

M Marker
 1 Azumaya
 2 Chiba
 3 Ebina
 4 Kato
 5 Kikuchi
 6 Kokuchi
 7 Mitsuo
 8 Miura
 9 Naomatsu
 10 Nikaido
 11 Ootake
 12 Sami
 13 Suzushichi

14 Yama
 15 Yati 96
 16 Yato 107
 17 N9
 18 N1915
 19 N503
 20 Tungliao
 21 LVS
 22 RV
 23 38
 24 Schu
 25 *F. novicida*
 26 *F. philomiragia*
 27 DW
 M Marker

図2. PPI-RNA helicase領域のPCRによる亜種の鑑別

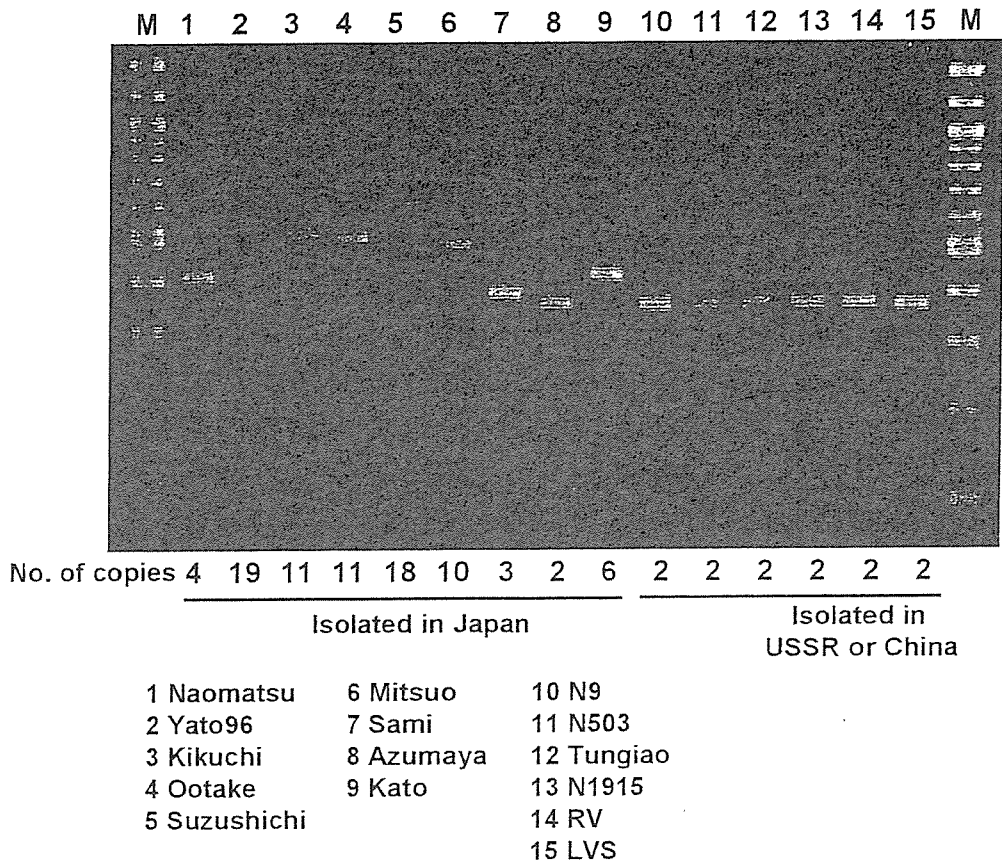


図3. SSTR16領域における繰返し配列の解析

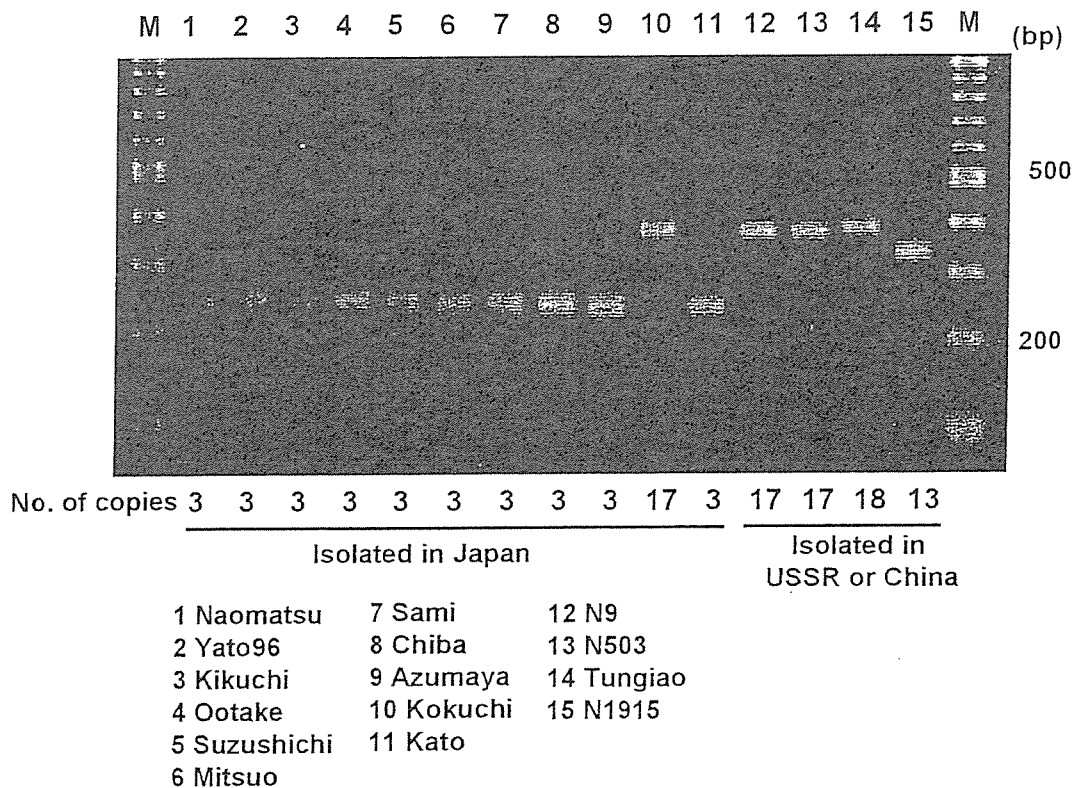


図4. SSTR9領域における繰返し配列の解析

屋外および屋内ラットにおける鼠咬症原因菌の保有状況調査

分担研究者	今岡 浩一	国立感染症研究所	獣医科学部	主任研究官
協力研究者	鈴木 道雄	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員
協力研究者	木村 昌伸	国立感染症研究所	獣医科学部	第1室研究員
協力研究者	谷川 力	イカリ消毒株式会社	技術研究所	所長
協力研究者	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：今回、日本における屋外および屋内の野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）における *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った。その結果、高率に保菌していることが明らかとなり、患者の報告は定かではないが、今後、感染・発症例が出て不思議ではないことが示された。MMWR に報告されたように発症後、死亡までの経過が非常に短い例もあるので、その診断・同定法の開発が必要である。今回、培養液から 16S rRNA を標的として PCR で検出する方法の開発を行ったが、近縁の細菌に対しても増幅が起こるという不十分な点もあるが、これら非特異的なバンドは明らかにサイズが異なっているので、ある程度、有効な検出法であると考えられた。

A. 研究目的

鼠咬症は、ラットに咬まれることによりヒトに感染し、その原因菌としては、*Streptobacillus moniliformis*（グラム陰性、多形性桿菌、好気性・通性嫌気性）（参考-図）と *Spirillum minus*（グラム陰性、螺旋状）がある。*S. minus* 感染は、主にアジアで見られ、日本では「Sodoku」と呼ばれ古くから知られているが、人工培地での培養が不可能でその検出・同定が困難なため、今回の検討からは除外した。一方、*S. moniliformis* 感染は、アメリカ大陸ほか、世界中で認められている。*S. moniliformis* はラットの口腔内正常細菌叢の1つであり、他の齧歯類にも認められる。ただし、マウスでは致死感染を起こすことが多い。

ヒトへの感染経路は、感染ラットによる咬傷、接触、その排泄物に汚染したものによる糞口感染である。潜伏期間は2～10日で、その症状は、発熱、寒気、筋肉痛、関節痛、四肢の斑状丘疹状発疹、敗血症性関節炎などがある。治療をしないときなどの致死率は10%とされている。その診断は、血液・関節液の培養によりおこなうが、栄養要求が厳しい細菌であり、培養は困難である。感染時の処置として、ペニシリン、アンピシリン、テトラサイクリンなどの投与が効果をもたらす。

患者の報告としては、1831年に最初の発生記録が認められ、1916～41年の間に125例の記録がある。アウトブレイクとしては、1926年に米国・マサチューセッツのHaverhillで、未殺菌ミルクやアイスクリームによる86名の患者発

生があり、また 1983 年には、英国・エセックスの寄宿舎で、飲み水の汚染と、ラットによる咬傷から 304 名の患者発生があった。その他、1986 年には米国・ニューメキシコで、飲み水から 2 名の発生報告がある。これらの大規模な患者発生は、感染ラット排泄物に汚染したものの糞口感染が主である。一方、直接ラットに咬まれる事による感染では、先のエセックスで 7 名の報告があるが、死亡にまでつながった例として 2002 年にワシントン州でラットを飼育していたもの 1 例、2003 年にフロリダ州でペットショップに勤務していてラットに咬まれて発症・死亡したもの 1 例の報告がある(参考資料)。どちらも発症から死に至るまでが 24 時間以内と非常に早い経過をたどっている。死亡には至っていないが、ラットに咬まれることにより四肢に発疹の認められたものや、特に関節炎を発症し、その原因として *S. moniliformis* が同定される例が報告されている。いずれにしても、感染・発症しても *S. moniliformis* の検出・同定が難しいことから、実際の患者数は不明で報告数よりもかなり多いのではないかと考えられている。

今回、国内における鼠咬症の危険性を確認する目的から、*S. moniliformis* 検出法の確立および屋外および屋内のラットにおける保有状況の調査を行った。

B. 研究方法

サンプル(口腔内スワブ): ラットより口腔・咽喉頭スワブを、BD BBL カルチャースワブ・プラス(#212553)を用いて採取した。屋外捕獲ラットは、豊島区千早町(4匹)、静岡県沼津市(1匹)、横浜市中区石川町(10匹)、横浜市中区黄金町(11匹)の計26匹で、いずれもドブネズミ(*Rattus norvegicus*)であった。屋内捕獲ラットは、新宿区M商業ビル(15匹)、新宿区S商店街(1匹)、小笠原(1匹)の計17匹で、いずれもクマネズミ(*Rattus rattus*)で

あった。

サンプル処理: スワブを 1 ml の *S. moniliformis* 用ウマ血清添加液体培地(ATCC medium 488 broth)に希釈し、このうち10ulをウマ血清添加寒天培地(ATCC medium 488 agar)で、37°C、5% CO₂存在下および微好気下で培養し、残りは488 broth 8mlを用いて37°C、5% CO₂存在下で培養した。

陽性対照菌株: 陽性対照菌株として、ATCCより *S. moniliformis* ATCC14647、ATCC49567、ATCC49940株を入手し用いた。

DNA の検出: 一晚培養後の 488 broth 1ml の遠心沈査、ならびに適宜培養後の 488 agar 上のコロニーを少量(50-100ul)のTEに溶解し熱変成後、16S rRNA 特異的プライマーを用いて、PCRを行った。プライマーのうちSおよびAS(Table 1)は、Bootら(Lab. Anim., 36;200-8, 2002)の報告により作製したが、このシーケンスは、*Leptotrichia amnioni* との相同性が高いため、*Leptotrichia* のシーケンスと塩基の異なる部分を中心にして、S3 および S4 (Table 1) を新たに作製した。PCR 産物はアガロースゲル電気泳動し、目的サイズのバンドをゲルより切り出し、DNA を抽出した後、ABI3100 を用いてプロトコールに従い遺伝子解析を実施しシーケンスの確認を行った。

C. 研究結果

1) PCR 用プライマーの特異性: S、S3、S4 と AS を組み合わせて、その反応の特異性を検討した。その結果、いずれのプライマーの組み合わせでも、*S. moniliformis* 以外の細菌では非特異的増幅反応は認められなかった(Fig. 1)。次に、*Streptobacillus* と近縁な *Fusobacterium* および *Leptotrichia* を区別できるかどうか検討した。サンプルは、*S. moniliformis*

ATCC14647、横浜市中区石川町で捕獲されたドブネズミ由来の#22、23、24で、それぞれのS-ASのPCR産物のシーケンスにより#22は不明、#23は*S. moniliformis*、#24は*Fusobacterium*と判断されたものである。DG-5、8、17は、マウス由来のサンプルであるが、S-ASのPCR産物のシーケンスにより*Leptotrichia*と確認されたものである。Fig. 2に示したように、S-ASは*S. moniliformis*以外の細菌でも特異的産物とほぼ等しい位置にバンドが確認され、区別ができなかった。S4-ASでは*S. moniliformis*と*Leptotrichia*が区別できなかった。S3-ASでは、明らかにサイズの異なる非特異的バンドが認められるが、*S. moniliformis*とそれ以外が区別可能であった。

以上のことより、*S. moniliformis*の判定にはSプライマーだけでは不十分で、SプライマーとS3プライマーを併用して用いることが有効であることが示された。

2) ラットサンプルにおける16S rRNAの検出：ラット咽喉頭スワブを488 brothで一晩培養したサンプルのPCRの結果をFig. 3に示した。屋外ラットでは、S-ASプライマーでは、検討したラットすべてで、陽性と思われる位置にバンドが検出された。屋内ラットでは、検討した17匹中9匹で陽性バンドが検出された。データは示さないが、S3-ASを用いた検討では、屋外ラットでは24匹で、屋内ラットでは9匹で陽性バンドが認められた。

3) 陽性サンプルの部分シーケンス：先に述べたように、*Fusobacterium*や*Leptotrichia*のように*Streptobacillus*と近縁な細菌の非特異的検出の可能性があるので、16S rRNAの部分シーケンスを行った。その結果、屋外ラットでは24/26、屋内ラットでは9/17が*S. moniliformis*であると確認された(Fig. 3)。また、屋外で捕獲されたドブネズミ(*Rattus norvegicus*)のシーケンスは、ATCC14647株

(Genbank accession: Z35305)と一致したのに対して、屋内で捕獲されたクマネズミ(*Rattus rattus*)のシーケンスは、AHL370-1株(同: Z35304)と近縁であり、ラットの系統による保有菌株の差が認められた(Fig. 4)。

D. 考察

現在、日本における*S. moniliformis*感染は明らかでないが、やはり日本においても野生ラットは高率に*S. moniliformis*を保菌していた。現在の日本では、ペットの多様化、地震・洪水等の災害後に齧歯類との接触機会の増加が考えられるなど、一般の人が感染する機会が全くないとはいえない。また、実験動物であるラットについても過去に保菌していることが報告されているので、実験動物用ラット取扱者はハイリスクであると考えられる。ただ、*S. moniliformis*は齧歯類の口腔内正常細菌叢の1つで高頻度に常在し、不顕性感染しているため、ラットの処置を行うことは実際的ではない。したがって、感染予防は、ラットに暴露する機会が多いヒトにおける、感染リスクの減少に重点を置くべきである。しかしながらMMWRに報告された例では、発症から死亡までが非常に短く、また、*S. moniliformis*の分離・同定が困難なことから、その迅速診断法の開発は必要であると考えられる。今年度、*S. moniliformis*のPCRによる検出を実施したが、過去に報告されているSプライマーだけでは非特異的反応があり不十分で、Sプライマーと今回新たに作製したS3プライマーを併用して用いることが有効であることが示された。今後さらにその精度を検討しておく必要があると考えられる。また、ドブネズミとクマネズミでは保菌している*S. moniliformis*株が異なっていたが、それぞれの株の病原性の違い、保菌株が異なっている理由など、詳細の検討については今後の課題である。

E. 結論

今回、日本における屋外および屋内の野生ラット（ドブネズミおよびクマネズミ）における *S. moniliformis* の保菌状況の調査を行った。その結果、高率に保菌していることが明らかとなり、患者の報告は定かではないが、今後、感染・発症例が出て不思議ではないことが示された。MMWR に報告されたように発症後、死亡までの経過が非常に短い例もあるので、その診断・同定法の開発が必要であると考えられた。今回、培養液から PCR で検出する方法の開発を行ったが、近縁の細菌に対しても増幅が起こるという不十分な点もあるが、これら非特異的なバンドは明らかにサイズが異なっているので、ある程度、有効な検出法であると考えられた。また、ドブネズミとクマネズミでは保菌している *S. moniliformis* 株が異なっていたが、それぞれの株の病原性の違い、保菌株が異なっている理由については不明である。

F. 健康危害情報

G. 研究発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

Table 1) *S. moniliformis* 16S rRNA 特異的PCR用Primers

Primer name	Primer sequence	GenBank #35305
S (Sense)	5'- gcttaacacatgcaaattctat	39-49
S3 (Sense)	5'- gaaaggagagattgctaag	202-220
S4 (Sense)	5'- aggagagattgctaagag	205-222
AS (AntiSense)	5'- tgagatacggcccttact	334-317

Fig 1) PCR用Primersの特異性(1)

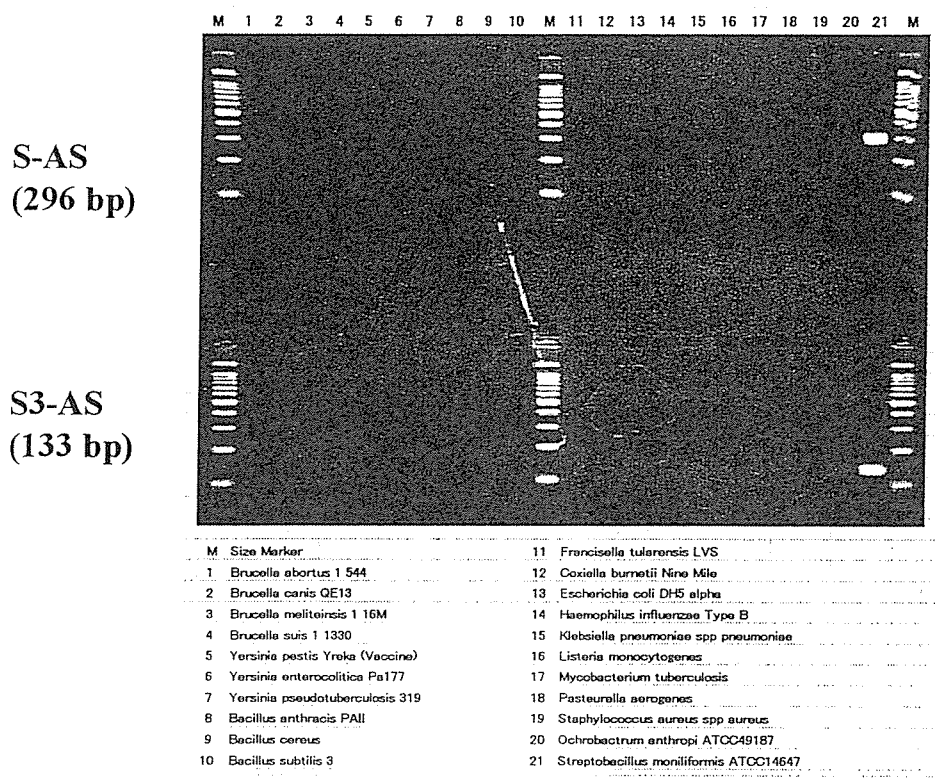


Fig 2) PCR用 Primers の特異性 (2)

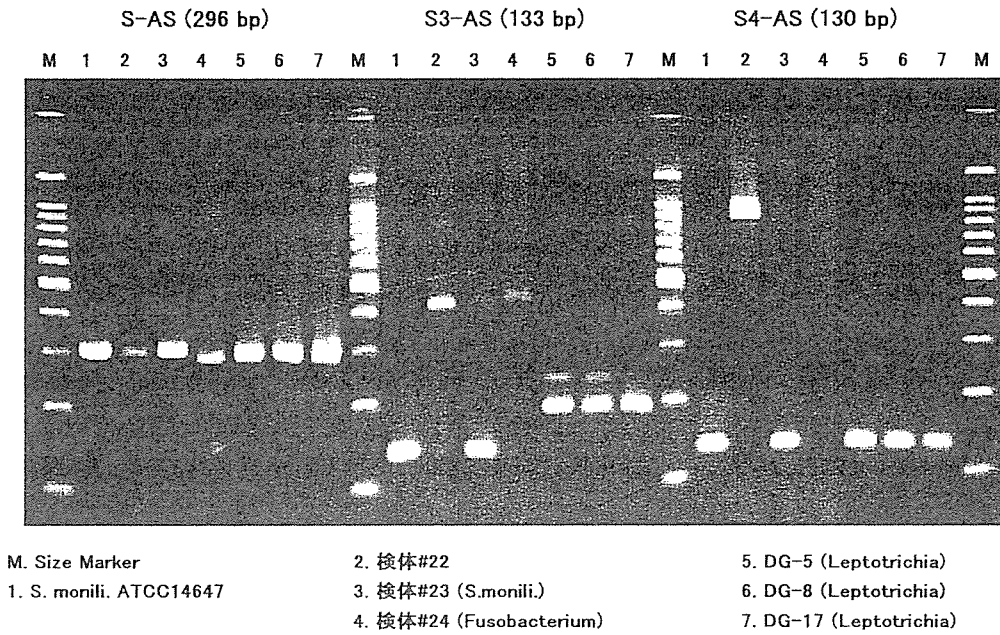
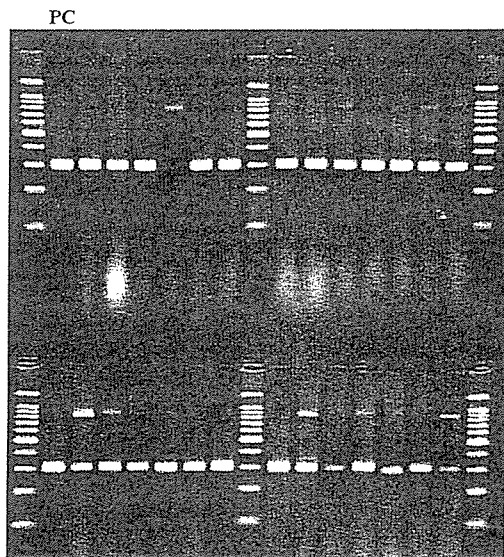
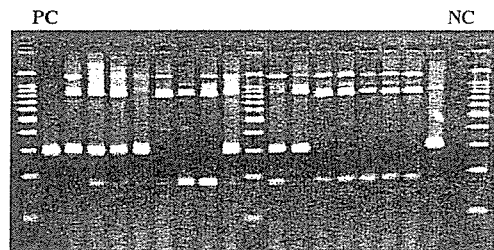


Fig 3) 16S rRNA の検出 (S-AS)

A) 屋外ラット (24/26) *



B) 屋内ラット (9/17) *



PC: *S.monili.* ATCC14647

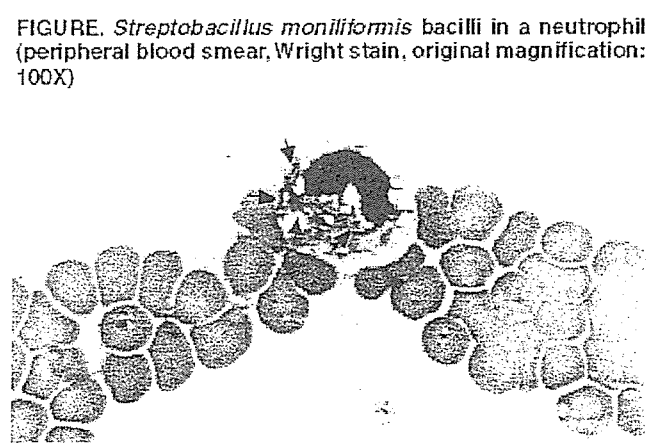
NC: Sample (-)

*: シーケンス確認後の陽性率

Fig 4) 16S rRNA の部分シーケンス (location: 38-297)

14647	1	10	20	30	40	50	14647	1	10	20	30	40	50
01.Seq	GC	TTAACACATG	1(Kuma).Seq	GC	TTAACACATG
05.Seq	TGC	TTAACACATG	2(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
09.Seq	TGC	TTAACACATG	4(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
15.Seq	TGC	TTAACACATG	6(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
AHL370-1	TGC	TTAACACATG	8(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
	TGC	TTAACACATG	9(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
	TGC	TTAACACATG	10(Kuma).Seq	TGC	TTAACACATG
	TGC	TTAACACATG	AHL370-1	GC	TTAACACATG
14647	51	50	70	80	90	100	14647	51	50	70	80	90	100
01.Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	1(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
05.Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	2(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
09.Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	4(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
15.Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	6(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
AHL370-1		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	8(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	9(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	10(Kuma).Seq		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC	AHL370-1		CAAACTCATG	TATGAAATGT	AACTTGCCTT	ACATAGACTA	CATGGTGGAC
14647	101	110	120	130	140	150	14647	101	110	120	130	140	150
01.Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	1(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
05.Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	2(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
09.Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	4(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
15.Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	6(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
AHL370-1		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	8(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	9(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	10(Kuma).Seq		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG	AHL370-1		TGGTGGATTA	CGGTAAARA	ACTTACCTCT	TAGACTGGGA	TACCCATTAG
14647	151	160	170	180	190	200	14647	151	160	170	180	190	200
01.Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	1(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
05.Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	2(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
09.Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	4(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
15.Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	6(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
AHL370-1		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	8(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	9(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	10(Kuma).Seq		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA	AHL370-1		GAAATGATGG	ATATACTAG	ATATTATTAG	TAGTAGGCAT	CTACTATTAA
14647	201	210	220	230	240	250	14647	201	210	220	230	240	250
01.Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	1(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
05.Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	2(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
09.Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	4(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
15.Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	6(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
AHL370-1		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	8(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	9(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	10(Kuma).Seq		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG	AHL370-1		TGAAAGGAGA	GATTGCTAAG	AGAGAGCTTT	GCATCCTATT	AGCTAGTGG
14647	251	260	270	280	290	300	14647	251	260	270	280	290	300
01.Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	1(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
05.Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	2(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
09.Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	4(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
15.Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	6(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
AHL370-1		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	8(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	9(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	10(Kuma).Seq		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...
		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...	AHL370-1		TGGGTTAAG	GCCTACCAAG	CCATGATAG	GTACCAGGCC	CGAAGG...

参考-図) 好中球内の *S. moniliformis* の菌体 (末梢血の塗抹、100倍)
(MMWR: 53 (51&52); 1198-1202, Jan. 2005 より)



Photo/CDC

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

リケッチア・クラミジアに関する研究

分担研究者	倉根一郎	国立感染症研究所	ウイルス第一部	部長
協力研究者	岸本壽男	国立感染症研究所	ウイルス第一部	第五室 室長
	安藤秀二	同		主任研究官
	小川基彦	同		主任研究官
	荒川香南子	同		流動研究員
	柳 陳堅	同		流動研究員
	佐藤 梢	同		協力研究員
	川端寛樹	国立感染症研究所	細菌第一部	第四室 室長
	藤田博巳	大原総合病院附属大原研究所		主任研究員
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座		教授

研究要旨:動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象に、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況の把握を行うことを目的として、それらの特異的な診断法の開発を試みた。まず今回は動物およびダニ由来リケッチア感染症の病原体の遺伝子データベースから、マダニ媒介性のリケッチア病原体の検出に限定した TaqMan Real-Time PCR による検出系のプライマーおよびプローブを設計した。感度、特異性の検討を行った結果、実用可能と判断したので、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定を試みた。調査を実施した動物寄生ダニ 230 検体からは 29 件が SFG リケッチア陽性となった。また *Ehrlichia chaffeensis*、*E. canis* を標的とした系では 3 件が陽性、1 件が疑陽性となった。次に動物由来クラミジア感染症の病原体検出法についても、TaqMan Real-Time PCR の開発および実用化を検討した。*C. psittaci* とともに動物由来の *C. caviae* および *C. pecorum* が検出可能であり、主にヒトを宿主とする *C. pneumoniae*、*C. trachomatis* には反応しなかった。今後さらに他の動物由来クラミジアやその他の病原体についても特異性、感度の検討を行い、鳥、哺乳類等におけるクラミジア感染状況のサーベイランスに実用的な検出法の確立を目指す。

A. 研究目的

本研究では動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象として、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況のサーベイランスを行うことを目的に、特異的で多検体を処理できる診断法の開発と実

用化を目指し、さらに実際の検体を用いて実用性の確認を行うこととした。リケッチアは、ほとんどが自然界ではダニと動物の間のサイクルがあり、分類学的にはレジオネラ目に配置換えされた Q 熱コクシエラ (*C. burnetti*) や、つつが虫病の *Orientia tsutsugamushi* な

どのほか、現在マダニ媒介性リケッチアとして国内においては紅斑熱群リケッチア (Spotted Fever Group Rickettsia, SFG Rickettsia) に属する *Rickettsia japonica* (日本紅斑熱) が知られている。また、国内には患者が報告されていないものの、ヒトへの病原性を持つ、ヒト単球エーリキア症 (HME) を起こす *Ehrlichia chaffeensis* やヒト顆粒球エーリキア症 (HGE) を起こす *Anaplasma phagocytophila* が知られている。本年はこれらのなかで比較的診断、鑑別が困難で不明な点が多いマダニ媒介疾患を網羅的に検出する TaqMan probe 法 Real-Time PCR の構築を試み、一部野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出を試みる。

クラミジアについては、動物由来クラミジア感染症として *C.psittaci* とともに動物由来の *C.abortus*、*C.caviae*、*C.felis* ヒトへの感染が報告されており、これらとヒト由来の *C.pneumoniae*、*C.trachomatis* との鑑別が可能な病原体検出法の開発は意義がある。TaqMan probe 法を用いた Real-Time PCR により、迅速、感度、特異性に優れた動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発を検討し、確立されれば、従来の PCR との比較や臨床検体での実用化を検討する。

B. 研究方法

1. 動物ならびにダニ由来リケッチア感染症の病原体検出法の開発

マダニ媒介疾患を網羅的に検出する TaqMan probe 法 Real-Time PCR の構築を試みた。まずマダニ由来リケッチア感染症の病原体の遺伝子データベースから、Real-Time PCR によるプライマーおよびプローブを設計し、感度、特異性の検討を行っ

た。

方法と材料

①プライマーおよびプローブの設計

データベースに登録されている情報にもとづき SFG *Rickettsia*、*Ehrlichia chaffeensis* / *canis*、*Anaplasma spp.* に特異的な Real-Time PCR のプライマーおよびプローブを設計した。

②特異性試験

以下の46菌種を用いて特異性試験を行った。

Alcaligenes faecalis, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Chryseobacterium indologenes*, *Flavobacterium breve*, *Staphylococcus spidermidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri*, *Acinetobacter lwoffii*, *Flavobacterium odoratum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus penneri*, *Legionella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Arizonae*, *Yersinia enterocolitica*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia conori*, *Rickettsia typhii*, *Rickettsia prowazekii*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *HGE*, *Ehrlichia sennetsu*, *Orientia tsutsugamishi* Gilliam 株, *Orientia*

tsutsugamishi Karp 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kato 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kawasaki 株 , *Orientia*
tsutsugamishi Kuroki 株

2. 野外ダニ類からのダニ媒介性リケッチアの遺伝子検出と同定

全国で捕獲されたマダニ類 230 件から QIAGEN DNA tissue kit を用いて鋳型 DNA を精製し、Real-Time PCR に供した。

3. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発

データベースから *C.psittaci* の 16s rRNA の領域においてプライマーおよびプローブを設計した。*C.psittaci*、*C.abortus*、*C.caviae*、*C.felis* など動物由来クラミジアに特異的で、ヒト由来の *C.pneumoniae*、*C.trachomatis* との鑑別が可能か、実際にそれぞれの株を用いて検出感度や特異性を検討した。

C. 研究結果

1. 動物ならびにダニ由来リケッチア感染症の病原体検出法の開発

① 特異性試験

リケッチア、エーリキアを含む 46 菌種を用いて特異性を検討したところ、SFG *Rickettsia* を標的とした反応では *Neorickettsia sennetsu* と *E. chaffeensis* に、*Ehrlichia chaffeensis* と *canis* を標的とした反応では HGE にも増殖が認められた。これらの反応を除き、他の菌種に対しては特異的であった。

2. マダニ材料への応用

今回構築した Real-Time PCR の各反応系

は若干の交差が認められるものの、それぞれの組み合わせによって消去法によりそれぞれを特定できることから、マダニ材料への応用を試みたところ、230 件のマダニ材料から 29 件が SFG リケッチアが陽性となった。また *Ehrlichia chaffeensis* と *canis* を標的とした系では 3 件が陽性、1 件が 35 サイクル以降にシグナルの増幅が見られる疑陽性となった(表)。

3. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の開発

新たに設計した Real-Time PCR 系では、*C.psittaci* とともに動物由来の *C.caviae* および *C.pecorum* が検出可能であったのに対し、*C.trachomatis* および *C.pneumoniae* は検出されなかった。他のクラミジア、およびその他の各種病原体についての特異性試験は今後実施予定である。

D. 考察

今回構築した Real-Time PCR 系によってダニ媒介性リケッチア症、エーリキア症を網羅的にスクリーニングできた。若干の交差は認められるものの、ダニ媒介性疾患の病原体の存在の有無には有効と考える。今後、より特異的な系の構築を試みるとともに、今回陽性となった検体を用いて、陽性マダニに含まれていた病原体についてシーケンス解析をおこなう予定である。マダニの病原体保有状況を網羅的に把握することにより、患者発生時のリスク評価へ有用と考えられる。

クラミジアについては新たに設計した Real-Time PCR 系では、*C.psittaci* はじめ動物由来のクラミジアが検出可能であったのに対し、*C.trachomatis* および *C.pneumoniae* は

検出されなかったことから、動物由来のクラミジアに特化した検出法としての有用性が示唆された。

E. 結論

今回開発した動物由来リケッチアならびにクラミジアの検出系は、動物由来感染症のサーベイランスに用いる場合、ある程度有用性が示唆されたが、さらに感度・特異性の確認や実用化のための検討を行い、今後の実用化を目指したい。

F.健康危機情報
特になし。

G.研究発表

論文発表

1.蔡 燕,小川基彦, アグス・スティヨノ,福士秀人,田原健司,安藤秀二,岸本寿男:鳥由来検体からのオウム病クラミジアの遺伝子抽出法の検討.感染症誌.2:153-154,2005.

学会発表

1)蔡 燕, 小川基彦, 佐藤 梢,志賀定嗣, アグス・スティヨノ, 岸本寿男 オウム病の病原診断における新しい PCR 法の検討.第78回日本感染症学会総会,東京,2004.

2)小川基彦, 岸本寿男,佐藤 梢,蔡 燕, 志賀定嗣, アグス・スティヨノ, 多田有希:オウム病集団発生の原因となったヘラジカ由来 *C.psittaci* の遺伝子学的解析とその感染源に関する調査.第78回日本感染症学会総会,東京,2004.

3)Chahota, R., H. Ogawa, T. Yamaguchi, H. Fukushi. Genetic Diversity of *Chlamydophila* species prevalent among the captive and feral avian species based on VD2

region of ompA gene. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会合同学術集会, 倉敷, 2004.

4)高原 悠, 黒田悦子, 子安沙織, 蔡 燕, 宮下修行, 山口剛士, 福士秀人. ネコクラミジア抗原発現遺伝子の同定および性状解析. 第22回日本クラミジア研究会・第11回リケッチア研究会合同学術集会, 倉敷, 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況
なし。

I.特許取得
なし。

J.実用新案登録
なし。

K.その他
なし。

表 Real Time PCR によるマダニからの特異遺伝子の検出

捕獲情報			マダニ形態分類		Real Time PCR 結果		
ID	捕獲地	捕獲日	属・種	ステージ	SFG	Ehrlichia	HGE
F-001	北海道 F	2004/6/6	<i>Haemaphysalis douglasi</i>	♀	+	-	-
F-002	北海道 F	2004/6/6	<i>H.douglasi</i>	♀	+	-	-
Y-016	山梨 U	2004/6/5	<i>Ixodes persulcatus</i>	♀	-	±	-
Y-017	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♀	-	+	-
Y-019	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♂	-	+	-
Y-021	山梨 U	2004/6/5	<i>I.ovatus</i>	♂	-	+	-
Fu-001	福島 F	2004/6/5	<i>H.japonica</i>	nymph	+	-	-
Yk-001	鹿児島 Y-1	2004/6/26	<i>H.megaspinosa</i>	♀	+	-	-
Yk-003	鹿児島 Y-1	2004/6/26	<i>H.megaspinosa</i>	nymph	+	-	-
Yk-007	鹿児島 Y-2	2004/6/26	<i>H.yeni</i>	nymph	+	-	-
Yk-008	鹿児島 Y-2	2004/6/26	<i>H.yeni</i>	nymph	+	-	-
Awj-002	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-003	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-004	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-005	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-006	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-007	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-008	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-009	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-010	兵庫 Awj-1	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-011	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♂	+	-	-
Awj-012	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-013	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-014	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-015	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-016	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-018	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	♀	+	-	-
Awj-019	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-020	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-021	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-022	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-023	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
Awj-024	兵庫 Awj-2	2004/9/1	<i>H.longicornis</i>	N	+	-	-
陽性					29	3	
疑陽性*						1	

* 疑陽性 35サイクル以降に増幅が認められたもの

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

各種動物におけるレプトスピラ保有状況調査

分担研究者 渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長
協力研究者 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 谷川力 イカリ消毒技術研究所 所長
研究協力者 林栄治 東京医科歯科大学大学院 助手
研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 水谷浩志 東京都動物愛護相談センター・城南島出張所 係長
研究協力者 長谷川徹 東京都動物愛護相談センター・城南島出張所 主任
研究協力者 新田芳樹 沖縄県家畜衛生試験場 研究員
研究協力者 廣瀬和彦 明治製菓生物産業研究所 研究員

研究要旨

1. 関東3県および静岡県計12ヶ所で捕獲したドブネズミ78頭中4頭(2ヶ所)からレプトスピラが分離された。また分離はできなかったものの、4頭(2ヶ所)の腎臓培養液のPCRにより、レプトスピラの遺伝子断片が検出された。
2. 神奈川県および長崎県のアライグマから分離されたレプトスピラ2株について性状解析を行った結果、2株とも *Leptospira interrogans* serovar Hebdomadis と同定され、血清型 Hebdomadis の遺伝的多様性が明らかになった。また神奈川県および愛知県で捕獲されたアライグマの血清診断を行い、それぞれ124頭中17頭と7頭中1頭が抗体価陽性であった。
3. 東京都動物愛護相談センターに引き取られたイヌの腎臓からレプトスピラの分離および尿からレプトスピラ遺伝子の検出を試みたがすべて陰性であった。
4. 沖縄県の養豚場のブタの尿からレプトスピラの分離と遺伝子の検出および養豚場内で捕獲したネズミ類からレプトスピラの分離を試みたがすべて陰性であった。

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。自然

界では、げっ歯類を中心として多くの野生動物や家畜、愛玩動物が、レプトスピラの保菌動物となっている。レプトスピラは保菌動物の腎臓に定着し、尿中に排出される。ヒトは、

この尿との直接的な接触，あるいは尿により汚染された水や土壌との接触により感染する。このため，レプトスピラ症のサーベイランスには，レプトスピラの保菌動物を明らかにすることが非常に重要である。本年度の調査では，レプトスピラの保菌動物である野生動物（ドブネズミおよびアライグマ），愛玩動物（イヌ），また家畜（ブタ）におけるレプトスピラ保有状況を調査した。

方法

1. レプトスピラの分離，培養法

ドブネズミなどのネズミ類，イヌの腎臓およびブタ尿から，コルトフ培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った。培養は，30°Cで3ヶ月間行い，一週間ごとに暗視野顕微鏡下でレプトスピラの増殖の有無を観察した。

2. レプトスピラ *flaB* 遺伝子配列解析

分離したレプトスピラより染色体 DNA を抽出し，これを鋳型として *flaB* 特異的プライマーを用いて遺伝子の増幅を行い，その塩基配列の決定を行った。また培養開始 24 時間後の培養上清 1 ml および尿サンプルを遠心分離にかけて沈殿を回収し，同様に DNA 抽出，*flaB*-PCR を行った。

3. 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のパターン解析

対数増殖期のレプトスピラ菌体を低融点アガロースに封入し，ゲルブロックとした。ゲルブロックをリゾチーム，Proteinase K，制限酵素 *Not I* で処理し，このブロックを

6V/cm，パルスタイム 10-60 秒，5°Cで 20 時間泳動を行った。

4. 顕微鏡下凝集試験(MAT)

96 穴マイクロタイタープレートに，PBS で希釈したアライグマ血清あるいはレプトスピラ標準抗血清と，被検レプトスピラ培養液をそれぞれ 25 μ l ずつ加え，37°C，3 時間インキュベートした後，暗視野顕微鏡下で観察を行った。

5. 凝集素交差吸収試験

アライグマから分離されたレプトスピラ Rc29, Rc57 に対する抗血清を作製し，血清型 Hebdomadis 標準株およびその標準抗血清を用いて凝集素交差吸収試験を行い，分離株の血清型を決定した。

結果および考察

1. ドブネズミのレプトスピラ保有状況

本年度は以下の 12 ヶ所で捕獲したドブネズミからレプトスピラの分離を行った(太字は本研究班で捕獲を行った場所。それ以外は研究協力者の元に集められたドブネズミ)。

- a) 東京都墨田区隅田川周辺 1 頭
- b) 東京都墨田区北部住宅街 4 頭
- c) 千葉県市川市 15 頭
- d) 神奈川県平塚市 1 頭
- e) 東京都八王子市 1 頭
- f) 神奈川県川崎市浮島公園 24 頭
- g) 東京都江東区 4 頭
- h) 千葉県銚子市 2 頭
- i) 静岡県沼津市 1 頭

- j) 東京都豊島区 4頭
- k) 横浜市中区大岡川周辺 11頭
- l) 横浜市中区中村川周辺 10頭

これらのうち、a)の1頭およびb)の3頭からレプトスピラが分離された。分離レプトスピラ4株は、*flaB* 遺伝子部分塩基配列、標準抗血清との反応性および *NotI* - PFGE の切断パターンから、すべて *L. interrogans* serovar Copenhageni あるいは *Icterohaemorrhagiae* と同定された(図1)。

また分離はできなかったものの、k)の3頭およびl)の1頭の培養液上清沈渣から *L. interrogans* の *flaB* 遺伝子の一部が検出された。

前研究班での調査により、東京都内では重症型レプトスピラ症であるワイル病の起因菌である血清型 Copenhageni/*Icterohaemorrhagiae* が分離されたが、本研究でもこの血清型が広くドブネズミの間で蔓延していることが明らかとなった。ワイル病の患者数は近年減少しているものの、感染機会は今も以前と変わらず都心部でも存在し、実際に東京都や神奈川県など都心部で患者が発生していることから、レプトスピラ症は決して過去の病気ではないということを認識する必要がある。

2. アライグマ分離レプトスピラの性状解析 およびアライグマ血清診断結果

前研究班での調査によりアライグマから分離されたレプトスピラ Rc29, Rc57 は、*flaB* 配列から遺伝種 *interrogans* であることが、

また抗血清との反応性および *NotI* - PFGE の切断パターンから血清型 Hebdomadis と共通な抗原を保有するが、これまで本邦で存在している血清型 Hebdomadis とは異なる血清型であることが示唆された。そこで本研究では、これら分離株の血清型を決定するためにそれぞれの抗血清を作製し、凝集素交差吸収試験を行ったところ、両株とも血清型 Hebdomadis であることが明らかとなった(表1および図2)。これまでの研究から、*NotI* による PFGE 切断パターンは、同じ遺伝種に属する血清型間では保存されており、時間、地域間による違いはないと考えられていた。しかしながら本研究により、すくなくとも血清型 Hebdomadis では遺伝的多様性が存在することが明らかとなった。一方、前、本研究班の結果から、血清型 Copenhageni/*Icterohaemorrhagiae* では、ゲノム構造が非常に保存されていることも明らかになっている。レプトスピラの血清型による遺伝的保存性、多様性について、さらに多くの血清型で調査を行い、明らかにしていく必要がある。

神奈川県で捕獲されたアライグマおよび愛知県で捕獲されたアライグマのレプトスピラ抗体測定を行ったところ、それぞれ124頭中17頭、7頭中1頭が抗体価陽性であった(表2)。これまでの我々の調査により、神奈川県および長崎県のアライグマからレプトスピラが分離されており、また他の研究者の調査から北海道のアライグマでもレプトスピラが広く蔓延していることも明らかとなっている。今回の結果は、アライグマのレプトスピラ汚染をさらに裏付けるものである。アライグマ

はペットとして輸入されたものが野生化したのであるが、これまで国内には存在しなかった動物が、新たなレプトスピラの保菌動物となってしまったということから、輸入動物の一層の規制、管理の徹底が望まれる。

3. 東京都引き取り犬のレプトスピラ保有状況

イヌは古くからレプトスピラの保菌動物として知られており、また人間との距離を考えた場合に、非常に重要な保有体である。本研究では、東京都動物愛護相談センターに引き取られたイヌ 28 頭の腎臓からレプトスピラの分離および 16 頭の尿からレプトスピラ遺伝子の検出を試みたが、すべて陰性であった。今後さらに調査頭数を増やし、正確な保有状況を明らかにしていきたい。

4. 沖縄県の飼養ブタのレプトスピラ保有状況調査

病原性レプトスピラはブタに対してもレプトスピラ症を引き起こすが、国内でのブタのレプトスピラ症の発生報告は少ない。しかしながら、沖縄県ではブタの死産、流産が散見されており、その原因としてレプトスピラ感染が考えられている。その理由として、流産胎子の乳剤上清中にスピロヘータ様菌体が観察されること、またブタ尿の *flaB*-PCR により期待される大きさの DNA 断片が増幅されたことなどがあげられている。そこで本研究では、過去に流産の発生があった沖縄県南部の養豚場のブタの尿 30 検体からのレプトスピラの分離および遺伝子検出を試みたが、す

べて陰性であった。また養豚場内でネズミ類の捕獲を行い(ドブネズミ 42 頭, クマネズミ 2 頭, ジャコウネズミ 1 頭), 腎臓からレプトスピラの分離を試みたが、これらもすべて陰性であった。今後、過去に流産が発生した他の養豚場でも同様の調査を行うとともに、MAT による抗体価測定なども行い、ブタの流産へのレプトスピラの関与を証明していきたい。

学会発表

1. 内田正紀, 小泉信夫, Okatani Alexandre Tomomitsu, 加藤行男, 渡辺治雄 アライグマにおけるレプトスピラの保有状況と分離株の性状解析. 第 138 回日本獣医学会学術集会. 北海道, 2004 年 9 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.

表 1. アライグマ由来分離株に対する抗血清と血清型 Hebdomadis 株との凝集素交差吸収試験

抗血清	吸収株	吸収前抗体価		吸収後抗体価		非吸収率
		抗血清同一株	吸収株	抗血清同一株	吸収株	
Hebdomadis	Rc29	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc29	Hebdomadis	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Hebdomadis	Rc57	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc57	Hebdomadis	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc29	Rc57	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%
Rc57	Rc29	4000	4000	< 100	< 100	< 2.5%

表 2. アライグマ血清中のレプトスピラ抗体価

捕獲場所	検体数	MAT 陽性数	血清型	陽性数
神奈川県	124	17 (13.7%)	Autumnalis	2
			Canicola	1
			Copenhageni	3
			Copenhageni/ Icterohaemorrhagiae	12
			Hebdomadis	1
愛知県	7	1 (14.3%)	Hebdomadis	1

M 1 2 3 4 5 6 7 M

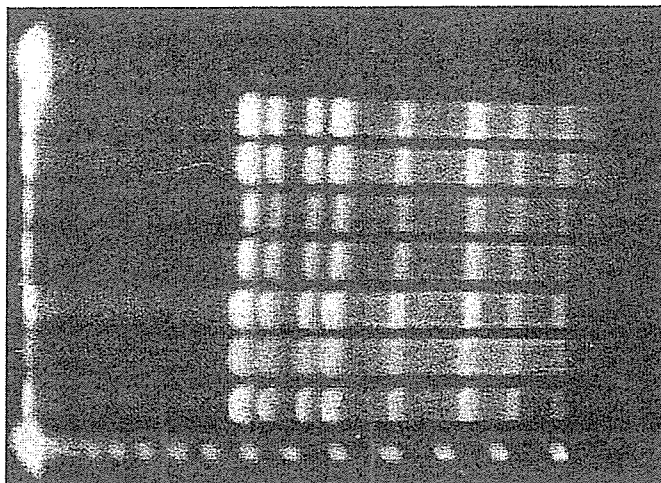


図1. 血清型 Copenhagani / Icterohaemorrhagiae 標準株とドブネズミ由来分離株のNot I-PFGH 切断パターン

Lanes 1 to 3: *I. interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae Ictico No.1, Icterohaemorrhagiae RGA, Copenhagani M 20 (標準株) . Lanes 4 to 7: Sum-1, Sum-2, Sum-3, Sum-4 (ドブネズミ) . Lane M: lambda ladder.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M

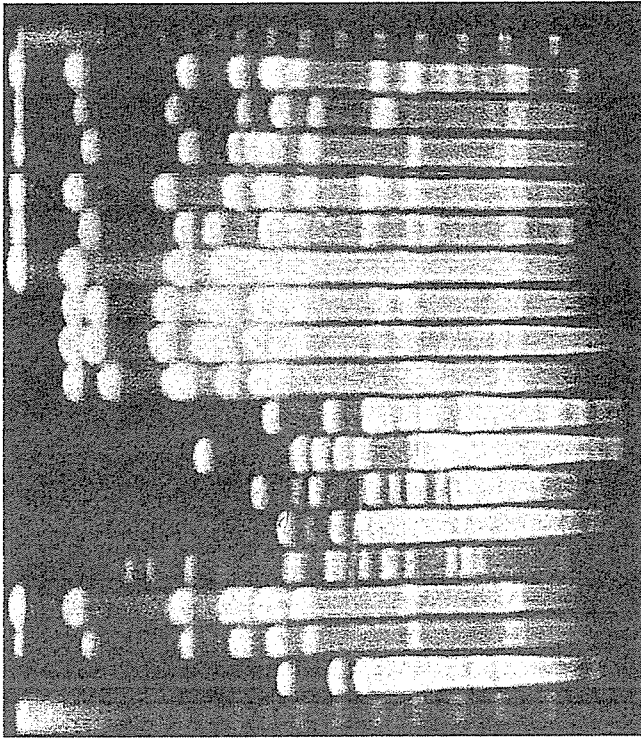


図2. 血清群 Hebdonadis 標準株とアライグマ由来分離株、レプトスピラ症患者由来分離株のNot I-PFGH

Lanes 1 to 2: *L. interrogans* serovar Borntown, Göttern. Lane 3: *I. interrogans* serovar Hebdonadis. Lane 4: *L. borgpetersenii* serovar Jukes. Lane 5: *L. feromonaspeck2* serovar Manchung. Lanes 6 to 7: *L. interrogans* serovar Maru, Sannatini. Lane 8: *L. borgpetersenii* serovar Worsfold. (標準株) Lane 9: Rc57 (野生アライグマ) . Lanes 10 to 11: OP82, OP79 (沖縄県レプトスピラ症患者) . Lane 12: Akiyami B (標準株) . Lane 13: Rc29 (展示アライグマ) . Lanes 14 to 17: OP81, OP58, OP83, OP98 (沖縄県レプトスピラ症患者) . Lane M: lambda ladder.