

現在までに報告, 確認されているイヌのヒストプラズマ症は7例で, これらのうち症例2-7について遺伝子解析の再検討を試み, その解読塩基数を表3に示した.

DNA テンプレートは診断依頼があった当時にパラフィンブロックより抽出し, -20°C で保存したものをを用いた. リボソーム RNA 遺伝子の 5.8s を含む internal transcribed spacer (ITS1-5.8s-ITS2 rRNA) 領域の遺伝子を検出するために nested PCR 法を用い, ITS5 (5' -GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') と ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') により第 1 増幅を行い, HcAF (5' -CAC GCC GTG GGG GGC TGG GAG CCT-3') および HcCR (5' -ATG GTG GGC RGG AGC CGG CC-3') で第 2 増幅を行った. この PCR 産物を HcAF, ITS-2 (5' -GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3'), ITS-3 (5' -GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3') および HcCR でラベル化し, ABI PRISM 3100 により塩基配列を決定した. この配列と GenBank に登録されている *Ajellomyces capsulatus* (*H. capsulatum* の有性型の名称) の配列および 2003 年に我が国で発症したヒト症例よりの分離株の塩基配列をあわせて Clustal X により解析, NJ 法による樹系解析を行った.

C. 結果およびD. 考察

我が国のヒト症例 2 例およびイヌ症例 6 例より得られた遺伝子型は, ウマの仮性皮疽より分離された *H. capsulatum* var. *farciminosum* に近縁であった. また, アフリカ以外のヒト症例から分離された *H. capsulatum* var. *capsulatum* は Tamura et al. や Kasuga et al. が提唱しているように (14, 15), いくつかの遺伝子型サブグループに分けられていた. 一方, アフリカのヒト症例から分離されたことによって *H. capsulatum* var. *duboisii* とされている株の遺伝子型は

多型があるものの近縁であった (図1).

興味あることに, 我が国で 2003 年に発症したヒト症例は全身播種性であったが (16), 分離株は *H. capsulatum* var. *farciminosum* の遺伝子型を示した. この事実から本邦土着の *H. capsulatum* による感染は皮膚病変だけでなく, 全身感染を起こすことがヒトで証明された. よって, *H. capsulatum* var. *farciminosum* の遺伝子型によって発症したイヌ症例は, 基礎疾患として乳癌を持っていた皮膚病変に限局せず, 全身感染に至ったことを分子疫学的にも裏付けることができた.

我が国に土着のヒストプラズマ症はヒト, イヌともにウマの仮性皮疽の異動物種感染であるといえる. 一方, アフリカ地域で分離された *H. capsulatum* var. *duboisii* は独自のクラスターに入るため, 独立した variety として扱うことは可能であるが, var. *capsulatum* と var. *farciminosum* は明確に分けることは難しいことから, 宿主によって variety を分ける方法には矛盾伴っている. 言い換えれば *H. capsulatum* の variety でアフリカ以外の地域におけるヒト分離株を var. *capsulatum*, ウマ分離株を var. *farciminosum* と分けることは意味が無い.

E. 結論

ヒストプラズマ症は我が国に存在する最も危険度レベルの高い (レベル3) 真菌によって起こる, 人獣共通感染症である.

ii) 病理組織標本からの接合菌症原因菌遺伝子の検出

病理組織標本から抽出された DNA より nested-PCR により接合菌種の LSUrRNA 遺伝子を検出する方法を動物症例 (インコ, イヌ, ブタ), ヒト症例に応用できた.

方法はパラフィンブロックより DEXPAT

(TaKaRa) を用いて抽出した DNA を用い、第 1 増幅にユニバーサルプライマー、第 2 増幅に Voigt らが報告している接合菌検出用プライマーセット 13 種を用いた (17) Nested PCR 法により、LSUrRNA 遺伝子の部分配列を検出 (図 2) した。さらに第 2 増幅産物を用いたダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定後、NCBI の BLAST による相同性検索をおこなった。

3) 人獣共通真菌症原因菌の 1 菌種 *Microsporum canis* によるヒト感染の現状と問題点について。

M. canis 感染による皮膚糸状菌症は近年、減少している (18)。そのため、医師、獣医師が *M. canis* 感染を見逃すこともまれに起こっている。今回、i) ネコから感染した *M. canis* による劇症ケルルス禿創を紹介し、ペットショップ、地域ネコでの皮膚糸状菌症に対する防御対策の必要性を提案するとともに、ii) *M. canis* の菌学的研究から本菌種を分離しても形態学的に同定の難しい株について、遺伝子解析を含む同定法の必要性を提案する。

i) ペットショップ、地域ネコでの皮膚糸状菌症に対する防御対策の必要性

M. canis は、人獣共通真菌症の原因菌の 1 つで好獣性の皮膚糸状菌である。家庭内で飼育されているイヌおよびネコの皮膚糸状菌症の原因菌の第 1 位は *M. canis* で、95% 以上が本菌種によるものと言われている (6)。動物の感染では頭頂部、体部、四肢先端部等に落屑、脱毛を伴った不連続な円形皮膚病巣を形成する。海外では、農村部では約 80%、都市部でも約 20% の皮膚糸状菌症は動物との接触により感染すると報告され、イヌの皮

膚糸状菌保有率は数〜10%程度、ネコでは 20%以上というのが定説である (19)。一方、我が国ではイヌ、ネコの皮膚糸状菌保有率は他属、多種の *Trichophyton* spp.、*Microsporum* spp. を含めた全体でも 2%以下にすぎない。かつてはイヌ、ネコを野外飼育もしくは野外との接触の多い形態で飼育していたが、現在では屋内飼育に移行したためと言われている。これらの動物は不顕性感染が多く、幼弱動物では脱毛、鱗屑とともに炎症による紅斑や腫脹を示す。ヒトに感染した場合、頭部白癬やケルルス禿瘡を起こす。本来、皮膚糸状菌症原因菌は宿主特異性が強く、本来の宿主以外には感染しづらいが、感染した場合激しい症状を示す。*M. canis* も例外では無い (6)。

今回、本プロジェクトでも家庭内で飼育されているイヌ 76 頭、ネコ 24 頭について皮毛採取、培養を行ったが、皮膚糸状菌症原因菌を保有している個体は検出されなかった。

このような背景から、医師、獣医師ともに皮膚糸状菌症の原因菌として *M. canis* を疑うことが難しくなっているのが現状である。そのためいったんヒトが感染すると、確定診断までに難渋する症例が確認されている。その 1 例として、ステロイドを多用して、飼育者 (子ども) が劇症ケルルス禿創に至ってから、診断、治療、感染源の特定が行われた症例があげられる (写真 2)。この症例の感染源は、ペットショップで販売されていたネコであった。また、今回の調査とは別に千葉大学真菌医学研究センターに菌の同定を依頼されて入ってくる *M. canis* に添付されている患者もしくは動物の背景から、野良ネコや地域ネコとして十分な衛生管理がなされていないネコが感染源で、ヒト感染を起こしていることが明らかとなった。

ii) 形態学的に同定の難しい *M. canis* 株の遺伝子解析

A. 研究目的

M. canis の同定は、その特徴的な大分子の形態で決めることができ、成書の記載によれば、紡錘形、表面粗造、先端部はやや屈曲し、6-12細胞性、35-110 x 12-25 μm である。

今回、千葉大学真菌医学研究センターでL-乾燥法により保存されている *M. canis* 菌株の大分子を観察中、成書の記載にはない、極端に湾曲する大分子を産生する株を見いだした(写真3)。そこでこの菌株について生物学的、生理学的、分子生物学的に検討した。

B. 研究方法

菌株：大分子形成に異常を認めた分離株 IFM 46149 は鹿児島県奄美大島の臨床分離株で、1989年に分離され、1993年より当センターでL-乾燥法にて保存されていた。

比較検討に供した *M. canis* 57株、*Arthroderma otae* 5株及び *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. cookei* 株は、同様にL-乾燥法により保存されていた株から復元培養した。**集落の観察**：ポテト・デキストロース寒天斜面培地、1/10 サブロー・ブドウ糖寒天斜面培地を用い、25°C、4週間培養して観察した。**分生子形成の観察**：掻き取り法により lactophenol cotton blue で染色し、顕微鏡下で観察した。大分子は、30個について長径・短径、構成する細胞数の測定を行ない、その平均値で表した。

分子生物学的解析：DNAの抽出は、スラントより菌体を1白金耳掻き取り、1.5 ml マイクロチューブに入れた DEXPAT®(DNA Extraction from Paraffin-embedded Tissue, TaKaRa Biomedicals, Kyoto) 0.5 ml に懸濁、

100°C 10分間加熱処理し、

12,000 rpm, 4°C, 10分間遠心後上清を採取、DNA原液とした。

リボソームRNA遺伝子の Internal transcribed spacer (ITS)1領域配列の決定にはユニバーサルプライマーITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') 及びITS2 (5'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3')を用いて常法によりPCRを行なった1)。Chitin synthase 1 (*CHS1*) 遺伝子領域配列の決定には nested PCR 法により、primer1 (5'-CTG AAG CTT ACN ATG TAY AAY GAR GAY-3') 及び primer2 (5'-GTT CTC GAG YTT RTA YTC RAA RTT YTG-3') 2) を用いて第一増幅を行なった後、皮膚糸状菌特異プライマー CHS1-1S (5'-CAT CGA GTA CAT GTG CTC GC-3') 及び CHS1-1R (5'-CTC GAG GTC AAA AGC ACG CC-3') 3) を用いて第二増幅を行なった。1%アガロースゲルにて電気泳動により目的DNAの増幅を確認後、DNA精製キット QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) により精製し、ABI PRISM^(R) BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Applied Biosystems, Tokyo) を用いてラベル化し、ABI PRISM^(R) 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi) によりそれぞれの遺伝子配列を決定した。

C. 研究結果

1) 集落の形状：*M. canis* 及び *A. otae* 株の集落は、potato dextrose 寒天培地上では表面は発育に従って白色から淡黄褐色の綿毛状ないし粉状、裏面は淡黄色から暗褐色を呈した。1/10 Sabouraud 寒天培地上では表面は白色の綿毛状ないし粉状、裏面は白色から淡黄褐色であった。IFM 46149 株の集落の性状は、他の *M. canis* 及び *A. otae* 株の集落と同様で、特記すべき形状は観察されなかつた。

った。

2) 分生子形成： IFM 46149 株の大分生子の形態を写真 3 に示す。長径は平均 75.9 μm 、短径 10.7 μm 、構成する細胞数 6.8 個であった。比較した *M. canis* 57 株のうち大分生子を観察できたのは 48 株であり、これらの大分生子の長径は平均 50.2~86.8 μm 、短径 10.4~19.5 μm 、細胞数 6.0~9.4 個であった。また *A. otae* 大分生子を観察できたのは 5 株中 4 株であり、これらの大分生子の長径は平均 53.0~74.5 μm 、短径 15.5~20.0 μm 、細胞数 6.2~9.0 個であった。

3) 分子生物学的解析： IFM 46149 株も含めた当センター保存 *M. canis* 58 株及び *A. otae* 5 株のリボソーム RNA 遺伝子 ITS 1 領域の配列は、3 種に分かれた。IFM 46149 株は他の 48 株と同様、NCBI GenBank accession No. AF168127 と一致した。6 株は accession No. AF168127 等に一致し、*M. canis* 1 株及び *A. otae* 5 株は accession No. AF168127 等に一致した。また、比較した *M. gypseum*、*M. fulvum*、*M. cookei* の配列と今回の分離株は一致することはなかった。一方、CHS-1 遺伝子配列は、今回用いた株、交配に用いた *A. otae* 株および比較した *M. canis* 株ともに同一配列を示した (GenBank 登録準備中)。

D. 考察

著しく湾曲した大分生子形成をする、*M. canis* として登録されていた株は、生理学的性状、分子生物学的解析により *M. canis* と同定することができた。この株が当センターに登録された時点では形態学的観察と生理生化学的性状に基づき、同定されている。当時の大分生子は正常の形態を示したと推測されるが、一部今回観察されたような湾曲した大分生子を形成していたかは不明である。

今回の形態学的変化は長期保存による影響と考えているが、新鮮臨床分離株ではこのような形態をとる株が出ることは否定できない。本菌株は形態学的同定をこえる 1 分離株であった。

E. 結論

M. canis の中には分生子の形態で簡単に同定できない株もあるので、臨床現場で見逃されないよう、注意が必要である。

4) その他

i) *Candida tropicalis* によるネコの膀胱炎の 1 例

A. 研究目的

成書によれば猫における真菌性膀胱炎の原因菌は病原性酵母とされている。しかし、真菌の種の同定を伴った症例は *Aspergillus nidulans* (20)、*Candida albicans* (21)、*Candida* spp. (22-24)、*Trichosporon beiglii* (25)、*T. domesticum* (26) などが知られているにすぎない。今回 *Candida tropicalis* を分離同定し、分離菌の抗真菌剤感受性試験成績に基づく治療を行って完治し得た、猫の膀胱炎を経験したので紹介する。

B. 研究症例

日本ネコ、8 歳、去勢。2003 年 8 月 1 日初診。猫下部泌尿器症候群 (FLUTD) のため他院にて治療していたが出血性膀胱炎、膀胱アトニーが軽快しないため、来院した。初診時 BUN; >200, CRE; 7.6 で、輸液療法により軽快したが、出血性膀胱炎、膀胱アトニーの

改善がみられなかったため、OFLX: 5 mg/kg, ABPC; 20 mg/kg, CEZ; 20 mg/kg, ERFX; 5 mg/kg, FOM; 20 mg/kg などを順次併用または単独投与を約 4 週間続けた。8 月 31 日, 尿沈渣の直接鏡検により, 真菌要素を確認したため (写真 4), 同尿沈渣をクロモアガーカンジダ上で培養したところ青色集落を形成した。分離菌は ID32C および 26S リボソーム RNA 遺伝子 D1/D2 領域の配列から *C. tropicalis* と同定された。同菌株は MIC 測定によりアゾール抗真菌剤に容量依存性感受性を持つ (耐性菌になりうる可能性は否定できない) ことが判明したので ITCZ; 10 mg/kg の経口投与を 12 週間と AMPH-B; 0.05 mg/ml (w/vol) 30 ml にて膀胱洗浄の併用を 3 週間行った。また *Streptococcus* も同時に確認されたため, AMPC; 20 mg/kg を 16 週間併用し, 消失を確認した。9 月 12 日に尿沈渣中の真菌要素は消失したが, 10 月 3 日再び出現したため, AMPH-B による膀胱洗浄をさらに 2 週間継続したところ 10 月 17 日真菌要素消失を確認した。予防的治療として AMPH-B による膀胱洗浄の回数を週 3 回-1 週間, 週 2 回-1 週間, 週 1 回-1 週間と漸減し, 3 ヶ月間継続した。真菌要素消失後, 洗浄時に真菌培養を行ったが, 陰性であった。これらの治療により出血性膀胱炎, 膀胱アトニーも改善し, 1 年後の現在も真菌性膀胱炎, 出血性膀胱炎および膀胱アトニーの再発はなく経過している。

C. 考察

真菌による難治性膀胱炎の治療を経験した。初診時に腎不全を認めたため, AMPH-B の全身投与による副作用を考え, 膀胱洗浄にとどめたが, 良好な成績を得た。本症例は多種の抗菌剤併用による菌交代症の結果生じた日和見感染であった。

尚, *C. tropicalis* によるネコの膀胱炎は

本邦初と思われる。今後, ネコの難治性膀胱炎において本菌種も含め, 真菌を起因菌として疑うことが必要である。

D. 結論

飼い主が高齢者や基礎免疫疾患を持つなど易感染性宿主の場合, 特にネコトイレの管理などについて, 注意を喚起する必要がある。

ii) 動物園のヤマアラシから分離された *Arthroderma benhamiae*

2004 年 7 月 17 日生まれ, 雄。8 月頃から頭部 (特に眼の周辺) の毛が抜けはじめ, 次第に頸部, 四肢, 腹部, 尾部, 後背部へと広がった。12 月 24 日よりグリセオフルビンの内服を開始。2005 年 1 月, 皮毛, 針毛が再生し始めた。2004 年 12 月および 2005 年 1 月に治療後も脱落した皮毛から, *A. benhamiae* が分離された。また同居飼育している母および父個体 (輸入個体) について, 皮毛を抜去し, 培養したところ, 全個体より同菌種が分離され, 飼育環境内での蔓延が示唆された (写真 5)。現在, 同動物園で持っているふれあい動物コーナーのげっ歯類および食虫目動物について, 皮膚糸状菌保有状況を調査し, その結果をもとに, ふれあい動物コーナーをもつ全国の動物園, 学校飼育動物関係者に還元する予定である。

参考文献

- 1) 荒島康友 (2001) : *Derma* 45(2), 9-14.
- 2) 荒島康友 (2001) : *Derma* 45(2), 15-21.
- 3) Starr JR et al. (2002) : *Oral Microbiol Immunol* 17(5), 304-10.
- 4) Sullivan DJ et al. (2004) : *FEMS Yeast Res* 4(4-5), 369-76.
- 5) Melo NR et al. (2004) : *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz 99(4), 425-31.
- 6) 永田雅彦ら (2001): *Derma* 45(2), 29-34.
 - 7) 飯塚崇志 (2001): *Derma* 45(2), 35-41.
 - 8) 中村遊香 (2001): *Derma* 45(2), 43-48.
 - 9) Chang HJ et al. (1998): *N Engl J Med* 338(11), 706-11.
 - 10) Krcmery V et al. (2002): *J Hosp Infect* 50(4), 243-60.
 - 11) Randhawa HS (2000): *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000 42(4), 207-19.
 - 12) Kano et al. (2002): *J Clin Microbiol* 40(9), 3535-7.
 - 13) Filizzola MJ et al. (2003): *Int J Infect Dis* 7(4), 282-6.
 - 14) Kasuga et al. (2003): *Mol Ecol* 12(12):3383-401.
 - 15) Tamura et al. (2002): *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 43(1):11-9.
 - 16) 高倉俊二 (2004): 第 45 回日本熱帯医学学会大会 ワークショップ II-2-2, p. 48.
 - 17) Voigt et al. (1999): *J Clin Microbiol* 37(12): 3957-64.
 - 18) 芝木秀臣ら (2003): *真菌誌* 44(3), 209-216.
 - 19) Brilhante RS et al. (2003): *Mycopathologia* 156(4): 303-8.
 - 20) Adamama-Moraitou KK et al. (2001): *J Fel Med Surg* 3(1): 31-34.
 - 21) Fulton RB Jr. et al. (1992): *J Am Vet Med Assoc* 200(4): 524-6.
 - 22) Gerding PA et al. (1994): *J Am Vet Med Assoc* 204(10): 1635-8.
 - 23) Toll J et al. (2003): *J Am Vet Med Assoc* 223(8):1156-8.
 - 24) Pressler BM et al. (2003): *J Am Anim Hosp Assoc* 39(3):263-70.
 - 25) Doster AR et al. (1987): *J Am Vet Med Assoc* 190(9): 1184-6.
 - 26) Sakamoto Y et al. (2001): *Mycoses* 44(11-12): 518-20.
- G. 研究発表等**
- 研究論文
- 1) Endo S, Komori T, Ricci G, Sano A, Yokoyama K, Ohori A, Kamei K, Franco M, Miyaji M, Nishimura K: Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMS Microbiol Lett.* 234:93-7, 2004.
 - 2) 五十嵐 毅, 黒瀬龍彦, 板橋孝一, 中野郁夫, 岡本賢三, 佐野文子, 木村清延, 加地 浩: 肺パラコクシジオイデス症の1例. *日本呼吸器学会雑誌* 42: 629-33, 2004.
 - 3) 森松嘉孝, 佐野文子, 行武奈穂, 今岡治樹, 西村和子, 相澤久道: *Absidia corymbifera* および methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* による肺内多発空洞穿破により致命的気胸を呈した生体腎移植後症例. *感染症学雑誌* 78: 984-8, 2004.
- 関連総説
- 1) 佐野文子: ヒトおよび愛玩動物における真菌症の発生状況の調査と予防・診断法の開発に関する研究: 平成 15 年度厚生科学研究費補助金(振興・再興感染症研究事業)「愛玩動物の衛生管理の徹底に関する研究(H15-新興-19)」報告書, 117-24, 2004.
 - 2) 佐野文子: カビ: よい子, 悪い子, おっかない子! 先端-News Letter (NPO 先端医療福祉開発研究会) 12: 6-7, 2004.
 - 3) 佐野文子, 村田佳輝, 上田八千代, 猪股智夫, 亀井克彦, 西村和子: 人と動物の共通感染症の最前線 Part 1. 本邦における犬のヒストプラズマ症の疫学. *獣医畜産新報* 57: 669-670, 2004.
 - 4) 佐野文子: シリーズ/病原性真菌の今日的

意味 (21) -13. 人獣共通真菌症. 化学療法の領域 21(2): 153-7, 2005.

5) 佐野文子: 特集 皮膚糸状菌症 ハリネズミの皮膚糸状菌症. ViVeD 1 (1): 33-40, 2005.

関連著書

- 1) 分担執筆: 国立感染症研究所 学友会編 「感染症の事典」宮治 誠, 佐野文子: ヒストプラズマ症. 2004年10月, 朝倉書店, 東京.
- 2) 分担執筆: 山崎修道 編「感染症予防必携 第2版」佐野文子: パラコクシジオイデス症, プラストミセス症, 2005年1月, 財団法人 日本公衆衛生協会, 東京.

学会発表

- 1) 大堀 陽, 鎗田響子, 遠藤成朗, 佐野文子, 横山耕治, 亀井克彦, 西村和子, 宮治誠: 種特異的プライマーを用いた分子生物学的手法による *Ochroconis gallopava* の迅速同定. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p90, 長崎, 2004. 5. 29-30.
- 2) 佐野文子, Itano EN, Tatibana BT, 宇野潤, 鎗田響子, 亀井克彦, 宮治 誠, 西村和子: LAMP法による患者喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 特異的遺伝子の gp43 検出. 日本菌学会第48回大会, 講演要旨集 p90, 長崎, 2004. 5. 29-30.
- 3) 佐野文子, 五十嵐 毅, 亀井克彦, 西村和子: LAMP法 (loop-mediated isothermal amplification) による喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 糖蛋白抗原遺伝子の gp43 検出. 真菌症フォーラム第5回学術集会, プログラム/抄録集 p57-58, 東京, 2004. 1. 31.
- 4) 鎗田響子, 伊藤純子, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子: 千葉大学真菌センター保存菌株の再評価—*Microsporium canis*, *M.*

gypseum 及び *M. cookei* について. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (Suppl 1): 91, 横浜, 2004. 9. 25-26.

- 5) 佐野文子, Itano EN, 宇野潤, 鎗田響子, 亀井克彦, 宮治 誠, 西村和子: LAMP法による患者喀痰からの *Paracoccidioides brasiliensis* 特異的遺伝子 pg43 の検出. 第48回日本医真菌学会総会, 真菌誌 45 (Supple 1): 100, 横浜, 2004. 9. 25-26.
- 6) 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子: イヌにおけるヒストプラズマ症 (Histoplasmosis) の一症例について. 第28回千葉県獣医学会, 講演抄録, p17, 2004. 3. 7
- 7) 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子, 斉藤陽彦: イヌにおけるヒストプラズマ症 (Histoplasmosis) の一症例について. 平成16年度関東地区獣医師大会 日本小動物獣医師会 (関東), 抄録集, p58, 甲府, 2004. 9. 6.
- 8) 小林久美, 青木信夫, 永田瑞穂, 木村久美子, 佐野文子: 肝臓に多発性肉芽腫を伴った *Absidia corymbifera* による豚の接合菌症. 平成16年度関東地区獣医師大会 日本産業動物獣医師会 (関東). 抄録集, p68, 甲府, 2004. 9. 6.
- 9) 村田佳輝, 佐野文子, 鎗田響子, 西村和子, 亀井克彦: 一般家庭で飼育されているイヌ, ネコの口腔内真菌叢について. I. 一般演題-8, 第4回 人と動物の共通感染症研究会学術集会, 安田講堂, (東京), 2004. 11. 6
- 10) 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦, 西村和子, 斉藤陽彦: 千葉県で発生したイヌのヒストプラズマ症 (Histoplasmosis) の一症例について. 平成16年度 学会年次大会 (新潟) 日本小動物獣医学会, 抄録集, p284, 新潟, 2005. 2. 10-12.
- 11) 小林久美, 青木信夫, 永田瑞穂, 木村久美子, 佐野文子: 肝臓に多発性肉芽腫を伴

った *Absidia corymbifera* による豚の接合菌症. 平成 16 年度 学会年次大会 (新潟) 日本獣医公衆衛生学会, 抄録集, p363, 新潟, 2005. 2. 10-12.

12) 村田佳輝, 佐野文子, 菅田 顕, 竹内裕子, 松井 健, 西山光一, 河口佳代, 神明良典, 亀井克彦, 西村和子: *Candida tropicalis* による猫の膀胱炎一症例. 日本獣医臨床病理学会 (JSVCP) 2005 年大会. 2005. 2. 26.

13) 石川利雄, 佐野文子, 村田佳輝, 石川雅子, 亀井克彦, 山本浩嗣: ヒストプラズマ症と鑑別を要した Large Granular Lymphoma の猫一例. 平成 16 年度 (第 29 回) 千葉県獣医学会. 抄録集 p9, はるるプラザ (千葉), 2005. 3. 6.

14) 村田佳輝, 佐野文子, 菅田 顕, 竹内裕子, 松井 健, 西山光一, 河口佳代, 神明良典, 亀井克彦, 西村和子: *Candida tropicalis* による猫の膀胱炎一症例. 平成 16 年度 (第 29 回) 千葉県獣医学会. 抄録集 p31, はるるプラザ (千葉), 2005. 3. 6.

招待講演など

1) 佐野文子: 人獣共通感染としての輸入真菌症. 第 45 回熱帯医学会大会. ワークショップ II-3. 輸入真菌症-現状とその問題点 (東京) 平成 16 年 10 月 15-16 日

2) 佐野文子: 真菌による人と動物の共通感染症について. 平成 16 年度関東地区公衆衛生講習会. 幕張セミナーハウス (千葉) 2004 年 11 月 14 日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 口腔内真菌叢調査背景

I. 検体数

動物種	検体数 (%)	真菌陰性個体数	真菌陽性個体数
イヌ	329 (100)	218 (66.3)	111 (33.7)
ネコ	95 (100)	77 (81.3)	18 (18.9)
合計	424 (100)	295 (69.6)	129 (30.4)

II. 平均年齢

	全体	真菌陰性個体	真菌陽性個体
イヌ	6.53±4.54	6.12±4.56	7.31±4.42
ネコ	6.03±5.3	6.18±5.15	5.42±6.
イヌおよびネコ	6.42±4.71	6.15±4.7	7.05±4.68

平均年齢 ± SD (standard deviation)

III. 性比 (雄 : 雌)

	全体	真菌陰性個体	真菌陽性個体
イヌ	165 : 164 (1 : 1)	117 : 101 (1 : 0.86)	48 : 63 (1 : 1.31)
ネコ	45 : 50 (1 : 1.1)	38 : 39 (1 : 1)	7 : 11 (1 : 1.57)
イヌおよびネコ	210 : 214 (1 : 1)	155 : 140 (1 : 0.9)	55 : 74 (1 : 1.34)

IV. 歯石との関連性

	全体	真菌陰性個体	真菌陽性個体
イヌ	185/329 (56.2%)	111/218 (50.9%)	74/111 (66.7%)*
ネコ	36/95 (37.9%)	28/77 (36.4%)	8/18 (44.4%)
イヌおよびネコ	221/424 (52.1%)	139/295 (47.1%)	82/129 (63.6%)**

*, p<0.01 で相関. オッズ比 2.1081 (95%信頼区間は 1.3142 から 3.3815).

***, p<0.01 で相関. オッズ比 1.9581 (95%信頼区間は 1.2797 から 2.9961).

V. イヌにおけるアトピーとの関連性

全体	真菌陰性個体	真菌陽性個体
37/329 (11.2%)	18/218 (8.3%)	19/111 (17.1%)*

*, p<0.05 で相関. オッズ比 2.2947 (95%信頼区間は 1.1504 から 4.5773).

VI. 免疫疾患との関連性

	全体	真菌陰性個体	真菌陽性個体
イヌ	26/329 (7.9%)	14/218 (6.4%)	12/111 (10.8%)
ネコ	28/95 (29.5%)	19/77 (24.7%)	11/18 (61.1%)*
イヌおよびネコ	54/424 (12.7%)	33/295 (11.2%)	23/129 (17.8%)

1 : IMHA, クッシング症候群, 天疱瘡, 甲状腺機能低下, 乳癌, エバンス症候群, パベシア症, リンパ腫.

2 : リンパ腫, FIV(+), FIP(+), リンパ球プラズマ細胞性口内炎, 免疫介在性皮膚炎, 免疫介在性角結膜炎, 骨髄異形成, 好酸球性潰瘍, IMHA, FeLV(+).

*, p<0.01 で相関. オッズ比 4.7970 (95%信頼区間は 1.6286 から 14.129).

表2. イヌおよびネコの口腔内から分離された真菌の種類と株数

菌種	イヌからの 分離数	ネコからの 分離数	合計
A. 酵母			
<i>Candida albicans</i>	6	2	8
<i>Candida famata</i>	0	1	1
<i>Candida glabrata</i>	2	0	2
<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1
<i>Candida</i> sp.	1	0	1
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	0	1	1
<i>Cryptococcus</i> sp.	1	1	2
<i>Malassezia pachydermatis</i>	71	1	72
<i>Rhodotorula minuta</i>	2	0	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	2	3
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	3	0	3
<i>Rhodotorula</i> sp.	3	1	4
<i>Trichosporon inkin</i>	2	0	2
<i>Trichosporon ovoides</i>	1	0	1
Not identified yeast	1	0	1
小計	94	11	105
B. 糸状菌			
<i>Alternaria alternata</i>	17	2	19
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	8	3	11
<i>Aspergillus sydowii</i>	2	0	2
<i>Aspergillus versicolor</i>	0	2	2
<i>Bipolaris</i> sp.	1	0	1
<i>Chaetomium sphaerale</i>	1	0	1
<i>Curvularia</i> sp.	6	1	7
<i>Fusarium chlamydosporum</i>	1	0	1
<i>Fusarium solani</i>	1	0	1
<i>Fusarium</i> sp.	1	0	1
<i>Geotrichum capitatum</i>	1	0	1
<i>Mucor racemosus</i>	1	0	1
<i>Mucor</i> sp.	1	0	1
<i>Penicillium</i> spp.	2	3	5
<i>Phoma</i> sp.	1	0	1
<i>Schizophyllum commune</i>	1	0	1
<i>Trametes versicolor</i>	2	0	2
Not identified mycelial fungi	4	1	5
小計	51	12	73
合計	145	23	168

表3. 我が国におけるイヌのヒストプラズマ症の遺伝子再検査

症例	年齢	性別	感染地	主な臨床症状	文献	決定塩基数
1	8	雌	東京都	粘膜・皮膚	J Vet Med Sci. 60:863-5, 1998.	行わず
2	3	雄	東京都	皮膚	真菌誌42: 229-35, 2001.	5 1 6
3	3	雌	熊本県	皮膚	真菌誌42: 229-35, 2001.	5 1 8
4	5	雌	東京都	皮膚	Vet Microbiol, 94: 219-24, 2003.	5 1 8
5	12	雄	東京都	皮膚	未発表	5 1 8
6	4	雄	東京都	皮膚	未発表	4 8 2—5 1 8
7	8	雌	千葉県	皮膚・全身	真菌誌 44 他 2003.	5 1 8

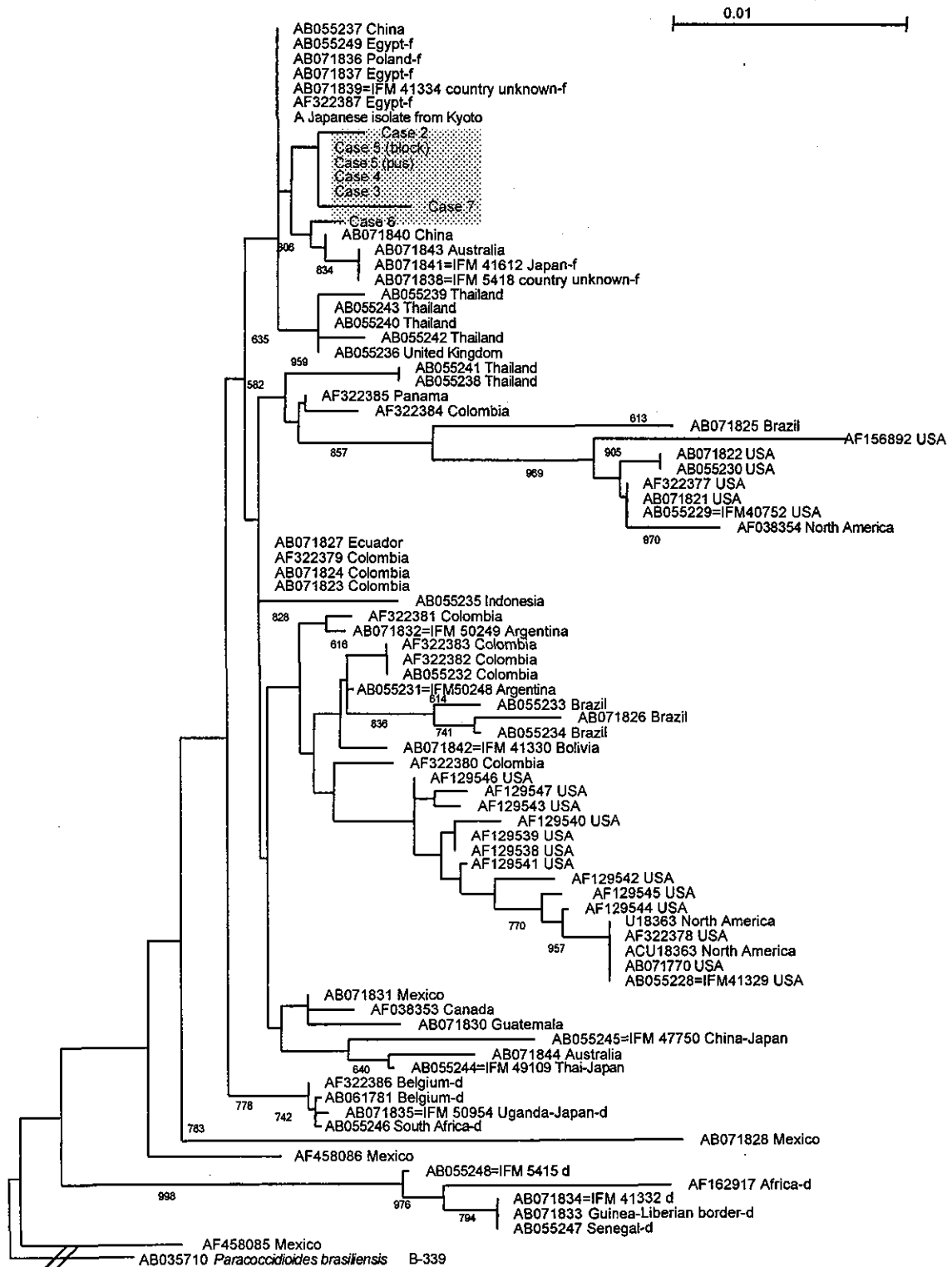
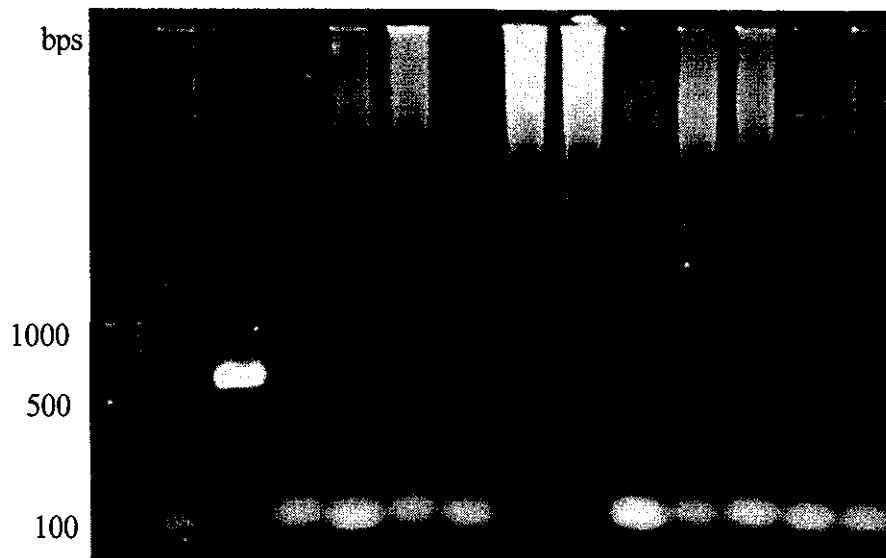


図1. リボゾーム RNA 遺伝子 internal transcribed spacer (ITS) 1- 5.8S-ITS 2 領域の配列から NJ 法により解析して得られた樹形図. イヌのヒストプラズマ症で検出された配列はウマの仮性皮膚症の原因菌 *Hisstoplasma capsulatum* var. *farciminosum* に近縁の遺伝子配列を示した.



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
 図2. 13種類のプライマーセットを用いた病理組織標本より抽出したDNAからの接合菌遺伝子の検出の1例.

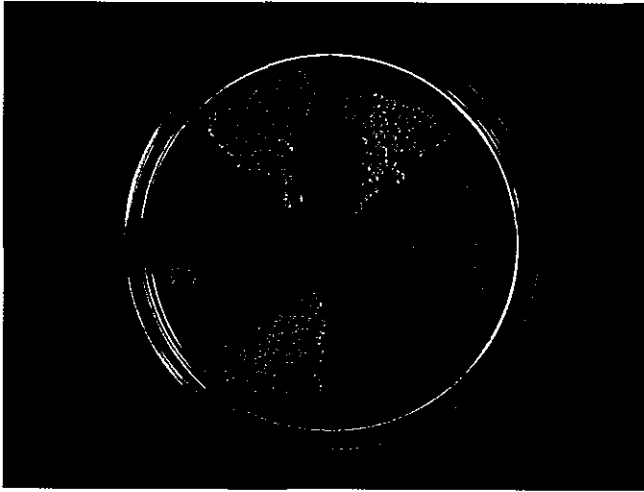


写真1. クロモアガーカンジダ平板培地上での *Malassezia pachydermatis* の発色.
25°C, 7日間培養. 株によって集落の発育, 色調が異なった.

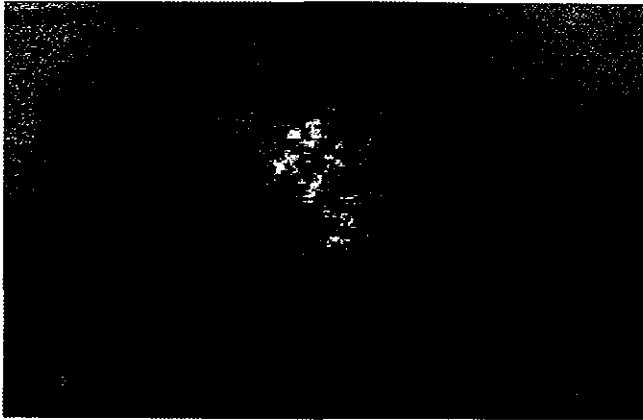


写真2. 7歳女兒. ネコから感染したケルズス禿瘡 (みずほ台動物病院 兼島 孝先生より)



写真3. *Microsporium canis*の標準的な大分生子 (左) 著しく湾曲した大分生子 (右, x400, ラクトフェノールコットンブルー染色).

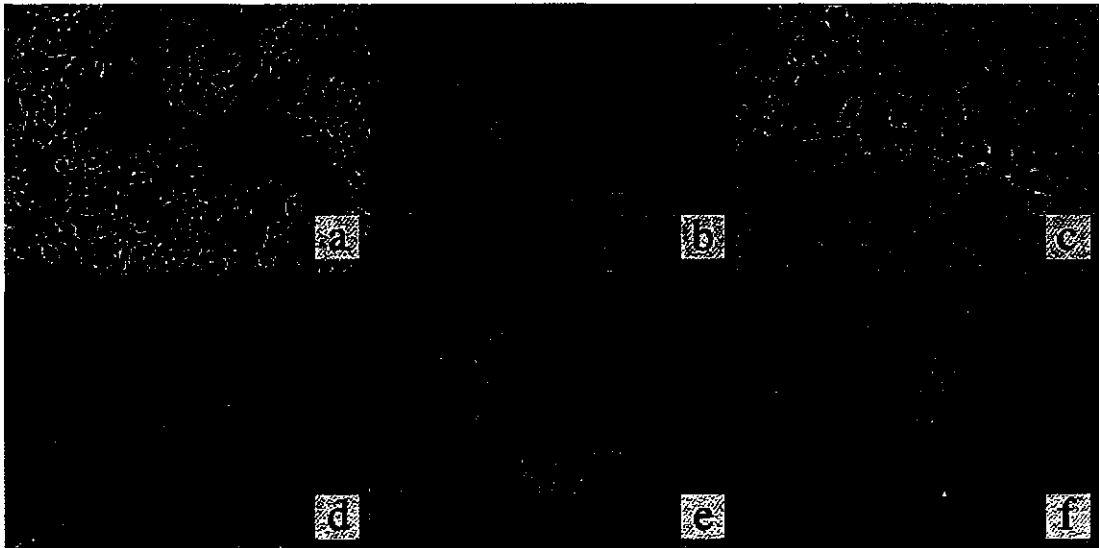


写真4. ネコの *Candida tropicalis*による膀胱炎；尿沈渣顕微鏡所見

(a:2004年8月31日, b:9月1日, c:9月6日, d:9月7日, e:10月3日, f:10月17日)

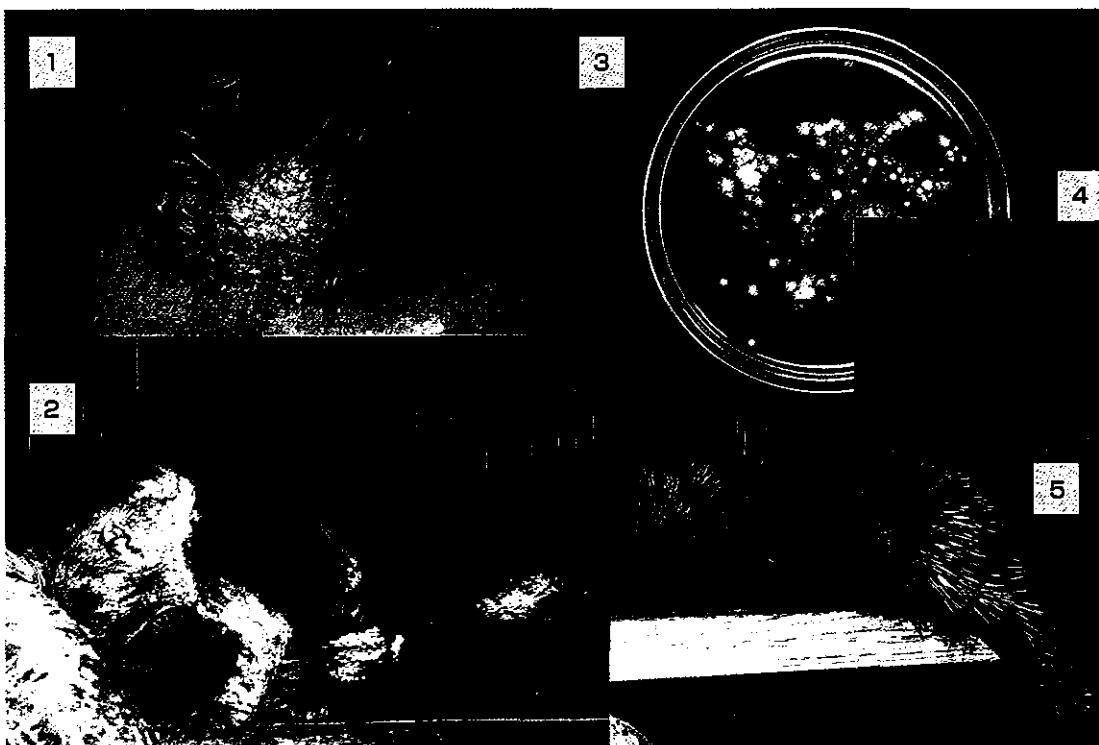


写真5. *Arthroderma benhamiae*によるヤマアラシの皮膚糸状菌症.

1, 2；治療前（2004年12月）. 3；分離された *A. benhamiae*（初代分離菌, 37°C10日間）,
4；顕微鏡所見（x400）, 5；治療後（2005年1月）.

猫ひっかき病の発生状況と愛玩動物のバルトネラ感染症の
調査ならびに予防・診断法の開発

分担研究者 丸山 総一 日本大学 生物資源科学部 助教授

研究要旨：

- 1) 神戸市，さいたま市，日本大学の動物病院 (ANMEC) に来院した犬 206 頭，49 頭，16 頭についてそれぞれ *Bartonella* 属菌の感染状況を検討した。いずれの犬からも *Bartonella* 属菌は分離されなかったが，*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の抗体は神戸市の犬 208 頭中 4 頭 (1.9%)，さいたま市の犬 49 頭中 1 頭 (2.0%) から検出された。*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* に対する抗体価は 1:64 が 3 頭，1:128 が 1 頭，1:512 が 1 頭であったが，*B. henselae* と *B. clarridgeiae* に対する抗体価は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* のそれに比べ低い値であった。これより，わが国の犬にも低率ながら *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の感染が存在することが血清学的に明らかとなった。本 IFA 法は，*B. henselae* および *B. clarridgeiae* 間の交差も少ないことから，犬の *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* に対する抗体測定に有用な方法と思われた。
- 2) *B. henselae* の type I と type II では，それぞれ発現している蛋白質が異なり，分子量 25KDa の蛋白質 (P25) は type ごとに抗原性が異なることが明らかとなった。一方，P25 と同じ分子量を有する phage-associated protein31 (PAP31) の遺伝子配列も type 間で相違があることが判明した。以上から，P25 は type ごとに抗原性に相違が見られる分泌蛋白であり，P25 は PAP31 と同一の蛋白である可能性が示唆された。また，C36-1 株 (type II) の P25 の抗原性および *pap31* 遺伝子配列は，type I, II いずれの型にも属さないことが明らかとなった。
- 3) 犬の接触による発生したと思われる *B. henselae* 感染症に遭遇した。この患者は，50 才，男性で，左頸部リンパ節の腫脹があり，犬を飼育しておりよく顔を舐められていた。リンパ節内の膿を用い，*B. henselae* の培養を行ったが，陰性であった。患者血清の *B. henselae* 抗体価は 1:128 であった。生検リンパ節および犬の唾液を採取し，PCR を行ったが *B. henselae* DNA は陰性であった。

A. 研究目的

Bartonella 属菌のうち *B. henselae*, *B. clarridgeiae* は猫を, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* は犬を病原巣とし, 人に対してはそれぞれ猫ひっかき病や心内膜炎などを起こすことが知られている。しかしながら, これまでわが国の犬における *Bartonella* 属菌の感染状況について検討した報告は見られない。そこで, 本研究では神戸市, さいたま市ならびに日本大学の動物病院 (ANMEC) に来院した犬について *Bartonella* 属菌の感染状況を細菌学的, 血清学的に検討した。

猫ひっかき病の病原体である *Bartonella henselae* は, 16S rRNA 遺伝子型によって type I と type II に大別される。しかし, 各遺伝子型における病原性や発現蛋白質, それらの診断時における抗原性の違いについては明らかになっていない。本研究では, *B. henselae* 16S rRNA 遺伝子型の異なる株について, 分子量 25KDa の抗原蛋白質 (P25) の性状ならびに phage-associated protein31 (PAP31) の *pap31* 遺伝子配列について比較検討した。

さらに, 犬を原因と考えられる猫ひっかき病患者について, 臨床生化学的, 血清学的, 分子生物学的検討を行ったのでその概要についても報告する。

B. 研究方法

1) 神戸市, さいたま市, ANMEC に来院した犬 206 頭, 49 頭, 16 頭からそれぞれ血液 (ANMEC 試料は心疾患を呈した犬血清のみ) を採取した。*Bartonella* 属菌の分離は 5%ウサギ血液寒天培地を用いて 37C, 3-4 週間, 5%CO₂ 下で行った。*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* 抗体価は間

接蛍光抗体法 (IFA) を用いて測定し, 1:64 以上の値を示したものを陽性とした。さらに, *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* 抗体陽性の血清については *B. henselae* と *B. clarridgeiae* の交差反応についても検討した。

2) P25 蛋白質の解析には, 京都府, 沖縄県およびタイの猫から分離された *B. henselae* の 7 株 (沖 6-1, 沖 26-2, 沖 49-2, ダクターリ 1-1, ダクターリ 1-3, S26-1, C36-1), アメリカの免疫不全患者由来 Houston-1 株, およびアメリカ猫由来 U4 株を使用した。沖 26-2, 沖 49-2, ダクターリ 1-1, ダクターリ 1-3, Houston-1 株は 16S rRNA 遺伝子型 type I, S26-1, C36-1, 沖 6-1, U4 株は type II であることを PCR 法で確認した。分離株の発現蛋白質の解析には, 各株の蛋白質を SDS-polyacrylamide-gel 電気泳動法 (SDS-PAGE) により分離した後, 抗 Houston-1 (type I) マウス血清, 抗 U4 (type II) マウス血清と抗 P25 (Houston-1 株由来) マウス血清をそれぞれ用いたウエスタンブロッティング (WB) を行った。さらにオートシーケンサーにより各株の *pap31* 遺伝子の塩基配列を決定し, UPGMA 法により系統樹解析を行った。

3) 犬を原因とする猫ひっかき病患者に遭遇したので, 臨床生化学的, 血清学的, 分子生物学的な診断を試みた。

C. 研究結果

1) 神戸市, さいたま市の犬 257 頭からは *Bartonella* 属菌は分離されなかった。*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の抗体は神戸市の犬 208 頭中 4 頭 (1.9%), さい

たま市の犬 49 頭中 1 頭 (2.0%) から検出されたが ANMEC の犬からは検出されなかった (表 1)。 *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* に対する抗体価は 1:64 が 3 頭, 1:128 が 1 頭, 1:512 が 1 頭であった。これらの犬の *B. henselae* と *B. clarridgeiae* に対する抗体価は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* のそれに比べ低い値であった (表 2)。

2) 各分離株の SDS-PAGE の結果, 実験に用いた type I 株では 18, 30kDa 蛋白質, type II 株で 29kDa 蛋白質がそれぞれ特異的に発現していることが判明した。WB の結果, 抗 Houston-1 血清により type I 株の全てに, また抗 U4 血清により type II の 4 株のうち C36-1 株を除く 3 株にそれぞれ P25 に相当するバンドが検出された。C36-1 株では, いずれの血清を用いた WB によっても P25 のバンドは検出されなかった (図 1)。さらに全ての株について抗 P25 血清を用いた WB を行ったところ, type I 株のみに P25 に特異的なバンドが検出された。次に, 各分離株の *pap31* 遺伝子の系統樹解析の結果, type I 株と type II 株でそれぞれ別のクラスターに分類された。C36-1 株は, type II 株のクラスターに近い位置に別のクラスターとして分類された (図 2)。

3) 犬との接触により発生したと思われる猫ひっかき病患者に遭遇した。この患者は, 50 才, 男性で, 左頸部リンパ節の腫脹があった。リンパ節内の膿を用い, *B. henselae* の培養を行ったが, 陰性であった。患者血清の *B. henselae* 抗体価は間接蛍光抗体法で 1:128 であった。生検リンパ節および犬の唾液を採取し, PCR を行ったが *B. henselae* DNA は陰性であった。この患者は猫との接触はなかった

が, 犬を飼育しておりよく顔を舐められていたことから, 犬を原因とする *Bartonella* の感染があったものと推察された。

D. 考察

今回の研究から, わが国の犬にも低率ながら *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の感染が存在することが血清学的に明らかとなった。また, IFA 法は, *B. henselae* および *B. clarridgeiae* 間の交差も少ないことから, 犬の *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* に対する抗体測定に有用な方法と思われた。今後, 犬の心内膜炎ならびに人獣共通感染症の原因菌としての *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の意義を詳細に検討する必要があると思われた。

B. henselae には type I と type II でそれぞれ発現している蛋白質に相違があり, WB の結果から, P25 は各 type により抗原性の異なる蛋白質であることが明らかとなった。一方, *pap31* の遺伝子配列は type 間で相違があることがわかった。以上から, P25 と PAP31 はいずれも type 別に抗原性と遺伝子配列にそれぞれ相違が見られること, さらに PAP31 の分子量は 25kDa であることから, P25 は PAP31 と同一であると示唆された。また, 本研究で検討した type II の C36-1 株は, P25 の抗原性および *pap31* 遺伝子配列では, type I, II いずれの型にも属さないことが明らかとなった。今後, この様に異なる P25 (=PAP31) を有する各 *B. henselae* 株について, それぞれの IFA の抗原性, 病原性や誘導される宿主免疫応答の相違について検討する必要がある。

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や犬を原因とする事例が諸外国及びわが国でも散

見されるようになった。また、さらにその病態も様々であることが明らかとなってきた。今回、遭遇した患者は、ほぼ猫ひっかき病と同様の症状であったが、猫との接触はなかった。しかしながら、患者は犬を飼育しておりよく顔を舐められていたことから、この犬から *B. henselae* の感染があったものと推察された。本研究からも、犬は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae* に感染していることが血清学的に示されており、今後、犬は種々の *Bartonella* の感染源として注意する必要があるものと思われる。

E. 結論

1) わが国の犬にも *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae* の感染があることが血清学的に明らかになった。

2) *B. henselae* には type I と type II でそれぞれ発現している蛋白質に相違があり、*B. henselae* の P25 は各 type により抗原性の異なる蛋白質であることが明らかとなった。

3) 犬との接触による発生したと思われる *B. henselae* 感染症患者を臨床生化学的、血清学的に診断した。

F. 健康危険情報

犬も *Bartonella* 感染症の感染源として注意する必要があると思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Jittapalapong, S., Sangvaranond, A., Pinyopanuwat, N., Chimnoi, W.,

Khachaeram, W., and Maruyama, S. 2005. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic goats in Satun Province, Thailand. *Vet. Parasitol.* 127: 17-22.

2) Verdida, R. A., Hara, O. A., Xuan, X., Fukumoto, S., Igarashi, I., Zhang, S., Dong, J., Inokuma, H., Kabeya, H., Sato, Y., Moritomo, T., Maruyama, S., Claveria, F., and Nagasawa, H. 2004. Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. *J. Vet. Med. Sci.* 66(12): 1517-1521.

3) Morita, Y., Maruyama, S., Kabeya, H., Boonmar, S., Nimsupan, B., Nagai, A., Kozawa, K., Nakajima, T., Mikami, T., and Kimura, H. 2004. Isolation and phylogenetic analysis of *Arcobacter butzleri* in ground chicken meat and environmental water in Japan and Thailand. *Microbio. Immunol.* 48(7):527-533.

4) Shinozaki, Y., Shiibashi, T., Yoshizawa, K., Murata, K., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. Ectoparasites of the Pallas, *Callosciurus erythraeus*, introduced to Japan. *Med. Vet. Entomol.* 18:1-3.

5) Shinozaki, Y., Yoshizawa, K., Murata, K., Shiibashi, T., Kimura, J., Maruyama, S., Hayama, Y., Yoshida, H. and Nogami, S. 2004. The first record of sucking louse, *Neohaematopinus callosciuri*,

- infesting Pallas squirrels from Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 66(3): 333-335.
- 6) Maruyama, S., Izumikawa, K., Miyashita, M, Kabeya, H., Mikami, T., Yamanouchi, H., Sasaki, E., Yoshida, H., and Izumikawa, K. 2004. First isolation of *Bartonella henselae* type I from a cat-scratch disease patient in Japan and its molecular analysis. *Microbiol. Immunol.* 48(2):103-109.
- 7) Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., and Mikami, T. 2004. Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 90(3): 303-308.
- 8) 鈴木幹啓, 西原秀宏, 柴田丈夫, 丸山総一(2004): 髄液中に*Bartonella henselae* DNAを検出した猫ひっかき病の1例. 小児科臨床57: 2131-2135.
- 9) 森田幸雄, 壁谷英則, 石岡大成, 阪脇廣美, 長井 章, 鈴木宣夫, 中林良雄, 丸山総一(2004): 家畜および市販ひき肉における*Arcobacter*, *Campylobacter*, *Salmonella*の分布状況. 日獣会誌57:393-397.
- 10) 山内寛嗣, 泉川欣一, 久松貴, 良永倫子, 佐々木栄祐, 泉川公一, 早川友一郎, 原耕平, 丸山総一, 大谷博, 下川功(2004): 犬が感染源と考えられた*Bartonella henselae*感染症の1例. 感染症誌 78(3): 270-273.
- 11) 丸山総一(2004): 猫ひっかき病, モダンメディア 50(9):203-211.
2. 学会発表
- 1) Sathaporn Jittapalapong, Nongnuch Pinyopanuwat, Wissanuwat Chimnoi, Soichi Maruyama, Philippe Brouqui, Hisashi Inokuma and Roger W. Stich. 2004. Serological Prevalence of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophila* in stray cats in Bangkok, Thailand. Joint international tropical medicine meeting, 2004. (29 November 1 December, 2004). Thailand (Bangkok).
- 2) Maruyama, S., Kabeya, H., Yanai, K., Kawanami, K., Morita, Y., Mikami, T. and Jittapalapong, S. 2004. Prevalence of *Bartonella* species among cats and dogs in Bangkok metropolitan areas, Thailand. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 3) Kabeya, H., Sase, M., Yamashita, M., Mikami, T., and Maruyama, S. 2004. Predominant Th2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. The 4th International Conference on *Bartonella* as Emerging Pathogens (August 24, Sept1, 2004). Sweden (Uppsala)
- 4) Rodolfo Verdida, Olga Hara, 玄学南, 福本晋也, 猪熊壽, 壁谷英則, 佐藤雪太, 森友忠昭, 丸山総一, 長澤秀行(2004): Serodiagnosis of *Babesia gibsoni* infection in dogs by an improved enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated P50. 第138