群馬県の猫および犬における *Bartonella* 保菌状況と 分離株の遺伝子多型性

高橋敏子^{1)†*} 久保雅敏²⁾ 鈴木宣夫¹⁾ 長井 章³⁾ 松本寿男⁴⁾
小林洋平⁵⁾ 森田幸雄⁶⁾ 丸山総一⁷⁾

- 1) 群馬県中央食肉衛生検査所 (〒370-1103 佐波郡玉村町桶越305-7)
- 2) 前橋保健福祉事務所 (〒371-0033 前橋市国領町2-21-22)
- 3) 群馬県北部食肉衛生検査所 (〒377-0021 渋川市金井2842-33)
- 4) 群馬県動物管理センター (〒378-0078 沼田市佐山町字前久保261-1)
- 5) 群馬県保健・福祉・食品局食品監視課 (〒371-8570 前橋市大手町1-1-1)
- 6) 群馬県新政策課 (〒371-8570 前橋市大手町1-1-1)
- 7) 日本大学生物資源科学部 (〒252-8510 藤沢市亀井野1866)

(2005年1月18日受付・2005年5月2日受理)

要 約

群馬県内の動物管理センターに収容されていた猫(収容猫)346頭(新生猫88頭を含む)と飼育猫84頭および収容犬72頭の*Bartonella*保菌状況を調査した。収容猫のうち新生猫88頭を除く258頭中11頭(4.3%)および飼育猫84頭中3頭(3.6%)から*Bartonella*属菌が検出されたが、新生猫88頭と収容犬72頭からは検出されなかった。収容猫11頭と飼育猫2頭からは*B. henselae*のみが分離され、飼育猫1頭からは*B. henselae*と*B. clarridgeiae*が分離された。*B. henselae*分離菌33株の16S rRNA型はすべてI型であった。また、その33株のDNAを制限酵素*Sma* Iおよび*Not* Iで切断後、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)パターンを系統樹解析を実施したところ、3クラスター(I, II, III)に類別され、群馬県には多様なゲノム遺伝子を有する菌が分布していることが判明した。また、新生猫からは、*Bartonella*属菌が分離されなかったことから、猫における本菌の垂直感染の可能性はきわめて少ないと思われた。

——キーワード：*Bartonella*, 猫, 系統樹解析, 犬, PFGE.

----- 日獣会誌 58, 697~702 (2005)

猫ひっかき病(Cat-scratch-disease: CSD)は1950年にフランスで初めて症例報告[3]された人と動物の共通感染症で、猫のひっかき傷や咬傷を受けた後に発症することが多い。おもな症状は受傷部位の付属リンパ節の腫脹や発熱であるが、非定型的な症状として、結膜炎、心内膜炎、脳炎なども報告されている。CSDの病原体は長い間不明であったが、1990年代になり、主要な病原体はグラム陰性、多形性短桿菌の*Bartonella henselae*であることが判明した[2, 4]。

*B. henselae*の抗体価や本菌の分離率は温暖な地域に生息する猫において高いことが報告されている[5, 8, 12]。また、本菌の猫間の伝播には猫ノミ(*Cteno-*

cephalides felis)の関与が報告されており、前述のような地域差は猫ノミの生息に有利な温暖な地域に感染猫が多いためと考えられている[5, 7]。

CSDはおもに猫から受傷して発症するが、近年、犬が感染源と考えられるCSDの症例やノミの刺咬が原因と思われる事例も報告されている[13]。このように、近年ペットとして人気の高い犬も猫とともに、CSDの重要な感染源となりうる。しかしながら、わが国では、Maruyamaら[5, 8], Uenoら[12], 富田ら[10, 11]により、日本全国の猫や山口県内の猫の*Bartonella*感染状況についての報告はあるものの、群馬県内における猫や犬の*Bartonella*感染状況は未解明である。そこで、

† 連絡責任者：高橋敏子(群馬県中央食肉衛生検査所)

〒370-1103 佐波郡玉村町桶越305-7 ☎0270-65-2135 FAX 0270-65-2869

* 現所属：高橋敏子(群馬県富岡保健福祉事務所)

〒370-2454 富岡市田島343-1 ☎0274-62-1541 FAX 0274-64-2397

表1 群馬県の猫および犬における *Bartonella* の検出状況

対 象	検体数	陽性数 (%)	地域別陽性率 (陽性数/検体数)			
			東 部	西 部	北 部	
収容猫 ¹⁾	3 カ月齢以上	258	11 (4.3) ²⁾	7.1 (3/42)	13.3 (4/30) ³⁾	2.2 (4/186) ³⁾
	新生猫 ⁴⁾	88	0 (0)	— ⁵⁾	—	0 (0/88)
飼育猫 ⁶⁾		84	3 (3.6) ²⁾	7.5 (3/40)	0 (0/22)	0 (0/22)
収容犬 ⁷⁾		72	0 (0)	0 (0/24)	0 (0/24)	0 (0/24)

1) 群馬県動物管理センターに搬入された猫。

2) 飼育猫で東部の1頭から *B. henselae* と *B. clarridgeiae* の2菌種が検出され、その他ではすべて *B. henselae* のみが検出された。

3) 西部と北部間で有意差 ($P=0.014$) あり。

4) 群馬県動物管理センターに搬入された生後1週間以内の猫。

5) 検査対象猫は存在せず。

6) 動物病院に来院した3カ月齢以上の猫。

7) 群馬県動物管理センターに搬入された3カ月齢以上と推定される犬。

本研究では群馬県内の猫および犬の *Bartonella* 保菌状況を調査するとともに、分離株のゲノム遺伝子性状を解析することによって、本県に分布する *Bartonella* の分子生物学的特徴を明らかにした。

材 料 お よ び 方 法

供試対象動物：平成7年3月～平成14年10月の間に、群馬県動物管理センターに収容された猫と犬および県内4カ所の動物病院に来院した猫を対象とした。収容猫は生後3カ月齢以上と推定される258頭（県東部地域由来42頭、西部由来30頭、北部由来186頭）および生後1週間以内の新生猫88頭（県北部地域由来）ならびに収容犬は生後3カ月齢以上と推定される72頭（東部地域由来24頭、西部由来24頭、北部由来24頭）であった。飼育猫は生後3カ月齢以上の猫84頭（県東部地域由来40頭、西部由来22頭、北部由来22頭）であった。なお、群馬県東部地域は伊勢崎市、太田市、館林市など、西部地域は高崎市、藤岡市、富岡市など、北部地域は渋川市、沼田市などであった。

菌の分離、同定、遺伝子多型性解析：各動物の血液1～2mlを真空採血管^{a)}に無菌的に採血し、菌分離まで-20℃で凍結保存した。菌の分離は凍結保存した血液を室温で解凍後、1,800Gで70分間遠心分離し、その沈渣にメディウム^{b)}を加え7%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地に塗抹した。これを35℃、5% CO₂条件下で3～4週間培養後、*Bartonella* 属菌が疑われる1～5集落を鈎菌し、7%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地で同様に純培養した。グラム染色でグラム陰性多形性桿菌 [7] であることを確認した後、クエン酸合成酵素遺伝子を標的としたPCR法で379bpに遺伝子増幅バンドが認められたものを *Bartonella* 属とした [9]。さらに、このPCR産物を制限酵素 *Taq* I と *Hha* I を用いた制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) 法で *B.*

henselae と *B. clarridgeiae* を同定した [8]。

分離された *Bartonella* はPCR法により16S rRNA遺伝子型別 [1] を行い、さらに、分離 *B. henselae* は、制限酵素 *Not* I および *Sma* I を用いたパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) によりゲノム遺伝子多型性解析を行った。PFGEのマーカー^{c)}を用い、泳動条件などはMaruyamaら [6] の方法に従った。各制限酵素で切断後のPFGE像は、PFGE像系統樹解析ソフトウェア^{d)}を用いたUPGMA法により解析した。

統計処理：それぞれの猫および犬からの *Bartonella* の分離率については χ^2 二乗検定 (Yatesの補正) またはFisherの直接確率法で有意差を求めた ($P<0.05$)。

成 績

***Bartonella* の分離状況 (表1)：**収容猫のうち、3カ月齢以上の258頭では、西部由来の4頭(4/30, 13.3%)、東部由来の3頭 (3/42, 7.1%)、北部由来の4頭 (4/186, 2.2%) の合計11頭 (11/258, 4.3%) から *Bartonella* が分離され、すべて *B. henselae* と同定された。飼育猫84頭では3頭 (3.6%) から *Bartonella* が分離され、これらはすべて東部由来 (3/40, 7.5%) であった。そのうち、1頭からは *B. henselae* と *B. clarridgeiae* の2菌種が、残り2頭からは *B. henselae* のみが分離された。動物管理センターに収容されていた新生猫88頭および収容犬72頭から *Bartonella* は分離されなかった。

西部および北部地域の3カ月齢以上の収容猫における保菌率間に有意差 (Fisherの直接確率法の P 値 = 0.014) が認められた。しかし、飼育猫では有意な地域差は認められなかった。調査対象猫のうち、飼育猫はすべて3カ

a) EDTA-2K, テルモ(株), 東京。

b) Medium 199, Gibco, U.S.A.

c) Lambda DNA Ladder, Cambrex, U.S.A

d) Lane Multi Screener Ver. 3, アトー, 東京。

表2 猫から分離された*B. henselae* 33株の遺伝子学的特徴

地 域	対 象	個体番号	菌株番号	遺伝子学的特徴	
				16S rRNA型	PFGE系統樹クラスター ¹⁾
西 部	収容猫	W-1	W-1-1	I	Ⅲ
			W-1-2	I	Ⅲ
			W-1-3	I	Ⅲ
	収容猫	W-2	W-2-1	I	Ⅲ
			W-2-2	I	Ⅲ
	収容猫	W-3	W-3-1	I	Ⅲ
			W-3-2	I	Ⅲ
			W-3-3	I	Ⅲ
			W-3-4	I	Ⅲ
	収容猫	E-1	E-1-1	I	I
			E-1-2	I	I
			E-1-3	I	I
東 部	収容猫	E-2	E-2-1	I	Ⅱ
			E-2-2	I	Ⅱ
			E-2-3	I	Ⅱ
			E-2-4	I	Ⅱ
	収容猫	E-3	E-3-1	I	Ⅱ
			E-3-2	I	Ⅱ
	飼育猫	E-11	E-11-1	I	I
			E-11-2	I	I
			E-11-3	I	I
			E-11-4	I	I
	飼育猫	E-12	E-12-1	I	Ⅱ
			E-12-2	I	Ⅱ
			E-12-3	I	Ⅱ
			E-12-4	I	Ⅱ
			E-12-5	I	Ⅱ
	飼育猫	E-13	E-13-1	I	Ⅱ
			E-13-2	I	Ⅱ
			E-13-3	I	Ⅱ
			E-13-4	I	Ⅱ
			E-13-5	I	Ⅱ
北 部	収容猫	N-1	N-1-1	I	I
			N-1-2	I	I
			N-1-3	I	I

1) 制限酵素*Not* I および*Sma* I のPFGE像を系統樹解析ソフトウェア^{e)}を用いたUPGMA法により解析した (図1 参照)。

月齢以上であったため、年齢別の差異は収容猫についてのみ検討した。その結果、保菌率の年齢 (3カ月齢以上と新生に区分) による差異は認められなかった。3カ月齢以上の猫について収容猫と飼育猫との保菌率を比較したが、有意差はなかった。また、収容猫と収容犬との間の保菌率にも有意差は認められなかった。

***B. henselae*分離株の遺伝子学的特徴 (表2, 図1, 図2):** *Bartonella* が分離された収容猫7頭 (東部由来3頭, 西部由来3頭, 北部由来1頭) および飼育猫3頭 (すべて東部由来) を任意に抽出し, それらの猫から分離された *B. henselae* 33株の16S rRNA型およびPFGEパターンを系統樹解析した。33株の *B. henselae* の16S rRNA型はすべてI型であった。また, 分離株は24のPFGEパターンを示し, 3つの大きなクラスターに分類

された。東部と北部由来の収容猫および東部由来の飼育猫の分離株はクラスターIとIIに, 西部由来の収容猫の分離株はすべてクラスターIIIに分類された。同一個体から分離された株は, 遺伝子多型性がみられたものの同じクラスターに分類された。

考 察

本調査によって群馬県の3カ月齢以上の収容猫4.3% (11/258) および飼育猫3.6% (3/84) が主として *B. henselae* を保菌していることが明らかになった。いっぽう, 今回の調査では新生猫および収容犬からは *Bartonella* は分離されなかった。わが国では1996年,

e) Lane Multi Screener Ver. 34, アトー, 東京。

図1 群馬県の猫から分離された *B. henselae* 株の系統樹

制限酵素 *Not* I あるいは *Sma* I により消化したDNAのPFGE電気泳動像をUPGMA法により解析した。

Maruyamaら [7] が、分離率9.1% (3/33) で、飼育猫から初めて *B. henselae* を分離した。後に同著者らの国内各地域の飼育猫を対象とした保菌状況調査 [8] では、調査各地を通しての *B. henselae* の平均検出率は7.2% (50/690) であったが、保菌率には地域差が認められ、北海道 (0% : 0/50) や宮城県 (0% : 0/50) の低温地域では低く、沖縄 (20.0% : 10/50) や鹿児島県 (12.0% : 6/50) の温暖な気候の地域では高い傾向があることが報告された。また、山口県における飼育猫の保菌調査 [10] では、15.8% (6/38) の保菌率であった。今回、群馬県の飼育猫の保菌率 (3.6%, 3/84) は Maruyama ら [8] が報告している神奈川県 (5.3% : 14/266) と新潟県 (2.0% : 1/49) の中間であった。このことは、一般的に群馬県は新潟県よりも温暖で神奈川県よりも寒冷な気候であることが原因のひとつと思われた。

これまで、日本における収容猫の保菌率の調査報告はなかったが、今回、3カ月齢以上の収容猫と飼育猫の保菌率の間に有意差は認められず、同様な *B. henselae* 保菌率であることが判明した。また、3カ月齢以上の収容猫では群馬県北部地域の猫の保菌率が西部地域の猫のそ

れと比べて有意に低かったが、その理由として、北部地域は冬季に多くの積雪があり、太平洋側気候である西部や東部地域に比べて年平均気温が2~3℃低いことなどが考えられる。したがって、群馬県における保菌率も気候の差が原因で変化すると推測された。さらに、新生猫から *Bartonella* が検出されなかったことから、本菌が猫において垂直感染する可能性はきわめて少ないと思われた。

本研究では、収容猫と飼育猫からは主として *B. henselae* が分離され、その16S rRNA型はすべてI型であった。また、*B. clarridgeiae* は東部由来の飼育猫1頭から分離されたにすぎず、しかもこの猫は *B. henselae* (16S rRNA型I型) との混合感染であった。過去のわが国の猫保菌率調査 [8, 10] においても、*B. henselae* の16S rRNA型はI型が主流であり、*B. clarridgeiae* の保菌率は0.9% (6/690) ~5.3% (2/38) と低いことが示されている。これらの成績ならびに本研究から、群馬県を含む日本の猫に感染している *B. henselae* は、16S rRNA型I型が主で、*B. clarridgeiae* の感染率は *B. henselae* に比べると低いものと考えられた。

群馬県の猫から分離された *B. henselae* 株のゲノム遺

図2 猫から分離された *B. henselae* 10 菌株の PFGE 電気泳動像

クラスター、菌株番号は表2、図1と同じ。同一猫から分離された菌株はすべて同一クラスターに属していたため3頭の猫から分離された菌株の電気泳動像を代表例として示した。同一クラスター内でも泳動パターンに差異があることが読みとれる。

伝子多型性を検討したところ、同一個体にはゲノム遺伝子パターンが異なる複数の株が存在したが、すべて同じクラスターに分類され、異なるクラスターに属する株に感染している個体は存在しなかった。Maruyamaら [6] および富田ら [10] は同一の猫に異なるゲノム遺伝子パターンを有する複数の株が感染していることを報告している。本研究においても、異なるゲノム遺伝子パターンを有する株が同一個体から分離されたが、そのパターンはクラスターを越える大きな変異がないことや、西部由来株のゲノム遺伝子パターンはクラスターⅢに、東部と北部由来株はクラスターⅠおよびⅡに分類され、地域特異性が認められた。これにより、群馬県内では猫が広汎に *B. henselae* に感染していることが明らかになった。なお、流行している菌のゲノム遺伝子は、地域によって異なることが示唆された。また、複数の遺伝子型の菌が混在して流行している地域のあることも明らかになった。

今回の調査で、犬からは *Bartonella* は分離されなかった。CSDはその名称が示すように猫を主要な病原巣としているが、近年、犬を感染源とする症例も報告されている [13]。今後、猫だけでなく、犬も含めた広範な動物の保菌調査や分離株の遺伝学的な性状を検討し、CSDの疫学における動物の役割を解明する必要があると思われる。

本研究を実施するにあたり、検体採取にご協力をいただいた神谷秀樹先生（神谷動物病院）、伊藤利一先生（伊藤動物病院）、木村芳之先生（木村動物病院）および桑原保光先生（桑原動物病院）に深謝する。

引用文献

- [1] Bergmans AMC, Schellekens JFP, Embden JDA, Schouls LM : J Clin Microbiol, 34, 254-260 (1996)
- [2] Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigprwalt G : Int J Syst Bacteriol, 43, 777-786 (1993)
- [3] Debre R, Lamy M, Jammet ML, Costil L, Mozziconocci P : Bull Soc Med Hop Paris, 66, 76-79 (1950)
- [4] Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, Jorgensen JH, Garcia M, Peters J, Drehner D : Ann Intern Med, 118, 331-336 (1993)
- [5] Maruyama S, Kabeya H, Nakao R, Tanaka S, Sakai T, Xuan X, Katsube Y, Mikami T : Microbiol Immunol, 47, 147-153 (2003)
- [6] Maruyama S, Kasten RW, Boulouis HJ, Gurfield NA, Katsube Y : Vet Microbiol, 79, 337-349 (2001)
- [7] Maruyama S, Nagami S, Inoue I, Namba S, Asanome K, Katsube Y : J Vet Med Sci, 58, 81-83 (1996)
- [8] Maruyama S, Nakamura Y, Kabeya H, Tanaka S, Sakai T, Katsube Y : J Vet Med Sci, 62, 273-279 (2000)
- [9] Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD : J Bacteriol, 173, 1576-1589 (1991)
- [10] 富田正章, 矢端順子, 富永 潔, 松村健道 : 日獣会誌,

- 57, 663-666 (2004)
- [11] 富田正章, 矢端順子, 富永 潔, 菅原雅俊, 橋本元秀, 岸本彦生, 福田好博, 網本昭輝, 田村佳子, 片山 淳 : 日獣会誌, 57, 257-261 (2004)
- [12] Ueno H, Muramatsu Y, Chomel BB, Hohdatsu T, Koyama H, Morita C : Microbiol Immunol, 39, 339-341 (1995)
- [13] 山之内寛嗣, 泉川欣一, 久松 貴, 良永倫子, 佐々木英祐, 泉川公一, 早川友一郎, 原 耕平, 丸山総一, 大谷 博, 下川 功 : 感染症誌, 78, 270-273 (2004)

Prevalence of *Bartonella* spp. in Cats and Dogs and Genomic Diversity of Isolates in Gunma Prefecture, Japan

Toshiko TAKAHASHI^{*†}, Masatoshi KUBO, Nobuo SUZUKI, Akira NAGAI, Toshio MATSUMOTO, Youhei KOBAYASHI, Yukio MORITA and Soichi MARUYAMA

^{*} Tomioka Health and Welfare Office 343-1, Tajima, Tomioka, 370-2454, Japan

SUMMARY

We investigated the prevalence of *Bartonella* spp. in 346 cats in a compound (sheltered cats, including 88 newborn cats), 84 pet cats in animal clinics and 72 dogs in a compound (sheltered dogs) in Gunma Prefecture. The genomic diversity of *B. henselae* isolates were also examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *Not* I and *Sma* I restriction enzymes. *Bartonella* spp. were isolated from 4.3% (11/258) of sheltered cats excluding newborn cats and 3.6% (3/84) of pet cats, but not from the sheltered newborn cats and dogs. Of these positive cats, *B. henselae* was detected in 11 sheltered and three pet cats, *B. clarridgeae* was detected in only one *B. henselae*-positive pet cat. All *B. henselae* isolates (33 strains) belonged to the 16S rRNA gene type I and showed genetically diverse genome patterns. Our data suggested that vertical transmission of *Bartonella* spp. may not occur in cats. The cats with positive results in Gunma Prefecture have been co-infected with *B. henselae* type I with various genetic divergences. — Key words : *Bartonella*, cats, dendrogram, dogs, PFGE.

[†] Correspondence to : Toshiko TAKAHASHI (Gunma Chuo Meat Inspection Laboratory)

305-7 Higoshi, Tamamura, Sawa-gun 370-1103, Japan TEL 0270-65-2135 FAX 0270-65-2869

^{*} Present address : Tomioka Health and Welfare Office 343-1, Tajima, Tomioka, 370-2454, Japan

TEL 0274-62-1541 FAX 0274-64-2397

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 697 ~ 702 (2005)

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57巻第12号819頁) 及び三学会誌投稿の手引き (第58巻第9号631頁) をご参照ください』