

寄生虫感染に関する研究グループ

「アライグマ回虫症、エキノкокクス感染等に関する疫学調査・リスク評価に関する研究」

国立感染症研究所：川中 正憲

平成 23 年厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
「動物由来感染症のリスク分析手法に基づくリスク管理のあり方に関する研究」班
分担研究報告書

アライグマ回虫症とエキノコックス感染に関する調査研究

分担研究者	川中正憲	国立感染症研究所寄生動物部
研究協力者	山崎 浩	国立感染症研究所寄生動物部
同	杉山 広	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	山本徳栄	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
同	近真理奈	埼玉県衛生研究所臨床微生物担当
同	仲佐友身	青森県十和田食肉衛生検査所
同	小堀和亮	青森県十和田食肉衛生検査所
同	黒田伸彦	山形県内陸食肉衛生検査所
同	上野正博	山形県内陸食肉衛生検査所
同	宮川幸二	長野県上田食肉衛生検査所
同	橋詰祐樹	長野県上田食肉衛生検査所
同	谷崎 剛	福岡県福岡食肉衛生検査所
同	一二三達郎	福岡県福岡食肉衛生検査所
同	上野明日香	熊本市食肉衛生検査所

研究要旨：

本分担研究者の課題の一つは、ヒトで重篤な神経障害を引き起こすアライグマ回虫による幼虫移行症の発生を予防する為に、全国的に野生化が拡大しつつあるアライグマの寄生虫保有状況を把握することである。本年度も、全国的な動向に配慮しつつ、神奈川、埼玉に於いて糞便検査による調査を継続した。同じく第二の課題は、感染症法で四類感染症に指定されているエキノコックス(多包虫)症について、北海道外への伝播状況を調査研究することである。北海道外での調査は、動物疫学を重点的に実施することが重要である。今年度は山形県の食肉衛生検査所で馬の多包虫感染が検出された事を受け、馬のと畜検査数の多い青森、山形、長野、福岡、熊本各県でのデータを整理した。また、山形県内陸食検と協力し、多包虫感染馬の抗体検査による診断法の検討を実施した。

(1) 野生アライグマに関するアライグマ回虫症の監視

A. 研究目的

我々は1999年からアライグマ回虫に関する全国調査を開始し、動物園等の展示施設のアライグマならびに捕獲された野生アライグマについての寄生虫保有状況を調査している。その結果、動物園等での飼育群からはアライグマ回虫の寄生例が少なからず確認されたが、全国の野生アライグマからは、現在のところアライグマ回虫の寄生例は発見されていない。一方で、外来生物法が施行されてから、この法律に基づく野生アライグマの駆除作業が全国的に行われている。今年度も、それらのアライグマの糞便を対象としてアライグマ回虫の実態調査を継続した。

B. 研究方法

神奈川県は、首都圏にあって早くから野生アライグマ問題が先鋭化している地域であることから、この調査を開始して以来14年間にわたりアライグマの生息状況をフォローすると共に、駆除業者からの直接サンプル送付による糞便検査を実施した。

埼玉県においては、アライグマの増加が近年非常に目立つ状況になっている。野生アライグマの捕獲数で見ると、平成2004年度は31頭であったのに2007年度は935頭を数え、2008年度は1,346頭、2009年度は1,756頭、2010年度は2358頭、そして2011年度は1,999頭であった。今年度は主として埼玉県全域で捕獲されたアライグマ218頭から直腸便を採取した。糞便検査は、直接薄層塗抹法、ホルマリン・エーテル法(MGL法)、ショ糖遠心浮遊法(ショ糖法)を併用し、顕微鏡で寄生虫卵、原虫類等の検索を行い、必要に応じて便の薄層塗抹標本にコーン染色、ギムザ染色を施して精査した。

C. 研究結果

今年度の神奈川県内で捕獲したアライグマの検査数は64例であった。1999年以来の神奈川県でのアライグマ糞便の検査数は1653例にのぼるが、アライグマ回虫卵は検出されていない。埼玉県では2007年から今年までの野生アライグマの糞便検査数は1,479に上るが、そのうち53検体に原虫類と蠕虫類の虫卵及び虫体が認められ、下表に示すように陽性率は2.3%であったがアライグマ回虫卵は検出されなかった。

D. 考察と結論

2000年を画して全国的に野生アライグマの増加が顕在化し農業上の被害も広がった。そして、2006年6月の「外来生物法」施行により「アライグマ防除実施計画」が各県で策定されて、農業被害への対策と生物多様性の維持・回復を目的として野生アライグマの駆除が実施されるようになった。皮肉なことに「外来生物法」の施行後、それまで「愛がん」目的で飼育されていた少なくないアライグマが野外へ放逐され、全国的な野生アライグマ

の分布域の拡大という様相を呈している。駆除計画の実施に当たり、アライグマ由来の感染症に対して効果的に対応することが必要になる。しかしながら、アライグマ由来の感染症への対応は、必ずしも組織的には実施されている状況にはない。

埼玉県野生アライグマにおける寄生虫類検査結果 (2011.01-2011.12)	
	(検体数 218)
蠕虫類	検出数 (%)
<i>Capillaria</i> 属虫卵	3 (1.4)
合計	3 (1.4)
原虫類	検出数 (%)
<i>Cryptosporidium</i> 属	2 (0.9)
<i>Octsporella</i> 属	1 (0.5)
合計	2 (0.9)
寄生虫類 総計	5 (2.3)
* 1検体は複数の寄生虫類を保有	

アライグマ回虫に関しては、もし感染獣が出現したときは、家屋天井裏での生息や駆除作業の過程で健康上の被害を及ぼす恐れがある。従って、当該地域でのアライグマ群に関して、アライグマ回虫の感染があるかどうかの監視作業を実施することが必要になってきた。現在の段階では、幸いにして国内の野生アライグマからアライグマ回虫の検出例は無い。現時点では、野生コロニー全てのチェックを終了したとは考えられないので、まだ暫くは、全国的な野生アライグマに関する監視作業を継続する必要があるだろう。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

なし

(2) エキノコックス症の国内流行地域拡大防止対策に関する研究

1) 各地のと畜場に搬入された馬の多包虫感染状況の調査研究

A. 研究目的

馬の多包虫症に関しては、これまで北海道以外での報告例は皆無であったが、山形県米沢市と場に搬入された馬から高率(約20%)にその感染が確認された。この成績は、2007年9月に初症例が検出されて以来、当該食肉衛生検査所において従来、馬の肝臓の肝砂粒

症又は白色結節として廃棄処理されていた病変組織を改めて精査した結果得られたものであった。豚や馬での多包条虫の発育は、初期段階に止まり生殖上不妊であり、多包条虫の生活環の成立に役割を持たないとされている。馬は、その多くが短い生存期間でと畜処理される豚と異なり、多包虫感染後の生存期間が比較的長い。その為に、馬が多包条虫の中間宿主としては、一般に不適當であるとしても、感染期間と個体の条件によっては、原頭節形成が起こる可能性を否定する根拠は現在のところ得られていない。即ち馬において、エキノコックスの感染を受けても原頭節が形成されなければ、犬等の終宿主への感染性を有しないこととなり、感染環を考慮する必要はなくなるが、世界的にも馬の多包虫感染事例の経験が無かった為に、実態等が十分に解明されている状況にはない。そこで、馬の肝臓病変の精査を通じて、現時点での我国の馬の多包虫感染状況を明らかにする事が必要となった。

B. 研究方法

馬のと畜検査を実施している食検より毎年公表している「事業概要」により「肝砂粒症」や「寄生虫による肝病変」により一部廃棄されている状況は下表で示す通りである。これらの病変の原因としては、多包虫は想定されておらず主として円虫類や馬回虫の幼虫によるものと考えられていた。

食肉衛生検査所	年度	と畜馬頭数	検出数	%
北海道早来食検	H21	87	22	25.2
十和田・田舎館食検	H21	1252	97	7.7
秋田市食検	H20	336	65	19.3
山形県内陸食検	H21	253	39	15.4
郡山市食検	H20	554	4	0.7
宇都宮市食検	H21	108	0	-
山梨県食検	H20	409	96	23.4
長野県上田食検	H20	550	121	22.0
岐阜県食検	H21	171	2	1.1
福岡県食検	H19	1240	190	15.3
熊本市食検	H21	3597	593	16.4

そこで、平成 22 年度に、馬の多包虫感染のデータを収集すべく協力を呼び掛けたところ、青森県十和田、山形県内陸、長野県上田、福岡県、熊本市の各食検により調査協力が得られるところとなった。方法は各食検において概ね 100 頭の馬について精査を行う事とし、(1)と畜馬についての産地その他の情報の記録、(2)部分廃棄の対象となる肝臓の結節病変の採取、(3)病理組織学的検討及び可能ならば PCR 検査、とした。

C. 研究結果

1. 山形県内陸食検

平成 22 年度では 155 頭の検査対象馬の中、99 頭に肝病変を認め、その中 18 頭からクチクラ層を検出した。また、PCR により陽性となったものは 14 頭で、両者を合計すると多包虫感染馬は 32 頭(20.6%)となる。これらの結果は前年度の調査結果と同様であった。

2. 青森県十和田食検

平成 22 年度の検査対象頭数は 105 頭で、17 頭に肝病変を認め、その中 3 頭からクチクラ層を検出した。また、PCR により陽性となったものは 2 頭で、両者を合計すると多包虫感染馬は 5 頭(4.7%)となる。

3. 長野県上田食検

平成 22 年度の検査対象頭数は 151 頭で、64 頭に肝病変を認め、その中 10 頭からクチクラ層を検出した。病理組織学的に確認した多包虫感染馬は 10 頭(6.6%)である。

4. 福岡県食検

平成 22 年 1 月～2 月に実施した検査対象頭数は 100 頭で、17 頭に肝砂粒症を認め、その中 2 頭からクチクラ層を検出した。病理組織学的に確認した多包虫感染馬は 2 頭(2.%)である。

5. 熊本市食検

平成 22 年度に実施した検査対象頭数は 100 頭で、54 頭に何らかの肝病変を認め、病理組織学的に検討したところ、クチクラ層を検出し得たのは 1 頭のみであった。従って、多包虫感染馬と確認したのは 1%ということになる。

食肉衛生検査所	年度	検査対象馬	肝病変検出馬	クチクラ層検出馬	PCR	多包虫感染馬
山形県内陸食検	H19-20	218	78 (0.357)	27 (12.3%)	(+14)	41 (18.8%)
	H22	155	99 (0.638)	18 (11.6%)	(+14)	32 (20.6%)
青森県十和田食検	H22	105	17 (0.161)	3 (2.8%)	(+ 2)	5 (4.7%)
長野県上田食検	H22	151	64 (0.423)	10 (6.6%)	-	10 (6.6%)
福岡県食検	H22	100	17 (0.170)	2 (2.0%)	-	2 (2.0%)
熊本市食検	H22	100	54 (0.540)	1 (1.0%)	-	1 (1.0%)

D. 考察と結論

今回の検討により、調査に協力して頂いた全ての食検において多包虫感染馬が検出された事は極めて重要である。今後、北海道から伝播しつつあるエキノコックスの監視及び対策に資するところ大であると考えからである。各食検での検出率に非常な差異が認められるが、これは主として、北海道産馬が各と畜場に搬入される比率が異なっていることの反映であると考えられる。エキノコックスの検査は、従来より病理組織学的に「PAS 染色によるクチクラ層の確認」をもって実施されてきた。しかしながら未成熟な幼生虫体の場合、PCR を用いた遺伝子検査によって単包虫か多包虫かの同定を行う手法が、極めて有効であることが近年明らかになってきた。そこで、国立感染症研究所寄生動物部第二室の協力を得

て、希望する食肉衛生検査所の検査員に PCR を用いた遺伝子検査の研修を実施し、可能であれば病理組織学的手法と遺伝子検査の併用を推進してきたところである。しかしながら現在のところ、多包虫症の PCR を用いた遺伝子検査に関しては、病理組織学的手法との間で検査結果の食い違いが一部にあり、特にホルマリン固定組織、或いは脱灰操作後の組織の扱いに関する事など技術的に解決すべき問題があると思われる。また、食検によっても装備や経験に大きな差が認められ、これら技術的な問題は今後に残された課題といえよう。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

なし

2) 馬多包性エキノコックス症のウエスタンブロット法による血清抗体検出の試み

A. 研究目的

1983 年に北海道東藻琴食肉衛生検査所において、自然感染例では世界で初めて馬の多包性エキノコックス症が発見された。最近になって我々は、山形県の米沢市営と畜場に搬入された馬の肝臓から北海道以外では初めて多包虫を検出し、その後継続した同と畜場での検査により軽種馬ではその 20%に及ぶ高い感染率があったことを報告した。そこで、肝臓の精査により確定した多包虫感染馬について特異的血清抗体の検出を試みた。

B. 研究方法

(1) と畜検査対象馬と血清材料

平成 22 年度に米沢市営と畜場に搬入された馬のうち、肝臓に結節病変を有するものに注目した。これらの結節を採取して組織学的に多包虫の存在 (PAS 陽性クチクラ層) が確認されたか、あるいは PCR-RFLP により多包虫の遺伝子が検出された 23 頭の多包虫感染馬血清を材料とした。

(2) 抗体の検出方法

ヒトのエキノコックス症診断用の市販キット *Echinococcus* Western Blot IgG (LDBIO Diagnostics, France) を用いた。検査手順として、標識二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウマ IgG [H+L] (Jackson Immuno Research Labs, USA) を添加した以外は、全て添付された説明書に従った。陽性対照としては、ヒトの多包性エキノコックス症患者血清を用いた。

(3) 判定方法

本キットは、ヒトのエキノコックス症検出のために特異的抗原バンドを分子量 30kDa

以下の比較的 low molecular weight 領域で検索するべく設定されており、7, 16, 18 及び 26-28kDa の抗原バンドに対する反応の有無とそのパターンによって、多包虫症と単包虫症との鑑別が可能とされている³⁾。そこで、今回の判定に際してもそれに倣い、比較的 low molecular weight 領域の抗原バンドについて検討することとした。

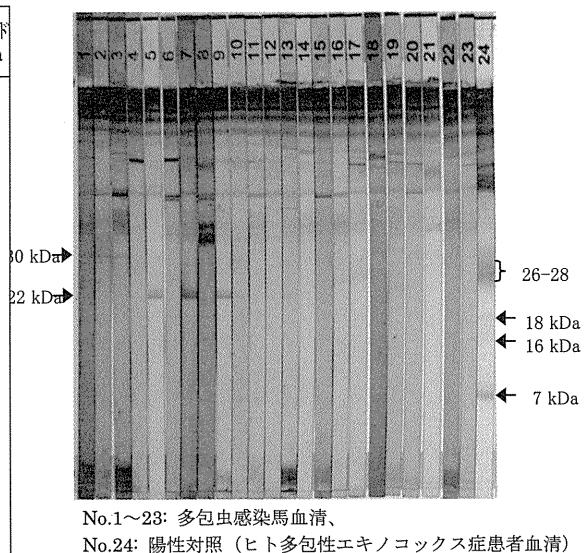
C. 研究結果

表 1 には、多包虫感染馬 23 頭の性別・年齢、肝臓内結節の数・大きさ、組織学的検査、遺伝子検査データと、図 1 のウエスタンブロット (WB) で現れた反応バンドの判定結果を示す。検討した感染馬の年齢は 4~9 歳であり、結節の数は 1 個から 20 個以上検出されたものを含み、結節の大きさは直径で最小 1mm から最大 25mm の範囲にあった。PAS 陽性のクチクラ層を確認できた馬は 12 頭、PCR-RFLP によって遺伝子が確認されたもの 17 頭であり、PAS 陽性クチクラ層と遺伝子の両者を確認できたものはそのうち 6 頭であった。図 1 は 23 検体 (No. 1~No. 23) の WB パターンの写真であるが、No. 24 はヒトの多包性エキノコックス症患者血清の反応パターンを示す。写真で示したように、今回検討した多包虫感染馬

表1 多包虫感染馬23頭のWB検査成績

番号	性別	年齢	肝臓内結節数	結節サイズ (mm)	PAS 陽性層	PCR-RFLP	検出されたバンド 30kDa 22kDa
1	F	5	1	5	-	+	+
2	F	5	2	2,25	+	-	+
3	F	6	1	2	+	+	+
4	F	6	2	2	+	-	
5	F	4	1	2	+	-	++
6	M	6	1	2	+	-	
7	F	6	4	1~5	+	+	++
8	M	5	6	2~7	+	-	
9	M	5	1	25	+	+	++
10	F	5	10	1~3	-	+	+
11	M	5	4	2~5	-	+	+
12	F	4	3	2~5	-	+	+
13	F	6	3	5~10	-	+	+
14	F	5	6	3~10	-	+	+
15	F	7	1	10	+	+	+
16	F	6	12	2~5	-	+	
17	F	7	3	5	-	+	
18	M	6	3	2~6	-	+	+
19	F	8	3	5~10	+	+	+
20	M	5	4	1	+	-	
21	F	9	20<	1~7	-	+	
22	F	6	2	1~5	-	+	
23	F	6	11	1~7	+	+	

図1 ウエスタンブロット (WB) 写真



No.1~23: 多包虫感染馬血清、
No.24: 陽性対照 (ヒト多包性エキノコックス症患者血清)

血清については、ヒト感染者で認められる 7, 16, 18 及び 26-28kDa の抗原バンドに対する反応はいずれも陰性であった。しかし、直径 25mm の結節が検出された No. 2 では 30kDa バンドに陽性反応を認め、また同様に 25mm 大の結節を検出した No. 9 では 22kDa に極めて明瞭な陽性バンドを認めた。また、30kDa バンドについては、No. 2 以外にも No. 1, 3, 15, 18, 19 が陽性であった。更に、22kDa に関しては、No. 9 に見られたものと反応強度の同様なバンドを No. 5 と 7 で認め、若干反応性の劣るバンドを No. 10, 11, 12, 13 で認めた。即ち、30kDa のバンドが陽性のものは 23 例中 6 例 (26%)、22kDa が陽性のものは 23 例中 7 例 (30%) で、両抗原バンド共に陽性であったものは無く、いずれかのバンドが陽性のものを合わせると 23 例の中 13 例 (56%) という結果であった。

D. 考察と結論

以上の成績により、馬での多包虫感染による特異抗体は 22kDa と 30kDa の抗原バンドに反応するものであることが示唆された。多包虫による馬への侵襲程度は、肝臓内結節の大きさと数で推定することができると思われる。直径 25mm という最大結節が検出された 2 頭の多包虫感染馬血清に対して、それぞれ 22kDa と 30kDa の抗原バンドに強い反応を示したことは「特異抗体」として判定する上で重要であると考えた。他方でこれら抗体の陽性率はそれぞれ 30%程度で、その出現は多包虫による肝臓内の結節数の多さに依存しているといった傾向は認められなかった(表 1)。

このような多包虫感染馬血清が示す抗原バンドは、ヒト患者で典型的に見られる反応バンドとは異なっていた。最近、ヒトの多包性エキノコックス症において、本キットを用いた WB による特異抗体の反応パターンとされているものが、患者の病期によって変化が起きるといふ解析結果が報告されている⁴⁾。馬の多包虫感染に関しては、世界的に症例が知られていないことからその臨床的な病像は全く不明で、今後、病理組織像などを含む病態と抗体検出との関連についても検索していく必要があると思われる。また、人獣共通感染症である多包性エキノコックス症の更なる伝播を阻止するという公衆衛生の立場から、と畜検査による馬の多包虫感染の実態調査は重要な意義を持つと考えている。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- (1) Ueno M., Kuroda N., Yahagi K., Ohtaki T., and Kawanaka M. Analysis of antibody responses by commercial western blot assay in horses with alveolar echinococcosis. *J. Vet. Med. Sci.* (Accepted Date: 6 Jan 2012, J-STAGE Advance Published Date: 20 Jan 2012)

寄生虫感染に関する研究グループ

「レプトスピラ症等のサーベイランスとリスク管理に関する研究」

国立感染症研究所：小泉 信夫

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

レプトスピラ症のサーベイランスとリスク管理に関する研究

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，大西真（国立感染症研究所・細菌第一部），赤地重宏（三重県保健環境研究所），堀川和美（福岡県保健環境研究所），原田誠也（熊本県保健環境科学研究所），岡野祥（沖縄県衛生環境研究所），谷川力，春成常仁（イカリ消毒技術研究所），安富一郎（ゆうべつ牛群管理サービス），宗村佳子（東京都動物愛護相談センター城南島出張所）

研究要旨

1. イヌのレプトスピラ症の発生実態を明らかにするため 10 県で検査定点サーベイランスを行い，7 県でレプトスピラ感染のイヌが認められた。福岡，佐賀，熊本，宮崎および鹿児島県のイヌの血液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分離株はすべて *L. interrogans* と推定された。また分離株の血清群は Australis および Hebdomadis であった。
2. 全国各地で捕獲されたネズミからレプトスピラの分離を行い，*flaB* 部分塩基配列および標準抗血清との反応性から，分離株は *L. borgpetersenii* serogroup Hebdomadis/Sejroe（北海道のエゾヤチネズミ分離株），*L. borgpetersenii* serogroup Javanica（北海道のエゾヤチネズミおよびオオアシトガリネズミ分離株），*L. interrogans* serogroup Autumnalis（北海道および福島県のアカネズミ分離株），*L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae（千葉県，東京都および神奈川県の新潟分離株）および *L. kirschneri*（北海道のオオアシトガリネズミ分離株，血清群未解析）と同定された。
3. 北海道の 19 牧場・343 頭の健常な乳牛のレプトスピラ抗体調査を行い，9 牧場・44 頭のウシからレプトスピラ抗体が検出された（陽性率 12.8%，陽性血清群 Sejroe: 95.5%）。また *flaB* が 39 頭中 2 頭の尿から検出され，その塩基配列は *L. borgpetersenii* Hardjobovis 株と同一であった。
4. 東京都で引き取りあるいは収容されたネコのレプトスピラ保有を調査したが，レプトスピラおよびレプトスピラ DNA は検出されなかった。

研究目的

レプトスピラ症は，病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によっておこる人獣共通感染症である。レプトスピラ症は希少感染症として認識されているが，2006 年の宮崎県での多発事例を契機として行ってきた疫学

調査により，レプトスピラ症の患者数は過小評価されている可能性が強く示唆されている。本研究はレプトスピラ症の国内の発生実態の解明およびレプトスピラ感染のリスク評価を目的に，レプトスピラの保有動物調査およびイヌのレプトスピラ症積極的サーベイランスを行った。

方法

1. レプトスピラの分離培養

レプトスピラ症疑いのイヌ血液，表 2 にある全国各地で捕獲されたネズミの腎臓，また東京都引き取りあるいは収容ネコの腎臓および尿から，コルトフ培地あるいは EMJH 培地を用いてレプトスピラの分離培養を行った。培養は 30°C で 3 ヶ月間行い，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. イヌおよびネコ臨床検体からのレプトスピラ遺伝子の検出

レプトスピラ症疑いのイヌの血液あるいは尿，ネコの腎臓および尿から 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. レプトスピラ分離株の *flaB* 塩基配列および MLST (multi locus sequencing typing) による解析

イヌおよびネズミから分離されたレプトスピラ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，*flaB* および参考文献 2 にある 7 つの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

標準抗血清とイヌおよびネズミ分離株培養液を上記のとおりインキュベートし，分離株の血清群を決定した。

参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.
2. Thaipadungpanit J et al., PLoS Negl. Trop. Dis. 1 e56, 2007.

結果および考察

1. イヌのレプトスピラ症積極的サーベイランス

これまでに行ってきた調査から，ヒトのレプトスピラ症は見過ごされた疾患であり，医師よりも獣医師のほうが関心の高いことが明らかとなった。したがって，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，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することができると考えられる。本年度は，茨城，千葉，三重，福岡，佐賀，長崎，熊本，宮崎，鹿児島，沖縄県で検査定点病院を選定して，イヌのレプトスピラ症積極的サーベイランスを行った。

その結果，茨城，千葉，福岡，佐賀，熊本，宮崎，鹿児島県でレプトスピラ症の発生が認められた。一方，三重，長崎，沖縄県では検査依頼がなかった。レプトスピラは，福岡，佐賀，熊本，宮崎および鹿児島の 5 県 17 頭のイヌから分離され，*flaB* 部分塩基配列から分離株はすべて *L. interrogans* であると推定された。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 (3)，Hebdomadis (10) と同定された (未解析 4 頭)。一方，抗体が検出された血清群は，Australis, Autumnalis, Canicola, Castellonis, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae,

Javanica, Pyrogenes, Poi, Pomona であった(表 1)。また宮崎県で、レプトスピラ感染が確定したイヌと同居していた無症候のイヌ 1 頭の尿からレプトスピラ DNA が検出された。

イヌのレプトスピラ感染が証明された茨城および福岡県では、感染症法施行後にヒトのレプトスピラ症は報告されていない。この 2 県でレプトスピラに感染したイヌはすべてペットであった。したがって、当該地域ではヒトの生活圏に感染リスクが存在すること、またこれら地域でヒト患者が見逃されている可能性が示唆された。今後、当該地域の医師のレプトスピラ症に対する認識を向上させ、ヒトの感染実態の把握へとつなげていきたい。

本調査でイヌのレプトスピラ急性感染がみられた複数の県で、イヌが感染した血清群に対する抗体がヒト患者でも検出されている。また宮崎県では、無症候のイヌの尿からレプトスピラ DNA が検出され、感染後治療が行われなかったイヌがレプトスピラの保有体となっていることが明らかとなった。したがって、レプトスピラ保有イヌがヒトへの感染を引き起こしている可能性が示唆される。今後これらの県でイヌがヒトへの感染源となっているかを明らかにするために、健常イヌのレプトスピラの保有状況を今後調査する必要がある。

イヌではレプトスピラワクチンが存在するが、現行の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いとされている。多くのワクチンは *Canicola* および *Icterohaemorrhagiae* の 2 血清型で構成されている。しかしながら、本調査により国内ではこれら 2 血清型よりも、*Australis* および *Hebdomadis* による感染が多く発生していることが明らかとなった。またレプトスピラ症陽性イヌの 40% が、ワクチンを接種していたにもかかわらずレプトスピラに感染してしまったことも明らかとなった。したがって、血清型に依存しない広範囲のレプトスピラ感染に有効なワクチンの開発が今後の重要な課題

である。

2. ネズミからのレプトスピラ分離培養および分離株の解析

表 2 の全国各地で捕獲されたネズミ 282 匹の腎臓をコルトフ培地で培養した結果、北海道のアカネズミ 1 匹、エゾヤチネズミ 2 匹、オオアシトガリネズミ 10 匹、福島県のアカネズミ 1 匹、千葉県、東京都および神奈川県ドブネズミそれぞれ 1 匹、8 匹、1 匹からレプトスピラが分離された。*flaB* 部分塩基配列および標準抗血清との反応性から、分離株は *L. borgpetersenii* serogroup *Hebdomadis/Sejroe* (北海道のエゾヤチネズミ分離株)、*L. borgpetersenii* serogroup *Javanica* (北海道のエゾヤチネズミおよびオオアシトガリネズミ分離株)、*L. interrogans* serogroup *Autumnalis* (北海道および福島県のアカネズミ分離株)、*L. interrogans* serogroup *Icterohaemorrhagiae* (千葉県、東京都および神奈川県ドブネズミ分離株) および *L. kirschneri* (北海道のオオアシトガリネズミ分離株、血清群未解析) と同定された(未解析株 4 株)。本調査により福島県で初めてレプトスピラが分離された。福島県ではこれまでレプトスピラ症の患者報告はないが、感染リスクがあることが明らかとなった。今後、熱性疾患の鑑別診断としてレプトスピラ症を考慮する必要性を医療機関等へ周知させる必要がある。またオオアシトガリネズミからのレプトスピラ分離はこれまで報告がなく、また *L. kirschneri* 分離はこれまで沖縄県でしか報告されていない。増殖が悪いため *L. kirschneri* 株の血清群を決定することはまだできていないが、本菌を血清診断に用いることにより、新たな患者の発見が可能となるかもしれない。

3. ウシからのレプトスピラ抗体および DNA 検出

ウシは、レプトスピラに偶発的に感染し発病する一方で、*L. borgpetersenii* 血清型

Hardjo type Hardjobovis の維持宿主であり、ヒトへの感染源となる。ウシのレプトスピラ症は家畜伝染病予防法の届出疾患となっているが、近年はほとんど報告がなくその実態は不明である。そこで北海道の 19 牧場・343 頭の健全な乳牛の抗体調査を顕微鏡下凝集試験により行った。その結果、9 牧場・44 頭のウシからレプトスピラ抗体が検出された(陽性率 12.8%, MAT 価 100)。陽性血清群は、Sejroe (血清型 Hardjo が属する血清群)が最も多く(42/44, 95.5%), 次いで Hebdomadis (6/44, 13.6%), Autumnalis (1/44, 2.3%)であった(5 頭ウシが Hebdomadis と Sejroe に同等の抗体価を示した)。またレプトスピラ抗体陽性だった 3 牧場のウシ 39 頭の尿から *flaB*-nested PCR により DNA 検出を試みた結果、過去に流産歴のある 2 頭が陽性となった。2 頭から検出された *flaB* 塩基配列は、*L. borgpetersenii* Hardjobovis 株と同一であったが、北海道のエゾヤチネズミから検出された *L. borgpetersenii* serogroup Hebdomadis/Sejroe の配列とは異なっていた。

今回の抗体調査および DNA 解析から、北海道でも海外と同様にウシで *L. borgpetersenii* Hardjobovis が蔓延している可能性が強く示唆された。これまでウシからの感染が考えられたレプトスピラ症患者は報告されていないが、今後酪農に従事する人たちのレプトスピラ感染の実態を調査する必要がある。

4. 東京都引き取りおよび収容ネコのレプトスピラ保有状況

ネコは愛玩動物としてヒトとの距離が近いにもかかわらず、レプトスピラ保有の実態についてはほとんど明らかになっていない。また、実験的にレプトスピラをネコに感染させた場合、ネコは症状をほとんど示さないという報告もある。このことはネコの不顕性感染後に保有体となる可能性を示唆している。国内では、沖縄県で 1.5%のネコがレプトスピラ

を保有していたことが報告されているのみである。そこで本研究では、東京都動物愛護相談センターに引き取られた、あるいは収容されたネコ 100 匹の腎臓および 94 匹の尿からレプトスピラの分離を試みたが、結果はすべて陰性であった。また 100 匹の腎臓および 95 匹の尿からレプトスピラ DNA の検出も試みたがすべて検出限界以下であり、東京都のネコのレプトスピラ保有は認められなかった。本研究班で合計 300 匹のレプトスピラ保有調査を行い、すべてが陰性だったことから、東京都におけるネコのレプトスピラ保有の可能性は非常に低いと考えられた。

本年度のイヌのレプトスピラ症積極的サーベイランスを行うにあたりご協力をいただいた、千葉県獣医師会、三重県獣医師会、福岡県獣医師会、佐賀県獣医師会、熊本県獣医師会、宮崎県獣医師会、沖縄県獣医師会に深謝します。

またネズミからのレプトスピラ分離にご協力いただいた、常盤俊大(東京医科歯科大学大学院)、Kyle Taylor(北海道大学)、高田伸弘(福井大学)、藤田博己(大原総合病院附属大原研究所)、伊東拓也(北海道立衛生研究所)、中本敦(岡山県環境保健センター)、赤松達矢(馬原アカリ医学研究所)、川端寛樹(国立感染症研究所)の各氏に深謝いたします。

学会発表

1. Koizumi N, Muto M, Akachi S, Horikawa K, Harada S, Ohnishi M. Serological and molecular investigation of canine leptospirosis in Japan. IUMS 2011, 2011 年 9 月。
2. Gamage CD, Koizumi N, Perera C, Muto M, Rajapakse JRPV, Kanda K, Lee RB, Obayashi Y, Ohnishi M, Umemura T, Tamashiro H. An

- investigation of carrier status of leptospirosis among cattle in Sri Lanka. IUMS 2011, 2011 年 9 月.
3. 小泉信夫, 武藤麻紀, 赤地重宏, 岡野祥, 山本正悟, 堀川和美, 原田誠也, 大西真. 国内のイヌから分離されたレプトスピラの性状解析. 第 48 回レプトスピラシンポジウム, 2011 年 9 月.
 4. Gamage CD, Koizumi N, Perera C, Muto M, Nwafor-Okoli C, Ranasinghe S, Rajapakse JRPV, Kanda K, Obayashi Y, Ohnishi M, Tamashiro H. Prevalence and carrier status of bovine leptospirosis in Sri Lanka. 第 48 回レプトスピラシンポジウム, 2011 年 9 月.
 5. Koizumi N, Muto M, Akachi S, Okano S, Yamamoto S, Horikawa K, Harada S, Ohnishi M. Serological and molecular investigation of canine leptospirosis in Japan. VIIth Meeting of the International Leptospirosis Society, 2011 年 9 月.
 6. Koizumi N, Yasutomi I. Prevalence of leptospirosis in farm animals. 平成 23 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2012 年 2 月.

表 1. イヌのレプトスピラ症積極的サーベイランス結果一覧

県	検査頭数	陽性頭数	陽性犬種別		陽性犬ワクチン接種率(%) (接種頭数/陽性頭数)	死亡率(%) (死亡頭数/陽性頭数)	血清診断陽性頭数	血清診断陽性血清群	分離頭数	分離株の MLST による sequence type (ST)および血清群	PCR 陽性頭数	PCR により臨床検体から検出された <i>flaB</i> sequence type (ST)
			ペット	狩猟犬								
茨城	8	2	2	0	50 (1/2)	0 (0/2)	2	Hebdomadis (2)				
千葉	12	2	1	1	0 (0/2)	50 (1/2)	1	Hebdomadis (1)			1	<i>L. interrogans</i> ST1 (U; 1)
福岡	15	7	7	0	71 (5/7)	100 (6/6)	5	Australis (1) Icterohaemorrhagiae (1) Hebdomadis (2) Pomona (1)	5	<i>L. interrogans</i> ST35 Hebdomadis (1) <i>L. interrogans</i> ST37 Australis (2) <i>L. interrogans</i> STN1 Hebdomadis (1) 未同定 (1)	4	<i>L. interrogans</i> ST1 (B+U; 1) <i>L. interrogans</i> ST2 (B; 2, U; 1)
佐賀	7	5	4	1	75 (3/4)	75 (3/4)	4	Canicola (1) Icterohaemorrhagiae (1) Hebdomadis (1) Poi (1)	3	<i>L. interrogans</i> STN1 Hebdomadis (1) 未同定 (2)	2	<i>L. interrogans</i> ST2 (B+U; 1, B; 1)
熊本	4	3	3	0	33 (1/3)	67 (2/3)	2	Hebdomadis (2)	1	<i>L. interrogans</i> ST35 Hebdomadis (1)	3	<i>L. interrogans</i> ST2 (B+U; 1, U; 1) <i>L. interrogans</i> ST6 (U; 1)
宮崎	29	16	4	12	14 (2/14)	64 (9/14)	12	Australis (3) Autumnalis/ Pomona (1) Hebdomadis (8)	6	<i>L. interrogans</i> ST37 Hebdomadis (3) MLST 未同定 Hebdomadis (2) 未同定 (1)	4	<i>L. interrogans</i> ST1 (U; 1) <i>L. interrogans</i> ST2 (B; 3)
鹿児島	17	8	4	4	50 (4/8)	57 (4/7)	6	Australis (1) Australis/Autumnalis	2	<i>L. interrogans</i> STN1 Hebdomadis (1)	4	<i>L. interrogans</i> ST1 (B; 1)

								/Pomona(1) Canicola (1) Canicola/Castellonis /Pyrogenes (1) Hebdomadis (1) Javanica/Poi (1)		MLST 未同定 Australis (1)		<i>L. interrogans</i> ST2 (B; 1, U; 1) <i>L. borgpetersenii</i> (B; 1)
合計	92	43	25	18	40 (16/40)	66 (25/38)	32	Australis (5) Australis/Autumnalis/Pomona (1) Autumnalis/ Pomona (1) Canicola (2) Canicola/Castellonis/Pyrogenes (1) Hebdomadis (17) Icterohaemorrhagiae (2) Javanica/Poi (2) Poi (1) Pomona (1)	17	<i>L. interrogans</i> ST35 Hebdomadis (2) <i>L. interrogans</i> ST37 Hebdomadis (3) <i>L. interrogans</i> ST37 Australis (2) <i>L. interrogans</i> STnew1 Hebdomadis (3) MLST 未解析 Australis (1) MLST 未解析 Hebdomadis (2) 未解析 (4)	18	<i>L. interrogans</i> ST1 (B; 2, B+U; 1, U; 2) <i>L. interrogans</i> ST2 (B; 7, B+U; 2, U; 3) <i>L. interrogans</i> ST6 (U; 1) <i>L. borgpetersenii</i> (B; 1)

B : 血液, U : 尿

表 2. ネズミからのレプトスピラ分離結果一覧

都道府県	市町村など	ネズミ	捕獲匹数	レプトスピラ 陽性匹数	レプトスピラ分離株
北海道	網走郡 北見市	アカネズミ	7		
		アカネズミ	3		
	斜里郡	エゾヤチネズミ	1		
		カラフトアカネズミ	1		
		アカネズミ	15	1	<i>L. interrogans</i> serogroup Autumnalis
		エゾヤチネズミ	49	1	<i>L. borgpetersenii</i> serogroup Javanica
		オオアシトガリネズミ	39	10	<i>L. borgpetersenii</i> serogroup Javanica (5), <i>L. kirschneri</i> serogroup 未解析 (3), 未解析 (2)
		ヒメトガリネズミ	5		
		ヒメネズミ	10		
		ミカドネズミ	23		
		ムクゲネズミ	1		
		エゾヤチネズミ	2		
	宗谷郡 富良野市	アカネズミ	25		
		エゾヤチネズミ	5		
		オオアシトガリネズミ	15		
		ヒメトガリネズミ	13		
		ヒメネズミ	17		
		ムクゲネズミ	3		
		トガリネズミ	1		
		未同定	3		
エゾヤチネズミ		3	1	<i>L. borgpetersenii</i> serogroup Hebdomadis/Sejroe	
アカネズミ		3	1	<i>L. interrogans</i> serogroup Autumnalis	
福島県	耶麻郡	アカネズミ	1		
		ハタネズミ	1		
千葉県	千葉市	ドブネズミ	7	1	<i>L. interrogans</i> serogroup Icterohaemorrhagiae
	船橋市	ドブネズミ	1		
東京都	新宿区	クマネズミ	5		
		ドブネズミ	1		
	中央区	ドブネズミ	18	8	<i>L. interrogans</i> serogroup Icterohaemorrhagiae (6), 未解析 (2)
	千代田区	クマネズミ	1		
神奈川県	横浜市	ドブネズミ	4	1	<i>L. interrogans</i> serogroup Icterohaemorrhagiae

Ⅲ. 委託研究報告

国内委託

東レリサーチセンター