

名古屋市内で飼育されている犬での *Bartonella* 属菌保菌調査

はじめに

猫ひっかき病(Cat Scratch Disease:CSD)は、主に猫の歯牙や爪からヒトに感染しリンパ節の腫脹、発熱、頭痛、食欲不振を示す。病原体は *Bartonella henselae* で、同属の *B. clarridgeiae* もまれに定型的、非定形的な症状を起こす。「猫ひっかき病」という名が付いているように、人がこの病気にかかる感染経路は、主に猫からとされていました。しかし、近年では、猫からではなく犬から感染した疑いのある症例が報告されている、そこで、名古屋市内における飼い犬のバルトネラ属菌の保有状況を調べることで、CSDの感染防止策の一助となると考え、今回、名古屋市内における飼い犬のバルトネラ属菌保菌状況ならびに飼育環境の調査を実施した。

① 調査材料および調査方法

調査施設

名古屋市内に施設を持つ名古屋市獣医師会会員病院に採材を依頼した。依頼施設は各区1施設とし、16区合計で96検体とした。

調査期間

調査期間は、平成21年8月18日から平成22年2月28日とした。

調査材料

各診療施設に来院した飼犬から静脈血を採取後、*Bartonella* 分離培養法と *Bartonella* DNA 検出法(PCR法)に用いる全血検体と、*Bartonella henselae* の抗体価測定法に用いる血清検体を作成し直ちに凍結保存した。また、口腔内スワブも採取し直ちに凍結保存した。検体は合計96頭の犬から採取した。

調査方法

検査は日本大学生物資源学部 獣医公衆衛生学研究室に依頼した。

A. 犬血液からの *Bartonella* 分離培養法

1. -80°C 下で冷凍保存されていた血液を室温で融解し、1検体につき $200\mu\text{l}$ ずつ尖底チューブに分注する。
2. 血液を $3,600\text{rpm}$, 75 分間遠心分離し上清を捨て、上清と等量の *Medium*199 を入れ混和する。
3. 5% ウサギ血液加寒天培地2枚を用意し、1枚につき2の試料 $100\mu\text{l}$ を塗布する。
4. $5\%\text{CO}_2$, 35°C 下で約1ヶ月間培養する。
5. コロニー形成が認められれば、釣菌し分離培養と同様の条件で純培養後、菌種の同

定を行う（今回は *Bartonella* は分離されなかった）。

B. PCR 法による犬血液からの *Bartonella* DNA 検出法

1. QIAGEN の Blood & Tissue Kit を用いて、血液 200 μ l から DNA 抽出。
2. 得られた DNA をテンプレートとして ITS 領域を標的とした PCR 法を行う。

Primer : Forward Primer に BS-3' } 本 Primer は *Bartonella* 属菌を種特異的に同定する際に使用。
Reverse Primer に BS-5'

Positive control には *B. henselae* (172bp) , *B. clarridgeiae* (154bp) , *B. vinsonii subsp. berkhoffii* (260bp) から抽出した DNA を使用。

3. 3%アガロースゲルで電気泳動し、UV 照射する。Positive control と同位置にバンドが認められれば陽性とする。

C. PCR 法による犬の口腔内スワブからの *Bartonella* DNA 検出法

1. 口腔内スワブを採取した綿棒から滅菌 PBS 400 μ l を用い、洗い出しサンプルを作製する。
2. QIAGEN の Blood & Tissue Kit を用いて上記のサンプルから DNA 抽出を行う。
サンプル内に Proteinase K 20 μ l を加え、よく攪拌し、56°C、10 分間インキュベートする。
3. 99.5%エタノール 400 μ l をサンプルに加え、よく攪拌した後、付属のスピンカラムへ移し、コレクションチューブへセットする。
4. 8000rpm、1 分間遠心分離し、ろ液が入ったコレクションチューブを捨て、新しいコレクションチューブを取り付ける。
5. 付属の Buffer AW1 を 500 μ l 加え、8000rpm、1 分間遠心分離し、ろ液が入ったコレクションチューブを捨て、新しいコレクションチューブを取り付ける。
6. 付属の Buffer AW2 を 500 μ l 加え、13200rpm、5 分間遠心分離し、ろ液が入ったコレクションチューブを捨て、スピンカラムを尖底チューブへ移す。
7. スピンカラムに付属の Buffer AE を加え、室温、3 分間インキュベートし、8,000rpm、1 分間遠心分離する。
8. 尖底チューブ内の DNA 溶液をテンプレートとし、「B」と同様に PCR 法を行う。

D. 間接蛍光抗体法 (IFA) による抗 *Bartonella henselae* 抗体の測定法

1. *B. henselae* を感染させた FCWF 細胞を 12 穴アッセイスライドグラスに固定する。
2. 血清を 56°C、30 分間非動化する。10%スキムミルク加 PBST を用いて血清を 1:32~1:1024 まで 2 倍階段希釈する。
3. PBS で抗原プレートを 5 分間洗浄する。
4. 希釈した血清を抗原上にスポットし、37°C、40 分間インキュベートする。

5. 抗原上の血清をアスピレーターで吸引した後，PBS で 5 分間洗浄する。
6. PBS で 400 倍に希釈した FITC 標識抗イヌ-抗ヤギ IgG^{※1}（二次抗体）を抗原上にスポットし，遮光して 37℃，40 分間インキュベートする。
7. アスピレーターで二次抗体を吸引した後，PBS で 5 分間洗浄する。
8. 再精製水で 30 秒間洗浄し，グリセリンを適量載せ，カバーガラスで封入する。

※1 アルミ箔で包み遮光した尖底チューブに PBS 1ml，エバンスブルー 5 μ l，FITC 標識抗イヌ-抗ヤギ IgG 抗体（Cappel 社）2.5 μ l を加えて混合し，作製する。

<判定時の注意点>

- ・陽性対照が発色し，かつ陰性対照が発色しないことを確認する。
- ・2 人以上で判定する。

<ヒトの血清の場合>

- 128 倍以上で発色→陽性
- 64 倍で発色→擬陽性，再検査
- 32 倍以下→陰性

② 調査対象件の環境調査

1 飼育動物

- ① 品種 _____
- ② 性別 オス 去勢済オス メス 避妊済メス
- ③ 年齢 _____歳（生年月日 平成____年____月____日）
- ④ 飼い始めた時期（平成____年____月頃～）
- ⑤ 健康状態 栄養状態 良 不良
過去にかかった病気（（_____））
現在かかっている病気（（_____））
- ⑥ 現在のノミの有無（有・無）
- ⑦ 以前にノミがいたことがある（有・無）

2 飼育状況

- ① 飼育場所 室内 屋外 その他（_____）
- ② 他に飼育している動物（種類____、数____、飼育場所_____）
- ③ 周囲に生息する動物（野良犬 野良猫 ネズミ ハト その他_____）

結果

試料	検査方法	検体数	陽性数(%)		
			<i>B. henselae</i>	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>B. vinsonii</i> sbsp. <i>berkhoffii</i>
血液	分離培養法	96	—	—	—
	PCR	96	18 (18.8%)	2 (2.1%)	—
口腔スワブ	PCR	96	—	—	—
血清	間接蛍光抗体法	96	4 (4.1%)	Not tested	Not tested

—：陰性

また、検体結果と飼育状況および環境に関する調査結果は表 1 に示した。

考察

Bartonella 属の菌は、Proteobacteria 門、Alphaproteobacteria 綱、Rhizobiales 目、*Bartonella* 科、*Bartonella* 属に分類されている。*Bartonella* 科、*Bartonella* 属の細菌で現在 20 種 3 亜種が知られている。(1)(2)

人に病原性を有すると考えられているものは、*Bartonella henselae* で、同属の *B.clarridgeiae* もまれに定型的、非定形的な症状を起こす。両菌とも猫の赤血球に寄生する。

人の CSD の定型的な臨床症状は、菌の侵入部位（通常、手指や前腕）に、3～10 日後虫刺されに似た病変が形成され、それが丘疹から水泡に、また一部では化膿や潰瘍に発展する場合もある。これらの病変の形成から 1～2 週間後に局所リンパ節（多くは鼠径部、腋窩あるいは頸部リンパ節）の腫脹が現れる。通常、リンパ節炎は一側性で痛みを伴い、数週から数ヶ月間持続する。多くの症例で、発熱、悪寒、倦怠、食欲不振、頭痛等を示す。非定形的な症状は 5～10%の割合でみられ、パリーノ症候群（耳周囲のリンパ節炎、眼瞼性結膜炎等）、脳炎、骨溶解性の病変、心内膜炎、肉芽腫性肝炎等が報告されている。(1)

B. vinsonii sbsp. *Berkhoffii* の病原巣は犬および犬科の動物であり、*B. vinsonii* subsp. *Berkhoffii* が人に心内膜炎を起こす可能性が示されている。(3)

CSD は感染猫のひっかき傷や咬傷だけでなく、感染犬や感染ノミによる咬刺によっても起こる可能性があることがわかっている。(4)

今回行った我々の調査では、血液から *Bartonella* 属菌が分離培養されることはなかったが、PCR 法では *B.henselae* が 18 頭 (18.8%) で陽性、*B.clarridgeiae* が 2 頭 (2.2%) で陽性であった。また、血清の抗体測定では、4 頭 (4.1%) が陽性であった。

この結果は、Maruyama(5)ら Ueno(6)ら Tomita(7)らが行った日本の飼育猫の保菌率 7.2%、抗体陽性率 8.8%と比較すると低い、犬も、CSD の感染源になりうることを裏付けているものと考えられる。今回 PCR 法と抗体測定法での陽性犬の合計は 24 頭あり、そのうちノミの寄生があったもの(過去と現在両方を含む)は 18 頭(75%)であった。Ishida(8)らが行った調査では犬から採取されたノミの 26.9%(7/26)から *B.henselae* の特異 DNA が検出されており、ノミが *Bartonella* 属菌の感染媒体であることが示唆される。

今回、我々が行った調査では PCR 法において、犬の口腔スワブから *B.henselae* *B.clarridgeiae* の DNA は検出されなかったが、ノミの寄生した犬が、ノミ糞が多量についた体表をグルーミングした後に人を咬んだりすると人に感染する危険性も考えられる。

最近では犬の飼育環境は室内飼育が多く、ノミの繁殖も室内が温暖なため活発に行われる可能性があり、ヒトと濃密に接触する機会も多くなっている。従来、CSD は CSD という名前の通り、猫が感染源として認識されてきたが、我々獣医師は、飼い主に対して犬やノミも CSD の感染源になりうることを伝え、ノミ対策の公衆衛生学的重要性を啓蒙する必要があると思われる。

文献

- 1) 丸山総一：モダンメディア 50,203-209(2004)
- 2) Kordick D.L,Hilyard F.J,Wilson K.H,Steigerwalt A.G,Brenner D.J, and Breitschwerdt E.B:J Clin Microbiol,35,1813-1818(1997)
- 3) 丸山総一 壁谷英則 見上彪：人の動物の *Bartonella* 感染症（猫ひっかき病を中心として）日獣会誌、56:209~217.2003
- 4) 山之内寛嗣、泉川欣一、久松 貴、良永倫子、佐々木英祐、泉川公一、早川友一郎、原耕平、丸山総一、大谷 博、下川 功：感染症誌、78,270-273(2004)
- 5) Maruyama S,Nakamura Y,Kabeya H,Tanaka S,Sakai,T,Katsube Y:J Vet Med Sci,62,273-279(2000)
- 6) Ueno H,Muramatu Y,Chomel BB,Hohdatsu T,Koyama H,Morita C:Microbiol Immunol,39,339-341(1995)
- 7) 富田正章、矢端順子、富永 潔、菅原雅俊、橋本元秀、岸本彦生、福田好博、網本 輝、田村佳子、片山 淳：日獣会誌、57,257-261(2004)
- 8) 石田千鶴、常岡英弘、飯野英親、村上京子、猪熊 壽、大西堂文、塚原正人：猫・犬寄生ノミの *Bartonella henselae* 感染
- 9) Kim YS,SEO KW,Lee JH,Choi EW,Lee HW,Hwang CY,Shin,NS,Youn HY:J Vet Sci.2009 Mar;10(1):85-7
- 10) 高橋敏子、久保雅俊、鈴木宣夫、長井 章、松本寿男、小林洋平、森田幸雄、丸山総一：日獣会誌、58,697~702(2005)
- 11) 名古屋市獣医師会：名古屋市で飼育されているネコの血液における *Bartonella*

henselae の保有状況調査 あゆみ Vol.43

検体NO.	培養結果	PCR				間接蛍光抗体法(Bartonella henselae)				同居動物		周囲の動物					症状						
		血液	口腔粘膜スワブ	抗体価	区	品種	年齢	性別	避妊去勢	/ミ書生(現在)	/ミ書生(過去)	飼育環境	猫	犬	鳥	野良猫		ハト	ネズミ	カラス	スズメ	その他	
NagoyaD-01	-	-	-	-	東	雑種	11歳	オス	去勢	無	無	室内	○			○							良好
NagoyaD-02	-	-	-	-	東	キャバリア	4歳	メス	避妊	無	有	室内				○							良好
NagoyaD-03	-	-	-	-	東	柴犬	10歳	オス		有	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-04	-	B. clarridgeiae	-	-	東	ミニチュアダックス	5歳	メス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-05	-	-	-	-	東	ヨークシャテリア	7歳	オス	去勢	無	有	室内				○							良好
NagoyaD-06	-	-	-	-	東	スタンダードプードル	2歳	オス		無	有	室内		○									良好
NagoyaD-07	-	-	-	-	東	キャバリア	9歳	オス		無	有	室内											良好
NagoyaD-08	-	-	-	-	東	ビションフリーゼ	3歳	オス	去勢	無	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-09	-	-	-	-	東	ウェルシュコーギー	11歳	メス	避妊	無	有	室内		○				○					良好
NagoyaD-10	-	-	-	-	西	柴犬	13歳	オス	去勢	無	有	室内											良好
NagoyaD-11	-	-	-	-	西	シーズー	1歳	オス		有	有	室内											良好
NagoyaD-12	-	B. henselae	-	-	西	雑種	7歳	メス		有	有	室内											良好
NagoyaD-13	-	-	-	-	西	ミニチュアシナウザー	5歳	メス	避妊	有	有	室内											良好
NagoyaD-14	-	-	-	-	西	トイプードル	3歳	不明		無	無	室内	○										良好
NagoyaD-15	-	-	-	-	西	バーニーズマウンテンドッグ	2歳	オス	去勢	無	無	屋外	○	○									良好
NagoyaD-16	-	-	-	-	港	バセットハウンド	6歳	オス		無	無	室内											良好
NagoyaD-17	-	-	-	-	港	ラブラドルレトリバー	11歳	メス	避妊	無	不明	室内											良好
NagoyaD-18	-	-	-	-	港	ボストンテリア	7歳	メス		無	不明	室内		○									良好
NagoyaD-19	-	-	-	-	港	ラブラドルレトリバー	10歳	オス	去勢	無	不明	室内		○									良好
NagoyaD-20	-	-	-	-	港	シーズー	8か月	メス		無	無	室内											良好
NagoyaD-21	-	-	-	-	港	ミニチュアダックス	9歳	オス		無	不明	室内											良好
NagoyaD-22	-	-	-	-	北	ミニチュアダックス	1歳	メス		無	無	室内		○									良好
NagoyaD-23	-	-	-	-	北	シーズー	8歳	メス		無	無	室内	○			○							良好
NagoyaD-24	-	-	-	-	北	ミニチュアシナウザー	8歳	オス		無	無	室内											良好
NagoyaD-25	-	-	-	-	北	ラブラドルレトリバー	9歳	オス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-26	-	-	-	256	北	シェルティー	11歳	メス		無	無	室内											良好
NagoyaD-27	-	-	-	-	北	ミニチュアダックス	8歳	オス	去勢	無	無	室内	○										良好
NagoyaD-28	-	-	-	256	名東	ミニチュアダックス	7歳	メス		有	有	室内				○							良好
NagoyaD-29	-	-	-	256	名東	シーズー	12歳	メス		有	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-30	-	B. henselae	-	-	名東	トイプードル	14歳	メス	避妊	有	有	室内				○							良好
NagoyaD-31	-	-	-	-	名東	ミニチュアシナウザー	12歳	オス		有	有	室内	○			○		○					良好
NagoyaD-32	-	-	-	-	名東	雑種	14歳	メス	避妊	有	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-33	-	B. henselae	-	-	名東	ミニチュアダックス	6歳	オス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-34	-	-	-	-	昭和	雑種	8歳	オス		無	有	室内	○	○				○					良好
NagoyaD-35	-	-	-	-	昭和	バグ	11歳	オス		無	有	室内											良好
NagoyaD-36	-	-	-	-	昭和	パピヨン	9歳	オス	去勢	無	有	室内											良好
NagoyaD-37	-	-	-	-	昭和	ミニチュアダックス	8歳	メス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-38	-	-	-	-	昭和	フラットコートレトリバー	10歳	メス	避妊	無	有	室内		○									不良
NagoyaD-39	-	-	-	-	昭和	ラブラドルレトリバー	11歳	メス		無	有	室内		○									不良
NagoyaD-40	-	-	-	-	瑞穂	ウェルシュコーギー	13歳	オス		無	有	屋外				○							不明
NagoyaD-41	-	-	-	-	瑞穂	キャバリア	12歳	オス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-42	-	-	-	-	瑞穂	スタンダードプードル	1歳	オス	去勢	無	有	屋外				○							良好
NagoyaD-43	-	-	-	-	瑞穂	ラブラドルレトリバー	7歳	オス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-44	-	-	-	-	瑞穂	柴犬	13歳	オス		無	有	室内・屋外				○		○					良好
NagoyaD-45	-	B. henselae	-	-	瑞穂	柴犬	8か月	オス		無	有	室内・屋外	○			○		○					良好
NagoyaD-46	-	-	-	-	千種	柴犬	1歳	メス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-47	-	-	-	-	千種	パピヨン	5歳	オス	去勢	無	有	室内				○							良好
NagoyaD-48	-	-	-	-	千種	ゴールデンレトリバー	12歳	不明		無	有	屋外				○		○					良好
NagoyaD-49	-	-	-	-	千種	不明	11歳	不明		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-50	-	-	-	-	千種	マルチーズ	15歳	オス	去勢	無	有	室内				○							良好
NagoyaD-51	-	-	-	-	千種	グレートピレニーズ	3歳	メス	避妊	無	有	室内	○	○									良好
NagoyaD-52	-	-	-	-	守山	ミニチュアダックス	4歳	メス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-53	-	-	-	-	守山	柴犬	6歳	メス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-54	-	B. clarridgeiae	-	-	守山	ボーダーコリー	7歳	オス		無	有	屋外			○				○				良好
NagoyaD-55	-	-	-	-	守山	ラブラドルレトリバー	7歳	メス	避妊	無	無	室内				○							良好
NagoyaD-56	-	-	-	-	守山	雑種	11歳	メス	避妊	無	無	屋外				○						○	良好
NagoyaD-57	-	-	-	-	守山	雑種	14歳	オス		無	無	屋外	○										良好
NagoyaD-58	-	B. henselae	-	-	守山	ウェルシュコーギー	8歳	オス	去勢	無	無	屋外				○							良好
NagoyaD-59	-	-	-	-	南	ゴールデンレトリバー	3歳	メス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-60	-	-	-	-	南	紀州犬	7歳	オス		無	有	室内				○							良好
NagoyaD-61	-	-	-	-	南	雑種	3歳	オス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-62	-	-	-	-	南	グレートピレニーズ	12歳	メス		無	無	室内				○							良好
NagoyaD-63	-	B. henselae	-	-	南	ラブラドルレトリバー	4歳	メス		無	有	室内											良好
NagoyaD-64	-	B. henselae	-	-	南	ゴールデンレトリバー	2歳	メス	避妊	無	有	室内											良好
NagoyaD-65	-	-	-	-	中川	フレンチブルドック	3歳	オス		有	有	室内				○							良好
NagoyaD-66	-	B. henselae	-	-	中川	ミニチュアダックス	1.8歳	メス	避妊	有	有	室内		○									良好
NagoyaD-67	-	B. henselae	-	-	中川	雑種	10歳	オス		有	有	室内				○							良好
NagoyaD-68	-	B. henselae	-	-	中川	トイプードル	7歳	オス		有	有	室内				○							良好
NagoyaD-69	-	B. henselae	-	-	中川	雑種	14歳	メス	避妊	有	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-70	-	-	-	-	中川	シーズー	9歳	メス	避妊	有	有	室内				○							良好
NagoyaD-71	-	B. henselae	-	-	熱田	シーズー	14歳	メス	避妊	有	有	室内				○							良好
NagoyaD-72	-	B. henselae	-	-	熱田	フレンチブルドック	8歳	メス		有	有	室内	○	○									良好
NagoyaD-73	-	B. henselae	-	-	熱田	マルチーズ	14歳	メス	避妊	有	有	室内				○							良好
NagoyaD-74	-	-	-	-	熱田	ミニチュアシナウザー	9歳	オス	去勢	有	有	室内				○		○					良好
NagoyaD-75	-	-	-	-	熱田	雑種	1歳	オス		有	有	室内				○							良好
NagoyaD-76	-	B. henselae	-	-	中村	マルチーズ	19歳	メス	避妊	有	無	室内		○									良好
NagoyaD-77	-	-	-	-	中村	ゴールデンレトリバー	5歳	メス	避妊	無	無	室内	○	○									良好
NagoyaD-78	-	B. henselae	-	-	中村	雑種	4歳	メス	避妊	無	無	室内	○	○									良好
NagoyaD-79	-	-	-	-	天白	アイリッシュセッター	11歳	オス		無	有	室内											良好
NagoyaD-80	-	B. henselae	-	-	天白		14歳	メス	避妊	無	有	室内	○										良好
NagoyaD-81	-	B. henselae	-	-	天白	柴犬	10歳	オス		無	有	室内											良好
NagoyaD-82	-	-	-	-	天白	シェルティー	3歳	オス		無(ダニ有)	無	室内		○									良好
NagoyaD-83	-	-	-	-	天白	雑種	8歳	メス	避妊	無	有	室内		○									良好
NagoyaD-84	-	-	-	-	中	バグ	6歳	メス		無	有	室内	○	○				○				○	良好
NagoyaD-85	-	-	-	-	中	ボメラニアン	9歳	メス	避妊	無	無	室内				○				○			良好
NagoyaD-86	-	-	-	-	中	パピヨン	9歳	不明		無	有	室内		○				○				○	良好
NagoyaD-87	-	-	-	-	西	チワワ	2歳	オス	去勢	無	無	室内		○									良好
NagoyaD-88	-	-	-	-	西	シベリアンハスキー																	