

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

Collaborative study on leptospirosis with Taiwan CDC and Vietnam NIHE

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

Nobuo Koizumi: Senior Researcher, Department of Bacteriology I, NIID

Jung-Jung Mu: Chief, Bacterial Enteric and Emerging Diseases Laboratory,
Center for Research, Diagnostics and Vaccine Development, Taiwan CDC

Hoang Thi Thu Ha: Chief, Bacteriology Department, National Institute of
Hygiene and Epidemiology, Vietnam

研究要旨

台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラ 20 株の性状解析を行った *flaB* 部分塩基配列決定および標準抗血清との反応性から，分離株は *L. borgpetersenii* serogroup Javanica および *L. interrogans* serogroup Australis および Bataviae と同定された（血清群未同定 1 株）。Multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) による *L. interrogans* 分離株の分子タイピングによって，Bataviae はフィリピン，ベトナム株と遺伝的に同一であり，Australis は沖縄県の患者から分離された株と近縁であることが明らかとなった。また *L. interrogans* 基準株 51 株の MLVA を行い，これらとの比較の結果，沖縄県の患者から分離された血清群 Icterohaemorrhagiae の血清型は Naam と推定された。

Serological and molecular characterization of leptospires isolated from small mammals in Taiwan was performed in this study. The isolates were identified as *L. borgpetersenii* serogroup Javanica and *L. interrogans* serogroup Australis and Bataviae (Serogroup of one strain of the *L. interrogans* isolates was unidentified). Multiple locus variable-number tandem repeats analysis revealed that the Bataviae isolates of Taiwan were genetically identical to those of Philippines and Vietnam isolates and the Australis isolates were genetically similar to those of human isolates in Japan. Fifty-one *L. interrogans* reference strains were subjected to MLVA and the serovar of *L. interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from human patients in Okinawa was deduced to be Naam.

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 *L. interrogans* の分子タイ

ピングとして multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) の有用性を明らかにしてきた。今年度の研究では台湾のげっ歯類から分離されたレプトスピラの遺伝学的および血清学的な解析を行った。

方法

1. レプトスピラ DNA

台湾のげっ歯類から分離されたレプトスピラ 20 株および *L. interrogans* 基準株 51 株のゲノム DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

2. レプトスピラ分離株の種・血清群同定

レプトスピラ分離株の種同定は *flaB* 遺伝子の部分塩基配列の決定により行った (参考文献 1)。また血清群の同定は、レプトスピラ標準抗血清を用いた MAT により行った (参考文献 2)。

3. MLVA

参考文献 3~5 にある 11 種類のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物のアガロースゲル電気泳動および DNA シーケンシングにより、各 VNTR のリピート数の算定を行った。各分離株のクラスター解析は、各 VNTR のリピート数をもとに Bionumerics を用いて行い、系統樹は UPGMA 法により作成した。

参考文献

1. Koizumi N et al., Jpn J Infect Dis. 61:465, 2008.
2. Faine S et al. *Leptospira* and leptospirosis, 2nd edn. MediSci. 1999.
3. Majed Z et al., J Clin Microbiol. 43:539, 2005.
4. Slack A et al., J Med Microbiol. 55:1549, 2006.
5. Zuerner RL & Alt DP. J Clin Microbiol. 47:1202, 2009.

結果および考察

1. 台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラの種および血清群同定

台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラ 20 株は、*flaB* 部分塩基配列の比較から、*L. borgpetersenii* 13 株および *L. interrogans* 7 株と同定された (表 1)。*L. borgpetersenii* の塩基配列はすべて同一で、*L. interrogans* の塩基配列は 2 種類であった (データ未掲載)。標準抗血清との反応性から *L. borgpetersenii* 分離株の血清群はすべて Javanica と同定された。一方 *L. interrogans* の血清群は Bataviae (*flaB* 塩基配列が同一の 4 株) および Australis (*flaB* 塩基配列が同一の 2 株) と同定された (1 株は複数の抗血清と弱い反応を示したため未同定)。

2. *L. interrogans* の MLVA

L. interrogans 台湾分離株および基準株の 11 種類の VNTR のリピート数をアガロース電気泳動および DNA シーケンシングにより算定した (MLVA)。台北市のドブネズミから分離された血清群 Bataviae の 11 VNTR のコピー数は 4 株とも同一で、フィリピンおよびベトナムのドブネズミから分離された Bataviae および血清型 Bataviae 基準株と同一であり、東アジアにおいて広くドブネズミに保有されていることが明らかとなった (表 2)。一方、日本のドブネズミが保有レプトスピラとは血清学的・遺伝学的に大きく異なっている (昨年度報告書)。今後東アジアおよびその他の地域のドブネズミ分離株を解析することで、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。

血清群 Australis 2 株の 11 VNTR のコピー数は同一で、また血清群の未同定の 1 株も遺伝的に近縁であることが明らかとなった。これら 3 株は沖縄県の患者分離株と同一のクラ

スターを形成し、本州のイヌおよびアカネズミから分離された血清群 Australis とは異なるクラスターであった(図1)。これまで沖縄県における本血清群の保有動物は明らかになっていない。コキバラネズミは日本に存在しないものの、ジャコウネズミは沖縄県に広く存在することから本動物が保有動物の可能性が示唆された。

L. interrogans 各血清型基準株の MLVA を行った結果、MLVA タイプの異なる本州と沖縄県の血清群 Icterohaemorrhagiae は、それぞれ血清型 Icterohaemorrhagiae および Naam であると推測された(表3)。この他にも上述の血清群 Bataviae 分離株、フィリピンの血清群 Pyrogenes 分離株は、それぞれ血清型 Bataviae および Manilae と MLVA タイプが同一であった(表2 およびデータ未掲載)。一方で、その他血清群分離株と同一あるいは近縁の MLVA タイプは今回タイピングを行った基準株から見いだされなかった。このことはこれら分離株の血清型が新規の血清型であることを示唆しているのかもしれない。あるいは同じ血清型が異なる分子タイプ群から構成されている可能性も考えられる。今後、他の地域の分離株の解析を通して血清学的分類と分子タイピングの関連性(普遍性あるいは多様性)をさらに明らかにしていく必要がある。

今回解析を行った台湾の *L. borgpetersenii*

血清群 Javanica 分離株の *flaB* 塩基配列は、日本およびフィリピンの小型哺乳動物から分離された *L. borgpetersenii* 血清群 Javanica 分離株と同一であった(データ未掲載)。

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)に深謝いたします。

論文発表

1. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症. 小児科. 54:43-48, 2013.
2. 小泉信夫, 岡野祥, 大西真. レプトスピラ症. 化学療法の領域. 29:670-678, 2013.
3. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ感染症(レプトスピラ症, ワイル病). 別冊 日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No. 24 感染症症候群(第2版)(上)病原体別感染症編. 257 - 260, 2013.

学会発表

小泉信夫. スリランカ・フィリピンにおけるレプトスピラ症の現状. 第87回日本細菌学会総会. 2014年3月.

表 1 . 台湾の小型哺乳動物から分離されたレプトスピラの種および血清群同定

ID	捕獲地	動物	レプトスピラ種	血清群
R27	Kinmen	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R45	Kinmen	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R81	Kinmen	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R145	Kinmen	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R208	Taipei city	ドブネズミ	L. interrogans	Bataviae
R210	Taipei city	ドブネズミ	L. interrogans	Bataviae
R238	Taipei city	ドブネズミ	L. interrogans	Bataviae
R241	Taipei city	ドブネズミ	L. interrogans	Bataviae
R288	Yilan	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R295	Yilan	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R316	Yilan	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R327	Hualien	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R376	Hualien	ナンヨウネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R476	Yilan	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R479	Yilan	オニネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R624	pingtung	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R725	Taoyuan	コキバラネズミ	L. interrogans	未同定
R729	Taoyuan	コキバラネズミ	L. interrogans	Australis
R900	Taoyuan	コキバラネズミ	L. borgpetersenii	Javanica
R972	Taoyuan	ジャコウネズミ	L. interrogans	Australis

表 2 . 血清群 Bataviae 分離株の各 VNTR のリピート数

株名	分離地*	分離動物	VNTR										
			V4	V7	V10	V19	V23	V27	V29	V30	V31	V36	V50
Van Tienen [#]	ID	ヒト	1 [§]	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
K1-37	PH	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
K1-46	PH	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
K68	PH	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
LT 101-69	PH	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
PP55	PH	ヒト	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
PP150	PH	ヒト	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
PP152	PH	ヒト	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
V13	VN	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
V15	VN	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
V16	VN	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
R208	TW	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
R210	TW	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
R238	TW	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9
R241	TW	ドブネズミ	1	10	6	15	8	11	8	2	5	3	9

*ID: インドネシア, PH: フィリピン, VN: ベトナム, TW: 台湾

[#]血清型 Bataviae 基準株

[§]リピート数

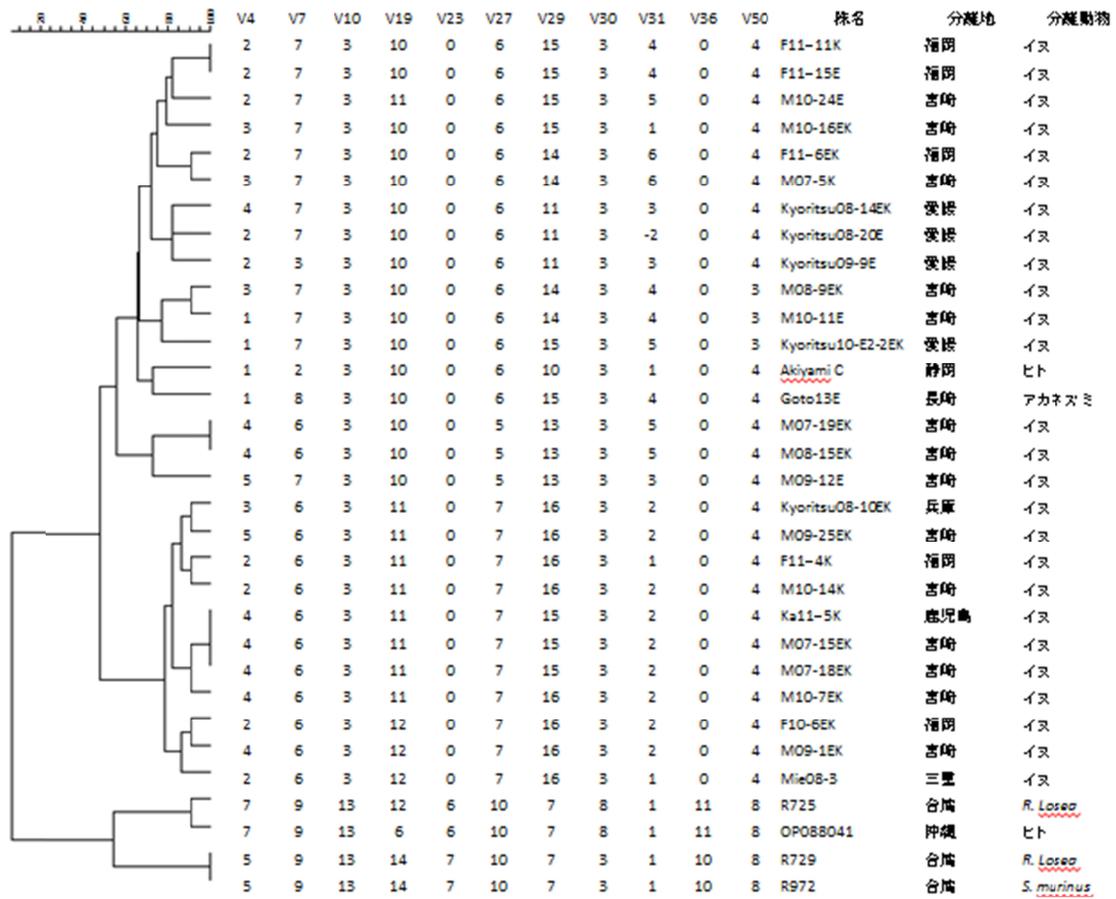


図1. 血清群 Australis 分離株の 11 VNTR の MLVA を基にしたクラスター解析

表 3 . 血清群 Icterohaemorrhagiae 分離株の各 VNTR のリピート数

株名	分離動物	血清型	VNTR										
			V4	V7	V10	V19	V23	V27	V29	V30	V31	V36	V50
C09-8E	イヌ		2 ^s	1	7	2	0	7	7	10	3	16	7
YKHM2010-2	ドブネズミ		2	1	7	2	0	7	7	10	3	17	7
CIC100616-1	ドブネズミ		2	1	7	2	0	7	7	10	3	17	7
CIC110303-7	ドブネズミ		2	1	7	2	0	7	7	10	3	17	7
Nakaminato-4	ドブネズミ		2	1	7	2	0	7	7	10	3	18	7
S3-3	ドブネズミ		2	1	7	1	0	7	7	10	3	17	7
Rc146	アライグマ		2	1	7	2	0	7	7	10	5	17	7
Ictero No.1*	ヒト	Icterohaemorrhagiae	2	1	7	2	0	7	7	10	3	17	7
OP35	ヒト		8	7	7	13	7	9	1	8	2	12	8
OP078012	ヒト		8	7	7	12	7	9	1	8	2	12	8
Naam*	ヒト	Naam	8	7	7	2	3	9	1	8	2	12	8

*血清型基準株

^sリピート数