

20030529

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 15 年度 統括・分担研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸

平成 16 年（2004 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. ライムボレリア症に関する基礎・応用研究：血清診断キットの評価及び遺伝学的手法によるライム病重症化メカニズムに関する研究、野生生物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・・・・・・・・・・ 9
川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部・研究員）
2. 病原性レプトスピラのタンパク質性抗原の検索・・・・・・・・・・ 15
小泉信夫（国立感染症研究所・細菌第一部・研究員）
3. 東海地方のネズミ類由来レプトスピラ調査(2003 年)・・・・・・・・・・ 23
角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）
4. 野鼠のペスト菌保菌に関する調査・研究・・・・・・・・・・ 26
高橋英之（国立感染症研究所・細菌第一部・研究員）
5. 静岡県内のマダニや野鼠が保有するエーリキア細菌について・・・・・・・・ 32
大橋典男（静岡県立大学・環境科学研究所・助教授）
6. 野生動物及びマダニ類を保有・媒介者とする人畜共通感染症、特に野兔病と紅斑熱群リケッチア症に関するフィールド調査の経過報告・・・・・・・・ 40
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所・主任研究員）
7. 蜱壕熱の疫学的研究・・・・・・・・・・ 49
小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）
8. 全国の港湾区域等で捕獲した野鼠におけるレプトスピラ保有状況・・ 55
後藤郁夫（神戸検疫所・副統括検査官）
9. 2003 年度野外調査一覧・・・・・・・・・・ 59

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

2003 年 11 月の感染症法見直しにより新 4 類に指定されたレプトスピラ病について、全国規模の野鼠からの分離調査、廃犬の保有状況調査、輸入げっ歯類の保有調査、ならびにレプトスピラ株の参照株コレクションの整備と DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 *gyrB* 配列に基づく血清型推定法の開発を行い、以下の知見を得た。

1. 野鼠 305 匹中 28 匹(9.2%)がレプトスピラを保有した。特に、北海道、沖縄、奄美諸島、軽井沢近郊の山林などきわめて保有率の高い地域を見いだした。当該地域で疑診患者が発生した場合は、レプトスピラ病を念頭に置いた診断が必要となる。また、廃犬 88 頭はレプトスピラを保有しなかった。
2. *gyrB* 解析のために、オランダ王立熱帯研究所(KIT)よりレプトスピラ 192 血清型を輸入し、コレクションの整備を行った。包括的 *gyrB* 解析をおこない、現在約 70%の解析を終了した。本解析法が血清型を推定する上で有用な情報を提供できることを、奄美大島与路島の分離株を用いて実証した。
3. 輸入げっ歯類について買い上げでレプトスピラの保有状況を調査し、アフリカヤマネ 10 匹中 5 匹からレプトスピラを分離した。現時点では血清型の同定には至っていないが、これまで日本に存在する血清型とは全く異なっている。輸入動物を介したレプトスピラの侵入があることを初めて明らかにした。

研究分担者

川端寛樹	国立感染症研究所・細菌部・研究員
小泉信夫	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
高橋英之	国立感染症研究所・細菌部・研究員
大橋典男	静岡県立大学・環境科学研究所・助教授
藤田博己	大原総合病院付属大原研究所・主任研究員
小林睦生	国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長
後藤郁夫	神戸検疫所・副統括検査官

研究協力者

伊東拓也（北海道衛生研究所）、川森文彦、稲吉恵（静岡県環境衛生研究所）、高田伸弘、矢野泰弘（福井大学）、石畝史（福井県衛生研究所）、山下昭広（静岡県動物管理センター）、本田俊郎（鹿児島県環境保健センター）、斉藤あつ子（神戸大学）、丸山総一、佐藤雪太（日本大学）、全国検疫所の協力者（分担 後藤報告書参照）、名古屋市生活衛生センター・感染症調査係（分担 角坂報告書参照）

A. 研究目的

本研究班ではげっ歯類やマダニ等の動物媒介性感染症、具体的にはレプトスピラ病、回帰熱、ライム病、野兔病、ペスト、エーリキア症、壔壕熱などのバルトネラ感染症を包括的調査対象としている。特にレプトスピラに関しては平成 12～14 年度に本研究課題にて、日本の現状を調査し、過去の調査からは全く予想しない血清型レプトスピラを見いだした。これらは海外から輸入された可能性もあるが、培養システム等の改良により新たに発見された可能性も考えられる。しかしながら、世界で分離された 250 あまりのレプトスピラ血清型基準株のコレクションを日本国内のいかなる施設も保有しない現状では、その血清型同定は困難を極めている。そこで、オランダ王立熱帯病研究所（レプトスピラ WHO コラボレーションセンター）で保存されるレプトスピラ分離株の譲渡を依頼し、それらを用いて独自の簡便迅速で、標準化が容易な血清型同定システムの確立を行う。さらには、これまで日本で行われてきた血清型に依存した検査法や血清型特異的ワクチンでは、診断予防に対応できない可能性がでてきた。そこで本研究では、病原レプトスピラに高度に抗原性が保存されている抗原を探索し、新たな診断、予防法の確立を目指す（分担者 川端・小泉・後藤報告書参照）。

ペストについては、日本国内においては、過去 50 年以上患者の報告例はない。国内の野兔病発生

は、この 10 年間では年に 0 ないし 1 例と減少傾向が続いている。一方で、2002 年におけるプレーリードックの輸入に伴ったペストや野兔病病原体侵入の危険性が注目された。さらにはバイオテロに使用可能な微生物あることから、危機管理体制の準備は最優先課題である（分担者 高橋・藤田報告書参照）。

ライム病ボレリア、エーリキア、紅斑熱リケッチアはげっ歯類を保有動物、マダニを媒介動物とする病原体である。ライム病、日本紅斑熱は感染症法 4 類に指定されているが、最近日本紅斑熱リケッチアとは別種の存在が知られるようになり、国内の保菌・媒介動物についての基礎データの集積が望まれる。エーリキアはライム病ボレリアと同じマダニ種により媒介されることから、欧米ではライム病との共感染が問題となっているが、日本ではいまだ調査はなされていない（分担者 川端・大橋報告書参照）。

回帰熱はヒメダニやコロモジラミを媒介動物とする。戦後症例報告はないが、海外での感染例、海外からの保菌節足動物および保菌動物の侵入もしくは輸入による国内感染が想定される。壔壕熱はコロモジラミを媒介動物とする。回帰熱同様、最近の症例報告はないが、一方でホームレスに咬着するシラミから本病原体 *Bartonella quintana* 遺伝子が 10% 程度検出されることから、実態解明は急務である。また病原体 *B. quintana* のコロモジラミの消化管内での増殖、シラミの糞内での生存期間を調べるためにコロモジラミを用いて実験感染を行い、壔壕熱の疫学解析に資する（分担者 小林報告書参照）。

それぞれの病原体について全国規模の野鼠等の保有体、並びにマダニ等の媒介動物の病原体保有状況調査システムを構築し、現状を把握できる情報の蓄積を行う。さらには、診断、検出、培養等の方法論の確立を行い患者発生の際に迅速な対応が可能となるよう危機管理体制の整備をする。具体的には、1) レファレンス株の整備、同定・検出法の迅速化や簡便化、予防ワクチンの

開発、および2) リスク評価のための基礎資料となる現状把握を行うことを二つの大きな柱とする。本報告書では、主任者が担当したレプトスピラの調査研究結果について、中心に以下に述べる。

B. 研究方法

1. レプトスピラコレクションの整備と DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子(*gyrB*) 配列解析に基づくレプトスピラ血清型推定法開発。

オランダ王立熱帯研究所(KIT)にレプトスピラ基準株のコレクションの譲渡を依頼した。譲渡株について、これまでの研究で Molecular typing に有用であると予想される *gyrB* 遺伝子配列解析を行い、血清型推定能力を評価した。すなわち、レプトスピラ基準株から抽出した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 ClustalX 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。さらには、本法を野外分離株に応用し、その有用性を評価した。血清型の同定は特異的抗血清を用いた顕微鏡的交差凝集試験 (Microscopic cross-agglutination test, MCAT)、並びに全ゲノム制限酵素断片長多形性解析(long restriction fragment pattern, LRFP)をにより行った。

2. レプトスピラ保有野鼠、ならびに廃犬からのレプトスピラ分離。 本年度は主任者は富士山 2 から 3 合目の雑木林、軽井沢周辺の山林、浜松並びに掛川周辺地域の公園、雑木林、豚舎など、伊豆の伊東市、下田市周辺の漁港、牛舎、豚舎で野鼠の捕獲を行った(報告書末、調査一覧参照)。捕獲野鼠からは、腎臓、肝臓、脾臓、耳介、血液、腸を採取し、この研究班の分担者に配布し、それ

ぞれの病原体の検査に使用した。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。また、廃犬からのレプトスピラの分離は、静岡県動物管理センターの協力の下実施した。廃犬の腎臓を乳剤とした後、培地に接種した。

3. 輸入げっ歯類のレプトスピラ保有調査。 厚生科研 吉川班(東大農学部)の依頼を受け、輸入げっ歯類のレプトスピラ保有調査を行った。輸入げっ歯類は買い上げにより調査に供した。げっ歯類種としては、リチャードソンジリス、コロンビアジリス、エゾリス、シマリス、タイリクモモンガ、ピグミージュールボア、ジュウサンボンセンジリス、フトオアレチネズミ、アフリカヤマネを供した。レプトスピラ保有の有無を腎臓培養により検討した。

倫理面への配慮

本研究班で実施したすべての調査研究において、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。また、野鼠の捕獲は鳥獣保護法に従い、各都道府県担当部署に捕獲申請を提出し、適正に実施した。

C. 研究結果

1. *gyrB* 遺伝子データベースの構築と血清型推定への応用

これまで 192 血清型中 134 血清型(70%)の解析を終え、異なる血清型でも一部で同一の *gyrB* 配列を示したものも存在したが、多くの血清型は異なる配列を示し、血清型の推定に利用できる可能性が示された(図 1)。また、*flaB* 解析の結果と比較しても、*gyrB* の多様性は高く血清型鑑別能力が高いと推察された。

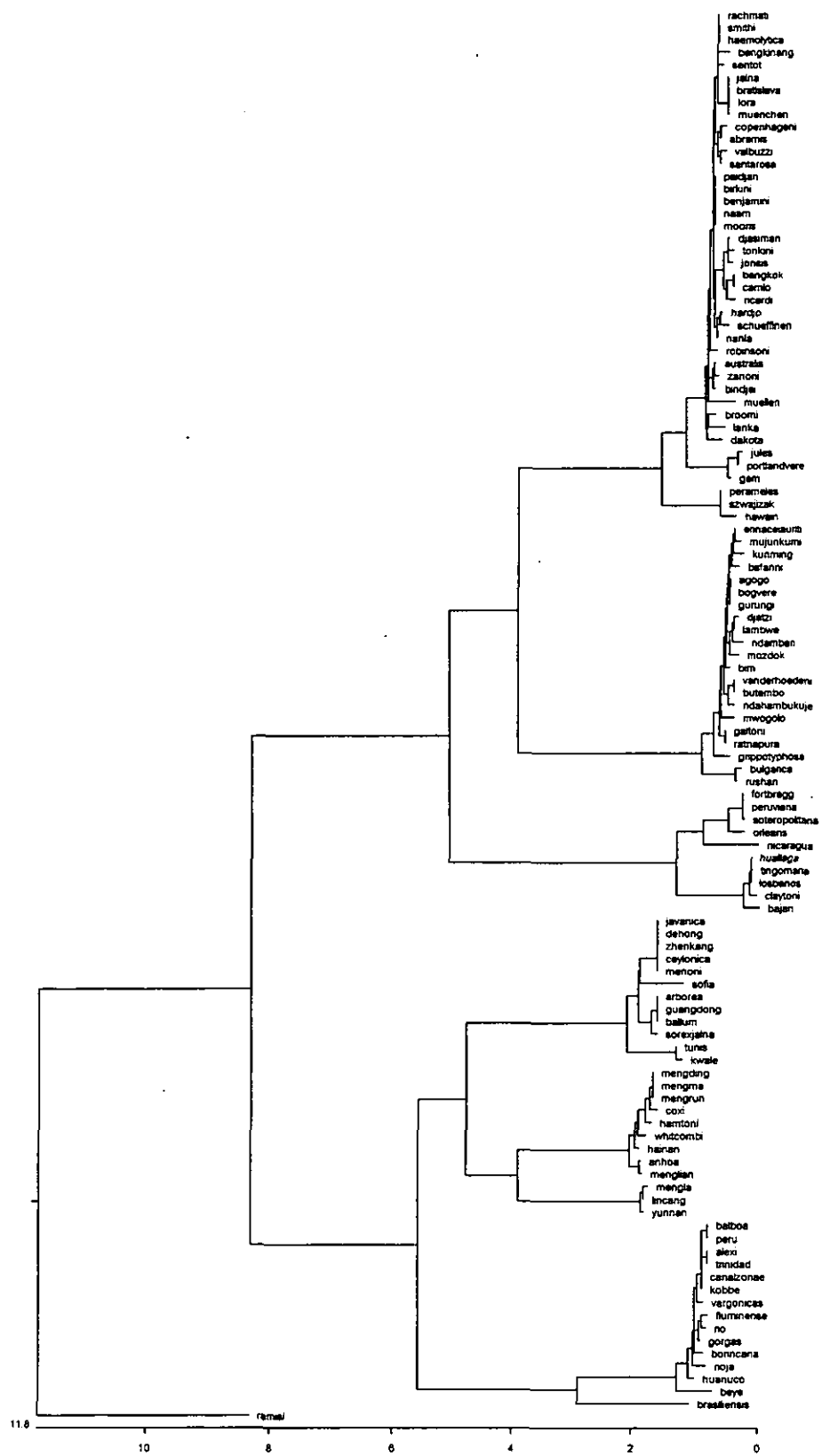


図 1 *gryB* 配列に基づく遺伝系統樹

2. レプトスピラ分離成績

表1にこの全調査班より寄せられた野鼠の腎臓培養の結果(2004年2月末現在、培養観察中のものは含まない)をまとめて示した。2003年の調査では、野鼠305匹中28匹(9.2%)からレプトスピラを分離した。とくに、北海道釧路市の野鼠は15.6%、軽井沢周辺の山林の野鼠は9.1%、鹿児島県与路島の野鼠は36.8%と高頻度にレプトスピラを保有することが示された(表1)。これまでも継続して調査を実施していた名古屋市の調査では2002年は2.9%、2001年では7.4%であったが、本年度は1株(1.8%)が分離された。このことから名古屋市に生息する野鼠は継続的にレプトスピラを保有していることが確認された。また、静岡県動物管理センターから寄せられた廃犬88匹はすべてレプトスピラ陰性であった。

分離レプトスピラの血清型の推定を *gyrB* 解析

により行った。まだ、基準血清型すべての解析が終了しておらず、また、顕微鏡的交差凝集試験(MCAT)、並びに全ゲノム制限酵素断片長多形性解析(LRFP)を実施できていないものもあるため、断定は出来ないが表2のように推定した。このうち、与路島由来株は *gyrB* 解析により血清型 *ceylonica*, *dehong*, *menoni*, *zhenkang*, *javanica* のいずれかと推定した。すでに、沖縄では *javanica* の存在が知られているため、これを中心に MCAT、ならびに LRFP 解析をおこなったところ、血清型 *javanica* と同定することができた。この血清型の奄美諸島からの報告は初めてである(調査の詳細は、分担研究者 川端の報告書参照)。また、*gyrB* 解析により血清型推定できることを示し、その有用性を示唆した。その他の分離株については、今後 MCAT、LRFP を実施し、血清型の同定を行いたい。

表1 レプトスピラ分離成績 (2004年2月末日現在、培養観察中のものは含まない)

捕獲調査地 (調査実施機関)	捕獲数 (匹)	培養陽性数 (匹)	培養陽性率 (%)	株名
広島市(広島検疫所)	1	0	0	
博多港(福岡検疫所)	5	0	0	
富士山:伊豆調査	45	1	2.2	fuji9/03
新潟市(新潟検疫所)	6	0	0	
名古屋市(名古屋市生活衛生センター)	18	1	5.6	nagoya2/03
名古屋市(愛知医大)	57	1	1.8	aichi6/03
軽井沢調査	33	3	9.1	nagano5/03, nagano10/03, nagano12/03
浜松調査	14	0	0	
北海道釧路市 (北海道立衛生研究所)	96	15	15.6	H14, H16, H15, H17, H19, H20, H23, H25, H33, H35, H37, H49, H65, H75, H86
神戸市(神戸検疫所)	11	0	0	
鹿児島県大島郡与路島 (感染症研究所)	19	7	36.8	yorol, yoro2, yoro3, yoro4, yoro5, yoro6, yoro7
合計	305	28	9.2	

表 2 *gyrB* 配列解析による分離株の血清型推定

未同定 1	未同定 2	hebdomadis, jules	poi, mini	sorexjalna, ceylonica, dehong, menoni, zhenkang, javanica
aichi6/03	AY-1	fuji9	H23	yorō1/03
nagoya2/03	AY-3	H14	H33	yorō2/03
	AY-4	H16	H35	yorō3/03
	AY-5	H17	H37	yorō4/03
	AY-6	H20	H49	yorō5/03
		H25	H65	yorō6/03
		H75		yorō7/03
		H86		
		nagano5/03		
		nagano10/03		
		nagano12/03		

3. 輸入げっ歯類からのレプトスピラ分離

試験した輸入げっ歯類 9 種、144 匹中アフリカヤマネ 10 匹中 5 匹からレプトスピラが分離された(表 2 の AY-1 から AY-6)。このレプトスピラは LRFP 解析では同一のパターンを示した。また、*gyrB* 解析から、*L. kirschneri* であることが明らかになったが、これまで日本に存在する血清型とは違った。現時点では、その血清型は同定できていないが、レプトスピラの輸入動物を介した侵入事例の存在を初めて明らかとした。

E. 考察

以上の結果より、2003 年 11 月の感染症法見直しにより新第 4 類に指定されたレプトスピラ病は、今日でも野生げっ歯類を中心に広範に分布することが確認された。特に、北海道、沖縄、奄美諸島、軽井沢近郊の山林などきわめて保有率の高い地域を見いだした。当該地域で疑診患者が発生した場合は、レプトスピラ病を念頭に置いた診断が必要となる。また、*gyrB* 解析のために、KIT よりレプトスピラ 192 血清型を輸入し、コレクションの整備を行った。包括的 *gyrB* 解析をおこない、

本解析法が血清型推定に有用な情報を提供できることを、与路島の分離株を用いて検証することが出来た。現在約 70% の解析を終了したが、今後残りの解析を進めるとともに、未同定血清型の同定を行い、その有用性を明らかにしていく計画である。また、解析終了後はインターネットを通じて全データを公開し、世界的に本法の有用性を評価する予定でいる。

F. 研究発表

発表論文

原著論文

1. Güner, E., Hashimoto, N., Takada, N., Kaneda, K., Imai, Y., and Masuzawa, T. First isolation and characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J. Med. Microbiol.* 52, 807-813 (2003)
2. Hirano, M., Ding, X., Li, T.-C., Takeda, N., Kawabata, H., Kizumi, N., Kadosaka, T., Goto, I., Masuzawa, T., Nakamura, M., Taira, K., Kuroki, T., Tanikawa, T., Watanabe, H., and Abe, K. Evidence for widespread infection of hepatitis E

virus among wild rats in Japan. *Hepatology Research* 27, 1-5 (2003)

3. Güner, E., Hashimoto, N., Kadosaka, T., Imai, Y., and Masuzawa, T. A novel, fast growing *Borrelia* isolated from the hard tick, *Hyalomma aegyptium*, in Turkey. *Microbiology-SGM* 149, 2539-2544 (2003)
4. 増澤俊幸、北邑かよ子、今井康之：ニューマクロライド roxithromycin の日本臨床分離ライム病ボレリアに対する抗菌力の評価。臨床と微生物 31, 110-114 (2004)
5. Masuzawa, T., Hashimoto, N., Kudeken, M., Kadosaka, T., Nakamura, M., Kawabata, H., Koizumi, N., and Imai, Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana* species isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *J. Med. Microbiol.* (in press).
6. Güner, E., Watanabe, M., Hashimoto, N., Kadosaka, Kawamura, Y., Ezaki, T., Kawabata, H., Imai, Y., Kaneda, K., and Masuzawa, T. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick, *Hyalomma aegyptium*, in Turkey. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press).

総説

1. 増澤俊幸：ライム病。からだの科学 (印刷中)

著書

1. 増澤俊幸：特集 新世紀の感染症学 (上) 「レプトスピラ病」 日本臨床 61, 増刊号 2, 557-563 (2003)
2. 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 214-218 (2003)
3. 増澤俊幸：エーリキア症。人獣共通感染症 (木村哲、喜田宏編集) 医薬ジャーナル (印刷中)
4. 増澤俊幸：レプトスピラ病(Leptospirosis) 共通感染症ハンドブック 日本獣医師会 (印

刷中)

学会発表

シンポジウム

1. 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
2. 増澤俊幸：ライム病(ライムボレリア症)病原体の *Borrelia burgdorferi* の地球規模分布と新たな展開 感染症フォーラム (東京) 2004 年 1 月 20 日
3. 増澤俊幸：ネズミ目(齧歯目)由来感染症 第 38 回ベストコントロールフォーラム (名古屋) 2004 年 2 月 27 日
4. 増澤俊幸：ライム病とレプトスピラ病—細菌学からの提案— 第 56 回日本衛生動物学会シンポジウム (福井) 2004 年 4 月 7 日

一般講演

1. 増澤俊幸、大須賀純一、今井康之、金田一秀：レプトスピラ走化性に関与するヘモグロビン結合リポ蛋白質 LipL32. 第 16 回微生物シンポジウム (京都) 2003 年 9 月 5 日
2. 増澤俊幸：トルコ産イボマダニ *Hyalomma aegyptium* から見いだされた新規なボレリア。第 11 回ダニと疾患のインターフェースに関するセミナー (軽井沢) 2003 年 9 月 14 日
3. 高田伸弘、小野恵実、石畝史、藤田博己、増澤俊幸：本州北半部におけるライム病ボレリアの検索。第 50 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部合同会 (札幌) 2003 年 9 月 27 日
4. 増澤俊幸、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、中村正治、平良勝也、今井康之：ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見いだされたライム病関連ボレリアの性状。第 3 回人と動物の共通感染症研究会 (東京) 2003 年 11 月 1 日

5. 増澤俊幸、金田一秀： 病原性レプトスピラの走化性に関与するヘモグロビン結合蛋白質 LipL32 (Hap1) の性状、並びにワクチンへの応用 2003US フォーラム 2004 年 3 月 2 日
6. 増澤俊幸、大橋典男、久留戸涼子：レプトスピラ DNA ジャイレース B サブユニット *gyrB* 遺伝子系統解析による分類法確立と迅速リアルタイム検出法の開発. 2003US フォーラム 2003 年 3 月 4 日
7. 増澤俊幸、渡邊むつみ、河村好章、川端寛樹、今井康之、金田一秀、江崎孝行：回帰熱ボレリアとも、ライム病ボレリア朋子となる新規なボレリア *Borrelia turcica* sp. nov. 第 77 回日本細菌会総会（大阪）2004 年 4 月 1 日
8. 榊原省司、増澤俊幸、今井康之：輸入げっ歯類のレプトスピラ保有状況と *gyrB* 解析による血清型推定法の開発 第 77 回日本細菌会総会（大阪）2004 年 4 月 2 日
9. 西村祐作、大橋典男、内藤博敬、稲吉恵、川森文彦、増澤俊幸：富士山麓の野鼠が保有する *Bartonella* 属細菌について 第 77 回日本細菌会総会（大阪）2004 年 4 月 1 日
10. 増澤俊幸、渡邊むつみ、Ece Guner、角坂照貴、河村好章、江崎孝行、川端寛樹、今井康之、金田一秀、：回帰熱ボレリアとライム病ボレリアの中間に位置する新種 *Borrelia turcica* の性状. 第 41 回レプトスピラシンポジウム（大阪）2004 年 4 月 4 日
11. 榊原省司、増澤俊幸、川端寛樹： *gyrB* 解析によるレプトスピラ血清型推定法の開発. 第 41 回レプトスピラシンポジウム（大阪）2004 年 4 月 4 日

G. 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(平成 15 年度)

ライムボレリア症に関する基礎・応用研究:血清診断キットの評価および遺伝学的手法によるライム病重症化メカニズムに関する研究, 野生生物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

分担研究者	川端寛樹	(国立感染症研究所・細菌第一部)
研究協力者	鶴見みや古	(山階鳥類研究所)
	佐藤文男	(山階鳥類研究所)
	阿部賢治	(国立感染症研究所・感染病理)
	藤田博己	(分担研究者, 大原研究所)
	増澤俊幸	(主任研究者, 静岡県立大学)

1. 水のレジャーによりレプトスピラ感染症発生が増加傾向にある南西諸島で、病原体の浸潤状況を調査した。九州では見出されないが、沖縄諸島では見出される血清型 Javanica が奄美諸島へも高度に浸潤していること等を明らかにした。レプトスピラ感染症の血清診断は感染病原体の血清型に依存するため、これら情報は奄美諸島での患者発生時に、実験室診断の感度を向上させるために有益である。また、これら地域における水のレジャーについては沖縄諸島同様の危険性が存在する可能性を明らかにした。
2. 回帰熱の国内浸潤を評価する目的で、これまで回帰熱媒介性ダニと考えられていたオルニトドロス属ダニ(サワイカズキダニ)の病原体調査を行った。病原体分離、核酸検出は陰性であり、現時点では警告を発する状況にはないと考えられる。今後はこれら調査を継続するとともに、輸入例対策の充実を図る方向性が示された。
3. ライム病の慢性化、重症化のメカニズム解析のための遺伝学的ツール開発、及び関節炎モデルの開発を行った。

南西諸島におけるレプトスピラ症の実態解明に関する研究

本邦では、1970 年代以降衛生環境の向上により、保菌野鼠等の尿により汚染された環境からの直接感染例は減少傾向にある一方で、水のレジャー等による感染例が増加傾向にある。特に年間を通じて温暖な気候にある沖縄

諸島では、八重山諸島・西表島(1999)、沖縄本島(2003)等、河川でのレジャー(リバーカヤック、小学生の川遊びなど)に起因するレプトスピラ症の集発事例が報告されている。また世界的に見ても、マレーシアでのトライアスロン大会における集団感染事例等、同様のケースが発生する傾向にある。

一方で沖縄諸島と同様に温暖な気候にある

奄美諸島では、これまでレプトスピラ症の発生は報告されていなかったため、環境中の病原体汚染についてその実態は全く不明であった。

そこで本研究では、この地域でのレプトスピラ症病原体の浸潤の有無、及び侵淫している病原体の種類を明らかにするために、現地で病原体保菌動物と考えられる野鼠の捕獲調査を実施した。

<調査方法・地域>

調査では、かご型トラップにより、ドブネズミ、クマネズミなどのラット類捕獲を試みた。希少保護動物が存在するため、シャーマントラップ、圧殺型トラップの使用は許可されていない。捕獲されたラットは麻酔下採血後、安楽殺し、腎臓(レプトスピラ)、膀胱(ボレリア)、脾臓(エーリキア、野兔病菌、ペスト菌など)、肝臓(E 型肝炎ウイルス)を摘出、各種培養試験、核酸検出試験などに供した。調査地域は、奄美諸島・与路島(鹿児島県大島郡瀬戸内町)内で地域内住居近辺の草地、牧草地、畑地などで野鼠捕獲を行った。調査は6日間行った。分離されたレプトスピラ株については種の同定、血清型同定・Pulse field ゲル電気泳動法による typing を行った。

<結果>

トラップ設置回数はおよそ 366 回におよび、これによりクマネズミ(*Rattus rattus*)19 個体を捕獲した(捕獲率 5.2%)。このうち腎臓より7株(保菌率 36.8%)のレプトスピラを分離した。これら分離株はすべて血清型 Javanica であり、PFGE-type は沖縄本島で分離された株と一致した。HEV については凍結肝臓組織をサンプルとした RT-PCR 法を行ったが、すべて検出限界以下であった。ELISA 法による HEV 抗体については未試験である。またこの他の臓器からは方法で示した病原体は現時点で分離されていない。

<考察>

これまでレプトスピラ感染例が報告されてい

ない奄美諸島でレプトスピラなどの病原体調査を行い、1)これら地域に棲息するラット類が高度にレプトスピラを保菌していること、2)沖縄などで分離されるレプトスピラ株と血清型、PFGE 型が一致する病原体がこの地域にも浸潤していることを初めて明らかにした。

(1) 病原体の汚染頻度について

季節間推移、複数地点での調査を行っていないため、一概に汚染頻度の高低を述べることは困難ではあるが、2000-2002 年度に国内各地で行ってきた野鼠のレプトスピラ保菌調査では、全国平均での病原体分離陽性率は約 3%であり、また沖縄地方に限っても約 4.5%であったことから、調査地域での病原体汚染は全国的に見ても高い水準にある可能性が高いと推定された。

(2) 浸潤レプトスピラの種類

この地域で見出されたレプトスピラは *Leptospira borgpetersenii* serovar Javanica であり、病原性レプトスピラに属している。また沖縄における患者からもこの血清型のレプトスピラが分離されており、今後この地域で、この病原性レプトスピラ感染患者を発生させる可能性は極めて高いと考えられる。

<結論>

- 1) 今後この地域でもレプトスピラ症患者の発生が報告される可能性が高い。この際、血清診断の抗原として、九州・本州などで見出されるレプトスピラ株よりはむしろ、沖縄型レプトスピラ株を診断抗原として用いる必要性があるだろう。
- 2) 近年水のレジャーを振興しているこの地域では、沖縄諸島同様に、水のレジャーに起因するレプトスピラ症発生が今後危惧される。
- 3) レプトスピラ株の迅速 typing 法の検討は、感染地の推定、感染源の特定など疾病対策を進める上で極めて重要である。これは既存の方法で

ある患者血清を用いた感染血清型推定、感染病原体の培養による血清型同定は迅速性に欠ける上、これら操作が煩雑であり、かつ試験材料の維持管理が難しいことから、限られた施設でしか行うことが出来ないためである。本研究班ではこれまでにPCR法による種レベルでの同定法を確立してきたが、今後は subspecies レベルでの迅速 typing 法の確立を急ぐべきである と考える。特に、核酸増幅法をベースにした Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法 等は今後検討すべきである。

共同研究者：増澤俊幸（静岡県立大学）、藤田博己（大原研究所）、阿部賢治（国立感染症研究所）、鶴見みや古、佐藤文男（山階鳥類研究所）

回 帰熱の国内浸潤に関する実地調査・推定媒介ダニの同定と病原体検出

回帰熱は人畜共通のスピロヘータ感染症で *Ornithodoros* 属ダニやシラミによって媒介される。本邦では戦後回帰熱発生の報告はなされていないが、世界のグローバル化によりいつ輸入感染が起こってもおかしくない状況にある。一方で国内には、これまで伊豆諸島や奄美諸島の限られた地域で *Ornithodoros* 属ダニの存在が報告されているが、これらダニによる感染の危険性については全く評価がなされていなかった。

そこで本研究では、これらダニの捕獲を行い病原体保有の有無を調べるとともに、このダニの吸血源である渡り鳥の血液からの病原体検出も行った。

<方法・調査地>

本邦での *Ornithodoros sawaii*（サワイカズキダニ）の棲息地である、奄美諸島・ハンミヤ島にて

ダニ捕獲調査を行った。ダニはオオミズナギドリ巣穴内巢材よりツルグレン法にて回収した。回収したダニは無菌的に半割し中腸類を材料として全DNAをアルカリ法にて抽出、PCRまたはダニミトコンドリアDNA塩基配列決定用サンプルとした。残りの半割片はBSK培地によるボレリア培養に供した。ボレリア検出用のPCRでは *flaB* 遺伝子の一部を増幅するDNA primerを用い、nested PCRによる高感度検出法を行っている。またこれと平行して、保菌宿主動物と推定されたオオミズナギドリの血液を採取、ボレリア検出のためBSK培地にて培養を行った。

<結果・考察>

本邦で *Ornithodoros* 属ダニとされているダニは、*O. capensis*（クチビルカズキダニ）および *O. sawaii*（サワイカズキダニ）の2種類が知られている。クチビルカズキダニは伊豆諸島でその存在が見出されており、サワイカズキダニは奄美諸島・ハンミヤ島にてその存在が知られている。今回ハンミヤ島にて捕獲したサワイカズキダニ25頭およびオオミズナギドリからはボレリア培養、核酸検出ともにすべて検出限界以下（陰性）であった。

我々が行ってきた1999年以降の伊豆諸島における病原体調査では、PCR法および培養法による試験では、保菌宿主と考えられるクロアシアホウドリ、媒介ダニと思われるクチビルカズキダニともに、ボレリアは陰性（検出限界以下）であったこと、また形態学的には *Ornithodoros* 属ダニではあるが、ミトコンドリアDNAの塩基配列決定では、このダニは *Carios* 属ダニであることを明らかにしてきた。本年度研究においても、奄美諸島にて捕獲したダニすべてについて、属の同定をミトコンドリアDNA塩基配列決定によって行ったが、これらダニもすべて *Carios capensis* もしくは *C. capensis* の亜種に分類されることが明らかとなった。*Carios* 属からのボレリア分離・検出は現在まで報告がないことから、本邦におけるク

チビルカズキダニ、サワイカズキダニ刺咬による回帰熱ボレリア感染の可能性は極めて低いことが推察された。

<結論>

- 1) 国内棲息のクチビルカズキダニ、サワイカズキダニは渡り鳥を吸血源としているが、今のところこれらダニ刺咬による回帰熱ボレリア感染の可能性は極めて低い。(今後このダニがボレリア媒介能を有しないことが実験的に証明されることが望ましい。)
- 2) 国内におけるシラミ媒介性回帰熱ボレリアのリスク評価を行う必要がある。
- 3) 特に海外からの輸入例対応のための実験室診断法の開発・整備に重点を置くべきと考える。

共同研究者: 藤田博己(大原研究所)、鶴見みや古、佐藤文男(山階鳥類研究所)

野鳥捕獲協力: 高美喜男、鳥飼久裕(奄美野鳥の会)

ライム病重症化・慢性化メカニズム解析のための遺伝学的ツール開発: マウス関節炎モデルによる関節炎重症化と相関するボレリア遺伝子領域の検索

ライム病ボレリアは人獣共通の細菌感染症で、全世界で年間数万人が感染しているとされる。その重篤かつ多彩な病態から予防・治療といった臨床面での研究が先行した一方で、ボレリア自身の病原性は遺伝学的ツールが確立されていなかったために未だに不明な部分が多い。我々も現在まで、ボレリアの病原性遺伝子の転写制御・機能解析を *E.coli*-backgroundで行ってきたが、いずれも *Borrelia*-backgroundでの実験系が確立されていなかったため、十

分な解析が行えたとは言い難い状況であった。

近年、ようやく数種類の *E.coli*-*Borrelia* シャトルベクターが開発されたが、一方でその形質転換頻度・効率は High-passage 株で高頻度である一方、Low-passage 株に至っては極めて低頻度であり、病原性解析などを行うための遺伝学的ツールとしての機能が十分であるとは言えなかった。また病原性株では形質転換後の非病原化が問題となっていた。従い、これらシャトルベクターを用いた *Borrelia* 形質転換効率の改善および非病原化の抑制が課題であった。

そこで我々は病原性株では形質転換が成功しないことに着目、病原性に関与するプラスミド上に何らかの形質転換を制限する遺伝子が存在すると考えた。これらプラスミド欠落株での形質転換効率がプラスミド非欠落株に比べ約 20-40 倍もの頻度であったこと、さらに遺伝子導入制限因子(制限修飾遺伝子)と推定した *bbe02* 破壊株では非破壊株に比較して約 40 倍の形質転換頻度の改善が見られたことから、この遺伝子が形質転換を制限している因子であることを立証した。さらに形質転換後においても、形質転換株はマウスに対しても感染性を失っておらず、これまで不可能であった *in vivo* でのボレリア因子の機能解析が可能であることを世界で初めて明らかにした。

ついでこのシステムの応用のためには、まずマウスなどの実験動物による病態再現モデルが必要である。本邦で入手可能であったマウスについては、主任研究者である増沢らが 1994 年に、ddY slc, C3H/HeN slc など純系、非近交系マウスで試行し、足蹠接種による強度炎症像を確認した一方で、足蹠接種法以外では関節炎誘導が見出されなかったことを報告していた。このことから、これらマウスによるライム関節炎など重症化に関与する因子の解析・評価は不可能と考えられていた。そこで我々はさらに数カ所の国内実感動物供給元よ

り純系の C3H/HeN マウスを入手, C3H/HeN Crj マウスでライム病の重症化の指標とされるマウス関節炎モデルが再現できることを確認した。これはマウス側に何らかの関節炎を増悪させる因子が有ることを示している。またこのモデルを用い, *bbe02* 破壊株でも同様に親株同様の関節炎が誘導できることを関節および足蹠腫脹度, 関節病理にて確認した。

現在まで, 感染性を指標としたボレリアの病原性を調べる研究は多いが, その重症度を定量化した成績は少ない。我々は *bbe02* 破壊の結果得られた各種変異株のうち数種類について, 関節炎増悪を指標とした重症度を定量化しているが, これまでに約 56kb の遺伝子領域の欠失と関節炎の減弱が相関していることを示す結果を得ている。今後はこの他の重症化相関領域の特定と遺伝子同定を計るとともに, その機能を明らかにする。またこれまで得られた国内分離株についても同様の系でその重症度を定量化することで, 国内感染例では関節炎などの重症化した病態が見出されないことについてもその原因を分子生物学的に明らかにしていく予定である。

<共同研究者> Norris SJ(テキサス大学・医学部), Rosa PA(NIH/NIAID・ロッキーマウンテン研究所)

論文発表・著書

Masuzawa T, Hashimoto N, Kudaken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y: *Borrelia valaisiana*-related species found in Okinawa, Japan and neighboring islands in the subtropical zone. Journal of Medical Microbiology. (in press)

Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T,

Tanikawa T, Sata T, Watanabe H and Abe K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. Hepatology Research. 1-5, 2003.

Koizumi N, Kawabata H, Watanabe H.: Probable laboratory contamination of clinical specimens with *Leptospira meyeri*. Microbiology and Immunology. 47(4), 305-306, 2003.

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. 89(1), 196-198, 2003.

学会発表

Kawabata H and Watanabe H. Pathogenicity of Lyme disease *Borrelia*: *bbe02*-disruption mutants of *B.burgdorferi* B31 have a highly transformable, infectious phenotype. The Gordon Research Conference, The Biology of Spirochetes. Ventura, CA, USA. Jan. 2004.

増澤俊幸、角坂照貴、小泉信夫、川端寛樹、中村正治、平良勝也、今井康之:ライム病の存在が予期されなかった沖縄で見出されたライム病関連ボレリアの性状。第3回人と動物の共通感染症研究会。2003年11月

川端寛樹、渡辺治雄:ライム病ボレリア推定制限・修飾遺伝子破壊による感染性株の形質転換法確立。第86回日本細菌学会関東支部会。2003年10月

川端寛樹:ポストゲノムにおけるライム病研究新戦略と展望-ライム病ボレリア遺伝子改変技術の現状。第11回 SADI(ダニと疾病のインタ

ーフェイスに関するセミナー)。2003 年 9 月

川端寛樹、足立拓也、相楽裕子、渡辺治雄：
ライム病の輸入例。第 40 回レプトスピラシンポ
ジウム。2003 年

川端寛樹、渡辺治雄：ライム病ボレリアの New
type-restriction / modification system：遺伝
子導入可能な感染性ボレリア作成の可能性に
ついて。第 40 回レプトスピラシンポジウム。
2003 年

増沢俊幸、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。2003 年

小泉信夫、星野真西、谷川力、牧野敬、川端
寛樹、黒木俊郎、渡辺治雄：野生動物のレプト
スピラ保有状況調査 -東京都内ドブネズミ及
びアライグマの場合-。第 40 回レプトスピラシン
ポジウム。2003 年

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

病原性レプトスピラのタンパク質抗原の探索

分担研究者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 研究員

研究要旨

レプトスピラ感染症に対する新たなワクチンの開発を目標に、レプトスピラの抗原タンパク質の探索を行った結果、2種類のタンパク質 LigA-m, LigB-m を同定した。LigA-m は菌体表面に露出しているリポタンパク質であることが示唆され、また *lig* 遺伝子は非病原性レプトスピラには存在しない一方で、多くの病原性レプトスピラに存在することが明らかとなった。Lig タンパク質は、マウス感染モデルにおいて感染防御免疫を誘導することが明らかになった。さらに、さまざまな血清型に感染したレプトスピラ症患者血清中に Lig に対する抗体が産生されていることから、Lig タンパク質は多くの血清型のレプトスピラ感染に有効なワクチンの候補となりえることが示唆された。

研究目的

レプトスピラ症は、スピロヘータの一種である病原性レプトスピラ(*Leptospira*)の感染により起こる人獣共通感染症である。レプトスピラ症の予防には、ワクチンが有効であることはすでに明らかになっているが、現行のワクチンは血清型に特異的な効果しかなく、レプトスピラに存在する 250 以上の血清型の多くの感染に対して無効であると考えられている。したがって、多くの血清型感染に有効なワクチンの開発が急務となっている。レプトスピラの血清型は細胞表面のリポ多糖によって規定されていることから、本研究は、血清型に依存しない広範囲のレプトスピラ感染に有効なワク

チンの開発を目的に、レプトスピラのタンパク質抗原の同定を行った。

方法

1. レプトスピラ

本研究に使用したレプトスピラ菌株は、*L. interrogans* serovar Manilae strain UP-MMC-NIID である。

2. レプトスピラタンパク質抗原遺伝子の同定

レプトスピラ染色体 DNA 発現ライブラリー(UP-MMC株由来)をレプトスピラ感染マウス血清でイムノスクリーニングを行い、陽性クローンについて、さらにレプトスピ

ラ症患者血清を用いてウエスタンブロッティングを行った。この結果得られた2つのクローン IS2-2, IS2-16 について、そのインサートの塩基配列を決定した。それぞれのクローンについて、得られた塩基配列よりプライマーを設計し、*Cla*I 消化/セルフライゲーションしたゲノム DNA を鋳型にして IPCR を行って完全長塩基配列を決定した。IPCR の条件は、94°C, 1min-(94°C, 20sec-55°C, 30sec-72°C, 5min)×35 cycles である。

3. サザンブロット解析

ligA, *B* 両遺伝子間で保存されている 5' 領域をプローブとして、サザンブロット解析を行った。プローブはDIGラベルを行い、ハイブリダイゼーションは次の条件下で行った；ハイブリダイゼーション溶液(40% ホルムアミド, 6×SSC, 5×デンハルト溶液, 0.5% SDS, 10 µg/ml サケ精子 DNA), 25°C 1 晩. 洗浄液(1×SSC, 0.1% SDS), 55°C 15 分を 2 回。その後 Roche の洗浄, 検出キットを用いて、バンドの検出を行った。

4. 組換えタンパク質の発現, 精製および抗血清の作製

LigA-m, LigB-m の C 末端領域 (GST/LigA-m-C; 708-1224, GST/LigB-m-C; 670-1191) は, PCR によって増幅し, pGEX-6P-1 ベクターを用いて GST 融合タンパク質として大腸菌 JM109 で発現させ, グルタチオンセファロース 4B を用いて精製した。またこれらをマウスに免疫し抗血

清を作製した。

完全長 LigA-m, LigB-m の His₆ タグ融合タンパク質(LigA-m/His₆, LigB-m/His₆)は, PCR によって増幅し, pQE60 ベクターを用いて, 大腸菌 JM109 に発現させた。また N 末端を欠損した LigA-m, LigB-m の His₆ タグ融合タンパク質 (His₆/LigA-m Δ N; 68-1224, His₆/LigB-m Δ N; 68-1191)は, LigA-m/His₆, LigB-m/His₆ の PCR 産物を *Kpn*I, *Bgl*II 消化し, これを pHSG396 にサブクローニングした後, *Kpn*I, *Sal*I にて再度消化し, pQE30 ベクターを用いて大腸菌 BL21 で発現させた。融合タンパク質は, Ni-NTA を用いて精製した。GST/His₆ は, pGEX-6P-1 を鋳型として PCR によって増幅し pQE60 に, また His₆/GST は GST/His₆ の PCR 産物をプラントエンド化した後に pQE30 を用いて, 大腸菌 JM109 に発現, 精製した。

5. *In vivo* [³H]パルミチン酸ラベルおよび proteinase K 消化

LigA-m/His₆ の大腸菌での [³H]パルミチン酸ラベルおよび proteinase K 消化は, Koizumi の方法 (FEMSML 226 (2): 215-219 2003)で行った。

6. マウス感染防御実験

4 週齢の C3H/HeJ マウスにフロイント完全アジュバントと共に 10 µg の His₆/GST, His₆/LigA-m Δ N, His₆/LigB-m Δ N あるいは His₆/LigA-m Δ N と His₆/LigB-m Δ N 同時に皮下免疫し, 2, 4 週間後に等量をアジ

ュバントなしで腹腔内に追加免疫した。最終追加免疫 1 週間後に 1×10^6 細胞の UP-MMC-NIID を腹腔内に注射し、生死を観察した。

7. ELISA

96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに GST/LigA-mC, GST/LigB-mC あるいは GST を 120 ng (TBS; 20 mM Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.5 で調製) 添加し、4°C で 1 晩吸着させた後、20 mg/ml BSA/TBST (TBST; TBS, 0.05% Tween 20 で調製) で 37°C 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除去後、BSA/TBST で 50 倍希釈した患者血清 100 μ l を加え 37°C 2 時間インキュベーションし、200 μ l の TBST で 3 回洗浄を行った。その後 BSA/TBST で 2000 倍希釈した 2 次抗体 (HRP 標識ヤギ抗ヒト IgG) を 100 μ l 加え、37°C 1 時間インキュベーションし、上述の通りに洗浄を行った。洗浄後、ABTS 溶液を各ウェル 100 μ l 加えて室温で発色させ、405 nm で吸光度を測定した。

倫理面への配慮

レプトスピラ症患者血清を本研究に使用することについては、国立感染症研究所のヒトを対象とする医学研究に係る倫理審査委員会にて承認を受けた。患者に対しては、担当医師を通して研究の内容を説明し、血清を研究に使用することの同意書を得た。動物実験を行うにあたっては、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、実験動

物管理運営規定、動物の保護と管理に関する法律に基づいて行った。

結果

1. *ligA-m*, *ligB-m* 遺伝子の同定

マウス感染血清およびヒト患者血清を用いたイムノスクリーニングにより、レプトスピラ抗原遺伝子 *ligA-m*, *ligB-m* を同定した (accession nos. AB098516, AB098517)。

ligA-m, *ligB-m* 遺伝子の ORF には、約 90 アミノ酸の繰り返し配列がそれぞれ 12 個と 11 個存在し、N 末端の 6 個の繰り返し配列はお互いに 93% の相同性が認められた一方で、C 末端側の相同性は 40% 以下と低いことがわかった。これらの繰り返し配列は相同性検索の結果から、病原細菌の接着因子にみられる細菌イムノグロブリン様ドメインであることが明らかになり (pfam02368,, smart00635), すでに *L. interrogans* serovar Pomona で同定されていた LigA と高い相同性を示した。

2. レプトスピラ血清型間での *lig* 遺伝子の保存性

さまざまな病原性、非病原性レプトスピラにおける *lig* 遺伝子の存在をサザンブロット解析により調査した結果、調査した病原性レプトスピラ 10 株すべてにおいて、*lig* 遺伝子の存在が確認されたが、非病原性レプトスピラでは確認されなかった (Fig. 1)。

3. LigA-m は菌体表面に露出しているリポタンパク質である

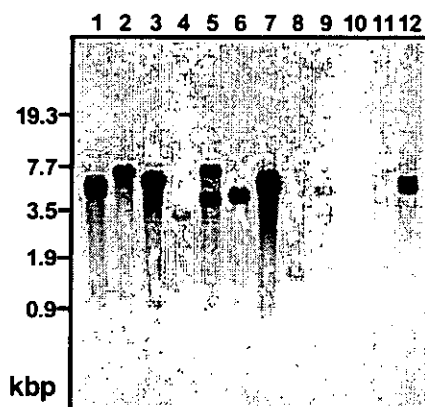


Fig. 1. Presence of *lig* genes among various leptospiral strains by Southern blot analysis. Five micrograms of genomic DNA were digested by *Cla* I and electrophoresed on a 0.9% agarose gel, transferred and hybridized with a probe derived from the *ligA-m* and *ligB-m* conserved region. Lanes: 1, *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae (Ictero No.1); 2, *L. interrogans* Lai (Lai); 3, *L. interrogans* Pomona (Pomona); 4, *L. borgpetersenii* Javanica (Veldrat Batavia 46); 5, *L. kirschneri* Grippotyphosa (Moskva V); 6, *L. noguchii* Panama (CZ214 K); 7, *L. inadai* Malaya (H6); 8, *L. santarosai* Shermani (1342 K); 9, *L. weilii* Celledoni (Celledoni); 10, *L. billexa* Patoc (Patoc I); 11, *L. meyeri* Semarang (Veldrat Semarang 173); 12, *L. interrogans* Manilae (UP-MMC-NIID). The upper band in *L. interrogans* UP-MMC-NIID (lane 12) corresponds to the *ligA-m* gene and the lower band corresponds to the *ligB-m* gene (data not shown).

イムノブロット解析により, *LigA-m* は *in vitro* で発現していることが明らかになった (Fig. 2A). 塩基配列から推定される *Lig* タンパク質の N 末端には脂質付加シグナルの存在することから, *LigA-m* はリポタンパク質であることが示唆された. これを検証するために, 完全長 *ligA-m* 遺伝子を *lac* プロモーターの制御下に持つプラスミドを導入した大腸菌を, [³H]-パルミチン酸による *in vivo* 標識を行った結果, SDS-PAGE 上で IPTG 誘導時のみ *LigA-m* に相当する分子量の位置に放射ラベルされたバンドが確認されたことから, *LigA-m* はリポタンパク質であると考えられた (Fig. 2B).

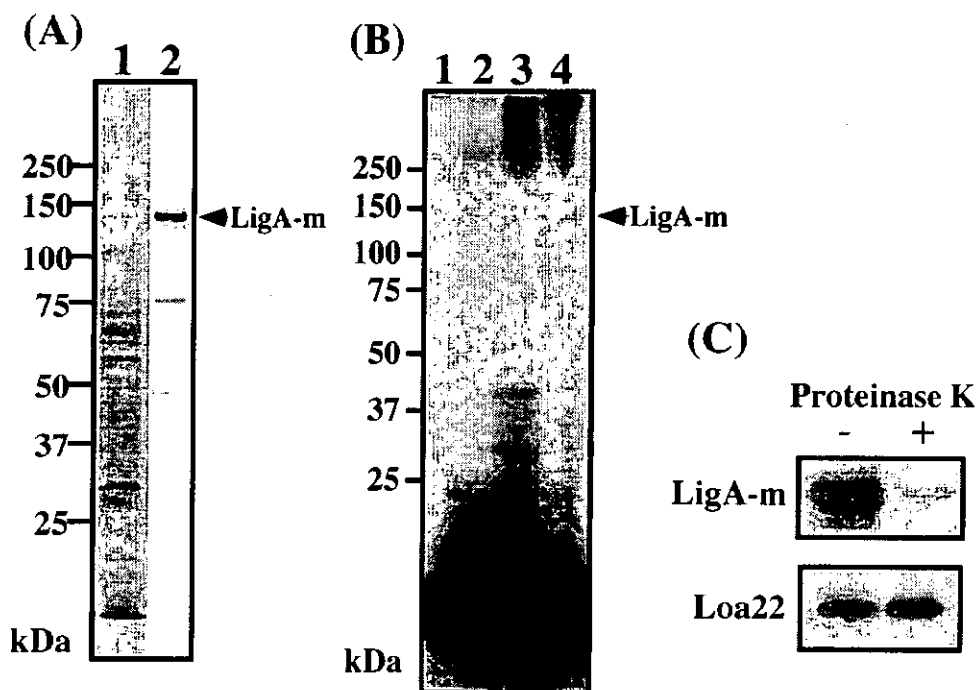


Fig. 2. *LigA-m* is a surface-exposed lipoprotein. (A) About 5×10^8 *L. interrogans* UP-MMC-NIID cells were suspended in 100 μ l of $1 \times$ SDS-PAGE sample buffer. 10 μ l of each sample was subjected to 4-20% SDS-PAGE and western blotting with anti-*LigA-mC* serum was performed. Lanes: 1, SDS-PAGE, CBB staining; 2, immunoblotting. (B) Lipid modification of the *LigA-m* expressed in *E. coli*. *E. coli* JM109 harboring the plasmid of GST or full-length *LigA-m* (pLIGAM-F) was cultured until the OD₆₀₀ of the culture reached 0.2 at 37°C. [³H]-palmitate (final conc. 10 μ Ci/ml) and IPTG (final conc. 100 μ M) were added to the culture, which was further incubated for 3 hr at 37°C. *E. coli* cells were pelleted and washed twice in PBS, then analyzed by 4-20% SDS-PAGE and fluorography. Lanes: 1, mock (no sample); 2, *E. coli* harboring the plasmid of GST, IPTG (+); 3, *E. coli* harboring the plasmid of full-length *LigA-m*, IPTG (-); 4, *E. coli* harboring the plasmid of full-length *LigA-m*, IPTG (+). (C) Proteinase K digestion. Motile leptospires were treated with proteinase K and the bacteria were lysed and analyzed by immunoblotting as described in Materials and Methods. (+) proteinase K treated; (-) untreated. Lysates were probed with anti-*LigA-mC* serum or anti-*Loa22* serum.