

- H., and Masuzawa, T. Characterization of *Ehrlichia* species from *Ixodes ovatus* in Shizuoka prefecture, Japan. 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. 6)
12. 増澤俊幸, 今井康之: トルコで見いだされた新奇なボレリアについて 乳酸菌研究会(静岡)2004年11月12日
 13. 渡邊むつみ, 神村卓也, 内藤博敬, 大橋典男, 金田一秀, 今井康之, 増澤俊幸: プロテオーム解析によるライム病ワクチン候補物質の探索. 第27回日本分子生物学会年会(神戸)2004年12月9日(抄録 p.814)
 14. 川口大蔵, 内藤博敬, 大橋典男, 稲吉恵, 川森文彦, 増澤俊幸: 野鼠が保有する *Ehrlichia* 属菌および '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' に関する分子疫学的解析 第78回日本細菌会総会(東京)2005年4月(予定)
 15. 西村祐作, 大橋典男, 内藤博敬, 丸山総一, 壁谷英則, 川森文彦, 稲吉恵, 増澤俊幸: 日本国内の野鼠が保有する *Bartonella* 属菌の分類学的解析 第78回日本細菌会総会(東京)2005年4月(予定)
 16. 久留戸涼子, 野澤龍嗣, 増澤俊幸: 病原菌レプトスピラの保有動物尿からの迅速定量検出法の開発 第78回日本細菌会総会(東京)2005年4月(予定)
 17. 井上快, 丸山総一, 山田直樹, 壁谷英則, 佐藤雪太, 湯川真嘉, 大橋典男, 増澤俊幸, 川森文彦, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫, 川端寛樹: 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発 第139回日本獣医学会(和光市)2005年3月(予定)

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16年度)

野生生物を保有体とする人獣共通スピロヘータ感染症に関する疫学調査研究

分担研究者

川端寛樹 国立感染症研究所

研究協力者

藤田博己	大原研究所(分担研究者)	角坂照貴	愛知医科大学(分担研究者)
本田俊郎	出水保健所	古田 康	北海道大学医学部
田原研司	島根県保健環境科学研究所	丸山総一	日本大学生物資源科学部
蔵元 強	鹿児島県環境保健センター	高田伸弘	福井大学医学部
御供田陸代	鹿児島県環境保健センター	矢野泰弘	福井大学医学部
溝口二郎	山形県衛生研究所	宮本健司	元旭川医科大学
板垣朝夫	元島根県保健環境科学研究所	馬原文彦	馬原医院
新田芳樹	沖縄県家畜衛生試験場	高橋 守	川越高校
鶴見みや古	山階鳥類研究所	小泉信夫	国立感染症研究所(分担研究者)
齋藤あつ子	神戸大学医学部	高橋英之	国立感染症研究所(分担研究者)
岸本寿男	国立感染症研究所	安藤秀二	国立感染症研究所

- 全国規模でのレプトスピラ病原体の浸潤状況把握を目的として、これまで未調査地域であった東北地方、四国地方、山陰地方を中心に野鼠捕獲調査を行い、病原体検出を行った。
- 顔面神経麻痺を指標としたライム病疫学調査では、小児神経ライム症と思われる患者は見出されなかった。

全国規模での野鼠におけるレプトスピラ保菌調査

国内でのレプトスピラ浸潤の実態を把握する目的で、当研究班では野生動物(特に野鼠類)の病原性レプトスピラ保菌状況を調査してきた。今年度はこれまで調査が行われていなかった地域を重点地域として、野鼠捕獲、病原体分離培養を行った。

<調査地域>

北海道、青森県、山形県、福島県、長野県、福井県、兵庫県、島根県(含隠岐島)、徳島県、鹿児島県(含屋久島、トカラ列島中之島)沖縄県(西表島)にて野鼠捕獲調査を行った。

<捕獲野鼠種類>

捕獲された野鼠はアカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ、クマネズミ、ドブネズミ、ジネズミ類、ハツカネズミ類である。クマネズミ、ドブネズミ、ハツカネズミをのぞき、いずれも捕獲申請に基づき捕獲を行った。

<捕獲調査都道府県名と捕獲野鼠数(レプトスピラ陽性個体数)、図1>

北海道:28(0)、青森:41(0)、山形:14(0)、福島:2(0)、長野:52(3, 5.8%)、福井:10(0)、兵庫:3(0)、島根(内、隠岐島:15):96(1, 1.0%)、徳島:6(0)、鹿児島:61(0)(内、屋久島:9、トカラ列島中之

島:45), 沖縄西表島:2(0)

捕獲野鼠数 315 頭, 陽性個体数 4 頭

<病原体分離結果>

レプトスピラ:捕獲野鼠 315 頭中 4 頭(分離陽性率=1.3%)で病原性レプトスピラが分離された。分離種 *flaB* 遺伝子塩基配列決定により長野分離 3 株は *Leptospira interrogans* と同定された。島根分離株は未同定である。分離陽性個体はいずれもアカネズミであった。

ライム病ボレリア:徳島、鹿児島で捕獲された野鼠より病原体分離を試み、捕獲野鼠 1 頭耳組織より *Borrelia japonica* が分離された。

この他分担研究者である藤田、大橋、高橋はそれぞれリケッチア属、フランシセラ属、エーリキア属、エルシニア属細菌について検出を試みている。また共同研究者である丸山らは、捕獲野鼠 315 頭の内試験に供した 25 頭中 14 頭から

Bartonella 属細菌を分離した。これらの解析結果は各分担研究者の報告書を参照されたい。

<考察>

1970 年代以前は、レプトスピラ症は毎年流行が見られ、かつ年間数百人もの死亡者をだした極めて重要な動物由来感染症である。近年は衛生環境の向上などにより患者数は減少傾向にあり、どちらかといえば「過去の感染症」という認識がなされているようである。一方で、沖縄県では本島、先島諸島で夏場における水のレジャーを原因とする集団発生事例が見出される事、かつての流行地域である宮城県でも、野鼠の保菌状況は未だに高いレベルで推移している事、また東南アジア等世界各地では洪水に起因する大流行が繰り返されている事から、今後何らかの社会的インフラの破綻(災害など)があった場合、再興しうるとの認識が必要であろう。

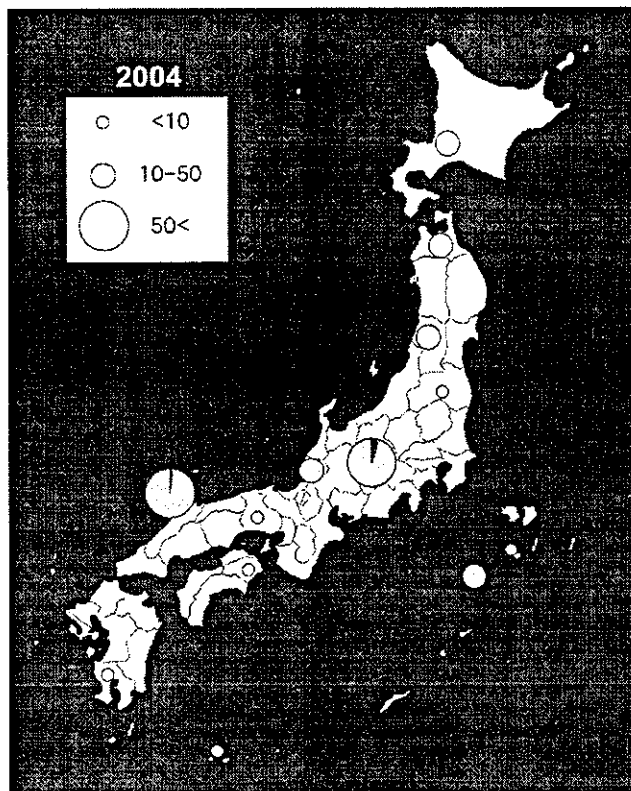


図 1.2004 年度調査地域と野鼠捕獲数、およびレプトスピラ陽性率

小児顔面神経麻痺患者におけるライム病の可能性に関する疫学調査

<背景>

ライム病、特に神経ボレリア症起因性のボレリア感染症はヘルペスウイルスの再活性化とともに、国内外を問わず不明顔面神経麻痺の要因となっていることが指摘されている。しかしながら国内における小児における顔面神経麻痺と感染症との因果関係については不明の部分が多い。そこでライム病流行地域である北海道において、小児における顔面神経麻痺の要因を追求するとともに鑑別すべき感染症について疫学調査を行った。

<方法>

小児の急性期顔面神経麻痺 30 例について、血清、及び唾液を材料とした病原体検索を行った。すなわち、唾液中のヘルペスウイルス (HSV-1)、Varicella-zoster ウイルス (VZV) を PCR 法により検出した。またペア血清はライム病ボレリア、ムンプスウイルスに対する抗体測定に供した。

<結果>

VZV による Ramsay Hunt 症候群 2 例においては VZV の再活性化が血清学的にも確認された。また血清学的、もしくは唾液からの PCR により、帯状疱疹を伴わない VZV 再活性化が 30 例中 9 例で見出された。すなわち 37% (11/30) では VZV の再活性化が顔面神経麻痺の要因である事が示唆された。年齢階層による VZV 再活性化による顔面神経麻痺は 5 才未満と比較して 6-15 歳で優位に多い傾向が見られた ($P=0.023$)。一方で、ライム病流行地域である北海道においてもライム病抗体陽性を示す例は見出されなかった。

<まとめ>

欧米ではライム病ボレリア感染に起因する神経疾患が多発している。その臨床症状は神経根炎、顔面神経麻痺、髄膜炎などである。これまで本邦において患者から分離されたボレリア種は

すべて *B.garinii* である。*B.garinii* は欧州で神経ライム症の要因となっている事が示されていることから、本邦でも不明神経疾患の起因菌である可能性が危惧されている。

同じく病原性を示すライム病ボレリアとして本邦に浸潤が確認されている *B.afzelii* はマダニ、野鼠のみから分離されている。また *B.turdi*, *B.tanuki*, *B.japonica* はその病原性は不明である。

感染症法施行後の国内でのライム病患者発生动向調査によれば、61 例中 35 例 (57%) が北海道での報告となっており、国内でのライム病流行地域となっている (図 2)。これは、この地域では、本州と異なり、人口密集地である平野部においてライム病媒介マダニである *Ixodes persulcatus* が見出されるためと推察されている。

本研究では神経ライム症の一症状である顔面神経麻痺を指標として、小児における神経ライム症の有無を調査してきたが、現在までにライム病ボレリア起因性の顔面神経麻痺患者は見出されていない。成人を対象とした場合でもライム病性顔面神経麻痺は低頻度である事から (Furuta et al. 2001)、1) 本邦に浸潤しているライム病ボレリアは欧米のライム病ボレリアと比較して神経症状を引き起こさない、もしくは 2) 人種差によりヒト側の感受性が異なるため、国内の患者ではその臨床症状が緩和されている可能性が考えられる。

<今後の課題>

この問題を解決するためには、さらなる疫学調査および基礎的研究の両面でのアプローチが必要である。

疫学的には本邦で分離されるボレリアと同様の型が *I.persulcatus* を介して浸潤していて、かつ欧州人種が居住するモスクワ以東における疫学調査を行う事で、結論の一部が見出される可能性がある。

病原体側の解析では、疾患の原因となる病原体遺伝子の同定が早急に行われる必要がある。本研究班主任の増沢は、*B.garinii* は *I.persulcatus* からのみ分離される *B.garinii* (アジ

ア型)と欧州で *I. ricinus*, *I. persulcatus* 両者から分離される *B. garinii*(欧州型)に遺伝型別できることを明らかにしている(Masuzawa, 2004)。このことは *B. garinii* は多様な集団であり、かつ未知の因子によって媒介マダニとの親和性が決定されている可能性を強く示唆している。同様に考えるのであれば、*B. garinii* のうちの一部がヒトに対して強い病原性を有している可能性を考える事が出来る。我々は、国内で患者から分離された株を

用い、マウス感染モデルによる病原性の強弱を、アジア型 *B. garinii*と欧州型 *B. garinii*で比較したが、少なくとも関節炎発症を指標とした病原性の強弱はアジア型、欧州型間で差が見出されなかった(データ未公表)。今後は患者由来株と環境分離株間でその病原性の強弱を比較する事で、未知の病原性因子を同定できれば、強病原性ボレリアの分布と発症危険地域の認識が可能になるかもしれない。

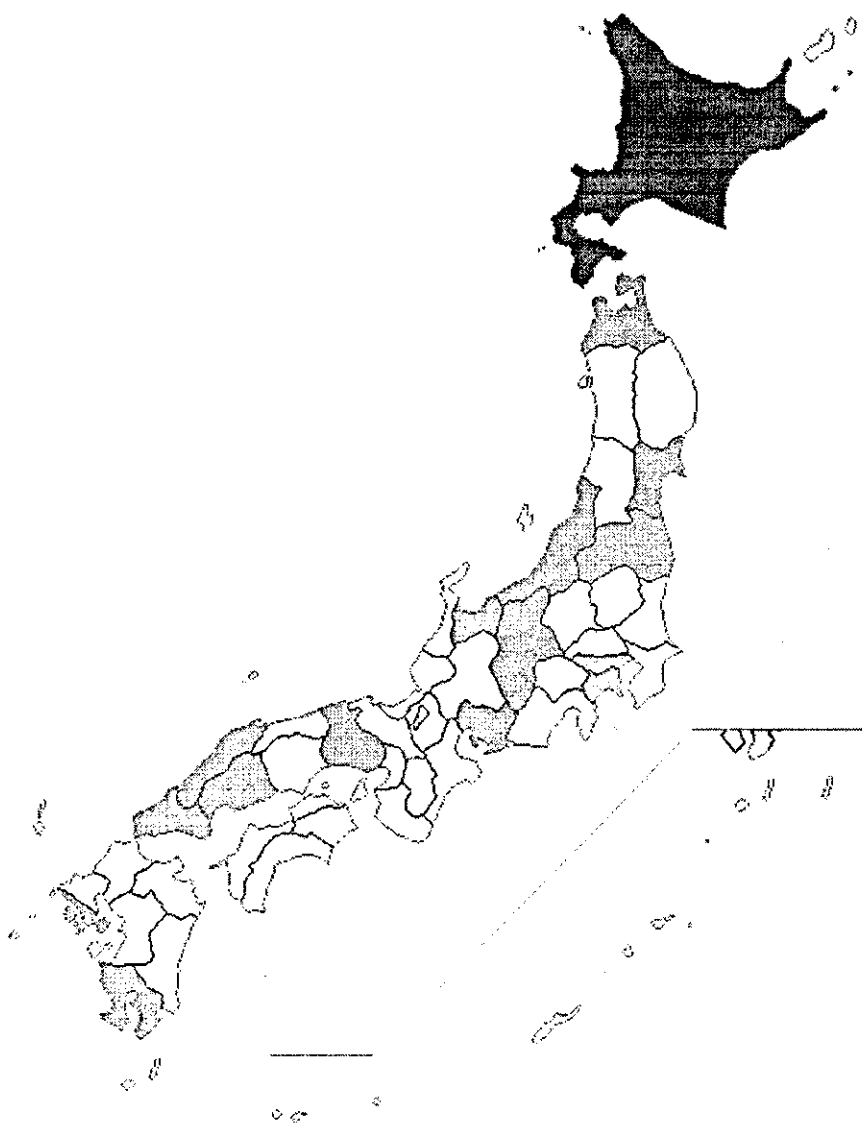


図2.感染症法施行後の各都道府県ライム病患者報告数。黒は10例以上の地域を示す。

論文発表・著書

Furuta Y, Ohtani F, Aizawa H, Fukuda S, Kawabata H, Bergström T.: Varicella-zoster virus reactivation is an important cause of acute peripheral facial paralysis in children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2005 (In press).

Kawabata H, Norris SJ and Watanabe H. BBE02 disruption mutants of *Borrelia burgdorferi* B31 have a highly transformable, infectious phenotype. *Infection and Immunity*. 72(12):7147-7154, 2004.

Masuzawa T, Hashimoto N, Kudaken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y: New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *Journal of Medical Microbiology*. 53: 421-6, 2004.

Güner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T: *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from hard tick, *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*. 54(5):1649-1952, 2004.

中村正治, 平良勝也, 大野惇, 増沢俊幸, 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(5), 321-325, 2004.

増沢俊幸, 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出されたライム病関連ボレリアの性状. *獣医畜産新報*. 57(8), 662-664, 2004.

本田俊郎, 中山浩一郎, 吉國謙一郎, 石谷完二, 新川奈緒美, 蔵元強, 川元孝久, 藤田博己, 斎藤あつ子, 矢野泰弘, 高田伸弘, 川端寛樹: 鹿児島県で捕獲した野鼠からの病原体検索. *鹿児島県環境保健センター所報*. (印刷中)

川端寛樹: ライム病. 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp2718-2719, 2004.

川端寛樹: 回帰熱. 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp2719-2720, 2004.

川端寛樹: レプトスピラ症(ワイル病). 感染症. 家庭医学大全科. 法研(株). pp2772-2773, 2004.

川端寛樹: ライム病. 感染症の辞典. pp251-253, 2004.

川端寛樹: 回帰熱. 感染症の辞典. pp40-41, 2004.

危機管理情報

川端寛樹, 渡辺治雄, 多田有希, 木村幹男: ライム病血清診断に関する注意の呼びかけ. *病原微生物検出情報*. 25(8), 2004.

学会発表・講演

丸山総一, 井上快, 山田直樹, 壁谷英則, 見上彪, 佐藤雪太, 川森文彦, 大橋典男, 増沢俊幸, 角坂照貴, 高田伸弘, 藤田博己, 小泉信夫, 川端寛樹. 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発. 日本獣医学会学術集会. 2005年3月.

川合さなえ, 山中新也, 藤沢智美, 清島真理子, 川端寛樹. 遊走性紅斑を呈したライム病の1例. 日本皮膚学会東海地方会. 2004年12月.

川端寛樹. 野生齧歯類とレプトスピラ症. 学術フ

ロンティア「人獣共通感染症のサーベイランスと制御」シンポジウム. 2004年11月.

川端寛樹. ダニと鳥の感染症:ダニに起因する感染症. 日本鳥学会 2004年度大会. 2004年9月.

川端寛樹. 細菌・ウイルスが引き起こす人獣共通感染症. 山階鳥類研究所セミナー). 2004年7月.

川端寛樹、藤田博己、榊原省司、増澤俊幸、鶴見みや古、渡邊治雄: 奄美諸島における回帰熱、レプトスピラ調査. 第12回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2004年6月.

増澤俊幸、渡邊むつみ、Ece S. 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. 2004年4月.

川端寛樹、渡邊治雄. 制限修飾遺伝子破壊株による形質導入とその感染性. 第41回レプトスピラシンポジウム. 2004年4月.

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. 2004年4月.

川端寛樹、榊原省司、今井康之、増澤俊幸、藤田博己、渡邊治雄. 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. 2004年4月.

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. 日本細菌学会総会(大阪). 2004年4月.

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

分担研究者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

レプトスピラの感染防御タンパク質 LigA・m, LigB・m 間で高度に保存されている N 末領域に, 感染防御効果があることが明らかとなった. また N 末領域は, 異なる血清型 Icterohaemorrhagiae 感染に対しても感染防御免疫を誘導することが明らかになった. これまでに複数のレプトスピラ血清型で同定された Lig タンパク質の N 末端領域のアミノ酸配列は相同性が高く, また *lig* 相同遺伝子は多くの血清型のレプトスピラに存在することから, 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への発展の可能性が示唆された.

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. 昨年度の研究により, マウスに対し感染防御免疫を誘導できるレプトスピラ抗原タンパク質 LigA・m, LigB・m が同定された. 本年度は Lig タンパク質の感染防御免疫誘導について更なる研究を行

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は, *L. interrogans* serovar *Manilae* strain UP-MMC-NIID および *L. interrogans* serovar *Icterohaemorrhagiae* strain NIID7 である.

2. LigB・m の N 末端領域および C 末端領域の発現

LigB・m の N 末端領域 (LigB・mN; aa 18-670) および C 末端領域 (LigB・mC; 671-1,191) 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。融合タンパク質の GST 領域は、プレジジョンプロテアーゼにより切断後、グルタチオンセファロース 4B を用いて除去した。

N 末端を欠損した LigA·m, LigB·m の His₆ タグ融合タンパク質 (LigA·m Δ N, LigB·m Δ N) は、昨年の報告書の通りに発現、精製を行った。

3. 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 GST, LigB·mN, LigB·mC, LigA·m Δ N あるいは LigB·m Δ N を皮下免疫し、2, 4 週間後に等量の抗原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 あるいは 1×10^8 細胞の NIID7 を腹腔内に注射し、生死を観察した。

4. ELISA

方法は昨年の報告書の通り。マウスの血清は 1,000 倍希釈して使用した。2 次抗体には HRP 標識ヤギ抗マウス IgG を 3,000 倍希釈して使用した。

倫理面への配慮

動物実験を行うにあたっては、国立感染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. LigB·mN, LigB·mC による感染防御免疫の誘導

2 種類の Lig タンパク質で高度に保存されている N 末端領域と、保存性の低い C 末端領域のどちらが感染防御に機能するかを調査するために、それぞれの領域の組換えタンパク質を作製し、C3H/HeJ マウスに免疫、血清型 Manilae による感染防御試験を行った。感染防御実験の結果、LigB·mN, に強い感染防御能があることが明らかになった (Table 1)。LigB·mN を免疫したマウスでは、抗体価が十分に誘導されているマウスではすべて感染防御が認められた (死亡した 2 頭は抗体が産生されていなかった)。一方、LigB·mC を免疫したマウスでは、抗体価誘導されている個体でも、防御が行われない個体があった。

2. 血清型 Icterohaemorrhagiae に対する感染防御試験

これまでの感染防御試験は、LigA·m, LigB·m が同定された血清型 Manilae を用いて行ってきたが、異なる血清型の感染に対しても Lig タンパク質が感染防御抗原となるかを、血清型 Icterohaemorrhagiae を用いて行った。感染防御実験の結果、完全長あるいは N 末端領域のみでも感染防御免疫を誘導できることが明らかになった (Table 2)。

考察

本研究によって、Lig タンパク質の N 末端領域に感染防御を誘導できることが明らかになった。また Lig タンパク質は、血清型 Manilae 感染だけでなく、血清型 Icterohaemorrhagiae 感染に対しても防御抗原として機能することが明らかになった。

lig 遺伝子の保存 N 末端領域をプローブとしたサザンブロット解析により、多くの病原性レプトスピラに相同遺伝子が存在することが明らかになっている。またこれまでに、複数のレプトスピラ血清型で *lig* 遺伝子が単離されてきているが、その塩基配列からは N 末端領域は非常に保存されていることが明らかになっている。さらに、異なる血清型に感染したレプトスピラ症患者血清中には、Lig タンパク質に対する抗体が産生されていることも明らかになっている。

レプトスピラ症に対する現行のワクチンは、血清型に特異的な効果しかなく、多くの血清型に有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。本研究で、多くの血清型で保存されている Lig タンパク質の N 末端領域に感染防御免疫を誘導できることが明らかとなったことから、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新たなワクチン候補と考えられた。今後、ハムスターやイヌなどの他の動物モデルを用いて感染実験を行い、Lig タンパク質の有用性をさらに検証していく。

論文発表・著書

1. Masuzawa T, Hashimoto N, Kudaken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N, Imai Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 53(5):421-426 2004.
2. Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine* 22 (11-12): 1545-1552 2004.
3. 小泉信夫 レプトスピラ症 感染症の事典 267-268 国立感染症研究所学友会編 朝倉書店 2004
4. 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラ症 日本医師会雑誌臨時増刊号 132(12): 180-181 2004
5. 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 183-193 日本ワクチン学会編 朝倉書店 2004
6. 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出されたライム病関連ボレリアの性状 獣医畜産新報 57(8): 662-664.
7. 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, 藤田博巳 沖縄県におけるレプトスピラ保菌動物調査 日本獣医師会雑誌 57 (5): 321-325 2004
8. 小泉信夫, 渡辺治雄 日本におけるレプトスピラ感染症の現状 日本醫事新報

学会発表

1. 小泉信夫, 渡辺治雄 レプトスピラ感染
 防御抗原 Lig タンパク質の解析. 第 77
 回日本細菌学会総会. 大阪, 2004 年 4 月.

2. 小泉信夫, 大部宏子, 谷川力, 牧野敬,
 林栄治, 渡辺治雄 ドブネズミおよびア
 ライグマ分離レプトスピラの性状解析.
 第 41 回レプトスピラシンポジウム. 大
 阪, 2004 年 4 月.

Table 1. Protection of C3H/HeJ mice immunized with LigB-m derivatives from a homologous challenge^a

Immunogens	No. of survivors / total no. of animals tested	Days to death
Naive	0/5	4, 4, 4, 4, 4
GST	0/4	4, 4, 4, 4
LigB-mN	3/5	4, 4
LigB-mC	2/5	5, 5, 9
LigB-m ΔN	5/5	

^aMice were challenged intraperitoneally with 1×10^6 *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID

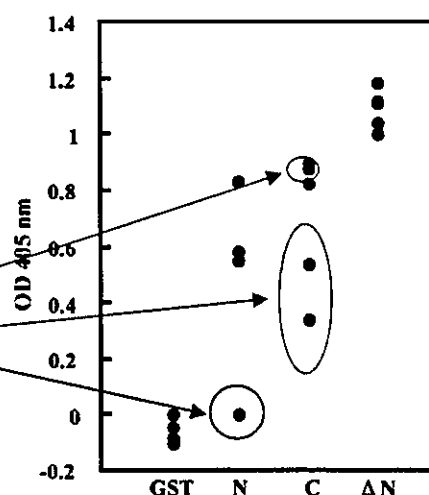
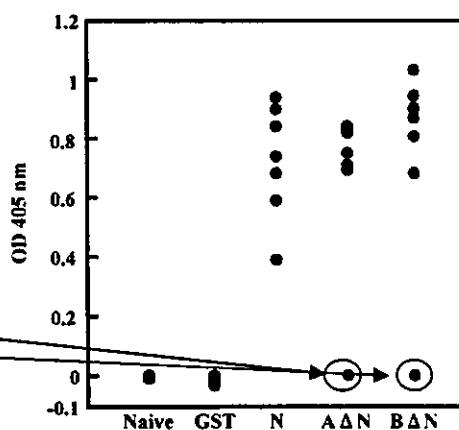


Table 2. Protection of C3H/HeJ mice immunized with Lig proteins from a heterologous challenge^a

Immunogens	No. of survivors / total no. of animals tested	Days to death
Naive	0/8	4, 4, 4, 4, 4, 4, 4, 6
GST	0/8	3, 4, 5, 5, 5, 5, 6, 6
LigB-mN	8/8	
LigA-m ΔN	6/8	4, 4
LigB-m ΔN	6/7	4

^aMice were challenged intraperitoneally with 1×10^8 *L. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae NIID7



厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症）
分担研究報告書

ネズミ類由来レプトスピラ調査（2004年）

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 小泉信夫 国立感染症研究所
研究分担者 高橋英之 国立感染症研究所
研究協力者 瀧幾子・弓指孝博 大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者 名古屋市生活衛生センター
研究協力者 名古屋市健康福祉局・中村保健所

研究要旨

イエネズミ・ノネズミのレプトスピラ保有状況を2000年から4か年にわたり調査してきた。ここでは、2004年度に大阪市、京都府北部、名古屋市で実施されたネズミ類のレプトスピラ保有調査と分離されたレプトスピラ株の解析結果について報告する。

大阪市ではドブネズミ25匹から1株のレプトスピラを分離した。*flaB*、*gyrB* 遺伝子解析および顕微鏡凝集試験により *Leptospira interrogans*（血清群 Icterohaemorrhagiae 血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni）と推定された。

京都府北部の1地域でノネズミ（アカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ）および食虫類（ジネズミ、ヒミズ）31匹を捕獲し調査したがレプトスピラは分離されなかった。

名古屋市のマンホールで捕獲されたドブネズミ15匹から4検体のレプトスピラを暗視野顕微鏡で検出したが培養が継続できず種の推定までには至らなかった。住居敷地内、地下街で捕獲したクマネズミ6匹、郊外の草地で捕獲したアカネズミ28匹からは分離されなかった。

研究目的

ネズミ類を感染源に発生していると思われるレプトスピラ症は、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、今なお毎年のように患者が発生している。さらに、近隣諸国においては多数の患者が発生しており国内への保菌動物を介した持ち込みの懸念も増加してきた。国内で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り、2000年からレプトスピラの全国調査を開始し、感染源として重要なネズミ類のレプトスピラ保有状況を、名古屋市をはじめ全国各地で4か年にわたり実施してきた。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。イエネズミ類が多く生息する都心に加えて、山間部に生息するノネズミ類にも感染がみられるために山間部地域の調査も行われた。

今年度は新たに大阪市、京都府北部の一部地域も加え調査を実施したので報告する。

材料・方法

1. レプトスピラの分離・培養法
2004年の調査ではネズミ類の腎臓から Korthof、EMJH 培地で分離・培養した。
2. 使用菌株
大阪市内の歩道沿い街路樹帯で捕獲され

Table 1 東海地方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予測血清型

分離株	捕獲地	種類	培地	種	予測血清型
Osaka 1-60	大阪市	<i>Rattus norvegicus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
04-7*	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	EMJH		
04-9*	名東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	EMJH		
04-12*	中村区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	EMJH		
04-16*	東区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	EMJH		

*培養初期に顕微鏡的に感染が確認されたが、培養が継続できなかった。

たドブネズミから培養に成功した1株の分離株を使用した。

3. *flaB*, *gyrB* 遺伝子配列による解析

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 反応を行ない、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、塩基配列を決定し解析した。

倫理面への配慮

愛知医科大学医学部動物実験委員会の承諾を得て、実験動物管理運営規定ならびに動物保護と管理に関する法律に基づいて行われた。

結果

1. ネズミ類からのレプトスピラ分離状況

2004年4月から2005年2月までの間に大阪市、京都府大江町、名古屋市内でネズミ類の捕獲を実施した。大阪市内では主に歩道沿いの街路樹帯で、25匹のドブネズミを捕獲し1株のレプトスピラを分離した (Table 1)。京都府大江町ではノネズミ (アカネズミ、ヒメネズミ、スミスネズミ) および食虫類 (ジネズミ、ヒミズ) 31匹を捕獲し調査したがレプトスピラは分離されなかった。名古屋市のマンホールで捕獲したドブネズミ15匹からは、4検体のレプトスピラを暗視野顕微鏡で検出したが培養が継続できず種の推定までには至らなかった (Table 1)。名古屋市内の住居敷地内、

地下街で捕獲したクマネズミ6匹、郊外の草地で捕獲したアカネズミ28匹からは分離されなかった。

2. *flaB*, *gyrB* 遺伝子配列に基づく種の同定

flaB, *gyrB* の部分塩基配列から、分離株は *L. interrogans* で血清 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と推定された。

3. MAT に基づく血清型の同定

抗血清との反応性から、血清群 Icterohaemorrhagiae 血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni であることが推測された。

考察

名古屋市内のネズミ類の調査 (2000年4.1%、2001年7.7%、2002年6.0%、2003年5.6%) で明らかのように、レプトスピラは都心であってもある程度の感染率を示している。そこで新たに大阪市内での調査を実施した。ネズミ類の捕獲数は少ないが、人通りの多い歩道沿いの街路樹帯で捕獲されたドブネズミから1株の *L. interrogans* 血清群 Icterohaemorrhagiae を分離した。この種はワイル病の病原体で名古屋市内と同様に都市部での優先種となると考えられる。

北海道、宮城、長野県の調査でアカネズミ、ヒメネズミなど山間部に生息するノネズミからもレプトスピラが分離されていることから、名古屋市郊外と京都府北部地域でノネズミの調査を実施したが分離されな

かった。

2000年から始めた調査で、EMJH、Korthof培地で培養が継続できないレプトスピラのネズミ類への感染を指摘していたが、2004年のネズミ類調査でも、これらのレプトスピラが確認された。これらは、培養開始の翌日から10日目くらいまでに暗視野顕微鏡で検出できるが、増殖しないで消失した。保有動物であるネズミ類の腎臓に感染しているが、ヒトや家畜への感染性、病原性は全く不明であり、レプトスピラ感受性動物への感染性、病原性を確認する必要があると考える。今年の名古屋市内のドブネズミからの検出率は25%を超える(体重100g以上のドブネズミでは50%)ために、早期から分離培地を顕鏡して検出に勤める必要があると思われる。これらは、継続した培養ができないために種の解析は行われていない。

昨年度から、レプトスピラ症は感染症法4類に加えられ患者の発生状況が監視できる体制がとられたが、近隣諸国でレプトスピラ症患者数が増大していることから考えると、これらの海外流行株が国内に侵入することも十分に考えられ、今後も調査地域を拡大して調査を実施する必要がある。

原著

1. Masuzawa T, Hashimoto N, Kudiken M, Kadosaka T, Nakamura M, Kawabata H, Koizumi N and Imai Y. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *Journal of Medical Microbiology* 53, 421-426. (2004)
2. Takahashi M, Misumi H, Urakami H, Nogami S, Kadosaka T, Misumi M, Matsumoto I. Trombidiosis in cats caused by the bite of the larval trombiculid mite *Helenicula miyagawai*

(Acari: Trombiculidae). *Vet Rec.* 154(15):471-472. (2004)

3. Guner ES, Watanabe M, Hashimoto N, Kadosaka T, Kawamura Y, Ezaki T, Kawabata H, Imai Y, Kaneda K, Masuzawa T. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol.* Sep;54(5):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・藤田博巳. 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 第57巻(5):321-325, 2004

5. 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出されたライム病関連ボレリアの性状. 獣医畜産新報 57巻(8号):662-664, 2004

学会

1. 増澤俊幸、渡邊むつみ、Ece S. 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. 平成16年4月4日(大阪)

平成 16 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)

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

主任研究者 高橋英之 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

現在までに multiplex PCR 法や real time PCR 法によってペスト菌の迅速な検出法が開発されてきたが、本研究では簡便、安価で且つ感度がよく、最終診断まで 30-60 分で終了される LAMP 法をペスト菌の検出に適用し、その系の確立を試みた。

A. 研究目的

日本国内においては、過去50年以上ペスト患者の報告例はないことから国内での感染の危険性は極めて低いか全くないと考えられてきた。しかし一方で、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兎病の原因（若しくは起因）病原体侵入の危険性が注目された例を始めとして、今後、本邦において海外からの感染源（保菌動物）の侵入もしくは輸入に起因する輸入感染が想定される。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。世界的にはホットスポットの一つであるアフリカで、WHOを中心にサーベイランス及び制圧対策を行なっているが、日本においてはペストに関する同定、検出、サーベイランスを含めた総合的な管理態勢は不十分であり、その充実は日本の感染症危機管理においても非常に有益かつ

重要であると考えられる。本研究においてはペスト菌の迅速検出法の開発を目的として real time PCRのように高額な専用機器が必要ではなく、multiplex PCRのように判定までに2-3時間という長時間をかけずに検出可能なLAMP法をペスト菌の検出に適用することによって現存のペスト菌の検出方法以上に簡便、安価、高感度、迅速な検出の確立を試みた。ペストの輸入感染の危険性はもはや排除できないと推測される現在においては、水際の防疫対策の有無が最も有効な行政対策として考えられる。本研究では1) 同定・検出法の確立、およびレファレンス株の整備、2) リスク評価のための基礎資料となる現状の把握、を二つの大きな柱とする。以上の研究成果により、ペストの輸入感染事例に対して科学的、行政的に迅速な判断、対応が可能になると共に、将来的なペスト感染に関する防疫指針の基礎資料作成に貢献で

きると考えられる。本年度は1) の検出系の確立に関する研究を進めた。

B. 研究方法

菌の生育方法

凍結乾燥保存されたペスト菌を Brain Heart Infusion 培地に塗布後、28°Cで3日間培養した。

菌体の処理

プレート上の菌体をディスポーザブル白金耳を用いて掻き取り、1 ml の TE に懸濁した。その懸濁液を 100 °Cで 5 分間処理して不活化した後、15,000 rpm × 5 分間遠心後、その上清を粗抽出 DNA 溶液として LAMP 法の鋳型として供した。

菌体数をカウントする場合には熱処理前に 10 µl を PBS にて希釈して Brain Heart Infusion 培地に撒き、28°Cで3日間培養後生細菌数をカウントした。

プライマーの設計

本研究では *Yersinia* 属菌の中でもペスト菌のみが保持するプラスミノージェンアクティベーター遺伝子 (*pla*) を LAMP 法のターゲットとした。プライマーの設計は栄研化学株式会社の Net laboratory のホームページ <https://biodb.netlaboratory.com/lamp/index.html> にて最適化された部位を選択した。以下にそのプライマーの塩基配列を示す。

F3: TTG AGC TTA TAC CGG AAA CTT C

B3: CGG TAC CAT AAT AAC GTG AGC C

FIP: CGA TAC TGG CCT GCA AGT CCA AAA GGA

GTG CGG GTA ATA GGT T

BIP: AAA TTC AGC GAC TGG GTT CGG GGG ATG

TCT TCT CAC GGA AAG T

LAMP 法

LAMP 法は栄研化学株式会社の DNA 増幅試薬キット (製品コード LMP201) を用いて、そのキットに添付されているプロトコールに従って行なった。UV 照射を用いて目視で DNA の増幅を確認する場合には栄研化学株式会社の蛍光・目視検出試薬キット (製品コード LMP221) を用いて LAMP 反応液中に添加した。以下に1反応辺りの反応液組成を示す。

1) 標準反応液

2×reaction mix.	12.5 µl
Primer: FIP (40 mM)	1 µl
BIP (40 mM)	1 µl
F3 (20 mM)	1 µl
B3 (20 mM)	1 µl
<i>Bst</i> DNA polymerase	1 µl
Distilled Water	6.5 µl

2) 蛍光・目視検出反応液

2×reaction mix.	12.5 µl
Primer: FIP (40 mM)	1 µl
BIP (40 mM)	1 µl
F3 (20 mM)	1 µl
B3 (20 mM)	1 µl
<i>Bst</i> DNA polymerase	1 µl
蛍光・目視検出試薬	1 µl

Distilled Water 5.5 μ l

反応液を調製後、鋳型 DNA を 1 μ l 反応液に添加し、65°C×60 分のインキュベーション後 80°C×10 分処理して反応を停止させた。増幅した DNA は 1.5%アガロースゲル、もしくは UV 照射による目視により確認した。

反応チューブは汎用 0.2 ml PCR チューブを用い、Gene Amp PCR system 9700 (Perkin Elmer) を用いてインキュベーションを行った。

C. 結果

本研究班では不活化ペスト菌を鋳型として LAMP 法を適用した迅速検出法の確立を試みた。

まず検出系として成立するかを検討するために、ペスト菌ワクチン株 Yreka 粗抽出 DNA を用いて検討した。Yreka 株の粗抽出 DNA を添加した場合には添加していない場合と比較して優位に UV 照射による目視で DNA の増幅による蛍光の増加が確認された (図 1B)。さらにアガロースゲルにて DNA のラダーが確認され (図 1A)、UV 照射下目視の結果と同じ結果を得た。さらに、増幅された DNA を増幅領域内に 1ヶ所存在する *Sau3AI* で処理するとバンドが 1本に収束することから LAMP 法により *pla* 遺伝子の領域内で目的通りに遺伝子の増幅が起こり、ペスト菌の DNA を検出していることが確認された。

さらに、本研究に用いた条件でのペスト菌に対する特異性を検討する目的で感染研

に保管されている他のペスト菌株 8 株と *Yersinia pseudotuberculosis*、*Yersinia enterocolitica* 菌各一株ずつの粗抽出液に対する LAMP 法の反応を検討した。UV 照射目視及びアガロースゲルによる判定は共にペスト菌株 9 株に対してはすべて陽性であった。一方で *Y. pseudotuberculosis*、*Y. enterocolitica* では陰性であった (図 2A, 図 2B)。以上の結果からペスト菌特異的に反応陽性が出るということが確認された。

さらに、LAMP 法による検出限界の検討を目的として 6×10^8 個/ml の菌液を希釈調製し、反応液に添加することによって LAMP 法で検出を試みた。図 3A 及び図 3B に認められるように理論的には反応液中に 1 菌体分の DNA が存在していれば LAMP 法では検出可能であることが確認された。

D. 研究考察

本研究においては本研究では簡便、安価で且つ感度がよく、最終診断まで 30-60 分で終了される LAMP 法をペスト菌の検出に適用し、その系の確立を試みた。

LAMP 法によって

- 1) ペスト菌の検出が 60 分の反応後に蛍光・目視によって迅速に判別可能となった。
- 2) ペスト菌株に対しては普遍的に陽性を示し、ペスト菌の近縁菌である *Y. pseudotuberculosis*、*Y. enterocolitica* では陰性を示し、ペスト菌特異的に検出可能となった。
- 3) 理論的には反応液中に 1 菌体分の

DNA が存在すれば検出可能であった。

一昨年度は野鼠からのペスト菌の培養検出実施したが、すべて陰性であった（厚生科学研究費補助金、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、野鼠のペスト菌保菌に関する研究参照）。現時点ではペスト菌の陽性報告が検疫所においても報告されていないため、ペスト菌の国内侵入はないと推測されている。しかし、培養検出ではやはり限界がある場合も推定され、より鋭敏で検出できる検出系での検査も精度の高いサーベイランスには必要であると考えられた。現時点においては real time PCR や multiplex PCR 迅速で鋭敏な検出法が開発されてきたが、特殊な機器を用いるため、簡便な検出方法ではなかった。本研究においてはペスト菌の検出に LAMP 法を適用することによって 30-60 分の短時間で簡便な機器のみで 1 オーダーの菌が検出可能となった。

だが、本研究では粗精製されたペスト菌 DNA を用いた場合の検出結果であり、実際に臨床検体、もしくは動物検体に潜むペスト菌の場合にはさらなる試料調製を含めた検出系の改良が必要となるであろう。来年度は主に LAMP 法を用いた動物組織からのペスト菌 DNA の検出方法の確立も試み、より実際の検出に適化させた LAMP 法のペスト菌の動物検体からの検出系の開発と確立を試みる予定である。

E. 参考文献

1. Tugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino and Tetsu Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* **28**(12):e63
2. 塚野尋子、高橋英之、ペスト診断マニュアル、地方衛生微生物研究会、2004.
3. Hiroko Tsukano, Ken-ichiro Itoh, Sosuke Suzuki and Haruo Watanabe. Detection and identification of *Yersinia pestis* by polymerase chain reaction (PCR) using multiplex primers. *Microbiology and Immunology* **40** (10): 773-775, 1996.

F. 健康危機管理情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願

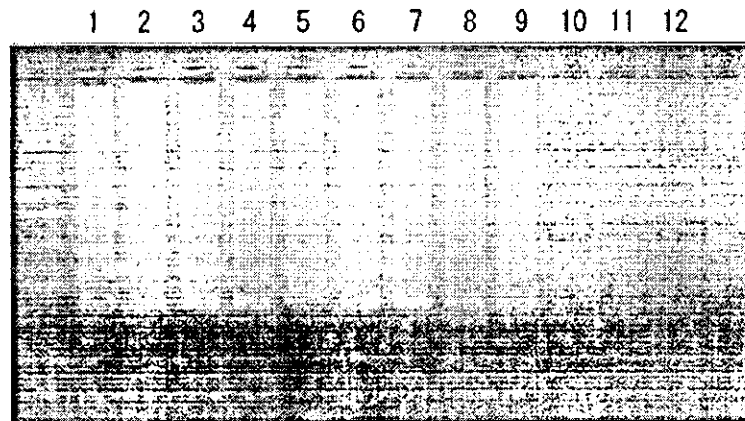
特になし



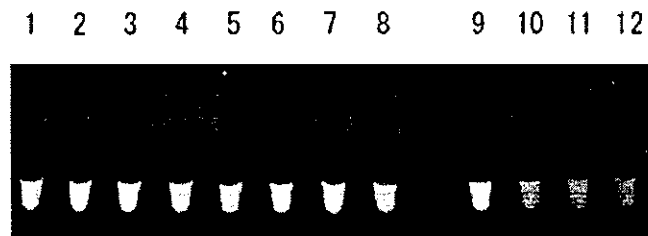
図1 LAMP法によるペスト菌検出例

- A. 反応液0.4 μ l分を1.5%アガロースゲル及びEtBr染色によってDNAを検出した。増幅領域内に制限酵素部位が1ヶ所存在する *Sau3AI* により処理すると増幅したDNAが等間隔に切断され、矢印のバンドの長さに収束されることから目的通りのDNA増幅が起こり、特異的にペスト菌のDNAを検出していると考えられた。
- B. 蛍光・目視試薬を添加してLAMP反応を行ない、反応後UV照射により増幅DNAを可視化した。増幅した場合にはしない場合と比べて優位に蛍光量が異なり、目視でも十分に確認できた。

A



B



- 1: *Y. pestis* Yreka
- 2: *Y. pestis* H1122
- 3: *Y. pestis* M1140
- 4: *Y. pestis* 283F1
- 5: *Y. pestis* L27
- 6: *Y. pestis* 横浜Q
- 7: *Y. pestis* Alexiander
- 8: *Y. pestis* 195/P
- 9: *Y. pestis* Bryans
- 10: *Y. pseudotuberculosis*
- 11: *Y. enterocolitica*
- 12: not added (negative control)

図2 LAMP法によるペスト菌検出の特異性

電気泳動及び蛍光・目視検出共にペスト菌のみ陽性反応が出て、*Y. pseudotuberculosis*、*Y. enterocolitica*では陰性であった。