

原 著

わが国の乳牛におけるレプトスピラ症の抗体調査

菊池直哉^{1)†} 鳥海史恵¹⁾ 中野良宣¹⁾ 森谷浩明²⁾ 高橋樹史¹⁾

1) 酪農学園大学獣医学群 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

2) 十勝農業共済組合 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-28)

(2012年10月18日受付・2013年4月8日受理)

要 約

日本の乳牛におけるレプトスピラ症の全国的な浸潤調査を実施した。スクリーニング試験としてバルク乳を用いたELISAを実施した結果、249農場中78農場(31.3%)が*Leptospira interrogans*血清型Hardjoに対して陽性を示した。北海道と東北が高く、それぞれ50.0%と47.5%であった。ELISA陽性牧場から無作為に抽出された約20頭の血清を用いて、病原性レプトスピラ8血清型について顕微鏡凝集反応(MAT)を行った。1,510検体中688検体(45.6%)が抗体陽性を示し、北海道の陽性率は67.5%で特に高い値を示した。血清型別では*L. interrogans*血清型Hardjo(43.9%)の陽性率が最も高く、次いで*L. interrogans*血清型Hebdomadis(38.9%)の陽性率が高かった。MATを行った血清について同様にELISAにより血清型Hardjo抗体を検索したところ、1,510検体中723検体(47.9%)が抗体陽性を示しMATの結果と一致した。以上から、日本における牛レプトスピラ症が血清学的に確認され、本症が日本において広く浸潤していることが示唆された。——キーワード：レプトスピラ、乳牛、抗体、抗体調査。

----- 日獣会誌 66, 463~467 (2013)

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラによって引き起こされる人獣共通感染症である。日本では家畜伝染病予防法により届出伝染病に、人のレプトスピラ症も感染症法により4類感染症に指定されている。世界的にも広く蔓延しており、特に熱帯・亜熱帯地域では公衆衛生上の大きな問題となっている [1-3]。

牛のレプトスピラ症は黄疸や血色素尿の他に、流産や死産などを起こし、世界各地で発生が報告されている。地域により血清型が異なるが、*Leptospira interrogans*と*L. borgpetersenii*の血清型Hardjo及び*L. interrogans*血清型Pomonaが本症による流産の主要な原因菌とされている [2, 4]。スコットランドでは、牛の60%以上が血清型Hardjoに対し抗体陽性を示しており [5-7]、オーストラリアでは血清型Hardjoによる流産が多い [8, 9]。また、アメリカではと殺された牛306頭中、82頭(26.8%)からレプトスピラが分離されており、その中で最も多いのが血清型Hardjoであった [10]。このように血清型Hardjoが牛の主要な血清型であるが、この理由として牛は本血清型の維持宿主であることによる [6]。また、本血清型は遺伝学的に*L. interrogans*血清型Hardjo Hardjoprajitno型と*L. borgpetersenii*血清型

Hardjo Hardjobovis型の2種に分類されている [11]。

日本においては、1956~1958年に全国的なレプトスピラ症の血清学的及び病原学的な調査が実施され、その抗体保有率は9.8%であり、血清型Autumnalis, Icterohaemorrhagiae, Hebdomadisに対する抗体が多く検出され、本症がわが国に広く分布していることが判明した(家畜衛生試験場：家畜のレプトスピラ病に関する研究、農林水産技術会議事務局(1960))。しかし、その後レプトスピラ症の発生報告及び血清学的調査の報告は少ない。茨城県においては、乳牛から血清型Hebdomadisの抗体が認められ [12]、鹿児島県では黒毛和種子牛のレプトスピラ症による死亡例や同牧場でのレプトスピラに対する抗体陽性例について報告された(Shimizu T, et al: Acute leptospirosis in a calf-possibly preceding seroconversion of the herd, Mem Fac Agr Kagoshima Univ (1985))。また、北海道においては天塩町で血清型Hardjoに対し抗体陽性を示した乳牛が血色素尿を呈し死亡した例 [13]、最近では血清型HardjoやHebdomadisに対する抗体陽性牛 [14] が報告されている。届出伝染病に指定された後では2007年群馬県で発生がみられた2例のみである(家畜伝染病発生情報データベース)。

† 連絡責任者：菊池直哉(酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医細菌学ユニット)

〒069-8501 江別市文京台緑町582 ☎011-388-4729 FAX 011-387-5890 E-mail: nkikuchi@rakuno.ac.jp

このように、日本におけるレプトスピラ症に関しては限定的な地域の報告であり、1950年代の血清学的調査以降、全国的規模での調査は実施されていない。さらに、これらの家畜は人間と深く接しており、人への感染の危険性も考えられるため、本症の浸潤状況を知ることは公衆衛生上重要なことである。本研究では、日本における乳牛のレプトスピラ症、特に血清型Hardjoを中心に、その浸潤調査を全国規模で行った。

材料及び方法

対象地域及び農場：対象地域は北海道の5支庁（石狩、胆振、十勝、根室、留萌）、東北の4県（岩手、宮城、山形、福島）、関東・中部の6県（茨城、千葉、栃木、群馬、新潟、静岡）、関西・中四国の5県（三重、兵庫、広島、鳥取、愛媛）及び九州・沖縄の5県（大分、熊本、宮崎、鹿児島、沖縄）、計5地域25支庁／県とした。各支庁／県からそれぞれ8～12農場、計249農場を無作為に抽出し調査対象とした。

バルク乳：ELISA検査用として上記の計249農場のそれぞれのバルク乳を2001年11～12月にかけて採取した。約10mlのバルク乳を採取し、滅菌試験管に分注し密栓した。本学へは4℃の条件下で速やかに輸送した。バルク乳は使用するまで4℃で保存した。

血清：ELISAにより陽性と診断された牧場については、1牧場あたり13～21頭を無作為に抽出し、血清を2001年12月～2002年2月にかけて採取した。これらの牛はすべて健康であり、レプトスピラ症が疑われる症状は認められなかった。血清は使用するまで-20℃で保存した。

ELISA：レプトスピラの抗体検出用ELISAキット（*Leptospira* ELISA kit, Linnodee Animal Care, Northern Ireland, U.K.）を用いて行った。本キットは血清や乳汁中の*L. borgpetersenii*血清型Hardjo Hardjobovis型及び*L. interrogans*血清型Hardjo Hardjoprajitno型に対する抗体を検出するものである。本研究においては、スクリーニング試験として、バルク乳を用いてレプトスピラ感染陽性牧場を摘発し、さらにその陽性牧場から無作為に抽出した牛血清を用いて、個体別のOD値を測定した。ELISAの方法及び判定は添付されている説明書にしたがって実施した。

顕微鏡凝集反応（microscopic agglutination test : MAT）：Faine [2]により記載されている方法に準じ、以下のように実施した。抗原として*L. interrogans*血清型Hardjo Hardjoprajitno型、Autumnalis, Hebdomadis, Australis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Canicola及び*L. kirschneri*血清型Grippotyphosaの計8血清型の菌株を使用した。それぞれの菌株をEMJH培地で30℃5～9日培養後、菌数を1～2×10⁸cell/mlに

表1 全国の酪農場由来バルク乳からのELISAによる*Leptospira interrogans*血清型Hardjoに対する抗体の検出

| 地域 | 支庁・県名 | 牧場数 | 陽性数 | 陽性率(%) |
|--------|-------|-----|-------------------|-------------------|
| 北海道 | 石狩 | 10 | 2 | |
| | 胆振 | 10 | 6 | |
| | 十勝 | 10 | 8 | |
| | 留萌 | 10 | 6 | |
| | 根室 | 10 | 3 | |
| | 計 | 50 | 25 | 50.0 ^a |
| 東北 | 岩手 | 10 | 3 | |
| | 宮城 | 10 | 6 | |
| | 山形 | 10 | 7 | |
| | 福島 | 10 | 3 | |
| | 計 | 40 | 19 | 47.5 ^a |
| 関東・中部 | 新潟 | 10 | 3 | |
| | 茨城 | 10 | 2 | |
| | 千葉 | 10 | 5 | |
| | 群馬 | 10 | 2 | |
| | 栃木 | 10 | 0 | |
| | 静岡 | 10 | 0 | |
| | 計 | 60 | 12 | 20.0 ^b |
| 関西・中四国 | 三重 | 10 | 4 | |
| | 兵庫 | 10 | 1 | |
| | 広島 | 10 | 1 | |
| | 鳥取 | 10 | 0 | |
| | 愛媛 | 10 | 6 | |
| 計 | 50 | 12 | 24.0 ^b | |
| 九州・沖縄 | 熊本 | 10 | 2 | |
| | 大分 | 12 | 3 | |
| | 宮崎 | 10 | 3 | |
| | 鹿児島 | 10 | 0 | |
| | 沖縄 | 7 | 2 | |
| 計 | 49 | 10 | 20.4 ^b | |
| 全国計 | | 249 | 78 | 31.3 |

aとbとの間には統計学的有意差あり（ $P<0.05$ ）

調整したものを抗原として使用した。96穴のマイクロプレートで被検血清を2倍階段希釈後、それぞれ等量の培養菌液を加えた。ミキサーでよく混和後密封し、30℃3時間反応後、各穴から1ユーゼずつ反応液を取り暗視野顕微鏡で検鏡した。対照培養液と比較し50%以上の凝集を示した場合を凝集陽性とした。凝集を示した最終希釈倍数を抗体価とし、凝集価100倍以上を示したものをレプトスピラ抗体陽性とした [3]。

統計処理：各地域での陽性率については χ^2 検定により有意差の有無を解析した。

成績

ELISAによるバルク乳を用いたレプトスピラ陽性牧場の摘発（表1）：バルク乳を用いたELISAによるスクリーニング試験の結果249農場中78農場（31.3%）が

表2 顕微鏡凝集反応 (MAT) によるレプトスピラ抗体の検出と血清型別分布

| 地 域 | 牧場数 | 検査頭数 | 陽性率 (%) | 陽性頭数 (%) | | | | |
|--------|-----|-------|--------------------------|------------|------------|------------|---------|-----|
| | | | | Hardjo | Hebdomadis | Autumnalis | Pomona | その他 |
| 北海道 | 25 | 501 | 344 (68.7 ^a) | 338 (67.5) | 302 (60.3) | 1 (0.2) | 1 (0.2) | 0 |
| 東 北 | 19 | 363 | 133 (36.6 ^b) | 122 (33.6) | 112 (30.9) | 0 | 0 | 0 |
| 関東・中部 | 12 | 221 | 64 (29.0 ^b) | 63 (28.5) | 54 (24.4) | 0 | 2 (0.9) | 0 |
| 関西・中四国 | 12 | 233 | 105 (45.1 ^b) | 101 (43.3) | 79 (33.9) | 0 | 0 | 0 |
| 九州・沖縄 | 10 | 192 | 42 (21.9 ^b) | 39 (20.3) | 34 (17.7) | 1 (0.5) | 0 | 0 |
| 全 国 | 78 | 1,510 | 688 (45.6) | 663 (43.9) | 581 (38.5) | 2 (0.1) | 3 (0.2) | 0 |

その他の血清型：Australis, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippotyphosa

a と b の間には統計学的有意差あり (P<0.05)

表3 *Leptospira interrogans* 血清型 Hardjo を抗原として実施した顕微鏡凝集反応 (MAT) と ELISA の相関性

| | | MAT | |
|-------|----|------------|------------|
| | | 陽性 (%) | 陰性 (%) |
| ELISA | 陽性 | 616 (92.9) | 111 (13.1) |
| | 陰性 | 47 (7.1) | 736 (86.9) |
| 計 | | 663 | 847 |

(%)：MAT と ELISA の一致率を示す

陽性を示した。陽性率は北海道、東北が他地域と比較し有意に高く、それぞれ50.0%、47.5%と高値を示した。北海道では十勝が最も陽性率が高く、10農場中8農場が、胆振と留萌では各10農場中6農場が陽性で高い値を示した。東北においては、山形県及び宮城県では10農場中それぞれ7農場と6農場が、関西・中四国においては愛媛県で10農場中6農場が陽性であった。

顕微鏡凝集反応 (MAT) によるレプトスピラ抗体の検出と血清型別分布 (表2)：上記で陽性を示した牧場から採取した血清を用いて、各個体の抗体価をMATによって調べた。1,510検体中688検体(45.6%)が用いた8種の菌株のうち、4種のいずれかに対し凝集価100倍以上で抗体陽性を示した。地域別にみると、バルク乳を用いたELISAでの陽性率が高かった北海道が有意に高く、68.7%であった。その他の地域では22%から45%の間に分布した。

抗体陽性を示した血清型の中では、Hardjoが最も多く、次いでHebdomadisであり、それぞれ43.9%と38.5%を示した。Hardjoに対して陽性を示したものは、Hebdomadisに対しても陽性を示す個体が多かった。AutumnalisとPomonaに対してはそれぞれ2例と3例が陽性を示したが、それ以外の血清型に対してはすべて陰性であった。

L. interrogans 血清型 Hardjo 抗体検出におけるMATとELISAの相関性 (表3)：L. interrogans 血清型Hardjoに対してMAT陽性を示した633検体中ELISA

では616検体が陽性を示し、一致率は92.9%であった。また、MAT陰性830検体中ELISAでは736検体が陰性で、一致率は86.9%であった。

考 察

本研究においてレプトスピラ症の全国的な血清学的検査を行ったところ、抗体陽性牛が全国的に分布していることが確認され、本症が乳牛間に広く浸潤していることが明らかになった。特に北海道における陽性率が高く、高濃度に汚染していた。レプトスピラ症の発生率は、本菌が生存しやすい温度・湿度環境である熱帯～亜熱帯地方で高いといわれている [1] が、今回の調査では温暖な九州よりも寒冷な北海道が最も抗体陽性率が高かった。レプトスピラは感染動物の尿中の菌が直接的または間接的に接触することにより感染する。本研究において高い陽性率を示した血清型はHardjoであり、牛は本血清型の維持宿主である。北海道の畜産規模は大きく、維持宿主である牛の飼育頭数、さらに1牛群における飼育頭数も多いことから牛と牛との接触頻度が他地域に比較し高いと推測される。そのような飼育環境が高い陽性率を示す一つの要因として考えられた。

MATにおいては、抗体陽性を示した血清型の中で、Hardjoが最も多く、次いでHebdomadisであり、他の血清型に対する抗体はほとんど認められなかった。血清型Hardjoは欧米における牛のレプトスピラ症の主要な血清型であるが、わが国においては、北海道のHardjo感染例と抗体陽性例の2例のみであった [13, 14]。これまで牛のレプトスピラ症の主要な血清型はAutumnalisあるいはHebdomadisなどと考えられていたが、本研究ではHardjoが全国的に広く浸潤し、主要な血清型であることが初めて明らかになった。

血清型Hardjoの浸潤時期については不明であるが、これまでの血清学的検索においては本血清型を抗原として使用していないことが多かったため、陽性牛が見逃されていた可能性もある。今後は血清型Hardjoも抗原として血清学的検査を行う必要があろう。

血清型 Hardjo と Hebdomadis は交叉反応を示すことが知られている [13]. 本研究においても血清型 Hardjo に対して陽性を示したものは, Hebdomadis に対しても陽性を示す例が多かったが, その抗体価は, Hardjo に比較すると低いものであった. 今後, 吸収試験などを実施し, さらに詳細に検査する必要がある.

レプトスピラ症を診断するには病原学的診断法としての菌分離, 特異抗体を検出する血清学的診断法として MAT, ELISA, 遺伝子診断法としての PCR などがある [2, 3, 15] が, 一般的には血清学的診断法が主流である. 特に MAT は本感染症の診断法の中で最も標準的な方法である [2, 3]. しかし, この方法では生菌を抗原として使用すること, 判定には時間と熟練を要することから, 一部の検査機関で行われているにすぎない. したがって迅速, 客観的かつ多数の試料の処理が可能な診断法が求められている. 本研究において, バルク乳を用いた ELISA により陽性を示した牧場から, MAT により高率にレプトスピラ感染陽性牛が確認された. また, ELISA と MAT の判定結果を比較すると, 双方の検査の一致率は高かった. これらのことから, 血清型 Hardjo によるレプトスピラ症の診断にはスクリーニング検査としてバルク乳を用いて ELISA を行い, 確定診断として血清を用いた MAT あるいは ELISA を実施して抗体価を決定することが最も確実な方法であると考えられた.

本調査で対象としたすべての牛は健康であり, レプトスピラ症の症状を示していたものは認められず, 流産歴についても特に報告はされていなかった. また, ELISA 陽性牧場と陰性牧場間での流産発生率に差はみられなかった. したがって陽性牛の多くが不顕性感染であると推測されるので, これらの牛による尿中への排菌によりさらに感染が拡大する危険性があると考えられた. また, 血清型 Hardjo は牛の流産や繁殖障害における原因血清型である [4, 8, 9, 16] ので, 不顕性にとどまらず発症することにより経済的な損失をもたらす危険性が考えられた. また, わが国では確認されていないが酪農場を中心とした人への感染例についても報告されている [17, 18] ので, 牛のレプトスピラ症のコントロールは重要な課題である. このような状況の中で, アメリカやヨーロッパなどでは牛へのワクチン接種が行われており, その有効性が示されている [19-21]. しかし, 日本では牛に対するワクチンはまだ応用されていないので, 今後は牛用ワクチンの導入が必要であろう. また, 感染防御は血清型特異性であるので, 抗体陰性地域を含めた定期的な血清学的検索により抗体の推移及び優勢血清型の動向を把握することは重要であると考えられた.

引用文献

[1] Everard JD, Everard COR : Leptospirosis in the

Caribbean, Rev Med Microbiol, 4, 114-122 (1993)

[2] Faine S : *Leptospira* and Leptospirosis, CRC Press, Boca Raton (1994)

[3] 増澤俊幸 : げっ歯類を感染源とする人獣共通感染症, レプトスピラ病, 日獣会誌, 55, 324-330 (2002)

[4] Ellis WA, Thiermann AB : Isolation of leptospires from the genital tracts of Iowa cows, Am J Vet Res, 47, 1694-1696 (1986)

[5] Ellis WA, Michna SW : Bovine leptospirosis : a serological and clinical study, Vet Rec, 99, 387-391 (1976)

[6] Ellis WA, O'Brien JJ, Cassells J : Role of cattle in the maintenance of *Leptospira interrogans* serotype hardjo infection in Northern Ireland, Vet Rec, 108, 555-557 (1981)

[7] Hathaway SC, Little TWA, Pritchard DG : Problems associated with the serological diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations, Vet Rec, 119, 84-86 (1986)

[8] Elder JK, Pepper PM, Hill MWM, Ward WH : The significance of leptospiral titres associated with bovine abortion, Aust Vet J, 62, 258-262 (1985)

[9] Slee KJ, McOrist S, Skilbeck NW : Bovine abortion associated with *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection, Aust Vet J, 60, 204-206 (1983)

[10] Thiermann AB : Bovine leptospirosis : bacteriologic versus serologic diagnosis of cows at slaughter, Am J Vet Res, 44, 2244-2245 (1983)

[11] Marshall RB, Winter PJ, Thiermann AB, Ellis WA : Genotypes of *Leptospira interrogans* serovar hardjo in cattle in the UK, Vet Rec, 117, 669-670 (1985)

[12] 蓮田安信, 石井正人, 桔梗洋右 : 茨城県西地域における乳牛のレプトスピラ抗体調査, 日獣会誌, 55, 341-344 (2002)

[13] Tsuchimoto M, Kida H, Yanagawa R, Inui S : *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in cows of Hokkaido, Japan -serological evidence, Jpn J Vet Sci, 45, 811-814 (1983)

[14] Koizumi N, Yasutomi I : Prevalence of leptospirosis in farm animals, Jpn J Vet Res, 60, S55-S58 (2012)

[15] Levett PN : Leptospirosis, Clin Microbiol Rev, 14, 296-326 (2001)

[16] Prescott JF, Miller RB, Nicholson VM, Martin SW, Lesnick T : Seroprevalence and association with abortion of leptospirosis in cattle in Ontario, Can J Vet Res, 52, 210-215 (1988)

[17] Hodgen AN, Stuckey MS : Leptospirosis in Western Australia, 1983-1984, Med J Aust, 144, 567-569 (1986)

[18] Thomley CN, Baker MG, Weinstein P, Maas EW : Changing epidemiology of human leptospirosis in New Zealand, Epidemiol Infect, 128, 29-36 (2002)

[19] Bolin CA, Alt DP : Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo, Am J Vet Res, 62, 995-1000 (2001)

[20] Hancock GA, Wilks CR, Kotiw M, Allen JD : The long term efficacy of a hardjo-pomona vaccine in prevent-

ing leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo, Aust Vet J, 61, 54-56 (1984)

[21] Little TW, Hathaway SC, Broughton ES, Seawright D : Control of *Leptospira hardjo* infection in beef cattle by whole-herd vaccination, Vet Rec, 131, 90-92 (1992)

Prevalence of Leptospiral Antibodies in Dairy Cows in Japan

Naoya KIKUCHI^{1)†}, Fumie TORIUMI¹⁾, Yoshinori NAKANO¹⁾, Hiroaki MORIYA²⁾
and Tatsufumi TAKAHASHI¹⁾

1) *Unit of Veterinary Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

2) *Tokachi Federation of Agricultural Mutual Aid Association, 59-28 Kawanishi-kisen, Obihiro, 089-1182, Japan*

SUMMARY

The prevalence of leptospiral antibodies in dairy cows was investigated throughout Japan. The antibodies were detected by an ELISA screening test using individual bulk tank milk and a microscopic agglutination test (MAT) using serum. A total of 249 dairy farms were randomly selected for the survey, with 78 (31.3%) of the farms found to be positive for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. Of 1,510 cows randomly selected from the farms that were found to be positive in the ELISA test, 688 (45.6%) were positive for leptospiral antibodies, with the positive rate in Hokkaido (67.5%) being particularly high. The positive rate for *L. interrogans* serovar Hardjo was the next highest, detected in 663 cows (43.9%), followed by *L. interrogans* serovar Hebdomadis (38.9%). In the detection of antibodies from serum using the ELISA test, 723 (47.9%) of cows were found positive for serovar Hardjo, which corresponded well with the MAT results. Thus, the wide prevalence of leptospiral antibodies in dairy cows in Japan was confirmed using the MAT and ELISA tests, and *L. interrogans* serovar Hardjo was found to be the major serovar.

—Key words : antibodies, dairy cow, *Leptospira*, serological survey.

† Correspondence to : Naoya KIKUCHI (Unit of Veterinary Bacteriology, Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)
582 Bunkyo-dai-midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan
TEL 011-388-4729 FAX 011-387-5890 E-mail : nkikuchi@rakuno.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 66, 463 ~ 467 (2013)