

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成23年 5月 12日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580343

研究課題名 (和文) 分子生物学的手法を用いた齧歯類由来バルトネラ属菌の生態解明に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on the ecology of *Bartonella* species by molecular biological approach

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

研究成果の概要 (和文)：わが国の小型哺乳類 685 頭のうち 176 頭 (25.7%) から *Bartonella* 属菌が分離された。陽性個体はいずれも郊外で捕獲した個体であった。2007-2008 年に米国のホームレスから採取したコロモシラミならびにアタマジラミのそれぞれ 33.3% (11/33 人), および 25% (3/12 人) から, *B. quintana* の遺伝子が検出された。また, タイの齧歯類から採取したダニとツツガムシ類の 30 検体(73.2%)から *B. tamiiae* DNA が検出された。ペット用の輸入齧歯類 28 種 546 頭のうち, 17 種 142 頭 (26%) から *Bartonella* 属菌が分離された。リス科動物は, *B. washoensis* を 31.7% (45/142), *B. grahamii* を 8.5% (12/142) 保菌していた。これらの動物から分離された 6 系統の 12 株は全て新種の *Bartonella* 属菌であった。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the prevalence of *Bartonella* species in wild and imported rodents. We also detected the genes of *Bartonella* in ectoparasite collected from rodents and homeless peoples. We successfully isolated *Bartonella* organisms from 176 of the 685 rodents (isolation rate, 25.7%). Those *Bartonella* isolates were all obtained from the rodents captured in suburban areas (rate, 51.8%). During 2007-2008, 33.3% of body lice- and 25% of head lice-infested homeless peoples in USA had DNA of *B. quintana*. Furthermore, sequence analysis demonstrated that DNA detected in 33 chigger mite pools and one tick pool from wild rodents in Thailand was similar to *B. tamiiae* sequences previously isolated from three patients in the country. We investigated the prevalence of *Bartonella* spp. in 546 imported small mammals (28 species). We obtained 407 *Bartonella* isolates and the animals examined were found to harbor 4 zoonotic *Bartonella* spp. and 6 novel *Bartonella* spp..

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症

1. 研究開始当初の背景

Bartonella 属菌は哺乳類を自然病原巣とする 1 科 1 属の赤血球内寄生性の細菌で、現在までに 20 種 3 亜種が知られている。このうち *Bartonella henselae* (猫ひっかき病, 細菌性血管腫, 細菌性紫斑病), *B. quintana* (塹壕熱), *B. bacilliformis* (カリオン病・ペルー疣病) 等, 10 種 2 亜種が人に対し病原性を有することが報告されており, 新興感染症の一つとして注目されるようになった。さらに, 野生齧歯類を自然病原巣とする *B. grahamii*, *B. elizabethae*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, *B. washoensis* は人に対しそれぞれ視神経網膜炎や心内膜炎, 心筋炎を引き起こすことも明らかとなっている。*Bartonella* 属菌の生態, 病原性についてはかなり複雑であることが判明しつつあるが, 齧歯類における *Bartonella* 属菌の感染状況, 伝播様式ならびにバルトネラ症の疫学上の役割は世界的に見ても解明されていない。

わが国は四方を海で囲まれた特異な地理的条件を有していることから, 小型ほ乳類も固有の種が多く生息している。申請者がこれまで実施してきた研究の中で, 日本国内で捕獲した *Apodemus* 属の野鼠が高率に *Bartonella* 属菌に感染していること, 分離株の多くはヒトに対し視神経網膜炎を起こす *B. grahamii*, 未だ病原性の不明な *B. tribocorum*, *B. taylorii* さらに既存の *Bartonella* 属菌に該当しない 2 菌種が存在することを見いだした。また, タイにおける不明熱患者の血液から, 齧歯類由来と思われる新種の *Bartonella* 属菌が米国 CDC の研究者により分離されている。

さらに, 多くの *Bartonella* 属菌の伝播には, ノミやダニなどの吸血性節足動物が関与していると考えられているが, 齧歯類間の同菌の伝播におけるベクターの関与について詳細に検討した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では, わが国に生息する野生齧歯類ならびにペットとして輸入された齧歯類から細菌学的手法を基本として用い, *Bartonella* 属菌の感染状況を明らかにするとともに, 分離株については PCR 法, DNA シーケンス等の分子生物学的手法を応用して系統解析することにより, 齧歯類に分布する *Bartonella* 菌の生態を明らかにする。さらに, 齧歯類やその他の宿主等に寄生する節足動物についても *Bartonella* 属菌の遺伝子を検出することによって, 本菌の伝播におけるベクターの関与を解明する。

3. 研究の方法

平成 20 年度

わが国の小型哺乳類に分布する病原性 *Bartonella* 属菌の生態を明らかにすることを目的とし, 北海道, 青森, 群馬, 神奈川, 静岡,

石川, 長野, 島根, 徳島, 愛媛, 鹿児島, 沖縄で捕獲した合計 685 頭の小型哺乳類 (アカネズミ 224 頭, ヒメネズミ 35 頭, エゾヤチネズミ 17 頭, オキナワハツカネズミ 7 頭, クマネズミ 297 頭, ドブネズミ 105 頭) の *Bartonella* 属菌の分布状況, 保有菌種ならびに宿主特異性等について細菌学的, 分子生物学的手法を用いて検討する。

Bartonella 属菌の分離は, 各個体の血液を 5% 兎血液加ハートインフュージョン培地で 35°C, 5%CO₂ 下で 2 週間培養した。*Bartonella* 属菌を疑う分離株から DNA を抽出し, *rpoB* および *gltA* 領域を標的とした PCR により *Bartonella* 属菌であることを確認し, 両領域の DNA シーケンス解析により種の同定を行う。また, 分離株の塩基配列から NJ 法で系統樹を作成し, クラスタ解析を行う。

2007-2008 年に, 米国・カリフォルニア州・サンフランシスコのホームレスからコロモシラミ(36 プール)ならびにアタマジラミ(7 プール)を採取し, *Bartonella* 属菌の *gltA* および *ftsZ* 遺伝子の検出を行う。

平成 21 年度

2004 年から 2006 年の間に, 世界の 8 地域から輸入されたペット用齧歯類 27 種 516 頭の *Bartonella* 属菌の保有状況について検討する。*Bartonella* 属菌の分離および系統解析の手法は前年度に準じて行う。

タイ全域に生息する 6 種の野生齧歯類 41 頭から採取した外部寄生虫 (ツツガムシ類 : 3 属 39 検体, ダニ : 1 属 1 検体, ノミ : 1 属 1 検体) から DNA を抽出し, 16S-23S 遺伝子間領域 (ITS) および *gltA* 領域を標的とした PCR 法により *Bartonella* 属菌および *B. tamiae* の DNA を検索する。さらに, 得られた PCR 増幅産物とタイの患者から分離された *B. tamiae* 3 株 (Th307, Th339, Th239) の塩基配列を決定し, 近隣接合法による系統解析を行う。

平成 22 年度

ペット用に輸入された齧歯類から分離された新種と思われる 6 系統の株 (各系統から 2 株, 計 12 株) について細菌学的, 分子生物学的に性状解析を行う。系統解析は平成 20 年度に行った方法に準拠する。

また, 22 年度は 3 年間の研究成果を総括し, わが国の野生齧歯類ならびに輸入齧歯類に分布する *Bartonella* 属菌の生態とその人獣共通感染症起因菌としての意義ならびにその感染機序を明らかにする。

4. 研究成果

平成 20 年度

わが国の 685 頭の小型哺乳類のうち 176 頭 (25.7%) から *Bartonella* 属菌が分離された。郊外で捕獲した個体の 51.8% (176/340) から *Bartonella* 属菌が分離されたのに対し, 市街地で

捕獲した個体からは同菌は分離されなかった。また、アカネズミの 60.3% (135/224), ヒメネズミの 54.3% (19/35), エゾヤチネズミの 23.5% (4/17), クマネズミの 6.1% (18/297), が陽性であったのに対し、オキナワハツカネズミ (7 頭) とドブネズミ (105 頭) からは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。分離された *Bartonella* 属菌は系統解析により 7 つのグループに分類され、5 つのグループはそれぞれ *B. grahamii*, *B. taylorii*, *B. rattimassiliensis*, *B. phoceensis* および *B. tribocorum* のクラスターに分類された。他の 2 つのグループは、新種の *Bartonella* 属菌であると思われた。

2007-2008 年に米国・カリフォルニア州・サンフランシスコ地域のホームレスから採取したコロモシラミならびにアタマジラミから *Bartonella* 属菌の遺伝子を検出したところ、ホームレスのそれぞれ 33.3% (11/33 人), および 25% (3/12 人) から、*B. quintana* Fuller 株と同じ遺伝子が検出された。今後、*B. quintana* を保有するシラミの寄生を受けた人における同菌の感染リスクを評価する必要があると思われた。

平成 21 年度

輸入齧歯類 28 種 546 頭のうち、17 種 142 頭 (26%) から *Bartonella* 属菌が分離された。7 種のリス科動物からは、人に心内膜炎を起こす *B. washoensis* が、4 種のリス科動物からは人に視神経網膜炎を起こす *B. grahamii* がそれぞれ 31.7% (45/142), 8.5% (12/142) から分離された。また、6 種のネズミ科動物の 18.3% (26/142) からは、人に心内膜炎を起こす *B. elizabethae* が分離された。さらに、陽性個体の 41.5% (59/142) が新種と思われる *Bartonella* 属菌を保有していることが明らかとなった。

ITS を標的とした PCR 法により、タイのダニとツツガムシ類の計 30 検体 (73.2%) から *B. tamiae* DNA が検出された。系統解析では、Th307, Th339 両株に近縁な DNA が 16 検体 (39.0%) のツツガムシ類と 1 匹のダニから、Th239 株に近縁な DNA が 14 検体 (34.1%) のツツガムシ類から検出された。*gltA* を標的とした PCR 法では、9 検体 (22.0%) のツツガムシ類が陽性を示し、全て Th239 株と Th307 株に近縁な DNA であった。本研究は、タイのツツガムシ類から *B. tamiae* DNA を検出した初めての報告であり、ツツガムシ類が本菌の伝播に関与している可能性が示唆された。

平成 22 年度

透過型電子顕微鏡解析では検討した 12 株全てに線毛が観察され、野鼠を自然宿主とする *B. alsatica*, および *B. tribocorum* と類似していた。生化学的性状および推定 G+C 含量 (36.2-38.9mol%) は、全株が既存種と類似した性状を示した。*gltA*, *rpoB* 遺伝子領域における既存種との塩基配列の相同性は、全株で *Bartonella* 属菌の種を分ける基準値となる 96.0%, 95.4% よりも低く、16S rRNA, *fisZ*, *gltA*,

groEL, *ribC*, *rpoB*, 16S-23S 遺伝子間領域の連結配列による系統樹では、各分節が 100% に近いブートストラップ値で支持される 6 つの系統に分岐された。

以上から、ペット用の輸入齧歯類から分離された 6 系統の株は、全て新種の *Bartonella* 属菌であることが判明した。今後新種として登録する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Engel, P., Salzburger, W., Liesch, M., Chang, C-C., Maruyama, S., Lanz, C., Calteau, A., Lajus, ., Médigue, C., Schuster, S. C., and Dehio, C. 2011. Parallel evolution of a type IV secretion system in radiating lineages of the host-restricted bacterial pathogen *Bartonella*. PLoS Genetics 7(2). E1001296. (査読有り)
- ② Inoue, K., Kabeya, H., Fujita, H., Makino, T., Asano, M., Inoue, S., Inokuma, H., Nogami, S., and Maruyama, S. 2011. Serological survey of five zoonoses, scrub typhus, Japanese spotted fever, tularemia, Lyme disease, and Q fever, in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. Vector-Borne Zoonotic Dis. 11(1): 15-19. (査読有り)
- ③ Inoue, K., Kabeya, H., Hagiya, K., Kosoy, K. M., Une, Y., Yoshikawa, Y. and Maruyama, S. 2010. Multi-locus sequence analysis reveals host specific association between *Bartonella washoensis* and squirrels. Vet. Microbiol. 148:60-65. (査読有り)
- ④ Berglund, E. C., Ellegaard, K., Granberg, F., Xie, Z., Maruyama, S., Kosoy, M. K., Birtles, R. J., and Anderson, S. G. E. 2010. Rapid diversification by recombination in *Bartonella grahamii* from wild rodents in Asia contrasts with low levels of genomic divergence in Northern Europe and America. Molecular Ecology. 19(11):2241-2255. (査読有り)

- ⑤ Inoue, K., Kabeya, H., Shiratori, H., Ueda, K., Kosoy, M. Y., Chomel, B. B., Boulouis, H. J. and Maruyama, S. 2010. *Bartonella japonica* sp. nov. and *Bartonella silvatica* sp. nov., isolated from Apodemus mice in Japan. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 759 – 763. (査読有り)
- ⑥ Brinkerhoff, R., Kabeya, H., Inoue, K., Bai, Y., and Maruyama, S. 2010. Detection of multiple Bartonella species in digestive and productive tissues of fleas collected from sympatric mammals. ISME J. 4(7):955-958. (査読有り)
- ⑦ Kabeya, H., Colborn, J. M., Bai, Y. Lerdthusnee, K., Richardson, J. H., Maruyama, S., and Kosoy, Y. M. 2010. Detection of *Bartonella tamiae* DNA in ectoparasites from rodents in Thailand and their sequence similarity with bacterial cultures from Thai patients. Vector-Borne Zoon. Dis. 10 (5): 429-434. (査読有り)
- ⑧ Kabeya, H., Umehara, T., Okanishi, H., Tasaki, I., Kamiya, M., Misawa, A., Mikami, T. and Maruyama, S. 2009. Experimental infection of cats with *Bartonella henselae* resulted in rapid clearance associated with T helper 1 immune responses. Microb. Infect. 11(6-7):716-720. (査読有り)
- ⑨ Bouchouicha, R., Durand, B., Monteil, M., Chomel, B. B., Berrich, M., Arvand, M., Birtles, R., J., Breitschwerdt, E. B., Koehler, J. E., Maggi, R., Maruyama, S., Kasten, R., Petit, E., Boulouis, H-J., and Haddad, N. 2009. Molecular epidemiology of feline and human *Bartonella henselae* isolates. Emer. Infec. Dis. 15(5):813-816. (査読有り)
- ⑩ Bonilla, D. L., Kabeya, H., Henn, J., Kramer, V. L., Kosoy, M. Y.. 2009 *Bartonella quintana* in body lice and head lice from homeless persons, San Francisco, California, USA. Emerg Infect Dis. 15(6):912-5. (査読有り)
- ⑪ Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M. Y., Bai, Y., Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H. and Maruyama, S. 2009. Evolutional and geographical relationships of *Bartonella grahamii* isolates from wild rodents by multi-locus sequencing analysis. Microb. Ecol. 57:534-541. (査読有り)
- ⑫ Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Kawanami, K., Yanai, K., Jitchum., S. and Jittaparapong, S. 2009. Prevalence of *Bartonella* infection in cats and dogs in a metropolitan area, Thailand. Epidemiol. Infect. 137: 1568-1573. (査読有り)
- ⑬ Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Hagiya, K., Izumi, Y., Une, Y., Yoshikawa, Y. 2009. Exotic small mammals as potential reservoirs of zoonotic *Bartonella* species. Emer. Infec. Dis. 15:526-532. (査読有り)
- ⑭ Inoue, K, Maruyama, S., Kabeya, H., Yamada, N., Ohashi, N., Sato, Y., Yukawa, M., Masuzawa, T., Kawamori, F., Kadosaka, T., Takada, N., Fujita, H., and Kawabata, H. 2008. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species isolated from wild rodents in Japan. Appl. Environ. Microbiol. 74: 5086-5092. (査読有り)
- [学会発表] (計 13 件)
- ① 藤長 悠太, 井上 快, 壁谷 英則, 丸山 総一. 愛玩用に輸入された小型哺乳類から分離された *Bartonella* 属菌の分類学的性状, 第 150 回日本獣医学会学術集会 (帯広畜産大学, 2010 年 9 月 16 日)
- ② 佐藤 真伍, 壁谷 英則, 山崎 真梨, 武野 侍那子, 鈴木 和男, 相馬 幸作, 増子 孝義, 小林 信一, 丸山 総一. わが国の鹿における *Bartonella* 属菌の分布とそ

- のベクターの検討, 第 150 回日本獣医学会
 学術集会 (帯広畜産大学, 2010 年 9 月 16
 日)
- ③ 壁谷 英則, 井上 快, 泉 泰仁, 森田 達
 志, 今井 壮一, 丸山 総一. 野鼠とネズ
 ミノミにおける *Bartonella* 属菌の分布と宿
 主特異性. 第 149 回日本獣医学会 (日獣大,
 2010 年 3 月 27 日)
- ④ 鈴木 悠, 小南 春佳, 本間 哲, 杉原 茂
 孝, 本多 麻衣子, 松原 正男, 丸山 総
 一. 視力障害を伴わない眼底病変から診断
 に至った猫引っかき病の一例. 日本感染症
 学会 (京都; 2010 年 4 月 6 日)
- ⑤ Inoue, K., Kabeya, H., Kosoy, M., Bai, Y.,
 Smirnov, G., McColl, D., Artsob, H., and
Maruyama, S. Evolutional and geographical
 relationships of *Bartonella grahamii* isolates
 from wild rodents by multi-locus sequencing
 analysis. (Chester UK, 21-23 June, 2009)
- ⑥ Kabeya, H., Shimura, N., Yoshioka, N., Tajiri,
 Y., Ryu, H., Bai, Y., Kosoy, M., and Maruyama,
 S. Factors involved in the kinetics of Bacterial
 load in *Bartonella elizabethae* infected Balb/C
 mice. International conference on bartonella as
 medical & veterinary pathogens. (Chester UK,
 21-23 June, 2009)
- ⑦ 壁谷 英則, James Colborn, Ying Bai,
 Lerthusnee Kriangkrai, Jason Richardson, 丸
 山 総一, Michael Kosoy : タイの齧歯類の
 外部寄生虫における *Bartonella tamiae* DNA
 分布状況, 第 147 回日本獣医学会, 宇都宮
 (2009.4.3)
- ⑧ 井上 快, 壁谷 英則, 川端 寛樹, 宇根
 有美, 吉川 泰弘, 丸山 総一 : 小型哺乳
 類を自然宿主とする病原性 *Bartonella* 属菌
 の生態に関する研究. 第 147 回日本獣医学
 会プレナリーセッション, 宇都宮
 (2009.4.3)
- ⑨ 井上 快, 壁谷 英則, Michael Y. Kosoy,
 Bai Ying, George Smirnov, Dorothy McColl,
 Harvey Artsob, 丸山 総一 : 野鼠由来
Bartonella grahamii の進化系統と地理的起
 源. 日仏獣医学会第 40 回研究例会, 恵比
 寿 (2009.3.13)
- ⑩ Inoue, K., Maruyama, S., Kabeya, H., Hagiya,
 K., Izumi, Y., Une, Y., and Yoshikawa, Y. 2008.
 Imported small pet animals as potential
 reservoirs of zoonotic *Bartonella* species in
 Japan. 5th International Conference on
 Rickettsiae and Rickettsial Diseases (2008. 5,
 France, Marseille).
- ⑪ Bouchouicha, R., Durand, B., Monteil, M.,
 Chomel, B., Birtles, R., Bretschwerdt, E.,
 Koehler, J., Kasten, R., Petit, E., Maruyama, S.,
 Arvand, M., Boulouis, H. J., and Haddad N.
 Epidemiological applications of multi-locus
 variable number tandem repeat analysis
 (MLVA) for *Bartonella henselae* isolates of
 human and feline origins. 5th International
 Conference on Rickettsiae and Rickettsial
 Diseases (2008. 5, France, Marseille)
- ⑫ 吉川 聡一, 井上 快, 小磯 祐介, 壁谷
 英則, 丸山 総一 : 分子生物学的手法を用
 いた *Bartonella* の菌種同定法の確立. 第 146
 回日本獣医学会, 宮崎大 (2008.9.24)
- ⑬ 井上 快, 壁谷 英則, 篠原 ひとみ, 小
 林 俊元, 高野 愛, 山内 健生, 丸山 総
 一 : 神奈川県の日沢山系のニホンジカとそ
 の寄生節足動物における *Bartonella* DNA
 の検出状況, 第 146 回日本獣医学会, 宮崎
 大 (2008.9.24)
- [図書] (計 9 件)
- ① 丸山 総一. 人獣共通感染症 改訂版, 細
 菌性血管腫・猫引っかき病(p200-206), 野
 兔病(p313-317)を分担執筆, (株) 医薬ジャ
 ーナル社 2011年2月 (大阪)

- ② 丸山 総一. チャイルドヘルス, 猫を飼うときに気をつけたい感染症(p31-37)を分担執筆, 2010年8月号
- ③ 丸山 総一. 日本臨床増刊号: 広範囲血液・尿科学検査, 免疫学検査(その数値をどう読むか)第7版, 猫ひっかき病の検査(p244-247)を分担執筆, 2010年6月, (株)日本臨床社, 大阪
- ④ 丸山 総一. 獣医公衆衛生学実習, 学窓社(獣医公衆衛生学教育研修協議会編)を監修, 分担執筆 (P82-87, P127-129, P145-146), 2010年5月
- ⑤ 丸山 総一. 小児科臨床 vol. 62 (4). 特集「子供と動物-上手にふれあうためには-」, 猫ひっかき病(P703), トキソプラズマ症(p717)を分担執筆, 日本小児医事出版社 2009年 4月
- ⑥ 丸山 総一. ズーノーシスハンドブック (監修岸本寿男, 山田章雄), 猫ひっかき病を分担執筆, Medical Science社(東京) 2009年4月.
- ⑦ 丸山 総一. 微生物の事典 ペットと微生物, 2.2 ペットの細菌病と予防(p624-630)を分担執筆, 朝倉書店 (東京) 2008年9月
- ⑧ 丸山 総一. 日本の食を科学する(酒井健夫, 上野川修一監修), III. 食と安全, 9. 食中毒とその予防(p77-88)を分担執筆, 朝倉書店(東京) 2008年6月
- ⑨ 丸山 総一. ライフステージから見た犬と猫の健康管理(猪熊壽編), 人と動物の共通感染症とその予防(p109-131)を分担執筆, IBS出版 (東京), 2008年2月

[その他]

ホームページ等

<http://hp.brs.nihon-u.ac.jp/~vetpub/top.htm>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

壁谷 英則 (KABEYA HIDENORI)
日本大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号: 10318389

(3) 連携研究者

宇根 有美 (UNE YUMI)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号: 40160303