原 著

北海道のアライグマからのレプトスピラの分離と抗体調査

吉識綾子¹・的場洋平²・浅川満彦²・高橋樹史¹・中野良宣¹・菊池直哉^{1*}¹ 酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医細菌学教室,² 酪農学園大学獣医学部獣医学科獣医寄生虫学教室

069-8501 江別市文京台緑町 582

Isolation of *Leptospira* from Raccoons and Serological Survey of Leptospirosis in Hokkaido, Japan

Ayako YOSHIKI¹, Yohei MATOBA², Mitsuhiro ASAKAWA², Tatsufumi TAKAHASHI¹,
Yoshinori NAKANO¹ and Naoya KIKUCHI^{1*}¹ Department of Veterinary Bacteriology School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University² Veterinary Parasitology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

582 Bunkyo-dai-midorimachi, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

(Received 27th August, 2011/Accepted 1st October, 2011)

Summary

A bacterial and serological survey of leptospirosis in raccoons (*Procyon lotor*) was performed in central Hokkaido, Japan. *Leptospira* was isolated from 10 (3.9%) of 259 raccoons captured in central Hokkaido. *Leptospira* DNA was also detected by PCR in samples from 60 (23.2%) raccoons, and leptospiral antibodies were detected in 63 (24.5%) raccoons. The positive rate was highest for serovar Autumnalis (10.8%), followed serovar Canicola, Australis, Ballum, Hebdomadis and Pyrogenes (4.6%). The present study revealed that *Leptospira* is widespread in raccoons in Hokkaido, and raises concerns regarding the likelihood of humans and domestic animals acquiring leptospirosis through contact with raccoons.

Keywords : Raccoons, *Leptospira*, Isolation, Antibody, Japan

序 文

レプトスピラ症は病原性レプトスピラの感染に起因する人獣共通感染症であり、世界各国で発生が報告されている。日本では、人においては感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）で第4類に、牛、豚、犬においては家畜伝染病予防法で届出伝染病に指定されている。レプトスピラは自然界に広く存在し、特にネズミなどのげっ歯類が保菌動物として重要な役割を占めている^{13, 17)}。

これらの動物の多くは不顕性のまま経過し、長期にわたり尿中に菌を排出し、川や土壌などの環境を汚染し、そこに人や家畜などが入り込む事により水などを介して皮膚や粘膜などから経皮的に、あるいは汚染飼料や感染動物の捕食などにより経口的に感染が起こる^{11, 17)}。生体内に侵入したレプトスピラは血中で増殖し、肝臓、腎臓などの各臓器に運ばれる。レプトスピラに対する抗体の産生により血中からレプトスピラは排除されるが、腎尿細管で潜伏、増殖することができ、腎尿細管から尿中に排泄され、次なる感染源となる³⁾。

人のレプトスピラ症では、発熱、黄疸、出血、蛋白尿、筋肉痛、頭痛、腎不全、髄膜炎などの臨床症状がみられ、重症の場合は死亡する。牛や犬などの動物が感染すると黄疸、貧血、血色素尿などの症状を示し、動物種によっては流産

連絡先：菊池直哉*

酪農学園大学獣医学部獣医細菌学教室

〒069-8501 江別市文京台緑町 582

Tel : 011-388-4729 ; Fax : 011-387-5890

E-mail : nkikuchi@rakuno.ac.jp

を起こす²⁵⁾。一方、野生動物においてもレプトスピラ症があることが報告されている^{1, 2, 13, 14, 20, 22, 24)}。北米では、アライグマにおける *Leptospira interrogans* を保有していると報告されており、主な血清型としては Icterohaemorrhagiae, Pomona, Bratislava, Grippotyphosa, Hardjo, Autumnalis などがある^{7, 14, 16, 18, 21, 23)}。

最近北海道を含め全国的に野生化したアライグマが増加の一途を辿っている^{8, 9, 10)}。アライグマは生息域を拡張、畑地、牛舎、民家などに餌を求めて侵入することもあり、ヒト、イヌ、家畜などと接触する機会が増加しているため、アライグマのレプトスピラの浸潤状況を知ることは重要である。日本における調査では、神奈川県と長崎県のアライグマから *L. interrogans* が分離された¹²⁾。しかし、多数のアライグマが生息し農業被害も甚大な北海道においては調査されていない。本研究では北海道に生息するアライグマを対象に病原学および血清学的調査を実施し本症の浸潤状況を調べた。

材料と方法

1. 供試材料

2003年5月から同年9月の間に、北海道石狩・空知・胆振地方において捕獲された259頭のアライグマを用いた。成獣と幼獣の区別は菌の状態及び胎盤痕の有無により確認した。さらに臼歯根の年輪により1歳以上かつ体重4kg以上を成獣とし、さらに雌の場合は胎盤痕および泌乳の認められるものを成獣とした。本研究では捕獲されたものの多くは成獣であり、雌の比率が高かった(表1)。アライグマはその日のうちに剖検され、肝臓、腎臓、尿、血液が無菌的に採取された。

2. レプトスピラの分離

1) レプトスピラ分離用培地

菌の生存期間と発育を高める目的で寒天を0.1%含む100 µg/ml 5-fluorouracil 添加 EMJH 培地を分離培地として使用した³⁾。

2) レプトスピラ培養方法

無菌的に採取した肝臓と腎臓をマイクロチューブ内で乳剤にし、滅菌生理食塩水1mlに懸濁し、400×gで2分間遠心した。その上清を700 µlとり、14,080×gで5分間遠心後、沈渣を培地に接種した。尿はマイクロチューブに2mlとり14,080×gで5分間遠心後、上清を捨て沈渣を培地に接種した。尿が採取できなかった時は無菌的に採取した膀胱に滅菌生理食塩水を5ml注入後、2ml回収し尿と同じ処理を行った。30℃で6ヶ月間培養し、6ヶ月経過しても菌の発育がみられないものを陰性とした。

3. nested PCR 法によるレプトスピラ DNA の検出

1) ゲノム DNA 抽出試料の調整

表 1 本研究において使用したアライグマの捕獲地域と概要

地域	検査頭数	生育状態		性別	
		成獣	幼獣	雄	雌
石狩	88	49	39	36	52
空知	154	104	50	68	86
胆振	17	17	0	7	10
総計	259	170	89	111	148

a. 肝臓および腎臓

無菌的に組織を5mm角に切り、マイクロチューブに入れホモジナイザーで乳剤にした後、1mlの滅菌生理食塩水を加えて調整した。調整乳剤は14,080×g, 5分間遠心によって上清を除去し沈渣を残した。その後、DNA抽出キット、(Sepa Gene, 三光純薬株式会社)を用い、添付の操作説明書に従ってDNAの抽出と精製を行い、DNAペレットを50 µlのTE緩衝液に浮遊させ、PCR反应用試料とした。

b. 尿

エッペンチューブに尿1.0mlを入れ14,080×g, 5分間遠心後、上清を除去し、沈渣を用いて、肝臓、腎臓と同様に処理を行った。

2) nested-PCR 反応

一次プライマーは Gravekamp ら⁶⁾ の G1/G2 プライマー (5'-CTGAATCGCTGTATAAAAGT-3', 5'-GAAGGC-TGGTAAACAAAAGG-3') を、二次プライマーは古谷ら⁵⁾ のプライマー int-G1/G2 (5'-CGCATGATACCAAATCTGAG-3', 5'-AACTGAGAACCGGACTTGGT-3') を用い nested-PCR を行った。

4. 顕微鏡学的凝集反応 (凝集反応)

1) 抗原の調整

凝集反応では、*L. interrogans*, *L. borgpetersenii* および *L. kirschneri* の11血清型を凝集反应用抗原とした(表2)。抗原は ENJH 培地を用い、30℃ 6~9日培養後、菌数を1~2 × 10⁸ cell/ml に調整したものである。

2) 抗体価測定

被検血清と等量の抗原液を加え、最終希釈倍数を25倍、50倍、100倍とした。ミキサーでよく混和した後、蒸発を防ぎ30℃3時間反応させた後、顕微鏡下で観察した。菌の凝集が見られた場合、または対照培養溶液よりも菌数が著しく減少している場合を凝集陽性とした。最終血清希釈倍数が100倍以上で凝集を示した血清については、さらに100~1,600倍に希釈し同様に凝集反応を行った。凝集を示した最終希釈倍数の逆数を抗体価とし、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。

表 2 顕微鏡学的凝集反応において抗原として用いた *Leptospira* 菌種および血清型

菌種	血清型	菌株名
<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Akiyami A
	Australis	Ballico
	Bratislava	Bratislava
	Hebdomadis	Hebdomadis
	Icterohaemorrhagiae	RGA
	Pomona	Pomona
	Hardjo	Hardjoprajitro
	Canicola	Hond Utrecht IV
<i>L. borgpetersenii</i>	Pyrogenes	Salinem
	Ballum	Mus 127
<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa	Moskva V

5. 統計処理

統計処理は χ^2 検定を行い、5% 以下を有意差とみなした。

成 績

1. 肝臓、腎臓および尿からのレプトスピラの分離

2003 年に捕獲されたアライグマ全 259 頭中、10 頭 (3.9%) からレプトスピラが分離された (表 3)。臓器別では、肝臓 2 例 (0.8%)、腎臓 9 例 (3.5%)、尿 1 例 (0.4%) からレプトスピラが分離された。このうち 2 頭は肝臓と腎臓の両方から分離された。レプトスピラが分離された 10 例中成獣 7 例、幼獣 3 例、また雄 6 例、雌 4 例で、成獣と幼獣間および雌雄間に差は認められなかった。また、地域的にも差は認められなかった。レプトスピラの発育が確認されるまでの培養期間は長く、2~3 週間で分離できたものが 10 例中 6 例であり、2 例は分離に 10 週を要した。

2. nested PCR 法によるレプトスピラ DNA の検出

アライグマ 259 頭の肝臓、腎臓および尿からの検体について nested PCR を行った。その結果、60 頭 (23.2%) からレプトスピラ DNA が検出された (表 3)。肝臓 26 例 (10%)、腎臓 33 例 (12.7%)、尿 28 例 (10.8%) からレプトスピラ特異的 DNA が検出された。肝臓、腎臓および尿からの検出率に差はみられなかったが、腎臓あるいは尿の泌尿器系から検出された例が 60 例中 46 例であり、肝臓に比較し検出率が高かった。肝臓、腎臓および尿の全てから検出されたものは 4 例であった。PCR の結果を成獣、幼獣別にみると、成獣では 170 頭中 46 頭 (27.1%) が、幼獣では 89 頭中 14 頭 (15.7%) が陽性を示し、幼獣よりも成獣の方が高い陽性率を示した。地域別では胆振地方における陽性率が石狩・空知地方に比較して高かった (表 4)。

表 3 アライグマの臓器からのレプトスピラの分離および nested-PCR によるレプトスピラ DNA の検出

検出方法	検査頭数	陽性数 (%)	レプトスピラ検出材料		
			肝臓 (%)	腎臓 (%)	尿 (%)
レプトスピラの分離	259	10 (3.9)	2 (0.8)	9 (3.5)	1 (0.4)
PCR による DNA の検出	259	60 (23.2)	26 (10.0)	33 (12.7)	28 (10.8)

表 4 成獣・幼獣別、雌雄別および地域別における nested PCR によるレプトスピラ DNA の検出

区分	検査頭数	陽性数 (%)
成獣	170	46 (27.1)*
幼獣	89	14 (15.7)*
小計	259	60 (23.2)
雄	111	26 (23.4)
雌	148	34 (23.0)
小計	259	60 (23.2)
石狩	88	20 (22.7)*
空知	154	32 (20.8) [#]
胆振	17	8 (47.1)* [#]
小計	259	60 (23.2)

*[#]: P<0.05

3. 凝集反応によるレプトスピラ抗体価の測定

259 頭中 255 頭から血清が得られ、それらについて 11 種の血清型のレプトスピラを用いて MAT を行った。その結果、63 頭 (24.3%) でいずれかの血清型に対しての抗体が確認された (表 5)。地域的には、検査例数は少なかったが胆振地方では 17 頭中 8 頭 (48.6%) が陽性で、他地域と比較し高い陽性率を示した。陽性を示した血清型は多様性を示し、その中で最も陽性率が高かったのは Autumnalis (10.8%) であり、次いで、Canicola (5.4%)、であった。Icterohaemorrhagiae, Australis, Pyrogenes に対しても抗体価の高い例が多くみられた。Grippotyphosa に対する抗体は認められなかった。胆振地方における抗体陽性率は、ほとんどの血清型において他地域より高かった。

成獣と幼獣別にみると、成獣では全 170 頭中 51 頭 (42.9%) が陽性を示したのに対し、幼獣は全 85 頭中 12 頭 (14.1%) が陽性を示した。このように幼獣よりも成獣の方が、陽性率が高く、PCR の結果と同様であった。

表 5 アライグマからの MAT によるレプトスピラ抗体の地域別検出と血清型の分布

地域	検査頭数	陽性数 (%)	血清型									
			Autum.	Australis	Hebdo.	Ictero.	Pomona	Hardjo	Canicola	Pyrogenes	Ballum	Grippe.
石狩	84	15 (17.9)*	2 (2.3)	2 (2.3)	1 (1.1)	5 (5.7)	0	1 (1.1)	5 (5.7)	3 (3.4)	2 (2.3)	0
空知	154	40 (25.6)	22 (14.2)	7 (4.5)	10 (6.5)	5 (3.2)	7 (4.5)	5 (3.2)	5 (3.2)	6 (3.9)	6 (3.9)	0
胆振	17	8 (48.6)	4 (23.5)	3 (17.6)	1 (5.9)	1 (5.9)	1 (5.9)	0	4 (23.5)	3 (17.6)	4 (23.5)	0
計	255	63 (24.7)*	28 (10.8)	12 (4.6)	12 (4.6)	11 (4.2)	8 (3.1)	6 (2.3)	14 (5.4)	12 (4.6)	12 (4.6)	0

Autum. : Autumnalis, Hebdo. : Hebdomadis, Ictero. : Icterohaemorrhagiae, Grippe. : Grippotyphosa

陽性 : 抗体価 100 倍以上

* : $P < 0.05$

考 察

北海道での最初のアライグマの野生化は、1979 年に恵庭市で飼育されていた約 10 頭のアライグマが逃亡し、これらが酪農地帯に定着したのが始まりと考えられている¹⁰⁾。アライグマは本来、日本には生息しない北米原産の動物である。それが、ペット飼育用として輸入されるようになり、逃亡や飼いきれず捨てることなどが続出し野生化につながったと考えられている。アライグマは繁殖能力が強い、食性の幅が広い、幅広い気候条件に適応するなどの特性から北海道だけでなく、日本各地で野生化し、増加している^{8, 9, 10)}。

海外ではアライグマのレプトスピラ症が報告されている^{2, 7, 14, 16, 18, 21, 23)}。しかし日本では、アライグマが本来日本に生息しない移入動物であることからアライグマのレプトスピラ症についての報告は少ない。アライグマは増加し、農家の納屋に住み着く、畑で作物を荒らすなど、ヒト、イヌ、家畜などとの接触の機会も増加しているのでアライグマの本症の浸潤状況を知ることは重要である。本調査においてアライグマにおけるレプトスピラの病原学的および血清学的検索を行った結果、本症が広く浸潤していることが明らかになった。

捕獲されたアライグマの肝臓、腎臓および尿からレプトスピラ検索の結果、259 頭中 10 頭 (3.9%) からレプトスピラが分離された。日本国内ではこれまで神奈川県で野生化したアライグマと長崎県の野外展示施設のアライグマから計 3 株の *L. interrogans* が分離されたとの報告がある¹²⁾。それらの 3 株中、1 株の血清型は Copenhageni あるいは Icterohaemorrhagiae であったが、残り 2 株はいずれも Hebdomadis と同定された。今回分離されたレプトスピラ

の血清型は不明であるが、今後パルスフィールド電気泳動法、*flaB* 遺伝子の解析、抗血清を用いた凝集反応などを実施することなどにより型別する必要がある。

全 259 頭について PCR 法を用いてレプトスピラ DNA の検出を試みたところ 60 頭 (23.2%) が陽性を示した。肝臓で陽性を示したものが 60 例中 26 例 (43.3%) であったのに対し腎臓、尿で陽性を示したものが 60 例中 47 例 (78.3%) であり、菌分離と同様の傾向を示した。したがってレプトスピラの多くが腎臓に保菌され尿中に排菌されることにより、環境が汚染され、人や動物の感染原因となるものと考えられた。レプトスピラ DNA の検出で陽性のものが 259 頭中 60 頭 (23.2%) であったのに対し菌分離陽性のものは 259 頭中 10 頭 (3.9%) であった。

総頭数 255 頭について 11 種の血清型のレプトスピラを用いて凝集反応を行った。その結果、63 頭 (24.5%) でいずれかの血清型に対しての抗体が確認され、レプトスピラが北海道のアライグマの間に広く浸潤していることが明らかとなった。小泉ら¹²⁾ は、神奈川県で野生アライグマのレプトスピラ抗体陽性率を 12.9%、主たる血清型は Copenhageni あるいは Icterohaemorrhagiae と報告している。本研究においてはより高い陽性率を示し、北海道における浸潤の程度が高いことが判明した。また、陽性を示した主たる血清型は Autumnalis であり、神奈川県とは異なっていたが地域的な差と考えられた。また、今回の調査では日本ではあまり見られない血清型 Pomona や Pyrogenes に対する抗体を保有する例がみられた。海外ではアライグマが血清型 Pomona に対する抗体を保有していたとの報告があり^{4, 14, 15, 23)}、アライグマが日本に持ち込んだ可能性も否定できない。凝集反応の結果から、これらの血清型について、同地域における他の野生動物の抗体調査を実施する必要がある。

ある。PCRの結果と同様に、成獣のほうが幼獣よりも陽性率が高かった。成獣のほうがレプトスピラに汚染された環境に接する機会がより多かったためと考えられる。また、胆振地方におけるPCR陽性率と抗体陽性率が他地域に比較し高かった。胆振地方におけるアライグマの密度が高く、陽性個体との接触の機会が多かったのではないかと考えられる。また、湿地帯などのレプトスピラにとって棲息に適した環境が多いのかもしれない。さらに検討する必要がある。

日本で生息しているアライグマがどのようにしてレプトスピラに感染するのかについては詳しくわかっていない。レプトスピラに感染したマウスを餌として与えた実験で、オポッサム、スカンク、レッドフォックスはレプトスピラに感染するものがいたのに対しアライグマはレプトスピラに感染しなかったという報告がある¹⁹⁾。アライグマは食性の幅が広く、雑食である^{8,9,10)}が、レプトスピラのレゼルボアであるネズミを捕食することによる感染の可能性は少ないと考えられる。感染動物から排泄された尿などに汚染された水や土などの環境との接触が主な感染経路と考えられる。

アライグマのレプトスピラ症の臨床症状についてはこれまで報告がなく、その詳細は不明である。今回の調査で用いたのは臓器と尿であり生前も不明であるが、臓器と尿にはとくに目立った異常は認められなかった。臨床症状については今後の検討課題である。

本研究から、北海道の石狩・空知・胆振地方のアライグマにはレプトスピラが広く浸潤していることが確認された。現在、アライグマは日本の各地で増加しており、人、犬および家畜などとの接触の機会も増えてきている可能性がある。日本各地におけるアライグマはレプトスピラを保有している可能性が十分考えられるため、アライグマから人、犬および家畜へのレプトスピラ感染の可能性があり、今後アライグマの増加に対する何らかの対策の必要性が示唆された。

要 約

北海道では野生化したアライグマが増加しているが、アライグマにおけるレプトスピラ症の浸潤状況は十分に知られていない。今回、北海道中央部で捕獲されたアライグマについてレプトスピラの浸潤調査を行った。

捕獲されたアライグマ259頭中10頭(3.9%)からレプトスピラが分離された。肝臓2例(0.8%)、腎臓9例(3.5%)、尿1例(0.4%)からレプトスピラが分離された。PCR法により60頭(23.2%)からレプトスピラDNAが検出された。肝臓26例(10%)、腎臓33例(12.7%)、尿28例(10.8%)からレプトスピラDNAが検出された。11種の血清型のレ

プトスピラを用いて顕微鏡学的凝集反応(MAT)を行った。255頭中63頭(24.5%)でいずれかの血清型に対しての抗体が確認された。その中でもAutumnalisに対して高く、10%以上の陽性率を示した。PCRおよび抗体調査の結果、幼獣よりも成獣のほうが、また地域的には胆振地方の陽性率が高かった。

以上の結果から、今回捕獲した北海道のアライグマにはレプトスピラが広く浸潤していることが明らかになった。アライグマは急増し、人、犬、家畜などとの接触の機会も増えてきている。したがって、アライグマからの人、犬、家畜へのレプトスピラ感染の可能性が危惧された。

引用文献

- 1) Amundson, T. E., Yuill, T. M. : Prevalence of selected pathogenic microbial agents in the red fox (*Vulpes fulva*) and gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) of southwestern Wisconsin. J. Wildl. Dis., **17**, 17-22, 1981.
- 2) Bradley, K. K. : Leptospirosis. J. Okla. State Med. Assoc., **92**, 114-115, 1999.
- 3) Faine, S. : Guidelines for the control of leptospirosis. WHO, 1982; 小西久典, 富田正章 共訳, 吉井善作 監訳: レプトスピラ症防疫指針. 内田老鶴圃, 東京, 1987.
- 4) Falk, V. S. : Leptospirosis in Wisconsin: Report of a case associated with direct contact with raccoon urine. Wisconsin Med. J., **84**, 14-15, 1985.
- 5) 古谷徳治郎: 豚の早死産胎児におけるPCRおよび抗体検査によるレプトスピラ浸潤調査. 日獣会誌, **59**, 459-463, 2006.
- 6) Gravekamp, C. et al. : Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. J. Gen. Microbiol., **139**, 1691-1700, 1993.
- 7) Hamir, A.N. et al. : The prevalence of interstitial nephritis and leptospirosis in 283 raccoons (*Procyon lotor*) from 5 different sites in the United States. Can. Vet. J., **42**, 869-871, 2001.
- 8) 北海道石狩支庁アライグマ被害検討協議会: アライグマによる農業等被害防止の手引き. 北海道石狩支庁, 1999.
- 9) 北海道環境生活部環境室自然環境課: 平成15年度アライグマ対策行動計画. 北海道環境生活部, 2003.
- 10) 北海道空知支庁 農業振興部農務課企画調整係, 地域政策部環境生活課自然環境係: 「アライグマをはじめとする移入動物問題を考える」フォーラム報告書. 北海道空知支庁, 2000.
- 11) 川端寛樹, 渡邊治雄: レプトスピラ症. 日本臨床, **57**, 191-193, 1999.

- 12) Koizumi, N. et al. : Isolation and characterization of *Leptospira* spp. from raccoons in Japan. J. Vet. Med. Sci., **71**, 425-429.
- 13) Levett, P. N. et al. : Surveillance of leptospiral carriage by feral rats in Barbados. West Indian Med. J., **47**, 15-17, 1999.
- 14) McGowan, J. E. and Karstad, L. : Field and laboratory studies of skunks, raccoon and groundhogs as reservoirs of *Leptospira pomona*. Can. Vet. J., **6**, 243-252, 1965.
- 15) Mikaelian, I. et al. : Leptospirosis in raccoons in Quebec: 2 case reports and seroprevalence in a recreational area. Can. Vet. J., **38**, 440-442, 1997.
- 16) Mitchell, M. A. et al. : Serologic survey for selected infectious disease agents in raccoons from Illinois. J. Wildl. Dis., **35**, 347-355, 1999.
- 17) 森 守 : レプトスピラ症の疫学と予防について. 化学療法の領域, **8**, 646-652, 1992.
- 18) Reilly, J. R. : The raccoon as a wildlife reservoir of *Leptospira canicola*. NY Fish Game J., **1**, 220, 1954.
- 19) Reilly, J. R. et al. : Experimentally induced predator chain transmission of *Leptospira grippotyphosa* from rodents to wild marsupialia and carnivore. Am. J. Vet. Res., **31**, 1443-1448, 1970.
- 20) Rapley, W. A. et al. : A natural outbreak of leptospirosis in a captive black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*) herd and in Dall's sheep (*Ovis dalli*) at the Metropolitan Toronto zoo. Pro. Am. Assoc. Zoo Vet. Annu. Meet, **23**, 115-120, 1981.
- 21) Richardson, D. J. and Gauthier, J. L. A. : Serosurvey of leptospirosis in Connecticut peridomestic wildlife. Vector Borne Zoonotic Dis., **3**, 187-193, 2003.
- 22) Roth, E. E. et al. : Isolation of *Leptospira canicola* from skunks in Louisiana. Pub. Health Rep., **76**, 335-340, 1961.
- 23) Schnurrenberger, P. R. et al. : Leptospirosis: long-term surveillance on an Illinois farm. Am. J. Epidemiol., **92**, 223-239, 1970.
- 24) Shotts Jr. E. B. et al. : Leptospirosis in selected wild mammals of the Florida panhandle and southwestern Georgia. J. Am. Vet. Med. Assoc., **167**, 587-589, 1975.
- 25) 柳原保武 : レプトスピラ症. 木村哲, 喜田宏 編 改訂版人獣共通感染症, 324-330, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2011.