

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19580369

研究課題名（和文） 犬レプトスピラ感染全国調査と診断システムの確立

研究課題名（英文） Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan

研究代表者

奥田 優 (OKUDA MASARU)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：10325243

研究成果の概要：レプトスピラ症は人獣共通細菌感染症である。本研究では全国 47 都道府県から集めた犬血清を材料として MAT 法を行い、我が国における犬レプトスピラ感染状況を明らかにした。その結果、icterohaemorrhagiae に潜在感染している犬が日本全国に広く分布していることが明らかとなった。また、我が国の野生アライグマがレプトスピラを保有していることを明らかにし、公衆衛生上、監視が必要であることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,555

研究分野：獣医内科学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・臨床獣医学

キーワード：犬、疫学、検査、人獣共通感染症、野生動物、レプトスピラ

1. 研究開始当初の背景

レプトスピラ症は病原性レプトスピラ *Leptospira interrogans sensu lato* の感染に起因する、人と動物の共通感染症である。伴侶動物である犬は人への重要な感染源となる可能性があり、そのため、犬レプトスピラ感染の地理的分布を明らかにすることは、公衆衛生上有益であると考えられるが、これまでに全国的な調査はない。また、自然界における保菌動物はげっ歯類をはじめとした野生動物であると考えられている。野生動物と犬のレプトスピラ感染の関連性を検討することは、臨床獣医学および公衆衛生学上重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 全国 47 都道府県から集めた犬血清を材料として組み換え OmpL1 蛋白を抗原とした ELISA 法ならびに MAT 法を行い、我が国における犬レプトスピラ感染状況を明らかにするとともに、両者を比較すること、(2) 近年、個体数の急激な増加が問題となっている野生アライグマと家庭飼育犬のレプトスピラ感染状況を明らかにすること、野生アライグマと家庭飼育犬のレプトスピラ感染との関連を検討することを目的として調査を行った。

3. 研究の方法

(1) 犬レプトスピラ抗体全国調査

①被験検体

検体の収集は2006年11月から2007年10月までの間、全国47都道府県の動物病院に来院し、生涯ワクチンを接種していない犬(Group A, n=243)、レプトスピラを含まないワクチンを接種した犬(Group B, n=143)、またはレプトスピラワクチン接種後11ヶ月以上経過している犬(Group C, n=415)の計801頭を対象として行った。各県ごとの調査頭数は4頭から40頭であった。

②レプトスピラ菌株

MATの抗原としては標準株として培養、維持されている *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae (strain RGA)、*L. interrogans* serovar canicola (strain Hond UtrechtIV)、*L. interrogans* serovar autumnalis (strain Akiyami A)、*L. interrogans* serovar hebdomadis (strain Akiyami B)、*L. interrogans* serovar australis (strain Akiyami C) を用いた。レプトスピラの培養には、WHO Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control に基づいて作製された EMJH 培地を用い、28~30°C で培養した。

③MAT

MAT は WHO Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control に基づいて行った。すなわち、前述の5種類のレプトスピラ標準株を供試抗原として、菌数が 1×10^8 個/ml になるようにリン酸緩衝液 (PBS) で調製した。被験血清は PBS で10倍希釈したのち、96穴マイクロプレート (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 上で160倍までPBSを用いて段階希釈した。希釈血清と同量の供試抗原を各wellに分注し、最終容量を50 μ l、最終希釈率をそれぞれ20、40、80、320倍とした。その後28°Cで1時間反応させた後、暗視野顕微鏡下で観察し、凝集していない遊離菌数が血清を含まない対照と比較して50%以下となる最終希釈倍率を凝集抗体価とした。抗体価が80倍以上のものを陽性とし、1血清型以上で陽性のものをMAT陽性とした。さらに、凝集抗体価が320倍以上であったものに関しては、さらに血清の段階希釈を進め、最終希釈倍率を求め、凝集抗体価とした。

④ELISA

ELISAはOkudaらの方法(2005)に従って行った。抗原には *L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae (strain RGA) の *OmpL1* 遺伝子を組み込んだ pGEX6P-1 ベクターを形質転換した大腸菌から抽出、精製した

GST-OmpL1 蛋白を用いた。96穴ELISA用プレート (F96 Polysorp NUNC immuno plate, Nalge Nunc International, Roskilde) に、0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で25.0 nM に希釈した GST-OmpL1 および GST (陰性コントロール) を100 μ l ずつ分注し、4°C で一晩放置して固相化した。プレートは蒸留水で2回洗浄し、洗浄液 [PBS-0.05% (v/v) Tween 20] で3回洗浄後、ブロッキング液 [5% スキムミルク in PBS-2% (v/v) Tween 20] を用いて37°C で1時間ブロッキングした。洗浄液で3回洗浄後、ブロッキング液で1/50に希釈した被験検体を50 μ l ずつ分注し、プレートシェーカー上、37°C で1時間反応させた。洗浄液で3回洗浄後、ブロッキング液で1/50000に希釈した horseradish peroxidase-conjugated goat affinity purified antibody to dog IgG (Southern Biotech, Birmingham) を50 μ l ずつ分注し、37°C で1時間反応させた。PBSで3回洗浄後、ABTS Peroxidase Substrate (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg) を100 μ l ずつ分注し、遮光し、37°C で40~50分間反応させた。各ウェルの吸光度 (OD) はELISAプレートリーダーを用いて波長405 nmにて測定した。各検体につきそれぞれ2ウェルずつ (GST-OmpL1 \times 2、GST \times 2) 測定を行い、GST-OmpL1、GST各ウェルのODの差の平均値を算出した。予備実験ならびに過去の報告の結果から、過去にレプトスピラ感染症の犬から得られた血清を用いた陽性コントロールのODが1.0の時の平均OD値が0.339以上を陽性とした。

(2) 野生アライグマと犬のレプトスピラ抗体保有状況調査

①調査地域および被験検体

アライグマの検体は大阪府および兵庫県それぞれの防除指針に従い、駆除目的で山、畑、果樹園において捕獲器で捕獲された個体、民家に侵入し捕獲された個体および交通事故で死亡した個体から採取された。地理的に隔絶された2地域の比較を行うため、大阪府では北部で捕獲された検体を除いた大阪府南部 (地域A)、ならびに兵庫県東部 (地域B) の2地域を本研究の調査対象地域とした。アライグマの検体は、地域Aにおいて2006年4月~2007年4月に捕獲された個体から血清54検体、腎臓18検体、地域Bにおいて2005年5月~2006年12月に同様に捕獲されたアライグマから血清132検体、腎臓48検体を採取し、血清検体は-20°C、腎臓検体は-80°Cのフリーザー内で検査に用いるまで冷凍保存した。検査に供したアライグマは、身体的に特に異常を認めたものはなく、健常なアライグマであったと考えられた。家庭飼育犬の検体は、地域Aおよび地域Bのアライグマ捕獲地域を中心に開業獣医師に依頼し2008年3

～7 月末の間、動物病院に来院し生涯レプトスピラワクチンを接種していない犬、または同ワクチン接種後 11 ヶ月以上経過している犬 133 頭（地域 A：86 頭、地域 B：47 頭）を対象とした。調査対象犬より血清または血漿を採取し、検査に用いるまでは-20℃のフリーザー内で保存した。

②レプトスピラ菌株、③MAT は（1）と同様

④PCR を用いたアライグマ腎皮質におけるレプトスピラ遺伝子の検出

アライグマの腎臓 48 検体において、腎皮質領域の一部（25mg 程度）を採材、ホモジェナイズし、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN GmbH, Hilden, Germany）を用いて DNA の抽出を行い、120 μl とした。抽出したサンプル DNA は使用するまで-20℃のフリーザー内にて保存した。それぞれの腎皮質から抽出したサンプル DNA 2 μl を鋳型とし、*L. kirschneri* serovar Grippotyphosa の *OmpL1* 遺伝子配列を基に作製されたプライマー *OmpL1*-Pr. 1（GCCGTAGCATTATCTTCG）、*OmpL1*-Pr. 2（ACCCCAGGTCATATCTAC）を用いて PCR を行い、レプトスピラ遺伝子の検出を行った。PCR では、熱変性を 94℃ 1 分、アニーリングを 55℃ 1 分、伸長反応 72℃ 1 分 30 秒を 1 サイクルとし、計 30 サイクル行い、最後の伸長反応は 72℃で 15 分間行った。*OmpL1*-PCR によって増幅された DNA は 2%のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色後、紫外線下でバンドを確認した。*OmpL1*-PCR においてバンドが確認されたサンプルに関して、シーケンス反応を行い、山口大学 遺伝子実験施設に塩基配列解析を依頼した。

4. 研究成果

（1）犬レプトスピラ抗体全国調査

①MAT

検索した犬 801 頭中 217 頭（27.0%）がいずれかの血清型において MAT 陽性を示した。47 都道府県中 43 都道府県で陽性検体を認め、陽性率が 80%以上は 0 県、60～80%は 1 県（兵庫）、40～60%は 7 県、20～40%は 21 都道府県、20%以下は 14 府県、陰性は 4 県であった。各血清型の陽性数は icterohaemorrhagiae が最も多く 172 頭（21.5%）、次いで autumnalis 42 頭（5.2%）、canicola 27 頭（3.3%）、hebdomadis 17 頭（2.1%）、australis 9 頭（1.1%）であった。40 頭は 2 血清型以上で陽性を示した。

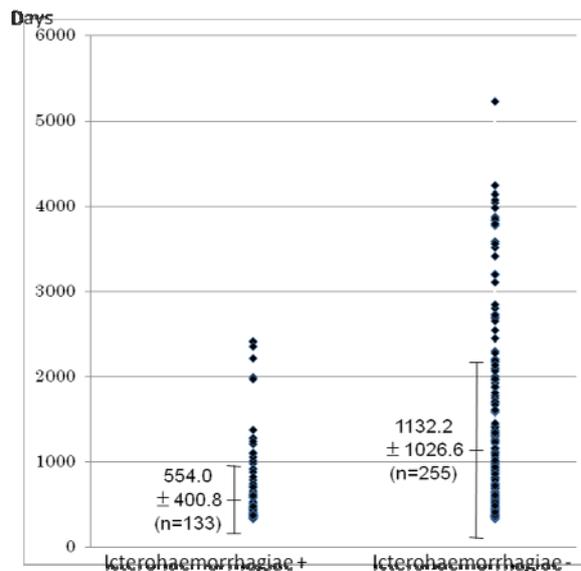
②ELISA

検索した犬 801 頭中 29 頭（3.6%）で陽性を示した。18 道府県で陽性検体を認め、福島県（3/12, 25.0%）、島根県（4/20, 20.0%）、山口県（3/25, 12.0%）で高い陽性率を示した。

③ワクチン接種の影響

MAT の結果におけるワクチン接種の影響を検討するため、生涯ワクチンを接種していない犬（Group A）とレプトスピラワクチン接種後 11 ヶ月以上経過している犬（Group C）における MAT の陽性率を解析したところ、ワクチン接種群で icterohaemorrhagiae と canicola の陽性率が有意に高かった。

さらにレプトスピラワクチン接種後 11 ヶ月以上経過している犬（Group C）を icterohaemorrhagiae 陽性群と陰性群に分け、最終ワクチン接種日から採材日までの日数

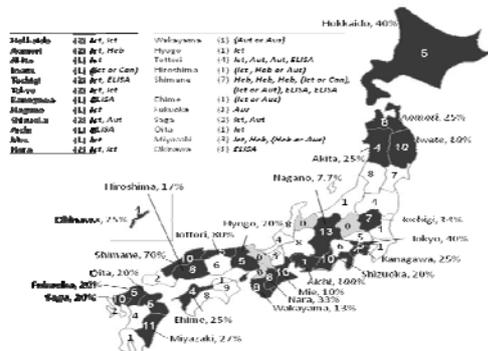


を解析したところ、MAT における icterohaemorrhagiae 陽性群は最終ワクチン接種日から採材日までの日数が有意に短く、本研究の MAT の結果はワクチン接種の影響を受けていることが示唆された。

レプトスピラワクチンによる抗体持続効果は数週間から 4 ヶ月程度とされている。本研究ではワクチン接種の影響を避けるため、レプトスピラワクチン接種後 11 ヶ月以上経過した犬を当初は被検検体としていた。しかしながら、前述の結果に加え、避妊または去勢している犬、ならびに室内飼育犬においても MAT 陽性率が高いという結果も得られたことから、レプトスピラワクチン接種後 11 ヶ月以上経過した犬でもワクチン接種による影響を避けることは出来なかったと推察された。興味深いことに通常我が国のワクチンに同時に含まれている icterohaemorrhagiae と canicola で陽性率が著しく異なった。④のワクチン未接種群における結果を鑑みると、我が国には icterohaemorrhagiae が広く分布しており、これがワクチン接種と相まって高い抗体保有率を示す結果に反映された可能性が考えられる。一方、canicola は①、④のいずれにおいても抗体保有率が低く、現在、我が国では感染源となっている可能性は低いものと考えられた。

④ワクチン未接種群におけるレプトスピラ抗体保有状況

上記の結果から本研究の MAT の結果にはワクチン接種による影響が示唆されたため、生涯ワクチンを接種していない犬 (Group A, n=243) のみの結果を再解析した。その結果、41 頭 (16.9%) が MAT または ELISA で陽性を示した。



陽性犬は 23 県で認められ、最も多く認められた血清型は icterohaemorrhagiae (22 頭、19 県)、次いで hebdomadis (7 頭、3 県)、Autumnalis (6 頭、4 県)、Australis (5 頭、5 県)、Canicola (2 頭、2 県) の順となった。この結果から icterohaemorrhagiae は日本全国に広く分布し、主な原因血清型であることが明らかとなった。一方、canicola はあまり一般的ではなく、hebdomadis と australis は西日本に認められることが明らかとなった。本研究で得られた情報は、我が国におけるレプトスピラ感染の地理的分布を明らかにした初めての研究であるが、残念ながら限界もある。例えば 2006 年にヒトでレプトスピラ集団感染が認められた宮崎県の陽性率はあまり高くなかった。これはヒトにおける感染が宮崎県北部で確認されたのに対して、本研究の協力病院が県南部に局限していたためであると考えられる。したがって、真の抗体保有率を算定するためには、病院数を増やした更なる研究が必要であると考えられる。

⑤MAT と ELISA の比較

生涯ワクチンを接種していない犬 (Group A) における MAT に対する ELISA の感度と特異性はそれぞれ 8.6% と 96.2% であった。感度が著しく低かった原因としては、OmpL1 に対する抗体の持続が MAT で検出される抗体と比較して早く消失することが考えられる (奥田未発表データ)。したがって、OmpL1 を抗原とした ELISA は単独手法としては疫学調査には不向きであると考えられた。

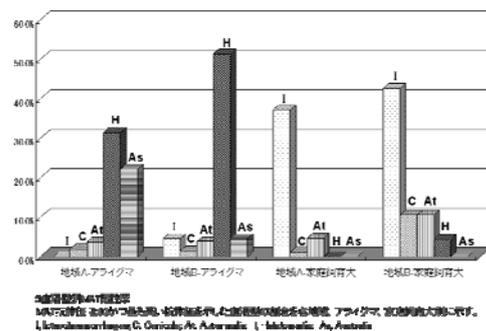
本研究では、レプトスピラに対する抗体を有する犬が日本に広く分布していることが明らかとなり、レプトスピラが再興感染症として重要な感染症となる可能性が示された。今後、レプトスピラ症を発症した犬からレプトスピラを培養し、血清型を明らかにするこ

とで、本研究で得られた結果を裏付けることも重要であると考えられる。

(2) 野生アライグマと犬のレプトスピラ抗体保有状況調査

①MAT

地域 A および地域 B の 2 地域におけるアライグマと飼育犬において、MAT を用いたレプトスピラ 5 血清型に対する血清抗体価を調査したところ、検索したアライグマ 186 頭中 115 頭 (61.8%)、飼育犬 133 頭中 65 頭 (48.9%) がいずれかの血清型で陽性を示した。各地域の陽性頭数は、地域 A のアライグマ 54 頭中 31 頭 (57.4%)、地域 B のアライグマ 132 頭中 84 頭 (63.6%)、地域 A の飼育犬 86 頭中 36 頭 (41.9%)、地域 B の飼育犬 47 頭中 29 頭 (61.7%) であった。各血清型陽性頭数は



地域 A のアライグマでは hebdomadis 19 頭 (35.2%)、australis 19 頭 (35.2%) が最も多く、次いで icterohaemorrhagiae 5 頭 (9.3%)、canicola 2 頭 (3.7%)、autumnalis 2 頭 (3.7%) であった。地域 B のアライグマでは、hebdomadis 71 頭 (53.8%) が最も多く、次いで icterohaemorrhagiae 18 頭 (13.6%)、australis 13 頭 (9.8%)、autumnalis 10 頭 (7.6%)、canicola 4 頭 (3.0%) であった。地域 A の飼育犬では icterohaemorrhagiae 33 頭 (38.4%) が最も多く、次いで autumnalis 9 頭 (10.5%)、canicola 3 頭 (3.5%) であり、hebdomadis と australis においては陽性は認められなかった。地域 B の飼育犬では、icterohaemorrhagiae 21 頭 (44.7%) が最も多く、次いで canicola 11 頭 (23.4%)、autumnalis 6 頭 (12.8%)、hebdomadis 2 頭 (4.3%) であり、australis においては陽性は認められなかった。以上のようにアライグマと犬で陽性率が高かった血清型に相関は認められなかった。

2004 年日本獣医学会学術集会の報告において、2003 年 5 月～9 月北海道 (道央地方) で捕獲された野生のアライグマ 255 頭において実施された 11 種の血清型を用いた MAT の結果では、94 頭 (36.9%) でいずれかの血清型に陽性が認められており、autumnalis、icterohaemorrhagiae、canicola に陽性を示

す例が多く認められている。また、2002年4月～2003年4月神奈川県内で捕獲された野生アライグマ124頭および長崎県内の動物展示施設で飼育されていたアライグマ53頭において、検査法は不明であるが野生のアライグマ16頭(12.9%)、動物展示施設のアライグマ33頭(62.3%)で抗体価の上昇が認められている。本研究における野生のアライグマのMATの結果は、過去の他の地域におけるアライグマの学会報告と比較して高い陽性率を示したが、これは本研究における調査地域による地域性を反映していると考えられた。また、我が国の現行の犬レプトスピラ不活化ワクチンに含まれている血清型は

②PCR

icterohaemorrhagiae、canicolaの2種混合が主であり、1社の製品のみがcopenhageni (icterohaemorrhagiaeと同一血清群に属する近縁の血清型)、canicola、hebdomadisの3種混合である。今回、兵庫県のアライグマにおいてhebdomadisに対する抗体陽性率が著しく高かったことは、同地域で飼育されている犬にワクチンを接種する際のワクチン選択に重要な知見であると考えられる。

アライグマの腎皮質において、*OmpL1* 遺伝子をターゲットとしたPCR (*OmpL1*-PCR) を行った結果、地域Aのアライグマ18頭中4頭(22.2%)、地域Bのアライグマ48頭中4頭(8.3%)で陽性が認められた。同様に、*flaB* 遺伝子をターゲットとしたPCR (*flaB*-PCR) を行った結果では、*OmpL1*-PCR陽性8頭中2頭において陽性が認められ、他の6頭ならびに*OmpL1*-PCRで陰性であったものにおいては、すべて陰性であった。次に*OmpL1*-PCR陽性であった8頭のPCR産物の塩基配列を解析したところ、7頭で解析が可能であった。これらの配列はType1 (n=1) およびType2 (n=6) に分かれる結果となった。Type 1、Type 2、および8血清型の標準株の*OmpL1* 遺伝子との塩基配列の同一性を比較したところ、Type 1はcanicolaと99.77%、Pomonaと99.55%、hardjoと99.09%、Type 2はhebdomadisと99.55%、icterohaemorrhagiaeと99.09%、Type 1とType 2は90.70%の同一性を示した。

2006年4月～2007年4月の大阪府動物由来感染症サーベイランスの報告において、*flaB* 遺伝子を標的としたPCRを用いてアライグマの尿を調査した結果、260頭中49頭(18.8%)で陽性を認めている。この結果はアライグマが尿中にレプトスピラを排出しており、感染源となる可能性を示唆していると考えられる。レプトスピラは感染後、感染動物の腎臓の腎尿細管において定着・増殖し、間質性腎炎を引き起こすといわれている。海外の調査において、野生のアライグマ283頭の腎臓を

調査した結果、3/283頭で肉眼的な異常を認め、71/832頭で病理組織学的検査において間質性腎炎が認められている。さらに、間質性腎炎が認められたアライグマのうち、9頭で菌体が検出(Warthin-Starry Silver stain)され、菌体の分布はいずれも腎皮質の腎尿細管に局限していた。本研究では、*OmpL1* 遺伝子をターゲットとしたPCRを用いてアライグマの腎臓検体の皮質領域からレプトスピラ遺伝子の検出を行った。今回調査した腎臓において、病理組織学的検索は行ってはいないが、少なくとも肉眼的に異常は認められなかった。データには示していないが*OmpL1*-PCRとの比較として、レプトスピラ遺伝子検査に広く用いられている*flaB*-PCRを同様に行ったところ、*OmpL1*-PCRと比較して感度が低い結果となった。また、予備実験において、レプトスピラ培養液(*L. interrogans* serovar icterohaemorrhagiae)から得られたDNAの希釈を行い、*OmpL1*-PCRおよび*flaB*-PCRの検出感度を比較したところ、それらの感度はほぼ同等であったことから(未発表データ)、本研究で用いた*OmpL1*-PCRは*flaB*-PCRと同等あるいはそれ以上の感度を有すると考えられた。

本研究において、感染血清型に犬との相関は認められなかったが、野生アライグマは高い確率で血清中にレプトスピラ抗体を保有していることが明らかとなった。また、アライグマの腎臓からレプトスピラ遺伝子が検出されたことから、アライグマは腎臓にレプトスピラを保有していることが明らかとなり、尿中へ排泄している可能性が強く示唆された。以上のことから、野生のアライグマはレプトスピラの保菌動物となっており、人への感染源となる危険性が考えられる。さらにアライグマは本来、北米を原産とする外来生物であり、本研究では調査していない今まで日本において存在しなかった血清型のレプトスピラを保有している可能性も否定できない。アライグマなどの野生動物におけるレプトスピラ抗体保有状況調査は人を含めた他の動物種におけるレプトスピラ感染症の危険予測管理においても、獣医臨床学上、公衆衛生学上重要であると考えられる。また、アライグマを捕獲し、個体数調整を行うことで、レプトスピラをはじめとする人畜共通感染症の広がりを防ぐとともに、これらの調査を行うことで人や他の動物種への感染を防ぐことが可能になると考えられる。レプトスピラに関しては今後、野外からの菌分離を含めたさらなる調査を進めていくことが肝要であると考えられる。

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 1 件)

- ① Iwamoto, E., Wada, Y., Fujisaki, Y., Umeki, S., Jones, M.Y., Mizuno, T., Itamoto, K., Maeda, K., Iwata, H. and Okuda, M. Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan: Results from microscopic agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有り, in press.

〔学会発表〕(計 1 件)

- ① 奥田 優、和田優子、岩本栄美子、前田健、板本和仁、水野拓也、顕微鏡下凝集試験(MAT)を用いた犬レプトスピラ抗体保有状況全国調査、平成20年度日本獣医師会学会年次大会岩手、2009年1月23日、岩手県盛岡市

〔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〕

- ① 奥田 優、兵庫県森林動物研究センター研究部編集、兵庫県におけるアライグマの現状 第5章人獣共通感染症レプトスピラ症の感染状況、2009、pp. 46-53
<http://www.wmi-hyogo.jp/F1.php?M=B5-6&F=F1>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 優 (OKUDA MASARU)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：10325243

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし