

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850188

研究課題名(和文)サル由来Bartonella quintanaを用いた共進化と病原性に関する研究

研究課題名(英文)Coevolution between Bartonella quintana and the natural reservoir and the pathogenicity of macaque-derived B. quintana for humans.

研究代表者

佐藤 真伍 (SATO, Shingo)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号：60708593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Bartonella quintana (B.q)は塹壕熱の病原体として、第一次・第二次世界大戦時に兵士に流行した細菌である。ヒトはB.qの唯一の自然宿主であるが、近年では飼育ザルからもB.qが分離されている。しかしながら、野生ザルにおけるB.qの保有状況やヒトへの病原性は不明である。

本研究では、野生ニホンザル45検体を対象にB.qの保有状況と遺伝子性状を解析した。その結果、B.qは13.3% (6/45)のニホンザルから分離され、既報のB.q株と異なるニホンザル独自の遺伝子性状であった。ニホンザル由来株を用いてヒト赤血球への感染性を検討したところ、赤血球へ接着・侵入している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bartonella quintana is known as the causative agent of trench fever. The disease caused major epidemics among soldiers in World Wars I and II. Humans are thought to be the unique natural reservoir for B. quintana, but this bacterium has also been isolated from captive-bred cynomolgus and rhesus macaques in other countries. However, no epidemiological studies of B. quintana have been conducted in wild macaques.

The aim of the present study was to investigate the prevalence of B. quintana in wild Japanese macaques. In addition, we evaluated the potential pathogenicity of monkey-derived B. quintana for humans.

Bartonella quintana was isolated from six (13.3%) of 45 wild-caught Japanese macaques. The genetic characteristics of the isolates were found to be different from other known B. quintana strains derived from humans and captive-bred macaques. Moreover, it was suggested that the Japanese macaque strain has the potential to infect and invade into the human erythrocytes.

研究分野：人獣共通感染症学

キーワード：Bartonella quintana ニホンザル 塹壕熱 MLST 赤血球

1. 研究開始当初の背景

近年、わが国では、野生動物が著しく増加したことにより、農・畜産業、文化遺産などへの被害、住居侵入や固有の生態系破壊、さらには野生動物による人身事故が日本各地で報告されるようになった。ニホンザルによる被害は深刻で、農作物被害の防止や餌付け等に端を発する人身事故が数多く報告されている。野生動物との軋轢を解消する目的で、野生ザルの個体数調整が一部の地域では積極的に展開されている。環境省の鳥獣関係統計によると、平成 22 年度には約 2 万頭ものニホンザルが捕獲されていることから、ヒトは野生ザルと接触する可能性も想定される。

哺乳動物の中でも、サルは遺伝的背景がヒトと最も近似していることから、共通の感染症に罹患しやすい。諸外国では、野生ザルが B ウイルス病や結核などといったヒトに重篤な症状を引き起こす人獣共通感染症の病原体を保有している。さらに、一部の地域では、サルを感染源とするエボラ出血熱の発生も認められている。これらの理由から、サルを対象とした人獣共通感染症の疫学研究は公衆衛生上、極めて重要である。

猫ひっかき病に代表されるバルトネラ症は、*Bartonella* を病原体とする細菌性感染症である。本菌は、哺乳類の血管内皮細胞に感染・増殖した後、赤血球内に持続感染する。ヒトに対して病原性を有する *Bartonella* は少なくとも 13 菌種 2 亜種が報告されており、そのうち *B. quintana* はヒトを唯一の自然宿主とする *Bartonella* 種である。*B. quintana* は第一次・二次世界大戦時に、欧州において兵士内に流行した塹壕熱の病原体である。現在では、欧米や日本の都市部において、主に路上生活者から検出されており、都市型塹壕熱の病原体として認知されている。

一般的に、*Bartonella* は自然宿主の哺乳動物種に対して病原性を有さないと考えられている。猫ひっかき病の原因菌である *B. henselae* を保有するネコは、外見上、異常がみられず、症状を示さない。しかしながら、ヒトは *B. quintana* の自然宿主であるにもかかわらず、本菌種に感染した場合、発熱や心内膜炎などの症状を引き起こすといった大きな矛盾を抱えている。

これまでに、海外では飼育ザルを対象とした *Bartonella* の疫学研究が行われている。ベトナムから米国に輸入された飼育下のカニクイザル、中国の実験動物施設内で飼育されていたアカゲザルとカニクイザルから、それぞれ *B. quintana* が分離されている。これらの結果から、ヒト以外の動物種も *B. quintana* を保有する可能性が初めて示された。さらに、飼育アカゲザル由来の *B. quintana* の全ゲノム解析によって、アカゲザル由来株とヒト由来株の遺伝子性状は、類似していることが明らかとなっている。以上から、ヒトと同様にサルも本菌の自然宿主である可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

近年の研究結果により、サルも本菌の自然宿主である可能性が示されている。しかしながら、先行研究は以下の 2 つの問題を抱えている。

- ・飼育ザルを用いたため、偶発的に「ヒトサル」へ *B. quintana* が伝播した可能性
- ・サル由来 *B. quintana* のヒトに対する病原性が不明

そこで本研究では、(1) および (2) をそれぞれ研究目的とした。

(1) 野生のニホンザルにおける *B. quintana* の保有状況と分離株のゲノム性状から、*B. quintana* の自然宿主を検討するとともに、サルと *B. quintana* の共進化を解明する。

(2) 野生のニホンザルから分離されたサル由来 *B. quintana* のヒトに対する感染性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 野生ニホンザルにおける *B. quintana* の保有状況と自然宿主の解明

実験材料：2011 年 7 月～2014 年 4 月にかけて、青森・山形・和歌山県に生息する野生のニホンザル 45 検体を捕獲し、血液を採取した。ニホンザルの捕獲地域と検体数は、青森県で 25 検体、山形県で 5 検体、和歌山県で 15 検体であった。採血時、いずれのニホンザルにも臨床的に異常な所見は確認されなかった。各血液試料は日本大学生物資源科学部獣医学科 獣医公衆衛生学研究室に輸送し、分離培養まで -70℃ で保存した。

血液からの *Bartonella* の分離培養：冷凍保存していた血液は、室温で解凍した後、遠心分離した。約 100 μl の上清を取り除き、残った沈査に *Bartonella* 分離用 Medium 199 を 100 μl 加えて攪拌した後、2 枚の 5% 兔血液加チョコレート寒天培地に塗抹し、35℃・5%CO₂ の気相で 1 カ月間培養した。*Bartonella* を疑うコロニーは、1 検体について 5 株ずつ釣菌し、分離培養と同様の条件下で純培養した。*Bartonella* 様の細菌が分離された血液については、定量培養を行い、培地上のコロニー数から陽性個体ごとに血中菌数を算出した。

PCR と DNA シーケンスによる菌種同定：

各分離株から市販の DNA 抽出キットを用いて、DNA を抽出した。*Bartonella* のハウスキーピング遺伝子であるクエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*) と RNA ポリメラーゼ サブユニット蛋白遺伝子 (*rpoB*) 領域、16S-23S rRNA 遺伝子間 (ITS) 領域をそれぞれ標的とした PCR を行い、電気泳動によって増幅バンドのサイズを確認した。*Bartonella* の遺伝子と確認された株については、各 PCR 産物の塩基配列を DNA シーケンスによって決定し、既存の *Bartonella* 種と比較した。

Multi-Locus Sequence Typing (MLST) 法による分離株の Sequence Type (ST) の決定: *B. quintana* を保有していることが確認された各個体から代表株を 1 株ずつ選抜し (計 6 株), 9 つのハウスキーピング遺伝子領域を用いて型別する MLST 法を行った。すなわち, 各代表株から抽出した DNA を鋳型とし *atpF*, *bqtR*, *ftsZ*, *gap*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribE*, および *rpoB* の計 9 つの遺伝子領域をそれぞれ増幅する *B. quintana* の MLST 用プライマーを用いて, PCR を行った。各領域の PCR 産物の塩基配列は DNA シーケンスによって決定し, Clustal W によって領域ごとに整列および編集した。ニホンザル由来の代表株 (6 株) と既報のヒト由来株 (STs 1~7), カニクイザル由来株 (STs 8~14), アカゲザル由来株 (STs 15~21) の各領域における塩基配列を比較した。各領域の塩基配列を基に, それぞれ遺伝子型の番号を付与し, その組み合わせによってニホンザル由来株の ST を決定した。

連結配列に基づく系統解析
ST の決定に使用した 9 領域の連結配列 (4,270bp) に基づく系統解析は, Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 6 (MEGA6) 内の最尤法, Tamura 3-parameter モデルを用いて行った。本解析には, ニホンザル由来株と既報のヒト (STs 1~7) およびサル由来 *B. quintana* 株 (STs 8~21) を用いて系統関係を検討した。

eBURST による集団遺伝学的解析
遺伝子解析ソフトウェア eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net>) を用いて, ニホンザル由来株と既報のヒト (STs 1~7), カニクイザル (STs 8~14) およびアカゲザル (STs 15~21) 由来の *B. quintana* 株の集団遺伝学的な関連性を検討した。ヒトおよびサル由来株の ST ならびに各 ST を構成する 9 領域の遺伝子型番号を eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net>) にそれぞれ入力し, 9 領域のうち, 8 領域の遺伝子型番号が一致した場合, Clonal Complex (CC) と定義した。さらに, 9 領域のうち, 7 領域以上の遺伝子型番号が一致した場合, 近縁な ST 系統 (Lineage) と定義した。

(2) サル由来 *B. quintana* のヒト赤血球に対する感染性の評価

実験材料: 本研究に用いたサル由来株は, 2012年6月に和歌山県で捕獲したニホンザル由来の *B. quintana* MF1-1 株とした。5% 兔血液加チヨコレート寒天培地に MF1-1 株を塗抹し, 35 °C・5%CO₂ 条件下で 10 日間培養した後, PBS によって菌液を調整した。

ヒト赤血球は, 健常者 (男性・A 型) から無菌的に採取した血液を基にした。血液は, 凝固処置を施した後, 遠心分離し, 血清を除去した。取り除いた血清と同量の Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) を加え, 再

び遠心洗浄した後, 上清を除去し, 血球を HBSS で懸濁した。10ml シリンジを用いて血球懸濁液を吸引し, PLASMODIPUR (EuroProxima 社, オランダ) によって赤血球を単離し, これを感染実験用のヒト赤血球とした。

接種菌とヒト赤血球の蛍光染色ならびに細胞数の調整: 接種菌の蛍光染色は, Carboxyfluorescein diacetatesuccinimidyl ester (CFSE; Invitrogen 社, USA) を用いて, 添付のプロトコルに従い行った。すなわち, PBS で $7.0 \sim 8.0 \times 10^7$ CFU/ml 程度に調整した菌液に CFSE を加え, 遮光・静置し, 蛍光染色した。染色済みの菌液は, 5%FBS 加 PBS を加え, 染色反応を停止した後, 遠心洗浄した。上清を除去し, 菌の沈渣に 10%ヒト血清加 F12 medium を加え, 波長 600nm で吸光度を測定し, 菌数が $7.0 \sim 8.0 \times 10^7$ CFU/ml になるよう調整した。

赤血球の蛍光染色は, PKH26 (SIGMA 社, USA) を用いて, 添付のプロトコルに従い行った。赤血球数は, 血球計算板を用いて, $6.4 \sim 8.5 \times 10^7$ cell/ml になるよう調整した。

なお, 蛍光顕微鏡による観察時には染色済みの菌と赤血球, フローサイトメトリー解析には, 染色済みの菌と未染色の赤血球, 透過型電子顕微鏡解析には, 未染色の菌と赤血球をそれぞれ用いた。

蛍光顕微鏡による感染赤血球の観察

染色済みのヒト赤血球は, 12 穴プレートに $6.4 \sim 8.5 \times 10^6$ 個となるように播種した。Multiplicity of infection (MOI: 多重感染度) = 1.0 となるように染色済みの菌液を各ウェルに加え, 35 °C・5%CO₂ 条件下で 24 および 48 時間共培養し, 蛍光顕微鏡によって感染赤血球を観察した。

フローサイトメトリー解析による感染赤血球率の検討

共培養 48 時間後に各ウェルから感染溶液を回収し, 遠心洗浄によって感染しなかった菌をヒト赤血球から除去した。同様の操作を 3 回繰り返した後, 感染赤血球を PBS に懸濁し, フローサイトメーター FACScanto (Becton Dickinson Biosciences 社, USA) によって感染赤血球の割合 (%) を測定した。

透過型電子顕微鏡解析による感染赤血球の観察

共培養 48 時間・MOI = 1.0 の条件下でサル由来 *B. quintana* を感染させた赤血球を対象に, 透過型電子顕微鏡によって細胞内を観察した。

4. 研究成果

(1) 野生ニホンザルにおける *B. quintana* の保有状況と自然宿主の解明

分離培養法による野生ニホンザルの *Bartonella* 陽性率と菌血症レベル

ニホンザル 45 検体のうち、6 検体 (13.3%) から *Bartonella* が分離された。捕獲地域別の陽性率は、青森県で 4.0% (1/25)、山形県で 20.0% (1/5)、和歌山県で 26.7% (4/15) となった。いずれの陽性個体においても異常な所見は確認されなかった。定量培養の結果、3 検体の血中菌数は 10^3 CFU/ml 以上であった。

分離株の菌種同定

培養陽性となった 6 検体から計 30 株を回収し、*gltA*、*rpoB* および ITS 各領域の塩基配列を決定した。各陽性個体から分離された 5 株は、それぞれ同一個体由来の株間で、3 領域全てにおいて同一配列であったため、各個体から代表の 6 株を選抜し、以後の遺伝子解析に用いた。ニホンザル由来株と飼育アカゲザル由来の *B. quintana* RM-11 株の相同性は、*gltA* 領域で 100%、*rpoB* 領域で 100%、ITS 領域で 99.5% であった。この結果から、ニホンザル由来株は *B. quintana* と同定された。

MLST 法によるニホンザル由来株の ST の決定

各陽性個体から選抜した代表の 6 株について、MLST 法により ST を決定したところ、全ての株が解析領域 9 つにおいて同一配列であった。さらに、ニホンザル由来株は既報の STs 1~21 と異なっていたことから、新規の ST22 に型別された。

連結配列に基づく系統解析

9 つのハウスキーピング遺伝子領域の連結配列に基づく系統解析の結果、ヒト由来株の STs 1~7、カニクイザル由来株の STs 9~14、アカゲザル由来株の ST (STs 15~21)、ニホンザル由来株の ST22 でそれぞれ構成される 4 つのクラスターに分類された (図 1)。

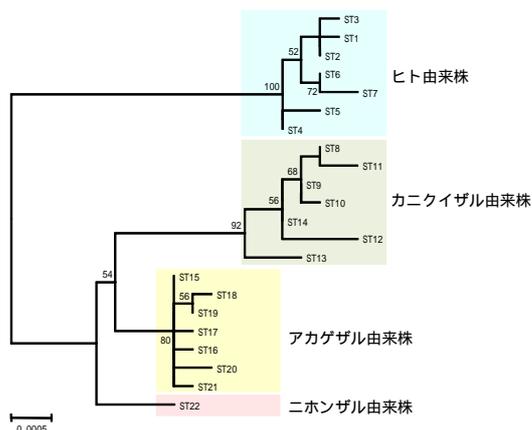


図1. 連結配列に基づく系統解析

eBURST による集団遺伝学的解析

eBURST により解析した結果、CC は 4 つ形成された (図 2)。それぞれ CC 1 と 2 がヒト、CC 3 はカニクイザル、CC 4 がアカゲザル由来株の ST のみで構成された。

各 CC を構成する ST のうち、いずれかの ST と 7 領域以上の遺伝子型番号が一致した場合で系統化すると、ヒト由来株の STs 1~7、カニクイザル由来株の STs 8~14、アカゲザル由来株の STs 15~21 の 3 つの Lineage (円枠) が形成された。さらに、ニホンザル由来株の ST22 はいずれの Lineage にも含まれず、ニホンザル独自の ST であった。

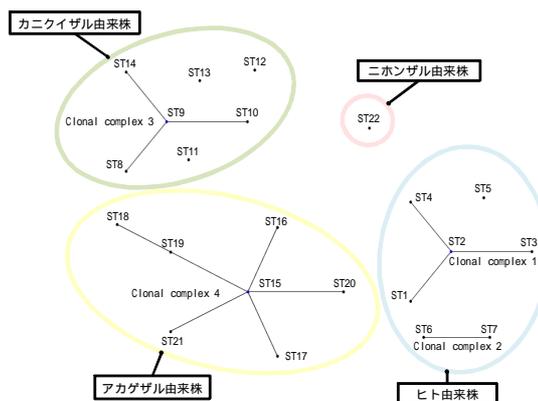


図2. eBURSTによる集団遺伝学的解析

(1) の および の成績により、わが国の野生ニホンザルには *B. quintana* が分布し、いずれの個体も臨床症状を示していなかったことから、ニホンザルは *B. quintana* の自然宿主であることが明らかとなった。 の成績により、検討した三県に棲息するニホンザルは遺伝的に均一な *B. quintana* を保有していることが明らかとなった。 および の成績によって、ヒトやサルの種類毎に独自の遺伝子性状を有する *B. quintana* が分布していると考えられたことから、*B. quintana* は宿主動物の種毎に共進化している可能性が示された。

なお、本研究は学術雑誌ならびに学会にて発表済みである。

(2) サル由来 *B. quintana* のヒト赤血球に対する感染性の評価

蛍光顕微鏡による感染赤血球の観察

共培養 24 時間後から、菌の存在を示す緑色蛍光が一部のヒト赤血球上に確認された (図 3)。緑色は CFSE で染色されたサル由来 *B. quintana* の菌体を、赤色は PKH で染色されたヒト赤血球をそれぞれ示す。

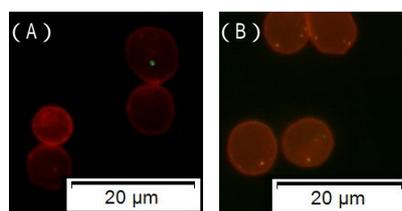


図3. 共培養24時間 (A) および48時間後の感染赤血球

フローサイトメトリ 解析による感染赤

血球率の検討

サル由来 *B. quintana* とヒト赤血球を共培養し、48 時間後にフローサイトメトリによって解析した結果、感染赤血球の割合は MOI=1.0 では 6.9% となり、菌を加えていないヒト赤血球では 0% であった。

透過型電子顕微鏡解析による感染赤血球の観察

共培養 48 時間・MOI = 1.0 の条件下では、サル由来 *B. quintana* はヒト赤血球内に侵入していることが明らかとなった。

(2) の ~ の成績によって、サル由来 *B. quintana* は *in vitro* においてヒト赤血球への接着・侵入能を有する可能性が示唆された。現在、追試験によって本成績の再現性を確認しているとともに、学术论文についても投稿準備中である。また、MF1-1 株の全ゲノム解析が終了しており、既報の *B. quintana* 株と比較解析中である。

本課題の研究では、*B. quintana* が野生のサル集団内に分布していることを明らかにすることができた。野生動物における *B. quintana* の生態解明に向けて、本成果はその一助になると考えられる。また、再現性を確認中ではあるものの、サル由来 *B. quintana* のヒトへの感染性を *in vitro* において評価できたことは、塹壕熱をサル由来人獣共通感染症の 1 つとして考慮するための基礎的研究になると考えられる。

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 1 件)

Sato, S., Kabeya H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, H. B., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S. *Emerging Infectious Diseases*, 査読有, Vol. 21, No. 12, 2015, pp. 2168-2170. DOI: 10.3201/eid2112.150632.

〔学会発表〕(計 4 件)

丸山総一, 佐藤真伍. わが国の野生動物が保有する *Bartonella*. 第 12 回日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2016 年 2 月 19 - 21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Sato, S., Kabeya, H., Yoshino, A., Sekine, W., Suzuki, K., Tamate, B. H., Yamazaki, S., Chomel, B. B., and Maruyama, S. Japanese macaques (*Macaca fuscata*) as a new natural reservoir of *Bartonella quintana*, the causative agent of trench fever. Third International Congress on Pathogens at the Human-Animal Interface, August 6-8, 2015, Chiangmai, Thailand.

佐藤真伍, 壁谷英則, 鈴木和男, 東 英生, 榑引道彦, 松岡史朗, 山崎翔気, 玉手英利, 丸山総一. わが国の野生ニホンザルの *Bartonella quintana* 保有状況と分離株の遺伝子解析. 平成 26 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会, 2015 年 2 月 13-15 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

佐藤真伍, 壁谷英則, 吉野愛香, 関根 涉, 鈴木和男, 東 英生, 榑引道彦, 松岡史朗, 山崎翔気, 玉手英利, 丸山総一. わが国の野生ニホンザルの *Bartonella quintana* 保有状況と分離株の遺伝子解析. 第 157 回日本獣医学学会学術集会, 2014 年 9 月 9 - 12 日, 北海道大学 (北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 真伍 (SATO, Shingo)
日本大学・生物資源科学部・助手
研究者番号: 60708593

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

丸山 総一 (MARUYAMA, Soichi)
壁谷 英則 (KABEYA, Hidenori)
鈴木 和男 (SUZUKI, Kazuo)
玉手 英利 (TAMATE, Hidetoshi)
山崎 翔気 (YAMAZAKI, Shouki)
Bruno B. CHOMEL