

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06003

研究課題名(和文) わが国のコウモリにおける病原性バルトネラの生態解明と分離株の簡易同定法の開発

研究課題名(英文) Ecology and molecular analysis of pathogenic Bartonella in bats in Japan

研究代表者

丸山 総一 (MARUYAMA, Soichi)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：30181829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：北海道のキタクビウコウモリの26%(32/123)、和歌山県のユビナガコウモリの24%(12/50)、静岡県のももジロコウモリの4頭とキクガシラコウモリの1頭がBartonellaを保有していた。コウモリ分離株は、コウモリの属や科に固有の系統、日本のコウモリに固有の系統であった。さらに、ユビナガコウモリではNycteribia属のクモバエが、キタクビウコウモリではコウモリノミが主要なBartonellaのベクターであった。また、コウモリ分離株の全ゲノム解析により、病原性を有するBartonella henselaeと同様の機序により、宿主体内で長期間維持されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、わが国の4種のコウモリには7種の異なる系統のBartonella属菌が高率に分布していること、各種コウモリにおいてBartonellaを媒介するベクターを明らかにするとともに、本菌の全ゲノム解析により、宿主体内で長期間維持される機序を明らかにした。本研究はコウモリが保有するBartonellaに関する我が国で初めての研究であり、その学術的意義は大きい。さらに、本研究を通じてコウモリにおけるBartonellaの生活環の一端が明らかにされたことは重要な新所見であり、今後のコウモリが関わるバルトネラ症の疫学解明に多大な影響を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：This project shows that four bat species in Japan harbor seven novel Bartonella species and that bat flies, genus Nycteribia, bat fleas (Ischnopsyllus needhami), and bat mites (Spinturnix myoti) and N. pygmaea are possible vectors of Bartonella in Miniopterus, Eptesicus, and Myotis bats, respectively. Furthermore, whole-genome sequences revealed that seven Bartonella strains from the bats examined harbored eight or seven virulence factors similar to those of B. henselae, suggesting that bat strains infect persistently their hosts by a similar mechanism of B. henselae.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：コウモリ Bartonella ベクター 病原性

1. 研究開始当初の背景

わが国に生息する 170 種の野生哺乳類のうち、翼手目(コウモリ)は少なくとも 35 種と国内では最も多種の野生動物である。また、コウモリはヘンドラウイルス感染症、ニパウイルス感染症、狂犬病、SARS、エボラ出血熱などの極めて病原性が高いウイルスの病原巣あるいは媒介動物であることから、わが国のコウモリにおいても各種病原体の保有状況を解明することは重要な課題であると考えられる。

Bartonella 属菌はグラム陰性の短桿菌で、人を含む多くの哺乳類を自然宿主とし、宿主の血管内皮細胞や赤血球に持続感染することで長期間の菌血症を引き起こすことが知られている。また、本属菌の宿主動物間あるいはヒトへの伝播には、ノミやシラミ、サシチョウバエなどの節足動物が関与している。

これまで 30 の国や地域のコウモリ(37 属 88 種)から *Bartonella* が分離、またはその DNA が検出されていることから、コウモリには *Bartonella* が広く分布していると考えられる。また、2014 年と 2017 年に、フィンランドとアメリカの *Myotis* 属および *Eptesicus* 属のコウモリから、ヒトに心内膜炎を起こす *Candidatus B. mayotimonensis* が分離・検出されたことから、*Myotis* 属や *Eptesicus* 属等のコウモリは、ヒトに感染性を有する *Bartonella* を保有していることが推定される。

以上のように、コウモリはバルトネラ症の新たな感染源となる可能性があることから、コウモリにおける *Bartonella* 属菌の生態を明らかにすることは、バルトネラ症の疫学を解明する上で極めて重要であるが、わが国のコウモリに関してはこれまで全く検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、日本に生息するコウモリにおける *Bartonella* 属菌の生態を明らかにすることを目的として、コウモリにおける本菌の分布状況、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクター、ならびに宿主における持続感染機序を細菌学的・分子生物学的手法を用い検討した。

3. 研究の方法

(1) わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の分布状況とその宿主特異性の検討

わが国に生息するコウモリにおける *Bartonella* の分布状況と保有する株の遺伝子性状の解明を目的として 2013 年から 2019 年の間に、北海道においてキタクビワコウモリ(*Eptesicus nilssonii*) 123 頭、和歌山県においてユビナガコウモリ(*Miniopterus fuliginosus*) 50 頭、静岡県においてモモジロコウモリ(*Myotis macrodactylus*) 4 頭とキクガシラコウモリ(*Rhinolophus ferrumequinum*) 1 頭を捕獲し、*Bartonella* の分離を試みた。各個体から分離された *Bartonella* 様のコロニー 3 株から InstaGene Matrix を用いて DNA を抽出し、*Bartonella* 属に特異的なクエン酸合成酵素遺伝子(*gltA*) および RNA ポリメラーゼ β サブユニット遺伝子(*rpoB*) 領域を標的とした PCR 法により本属菌であることを確認した。さらに、*gltA* 遺伝子領域の塩基配列を決定し、海外のコウモリ由来株および *Bartonella* 標準株との遺伝子相同性解析ならびに系統解析を行った。

(2) コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターの検討

Bartonella 属菌の中で、*B. henselae* はネコノミ、*B. quintana* はコロモジラミ、*B. bacilliformis* はサシチョウバエによって媒介されるが、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターについては解明されていない。本研究では、コウモリから採取した吸血性外部寄生虫種を形態学的ならびにチトクロム c オキシダーゼサブユニット 1(*COI*) 遺伝子に基づく系統解析により同定した。さ

らに、それらから *Bartonella* を分離・検出し、宿主コウモリの株の遺伝子と相同性解析することで、各コウモリに寄生する外部寄生虫相とそれらの *Bartonella* を媒介するベクターとしての可能性について検討した。

(3) コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機序の解明

病原性を有する *Bartonella henselae* では、8つの病原因子をコードする遺伝子が同定されている。本研究では、コウモリ由来 *Bartonella* の病原因子と宿主における感染機序の解明を目的として、次世代シーケンサー-Miseq と Nanopore MinION を用いて異なる7系統の *Bartonella* (系統 A~G; 遺伝子型 1, 5, 6, 8, 9, 10, 13) のドラフトゲノム配列を決定するとともに、Virulence factor database (VFDB) を用い、コウモリ株の病原関連遺伝子の保有状況を *B. henselae* と比較解析した。

4. 研究成果

(1) わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の分布状況とその宿主特異性の検討

ユビナガコウモリの24% (12/50)、キタクビワコウモリの26% (32/123)、キクガシラコウモリとモモジロコウモリの全個体から *Bartonella* 属菌が分離された。分離株の *gltA* 領域の遺伝子型別では、13の *gltA* 遺伝子型 (1~13) に分類された。ユビナガコウモリは遺伝子型 1~5、キタクビワコウモリは遺伝子型 6~8、モモジロコウモリは遺伝子型 10~12、キクガシラコウモリは遺伝子型 13 を保有していた。一方、コウモリの種間で共通した遺伝子型の *Bartonella* は存在しなかった。さらに、*gltA*、*rpoB* 領域の相同性解析に基づく菌種同定では、今回コウモリから分離された株は、いずれの既存種にも該当しなかった。

gltA 領域に基づく系統解析では、わが国のコウモリ由来13株は、大きく7つの系統 (A~G) に分類された。ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) 由来の遺伝子型 1, 2, 3, 4 は、台湾の *Miniopterus* 属コウモリ由来株とともに系統 A に、遺伝子型 5 は単系統の系統 E に分類された。キタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*) 由来の遺伝子型 6, 7 は Vespertilionidae 科コウモリ由来株とともに系統 G に、遺伝子型 8 はげっ歯類由来株に近縁な単系統の系統 F に分類された。モモジロコウモリ由来 (*Myotis macrodactylus*) の遺伝子型 9, 11 は系統 D に、遺伝子型 10 は系統 B に、それぞれ中国の *Myotis* 属コウモリ由来株とともに分類された、遺伝子型 12 は遺伝子型 6, 7 と Vespertilionidae 科コウモリ由来株とともに系統 G に分類された。キクガシラコウモリ由来の遺伝子型 13 は、*Myotis* 属と *Rhinolophus* 属コウモリ由来株とともに系統 C に分類された。

本研究では、検討したわが国の4種のコウモリ全てが *Bartonella* を保有していることを初めて明らかにした。コウモリ由来株の系統 A, B, D, G は、それぞれ、*Miniopterus* 属、*Myotis* 属 (2系統)、Vespertilionidae 科のコウモリにそれぞれ固有の新種であることが明らかとなった。また、系統 C の株は複数のコウモリ科から分離されていることから、コウモリの科を超えて感染可能な系統であると考えられた。さらに、系統 E と F に近縁な他国のコウモリ由来株あるいは近縁種は存在しなかったことから、両系統の株は日本のユビナガコウモリとキタクビワコウモリにそれぞれ固有の新種の *Bartonella* であることが示唆された (表1)。

表 1. コウモリ種ごとの *Bartonella* 陽性率とコウモリが保有していた *Bartonella* の系統

コウモリ種	<i>Bartonella</i> 陽性率	保有していた <i>Bartonella</i> の系統
ユビナガコウモリ	24% (12/50)	✓ <i>Miniopterus</i> 属固有 (系統 A) ✓ 日本のユビナガコウモリ固有 (系統 E)
キタクビワコウモリ	26% (32/123)	✓ 日本のキタクビワコウモリ固有 (系統 F) ✓ Vespertilionidae 科(<i>Eptesicus</i> , <i>Myotis</i> 属)固有 (系統 G)
モモジロコウモリ	100% (4/4)	✓ Vespertilionidae 科(<i>Eptesicus</i> , <i>Myotis</i> 属)固有 (系統 G) ✓ <i>Myotis</i> 属に固有 (系統 B, D)
キクガシラコウモリ	100% (1/1)	✓ Vespertilionidae 科, Rhinolophidae 科 のコウモリに感染可能 (系統 C)

(2) コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターの検討

ユビナガコウモリからは,クモバエが 281 匹採取され,*Nycteribia allotopa* (N=157),*Nycteribia* sp. (N=79),*Penicillidia jenynsii* (N=45) に同定された。また,*Nycteribia* sp. は COI 遺伝子の系統解析で,既存種とは異なる系統となったことから,新種のクモバエである可能性が示された。キタクビワコウモリからは,174 匹のノミと 2 匹のトコジラミが採取され,ノミはコウモリノミ (*Ischnopsyllus needhami*; N=174),トコジラミは *Cimex japonicus* (N=2) と同定された。モモジロコウモリからは,16 匹のクモバエと 2 匹のダニが採取され,クモバエは *N. pygmaea* (N=16),ダニは *Spinturnix myoti* (N=4) と同定された。以上の結果から,コウモリ種ごとに異なる外部寄生虫相を形成していることが明らかとなった。

コウモリの外部寄生虫,*N. allotopa* 2 匹,*Nycteribia* sp. 1 匹,コウモリノミ 1 匹から *Bartonella* が分離されたことから,*Nycteribia* 属のクモバエとコウモリノミの体内においても *Bartonella* は生存可能であることが示唆された。

寄生虫種ごとの *Bartonella* DNA の陽性率は,ユビナガコウモリ由来の *N. allotopa* で 47.1% (74/157),*Nycteribia* sp. で 15.2% (12/79),*P. jenynsii* で 6.7% (3/45) で,*N. allotopa* の陽性率は *Nycteribia* sp. および *P. jenynsii* の値に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。キタクビワコウモリ由来のコウモリノミの *Bartonella* DNA 陽性率は 46% (80/174) であったが,トコジラミからは検出されなかった。モモジロコウモリ由来の *N. pygmaea* の *Bartonella* DNA 陽性率は 43.8% (7/16),*S. myoti* では 25% (1/4) であった。

外部寄生虫由来 *Bartonella* DNA の *gltA* 領域と宿主コウモリ由来株の同領域の塩基配列の相同性解析を行ったところ,*N. allotopa* はユビナガコウモリ由来株と同じ遺伝子型 1, 2, 3, 4 を,*Nycteribia* sp. は遺伝子型 1 を保有していた。*P. jenynsii* 由来株は既存の遺伝子型には分類されなかった。コウモリノミ由来株の遺伝子型は 6, 7, 8 で,コウモリノミはキタクビワコウモリ由来株と同じ遺伝子型を保有していた。*S. myoti* 由来株の遺伝子型は 9,*N. pygmaea* 由来株の遺伝子型は 10 で,いずれもモモジロコウモリ由来株と同じ遺伝子型であった。

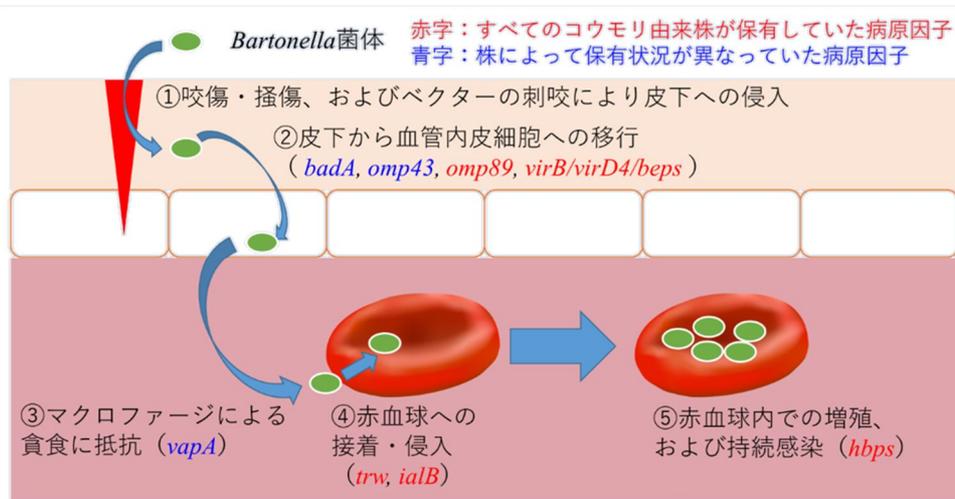
以上の結果から,ユビナガコウモリにおいては *Nycteribia* 属のクモバエが,キタクビワコウモリにおいてはコウモリノミが主要な *Bartonella* のベクターであると考えられた。また,モモジロコウモリでは *N. pygmaea* と *S. myoti* の両方が *Bartonella* のベクターである可能性が考えられた。

(3) コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機序の解明

検討したコウモリ由来7株は、宿主の血管内皮細胞への接着に關与する分子をコードする *badA*, *omp43*, *omp89* の全てまたはいずれかを保有していた。また、全ての株は、宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入し、血管内皮細胞内への侵入に關与する分子をコードする *virB/virD4/beps*, 宿主血管内皮細胞への接着および侵入に關与する分子をコードする *trw*, *ialB*, 赤血球中での持続感染と増殖に關わる分子をコードする *hbps* 遺伝子を保有していたことから、*B. henselae* と同様の機序で宿主の血管内皮細胞や赤血球へ感染すると考えられた。一方、マクロファージの貪食を阻害する分子をコードする *vapA* 遺伝子は、全てのキタクビワコウモリ由来株、キクガシラコウモリ由来株、モモジロコウモリ由来株の1株が保有していたことから、これらの株は *vapA* の機序により宿主のマクロファージによる貪食を阻害し、生体内で長期間生存する可能性が考えられた。

以上から、わが国のコウモリ由来 *Bartonella* は、*B. henselae* と同様の機序を用い、ベクターの刺咬等により皮下に侵入後、皮下から血管内皮細胞に移行する。その後、血管内皮細胞から血管内腔へ遊離し、マクロファージによる貪食に抵抗して、赤血球内に侵入することで、宿主体内で持続感染を成立させていると推定された(図1)。

図1. コウモリ由来 *Bartonella* の宿主における持続感染機序



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Nabeshima, K., Sato, S., Kabeya, H., Kato, C., Suzuki, K., and Maruyama, S.	4. 巻 83
2. 論文標題 Isolation and genetic properties of Bartonella species in eastern bent-wing bats (<i>Miniopterus fuliginosus</i>) in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 104354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2020.104354	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nabeshima, K., Sato, S., Kabeya, H., Komine, N., Nanashima, R., Takano, A., Shimoda, H., Maeda, K., Suzuki, K., and Maruyama, S.	4. 巻 73
2. 論文標題 Detection and phylogenetic analysis of Bartonella species from bat flies on eastern bent-wing bats (<i>Miniopterus fuliginosus</i>) in Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Comparative Immunology, Microbiology and Infectious	6. 最初と最後の頁 101570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cimid.2020.101570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizukami, M., Sato, S., Nabeshima, K., Kabeya, H., Ueda, D., Suzuki, K., and Maruyama, S.	4. 巻 56
2. 論文標題 Molecular survey of Bartonella rochalimae in Japanese raccoon dogs (<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Wildlife Diseases	6. 最初と最後の頁 778-781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7589/2019-06-162. Epub 2020 Feb 17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Nabeshima, K., Sato, S., Kabeya, H., Amano, M., Komine, N., Nanashima, R., Takano, A., Shimoda, H., Maeda K., Brinkerhoff, R. J., Suzuki, K., and Maruyama, S.
2. 発表標題 Blood-sucking Ectoparasites in <i>Miniopterus schreibersii fuliginosus</i> and <i>Eptesicus nilsonii</i> in Japan
3. 学会等名 18th International Bat Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nabeshima, K., Sato, S., Brinkerhoff, R. J., Amano, M., Kabeya, H., Kato, C., Suzuki, K., and Maruyama, S.
2 . 発表標題 Isolation and the genetic properties of Bartonella spp. in insectivorous bats in Japan.
3 . 学会等名 9th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens (Paris) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Maruyama, S.
2 . 発表標題 Bartonella in wild mammals in Japan : from rodents to deer.
3 . 学会等名 9th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens (Paris) (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Mizukami, M., Sato, S., Nabeshima, K., Kabeya, H., Ueda, D., Suzuki, K., and Maruyama, S.
2 . 発表標題 Molecular survey of Bartonella rochalimae infection in Japanese raccoon dogs.
3 . 学会等名 9th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens (Paris) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sato, S., Kabeya, H., Fukudome, Y., Kakeuchi, K., Suina, C., Okamoto, M., Sankai, T., Takano, J., and Maruyama, S.
2 . 発表標題 Prevalence of Bartonella quintana in experimental macaques in primate research centers in Japan and a unique genetic property of Japanese macaque strain MF1-1.
3 . 学会等名 9th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens (Paris) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Brinkerhoff, R. J., Sato, S., Ota, A., and Maruyama, S.
2. 発表標題 Microbiome analysis of monkey lice, potential sylvatic vectors for Bartonella quintana in Japanese macaques.
3. 学会等名 9th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens (Paris) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鍋島圭, 佐藤真伍, 壁谷英則, 丸山総一
2. 発表標題 わが国のキタクピワコウモリにおけるBartonellaの保有状況と分離株の遺伝的多様性
3. 学会等名 第161回 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鍋島圭, 佐藤真伍, 天野むらさき, 壁谷英則, 丸山総一
2. 発表標題 キタクピワコウモリにおけるBartonella属菌のベクターの検討
3. 学会等名 第18回 人と動物の共通感染症研究会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nabeshima K., Sato S., Kabeya H., Amano M., and Maruyama S.
2. 発表標題 Prevalence and genetic diversity of Bartonella species in northern bats and its ectoparasites in Japan
3. 学会等名 14th International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 佐藤真伍, 丸山総一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)インターズー	5. 総ページ数 821
3. 書名 犬と猫の検査・手技ガイド	

1. 著者名 丸山総一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 緑書房	5. 総ページ数 166
3. 書名 動物病院スタッフのための犬と猫の感染症ガイド, 猫ひっかき病	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 真伍 (SATO Shingo) (60708593)	日本大学・生物資源科学部・講師 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------