

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）  
総合分担研究報告書（平成 23～25 年度）

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

1. 日本，台湾，フィリピンおよびベトナムで分離された *Leptospira interrogans* および各血清型基準株の分子タイピングを multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。MLVA により，他の分子タイピング法で同じ分子タイプと分類された異なる血清群を識別できること，また同じ血清群内の遺伝的多様性が明らかとなった。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，動物種特異的な血清群の存在が明らかになった。

We performed molecular typing of *Leptospira interrogans* isolated in Japan, Taiwan, Philippines and Vietnam by multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA). MLVA revealed the genetic diversity of strains which belong to the same serogroup and turned out to have more discriminatory power than that of *flaB* sequence typing or multilocus sequence typing. MLVA also revealed the diversity and the universality of the relation between *L. interrogans* and host animals in/across these countries.

2. ベトナム北部のレプトスピラ症の現状を明らかにするために，ベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行った。これらの診断法を用いてタインホア地域の熱源が不明の発熱患者および一般健康人の血清疫学，ネズミ，ブタおよび土壌からのレプトスピラ検出を行った。熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM が検出され，9% の患者血液からレプトスピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG が検出され，農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。

To elucidate the current situation of leptospirosis in the northern part of Vietnam, the technical transfer of diagnostic methods of leptospirosis was implemented, and then the seroprevalence study of patients with undifferentiated fever and healthy people and the detection of leptospiral DNA from patients, rats and soil were conducted in Thanh Hoa

area. *Leptospira*-specific IgM and DNA was detected in 20% and 9% of the patients with undifferentiated fever, respectively. *Leptospira*-specific IgG was detected in 49% of healthy people whose occupations were agriculture-related, indicating the epidemicity of leptospirosis among agricultural workers in Thanh Hoa area.

## 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、日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の解析を multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った。

レプトスピラ症はアジアの多くの国で流行しているが、ベトナムでは南部メコンデルタ地域での患者報告があるものの、国レベルでの実態は明らかになっていない。そこで本研究では、ベトナム北部におけるレプトスピラ症の実態を明らかにするために、ベトナム国立衛生疫学研究所(NIHE)にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、タインホア地域のレプトスピラ症の実態を調査した。

## 方法、結果および考察

1. 日本、台湾、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の MLVA 各国で分離されたレプトスピラ *L.*

*interrogans* 263 株の血清群同定を行い(表1)、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)。また *L. interrogans* 各血清型標準株 51 株の MLVA も行った。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。

本 MLVA により、*flaB*-ST および MLST で同じシーケンスタイプだった血清群の異なる分離株を、血清群ごとにタイピングすることができた(図1)。また血清型基準株との比較により、血清群 Bataviae, Canicola, Pyrogenes 分離株の血清型をそれぞれ Bataviae, Canicola, Manilae と、また Icterohaemorrhagiae 分離株の血清型を Icterohaemorrhagiae および Naam と同定することができた。したがって、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り、血清型推定にも有用である可能性が示された。しかしながら、その他の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。

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(表1)。また他の動物が保有するレプトスピラに比べて、ドブネズミが保

有するレプトスピラの血清群間のゲノムは高度に保存されていた。このことから、保有するレプトスピラ血清群・分子タイプを決定することで、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。今後他の地域のドブネズミ分離株の解析を行い、これら仮説の検証を行っていく。

MLVA により、ヒトへの感染源となっている保有動物の推定に有用なことが明らかとなった。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、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り、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が示唆された。また沖縄県の患者分離株は台湾のネズミ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。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が、沖縄県に広く存在するジャコウネズミが保有動物の可能性が示唆された。

## 2. ベトナム北部におけるレプトスピラ症疫学研究

ベトナムでは、南部メコンデルタ地帯でレプトスピラ症の蔓延が報告されているが、北部におけるレプトスピラ症の発生実態はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、ベトナム NIHE にレプトスピラ症実験室診断法の技術移転を行い、これらの診断法を用いてタインホア省のレプトスピラ症疫学研究を行った。

熱源不明の発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM (LigA IgM) が検出され、9% の患者血液から *flaB*-nested PCR によりレプト

スピラ DNA が検出された。また同地域の健康人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG (LigA IgG) が検出された。抗体陽性者の職業は農作業従事者 62%、畜産従事者 17%、屠畜従事者 6% であり、農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延が明らかとなった。またネズミの 10% の腎臓あるいは尿からレプトスピラ DNA が検出された。一方、土壌 70 検体からレプトスピラ DNA は検出されなかった。今後ネズミ以外のウシやブタなどの家畜からのレプトスピラ検出を行うとともに、環境からの検出法の改善を行い、同地域におけるレプトスピラ症の伝播経路の解明を目指す。

loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による血漿からの DNA 検出のための、DNA 精製を必要としない簡便な DNA テンプレートの調整法を以下のように確立した。

### 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

レプトスピラを分与いただいた岡野祥 (沖縄県衛生環境研究所), 吉松組子 (北海道大学大学院), また MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌 (国立感染症研究所) 各氏に深謝いたします。

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.
4. 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

1. 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.
2. 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.

表 1 . 本研究で解析を行った *L. interrogans* の分離国，血清群および分離動物

国	レプトスピラ血清群	分離動物
日本	Australis	アカネズミ，イヌ，ヒト
	Autumnalis	アカネズミ，イヌ，ヒト
	Canicola	イヌ，ネコ，ヒト
	Grippotyphosa	ヒト
	Hebdomadis	アカネズミ，アライグマ，イヌ，オキナワハツカネズミ，ヒト，マンゲース
	Icterohaemorrhagiae	アライグマ，イヌ，ドブネズミ，ヒト
	Pomona	ドブネズミ
	Pyrogenes	ヒト
台湾	Australis	コキバラネズミ，ジャコウネズミ
	Bataviae	ドブネズミ
ベトナム	Bataviae	ドブネズミ
フィリピン	Bataviae	ドブネズミ，ヒト
	Grippotyphosa	ドブネズミ，ヒト
	Pyrogenes	ドブネズミ，ヒト

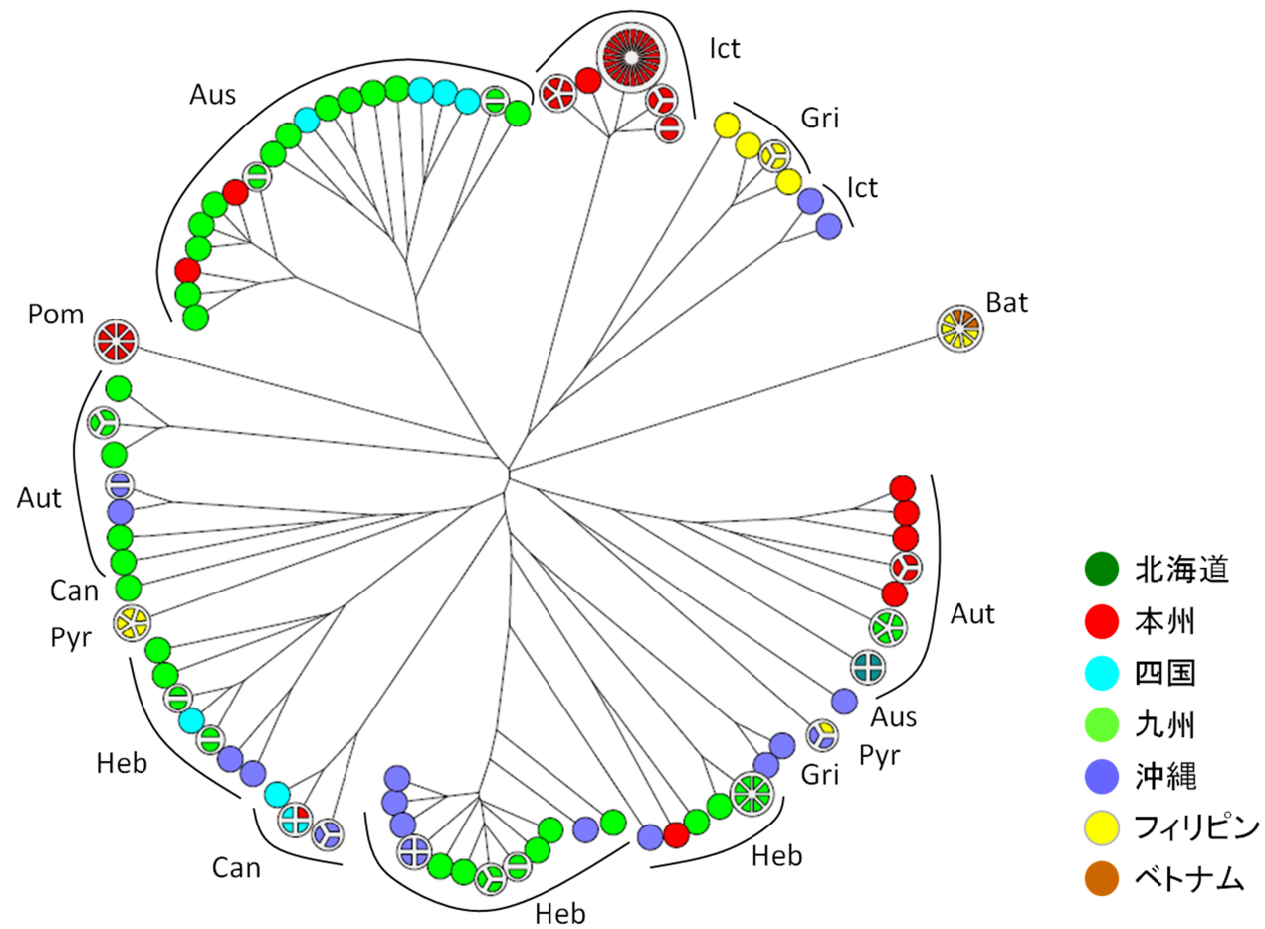


図1. MLVAによる日本, フィリピン, ベトナムで分離された *L. interrogans* の系統樹  
 各アルファベットは血清群を表す: Aus; Australis, Aut; Autumnalis, Bat; Bataviae, Can; Canicola, Gri; Grippotyphosa, Heb; Hebdomadis, Pom; Pomona, Pyr; Pyrogenes.

