

第 5 章

人畜共通感染症レプトスピラ症の感染状況

要 点

- ・レプトスピラ症は *Leptospira interrogans* (病原性細菌) 感染に起因する人畜共通感染症である。
- ・レプトスピラの保菌動物はげっ歯類をはじめとした野生動物であり、近年、個体数が急激に増加し、人の生活圏に出没する機会の増えているアライグマもまた、レプトスピラの保菌動物となる可能性のある動物である。
- ・アライグマ防除計画が実施されている兵庫県内のアライグマにおいて、顕微鏡下凝集試験 (MAT) を用いてレプトスピラ抗体保有率の調査を行うとともに PCR を用いてレプトスピラ遺伝子を検出した。
- ・主に分布中心において回収された 132 頭のうち MAT で 84 頭 (63.6%) が抗体陽性を示した。
- ・PCR では 48 頭中 4 頭 (8.3%) でレプトスピラ遺伝子が検出された。これらの結果から兵庫県のアライグマには広くレプトスピラが感染していることが明らかとなった。
- ・アライグマの生息地域の拡大により、人の生活環境への接触の機会が増すことでアライグマから人への感染のリスクが高まる可能性が考えられる。

5-1. はじめに

レプトスピラはスピロヘータ目レプトスピラ科に分類されるグラム陰性好気性らせん菌であり、人や犬をはじめとする多くの哺乳動物に感染し、血色素尿、急性腎不全、黄疸などを呈する人畜共通感染症の病原菌として重要である [1]。人レプトスピラ症は感染症法四類感染症に指定される急性熱性疾患であり、黄疸、出血、腎障害を伴う重症型から、感冒様症状のみの軽症型まで様々な症状を示す [2-4]。また、犬レプトスピラ症は家畜伝染病予防法における届出伝染病であり、急性の腎不全、肝不全、血液凝固不全を呈し早期に死亡する例も多い [5]。

環境中におけるレプトスピラの保菌動物はげっ歯類をはじめとした野生動物であり、感染した動物の多くがレプトスピラを腎臓に保菌し、尿中に排泄すると考えられている。人、家畜、伴侶動物である犬はこれら保菌動物の尿と直接、またはレプトスピラを含む尿で汚染された水や土壌などとの間接的な接触により感染すると考えられている [2-5]。

近年、個体数が急激に増加し、人、家畜、犬などの生活圏に出没する機会の増えているアライグマ (*Procyon lotor*) もまた、レプトスピラの保菌動物となる可能性のある動物の 1 つである。海外では、これまでにアライグマにおける顕微鏡下凝集試験 (microscopic agglutination test, MAT) を用いたレプトスピラ抗体保有状況調査をはじめ、腎臓の病理学的検査、腎臓および尿から菌体の分離など多くの報告があり [6-11]、アライグマがレプトスピラの保菌動物となっている可能性が示唆されている。また、野生アライグマ捕獲者におけるレプトスピラ症の発症事例の報告があり [11]、野生のアライグマが人のレプトスピラ症の感染源となる可能性も強く示唆されている。

一方、日本におけるアライグマのレプトスピラに関する調査には、我々が調べた限りでは、① 2003 年 5 月～9 月に実施された北海道内野生アライグマの調査、② 2002 年 4 月～2003 年 4 月に実施された神奈川県内野生アライグマおよび長崎県内動物展示施設アライグマの調査の 2 つの学会報告、③ 2006 年 4 月～2007 年 4 月に実施された大阪府の動物由来感染症サーベイランスの一部としての報告があるのみである。

そこで本研究では、野生アライグマのレプトスピラ感染状況を明らかにすることを目的として、兵庫県のアライグマにおいて、MAT を用いてレプトスピラ抗体保有率の調査を行った。さらに、レプトスピラ外膜蛋白 *OmpL1* 遺伝子を標的とした PCR (*OmpL1*-PCR) を用いた調査も同時に行った。

5-2. 材料と方法

(1) 調査地域および被験検体

アライグマの検体は有害捕獲個体および交通事故で死亡した個体から採取された (3 章参照)。アライグマの検体は、2005 年 5 月～2006 年 12 月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℃、腎臓検体は-80℃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られたものはなく、健全なアライグマであった。

(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 [2] に基づいて作製された EMJH 培地を用い、28～30℃で培養した。

(3) MAT

MAT は WHO Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control に基づいて行った [2]。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 $50 \mu\text{l}$ 、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。

(4) PCR 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、ホモジエナイズし、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いて DNA の抽出を行い、 $120 \mu\text{l}$ とした。抽出したサンプル DNA は使用するまで -20°C 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 $2 \mu\text{l}$ を鋳型とし、*L. kirschneri* serovar Grippotyphosa の *OmpL1* 遺伝子配列 [12] 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°C 1 分、アニーリングを 55°C 1 分、伸長反応 72°C 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°C 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。

5-3. 結果と考察

(1) MAT を用いた抗体価

検索したアライグマ 132 頭中 84 頭 (63.6%) がいずれかの血清型で抗体陽性を示した。各血清型陽性頭数は、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 (表 1)。

表 1 MAT によるレプトスピラ 5 血清型抗体保有頭数の分布 (n=132)

	<80	80	160	320	>320	*陽性頭数
Icterohaemorrhagiae	114	10	5	1	2	18 (13.6)
Canicola	128	3	0	0	1	4 (3.0)
Autumnalis	122	2	0	6	2	10 (7.6)
Hebdomadis	61	17	13	15	26	71 (53.8)
Australis	119	8	2	0	3	13 (9.8)

*陽性: 抗体価 \geq 80 を陽性とする

今回、MAT 陽性個体の中、2 血清型以上で陽性を示したものは 22/84 (26.2%) であった。MAT において最も高い抗体価を示した血清型のみを陽性とした場合の各血清型陽性頭数の割合を図 1 に示す。最も高い抗体価を示した血清型を陽性とした場合も hebdomadis に対する抗体陽性率が高く、51.5%となった。

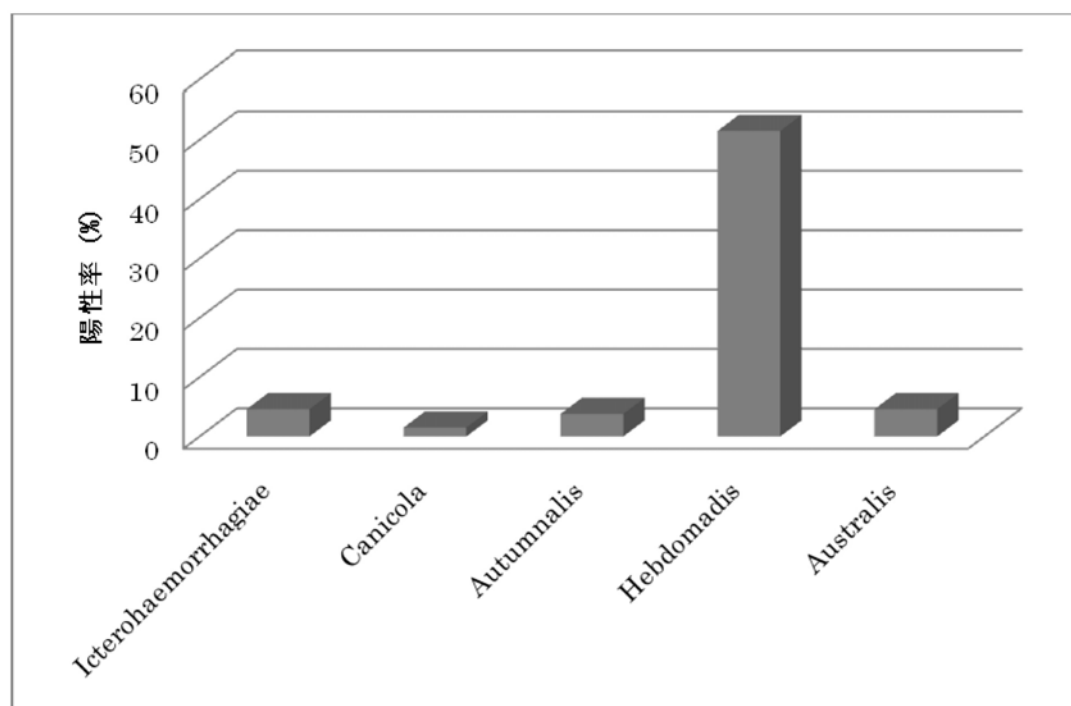


図 1. 5 血清型別 MAT 陽性率

MAT 抗体価 \geq 80 かつ最も高い抗体価を示した血清型を陽性としてそれぞれ陽性率で示す。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 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。

(2) PCR

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、48 頭中 4 頭 (8.3%) で陽性が認められた。次に *OmpL1*-PCR 陽性であった 4 頭の PCR 産物の塩基配列を解析したところ、3 頭で解析が可能であった。これらの配列はいずれも同一であり、8 血清型の標準株の *OmpL1* 遺伝子との塩基配列の相同性を比較したところ、hebdomadis と 99.55%、icterohaemorrhagiae と 99.09%の相同性を示した (表 2)。

表 2 アライグマ腎皮質より検出された *OmpL1* 遺伝子 441bp と標準株塩基配列の比較 (%)

	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Autumnalis	Hebdomadis	Australis	Hardjo	Pomona	Pyrogenes
アライグマ	99.09	90.48	98.64	99.55	98.64	91.16	91.16	90.93

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 [2-4, 13]。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限局していた [10]。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。

5-4. 結論

本研究において、兵庫県の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。

引用文献

1. 菊池直哉 (1999) 獣医感染症カラーアトラス、第 1 版: 283-286. (見上彪、丸山務監修)、文永堂出版、東京.
2. World Health Organization(WHO) (2003) Human Leptospirosis: Guidance for

Diagnosis, Surveillance and control, WHO, Geneva.

3. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P (1999) *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd ed, MediSci, Melbourne.
4. Levett PN : Leptospirosis, *Clin Microbiol* (2001) Rev. 14: 296-326.
5. Katrin H, Craig EG (2005) Disease caused by systemic bacterial infection. In:Textbook of Veterinary Internal Medicine, pp.616-619. Ettinger SJ, Feldman EC, 6th eds, Elsevier Saunders,St.Louis.
6. Mitchell MA, Hungford LL, Nixon C, Esker T, Sullivan J, Koerkenmeier R, Dubey JP (1999) Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. *J. Wildl. Dis.* 35: 347-55.
7. Richardson DJ, Gauthier JL. (2003) A serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 3: 187-93.
8. Junge RE, Bauman K, King M, Gompper ME. (2007) A serologic assessment of exposure to viral pathogens and *Leptospira* in an urban raccoon (*Procyon lotor*) population inhabiting a large zoological park. *J. Zoo. Wildl. Med.* 38: 18-26.
9. Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VancerSchalie J, Besser TE, Huckabee J, Daniels JB, Hancock DD, Leslie M, Baer R (2008) Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State. *Zoonoses Public Health.* 55: 436-42.
10. Hamir AN, Hanlon CA, Niezgoda M, Rupprecht CE (2001) The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*procyon lotor*) from 5 different sites in the United States, *Can. Vet. J.* 42: 869-71.
11. Warshawsky B, Lindsay LR, Artsob H (2000) *Leptospira* infections in trappers from Ontario, *Can. J. Infect. Dis.* 11: 47-51.
12. Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA (1993) Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp, *J. Bacteriol.* 175: 4225-34.
13. Yang CW, Wu MS, Pan MJ (2001)Leptospirosis renal disease, *Nephrol Dial Transplant*, 16: 73-77.

BOX2 レプトスピラをはじめとする細菌類感染の予防方法

人や犬などの哺乳類に広く感染する病原性細菌レプトスピラは、主に感染動物から排泄された尿を含む土壌や水に存在する可能性が高い。人や犬が汚染された土壌や水に接触した際に、皮膚の細かな傷からレプトスピラが感染するケースが多いと考えられる。したがって、野生動物と接触する機会が多い狩猟者や職業にある人は、野生動物を捕獲する際には、必ず帽子、マスク、手袋、長靴を装着し、野生動物を取り扱うべきである（写真1）。特に手などに傷などがある場合には、野生動物を扱わないようにする。

レプトスピラは水の中や湿度の高い環境では長期間生存可能であるが、熱、乾燥、各種消毒薬には弱く、一般的な消毒法で簡単に死滅する。野生動物を捕獲した捕獲檻などの器具については、洗剤などで十分に洗浄し、逆性せっけん、次亜塩素酸ソーダ（塩素剤）、クレゾールなどで洗浄する必要がある（写真2）。また、捕獲作業終了後は、手洗い、うがいを励行する必要がある。

特にレプトスピラは、台風や大雨の後にその汚染土壌が広がる可能性が考えられたため、注意が必要である。実際、犬のレプトスピラ症の発生は台風の到来する晩夏～秋にかけて多く、森林地帯や河川で遊ばせた数日後に発生することが多い。犬のレプトスピラ症では主に肝臓、腎臓が障害を受け、黄疸を呈することが多い。黄疸はおしっこの色が黄色～オレンジ色になることや、口の中や目玉の白い部分（強膜）が黄色くなることで判別できる。このような変化が認められたら、近くの獣医師に相談するべきである。また、レプトスピラ感染が多く認められる地域の犬は最低年1回のワクチン接種を行うべきであるし、このような地域に住む犬の尿には直接手を触れないようにしたい。人が感染した場合の症状は軽度の発熱から黄疸を呈するような重症例まで様々であるが、体調の異変が持続した場合には医師の診察を受けるべきである。

奥田 優（獣医師）



写真1 捕獲作業時の装備

捕獲檻や捕獲個体を扱うときは、帽子、手袋でマスク、長靴を装着する。



写真2 捕獲後の洗浄・消毒作業

汚れを十分に落とした後、逆性せっけんなど消毒する。

BOX 3 ウイルス感染の予防方法

一般的にウイルスは細菌などとは異なり外部環境中では長期間生存することができない。そのため、野生動物からのウイルス感染を予防するには以下の点を心掛けたい。

1. 野生動物には不用意に近づかない。特に病気と思われる野生動物（下の写真）には注意する。現在、日本には存在しないが、海外ではアライグマは狂犬病などを持つことが報告されている。
2. ワクチンで予防できるイヌジステンパーに関しては、飼い犬にワクチン接種する。
3. 日本脳炎などの蚊が運ぶウイルスに関しては、長そで、長ズボンの着用、防虫剤の散布を推奨する。また、家の周囲で蚊（ボウフラ）を発生させないために、水たまり（植木鉢の水受け、タイヤなど）をなくす。
4. 野生動物の肉を食べる際には良く加熱するとともに、他の食材を扱うときはよく洗浄・消毒する。
5. 野生動物を取り扱う狩猟者や関係者は、野生動物を解体する際には、手袋、マスクを装着する（BOX2 参照）。また、取り扱い後には、手洗い・うがいを励行する。
6. 野生動物を取り扱った捕獲檻などの器具は、次亜塩素酸ソーダ、逆性せっけん、クレゾールなどで消毒する（BOX2 参照）。

前田 健(獣医師)



アライグマの異常を発見するためのチェック部位



CDV で死亡したタヌキの肛門周囲の汚れ



CDV で死亡したハクビシンの顔面の汚れ