

[結果と考察]

ボレリア接種マウスの踵関節の腫脹度を Fig.5 に示す。感染性株接種の場合、接種後約 10 日前後に一過的に強度の関節腫脹が見られ後、緩やかに緩解へ向かう。この時期に、ボレリア菌体は関節周囲組織へ浸潤し、同時に炎症細胞(主に好中球)の強度浸潤が観察される(Kawabata et al. 2004)。また、感染 20 日以降、関節腫脹が緩解した後も、病原体ボレリアは組織内に定着、持続的に病原体が見出される。一方で、非感染性株では、関節周囲への病原体浸潤および関節腫脹は見られない。沖縄県で野鼠耳介組織より分離された *Borrelia* 3 株中 2 株で、軽度の関節腫脹が見られたが、統計処理の結果、有意の上昇とはされなかった。また接種後 28 日目での解剖による病原体分離においても、病原体は何れの臓器からも分離されなかった。

本ボレリアは沖縄県で捕獲された野鼠耳介組織から分離された株であり、また低経代株であることから、実験マウスモデルにおいても、感染性が維持されていると考えられた。しかしながら、使用したボレリア 3 株でマウス臓器から病原体の

再分離がなされなかったことから、1) 感染は起こるが、一過的であり、長期間にわたる持続感染は起こらない、もしくは 2) マウスには感染しない可能性が考えられた。一方で、沖縄本島及び徳之島では、野鼠耳介組織のみならず膀胱からも本ボレリアが分離されている。米国では RIS 領域によりマウスへの病原性に有意差が見られるとする報告がある。従い、これら膀胱由来株は耳介由来株とは何らかの遺伝的相違があり、その結果、深部組織への侵入が高まっている可能も考えられた。しかしながら現時点で、米国のような RIS 領域と病原性の相関を示す差は、沖縄分離ボレリア膀胱由来株(=全身移行株)および耳介分離株では見出されていない(Supplemental table 3)。近年、ボレリアの宿主決定には、宿主補体への抵抗性が重要であることが示されている。本 *Borrelia* のマウス補体系への抵抗性は不明であり、今後、これらボレリアの宿主補体への抵抗性について調べる等が必要であろう。

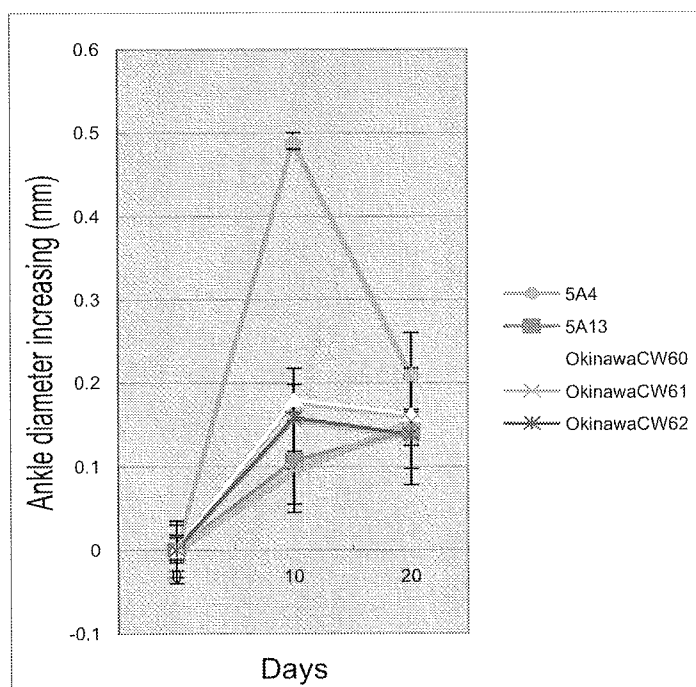


Fig. 5. Ankle diameter increase following inoculation of C3H/HeN mouse with *Borrelia* strains. Mice were five weeks age at the time of infection and were inoculated in the right hind footpad with 1×10^5 *Borrelia* organisms in 50 μ l of BSK-II medium. Infectious clone (B31 5A4) and non-infectious clone (B31 5A13) were used as control in this study.

4.種子島におけるライム病ボレリア

国内に分布するライム病ボレリアには, *Borrelia garinii*, *B.afzelii* の病原性ボレリア 2 種, 病原性が不明な *B.japonica*, *B.valaisiana*, *B.tanukii*, *B.turdi*, *B.miyamotoi* の 5 種, 計 7 種に加え, 新しい種と考えられる *B.valaisiana* 近縁種が南西諸島で見出されている。これらボレリアの分布は九州以北と南西諸島で異なり, 九州以北では沖縄で見出される *B.valaisiana* 近縁種は見出されていない。一方で, *B.valaisiana* 近縁種は 2005 年, ヒト患者から病原体 DNA が検出され, 今後ヒト感染種として注意が必要である可能性がでてきた。そこで本研究では, 鹿児島県, 大原研究所が主となって, *B.valaisiana* 近縁種の北限を調査すべく, 野鼠捕獲調査, およびマダニからの病原体分離を試みた。

[方法] 2005 年 3 月, 種子島において常法に従い, 野鼠捕獲, 病原体分離を行った。捕獲された野鼠種および捕獲頭数は以下の通りである。

- ヒメネズミ 3 頭 (♂2, ♀1)
- アカネズミ 24 頭 (♂13, ♀11)

分離ボレリアの DNA 型別には 23SrDNA - 5SrDNA intergenic spacer(RIS)領域の sequence typing 法を用いた。

[結果および考察] 捕獲された野鼠 27 頭中 10 頭で野鼠耳介よりボレリアが分離された。分離ボレリアの DNA 型別により分離株 10 株はいずれも *Borrelia tanukii* もしくは *B.tanukii* に近縁な種であると推定された。RIS 領域の塩基配列をもとに系統解析を行い, 結果を Fig.6 に示した。また分離株の一部は SDS-PAGE による protein profile および単クローン抗体による反応性を調べ, 結果を Fig.7 に示した。

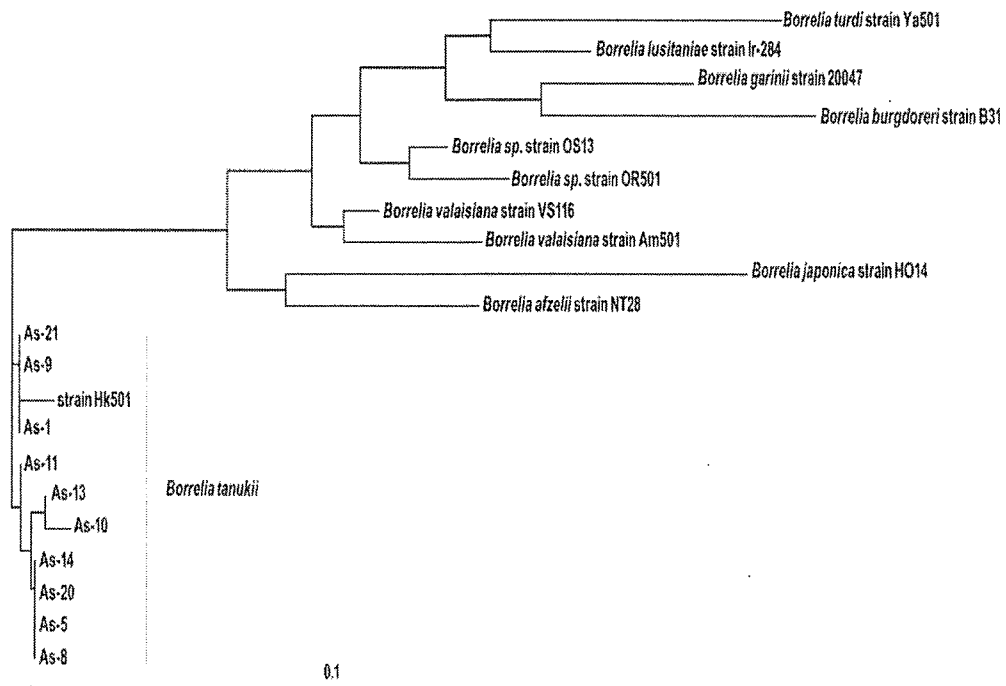


Fig.6. RIS 領域 sequencing による種子島分離株の DNA 型別

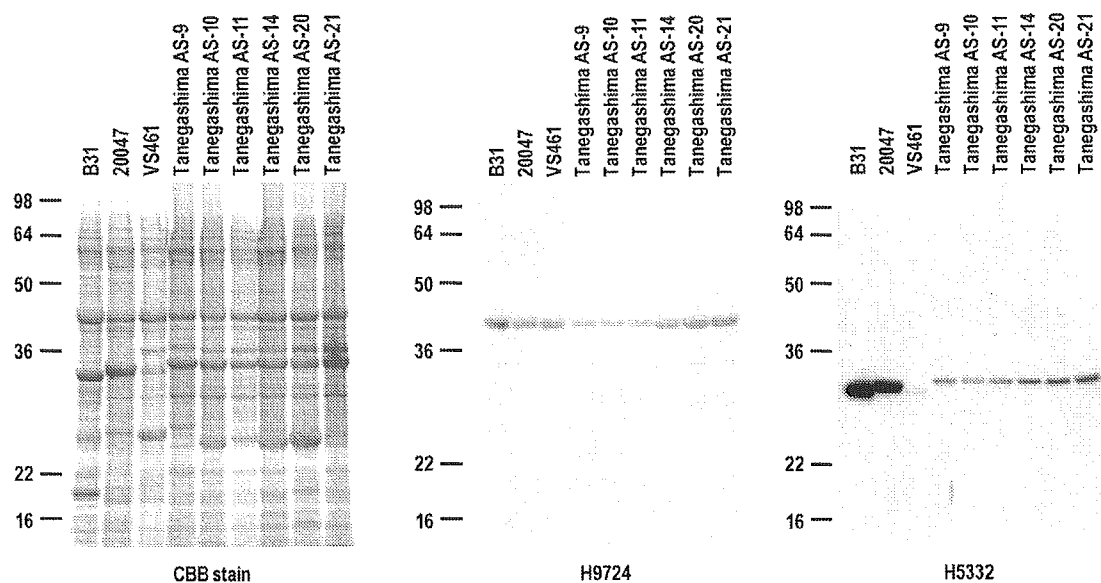


Fig.7. 種子島で分離されたボレリア 6 株と単クローン抗体(H9724, H5332)との反応性

分離されたボレリアは *B. tanukii* の標準株である Hk501 と NJ 法(open gap penalty=10, gap extension penalty=0.1) とクラスターを形成した。また SDS-PAGE による protein profile によって OspC と目される約 25kDa 抗原に数 kDa の範囲での差異が認められるが、H5332 によって検出される OspA はほぼ同一サイズであることが明らかとなった。また H9724 に反応するフラジェリン抗原(FlaB)もライム病群ボレリアに特徴的な 41kDa であることが明らかとなった。この他結果は示さないが、*Ixodes turdus* より *B. turdi* が一株分離されている(strain 047-3)。

一方捕獲野鼠からは南西諸島、アジア各国で見出される *B. valaisiana* 近縁種は分離されなかった。*Borrelia* 種は *Rickettsia* 種と比較して、媒介宿主であるマダニ種とほぼ 1:1 の関係が成立する。即ち、マダニの生息域と *Borrelia* 種の存在域が overlap することがフィールド調査結果から強く示唆されている。種子島は *B. valaisiana* 近縁種が dominant である沖縄県と直接接しているわけではないが、比較的近距离に位置する。しかしながら種子島で *B. valaisiana* 近縁種が見出されなかったことは、種子島では、沖縄地方と比較して *Ixodes granulatus* が優先種ではない可能性が考えられた。

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、福井県、島根県、徳島県、鹿児島県、沖縄県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。(Supplemental table. 1)

<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),Supplemental table. 2>

北海道:53(1), 青森:14(0),福井:14(0), 島根:6(0),
鹿児島:45(0), 沖縄:12(2)

捕獲野鼠数 144 頭, 陽性個体数 3 頭, 陽性率 2.1%

<病原体分離結果>

レプトスピラ:捕獲野鼠 144 頭中 3 頭(分離陽性率=2.1%)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北海道分離1株は *Leptospira borgpetersenii*と同定された.沖縄分離株は未同定である.

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,昨年度分与した野鼠肝臓,もしくは血液より各種 *Bartonella* 属細菌を見出している.*Bartonella* 属細菌は壱塚熱,ネ

コヒツカキ病にくわえ,心内膜炎,眼結膜炎などの要因になることが知られている.本調査で見出された *Bartonella* 属細菌は *rpoB* 遺伝子解析等から *B.grahamii*, *B.taylorii*,もしくはこれらの近縁種であると考えられる.

<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.

[論文発表]

Naitou H, Kawaguchi D, Nishimura Y, Inayoshi M, Kawamori F, Masuzawa T, Hiroi M, Kurashige H, Kawabata H, Fujita H, Ohashi N.: Molecular Identification of *Ehrlichia* species and '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano Prefectures, Japan. **Microbiology and Immunology**. (In press), 2006.

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**. 24: 97-101, 2005.

[学会発表]

Masuzawa T, Sakakibara S, Kawabata H, Imai Y. Classification of *Leptospira* Reference Strains Based on DNA Gyrase B Subunit Gene Sequences. International Leptospirosis Society 4th Scientific Meeting. Thailand, Nov. 2005.

Takano A, Kishimoto T, Ando S, Satou K, Arakawa K, Ogawa M, Nogami S, Kawabata H, Fujita H Prevalence of *Borrelia*, *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks(Acari:Ixodidae), Japan. The 1st Scientific Meeting of the Asian Zoo & Wildlife Medicine 2005. Thailand. Oct. 2005.

三宅浩行, 山口全一, 加藤理子, 馬場俊一, 藤田博己, 川端寛樹, 斎藤範夫. フタトゲチマダニ若虫刺咬症の小児例. 日本皮膚科学会東京地方会. 2006年1月.

増澤俊幸, 岡本能弘, 宇根有美, 竹内隆浩, 塚越啓子, 川端寛樹, 小泉信夫, 吉川泰弘. 輸入動物(アメリカモモンガ)に起因するレプトスピラ症感染事例. 第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 2005年11月.

増澤俊幸, 岡本能弘, 宇根有美, 竹内隆浩, 塚越啓子, 川端寛樹, 小泉信夫, 吉川泰弘. 輸入動物に起因するレプトスピラ症感染事例の診断と感染源の特定. 日本細菌学会関東支部会. 2005年10月.

川端寛樹. ライム病とボレリアの遺伝子改変技術. 日本細菌学会関東支部会. 2005年10月.

安藤秀二, 高野愛, 鶴見みや古, 仲村昇, 佐藤文男, 高橋守, 岸本寿男, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. *Carios* 属ダニの病原体ベクターとしてのリスク評価. リケッチア研究会. 2005年10月.

高野愛, 岸本寿男, 安藤秀二, 佐藤梢, 荒川香南子, 小川基彦, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. 日本国内で採取されたマダニにおけるライム病病原体ボレリアの浸潤状況. 日本野生動物医学会. 2005年9月.

高野愛, 鶴見みや古, 仲村昇, 佐藤文男, 高橋守, 岸本寿男, 安藤秀二, 野上貞雄, 川端寛樹, 藤田博己. *Carios* 属から見出された *Rickettsia*. 第13回 SADI(ダニと疾病のインターフェイスに関するセミナー). 2005年9月.

田原研司, 板垣朝夫, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県におけるつつがむし病の発生状況と *Orientia tsutsugamushi* の流行株. 島根県獣医学会. 2005年8月.

矢野泰弘, 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘. 隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 日本衛生動物学会大会. 2005年6月.

石畝史, 高田伸弘, 藤田博己, 矢野泰弘, 溝口二郎, 田原研司, 川端寛樹, 増沢俊幸. 島嶼を含む列島各地におけるライム病関連ボレリアの調査, 2004年の成績と考察. 日本衛生動物学会大会. 2005年6月.

佐々木年則, 佐々木次雄, 久保田真由美, 川端寛樹, Poudel, S.K.S., 星野啓太, 比嘉由紀子, 伊澤晴彦, 富田隆史, 澤邊京子, 荒川宜親, 小林陸生. 再興感染症としての壱塚熱および回帰熱に対する疫学的試み. 日本衛生動物学会大会. 2005年6月.

藤田博己, 川端寛樹, 小泉信夫, 角坂照貴, 新田芳樹. 沖縄本島のミナミズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 日本衛生動物学会大会. 2005年6月.

新田芳樹, 柳田千夏, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己, 角坂照貴. *Leptospira flaB* nested PCR の検討と野外応用. 第42回レプトスピラシンポジウム. 2005年4月.

[和文発表]

齋藤幹, 伊東高章, 大野実, 浅島信子, 川端寛樹, 渡邊治雄, 小泉信夫, 藤田博己. 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病の報告. 病原微生物情報 26(11), 20-21. 2005.

川端寛樹: 節足動物媒介性感染症と媒介動物のインターフェイス: cutting edge. ダニ類研究班会報. 2005.

川端寛樹: ライム病とボレリアの遺伝子改変技

術. 日本細菌学会ニュース. 2005.

本田俊郎, 中山浩一郎, 吉國謙一郎, 石谷完二, 新川奈緒美, 蔵元瀧, 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. 67-70, 2004.

御供田睦代, 中山浩一郎, 吉國謙一郎, 石谷完二, 新川奈緒美, 蔵元瀧, 宮田義彦, 本田俊郎, 藤田博己, 高田伸弘, 川端寛樹. 鹿児島県内の野鼠及びダニ類の調査について. 鹿児島県環境保健センター所報. 67-70, 2005.

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

レプトスピラ抗原 Lig タンパク質免疫によるハムスターでの感染防御誘導に関する研究

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

研究協力者 鈴木悟 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部二課 研究員

研究協力者 村上保人 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部二課 課長

研究協力者 岸雅彦 共立製薬先端技術開発センター 研究開発一部 部長

研究要旨

レプトスピラの感染防御タンパク質 LigA-m の感染防御効果をハムスターを用いて評価した。組換え LigA-m タンパク質の免疫を免疫することにより、マウスに比べて弱いものの、ハムスターでもレプトスピラ感染に対する防御効果が認められた。今後免疫方法の改良などにより、ハムスターに対しても高い防御効果を示せるよう検討を行うことが重要である。

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 230 以上の血清型の多くの感染に対して有効な新たなワクチンの開発が急務となっている。昨年度までの研究により、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 を同定した。本年度は Lig タンパク質の感染防御免疫誘導について他のレプトスピラ症モデル動物

であるハムスターを用いてその感染防御効果を検討した。

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 である。この菌のハムスターに対する病原性は表 1 の通りである。

2. LigA-m のヒスチジンタグ組換えタンパク質の発現

完全長 LigA-m は PCR によって増幅し、PQE60 ベクターを用いて、N 末端にヒスチジンタグを付加した組換えタンパク質

(LigA-m/His₆)として大腸菌 SCS110 で発現させ、Ni-NTA を用いてアフィニティー精製を行った。

3. ハムスター感染防御実験

3-1. 熱不活化全菌体免疫による感染防御試験

継代培養している UP-MMC-NIID 株を新しいコルトフ培地 4 ml に植え継ぎ、30°C で 5 日間培養した培養液を 56°C で 30 分間不活化処理を行った。6 週齢の Syrian ハムスターに熱不活化レプトスピラ培養液 1 ml を皮下免疫し、1 週間後に等量の熱不活化レプトスピラ培養液を皮下に追加免疫した。追加免疫 2 週間後に 1×10^1 , 10^2 , 10^3 細胞の UP-MMC-NIID をそれぞれ 5 頭の腹腔内に注射し、生死を 1 ヶ月間観察した。

3-2. LigA-m/His₆ 免疫による感染防御試験

6 週齢の Syrian ハムスターに、フロイント完全アジュバント(FCA)と共に 50 µg の LigA-m/His₆ あるいはフロイント完全アジュバントのみを皮下免疫し、2, 4 週間後に等量の LigA-m/His₆ をアジュバントなしで腹腔内に追加免疫した。FCA 免疫群には PBS のみを接種した。最終追加免疫 1 週間後に 1×10^2 細胞の UP-MMC-NIID 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。ハムスターの血清は 100 倍から 5 段階希釈で 62,500 倍まで希釈して使用した。2 次抗体には

HRP 標識ヤギ抗ハムスター-IgG を 2,000 倍に希釈して使用した。

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. 熱不活化全菌体による感染防御免疫の誘導

これまで LigA-m 免疫により、マウスで感染防御を誘導できることを示してきたが、他のレプトスピラ症モデル動物であるハムスターを用いて LigA-m の感染防御効果を調査した。ハムスターでの LigA-m 免疫による感染防御試験を行うにあたって、現行のレプトスピラワクチンと同等のレプトスピラ全菌体死菌の免疫によるハムスターでの感染防御効果を調査した。その結果、熱不活化全菌体免疫により 10, 100, 1,000 細胞レプトスピラの感染に対して感染防御がみられ、不活化菌体を免疫した全てのハムスターが感染後 1 ヶ月間生存した(非免疫ぐうはすべて死亡)。また感染後に腎臓を摘出し、レプトスピラの定着を培養法により調査した結果、すべての検体でレプトスピラの増殖はみられなかった。

2. LigA-m/His₆ 免疫による感染防御免疫の誘導

LigA-m/His₆ 免疫によって、ハムスター

においても抗 LigA-m 抗体が産生されることが明らかになった(図 1). また感染防御実験の結果, マウスでの効果に比べると弱いもののハムスターにおいても感染防御免疫を誘導できることが明らかになった(図 2). レプトスピラ感染 1 ヶ月後に生存していたハムスターから腎臓を摘出し, レプトスピラの定着を培養により調査した結果, 4 頭中 2 頭でレプトスピラの増殖が確認され, 残りの 2 頭からはレプトスピラの増殖はみられなかった.

考察

本研究によって, Lig タンパク質はマウスだけでなく, ハムスターに対しても感染防御免疫を誘導できることが明らかになった. しかしその防御効果はマウスに比較して弱いものであった. 一方マウスでは感染後生存したマウスはすべて腎臓にレプトスピラが定着していたが, ハムスターでは 4 頭中 2 頭でレプトスピラが腎臓に定着しない sterilizing immunity が誘導された. マウスでは, Lig タンパク質の免疫により抗体が産生された場合には 100%の感染防御が認められたが, ハムスターでは抗体が十分に産生していても 100%の感染防御が行われなかった. これまでレプトスピラ感染に対する免疫は液性免疫, すなわち抗体が担っているとされてきたが, 最近のウシでの全菌体ワクチン免疫の実験から, 細胞性免疫の重要性が明らかとなり, Th1 免疫の確立が持続感染の阻止に重要であることが明らかとなった¹⁾. またレプトスピラ抗原

Hap1/LipL32 の免疫誘導について, アデノウイルスベクターあるいはプラスミドベクターを用いた免疫では防御効果があるものの, 本研究と同様の大腸菌で作らせた組換えタンパク質では防御を誘導することができなかったとの報告もある²⁾. ウイルスベクターやプラスミドベクターなどの DNA ワクチンにより, どのような免疫が誘導される, レプトスピラの感染防御に効いているのかは明らかではないが, これらの実験結果は免疫方法が感染防御誘導に大きく関わっていることを示している.

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. *lig* 遺伝子は多くの病原性レプトスピラに相同遺伝子が存在し, 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. 今後はより効果の高い Lig タンパク質の免疫方法の確立し, ハムスターでの感染防御効果の増強を検討する必要がある. さらに他のレプトスピラ感染モデル動物であるイヌでの感染防御実験も現在準備中であり, 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. Nakamura M, Taira K, Itokazu K, Kudaka J, Asato R, Kise T, Koizumi N. Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated

- with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa Main Island. *Journal of Veterinary Medical Science* 68(1): 83-85 2006.
2. Koizumi N, Watanabe H. Leptospirosis vaccines: Past, present, and future. *Journal of Postgraduate Medicine* 51(3): 210-214 2005.
 3. 坂本光男, 加藤哲朗, 佐藤文哉, 吉川晃司, 吉田正樹, 柴孝也, 小野寺昭一, 保科定頼, 小泉信夫, 渡辺治雄. インドネシア・バリ島で感染した *Leptospira botgpetersenii* 血清型 Sejroe によるレプトスピラ症の 1 例. *感染症学雑誌* 79(4): 294-298 2005.
 4. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ症. *モダンフィジシャン* 25(5): 606-609 2005.
 5. 小泉信夫, 渡辺治雄. レプトスピラ. 日本臨床増刊号 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査 214-216 2005.

表 1. *L. interrogans* UP-MMC-NIID のハムスターに対する病原性

感染レプトスピラ数	動物数	生存動物数	死亡日数
10 ⁷	5	1	5, 5, 5, 8
10 ⁵	5	0	6, 6, 6, 6, 7
10 ³	5	1	8, 8, 8, 8
10 ¹	5	1	9, 9, 9, 11

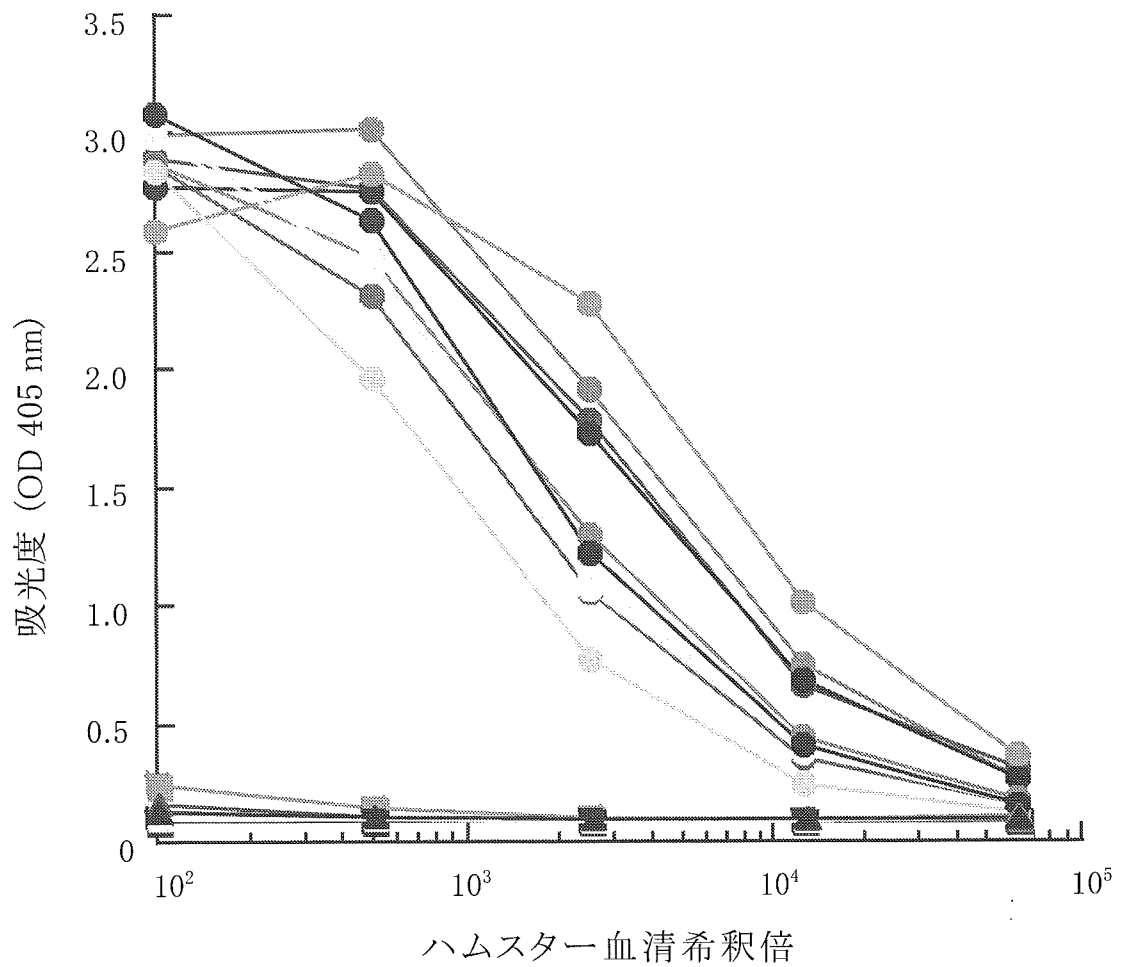


図 1. LigA-m 免疫hamster血清中の抗 LigA-m 抗体の測定. ● ; LigA-m 免疫hamster血清, ■ ; FCA 免疫hamster血清, ▲ ; 未接種hamster血清.

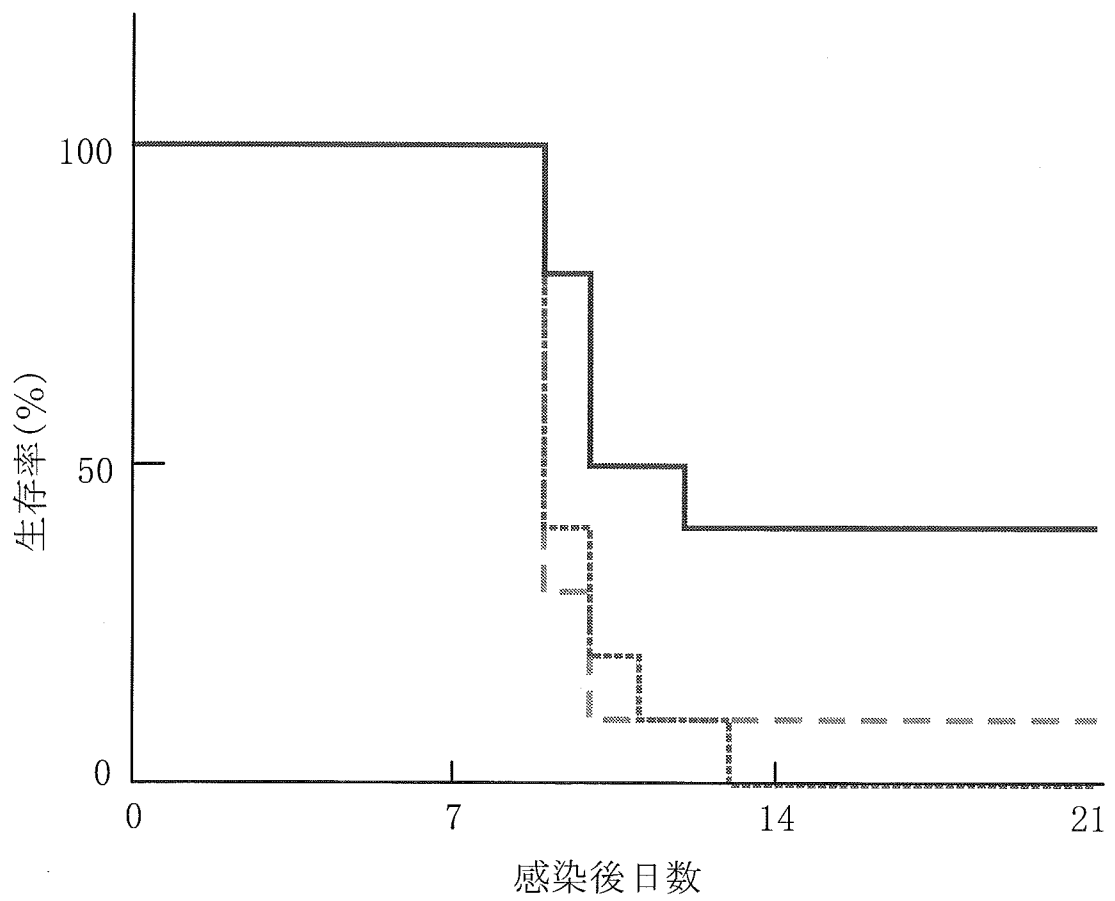


図 2. *L. interrogans* UP-MMC-NIID 感染後のハムスターの生存率の推移. 実線 ; LigA-m 免疫群, 点線 ; FCA 免疫群, 破線 ; 未接種群. 観察は感染後 30 日目まで継続, 21 日目以降生存率に変化なし.

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（2005年度）

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 千葉科学大学・薬学部・教授
研究協力者 名古屋市生活衛生センター
研究協力者 西宮市環境局環境衛生課

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6か年にわたり調査してきた。ここでは、2005年度に名古屋市、兵庫県西宮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。

名古屋市ではドブネズミ29匹から3株、アカネズミ46匹から2株のレプトスピラを分離した。*gyrB* 遺伝子解析および顕微鏡凝集試験によりドブネズミ由来の3株は *Leptospira interrogans* 血清型 *Icterohaemorrhagiae* あるいは *Copenhageni* と同定された。アカネズミ由来の2株は *Leptospira interrogans* 血清型 *Hebdomadis* (Akiyami B) と同定された。

兵庫県西宮市では27匹のドブネズミ、1匹のハツカネズミ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2匹のドブネズミからを暗視野顕微鏡でレプトスピラ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。

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6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、隣接する里山に生息するノネズミ類にも感染がみられるために里山地域の調査も実施した。

材料・方法

1. レプトスピラの分離・培養法

2005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

名古屋市内のマンホールで捕獲したドブネズミから分離した3株と都市部に隣接する里山で捕獲したアカネズミから分離した2株を使用した。

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

分離株	捕獲地	種類	培地	種	血清型
AC33/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC37/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC39/05	港区・マンホール	<i>Rattus norvegicus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae or Copenhageni
AC48/05	名東区・草地	<i>Apodemus speciosus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis
AC60/05	名東区・草地	<i>Apodemus speciosus</i>	Korthof	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis

3. *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。

4. 顕微鏡凝集試験 (MAT)

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

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

2005 年 4 月から 2006 年 2 月 までの間に名古屋市と西宮市内でネズミ類の捕獲を実施した。名古屋市のマンホールで 29 匹のドブネズミを捕獲し 3 株のレプトスピラを分離した (Table 1)。名古屋市の里山地域では 46 匹のアカネズミを捕獲し 2 株のレプトスピラを分離した (Table 1)。前年と

同様に、名古屋市のマンホールで捕獲したドブネズミでは、培養初期にレプトスピラを暗視野顕微鏡で検出できるが培養が継続できないレプトスピラが存在した。

西宮市で捕獲した 27 匹のドブネズミと 1 匹のハツカネズミからは分離されなかった。

2. *gyrB* 遺伝子配列および顕微鏡凝集試験に基づく種の同定

gyrB の部分塩基配列および顕微鏡凝集試験から、ドブネズミから分離された AC33/05 株、AC37/05 株、AC39/05 株は *L. interrogans* 血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と同定された。

アカネズミから分離された AC48/05 株、AC60/05 株は *L. interrogans* 血清型 Autumnalis あるいは Hebdomadis と推定されたが顕微鏡凝集試験に結果、血清型 Hebdomadis (Akiyami B) と同定された。

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保有率を示している。今年度に名古屋市内のドブネズミから分離培養に成功したレプトスピラ株は、*L. interrogans* 血清型 Icterohaemorrhagiae あるいは Copenhageni と同定された。この

種はウイルスの病原体で、感染すると重症化するとされ、都市部での優先種と考えられる。

名古屋市郊外の里山地域で捕獲されたアカネズミから分離培養に成功した2株は、*L. interrogans* 血清型 Hebdomadis (Akiyami B) と同定された。血清型 Hebdomadis (Akiyami B) は、全国の山間部に生息するノネズミから分離されている。

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きたが、2005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。これらは、培地中で増殖しないために種の解析は行われていない。

2003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。

研究発表

原著

1. Guner ES, Watanabe M, Kadosaka T, Polat E, Gargili A, Gulanber A, Ohashi N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. *Epidemiol Infect.* 2005 Apr;133(2):331-6.
2. Masuzawa T, Kharitonov IG, Kadosaka T, Hashimoto N, Kudiken M, Takada N, Kaneda K,

Imai Y. Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province--a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *Int J Med Microbiol.* 2005 Jan;294(7):455-64.

3. Shintoku Y., Kimura E., Kadosaka T., Hasegawa H., Kondo S., Itoh M., Islam MZ. *Strongyloides ratti* infection in the large intestine of wild rats, *Rattus norvegicus*. *J. Parasitol.* 2005 91(5):1116-1121.

学会

1. 日本の野鼠に分布する *Bartonella* 属菌と同定法の開発. 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. 日本獣医学会. 2005. 3. 29 (和光)
2. *Leptospira* flaB nested PCR の検討と野外応用. 新田芳樹, 柳田千夏, 川端寛樹, 小泉信夫, 藤田博己, 角坂照貴. 第42回レプトスピラシンポジウム、2005. 4. 3 (東京)
3. 静岡県内における犬のレプトスピラ保有状況について. 山下昭広, 村松芳貴, 川森文彦, 角坂照貴, 榊原省司, 増澤俊幸. 第42回レプトスピラシンポジウム、2005. 4. 3 (東京)
4. 沖縄本島のミナミネズミマダニからの紅斑熱群リケッチア分離例. 藤田博己, 川端寛樹, 小泉信夫, 角坂照貴, 新田芳樹. 日本衛生動物学会. 2005. 6. 2. (札幌)
5. 1999年から2004までに愛知医科大学で同定されたマダニ刺咬症. 角坂照貴, 木村英作. 日本衛生動物学会、2005. 6. 2 (札幌)
6. 隠岐諸島および島根県本土域におけるツツガムシ病の疫学的特性. 矢野泰弘, 田原研司, 板垣朝夫, 藤田博己, 角坂照貴, 川端寛樹, 高田伸弘. 日本衛生動物学会、2005. 6. 3 (札幌)
7. 島根県におけるつつが虫病の発生状況と *Orientia tsutsugamushi* の流行株. 田原研司, 板垣朝夫, 川端寛樹, 角坂照貴, 藤田博己, 矢野泰弘, 高田伸弘. 島根県獣医学会. 2005. 8.

平成 17 年度厚生科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
real time PCR 法を用いたペスト菌の迅速検出法に関する研究

分担研究者 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

ペストの診断には迅速性が非常に要求されるが、現段階において本邦において TaqMan real time PCR 法を用いた診断系の開発は報告されていない。そこで、迅速診断法の一つとして多検体の検査が可能な TaqMan real time PCR 法によるペスト診断系の確立を試みた。

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が原因（若しくは起因）の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。その際には迅速な診断とそれに応じた政治的措置が必要となり、ペスト菌の迅速診断は危機管理体制の準備においては最優先課題であると考えられる。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2001年のアメリカで発生した炭疽菌のバイオテロに応じて日本国内でも各地方衛生研究所にTaqMan real time PCR 機が設置され、各自治体においてもreal time PCRの実施が可能な状態になっている。そこで昨年度に引き続き、ペスト菌の迅速検出方法の一つとしてTaqMan 7000を用いたreal time PCR法によるペスト菌の検出法の確立を試みた。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、水際で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考えられる。

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 real time PCR 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

本研究では表 1 に記してある *pla*、*inv*、*yopM*、*cafI* の 4 種の遺伝子及びペスト菌特異的 DNA 領域 3a をペスト菌の検出用に選定し、プライマーを設計して本実験に供した。なお、プライマーの設計は Primer Express というプログラムを用いて行なった。

Real time PCR 法

反応及び検出すべてを ABI PRISM 7000 にて行なった。反応液は以下のような組成で 1 遺伝子を 1 反応 (1 チューブ) で検出した。なお、プライマー及びプローブの希釈は用事調製で行なった。

TaqMan Universal Master Mix (2X)	12.5 µl
F primer (9 µM)	2.5 µl

R primer (9 µM)	2.5 µl
FAM-labelled probe (2 µM)	2.5 µl
template DNA	1 µl
H ₂ O	4 µl
Total	25 µl

PCR チューブを ABI PRISM 7000 にセットし、下記プロトコールにより PCR 反応を行なった。

50°C × 2min	} 40 サイクル
95°C × 10min	
95°C × 15sec	
60°C × 1min.	

反応は Absolute determination モードにてリアルタイムで検出した。

C. 結果

本研究班では不活化ペスト菌を鋳型として real time PCR 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、ペスト菌株 Alexander 粗抽出 DNA を用いて検討した。約 10⁵ 菌体分の DNA を用いた場合には 10~15 サイクルからシグナルが検出され始め、サイクル終了の 40 サイクルまでに十分にシグナルが増加していくことが確認された (図 1)。

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、ペスト菌と近縁で病原性がある *Yersinia* 属菌で *Yersinia pseudotuberculosis*、*Yersinia enterocolitica* 菌各 1 株ずつに対する検出

反応を検討した。*Yersinia pseudotuberculosis*、*Yersinia enterocolitica* に対しては 10^8 菌体以上の多量の鋳型 DNA を添加した場合には 30 サイクル当たり検出され始める非特異的な疑陽性反応が確認された(図 2 左)。しかし、real time PCR 反応の鋳型 DNA としては過剰であるのでさらに希釈した鋳型 DNA に対しても同様の反応を検討した。その結果、*Yersinia pseudotuberculosis*、*Yersinia enterocolitica* の 10^5 菌体程度に対しては非特異的疑陽性反応は検出されなかった(図 2 右)。以上の結果から本研究で実施している real time PCR 法によってペスト菌特異的に反応陽性が出ることを確認された。

また、感染研に保管されている他のペスト菌株 7 株の粗抽出 DNA を用いて他のペスト菌種に対する反応性を検討した。195/P、L27、283F1、Bryans の 4 株に関しては Alexander 株と同様に 5 種のプローブですべて良好に陽性反応が検出された(図 3)。しかし、Yreka 及び MII40 株に関しては *yopM* 遺伝子の検出が弱かった(図 4)。また、H122 株に至っては *yopM* の遺伝子が全く検出されなかった(図 4)。以上の結果から real time PCR によるペスト菌の検出系としては十分に機能しているが、*yopM* 遺伝子を検出する場合にはその結果に注意を要する場合があることが推測された(研究考察参照)。

さらに、real time PCR 法による検出限界の検討を目的として 1×10^8 個/ml の菌液を希釈調製し、1 μ l (1×10^5 菌体相当) を反応液に添加することによって real time PCR

法で検出を試みた。横浜 Q 株に比べて Alexander 株の方が検出感度が若干高い結果が得られたが、両株共に 10^2 菌体程度は検出可能であることが確認された(図 4)。

D. 研究考察

本研究においては TaqMan real time PCR 法をペスト菌の検出に適用し、その系の確立を試みた。その結果、real time PCR 法によってペスト菌特異的に 5 種のプローブが検出でき、 10^2 個程度の菌体量があれば十分に検出可能なレベルであることが確認された。各 real time PCR の結果を詳細に観察すると 5 種のプローブの中ではペスト菌に特異的に存在する 3a 領域に対する検出感度が高かった。おそらく十分な T_m 値を得るために、プローブの長さが長く設計されたことが一因とも考えられた。いずれにせよ、本検出系においては最も信頼度の高いプローブと考えられ、今後の検出においては 3a プローブの反応を基準とした判定にした方が誤判定を最小限に食い止められる可能性が考えられた。一方、*pla* 遺伝子に対する反応性は全般的に 5 種のプローブの中では最も早いサイクルで検出が開始されているが、反応がプラトーに達する時間もまた早い(即ち反応が早いサイクルで停止し、伸びない)ことが観察された。おそらく、これは *pla* 遺伝子が今回の 5 つのターゲット遺伝子中コピー数が最も多いプラスミド上の遺伝子であるが故に最も遺伝子のコピー数が多いことに起因していると考えられる。*pla* 遺伝子の結果を判定する場合

にはこの点にも注意する必要があるであろう。また、*yopM* 遺伝子に関しては反応が弱い菌株 (Yreka、MII40)、そして陽性反応が全く検出されなかった株 (H122) があつた。*yopM* 遺伝子自体はペスト菌の成育自体には必須遺伝子では無く、プラスミド性であるため、それらの菌では *yopM* 遺伝子が欠如もしくは減少している可能性が考えられた。いずれにせよ *yopM* 遺伝子の検出結果は十分に菌株によってばらつきがある可能性があるため、十分に注意する必要があるであろう。また、*yopM* 及び *inv* の遺伝子は *Yersinia pseudotuberculosis* でも検出され、*Yersinia enterocolitica* ではいずれのプロープでも陽性反応が検出されなかったことから 5 種のプロープの陽性反応のパターンを観察することにより、病原性 *Yersinia* 属菌の検出と同定も本研究の検査手法で検出・同定可能であることが明らかとなった。以上のことから本研究で開発された TaqMan real time PCR 法によって *pla*、*inv*、*yopM*、*cafI* 及びペスト菌特異的 DNA 領域 3a を検出し、総合的にペスト菌を同定し、さらには *Yersinia pseudotuberculosis* 及び *Yersinia enterocolitica* を検出・想定する系が構築された。

E. 参考文献

1. 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.
2. 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

表1 real time PCR 用のプローブ及びプライマー

プローブ名	長さ(bp)	塩基配列(5'-3')	リポーター色素
3a-TaqMan	21	CTGTTGCCGAACCGCGTTTGG	FAM
yopM-TaqMan	22	ATTGCCTGGACCGACAAGZZZA	FAM
cafI-TaqMan	24	CAAGCACCCTGCAACGGCAACTC	FAM
inv-TaqMan	19	CAACGGAACGCGTGCGCCT	FAM
pla-TaqMan	39	TCTCAGTTAATACCAAATATATCCCCTGACA GCTTTACA	FAM

プライマー名	長さ(bp)	塩基配列(5'-3')
3a-F	19	CCTTGCCCAAAGGTGTTGA
3a-R	20	CAACTGGTTTTTCGGCTGGAT
yopM-F	19	TGGCGGTTTCAAGGTTACG
yopM-R	26	CAGCCCCAGATTATTTAGTTCTAGCT
cafI-F	23	CTGCTAATGCGGCAGATTTAACT
cafI-R	17	TGCGGGCTGGTTCAACA
inv-F	22	GTTCTTGAATCCTCACGTGCAA
inf-R	18	CCACTCGCCCCACAATGT
pla-F	20	CGGGAGTGCTAATGCAGCAT
pla-R	16	CCGGTGGAGGCTGCAA