

(20) マニラ首都圏における台風 Ketsana による 洪水域内環境水からの病原性レプトスピラの検出

沼澤 聡^{1*}・真砂 佳史¹・齊藤 麻理子²
山口 諒¹・押谷 仁²・大村 達夫¹

¹東北大学大学院工学研究科土木工学専攻 (〒980-8579宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

²東北大学大学院医学系研究科微生物学分野 (〒980-8575宮城県仙台市青葉区星陵町2-1)

* E-mail: numazawa@water.civil.tohoku.ac.jp

台風Ketsanaによる被害を受けたマニラ首都圏の洪水試料および河川水試料から病原性レプトスピラを検出し、その種を同定した。既存の検出系の検出感度を評価したところ、16S rRNAを検出対象とすることで既存の手法より高感度で検出できることが示された。また、遺伝子解析に用いられている既存の検出系は十分な特異性を持っていなかったため、本研究で新たにプライマーセットを設計した。調査の結果、現地試料から広範囲かつ長期間にわたり病原性レプトスピラが検出された。*Leptospira wolffi*, *L. licerasiae*, *L. kmetyi*の3種の病原性レプトスピラが存在したが、中でも犬由来と考えられる*L. wolffi*が優占しており、今回のレプトスピラ症の原因種であることが示唆された。

Key Words : *Leptospira*, typhoon Ketsana, leptospirosis, TaqMan PCR, 16S rRNA

1. はじめに

台風 Ketsana は、2009 年の 9 月末にフィリピンのマニラ首都圏を通過し、過去 40 年間で最も深刻な洪水を引き起こした。地域によっては、台風が通過してから約 2 ヶ月半後も水が引くことなく冠水が続いた。下水道などの衛生設備が万全でない地域では、汚染された環境水が傍らに存在する状態での長期間の生活を余儀なくされた。この事態に際して、病原性レプトスピラに汚染された水や土壌を介して伝播する人獣共通細菌感染症のレプトスピラ症が流行し、2009 年 10 月 1 日から 11 月 19 日の間にマニラ首都圏において 2,299 名が発症し、178 名が死亡した¹⁾。

レプトスピラ症は病原性レプトスピラに感染することにより引き起こされる。全世界で散発的に発生しており、WHO の International Leptospirosis Society によると年間 35~50 万人が感染しているとされる²⁾。レプトスピラ症は、初期症状として発熱、悪寒、頭痛、筋肉痛、結膜充血などの一般的な熱性疾患と似た症状を呈し、多くの患者が初期症状のみで回復するが、約 20%の患者が重篤な症状へと進行する³⁾。重篤な症状は粘膜からの出血、黄疸、喀血、肺出血、肝不全、腎不全などであり、腎不全に伴う尿毒症などにより死に至る場合もある⁴⁾。

レプトスピラ (*Leptospira*) はスピロヘータ目レプトス

ピラ科レプトスピラ属のグラム陰性細菌であり、13種の病原性レプトスピラと3種の非病原性レプトスピラに大分される⁵⁾。病原性レプトスピラは、ほぼすべての哺乳類に感染することができるとされる。感染後は腎臓で保菌され、尿管で増殖した後に尿と共に排出される。環境中では、尿と共に排出された病原性レプトスピラが、ヒト以外の動物(野生動物、家畜、ペット)の個体間で感染と排出を繰り返し、循環することで維持されている。齧歯類は症状を示さず自然宿主となる。ヒトへ感染は保菌動物の排出した尿に直接接触する、あるいはこの尿で汚染された水や土壌、植物に接触することで経皮、または経口感染する。

今回の流行の主な伝播経路は不明だが、レプトスピラ症が病原性レプトスピラにより汚染された水への接触により経皮感染すること、また患者が洪水域に集中していたことから、洪水域の水がレプトスピラにより汚染されていたことが懸念される。

病原微生物の検出技術として、PCR を用いた手法が近年一般的になりつつあり、病原性レプトスピラの検出においても PCR や real-time PCR を用いた研究が既に存在する⁷⁾。これら既存の研究で対象とした試料は、レプトスピラ症患者から採取した血液や尿、レプトスピラの分離培養液などレプトスピラが高濃度で存在しているもので

ある。一方で、環境水中のレプトスピラの濃度は非常に低いと考えられることから、既存の研究で用いられた検出法をそのまま環境水に適用し、レプトスピラを検出することは難しいと考えられる。Vital-Brazil⁹⁾はブラジルのペトロポリス近郊の下水道設備のない地域の環境水から100個の水試料を採取し、病原性レプトスピラの検出を目的としてゲノムDNAを検出対象としたPCRを試みた。その結果は1試料(1%)のみが陽性を示し、極めて低い陽性率であった。このような低濃度試料からの細菌検出では、ゲノムDNAを検出対象とするのではなく、一つの細胞に多数存在している16S ribosomal RNAを検出対象とすることで、検出感度が向上すると考えられる。16S rRNAは細胞内に数多く存在しているタンパク質を合成する器官であるリボソームを構成している。このため、例えば濃度が低い環境水試料であっても、レプトスピラ由来の16S rRNAは比較的に高濃度で存在しており、検出が容易であると考えられる。

以上の背景より、本研究では2009年にマニラ首都圏の洪水域および河川で採取した水試料から病原性レプトスピラの検出、及び種の同定を行った。

まず、TaqMan PCRを用いた検出系において、ゲノムDNAを検出対象としたものと16S rRNAを検出対象としたものを比較し、検出感度の比較を行った。また、PCRによる対象微生物の検出において、用いるプライマーの特異性は結果に大きな影響を与えるため、既存の研究で用いられている16S rRNA遺伝子をターゲットとするプライマーの特異性を評価した。さらに、遺伝子系統解析を

行い、環境水中に存在する病原性レプトスピラの種を同定した。

2. 実験方法

(1) 水試料の採取

水試料の採取は、2009年10月13-14日、同年11月3-5日、及び同年12月9-10日の計3回行った。採取地点はフィリピンのマニラ首都圏の洪水域12地点(図-1のF1-F12)、及び河川3地点(同St. 1-3)であり、洪水域より洪水試料、河川より河川水試料を採取した。洪水地点は、冠水した道路上(F10を除いたすべての洪水地点)、及び冠水した小学校内(F10)である。現地の人々は洪水域を素足などで通行し、皮膚を介して環境水と接触していた。河川水試料は、マニラ首都圏を流れるパシグ川、及びマリキナ川に架かる橋の上から河川水を採取した。

水試料は各地点で40ml採取し、-20℃で保存した。洪水域は時間の経過とともに減少し、試料を採取できない地点があったため、3回の試料採取で洪水試料28試料と河川水試料9試料を得た。

(2) 濃縮

濃縮手法はGanoza¹⁰⁾に従った。40mlの水試料を室温で3,000×g、30分間遠心分離して得たペレットに、400μlの滅菌超純水を加えて、これを濃縮溶液とした。

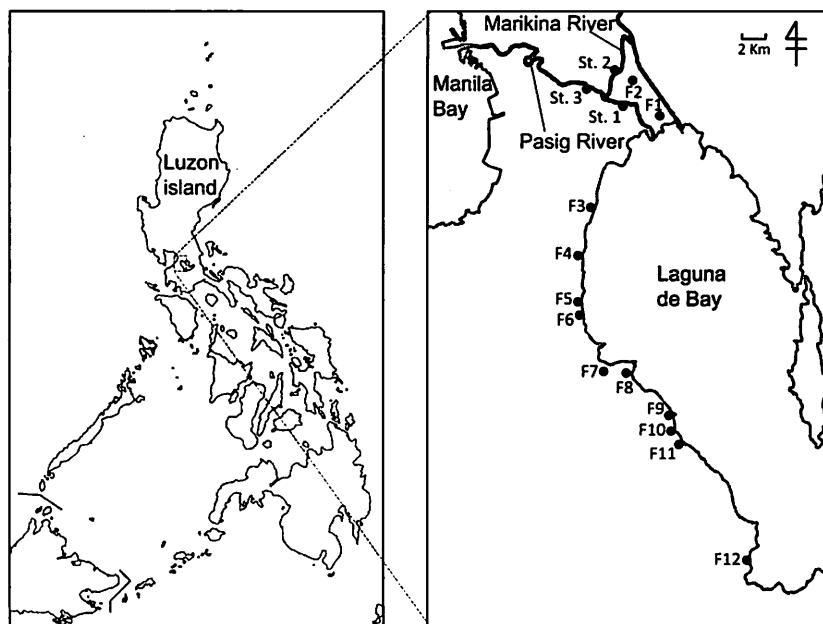


図-1 試料採取地点
左：フィリピン全体地図、右：マニラ首都圏拡大地図

(3) 遺伝子抽出、逆転写反応

濃縮溶液からQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), RNeasy Protect Bacteria Mini Kit (Qiagen) を用いて、それぞれDNA, RNAを抽出した。次に、RNA抽出溶液からiScript cDNA Synthesis kit (Bio-Rad) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを作成した。各過程の手順はキットに添付されているマニュアルに従った。

(4) TaqMan PCR検出系の検出対象の比較

比較した各TaqMan PCR検出系は、それぞれ検出対象が異なる。①病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子を検出対象としたもの⁷⁾、②病原性レプトスピラのみが持つ表面タンパク質LipL32をコードする遺伝子を検出対象としたもの⁸⁾、及び③RT-PCR法により病原性レプトスピラの16S rRNAを検出対象としたもの(プライマーは①と同じ)である。①、及び②は既存の検出系であり、1細胞当たり一つ存在するゲノムDNAを検出対象としている。③は1細胞に多数存在する16S rRNAを検出対象としている。これらのTaqMan PCR検出系を用いて、水試料から病原性レプトスピラの検出を行い、その結果を比較した。

PCR反応液(全量25 μ l)は、DNA抽出溶液(①、②)またはcDNA溶液(③)を5 μ l、2 $\times$ iQ SuperMix (Bio-Rad)を12.5 μ lに加え、蛍光プローブの最終濃度0.2 pmol/ μ l、各プライマーの最終濃度0.5 pmol/ μ lとなるように、滅菌超純水を用いて調整した。サーマルサイクラーはCFX96 (Bio-Rad)を用いた。増幅プロトコールは、95 $^{\circ}$ C 3分の後に、95 $^{\circ}$ C 15秒、60 $^{\circ}$ C (①、③)または58 $^{\circ}$ C (②) 30秒、72 $^{\circ}$ C 15秒(蛍光取得)のサイクルを40回繰り返した。

(5) プライマーの特異性の評価

病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子の検出を目的とした既存の各プライマー配列(表-1)が、いくつかの病原性レプトスピラ、及び非病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子配列と一致するかを調べた。病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子配列とより多く一致し、非病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子配列とは全く一致しないプライマーが、より本研究の目的に則した特異性を有すると評価した。

具体的には、まず、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) から病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子配列(298配列)、及び非病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子配列(38配列)を取得した。これらは、配列取得時にDDBJに登録されていたすべてのレプトスピラの16S rRNA遺伝子配列であり、現在報告されているレプトスピラ種(13+3=16種)を網羅している。次に、取得した16S rRNA遺伝子配列をClustalW 1.83を用いてアライメントを行い、Jalview 2.6.1を用いて表-1に示した各プライマー配列と一致する取得した16S rRNA遺伝子配列の数を調べた。

また、上記で得た16S rRNA遺伝子配列をもとに、Clustal W 1.83, Jalview 2.6.1を用いて、既存のプライマーよりも本研究の目的に則した特異性を持つプライマーを新たに作成した。

(6) PCR増幅、クローニング、シーケンシング

検出系③を用いた定量PCRの結果において、レプトスピラ由来の16S rRNA濃度が高い上位10試料(10月の試料F1, F5, F7, F12, 11月の試料 F1, F3, F5, F7, F11, St1)を選び、16S rRNAの塩基配列の決定を試みた。

PCRは、本研究で作成したプライマーセット(表-1)を

表-1 用いたプライマー配列

検出領域	プライマー プローブ	配列(5'→3')	文献
16S rRNA遺伝子	LeptoF	CCCGCGTCCGATTAG	Smythe <i>et al.</i> , 2002 ⁷⁾
	LeptoR	TCCATTGTGGCCGRACAC	
	LeptoP	CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC	
LipL32遺伝子	LipL32-45F	AAGCATTACCGCTTGTGGTG	Stoddard <i>et al.</i> , 2009 ⁸⁾
	LipL32-286R	GAAGTCCCATTTCAGCGATT	
	LipL32-189P	AAAGCCAGGACAAGCGCCG	
16S rRNA遺伝子	Lepto-PFA	TGAGTAACACGTGGGTAATCTTCC	Feamley <i>et al.</i> , 2008 ¹¹⁾
	Lepro-PRA	TCCATTGTGGCCGRACAC	
16S rRNA遺伝子	Lep1	GGAAGTACGACACGGTCCAT	Tansuphasiri <i>et al.</i> , 2006 ¹²⁾
	Lep2	GCCTCAGCGTCAGTTTATAGG	
16S rRNA遺伝子	LeptoR-F	GTGTYCGGCCACAATGGA	本研究
	LeptoN	ATGCGACGTCGGGCCCAATT	

用いて病原性レプトスピラの16S rRNAを増幅した。PCR反応液（全量10 μ l）にcDNA溶液1 μ l, PCR Master I (Roche) 5 μ l, PCR Master II (Roche) 3 μ lを加え、各プライマーの最終濃度が0.5 μ mol/ μ lとなるように滅菌超純水を用いて調整した。増幅プロトコールは、94°C 2分の後に、94°C 30秒, 53°C 30秒, 72°C 1分のサイクルを35回繰り返した。

次に、GENECLEAN Kit (MP Biomedicals) を用いて、増幅後のPCR反応液からプライマーなど除去し、10 μ lのPCR産物を精製した。得られたPCR産物からプラスミドベクター (pGEM-T Easy Vector Systems II, Promega) , 及びコンピテントセル (*Escherichia coli* JM109, TaKaRa) を用いてクローニングを行った。核酸精製, 及びクローニングは、キットに添付されているマニュアルに従った。シーケンシングは本研究で新たに作成したプライマーを用いて行った。

(7) 遺伝子系統解析

水試料から得られた16S rRNAの塩基配列とDDBJからレプトスピラ標準株の16S rRNA遺伝子配列（病原種13種14配列：Accession No. Z21634, AY631885, AY796065, EF025496, EF612284, AY631895, AY631886, Z12817.1, AY631894, AB279549, AY631880, AY887899, AY631883, AY631877, 非病原種3配列：Accession No. AY631876, AY631878, AY631879）, 及びアウトグループとして大腸菌（Accession No. E05133）の16S rRNA遺伝子の配列を取得し用いた。取得したレプトスピラ標準株は、現在報告されているレプトスピラ種を網羅している。MEGA Ver. 5を用いて、ネイバージョイント法により16S rRNA遺伝子に基づいた系統樹を作成した。

3. 結果および考察

(1) TaqMan PCR検出系の検出対象比較

ゲノムDNAを検出対象とした既存の検出系①, ②では、全37試料が陰性であった。一方で16S rRNAを検出対象とした検出系③では、全37試料中34試料（表-2）が陽性を示した。10月はF8を除いたすべての地点、11月はF8, 及び

F9を除いた地点、12月は採水できたすべての地点の環境水に病原性レプトスピラが存在していることが確認された。このことは、台風Ketsanaが通過した後も、広範囲かつ長期間にわたり環境水中に病原性レプトスピラが存在したことを示している。

既存のゲノムDNAを検出対象とした検出系では、洪水試料や河川水試料に対してはレプトスピラが存在していたとしても、検出することができなかった。この理由はゲノムDNAは一つの細胞に1個しか存在しないため、レプトスピラの濃度が低い試料では検出下限値以下となったためと考えられる。一方で、16S rRNAは一つの細胞に多数存在するため、レプトスピラの濃度が低い場合においても、16S rRNAは比較的に高濃度で存在し、検出系③では検出が可能となったと考えられる。以上より、検出対象細菌の濃度が低い場合には、16S rRNAを検出対象とすることで検出感度が格段に上昇することが示された。

(2) プライマーの特異性の評価

既存のプライマーの特異性の評価結果を表3に示した。非病原性レプトスピラの配列と全く一致しないプライマーの中で、最も多く病原性レプトスピラの配列と一致するプライマーは、Smythe ら⁷⁾が作成したリバースプライマーである LeptoR であった。しかし、フォワードプライマーの LeptoF の特異性が低く、プライマーセットで見ると比較に用いた3つのプライマーセットの中で最も特異性が低かった。最も特異性の高い Tansuphasini ら¹²⁾の検出系であっても全体の 85.9% (256/298) であった。これらのことから、既存のプライマーを用いた検出系は、検出することができない病原種の配列が多数存在することが示された。これらのプライマーの特異性が低い理由としては、プライマーの作成に用いた遺伝子配列情報が十分でなかったことが考えられる。

新たなプライマーセットの作成を試みたところ、病原性レプトスピラ種の内の 296 配列と一致する遺伝子領域を発見し、この領域の配列をリバースプライマーの配列として用いた。もう一つのプライマーとして、Smythe ら⁷⁾の Lepto-R が最も良好な特異性を持っていたので、これをフォワードプライマーとして利用した。本研究で作成

表-2 検出系③による地点ごとの検出結果

日時	地点													
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	St. 1	St. 2
2009年10月13-14日	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○
2009年11月3-5日	○	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○	○
2009年12月9-10日	○	-	○	-	-	-	○	-	-	-	-	○	○	○

○：陽性 ×：陰性 -：サンプルなし

表3 各プライマーの特異性

プライマー	各レプトスピラ種と一致する配列数		PCR法により 検出可能な配列数(%)	文献
	病原性種	非病原性種		
LeptoF	189	0	187 (62.8)	Smythe <i>et al.</i> , 2002 ⁷⁾
LeptoR	296	0		
Lepto-PFA	243	0	237 (79.8)	Feamley <i>et al.</i> , 2008 ¹¹⁾
Lepro-PRA	290	0		
Lep1	297	20	256 (85.9)	Tansuphasiri <i>et al.</i> , 2006 ¹²⁾
Lep2	257	0		
LeptoR-F	296	0	294 (98.4)	本研究
LeptoN	296	0		

したプライマーセットは病原性レプトスピラの遺伝子配列の 98.4% (294/298) と一致し、非病原性レプトスピラの遺伝子配列とは全く一致せず、本研究の目的に則した非常に高い特異性を有していた。また、このプライマーセットで増幅される PCR 産物長は 893bp であり、遺伝子解析に十分な長さを有していた。

(3) 病原性レプトスピラの種の同定

検出系③を用いた定量 PCR の結果において、レプトスピラ由来の 16S rRNA 濃度が高い上位 10 試料を選び、16S rRNA の塩基配列の決定を試みた。しかし、いくつかの試料で PCR、及びクローニングがうまく行われず、最終的に得られた 16S rRNA の塩基配列は 10 月の F5 から 2 配列、11 月の F3 から 10 配列、11 月の F7 から 2 配列、11 月の F10 から 13 配列であり、全 27 配列であった。このため、地点、および時期に関して一部のサンプルの情報しか得ることができず、限定的な結果となった。

得ることのできた 16S rRNA 遺伝子を元とした系統樹を図-2 に示した。系統樹において、病原性である *L. wolffii* に近縁なクローン配列が 18 配列 (66.6%, 18/27)、*L. licerasiae* に近縁なクローン配列が 2 配列 (7.4%, 2/27)、*L. kmetzi* に近縁なクローン配列が 2 配列 (7.4%, 2/27) 得られた。このため、*L. wolffii*、*L. licerasiae*、*L. kmetzi* の 3 種の病原性レプトスピラが、洪水域の環境水中に存在していたことが示された。

各病原性レプトスピラ種ごとの検出頻度 (表4) に関して、*L. wolffii* は病原性レプトスピラの全 22 配列中 18 配列 (81.8%) と大半を占め、すべて地点、及び時期において他の 2 種より多く検出された。これらのことより、洪水域の環境水には、*L. wolffii* が優占して存在していたと考えられる。

Zakeri¹³⁾ は、イランにおいて同一地域に暮らすレプトスピラ症に感染したヒト、ヒツジ、イヌから血液や尿を採集し、Nested PCR-RFLP 法、及びシーケンシング法により、レプトスピラ症の流行実態を調査した。その結果、*L.*

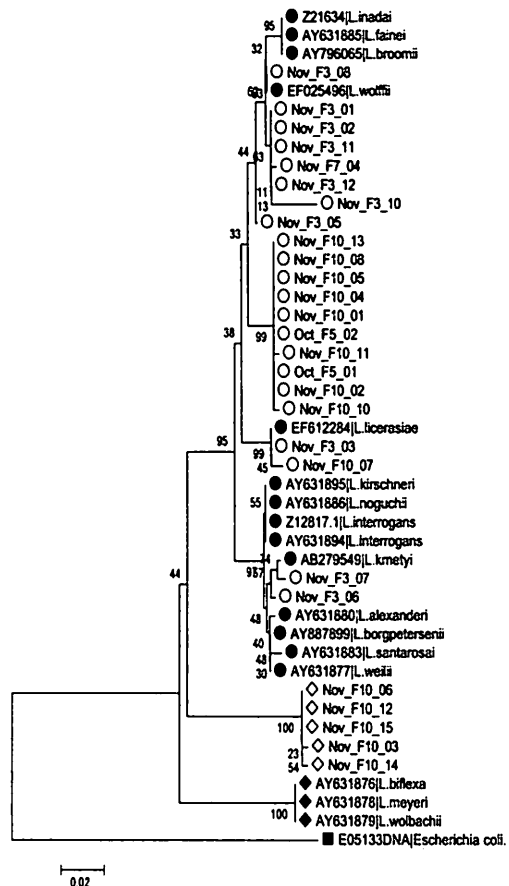


図-2 検出された 16S rRNA 遺伝子配列 (○, ◇) と DDBJ 上の 16S rRNA 遺伝子配列 (●, ◆, ■) から作成した遺伝子系統樹。Nov F3 09 は 11 月に F3 で採取した試料から得られた 9 番目のクローンを表す。○, ●: 病原性レプトスピラ種, ◇: 報告のないレプトスピラ種, ◆: 非病原性レプトスピラ種, ■: 非レプトスピラ種。

表4 各レプトスピラ種ごとの検出頻度

	<i>L. wolffii</i>	<i>L. licerasiae</i>	<i>L. kmetyi</i>	Nonreport <i>Leptospira</i>	Total
10月 F5	2(7.4%)	-	-	-	2(7.4%)
11月 F3	7(25.9%)	1(3.7%)	2(7.4%)	-	10(37.0%)
11月 F7	1(3.7%)	1(3.7%)	-	-	2(7.4%)
11月 F10	8(29.6%)	-	-	5(18.5%)	13(48.1%)
Total	18(66.6%)	2(7.4%)	2(7.4%)	5(18.5%)	27(100%)

interrogans, *L. kirschneri*, *L. wolffii*が検出され、*L. interrogans*はヒト (64.6%, 53/82), ヒツジ (84.6%, 11/13) において優占していたのに対して、*L. wolffii* (27/29, 93.1%) はイヌにおいて優占して検出された。さらに、*L. wolffii*はヒト、ヒツジ、イヌのすべてから検出され、ヒトとイヌの間で伝染を繰り返していると報告している。このことから、マニラ首都圏の洪水域の環境水から検出された*L. wolffii*は、イヌ由来のものであったと考えられる。病原性レプトスピラは感染動物の尿と共に排出されるため、レプトスピラ症を発症したイヌの尿が洪水域の環境水に混入し、環境水が*L. wolffii*に汚染されたと考えられる。病原性レプトスピラは種ごとに感染しやすい特定の動物種が存在する⁹⁾が、Slackら¹⁰⁾は、タイにおいてレプトスピラ症患者から*L. wolffii*を検出していることから、*L. wolffii*はヒトに感染能を持つと考えられる。これらより、マニラ首都圏の洪水域の人々は汚染された環境水中を素足などで通行することで、肌や傷口を通して*L. wolffii*に感染しやすい状況であったと考えられる。しかし、現地の人々が環境水を介して*L. wolffii*に感染したと示すには、実際にレプトスピラ症患者の検体から*L. wolffii*を検出することが必要である。

Mathiasら¹⁰⁾はペルーのイクワトス周辺に生息する家ネズミと急性熱性疾患の患者の両方から*L. licerasiae*を分離している。このことより、洪水域の環境水から検出された*L. licerasiae*はネズミから排出されたものであったと考える。

*L. kmetyi*は、2007年に開催されたSubcommittee on the Taxonomy of Leptospiraceaeにおいて非病原性種として分類された¹⁰⁾が、本研究により作成した系統樹においては病原性を示すクラスターに分類された。Slackら¹⁰⁾はマレーシアの土壌から*L. kmetyi*の分離を行い、16S rRNA遺伝子配列を元に系統解析を行っている。その結果は本研究の結果を支持するもので、病原性を示すクラスターに分類された。本研究では、*L. kmetyi*を病原性種と考えた。

11月にF10で採取された試料から得た5つの配列 (Nov_F10_03, 06, 12, 14, 15) は近縁なレプトスピラ種が存在しなかった。これらの配列はGanozaらの研究¹⁰⁾においてペルーの河川水試料から得られたレプトスピラの塩基配列との相同性がいずれも最も高かった。Ganozaら¹⁰⁾は

これらの株はSmytheら⁹⁾のプライマーでは検出することができないが、塩基配列から新種の病原性レプトスピラである可能性があるとして報告している。本研究の結果は新種のレプトスピラの存在を裏付けるものであるが、これらが病原性を持つかを本研究の結果から判断することはできない。

4. 結論

環境水中の病原性レプトスピラを検出する上で、最適な検出系の検討を行った結果、1つの細胞に多数存在する16S rRNAを検出対象としてRT-TaqMan PCRで検出することが有効であるとわかった。また、この検出系を用いた結果、マニラ首都圏の洪水域の環境水には、10月、11月、12月のすべての時期、及び多くの地点で病原性レプトスピラが存在していたことが明らかとなった。これは、台風Ketsanaが通過した後も、広範囲かつ長期間にわたり環境水中に病原性レプトスピラが存在し、洪水域に住む人々が感染しやすい状況であったことを意味する。

次に、病原性レプトスピラの検出を目的とした既存のプライマーは、幅広い病原性レプトスピラ種を十分に検出することができないことが判明し、本研究で、新たに298種類の病原性レプトスピラの16S rRNA遺伝子の98.4%と一致し、非病原性レプトスピラとは1つも一致しないプライマーセットを作成した。

作成したプライマーセットを用いて16S rRNAに基づいた遺伝子系統解析を行い、病原性レプトスピラの種の同定をした結果、病原性レプトスピラである*L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. kmetyi*の3種を同定することができた。特に、犬由来と考えられる*L. wolffii*が、環境水中において優占して存在しており、今回の流行の原因種であったことが示唆された。

謝辞：本研究は感染症研究国際ネットワーク推進プログラム (J-GRID) および東北大学若手研究者萌芽研究育成プログラムの補助を受けて行われた。

参考文献

- 1) National Disaster Coordinating Council Philippine, Situation Report no.52 on Tropical Storm "Ondoy" KETSANA TC-2009-000205-PHL and Typhoon "Pepang" PARMATC-2009-000214-PHL, 2009.
- 2) International Leptospirosis Society :World Health Organization. Human Leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control, *WHO*, 2003.
- 3) Levett P.N: Leptospirosis, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 14, pp. 296-326, 2001.
- 4) Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P: *Leptospira* and leptospirosis. *Medisci*, Melbourne, 1999.
- 5) Bharti A., Nally J., Ricakli J., Matthias M., Diaz M., Lovett M., Levett P., Gilman R., Willig M., Gotuzzo E., and Vinetz J.: Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *THE LANCET Infectious Diseases*, Vol.3, Dec., 2003.
- 6) Brenner D., Kaufmann A., Sulzer K., Steigerwalt A., Rogers F., and Weyant R.: Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family Leptospiraceae with a proposal for *Leptospira alexandri* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol.49, pp. 839-856, 1999.
- 7) Smythe D.L., Smith L.L., Smith A.G., Dohrt F.M., Symonds L.M., Barnett J.L. and McKay B.D.: A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. *BMC Infectious Diseases*, Vol. 2, pp. 13-20, 2002.
- 8) Stoddard R. A., Gee J. E., Wilkins P. P., McCaustland K., Hoffmaster A. R.: Detection of pathogenic *Leptospira* spp. through TaqMan polymerase chain reaction targeting the *LipL32* gene, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol. 64, pp. 247-255, 2009.
- 9) Vital-Brazil J. M., Balassiano I. T., de Oliveira F. S., de Souza Costa A. D., Hillen L., Pereira M. M.: Multiplex PCR-based detection of *Leptospira* in environmental water samples obtained from a slum settlement. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 105, pp. 353-355, 2010.
- 10) Ganoza C. A., Matthias M. A., Collins-Richards D., Brouwer K. C., Cunningham C. B., Gilman R. H., Gotuzzo E., Vinetz J. M.: Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. *PLoS Medicine*, Vol. 3, Issue 8, p. 308, 2006.
- 11) Feamley C., Wakeley P. R., Gallego-Beltran J., Dalley C., Williamson S., Gaudie C., Woodward M. J.: The development of a real-time PCR to detect pathogenic *Leptospira* species in kidney tissue, *Research in Veterinary Science*, Vol. 85, pp. 8-16, 2008.
- 12) Tansuphasiri U., Thipsuk C., Phuaksubombati D., Chanyasanth C.: Duplex PCR-hybridization based detection of pathogenic *Leptospira* in environmental water samples obtained from endemic areas in northeast region of Thailand. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public*, Vol. 37, No. 4, July, 2006.
- 13) Zakari S., Khorami N., Ganji Z. F., Sepahian N., Malmasi A., Gouya M. M., Djadjid N. D.: *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 10, pp. 273-277, 2010.
- 14) Slack A. T., Kalamaheti T., Symonds M. L., Dohrt M. F., Galloway R. L., Steigerwalt A. G., Chaiyaporn W., Bunyaraksyotin G., Craig S., Harrower B. J., Smythe L. D.: *Leptospira wolffii* sp. nov., isolated from a human with suspected leptospirosis in Thailand, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, pp. 2305-2308, 2008.
- 15) Matthias M., Ricakli J., Cespades M., Diaz M. M., Galloway R. L., Saito M., Steigerwalt A. G., Patra K. P., Ore C. V., Gotuzzo E., Gilman R. H., Levett P. N., Vinetz J. M.: Human leptospirosis caused by a new, antigenically unique *Leptospira* associated with a *Rattus* species reservoir in the Peruvian Amazon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Vol. 2, Issue 4, p. e213, 2008.
- 16) Adler B., de la Peña Montezuma A.: *Leptospira* and leptospirosis, *Veterinary Microbiology*, Vol. 140, pp. 287-296, 2010.
- 17) Slack A. T., Khairani-Bejo S., Symonds M. L., Dohrt M. F., Galloway R. L., Steigerwalt A. G., Bahaman A. R., Craig S., Harrower B. J., Smythe L. D.: *Leptospira kmetyi* sp. nov., isolated from an environmental source in Malaysia, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 59, pp. 705-708, 2009.

(2011.5.30 受付)

Detection of Pathogenic *Leptospira* in Environmental Water of Flood Area in the Metro Manila Following Typhoon Ketsana

Satoshi NUMAZAWA¹, Yoshifumi MASAGO¹, Mariko SAITO²,
Ryo YAMAGUCHI¹, Hitoshi OSHITANI² and Tatsuo OMURA¹

¹Department of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

²Department of Virology, Tohoku University

We conducted a field survey to detect and identify pathogenic *Leptospira* spp. from flooded water and river water samples collected in the Metro Manila area after devastation by typhoon Ketsana. In quantification using TaqMan PCR, high sensitivity was achieved by targeting 16S rRNA instead of genes on genomic DNA. A new primer set was designed for gene analysis because existing primer sets did not have sufficient specificity. As a result of the investigation, three *Leptospira* species, *L. wolffii*, *L. licerasiae*, *L. kmetyi*, were present in the water sample. Among them, *L. wolffii*, a dog origin species, was suggested to have caused the outbreak because it was the predominant species in the water samples.