

を行った。輸入蠕虫症や動物由来蠕虫による幼虫移行症は今日の社会背景に則れば増加が予想されるが、一部の幼虫移行症を除いてヒトの感染を把握する技術が未整備である。国内ではイヌ回虫はイヌ集団において比較的高頻度で維持されていることが示唆され、ヒトの感染リスクは低くない。また、イヌ回虫症の免疫診断は未だ標準化が未整備で、眼トキソカラ症の免疫診断の信頼性についても、今後さらに情報蓄積が必要である。防疫の観点からは、蠕虫の感染源の特定は有用な情報であるが、日本を含む東アジアの各種蠕虫の地理分布による遺伝的差異を、鑑別マーカーにすることが出来るなら、保健行政上もインパクトが高い。今後も引き続いて同様の研究を行い、情報整備と対策戦略確立に資する予定である。

E. 健康危険情報

該当せず

F. 研究発表

論文発表

Akao N, Ohta N. Toxocariasis in Japan. *Parasitol Int*, 56:87-93, 2007.

Ohta N, Waikagul J. Disease burden and epidemiology of soil-transmitted helminthiases and schistosomiasis in Asia: the Japanese perspective. *Trends in Parasitol*, 23:30-35, 2007.

Jin Z, Akao N, Nobuota T, Ohta N. An improved method for recovery of muscle-stage larvae from mice infected with *Toxocara canis*. *J Parasitol*, (in press)

太田伸生 駆虫薬-小児の寄生虫駆除の問題点 小児科臨床 60 : 2367-2372,2007.

学会発表

金 宗范、赤尾信明、太田伸生 トキソカラ属回虫感染マウスにおける幼虫の母子間移行に関する経乳汁感染の成立機序 第76回日本寄生虫学会総会、

2007年3月、大阪

秋山隆志、今井乃理子、赤尾信明、太田伸生 眼トキソカラ症動物モデルを用いた眼内液中抗体の診断的意義と薬物治療効果判定 同上

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
------	--------	-----------	-----	------	-----	-----	-----

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohta N, Waikagul J.	Disease burden and epidemiology of soil-transmitted helminthiases and schistosomiasis in Asia: the Japanese perspective.	Trends in Parasitology	23	30-35	2007
Jin Z, Akao N, Nobuota T, Ohta N.	An improved method for recovery of muscle-stage larvae from mice infected with <i>Toxocara canis</i> .	Journal of Parasitology			(in press)
Akao N, Ohta N.	Toxocariasis in Japan.	Parasitology International	56	87-93	2007
太田伸生	駆虫薬—小児科の寄生虫駆除の問題点	小児科臨床	60	2367-2372	2007

「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」班
分担研究報告書

15、住血吸虫の感染コントロール法の研究

分担研究者 平山謙二 長崎大学・熱帯医学研究所・疾病生態分野

研究要旨

日本住血吸虫症における糞便中虫卵検査に代わる簡便で高感度の診断法作製のために感染の際に血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、活動性感染の有無を決定しうるシステムの開発をめざしている。これまでに、感染の際に血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し感染患者血清をトリクロロ酢酸（TCA）処理するにより、感染強度を評価しうる検出系を確立した。本年度はこの検出系を用いて中国の浸淫地、非浸淫地、及びフィリピンの対象者血清・尿を用いて評価した。また、放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニプタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原の同定を行い、新しいワクチン候補の探索を行った。

A. 研究目的

住血吸虫症は中間宿主の淡水産巻貝から放出される感染型幼虫（セルカリア）の経皮感染によって引き起こされるぜん虫感染症で中国揚子江流域、フィリピンなどに分布する日本住血吸虫症とアフリカ、中南米に分布するマンソン住血吸虫症が重要である。

活動性感染は糞便中虫卵検査が標準法であるが、急性期には検出率は高いが、ばらつきが大きいことから1回だけの検査では確実性に乏しい、また慢性期の検出が難しいなどの問題点がある。抗体価検査を同時に行われるが、プラジカンテルによる治療後にも高い抗体価が残ることから、確定診断にはむかないなどの問題がある。我々が開発を進めている、活動性感染の際に血中に検出される循環抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体によるELISAシステムの系を用いて住血吸虫症浸淫地におけるフィールドサーベイを主体とした、実際面での応用についての検討、及び動物実験モデルとしてミニプタの感染系における、循環抗原量との相関について検討を行った。また、

感染防御ワクチン候補分子のスクリーニングの為に放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニプタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原分画を同定し、新規ワクチン候補分子の探索を試みた。

B. 研究方法

活動性の感染を検出する系として腸粘膜関連抗原(GAA)を認識する抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立し、モノクローナル抗体を組み合わせたGAA抗原を検出するサンドイッチELISA法を確立した。これを用いて中国江西省の住血吸虫浸淫地（Kato-Katz法1回：155名）あるいは非浸淫地（78名）に居住する対象者の血清・尿を用いて本法の評価を行なった。患者尿中の抗原についても、検出が可能であるかについて検討した。2003年より継続して行っているフィリピンのミンドロ島、ソルソゴン島で、独協大・千種らが行っているフィールドサンプル(Kato-katz法1回：120名)についても検討を行った。また、検出系の正当性を確認するために、実験的に

住血吸虫を感染させたミニブタでの血清試料からの検出を試みた。

(倫理面での配慮)

フィールド調査及び、採血に関しては共同研究者らにより対象者のインフォームドコンセントを得た上で行った。フィリピンのフィールド調査に関しては長崎大学・熱帯医学研究所の倫理審査委員会での承認を得て行った(承認番号 04031002)。

放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニブタの血清中の特異抗体に反応する住血吸虫抗原分画を同定し、新規ワクチン候補分子の探索を試みた。 γ 線照射セルカリア免疫ミニブタの血清に反応性の蛋白を解析するために、虫卵及び虫体の可溶性抗原分画を二次元液体クロマトグラフィーシステム(2D-PF, BECKMAN Coulter 社)で分画した後、抗体の反応性が認められる分画蛋白から、感染防御に関わるワクチン候補分子の同定を試みた。この反応性分画のN末端アミノ酸配列を決定し、この結果をデータベースを用いて相同性検索を行い、候補分子を決定した。

C. 研究結果

浸淫地の対象者 Kato-katz 法 1 回の検出結果と抗体価の比較では感染強度の高い患者血清(98人中93人)においては相関が認められたが、虫卵検査陰性者ではかなりのばらつきが検出された(57人中37人陽性;64.9%)。非浸淫地の陰性対象者(78人)はUnit ODで5.0のカットオフ値以下であった。患者尿中の抗原を検出することはできなかった。フィリピンの対象者の虫卵検査陽性者は(34/120, 28.3%)全員が陽性となったが、虫卵数と抗体価との相関は極めて弱かった。また、虫卵陰性者(86/120, 71.7%)中では、42名48.8%が循環抗原陽性となり、中国で得られた結果と同様にかなりのばらつきが認められた。実験的に住血吸虫を感染させたミニブタでの血清試料からの検出を試みた。通常法のサンドイッチELISAでは、ごく初期の感染の検出のみが可能で、感染経過に応じて同様に検出力の低下が認められた。この感染後期の血清はTCA処理することにより検出が可

能となった。

放射線照射セルカリア免疫したミニブタ血清は、虫卵由来分画2496文面中から61分画に対して反応性が認められた。このうちシングルピークの17分画についてN末端アミノ酸配列の決定を試みた。虫卵由来分画のF29.2E(pH<4.8): MCVLPVD、F2.3D(pH 8.49-8.4): MAVLPPIYKYLのアミノ酸配列を得ることができた。

D. 考察

抗体価の高い血清ではTCA処理することにより、活動性の感染の検出が可能となるものの、初期感染対象者については通常法で行う必要があることを示唆する結果を得た。また、実際のフィールドでの使用を考慮すると通常法、TCA処理の2種類の方法を行うのは非常に困難であると考えられる。実際の検出感度は十分であると考えられたため、抗原抗体複合体から抗原を解離して検出する方法(抗体ビーズ法など)についてさらに検討し、高感度かつ簡便なキット化をめざして改良を行う。また、このモノクローナル抗体が認識している抗原について、その抗原蛋白の性質を決定する必要があると考えられた。また、虫卵検査陰性者にかかなりの頻度で陽性者が認められたことは、今後、さらにフィールド調査の結果を蓄積して検出系の確立のための検討が必要であることが示唆された。

放射線照射セルカリア免疫したミニブタ血清から得られた感染防御ワクチン候補分子については、組み換え蛋白などの発現を試み、その反応性についての解析を進める必要があると考えられた。

E. 結論

日本住血吸虫症患者の血中に検出される循環抗原を特異的に検出する測定系により、感染強度の定量の可能性が示唆された。

放射線照射セルカリア感染によるワクチン効果が確かめられたミニブタの血清中の特異抗体に反応する日本住血吸虫卵及び虫体由来の抗原の同定を行い、新し

いワクチン候補の探索を行い、反応性を示した虫卵由来の分画から候補分子を得ることができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Helegbe GK, Goka BQ, Kurtzhals JA, Addae MM, Ollaga E, Tetteh JK, Dodoo D, Ofori MF, Obeng-Adjei G, Hirayama K, Awandare GA, Akanmori BD. Complement activation in Ghanaian children with severe Plasmodium falciparum malaria. *Malar J.* 2007 Dec 17;6 :165.
2. Shuaibu MN, Wuyep PT, Yanagi T, Hirayama K, Ichinose A, Tanaka T, Kouno I. Trypanocidal activity of extracts and compounds from the stem bark of *Anogeissus leiocarpus* and *Terminalia avicennoides*. *Parasitol Res.* 2007. in printing
3. Yu C, Yin X., Kikuchi M., Hirayama K, Zhu Y. Isolation of the cDNAs encoding secreted and membrane binding proteins from egg of *Schistosoma japonicum* (Chinese strain), *Acta parasitologica* in vol. 53, number 1, 2008. in printing.

2. 学会発表

MIHOKO KIKUCHI, CHEN HONGGEN, XIE SHUYING, GE JUN, DAN DAN LIN, KENJI HIRAYAMA. :日本住血吸虫の感染負荷量を決定する循環抗原測定系の開発 第76回日本寄生虫学会 平成19年3月29-30日、大阪大学コンベンションセンター、大阪府

MIHOKO KIKUCHI, CHEN HONGGEN, XIE SHUYING, GE JUN, DAN DAN LIN, KENJI HIRAYAMA. : Development of diagnostic ELISA system that detects active infection with *S. japonicum*. 第48回日本熱帯医学会 平成19年10月12-13日、別府市ビーコンプラザ、大分県.

Abdel-Hafeez E. Hamed, Mihoko Kikuchi, Kanji Watanabe, Takashi Itoh, Kenji Hirayama. : Proteome approach for Identification of protective vaccine candidate antigens for *Schistosoma japonicum* Infection. 第48回日本熱帯医学会 平成19年10月12-13日、別府市ビーコンプラザ、大分県.

菊池三穂子 エクラス・ハメド・ハーフィス、渡部幹次、伊藤敬、平山謙二. 日本住血吸虫の放射線照射セルカリアに誘導される感染防御機構の解析 第6回分子寄生・マラリア研究フォーラム 平成19年10月27-28日、松山市男女共同参画推進センター、愛媛県

Kenji Hirayama, Abdel-Hafeez E. Hamed, Mihoko Kikuchi, Kanji Watanabe, Takashi Itoh, Proteome approach for Identification of protective vaccine candidate antigens for *Schistosoma japonicum* Infection. 42nd Annual US-JAPAN parasitic diseases meeting. JAN. 17-18, 2008. Davis, CA, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」班
分担研究報告書

16. 蠕虫類の疫学に関する研究

分担研究者	杉山 広	国立感染症研究所寄生動物部
協力研究者	川中正憲	国立感染症研究所寄生動物部
同	森嶋康之	国立感染症研究所寄生動物部
同	梅原梓里	国立感染症研究所寄生動物部
同	船津丸貞幸	佐賀県衛生薬業センター微生物課
同	平野敬之	佐賀県衛生薬業センター微生物課
同	吉川 亮	長崎県衛生公害研究所衛生微生物科
同	川上 泰	麻布大学環境保健学部
同	田邊将信	慶応大学医学部
同	伊藤 誠	愛知医科大学医学部

研究要旨：

吸虫，条虫，線虫という多様な動物種から構成される蠕虫は，時に動物だけではなく人を宿主に寄生し，思いがけない病害を与える事がある。この様な寄生蠕虫の例として，今年度も継続して，肺吸虫とアニサキスを取り上げ，コントロール法の確立を模索した。まず肺吸虫については，その発生状況を調査し，予防対策法を考察した。輸入症例の発生が危惧される肺吸虫については，流行地のタイ・インドおよび中国の研究者に協力を仰ぎ，現地の材料を用いて，種の同定・鑑別につながる情報の収集に取り組んだ。更にアニサキスに関しては，感染源対策にも適用できる同定・鑑別法の確立に努めた。

1. 肺吸虫症に関する研究

1-1. 佐賀県猟友会を对象としたウェステルマン肺吸虫症に関する調査

A. 研究目的

感染源が淡水産のカニではなく，イノシシ肉であるウェステルマン肺吸虫症の事例は，1970年代に九州南部で世界に先駆けて発見された。以降も同地域から，集団発生例も含めて，多くの症例が報告されている。一方，九州北部では，感染源がカニであろうが，イノシシ肉であろうが，肺吸虫症例の報告は単発的・限局的である。

この理由として，まず寄生虫側の要因（肺吸虫の分布域や中間宿主の多寡など）が，次にヒト側の要因（感染に寄与する食習慣など）が重要と考えられる。本研究ではヒト側の要因に注目し，九州北部におけるウェステルマン肺吸虫の感染実態を，イノシシ肉の生食状況と関連づけて明らかにする事にした。

B. 研究方法

イノシシ肉の摂食機会が多い猪猟師（社団法人・佐賀県猟友会の会員）にお願いし，調査趣旨の説明に対して協力の同意が得られた方を検

索の対象とした。質問票調査では、イノシシ肉に加え、モクズガニの生食歴を尋ねた。イノシシ肉やモクズガニの生食により（不完全加熱調理を含む）、肺吸虫に感染する危険性がある事を認知しているかも尋ねた。さらに、肺吸虫の終宿主を探索する目的で、猟犬にイノシシ肉を与えているか尋ねた。尿中抗体価の測定には、本虫の抽出粗抗原と IgG4 に対する抗血清を用いたマイクロ ELISA を行ない、吸光度をもとに力価換算した。質問票調査の結果と抗体価は、感染源の種ごとに 2×2 分割表を作成し、カイ二乗検定を用いて有意差検定した。さらに、九州南部との地域差を抽出するため、川中ら（1998）の報告にあるデータとの比較を行なった。なお、本研究で取り扱う内容には個人情報が含まれるので、調査の実施に先立って、国立感染症研究所・医学研究倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

回答済みの質問票および尿検体の提供は、315 名から得られた。このうち、イノシシ肉の生食歴がある方は 44 名（14.0%）であった。一方、モクズガニの生食歴を持つ回答者はいなかった。また、尿中抗体の陽性者は 4 名（1.3%）であった。この結果をもとに検定したところ、イノシシ肉あるいはモクズガニの生食歴と抗体の検出状況（陽性者）とのあいだには、有意差が認められなかった（イノシシ肉： $P=0.932$ ，モクズガニ： $P=1.000$ ）。また、イノシシ肉あるいはモクズガニの生食が肺吸虫感染のリスク・ファクターであるとの認知は、半数以上が有していた。九州北部（佐賀県）の狩猟者は、九州南部の者と比べ、イノシシ肉の生食歴保有率が有意に低かった（ $P<0.001$ ）。

D. 考察

2004 年に佐賀県唐津市でウェステルマン肺吸虫の集団感染事例が発生し、これを契機に佐賀県内で動物疫学調査を実施した。その結果、中間宿主のカニがウェステルマン肺吸虫に高い寄生率で感染している実態を明らかにした。一方で、九州他県と比べた場合、佐賀県におけるウェステルマン肺吸虫症の事例発生は少なく、

その原因は明らかでなかった。今回の調査により、佐賀県では感染に直結する食習慣が一般的でない事が明らかとなり、その結果、肺吸虫症の発生が抑制されているものと推察された。ウェステルマン肺吸虫症は、食習慣を改善する事によって予防可能な疾病である。しかし、イノシシ肉の生食が肺吸虫感染のリスク・ファクターである事を認知していても、生食を継続する狩猟者が居た。個人の食習慣を改める事は容易ではない。この為、本症の発生を予防するには、本虫の感染により死に至る事がある事実も紹介するなど、啓発活動に工夫を凝らす必要があると考えられた。

E. 結論

佐賀県では、肺吸虫陽性のカニが生息する河川が見られるが、カニやイノシシ肉の生食が一般的ではないので、ウェステルマン肺吸虫症の発生が制御されていると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 杉山 広. イノシシ肉を生で食べて感染する肺吸虫. 狩猟界, 51, 88-91, 2007.

2. 学会発表

なし

1-2. 佐賀県唐津市におけるウェステルマン肺吸虫症の動物疫学調査

A. 研究目的

2004 年に佐賀県唐津市で発生したウェステルマン肺吸虫の集団感染事例は、同市内を流れる玉島川のモクズガニを感染源とするものであった。事例発生を契機とした昨年度の疫学調査では、原因モクズガニの採集地以外でも、陽性カニの生息地区が見付かった。この知見は、河川の流域を広範に移動する動物が、終宿主として、肺吸虫の生息域拡大や生活環維持に重要な役割を果たしている事を示唆するものと考えら

れた。また、終宿主を明らかにする事は、生活環境を切断して本症の発生を予防するという対策を立案する上でも、重要と考えられた。そこで、流域の一般家庭で飼育されているイヌとネコを対象とし、寄生蠕虫の感染状況の調査と飼育状況に関するアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

唐津市内で開業する獣医師の協力を得て、同市内で飼育されているイヌおよびネコの糞便検体を収集し、ホルマリンエーテル法によって、糞便内寄生虫卵の検査を行なった。また糞便を提供した飼い主を対象として、飼育状況に関するアンケート調査を実施した。

C. 研究結果

イヌ 46 検体、ネコ 28 検体を得て、検査を実施した。しかしながら、肺吸虫感染例は発見できなかった。肺吸虫以外の動物由来寄生蠕虫としては、イヌからマンソン裂頭条虫感染が 1 例、ネコからネコ回虫感染が 3 例、それぞれ見付かった。なお、陽性ネコは放し飼いをされていた（「いつも」が 2 頭、「時々」が 1 頭）が、陽性イヌは家の庭で飼育されていた。

D. 考察

玉島川にはウェステルマン肺吸虫陽性のモクズガニが生息する事を明らかにしてきた。しかし、その終宿主は不明のままであった。そこで、一般家庭で飼育されるイヌおよびネコを対象として、疫学調査を行った。しかしながら、肺吸虫に感染した個体を検出する事はできなかった。今年度の別調査（2-1 参照）では、猟犬を飼育するハンター（198 名）の半数以上（118 名、59.6%）が、イノシシ肉をイヌに与えている事が分かった。モクズガニではなく、イノシシ肉を原因に猟犬が肺吸虫に感染し、終宿主として汚染を拡大している危険性がある。従って、調査対象の動物を一般家庭のイヌ・ネコから猟犬に広げ、終宿主に関する調査を継続していく必要があると考えられた。

駆虫プログラムを導入して肺吸虫の生活環境に介入する事も、肺吸虫症の発生予防の対策とし

て有用である。この対策を実行する為にも、終宿主における寄生状況の調査は重要である。従来の調査（1961 年）では、玉島川は肺吸虫陰性であった。半世紀近くの歳月を経て、高い寄生率を示す河川となった原因は何か、この点も、今後の調査で明らかにする必要がある。

E. 結論

ウェステルマン肺吸虫に汚染されている玉島川流域において、終宿主の特定を目的に、付近で飼育されるイヌおよびネコを対象とする疫学調査を実施したが、感染例は発見できなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

2. 肺吸虫の由来地判別に向けての分子生物学的検討：ヒロクチ肺吸虫を用いての試み

A. 研究目的

在日外国人が淡水産・汽水産のカニを用いて出身地固有の料理を作り、非加熱で賞味して肺吸虫に感染する事例が増加している。飲食を共にする日本人にも感染の恐れがある。食材となるカニは、居住地（日本）近くの市場で購入するか、近隣の河川で自ら採集する事で調達される。更に彼らが里帰りする時に、我が国に持ち帰るカニも食材とされてきた。この場合は、我が国には分布しない肺吸虫の感染が発生する事も危惧される。人体症例の原因虫種の検索に当たっては、使い残された食材（カニ）からメタセルカリアを分離して検討する事になるが、その場合は遺伝子配列に基づく解析が有用となる。肺吸虫に関する遺伝子情報は、GenBank などのデータベースに集積され、日本に分布しない肺吸虫については、種同定を行なうことで外来種である事が明らかとなる。また由来地にリンクした種内多型に関する情報があれば、単に外来種というだけでなく、由来地を絞り込む事も可

能となる。このような検索を行う事が有用な虫種として、ヒロクチ肺吸虫を挙げる事が出来る。本虫は我が国には分布していないが、タイなどの東南アジア諸国では、人体寄生の主要病原虫として重要視されている。また、本虫は中国やインドにも分布し、患者発生の報告がある。そこで本研究では、タイ、中国、インドに出掛け、海外の共同研究者の支援のもと、本虫のメタセルカリアを入手し、塩基配列を解読して、由来地の特定に役立つような遺伝子情報の収集を試みた。

B. 研究方法

タイでは、バンコク近郊のサラブリー県で中間宿主カニ (*Larnaudia larnaudii*) を捕獲した。中国では、華南地方の広西壮族自治区で中間宿主カニ (*Sinolapotamon patellifer*) を捕獲した。インドでは、東北部のマニプール州で中間宿主カニ (*Potamiscus manipurensis*) を捕獲した。これらのカニからメタセルカリアを分離し、DNAを抽出して、核DNAのITS2領域とミトコンドリアDNAのcox1遺伝子を対象にPCR増幅を試み、塩基配列を解読した。

C. 研究結果

メタセルカリアからDNAを調整し、これをテンプレートとしてITS2領域をPCR増幅したところ、いずれのサンプルからも予想サイズのバンド(約520bp)が増幅された。配列を解読したところ、タイ産と中国産の各虫体の配列は、完全に一致する事が分かった。一方、インド産虫体の配列は、タイ産・中国産との間に4塩基の違いを認め、鑑別が容易であった。更にタイ産の虫体についてcox1遺伝子を解読したところ、3塩基の相違を見る2グループに分別された。種内多型を反映していると考えられた。中国産についても配列解読を進め、タイ産との鑑別に必要な情報を抽出中である。

D. 考察

扁形動物(吸虫類・条虫類)では、ITS2領域

は同一種内の変異が乏しく、従って種の同定に有用な領域であると認識されている。しかしながら、今回のヒロクチ肺吸虫を用いた検討では、種内変異が検出されたが、この変異は由来地の特定に役立つ情報であった。これに対してcox1遺伝子は、種内でも変異に富み、多型の検出に有用とされる。タイ産の虫体と中国産のものとの鑑別にあたって、有用な情報と考えられるので、中国産についての配列解読を進めたい。

E. 結論

人体寄生種として重要なヒロクチ肺吸虫の由来地が、ITS2領域やcox1遺伝子の配列を解読する事で明かにできる事を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Singh, T.S., Sugiyama, H., Rangsiruji, A., Devi, K.R. Morphological and molecular characterization of *Paragonimus heterotremus*, the causative agent of human paragonimiasis in India. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 37 (Supplement 1), 82-86, 2007.

2. Sugiyama, H., Morishima, Y., Binchai, S., Rangsiruji, A. Molecular discrimination between *Paragonimus heterotremus* and two forms of *P. westermani* occurring in Thailand. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 38 (Supplement 1), in press, 2008.

2. 学会発表

1. 杉山 広, アチャリア・ラングシルジ, シャ

ンティクマール・シン. インドの肺吸虫：
スクリアビン肺吸虫およびヒロクチ肺吸虫
の形態観察と分子同定. 第 143 回日本獣医
学会学術集会, つくば, 2007.

2. Sugiyama, H., Morishima, Y.,
Binchai, S., Rangsiruji, A.
Molecular discrimination between
Paragonimus heterotremus and two
forms of *P. westermani* occurring in
Thailand. Joint International
Tropical Medicine Meeting 2007,
Bangkok, 2007.

3. アニサキス科線虫の迅速鑑別法の確立

3-1. ミスマッチ・プライマーを用いたマルチ プレックス PCR 法による *Anisakis simplex* *sensu stricto* と *A. pegreffii* との迅速鑑 別

A. 研究目的

魚介類の生食を原因として発生するアニサキ
ス症は、わが国では年間 3,000 例に達する症例
があると推定される。本症の主要な原因虫であ
る *Anisakis simplex* は、従来は形態学的な
特徴から単一種とみなされていた。しかし遺伝
子の配列の相違から、3 種類の同胞種 (*A.*
simplex sensu stricto [以下 As], *A.*
pegreffii [以下 Ap] および *A. simplex* C)
に分類することが既に一般的となってきた。こ
の新たな分類法に基づいて、日本近海で捕獲さ
れた海産魚を検索した梅原ら (2006) は、As と
Ap の両種が魚に寄生している事を明らかにした。
この両種の鑑別には、PCR-RFLP 法 (PCR 増幅
した ITS 領域を制限酵素で処理して切断パター
ンで鑑別) が専ら用いられてきた。そこで本研
究では、種特異なプライマーを反応に用いる事
で、PCR だけで両種を迅速に鑑別できないか、
検討した。

B. 研究方法

As と Ap の ITS1 領域には、16bp 離れた 2

箇所塩基の置換を認める。この 2 塩基の置換
を反映した種特異的なフォワードプライマーを
作製した (As 特異: プライマー-ASI; Ap 特異:
プライマー-APE)。次にプライマー-APE をさら
に改変し、Ap に特異的な配列 (1 箇所) の 5' 末
端側の共通配列を T から G に意図的に置換して、
ミスマッチ・プライマーを作製した (プライマー
-APE1, フォワード)。これらの各フォワードプ
ライマーに加えて、As および Ap に共通する配
列領域からプライマーペアを作製し、As ある
いは Ap の DNA をテンプレートに、同時に 3 種類
のプライマーを用いるマルチプレックス PCR を
行なった。

C. 研究結果

プライマー-ASI を用いたマルチプレックス
PCR では、As だけでなく Ap から約 590bp と
670bp の 2 本のバンドが増幅された。また、プ
ライマー-APE を用いたマルチプレックス PCR で
は、Ap だけでなく As から約 590bp と 670bp
の 2 本のバンドが増幅された。一方、プライマ
ー-APE1 を用いたマルチプレックス PCR では、
Ap からは約 590bp と 670bp の 2 本のバンドが
増幅されたが、As からは約 590bp のバンドの
みが増幅され、両種が正確に鑑別できた。

D. 考察

As と Ap の間に認める 2 塩基の違いを反映さ
せた種特異プライマー (プライマー-ASI および
プライマー-APE) では、PCR 増幅時にミスアニ
ーリングが起り、両種を鑑別する事ができな
かった。しかし、種特異的プライマーに、更に 1
箇所意図的な塩基置換を導入する事で (APE1 プ
ライマー)、このミスアニーリングを防ぎ、種特
異的な増幅を導く事ができた。本法を適用する
事で、魚介類やさらに海獣由来の多数のアニサ
キス虫体が、As であるのか、あるいは Ap であ
るのか、迅速・正確に鑑別できるものと考えら
れた。その結果、日本近海での両種の分布状況
を正確に把握できると期待された。

E. 結論

種特異的な配列に、更に人為的な塩基置換を

導入したミスマッチ・プライマーを用いたマルチプレックス PCR 法を確立した。As と Ap とが正確・迅速に鑑別された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57, 49-53, 2008.

2. 学会発表

なし

3-2. マルチプレックス PCR 法によるアニサキス科線虫の迅速同定

A. 研究目的

梅原ら (2007) の検討によると、わが国で発生するアニサキス症の主要な病原虫は *Anisakis simplex* で、特に *A. simplex* sensu stricto が重要とされる。しかしながら他のアニサキス科線虫による感染も報告があり、例えば *A. pegreffii*, *A. physeteris*, *Contracaecum osculatum*, *Hysterothylacium aduncum*, *Pseudoterranova decipiens* による人体症例も報告されている。この中でも、*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii*, あるいは *C. osculatum* と *H. aduncum* とは、形態が相互に酷似し、正確かつ迅速・簡便な鑑別法の確立が望まれていた。そこで本研究では、上述の 6 種類のアニサキス科線虫を対象に、正確・迅速・簡便という目的を達成する様なマルチプレックス PCR 法の確立を目指した。

B. 研究方法

アニサキス科の線虫 6 種について塩基配列を解析し、18S rDNA から 28S rDNA に至る領域の中から、各虫種に特異的な塩基配列を選別し、種特異的プライマーを設計した。また今年度の別研究 (2-1 参照) で構築したミスマッチ・プライマー (プライマー APE1) も、マルチプレックス PCR の反応に加えた。得られた増幅産物は電気泳動を行ない、バンドパターンで虫種の鑑別が可能かを判定した。

C. 研究結果

各種アニサキス科虫体に特異的なプライマーを用いたマルチプレックス PCR の系においても、プライマー APE1 は有効に働き、*A. pegreffii* では約 590bp と 670bp の 2 本のバンドが、また *A. simplex* s. str. では約 590bp のバンドのみが検出された。他のアニサキス科線虫においても、マルチプレックス PCR で非特異的な増幅は認められず、種特異的な産物として、*A. physeteris* では約 140bp, *C. osculatum* では約 800bp, *H. aduncum* では約 990bp, *P. decipiens* では約 370bp のバンドがそれぞれ 1 本ずつ増幅された。

D. 考察

アニサキス科線虫の分子同定には、PCR-RFLP 法が用いられてきたが、電気泳動でバンドパターンを判読する前に、PCR 産物の制限酵素切断が必要であった。今回開発したマルチプレックス PCR 法では、1 回の PCR 反応 (とそれに続く電気泳動) だけで種鑑別が可能であった。アニサキス科線虫を迅速に同定するための方法として、本法は極めて有用であると考えられた。

E. 結論

新たに開発したマルチプレックス PCR 法により、アニサキス科の線虫 6 種が、迅速・簡便・正確に同定された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International* 57, 49-53, 2008.
2. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A, Sugiyama H. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J Trop Med Public Health. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 38 (Supplement 1), in press, 2008.

2. 学会発表

1. 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. ミトコンドリア *cox1* 遺伝子の塩基配列に基づく *Anisakis simplex* 同胞種分類学的解析 第67回日本寄生虫学会東日本支部大会, 東京, 2007.
2. Umehara A, Kawakami Y, Araki J, Uchida A., Sugiyama H. (2007): Molecular analysis of *Anisakis simplex* isolated from Japan. Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, Bangkok, 2007.

17. 輸入動物・野生動物におけるレプトスピラ保有実態の解析

分担研究者 増澤俊幸 千葉科学大学・薬学部・教授

研究要旨

タイ産とインドネシア産の輸入フクロモモンガ30頭からレプトスピラの検出を行った。腎臓培養からはレプトスピラは検出されなかった。一方、鞭毛遺伝子を標的としたPCRによりインドネシア産1頭の膀胱抽出DNAからレプトスピラ特異的遺伝子が検出された。検出された増幅DNAは遺伝子のシーケンス解析、ならびに遺伝系統解析により *Leptospira interrogans* と同定された。

名古屋市、および西宮市内のマンホールでドブネズミを捕獲しレプトスピラの分離を試みた。名古屋市内（保有率 39%）および西宮市内（保有率 30%）のドブネズミからレプトスピラの分離に成功し、これらはいずれも *L. interrogans* に属するが、血清型を同定できない未同定血清型であることが明らかとなった。一方、北海道千歳近郊泉郷の森林で捕獲したアカネズミからレプトスピラ1株が分離された。これらは *gyrB* 遺伝子解析により *L. borgpetersenii* と同定したが、この株はこれまでも北海道で分離されるが本州ではみられない *L. borgpetersenii* 未同定血清型であることが判明した。

前述のドブネズミから分離される *L. interrogans* 未同定血清型株は、これまで培養が困難であったが、0.1%アガロース添加EMJH培地を用いることで培養を可能とし、さらには一部の株からはアガロースを含まない培地でも増殖可能なクローンを得ることに成功した。これらの株に対する免疫ウサギ抗血清を作製し、交差凝集試験、ウェスタンブロットにより反応性を検討した。その結果、血清型Pomonaと交差凝集性を示すことが明らかとなった。しかしながら、これらの株の *gyrB* 配列は、欧米のPomonaとは異なることから、近縁の新しい血清型である可能性が考えられた。今後は、この株群の詳細な免疫学的性状を明らかにするため、単クローン抗体の作出を行う計画である。

研究協力者

岡本能弘、福井貴史（千葉科学大学）、
宇根有美（麻布大学）、角坂照貴（愛知医
科大学）、伊東拓也、長野秀樹（北海道衛
生研究所）、名古屋市生活衛生センター・
感染症調査係、西宮市環境局環境衛生課

A. 研究目的

本研究班では主にげっ歯類を保有動物とするレプトスピラ症の輸入動物、ならびに国内野鼠の保有状況を調査した。すでに、我々は過去の調査から国内では全く予想しない血清型レプトスピラを見いだしている。また、2005年にはアメリカ

産のアメリカモモンガを感染源とするレプトスピラ症の診断、並びに感染源の特定を行い、輸入動物を介した感染症の侵入があることを明解に示した。本年度は、輸入げっ歯類であるフクロモモンガ（タイ産、インドネシア産）、さらにこれまで定点調査を実施してきた名古屋市、西宮市内、北海道千歳市郊外泉郷で野鼠の捕獲を行いレプトスピラ保有状況調査を実施した。さらに、これまで日本各地で、ドブネズミから分離されながら、安定した培養が得られないために血清型の鑑別ができなかった *L. interrogans* 血清型未同定株を培養することに成功し、この安定培養株の一つである西宮市でドブネズミから分離された Ni86-06 株をウサギに免疫し、得られた抗血清を用いてウエスタンブロット法、及び顕微鏡凝集試験により、その血清型の同定を試みた。

B. 研究方法

1. 輸入げっ歯類からのレプトスピラの分離

タイ、インドネシアより輸入されたフクロモモンガ 30 頭の腎臓及び膀胱は宇根有美准教授（麻布大学・獣医学部）より分与を受けた。動物を安楽死させ、腎臓を注射器を用いて、ホモジェナイズし 0.1%アガロース、2.5%ウサギ血清を含む EMJH 培地に注入した。翌日、上清約 0.1ml を別の培地に接種し、これを 30°C で 3 カ月間培養した。培養は 2 週間ごとに増殖の有無を暗視野顕微鏡で観察した。

2. 野鼠からのレプトスピラの分離

野鼠は金網カゴ、またはシャーメントラップで捕獲した。捕獲後、エーテルで安楽死させ腎臓を注射器を用いてホモジェナイズして、0.1%アガロース、2.5%ウサギ血清を含む EMJH 培地に注入した。翌日、上清約 0.1ml を別の培地に接種し、これを 30°C で 3 カ月間培養した。培養は 4 週間ごとに増殖の有無を暗視野顕微鏡で観察した。

3. PCR による膀胱からのレプトスピラ鞭毛遺伝子 (*flaB*) 遺伝子の検出

フクロモモンガの膀胱を滅菌したカッターナイフで米粒大に切断し、Quick gene 800 DNA 抽出機を用いて、DNA を抽出した。これを PCR 試料とした。First PCR には、表 1 に示した L-*flaB*-F1 と L-*flaB*-R1 を用いた。PCR は熱変性 94°C で 30 秒間、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。

4. DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 (*gyrB*) のシークエンス解析

腎臓よりレプトスピラが培養できた場合は、*gyrB* 塩基配列を決定し、遺伝系統解析による遺伝種の同定を行った。培養

菌液 1mL をより InstaGene™ Matrix (Bio Rad) を使用して鋳型 DNA を調製した。PCR は、表 1 に示した *gyrB* に特異的なプライマー UP1TL、UP2rTL を用い、94°C で 5 分間前熱変性、さらに熱変性 94°C で 30 秒、アニーリング反応 48°C で 1 分間、伸長反応 72°C で 90 秒間のサイクルを 35 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。増副産物を Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore) を用いて精製し、これを鋳型として、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応後 Montage™ SEQ96 シークエンスクリーンナップキット (Millipore) を用い、マニュアルに従って精製した。シーケンスにはプライマー UP1TL、UP2rTL、GyrF1、GyrR1 を使用した。シーケンス解析には、ポリマーは ABI Prism POP-7™ (Applied Biosystems)、50cm のキャピラリーを用い ABI PRISM 3110-Avant (Applied Biosystems) により 2.5 時間泳動し解析した。得られたシーケンスはシーケンス連結ソフト ACGT (ゼネティクス) を用いて行った。

5. 遺伝系統解析

得られた配列をこれまで国内で分離できたレプトスピラ株の配列、ならびに日本に存在が予想される参照株の配列と比較した。解析は MegAlign (DNA star) を使用し、ClustalW アルゴリズムにより配列を整列し、さらに近接結合法 (NJ 法) により系統樹を作成した。系統解析結果よりレプトスピラ遺伝種の決定を行った。

6. ウサギ血清の作製

L. interrogans 血清型未同定株 Ni86-06 を 0.1 % アガロース含有 2.5 % ウサギ血清添加 EMJH 培地で培養し、培養液 ($2 \sim 4 \times 10^8$ cell / mL) 5 ml を 56 °C 30 分不活性化し、抗原液とした。これを腹腔内に 5 日間隔で 2 回接種した。最終免疫として、抗原液 1 ml を腹腔内に接種し、7 日目に心臓より全採血し、血清を分取した。

7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

EMJH 培地で培養した各種代表的血清型のレプトスピラを 12.5%ゲルを用いて SDS-PAGE により分離を行った。泳動後、ゲル上の抗原を polyvinilidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。転写膜に Ni86-06 免疫ウサギ抗血清 (一次抗体) を反応させ、さらに Horse Radish Peroxidase (HRPO) 標識抗ヤギ抗ウサギ IgA + IgG + IgM (二次抗体) を反応させ、基質として 3, 3'-diaminobenzidine(DAB)を用いて反応抗原バンドの検出を行った。

8. 顕微鏡凝集試験 (microscopic agglutination test, MAT)

96 穴丸底プレート (Iwaki) にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、及び PBS で 25 倍希釈した参照株に対するウサギ抗血清をそれぞれ 25 μ L 加え、段階希釈液を調製した。各穴に 30°C で 1×10^8 cells/mL まで培養した菌液 25 μ L を加えた。室温で 2 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡で観察し、抗血清を加えていないコントロールと比較し菌体の 50%以上に凝集が見

られた時、陽性と判定した。代表的な血清群のレプトスピラ菌株 23 種 (表 2)、及び *L. interrogans* 未同定血清型株を Ni86-06 株免疫ウサギ抗血清と反応させ、暗視野顕微鏡下で凝集の有無を調べた。50 % 以上の菌の凝集のとき陽性と判定した。

C. 結果と考察

1. 輸入げっ歯類からのレプトスピラの検出

輸入フクロモモンガ30頭中インドネシア産の1頭から*flaB*-PCRにより、レプトスピラが検出され、シーケンス解析より *L. interrogans* と同定できた (表3)。一方、腎臓培養は陰性であった。すでに我々はこれまでも、アメリカモモンガを介したヒト感染事例の報告、さらにはアフリカヤマネからのレプトスピラの分離、さらには何種かの輸入げっ歯類からのPCRによるレプトスピラの検出について報告しているが、今回も30頭中1頭ではあるが、レプトスピラの検出に成功した。インドネシアはこれまでも人のレプトスピラ症の流行地のひとつであり、日本人のレプトスピラ症の輸入症例も知られている。

2. 国内の野鼠からのレプトスピラの検出

これまで継続してきた名古屋内、ならびに西宮市内のマンホール内で野鼠の捕獲調査を行った。それぞれ18頭中、並びに67頭中、それぞれ7頭 (保有率 39%)、20頭 (保有率 30%) からレプトスピラの分離に成功した (表4)。継続的にレプトスピラ保有野鼠が検出され、汚染は持続

している。また、分離株の*gyrB*のシーケンス解析により、すべて *L. interrogans* と同定された。またその配列はこれまでに日本全国で分離されている血清型の同定できないタイプ (未同定血清型) と完全に一致した。これらの分離株はいずれもドブネズミより分離されている。

この株群は、これまで様々な試行錯誤を繰り返して培養を試みてきたが、十分に増殖させることができず、そのために血清学的検討が実施できなかった。昨年度からEMJH培地に0.1%のアガロースを添加した改良培地を用いることで、培養を可能にし、さらには一部の株はアガロースを含まない培地でも培養できるようになり、血清学的検討が可能となった。

2007年8月に北海道千歳市近郊泉郷で野鼠の捕獲調査を行った。北海道はレプトスピラの流行地とは認識されていなかったが、酪農を中心とした農地が広がっており、レプトスピラの家畜への感染が危惧されている。エゾヤチネズミ、ヒメネズミ、アカネズミ計64頭を捕獲し、うちアカネズミ1頭からレプトスピラを分離した。*gyrB*解析の結果、これまでも北海道で見いだされている *L.*

borgpetersenii に属する未同定血清型株と一致した。これら株の免疫学的性状解析は今後の課題である。

3. 未同定血清型株の血清学的性状解析

ウェスタンブロット法により、代表的な23の血清型の菌体由来抗原に対するレプトスピラ Ni86-06 免疫ウサギ抗血清の交差反応性を検討したところ、血清型 Pomona の菌体由来抗原に対して血清型

を規定する抗原であるリポ多糖 (LPS) と
思われるスメア状のバンドが検出された
(図 1)。また、MAT においても同様に、レ
プトスピラ Ni86-06 株ウサギ免疫抗血清
は、今回用いた代表的な 23 の血清型のう
ち、血清型 Pomona に対して特異的凝集性
を示した。Ni86-06 を代表とする未同定血
清型レプトスピラは、血清型 Pomona に近
縁であることが明らかとなった (表 5)。

L. interrogans に属する未同定血清型株
は、豚に流産を起こすことで有名な血清
型 Pomona と近縁であることが示された。
一方、*gyrB* 系統解析では、基準株の血清
型 Pomona Pomona 株とは異なるクラス
ターに配置され、欧米の Pomona と異なる
可能性が示された (図 2)。血清群 Pomona
に属する株群との *gyrB* 系統解析でも近縁
なものは見つかっておらず、新しいタイ
プである可能性が高い。今後、単クロー
ン抗体を作製し、免疫学的性状を明らか
にする。

D. 研究発表

発表論文

原著論文

総説

1. Yasutake Yanagihara, Sharon Y. A. M Villanueva, Shin-ichi Yoshida, Yoshihiro Okamoto, and Toshiyuki Masuzawa. Current status of Leptospirosis in Japan and Philippines. Comparative Immunology Microbiology and

Infectious Diseases, 30, 399-413, 2007.

学会発表

1. 増澤俊幸、岡本能弘、宇根有美、太田周司、吉川泰弘: 輸入げっ歯類からのレプトスピラ検出 (2006 年度報告) 第 44 回レプトスピラシンポジウム (和泉市) 2007 年 3 月 25 日
2. 増澤俊幸、岡本能弘、Sharon Y. A. M. Villanueva、小泉信夫、柳原保武、吉田真一: フィリピンの野鼠由来レプトスピラの *gyrB* 遺伝子解析 第 44 回レプトスピラシンポジウム (和泉市) 2007 年 3 月 25 日
3. 福井貴史、増澤俊幸、岡本能弘: レプトスピラ LipL32 のヘモグロビンとの相互作用. 第 45 回レプトスピラシンポジウム (京都市) 2008 年 3 月 23 日
4. 川島遙、福井貴史、増澤俊幸、岡本能弘: レプトスピラに対する単クローン抗体の作成と性状解析. 第 45 回レプトスピラシンポジウム (京都市) 2008 年 3 月 23 日

E. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. *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
LavrF	GGTCTTTCCGGAGAAGATG	940-958	Ictero No. 1
LavrF4	AAAGAAAAATTAGTGAACGC	1024-1043	Ictero No. 1
LavrR	GAATTGAATTGAGGTTGAGG	1016-997	Ictero No. 1
LavrR3	TTMCCNGGAAGVCCDCCHCC	1232-1213	Ictero No. 1
L-flaB-F1	CTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC	35-57	Akivami A
L-flaB-F2	TGTGCACAAGACGATGAAAGC	66-86	Akivami A
FlaB-710F	GAATCTAGAATTTCGAGACGCCG	730-709	Akivami A
L-flaB-R1	TGAATTCGGTTTCATATTTGCC	825-804	Akivami A
L-flaB-R2	AACATTGCCGTACCACTCTG	797-778	Akivami A
M13F	TGTAAAACGACGGCCAGT		
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)

表 2 使用した菌株

	Serogroup (血清群)	Species (種)	Serovar (血清型)	Strain (株)
1	Andaman	<i>L. biflexa</i>	Andamana	CH 11
2	Australis	<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico
3	Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
4	Ballum	<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Arborea
5	Bataviae	<i>L. interrogans</i>	Losbanos	LT 101-69
6	Canicola	<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV
7	Celledoni	<i>L. borgpetersenii</i>	Anhoa	LT 90-68
8	Cynopteri	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C
9	Djasiman	<i>L. kirschneri</i>	Agogo	Agogo
10	Grippotyphosa	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V
11	Hebdomadis	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis
12	Hurstbridge	<i>L. fainei</i>	Hurstbridge	BUT6T
13	Icterohaemorrhagiae	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA
14	Javanica	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46
15	Louisiana	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945
16	Mini	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Sari
17	Pomona	<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona
18	Pyrogenes	<i>L. interrogans</i>	Manilae	LT 398
19	Pyrogenes	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Salinem
20	Sarmin	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin
21	Sejroe	<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajitno
22	Patoc	<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I
23	Tarassovi	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Perepelitsin

表3 フクロモモンガからのレプトスピラの検出

No.	体重	性別	原産国	現地出荷日	日本到着日	レプトスピラ	
						培養	flaB-PCR
SG-1	108g	♂	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-2	80g	♂	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-3	90g	♂	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-4	81g	♂	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-5	85g	♂	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-6	65g	♀	インドネシア産		2007/10/5	-	+
SG-7	60g	♀	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-8	65g	♀	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-9	65g	♀	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-10	65g	♀	インドネシア産		2007/10/5	-	-
SG-11	15.5g	♂	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-12	17.8g	♂	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-13	15.4g	♂	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-14	18.6g	♂	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-15	19.0g	♂	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-16	15.7g	♀	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-17	13.0g	♀	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-18	15.5g	♀	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-19	21.7g	♀	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-20	19.7g	♀	タイ産	2007/10/16	2007/10/18	-	-
SG-21	26.5g	♂	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-22	18.0g	♂	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-23	22.6g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-24	25.0g	♂	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-25	25.6g	♂	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-26	21.3g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-27	19.2g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-28	20.5g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-29	24.6g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-
SG-30	22.7g	♀	インドネシア産	2007/10/25	2007/10/26	-	-

表4 野鼠のレプトスピラ保有状況調査結果 (2007年度)

	野鼠種	捕獲数	レプトスピラ培養陽性	株名	遺伝種	血清型
名古屋市	ドブネズミ	18	7 (39%)	AC2-07、AC3-07、AC4-07 AC5-07、AC10-07、AC11-07 AC12-07	<i>L. interrogans</i>	未同定血清型
西宮市	ドブネズミ	67	20 (30%)	Ni126、Ni129、Ni130、Ni131 Ni133、Ni140、Ni149、Ni150 Ni152、Ni154、Ni158、Ni161 Ni164、Ni169、Ni172、Ni175 Ni179、Ni182、Ni186、Ni189	<i>L. interrogans</i>	未同定血清型
北海道 泉郷	エゾヤチネズミ	16	0			
	ヒメネズミ	20	0			
	アカネズミ	28	1	H36-07	<i>L. borgpeterseni</i>	未同定血清型 (poi?)
	計	149	28			

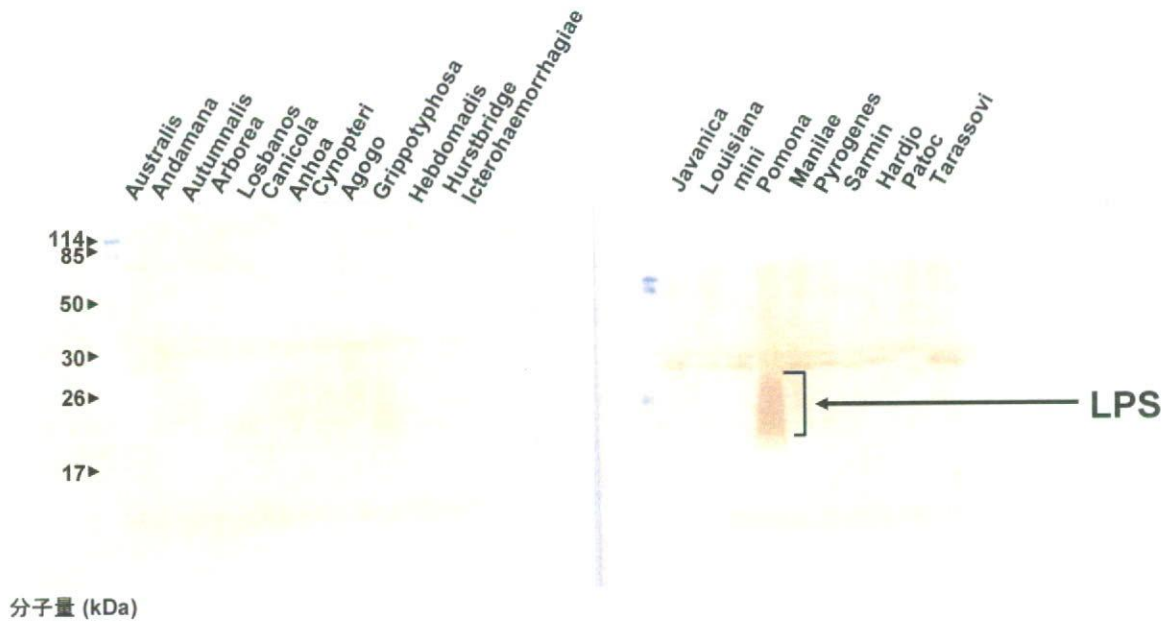


図1. 未同定血清型株 Ni86-06免疫ウサギ抗血清の交差反応性

ウエスタンブロット法により、23種のレプトスピラ血清型に対する Ni86-06株免疫ウサギ抗血清の交差反応性を調べた。
 一次抗体はNi86-06ウサギ免疫血清 × 500を使用した。
 二次抗体はHRP標識抗ヤギ抗ウサギIgA + IgG + IgM × 3,000を使用した。
 発色基質はDABを使用した。

表 5. 顕微鏡凝集試験による Ni86-06 免疫ウサギ抗血清の交差反応性の検討

抗血清	凝集力価
Andaman	<100
Australis	<100
Autumnalis	<100
Ballum	<100
Bataviae	<100
Canicola	<100
Celledoni	<100
Cynopteri	<100
Djasiman	<100
Grippytyphosa	<100
Hebdomadis	<100
Hurstbridge	<100
Icterohaemorrhagiae	<100
Javanica	<100
Louisiana	<100
Mini	<100
Pomona	6400
Pyrogenes	<100
Manilae	<100
Sarmin	<100
Sejroe	<100
Patoc	<100
Tarassovi	<100
Ni86-06	400
Ni89-09	1600