

200500657B

厚生労働科学研究費補助金  
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～17 年度 総合研究報告書

主任研究者 増 澤 俊 幸  
千葉科学大学・薬学部

平成 18 年 (2006 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. 国内における動物由来スピロヘータ感染症に関する研究・・・・・・・・ 15  
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タンパク質抗原の探索・・・・・・・・ 37  
小泉信夫（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
3. ネズミ類が保有するレプトスピラ・・・・・・・・ 42  
角坂照貴（愛知医科大学・医学部・講師）
4. ペスト菌の（迅速）検出法の確立に関する研究・・・・・・・・ 48  
高橋英之（国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官）
5. 我が国における *Ehrlichia* 属菌、*Anaplasma* 属菌、および *Bartonella* 属菌の分子  
疫学的調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 53  
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 2003  
年 3 月～2006 年 1 月のフィールド調査結果・・・・・・・・ 65  
藤田博己（大原総合病院附属大原研究所・主任研究員）
7. 塹壕熱および回帰熱の疫学的研究・・・・・・・・ 72  
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・・・・・・・・ 78  
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. 2003－2005 年度野外調査一覧・・・・・・・・ 87
10. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・ 89

## 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 千葉科学大学・薬学部・教授

### 研究要旨

1. WHO 出版の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 日本語訳を作成した。レプトスピラ症に遭遇する可能性のある衛生研究所の研究員(約 100 部)、獣医学、細菌学などの分野の研究者、獣医師などに(150 部)配布を行った。
2. 191 種類の血清型からなる 192 の参考株をオランダ国立熱帯研究所 KIT より入手し、DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子(*gyrB*、約 1200bp)の解析を行ない、データベースの構築を行った。*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。
3. 日本各地の野鼠と静岡県伊豆半島のイヌからレプトスピラの分離に成功した。北海道から沖縄までに至る日本全国各地で野生齧歯類の捕獲を行い、レプトスピラの腎臓からの分離培養を行った。3年間で1,101匹の各種野生齧歯類を捕獲し、45株のレプトスピラを分離した(保有率4.1%)。調査地域により保有率にはばらつきがみられたが、北海道においては15%、また長野の八千穂村周辺においては9%、鹿児島県の離島である与路島において37%など高頻度レプトスピラを保有する野生齧歯類が棲息する地域が見られた。また継続的に調査を行っている愛知県名古屋市のマンホールでは数%から7%の保有率がコンスタントに見られている。保有齧歯類としてはアカネズミ、ヤチネズミ、ドブネズミ、クマネズミ、沖縄ではジャコウネズミなどが主要な保有体となっていた。
4. 世界各国より輸入される野生哺乳動物(30 種、519 匹)についてレプトスピラの保有状況を腎臓培養と膀胱の PCR により調べた。2003 年の検査試料ではアフリカヤマネ(アフリカ原産)の腎臓 10 匹中 5 匹より、2005 年の試料ではアメリカモモンガ(北アメリカ原産)より 10 匹中 5 匹からレプトスピラを分離した。それぞれ *L.kirschneri*と同定されたが、アフリカヤマネ由来株については血清型の同定はできていない。一方、アメリカモモンガ由来株は血清型 *Grippotyphosa*と同定することができた。2004 年の試料ではレプトスピラの分離にはできなかったが、鞭毛特異的 PCR により 10.2%の動物の膀胱からレプトスピラを検出した。また、このアメリカモモンガを輸入し販売のために飼育していた従業員 2 名がレプトスピラに感染発病し、その診断と感染源の特定を行った。患者分離株とアメリカモモンガ分離株の鞭毛遺伝子、*gyrB* 配列、ならびに全ゲノムの制限酵素断片長多型性解析パターンは同一であったことから、アメリカモモンガが感染源であることを強く示唆した。本事例は、輸入動物を介した感染症の侵入があったことを示す特異で貴重な事例となった。

### 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

木村浩一、伊東拓也(北海道衛生研究所)、宮本健司(元旭川医科大学)、古田康(北海道大学医学部)、溝口二郎(山形県衛生研究所)、岸本寿男、安藤秀二(国立感染症研究所・ウイルス一部)、阿部賢治(国立感染症研究所・感染病理)、齋藤幹

(東京大学医学部)、斉藤あつ子(神戸大学)、丸山総一、佐藤雪太、高野愛、野上貞雄(日本大学生物資源科学部)、高橋守(川越高校)、鶴見みや古、佐藤文男、仲村昇(山階鳥類研究所)、岡本能弘(千葉科学大学)、川森文彦、稲吉恵(静岡県環境衛生研究所)、山下昭広(静岡県動物管理センター)、

竹内隆浩、塚越啓子(静岡済生会総合病院)、高田伸弘、矢野泰弘(福井大学)、石畝史(福井県衛生研究所)、田原研司、保科健(島根県保健環境科学研究所)、板垣朝夫(元島根県保健環境科学研究所)、福長将仁、牛島陽子(福山大学薬学部)、馬原文彦(馬原医院)、山本正吾(宮崎県衛生研究所)、御供田睦代、蔵元強(鹿児島県環境保健センター)、本田俊郎(鹿児島県出水保健所)、新田芳樹(沖縄県家畜衛生試験場)、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、名古屋市健康福祉局、西宮市環境局環境衛生課、大阪府立公衆衛生研究所(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、野兎病、ペスト、エーリキア症、壱塚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、オランダ王立熱帯研究所(Koninklijk Instituut voor de Tropen, KIT, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis)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。国内の野兎病発生は、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兎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。壱塚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、壱塚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

I. レプトスピラコレクションの整備とDNAジャイレーズ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。

本研究にはKIT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℃好氣的条件で培養した。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 *gyrB* 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, LRFPP)をにより行った。

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	Moorees
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>	Argentiniensis	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	Wumalasesa
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 2	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 2	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 2	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 2	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>	Camlo	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>	Princetown	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 1	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 5	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>	Sulzeriae	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

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	CAYGCNGGNAARTTYGA	301-320	Ictero No. 1
UP2rTL	TCNACRTCNGCRTCNGCTAT	1520-1502	Ictero No. 1
LgyrF	GGTCTTTCCGGAGAAGATG	940-958	Ictero No. 1
LgyrF4	AAAGAAAAATTAGTGAACGC	1024-1043	Ictero No. 1
LgyrR	GAATTGAATTGAGGTTGAGG	1016-997	Ictero No. 1
LgyrR3	TTMCCNGGAAGVCCDCCHCC	1232-1213	Ictero No. 1
L-flaB-F1	CTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC	35-57	Akiyami A
L-flaB-F2	TGTGCACAAGACGATGAAAGC	66-86	Akiyami A
FlaB-710F	GAATCTAGAATTCGAGACGCCG	730-709	Akiyami A
L-flaB-R1	TGAATTCGGTTTCATATTTGCC	825-804	Akiyami A
L-flaB-R2	AACATTGCCGTACCACTCTG	797-778	Akiyami 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)

II. 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.

1. 調査: 3年間の調査で北海道から沖縄にいたる地域で、野鼠からのレプトスピラ分離を行った(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°Cにて1~3カ月間培養した。この間1カ月ごとに暗視野顕微鏡で菌の増殖の有無を調べた。

2. 鞭毛遺伝子 *flaB*-PCR と *gyrB*-PCR とそのシーケンス解析: レプトスピラ分離株より 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。また、*gyrB* シーケンス解析は前述の方法に準じた。得られた配列データをもとに系統解析を行い、種の同定を行った。

III 輸入げっ歯類のレプトスピラ保有調査.

1. 調査試料 世界の国々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*-PCR 反応とシーケンス解析: 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。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。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。

3. 輸入動物を介したレプトスピラ症発生事例の診断と感染源の分析: 患者全血、並びに血清は竹内隆浩医師(静

岡濟生会総合病院)、並びに塚越敬子医師(静岡済生会総合病院)より提供を受けた。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。この患者全血を1~10 $\mu$ Lを、齧歯類の腎臓は注射器を用いて乳剤とした後、非働化ウサギ血清 2.5%を添加したEMJH培地中に接種し30 $^{\circ}$ Cで3ヶ月間培養した。その間1週間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。患者、並びに輸入げっ歯類の血清診断は顕微鏡凝集試験(microscopic agglutination test; MAT)により行った。さらには確認のためにマイクロカプセル凝集試験(MCAT、日本凍結乾燥)、並びに Dipstick キット(PanBio)により確認を行った。*flaB*-PCRによる遺伝子診断は以下の通りを行った。QIAamp DNA mini kit (キアゲン)、または QuickGene-800DNA 抽出機(フジフィルム)を用いて患者血清遠心沈渣、または全血、動物の膀胱組織および分離レプトスピラ株よりPCR用鋳型DNAを調製し、以後は前述の*flaB*解析に基づき行い、さらに増幅産物のシーケンス解析から産物配列の確認と遺伝種の同定を行った。

4. 分離株の性状解析と患者株、動物由来株の鑑別同定: 分離株の遺伝種同定は前述の*gyrB*のシーケンス解析により行った。得られた配列をレプトスピラ基準株 192 株、およびこれまで国内で分離されたレプトスピラの配列と比較した。パルスフィールドゲル電気泳動(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)による制限酵素長鎖断片長パターン(large restriction fragment pattern, LRFP)解析は以下のように行った。レプトスピラ培養液を遠心集菌し、1%低融点アガロース(InCert agarose, Bio-Rad)と混合し 4 $^{\circ}$ C、30分固化させた。EDTA-Sarkosyl 溶液中で、Proteinase Kによりタンパク質を 50 $^{\circ}$ C、1 晩消化した。ゲルプラグを 1 $\times$ H buffer 150 $\mu$ L 中で1時間平衡化した後、15Uの *Not* I 溶液中で 37 $^{\circ}$ C、1 晩消化した。1.2%アガロースゲル(Pulsed Field Certified Agarose, Bio-Rad)にブロックをセットし、パルスフィールドゲル電気泳動装置 Gene Navigator System (Pharmacia)を用いて、200V、パルスタイム10秒で5時間、30秒で12時間、60秒で7時間の計24時間泳動した。泳動後、ゲルを SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stains (Takara)で1時間染色後、長波長紫外線照射バンドの検出を行った。

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 研究結果と考察

### I. レプトスピラコレクションの整備と *gyrB* 配列解析に基づくレプトスピラ血清型推定法開発

*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(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。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野外分離株の *gyrB* 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。

### II 野生げっ歯類のレプトスピラ保有状況調査

北海道から沖縄までに至る日本全国各地で野生齧歯類の捕獲を行い、レプトスピラの腎臓からの分離培養を行った。3年間で1,101匹の各種野生齧歯類を捕獲し、45株のレプトスピラを分離した(保有率4.1%、表3)。調査地域により保有率にはばらつきがみられたが、北海道においては15%、また長野

の八千穂村周辺においては9%、鹿児島県の離島である与路島において37%など高頻度レプトスピラを保有する野生齧歯類が棲息する地域が見られた(図2)。また継続的に調査を行っている愛知県名古屋市のマンホールでは数%から7%の保有率がコンスタントに見られている。保有齧歯類としてはアカネズミ、ヤチネズミ、ドブネズミ、クマネズミ、沖縄ではジャコウネズミなどが主要な保有体となっていた(表4)。

分離株の遺伝子同定並びに血清型同定を*gyrB*遺伝子配列解析並びに*flaB*遺伝子解析および免疫抗血清を用いた交差凝集試験により行なった。本土の分離株は*L.interrogans*血清型Autumnalis、Hebdomadis、Icterohaemorrhagiaeまたはcopenhageni、ほかに血清型が同定できていないが広範囲に見いだされる未同定血清型、および北海道において*L.borgpetersenii*が高頻度見いだされた。この*L.borgpetersenii*は血清型の同定はできていないが、従来日本に存在が予想されてないものであった。与路島では*L.borgpetersenii*血清型Javanicaが高頻度分離され、沖縄のレプトスピラ血清型が類似することが明らかとなった。一方、沖縄においては*L.borgpetersenii*血清型Javanicaが同じく分離されている。このように、今日でもレプトスピラは我々の身近に存在しその感染機会があることが明らかとなった。事実2005年度に沖縄で野生齧歯類等接触し感染した患者2名が報告されている。一方、北海道においてはこれまでレプトスピラ症は重要な感染症としては位置づけられていなかった。しかしながら今回の調査から北海道の野鼠は高頻度にレプトスピラ保有していることが明らかとなり、ヒトや家畜に対する感染リスクがあることが明らかとなった。このようにして、日本全国の野生齧歯類のレプトスピラ保有状況を明らかにすることができた。これまで日本に存在しているとは予想されなかった血清型が見いだされたことから、今後はこれらの血清型も考慮して患者の血清診断を実施する必要があると思われる。血清型に依存しない診断法の開発が急務であり、本件に関しては分担研究者の小泉により新規診断用抗原Ligの有用性が明らかになっている。この診断抗原を用いた血清診断法を普及させることにより、適正な血清診断の実現が可能となると考えている。

### III 輸入げっ歯類のレプトスピラ保有調査

1. 輸入動物の調査: 世界各国より輸入される野生哺乳動物(30種、519匹)についてレプトスピラの保有状況を腎臓培養と膀胱のPCRにより調べた(表5)。レプトスピラは長期にわたり齧

歯類の腎臓に定着し、尿中に排泄される。このため、膀胱と腎臓はレプトスピラを検出するのに都合の良い臓器である。2003年の検査試料ではアフリカヤマネ(アフリカ原産)の腎臓10匹中5匹より、2005年の試料ではアメリカモモンガ(北アメリカ原産)より10匹中5匹からレプトスピラを分離した。それぞれ*L.kirschneri*と同定されたが、アフリカヤマネ由来株については血清型の同定はできていない。一方、アメリカモモンガ由来株は血清型Grippotyphosaと同定することができた。この血清型は日本本土には存在しないが、沖縄には比較的良好に見られる血清型であるため、幸運にも抗血清を保有しており同定することができた。また2004年の試料ではレプトスピラの分離はできなかったが、鞭毛特異的PCRにより10.2%の動物の膀胱からレプトスピラを検出した。また、このアメリカモモンガを輸入し販売のために飼育していた従業員2名がレプトスピラに感染発病し、その診断と感染源の特定を行った。

2. 患者症例と診断: 静岡市の動物輸入販売に携わる従業員2名(29歳男性、28歳男性)が、発熱、腰痛及び倦怠感、さらには結膜黄疸、充血、乏尿、血尿を呈し静岡済生会総合病院を受診した。一例目の患者は2005年4月22日に、二例目は同年6月1日に発病した。臨床経過並びに動物との接触があったことから、レプトスピラ症を疑いストレプトマイシン2g/日筋注による治療を行った。それぞれ約1週間の治療で回復し、退院となった。1例目患者では、患者感染初期血清について*flaB*を標的としたPCRでレプトスピラ抗原陽性、さらにはアメリカモモンガ由来レプトスピラ分離株を抗原とするMATでは、受診時の血清抗体は陰性であったが、回復期血清は800倍の抗体価を示した。2例目患者では全血培養よりレプトスピラの分離に成功し、さらには全血PCRにより*flaB*の増幅を確認した。血清学的検査でも回復期血清は200倍希釈でアメリカモモンガ由来株に対して陽性反応を示した。市販のレプトスピラ症診断キットMCAT、並びにDipsticテストでもいずれも回復期血清では、陽性の診断結果が得られた。

3. 分離株の性状比較・鑑別・同定: 2例目の患者の全血より複数の培養を調製し、分離株を得た。代表的患者分離株3株、並びにアメリカモモンガ由来の5株は*flaB*、*gyrB*配列解析(図3)、およびRFLP解析、各種血清型特異的ウサギ抗血清を用いた交差凝集試験(表6)においても同一

であることを確認した。同じ動物の膀胱凍結試料からも *flaB*-PCR により増幅産物を検出し、その配列は患者臨床材料、並びに患者分離株、アメリカモモンガ腎臓分離株と完全に一致し、アメリカモモンガを介したレプトスピラ感染事例であったことを証明した。分離株は *L. kirschneri* serovar(血清型)Grippotyphosa と同定した。この血清型は米国においては、イヌ、家畜、ヒトのレプトスピラ病起因血清型としてありふれた型である。今回輸入動物を介したヒトへの感染事例を経験すると共に、その感染源の特定に成功した。感染源の特定にまで至る事例はきわめて希で、輸入動物を介した病原体侵入のリスクを評価する目的で調査を実施していたことが、この事例の全容を解明できた主因であると考えている。

#### D. 今後の展開

平成14年度財務省貿易統計によれば年間190万頭以上もの動物が輸入され、齧歯類は75万頭を超えるという。日本は世界最大の動物輸入国でありながら、一方、エキゾチックアニマルの感染症対策におけるリスク評価は十分になされていなかった。各種輸入齧歯類のレプトスピラ保有状況の調査を実施し、その過程でアメリカモモンガを起源とするヒトレプトスピラ感染事例に遭遇した。輸入動物を介した感染症の侵入が危惧されていたが、それが現実のものとなった。厚生労働省では、輸入動物を介した病原体の侵入を水際で抑えるために、2005年9月よりすべての輸入動物に対して衛生証明書の添付を義務づけた。煩雑な輸入手続きが増えたにもかかわらず、昨年同期よりも輸入動物数はむしろ増加しているという(麻布大学 宇根有美先生 私信)。先の米国産牛肉輸入再開後にBSE危険部位を含む牛肉の輸入を摘発できたように、輸入動物に関しても適正に手続きが実施されいるかを監視していく必要があると考える。

#### E 学会発表など

##### ガイダンス

1. 増澤俊幸、藤倉孝夫、柳原保武、小泉信夫、川端寛樹、岡本能弘(レプトスピラ研究班WHOガイダンス翻訳チーム): 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 日本語訳 pp.1-117 (2004)

##### 原著論文

2. 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)
3. Hirano, M., Ding, X., Li, T.-C., Takeda, N., Kawabata, H., Koizumi, 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)
4. 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* 149, 2539-2544 (2003)
5. 青木重成、落合豊子、鈴木啓之、増澤俊幸. 巨大な遊走性紅斑と2次多発性紅斑が同時期に併発した Lyme 病. *皮膚科の臨床* 45, 1537-1539 (2003)
6. 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)
7. Masuzawa, T., Hashimoto, N., Kudaken, 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).
8. 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).

9. 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)
10. 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)
11. Masuzawa, T., Kharitonov, I. G., Kadosaka, T., Hashimoto, N., Kudiken, 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.* 26, 455-464 (2005)
12. Güner, E., Watanabe, M., Kadosaka, T., Polat, E., Gargili, A., Gulanber, 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. *Epidemiol. Infect.* 133, 331-336 (2005)
13. Ishiguro, F., Takada, N., and Masuzawa, T. : Molecular evidence of the dispersal of Lyme disease *Borrelia* from the Asian continent to Japan via migratory birds. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 58, 184-186 (2005)
14. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Naitou, H., Hiroi, M., and Masuzawa, T. : *Anaplasma phagocytophilum*-infected Ticks, Japan. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 1780-1783 (2005)
15. Naitou, H., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., Inayoshi, M., Kawamori, F., Masuzawa, T., Hiroi, M., Kurashige, H., Kawabata, H., Fujita, H., and Ohashi, N. : Molecular identification and characterization of *Ehrlichia* species and *E. candidatus* Neoehrlichia mikurensis from ticks and wild rodents in Shizuoka and Nagano prefecture. *Microbiol. Immunol.* , 50, 45-51 (2006)
16. 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)
17. Masuzawa, T: Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 57, 229-235 (2004)

## 総説

## 著書

18. 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)
19. 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)
20. 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)
21. 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)
22. 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)
23. 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)
24. 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)
25. 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)

26. 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 p.600-604(2005)

#### 学会発表

27. 稲吉恵、内藤博敬、川森文彦、増澤俊幸、大橋典男:富士山麓のマダニ媒介性 *Ehrlichia* sp.について. 第76回日本細菌会総会(福岡)2003年4月1日(抄録 p.248)
28. 増澤俊幸、橋本直弥、今井康之:トルコで発見されたライム病ボレリアの分子生物学的性状. 第76回日本細菌会総会(福岡)2003年4月2日(抄録 p.329)
29. 高田伸弘、石畝史、藤田博己、矢野泰弘、増澤俊幸:東北地方におけるライム病ベクターとボレリアの追調査. 第77回日本感染症学会総会(場所?)2003年4月?日(抄録?ページ)
30. 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(抄録 p.37)
31. 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
32. 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(抄録?)
33. 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(抄録 p.7)
34. 増澤俊幸、金田一秀:病原性レプトスピラの走化性に関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(抄録 p.)
35. 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 2004年3月4日(抄録 p.105)
36. 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)
37. 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)
38. 八木陽子、増澤俊幸、野沢龍嗣:ギリシャ原産マスティックの抗ヘリコバクターピロリ菌作用について 第77回日本細菌会総会(大阪)2004年4月1日(抄録 p. 147)
39. 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)
40. 榎原省司、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)
41. 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)
42. 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)
43. 榊原省司、増沢俊幸、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)
  44. 川端寛樹、榊原省司、今井康之、増澤俊幸、藤田博己、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)
  45. 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)
  46. Ohashi, N., Inayoshi, M., Kawamori, F., Naitou, 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)
  47. 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
  48. 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)
  49. 増澤俊幸: 新規ワクチン抗原の探索を目的としたライム病ボレリア発現プロテオーム解析と Oms28 発現に及ぼす温度の影響 2004USフォーラム 2005年3月2日(抄録 p.31)
  50. 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、増沢俊幸、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29日(抄録 p.186)
  51. 増澤俊幸、野田ヶ谷汐里、久留戸涼子、樋坂光明、野沢龍嗣、今井康之: イヌ尿中からのレプトスピラ迅速検出法の開発 (東京)第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号2)
  52. 山下昭広、村松芳貴、川森文彦、角坂照貴、榊原省司、増澤俊幸: 静岡県内における犬のレプトスピラの保有状況について (東京)第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号3)
  53. 神村卓也、渡邊むつみ、今井康之、内藤博敬、大橋典男、増澤俊幸: ライム病ボレリアのポーリンタンパク質 Oms28 の発現変動解析 (東京)第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号8)
  54. 北邑かよ子、Zorana Orescanin、大橋典男、今井康之、Marija Milutinovic、増澤俊幸: セルビアモンテネグロと日本由来マダニからの p44 遺伝子をターゲットとした *Anaplasma phagocytophilum* の検出及びその性状解析 (東京)第42回レプトスピラシンポジウム 2005年4月3日(抄録番号9)
  55. 大橋典男、西村祐作、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4日(抄録 p.63)
  56. 内藤博敬、川口大蔵、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4日(抄録 p.64)
  57. 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5日(抄録

58. **Ece Sen, Masuzawa, T., and Kadosaka, T.** :*Borrelia burgdorferi* found in Turkey and Moscow, Russia on the border of Europe and Asia. Federation of European Microbiology Society (FEMS) Symposium, Tick-borne emerging and re-emerging pathogens and their infections. Diseases (Istanbul, Turkey) June 4, 2005 (Abstract pp.18-19)
59. **増澤俊幸、渡邊むつみ、神村卓也、今井康之、内藤博敬、大橋典男**:ライム病ボレリア発現プロテオーム解析と外膜タンパク質 Oms28 発現に及ぼす温度の影響 第17回微生物シンポジウム(東京)2005年9月3日(抄録 pp.90-91)
60. **Masuzawa, T., Okamoto, Y., and Ohashi, N.**: Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in east Asia and neighboring country and region. Xth International Conference on Lyme borreliosis and Tick-borne Diseases (Vienna Austria) Sep. 11-15, 2005 (Abstract p.3)
61. **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 第88回細菌学会関東支部総会(浜松)2005年10月21日(抄録 p.39)
62. **北邑かよ子、Zorana Orescanin、大橋典男、今井康之、Marija Milutinovic、増澤俊幸**:セルビアモンテネグロ由来マダニからの *Anaplasma phagocytophilum* と *Borrelia burgdorferi* s.l.の検出及びその性状解析 第88回細菌学会関東支部総会(浜松)2005年10月
63. **Masuzawa, T., Sakakibara, S., Kawabata, H., and Imai, Y.** Classification of *Leptospira* reference strains based on DNA gyrase B subunit gene sequences. 4th Scientific Meeting of the International Leptospirosis Society (Chiang Mai, Thailand) November 14-16 2005, (Abstract p.224)
64. **宇根有美、増澤俊幸、太田周司、吉川泰弘**:輸入愛玩用野生齧歯類のレプトスピラ保有状況と保菌動物の病理像 第5回人と動物の共通感染症研究会学術集会(東京)2005年11月5日(抄録 p.19)
65. **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(東京)2005年11月5日(抄録 p.20)

#### 病原微生物検出情報

66. **大輪達仁、長坂好洋、三木 朗**:輸入動物(アメリカモモンガ)に由来するレプトスピラ症感染事例ー静岡市(概要)病原微生物検出情報 26, pp. 209-211 2005



厚生労働科学研究費補助金(新興再興感染症研究事業)  
分担研究総合報告書(平成 15-17 年度)

国内における動物由来スピロヘータ感染症に関する研究

分担研究者 川端寛樹 (国立感染症研究所 細菌第一部 室長)

研究協力者

増沢俊幸	千葉科学大学(主任研究者)	高田伸弘	福井大学医学部
藤田博己	大原研究所(分担研究者)	矢野泰弘	福井大学医学部
角坂照貴	愛知医科大学(分担研究者)	丸山総一	日本大学生物資源科学部
後藤郁夫	神戸検疫所(分担研究者)	高野 愛	日本大学生物資源科学部
小泉信夫	国立感染症研究所(分担研究者)	佐藤雪太	日本大学生物資源科学部
高橋英之	国立感染症研究所(分担研究者)	斎藤あつ子	神戸大学医学部
伊東拓也	北海道衛生研究所	古田 康	北海道大学医学部
木村浩一	北海道衛生研究所	齋藤 幹	東京大学医学部
溝口二郎	山形県衛生研究所	馬原文彦	馬原医院
田原研司	島根県保健環境科学研究所	宮本健司	元旭川医科大学
保科 健	島根県保健環境科学研究所	鶴見みや古	山階鳥類研究所
板垣朝夫	元島根県保健環境科学研究所	佐藤文男	山階鳥類研究所
本田俊郎	出水保健所	高橋 守	川越高校
御供田睦代	鹿児島県環境保健センター	安藤秀二	国立感染症研究所
蔵元 強	鹿児島県環境保健センター	岸本寿男	国立感染症研究所
新田芳樹	沖縄県家畜衛生試験場	阿部賢治	国立感染症研究所

ボレリア感染症に関して、東アジアに広く分布する *Borrelia valaisiana* 近縁種(新種)の感染例が輸入例として見出した。本ボレリアは国内南西諸島に分布域が及んでいることから、今後これら地域において本ボレリア感染症が見出される可能性が危惧される。一方回帰熱群ボレリアに関して、国内に生息する回帰熱群ボレリアマダニの保菌調査を行ったが、現時点で回帰熱群ボレリアの国内浸潤を疑わせる証拠は見出されなかった。

レプトスピラ感染症について、沖縄地方での流行種である血清型 Javanica が鹿児島県奄美地方においても見出された。一方で、トカラ列島、屋久島、及び種子島では本血清型は見出されておらず、現時点での本血清型浸潤は奄美地方である可能性が示唆された。一方で本血清型は北海道でも見出されており、何らかの要因により、北海道へ持ち込まれた可能性が示唆された。レプトスピラ感染症は病原体汚染環境との接触を低減させることが最も重要であること、また感染した場合には早期診断による早期治療が最も重要である。本調査により、環境中のレプトスピラ汚染はほぼ全国的に見出されていることから、教育啓蒙活動による接触の低減を計るとともに、本調査で見出された血清型(新規血清型を含む)情報をもとに、早期診断のシステムを構築することが早急に求められる。

### ボレリアに関する研究

#### 海外での *Borrelia valaisiana* 近縁種感染によるライム病輸入例

ライム病は鼠や小鳥などを保菌動物としマダニにより媒介されるスピロヘータ(ボレリア)による感染症である。これ

までは欧州や北米を中心に発生が報告されているが、最近ではわが国でも報告が多い。今回海外旅行中にライム病に感染し、患者の全血中からボレリア病原体を検出した症例を経験したので報告する。我々の知る限り、血液中からライム病病原体が検出されたのは日本で初めてである。

患者は74歳男性。もともと気管支喘息と洞機能不全症候群に対するペースメーカー植込み後にて東大医学部付属病院外来通院をされていた。蝶の採集のため2005年5月27日から6月7日までカンボジアに旅行に行き、さらにその後6月10日から6月13日まで同様の目的にてハバロフスクに出かけた。ハバロフスクから帰国後の6月17日頃より咳・38度台の発熱・咳・全身倦怠感・食欲不振が続いたため当院救急外来を受診。感冒の診断でclarithromycinを処方され帰宅となった。しかし、その後も発熱・咳が続き新たに全身の関節痛と下痢が出現したため6月24日外来受診し精査加療目的で入院となった。

入院時の身体所見では37°C台の発熱と咽頭痛と咳嗽を認めた。両側上下肢の関節痛を訴えるが明らかな発赤や腫脹はなく、皮疹などの皮膚症状も確認できなかった。採血データではWBC 5500/ $\mu$ l、CRP 4.48mg/dlと炎症反応は認めるも白血球数の増加は認めなかった。下痢以外の感染のフォーカスは明らかではなく、輸液にて保存的に経過観察とした。その後も37度台の発熱と咳が続き、全身の関節痛が続いたため気道感染を考え6月27日よりcefotiamを開始したが症状の改善は認められなかった。その後注意深く診察を行ったところ、右耳介に径10mmの黒色の腫瘤を確認した(Fig.1)。本人の話ではハバロフスクから帰国した後の6月15日頃に気づき、気づいてから大きさは不変とのことであった。当院皮膚科の診察により、黒い腫瘤はマダニの虫体でマダニ刺咬症と考えられた。遊走性紅斑などの皮膚症状や神経症状は認められなかったが、全身の関節痛や発熱などインフルエンザ様症状から臨床的にライム病と診断した。このため6月29日から抗生剤をcefotiamからminocyclineに変更したところ、開始後速やかに解熱し下痢や関節痛などの症状は消失した。マダニの虫体は自然落下し口器は残っていたものの皮膚には明らかな結節などはなく、口器のみ抜去した。7月11日にはCRPも陰転化したため7月12日に退院とした。

国立感染症研究所にて病原体診断したところ、患者の全血と虫体からボレリアDNAが検出され、そのDNAは完全に一致した。さらにその相同性から*Borrelia valaisiana*近縁種と診断された(表1)。また*B.burgdorferi*、*B.garinii*、*B.afzelii*を用いた血清診断では*B.garinii*に対し抗体反応が陽性であった(Fig.3)。刺咬マダニ種はマダニミトコンドリア*rrs*遺伝子の塩基配列から*Ixodes persulcatus*(シュルツェマダニ)と推定された(表2)。また大原総合病院における抗体調査により、野兎病、ブルセラ症、日本紅斑熱、チフス熱、およびQ熱は否定的であった(data not shown)。

マダニに刺咬された記憶は本人にはないが、ハバロフスクでの蝶の採集の際に現地の人からダニがいると注意されていること、蝶の採取を終えて宿へ戻った際に友人のタオルにダニがついていることを見ていることから、ハバロフスクでのマダニに刺咬されたと思われた。実際シュルツェマダニはハバロフスクでは見出されるがカンボジアでは未記載のマダニで、国内のみならずロシアでのライム病ボレリア媒介種となっている。一方で*B.valaisiana*近縁種は韓国、中国、タイなどの東南アジアおよび本邦南西諸島で見出されているが、ハバロフスクで見出されたことはない。またこれまでシュルツェマダニから*B.valaisiana*近縁種が見出されたことはないことから、シュルツェマダニの*B.valaisiana*近縁種の媒介能については不明である。

これらのことから、カンボジアで*B.valaisiana*近縁種に感染後ハバロフスクでさらにシュルツェマダニに刺咬された可能性と、ハバロフスクでのシュルツェマダニ刺咬により*B.valaisiana*近縁種に感染、ライム病を発症した可能性が考えられた。いずれの可能性も現時点では否定できないが、*B.valaisiana*近縁種による感染症例は世界で初めてであり今後*B.valaisiana*近縁種に対しても注意が必要であることが示された。

これまで*B.garinii*感染が見出されているハバロフスクなどシュルツェマダニの生息地域でのマダニ刺咬には注意が必要であるとともに、*B.valaisiana*近縁種の存在が確認もしくは推定されている、東南アジア、韓国や本邦南西諸島などでも、ライム病媒介マダニの刺咬を受けないように注意する必要がある。

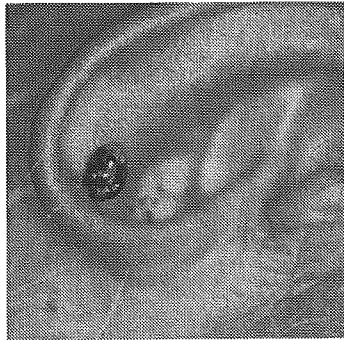


Fig.1  
*Borrelia valaisiana* 近縁種感染が疑われたライム病症例.患者耳介に吸着マダニが見える.マダニ種はマダニミトコンドリア *rrs* 遺伝子の塩基配列により *Ixodes persulcatus* と遺伝子同定された.

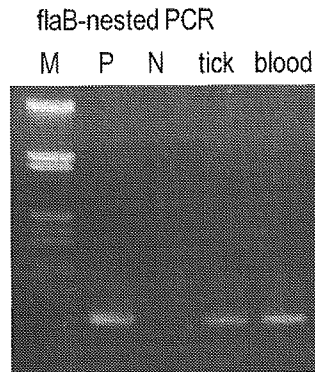


Fig.2.  
 flaB-nested PCRによる患者血液および刺咬マダニからの *Borrelia* DNA の検出.1st-PCR では BflaPAD(5'-GAT CAR GCW CAA YAT AAC CAW ATG CA-3') および BflaPDU(5'-AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC-3')により PCR を行った.2nd-PCR(nested)では BflaPBU(5'-GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC-3') および BflaPCR(5'-TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA-3')を使用し PCR を行った.増幅産物は 0.8% Agarose gel にて電気泳動後 EtBr 染色によりバンドを検出した.

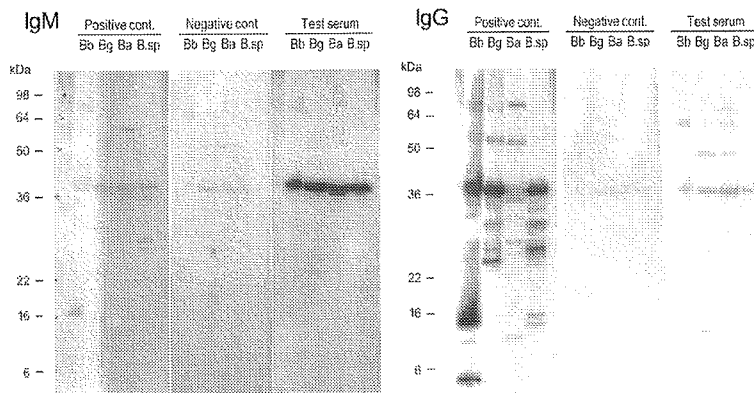


Fig.3.Western blotting による血清診断結果.  
 Bb:*B.burgdorferi* B31 株 ,  
 Bg:*B.garinii* HP1 株, Ba:*B.afzelii* P/Gau 株, B.sp.:*B. valaisiana* 近縁種 OkinawaCw60 株.

表 1.患者全血およびマダニから検出された *Borrelia* DNA 塩基配列と相同性が高い DNA 配列の一覧.検出された *flaB* 遺伝子塩基配列の比較による.

Strain (accession no.)	Country	<i>Borrelia</i> sp.	Identities
Identities >97%			
CKA1 (AB022132)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	344/349 (98.6%)
OM58 (AB091705)	Okinawa, Japan	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	331/336 (98.5%)
CMN1b (AB022134)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	343/349 (98.3%)
QLM4P1 (DQ188928)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	341/349 (97.7%)
QLT1P2 (DQ188927)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	341/349 (97.7%)
CKA3a(AB022135)	China	<i>Borrelia valaisiana</i> 近縁種	340/349 (97.4%)
Identities <95%			
VS116 (DQ111037)	Switzerland	<i>Borrelia valaisiana</i>	279/293 (94.9%)
I-77(AF497995)	Czech Republic	<i>B.spielmani</i>	327/349 (93.7%)
ACA1(AB035613)	Sweden	<i>B.afzelii</i>	325/348 (93.4%)
Ip90 (X75203)	Sweden	<i>B.garinii</i>	325/349 (93.1%)
B31 (AB035617)	US	<i>B.burgdorferi</i>	323/348 (92.8%)
NT112(D82853)	Japan	<i>B.japonica</i>	326/349 (93.4%)

表 2. マダニミトコンドリア 16SrRNA 遺伝子塩基配列による患者刺咬マダニ種の推定

Tick species	Accession No.	Identities
<i>Ixodes persulcatus</i>	AB073725	234/236 (99.2%)
<i>I. persulcatus</i>	AF549856	216/216 (100%)
<i>I. muris</i>	U95896	219/235 (93.2%)
<i>I. ricinus</i>	L34292	218/235 (92.8%)
<i>I. nipponensis</i>	AB006024	217/235 (92.3%)
<i>I. gibbosus</i>	AF549846	202/216 (93.5%)
<i>I. pavlovskyi</i>	AF549835	202/216 (93.5%)
<i>I. scapularis</i>	L43866	218/235 (92.8%)
<i>I. loricatus</i>	U95892	220/237 (92.8%)

#### 南西諸島における *Borrelia valaisiana*-related の浸潤

希少感染症における、病原体診断のためのリファレンス整備、簡易診断法開発を目的として、1) 環境中の病原体調査を行った。調査は沖縄県、および鹿児島県にて行った。分担研究者以外に、沖縄県家畜衛生試験場、鹿児島県環境保健センター、鹿児島県出水保健所および徳之島保健所の協力を得て、調査研究は行われた。

[方法] 沖縄県、および鹿児島県にて野鼠捕獲を行い、耳介、および膀胱を *Borrelia* 培養に供した。沖縄調査 (H17.1.11-1.15 および H17.10.10-10.15)、徳之島調査 (H17.11.23-11.28) で捕獲した野鼠類の一覧を表 3 に示した。

表 3. 徳之島、沖縄本島、および石垣島における捕獲野鼠種一覧

野鼠種	徳之島 (H17.11.23-11.28)	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)	石垣島 (H17.10.10-10.15)	沖縄本島 (H17.1.11-1.15)
クマネズミ	13	1	1	6
ワタセジネズミ	2	1	-	9
ジャコウネズミ	3	3	-	21
ドブネズミ	-	1	3	19
オキナワハツカネズミ	-	2	-	8
計	18	8	4	63
<i>Borrelia</i> 陽性個体数(陽性率)	3 (16.7%)	6 (75.9%)	0 (0%)	7 (11.1%)

分離株の型別は 5S-23S rDNA intergenic spacer (RIS) 領域の塩基配列決定に基づいた、DraI もしくは MseI 切断断片の DNA 多型性により行った (Masuzawa et al. 2004)。即ち、分離株より常法に従って genomic DNA を抽出、精製後 Masuzawa らの方法に従って RIS 領域の直接 sequencing を行い、DraI もしくは MseI 切断断片の DNA 多型性を調べ、既報の Reference sequence と比較した。

また、徳之島で分離された 3 株については、これまで徳之島での *Borrelia* 分離記録がなかったことから、新規に 16SrRNA 遺伝子および flaB 遺伝子の直接塩基配列決定を行い、*Borrelia* 種同定を行った。

[結果と考察] 各野鼠臓器より分離された *Borrelia* 株の一覧を表 4 に示した。

表 4. *Borrelia* isolates in this study.

Borrelia 株名	分離保菌動物	調査地及び調査日
1 Tokunoshima-RR12B05	クマネズミ膀胱由来	徳之島 (H17.11.23-11.28)
2 Tokunoshima-CW14B05	ワタセジネズミ膀胱由来	徳之島 (H17.11.23-11.28)
3 Tokunoshima-RR16E05	クマネズミ耳介由来	徳之島 (H17.11.23-11.28)
4 Okinawa-SM1E05	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
5 Okinawa-SM3E05	ジャコウネズミ耳介由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
6 Okinawa-CW4B05	ワタセジネズミ膀胱由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
7 Okinawa-MC5B05	オキナワハツカネズミ膀胱由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
8 Okinawa-RN6E05	クマネズミ耳介由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
9 Okinawa-MC8B05	オキナワハツカネズミ耳介由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)
10 Okinawa-MC8E05	同上膀胱由来	沖縄本島 (H17.10.10-10.15)