
 4. Masuzawa T, Pan MJ, Yu Q, Kadosaka T, Imai Y, Yanagihara Y. Negative incidence of Lyme disease-related *Borrelia* spp. in Alishan, Taiwan. *Microbiol. Immunol.*;45:387-91 (2001)
- 学会発表
1. 鈴木克枝、増澤俊幸、川端寛樹、柳原保武、今井康之、渡邊治雄：フィリピン患者由来レプトスピラの血清学的、遺伝学的同定。第 83 回日本細菌学会関東支部総会（東京）、抄録 p.55、2000 年 11 月 21 日
 2. 増澤俊幸、鈴木克枝、川端寛樹、渡邊治雄、今井康之、柳原保武。フィリピン患者、並びに野鼠由来レプトスピラの分子生物学的性状。日本薬学会第 121 年会（札幌） 2001 年 3 月 29 日
 3. 増澤俊幸、鈴木克枝、今井康之、川端寛樹、小泉信夫、角坂照貴、後藤郁夫、中村正治、平良勝也、Sharon Y. A. M. Villanueva、渡邊治雄、柳原保武：日本を含む東アジアにおけるウイルス病病原体レプトスピラの血清学的、遺伝学的同定。第 38 回レプトスピラシンポジウム（岡山） 2001 年 4 月 1 日
 4. 余勤、潘銘正、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、中村正治、平良勝也、今井康之、増澤俊幸 台湾、並びに沖縄由来野鼠血清のライム病ボレリアの抗体価の検討。第 38 回レプトスピラシンポジウム（岡山） 2001 年 4 月 1 日
 5. 増澤俊幸、余勤、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、後藤郁夫、中村正治、秋山和夫 レプトスピラ保有野鼠の疫学的全国調査（中間報告）。

第 39 回レプトスピラシンポジウム
(東京)2002 年 4 月 7 日 (予定)

6. 増澤俊幸、橋本直弥、今井康之、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、中村正治、平良勝也 沖繩由来野鼠より見出されたライム病関連ボレリアの性状と分類.
第 39 回レプトスピラシンポジウム(東京)2001 年 4 月 7 日 (予定)

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

宮城県および名古屋港で捕獲した野鼠のレプトスピラ保有状況と分離株の性状解析

分担研究者	後藤郁夫	名古屋検疫所・検疫専門官
分担研究者	角坂照貴	愛知医科大学・助手
研究協力者	小泉信夫	国立感染症研究所・細菌部・研究員
研究協力者	秋山和夫	宮城県塩釜保健所・食品衛生指導専門監 (前 宮城県保健環境センター)
研究協力者	蔦宗俊明	名古屋検疫所・所長
研究協力者	品川道夫	名古屋検疫所・衛生・食品監視課長
研究協力者	柳井慶明	名古屋検疫所・試験検査室長
研究協力者	中野義則	名古屋検疫所・衛生調査係長

研究要旨

1999年9月、宮城県では1983年以来となるレプトスピラ症による死亡例が報告された。宮城県は、過去に多数のレプトスピラ症患者が発生していた地域であり、現在の野鼠におけるレプトスピラの保有状況を調査する目的で、宮城県で野鼠を捕獲してレプトスピラの分離を行った。名古屋港では、前年に引き続き、野鼠からレプトスピラの分離を行い、あわせて回帰熱およびペストの媒介ベクターの保有状況を調査した。

宮城県内で捕獲した野鼠 20 頭から 8 株のレプトスピラを分離し（分離率 40.0%）、野鼠においては、未だ高率にレプトスピラを保有していることを確認した。分離したレプトスピラは顕微鏡凝集試験およびバルスフィールド電気泳動解析により、5 株は血清型 *icterohaemorrhagiae*、2 株は血清型 *autumnalis* と同定された。残りの 1 株は現在解析を継続中である。

名古屋港においては、捕獲した野鼠 130 頭からレプトスピラを 1 株分離した（分離率 0.8%）。名古屋港の港湾地域でも野鼠のレプトスピラ保有を確認した。分離したレプトスピラは、*flaB* 遺伝子解析により *Leptospira interrogans*（血清型は未同定）と同定された。また、回帰熱およびペストを媒介するベクターは見出されなかった。

A. 研究目的

ワイル病、秋疫などに代表されるレプトスピラ症は、げっ歯類などの野生動物や家畜などの保菌動物の排尿等で汚染された水から経皮的に感染する人獣共通の細菌感染症である。

1970年代までは年間数十人の死亡例が報告されていたが、近年では農業の機械化や衛生環境の向上に伴い急激に減少してきた。レプトスピラ症は、感染症新法における届出義務のある疾患ではないことから、近年の発生状況を把握することは困難であるが、1999年には2例の死亡例、同年沖縄県八重山諸島での集団発生例や2000年の鳥取西部地震による

井戸水汚染が原因と考えられるレプトスピラ症が報告されている。

宮城県はかつて、ワイル病（重症型レプトスピラ症）が多発した地域で、1959年から1987年までの届出患者数は2,346名（死亡者163名）に達している。1959年には患者822名（死亡者35名）にも及ぶ大流行があり、患者の発生は県内市町村の75%にも達した。しかし、1975年以降は、予防対策が講じられ患者数は減少し、1987年に1名の患者が確認されたのみであった。しかし、1999年9月に農作業が原因と思われるレプトスピラ症による死亡例が報告され、2001年8月には川釣りが原因と思われ

るレプトスピラ症の患者が報告された。農作業の機械化などにより患者数は激減したが、未だに患者発生があり、水辺でのレジャーなどで感染する危険も存在する。また、1994年以降は、野鼠のレプトスピラ保有状況調査は実施されていないため、現在の野鼠のレプトスピラ保有状況は明確でない。

そこで今回、我々は宮城県で野鼠の捕獲を実施し、野鼠におけるレプトスピラ保有状況を明らかにする。

名古屋港では、前年に引き続き港湾地域で野鼠を捕獲し、レプトスピラの分離を行う。現在の世界規模での交通網の拡大により、野鼠を介して海外から未知血清型レプトスピラが侵入することも危惧されていることから、野鼠の海外からの侵入監視とレプトスピラの保有状況を明らかにする。さらに、回帰熱およびペストを媒介するベクターの検索も行う。

現在、日本で用いられているレプトスピラ血清診断試薬 (MCAT) は血清型 *icterohaemorrhagiae*、*autumnalis*、*hebdomadis*、*australis*、*pyrogenes*、*canicola* の 6 種を抗原として、ワクチンもこれらに準ずる血清型の不活化菌体を含むものが使用されている。血清診断やワクチンは血清型特異的であることから、これ以外の血清型レプトスピラには対応できない。現在、1960年代になされた調査に基づき流行血清型が定義されているが、現在の状況については全く不明である。そこで日本に分布するレプトスピラ血清型を明らかにするために、宮城県および名古屋港の港湾地域で野鼠を捕獲し、当該地域でのレプトスピラの保有状況を明らかにする。

B. 研究方法

1. 調査地

宮城県では、かつてのレプトスピラ症発生地である栗原郡、遠田郡、玉造郡、宮城県および古川市の山林、休耕田、民家などに捕鼠器を設置して、野鼠を捕獲した。また、仙台検疫所の調査によりレプトスピラ保有野鼠が確認された塩釜港

でも野鼠の捕獲を行った。

名古屋港では、港湾地域を 5 地区に分け、各地区の埠頭および倉庫周辺に捕鼠器を設置して、野鼠の捕獲を行った。

また、外部事業所から当所に持ち込まれた名古屋市街地で捕獲した野鼠についても調査を実施した。

2. レプトスピラの分離および培養法

レプトスピラの分離には、野鼠の腎臓乳剤を Korthof 培地に接種し、30℃にて 3 ヶ月間培養した。この間 1 ヶ月ごとに暗視野顕微鏡でレプトスピラ増殖の有無を調べた。

3. ウサギ抗血清の作製法

レプトスピラ培養液を 56℃、30 分間不活化し抗原液とした。これをウサギ (日本白色家兎) の静脈内に 5 日間隔で 3 回接種して免疫した。

4. 鞭毛遺伝子 *flaB* および 16S rRNA 遺伝子配列解析

レプトスピラ抽出 DNA を鋳型に特異的プライマーを用いて、遺伝子の PCR 反応を行った。PCR で増幅した遺伝子産物を鋳型として、直接サイクルシーケンシング反応を行い、塩基配列を決定した。

5. 顕微鏡凝集試験 (MAT)

96 穴丸底プレートに PBS で倍々希釈したウサギ抗血清と被検レプトスピラ培養液を加え 37℃、2 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡にて観察し、菌体の 50% 以上の凝集を示す最大希釈倍率を力価とした。

6. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による制限酵素長鎖断片のパターン解析 (large restriction fragment pattern, LRFP)

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し、ゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム、Proteinase K 処理後、制限酵素 *Not I* で 37℃、1 晩消化した。このゲルを 200V、