

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

アジアの感染症担当研究機関とのレプトスピラ症に関するラボラトリーネットワークの促進と
共同研究体制の強化に関する研究

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

研究要旨

1. 日本、フィリピンおよびベトナムで分離された *Leptospira interrogans* の分子タイピングを、multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。MLVA は、これまでの分子タイピング法で同じタイプと分類された異なる血清群分離株を識別できることが明らかとなった。またこれらの国に分布する *L. interrogans* と保有動物の多様性および普遍性が明らかとなった。
2. 血漿から LAMP 法による簡便なレプトスピラ DNA 検出のための DNA 抽出法を検討した。イオン交換樹脂 Chelex 100 を懸濁バッファーに加えることで、キット精製 DNA と同等の検出感度を得ることができた。

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。レプトスピラは、交差凝集素吸収試験により 250 以上の血清型に分類されるが、本試験法は非常に煩雑で実施できる機関は限られている。近年、血清学的分類に替わる多くの分子タイピング法が開発されてきた。我々はこれまで国内のレプトスピラ分離株について、*flaB* シーケンスタイピング (*flaB*-ST) および multi locus sequencing typing (MLST) を行ってきたが、異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点が明らかとなってきた。そこで本研究では、multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) によるアジア各国で分離された *L. interrogans* の解析を行った。

またレプトスピラ症はアジアの多くの国で流行しているが、リソースが限られた途上国で実施可能な簡便な診断法は確立されていない。我々はレプトスピラ DNA 検出法として、尿からの簡便な DNA 調整による LAMP 法を開発したが、血液（血漿）からの検出にはキットを用いた DNA 精製が必要であった。本研究ではイオン交換樹脂である Chelex 100 を用いた血漿からの簡便な DNA 調整法による LAMP 法の確立を試みた。

方法

1. レプトスピラ DNA

日本、フィリピン、ベトナムで分離されたレプトスピラ *L. interrogans* 91 株（分離動物：アカネズミ 1 株、イヌ 30 株、オキナワハツカネズミ 1 株、ドブネズミ 23 株、ヒト 30 株、ネコ 3 株、マンガース 3 株）のゲノム DNA

を DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて抽出した。

2. MLVA

参考文献 1~3 にある 11 種類のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物の塩基配列の決定およびアガロースゲル電気泳動により、各 VNTR のコピー数の算定を行った。各分離株の系統解析は、各 VNTR のコピー数をもとに Bionumerics を用いて行い、系統樹は UPGMA 法により作成した。

3. レプトスピラ血清群の同定

96 穴マイクロタイタープレートに、PBS で希釈したレプトスピラ標準抗血清と、レプトスピラ分離株培養液をそれぞれ 25 μ l ずつ加え、30 分、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。

4. 血漿からの *Lepto-rrs* LAMP による簡便なレプトスピラ DNA 検出

ヒト血漿 1 ml あたりレプトスピラ Akiyami B 株が $10^{-1} \sim 10^3$ 細胞になるように 10 段階希釈した。調整した血漿 1 ml を遠心分離 (4 分、13,000 \times g、10 分) にかけて、得られた沈渣を TE 20 μ l あるいは 5% Chelex-100 (salt form, Bio-Rad) を含む TE 20 μ l に溶解し、10 分間煮沸した (DNA 溶液)。DNA 溶液 2 μ l を *Lepto-rrs* LAMP 反応液 23 μ l に加え DNA 増幅を行った (参考文献 4)。判定は UV 蛍光の目視で行った。

参考文献

1. Majed Z et al., J Clin Microbiol. 43:539, 2005.
2. Slack A et al., J Med Microbiol. 55:1549, 2006.
3. Zuerner RL & Alt DP. J Clin Microbiol. 47:1202, 2009.

4. Koizumi N et al. J Clin Microbiol. 52:2072, 2012.

結果および考察

1. 日本、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の MLVA

昨年度の解析以降に国内で新たに分離された *L. interrogans* の血清群は、標準抗血清との反応性から Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona と同定された。またベトナムのドブネズミから分離されたレプトスピラの血清群は、すべて血清群 Bataviae であった。フィリピンのヒトおよびドブネズミ分離株の 3 血清群 (Bataviae, Grippotyphosa, Pyrogenes) を加えて 11 種類の VNTR のコピー数を算定し、UPGMA 法で系統樹を作成した (図 1)。

昨年度の解析から 3 血清群が新たに追加されたが、これら血清群もそれぞれのクラスターを形成し、MLVA により血清群の分類ができることがさらに実証された。一方、沖縄県とフィリピンから分離された血清群 Grippotyphosa および Pyrogenes、本州と沖縄県の血清群 Icterohaemorrhagiae は明らかに異なるクラスターを形成した (図 1)。それぞれのクラスターは血清型の違いを示している可能性があるため、今後各血清型標準株の VNTR を決定し、各クラスターと血清型との関連を明らかにする。

ドブネズミは世界中に分布しているが、地域により保有している血清群が異なることが明らかとなった (図 2)。このことから、保有するレプトスピラ血清群を決定することで、ドブネズミの拡散経路に関する新たな知見が得られる可能性が示唆された。一方で、地域により保有血清群が異なることは、特定の血清群を保有したドブネズミが拡散したのではなく、その地域ごとに新たなドブネズミ - レプトスピラの保有関係が成立したことを示唆

しているのかもしれない。

国内の血清群 Autumnalis はアカネズミおよびイヌに特異的なクラスターを形成するが、今年度の解析からヒト患者分離株はイヌと同じクラスターに分類されることが明らかとなった。本研究で解析を行った *L. interrogans* は、急性発症したイヌからの分離株である。したがって、未知の動物がこのレプトスピラ血清群の維持宿主となっていることが示唆されるが、イヌがこの血清群の維持宿主となり、ヒトへの感染源となっている可能性も考えられる。今後、健常イヌの本血清群レプトスピラの保有調査を行い、ヒトへの感染源としての重要性を明らかにする必要がある。

今回の結果から、MLVA はこれまでの分子タイピング法よりも解像度が高いことが明らかとなった。今後、台湾のレプトスピラの解析を行い、東アジアにおけるレプトスピラ分布、保有動物とレプトスピラ分子タイプの関係性を明らかにしていく。

2. 血漿からの *Lepto-rrs* LAMP による簡便なレプトスピラ DNA 検出法の開発

LAMP 法は、PCR とは異なり一定の温度で DNA を増幅できるため、高価な機器を必要とせず、リソースが限られた途上国でも適用可能な診断法としてのポテンシャルをもつ。これまで我々は、尿から簡便にレプトスピラ DNA を検出するための *Lepto-rrs* LAMP 法を開発したが、血漿からの DNA 検出にはキットを用いた DNA 精製が必要であった。そこで血漿からも簡便に DNA 検出を行うための DNA 抽出法の検討を行った。その結果、血漿の遠心沈渣を懸濁するバッファーにイオン交換樹脂である Chelex 100 を 5% 加えることによって、検出感度が向上した。Chelex 100 を加えない場合の検出限界は反応系あたり 2000 レプトスピラ細胞であったが、加えることにより反応あたり 2 レプトスピラ細胞と向上し、この検出限界値は、キットを用いて精

製した DNA を使用した場合と同等であった。今後この方法をベトナムで評価する予定である。

Lepto-rrs LAMP のための血漿からの DNA 調整法

血漿

遠心分離(16,000 × g, 10 分間)

遠心沈渣

5% Chelex 100 を含む TE 20 μl に懸濁

熱処理 (100 °C, 10 分間)

急冷

遠心分離(16,000 × g, 1 分間)

上清を DNA 検体として使用

MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌博士 (国立感染症研究所・細菌第一部) に深謝いたします。

論文発表

Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. J Clin Microbiol 50: 2072-2074, 2012.

学会発表

小泉信夫 . レプトスピラ症の現状 . 第 12 回人と動物の共通感染症研究会学術集会 . 2012 年 11 月 .

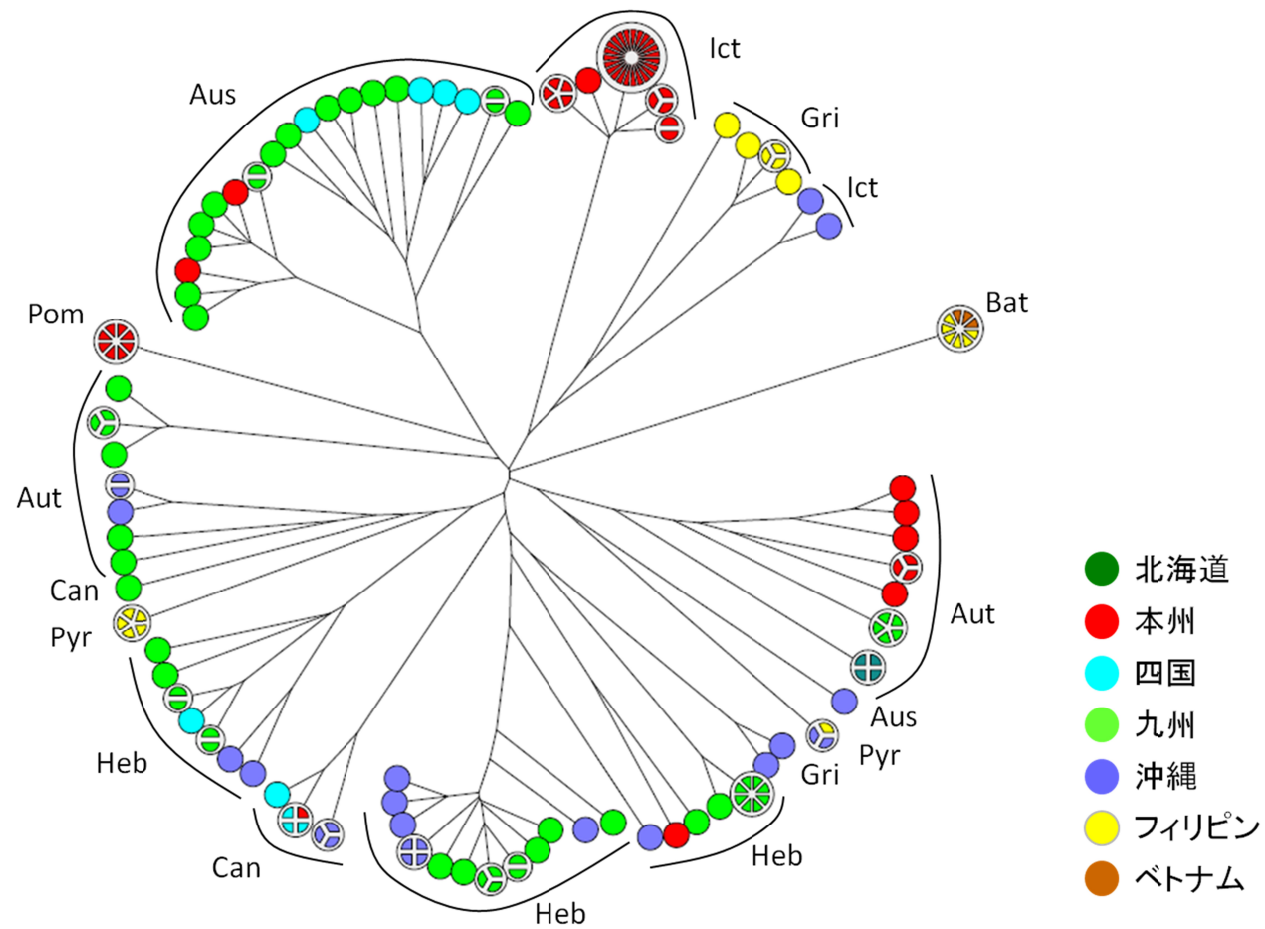


図1. MLVAによる日本, フィリピン, ベトナムで分離された *L. interrogans* の系統樹
 各アルファベットは血清群を表す: Aus; Australis, Aut; Autumnalis, Bat; Bataviae, Can; Canicola, Gri; Grippotypfosa, Heb; Hebdomadis, Pom; Pomona, Pyr; Pyrogenes.

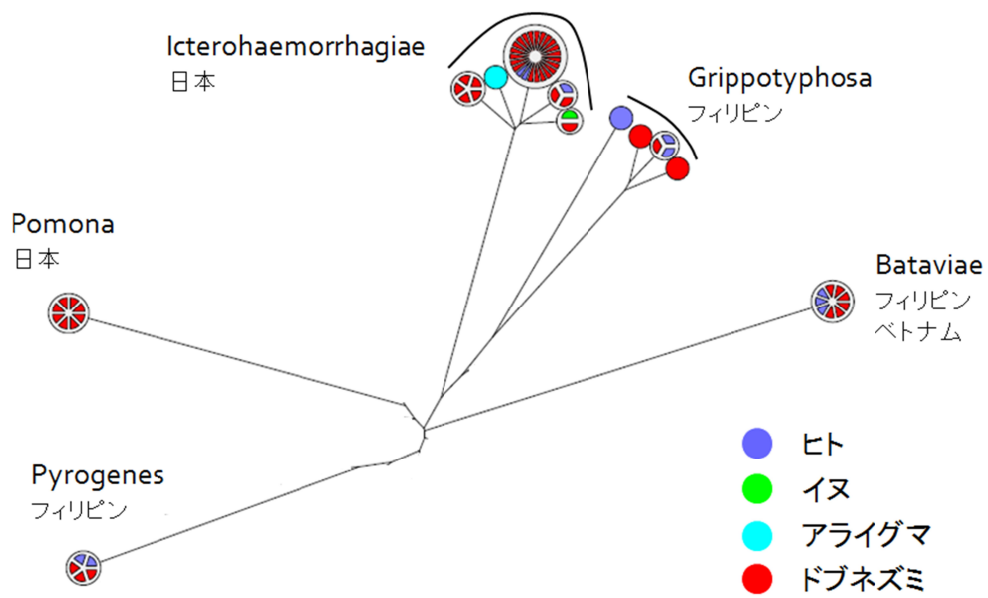


図2 .MLVA による日本 ,フィリピン ,ベトナムのドブネズミから分離された *L. interrogans* の系統樹 (図1 より抜粋).

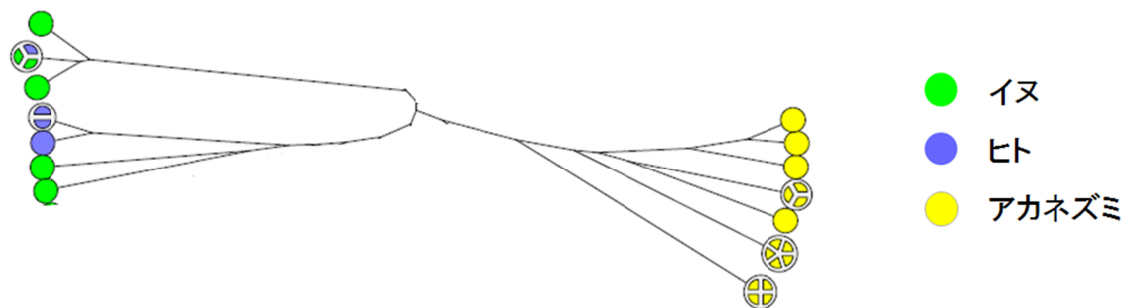


図3 . MLVA による日本のヒト , イヌおよびアカネズミから分離された *L. interrogans* 血清群 Autumnalis の系統樹 (図1 より抜粋).