

動物愛護管理センターで飼育されている イヌのレプトスピラ属菌保有調査について

浅井 紀夫 中嶋 智子 杉浦伸明 柳瀬 杉夫 神村 孝*

Surveillance of *Leptospira* Infection in Dogs at Kyoto Prefectural Animal Protection Management Center

Norio ASAI Satoko NAKAJIMA Nobuaki SUGIURA Sugio YANASE Takashi KAMIMURA*

動物愛護管理センターと共同で、譲渡用、しつけ教室用等に飼育していたイヌ 40 頭の血液をコルトフ培地で培養し、DNA 抽出産物の *flaB* 遺伝子を標的とした PCR を行うことにより、イヌのレプトスピラ属菌保有調査を行った。対象としたイヌの血液は 2009 年 12 月 16 日から 2011 年 1 月 27 日までに採取したものを用いた。調査の結果、40 検体全てにおいてレプトスピラ属菌遺伝子は検出されず、対象としたイヌのレプトスピラ属菌保有はみられなかった。イヌに感染する血清型の標準菌株 6 株を用いて、検査法に関しての精度管理を行った。いずれの株についてもレプトスピラ属菌遺伝子のバンドが検出された。イヌレプトスピラ症のサーベイランスは生活環境汚染の指標となることからヒトへの感染予防として有効であるが、本法を解析に使用するためには検査材料の選択並びに検出限界の設定方法を検討する必要があると考察した。

キーワード：レプトスピラ、PCR、イヌ、*flaB*、サーベイランス

key words: *Leptospira*, Polymerase Chain Reaction, Dog, *flaB*, Surveillance

はじめに

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ属菌によって引き起こされる人獣共通感染症であり、感染症法では第 4 類感染症に、家畜伝染病予防法では届出対象伝染病に分類される。ヒトレプトスピラ症はワイル病あるいは秋疫とも称されている。Yanagihara et al.¹⁾によると、わが国では 1960 年までは年間 200 人以上の死亡例が報告されていたが、近年では衛生環境の向上などにより患者数は著しく減少した。小泉・渡邊²⁾によると 2003 年 11 月～2007 年 11 月の国内事例におけるヒトレプトスピラ症の発生は 87 例に留まり、うち沖縄県が 40 例を占めた。レプトスピラ属菌は、げっ歯類を中心とした多くのほ乳動物の腎臓に定着し尿中へと排出される。イヌも宿主となり、ヒトは、イヌの尿との直接的な接触、あるいは尿に汚染された水や土壌との接触により経皮的または経口的に感染する。そのため、イヌはヒトレプトスピラ症の感染源として重要な監視対象となっており、家畜伝染病予防法の届け出伝染病対象には愛玩動物ではイヌが唯一挙げられている。監視制度の開始された 2008 年 1 月から 2010 年 2 月現在までに、全国で 75 頭が届けられている*1。一方、各地域における飼育犬のレプトスピラ抗体保有調査が北海道、静岡県、富山県、兵庫県、沖縄県、鹿児島県、山口県で行われ、最小 8.9% (兵庫県) から最大 40% (静岡県) と、いずれの県でも高い抗体保有率が報告されている³⁾。

そこで、動物愛護管理センターと共同で、府民へ譲渡

表 1. 精度管理に用いた 6 菌株

| No | 菌株名 |
|----|---|
| 1 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Australis strain Ballico |
| 2 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Autumnalis strain Akiyami A |
| 3 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Canicola strain Hond Utrecht IV |
| 4 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Hebdomadis strain Akiyami B |
| 5 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA |
| 6 | <i>Leptospira</i> sp. serovar Copenhageni strain Shibaura |

予定の犬や「しつけ方教室」等の愛護事業に使用する犬のレプトスピラ属菌の保有状況について、*flaB* 遺伝子を標的とした PCR 法⁴⁾を用いて調査した。

この調査は動物由来感染症予防体制整備事業の一環として行われた。

材料と方法

1. 検体

イヌの耳静脈を穿刺して得られた 1, 2 滴の血液を直ちにコルトフ培地 (デンカ生研製) へ接種したものを検体とした。

2. 実験方法

接種したコルトフ培地は、30℃で約 2 か月間培養し、小泉らの方法⁵⁾に従って PCR を行った。DNA 抽出キット (High Pure™ PCR Template preparation kit, Roche 製) を用い、培養液上清から DNA を抽出し、サーマルサイクラー (TAKARA PCR Thermal cycler 480) を用いて 94℃ 25 秒の熱処理後、熱変性 94℃ 20 秒、アニーリング 50℃ 30 秒、伸長 72℃ 60 秒からなる増幅反応を 30 サイクル行

(平成23年7月31日受理)

* 京都府動物愛護管理センター

* Kyoto Prefectural Animal Protection Management Center

い、72℃ 7分の最終伸長の条件でPCRを行った。増幅産物を1.5%アガロースゲル(Agarose-1, Dojindo 製)で電気泳動(100V、60分)し、エチジウムブロマイド染色後、UV照射下で790bpの位置のバンドを確認した。プライマーは小泉らの方法⁶⁾に示されているプライマーを合成(Sigma 製)して用いた。

3. 精度管理

沖縄県衛生環境研究所より分与された表1に示す6株を用いた。菌株が保存されたEMJH培地の1μLをコルトフ培地10 mLに加え、30℃で2週間培養し、菌液を遺伝子用蒸留水でマクファランド1に調整し、この3.4μLを10 mLの遺伝子用蒸留水で希釈し陽性検体とした。

4. イヌの情報

検体を採取したイヌの情報は動物愛護管理センターで集計した。

結果

2009年12月16日から2011年1月27日までに採取した検体のレプトスピラ属菌遺伝子のPCR結果を検体を採取したイヌの情報とともに表2に示す。40検体全てについてレプトスピラ属菌遺伝子は検出されなかった。No1～No20までは2009年12月16日に採取した検体であった。No21～No40は2010年5月18日から2011年1月27日まで数頭ずつ順次採取した。犬の搬入保健所は丹後保健所9頭、中丹東保健所2頭、中丹西保健所5頭、南丹保健所12頭、山城北保健所9頭、山城南保健所1頭、

表2. 検体を採取したイヌの情報およびレプトスピラ属菌遺伝子PCR結果

| No | 検体採取年月日 | 検体を採取したイヌの情報 | | | | | | 検査結果 |
|----|----------|--------------|-------|-----------------|-----|----------|----|----------|
| | | 搬入年月日 | 搬入保健所 | 種類 | 大きさ | 推定年齢 | 性別 | |
| 1 | 20091216 | 20090216 | 南丹 | ラブラドール | 大 | 不明(推定3歳) | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 2 | 20091216 | 20071122 | 中丹東 | 雑種 | 中 | 2歳2ヶ月 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 3 | 20091216 | 20091119 | 南丹 | 雑種 | 小 | 5ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 4 | 20091216 | 20091102 | 南丹 | ダックスフント | 小 | 2歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 5 | 20091216 | 20081015 | 山城北 | ダックスフント | 小 | 1歳6ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 6 | 20091216 | 20081015 | 山城北 | ダックスフント | 小 | 1歳4ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 7 | 20091216 | 20081015 | 山城北 | ポメラニアン | 小 | 5歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 8 | 20091216 | 20090213 | 丹後 | ポメラニアン | 小 | 不明(推定5歳) | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 9 | 20091216 | 20091211 | 丹後 | チワワ | 小 | 5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 10 | 20091216 | 20091211 | 丹後 | チワワ | 小 | 5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 11 | 20091216 | 20091211 | 丹後 | チワワ | 小 | 5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 12 | 20091216 | 20091119 | 南丹 | 雑種 | 小 | 5ヶ月 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 13 | 20091216 | 20091102 | 南丹 | 雑種 | 小 | 3ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 14 | 20091216 | 20091110 | 山城北 | 雑種 | 小 | 3ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 15 | 20091216 | 20091110 | 山城北 | 雑種 | 小 | 3ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 16 | 20091216 | 20091215 | 山城北 | 雑種 | 小 | 3ヶ月 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 17 | 20091216 | 20091211 | 中丹西 | 雑種 | 小 | 1.5ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 18 | 20091216 | 20091211 | 中丹西 | 雑種 | 小 | 1.5ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 19 | 20091216 | 20091211 | 中丹西 | 雑種 | 小 | 1.5ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 20 | 20091216 | 20091211 | 中丹西 | 雑種 | 小 | 1.5ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 21 | 20100518 | 20100514 | 丹後 | 柴 | 中 | 6歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 22 | 20100518 | 20100514 | 中丹西 | ダックスフント | 小 | 4歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 23 | 20100518 | 20100518 | 山城北 | ダックスフント | 小 | 3歳6ヶ月 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 24 | 20100618 | 20100616 | 乙訓 | 柴 | 中 | 7歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 25 | 20100621 | 20100618 | 丹後 | 雑種 | 中 | 6歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 26 | 20100630 | 20091119 | 南丹 | 雑種 | 中 | 10ヶ月 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 27 | 20100713 | 20100712 | 南丹 | ダックスフント | 小 | 2歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 28 | 20100713 | 20100712 | 南丹 | 雑種 | 中 | 4～5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 29 | 20100716 | 20100716 | 丹後 | 雑種 | 中 | 7～8歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 30 | 20100722 | 20100721 | 山城南 | ジャックラッセル | 小 | 5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 31 | 20100727 | 20100726 | 南丹 | シェルティ | 中 | 7～8歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 32 | 20100730 | 20100730 | 丹後 | ダックスフント | 小 | 5歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 33 | 20100730 | 20100730 | 丹後 | 柴 | 中 | 5歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 34 | 20100820 | 20100820 | 乙訓 | アメリカン・ピット・ブルテリア | 大 | 1歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 35 | 20100820 | 20100820 | 山城北 | パピヨン | 小 | 5歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |
| 36 | 20100820 | 20100820 | 山城北 | パピヨン | 小 | 1歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 37 | 20101102 | 20101101 | 南丹 | ホワイトテリア | 小 | 5～6歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 38 | 20101102 | 20101101 | 南丹 | ダックスフント | 小 | 5～6歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 39 | 20101102 | 20101101 | 南丹 | ダックスフント | 小 | 5～6歳 | ♀ | 遺伝子を検出せず |
| 40 | 20110127 | 20110107 | 中丹東 | ダックスフント | 小 | 5歳 | ♂ | 遺伝子を検出せず |

乙訓保健所 2頭であった。

犬種はラブラドル 1頭、アメリカンピットブルテリア 1頭、シェルティ 1頭、柴犬 3頭、ジャックラッセル 1頭、ホワイトテリア 1頭、ダックスフント 10頭、パピヨン 2頭、ポメラニアン 2頭、チワワ 3頭および雑種 15頭 (小型犬 10頭、中型犬 5頭) であった。

年齢については 3か月未満が 4頭、3か月～1歳未満が 9頭、1歳～3歳未満が 7頭、3歳～5歳未満が 3頭、5歳～8歳が 17頭であった。不明が 2頭あったが、推定 3歳および 5歳程度であった。

性別はオス 18頭メス 22頭であった。

本調査での検査精度管理のため、家畜伝染予防法において届け出伝染病で指定された 7種類の血清型のうち、沖縄県でのみ見られる Pomona および Grippotyphosa⁷⁾ をのぞき、ワクチン対象とされている Copenhageni⁸⁾ を追加した 6株の PCR 結果を図 1 に示す。6株全てにレプトスピラ属菌遺伝子バンドが確認された。

考察

調査した全ての犬について、少なくとも血液中にはレプトスピラ属菌の保有はなかったと判定した。対象とした犬は搬入時期、搬入保健所、犬種、年齢および性別において特定の偏りはみられず調査対象として不適切ではなかったと推測できる。

山口県は動物由来感染症予防体制整備事業として平成 21 年度および 22 年度に本報と同じ PCR による手法でそれぞれ飼育犬 35 頭および 50 頭の尿についてレプトスピラ属菌保有調査を行い、全て陰性であったと報告している^{9), 10)}。一方、岩本ら¹¹⁾ は全国の非ワクチン接種飼育犬 243 頭の抗体保有調査を行い、41 頭において陽性と判定している。さらに和田ら¹²⁾ は大阪府南部と兵庫県北部地域で合わせて 52 頭の非ワクチン接種飼育犬の抗体保有調査を行い、12 頭が陽性であったと報告している。血清抗体価によるレプトスピラ症の診断方法は、本来発症している動物の診断に用いる方法で、病原体検査マニュアルでもペア血清の使用を強く勧めている¹³⁾。しかし、単一血清でも 40 倍以上の抗体価であれば陽性と判断できることから多くの調査で血清抗体価による診断が用いられてきた³⁾。しかし、岩本ら¹¹⁾ は詳細な検討を行った結果、ワクチン接種歴のある犬に血清抗体価による診断を用いることは適切でないとしており、従来の報告において、高い抗体保有率を示した理由として、ワクチン由来の抗体を測定した可能性があるとしている。一方、血清抗体価による診断法と *flaB* 遺伝子をターゲットとした PCR による診断法とを感度の点で比較した報告はない。レプトスピラ属菌数を測定する方法がないため、本報においてもマックファランドを基に暫定的に精度管理を行った。岩本ら¹¹⁾ や和田ら¹²⁾ の結果と山口県⁹⁾ や本法の結果とが異なるのは、対象としたイヌのワクチン接種履歴が異なるためか、検査方法の感度の差によるものかは不明である。

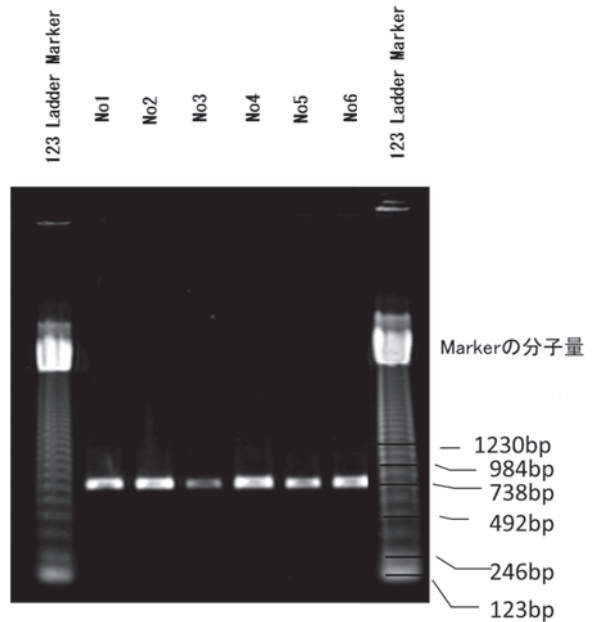


図 1. 精度管理に用いた 6 菌株のレプトスピラ属菌遺伝子 (*flaB*) PCR 結果

- No1 : *Leptospira* sp. serovar Australis strain Ballico
- No2 : *Leptospira* sp. serovar Autumnalis strain Akiyami A
- No3 : *Leptospira* sp. serovar Canicola strain Hond Utrecht IV
- No4 : *Leptospira* sp. serovar Hebdomadis strain Akiyami B
- No5 : *Leptospira* sp. serovar Icterohaemorrhagiae strain RGA
- No6 : *Leptospira* sp. serovar Copenhageni strain Shibaura

犬は散歩等においてマーキングや、他の犬の尿の臭いを嗅ぐ習性がある¹⁴⁾。したがって、一頭からその地域に生活する多くの犬に容易に感染拡大し、生活環境が汚染されるおそれが否定できない。宮崎県では 2006 年 8 月から 9 月にかけて 8 例のヒトレプトスピラ症患者が発生するアウトブレイクが発生した。塩山ら¹⁵⁾ は 2006 年以降、県内各地の動物病院からイヌレプトスピラ症の届け出が増加しており、動物や生活環境が広い範囲でレプトスピラ属菌に汚染され、これがヒトの患者発生原因になったと結論している。また、イヌレプトスピラ症は不顕性感染が多く¹⁶⁾、感染した犬が診察されず長期にわたり尿中に排菌するおそれも強い。したがってイヌのレプトスピラ属菌の保有状況の調査はヒトレプトスピラ症の予防措置として有望と予想される。今回の調査では採取のしやすい血液を対象としたが、レプトスピラ属菌は腎臓尿細管などで増殖し、腎臓に保菌される¹⁷⁾ ことから、今後尿を対象とした検査が必要であろう。また、本調査においては母集団の数が少ない等の課題も残ったが、対象としたイヌの生活地域の汚染状況監視としては有用であった。なお、京都府においては感染症法の改正された 2003 年以降、現在に至るまで、ヒトレプトスピラ症の届け出はない*²⁾。

積極的かつきめ細やかなサーベイランスによる生活環境のレプトスピラ属菌汚染状況監視がヒトレプトスピラ症の予防措置として期待できる。ただし、レプトスピラ属菌に感染した多くの犬が発症せず保菌動物となること

* 2 京都府感染症情報センター <http://www.pref.kyoto.jp/idsc/> (2011 年 8 月現在)

を考慮すると、サーベイランス手法のツールとして小泉らの方法^{5), 6)}を用いるためには、検査材料の選択、および検出限界値と犬症状との関連性を正確に把握すること等が必須と考えられる。

謝辞

本研究にあたり菌株を御提供いただいた沖縄県衛生環境研究所の岡野祥先生および久高潤先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) Yanagihara Y., Villanueva S., Yoshida S., Okamoto Y., Masuzawa T. 2007. Current status of leptospirosis in Japan and Philippines. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 30, 399-413.
- 2) 小泉信夫, 渡邊治雄. 2008. レプトスピラ症 2003年11月～2007年11月. 病原微生物検出情報 (月報) 29, 1-2.
- 3) Iwamoto E., Wada Y., Fujisaki Y., Umeki S., Jones M., Mizuno T., Itamoto K., Maeda K., Iwata H. and Okuda M. 2009. Nationwide Survey of *Leptospira* Antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1197.
- 4) 小泉信夫, 渡邊治雄, 梅澤和夫, 飯塚朝明, 猪口貞樹. 2003. PCRにより早期診断が行えたレプトスピラ病の1例. *感染症学雑誌* 77, 627-630.
- 5) 小泉信夫, 川端寛樹, 塩澤俊幸, 中村正治, 平良勝也, 秋山和夫, 沖村容子. 2003. レプトスピラ症. 病原体検出マニュアル. (国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編), 8-9.
- 6) 小泉信夫, 川端寛樹, 塩澤俊幸, 中村正治, 平良勝也, 秋山和夫, 沖村容子. 2003. レプトスピラ症. 病原体検出マニュアル. (国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編), 10.
- 7) 小泉信夫, 川端寛樹, 塩澤俊幸, 中村正治, 平良勝也, 秋山和夫, 沖村容子. 2003. レプトスピラ症. 病原体検出マニュアル. (国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編), 13.
- 8) 小泉信夫, 渡邊治雄. 2008. レプトスピラ症とは. 病原微生物検出情報 (月報) 29, 5-7.
- 9) 山口県環境衛生部生活衛生課. 2010. 平成21年度動物由来感染症予防体制整備事業報告書.
- 10) 山口県環境衛生部生活衛生課. 2011. 平成22年度動物由来感染症予防体制整備事業報告書.
- 11) Iwamoto E., Wada Y., Fujisaki Y., Umeki S., Jones M., Mizuno T., Itamoto K., Maeda K., Iwata H., Okuda M. 2009. Nationwide Survey of *Leptospira* Antibodies in Dogs in Japan: Results from Microscopic Agglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1191-1199.
- 12) 和田優子, 藤崎由香, 前田健, 佐藤宏, 横山真弓, 宇仁茂彦, 水野拓也, 奥田優. 2009. 大阪府および兵庫県の2地域における野生アライグマと犬のレプトスピラ抗体保有状況調査. *日本小動物獣医学会誌* 63, 707-710.
- 13) 小泉信夫, 川端寛樹, 塩澤俊幸, 中村正治, 平良勝也, 秋山和夫, 沖村容子. 2003. レプトスピラ症. 病原体検出マニュアル. (国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編), 14.
- 14) 藤井聡. 2009. 面白いほどよくわかるイヌの気持ち. 78-79, 日本文芸社, 東京.
- 15) 塩山陽子, 山本正悟, 井料田一徳, 若松英雄, 佐藤弘, 中島一敏, 大山卓昭, 谷口清州, 岡部信彦, 鈴木智之, 高橋亮太, 小泉信夫. 2008. 宮崎県におけるレプトスピラ症アウトブレイクとその対応. *宮崎県衛生環境研究所年報*, 20, 67-68.
- 16) 其田三夫. 1983. 主要症状を基礎にした犬の臨床. 62-64, デーリーマン社, 札幌市.
- 17) 河野公一. 2009. 動物由来感染症マニュアル, 28-31, 金芳堂, 京都市.