山口県内の飼猫からのバルトネラ属菌の 分離と分離株の分子疫学的解析

富田正章[†] 矢端順子 富永 潔 松村健道

山口県環境保健研究センター (〒753-0821 山口市葵2-5-67)

(2004年1月6日受付・2004年6月23日受理)

要 約

山口県内の飼猫の血液中におけるバルトネラ属菌の保菌状況を調査したところ、その15.8% (6/38) からバルトネラ属菌が分離された。菌が分離された6頭のうち、4頭は*Bartonella henselae*、1頭は*B. clarridgeiae*、また1頭は*B. henselae*と*B. clarridgeiae*の2菌種に混合感染していた。分離された*B. henselae*の5株の16S rRNA遺伝子型はすべてI型であった。また、流行する菌株のゲノムパターンをパルスフィールドゲル電気泳動法により解析したところ、*B. clarridgeiae*の2株は同じパターンであったが、*B. henselae*においては多様なゲノムの菌が分布していることが明らかとなった。——キーワード：*Bartonella clarridgeia*, *Bartonella henselae*, 猫, 猫ひっかき病。

日獣会誌 57, 663～666 (2004)

猫ひっかき病の原因である*Bartonella henselae* (*B. henselae*) は猫が主要な保菌動物であるが、日本における猫の保菌状況についてはMaruyamaら [9, 10] により報告されているにすぎない。それによると、関東地域の猫の保菌率は9.1% [10]、全国的な調査では、猫の平均保菌率は7.2%であるが東日本地域では低く、西日本地域では高いことが明らかにされている [9]。さらに、発育集落の形態が*B. henselae*と異なるとともに、べん毛を保有する*Bartonella clarridgeiae* (*B. clarridgeiae*) も猫ひっかき病の原因となることが報告された [6]。しかし、これまで山口県内の飼猫におけるバルトネラ属菌の保菌状況を調査した報告はない。

本研究では山口県内におけるバルトネラ属菌の分布の詳細を明らかにするため、飼猫の保菌調査と分離された菌株の分子疫学的解析を行った。

材 料 お よ び 方 法

血液：猫の血液は山口県内の5動物病院（光市，防府市，山口市，宇部市，長門市内）を受診した38頭から採血した。血液は採血管^{a)}に採取後凍結保存した。

分離培養：凍結した血液は室温で解凍した後、2枚の5%兎血液加ハートインフュージョン寒天培地に0.1mlずつ塗抹し、35℃、5%CO₂の条件で30日間培養した。

菌種の同定：培地上に発育した集落を5個鈎菌しそれ

ぞれについて、グラム染色とバルトネラ属菌に特異的なクエン酸合成酵素遺伝子および16S rRNA遺伝子についてPCR法による検出とその制限酵素切断パターン(Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))による菌種の同定を行った。クエン酸合成酵素遺伝子は、Normanら [11] の報告によるPCRとその制限酵素*Taq* IによるRFLP解析を行った。16S rRNA遺伝子については、Gurfieldら [4] の報告によるPCRと制限酵素*Dde* IによるRFLP解析を行った。

パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)：5%兎血液加ハートインフュージョン寒天培地で培養した菌体を、滅菌蒸留水200μlに浮遊させ等量の1.6%低融点アガロースと混合し、固化後lysis buffer (0.5M EDTA, 1% lauroyl sarcosine, 1mg/ml proteinase K, pH8.0) により、50℃、1夜処理した。ゲルはTE緩衝液 (pH8.0) で3回洗浄後0.5M EDTA (pH8.0) 中で冷蔵保存した。ゲルブロックは制限酵素*Sma* I 30Uで30℃5時間処理の後、1.2%アガロースゲルによりパルスタイム2秒～17秒 (6V/cm, 14℃, 0.5xTBE緩衝液, pH8.3) の条件で17時間泳動^{b)}後、エチジウムブロマイドで染色し、泳動像を観察した。

a) ヘモガードTMプラス, 日本ベクトン・ディッキンソン(株), 東京。

b) ジーンパスシステム, 日本バイオラッドラボラトリーズ(株), 東京。

[†] 連絡責任者：富田正章 (山口県環境保健研究センター)

〒753-0821 山口市葵2-5-67 ☎083-922-7630 FAX 083-922-7632

図1 PCR法による *Bartonella* 属菌クエン酸合成酵素遺伝子の検出 (A) とそのRFLP解析 (B)。

M: サイズマーカー, Houston-1: *B. henselae* 参考株, i6-1: *B. henselae* 参考株, Y02-57: *B. henselae* 分離株, Y02-64: *B. henselae* 分離株, Y02-102: *B. henselae* 分離株, Y02-105h: *B. henselae* 分離株, Y02-106: *B. henselae* 分離株, Y02-105c: *B. clarridgeiae* 分離株, Y02-130: *B. clarridgeiae* 分離株

***B. henselae* 16S rRNA 遺伝子の型別:** Bergmans ら [2] の方法により, *B. henselae* の 16S rRNA 遺伝子の型別を行った。

成 績

菌の分離: 被検血液の 15.8% (6/38) からバルトネラ属菌が分離された。菌の検出された 6 頭の内訳は雌 1 頭, 雄 5 頭であった。

菌種の同定: PCR 法によるクエン酸合成酵素遺伝子の検出と RFLP 解析によって, すべての分離株にバルトネラ属菌に特異的なクエン酸合成酵素遺伝子が検出された。それらの制限酵素 *Taq* I による断片像を図 1 に示す。6 頭のうち 1 頭から分離された株では 2 種類の切断パターンが認められた (図 1, レーン 105h, レーン 105c)。同様にすべての菌株に PCR 法によってバルトネ

図2 PCR法による *Bartonella* 属菌 16S rRNA 遺伝子の検出 (A) とそのRFLP解析 (B)。

M: サイズマーカー, Houston-1: *B. henselae* 参考株, i6-1: *B. henselae* 参考株, Y02-57: *B. henselae* 分離株, Y02-64: *B. henselae* 分離株, Y02-102: *B. henselae* 分離株, Y02-105h: *B. henselae* 分離株, Y02-106: *B. henselae* 分離株, Y02-105c: *B. clarridgeiae* 分離株, Y02-130: *B. clarridgeiae* 分離株

ラ属菌に特異的な 16S rRNA 遺伝子が検出され, それらの制限酵素 *Dde* I による RFLP 解析では 2 種類の切断パターンが認められた (図 2)。

これらの結果から, 4 頭は *B. henselae*, 1 頭は *B. clarridgeiae*, また 1 頭は *B. henselae* と *B. clarridgeiae* の 2 菌種に混合感染していると判定した。

***B. henselae* の 16S rRNA 遺伝子型:** 猫 5 頭の血液から分離された *B. henselae* の 16S rRNA 遺伝子型は, Bergmans らの分類による I 型であった。

PFGE による分離株の分子疫学的解析: *B. henselae* の分離株 5 株と参考株 2 株および *B. clarridgeiae* の分離株 2 株のゲノムについて制限酵素 *Sma* I を用いた PFGE 法による泳動像を示す (図 3)。 *B. henselae* では分子量 40kb~200kb の間に多くのバンドが観察されるときともに, 被験菌 7 株のゲノムにはいくつかの異なるバ

図3 *B. henselae* および *B. clarridgeiae* ゲノムのパルスフィールドゲル電気泳動法による解析像 (制限酵素 *Sma* I)。

M: サイズマーカー, Houston-1: *B. henselae* 参考株, i6-1: *B. henselae* 参考株, Y02-57: *B. henselae* 分離株, Y02-64: *B. henselae* 分離株, Y02-102: *B. henselae* 分離株, Y02-105h: *B. henselae* 分離株, Y02-106: *B. henselae* 分離株, Y02-105c: *B. clarridgeiae* 分離株, Y02-130: *B. clarridgeiae* 分離株

ターンがみられたが、参考株を含めて共通するパターンも認められた。いっぽう、*B. clarridgeiae* のゲノムパターンは、*B. henselae* の7株のものとは明らかに区別できるものであったが、*B. clarridgeiae* の2株の分離株は同じパターンを示し区別することができなかった。

考 察

山口県内の飼猫のバルトネラ属菌の感染状況を調査した結果、15.8% (6/38) の猫の血液から菌が分離された。バルトネラ属菌の猫の血液中における保菌率は、フランスで53% [5]、オランダで22% [2]、米国で39.5% [3] と報告者によりさまざまである。日本では Maruyama ら [10] が、初めて関東地域の猫の血液から *B. henselae* を分離し、その保菌率を9.1%と報告した。その後、全国的な調査を行い、猫におけるバルトネラ属菌の保菌率は全体としては7.2%であるが、地域的には西日本地域での保菌率が高く、北海道や東日本地域では低いことを明らかにした [9]。今回の調査によって山口県内の飼猫の保菌率は、Maruyama ら [9] の報告における大阪府や鹿児島県の猫の保菌率に近いものであった。

猫の *B. clarridgeiae* の保菌率について、Heller ら [5] はフランスで30%、Marston ら [7] はインドネシアで21%、Arvand ら [1] はドイツで0.6%と報告している。日本では、Maruyama ら [9] が0.87%の保菌率を報告している。また、*B. henselae* と *B. clarridgeiae* の猫における混合感染については、フランスでは1.1% [4]、日本では0.1% [9] と報告されている。今回の調査で、*B. clarridgeiae* は38頭中2頭から分離され、このうちの1頭は *B. henselae* との混合感染であった。わが国では *B. clarridgeiae* の分離例もきわめて少なく、保菌状況や、*B. henselae* との混合感染事例については今後の調査を積み重ねることにより正確な実態把握や地域的な特徴が解明できるものと考えられる。

Bergmans ら [2] は、*B. henselae* の16S rRNA 遺伝子には2種類の遺伝子型があり、流行の型は地域的に特徴があることを報告した。日本では Maruyama ら [9] が国内分離株44株のうち43株はI型であることを明らかにしている。今回分離された5株もすべてI型であった。これらのことから、日本で主として流行している *B. henselae* の16S rRNA 遺伝子型はI型が主要であると考えられる。

Maruyama ら [8, 9] は、日本における *B. henselae* の分離株を PFGE 法により解析した結果、多様なゲノムの菌が分布していることを明らかにした。私たちも、今回の分離株について PFGE 解析を行ったところ異なるゲノムの分布が明らかとなった。いっぽう、*B. clarridgeiae* の2株は Maruyama ら [9] の報告と同様に同じ泳動像であり PFGE 解析によりゲノムの差異を明らかにすることはできなかった。しかし、報告例は少ないものの、*B. clarridgeiae* も猫ひっかき病の原因となることから、本菌についての分子疫学的解析手法の確立が必要と考えられる。

日本では、バルトネラ属菌の人の感染症例や動物の保菌状況などの情報が乏しいため、今後、人獣共通感染症対策の観点から広域的な疫学的調査が必要であると考えられる。

本研究を実施するにあたり御助言および菌株の分与をいただいた日本大学生物資源科学部丸山総一博士に深謝する。

引 用 文 献

- [1] Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, C Wndt C: J Clin Microbiol, 39, 743-746 (2001)
- [2] Bergmans AMC, De Jong CMA, Amerongen GV, Schot CS, Schouls LM: J Clin Microbiol, 35, 2256-2261 (1997)
- [3] Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler J: J Clin Microbiol, 33, 2445-2450 (1995)
- [4] Gurfield AN, Boulouis H-J, Chomel BB, Heller R, Kasten RW, Yamamoto K, Piemont Y: J Clin Microbiol, 35, 2120-2123 (1997)

- [5] Heller R, Artois M, Xemar V, Briel DD, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y : J Clin Microbiol, 35, 1327-1331 (1997)
- [6] Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TL, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB : J Clin Microbiol, 35, 1813-1818 (1997)
- [7] Marston AM, Finkel B, Regnery RL, Winot IL, Graham RR, Wingnal S, Simanjuntak G, Olson JG : Clin Diag Lab Immunol, 6, 41-44 (1999)
- [8] Maruyama S, Kasten RW, Boulouis H-J, Gurfield NA, Katsube Y, Chomel BB : Vet Microbiol, 79, 337-349 (2001)
- [9] Maruyama S, Nakamura Y, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y : J Vet Med Sci, 62, 273-279 (2000)
- [10] Maruyama S, Nogami S, Inoue I, Namba S, Asanome K, Y Katsube Y : J Vet Med Sci, 58, 81-83 (1996)
- [11] Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, Krause DC : J Clin Microbiol, 33, 1797-1803 (1995)

Isolation and Characterization of *Bartonella* spp. from Domestic Cats
in Yamaguchi Prefecture, Japan

Masaaki TOMITA^{*†}, Junko YABATA, Kiyoshi TOMINAGA and Kendo MATSUMURA

** Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health, 2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan*

SUMMARY

Blood collected from 38 pet cats in Yamaguchi Prefecture was cultured for *Bartonella* species on rabbit-blood agar plates. Of the samples, 4 were positive for *B. henselae*, 1 for *B. clarridgeiae*, and 1 for both *B. henselae* and *B. clarridgeiae*. All of the *B. henselae* isolates belonged to type 1 of the 16S rRNA gene. Pulsed field gel electrophoresis analysis revealed genetic diversity among the *B. henselae* isolates but none for *B. clarridgeiae*.

— Key words : *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella henselae*, cat, cat-scratch disease.

† Correspondence to : Masaaki TOMITA (Yamaguchi Prefectural Research Institute of Public Health)

2-5-67 Aoi, Yamaguchi, 753-0821, Japan TEL 083-922-7630 FAX 083-922-7632

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 57, 663 ~ 666 (2004)

日本獣医公衆衛生学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎山本 茂貴 (国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部)
○高島 郁夫 (北海道大学大学院獣医学研究科)
金内 長司 (元・麻布大学獣医学部)
高島 浩介 (国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部)
津田 修治 (岩手大学農学部)
明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
今井 壯一 (日本獣医畜産大学獣医畜産学部)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)
月瀬 東 (日本大学生物資源科学部)
中澤 宗生 (動物衛生研究所安全性研究部)

(◎委員長, ○副委員長)

編集人 日本獣医公衆衛生学会
会長 品川 邦 汎

『* 投稿を希望される方は、学会誌投稿規程 (第56巻第12号) をご参照ください』