

表 2 採血およびアンケート実施期間

地域	実施期間	回答者数
北九州	平成 18 年 1 月 18 日～20 日	70 名
神戸	平成 18 年 6 月 16 日、28 日、30 日	90 名
埼玉	平成 19 年 9 月 12 日～13 日	163 名
合計		323 名

表 3 抗体測定項目および検査実施機関

検査機関	(1)				(2)		(3)	(4)	(5)		
感染症	HRFS	LCM	<i>Leptospira</i>		<i>B.hens elae</i>	<i>Toxopl asma</i>	オウム 病	イヌブ ルセラ	Q 熱		
検査 方法	IFA	ELISA	ELISA	MAT	抗体	抗体	抗体 価 MIF 測定	MAT	ELISA Antibo dy Index	IFA Scree ning	IFA Titer
北九州	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
神戸	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
埼玉	○	○	○	-*	○	○	○	○	○	○	○

(1)神戸検査所、(2)日本大学(丸山)、(3)岐阜大学(福士)、(4)感染症研究所(今岡)、(5)感染症研究所(岸本)
*ELISA でのスクリーニング検査ですべて陰性であったため実施されなかった。

図 1-1 調査協力者の年齢分布(男女別)

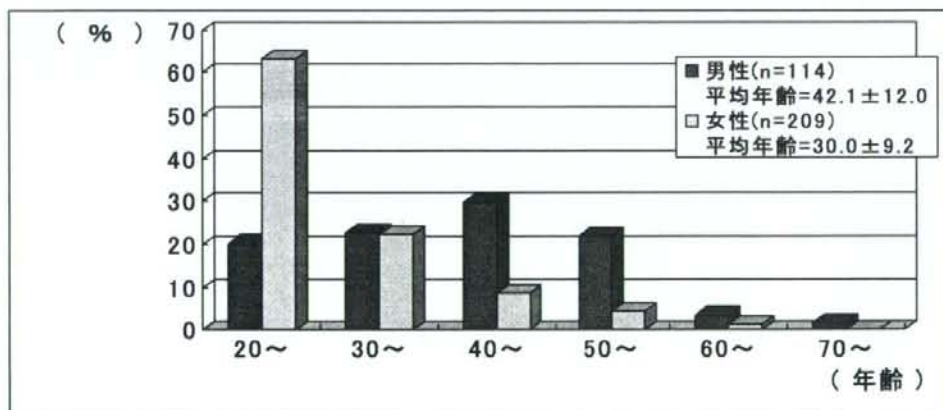


図 1-2 調査協力者の年齢分布(職業別)

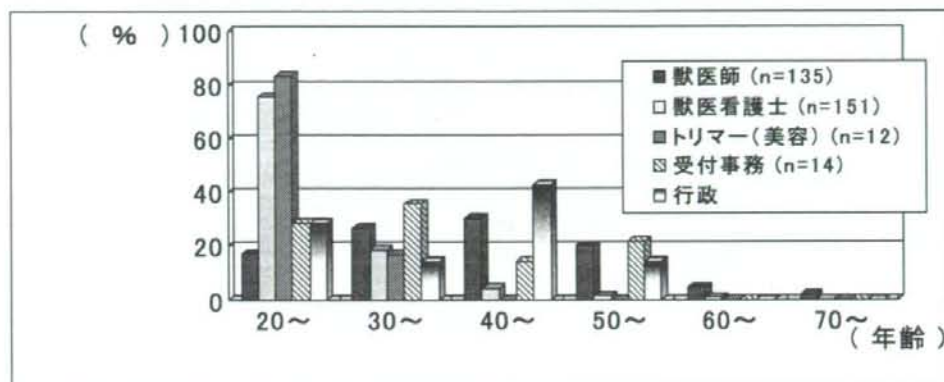


表 4-1 1日のうちで動物や動物ケージ等と接する時間(選択回答)

1時間未満	1~2時間未満	2~4時間	4~6時間	6~8時間	8時間以上	その他	有効回答	総数
10	7	16	37	58	193	2	323	323
3.1%	2.2%	5.0%	11.5%	18.0%	59.8%	0.6%	100.0%	100.0%

表 4-2 職種別・1日のうちで動物や動物ケージ等と接する時間

	1時間未満	1~2時間未満	2~4時間	4~6時間	6~8時間	8時間以上	その他	総数
獣医師	1	1	5	24	24	80	0	135
獣医看護師	3	2	5	10	31	100	0	151
トリマー(美容)	0	0	0	0	3	9	0	12
受付事務	3	2	5		0	3	1	14
行政	2	2		2	0	0	1	7
その他	1		1	1	0	1	0	4
総計	10	7	16	37	58	193	2	323

表 5 取り扱ったことのある動物種(複数回答)

	霊長類	食肉目	翼手目	げっ歯類	ウサギ目	鳥類	は虫類・両生類	その他	総数
回答数	24	253	27	241	254	244	92	20	323
	7.4%	78.3%	8.4%	74.6%	78.6%	75.5%	28.5%	6.2%	100.0%
有効回答数	308	321	308	308	308	308	308	308	
	95.4%	99.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	95.4%	

表 6-1 輸入動物取り扱いの有無(自由記述より抽出)

なし		あり	有効回答	無効回答	総数
通常の動物取り扱いあり・本設問回答欄未記入	無しという回答が記載されている	具体的動物名が記載されている	左記合計	通常の動物取り扱い無し・本設問回答欄未記入、および?との回答	
237	8	75	320	3	323
245		75	320	3	323
76.6%		23.4%	100.0%		

表 6-2 取り扱った輸入動物種(自由記述より抽出)

畜長類	食肉目			げっ歯類		鳥類	は虫類・両生類	その他	有効回答	総数
	うちアライグマ	うちフェレット	うちプレーリードッグ							
6	47	4	42	27	24	6	18	5	320	323
1.9%	14.7%	1.3%	13.1%	8.4%	7.5%	1.9%	5.6%	1.6%	100.0%	

上記の動物種に分類されないその他の動物としては、シカ(8)、ウシ(5)、ブタ(3)、ヤギ(2)、魚類(2)、ウマ、イノシシ、ハリネズミ、有袋類、野生動物、外来種動物、動物園動物(各1)という回答があった。

表 6-3 地区別・輸入動物取り扱いの有無(自由記述より抽出)

	なし	あり	有効回答	総数
埼玉	111	50	161	163
	68.9%	31.1%	100.0%	
神戸	71	19	90	90
	78.9%	21.1%	100.0%	
北九州	63	6	69	70
	91.3%	8.7%	100.0%	
総計	245	75	320	323
	76.6%	23.4%	100.0%	

表 6-4 地区別・取り扱った輸入動物種(自由記述より抽出)

	畜長類	食肉目		げっ歯類		鳥類	は虫類・両生類	その他	取り扱い有り 回答者数計	有効回答	総数		
		アライグマ うち	フェレット うち	うち リードング	うち ブレ								
取り扱い有り 回答者数	6	47	4	42	27	24	6	18	5	75	320	323	
地区別 内訳	埼玉	6	29	4	24	19	16	5	15	3	50	161	163
	神戸	0	14	0	14	5	5	1	2	2	19	90	90
	北九州	0	4	0	4	3	3	0	1	0	6	69	70

上記の動物種に分類されないその他の動物としては、シカ(8)、ウシ(5)、ブタ(3)、ヤギ(2)、魚類(2)、ウマ、イノシシ、ハリネズミ、有袋類、野生動物、外来種動物、動物園動物(各1)という回答があった。

表 7-1 地区別・動物やケージ等を取り扱う時に自分や動物を守るために実施していること
(複数回答)

	前後 に手 洗い	手袋 着用	マス ク着 用	専用 履物 使用	前後 にう がい	帽子 をか ぶる	専用 作業 着用	シャ ワー を浴 びる	常に 爪を きつ てお く	器具 の消 毒・ 衛生 管理	特に 何も しな い	その 他	有効 回答	総数
実施有り 回答者数	309	85	43	110	16	9	154	8	212	239	2	0	323	323
埼玉	157	50	23	64	14	6	82	1	108	123	0	0	163	163
神戸	87	19	15	27	2	2	40	2	55	70	1	0	90	90
北九州	65	18	5	19	0	1	32	5	49	46	1	0	70	70

表 7-2 職種別・動物やケージ等を取り扱う時に自分や動物を守るために実施していること

	前後 に手 洗い	手袋 着用	マス ク着 用	専用 履物 使用	前後 にう がい	帽子 をか ぶる	専用 作業 着用	シャ ワー を浴 びる	常に 爪を きつ てお く	器具 の消 毒・ 衛生 管理	特に 何も しな い	その 他	総数
実施有り 回答者数	309	85	43	110	16	9	154	8	212	239	2	0	323
獣医師	126	31	15	35	7	9	51	4	86	100	2	0	135
獣医看 護師	147	44	18	67	6	0	89	4	112	120	0	0	151
トリマー (美容)	12	2	6	6	0	0	7	0	5	9	0	0	12
受付 事務	13	1	1	2	0	0	5	0	7	8	0	0	14
行政	7	6	2	0	3	0	1	0	0	0	0	0	7
その他	4	1	1	0	0	0	1	0	2	2	0	0	4

図2 動物咬傷、ノミ刺傷、動物からの感染時の対応

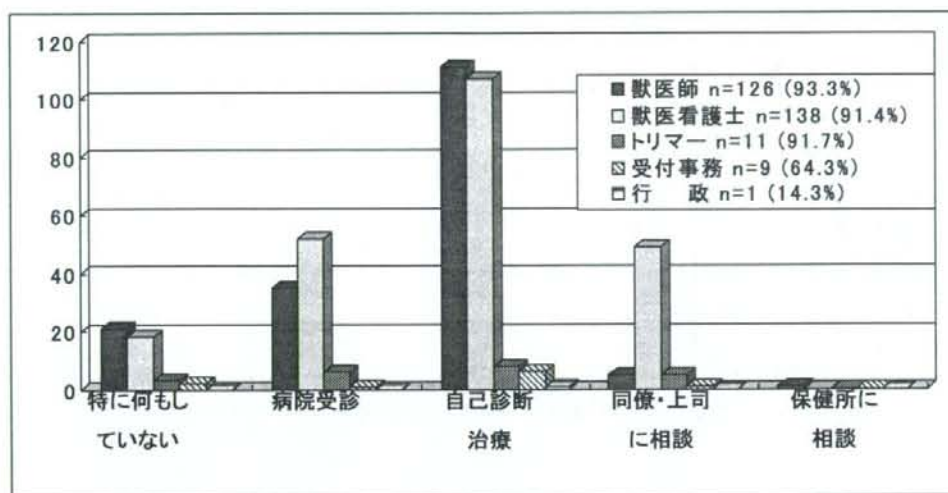


表 8-1 病気をうつされた経験・頻度

咬傷・ノミ・感染すべて経験なし	病気感染経験なし	病気感染経験あり				計	設問が 用紙に ない	総数
		極たまに	たまに	時々	頻度未記入			
36	252	29	1	0	3	33	2	323

表 8-2 うつされた病気(複数回答)

肺炎	皮膚炎(カビ)	皮膚化膿症	リンパ節炎	その他	病気感染経験回答者数	総数
0	21	4	5	4	33	323

表 8-3 地区別・うつされた病気(複数回答)

	肺炎	皮膚炎(カビ)	皮膚化膿症	リンパ節炎	その他	病気感染経験回答者数	総数
埼玉	0	10	1	1	4	15	163
神戸	0	5	2	2	0	9	90
北九州	0	6	1	2	0	9	70
総計	0	21	4	5	4	33	323

表 8-4 職種別・うつされた病気(複数回答)

	肺炎	皮膚炎 (カビ)	皮膚化 膿症	リンパ 節炎	その他	病気 感染経路 回答者数
獣医師	0	11	2	4	2	18
獣医看護師	0	8	2	1	1	12
トリマー(美容)	0	0	0	0	0	0
受付事務	0	2	0	0	0	2
行政	0	0	0	0	1	1
その他	0	0	0	0	0	0
総計	0	21	4	5	4	33

表 9-1 職種別・健康診断や人間ドック受診について(選択回答)

	毎年必ず 受診	なるべく受 診	あまり気 にしてい ない	全く考 えてい ない	上記以外*	有効 回答	総数
獣医師	23	38	58	12	4	135	135
獣医看護師	7	19	93	28	4	151	151
トリマー(美容)	0	0	7	2	2	11	12
受付事務	3	1	6	4	0	14	14
行政	6	1	0	0	0	7	7
その他	1	1	1	0	0	3	4
総計	40	60	165	46	10	321	323
率(%)	12.4%	18.6%	51.1%	14.2%	3.1%	99.4%	

受診者 31.0%

*その他・受診したいが時間がない、等

表 9-2 地区別・健康診断や人間ドック受診について(選択回答)

	毎年必 ず受診	なるべく 受診	あまり 気にし ていな い	全く考 えてい ない	上記 以外*	有効 回答	総数
埼玉	35	36	79	10	3	163	163
	21.5%	22.1%	48.5%	6.1%	1.8%	100.0%	
神戸	5	16	51	17	1	90	90
	5.6%	17.8%	56.7%	18.9%	1.1%	100.0%	
北九州	0	8	35	19	6	68	70
	0.0%	11.8%	51.5%	27.9%	8.8%	100.0%	
総計	40	60	165	46	10	321	323
	12.5%	18.7%	51.4%	14.3%	3.1%	100.0%	

*その他・受診したいが時間がない、等

表 9-3 これまでに健康診断等で異常を指摘されたこと、
 社会人になってからの治療・入院経験のある病気(複数回答)

特になし	腎機能異常・腎疾患	黄疸を伴う肝機能異常	原因不明の髄膜炎	肺炎	リンパ節腫張	その他	有効回答	総数
238	8	0	0	11	7	53	311	323
73.7%	2.5%	0.0%	0.0%	3.4%	2.2%	16.4%	96.3%	

表 10-1 職種別・自宅におけるペット飼育状況【神戸・埼玉】(複数回答)

	過去も現在も自宅でのペット飼育はしていない	過去には自宅でペットを飼育していた	現在(1-2年)は自宅でペットを飼育している	過去も現在も自宅でペット飼育をしている	ペット飼育はしていないが、ペット動物との接触は多い	有効回答
獣医師	2	19	9	75	2	107
獣医看護師	1	18	7	93	1	120
トリマー(美容)	0	1	1	7	0	9
受付事務	0	0	2	6	0	11
行政	1	5	0	0	1	7
その他	0	0	1	1	0	2
総計	4	43	20	182	4	253
合計 245 名(96.8%)						

表 10-2 飼育経験のあるペット(記述回答をもとに分類)

過去も現在も自宅でのペット飼育はしていない	イヌ	ネコ	齧歯類	ウサギ	その他ほ乳類	鳥類	は虫類	総数
4	201	151	65	39	9	79	24	253
1.6%	79.4%	59.7%	25.7%	15.4%	3.6%	31.2%	9.5%	100.0%

表 10-3 接触度が濃厚であったペット(記述回答をもとに分類)

過去も現在も自宅でのペット飼育はしていない	イヌ	ネコ	齧歯類	ウサギ	その他ほ乳類	鳥類	は虫類	総数
4	71	58	17	10	2	20	5	253
1.6%	28.1%	22.9%	6.7%	4.0%	0.8%	7.9%	2.0%	100.0%

表 11-1 項目・地域別、抗体陽性率

	埼玉(n=163)			神戸(n=90)			北九州(n=70)			総計 (n=323)	陽性率(%)
	男性	女性	合計	男性	女性	合計	男性	女性	合計		
<i>B.henselae</i> 抗体	6	10	16	4	8	12	1	7	8	36	11.15
<i>Toxoplasma</i> 抗体	8	0	8	1	1	2	0	4	4	14	4.33
オウム病	1	5	6	3	2	5	1	1	2	13	4.02
イヌブルセラ	0	1	1	1	1	2	0	1	1	4	1.24
Q熱*	0	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0.66

*Q熱のみ19名(神戸:女性6名、北九州:男性2名、女性11名)のデータが欠損

いずれか1つ以上の抗体が陽性:65名(20.12%)、うち複数の抗体が陽性:4名(全体の1.24%)

表 11-2 2項目が陽性であった回答者

<i>B.henselae</i> 抗体	<i>Toxoplasma</i> 抗体	オウム病抗体価	イヌブルセラ	Q熱-IFA Titer	回答者
-	256	16	-	-	埼玉076
128	-	64	-	-	埼玉112
64	-	64	1280	-	神戸042
256	-	<16	320	-	北九州013

下線:陽性と判断された項目

表 12-1 性別・抗体陽性有無・年齢分布

性別	抗体陽性有無	年齢						総数
		20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79	
男性	抗体陽性なし	20	21	25	18	2	2	88
		87.0%	80.8%	73.5%	72.0%	50.0%	100.0%	77.2%
	抗体陽性あり	3	5	9	7	2	0	26
男性計		23	26	34	25	4	2	114
女性	抗体陽性なし	108	37	14	8	3	0	170
		81.8%	78.7%	77.8%	88.9%	100.0%	-	81.3%
	抗体陽性あり	24	10	4	1	0	0	39
女性計		132	47	18	9	3	0	209
総計		155	73	52	34	7	2	323

表 12-2 性別・陽性抗体別、年齢分布

性別	陽性抗体	年齢					
		20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-79
男性	<i>B.henselae</i>	1	2	5	3	0	0
	<i>Toxoplasma</i>	0	3*	2	3	1	0
	オウム病	1	1*	2	1*	0	0
	イヌブルセラ	0	0	0	1*	0	0
	Q熱	1	0	0	0	1	0
	陽性計	3	5	9	7	2	0
女性	<i>B.henselae</i>	17* ¹ * ²	5	2	1	0	0
	<i>Toxoplasma</i>	2	2	1	0	0	0
	オウム病	5* ¹	2	1	0	0	0
	イヌブルセラ	2* ²	1	0	0	0	0
	Q熱	0	0	0	0	0	0
	陽性計	24	10	4	1	0	0

*複数の抗体陽性者は4名であった。

表 13-1 抗体陽性有無別・勤務年数分布

	～5年	6～10年	11～15年	16～20年	21～25年	26～30年	31～35年	36～40年	41年以上	総数
抗体陽性なし	131	56	19	19	14	9	4	2	4	258
抗体陽性あり	32	8	7	7	4	3	3	1	0	65
総計	163	64	26	26	18	12	7	3	4	323

勤務年数が11年より長いほど、抗体陽性者の割合が高いことについて有意傾向がみられた

($p=0.0955$)。

表 13-2 男性における抗体陽性有無別・勤務年数

	抗体陽性なし	抗体陽性あり	計		抗体陽性なし	抗体陽性あり	計		抗体陽性なし	抗体陽性あり	計
～5年	32	3	35	～10年	44	5	79	～15年	65	16	81
5年以上	56	23	79	11年以上	44	21	65	16年以上	23	10	33
計	88	26	114	計	88	26	114	計	88	26	114

5年以内と6年以上、10年以内と11年以上、15年以下と16年以上のいずれの分け方においても、勤務年数が長い方が陽性者の割合が高いことについて有意であった(それぞれ $p=0.028$ 、 $p=0.006$ 、 $p=0.045$)。

表 13-3 男性獣医師における抗体陽性有無別・勤務年数

	抗体陽性なし	抗体陽性あり	計
～10年	32	4	36
11年以上	44	20	64
計	76	24	100

勤務年数が11年より長いほど、抗体陽性者の割合が高いことについて有意であった($p=0.028$)。

表 14 抗体陽性有無別・1日のうちで動物や動物ケージ等と接する時間

	1時間未満	1～2時間未満	2～4時間	4～6時間	6～8時間	8時間以上	その他	総数
抗体陽性なし	6	5	12	26	48	160	1	258
抗体陽性あり	4	2	4	11	10	33	1	65
総計	10	7	16	37	58	193	2	323

動物や動物ケージ等と接する時間と抗体陽性有無については、勤務時間6時間を境として、勤務時間が短い方が、抗体陽性者の割合が有意に高かった($p=0.019$)。

表 15 地区別・いずれかの検査項目が陽性であった人数

	いずれかが陽性	総数
埼玉	29	163
	17.8%	
神戸	21	90
	23.3%	
北九州	15	70
	21.4%	
総計	65	323
	20.1%	

χ^2 検定では、地域間の差はみられなかった。

表 16 職種別・いずれかの検査項目が陽性であった人数

	いずれかが陽性	総計	%
獣医師	28	135	20.7
獣医看護師	30	151	19.9
トリマー(美容)	3	12	25.0
受付事務	2	14	14.3
行政	2	7	28.6
その他	0	4	0
総計	65	323	100

平成 20 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）
分担研究報告書

3. 1. 沖縄島北部におけるジャワマングース (*Herpestes javanicus*) の
レプトスピラ (*Leptospira* spp.) 保菌状況

研究分担者：宇根有美	麻布大学獣医学部病理学研究室
研究協力者：桜井悠子	麻布大学獣医学部病理学研究室
：田中脩嗣	琉球大学農学部亜熱帯動物学講座
：小倉剛	琉球大学農学部亜熱帯動物学講座
：平良勝也	沖縄県衛生環境研究所
：石橋治	厚生労働省広島検疫所
：増澤俊幸	千葉科学大学薬学部免疫/微生物学研究室

研究要旨：

国内各地でレプトスピラ症が散発しているが、沖縄県は患者発生数が最も多い。そこで、沖縄県におけるヒトレプトスピラ症の感染源として保菌動物を特定するため、沖縄島北部地域のジャワマングースのレプトスピラ保有状況を病理学および分子生物学的に検索した。各種検査法別の陽性率は、ワーシンスターリー染色：12.1%(21/173)、免疫染色：15%(20/133)、PCR法：14.7%(24/163)、菌分離：20.2%(25/124)で、3つの方法のいずれかで検出されたものは23.3%(29/124)であった。なお、抗体保有率は32.5%であった。分離菌の血清型はHebdomadisが最も多く、次いでAutumnalis、Javanicaであった。

以上より、マングースは、レプトスピラ保菌率が高く、さらに、分離菌の血清型が本地域の患者より最も多く検出されるタイプであったことから、マングースはレプトスピラの自然保菌動物であり、ヒトへの媒介動物となっている可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

レプトスピラ症は病原性レプトスピラの感染による人獣共通感染症である。発生は全世界的にみられ、年間患者発生数は50万人以上と推測されている。国内では1970年代前半までは毎年50~250名の死亡者が報告されていたが、近年では患者数は著しく減少した。しかし、現在でも散発的な発生は全国各地で認められ、特に沖縄県では他の地域よりも多く発生

している。2003年11月から2007年11月までの患者発生数は輸入例を含め計93例で、国内87例のうち40例(46%)が沖縄県での感染と推定されている。

レプトスピラはスピロヘータ目(order *Spirochaetales*)、レプトスピラ科(family *Leptospiraceae*)、レプトスピラ属(genus *Leptospira*)に属するグラム陰性細菌である。レプトスピラ属は、病原性レプトスピラ *L. interrogans sensu lato* と非病

原性レプトスピラ *L. biflexa sensu lato* に大別され、DNA の相同性に基づき、13 遺伝種と、分類が確定していない 4 つの遺伝群に分類され、さらに免疫学的性状により 250 以上の血清型に分類されている。病原性レプトスピラは広範囲に亘る動物種に感染するが、特に野生及び人家の周辺にいるげっ歯類やウシ、ブタ、イヌなどの家畜はヒトへの重要な感染源となる。自然宿主は特定のレプトスピラ属菌を腎臓に保有し、長期間、ときには生涯にわたり尿中にレプトスピラを排出する。ヒトはこの保菌動物の尿で汚染された水や土壌との接触、あるいは尿との直接的な接触により、経皮または経口感染する。その症状は軽症型のインフルエンザ様症状から、重篤なワイル病様症候群(黄疸、腎不全、出血、心筋炎など)、髄膜脳炎、肺出血まできわめて多様である。

レプトスピラの病原因子は十分に解明されていない。血清型によって、症状の軽重が異なるとする報告があるが、特定の血清型に特異的な症状がみられるわけではない。多くのレプトスピラ菌種はきわめてよく特定の自然宿主に適応し、なんら症状を呈することなく感染している。

ジャワ マングース (*Herpestes javanicus* : 以下マングース) は 1910 年にハブの駆除と野鼠被害を防ぐ目的として沖縄島へ導入された。しかし、マングースはヤンバルクイナ (*Gallirallus okinawae*) など固有の稀少野生動物を脅かし、亜熱帯森林生態系に重要な影響をもたらすため、2000 年より沖縄島北部地域においてマングース駆除事業が開始された。さらに 2004 年には外来生物法が制

定され、マングースは特定外来生物の 1 種に指定され、2005 年の施行より生息地からマングースを完全排除するため 10 年間にわたる本格的根絶事業が開始された。

石橋らの報告によると、沖縄島北部地域におけるマングースのレプトスピラの分離率は 30.1% とされ、マングースが環境中のレプトスピラ汚染をより高頻度に維持している可能性が示唆されている。これらの調査で行われた方法は菌分離のみであり、マングースがレプトスピラの自然保菌動物であるかは明らかではない。レプトスピラ症の防除には、感染源となる動物の特定と、その動物の制御は極めて重要である。本研究の目的は、沖縄島北部地域におけるマングースがレプトスピラの自然保菌動物であるかを病理組織学的に検討し、また、2002 年に行われたマングースのレプトスピラ保有調査から 5 年経過し、捕獲事業が本格化した現在のレプトスピラ保有状況を分子生物学的手法、および特殊染色、免疫染色を用いた病理組織学的手法により明らかにし、さらに菌の分布と感染に関連した病変を明らかにすることである。

B. 研究方法

1) 材料

材料は、外来生物法に基づき沖縄島北部地域(国頭村、東村、大宜味村)(図 1)において行われているマングース防除実施計画により、2007 年 5 月から 2008 年 8 月までの期間に捕獲されたマングースの腎臓 173 検体を用いた。動物の捕獲にはスルメを餌としたカゴワナを用いた。捕

獲したマングースはペントバルビタールナトリウム(50mg/ml, 0.7ml/kg, 腹腔内投与)による麻酔後、外部形態測定を行い、開腹して腹部大静脈から全採血により安楽死させた。そのうち、No.1~49の49頭は死後、冷凍保存し、解凍後剖検、No.50~173の124頭は死後直ちに剖検し、腎臓を採取した。なお、マングースの安楽死、剖検、腎臓の採材は琉球大学農学部亜熱帯動物学講座によって行われた。

2) 病理学的検査

採取した腎臓を10%緩衝ホルマリンによって固定し、定法に従いパラフィン包埋した後、4 μ mで薄切、HE染色およびワシンスターリー染色(以下WS染色)を施した。HE染色による病変の観察は死後変化の少なかったNo.50~173の124検体で行った。WS染色による菌感染の検出は173検体全てで行った。観察された病変はレプトスピラの保有との関連を χ^2 検定にて検討した。

免疫組織学的検査はNo.1~109の109検体で、以下の手順により行った。4 μ mで薄切した切片を脱パラフィン後、0.5%過酸化水素加メタノール室温20分間で内因性ペルオキシダーゼ反応を阻止し、5%スキムミルク室温30分間で非特異反応を阻止した。一次抗体はレプトスピラの血清型3種類(*L. interrogans* serovar *Hebdomadis*, *L. interrogans* serovar *Autumnalis*, *L. Borgpetersenii* serovar *Javanica*)によってそれぞれ免疫されたウサギ抗血清(千葉科学大学薬学部免疫/微生物研究室増沢俊幸教授より分与)を3,000倍に希釈し、4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。PBS洗浄後、二次抗体としてペルオキシ

ダーゼ標識抗マウスIgGポリクローナル抗体(ヒストファイン、シンプルステインMAX-PO[MULTI])を室温1時間で反応させた。発色はDABにより行い、ヘマトキシリンで核染色した後、脱水、透徹、封入を行った。

3) 分子生物学的検査

分子生物学的検査はNo.1~163の163検体で行った。採集した腎臓を99%アルコールで固定し、滅菌PBSで洗浄、組織量が5mgになるようにカッターを用いて細切した後、FastPure DNA Kit(TaKaRa)を用いてプロトコールに従いDNAを抽出した。抽出したレプトスピラDNAを鋳型として、特異的プライマーL-flaB-F1(5'-TCTCACCGTTCTCTAAAGTTCAAC-3')ならびにL-flaB-R1(5'-CTGAATCGGTTTCATATTTGCC-3')により、遺伝子のPCR反応を行った。反応液組成、反応条件は表に示す(表1、2)。

また、No.1~109のうちで増幅産物の得られた検体は千葉科学大学薬学部免疫/微生物学研究室の増沢俊幸教授にシーケンス解析による種同定を依頼した。

C. 研究結果

各検査方法の結果の一覧を表に示した(表4)。

1) 病理組織学的および免疫組織学的検査

WS染色の結果、173検体中21検体(12.1%)で皮質尿細管内に黒色に染まる菌体が観察された(図3)。菌は細毛状を呈し、近位あるいは遠位尿細管内に密集していた。コロニーは皮質表層から深部にかけて、限局性にネフロン単位でスポッ

トを形成していた。軽度感染例では皮質深部の1、2箇所尿細管にわずかに観察されるのみだったが、濃厚感染例では皮質全体に分布し、尿細管内に菌が密集、充満していた。

抗レプトスピラ抗体を用いた免疫染色はNo.1~133の133検体で行い、20検体(15%)で陽性反応が得られた。WS染色で菌体が観察された全ての検体で免疫染色陽性を示す菌体が観察され、WS染色と免疫染色の結果は一致していた。血清型 *Hebdomadis*, *Autumnalis*, *Javanica* の3種類の抗体を用いたが、いずれの菌体も3種類すべての抗体に対して陽性反応(交差反応)を示した(図4)。染色性の強さは抗体、検体により差があり、その検体から分離された菌の血清型に一致した抗体が強く染まる傾向が認められた。

HE染色では、WS染色および免疫染色結果に基づいてレプトスピラの菌体を認識することはできなかつたため、菌が確認された部位と同部位の尿細管を観察したが、壊死、変性、周囲間質の炎症などの病変は見られなかつた(図3)。その他、124検体中11検体において、腎盂の移行上皮粘膜から腎実質にかけての結合組織内に孤在性のリンパ球集簇が1から数か所観察された(図5)。また、9検体において間質のリンパ球浸潤が観察された(図5)。これらはわずかな巣状のリンパ球浸潤が1、2ヶ所認められるものがほとんどだったが、2例では炎症が皮質全体に広がり、リンパ球性間質性腎炎の像を呈していた。3検体においては腎盂と間質の両方にリンパ球の浸潤が観察された。これらの病変において、菌の存在部位と炎症反

応部位は一致しなかつた。また、病変の有無と感染には統計学的に関連はなかつた(表3)($p < 0.05$)。

2) 分子生物学的検査結果

レプトスピラに特異的な *L-flaB* プライマーによりPCR反応を行った結果、163検体中24検体(14.7%)で約790bpの増幅産物が観察された(図2)。No.1~109のうちでPCRにより陽性となった20検体のシーケンス解析の結果、これらのうち17検体で遺伝種が同定された(表5)。No.39、40はPCRで複数の増幅産物が検出されたため、*flaB* の増幅と思われる産物を電気泳動ゲルから切り出し精製後シーケンス解析を行った。しかし、得られたシーケンスはレプトスピラの鞭毛遺伝子とは異なるものであり、非特異的増幅であると考えられた。

3) 共同研究者による成果(微生物学的検査)

No.50~173の124検体は琉球大学農学部亜熱帯動物学講座により、腎臓からの菌分離、分離培養菌のMATによる血清型の推定、血清からの抗体価測定が行われた。結果は以下のとおりである。

分離率: 20.2%(25/124)

血清型: *Hebdomadis* 8株、

Autumnalis 群 6株、

Javanica 4株、不明 1株

抗体陽性率: 32.5%(13/40)

D. 考察

国内レプトスピラ症患者発生数が最も高い沖縄県におけるレプトスピラの保菌動物を明らかにするために、沖縄島北部地域のジャワマングース(以下マングー

ス)のレプトスピラ保有状況を病理学のおよび分子生物学的に検査し、その病理像を検討した。各種検査法別の結果は、WS染色により12.1%(21/173)、免疫組織化学的検査により15%(20/133)、PCR法により14.7%(24/163)、菌分離により20.2%(25/124)検出された(W染色と免疫染色は実施数が異なるため、結果の数値は異なるが、これらの結果は完全に一致していた)。病理学、分子生物学的および微生物学的検査をすべて実施した124検体中29検体(23.3%)より、いずれかの検査法によりレプトスピラが検出された。また、MATによる抗体保有率は32.5%だった。

今回行った検査法のうち、検出感度が最も高かったのは菌分離で、次いでPCR法、そしてWS染色、免疫染色であった。ただし、菌分離はできなかったものの、PCR法あるいは病理検査により菌が検出された検体もあったことから、レプトスピラの検出には、菌分離に加え、各種の方法を併用することによって、より正確な病原体保有率を明らかにすることができると考えられた。また、菌分離は安楽死後直ちに採材を行える場合に限られる上、培養に長期間を要するという短所がある。これに比較して、PCR法は、冷凍材料およびアルコール固定材料にも適用でき、さらに短時間で多くの検体を処理できることから、検査法として推奨できる。

これまでの研究で、沖縄県の野生動物ではマングースの他に、クマネズミ(30%)、ドブネズミ(11.8%)、ハツカネズミ(6.8%)、ジャコウネズミ(2.4%)、オキナワハツカ

ネズミ(1.8%)等からレプトスピラが分離されている。また、リュウキュウイノシシは抗体保有率51.1%とレプトスピラ保菌動物としての可能性が示唆されている。沖縄県以外では北海道において野生化したアライグマがレプトスピラの保菌動物として挙げられているが、菌の分離率は3.8%、抗体保有率は36.9%である。また、全国規模での野鼠のレプトスピラ保菌調査の結果は分離率2.1%であった。

マングースは、カリブ海地域やハワイ諸島においてもレプトスピラのレゼルボアとして報告されており、バルバドス島における分離率は2.9%であった。これらと比較すると、沖縄県の野生動物は他地域に比べ、高率にレプトスピラに汚染されており、また、マングースは中でも比較的高率にレプトスピラを保有していると考えられた。

石橋らによって行われた調査(2002年)では分離率は30.1%(n=133)であったが、今回の分離率は20.2%(n=124)と有意に低かった($p>0.01$)。これは、個体番号No.120以降の個体、すなわち、捕獲時期が調査実施期間の後半の個体での保有率が著しく低下したことによるもので、その要因として、捕獲された時期、捕獲される動物の年齢あるいは捕獲地の違い等が考えられた。また、2000年より実施されているマングース駆除事業により年々マングースの生息数は減少し、その密度は低下していることから、これらがマングースのレプトスピラの保菌状況に影響を与えている可能性もあったが、原因を特定するに至らなかった。いずれにせよ、長期的な視点で捉えれば、保有率は依然

として高く維持されていたため、今後継続した調査が必要とされる。

今回、No.50~89の40例について抗体検査を行ったところ、保有率は32.5%であった。病理検査および培養分離率とほぼ一致しており、本地域におけるマングースは抗体を保有する個体のほとんどがレプトスピラを保菌していると考えられた。パルパドス島における調査では、マングースの腎臓からの菌分離率は2.9%であるが、MATを用いた抗体保有率は40.7%と、病原体保有に対し抗体の保有率が明らかに高値を示している。一方で、同じ地域に生息するマウスでは菌分離率28.9%であるのに対し、抗体保有率は28.2%であった。このように、レプトスピラの保菌率は動物種や地域によって様々で、加えて、抗体保有と保菌の状況も、地域と動物種によって異なることが改めて示唆され、この実際の把握が、その地域での自然宿主(保菌動物)探索の一助になるものと考えられた。

今回、レプトスピラが腎皮質の尿細管内に密集する像が観察されたが、菌感染に関連した病変は観察されなかった。レプトスピラ症の病理組織学的特徴は尿細管の変性および壊死、間質の単核細胞浸潤である。慢性期には炎症性細胞の浸潤とともに著しい間質の線維化と糸球体の消失が起り、慢性硬化性病変に移行する。しかし、げっ歯類を始めとする特定の血清型のレプトスピラと共生関係をもつ動物種は徴候を示さずに、終生排菌し続けることが報告されている。ラットにおける高病原性レプトスピラの接種実験では、無症候性の腎キャリアー状態が長

期間持続し、血清群 *Icterohaemorrhagiae* に感染したラットでは220日間、血清型 *Copenhagen* は4ヶ月間の感染の持続が確認されている。レプトスピラは宿主に感染すると血中に現れ、速やかに全身の組織へ拡散する。その後、免疫応答が誘起され、全身臓器からレプトスピラは排除され腎臓の尿細管内に蓄積し、尿中へ排泄される。このプロセスは感受性動物においても、ラットのような抵抗性動物でも同じ動態を示すが、ラットではこれらの過程の中で組織学変化は伴わず、レプトスピラを腎臓内に長期間あるいは終生排出し、自然保菌動物となる。今回、マングースにレプトスピラ感染に関連する病変は観察されなかったことから、マングースはげっ歯類と同様に、レプトスピラの自然保菌動物であることが示唆された。

11検体においてみられた腎盂におけるリンパ球の集簇像、9検体においてみられた間質のリンパ球浸潤あるいは非化膿性間質性腎炎についても検討したが、レプトスピラの分布と病変部位の関連、および統計学的にも菌との関連はなかった。

免疫染色では、*Leptospira* の3種類の血清型に対する抗体を使用した。この抗体は通常MATにおいて血清型の型別で使用される血清であったにもかかわらず、陽性個体では3種類全ての抗体に対し反応を示した。これはレプトスピラが共有する共通抗原に対する抗体から起きた交差反応の結果であると推測された。

今回分離された菌の血清型は *Hebdomadis* が最も多く、次いで *Autumnalis* 群、*Javanica* だった。腎臓

からの *flaB*-PCR のシークエンス解析により得られた菌種は、*Hebdomadis* と *Autumnalis* 群は *L. interrogans*、*Javanica* は *L. borgpetersenii* と一致した。レプトスピラの血清型は特定種の保菌宿主と関連する傾向があり、例えば血清型 *Copenhageni* はラット、*Canicola* はイヌ、*Harjo* はウシとそれぞれ関連している。

前回の調査と同様、マングースが *Hebdomadis* を最も高率に保有していたという点から、*Hebdomadis* とマングースには宿主特異性があることが示唆される。同じく沖縄島北部地域におけるレプトスピラ保有調査においてクマネズミでは *Javanica* が分離され、抗体保有調査ではハツカネズミ属で *Autumnalis*、*Rachmati*、*Grippytyposa*、リュウキュウイノシシでは *Hebdomadis*、*Autumnalis*、*Icterohaemorrhagiae* などが確認されている。沖縄県を除く日本国内の主要なヒトのレプトスピラ症血清型は *Australis*、*Autumnalis*、*Canicola*、*Copenhageni*、*Hebdomadis*、*Icterohaemorrhagiae* とされているが、沖縄県ではレプトスピラ症発生患者の 36% を *Hebdomadis* が占め、続いて *Rachmati*、*Icterohaemorrhagiae*、*Javanica*、*Pyrogenes* 等、12 種類が確認されている。また、沖縄県内においてもその地域によって流行の血清型は異なり、沖縄島北部地域では *Hebdomadis* が 66% と大半を占める。近年発生した、同地域における河川でのレクリエーションに関連したレプトスピラ症の散発および多発事例では、レプトスピラ症と診断された患者 16 症例のうち 14 症例が感染血清型は *Hebdomadis* と判定された。沖縄島北

部地域における発生患者の血清型と沖縄島北部地域におけるマングースの保有するレプトスピラの血清型が一致することから、マングースはこの地域においてレプトスピラの媒介動物となっている可能性が考えられた。

以上をまとめると、沖縄島北部地域におけるマングースのレプトスピラ保有率は 23.3% であった。感染に関係する病変はなかった。最も多かった血清型は *Hebdomadis* であり、これは同地域におけるレプトスピラ症発生患者の血清型と一致した。これらのことから、マングースがレプトスピラの自然保菌動物であり、レプトスピラの環境中への汚染源の一因となり、ヒトへの媒介動物になっている可能性が強く示唆された。

F. 参考文献

1. Damude, D. F., Jones, C. J., Myers, D. M. 1979. A study of leptospirosis among animals in Barbados W.I. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73:161-168.
2. Daniel, A., Athanazio, b., Everton, F., Silva, Cleiton, S., Santos, Gustavo, M., Rochaa, Marcos, A., Vannier-Santosa., Alan, J. A., McBridea. Albert, I. Ko, Mitermayer, G. Reis. 2008. *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica*. 105:176-180
3. Everard, C. O., Sulzer, C. R., Bhagwandin, L. J.,

- Fraser-Chanpong, G. M., James, A. C. 1980. Pathogenic leptospira isolates from the Caribbean Islands of Trinidad, Grenada and St. Vincent. *Int J Zoonoses*. 7:90-100.
4. Faine, S., Adler, B., Bolin, C., Perolat, P. 1999. *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia.
5. Higa, H. H., Fujinaka, I. T., 1976. Prevalence of rodent and mongoose leptospirosis on the Island of Oahu. *Public Health Rep*. 91:171-7.
6. <http://kyushu.env.go.jp/naha/wildlife/gairai.html>
7. <http://www.env.go.jp/nature/intro/3control/index.html#kihon>
8. Ido, Y., Hoki, R., Ito, H., Wani, H., 1917. The rat as a carrier of *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*, the causative agent in Weils disease (spirochaetosis icterohaemorrhagiae). *J. Exp. Med.* 26:341-353.
9. 飯島康夫. 2007. 沖縄島におけるマングース対策の実際と今後. 緑の読本. 78:70-79.
10. 石橋治, 阿波根彩子, 中村正治, 盛根信也, 平良勝也, 小倉剛, 仲地学, 川島由次, 仲田正. 2006. 沖縄島北部のジャワマングースおよびクマネズミにおけるレプトスピラの保有調査. 日本野生動物医誌. 11:35-41.
11. 城ヶ原貴通, 中村正治, 盛根信也, 石橋治, 小倉剛, 川島由次, 織田統一. 2005. 沖縄島産ハツカネズミ属(*Mus* spp.)における *Leptospira* 抗体調査ならびに *Leptospira* の分離調査. 日本野生動物医学学会誌. 10:85-90.
12. Kawabata, H., Dancel, L. A., Villanueva, S. Y., Yanagihara, Y., Koizumi, N., 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.
13. 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: 厚生労働科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業, 平成 15 年~平成 17 年度総合研究報告書, pp. 29-31.
14. 小泉信夫, 渡辺治雄. 2005. これだけは知っておきたい国際感染症; レプトスピラ症. *JCLS*. 25:606-609.
15. 小泉信夫, 渡辺治雄. 2006. レプトスピラ症の最新の知見. *モダンメディア*. 52:1-18
16. 小泉信夫, 渡辺治雄. 2008. レプトスピラ症. 病原微生物検出情報. 1-7
17. 厚生労働科学研究費補助金, 新興・再興感染症研究事業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, サーベイランスとその制御に関する手引き.
18. Matthias, M. A., Levett, P. N. 2002. *Leptospiral* carriage by mice and mongooses on the island of Barbados. *West Indian Med J.* 51:10-13
19. Minette, H. P. 1964. *Leptospirosis* in

- rodents and mongooses on the island of Hawaii. *Am J Trop Med Hyg.* 13:826-832.
20. 中村正治, 平良勝也, 糸数清正, 久高潤, 安里龍二, 大野惇, 増澤俊幸. 2004. 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.
21. Nakamura, M., Taira, K., Itokazu, K., Kudaka, J., Asato, R., Kise, T., Koizumi, N. 2006. Sporadic cases and an outbreak of leptospirosis probably associated with recreational activities in rivers in the northern part of Okinawa Main Island. *J Vet Med Sci.* 68:83-5.
22. 中村正治, 平良勝也, 久高潤. 2003. 河川が感染源と推定されたレプトスピラ症の多発. 病原微生物検出情報. 24:326-327.
23. Nally, J. E., Chow, E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R., Lovett, M. A. 2005. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. *Infect Immun.* 73:3251-3260.
24. Nally, J. E., Fishbein, M. C., Blanco, D. R., Lovett, M. A. 2005. Lethal infection of C3H/HeJ and C3H/SCID mice with an isolate of *Leptospira interrogans* serovar copenhageni. *Infect Immun.* 73:7014-7.
25. 日本獣医病理学会 編. 動物病理学各論. 文永堂. 東京.
26. 岡野祥, 平良勝也, 中村正治, 大城直雅, 大野惇, 奥那原良克. 2008. 沖縄県におけるレプトスピラ症患者の発生状況1988~2007. 病原微生物検出情報. 29:1-15
27. 小倉剛, 川島由次, 織田銃一. 2003. 外来動物ジャワマングースの捕獲個体分析および対策の現状と課題. *JVM.* 56:295-301
28. WHO. 1999. Leptospirosis worldwide. *Weekly Epidemiol Rec.* 74:237-242.
29. 山田文雄. 2006. マングース根絶への課題. 哺乳類科学. 46:99-102.
30. 吉織綾子, 的場洋平, 浅川満彦, 高橋樹史, 菊地直哉. 2004. 北海道のアライグマにおけるレプトスピラの浸潤調査. 日本獣医学会学術集会講演要旨集第138回, pp.104

表1 反応液組成(全量50 μ l)

反応液	容量
TaKaRa TaqTM	0.2 μ l
10 \times PCR Buffer	5 μ l
dNTP Mixture	4 μ l
Template	10 μ l
L-flaB-F1	0.5 μ l
L-flaB-R1	0.5 μ l
H2O	29.8 μ l

表2 flaB-PCR反応条件

	温度	時間	cycle数
熱変性	95 $^{\circ}$ C	3分	1cycle
↓			
熱変性	95 $^{\circ}$ C	30秒	
アニーリング	50 $^{\circ}$ C	30秒	30cycle
伸長反応	72 $^{\circ}$ C	1分	
↓			
伸長反応	72 $^{\circ}$ C	5分	1cycle

表3 レプトスピラ感染と病変の相関

		A	B	A+B
レプトスピ ラ保有	陽性	6	5	2
	陰性	4	4	1

A:腎盂リンパ球集簇
B:間質リンパ球浸潤