

To determine epitope E5/G6 in more detail, we first synthesized 32 peptides consisted of 10 residues, which located between aa 140 and 180 of the NP of SEOV strain SR-11 with a 9-residue overlap. All the peptides were synthesized with an Autospot Peptide Synthesizer, ASP222 (ABiMED, Langenfeld, Germany) using an Fmoc-protected system and Amino-Peg-membrane (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, Köln, Germany) as the spotting membrane. Immunostaining was performed as follows. After rinsing in methanol once followed by two rinses in phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween 20 (PBST), the spotting membrane was blocked in Block Ace (Yukijirushi Co., Tokyo, Japan) for 30 min at room temperature. The membrane was washed with PBST several times, before soaking in culture supernatant of hybridoma cells containing MAb E5/G6. After incubating for 60 min at 37 °C, the membrane was washed several times with PBST. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, U.S.A.) was diluted 1:500, added, and incubated at 37 °C for 60 min. Then the membrane was washed several times with PBST. To develop the seared peptides, we used the 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) detection system (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.). After a few-minute incubation with AEC reagent, the membrane was washed with distilled water and dried. Binding of the peptides to MAb E5/G6 was measured as the density of spots using ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). As shown in Fig. 1, the strongest reactions were obtained for peptides #25 (aa 164–173, SYEDVNGIRK) and #26 (aa 165–174, YEDVNGIRKP). These two peptides showed no or very low background staining compared with the negative controls. By contrast, the other peptides had no or very low reactivity to both E5/G6 and the negative control. These results suggested that epitope E5/G6 locates within aa 164–174. This epitope sequence includes the previously reported epitope sequence aa 166–175 (EDVNGIRKPK) determined by using 10-residue peptides of PUUV with a 5 aa overlap [17].

Next, we determined the minimum sequence of epitope E5/G6 (Fig. 2). As shown in Fig. 1, the K at aa 173 (K173) is essential for E5/G6 binding. Therefore, we synthesized a variety of shorter peptides with K left at the C-terminus. Figure 2(A) showed that the minimum sequence for E5/G6 binding is 166–173 (EDVNGIRK). This peptide lacking both Y165 and P174 showed considerably lower binding to E5/G6 compared with #26. But adding amino acid Y or P to the minimum epitope 166–173 improved E5/G6 binding. Because the deletion of Y165 decreased E5/G6 binding slightly compared with the deletion of P174, the most effective minimum epitope for E5/G6 binding is the 9-residue peptide YEDVNGIRK. But 10-residue peptide YEDVNGIRKP was also the most effective sequence for E5/G6 binding, so we examined the 10 residue peptides containing various amino acid mutations in following experiments.

To determine which residues in YEDVNGIRKP are required for E5/G6 binding, we examined alanine- and serine-scanning of peptide #26 in Fig. 1. We synthesized and immunostained a variety of peptides in which each amino acid in YEDVNGIRKP was replaced with A or S. As shown in Fig. 2(B), these two assays gave essentially the same results: D167, G170, I171, and R172 were indispensable

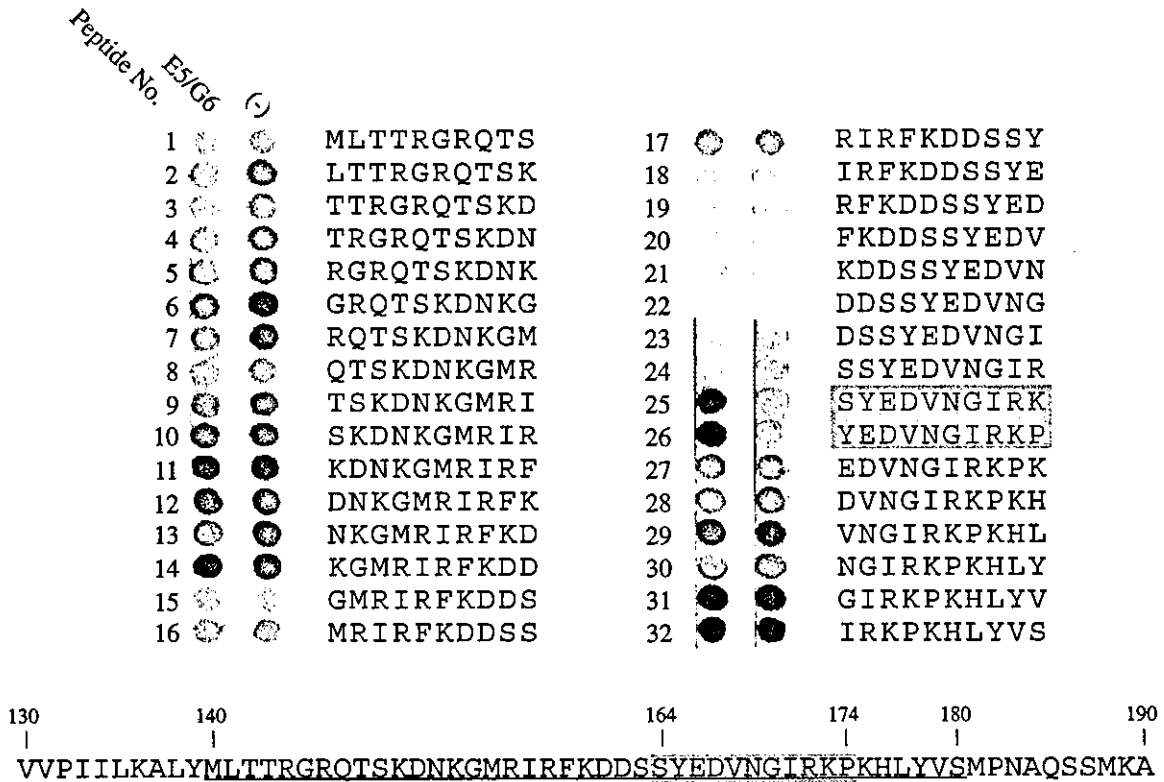


Fig. 1. Mapping continuous E5/G6 epitopes. Peptide scanning of the 41 amino acid residues between NP140 and 180 of SEO/SR-11 (underlined). Thirty-two 10-residue peptides were synthesized with a 9-residue overlap. These were blocked in Block Ace (Yukijirushi Co.) and incubated with the culture supernatant (Hybridoma SFM, Invitrogen) of hybridoma cells containing MAb E5/G6 (left lane) or with culture medium as a negative control (right lane) for 60 min at 37 °C. The spotting membranes were washed several times with PBST and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:500, Zymed Laboratories). After incubation for 60 min, the spotting peptides were visualized by using 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) detection system (Sigma-Aldrich). The strongest signals were obtained with SYEDVNGIRK (#25) and YEDVNGIRKP (#26)

for the epitope. Furthermore, when Y165, E166, K173, or P174 was replaced with A or S, the E5/G6 reactivity for these peptides decreased slightly, making them necessary for more effective reactions, but not indispensable. By contrast, V168 or N169 could be replaced with little consequence.

Because epitope E5/G6 had been identified as YEDVNGIRKP based on the SEOV sequence, E5/G6 binding to various hantavirus species was estimated using synthetic peptides based on the aa sequences of the corresponding region of published sequences of S segment. More than 80 different hantavirus sequences were checked (data not shown). As summarized in Table 1, sequence 165–174 was highly conserved within these viruses. We synthesized 15 peptides representing 16 variations and investigated their reactivity to MAb E5/G6. Table 1 shows that all the synthetic peptides reacted with E5/G6 as a similar degree as for the

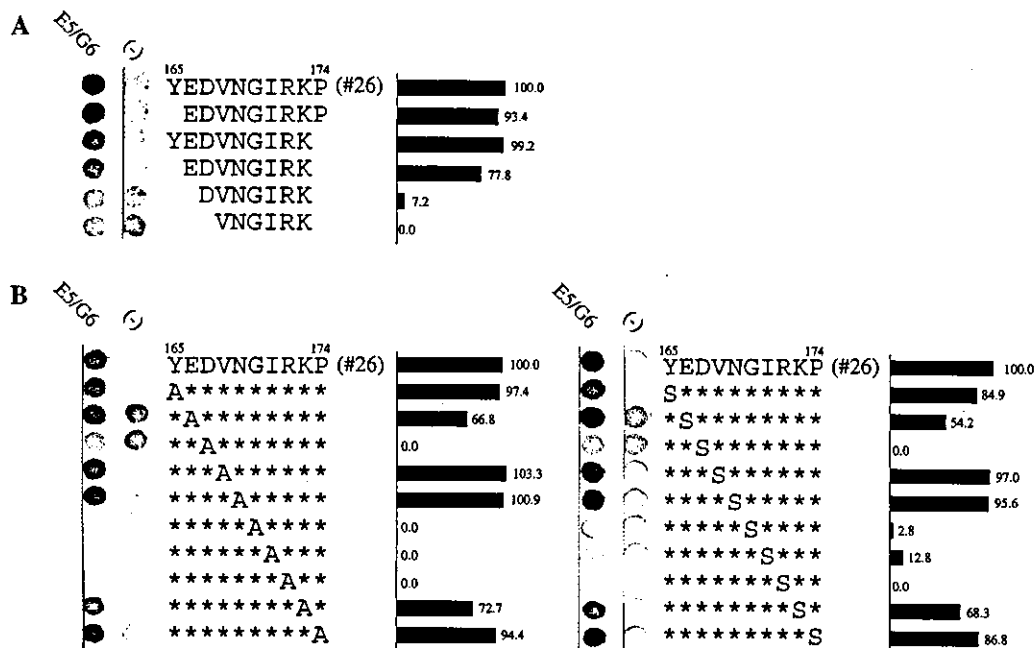


Fig. 2. Detailed determination of the E5/G6 epitope. **A** We determined the minimum epitope sequence for E5/G6. Because K172 was indispensable for epitope E5/G6 (Fig. 1), peptides with K left at the C-terminus and lacking the N-terminal amino acids were synthesized and immunostained by the procedure previous described. The minimum sequence that could bind E5/G6 was the 8-residue EDVNGIRK, and the most effective minimum sequence was the 9-residue YEDVNGIRK. **B** To determine the amino acid residues essential for E5/G6 binding, various peptides in which the amino acid residues of peptide #26 in Fig. 1 were altered to A (left panel) or S (right panel) were examined. Residues D167, G170, I171, and R172 were indispensable residues, and Y165, E166, K173, and P174 were necessary for an effective reaction but not indispensable. We obtained similar results with the alanine- and serine-scanning assays

homologous combination. But changing the third position (D167) to E decreased E5/G6 binding slightly to 71–85%. Conversely, altering the ninth position (K173) to R increased E5/G6 binding to around 110%. Because D167 to E and K173 to R are the replacements within same acidic or basic aa, these changes would not induce much difference as epitope E5/G6. Despite the sequence variation in this region, E5/G6 can bind to all the registered hantaviruses.

Finally, we carried out a database search by FASTA program in DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/fasta-e.html>) to find sequences similar to epitope E5/G6 in other viruses, bacteria, and animals. No similar sequences were found in viruses and animals. One bacterium, the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*, possesses a similar sequence in its glycosyltransferase (FEDINGIREC). Because this bacterium inhabits a very restricted environment, it should not affect the use of MAbs E5/G6 as a general hantavirus assay. In fact, E5/G6 showed no background reaction against rodent lung cells or various cell lines, such as insect and Vero E6 cells (data not shown).

Table 1. The hantavirus strains used in this study and E5/G6 binding to sequences derived from various hantaviruses

165–174	Hantaviruses	E5/G6-binding (%)
Murinae-associated hantavirus		
YEDVNGIRKP	SEOV	100.0
F*****R*	HTNV, DOBV, SAAV, AMRV, Dabie Shan virus	103.7
Arvicolinae-associated hantavirus		
F**I****R*	PUUV	112.1
EI**R*	TULV	71.9
F*****R*	TOPV	116.6
*****R*	PHV, BLLV	117.2
FD*****R*	KHAV	NT
*D*****R*	KHAV (Vladivostok strain)	109.3
Sigmodontinae-associated hantavirus		
F*****R*	MULV	103.7
E***R*	SNV, NYV, ELMCV	85.1
F*E*****R*	ANDV, LANV, CADV	86.9
*****R*	BCCV	100.0
F*EI*****R*	RIOMV	83.1
F*E*****R*	RIOS	72.4
F*EI*****R*	ISLAV	84.3
*D*****R*	BAYV	97.6

NT: not tested

The viruses are listed according to the virus taxonomy [14], except Dabie Shan virus strain NC167 [15], Saaremaa virus (SAAV), and Amur virus (AMRV) [9]. These sequences included 16 variations within the 165–174 region. Each amino acid sequence was synthesized and immunostained with MAb E5/G6. The densities of the spotting peptides bound to MAb E5/G6 were quantified using ImageJ-software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). E5/G6 binding to each peptide is reported as the relative density compared with that of the SEOV sequence after subtracting non-specific peptide binding

In this report, by using the peptide-synthesizing system, we confirmed the epitope sequence for MAb E5/G6 and found that it have a broad binding spectrum. These results imply that E5/G6 will be a useful tool for detecting hantavirus antigen in rodent or patient tissue via Western blot or immunohistochemical assays. The use of this linear epitope-binding MAb common to the genus may lead to the discovery of unknown hantaviruses.

Acknowledgments

This study was partially supported by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan. Textcheck (English consultants) revised the English in the final draft of this paper.

References

1. Araki K, Yoshimatsu K, Ogino M, Ebihara H, Lundkvist A, Kariwa H, Takashima I, Arikawa J (2001) Truncated hantavirus nucleocapsid proteins for serotyping Hantaan, Seoul, and Dobrava hantavirus infections. *J Clin Microbiol* 39: 2397–2404
2. Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Wadell G, Juto P (1996) A major antigenic domain for the human humoral response to Puumala virus nucleocapsid protein is located at the amino-terminus. *J Virol Methods* 59: 161–172
3. Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, Stenlund H, Avsic-Zupanc T, Hjelle B, Lee HW, Smith KJ, Vainionpaa R, Wiger D, Wadell G, Juto P (1997) Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol* 35: 1122–1130
4. Lundkvist A, Fatouros A, Niklasson B (1991) Antigenic variation of European haemorrhagic fever with renal syndrome virus strains characterized using bank vole monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 72: 2097–2103
5. Lundkvist A, Horling J, Bjorsten S, Niklasson B (1995) Sensitive detection of hantaviruses by biotin-streptavidin enhanced immunoassays based on bank vole monoclonal antibodies. *J Virol Methods* 52: 75–86
6. Lundkvist A, Vapalahti O, Plyusnin A, Sjolander KB, Niklasson B, Vaheri A (1996) Characterization of Tula virus antigenic determinants defined by monoclonal antibodies raised against baculovirus-expressed nucleocapsid protein. *Virus Res* 45: 29–44
7. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914–917
8. Plyusnin A, Vapalahti O, Lundkvist A (1996) Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77: 2677–2687
9. Plyusnin A (2002) Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Arch Virol* 147: 665–682
10. Ruo SL, Sanchez A, Elliott LH, Brammer LS, McCormick JB, Fisher H-S (1991) Monoclonal antibodies to three strains of hantaviruses: Hantaan, R22, and Puumala. *Arch Virol* 119: 1–11
11. Schmaljohn CS, Hasty SE, Dalrymple JM, LeDuc JW, Lee HW, von Bonsdorff CH, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Tsai TF, Regnery HL (1985) Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 227: 1041–1044
12. Schmaljohn CS (1996) Molecular biology of hantaviruses. In: Elliott RM (ed) *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York, pp 19–53
13. Schmaljohn CS, Hjelle B (1997) Hantaviruses – a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 3: 95–104
14. van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Leman SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle DJ, Wickner RB (eds) (2000) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, pp 609–612
15. Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, Ogino M, Araki K, Kariwa H, Wang Z, Luo Z, Li D, Hang C, Arikawa J (2000) Genetic diversity of hantaviruses isolated in china and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology* 278: 332–345

16. Yamada T, Hjelle B, Lanzi R, Morris C, Anderson B, Jenison S (1995) Antibody responses to Four Corners hantavirus infections in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*): identification of an immunodominant region of the viral nucleocapsid protein. *J Virol* 69: 1939–1943
17. Yoshimatsu K, Arikawa J, Tamura M, Yoshida R, Lundkvist A, Niklasson B, Kariwa H, Azuma I (1996) Characterization of the nucleocapsid protein of hantaan virus strain 76–118 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* 77: 695–704

Author's address: Prof. Jiro Arikawa, D. V. M., Ph.D., Institute for Animal Experimentation, Graduate School of Medicine, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan; e-mail: j_arika@med.hokudai.ac.jp

First Isolation of *Bartonella henselae* Type I from a Cat-Scratch Disease Patient in Japan and Its Molecular Analysis

Soichi Maruyama*¹, Koichi Izumikawa², Mayumi Miyashita¹, Hidenori Kabeya¹, Takeshi Mikami¹, Hirotsugu Yamanouchi², Eisuke Sasaki², Hiroshi Yoshida³, and Kinichi Izumikawa²

¹Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252–8510, Japan, ²Izumikawa Hospital, Nagasaki, Nagasaki 859–1504, Japan, and ³Department of Medicine, Yame General Hospital, Fukuoka, Fukuoka 834–0034, Japan

Received September 12, 2003; in revised form, October 27, 2003. Accepted November 20, 2003

Abstract: We isolated *Bartonella henselae* from an inguinal lymph node of a 36-year-old male patient with cat-scratch disease. The patient had many areas of erythema on his body, swelling of the left inguinal lymph nodes with pain and slight fever. The diagnosis was made on the basis of polymerase chain reaction for *B. henselae* DNA from the lymph node biopsies and blood sample, and isolation of the organism, histology of the lymph node and serology with an indirect immunofluorescent antibody test. We also analyzed the genome profiles for five strains of 90 isolates from the lymph node by pulsed-field gel electrophoresis after *NotI* endonuclease digestion. We found two different genomic profiles. These results suggest that the patient had been either co-infected or re-infected with two genetically different strains of *B. henselae*.

Key words: *Bartonella henselae*, Cat-scratch disease, Isolation, Pulsed-field gel electrophoresis

Cat-scratch disease (CSD) is a worldwide zoonosis primarily caused by *Bartonella henselae* (5, 11, 20, 24, 33, 34), but *Bartonella clarridgeiae* has also been linked to a few human cases of CSD (17, 19). The organism also causes bacillary angiomatosis (15, 31) and peliosis (32) in immunocompromised individuals and bacteremia in immunocompetent individuals. The clinical manifestation of CSD is mainly characterized by pyrexia, papules on the site of the cat scratch or bite and unilateral lymphadenopathy, while cats themselves, the major reservoir of CSD, are asymptomatic carriers, showing long-term bacteremia with antibody formation (1, 16).

The number of human clinical cases of CSD has been increasing worldwide. Most cases are diagnosed based on clinical manifestations, the history of contacts with cats, serology (14, 20, 24, 26, 28, 33) or PCR-based methods for examining the biopsy specimens (2, 10, 28). However, the isolation of the organism from patients is relatively difficult and only a few cases of the organism isolation have been reported worldwide (7, 9, 18, 25),

because suitable material is not available, the culture conditions are not appropriate or the organism shows fastidious, cytozoic and slow-growth properties. The isolation and establishment of *Bartonella* strains are extremely important for both etiological diagnosis and epidemiological and genetical analysis of the isolates. Though many clinical cases of CSD have been reported in Japan (20, 24, 33), there are to date no available reports of the isolation of *B. henselae* from human cases in Japan.

B. henselae type II was detected in 18% of the isolates from CSD patients in the Netherlands (3), and 94% of cat isolates in Germany (27). In contrast, Maruyama et al. showed that type I is the predominant gene type in domestic cats in Japan (21). However, no data was available for the prevalence of gene type on the isolates from CSD patients in Japan.

In this study, the authors describe a typical CSD case and the isolation of *B. henselae* from the patient in

*Address correspondence to Dr. Soichi Maruyama, Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252–8510, Japan. Fax: 0466–84–3636. E-mail: maruyama@brs.nihon-u.ac.jp

Abbreviations: bp, base pair; CSD, cat-scratch disease; CFU, colony forming unit; CRP, C-reactive protein; CT, computed-tomography; γ -GTP, gamma glutamyl transpeptidase; IFA, indirect immunofluorescence antibody; LAP, leucine amino peptidase; Mbp, mega base pair; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

Japan for the first time. Furthermore, the authors investigate the genomic properties of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and suggest that the patient has been either co-infected or possibly re-infected with two genetically different strains of *B. henselae*.

Case Report

A 36-year-old previously healthy male had persistent multiple areas of erosive erythema with severe itching on his legs and body for about 30 days and swelling of the left inguinal lymph node with pain. He was admitted to Izumikawa Hospital on September 15, 2001 for further examination and treatment. At the time of admission, his body temperature was 37.1 C and medical examination was negative except for multiple systemic erosive eruptions, cat scratches on his legs (Fig. 1) and the swollen appearance and tenderness of the left inguinal lymph node. He had been keeping a cat infested with fleas for 3 months before admission. Laboratory findings showed an elevated gamma-GTP (154 IU) and LAP (589 IU), and he was positive for CRP. The computed-tomography X-ray films of the patient's left inguinal region showed a 30×40 mm area of lymphadenopathy containing a 10×10 mm low-density area (Fig. 2). A left inguinal lymphoidectomy was performed on the second day of admission, and a 50 mm×50 mm lymph node and a 12 mm×12 mm lymph node were removed (Fig. 3). The patient started receiving 100 mg/day of minomycin intravenously for 5 days after the lymphoidectomy, followed by 50 mg/day by oral adminis-



Fig. 1. Many cat scratches, fleabites and areas of erosive erythema are observed on both legs of the patient.

tration for 4 days. The low-grade fever and pain in the inguinal regions were diminished during the treatment, and the CRP value turned out to be negative. The patient was discharged on September 24, 2001 without no complications.

Materials and Methods

Clinical samples. The lymph node specimen was submitted to the culture of *Bartonella* species and to histopathological examinations by using the Warthin-Starry stain. The blood and serum samples collected just before the surgical operation were also sent for the laboratory diagnosis of CSD. The blood samples were collected in EDTA tubes and submitted to the culture and genetical examination of *Bartonella* species. Flea samples were collected from the cat and submitted for genetical and bacteriological examination of *Bartonella* species. The blood, serum and lymph node from the patient and the flea samples were sent to the Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary

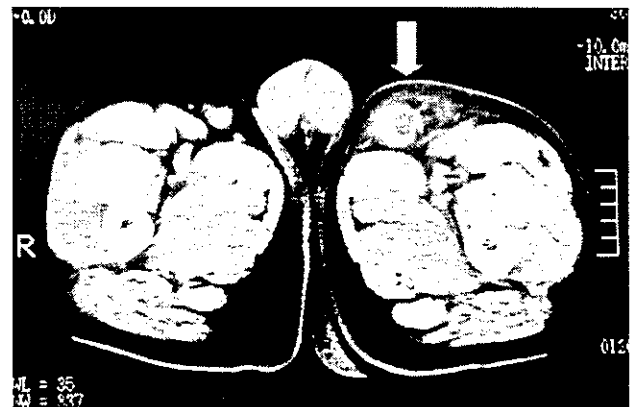


Fig. 2. The computed-tomography X-ray film shows 30×40 mm of lymphadenopathy containing a 10×10 mm low-density area in the left inguinal region (arrow).

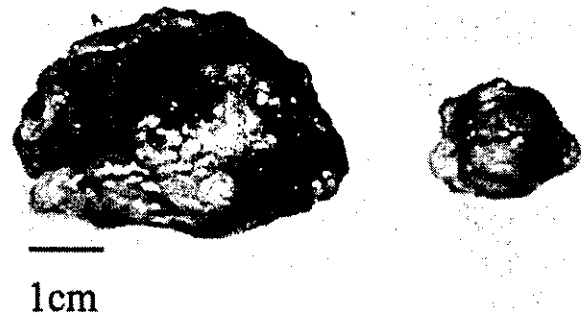


Fig. 3. Two inguinal lymph nodes, one 50 mm×30 mm and one 12 mm×12 mm, were removed from the patient on the second day of hospitalization by surgical operation.

Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University. All the samples were stored at -70 C until they were examined.

Indirect immunofluorescence antibody (IFA) test. The serum was inactivated at 56 C for 30 min. The antibody titer to *B. henselae* was examined by IFA test with strain *B. henselae* Houston-1. The IFA test procedure was as reported previously (20).

Isolation of Bartonella species. The frozen blood sample in an EDTA tube was thawed at room temperature and centrifuged at 3,800 rpm for 70 min. After centrifugation, the supernatant was removed and 120 μl of supplemented Medium 199 (Gibco, U.S.A.) was added to the sediment, which was mixed well. The mixture was inoculated to two 7% rabbit blood-agar plates, which were incubated at 35 C in a 5% CO_2 atmosphere for 4 weeks.

One gram of the lymph node specimen was aseptically minced, and 1 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) was added to the specimen. The mixture was then homogenized well with a sterile glass homogenizer. A volume of 100 μl of homogenate was inoculated to two 7% rabbit blood-agar plates and incubated at 35 C in a 5% CO_2 atmosphere for 4 weeks.

For flea samples, 5 fleas collected from the cat were dipped in 70% (vol/vol) ethanol in a 1.5-ml sterile microcentrifuge tube and left for 15 min at room temperature. The tube was centrifuged at 12,000 rpm for 3 min and the ethanol was removed. A volume of 1 ml of PBS was added to the tube and washed twice as same procedure stated above. A volume of 200 μl of supplemented Medium 199 was added and homogenized with a small sterile plastic homogenizer for a conical 1.5-ml tube. A 100- μl volume of the homogenate was used for the isolation of *B. henselae* and the rest for the DNA extraction.

Extraction of DNA from the homogenate of lymph node, blood and fleas was performed with a QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. For *Bartonella* suspected isolates, the DNA was extracted by InstaGene DNA purification matrix (Bio-Rad, U.S.A.).

Identification of Bartonella species. Five colonies suspected to be *Bartonella* on the agar plates were subcultured and subjected to identification of *Bartonella* species by species-specific PCR of 16S-23S rRNA intergenic region sequences (13). In the PCR, amplification of template DNA with 5'-CCTTCGTTTCTCTTTCTTCA-3' and 5'-AACCAACTGAGCTACAAGCC-3' as forward and reverse primers, respectively, resulted in amplified products corresponding to those of the predicted size, namely, 154 bp (*B. clarridgeiae*), 260 bp (*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*) and 172 bp (*B. henselae*). Amplifications were performed in an iCycler (Bio-Rad)

by a timed-release PCR protocol, as follows: 10 min of incubation at 20 C , followed by 2 min denaturation at 95 C and then 45 cycles of 1 min of denaturation at 95 C , 1 min of annealing at 60 C and 30 sec of extension at 72 C . PCR products were differentiated by gel electrophoresis.

The 16S rRNA gene typing of *B. henselae*, type I or type II, was performed by PCR as previously reported (21). Briefly, 1 μl of the extracted DNA sample was added to 17 μl of reaction mixture (10 mM Tris, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2) containing 0.5 μM of each set of 16SF and BH1 or 16SF and BH2 primers, 0.8 mM dNTP and 2.5 U of *Taq* polymerase. The DNA amplification was performed with initial denaturation (95 C , 3 min), followed by 30 cycles of denaturation (95 C , 20 sec), annealing (56 C , 30 sec) and extension (73 C , 1 min), with a single final extension step (73 C , 5 min). The amplified PCR product was subjected to electrophoresis in a 3% agarose (Agarose 21, Nippon Gene, Japan). When a specific band of 185 bp was detected with each specific primer set, the strain was identified as type I or type II.

Pulsed-field gel electrophoresis. Five *Bartonella* strains isolated from the patient were cultivated on 5% rabbit blood agar plates at 35 C in 5% CO_2 for 4-7 days. The bacteria grown on the agar plates were harvested and suspended in sterile distilled water and washed twice by centrifugation at 12,000 rpm for 5 min. The turbidity of the suspension was adjusted to McFarland # 6. Agarose plugs were prepared by adding 1 ml of cell suspension to the same amount of 2% low-melting-point agarose (Bio-Rad). The solidified agarose plugs were treated using procedures reported previously (22). The restriction enzyme *NorI* (Roche, Germany) was used for the analysis of genomic DNA patterns of the isolates. The molecular size of each isolate was calculated with the Windows version of Lane Multi Screener, version 2.0 (Atto Co., Ltd., Japan).

Results

The *B. henselae*-specific IgG antibody was detected in the patient serum samples at titers of 1:64 to strain Houston-1.

Histopathological examination showed severe granulomatous lymphadenitis. The lymph node was infiltrated with neutrophils, and abundant necrotic lesions and small bacilli suspected to be *Bartonella* species were observed in the tissue (Fig. 4).

B. henselae DNA was found in the blood and lymph node specimens from the patient and in fleas from the cat by species-specific PCR (Fig. 5). Colonies suspected of being *Bartonella* species were isolated from the homogenate of the lymph node specimen at the number

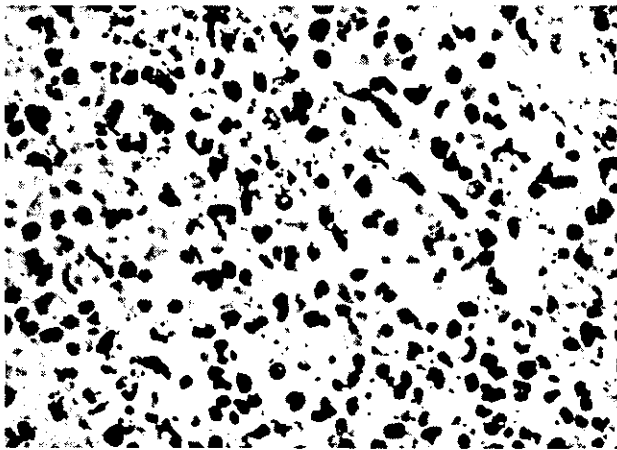


Fig. 4. Warthin-Starry stain of a lymph node from the patient showing many necrotic lesions with neutrophil infiltrations and small bacilli suspected of being *Bartonella* ($\times 60$).



Fig. 5. Detection of *Bartonella* DNA by species-specific PCR. S, DNA size standard; lane 1, *B. henselae* ATCC49882; lane 2, *B. clarridgeiae* ATCC51734; lane 3, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* ATCC51672; lane 4, blood of the patient; lane 5, inguinal lymph node of the patient; lane 6, fleas collected from the patient's cat.

of 90 colony forming units (CFU)/g. Five colonies (IZM1–IZM5) were identified as *B. henselae* by species-specific PCR (Fig. 6). No bacteria were isolated from the blood of the patient or the flea samples.

The extracted DNA from the isolates and flea samples yielded a 16S rRNA gene type I fragment by PCR with primers 16SF and BH1, while no specific band of 185 bp was observed with primers 16SF and BH2.

Five *B. henselae* isolates from the lymph node were submitted to PFGE analysis and digested by the restriction enzyme *NotI*. Isolates IZM1 (lane 1), IZM4 (lane 4) and IZM5 (lane 5) showed a similar genomic DNA pattern, while the patterns of IZM2 (lane 2) and IZM3 (lane 3) were different from those of the other three isolates (Fig. 7). The genome size of *B. henselae* isolates was calculated to be 1.7 Mbp (strains IZM1, IZM4 and IZM5) and 1.9 Mbp (strains IZM2 and IZM3) by the software used.

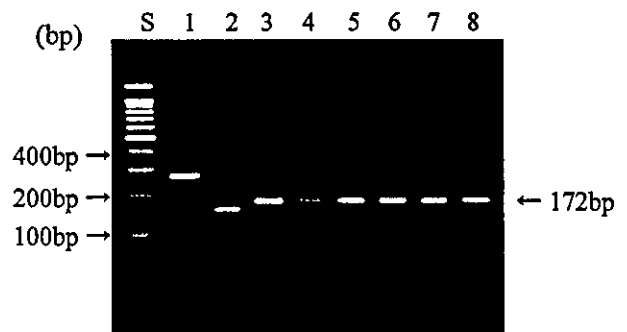


Fig. 6. Identification of *Bartonella* isolates from the inguinal lymph node of the patient by species-specific PCR. S, DNA size standard; lane 1, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* ATCC51672; lane 2, *B. clarridgeiae* ATCC51734; lane 3, *B. henselae* ATCC49882; lane 4, IZM1; lane 5, IZM2; lane 6, IZM3; lane 7, IZM4; lane 8, IZM5.

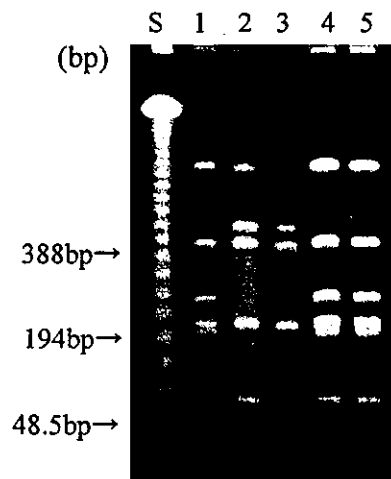


Fig. 7. DNA analysis of *Bartonella* isolates from the patients after *NotI* digestion by pulsed-field gel electrophoresis. S, DNA size standard (Lambda ladder); lane 1, IZM1; lane 2, IZM2; lane 3, IZM3; lane 4, IZM4; lane 5, IZM5.

Discussion

This is the first report of the isolation of *Bartonella henselae* from a CSD patient in Japan. The patient showed a significant antibody elevation in reaction to strain Houston-1 after typical clinical manifestation of CSD, and the DNA of *B. henselae* was also detected from the blood and lymph node specimen. Thus, the patient was clinically, serologically, histopathologically, genetically and bacteriologically diagnosed as having CSD.

La Scola (18) reported that only 5 of 290 patients with suspected CSD were positive for isolation, while 73 patients were diagnosed by serology or genomic detection among definitively diagnosed CSD patients. In

Australia, seventeen *B. henselae* strains were isolated from the 83 PCR-positive human specimens (9). In our previous study, though genetical and/or serological diagnosis was successful in three suspected CSD patients, no *Bartonella* species was isolated from the patients (20). Thus, an isolation of *B. henselae* from CSD patients is seldom accomplished, because suitable materials are not available, the culture conditions are not appropriate or the organism shows fastidious, cytozoic and slow-growth characteristics. In the present case, the patient had received no treatment with any antibiotics before sample collection. Antibiotic treatment seems to make isolation and establishment of strains difficult in CSD patients.

As reported previously, CSD patients were more likely to own a kitten under 12 months old (5). Several investigations have also suggested that young cats are strongly associated with bacteremia and seropositivity to *B. henselae* (6, 11, 21, 23). In the present case, the patient had also kept a kitten 2 months before the onset of the disease and had many cat scratches. These data indicate that cats are the significant natural reservoir of the organism, and cat ownership and close contact are the most important epidemiological risk factors for CSD (5, 14, 20).

A number of CSD patients have owned kittens infested with cat fleas (*Ctenocephalides felis*), and *B. henselae* strains and the DNA from fleas have been found on carrier cats (4, 15). *B. henselae* was isolated from the blood and the fleas on a cat of a patient with CSD in Australia (8), although this patient had no history of a bite or scratch from the cat and no primary lesion on the skin. Higgins et al. (12) have shown that *B. henselae* can survive in the gut of a flea up to 9 days after infection. The present patient had many fleabites on his body, and *B. henselae* DNA was also detected in the flea samples obtained from the patient's cat. These data suggest that fleas may play some role in the transmission of *B. henselae* from infected cat to human.

The prevalence of the 16S rRNA gene type of *B. henselae* was different in patients depending upon the country where patients lived. In the Netherlands, *B. henselae* type I was more prevalent than type II in the isolates from CSD patients (3). Zeaiter et al. (35) reported that among the 107 patients of France, 64 (59.8%) were infected with the Marseille genogroup (type II) and 43 (48.2%) were infected with the Houston-1 genogroup (type I) when examined by PCR, while there were no significant differences between the genogroups epidemiologically or clinically. In Germany, *B. henselae* type II was isolated more frequently from cats than type I (27), but 23 of the 39 PCR-positive lymph nodes from the patients were found to belong to genotype I and 9

(23%) to genotype II by type-specific PCR (30). In Australia, out of 17 *B. henselae* strains isolated from CSD patients, 13 (76.5%) isolates belonged to the Houston-1 genotype and 4 (23.5%) belonged to the Marseille genotype (9). Although we had, unfortunately, no opportunity to isolate the organism from the cat implicated in our patient, *B. henselae* type I was isolated from the inguinal lymph node and identical DNA was detected from the blood of the patient and fleas from the cat. In our previous study, we found that most infected cats in Japan harbored *B. henselae* type I in their blood (21). These data suggest that our patient's cat harbored *B. henselae* type I, which may be the predominant genotype in CSD patients in Japan.

To date, there is no available data indicating the infective dose of *B. henselae* in CSD patients. In this study, 90 CFU/g of the organism was detected from the lymph node specimen. This suggests that the infective dose of *B. henselae* is relatively low, which may be why it is difficult to isolate the organism from clinical specimens of CSD patients.

In PFGE analysis, the genomic DNA size of *B. henselae* isolated from the patient was found to be 1.7 Mbp and 1.9 Mbp by digestion with *NotI* enzyme. Previous study also showed that the genome size of *B. henselae* isolates from cats in Germany, the United States, France and Japan varied from approximately 1.5 Mbp to 2.9 Mbp (22, 29). The genome size of the isolates obtained from our patient is in agreement with previous data of isolates from cats. Sander et al. (30) reported three *B. henselae* variants in human lymph node specimens by PCR and explained the wide variation of genomic size of the organism by the eventual presence of double bands by *SmaI* endonuclease digestion, especially in the high-molecular-weight range above 194 kbp. Zeaiter et al. (35) also identified two *B. henselae* genogroups using the *groE* sequences and four genotypes using *Pap31* sequences. Thus, several genetic variants were found in the strain of *B. henselae*. In our previous study with cat strains from France, the United States and Japan, some cats were co-infected with genetically different *B. henselae* strains (22). In the present PFGE analysis, two different genome patterns were obtained from five *B. henselae* isolates, which suggests that our patient has either been co-infected or possibly re-infected with two genetically different strains of *B. henselae* type I.

This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 14360193) from the Japan Society for the Promotion of Science.

References

- 1) Abbott, R.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kikuchi, Y., Koehler, J.E., and Pedersen, N.C. 1997. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 41–51.
- 2) Anderson, B., Sims, K., Regnery, R., Robinson, L., Schmidt, M.J., Goral, S., Hager, C., and Edwards, K. 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 942–948.
- 3) Bergmans, A.M., Schellekens, J.F., van Embden, J.D., and Schouls, L.M. 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 254–260.
- 4) Bergmans, A.M., de Jong, C.M., van Amerongen, G., Schot, C.S., and Schouls, L.M. 1997. Prevalence of *Bartonella* species in domestic cats in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2256–2261.
- 5) Carithers, H.A. 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am. J. Dis. Child.* **139**: 1124–1133.
- 6) Chomel, B.B., Abbott, R.C., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kass, P.H., Glaser, C.A., Pedersen, N.C., and Koehler, J.E. 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2445–2450.
- 7) Dolan, M.J., Wong, M.T., Regnery, R.L., Jorgensen, J.H., Garcia, M., Peters, J., and Drehner, D. 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann. Intern. Med.* **118**: 331–336.
- 8) Flexman, J.P., Lavis, N.J., Kay, I.D., Watson, M., Metcalf, C., and Pearman, J.W. 1995. *Bartonella henselae* is a causative agent of cat scratch disease in Australia. *J. Infect.* **31**: 241–245.
- 9) Fournier, P.E., Robson, J., Zeaiter, Z., McDougall, R., Byrne, S., and Raoult, D. 2002. Improved culture from lymph nodes of patients with cat scratch disease and genotypic characterization of *Bartonella henselae* isolates in Australia. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3620–3624.
- 10) Goral, S., Anderson, B., Hager, C., and Edwards, K.M. 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA by polymerase chain reaction from suppurative nodes of children with cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **13**: 994–997.
- 11) Hamilton, D.H., Zangwill, K.M., Hadler, J.L., and Cartter, M.L. 1995. Cat-scratch disease—Connecticut, 1992–1993. *J. Infect. Dis.* **172**: 570–573.
- 12) Higgins, J.A., Radulovic, S., Jaworski, D.C., and Azad, A.F. 1996. Acquisition of the cat scratch disease agent *Bartonella henselae* by cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* **33**: 490–495.
- 13) Jensen, W.A., Fall, M.Z., Rooney, J., Kordick, D.L., and Breitschwerdt, E.B. 2000. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1717–1722.
- 14) Kikuchi, E., Maruyama, S., Sakai, T., Tanaka, S., Yamaguchi, F., Hagiwara, T., Katsube, Y., and Mikami, T. 2002. Serological investigation of *Bartonella henselae* infections in clinically cat-scratch disease-suspected patients, patients with cardiovascular diseases, and healthy veterinary students in Japan. *Microbiol. Immunol.* **46**: 313–316.
- 15) Koehler, J.E., Glaser, C.A., and Tappero, J.W. 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *J. Am. Med. Assoc.* **271**: 531–535.
- 16) Kordick, D.L., Wilson, K.H., Sexton, D.J., Hadfield, T.L., Berkhoff, H.A., and Breitschwerdt, E.B. 1995. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3245–3251.
- 17) Kordick, D.L., Hilyard, E.J., Hadfield, T.L., Wilson, K.H., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., and Breitschwerdt, E.B. 1997. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1813–1818.
- 18) La Scola, B., and Raoult, D. 1999. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1899–1905.
- 19) Margileth, A.M., and Baehren, D.F. 1998. Chest-wall abscess due to cat-scratch disease (CSD) in an adult with antibodies to *Bartonella clarridgeiae*: case report and review of the thoracopulmonary manifestations of CSD. *Clin. Infect. Dis.* **27**: 353–357.
- 20) Maruyama, S., Kabeya, H., Nogami, S., Sakai, H., Suzuki, J., Suzuki, H., Sugita, H., and Katsube, Y. 2000. Three cases of cat scratch disease diagnosed by indirect immunofluorescence antibody assay and/or polymerase chain reaction of 16S rRNA gene of *Bartonella henselae*. *J. Vet. Med. Sci.* **62**: 1321–1324.
- 21) Maruyama, S., Nakamura, Y., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T., and Katsube, Y. 2000. Prevalence of *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **62**: 273–279.
- 22) Maruyama, S., Kasten, R.W., Boulouis, H.J., Gurfield, N.A., Katsube, Y., and Chomel, B.B. 2001. Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **79**: 337–349.
- 23) Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Katsube, Y., and Mikami, T. 2003. Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiol. Immunol.* **47**: 147–153.
- 24) Murakami, K., Tsukahara, M., Tsuneoka, H., Iino, H., Ishida, C., Tsujino, K., Umeda, A., Furuya, T., Kawauchi, S., and Sasaki, K. 2002. Cat scratch disease: analysis of 130 seropositive cases. *J. Infect. Chemother.* **8**: 349–352.
- 25) Reed, J.B., Scales, D.K., Wong, M.T., Lattuada, C.P., Jr., Dolan, M.J., and Schwab, I.R. 1998. *Bartonella henselae* neuroretinitis in cat scratch disease. Diagnosis, management, and sequelae. *Ophthalmology* **105**: 459–466.
- 26) Regnery, R.L., Olson, J.G., Perkins, B.A., and Bibb, W. 1992. Serological response to “*Rochalimaea henselae*” antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**: 1443–1445.
- 27) Sander, A., Buhler, C., Pelz, K., von Cramm, E., and Bredt, W. 1997. Detection and identification of two *Bartonella*

- henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 584–587.
- 28) Sander, A., Posselt, M., Oberle, K., and Bredt, W. 1998. Seroprevalence of antibodies to *Bartonella henselae* in patients with cat scratch disease and in healthy controls: evaluation and comparison of two commercial serological tests. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**: 486–490.
- 29) Sander, A., Ruess, M., Bereswill, S., Schuppler, M., and Steinbrueckner, B. 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 2973–2981.
- 30) Sander, A., Posselt, M., Bohm, N., Ruess, M., and Altwegg, M. 1999. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 993–997.
- 31) Welch, D.F., Hensel, D.M., Pickett, D.A., San Joaquin, V.H., Robinson, A., and Slater, L.N. 1993. Bacteremia due to *Rochalimaea henselae* in a child: practical identification of isolates in the clinical laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 2381–2386.
- 32) Welch, D.F., Pickett, D.A., Slater, L.N., Steigerwalt, A.G., and Brenner, D.J. 1992. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 275–280.
- 33) Yoshida, H., Kusaba, N., Omachi, K., Miyazaki, N., Yamawaki, M., Tsuji, Y., Nakahara, K., Sumino, M., Noudomi, M., Shimokawa, Y., and Tanikawa, K. 1996. Serological study of *Bartonella henselae* in cat scratch disease in Japan. *Microbiol. Immunol.* **40**: 671–673.
- 34) Zangwill, K.M., Hamilton, D.H., Perkins, B.A., Regnery, R.L., Plikaytis, B.D., Hadler, J.L., Cartter, M.L., and Wenger, J.D. 1993. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N. Engl. J. Med.* **329**: 8–13.
- 35) Zeaiter, Z., Liang, Z., and Raoult, D. 2002. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3641–3647.

話題の感染症

—猫ひっかき病—

Cat-scratch disease

まる やま そう いち
丸 山 総 一
Soichi MARUYAMA

はじめに

猫の飼育頭数は現在700～800万頭ともいわれている。特に猫は、ペットの中でも人と濃密に接触する機会の多い動物種であるため、猫を介して感染する人獣共通感染症の1つである猫ひっかき病 (Cat-scratch disease: CSD) の発生数も近年増加の傾向にある。CSDはフランスで報告された当初から、猫が関与する疾病として認識されていたが、病原体が確定されないまま今日に至ったため、その研究は他の疾病に比べ遅れた状況にあった。1990年代の米国において、猫が感染源となってAIDS患者に発生した特殊な血管増殖性の疾病から新種の細菌 *Bartonella henselae* が分離されたことが契機となって、本菌が猫ひっかき病の主要な病原体であることが明らかとなった。その後、猫の飼育頭数の増加とともに医学領域でもCSDは新興感染症として注目されるようになり、各国における研究から、種々の事実が明らかになってきた。

身近なペットである猫と楽しく、また、快適に生活していくために、その生態や習性はもちろんのこと、CSDに対する正しい認識を持つことが重要である。

I. 病原体

Bartonella 属の菌は、*Proteobacteria* 門、*Alpha-proteobacteria* 綱、*Rhizobiales* 目、*Bartonella* 科、*Bartonella* 属に分類されている。*Bartonella* は一科一属の細菌で、現在、20種3亜種が知られている。

いずれもほ乳類を自然病原巣とし、人に病原性を有すると考えられているものは8種 (1亜種を含む) である (表1)。

猫を自然病原巣とする *Bartonella* は *B. henselae*, *B. clarridgeiae*, *B. koehlerae* の3菌種が知られている。*B. henselae* はCSDの主要な病原体であるが、*B. clarridgeiae* も人に定型的、非定型的なCSDを起こすことが報告されている^{45,49)}。

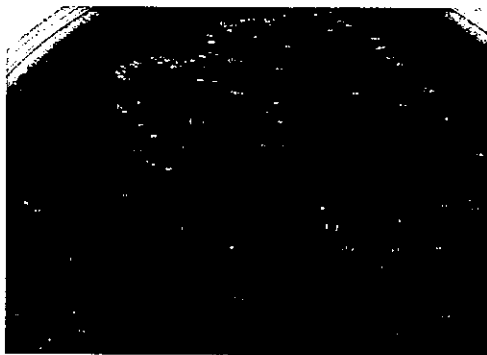
B. henselae は初代培養では2～3週間で灰白色、表面が隆起したカリフラワー状、非溶血性、直径約0.5～1mm程度の微小なコロニーを形成する (写真1)。*B. clarridgeiae* は初代分離培養では、約5日で可視コロニーを形成する。また、*B. koehlerae* は5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地では発育せず、チョコレート寒天培地を用いて14日間微好気培養することで、ピンポイントコロニーを形成する³²⁾。*B. koehlerae* の猫からの分離は他の2菌種に比べ極めて難しく、分離報告例は1例のみである²¹⁾。

顕微鏡下では、*B. henselae* は小型 (2×0.5～0.6 μm) の微小なグラム陰性、多形性単桿菌の特徴を示す。大きさ、形態は *Campylobacter* 属に類似する。本菌は運動性 (twitching) を示すが、電子顕微鏡では鞭毛は確認されていない⁶³⁾。*B. clarridgeiae* の大きさは1.2×0.5 μmで、形態も *B. henselae* に類似するが、叢毛性の鞭毛を保有する。

B. henselae は極めて発育が遅く、また、発育に血液を必要とするため、腸内細菌で用いられるような生化学検査は応用できない。分離した *B. henselae* を疑うグラム陰性桿菌の同定には、抽出した菌体DNAによるPCR法を用いる。クエン酸合成酵素遺

表1 *Bartonella* 属菌の自然病原巣と人に対する病原性

菌種	自然病原巣	人に対する病原性
<i>B. alsatica</i>	野兎	不明
<i>B. bacilliformis</i>	人	カリオン病, オロヤ熱, 細菌性血管腫
<i>B. birtlesii</i>	齧歯類	不明
<i>B. bovis</i>	牛	不明
<i>B. capreoli</i>	反芻獣	不明
<i>B. chomelii</i>	牛	不明
<i>B. clarridgeiae</i>	猫	猫ひっかき病
<i>B. doshiae</i>	齧歯類	不明
<i>B. elizabethae</i>	齧歯類	心内膜炎
<i>B. grahamii</i>	齧歯類	視神経網膜炎
<i>B. henselae</i>	猫	猫ひっかき病, 細菌性血管腫など
<i>B. koehlerae</i>	猫	不明
<i>B. peromysci</i>	齧歯類	不明
<i>B. quintana</i>	人	塹壕熱, 細菌性血管腫, 心内膜炎
<i>B. schoenbuchensis</i>	野生鹿	不明
<i>B. talpae</i>	齧歯類	不明
<i>B. taylori</i>	齧歯類	不明
<i>B. tribocorum</i>	齧歯類	不明
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	齧歯類	菌血症, 発熱
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	犬	心内膜炎
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	齧歯類	不明
<i>B. washoensis</i>	齧歯類	不明

写真1 血液寒天培地上の *Bartonella henselae* のコロニー

伝子の PCR 増幅産物を 2 種の制限酵素 *TaqI*, *HhaI* で切断し, その断片の電気泳動パターンを比較する方法⁶³⁾ あるいは種特異的プライマーを用いた PCR 法で他の *Bartonella* 属菌と鑑別することができる³⁶⁾。最近の研究から, *B. henselae* は PCR 法により 2 種類の 16SrRNA 型 (type I, type II) に分類されること^{5, 65)}, PCR 産物の制限酵素切断パターン²⁴⁾, パルスフィールド電気泳動パターン^{55, 66)} などにより種々の遺伝子型に分類されることが明らかとなり, その生態も複雑化の様相を呈している。

II. 疫学

1. 発生状況

Jackson ら³⁴⁾ によると, 1992 年の全米の CSD 患

者は年間約 22,000 人で, そのうち約 2,000 人が入院しており, CSD の年間発生率は 0.77 ~ 0.88/100,000 人と見積もられている。米国のコネチカット州では, 1992 ~ 1993 年にかけて 246 人の CSD 患者が報告され, 年間発生率は 3.7/100,000 人となっている²⁸⁾。

わが国では, 1953 年に浜口ら²⁷⁾ によって本症が初めて報告されて以来, 症例は散見されているが, 全国的な CSD 患者数に関する統計はない。神戸市と福岡市の医師に行ったアンケート調査において, 医師が経験した人獣共通感染症のうち CSD は外科系医師では 1 位, 内科系医師では 2 位にランクされている⁷⁰⁾。これより, わが国でも相当数の CSD 患者が発生しているものと考えられる。

各国の CSD 患者の *B. henselae* 抗体陽性率は健常者のそれに比べて, 有意に高い値を示している。わが国でも CSD と診断された患者の 39 ~ 50% が *B. henselae* 抗体陽性であった^{40, 68, 76)}。また, 健常者のうち, 猫の飼育・受傷歴のないグループの抗体陽性率は 2.3% (4/173), 猫の飼育歴・受傷歴のあるグループでは 12.5% (10/80), CSD 患者の同居家族では 21.4% (3/14) であることが示されている^{68, 76)}。これらの事実は, 猫が本症の重要な感染源であることを示しているものと思われる。

2. 患者の性, 年齢

CSD患者は、男性に多発する傾向があることが報告されている^{10,34)}。一方、吉田らの報告では、CSD患者の60%以上が女性で、10代と40代の女性に多発する傾向がみられている⁷⁶⁾。CSDは小児から老人まで全年齢層に発生するが、成人より子供の割合が高く、15歳以下の症例が45～50%を占めている^{10,28,34,60)}。わが国は、9歳以下の子供では、男子に多発する傾向がみられる⁷⁷⁾。このことは、男子の猫の扱いが乱暴で、引っ掻かれたり、噛まれたりする頻度が高いことを示しているのかもしれない。

3. 発生と季節

CSDは7～12月^{10,77)}、あるいは秋から冬にかけて多発している^{28,48)}。この理由として、夏のネコノミの繁殖期に*B. henselae*に感染する猫が増加し、その後、寒い時期になると猫は室内にいることが多くなるため、飼い主が猫から受傷する機会が増えるためではないかと考えられている。

4. 猫の*B. henselae*抗体保有率

猫の*B. henselae*抗体保有率は国、地域、あるいは調査対象の猫等によってさまざまである(表2)。

米国のコネチカット州では、CSD患者の飼い猫の*B. henselae*抗体陽性率は81%で、対照群の猫の

38%に比べ有意に高いことが示されている⁷⁸⁾。Childsら¹¹⁾は、調査した猫の14.7%(87/592)が抗体陽性で、特に、野良猫で44.4%と高いことを示している。カリフォルニア州を中心とした調査では、81%(166/205)の猫が抗体陽性で、高い抗体価を示した猫では菌血症を示す率が高いことも示されている¹²⁾。動物病院に来院した猫を対象とした調査では、21%(109/518)が抗体陽性であった⁷⁾。さらに、米国³⁵⁾や日本の猫⁵⁷⁾の調査で、気候が温暖で湿潤な地域では本菌の抗体陽性率が高いのに対し、寒冷な地域で低かったことから、本症はノミを含む節足動物の分布と関係している可能性が示されている。

その他の国では、オーストリアで33.3%(32/96)³⁾、フランスで36%(23/64)¹³⁾、スイス・南ドイツで8.3%(61/728)²³⁾、オランダで56%⁶⁾、ジンバブエで24%、南アフリカ共和国で21%³⁸⁾、イスラエルで39.5%⁴⁾、インドネシアで54%⁵⁰⁾の猫がそれぞれ抗体陽性であったことが報告されている。

わが国では、Uenoら⁷¹⁾が、調査した猫の15.1%が*B. henselae*抗体陽性であったことを報告している。Maruyamaら⁵²⁾は、神奈川県および埼玉県では飼育猫の9.1%が*B. henselae*抗体陽性であったこと、また、全国の猫では8.8%が抗体陽性であったこと、1～3歳の若い猫、室外飼育の猫およびノミの寄生のあった猫で有意に高かったことを明らかにしている⁵⁷⁾。

表2 各国の猫における*Bartonella henselae*抗体保有状況

調査地域	陽性率	対象猫	文献
米国(メリーランド州)	11.8～44.4%(平均14.7%)	不用猫, 飼い猫	11)
米国(全米)	4～54.6%(平均27.9%)	飼い猫	35)
米国(カリフォルニア州)	61.6～100%(平均81.0%)	飼い猫(61.8%, 86.4%) 不用猫(85.7%), 野良猫(100%)	12)
米国(ハワイ州)	81%	主として子猫	18)
米国(コネチカット州)	81%, 38%	患者飼育猫, 対照猫	78)
米国(ノースカロライナ州)	21%	動物病院の病猫	7)
米国(ノースカロライナ州)	40.4%	飼い猫	4)
イスラエル	39.5%	飼い猫	4)
フランス(パリ)	36%	飼い猫	13)
オランダ	50%	収容猫(野良猫52%, 飼い猫35%)	5)
オランダ	56%	飼い猫	6)
スイス・南ドイツ	8.3%	飼い猫(健康猫, 病猫)	23)
ジンバブエ	24%	飼い猫	38)
南アフリカ共和国	21%	飼い猫	38)
日本	6.3～22.0%(平均15.1%)	飼い猫	71)
日本	9.1%	飼い猫(神奈川県, 埼玉県)	52)
日本	0～24.0%(平均8.8%)	飼い猫(北海道～沖縄県)	57)
オーストリア	33.3%	飼い猫(健康猫)	3)
インドネシア	54%	飼い猫, 野良猫	50)

米国では野生のピューマ、ボブキャットや動物園で飼育されているヒョウやライオンなどの猫科動物からも *B. henselae* 抗体が検出されており、その保有率も地域によっては飼い猫と同等の高い値となっている⁷⁴⁾。CSDの疫学において、これらの野生猫科動物がどのように関与しているのかは不明であるが、*B. henselae* は自然界の猫科動物にも広く分布しているものと思われる。

5. 猫の *Bartonella* 保菌率

Regnery ら⁶²⁾ が1992年に初めて猫の *B. henselae* 菌血症を報告し、CSDおよび細菌性血管腫 (Bacillary angiomatosis: BA) の病原原としての猫の重要性を指摘して以来、世界各国の猫の保菌状況が報告されるようになった (表3)。

米国の Koehler ら⁴³⁾ は、BA患者の所有する7頭の猫の血液から本菌を検出するとともに、サンフランシスコ周辺のペットおよび収容猫の41% (25/61) が菌血症であることを報告した。Chomel ら¹²⁾ は、調査した北カリフォルニアの猫の39.5%が菌血症で、特に、12カ月齢以下の若い猫とノミの感染を受けている猫において菌血症の割合が高いことを示している。また、ハワイでは72.4% (21/29)¹⁸⁾、ドイツでは13% (13/100)⁶⁵⁾、オランダでは22%⁶⁾、デンマークでは22.6% (21/93)¹⁷⁾、インドネシアでは64% (9/14)⁵⁰⁾、タイでは27.6% (76/275)⁵⁶⁾、フィリピンでは61% (19/31)¹⁵⁾ の猫から *Bartonella* が

分離されている。

わが国では、1995年に Maruyama ら⁵¹⁾ が初めて猫から *B. henselae* の分離に成功した。その後、Maruyama ら⁵⁴⁾ は、全国の690頭の猫について詳細に調査し、その7.2% (50/690) が *Bartonella* 属菌を保菌していたこと、3歳以下の猫で保菌率が高いこと、わが国の猫の保菌率は北海道、宮城県の0%から沖縄県 (島尻郡) の20%で、南の地方や都市部の猫で高いことを明らかにしている (表4)。これより、わが国の猫の *Bartonella* 保菌率は、抗体陽性率と同様にノミの分布あるいは猫の密度に関係している可能性がある。

猫は *B. henselae*, *B. clarridgeiae* に単独、あるいは両菌種に混合感染している例が各国で報告されている^{26, 29, 50, 54, 56)}。

6. ベクター

CSD患者は、ネコノミ (*Ctenocephalides felis*) が多く寄生した子猫を飼育している人で多発しており⁴³⁾、また、*B. henselae* 保菌猫に寄生していたネコノミからも本菌が分離されたこと²⁶⁾ や猫から採取したノミの33.3% (12/36) から *B. henselae* のDNAが検出されていること³³⁾ から、ネコノミが *B. henselae* のベクターである可能性が示唆された。Chomel ら¹⁴⁾ は、*B. henselae* 菌血症の猫から採取したノミを5匹のSPF猫に寄生させたところ、SPF猫は数週間後にすべて菌血症になったことから、*B. henselae* の猫

表3 各国の猫における *Bartonella* 属菌分離状況

調査地域	分離率	対象猫, 分離菌種など	文献
米国 (サンフランシスコ)	41%	飼い猫 (41%), 収容猫 (41%)	43)
米国 (カリフォルニア州)	4.4~70.4%	飼い猫 (4.4~47.7%), 収容猫 (53%), 野良猫 (70.4%)	12)
米国 (ハワイ州)	72.4%	主として子猫	18)
米国	89%	CSD患者飼育猫	44)
米国	28%	飼い猫	44)
フランス (パリ)	11%	飼い猫	13)
フランス (ナンシー)	53%	野良猫	29)
		<i>B. henselae</i> (type I, type II), <i>B. clarridgeiae</i>	
ドイツ	13%	飼い猫	65)
オランダ	22%	収容猫 (野良猫65%, 飼い猫16%)	6)
日本	0~20%	飼い猫 (北海道~沖縄県, 平均7.2%)	54)
		<i>B. henselae</i> (type I, type II), <i>B. clarridgeiae</i>	
タイ	12.8~50%	飼い猫, 野良猫 (平均27.6%)	56)
		<i>B. henselae</i> (type I, type II), <i>B. clarridgeiae</i>	
インドネシア	64%	飼い猫, 野良猫	50)
		<i>B. henselae</i> , <i>B. clarridgeiae</i>	
フィリピン	61%	飼い猫	15)
		<i>B. henselae</i> (type I), <i>B. clarridgeiae</i>	
デンマーク	22.6%	飼い猫 (18.2%), 野良猫 (26.5%)	17)

表4 日本の猫の *Bartonella* 属菌分離状況

道府県 (市, 郡)	検体数	陽性数 (%)
北海道 (札幌市)	50	0
宮城県 (仙台市)	50	0
新潟県 (上越市)	49	1 (2.0)
神奈川県 (藤沢市)	266	14 (5.3)
京都府 (京都市)	50	8 (16.0)
大阪府 (三島郡)	50	8 (16.0)
兵庫県 (三田市)	50	1 (2.0)
島根県 (簸川郡)	25	2 (8.0)
鹿児島県 (始良郡)	50	6 (12.0)
沖縄県 (島尻郡)	50	10 (20.0)
計	690	50 (7.2)

(Maruyama S. ら, J Vet Med Sci, 62, 273-279, 2000 より改変)

間の伝播にネコノミが関与していることを実験的に明らかにした。Maruyama ら⁵⁷⁾ は、ノミが寄生していた猫の *B. henselae* 抗体保有率が寄生していない猫に比べ有意に高かったことから、ノミが本菌のベクターであることを示した。また、ノミの腸管内で *B. henselae* が長期間生存すること³⁰⁾ や感染猫の血液を吸血したノミの糞を他の猫に接種することで、感染が成立することも報告されている⁶⁾。猫では何らかの理由で口腔内に *B. henselae* が排菌されるか、あるいはノミの糞便中に排泄され猫の体表に付着した菌をグルーミングの際に歯牙や爪に付着させたり、感染ノミを口腔内に取り込んで本菌に汚染されることにより、猫間あるいは猫から人へ創傷感染するものと思われる。

現在のところ、ノミから人への *B. henselae* 感染は明らかにされていないが、猫から受傷していないにもかかわらず、ノミから感染したと思われる例が、日本⁷⁷⁾ やオーストラリア²²⁾ で報告されている。Maruyama ら⁵⁸⁾ は、飼い猫に寄生していた多数のノミが飼い主に寄生した後に CSD を発症した例を報告している。この事例では猫ノミからも *B.*

henselae の DNA が検出されると共に、患者の鼠径リンパ節から本菌がわが国で初めて分離されている。ネコノミは広い宿主域を有することから、感染猫の血液を吸血したノミが人へ本菌を伝播する可能性も否定できない。

Ⅲ. 人の臨床症状

定型的な CSD では、猫から受傷後、3～10 日目に受傷部すなわち菌の侵入部位 (通常、手指や前腕) に虫さされに似た病変が形成され、丘疹 (写真 2) から水疱に、また、一部では化膿や潰瘍に発展する場合もある。これらの初期病変から 1, 2 週間後にリンパ節の腫脹が現れる。リンパ節炎は、一般に一側性で、鼠径部、腋下 (写真 3) あるいは頸部リンパ節に多く現れる^{45, 53)}。わが国の 130 名の CSD 患者のうち、リンパ節の腫脹を呈した患者は 84.6% で、そのうち 33% は頸部、27% が腋窩部、18% が鼠径部のリンパ節であった⁶⁰⁾。通常、リンパ節の腫脹は疼痛を伴い、数週から数カ月間持続する。多くの症例で、全身感染の徴候、すなわち、発熱、悪寒、倦怠、食欲不振、頭痛等を示すが、一般に良性で、自然に治癒する。

CSD の非定型的な症状は 5～10% の割合で発生する。症状としては、パリノー症候群 (耳周囲のリンパ節炎、眼球運動障害等)、脳炎、骨溶解性の病変、心内膜炎、肉芽腫性肝炎、あるいは血小板減少性の紫斑等が報告されている^{10, 47, 48)}。*B. henselae* の心内膜炎は、猫ひっかき病の非定型的な症状として認められ、特に猫との接触がある心臓弁膜症患者に多くみられる^{20, 31, 46)}。脳炎は CSD の最も重篤な合併症の一つで、リンパ節炎を発症してから 2～6 週間

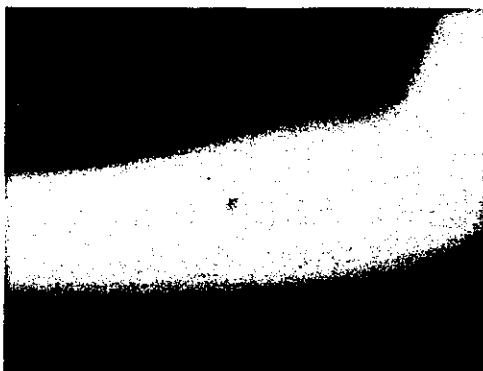


写真2 猫から受傷後2週間目にできた丘疹(左前腕部)
(写真提供: 日本大学生物資源科学部, 丸山総一)



写真3 腋窩リンパ節が鶏卵大に腫脹した例(6歳, 男子)
(写真提供: 公立八女総合病院, 吉田博 博士)

に発症する^{10,19)}。ほとんどの例で後遺症なしに完全に治癒する。

免疫不全状態の人が *B. henselae* に感染した場合、細菌性血管腫 (BA) を起こす^{1,2,8,67,72)}。BA は上皮様血管腫症 (epitheloid angiomatosis) ともいわれ、血液の充満した囊腫を特徴とした皮膚の血管増殖性疾患で、臨床的にはカポジ肉腫のような紫色や無色の小胞あるいは囊胞性皮膚病変である⁴³⁾。実質臓器に囊腫が波及した場合、細菌性肝臓紫斑病 (bacillary peliosis hepatis), 脾臓性紫斑病 (splenic peliosis) とも呼ばれる。

B. henselae による菌血症も HIV-感染者⁴³⁾, 骨髄移植者²⁾, 発熱を呈した免疫健全者⁷³⁾ で報告されている。

IV. 動物の臨床症状

B. henselae に感染した猫は通常、臨床症状は示さない^{12,25,37,62)}。猫を実験的に *B. henselae* に感染させた場合、2~3週間で菌血症 (菌量: 3~10⁶FU/ml) に達し、2~3カ月間持続する^{12,25)}。自然感染した猫では1~2年もの間、菌血症が持続した例も報告されている^{37,44)}。

Breitschdwertら⁷⁾ は、輸血により *B. henselae* を実験的に感染させた2匹の猫に48~72時間の発熱、一過性の神経機能障害が生じたことを報告している。また、O'Reillyら⁶¹⁾ は、自然感染猫から分離した *B. henselae* (LSU株)、LSU株実験感染猫の血液、ならびにLSU株実験感染猫を吸血させたノミの糞をそれぞれ他の猫に皮内投与したところ、いずれの猫も傾眠、発熱、食欲不振などの臨床症状を示したことから、*B. henselae* の株によっては猫に病原性を示すものがあると思われる。

われわれが収容猫を調査したところ、幼猫や成猫からは *B. henselae* は分離されたが、新生猫からは分離されなかったことから、猫では垂直感染は起こらないものと思われる (表5)。

B. clarridgeiae は猫が自然病原巣であるが、猫に対する病原性は確認されていないが、Chomelら¹⁶⁾ は、*B. clarridgeiae* を犬の心内膜炎の病変部から分離し、本菌は犬に対しても病原性を有することを明らかにした。

近年、peliosis hepatis を呈した犬の肝臓から *B.*

表5 わが国の収容猫における *Bartonella henselae* 分離状況

年齢	検体数	陽性数 (%)
新生猫	88	0
子猫~成猫	162	5 (3.1)
不明	12	0
合計	262	5 (1.9)

(丸山ら調査データ)

henselae の DNA が検出され⁴¹⁾, またリンパ節炎、血小板減少症、運動失調、貧血、瘦削を呈した犬の血液から *B. elizabethae* あるいは *B. henselae* の DNA が検出されたことから⁵⁹⁾, これらの *Bartonella* は犬に対しても病原性を有するとともに、犬が猫と同様に病原巣となる可能性が示されている。

V. 診断

これまで、CSDの診断は、猫による外傷後に起きたリンパ節の腫脹、皮膚反応、あるいはバイオプシー検体中に多形性、W-S銀染色陽性、グラム陰性桿菌の存在を顕微鏡学的に確認することで行われてきた。

CSDの診断方法として、Carithers⁹⁾ は、①1カ所あるいは局所リンパ節の腫脹 (1点), ②猫、特に幼弱猫との接触 (2点), ③創傷部の存在 (2点), ④Hanger-Rose抗原を用いた皮膚反応陽性 (2点) の基準を示している。これらのうち、合計5点であれば本症の疑いが強く、7点であれば本症と診断する。なお、鼠径リンパ肉芽腫、化膿性炎、非定型抗酸菌症、結核、ブルセラ症、野兎病、伝染性単核症、コクシジオマイコーシス、ヒストプラズマ症、ホジキン病、サルコイドーシス等のリンパ節が腫脹する他の疾病との類症鑑別が必要である。

Regnery⁶⁴⁾ らによって *B. henselae* 感染を対象とした間接蛍光抗体法 (IFA) が開発され、診断に用いられるようになった。この IFA では、血清の抗体価が64倍以上、または、ペア血清で4倍以上の抗体価の上昇を示すことと、猫による受傷の有無等に基づいて判定される。

患者血液、リンパ節生検材料から本菌を分離することは非常に難しく、また培養から同定までに時間がかかるため、これらの材料を用いた PCR 法により *B. henselae* の遺伝子を検出する方法も診断に有

用である⁵³⁾。

B. henselae の分離には、血液、リンパ節材料が用いられる。本菌を血液から分離する場合、赤血球を溶血させる必要がある。EDTA チューブに採血したものは、一度凍結 (-70 ~ 80°C) させて溶解したもの、あるいは、新鮮血を Lysis Isolator tube (Wampole, NJ, USA) に採取して、溶血させた後、3,700 回転、70 分間遠心する。沈渣に Medium199 を主成分とする分離用液体培地を加え、よく混合したものを 5 ~ 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、35 ~ 37°C、5% CO₂ の気相で培養する。

VI. 治療

1. 人

定型的 CSD に対して各種の抗菌性物質による治療が試みられているが、多くの症例でその効果は認められていない。通常、特別な治療なしで 2 ~ 3 週間で自然に治癒する。Holly は³²⁾、シプロフロキサシン 500mg を 5 人の CSD 患者に経口的に 1 日 2 回投与することで、数日で快方に向かったことを報告している。

一方、全身性の CSD を含む BA や BP には、エリスロマイシン、リファンピシン、ゲンタマイシン、ドキシサイクリン、シプロフロキサシン等が有効である。

2. 猫

Koehler⁴²⁾ は、猫に対しドキシサイクリン 25 ~ 50mg を 1 日 2 回、リンコマイシン 100mg を 1 日 2 回、3 週間続けて投与することで菌血症を抑制できたと報告している。また、Greene ら²⁵⁾ もドキシサイクリンやアモキシシリンの経口投与で猫の菌血症を抑制できたと報告しているが、血液中から完全に菌を排除するには至っていない。

VII. 予防

CSD の発症には猫が深く関与しているものの、猫と接したり猫から受傷することで直ちに発症することはない。しかしながら、*B. henselae* の保菌率や

抗体陽性率から推定すると 10 ~ 15% 程度の猫が潜在的な感染源になっているものと思われる。

現在までのところ、本症に対する積極的な予防法はないため、性格のおとなしい猫を飼う、猫の爪を定期的に切る、猫（特に子猫）との接触後の手指の洗浄、猫による外傷の消毒、ならびに猫ノミの駆除等の一般的な対策で対応する。子供のいる家庭内で猫を飼育する場合、ノミ対策を施された猫や *B. henselae* 菌血症が陰性であることを確認された猫を飼育することも考慮すべきであろう。また、免疫不全状態にある人は、CSD 以外の感染症の可能性も考慮して、猫との接触は避けるべきである。

現在のところ、人、猫の *B. henselae* 感染に対する有効なワクチンはまだ開発されていない。

おわりに

わが国の CSD 患者数は、他の人獣共通感染症に比べても多いにもかかわらず⁷⁰⁾、届け出の義務がないため、その患者の実態は依然として不明の状態である。近年、“猫ひっかき病”とはいうものの、発症に猫が関与していない事例^{77,78)} や犬が関与した事例なども報告されている^{39,69,75)}。さらにその病態もさまざまであることが明らかとなってきた。したがって、猫ひっかき病は *Bartonella* 感染症の病態の 1 つとして位置づけるとともに、その名称についても検討する時期が来ているようにも思われる。

現在、20 種 3 亜種の *Bartonella* 属の菌が報告されているが、いまだ人や動物に対する病原性が不明なものも多い。今後、新種の *Bartonella* 属菌が発見されてくる可能性もあり、それらの病原性ならびに CSD をはじめとする *Bartonella* 感染症の疫学を明らかにしていく必要があると思われる。

なお、本菌の分離・同定と抗体測定に関しては日本大学生物資源科学部、獣医公衆衛生学研究室 (Tel & Fax : 0466-84-3636) までお問い合わせ下さい。

文 献

- 1) Adal K. A. Cockerell C.J. and Petri W.A. Jr.: N Engl J Med. 330: 1509-1515, 1994.
- 2) Ahsan N., Holman M.J., Riley T.R., Abendroth C.S., Langhoff E.G. and Yang H.C.: Transplantation 65: 1000-