

分担研究報告書

熱性疾患におけるバルトネラ感染の検討

分担研究者 小田 紘

研究要旨

ネコひっかき病が疑われた症例のほか、不明熱、肺炎、および若年性関節リウマチが疑われた症例について、*Bartonella henselae* に対する抗体の検出状況を検討し以下の結果を得た。

健康成人および非感染性疾患小児の血清では、*B. henselae* に対する IgG 抗体が 64 倍を超えるものはなかった。抗体陽性者 (IgG 抗体が 64 倍) は、健康成人 30 例中 4 例 (13.3%)、非感染症小児 67 例中 2 例 (3.0%) であった。これに対して、臨床的にネコひっかき病が疑われた 25 症例では、IgG 抗体が 256 倍以上のものが 7 例 (28%)、128 倍のものが 5 例 (20%) であり、両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 12 例 (48%) あった。不明熱および肺炎 36 症例中 IgG 抗体が 256~512 倍のものが 3 例 (8.3%)、128 倍のものが 5 例 (13.9%) であり、両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 8 例 (22.2%) あった。若年性関節リウマチを疑われた小児 78 例中、IgG 抗体 256 倍のものが 1 例 (1.3%)、128 倍のものが 1 例 (1.3%) あり、両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 2 例 (2.6%) あった。

以上より、ネコひっかき病以外の熱性疾患においてもバルトネラ感染が関与するものが存在していると考えられた。

A. 研究目的

1992 年に初めて記載された新種のバルトネラ属細菌である *Bartonella henselae* は、新興感染症の病原体としてネコひっかき病、菌血症性持続性発熱、心内膜炎、細菌性血管腫、など多彩な疾患 (バルトネラ症と総称) の病因となることが明らかとなってきた。本菌は日本を含めた世界各国に分布しており、ネコの 15~40% が保有しているため、ヒトへの感染の機会が多

いと考えられる。しかし、本菌感染を調べるための血清学的検査法はこれまで国内では普及しておらず、感染の実態はほとんど把握されていない。

本菌の発見以来、ネコひっかき病の原因としての認識が高まったため、ネコと関連したリンパ節病変については本菌の感染を疑って検査を行うケースが増加しつつあるが、リンパ節腫脹を伴わない熱性疾患においては本菌の感染が想起されない場合が多い

のが実状である。また、本菌による弛張熱や関節痛については、小児科領域で問題となる若年性関節リウマチとの鑑別の必要性が指摘されている。

本研究ではネコひっかき病が疑われた症例のほか、リンパ節腫脹をともなわない不明熱の症例、肺炎、および若年性関節リウマチを疑われた症例について *B. henselae* 抗体価を測定して本菌の関与につき検討した。

B. 研究方法

検査対象：ネコひっかき病が疑われた 25 症例、不明熱および肺炎 36 症例、若年性関節リウマチが疑われた 78 症例、健康成人 30 名、および非感染症疾患が確定した小児 67 名の血清を対象とした。

B. henselae 抗体価の測定：*B. henselae* 感染 Vero 細胞を抗原とした関節蛍光抗体法 (IFA) により IgG 抗体価を測定した。抗原作成のための菌株として *B. henselae* ATCC 49882 株を用いた。5%ウサギ血液加ブレインハートインフュージョン寒天培地で 5%CO₂ 存在下に 35°C で 7 日間培養した菌を、24 穴テフロンコートスライドガラス上に単層培養した Vero 細胞に接種し、4 時間後に細胞をアセトンで固定し IFA 用抗原として用いた。

被検血清を 0.3% ウシ血清アルブミン加 リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 倍段階希釈し、抗原プレートの各穴にのせてモイストチェンバー中で 37°C 30 分間インキュベートした。PBS にて十分に洗浄後、二次血清とし

て FITC 標識抗ヒト IgG ヤギ血清をのせ 37°C 30 分間反応させたのち十分に洗浄し、PBS-グリセリンで封入して蛍光顕微鏡で観察した。

判定：ペア血清で 4 倍以上の上昇がみられた場合、または単独血清で IgG 抗体価が 256 以上の場合、および IgM 抗体が 32 倍以上の場合を *B. henselae* 感染症と判定した。単独血清で IgG が 128 倍の場合は *B. henselae* 感染症の疑い濃厚と判定した。IgG 64 倍以下の場合、抗体陽性であっても、*B. henselae* が現疾患の原因ではないと判定した。

(倫理面への配慮)

本研究は病因診断の目的で採取された血清について行われた検査結果の集計であり、結果は全て匿名化されており、人権擁護上の問題および動物愛護上の問題は含まれておらず、倫理面の問題はないと判断した。

C. 研究結果

健康成人および非感染性疾患小児の血清では、*B. henselae* に対する IgG 抗体が 64 倍を超えるものはなかった。健康成人 30 例中 64 倍のもの 4 例 (13.3%)、非感染症小児では 67 例中 64 倍のもの 2 例 (3.0%) であった。

これに対して、臨床的にネコひっかき病が疑われた 25 症例では、256 倍以上のものが 7 例 (28%)、128 倍のもの 5 例 (20%) であり、両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 12 例 (48%) を占めた。

一方、リンパ節病変を伴わない熱性

疾患（このうちの大部分は肺炎の入院患者）36 症例中 IgG 抗体 256～512 倍のもの 3 例（8.3%），128 倍のもの 5 例（13.9%）であり，両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 8 例（22.2%）を占めた。なお，この 8 例はいずれも肺炎と診断された患者であった。

若年性関節リウマチを疑われた小児では 78 例中，IgG 抗体 256 倍のもの 1 例（1.3%），128 倍のもの 1 例（1.3%）であり，両者を合わせてバルトネラの関与が強いものが 2 例（2.6%）を占めた。このうち，IgG 抗体 256 倍の症例は全身型若年性関節リウマチを疑われた患者で，弛張熱があり腹部エコーで脾臓内に微小低吸収域像が認められている。

D. 考察

バルトネラ感染症は稀な疾患ではないと考えられる。これが典型的なネコひっかき病の経過をとる場合には気づかれやすいが，それ以外の病型をとった場合には見落とされる可能性が非常に高い。繰り返す発熱，中枢神経系症状，関節症状，あるいは若年性関節リュウマチ様患者などの場合に考慮されるべき疾患である。今回の結果で注目すべきは，肺炎患者の中に *B. henselae* の関与が疑われる症例のあった点である。今後，本菌と肺炎の関係についても検討する必要がある。

なお，一般健康人におけるバルトネラ抗体保有率は小児期から成人に至る過程で上昇することが推測された。

F. 研究発表

<印刷発表>

1. Maeno N, Takei S, Imanaka H, Takasaki I, Kitajima I, Maruyama I, Matsuo K, Miyata K: Increased circulating vascular endothelial growth factor is correlated with disease activity in polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26, 2244-2248, 1999
2. 小田 紘：ネコひっかき病．中山宏明ら（編），知っておきたい現代感染症事情 vol. 1, 医歯薬出版（東京），p 132-139, 1999

<学会発表>

1. 前野伸昭，又吉盛健，藤村剛，吉家清貴，小田紘：*Bartonella henselae* による血管内皮細胞増殖促進機構．第 72 回日本細菌学会総会（1999.3. 東京都）
2. 前野伸昭，吉家清貴，藤村剛，又吉盛健，小田紘：*Bartonella henselae* の非 LPS 成分による血管内皮細胞接着分子の発現誘導．第 73 回日本細菌学会総会（2000. 5. 札幌市）
3. Hiroshi Oda, Nobuaki Maeno, Kiyotaka Yoshiie, Tsuyoshi Fujimura, Seiken Matayoshi: *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation and adhesion molecules expression.

The 7th China-Japan
International Congress of
Microbiology (2000. 8. 上海)

4. 前野伸昭, 吉家清貴, 藤村剛, 又吉盛健, 小田紘: *Bartonella henselae* による血管内皮細胞増殖促進と接着分子発現誘導. 日本細菌学会九州支部総会 (2000. 9. 長崎市)
5. 前野伸昭, 又吉盛健, 森浩純, 今

中啓之, 根路銘安仁, 武井修治, 重森雅彦, 赤池治美, 鉾之原昌, 宮田晃一郎, 小田紘: 若年性関節リウマチを疑われた症例における *B. henselae* 抗体価の検討. 九州リウマチ学会 (2001. 3. 福岡市)

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

分担研究報告書

猫ひっかき病の疫学的研究

分担研究者 上野 弘志

研究要旨

Bartonella henselae は猫の間ではネコノミで伝播されることが、主としてネコノミの寄生の多い猫に *B. henselae* 感染猫の多いことなどの疫学的知見および感染実験で証明されてきた。しかし、自然感染猫とそれに寄生するネコノミについての *B. henselae* の伝播に関する知見はきわめて乏しい。昨年著者は、本菌の自然感染猫の多いインドネシアのジャカルタ市内において、自然感染猫とそれに寄生するネコノミから同時に本菌を分離した。今回、その菌株の遺伝学および生物化学的性状を調べ、分離菌株がきわめて近縁なことを明らかにした。

A. 研究目的 自然感染猫およびそれに寄生していたネコノミから同時に検出した *B. henselae* を材料として、それらの遺伝学および生物化学的性状を比較することを目的とした。

B. 研究方法 インドネシア・ジャカルタにおいて、1 アニマルシェルター 8 匹中 2 匹および 1 動物病院来院猫 4 匹中 1 匹から分離した *B. henselae* 10 菌株を使用した。また、それらの内 8 匹の猫に合計 16 匹のネコノミが寄生していた。このうち、当該細菌の分離された猫に寄生していたネコノミ 1 匹から分離した 3 菌

株も使用した。これらの菌株を 5% 鬼脱繊維素血液を 5% の割合に加えた Blood Agar Base に塗抹し、5% CO_2 下 35°C で 1 週間培養した。菌株の生物化学的性状検査は Microscan Anaerobe Panel を用い、製造者の定める方法に従い検査した。菌体 DNA は加熱法により抽出し、primer pair RpCS877p と RpCS1258n を使用してクエン酸合成酵素領域の PCR 産物を得、Big Dye Terminator 法によりその遺伝子配列を決定し、Fasta Program に照合した。さらに、16SrRNA 型を型別 PCR により決定した。なお、猫血液からの *Bartonella* 分離に際し、残余の血液の遠心沈殿

上清を用いて、定法に従い *B. henselae* (ATCC 49882) を抗原とし、蛍光抗体法 (IFA) で抗体価 (抗体価 64 倍以上を陽性とした) も測定した。

C. 研究結果 猫の抗体保有率は 50% であった (抗体価 64 ~ 512)。供試した 13 菌株中、継代培養中に死滅した 1 菌株を除き、すべての菌株の生物化学的性状検査結果の Profile number は 10077640 であった。すなわち、DL-methionine- β -naphthylamide 活性陽性であったこと等 24 の生物化学的性状は *B. henselae* のそれと完全に一致した。

アニマルシェルターの 1 匹のネコ、それに寄生していた 1 匹のネコノミ及び動物病院来院の 1 匹のネコ由来の各 1 菌株計 3 菌株の PCR 産物の塩基配列は完全に一致し、すべて *B. henselae* (Gene Bank Access No. L38957) であった。また、全 13 菌株の 16SrRNA 型は 1 型であった。

D. 考察 インドネシアのジャカルタでは 1995~1996 年の feral cat の保菌率は 42.9% (6/14) であった。また、pet cat および feral cat の IFA 抗体陽性率はそれぞれ、74% (14/19)、53% (30/57) であった。今回の調査

では、猫の本菌陽性率は 25% (3/12)、抗体陽性率は 50% であったため、この地域の猫での本病原体の流行が再確認された。

猫の保菌する *B. henselae* の 16SrRNA 型の分布には、地域差のあることが知られている。猫から分離された *B. henselae* の内、フランスでは 19%、ドイツでは 94% が type II であるのに反し、日本では 97.7%、フィリピンでは 100% が type I に属していた。今回のインドネシアの猫でも、分離菌株はすべて type I であったため、アジアでは主として type I の *B. henselae* が流行している可能性がある。しかし、インドネシアでの調査地はジャカルタに限られていたことからこの推論を確認するためには、さらに広範な調査が必要と考えられる。

ネコの集団内で *B. henselae* は疫学的証拠および感染実験により証明されてきた。自然感染猫とそれに寄生するネコノミとの間の知見として、これまでに、ネコとそれに寄生していたネコノミから本菌は分離されている。しかし、その分離時期は不明であったり、ネコノミからの分離はネコからの分離より数カ月も経てからのものであった。今回はネコ材料採取と同時にネコ寄生ノミを採取したため、材料採取時期にずれがない。

今回得られた菌株の生物化学的性状はすべて同一であった。また、分離された *B. henselae* は2つの異なる遺伝子領域である 16SrRNA およびクエン酸酵素領域の解析によっても、きわめて類似していた。この事実は、*B. henselae* は自然感染ネコでもネコノミにより病原体が媒介されることを強く示唆するものである。

E. 結論 インドネシア・ジャカルタにおける猫の *Bartonella henselae* の流行が再確認され、その16SrRNA型は1型が主流と判断できた。また、自然感染猫とそれに寄生していた猫からの分離菌株は、生物化学的性状および遺伝学的性状がきわめて類似していた。そのため、*B. henselae* は自然状態でもネコノミが猫への病原体の媒介動物であることが強く示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

1) Numazaki, K., Ueno, H., Yokoo, K., Muramatsu, Y., Chiba S., Morita, C.: Detection of serum antibodies to *Bartonella henselae* and *Coxiella burnetii* from Japanese children and pregnant women. *Microbes Infection.* 12:1431-1434, 2000

2) Chang, C-c., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Heller, R., Kocan, M., Ueno, H., Yamamoto, K., Bleich, V.C., Pierce, B.M., Gonzales, B.J., Swift, P.K., Boyce, W.M., Jang, S.S., Boulouis, H-J., Piemont, Y. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in north America. *Emerging Infectious Disease.* 6:306-311, 2000

2. 学会発表

1) 上野弘志、木田桃子、Ima Nurisa Ibrahim、中川美穂、佐藤弘、村松康和、森田千春：インドネシアの猫及びそれに寄生していたネコノミからの性状の類似した *Bartonella henselae* の同時検出：第130回日本獣医学会（2000年）

2) 上野弘志、木田桃子、Ima Nurisa Ibrahim、中川美穂、佐藤弘、村松康和、森田千春：インドネシアの猫における *Bartonella* の疫学調査、第7回リケッチア研究会（2000年）

分担研究報告書

日本紅斑熱の疫学的研究

分担研究者 森田 千春

研究要旨

北海道、大阪、沖縄など日本紅斑熱の報告されていない地域で前年度に引き続き調査を行った。大阪のニホンジカとフタトゲチマダニ、沖縄の放浪犬よりPCRにより日本紅斑熱リケッチア様の遺伝子が検出された。沖縄のイヌに寄生していたクリイロコイタマダニからは同様のリケッチアは検出されない。一方、北海道のシュルツェマダニ、大阪チマダニからこれまで世界でダニのみから検出されている紅斑熱群リケッチアが検出された。このリケッチアは近年人に対するの病原性が報告された*R. helvetica* に極めて類似しており、今後このリケッチアの疫学的研究が重要である。沖縄のクリイロコイタマダニからはそれとは異なるグループに属すると考えられるリケッチアが検出された。

A. 研究目的

日本における紅斑熱の疫学を研究するに当たって、その背景となる非病原性、あるいは病原性不明のリケッチアの性状、分布を明らかにすることは疫学調査のみならず、将来の新興感染症としての可能性を考える上からも重要である。このため、この研究はリケッチアの保有ほ乳類、媒介ダニを日本各地で調査すること、及びこれを諸外国特にアジア、アフリカと比較することを目的として行われている。今年度は主として患者発生の報告されていない北海道、大阪、沖縄で調査を行った。

B. 研究方法

ダニは北海道においては江別市、穂別町に2箇所において主として旗ずり法により採集した。採集したダニは主としてヤマトマダニ、シュルツェマダニである。大阪では北部で捕獲したニホンジカに付着していたもの及び一部は旗ずり法により採集した。採集されたダニはフタトゲチマダニ、キチマダニ、オオトゲチマダニである。沖縄では大里町の動物愛護センターに収容され

た放浪犬に付着、ないしは落下したクリイロコイタマダニを採集した。北海道の野生齧歯類についてはアカネズミを中心として調査を行った。大阪ではニホンジカより、沖縄では放浪犬より血液を採集し、濾紙に吸着、乾燥した。ダニはPBSにより乳剤を作成し、血液は同じくPBSにより抽出し、これよりQIAamp Tissue KitによりDNAを抽出した。なお、一部の血液は間接蛍光抗体法(IFA)による抗体検査に用いた。PCRについてはEremeevaら(1994)の方法に準じ、クエン酸合成酵素(gltA)および表面抗原(rompA)の領域について検査し、得られたPCR産物については制限酵素切断多型性(RELP)及び遺伝子塩基配列の解読により解析し、近隣結合法により系統樹解析を行った。抗体は*R. japonica*感染Vero細胞を抗原としてIFAにより行い、1:64以上を陽性とした。なお、動物材料は酪農学園大学動物実験に関する指針(平成4年8月20日施行)に準じた方法により採集した。なお、東南アジア、アフリカからも主としてダニの材料の送付を受けた。アジアでは台湾、フィリピン、タイ、インドネシアであ

り、アフリカからはスーダンから多数のダニの送付を受け、わが国の材料と同様に処理して検査した。

C. 研究結果と考察

北海道においては調査地において優占種であるIxodes属のマダニ、ヤマトマダニとシュルツェマダニについてそのリケッチアの保有状態をPCR法のみでなく、細胞接種を併用して調査した。ヤマトマダニからは昨年までの調査でrompA及びgltAが検出できるリケッチアの存在が認められていたが、細胞に接種したときにはヤマトマダニの材料からはこのリケッチアの存在は認められなかつた。この事はヤマトマダニから検出されるリケッチアは所謂ダニの共生体であり、ダニの外での生活環を持たないものである可能性が示唆された。一方、シュルツェマダニからは細胞に感染性を有するリケッチアが検出された。このリケッチアはrompAは現在の検出系では検出されない。検出されたgltA領域の遺伝子配列を本州のヤマトマダニから分離されたリケッチアと良く類似し、また、欧州で分離された*R. helvetica*のそれとも極めて類似する。このリケッチアはスカンジナビアでヤマトマダニと近縁な*I. ricinus*から分離されたものである。しかし、北海道ではヤマトマダニからは分離、検出されない。この事は紅斑熱群リケッチアの生態学、疫学を考える上で重要な示唆を含んでいると考えている。現在、北海道の齧歯類について改めて血清疫学的調査を行うため、シュルツェマダニからリケッチアの分離を試みている。

沖縄についてはイヌに認められた抗体、及びイヌ血液から検出された日本紅斑熱類似リケッチアの由来するダニについて研究を進めているがイヌに付着するクリイロコイタマダニからはイヌのものとは異なるリケッチアが検出される。クリイロコイタマダニの寄生は放浪犬、飼育犬の何れにも認められるが紅斑熱リケッチアに対する抗体

は飼育犬では殆ど認められず、放浪犬では高率に認められることから疫学的にもクリイロコイタマダニが日本紅斑熱類似リケッチアの保有ダニである可能性は少ない。日本紅斑熱リケッチア保有ダニと考えられるチマダニ、キララマダニについて検出を試みたが現在まで日本紅斑熱類似リケッチアは検出されていない。

沖縄県と距離的に近い台湾よりイヌの血液材料、フィリッピンよりイヌ、齧歯類の血液材料を入手し紅斑熱に対する抗体とリケッチアの検出を行った。

何れの場所からもリケッチア様の遺伝子が検出されているが沖縄県で検出された日本紅斑熱に類似したものは見出されていないが、*R. helvetica*に類似するリケッチアが見出された。

なお、今回の調査を通じて採集された材料を用いて沖縄県のイヌ材料及びそれに寄生したクリイロコイタマダニより、イヌに血小板減少症を起こす*Ehrlichia platys*検出された。また、わが国で初めて*Babesia microti*の人への感染が起こり報告されたとき、この調査で採集保管された主として北海道の齧歯類及びダニ材料を用いて*Babesia*の疫学的調査を行ったところ、複数の*Babesia*の存在が明らかになるなどダニ媒介感染症の研究に貢献した。

D. 結論

ダニ媒介性疾患の疫学特に寄生ダニとの関係は複雑である。*R. helvetica*に類似し、人への病原性が疑われるところから注目されるヤマトマダニ、シュルツェマダニから検出されるリケッチアについては本州と北海道では保有ダニが異なるように見受けられる。これに類似するリケッチアは沖縄、東南アジアにも広く分布しているようであり、今後の研究が必要である。

E. 研究発表

- 1) Camer G. A., Masangkay J., Satoh H., Okabayashi T., Norizuki S., Motoi Y., Ueno H., and Morita C. :Prevalence of spotted fever rickettsial antibodies in dogs and rodents in the Philippines. *Jpn. J. Inf. Dis.*, 53, 162-163. 2000
- 2) Satoh H., Tsuneki A., Inokuma H., Kumazawa N., Jahana Y., Kiyuuna T., Okabayashi T., Muramatsu Y., Ueno H., and Morita C.,: Seroprevalence of antibodies against spotted group rickettsia among dogs and humans in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 85-87. 2001
- 3) Motoi Y., Satoh H., Inokuma H., Kiyuuna T., Muramatsu Y., Ueno H., and Morita C.,: First detection of *Ehrlichia platys* in dogs and ticks in Okinawa, Japan. *Microbiol. Immunol.*, 45, 89-91, 2001
- 4) 康和, 森田千春: インドネシアの猫及びそれに寄生していたネコノミからの性状の類似した *Bartonella henselae* の同時検出 第130回日本獣医学会
- 5) 本井 ゆり恵, 佐藤 弘, 猪熊 壽1, 喜友名 強2, 村松 康和, 上野 弘志, 森田千春: 沖縄県のイヌとマダニにおける *Ehrlichia platys* の検出 第130回日本獣医学会
- 6) 佐藤 弘, Ming-Huei Liao1, Chieh-Hsien Tu1, 村松 康和, 上野 弘志, 森田千春: 台湾のイヌおよびマダニにおける紅斑熱群リケッチアの血清学的, 分子生物学的調査 第130回日本獣医学会
- 7) 森田千春: 沖縄県のイヌおよびダニからの *Ehrlichia platys* の検出 第7回リケッチア研究会
- 8) 上野弘志: インドネシアの猫における *Bartonella* の疫学調査 第7回リケッチア研究会
- 9) 佐藤 弘: 台湾における紅斑熱群リケッチアの疫学調査 第7回リケッチア研究会

学会発表

- 1) 岡林 環樹, 萩谷 順子, 辻 正義, 石原 智明, 佐藤 弘, 村松 康和, 上野 弘志, 森田千春: 北海道における採血用濾紙吸着小型齧歯類血液および節足動物からの *Babesia microti* の遺伝子検出 第129回日本獣医学会 (農林水産省家畜衛生試験場)
- 2) 岡林 環樹, 石塚 譲, 川井 裕史, 弓指 孝博, 木村 朝昭, 奥野 良信, 佐藤 弘, 上野 弘志, 森田 千春: 大阪における紅斑熱群リケッチアの疫学調査, 第6回獣医疫学会
- 3) 佐藤 弘, 謝花 貴英, 猪熊 壽, 喜友名 強, 伊澤 雅子, 岡林 環樹, 森田千春: 沖縄県における紅斑熱群リケッチアの血清学的, 分子生物学的調査 第6回獣医疫学会
- 4) 上野 弘志, 木田 桃子, Ima Nurisa Ibrahim1, 中川 美穂, 佐藤 弘, 村松