

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的 医薬品等開発推進研究事業）
委託業務成果報告書

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 Vietnam NIHE

担当責任者 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

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

研究要旨

1. ベトナム・ハノイ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と疫学調査に関する研究打ち合わせを行うとともに、全菌体 IgG ELISA および LigA-IgG ELISA の技術移転を行った。
2. ゲノムワイドにレプトスピラの病原因子を探索するために、トランスポゾンを利用したランダム挿入変異法を *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株で確立した。またレプトスピラの溶血活性を測定するアッセイ法を構築し、溶血活性を指標としてトランスポゾンランダム変異株のスクリーニングを行った。
1. To reveal the current status of leptospirosis in Hanoi, Vietnam, seroprevalence of healthy people in Hanoi was planned to perform. For that, a technical transfer of whole cell-based and LigA-based IgG ELISA assays to Bacteriology Department, NIHE was conducted.
2. To perform a genome-wide screening of virulence factors in *Leptospira interrogans*, transposon-mediated random mutagenesis in *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID was established. An assay for determining hemolytic activity of UP-MMC-NIID was constructed and then, *Leptospira* mutants in hemolytic activity were screened.

研究目的

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によって起こる人獣共通感染症である。本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。こ

れまで我々は、ベトナム北部・タインホア地域で熱源不明の発熱患者および一般健常人の血清疫学を行い、発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM を、また健常人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG を検出し、同地域の農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延を明らかにした。本研究では、ハノイにおけるレプトスピラ症の実態を明らかにするため

に、まずは同地域の健常人の血清疫学を行うこととし、そのための検査法の技術移転をベトナム国立衛生疫学研究所 (NIHE) に行った。

レプトスピラでは特定の遺伝子を選択的に破壊・相補する遺伝学的ツールが欠如しており、分子レベルでの病原性メカニズムの解明が行えなかった。近年 *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により、遺伝子をランダムに欠損させたレプトスピラ変異体の作製を行うことが可能となった [1]。しかしこの方法の形質転換効率是非常に低いため、本研究では変異体作製法の改変を行うとともに、レプトスピラの溶血活性を測定するアッセイ系を構築し、ランダム変異法によるレプトスピラの溶血活性変異体のスクリーニングを行った。

研究方法

1. レプトスピラ全菌体および LigA-IgG ELISA

全菌体抗原プレートおよび LigA 抗原の調整は文献 2 および 3 の通り行った。ヒト血清中の IgG 測定は文献 3 の通り行った。

2. トランスポゾンを利用したランダム挿入変異法

変異体の作製には *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株を使用した。*mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法は文献 1 の方法を改変して行った。レプトスピラと大腸菌の接合のため各溶液を混合し、遠心分離 (4000 × g, 15 分間) を行い菌を沈殿させ、上清を 600 μl 残して除去した。菌を再懸濁後、アスピレーターを用いてフィルター上に菌を濃縮した。接合後のレプトスピラ培養のための EMJH 寒天培地には 1% の Noble agar (Difco) を使用した。また菌のプレーティングには Bac'n roll beads (ニッポンジーン) を使用した。

3. 溶血試験

UP-MMC-NIID 株および非病原性レプトスピラ *L. biflexa* serovar Patoc Patoc 株の溶血活性を以下の通り測定した。各株を EMJH 培地で培養し、420 nm の吸光度が 0.2 ~ 0.3 となった培養液 1.6 ml (4.8 × 10⁸ 細胞) を 4000 × g で 15 分間遠心分離し、沈渣を 1.6 ml の PBS で懸濁した。懸濁液を再び 4000 × g で 15 分間遠心分離を行い、沈渣を PBS 70 μl に懸濁した。ウシ赤血球溶液は、ウシ血液 50 ml を遠心分離 (800 × g, 10 分間) 後、上清を捨て沈渣 (赤血球) を PBS 40 ml で 4 回洗浄した。最終遠心後、沈渣と等量になるまで上清を捨て、これを再懸濁してウシ赤血球溶液とした。120 mM NaCl を含む EMJH 培地でウシ赤血球溶液を終濃度 10% となるように調整し、これを RBC 溶液とした。RBC 溶液 70 μl とレプトスピラ懸濁液 70 μl を 1.5 ml マイクロチューブに加え、1000 × g で 5 分遠心分離をした後 30 分で培養した。赤血球溶液 7 μl に水 133 μl を加えて赤血球を完全に溶血したものを陽性コントロール (PC), RBC 溶液 70 μl に PBS 70 μl を加えたものを陰性コントロール (NC) とした。培養 18 時間後に 1000 × g で 5 分間遠心分離を行い、上清 70 μl を回収して 540 nm の吸光度を測定した。溶血活性は以下のように求めた。

$$\text{溶血活性} = \frac{(\text{レプトスピラ懸濁液} + \text{RBC溶液の540 nmの吸光度}) - (\text{NCの540 nmの吸光度})}{(\text{PCの540 nmの吸光度}) - (\text{NCの540 nmの吸光度})} \times 100$$

また UP-MMC-NIID 培養液 1.6 ml を 16900 × g, 3 分間の遠心分離を 2 回行い、上清を孔径 0.2 μm フィルター (Merk Millipore) に通してレプトスピラを完全に除去した。この培養上清 7.5 μl, 15 μl, 30 μl (それぞれ UP-MMC-NIID 2.3 × 10⁶ 細胞, 4.5 × 10⁶ 細胞, 9.0 × 10⁶ 細胞の培養液量に相当) を用いて RBC 溶液を調整し、上記の通り溶血活性を測定した。

4. レプトスピラ変異体の溶血試験

レプトスピラ変異体の各コロニーを、25 μ l/ml カナマイシン、100 mg/ml 5 フルオロウラシルを含む EMJH 培地 500 μ l で 2 回植え継ぎ、5~7 日間培養したものを実験に使用した。培養は 96 Well Masterblock (grenier bio-one) で行い、上記 3 の通り PBS で洗浄を行い、RBC 溶液 70 μ l を加え 12 時間培養した後、415 nm の吸光度を測定し溶血活性を求めた。

研究結果および考察

1. ベトナム・ハノイ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。これまで我々は、ベトナム北部・タインホア地域で熱源不明の発熱患者および一般健常人の血清疫学を行い、発熱患者の 20% からレプトスピラ特異的 IgM を、また健常人の 49% からレプトスピラ特異的 IgG を検出し、同地域の農業従事者におけるレプトスピラ感染の蔓延を明らかにした。本研究では、ハノイにおけるレプトスピラ症の実態を明らかにすることを目的とした。ベトナム NIHE 所長および担当責任者である Dr Hoang との話し合いの結果、まずは同地域の健常人の血清疫学調査を行うこととした。10 月に NIHE を訪問し、血清疫学調査に必要な検査法である全菌体 IgG ELISA および LigA-IgG ELISA の技術移転を行った。今後これらの診断法を用いてハノイ地域の健常人のレプトスピラ特異的 IgG の検出を行う。また上述のタインホア地域での調査は市販のキットを使用した。本研究では自作の ELISA と市販品との比較を行う。健常人を対象とした本調査でレプトスピラ症の発生実態を明らかにし、今後は患者調査につなげていく。

2. トランスポゾンを利用した病原性レプトスピラのランダム挿入変異体の作製

レプトスピラでは特定の遺伝子を選択的に破壊・相補する遺伝学的ツールが欠如しており、分子レベルでの病原性メカニズムの解明が行えなかった。近年 *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法により、遺伝子をランダムに欠損させたレプトスピラ変異体の作製を行うことが可能となった [1]。しかしこの方法の形質転換効率は非常に低く、ゲノムワイドな解析に用いることはできない。また Wuthiekanun らは、平板培地上で病原性レプトスピラのコロニー形成率を向上する培養条件を報告した。本研究では上記 2 報を参考に *L. interrogans* serovar Manilae UP-MMC-NIID 株で *mariner* トランスポゾンを用いたランダム挿入変異法を構築した。

文献 1 ではレプトスピラと大腸菌培養混合液をそのままフィルター吸着に用いたが、混合液を遠心濃縮することにより操作時間の短縮とコロニー形成率の向上がみられた。また平板培地の寒天を Bacto agar から Noble agar に変更し、Bac'n roll beads を用いて平板培地にプレーティングすることで得られるコロニー数が増加した。これらを組み合わせることにより文献 1 では $1/8.5 \times 10^{-8}$ であった変異体取得効率が、 $1/1.6 \times 10^{-6}$ に改善した。一方、Wuthiekanun らは平板培地へのウサギ血清の添加や 5% CO₂ 下で初期培養することによりコロニー形成の向上がみられることを報告したが、本研究ではこれらの効果はみられなかった。使用した菌株の違いあるいは大腸菌存在下での培養のため、本研究では効果がみられなかったのかもしれない。

3. レプトスピラ溶血活性の測定

細菌の溶血活性の測定には通常血液寒天培地が用いられる。しかしながら、レプトスピラは寒天培地中にコロニーを形成し、またコロニーを形成するまでに 10 日以上を要するため、血液寒天培地を用いて溶血活性を測定

することができなかった。そこで上記方法 3 の液体中での溶血活性測定法を構築し、病原性 UP-MMC-NIID および非病原性 Patoc の溶血活性を調査した。その結果、本測定系で非病原性 Patoc でも約 20%の溶血活性がみられたものの、病原性 UP-MMC-NIID は赤血球を完全に溶血した(図 1A)。UP-MMC-NIID の溶血活性の経時変化を調べた結果、培養 1 時間後から溶血活性がみられ、3 時間でほぼ完全に赤血球を溶血することが明らかとなった(図 1B)。更に、UP-MMC-NIID の溶血活性が菌の分泌物に由来するかを明らかにするため、培養上清の溶血活性を調査した。その結果、培養上清の量に依存して溶血活性がみられた(図 1C)。一方、陽性コントロールに用いた菌数を含む培養液量に相当する培養上清 30 μ l でも、菌懸濁液の約 70%の溶血活性しかみられなかった(図 1C)。しかしながら、非病原性株でも 20%の溶血活性がみられることから、病原性レプトスピラの溶血活性の本体は菌からの分泌産物であると考えられた。

この測定系を用いて現在までにレプトスピラトランスポゾン挿入変異体 960 クローンのスクリーニングを行ったが、溶血活性が失われた変異体を得ることはできなかった。今後、実験条件の検討を行いつつスクリーニングを継続していく。

1. Slamti L & Picardeau M. *Methods Mol Biol.* 859:169, 2012.
2. WHO. *Human leptospirosis.* 2003.
3. Koizumi N & Watanabe H. *Vaccine.* 22:1545, 2004.
4. Wuthiekanun V et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 57:297, 2013.

論文発表

1. Koizumi N, Mizutani Muto M, Izumiya H, Suzuki M, Ohnishi M. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis

and clinical characterization of *Leptospira interrogans* canine isolates. *J Med Microbiol.* in press

2. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症. 月刊公衆衛生情報. 44: 22-23, 2014.
3. 小泉信夫, 大西真. レプトスピラ症. 感染症内科. 2: 159-164, 2014.

学会発表

1. 水谷麻紀, 小泉信夫, 泉谷秀昌, 川原一芳, 大西真. MLVA genotyping and clinical characterization of *Leptospira interrogans* canine isolates. 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜市, 2015 年 3 月.

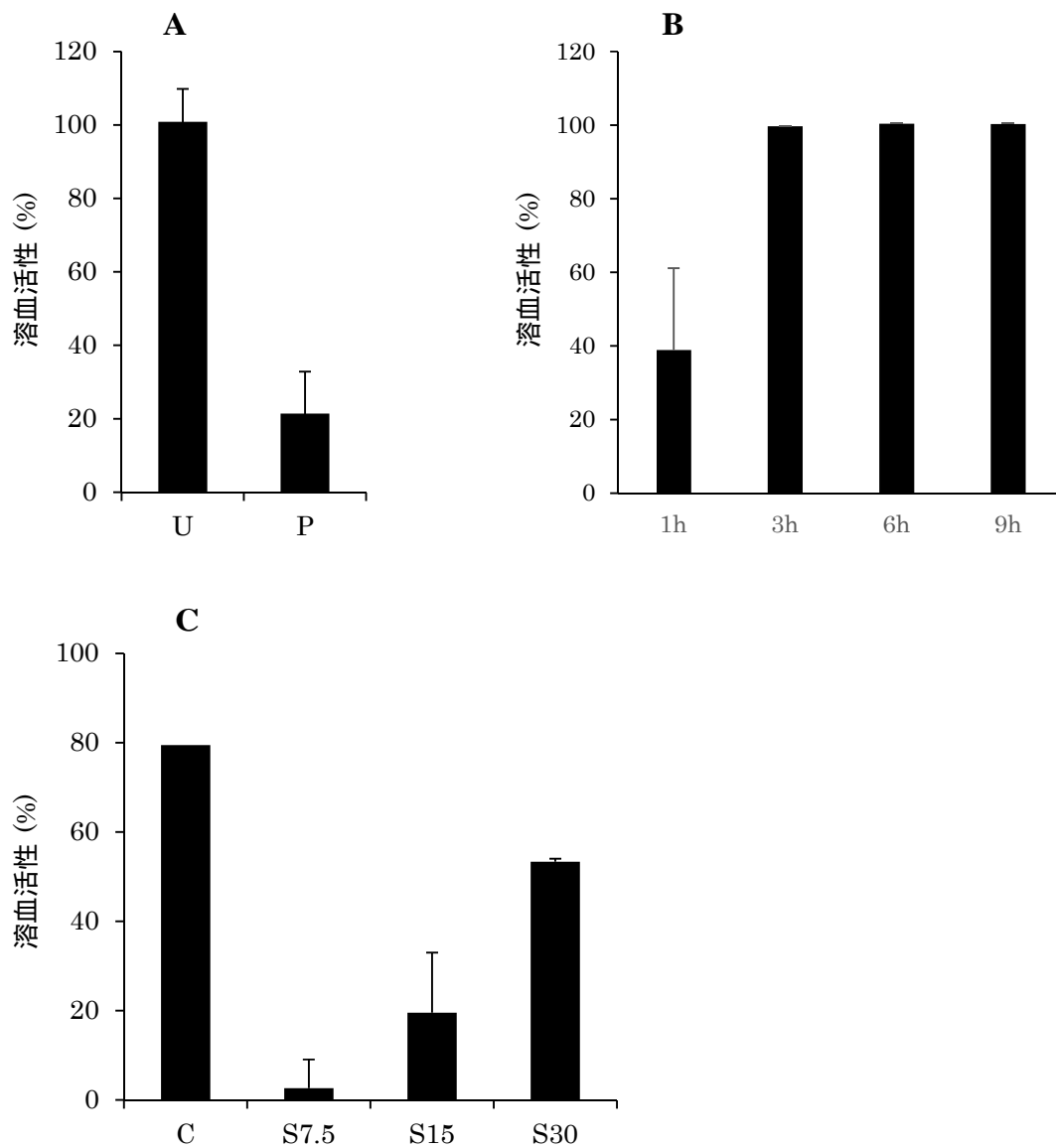


図1. レプトスピラ溶血活性の測定 . A: UP-MMC-NIID (U)および Patoc I (P) 4.8×10^8 細胞の溶血活性 (18 時間). B: UP-MMC-NIID の溶血活性の経時的変化 . C: UP-MMC-NIID 培養上清の培養の溶血活性 (18 時間). C, UP-MMC-NIID 4.8×10^8 細胞; S7.5, 培養上清 7.5 μ l; S15; 培養上清 15 μ l; S30, 培養上清 30 μ l . 溶血活性は以下の式で求めた .

$$\text{溶血活性(\%)} = \frac{(\text{PBS 溶液+RBC 溶液の 540 nm の吸光度}) - (\text{NC の 540 nm の吸光度})}{(\text{PC の 540 nm 吸光度}) - (\text{NC の 540 nm の吸光度})} \times 100$$