

レプトスピラ症

病原体検査マニュアル

目 次

- 1 レプトスピラ症の概説
- 2 検査に関する一般的注意
 - 1) 検査材料の採取および輸送
 - 2) 検査の判定
 - 3) 実験室内の安全対策
- 3 検査方法
 - 1) 顕微鏡法
 - 2) 培養法
 - (1) コルトフ培地の組成
 - (2) EMJH 培地の組成
 - (3) 血清群および血清型の同定
 - (4) *flaB* 部分塩基配列による分類
 - 3) 抗体検出
 - (1) 顕微鏡下凝集試験
 - 4) DNA 検出
 - 5) 参考：レプトスピラ保有動物からのレプトスピラ分離方法
- 4 参考文献
- 5 連絡先

1 レプトスピラ症の概説

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans sensu lato*) の感染に起因する人獣共通感染症である¹⁾。病原性レプトスピラは、げっ歯類をはじめ多くの野生動物（ドブネズミ、イノシシ、アライグマなど）や家畜（ウシやブタなど）、愛玩動物（イヌ）の腎臓に定着・増殖し、その尿中に排菌される。ヒトは、この動物の尿で汚染された水や土壌などの環境を介して、あるいは尿との直接的な接触によって経皮的に感染する。したがって、レプトスピラ症の感染原因としては、農作業や河川でのレクリエーション（特に沖縄県で多い）、あるいは保菌動物のドブネズミの尿との接触が報告されている²⁾。また、汚染された水や食物の飲食による感染の報告もある。

レプトスピラは 22 種からなり、このうち 15 種が病原性を保持していると考えられている。病原性レプトスピラは、凝集素交差吸収試験に基づいた免疫学的性状により 250 以上の血清型に分類されている。また抗原性が似ている血清型は血清群にグループ化され、病原性レプトスピラには 26 の血清群が報告されている³⁾。

レプトスピラ症は、急性熱性疾患であり、感冒様症状のみで軽快する軽症型から、黄疸、出血、腎障害を伴う重症型まで多彩な症状を示す¹⁾。レプトスピラの潜伏期は、多くの場合は 5～14 日である。その後 38～40℃の発熱を呈し、悪寒、頭痛、筋痛、腹痛、結膜充血、また頻度はさほど高くはないが皮疹を伴う初期症状を持って発病する。重症型の場合は第 2 病週に黄疸、出血、腎障害が増強する。

国内のレプトスピラ症は、1960 年代中頃までは毎年 100 人以上の死亡者数が報告されていたが、水田の乾田化や農作業の機械化に伴う衛生環境の向上などにより患者者数は近年著しく減少した。しかしながら、現在でも散発的な発生は全国的に認められており、2003 年に感染症法に入ってからでは 27 都府県 283 例が報告されている（2014 年 12 月現在）。また報告例の約半数が沖縄県での感染となっている。一方国外では、全世界的に発生がみられており、特にアジア、東南アジアや中南米などの亜熱帯、熱帯地域では大規模な流行が報告されている。また海外で感染・帰国後発症する輸入感染例も報告されている²⁾。

表 1. レプトスピラの種と国内でみられる血清型／血清群

種名	グループ*	国内でみられる血清型／血清群
<i>L. alexanderi</i>	P	
<i>L. alstonii</i>	P	
<i>L. biflexa</i>	S	
<i>L. borgpetersenii</i>	P	Ballum [#] , Hebdomadis/Sejroe [#] , Javanica
<i>L. broomii</i>	I	
<i>L. fainei</i>	I	
<i>L. idonii</i>	S	
<i>L. inadai</i>	I	
<i>L. interrogans</i>	P	Australis, Autumnalis, Bataviae, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Kremastos, Pomona [#] , Pyrogenes, Rachmati
<i>L. kirschneri</i>	P	Cynopteri [#] , Grippotyphosa [#]
<i>L. kmetyi</i>	P	
<i>L. licerasiae</i>	I	
<i>L. mayottensis</i>	P	
<i>L. meyeri</i>	S	
<i>L. noguchii</i>	P	
<i>L. santarosai</i>	P	
<i>L. terpstrae</i>	S	
<i>L. vanthielii</i>	S	
<i>L. weilii</i>	P	
<i>L. wolbachii</i>	S	
<i>L. wolffii</i>	I	
<i>L. yanagawae</i>	S	

*16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づくグループ. P: Pathogens, I: Intermediates, S: Saprophytes. Pathogens および Intermediates グループのレプトスピラはヒトあるいは動物に対して病原性があると考えられている.

[#]血清群 (血清型未同定). 表示がないものは血清型

2 検査に関する一般的注意

1) 検査材料の採取および輸送

病原体の分離に用いられる臨床検体は、抗生薬投与以前の発熱期の血液、髄液あるいは尿（尿の場合は第 2 病週のものも）であり、検体は採取後速やかに培地に接種するのが基本である。検体を接種した培地は、常温で検査可能な機関に送付する。しかしながら、レプトスピラ用の培地は病院に常備されていないことが多い。その場合は、血液を抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、常温で検査可能な機関に速やかに送付する。

血清診断に用いられる検体は、発症直後と、発症後 10 日から 2 週間程度の血清（ペア血清）である。血清は凍結して、速やかに検査機関に送付する。

PCR に用いられる臨床検体は、抗生剤投与以前の発熱期の血液、髄液あるいは尿（尿の場合は第 2 病週のものも）である。血液は上述の通り抗凝固剤を用いて採血し、常温あるいは 4°C で速やかに検査機関に送付する。髄液と尿は凍結し、速やかに検査機関に送付する。

2) 検査の判定

レプトスピラ症の確定診断は、病原体の分離、レプトスピラ DNA の検出、あるいはペア血清を用いた顕微鏡下凝集試験による抗体検出により行われる。

3) 実験室内の安全対策

レプトスピラは、バイオハザードクラス 2 の病原体であり、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、乾燥や酸、フェノール系あるいは界面活性剤系の消毒薬、熱に対して感受性で、これらにより除菌可能である。検査に使用した検体および器具は、必ず滅菌処理を行い廃棄する。

レプトスピラ生菌を扱う場合は、経皮感染、特に傷口からの感染、あるいはスプラッシュによる眼からの感染の危険性があることを認識し、操作を行うことが重要である。

3 検査方法

1) 顕微鏡法

感染初期には、暗視野顕微鏡（倍率 100 倍）によって血液や尿から直接レプトスピラが観察される場合があり、早期診断に有用である。しかしながら、感度が低く、暗視野顕微鏡 1 視野にレプトスピラ 1 細胞を観察するためには、 $1 \times 10^4/\text{ml}$ 以上のレプトスピラが必要である。また、ひも状になったフィブリンやタンパク質をレプトスピラと見誤ることがあり、習熟を要する。

顕微鏡観察の感度をあげるために、蛍光抗体法や免疫染色法、銀染色法などが用いられることがある^{1,4)}。しかしながら、現在日本で行っているところはなく、確立されたプロトコールは存在しない。

したがって、顕微鏡法はその結果にかかわらず、菌の分離、血清診断法によって追試する必要がある。

2) 培養法

病原体の分離には、抗生剤投与以前の発熱期の血液、髄液あるいは尿が用いられる。血液からの分離は、血液 1, 2 滴を 5 ml のコルトフ培地あるいは EMJH 培地に接種する。各培地の組成は以下の通りである。

髄液の場合は、0.5 ml を 5 ml の培地に接種する。

尿からの分離の場合は、発熱期と第 2 病週のものが検体となる。尿 1 滴を 5 ml の培地に接種する。尿培養の場合、他の細菌の混入を避けるために 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 5-フルオロウラシルを加える場合もある。

(1) コルトフ培地の組成

[1] 10×コルトフ基礎培地

ペプトン (Peptone 140; Amresco)	8 g
NaCl	14 g
NaHCO ₃	0.2 g
KCl	0.4 g
CaCl ₂	0.4 g
KH ₂ PO ₄	2.4 g
Na ₂ HPO ₄	8.8 g
蒸留水	1,000 ml に調整

CaCl₂を除いて作製し、pH7.2~7.4に調整後、オートクレーブで121°C、20分間滅菌する。CaCl₂溶液は別に作製し、フィルター滅菌を行い、オートクレーブ後の室温になった培地に無菌的に加える。

[2] ウサギ血清

ベリタス、ライフテクノロジーズジャパンなどから入手可能。必ずロットチェックを行うこと。自前でウサギ血清を用意する場合は、やや溶血させるほうが良い。56°Cで30分間非働化を行った後に使用すること。

[3] コルトフ培地^a

10×コルトフ基礎培地	100 ml
滅菌非働化ウサギ血清 ^b	100 ml
滅菌蒸留水	800 ml

^a 無菌的に加えること。

^b 市販の滅菌ウサギ血清を使う場合は、そのまま無菌的に加える。自家製のウサギ血清を用意した場合は、フィルター滅菌を行った後に無菌的に加えること。

(2) EMJH 培地の組成

[1] ストック溶液（蒸留水 100 ml 中）

① NH ₄ Cl	25 g
② ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.4 g
③ MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.5g
④ CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.5 g
⑤ FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g（用事調整）
⑥ ピルビン酸ナトリウム	10.0
⑦ グリセロール	10.0
⑧ Tween 80	10.0
⑨ チアミン塩酸塩	0.5
⑩ シアノコバラミン	0.02

[2] アルブミン溶液

ウシ血清アルブミン(BSA)	10 g (蒸留水 50 ml に溶解)
ストック溶液②	1 ml
ストック溶液③	1 ml
ストック溶液④	1 ml
ストック溶液⑤	10 ml
ストック溶液⑧	12.5 ml
ストック溶液⑩	1 ml

pH 7.4 に調整後、100 ml にメスアップし、フィルター滅菌する。

[3] EMJH 基礎培地

NaCl	1.0 g
Na ₂ HPO ₄ (無水)	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
ストック溶液①	1 ml
ストック溶液⑥	1 ml
ストック溶液⑦	1 ml
ストック溶液⑨	1 ml
蒸留水	896 ml

pH 7.4 に調整後、オートクレーブで 121°C、20 分間滅菌する。

[4] EMJH 培地

アルブミン溶液と EMJH 基礎培地を無菌的に混合する。

コルトフ培地はデンカ生研より、EMJH 培地は Difco より市販されており、入手可能である。

培養は 30°C で行い、1 週間ごとに新鮮な培地に植え継ぐことで、分離率は上昇する場合がある。観察は暗視野顕微鏡下で行う。培養は 3 ヶ月間行う。レプトスピラは暗視野顕微鏡下で、ひも状螺旋型の回転運動をする菌体が観察される。培養液にレプトスピラと思われる螺旋型のスピロヘータが観察された場合は、以下の方法でレプトスピラであることを証明する。

(3) 血清群および血清型の同定

血清群の同定は、標準抗血清を用いた顕微鏡下凝集試験により行われる。ま

た血清型の同定は、凝集素交差吸収試験によって行われる。これには定められた方法¹⁾があり、このために必要なレプトスピラの代表的な標準株およびその抗血清は、国立感染症研究所細菌第一部および沖縄県衛生環境研究所にある。いずれかの機関に依頼して行う。

(4) *flaB* 部分塩基配列による分類

レプトスピラの鞭毛遺伝子 *flaB* を PCR によって増幅し、その増幅産物の塩基配列を決定することで、レプトスピラの同定が可能である。

[1] レプトスピラからの DNA 抽出

本マニュアルでは、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いたレプトスピラからの DNA 抽出法を記載する。

手順	操作
1	レプトスピラ培養液500 μ lを遠心分離 (4,000 \times g, 15分間, 室温) し, 上清を捨てる.
2	沈渣にBuffer ATLを180 μ l加える.
3	手順2の溶液にproteinase Kを20 μ l加えて, ボルテックスにより完全に混合する. 56 $^{\circ}$ Cで1時間以上インキュベーションする.
4	15秒間ボルテックスをする. Buffer ATLを200 μ l加えて, ボルテックスにより完全に混合する. 沈殿物が出た場合は, 70 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションする.
5	エタノール (96~100%) を200 μ l加えて, ボルテックスにより完全に混合する.
6	手順5の溶液を付属のスピンカラム (コレクションチューブ装着済) に添加し, 遠心分離 (6,000 \times g以上, 1分間, 室温) する. 溶出液およびコレクションチューブを捨てる.
7	新しいコレクションチューブをスピンカラムに装着し, Buffer AW1を500 μ l加えて, 遠心分離する (6,000 \times g以上, 1分間, 室温). 溶出液およびコレクションチューブを捨てる.
5	新しいコレクションチューブをスピンカラムに装着し, Buffer AW2を500 μ l加えて, 遠心分離する (16,000 \times g, 3分間, 室温). 溶出液およびコレクションチューブを捨てる.
6	1.5 mlあるいは2 mlマイクロチューブをスピンカラムに装着し, Buffer AEを200 μ l加えて, 1分間室温でインキュベーション後, 遠心分離する (16,000 \times g, 1分間, 室温).
7	溶出液を再度スピンカラムに添加し, 手順7を繰り返す.

[2] PCR

i) プライマー

ターゲット遺伝子	プライマー	配列 (5' - 3')
<i>flaB</i> (791 bp)	L- <i>flaB</i> F1	5'- CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3' (23 mer)
	L- <i>flaB</i> R1	5'- TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C -3' (22 mer)

ii) 反応液の組成

DNA 溶液	1 μ l
10 \times PCR バッファー (+MgCl ₂)	2 μ l
dNTP 混合液 (各 2.5 mM)	1.6 μ l
20 μ M F1 プライマー	0.2 μ l
20 μ M R1 プライマー	0.2 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i> Hot Start Version	0.1 μ l
滅菌蒸留水	14.9 μ l

iii) PCR 条件

熱処理	95°C	1 分	} 30 サイクル
熱変性	98°C	10 秒	
アニーリング	50°C	30 秒	
伸長	72°C	60 秒	
最終伸長	72°C	7 分	

[3] 増幅の確認

PCR サンプルを 5 μ l 分取し, アガロース電気泳動にて DNA の増幅を確認する.

[4] PCR 産物の精製

High PureTM PCR product purification kit (Roche) や ExoSAP-IT (USB Products) 等の市販のキットを用いて添付の操作手順により PCR 産物を精製する.

[5] シーケンス反応

プライマーはPCRと同じプライマーを用いて、両方向からシーケンスを行う。

シーケンス反応試薬には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI Biosystems)等の市販のキットを用いて、シーケンス反応液を調製する。あるいは、遺伝子配列解析を実施する業者も多数存在するので、そちらに依頼することも可能である。

[6] シーケンスデータの解析

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) BLAST Searchにて解析が可能である。

分離されたレプトスピラの記載は、血清型、*flaB* 部分塩基配列の両方が決定された場合は、次のようになる。

(例) *Leptospira interrogans* serovar Icterohaemorrhagiae

属名、種名はイタリック体で、血清型名は正体で、一文字目を大文字にする。

血清型のみが決定されている場合、あるいは *flaB* 部分塩基配列のみが決定されている場合には、次のようになる。

(例) *Leptospira* sp serovar Icterohaemorrhagiae

Leptospira interrogans

3) 抗体検出

(1) 顕微鏡下凝集試験 (Microscopic Agglutination Test: MAT)

確定診断のためには、ペア血清を用いた MAT が必要である。MAT は、血清とレプトスピラ生菌を混合し、30°C で3時間静置後、菌の凝集を暗視野顕微鏡下で観察する方法である。以下にポイントを示す。

[1] 血清

発症直後の血清と、発症後10日から2週間程度のペア血清を用いる。血清は非働化(56°C, 30分間)を行ってから使用する。

[2] レプトスピラ供試菌

継代培養しているものを新しい培地に1/10植え継ぎ、4~7日間、30°Cで培養

したもの（ $1\sim 2\times 10^8$ 細胞/ml）を用いる。MAT は血清群特異的な抗体を検出する方法である。病原性レプトスピラには 26 の血清群および 250 以上の血清型が存在し、そのうち表 2 の血清型／血清群が日本では報告されている。したがって、MAT には表 2 に記載されている血清群を使うことが望ましい。

表 2. 日本におけるレプトスピラ症起因菌の血清群・血清型とその分布

血清群	血清型	分布
Australis	Australis	本州, 四国, 九州, 沖縄
Autumnalis	Autumnalis	全国
	Rachmati	沖縄
Ballum	未同定*	沖縄
Bataviae	Bataviae	本州
Canicola	Canicola	全国
Cynopteri	未同定*	北海道
Grippotyphosa	Grippotyphosa	沖縄
Hebdomadis	Hebdomadis	全国
	Kremastos	本州
Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	本州, 四国, 九州
	Icterohaemorrhagiae	全国
Javanica	Javanica	沖縄
	未同定	北海道
Pomona	未同定*	本州
Pyrogenes	Pyrogenes	沖縄
Sejroe	未同定*	北海道

*MAT には血清型 Castellonis, Cynopteri, Pomona, Sejroe の株を用いる

[3] 方法

- i) 被検血清を PBS で 5 倍に希釈する。
- ii) 96 穴マイクロプレートの第 2 穴から最終穴まで PBS を 25 μ l ずつ入れる。
- iii) 5 倍希釈した血清 50 μ l を第 1 穴に入れる。
- iv) 第 1 穴から血清 25 μ l を分取し, 第 2 穴から順に 2 倍連続希釈していく。
最終穴には血清を加えずにコントロールとする。
- v) レプトスピラ培養液 25 μ l を全穴に入れる。
- vi) プレートミキサーで混合する。
- vii) 30°C, 3 時間反応後, 各穴の上清 5 μ l をスライドガラスに分取し, 暗視野顕微鏡下 (倍率 100 倍) で観察する。コントロールと比較して, 凝集し

ていないフリーの菌数が 50%以下*になっている場合を陽性とする。

*コントロール上清を分取し、これを 2 倍希釈して対照とすると解釈が容易になる。

[4] 判定

ペア血清を用いて 4 倍以上の抗体価の上昇が認められた場合を陽性とする。単一血清の場合は、160 倍を陽性とするが、感染初期では抗体価が十分に上昇していない場合があること、また既往の感染とを区別することができないことから、ペア血清を用いて行うことが重要である。

4) DNA 検出

PCR により、血液、血漿、血清、尿、髄液等からレプトスピラ DNA が検出されている。本マニュアルでは、レプトスピラの鞭毛遺伝子 *flaB* をターゲットとした nested PCR による DNA 検出法を記載する。

(1) 臨床検体からの DNA 抽出

本マニュアルでは、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いた臨床検体からの DNA 抽出法を記載する。

[1] 血液

手順	操作
1	1.5 mlあるいは2 mlマイクロチューブにproteinase Kを20 μ l分取する。血液を100 μ lおよびPBSを100 μ l添加する。
2	Buffer ALを200 μ l加えて、56°Cで1時間以上インキュベーションする。
3	エタノール（96～100%）を200 μ l加えて、ボルテックスにより完全に混合する。
4	手順5の溶液を付属のスピンカラム（コレクションチューブ装着済）に添加し、遠心分離（6,000 \times g以上, 1分間, 室温）する。溶出液およびコレクションチューブを捨てる。
5	新しいコレクションチューブをスピンカラムに装着し、Buffer AW1を500 μ l加えて、遠心分離する（6,000 \times g以上, 1分間, 室温）。溶出液およびコレクションチューブを捨てる。
6	新しいコレクションチューブをスピンカラムに装着し、Buffer

	AW2を500 μ l加えて，遠心分離する（16,000 \times g, 3分間, 室温）. 溶出液およびコレクションチューブを捨てる.
7	1.5 mlあるいは2 mlマイクロチューブをスピncラムに装着し，Buffer AEを200 μ l加えて，1分間室温でインキュベーション後，遠心分離する（6,000 \times g以上, 1分間, 室温）.
5	溶出液を再度スピncラムに添加し，手順7を繰り返す.

[2] 血漿，血清，尿，髄液

手順	操作
1	検体に沈殿物がみられる場合は，遠心分離（100 \times g, 5分間, 4 $^{\circ}$ C）を行う.
2	上清を新しいチューブに分取し，遠心分離（16,000 \times g, 10分間, 4 $^{\circ}$ C）
3	沈渣にBuffer ATLを180 μ l加える.
4	手順2の溶液にproteinase Kを20 μ l加えて，ボルテックスにより完全に混合する. 56 $^{\circ}$ Cで1時間以上インキュベーションする.
5	15秒間ボルテックスをする. Buffer ATLを200 μ l加えて，ボルテックスにより完全に混合する. 沈殿物が出た場合は，70 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベーションする.
6	上記血液からのDNA抽出法の手順3以降を行う.

(2) 1st PCR

[1] プライマー

ターゲット遺伝子	プライマー	配列 (5' - 3')
<i>flaB</i> (791 bp)	L- <i>flaB</i> F1	5'- CTC ACC GTT CTC TAA AGT TCA AC -3' (23 mer)
	L- <i>flaB</i> R1	5'- TGA ATT CGG TTT CAT ATT TGC C -3' (22 mer)

[2] 反応液の組成

DNA 溶液	5 μ l
10 \times PCR バッファー (+MgCl ₂)	5 μ l
dNTP 混合液 (各 2.5 mM)	4 μ l
20 μ M F1 プライマー	0.5 μ l
20 μ M R1 プライマー	0.5 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i> Hot Start Version	0.25 μ l

滅菌蒸留水	34.75 μ l
-------	---------------

[3] PCR 条件

熱処理	95°C	1 分	} 25 サイクル
熱変性	98°C	10 秒	
アニーリング	50°C	30 秒	
伸長	72°C	60 秒	

(3) 2nd PCR

[1] プライマー

ターゲット遺伝子	プライマー	配列 (5' - 3')
<i>flaB</i> (732 bp)	L- <i>flaB</i> F2	5'-TGT GGA CAA GAC GAT GAA AGC -3' (21 mer)
	L- <i>flaB</i> R2	5'- AAC ATT GCC GTA CCA CTC TG -3' (20 mer)

[2] 反応液の組成

1 st PCR 溶液	1 μ l
10×PCR バッファー (+MgCl ₂)	2 μ l
dNTP 混合液 (各 2.5 mM)	1.6 μ l
20 μ M F2 プライマー	0.2 μ l
20 μ M R2 プライマー	0.2 μ l
<i>TaKaRa Ex Taq</i> Hot Start Version	0.1 μ l
滅菌蒸留水	14.9 μ l

[3] PCR 条件

熱処理	95°C	1 分	} 30 サイクル
熱変性	98°C	10 秒	
アニーリング	55°C	30 秒	
伸長	72°C	50 秒	

最終伸長 72°C 7分 —

(4) 増幅の確認

PCR サンプルを 5 μ l 分取し, アガロース電気泳動にて DNA の増幅を確認する.

5) 参考 : レプトスピラ保有動物からのレプトスピラ分離方法

病原性レプトスピラは, げっ歯類をはじめ多くの野生動物 (ドブネズミ, イノシシ, アライグマなど) や家畜 (ウシやブタなど), 愛玩動物 (イヌ) の腎臓に定着しているため, 分離は無菌的にとりだした腎臓から行う. 以下にドブネズミを例とした分離方法を記載する.

(1) 器具・試薬

解剖バサミ (3 本)
ピンセット (3 本)
使い捨て滅菌シリンジ (2.5 ml, 5 ml 各 1 本)
使い捨て注射針 (21G, 1 本)
消毒用エタノール入りビーカー (2 個)
培地 (コルトフ培地あるいは EMJH 培地)
マイクロチューブ (血液回収用)
消毒用エタノール
炭酸ガス (麻酔用)

(2) 麻酔

炭酸ガスにより安楽死させる.

(3) 採血

皮膚を消毒用エタノールで清拭して, 心臓から採血する. 採取した血液は, 凝固させてから遠心分離 (2000 \times g, 5 分間) により血清を分取する.

(4) 解剖

i) 消毒用エタノールを満たしたビーカーに, ハサミとピンセットを皮膚用 (各 2 本) と臓器摘出用 (各 1 本) に分けて投入し, 消毒しておく.

- ii) 皮膚用ハサミ・ピンセットを使って表皮を切開後、ハサミとピンセット（皮膚用）を交換してから筋層を切開する。
- iii) 臓器摘出用ハサミ・ピンセットを使って腎臓を摘出する。摘出した腎臓から 1/4 程度を切り出し、2.5 ml シリンジ(注射針なし)の内筒を抜いた外筒の中に投入する。
- iv) 内筒を装着し、培地（5 ml）の入ったチューブの中へ腎臓を押し出す。

(5) 培養

腎臓を接種した培地を 30°C で一晩静置する。翌日、上清を 0.5 ml 新しい培地に移植し 30°C で培養を続ける。

4 引用文献

- 1) Faine S et al: “*Leptospira* and Leptospirosis” 2nd ed. MediSci, Melbourne; 1999.
- 2) 病原微生物検出情報. 1: 1-4, 2008;
- 3) Cerqueria GM, Picardeau M: A century of *Leptospira* strain typing. Infect Genet Evol. 9: 760-8, 2009.
- 4) 梁川良: レプトスピラ. 厚生省監修 微生物検査必携 細菌・真菌検査 第3版 I-40-I51. 財団法人 日本公衆衛生協会 ; 1995.

5 連絡先

国立感染症研究所 細菌第一部

小泉信夫

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

TEL 03-5285-1111 内線 2224

FAX 03-5285-1163

三重県保健環境研究所

赤地重宏

〒512-1211 三重県四日市市桜町 3690-1

TEL 0593-29-3800

FAX 0593-29-3004

沖縄県衛生環境研究所 衛生科学班

岡野祥

〒901-1202 沖縄県南城市大里字大里 2085

TEL 098-945-0785

FAX 098-945-9366