

# 北海道のウシ及び周辺動物における バルトネラ属細菌の浸潤状況の調査

松 本 高太郎

臨床獣医学研究部門診断治療学分野・助教

## 1. 目 的

バルトネラ属は難培養性のグラム陰性細菌で約20の種が同定されており、また近年の分子生物学的手法および培養方法の発達により多数の株が報告されている。バルトネラ属細菌はヒトに対して猫ひっかき病 (*Bartonella henselae*) や塹壕熱 (*B. quintana*) を引き起こし、ノミやシラミといった吸血節足動物により媒介されることが知られている。ウシからは *B. bovis*, *B. chomelii*, および *B. schoenbuchensis* がヨーロッパ, 北米, およびアフリカのウシから分離されており, このうち *B. bovis* はウシの心内膜炎の原因となることが報告されている。また, ウシの周辺動物であるシカからは *B. capreoli* および *B. schoenbuchensis* が, ネズミからは *B. grahamii*, *B. rattimassiliensis*, および未分類の株が多数分離・同定されている。しかしながら, 国内におけるバルトネラ属細菌については, 猫ひっかき病の病原体である *B. henselae* についての調査, および野鼠における保有状況の調査はなされているものの, ウシにおける感染状況については未だ不明である。また, バルトネラ属細菌は吸血節足動物により媒介されると考えられており, シラミバエやマダニから *B. schoenbuchensis* が検出されているが, 国内ではこれらの吸血節足動物のバルトネラ属細菌の保有状況は調査されていない。そこで, ウシ, およびウシへの感染に関与すると考えられる周辺動物におけるバルトネラ属細菌の保有状況を明らかにすることを目的として調査を行った。

## 2. 方 法

### サンプル採取

2005年7月から2008年12月までに帯広畜産大学に搬入された十勝地方のウシ165頭から血液を, およびこれらのうち病理解剖にて心内膜に疣贅物が認められた11頭のウシから疣贅物の一部を採取した。静内で捕獲されたエゾシカ21頭の血液, および中札内で捕獲されたエゾシカ28頭の脾臓の一部を採取した。また, 当研究室で過去に採取した洞爺のエゾシカ120頭のDNAサンプルを調査に用いた。また, 2007年までに帯広畜産大学周辺で捕獲された野ネズミ49匹の血液由来DNAを用いた。

中札内で捕獲されたエゾシカの体表から採取したシラミバエ21匹, マダニ61匹 (ヤマトマダニ28匹, シュルツェマダニ28匹, ダグラスチマダニ5匹), 十勝地方の牧野で採取したマダニ80検体を調査に用いた (表1)。

## DNA 抽出およびスクリーニング PCR

採取した血液、脾臓、節足動物から QIAGEN DNA mini Kit を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA サンプルをテンプレートとして、バルトネラ属細菌の *gltA* 遺伝子約380bp を特異的に増幅するプライマーBhCS781p および BhCS1137n を用いてスクリーニング PCR を行った。陽性を示したサンプルについて、その塩基配列を決定、BLAST 検索を行い、得られた配列がバルトネラ属に類似性を持つことを確認した。

## *gltA* および *rpoB* 遺伝子の配列決定

バルトネラ属細菌と確認された検体について、表 2 に示したプライマーを用いて915bp の *gltA* 遺伝子および852bp の *rpoB* 遺伝子を増幅し、その配列を決定した。得られた配列について BLAST にて近縁な種・株を検索した。また、ClustalW および MEGA 4 を用いて系統樹を作成した。

## 3. 結 果

スクリーニング PCR の結果、ウシ、エゾシカ、シラミバエ、およびマダニからはバルトネラ属細菌の DNA は検出されなかった。野ネズミでは49検体中4検体が陽性を示し、ヒメネズミで7検体中3検体が、ドブネズミでは14検体中1検体が陽性であった（表 1）。

ヒメネズミ由来の3検体（Aa22, Aa30および Aa32）およびドブネズミ由来の1検体（Rn40）について、*gltA* の遺伝子配列がバルトネラ属細菌に含まれることを確認した後、915bp の *gltA* 遺伝子および852bp の *rpoB* 遺伝子の配列を決定した。

Aa22 由来の *gltA* 遺伝子は *B. grahamii* strain Far East II (GenBank Accession Number, AY584855) と 99.0% (902/911) の類似性を示し、*rpoB* 遺伝子は *B. grahamii* (AB426691) と 100% (825/825) の類似性を示した。Aa30 および Aa32 はスクリーニング検査での *gltA* 遺伝子配列は 100% 一致し、915bp の *gltA* 遺伝子は *Bartonella* sp. 16/40 (AY584859) と

表 1 本調査に用いた検体および検体数、スクリーニング結果

本調査に用いた検体	スクリーニング PCR 結果
2005年7月から2008年12月までに畜大に搬入されたウシの血液	0/165
上記ウシから採取した心臓贅物	0/11
エゾシカ（静内、中札内、洞爺湖）の血液もしくは脾臓	0/169
畜大周辺で採取された野ネズミの血液由来 DNA	
ヤチネズミ	0/16
ドブネズミ	1/14
ヒメネズミ	3/7
アカネズミ	0/4
ハツカネズミ	0/3
エゾアカネズミ	0/2
エゾヤチネズミ	0/2
トガリネズミ	0/1
ハタネズミ	0/1
中札内のエゾシカ由来のシラミバエ	0/21
中札内のエゾシカ由来マダニ	
ヤマトマダニ	0/28
シュルツェマダニ	0/28
ダグラスチマダニ	0/5
2005年に採取した十勝牧野由来のマダニ	0/80

表 2 本調査で用いたプライマー

プライマー名	プライマーの配列	用途
<i>gltA</i> 遺伝子		
BhCS.781p	GGGGACCAGCTCATGGTGG	スクリーニング PCR、配列決定
BhCS.1137n	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	スクリーニング PCR、配列決定
BvCS.205p	TTTATCGYGGTTATCCTATYG	PCR、配列決定
Bv322R	GAGATGAGGCGAACAGAAGC	配列決定
<i>rpoB</i> 遺伝子		
1400F	CGCATTGGCTTACTTCGTATG	PCR、配列決定
2300R	GTAGACTGATTAGAACGCTG	PCR、配列決定
1596R	GGACAAATACGACCATAATGCG	配列決定
2028F	GGAAAATGATGATGCGAATCGTGC	配列決定

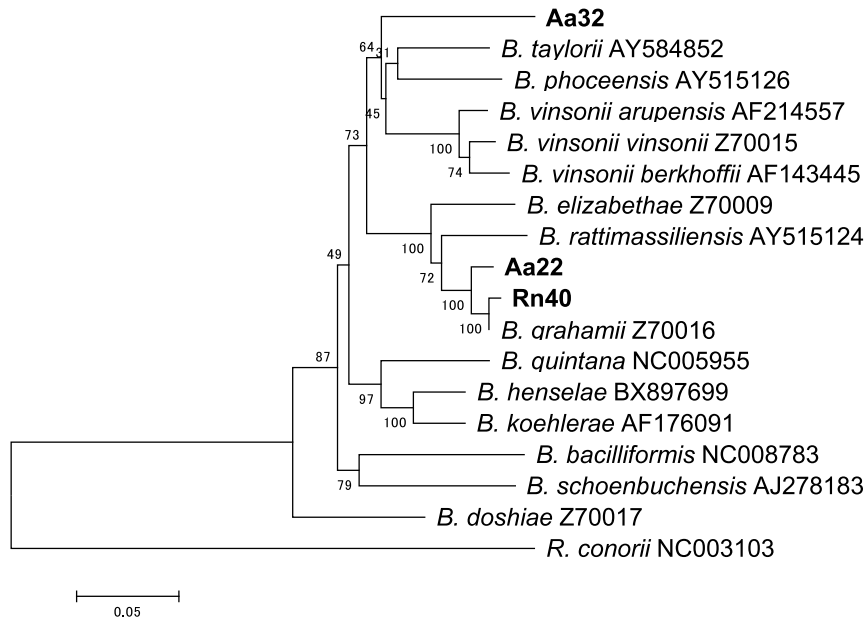


図1 915bp の *gltA* 配列をもとに Neighbor-joining 法にて作成した系統樹。用いたバルトネラ属細菌の種名および GenBank Accession Number を図中に示した。

99.4% (868/873) の類似性を、*rpoB* 遺伝子は *B. grahamii* (AB426691) と100% (825/825) の類似性を示した。Rn40の *gltA* 遺伝子は *B. grahamii* (Z70016) と99.5% (911/916) の類似性を示し、*rpoB* 遺伝子は *B. grahamii* (AF165993) と99.5% (821/825) の類似性を示した。

既知のバルトネラ種の *gltA* 配列と今回の調査で得られた915bp の *gltA* 配列をもとに Neighbor-joining 法にて系統樹を作成した (図1)。

#### 4. 考 察

本調査では牛の血液および心臓贅物からはバルトネラ属細菌の DNA は検出されなかった。このことから、バルトネラ属細菌が十勝地方のウシに浸潤しておらず、心内膜炎の原因菌となっていない可能性が示された。野ネズミ由来のサンプルは4検体が陽性を示し、系統樹からはヒメネズミから検出されたバルトネラ属細菌は *B. grahamii* および *B. taylorii* に近縁であり、ドブネズミから検出されたバルトネラ属細菌は *B. grahamii* に近縁であることが示された。*B. grahamii* および *B. taylorii* はヨーロッパヤチネズミおよびアカネズミ属ネズミからそれぞれ分離され、1995年にバルトネラ属細菌として記載された。しかしながら、今回の調査ではウシからはバルトネラ属細菌は検出されず、また *B. grahamii* および *B. taylorii* のウシからの検出も報告がないため、これらのバルトネラ属細菌がウシに及ぼす影響については不明である。これらのバルトネラ属細菌はノミ (*Ctenophthalmus nobilis*) から検出されたことが報告されており、今後はノミについて保有状況を調査する必要がある。また、*B. grahamii* がヒトの視神経網膜炎の原因となることが報告されていることから、ズーノーシスとしての重要性を検討する必要があると考えられた。

キーワード：ウシ，バルトネラ，ネズミ