

論文審査の結果の要旨

氏名：鍋島 圭

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

論文題名：コウモリを自然宿主とする *Bartonella* 属菌の分子生態学的研究

審査委員：(主査) 教授 丸山 総一

(副査) 教授 遠矢 幸伸

教授 壁谷 英則

専任講師 佐藤 真伍

わが国に生息する 170 種の野生哺乳類のうち、翼手目（コウモリ）は少なくとも 35 種が知られており、国内では最も多種の野生動物である。また、コウモリはヘンドラウイルス感染症、ニパウイルス感染症、狂犬病、SARS、エボラ出血熱などの病原性が極めて高いウイルスの病原巣あるいは媒介動物であることから、わが国のコウモリにおいても各種病原体の保有状況を解明することは重要な課題であると考えられる。

Bartonella 属菌はグラム陰性の短桿菌で、人を含む多くの哺乳類を自然宿主とし、宿主の血管内皮細胞や赤血球に持続感染することで長期間の菌血症を引き起こすことが知られている。また、本属菌の宿主動物間あるいはヒトへの伝播には、ノミやシラミ、サシチョウバエなどの節足動物が関与している。

これまで 30 の国や地域のコウモリ（37 属 88 種）から *Bartonella* が分離あるいはその DNA が検出されていることから、コウモリには *Bartonella* が広く分布していると考えられる。また、2014 年と 2017 年に、フィンランドとアメリカの *Myotis* 属および *Eptesicus* 属のコウモリから、ヒトの心内膜炎の起因菌である *Candidatus B. mayotimonensis* が分離・検出されたことから、*Myotis* 属や *Eptesicus* 属等のコウモリは、ヒトに感染性を有する *Bartonella* を保有していることが推定される。

以上のように、コウモリはバルトネラ症の新たな感染源となる可能性があることから、コウモリにおける *Bartonella* 属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極めて重要であるが、わが国のコウモリに関してはこれまで全く検討されていない。そこで、本学位論文では、日本に生息するコウモリにおける *Bartonella* の生態、すなわち分布状況、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクター、ならびに感染機序を細菌学的・分子生物学的手法を用いて明らかにした。

1. わが国のコウモリにおける *Bartonella* 属菌の分布とその宿主特異性の検討

わが国に生息するコウモリにおける *Bartonella* の分布状況と保有する株の遺伝子性状の解明を目的として、2013年から2019年の間に、北海道においてキタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*) 123頭、和歌山県においてユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) 50頭、静岡県においてモモジロコウモリ (*Myotis macrodactylus*) 4頭とキクガシラコウモリ (*Rhinolophus ferrumequinum*) 1頭を捕獲し、*Bartonella* の分離を試みた。各個体から分離された *Bartonella* 様のコロニー3株から InstaGene Matrix を用いて DNA を抽出し、*Bartonella* 属に特異的なクエン酸合成酵素遺伝子 (*gltA*) および RNA ポリメラーゼ β サブユニット遺伝子 (*rpoB*) 領域を標的とした PCR 法により本属菌であることを確認した。さらに、*gltA* 遺伝子領域の塩基配列を決定し、海外のコウモリ由来株および *Bartonella* 標準株との遺伝子相同性解析ならびに系統解析を行った。

ユビナガコウモリの 24% (12/50)、キタクビワコウモリの 26% (32/123)、キクガシラコウモリとモモジロコウモリの全個体から *Bartonella* 属菌が分離された。分離株の *gltA* 領域の遺伝子型別では、13の *gltA* 遺伝子型 (1~13) に分類された。ユビナガコウモリは遺伝子型 1~5、キタクビワコウモリは遺伝子型 6~8、モモジロコウモリは遺伝子型 10~12、キクガシラコウモリは遺伝子型 13 を保有していた。一方、コウモリの種間で共通した遺伝子型の *Bartonella* は存在しなかった。さらに、*gltA*、*rpoB* 領域の相同性解析に基づく菌種同定では、今回コウモリから分離された株は、いずれの既存種にも該当しなかった。

gltA 領域に基づく系統解析では、コウモリ由来 13 株は大きく 7 つの系統 (A~G) に分類された。ユビナガコウモリ (*Miniopterus fuliginosus*) 由来の遺伝子型 1, 2, 3, 4 は、台湾の *Miniopterus* 属コウモリ由来株とともに系統 A に、遺伝子型 5 は単系統の系統 E に分類された。キタクビワコウモリ (*Eptesicus nilssonii*) 由来の遺伝子型 6, 7 は *Vespertilionidae* 科コウモリ由来株とともに系統 G に、遺伝子型 8 はげっ歯類由来株に近縁な単系統の系統 F に分類された。モモジロコウモリ由来 (*Myotis macrodactylus*) の遺伝子型 9, 11 は系統 D に、遺伝子型 10 は系統 B に、それぞれ中国の *Myotis* 属コウモリ由来株とともに分類された、遺伝子型 12 は遺伝子型 6, 7 と *Vespertilionidae* 科コウモリ由来株とともに系統 G に分類された。キクガシラコウモリ由来の遺伝子型 13 は、*Myotis* 属と *Rhinolophus* 属コウモリ由来株とともに系統 C に分類された。

本研究では、わが国の 4 種のコウモリ全てが *Bartonella* を保有していることを初めて明らかにした。分離株の遺伝子系統解析では、コウモリ由来株は A~G の 7 系統に分類され、系統 A, B, D, G はそれぞれ、*Miniopterus* 属、*Myotis* 属 (2 系統)、*Vespertilionidae* 科のコウモリにそれぞれ固有の新種であることが明らかとなった。また、系統 C の株は複数のコウモリ科から分離されていることから、コウモリの科を超えて感染可能な系統であると考えられた。さらに、系統 E と F に近縁な他国のコウモリ由来株あるいは近縁種は存在しなかったことから、両系統の株は日本のユビナガコウモリとキタクビワコウモリにそれぞれ固有の新種の *Bartonella* であることが示唆された。

2. コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターの検討

Bartonella 属菌の中で、*B. henselae* はネコノミ、*B. quintana* はコロモジラミ、*B. bacilliformis* はサシチヨウバエによって媒介されるが、コウモリ間で *Bartonella* を媒介するベクターについては解明されていない。本研究では、コウモリから採取した吸血性外部寄生虫種を形態学的、チトクロム *c* オキシダーゼサブユニット 1 (*COI*) 遺伝子に基づく系統解析により同定するとともに、それらから *Bartonella* を分離・検出し、宿主コウモリの株と遺伝子相同解析することで各コウモリに寄生する外部寄生虫相と

それらの *Bartonella* を媒介するベクターとしての役割について解析した。

ユビナガコウモリからは、クモバエが 281 匹採取され、*Nycteribia allotopa* (N=157)、*Nycteribia* sp. (N=79)、*Penicillidia jenynsii* (N=45) に同定された。また、*Nycteribia* sp. は COI 遺伝子の系統解析で、既存種とは異なる系統となったことから、新種のクモバエである可能性が示された。キタクビワコウモリからは、174 匹のノミと 2 匹のトコジラミが採取され、ノミはコウモリノミ (*Ischnopsyllus needhami*; N=174)、トコジラミは *Cimex japonicus* (N=2) と同定された。モモジロコウモリからは、16 匹のクモバエと 2 匹のダニが採取され、クモバエは *N. pygmaea* (N=16)、ダニは *Spinturnix myoti* (N=4) と同定された。以上の結果から、コウモリでは、種ごとに異なる外部寄生虫相を形成していることが明らかとなった。

外部寄生虫のうち、*N. allotopa* 2 匹、*Nycteribia* sp. 1 匹、コウモリノミ 1 匹から *Bartonella* が分離されたことから、*Nycteribia* 属のクモバエとコウモリノミの体内で *Bartonella* は生存可能であることが示唆された。

寄生虫種ごとの *Bartonella* DNA の陽性率は、ユビナガコウモリ由来の *N. allotopa* で 47.1% (74/157)、*Nycteribia* sp. で 15.2% (12/79)、*P. jenynsii* で 6.7% (3/45) で、*N. allotopa* の陽性率は *Nycteribia* sp. および *P. jenynsii* の値に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。キタクビワコウモリ由来のコウモリノミの *Bartonella* DNA 陽性率は 46% (80/174) であったが、トコジラミからは検出されなかった。モモジロコウモリ由来の *N. pygmaea* の *Bartonella* DNA 陽性率は 43.8% (7/16)、*S. myoti* では 25% (1/4) であった。

外部寄生虫由来 *Bartonella* DNA の *gltA* 領域の塩基配列を宿主のコウモリ由来株とともに相同性解析を行ったところ、*N. allotopa* はユビナガコウモリ由来株と同じ遺伝子型である遺伝子型 1、2、3、4 を、*Nycteribia* sp. は遺伝子型 1 を保有していた。*P. jenynsii* 由来株は既存の遺伝子型に分類されなかった。コウモリノミ由来株の遺伝子型は 6、7、8 で、コウモリノミはキタクビワコウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* を保有していた。*S. myoti* 由来株の遺伝子型は 9、*N. pygmaea* 由来株の遺伝子型は 10 で、いずれもモモジロコウモリ由来株と同じ遺伝子型の *Bartonella* であった。

以上の結果から、ユビナガコウモリにおいては *Nycteribia* 属のクモバエが、キタクビワコウモリにおいてはコウモリノミが主要な *Bartonella* のベクターであると考えられた。また、モモジロコウモリでは *N. pygmaea* と *S. myoti* の両方が *Bartonella* のベクターである可能性が考えられた。

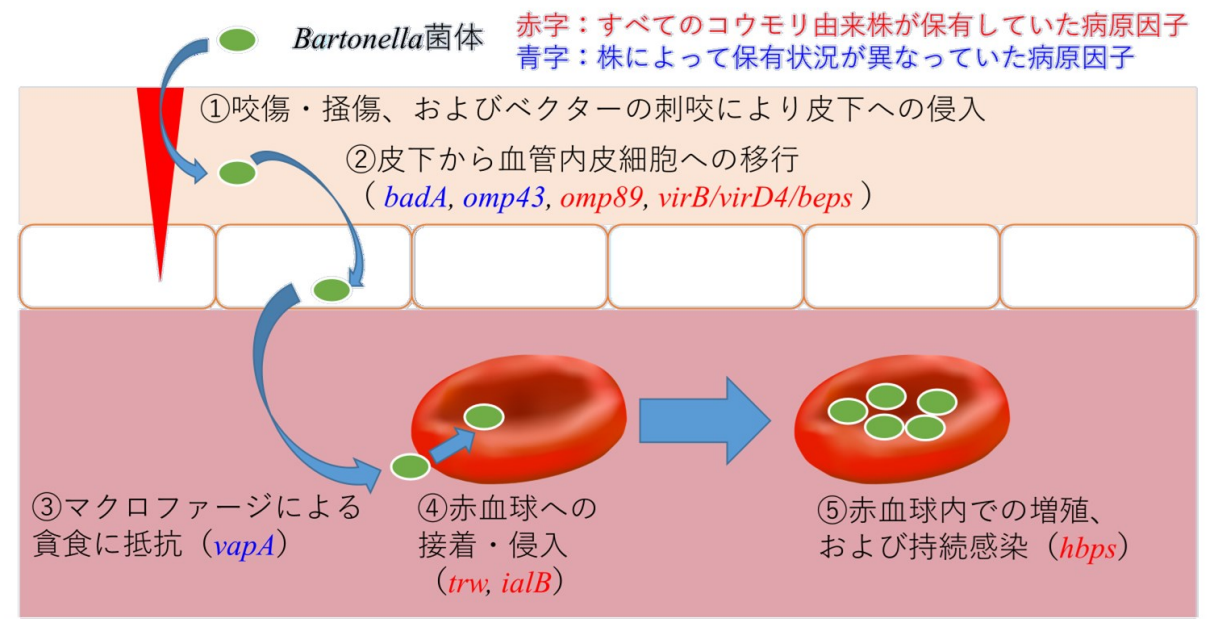
3. コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析による病原因子と宿主における感染機序の解明

病原性 *Bartonella* の *B. henselae* では、8 つの病原因子をコードする遺伝子が同定されている。本研究ではコウモリ由来 *Bartonella* の病原因子と宿主における感染機序の解明を目的として、次世代シーケンサー Miseq と Nanopore MinION を用いて異なる 7 系統の *Bartonella* (系統 A~G; 遺伝子型 1, 5, 6, 8, 9, 10, 13) のドラフトゲノム配列を決定し、Virulence factor database (VFDB) を用い、病原関連遺伝子の保有状況を *B. henselae* と比較解析した。

検討したコウモリ由来 7 株は、宿主の血管内皮細胞への接着に関与する分子をコードする *badA*, *omp43*, *omp89* の全てまたはいずれかを保有していた。また、全ての株は、宿主血管内皮細胞へエフェクタータンパクを注入し、血管内皮細胞内への侵入に関与する分子をコードする *virB/virD4/beps*、宿主血管内皮細胞への接着および侵入に関与する分子をコードする *trw*, *ialB*、赤血球中での持続感染および増殖を成立させる分子をコードする *hbps* 遺伝子を保有していたことから、*B. henselae* と同様の機序で宿主の血管内皮細胞や赤血球へ感染すると考えられた。一方、マクロファージの食食を阻害す

る分子をコードする *vapA* 遺伝子は、全てのキタクビワコウモリ由来株、キクガシラコウモリ由来株、モモジロコウモリ由来株の1株が保有していたことから、これらの株は *vapA* の機序を用いて宿主のマクロファージによる貪食を阻害し、生体内で長期間生存する可能性が考えられた。

以上から、わが国のコウモリ由来 *Bartonella* は、*B. henselae* と同様に、ベクターの刺咬等により①皮下に侵入後、②皮下から血管内皮細胞に移行する。その後、血管内皮細胞から血管内腔へ遊離し、③マクロファージによる貪食に抵抗して、④赤血球内に侵入することで、⑤宿主体内で持続感染を成立させていると推定された（下図）。



本研究では、わが国の4種のコウモリは7種の異なる系統の *Bartonella* 属菌を保有しており、その系統はコウモリの科や属ごとに固有の新種であることを初めて明らかにした。特に、ユビナガコウモリ由来株、キタクビワコウモリ由来株の一部は、わが国に生息するこれらのコウモリに固有の新種であると考えられた。また、ユビナガコウモリでは *Nycteribia* 属のクモバエ、キタクビワコウモリではコウモリノミが、モモジロコウモリではコウモリダニと *N. pygmaea* が *Bartonella* を媒介するベクターである可能性を示すことができた。さらに、コウモリ由来 *Bartonella* の全ゲノム解析では、コウモリ由来株は *B. henselae* と同様に、8つないしは7つの病原因子を保有していたことから、類似の感染機序で宿主に持続感染していることが示唆された。本研究によって、コウモリにおける *Bartonella* の生活環の一端が明らかにされたことは重要な新所見である。

よって本論文は学術上および獣医学術上重要な所見が多く含まれており、博士（獣医学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和3年2月22日