

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸

平成 17 年 (2005 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
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. 野生動物を保有体とする人畜共通スピロヘータ感染症に関する疫学調査研
究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 20
川端寛樹（国立感染症研究所・細菌第一部・室長）
2. 病原性レプトスピラの感染防御抗原 Lig タンパク質の解析・・・・・・・・ 26
小泉信夫（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
3. ネズミ類由来レプトスピラ調査(2004年)・・・・・・・・・・・・・・・・ 30
角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）
4. ペスト菌の迅速検出法に関する研究 LAMP 法を用いた迅速検出法の開
発・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33
高橋英之（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
5. 静岡県および長野県の野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌、' *Candidatus*
Neoehrlichia' 属菌、および *Bartonella* 属菌に関する分子疫学的調査・・・ 40
大橋典男（静岡県立大学・環境科学研究所・助教授）
6. 国内各地の小型ほ乳類とマダニ類における野兔病菌と紅斑熱群リケッチアの検
索・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 54
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所・主任研究員）
7. 壱塚熱および回帰熱の疫学的研究・・・・・・・・・・・・・・・・ 68
小林睦生（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）
8. 日本の港湾区域に生息するネズミのレプトスピラ保有実態調査・・・・・・・・ 76
後藤郁夫（神戸検疫所・輸入食品・検疫検査センター・副統括検査官）
9. 2004年度野外調査一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 80
10. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

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

レプトスピラの血清型参考株の DNA ジャイレース B サブユニット (*gyrB*) 解析を網羅的に行い、野外分離株の血清型推定に応用した。また、輸入げっ歯類を対象としたレプトスピラ保有調査を行い、分離株及び検出したレプトスピラの性状解析を行なうことにより、以下の知見を得た。

1. 191 種類の血清型からなる 192 の参考株の *gyrB* 解析を網羅的に行なった。*gyrB* は *flaB* に比べ多様性に富んでおり、多くの血清型を鑑別できることが示唆された。
2. 日本各地の野鼠と静岡県のイヌからレプトスピラの分離に成功した。分離株の血清型は *gyrB* 解析によって推定し、血清学的解析法で同定した。愛知県の野鼠由来株や静岡県のイヌ由来株は、推定結果と同定結果が一致していた。一方、長野県などの野鼠由来株は推定結果と同定結果が一致せず、*gyrB* の多様性が同じ血清型に属する株間でもみられることが示された。
3. 輸入げっ歯類アフリカヤマネからレプトスピラの分離に成功した。分離株の *gyrB* 解析の結果、参考株には配列が一致する株はみられず、また、これまで日本に存在が確認されている血清型ではないことが示唆された。分離できなかった個体からも nested-PCR 法によって高い割合でレプトスピラが検出され、輸入げっ歯類を介してレプトスピラが国内に侵入した事実を示した。
4. 実験的レプトスピラ感染イヌの尿から、*flaB* 遺伝子を標的とする nested PCR による迅速、高感度な検出法、及びリアルタイム PCR による排菌数の定量法の開発に成功した。

研究分担者

- 川端寛樹 国立感染症研究所・細菌部・室長
小泉信夫 国立感染症研究所・細菌部・主任研究官
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・主任研究官
大橋典男 静岡県立大学・環境科学研究所・助教授
藤田博己 大原総合病院附属大原研究所・主任研究員
小林陸生 国立感染症研究所・昆虫医学部・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）、宇根有美（麻布大学）、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）、全国の検疫所の協力者（分担研究者 後藤郁夫報告書参照）、名古屋市生活衛生センター・感染症調査係（分担研究者 角坂照貴報告書参照）

研究課題 1 レプトスピラ血清型参考株の *gyrB* データベース構築

A. 研究目的

レプトスピラは、スピロヘータ目（*Spirochaetales*）レプトスピラ科（*Leptospiraceae*）レプトスピラ属（*Leptospira*）に分類されるグラム陰性、好気性の螺旋状の細長い運動性細菌で、病原性、非病原性のものを含め、免疫学的性状に基づき 30 余りの血清群（serogroup）、さらにその血清群内では 250 余りの血清型（serovar）に分類されている。また、全ゲノムハイブリダイゼーションによる分子生物学分類法により、13 遺伝種と種名のない 4 遺伝種に分類されている。レプトスピラ症の流行を予防するには、病原体、感染経路、保有体のバックグラウンドの把握が重要である。特にレプトスピラ症の実態の解明、予防法、診断法の確立には現地で流行する血清型を明らかにすることが必須である。レプトスピラの分類、同定は古典的な

顕微鏡凝集試験（microscopic agglutination test, MAT）や交差吸収試験（cross-agglutination absorption test, CAAT）などの血清学的解析法が標準的に行われてきた。しかしながら MAT の実施にはレプトスピラ生菌培養を必要とし、また 250 種もの血清型参考株とそれに対する抗血清を準備しなくてはならないなど、一般的な研究室で日常的に実施することは困難である。

本研究では、迅速簡便な血清型推定法の開発をめざし、191 種類の血清型参考株の *gyrB* のシーケンス解析を網羅的に行い、データベースの構築を行った。

B. 研究方法

1. 使用菌株とその培養法

本研究にはオランダ王立熱帯研究所（Koninklijk Instituut voor de Tropen, KIT, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis）の Rudy Hartskeerl 博士より恵与された 13 種、26 血清群、191 の血清型からなるレプトスピラ 192 株を使用した（表 1）。この株群の一部の血清型は家畜伝染病予防法に規定される報告伝染病起因血清型に該当するため輸入禁止となっている。研究目的の使用のため、農林水産大臣の許可を受けて輸入を行なった。レプトスピラは、EMJH 培地中で 30℃ 好气的条件で培養した。

表 1. KIT より輸入して *gyrB* 解析に使用した参考株

No.	Serogroup	Species	Serovar	Strain
1	Australis	<i>L. biflexa</i>	Andamana	CH 11
2		<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico
3		<i>L. noguchii</i>	Bajan	Toad 60
4		<i>L. interrogans</i>	Bratislava	Jez Bratislava
5		<i>L. interrogans</i>	Bangkok	BD 92
6		<i>L. interrogans</i>	Hawain	LT 62-68

7		<i>L. interrogans</i>	Jalna	Jalna
8		<i>L. interrogans</i>	Lora	Lora
9		<i>L. interrogans</i>	Muenchen	München C 90
10		<i>L. noguchii</i>	Nicaragua	1011
11		<i>L. noguchii</i>	Peruviana	V 42
12		<i>L. kirschneri</i>	Ramisi	Musa
13		<i>L. noguchii</i>	Rushan	507
14		Unknown	Soteropolitana	R 93
15	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
16		<i>L. interrogans</i>	Bangkinang	Bangkinang I
17		<i>L. kirschneri</i>	Bim	1051
18		<i>L. kirschneri</i>	Bulgarica	Nicolaevo
19		<i>L. kirschneri</i>	Butembo	Butembo
20		<i>L. interrogans</i>	Carlos	C 3
21		<i>L. kirschneri</i>	Erinaceauriti	Erinaceus auritus 670
22		<i>L. noguchii</i>	Fortbragg	Fort Bragg
23		<i>L. kirschneri</i>	Lambwe	Lambwe
24		<i>L. interrogans</i>	Mooris	Moore's
25		<i>L. kirschneri</i>	Mujunkumi	Yeszsh 237
26		Unknown	Nanla	A 6
27		<i>L. interrogans</i>	Rachmati	Rachmat
28		<i>L. interrogans</i>	Weerasinghe	Weerasinghe
29	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Arborea
30		<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum	Mus 127
31		<i>L. borgpetersenii</i>	Castellonis	Castellon 3
32		<i>L. borgpetersenii</i>	Guangdong	1853
33		<i>L. santarosai</i>	Peru	MW 10
34	Bataviae	<i>L. noguchii</i>	Argentinensis	Peludo
35		<i>L. santarosai</i>	Balboa	735 U
36		<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Swart
37		<i>L. santarosai</i>	Brasiliensis	An 776
38		<i>L. noguchii</i>	Claytoni	1348 U
39		<i>L. kirschneri</i>	Djatzi	HS 26
40		<i>L. santarosai</i>	Kobbe	CZ 320
41		<i>L. interrogans</i>	Losbanos	LT 101-69
42		<i>L. interrogans</i>	Paidjan	Paidjan
43		<i>L. santarosai</i>	Rioja	MR 12
44		<i>L. interrogans</i>	Santarosa	LT 21-74
45		<i>L. kirschneri</i>	Bafani	Bafani
46	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Benjamini	Benjamin
47		<i>L. interrogans</i>	Bindjei	Bindjei
48		<i>L. interrogans</i>	Broomi	Patane
49		<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
50		<i>L. kirschneri</i>	Galtoni	LT 1014
51		<i>L. interrogans</i>	Jonsis	Jones
52		<i>L. inadai</i>	Malaya	H 6
53		<i>L. interrogans</i>	Portlandvere	MY 1039
54		<i>L. interrogans</i>	Schueffneri	Vleermuis 90 C
55	Celledoni	<i>L. borgpetersenii</i>	Anhoa	LT 90-68
56		<i>L. weilii</i>	Hainan	6712

57		<i>L. weilii</i>	Mengding	M 6906
58		<i>L. borgpetersenii</i>	Whitcombi	Whitcomb
59	Cynopteri	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
60		<i>L. santarosai</i>	Tingomaria	M 13
61	Djasiman	<i>L. kirschneri</i>	Agogo	Agogo
62		<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman
63		<i>L. interrogans</i>	Gurungi	Gurung
64		<i>L. noguchii</i>	Huallaga	M 7
65		<i>L. interrogans</i>	Sentot	Sentot
66	Grippotyphosa	<i>L. santarosai</i>	Canalzonae	CZ 188
67		<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V
68		Unknown	Huanuco	M 4
69		Unknown	Muelleri	RM 2
70		<i>L. kirschneri</i>	Ratnapura	Wumalasena
71		<i>L. interrogans</i>	Valbuzzi	Valbuzzi
72		<i>L. kirschneri</i>	Vanderhoedeni	Kipod 179
73	Hebdomadis	<i>L. santarosai</i>	Borincana	HS 622
74		<i>L. santarosai</i>	Goiano	Bovino 131
75		<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
76		<i>L. borgpetersenii</i>	Jules	Jules
77		Genomospecies	Manzhuang	A 23
78		<i>L. santarosai</i>	Maru	CZ 285
79		<i>L. santarosai</i>	Sanmartini	CT 63
80		<i>L. borgpetersenii</i>	Worsfoldi	Worsfold
81	Hurstbridge	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	BUT6
82	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Birkini	Birkin
83		<i>L. kirschneri</i>	Bogvere	LT 60-69
84		<i>L. interrogans</i>	Copenhageni	M 20
85		<i>L. kirschneri</i>	Dakota	Grand River
86		<i>L. interrogans</i>	Gem	Simon
87		<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Ictero I
88		<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
89		<i>L. interrogans</i>	Lai	Lai
90		<i>L. interrogans</i>	Mankarso	Mankarso
91		<i>L. kirschneri</i>	Mwogolo	Mwogolo
92		<i>L. interrogans</i>	Naam	Naam
93		<i>L. kirschneri</i>	Ndahambukuje	Ndahambukuje
94		<i>L. kirschneri</i>	Ndambari	Ndambari
95		<i>L. interrogans</i>	Smithi	Smith
96		<i>L. borgpetersenii</i>	Tonkini	LT 96-68
97	Javanica	<i>L. borgpetersenii</i>	Ceylonica	Piyasena
98		<i>L. weilii</i>	Coxi	Cox
99		<i>L. borgpetersenii</i>	Dehong	De 10
100		<i>L. santarosai</i>	Fluminense	Aa 3
101		<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46
102		Genomospecies	Mengla	A 85
103		<i>L. weilii</i>	Mengma	S 590
104		<i>L. weilii</i>	Mengrun	A 102
105		<i>L. borgpetersenii</i>	Menoni	Kerala
106		<i>L. borgpetersenii</i>	Poi	Poi

107		<i>L. meyeri</i>	Sofia	Sofia 874
108		<i>L. borgpetersenii</i>	Sorexjalna	Sorex Jalna
109		<i>L. santarosai</i>	Vargonicas	24
110		<i>L. borgpetersenii</i>	Zhenkang	L 82
111	Louisiana	<i>L. interrogans</i>	Lanka	R 740
112		<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945
113		<i>L. noguchii</i>	Orleans	LSU 2580
114	Manhao	Genomospecies	Manhao	L60
115		<i>L. inadai</i>	Lincang	L 14
116	Mini	<i>L. santarosai</i>	Beye	1537 U
117		<i>L. weilii</i>	Hekou	H 27
118		<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Sari
119		<i>L. meyeri</i>	Perameles	Bandicoot 343
120		<i>L. interrogans</i>	Szwajizak	Szwajizak
121		Genomospecies	Yunnan	A 10
122	Panama	<i>L. noguchii</i>	Panama	CZ 214
123	Pomona	<i>L. kirschneri</i>	Kunming	K 5
124		<i>L. kirschneri</i>	Mozdok	5621
125		<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
126		<i>L. noguchii</i>	Proechimys	1161 U
127		<i>L. santarosai</i>	Tropica	CZ 299
128	Pyrogenes	<i>L. interrogans</i>	Abramis	Abraham
129		<i>L. santarosai</i>	Alexi	HS 616
130		<i>L. interrogans</i>	Biggis	Biggs
131		<i>L. interrogans</i>	Camilo	LT 64-67
132		<i>L. interrogans</i>	Guaratuba	An 7705
133		<i>L. borgpetersenii</i>	Hamptoni	Hampton
134		<i>L. borgpetersenii</i>	Kwale	Julu
135		<i>L. interrogans</i>	Manilae	LT 398
136		<i>L. weilii</i>	Menglian	S 621
137		<i>L. noguchii</i>	Myocastoris	LSU 1551
138		Unknown	Nigeria	Vom
139		<i>L. santarosai</i>	Prinestown	TRVL 112499
140		<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem
141		<i>L. interrogans</i>	Robinsoni	Robinson
142		<i>L. interrogans</i>	Zanoni	Zanoni
143	Ranarum	Genomospecies	Pinchang	80-412
144		<i>L. meyeri</i>	Ranarum	ICF
145	Sarmin	<i>L. santarosai</i>	Machiguenga	MMD 3
146		<i>L. santarosai</i>	Rio	Rr 5
147		<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin
148		<i>L. interrogans</i>	Waskurin	LT 63-68
149		<i>L. santarosai</i>	Weaveri	CZ 390
150	Sejroe	<i>L. borgpetersenii</i>	Balcanica	1627 Burgas
151		<i>L. santarosai</i>	Caribe	TRVL 61866
152		<i>L. interrogans</i>	Geyaweera	Geyaweera
153		<i>L. santarosai</i>	Gorgas	1413 U
154		<i>L. santarosai</i>	Guaricura	Bov. G.
155		<i>L. interrogans</i>	Haemolytica	Marsh
156		<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno

157		<i>L. borgpetersenii</i>	Istrica	Bratislava
158		<i>L. interrogans</i>	Medanensis	Hond HC
159		<i>L. borgpetersenii</i>	Nyanza	Kibos
160		<i>L. borgpetersenii</i>	Polonica	493 Poland
161		<i>L. interrogans</i>	Recreo	380
162		<i>L. interrogans</i>	Ricardi	Richardson
163		<i>L. interrogans</i>	Roumanica	LM 294
164		<i>L. interrogans</i>	Saxkoebing	Mus 24
165		<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroe	M 84
166		<i>L. santarosai</i>	Trinidad	TRVL 34056
167		<i>L. interrogans</i>	Wolffi	3705
168	Semarang	<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I
169		Genomospecies	Saopaulo	Sao Paulo
170		<i>L. meyeri</i>	Semarang	Veldrat Semarang 173
171	Shermani	<i>L. santarosai</i>	Shermani	1342 K
172	Tarassovi	<i>L. santarosai</i>	Atchafalaya	LSU 1013
173		<i>L. santarosai</i>	Atlantae	LT 81
174		<i>L. santarosai</i>	Bakeri	LT 79
175		Unknow	Banna	A 31
176		<i>L. santarosai</i>	Bravo	Bravo
177		<i>L. santarosai</i>	Chagres	1913 K
178		<i>L. santarosai</i>	Darien	637 K
179		<i>L. borgpetersenii</i>	Gengma	M 48
180		<i>L. borgpetersenii</i>	Guidae	RP 29
181		<i>L. borgpetersenii</i>	Kanana	Kanana
182		<i>L. inadai</i>	Kaup	LT 64-68
183		<i>L. borgpetersenii</i>	Kisuba	Kisuba
184		<i>L. weilii</i>	Langati	M 39090
185		<i>L. weilii</i>	Mogden	Compton 746
186		<i>L. santarosai</i>	Navet	TRVL 109873
187		<i>L. santarosai</i>	Rama	316
188		<i>L. sanarosai</i>	Sulzerae	LT 82
189		<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelitsin
190		<i>L. borgpetersenii</i>	Tunis	P 2/65
191		<i>L. weilii</i>	Vughia	LT 89-68
192		<i>L. borgpetersenii</i>	Yunxian	L100

2. *gyrB*のシーケンス解析

培養した菌液 1mL をより InstaGene™ Matrix (Bio Rad) を使用して鋳型 DNA を調製した。PCR は、表 2 に示した *gyrB* に特異的なプライマー UP1TL、UP2rTL を用い、94℃で 5 分間前熱変性、さらに熱変性 94℃で 30 秒、アニーリング反応 48℃で 1 分間、伸長反応 72℃で 90 秒間のサイクルを 35 サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を 72℃で 10 分間行った。増副産物を Montage™ PCR

Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応後 Centri-Sep™ spin columns (Princeton Separations) を用い、マニュアルに従って精製した。シーケンス解析には、ポリマーは ABI Prism POP-4™ (Applied Biosystems)、80cm のキャピラリーを用い ABI PRISM

表 2. *gyrB* および *flaB* の PCR, ならびにシーケンス解析に使用したプライマー

Primer	Sequence (5'-3')	Position	Origin
UP1TL	CAYGCNNGGNAARTTYGA	301-320	Ictero No. 1
UP2rTL	TCNACRTCNGCRTCNGCTAT	1520-1502	Ictero No. 1
LavrF	GGTCTTTCCGGAGAAGATG	940-958	Ictero No. 1
LavrF4	AAAGAAAAATTAGTGAACGC	1024-1043	Ictero No. 1
LavrR	GAATTGAATTGAGGTTGAGG	1016-997	Ictero No. 1
LavrR3	TTMCCNGGAAGVCCDCCHCC	1232-1213	Ictero No. 1
L-flaB-F1	CTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC	35-57	Akivami A
L-flaB-F2	TGTGCACAAGACGATGAAAGC	66-86	Akivami A
FlaB-710F	GAATCTAGAATTCGAGACGCCG	730-709	Akivami A
L-flaB-R1	TGAATTCGGTTTCATATTTGCC	825-804	Akivami A
L-flaB-R2	AACATTGCCGTACCACTCTG	797-778	Akivami A
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT		
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC		

(M= A or C, R=A or G, Y=C or T, V=A or C or G, N=A or C or G or T)

C. 研究結果と考察

L. interrogans 59 株、*L. kirschneri* 22 株、*L. noguchii* 13 株、*L. borgpetersenii* 31 株、*L. santarosai* 34 株、*L. weilii* 11 株、*L. alexanderi* 4 株、*L. inadai* 3 株、*L. meyeri* 4 株、Genomospecies1 1 株、Genomospecies5 1 株、*L. fainei* 1 株、*L. biflexa* 2 株及び未同定 6 株の合計 192 株の *gyrB* 約 1,200bp を解析し、系統樹を作成した。ここでは、代表的 83 株の *gyrB* 解析による系統樹を示した(図 1)。*gyrB* 配列は血清型間で多様性を示し、血清型の異なる参考株を鑑別することができた。レプトスピラの特定の遺伝子について、これだけ多くの血清型の遺伝子配列を決定したのはこれが初めての試みである。本研究によって血清型間の遺伝子レベルでの類縁関係を明らかにするとともに、それぞれの血清型を代表する参考株の鑑別に利用できることを明らかにした。*gyrB* など特定の遺伝子配列によって種や血清型を分類する利点は、微量の菌からでも PCR で特定の遺伝子領域を増幅して解析できること、解析結果をデジタルデータとして保存でき、データベース上で多くの研究者が共有できる

ことである。

一方、一部では異なる血清型間で同一の配列を示すものもあった。DNA ハイブリダイゼーション法により種を同定されたそれぞれの血清型を代表する参考株は、それぞれの種ごとにクラスターを形成したが、DNA ハイブリダイゼーション法で決定した種と *gyrB* 解析結果が一致しない株が 23 株あった。これらの不一致株については、現在 DNA ハイブリダイゼーションによる種の確認を行う予定である。

レプトスピラの血清型は非常に多く、これだけ多くの血清型の中から 1 つの血清型を同定することは容易ではない。ヒトや野生動物からの分離株の血清型を同定する際、*gyrB* 解析をおこなうことによりいくつかの候補となる血清型に絞り込めるのであれば、それは極めて有効な手段となる。今回の結果を基にして *gyrB* データベースを構築し、さらにはまだ解析をおこなっていない血清型や、解析を行なった血清型で今回とは異なる株の配列を加えデータベースを再構築することで、本法の有用性はさらに増すと考えられる。本データベースが、レプトスピラの血清型推定に将

来有効利用されることを期待したい。

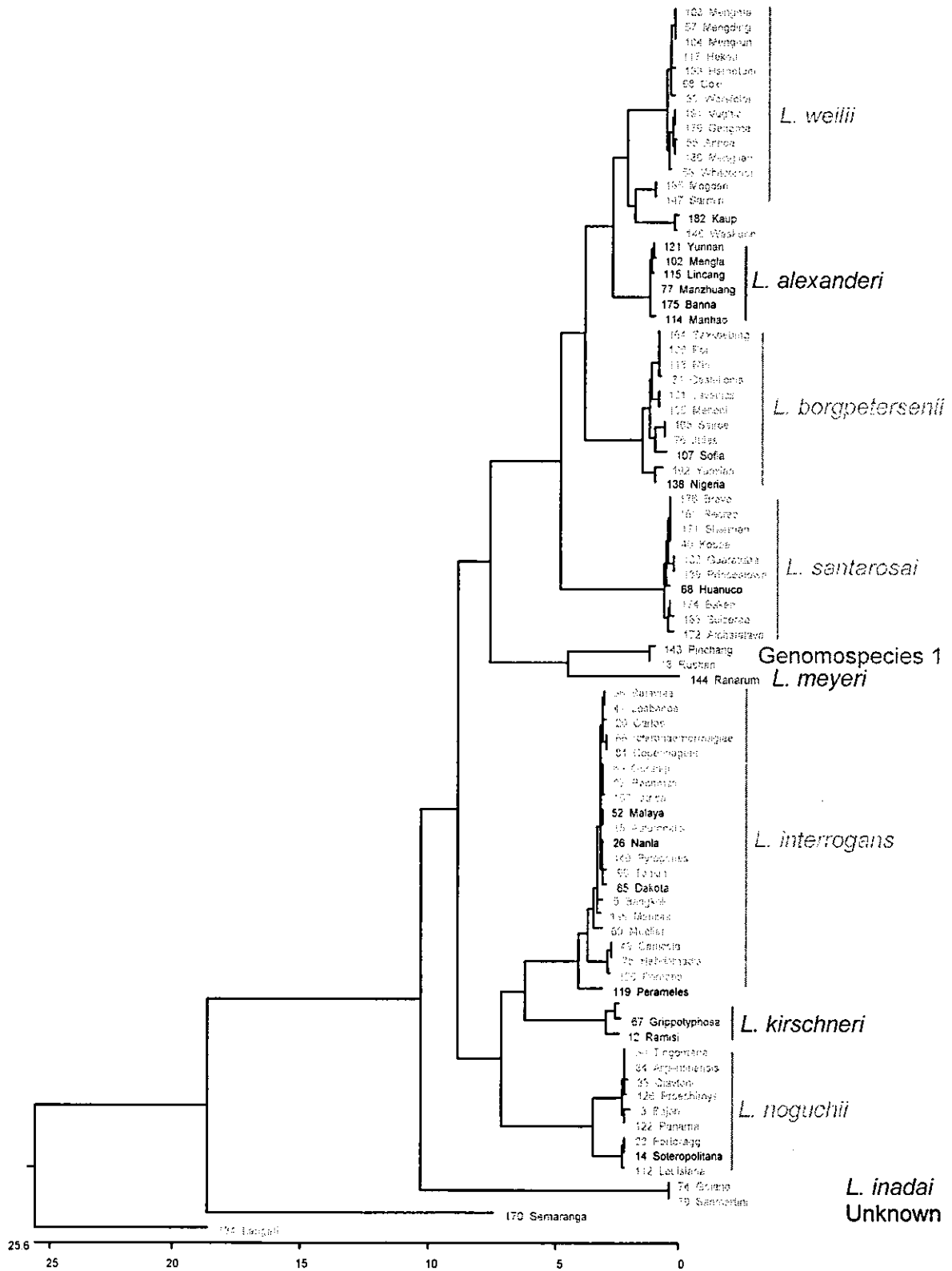


図 1. 83 参考株の *gyrB* 解析による系統樹

表 1 の株番号、ならびに血清型番号を示した。

研究課題 2 国内の野鼠分離株の性状解析

A. 研究目的

日本各地の野鼠におけるレプトスピラ保有実態の把握を目的として調査を行った。また、静岡県内の犬についても調査を行った。各分離株について *gyrB* 解析を行い、分離株の血清型を推定した。さらに顕微鏡凝集試験 (MAT)、交差吸収試験 (CAAT)、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長パターン (LRFP) 解析の結果から同定した血清型を比較することにより、*gyrB* 解析による血清型鑑別能力の評価を行った。

B. 研究方法

1. 野鼠及びイヌからのレプトスピラの分離

金網カゴ、及びシャーメントラップで捕獲した野鼠の腎臓を EMJH 培地中に接種し 30°C で 3 ヶ月間培養した。その間 1 ヶ月ごとに暗視野顕微鏡でレプトスピラの増殖の有無を確認した。イヌからの分離は、山下昭広氏 (静岡県動物管理指導センター) により屠殺前の野犬を解剖して得た腎臓の一部を培養した。

2. ウサギ抗血清の作製と顕微鏡凝集試験 (MAT)

分離株及び参考株の培養液 ($2-4 \times 10^8$ cells/mL) 5mL を遠心集菌し、滅菌生理食塩水で洗浄後、1mL の滅菌生理食塩水に再懸濁し、56°C、30 分間不活性化し、抗原液とした。これを静脈内に 5 日間隔で 2 回接種し、10 日目に静脈より採血し、抗体価を MAT で確認した。抗原液 1ml

を静脈内に接種し、7 日目に心臓より全採血し、血清を分取した。顕微鏡凝集試験は常法に従って行った。

3. 交差吸収試験 (cross-agglutination absorption test, CAAT)

抗原液となるレプトスピラ培養液 (1×10^8 cells/mL) 40mL を遠心集菌し、1mL の上清に再懸濁した。250 μ L の 10 倍希釈ウサギ免疫抗血清を加え、30°C で振とうしながら 2 時間反応後、遠心によってレプトスピラを沈澱させた。上清の吸収菌株に対する残余力価が 100 以下であれば特異的凝集抗体が吸収されたと判定し、これを吸収抗血清とした。100 倍以上の抗体価を示した時は、前述の吸収操作を繰り返した。この吸収抗血清を用いて、前述の MAT に準じて抗体価を測定した。

C. 研究結果と考察

1. レプトスピラの分離状況

2003 年と 2004 年の調査では、490 匹の野鼠から 32 株のレプトスピラを分離した。全体での分離率は 6.5% であり、各地の分離率は 0-36.8% であった (表 3, 4)。また、静岡県内のイヌを対象とした 2003 年と 2004 年の調査の結果、383 匹中 1 匹からレプトスピラを分離した。分離率は 0.3% であった。

2. 血清型の同定

2003 年調査で得られた株を含めて、*gyrB* 解析、ならびに交差凝集試験、交差凝集吸収試験、並びに LRFP 解析により種、並びに血清型の推定を行った (表 5)。

表3 野鼠からの *Leptospira* 分離成績

調査地	捕獲野鼠数	培養陽性個体数	分離率 (%)	株
2003年				
北海道	96	14	14.5	H14, H16, H17, H19, H20, H23, H25, H33, H35, H37, H49, H65, H75, H86
新潟	6	0	0.0	
静岡	91	1	1.1	Fuji9/03
長野	63	6	9.5	Yachiho1, Yachiho2, Yachiho3, Nagano5, Nagano10, Nagano12
愛知	65	1	1.5	Nagoya2
岐阜	15	1	6.7	AC6/03
兵庫	25	0	0.0	
広島	1	0	0.0	
福岡	5	0	0.0	
鹿児島	37	1	2.7	K29
与路島 (鹿児島)	19	7	36.8	Yoro1, Yoro2, Yoro3, Yoro4, Yoro5, Yoro6, Yoro7
2004年				
愛知	49	1	2.0	AC11/04
静岡	18	0	0.0	
計	490	32	6.5	

表4. 2003~2004年の分離株

分離株	調査地	由来	性別	組織 / 培地
2003				
H14	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
H16	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
H17	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
H19	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
H20	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
H23	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
H25	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
H33	北海道	<i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i>	F	Kidney / EMJH
H35	北海道	<i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i>	M	Kidney / EMJH
H37	北海道	<i>Clethrionomys rutilus mikado</i>	F	Kidney / EMJH
H49	北海道	<i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i>	F	Kidney / EMJH
H65	北海道	<i>Clethrionomys rufocanus bedfordiae</i>	M	Kidney / EMJH
H75	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
H86	北海道	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Yachiho1	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
Yachiho2	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
Yachiho3	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	F	Kidney / EMJH
Nagano5	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Nagano10	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Nagano12	長野	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Nagoya2	愛知	<i>Rattus norvegicus</i>	M	Kidney / EMJH
AC6/03	岐阜	<i>Apodemus argenteus</i>	F	Kidney / EMJH
K29	鹿児島	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Fuji9/03	静岡	<i>Apodemus speciosus</i>	M	Kidney / EMJH
Yoro1	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
Yoro2	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
Yoro3	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
Yoro4	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
Yoro5	与路島	<i>Rattus rattus</i>	M	Kidney / EMJH
Yoro6	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
Yoro7	与路島	<i>Rattus rattus</i>	F	Kidney / EMJH
2004				
AC11/04	名古屋	<i>Rattus norvegicus</i>	F	Kidney / EMJH

表 5. 分離株の種、血清型の同定

分離株	<i>gyrB</i> (遺伝種 / 節制型)	MAT (血清群)	CAAT (血清型)	PFGE (血清型)
Group 1 Yoro1, Yoro2 Yoro3, Yoro4 Yoro5, Yoro6 Yoro7	<i>L. borgpeterseni</i> / Deh ^(a) , Men ^(b) , Cey ^(c) , Zhe ^(d) , Jav ^(e)	Jav	Jav	Not Jav
Group 2 AC11/04 H14, H16 H17, H19 H20, H25 H75, H86 Fuji9/03	<i>L. interrogans</i> / Ict ^(f) , Cop ^(g)	Ict, Pyr ^(h) , Sar ⁽ⁱ⁾	Ict	Ict
Group 3 Yachiho1 Yachiho2 Yachiho3 Nagano5 Nagano10 Nagano12 K29	<i>L. interrogans</i> / Hebdomadis	Autumnalis	vAutumnalis	Not Autumnalis
Group 4 D218 H23, H33	<i>L. interrogans</i> / Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis	Not Hebdomadis
Group 5 H35, H37 H49, H65	<i>L. borgpeterseni</i> / Poi, Mini, Sorexjalna, Saxkoebing	NT	NT	NT
Group 6 Nagoya2 AC6/03	<i>L. interrogans</i> / Unknown	NT	NT	NT

^(a)Deh = Dehong, ^(b)Men = Menoni, ^(c)Cey = Ceylonica, ^(d)Zhe = Zhenkang, ^(e)Jav = Javanica, ^(f)Ict = Icterohaemorrhagiae, ^(g)Cop = Copenhageni, ^(h)Pyr = Pyrogenes, ⁽ⁱ⁾Sar = Sarmin, NT = Not teste

分離した 33 株のうち、グループ 1 の鹿児島県与路島の野鼠由来 7 株、グループ 2 の愛知県野鼠由来 AC11/04、並びにグループ 3 と 4 の 17 株について血清型の同定を行い、*gyrB* 解析による血清型鑑別能力の検討を行った。グループ 1, 2, 4 では *gyrB* 解析による血清型推定に成功した。一方、グループ 3 では *gyrB* では Hebdomadis と推定されたが、血清学的には Autumnalis であった。このような矛盾は *gyrB* データベースを構築する株が、参考株のみであるためと思われる。今後、国内の分離株について *gyrB* のデータを蓄積し、データベースの再構築を行うことで、推定精度を改善できると考えている。また、グループ 5 と 6 の 8 株は *gyrB* 解析は行ったが、菌の培養がうまくいかず血清型の同定は行えなかった。また、培養開始後 1-2 週間は暗視野顕微鏡下でレプトスピラを確認できたが、1 ヶ月後には

確認できなくなった培養がいくつかあった。初期培養の上清から DNA を抽出し *flaB* を標的とした PCR 法によってレプトスピラの検出を行ったところ、増殖が確認できなかった培養の初期培養からもレプトスピラが検出されることから、使用した培地では培養不可能な株も多数存在していることが示された。今回は市販ウサギ血清を 2.5% 加えた EMJH 強化培地を使用した。ウサギ新鮮血清を用いることや、血清濃度を高くするなど改善の余地があると思われる。

gyrB の多様性は異なる血清型間だけでなく同一の血清型内に含まれる株間にも見られた。グループ 3 のように *gyrB* 配列が参考株と異なるものについても、分離株同士の配列は一致していた。このことから血清型を同定した新たな *gyrB* 配列を加えて、データベースの再構築を行うことにより、血清型の推定能力を高めることができると考えられる。

研究課題3 輸入げっ歯類のレプトスピラ保有の実態と分離株の性状解析

A. 研究目的

わが国には、家畜、ペット、実験動物及び展示動物などの多種多様な動物が、世界各国から輸入されている。これまで、イヌは狂犬病ウイルス、アフリカ産サルはエボラなどのウイルス性出血熱ウイルス、コウモリはニッパウイルスなど狂犬病関連ウイルス、マストミスはラッサ熱ウイルス、プレーリードッグはペスト菌、並びに野兎病菌の保有体であることが明らかであることから、国内への侵入を防ぐために、検疫措置や輸入禁止措置が執られてきた。一方、その他のほ乳類、鳥類、爬虫類などは何の検疫もなく国内に輸入されてきた。平成13年から15年にかけて輸入統計品目表が改正され、詳細な動物の輸入状況が把握できるようになり、この統計によると、平成14年げっ歯類は752,185匹輸入されていることがわかった。そのうちハムスター(678,793匹)やフェレット(27,418匹)は繁殖された動物だが、リス(57,540匹)やその他のげっ歯類(51,373匹)の多くは捕獲した野生動物と考えられる。その他、鳥類や爬虫類など、このような野生動物が十分な安全性を評価、確認されないまま日本に輸入され、愛玩用として販売されているのが現状である。

今回は、2003年、2004年に輸入した17種類のげっ歯類317匹を対象とし、レプトスピラの分離を試みた。前述の方法に準じて、遺伝種並びに血清型の同定を試みた。また、2004年に輸入したげっ歯類については、*flaB*を標的としたPCR法を用いてげっ歯類の膀胱からレプトスピラの検出を試みた。本研究は厚生労働科学研究費(主任研究者 東京大学農学部 吉川泰弘教授)の一環として、麻布大学獣医学部 宇根有美助教授を中心として実施された。

B. 研究方法

1. 輸入げっ歯類からのレプトスピラの分離

各国から輸入したげっ歯類の腎臓及び膀胱は宇根有美助教授(麻布大学獣医学部)より分与を受けた。この腎臓を用いレプトスピラの分離培養を行った。

2. 膀胱からのレプトスピラ *flaB* のPCR反応

輸入げっ歯類の膀胱を滅菌したカッターナイフで米粒大に切断し、Dneasy Tissue Kit (Qiagen)を用い、マニュアルに従ってDNAを抽出した。これをPCR試料とした。First PCRには、表2に示したL-*flaB*-F1とL-*flaB*-R1を用いた。PCRは熱変性94°Cで30秒、アニーリング反応62°Cで30秒間、伸長反応72°Cで1分間のサイクルを40サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を72°Cで10分間行った。nested PCRはfirst PCR産物を鋳型とし、プライマーL-*flaB*-F2とL-*flaB*-R2のセット、またはFlaB-710FとL-*flaB*-R2のセットを用いて行った。PCR反応は、94°Cで3分間前熱変性を行った。さらに、熱変性94°Cで15秒、アニーリング反応60°Cで30秒間、伸長反応72°Cで60秒、または15秒間のサイクルを30サイクル繰り返し、最後に最終伸長反応を72°Cで10分間行った。

C. 研究結果

1. 輸入げっ歯類からのレプトスピラ分離状況

17種類、317匹の輸入げっ歯類からレプトスピラの分離を試みた。アフリカヤマネ(*Grathurus murinus*)から5株のレプトスピラを分離した(2003年報告済み)。アフリカヤマネのレプトスピラ保有率は50%であり、非常に高い確率でレプトスピラを保有していた。一方、本年度分からはレプトスピラは分離できなかった。

2. アフリカヤマネ由来株の同定

分離した 5 株は全て同一の配列を示し、*L. kirschneri* の基準株からなるクラスターに属したが、*gyrB* 解析を行った 192 の血清型参考株には同一の配列を示す株は存在しなかった。分離した AY-5 株に 25 種類の血清群を代表する参考株に対する抗血清を反応させたところ、血清群 Autumnalis の血清型 Autumnalis と血清群 Pomona の血清型 Pomona の参考株に対する抗血清と強く反応した。AY-5 株に対する抗血清と血清群 Autumnalis に属する 14 の血清型参考株を用いて MAT を行なった。その結果、*L. interrogans* の血清型 Mooris、血清型 Weerasinghe 及び *L. kirschneri* の血清型 Bulgarica の参考株と特に強く反応し、このいずれかの血清型であると同定した。分離した AY-5 株に対する抗血清を、血清群 Autumnalis に属する *L. kirschneri* の血清型 Bim、血清型 Bulgarica、血清型 Butembo、血清型 Erinaceauriti、血清型 Lambwe、血清型 Mujunkumi、及び *L. interrogans* の血清型 Mooris と血清型 Weerasinghe の各参考株で吸収した吸収抗血清を、AY-5 株と反応させた。その結果、血清型 Mooris、血清型 Weerasinghe、血清型 Bim そして血清型 Bulgarica の参考株で吸収するこ

とで力価は失われた。この結果は AY-5 がこれら 4 つの血清型に極めて近いことを示している。いずれの血清型にしてもこれまで日本に存在が知られないものである。

2. Nested PCR によるレプトスピラの検出及びシークエンス解析

2004 年度に調査した 12 種類 176 匹の輸入げっ歯類のうち、16 匹の膀胱からレプトスピラ特異的 DNA を検出した。内訳はアメリカアカリス (*Tamiasciurus hudsonicus*) 2 匹、シマリス (*Tamias sibiricus*) 1 匹、バナナリス (*Callosciurus notatus*) 2 匹、オオミユビトビネズミ (*Jaculus orientalis*) 1 匹、ヒメミユビトビネズミ (*Jaculus jaculus*) 1 匹、シナイスナネズミ (*Meriones tristrami*) 1 匹、カイロトゲネズミ (*Acomys cahirinus*) 2 匹そしてアフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) 8 匹である (表 6)。検出率は 10.2% であり、最も高かったアフリカチビネズミでは検出率 40% であった。*flaB* を検出できた検体は nested PCR 産物のシークエンス解析を行ない、所属する種を同定した。*L. borgpetersenii*

表 6. PCR による輸入げっ歯類からのレプトスピラ検出

略号	動物名	原産国・分布	検査数	陽性数	陽性率 (%)	レプトスピラ陽性個体番号
AA	アメリカアカリス	北米	19	2	10.5	AA-1, AA-4
CJ	コロンビアシリリス	コロンビア	9	0	0	
DG	デグー	南米	20	0	0	
RJ	リチャードソンシリリス	北米	10	0	0	
SR	シマリス	中国	20	1	5	SR-36
PJ	ビグミーシェルボア	パキスタン	10	0	0	
BR	バナナリス	タイ	20	2	10	BR-2, BR-5
OY	オオミユビトビネズミ	モロッコ～イスラエル	16	1	6.25	OY-15
HT	ヒメミユビトビネズミ	北アフリカ	8	1	12.5	HT-3
HR	シナイスナネズミ	シナイ半島	4	1	25	HR-4
KT	カイロトゲネズミ	アフリカ	20	2	10	KT-12, 17
AC	アフリカチビネズミ	アフリカ	20	8	40	AC-2, 3, 4, 7, 8, 11, 16, 18
	合計		176	18	10.2	

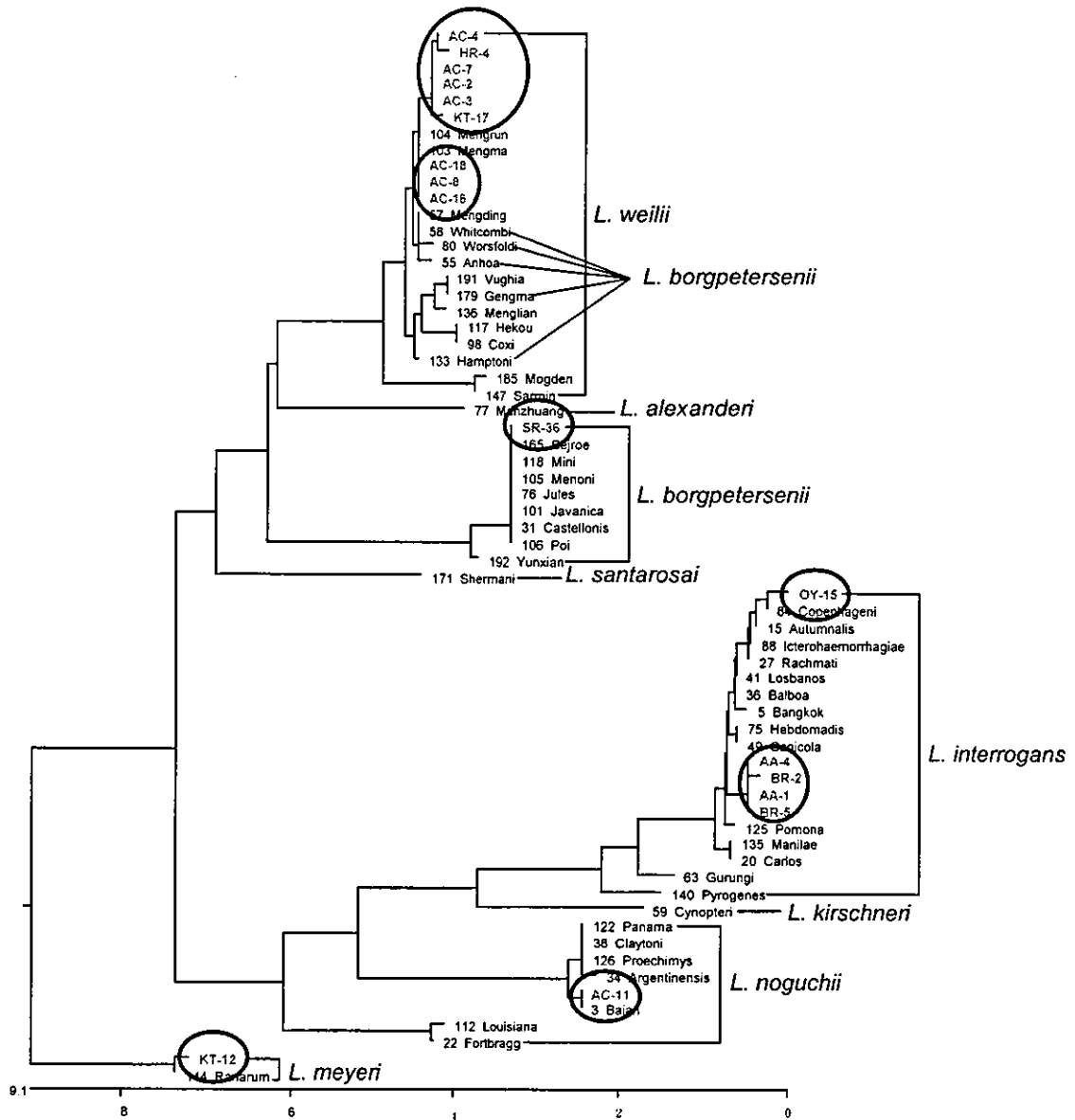


図2. 輸入げっ歯類から検出された *flaB* 遺伝子配列の系統解析

は1株、*L. meyeri*は1株、*L. interrogans* 5株、*L. noguchii*は1株、*L. weilii*と*L. borgpetersenii*の混在するクラスターに属しどちらの種も同定できないものが9株であった(図2)。また、シナイスナネズミから検出したHR-4は十分な精度の増幅産物が得られず、*flaB*解析を行なえなかった。

D. 考察

2003年の調査では、原産地アフリカのアフリ

カヤマネ10匹中5匹からレプトスピラを分離した。アフリカヤマネはペットショップでも販売されており、一般の家庭においても容易に入手することができるため、レプトスピラを保有した個体が販売されていれば、ヒトへの感染が起こっていた可能性がある。アフリカヤマネ10匹中5匹がレプトスピラを保有していたが、1個体でも感染していると、輸送や保管中に相互感染が起き未感染個体へ感染が広まってしまふ危険性がある。

アフリカヤマネ分離株は少なくともこれまで

日本に存在が確認されている血清型ではないと考えられた。*L. kirschneri* の血清型 *Bulgarica* の可能性が高い。

2004 年の調査では、腎臓培養からはレプトスピラを全く分離できなかった。一方、同じ個体の膀胱から抽出した DNA を用いた PCR では、レプトスピラを検出することができた。レプトスピラは保有体の腎臓に定着し、尿中に排出されるため、膀胱からレプトスピラが検出されたと考えられる。検出した *flaB* 配列は、参考株の配列と一致するものもあったが、いずれの参考株の *flaB* とも一致しないものが半数以上であった。この事実は現在使用している培地では培養不可能なレプトスピラが存在することを示していると思われる。

アフリカヤマネからの分離成功によって、輸入動物を介してレプトスピラが国内に侵入した証拠を初めて示すことができた。さらに、*flaB*-nested PCR 法を用いることによって、培養では分離できなかったレプトスピラを検出することに成功した。海外からの輸入動物を介した各種病原体の侵入を防ぐためにもこのような野生動物の検疫処置や輸入禁止措置など行政対応が必要である。レプトスピラを分離した事実はマスコミにも取り上げられた（サイエンス ZERO「外来生物が、日本の自然を脅かす」NHK 教育 2004 年 8 月 7 日放送、他 NHK BS2 など 再放送数回）が、一般家庭では動物を介した感染症に対する意識はまだ低いと考えられる。一般家庭で野生動物を飼育しないように啓発を行なうことが必要である。

研究課題 4 実験的感染イヌ尿中からのレプトスピラ迅速検出法の開発

A. 研究目的

感染野生げっ歯類のレプトスピラを含む汚染

尿を介して、ヒトやその他動物への感染や拡散が起こると考えられている。野生げっ歯類はレプトスピラに不顕性感染し、1 年以上に渡り保菌、排菌し、環境を汚染する。また、ネズミだけでなくイヌなどのペットや、ウシ、ブタなどの家畜もヒトへの感染源となる。保有体動物の検出はレプトスピラ病の制御を行う上で重要な技術である。そこで、イヌ尿からの PCR、並びにリアルタイム PCR による迅速検出法の確立を行った。

B. 研究方法

1. 感染実験

3 匹の 10~14 週齢のビーグル犬に対数増殖期の *L. interrogans* serovar *autumnalis* Yachiho1/071304 株（八千穂村で捕獲した野鼠由来株）をそれぞれ、①腹腔内に 1×10^5 個、②腹腔内に 1×10^8 個、③静脈内に 1×10^8 個接種攻撃した。接種から 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 日後に採取した尿と血清をサンプルとして使用した。血清抗体価は常法に従って、顕微鏡凝集試験で測定した。

2. 尿からのレプトスピラ *flaB* 遺伝子検出

尿 500 μ l から、インスタジーン DNA 精製マトリックス (Bio-Rad) を用いて、マニュアルにしたがって鋳型 DNA の調製を行った。抽出した DNA を鋳型として L-*flaB*-F1/L-*flaB*-R1 プライマーセットによる 1st PCR、さらには FlaB-710F/L-*flaB*-R2 プライマーセットによる nested PCR により検出を行った。

3. *flaB* 遺伝子のリアルタイム PCR による定量的検出

プライマー (L-*flaB*-710F、L-*flaB*-R1) セットを使用し SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用い、GeneAmp® 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) によりリアルタイム定量 PCR 反応を行った。

C. 研究結果と考察

レプトスピラ接種後 5~7 日から抗体価が上昇し、7~8 週間まで高い値が続いた。イヌはレプトスピラに感染後、一週間ほどで血中に抗体を産生することがわかった。また、静脈内に接種した方が抗体価の上昇が早いことが明らかとなった(表 7)。開始 14 日目から尿中にレプトスピラが検出された。MAT の結果と比べ、抗体産生より一週間から 10 日ほど遅れて尿中に排出されることが明らかになった(表 8)。リアルタイム PCR によって定量した尿 1ml あたりのレプトスピラの排菌数を図 3 示した。10 日以前は PCR でレプトスピラが検出されなかったため、12 日以降のサンプルのみ測定に使用した。排菌数は、菌接種後 3~4 週間の間に数 100 から多い時には 60,000 個

/ml にもなることがわかった。リアルタイム PCR では PCR で検出されなかった 56 日目の尿からも菌を検出することができた。一方、 1×10^5 個腹腔内投与したイヌの 35~49 日目の尿や、 1×10^8 個腹腔内投与したイヌの 42~49 日目の尿では検出されなかったのは、DNA を精製してから時間がたっており、DNase などが混入して DNA が分解されてしまったのではないかと考えた。本法では 1μ l の鋳型中に 1 個のレプトスピラ遺伝子が存在すれば検出可能であった。尿試料の調製方法も考慮すると、最少検出菌数は 400 個/ml となる。これらの実験から、イヌの尿からレプトスピラを *flaB* を標的とした Nested PCR、並びにリアルタイム PCR によって迅速、高感度に検出、定量できることが示された。

表 7. 実験的感染イヌの MAT 抗体価

Days	10E5 ip	1CE8 ic	10E8 iv
0	< 20	< 20	< 20
3	20	40	80
5	40	2,560	5,120
7	1,280	5,120	10,240
10	10,240	10,240	10,240
12	10,240	10,240	10,240
14	5,120	20,480	5,120
21	5,120	10,240	10,240
28	5,120	10,240	10,240
35	5,120	10,240	10,240
42	10,240	10,240	2,560
49	2,560	5,120	2,560
56	1,280	2,560	5,120

表 8. *flaB* 1stPCR(左)、Nested PCR(右)によるレプトスピラの検出

Days	10E5 ic	10E3 ip	10E8 iv
3	××	××	××
5	××	××	××
7	××	××	××
10	××	××	××
12	××	××	××
14	○○	×○	××
21	×○	×○	×○
28	×○	×○	○○
35	○○	×○	×○
42	○○	××	×○
49	××	××	××
56	××	××	××

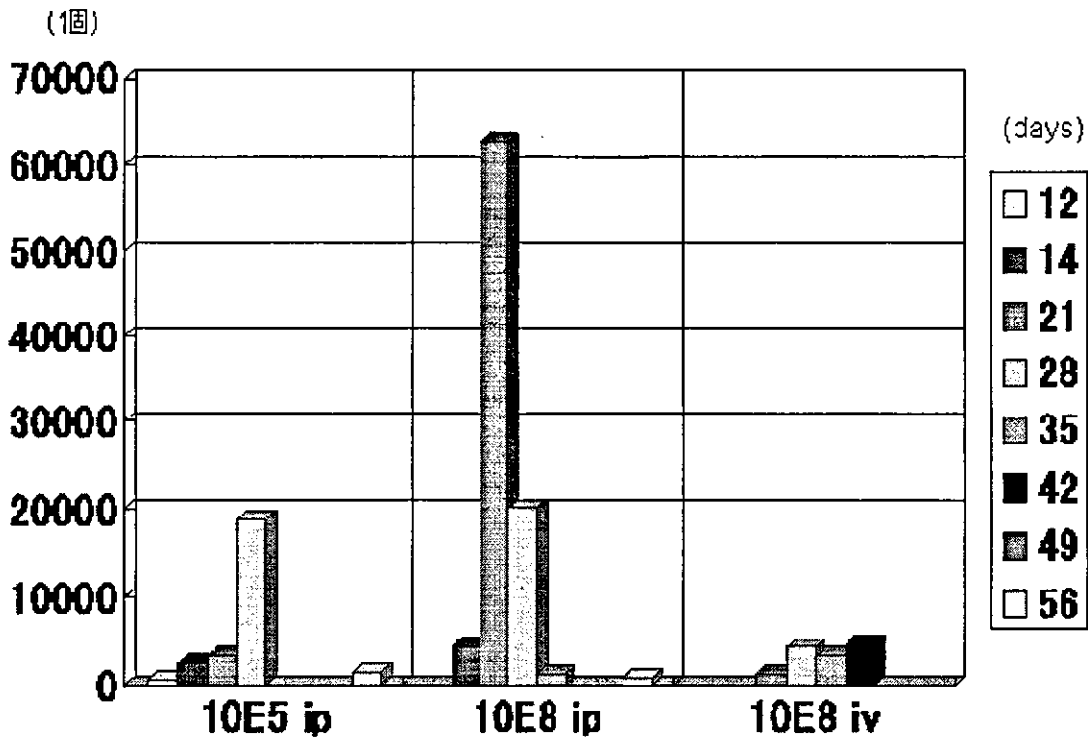


図3. 実験的感染イヌ尿 1ml 中の排菌数

F 研究発表

発表論文

原著論文

1. 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)
2. 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.* 53, 421-426 (2004).
3. Güner, E., Watanabe, M., Hashimoto, N., Kadosaka, T., 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.* 54, 1649-1652 (2004).
4. 中村正治、平良勝也、大野惇、増澤俊幸、角坂照貴、川端寛樹、小泉信夫、藤田博己. 沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物調

査 日本獣医師会雑誌, 57, 321-325 (2004)

5. Inayoshi, M., Naitou, H., Kawamori, H., Masuzawa, T., and Ohashi, N. Characterization of *Ehrlichia* Species from *Ixodes ovatus* Ticks in the Foot of Mount Fuji in Japan. *Microbiol. Immunol.* 48, 737-746 (2004)
6. Masuzawa, T., Kharitononkov I. G., Kadosaka T., Hashimoto N., Kudeken M., Takada N., Kaneda K., and Imai Y. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province -a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *Int. J. Medical. Microbiol.* (in press)
7. Güner, E., Watanabe, M., Kadosaka, T., Polat, E., Gargili, A., Gulamber, A., Ohashi, N., Imai, Y., Kaneda, K., and Masuzawa, T. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in Northern Turkey. *Epidemiology and Infection* (in press)

総説

1. Masuzawa, T: Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia. Jpn. J. Infect. Dis., 57, 229-235 (2004)

プロシーディング

1. 増澤俊幸、金田一秀、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. 獣医畜産新報 57, 662-664 (2004)

著書

1. 増澤俊幸: レプトスピラ病. 感染症 (竹田美文、木村哲編集) 朝倉書店 pp.188-191 (2004)
2. 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 pp.151-153 (2004)
3. 増澤俊幸: ライム病 (Lyme disease) 共通感染症ハンドブック 日本獣医師会 pp.220-221 (2004)
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 pp.234-235 (2004)
5. 増澤俊幸: ライム病. 感染症の診断・治療ガイドライン2004, 日本医師会雑誌 臨時増刊 (日本医師会感染症危機管理対策室, 厚生労働省健康局結核感染症課 監修) 医学書院 (東京) pp.172-173 (2004)
2. 増澤俊幸: ライム病. からだの科学増刊 新興再興感染症 145-149 (2004)
6. 増澤俊幸: これだけは知っておきたい国際感染症 ライム病・回帰熱 Modern Physician 新興医学出版社 (印刷中)
7. 増澤俊幸: スピロヘータ シンプル微生物学 改訂第4版 南江堂 (印刷中)
8. 増澤俊幸、藤倉孝夫、柳原保武、小泉信夫、川端寛樹、岡本能弘: ヒトのレプトスピラ症の診断、サーベランスとその制御に関する手引き (WHO Human Leptospirosis 訳書)

学会発表

1. 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、ライム病ボレリアとも異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 (抄録 p. 74)

2. 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 (抄録 p. 78)
3. 渡邊むつみ、内藤博敬、大橋典男、今井康之、増澤俊幸: ライム病ボレリアのベクターおよび宿主内発現が想定されるタンパク質のプロテオーム解析 第77回日本細菌会総会 (大阪) 2004年4月2日 (抄録 p. 175)
4. 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 (抄録 p. 210)
5. 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 (抄録 p.1)
6. 渡邊むつみ、内藤博敬、大橋典男、今井康之、増澤俊幸: ライム病ボレリアのベクターおよび宿主内発現が想定されるタンパク質のプロテオーム解析. 第41回レプトスピラシンポジウム (大阪) 2004年4月4日 (抄録 p.2)
7. 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 (抄録 p.7)
8. 川端寛樹、榊原省司、今井康之、増澤俊幸、藤田博巳、渡辺治雄: 奄美諸島におけるレプトスピラの浸潤. 第41回レプトスピラシンポジウム (大阪) 2004年4月4日 (抄録 p.13)
9. 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 (要旨集 p.27 別冊 pp.13-14)
10. Masuzawa, T., Kitamura, K., Ohashi, N., Imai, Y., and Guner, E.S. Tick-transmitted pathogens found in Turkey, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum* (HGA) and novel species of *Borrelia*. On strategies for research and control of tick and tick-borne disease, In particular to tick-bioactive molecules (TBM) affecting transmission of tick-borne disease. Obihiro International Symposium (Obihiro), August 2-5, 2004 (Abst. 5)
11. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kawamori, F., Naitou,