

20020626

厚生労働科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の
実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究

平成 14 年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸

平成 15 年 (2003 年) 3 月

目次

I. 総括研究報告書

- 回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
増澤俊幸（静岡県立大学・薬学部・助教授）

II. 分担研究報告書

1. ライトサイクラーを用いた *Yersinia pseudotuberculosis* および *Yersinia pestis* の微量迅速・鑑別診断法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16
神山恒夫（国立感染症研究所・獣医科学部・室長）
2. レプトスピラ感染症診断キットの評価、野鼠を保有体とする人畜共通感染症に関するフィールド調査、輸入スピロヘータ感染症の監視、レプトスピラ・ボレリア感染症における新規の診断抗原・ワクチン抗原開発及び遺伝学的ツールの開発研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
川端寛樹（国立感染症研究所・細菌部・研究員）
3. 名古屋市のネズミ類由来レプトスピラ調査・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）
4. 静岡県天竜川流域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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 35
後藤郁夫（名古屋検疫所・検疫専門官）

回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査 及び迅速診断法の確立に関する研究

主任研究者 増澤俊幸 静岡県立大学・薬学部・助教授

研究要旨

平成 13 年度までに、北海道から九州、沖縄に至る検疫所、衛生研究所、大学からなる全国的な野鼠のレプトスピラ保有状況調査体制の確立を行った。また、本年度はかつてのレプトスピラ流行地である静岡県、及びイヌからレプトスピラ遺伝子が高頻度に検出された宮崎県、さらには交通の要所である横浜市内で調査を実施した。本年度は全調査を通じて野鼠 789 匹からレプトスピラ 8 株（1.0%）を分離した。分離レプトスピラは日本に土着の秋季レプトスピラ病病原体血清型 autumnalis（秋疫 A）、hebdomadis（秋疫 B）、australis（秋疫 C）の他に、本調査でこれまで名古屋、沖縄、宮城で見出してきた未同定血清型株を本年度も名古屋と北海道十勝で分離した（分担者 角坂、後藤、川端報告書参照）。これら未同定血清型を含むこれまで得られた血清型同定が不能な株については、オランダ王立熱帯研究所に送付し、同定を進めている。予備的結果ながら、これまで日本にはその存在が予想できなかった血清群 Javanica 血清型 poi、血清群 Ballum 血清型 arborea または guangdon または castellonis の存在を示唆する結果が得られつつある。最終的な血清型の同定完了の後には、これらの既存の血清型に加えてこの新たな血清型を含む血清診断システムの構築が必要となることを示した。

新たなレプトスピラ血清型推定法として、ジャイレース B 遺伝子 *gyrB* の配列解析法を確立し、本法が鞭毛遺伝子、16SrRNA 解析よりも血清型の推定に適すことを明らかにした。

ハムスターから小学生男児がレプトスピラの感染を受け重症化した症例をうけて、平成 13 年度末に輸入ジャンガリアンハムスター（チェコ産、台湾産）144 匹の腎臓からのレプトスピラ検出と血清抗体検出を行った。さらに本年度は追加して、チェコ産ゴールデンハムスター 23 匹、チェコ産ジャンガリアンハムスター 27 匹、台湾産ゴールデンハムスター 47 匹、国内産ゴールデンハムスター 47 匹について、腎臓培養を行ったが、計 288 匹はすべてレプトスピラ陰性であった。実験動物のゴールデンハムスターに高い致死活性を示すレプトスピラ強毒株を輸入ペットのジャンガリアンハムスター腹腔内に接種したが、2 週間の観察期間中病態は示さず、また解剖後組織と尿からレプトスピラは検出せず、この種のハムスターはレプトスピラに対して感受性が低いことが示唆された。しかしながら、ペットとして供給されるハムスター種は多岐にわたるため、様々な種類のハムスターとレプトスピラ株の組み合わせの中には、病態を引き起こすものや致命的なもの、あるいは保有体化し尿中にレプトスピラを排出するものがないとは断

言できない。現時点では、ハムスターは一般のげっ歯類と同様に、保有体化する可能性を考慮して、野生動物との接触を避けて衛生的環境で飼育することが肝要である。

さらには、ハムスターからの感染が疑われた症例では、市販のラテックス凝集試験に基づき血清反応陽性の診断結果がくだされていた。本血清診断キットの信頼性に疑問が生じたため、国内で入手可能なレプトスピラ検査キットの評価を行った。4種類の市販検査キット Dipstick、ELISA、RPLA（ラテックス凝集試験）、MCAT を用いて検討を行い、Dipstick、ELISA は国内流行血清型を用いた検査キット（RPLA、MCAT）と比較して感度が低いこと、ラテックス凝集試験法による抗体検出は他の3種類のキットと比較して特異性が低く、特に偽陽性を生じやすいこと、いずれのキットでも偽陰性の頻度は低いことを明らかにした（分担者 川端報告書参照）。

2002年6月から8月に米国ニューヨーク州山中で開催された国際キャンプに参加した日本人高校生2名を、ライム病の輸入症例として診断した。これら患者は、流行地での野外活動中に感染したものと考えられるレプトスピラ感染症例において、PCR法による早期診断に成功した。本法が感染早期診断として有用であることが示された。ボレリアの感染機構解明および新規ワクチン開発のための遺伝学的ツール開発が可能であることを示した。今後梅毒などでも見られる長期の慢性感染機構、特定の病態解明が期待できる。病原性レプトスピラの新規診断抗原、ワクチン抗原の探索を2通りの方法で行い、3種類の候補を見出した。これら抗原は病原レプトスピラに対して感染防御活性を示していることから、今後新規の組換え体ワクチンとしての可能性が強く期待される（分担者 川端報告書参照）。

ペスト菌は、動物由来感染症の中でも齧歯類由来の重要な、また生物テロの材料としても考えられる非常に危険度の高い病原細菌である。他のエルシニア感染症との鑑別を含め、迅速に対応（診断、対策等）することが求められている。本研究では、*Y. pseudotuberculosis* 特異的遺伝子の *inv* および *Y. pestis* 特異的遺伝子の *3a* をプライマーとしたライトサイクラーによる Real-time PCR 法を検討した。*inv* は *Y. pseudotuberculosis* および *Y. pestis* を検出し、*3a* は *Y. pestis* のみを検出することより、両者の鑑別診断が可能であると考えられた。また、本ライトサイクラーの系では、一時間程度で結果が得られ、また、検出感度も通常の PCR よりも約 1000 倍程度の感度を持つことから、非常に有用な迅速診断法となると考えられた（分担者 神山報告書参照）。

研究分担者

神山恒夫 国立感染症研究所・獣医科学部室長
川端寛樹 国立感染症研究所・細菌部・研究員
角坂照貴 愛知医科大学・講師
後藤郁夫 名古屋検疫所・検疫専門官

研究協力者

小泉信夫（国立感染症研究所）、加邊純雄（名古屋検疫所）、藤川和生、佐久本微笑、中溝芳行（小樽検疫所）、望月靖、木田中、石橋治（新潟検疫所）、

田中義枝、長谷山路夫（成田空港検疫所）、片山敦、小林順一（名古屋検疫所清水支所）、大友雅人（名古屋検疫所四日市検疫所支所）、多賀賢一郎、林昭宏、勝部宗幸、尾山勇一（神戸検疫所）、出水美成、河島英二（広島検疫所）、高橋直樹、黒木志郎（福岡検疫所）、伊東拓也（北海道衛生研究所）、藤田博己（大原総合病院付属大原研究所）、生嶋昌子、浦辺研一（埼玉県衛生研究所）、大橋典男（静岡県立大学環境科学研究所）、川森文彦、稲吉恵、有川世乃（静岡県環境衛生研究所）、高田伸弘、矢野泰弘（福井医科大学）、石畝史（福井県衛生研究所）

A. 研究目的

レプトスピラ症、回帰熱、ペストはいずれもげっ歯類を保有体とする細菌感染症である。これらは近年日本では患者が激減した、あるいは全く報告されない感染症である。しかし、これらの感染症は世界的にはきわめて重要であり、未だ多くの患者が報告され、重大な被害をもたらしている。レプトスピラ (*Leptospira*) は九州大学の稲田、井戸により 1915 年に世界に先駆けて日本で患者より初めて発見され、純培養された。古くから日本ではレプトスピラ病は秋疫、用水病などの名で呼ばれる風土病として恐れられていた。1970 年代まで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等の農業様式や生活様式の変化に伴い、急激に減少した。しかし、その一方で 1999 年に沖縄県八重山諸島で十数名が川などで感染した事例や、1998 年にアメリカで大雨後の増水した湖で行われたトライアスロン大会に参加した多くの選手が感染した事例もあり、水辺でのレジャーやスポーツ時の感染が懸念されている。

レプトスピラの分類、同定には血清学的手法として古典的な顕微鏡凝集試験 (Microscopic agglutination test : MAT) が標準的に用いられてきたが、これらは生菌を必要とし、また 250 種の血清型の基準株を準備しなくてはならないことから、日常的に実施するのは容易ではない。一方、今

日では分子生物学的分析技術の発展により、全ゲノムの制限酵素切断長鎖断片のパターン (Long restriction fragment pattern : LRFP) 解析による分離株の分析方法もとり入れられているが、その解析には相当量の菌体の培養が必要である。微量な試料からの血清型推定法としては、16SrRNA 遺伝子系統学的分類や鞭毛遺伝子 *flaB* の系統解析があるが、種のレベルでの同定はできても、血清型まで同定することはできない。一方、トポイソメラーゼ B 遺伝子 *gyrB* は 16SrRNA 遺伝子と同様に全ての生物に必要な house keeping な遺伝子であるが、16SrRNA 遺伝子が 5000 万年で 1% の塩基置換が起こるのに対して、*gyrB* では 100 万年で 0.7~0.8% の塩基置換が起こるとされている。このため、*gyrB* は 16SrRNA 遺伝子よりも 35~40 倍進化のスピードが速く、より多様性に富むと考えられている。*gyrB* による系統分類はこれまでに *Mycobacterium*、*Salmonella*、*Shigella*、*Escherichia coli* などについて行われており、その有用性が明らかにされている。そこで 16srRNA 遺伝子分類より細分類できると予想されるため血清型の推定が可能と期待される。

現代の世界規模の交通網の拡大により、保有体げっ歯類を介して海外からこれら病原体の侵入が危惧されている。そこで本研究では港湾、並びに都市部で野鼠の捕獲を実施し、これら野鼠の当該病原体の保有状況を明らかにする。また、米国よりペットとして輸入されるプレーリードッグ等のペスト菌保有状況を調べ、侵入のリスクを疫学的に分析するとともに、リスクに応じた侵入防止対策を検討する。さらに、疫学調査と並行して分離された病原体について、血清学的、分子生物学的性状解析を行い、その由来を追跡し進入経路を解明し、防疫対策の確立に資する。分離された病原体株をもとに、迅速な血清診断法、遺伝子診断法、予防ワクチンの開発研究、さらには病原性発現の分子機構の解析を行う。

B. 研究方法

1. レプトスピラ、および回帰熱、ライム病ボレリアの分離培養。

研究協力者の協力のもと全国的な野鼠の捕獲を行った。また、本年度はかつてのレプトスピラ流行地である静岡県の天龍川流域（浜北市春野町、掛川市）、富士山周辺（富士市、裾野市）及び最近イヌのレプトスピラ病が報告された宮崎県（宮崎市）で調査を実施した。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1～3カ月間培養した。この間1カ月ごとに暗視野顕微鏡で菌の増殖の有無を調べた。

2. レプトスピラ *flaB* および *gyrB* (トポイソメラーゼⅡ遺伝子) 配列解析に基づくレプトスピラ遺伝種の同定。

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て、PCR 反応を行った。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。*gyrB* の解析には *Escherichia coli*、*Pseudomonas putida*、*Bacillus subtilis* のジャイレース B のアミノ酸配列をもとに設計されたユニバーサルプライマー UP1TL、UP2rTL を用いた。塩基配列は Clustal W 法により整列し、Neighbor-Joining 法により系統樹を作製し、株の遺伝種の同定、血清型の推定を行った。

3. 輸入ハムスターのレプトスピラ保有調査。

成田空港検疫所の協力のもと輸入ならびに国内産ハムスターを買い上げ、レプトスピラ保有の有無を腎臓培養により検討した。平成 13 年度末に輸入ジャンガリアンハムスター（チェコ産、台湾産）144 匹の腎臓からのレプトスピラ検出と血清抗体検出を行った。本年度はさらにチェコ産ゴールドンハムスター 23 匹、チェコ産ジャンガリアンハムスター 27 匹、台湾産ゴールドンハムスター 47 匹、国内産ゴールドンハムスター 47 匹、計 144 匹について腎臓培養を行った。

4. 輸入ハムスターのレプトスピラ感受性試験。

ペット販売業者より購入したジャンガリアンハムスターに（性別不明、体重 10～15g）にレプトスピラ強毒株 Shibaura Line1 株 10～10⁵ 個を腹腔内接種し、その生残を 2 週間観察した。生存したハムスターの尿遠心沈渣より DNA を抽出し、鞭毛遺伝子を標的とした PCR によりレプトスピラ遺伝子の検出を行った。また、解剖し、腎臓、肝臓、血液を Korthof 培地に接種し、1 カ月間レプトスピラの培養検出をした。

倫理面への配慮

動物に対しては「動物の保護と管理に関する法律」に基づき取り扱いを行った。動物からの材料の採取等を行う場合は国立感染症研究所実験動物取扱規程に準じて行った。

C. 研究結果

1. レプトスピラ分離成績と種、血清型の同定

表 1、表 2 に野鼠からのレプトスピラ分離結果を示した。参考に表 3 には昨年調査結果を示した。2002 年の調査では、野鼠 789 匹から北海道十勝で 1 株、名古屋市で 6 株、静岡県天竜川周辺で 1 株、計 8 株のレプトスピラを分離した(表 1)。そのうち名古屋市内調査により得られた AC28/02 株は十分な培養が得られず、後の解析は行えなかった。名古屋市の調査では 2002 年の培養陽性率が 2.9%、2001 年では 7.4%でありほぼ同程度の結果が得られた。このことから名古屋市に生息する野鼠は一定の割合でレプトスピラを保有しており、その割合も他の地域よりも高いことが明らかになった。十勝と天龍川の調査は今年新たに実施したが、それぞれ 1 株のレプトスピラを分離した。

表1 野鼠からのレプトスピラ分離状況（2002.1～2003.3）

2002年	捕獲調査地名	担当部署	捕獲数(匹)	培養陽性数(匹)	培養陽性率(%)
北海道	小樽港	小樽検疫所	104	0	0
	稚内港	小樽検疫所	12	0	0
	釧路港	小樽検疫所	8	0	0
	留萌港	小樽検疫所	45	0	0
	花咲港	小樽検疫所	19	0	0
	十勝	北海道衛生研究所	22	1	4.5
	釧路市	北海道衛生研究所	6	0	0
新潟県	新潟港	新潟検疫所	35	0	0
千葉県	成田市	成田空港検疫所	23	0	0
埼玉県	さいたま市	埼玉県衛生研究所	10	0	0
神奈川県	横浜市	国立感染症研究所	82	0	0
静岡県	清水港	清水検疫所	16	0	0
	富士山調査 (富士市、裾野市)	静岡県立大学	21	0	0
	天龍川流域 (掛川市、春野町、浜北市)	静岡県立大学	56	1	2
愛知県	名古屋市	愛知医科大学	100	6	6.0
	名古屋港	名古屋検疫所	71	0	0
三重県	四日市港	名古屋検疫所	6	0	0
兵庫県	神戸港	神戸検疫所	17	0	0
	淡路島	福井医科大学	24	0	0
広島県	広島港	広島検疫所	1	0	0
福岡県	博多港	福岡検疫所	56	0	0
宮崎県	宮崎市、高鍋市、 高岡町、清武市	国立感染症研究所	55	0	0
小計			789	8	1.0

表 2 野鼠から分離されたレプトスピラ(2002.1~2003.3)

分離株名	野鼠の種類	捕獲場所	種	血清型
AC13/02	<i>Rattus norvegicus</i>	北区金田町・大野町	<i>L.interrogans</i>	未同定
AC15/02	<i>Rattus norvegicus</i>	北区金田町・大野町	<i>L.interrogans</i>	未同定
AC16/02	<i>Rattus norvegicus</i>	北区金田町・大野町	<i>L.interrogans</i>	未同定
AC28/02	<i>Rattus norvegicus</i>	昭和区広小路本町	不明	不明
AC37/02	<i>Rattus norvegicus</i>	名東区宝が丘	<i>L.interrogans</i>	未同定
AC02-2	<i>Rattus norvegicus</i>	北区長喜町	<i>L.interrogans</i>	autumnalis
HA14/02	<i>Apodemus speciosus</i>	十勝管内豊頃町勇洞	<i>L.interrogans</i>	未同定
SA51/02	<i>Apodemus speciosus</i>	浜北市下堀合	<i>L.interrogans</i>	australis or hebdomadis

表3 2001年度レプトスピラ分離状況

2001年	捕獲調査地名	捕獲数(匹)	培養陽性数(匹)	培養陽性率(%)
北海道	稚内港	19	0	0.0
	釧路港	2	0	0.0
	留萌市	18	0	0.0
	小樽港	122	0	0.0
	上ノ国町、木古内町、北檜山町	17	3	17.6
宮城県	塩釜港	10	4	40.0
	石巻港	11	0	0.0
	仙台港	1	0	0.0
	仙台空港周辺	1	0	0.0
	鳴子町、瀬峰町、岩出山町、 古川市、塩釜市場	20	8	40.0
新潟県	新潟港	17	0	0.0
群馬県	片品村	4	0	0.0
長野県	軽井沢町	4	0	0.0
埼玉県	さいたま市	9	0	0.0
千葉県	成田空港	41	0	0.0
静岡県	清水港	38	0	0.0
愛知県	名古屋市内	103	3	2.9
	名古屋港	144	1	0.7
三重県	四日市	2	1	50.0
福井県	丸岡町	3	0	0.0
兵庫県	淡路島	6	0	0.0
	神戸港	64	0	0.0
	神戸市六甲山地	4	0	0.0
広島県	呉港、宇品港	3	0	0.0
福岡県	博多港	15	1	6.7
鹿児島	屋久島	10	0	0.0
沖縄県	伊是名島、名護市、那覇市、 大里村、国頭村、大宜味村	153	7	4.6
計		841	28	3.3

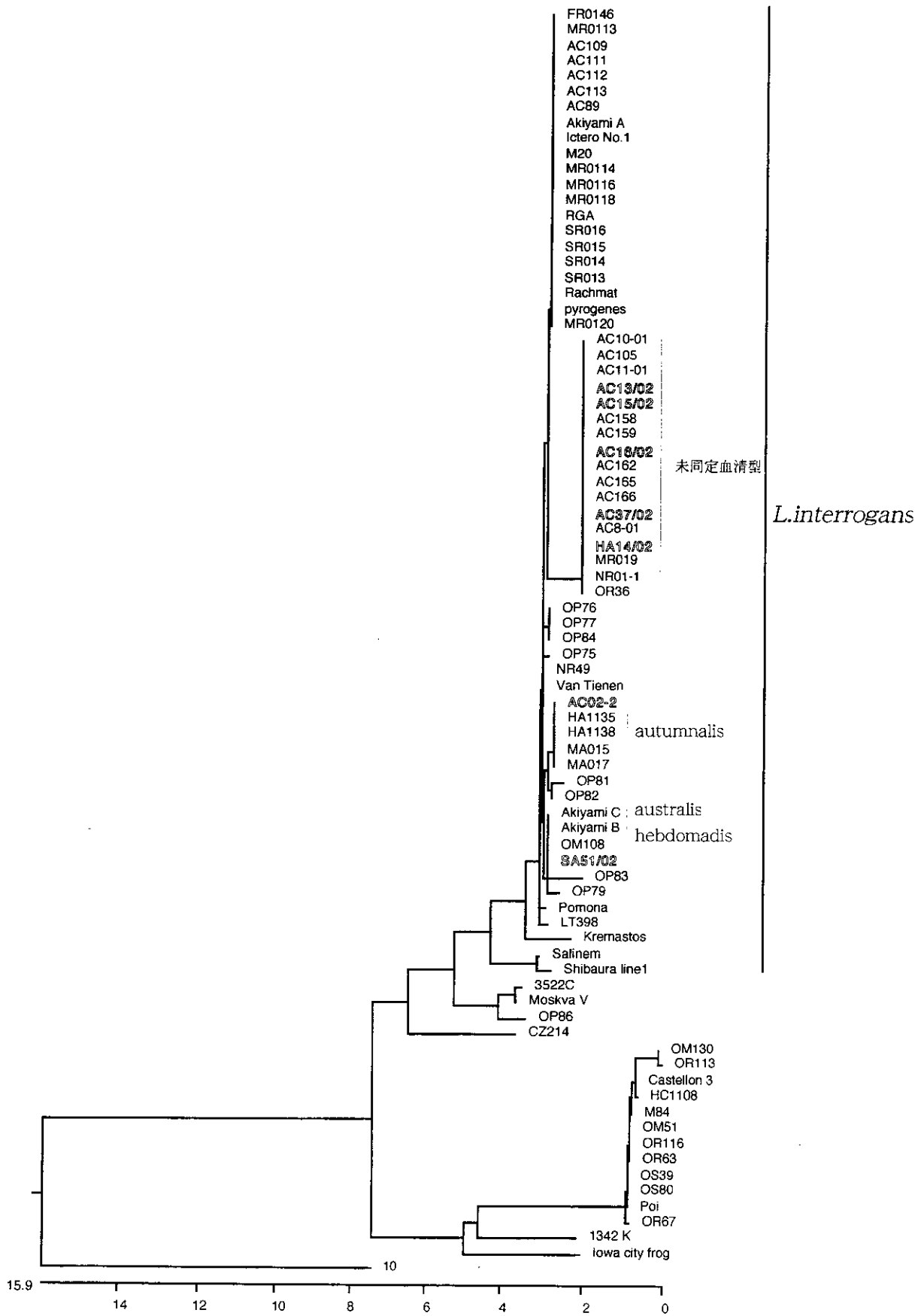


図 1. レプトスピラ分離株の鞭毛遺伝子 *flaB* 解析による系統樹
(本年度分離株は白抜きで示した。)

図 1 に昨年の分離株も含めた分離レプトスピラの *flaB* 解析による系統樹を示した。北海道十勝の野鼠から分離した HA14/02 株、天竜川調査で浜北市の野鼠から分離した SA51/02 株、名古屋市での野鼠から分離した AC13/02 株、AC15/02 株、AC16/02 株、AC37/02 株、について *flaB* のシーケンスを行った。HA14/02 株、AC13/02 株、AC15/02 株、AC16/02 株、AC37/02 株はこの一連の調査で初めて存在が明らかになった未同定血清型株と同じクラスターに属し、*L.interrogans* 属の未同定血清型であることが予測できた。またこの血清型株の特徴として増殖がかなり遅く培養が容易でないことが挙げられるが、この点についてもこの 5 株の性状は過去の株に類似した。名古屋市から分離された AC02-2 株は血清型 *autumnalis* の分離株のみからなるクラスターに属したことから、*L.interrogans* 血清型 *autumnalis* であることが予測できた。天竜川流域の浜北市から分離した SA51/02 株は *australis* の Akiyami C 株、並びに *hebdomadis* の Akiyami B 株と OM108 株と同じクラスターに属し、*L.interrogans* 血清型 *australis*、または *hebdomadis* であることが予測できた。

今回の調査で名古屋市の野鼠から分離されたレプトスピラのうち 4 株が未同定血清型であると予測できた。これまで日本で存在が明らかである 6 血清型 (*autumnalis*、*hebdomadis*、*australis*、*copenhageni*、*canicola*、*icterohaemorrhagiae*) の抗血清に対し、これら分離株は反応を示さなかったため血清型を同定できていない。2001 年の調査においてもこの未同定血清型株が多く分離された。これらの株は名古屋市において特に多く分離されていることから、何らかの保有動物を介して海外から侵入してきた可能性を当初考えた。その後この未同定血清型株が宮城と沖縄で分離され、さらに今回北海道でも分離されたことを考えると、以前より全国的に分布していたが、特有の増殖の遅さのために培

養できず、見逃されていた可能性が高い。

これまでこの調査で得られた分離株で、日本での存在が知られていないために血清型の同定に至らなかった株をオランダ王立熱帯研究所(KIT)の Dr. Hartskeerl に送り単クローン抗体パネルによる血清型の同定を依頼した。予備的検討では、昨年北海道で分離された HC1108 株は *L. borgpetersenii* 血清群 *Javanica* 血清型 *poi*、沖縄で分離された OM130 株は *L. borgpetersenii* 血清群 *Ballum* 血清型 *arborea* または *guangdon* または *castellonis* であることが示唆されている。また、多くの分離株が得られた未同定血清型の代表として本年度の分離株 AC37/02 株、AC15/02 株を送付したが KIT においても培養がうまくいかず、いまだ血清型同定に至っていない。これら株については継続して、培養を観察し血清型の同定を目指す。

2. *gyrB* 配列解析法の血清型同定への応用

図 2 に *gyrB* 解析結果を示した。血清型 *icterohaemorrhagiae* MR0118 株、MR0114 株、MR0120 株、MR0116 株は基準株である *Ictero No.1* 株、RGA 株と同一の塩基配列であった。血清型 *hebdomadis* OM108 株は、基準株である Akiyami B 株と同じ塩基配列であった。血清型 *javanica* OR116 株、OR113 株、OR67 株、OS80 株、OM51 株も同様に基準株である *Veldrat Batavia46* 株と同じ塩基配列であった。血清型 *castellonis* と推定される分離株 OM130 株は基準株である *Castellon 3* 株とは一塩基だけ異なる塩基配列であったが、血清型 *sejroe* M84 株とは同じ配列であった。一方、血清型 *autumnalis* MA015 株は基準株である Akiyami A 株とは 15 塩基の違いがあった。基準株である Akiyami A 株よりも別の血清型 *australis* Akiyami C 株とは 6 塩基の違いしかなく、一方で Akiyami C 株と同じ血清型 *australis* *Ballico* 株とも 20 塩基の違いがみられた。

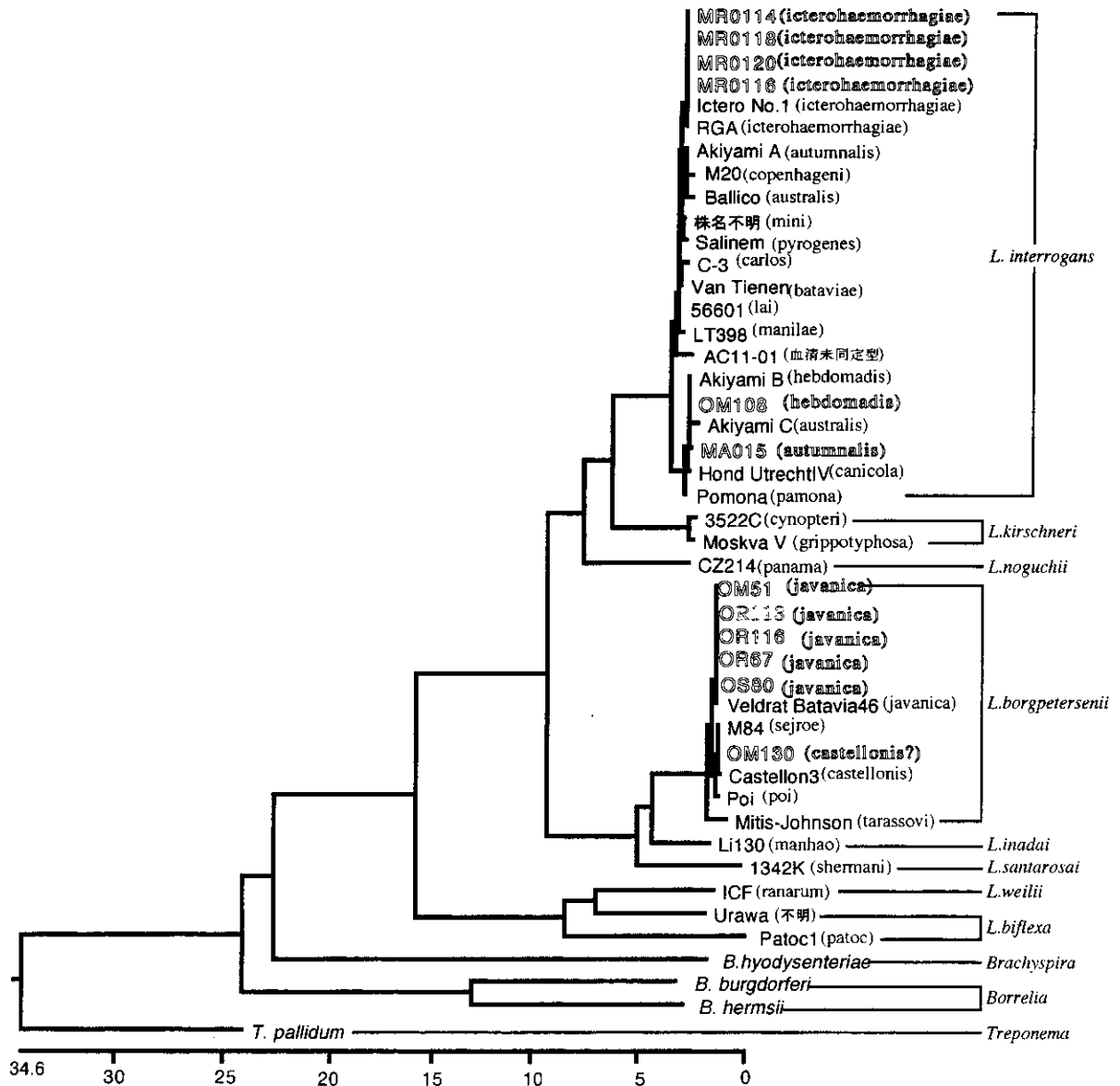


図2. *gyrB* 配列に基づく系統樹

図3、図4にそれぞれ血清型の異なる12株の *flaB*、並びに *gyrB* 解析による系統樹を示し、対応させた。*flaB* 解析では異なる血清型においても同一の塩基配列を示すことがあったが、*gyrB* の解析では12株全てが異なる配列であり、系統樹上でこれら12

株の血清型を区別することができた(図4)。このことから *gyrB* は *flaB* よりも多様性を示し、*flaB* 解析に比べはるかに血清型の推定に適していることが明らかになった。

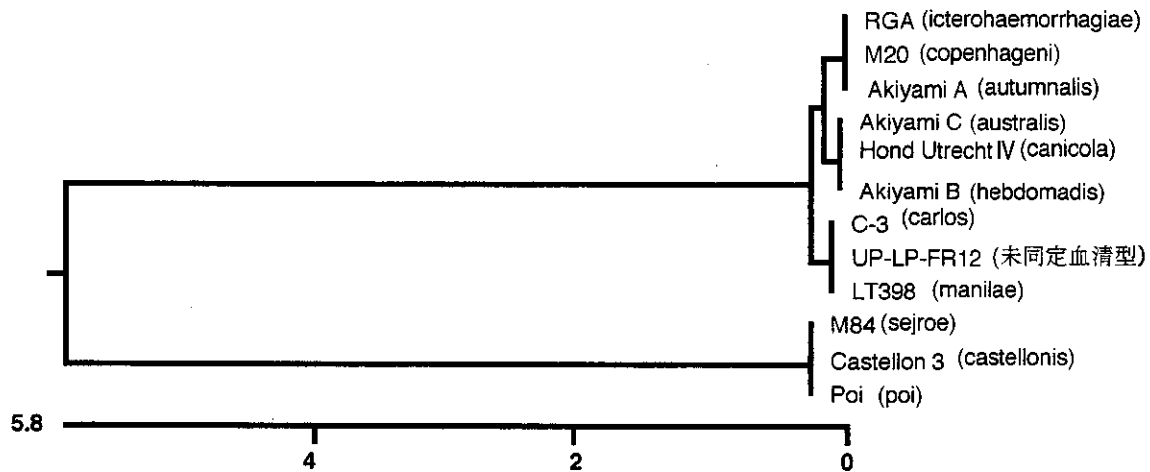


図3 *flaB*に基づく系統樹

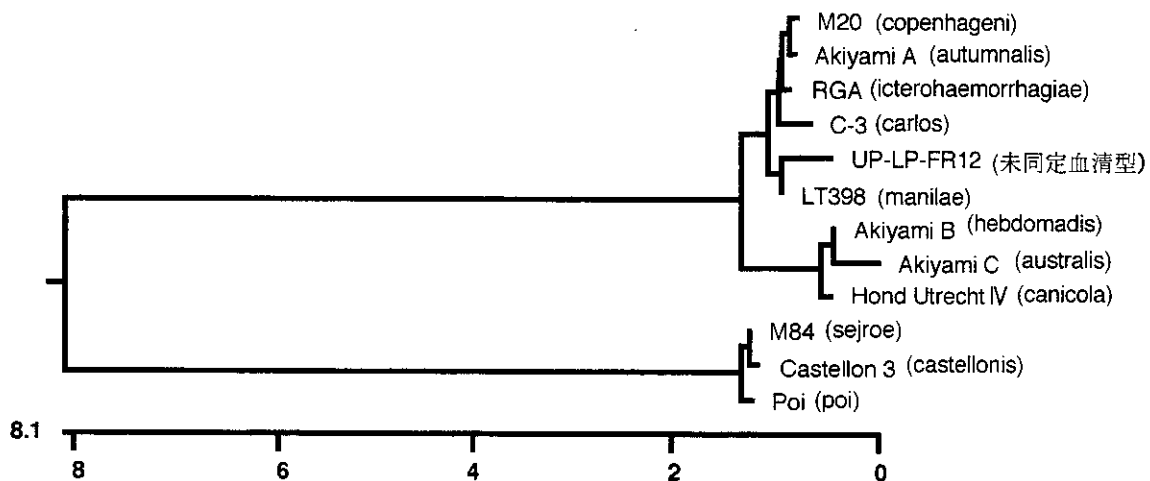


図4 *gyrB*に基づく系統樹

3. 輸入ペットハムスターのレプトスピラ保有の調査とレプトスピラ感受性の検討

平成13年に夜店で買ったハムスターから小学生男児がレプトスピラの感染を受け重症化したとの症例発生を受けて、昨年度の調査ではハムスターのレプトスピラ保有の有無を調べた。チェコ産、台湾産、並びに国内産ハムスター（ゴールデンハムスターとジャンガリアンハムスター）計288匹について培養を行い、すべて陰性であった。本年度はこの輸入ハムスターの血清抗体の検出を行ったが、すべて陰性であった。

さらにはペット用のジャンガリアンハムスターのレプトスピラに対する感受性を感染実験により調べた。試験したハムスターは全て2週間の観察期間中

病態を示さず生残した。ハムスターを解剖し、レプトスピラが定着する臓器腎臓、肝臓、血液をコルトフ培地に接種し1カ月間37℃で培養したが、レプトスピラの増殖は見られなかった。また、ハムスター尿を採取し、*flaB*-PCRによるレプトスピラの検出を行ったが、特異的増幅産物を検出することは出来なかった。

D. 考察

北海道から沖縄に至る検疫所、衛生研究所、大学からなる全国的調査体制を確立することができた。本年度の全国の野鼠の平均レプトスピラ保有率は1.2%であるが、名古屋市内に限ってみれば、8.5%ときわめて高い。また、北海道、静岡でレプトスピ

ラが分離できたことから、レプトスピラを保有した野鼠が全国的に生息している可能性を示すものとする。一方、昨年の調査でレプトスピラを分離できなかった地域については、今年も同様にレプトスピラを分離できなかった。このことから、レプトスピラによる汚染が拡大している事実はないと考えられる。日本では今日もなおレプトスピラ病は我々の身近に存在し、いつ患者が発生してもおかしくない状況にあることを再確認するとともに、実態解明と監視体制の必要性を示唆した。患者の減少は、レプトスピラ病自体が無くなったのではなく、ヒトの生活様式の変化が原因であることを強く裏付けた。このことは、この生活様式が乱されるような状況下、たとえば災害時などではレプトスピラ病の発生を危惧する必要があることを示している。また、これまで日本にはその存在が予想できなかった血清群 Javanica 血清型 poi、血清群 Ballum 血清型 arborea または guangdon または castellanis の存在を示唆する結果が得られつつある。最終的な血清型の同定完了の後には、これらの血清型を含む血清診断システムの構築が必要である。

gyrB では同じ株間でも *flaB* に比べ 2 倍以上変異がみられ、また異なる血清型であるにもかかわらず *flaB* で同一配列を示した株が *gyrB* 解析では異なる配列を示したことから、血清型の鑑別に利用できることが明らかになった。一方、問題点として *gyrB* は変異が多いため増幅の際のプライマーには縮重プライマーを用いなければならず、*flaB* に比べ増幅させにくい欠点があるが、今後のプライマーの設計変更で解決できると考えている。

チェコ産、台湾産、及び国内産のハムスター計 288 匹についてレプトスピラ保有の有無を調査し、レプトスピラを保有しないことを確認した。さらにはペット用のジャンガリアンハムスターのレプトスピラに対する感受性を感染実験により調べた。試験したハムスターは全て 2 週間の観察期間中病態を示さず生残した。今回の接種菌数 10^5 個は実験動物として入

手できるゴールデンハムスターの 100%致死量である。通常の飼育環境ではこのように大量のレプトスピラが宿主ないに一度に侵入することはあり得ず、きわめて強い感染条件でありながら、ペットのジャンガリアンハムスターは全く病状を示さず、また尿中へのレプトスピラの排出も見られなかった。この結果より、ペットのジャンガリアンハムスターはゴールデンハムスターと全く異なり、レプトスピラ感染に抵抗性である可能性が示唆された。

ハムスターはげっ歯目ネズミ亜目キヌゲネズミ亜科に属し、さらにカンガルーハムスター属、クロハラハムスター属、ゴールデンハムスター属、キヌゲネズミ属、ヒメキヌゲネズミ属の 5 属に分離される。最もペットとして普及しているのは、ゴールデンハムスターであるが、最近はヒメキヌゲネズミ属（ドワーフハムスター、ドワーフは小さいの意味）のジャンガリアンハムスター等、キヌゲネズミ属のチャニーズハムスターなど様々な種類が輸入され流通している。このようにペットとして供給されるハムスター種は多岐にわたり、また今回試験した病原レプトスピラも 1 株であり、様々な種類のハムスターとレプトスピラ株の組み合わせの中には、病態を引き起こすものや致命的なもの、あるいは保有体化し尿中にレプトスピラを排出するものがないとは断言できない。現時点では、ハムスターは一般のげっ歯類と同様に、保有体化する可能性を考慮して、野生動物との接触を避けて衛生的環境で飼育することが肝要である。

F. 健康危機管理情報

1. 武藤哲典, 山田三紀子, 相楽裕子, 足立拓也, 川端寛樹, 渡辺治雄: ライム病の輸入感染例. 病原微生物検出情報 23(10): 251-252, 2002.
2. 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 22(1): 13 2002.

G. 研究発表

発表論文

1. Masuzawa, T., Hashimoto, N., Kudeken, M., Kadosaka, T., Nakamura, M., Kawabata, H., Koizumi, N., and Imai, Y. *Borrelia valaisiana*-related species found in okinawa main island and neighboring islands, Japan in the subtropical zone. *Appl. Environ. Microbiol.* (submitted).
2. Kawamoto, H., Sakakibara, S., Masuzawa, T., and Kondo, F. Detection of *Leptospire*s by Nested *FlaB*-PCR in Urine from Asymptomatically Infected Dogs in Animal Shelter. *Vet. Microbiol.* (submitted)
3. 神山恒夫、山田章雄(編): 動物由来感染症、真興交易出版、東京、2003年(印刷中)
4. 増澤俊幸: ライム病. 動物由来感染症—その診断と対策—(山田章雄、神山恒夫編集) 真興交易医書出版 東京、2003年(印刷中)
5. 川端寛樹, 小泉信夫, 渡辺治雄: レプトスピラ症. 動物由来感染症—その診断と対策(印刷中)
6. 川端寛樹: 回帰熱. 感染症の辞典(印刷中)
7. 川端寛樹: ライム病. 感染症の辞典(印刷中)
8. 川端寛樹: ライム病. 総合臨床(印刷中)
9. Ushijima Y, Keirans JE, Oliver Jr JH, Tsurumi M, Kawabata H., Watanabe H, Fukunaga M: Mitochondrial sequence variation in *Carios capensis* (NEUMANN), a parasite of seabirds, collected on Torishima island in Japan. *Journal of Parasitology.* (印刷中)
10. Koizumi N., Kawabata H., Watanabe H: Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. *Microbiology and Immunology* (印刷中)
11. 神山恒夫: ペスト. 新世紀の感染症学 p453-458, 日本臨床、東京、2003
12. 増澤俊幸: ライム病、その臨床と病原体ボリアの世界規模での維持伝播機構 生化学 74, 122-127 (2002)
13. 増澤俊幸: 微生物ゲノム情報と医学 「スピロヘータゲノムが語るもの」 現代医療 34, 1035-1039 (2002)
14. 増澤俊幸: げっ歯類を起源とする人畜共通感染症 「レプトスピラ病」 日本獣医師雑誌 55, 324-330 (2002)
15. 増澤俊幸: ライム病、回帰熱. 小児科診療 109, 2121-2125 (2002)
16. 増澤俊幸: レプトスピラ病. 感染と抗菌薬 5, 367-372 (2002)
17. 増澤俊幸: 特集 新世紀の感染症学 「レプトスピラ病」 557-563 日本臨床 (2002)
18. Miyamoto, K., and Masuzawa, T.: Chapter 8. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Japan and East Asia. Lyme Borreliosis: Biology of the Agents and Epidemiology of the Disease (Gray, J., Khal, O., Lane, B., and Stanek, G., ed) CABI Publishing (UK) pp.201-222 (2002)
19. 高田伸弘、石畝史、増澤俊幸、藤田博己、矢野泰弘、大竹秀男: 我が国周辺のライム病ボリアの疫学調査における新たな展開. 虫の知らせ(第57回日本寄生虫学会西日本支部大会と第56回日本衛生動物学会西日本支部大会の記録、高橋優三、粕谷志郎編集) pp.109-113 (2002)
20. 神山恒夫: 輸入ペット由来の感染症、小児科診療、65: 2156-2160, 2002
21. 神山恒夫: 身近なペットからうつる病気、チャイルドヘルス、5: 33-35, 2002
22. 神山恒夫: 珍しいペットと人獣共通感染症、チャイルドヘルス、5: 28-30, 2002
23. 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.
24. 小泉信夫, 渡辺治雄: レプトスピラ病. 小児科診療 65(12): 2145-2148 2002.
25. 小泉信夫, 渡辺治雄: レプトスピラ抗体. 検

- 査値異常から読む病態と診断計画. 28 (増刊号) 1252-1253 2002.
26. 小泉信夫, 渡辺治雄: レプトスピラ感染症. 治療 84 (6): 1831-1833 2002.
 27. 鶴見みや古, 川端寛樹, 佐藤文男: 伊豆諸島鳥島のクロアシアホウドリのコロニーにみる *Carios (Ornithodoros) capensis* の生息状況およびその疫学調査. 山階鳥研報. 34: 250-256, 2002.
 28. Lawrenz MB*, Kawabata H*, Purser JE, Norris SJ: Decreased electroporation efficiency containing linear plasmids lp25 and lp56: Impact on transformation of infectious *B.burgdorferi*. Infect Immun, 70, 4798-4804, 2002. *These authors contributed equally to this study.
- 日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (仙台) 2002年10月31日 (要旨集 p.52)
6. 太田周司, 田中義枝, 長谷山路夫, 森雅美, 松本泰治, 青木英雄, 飯塚信二, 一戸邦彦, 後藤郁夫, 増澤俊幸: 輸入ハムスターの人畜共通感染症病原体の保有状況調査について. 第5回日本検疫医学会学術大会 (大阪) 2002年12月7日 (抄録 p.31)
 7. 後藤郁夫, 中野義則, 小澤毅彦, 柳井慶明, 品川道夫, 加邊純雄, 増澤俊幸, 中溝芳行, 稲垣俊一, 長谷山路夫, 大神田実, 木田中, 小林順一, 大友雅人, 黒飛敏, 林昭宏, 出水美成, 高橋直樹: 日本の港湾区域等で捕獲された野鼠におけるレプトスピラ保有状況. 第5回日本検疫医学会学術大会 (大阪) 2002年12月7日 (抄録 p.28)
 8. 増澤俊幸, 角坂照貴, 川端寛樹, 小泉信夫, 後藤郁夫, 中村正治: レプトスピラ病疫学調査結果 最終報告. 第40回レプトスピラシンポジウム (福岡) 2003年3月31日
 9. 増澤俊幸: シンポジウム 新興再興感染症 ふたたび レプトスピラ病とライムボレリア症 第76回 日本細菌学会総会 (熊本) 2003年4月1日
 10. 角坂照貴, 増澤俊幸, 名古屋市生活衛生センター 名古屋市内のネズミより分離されたレプトスピラ. 第55回日本生動物学会大会 2003年4月1日. 大分 (予定)
 11. Yanagihara Y, Villanueva SAVM, Dancel LA, Barzaga NG, Masuzawa T, Imai Y, Kawabata H, Koizumi N, and Watanabe H: Leptospirosis investigation in the Philippines. International Leptospirosis Society 3rd Scientific Meeting. Barbados, Oct. 2002.
 12. Lawrenz MB, Kawabata H, Norris SJ: Plasmid content determines the ability to transform *Borrelia burgdorferi*. American Society of Microbiology. 102th General meeting. Salt Lake, Utah, USA. May. 2002.
 13. 川端寛樹, 渡辺治雄: ライム病ボレリアの形質
- ### 学会発表
1. 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 (抄録 p.5)
 2. 網野裕之, 吉原弘, 高橋徹, 小池勤, 上野均, 供田文宏, 泉野潔, 高田正信, 井上博, 増澤俊幸: 発熱と腎機能障害を初発とした秋季レプトスピラ症の1例. 第39回レプトスピラシンポジウム (東京) 2002年4月7日 (抄録 p.6)
 3. 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) 2002年4月7日 (抄録 p.12)
 4. 坂本祐紀, 神田憲子, 石黒直子, 川島眞, 増澤俊幸: ライム病の1例. 日本皮膚科学会東京地方会 2002年10月19日
 5. 増澤俊幸: シンポジウム 「動物由来感染症の疫学, 診断, 予防」 レプトスピラ病 第51回日本感染症学会東日本地方会総会, 第49回

転換効率とプラスミドプロファイルの相関. 第75回日本細菌学会総会. 2002年

14. 川端寛樹, Lawrentz MB, Norris SJ.: ライム病ボレリア形質転換効率はプラスミド・プロファイルに依存する. 第39回レプトスピラシンポジウム. 2002年
15. 川端寛樹, 古田康, 渡辺治雄: 北海道におけるベル様麻痺を指標としたライム病の血清疫学調査. 第39回レプトスピラシンポジウム. 2002年
16. 小泉信夫, 川端寛樹, 渡辺治雄: 2001-2002年感染研レプトスピラ抗体検査結果. 第39回

レプトスピラシンポジウム. 2002年

17. 小泉信夫, 川端寛樹, 渡辺治雄: 病原性レプトスピラの新規タンパク質抗原の探索. 第39回レプトスピラシンポジウム. 2002年
18. 小泉信夫, 渡辺治雄: 2001年度感染研レプトスピラ抗体検査結果報告. 第51回日本感染症学会東日本地方会総会. 2002年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

ライトサイクラーを用いた *Yersinia pseudotuberculosis* および
Yersinia pestis の微量迅速・鑑別診断法

分担研究者 神山 恒夫 国立感染症研究所 獣医科学部
協力研究者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨

ペストは、動物由来感染症の中でも齧歯類由来の非常に重要な感染症であり、海外からの輸入齧歯類についても十分な警戒をしなければならないが、一方、生物テロの材料としても考えられている非常に危険度の高い疾患である。他のエルシニア感染症との鑑別を含め、迅速に対応（診断、対策等）することが求められている。本研究では、*Y. pseudotuberculosis* 特異的遺伝子の *inv* および *Y. pestis* 特異的遺伝子の *3a* をプライマーとしたライトサイクラーによる Real-time PCR 法を検討した。*inv* は *Y. pseudotuberculosis* および *Y. pestis* を検出し、*3a* は *Y. pestis* のみを検出することより、両者の鑑別診断が可能であると考えられた。また、本ライトサイクラーの系では、一時間程度で結果が得られ、また、検出感度も通常の PCR よりも約 1000 倍程度の感度を持つことから、非常に有用な迅速診断法となると考えられた。

A. 研究目的

わが国では 1926 年以来ペストの国内発生はないが、アフリカ、南北アメリカ、およびアジアでは依然発生が多く、1999 年の WHO の報告では患者数 2603 名（14 カ国）で、このうち 212 名が死亡したとされている世界的に重要な感染症である。また、動物由来感染症の中でも齧歯類由来の非常に重要な感染症であり、齧歯類に寄生するノミによって偶発的にヒトへも感染する。そのような点から、国内の齧歯類のみならず、（むしろ）海外からの輸入齧歯類についても十分な警戒をしなければならない。さらに、生物テロの材料としても考えられている非常に危険度の高い疾患であり、迅速に対応（診断、対策等）することが求められる。そこで、本研究では、*Y. pestis* の高感度・迅速診断法となり、同時に近縁の種である *Y. pseudotuberculosis* や他の菌との鑑別も行うことの可能な Real-time PCR 法の確立を試みた。

B. 研究方法

1. 供試菌株：*Y. pestis* は、A1122（ワクチン株、42Md プラスミドを欠く）と Yreka 株を用いた。対照として、*Y. pseudotuberculosis* 2a、*Y. enterocolitica* O9、*F. tularensis*、*B. abortus*、*B. canis*、*B. anthracis*、*B. cereus* 各々から DNA を抽出して用いた。
2. PCR：*Y. pestis* を検出するために、Tsukano ら（Microbiol. Immunol., 40, 883-775, 1996）の報告した Multiplex PCR、および Radnedge ら（Appl. Environ. Microbiol., 67, 3759-3762, 2001）の PCR を検討した。それぞれに用いられるプライマーは、Table 1 に示した。Multiplex PCR では、細胞侵入性のための遺伝子である *inv*、*Y. pestis* 特異的な 60Md プラスミドにある Fraction I 抗原の *caf1*、7Md プラスミドにあり、病原性に関与するプロテアーゼの *pla*、42Md プラスミド上の *Yersinia* 属に共通の病原因子で血小板凝集阻止に関与する *yopM* を検討した。また、*Y. pestis* クロモソーム特異的な 41.7 kb 領域におけ

る 3a を検討した。どちらも、*Y. pestis* は反応チューブあたり 2~0.02ng DNA、他の菌種は 2ng DNA を用いた。

3. Real-time PCR : Tsukano らの報告では病原因子である *pla* および *caf1* は、*Y. pestis* の一部に反応しない株が認められたので、Table 2 に示したように *inv* および 3a (41.7 kb 領域) をプライマーに設定した。ただし、*inv* は *Y. pseudotuberculosis* にも反応する。それぞれ、その増幅領域内にライトサイクラー (ロシュ・ダイアグノスティック社) 用のハイブリダイゼーションプローブを作成し、Real-time PCR 法を検討した。これは、増幅領域内に、互いに近接して (1 塩基の間隔をあけて) ハイブリダイズする 2 種の異なる蛍光プローブを用意し、この 2 種のプローブが近接してハイブリダイズしたときに初めて発する蛍光をモニターすることで、特異的 PCR 産物の検出を行う方法である。どちらも、反応条件は 95°C, 10min—(95°C, 10sec.—62°C, 15sec.—72°C, 10sec.) × 45 cycle、反応チューブあたりの DNA 量は *Y. pestis* が 100~0.1pg DNA、他の菌種は 100pg DNA を用いた。

C. 研究結果

1. PCR : Multiplex PCR (Fig. 1A) では、*Y. pestis* (A1122 および Yreka) において、*inv*、*caf1*、*pla* に特異的バンドが認められ、0.2ng DNA まで検出された。*Y. pseudotuberculosis* でも *inv* および *yopM* でバンドが検出された。他の菌種においてはバンドは検出されなかった。一方、3a (41.7 kb 領域) (Fig. 1B) では、*Y. pestis* (A1122 および Yreka) のみで、0.2ng まで特異的バンドが認められた。

2. Real-time PCR : *inv* に対しては、*Y. pestis* (A1122 および Yreka) では 0.1pg まで、容量依存性に検出可能であった。ただ、*Y. pseudotuberculosis* も検出された (Fig. 2A)。3a (41.7 kb 領域) (Fig. 2B) では、*Y. pestis* (A1122 および Yreka) のみで、0.1pg まで容量依存性に検出可能であった。他の *Yersinia* spp. および他の菌種に

は反応しなかった。

D. 考察

Y. pseudotuberculosis および *Y. pestis* 特異的遺伝子の高感度・迅速鑑別診断法として、ライトサイクラーを用いた Real-time PCR 法を検討した。その結果、*inv* および 3a をプライマーとした方法が利用できることが示された。また、3a および *inv* の Real-time PCR の反応条件は、同じであることから、両者を一台のライトサイクラーで同時に検討することが可能である。3a のみでも *Y. pestis* ならば検出は可能であるが、*inv* (*Y. pseudotuberculosis* も検出する) を組み合わせ、両者で検出されることで、*Y. pestis* であるとの信憑性を増すことが可能となる。また、3a で検出できず *inv* でのみ検出できる物は *Y. pseudotuberculosis* であると、両者の鑑別診断も行える。現在行われている自動細菌同定システムも有効ではあるが、*Y. pseudotuberculosis* との誤同定があったりして、システムプログラムが必ずしも適当ではない場合もある。今回試験に用いた菌株数は少なく、さらに多くの菌株を用いて検討する必要があるとは考えられるが、本ライトサイクラーの系では、一時間程度で結果が得られ、また、検出感度も通常の PCR よりも約 1000 倍程度の感度を持つことから非常に有用であると考えられた。

E. 結論

Y. pseudotuberculosis 特異的遺伝子の *inv* および *Y. pestis* 特異的遺伝子の 3a をプライマーとしたライトサイクラーによる Real-time PCR 法を検討した。3a および *inv* の Real-time PCR の反応条件は、同じであることから、両者を一台のライトサイクラーで同時に検討することが可能である。*inv* は *Y. pseudotuberculosis* および *Y. pestis* を検出し、3a は *Y. pestis* のみを検出することより、両者の鑑別診断にも応用できる。本ライトサイクラーの系では、

一時間程度で結果が得られ、また、検出感度も通常の PCR よりも約 1000 倍程度の感度を持つことから、不慮の際および検疫等迅速に結果を得たいときに非常に有効である。

F. 健康危害情報

ペストは、動物由来感染症の中でも齧歯類由来の非常に重要な感染症であり、海外からの輸入齧歯類についても十分な警戒をしなければならないが、一方、生物テロの材料としても考えられている非常に危険度の高い疾患である。他のエルシニア感染症との鑑別を含め、迅速に対応（診断、対策等）することが求められている。

G. 研究発表等

- 1) 神山恒夫、山田章雄（編）：動物由来感染症、真興交易出版、東京、2003年（印刷中）
- 2) 神山恒夫：ペスト。新世紀の感染症学 p453-458、日本臨床、東京、2003
- 3) Katae M, Miyahira Y, Takeda K, Matsuda H, Yagita H, Okumura K, Takeuchi T, Kamiyama T, Ohwada A, Fukuchi Y, Aoki T.: Coadministration of an interleukin-12 gene and a Trypanosoma cruzi gene improves vaccine efficacy. *Infect Immun.* 2002, 70:4833-40.
- 4) 神山恒夫：輸入ペット由来の感染症、小児科診療、65：2156-2160, 2002
- 5) 神山恒夫：猫ひっかき病とその予防、チャイルドヘルス、5：54-56, 2002
- 6) 神山恒夫：身近なペットからうつる病気、チャイルドヘルス、5：33-35, 2002
- 7) 神山恒夫：珍しいペットと人獣共通感染症、チャイルドヘルス、5：28-30, 2002
- 8) Kamiyama, 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.

9) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし