

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21790538

研究課題名（和文） 猫ひっかき病原菌 *Bartonella henselae* の分子疫学的研究研究課題名（英文） Molecular epidemiological study on the causative agent of cat scratch disease, *Bartonella henselae*

研究代表者

柳原 正志 (YANAGIHARA MASASHI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40379954

研究成果の概要（和文）：*Bartonella henselae* は猫ひっかき病(CSD)の原因菌である。本邦のCSD患者およびネコ由来 *B. henselae* を対象に遺伝子型別解析を行った結果、わが国では欧米で分離された標準菌株とは異なる系統のMST cluster 1の *B. henselae* によって、ヒトへの感染が起きている実態が初めて明らかとなった。さらに、本菌病原因子 (*virB5*、*bepA*、*badA*) の塩基配列多型を指標にしたタイピング法を確立し、わが国での本菌病原因子の遺伝子型の分布を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Bartonella henselae* is the causative agent of cat scratch disease (CSD). We characterized *B. henselae* isolates from CSD patients and cats using DNA sequence-based genotyping methods. Our study demonstrated that human infections in Japan can be caused by *B. henselae* strains in MST cluster 1, distinct from clusters containing the Houston-1 and Marseille type strains. Furthermore, we developed a novel genotyping method based on three virulence genes (*virB5*, *bepA* and *badA*), and uncovered the genotypic distribution of *B. henselae* in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：猫ひっかき病、Cat scratch disease、*Bartonella henselae*、Multilocus sequence typing (MLST)、Multispacer typing (MST)、*virB5*、*bepA*、*badA*

## 1. 研究開始当初の背景

*Bartonella henselae* は猫ひっかき病 (Cat Scratch Disease: CSD) の主要病原体で、ネコからヒトに感染する人獣共通感染症である。本症はリンパ節腫大と発熱を主訴とする

定型例から、リンパ節腫大の認められない重症な非定型例（不明熱、肝・脾肉芽腫、心内膜炎、視神経網膜炎、急性脳症など）までその臨床症状は多彩である。本症は患者からの菌の分離が極めて困難であるため、その診断

は患者血清中の抗 *B. henselae* 抗体価測定や PCR 法による *B. henselae* 特異 DNA の検出が行われている。近年、Multilocus sequence typing (MLST) 法や Multispacer typing (MST) 法などの DNA 塩基配列解析による新しいゲノムタイピング法の開発により、菌の分離が困難な場合でも微量の患者材料から直接菌株のタイピングが可能となった。この新しいゲノムタイピング法を用いて、欧米諸国ではすでに CSD 患者およびネコ由来 *B. henselae* を対象とした分子疫学的研究が行われ、MLST 型別解析から地域流行型と強病原型 (ST1) が存在すること、MST 型別解析から CSD 患者由来株は特定のクラスターだけに分布していることが報告され、その実態が多方面から解明されつつある。しかし、わが国ではこれら新手法による本菌の遺伝子解析はもちろんのこと、CSD 患者由来株とネコ由来株の両者 *B. henselae* の遺伝子解析による分子疫学的研究はないこと、また、これら新手法による解析でも未だ病原因子の遺伝子型との関連性は不明であること、など本菌の分子疫学的研究に検討すべき課題は多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、CSD 患者およびネコ由来 *B. henselae* を対象に遺伝子解析による CSD の分子疫学的研究を実施し、わが国の CSD の実態を解明することである。本研究では、(1) MLST 法による分子系統解析、(2) MST 法による分子系統解析、(3) 病原因子の遺伝子型別解析を行い、本菌の分子系統および病原因子遺伝子型の分布や CSD 患者由来株とネコ由来株との関連性について検討した。

## 3. 研究の方法

CSD 患者の各種臨床材料ならびに分離菌株からゲノム DNA を抽出し、PCR の鋳型とした。MLST では、既報の *B. henselae* 用の MLST primer を用いて 8 つの遺伝子 (*rrs*, *batR*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC*, *rpoB*) を PCR により増幅し、得られた PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。MST では、既報の *B. henselae* 用の MST primer を用いて 9 つの intergenic spacer 配列 (S1~S9) を PCR により増幅し、PCR 産物を精製後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。Intergenic spacer S1 に異なる回数 of VNTR を含むために、intergenic spacer S1 の塩基配列の決定に失敗したものは、S1 forward primer と BH12700-R primer または S1 forward primer と BH13810-R primer の各プライマーペアを用いて PCR を行い、S1 forward primer と S1 reverse primer を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。各遺伝子の allele、ST、MST genotype は公表されている

データに従って割り当てた。新規の塩基配列は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) に登録した。遺伝子解析ソフト MEGA4 を用いて、各遺伝子の塩基配列を繋げて 1 つの配列とし、CLUSTAL W によるアライメントを行い、近隣結合法または UPGMA 法により系統樹を作成した。

## 4. 研究成果

### (1) Multilocus sequence typing (MLST) 法による分子系統解析

全国から集められた CSD 患者の各種臨床材料由来 *B. henselae* DNA 24 例とネコ由来 *B. henselae* 31 株の計 55 例を対象に、MLST 型別解析を行った。55 例の CSD 患者およびネコ由来 *B. henselae* は 3 つの異なる ST に分類された。CSD 患者由来 24 例はすべて ST1 であった。一方、ネコ由来株では、28 株 (90.3%) が ST1 に、2 株 (6.5%) が ST6 に分類された (表 1)。残る 1 株 (3.2%) では、*rpoB* (*B. henselae* Houston-1 のゲノム (BX897699) の 711784 塩基目) に新たな 1 塩基多型 (G→A) がみつかった。この allele を含む新しい ST は本研究が初めてであるため、これを ST15 とした。既知の 14 の ST と本研究で初めて得られた ST15 について分子系統解析を行ったところ、ST15 は Group 1 に属し、ST1 に非常に近縁であった (図 1)。一方、ネコ由来株の 2 株でみつかった ST6 は ST1 や ST15 とは異なるグループに属し、分子系統学的にも離れていた。

以上の MLST 型別解析から、わが国では ST1 が主な流行型であることが明らかとなった。

表 1 *B. henselae* ネコ由来 31 株の Multilocus sequence typing

ST	Allele number								No. of isolates (n)
	<i>rrs</i>	<i>batR</i>	<i>gltA</i>	<i>ftsZ</i>	<i>groEL</i>	<i>nlpD</i>	<i>ribC</i>	<i>rpoB</i>	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	28
6	2	3	2	2	2	1	1	2	2 <sup>a</sup>
15	1	1	1	1	1	1	1	5	1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*B. henselae* isolates YC-012 and YC-013.

<sup>b</sup>*B. henselae* isolate YC-073.

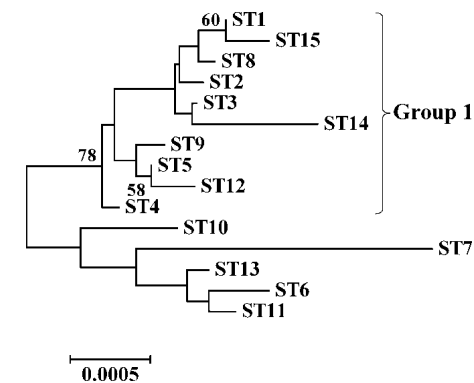


図 1 *B. henselae* MLST の近隣結合法による分子系統樹

(2) Multispacer typing (MST)法による *B. henselae* の分子系統解析

全国から集められた CSD 患者由来 *B. henselae* 25 例(心内膜炎患者由来分離株 1 株、CSD 患者臨床材料より直接抽出した DNA 24 例)とネコ由来分離株 31 株の計 56 例を対象に、MST 型別解析を行った。その結果、56 例の *B. henselae* は 13 種類の MST genotype に分類され、このうち 7 種類(MST genotype 51~57)は新規の遺伝子型であった(表 2)。CSD 患者由来 25 例は 9 種類の MST genotype に、ネコ由来 31 株は 10 種類の MST genotype にそれぞれ分類された。両者において MST genotype 14 (36%; 20/56)と MST genotype 35 (23%; 13/56)が主要な遺伝子型であった。さらに、両遺伝子型に分類された CSD 患者由来 *B. henselae* の多く(88%; 15/17)はリンパ節腫脹を伴う定型的な CSD 症例であり、MST genotype 35 の 2 例のみが非定型症例(感染性心内膜炎と菌血症)であった(表 2)。本研究で得られた新規の MST genotype と既知の 50 種類をもとに分子系統樹解析を行ったところ、今回得られた 13 種類の MST genotype のうち、12 種類が 1 つの系統(cluster 1)に属し、残る 1 種類は MST genotype 52 のネコ由来 2 菌株(YC-012, YC-013)で cluster 4 に属していた(図 2)。これまでに欧米では標準菌株の Houston-1 株や Marseille 株が属する cluster 2 や cluster 3 の *B. henselae* による CSD が報告されているが、本研究結果から、わが国では cluster 1 の *B. henselae* が主に分布し、ヒトへの感染を起こしている実態が初めて明らかとなった。

(3) MLST 法と MST 法による同一菌株群の分子系統解析データの比較

MLST 法と MST 法による分子系統解析を行った 55 例の *B. henselae* の解析結果を比較すると、MLST 法では 3 種類の遺伝子型を検出し、そのほとんど(94.5%; 52/55)は標準菌株の

Houston-1 株と同じ ST1 であった。一方、MST 法では 13 種類の遺伝子型を検出し、MLST 法で ST1 となった 52 例は、MST 法で 12 種類の

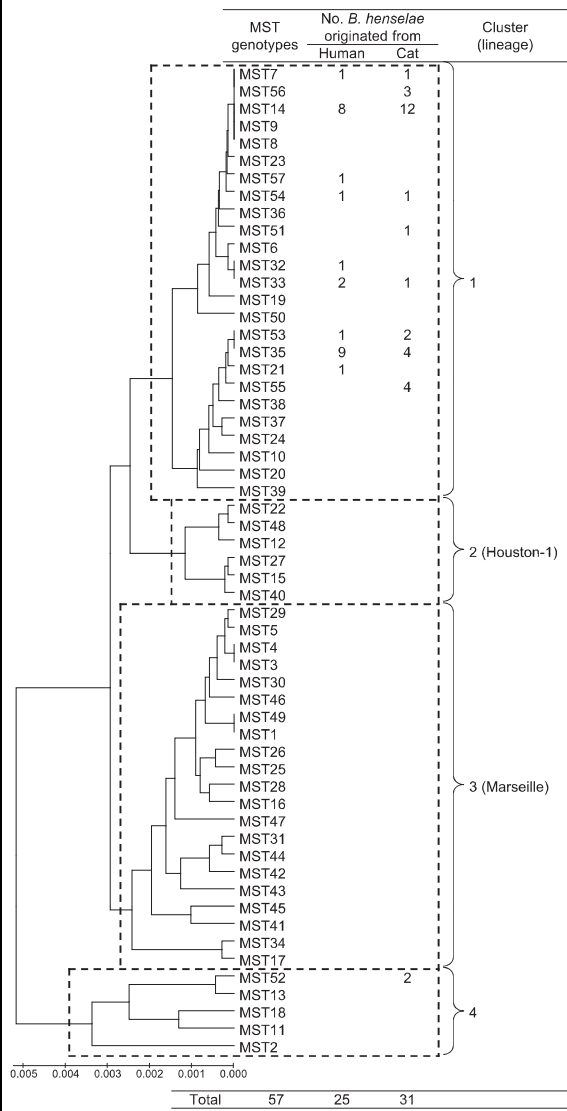


図 2 *B. henselae* MST の UPGMA 法による分子系統樹

表 2 日本のヒトおよびネコから検出した 56 例の *B. henselae* の Multispacer typing

<i>B. henselae</i> source		Genotypes											16S rRNA genotype
No. human	No. cat	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	MST		
1	1	7	2	5	4	1	2	1	1	3	7	I	
8	12	4	2	5	4	1	2	1	1	3	14	I	
1	0	3	2	6	5	2	2	2	1	1	21	I	
1	0	8	2	5	4	1	2	2	1	3	32	I	
2†	1	4	2	5	4	1	2	2	1	3	33	I	
9‡§	4	5	2	6	5	2	2	2	1	1	35	I	
0	1	11	2	6	4	1	2	1	1	3	51	I	
0	2	12	9	2	7	5	4	4	3	2	52	II	
1	2	5	2	6	8	2	2	2	1	1	53	I	
1¶	1	4	2	5	5	1	2	1	1	3	54	I	
0	4	5	2	6	5	1	2	2	1	1	55	I	
0	3	7 + 4#	2	5	4	1	2	1	1	3	56	I	
1	0	4	2	5	4	2	2	1	1	3	57	I	

\*MST, multispacer typing; I, 16S type I; II, 16S type II.  
 †Includes a clinical specimen isolated from a patient with hepatic granuloma.  
 ‡Includes *B. henselae* strain isolated from a patient with endocarditis.  
 §Includes a clinical specimen isolated from a patient with bacteremia.  
 ¶Includes a clinical specimen isolated from a patient with splenic granuloma.  
 #Strain with 2 different copies of intergenic spacer S1 in its genome.

遺伝子型に細分類でき、分子系統解析からこれらの遺伝子型はHouston-1株とは異なる系統であった。すなわち、今回の解析対象では、本菌のMLSTに選別されている8つのハウスキーピング遺伝子は配列の多型性に乏しかったのに対し、intergenic spacer配列を指標にしたMST法では、ハウスキーピング遺伝子が保存された近縁な菌株群でも十分に識別することができた。このように、同一菌株群の解析結果の比較から、*B. henselae*の遺伝子型別解析にはMST法がより有用であることが明らかとなった。

(4) *B. henselae*の病原因子の配列多型を指標にしたタイピング法の確立と型別解析

初めに、MST遺伝子型や由来が異なる5菌株を用いて、Houston-1株のゲノム情報(BX897699)をもとに、11種類の病原遺伝子の詳細な配列多型解析を行い、タイピングに適した遺伝子とその領域を検討し、IV型分泌装置構成遺伝子 *virB5*、エフェクター蛋白 *bepA* および接着因子 *badA* の組合せを得た。

次に、全国から集められたCSD患者由来 *B. henselae* DNA 27例とネコ由来分離株31株の計58例を対象に、*virB5*、*bepA*、*badA*の標的領域をダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定し、Houston-1株(BX897699)を基準とした配列多型解析を行った。その結果、*virB5*では3種類の遺伝子型が、*bepA*では2種類の遺伝子型が、*badA*では5種類の遺伝子型がそれぞれ検出され、これら3つの病原因子の配列多型の組合せによって、58例の *B. henselae* は7種類の sequence type (ST) に分類された(表3)。CSD患者由来27例は5種類のSTに、ネコ由来31株は4種類のSTにそれぞれ分類され、両者においてST2(46.6%; 27/58)とST3(34.5%; 20/58)が主要なSTであった。さらに、両STに分類されたCSD患者由来 *B. henselae* のほとんど(95.2%; 20/21)はリンパ節腫脹を伴う定型的なCSD症例であり、ST2の1例のみが非定型症例(脾肉芽腫)であった。

表3 日本のヒトおよびネコから検出した58例の *B. henselae* の病原因子 *virB5*、*bepA*、*badA*によるタイピング

<i>B. henselae</i> source		Allele number			ST
No. human	No. cat	<i>virB5</i>	<i>bepA</i>	<i>badA</i>	
1	0	1	1	1	ST1
11	16	1	1	2	ST2
10	10	3	1	2	ST3
4	0	3	1	3	ST4
0	2	2	2	4	ST5
0	3	1	1	3	ST6
1	0	1	1	5	ST7

CSD患者由来 *B. henselae*の各病原因子の遺伝子型の分布に注目すると、*bepA*では配列多型を認めず、全例が *bepA*-1型であったが、*virB5*では2つの遺伝子型が検出され、*virB5*-3型が51.9%(14/27)、*virB5*-1型が48.1%(13/27)であった。*badA*では *badA*-2型が77.8%(21/27)と最も多かった。

以上より、*B. henselae*の病原因子である *virB5*、*bepA*、*badA*の配列多型を指標にしたタイピング法を確立し、わが国での本菌病原因子の遺伝子型の分布を明らかにした。

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8件)

- ① Yamada Y, Ohkusu K, Yanagihara M, Tsuneoka H, Ezaki T, Tsuboi J, Okabayashi H, Suwabe A. Prosthetic valve endocarditis caused by *Bartonella quintana* in a patient during immunosuppressive therapies for collagen vascular diseases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 70: 395-398, 2011. 査読有り
- ② Nojima J, Motoki Y, Tsuneoka H, Kuratsune H, Matsui T, Yamamoto M, Yanagihara M, Hinoda Y, Ichihara K. Oxidation stress index' as a possible clinical marker for the evaluation of non-Hodgkin lymphoma. *British Journal of Haematology*. 155:528-530, 2011. 査読有り
- ③ Yanagihara M, Tsuneoka H, Sugasaki M, Nojima J, Ichihara K. Multispacer Typing of *Bartonella henselae* Isolates from Humans and Cats, Japan. *Emerging Infectious Diseases*. 16: 1983-1985, 2010. 査読有り
- ④ Tsuneoka H, Yanagihara M, Nojima J, Ichihara K. Antimicrobial susceptibility by Etest of *Bartonella henselae* isolated from cats and human in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 16: 446-448, 2010. 査読有り
- ⑤ Tsuneoka H, Yanagihara M, Otani S, Katayama Y, Fujinami H, Nagafuji H, Asari S, Nojima J, Ichihara K. A first Japanese case of *Bartonella henselae* induced endocarditis diagnosed by prolonged culture of a specimen from the excised valve. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 68: 174-176, 2010. 査読有り
- ⑥ Yanagihara M, Tsuneoka H, Hoshide S,

Ishido E, Umeda A, Tsukahara M, Nojima J, Ichihara K, Hino K, Hirai I, Yamamoto Y. Molecular typing of *Bartonella henselae* DNA extracted from human clinical specimens and cat isolates in Japan. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 60: 44-48, 2010. 査読有り

- ⑦ Nojima J, Iwatani Y, Ichihara K, Tsuneoka H, Ishikawa T, Yanagihara M, Takano T, Hidaka Y. Acquired activated protein C resistance is associated with IgG antibodies to protein S in patients with systemic lupus erythematosus. Thrombosis Research. 124: 127-131, 2009. 査読有り
- ⑧ 常岡英弘、柳原正志. 最近注目される微生物-その臨床的意義と検査法、*Bartonella quintana*, *B. henselae*. 臨床と微生物. 36: 139-142, 2009. 査読無し

[学会発表] (計9件)

- ① 菅崎幹樹、柳原正志、常岡英弘. 感染性心内膜炎患者より分離された *Bartonella henselae* の病原因子の遺伝子解析. 第44回中国四国医学検査学会, 2011年11月6日, アスティとくしま (徳島県)
- ② 柳原正志、常岡英弘. 猫ひっかき病原菌 *Bartonella henselae* のIV型分泌装置とBepAの配列多型および病原性との関連性について. 第85回日本感染症学会総会, 2011年4月22日, ザプリンスパークタワー東京 (東京都)
- ③ 柳原正志、常岡英弘. わが国におけるヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の Multispacer typing による遺伝子型の分布. 第80回日本感染症学会西日本地方会学術集会, 2010年11月20日, 松山市総合コミュニティセンター (愛媛県)
- ④ 柳原正志、菅崎幹樹、梅田昭子、常岡英弘. 感染性心内膜炎患者より分離された *Bartonella henselae* の分子系統解析. 第63回日本細菌学会中国・四国支部総会, 2010年10月17日, 松山大学文京キャンパス (愛媛県)
- ⑤ 柳原正志、常岡英弘、梅田昭子. *Bartonella henselae* ST-1型(MLST法)のSpacer配列による亜型分類. 第84回日本感染症学会総会, 2010年4月6日, 国立京都国際会館 (京都府)
- ⑥ 柳原正志、常岡英弘、梅田昭子. Presence of 2 different copies of the tRNA-Ala/GCA-tRNA-Ile/AUC spacer in *Bartonella henselae*. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月29日, パンフィコ横

浜 (神奈川県)

- ⑦ 常岡英弘、柳原正志、浅利祥子、藤波裕子、長藤宏士. 本邦初めての *Bartonella henselae* による感染性心内膜炎-大動脈弁疣贅からの分離例-. 第21回日本臨床微生物学会総会, 2010年1月30日, 東京ドームホテル (東京都)
- ⑧ 浅利祥子、藤波裕子、長藤宏士、柳原正志、常岡英弘. 感染性心内膜炎患者の大動脈弁疣贅から *Bartonella henselae* を分離した1症例. 第42回中国四国医学検査学会, 2009年10月31日, サンポートホテル高松 (香川県)
- ⑨ 柳原正志、常岡英弘、梅田昭子、塚原正人. MLST法によるわが国のヒトおよびネコ由来 *Bartonella henselae* の分子系統解析. 第83回日本感染症学会総会, 2009年4月24日, 京王プラザホテル (東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柳原 正志 (YANAGIHARA MASASHI)  
山口大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 40379954