

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791130

研究課題名(和文) レプトスピラ症の血清学的診断法の開発と疫学動態の解析

研究課題名(英文) Improvement of serological diagnosis of leptospirosis and its epidemiological dynamics

研究代表者

五十棲 理恵 (RIE, ISOZUMI)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30550355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：レプトスピラ症は熱帯途上国を中心に流行しており、しばしば重症化や致死的な転帰を引き起こす。有効な治療薬はあるので、早期に診断、治療開始できれば速やかな回復を期待できるが、現況の診断法では感度・特異度に問題あり、早期診断も困難である。また、こうした診断の問題点から熱帯途上国での正確な流行状況は把握できていない。本研究では組み換え抗原(LipL32及びLigA)を用いた新たなELISA法を開発し、実際の流行地域であるタイ、スリランカ及びベトナムから得たサンプルでその有効性を検討した。また、ベトナムでは主な媒介動物である野鼠を調査し、レプトスピラの保菌状況を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Leptospirosis is wide spread disease especially in tropical developing countries, which cause symptom in human often severe to lethal. Early diagnosis and early treatment is quite important to avoid bad outcome, but it is difficult to diagnose at early stage of disease by current diagnose methods whose sensitivity and specificity are also insufficient to do complete diagnosis. With the diagnostic problem, we do not understand accurate epidemic status of leptospirosis in tropical developing countries. In this study, we developed a new diagnostic method based on ELISA with recombinant antigens (LipL32 and LigA). We tested samples from epidemic area (Thailand, Sri Lanka and Vietnam) with this method. We also investigated wild rats in Hanoi which are important vector of leptospirosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：レプトスピラ症 血清学的診断 ELISA 疫学動態 熱帯地域

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は熱帯途上国を中心に多くの人々が罹患し、深刻な健康問題となっている。本症は病原性レプトスピラが引き起こす人獣感染症である。レプトスピラはげっ歯類をはじめとする多くの哺乳類の腎臓に定着し、尿中に排出される。ヒトへの感染はこうした尿またはそれに汚染された水系や土壌と接触することにより成立する。

レプトスピラ症に罹患しても早期に診断できれば、有効な治療薬は多種あり、重症化や致死的な転帰を回避することができる。しかしながら、感染早期に診断することは難しく早急な診断法の開発が望まれている。

また、流行地において公衆衛生的に有効な介入をするためにはヒト及び媒介動物における疫学動態を把握する必要があるが現況では十分な調査・解析はなされていない。こうした状況を踏まえ本研究では、新規組み換え抗原を用いた ELISA 法による診断法の開発と、それを一部応用して、レプトスピラ症流行地域における疫学動態の把握を試みた。

2. 研究の目的

(1)新規レプトスピラ組み換え抗原を作成し、高感度・高特異度のレプトスピラ症診断のための ELISA 法を開発する。

(2)(1)の新規 ELISA 法を用いて発展途上国におけるレプトスピラ症の疫学動態を検討する。

(3)レプトスピラ流行地の市街地に棲息するげっ歯類のレプトスピラ保菌状況を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)病原性レプトスピラである *Leptospira interrogans* serover *Manilae* から抽出した DNA をクローニングし、LipL32 の全長遺伝子及び LigA の一部 (図 1) を NUS/His タグ付き抗原として大腸菌 BL21 に発現させ、ELISA 法に用いた。

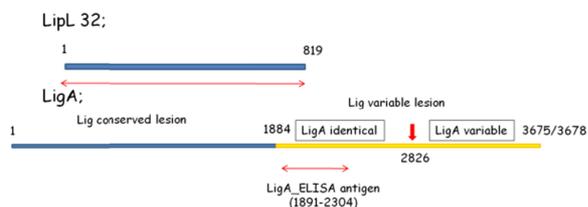


図 1. レプトスピラ組み換え抗原 (LipL32 及び LigA)

ELISA 法では図 2 に示す方法で LipL32 または LigA に対する IgG 及び IgM の検出を行った。

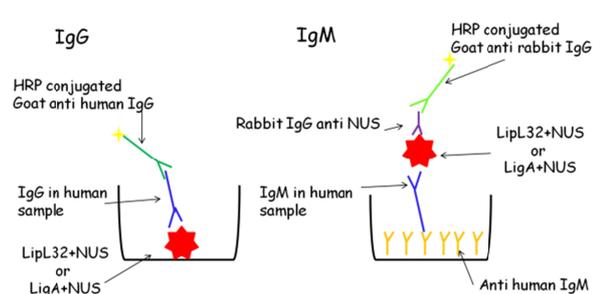


図 2. ELISA 法による抗 LipL32 または抗 LigA 抗体 (IgG, IgM) の検出

(2)下記の患者血清を対象に(1)で開発した ELISA 法で再検討を行った。

2003-2004 年にかけて、タイ国スリン州の発熱患者血清 284 サンプル。尚、このサンプル由来の患者は熱性疾患で国内の診療所を受診し、MAT 法や IFA 法、lateral flow 法など現地で行われている検査ではレプトスピラは陰性であった。また、他に明らかな原因を特定できなかったものである。

2008 年にスリランカ中部州キャンディの病院を受診した熱性疾患患者血清 106 サンプル。

2001 年にベトナム、ハノイ市の病院を受診した熱性疾患患者 38 人から集められたベトナム血清。

(3)2012-2013 年にかけて 5 回、ベトナム、ハノイ市のマーケット及びバスセンターにトラップをしかけ野鼠を収集した。トラップから回収した野鼠は速やかに解剖し、腎臓を採取、EMJH 培地またはコルトフ培地で培養しレプトスピラの感染状況を調査した。

4. 研究成果

(1)組み換え抗原を用いた新規 ELISA 法の開発を前述 2.-(1)の方法を用いて行った。尚、動物モデルを用いた経時的な評価は現在進行中である。

(2)

タイ:調査したサンプル284のうちLipL32に関しては181(63.7%)がIgG陽性、147(51.8%)がIgM陽性であった。LigAに関しては138(48.6%)がIgG陽性、176(62.0%)がIgM陽性であった。この結果から、タイにおいて従来の検査で陰性であってもレプトスピラ症を見落としている可能性があり、周辺状況や臨床所見から同症の可能性が否定できない状況であれば治療開始の検討が必要であると考えられた。

スリランカ:調査した106サンプルのうちLipL32に関しては36(29.3%)がIgG陽性、19(15.4%)がIgM陽性であった。対象地域では日常診療においてレプトスピラの診断を行うのは困難であるが、高い確率で流行して

いる可能性があり今後の継続的、詳細な調査が必要である。

ベトナム：調査した38ではLipL32及びLigAのIgGを測定した。LipL32に関しては受診時1例陽性、回復後は2例が陽性であった。LigAに関しては受診時2例陽性、回復後は3例が陽性であった。

(3)ハノイ市内のマーケット及びバスセンターの野鼠のレプトスピラ保有状況の調査を行ったところ、マーケットで0-12.8%、バスセンターにて5.0-27.3%で生菌の培養をすることができた(図3)。分離した株に関しては今後、病原性を含めた詳細な検討を予定しているが同地域においては水害に伴いレプトスピラ症の集団発生が起こる可能性もあり、注意喚起を行っている。

	Market				Bus station		
	2012		2013		2012	2013	
	Aug	Nov	Mar	May	Aug	Mar	May
Leptospirosis	5/39 (12.8%)	3/56 (5.4%)	1/43 (2.3%)	0/34 (0%)	6/22 (27.3%)	1/10 (10.0%)	1/20 (5.0%)

図3.ハノイ市野鼠のレプトスピラ保有状況に関する調査

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Kaneko, A.; Chaves, L. F.; Taleo, G.; Kalkoa, M.; Isozumi, R.; Wickremasinghe, R.; Perlmann, H.; Takeo, S.; Tsuboi, T.; Tachibana, S.; Kimura, M.; Bjorkman, A.; Troye-Blomberg, M.; Tanabe, K.; Drakeley, C., Characteristic age distribution of Plasmodium vivax infections after malaria elimination on Aneityum Island, Vanuatu. *Infect Immun* **2014**, 82, (1), 243-52. (査読あり)

Koma, T.; Yoshimatsu, K.; Yasuda, S. P.; Li, T.; Amada, T.; Shimizu, K.; Isozumi, R.; Mai, L. T.; Hoa, N. T.; Nguyen, V.; Yamashiro, T.; Hasebe, F.; Arikawa, J., A survey of rodent-borne pathogens carried by wild Rattus spp. in Northern Vietnam. *Epidemiol Infect* **2013**, 141, (9), 1876-84. (査読あり)

Nakamura, I.; Hang'ombe, B. M.; Sawa, H.; Kobayashi, S.; Orba, Y.; Ishii, A.; Thomas, Y.; Isozumi, R.; Yoshimatsu, K.; Mweene, A. S.; Takada, A.; Sugimoto, C.; Arikawa, J., Cross-reactivity of secondary antibodies against African rodents and application for sero-surveillance. *J Vet Med Sci* **2013**, 75, (6), 819-25. (査読あり)

Isozumi, R.; Yoshimatsu, K.; Yamashiro, T.; Hasebe, F.; Nguyen, B. M.; Ngo, T. C.; Yasuda, S. P.; Koma, T.; Shimizu, K.; Arikawa, J., bla(NDM-1)-positive Klebsiella pneumoniae from environment, Vietnam. *Emerg Infect Dis* **2012**, 18, (8), 1383-5. (査読あり)

Yasuda, S. P.; Yoshimatsu, K.; Koma, T.; Shimizu, K.; Endo, R.; Isozumi, R.; Arikawa, J., Application of truncated nucleocapsid protein (N) for serotyping ELISA of murinae-associated hantavirus infection in rats. *J Vet Med Sci* **2012**, 74, (2), 215-9. (査読あり)

Tsumori, Y.; Ndounga, M.; Sunahara, T.; Hayashida, N.; Inoue, M.; Nakazawa, S.; Casimiro, P.; Isozumi, R.; Uemura, H.; Tanabe, K.; Kaneko, O.; Culleton, R., Plasmodium falciparum: differential selection of drug resistance alleles in contiguous urban and peri-urban areas of Brazzaville, Republic of Congo. *PLoS One* **2011**, 6, (8), e23430. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

安田俊平、Chandika D. Gamage、小泉信夫、西尾佐奈恵、五十棲理恵、清水健太、駒貴明、天田貴子、鈴木仁、吉松組子、有川二郎：スリランカ産 Rattus rattus および Bandicota bengalensis の系統学的位置：日本哺乳類学会2012年度大会、麻布大学(神奈川県)

Rie Isozumi, Kumiko Yoshimatsu, Sirima Pattamadilok, Sanit Kumperasart, Jiro Arikawa: "Seroprevalence of anti-leptospira antibodies among patients with acute febrile illness with renal dysfunction in spite of negative result with several leptospira tests in Thailand" International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. (9, September, 2011). 札幌コンベンションセンター(北海道)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

五十棲 理恵 (ISOZUMI, Rie)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：30550355

(2)研究分担者なし

(3)連携研究者なし

(4)研究協力者

有川 二郎 (ARIKAWA, Jiro)

北海道大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10142704

吉松 組子 (YOSHIMATSU, Kumiko)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：23590770

清水 健太 (SHIMIZU, Kenta)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20466840