

大阪府および兵庫県の2地域における野生アライグマと 犬のレプトスピラ抗体保有状況調査

和田優子¹⁾ 藤崎由香¹⁾ 前田 健¹⁾ 佐藤 宏¹⁾ 横山真弓²⁾
宇仁茂彦³⁾ 水野拓也¹⁾ 奥田 優^{1)†}

1) 山口大学農学部 (〒753-8515 山口市吉田1677-1)

2) 兵庫県立大学兵庫県森林動物研究センター (〒669-3842 丹波市青垣町沢野940)

3) 大阪市立大学医学部 (〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3)

(2009年9月14日受付・2010年3月31日受理)

要 約

大阪府南部(地域A), 兵庫県東部(地域B)で捕獲されたアライグマ(186頭)および同地域の家庭飼育犬(52頭)の血清を用いて *Leptospira interrogans* の5血清型標準株を抗原とした顕微鏡下凝集試験(Microscopic agglutination test: MAT)を行った。A, B両地域のアライグマにおいてMATで最も高い抗体価を示した血清型はいずれも *hebdomadis* (地域A: 31.5%, 地域B: 51.5%) であり, 地域Aでは *australis* (22.2%) の割合も高かったが, 両地域の飼育犬においてはそれらの陽性は認められなかった。アライグマ66頭の腎皮質から *OmpL1*-PCRを用いてレプトスピラ遺伝子の検出を行った結果, 8頭(12.1%)で陽性が認められた。以上の結果から, 野生アライグマは高率にレプトスピラに感染しているが, 犬の感染源となっている可能性は低いと考えられた。

——キーワード: 犬, 兵庫県, レプトスピラ, 大阪府, アライグマ。

----- 日獣会誌 63, 707~710 (2010)

レプトスピラ症は *Leptospira interrogans* の各種血清型に起因し, 多くの哺乳動物に発生する人と動物の共通感染症である [1-3]。環境中におけるレプトスピラの自然宿主はげっ歯類をはじめとする野生動物であり, 感染した動物の多くがレプトスピラを腎臓に保菌し, 尿中に排泄すると考えられている。人や動物は保菌動物の尿, またはレプトスピラに汚染された水や土壌などと直接, 間接的な接触により感染すると考えられている [1-3]。伴侶動物である犬は人との接触の機会が多いため, レプトスピラの人への重要な感染源となる可能性がある。われわれが2006~2007年に実施した犬のレプトスピラ抗体保有状況の全国的調査では, レプトスピラに不顕性感染している犬が全国的に存在している可能性が示唆されている [4]。

近年, 個体数が急激に増加し, 特定外来生物に指定されたアライグマ (*Procyon lotor*) もまた, レプトスピラの保菌動物となる可能性がある [5]。本邦におけるアライグマのレプトスピラの感染状況に関する研究は, われ

われが調べたかぎりでは, ①2003年5月~9月に実施された北海道の野生アライグマの調査, ②2002年4月~2003年4月に実施された神奈川県野生アライグマおよび長崎県の動物展示施設アライグマに関する学会報告のみで, アライグマと犬のレプトスピラ感染状況を比較検討した報告はない。そこで本研究では, 近年アライグマが増加し, その被害発生が多く, アライグマ防除計画が実施されている大阪府および兵庫県内2地域における野生アライグマのレプトスピラ感染状況を血清学的, 分子生物学的に検討した。さらに2地域のアライグマおよび家庭飼育犬のレプトスピラ抗体保有率と感染血清型を比較検討した。

材 料 お よ び 方 法

調査地域および被験検体: 大阪府南部(地域A), ならびに兵庫県東部(地域B)において有害捕獲許可に基づき捕獲されたアライグマから検体を採取した。地域Aの検体は, 2006年4月~2007年4月に捕獲された個体

† 連絡責任者: 奥田 優 (山口大学農学部臨床獣医学講座獣医内科学研究室)

〒753-8515 山口市吉田1677-1

☎083-933-5893 FAX 083-933-5930

E-mail: okudamu@yamaguchi-u.ac.jp

表1 MATによるレプトスピラ血清型別陽性頭数とその割合

動物	地域	検査頭数	陽性頭数 (%)	血清型別の陽性頭数 (%) [*]				
				Icterohaemorrhagiae	Canicola	Autumnalis	Hebdomadis	Australis
アライグマ	A	54	31 (57.4)	0 (0)	1 (1.9)	2 (3.7)	17 (31.5) ^a	12 (22.2) ^a
	B	132	84 (63.6)	6 (4.6) ^{b,c,d,e}	2 (1.5) ^b	5 (3.8)	68 (51.5) ^{c,d}	6 (4.6) ^e
飼育犬	A	33	2 (6.1)	1 (3.0)	0 (0)	1 (3.0)	0 (0)	0 (0)
	B	19	10 (52.6)	7 (36.8) ^f	1 (5.3) ^f	3 (15.8)	0 (0)	0 (0)

^{*}MAT抗体価>1:80かつ最も高い抗体価を示した血清型を陽性とした場合

a-a~f-f はそれぞれ, MAT抗体価が同等のものを1つずつ含む

の血清54検体, 腎臓18検体, 地域Bの検体は, 2005年5月~2006年12月に捕獲された個体の血清132検体, 腎臓48検体を用いた。検査に供したアライグマは, 外見上特に異常は認められなかった。

家庭飼育犬の検体は, 2008年3月~7月の間, AおよびB地域を中心に開業獣医師に依頼し, 血清または血漿を収集した。対象犬は動物病院に来院した生涯レプトスピラワクチン未接種の犬(地域A:33頭, 地域B:19頭)を用いた。供試検体は検査に用いるまで血清または血漿検体は-20℃, 腎臓検体は-80℃のフリーザー内で冷凍保存した。

Microscopic agglutination test (MAT): 抗原は5血清型標準株 *L. interrogans* icterohaemorrhagiae (RGA), canicola (Hond Utrecht IV), autumnalis (Akiyami A), hebdomadis (Akiyami B), australis (Akiyami C) を用いた。MATはWHOの方法に準拠した[1]。5血清型いずれかに対し抗体価80倍以上を示したものをMAT陽性とした。

OmpL1-PCR: アライグマの腎臓66検体の腎皮質領域の一部(約25mg)をホモジェナイズし, QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) を用いてDNAを抽出した。抽出DNAは検査を行うまで-20℃のフリーザーで保存した。*L. kirschneri* serovar grippotyphosa の *OmpL1* 遺伝子配列[6]を基に作製したプライマー *OmpL1*-Pr.1 (GCCGTAGCATTA TCTTCG), *OmpL1*-Pr.2 (ACCCAGGTCATATCTAC) を用い, 10 × NH₄ Reaction Buffer [160mM (NH₄)₂ SO₄, 670mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% Tween 20] 2.5 μl, 50mM MgCl₂ 2 μl, 2.5mM each dNTP 0.4 μl, 50 μM each primer 0.25 μl にテンプレートDNA 2 μl を混合し, 95℃9分間のプレヒーティング後に *Taq* DNA Polymerase (BIOTAQ™ DNA Polymerase, BIOLINE, Randolph, MA) 0.75 Units を加え, 計25 μl で反応を行った。DNAの増幅反応は Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いた。熱変性94℃, 1分間, アニーリング55℃, 1分間, 伸長反応72℃, 1分30秒間の1サイクルを計30サイクル行い, 最後の伸

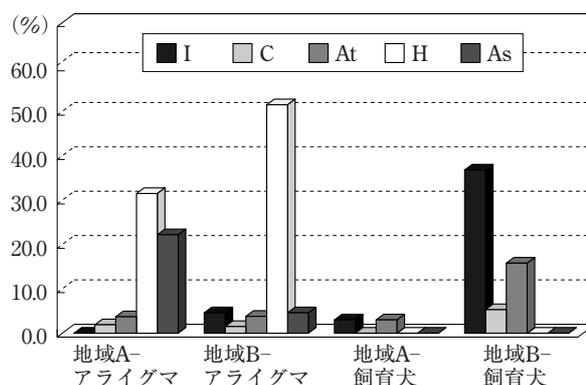


図1 5血清型別MAT陽性率

MAT抗体価≥80かつ最も高い抗体価を示した血清型の割合を各地域, アライグマ, 家庭飼育犬別に示す。

I: icterohaemorrhagiae, C: canicola, At: autumnalis; H: hebdomadis, As: australis

長反応は72℃で15分間行った。*OmpL1*-PCRによって増幅されたDNAは, 2%のアガロースゲルにてそれぞれ電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色後, 紫外線下でバンド(480bp)を確認した。さらに, *OmpL1*-PCRにおいてバンドが確認されたサンプルに関して, シークエンス反応を行いPCR産物の塩基配列解析を行った。

成 績

MATによる抗体調査: 検討したアライグマ186頭中115頭(61.8%), 飼育犬52頭中12頭(23.1%)がいずれかの血清型に陽性を示した。地域別では, 地域Aのアライグマ54頭中31頭(57.4%), 地域Bのアライグマ132頭中84頭(63.6%), 地域Aの飼育犬33頭中2頭(6.1%), 地域Bの飼育犬19頭中10頭(52.6%)が陽性であった。MATにおいて抗体価80倍以上かつ最も高い抗体価を示した血清型を陽性とした場合の結果を表1に示す。A, B両地域のアライグマは, いずれも hebdomadis に対する抗体陽性率が高い傾向にあり, 地域Aでは31.5%, 地域Bでは51.5%がそれぞれ陽性であった。また, 地域Aのアライグマの australis に対する陽

表2 アライグマ腎皮質より検出した *OmpL1* 遺伝子配列の比較 (%)

	Type 1	Type 2	Icterohaemorrhagiae	Canicola	Autumnalis	Hebdomadis	Australis	Hardjo	Pomona	Pyrogenes
Type 1	—	90.70	90.25	99.77	89.80	90.25	89.80	99.09	99.55	98.87
Type 2	90.70	—	99.09	90.48	98.64	99.55	98.64	91.16	91.16	90.93

性率は22.2%と地域Bの4.6%と比較して高かった。

地域Aの飼育犬ではicterohaemorrhagiaeとautumnalisに対して陽性が1例(5.0%)ずつ認められたのみであり、地域Bではicterohaemorrhagiaeに対する陽性率が36.8%と高い傾向にあった。両地域の飼育犬において、アライグマで高い陽性率を示したhebdomadisおよびaustralisに対して陽性を示した個体は認められなかった(表1, 図1)。

OmpL1-PCR : 地域Aのアライグマ18頭中4頭(22.2%), 地域Bのアライグマ48頭中4頭(8.3%)で*OmpL1* 遺伝子陽性を示した。陽性検体のPCR産物(480 bp)の塩基配列を解析したところ、7検体で解析が可能であり、それぞれはType 1 (n = 1) およびType 2 (n = 6) であった(表2)。Type 1, Type 2, および既知のレプトスピラ8血清型標準株の*OmpL1* 遺伝子との塩基配列の相同性を比較したところ、Type 1とType 2は90.70%の相同性を示した。また、Type 1はcanicolaと99.77%, pomonaと99.55%, hardjoと99.09%, Type 2はhebdomadisと99.55%, icterohaemorrhagiaeと99.09%の相同性を示した。

考 察

2004年日本獣医学会学術集会の報告で、2003年5月～9月北海道(道央地方)で捕獲された野生のアライグマ255頭を用いたMATの成績では、94頭(36.9%)が陽性で、autumnalis, icterohaemorrhagiae, canicolaに陽性を示す例が多く認められている。また、2002年4月～2003年4月、神奈川県内で捕獲された野生アライグマ124頭のうち16頭(12.9%), 長崎県内の動物展示施設で飼育されていたアライグマ53頭の33頭(62.3%)でレプトスピラ抗体陽性が認められている。本研究における野生のアライグマのレプトスピラ抗体陽性率は、過去のアライグマの成績と比較しても高い値を示した。hebdomadis, australisに対する高い陽性率は、調査地域に分布している血清型を反映しているものと考えられた。

いっぽう、飼育犬ではhebdomadis, およびaustralisの血清型に対し高い抗体価を示した個体は両地域で認められなかったのに対し、地域Bではicterohaemorrhagiaeに対する陽性率が高く、同じ地域であってもアライグマと飼育犬では感染している血清型が異なっていることが明らかとなった。アライグマは雑食性であり、レプ

トスピラを保菌している野生げっ歯類を捕食して感染している可能性も考えられる。また、アライグマは、水辺近くの森林に生息し、夜行性で非常に広い行動範囲を示すことが知られている。いっぽう、今回調査した飼育犬の行動範囲は基本的に飼育者の行動範囲と同一であったと考えられる。このような食性や行動範囲の違いが、アライグマと飼育犬で陽性率や感染血清型の違いとして現れたと考えられた。

過去の米国Washington州の調査において、飼育犬と野生アライグマでは必ずしも感染しているレプトスピラの血清型が一致しないことが示されている[7]。また、Washington州では感染動物との直接的な接触歴はなく水系感染が疑われたヒトのレプトスピラ症の報告もあり、地域に生息する犬や野生動物の疫学調査を行うことは公衆衛生上重要であると考えられている[7]。近年、犬はヒトレプトスピラ症の感染源というよりはむしろ歩哨動物として公衆衛生上重要であると考えられている[8]。しかしながら、犬に対するレプトスピラワクチン接種の普及により、地域に分布する血清型を犬の疫学調査から明らかにすることは、困難になってくると考えられる。今後、レプトスピラ症の犬と野生アライグマに感染している血清型を調査することによって、アライグマが本症の歩哨動物になりうるかを明らかにする必要がある。

今回、検討した地域Aのアライグマの22.2%(4/18)、地域Bのアライグマの8.3%(4/48)が*OmpL1*-PCR陽性を示した。PCR陽性8検体のうち、7検体において、2種類の遺伝子型(Type 1, Type 2)が認められた。現在、確認されている8種血清型標準株の*OmpL1* 遺伝子配列(未発表データ)と比較すると、Type 1はcanicola, pomona, hardjoと、Type 2はhebdomadis, icterohaemorrhagiaeと相同性の高い変異型であった。*OmpL1*はレプトスピラのより詳細な遺伝学的分類に有用である可能性が示唆されており[9]、アライグマをはじめとした野生動物および犬レプトスピラ症例から検出された*OmpL1* 遺伝子配列の解析は血清型とともにレプトスピラ症の疫学解明に有用であると考えられる。

アライグマは血清型hebdomadis, australisに対し高い陽性率を示したが、北米を原産とする外来生物であるため、日本に存在しない血清型を保有している可能性も考えられる。今後、アライグマからの菌分離を含め、

さらなる調査を進めていく必要があると考えられる。今回の成績から、現在アライグマが犬レプトスピラ症の感染源となっている可能性は低いと考えられたが、今後アライグマの生息地域の拡大により、人の生活環境への侵入の機会が増すことでアライグマから犬や人へレプトスピラの感染の危険性が高まる可能性も否定できないと考えられる。

稿を終えるにあたり、アライグマ材料の提供をいただいた方々ならびに犬血清を提供いただいた開業獣医師の方々に深謝する。本研究は科研費（19580369, 21580391）の助成を受けたものである。

引用文献

- [1] World Health Organization (WHO) : Human Leptospirosis : Guidance for Diagnosis, Surveillance and control, WHO, Geneva, 69-73 (2003)
- [2] Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P : *Leptospira* and Leptospirosis, 2nd ed, MediSci, Melbourne (1999)
- [3] Levett PN : Leptospirosis, Clin Microbiol Rev, 14, 296-326 (2001)
- [4] Iwamoto E, Wada Y, Fujisaki Y, Umeki S, Jones MY, Mizuno T, Itamoto K, Maeda K, Iwata H, Okuda M : Nationwide survey of *Leptospira* antibodies in dogs in Japan : Results from microscopic agglutination test and Enzyme-linked immunosorbent assay : J Vet Med Sci, 71, 1191-1199 (2009)
- [5] 池田 透 : アライグマ対策の課題, 哺乳類科学, 46, 95-97 (2006)
- [6] Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, Lovett MA : Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding *OmpL1*, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp, J Bacteriol, 175, 4225-4234 (1993)
- [7] Davis MA, Evermann JF, Petersen CR, VancersChalie J, Besser TE, Huckabee J, Daniels JB, Hancock DD, Leslie M, Baer R : Serological survey for antibodies to *Leptospira* in dogs and raccoons in Washington State, Zoonoses Public Health, 55, 436-442 (2008)
- [8] Moore GE, Guptill LF, Glickman NW, Caldanaro RJ, Aucoin D, Glickman LT : Canine leptospirosis, United States, 2002-2004, Emerg Infect, 12, 501-503 (2006)
- [9] Okuda M, Sakai Y, Matsuuchi M, Oikawa T, Watanabe M, Itamoto K, Iwata H, Kano R, Hasegawa A, Onishi T, Inokuma H : Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine *Leptospira* antibodies using recombinant *OmpL1* protein, J Vet Med Sci, 67, 249-254 (2005)

Epidemiological Survey of *Leptospira* Antibodies in Raccoons and Dogs in Osaka and Hyogo Prefectures

Yuko WADA*, Yuka FUJISAKI, Ken MAEDA, Hiroshi SATO, Mayumi YOKOYAMA, Shigehiko UNI, Takuya MIZUNO and Masaru OKUDA†

* Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan

SUMMARY

In the present study, serum samples were collected from feral raccoons (n = 186) captured in the southern part of Osaka Prefecture (A) and the eastern part of Hyogo Prefecture (B), as well as from pet dogs (n = 52) in the same regions. Anti-*Leptospira interrogans* antibodies were evaluated with a microscopic agglutination test (MAT), using five major *L. interrogans* serovars as antigens. In both regions, the most frequently detected serovar was hebdomadis (A : 31.5% and B : 51.5%) in raccoons, but these serovars were not detected from the pet dogs. *L. interrogans*-specific PCR analysis revealed that eight out of 66 (12.1%) raccoons were infected with the pathogen. These observations revealed that a high percentage of feral raccoons are infected with *Leptospira interrogans*, but that transmission may not occur between the raccoons and dogs.

—Key words : Dogs, Hyogo, *Leptospira*, Osaka, raccoons.

† Correspondence to : Masaru OKUDA (Faculty of Agriculture)

1677-1 Yoshida, Yamaguchi, 753-8515, Japan

TEL 083-933-5893 FAX 083-933-5930 E-mail : okudamu@yamaguchi-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 707 ~ 710 (2010)