



Fig. 1. Phylogenetic tree based on *flaB* gene sequencing (A) and *gyrB* gene sequencing (B). Representative strains of each species were compared with the Yoroshima Island isolate (strain Yoro-1) for a *flaB*-based taxonomic analysis. *L. inadai* strain 10 (accession number AB030273) was used as an outgroup. For the *gyrB*-based taxonomic analysis, strains belonging to serogroup Javanica were used (see “Materials and Methods”). *L. biflexa* strain Patoc I (accession number AB252857) was used as an outgroup.

Table 2. Reactivity of antiserum to Amami isolates by a cross-agglutination test based on MAT

Antiserum to the strain (serovar)	Titer ^{a)}	Agglutination titers of antiserum against antigens							
		Yoro-1	Yoro-2	Yoro-3	Yoro-4	Yoro-5	Yoro-6	Yoro-7	VB46 ^{b)}
Yoro-1	6,400	6,400	6,400	6,400	6,400	6,400	12,800	12,800	6,400
OS39 (Javanica)	12,800	51,200	102,400	25,600	25,600	25,600	51,200	51,200	51,200
Veldrat Batavia 46 (Javanica)	51,200	12,800	25,600	6,400	6,400	6,400	6,400	6,400	51,200
RGA (Icterohaemorrhagiae)	25,600	200	200	<200	<200	<200	<200	<200	NT ^{c)}
Shibaura (Copenhageni)	6,400	800	800	200	400	400	200	400	NT
AkiyamiA (Australis)	>3,200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT
Hebdomadis (Hebdomadis)	>3,200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT
AkiyamiC (Autumnalis)	6,400	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT
Moulton (Canicola)	16,000	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT
Moskva V (Grippityphosa)	>3,200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT
Salinem (Pyrogenes)	>3,200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	<200	NT

^{a)} Agglutination titer of the antiserum against the comprehensive strain used for antiserum preparation.

^{b)} *L. borgpetersenii* serovar Javanica strain Veldrat Batavia 46.

^{c)} Not tested.

Leptospira strain serovar Javanica was isolated in the Okinawa Islands, but not in other areas of Japan. Serovar Javanica is known as a specific serovar in the Okinawa Islands, but our findings have indicated that serovar Javanica was also migrating to the Amami Islands. Our investigation strongly suggests that serovar Javanica must be used for the serodiagnosis of leptospirosis cases on the Amami Islands.

Some *Leptospira* isolates from field rats and clinically obtained human blood have been identified as *L. borgpetersenii* from the Okinawa Islands (13). In order to compare *Leptospira* strains isolated from the Amami Islands with an Okinawa isolate, a long restriction fragment pattern (LRFP) analysis was performed due to its usefulness for resolving the relationship among strains of different origins (18, 21). As a result, *NotI*-LRFP was indistinguishable between the Amami isolates and the Okinawa isolate (Fig. 2). This finding suggested that the Amami isolates were closely related to OS39, which was isolated on Okinawa Island.

In conclusion, this is the first report of the isolation of *Leptospira* from the Amami Islands and the discovery of serovar Javanica in the Amami Islands. Recently, visiting river resorts has been considered as a behavioral risk for *Leptospira* infection (12, 13, 16). In the case of Eco-Challenge-Sabah 2000, epidemiological analyses demonstrated that river water was a source of contamination with *Leptospira*, which could lead to infection. More than 400 thousand people visit the Amami Islands per year (<http://chukakunet.pref.kagoshima.jp/>) for sightseeing, river fishing, hiking in the forest, river kayaking, and other common activities in this area. The present findings suggest that people who live on the Amami Islands, as well as sightseers in the Amami Islands, should be careful when coming in contact with infectious sources of leptospirosis.

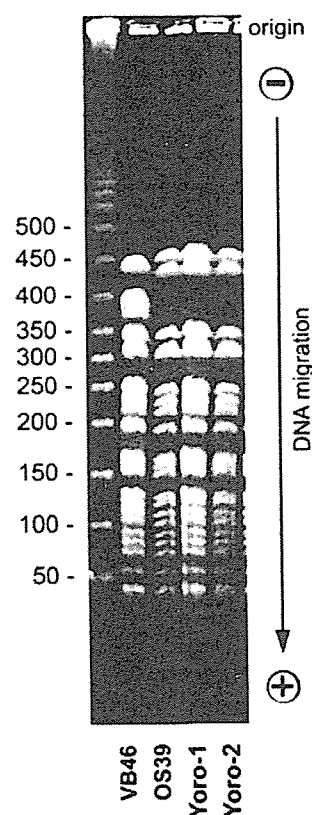


Fig. 2. LRFP analysis of Amami isolates. Migration positions of DNA marker lambda concatemers are indicated on the left (kb). VB46, *L. borgpetersenii* serovar Javanica strain Veldrat Batavia 46; OS39, *L. borgpetersenii* serovar Javanica strain OS39; Yoro-1 and Yoro-2, Yoroshima isolates (in this study).

We are grateful to Mikio Takashi and Hisahiro Torikai for their technical support in capturing the rats on Yoroshima Island, and we would also like to thank Masaji Nakamura (Okinawa Prefectural Institute of Health and Environment) for helpful discussions of this topic. We also greatly appreciate Rudy

Hartskeerl (the Royal Tropical Institute in Netherlands) for supplying a large collection of *Leptospira* serovars. H.K., H.F., and T.M. were supported by a grant for Research on Emerging and Reemerging Infectious Diseases from the Ministry of Health, Labour and Welfare (H15-Shinkou-14).

References

- 1) Akiyama, K., Shiraishi, H., Yamamoto, H., and Ishida, N. 1991. Epidemiological analyses of Leptospirosis in Miyagi prefecture through 30 years, p. 55–67. *In* Kobayashi, Y. (ed), Leptospirosis, Hokusen-sha, Tokyo.
- 2) Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M., and van der Noordaa, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 495–503.
- 3) Easton, A. 1999. Leptospirosis in Philippine floods. *Br. Med. J.* **24**: 212.
- 4) Faine, S., Adler, B., Bolin, C., and Perolat, P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd ed, MediSci, Melbourne, Australia.
- 5) Fukunaga, M., Horie, I., Okuzako, N., and Mifuchi, I. 1990. Nucleotide sequence of a 16S rRNA gene for *Leptospira interrogans* serovar canicola strain Moulton. *Nucleic Acids Res.* **18**: 366.
- 6) Kasai, H., Ezaki, T., and Harayama, S. 2000. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 301–308.
- 7) Kasai, H., Tamura, T., and Harayama, S. 2000. Intra-genetic relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 127–134.
- 8) Kawabata, H., Dancel, L.A., Villanueva, S.Y., Yanagihara, Y., Koizumi, N., and Watanabe, H. 2001. *flaB*-polymerase chain reaction (*flaB*-PCR) and its restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis are an efficient tool for detection and identification of *Leptospira* spp. *Microbiol. Immunol.* **45**: 491–496.
- 9) Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111–120.
- 10) Kishaba, T., Endo, K., Nakamoto, H., Sunagawa, H., and Taira, K. 1991. Leptospirosis in central Okinawa twelve-year-experience in one institution, p. 75–87. *In* Kobayashi, Y. (ed), Hokusen-sha, Tokyo.
- 11) Ko, A.I., Galvao Reis, M., Ribeiro Dourado, C.M., Johnson, W.D., Jr., and Riley, L.W. 1999. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. *Lancet* **354**: 820–825.
- 12) Morgan, J., Bornstein, S.L., Karpati, A.M., Bruce, M., Bolin, C.A., Austin, C.C., Woods, C.W., Lingappa, J., Langkop, C., Davis, B., Graham, D.R., Proctor, M., Ashford, D.A., Bajani, M., Bragg, S.L., Shutt, K., Perkins, B.A., Tappero, J.W., and Leptospirosis Working Group. 2002. Outbreak of leptospirosis among triathlon participants and community residents in Springfield, Illinois, 1998. *Clin. Infect. Dis.* **15**: 1593–1599.
- 13) Nakamura, M., Taira, K., Itokazu, K., Kudaka, J., Asato, R., and Narita, M. 2000. Outbreak of leptospirosis in Yaeyama, Okinawa, Japan, 1999. *Infect. Agent Surv. Rep.* **21**: 165–166.
- 14) Phraisuwan, P., Whitney, E.A., Tharmaphornpilas, P., Guharat, S., Thongkamsamut, S., Aresagig, S., Liang-phongphanthu, J., Junthima, K., Sokampang, A., and Ashford, D.A. 2002. Leptospirosis: skin wounds and control strategies, Thailand, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 1455–1459.
- 15) Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406–425.
- 16) Sejvar, J., Bancroft, E., Winthrop, K., Bettinger, J., Bajani, M., Bragg, S., Shutt, K., Kaiser, R., Marano, N., Popovic, T., Tappero, J., Ashford, D., Mascola, L., Vugia, D., Perkins, B., Rosenstein, N., and Eco-Challenge Investigation Team. 2003. Leptospirosis in “Eco-Challenge” athletes, Malaysian Borneo, 2000. *Emerg. Infect. Dis.* **9**: 702–707.
- 17) Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J.B., Yanagida, M., and Cantor, C.R. 1987. An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed-field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **15**: 4481–4489.
- 18) Swaminathan, B., Barrett, T.J., Hunter, S.B., Tauxe, R.V., and CDC PulseNet Task Force. 2001. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 382–389.
- 19) Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876–4882.
- 20) Venkateswaran, K., Dohmoto, N., and Harayama, S. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 681–687.
- 21) Watanabe, H., Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., and Tamura, K. 2002. PulseNet Japan: surveillance system for the early detection of diffuse outbreak based on the molecular epidemiological method. *Kansenshogaku Zasshi* **76**: 842–848.
- 22) Watanabe, K., Teramoto, M., and Harayama, S. 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2813–2819.
- 23) Watanabe, K., Yamamoto, S., Hino, S., and Harayama, S. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1203–1209.
- 24) Yamamoto, S., and Harayama, S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1104–1109.
- 25) Yamamoto, S., and Harayama, S. 1996. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 506–511.

疾患解説

レプトスピラ症

増澤 俊幸*1・岡本 能弘*2

I レプトスピラの性状

レプトスピラはスピロヘータ科に属するグラム陰性好気性細菌で菌体は細長いらせん状(直径 $0.1\mu\text{m}$ 、長さ $6\sim 20\mu\text{m}$)を呈し、“?”マークのごとくに両端はフック状に湾曲している(図1)¹⁾。細胞体両先端付近に端を発する各1本の鞭毛は外被に包まれ菌体外に遊離することなく独特の運動性を示す。通常の染色法では染まりにくく、また活発な運動を観察するには暗視野顕微鏡が最適である。28~30℃の培養で、1~2週間で増殖する。

II レプトスピラの発見、分類

黄疸出血性レプトスピラ症(ワイル病)は1886年、ハイデルベルグの医師Adolf Weilにより見いだされた。1914年秋、九州大学の稲田らは黄疸を呈した坑夫から病原体の分離に成功し、ネズミが感染源であることを明らかにした²⁾。1918年、野口英世の提案で属名が*Leptospira*に改められた。1987年以前は、レプトスピラは病原性の*L. interrogans*と非病原性の*L. biflexa*の2種に大別され、さらには免疫学的性状に基づき250以上の血清型(serovar)に分類されていた³⁾。現在は分子生物学的分類法が導入され、13遺伝種と種名がない4遺伝群に分類される^{1), 4)}。しかし、予防ワクチン、血清診断は血清型特異的であるため、今日でもこの分類は広く利用されている。

III 感染機構、疫学

80種のげっ歯類をはじめ、トリ、ヘビ、ダニ、カエル、魚など120種を超える多種、多様な動物から分離され、ヒトは終末宿主である。ヒトや動物はレプトスピラが含まれる尿で汚染された水、土壌を介して経皮、あるいは経口感染する。高湿な熱帯では、長期にわたりレプトスピラが環境中で生存可能であるため、中南米、東南アジア諸国で大規模な発生がみられている⁵⁾。日本では古来より秋疫、用水病、七日熱等の名前でよばれる秋季レプトスピラ症として知られていたが、農業の機械化が進んだ今日では患者は激減した。われわれは野ネズミのレプトスピラ保有状況を明らかとするために全国調査を行った。1,204匹の野ネズミ中42匹からレプトスピラを分離し(分離率3.5%)、身近にレプトスピラの感染機

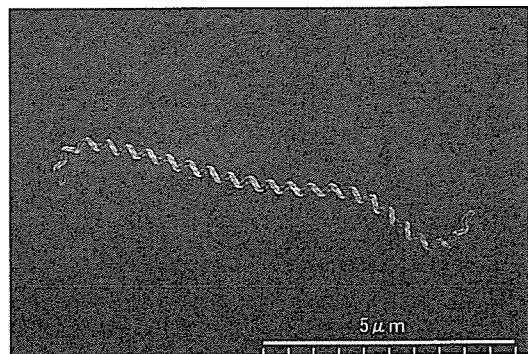


図1 レプトスピラの透過型電顕写真 (*Leptospira interrogans* serovar manilae)

(愛知医科大学医学部寄生虫学教室 角坂照貴博士のご厚意による)

*1 千葉科学大学薬学部免疫/微生物学研究室教授

*2 千葉科学大学薬学部免疫/微生物学研究室助教授

会が存在することを明らかにした。

IV 臨床症状と治療

発熱，全身倦怠，筋痛，結膜充血などを特徴とする⁶⁾。ワイル病は最も重症型であるが，このほかに中等症，あるいは軽症とされる秋季レプトスピラ症も知られる。日本ではワイル病は*L. interrogans*血清型Icterohaemorrhagiaeと血清型Copenhageniに起因し，3～14日の潜伏期の後に発病する。

第1期（発熱期）：突然の悪寒を伴う39～40℃に及ぶ発熱に始まり，頭痛，腰痛，全身倦怠感，結膜の充血，腓腹筋痛が起こる。結膜の充血は最も特徴的の症状であり，第2～3病日には顕著となり，第4～5病日には結膜，皮膚に黄疸がみられるようになる。

第2期（発黄期，黄疸期）：黄疸は最高潮に達し，皮膚の点状出血，歯茎や口蓋の口腔内出血，鼻血，吐血，血便，眼球結膜の出血，喀血，血尿などがみられる。

第3期（回復期）：衰弱と激しい貧血がみられ，皮膚は灰緑黄色となる。

秋季レプトスピラ症は*L. interrogans*血清型Hebdomadisによる秋疫B症，血清型Autumnalisによる秋疫A症，血清型Australisによる秋疫C症があるが，重症のものはワイル病と区別できない。1～6カ月後に30～40%の頻度で後発症として水晶体混濁がみられる。

ヒトでは発病期から蛋白尿，白血球増加，血沈の促進，CRP陽性などの所見がみられる。第1～2週のはじめにかけて，レプトスピラの排菌が起こる。重症例では貧血，血小板減少がみられる。黄疸を呈した重症例でも血清中のGOT (AST)，GPT (ALT)，LDHは正常ないし，一過性の上昇にとどまる。遅くとも第5病日までに治療を開始しないと，十分な効果は期待できない。日本ではヒトのレプトスピラ症にはストレプトマイシン1日1～2gずつ，2～4日間筋注が推奨されている。ゲンタマイシン，トブラマイシン，イセパマイシンでもほぼ同様の効果が期待できる⁶⁾。欧米ではペニシリン，オキシテトラサイクリンが使用されるが，長期間大量投与する必要がある。また，Jarisch-Herxheimer反応がみられる場合がある。

V 診断

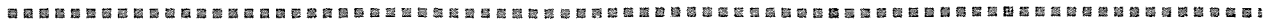
血液，脳脊髄液などをEMJH培地，またはKorthof培地などに接種し，30℃，2週～3カ月間培養し病原体の分離を行う。初代培養は特に増殖に時間がかかる。特異抗体は第8～10病日に現れはじめ，第3～4病週で最高に達する。顕微鏡凝集試験(microscopic agglutination test: MAT)では新鮮菌液(1～2×10⁸/mL)を，急性期，回復期(2病週)のベア血清とマイクロプレート中で反応させ，50%凝集をもって陽性と判定する。ベア血清で4倍以上，単一血清では通常64～100倍以上を陽性とする。患者血液，尿等を材料として，鞭毛遺伝子などを標的としたPCRにより診断ができるが，実施できる施設は限られる。

VI 最近の発生事例

事例1：1999年7月から9月に沖縄県八重山地区においてレプトスピラ症の多発事例があった。15例の患者の起因血清型は，Hebdomadis 7例，Grippotyphosa 5例，Pyrogenes 1例，Kremastos 1例，血清型不明1例であった。患者は観光ガイドやシーカヤックのインストラクターなど観光関連就業者や農業，土木作業従事者であった。

事例2：2005年4月から6月に相次いで，動物輸入業従業員がレプトスピラ症に感染，発病した。われわれのその後の調査から，感染源は輸入したアメリカモモンガ(10匹中5匹レプトスピラ保有)であり，起因血清型はGrippotyphosaであった。米国ではイヌのレプトスピラ症起因血清型として多い。輸入動物を介した感染で，感染源の特定に至った貴重な事例である。

このような輸入事例では日本に存在しない血清型が原因となる可能性もある。現在国内で使用されているヒト用ワイル病秋疫混合ワクチンで予防可能な血清型はCopenhageni(Icterohaemorrhagiae)に対しても交差防御)，Autumnalis，Hebdomadis，Australisだけであり，その他の血清型には全く対応できない。血清型に依存しない広域ワクチンの開発が切望されている。



VII おわりに

世界的交通網の発達，世界規模での物流のなかで，海外からの各種病原体の侵入はもはや看過できない状況となりつつある．実際，事例2では輸入動物を介してレプトスピラが侵入して，患者の発生もみた．海外からの病原体の侵入を水際で防ぐために，厚生労働省は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．今後も輸入動物を介した病原体の侵入がないことを常に監視し，この規制が遵守されていることを見守る必要があるだろう．

追記

本研究の一部は平成15～17年度厚生労働省厚生科学研究費新興再興感染症研究事業（主任研究者 増澤）の援助のもと実施された．アメリカモモンガ感染事例は，麻布大学獣医学部（獣医）病理学 宇根

有美助教授，厚生労働省東京検疫所川崎支所 太田周司所長，東京大学大学院農学生命科学研究科 吉川泰弘教授，厚生労働省国立感染症研究所細菌部 川端寛樹室長，同 小泉信夫主任研究官，静岡済生会総合病院血液内科 竹内隆浩先生，同 神経内科 塚越敬子先生のご協力のもと感染源の特定に至った．

参考文献

- 1) Levett PN : Leptospirosis. Clin Microbiol Rev 14 : 296～326, 2001
- 2) 稲田龍吉, 井戸泰 : ワイル氏病原体—新種スピロヘータ発見総括報告. 東京医事新誌 1908 : 351～360, 1915
- 3) Faine S : レプトスピラ症防疫指針 (吉井善作訳). 内田老鶴圃. 東京, 1987
- 4) Faine S : Leptospira and Leptospirosis. MediSci, Melbourne, Australia, 1999
- 5) 柳原保武 : 世界におけるレプトスピラ病. 化学療法の領域 17 : 2146～2153, 2001
- 6) 小林謙 : レプトスピラ病の臨床と診断, 治療. 化学療法の領域 17 : 2137～2145, 2001

ライム病ボレリアの世界分布と伝播サイクル

増澤 俊幸*

我々はこれまで15年余にわたり、マダニ媒介性スピロヘータ感染症病原体であるライム病ボレリアの分子疫学的研究を行ってきた。国内のみならず、東アジアから欧州の東端に至る地域で媒介マダニと保有体野鼠からのボレリア分離と性状解析を行い、その分布と維持伝播サイクルなどの一部を解明できた。その過程で、ヤマトマダニにより媒介される *Borrelia japonica* と *B. sinica*, トルコで陸亀の1種に寄生したマダニよりライム病と回帰熱ボレリアの中間に位置する新規のボレリア *B. turcica* を発見し新種記載を行った。分子疫学的調査に基づくライム病関連ボレリアの維持伝播サイクル解析研究は、ライム病の実態解明や迅速な診断や予防策の策定に必要な情報を提供したと考えている。

Key Words : ライム病, ボレリア, マダニ, アナプラズマ, 分子疫学

I はじめに

ライム病 (Lyme disease) は、1970年代後半米国コネチカット州ライムという小さな集落で地域集積性に発生した関節炎に端を発する¹⁾。発見者の Steere によりライム関節炎と命名されたが、その後皮膚の遊走性紅斑 (erythema migrans : EM), 循環器症状, 神経症状など多様な全身的徴候を示すことが明らかとなり、ライムボレリア症 (Lyme borreliosis) と呼ばれるようになった²⁾。病原体であるライム病ボレリア *Borrelia burgdorferi* sensu lato (sl, 広義) はスピロヘータの一種である (図1)。当初1種と思われたライム病関連ボレリアは、今日全世界で少なくとも12種が見出されているが (表1)³⁾, 病原性が明かなものは、*B. burgdorferi* sensu stricto (ss, 狭義), *B. garinii*, *B. afzelii*, 及び *B. spielmani* (*Borrelia* sp. A14S) の4遺伝種である。その他の遺伝種の病原性は不明か、弱毒と考えられる。日本には病原性ボレリアとしてはシュルツェマダニ (*Ixodes persulcatus*) に

よって媒介される *B. afzelii* と *B. garinii* が存在し、感染症法上は第4類に分類されている。

II 感染経路, 及びボレリア遺伝種と媒介マダニ種, 保有体, 臨床症状との関係

自然界ではボレリアは *Ixodes* 属マダニ種 (図1) と野生動物の間で維持伝搬されている。この維持伝播サイクルにヒトが紛れ込み、マダニの刺咬を受けるとライム病に感染することとなる (図2)。マダニは数日~約1週間にわたり吸血し続け、この間にマダニ中腸内のボレリアは増殖を開始し、48時間以上経つと唾液腺を経て宿主皮内へ移行し感染する。

マダニ刺咬より数日~数週後に皮膚に遊走性紅斑が出現するが、見られない症例も多い。随伴症状として疲労感, 不快感, 項部疼痛, 発熱, 咳, 筋肉痛, 移動性の関節痛等, インフルエンザ様, 髄膜炎様症状が見られる。数週~数カ月後に神経及び循環器系の疾患へと進展し, 数カ月~数年後には慢性関節炎, 慢性萎縮性肢端皮膚炎 (achro-

Terrestrial distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato

* Toshiyuki Masuzawa 千葉科学大学薬学部 教授

150 (452)

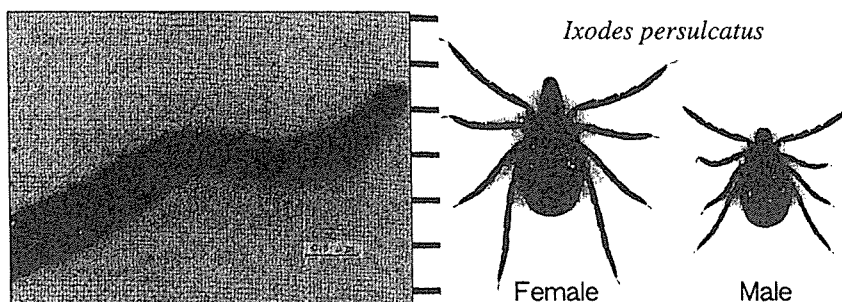


図1 ライム病ボレリア *Borrelia burgdorferi* の透過型電子顕微鏡写真(写真左)と日本のライム病媒介マダニシュルツェマダニ(写真右)

菌体はコルクスクリー状の形態を呈し、長さ3~20 μ m、径0.2~0.5 μ m、菌体の両端から派生する7~15本の鞭毛を有する。暗視野顕微鏡を用いると特有のらせん回転運動を観察することができる。

雌成虫(左)、雄成虫(右)、スケールは1 mm(愛知医大 角坂照貴講師撮影)

表1 ライム病ボレリア種と臨床病態、保有体、媒介マダニ種の関係

ボレリア種	臨床病態	保有体	媒介マダニ種	分布地域
<i>B. burgdorferi</i> ss	遊走性紅斑, 神経ボレリア症, 関節炎	小型齧歯類, 鳥類	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>I. pacificus</i>	米国
<i>B. afzelii</i>	遊走性紅斑, 慢性委縮性肢端皮膚炎	小型齧歯類	<i>I. ricinus</i> , <i>I. persulcatus</i>	欧州, アジア北部
<i>B. garinii</i> (ユーラシア型)	遊走性紅斑, 神経ボレリア症	鳥類	<i>I. ricinus</i>	欧州
<i>B. garinii</i> (アジア型)	遊走性紅斑, 神経ボレリア症	小型齧歯類, 鳥類	<i>I. persulcatus</i>	アジア北部
<i>B. spielmani</i> (Type A14S)	病原性	ヤマネ	<i>I. ricinus</i>	欧州
<i>B. lusitaniae</i>	病原性?	?	<i>I. ricinus</i>	地中海周辺地域
<i>B. valaisiana</i>	病原性	鳥類	<i>I. ricinus</i>	欧州
<i>B. valaisiana</i> (Am501)	病原性?	?	<i>I. columnae</i>	日本
<i>B. valaisiana</i> 関連群	病原性?	小型齧歯類	<i>I. granulatus</i>	アジア南部, 沖縄
<i>B. japonica</i>	病原性がない, もしくは極めて弱い	小型齧歯類	<i>I. ovatus</i>	日本
<i>B. sinica</i>	病原性?	小型齧歯類	<i>I. ovatus</i>	中国中部
<i>B. tanukii</i>	病原性?	小型齧歯類	<i>I. tanuki</i>	日本, ネパール
<i>B. turdi</i>	病原性?	鳥類	<i>I. turdus</i>	日本
<i>B. andersonii</i>	病原性がない, もしくは極めて弱い	ウサギ	<i>I. dentatus</i>	米国
<i>B. bissettii</i>	病原性がない, もしくは極めて弱い	小型齧歯類, ウサギ	<i>I. pacificus</i> , <i>I. spinipalpis</i>	米国

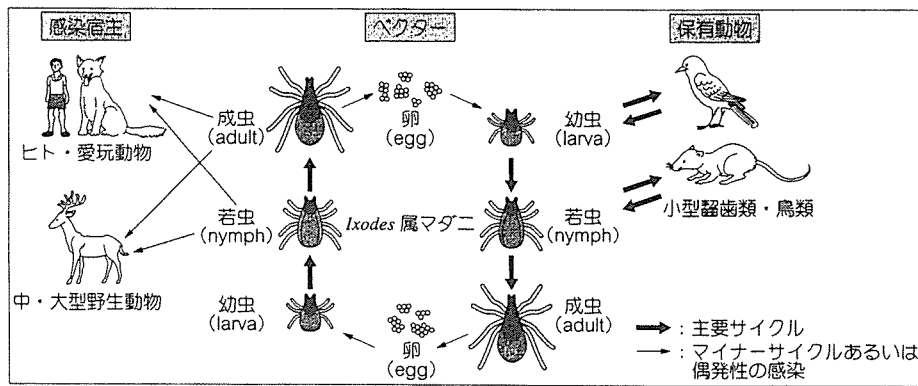


図2 ライム病関連ボレリアの維持伝播サイクル

自然界ではボレリアは *Ixodes* 属マダニ種と野生動物の間で維持伝搬されている。

dermatitis chronica atrophicans : ACA), 慢性脳脊髄膜炎, 慢性角膜炎等を呈すようになる²⁾。これまでに膨大な分子疫学的研究によりボレリア遺伝種と媒介マダニ種, 保有体, 患者の臨床症状との間に関連があることが明らかとなってきた。表1に示すように媒介マダニ種とボレリア種の間にはかなり厳密である。*B. afzelii* は小型齧歯類を, *B. garinii* は小型鳥類(一部に野鼠を保有体とするタイプもある)を, *B. spielmani* はヤマネの仲間を保有体とし, マダニを媒介者として両者間で維持伝播される。*B. garinii* は神経症状を, *B. afzelii* はACAなどの皮膚症状を惹起する。日本の患者では初期症状のEMと随伴症状が見られるが, それ以後の続発症状はまれである。日本に*B. afzelii* は明らかに存在するが, ACA患者はこれまで知られていない。

III ライム病ボレリアの遺伝種分類法

ライム病ボレリアの分類は基本的にその他の細菌の系統分類と同様に, ゲノムのDNA/DNAハイブリダイゼーション解析によって行われる。2つの異なるボレリア株間のゲノム相同性が70%以上であれば同種とし, それ以下であれば種を別とする。遺伝子配列解析が機械化され, 膨大な遺伝子情報が利用できるようになった。ライム病ボレリアのゲノムは1997年に直鎖状染色体が, 2000年には直鎖状および環状プラスミドを含むすべてのゲノムの解読が終わった。16SリボソームRNA遺伝子や鞭毛遺伝子配列に基づく系統解析が広く取り入れられ, さらに簡便に遺伝種

152 (454)

を同定する手段としてライム病ボレリアの5S-23SリボソームRNA遺伝子間スペーサー領域の制限酵素断片長多形性解析(RFLP)も利用されている。

IV 日本のライム病ボレリア種と分布, 媒介マダニ種との関係

日本では1987年に初のライム病患者が見出され, 病原体の発見には至っていなかった。我々はマダニから病原体の分離に着手した。当時はポリメラーゼ連鎖反応(PCR)はまだ誰でも利用できる技術ではなく, マダニからボレリアの分離培養を行っていた。ライム病ボレリアの培地(BSK II培地)は, きわめて複雑な組成で調製も容易ではなかった。また, ライム病ボレリアの増殖はきわめて遅く, 初期培養では1カ月から数カ月の培養期間を必要とした。1989年に佐藤七七郎(北海道立衛生研究所), 宮本健司(旭川医科大学)らは北海道でシュルツェマダニ, 並びにヤマトマダニ(*I. ovatus*)からライム病ボレリアの分離に成功し, その性状解析を分担した⁴⁾。その後, 我々も遅ればせながら富士山で採取したこの2種のマダニからライム病ボレリアの分離に成功した⁵⁾。

当時は, 分離株の菌体タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン解析や単クローン抗体との反応性に基づく同定分類を行っていた。欧米分離株, 並びに日本のシュルツェマダニおよびヤマトマダニ由来株の性状比較から, シュルツェマダニ由来株の中には欧州の株に類似のものが存在するが, 米国のものとは異なるこ

と、一方ヤマトマダニ由来株はユニークであることを明らかにした⁶⁾。

それまでライム病ボレリアは *B. burgdorferi* ss の 1 種と信じられていた。Baranton らにより、欧州に存在するが米国には見られない新種 *B. garinii*⁷⁾ と *B. afzelii* の記載がなされた。この結果、米国に存在するライム病ボレリアは *B. burgdorferi* ss の 1 種であり、一方欧州には *B. burgdorferi* ss のほかに *B. garinii* と *B. afzelii* が存在することとなった。我々もこれとほぼ平行して、日本のヤマトマダニ由来株を新種 *B. japonica* と記載した⁸⁾。米国の研究者らは新しいライム病関連ボレリア種の記載は混乱を招くだけであるとして、すぐにはこれを受け入れなかった。その後、ボレリア種と患者病態、ボレリア種と媒介マダニ種、ボレリア種と保有動物種との関係などが明確になり、この分類は現在では完全に受け入れられている。その後、次々と新しいライム病関連ボレリアの発見と新種の記載がなされ、今日では少なくとも 12 種に分類されるに至った⁹⁾。

野生齧歯類や媒介者であるマダニからの病原体の検索は、中尾稔、宮本(旭川医科大学)、福長将仁(福山大学)を中心に精力的に行われ、国内におけるその全貌は 1990 年代半ばまでにはほぼ明らかとなった。すなわち、比較的夏涼しい地域(最高気温が 25℃ 以下ぐらい)の地域に棲息するシュルツェマダニは *B. afzelii* と *B. garinii* を保有し、これらはヒトに対して病原性を示す。一方、比較的温暖な地域にも棲息するヤマトマダニによって媒介される *B. japonica* は、ヒトに対しては全くあるいはほとんど病原性を示さない。ライム病はシュルツェマダニが棲息する北海道や長野で発生する事実とも一致し、日本における媒介者が確定した。

V 世界規模でのボレリア分布と伝播サイクルの解析

米国や欧州の研究者も同様の研究を展開し、その現状が 90 年代後半までにはほぼ明らかとなっていた。その一方で、日本から欧州に至るアジア地域におけるライム病ボレリアの実態は全く不明であった。そこで我々は、未知の領域を開拓するために、これらの地域に赴き試料の採取とボレリアの分離、及びその分離株の性状解析に関わる

野外調査を展開するに至った。流行となりつつあった PCR などを基盤技術とする molecular epidemiology (分子疫学) 研究の実践であった。

極東ロシア地域(サハリンを含む)、中国東北部、韓国全土、台湾本島と台湾が統治する中国の沖合数 km にある軍事拠点の金門島、中国揚子江流域、新疆ウイグル自治区、ネパール、タイ北部、さらにモスクワ周辺地域、欧州側のトルコ(トラキア)とアジア側のトルコ(アナトリアの黒海沿岸地域)の現地調査を行うに至った(図 3)^{3, 9~17)}。ユーラシア大陸北部にはシュルツェマダニによって媒介される *B. garinii* と *B. afzelii* が分布するが、*B. burgdorferi* ss は存在しない。我々の研究結果と矛盾して、中国と台湾の研究者は、それぞれの国に *B. burgdorferi* ss が存在すると報告していたが、今日ではそれが誤りであることは欧米の研究者も認めるところとなった。

さらには、我々は現在第 13 番目の種として記載しうるボレリアを沖縄や台湾、中国の揚子江流域、韓国東部で採材した野生齧歯類およびミナミネズミマダニ(*I. granulatus*)より分離した^{12~14, 18)}。欧州の *B. valaisiana* に近縁だが、*B. valaisiana* はリシヌマダニ(*I. ricinus*)を媒介者とし鳥類を保有体とすることから、アジアのこのボレリアとは異なっている。ミナミネズミマダニはヒトに対する嗜好性が強くないことから、媒介者としては重要でないと考えられる。しかしながら偶発的な刺咬による感染の可能性はいまだ否定できない。

調査地域を欧州まで広げ、アジアの媒介者であるシュルツェマダニと欧州の媒介者であるリシヌマダニがともに棲息する地域で、それぞれが保有するボレリア種の解析を行った。シュルツェマダニは *B. garinii* と *B. afzelii* を保有するが、*B. burgdorferi* ss は保有しないこと(図 4)、一方、欧州のベクターであるリシヌマダニは *B. garinii*、*B. afzelii*、*B. burgdorferi* ss、病原性が不明な *B. valaisiana* と *B. lusitaniae* を媒介することが示されていた。さらに我々やパスツール研グループの研究から、*B. garinii* は 5S-23S リボソーム RNA 遺伝子間スペーサーの PCR-RFLP 解析により鑑別可能な 2 サブタイプ(ユーラシア型とアジア型)が存在すること、シュルツェマダニはこの両サブタイプの *B. garinii* を保有するが、欧州のリシヌマ

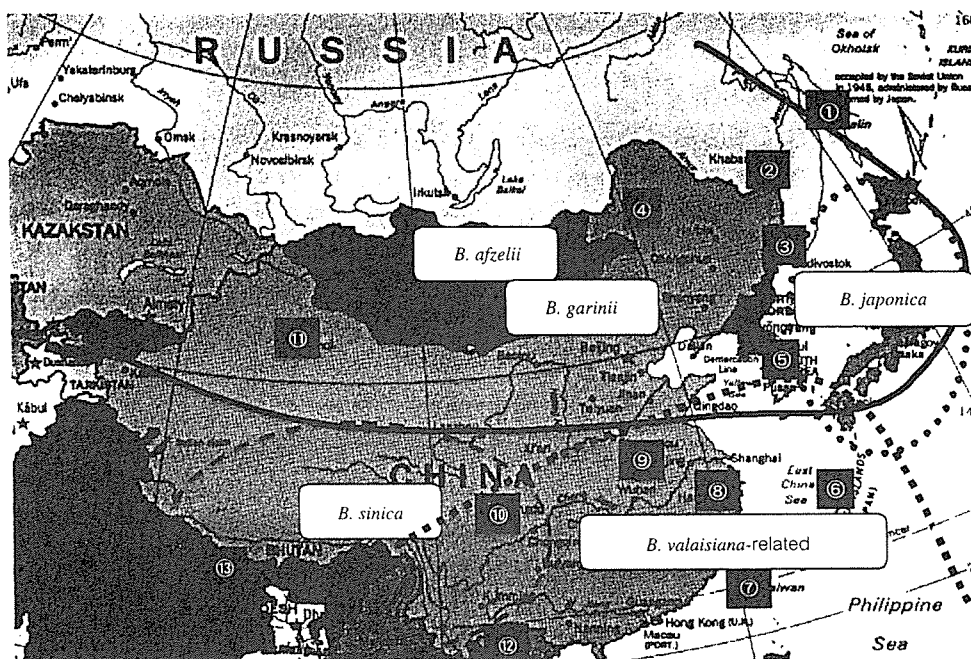


図3 調査地点(1995年から現在)とライム病関連ボレリアの分布

① サハリン, ② ハバロフスク, ③ ウラジオストク, ④ ヤケシ(内モンゴル), ⑤ 春川, 忠洲, 海南(韓国), ⑥ 沖縄, ⑦ 金門島, 台中, 阿里山(台湾), ⑧ 杭州, ⑨ 黄山, ⑩ 成都, ⑪ ウルムチ, ⑫ チェンマイ(タイ), ⑬ ネパール, 他モスクワ周辺地域, トルコ黒海周辺, ヨーロッパ側のトルコ(トラキア), 現在はベオグラード(セルビア-モンテネグロ), イルクーツク(ロシア)との共同研究も展開中。

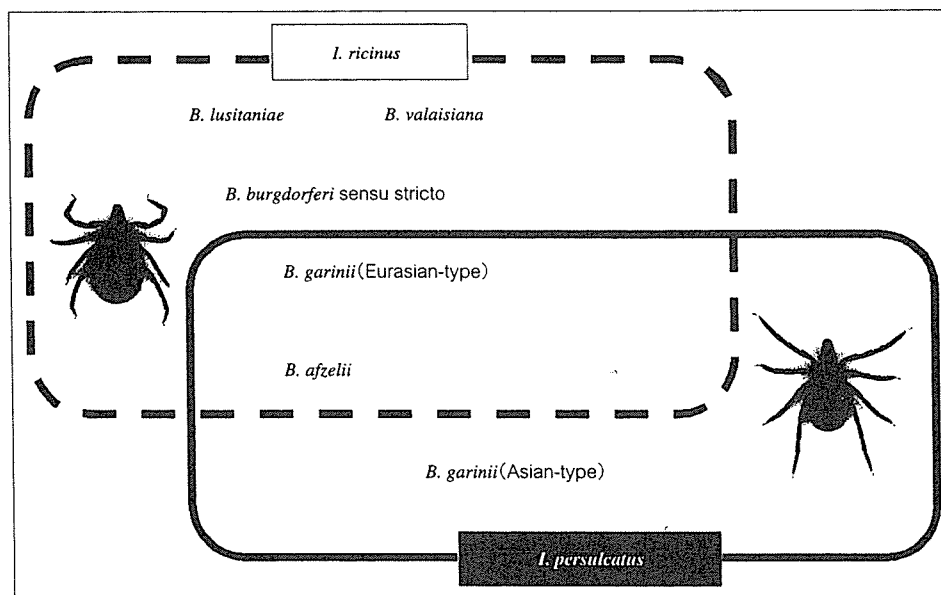


図4 シュルツェマダニ (*I. persulcatus*) とリシヌスマダニ (*I. ricinus*) の保有するライム病関連ボレリアの関係
シュルツェマダニは *B. garinii* と *B. afzelii* を保有するが, *B. burgdorferi* ss は保有しないこと, 一方, 欧州のベクターであるリシヌスマダニは *B. burgdorferi* ss と *B. afzelii*, *B. garinii* (ユーラシア型) を保有するが, *B. garinii* (アジア型) は媒介しない。

写真はそれぞれのマダニ種の雌成虫。

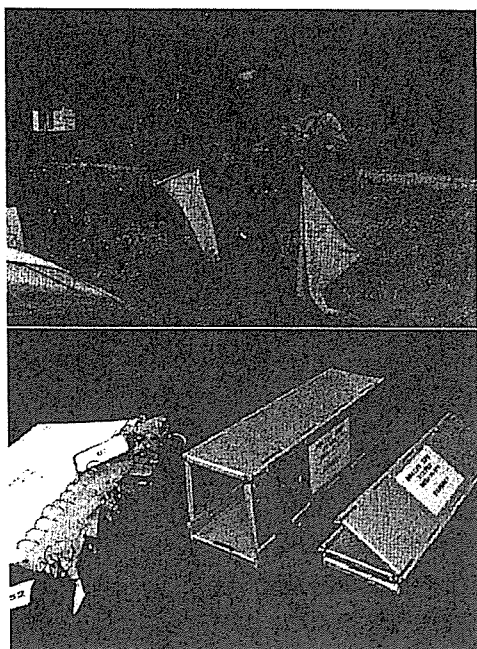


図5 ロシアにおけるマダニ採取時の記念写真(写真上)と野鼠捕獲用シューマン型トラップ(写真下)

(写真上)中央は共同研究者のI.G. Kharitonov教授(モスクワ大学)と地方衛生局職員とその家族。手に持っている白い旗を草むらで引きずるとマダニが旗に付着し、これを採取する。ロシアの森は日本の山林と違い、深く、森のなかに道もないので、迷うと大変なことになる。一度実際に迷ってしまった。蚊が多く、蚊に対する対策も必要であった。

(写真下)野鼠捕獲用のシューマン型トラップ。アルミ製で簡単に折り畳むことができ、可搬性に優れる。

ダニはユーラシア型 *B. garinii* しか保有しないことが、それぞれ両地域からの研究により示された。このようなライム病ボレリア種の分布の違いはボレリアの地理的分布の違いに基づいているのか、あるいは媒介マダニ種の分布によって規定されているのかは不明であった。

我々は欧州とアジアの中間に位置し、この2種類のマダニがともに棲息するモスクワを調査地点として選んだ(図5)。この地域で採取した両マダニ種から分離されるボレリア種を分析することにより、回答を導き出そうとしたのである。多くの困難と感染の危険を伴う調査を行い、両マダニが

ともに棲息する地域においても、マダニ種とボレリア種の間特定の関係が形成されていることを確認した(図4)¹⁶⁾。近縁なこの2種のマダニ種シュルツェマダニとリシヌスマダニの間で保有するボレリア種の違いを明確にすることができた。このマダニ内でのボレリア種選別の分子機構は未だ不明である。マダニ中腸にライム病ボレリアの主要表層タンパク質 outer surface protein A (OspA) に対する受容体が存在することが報告された。この OspA 受容体により規定されているのかもしれない。

マダニ、野生齧歯類から分離されたボレリアの性状解析により、維持伝播サイクルと分布をほぼ解明することができた(図6)。もちろんさらに新しいものが見つかる可能性はある。事実トルコではライム病ボレリアとも回帰熱ボレリアとも異なる新種のボレリア *B. turcica* を発見した(図7)¹⁹⁾。我々の研究から現地に棲息するマダニ種が分かれば、そのマダニが保有するボレリア種も推定でき、さらにはそのボレリア種によって誘発される患者病態も推定できるようになり、適正な診断・治療を実現する上で必要な情報を提供したと信じている。

VI 新展開 ヒト顆粒球アナプラズマ症

1994年米国で、それまでウマやヒツジの感染症として知られていた顆粒球型エーリキア症病原体 (*Anaplasma phagocytophilum*, 旧 *Ehrlichia phagocytophila* と *Ehrlichia equie*) がヒトに感染することが明らかとなった。媒介者はライム病ボレリアと同じく米国ではシカダニ (*I. scapularis*)、欧州ではリシヌスマダニである。このためライム病とアナプラズマ症の共感染による患者病態の複雑化の可能性が指摘されてきた。

アナプラズマはリケッチアの一つであり、好中球に特異的に感染し細胞質内にモルラと呼ばれる桑の実状のマイクロコロニーを形成する。偏性細胞内寄生菌で、その培養は容易ではない。分子生物学的研究手法が一般化するまでは、ごく一部の研究者が扱える特別な微生物であった。我々は、日本におけるアナプラズマ症病原体の存在の有無の調査に着手した。富士山周辺部から調査を開始し、山梨県、長野県調査を展開していた。ついに

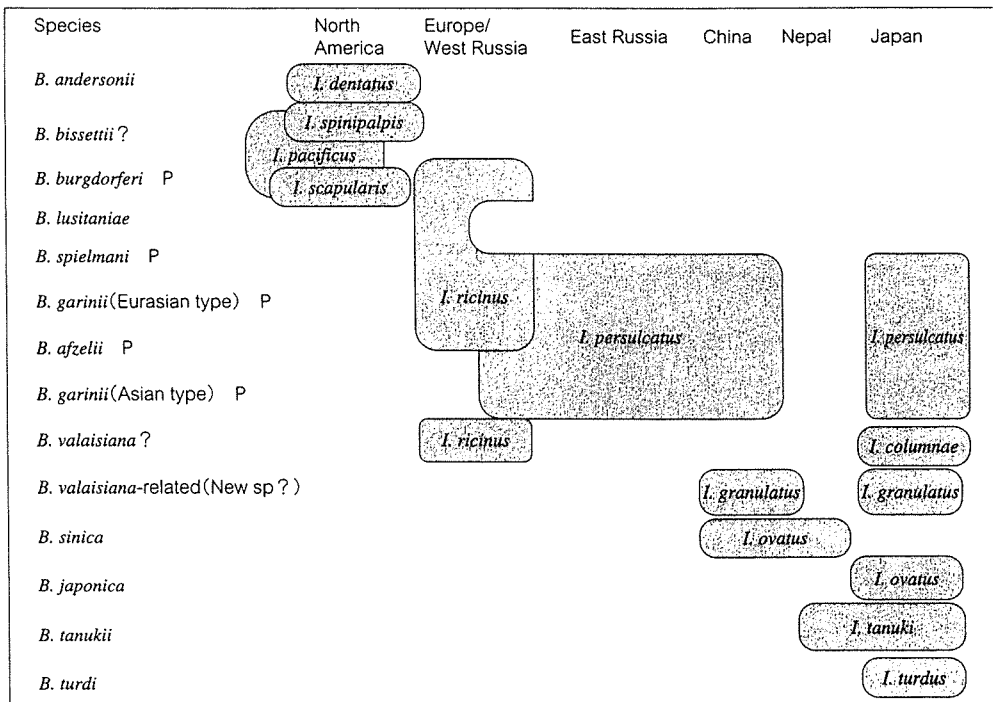


図6 ライム病関連ボレリア種の地理的分布と媒介マダニ種との関係

マダニ、野生齧歯類から分離されたボレリアの性状解析により、維持伝播サイクルと分布をほぼ解明することができた。Pは病原性種、その他は病原性が不明、または非病原性。

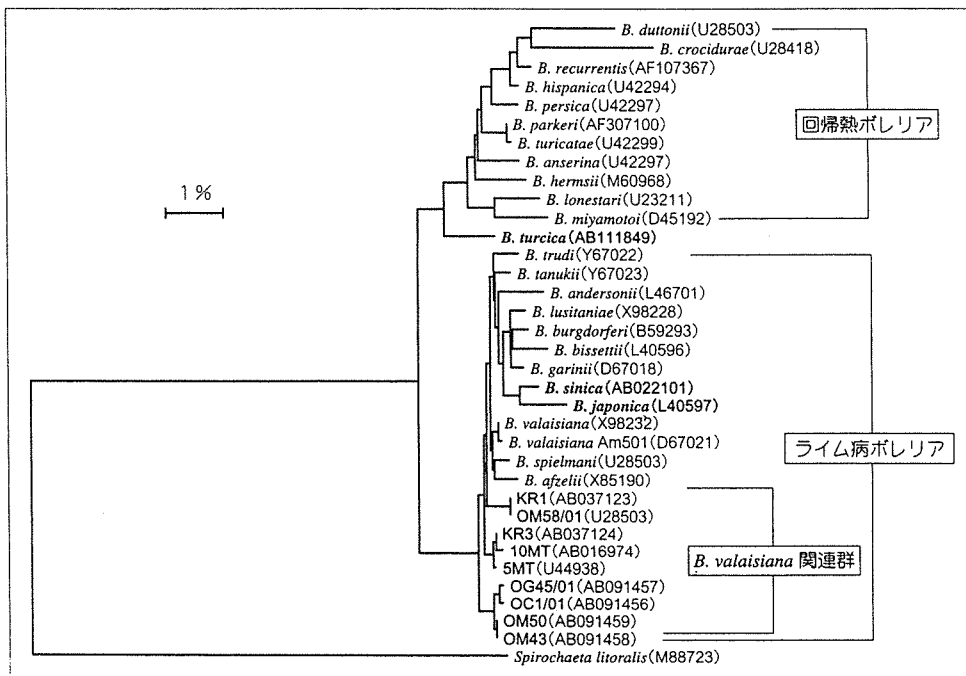


図7 16S リボソーム RNA 遺伝子配列に基づく系統樹

ライム病関連ボレリア種及び回帰熱関連ボレリア種とトルコで発見された新規なボレリア種 *B. turcica* との関係。筆者は *Borrelia japonica*, *B. sinica*, *B. turcica* の新種記載を行った。また、アジアの南部で見つかった *B. valaisiana* 関連ボレリアは将来新種として記載できるかもしれない。

シュルツェマダニおよびヤマトマダニからアナプラズマの *p44* 遺伝子ファミリー増幅産物を検出し、日本におけるその存在を明確にした²⁰⁾。今後、調査地域を拡大して、その病原体の分布、保有率を明らかにし、患者の探索を行い、日本におけるアナプラズマ症の実態を解明するのが目下の研究テーマである。

Ⅶ おわりに

1995年から調査を現在まで継続し、調査地を増やすことで点は線となり、さらに面となった。調査地域の治安、交通、各種感染症に対する対処(ダニ脳炎ウイルス、ハンタウイルスなど、もちろんライム病感染の危険性も含めて)、研究資材の運搬・搬入、入国の審査などの多くの難題を、現地の協力者と信頼関係を築くことで解決しながら、調査を実施することができた。国内の共同研究者の危険と労苦をいとわない協力があつたことは言うまでもない。この場をお借りして感謝申し上げます。国内外の研究協力者とは今日でも深い共同研究関係が築かれている。

少なくともライム病の研究を始める以前は普通の?細菌研究者であつたと思う。今は野外調査をしている人とのレッテルが貼られているように思われるが、この他にライム病ボレリアのプロテオミクスやレプトスピラの走化機構の研究などスピロヘータの分子生物学的研究も行っている。

このボレリアの分子疫学調査については、多くの国際学会に招待され講演を行ってきた。ともすればこのような泥臭い野外調査は、アカデミックな研究としては評価されにくいものだが、欧米の研究者の間では評価されているようだ。このような研究も必要であることを理解していただければ幸いである。

文 献

- 1) Steere AC, et al. : Lyme arthritis : an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* 20 : 7-17, 1977
- 2) Steere AC : Lyme disease. *N Engl J Med* 345 : 115-125, 2001
- 3) Masuzawa T : Terrestrial distribution of the Lyme borreliosis agent, *Borrelia burgdorferi* sensu lato in East Asia. *Jap J Infect Dis* 57 : 229-235, 2004
- 4) Masuzawa T, et al. : Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *Ixodes persulcatus* in Hokkaido, Japan. *J Clin Microbiol* 29 : 1568-1573, 1991
- 5) Masuzawa T, et al. : Immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from the *Ixodes ovatus* in Shizuoka, Japan. *Microbiol Immunol* 35 : 913-919, 1991
- 6) Masuzawa T, et al. : Comparison of OspA serotypes for *Borrelia burgdorferi* sensu lato from Japan, Europe and North America. *Microbiol Immunol* 40 : 539-545, 1996
- 7) Baranton G, et al. : Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* 42 : 378-383, 1992
- 8) Kawabata H, et al. : Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* 37 : 843-848, 1993
- 9) Sato Y, et al. : Prevalence of the Lyme disease spirochete in *Ixodes persulcatus* and wild rodents in far eastern Russia. *Appl Environ Microbiol* 62 : 3887-3889, 1996
- 10) Masuzawa T, et al. : Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in far eastern Russia. *Microbiol Immunol* 41 : 595-600, 1997
- 11) Li M, et al. : Lyme disease *Borrelia* species in northeastern China resemble those isolated from far eastern Russia and Japan. *Appl Environ Microbiol* 64 : 2705-2709, 1998
- 12) Masuzawa T, et al. : Determination of members of a *Borrelia afzelii*-related group isolated from *Ixodes nipponensis* in Korea as *Borrelia valaisiana*. *Int J Syst Bacteriol* 49 : 1409-1415, 1999
- 13) Masuzawa T, et al. : Characterization and identification of *Borrelia* isolates as *Borrelia valaisiana* in Taiwan and Kinmen Islands. *Microbiol Immunol* 44 : 1003-1009, 2000
- 14) Masuzawa T, et al. : *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 51 : 1817-1824, 2001
- 15) Takada N, et al. : Lyme disease *Borrelia* spp. in

- ticks and rodents from northwestern China. *Appl Environ Microbiol* 67 : 5161-5165, 2001
- 16) Masuzawa T, et al. : Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated in Moscow province-a sympatric region for *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*. *Int J Medical Microbiol* 294 : 455-464, 2005
- 17) Güner ES, et al. : First Isolation and Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains from *Ixodes ricinus* ticks in Turkey. *J Med Microbiol* 52 : 807-813, 2003
- 18) Masuzawa T, et al. : New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals Okinawa archipelago, Japan. *J Med Microbiol* 53 : 1-6, 2004
- 19) Güner ES, et al. : *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick, *Hyalomma aegyptium*, Turkey. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 : 1641-1652, 2004
- 20) Ohashi N, et al. : *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerg Infect Dis* 11 : 1783-1788, 2005

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

増澤俊幸*¹ 岡本能弘*¹ 宇根有美*² 竹内隆浩*³
塚越啓子*³ 川端寛樹*⁴ 小泉信夫*⁴ 吉川泰弘*⁵

要約

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¹⁾。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。厚生労働省科学研究費研究班に協力して、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てきた。その過程でアメリカモモンガを起源とする人の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。

はじめに

レプトスピラ症は野生齧歯類等を保有体とするスピロヘータ感染症であり、感染症法上第4類に指定されている。レプトスピラは保菌動物腎臓に長期にわたり定着し、尿中に排出される。排出されたレプトスピラは人や動物に経皮

あるいは経粘膜感染する²⁾。近年輸入動物を介した感染症の侵入が危惧されてきた。今回、アメリカより輸入されたアメリカモモンガに起因するレプトスピラ症の発生を経験し、患者診断だけでなく、感染源の特定と分離レプトスピラの性状解析を行った³⁾。

1. 材料と方法

患者の血清学的、ならびに遺伝学的診断は、顕微鏡凝集試験 (microscopic agglutination test ; MAT) ならびに鞭毛遺伝子 *flaB* を標的とした PCR により行った。QIAamp DNA mini kit (キアゲン)、または QuickGene-800DNA 抽出機 (フジフィルム) を用いて患者血清または全血、動物の膀胱組織および分離レプトスピラより PCR 用鋳型 DNA を調製した。レプトスピラの分離は、動物の腎臓乳剤または患者全血を EMJH 培地に添加後 30°C で 2~4 週間培養した。分離株の性状解析は、レプトスピラ鞭毛遺伝子 *flaB*、ならびに DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 *gyrB* の配列解析、およびパルスフィールドゲル電気泳動による全ゲノムの *Not I* 制限酵素断片長多形性解析 (RFLP) により行った。

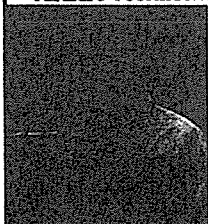
*¹Toshiyuki MASUZAWA (写真・コメント) & Yoshihoro OKAMOTO : 千葉科学大学薬学部免疫微生物学研究室 (〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3番地)

*²Yumi UNE : 麻布大学獣医学部病理学研究室 (〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71)

*³Takahiro TAKEUCHI & Keiko TSUKAGOSHI : 静岡済生会総合病院血液内科 & 神経内科 (〒422-8527 静岡県静岡市駿河区小鹿1-1-1)

*⁴Hiroki KAWABATA & Nobuo KOIZUMI : 国立感染症研究所細菌第一部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)

*⁵Yasuhiko YOSHIKAWA : 東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学研究室 (〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1)



ここ10年ぐらいでフィールドワークの道にどっぷりはまり込み、抜けられなくなりつつあります。薬学部に所属しながら、マダニやネズミを追いかける研究をしていますので、変わったことをしていると思われるようです。世界中のいろいろなところに行きましたが、マダニや野生齧歯類の生息するところばかりで、観光と縁のないところがほとんどです。しかし、それ故通常の学会出張などでは絶対に得られない、貴重な体験を沢山しました。また、機会がありましたら。

表 1 顕微鏡凝集試験 (MAT) による患者血清診断結果

種名	抗原		採血日	
	血清型	株	凝集抗体価	
1 例目			4/24	5/9
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM1	< 50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	< 50	800
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	< 50	100
2 例目			6/2	6/15
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa?	AM3	< 50	200
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	< 50	200

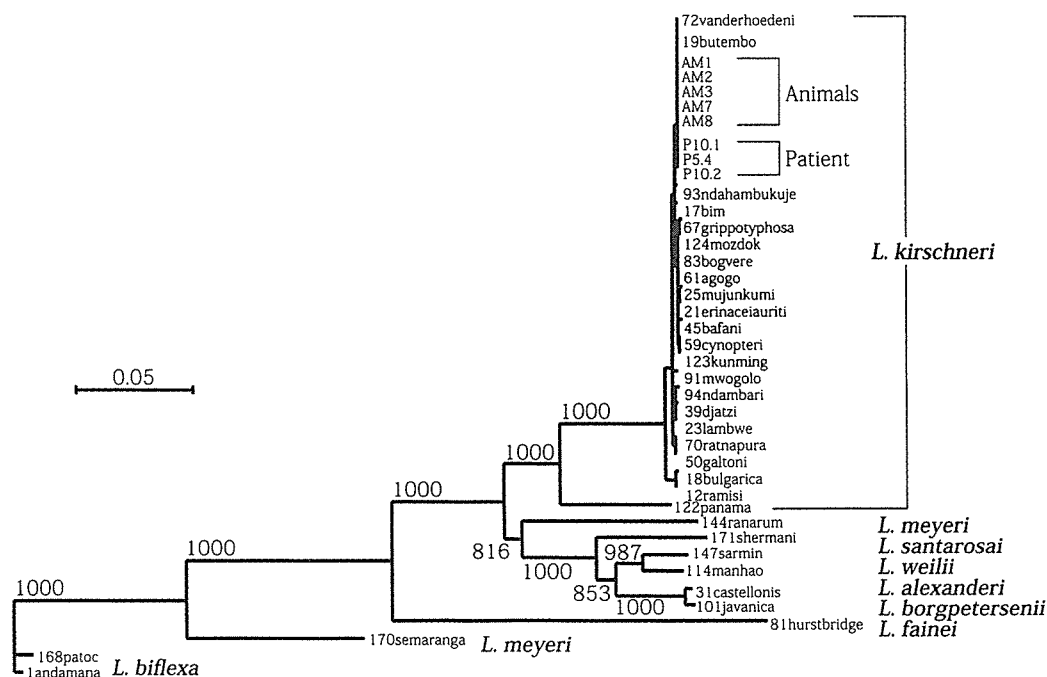


図 1 *gyrB* 塩基配列解析に基づく患者, アメリカモモンガ分離株の遺伝種同定

2. 症 例

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, 腰痛および倦怠感, 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。1 例目の患者は 2005 年 4 月 22 日に, 2 例目は同年 6 月 1 日に発病した。臨床経過なら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。

3. 診 断

厚生労働科学研究費新興・再興感染症研究事業「輸入動

物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究」研究班 (主任研究者 吉川泰弘教授) の研究の一環として, この輸入業者より動物を買い上げ各種病原体の保有調査を実施して, その中でレプトスピラについても検索を行っていた。この輸入業者より買い上げた動物 8 種 (計 86 匹のうち, アメリカモモンガ (*Glaucomys volans*) の腎臓培養では 10 匹中 5 匹よりレプトスピラの増殖を確認した。その他の試験した輸入動物からは検出しなかった。感染源としてアメリカモモンガを疑った。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

表2 交差凝集試験による患者、アメリカモモンガ分離株の血清型同定

Antisera	アメリカモモンガ分離株					患者分離株		
	AM1	AM2	AM3	AM4	AM7	p5.4	p10.1	p10.2
α -Grippotyphosa	6400	6400	6400	6400	6400	6400	3200	3200
α -Icterohaemorrhagiase	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Copenhageni	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Autumnalis	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Hebdomadis	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Australis	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Javanica	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100
α -Castellonis	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100	< 100

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 (表 1)。

4. 分離株の性状比較・鑑別・同定

患者、ならびにアメリカモモンガ由来の 5 株は *flaB*, *gyrB* 配列解析 (図 1), 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 2) 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, ならびに患者分離株, 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³⁾。分離株は *Leptospira kirschneri* serovar (血清型) Grippotyphosa と同定した。この血清型は米国においては, 犬, 家畜, 人のレプトスピラ病起因血清型としてありふれたタイプである^{4,5)}。偶然沖縄にも存在する血清型であったために, 我々は免疫抗血清を保有していた。このような幸運が重なり血清型の同定に成功した。我々は過去にも輸入動物のアフリカヤマネがレプトスピラを保有している事実を明らかにしてきたが⁶⁾, 今回輸入動物を介した人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。

おわりに

我々は輸入動物を介した病原体の侵入と人の感染リスクの存在を示した。2005 年 9 月よりすべての輸入動物に対して衛生証明書の提出が義務づけられるようになったが, 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。今後も輸入動物を介した病原微生物の侵入に対して監視を続けていく必要がある。

引用文献

- 1) 吉川泰弘: 厚生科学研究費 新興・再興感染症研究事業 輸入動物に由来する新興感染症侵入防止対策に対する研究 平成 15 年度研究成果報告書
- 2) 柳原保武 (2004): レプトスピラ病 人獣共通感染症, 256-261. 医薬ジャーナル社.
- 3) 大輪達仁, 長坂好洋, 三木 朗 (2005): 病原微生物検出情報 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 - 静岡県 (概要), 26, 209-211.
- 4) Anderson, D.C., Folland, D.S., Fox, D.S. et al. (1978): *Am. J. Epidemiol.* 107, 538-544.
- 5) Khan, M.A. & Goyal, S.M. (1991): *J. Wild. Dis.* 27, 248-253.
- 6) 増澤俊幸: 厚生労働科学研究費 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および迅速診断法の確立に関する研究 平成 15 年度研究成果報告書.



ヒトと動物のレプトスピラ感染症



増澤 俊幸

ますざわ としゆき



岡本 能弘

おかもと よしひろ

千葉科学大学 薬学部 免疫/微生物学研究室

銚子市に新設された千葉科学大学（岡山理科大の姉妹校です）に、所属を移して、1カ月で遭遇したのが本原稿で紹介しました輸入動物アメリカモモンガを介したレプトスピラ症の発生でした。感染源を特定し、それ以上の感染拡大を阻止することができました。表だった事件に発展することは、そうそう無いと思いますが、水面下では輸入動物を介した感染症の侵入は起こっているのではないかと推測します。対応を一つ誤ると大惨事に発展しかねない、危うい状況にあることを認識しなくてはなりません。

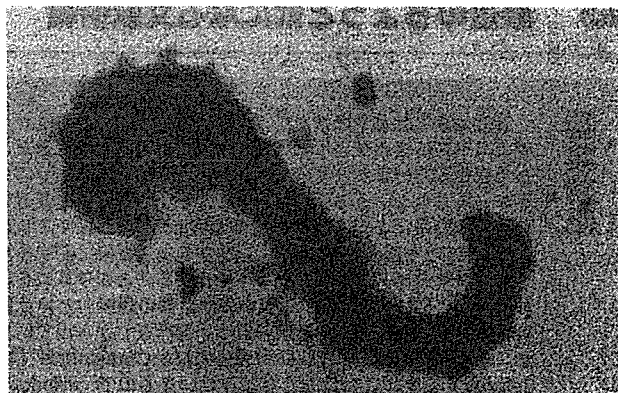
はじめに

黄疸出血性レプトスピラ症（ワイル病）は古くよりその存在が知られていたが、臨床病態について詳細な記述を行ったのはハイデルベルグの医師Adolf Weil（1886年）である。病原体であるレプトスピラは1914年九州大学の稲田龍吉らにより黄疸を呈した坑夫から分離され、感染源は炭坑に生息する野鼠であることが明らかにされた（6）。1918年野口英世の提案で属名が *Leptospira* に改められた。1987年以前は、レプトスピラは病原性の *L. interrogans* と非病原性の *L. biflexa* の2種に大別されていたが、現在は分子生物学的分類法が

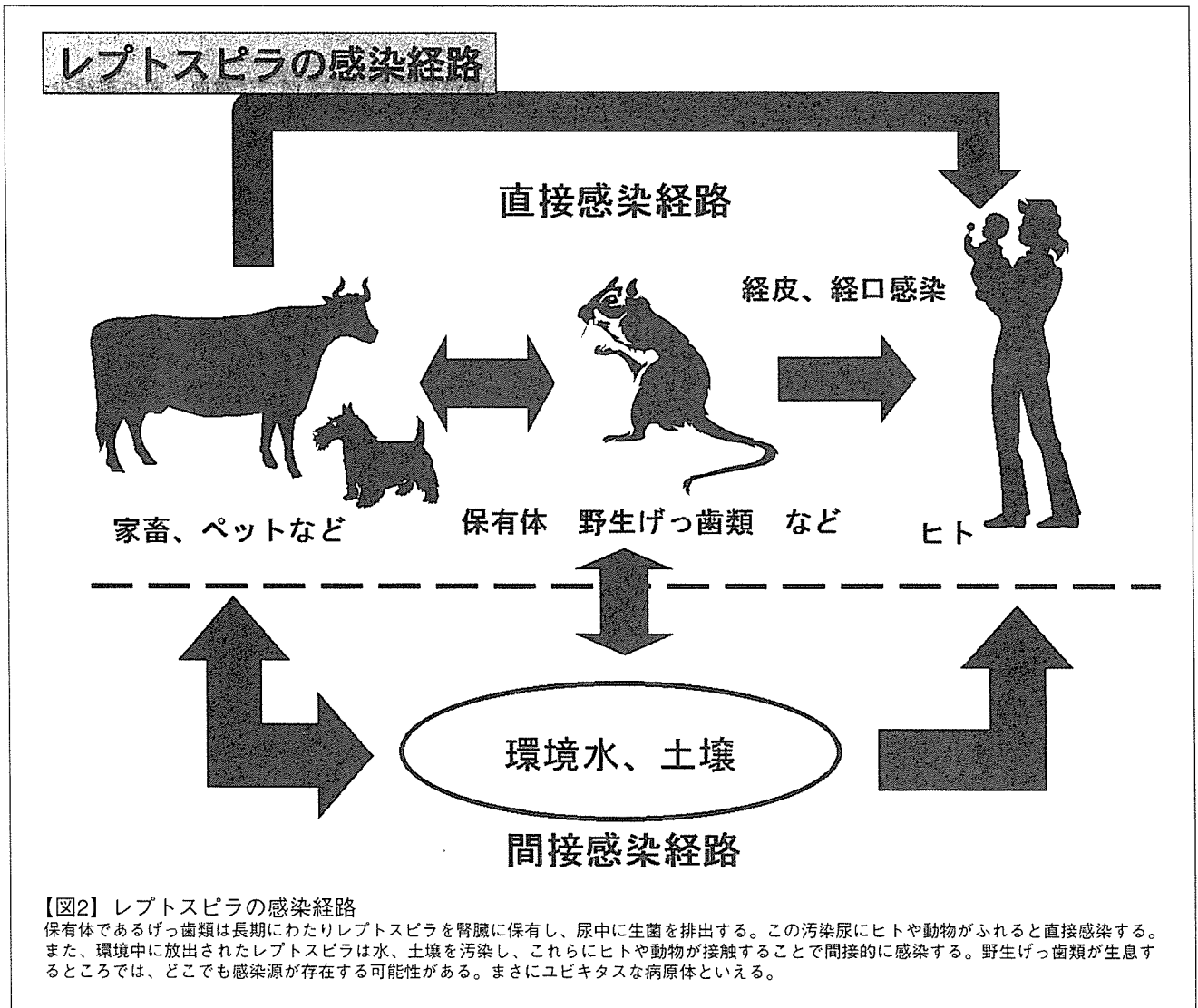
導入され、13遺伝種と種名がない4遺伝群に分類されている（10）。さらには、免疫学的性状に基づき250以上の血清型（serovar）に分類されている。予防ワクチン、血清診断は血清型特異的であるため、今日でもこの血清型分類は広く利用されている。臨床家には血清型分類の方が身近であると思われるので、本稿では以後は血清型分類に基づく表記のみを行うこととする。本症はヒトでは感染症法4類全数把握疾患に、家畜伝染病予防法では牛、水牛、鹿、豚、猪、犬を対象動物としてレプトスピラ血清型 Pomona, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Grippotyphosa, Hardjo, Autumnalis, Australis が届出伝染病に指定されている。

レプトスピラの性状

レプトスピラはスピロヘータ科に属するグラム陰性好気性細菌で菌体は細長いらせん状（直径0.1 μ m、長さ6~20 μ m）を呈し、“?”マークのごとくに両端はフック状に湾曲している（図1）。細胞体両先端付近に端を発する各1本の鞭毛は外被に包まれ菌体外に遊離するこ



【図1】レプトスピラの透過型電子顕微鏡像
コルクスクリュー状のらせん形を呈し、長短はフック状に曲がる。菌体の中心を貫く鞭毛がみえる。



となく独特の運動性を示す。通常の染色法では染まりにくく、また活発な運動を観察するには暗視野顕微鏡が最適である。28～30℃の培養で、1～2週間で増殖する(1, 2, 3)。

感染機序

レプトスピラは80種以上のげっ歯類をはじめトリ、ヘビ、ダニ、カエル、魚など120種を超える多種、多様な動物から分離され、ヒトは終末宿主である。野鼠は長期に渡りレプトスピラを腎臓に保有し、尿中に生菌を排出する。ヒトや動物はこのレプトスピラが含まれる尿に直接ふれることで、あるいはレプトスピラで汚染された水、土壌を介して間接的に経皮、あるいは経

口的に感染する(図2)。高湿な熱帯では、環境中で長期にわたりレプトスピラが生存可能であるため、中南米、東南アジア諸国で大規模な患者発生がたびたび見られる(16, 17, 20)。日本では古来より秋疫、用水病、七日熱等の名前で呼ばれる秋季レプトスピラ症として知られていたが、農業の機械化が進んだ今日では患者は激減した。一方、現在の日本ではむしろ水泳、カヌーなどの水遊び、あるいは海外旅行での感染や動物との接触による感染が目立ってきている(13, 20)。

臨床症状と治療

ヒトのレプトスピラ症では発熱、全身倦怠、筋痛、結膜充血などの症状が見られる(9)。重症型のレプトス