

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

日本大学大学院獣医学研究科獣医学専攻

博士課程

水上 昌也

2020

目次

第 1 章 各国の野生食肉目動物における病原性 *Bartonella* の感染状況に関する

文献的考察

1.1 はじめに	2
1.2 ネコ型亜目における <i>Bartonella</i> 属菌の生態	7
1.3 イヌ型亜目における <i>Bartonella</i> 属菌の生態	9

第 2 章 イヌ科動物の血液中 *Bartonella* DNA 検出を目的とした PCR 法の検討

2.1 はじめに	19
2.2 材料および方法	22
2.2.1 検出感度測定用のプラスミド DNA の作製	
a) 使用菌株と DNA 抽出	
b) <i>B. rochalimae</i> BAA-1498 ^T 株の <i>rpoB</i> および <i>ssrA</i> 領域の PCR 法による増幅	
c) PCR の検出感度測定用プラスミド DNA 溶液の作製	
d) プラスミド DNA 溶液のコピー数の調整	
2.2.2 PCR 法の検出感度測定	
2.3 成績	30
2.3.1 テンプレート DNA①を用いた PCR 法の検出感度	
2.3.2 テンプレート DNA②を用いた PCR 法の検出感度	

2.4	考察	36
2.5	小括	39
2.6	第2章で使用した試薬類の組成	41
第3章 タヌキにおける <i>Bartonella</i> 感染状況、疫学要因ならびに検出株の遺伝子解析		
3.1	はじめに	43
3.2	材料および方法	46
3.2.1	検査材料	
3.2.2	PCRによる <i>Bartonella</i> DNA の検出	
3.2.3	<i>Bartonella</i> DNA シーケンシング	
3.2.4	遺伝子系統解析および相同性解析	
3.3	統計解析	
3.3	成績	49
3.3.1	タヌキにおける <i>Bartonella</i> DNA 保有率	
3.3.2	タヌキから検出された <i>Bartonella</i> DNA の系統解析	
3.3.3	BLAST 検索に基づくタヌキ RD86 株の相同性解析	
3.3.4	タヌキにおける <i>B. rochalimae</i> DNA 保有率に関する疫学要因	
3.4	考察	58
3.5	小括	62

第 4 章 総括	64
謝辞	75
引用文献	76

第 1 章

各国の野生食肉目動物における
病原性 *Bartonella* の感染状況に関する文献的考察

1.1 はじめに

わが国には、多種多様な野生動物が複雑な生態環境下で生息し、その数は外来種を含め 31 科 72 属 170 種にも達する [Ohdachi et al., 2009]。このうち、陸上に生息する野生食肉目動物は、ネコ型亜目動物に属するネコ科、マングース科およびジャコウネコ科、イヌ型亜目に属するイヌ科、クマ科、イタチ科およびアライグマ科の計 7 科 32 種が生息していると考えられている。ネコ型亜目動物のネコ科では、在来種のイリオモテヤマネコが沖縄県（西表島）、ツシマヤマネコが長崎県（対馬）をはじめ、外来種では、ジャコウネコ科のハクビシンが全国に、マングース科のファイリマングースが沖縄県や鹿児島県（奄美大島）に生息している。イヌ型亜目動物では、クマ科のヒグマは北海道に限局して生息しており、ツキノワグマは北海道、九州を除く地域に生息している。また、イヌ科のタヌキ、キツネをはじめ、イタチ科のテン、イタチ、イイズナ、オコジョ、ミンク、ニホンアナグマ、外来種のアライグマなどは全国に生息している。

わが国の野生動物の多くは、人の生活圏と重なるように生息しており、高齢化による耕作地の放置や若者の都市部への流出による里地里山の崩壊等により、その生息数は近年著しく増加している。その結果、農・畜産業に及ぼす被害は年間 10 億円以上に達し、2009 年から 2016 年にかけては毎年ほぼ同様の被害額で推移している（図 1-1）。また、食肉目動物による被害は農作物にとどまらず、特に外来種のアライグマやファイリマングース等は、ニホンザリガニ、エゾサンショウウオやアマミノクロウサギといった日本固有種の捕食や在来種のタヌキと生息域を競合するなど、わが国の生態系にも大きな影響を及ぼしている。さらに、文化遺産などへの被害、住居侵入や直接的な人への危害なども日本各地で報告されるようになった（図 1-2）。

以上のような背景から、野生動物に起因する各種被害を解消する目的で、日本各地で自治体を中心とした有害鳥獣駆除事業が積極的に行われるようになった。その結果、ハクビシン、アライグマ、ニホンアナグマ、タヌキ、クマ等の野生食肉目動物の捕獲頭数は、2009年には約22,000頭であったのが2016年には約77,000頭へと年々増加している（図1-3）。また、タヌキは人家周辺に生息していることにも関連し、傷病動物としての保護頭数が近年著しく増加している（図1-4）。

近年、野生食肉目動物は各種新興・再興感染症の媒介動物として重要な役割を担っていることが認知されるようになった。米国ではアライグマ、スカンク、ヨーロッパ圏においてはキツネなどが狂犬病の媒介動物として重要である。その他の疾病では、パスツレラ症、エキノコックス症、アライグマ回虫症など種々の細菌性・寄生虫性感染症を含む人獣共通感染症の43%が、食肉目動物に由来することが報告されている[Cleaveland et al., 2009]。わが国においても、北海道のキタキツネは、エキノコックス症の重要な媒介動物として注目すべき食肉目動物となっている[Yimam et al., 2002]。

バルトネラ症は、*Bartonella* 属の細菌を原因とする新興・再興感染症である。猫ひっかき病（Cat-scratch disease:CSD）は、その名が示すように、猫が重要な感染源・病原巣とする代表的なバルトネラ症であるが、近年、コヨーテやアライグマなどの野生食肉目動物を自然宿主とする *Bartonella* 属菌が、人に心内膜炎、脾腫、関節炎などを引き起こす新たなバルトネラ症の原因となることが明らかになってきた[Breitschwerdt et al., 1995]。

Bartonella 属は、グラム陰性の多形性短桿菌（ $0.5\sim 0.6\times 1.0\mu\text{m}$ ）で、ノミ、シラミ、サシチョウバエなどの吸血性節足動物によって媒介される。本属菌は、

霊長目、齧歯目、食肉目、ウサギ目、げっ歯類などの哺乳類を自然宿主として、宿主の血管内皮細胞ならびに赤血球内に持続感染することで長期間の菌血症を引き起こす[Breitschwerdt et al., 2010]。本菌の発育には赤血球成分の一つであるヘミンを必要とし、その発育速度は極めて遅いため、その分離には血液寒天培地を用いて 5%の CO₂濃度、20~37°C環境下で 7~21 日間と長期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、本菌を分離培養するための優れた選択培地は未だに開発されていない。

Bartonella henselae は、猫ひっかき病の起因菌であり [Regnery et al., 1992]、猫科動物を自然宿主とする代表的な *Bartonella* である。後天性免疫不全症候群患者や臓器移植者などの免疫不全状態の人においては、細菌性血管腫症、心内膜炎、Bacillary peliosis、Bacillary splenitis が重篤な合併症として報告されている [Regnery et al., 1992]。

1995年に米国の Clarridge ら [1995]により猫から分離された *B. clarridgeiae* も、CSDの原因となる可能性があることが Kordick ら [1997] により報告された。1999年に Droz ら [1999]は、米国のサンフランシスコ湾周辺地域の飼い猫から分離された *B. henselae* 25株のうち、既存の *B. henselae* と表現型および遺伝子型が異なる株が2種あることを発見した。これらの株は、*gltA* 領域における遺伝子解析では区別することはできなかったが、DNA-DNA hybridization の成績から、*B. henselae* とは異なる新種の *Bartonella koehlerae* として報告された。発見当初、*B. koehlerae* の人に対する病原性は不明であったが、2004年、人に心内膜炎を起こすことが Avidor ら [2004]により初めて報告された。

1995年に Breitschwerdt ら [1995]は、米国の心内膜炎のイヌから新種の *Bartonella* を分離し、DNA-DNA hybridization や 16sRNA の塩基配列を用いた系

統解析の成績から、分離株は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* として報告された。2000年には、心内膜炎に罹患した患者からも *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の DNA と抗体が検出され、本菌は人に対しても病原性を示す *Bartonella* であることが明らかになった [Chang et al., 2000]。

2007年には、発熱、脾腫、筋肉痛、関節炎などの多様な症状を呈した女性の血液から、*Bartonella* 様の細菌が分離された[Eremeeva et al., 2007]。この患者は発症前にペルーに滞在しており、滞在中に多数の吸血性節足動物の寄生を受けていたことから、当初、アンデス地域のベクター媒介性の感染症であるカリオン病が疑われた。患者から分離された株は、単極に複数の鞭毛を保有するなどの *B. clarridgeiae* 様の形態を示し[Sanchez et al., 2016]、また、ペルーのヒトノミ (*Pulex irritans*) から検出された新種と思われる *Bartonella* の 16S-23S rRNA 遺伝子間 (ITS) 領域の DNA 配列と非常に高い相同性 (99.8%) を示したことから、新種の *Bartonella rochalimae* として命名された[Parola et al., 2002]。その後、*B. rochalimae* は、米国のアライグマ、ハイイロギツネ、およびフランスのアカギツネからも分離され、野生食肉目動物が自然病原巣であることが明らかになってきた[Henn et al., 2009]。

以上に示したように、食肉目動物は、種々の *Bartonella* の自然病原巣を形成していることが近年明らかになってきたことから、*Bartonella* 菌の生態を明らかにすることはバルトネラ症の疫学を解明する上で、きわめて重要である。また、*Bartonella* 属菌の生態解明を行う上で、分離培養法は直近の感染状況を把握し、分離菌の種々の遺伝学的性状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。Polymerase chain reaction (PCR)法は、試料の状態にほとんど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る。PCR 法は、様々な動物の血液や臓器からの *Bartonella* DNA の検出に応用される一方で、生菌・死菌の双方を検出することや非特異反応による偽陽性が問題となることがある。また、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* 属の菌種間の交差反応が生じることがあるため、抗体陽性率は分離培養法や PCR 法の陽性率に比べて高くなる傾向にある。

以上から、野生食肉目動物の *Bartonella* 感染の疫学を研究する際には、各手法の特性を充分理解した上で実施する必要がある。

1.2 ネコ型亜目における *Bartonella* 属菌の生態

世界各国で、飼育下の猫 (*Felis domesticus*) における *B. henselae* の分離培養法による保菌率が検討されている。その値は、ノルウェーで 0% (0/100) [Bergh et al., 2002]、日本で 6.4% (44/690) [Maruyama et al., 2000]、オーストラリア (シドニー) で 35.0% (27/77) [Branley et al., 1996]、米国 (カリフォルニア州) で 39.5% (81/205) [Chomel et al., 1995]、インドネシアで 43% (5/14) [Marston et al., 1999]、フィリピンで 55%(17/31) [Chomel et al., 1999]、ジンバブエで 8%(2/25) [Kelly et al., 1998] といったように、国によって様々である。野生のネコ型亜目動物においては、アフリカの野生ライオンの 5.2% (3/58) やチーターの 33% (1/3) [Kelly et al., 1998] から *B. henselae* が、チーターの 5.9% (1/17) からは *B. koehlerae* が分離されている [Molia et al., 2016]。また、米国のマウンテンライオンやボブキャットは、*B. henselae* をはじめ、*B. koehlerae* subsp. *boulouisii* や *B. koehlerae* 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 [Chomel et al., 2016]。このように、ネコ型亜目動物の多くが、本菌の自然宿主であることが諸外国の研究者により示されている (表 1-1)。

わが国の野生ネコ型亜目では、特別天然記念物に指定されている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 [Tateno et al., 2013]。さらに、外来種のフイリマングースの 15% (10/63) やハクビシンの 2.0% (1/50) からも *B. henselae* が分離されている [Sato et al., 2013] (表 2-2)。また、高知県ではペットとして飼育していたハクビシンに飼い主が引っ搔かれた後に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 [宮崎ら, 2001]、野生ネコ型亜目動物も猫ひっかき

病をはじめとするバルトネラ症の感染源あるいは病原巣として重要な役割を果たしているものと考えられる。

1.3 イヌ型亜目における *Bartonella* 属菌の生態

犬 (*Canis familiaris*) の *Bartonella* の病原巣としての役割は明確ではないが、これまでヒトの心内膜炎の症例から、*B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* が検出されており、犬の本菌による心内膜炎の病態に類似していることから [Chomel et al., 2009]、犬は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* の病原巣であると考えられている。

近年、各国の野生イヌ型亜目においても *Bartonella* の保有状況が研究されている (表 1-1)。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) [Bai et al., 2016]、フランスのアカギツネ (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 [Henn et al., 2009]。また、米国のシマハイイロギツネの 11.8% (6/51) [Schaefer et al., 2011]、ハイイロギツネの 9.4% (5/53)、コヨーテの 28% (31/109) からは人の心内膜炎の原因菌となる *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* が分離されている [Bai et al., 2016]。

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) [López-Pérez et al., 2017]、オーストリアのアカギツネの 0.2% (1/506) [Kaewmongkol et al., 2011]、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) [Gerrikagoitia et al., 2012]、イスラエルのキンイロジャッカル の 55% (5/9) とアカギツネの 9.1% (1/11) [Marciano et al., 2016] から *B. rochalimae* の DNA が検出されている。さらに、米国のハイイロギツネから採取したヒトノミの一種 (*Pulex* spp.) [Schaefer et al., 2012] やチリのイヌから採取したノミ [Pérez-Martínez et al., 2009] から *B. rochalimae* の DNA が検出されたことから、*B. rochalimae* の自然宿主はアライグマやギツネなどの野生イヌ型亜目動物であることが明らかとなり、*Pulex* 属のノミが本菌の主要なベクターであると考えられている。東部スロバキアのアカギツネにおけるノミの寄生率は 72%

(56/78) と非常に高い値であり [Kočišová et al., 2006]、また同国のアカギツネから回収したノミの 4.7% (19/407) から *Bartonella* DNA が検出されていることから、ノミはアカギツネにおいて *Bartonella* の重要なベクターの一つである可能性が示唆されている [Víchová et al., 2018]。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 [Chomel et al., 2012]。以上に示したように、各国のイヌ科動物も、種々の *Bartonella* の自然病原巣を形成していると考えられる (表 1-1)。また、米国ではコヨーテに咬まれた人が、バルトネラ症を発症した事例が報告 [Chang et al., 2000] されていることから、野生イヌ型亜目も人のバルトネラ症の感染源として注目する必要がある。

わが国の野生イヌ型亜目では、テンの 12.5% (1/8) から病原性は不明であるが、北米のジリス由来の *B. washoensis* と高い相同性を示す株が分離されている。さらに、ニホンアナグマの 6.7% (1/15) から新種と思われる *Bartonella* も分離されている [Sato et al., 2012] (表 1-2)。

以上から、各国の野生食肉目動物は、数種の病原性 *Bartonella* を保有しており、特にネコ型亜目では *B. henselae*、*B. clarridgeiae*、および *B. koehlerae* が、イヌ型亜目では、*B. rochalimae* および *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* がそれぞれの亜目の動物における主要な菌種であることが判明した。さらに、亜目ごとに固有の菌種を保有していること、ネコ型亜目およびイヌ型亜目の動物は、それぞれ新種の *Bartonella* を保有していることも確認された。一方、わが国固有のイヌ型亜目動物であるタヌキは、人の生活圏に密接した環境に生息しているため、有害獣として駆除されたり、傷病獣として保護される件数は年々増加しているにもかかわらず、その病原性 *Bartonella* の保有状況については未だ検討されていない。

したがって、タヌキにおける *B. rochalimae* を含む病原性 *Bartonella* の感染状況を明らかにすることは、わが国におけるバルトネラ症の疫学を解明する上で重要な課題であると思われた。さらに、食肉目動物由来の *Bartonella* に感染した人の事例が日本や米国で報告されていることから、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十分認識した上で対応する必要があると思われた。

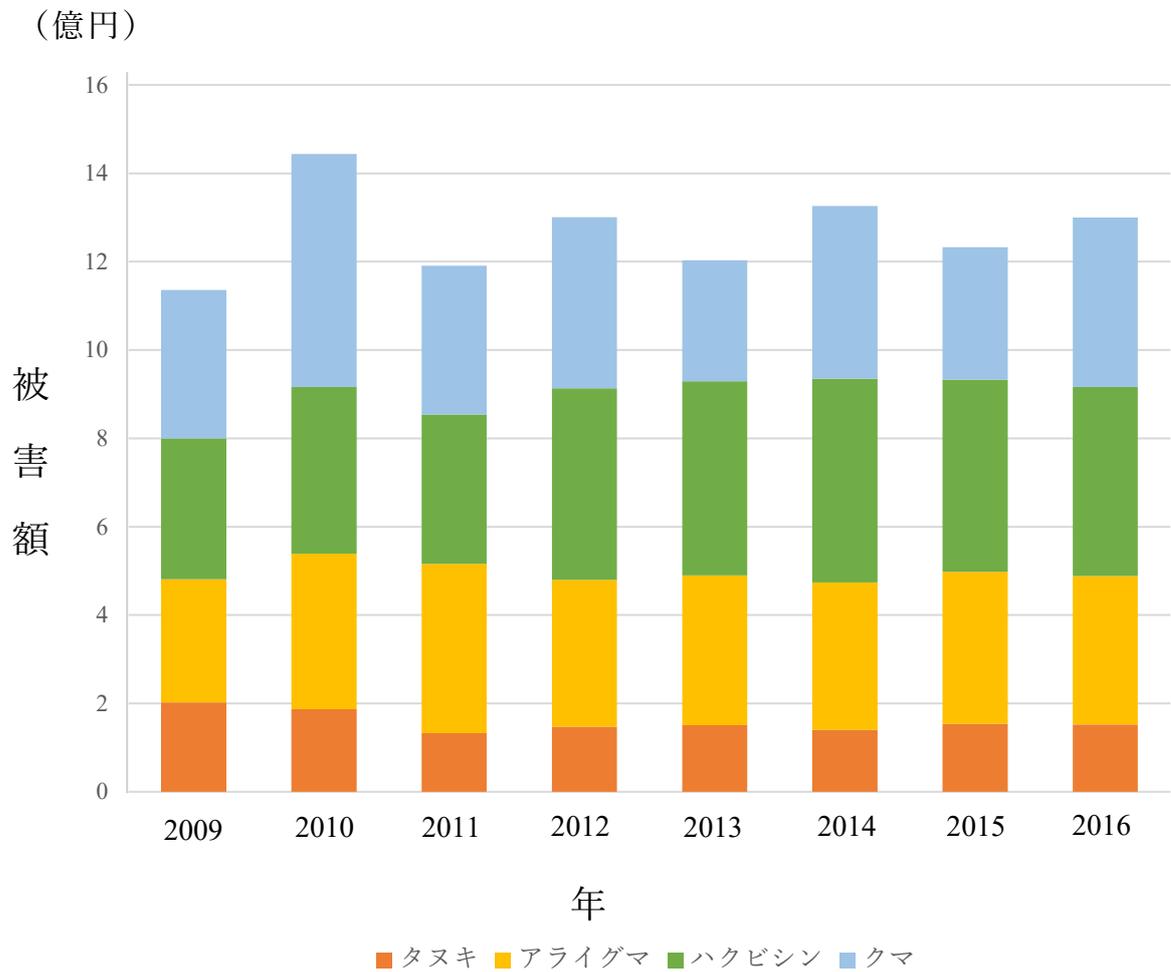


図 1-1 わが国の野生食肉目動物による農業被害額の推移 (2009～2016 年)

出典：農林水産省 (<https://www.maff.go.jp/>) 農作物被害状況より



a



b



c



d

図 1-2 食肉目動物による各種被害

- a. タヌキによるトウモロコシの食害
(出典 URL : <https://plaza.rakuten.co.jp/hananoyakata/diary/201708290000/>)
- b. ハクビシンによる天井裏の糞尿
(出典 URL : <https://npo-hakubishin.com>)
- c. 床下のアナグマ
(出典 URL : <https://mosika1.hamazo.tv/e7173670.html>)
- d. アライグマによる咬傷
(出典 URL : <https://www.whistlerquestion.com/news/local-news/local-woman-attacked-by-raccoon-after-rescuing-dog-1.23106017>)

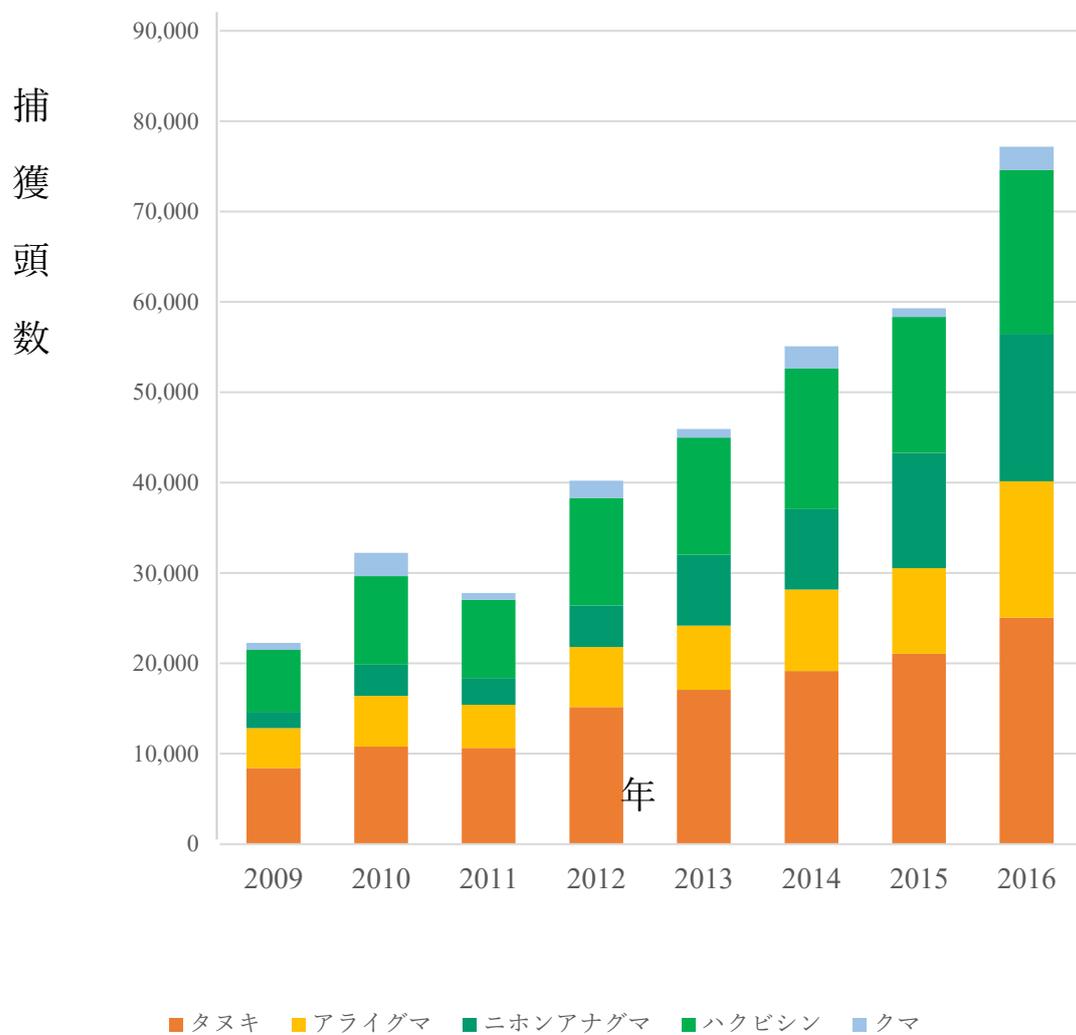


図 1-3 有害鳥獣捕獲による野生食肉目動物の捕獲頭数の推移（2009～2016 年）

出典：環境省 野生鳥獣の保護管理
 (<http://www.env.go.jp/nature/choju/index.html>)

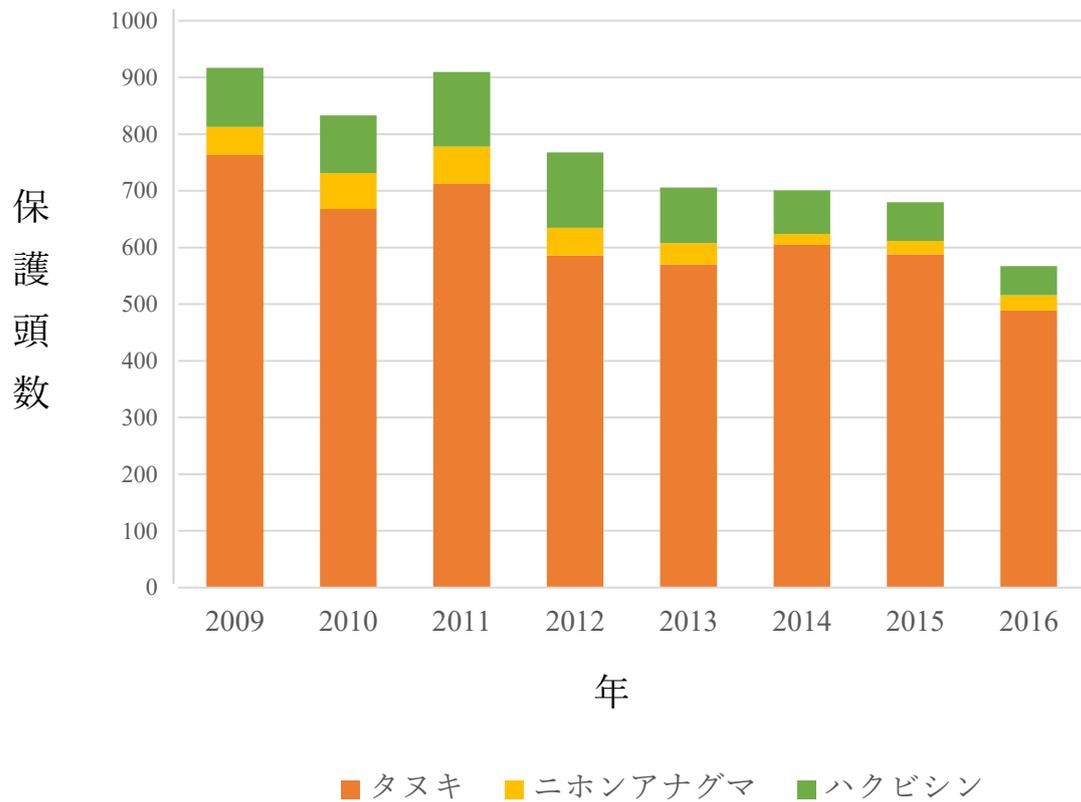


図 1-4 日本の傷病鳥獣としての食肉目動物の保護頭数の推移

出典：環境省 野生鳥獣の保護管理
<http://www.env.go.jp/nature/choju/index.html>

表 1-1 世界の野生食肉目動物から検出された *Bartonella* 属菌

亜目	自然宿主	菌種	人に対する症状	引用文献
ネコ型亜目	ボブキャット	<i>B. henselae</i>	患部発赤、リンパ節腫脹、発熱 (猫ひっかき病)	Chomel et al., 2016
	ピューマ			Molia et al., 2016
	チーター			
	ライオン			
	リビアヤマネコ			
チーター	<i>B. koehlerae</i>	心内膜炎	Molia et al., 2016	
イヌ型亜目	ハイイロギツネ	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	心内膜炎	López-Pérez et al., 2017
	シマハイイロギツネ			Schaefer et al., 2011
	コヨーテ			López-Pérez et al., 2017
	アライグマ			Henn et al., 2009
	キンイロジャッカル			Marciano et al., 2016
	コヨーテ			López-Pérez et al., 2017
	ハイイロオオカミ			Gerrikagoitia et al., 2012

表 1-2 日本の野生食肉目動物から分離された *Bartonella* 属菌

亜目	自然宿主	菌種	引用文献
ネコ型亜目	フィリマンゲース	<i>B. henselae</i>	Sato et al., 2013
	ハクビシン		
	イリオモテヤマネコ		Tateno et al., 2013
	ツシマヤマネコ		
イヌ型亜目	ニホンアナグマ	<i>Bartonella</i> sp.	Sato et al., 2012
	テン	<i>B. washoensis</i> -like bacterium	

第 2 章

イヌ科動物の血液中 *Bartonella* DNA
検出を目的とした PCR 法の検討

2.1 はじめに

各種動物の血液を用いて *Bartonella* 感染の有無を検討する場合、間接蛍光抗体法による抗体検出法[常岡ら, 1998]と PCR 法や分離培養法による抗原検出法がある。しかしながら間接蛍光抗体法で本菌に対する特異抗体を検出するための野生動物の二次抗体の入手は困難で、また、*Bartonella* は、Q 熱やクラミジア肺炎の原因菌である *Coxiella burnetii* や *Chlamydia pneumoniae* と交差反応を示すため[常岡ら, 2001]、野生動物における *Bartonella* の感染を血清学的に証明することは極めて難しい。一方、血液から *Bartonella* を分離する分離培養法と *Bartonella* DNA を検出する PCR 法では、分離株や検出された DNA の塩基配列から、宿主に感染している菌種を同定するとともにゲノム性状を詳細に解析することが可能である[La Scola et al., 2003]。特に、培養細胞を用いた感染実験で分離株の病原性も解析できることから[Eicher et al., 2012]、バルトネラ症の疫学を研究する上で分離培養法は理想的な方法であるといえる[Gutiérrez et al., 2017]。

猫における *Bartonella* 感染を調べる場合、分離培養法が広く用いられており、米国[Regnery et al., 1992]、ドイツ[Heller et al., 1997]、フランス[Heller et al., 1997]、日本[Maruyama et al., 2004]などをはじめ、世界各地の猫における *Bartonella* 菌の保有状況が検討されている。*Bartonella* はその発育に血液成分を必要とするため、分離には、ウサギやヒツジの血液を加えた栄養価の高いハートインフュージョン寒天培地が用いられている[Regnery et al., 1992]。血液寒天培地上における *Bartonella* の発育速度は、大腸菌やサルモネラなどと比べると極めて遅く、可視化コロニーの形成まで最低 2 週間を要する。また、*Bartonella* は、種々の抗生物質に対し感受性を示すため、優れた選択分離培地は未だに開発されておらず、本菌を分離する場合、検体から無菌的に採血した新鮮血液が必要と

なる。しかしながら、タヌキを含む野生動物から血液を採取する場合、狩猟で捕獲した個体、交通事故死あるいは野外斃死個体等から採血することが多いため、無菌的な新鮮血液を入手することは、極めて困難である。一方、PCR 法は、*Bartonella* の特定の遺伝子領域を高感度、かつ特異的に増幅する適切なプライマーがあれば、血液検体の雑菌汚染の有無にかかわらず、対象となる動物の *Bartonella* DNA の保有状況を正確に把握できると考えられる。

これまで、PCR 法を用いて様々な野生食肉目動物から *Bartonella* DNA が検出されている。Henn ら[2009]は、*Bartonella* の ITS 領域、クエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*)、RNA ポリメラーゼサブユニット β (*rpoB*)、および細胞分裂タンパク質 (*ftsZ*) 領域をそれぞれ標的とした PCR 法によって、フランスの 1 頭のアカギツネの血液から *Bartonella* DNA を検出し、その塩基配列から *B. rochalimae* であったことを明らかにしている。Gerrikagoitia ら[2012]は、*gltA* 領域を標的とした PCR 法により、スペインの 1 頭のハイイロオオカミの肝臓および脾臓から *B. rochalimae* を検出している。López-Pérez ら[2017]も、*gltA* 領域を標的とした PCR 法でハイイロギツネ 5 頭の血液から *B. rochalimae* DNA を検出している。

Bartonella の菌種を同定する場合、*gltA* 領域と *rpoB* 領域の塩基配列における *Bartonella* 標準株との相同性値を用い、*gltA* 領域では 96.0%未満、*rpoB* 領域が 95.4%未満であれば、解析に用いた *Bartonella* 株は既存種とは別種であると定義される[La Scola et al., 2003]。このことから、両領域の塩基配列解析は検出した *Bartonella* の菌種を同定する上で必須であると考えられてきた。しかしながら、*gltA* 領域を増幅するプライマーは、マウス、ラット、ヒトなどの宿主由来ゲノムとアニール反応し、PCR 法において、顕著な非特異反応が生じる可能性があることが指摘されている[Diaz et al., 2012]。また、複数のげっ歯類由来

Bartonella 株を用いたゲノム解析では、異なる株間で同領域の遺伝子組換えが生じる可能性が報告されている [Paziewska et al., 2011]。これらの背景から、*Bartonella* の菌種を同定する場合、*gltA* 領域以外の複数の遺伝子領域を解析することが推奨されるようになった。Diaz ら[2012]は、*Bartonella* のトランスファームessengerRNA (*ssrA*) 領域を標的とした real-time PCR 法によるスクリーニング検出法を開発した。また、*ssrA* 領域に基づく系統解析の成績が *gltA* 領域に基づくものと非常に近似していたことから、*Bartonella* の疫学研究において *ssrA* 領域を用いた PCR 法も広く用いられるようになった [Marciano et al., 2016]。

第 2 章では、タヌキを含むイヌ科動物の血液中から *Bartonella* DNA を高感度かつ特異的に検出可能な PCR 法の確立を目的として研究を行った。特に、*rpoB* 領域と *ssrA* 領域の遺伝子を標的とした PCR 法の有用性とその諸条件について検討した。また、血液検体中には PCR 反応を阻害する物質が存在することも知られていることから、それらが PCR 反応の感度にどの程度の影響を及ぼすかについても同時に検討することとした。

2.2 材料および方法

2.2.1 タヌキ *Bartonella* DNA 陽性株を用いた予備実験

−70℃で保管していたタヌキ血液を室温で解凍したのち、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。タヌキ血液 200μl から抽出した DNA を無作為に選択し、後述の *rpoB* 領域を標的とした PCR 法 [Renesto et al., 2001] で *Bartonella* DNA の検出を行った。本 PCR 法で陽性となった RD198 株、443 株、474 株を用いて、さらに *gltA* および *ssrA* 領域の PCR 法を実施し、それぞれの増幅産物の泳動像を比較検討した。なお、陽性コントロールには、*B. arsatica* IBS 382^T 株を用いた。

2.2.2 検出感度測定用のプラスミド DNA の作製

a) 使用菌株と DNA 抽出

−70℃で凍結保存していた *B. rochalimae* BAA-1498^T 株の一白菌耳量を、5%ウサギ血液加ハートインフュージョン寒天培地 (HIA) *¹ に塗抹して、35℃、5%CO₂の気相で7~10日間培養した。HIA 上に発育した菌株を適量掻き取り、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 500μl に懸濁して遠心洗浄した後、InstaGene Matrix (Bio-Rad 社) を用いて菌体から DNA を抽出した。

b) *B. rochalimae* BAA-1498^T 株の *rpoB* および *ssrA* 領域の PCR 法による増幅

Bartonella 属菌の *rpoB* および *ssrA* 領域を増幅するプライマーをそれぞれ使用した (表 2-1)。各領域を増幅する Forward、Reverse プライマー (10μM) を 1μl ずつ、DNA ポリメラーゼに TakaRa EX Taq HS (TaKaRa 社) を 0.1μl、dNTP 溶液を 1.6μl、反応用 buffer の 2 μl をそれぞれ加え、Nuclease Free Water (以下、

NFW) 13.3 μ l で全量を 20 μ l とした (表 2-2)。各領域の PCR 法は表 2-3 に示す条件下で行った。両 PCR の増幅産物を 3%アガロースゲルを用いてそれぞれ電気泳動し、0.5 μ g/ml のエチジウムブロマイドで染色済のゲルから、UV 照射下で PCR 産物を切り出した。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega 社) を用いて PCR 産物を精製し、これをインサート用 DNA とした。

c) PCR 検出感度測定用のプラスミド DNA の作製

pGEM T-easy Vector システム (Promega 社) を用いて、添付のプロトコールに従ってインサート用 DNA と pGEM T-easy Vector をライゲーションし、コンピテントセル (大腸菌 DH5 α 株) を形質転換した。2% X-Gal (Invitrogen 社) を 40 μ l、200mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitroge 社) の 40 μ l を塗付したアンピシリン含有 Luria Bertani (LBamp) 寒天培地*² に形質転換した菌を塗抹し、37 $^{\circ}$ C で 16 時間、好気培養した。培地上に発育したコロニーを 3~5 個釣菌し、PCR 法によって目的の DNA が挿入されたプラスミドが大腸菌内に存在することを確認した。なお、PCR 法には、プラスミド DNA の SP6 および T7 プロモーター領域にそれぞれ結合する SP6 プライマー (5'-TATTTAGGTGACACT ATAG-3') と T7 プライマー (5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3') を使用した。PCR 反応液の組成は表 2-2 に、反応条件は表 2-3 にそれぞれ示すとおりである。

形質転換済の大腸菌を LBamp 液体培地*³ に接種し、37 $^{\circ}$ C で一晩激しく振とう培養した。培養した大腸菌から Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega 社) を用いて、プラスミド DNA を抽出した。すなわち、培養液 3ml を 1,930 \times g、10 分間遠心分離 (EX-136 : TOMY 社) した後、上清を除去した。大腸菌の沈査に Cell Resuspension Solution 250 μ l を加えて混和し、1.5ml 尖底プラスチックチューブに移した。Cell Lysis Solution の 250 μ l を加えて転倒混和し、

さらに Alkaline Protease Solution を 10 μ l 加えて転倒混和した後、室温で 5 分間静置した。反応後、Neutralization Solution の 350 μ l を加えて転倒混和し、15,700 \times g で 1 分間遠心分離 (5415R : Eppendorf 社) した。次いで、ミニカラムのメンブレン上に Column Wash Solution の 750 μ l を加えて 15,700 \times g で 1 分間遠心洗浄し、この洗浄工程を 2 回繰り返した。メンブレンを洗浄後、ミニカラムを滅菌 1.5ml マイクロチューブに装着した。NFW を 30 μ l 加えて室温で 1 分間静置した後、15,700 \times g、1 分間遠心分離し、精製済のプラスミド DNA 溶液を回収した。NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific 社)を用いて *rpoB* 領域あるいは *ssrA* 領域がそれぞれ組み込まれたプラスミド DNA 溶液の濃度を測定した後、NFW を用いて両プラスミド溶液ともに 6×10^7 copy/ μ l になるよう濃度を調整した。

d) プラスミド DNA 溶液のコピー数の調整

2.2.2-c) で作製したプラスミド DNA 溶液 (6×10^7 copy/ μ l) を原液として、 6×10^7 copy/ μ l \sim 6×10^{-1} copy/ μ l になるよう NFW を用いて 10 倍階段希釈した。続いて、NFW を 45 μ l ずつ入れた 9 本の 1.5ml チューブそれぞれに、プラスミド DNA 溶液の各希釈系列から分取した 5 μ l を加えてよく混合し、これらを PCR 法の検出感度の測定に用いる希釈列 (テンプレート DNA①) とした (図 2-1)。

また、血液中に存在する PCR 阻害物質の影響を検討するために、犬血液の抽出 DNA 液を加えた希釈列を作製した。すなわち、あらかじめ *Bartonella* の感染が陰性であることを確認しておいたビーグル犬から採取した 200 μ l の血液から、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を 45 μ l 抽出し、これを希釈列作製のイヌ血液抽出液とした。

イヌ血液抽出液を 45 μ l ずつ入れた 1.5ml のチューブ 9 本に、プラスミド

DNA 溶液の各希釈列から分取した 5 μ l を加えて混合し、これらをイヌ科動物の血液から *Bartonella* DNA を検出する PCR 法の検出感度の測定に用いる希釈列 (テンプレート DNA②) とした (図 2-2)。

表 2-1. PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅塩基長

標的遺伝子	プライマー	塩基配列	増幅塩基長 (bp)
<i>gltA</i>	BhCS.781p	5'-GGGGACCAGCTCATGGTGG-3'	379
	BhCS.1137n	5'-CGATGCACAATCATTCTGG-3'	
<i>rpoB</i>	1400F	5'-CGCATTGGCTTACTTCGTATG-3'	893
	2300R	5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3'	
<i>ssrA</i>	<i>ssrA</i> -F	5'-GCTATGGTAATAAATGGACAATGA-3'	301
	<i>ssrA</i> -R	5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3'	

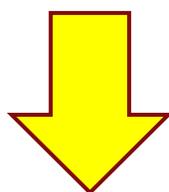
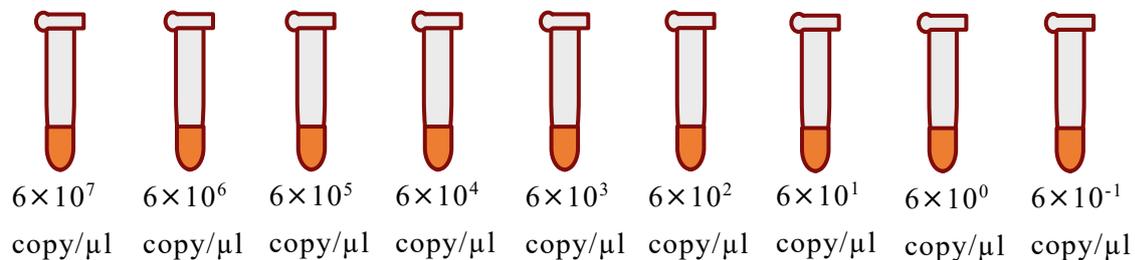
表 2-2. PCR に用いた試薬の組成

×10 Ex Taq Buffer (Takara 社)	2.0	μl
dNTP Mixture (TaKaRa 社)	1.6	μl
TaKaRa Ex Taq HS (TaKaRa 社)	0.1	μl
DNA 溶液 (20ng/μl)	1.0	μl
10μM 各プライマー	各 1.0	μl
Nuclease Free Water	13.3	μl
計	20.0	μl

表 2-3. *gltA*、*rpoB* および *ssrA* 領域の PCR の反応条件

標的遺伝子	反応	温度 (°C)	時間 (秒)	回数	
<i>gltA</i>	熱変性	94	300	1	
	増幅	熱変性	94	20	35
		アニーリング	53	30	
		伸長	72	30	
	伸長反応	72	300	1	
<i>rpoB</i>	熱変性	94	120	1	
	増幅	熱変性	94	30	35
		アニーリング	53	30	
		伸長	72	60	
	伸長反応	72	120	1	
<i>ssrA</i>	熱変性	94	120	1	
	増幅	熱変性	94	30	35
		アニーリング	53	30	
		伸長	72	60	
	伸長反応	72	120	1	

プラスミド DNA を 10 倍階段希



5μl ずつ添加

Nuclease Free Water 45μl

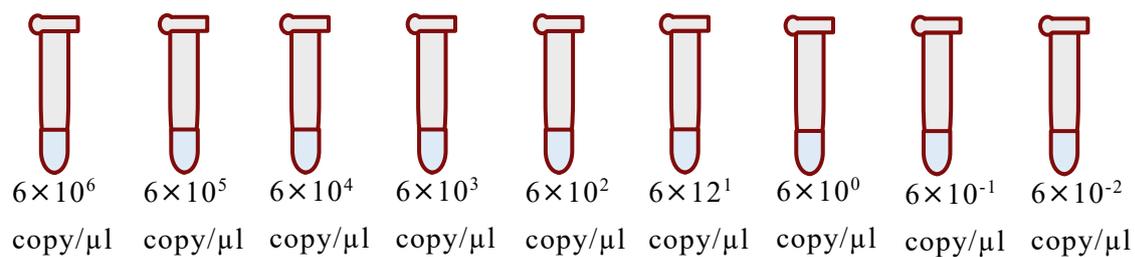
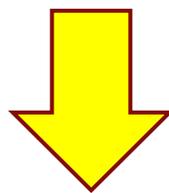
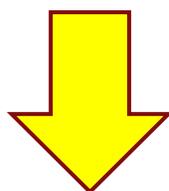
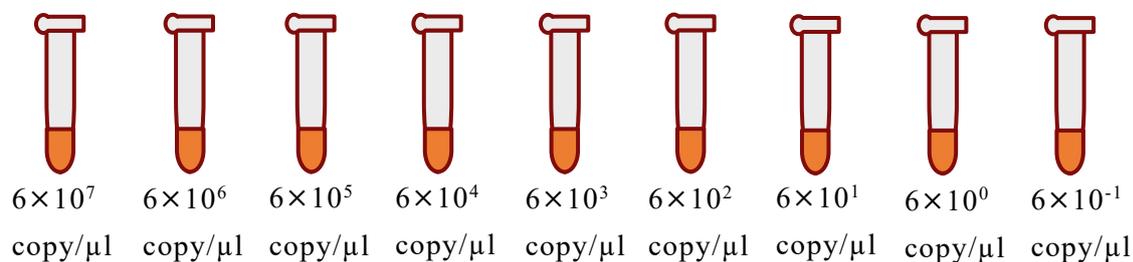


図 2-1 テンプレート DNA①の作製過程

血液中の阻害物質の影響を受けずに *Bartonella* DNA を検出する PCR 法の感度測定系

プラスミド DNA を 10 倍階段希



5μl ずつ添加

イヌ血液抽出液 45μl

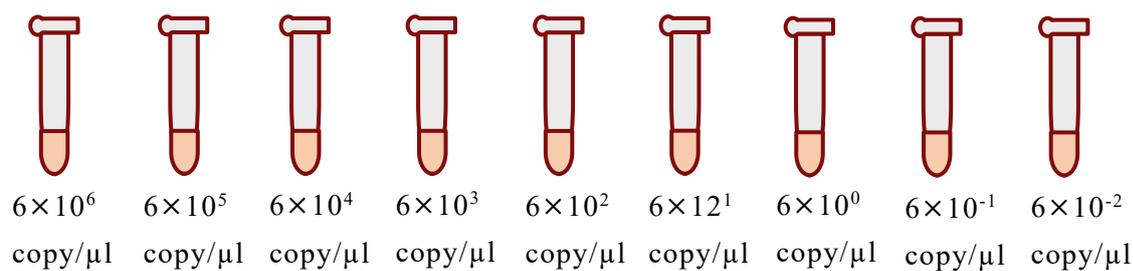
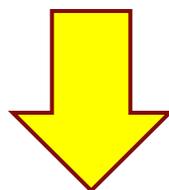


図 2-2 テンプレート DNA②の作製過程

イヌ血液中から *Bartnella* DNA を検出する PCR 法の感度測定系

2.2.3 PCR 法の検出感度の測定

2.2.2-d) で作製したテンプレート DNA①および DNA②を用い、*Bartonella* の *rpoB* 領域と *ssrA* 領域を増幅する PCR 法の検出感度を測定した。すなわち、PCR 反応用チューブ内に、 $6 \times 10^6 \sim 6 \times 10^{-2}$ copy/ μ l に希釈したテンプレート DNA ①あるいは DNA②を 1 μ l、Forward および Reverse プライマー (10 μ M) をそれぞれ 1 μ l、DNA ポリメラーゼの TakaRa EX Taq HS (TaKaRa 社) を 0.1 μ l、dNTP 溶液を 1.6 μ l、反応用 buffer を 2 μ l それぞれ加え、PCR 反応を行った。PCR 産物を電気泳動し、染色・脱色した後、UV 照射下で増幅バンドの有無を確認した。

各遺伝子領域に対して、上記の PCR 法を 7 回ずつ行い、4 回以上陽性を示し、かつプラスミド DNA のコピー数が最も少ない希釈を検出限界とした。

2.3 成績

2.3.1 タヌキ *Bartonella* DNA 陽性株を用いた予備実験

gltA、*rpoB*、*ssrA* の各領域を標的とした PCR 法における予備実験の結果、*gltA* 領域を標的とした PCR 産物の泳動像には、特異的とされる増幅バンド (379bp) 周辺に非特異反応が多く出現し、判別が困難であった。一方、*rpoB* および *ssrA* 領域の泳動像では、目的とする増幅領域周辺に非特異反応は少なく、特異的なバンドの判別は容易であった (図 2-3)。

2.3.2 テンプレート DNA①を用いた PCR 法の検出感度

rpoB 領域を標的とした PCR 法では、7 回実施したうちの 4 回において 6×10^1 copy/tube まで 800bp 付近に明瞭な特異バンドが検出された (図 2-4)。

ssrA 領域を標的とした PCR 法では、7 回実施したうちの 4 回において 6×10^2 copy/tube まで 300bp 付近に明瞭な特異バンドが検出された (図 2-5)。

2.3.3 テンプレート DNA②を用いた PCR 法の検出感度

rpoB 領域を標的とした PCR 法では、7 回実施したうちの 4 回において 6×10^3 copy/tube まで 800bp 付近に明瞭な特異バンドが検出された (図 2-6)。

ssrA 領域を標的とした PCR 法では、7 回実施したうちの 4 回において 6×10^2 copy/tube まで 300bp 付近に明瞭な特異バンドが検出された (図 2-7)。

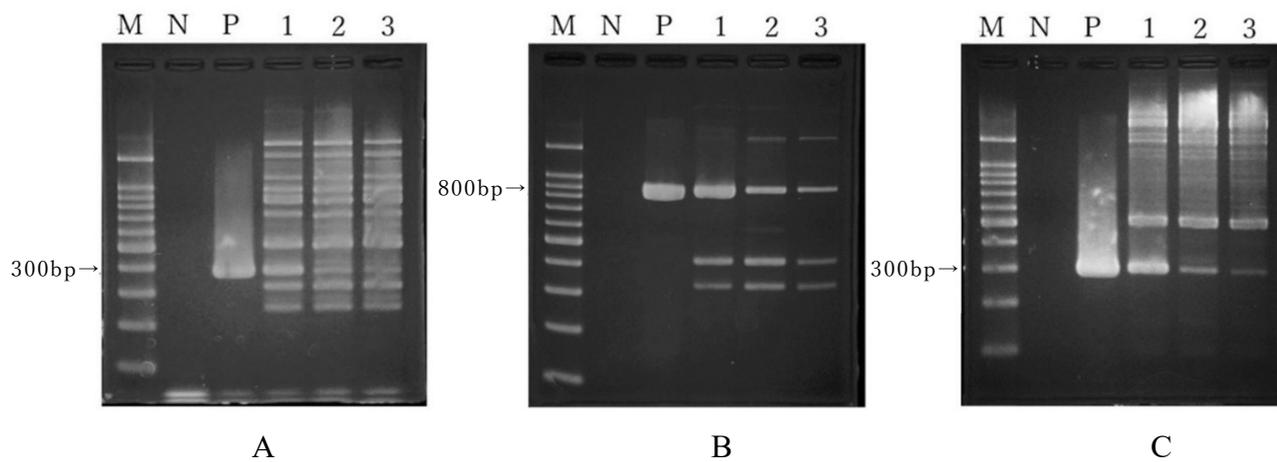
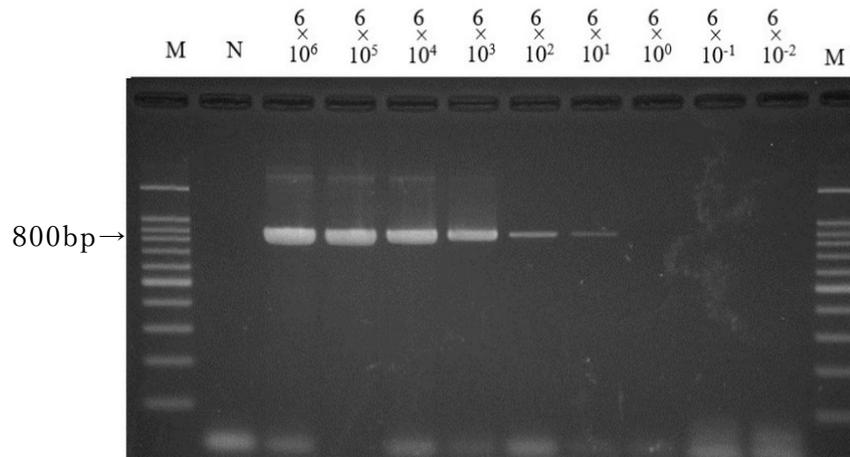


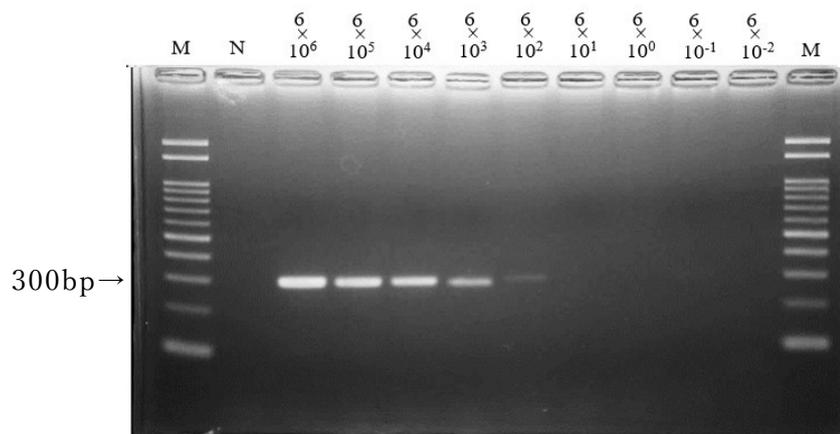
図 2-3 タヌキ DNA 溶液の *gltA* (A)、*rpoB* (B)、*ssrA* (C) 領域を増幅する PCR 泳動像の比較

M: 100bp DNA マーカー、N: 陰性コントロール、P: 陽性コントロール、
1; RD198 株、2: RD443 株、3: RD474 株



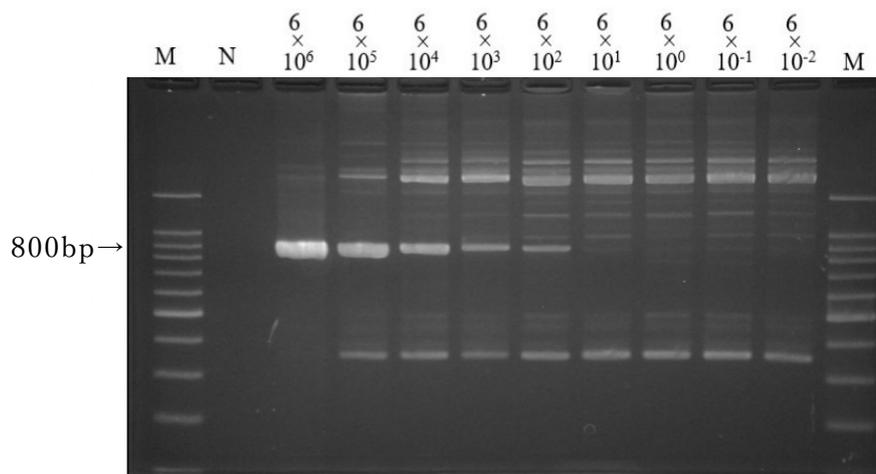
M: 100bp DNA マーカー、N: 陰性コントロール

図 2-4 テンプレート DNA①を用いた *rpoB* 領域における PCR 法の
検出感度測定



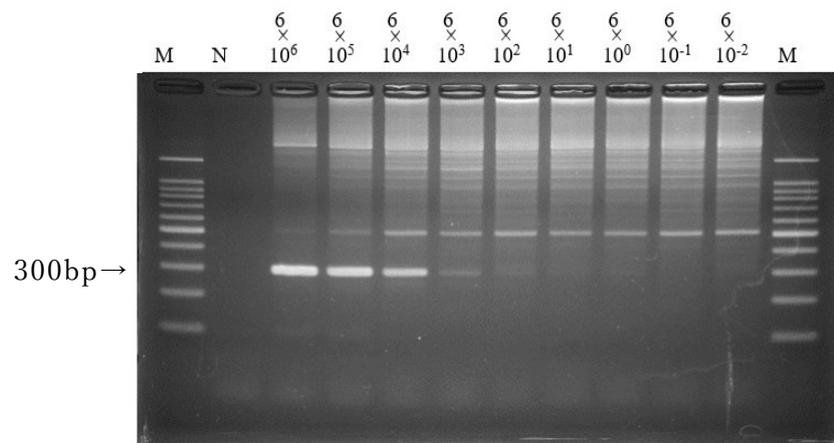
M: 100bp DNA マーカー、N: 陰性コントロール

図 2-5 テンプレート DNA①を用いた *ssrA* 領域における PCR 法の
検出感度測定



M: 100bp DNA マーカー、N: 陰性コントロール

図 2-6 テンプレート DNA②を用いた *rpoB* 領域における PCR 法の
検出感度測定



M: 100bp DNA マーカー、N: 陰性コントロール

図 2-7 テンプレート DNA②を用いた *ssrA* 領域における PCR 法の検出感度

2.4 考察

第 2 章では、食肉目動物の血液から、*Bartonella* DNA を感度よく検出する PCR 法の諸条件を検討した。現在、*Bartonella* の同定は、*gltA* 領域の塩基配列の相同性が 96.0%未満、*rpoB* 領域では 95.4%未満の相同性であれば、解析に用いた *Bartonella* 株は既存種に該当しない別種であると定義される [La Scora et al., 2003]。さらに系統解析では、*gltA* と同等の鑑別が可能とされる *ssrA* 領域も用いられることから、*gltA*、*ssrA* および *rpoB* 領域をタヌキ血液からの *Bartonella* DNA 検出に有用と考えられる遺伝子候補として選択することとした。その結果、*gltA* 領域の PCR 法では、標的の増幅産物（約 380bp）のバンド付近に非特異的な増幅反応の結果であるバンドが多数出現したため、判別困難であることが判明した。一方、*rpoB* および *ssrA* 領域を対象とした PCR 法では、非特異反応も少なく、明瞭な増幅バンドが確認され、判別が容易であった。Diaz ら [2012] は、*Bartonella* DNA 検出において *gltA* が優れた標的遺伝子であることを認める一方で、人およびハツカネズミ、ドブネズミ、ヒトなどの血液検体から *Bartonella* DNA を検出する場合、本研究と同様に非特異反応が出現する問題点を指摘している。また、Colborn ら [2010] は、*Ehrlichia* spp. などの数種の病原体に対し、*gltA* 領域の PCR 法は *Bartonella* と交差反応を起こすことを指摘している。以上から、タヌキ血液から *Bartonella* DNA を検出するための標的遺伝子として *gltA* 領域は不適當であると思われた。そこで、以降は *rpoB* と *ssrA* 領域を対象とした PCR 法を用いてイヌ血液中の *Bartonella* DNA の検出感度について検討した。

イヌ血液抽出液を用いた PCR 法では、*rpoB* と *ssrA* 両遺伝子領域において、検出感度の低下が認められた。Al-Soud ら [2002] は、人血液由来のヘモグロビンやラクトフェリンが、PCR 法における *Listeria monocytogenes* DNA の検出感度の

低下に影響を及ぼすことを示している。このことから、イヌ血液中においてもこれらの成分が、*rpoB* および *ssrA* 領域を対象とした PCR 法による *Bartonella* DNA の検出感度低下に影響を及ぼしている可能性がある。

NFW とイヌ血液抽出液を用いた検出感度測定では、いずれにおいても *rpoB* 領域を対象とした PCR 法の検出感度が高かった。これより、血液から *Bartonella* DNA の検出を目的としたスクリーニング PCR 法には、*rpoB* 領域が標的遺伝子として適していると考えられた。また、今回検討した PCR 法を用いてタヌキの血液から *B. rochalimae* を検出する場合、*rpoB* 領域では 6×10^2 copy の DNA が反応用チューブ内に存在すれば、検出可能であることが明らかとなった。一方、*ssrA* を標的とした PCR 法では、イヌ血液抽出液で希釈したプラスミド DNA は、 6×10^3 copy/tube まで検出可能であった。Rolain ら [2002]は、塹壕熱患者の研究において、ヒトの赤血球における *B. quintana* の感染率は、0.001~0.005% (1 赤血球当たりの感染菌数：最大 5 個) と報告している。すなわち、塹壕熱患者の血液 1ml 量に感染している *B. quintana* の菌数は 50,000~200,000 個であると算出される。本研究に用いた *Bartonella* の *rpoB* 領域は、*B. rochalimae* のゲノム上に 1copy がコードされているため、検出コピー数を細胞数に換算すると、1ml の血中に 150,000 個の *B. rochalimae* が存在すれば本 PCR 法によってその DNA を検出できる感度であることが判明した。従って、今回検討した *rpoB* 領域を対象とした PCR 法は、タヌキ血液中の 150,000 個/ml の *B. rochalimae* を検出可能な感度を有すると考えられた。

本研究により、イヌ科動物の血液から PCR 法を用いて *Bartonella* DNA を検出・同定する手法が確立された。まず、①血液から市販のキットを用いて DNA を抽出し、②*rpoB* 領域の PCR 法を実施する (スクリーニング PCR)。③

rpoB 領域のスクリーニング PCR 法で陽性を示した検体について、*ssrA* 領域の PCR 法を実施し、確認する。④さらに、両領域の塩基配列を決定し、系統解析および相同性解析等により、菌種を同定することで、感染している *Bartonella* を特定する有効な方法であると考えられた。

2.5 小括

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* の分離には適さない血液試料が多いことが予想されるため、野生動物集団における *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から *Bartonella* DNA を検出することを目的とした 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 を高感度に検出する PCR 法の条件について検討した。

Bartonella の RNA polymerase subunit β (*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 3 検体から本菌の DNA 検出を試みた。その結果、*gltA* 領域を標的とした PCR 法では、いずれの検体においても多くの非特異反応が確認され、判別が困難であった。一方、*rpoB* と *ssrA* 領域を標的とした PCR 法では、いずれの検体においても非特異反応は少なく、明瞭な特異バンドが認められ、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 を感度よく検出することを目的として、*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^T 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 DNA easy Blood and Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて抽出した溶液 (以下、イヌ血液抽出液) を用いて PCR 法の感度を検討した。 $6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^{-1}$ copy/ μ l

に希釈した各遺伝子領域のプラスミド DNA の 5 μ l を 45 μ l の NFW およびイヌ血液抽出液 45 μ l それぞれに加え、 $6\times 10^6\sim 6\times 10^{-2}$ copy/ μ l の希釈系列を作製した。NFW13.3 μ l を分注した PCR 反応用チューブに、先に作製した $6\times 10^6\sim 6\times 10^{-2}$ copy/ μ l のプラスミド DNA を 1 μ l、10 μ M の Forward、Reverse プライマーを各 1 μ l、dNTP 溶液を 1.6 μ l、TakaRa EX Taq HS を 0.1 μ l、反応用 buffer を 2 μ l それぞれに加え、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 6×10^1 copy/tube、イヌ血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では 6×10^2 copy/tube 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 6×10^2 copy/tube、イヌ血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では 6×10^3 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 法の系ではイヌ科動物の血液 200 μ l 中に 6×10^2 copy 以上、*ssrA* 領域の PCR 法では 6×10^3 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、イヌ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、血液に由来するヘモグロビン等の物質が PCR 反応の感度低下に影響している可能性が示された。

2.6 第2章で使用した試薬類の組成

*1. 5% 兎血液加 HIA 培地の組成

Heart Infusion Agar (HIA) (DIFCO 社)	20	g
再精製水	500	ml
兎脱繊維血液	25	ml

HIA と再精製水を混和し、加温溶解した後に 121°C で 15 分間、オートクレーブで滅菌した。滅菌後、55°C に保存した培地に、兎脱繊維血液 25ml を無菌的に加え、泡立てないように充分混和し、これをシャーレに約 20ml ずつ分注し、室温で固めた。

*2. アンピシリン含有 Luria Bertani (LBamp) 寒天培地の組成

LB AGAR (Invitrogen 社)	16	g
アンピシリン	25	mg

LB AGAR (Invitrogen 社) の 16g を再精製水で 500ml にメスアップして混和し、オートクレーブ滅菌後、55°C に保温した培地に 50mg/ml のアンピシリン溶液を 500 μ l 加え、滅菌シャーレに約 20ml ずつ分注し、静置して固めた。

*3. LBamp (アンピシリン含有 LB) 液体培地の組成

LB BROTH BASE (Invitrogen 社)	11	g
アンピシリン	25	mg

LB BROTH BASE (Invitrogen 社) の 11g を再精製水で 500ml にメスアップして混和し、オートクレーブ滅菌後、55°C に冷却した培地に 50mg/ml のアンピシリン溶液を 500 μ l 加え、冷蔵保存した。

第 3 章

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

3.1 はじめに

第1章における文献的考察から、多くの野生食肉目動物は数種の *Bartonella* の自然宿主であることが判明した。食肉目由来の *Bartonella* のうち *Bartonella rochalimae* [Eremeeva et al., 2007]、*Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* [Roux et al., 2000, Breitschwerdt et al., 2010]、および *Bartonella henselae* [Sato et al., 2013; Kosoy et al., 2019] は、ヒトに対する病原性が確認されている。菌血症、発熱、軽度の貧血、筋肉痛、悪心、および脾腫などの症状を引き起こす *B. rochalimae* は、米国のコヨーテ (*Canis latrans*)、ハイイロギツネ (*Urocyon cinereoargenteus*) [Bai et al., 2016]、シマハイイロギツネ (*Urocyon littoralis*) [Schaefer et al., 2011]、アカギツネ (*Vulpes vulpes*) [Henn et al., 2009]、アライグマ (*Procyon lotor*) [Henn et al., 2009]、シマスカンク (*Mephitis mephitis*) [López-Pérez et al., 2017] から分離されている。さらに、セルビア共和国のキンイロジャッカル (*Canis aureus*)、イスラエルのアカギツネ [Marciano et al., 2016]、スペインのオオカミ (*Canis lupus*) [Gerrikagoitia et al., 2012] などの食肉目動物からも *B. rochalimae* が相次いで検出された。これらの疫学研究の成果は、野生食肉目、特にイヌ型亜目動物が、*B. rochalimae* の自然宿主として主要な役割を果たしていることを示唆している。

日本における食肉目動物では、ネコ型亜目動物のファイリマングース (*Herpestes auropunctatus*) やハクビシン (*Paguma larvata*) から、猫ひっかき病の原因菌である *B. henselae* が分離されており、これらの動物が猫と同様に重要な病原巣であることが明らかとなった [Sato et al., 2013]。さらに、イヌ型亜目動物では、日本のテン (*Martes melampus*) は *Bartonella washoensis* 様の細菌、ニホンアナグマ (*Meles anakuma*) は、アナグマ固有の *Bartonella* を保有しているこ

とが明らかになっている[Sato et al., 2012]。

タヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*) は、日本固有の中型 (3~10 kg) のイヌ科動物で、森林、亜高山帯、農村地帯、都市部などに広く分布している[Mitsuhasi et al., 2018; Saito et al., 2016]。特に、東京近郊では、タヌキの生息数が近年増加する傾向が認められており[Sako et al., 2008]、われわれの周辺でもタヌキが目撃される機会が増えてきた。また、第1章で示したように、傷病鳥獣として保護される動物の中でも、タヌキの頭数は群を抜いている。このように、都市部では人とタヌキが偶発的に遭遇する機会が増加していることから、タヌキにおける病原性 *Bartonella* の保有状況やその菌種の遺伝子性状を明らかにすることはバルトネラ症の疫学を解明する上で極めて重要であると考えられる。しかしながら、日本のタヌキが保有する病原性 *Bartonella* については、全く検討されていない。

近年、イヌセンコウヒゼンダニ (*Sarcoptes scabie* var. *canis*) による疥癬症が、日本各地のタヌキに蔓延していることが報告されている[Kido et al., 2013; Takahashi et al., 2001]。Matsuyama ら[2015]は、岐阜県の飼育犬とタヌキ間で疥癬症の感染環が成立していることを示した。2009年7月、和歌山県でも重度の疥癬症のタヌキが認められて以降、疥癬症に罹患したタヌキの報告数は年々増加している[Makouloutou et al., 2015]。また、げっ歯類では、*Leptotrombidium* 属、*Schoengastia* 属、*Blankarrtia* 属のダニやイヌでは *Ornithonyssus* 属のダニが *Bartonella* の感染を媒介することが示唆されている[Bradley et al., 2014; Kabeya et al., 2010; Loan et al., 2015]。しかしながら、*Bartonella* の伝播に関するイヌセンコウヒゼンダニの潜在的な役割は、これまで十分に検討されていない。

本研究では、和歌山県田辺市周辺のタヌキから9年間に亘り採取したタ

ヌキの血液を材料とし、分子生物学的手法によって、*Bartonella* の分布状況とその遺伝子性状を詳細に解析した。さらに、今回検討したタヌキの集団において疥癬症やその原因であるイヌセンコウヒゼンダニが *Bartonella* 伝播に関わっている可能性についても検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 検体

和歌山県田辺市周辺 (33°45'N、135°230'E) において、2009年から2017年にかけて、野生タヌキ 619頭 (雄 344頭、雌 275頭) から血液を採取した。血液は、野外における捕獲・狩猟個体、交通事故死の個体、あるいは衰弱し保護された個体から採取した。血液の採取時には、個体ごとに性別、健康状態、および疥癬症の有無を記録した。血液はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含む真空採血管 (TERUMO 社) に採取し、凍結下で日本大学生物資源科学部獣医公衆衛生研究学研究室に送付した後、検査時まで -70°C で保管した。

3.2.2 PCR による *Bartonella* DNA の検出

凍結保存していた血液試料を室温で解凍し、DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen 社) を用いて、200 μl 量の血液から付属の手順書に従って DNA を抽出した。サンプル中の *Bartonella* DNA 検出を目的としたスクリーニング PCR 法には、第 2 章で検討した *Bartonella* の *rpoB* 領域を標的とした PCR 法を用いた [Renesto et al., 2001]。さらに、*rpoB* 領域の PCR 法で陽性を示した全てのサンプルについて、*ssrA* 領域を標的とした PCR 法 [Diaz et al., 2012] を行った。PCR 反応用試薬は、滅菌した PCR 用マイクロチューブにタヌキ血液から抽出した DNA 溶液を 1 μl (20ng/ μl)、10 μM の各 PCR 用プライマーを 1 μl 、Ex Taq HS (TaKaRa 社) を 0.5U/tube、20mM の Mg^{2+} 添加済み buffer を 2 μl (最終濃度 2mM)、2.5mM の dNTP mixture を 1.6 μl (最終濃度 200 μM) をそれぞれ添加し、Nuclease Free Water (以下、NFW) で全量を 20 μl に調整した。さらに、*B. alsatica* IBS382^T の DNA および NFW で DNA 溶液に置き換えたものを、それぞれ陽性コントロールと陰性コントロールとした。*rpoB* および *ssrA* の両 PCR 反応は、S1000 サー

マルサイクラー (Bio-Rad 社) で実施した。本研究に使用した PCR 法の条件は、第 2 章の表 2-3 に記載した。

3.2.3 *rpoB* および *ssrA* 領域の PCR 産物の塩基配列決定

rpoB および *ssrA* 領域の PCR 増幅産物は、それぞれ Wizard SV Gel および PCR Clean-Up System (Promega 社) または Spin Column PCR 産物精製キット (Bio Basic 社) を使用して精製した。精製した各増幅産物の塩基配列は、Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社) を使用し、Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems 社) を用いてダイレクトシーケンス法により決定した。本法に用いたプライマーは表 3-1 に示す通りである。

3.2.4 遺伝子系統解析および相同性解析

rpoB および *ssrA* 遺伝子の塩基配列は、*Bartonella* 標準株の塩基配列とマルチプルアラインメントし、*rpoB* 領域では塩基配列を 825bp、*ssrA* 領域では 301bp にそれぞれ揃えた。系統樹は、系統解析ソフトウェア MEGA6 の Kimura 2 パラメーター法を使用し、近隣結合法により作成した [Tamura et al., 2013]。

本研究で決定した *rpoB* および *ssrA* 領域の塩基配列を BLAST 検索を使用して International Nucleotide Sequence Database (INSD; <http://www.insdc.org/>) に登録されている原核生物のゲノム配列とそれぞれ比較した。

3.2.5 統計解析

ピアソンのカイ二乗検定により、タヌキの性別および疥癬症の有無による *Bartonella* DNA 保有率の統計学的有意差を検定した。また、フィッシャーの直接確率検定を用い、サンプリングした年度ごとの *Bartonella* DNA 保有率の統計学的有意差を検定した ($p < 0.05$)。

表 3-1. ダイレクトシーケンス法に用いたプライマーの塩基配列

標的遺伝子領域	プライマー	塩基配列*
<i>rpoB</i>	1400F	5'-CGCATTGGCTTACTTCGTATG-3'
	1600R	5'-GGRCAAATACGACCATAATGSG-3'
	2000F	5'-GGGWGAAGTTTTRATGGYRCCRCG-3'
	2000R	5'-CGYGGYRCCATRAAACTTCWCC-3'
	2300R	5'-GTAGACTGATTAGAACGCTG-3'
<i>ssrA</i>	<i>ssrA</i> -F	5'-GCTATGGTAATAAATGGACAATGA-3
	<i>ssrA</i> -R	5'-GCTTCTGTTGCCAGGGTG-3

*R は A または G を、Y は T または C を、W は A または T を、S は C または G をそれぞれ示す。

3.3 成績

3.3.1 タヌキ *Bartonella* DNA 保有率

rpoB 領域を標的とした PCR 法により個体の 7.1% (44/619) から *Bartonella* DNA が検出された。*rpoB* 領域の PCR 法で陽性を示したサンプルは、*ssrA* を標的とした PCR 法においても全てが陽性であった。

また、*rpoB* および *ssrA* 領域で陽性を示した 44 株について、両領域の塩基配列を決定したところ、全てが同一であった。

3.3.2 タヌキから検出された *Bartonella* DNA の系統解析

Bartonella DNA が検出された 44 検体の *rpoB* および *ssrA* 遺伝子領域はすべて同一の塩基配列を示したことから、代表として個体番号 RD86 株を用いて、以後の解析を行った。なお、RD86 株の *rpoB* および *ssrA* 領域の塩基配列は、INSDB に登録し、それぞれのアクセッション番号を取得した (*rpoB*: LC513659 および *ssrA*: LC513660)。

rpoB 領域の塩基配列に基づく系統樹では、RD86 株はバルトネラ症の患者由来の *B. rochalimae* BAA-1498^T と同一のクラスターを形成した [Eremeeva et al. 2007] (図 3-1)。

ssrA 領域の塩基配列に基づく系統解析においても、RD86 株は *B. rochalimae* BAA-1498^T と同一のクラスターを形成した (図 3-2)。

3.3.3 BLAST 検索に基づく RD86 株の相同性解析

BLAST 検索に基づいて、RD86 株と最も近縁な *Bartonella* 株の塩基配列との相同性を検討した (表 3-2)。RD86 株の *rpoB* および *ssrA* 領域の塩基配列は、コヨーテ由来 Coyote22sub2 株、イヌ由来 114 株、ハイイロギツネ由来 11B 株、

およびアカギツネ由来 A1379B 株の配列に最も近縁で、それぞれ 99.8%、99.7% の相同性であった。また、RD86 株の *rpoB* 領域の塩基配列は、患者から由来の *Bartonella* BAA-1498^T 株、スカンク由来 CDC_skunk 株、およびアライグマ由来 Raccoon 60 株と 99.4% の相同性であった。

さらに、RD86 株の *ssrA* 領域の塩基配列の相同性は、*Bartonella* BAA-1498^T 株、CDC_skunk 株、および Raccoon60 株とそれぞれ 99.7%、99.3%、および 99.0% であった。一方、RD86 株とドブネズミ (*Rattus norvegicus*) 由来の 1-1C 株との相同性は上述の株と比較して低く、*rpoB* 領域で 97.5%、*ssrA* 領域で 98.7% であった。

3.3.4 疫学要因別にみたタヌキにおける *B. rochalimae* DNA 保有率

タヌキの性別による *B. rochalimae* DNA の保有率は、雄で 6.1% (21/344)、雌で 8.4% (23/275) で、有意な差は認められなかった (図 3-3)。

採材した年度別の *Bartonella* DNA 保有率では、2011 年の 2.2% (1/45) から 2016 年の 14.3% (4/28) まで変動が認められたものの、年度毎の陽性率に有意差は認められなかった (図 3-4)。

疥癬症に罹患していた個体は 494 頭で全体の 79.8% であった。図 3-5 は、重度の疥癬症の角化性脱毛症により衰弱したタヌキを示す。疥癬症に罹患したタヌキの *B. rochalimae* 陽性率は、7.9% (39/494) と、疥癬症陰性タヌキの *B. rochalimae* DNA 保有率 4.0% (5/12) に比べ高い傾向にあったが、両グループの間に有意差は認められなかった (図 3-6)。

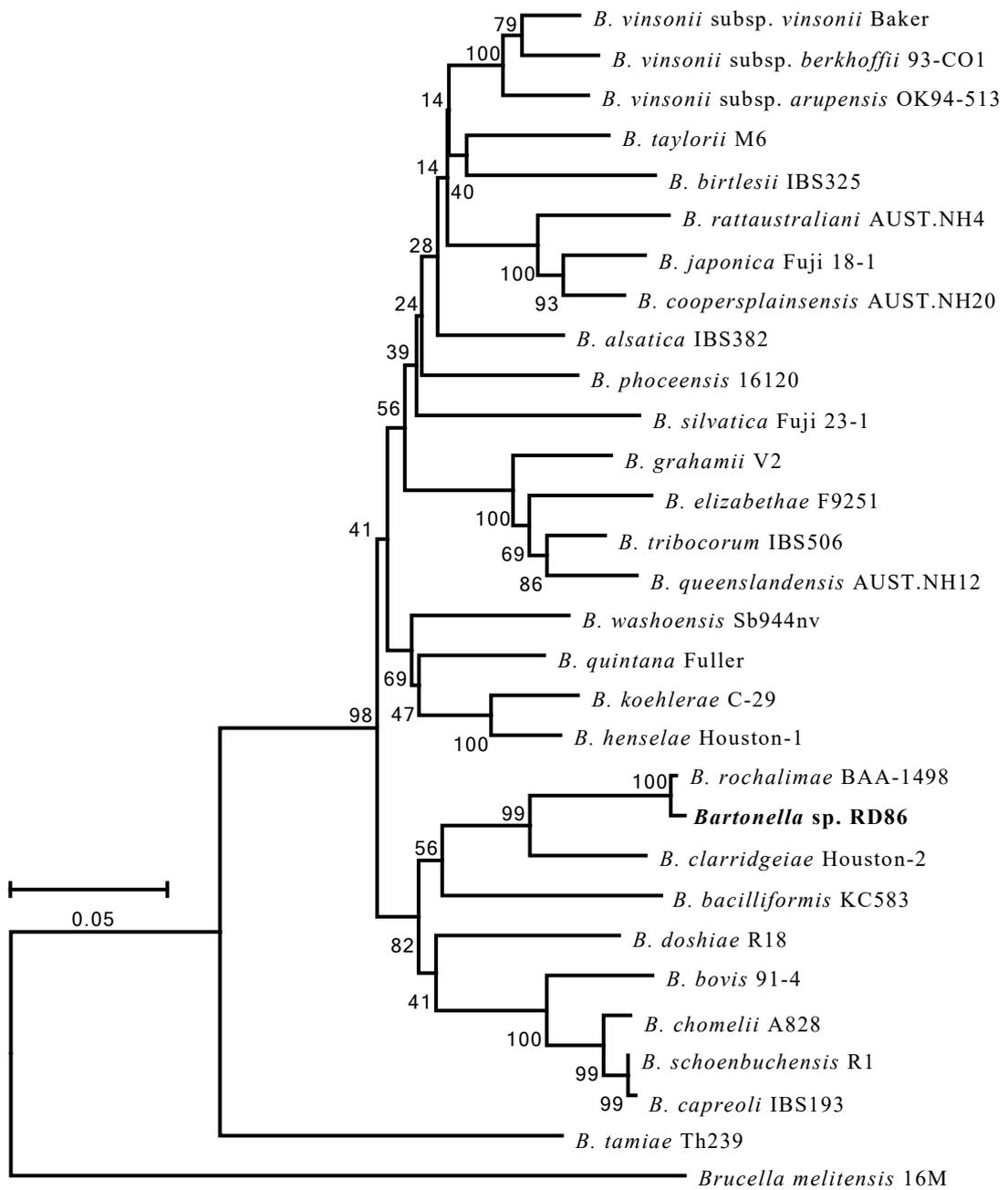


図 3-1. タヌキ由来 *Bartonella* DNA (RD86) および既存の *Bartonella* 標準株の *rpoB* 領域に基づく系統樹

アウトグループには *Brucella melitensis* 16M 株を用いた。Bootstrap value は、1,000 回とした。進化距離のスケールバーには、1 座位当たり 0.05 の推定ヌクレオチド置換数があることを示す。RD86 株を太字で記す。

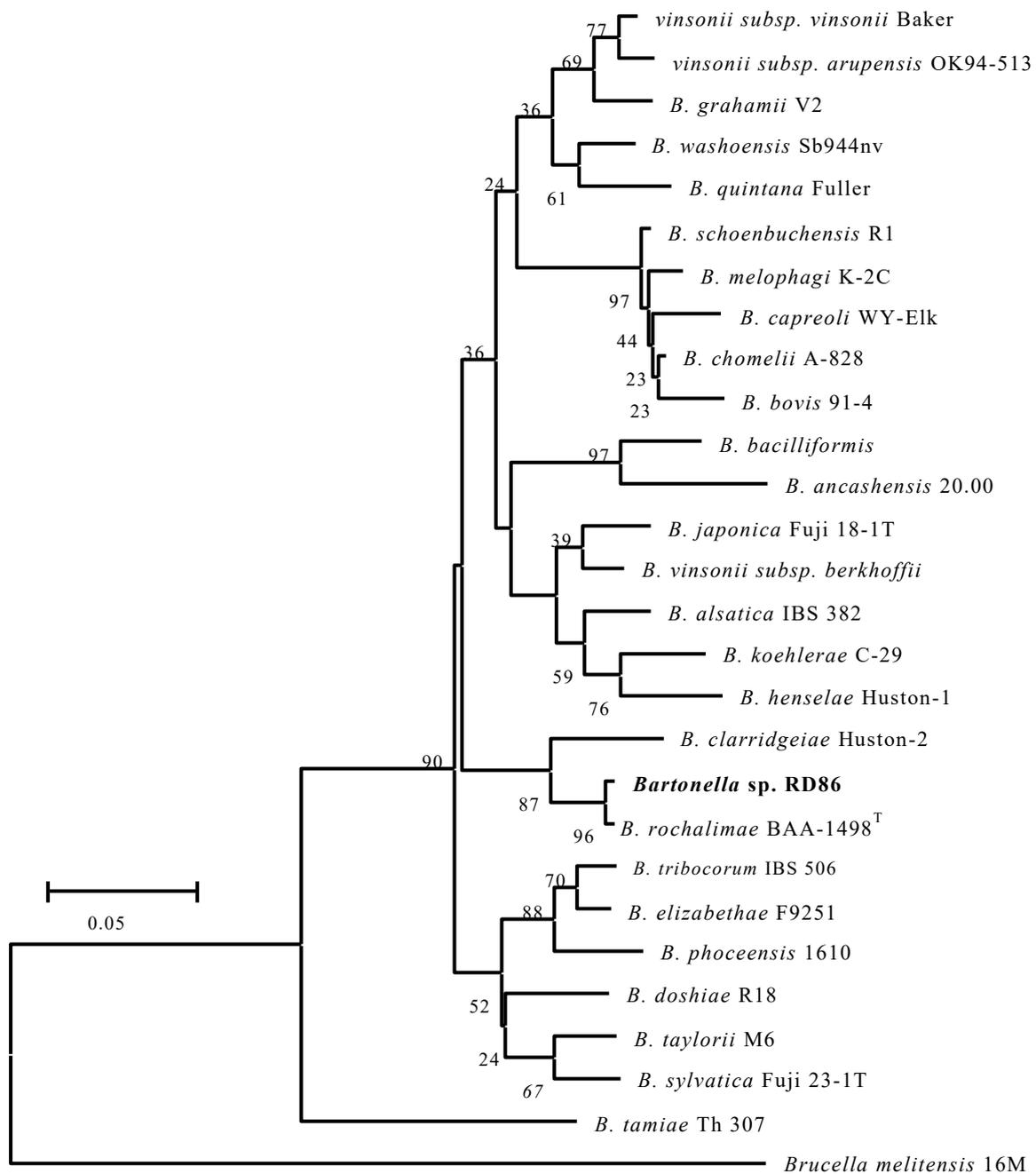


図 3-2. タヌキ由来 *Bartonella* DNA(RD86)および他の既存の *Bartonella* 菌株の *ssrA* 遺伝子に基づく系統樹

アウトグループには *Brucella melitensis* 16M 株を用いた。Bootstrap value は、1,000 回とした。進化距離のスケールバーには、1 座位当たり 0.05 の推定ヌクレオチド置換数があることを示す。RD86 株を太字で記す。

表 3-2. タヌキ RD86 株と近縁な *Bartonella rochalimae* 株間の *rpoB* および *ssrA* 領域の塩基配列の相同性

株	動物種 (学名)	国名	塩基配列の相同性			
			<i>rpoB</i>	アクセッション番号	<i>ssrA</i>	アクセッション番号
Coyote22sub2	Coyote (<i>Canis latrans</i>)	アメリカ	99.8% (823/825 bp)	CP019785	99.7% (301/302 bp)	CP019785
114	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	アメリカ	99.8% (823/825 bp)	CP019784	99.7% (301/302 bp)	CP019784
11B	Gray fox (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	アメリカ	99.8% (823/825 bp)	CP019783	99.7% (301/302 bp)	CP019783
A1379B	Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	フランス	99.8% (823/825 bp)	CP019780	99.7% (301/302 bp)	CP019780
BAA-1498 ^T	Human (<i>Homo sapiens</i>)	アメリカ	99.4% (820/825 bp)	FN645459	99.7% (301/302 bp)	FN645459
CDC_skunk	Striped skunk (<i>Mephitis mephitis</i>)	メキシコ	99.4% (820/825 bp)	CP019782	99.3% (300/302 bp)	CP019782
Racoon 60	Raccoon (<i>Procyon lotor</i>)	アメリカ	99.4% (820/825 bp)	CP019786	99.0% (299/302 bp)	CP019786
1-1C	Brown rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	台湾	97.5% (804/825 bp)	CP019489	98.7% (298/302 bp)	CP019489

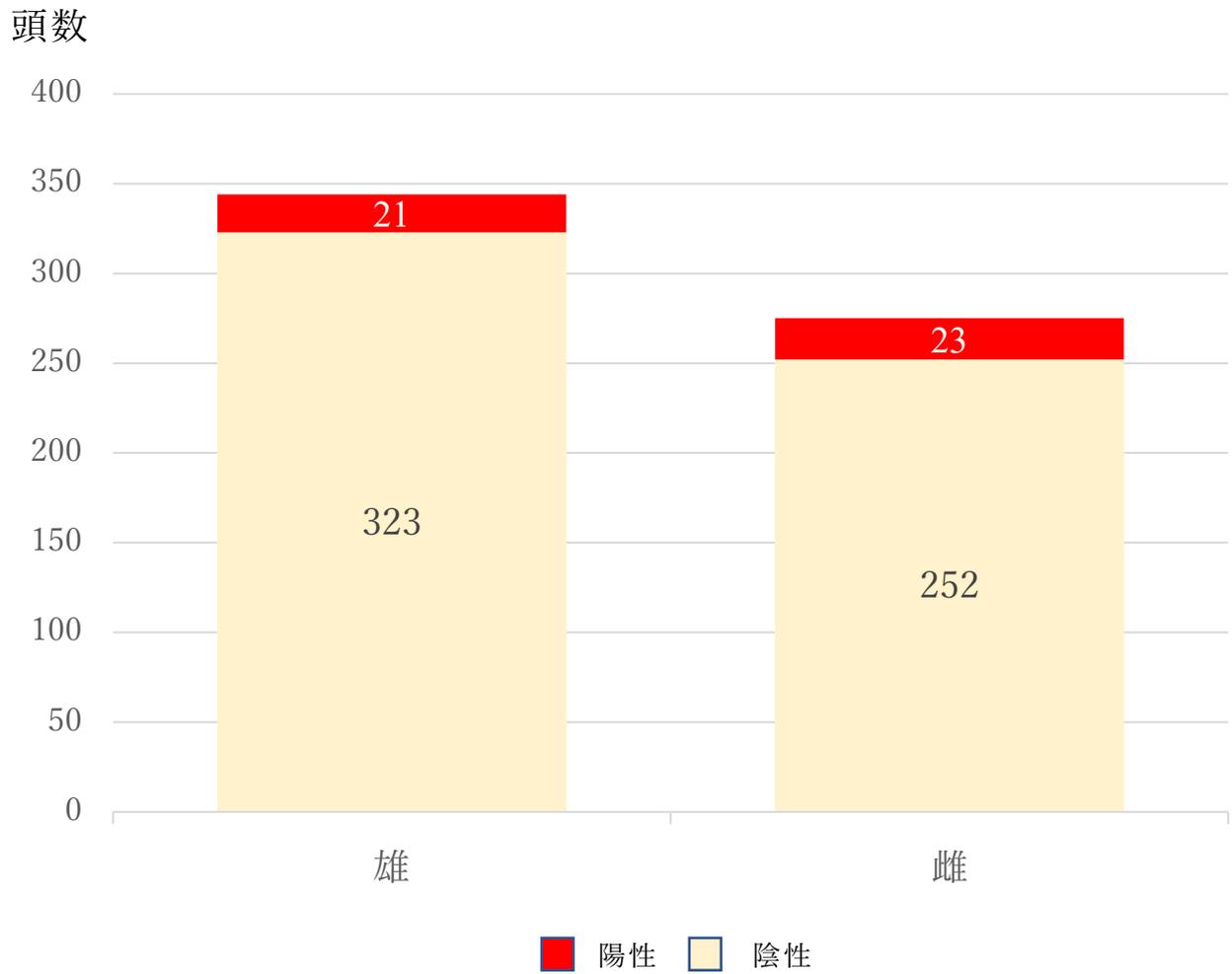


図 3-3. 性別にみた *B. rochalimae* DNA 保有率 ($p < 0.05$)

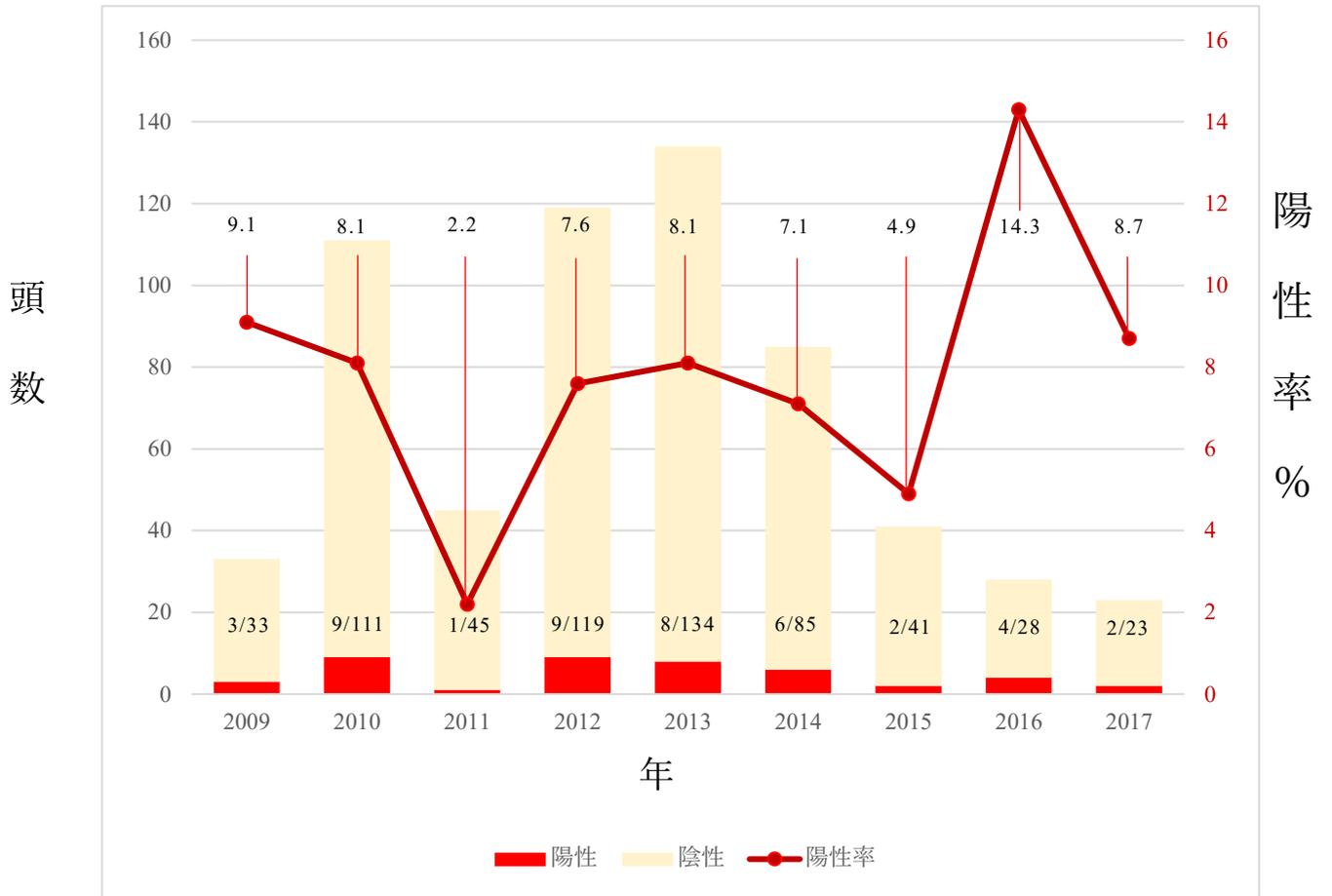


図 3-4. 年度ごとにみたタヌキの *B. rochalimae* DNA 保有状況

棒グラフは検体数を、折れ線グラフは保有率をそれぞれ示す。



図 3-5. 重度の疥癬症で衰弱したタヌキ (*Nyctereutes procyonoides viverrinus*)。
(和歌山県引岩公園センターにて撮影, 2013年3月12日)

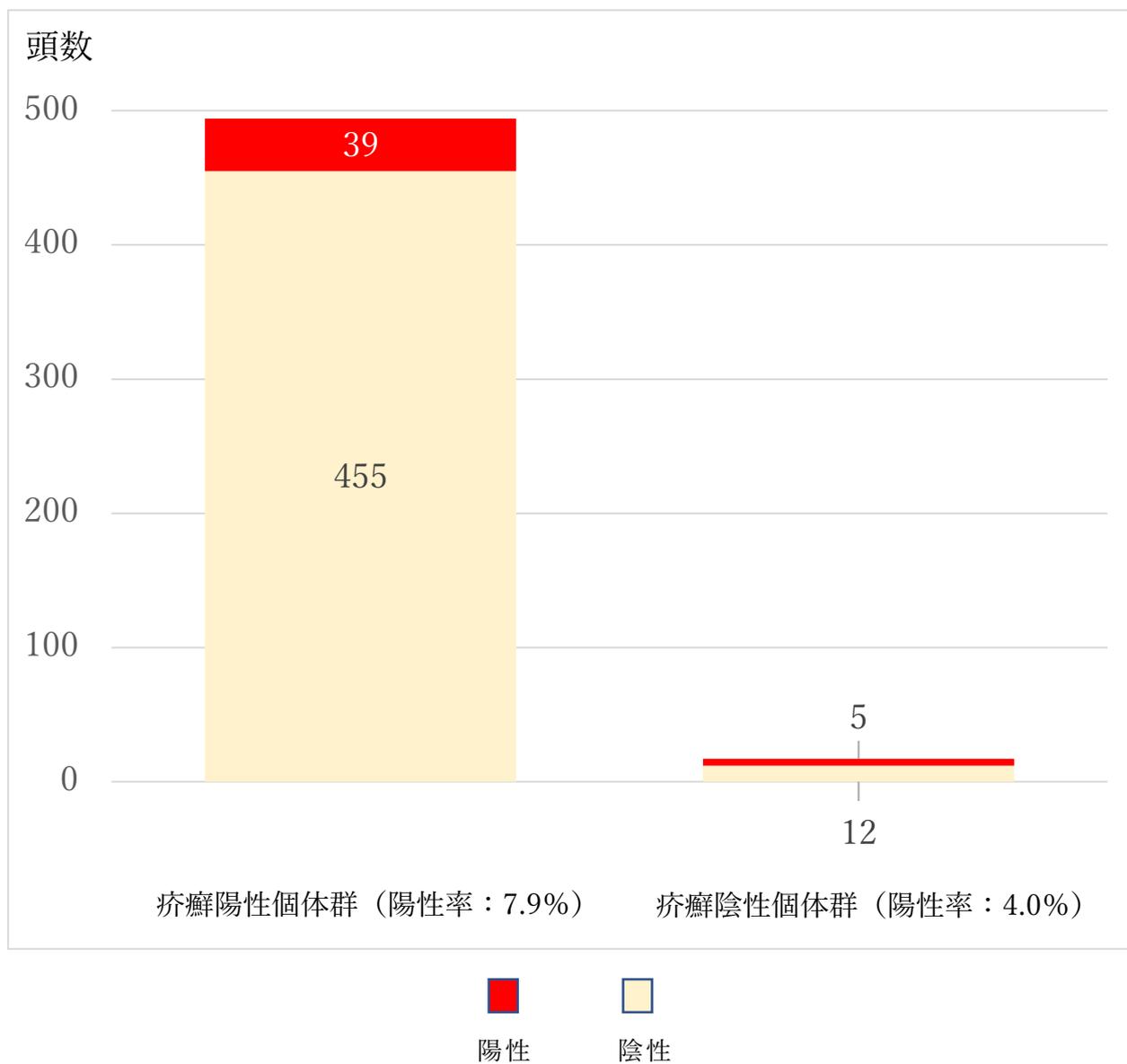


図 3-6 疥癬症と *B. rochalimae* DNA 率の関連性

B. rochalimae DNA 保有率と疥癬症との関連性について検討した ($p < 0.05$)。

3.4. 考察

本研究により、日本固有の野生イヌ科動物であるタヌキの 7.1%が、病原性 *Bartonella* である *B. rochalimae* を保有していることが初めて明らかになった。過去の研究において、和歌山県に生息しているイヌ型亜目動物のテンから *B. washoensis* 様の株が、ニホンアナグマから、本動物種に固有な *Bartonella* 菌が分離されている [Sato et al. 2012] が、*B. rochalimae* は検出されていない。これより、和歌山県田辺市周辺に生息するタヌキは、特異的に *B. rochalimae* を保有しているものと思われる。今回検討したサンプルは、和歌山県の一地域から採取したものであったため、*B. rochalimae* が日本のタヌキに広く分布しているかについては、他の地域の個体を対象としたさらなる検討が必要であると考えられた。

本研究ならびに諸外国の研究から、野生のイヌ型亜目動物は *B. rochalimae* の主要な病原巣であると考えられている。その一方で、イスラエルのケープハイラックス (*Procavia capensis*) やシナイスナネズミ (*Meriones tristrami*) からも *B. rochalimae* 様の細菌の DNA が検出されている [Marciano et al. 2016]。さらに興味深いことに、台湾中部 [Lin et al., 2008] および米国カリフォルニア州ロサンゼルス [Gundi et al. 2012] で捕獲されたドブネズミからも *B. rochalimae* が分離されている。これらの成績から、*B. rochalimae* は多様な哺乳類に感染可能であるとともに、生態系における *B. rochalimae* の維持には、食肉目動物に加え、ハイラックス目や齧歯目など、種々の野生動物が関与している可能性があると考えられる。

本研究において、タヌキの雌・雄間の *B. rochalimae* DNA 保有率に有意差は認められなかった。しかしながら、猫において、血清学的に検討した *B. henselae* の陽性率は、雄は雌よりも高いことが報告されている [Maruyama et al., 2003]。猫は基本的に単独行動する動物であるが、雄猫は、自らの縄張りを徘徊し、繁殖期には他の個体と闘争したり、*B. henselae* のベクターであるネコノミを移される可能性があるため、雄猫の *B. henselae* 陽性率は雌猫に比べ高い値を示すと考えられている。一方、北アメリカで6年間にわたり、イヌの *Bartonella* DNA 保有率を調査した報告では、DNA 保有率に雌・雄差は認められていない [Lashnits et al., 2018]。このように、*Bartonella* 陽性率の違いは、菌種、宿主動物の生態、地域あるいはベクターの違い等に大きく影響を受けていると考えられる。タヌキは家族単位の群で行動し、個体同士が密接した生活形態をとることから、*B. rochalimae* の感染が群れあるいは家族全体に均一に伝播し、その陽性率に雌・雄差が生じにくいと推察される。

2009年から2017年に捕獲したタヌキにおいて、*B. rochalimae* の陽性率は2011年の2.2%から2016年の14.3%まで変動があったものの、いずれの年次においても陽性個体が認められた。この成績から、2009年以降、研究対象とした地域のタヌキ個体群において *B. rochalimae* の感染が維持されていると考えられる。

日本では、1980年代からタヌキに疥癬症が蔓延するようになり、タヌキの種保全の観点からタヌキの疥癬症は深刻な問題となっている[Ninomiya et al., 2005 ; Sugiura et al., 2018]。和歌山県をはじめ他の地域においても、疥癬症により衰弱したタヌキが多数捕獲されるようになった。疥癬症の原因となるイヌセンコウヒゼンダニは主にイヌに寄生しているが、本節足動物が *Bartonella* の伝播にどのような役割を果たしているかは不明であった。本研究において、疥癬症陽性のタヌキの7.9%が *B. rochalimae* を保有しており、疥癬症陰性タヌキの4.0%が、*B. rochalimae* を保有していることが明らかになった。疥癬症は、紅斑性丘疹、痂皮、表皮の不全角化、脱毛などの皮膚病変を伴う掻痒性皮膚疾患である。ダニが皮膚角質層を穿孔する際に生じる掻痒が原因で、爪や歯で皮膚を引っ掻いたり咬んだりすることで発生するびらん性および裂傷性皮膚病変が多くの疥癬症の個体で認められる。タヌキは、家族単位の群れで生息する野生動物であるため、疥癬症に罹患した個体におけるびらん性皮膚病変の接触を介し、タヌキ集団内に *B. rochalimae* の感染が蔓延している可能性が推測される。*B. henselae* ではネコノミ[Chomel et al., 1996]、*Bartonella quintana* ではシラミ[Fournier et al., 2001]、*B. bacilliformis* ではサシチヨウバエ[Ihler., 1995]、*Bartonella melophagi* ではヒツジシラミバエ[Kosoy et al., 2016]などの節足動物が伝播に関与していることが明らかにされている。*B. rochalimae* のベクターに関する研究では、数種のノミ (*Pulex irritans*、*Pulex simulans*、*Xenopsylla cheopis* および *Ctenocephalides*

canis) が、食肉目動物における *B. rochlimae* の媒介に関与していると考えられている [Gabriel et al., 2009; López-Pérez et al., 2017; Pérez-Martínez et al., 2009]。わが国の広島県のタヌキには、*Paraceras melissinensis*oy や *Chaetopsylla mikado* 等のノミが広く分布していることから [山内ら., 2005]、今後、和歌山県のタヌキに分布するノミ種を同定するとともに、ノミがタヌキ間で *B. rochalimae* を媒介している可能性についても検討する必要がある。

rpoB および *ssrA* 領域の遺伝子解析により、和歌山県田辺市周辺のタヌキは遺伝的に均一な *B. rochalimae* を保有していることが明らかになった。両遺伝子領域の BLAST 検索による相同性解析では、今回解析に用いた RD86 株は、諸外国のイヌ科動物由来株と最も高い相同性を示した。これより、わが国、特に和歌山県のタヌキにはイヌ科動物固有の *B. rochalimae* 株が分布しているものと考えられる。また、RD86 株はヒト患者由来の BAA-1498^T 株とも *rpoB* および *ssrA* 領域において極めて高い相同性を示した。今後、種々の手法を用いてタヌキから *B. rochalimae* の分離を試みるとともに、分離株の病原性因子を明らかにし、バルトネラ症におけるタヌキの疫学的な病原巣としての役割を明らかにしていく必要があると考えられた。

3.5 小括

これまでタヌキにおける *Bartonella* 属の保有状況および保有する株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・狩猟、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 採血管に採取し、検査時まで -70℃ で保存した。血液は室温で解凍した後、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 法では、619 検体中 44 検体 (7.1%) から *Bartonella* DNA が検出され、それらは、*ssrA* 領域の PCR においても全て陽性であった。全ての陽性株の *rpoB*、*ssrA* 領域の塩基配列を決定した後、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* 領域の塩基配列の相同性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^T 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 保有率は、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和歌山県田辺市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、疥癬症に感染していたタヌキの *B. rochalimae* DNA 保有率は 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* の伝播に疥癬症が関与している可能性も考えられた。

第 4 章

総括

4.1 はじめに

わが国には、7科32種の野生食肉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、各種病原体の食肉目動物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。

4.2 各国の野生食肉目動物における病原性 *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。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。一方、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る。様々な動物の血液や臓器からの *Bartonella* DNA の検出に応用され

ている一方で、PCR 法は生菌・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。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の 7.1% (5/70) とアカギツネの 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、アフリカの野生ライオンの 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フイリマングースの 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、特別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における病原性 *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引っ搔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た。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、バルトネラ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。

4.3 イヌ科動物の血液中 *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 β (*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 3 検体から本菌の DNA 検出を試みた。その結果、3 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^T 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 (イヌ血液抽出液) を用いて PCR 法の感度を検討した。 $6 \times 10^7 \sim 6 \times 10^{-1}$ copy/ μ l に希釈した各遺伝子領域のプラスミド DNA の 5 μ l を 45 μ l の NFW およびイヌ血液抽出液

45 μ l に加え、 $6\times 10^6\sim 6\times 10^{-2}$ copy/ μ l の希釈系列を作製した。NFW13.3 μ l を分注した PCR 反应用チューブに、先に作製した $6\times 10^6\sim 6\times 10^{-2}$ copy のプラスミド DNA を 1 μ l、10 μ M の Forward、Reverse プライマーを各 1 μ l、dNTP 溶液を 1.6 μ l、TakaRa EX Taq HS を 0.1 μ l、反应用 buffer を 2 μ l 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 6×10^1 copy/tube、イヌ血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では 6×10^2 copy/tube 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 6×10^2 copy/tube、イヌ血液抽出液で希釈したプラスミド DNA では 6×10^3 copy/tube 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 1 μ l 中に 6×10^2 copy 以上、*ssrA* 領域の PCR 法では 6×10^3 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、イヌ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、血液に由来するヘモグロビン等の物質が PCR 反応の感度低下に影響している可能性が示された。

4.4 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、619頭の血液200 μ lからDNAを抽出し、*rpoB*領域および*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*および*ssrA*領域の塩基配列を決定した後、既存の*Bartonella*標準株の同配列と系統解析を行った。さらに、検出差されたタヌキ由来RD86株の*rpoB*領域および*ssrA*領域の相同性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^Tと同一のクラスターに分類された。RD86株の塩基配列の相同性は、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、イヌ科食肉目動物に固有の *B. rochalimae* であると考えられた。

タヌキの *B. rochalimae* DNA 保有率は、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。年別の保有率は、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和歌山県田辺市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、疥癬症に感染していたタヌキの *B. rochalimae* DNA 保有率は 7.9% (39/494) と疥癬症陰性のタヌキの 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* の伝播に疥癬症が関与している可能性も考えられた。

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 6×10^2 copy/ μ l 以上、*ssrA* 領域の PCR 法では 6×10^3 copy/ μ l 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で、人に病原性を有することが予測される *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。

謝辞

本研究ならびに学位論文の作成を終えるにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました、日本大学教授 丸山総一 博士に深甚なる謝意を表しますとともに、有益なご助言を賜りました同大学教授 壁谷英則 博士ならびに専任講師 佐藤真伍 博士に心より感謝いたします。

貴重な野生動物種の資料を提供していただきました 和歌山県田辺市ふるさと自然公園センター 鈴木和男 先生に深くお礼申し上げます。また、各種実験の遂行に、終始ご協力いただいた獣医公衆衛生学研究室所属の学生諸君に篤くお礼申し上げます。

最後に、私に学位を修得する機会と時間を与え、日々の研究生活を陰から暖かく支えてくれた家族に、心から感謝いたします。

引用文献

1. Al-Soud, W. A., & Rådström, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (2), 485-493.
2. Avidor, B., Graidy, M., Efrat, G., Leibowitz, C., Shapira, G., Schattner, A., Zimhony, O., & Giladi, M. (2004). *Bartonella koehlerae*, a new cat-associated agent of culture-negative human endocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (8), 3462–3468.
3. Bai, Y., Gilbert, A., Fox, K., Osikowicz, L., & Kosoy, M. (2016). *Bartonella rochalimae* and *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* in wild carnivores from Colorado, USA. *J. Wildl. Dis.*, 52 (4), 844-849.
4. Bergh, K., Bevanger, L., Hanssen, I., & Løseth, K. (2002). Low prevalence of *Bartonella henselae* infections in Norwegian domestic and feral cats. *Apmis*, 110(4), 309-314.
5. Branley, J., & Bradbury, R. (1996). Prevalence of *Bartonella henselae* bacteremia, the causative agent of cat scratch disease, in an Australian cat population. *Pathology*, 28 (3), 262-265.
6. Bradley, J. M., Mascarelli, P. E., Trull, C. L., Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2014). *Bartonella henselae* infections in an owner and two Papillon dogs exposed to tropical rat mites (*Ornithonyssus bacoti*). *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(10), 703-709.

7. Breitschwerdt, E. B., Kordick, D. L., Malarkey, D. E., Keene, B., Hadfield, T. L., & Wilson, K. (1995). Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (1), 154-160.
8. Breitschwerdt, E. B., Maggi, R. G., Chomel, B. B., & Lappin, M. R. (2010). Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J Vet Emerg Crit Care*, 20 (1), 8-30.
9. Chang, C. C., Kasten, R. W., Chomel, B. B., Simpson, D. C., Hew, C. M., Kordick, D. L., Heller, R., Piemont, Y., & Breitschwerdt, E. B. (2000). Coyotes (*Canis latrans*) as the reservoir for a human pathogenic *Bartonella* sp.: molecular epidemiology of *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* infection in coyotes from central coastal California. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (11), 4193–4200.
10. Chomel, B. B., Abbott, R. C., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K. A., Kass, P. H., Glaser, C. A., Pedersen, N. C., & 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 (9), 2445–2450.
11. Chomel, B. B., Carlos, E. T., Kasten, R. W., Yamamoto, K., Chang, C. C., Carlos, R. S., Abenes, M. V., & Pajares, C. M. (1999). *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60 (4), 593–597.

12. Chomel, B. B., Kasten, R. W., Floyd-Hawkins, K., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A. N., Abbott, R. C., Pedersen, N. C., & Koehler, J. E. (1996). Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.*, 34(8), 1952-1956.
13. Chomel, B. B., Kasten, R. W., Williams, C., Wey, A. C., Henn, J. B., Maggi, R., Carrasco, S., Boulouis, H. J., Maillard, R., & Breitschwerdt, E. B. (2009). *Bartonella* endocarditis. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1166, 120-126.
14. Chomel, B. B., McMillan-Cole, A. C., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Sato, S., Maruyama, S., Diniz, P. P. V. P., & Breitschwerdt, E. B. (2012). Candidatus *Bartonella merieuxii*, a potential new zoonotic *Bartonella* species in canids from Iraq. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(9), e1843.
15. Chomel, B. B., Molia, S., Kasten, R. W., Borgo, G. M., Stuckey, M. J., Maruyama, S., Chang, C. C., Haddad, N., & Koehler, J. E. (2016). Isolation of *Bartonella henselae* and Two New *Bartonella* Subspecies, *Bartonella koehlerae* Subspecies *boulouisii* subsp. nov. and *Bartonella koehlerae* Subspecies *bothieri* subsp. nov. from Free-Ranging Californian Mountain Lions and Bobcats. *PLOS ONE*, 11 (3), e0148299.
16. Clarridge, J. E., 3rd, Raich, T. J., Pirwani, D., Simon, B., Tsai, L., Rodriguez-Barradas, M. C., Regnery, R., Zollo, A., Jones, D. C., & Rambo, C. (1995). Strategy

- to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *J. Clin. Microbiol.*, 33 (8), 2107–2113.
17. Cleaveland, S., Laurenson, M. K., & Taylor, L. H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B*, 356 (1411), 991-999.
 18. Colborn, J. M., Kosoy, M. Y., Motin, V. L., Telepnev, M. V., Valbuena, G., Myint, K. S., Fofanov, Y., Putonti, C., Feng, C., & Peruski, L. (2010). Improved detection of *Bartonella* DNA in mammalian hosts and arthropod vectors by real-time PCR using the NADH dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*). *J. Clin. Microbiol.*, 48 (12), 4630–4633.
 19. Diaz, M. H., Bai, Y., Malania, L., Winchell, J. M., & Kosoy, M. Y. (2012). Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 50 (5), 1645-1649.
 20. Droz, S., Chi, B., Horn, E., Steigerwalt, A. G., Whitney, A. M., & Brenner, D. J. (1999). *Bartonella koehlerae* sp. nov., isolated from cats. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (4), 1117-1122.
 21. Eicher, S. C., & Dehio, C. (2012). *Bartonella* entry mechanisms into mammalian host cells. *Cellular microbiology*, 14 (8), 1166-1173.

22. Ereemeeva, M. E., Gerns, H. L., Lydy, S. L., Goo, J. S., Ryan, E. T., Mathew, S. S., Ferraro, M. J., Holden, J. M., Nicholson, W. L., Dasch, G. A., & Koehler, J. E. (2007). Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *N. Engl. J. Med.*, 356 (23), 2381–2387.
23. Fournier, P. E., Lelievre, H., Eykyn, S. J., Mainardi, J. L., Marrie, T. J., Bruneel, F., Roure, C., Nash, J., Clave, D., James, E., Benoit-Lemercier, C., Deforges, L., Tissot-Dupont, H., & Raoult, D. (2001). Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine*, 80 (4), 245–251.
24. Gabriel, M. W., Henn, J., Foley, J. E., Brown, R. N., Kasten, R. W., Foley, P., & Chomel, B. B. (2009). Zoonotic *Bartonella* species in fleas collected on gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*). *Vector-borne and zoonotic diseases*, 9(6), 597-602.
25. Gerrikagoitia, X., Gil, H., García-Esteban, C., Anda, P., Juste, R. A., & Barral, M. (2012). Presence of *Bartonella* species in wild carnivores of northern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (3), 885-888.
26. Gundi, V. A., Billeter, S. A., Rood, M. P., & Kosoy, M. Y. (2012). *Bartonella* spp. in rats and zoonoses, Los Angeles, California, USA. *Emerging Infect. Dis.*, 18 (4), 631.
27. Gutiérrez, R., Vayssier-Taussat, M., Buffet, J. P., & Harrus, S. (2017). Guidelines

- for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 17 (1), 42-50.
28. Heller, R., Artois, M., Xemar, V., De Briel, D., Gehin, H., Jaulhac, B., Monteil, H., & Piemont, Y. (1997). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (6), 1327–1331.
29. Henn, J. B., Chomel, B. B., Boulouis, H. J., Kasten, R. W., Murray, W. J., Bar-Gal, G. K., King, R., Courreau, J. F., & Baneth, G. (2009). *Bartonella rochalimae* in raccoons, coyotes, and red foxes. *Emerging Infect. Dis.*, 15 (12), 1984–1987.
30. Ihler, G. M. (1996). *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiology Letters*, 144(1), 1-11.
31. Kabeya, H., Colborn, J. M., Bai, Y., Lerdthusnee, K., Richardson, J. H., Maruyama, S., & Kosoy, M. Y. (2010). Detection of *Bartonella tamiae* DNA in ectoparasites from rodents in Thailand and their sequence similarity with bacterial cultures from Thai patients. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(5), 429-434.
32. Kaewmongkol, G., Kaewmongkol, S., Fleming, P. A., Adams, P. J., Ryan, U., Irwin, P. J., & Fenwick, S. G. (2011). Zoonotic *Bartonella* species in fleas and blood from red foxes in Australia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*., 11 (12), 1549-1553.
33. Kelly, P. J., Rooney, J. J. A., Marston, E. L., Jones, D. C., & Regnery, R. L. (1998). *Bartonella henselae* isolated from cats in Zimbabwe. *The Lancet*, 351

- (9117), 1706.
34. Kido, N., Itabashi, M., Takahashi, M., & Futami, M. (2013). Epidemiology of sarcoptic mange in free-ranging raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Yokohama, Japan. *Veterinary parasitology*, *191*(1-2), 102-107.
 35. Kordick, D. L., Hilyard, E. J., Hadfield, T. L., Wilson, K. H., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J., & Breitschwerdt, E. B. (1997). *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J. Clin. Microbiol.*, *35* (7), 1813-1818.
 36. Kočišová, A., Lazar, P., Letková, V., Čurlík, J., & Goldová, M. (2006). Ectoparasitic species from red foxes (*Vulpes vulpes*) in East Slovakia. *Vet Arh*, *76*, 59-63.
 37. Kosoy, M., Bai, Y., Ensore, R., Rizzo, M. R., Bender, S., Popov, V., Albayrakc,L., Fofanov,Y., & Chomel, B. (2016). *Bartonella melophagi* in blood of domestic sheep (*Ovis aries*) and sheep keds (*Melophagus ovinus*) from the southwestern US: cultures, genetic characterization, and ecological connections. *Veterinary Microbiology*, *190*, 43-49.
 38. Kosoy, M., & Goodrich, I. (2019). Comparative ecology of *Bartonella* and *Brucella* infections in wild carnivores. *Frontiers in veterinary science*, *5*, 322.
 39. La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A., & Raoult, D. (2003). Gene-sequence-based

- criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm. *Trends in microbiology*, 11 (7), 318-321.
40. Lashnits, E., Correa, M., Hegarty, B. C., Birkenheuer, A., & Breitschwerdt, E. B. (2018). *Bartonella* seroepidemiology in dogs from North America, 2008–2014. *Journal of veterinary internal medicine*, 32(1), 222-231.
41. Lin, J. W., Chen, C. Y., Chen, W. C., Chomel, B. B., & Chang, C. C. (2008). Isolation of *Bartonella* species from rodents in Taiwan including a strain closely related to ‘*Bartonella rochalimae*’ from *Rattus norvegicus*. *J. Med. Microbiol.*, 57 (12), 1496-1501.
42. Loan, H. K., Cuong, N. V., Takhampunya, R., Klangthong, K., Osikowicz, L., Kiet, B. T., Campbell, J., Bryant, J., Promstaporn, S., Kosoy, M., Hoang, N. V., Morand, S., Chaval, Y., Vo Be H., & Hoang, N. V. (2015). *Bartonella* species and trombiculid mites of rats from the Mekong Delta of Vietnam. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(1), 40-47.
43. López-Pérez, A. M., Osikowicz, L., Bai, Y., Montenieri, J., Rubio, A., Moreno, K., Gage, K., Suzán, G., & Kosoy, M. (2017). Prevalence and Phylogenetic Analysis of *Bartonella* Species of Wild Carnivores and Their Fleas in Northwestern Mexico. *EcoHealth*, 14 (1), 116–129.
44. Marciano, O., Gutierrez, R., Morick, D., King, R., Nachum-Biala, Y., Baneth, G., & Harrus, S. (2016). Detection of *Bartonella* spp. in wild carnivores, hyraxes, hedgehog and rodents

- from Israel. *Parasitology*, 143 (10), 1232.
45. Makouloutou, P., Suzuki, K., Yokoyama, M., Takeuchi, M., Yanagida, T., & Sato, H. (2015). Involvement of two genetic lineages of *Sarcoptes scabiei* mites in a local mange epizootic of wild mammals in Japan. *J. Wildl. Dis.*, 51(1), 69-78.
 46. Maruyama, S., Kabeya, H., Nakao, R., Tanaka, S., Sakai, T., Xuan, X., Katsube, Yasuji K., & Mikami, T. (2003). Seroprevalence of *Bartonella henselae*, *Toxoplasma gondii*, FIV and FeLV infections in domestic cats in Japan. *Microbiology and immunology*, 47(2), 147-153.
 47. Maruyama, S., Nakamura, Y., Kabeya, H., Tanaka, S., Sakai, T., & 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 (3), 273–279.
 48. Matsuyama, R., Yabusaki, T., Kuninaga, N., Morimoto, T., Okano, T., Suzuki, M., & Asano, M. (2015). Coexistence of two different genotypes of *Sarcoptes scabiei* derived from companion dogs and wild raccoon dogs in Gifu, Japan: The genetic evidence for transmission between domestic and wild canids. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 356-360.
 49. Marston, E. L., Finkel, B., Regnery, R. L., Winoto, I. L., Graham, R. R., Wignal, S., Simanjuntak, G., & Olson, J. G. (1999). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in an urban Indonesian cat population. *J. Clin. Lab. Anal.*, 6 (1), 41–44.

50. Mitsuhashi, I., Sako, T., Teduka, M., Koizumi, R., Saito, M. U., & Kaneko, Y. (2018). Home range of raccoon dogs in an urban green area of Tokyo, Japan. *J. Mammal.*, 99 (3), 732-740.
51. Molia, S., Chomel, BB., Kasten, R. W., Leutenegger, C. M., Steel, B. R., Marker, L., Martenson, J.S., Keet, D. F., Bengis, R. G., Peterson, R. P., Munson, L & O'Brien, S. J. (2004). Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet. Microbiol.* 100, 31-41.
52. Molia, S., Kasten, R. W., Stuckey, M. J., Boulouis, H. J., Allen, J., Borgo, G. M., Koehler, J.E., Chang, C.C., & Chomel, B. B. (2016). Isolation of *Bartonella henselae*, *Bartonella koehlerae* subsp. *koehlerae*, *Bartonella koehlerae* subsp. *bothieri* and a new subspecies of *B. koehlerae* from free-ranging lions (*Panthera leo*) from South Africa, cheetahs (*Acinonyx jubatus*) from Namibia and captive cheetahs from California. *Epidemiology & Infection*, 144(15), 3237-3243.
53. Ninomiya, H., & Ogata, M. (2005). Sarcoptic mange in free-ranging raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in Japan. *Vet. Dermatol.*, 16 (3), 177–182.
54. Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., Saitoh, T., & Sellers, S. B. (Eds.). (2009). *The wild mammals of Japan* (p. 544). Kyoto, Japan: Shoukadoh Book Sellers.
55. Parola, P., Shpynov, S., Montoya, M., Lopez, M., Houpiqian, P., Zeaiter, Z., Guerra, H., & Raoult, D. (2002). First molecular evidence of new *Bartonella* spp. in fleas

- and a tick from Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 67 (2), 135–136.
56. Paziewska, A., Harris, P. D., Zwolińska, L., Bajer, A., & Siński, E. (2011). Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents. *Microbial Ecology*, 61 (1), 134-145.
57. Pérez-Martínez, L., Venzal, J. M., González-Acuña, D., Portillo, A., Blanco, J. R., & Oteo, J. A. (2009). *Bartonella rochalimae* and other *Bartonella* spp. in fleas, Chile. *Emerging Infect. Dis.*, 15 (7), 1150.
58. Regnery, R. L., Anderson, B. E., Clarridge, J. 3., Rodriguez-Barradas, M. C., Jones, D. C., & Carr, J. H. (1992). Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J. Clin. Microbiol.*, 30 (2), 265-274.
59. Renesto, P., Gouvernet, J., Drancourt, M., Roux, V., & Raoult, D. (2001). Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (2), 430-437.
60. Rolain, J. M., Foucault, C., Guieu, R., La Scola, B., Brouqui, P., & Raoult, D. (2002). *Bartonella quintana* in human erythrocytes. *The Lancet*, 360 (9328), 226-228.
61. Roux, V., Eykyn, S. J., Wyllie, S., & Raoult, D. (2000). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (4), 1698-1700.

62. Saito, W., Amaike, Y., Sako, T., Kaneko, Y., & Masuda, R. (2016). Population structure of the raccoon dog on the grounds of the Imperial Palace, Tokyo, revealed by microsatellite analysis of fecal DNA. *Zool. Sci.*, 33 (5), 485-490.
63. Sako, T. (2008). Seasonal food habits of the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, in the Imperial Palace, Tokyo. *Bulletin of the National Museum of Nature and Science, Series A (Zoology)*, 34, 63-75.
64. Sanchez Clemente, N., Ugarte-Gil, C., Solorzano, N., Maguiña, C., & Moore, D. (2016). An outbreak of *Bartonella bacilliformis* in an endemic Andean community. *PLOS ONE*, 11 (3), e0150525.
65. Sato, S., Kabeya, H., Miura, T., Suzuki, K., Bai, Y., Kosoy, M., Sentsui, H., Kariwa, H., & Maruyama, S. (2012). Isolation and phylogenetic analysis of *Bartonella* species from wild carnivores of the suborder Caniformia in Japan. *Vet. Microbiol.*, 161 (1-2), 130–136.
66. Sato, S., Kabeya, H., Shigematsu, Y., Sentsui, H., Une, Y., Minami, M., Murata, K., Ogura, G., & Maruyama, S. (2013). Small Indian mongooses and masked palm civets serve as new reservoirs of *Bartonella henselae* and potential sources of infection for humans. *Clin. Microbiol. Infect.*, 19 (12), 1181–1187.
67. Schaefer, J. D., Kasten, R. W., Coonan, T. J., Clifford, D. L., & Chomel, B. B. (2011). Isolation or detection of *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii* and *Bartonella rochalimae* in the endangered island foxes (*Urocyon littoralis*). *Vet.*

- Microbiol.*, 154 (1-2), 135-139.
68. Schaefer, J. D., Moore, G. M., Namekata, M. S., Kasten, R. W., & Chomel, B. B. (2012). Seroepidemiology of *Bartonella* infection in gray foxes from Texas. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 12 (5), 428-430.
69. Sugiura, N., Doi, K., Kato, T., Morita, T., & Hayama, S. I. (2018). Epizootic of sarcoptic mange in raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) in relation to population density. *J. Vet. Med. Sci.*, 17, 0092.
70. Takahashi, M., Misumi, H., Nogami, S., Takahama, M., & Hirayama, K. (2001). Severe sarcoptic mange in the raccoon dog, *Nyctereutes procyonoides*, in Saitama and Gunma Prefectures, Japan. *Medical entomology and zoology*, 52 (1), 67-71.
71. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725-2729.
72. Tateno, M., Nishio, T., Sakuma, M., Nakanishi, N., Izawa, M., Asari, Y., Okamura, M., Maruyama, S., Miyama, T. S., Setoguchi, A., & Endo, Y. (2013). Molecular epidemiologic survey of *Bartonella*, *Ehrlichia*, and *Anaplasma* infections in Japanese Iriomote and Tsushima leopard cats. *J. Wildl. Dis.*, 49 (3), 646–652.
73. Tsai, Y. L., Chang, C. C., Chuang, S. T., & Chomel, B. B. (2011). *Bartonella* species and their ectoparasites: selective host adaptation or strain selection

- between the vector and the mammalian host. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 34 (4), 299-314.
74. Víchová, B., Bona, M., Miterpáková, M., Kraljik, J., Čabanová, V., Nemčíková, G., Hurníková, Z., & Oravec, M. (2018). Fleas and Ticks of Red Foxes as Vectors of Canine Bacterial and Parasitic Pathogens, in Slovakia, Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 18(11), 611–619.
75. Welch, D.F. (2015). Bartonellaceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (eds M.E. Trujillo, S. Dedysh, P. DeVos, B. Hedlund, P. Kämpfer, F.A. Rainey and W.B. Whitman).
76. Yimam, A. E., Nonaka, N., Oku, Y., & Kamiya, M. (2002). Prevalence and intensity of *Echinococcus multilocularis* in red foxes (*Vulpes vulpes schrencki*) and raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides albus*) in Otaru city, Hokkaido, Japan. *Jpn. J. Vet. Res.*, 49 (4), 287-296.
77. 丸山総一. (2004). 話題の感染症-猫ひっかき病-Cat scratch disease. *モダンメディア*, 50(9), 203-211.
78. 宮崎聖也, 石井隆之, 的場俊, 阿波谷敏英, & 戸田巖雄. (2001). ハクビシンによる猫ひっかき病の経験. *地域医学*, 15(8), 19-21.
79. 山内健生, & 江草真治. (2005). 広島県の中型哺乳類および鳥類に寄生するノミ類. *昆虫*. *ニューシリーズ*, 8 (2), 37-42.

80. 常岡英弘, 石田千鶴, 梅田昭子, 猪熊壽, & 塚原正人. (2004). *Bartonella henselae* 検出のための分離培地の検討. *感染症学雑誌*, 78 (7), 574-579.
81. 常岡英弘, 藤井玲子, 山本きよみ, 藤沢桂子, 飯野英親, 松田昌子, & 塚原正人. (1998). 間接蛍光抗体法による *Bartonella henselae* 抗体価測定. *感染症学雑誌*, 72 (8), 801-807.
82. 常岡英弘, 尾内一信, 長岡宏美, 石田千鶴, 飯野英親, 村上京子, 梅田 昭子, & 塚原正人. (2001). 間接蛍光抗体 (IFA) 法による *Bartonella henselae*, *Chlamydia pneumoniae* および *Coxiella burnetii* の交差反応. *感染症学雑誌*, 75 (5), 406-410.