

**HUMAN LEPTOSPIROSIS:  
GUIDANCE FOR  
DIAGNOSIS,  
SURVEILLANCE AND CONTROL**

**ヒトのレプトスピラ症の診断、サーベイランスと  
その制御に関する手引き**

**厚生労働科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業**

**レプトスピラ研究班 WHO ガイダンス翻訳チーム**



**World Health Organization**

**ILS**

**International Leptospirosis Society**

**HUMAN LEPTOSPIROSIS : GUIDANCE FOR DIAGNOSIS, SURVEILLANCE AND CONTROL.**

**WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**

**World Health Organization**

**Human Leptospirosis : guidance for diagnosis, surveillance and control.**

1. Leptospirosis - diagnosis
2. Leptospirosis - prevention and control
3. Leptospira - isolation and purification
4. Serologic tests
5. Guidelines I. Title,

ISBN 92 4 154589 5 (NLM classification: WC 420)

**© World Health Organization 2003**

All rights reserved.

The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries.

Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

The mention of specific companies or of certain manufacturers' products does not imply that they are endorsed or recommended by the World Health Organization in preference to others of a similar nature that are not mentioned. Errors and omissions excepted, the names of proprietary products are distinguished by initial capital letters.

The World Health Organization does not warrant that the information contained in this publication is complete and correct and shall not be liable for any damages incurred as a result of its use.

本書 *Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control* © World Health Organization 2003 は 2003 年に世界保健機関から出版された。

世界保健機関の事務局長、並びに国際レプトスピラ症学会(ILS)は本書の日本語翻訳権をこのレプトスピラ研究班 WHO ガイダンス翻訳チーム(厚生労働科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業)に与えるものである。また、この翻訳チームが日本語版に関する責任を負うものである。

## **DISCLAIMER**

Publications of the World Health Organization have been translated into many languages by publishers in different countries.

The sole responsibility for the translation of this WHO publication lies with the institution named on the publication itself. For further information please contact the institution.

Reproduced by permission.

## **DENI DE RESPONSABILITE**

Les publications de l'Organisation mondiale de la Santé sont traduites en de nombreuses langues par des maisons d'édition de divers pays.

La responsabilité de la traduction de la présente publication de l'OMS incombe exclusivement à l'institution mentionnée dans ladite publication. Pour de plus amples renseignements, veuillez vous adresser à l'institution en question.

Reproduit avec permission.

## **DESCARGO DE RESPONSABILIDAD**

Gran número de editoriales de diversos países traducen las publicaciones de la OMS a muchos idiomas distintos.

La traducción de la presente publicación de la OMS es responsabilidad exclusiva de la institución cuyo nombre se menciona en la obra. Para más información, por favor pónganse en contacto con esa institución.

Reproducido con autorización.

## **不承担责任的声明**

界卫生组织的出版物已在不同国家被出版商翻译成多种语言。

翻译本世界卫生组织出版物的唯一责任在于该出版物上的署名机构本身。如欲获得进一步信息，请与该机构联系经许可印制。

## **ОГОВОРКА**

Публикации Всемирной организации здравоохранения переводятся на многие языки издательствами в различных странах.

Всю ответственность за перевод данной публикации ВОЗ несет учреждение, указанное в самой публикации. За дальнейшей информацией просьба обращаться в это учреждение.

Воспроизводится с разрешения.

## 謝辞

世界保健機関（World Health Organization, WHO）は、オランダ国アムステルダム市所在の王立熱帯研究所生物医学研究部（Institut voor de Tropen (KIT), Biomedical Research）に設置されている WHO/FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 国連食糧農業機関) レプトスピラ症レファレンス・研究協力センターより賜った技術的支援に対して深甚なる謝意を表する。WHO はまた、本書の内容及び編集に対して多大な貢献をされた、連合王国ヘレフォード県公衆衛生局 レプトスピラ症研究部門担当官 T. J. Coleman 博士 ならびに KIT の I. M. Struiksma 夫人の卓越した事務的支援に深く感謝の意を表明する。

また、WHO はイタリア共和国政府に対しても、本書出版にあたり財政的貢献をなされたことに敬意と深甚なる謝意を表する。

## 日本語版 まえがき

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金、新興・再興感染症研究事業「回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究」研究班(主任研究者 増澤俊幸)の研究事業の一環として、日本国内におけるレプトスピラ症のサーベイランス、適正な診断、迅速な治療の実現の一助とするために、本手引き書の翻訳を行った。

レプトスピラ症は 1999 年施行の感染症法では、報告すべき感染症としてあげられていなかったが、昨今のペットブームや SARS、鳥インフルエンザ、ウエストナイル脳炎など動物由来感染症に対する認識が高まるなかで実施された 2003 年の見直しで、新 4 類に加えられた。また、家畜伝染病予防法ではすでに届出伝染病として指定されている。このようななかで、衛生担当者、検疫担当者、医師、獣医師、臨床検査技師などからレプトスピラ症の診断、治療に関する問い合わせも増えている。国内では国立感染症研究所を中心として診断の指針が策定されているが、レプトスピラ症全般について勉強するための日本語で書かれたガイドブックは、WHO 出版の「Guidance for the control of Leptospirosis(1982)」の翻訳書であるレプトスピラ症防疫指針(S. Faine 編著、小西久典・富田正章共訳、吉井善作監訳、内田老鶴園出版、昭和 62 年)があるのみであった。我々は国内のレプトスピラ症の制御に役立てたいと考え、WHO オフセット印刷物の改訂版である「Human Leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control (2003)」の翻訳を思い立った。

本書がヒトや動物の感染症の研究、診断、治療、あるいは衛生、検疫行政に携わる方々がレプトスピラ症について理解を深めるための一助となれば幸いである。

なお、本書に関する問い合わせは、以下にお願いしたい。

288-0025

千葉県銚子市潮見町 15-8

千葉科学大学・薬学部・免疫微生物学研究室

増澤俊幸、岡本能弘

162-0025

東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所・細菌部

小泉信夫、川端寛樹

2005 年 4 月 訳者一同

## レプトスピラ研究班 WHO ガイダンス翻訳チーム

### 翻訳者

- 増澤俊幸 (千葉科学大学薬学部免疫微生物学研究室・教授)  
藤倉孝夫 (元世界保健機関 (WHO) 感染症局・上席獣医公衆衛生管理官)  
柳原保武 (静岡県立大学・名誉教授)  
小泉信夫 (国立感染症研究所細菌部・主任研究官)  
川端寛樹 (国立感染症研究所細菌部・室長)  
岡本能弘 (千葉科学大学薬学部免疫微生物学研究室・助教授)

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金、新興再興感染症研究事業「回帰熱、レプトスピラ等の希少輸入細菌感染症の実態調査及び迅速診断法の確立に関する研究」研究班(主任研究者 増澤俊幸)の研究事業の一環として、本手引き書の翻訳が行われました。

## 目次

まえがき	ii
はじめに	iv
第Ⅰ章 レプトスピラ症の微生物学と免疫学	1
第Ⅱ章 レプトスピラ症の臨床的特徴と治療	5
第Ⅲ章 検査室の役割	9
第Ⅳ章 感染源としての動物	18
第Ⅴ章 型別	21
第Ⅵ章 伝播と暴露	23
第Ⅶ章 予防と対策	25
第Ⅷ章 診断サービス、サーベイランス、および集団発生の管理	27
解説 1 エキスパートセンターと国際レプトスピラ症学会 (ILS)の連絡先	32
解説 2 リスク要因とリスク集団	35
解説 3 レプトスピラ症の制御	39
解説 4 サーベイランス	46
解説 5 レプトスピラ症の臨床的特徴と鑑別診断	51
解説 6 顕微鏡と染色	56
解説 7 病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラ	59
解説 8 血清型別と免疫ウサギ抗血清の作製	60
解説 9 分子生物学的手法によるレプトスピラの分類	64
解説 10 血清診断技術 (MAT と ELISA)	69
解説 11 MAT と ELISA 以外の血清診断技術	84
解説 12 レプトスピラの分離と培養	89
解説 13 実験動物を用いたレプトスピラの分離	91
解説 14 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)	92
解説 15 市販の検査試薬、培地、血清、単クローナ抗体とレプトスピラ株	98
解説 16 培地の調製	102
解説 17 検査室内の安全対策	111
レプトスピラ病全般に係わる参考文献	112
本手引き書の執筆協力者	114

## まえがき

### 本手引き書が編纂された理由

レプトスピラ症は、地球規模の公衆衛生上の大きな問題である。とくに、多くの発展途上国のある湿潤な熱帯、亜熱帯地域では、温帯地域の国々よりもより大きな問題に直面している。熱帯、亜熱帯地域における問題の重要性は、単に気候、環境条件のみならずレプトスピラに汚染された環境とヒト集団との接触の起こり易さに起因する。例えば、これらの地域における農作業の様式や、貧しい住宅事情、廃棄物の放置などいずれも感染源となるものばかりである。温帯気候にある国々においても、その地域での感染のほかに、熱帯地域への旅行者にも感染が認められることがある。

レプトスピラ症は本来、重篤ではあるが治療可能な疾病である。その症状は、インフルエンザ、髄膜炎、肝炎、デング熱、またはその他のウイルス性出血熱など、他の感染症に似ている。これらの感染症のいくつか、とくにデング熱は大きな流行を起こすことがあり、この場合には同時期に発生したレプトスピラ症はしばしば見過ごされることがある。この理由からこれらの感染症の流行が認められる地域ではレプトスピラ症をデング熱やウイルス性出血熱などと区別することが重要である。現在、このことは容易ではないが、近い将来このような技術上の問題は軽減されるであろう。それ故、公衆衛生上の重要な課題としてレプトスピラ症に対する関心と知識を向上させる必要がある。本手引き書はこの目的に適うよう編纂されている。

多くの観点から、レプトスピラ症は新興感染症の一つとして認められ、これにより関心や興味が増大し、とくに開発途上国では該疾患に対する情報が求められている。近年では比較的簡易な新しい診断法が開発され、設備や人材が備わったレプトスピラ症レファレンスセンターの支援がなくても、この感染症を確認できるようになってきた。

### この手引き書は誰のために書かれたか？

この手引き書が直接対象とした集団は、臨床医師、検査技師、微生物研究者、公衆衛生従事者、獣医師、人獣共通感染症に関心を持つ生物学者などを含み、また、レプトスピラ症に対する特別の知識を持たないが、一般にレプトスピラの性状やこの疾患について知つておく必要のある医療従事者である。本手引き書はハンドブックではなく、技術的な詳細は割愛されている。さらに興味のある読者は本書の解説か参考文献を参照されたい。

臨床的問題が最も大きい国々では、技術的支援がほとんど得られないために、簡便な診断法が強く求められるが、これらはいまだ十分には通常の手技として使えるまでには至っていない。技術的支援に関する情報は、解説 1 のリスト示されたエキスパートセンターから入手できる。

レプトスピラ症はヒトと動物の健康上の問題であるが、本手引き書では主にヒトのレプトスピラ症に重点をおいている。レプトスピラ症制御には獣医師の役割が不可欠であり、

十分に評価しうるものであるが、獣医学領域のレプトスピラ症に関しての記述を加えると、一般読者にとっては過重なものとなるかもしれないので、本書では省いている。本書は質問と回答方式を採用しており、これらは長年にわたりレファレンスセンターへ寄せられた多くの質問に基づいている。

## 将来への展望

レプトスピラ症は容易に見過ごされ、また、あまり良く知られていない。それ故、研究もあまり多くは行われておらず、そのために、この疾患は適切に診断されずに見落とされるという悪循環を招いている。本手引き書は、該疾患に対する認識を新たにし、より正確な診断を実施し、サーベイランス計画を立案することで、この悪循環を断ち切るために編纂された。

本手引き書は定期的に改訂される予定である。レプトスピラ症や国際レプトスピラ症学会（International Leptospirosis Society, ILS, 解説 1）に関する質問や情報については、本学会事務局に照会されたい。

本手引き書は WHO と ILS の合同チームにより編纂された。

## はじめに

### レプトスピラ症

#### レプトスピラ症とはなにか？

レプトスピラ症は、スピロヘータの一種で、病原細菌のレプトスピラにより引き起こされる感染症であり、この感染症は動物からヒトへ直接的、あるいは間接的に伝播される。したがって、本感染症は人獣共通感染症（zoonosis）である。ヒトからヒトへの伝播はごく稀にしか起こらない。

## 分布

#### レプトスピラ症はどこで発生しているか？

レプトスピラ症は世界各地で認められるが、通常、とくに雨量の多い熱帯・亜熱帯地方に認められる。本感染症は感染動物の尿にヒトが直接接触するか、尿で汚染された環境下で起こる。

## 発生状況

#### 世界中でレプトスピラ症はどのくらいの頻度で発生しているか？

全世界のヒトのレプトスピラ症の発生例数は正確には分かっていない。最近の資料によると、頻度は年間 100,000 人あたり、温帯地域でおよそ 0.1～1、湿潤な熱帯では 10～100 である。そして流行期には高暴露リスク集団では 100 以上にもなる（解説 2, 3, 4）。

## 見落としと過少報告

#### 何故 レプトスピラ症に対して認識が不足しているのか？

レプトスピラ症は広範で多様な臨床症状を呈する。これらの症状は、風邪のような軽度のものから、ときに致死的で重篤なものまである。また デング熱、ウイルス性出血熱など他の多くの疾患に似ている。

黄疸はレプトスピラ症に比較的特徴的な症状であるが、肝臓に関係するその他の多くの疾患、例えば種々の肝炎にも黄疸はみられる。その他の症状はあまり共通とはいえない（解説 5 参照）、レプトスピラ症に特徴的といえる症状は少ない。

レプトスピラ症は検査室診断で確定されるが、開発途上国では必ずしも容易ではない。これらの理由により、世界の多くの地域でレプトスピラ症は見落とされ、報告が見送られている。

## 歴史

#### レプトスピラ症の歴史はどのようなか？

1886 年 Adolf Weil によりレプトスピラ症が一つの独立した疾病としてその存在が記述さ

れた。現在でも重篤なレプトスピラ症はワイル氏病と呼ばれ、血清型 *Icterohaemorrhagiae* 及び *Copenhageni* (p.2, 血清型参照) による感染症に対して伝統的に用いられてきた。しかし、現在では全てのレプトスピラ感染症に対して、臨床症状（解説 5）の如何に関わらずレプトスピラ症と呼称することが望ましい。

20世紀の最初の20年期(1915年)に日本の稻田および井戸により初めて、レプトスピラが Weil により最初に記述された疾病(ワイル病、訳者註)の病原体であることが証明され、次いで、わずかに遅れてドイツでも Uhlenhuth 及び Fromme により独立して同様のことが証明された。

# 第Ⅰ章 レプトスピラの微生物学と免疫学

## 病原性レプトスピラ

### レプトスピラとはなにか？

レプトスピラは細菌で、病原性(pathogenic)を有するものと非病原性(saprophytic)のものがある。病原性のレプトスピラはヒトや動物の病気の原因となる可能性がある。非病原性のレプトスピラは自然界に広く分布し、病気の原因とはならないと考えられている。

病原性レプトスピラは、自然界ではある種の動物の尿細管内で維持されている。

非病原性レプトスピラは 地表水、湿気を含む土壌、水道水など濡れた、湿潤な様々な環境中に見出される。また、海水からは好塩性の非病原性レプトスピラが見出されている。

## 形態学

### レプトスピラの形態はどのようか？

レプトスピラはコルク栓抜き状の螺旋形をした細菌であり、他のスピロヘータとは両端がフック(鉤)状であることにより区別される。レプトスピラはスピロヘータ目(order Spirochaetales)、レプトスピラ科(family Leptospiraceae)、レプトスピラ属(genus *Leptospira*)に属する。レプトスピラは通常の光学顕微鏡で検鏡するには微細すぎるので、顕微鏡下での検査には暗視野顕微鏡が最もよく用いられてきた(解説6)。全てのレプトスピラは、みなほとんど区別ができないぐらいにわずかな差異しか認められないので、形態からは病原性、非病原性の区別や、病原性レプトスピラの様々な血清型の区別は困難である。

## 非病原性レプトスピラ

### 非病原性レプトスピラの医学上の重要性はなにか？

非病原性レプトスピラが病気を起こすとは考えられない。これらのレプトスピラは時に臨床材料から分離されているが、その意義はよく解っていない。この種のレプトスピラの医学微生物学上の重要性は、無菌であると思われる器具類、あるいは少なくとも非病原性微生物の汚染のないと思われる器物を汚染することである。非病原性レプトスピラは、培地調製時に無菌性が保たれなかった場合や非滅菌の培地基材が用いられた場合、あるいは臨床検体が無菌的に採取されなかつた場合に培養液中に認められることがある。

## 病原性および非病原性

### どのように病原性レプトスピラは非病原性レプトスピラと区別されるか？

培養条件、抗原性、遺伝学的性状など、いくつかの諸性状からこれらの2種のレプトスピラが区別できる(解説7)。

## 自然界でのレプトスピラの保有動物

### 病原性レプトスピラは必ず病気を起こすのか？

ある種の脊椎動物は、病原性レプトスピラを腎臓内に保菌し、自然宿主としてレプトスピラと

の共生関係にある。このようなレプトスピラは宿主にほとんど、あるいは全く害を与えない。一方、宿主動物では感染は持続し、そのため自然宿主動物として知られている。しかし、自然宿主とされていない動物やヒトが、同じ病原性レプトスピラに感染した場合は発病する。さらに、特定のレプトスピラの自然宿主動物が、それ以外の血清型のレプトスピラに感染した場合には、レプトスピラ症を発症することがある（下記を参照）。

## 血清型

### 病原性レプトスピラは相互に区別できるのか？

答えはイエス。分類学上の基本的単位は血清型で、抗原的類似性と差異をもとに区分され、交差凝集吸収試験(cross-agglutination absorption test)により決定される（解説 8）。それぞれの血清型は特徴的な抗原構造を有する。

## 血清型の数

### 血清型は沢山あるのか？

答えはイエス。抗原に類似性のあるいくつかの血清型(serovar)は血清群 (serogroup) としてまとめられている。即ち、少なくとも 200 種以上存在する血清型は 25 の血清群にまとめられる。異なる株間で見られわずかな抗原性の違いは、ときにはある一つの血清型内に収まる。

## 血清型の概念の重要性

### 血清型の実際的な意義とはなにか？

血清型は疫学的に重要な意義をもつていて、血清型のあるものはある特定の宿主動物種と共生関係にあり、宿主動物に比較的弱い病原性を示すこともある。例えば、ウシはしばしば血清型 Hardjo と、イヌは Canicola、ネズミは Icterohaemorrhagiae や Copenhageni との間でしばしばこのような関係がみられる。

血清型を基礎とした概念はこのように実用性とともに広範に受け入れられている（解説 8, 9）。

## レプトスピラ種

### レプトスピラの分類法はほかにもあるのか？

答えはイエス。レプトスピラの種の概念については、以前には二つの種が認められていた。すなわち、病原性を有する種として *Leptospira interrogans* が、また、非病原性の種として *Leptospira biflexa* が知られていた。しかし、近年 DNA 相同性に基づくレプトスピラの遺伝種分類が行われるようになった（解説 9）。

さらなる研究の進展によっては、現在知られているより多くのレプトスピラ種が明らかになるかもしれない。

血清型と種の二つの概念に基づいた現在の分類法では、同じ血清型に属するレプトスピラ菌株が、それぞれ別のレプトスピラ遺伝種に属するという矛盾もみられる。

## 偶発的(accidental)、または二次的 (incidental)宿主

### レプトスピラにとって偶発的、または、二次的宿主とはなにか？

元来、ある血清型の自然宿主でないある動物が、その血清型に偶発的、あるいは二次的に感染

した場合、その動物は偶発的宿主、あるいは二次的宿主といわれる。

自然宿主と偶発的、あるいは二次的宿主の区別は必ずしも明確ではない。病原性レプトスピラと宿主動物との関係は動的であり、レプトスピラは新しい動物種に適応し易いからである。

## 体内でのレプトスピラ

### 病原性レプトスピラがヒト体内へ侵入した後、なにが起こるのか？

感染後、レプトスピラは血中に現れ、全組織や全器官に到達する。その後、レプトスピラに対する免疫応答が誘起され、体内から排除される。レプトスピラは腎臓の尿細管内に留まり尿中へ排出される。排出期間は2~3週間から数カ月、ときにそれ以上長引くこともある。その後、レプトスピラは腎臓やその他の臓器から排除されるが、さらに長期間眼内に留まることがある。

## 抗体応答

### 抗体応答の性質はどのようなものか？

ヒトは、レプトスピラ感染に反応し、特異的抗レプトスピラ抗体を産生する。抗体価は通常感染後5~7日で上昇する。しかし、ときには10日後もしくはそれ以上を要する場合がある（臨床検体p.9、抗体の検出p.10参照）。

IgM抗体は、通常IgG抗体よりも早く出現し、数カ月から数年間は検出可能な低い抗体価の水準で持続する。

IgG抗体の検出は、IgM抗体に比べ変化がある。すなわち、IgG抗体は全く出現しないか、出現してもごく短い期間であったり、あるいは時には数年間持続することもある。

検出される抗体は次のようなものである（解説8）。

- 共通抗原（いわゆる属特異的抗原）即ち、病原性、非病原性を問わず全てのレプトスピラが共有する抗原に対する抗体
- 血清型特異的、血清群特異的抗原に対する抗体

レプトスピラ症に罹患した患者は、数種の血清型に反応する抗体を産生することがある。この現象は交差反応といわれ、感染初期にしばしば認められる。

急性期を過ぎると、交差反応性抗体は免疫応答の成熟に伴い、通常数週間から数カ月で徐々に消失する。一方、血清群特異的、血清型特異的抗体は数年間持続される。

したがって、属特異的な抗体は通常数カ月間検出され、血清型特異的抗体は数年間検出可能である。

また、弱い交差反応が他種の微生物との間にも起こり、これは抗体測定法の違いによって、その程度は様々である。

時に患者は広範囲の免疫学的反応性を示す抗原（属特異的抗原、訳者註）のみに対する抗体を産生し、ほとんど、あるいは全く血清型特異抗体が検出されない場合もある。他方、ある患者では血清型特異的抗体のみが産生されることもある。

## 感染防御免疫

### 抗体反応は感染防御に役立つか？

血清型特異的抗体は、感染防御に役立つと一般的に信じられている。患者は、同一血清型レプトスピラによる再感染に対して免疫をもち、特異的抗体価が十分に高い限り感染から防御される。

しかし、ある血清型レプトスピラ感染で誘導された抗体は、他の血清型レプトスピラによる感染防御には必ずしも役立たない。

## 第Ⅱ章 レプトスピラ症の臨床的特徴と治療

### 臨床症状

レプトスピラ症ではどのような臨床症状がみられるか？

レプトスピラ症の臨床症状は多様である (p.6~7, 解説 5).

該感染症は典型的な 4 つの臨床症候群に大別される。

- 軽度でインフルエンザ様症状
- 黄疸、腎不全、出血、不整脈を伴う心筋炎などで特徴づけられるワイル病様症候群
- 隹膜炎、鰓膜脳炎
- 呼吸不全を伴う肺出血

症状が多様で特異的ではないので、臨床診断は容易ではない。このため他の感染症と混同されがちである。例えば、熱帯地方でしばしば認められるデング熱や他の出血熱などがある (解説 5)。そして感染の進展に伴って臨床症状もこれら疾患と重なる。

### 罹患率

レプトスピラ症の罹患率はどのくらいか？

正確な罹患率は不明である。それは以下の理由から見過ごさることがあるからである。

- 診断を確定することが困難
- 他の病気と混同され易い
- 軽度の症状の場合は、検査室での検査がなされない

### 臨床検査所見

レプトスピラ症患者ではどのような臨床検査所見が見られるか？

入院患者の臨床検査結果には、直接診断に結びつかない様々な異常が見られることがある。例えば、赤血球沈降速度上昇、血小板減少症、白血球減少あるいは増加症、高ビリルビン血症、血清クレアチニンの上昇、クレアチニン・キナーゼ上昇、血清アミラーゼ上昇などが含まれる。

### 病因

レプトスピラ症の病態はなにがもたらすか？

現在でもなおよく解明されていないメカニズムにより、毛細血管内皮細胞の障害が起こり、様々な臨床病変が引き起こされると考えられる。全ての内部器官が冒されることから、広範な臨床所見がみられる。間質性腎炎、および尿細管性、糸球体性、尿細血管性の腎損傷は尿毒症、無尿/乏尿症の原因となる。肝細胞壊死を伴わない肝毛細血管傷害は、黄疸の原因となる。また、鰓膜炎は頭痛、項部硬直、意識混濁、精神障害、譫妄（せんもう、錯覚や幻想が多く、軽度の意識障害を伴う状態 訳者註）などの原因となる。血小板減少症は出血の原因となる。

## **致命率**

### **レプトスピラ症による患者致命率はどのぐらいか？**

世界各地からの報告では、レプトスピラ症による致命率は5%未満から30%にも及ぶ。しかしながら、これらの数値はあまり信頼のおけるものではない。その理由は、多くの地域ではこの疾病の発生については満足のいく記録に乏しいからである。さらには、軽症の場合、レプトスピラ症として診断されることはない。

最近の20~30年間で、いくつかの症例でみられる可逆的な腎不全のような重篤なレプトスピラ症の予後は、血液透析法と積極的な対症療法の適用のお蔭で大きく改善された。

## **死因**

### **レプトスピラ症患者が死亡する場合、なにが原因となっているか？**

レプトスピラ症患者の死因は腎不全、心肺機能不全、それに広範な出血である。肝不全は黄疸がでている場合でもきわめて少ない。

## **回復**

### **レプトスピラ症患者が生存した場合、患者は完治するであろうか？**

ほとんどの患者はレプトスピラ症から完全に回復する。しかしながら、一部の患者では、その回復に数ヶ月から数年を要する。そして後遺症が残ることがある。

## **後遺症**

### **レプトスピラ症における後遺症はどのようなものか？**

後遺症として慢性疲労や頭痛、不全麻痺、完全麻痺、情緒不安、抑鬱などの神経精神症状が表れることがある。また、ある症例では、レプトスピラ症の後期症状としてブドウ膜炎や虹彩毛様体炎が認められる。眼の症状は、おそらく患者の免疫応答からレプトスピラが逃避するために、眼内に留まることにより起こるものと思われる。

眼の障害以外にも後期に表われ、あるいは持続する症状の病因については、解明されていない。持続性、あるいは慢性の感染は確認されておらず、急性期に見られる、いわゆる“瘢痕”は証明されていない。

## **妊娠**

### **妊娠期間中にレプトスピラ症になるとどうなるか？**

妊娠期間中にレプトスピラ症になると、胎児の死亡、流産、死産、あるいは先天性レプトスピラ症を引き起こすことがある。しかし、この様な症例の報告はわずかしかない。

## **ビルレンス(病原性の強さ)**

### **何故レプトスピラ症患者のある者は重篤で、またある者は軽度な経過をとるのか？**

レプトスピラの病原因子は十分には解明されていない。ある血清型レプトスピラは軽度な症状を、またある血清型では重篤な症状を呈する。しかしながら、血清型に特異的な症状はみとめられず、どのような血清型でも種々の宿主に軽度な、または重篤な症状を呈する。患者の素因、例えば年齢や基礎疾患がある場合などは、しばしば重篤な臨床症状を引き起こし、致命率も高い。

感染量もレプトスピラ症の経過に影響する。

### それはレプトスピラ症か？

#### 臨床医はいつレプトスピラ症の診断を考慮すべきか？

突然の発熱、悪寒、結膜の充血、頭痛、筋肉痛、黄疸が認められた時には、レプトスピラ症の診断を下すことを考慮すべきである。

患者に咳、呼吸困難、吐き気、嘔吐、腹痛、下痢、関節痛、発疹などの症状が現れると診断は難しくなる。結膜充血と筋痛（ふくらはぎと腰部で最も顕著）は最も特徴的な身体的所見である（病院内診断、解説4、A4.2.1 p.46、解説5）。

患者が職業的に、あるいはレクリレーションの機会に、レプトスピラに感染した動物に接触していたか、あるいは感染動物の尿で汚染されたと思われる環境に暴露されていたかなどにより、レプトスピラ症の疑いはさらに強くなる。ひとたび、レプトスピラ症の可能性が考えられた場合は、直ちに適切な診断と治療を実施しなければならない。

### 潜伏期間

#### レプトスピラ症の潜伏期間はどのくらいか？

潜伏期間は通常5～14日とされているが、2～30日間の幅がある。

### 化学療法(抗生素質療法)

#### レプトスピラ症の最適の治療法はなにか？

レプトスピラ症と診断上疑ったならば、発病後5日以内に、できるだけ早く抗菌薬による治療を開始しなければならない。

第5病日以降の抗菌薬(抗生素質)による治療の効果については議論が分かれるところである。しかしながら、ほとんどの臨床医は、発病日の如何に関わらず抗菌薬による治療を行っている。

臨床医は、検査室での診断結果を待つことなく、化学療法を実施すべきである。その理由は、発病後約1週間までは抗体価は陽性にならない、また、レプトスピラの培養による検出には、数週間を要するからである。

### 抗菌薬

#### レプトスピラ症の治療に最も有効な抗菌薬はなにか？

重篤なレプトスピラ症には高用量のペニシリンによる静脈内投与が有効である。重症でない患者にはアモキシシリン、アンピシリン、ドキシサイクリン、やエリスロマイシンなどの経口抗菌薬で治療する。セフトリアキソン、およびセフォタキシムなど第3世代セファロスporin系や、キノロン系の抗菌薬も有効である。ペニシリン治療後にはJarisch-Herxheimer反応（ペニシリンによるレプトスピラの溶菌により漏出した大量の菌体成分による病状の増悪、訳者註）が起こることがある。

試験管内、ならびに動物実験では、広い範囲の抗菌薬に対してレプトスピラは感受性であるが、不運にも、多くの新しい抗菌薬はレプトスピラ症の治療に使用された経験に乏しい。

## **対症療法と血液透析**

重篤な患者は必ず入院させなければならない。透析液と電解質のバランスに厳しく配慮した、積極的な対症療法が必須である。腎不全には腹膜透析および血液透析が必要である。的確な対症療法と透析療法は近年致命率の低下に貢献している。

## **動物におけるレプトスピラ症**

### **レプトスピラに感染したすべての動物は発病するか？**

答えはノーである。ある特定の血清型レプトスピラの自然宿主となっている動物は、症状を呈さないか、発症したとしても比較的軽度にとどまる。

しかし、同じ動物が、異なる血清型のレプトスピラ感染により発病することがある。感染の初期には、動物は軽度の症状を呈する場合がある。乳牛では倦怠と乳量の減少を起こす。ウシやブタでは、慢性感染により流産や受胎能低下などの繁殖障害を起こすことがあり、発育不良を招く。

家畜においては軽度の感染は、注目されないまま放置される。ときとして、仔ウシや仔ブタでは黄疸出血性の症状を呈し、斃死の原因となる。

ヒトと同様に、動物も二次的な宿主となり、重篤な症状を呈する。この場合、致命的な経過をたどる。慢性感染を受けたイヌは腎臓障害に陥り、感染した血清型によっては急性ワイルド病様症候群の症状を呈する。

## 第Ⅲ章 検査室の役割

### 基本的設備

#### レプトスピラ症の基本的診断検査室の設営になにが必要か？

レプトスピラ症の診断検査室は、原則として他の微生物診断検査室と器具機材、技術要員との訓練、検査室の安全管理などについて、何ら異なることはない。さらなる支援や助言は、解説1に挙げられた専門機関より提供される。

### 検査室の必要性

#### なぜ検査室支援がレプトスピラ症診断に必要か？

検査室支援の必要性は以下の理由による。

- レプトスピラ症は臨床症状のみで他の多くの疾病と区別することが困難であり、確定診断に検査室支援が欠かせない。検査室診断法は、臨床症状により疑われたレプトスピラ症を確定することができる。
- 疫学的、かつ公衆衛生学的理由から、すなわち、感染の原因となった血清型、感染源、潜在的な保有動物とその所在の特定は検査室に負うところが大きい。これらを特定することにより、制御対策の戦略を確立することが可能になる。

### 診断法

#### 検査室で実施できるレプトスピラ症診断法にはどのようなものがあるか？

検査室では、通常、抗体の検出（血清診断、解説10、11参照）や血液、尿あるいは組織からのレプトスピラの培養（解説12、13）、蛍光抗体法により組織中のレプトスピラの存在を証明することなどにより、レプトスピラ症の診断を行う。検査室によってはこれら以外の方法、すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction, PCR）、および（免疫）染色法の実施が可能である（解説6、13、14参照）。

### 臨床検体

#### 検査のためにはどのような臨床検体が採取されるべきか？

採取すべき検体は、発病後の時期により異なる。すなわち、レプトスピラは患者が発病してから約10日間は血液中を循環する。また、発病してから2、3日で体液、つまり尿や脳脊髄液中に出現し、この期間に各臓器内へ侵入する。抗体が検出されるのは発病5～10日後であるが、抗菌薬で治療を受けている場合には、これよりも遅くなることがある。

最も日常的に採取されている有用な検査検体は下記の通りである。

1. 凝固防止用にヘパリンを使用した第10病日以内の血液は、レプトスピラの培養に使用することができる（解説12）。第10病日を過ぎた血液検体は、血清中に抗体が出現し、抗体検査が可能になる。一方、レプトスピラは消失するので培養試験には適さない。培養に供する検体は、常温で保存し輸送されねばならない。それは、病原性レプトスピラの生残率が、低温では低下するためである。

2. 凝固血液、または血清による血清反応（解説 10, 11 参照）では、検体を数日の間隔で病日を考慮しながら、血清反応陽転時期を予測して採取しなければならない。レプトスピラ症の診断を確定するためには、ペア血清間での抗体価の上昇、あるいは抗体価の陽転が認められなければならない（p.10、血清反応の重要性 参照）。発病初期での血清反応陰性の結果からは、レプトスピラ症感染を否定することはできない。
3. 培養のために採取された尿中では、レプトスピラはすばやく死滅する（解説 12）。したがって、無菌的に尿を採取し、2時間以内に適切な培地に接種できる場合にのみ、有効となるであろう。酸性尿中でのレプトスピラの生存率は、尿を中性に調整することにより高まる。
4. 死後検体（解説 12）は、なるべく多くの器官から材料を採取する必要がある。すなわち、脳、脊髄液、眼房水、肺、腎臓、肝臓、脾臓、心臓、および血清診断のための心血などである。集めることのできる検体は供給源、並びに培養上の制約に依存する。死後検体は直ちに、無菌的に採取し、培養試験に当たっては、極力短時間内に培養に供さなければならない。これらの検体は、組織の自己融解をさけるために4°Cに保持され、輸送されなければならない。4°Cでの細胞の自己融解と、結果としておこるpHの低下を防止することは、低温での病原性レプトスピラの生残の減少を補償するものである。新鮮組織や固定された組織を用いて蛍光標識抗体法によりレプトスピラの存在を検証することもできる。さらに、その他の方法、例えば、鍍銀染色法、免疫染色法、免疫組織化学法などの方法が有用であるが、これらの検査には熟練、また、結果の解釈にはかなりの習熟を要する（解説 6）。
5. 脳脊髄液と透析液の培養については解説 12 を参照されたい。

## 診断に必要な血清反応

### レプトスピラ症診断に最もよく用いられる血清診断法としてはなにがあるか？

現行のレプトスピラの直接検出法（解説 6, 12, 13, 及び 14）は、いずれも時間を要し、また、信頼性に問題がある。そこで、血清反応がもっとも適当な診断方法とされている。さらに、実際的には、医療処置が必要な患者や入院患者は、すでに、抗体価が検出可能なほど十分に長い期間発病しているものである。

## 血清反応の重要性

### 血清反応陽性は最近の感染を意味するか？

必ずしもそうではない。抗体が検出されること自体は、必ずしも現在罹患している感染の証拠とはならない。それは、以前の感染により產生された抗体が、長期間持続する場合があるからである。

通常は、血清反応の陽転（ペア血清において最初の検体は抗体価陰性、次の検体は陽性、すなわち、カットオフ値以上の抗体価）、あるいは4倍もしくはそれ以上の抗体価の上昇（最初の検体は低い抗体価で、次の検体は十分に高い抗体価）がペア血清間で認められなければ、最近の、あるいは現在の感染と結論づけられない。

ELISA、または他の（市販の）類似の検査試薬（p.14 参照）により、高い IgM 抗体価、即ち、カットオフ値より数倍高い価（MAT のカットオフ値については p.12 参照）を单一血清試料で得ている場合には、この感染は、最近もしくは現在のレプトスピラ症と診断する。しかし、留意すべきは、IgM 抗体は数カ月から数年にもおよび持続することがあるということである。

血清反応の成績は診断上重要ではあるが、必ず同時に、臨床症状や感染源への暴露の可能性やリスク要因などの疫学的なデータも合わせ考慮する。病原性レプトスピラの分離が、唯一のレプトスピラ感染の直接的で確定的な証明である。

## 抗体の検出

### どのようにして抗体を検出するか？

抗体（属特異的、血清型特異的、血清群特異的）は抗原と反応する（解説 8）。血清診断では、患者血清は抗原と反応させる。いくつかの血清反応ではレプトスピラ生菌を、また別の方法ではレプトスピラからの抽出物が抗原として用いられる。血液中の抗体価は、抗原と抗体の濃度やその反応の強さにより決まる。抗体価は、血清の希釈系列の中で陽性反応が検出できる最高血希釈倍数を決定することで求められ、陽性反応を示す最終希釈倍数で表示する。抗体価は、また、あるレベル以上、即ちカットオフ値（カットオフ値については p.12 参照）、以上の場合、“陽性価”(positive titre)、あるいは“有意価”(significant titre)といわれることがある。抗体価は、病気の経過につれて徐々に上昇し、回復後は低下する。弱い血清反応に対する解釈は必ずしも明確ではない。それらは、感染の非常に早い時期か、遅い時期での免疫反応であるか、あるいは非特異的反応によるのかもしれない。また、低い抗体価や、抗体の出現の遅延は、重症例や免疫抑制患者、発病の初期に高濃度の抗菌薬を投与された患者で認められることがある。

## 血清診断法

### 血清診断法にはどのような方法があるか？

顕微鏡凝集試験（microscopic agglutination test, MAT）（解説 10）は最も基本となる、信頼性のある血清診断法(gold standard)と考えられている。MAT は、現行の他のどの検査法をもってしても、代替できないほどの血清型/血清群特異性を備えた診断法である。

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合抗体法) などの他の血清診断法も開発されており（解説 10, 11），これら多くは比較的簡便で、レプトスピラ症のスクリーニング検査に用いられている。

## 顕微鏡凝集試験(MAT)

### MAT はどのような方法か？

MAT は、希釈した血清とレプトスピラ生菌、またはホルマリン処理死菌体とを混合することにより、患者血清中の凝集抗体を検出する検査法である。血清中にある抗レプトスピラ抗体は、レプトスピラを互いに密着させ、塊を形成させる。この過程を凝集と呼び、暗視野顕微鏡下で観察できる（解説 6）。凝集抗体は IgM および IgG 抗体である。

## MAT の特異性

### MAT の特異性はどのようにして示されるか？

患者は、通常感染しているレプトスピラ血清型に対して凝集抗体を産生する。しかしながら、他のレプトスピラ血清型と交差反応を起こす凝集抗体もしばしば検出される。これはとくに感染初期には顕著である。感染後 1~2 週では、感染している血清型に対するよりも、別のレプトスピラ血清型に対して、高い抗体価を示す場合がある。ときには、他のレプトスピラ血清型に陽性で

も、感染レプトスピラ血清型に対しては陰性の場合もある。このような現象を矛盾反応（paradoxical reaction）と言う。交差凝集抗体価は数ヶ月後に比較的速やかに低下する。一方、血清群特異的、血清型特異的抗体は、かなり長期間、しばしば数年間にわたり持続することがある。これまでに分かっていることは下記の通りである。

- (1) 凝集抗体は特定の血清型、血清群にのみ反応する
- (2) 多数のレプトスピラ血清型が一つの地域へ浸潤し感染を起こす
- (3) 流行するレプトスピラ血清型は、新しい保有宿主の導入や、農業形態の変化などにより変わることがある
- (4) 新しいレプトスピラ血清型の導入は起りうる

これらの理由により、異なる血清型に属するレプトスピラ生菌培養の一式(panel)を MAT 用の抗原として使用するために、検査室内で維持していかなければならない。これらの抗原一式には、最低限、その地域に存在するレプトスピラ血清型を含んでいかなければならない。もしも、この一式の抗原に含まれる血清型が不適当であると、一式に含まれていない血清型に対する抗体を検出し損ない、血清診断は不正確、偽陰性の結果を与えることになる。地域に浸潤しているレプトスピラの血清型が明らかでない場合、あるいは、血清型が変化しつつある時には、すべての血清群を代表する血清型からなる抗原一式を用意しなければならない。

## MAT抗体価

### MAT 抗体陽性、あるいは有意になるのはいつか？

MAT では、現在の感染か、最近の感染か、それとも過去の感染に起因する凝集抗体であるかを明確には区別できない。理想的には、他の血清反応と同じく、間隔を置いて採取されたペア血清を検査し、抗体価の陽転、あるいは4倍以上の抗体価の上昇を確認するべきである。しかし、感染初期の単一の血清検体のみが診断に供されることが多い。単一血清検体中の抗体価の意味については議論が絶えない。そして地域が異なると、異なるカットオフ値を設定する必要がある。最近、あるいは現在の感染を診断するまでの陽性限界として 1:100, 1:200, 1:400, あるいは 1:800 が採用されるなど様々である。

## MAT のカットオフ値

### MAT のカットオフ値を当該地域でどのように設定したらよいか？

レプトスピラ症の発生が滅多にみられない地域では、低い抗体価を検出することは意義がある。しかし、なお、常に臨床所見や疫学的要因（暴露、リスク集団）なども考慮すべきである。

レプトスピラ症の流行地では、多くの人々は過去の感染による抗体を保有している。それゆえ単一血清中の比較的低い抗体価についての解釈は容易ではない。

カットオフ値、そして単一血清中の抗体価の臨床的重要性は、以下のことを考慮して決定されるべきである。

- 一般人の集団で、過去の感染による持続抗体の保有率の背景
- レプトスピラと交差反応を起こすかも知れない抗体を産生するレジオネラ感染症、肝炎、自己免疫病など他の疾患の発生状況との関係

血清反応におけるカットオフ値は、理想的にはレプトスピラ培養が陽性となった患者と他の疾患患者群との血清学的試験結果の比較にもとづいて決定することが望ましい。しかしながら、こ

の方法はいつも実行できるとは限らない。その理由は、臨床検体からのレプトスピラの培養は成功するとは限らないので、レプトスピラ培養陽性の患者群を集めることは容易ではないからである（p.10, 診断に必要な血清反応; p.15, 培養参照）。

## MAT の長所と短所

### MAT の長所と短所とはなにか？

長所は特異性がきわめて高いことである。

MAT の重大な短所は抗原に用いるレプトスピラを培養し、維持できる施設を必要とすることである。さらに、MAT は技術の習熟が必要であり、特に一式の抗原に含まれる血清型の種類が多い時には時間要する。また、明らかに決定的な欠点は、感染の真の原因であるレプトスピラ血清型が一式の抗原に含まれていない場合には、抗体は検出されないということである。あるいは感染血清型と抗原的に類似した血清型に低い抗体価しか示さないことがある。そのため MAT で低い抗体価を検出したり、あるいは抗体が全く検出されない場合でも、診断結果としてレプトスピラ症を除外することはできない。

用意された抗原一式が完全であるとは決して言えない。それは、新しい、未知の血清型レプトスピラにより感染が引き起こされる場合があるからである。このため、多くの血清型に対して反応する抗原を用いた ELISA などのレプトスピラ属特異的検査を、スクリーニング試験として行うことが望ましい（解説 10, A10.2.2）。

## MAT の標準化

### MAT は標準化できるか？

MAT は、抗原としてレプトスピラ生菌を用いるので標準化できない。試験の結果は、実施日ごとに毎回少しずつ異なる可能性があるので、ペア血清は、同時に検査することが最もよい方法である。

ホルマリン不活化抗原を用いた場合には、ある程度の標準化は可能である。しかし、この方法も同時期に調製された抗原を用いたときのみ可能である。残念ながら、保存した抗原は、2~3 週間で性状が変わってしまい、役立たなくなる。

## 血清型/血清群 特異的凝集反応

### 血清反応は患者の起因レプトスピラ血清型を明らかにできるか？

患者は、通常感染レプトスピラ血清型に対して凝集抗体を産生する。現在進行中の感染や、最近うけた感染に対しては MAT では交差反応性がみられるので、真の感染血清型や血清群を決定することは難しい。しかし、発病後のある時点、例えば、発病から 1 カ月後に血清検体を採取して、抗体価を測定する。このとき残存している抗体は、特異抗体であり、感染した血清群、あるいはまれには血清型まで明らかにできる可能性がある。

ELISA は、通常レプトスピラ属特異抗体の検出に有用であり、感染の原因となっている血清型や血清群を検出することはできない。

## 血清疫学

**血清反応はある地域のある集団中の感染原因となっているレプトスピラ血清型を明らかにできるか？**

MAT では使用する一式の抗原の中に含まれているレプトスピラ血清型との凝集反応により、感染レプトスピラ血清型の帰属している血清群を明らかにできることがある。最も良い条件下では、血清型を同定することも可能である。それゆえ、一般住民集団から集められた血清検体の血清疫学的調査で、その地域に浸潤しているレプトスピラ血清群を明らかにすることができる。過去の感染による残存抗体は、血清群特異的だからである。

## ELISA とその他の（市販の）検査法

**MAT 以外にどのような血清診断法が利用されているか？**

様々な診断法がある（解説 10, 11）。市販キットも利用できる（解説 15）。

ELISA はよく使われる方法で、いくつかの術式がある。それらは市販キットとして入手でき、また、検査室内で調製された抗原を用いることもできる。ELISA はいわゆるレプトスピラ属特異的抗原を使用し、IgM 抗体、ならびに IgG 抗体を検出するのに通常用いられる。IgM 抗体の存在は現在、または最近の感染を示唆するものであるが、忘れてはならないのは IgM 抗体は数年間にもわたり残存することがあるということである。陽性反応のカットオフ値の設定については十分に考慮しなくてはならない。この点については、MAT のところで述べた（p.12, MAT のカットオフ値参照）。属特異的検査では、MAT よりも感染初期の抗体が陽性にでる傾向がある。

## ELISA：その長所と短所

**MAT と比較して ELISA の長所と短所はなにか？**

### 長所

- ELISA は罹患初期の IgM 抗体を捕捉できるので、現在、もしくは最近受けた感染を証明することができる。抗体が検出されなかった時、または抗体価が低い場合には、ひきつづき血清検体を採取し、抗体価の陽転、もしくは抗体価の有意な上昇を確認する必要がある。
- 病原性、非病原性レプトスピラの両方に共通な属特異的抗原 1 種だけで実施できる。
- MAT と比較して、ELISA は標準化することが可能である。
- 市販キットが利用できれば、検査室で抗原調製のためのレプトスピラを培養する必要がない。

### 短所

- ELISA の術式によっては、MAT よりも特異性が低く、他の疾病によって低い交差反応を起こすことがある。それゆえ ELISA の成績は、MAT により確かめなければならない。検査に用いた最初の検体が感染の初期に採取されたもので、ELISA で陽性、MAT では陰性であったならば、その後の血清を採取し、検査する必要がある。
- ELISA では属特異的抗原を検査するので、感染しているレプトスピラの血清型までは分からぬ。

## スクリーニング

### レプトスピラ抗体を迅速に検出するスクリーニング法はあるか？

現在では多くの診断方法がある。例えば、肉眼的スライド凝集試験、Patoc スライド凝集試験、マイクロカプセル凝集試験、ラテックス凝集試験、Dipstick 試験、間接血球凝集試験などは、手技が簡単で、比較的迅速に結果が得られる（解説 11）。これらのスクリーニングの結果の如何に関わらず、他の試験、できれば MAT で確認しなければならない。

## 直接法

### レプトスピラを直接検出する方法はなにか？

直接法には、培養、暗視野鏡検、実験動物への接種、（免疫）染色、PCR などがある（解説 6, 12, 13, 14）。

## 培養

### レプトスピラを培養するにはどうしたらよいか？

レプトスピラは様々な培地中で増殖する（解説 16）。増殖は遅く、菌の分裂時間は最もよい条件下で 6~8 時間である。培養至適温度は 28~30°C である。しかし、血清型によっては培養時の要求性がより厳しい。

## 培養のための検体

### どのようにして患者からレプトスピラが培養されるか？

通常、血液検体が培養に用いられる。血液は培地に接種する（解説 12）。血液以外の体液や組織も培養に用いられる。通常、1~3 滴の血液や体液を培地に接種する。また、細かく切り刻んだ組織片も培養に用いられる。

レプトスピラは、ときには 1 週間の培養で検出可能になることもあるが、多くの場合さらに長い時間を要する。このため培養液は、4 カ月にわたり一定の間隔で、レプトスピラの増殖を暗視野顕微鏡で確認する必要がある（解説 6）。

血液やその他の臨床材料は、抗菌薬が投与される前に採取されなければならない。当然のことながら、培養に使われる培地に、他の細菌やその他の混入物が全くないことを確認しなければならない。雑菌、特に非病原性レプトスピラによる汚染を防止するために、培養に使用する器具、臨床検体を入れる容器は滅菌しておかなければならない。

## 培養による早期診断は可能か？

### 培養は迅速かつ早期の診断に役立つか？

レプトスピラは増殖が遅いので、培養で確認されるまでには時間がかかる。そのため患者から血清診断で抗体が検出される前に、培養結果が明らかになることはまずない。このため、培養は早期の診断にはあまり役立たない。また、この方法は、他の診断法に比べて感度が低い。しかし、発病後まもなく、抗体が検出される前に死亡した患者のレプトスピラ症を診断するためには有用である。

## **培養の有用性**

### **培養が有用である理由はなにか？**

病原性レプトスピラの分離は、感染の証拠となる。また、分離されたレプトスピラの型別により、血清型を同定することができる。分離したレプトスピラの血清型別は、その地域に浸潤している病原性レプトスピラの血清型のサーベイランス、レプトスピラ症の新たな病態パターンの認知、さらには防疫対策の効果を評価するのに有益である。

## **実験動物**

### **実験動物による病原性レプトスピラの検出は可能か？**

血液やその他の臨床検体は、実験動物の腹腔内に接種する(解説 13)。ゴールデンハムスターが最もよく使われる。接種後、一定の間隔で腹腔内から鋭利な毛細管ピペットを使って腹腔液を採取し、レプトスピラの存在を暗視野顕微鏡で検査する。さらに、この動物が発症するかどうか観察する。

この動物を用いる方法は、最近ではあまり使われていないようである。その理由は、培養によってもほぼ同様な成績が得られることと、動物に苦痛を与えるのを防ぐためである。

## **暗視野顕微鏡**

### **暗視野顕微鏡はどのように使用するか？**

レプトスピラは、暗視野顕微鏡下、培地内、血液、あるいは尿中などの液体中で、細く、コイル状で、活発に運動する微生物として観察される(解説 6)。血液や尿中のレプトスピラは分別遠心分離により濃縮することができる。

## **暗視野顕微鏡：長所と短所**

### **暗視野顕微鏡の長所と短所とはなにか？**

#### **長所**

- 暗視野顕微鏡はレプトスピラの観察に甚だ有用である。とくに培養液中に多数のレプトスピラが存在する時や、MAT の判定に当たっては不可欠である。

#### **短所**

- 暗視野鏡検には経験と技術が必要である。とくに鏡下で少数のレプトスピラを認識することは困難が多い。血中にみられる糸状のフィブリンなどは、レプトスピラと見誤ることが多い。
- 偽陽性の誤診が頻繁に起こる。このため、暗視野顕微鏡による検査は、レプトスピラの観察にかなり経験のある場合にのみ有用な検査方法といえよう。偽陽性、偽陰性との誤診は、いずれも容易に起こりうる。臨床検体での暗視野鏡検による結果は、必ず他の診断法で確認されなければならない。

## **染色**

### **レプトスピラは染色して観察できるか？**

レプトスピラは様々な方法で染色できるが(解説 6)，常法であるグラム染色では、染色されても弱いか、ほとんど染色されない。鍍銀染色では良好な染色ができる。直接免疫蛍光染色法や

変法のペルオキシダーゼ免疫染色法なども使われている。これらの染色法は、死後診断のための“固定”，あるいは“未固定”の組織検査に有用である。しかしながら、これらの染色法は暗視野鏡検法と同様の問題点がある。すなわち、偽陽性、偽陰性と診断する高いリスクがある。試料作製過程で起こるアーティファクト（非レプトスピラ様構造体、訳者註）は、とくに、レプトスピラがほとんど存在しない場合には、容易にレプトスピラと見間違えやすい。

## PCR

### PCR のレプトスピラ症診断への応用は可能か？

PCR（解説 14）は、血液などの臨床検体から、レプトスピラ DNA の特異的配列を検出可能な程度まで増幅する方法である。すなわち、レプトスピラ DNA の特異的配列を検出、同定することによりレプトスピラの存在を確認できる。

## PCR:長所と短所

### PCRの長所と短所はなにか？

#### 長所

- PCR は、感染初期のレプトスピラ症診断を迅速に行うことができる。レプトスピラ菌体がすでに患者の体内に存在するが、まだ、抗体が検出できる水準までに至っていない段階での診断に利用できる。

#### 短所

- PCR を実施するには、特別の装置と施設内に専用の場所が必要である。また、高い能力と経験のある技術者も必要になる。
- この作業空間が検体に由来しない外来 DNA に汚染されていると、それがごく微量であっても、偽陽性結果となる。また、検査される臨床検体中には、PCR の阻害因子が含まれることがあるので、偽陰性結果となることがある。PCR により正当なデータを得るには、全操作過程の作業精度管理が不可欠である。PCR は多くの疾病的診断に用いられているが、レプトスピラ症の迅速診断の一般的な有用性については、世界的には未だ十分な評価がなされているとはいえない。それは、PCR が熱帯、亜熱帯諸国では未だほとんど利用されていないのがその一つの理由である。

## 死後診断

### レプトスピラ病の死後診断はどのようにして行うか？

血清反応、培養法に加えて、レプトスピラは組織内から PCR、免疫組織化学染色法、とくに直接免疫蛍光抗体法により検出される。

## 第IV章 感染源としての動物

### 感染源

#### ヒトへのレプトスピラの感染源となる動物種はなにか？

広範囲にわたる動物種、主に哺乳動物がヒトへの感染源となる（解説4）。

最も重要な動物は下記の通りである。

- (1) 小型哺乳動物、とくに野生、および人家の周辺にいるげっ歯類（ラット、マウス、ハタネズミなど）、および食虫類（トガリネズミ、ハリネズミなど）。
- (2) 家畜（ウシ、ブタ、イヌ、稀にヒツジ、ヤギ、ウマ、スイギュウなど）。

毛皮の生産のために飼育されている動物（キツネ、ミンク、ヌートリア）もヒトへの感染源となる可能性がある。爬虫類や両生類もレプトスピラを保有していることがある。

### 保菌動物の取り扱い方

#### 動物がレプトスピラの保有状態にあるかどのようにして確認できるか？

動物がレプトスピラの保有状態にあるかどうかを明らかにするためには、レプトスピラを尿や腎臓から分離培養するのが唯一の方法である。レプトスピラは動物の腎臓に保菌されており、尿中へ排出されるので、動物の取り扱いについては検査で安全が確認されるまでは、潜在的な感染源であることを考慮し常に注意が必要である。

### 病原体保有動物

#### 自然条件下でのレプトスピラ感染はどのように持続するか？

自然宿主の集団内で、レプトスピラは垂直感染および水平感染により維持されている。このようなレプトスピラの自然宿主種の集団は、病原体保有動物とされる。

### 自然宿主

#### 自然宿主の感染伝播に果す役割はなにか？

自然保菌宿主は、一つの地域（自然病巣）で他種の二次的宿主の関与を必要とせずに、特定のレプトスピラ血清型を、確実に継続的に循環させている。自然宿主は特定のレプトスピラ菌種を腎臓に保有し、長期間、ときには生涯にわたり尿中にレプトスピラを排出する。多くのレプトスピラ菌種はきわめてよく特定の自然宿主に適応し、何ら症状を呈することなく感染している。

げっ歯類は、最も重要で、広範囲に分布しているレプトスピラの自然宿主である。食虫類、肉食類、反芻類のある種の動物も、また、多種のレプトスピラ血清型の保有動物となっている。それぞれの地域ではヒトが感染するリスクは、レプトスピラの自然宿主の尿と直接、あるいは間接的に接触する機会の程度により様々であろう。さらに、このような長期間の保菌宿主のほかにも、どのような感染動物も同一種間だけでなく、ヒトを含む他種の動物への感染源ともなりうる。

### 自然保菌宿主と血清型

#### 特定のレプトスピラ血清型と特定の宿主の間に関連があるか？

答えはイエスである。概括的には、各レプトスピラ血清型は特定種の保菌宿主と関連する傾向

がある。例えば、血清型 Copenhageni はラット、Canicola はイヌ、Hardjo はウシとそれぞれ関連している。しかし、これには多くの例外がある。ある血清型は多くの種類の動物を宿主とし、また、ある動物種がいくつかの血清型の宿主となる場合もある。さらに、あるレプトスピラ血清型が新しい動物種に適応して、それが自然保有動物となることもある。

## “終末”宿主

### 感染の伝播におよぼす二次的、偶発的感染宿主の役割は何か？

偶発的、二次的宿主（原文 p.2 参照）は、通常レプトスピラの感染により明瞭な症状を呈する。その後、その動物が生残できた場合、2~3 週間で感染したレプトスピラは消失し、回復する。ヒト及びその他の偶発的宿主はレプトスピラの感染保有宿主とはならず、“終末”宿主である。レプトスピラ症患者が他のヒトへの感染源となる可能性は低い。ヒトからヒトへのレプトスピラ感染については記録はあるが、きわめて稀にしか起こらない（p.23、ヒトからヒトへの伝播参照）。

## 家畜

### 感染伝播における家畜の役割はなにか？

全ての家畜で、レプトスピラ症の臨床症状は、急性、亜急性、慢性など様々である。慢性感染は腎臓に限局され（ときには生殖器にも）、通常、臨床症状はみられない。保有動物は、数カ月から数年にわたり尿中にレプトスピラを排出する。ときに多量のレプトスピラを排出し 湿潤な土壤、家畜の畜房内、給餌場、畜舎の床、飲水の水源などを汚染する。水の汚染により他の家畜やヒトにレプトスピラが伝播するリスクが高まり、水を介したヒトの集団感染の原因となる。

## 家畜におけるレプトスピラ症の証拠

### 家畜のレプトスピラ症はどのようにして認識できるか？

ウシで、突然の乳量減少症、黄疸、血色素尿（とくに若齢のウシ）、髄膜炎、急性腎炎、および流産がみられた場合は、急性レプトスピラ症を疑うべきである。ブタでレプトスピラ症が疑われる原因是、流産、死産、不妊が認められた場合などである。また、ウマでは月盲症がレプトスピラ感染の特徴とされている。集団飼育中の家畜の多くののは、レプトスピラに感染してもほとんど無症状であるか、ときに変わった徵候を示す程度である。そのため、これらの家畜では、尿や腎臓からレプトスピラを分離培養するか、MAT などの血清反応を行なって、レプトスピラ症の診断を確定する。家畜の不顕性レプトスピラ感染は、家畜と接触したヒトが感染発病したことにより、家畜での感染が明らかにされることになる。この場合、ヒトは、家畜のレプトスピラ感染の歩哨動物(sentinel)としての役割を果したことになる。

## イヌ及びその他のペット動物

### ヒトにレプトスピラ感染を起こすペット動物の役割は何か？

イヌはレプトスピラに感染し、環境を介して、あるいは直接ヒトにレプトスピラを伝播する。イヌのレプトスピラ症の臨床的特徴は、ほかの種類の動物と同様に多様である。多くは無症状（腎臓内の保菌状態）であるものの、急性間質性腎炎を伴う重篤な黄疸出血性症候群まで実際に多様である。ワクチン未接種の1歳未満の仔イヌへの感染では、きわめて重篤な症状を呈し、ときに死の転機をとる。

イヌや他のコンパニオン動物の尿や体液を取り扱う際には、潜在的な感染源であることを考慮して、それらの安全が確認されるまでは十分に注意することが肝要である。病気のイヌや他の動物の世話をする時には、衛生的に適切に取り扱うよう心掛けなければならない（解説3）。

## 第V章 型別

### 型別

#### レプトスピラの型別の目的はなにか？

臨床管理の観点からは、患者がレプトスピラ症であるか否かを知ることで事足りる。しかしながら、公衆衛生の見方からは、型別を行うことで感染源と保有動物に関する情報が得られるので、最終的な予防と制御方法の選択を行う上で重要である。

### 参考菌株

#### 血清型はどのように記載するか？

各血清型には参考菌株がある。これら参考菌株のコレクションは、レファレンスラボラトリー並びに他の特定の検査室で維持されている（解説1）。参考菌株に加え、参考抗血清も維持されている（解説8）。

### 血清型の同定

#### 全てのレプトスピラ分離株は血清型として型別されるべきか？

理想的には、全ての分離株は、血清型に型別されるべきである。何故なら血清型の概念と血清群における血清型の分類は広く受け入れられ、疫学にも広く使用されているからである。分離株の血清型を決定することで、多くの有益な情報がもたらされる。また、遺伝学的手法による補足的な型別は、系統分類学的に適切に菌株を記載する上で必要かもしれない。

### 型別法

#### 分離されたレプトスピラは如何にして型別できるか？

前に説明したように、分類の基本体系的単位は血清型である（p.1、血清型）。血清型は、ウサギ抗血清を用いたいわゆる交差凝集吸収試験により決定される（解説8）。本試験は煩瑣で時間を要し、したがって、迅速な結果が要求される時は適当でない。本試験は、ほんの少数の特定の検査室でのみ使われているにすぎない。

上記の血清型に代わる多くの型別法が開発されている。例えば、単クローナル抗体、または“因子血清”を用いた、レプトスピラの抗原性状に基づく二つの血清学的型別法がある（解説8）。その他の方針として、レプトスピラDNAの差異に基づく試験があり（解説9），それらの結果は、血清型の型別の結果とある程度一致する。

### 単クローナル抗体

#### 単クローナル抗体は型別にどのように使かわれるか？

レプトスピラを凝集するマウスの単クローナル抗体が作製されている（解説8）。血清型は、各種単クローナル抗体との特徴的な凝集反応パターンにより同定できる。単クローナル抗体の作製は難しく、また時間を要する。しかし、一度作製されてしまえば、単クローナル抗体を用いたMATによる血清型の型別は容易で、迅速に結果を得ることができる。単クローナル抗体は、今日まで確認された、最も一般的な血清型の約半分を型別するのに利用できる（解説5）。

## 因子血清

### “因子血清”は型別に如何に利用できるか？

“因子血清”は、常法に基づき作られたウサギ血清を、各種レプトスピラ抗原で吸収して調製された、高い特異性を示す抗血清である（解説8）。一連の“因子血清”は单クローニング抗体と同様に、菌株を血清型レベルで迅速に同定することができる。しかし、“因子血清”的調製には長時間を要し、バッチ調製品は、必ずしも再現性の良い結果を与えるものでない。

## DNA型別

### DNAは型別に如何に利用できるか？

各生物のDNAは、それぞれその生物に独特のものである。DNA分析には種々の方法がある（解説9）。DNAを制限酵素処理して得られた断片は、電気泳動ゲル上で分離され、多くの場合、各レプトスピラ菌株に特徴的なパターンを示す。DNAに基づく方法は、しばしば有用な結果をもたらすが、あるものは比較的複雑で特別の熟練と特殊な装置を要する。

## 方法の選択

### 型別のどの方法が選択されるべきか？

分離株がレファレンスセンターに送られた場合、結果を得るのに長い時間がかかることがある。さらに、分離株の郵送、または、国際規則に従う国際宅急便は高価である。何故なら、検体の漏出防止への配慮が必要であり、輸送中に第三者が感染を受けるリスクが付随するからである。したがって、型別は現場で実施されるのがより望ましい。

方法の選択は、必要とされる情報次第である。多くの研究者は、多分ある特定の地域にどの菌株が存在し、感染源や保有体が何であるかを知りたいであろう。多くの熱帯地方では、多くの異なる血清型が存在し、あるものは多分同定されていないかも知れない。一つの可能性は、最も広く分布する分離株の迅速な型別を可能にする方法を使うことがよいであろう。珍しい、変わった分離株は、型別のためにレファレンスセンターに送った方がよい。方法の選択は、技術的設備とスタッフの専門的技術に依存し、ある種の方法は明らかに“日常的な”検査室での使用には適当でない。

如何なる型別法が用いられようと、参考菌株との比較が必要である。ある地方での分離株は、参考菌株の性状と異なる独特の性状を示すことがある。参考菌株と地方分離株との間の差異の観察は、疫学的展望から、また、地方分離株の同定を可能にする独特的特徴を明らかにする点において重要である。今日実施できる型別法は、必ずしも満足すべき結果を与えるものではないので、専門の検査室やエキスパートセンターは、分離株の特徴づけに血清学的、および遺伝学的方法を組合せて実施することがある。

## 第VI章 伝播と暴露

### 伝播

#### レプトスピラ病の伝播様式はなにか？

ヒトのレプトスピラ感染は、主に感染動物の尿への直接、または間接的暴露から起こる。感染動物組織の取り扱い、汚染食品や水の摂取からの病原体の伝播様式もある。生きたレプトスピラを含む尿または他の体液との直接、または間接的な接触を介して、レプトスピラは、ある保有動物から他の動物へ伝播する。農場動物間での別の伝播様式、即ち、先天的または新生感染もある。レプトスピラの性的伝播も、例えばラット、ウシ、ブタ、イヌの交配において報告されている。

### 感染の侵入門戸

#### 如何にしてレプトスピラはヒトや動物の体内に侵入するか？

レプトスピラは、皮膚の切り傷や擦過傷を通して、無傷の粘膜（鼻、口、眼）を通して、そして多分、水に浸った皮膚を通して、ヒトへの侵入を果たすことができる。レプトスピラは、ときに尿飛沫の吸入や飲料水を介して、ヒトの体内に侵入する。

### ヒトからヒトへの伝播

#### レプトスピラはヒトからヒトに伝播できるか？

答えはイエスである。しかし、稀である。レプトスピラは、ヒトからヒトに性交により、母から胎児に経胎盤的に、また、母乳を介して子供に伝播される。レプトスピラ症患者の尿は感染性であると考えるべきである。レプトスピラは血液から培養できるので、血液は発病前のしばらくの間（次節 輸血を見よ）、また、発病後、最初の7～10日は感染性があると考えるべきである。

### 輸血

#### レプトスピラは輸血によって伝播されるか？

レプトスピラは感染後、いつ血中に現われるかは正確には分かっていない。感染したヒトが発病する前の潜伏期の間、レプトスピラは血中を循環し、輸血を介して伝播されることが考えられる。しかしながら、発病後、1週間前後に抗体が現われ、通常、血中からレプトスピラは排除される。回復後、持続する、おそらく感染防御に働く抗体は、血液とほとんどの組織からのレプトスピラの排除を促進する。しかし、免疫学的に隔離された場所、例えば眼では、レプトスピラは長期間生き続けることがある。将来、PCRのような迅速法が、輸血用血液中のレプトスピラの検出に使われることが可能になろう。

### 感染リスク

#### 全てのヒトはレプトスピラに感染する同等の機会を持っているか？

感染のリスクは、レプトスピラへの暴露如何にかかっている（解説2）。実際、あるヒト達は暴露の高いリスクがあり、リスク集団はこれを根拠に定義される。ある国では、例えば、米作のような日常活動において、実際に全住民が汚染水への高い頻度の暴露の結果、感染リスクが高い状

態にある。

## リスク集団

### リスク集団とはなにか？

リスク集団は、職業上またはレクリエーション活動において、よりレプトスピラに暴露され易い一定のヒトの集団である。レプトスピラ感染には多数の潜在的感染源があり、また、多様な伝播の機会があるので、リスク集団は地域ごとに異なる（解説2、考えられるリスク要因のリストを見よ）。

しかしながら、多くの熱帯地方では、伝播様式は十分に解明されていない。熱帯地方におけるリスク集団を明らかにしようとしたとき、レプトスピラ症の集団発生に特別の注意を払うことが重要であろう。レプトスピラ症の疫学は動的である。農業または社会的慣習、あるいはその地域における保有体動物数の変化の結果として、新しいリスク集団が形成されることがある。

継続的なサーベイランスと報告システムの確立が強く勧められる。

この病気の負担は住民全体からみれば小さいものであるが、ある特定の小集団では非常に大きいものである。

## 地域流行または流行

### レプトスピラ症は地方病か、あるいは流行病か？

レプトスピラ症は多くの国、多分、全世界で地方病となっている。それは降雨量の増加、または気温上昇に伴って増加するなど、季節的分布を示す。しかしながら、レプトスピラ症は一年中を通して発生し得る。流行は多分ヒトの行動の変化、動物、または水の汚物汚染、保有体動物密度の変化と関連し、あるいはサイクロン（台風）や洪水のような自然災害の結果として起こる。

## 第VII章 予防と対策

### 予防と制御(control)

#### レプトスピラ症は如何にして予防し、制御できるか？

レプトスピラ症の制御は、多数の血清型と感染源、伝播条件の幅広い相違のため、複雑で、また、その地方の条件に依存する。イヌや家畜のような保有動物集団の場合、レプトスピラ保有動物の制御、あるいは感染を減少させることにより、レプトスピラ症の制御は達成できる。しかし、野生動物の制御は恐らく困難であろう。予防対策は、特定の感染リスク集団に関する情報と、地域の疫学的要因に基づいて策定されなければならない（解説2と3）。

予防と制御は、(a) 感染源、(b) 感染源とヒト宿主の間の伝播経路、あるいは(c) ヒトの感染または病気を標的にすべきである。

### 感染源の制御

#### 感染源は如何にして制御できるか？

特定の地域で、どんな動物種が感染源であるかを確定することは重要である（解説3と4）。その結果、その地域の特定の保有体動物種を標的とした制御対策を実行できるようになる。

対策は下記の事項を含む。

- ある種の保有体の駆除。例。ラット
- ヒトの居住区からの保有体動物のフェンスやスクリーンによる分離
- イヌと家畜のワクチン接種
- ごみの除去とヒト居住区域を清浄に保つこと
- ネズミが生息する場所、特にレクリエーション区域に食べ物を放置しない人々に注意を喚起する

他の例は解説3に示されている。

### 伝播の遮断

#### 伝播は如何にして遮断できるか？

ヒトの感染に対するリスク要因、そして、もし可能ならば、感染源を知っていることは重要である。感染のリスクは、動物の尿、感染動物、または感染環境との接触を避けることによって最小にすることができる。職業上またはレクリエーションでの暴露のように、暴露される可能性がある場合は、感染の機会を少なくするために適当な防御衣類を着用し、傷は防水の手当て用品で保護すべきである（解説3を見よ）。

### ヒトの防御

#### ヒトは如何に防御できるか？

多くはヒトが特定の地域において、いつ、どこで、どのようにして感染したかの詳細な情報を集めることに依存する。そのためには、住民、リスク集団、健康管理者の間で、レプトスピラ症に対する知識の普及につとめることである。その結果、この病気は早期に発見され、早期治療が

可能になる。ドキシサイクリンは、感染と発病に対し多少の予防作用を示すことが報告されている。ある国では、ヒト用のワクチンが入手可能である。しかし、現行のヒト用ワクチンは、それに含まれる血清型にのみ、免疫応答を惹起することしかできない点に注意しなくてはならない(下記のヒトに対する免疫処置とさらに詳細な情報記載の解説3を見よ)。

## ヒトに対する免疫処置

### ヒトは免疫処置によって防御可能か?

ワクチンによる免疫は、ある程度の防御効果を与える。ワクチンは、原則としてレプトスピラ死菌の懸濁液である。感染防御は、大部分が血清型特異的である。多くの血清型がレプトスピラ症を引き起こす地域では、ワクチンは地域に流行している血清型に対応する、種々の血清型から構成されなくてはならない。ある国、例えば多くの血清型が存在する中国のような国では、ワクチンは最も流行するいくつかの血清型の混合物からなる。防御抗体は、使用されるワクチン中に存在する血清型に対してのみ産生される。

### ワクチン:長所と短所

#### 免疫することの長所と短所はなにか?

ヒト用のワクチンに関する情報は限られており、ワクチンはある特定の国でしか入手できない。ワクチンは、ある程度の防御効果を与えることが報告されている。したがって、重篤なレプトスピラ症が発生し、医療サービスの利用が限られ、または治療の遅れがちな地域において特に重要である。しかしながら、防御効果は比較的短期間しか持続せず、また、抗体の防御力価を維持するために、一定間隔での追加免疫が必要である。ワクチンは、注射部位の疼痛や発熱のような副作用がみられることもある。

## 動物に対する免疫処置

### 動物は免疫できるか?

動物は、レプトスピラ死菌体の懸濁液からなるワクチンで免疫できる。感染防御は、大部分血清型特異的である。免疫は、発病を阻止するかもしれないが、必ずしも腎臓での保菌化を阻止できるとは限らない(解説3)。

## 汚染除去

### 環境中の病原レプトスピラは制御できるか?

建物の床のような小さな領域は、消毒し、浄化することが可能である。しかし、湖や川のような広い自然界の領域を消毒することは不可能である。レプトスピラは、多くの環境要因に感受性である。レプトスピラは消毒薬や乾燥により急速に死滅する。しかしながら、動物尿中に排出されたレプトスピラは、例えば、中性または微アルカリ性の湿った土壤や地表水のような適当な条件下では、数週間から数ヶ月間、環境中で生存できる。

## 第Ⅴ章 診断サービス、サーベイランス、および集団発生の管理

### 検査室支援

検査室支援を提供しようとした場合、どんな検査が行われるべきか？

多くは地域の条件（解説4）によるが、以下の事項を考慮すべきである。

- 健康管理が、施設と財源に関して著しく限られている地域では、レプトスピラ症の調査は簡単な血清学的スクリーニング法に限られるであろう。
- もし、検査設備と財源が許すならば、様々な病態のレプトスピラ症の血清診断を行えるよう広範囲の反応性抗原（属特異性抗原、訳者註）を用いる IgM-ELISA または類似の試験法の開発、あるいは導入を勧める。試験キットは、多くの市販元（解説15）から購入、あるいは自家調製が可能であろう。
- 財源が確保でき、レファレンス/委託検査室の設立のための国家援助があれば、診断法に顕微鏡凝集試験（MAT）も追加するべきである。MAT と属特異試験（例、ELISA）を組み合わせることで、レプトスピラ感染を確定でき、また、起因血清型を決定できることは稀であるが、感染血清群を決定することができる。
- MAT を行うことができる検査室では、MAT を実施するためにレプトスピラ株を維持していく必要があるので、血清学的に確定診断を行えることに加え、レプトスピラの分離培養もできる。

経験豊富な職員のいる設備が整った検査室では、PCR を正しく行うことも可能であろう。

### 地域社会の診断サービス

地域社会において診断サービスをどのように提供できるか？

診断サービスのためには、下記のような3つないし4つの水準の診断能力が想定される。

第一水準 これは健康管理の最も低い水準である。抗レプトスピラ抗体に対する簡単なスクリーニング法が利用できるようにしなければならない。

第二水準 適度に複雑な血清学的方法と、多分、培養の取扱いができる、第一水準での観察所見を点検できる。

第三水準 ここでは全ての複雑な診断法、第二水準での知見の点検ができる、また、品質管理を行う。公衆衛生目的のため、分離レプトスピラの暫定的な型別も実施することができる。

第四水準 国立、または国際レファレンスラボラトリ、あるいは他のエキスパートセンターの水準である。これは検査室において、レプトスピラ株を維持し、型別を行い、他の検査室で行われた検査結果を点検できる。

感染源や伝播様式の疫学的研究を実施できる検査室は、レプトスピラ症の監視、また、制御対策の導入と評価において特に重要である。

## 公衆衛生への影響

もし信頼すべき通報システムがない場合、公衆衛生当局はどのようにレプトスピラ症の発生とヒトの健康への影響を調査するか？

以下に論じる幾つかの可能性がある（解説4）。

臨床検体、特に血清は、レプトスピラ症の臨床症状に適合する患者をもつ病院から集めることができる。これらの検体は、試験の実施可能な検査室で検査すべきである。この方法で、重症のレプトスピラ症発生に関する情報が得られるであろう。しかしながら、軽症例は見逃されてしまうかもしれない。何故なら、軽症患者は入院することがないからである。したがって、レプトスピラ症の発生が疑われる地域社会では、医師は患者に臨床検体を提供するよう求めるべきである。そして、これら検体は、適切な検査室で検査しなくてはならない。求める検体は、ペア血清（例えば14日以上間隔をおいてとる；勿論、迅速な結果が要求される時、サンプル採取間隔は短縮できる）、および培養のための全血（ヘパリン処理済み）である。

血液検体は、既知のリスク集団から集め、レプトスピラ抗体を調べることもできる。そのようなリスク集団には、レプトスピラ症であったかもしれない過去の病気について問診を行わなくてはならない。

無作為血液検体は、抗体保有率を決定するために検査されるべきである。無作為血液検体は、一般的の健康な住民からも集め、抗体検査を実施する。しかしながら、このような検体採取法は、前に記載した方法に比べると有用性は低い。例えば、ハワイでのレプトスピラ症の高率発生地域における調査では、検体が数百人の血液提供者から集められたが、全体の抗体保有率は約0.5%で、非常に低い抗体価がみられたに過ぎなかった。熱疾患で入院、または通院している患者の血清学的評価は、未確認のレプトスピラ症の発生を察知するための手がかりをより多く与えてくれるであろう。一方、既知のハイリスク集団に属するヒトから血液検体を集めることは、感染の流行の程度を評価、または確認するのに有用であろう。このような抗体保有率の調査は、レプトスピラの暴露を反映するかもしれないが、必ずしも明白なレプトスピラ症の発生動向を反映するものではない。

## 保有動物の解明

環境におけるレプトスピラの動物源を明らかにすることはできるか？

レプトスピラ感染の源となる動物は、血清学的試験、並びに組織や尿の培養により明らかにすることができる。

血清学的試験によって、結果は迅速に得られるが、それは感染率と流行している血清型に関する限られた情報のみである。動物は検出可能な抗体をもたないで、レプトスピラを保持することもある。

培養は、他の細菌などの混入を受けやすく、6カ月にも及ぶ長期間の培養が必要である。しかしながら、培養により感染血清型の最終的な同定を行うことができる。動物種により、レプトスピラ症による病態は異なる。げっ歯類は通常病気の徵候を示さない。しかし、それらげっ歯類は、一度感染すると尿中に終生レプトスピラを排出する。ウマや他の動物も感染するが、ヒトにレプトスピラ症を伝播する主要な保有動物であるイヌ、ウシ、ブタではそれぞれ異なる病型を示す。感染源動物の調査は、ある地域における主要な保有体、その種における感染の広がり、並びにその種の地域ごとの感染率の変化を調べるのに有用である。

ヒトの検査用に開発されたラテックス凝集試験および間接血球凝集試験は、おそらく動物にも利用することができるけれども、多くのレプトスピラ症のスクリーニング試験は、動物においてはいまだ十分評価されていない。そして、いくつかの試験、例えば、ELISA は、被験動物種から作製した標識抗体を必要とするなどの問題もある。もし可能であるならば、MAT を行うべきである。MAT は、感染を引き起こしている血清群/血清型に関する情報をも提供するであろう。しかしながら、血清検体採取はげっ歯類では不適当である。何故なら、多くの感染げっ歯類は、抗体応答を示さないために、感染が過小評価されることになるからである。げっ歯類において診断感度を最大にするには、腎臓からの培養と MAT による血清学的調査の両方を必要とする。

安樂死させた動物からの腎臓組織の培養は、動物のレプトスピラ感染を検出する最も信頼のおける方法である。腎臓試料（0.5 cm×0.5 cm）を動物から無菌的に採取し、滅菌した器具で磨碎、あるいは小さな切片にする。これを雑菌の増殖を抑え、かつレプトスピラの増殖に影響しない5-フルオロウラシルなどの適当な抗菌薬を含む培地に接種する（解説 12）。

げっ歯類調査では、動物は生きたまま捕獲する必要がある。ブタやウシの調査は、屠畜場で動物を屠殺した後、腹腔を開き内臓を摘出する時に行われる。

生きている家畜の尿からの培養は難しく、試料は容易に雑菌で汚染されるけれども、実施は可能である。動物には尿量を増やすため利尿剤を投与してもよい。生殖器は消毒液（クロルヘキシジン）で洗浄し、滅菌乾燥布で拭き取るべきである。中間尿検体はかき混ぜないように注意して、滅菌容器に集める。検体は2時間以内に処理すべきで、遠心分離を行い、その沈渣を組織検体取り扱いの項で述べたように（解説 12 も参照）、汚染雑菌の増殖を抑える選択培地中に接種する。

## 環境中のレプトスピラの検出

### 環境中の病原性レプトスピラは検出できるか？

水と土壤検体は培養し、病原性レプトスピラの増殖を調べることができる。しかしながら、そのような試験は完了するまで数週から数ヶ月を要する。したがって、その結果は遅延的で、検体が得られた時と場所にのみ適用できる。PCR を試みることはできるが、17 ページの PCR の長所と短所に概説したのと同じ難点がある。実験動物もレプトスピラ分離のための歩哨動物として使用されている。

環境採取検体の培養感度は低い。保有動物から排出された病原性レプトスピラが生存する環境中には、非病原性レプトスピラも生存しており、したがって、これが病原性レプトスピラの検出を妨害することがあることを、念頭におくことは重要である（解説 7）。

## レプトスピラ汚染の可能性

### 環境の検査で病原レプトスピラは検出できるか？

培養と型別により、環境中の病原性レプトスピラの存在を証明することは、疫学的に意味のあることである。しかしながら、レプトスピラは増殖が遅いので、結果を得るのに数週間から数ヶ月間を要する。培養が陰性でも、病原性レプトスピラの存在を否定はできない。また、レプトスピラが環境中に存在していても、偏在しているかもしれない。したがって、採取された場所の検体には、レプトスピラは存在しないかもしれない。さらに、検体が採取された時には、環境中に病原性レプトスピラは存在していなかったかもしれないが、その後、間もなく感染動物により汚染されてしまうこともあるだろう。

## **環境の安全性**

**その地表水は水泳、水浴びあるいは他のレクリエーションを行っても安全であると明言することができ  
るか？**

もし、感染動物が存在し、地表水に近づくことができたならば、その環境は当然病原性レプトスピラで汚染され、感染の危険性があると、論理的には推測される。したがって、その地表水は安全であると断言することはできない。なぜなら、その水域の各地点で水検体を採集し、検査することは困難であるからである。培養やPCR、あるいは他の適当な方法により、水中の病原性レプトスピラを検出することは、検体を採取したその時点、その場所で、その水中にレプトスピラが存在していたという証拠であり、感染のリスクがあつたことを明確にする。しかしながら、検出されなかつたからといって、それは、必ずしも病原性レプトスピラが存在しないことを意味するわけではない。

病原性レプトスピラの存在が、感染を引き起こすか否かは、レプトスピラの濃度、暴露時間、レプトスピラが人体に侵入できる可能性など多くの要因に依存する。

病原性レプトスピラによる地表水の汚染が疑われる場合は、感染源となる動物がその地表水の周辺に棲息するか否かを調査し、汚染の可能性を評価する。このことは伝播が考えられる全ての状況にあてはまる。

## **リスクに関する助言(旅行者、観光客、職業またはレクリエーション上のリスク集団など)**

**レプトスピラ感染のリスクについて尋ねてきた人にどんな助言を与えることができるか？**

個人、とくに既知のリスク集団に属する人達（解説2）に対して、動物が棲息する環境と関連する潜在的なレプトスピラ症のリスクを理解させなければならない。そこで、個人は、解説3で概説するような感染に対して予防的手段をとった方がよい。暴露のリスクが高い場合は、医師は、レプトスピラ症感染のリスクに対して、抗菌薬の副作用のリスクとのバランスを勘案しつつ、ドキシサイクリンの予防的服用を考慮した方がよい。職業上、あるいはレクリエーションや社会環境により感染のリスクがある場合、そのリスク集団にはレプトスピラ症の症状を知らせておき、もしレプトスピラ症を疑う症状が発生した時は、直ちに医療機関にいき、医師などに暴露の可能性について知らせなければならない。

## **地方流行レプトスピラ症**

**流行地域では制御対策はどのように計画されるべきか？**

多くの保健部局では、一人または少人数のグループが、他の疾病と一緒に、レプトスピラ症のサーベイランスと制御に責任を負うであろう。その地域において、レプトスピラ症が主要な問題である場合、地域社会で制御対策の展開を促進する特別委員会を組織することは有益である。そのような委員会は、通常、公衆衛生の専門家を中心に、問題に関連するいろいろな専門分野を代表する委員で構成される。委員には公衆衛生疾患サーベイランスの専門家、公衆衛生研究所職員、げつ歯類制御専門家、その地域の大学の代表者（公衆衛生疫学者、感染症、予防医学、環境衛生並びに安全の専門家、および獣医師）、開業医、ウシの畜産・酪農家、養豚業者、地域公園とレクリエーション、漁業と野生生物、農業担当の公務員、予防医学に関与する防衛・防災関係者が含まれる。同時に、特別委員会は、地域社会における効果的な制御と予防対策の計画と実施、また、

衛生教育の機会を増大させる方策をより効果的なものにすることができる。具体的な例は解説3と4に記載されている。

## レプトスピラ症に類似した病気の発生

### レプトスピラ症に一致する症状の病気の発生がある時、どんな対策をとるべきか？

レプトスピラ症は、他の熱性疾患と混同され易い。洪水を起こすような気象条件は、レプトスピラ症だけでなく他の病気のリスクも増加させるだろう。予期しない熱性疾患が発生したときの早期の対応の中には、レプトスピラ症の迅速なスクリーニング試験を含めるべきである。

多くのウイルス感染症とは対照的に、レプトスピラ症には効果的で特別な治療法がある。したがって、可能なところでは、レプトスピラ症を診断する試みは奨励されるべきであり、その結果、適切な抗菌薬と他の対症療法による迅速な治療が可能になる。

これには、検査のための臨床検体の採集が必要である。遠隔地域での発生に際しては、抗体検出のスクリーニング試験をその場で行うことは有益である。しかしながら、そのような検査の限界、とくに、抗体は発病後、少なくとも5～6日までは検出できないという事実を理解させなければならない。

保有体動物を検出するには、家畜やペット、野生動物のレプトスピラ感染を血清学的、または培養により調査しなくてはならない。ここで得られる知見は、レプトスピラ症患者における知見に匹敵すべきものである。

レプトスピラ症の発生が診断試験により疑われ、または確認された場合、感染リスク集団の人達に適切な情報を与えなければならない。情報提供は、報道発表（病気の確定、発病した人達に対して適切な医学的処置を行うよう求めることの重要性、および暴露を限定し、防止する手段に関する情報の提供）、ならびに、病気発生が少数の原因、例えば湖に限られる時など、警告表示板を設置することを含んでいる。より明確な助言が解説3と4に記載されている。

## 解説 1

### エキスパートセンターと国際レプトスピラ症学会 (ILS)の連絡先

#### I. Collaborating Centres

WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Leptospirosis Reference Laboratory, Queensland Health Scientific Services, 39 Kessels Road, Coopers Plains, QLD 4108, Australia  
Dr L. D. Smythe, Tel: +61 7 3274 9064; Fax: +61 7 3274 9175; E-mail: smythe@health.qld.gov.au

FAO/WHO Collaborating Centre for the Epidemiology of Leptospirosis, Laboratoire des Leptospires, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris cedex 15, France  
Dr G. Baranton, Tel: +33 1 4568 8337; Fax: +33 1 4061 3001; E-mail: gbaran@pasteur.fr

WHO/FAO Collaborating Centre for the Epidemiology of Leptospirosis. Israel Institute of Biological Research, P.O. Box 19. Ness-Ziona 70450, Israel  
Dr A. Bamea, Tel: +972 8 938 1656; Fax: +972 8 940 1404

WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Koninklijk Instituut voor de Tropen /Royal Tropical Institute (KIT), KIT Biomedical Research. Meibergdreef 39, NL-1105 AZ Amsterdam. The Netherlands

Dr R. A. Hartskeerl, Tel: +31 20 566 5438 / 40; Fax: +31 20 697 1841; E-mail: R.Hartskeerk@kit.nl  
Web site: www.kit.nl

WHO Collaborating Centre on the Epidemiology of Leptospirosis, Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Gamaleya Street 18, 123098 Moscow, Russian Federation  
Dr J. V. Ananyina, Tel: +7 095 193 3001; Fax: +7 095 193 6183; E-mail: 1570.g23@g23.relcom.ru

FAO/WHO Collaborating Centre for the Epidemiology of Leptospirosis, Institute of Epidemiology, Medical Faculty of the Comenius University, Spitalska 24, 81372 Bratislava, Slovakia  
Professor P. Bakoss, Tel: +421 2 5935 7488; Fax: +421 2 5935 7506; E-mail: epidem@uniba.sk

WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Leptospira Reference Unit. Public Health Laboratory, County Hospital, GB-Hereford HR1 2ER, United Kingdom.  
Dr T. J. Coleman, Tel: +44 1432 277 707; Fax: +44 1432 351 396;  
E-mail: martin.palmer@hh-tr.wmids.nhs.uk

WHO Collaborating Centre for Leptospirosis, Meningitis and Special Pathogens Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Service, Department of Health and Human Services, Atlanta, GA 30333, USA  
Dr P. N. Levett, Tel: +1 404 639 2743; Fax: +1 404 639 4421; E-mail: pel5@cdc.gov

## **II. Reference Centres**

Leptospira Laboratory, Ministry of Health, Lower Collymore Rock, Enmore 2, St. Michael, Barbados  
Dr C. Edwards, Tel: +1 246 427 5586; Fax: +1 246 429 6738; E-mail: cedwards@sunbeach.net

National Reference Centre for Diagnosis and Research on Leptospirosis, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Dr M. M. Pereira. Tel: +55 21 270 6565; Fax: +55 21 280 0754; E-mail: [mpereira@ioc.fiocruz.br](mailto:mpereira@ioc.fiocruz.br)  
Web site: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br) or <http://labcentres.ioc.fiocruz.br>

Chinese Academy of Preventive Medicine, Institute of Epidemiology and Microbiology, P.O. Box 5, ChangPing, Beijing 102206, People's Republic of China

Professor Jiang XiuGao, Tel: +86 10 6978 9319; Fax: +86 10 6978 0233; E-mail: [xiugaoj@163.net](mailto:xiugaoj@163.net)

Ministry of Health, National Institute for Control of Pharmaceutical and Biological Products, Temple of Heaven, Beijing. People's Republic of China

Dr Qin JinCai, Tel: +86 10 670 1775-404/352

Leptospira Laboratory, Consiliar Laboratory, Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine, Diedersdorfer Weg 1, D - 12277 Berlin, Germany

Dr A. Schönberg, Tel: +49 1888 41 2 2056; Fax: +49 1888 41 2 2000; E-mail: [a.schoenberg@bgvv.de](mailto:a.schoenberg@bgvv.de)  
Web site : [www.bgvv.de](http://www.bgvv.de)

National Leptospirosis Reference Centre, Regional Medical Research Centre, Indian Council of Medical Research, Post Bag No. 13. Port Blair 744101, Andaman and Nicobar Islands, India

Professor S.C. Sehgal. Tel: +91 3192 51 158/51043; Fax: +91 3192 51 163 / 33660: E-mail: [publicmr@sancharmet.in](mailto:publicmr@sancharmet.in)

National Centre for Leptospirosis, Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica. Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, I-00161 Rome, Italy

Dr L. Ciceroni, Tel: +39 06 4990 2741; Fax: +39 06 4990 2934 / 4938 71 12; E-mail: [ciceroni@iss.it](mailto:ciceroni@iss.it)

Spirochete Laboratory, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste, Via Fleming 22, I-341 27 Trieste, Italy

Professor M. Cinco. Tel: +39 040 676 7178; Fax: +39 040 56 822; E-mail: [cinco@univ.trieste.it](mailto:cinco@univ.trieste.it)  
Web site: <http://pdf.univ.trieste.it/spirolab/>

Leptospira Laboratory, Institut Pasteur of New Caledonia, 9-11 Paul Doumer Street. PO Box 61, 98845 Noumea cedex, New Caledonia

Dr P. Perolat. Tel: +687 270 280; Fax: +687 273 390; E-mail: [perolat.Pasteur.@canl.nc](mailto:perolat.Pasteur.@canl.nc) or

pperolat@pasteur.nc

National Leptospirosis Reference Center, US Department of Agriculture / ARS, National Animal Disease Center, Zoonotic Diseases Research Unit, P.O. Box 70, Ames, IOWA 50010, USA

Dr R. L. Zuerner, Tel: +1 515 663 7392; Fax: +1 515 663 7458; E-mail: rzuerner@nsdc.ars.usda.gov

State of Hawaii, Department of Health, Epidemiology Branch, Zoonoses Section, P.O. Box 3378, Honolulu HI 96801, USA

Dr D. M. Sasaki, Tel: +1 808 586 4586; Fax: +1 808 586 4595; E-mail: dmsasaki@mail.health.state.hi.us

### **III. International Leptospirosis Society (ILS)**

International Leptospirosis Society (ILS), c/o KIT (Koninklijk Instituut voor de Tropen / Royal Tropical Institute). KIT Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1 105 AZ Amsterdam, The Netherlands

Dr L. D. Smythe, President; Dr R. A. Hartskeerl, Secretary; Dr P. N. Levett, Adjunct Secretary

Tel: +31 20 566 5438; Fax: +31 20 697 1841; E-mail: R.Hartskeerl@kit.nl

web site: www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ilspage.htm

## 解説 2

### リスク要因とリスク集団

レプトスピラの暴露はヒトと感染動物、あるいはレプトスピラで汚染された環境との接触により起こる。風土病として知られるレプトスピラ症の病名（例えば水田熱, rice field fever; サトウキビ刈入れ病, cane cutter's disease; ブタ飼い病, swineherd's disease; 酪農熱, dairy farm fever; 泥濘熱, mud fever）は、その伝播環境を表している。レプトスピラ暴露の程度と質は、以下の例に示すような職業、余暇活動、社会活動に依存している。

- ウシを飼育している家畜農家は、ウシを扱うとき、とりわけ搾乳時や、死亡あるいは流産した胎児や、分娩時の産物、例えば羊水や胎盤に触れたり、あるいは、感染牛が放尿した時の飛沫に接触した場合、レプトスピラの暴露を受ける。
- 養豚農家はブタの世話をする際にレプトスピラの感染する可能性がある。
- 野菜農家や園芸家は、直接、あるいは、間接的にレプトスピラの感染したげっ歯類や、その尿に接触することにより感染する危険性がある。
- 農民は農地を灌漑する際、げっ歯類や他の動物の尿によって汚染した水に接触し感染する危険性がある。
- 稲作従事者は、特に裸足で作業した場合、げっ歯類や水牛（例えば耕運に利用）の尿で汚染された水に接触することにより感染する危険性がある。
- 獣医師やペット飼育者は、レプトスピラ症の症状を示している、あるいは、感染死した、さらには、無症状でレプトスピラを排菌をしているような保有動物に接触することにより感染する危険性がある（ウシ、ブタの飼育農家にもあてはまる）。
- 屠畜場労働者や食肉処理場労働者は感染動物屠殺時、感染した屍体や腎臓など臓器を扱う際に感染する危険性がある。
- 食品加工に関わる人々は衛生管理が不備で、ラットが出没する環境に暴露されると感染する危険性がある。
- 下水関連施設の労働者は、ラット尿で汚染された水から感染する危険性がある。
- サトウキビ栽培に関わる労働者は、畑に生息するラットの尿で汚染されたサトウキビを収穫する際、接触感染する危険性がある。
- 鉱山労働者は、鉱山でラットの尿で汚染した水に曝され、感染する危険性がある。
- 酪農従事者は牛の世話をする際に感染する危険性がある。
- 家畜に接触のあるような場所に生活する人々も、それらの動物が感染していた場合に暴露を受ける危険性がある。
- 近海で漁業に従事する労働者や魚／エビの養殖業者でも、感染が起こりうる。特に、その地域の環境や沿岸地表水が汚染している場合には、感染が起こる危険性がある。
- 軍人、猟師、ハイカーは、汚染した地表水、沼地を歩いて渡ったり、汚染した土、泥、植物の上を歩いたり、動物に接触したときに感染する危険性がある。
- 子供達は、イヌ、ブタ、ラットなどの動物によって汚染された庭（雨の水溜りや泥）で遊んだ場合、感染する危険性がある。

- レジャーや余暇活動（水泳、セーリング、カヌーやいかだ下り、洞窟探検、峡谷探検、釣りなど）に参加したり、事故（車、ボートの事故）に巻き込まれた者は、汚染した水面に接触し、感染する危険性がある。特に頭まで水面下に浸かり、長くいた場合はなおさらである。これは、旅行者がジャングル探検やアウトドアスポーツに参加した場合もあてはまる。
- 飲料水の消毒が不適切であった場合、集落全体に感染が起こる可能性がある。
- レプトスピラ症や他の人獣共通感染症の診断や研究に従事する職員、特に野外調査を行う職員は感染する危険性がある（解説 17 参照）。

レプトスピラ症は、田舎に特有の病気だと考えられているが、都市に住む人々も感染の可能性がある。特に感染したラットから暴露を受ける可能性がある。その暴露リスクは、生活環境、および家の中とその地域の両方の衛生環境のレベルに依存する。また1つの都市の中でも、その地域ごとの衛生環境に依存する。レプトスピラ症患者は通常女性より男性が多い。このことは男性が職業上、暴露の機会が多いことを反映しているかもしれない。同様の理由で、青年、中年男性は、少年、老年男性よりレプトスピラ症の罹患者が多い。

レプトスピラ症の集団発生は、洪水、ハリケーンのような自然災害の後に起こることが報告されている。

## 参考文献

- P. Bovet, C. Yersin, F. Merien, C.E. Davis, P. Perolat (1999). Factors associated with clinical leptospirosis: a population-based case-control study in the Seychelles (Indian Ocean). *International Journal of Epidemiology*, 28:583-590.
- B. Cacciapuoti, L. Ciceroni, C. Maffei, F. Di Stanislao, P. Strusi, L. Calegari, R. Lupidi, G. Scalise, G. Cagnoni, G. Renga (1987). A waterborne outbreak of leptospirosis. *American Journal of Epidemiology*, 126(3):535-545.
- E. R. Campagnold, M. C. Warwick, Jr H. L. Marx, R. P. Cowart, Jr H. D. Donnell, M. D. Bajani, S. L. Bragg, J. E. Estaban, D. P. Alt, J. W. Tappero, C. A. Bolin, D. A. Ashford (2000). Analysis of the 1998 outbreak of leptospirosis in Missouri in humans exposed to infected swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 216(5):676-682.
- Centers for Disease Control and Prevention (1995). Outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *Journal of the American Medical Association*, 274(21):1668.
- Centers for Disease Control and Prevention (1998). Update: Leptospirosis and unexplained acute febrile illness among athletes participating in triathlons-Illinois and Wisconsin, *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 47:673-676.

Centers for Disease Control and Prevention (2001). Update: Outbreak of acute febrile illness among athletes participating in Eco-Challenge-Sabah 2000 - Borneo, Malaysia, 2000. Morbidity and Mortality Weekly Report, 50:21-24.

A. Corwin, A. Ryan, W. Bloys, R. Thomas, B. Deniega, D. Watts (1990). A waterborne outbreak of leptospirosis among United States military personnel in Okinawa, Japan. *International Journal of Epidemiology*, 19(3):743-748.

R. van Crevel, P. Speelman, C. Gravekamp, W. J. Terpstra (1994). Leptospirosis in travelers. *Clinical Infectious Diseases*, 19:132-134.

C. O. R. Everard, G. A. Ferdinand, L. V. Butcher, J. D. Everard (1989). Leptospirosis in piggery workers on Trinidad. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92:253-258.

C. O. R. Everard, S. Bennett, C. N. Edwards, G. D. Nicholson, T. A. Hassell, D. G. Carrington, J. D. Everard (1992). An investigation of some risk factors for severe leptospirosis on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95:13-22.

A. R. Katz, S. J. Manea, D. M. Sasaki (1991). Leptospirosis on Kauai: Investigation of a common source waterborne outbreak. *American Journal of Public Health*, 81 (10): 1310-1312.

Ko Al, M. G. Reis, C. M. R. Dourado, W. D. Johnson, L. S. Riley (1999). Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*, 354:820-825.

Leptospirosis in India-Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999 (2000). *Weekly Epidemiological Record*, 75(27):217-223.

C. G. Mackintosh, L. M. Schollum, R. E. Harris, D. K. Blackmore, A. F. Willis, N. R. Cook, J. C. J. Stoke (1980). Epidemiology of leptospirosis in dairy farm workers in the Manawatu. Part I: A cross-sectional serological survey and associated occupational factors. *New Zealand Veterinary Journal*, 28:245-250.

M.V. Murhekar, P. Vijayacharl, S. Sharma, S. C. Sehgal (1998). Risk factors in the transmission of leptospirosis infection. *Indian Journal of Medical Research*, 107:218-223.

N. F. Onyemelukwe (1993). A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96:301-304.

E. J. Sanders, J. G Rigua-Perez, H. L. Smits, C. C. Deseda, V. A. Vorndam, T Aye, R. A. Spiegel, R.S. Weyant, S. I. Bragg (1999). Increase in leptospirosis in dengue-negative patients after a hurricane in Puerto Rico in 1996. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61: 399-404.

D. M. Sasaki, L. Pang, H. P. Minette, C. K. Wakida, W. J. Fujimoto, S. J. Manea, R. Kunioka, C. R. Middleton (1993). Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:35-43.

S. C. Sehgal, P. Vijayachari, M. V. Murhekar, A. P. Sugunan, S. Sharma, S. S. Singh (1999). Leptospiral infection among primitive tribes of Andaman and Nicobar Islands. *Epidemiology and Infection*, 122:423-428.

S. C. Sehgal, A. P. Sugunan (2000). Leptospirosis in Andamans-Epidemiological considerations. Leptospirosis in Western Pacific and South East Asia. In: *Proceedings of the Regional Seminar - Workshop on Leptospirosis*. Manila, WHO Regional Office for the Western Pacific. (unpublished document; available in electronic form from: WHO Western Pacific Regional Office, e-mail: <mailto:crs@wpro.who.int>):45-56.

R. D. Shaw (1992). Kayaking as a risk factor for leptospirosis. *Missouri Medicine*, 89:354-357.

## 解説 3

### レプトスピラ症の制御

#### A3.1 はじめに

以下の事象に介入することで、レプトスピラ症の制御が可能である。

- 感染源（保有体／保菌動物／病原体排出宿主）に対して
- 伝播経路に対して
- 保菌者のレベルで

また、以下のことを考慮すべきである。

- レプトスピラには多くの血清型があり、多くの動物種が保有体となっている。特定の保有宿主に保持され、ある特定の地域でレプトスピラ症を起こす。
- ヒトに対してはさまざまな感染経路があり、その経路は感染源やその流行する環境に依存する（解説 2 参照）。

前述の見地から、レプトスピラ症を制御するための絶対的な方策を立てることはできない。各々の状況に固有の対策が必要である。対策の例を以下に述べる。

野性動物のレプトスピラ症を根絶することは不可能であるが、小さな限られた集団（イヌ、血統書つきのウシなど）内では、制御することが可能である。

#### A3.2 感染源に対する対策

##### A3.2.1 感染源の動物

レプトスピラは、保菌動物（一般に哺乳動物）、あるいは維持動物宿主の腎臓で生存し、増殖する。レプトスピラを尿中に排出する動物を排出宿主と呼ぶ。

あるレプトスピラ血清型は、通常共生関係にある特定の動物宿主に感染指向性を示す。つまり、その特定の宿主は感染しても発病せず、たとえ発病しても比較的軽症である。感染した動物はレプトスピラを子宮内で、あるいは新生児期に自分の子に感染させる。これら感染した子は、またその子にと次々に感染させていく。このように、感染の連鎖は、宿主を傷害しないことにより維持される。感染を維持することにより、その維持宿主は感染源となる。

維持宿主でないヒトや動物は、二次的に感染を受ける。そのような感染は「二次的」、あるいは「偶発的」感染宿主と呼ばれる。このような宿主は、しばしば感染後、レプトスピラ症を発病する。

自然宿主、あるいは維持宿主と偶発的宿主の区別は必ずしも、明確ではない。特に、伝播が起こりやすい混み合った環境で飼育されている家畜では、はっきりしない。

例外的な感染や、一過的な感染も起こりうる。以下にこれを述べる。

- レプトスピラは新しい宿主に適応できる。レプトスピラ感染が同種動物のある集団内で成立した場合、その新しい宿主は最終的には自然維持宿主となり、さらには病原体保有宿主となるであろう。
- もしその感染が同種動物の集団内で成立しない場合、その動物は自然維持宿主とはなら

ないが、一時的にレプトスピラを保有したり、排菌するようになることはある。

- 維持宿主では、発病し続発症状を伴う場合と、そうでない場合があるが、慢性的な感染が起こることがある。

### A3.2.2 感染源の検出

職業や余暇活動、娯楽に伴う暴露歴の調査は、その感染源を同定するのに役立つ。もし、疑わしい単一の、あるいは、複数の感染源が明らかになったならば、その疑いのある動物がレプトスピラを保菌しているか、尿中に排菌しているかどうかを明らかにするため、検査を行わなければならない。小動物はトラップで捕獲し、動物種を同定した後、安樂死させ、検査のために血液、尿、そして組織（腎臓）を無菌的に摘出す。家畜の検体は、レプトスピラ症検査（可能であれば動物の他の健康診断時に同時に）のために農場で、あるいは屠畜場で採取する。大型の家畜の尿は利尿剤を投与後に、あるいはカテーテルを使って集める。血液は血清診断に使用し、腎臓組織と尿は培養検査に供する。動物から分離されたレプトスピラ株の型別を行い、ヒトからの分離株との比較を行うべきである。

この際に用いる検査方法の限界を知っておく必要がある。動物が、抗体産生無しに保菌動物となることもあるし抗体が存在したからといって現在保菌状態にあることを示すわけではない。培養検査は、培養で増殖しにくいレプトスピラは検出されにくいし、保有体は常時排菌するのではなく断続的に排菌することもある。このように、検査には限界がある。

### A3.2.3 實施可能な対策

対策としては、以下のものがある。

- 感染動物（ウシ／ブタ／イヌ）を隔離する。もし、必要であれば屠殺する。
- レプトスピラの排菌をおさえるために、感染動物に抗菌薬を投与する。
- げっ歯類（ラットやマウス）を殺鼠剤で駆除する。
- げっ歯類や他の野生動物を捕獲する。
- 感染源となるげっ歯類や他の野生動物が、人間の生活環境に侵入しないように、建物や家畜舎にフェンスや網戸を設置する。
- げっ歯類（ラット、マウス）を食品や飲み水に近づけないようにする。すなわち、げっ歯類から防護できる倉庫、食品穀物貯蔵庫、水源、家畜舎、庭、家畜檻を建設し、食べこぼしや食品廃棄物は害獣が届かないような場所に移す。
- 瓦礫やごみを取り除き、背の高い草木を刈りとる。さらに、適切な衛生施設、特に十分な下水施設とトイレを含む廃棄物処理施設を設置し、清浄な水を供給することによって環境を清潔に保ち、ヒトの居住地域にげっ歯類や他の野生動物が棲息しにくくする。
- ペットや家畜にワクチンを接種する。例えばイヌには血清型 *Icterohaemorrhagiae* や *Canicola*、ウシには *Hardjo* や *Pomona* を、ブタには *Pomona* や *Tarassovi* や *Bratislava* を抗原とするワクチンを用いる。
- 家畜の排泄物は他への感染を起こさないような方法で処分すべきである。

### A3.3 伝播経路に対する対策

感染は以下の方法により防止できる：

- 感染防護できるような衣服の着用（ブーツ、手袋、眼鏡、エプロン、マスク）
- 水を通さない包帯などで皮膚の傷を覆う。
- 尿飛沫や汚染土壤・水に触れた後は、洗浄し、シャワーで流す。
- 傷を洗い、消毒する。
- 感染の危険性の程度、感染に対する防護方法、および暴露を最小限にとどめる方法を啓蒙する。例えば、尿の飛沫やエアロゾルとの接触吸入を避ける。病気や死亡した動物、胎児、胎盤、臓器（腎臓、膀胱）を素手で触れないようにする。もし、動物の出産介助にたずさわるのなら、必ず手袋をすることなどである。
- イヌや他の動物の尿を扱う場合は、手袋を着用し、作業後は手を洗う。病気の犬や動物を手当てる場合、感染の可能性があることを認識するべきである。
- あらゆる動物を世話をしたり、扱う際は、厳密に衛生管理規則を遵守し、尿や他の体液との接触を避ける。
- 感染の起こりうる場所では、汚染区域を消毒する（家畜小屋、肉屋、屠畜場などの床を洗浄する）。
- 清潔な飲料水を供給する。
- 汚染していることが判明している、あるいは疑いのある水源（プール、池、川）への接近を禁止したり、適切な警告を行う。
- 米、サトウキビの収穫のような感染危険のある作業を機械化する。
- 適切な家畜管理を行う（飼料を共用することをやめ、レプトスピラが存在しないことを保証された飼料を購入する）
- 検査室内では取り扱い安全基準を作成し、遵守する。

#### A3.4 ヒトの感染に対する対策

ヒトの感染に対する対策を以下に述べる。

##### A3.4.1 認識を高める

レプトスピラ症についての認識を高めることは、一般の人々、リスク集団双方にとって、重要な取り組みである。人々はレプトスピラ症について理解すべきであり、できるなら感染を防ぐ方法、さらにレプトスピラ症の発症が疑われた場合は、直ちに治療を開始すべきことを知っておく必要がある。医師、獣医師は、鑑別診断として、レプトスピラ症を念頭においておくべきである。そして迅速に適切な治療を開始すべきである。また、公衆衛生局やその専門家はその予防法を広めるべきである。

##### A3.4.2 抗菌薬による予防

例えば、検査室での事故、その他感染のリスクが高い場合などレプトスピラ暴露がはつきりしている場合は、十分な抗菌薬治療が必要である。ドキシサイクリンは、非流行地から来たヒトに対して、ある程度の感染予防効果があることが報告されている。たとえ抗菌薬が感染を完全に予防できなくとも、症状を緩和し、致死率、罹患率を下げるることはできる。

### A3.4.3 予防接種

ワクチンが入手可能な国では、公衆衛生上問題がある場合は予防接種を考慮すべきである。現行のワクチンはそれに含まれる血清型、よくても血清群に対してしか感染防御効果を示さないので、その地域で流行する複数の血清型を組み合わせた多価ワクチンを作らなければならない。感染防御効果は一時的であり、追加免疫が必要である。ワクチンは副作用の可能性があり、また、特定の国でしか入手できない。

### A3.4.4 教育

#### 医師の教育と再教育

レプトスピラ症の症状、リスク要因、診断検査法、治療方法に関する情報を認定医や医療従事者に定期的に伝えるべきである。このためには、ダイレクトメール、公衆衛生局等から発信されるニュースレターやレポート、地域の医学ジャーナルの記事、病院、外来診療所での巡回教育講演などあらゆる手段を使って、あるいは、いくつかを組み合わせて行う。医師に常にレプトスピラ症を疑うように意識させることで、レプトスピラ症と確定される症例は増えるであろう。レプトスピラ症の確定診断がなされた症例について、積極的な医師教育プログラムが行われたハワイの医師による正しい初期診断率(62%) (Katz et al, 2001) と米国のその他の地域の医師によるもの(27%) (Martone & Kaufmann, 1979) とを比較すれば、はっきりと教育効果があることがわかる。

#### 地域社会での教育

広く地域社会へ教育を行き渡らせるることは、リスク要因を解明し、疾病の予防法を確立することにつながり、また感染早期にレプトスピラ症を疑う症状を認知して、自ら治療を申し出ることにより、治療期間を短縮し、症状を軽減することができる。以下に地域社会における様々な教育方法について述べる。

- 小冊子は安価に作成できる上、あらゆる場所で入手できるようにしたり、診療所、保健所、農業水産部局、軍隊などに頒布することができる。小冊子では、その病気がどのような臨床症状があり、どのように治療されるか、さらにレプトスピラ暴露を防ぐ方法について記載する。その小冊子は、その地域で最も広く用いられる言語で書かれるべきである。より詳しい情報を知りたい人々のために、問合せ先電話番号を記載する。
- もし、政策的に許されるなら、人々の注意を喚起するよう目立つ色の警告標識を使用する。そのような標識は1つか2つの重要なリスク要因について記載し、それといっしょに詳細な情報の提供のために担当部局とその電話番号などを示す。これらの標識は、レプトスピラ感染リスクの高い人々が見るであろう場所や暴露の可能性がある場所に設置する。
- もし予算が許すならば、厚生担当部局や特別委員会は、解説ビデオを作成するのもよい。そこでは、レプトスピラ症の臨床症状やどのように治療、予防できるかについて述べる。ビデオテープは地域の保健所、図書館、学校に頒布し、さらに、レンタルビデオ店で無料で貸し出す。それらビデオの入手手法に関する情報を、広く宣伝すべきである。
- レプトスピラ症の診断、リスク要因、治療、予防についての情報を示した表、グラフ、

写真付きの掲示板の作成は安価にできる。健康フェア、病院、診療所、学校、図書館にこれを掲示することで、レプトスピラ症の理解促進に役立つ。

- 特別対策委員会は、背中の部分に適当なメッセージを入れたTシャツの製作を考えるべきである。このTシャツをさまざまな教育活動時に着用し、希望者やTシャツ製作費を援助してくれる人たちに配布する。
- レプトスピラ症に対する認識とその予防法に関する理解をより深めるため、対策委員会により作成された広告をバスに掲示する。より詳細な情報を望む人々のために、問合せ先電話番号を記載すべきである。

#### 集団発生の制御に関する情報の伝達

集団発生が起こった場合（ハリケーンや洪水の後など）、医師と一般の人々の双方にその現状と予防法を速やかに知らせる必要がある。

報道機関への情報やメールにより、レプトスピラ症によると思われる発熱疾患を認知することを助け、その疾患の適切な治療方法に関する情報を、医師に提供すべきである。

さらに、新聞報道やラジオ、テレビで、そして可能なら、その集団発生が特定地域に限定される場合、標識・広告を設置することによって、レプトスピラ症の臨床徴候、感染の危険性、できるだけ早期に医師の診察を受けければ抗菌薬で治療が可能であることなどを、一般市民に伝えるべきである。汚染が疑われる水を飲んだり、その水中に潜ったりしないよう、皮膚に傷のある場合、汚染の可能性のある水を使って衣服を洗濯しないようになど、予防法に関する情報も提供すべきである。

ハリケーンに伴う洪水が起こる場合などには、動物の大規模集団発生が起こる危険性があることを人々に知らせるべきである。例えば動物にあらわれる徴候、症状を知らせるとともに、動物が感染を起こす危険を最小限にするために抗菌薬（例えばペニシリン）を投与することや、もし、入手できるならワクチンを投与することなどである。

#### **参考文献**

- B. Babudieri (1957). Schutzimpfung gegen Leptospirosen. *Zentralblatt für Bakteriologie I Abteilung Originale*, 168:280-283.
- Chen Ting-Zuo (1986). Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Annales Immunologiae Hungaricae*, 26: 125-1 51 .
- L. Ciceroni, E. Stepan, A. Pinto, P. Pizzocaro, G. Dettori, L. Franzin, R. Lupidi, S. Mansueto, A. Manera, A. Ioli, L. Marcuccion, R. Grillo, S. Ciarrochi, M. Cinco (2000). Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *European Journal of Epidemiology*, 16:79-86.
- J. C. Frantz, L. E. Hanson, A. L. Brown (1989). Effect of vaccination with a bacterin containing *Leptospira interrogans* serovar bratislava on the breeding performance of swine herds. *American Journal of Veterinary Research*, 50:1044-1047.

A. R. Katz, V. E. Ansdell, P. V. Effler, C. R. Middleton, D. M. Sasaki (2001). Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 1834-1841.

Leptospirosis in India-Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999 (2000). *Weekly Epidemiological Record*, 75(27):217-223.

W. J. Martone, A. F. Kaufmann (1979). From the Centers for Disease Control: Leptospirosis in the United States, 1974 - 1978. *Journal of Infectious Diseases*, 140:1020-1022.

A. Perrocheau, P. Perolat (1997). Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13(2): 161 -167.

D. M. Sasaki, L. Pang, H. P. Minette, C. K. Wakida, W. J. Fujimoto, S. J. Manea, R. Kuniok, C. R. Middleton (1993). Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48(1): 35-43.

S. C. Sehgal, A. P. Sugunan, M. V. Murhekar, S. Sharma, P. Vijayachari (2000). Randomized controlled trial of doxycycline prophylaxis against leptospirosis in an endemic area. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 13:249-255.

M. M. Shimizu (1984). Environmental and biological determinants for the prevalence of leptospirosis among wild small mammal hosts, Island of Hawaii. *International Journal of Zoonoses*, 11 :173-188.

E. T. Takafujl, J. W. Klirkpatnck, R. N. Miller, J. J. Karwacki, P. W. Kelley, M. R. Gray, K. M. McNeill, H. L. Timboe, R. E. Kane, J. L. Sanchez (1984). An efficacy trial of doxycycline chemoprophylaxis against leptospirosis. *New England Journal of Medicine*, 310:497-500.

J. Tappero, D. A. Ashford, B. A. Perkins (2000). Leptospirosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practices of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone: 2495-2500.

M. Torten, E. Shenberg, C. B. Gerichter, P. Neuman, M. A. Klingberg (1973). A new leptospiral vaccine for use in man. II. Clinical and serological evaluation of a field trial with volunteers. *Journal of Infectious Diseases*, 128:647-651.

World Health Organization (1986). *Report of the WHO Consultation on the Development of National Programmes for the Prevention and Control of Leptospirosis, Sapporo, Japan, July 15-16, 1984*. Geneva (unpublished document WHO/CDSNPH/86.62: available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).

World Health Organization (1993). *Report of Discussions of the WHO Working Group on Leptospirosis Vaccine Development and Vaccinology, Nagoya, Japan. March 26-27, 1993.* Geneva (unpublished document VPH/93.122; available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland).

## 解説 4

### サーベイランス

#### A4.1 はじめに

きわめて多様な徴候を呈するレプトスピラ症では、その流行の様式は複雑で多様である。このためレプトスピラ症の制御を始めるにあたっては、サーベイランスによって明らかにされた信頼できる基礎資料が必要である(解説 3)。

レプトスピラ症は全世界で発生しているが、地域ごとの患者の発生率や有病率に関する信頼できるデータは少ない。世界の多くの国々では、レプトスピラ症はおそらく診断で見落され、報告されている患者数は実際より少ないと考えられる。

#### A4.2 症例の確定（罹患率と致死率）

##### A4.2.1 病院内での調査

レプトスピラ症の臨床症状はしばしば非特異的であるため、診断は検査室診断で確認されなければならない。患者が発熱、激しい頭痛、疲労感、筋肉痛、結膜の充血、無菌性髄膜炎様の症状、肺出血を伴う成人呼吸促進症候群、腎不全、黄疸などの症状があった場合は、レプトスピラ症を疑うべきである。患者の年齢、性別、職業、感染源からの暴露歴(場所、日時、動物や汚染された環境との接触の有無)などの情報を収集する。

検査には適正な血清診断と、感染初期の診断には役にはたたないが確定診断のためのレプトスピラの分離培養が含まれる。分離株の血清型別は、その地域内に分布するレプトスピラに関する情報を提供してくれるので、サーベイランスには必須である。さらには分離株の血清型の同定結果と、地域内で発生するレプトスピラ症患者の臨床症状の関連性を調べることもできる。患者の血清学的検査はまた重要ではあるが、免疫学的交差反応がみられるために、起因血清型に関してそこから得られる情報には限りがある。また、病院を中心としたサーベイランスでレプトスピラの公衆衛生学的重要性を評価すると、軽症の患者は病院にはいかないため、より重篤な患者に基づくデータによる偏りがおこることになる。

また、非常に重症例では診断が確定する前の感染初期の段階で患者は死亡し、これらのデータは加えられないことになる。このような症例では、剖検検体からレプトスピラの培養、PCR や免疫組織学的解析により病原体の検出を行うことができる。

##### A4.2.2 血清学的サーベイランス

頭微鏡凝集試験(MAT)によりレプトスピラに対する持続抗体の検出を行うことで、その地域内でのレプトスピラ症の発生率を示すことができる。血清抗体陽性は非常に軽度のレプトスピラ症においても見いだされるので、血清学的サーベイランスはレプトスピラ症の発症よりも、むしろ感染に起因するデータ、つまり公衆衛生上の重要性に関するデータを提供している。もし当該地域内に分布するレプトスピラの血清型が十分に明らかでない場合には、全ての存在が予想される血清群の代表株からなる抗原一式(パネル)を使用すべきである。過去の感染に起因する持続的な抗体は、多くの場合血清群特異的である。MAT に使用した血清型に対する抗体価とその検出頻度はその血清型、あるいはおなじ血清群に属する免疫学的に近縁な血清型が分布する可能性を

示している。

ELISA からは最近、または現在の感染の有無に関する情報が得られるが、その地域に分布する血清型に関する情報は得られない。なぜなら ELISA では広範な反応性を示す、いわゆるレプトスピラ属特異抗原に対する IgM 抗体を検出しているからである。

#### A4.2.3 リスク集団

レプトスピラ症に感染する可能性が高いと思われる集団(稻作農家、食肉業者など)に対する調査もしなければならない。その地域内での患者発生率は低くとも、選ばれたリスク集団ではとても高い可能性もあり得る。感染予防措置はリスク集団に対して、まず実施されるべきである。

#### A4.2.4 コホート研究

リスク集団に対し一定期間ごとに繰り返して行うコホート研究では、血清学的反応の変化を追跡することで、感染頻度に関する情報が得られる。それぞれの期間に起こった病状や徴候について問診を行うことで、レプトスピラ症の随伴症状や発病に至る状況に関する情報を得ることができる。

#### A4.2.5 血液バンク

供血者の抗レプトスピラ抗体保有の有無を調べることで、レプトスピラ症の浸淫の実態に関する情報が得られる。

#### A4.2.6 サーベイランス調査票

レプトスピラ症の疑いのある患者の記録を集めるために、サーベイランス調査票を作成する。この調査票は流行、あるいは集団感染の両方の記録に使用できるように作成する。この調査票には以下の情報が含まれなければならない。この地域におけるレプトスピラ症の流行を明らかにできるような情報やリスク集団や感染を引き起こす危険地域を特定できるような情報である。

- 個人の識別：名前、住所、年齢、性別、民族、職業
- 臨床的特徴：医師の名前、発病日、初期の臨床症状、潜伏期間、入院期間、入院までの日数、有症日数、生死、臨床症状、病状など
- 検査室診断結果：試験法の名称、試験検体の採取日、試験結果
- 暴露歴(発病より 4 週間前まで)：汚染の可能性のある水や土壤、生水との接触、暴露を受けた日時、場所、接触のあった動物のリストとそれらの健康状態あるいは生死、感染より 4 週間前までの皮膚の傷の有無、飲用水の由来
- 経済的損失に関する情報： 病気により仕事を休んだ日数

### A4.3 能動的サーベイランスと症例対照研究

能動的サーベイランスはその地域内でのレプトスピラ症の発生率を知る上で有用である。医師は米国 CDC、WHO、保健省、あるいは国の決めた診断基準に基づいてレプトスピラ症疑いと診断された患者に対して、承諾を受けた上でレプトスピラ培養、あるいは血清診断を行うための全血または血清などの採取を行う。医師は、臨床症状や暴露歴を明らかにできるような問診をおこなわなければならぬ。抗体価の陽転には発症後早くても 5~7 日はかかるので、血清の追加採取は最

初の採取から2~3週間後、あるいはもう少し早い時期に行う。このような能動的サーベイランスはその地域における通常のレプトスピラ症の発生率とその地域内で流行するレプトスピラ血清型を知る上で重要である。保健所のネットワークは中央の衛生研究所などへ、被検血清検体を輸送することを容易にする。

能動的サーベイランスと同時に並行して症例対照研究を行いリスク要因を評価することにより、レプトスピラ症の未知リスク要因を解明できる場合がある。さらに、上述の方法で集めた情報と適切な臨床診断検体に加えて、関連するリスク要因を含む2回目の問診を行うべきである。対照はこのサーベイランスを通じて発病しなかった人々とする。発病より4週間前まで考えられるリスク要因を明らかにしていく。たとえば動物との接触、それらの尿、生水、泥などの暴露、それから特別な活動への参加、たとえば水泳、ブタの飼育、ブタ小屋の掃除、皮膚の傷、生水や雨水の飲用、裸足での歩行などである。この完全な問診票からの集計結果の分析はパソコンを使用して、統計学的に解析する。解析にはCDCのホームページ(<http://www.cdc.gov>)から無料で入手できる解析分析ソフト、EpiInfo 6.04あるいはこれ以後のバージョン、あるいはEpiInfo 2000を使用する。

#### A4.4 動物のサーベイランス

野生動物、家畜のサーベイランスはヒトに対する感染源を解明する上で、補足的サーベイランスとして必要である。

#### 参考文献

- R. J. Chappel, R. W. Prime, B. D. Millar, L. J. Mead, R. T. M. Jones, B. Adler (1992). Comparison of diagnostic procedures for porcine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 30:151-163.
- L. Ciceroni, E. Stepan, A. Pinto, P. Pizzocaro, G. Dettori, L. Franzin, R. Lupidi, S. Mansueto, A. Manera, A. Ioli, L. Marcuccio, R. Grillo, S. Ciarrocchi, M. Cinco (2000). Epidemiological trend of human leptospirosis in Italy between 1994 and 1996. *European Journal of Epidemiology*, 16:79-86.
- M. Collares-Pereira (1991). Bovine leptospirosis in cattle in Portugal: bacteriological and serological findings. *Veterinary Record*, 128:549-550.
- J. D. Everard, C. O. R. Everard (1993). Leptospirosis in the Caribbean. *Reviews in Medical Microbiology*, 4:114-122.
- C. O. R. Everard, P. I. Cazabon, D. W. Dreesen, C. R. Sulzer (1979). Leptospirosis in dogs and cats on the Island of Trinidad: West Indies. *International Journal of Zoonoses*, 6:33-40.
- C. O. R. Everard, C. N. Edwards, J. D. Everard, D. G. Carrington (1995). A twelve-year study of leptospirosis on Barbados. *European Journal of Epidemiology*, 11:311-320.
- C. O. R. Everard, G. M. Fraser-Chanpong, R. Hayes, L. J. Bhagwandin, L. V. Butcher (1982). A survey of

leptospirosis in febrile patients mainly from hospitals and clinics in Trinidad. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76:487-492.

C. O. R. Everard, R. J. Hayes, C. N. Edwards (1989). Leptospiral infection in school-children from Trinidad and Barbados. *Epidemiology and Infection*, 103:143-156.

C. O. R. Everard, G. H. Maude, R. J. Hayes (1990). Leptospiral infection: a household serosurvey in urban and rural communities in Barbados and Trinidad. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 84:255-266.

N. P. Farrington, C. R. Sulzer (1982). Canine Leptospirosis in Puerto Rico. *International Journal of Zoonoses*, 9:45-50.

A. R. Katz, V. E. Ansdell, P. V. Effler, C. R. Middleton, D. M. Sasaki (2001). Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii. 1974-1998. *Clinical Infectious Diseases*, 33:1834-1841.

Leptospirosis in India: Report of the investigation of a post-cyclone outbreak in Orissa, November 1999 (2000). *Weekly Epidemiological Record*, 75:217-223.

D. A. Miller, M. A. Wilson, G. W. Beran (1991). Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1761-1765.

D. A. Miller, M. A. Wilson, G. W. Beran (1991). Relationships between prevalence of *Leptospira interrogans* in cattle, and regional, climatic, and seasonal factors. *American Journal of Veterinary Research*, 52:1766-1768.

H. P. Minette (1983). Leptospirosis in poikilothermic vertebrates - A review. *International Journal of Zoonoses*, 10:111-121.

A. Perrocheau, P. Perolat (1997). Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13:161-167.

D. M. Sasaki, L. Pang, H. P. Minette, C. K. Wakida, W. J. Fujimoto, S. J. Manea, R. Kunioka, C. R. Middleton (1993). Active surveillance and risk factors for leptospirosis in Hawaii. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48:35-43.

S. C. Sehgal, M. V. Murhekar, A. P. Sugunan (1994). A serosurvey for leptospirosis in North Andamans. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 12(4):289-291.

K. D. Taylor, L. H. Turner, J. D. Everard (1991). Leptospires in *Rattus* spp. on Barbados. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94:102-103.

L. D. van Til, I. R. Dohoo (1991). A serological survey of leptospirosis in Prince Edward Island swine herds and its association with infertility. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55:352-355.

C. C. Weekes, C. O. R. Everard, P. N. Levett (1997). Seroepidemiology of canine leptospirosis on the island of Barbados. *Veterinary Microbiology*, 57:2315-2322.

C. Yersin, P. Bovet, F. Merien, T. Wong, J. Panowsky, P. Perolat (1998). Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): A population-based study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59:933-940.

## 解説 5

### レプトスピラ症の臨床的特徴と鑑別診断

ヒトのレプトスピラ症は以下に示すような大変多様な症状、徵候を示す。

- 热
- はげしい頭痛
- 筋（肉）痛
- 結膜の充血
- 黄疸
- 倦怠感
- 頸部硬直
- 悪寒
- 腹痛
- 関節痛
- 食欲減退
- 吐き気
- 嘔吐
- 下痢
- 乏尿／無尿
- 出血
- 皮疹
- 羞明
- 咳嗽
- 不整脈
- 低血圧
- 精神錯乱
- 精神異常
- 譫妄

レプトスピラ症は、臨床症状のみで診断できない。臨床的にレプトスピラ症の疑いがある場合、検査室診断で確認しなければならない。臨床像の詳細については他の成書を参照されたい。

以下の疾患はレプトスピラ症の鑑別診断で考慮すべきものである。

- インフルエンザ
- デング熱とデング出血
- ハンタウィルス感染、ハンタウィルス肺症候群や他の呼吸不全症候群を含む黄熱や他のウイルス性出血熱
- リケッチア症
- ボレリア症

- プルセラ症
- マラリア
- 腎盂腎炎
- 無菌性髄膜炎
- 化学物質中毒
- 食中毒
- 腸チフスや他の腸熱
- ウイルス性肝炎
- 不明熱
- 初期の抗体陽性 HIV 感染
- レジオネラ症
- トキソプラズマ症
- 伝染性単核球症
- 咽頭炎

### 参考文献

- A. D. Alexander, A. S. Benenson, R. J. Byrne, R. S. Diaz-Rivera, L. B. Evans, W. S. Gochenour, H .E. Hall, J. A. Hightower, H. Jeffries, J. De Jests, E. Martinez, M. Paniagua, J. A. Pons, F. Ramos-Morales, R. Rodriguez-Molina, K. Y. Swisher, T. E. Woodward, R. H. Yager (1963). *Leptospirosis in Puerto Rico. Zoonoses Research*, 2:152-227.
- V. M. Arean (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *American Journal of Pathology*, 40:393-423.
- S. J. Berman, C. C. Tsai, K. Holmes, J. W. Fresh, R. H. Watten (1973). Sporadic anicteric leptospirosis in South Vietnam: a study of 150 patients. *Annals of Internal Medicine*, 79: 167-73.
- B. Brethes, P. L. Puech, A. Fraisse, P. Dubois, J. Domenech, P. Bourdin, J. P. Moreau, P. Capdevielle, D. Dessouter, M. Lambert (1988). Leptospirosis and environment. Study of 2 major foci in New Caledonia. *Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique*, 26(6):436-442.
- K. M. Chu, R. Rathinam, P. Namperumalsamy, D. Dean (1998). Identification of *Leptospira* species in the pathogenesis of uveitis and determination of clinical ocular characteristics in South India. *Journal of Infectious Diseases*, 177:1314-1321.
- T. De Brito, C. F. Morais, P. H. Yasuda (1987). Cardiovascular involvement in human and experimental leptospirosis: pathologic findings and immunohistochemical detection of leptospiral antigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 81 (3):207-214.
- C. N. Edwards, G. D. Nicholson, C. O. R. Everard (1982). Thrombocytopenia in leptospirosis. *American*

*Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 31 (4):827-829.

C. N. Edwards, G. D. Nicholson, T. A. Hassell, C. O. R. Everard, J. Callender (1986). Thrombocytopenia in leptospirosis, the absence of evidence for disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35:352-354.

C. N. Edwards, G. D. Nicholson, T. A. Hassell, C. O. Everard, J. Callender (1990). Leptospirosis in Barbados: a clinical study. *West Indian Medical Journal*, 39:27-34.

S. Faine (1998). Leptospirosis. In: Hausler W. J. Jr, Sussman M., eds. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, 9th ed. London, Arnold: Vol. 3: 849-869.

R. W. Farr (1995). Leptospirosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21:1-8.

R. D. Feigin, D. C. Anderson (1975). Human Leptospirosis. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 5:413-67.

J. G. Im, K. M. Yeon, M. C. Han, C. W. Klm, W. R. Webb, J. S. Lee, Y. C. Han, W. H. Chang, J. G. Chi (1989). Leptospirosis of the lung: radiographic findings in 58 patients. *American Journal of Roentgenology*, 152:955-959.

W. D. Johnson, I. C. Silva, H. Rocha (1975). Serum creatinine phosphokinase in leptospirosis. *Journal of the American Medical Association*, 233:981-982.

A. R. Katz, V. E. Ansdell, P. V. Effler, C. R. Middleton, D. M. Sasaki (2001). Assessment of the clinical presentation and treatment of 353 cases of laboratory-confirmed leptospirosis in Hawaii, 1974 - 1998. *Clinical Infectious Diseases* 33: 1834-1841.

M. Kuriakose, C. K. Eapen, E. Punnoose, G. Koshi (1990). Leptospirosis-clinical spectrum and correlation with 7 simple laboratory tests for early diagnosis in the Third World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84:419-421.

K. N. Lai, I. Aarons, A. J. Woodroffe, A. R. Clarkson (1982). Renal lesions in leptospirosis. *Australian and New Zealand Journal of Medicine*, 12:276-279.

C. R. Middleton, V. E. Ansdell, D. M. Sasaki (2001). Of mice and mongooses. A history of leptospirosis research in Hawaii. *Hawaii Medical Journal*, 60: 174, 179-181, 184-186.

A. C. Nicodemo, G. Del Negro, V. Amato Neto (1990). Thrombocytiopenia and leptospirosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 32(4):252-259.

K. M. O'Neil, L. S. Rickman, A. A. Lazarus (1991). Pulmonary manifestations of leptospirosis. *Review of Infectious Diseases*, 13:705-709.

M. Parsons (1965). Electrocardiographic changes in leptospirosis. *British Medical Journal*, 2:201-203.

A. Perrocheau, P. Perolat (1997). Epidemiology of leptospirosis in New Caledonia (South Pacific): a one-year study. *European Journal of Epidemiology*, 13(2):161 -167.

S. C. Sehgal, M. V. Murhekar, A. P. Sugunan (1995). Outbreak of leptospirosis with pulmonary involvement in North Andaman. *Indian Journal of Medical Research*, 102:9-12.

Y. Shaked, O. Spilberg, D. Samra, Y. Samra (1993). Leptospirosis in pregnancy and its effect on the fetus: case report and review. *Clinical Infectious Diseases*, 17:241-243.

S. S. Singh, P. Vijayachari, A. Sinha, A. P. Sugunan, M. A. Rasheed, S. C. Sehgal (1999). Clinico-epidemiological study of severe cases of leptospirosis in Andamans. *Indian Journal of Medical Research*, 109:94-99.

S. Soie, K. Hironaga, A. Koshiro, H. Konishi, Z. Yoshii (1983). In vitro susceptibilities of five *Leptospira* strains to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24(6):905-908.

J. Tappero, D. A. Ashford, B. A. Perkins (2000). Leptospirosis. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., eds. *Principles and practices of infectious diseases*, 5th ed. Philadelphia, PA, Churchill Livingstone:2495-2500.

R. T. Trevejo, J. G. Rigau-Perez, D. A. Ashford, E. M. McClure, C. Jarquin-Gonzalez, J. J. Amador, J. O. De los Reyes, A. Gonzalez, S. R. Zaki, W. J. Shieh, R. G. McLean, R. S. Nasci, R. S. Weyant, C. A. Bolin, S. L. Bragg, B. A. Perkins, R. A. Spiegel (1998). Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 178:1457-1463.

G. Watt, L. P. Padre, M. L. Tuazon, C. Calubaquib, E. Santiago, C. P. Ranoa, L. W. Laughlin (1988). Placebo-controlled trial of intravenous penicillin for severe and late leptospirosis. *Lancet*, 1 (8583):433-435.

C. Yersin, P. Bovet, F. Mérien, T. Wong, J. Panowsky, P. Perolat (1988). Human leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): a population based study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(6):933-940.

S. R. Zaki, R. A. Spiegel (1998). Leptospirosis, In: Nelson A.M., Horsburgh C.R. Jr, eds. Part IV, Factors

contributing to emergence of infectious diseases. *Pathology of emerging infections* 2, 1st ed. Washington, DC, ASM Press: 73-92.

Z. R. Zaki, W. J. Shieh (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary haemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet*, 347: 535-536.

## 解説 6

### 顕微鏡と染色

#### A6.1 暗視野顕微鏡

レプトスピラはとても細く、常法の染色では非常に染まりにくいので、通常の光学顕微鏡では観察できない。そこで、通常の光学顕微鏡に暗視野コンデンサーをセットした暗視野顕微鏡を使用する。スライドガラス上のレプトスピラに対して直接光を遮断し間接光だけを照射する(図 A6.1, Culling, 1963; Romeis, 1968)と、レプトスピラは暗黒の視野に散乱光で輝いて見える。良質な暗視野顕微鏡がレプトスピラの観察には必須である。

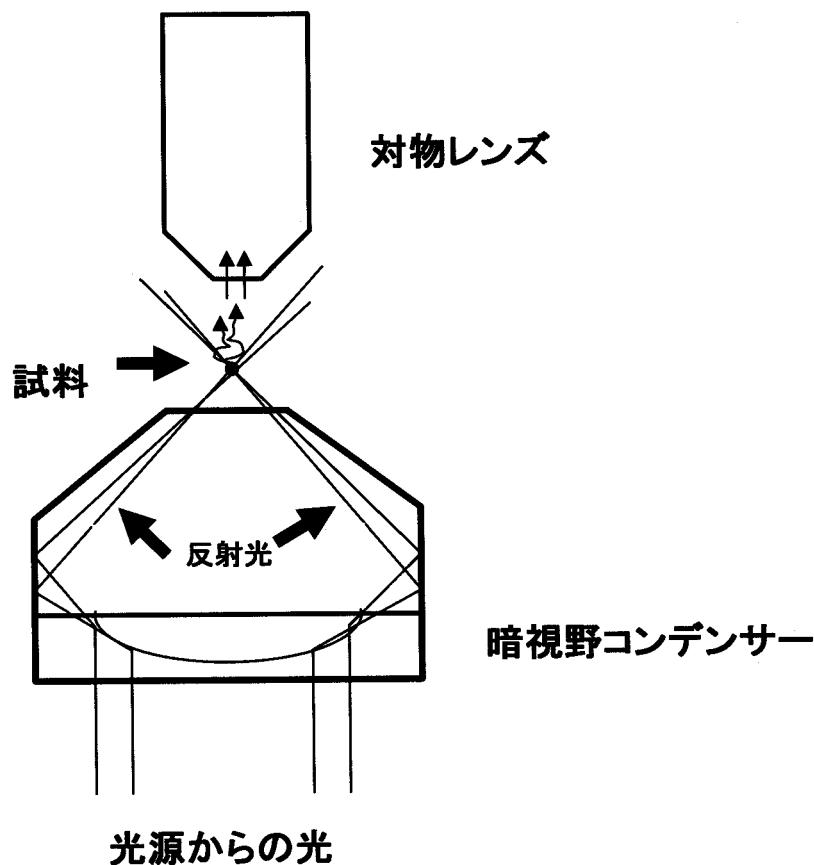


図 A. 6. 1 暗視野顕微鏡の原理 レプトスピラにあたって生じた上方への散乱光だけが、対物レンズに入射する。

#### A6. 2 臨床検査法としてレプトスピラの直接暗視野顕微鏡法

直接暗視野顕微鏡検出法は体液からのレプトスピラの検出法としてテキストブックに記載されている方法であるが、熟練した実施者でないと疑わしい結果しか得られないことがある。

血液中に入られる血清蛋白質やフィブリリン線維、ほかの細胞の破片などがレプトスピラのように見えることがある。一方、ヒトや動物の尿中のレプトスピラ菌数はこの方法で検出するには少なすぎる場合が多い。それゆえにレプトスピラをアーティファクトと見間違わないためには、慎重さと経験を積むことが必要である。

レプトスピラは遠心により濃縮することができるが、それでも検出できるようになる確率はやはり低い(Wolff, 1954).

血液の直接暗視野顕微鏡観察によるレプトスピラの検出は日常的検査としては勧められない。

また、レプトスピラは電子顕微鏡で観察することもできる(Morton & Anderson, 1943).

### A6. 3 染色法

以下の方法がある

- 鎌銀染色法(Murray & Fielding, 1936; Gangadhar & Rajasekhar, 1998)
- ウサギ抗血清(Sheldon, 1953), または蛍光標識マウス単クローナン抗体(Stevens et al., 1985; Zaki & Shieh, 1996)を用いた直接免疫蛍光染色法
- 免疫ペルオキシダーゼ染色法(Tripathy & Hanson, 1974)
- DNA プローブを使用した *in situ* ハイブリダイゼーション(Terpstra et al., 1987)

### 引用文献

C. F. A. Culling (1963). *Handbook of histopathological techniques (including museum technique)*, 2nd ed., London, Butterworths.

N. L. Gangadhar, M. Rajasekhar (1998). A modified silver impregnation staining for *Leptospires*. *Indian Veterinary Journal*, 75:349-351.

H. E. Morton, T. F. Anderson (1943). Morphology of *Leptospira icterohaemorrhagiae* and *L. canicola* as revealed by electron microscope. *Journal of Bacteriology*, 45:143-146.

R. E. Murray, J. W. Fielding (1936). Notes on the silver impregnation of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Medical Journal of Australia*, 1:610-611.

B. Romeis (1968). *Mikroskopische technik*. München-Wien, R. Oldenbourg Verlag.

W. P. Sheldon (1993). Leptospiral antigen demonstrated by the fluorescent antibody technique in human muscle lesions of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 84:165-167.

A. E. Stevens, S. A. Headlam, D. G. Pritchard, C. J. Thorns, J. A. Morris (1985). Monoclonal antibodies for diagnosis of infection with *Leptospira interrogans* serovar hardjo by immunofluorescence. *Veterinary Record*, 116:593-594.

W. J. Terpstra, G. J. Schoone, G. S. Lighthart, J. Scheggeter (1987). Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by *in situ* hybridization using biotin-labeled DNA probes. *Journal of General Microbiology*, 133:911-914.

D. N. Tripathy, L. E. Hanson (1974). Immunoperoxidase staining of leptospires. *Applied Microbiology*, 27:268-269.

J. W. Wolff (1954). *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL Charles C. Thomas.

S. R. Zaki, W. J. Shieh (1996). Leptospirosis associated with outbreak of acute febrile illness and pulmonary hemorrhage, Nicaragua, 1995. *Lancet*, 347:535-536.

## 解説 7

### 病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラ

病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラの区別をするには以下の方法がある。

- 8-アザグアニン(225mg/L)存在下における増殖性(Johnson & Rogers, 1964)
- 13°Cにおける増殖性(Johnson & Harris, 1967)
- 1M NaCl処理による球状化(Johnson & Faine, 1984)

8-アザグアニン存在下、13°Cにおける増殖は非病原性レプトスピラで、一方1M NaCl処理による球状化は病原性レプトスピラでみられる。病原性レプトスピラにのみ反応する单クローニング抗体F9-4(Cinco, 1990)を用いたELISAで区別を行うこともできる。

また、現在は水中の病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラを区別できるPCRも開発されている(Murgia et al., 1997)。環境中の病原性レプトスピラと非病原性レプトスピラの鑑別は、疫学的、あるいは公衆衛生学的にきわめて重要である。

#### 引用文献

- M. Cinco (1990). Evaluation of monoclonal antibody F9-4 as immunological probe for *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:2154-2155.
- R. C. Johnson, S. Faine(1984). Order I. Spirochaetalis. Family II. "Leptospiraceae" Hovind-Hougen 1979. In: Krieg NR, Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1st ed. Baltimore, MD. Williams & Wilkins, Vol.1, 245:62.
- R. C. Johnson, V. G. Harris (1967). Antileptospiral activity of serum. II. Leptospiral virulence factor. *Journal of Bacteriology*, 93:513-519.
- R. C. Johnson, P. Rogers (1964). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospires with 8-azaguanine. *Journal of Bacteriology*, 88: 1618-1623.
- R. Murgia, N. Riquelme, G. Baranton, M. Cinco (1997). Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiology Letters*, 148:27-34.

## 解説 8

### 血清型別と免疫ウサギ抗血清の作製

#### A8.1 交差凝集吸収

MATにおける抗原抗体反応はレプトスピラ株の同定に使用される。レプトスピラの抗原構造は複雑である。基本的系統分類の単位は、参考菌株に代表される血清型(serovar)である(Kmety & Dikken, 1993)。

血清群(serogroup)は、交差凝集試験により中程度、あるいは強く凝集されるいくつかの血清型から成るグループのことである(Kmety & Dikken, 1978)。血清群には厳密な規定や正式な分類学的意味合いはないが、抗原性の類似性に基づくレプトスピラ株のグループ化はより実践的な目的のために用いられる。

この血清群の概念は必要である。なぜならレプトスピラの血清型は200以上あるため、現実問題として血清型を同定するためにこれら全ての血清型について検討することは不可能であるからである。血清群についての定義はなく、血清群間の区分はしばしば明確でない。そのためある血清型は、所属する血清群が変わったりすることが過去にはあった。

Wolff & Broom (1954)とWHOの専門家グループ(World Health Organization, 1967)により提案された血清型の定義は、分類学的な目的のみならず、宿主と病原体間の関連性を理解する上でも実践的方法であった。現在の定義では、適定量のヘテロ抗原で吸収した抗血清を使用したときに、複数回の試験で少なくとも2つの抗血清の1つで、ホモの株に対して10%以上の抗体価が残った場合には2つの株が異なる血清型に属すといえる(International Committee on Systematic Bacteriology 1987)。上述の定義から、血清型が未知の株が参考菌株で代表される全ての既知の血清型と異なったならば、それは新規な血清型と考えられる。しかし、もしホモガスな株に対する残存凝集力価が10%未満である場合は、未知の株はその血清型に属することになる。したがって、未知の株は参考菌株に代表される既知の血清型に属するのか、あるいは新しい血清型でこの新しい血清型の参考菌株となるかの、どちらかである。10%限界の基準は重要である。この基準では、同じ血清型に属する株に対しては0~10%の違いの余地を認めている(Faine, 1982)。

未知の株の血清型別の常法としては、次の2つがある。

##### A8.1.1 血清群の確定

MATにより未知の株を抗原として、全ての既知の血清群を代表する参考菌株に対するウサギ抗血清と反応させ、定量的にどの血清群に属するかを決定する。また、同じ血清群内の他の血清型の参考菌株と未知の株間の関係を同じく調べる。このとき未知の血清型は、1つあるいはそれ以上の抗血清と反応し、凝集を起こすかもしれない。

##### A8.1.2 交差凝集吸収試験

2つめの方法はより複雑である。未知の株とそれに対する抗血清、血清群の決定で陽性となつた参考菌株とそれに対する抗血清を用いて交差凝集吸収試験を行う(Babudieri, 1971; Kmety et al., 1970)。この試験は、レプトスピラ分類小委員会(International Committee on Systematic Bacteriology,

1984)の規定による方法に準じて行う。

## A8.2 他の血清型別法

交差凝集吸収試験は手間のかかる方法で、特に熟練を重ねた研究施設でのみ分離株の同定に使用される方法である。このためレファレンスラボラトリーはレプトスピラ分離株の迅速な血清型別法の開発に力を注いできた。現在では免疫ウサギ抗血清を使用した因子解析(Kmety 1967; Dikken & Kmety, 1978)とマウス単クローン抗体を使用した分離株の同定システム(Collares-Pereira et al., 2000; Sehgal et al., 2000; Terpstra et al., 1985, 1987)が他の血清型別法として確立されている。

## A8.3 因子解析

新しい血清型を定義することは、その血清型を詳細に性格づけることではない。むしろ新しい血清型の代表株の血清学的な違いの程度を定義することである。因子解析 (Kmety, 1967)はそれぞれの血清型の抗原構造の詳細な研究に基づいている。すなわち血清型を規定する抗原構造は、それは主要な、あるいは少数の抗原決定基の様々な組み合わせやモザイク状の構造として特徴付けられる。因子抗血清は免疫ウサギ抗血清を吸収して調製される。吸収には1つ、あるいはそれ以上の異なる抗原が使用され、抗血清が1つの血清型、またはいくつかの血清型よりなる亜血清群や、血清群にのみ反応するようになるまで吸収を行って作製する。

因子解析は株間の抗原の類似性の程度を分析するのに非常に適した方法である(Kmety, 1967)。そして問題となる株の暫定的な血清型を迅速に決定することができる (Dikken & Kmety, 1978)。

因子解析は迅速な血清型の推定には適した方法であるが、因子血清の作製は手間のかかる、そして再現性にも問題のある方法である。

## A8.4 単クローン抗体

単クローン抗体(MCAs)を使用した性状解析は通常の血清型別と関連しており、複数の単クローン抗体を用いて血清型を規定する特徴的な抗原パターンの認識に基づいている。交差凝集吸収試験と異なり、単クローン抗体を使用することで短時間に多くの株のタイピングが可能となる。

顕微鏡凝集試験においても、単クローン抗体は1つの抗原決定基と反応する。決定基はおそらく、ある1つの血清型に特定的か、あるいはいくつかの血清型間で共通であると思われる。ある血清型に特徴的な抗原決定基の組み合わせ、あるいはモザイク状の存在様式にもとづき、複数の単クローン抗体を用いてレプトスピラを血清型のレベル、あるいは亜血清型のレベルまでに同定することができる。複数の単クローン抗体との反応性から得られた新しい凝集パターンの違いは新しい血清型の存在を示唆することになる。しかしながら、同じ血清型に属す株間でもこの単クローン抗体の反応性に違いが観察されることがある(Collares Pereira et al., 2000; Sehgal et al., 2000; Terpstra et al., 1985)。

その地域に分布するレプトスピラ血清型に対する適当な複数の単クローン抗体を準備することができれば、特に訓練された施設でなくとも迅速かつ容易にレプトスピラの型別を行うことができる。

現在明らかになっている最も一般的な血清型の約半数を単クローン抗体で同定することができる(解説 15)。

単クローン抗体は、MATによる血清診断に使用する抗原株の迅速な品質管理にも使用できる。

通常の免疫ウサギ抗血清を使用するよりはるかに容易に、ラベルを貼り間違えた株を再度タイプングし、同定することができる。

单クローニング抗体のパネルの組み合わせは、作製された多くの单クローニング抗体の中から選ばれるので、その選択に主観的因素がはいる可能性がある。また、実際に使用される单クローニング抗体は作製されたうちの一部であるため、これは応用面で制限となる。

单クローニング抗体の特異性は、免疫株の抗原構造と免疫に使用したマウスの免疫学的レパートアにより規定される。

#### A8.5 免疫ウサギ抗血清の作製

体重約3~4 kgの家兔に、生菌、またはホルマリン処理死菌体を毎週一回静脈内投与する。レプトスピラ分類小委員会では標準化した手順を発表している(Internatiol Committee on Systematic Bacteriology, 1984)。レプトスピラを $2 \times 10^8/mL$ まで培養し、毎週の接種培養液量は1, 2, 4, 6, そして6 mLとする。最終免疫から1週間後のMATによる抗体価は1:12,800倍以上となっているはずである。もしこれより低いときは、さらに6 mLの追加免疫を行い、さらに1週間後に抗体価を再度調べる。最終免疫から2週間後、心臓より採血をおこなう。通常2羽のウサギを使用し、両方とも十分な抗体価が得られた場合は、両血清をプールして使用する。

#### 引用文献

B. Babudieri (1971). Proposed standardization of the agglutination-adsorption test for *Leptospira*. *Bulletin of the Woild Health Organization*, 44:795-810.

M. Collares-Pereira, H. Korver, B. V. Cao Thi, M. Santos-Reis, E. Bellenger, G. Baranton, W. J. Terpstra (2000). Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiology Letters*, 185:181-187.

H. Dikken, E. Kmety (1978). Serological typing methods of leptospires. In: Bergan T., Norris J.R. eds. *Methods in Microbiology*. New York, Academic Press, Vol. 11:260-295.

S. Faine (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No.67).

International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* (1984). Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982, Boston, Massachusetts, USA. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34 :258-259.

International Committee of Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira* (1987). Minutes of the Meeting, 5 and 6 September, 1986, Manchester, England. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37:472-473.

E. Kmety (1967). Faktorenanalyse von Leptospiren der Icterohaemorrhagiae und einiger verwandter

Serogruppen. Bratislava, Slovak Academy of Sciences: 124,

E. Kmety, H. Dikken (1993). Classification of the species *Leptospira interrogans* and history of its serovars. Groningen, University Press:104.

E. Kmety, M. M. Galton, C. R. Sulzer (1970). Further standardization of the agglutinin absorption test in the serology of leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 42:733-738.

S. C. Sehgal, P. Vijayachari, L. D. Smythe, M. Norris, M. Symonds, M. Dohnt, H. Korver, H. van de Kemp, R. A. Hartskeerl, W. J. Terpstra (2000). Lai-like *Leptospira* from the Andaman islands. *Indian Journal of Medical Research*, 112:135-139.

W. J. Terpstra (1991). Typing of *Leptospira* from the perspective of a reference laboratory. *Acta Leidensia*, 60:79-87.

W. J. Terpstra, H. Korver, J. van Leeuwen, P. R. Klatser, A. H. J. Kolk (1985). The classification of Sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A259:498-506.

W. J. Terpstra, H. Korver, G. J. Schoone, J. van Leeuwen, C. E. Schönemann, S. de Jonge-Aglibut, A. H. J. Kolk (1987). Comparative classification of *Leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction endonuclease analysis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A266:412-421.

World Health Organization (1967). *Current problems in leptospirosis research*. Report of a WHO Expert Group. Geneva (WHO Technical Report Series, No.380):8.

J. W. Wolff, B. R. Broom (1954). The genus *Leptospira noguchi*, 1917: problems of classification and a suggested system based on antigenic analysis. *Documenta de Medicina Geographica et Tropica*, 6:78-95.

## 解説 9

### 分子生物学的手法によるレプトスピラの分類

レプトスピラはスピロヘータ目レプトスピラ科レプトスピラ属に属する。レプトスピラ属は、病原性レプトスピラ *L. interrogans* sensu lato と非病原性レプトスピラ *L. biflexa* sensu lato からなる。現在のレプトスピラの種の決定は、DNA の相同性に基づいている。現在認められている病原性レプトスピラの種には、*L. interrogans* sensu stricto が、一方非病原性レプトスピラには *L. biflexa* sensu stricto が含まれている(表 A9.1 参照)。

過去数年間のうちに、多くの遺伝学的な解析方法がレプトスピラの分類に利用されるようになってきた。しかしながら、遺伝学的な分類は血清学的な分類とは異なっている。遺伝子の塩基配列は、系統解析研究の魅力的な標的である。16S rRNA をコードする *rrs* 遺伝子の配列は、遺伝的相関の研究にもっとも広く用いられ、受け入れられている(Perolat et al., 1998)。

遺伝学的特性に基づく分類システムは、理想的には亜種の特徴づけまで可能とするはずである。もしそれら分類方法を実際に臨床や疫学の分野で利用するとすれば、それらの方法は操作が簡単でありなおかつ信頼性のある結果を与えるものでなければならない。

ここではさまざまな方法を述べる。実践的なプロトコールは、この章の終わりにある文献を参照していただきたい。

#### A9.1 DNA 相同性に基づくレプトスピラの種名

各レプトスピラ株(strain)間の DNA 近縁度を測定するために定量的 DNA/DNA ハイブリダイゼーションを用いることは、各レプトスピラ株を種に当てはめるための標準的方法である。現在約 300 株が、DNA 相同性試験に基づいて分類されている(Brenner et al., 1999; Faine et al., 1999; Ramadass et al., 1990, 1992; Yasuda et al., 1987)。

遺伝学的解析に基づくレプトスピラの種名を、各種で最も良く見られる血清群と共に、表 A9.1 に挙げる。

表 A9.1 レプトスピラの種名と各種で最も良く見られる血清群 (Brenner et al., 1999)

種	主な血清群
<i>L. alexanderi</i> (genomospecies 2)	Hebdomadis, Manhao
<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum, Javanica, Sejroe, Tarassovi
<i>L. interrogans</i> sensu stricto	Australis, Autumnalis, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Sejroe
<i>L. kirschneri</i>	Autumnalis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae
<i>L. noguchii</i>	Australis, Icterohaemorrhagiae
<i>L. santarosai</i>	Hebdomadis, Mini, Pyrogenes, Sejroe, Tarassovi
<i>L. weili</i>	Celledoni, Javanica, Tarassovi
<i>L. fainei</i> <sup>a</sup>	Hurstbridge
<i>L. inadai</i> <sup>a</sup>	Lyme, Manhao

<i>L. meyeri</i> <sup>a</sup>	Javanica, Mini, Sejroe
<i>L. biflexa</i> sensu stricto <sup>b</sup>	Andamana
<i>L. wolbachii</i> <sup>b</sup>	Codice, Semaranga
<i>Turneria parva</i> <sup>b</sup> (以前は <i>L. parva</i> )	Turneri
<i>Leptonema illini</i> <sup>b</sup>	“Leptonema”
Genomospecies 1 <sup>a</sup>	非病原性血清群 Ranarum
Genomospecies 3 <sup>b</sup>	非病原性の仮の血清群 Holland
Genomospecies 4	Icterohaemorrhagiae
Genomospecies 5 <sup>b</sup>	非病原性血清群 Ranarum

<sup>a</sup> 病原性不確定

<sup>b</sup> 非病原性または他の属

DNA の相同意基に基づく分類は、日常的に行うには煩雑すぎるという欠点がある。しかしながら、より作業が単純で、加えて亜種レベルまで判別することができる多くの DNA フィンガープリントティング法が開発されてきている(下記参照)。

#### A9.2 制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

制限酵素解析(REA)やパルスフィールド電気泳動(PFGE、下記参照)のような多くの技法を含む。これらの方法では様々な制限酵素を用いて、それぞれのレプトスピラ株に特徴的となるような断片(制限酵素断片長多型、RFLP と言われる)が生じるようにレプトスピラ DNA を切断する。これらの DNA 断片は、アガロースゲル電気泳動によって分離され、それぞれ特徴的なバンドパターンを形成する(Ellis et al., 1991)。未知の株と既知の株(参考菌株)のバンドパターンを比較することによって、それぞれの株間の相同意基が確認される。しばしば血清学的な方法を凌ぐ高度な解像力を得ることが RFLP では可能であり、レプトスピラ株間の小さな差異を明らかにすることがある。

#### A9.3 パルスフィールド電気泳動

パルスフィールド電気泳動(PFGE)では、レプトスピラ種間、そしてしばしばレプトスピラ株間を区別するために、*Not I* のような制限酵素が用いられる。ゲノム DNA はこのような制限酵素により大きな断片に切断され、アガロースゲル上で特徴的な泳動バンドパターンを示す。この方法では、サイズが大きく比較的少数のバンドがゲル上に見られることから、解釈が容易であるとの利点がある。

#### A9.4 リボタイピング

RFLP は、特異的なプローブを用いたサザンプロット法と組み合わせて行われることがある。

その例として、リボタイピングでは、制限酵素消化断片をアガロースゲルで分離後、膜に転写し、標識した 16S あるいは 23S rRNA プローブを用いてハイブリダイゼーションを行う。この方法では、解釈がより容易なフィンガープリントが得られる(Perolat et al., 1993)。この方法は市販されている試薬を使って行われるため、検査室でも行うことができ、すべてのレファレンス株とそ

れに対応した免疫血清を維持する必要がない。また、リボタイピングは各レプトスピラ株間に存在する共通断片の類似性を基にした、ゲノムの相関性に関する情報を得ることができる。

より詳しい情報が、インターネットのウェブサイト上で入手できる (<http://www.pasteur.fr/recherche/Leptospira/Leptospira.html>)

#### A9.5 ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction, PCR)による分類

PCR はレプトスピラの分類のための新基準を提供した。以下の方法が用いられる。

1. 種あるいは株特異的な配列から設計されたプライマーの使用(Gravekamp et al., 1993; Murgia et al., 1997)
2. PCR 産物の塩基配列決定(Gravekamp et al., 1993)
3. RFLP 解析の PCR 産物への応用(Perolat et al., 1994; Woodward & Redstone, 1993)
4. IS1500 のような挿入配列(IS)は各株のゲノム上で特徴的に配置されることを利用して、それゆえ、アガロースゲル上で株に特異的なパターンを生じるような配列に基づくプライマーの使用(Zuerner et al., 1995; Zuerner & Bolin, 1997)
5. 1本鎖 DNA 高次構造多型(Single-strand conformation polymorphism, SSPC)解析(Woo et al., 1998)
6. 任意配列プライマーPCR (Arbitrarily primed PCR, AP-PCR), 多型 DNA 任意増幅法(random amplification of polymorphic DNA, RAPD), 緩条件 PCR (low stringency PCR, LS-PCR) (Brown & Levett, 1997; de Caballero et al., 1994; Perolat et al., 1994)

1～5 の方法は、少なくとも理論的には、培養によるレプトスピラ分離の必要なく臨床検体へ応用できるという利点がある。しかし、このうちで RFLP に基づく技法では、レプトスピラを分離する必要がある。さらに、これらの方法では結果として出てくる DNA プロファイルは、抽出した DNA の質に依存するので、標準化するのは難しい。

#### 引用文献

- D. J. Brenner, A. F. Kaufmann, K. R. Sulzer, A. G. Steigerwalt, F. C. Rogers, R .S. Weyant (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:839-858.
- P. D. Brown, P. N. Levett (1997). Differentiation of *Leptospira* species and serovars by PCR-restriction endonuclease analysis, arbitrarily primed PCR and low-stringency PCR. *Journal of Medical Microbiology*, 46:173-181.
- O. L. S. D. De Caballero, E. Dias Neto, M. C. Koury, A. J. Romanha, A. J. G. Simpson (1994). Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1369-1372.

- W. A. Ellis, J. M. Montgomery, A. B. Thiermann (1991). Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *Journal of*

*Clinical Microbiology*, 29:957-961.

S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat (1999). *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia.

C. Gravekamp, H. van de Kemp, M. Franzen, D. Carrington, G. L. Schoone, G. J. J. M. van Eys, C. O. R. Everard, R. A. Hartskeerl, W. J. Terpstra (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139:1691-1700.

J. L. Herrmann, E. Bellenger, P. Perolat, G. Baranton, I. Saint Girons (1992). Pulsed-field gel electrophoresis of *NotI* digests of leptospiral DNA: a new rapid method of serovar identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:1696-1702.

R. Murgia, N. Riquelme, G. Baranton, M. Cinco (1997). Oligonucleotides specific for pathogenic and saprophytic leptospira occurring in water. *FEMS Microbiology Letters*, 148:27-34.

P. Perolat, I. Lecuyer, D. Postic, G. Baranton (1993). Diversity of ribosomal DNA fingerprints of *Leptospira* serovars provides a database for subtyping and species assignation. *Research in Microbiology*, 144:5-15.

P. Perolat, F. Merien, W.A. Ellis, G. Baranton (1994). Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction site polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1949-1957.

P. Perolat, R. J. Chappel, B. Adler, G. Baranton, D. M. Bulach, M. L. Billinghamst, M. Letocart, F. Merien, M. S. Serrano (1998). *Leptospira fainei* sp. nov., isolated from pigs in Australia. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48:851-858.

P. Ramadass, B. D. Jarvis, R. J. Corner, M. Cinco, R. B. Marshall (1990). DNA-relatedness among strains of *Leptospira biflexa*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 40:231-235.

P. Ramadass, B. D. Jarvis, R. J. Corner, D. Penny, R. B. Marshall (1992). Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42:215-219.

M. J. Woodward, J. S. Redstone (1993). Differentiation of *Leptospira* serovars by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Record*, 132:325-326.

Wu W., Bao L., Wu Q., Li S., Huang W., Wan B., Zhang M., Xiong Q., Fang Z. (1996) 16S rRNA gene PCR-SSCP analysis of the reference strains from 15 serovars (14 serogroups) of pathogenic leptospires in

China. *Hua Hsi I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao*, 27:17-20.

P. H. Yasuda, A. G. Steigerwalt, K. P. Sulzer, A. F. Kaufmann, F. Rogers, D. J. Brenner (1987). Deoxyribonucleic acids relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with proposals for seven new *Leptospira* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37:407-415.

R. L. Zuerner, D. Alt, C. A. Bolin (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:3284-3289.

R. L. Zuerner, C. A. Bolin (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2612-2617.

## 解説 10

### 血清診断技術 (MAT と ELISA)

#### A10.1 はじめに

レプトスピラ症の診断のためにいくつかの血清診断技術が用いられているが、それぞれの方法で感度と特異性は異なる(Postic et al., 2000)。診断の正確性をより高めるために、しばしばいくつかの診断技術が同時並行で、もしくは連続して行われる必要がある。酵素結合抗体法(ELISA)と顕微鏡凝集試験(MAT)が、検査室診断として最も一般的に用いられている方法である。一方で、Martin と Pettit(1918)によって開発された MAT は、現在にあっても標準的方法であり、以下に詳述する。

血清反応データの解釈は連続的に得られた検体、すなわち、発症後、数日間の期間（例えば 8 ~10 日間等）をおいて採取した 2 つの検体の試験結果によってより確実性が高まる。3 回目の検体は臨床診断と感染血清群を確定するために必要となることがあるかもしれない。

#### A10.2 顕微鏡凝集試験法(MAT)

MAT は、Martin と Pettit(1918)によって確立された凝集-溶解試験法をもとに改良が積み重ねられてきた (Borg-Petersen と Fagreus, 1949; Carbrey, 1960; Cole ら, 1973; Postic ら, 2000; Schuffner と Mochtar, 1926; Watt ら, 1988; Wolff, 1954)。“溶解”という概念は、後に誤った解釈であったことが明らかになり、標記から削除された。現在 MAT は標準的方法として、抗体の検出、および抗体価の決定に用いられている。MAT は感染血清型が属する血清群を示唆することは可能であるが、同定にいたることはまれである。IgM 抗体、IgG 抗体ともに MAT で検出可能である。生菌を使用していることから、MAT の標準化は不可能である。たとえば使用する培養の新鮮さと菌数など、さまざまな因子が凝集価に影響するからである。

##### A10.2.1 原理

方法は単純で、被検血清と培養菌体を混合し、ついで凝集の度合いを暗視野顕微鏡で観察することで行われる（図 A.10 参照）。レプトスピラ分類小委員会によれば、抗原液をリン酸緩衝液にて 2 倍に希釈した対照培養液と比較したとき、50% が凝集し、残り 50% が浮遊している菌として観察された希釈倍率をエンドポイントとすることとなっている (International Committee on Systematic Bacteriology, 1984)。

##### A10.2.2 材料と試薬

プラスチックの平底 96 穴マイクロプレートを使用する。各穴の菌液をスライドグラスに白金耳などを用いて分取し顕微鏡観察を行う場合、特殊なマイクロプレートを必要とはしない。もしマイクロプレートを直接倒立型暗視野顕微鏡で観察する場合には、高品質なマイクロプレートを用いる必要がある。

以下必要な試薬、材料を列記する。

- 生理緩衝液, pH7.6 : 0.85% 生理食塩水(1,840 mL)および、Sörensen 緩衝液(160 mL, 以下参考)からなる。

- Sörensen 緩衝液:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (8.33 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.09 g), 水で 1,000 mL にする。110°C, 20 分間高圧蒸気滅菌した後, 4°C 保存。
- レプトスピラ菌株: 使用菌株一式を選ぶ必要がある。主要な血清群すべてを含む菌株一式、または(i)地域での出現頻度が分かっている血清型(=流行血清型), および(ii) 疫学調査などで浸潤の可能性がある血清型に基づいて菌株を選択する。

MAT で未知の血清型による感染を明らかにするために使用が推奨される参考抗原の一覧を、表 A10.1 に示した。

表 A10.1 推奨抗原一覧

血清群	血清型	菌株名
Australis	Australis	Ballico
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
Ballum	Castellonis	Castellon 3
Bataviae	Bataviae	Swart
Canicola	Canicola	Hond Utrecht IV
Cynopteri	Cynopteri	3522 C
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Copenhageni	M20
Javanica	Javanica	Veldrat batavia 46
Panama	Panama	CZ 214
Pomona	Pomona	Pomona
Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
Sejroe	Hardjo	Hardjoprajitno
	Sejroe	M 84
	Wolffi	3705
Tarassovi	Tarassovi	Perepeletsin
Semaranga	Patoc	Patoc □

これら試験株群にその地域で分離された株を加えることで、しばしば参考菌株のみの組み合わせに比べ感度が上昇する事がある。一方で被検抗原を不用意に地域流行株のみに絞る事は得策ではない。これは感染がまれである血清型による感染、もしくは地域内での浸潤が知られていないかった血清型（未知の血清型）による感染が起こりうるからである。*L.biflexa* PatocI 株を含む非病原性レプトスピラは病原性レプトスピラの多くの血清型に対して誘導されたヒト抗体に対して交差反応性を有するので、これら診断抗原の組み合わせに含めると良いであろう。また、この一覧表に記載されていない他の血清群を加えた方がよい場合もある。

性状が良く把握されている株を使用することは、標準的検査法を正確に実施上で重要である。

保存バイアル等の誤記、抗原の誤った混合などを起こさないためにも、標準抗血清や単クローナル抗体による株の性状確認は定期的に行うべきである。

MAT の作業手順を以下に示す。

- 菌株は週毎に EMJH 培地(解説 16, A16.4 参照)にて植え継ぐ。30℃で 4~10 日培養した培養液を試験に用いる。レプトスピラの増殖を抑えるため、 $2\sim4\times10^8$  細胞数/mL まで増殖した培養は室温で暗所に保存することを勧める。培養 10 日目以降は 15 ℃での保存も可能である。レプトスピラの生存度(菌数と運動性)と雑菌による汚染がないことを暗視野顕微鏡で必ず確認する。
- 使用前に、菌液は通常生理緩衝液にて 1:2 に希釈し、最終菌濃度を  $1\sim2\times10^8$  菌数/mL に調整する。個々の菌液について、それぞれ菌数を確認する。
- 生菌、不活化菌とともに MAT の抗原として使用される。概して不活化菌(ホルムアルデヒド終濃度 2%)を用いた試験は生菌を用いる場合に比べ、感度は優れているが特異性に劣るとされる(Turner, 1968; Sulzer と Jones, 1978; Palmer ら, 1987)。不活化菌は、安全性の面で取り扱いが容易であること、抗原としての安定性が保たれている数週間に限り保存が可能であることが利点である(p.13, MAT の標準化参照)。

#### A10.2.3 方法と結果の解釈

以下 2 段階で作業を進める。(1)反応血清群の同定(スクリーニング)、(2)各種使用抗原に対する抗体価の測定(定量的 MAT)。脂肪滴を含むミルク様血清は使用不可である。

##### スクリーニング

方法を以下に示す。

- (1) 56℃, 30 分加温し被検血清中の補体の非働化を行う。
- (2) 被検血清を生理食塩水で 25 倍に希釈する。
- (3) マイクロプレートの第一列目(横列)に生理緩衝液 50μL を加える。穴の番号は抗原の番号と合致させておく。この行は抗原対照である(図 A10.2 参照)。
- (4) 第 2 列目以降は被検血清を加える。補体を非働化した希釈被検血清 50μL を穴に加える。穴の番号は上述のように抗原の番号と一致させる。
- (5) 縦の列は抗原の番号に一致させる。抗原液を各 50μL ずつ各穴へ加えていく。各縦の列毎に抗原液の種類を変え、操作を繰り返す。血清の最終希釈倍率は 50 倍である。
- (6) プレートにふたをし、室温、暗所で 2 時間放置、もしくは 4℃で一晩放置する。
- (7) 列単位で各穴から反応液を分取し、スライドグラス上に滴下する。鏡検は、抗原対照と比較しつつ行う。
- (8) 抗原対照と比較し、50%以上の凝集を示した血清を陽性と判定する。

	抗原 1 (Ag1)	抗原 2 (Ag2)	抗原 3 (Ag3)	抗原 4 (Ag4)
抗原対照	緩衝液 +Ag1	緩衝液 +Ag2	緩衝液 +Ag3	緩衝液 +Ag4
血清 1	血清 1 +Ag1	血清 1 +Ag2	血清 1 +Ag3	血清 1 +Ag4
血清 2	血清 2 +Ag1	血清 2 +Ag2	血清 2 +Ag3	血清 2 +Ag4
血清 3	血清 3 +Ag1	血清 3 +Ag2	血清 3 +Ag3	血清 3 +Ag4
血清 4	血清 4 +Ag1	血清 4 +Ag2	血清 4 +Ag3	血清 4 +Ag4
血清 X	血清 X +Ag1	血清 X +Ag2	血清 X +Ag3	血清 X +Ag4

図 A10.2 感染血清群を決定するためのスクリーニング試験におけるプレート上の抗原・血清配置例

凝集したレプトスピラは塊を形成し、場合によっては運動性のある細胞端が見えるものも見出される。凝集が完全な場合には、非凝集のレプトスピラは視野には見られない。

しかしながら、現実的には対照と比較して、凝集していないレプトスピラの菌数を調べる方が容易である。その評価法を以下に示す。

- 凝集していないレプトスピラ菌数が 50～100%の場合：陰性
- 凝集していないレプトスピラ菌数が 50%以下の場合：陽性

### 定量的 MAT

次に、2倍連続希釈血清を用いて、スクリーニングで陽性となった抗原に対する抗体価を決定する定量的 MAT を行う(図 A10.3 参照)。

### 判定

一般的には発症後より 10～12 病日で抗体は陽転するが、しばしば 5～7 病日でも抗体が陽転することもある。抗菌薬による治療により、抗体の陽転が遅れることもある。

MAT 陽性の閾値は多くの検査施設で 1/100 を設定しているようである。しかしながら、判定には以下の点も考慮を入れる必要があろう。

- 検体採取時の病日
- ペア血清（2 点もしくは 3 点）間の抗体価の比較
- 感染血清群
- 治療の有無

	抗原対照	希釈倍率 1/50	希釈倍率 1/100	希釈倍率 1/200	希釈倍率 1/400	希釈倍率 1/n	
血清 1	緩衝液+抗原 1	血清 1 1/25+抗原 1	血清 1 1/50+抗原 1	血清 1 1/100+抗原 1	血清 1 1/200+抗原 1	etc	抗原 1
血清 1	緩衝液+抗原 2	血清 1 1/25+抗原 2	血清 1 1/50+抗原 2	血清 1 1/100+抗原 2	血清 1 1/200+抗原 2	etc	抗原 2
血清 1	緩衝液+抗原 3	血清 1 1/25+抗原 3	血清 1 1/50+抗原 3	血清 1 1/100+抗原 3	血清 1 1/200+抗原 3	etc	抗原 3
血清 1	緩衝液+抗原 X	血清 1 1/25+抗原 X	血清 1 1/50+抗原 X	血清 1 1/100+抗原 X	血清 1 1/200+抗原 X	etc	抗原 X
血清 2	緩衝液+抗原 1	血清 2 1/25+抗原 1	血清 2 1/50+抗原 1	血清 2 1/100+抗原 1	血清 2 1/200+抗原 1	etc	抗原 1
血清 2	緩衝液+抗原 2	血清 2 1/25+抗原 2	血清 2 1/50+抗原 2	血清 2 1/100+抗原 2	血清 2 1/200+抗原 2	etc	抗原 2
血清 2	緩衝液+抗原 y	血清 2 1/25+抗原 y	血清 2 1/50+抗原 y	血清 2 1/100+抗原 y	血清 2 1/200+抗原 y	etc	抗原 y

図 A10.3 各試験抗原に対する抗体価の決定のためのプレートの使用例

共凝集素(交差反応)はレプトスピラ症患者血清ではしばしば存在する(Borg-Petersen, 1949; Kmety, 1957). 交差反応の原因となる抗体は、しばしば感染初期に見出されるが、速やかに消失する。ホモ抗体(血清群、もしくは血清型特異的抗体)は感染後、やや遅れて出現するが、長期にわたって維持されるため、感染血清群の推定、および過去の感染歴を調べるには有効である。

### A10.3 ELISA

#### A10.3.1 原理

ELISA は最も一般的に用いられている血清診断法で、抗原の種類、使用試薬類によりいくつかの変法がある(Adler ら, 1980; Postic ら, 2000; Terpstra ら, 1980, 1985; Watt ら, 1988; Zochowski ら, 1987).

ここでは概略のみを以下に示す。本法では属特異的抗体を検出するため、血清群/血清型の同定には不向きである。被検血清中の抗体は固層保持体、いわゆるマイクロプレート上に固定された抗原と結合する。反応、洗浄などの操作後、被検血清に対応した酵素を結合した特異的抗体を加える。結合した酵素活性は特異的発色基質を加えることで、測定される。基質の分解の結果生ずる色素量は、被検血清中の抗体量に比例する (Beer-Lambert 法則による比例区間に限る)。

#### A10.3.2 使用試薬類、材料

以下必要試薬類である：

- マイクロプレートもしくは ELISA 用ストリップ： ELISA 用平底 96 穴プレートもしくは 8 ないし 12 穴の平底ストリップ(マイクロプレートの一部を 8 穴もしくは 12 穴単位で切り出した形状をしている)を使用する。これ以外のタイプでは抗原の吸着が不均一であったり、

再現性に問題がある可能性がある。現在、ELISA マイクロプレート M129A(Dynatech)と ImmulonA で良好な結果が得られている。

- リン酸緩衝生理食塩水(PBS)： NaCl (80 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (11.33 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2 g)を蒸留水に溶解し、全量で 1,000 mL とする。120°C, 20 分間高压蒸気滅菌する。用時 1/10 に希釈して用いる。
- スキムミルク-PBS 溶液： PBS に 5%(W/V)となるようにスキムミルクを加えたもの。0.2% マーシオレートを加え防黴剤とすることもある(5%スキムミルク-PBS 1mL に 20%マーシオレート保存液 1mL を加える)。しかし、本溶液は用時調製が好ましい。
- 酵素標識抗体(2次抗体)：多くの試薬製造メーカーがペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 製品を供給している。これらの抗体は 1/500, もしくは予備試験によって決定された希釈倍率にしたがって、スキムミルク-PBS 溶液で希釈する。
- 基質： 酵素活性は至適緩衝液中で、特異的基質を用いて測定される。よく使用される基質は 2,2'-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン)-6-スルホン酸 (ABTS) アンモニウム塩である(Sigma, Boehringer)。保存溶液は 0.219 g を蒸留水 10 mL に溶解させたものである。本基質は発がん性が強いため、この保存液の取り扱いには注意を要する。反応緩衝液は酢酸ナトリウム(13.6 g), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6.9 g)を蒸留水 1,000 mL に溶解させた後、100°C, 20 分間高压蒸気滅菌する。過酸化水素水（用事調製）は、30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液 200 μL を蒸留水 7 mL で希釈して用いる。

#### A10.3.3 方法

##### 抗原調製

- 培養 7 日目の  $10^8 \sim 10^9$  レプトスピラ/mL まで増殖させた *L.biflexa* Patoc I 株を使用する。培養状態、菌数などは暗視野顕微鏡で確認する。最終濃度 2%になるようにホルムアルデヒドを加え、3~4 時間静置して不活化を行う。
- 100°Cの沸騰水浴に、30 分間つける。
- pH 9.6 に調整する。
- 10,000 ×g, 30 分遠心する。
- 上澄みを抗原溶液として使用する。

##### プレートコーティング

- 抗原液 150 μL を各穴に加える
- 溶液がすべて蒸発するまで 37°Cで 3~5 日間保温する。

抗原をコートしたプレートは、密封容器に入れ乾燥下室温暗所に保存可能である。本条件下ではプレート上の抗原は約 1 年間は安定である。

##### プロッキング(非特異的結合部位の保護)

- プレートを用時調製したスキムミルク-PBS 溶液で 3 回洗浄する。
- 穴にスキムミルク-PBS 溶液を加え、4°C一晩、もしくは 37°Cで 1 時間静置する。
- 穴内のスキムミルク-PBS 溶液を除去し、ろ紙上に軽くたたきつけて余分な溶液を完全に取り除く。

### **被検血清(一次抗体)の添加**

各被検血清は 2 連で試験する。試験血清希釈倍率は 1/400 である。同一患者由来のすべての血清を試験する。

- プレート中の 8 穴は 1/400～1/51,200 に段階希釈した陽性対照のプール血清
- 2 穴は閾値対照血清（弱陽性）
- 1 穴は抗原対照
- 1 穴は酵素標識抗体
- 37°Cで 1 時間静置する。

### **酵素標識抗体(二次抗体)の添加**

- 穴中の反応液を捨て、スキムミルク-PBS 溶液で 3 回洗浄する。
- 酵素標識抗体の至適希釈倍率はあらかじめ希釈滴定法により決定しておく。
- 希釈した酵素標識抗体 150 μL を、各穴に加える。
- 37°Cで 1 時間反応させる。

### **発色検出**

- 穴中の反応液を捨て、1×PBS 溶液で 3 回洗浄する。
- 使用直前に以下の試薬を混合し基質液を調製する。
  - ABTS 保存溶液：1 mL
  - 基質緩衝液：20 mL
  - 希釈した H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液：200 μL
- 各穴に基質液 150 μL を加える
- 室温で 10 分間振とうする（色が変化したことを目視で確認する）。各穴に 10% SDS を 50 μL 加え反応を停止させる。

### **測定**

マイクロプレート用吸光度計で 405 nm の吸光度を測定する。緑色の発色は、被検血清中に抗体が存在することを示している。

各被検血清抗体価は、段階希釈したプール陽性血清の吸光度から得られた検量線をもとに算出する。陽性閾値は 400 倍希釈した閾値対照血清の値を検量線にプロットして決定する。

#### **A10.3.4 結果と試験の適用範囲**

##### **注意事項**

本試験法は高感度であることから、使用器材の洗浄は十分に行うこと、ガラス器具等は ELISA 専用とすることが望ましい。

##### **抗体応答の時期**

ELISA は MAT に比較し IgM 抗体の検出感度が良いため、レプトスピラ症の早期診断に適している。通常発症後 6～8 日後には抗体反応が見られる。一方、低レベルの IgM 抗体が持続してい

るにもかかわらず、ELISA による抗体検出は、MAT に比べ早く陰性化することがある。ELISA では過去の感染や予防接種による抗体は検出されないので、過去の感染と現在の感染を区別することができる。二次抗体として抗ヒト全免疫グロブリン、もしくは抗ヒト IgG 抗体を用いた場合、試験の陽性範囲は広くなる。なぜなら回復した患者、もしくは免疫されたヒトにおいて維持されている抗体も検出されることがあるからである。したがって全免疫グロブリンの検出に基づく試験の陽性レベルは、IgM のみ、もしくは IgG のみの検出よりも、必ず同程度もしくはより高いレベルにある。

### **感度と特異性**

ELISA は高感度でかつ特異性が高いレプトスピラ症の試験法である。ELISA は MAT と比較してその操作が簡便であることから、スクリーニング試験として特に適している。ELISA はレプトスピラ症の発生状況や抗体の保有率を把握するための疫学調査にも有用である。

しかしながら、本試験は絶対に確実とはいえない。たとえば血清群 *Grippotyphosa* による多くの感染例や血清群 *Australis* による一部の感染例では陰性となることがある。いくつかの血清群株を非病原性の *Patoc I* 株の替わりに抗原として使用すれば、検出感度は上昇すると考えられる。しかしながら、感染起因血清群が明らかになっていない場合は、多種の抗原を使用しなくてはならず手間がかかる。

市販の ELISA キットがいくつかの製造元から入手できる(解説 15)。

### **A10. 4 まとめ**

血清学的データの解釈には注意が必要である。技術的な問題や、起因血清群が検査抗原に含まれているか否か、病気のどの時期に採取した血清か、あるいは抗菌薬投与歴など多くの因子を考慮しなければならない。属特異的血清診断は、MAT に比べて感染早期に抗体検出を可能にする傾向がある (Turner, 1968)。

10 日間程度の間隔をあけて 2 回、ないし 3 回採血を行い、血清学的検査を行う必要がある。レプトスピラ症の集団発生時や診断を速やかに行う必要がある時は、この間隔を短くすることも可能である。

このため、完全な疫学情報・臨床情報は、血清学的試験を行う部門に伝達される必要がある(解説 A10.1 参照)。この調査票には抗菌薬投与の有無、発症日などの情報が含まれていなければならない。もし発症後速やかに抗菌薬投与が行われているならば、免疫応答、抗体価上昇は遅延することがある。この場合いくつかの試験、特に ELISA では陰性となることから、陽性と診断できるような試験法への変更が必要となる。

しかしながら、一般的には ELISA によって検出される抗体の陽転は、MAT による検出より、通常 24~48 時間早いことが知られていることから、抗体はいずれの試験でも陰性と判定される可能性がある。MAT は既往のレプトスピラ感染を検出するのに適した方法であることはいうまでもない。

パリのパストール研究所によれば、1 ないし複数の抗原に対して 100 倍以上の抗体価を示した場合、すでに抗体陽性の閾値に達しているということである(p.12, MAT 抗体価, 参照)。しかしながら、これは過去の暴露による残存抗体を検出している可能性もあることから、現症がレプトスピラ症であると確定することはできない。上述のとおり、10 日間ほどの間隔をあけたペア血清に

よる抗体価上昇を確認することが必要である。4倍以上の抗体価の上昇により、最近、あるいは現在の感染を確定できる(2倍は有意ではない)。加えて連続して採血した2検体で、抗体が陽転していることが必要である。もしPatoc I株に対してのみ抗体価上昇が見られる場合、診断抗原のなかに感染起因血清群が含まれていない可能性、あるいは非特異反応である可能性を考える必要がある。

## 解説 A10.1 レプトスピラ症診断のための問診票(例)

ヘレフォード郡病院・公衆衛生研究室・レプトスピラレンスユニット(LRU)			
レプトスピラレンスユニットへの依頼時には、この様式をご使用願います。			
診断および疫学情報収集のため、以下質問すべてにお答えください。			
<b>氏名、性別、年齢、生年月日</b>			
<b>臨床症状</b> <input type="checkbox"/> インフルエンザ様症状 <input type="checkbox"/> 頭痛 <input type="checkbox"/> 筋肉痛 <input type="checkbox"/> 発熱 <input type="checkbox"/> 嗜眠 <input type="checkbox"/> 倦怠感 <input type="checkbox"/> 吐き気 <input type="checkbox"/> 下痢 <input type="checkbox"/> 結膜炎 <input type="checkbox"/> 肝機能指標異常 <input type="checkbox"/> 黄疸 <input type="checkbox"/> 肝機能障害 <input type="checkbox"/> 腎不全 <input type="checkbox"/> 骨膜炎 <input type="checkbox"/> 無症状 <input type="checkbox"/> 死亡 <input type="checkbox"/> 隔離  ほか(具体的に)	<b>職業</b> <input type="checkbox"/> 農民(耕作) <input type="checkbox"/> 農民(畜産) <input type="checkbox"/> 農作業従事 <input type="checkbox"/> 畜産業従事 <input type="checkbox"/> 屋外労働者 <input type="checkbox"/> 屋外労働者(動物との接触がある) <input type="checkbox"/> 飼育業従事者 <input type="checkbox"/> 漁業従事者 <input type="checkbox"/> 魚の調理者 <input type="checkbox"/> 屠畜業関連者 <input type="checkbox"/> 屠畜業従事者 <input type="checkbox"/> 屋内労働者 <input type="checkbox"/> 屋内(オフィス) <input type="checkbox"/> 屋内(家庭) <input type="checkbox"/> 下水道工事従事者 <input type="checkbox"/> 水道配管従事者 <input type="checkbox"/> 獣医師 <input type="checkbox"/> 医療従事者 <input type="checkbox"/> 軍関係者 <input type="checkbox"/> 教師 <input type="checkbox"/> 学生 <input type="checkbox"/> 主婦 <input type="checkbox"/> 退職 <input type="checkbox"/> 無職 <input type="checkbox"/> その他(具体的に)	<b>水との接触歴</b> <input type="checkbox"/> ウォータースポーツ <input type="checkbox"/> 一水泳 <input type="checkbox"/> 一手漕ぎボート <input type="checkbox"/> 一ウインドサーフィン <input type="checkbox"/> 一カヌー <sup>1</sup> <input type="checkbox"/> 一急流くだり <input type="checkbox"/> 一サーフィン <input type="checkbox"/> 魚釣り <input type="checkbox"/> 川 <input type="checkbox"/> 運河 <input type="checkbox"/> 湖 <input type="checkbox"/> 池 <input type="checkbox"/> ドブ <input type="checkbox"/> 下水 <input type="checkbox"/> 接触なし <input type="checkbox"/> その他(具体的に)	<b>動物との接触歴</b> <input type="checkbox"/> 家畜 <input type="checkbox"/> 一ウシ <input type="checkbox"/> 一ヒツジ <input type="checkbox"/> イヌ <input type="checkbox"/> ラット <input type="checkbox"/> マウス <input type="checkbox"/> その他(具体的に) <input type="checkbox"/> 不明
<b>渡航歴</b> <input type="checkbox"/> はい <input type="checkbox"/> いいえ もし「はい」の場合は渡航先、渡航日、期間などを記入ください。		<b>余暇活動</b>	
<b>発症日:</b> <b>抗菌薬治療開始日:</b> <b>抗菌薬種類:</b>		<b>その他</b>	
<b>被検材料名:</b>	<b>採取日:</b>	<b>番号:</b>	
<b>依頼試験名:</b> <input type="checkbox"/> CFT <input type="checkbox"/> ELISA <input type="checkbox"/> ほか(具体的に): <b>結果:</b> 以前の検体送付の有無(日付 ) もし「はい」の場合 LRU 番号と日付: 検査依頼者が下記の施設と異なる場合その依頼者名 <b>依頼施設名:</b> <b>住所:</b> <b>医師名:</b> <b>日付:</b>			<b>LRU 記入欄</b> IgM ELISA MAT 感染血清群  疫学 血清学 再検希望 終了 検査室番号

## 解説 A10.1 レプトスピラ症診断のための問診票(例)

### レプトスピラ症血清学的検査について：本検査とは、また検査内容についての説明

レプトスピラ症の血清診断のためレプトスピラレファレンスユニット(LRU)は2通りの試験を行います。自家製のELISAによりスクリーニングを行い、陽性血清については標準的検査法である顕微鏡凝集試験(MAT)を行います。

#### レプトスピラ ELISA

本試験では抗レプトスピラ IgM を検出します。*Leptospira interrogans* 血清型 Hardjo を抗原として用い、ペルオキシダーゼ/ABTS を酵素基質系として試験を行います。

患者血清抗体価は発症後5日以降で陽転しますが、一般的にこれ以前では陽転しません。抗菌薬投与がこの期間に行われていた場合、陰性の期間は延長します。

IgM 抗体価が 1:80～1:160 の場合、レプトスピラ感染の疑いがありますので、さらに MAT による確定診断を実施するため、追加血清が必要になることをご承知おきください。

#### 顕微鏡凝集試験(MAT)

MAT では、19種類の抗原プールについて顕微鏡凝集試験を行います。病原性レプトスピラには200以上の血清型が存在することが知られています。これらは抗原の類似性により血清群として分けることができます。できるだけ多くの血清型と反応ができるように、この MAT では各血清群に属するいくつかの血清型をプールして抗原として使用します。

MAT では、発症後約10日目以降で陽性反応を検出できますが、初期ではいくつかの血清群に反応する可能性があります。その後、一定期間後（数ヵ月程度）、感染起因血清群に対する抗体が優勢になると考えられます。

LRUにおいて感染血清群の同定を行うためには、長期間にわたって採取された血清が必要になります。

#### 本情報の必要性について

本情報は、英国における固有のレプトスピラ血清群をモニターすること、また新興血清型や海外からのレプトスピラの侵入を検知すること、そしてそれらに対して適切な対応をとるためにきわめて重要です。

レプトスピラ症の血清学的検査に関するこの説明により、患者様のご理解を得ることができ、再度の検体の収集と疫学情報の提供をお願いできるものと考えております。ご協力に感謝いたします。

#### レプトスピラ症診断確定のための検体

##### 1. 血清学的診断

一血清、最低必要量 250 μL

##### 2. レプトスピラ分離（被検材料）

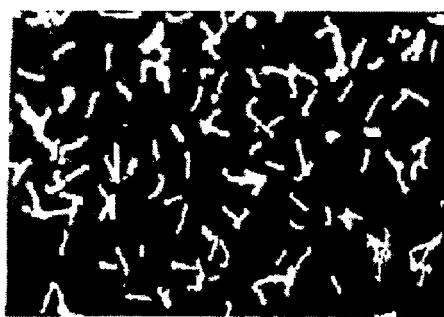
一脳脊髄液

一発症後5日以内の好気血液培養（培養ビン）を LRU へ直送

##### 3. 固定、もしくは非固定剖検組織は免疫染色に使用します。

現在、尿検体は分離には適さないとされています。

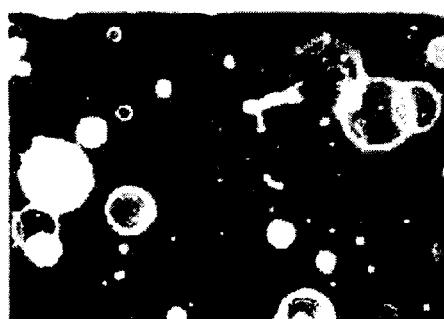
ほかレプトスピラ症診断に関しまして、ご不明点などございましたら LRU までご連絡ください。



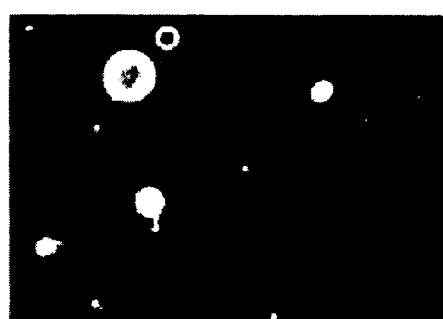
Negative control



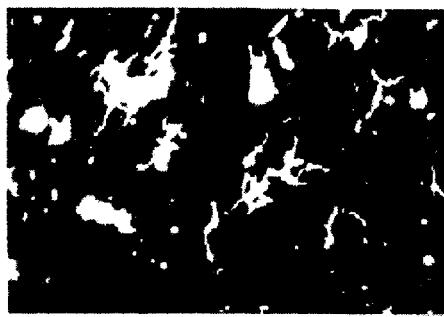
1:160



1:120



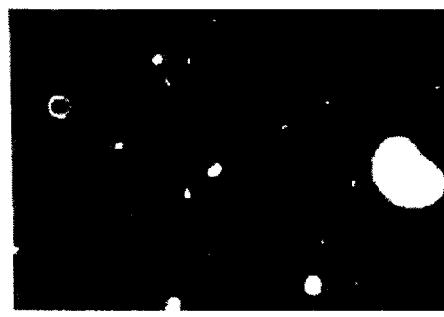
1:320



1:40



1:640



1:80

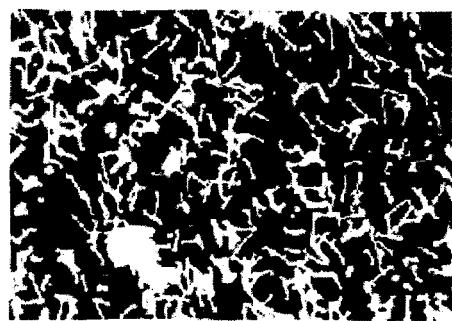


1:1280

A10.1 参考菌株 M20 (血清型 Copenhageni) を使用した凝集例。ホモ血清を 20 倍希釈から段階希釈し、試験した結果を示している。暗視野顕微鏡での倍率は 200 倍である。被検血清の抗体価は 5,120 倍である。



1:2560



1:40 960



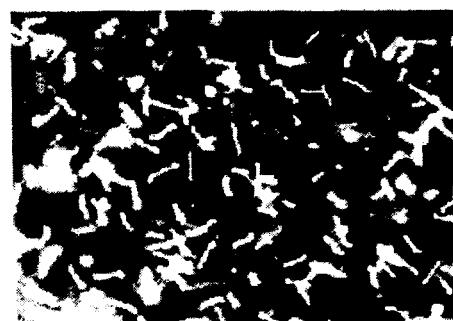
1:5120



1:81 920



1:10 240



1:20 480

## 引用文献

- B. Adler, A. M. Murphy, S. A. Locarnini, S. Faine (1980). Detection of specific anti-leptospiral immunoglobulins M and G in human serum by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 11:452457.
- C. Borg-Petersen (1949). Experience of leptospirosis in Denmark. From: Discussion of leptospirosis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 42:714-718.
- C. Borg-Petersen, A. Fagroeus (1949). The influence of the antigen density and other factors on the serum titer in the agglutination-lysis-test for leptospirosis. *Acta Pathologica*, 26:1-4.
- E. A. Carbrey (1960). The relative importance of variable factors in the agglutination-lysis test. *Annual Proceedings of the United States Livestock Sanitary Association*, 64:130-142.
- J. R. Cole, C. R. Sulzer, A. R. Pursell (1973). Improved microtechniques for the Leptospiral agglutination test. *Applied Microbiology*, 25:976-980.
- International Committee on Systematic Bacteriology, Subcommittee on the Taxonomy of *Leptospira*. Minutes of the meeting, 6 to 10 August, 1982, Boston. Massachusetts, USA (1984) *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34:258-259.
- E. Kmety (1957). Betrachtungen zum Problem der paradoxen Reaktion und deren Bedeutung in der Serodagnostik der Leptospirosen. *Zentralblatt für Bakteriologie I Abteilung Originale*, 170:597-608.
- L. Martin, A. Pettit (1918). Sero-diagnostic de la spirochaetose icterohaemorrhagique. *Bulletin et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux de Paris*, 42:672-675.
- M. F. Palmer, S. A. Waitkins, S. W. Wanyangu (1987). A comparison of live and formalised leptospiral microscopic agglutination test. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A265:151-159.
- D. Postic, F. Merien, P. Perolat, G. Baranton (2000). *Diagnostic biologique leptospirose - borréliose de Lyme/Biological diagnostic leptospirosis-Lyme borreliosis*, 2nd ed. Paris. Collection des Laboratoires de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris, 177-186.
- W. Schüffner, A. Mochtar (1926). Experiments on the differential characters of Leptospira-strains with introductory remarks on the process of agglutination and lysis. *Proceedings of the Imperial Academy of Sciences, Amsterdam*, 30(1):25-32.
- C. R. Sulzer, W. L. Jones (1978). *Leptospirosis: methods in laboratory diagnosis*. Atlanta. GA, U.S.

Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service (DHEW Publication No. (CDC) 78-8275).

W. J. Terpstra, G. S. Ligthart, G. J. Schoone (1980). Serodiagnosis of human leptospirosis by enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA). *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. I. Abteilung Originale*, A247:400-405.

W. J. Terpstra, G. S. Ligthan, G. J. Schoone (1985). ELISA for the detection of specific IgM and IgG in human leptospirosis. *Journal of General Microbiology*, 131:377-385.

L. Turner (1968). Leptospirosis II. Serology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 62:880-899.

G. Watt, L. M. Alquiza, L. P. Padre, M. L. Tuazon, L. W. Laughlin (1988). The rapid diagnosis of leptospirosis: a prospective comparison of the dot enzyme-linked immunosorbent assay and the genus-specific: microscopic agglutination test at different stages of illness. *Journal of Infectious Diseases*, 157:840-842.

J. W. Wolff (1954). *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas.

W. J. Zochowski, S. A. Waitkins, M. F. Palmer (1987). The use of ELISA in the diagnosis of human leptospirosis. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 43:330-339.

## 解説 11

### MAT と ELISA 以外の血清診断法

以下代表的な手法について記す。

試験	市販の有無(+:あり, -:なし) <sup>a</sup>
補体結合試験法(CFT)	抗原のみ
交差免疫電気泳動法(CIE)	-
Dipstick 法 :	
LEPTO Dip-Stick	+
LeptoTek Lateral Flow	+
乾燥ラテックス凝集試験法(LeptoTek Dri-Dot)	+
間接蛍光抗体法(IFAT)	+
間接赤血球凝集試験法(IHA)	+
ラテックス凝集試験法(LA)	-
肉眼的スライド凝集試験法(SAT)	抗原のみ
マイクロカプセル凝集試験法	+
Patoc-スライド凝集試験法(PSAT)	+
感作赤血球溶血試験法(SEL)	-

a 解説 15 参照

#### 参考文献

##### Complement-fixation test (CFT)

M. Nicolescu, L. Brosai (1972). The estimation of the results obtained by the complement Fxation test performed with the Patoc antigen in the diagnosis of human leptospirosis. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale et de Microbiologie*, 31:209-216.

A. A. Pinto, C. A. Santa Rosa, T. Sadatsune, G. C. Fleury (1974). Comparative study between complement fixation and microscopic agglutination tests for leptospiral diagnosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo, Brasil*, 16:28-31.

J. H. Schubert, L. B. Carrington, E. Conner, L.V. Holdeman (1956). Whole Leptospira suspensions as antigens in the complement-fixation test for leptospirosis. *American Journal of Hygiene*, 63:254-260.

N. Sturdza, M. Elian, G. Tulpan (1960). Diagnosis of human leptospirosis by the complement-fixation test with a single antigen. *Archives Roumaines de Pathologie Experimentale*, 19:571-582.

## **Counterimmunoelectrophoresis**

W. J. Terpstra, G. J. Schoone, G. S. Lighthart (1979). Countereimmunoelectrophoresis in the diagnosis of human leptospirosis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung Originale*, A244:285-290.

## **Dipstick tests:**

### **LEPTO Dip-Stick**

P. H. Levett, S. I. Branch, C. U. Whittington, C. N. Edwards, H. Paxton (2001). Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:349-351.

### **- Lepto Tek Lateral Flow**

C. K. Eapen, S. Sugathan, M. Kuriakose, T. Abdoel, H. L. Smits (2002). Evaluation of the clinical utility of a rapid blood test for human leptospirosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42:221-225.

H. L. Smits, Y.V. Ananyina, A. Chereshsky, L. Dancel, R.F.M. Lai A Fat, H.D. Chee, P.N. Levet, T. Masuzawa, Y. Yanagihara, M. A. Muthusethupathi, E. J. Sanders, D. M. Sasaki, H. Domen, C. Yersin, Tin Aye, S.L. Bragg, G. C. Gussenhoven, M. G. A. Goris, W. J. Terpstra, R. A. Hartskeerl (1999). International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for the detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 37:2904-2909.

H. L. Smits, C. K. Eapen, S. Sugathan, M. Kuriakose, M. Hussein Gasem, C. Yersin, D. M. Sasaki, B. Pujianto, M. Vestehng, T. H. Abdoel, G. C. Gussenhoven (2001). Lateral-flow assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 8:166-169.

H. L. Smits, R. A. Hartskeerl, W.J. Terpstra (2000). International multi-centre evaluation of a dipstick assay for human leptospirosis. *Tropical Medicine and International Health*, 5:124-128.

### **Dried latex agglutination test**

H. L. Smits, M. A. W. G. van der Hoorn, M. G. A. Goris, G. C. Gussenhoven, C. Yersin, D. M. Sasaki, W. J. Terpstra, R. A. Hartskeerl (2000). Simple latex agglutination assay for rapid serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1272-1275.

H. L. Smits, H. D. Chee, C. K. Eapen, M. Kuhakose, S. Sugathan, M. Hussein Gasem, C. Yersin, D. M. Sasaki, R. F. M. Lai, A. Fat, R. A. Hartskeerl, B. Liesdek, T. H. Abdoel, M. G. A. Goris, G. C. Gussenhoven (2001). Latex based, rapid and easy assay for human leptospirosis in a single test format. *Tropical Medicine and International Health*, 6:114-118.

### **Indirect fluorescent antibody test (IFAT)**

M. ToKen, E. Shenberg, J. Van der Hoeden (1966). The use of immunofluorescence in the diagnosis of

human leptospirosis by a genus-specific antigen. *Journal of Infectious Diseases*, 116:537-543.

S. Udomsakdi, U. Potha (1972). The diagnosis of leptospirosis by fluorescent antibody technique using saprophytic leptospira as a genus-specific antigen. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 55:101-104.

### **Indirect haemagglutination test (IHA)**

P. V. Effler, H. Y. Domen, S. L. Bragg, Aye Tin, D.M. Sasaki (2000). Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis in Hawaii. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1081 -1084.

S. Imamura, H. Matsui, Y. Ashizawa (1972). Studies on indirect hemagglutination test for leptospirosis. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 42:563-568.

S. Imamura, H. Matsui, M. Kasao, Y. Ashizawa (1977). Use of freeze-dried sensitized erythrocytes in indirect hemagglutination test for serodiagnosis of leptospirosis. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 47:441-444.

P. N. Levett, C.U. Whittington (1998). Evaluation of the indirect hemagglutination assay for diagnosis of acute leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:11-14.

C. R. Sulzer, W. L. Jones (1973). Evaluation of a hemagglutination test for human leptospirosis. *Applied Microbiology*, 26:655-657.

### **Latex agglutination test (LA)**

A. E. Kelen, N.A. Labzoffsky (1960). Studies on latex agglutination test for leptospirosis. *Canadian Journal of Microbiology*, 6:463-473.

T. F. Muraschi (1959). A simple screening test for the detection of leptospirosis in human beings and animals. *American Journal of Public Health*, 49:1074-1078.

J. Vosta (1962). Die Diagnostik der Leptospirosis mit Hilfe des Latex-Agglutinations-Tests mit dem Antigen aus der *L. biflexa*. *Microbiology und Epidemiology*, 7:515-570.

### **Macroscopic slide agglutination test (SAT)**

M. M. Galton, D. K. Powers, D. Hall, R. G. Cornell (1958). A rapid macroscopic-slide screening test for the serodiagnosis of leptospirosis. *American Journal of Veterinary Research*, 19:505-512.

J. W. Wolff, H. J. Bohlander (1967). Screening tests in human serum samples with *Leptospira biflexa* antigens incorporated in Galton's macroscopic slide test. *Tropical and Geographical Medicine*, 19:63-69.

### **Microcapsule agglutination test**

Y. Arimitsu, E. Kmety, Y. Ananyina, G. Baranton, I. R. Ferguson, L. Smythe, W. J. Terpstra (1994). Evaluation of the one-point microcapsule agglutination test for diagnosis of Leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 72:395-399.

S. C. Sehgal, P. Vijayachan, V. Subramaniam (1997). Evaluation of *Leptospira* Micro Capsular Agglutination Test (MCAT) for sero-diagnosis of leptospirosis. *Indian Journal of Medical Research*, 106:504-507.

### **Patoc-slide agglutination test (PSAT)**

M. Mailloux, J. Mazzonelli, G. T. Dorta de Mazzonelli (1974). Thermoresistant antigen in leptospires. Possibility of a macroscopic diagnosis of leptospirosis with a single antigen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung Originale*, A229:238-241.

J. Mazzonelli, G. Dorta de Mazzonelli, M. Mailloux (1974). Possibilité de diagnostique sérologique macroscopique des leptospires à l'aide d'un antigène unique. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 4-5:253-254.

J. Mazzonelli, G. Dorta de Mazzonelli, M. Mailloux (1974). Antigène thermorésistant chez les leptospires. *Annales de Microbiologie*, 125A:125-126.

J. Mazzonelli, G. Dorta de Mazzonelli, M. Mailloux (1975). Recherches sur les antigènes de leptospires. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 26:35-42.

### **Sensitized erythrocyte lysis test (SEL)**

C. D. Cox (1955). Hemolysis of sheep erythrocytes sensitised with leptospiral extracts. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 90:610-615.

C. D. Cox (1957) Standardization and stabilization of an extract from *Leptospira biflexa* and its use in the hemolytic test for leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 101:203-209.

C. D. Cox, A. D. Alexander, L. C. Murphy (1957). Evaluation of the hemolytic test in the serodiagnosis of human leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 101:210-218.

C. D. Cox, R. C. Stover, R. W. Treick (1958). Serological studies on hemolytic antigen from *Leptospira*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98:265-269.

D. E. Macomb, D. J. W. Smith, D. L. Coffin, R.A. MacCready, R. Shihman Chang (1957). The use of erythrocyte sensitizing substance in the diagnosis of leptospirosis. I. The sensitized erythrocyte

agglutination test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6:90-100.

C. F. Sharp (1958). Laboratory diagnosis of leptospirosis with the sensitised-erythrocyte lysis test. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 26:349-356.

R. Shihman Chang, D. J. W. Smith, D. E. McComb, C. J. Sharp, J. I. Tonge (1957). The use of erythrocyte sensitizing substance in the diagnosis of leptospiroses. II. *The sensitized erythrocyte lysis test. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 6:101-107.

D. S. K. Tan (1969). Sensitized-erythrocyte-lysis (SEL) test as an epidemiological tool for human leptospirosis serological surveys. *Bulletin of the World Health Organization*, 40:899-902.

## 解説 12

### レプトスピラの分離と培養

レプトスピラの分離は、検体の選択と病気の段階に依存している。レプトスピラ血症期(発症後1日から約10日まで)の間は、血液が最も適した検体となる。レプトスピラの培養に適した培地に関する情報は、解説16に記載した。

#### A12.1 血液

培養には発症後10日目まで、抗菌薬投与前に採血した血液を用いなければならない。理想的には病室で患者より静脈血を無菌的に採取し、レプトスピラ用培地の入った血液培養容器に接種する。5mLのレプトスピラ用培地の入った数本のチューブに、血液を2、3滴接種する。接種する血液量が多すぎると、レプトスピラの生育は阻害される。

培養は30°Cで行い、4~6ヶ月間定期的に観察を行う。

#### A12.2 脳脊髄液

レプトスピラは、第1病週の脳脊髄液中に暗視野顕微鏡下で観察されることがあり(解説6参照)、髄液0.5mLを5mLの半流動培地に接種、培養することによりレプトスピラを分離できことがある。

#### A12.3 尿

発症から約1週間後のレプトスピラに対する抗体の上昇期には、尿中にレプトスピラを排出する。この時期には尿と腎皮質剖検組織(下記参照)が、ヒトからのレプトスピラの分離に最も適した検体である。保菌状態の野生動物や家畜は、長期間、動物種によっては一生涯レプトスピラを尿中に断続的に排出することがある。この時期には、尿や腎臓組織からレプトスピラが分離されることがある(下記参照)。

新鮮な中間尿を採取し、速やかに培地に接種する。5mLの培地を含む最初のチューブに尿を1滴接種する。あるいは、尿検体を遠心分離にかけ( $1600\times g$ , 30分または $10,000\times g$ , 1分)，沈渣を培地に再懸濁する。その後速やかに、1~2本の10倍希釈培養を調製する。培養は血液の場合と同様に行う。

尿は酸性で、それゆえレプトスピラの生存数は尿中では減少していくので、採取後2時間以内に培地に接種しなければならない。尿中のレプトスピラの生存は、炭酸水素ナトリウムで中和することや、ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液を用いることで上昇するとの報告がある(Ellinghausen, 1973)。

5-フルオロウラシルやレプトスピラの増殖には影響がなく、他の細菌の増殖を抑制する適切な抗菌薬を含む培地(解説16参照)は、尿培養のコンタミネーションを減少させるのに有用なことがある。

#### A12.4 剖検材料

レプトスピラ症によりヒトや動物が死亡した場合は、さまざまな組織の剖検材料からレプトス

ピラの培養が可能である。レプトスピラはまた、動物の流産胎仔からも分離されることもある。組織片を針なしの滅菌注射筒の中に入れ、注射筒の先を培地の入った試験管の中に入れて、組織片をその中に押し出し、細かくする。あるいは、肝臓や腎臓の組織片を乳鉢の中に入れて、リン酸緩衝生理食塩水（PBS） pH 7.2 あるいは培地を加えて磨碎し、その上清を培地に接種する。

手順は以下の通りである。

1. 無菌条件下で、ペトリ皿に組織片(0.5×0.5 cm)を小さく切り出す。
2. 標準 EMJH 培地(p.103~106 参照)1 mL を加え、しっかり磨碎する。
3. 磨碎した組織を含む培地 0.5 mL を 5-フルオロウラシル(5 FU)と 1% ウサギ血清、1% ウシ胎児血清を加えた栄養強化 EMJH 培地 5 mL に接種する。残りの 0.5 mL は 5 FU 添加標準 EMJH 培地に接種する。
4. 検体を接種した培地を混合し、その 0.5 mL を滅菌ピペットで新しい 5 FU 添加栄養強化 EMJH 培地 5 mL と 5 FU 添加標準 EMJH 培地 5 mL に移す。
5. これらを混合後、4 と同様にしてさらに新しい培地に希釈した検体を接種する。これにより 10 階段希釈の培養液がそれぞれ 3 本ずつとなる。
6. これら 6 本の培養液を 30°C で 4~6 カ月間培養し、最初の 2 週間は週に一度、その後は 2 週間に一度の観察を行う。

レプトスピラの分離は、培地への接種時の生存菌数に依存する。宿主の死後変化によって、急速に生存菌数は減少する。生存菌数の減少はまた温度依存的でもある。レプトスピラは 4°C ではしばらく生存できるが、20°C に保たれた組織中では、細胞の自己融解とそれに続く pH の低下によって、急速に死滅し、30~40°C ではさらにその速度は速まる。レプトスピラの生存菌数は、凍結により著しく減少してしまうため、組織は凍結してはならない。

## 引用文献

H. C. Ellinghausen (1973). Growth temperatures, virulence, survival, and nutrition of leptospires. *Journal of Medical Microbiology*, 6:487-497.

## 参考文献

B. Babudieri (1961). Laboratory diagnosis of leptospirosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 24:45-58.

W. A. Ellis, T. W. A. Little, eds (1986). *The present state of leptospirosis diagnosis and control*. Dordrecht, Boston, Lancaster, Martinus Nijhoff Publishers.

S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat (1999). *Leptospira and Leptospirosis*, 2nd ed. MediSci, Melbourne, Australia.

P. H. Levett (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Review*, 14:296-326.

J. W. Wolff (1954). *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas.

## 解説 13

### 実験動物を用いたレプトスピラの分離

レプトスピラの間接的な分離法として、実験動物に血液や尿を接種する方法がある。分離が成功するかは、実験動物の感受性によって異なり、レプトスピラ血清型やその相対的な病原性の強さに依存している。使用される動物は、若いモルモット(150～175 g)やゴールデンハムスター(4～6 週齢)である。

検体の接種(0.5～1 mL)は腹腔内に行う。

接種後 3 日目に腹水を採取する。下腹部にキャピラリーピペットを穿刺すると、毛細管現象によってピペットに腹水が流入してくる。その腹水を 1 滴スライドガラス上に滴下し、カバーガラスをのせて暗視野顕微鏡下で観察を行う(解説 6 参照)。レプトスピラが観察された場合は、麻酔下で心臓採血を行い、培養のための血液を回収する。

接種した動物が死亡した場合は、さまざまな培地での培養(解説 12)に用いるための肝臓や腎臓組織を得ることが可能である。

#### 参考文献

J. W. Wolff (1954). *The laboratory diagnosis of leptospirosis*. Springfield, IL, Charles C. Thomas.

## 解説 14

### ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)は臨床検体からのレプトスピラ DNA の検出に用いられている。プライマー(レプトスピラのある遺伝子に特異的な短いオリゴヌクレオチド)と耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて、温度サイクルを繰り返すことにより検体から、レプトスピラ DNA を増幅させる方法である。PCR は血液、尿、脳脊髄液および組織検体に適用可能である。

増幅した DNA はゲル電気泳動により容易に検出可能である。加えて、PCR の増幅過程、もしくは PCR 終了後に、標識 DNA プローブとのハイブリダイゼーションによりその検出特異性をさらに高めることができる。検出はプロット、あるいは溶液中でフルオログラフィー、オートラジオグラフィー、クロマトグラフィーなどにより行われる。

PCR では特異性を高めるためにハイブリダイゼーション法、あるいはネステッド PCR を行うことが望ましい。最新のサーモサイクラーと市販の核酸抽出キット(Woo ら 1997, 1998)を使用することで、PCR は迅速かつ意味のあるレプトスピラ症の早期診断の方法となっている。

今日までに、多くの PCR が発表されている(Gravekamp ら 1993, Hookey 1992, Merien ら 1992, Wagenaar ら 1994, Woodward ら 1991, Zuerner ら 1995, Zuerner & Bolin 1997)。主な増幅標的として 16SrRNA をコードする *rrs* 遺伝子が使われている(Hookey 1992, Merien ら 1992, Wagenaar ら 1994)。この他に、*secY* 遺伝子を標的としたプライマー G1/G2 や *flaB* 遺伝子を標的としたプライマー B64I/B64II なども報告されている(Gravekamp ら 1993, Zuerner ら 2000)。

プライマー G1/G2 やプライマー B64I/B64II を用い、尿と血液からの抽出 DNA を用いた PCR のプロトコールを以下に示した。*rrs* 遺伝子内の異なる領域を増幅する PCR、およびプライマーについての詳細は Postic らの論文(2000)を参照願いたい。

*rrs* の PCR、と *secY* や *flaB* を標的とした PCR の臨床検体を用いた評価が、Merien ら(1995)、さらには Brown ら(1995)によって報告されている。

他の PCR については参考文献に記載した。アガロースゲル電気泳動法、サザンブロッティング法、ハイブリダイゼーション法、DNA ラベルの方法は標準的な実験手引書、もしくは試薬製造元の添付書類を参考にしていただきたい。

#### A14.1 DNA 抽出法

Boom ら(1990, 1991)の方法を以下に示す。

##### A14.1.1 溶液

溶液の調製は以下に示した通りである。以下の溶液が必要であり、その調製方法を述べる。

###### L<sub>2</sub>-緩衝液 0.1M,Tris-HCl pH6.4

- トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン 12.1 g を 800 mL の蒸留水に溶解する。
- 12N HCl を 8.1 mL 加える。
- 蒸留水で 1 リットルにあわせる。

### L<sub>2</sub>-洗浄用緩衝液:

- グアニジンチオシアノ酸塩(GuSCN) 120 g を 100 mL の L<sub>2</sub>-緩衝液に溶解する。60°C にて穏やかに振とうし溶解する。

### L<sub>6</sub>-溶解用緩衝液:

- GuSCN 120 g を 100 mL の L<sub>2</sub>-緩衝液に溶解する。溶解後、22 mL の 0.2M EDTA (pH8.0)と Triton X-100 2.6 g を加える。

### 0.2M EDTA (pH8.0):

- 37.2 g の EDTA と 4.4 g の NaOH を蒸留水に溶解後、蒸留水にて 500 mL にあわせる。

### ケイソウ土:

- 10 g の Kieselguhr-DG を 50 mL の蒸留水に懸濁する。
- 12N HCl を 0.5 mL 加える。
- 良く混和後、分注し高圧蒸気滅菌する。
- 遮光し、室温で保存。

Kieselguhr-DG(ケイソウ土)はシリカゲルで代用可能である。

GuSCN: Fluka Biochemica Cat.No. 50990.

Kieselguhr-DG: Riedel-de Haen Cat No. 31689.

### A14.1.2 尿からの DNA 抽出

方法を以下に示す。

- (1) 10 mL の尿を 15 mL 容器に分取後、10 μL のホルマリン(最終濃度 0.1%)を加える。使用まで 4°C で保存。
- (2) 全量を 1600×g, 30 分間遠心。
- (3) 上澄を捨てる
- (4) 9 mL の L<sub>6</sub>-溶解用緩衝液及び 40 μL のケイソウ土、もしくはシリカゲルを沈渣に加える。
- (5) 室温で 10 分間振とうする。
- (6) 1600×g, 5 分間遠心。
- (7) 上澄を吸引除去。
- (8) L<sub>2</sub>-wash buffer を 1 mL 加え沈渣を懸濁後、新しい 1.5 mL をチューブに移す。
- (9) 沈渣を 1 mL の L<sub>2</sub>-洗浄用緩衝液で 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (10) 沈渣を 1 mL のエタノールで 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (11) 沈渣を 1 mL のアセトンで 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (12) 沈渣を 56°C, 10 分間加温し乾燥させる。
- (13) 乾燥沈渣に 200 ng/mL プロテネース K 溶液 125 μL を加え、56°C, 10 分間加温する。
- (14) 100°C, 10 分間煮沸する。
- (15) 10,000×g, 2 分間遠心する。
- (16) 上澄 100 μL を回収し、うち 10~30 μL を PCR 反応に使用する。

Proteinase K 处理 (13, 14 の操作)は省略可能である。この場合、沈渣は 125 μL の蒸留水に懸濁す

る。

#### A14.1.3 血清、血漿からのDNA抽出

いくつかの方法が報告されているが、以下の方法は信頼性が高い。

- 検体 0.1 mL に 0.9 mL の L<sub>6</sub>-緩衝液を加える。操作はエッペンドルフチューブで行う。
- 1 mL の検体を使用する場合には、15 mL スクリューキャップチューブを用い、9 mL の L<sub>6</sub>-buffer を加える。ステップ 8 (1 mL の L<sub>2</sub>-洗浄用緩衝液による洗浄操作) 以降、1.5 mL エッペンドルフチューブを用いる。使用検体量は 1 mL 以下で次の操作法に準じて実施する。

- (1) 1 容量の検体に 9 倍量の L<sub>6</sub>-溶解用緩衝液を加える。容量によって 1.5 mL チューブもしくは 15 mL スクリューキャップチューブを使う。
- (2) 40 μL のケイソウ土、またはシリカゲルを加える。
- (3) 室温で 10 分間振とうする。
- (4) 遠心する。1.5 mL チューブ使用時には 10,000×g, 1 分間、15 mL スクリューキャップチューブ使用時には 1,600×g, 5 分間行う。
- (5) 上澄を吸引除去。
- (6) L<sub>2</sub>-洗浄用緩衝液を 1 mL 加え沈渣を懸濁する。開始時の検体容量が 1mL 以上の場合には、新しい 1.5 mL チューブに懸濁した溶液を移す。
- (7) 沈渣を 1 mL の L<sub>2</sub>-洗浄用緩衝液で 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (8) 沈渣を 1 mL の 70% エタノールで 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (9) 沈渣を 1 mL のアセトンで 2 回洗浄する(10,000×g, 1 分間)。
- (10) 沈渣を 56°C, 10 分間加温し乾燥させる。
- (11) 乾燥沈渣に 200 ng/mL Proteinase K 溶液 125 μL を加え、56°C, 10 分間加温する。
- (12) 100°C, 10 分間煮沸する。
- (13) 10,000×g, 2 分間遠心する。
- (14) 上澄 100 μL を回収し、うち 10~30 μL を PCR 反応に使用する。

Proteinase K 处理(11, 12 の操作)は省略可能である。この場合、沈渣は 125 μL の蒸留水に懸濁する。

#### A14.2 Gravekamp らの方法によるPCR

本法は Gravekamp ら(1993)および Bal ら(1994)によって記述された方法に、若干の改変を加えたものである。

##### A14.2.1 使用溶液

- (1) GeneAmp 10×PCR 緩衝液 II (100mM Tris-HCl, pH8.3, 500mM KCl) (Applied Biosystems)
- (2) 25mM MgCl<sub>2</sub> 溶液 (Applied Biosystems)

##### A14.2.2 プライマーおよび増幅鎖長

G1 5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT

G2 5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG

増幅鎖長: 285bp

B64I 5'-ACT AAC TGA GAA ACT TCT AC

B64II 5'-TCC TTA AGT CGA ACC TAT GA

増幅鎖長: 563bp

#### A14.2.3 PCR

1 反応当たり(50 μL)の組成を以下に示す:

- 0.5 μL フォーワード側プライマー, 100 μM (100 pmol/μL)
- 0.5 μL リバース側プライマー, 100 μM (100 pmol/μL)
- 0.5 μL dNTP ミックス (各 25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Amersham Pharmacia)
- 0.125 μL デオキシヌクレオチド dUTP 100 mM (Amersham Pharmacia)
- 5.0 μL 10×PCR 緩衝液 (GeneAmp 10×PCR buffer II)
- 6 μL 25 mM MgCl<sub>2</sub> 溶液
- 0.2 μL AmpliTaq DNA ポリメラーゼ (5U/μL)
- 0.5 μL ウラシルグルコシダーゼ(1U/μL)
- 10~30 μL DNA 試料
- 蒸留水(最終量が 50μL となるように)
- ミネラルオイル 2 滴

最終緩衝液濃度は 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> となる。PCR ではウラシル-N-グルコシダーゼ (UNG)を使用する事が望ましい。これは反応試薬へ混入した増幅産物を分解し、偽陽性反応を避けるためである。UNG を使用しない場合は、代わりに蒸留水を加える。

複数の検体で PCR を行う場合、検体数をまとめて調製し、各 PCR 反応チューブへ分注するといい。

至適条件、特に MgCl<sub>2</sub> 濃度については事前に検討する必要がある。さらに反応組成試薬のバッチ、試薬メーカーなどを変更する場合には、あらかじめ増幅性能試験を行わなければならない。

PCR 反応条件を以下に示す。

- 36°C, 10 分加温することで UNG により混入増幅産物を消化する。次いで 94°C, 5 分加温し、UNG を不活化する。この間に DNA 二本鎖も一本鎖となる。以下反応を 35 サイクル行う: 94°C(熱変性)1 分, 55°C(プライマーのアニーリング)1 分, 72°C(耐熱性 DNA ポリメラーゼによるプライマー伸長)2 分。終了後 72°C で維持。
- PCR の感度・増幅特異性は、適当な DNA プローブとのハイブリダイゼーションによって高めることができる(Bal ら, 1994)。

#### 引用文献

B. A. Bal, C. Gravekamp, R. A. Hartskeerl, J. de Meza-Brewster, H. Korver, W. J. Terpstra (1994). Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 32:1894-1898.

R. Boom, C. J. A. So., M. M. M. Salimans, C. L. Jansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:495-503.

R. Boom, C. J. A. So., R. Heijtink, P. M. E. Wertheim-van Dillen, J. van der Noordaa (1991). Rapid purification of hepatitis B virus DNA from serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 29:1804-1811.

P. D. Brown, C. Gravekamp, D. G. Carhngton, H. van de Kemp, R. A. Hartskeerl, C.N. Edwards, C. O. R. Everard, W. J. Terpstra, P. N. Levett(1995). Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 43:110-114.

C. Gravekamp, H. van de Kemp, M. Franzen, D. Carhngton, G.L. Schoone, G. J. J. M. van Eys, C. O. R. Everard, R. A. Hartskeerl, W. J. Terpstra (1993). Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology*, 139:1691 -1700.

J. V. Hookey (1992). Detection of leptospiraceae by amplification of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 90:267-274.

F. Meden, P. Amouhaux, P. Perolat, G. Baranton, I. Saint Girons (1992). Polymerase chain reaction for the detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:2219-2224.

F. Mehen, G. Baranton, P. Perolat (1995). Companion of polymerase chain reaction with microagglutination test and culture for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Infectious Diseases*, 172:281-285.

D. Postic, F. Mehen, P. Perolat, G. Baranton (2000). *Diagnostic biologique leptospirose- borreliose de Lyme/Biological diagnosis leptospirosis-Lyme borreliosis*, 2nd ed. Pans, Collection des Laboratories de Référence et d'Expertise. Institut Pasteur à Paris.

J. A. Wagenaar, R. P. A. M. Segers, B.A.M. van der Zeijst (1994). Rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira* species by amplification of ribosomal sequences. *Molecular Biotechnology*, 1994;2:1-14.

T. H. Woo, B. K. Patel, L. D. Smythe, M. L. Symonds, M. A. Norhs, M. F. Dohnt (1997). Identification of pathogenic *Leptospira* genospecies by continuous monitoring of fluorogenic-hybridisation probes during rapid-cycle PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:3140-3146.

T. H. Woo, B. K. Patel, L. D. Smythe, M. L. Symonds, M. A. Norris, M. F. Dohnt (1998). Identification of pathogenic *Leptospira* by TaqMan probe in a Light Cycler. *Annals of Biochemistry*, 256:132-134.

M. J. Woodward, G. J. Sullivan, J. C. Palmer, J. C. Wooley, J. S. Redstone (1991). Development of a PCR test specific for *Leptospira* hardjo genotype bovis. *Veterinary Record*, 128:282-283.

R. L. Zuerner, D. Art, C. A. Bolin (1995). IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans* sensu lato serovars. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:3284-3289.

R. L. Zuerner, C. A. Bolin (1997). Differentiation of *Leptospira interrogans* by IS1500 hybridization and PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:2612-2617.

R. L. Zuerner, R.A. Hartskeerl, H. van de Kemp, A. E. Bal (2000). Characterization of the *Leptospira interrogans* S10-spe-a operon. *FEMS Microbiology Letters*, 18:303-308.

## 解説 15

### 市販の検査試薬、培地、血清、単クローニング抗体とレプトスピラ株

以下のリストにあげた内のいくつかの製造元、研究所には、これらの情報を確認するためのアンケートを送ったが返答が得られなかつた。しかし、これらの会社は以下の製品を製造し、販売していることは間違いないので、そのままリストに入れてある。市販の検査試薬は表 A15.1 に、培地類、血清、単クローニング抗体とレプトスピラ株は表 A15.2 に示した。

表 A15.1 市販のレプトスピラ研究、診断試薬類

国	製造元	市販テスト試薬
オーストラリア	PanBio Limited 116 Lutwyche Road Windsor Windsor, Q 4030, Brisbane, Australia Tel:+61 7 3357 1177 Fax:+61 7 3357 1222 E-mail: <a href="mailto:PanBio@PanBio.com.au">PanBio@PanBio.com.au</a> Web site : <a href="http://www.panbio.com.au/">http://www.panbio.com.au/</a>	Leptospira IgM ELISA test (cat. no. LPM-200)
ベルギー	Sanofi-BioRad Begoniastraat 5, 9810 Nazareth, Belgium Tel:+32 9 385 6554 Fax:+32 9 385 5511	TR Slide agglutination test
ブラジル	BioManguinhos-Fiocruz Avenida Brasil 4365 Rio de Janeiro, Brasil Fax:+55 21 2260 4727 E-mail : <a href="mailto:emilson@bio.fiocruz.br">emilson@bio.fiocruz.br</a> Web site : <a href="http://www.fiocrus.br">http://www.fiocrus.br</a>	1. Simple macroagglutination slide test-leptospirosis- BioManguinhos 2. EIA-IgM-leptospirosis-BioManguinhos
フランス	BioMérieux Chemin de L'Orme F-69280 Marcy l'Etoile, France Tel:+33 4 7887 2000 Fax:+33 4 7887 2090 E-mail: <a href="mailto:infoleptotek@na.biomerieux.com">infoleptotek@na.biomerieux.com</a> Web site: <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a>	1. Lepto Tek Lateral Flow 2. Lepto Tek Dri-Dot
ドイツ	Bios GmbH Labordiagnostik Reisheimerstrasse 52, D-82166 Gräfeling Postfach 1640, D-82158 Gräfeling/ München, Germany Tel: +49 89 8988 9541/ 8988 950	1. The Biolisa kit(leptospirosis IgG and IgM) 2. Biosave <i>Leptospira</i> latex assay 3. Biognost leptospirosis IgG and IgM (IFA)

	Fax: +49 89 8988 9540/8988 95 E-mail: info@bios-world.com	
ドイツ	Institut Virion Serion GmbH Serion Immundiagnostica GmbH Konradstrasse 1, 97072 Würzburg, Germany Tel: +49 931 309 860 Fax: +49 931 52 650 E-mail : virion-serion@t-online.de Web site: http://www.virion-serion.de	<p>1. Complement-fixation tests (CFT)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Leptospira, group specific (biflexa) antigen</li> <li>- Leptospira, group specific (biflexa) control serum positive</li> <li>- Leptospira canicola antigen</li> <li>- Leptospira grippotyphosa antigen</li> <li>- Leptospira icterohaemorrhagiae antigen</li> <li>- Leptospira pomona antigen</li> <li>- Leptospira sejroe antigen</li> <li>- Leptospira control serum positive</li> <li>- Leptospira control serum negative</li> </ul> <p>2. ELISA classic Testkits</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SERION ELISA classic Leptospira IgG Testkit</li> <li>- SERION ELISA classic Leptospira IgM Testkit</li> </ul>
日本	日本凍結乾燥研究所 東京都文京区小日向4-2-6 小石川 ISビル 電話 03-5800-5303 ファックス 03-5802-6730 電子メール:JLL@bcg.gr.jp 担当者 中田直樹(国際部)	レプトスピラ抗体検出用 レプトスピラ MC
ロシア	WHO Collaborating Centre on the Epidemiology of Leptospirosis Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Gamaleya Street 18, 123098 Moscow, Russian Federation Tel: +7 095 193 3001 Fax: +7 095 193 6183 E-mail : 1570.g23@g23.relcom.ru Contact person: Dr J.V. Ananyina	Leptospirosis BASA slide agglutination kit
アメリカ	Focus Technologies 10703 Progress Way Cypress, CA 90630, USA Fax: +1 714220 1683	Indirect haemagglutination assay (IHA), Product code: IH 100
アメリカ	PanBio InDx	1. Leptospirosis IgM Dip-Stick

	<p>1756 Sulphur Spring Road Baltimore MD 21227, USA Tel: +1 410 737 8500 Fax: +1 410 536 1212 E-mail: <a href="mailto:Carl_Stubblings@PanBio.com.au">Carl_Stubblings@PanBio.com.au</a> Web site: <a href="http://www.indxd.com">http://www.indxd.com</a></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– 10 Test pack cat. no.5065M-02-10</li> <li>– 50 Test pack cat. no.5065M-01-50</li> </ul> <p>2. <i>Leptospira Ig ELISA Test</i> – Cat no. 5065-03-96</p>
--	--	---

表 A15.2 培地、血清、単クローン抗体とレプトスピラ株

国	製造元	培地、血清、単クローン抗体とレプトスピラ株
ベルギー	<p>Sanofi-BioRad Begoniastraat 5, 9810 Nazareth, Belgium Tel: +32 9 385 6554 Fax: +32 9 385 5511</p>	Culture media
インド	<p>National Leptospirosis Reference Centre Regional Medical Research Centre Indian Council of Medical Research Post Bag No. 13 Port Blair 744101 Andaman and Nicobar Islands Tel: +91 3192 51158/51043 Fax: +91 3192 51163/33660 E-mail: <a href="mailto:ICMR@Cal3.vsnl.net.in">ICMR@Cal3.vsnl.net.in</a></p>	Culture media, <i>Leptospira</i> strains and rabbit antisera
オランダ	<p>KIT Biomedical Research Meibergdreef 39 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands Tel: +31 20 566 5431 Fax: +31 20 697 1841 E-mail: <a href="mailto:lepto@kit.nl">lepto@kit.nl</a> Web site: <a href="http://www.kit.nl">http://www.kit.nl</a></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. EMJH medium-enrichment as well as complete medium can be obtained at cost price</li> <li>2. Rabbit antisera at cost price</li> <li>3. Monoclonal antibodies of different anti-<i>Leptospira</i> specificities at cost price.</li> <li>4. <i>Leptospira</i> strains, transport costs must be paid for by recipient</li> </ol>
ロシア	<p>WHO Collaborating Centre on the Epidemiology of Leptospirosis Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology, Gamaleya Street 18, 123098 Moscow, Russian Federation Tel: +7 095 193 3001 Fax: +7 095 193 6183</p>	<i>Leptospira</i> reference strains

	E-mail:1570.g23@g23.relcom.ru Contact person: Dr J. L. Ananyina	
スロバキア	FAO/MHO Collaborating Centre for the Epidemiology of Leptospirosis Institute of Epidemiology Medical Faculty of the Komensky University, Spitalska 24 81372 Bratislava, Slovakia Tel: +421 7 59 357 489/496/491 Fax: +421 7 59 357 506 E-mail:epidem@fmed.uniba.sk Web site: www.fmed.uniba.sk	Korthof's medium and <i>Leptospira</i> reference strains
アメリカ	Becton-Dickinson Biosciences / Difco 7 Lofton Circle Sparks, MD 21152-0999, USA Tel: +1 800 638 8663 Te1: +1 800 675 0908 (Customer service) Web site: <a href="http://www.bd.com/microbiology">http://www.bd.com/microbiology</a>	EMJH and enrichment media
アメリカ	Intergen Company 2 Manhattanville Road The Centre at Purchase Purchase, NY 10577, USA Tel: +1 914 694 1700 E-mail: <a href="mailto:techinfo@intergenco.com">techinfo@intergenco.com</a> Web site: <a href="http://www.intergenco.com">http://www.intergenco.com</a>	1 . Bovuminar Microbiological Media (PLM-5) Cat.no. 3412 2 . Bovuminar Microbiological 30% (Leptalb-7) Cat.no. 3410 3 . Bovuminar Microbiological Grade pH7 Cat.no. 3265 4 . Bovuminar Cohn Fraction V pH7 Powder Cat.no. 3225

## 解説 16

### 培地の調製

#### A16.1 レプトスピラの栄養要求性

レプトスピラの栄養要求性は、独特であるが、要求性は少ない。ビタミン B1 と B12 そして長鎖脂肪酸だけが、必須栄養素であることがわかっている有機化合物である。脂肪酸（炭素数 15 個以上）は、エネルギー源かつ炭素源であり、レプトスピラは自身で脂肪酸を合成できないので細胞の脂質源として必要である。脂肪酸自体の毒性のために、遊離脂肪酸はアルブミンとの複合体としてレプトスピラに与えなければならない。炭水化物（糖）は、エネルギーや炭素源として不適当である。アミノ酸は限られた量を使用するが、そのアミノ酸はレプトスピラの窒素要求量を満たさない。

必須栄養素ではないが、ピルビン酸は培養の難しいレプトスピラの増殖開始を促進する。多くの他の細菌と違って、レプトスピラは DNA や RNA 合成に外部から供給されるピリミジン塩基を利用しない。そのために、レプトスピラはピリミジン構造類縁体である 5-フルオロウラシルの抗菌作用に耐性である。それゆえ、この化合物は雑菌の混在した中から、レプトスピラを分離するための選択培地に添加される。

#### A16.2 レプトスピラ培養のための培地

これまでに多くの種類の培地が報告されているが、それらは以下の 5 つのグループに分けることができる。

- 8~10%のウサギ血清を含む伝統的な培地 (Stuart, Korthof, Fletcher, Vervoot, Schüffner)。  
ウサギ血清はレプトスピラの増殖に不可欠な複合体型ビタミン B12 を最も高濃度に含む。ウサギ血清中のレプトスピラ凝集素の力価は一般的に他の動物のものと比較して低いが、血清中の抗体の有無についてあらかじめ確認すべきである。Schüffner 培地と Korthof 培地は、沈殿する可能性のあるリン酸塩を含むという欠点がある。これは、顕微鏡凝集試験 (MAT) を行う場合に望ましくない。
- Ellinghausen と McCullough のツィーン 80／ウシ血清アルブミン(BSA)培地(1965a, 1965b, 1967) や Johnson と Harris によるその変法培地 (EMJH)  
BSA はこの培地に含まれる最も高価な成分である。
- 低タンパク質、あるいは無タンパク質培地は、ワクチンの製造に用いられる (Shenberg 1967, Bey & Johnson 1978)。
- 栄養強化培地  
血清型 hardjo のような培養しにくいレプトスピラの増殖を促すために、血清（例えば 1~4%牛胎児血清 (FCS) とウサギ血清）やラクトアルブミンの加水分解産物、スーパー オキシドジスムターゼ、ピルビン酸のような成分を加えて、培地の栄養分を強化する (Elis, 1986)。EMJH 培地には、時に 1%ウサギ血清と 1%FCS を添加して、栄養分を強化する。
- 5-フルオロウラシル（あるいは／またはこれに加えて、ネオマイシン、ナリジクス酸、アクチジョン、スルファチアゾール、リファンビシン、アンホテリシン B のような抗菌

物質)を加えた選択培地。このような添加成分は、非滅菌の臨床検体中に混入した雑菌の増殖を抑制する。これらの添加物質は、レプトスピラに影響を及ぼさないが、ある程度の増殖抑制を示すことがある。これはとくにスルファチアゾールでは明らかである。

### A16.3 培地の形状

液体培地は寒天を加えた場合、半流動、あるいは固形培地とすることができる。

#### A16.3.1 液体培地

液体培地はレプトスピラの分離や凝集試験の抗原調製の際に、レプトスピラを培養するために不可欠である。半流動培地中の寒天粒子はこれらの試験の妨害物質となる。

液体培地中でのレプトスピラの増殖は、主に培地の濁りによって確認できるが、しばしば、試験管の底にレプトスピラの増殖による沈殿塊があらわれてくることがあり、それによっても確認できる。これらの両方とも肉眼で検出できるが、顕微鏡でも増殖を確認すべきである。

#### A16.3.2 半流動培地

半流動培地は 0.1~0.5%(w/v)の寒天を含む。この培地は様々なレプトスピラ株の分離や中期的な維持(数年間)のために適している。これらの培地では、増殖はすぐに始まり、通常培地の表面から数ミリの深さで一つか、それ以上のリング状の増殖環を簡単に見つけることができる。リングが見られない場合でも、必ずしもレプトスピラがないことを意味しない。スクリューキャップのある試験管中の半流動培地は、通常、保存のための維持培地に使われる。それらは、室温に保存し、3ヶ月ごとに新しい培地に継代することが望ましい。

#### A16.3.3 固形培地

固形培地は 0.8~1.3%(w/v)の寒天を含み、試験管あるいはシャーレに分注する。寒天濃度を低くすればするほど、レプトスピラは培地中に拡がっていく。寒天濃度を高くすればするほど、より小さなコロニーを形成することになる。レプトスピラは培地表面下で増殖する。平板培地は湿潤環境を保ち、乾燥を防ぐために密封しなければならない。この方法は様々なものが混入した自然界の検体からレプトスピラを分離するため、あるいは様々な系統のレプトスピラの混在したものから、特定の系統をクローニングするために用いられる。1%寒天中でのコロニーは培地表面下に増殖し、ほとんどの血清型は7~14日以内に肉眼で見える大きさとなる。運動性のある株のコロニー形態は培養時間とともに変化していく。

培地表面下のコロニーの形態は、様々なレプトスピラ株を区別できるような特徴ではない。

### A16.4 EMJH 培地(ELLINGHAUSEN AND McCULLOUGH, MODIFIED BY JOHNSON AND HARRIS)の調製

この培地は、1容のアルブミン脂肪酸溶液(AFAS)と9容の基礎培地を混合し、調製する。

AFAS の溶解には高压蒸気滅菌した蒸留水を使用することが不可欠である。なぜなら、水をフィルターによりろ過滅菌した場合、混入した非病原性レプトスピラはそのフィルターを通過してしまうからである。

#### A16.4.1 調製に必要な試薬、基材

滅菌したガラス器具： 5 リットルのフラスコ（5 個），3 リットルのフラスコ（1 個），2 リットルのメスシリンドラー（1 個），1 リットルのメスシリンドラー（1 個），パストールピペット

試薬：  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ （例えば Merck 1.06586.0500）， $\text{KH}_2\text{PO}_4$ （例えば Merck 1.04873.1000）， $\text{NaCl}$ （例えば Merck 1.06404.1000）， $\text{NH}_4\text{Cl}$ （例えば Merck 1.01145.0500），ビタミン B1(チアミン)（例えば Merck 1.08181.0025），グリセロール（例えば Merck 1.04093.1000），ウシ血清アルブミン 第V 画分（例えば Sigma A 9647）， $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ （例えば Merck 1.02382.0500）， $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （例えば Merck 1.05833.0250）， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （例えば Merck 1.03965.0100）， $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ （例えば Merck 1.02790.0250）， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ （例えば Merck 1.08883.0100），ビタミン B12(シアノコバラミン)（例えば Merck 5.24950.0010），ツイーン 80（例えば Merck 8.22187.0500），ピルビン酸ナトリウム（例えば Merck 1.06619.0050），

保存溶液： EMJH 培地 20 リットル調製に必要な試薬の量を表 A16.1 と A16.2 に示した。

表 A16.1 アルブミン脂肪酸溶液 (AFAS) の保存液

試薬	100ml 滅菌水あたり の添加量(g)	容量	保存時の温度
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} +$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0(それぞれ)	30 mL	-20°C
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4	20 mL	-20°C
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.3	2 mL	+4°C
ビタミン B12	0.02	20 mL	-20°C
ツイーン 80	10.0	250 mL	-20°C
グリセロール	10.0	20 mL	-20°C

表 A16.2 基礎培地保存液

試薬	100ml 滅菌水あたりの 添加量(g)	容量	保存時の温度
$\text{NH}_4\text{Cl}$	25.0	20 mL	-20°C
ビタミン B1(チアミン)	0.5	20 mL	-20°C

#### A16.4.2 方法

##### アルブミン脂肪酸溶液 (AFAS) 2 リットル

以下のように調製する。

- (1) 滅菌蒸留水 1200 mL に 200 g のウシ血清アルブミン (BSA) を溶解する。溶解はマグネットスターラー上でゆっくりと攪拌する（泡立てないように）。BSA のロットにより異なるが、アルブミンを溶解するのに数時間要する。
- (2) 必要な保存液を全てフリーザーから取り出す。

- (3) 30 mL の  $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$  保存液, 20 mL の  $\text{ZnSO}_4$  保存液, 2 mL の  $\text{CuSO}_4$  保存液, 1 g の  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8 g のピルビン酸ナトリウム, 20 mL のビタミン B12 保存液, 20 mL のグリセロール保存液, 250 mL のツイーン 80 保存液を加える.
- (4) 滅菌蒸留水を加え, 全量 2 リットルにする.
- (5) 測定範囲の狭い pH 試験紙, あるいは, pH メーター (非病原性の水レプトスピラの混入を避けるため, 高圧蒸気滅菌した蒸留水で電極を洗浄すること) を用いて, 1N NaOH で pH を 7.4~7.6 に調整する.

#### 基礎培地 20 リットル

以下のように調製する.

- (1) 滅菌蒸留水 2 リットル中に 20 g の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 g の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g の  $\text{NaCl}$  を加え, 溶解する (5 リットルの容器を使用).
- (2) 20 mL の  $\text{NH}_4\text{Cl}$  保存液, および, 20 mL のビタミン B1 (チアミン) 保存液を加える.
- (3) 滅菌水を加え全量 4 リットルとする.
- (4) 4 つの 5 リットルフラスコに, 各々基礎培地 1 リットルずつを移す.
- (5) 4 つのフラスコに, 各々 4 リットルずつ滅菌蒸留水を加える.
- (6) 上記と同様に 1N NaOH で pH を 7.4 に調整する.
- (7) 121°C, 30 分間高压蒸気滅菌する.

完全培地: 18 リットルの基礎培地に 2 リットルのアルブミン脂肪酸溶液を加え, 全量 20 リットルとする.

ろ過: Millipore あるいは, Seitz のフィルター(0.22 $\mu\text{m}$ )を用いる. 例えば, Millipore フィルター ホルダー 316 型(直径 142mm)を 20 リットルの耐圧容器と組み合わせて用いる. 支持膜上に Millipore 社製 GSWP 14200 型フィルター (ポアサイズ 0.22 $\mu\text{m}$ ) を置き (光沢面を上向きに), 続いてガーゼ Type AP3212400 と Millipore 社製 HAWP 14200 型 フィルター(ポアサイズ 0.45 $\mu\text{m}$ )をセットする. それからこのフィルターの一番上に 2 枚のグラスファイバー製のプレフィルターをセットする. 全てのフィルターを蒸留水で濡らした後, このフィルターシステムをオートクレーブにて滅菌する. フィルターの選択は培地の種類とろ過する培地の量によって決める.

栄養強化物質: ウサギ血清, および/あるいは, 牛胎児血清を最終濃度 1~4% (v/v) になるよう無菌的に EMJH 培地に加える.

選択培地: 5-フルオロウラシルを, 最終濃度 0.01~0.04% になるよう無菌的に EMJH 培地に加える.

#### 品質管理

培地の品質の管理は, 以下のように行う.

- 非病原性のレプトスピラやその他の汚染混入物が無いことを確認する. 培地を 30°C で 1 週間, 37°C で 1 週間, そして室温で 2 週間放置する. その培地が濁った場合顕

- 微鏡による観察を行い、汚染混入が見つかった場合はその培地は廃棄する。
- 陽性対照： その培地にレプトスピラ培養液 1/10 量を接種し、30°C、1週間培養後、その増殖を確認する。
  - ウサギ血清や牛胎児血清を栄養強化物質として加えた場合、それら血清に抗レプトスピラ抗体が含まれていないかを顕微鏡凝集試験 (MAT) で確認すべきである。MAT は陰性でなければならない。

### A16.5 Fletcher 培地の調製

この培地はレプトスピラの培養、および継代培養することなく長期間の生存を維持するのに適している。これは、Fletcher の基礎培地にウサギ血清を添加して調製する。

#### A16.5.1 調製に必要なもの

試薬： 以下のものが必要である。:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (例えば Merck 1.06586.0500),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (例えば Merck 1.04873.1000),  $\text{NaCl}$  (例えば Merck 1.06404.1000), Bacto Peptone (例えば Difco 0118), Bacto Beef Extract (例えば Difco 0126), Agar Noble (例えば Difco 0142)

保存溶液： 2つの保存液が必要である。(1) リン酸塩 A 液: 11.876 g の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  を 1 リットルの蒸留水に溶解したもの、(2) リン酸塩液 B 液: 9.078 g の  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  を 1 リットルの蒸留水に溶解したものである。両方の緩衝液を 121°C、30 分間高压蒸気滅菌する。4°Cで数ヵ月間保存可能である。

ウサギ血清： 血清に抗レプトスピラ抗体が含まれていないことを、MAT で確認すべきである。MAT は陰性でなければならない。

#### A16.5.2 方法

##### Fletcher 基礎培地

以下のように調製する。

- 次の試薬を 820 mL の蒸留水に溶解する： 0.3 g の Bacto Peptone, 0.5 g の  $\text{NaCl}$ , 0.2 g の Bacto Beef Extract, 1.5 g の Agar Noble.
- 80.8 mL のリン酸塩 A 液と 19.2 mL のリン酸塩 B 液を加える。
- 十分に混和する。
- 1N NaOH で pH 7.6~8.0 に調整する。
- 高圧蒸気滅菌
- 滅菌終了後、培地が冷える前にボトルをよく振って混和する。この操作は、寒天が容器の底に固まってしまうことを防ぐために必要である。
- 4°Cでそのまま保存する。あるいは、培地がまだ 50°C程度の時に試験管に分注する。

##### 最終的な培地の調製

手順は次の通り：

- ウサギ血清を採取する。できれば、少量の赤血球が含まれるもの。代わりに、溶血していない市販のウサギ血清を用いることができる。

- ウサギ血清を 56°C, 30 分間加温し, 非働化する.
- Fletcher 基礎培地を 4°Cで保存していた場合は, 50°Cに加温する.
- 920 mL の培地に, ウサギ血清を 80mL 加える.
- 試験管に 4~5 mL の Fletcher 培地を分注する.
- 使用するまで 4°Cで保存する.

品質管理： レプトスピラ培養液を Fletcher 培地に接種し, 30°C, 1 週間培養後, その増殖を確認する.

#### A16.6 Korthof-Babudieri 培地の調製

この培地はレプトスピラの培養に適した液体培地である. その成分は原法の Korthof 培地を改変したものである. この培地は Korthof-Babudieri 基礎培地にウサギ血清を加えたものである. この培地は, ローマのレファレンスセンターでレプトスピラの系統維持に使われている. その成分には Proteose Peptone No.3-Difco (Peptone Witte の代わり), および, ビタミン B3(ニコチンアミド, ビタミン B1 の代わり) を含み, CaCl<sub>2</sub>は含まない.

高圧蒸気滅菌した蒸留水を使用することが不可欠である. なぜなら, この培地は最終的にろ過滅菌されるだけであり, 混入した非病原性レプトスピラはそのフィルターを通過してしまうからである.

##### A16.6.1 調製に必要なもの

次のものが必要である.

器具： 3 リットルのフラスコ (2 個), 250 mL のフラスコ (1 個), 1 リットルのメスシリンダー (1 個), 100 mL のメスシリンダー (1 個), ろうと (1 個), 5 mL のピペット, 1 mL のピペット, 試験管, Milipore フィルター (0.22μm), 紙 (Whatman No.1 またはその同等製品), 分析用天秤, 遠心分離機, 恒温培養器 (30°C), 恒温槽, pH メーター.

pH メーターの電極は非病原性レプトスピラの混入を避けるために, 高圧蒸気滅菌した蒸留水で洗わなければならない.

試薬： Proteose Peptone No.3 (Difco), NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, ビタミン B3(ニコチンアミド), ウサギ血清, 溶血赤血球, ビタミン B12(シアノコバラミン).

#### A16.6.2 調製方法

##### Korthof 基礎培地

これは以下のように調製する：

- 900 mL の滅菌蒸留水に以下のものを溶解する (3 リットルのフラスコを使用).
 

0.80 g Proteose Peptone No.3 (Difco), 1.40 g NaCl, 0.02 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.04 g KCl  
 0.18 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.96 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.001 g ビタミン B3(ニコチンアミド).
- 上記のものを混和し, 滅菌蒸留水にて全量 1 リットルにする.
- 121°C, 20 分間高圧蒸気滅菌する.

- 室温にて、一晩放置し、冷却する。
- 紗紙（Whatman No.1 あるいは、その同等製品）でろ過する。
- pH を確認する。（培地の最終的な pH は 7.2～7.4 でなければならない）
- 116°C, 30 分間高圧蒸気滅菌する。

#### ウサギ血清

- ウサギ血清を採取する（市販のウサギ血清を使用してもよい）。動物の個体差があるので、ウサギ血清（抗生物質を含まない飼料で飼育した動物から採取する）をプールして使用することが好ましい。
- 血清に抗レプトスピラ抗体が含まれていないかを MAT で確認すべきである。MAT は陰性でなければならない。
- ウサギ血清を水浴中、56°C, 120 分間加温し、補体を非働化する。
- 血球の破片残渣を除くために、高速で遠心分離する（22,000 ×g, 30 分間）。
- Millipore 社製 フィルター（ポアサイズ 0.22μm）にてろ過滅菌する。
- 試験管に 30 mL づつ分注し、使用するまで-70°Cで保存する。

#### 溶血赤血球

- ガラスビーズを入れた 250 mL のフラスコに、5 mL のウサギ血液を採取する（抗生物質を含まない飼料で飼育したレプトスピラ抗体陰性の動物から採取する）。
- フィブリンを除くために 10～15 分間ゆっくりと攪拌混和する。
- 10 mL の滅菌蒸留水を加え、混和し、4°C、一晩放置する。
- 血球の破片残渣を除くために、高速で遠心分離する（22,000 ×g, 30 分間）。
- Millipore 社製 フィルター（ポアサイズ 0.22μm）にてろ過滅菌する。
- 試験管に 2mL ずつ分注し、使用するまで-70°Cで保存する。

#### ビタミン B12

- 10 mL の滅菌蒸留水 pH4.5（滅菌蒸留水を使用し、1N HCl で pH を 4.5 に調整する）に 100 mg のビタミン B12 を溶解する。
- Millipore 社製 フィルター（ポアサイズ 0.22μm）にてろ過滅菌する。

#### 最終的な培地の調製

- 次のものを Korthof 基礎培地に添加する： 60 mL の非働化した滅菌ウサギ血清、2 mL の滅菌、非働化した溶血赤血球、0.1 mL のビタミン B12 保存液。
- Millipore 社製 フィルター（ポアサイズ 0.22μm）にてろ過滅菌する。試験管に Korthof 培地 4～5 mL ずつを分注する。
- 56°C、60 分間 3 回の加温を行い、分散させる。
- 使用するまで 4°C で保存する。

#### 品質管理

- 雜菌が混入していないことを確認する。培地を 30°C に 1 週間、37°C に 1 週間、室温に 2

週間放置する。培地に濁りが見られた場合、顕微鏡で観察し、もし汚染が見つかったら培地を廃棄する。

- 陽性対照：その Korthof 培地にレプトスピラ培養液 1/10 量を接種し、30℃、1 週間培養後、その増殖を確認する。

### 引用文献

R. F. Bey, Johnson Research co-ordinator (1978). Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infection and Immunity*, 19:562-259.

H. C. Ellinghausen, W.G. McCullough (1965a). Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: A serum-free medium employing oleic albumin complex. *American Journal of Veterinary Research*, 26:39-44.

H. C. Ellinghausen, W.G. McCullough (1965b). Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: Fractionation of oleic albumin complex and a medium of bovine albumin and polysorbate 80. *American Journal of Veterinary Research*, 26:45-51.

H. C. Ellinghausen, W. G. McCullough (1967). Albumin fatty acid broth for *Leptospira*, modified by Johnson and Harris. *Journal of Bacteriology*, 94:27-31.

W. A. Ellis, T. W. A. Little, eds. (1986). The present state of leptospirosis diagnosis and control. *Dordrecht, Boston, Lancaster*, Martinus Nijhoff Publishers.

E. Shenberg (1967). Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *Journal of Bacteriology*, 93:1598-1606.

### 参考文献

B. Babudieri (1952). Leptospirosi. In: Trattato di malattie infettive. Napoli, Edizioni Scientifiche Italiane, Vol.3:785-856.

B. Babudieri (1971). Proposed standardization of the agglutination-adsorption test for *Leptospira*. *Bulletin of the World Health Organization*, 44:795-810.

H.C. Ellinghausen (1960). Some observations on cultural and biochemical characteristics of *Leptospira pomona*. *Journal of Infectious Diseases*, 106:237-244.

S. Faine (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis*. Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No. 67).

S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat (1999). *Leptospira and leptospirosis*. 2nd ed . Melbourne, MedSci.

G. Korthof (1932). Experimentelles Schlammfieber beim Menschen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. I. Abteilung Orlginale*, 125: 429-434.

P. H. Levett (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326.

J. L. Staneck, R. C. Henneberry, C. D. Cox (1973). Growth requirements of pathogenic leptospires. *Infection and Immunity*, 7:886-897.

A. B. Thiermann (1981). Use of solid medium for isolation of leptospires of the Hebdomadis serogroup from bovine milk and urine. *American Journal of Veterinary Research*, 42:21 43-2145.

L. H. Turner (1970). Leptospirosis III. Maintenance, isolation and demonstration of leptospires. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 64:623-646.

W. P. Vaneseltine, S. A. Staples (1961). Nutritional requirements of leptospirae. I. Studies on oleic acid as a growth factor for a strain of *Leptospira pomona*. *Journal of Infectious Diseases*, 108:262-269.

J. W. Wolff (1954). The laboratory diagnosis of leptospirosis. Spring Weld, IL, Chades C. Thomas. J. Wood, R.C. Johnson, K. Palin (1981). Surface colonies of *Leptospira interrogans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 13:102-105.

## 解説 17

### 検査室内の安全対策

検査室内でレプトスピラを取り扱う際には、標準的微生物取扱安全対策が必要である。レプトスピラは乾燥、酸、フェノール系や界面活性剤など消毒剤、加熱などに感受性が高くこれらにより消毒できる。飛沫や液こぼしによる検査室の床面や実験台の汚染、動物舎の床面の汚染は消毒する。検査室内の事故により作業者は、感染の危険性がある。経皮、特に傷口からの感染、動物への接種時に注射針の装着不備による噴出が目に入ることなどに十分に注意する。口によるピペット操作は厳禁である。使用済みのガラス器具類は洗浄前に消毒処理を行う。スライドガラスやピペット類は滅菌処理後廃棄する。可能な限り、プラスチック製のディスポーザブルのものを使用する。職員は、ヒト血液、血清などからの感染のリスク（ウイルス性肝炎、HIVなど）がある。感染により、重篤な病状を呈したり、もしくは死亡することがある。血清を扱うときは手袋は必ず着用すること。

もし、事故がおき、職員が病原性レプトスピラに感染した場合、もしくは感染した可能性が高い場合には、予防的抗菌薬投与を行うべきである。新鮮な分離株、強病原株使用施設では、すべての作業従事者は、熱発があった場合、速やかに報告しなければならない。

素手、露出した皮膚、衣服に、漏出した血清や血液などを付着させないよう注意すること。

被検血清は加温（56℃、30分間）することで、すべてではないが、多くの感染性病原体を不活性化できる。

事故が起った場合のために、健康時の血清を保管しておくことが望ましい。事故後、もしくは感染が濃厚に疑われる場合、速やかに血液サンプルを確保すること。

すべての職員は、B型肝炎ワクチンの接種を受けること。レプトスピラワクチン接種に関しても、感染動物との接触頻度、有効なワクチンの有無をもとに、考慮すること。他の人獣共通感染症（狂犬病など）に関するワクチン接種についても、必要性に応じて考慮すること。

## レプトスピラ症全般に係わる参考文献

以下にレプトスピラ症について、参考となる文献を挙げた。解説のそれぞれの項目にも対応した参考文献を挙げているが、もちろんこれで全てを網羅できているわけではない。

W. A. Ellis, T. W. A. Little, eds (1986). *The present state of leptospirosis diagnosis and control.* Dordrecht, Boston, Lancaster. Martinus Nijhoff.

J. D. Everard, C. O. R. Everard (1993). Leptospirosis in the Caribbean. *Reviews in Medical Microbiology*, 4:114-122.

S. Faine (1982). *Guidelines for the control of leptospirosis.* Geneva, World Health Organization (WHO Offset Publication No. 67).

S. Faine, B. Adler, C. Bolin, P. Perolat (1999). *Leptospira and leptospirosis.* 2nd ed. Melbourne, MediSci. Leptospirosis worldwide (1999). *Weekly Epidemiological Record*, 74(29):237-242.

P. N. Levett (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:296-326.

*Manual of standards for diagnostic tests and vaccines.* 3rd ed (1996). Pans, Office International des Epizooties: 198-206.

D. Postic, F. Merien, P. Perolat, G. Baranton (2000). *Diagnostic biologique leptospirose - borréliose de Lyme [Biological diagnosis leptospirosis-Lyme borreliosis].* 2nd ed. Pans, Institut Pasteur, Collection des Laboratoires de Rèférence et d'Expertise.

A. Schönberg, F. Müller, A. Weber, E. Fingscheidt, S. Brem, H. Seeliger, E. Schaal (1984). Diagnosdk bei Leptospirosen. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene I Abteilung (International Journal of Microbiology and Hygiene)*, A258:480-491.

S. C. Sehgal (2000). Leptospirosis on the horizon. *National Medical Journal of India*, 13(5):228-230.

World Health Organization (1986). *Report of the WHO Consultation on the Development of National Programmes for the Prevention and Control of Leptospirosis, Sapporo, Japan, July 15-16, 1984.* Geneva (unpublished document WHO/CDSNPH/86.62: available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 121 1 Geneva 27, Swaziland).

World Health Organization (1993). *Report of Discussions of the WHO Working Group on Leptospirosis Vaccine Development and Vaccinology, Nagoya, Japan, March 26-27, 1993.* Geneva (unpublished

document VPH/93. 1 22; available from: Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization. 1211 Geneva 27. Switzerland).

## **本手引き書の執筆協力者**

### **編集責任者**

Dr W. J. Terpstra, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-105 AZ Amsterdam. The Netherlands

### **協力者**

Professor B. Adler, Bacterial Pathogenesis Research Group, Department of Microbiology, Monash University, Clayton, Victoria 3800, Australia

Dr J. Ananyina, Gamaleya Research Institute for Epidemiology and Microbiology - RAMS, Gamaleya Street 18, 123098, Moscow, The Russian Federation

Professor G. André-Fontaine, Unité Bactériologie Médicale et Moléculaire des Leptospires, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, B.P. 40706, F-44307 Nantes cedex 03, France

Dr V. Ansdel, Kaiser Medical Center, 3288 Moanalua Road, Honolulu, HI 96819, USA

Dr D. A. Ashford. Chief Zoonoses Unit, Meningitis and Special Pathogens Branch, DBMD, CDC, MS-C09, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA 30333, USA

Professor P. Bakoss, Medical Faculty Comenius University. Faculty of Epidemiology, Spitalska 24, 81 1 08 Bratislava, Slovakia

Dr G. Baranton, Institut Pasteur, Unité de Bactériologie Moléculaire et Médicale, 28 rue du Dr Roux. F-75724 Paris cedex 15, France

Dr A. Barnea. Department of Epidemiology. Israel Institute for Biological Research (TIBR), P.O. Box 19, Ness Ziona 70450, Israel

Dr C. A. Bolin, Animal Health Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, A3A Veterinary Medical Center., Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA

Dr L. Ciceroni, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica, Centro Nazionale per le Leptospirosi (National Centre for Leptospirosis), Viale Regina Elena 299, I-00161 Rome, Italy

Dr M. Cinco, Dipartimento Scienze Biomediche, Università degli Studi di Trieste. Via Fleming 22.

1134127 Trieste, Italy

Dr T. J. Coleman, Director, Public Health Laboratory Service, Leptospira Reference Unit, County Hospital, GB-Hereford HR1 2ER, United Kingdom

Dr M. Collares Pereira, Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Universidade Nova de Lisboa, Rua da Junqueira 96, P-1349-008 Lisboa, Portugal

Dr C. Edwards, Gastro-enterologist, Department of Medicine. Queen Elizabeth Hospital. St-Michael, Barbados

Professor W. A. Ellis, Department of Agriculture and Rural Development Northern Ireland, Veterinary Sciences Division, Stoney Road. Stormont, Belfast, Northern Ireland BT4 3SD, United Kingdom

Professor S. B. Feresu, University of Zimbabwe, Department of Biological Sciences, Mount Pleasant, P.O. Box mp 167, Harare, Zimbabwe

Dr Takao Fujikura (Former staff member) World Health Organization, Communicable Diseases Division, Veterinary Health, Geneva, Switzerland.

(present address) 15-10, 7-Chome. Tokiwa, Urawa-Ku, Saitama-Shi, 330-0061, Japan

Dr L. Gonzalez-Salas, National Reference Center for Virology and Leptospirosis, National Institute for Investigation in Nutrition and Health, Inciensa. Ministry of Health, Apartado 4-2250 Tres Rios, Costa Rica

Dr R. A. Hartskeerl, Head WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-1000 AZ Amsterdam, The Netherlands R.Hartskeerl@kit.nl

Mr H. Korver, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research. Meibergdreef 39, NL-1000 AZ Amsterdam, The Netherlands

Professor P. N. Levet, WHO Collaborating Center on Leptospirosis, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Infectious Diseases, 1600 Clifton Road NE, Atlanta GA 30333, USA

Dr Toshiyuki Masuzawa, Laboratory of Microbiology and Immunology, Ciba Institute of Science, School of Pharmaceutical Sciences, 3 Shiomi, Choshi, Chiba 288-0025, Japan

Professor M. A. Muthusethupathi, Department of Nephrology, Madras Medical College of Tamilnadu, Government General Hospital, 14 First Street, North Gopalapuram, Chennai 600086 Tamilnadu, India

Dr M. M. Pereira, Senior Researcher, Head of the Bacteriology Department. National Reference Center for Leptospirosis, Department of Bacteriology. Foundation Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365. CEP 21045-900 - Manguinhos Rio de Janeiro, Brazil

Dr P. Perolat, Director, Institut Pasteur de Nouvelle Calédonie, Leptospira Laboratory, B.P. 61. 9-11 Paul Doumer Street, 98845 Noumea cedex, New Caledonia

Dr I. Saint-Girons, Vice-President for Scientific Assessment. Vice-President for Teaching, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux. F-75724 Paris cedex 15, France

Dr D. M. Sasaki, Zoonoses Section, State of Hawaii, Department of Health, Epidemiology Branch, P.O. Box 3378, Honolulu HI 96801, USA

Dr A. Schönberg. Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Diedersdorfer Weg 1, Postfach 480447, D-12277 Berlin, Germany

Professor S. C. Sehgal, National Leptospirosis Reference Center. Regional Medical Research Centre, Indian Council of Medical Research, P.O. Bag No 13, Port Blair 744101, Andaman and Nicobar Islands, India

The late Professor Manhua Shi, Department of Leptospirosis, Institute of Epidemiology and Microbiology. Chinese Academy of Preventive Medicine, P.O. Box 5. Changping, Beijing 102206, China

Dr H. L. Smits, Molecular Biologist, Royal Tropical Institute (KIT), Biomedical Research. Meibergdreef 39, NL-105 AZ Amsterdam, The Netherlands

Dr S. P. Smits, WHO/FAO Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Royal Tropical Institute (KIT). Biomedical Research, Meibergdreef 39, NL-105 AZ Amsterdam, The Netherlands

Dr L. D. Smythe, Supervising Scientist, WHO/FAO/OIE Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, Western Pacific Region, Queensland Health Scientific Services, 39 Kessels Road, Coopers Plains, Queensland 4108, Australia

The late Dr R. A. Spiegel, Program for Appropriate Technology in Health (PATH/CVP), Bill and Melinda Gates Children's Vaccine Program, 4 Nickerson Street, Seattle, WA 98109-1699 USA

Professor Xiugao Jiang, Head of Department of Leptospirosis, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, P.O. Box 5, Changping, Beijing 102206, China

Professor Yasutake Yanagihara, Emeritus Professor of University of Shizuoka 7-18-15 Sena, Shizuoka-Shi  
420-0911, Japan

Dr R. L. Zuerner, Lead Scientist, Spirochete Diseases, National Leptospirosis Reference Center, U.S.  
Department of Agriculture / ARS, National Animal Disease Center, Zoonotic Diseases Research Unit, P.O.  
Box 70, Ames, IA 50010, USA

### 事務局

Dr P. Braam, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland

Dr O. Cosivi, (Secretary to the Group), Department of Communicable Disease Surveillance and Response, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland