

Itoh, M., Yahathugoda, T.C.,
Vidanapathirana K.K., Mudalige
M.P., Kimura E. Distribution of
filarial elephantiasis and
hydrocele in Matara district, Sri
Lanka, as reported by local leaders,
and an immunological survey in
areas with relatively high
clinical rates. *Parasitology
International*, 57:390-395, 2008

3. Weerasooriya, M.V., **Itoh, M.,**
Islam, M.Z., Aoki, Y.,
Samarawickrema, W.A., Kimura, E.
Presence and gradual disappearance
of filaria-specific urinary IgG4
in babies born to
antibody-positive mothers: a
2-year follow-up study.
Parasitology International,
57:386-389, 2008

1-3. 市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査

A. 研究目的

我が国に長期間在住するアジア系外国人が、淡水産・汽水産のカニを食材とする出身地固有の料理を加熱せずに賞味し、肺吸虫に感染する事例が、絶えずに報告されている。飲食を共にした日本人の感染も報告されており、食習慣に起因する新たな肺吸虫症として、注意する必要が出てきた。これらの事例の中には、食用として市販されていたサワガニが、原因食材となった場合も認められた。そこで、食用に販売されていたサワガニを対象に、肺吸虫の寄生状況を調べ、検出された肺吸虫は、人体への寄生性を判定する為に、虫種を同定した。

B. 研究方法

東京都のスーパーマーケットやデパートの鮮魚売り場、あるいは鮮魚店で、2004年4月から

2008年2月の間に8回にわたり、合計266匹の食用サワガニを購入し、肺吸虫の寄生状況を調べた。また福岡市内でも食用サワガニ30匹を購入し（2008年4月・宮崎県産）、肺吸虫寄生の有無を調べた。肺吸虫メタセルカリアが検出された場合は、まず形態鑑別を試みた。次にPCR産物を得て、制限酵素による切断解析（PCR-RFLP）と配列解読を行なった。標的とする遺伝子領域には、核リボソームDNA・ITS2領域とミトコンドリア・16SリボソームDNAの部分配列を選んだ。前者は宮崎肺吸虫とウェステルマン肺吸虫との鑑別、後者はウェステルマン肺吸虫の2倍体型と3倍体型との判別に利用した。

C. 研究結果

東京都の鮮魚店で購入した合計266匹のサワガニのうち、44匹（17%）から肺吸虫のメタセルカリア（被嚢幼虫：人や動物への感染能力を持つ発育段階）が検出された（表1）。メタセルカリアの寄生数が最も多かったのは、2008年2月に購入した宮崎県産のサワガニで、1匹から最高23個のメタセルカリアが検出された。肺吸虫の種類を調べると、宮崎肺吸虫と同定されたものが最も多かった。しかしウェステルマン肺吸虫（2倍体型、あるいは3倍体型）が検出されたサワガニもあった。

福岡市の鮮魚店で購入した合計30匹のサワガニでは、15匹からメタセルカリアが検出された。これらはどれも宮崎肺吸虫であった。

D. 考察

食用として販売されているサワガニの約2割（東京都）および5割（福岡市）に、肺吸虫メタセルカリアが寄生していた。この事実を、感染症・公衆衛生関係の専門家および地方自治体の医療保健行政担当者に周知する必要がある。サワガニを安全に喫食するには、何よりも十分な加熱が必要となる。これも徹底して啓発する必要がある。

E. 結論

食用として販売されているサワガニには、人体感染性の肺吸虫が多数寄生しており、非常に

危険である事が明らかとなった。

表1 東京都内において食用として販売されていた
サワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出状況

購入時期	産地	検査数	陽性数(%)	検出メタセル カリア数	同定結果*
2004. 4.	静岡	48	0(0)	0	-
2007. 4.	宮崎	46	0(0)	0	-
2007. 4.	宮崎	16	7(44)	29	Pm
2007. 4.	長崎	21	5(24)	9	Pm
2007. 6.	静岡	35	0(0)	0	-
2007. 6.	宮崎	44	5(11)	9	Pw(3n)
2008. 1.	宮崎	30	4(13)	6	Pm, Pw(2n)
2008. 2.	宮崎	26	23(88)	116	Pm
合計		266	44(17)	169	

* Pm: 宮崎肺吸虫; Pw(2n): ウェステルマン肺吸虫 (2倍体型);
Pw(3n): ウェステルマン肺吸虫 (3倍体型)

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **杉山 広**, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩. 食用として販売されていたサワガニからの肺吸虫メタセルカリアの検出. 病原微生物検出情報, 29: 284-285, 2008
2. **杉山 広**, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩. 市販サワガニを対象とした肺吸虫メタセルカリアの寄生状況調査. Clinical Parasitology (臨床寄生虫学会誌), 19: 印刷中, 2008

2. 学会発表

1. **杉山 広**, 梅原梓里, 森嶋康之, 川中正憲, 山崎 浩. 市販サワガニを対象とした肺吸虫

メタセルカリアの寄生状況調査. 第19回日本臨床寄生虫学会大会, 京都, 2008

1-4. タイに分布するウェステルマン肺吸虫の
2型: 系統関係の解析

A. 研究目的

在日外国人が淡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の報告が絶えない。食材となるカニは市場で購入する, あるいは住居近くの河川で自ら採集する等で調達されてきた。更に彼らが里帰りする時に持ち帰ったカニも, 食材として利用される可能性が高い。

淡水産のカニを用いた伝統料理で肺吸虫に感染する事例は, 韓国, 中国, タイなど, 我が国と交流が深い東アジア・東南アジアの国からの人に多く認める。この中でも興味深い話題として, 時に学会で報告されるのは, タイレストラ

ンを経営するタイ人女性（とその友人達）の感染事例である。飲食を共にした日本人が同時に感染した例も報告されている。我々もこの様な事例が次々と報告される事に関心を持ち、タイにおける肺吸虫の発生分布に関し、病原体そのものや病気の背景となる食文化の進入阻止も視野に入れて、継続的な検討を進めてきた。

タイには少なくとも7種類の肺吸虫が分布するが、人への感染は専らヒロクチ肺吸虫を原因とする。一方、我が国を始め東アジアの各国で人体種として重要なウエステルマン肺吸虫は、タイでは人体症例が報告されていない。在日外国人あるいは邦人から検出される輸入あるいは原発の肺吸虫症例について、感染地の特定を含む分子疫学的調査を進めていたところ、形態学的にも明らかに2型に分類できるウエステルマン肺吸虫が、タイ南部の同一種のカニから、メタセルカリアとして分離された。この材料について、以下の検討を加えた。

B. 研究方法

タイ南部のスラタニ県で採集した淡水産のカニ *Phricotelphusa aedes* を検索材料に、大小2種類の肺吸虫メタセルカリアを分離した。このメタセルカリアと試験感染ネコから回収した虫体について、形態観察と塩基配列の解読・系統関係の解析を行った。

C. 研究結果

(1) 大型メタセルカリアとそれに由来する成虫の形態

メタセルカリアは球形を呈し、直径は平均473 μ m (383-522 μ m)であった。また試験感染ネコから回収した成虫は紡錘形を呈し、体長は7.6mmであった(198日齢成虫・染色封入標本)。成虫の腹吸盤は、虫体中央部より前方に位置した。卵巣は腹吸盤の前方片側に位置し、6本に単純に分岐した。卵巣の反対側には子宮を認め、内腔には虫卵が充満していた。腹吸盤の後方両側には、左右に各1個、精巣を認めた。その大きさは卵巣とほぼ同大か、あるいはわずかに小さく、葉は5-6本に単純に分岐した。また皮棘は単生であった。これらの形態学的特徴は、メ

タセルカリアおよび成虫共に、ウエステルマン肺吸虫の所見と良く一致した。

(2) 小型メタセルカリアとそれに由来する成虫の形態

メタセルカリアは球形を呈し、直径は平均227 μ m (204-252 μ m)であった。大型メタセルカリアと比較すると、その大きさはほぼ半分に留まった。試験感染ネコから回収した成虫は紡錘形を呈し、体長は4.4mmであった(163日齢成虫・染色封入標本)。成虫の体長も大型メタセルカリア由来のものと比較すれば、約6割程度の大きさに留まった。これに対して、生殖器や皮棘の形態は、大型メタセルカリア由来の虫体、すなわち、ウエステルマン肺吸虫に良く一致した。

(3) 塩基配列の解読・解析

大型メタセルカリアおよび小型メタセルカリアからDNAを抽出し、ITS2を含む領域(5.8S + ITS2 + 28S)をPCR増幅したところ、予想サイズのバンド(約520bp)が得られた。配列を解読して相互に比較したところ、ITS2(363bp)では、13箇所(3.6%)で塩基に相違を認めた。次に、大型メタセルカリアおよび小型メタセルカリア由来の配列を国際塩基配列データベースの登録配列と比較した。その結果、大型メタセルカリアの配列は、*P. westermani* strain Thailand, すなわちタイ産のウエステルマン肺吸虫として登録されているものと完全に一致した(Accession No., AF159604)。一方、小型由来の配列とホモログスな配列は、全く見付からなかった。

(4) 系統関係の解析

ウエステルマン肺吸虫の系統関係に関しては、アジアの各地で得た虫体を用いて、検討が進められてきた。その結果、東アジア(日本・韓国・中国・台湾)のもの、東南アジア(タイ・フィリピン・マレーシア)のもの、南アジア(インド・スリランカ)のものに区別される事が分かってきた。

今回検討した大型メタセルカリア由来のウエ

ステルマン肺吸虫は、タイ産のウェステルマン肺吸虫として、東南アジアのグループに位置付けられた。一方、小型メタセルカリア由来のウェステルマン肺吸虫は、東アジアのグループや東南アジアのグループよりも先行して分岐し、両グループを併せた、より大きなグループの一員として、ウェステルマン肺吸虫の構成に関与する事が分かった。

D. 考察

ウェステルマン肺吸虫に関する系統関係については、アジアの各地で得た虫体を用いて、この15年程の間に活発な検討が進められてきた。その結果、各虫体の地理的分布に一致して、大きく3つのグループに分類する事が提案されるに至った (Blair et al., 1999; Doanh et al., 2008)。すなわち、東アジア (日本・韓国・中国・台湾) のもの、東南アジア (タイ・フィリピン・マレーシア) のもの、南アジア (インド・スリランカ) のものの3グループである。今回検討した大型メタセルカリア由来のウェステルマン肺吸虫は、東南アジアのグループに位置付けられた。一方、小型メタセルカリア由来のウェステルマン肺吸虫は、東アジアのグループや東南アジアのグループの上位に位置し、両グループを併せた、より大きなグループの一員として、ウェステルマン肺吸虫の構成に関与する事が明らかとなった。

Iwagami et al. (2008) は、南アジア (スリランカ) のウェステルマン肺吸虫 (卵巣が主に5本に分岐する) と、タイに分布するタイ肺吸虫 (卵巣が6本に単純分岐、皮棘が群生) を、南アジアのウェステルマン肺吸虫として位置付けた。その上で、これらの肺吸虫が東アジア・東南アジアのウェステルマン肺吸虫の祖先種である見なし、本虫の系統発生に関する議論を展開している。小型メタセルカリア由来のウェステルマン肺吸虫は、この議論に根拠を与える重要な種として、研究の発展に寄与する材料と考えられた。人体に対する宿主適合性についても、疫学的な情報を集めて整理する必要がある事が示唆された。

E. 結論

タイの南部で見出した2型のウェステルマン肺吸虫について、形態観察と塩基配列の解説・解析を行った。その結果、一方は、中部タイのウェステルマン肺吸虫 (と同一の系列) である事を明らかにした。そしてもう一方は、東アジア・東南アジアのウェステルマン肺吸虫の共通する祖先種である事を、系統関係の解析結果から明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama, H., Morishima, Y., Binchai, S. and 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, 39 (Supplement. 1):32-36, 2008

2. 学会発表

1. Sugiyama, H., Morishima, Y., Binchai, S. and Rangsiruji, A. Two forms of *Paragonimus westermani* discovered in Thailand: morphological characteristics, host susceptibility and phylogenetic analysis (タイで見出したウェステルマン肺吸虫の2型). 第76回日本寄生虫学会大会, 長崎, 2008

2. アニサキス症に関する研究

: 感染源の特定に向けた日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの同定

A. 研究目的

我が国では魚介類の生食が一般的であるため、

これに起因するアニサキス症が多発し、年間に2,000例以上の症例が発生している。このアニサキス症の主要病原虫である *Anisakis simplex* は、アイソザイムの結果解析やリボソームDNA(以下 rDNA)の介在配列(以下 ITS 領域)に認める塩基配列の相違から、これを同胞種に分けて、*A. pegreffii*, *A. simplex sensu stricto* (s. str., = 狭義の *A. simplex*), *A. simplex C* に分類するという学説が欧州の研究者から提出された。そこで我々は、日本産 *A. simplex* に対して、この新しい基準を適用し、欧州産の虫体と同様に同胞種への分類を試みた。その結果、北海道で患者と魚から得た虫体は、いずれも *A. simplex* s. str. となる事を明らかにした。一方、九州では、患者由来の虫種は北海道と同様に主として *A. simplex* s. str. であったが、魚由来の虫体は *A. pegreffii* となった。このように九州では、魚と患者に由来する優占種が異なっていた。しかしながら、この理由は説明できていない。

我々が従来の検索に用いた九州の魚は、日本海産のマサバ *Scomber japonicus* (以下サバ)であった。そこで、市場で日本海産と同様によく流通する東シナ海産のサバを検索対象とし、*A. simplex* の検出と同胞種レベルでの同定を試みた。千葉県産および新潟県産のサバも対象にして、同様の検索を行なった。

B. 研究方法

福岡県(東シナ海)・千葉県(太平洋)・新潟県(日本海)で各々水揚げされたサバを地元の鮮魚店から購入し、アニサキス虫体の検出を試みた。魚は内臓と体腔を、更に一部については筋肉についても肉眼で検索し、虫体寄生の有無を調べた。検出した虫体は光学顕微鏡下で観察し、形態学的に *Anisakis* I型と確認され、*A. simplex* と推定した虫体を、約2割(東シナ海産)、あるいは全部(他の地域産)選んで、常法に従いDNAを抽出した。次に、各虫体に由来するDNAをテンプレートとし、rDNAのITS領域を標的とするプライマー・ペアを用いて、当該領域をPCR増幅した。増幅された産物は制限酵素 *Hinf*I で消化し、得られた切断パターンに基

づき、D'Amelioら(2000)の提唱に従って、同胞種レベルでの同定を試みた(RFLP解析)。なお一部の虫体については、更に塩基配列を解読して、同定結果を確認した。なお、この方法で種の確定ができないHybrid Genotype (*A. simplex* s. str. と *A. pegreffii* との交雑により産出されたと考えられている虫体で、ITS領域のRFLP解析で2種に認めるバンドを総て保有する(Martin-Sanchezら(2005))については、ミトコンドリア *cox1* 遺伝子のRFLP解析により、何れかの同胞種に分類した。

C. 研究結果(表2, 図1)

福岡県(東シナ海)の虫体152匹のうち、150匹は *A. pegreffii* と同定され、1匹が *A. simplex* s. str. と同定された(残り1匹については後述)。千葉県(太平洋)の虫体76匹は、67匹が *A. simplex* s. str., 9匹が *A. pegreffii* と同定された。新潟県(日本海)の虫体32匹は、16匹が *A. simplex* s. str., 16匹が *A. pegreffii* と同定された。なお、*A. pegreffii* と同定された虫体のうち3匹(福岡県の1匹と千葉県の2匹)、また *A. simplex* s. str. と同定された虫体のうち3匹(いずれも新潟県)は、rDNA・ITS領域の解析では同胞種レベルでの分類ができないHybrid Genotypeであった。

福岡県(東シナ海)の虫体152匹中の1匹は、rDNA・ITS領域のPCR産物を制限酵素処理したところ、*A. simplex* s. str. あるいは *A. pegreffii* とは全く異なる切断パターンを示した。PCR産物の塩基配列を解読した結果、この虫体はインドネシア産の *A. typica* (国際塩基配列データベースのアクセッション番号: EU346092) と同一の配列を持つことが分かった。この虫体の塩基配列を登録し、アクセッション番号: AB432908 を取得した。*A. typica* は、我が国で水揚げされた魚からの検出記録はなく、今回、我々が初めて報告した。

D. 考察

福岡県で水揚げされたサバからは、産地が日本海産であれ、東シナ海産であれ、*A. simplex*

s. str.は殆ど検出されず、*A. pegreffii* が専ら認められる事が明らかとなった。一方、新潟県・千葉県で水揚げされたサバからは、北海道のサバと同様に、人体寄生の原因虫である *A. simplex* s. str. が多数検出された。従って、サバを原因とする九州地域のアニサキス症は、地元産ではなく、他の地域から搬入された *A. simplex* s. str. 陽性のサバを原因とする可能性が示唆された。実際に九州の市場では、他の地域に由来するサバを見る事も多い。感染源が特定できれば、その情報はアニサキス症の発生子防に役立つ。この様な知見を生かした啓発活動を具体的に展開する為に、どの様に取り組んでいけば良いか、現在検討中である。

E. 結論

アニサキス症の原因虫となる *Anisakis simplex* をサバから得て、同胞種レベルでの解析を試みた。その結果、サバを原因とする九州地域のアニサキス症は、地元産ではなく、他の地域から搬入された *A. simplex* s. str. 陽性のサバを原因とする可能性が示唆された。

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. and Sugiyama, H. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health 39 (Supplement 1), 26-31, 2008.

2. 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの分類学的解析. 獣医寄生虫学会誌, 7:36, 2008

2. 学会発表

1. 梅原梓里, 川上 泰, 荒木 潤, 内田明彦, 杉山 広. 日本産 *Anisakis simplex* の同胞種レベルでの分類学的解析. 第145回日本獣医学会学術集会, 相模原, 2008年3月.

表2 サバおよび患者から得た *Anisakis* I型幼虫の分子同定結果

由来	由来地 ^{a)}	検査数	同定数			報告者
			As ^{b)}	Ap ^{c)}	At ^{d)}	
サバ ^{e)}	北海道 (太平洋)	16	16	0	0	Umehara <i>et al.</i> (2006)
	千葉県 (太平洋)	76	67	9	0	梅原ら (本報告)
	新潟県 (日本海)	32	16	16	0	梅原ら (本報告)
	福岡県 (日本海)	38	0	38	0	Umehara <i>et al.</i> (2006)
	福岡県 (東シナ海)	152	1	150	1	梅原ら (本報告)
患者	北海道	5	5	0	0	Umehara <i>et al.</i> (2007)
	九州	95	94	1	0	Umehara <i>et al.</i> (2007)

^{a)}サバの水揚げ地 (漁獲海域) あるいは患者の居住地を示す

^{b)}*A. simplex* s. str. : *A. simplex*に含まれる同胞種の一つ

^{c)}*A. pegreffii* : *A. simplex*に含まれる同胞種の一つ

^{d)}*A. typica* : *A. simplex*の近縁別種。第三期幼虫の形態では、*A. simplex*との鑑別点は認められず、両者は *Anisakis*I型幼虫として扱われてきた⁹⁾

^{e)}マサバ *Scomber japonicus*



図1 サバおよび患者から得た *A. simplex* の地理的分布状況：
同胞種レベルで調べた各虫体の寄生状況

[虫体の由来：検査虫体数]を示す。円グラフのAsは *A. simplex* s. str.、Apは *A. pegreffii* で、数値は各同胞種として同定された虫体数を示す。検査に用いた魚は、いずれもマサバ *Scomber japonicus* で、サバと表記した。なお、*A. typica* (東シナ海産サバに由来する1虫) は、この図には含まれていない。

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
動物由来感染症コントロール法の確立に関する研究

分担研究報告書

16. 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

名古屋市、および西宮市内のマンホール、キャンプ場、公園など、和歌山県田辺市周辺の山林などで野鼠のレプトスピラ保有実態調査を行った。名古屋市内のドブネズミのレプトスピラ保有率は13%、および西宮市内では10%と高率であった。一方、西宮市内のアカネズミのレプトスピラ保有率は0.4%、和歌山では0%であった。アカネズミの保有率が低かった理由としては、西宮の個体は11月～12月の寒い時期に捕獲を行ったために、死亡個体が多く分離できなかった可能性が高い。一方、和歌山では、捕獲頭数が少なかったために、陽性個体が検出できなかったと思われる。分離株の性状解析を*gyrB*の配列解析により行い、そのすべてがこれまで日本各地のドブネズミから分離されている血清型 Pomona に近縁の未同定血清型株であると同定した。また、西宮のアカネズミ由来株は、後述の血清型特異的単クローン抗体を用いて、血清型 Hebdomadis と同定した。

日本に分布するレプトスピラ血清型（*Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Australis*, *Canicola*, *Javanica*, *Grippotyphosa*, *Pomona* 近縁型, *Poi* 近縁型）に対する単クローン抗体を作製した。これまでに *Icterohaemorrhagiae*, *Autumnalis*, *Hebdomadis*, *Australis*, *Canicola* に対する血清型特異的単クローン抗体の作製に成功した。これらの認識抗原は、血清型を規定する 20～25 kDa のリポ多糖体（LPS）であることを確認した。これを、沖縄で駆除されたマングースの腎臓からの免疫組織学的染色によるレプトスピラの検出に応用した。レプトスピラ全菌体免疫ウサギ抗血清を用いた免疫染色では、起因血清型は判定不能であった。一方、単クローン抗体を用いた免疫染色では、感染血清型の推定が可能であった。抗原検出による感染血清型を推定可能なツールとして利用できることが明らかになった。

研究協力者

岡本能弘、福井貴史、川谷慶太、川島遥（千葉科学大学）、宇根有美（麻布大学）、角坂照貴（愛知医科大学）、高田伸弘、矢野泰弘（福井大学）、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国内野鼠の保有状況を調査し、あわせてこれら分離レプトスピラの迅速な血清型同定ツールとして、単クローン抗体の作製を行った。

これまで定点調査を実施してきた名古屋市内、西宮市内、あわせて和歌山県田辺市で近郊の山林でも調査を行った。日本に存在する血清型レプトスピラに対する単クローン抗体を作製、その各種血清群、血清型との反応性を調べ、また感染動物組織からのレプトスピラの免疫組織学的検出に応用した。

B. 研究方法

1. 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 か月間培養した。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。

2. DNA ジャイレース B サブユニット遺伝子 (*gyrB*) のシーケンス解析

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。

3. 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) により系統樹を作製した。系統解析結果よりレプトスピラ遺伝種の決定を行った (図 1)。

4. 単クローン抗体の作製

日本に分布するレプトスピラ血清型 (Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hebdomadis, Australis, Canicola, Javanica,

Grippotyphosa, Pomona 近縁型, Poi 近縁型) に対する単クローン抗体の作製を行った。不活化菌体 1×10^{10} 個をマウス腹腔内に週 1 回、4 回～6 回免疫した。眼底より採血し、凝集抗体価を顕微鏡凝集試験 (microscopic agglutination test, MAT) により測定した。抗体価の上昇したマウスについて、50%ポリエチレングリコールを用いて常法に従いマウスミエローマ細胞 P3X63.Ag8.653 細胞と細胞融合した。HAT 培地による選択をおこない、レプトスピラ凝集抗体産生クローンを MAT により選別した。産生クローンは限界希釈法によりクローニングし、単クローン抗体産生ハイブリドーマクローンを確立した。単クローン抗体として、このハイブリドーマ細胞の培養上清を、または一部はハイブリドーマ細胞をプリスタンで免疫抑制したマウス腹腔内に接種して得られた腹水から精製したものをを用いた。

5. 顕微鏡凝集試験 (MAT) と免疫組織染色

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 $^{\circ}$ 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 1～2 時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡で観察し、単クローン抗体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) を用いて反応性を調べた。また、沖縄で駆除されたマングースの腎臓組織

からの免疫染色法により、レプトスピラの検出、並びに感染血清型の推定を行った。

C. 結果と考察

1. 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、和歌山県田辺市周辺の山林などで野鼠の捕獲とレプトスピラの分離を行った (表 3)。名古屋市内で捕獲したドブネズミのレプトスピラ保有率は 13%、西宮市内では 10% と高率であった。一方、西宮市内で捕獲したアカネズミのレプトスピラ保有率は 0.4%、和歌山では 0% であった。保有率が低い理由としては、西宮の個体は 11 月～12 月の寒い時期に捕獲を行ったために、死亡個体が多く分離できなかった可能性が高い。一方、和歌山では、捕獲頭数が少なく陽性個体が検出できなかった。

分離株の性状解析を *gyrB* の配列解析により行った。ドブネズミから分離された株は、これまで日本各地のいる血清型 Pomona に近縁の未同定血清型株であると同定した (図 1)。現在、この未同定血清型株に対する単クローン抗体の作製を進めている。また、西宮のアカネズミ由来株は、後述の血清型特異的単クローン抗体を用いて、血清型 Hebdomadis と同定した。

2. 血清型特異的単クローン抗体の作製とその応用

日本に分布するレプトスピラ血清型 (Icterohaemorrhagiae, Autumnalis,

Hebdomadis, Australis, Canicola, Javanica, Grippytyphosa, Pomona 近縁型, Poi 近縁型)に対する単クローン抗体の作製を行った。これまでに Icterohaemorrhagiae, Autumnalis, Hebdomadis, Australis, Canicola に対する血清型特異的単クローン抗体の作製に成功した。各種血清群レプトスピラに対する反応性を MAT により調べたところ、抗 Hebdomadis 抗体は血清型 Mini に、抗 Icterohaemorrhagiae 抗体は、血清型 Anhoa, Cynopteri にも交差反応性を示した (表 4)。さらに、それぞれ反応性が見られた血清群内に含まれる各種血清型株を抗原として、交差反応性を MAT により調べたところ、多くの単クローン抗体は同一血清群に含まれる複数の血清型に反応性を示し、必ずしも血清型特異的では無いことが明らかになった (表 5)。しかしながら、現在の日本に分布するレプトスピラ血清型は、同一血清群に属する異なる血清型の存在は知られないことから、国内で使用の上では、血清型特異的抗体と使用して何ら問題ないと考えられる。これらレプトスピラ凝集性単クローン抗体はウエスタンブロット法により、血清型を規定する 20~25 k Da のリポ多糖体 (LPS) を認識することが確認できた。

沖縄で駆除されたマングースの腎臓を材料に、これら単クローン抗体を免疫組織学的染色によるレプトスピラの検出に利用した (図 2)。血清型 Autumnalis 並びに Hebdomadis に対する全菌体免疫ウサギ抗血清を用いた免疫染色では、マングースの腎組織内に、レプトスピラ抗原に由来する染色が見られた。陽性サンプルは、両方の

抗血清に反応し、感染血清型の鑑別は不可能であった。一方、単クローン抗体を用いた場合は、免疫ウサギ抗血清に反応が見られたサンプルは、抗 Autumnalis 単クローン抗体、または抗 Hebdomadis 単クローン抗体のどちらか一方に対する反応性を示すか、あるいはどちらにも反応性を示さないサンプルに分けられた (図 2)。以上の結果より、単クローン抗体を使用することで、感染血清型の推定が可能であることを明らかにした。また、免疫抗血清で反応が見られるのに、単クローン抗体で反応が見られなかったサンプルは、沖縄固有の血清型 Javanica, Grippytyphosa などを含んでいる可能性がある。現在、これらの血清型に対する単クローン抗体の作製を進めており、今後結論を付けることができると考えている。

D.研究発表

発表論文

著書

1. 増澤俊幸: レプトスピラ バイオセーフティの辞典 病原微生物とハザード対策の実際 医学評論社 p.186-187 (2008)

学会発表

1. 福井貴史, 増澤俊幸, 岡本能弘: レプトスピラのヘモグロビン走化性にかかわる因子の探索と同定. 第 45 回レプトスピラシンポジウム (京都市) 2008 年 3 月 23 日 (抄録番号 3)
2. 川島遙, 福井貴史, 増澤俊幸, 岡本能弘: イムノクロマトグラフィーによるレプトスピラ抗原検出法の開発のた

- めの基礎的研究 ～診断用単クローン抗体の作製～. 第45回レプトスピラシンポジウム (京都市) 2008年3月23日 (抄録番号6)
3. Yoshihiro Okamoto, Yumi Une, Takehiro Takeuchi, Keiko Tsukagoshi, Nobuo Koizumi, Hiroki Kawabata, Yasuhiro Yoshikawa, and Toshiyuki Masuzawa: Leptospirosis in Squirrels imported from United States to Japan. International Crisis Management Symposium on CBRN and Emerging Infectious Diseases (Choshi, Japan). September 13-16, 2008 (Abt. p.74)
 4. Hideaki Yoshida, R. Yazima, N. Hayashimoto, A. Takakura, T. Fukui, Yoshihiro Okamoto, and Toshiyuki Masuzawa: Detection of *Leptospira* antigen by ELISA and immunochromatographic assay. International Crisis Management Symposium on CBRN and Emerging Infectious Diseases (Choshi, Japan). September 13-16, 2008 (Abt. p.77)
 5. 桜井悠子、宇根有美、田中修嗣、平良勝也、石橋治、小倉剛、増澤俊幸：沖縄島北部の野生ジャワマングース (*Herpestes javanicus*) におけるレプトスピラ (*Leptospira* spp.) に関する病理学的検討. 第146回日本獣医学会 (宮崎) 2008年9月24～26日
 6. 増澤俊幸：動物由来スピロヘータ感染症、レプトスピラ症 ～野生げっ歯類、輸入動物の感染リスク～. 日本大学・学術フロンティア 公開国際シンポジウム 「野生動物と人獣共通感染症 -人と動物の共生をめざして-」 (藤沢) 2008年10月27日 (要旨 p.7-9)
 7. 桜井悠子、田中脩、平良勝也、石橋治、小倉剛、増澤俊幸、宇根有美：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. 第8回人と動物の共通感染症研究会 (東京) 2008年11月1日
 8. 角坂照貴、米正静男、岡田邦宏、福井貴史、岡本能弘、増澤俊幸：兵庫県西宮市内で捕獲したネズミのレプトスピラ調査 (2005-2008). 日本衛生動物学会西日本支部大会 (神戸) 2008年11月2・3日
 9. Toshiyuki Masuzawa, Keita Kawatani, Haruka Kawashima, Takashi Fukui, Yoshihiro Okamoto, Hideaki Yoshida, Sharon Y. A. M. Villanueva, Yasutake Yanagihara, Nobuo Koizumi, and Shin-ichi Yoshida: Classification of *Leptospira* based on *gyrB* sequence analysis and its application for identification of isolates in the Philippines. Joint Scientific Meeting on Leptospirosis in the Asia Pacific Region, University of Philippines, Manila-College of Public Health (Manila, Philippines) November 6-7, 2008
 10. 増澤俊幸、岡本能弘、福井貴史、小

泉信夫、Sharon Y.A.M. Villanueva、柳原保武、吉田真一：DNA ジャイレースBサブユニット遺伝子 *gyrB* によるレプトスピラ分類とその応用。第82回日本細菌学会総会（名古屋）
2008年3月12日

11. 増澤俊幸、川谷慶太、川島遥、岡本能弘、福井貴史、小泉信夫、Sharon

Y.A.M. Villanueva、柳原保武、吉田真一：レプトスピラ血清型推定へのDNA ジャイレースBサブユニット遺伝子解析の応用。日本薬学会第129年会（京都）2008年3月27日

12. 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	AAAGAAAAATTAGTGACGC	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	GAATCTAGAATTCGAGACGCCG	730-709	Akivami A
L-flaB-R1	TGAATTCGGTTTCATATTTGCC	825-804	Akivami A
L-flaB-R2	AACATTGCCGTACCACTCTG	797-778	Akivami A
M13F	TGTAACACGACGGCCAGT		
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	Akivami 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. 捕獲野鼠のレプトスピラ保有率

捕獲地	野鼠種	培養陽性/捕獲数	保有率 (%)
名古屋 マンホールなど	ドブネズミ	3/21	13.3
名古屋 草地	アカネズミ	0/5	0
西宮 公園	ドブネズミ	2/19	10.5
西宮 キャンプ場など	アカネズミ	1/226	0.4
和歌山県田辺市山林など	アカネズミ	0/15	0

図 1. *gyrB* 解析による分離株の血清型の推定

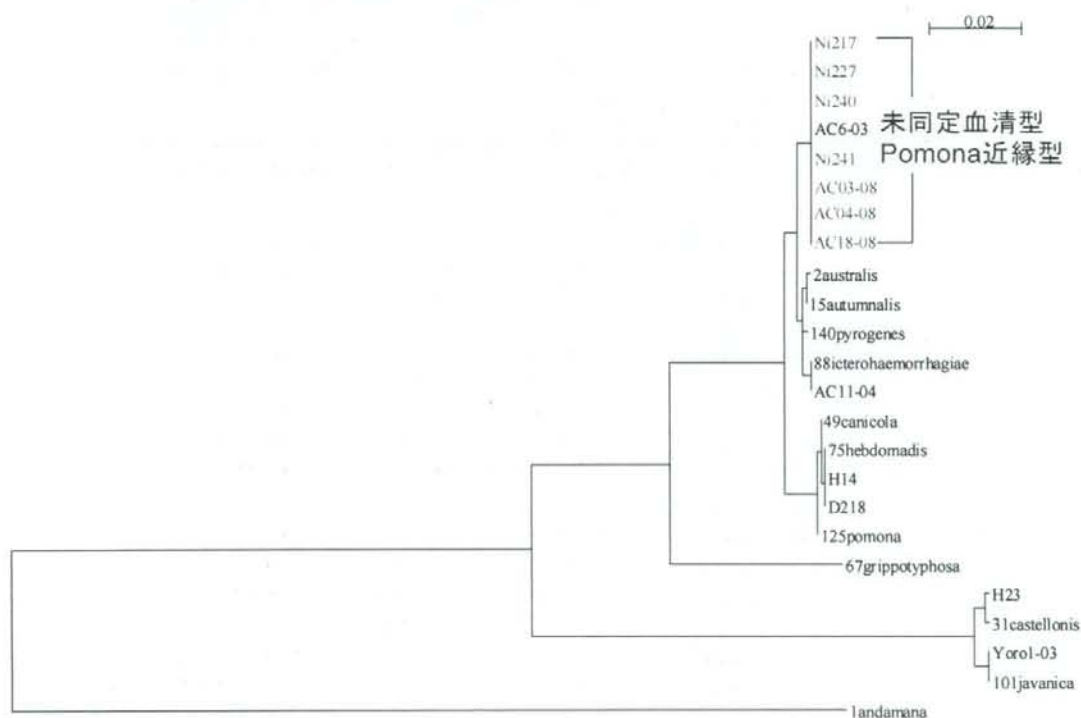
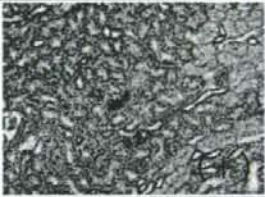
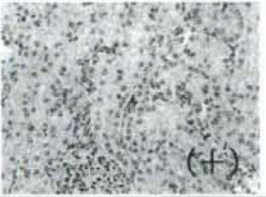

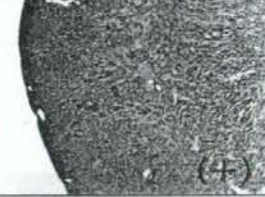

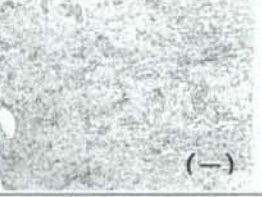





表3 レプトスピラ単クローン抗体の各血清型を代表する血清型との反応性

Species	serovar	Strain	抗Australis		抗Autumnalis			抗Canicola	抗Hebdomadis			抗Icterohaemorrhagiae	
			Aus 1m	Aus 2m	Aut 1m	Aut 2m	Aut 3m	Can 1m	Hebd 2m	Hebd 3m	Ict 1m	Ict 2m	
<i>L. biflexa</i>	Andamana	CH11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Ajiyama A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Arborea	Arborea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Losbanos	LT 101-69	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Canicola	Hond Utrecht IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Anhola	LT 90-88	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	3522 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>L. kirschneri</i>	Agogo	Agogo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. feineri</i>	Hurstbridge	BUT6T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	RGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Veldrat Batavia 46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. noguchii</i>	Louisiana	LSU 1945	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	Sari	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Pomona	Pomona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Manilae	LT 398	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Pyrogenae	salonem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. interrogans</i>	Hardjo	Hardjoprajtno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. biflexa</i>	Patoc	Patoc I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Persepsitain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図2. マングース腎組織からのレプトスピラの免疫組織染色による検出

試料番号	免疫ウサギ抗血清	抗 Autumnalis MAb	抗 Hebdomadis MAb
22			
30			
40			

(+) レプトスピラ免疫組織染色陽性

(-) レプトスピラ免疫組織染色陰性

表4. 各単クローン抗体の血清群内血清型との反応性

Serogroup	Species	Serovar	Strain	Aus 1m	Aus 2m	Aut 1m	Aut 2m	Aut 3m	
<i>Leptospira</i>	Australis	<i>L. interrogans</i>	Australis	Ballico					
		<i>L. noguchii</i>	Bajan	Toad 60	-	+			
		<i>L. interrogans</i>	Bratislava	Jez Bratislava	+	-			
		<i>L. interrogans</i>	Bangkok	BD 92	+	+			
		<i>L. interrogans</i>	Hawaii	LT 62-68	-	-			
		<i>L. interrogans</i>	Jalna	Jalna	+	-			
		<i>L. interrogans</i>	Lora	Lora	+	+			
		<i>L. interrogans</i>	Muenchen	München C 90	-	-			
		<i>L. noguchii</i>	Nicaragua	1011	+	+			
		<i>L. noguchii</i>	Peruviana	V 42	+	+			
		<i>L. kirschneri</i>	Ramisi	Musa	+	+			
		<i>L. noguchii</i>	Rushan	507	+	+			
		<i>L. ?</i>	Soteropolitana	R 93	+	+			
		Autumnalis	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A				
<i>L. interrogans</i>	Bangkinang		Bangkinang I			+	-	+	
<i>L. kirschneri</i>	Bim		1051			+	+	+	
<i>L. kirschneri</i>	Bulgaria		Nicolaevo			+	+	+	
<i>L. kirschneri</i>	Butembo		Butembo			+	+	+	
<i>L. interrogans</i>	Carlos		C 3			+	-	-	
<i>L. kirschneri</i>	Erinaceauriti		Erinaceus auritus			+	+	+	
<i>L. noguchii</i>	Fortbragg		Fort Bragg			+	+	+	
<i>L. kirschneri</i>	Lambwe		Lambwe			-	-	-	
<i>L. interrogans</i>	Mooris		Mooris			+	-	-	
<i>L. kirschneri</i>	Mujunkumi		Yeszsh 237			+	+	+	
<i>L. ?</i>	Nanla		A 6			+	+	+	
<i>L. interrogans</i>	Rachmati		Rachmat			+	+	+	
<i>L. interrogans</i>	Weerasinghe		Weerasinghe			+	+	+	
ホモロガスな血清型				それぞれ+は陽性、-は陰性を示す					
ヘテロガスな血清型									
Serogroup	Species	Serovar	Strain	Hebd 2m	Hebd 3m	Ict 1m	Ict 2m		
<i>Leptospira</i>	Hebdomadis	<i>L. santarosai</i>	Borincana	HS 622	-	-			
		<i>L. santarosai</i>	Goiano	Bovino 131	+	-			
		<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis					
		<i>L. borgpetersenii</i>	Jules	Jules	+	-			
		<i>L. genomospecies</i>	Manzhuang	A 23	+	-			
		<i>L. santarosai</i>	Maru	CZ 285	+	-			
		<i>L. santarosai</i>	Sanmartini	CT 63	-	-			
		<i>L. borgpetersenii</i>	Worsfoldi	Worsfold	+	+			
		Icterohaemorrha	<i>L. interrogans</i>	Birkin	Birkin			-	-
<i>L. kirschneri</i>	Bogvere		LT 60-69			+	-		
<i>L. interrogans</i>	Copenhageni		M 20			+	-		
<i>L. kirschneri</i>	Dakota		Grand River			+	-		
<i>L. interrogans</i>	Gem		Simon			+	-		
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhag		Ictero I			+	-		
<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhag		RGA						
<i>L. interrogans</i>	Lai		Lai			-	-		
<i>L. interrogans</i>	Mankarso		Mankarso			-	-		
<i>L. kirschneri</i>	Mwogolo		Mwogolo			-	-		
<i>L. interrogans</i>	Naam		Naam			+	-		
<i>L. kirschneri</i>	Ndahambukuje		Ndahambukuje			+	-		
<i>L. kirschneri</i>	Ndambari		Ndambari			+	-		
<i>L. interrogans</i>	Smithi		Smith			+	-		
<i>L. borgpetersenii</i>	Tonkini	LT 96-68			-	-			
ホモロガスな血清型				それぞれ+は陽性、-は陰性を示す					
ヘテロガスな血清型									

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

17. レプトスピラ症のコントロール法に関する研究

研究分担者 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 武藤麻紀, 渡辺治雄 (国立感染症研究所 細菌第一部)
三浦美徳, 塩山陽子, 岩切章, 山本正悟 (宮崎県衛生環境研究所)
下村高司 (宮崎県衛生管理課), 長友明彦, 相馬宏敏 (宮崎県健康増進課)
横山栄二 (千葉県衛生研究所)
赤地重宏 (三重県保健環境研究所)
濱崎光宏, 堀川和美 (福岡県保健環境研究所)
坂本晃子, 船津丸貞幸 (佐賀県衛生薬業センター)
松本一俊, 八尋俊輔, 原田誠也 (熊本県保健環境科学研究所)
岡野祥, 平良勝也, 中村正治 (沖縄県衛生環境研究所)

研究要旨

- 2006年夏季にレプトスピラ症の多発があった宮崎県で, 昨年度に引き続きヒトとイヌのレプトスピラ症強化サーベイランスを行った. その結果, ヒトではレプトスピラ症疑い10例中1例のレプトスピラ症が確定診断された. またイヌは25例中16例がレプトスピラ症と確定診断された. このうちイヌ9頭の血液からレプトスピラが分離され, レプトスピラの鞭毛構成遺伝子のひとつである *flaB* 遺伝子の部分塩基配列から, 分離株はすべて *Leptospira interrogans* と推定され, また血清群は Australis, Autumnalis, Hebdomadis であった.
- 全国でのイヌのレプトスピラ症の発生状況を明らかにするための初動調査として, 千葉, 三重, 福岡, 佐賀, 熊本および沖縄県で, 宮崎県と同様に検査定点サーベイランスを行った. その結果, 千葉, 三重(奈良), 福岡, 佐賀, 熊本の各県で陽性イヌを検出した. また三重県のイヌからレプトスピラが分離され, *flaB* 遺伝子の部分塩基配列から, *L. interrogans* と推定された.
- 全国33か所の検疫港および検疫飛行場の政令区域で270匹のネズミを捕獲し, レプトスピラの分離を試みた結果, 那覇空港で捕獲されたハツカネズミ2匹からレプトスピラが分離された. *flaB* 遺伝子の部分塩基配列から, 分離株は *L. borgpetersenii* であると推定された.

A. 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*)の感染によりおこる人獣共通感染症である. レプトスピラ症は全国的に散発例がみられるが, 集団発生は近年沖縄県でのみ報告されていた. しかしながら, 2006年夏季に宮崎県北部を中

心にレプトスピラ症の多発があった. 宮崎県におけるレプトスピラ症の実態を明らかにするために, 本年度も昨年度に引き続きヒトおよびイヌのレプトスピラ症強化サーベイランスを行った.

昨年度の宮崎県で行ったイヌのレプトスピラ症のサーベイランスの結果から, 獣医師の

レプトスピラ症に対する認知度の高さおよび臨床診断の確かさが明らかとなった。またレプトスピラ症は医師よりも獣医師のほうが関心の高い疾患であることから、調査対象地域でのイヌのレプトスピラ症の発生状況を明らかにし、ヒトへの感染リスクの存在を示すことによって、医師のレプトスピラ症への関心を向上させるとともに、疑い患者について積極的な報告・情報収集・検査を実施することによって本症の実態を明らかにしていくことができると考えられた。そこで本年度は、全国的なイヌのレプトスピラ症発生状況調査のための初動調査として、千葉、三重、福岡、佐賀、熊本、沖縄各県の衛生研究所の協力の下、宮崎県と同様に検査定点サーベイランスを行った。

国内ではレプトスピラ症は希少感染症であると考えられているが、世界ではアジアや東南アジア、中南米で大規模な流行がおこっており、レプトスピラを保有するネズミがこれら流行地域から船舶などを介して侵入することも考えられる。そこで海外からのレプトスピラ保有ネズミの侵入監視体制の確立のため、全国の検疫所の協力により検疫港および検疫飛行場の政令区域(以下、港湾区域)で捕獲されたネズミからレプトスピラの分離を試みた。

B. 方法

1. レプトスピラの分離培養

宮崎県におけるレプトスピラ症疑いのヒト血液、各県のレプトスピラ症疑いのイヌ血液、また表3にある全国33か所の港湾区域で捕獲されたネズミの腎臓から、コルトフ培地およびEMJH培地(ヒトおよびイヌ)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、およそ2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. イヌ臨床検体からのレプトスピラ遺伝子の検出

イヌの血液、血しょうあるいは尿からDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いてDNA抽出を行った。抽出したDNAを鋳型として、特異的プライマーを用いてレプトスピラの鞭毛構成遺伝子のひとつである*flaB*遺伝子の増幅をnested PCRで行った(nested *flaB*-PCR, 参考文献1)。

3. レプトスピラ *flaB* 遺伝子の塩基配列の解析

イヌおよびネズミのレプトスピラ分離株から上記キットを用いて抽出したゲノムDNAを鋳型として、特異的プライマーを用いてレプトスピラの鞭毛構成遺伝子のひとつである*flaB*遺伝子の増幅を行い、その塩基配列の決定を行った。

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で希釈したヒトあるいはイヌ血清と、レプトスピラ標準株培養液をそれぞれ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。陰性対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が50%以下になっている場合を陽性とした。また、レプトスピラ標準抗血清とイヌ分離株培養液を上記のとおり反応を行い、分離株の血清群を決定した。

5. 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、14°Cで20時間泳動を行った(参考文献2)。

参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.

2. Koizumi N, et al., Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. J Vet Med Sci. (in press)

C. D. 結果および考察

1. 宮崎県のレプトスピラ症強化サーベイランス

2006年8、9月の宮崎県北部におけるレプトスピラ症多発事例をうけて、昨年度に引き続き本年度もヒトおよびイヌのレプトスピラ症強化サーベイランスを行った。ヒトでは県内の病院を対象にサーベイランスを行った結果、10例のレプトスピラ症疑い例があり、そのうち1例がベア血清を用いたMATにより抗体陽転がみとめられたためレプトスピラ症と確定診断された。患者の推定感染血清群はAutumnalisであった。また患者の感染推定原因は水田での農作業であり、これまでと同様に労働を介した土壌や水との接触であると推測された。レプトスピラの感染予防には、レプトスピラで汚染された環境との直接的な接触を避けることが重要である。2006年以降患者数は減少しているが、農業者へのさらなるレプトスピラ感染に対する知識を普及し、注意喚起を行っていくことが重要である。

イヌについては県内12か所の動物病院を検査定点病院に選定してサーベイランスを行った。その結果、レプトスピラ症臨床診断25例のうち16例が実験室診断によりレプトスピラ症であると確定した(表1)。9頭のイヌからレプトスピラが分離され、分離株のレプトスピラ遺伝種は*flaB*部分塩基配列からすべて*L. interrogans*であると推定された。また分離株の血清群はレプトスピラ標準抗血清との反応性から、Australis 4株(2頭)、Autumnalis 3株(2頭)、Hebdomadis 9株(5頭)と判明した(表1)。また昨年度の分離株のPFGEによるRFLP解析により、特定の血清型クローンにより感染が起きているのではないことが明らかとなった(図1)。

本年度の調査では、昨年度発生報告のなかった高原町、西都市、高城市、えびの市でのイヌのレプトスピラ症の発生が明らかとなり、イヌのレプトスピラの急性感染が県内の広い範囲で起こっていることが明らかとなった。また、ヒト患者が発生していない地域でもイヌのレプトスピラ症が発生していることから、これらの地域でもヒトの感染リスクは存在すること、またこれら地域でのヒト患者の見逃しの可能性が考えられた。これまでの調査から、宮崎県のヒトレプトスピラ症患者血清中には、血清群Australis, Autumnalis, Hebdomadisに反応する抗体が検出されている。狩猟犬だけでなくペットも多く感染していることから、ヒトもイヌも同じ市中の環境から感染していると推測されるが、イヌがこれら血清型のレプトスピラの保有体となり、ヒトの感染源となっている可能性を明らかにするために、今後は急性感染だけではなく、イヌのレプトスピラの保有状況を調査する必要がある。

レプトスピラの分離培養およびMATによる血清診断には時間を要するため、PCRによる迅速診断が行われている。本調査でも培養および血清診断が陰性の患者の血しょうからレプトスピラの遺伝子が検出された。しかしながら、分離がなされた患者の血しょうから遺伝子検出ができていない例があり、今後PCRのターゲット遺伝子や増幅条件、また臨床検体の種類についても検討していく必要がある。

宮崎県では広範囲でイヌのレプトスピラ感染がおこっており、また感染したイヌのほとんどがワクチンを接種しておらず死亡率も63%と高率であることから、レプトスピラワクチン接種の啓発を行う必要がある。しかしながら、国内で入手可能な全菌体不活化ワクチンはレプトスピラの血清型に特異的な効果しかなく、県内で流行しているAustralis, Autumnalisはワクチンに含まれていない。またHebdomadisも一部のワクチンにしか含