

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580429

研究課題名(和文) 野生動物における病原性 *Bartonella* 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 pathogenic *Bartonella* species in wildlife

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：わが国の野生鹿の57.8% (26/45)は少なくとも2種の *Bartonella* 属菌を保有しており、その水平伝播にはシラミバエが関与していることが示された。ニホンアナグマおよびテンの各1頭から分離された株は、それぞれ *B. clarridgeiae* および *B. washoensis* と近縁であったが、遺伝子系統解析では、各動物に固有の *Bartonella* 属菌であると考えられた。沖縄県のマングースの15.9% (10/63)、千葉県のパルマシビンの3.8% (1/26) から初めて *Bartonella henselae* が分離されたことから、両動物種は猫ひっかき病の新たな感染源となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It was found that 57.8% (26/45) of wild deer in Japan harbor at least two *Bartonella* species in their blood. It is suggested that deer keds contribute in the transmission of the *Bartonella* species because of high prevalence of *Bartonella*. *Bartonella* bacteria were isolated from one Japanese badger (6.7%) and from one Japanese marten (12.5%). The sequence analysis indicated that the isolate derived from the Japanese badger (strain JB-15) can represent a novel *Bartonella* species and the isolate from the Japanese marten (strain JM-1) was closely related to *Bartonella washoensis*. This is the first report on isolation of *Bartonella* from badger and marten. *Bartonella henselae* was isolated from 15.9% (10/63) of captive wild mongooses in Okinawa and 3.8% (1/26) of masked palm civets in Chiba Prefecture, respectively. It is suggested that both animal species may serve as a source of infection for cat-scratch disease.

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 獣医学 パルトネラ 野生動物 生態

1 . 研究開始当初の背景

近年、人獣共通感染症の起因菌として注目を集めている *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ある。人や動物の本菌の感染は、動物の咬傷・搔傷(猫ひっかき病)やベクターである吸血性節足昆虫(シラミ、ノミ、サシバエ等)によって成立する。現在、野生動物を自然病原巣とする病原性 *Bartonella* は 9 種 2 亜種が知られており、申請者は日本、タイ、台湾の猫や野鼠が病原性 *Bartonella* を保有していることを明らかにしてきた。一方、欧米ではペット、家畜(羊)、種々の野生動物が種々の病原性 *Bartonella* を保有し、人の感染事例も多数報告されている。さらに、マダニやシラミバエが動物間で病原性 *Bartonella* を媒介する新たなベクターとして疑われており、自然界では複雑な伝播様式によって病原性 *Bartonella* が維持されていると考えられる。しかしながら、野鼠を除き、わが国の野生動物における病原性 *Bartonella* の生態とベクターに関しては不明な部分が多く、人の感染リスクの評価を行う上で支障をきたしている。申請者は世界各国の野鼠から分離した *Bartonella grahamii* を用いて系統解析を行った結果、分離株は日本、韓国および中国由来株からなるアジア系統と、英国・ロシア・スウェーデン・カナダおよび米国由来株からなるアメリカ・ヨーロッパ系統に大別されること、日本由来株は極東ロシア系統および韓国・中国系統の 2 つのサブ系統に分類されたことから、わが国の野鼠に分布する *B. grahamii* には、異なる地域から移入したと思われる 2 つの系統が存在することを明らかにした。このように、病原性 *Bartonella* の遺伝的多様性からその生態を解明することは、本症の疫学を知る上で極めて有用な方法であることを立証している。したがって、わが国の野生動物に分布する病原性 *Bartonella* の生態を解明することは、世界各地で発生している人のバルトネラ症の感染リスクを評価する上でも極めて重要であると考えられる。

2 . 研究の目的

本研究では、これまでに申請者が構築してきた国内および国際共同研究体制を活用し、野生動物とその外部寄生虫(マダニ・シラミバエ等)を研究対象として、わが国における病原性 *Bartonella* の生態を、細菌学的・分子生物学的手法を用いて総合的に研究・解明することを目的とする。

3 . 研究の方法

日本各地において、さまざまな野生動物から血液材料とダニ等の外部寄生虫を採材し、それらから *Bartonella* 属菌を分離するとともに、分離株の細菌学的性状・形

態学的特徴・生化学性状および分子生物学的性状、病原性 *Bartonella* の生態学的特性を明らかにする。

(1) 血液材料

鹿: 北海道・奈良県・和歌山県で捕獲された野生鹿(エゾシカ 19 頭とホンシュウシカ 26 頭)、宮城県・愛知県の飼養鹿(ホンシュウシカ 27 頭)から血液を、奈良県の野生鹿からマダニ 33 匹とシラミバエ 10 匹を採取した。

野生イヌ亜目: 北海道ならびに和歌山県において 1,205 頭(アライグマ 1,008 頭、タヌキ 171 頭、ニホンアナグマ 15 頭、テン 8 頭、ニホンイタチ 2 頭、チョウセンイタチ 1 頭)から血液を採取した。

野生猫亜目: 沖縄県のマングース 63 頭と千葉・神奈川県のパウチネコ 50 頭から血液を採取した。採取した各血液は EDTA 管に入れ凝固防止した後、分離まで -80 で保存した。

(2) 分離培養法

各野生動物の血液は、室温で解凍後、溶血液の約 100 μ l を 5%ウサギ血液加 Heart Infusion Agar に塗沫し、35、5%CO₂ 下で 4 週間培養した。

分離株は、コロニー形態、発育日数ならびにグラム染色性(陰性)から *Bartonella* 属菌と推定した。

(3) 菌種の同定ならびに遺伝子系統解析

鹿分離株: 分離株と既存種の *gltA* 領域の塩基配列から系統解析を行い、菌種を推定した。また、同領域の PCR 法により、マダニとシラミバエの体内における *Bartonella* 属菌の DNA を検出した。

野生イヌ亜目分離株: 分離株と既存種の *gltA* および *rpoB* 遺伝子領域を標的とした PCR 法により *Bartonella* 属菌と同定した。さらに 16S rRNA、*ftsZ*、*groEL*、*ribC* 遺伝子領域を加えた 6 遺伝子領域を連結した塩基配列による系統解析を行い、菌種を推定した。

野生ネコ亜目分離株: 分離株と既存種のハウスキーピング遺伝子(16S rRNA、*ftsZ*、*gltA*、*groEL*、*ribC*、*rpoB*)の塩基配列を解析して BLAST 検索を行い、最も近縁な *Bartonella* 属菌種との相同性から菌種を同定した。さらに、9 つの遺伝子間領域を用いた Multispacer typing (MST) 法によって分離株、猫ひっかき病(CSD)患者由来株、ならびに沖縄、千葉、神奈川、東京のネコ由来株を型別し、その病原的意義の解明を試みた。

4 . 研究成果

(1) 鹿: 野生鹿の 57.8% (26/45 検体)、マダニの 3% (1/33 検体)、シラミバエの 90% (9/10)から *Bartonella* 属菌が分離された。PCR 法による *Bartonella* DNA の保有率は、マダニで 0% (0/33)、シラミバエ

で 100% (10/10)であった。

gltA 領域に基づく系統解析の結果、分離株は *B. capreoli* と同一 (系統)または独立した 2 つのクレード (系統 I, 系統 II) を形成した (図 1)。さらに、マダニ分離株の遺伝子型は寄生していた鹿の株と同一の遺伝子型であったが、シラミバエ分離株では異なっていた。

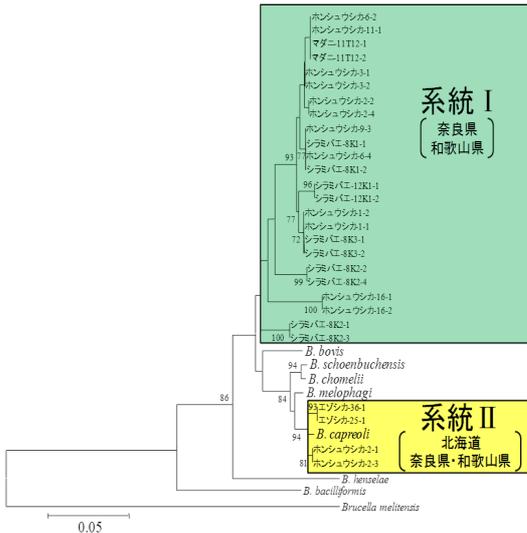


図 1. *gltA* 領域に基づいた系統解析

系統 : 既存種とは独立したクレードを形成
系統 : *B. capreoli* とともにクレードを形成

(2) 野生イヌ亜目: ニホンアナグマの 1 頭 (1/15) およびテンの 1 頭 (1/8) からそれぞれ初めて *Bartonella* 属菌が分離された。一方、アライグマ、タヌキ、ニホンイタチ、チョウセンイタチからは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。*gltA* および *rpoB* 遺伝子領域の相同性解析では、ニホンアナグマ分離株は *B. clarridgeiae* と最も高い相同性を示し、それぞれ 96.5%、95.6% であった。テン分離株は *B. washoensis* と最も高い相同性を示し、両遺伝子領域の相同性はそれぞれ 97.1%、93.8% であった。また、6 遺伝子領域の連結配列から作成した系統樹では、両分離株は既存種とは異なるクラスターを形成し、各クラスターは高いブートストラップ値 (100%) で支持された (図 2)。



図 2. 6 遺伝子領域に基づいたテンおよびアナグマ分離株の系統解析

各動物の血液から抽出した DNA を用いた PCR 法では、アライグマの 1 頭 (0.1%; 1/1,008)、タヌキの 14 頭 (8.2%; 14/171)、ニホンアナグマの 1 頭 (6.7%; 1/15)、テンの 1 頭 (12.5%; 1/8)、から *Bartonella* 属菌の DNA が検出された。系統解析の結果、検出された DNA は、既存の病原性 *Bartonella* と近縁種であった。

(3) 野生ネコ亜目: 沖縄県のマングースの 15.9% (10/63) および千葉県のパクビシンの 3.8% (1/26) から *Bartonella* 属菌が分離されたが、2 種のヤマネコから *Bartonella* 属菌は分離されなかった。

マングース・ハクビシンの血中菌数はそれぞれ $3.0 \times 10^1 \sim 8.9 \times 10^3$ CFU/ml、 7.0×10^3 CFU/ml であったにもかかわらず、無症状であった。マングース・ハクビシンから分離された 11 株について、6 つのハウスキーピング遺伝子の BLAST 検索を行ったところ、各分離株は *Bartonella henselae* と最も高い相同性 (相同性値; 99.6 ~ 100%) を示し、*B. henselae* と同定された。

MST 法の結果、マングース由来の 10 株およびハクビシン由来の 1 株は 5 つの MST 型 (MST 8, 14, 37, 58, 59) に分類され、全てが CSD 患者株と同じ系統に属した。また、マングースから分離された 10 株のうち、2 株 (MST58) は沖縄のネコ由来の 2 株と、2 株 (MST14) は CSD 患者由来の 8 株とそれぞれ同じ MST 型であった。一方、ハクビシン由来の 1 株は新規の MST 型 (MST59) であった (図 3)。

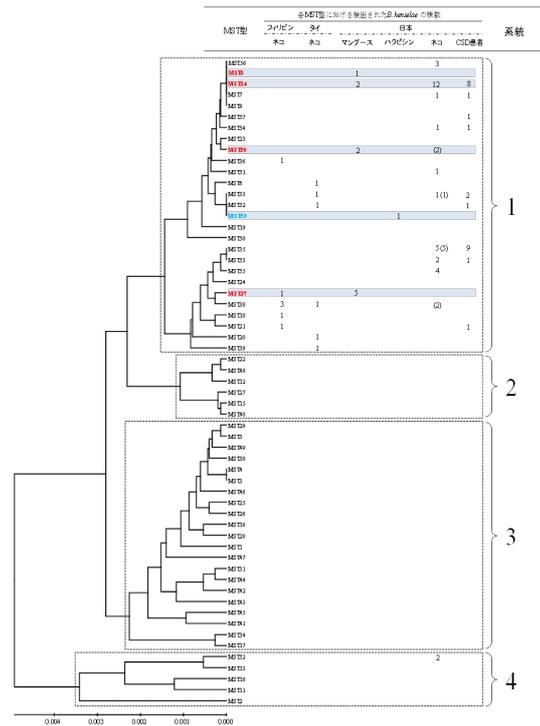


図 3. 猫、CSD 患者、マングースならびにハクビシン分離株の MST 型

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 13 件)

1. Bai, Y., Malania, L., Alvarez Castillo, D., Moran, D., Boonmar, S., Chanlun, A., Suksawat, F., Maruyama, S., Knobel, D., and Kosoy, M. 2013. Global distribution of *Bartonella* infections in domestic bovine and characterization of *Bartonella bovis* strains using multi-locus sequence typing. Plos One. 8(11): e80894. (査読有り)
2. Sato, S., Kabeya, H., Shigematsu Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., and Maruyama, S. 2013. Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of *Bartonella henselae* and potential sources of infection for humans. Clin. Microb. Infect. 19:1181-1187. (査読有り)
3. Tateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A. and Endo, Y. 2013. Molecular epidemiological survey of *Bartonella*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. J. Wildl. Dis. 49(3): 646-652. (査読有り)
4. Sato, S., Kabeya, H., Fujinaga, Y., Inoue, K., Une, Y., Yoshikawa, Y., and Maruyama, S. 2013. *Bartonella jaculi* sp. nov., *Bartonella callosciuri* sp. nov., *Bartonella pachyuromydis* sp. nov., and *Bartonella acomydis* sp. nov. isolated from wild Rodentia. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 1734-1740. (査読有り)
5. Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Pedro P.V.P. Diniz, P.P.V.P. and Breitschwerdt, E. B. 2012. *Candidatus* *Bartonella merieuxii*, a potential new zoonotic *Bartonella* species in canids from Iraq. PLOS Neglected Tropical Diseases. 6(9): e1843. (査読有り)
6. Sato, S., Kabeya, H., Yamazaki, M., Takeno, S., Suzuki, K., Kobayashi, S., Souma, K., Masuko, T., Chomel, B. B., and Maruyama, S. 2012. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* species in sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. Com. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 35(6) : 575-581. (査読有り)
7. Sato, S., Kabeya, H., Miura, T., Suzuki, K., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., and Maruyama, S. 2012. Isolation and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from wild carnivores of the suborder *Caniformia* in Japan. Vet. Microbiol. 161(1-2): 130-136. (査読有り)
8. Murai, A., Maruyama, S., Nagata, M., and Yuki, M. 2012. Mastitis caused by *Mycobacterium kansasii* infection in a dog. Vet. Clin. Microbiol. 42(3): 377-381. (査読有り)
9. Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., Ohtsuka, M., Hongo, I., Fukata, T., Kabeya, H., Maruyama, S., and Hiramatsu. 2012. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. J. Clin. Microbiol. 50(6): 2152-2155. (査読有り)
10. Kabeya, H., Inoue, K., Izumi, Y., Morita, T., Imai, S., and Maruyama, S. 2011. *Bartonella* species in wild rodents and the infested fleas in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73(12): 1561-1567. (査読有り)
11. Pangjai, D., Maruyama, S., Boonmar, S., Petkanchanapong, W., Wootta, W., Sawanpanyalert, P. 2011. Seroprevalence of antibodies against *Bartonella henselae* infection in cats and dogs along the northern borders of Thailand. Thai J. Vet. Med. 41(1): 95-98. (査読有り)
12. 丸山総一 : 猫ひっかき病の感染源 . 獣医畜産新報 vol. 64 (7) : 539-543. 2011年 (7月) (査読無し)
13. 壁谷英則 , 丸山総一 : 鹿が保有する腸管出血性大腸菌 . 日本鹿研究第2号 : 15-19 , 2011年 (3月) (査読無し)

[学会発表](計 13 件)

1. 佐藤真伍, 壁谷英則, 重松幸典, 宇根有美, 南 正人, 村田浩一, 小倉 剛, 丸山総一 . わが国のマングースおよびハクビシンから分離された *Bartonella henselae* の遺伝子性状解析 . 第13回 人と動物の共通感染症研究会学術集会 (国立感染研, 2013年11月2日) .
2. 佐藤真伍, 武野侍那子, 壁谷英則, 大橋正孝, 大竹正剛, 丸山総一, わが国の鹿における *Bartonella* のベクターの検討 . 第156回日本獣医学会学術集会 (岐阜大学, 2013年9月21日) .
3. 有本千波, 根岸あかね, 佐藤真伍, 壁谷英則, 辻本 元, 遠藤泰之, 坂田義美, 市川康明, 丸山総一 . わが国の猫における *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* および *Chlamydia felis* DNA の検出状況 . 第156回日本獣医学会学術集会 (岐阜大学, 2013年9月21日) .
4. 藤永洋平, 國吉奏慧, 壁谷英則, 佐藤真伍, 市川康明, 丸山総一 . 犬, 猫とその外部寄生虫からの *Rickettsia* および

- Bartonella*の検出状況について．第156回日本獣医学会学術集会（岐阜大学，2013年9月21日）．
5. 吉野愛香，佐藤真伍，壁谷英則，鈴木和男，丸山総一．野生日本猿から分離された*Bartonella quintana*の遺伝子解析．第155回日本獣医学会学術集会（東京大学，2013年3月28日）
 6. 有馬奈公子，壁谷英則，丸山総一．*Bartonella elizabethae*感染マウスにおける菌血症動態と免疫応答の性差．第154回日本獣医学会学術集会（岩手大学，2012年9月16日）
 7. 佐藤真伍，壁谷英則，重松幸典，宇根由美，南 正人，村田浩一，小倉 剛，丸山総一．わが国のマンガースおよびハクビシンから分離された*Bartonella henselae*の遺伝子性状解析．第154回日本獣医学会学術集会（岩手大学，2012年9月16日）
 8. 立野守洋，西尾拓真，佐久間暢人，伊澤雅子，中西 希，浅利裕美子，岡村麻生，丸山総一，下川孝子，瀬戸口明日香，遠藤泰之．日本産ヤマネコにおける節足動物媒介性疾患の分子疫学調査．第154回日本獣医学会学術集会（岩手大学，2012年9月16日）
 9. 佐藤真伍，壁谷英則，山崎真梨，三浦達弥，武野侍那子，鈴木和男，泉對博，相馬幸作，増子孝義，小林信一，苺和宏明，Michael Kosoy，Ying Bai，丸山総一．わが国の野生動物に分布する*Bartonella*属菌について．第11回人と動物の共通感染症研究会学術集会（国立感染症研究所，2011年11月5日）
 10. 白川 唯，壁谷英則，佐藤真伍，尾田真也，小林信一，相馬幸作，増子孝義，藤田博己，丸山総一．わが国の鹿科動物とその外部寄生虫におけるリケッチアDNA保有状況．第152回日本獣医学会学術集会（大阪府立大学，2011年9月20日）
 11. 壁谷英則，田中麻菜世，丸山総一．猫，犬に寄生した猫ノミからの*Rickettsia felis*および*Bartonella*属菌の検出状況．第152回日本獣医学会学術集会（大阪府立大学，2011年9月20日）
 12. 佐藤真伍，壁谷英則，三浦達弥，鈴木和男，泉對博，苺和宏明，丸山総一．わが国の野生犬亜目から分離された*Bartonella*属菌の遺伝子性状．第152回日本獣医学会学術集会（大阪府立大学，2011年9月20日）
 13. 尾田真也，壁谷英則，横山栄二，平井晋一郎，黒木俊郎，小林信一，相馬幸作，増子孝義，丸山総一．わが国の鹿における志賀毒素産生大腸菌の保有状況について．第152回日本獣医学会学術集会（大阪府立大学，2011年9月19日）

〔図書〕（計7件）

1. 丸山総一：微生物の簡易迅速検査法，第10項 愛玩動物の感染症の簡易迅速診断，p597-604(総頁758)，株式会社テクノシステム，2013年．
2. 丸山総一：ペットからの感染症，トキソプラズマ症 - 小児科，54(1)；37-41(総頁144)，金原出版，2013年．
3. 丸山総一：小児疾患の診断治療基準（第4版），猫ひっかき病，p360-361(総頁957)，東京医学社，2012年．
4. 丸山総一：小動物の小児科（筒井敏彦監訳），Chapter 46 子犬と仔猫が関わる人獣共通感染症，p493-501(総頁521)，文永堂出版，2012年．
5. 丸山総一：獣疫学 第2版，感染症の疫学事例 <猫ひっかき病>，p135(総頁229)，近代出版，2011年．
6. 丸山総一：獣疫微生物学 第3版，滅菌と消毒，p369 - 371(総頁452)，文永堂出版，2011年．
7. 丸山総一：人獣共通感染症 改訂版，細菌性血管腫，猫ひっかき病，p200-206，野兎病 p313-317(総頁551) 医薬ジャーナル社，2011年．

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/57/0005692/profile.html>

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

野上 貞雄 (Nogami Sadao)
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：90172767