

## 論文の内容の要旨

氏名：水上 昌也

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：野生食肉目動物、特にタヌキにおける *Bartonella* 属菌の生態学的研究

わが国には、7科32種の野生食肉目動物が生息しているといわれている。その中でも在来種のタヌキやキツネ、外来種のアライグマやハクビシンなどは、人の生活圏と重なるように生息しているため、農・畜産業、住居への侵入、直接的な人への咬傷被害などの事例が多数報告されるようになった。また、新興感染症を含む人獣共通感染症の43%は食肉目動物に由来することが報告されていることから、食肉目動物の各種病原体の病原巣としての役割を明らかにすることが極めて重要である。

*Bartonella* 属の細菌は、哺乳類の血管内皮細胞や赤血球内に寄生するグラム陰性の多形性短桿菌で、37種3亜種のうち14種2亜種が人に対して病原性を示すことが知られている。猫ひっかき病や塹壕熱等のバルトネラ症の起原菌である *Bartonella henselae* や *Bartonella quintana* は、ノミやシラミなどの吸血性節足動物によって媒介される。近年、種々の野生食肉目動物が *B. henselae*、心内膜炎の原因となる *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii*、脾腫、貧血、発熱の原因となる *Bartonella rochalimae* を保有していることが報告されるようになった。しかしながら、わが国の野生食肉目動物、特にタヌキにおける *Bartonella* の生態については、全く不明の状態である。タヌキは、人の生活圏と密着して生息しているため、有害獣あるいは傷病獣として駆除・保護される機会が多いが、病原性 *Bartonella* の感染状況は明らかにされていない。

本研究は、日本の代表的な野生食肉目動物であるタヌキにおける *Bartonella* 属菌の生態解明を目的として、第1章では、世界各国の野生食肉目動物における病原性 *Bartonella* の検査手法・菌種とその分布状況を解析することで、*Bartonella* 症の病原巣としての食肉目動物の意義を考察するとともに、第2章では、Polymerase chain reaction (PCR) を用いてイヌ科動物の血液から *Bartonella* DNA を高感度に検出する方法とその感度を検討した。第3章では、わが国の野生タヌキに感染している *Bartonella* 菌種とその感染にかかわる疫学要因について検討するとともに、検出された *Bartonella* 遺伝子の詳細な解析を行った。

### 1. 野生食肉目動物と病原性 *Bartonella* の感染状況に関する文献的考察

*Bartonella* は発育速度が極めて遅いため、その分離には2~4週間、培養する必要がある。また、*Bartonella* は種々の抗菌性物質に感受性を示すため、本菌を選択的に分離するための培地がない。そのため、分離培養法は直近の感染状況を把握し、分離株の各種病原因子等を解析する上で極めて有用な方法であるが、対象動物から無菌的に採取した新鮮な血液が必要となる。PCR法は試料の状態に影響されることなく、目的とする病原体の遺伝子を高感度に検出することが可能であり、様々な動物の血液や臓器からの *Bartonella* DNA の検出に応用されている。その一方で、生菌・死菌の双方を検出することや類縁菌の交差汚染による偽陽性が問題となることがある。抗体検出は、過去の感染を知る上で有用な方法であるが、*Bartonella* 菌種間の交差反応の可能性を考慮する必要がある。また陽性率も分離培養法やPCR法に比べて高く出る傾向にある。以上から、野生食肉目動物の *Bartonella* 感染を研究する際は、各手法の特性を理解した上で実施する必要があると思われた。

野生イヌ型亜目では、米国のハイイロギツネの42% (22/53)、アライグマの26% (11/42)、コヨーテの9.5% (2/21)、フランスのアカギツネの1頭から人に脾腫、貧血、発熱を起こす *B. rochalimae* が分離されている。また、米国のシマハイイロギツネの11.8% (6/51)、ハイイロギツネの9.4% (5/53)、コヨーテの28% (31/109) から人の心内膜炎の原因菌である *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* が分離されている。

PCR法を用いた研究では、メキシコのキットギツネの13.3% (2/15) とコヨーテの5.6% (1/18)、オーストリアのアカギツネの0.2% (1/506)、スペインのアカギツネの1.6% (1/62) とオオカミの33.3% (1/3)、イスラエルのキンイロジャッカル7.1% (5/70) とアカギツネ9.1% (1/11) から *B. rochalimae* のDNAが検出されている。さらに、イラクのジャッカルの12.3% (7/57) からは新種と思われる *Bartonella merieuxii* のDNAが検出されている。

野生ネコ型亜目では、アフリカのライオンの 5.2% (3/58) から猫ひっかき病の原因菌である *B. henselae* が、チーターの 5.9% (1/17) からは *Bartonella koehlerae* が分離されている。また、米国のマウンテンライオンやボブキャットは、*B. henselae* や *B. koehlerae* subsp. *boulouisii* や subsp. *bothieri* といった新種の *Bartonella* 属菌を保有していることも明らかとなっている。

米国のハイイロギツネの 25.8% (68/263) 、コヨーテの 36% (309/869) から *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* 抗体が、ハイイロギツネの 27.7% (73/263) から *B. clarridgeiae* 抗体が検出されている。また、ブラジルのカニクイイヌの 12.8% (5/39) 、ヤブイヌの 11.1% (3/11) 、タテガミオオカミの 8.7% (2/23) から *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*、*B. clarridgeiae*、*B. rochalimae* の抗体が検出されているが、菌種間の交差反応も否定できない。

わが国の野生食肉目動物では、イヌ型亜目のテンの 12.5% (1/8) から、北米のジリス由来の *B. washoensis* と高い相同性を示す株が、ニホンアナグマの 6.7% (1/15) からは新種と思われる *Bartonella* が、ネコ型亜目では外来種のマングースの 15% (10/63) やハクビシンの 2.0% (1/50) から *B. henselae* が分離されている。さらに、天然記念物のイリオモテヤマネコの 6% (2/33) やツシマヤマネコの 7.7% (1/13) から *B. henselae* や *B. clarridgeiae* DNA が検出されている。しかしながら、日本の代表的なイヌ型亜目動物で、ヒトの生活圏に密着して生息しているタヌキの病原性 *Bartonella* の生態に関しては、未検討であることが判明した。

コヨーテにかまれ発熱とリンパ節腫脹を示した少年が *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* 抗体陽性であった米国の事例や高知県でペットとして飼育していたハクビシンにひっかかれて猫ひっかき病を発症した事例が報告されていることから、野生食肉目動物は人のバルトネラ症の感染源になることが示されている。

以上のように、野生食肉目動物は、数種の病原性 *Bartonella* に感染しており、イヌ型亜目では、*B. rochalimae* と *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* が、ネコ型亜目では *B. henselae*、*B. clarridgeiae*、および *B. koehlerae* が主要な菌種であり、亜目毎に固有の菌種を保有していることが明らかとなった。また、両亜目の動物は、それぞれ新種の *Bartonella* を保有していること、タヌキの病原性 *Bartonella* の生態については未検討であることから、これらを明らかにすることが今後の重要な課題であると思われる。さらに、食肉目動物から *Bartonella* に感染した人の事例が報告されていることから、今後、野生食肉目動物を取り扱う際は、本症の病原巣であることを認識した上で対応する必要がある。

## 2. イヌ科動物血液中の *Bartonella* DNA 検出を目的とした PCR 法の検討

野生動物から血液を採材する場合、狩猟捕獲、傷病保護、あるいは交通事故等で死亡した個体が多いため、種々の細菌や真菌の汚染を受けている可能性が高い。したがって、*Bartonella* の分離には不適な検体が多いため、*Bartonella* の感染状況を把握する場合、PCR 法が多用されている。しかしながら、タヌキを含むイヌ科動物の血液中の *Bartonella* DNA の検出を目的とした PCR 法の諸条件を検討した報告はない。そこで第 2 章では、イヌ科動物の血液試料から *Bartonella* DNA を高感度かつ特異的に検出する PCR 法の条件について検討した。

*Bartonella* の RNA polymerase subunit  $\beta$  (*rpoB*)、Citrate synthase (*gltA*) および Transfer-messenger RNA (*ssrA*) の各遺伝子領域を標的とする PCR 法によってタヌキの血液 6 検体から本菌の DNA 検出を試みた。その結果、6 検体において *gltA* を標的とした PCR 法では多くの非特異反応が確認され、判別不能であった。一方、*rpoB* と *ssrA* を標的とした PCR 法では、いずれの検体においても非特異反応は少なく、容易に判定が可能であった。そこで、タヌキの血液から *Bartonella* DNA を正確に検出すること目的として、*rpoB* および *ssrA* を標的とした PCR 法の検出感度を検討した。

*B. rochalimae* BAA-1498<sup>T</sup> 株の *rpoB* および *ssrA* 領域をそれぞれ増幅した後、TA クローニングにより当該領域を組み込んだプラスミド DNA を作製した。Nuclease-free water (以下、NFW) および *Bartonella* 非感染犬の血液から DN easy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した溶液 (以下、犬血液抽出液) を用いて PCR 法の感度を検討した。6×10<sup>7</sup>~6×10<sup>-1</sup> copy/μl に希釈した各遺伝子領域のプラスミド DNA の 5μl を 45μl の NFW および犬血液抽出液 45μl に加え、6×10<sup>6</sup>~6×10<sup>-2</sup> copy/μl の希釈系列を作製した。NFW13.3μl を分注した PCR 反应用チューブに、先に作製した 6×10<sup>6</sup>~6×10<sup>-2</sup> copy のプラスミド DNA を 1μl、10μM の Forward、Reverse プライマーを各 1μl、dNTP 溶液を 1.6μl、Takara EX Taq HS を 0.1μl、反应用 buffer の 2μl をそれぞれ加え、PCR 反応を行った。

*rpoB* 領域の PCR 法では、NFW で希釈したプラスミド DNA において  $6 \times 10^1$  copy/反応、犬血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では  $6 \times 10^2$  copy/反応まで遺伝子増幅が確認された。*ssrA* 領域の PCR 法では、NFW で希釈したプラスミド DNA において  $6 \times 10^2$  copy/反応、犬血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では  $6 \times 10^3$  copy/反応まで遺伝子増幅が確認された。

これらの成績から、*rpoB* 領域を標的とした PCR 法ではイヌ科動物の血液中に  $6 \times 10^2$  copy 以上、*ssrA* 領域の PCR 法では  $6 \times 10^3$  copy 以上の *Bartonella* DNA が存在すれば、検出可能であると思われた。また、両 PCR 法ともに、犬血液抽出液で希釈した試料の検出感度は、NFW で希釈した際の感度に比べて 1/10 に低下したことから、血液に由来する物質が PCR 反応の感度低下に影響している可能性が示された。

### 3. タヌキにおける *Bartonella* 感染状況、疫学要因ならびに検出株の遺伝子解析

これまでタヌキが保有する *Bartonella* 種およびその遺伝子性状については、全く検討されていなかった。そこで、本章ではわが国の野生タヌキにおける *Bartonella* 感染状況を PCR 法により検討した。さらに、検出された *Bartonella* DNA の塩基配列の系統解析、遺伝子相同解析から菌種を同定するとともに、タヌキの *Bartonella* 感染に係る各種疫学要因について検討した。

2009～2017 年に和歌山県田辺市周辺で捕獲、傷病保護、あるいは交通事故等で死亡したタヌキの 619 頭から血液を採取した。タヌキは性別、健康状態、および疥癬感染の有無を調べた後、血液を EDTA 入り採血管に入れ、検査時まで  $-70^\circ\text{C}$  で保存した。血液は室温で解凍した後、その 200 $\mu\text{l}$  から DNA を抽出し、*rpoB* 領域、*ssrA* 領域を標的とした PCR 法で *Bartonella* DNA の検出を行った。

*rpoB* 領域の PCR では、619 検体中 44 検体 (7.1%) から *Bartonella* DNA が検出され、陽性の 44 検体は、*ssrA* 領域でも陽性であった。全ての陽性株の *rpoB*、*ssrA* 領域の遺伝子配列を決定した後、既存の *Bartonella* 標準株の同配列と系統解析を行った。さらに、タヌキ由来 RD86 株の *rpoB* 領域および *ssrA* 領域の相同性にに基づき菌種を同定した。

検出された 44 株の *rpoB* および *ssrA* 領域の塩基配列は、全て同一であった。両遺伝子領域の系統解析により、タヌキ由来 RD86 株は患者由来の *B. rochalimae* BAA-1498<sup>T</sup> と同一のクラスターに分類された。RD86 株の遺伝子相同性は、コヨーテやアカキツネなどのイヌ科動物の *B. rochalimae* 株と最も高い値 (*rpoB* : 99.8%、*ssrA* : 99.7%) を示した。これより、わが国のタヌキは遺伝的に均一な病原性 *Bartonella* である *B. rochalimae* に感染していることが初めて明らかとなった。さらに、タヌキ由来 RD86 株は、イヌ科食肉動物に固有の *B. rochalimae* であると考えられた。

タヌキの *B. rochalimae* DNA の陽性率は、雄が 6.1% (21/344)、雌が 8.4% (23/275) と有意差はなかったことから、感染機会には性差がないことが明らかとなった。年度別の陽性率は、2011 年の 2.2%

(1/45) から 2016 年の 14.3% (4/28) まで差がみられたものの、全ての年度で陽性個体が存在した。これより、今回研究対象とした地域周辺のタヌキ個体群では、2009 年以降から *B. rochalimae* の感染が維持されていたと考えられた。また、疥癬に感染していたタヌキの *B. rochalimae* 陽性率は、7.9% (39/494) と疥癬陰性のタヌキの 4.0% (5/125) に比べて高い傾向にあったことから、タヌキの個体間における *B. rochalimae* の伝播に疥癬感染が関与している可能性も考えられた。

**【総括】** 本研究により、野生食肉目動物が保有する *Bartonella* 種は、イヌ型亜目では、*B. rochalimae* と *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* が、ネコ型亜目では *B. henselae*、*B. clarridgeiae*、*B. koehlerae* が主要な菌種であり、食肉目動物は新種を含む様々な病原性 *Bartonella* の病原巣であることを示すことができた。

*rpoB* 領域を標的とした PCR 法では、イヌ科動物の血液中に  $6 \times 10^2$  copy 以上、*ssrA* 領域の PCR 法では  $6 \times 10^3$  copy 以上の *Bartonella* DNA が検出可能であったことから、*rpoB* 領域の PCR でスクリーニングを行った後、*ssrA* 領域の PCR を行うことで確実に *Bartonella* DNA を検出するとともに、菌種を同定することが可能となった。また、血液中の PCR 阻害物質が感度低下に関与している可能性を明らかにした。

わが国固有の野生食肉目動物であるタヌキは遺伝的に均一な病原性 *B. rochalimae* に感染しており、この感染は、和歌山県田辺市周辺地域のタヌキ個体群において 2009 年から維持されていたことが初めて明らかとなった。また、タヌキの個体間における *B. rochalimae* の伝播に、疥癬感染が関与している可能性も考えられた。さらに、*rpoB* 領域および *ssrA* 領域の遺伝子解析から、タヌキが保有する株はイヌ科食肉動物に固有の *B. rochalimae* であると考えられた。