

## 黒毛和種子牛の尿から PCR により検出された レプトスピラ DNA と血清抗体との関連

阿久沢正夫・杉谷智彦・大石明広・

会亀祐子・佐藤めぐみ・田端克俊・出口栄三郎<sup>1</sup>

(家畜内科学研究室・<sup>1</sup>農学部附属家畜病院)

平成15年8月10日 受理

### 要 約

牛の尿中のレプトスピラ DNA を PCR により検出し、血清中の抗体の推移との関連を検討した。放牧されている 1 年齢未満の黒毛和種子牛 14 頭から毎月 1 回血液と尿を採取し、レプトスピラの血清抗体の測定と尿中のレプトスピラ DNA の PCR による検出、血液と尿の生化学検査と尿沈渣の鏡検を行った。生化学検査ではとくに異常値は認められず、尿沈渣の鏡検でもレプトスピラの菌体は確認できなかったが、血清抗体は 7 頭、尿の PCR 検査は 6 頭が陽性であった。

尿のレプトスピラ DNA 検出および血清抗体の関連については、牛は血清レプトスピラ抗体が認められるときにも尿中にレプトスピラを排泄し、感染源になることが推測された。また、血清中のレプトスピラ抗体が検出されずに、牛の尿中にレプトスピラ DNA が PCR によって検出された牛が認められた。このため、牛におけるレプトスピラ感染状況の検索には、血清抗体の測定と尿中のレプトスピラ DNA の PCR による検出の併用が最良の方法であると考えられた。

キーワード：レプトスピラ、牛、PCR、尿、抗体

### 緒 言

レプトスピラ症は、スピロヘータ科 (Spirochaetaceae) レプトスピラ属に属する病原性レプトスピラ (*Leptospira interrogans*) の感染によって発症する。世界中に広く分布し人、犬、牛、馬、豚、げっ歯類など多くの動物種が感染宿主となる重要な人獣共通伝染病のひとつである。感染源は感染動物の尿、汚染された水、あるいは感染動物の組織に人や家畜が摂取し、あるいは創傷などがある体表に接触したときに感染する。げっ歯類の保菌期間は牛、豚に比べ長期にわたり、人や家畜などの感染に重要である [9, 11, 12, 14]。

感染後 4-6 日間の潜伏期を経て血中で増殖し、約 1 週間レプトスピラ血症が続く。血液からレプトスピラが消失するころには血清抗体が検出されるようになり、その 3-4 週間後に抗体価は最高に達する。初感染後 7-28 日頃になるとレプトスピラは近位尿細管上皮細胞の刷子縁に着生し、尿中に排泄さ

れる [6, 10]。慢性感染は通常、病変が腎臓に限局し、臨床所見の有無にかかわらず急性期を耐過した動物に起り、レプトスピラは保菌状態となった動物尿中に排泄されるが、排泄する期間は異なる [11]。

レプトスピラ症の診断は、血清抗体測定（生菌凝集測定法、ELISA 法）、菌分離法、直接培養法、モルモット腹腔内接種法などがある [6]。血清抗体測定の短所として、血清レプトスピラ抗体の上昇には初感染後最低でも 4-6 日間以上を要するため [4, 6]、それより以前ではレプトスピラに感染していても抗体陽性とはならない。また、レプトスピラに感染し腎臓や肝臓などの臓器にレプトスピラが存在していても血清抗体が上昇しない個体もある [13]。さらに、血清抗体が陽性であってもレプトスピラ菌体排泄の有無の判定はできない。抗原そのものを検出する他の 3 つの方法の短所としては、結果を得るために数週間と時間を要し、診断が遅くなる [6]。一方、PCR による尿中レプトスピラ DNA の検出

は、①レプトスピラの血清抗体が上昇する以前に尿中レプトスピラDNAを検出することにより早期診断が可能であること、②特異性と精度が高く、かつ判定に要する時間が短いことなどの長所があり、人[4, 8]、牛[15]、犬[3]で報告されている。

本研究は放牧されている黒毛和種牛の1年齢未満の子牛についてレプトスピラ血清抗体測定と、尿中に存在するレプトスピラDNAのPCR検査を連続して行うことにより、血清抗体と尿中の菌の検出を関連づけて考察した。

## 材料と方法

### 1. 動物

放牧されている黒毛和種牛の1年齢未満の子牛（雌13頭、雄1頭）14頭を用いた。1999年6月から2,000年3月までの間に毎月1回臨床症状の観察、採血、採尿を行い、レプトスピラ血清抗体、PCRによる尿中レプトスピラDNA検出、尿検査、血液検査を実施した。採血は10ml注射器と18Gの注射針を用い、頸静脈より10mlを得た。また、子牛ではカテーテルによる採尿は困難なので、雌はマッサージ法により陰部を刺激しスピツ管に約10ml採取したが、ときには5ml以下の個体もあった。雄においても雌と同様の方法で採尿可能であった。

### 2. レプトスピラの培養方法

レプトスピラの継代培養には以下のように作成した加熱処理牛血清加Korthof液体培地を用いた。まず、Korthof培地に添加する処理血清を作るため、レプトスピラ抗体が陰性である牛の静脈血をヘパリン加注射器で採血した後、3000 rpm、15分間遠心分離を行い血清を分離した。血清とKorthof液体培地を1:1の割合で混合し、1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>でpH 5.2に調整した。この混合液を68–70°Cの温水浴中で2時間加温して非働化し、3500 rpm、15分間遠心分離を行い上清を採取した。上清は希NaOH液でpH 7.2–7.4に調整した後、牛血液製ヘモグロビン（和光純薬工業）を上清100mlに対し約0.5g加えろ過した。ろ液は滅菌フィルター（Millex-HA 0.45 μm: Millipore）を通し、再度滅菌フィルター（Millex-GS 0.22 μm: Millipore）を通し10mlのKorthof液体培地が入った試験管に1mlずつ無菌的に分注した。

Korthof培地は蒸留水1Lにポリペプトン0.8g、

NaCl1.4g、NaHCO<sub>3</sub> 0.02g、KCl 0.04g、Na<sub>2</sub>HP<sub>O</sub><sub>4</sub> 1.96gの順に溶かし、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.18gを加えてpH 7.4に調整した後、試験管に10mlずつ分注し、オートクレーブで121°C、20分間加圧蒸気滅菌した。

### 3. 抗体測定

マイクロタイタープレートの各well（孔）にKorthof液体培地を50μlずつ注入する。次に被検血清を第1列のwellに10μl加え、内容をよく混和した後その10μlを隣のwellに注入を繰り返す。最後のwellではよく混和した後10μlを捨てる。レプトスピラ培養液50μlを各wellに加える。Korthof液体培地50μlとレプトスピラ培養液50μlを注入したwellを対照とする。プレートは静かに振盪して内容を攪拌した後、蒸発防止のために蓋をのせ、37°Cで3時間インキュベートした。判定は血清を添加していないwellを対照として、各wellから白金耳で液を1滴とりスライドガラス上に載せ、暗視野顕微鏡により100倍で鏡検し、1視野に5個以上の菌凝集が認められる場合、あるいは浮遊菌体数が対象と比べて著しく少ない場合を陽性と判定し、血清の最高希釈の逆数を抗体価とした。抗体測定には当研究室で保存しているレプトスピラの8種類の血清型 Autumnalis, Hebdomadis, Australis, Icterohaemorrhagiae, Canicola, Hardjo, Pomonaを抗原として用いた。

### 4. PCRによる尿中レプトスピラDNAの検出

#### (1) レプトスピラDNAの抽出方法 [5, 7, 8, 15]

10–15mlの尿を3,000 rpmで15分遠心分離した後、上清を吸引ポンプに接続した滅菌バストールピペットで吸引除去した。沈渣に全容量が1.0mlになるように滅菌注射用蒸留水を加え混和した後、全量を容量1.5mlのマイクロチューブに移し、5°Cで6,400 rpm (3,000×g)で10分間冷却遠心分離し上清を除去した。沈渣に全量が100μlになるように滅菌注射用蒸留水を加え充分混和した後、容量0.5mlのマイクロチューブに入れレプトスピラDNAを抽出するために99°Cで15分間加熱処理した。レプトスピラDNAは–20°Cで保存した。

#### (2) PCR反応溶液の作成

レプトスピラDNA溶液10μlに、10倍PCR緩衝液10μl、10mM dNTP Mixture 8μl、5 U/μl Taq DNA Polymerase 0.5μl、G<sub>1</sub>とG<sub>2</sub> primer [8]を各60 pM（以上 宝酒造）、蒸留水66.2μlを加え

て全量で $100\mu\text{l}$ とした。これを、容量 $0.5\text{ ml}$ のマイクロチューブにとり、DNA 増幅操作中に乾燥を防ぐためにミネラルオイル (SIGMA) を $50\mu\text{l}$ 重層した。

$G_1$  primer は、原液 $0.57\mu\text{l}$  ( $60\text{pM}$ ) とその 4 倍量の注射用滅菌蒸留水 $2.28\mu\text{l}$ を混和し 5 倍希釈として、 $2.85\mu\text{l}$ を 1 検体分とした。また、 $G_2$  primer は、原液 $0.47\mu\text{l}$  ( $60\text{pM}$ ) とその 4 倍量の注射用滅菌蒸留水 $1.88\mu\text{l}$ を混和し 5 倍希釈として、 $2.35\mu\text{l}$ を 1 検体分とした。

$G_1-G_2$  primer set(宝酒造)は、*L. Icterohaemorrhagiae* 由来 [8] で、レプトスピラ DNA は $285\text{ bp}$ である。プライマーの塩基配列は以下の通りである。

$G_1$  : 5' -CTGAATCGCTGTATAAAAGT-3'  
 $G_2$  : 5' -GGAAAACAAATGGTCGGAAG-3'

### (3) DNA の増幅 (Fig. 1)

DNA 増幅システム (PC-700; アステック) を用いて、Caballer ら [5] の PCR の反応時間と温度条件で標的 DNA ( $285\text{ bp}$ ) の増幅を行った。

Fig. 1 Reaction temperature and time condition for PCR  
PCR の反応温度と時間条件

第 1 サイクル
3 min at $94^\circ\text{C}$ (determination)
2 min at $51^\circ\text{C}$ (annealing)
2 min at $72^\circ\text{C}$ (extension)
第 2 -31 サイクル
30 sec at $94^\circ\text{C}$ (determination)
2 min at $51^\circ\text{C}$ (annealing)
2 min at $72^\circ\text{C}$ (extension)
最終-32 サイクル
30 sec at $94^\circ\text{C}$ (determination)
2 min at $51^\circ\text{C}$ (annealing)
5 min at $72^\circ\text{C}$ (extension)

### (4) 電気泳動用アガロースゲルの作成

Tris-acetate-EDTA 緩衝液 (ナカライトスク、以下 TAE と略す)  $30\text{ml}$  にアガロース (Nusieve 3:1 agarase; FMC Bio Products)  $0.6\text{g}$  を加え加熱溶解して 2 % 溶液とし、続いて EB 溶液 (エチジウムブロマイド  $1\text{ mg/l}$ )  $15\mu\text{l}$  を加えた。その後 $45^\circ\text{C}$ まで冷ました後トレイに流し込み、室温にて固化させた。

### (5) 電気泳動および写真撮影

DNA 増幅操作後の反応溶液 $10\mu\text{l}$ に色素液 (ブ

ロモフェノールブルー: ナカライトスク)  $3\mu\text{l}$  加え、アガロースゲルの溝に注入した。TAE 緩衝液 (EB 溶液を $135\mu\text{l}$ 加えたもの) を入れた泳動槽にアガロースゲルを入れ、 $100\text{V}$ で約1時間電気泳動を行った。分子量マーカーには、 $100\text{ bp}$  DNA Ladder (GIBCO BRL Life Technologies:  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) を $0.5\mu\text{l}$ 用いた。泳動後、アガロースゲルに紫外線を照射し、PCR 産物の標的バンドを肉眼的に確認後、写真撮影した。

### (6) ブースター PCR

ブースター PCR は阻害物質を希釈するために行う。First PCR 操作後の反応溶液 $5\mu\text{l}$ を、容量 $1.5\text{ ml}$ のマイクロチューブに入れた後、滅菌注射用蒸留水 $495\mu\text{l}$ を加え充分混和し室温にて $12,000\text{ rpm}$ 、2 分間遠心分離し、上清 $10\mu\text{l}$ を DNA 試料として用いた。First PCR と同じ条件で再度 PCR 操作を行い、結果を写真撮影した。

## 5. 血液化学検査および尿検査

赤血球数、白血球数、ヘモグロビン量は 血球計数装置 (Mycrocell Counter F-800: SYSMEX)、PCV は毛細管法、血清総蛋白はアタゴ屈折計により、血清中のブドウ糖、尿素窒素、GOT、アルカリリフォスファターゼ、総コレステロール、総ビリルビンはドライケミストリー法 (Autodry Chemistry Analyzer SP-4410: 京都第一科学) により測定した。白血球百分比はメイーギムザ染色した血液塗沫により行った。尿は試験紙により pH、蛋白、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビン、潜血について検査した。尿は $1500\text{ rpm}$ で 5 分間遠心分離して得た沈渣を鏡検し、レプトスピラ菌体の有無を確認した。

## 結 果

### 1. 一般症状

研究期間中に症状に異常が認められた例はなかった。

### 2. レプトスピラ抗体および PCR による尿中レプトスピラ DNA の検出

全14頭中において、抗体または尿にレプトスピラ DNA の検出された 9 頭の抗体価と尿の PCR 検査の成績を、月齢別に Table 1 に示した。

3 種類の血清型 (*L. Autumnalis*, *L. Hebdomadis*,

*L. Australis*) の抗体が、測定した14頭中 7頭 (No. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9) に検出された。血清抗体が検出されたのは、2カ月齢以下の牛に5頭 (No. 2, 4, 7, 8, 9) と高率であった。Autumnalis が14頭中 6頭 (No. 1, 2, 4, 7, 8, 9) から検出されて42.9%と最も多く、Autumnalis と Australis は各々 2頭 (No. 3, 4) で14.3%，Hebdomadis は1頭 (No. 1) で7.1%であった。抗体価は72倍から432倍の範囲内にあり、72倍の例が最も多かった。PCR 検査によるレプトスピラ DNA は、14頭中 6頭 (No. 1, 2, 3, 4, 5, 6) の尿中から検出された。尿中のレプトスピラ DNA は、すべて 4カ月齢以降に検出された。

No. 1 は 9カ月齢のとき Autumnalis (432倍) と Hebdomadis (72倍) の抗体および尿中にレプトスピラ DNA が検出されたが、11カ月齢では Hebdomadis (72倍) の抗体だけが検出された。No. 2 は 2カ月齢時に Autumnalis (72倍) の抗体を、10カ月齢時に尿中にレプトスピラ DNA が検出された。No. 3 は 6カ月齢時に Australis (72倍) 抗体を、6, 7カ月齢時に尿中にレプトスピラ DNA が検出された。No. 4 は 0カ月齢時に Australis (72倍) の抗体を、2カ月齢時に Autumnalis (72倍) の抗体が、4カ月齢時に尿中にレプトスピラ DNA が認められた。No. 5 は 10カ月齢時に尿中にレプトスピラ

DNA が検出されたが、血清抗体はいずれの時期にも陰性であった。No. 6 は 4カ月齢時に尿中レプトスピラ DNA が検出された。No. 7 は 2カ月齢時に Autumnalis (72倍) の抗体が、No. 8 は 2カ月齢時に Autumnalis (432倍) の抗体が、No. 9 は 1カ月齢時に Autumnalis (72倍)，2カ月齢時に Autumnalis (432倍) の抗体が検出されたが、いずれも尿中にはレプトスピラ DNA は検出されなかった。

#### 4. 尿検査

尿検査では潜血および蛋白が全例に認められたが、糖、ケトン体、ウロビリノーゲン、ビリルビンは正常であった。沈渣ではレプトスピラの菌体は確認されなかった。また、全例の牛において尿にストラバイト結晶が認められた。

#### 5. 血液検査

抗体あるいは尿中にレプトスピラ DNA が検出された例でも、とくに検査値に異常は認められなかった。

Table 1. Results of titration of serum leptospiral antibody and detection of leptospiral DNA in urine by PCR  
レプトスピラ抗体検査と PCR による尿中レプトスピラ DNA 検出の成績

月齢	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
No.1 抗体	—	—	—	—	—	—	—	—	A(432) B(72)	—	B(72)	—	—
PCR	—	—	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—
No.2 抗体	A(72)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
No.3 抗体	—	—	—	—	—	C(72)	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
No.4 抗体	C(72)	—	A(72)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No.5 抗体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
No.6 抗体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No.7 抗体	A(72)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No.8 抗体	—	A(432)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No.9 抗体	—	A(72)	A(432)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
PCR	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注：A は *L. Autumnalis*, B は *L. Hebdomadis*, C は *L. Australis* を示し、( ) 内の数字は抗体価を示す。

## 考 察

入来牧場で1985年4月から1986年9月の間に行つた黒毛和種牛に関する調査 [1, 2] では、レプトスピラに対する抗体は120頭中90%以上の牛から検出されたが、本研究では14頭中7頭(50%)で前回の調査よりも陽性率は低下していた。

尿検査ではいずれの尿試料においても、レプトスピラの菌体は認められなかった。その原因として、尿中のレプトスピラが少数であること、鏡検するまでの保存時間が長いために起こる溶菌 [6, 11] などが推測された。また、尿潜血の検出は尿中に多量に認められた尿石によるものと考えられた。

尿中にレプトスピラ DNA が検出されたのは、いずれも4カ月齢以上であった。その理由として①抗体の産生には個体差があり感染しても抗体が上昇しない例がある [6, 11], ②初感染時に産生された抗体は検出限界以下であったが、再感染により血清抗体価が検出限界以上に上昇した、などのことが推測された。

PCR の陽性例が少なかったことの原因として、①尿をマッサージ法で採取したためゴミや雑菌の混入が多くなり PCR の感度が落ちた、②ブースター PCR は尿1 ml に1個のレプトスピラが存在すると検出できる [6] が、採取した尿中のレプトスピラ数は少なく検出限界以下であった、あるいは採取尿量が少なかったなどのことが考えられた。

血清抗体と尿の PCR の関連性については、2カ月齢以下の牛5頭(No. 2, 4, 7, 8, 9)で血清抗体が検出されたが、3カ月齢以下の牛の尿中にレプトスピラ DNA は検出されなかつた。このことから、2カ月齢頃に検出された抗体は、親牛からの初乳によるもの [1] と推測された。

1頭(No.1)において、血清抗体が検出される以前にレプトスピラ DNA が尿中に認められた。この牛では尿の PCR 陽性血から血清抗体が検出されるまでに4カ月の間隔があるが、その理由として①抗体の産生には個体差があり、腎臓などにレプトスピラが存在しているにもかかわらず抗体が上昇しなかつた [5, 10, 16], ②初感染時に産生された抗体が検出限界以下であったが、再感染により上昇したことなどが推測された。さらに、9カ月齢時の血清抗体価は Autumnalis が432倍、Hebdomadis が72倍であり、尿中にレプトスピラが排泄され、10カ月齢では血清抗体と尿中のレプトスピラ DNA が検出さ

れなかったが、11カ月齢時では Hebdomadis の抗体価だけが72倍に上昇している。この理由として、①9カ月齢時に上昇した抗体によりレプトスピラは尿中に検出できない程度に減少はしたが、11カ月齢時に腎臓などに存在していた Hebdomadis だけが再び増殖し抗体価が上昇した、②Hebdomadis の感染が再度起こったことなどが考えられた。

3頭(No.2, 3, 4)では抗体が確認された後に尿中にレプトスピラ DNA が検出された。このうち2頭(No.2, 4)の血清抗体は2ヶ月齢以下で検出されたことから、初乳から得た抗体[1]と推測され、血清抗体が検出限界以下に低下した後に感染したレプトスピラが尿中に排泄された、と考えられた。さらに血清抗体の血清型が Australis から Autumnalis に変化している1頭(No.4)は、Autumnalis の感染が後から起こったと推測された。

1頭(No.3)では、上昇した血清抗体がその後検出限界以下に低下したため尿中にレプトスピラの排泄が起こったと考えられた。

2頭(No.1, 3)では血清抗体と同時に尿中にレプトスピラ DNA が検出され、抗体が存在しても尿中へレプトスピラ排泄を抑制できないことが示唆された。

3頭(No.7, 8, 9)では血清抗体が検出されたが、尿中にレプトスピラ DNA は検出されなかつた。いずれも血清抗体が2カ月齢までの早い時期に検出されていることから、初乳から得た抗体 [1] と推測された。

2頭(No.5, 6)では抗体は検出されずに尿中にレプトスピラが排出される例も認められ、レプトスピラに感染し腎臓などの臓器にレプトスピラが存在しているのにもかかわらず抗体価が上昇しなかつた [5, 10, 16] と推測された。以上のことから牛は、レプトスピラ抗体が血清中に認められるとき、および上昇した血清抗体がその後検出限界以下に下がつたとき、尿中にレプトスピラを排泄し感染源になることが推測された。

また、血清抗体が1度も検出されなかつた牛の尿中にレプトスピラの排泄が認められた例では、子牛の血清抗体が初乳由來のものか感染によるものか判別できないため、牛におけるレプトスピラの感染状況を知るために、血清抗体の測定と尿の PCR の併用が現状では最良の方法であると考えられた。

謝辞：本研究の遂行にあたり、御協力をいただいた

鹿児島大学農学部附属牧場の教職員の皆様に深謝します。

## 文 献

- [1] 阿久沢正夫・岡本智文・山内聰子・森園 充・柳田宏一：ホルスタイン牛と子牛のレプトスピラ抗体保有状況調査。鹿大農学術報告, No.42, 93-99 (1992)
- [2] 阿久沢正夫・高橋隆之・中村康男・竹之下浩和・原 由香・森園 充・中西喜彦・柳田宏一：入来牧場の黒毛和牛におけるレプトスピラ浸潤状況の調査。鹿大農学術報告, No.38, 133-138 (1988)
- [3] 阿久沢正夫・田中宗広・村上敏正・大石明広・出口栄三郎・三角一浩・藤木 誠・安田宣絃・杉村崇明・富宿誠吾：PCRによる犬の尿中レプトスピラ検出法の検討および臨床例への応用。日獣会誌, 54, 288-292 (2001)
- [4] Bal, A. E., Gravekamp, C., Hartskeerl, R. A., Brewster, J. D. M., Korver, H. and Terpstra, W. J.: Detection of leptospires in urine by PCR for early diagnosis of leptospirosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1369-1372 (1994)
- [5] Caballero, O. L. D., Neto, E. D., Koury, M. C., Romanha, A. J. and Simpson, A. J. G.: Low-stringency PCR with diagnostically useful primers for identification of *Leptospira* serovars. *J. Clin. Microbiol.*, 1369-1372 (1994)
- [6] Faine, S. (編著), 吉井善作 (監訳)：レプトスピラ症防護指針, 内田老鶴園 (1987)
- [7] Gerritsen, M. J., Koopmans, M. J., Peterse, D. and Olyhoek, T.: Sheep as maintenance host for *Leptospira interrogans* serovar Hardjo subtype Hardjobovis. *Am. J. Vet. Res.*, 55, 1232-1237 (1994)
- [8] Gravekamp, C., Kemp, H. V., Franzen, M., Carrington, D., Schoone, G. J., Van Eys, G. J. J. M., Everard, C. O. R., Hartskeerl, R. A. and Terpstra, W. J.: Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. *J. Gen. Microbiol.*, 139, 1691-1700 (1993)
- [9] 見上 彪・丸山 務 (監修)：獣医感染症カラーアトラス, p.283-289, 文永堂出版, (1999)
- [10] 大谷 晶：レプトスピラ。日本臨床, 53, 151-154 (1995)
- [11] 梁川 良：レプトスピラおよびレプトスピラ病。山口獣医学雑誌, 10, 1-14 (1983)
- [12] Ryu E: An international survey of leptospiral agglutinin of dogs by RMAT. *Int. J. Zoon.*, 3, 33-60 (1976)
- [13] Shimizu, T., Kono, I. and Akuzawa, M.: Acute leptospirosis in a calf. — Possibly preceding seroconversion of the herd. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, No.21, 167-174 (1985)
- [14] 清水悠紀臣・鹿江雅光・田淵 清・平棟孝志・見上 彪 (編)：獣医伝染病学 (第四版), p.130-131, p.249, 近代出版 (1995)
- [15] Van, Eyes, G. J. J. M., Gravekamp, C., Gerritsen, M. J., Quint, W., Cornelissen, M. T. E., Schegget, J. T. and Terpstra, W. J.: Detection of Leptospires in urine by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, 2258-2262 (1989)

## Relation between Leptospiral DNA in Urine Detected by PCR and Antibody in Serum in Japanese Black Beef Cattle

Masao AKUZAWA, Tomohiko SUGITANI, Akihiro OISHI, Yuko KAIGAME,  
Megumi SATO, Katsutoshi TABATA and <sup>1</sup>Eisaburo DEGUCHI  
(*Laboratory of Veterinary Internal Medicine, <sup>1</sup>Veterinary Hospital*)

### Summary

The relation between leptospiral DNA in urine detected by PCR and antibodies to *Leptospira spp.* in serum in cattle was considered. Blood and urine samples collected monthly from fourteen calves of Japanese black beef cattle under one year of age were checked for serum leptospiral antibody and for leptospiral DNA in the urine by PCR, and examined hematologically, biochemically and by urinary examination and observed microscopically for urine sediment. No abnormal value was detected in the hematological and biochemical examination, and no leptospire was observed in urinary sediment, but seven calves were positive for serum antibody to *Leptospira* and the inspection by PCR showed six to be positive for leptospiral DNA in the urine. As for the relationship between leptospiral DNA in the urine and serum antibody, leptospires were excreted in the urine of cattle when the antibody existed just in the serum.

Leptospiral DNA was detected by PCR in the urine of calves in which leptospiral antibody in serum had never been detected. Therefore, it was thought that combining measurement of the serum antibody with detection of leptospiral DNA in urine by PCR was the best way to check for *Leptospira* infection in cattle.

**Key words :** *Leptospira*, cattle, PCR, urine, antibody

The Bulletin of the Faculty of Agriculture 54, 1~7 (2004)