

ミニ・レビュー —中村賞受賞者—

猫ひっかき病抗体陰性患者からの
Bartonella henselae DNAの検出

柳原正志

山口大学大学院医学系研究科器官病態外科学（外科学第一） 宇部市南小串1丁目1-1（〒755-8505）

Key words : 猫ひっかき病, *Bartonella henselae*, 末梢血, リアルタイムPCR法, 間接蛍光抗体法

和文抄録

猫ひっかき病（Cat-scratch disease, CSD）は *Bartonella henselae*によって引き起こされる人獣共通感染症である。 *B. henselae*は患者からの分離培養が極めて困難であるため、現在のCSDの検査診断は間接蛍光抗体（Indirect fluorescent antibody, IFA）法による抗*B. henselae*抗体価測定（血清学的検査）が標準法である。リンパ節や膿などが得られる場合にはPCR検査（*B. henselae* DNAの検出）も行われる。患者末梢血から*B. henselae* DNAを検出した報告が散見されており、リンパ節生検が適応とならない場合や血清学的検査結果が曖昧な場合には末梢血PCR検査が有用と考えられる。しかし、血清学的検査と末梢血PCR検査の併用の有用性に関する報告はない。そこで、我々は*B. henselae* DNAを高感度に検出するreal-time PCR法を開発し、CSD疑い患者80名（小児73例、成人7例）を対象に、非侵襲的なCSD検査診断における血清学的検査（IFA法）と末梢血PCR検査の併用の有用性を検討した。その結果、17例（21.3%）がIFA法陽性、11例（13.8%）が末梢血PCR検査陽性となり、両者が陽性となったのは6例であった。末梢血PCR検査は単独では感度が十分ではなかったものの、IFA法陰性の7.9%（5/63）の末梢血から*B. henselae* DNAを検出した。このため、IFA法と末梢血PCR検査の併用によって

CSD診断率はIFA法単独の21.3%（17/80）から27.5%（22/80）に向上した。IFA法陰性末梢血PCR検査陽性の5例中4例は発熱とリンパ節腫脹を伴う定型例で、1例はリンパ節腫脹を伴わない不明熱（非定型例）であった。末梢血PCR検査が陽性となる時期は未だ不明であるが、菌血症や菌の分解産物の血中への流入の可能性があるため、発症後の日数に関係なく、積極的に末梢血PCR検査を実施すべきである。以上より、CSD抗体陰性患者の末梢血から*B. henselae* DNAを検出できることが示された。非侵襲的なCSDの検査診断の新たな標準法として、「血清学的検査と末梢血PCR検査の併用」が推奨される。

はじめに

猫ひっかき病（Cat Scratch Disease : CSD）は1950年にDebréら¹⁾の最初の報告以来、ネコが関与する疾病として認識されていたが、病原体が特定されず長い間不明であった。1990年代に細菌性血管腫を伴ったAIDS患者から新種の細菌*Bartonella henselae*が分離されたことがきっかけとなり^{2, 3)}、CSD疑い患者の約90%で抗*B. henselae*抗体が陽性であったこと⁴⁾、CSD患者のリンパ節から直接*B. henselae*が分離されたこと⁵⁾、CSD患者のリンパ節や膿から*B. henselae* DNAが検出されたこと⁶⁾、さらにネコの*B. henselae*菌血症が報告されたこと⁷⁾などの一連の研究を経て、CSDは*B. henselae*による感染症であることが明らかになった。わが国にお

いても1953年の浜口ら⁸⁾の報告以来、600例以上の報告がある⁹⁾。

*B. henselae*の宿主はネコである。感染したネコは通常、無症状で、長期にわたり菌血症を繰り返す¹⁰⁾。ネコ間での本菌の感染は、ネコノミ(*Ctenocephalides felis*)によって媒介される¹¹⁾。通常、ヒトの感染は本菌に感染したネコにひっかかれたり噛まれることによって起こり、局所リンパ節腫脹と発熱を伴った定型的なCSDとなる。また、ネコだけでなく、ノミやイヌからも感染することが明らかとなっている^{12, 13)}。稀に、血行性に菌が広がることで非定型例となり、不明熱、菌血症、心内膜症、脳症や視神経網膜炎、肝・脾肉芽腫を伴った全身性のCSDを引き起こす¹⁴⁻¹⁶⁾。また、HIV感染者などの免疫不全患者では、細菌性血管腫や肝臓紫斑病を惹起する³⁾。全国から我々の施設に寄せられたCSD疑い573例のうち、血清学的に診断し得た188例の成績では、患者の80% (152/188) が小児であり、定型例が62% (116/188)、非定型例が38% (72/188)であった。非定型例の内訳は、不明熱が最も多く(52/72)、視神経網膜炎、急性脳症、肝・脾肉芽腫、パリノー眼腺症候群、顔面神経麻痺、若年性慢性関節リウマチであった¹⁷⁾。このように、CSDは多彩な臨床症状を呈する人獣共通感染症である。

*B. henselae*は患者からの分離培養が極めて困難であるため¹⁸⁾、現在のCSDの検査診断は、間接蛍光抗体(Indirect fluorescent antibody: IFA)法による抗*B. henselae*抗体価測定(血清学的検査)が標準法であり、リンパ節や膿などの生検材料が得られる場合には、PCR検査による確定診断が行われている^{4, 16, 18)}。リンパ節腫脹と発熱を伴うCSDの定型例では、自然治癒傾向があるため、リンパ節切除の必要はなく、また、早期に適切な抗菌薬投与した場合には症状軽減と病期短縮が可能となる¹⁹⁻²¹⁾。そのため、迅速かつ非侵襲的な検査診断が求められており、IFA法による血清学的検査に依存しているのが国内での現状である。CSD患者の末梢血から*B. henselae* DNAを検出した報告が散見されており、リンパ節生検が適応とならない場合や血清学的検査結果が曖昧な場合に末梢血PCR検査が有用と考えられる²²⁻²⁶⁾。しかし、血清学的検査と末梢血PCR検査の併用の有用性に関する報告はない。そこで、非侵襲的なCSD検査診断における血清学的検査(IFA法)

と末梢血PCR検査の併用の臨床的有用性を検討した。

方 法

2009年4月から2014年5月の間(5年1ヵ月間)に、リンパ節腫脹の有無を問わず、発熱があり、ネコまたはイヌとの接触歴のあるCSD疑いの患者80例(小児73例、成人7例)を対象とし、血清学的検査(IFA法)と末梢血PCR検査の両者によるCSD検査診断を実施した。

血清学的検査は、間接蛍光抗体(IFA)法で血清中の抗*B. henselae*抗体価を測定した。抗原には*B. henselae* ATCC49882株で自家調製したものを用いた。IgM用抗原はチョコレート寒天培地上に37°C、5% CO₂下で3~4日間培養した*B. henselae*の菌体のみを菌液を抗原とした。IgG用抗原はRegneryらの方法⁴⁾に準じ、Vero細胞に*B. henselae*を接種し、37°C、5% CO₂下で3日間共生培養したものを抗原とした。IFA法で血清抗体価を測定し、IgM抗体価は1:20倍以上、IgG抗体価は1:256倍以上のいずれかを満たした場合、陽性と判定した。本法の感度は69%、特異度は100%である¹⁶⁾。

末梢血PCR検査は、末梢血からDNAを抽出し、real-time PCR法で*B. henselae*の*virB4*遺伝子の検出を行った^{26, 27)}。QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)を用いて、末梢血200 μLからDNAを抽出した。PCR反応液は、10 μLの2×LightCycler480 Probes Master Mix (Roche Diagnostics)、0.4 μmol/Lの各primer (forward: 5'-AGCGAAGAAAACACAATCTGAA-3', reverse: 5'-TCCATAGCTTTC CAATCCTTCT-3'), 0.1 μmol/LのUniversal ProbeLibrary probe #135 (Roche Diagnostics)、5 μLのDNAを含む20 μLである。LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics)を用いて、95°C 5分の後、95°C 10秒、60°C 30秒、72°C 1秒を45サイクルの反応条件でreal-time PCRを実施した。全て三重測定で行い、Second Derivative Maximum法にて、Crossing point (Cp) 値を決定した。

*B. henselae*の*virB4*遺伝子には3つの遺伝子型が存在するため、primerと加水分解probeの位置は*B. henselae*の共通配列部分かつ近縁の*Bartonella*には多型が存在する部位を選択した(図1)。遺伝子型の異なる*B. henselae*の3菌株、他の*Bartonella*属の

5菌種、そして、ヒトのゲノムDNAを用いて、本法の特異性を検証したところ、*B. henselae*のみに増幅曲線のシグナルを検出し、さらに、PCR反応液の一部を電気泳動したところ、*B. henselae*のみに増幅産物を確認した(図2)。さらに、*B. henselae*と確認済みの56菌株²⁸⁾も全て検出できることを確認している。*B. henselae*の*virB4*遺伝子を組み込んだプラスミドDNAの希釈系列を用いた検量線では4.6コピーまで定量性のある直線が得られた。

結 果

CSD疑い患者80例に対して血清学的検査(IFA法)と末梢血PCR検査を同時に行い、両者の成績を比較したところ、表1のように、80例中17例(21.3%)で血清学的検査(IFA法)が陽性となり、11例(13.8%)で末梢血PCR検査が陽性となった。血清学的検査

(IFA法)と末梢血PCR検査の両者が陽性となったのは6例のみで、血清学的検査(IFA法)陽性17例中11例で末梢血PCR陰性、末梢血PCR陽性11例中5例で血清学的検査(IFA法)陰性となる乖離が見られた。全体では80例中22例(27.5%)がCSDとの診断に至った(表1, 2)。

考 察

IFA法による血清学的検査はCSD検査診断の標準法であるが、特異度は高いものの、感度は低く、必ずしも満足できるものではない。これまで様々な血清学的検査法の開発の試みがなされているものの、現在のところ、IFA法より優れたCSDの検査法は存在しない。そのため、定型例・非定型例を問わず、IgG抗体価の上昇が不十分(1:64~1:128倍; 判定定保留例)で診断に苦慮する場面も少なくない。

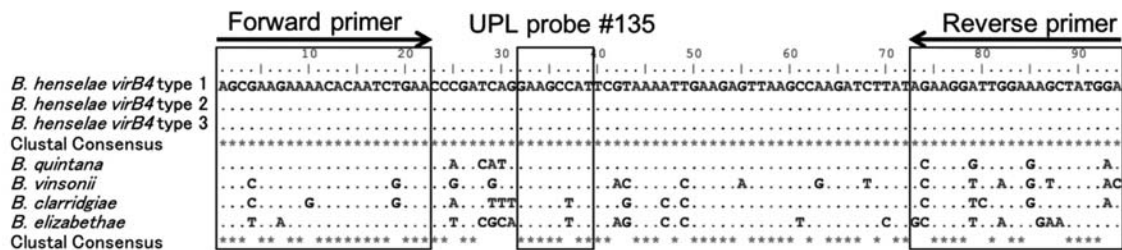


図1 *virB4*遺伝子標的領域の塩基配列の比較

リアルタイムPCR法のprimerと加水分解probeの位置は*B. henselae*の共通配列部分かつ近縁の*Bartonella*には多型が存在する部位を選択した。

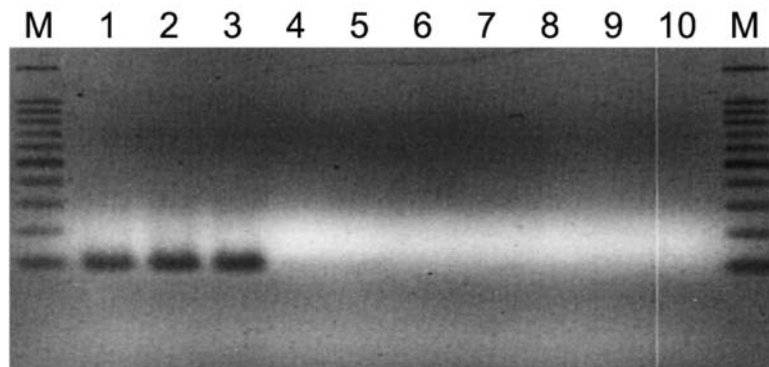


図2 アガロースゲル電気泳動によるリアルタイムPCR増幅産物の確認

リアルタイムPCR法の特異性の確認のため、遺伝子型の異なる*B. henselae*の3菌株、他の*Bartonella*属の5菌種、ヒトのゲノムDNAをそれぞれ添加し、リアルタイムPCR反応を行なった。その増幅産物の一部を3%アガロースゲル電気泳動で分析した。レーン1~3に94bpの増幅産物のバンドを検出した。レーンM: 100-bp DNA ladder, レーン1: *B. henselae* ATCC49882, レーン2: *B. henselae* YC-12, レーン3: *B. henselae* YH-01, レーン4: *B. quintana*, レーン5: *B. vinsonii*, レーン6: *B. clarridgeiae*, レーン7: *B. elizabethae*, レーン8: *B. bacilliformis*, レーン9: human genomic DNA, レーン10: distilled water.

定型例ではリンパ節を切除してPCR検査による確定診断も可能であるが、患者の多くは小児であり、侵襲的処置を伴うため慎重な判断が求められる。一方、非定型例の中で最も多い不明熱では、IFA法による

血清学的検査以外の選択肢はない。我々は血清学的検査 (IFA法) 陰性の非定型例の患者末梢血から *B. henselae* DNAを検出した症例を経験し、末梢血PCR検査の重要性を認識した²⁶⁾。そこで、我々は

表1 CSD疑い患者80例における血清学的検査 (IFA法) と末梢血PCR検査の結果の比較

		末梢血 PCR 検査		総数
		陽性	陰性	
血清学的検査 (IFA 法)	陽性	6	11	17
	陰性	5	58	63
総数		11	69	80

表2 CSDと診断できた22症例の患者背景と血清抗体価, 末梢血PCR検査の結果一覧

患者 No.	年齢/性別	発熱	リンパ節腫脹	動物との 接触歴	血清抗体価		Real-time PCR Cp値 (mean ± SD)	合併症
					IgM	IgG		
1	15/M	+	+	Cat, dog	40	256	NA	
2	4/F	+	-	Cat	20	512	36.82 ± 0.57	不明熱
3	6/F	+	-	Dog	<10	64	33.93 ± 0.39	不明熱
4	13/M	+	+	Cat	<10	256	35.98 ± 0.69	
5	14/F	+	+	Cat, dog	<10	256	34.29 ± 0.43	
6	8/M	+	+	Dog	<10	<64	35.35 ± 0.33	
7	10/M	+	+	Cat	20	256	NA	
8	8/F	+	+	Dog	<10	<64	37.18 ± 0.36	
9	10/M	+	+	Cat	20	256	NA	
10	7/F	+	+	Cat	10	<64	35.64 ± 0.27	
11	2/M	+	+	Cat	40	256	NA	
12	15/M	+	-	Cat, dog	>80	512	NA	視神経網膜炎
13	6/F	+	+	Cat	<10	256	37.29 ± 0.15	
14	10/M	+	+	Cat	<10	256	NA	
15	12/F	+	+	Cat, dog	<10	512	33.55 ± 0.33	
16	13/M	+	-	Cat	<10	512	NA	不明熱
17	9/F	+	+	Cat	<10	<64	34.84 ± 0.47	
18	4/M	+	+	Cat	20	512	NA	
19	14/F	+	-	Dog, rabbit	80	512	NA	視神経網膜炎
20	56/F	+	-	Cat	<10	256	NA	視神経網膜炎
21	35/F	+	+	Cat	40	1024	37.19 ± 0.59	
22	7/M	+	+	Cat, dog	<10	512	NA	

*Cp, crossing point; NA, no amplification; +, positive; -, negative.

CSDの検査診断における血清学的検査（IFA法）と末梢血PCR検査の併用の臨床的有用性について検討したところ、血清学的検査（IFA法）陰性の7.9%（5/63）のCSD疑い患者の末梢血から*B. henselae* DNAを検出した。このため、血清学的検査（IFA法）と末梢血PCR検査の併用によってCSD診断率は血清学的検査（IFA法）単独の21.3%（17/80）から27.5%（22/80）に向上した。血清学的検査（IFA法）陰性末梢血PCR検査陽性となった5例中4例は発熱とリンパ節腫脹を伴う定型例で、残る1例はリンパ節腫脹を伴わない不明熱であった（表2）。確定診断後、速やかにマクロライド系抗菌薬が投与され、解熱した。これらの症例では*B. henselae*に対する抗体が著明に上昇する以前の発症初期であった、もしくは、患者の免疫反応は*B. henselae*に対する抗体産生が不十分であったと考えられる²²⁾。患者血液中から抗体を検出できない場合でも、*B. henselae* DNAが検出できることが示され、末梢血PCR検査の有用性が認められた。

末梢血からの*B. henselae* DNAの検出率を抗体陽性例に限定して過去の報告と比較すると、本検討では35.3%（6/17）で末梢血PCR検査が陽性となったのに対し、19.2%（5/26）の末梢血から*B. henselae* DNAを検出した報告²²⁾や16.7%（3/18）の血清からDNAを検出した報告がある²³⁾。このことから全てのCSD患者において、常に血液中に*B. henselae* DNAが検出できるレベルで存在している訳ではないため、末梢血PCR検査を単独で用いるには感度が十分ではない。末梢血PCR検査が陽性となる時期については未だ不明である。発症3週間後に末梢血から検出した1症例²⁴⁾や感染3-4ヵ月後に末梢血から検出した1症例²⁵⁾の報告がある。本検討では、ほとんどが発症3週間以内に採血された血液を用いた。菌血症や分解された菌のDNA断片の血中への流入の可能性が考えられるため、発症後の日数に関係なく、末梢血PCR検査の積極的な実施が推奨される²⁸⁾。

結 論

猫ひっかき病抗体陰性患者の末梢血から*B. henselae* DNAを検出できることが示された。非侵襲的なCSDの検査診断の新たな標準法として、「血清学的検査と末梢血PCR検査の併用」が推奨される。

謝 辞

長年にわたり親身になってご指導をいただきました常岡英弘先生（山口大学大学院医学系研究科保健学専攻病態検査学教授）に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Debré R, Lamy M, Jammet ML, et al. La maladie des griffes de chat. *Bull Memb Soc Méd Hosp Paris* 1950 ; 66 : 76-79.
- 2) Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, 3rd, et al. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 265-274.
- 3) Welch DF, Pickett DA, Slater LN, et al. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 1992 ; 30 : 275-280.
- 4) Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* 1992 ; 339 : 1443-1445.
- 5) Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, et al. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann Intern Med* 1993 ; 118 : 331-336.
- 6) Anderson B, Sims K, Regnery R, et al. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J Clin Microbiol* 1994 ; 32 : 942-948.
- 7) Regnery R, Martin M, Olson J. Naturally occurring "*Rochalimaea henselae*" infection in domestic cat. *Lancet* 1992 ; 340 : 557-558.
- 8) 浜口英祐, 長野和夫. 猫ひっかき病の1例. 外科 1953 ; 15 : 672-674.
- 9) Tsukahara M. Cat scratch disease in Japan. *J Infect Chemother* 2002 ; 8 : 321-325.
- 10) Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, et al. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats

- associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* 1995 ; **33** : 3245-3251.
- 11) Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, et al. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol* 1996 ; **34** : 1952-1956.
 - 12) Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Ohno K, Murano I. *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet* 1998 ; **352** : 1682.
 - 13) 石田千鶴, 常岡英弘, 飯野英親, 他. 猫・犬寄生ノミの *Bartonella henselae* 感染. 感染症学雑誌 2001 ; **75** : 133-136.
 - 14) Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* 1997 ; **10** : 203-219.
 - 15) Murakami K, Tsukahara M, Tsuneoka H, et al. Cat scratch disease : analysis of 130 seropositive cases. *J Infect Chemother* 2002 ; **8** : 349-352.
 - 16) Tsuneoka H, Tsukahara M. Analysis of data in 30 patients with cat scratch disease without lymphadenopathy. *J Infect Chemother* 2006 ; **12** : 224-226.
 - 17) 常岡英弘, 柳原正志. *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae*. 臨床と微生物 2009 ; **36** : 139-142.
 - 18) La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples : a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 1999 ; **37** : 1899-1905.
 - 19) Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, et al. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1998 ; **17** : 447-452.
 - 20) 塚原正人. バルトネラ感染症 (猫ひっかき病). 小児科 2003 ; **44** : 799-807.
 - 21) 吉田 博, 草場信秀, 佐田通夫. ネコひっかき病の臨床的検討. 感染症学雑誌 2010 ; **84** : 292-295.
 - 22) Tsukahara M, Iino H, Ishida C, et al. *Bartonella henselae* bacteraemia in patients with cat scratch disease. *Eur J Pediatr* 2001 ; **160** : 316.
 - 23) Vermeulen MJ, Diederens BM, Verbakel H, Peeters MF. Low sensitivity of *Bartonella henselae* PCR in serum samples of patients with cat-scratch disease lymphadenitis. *J Med Microbiol* 2008 ; **57** : 1049-1050.
 - 24) Maruyama S, Kabeya H, Nogami S, et al. Three cases of cat scratch disease diagnosed by indirect immunofluorescence antibody assay and/or polymerase chain reaction of 16S rRNA gene of *Bartonella henselae*. *J Vet Med Sci* 2000 ; **62** : 1321-1324.
 - 25) Arvand M, Schad SG. Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. *J Clin Microbiol* 2006 ; **44** : 2288-2290.
 - 26) Kimura S, Hasegawa S, Yanagihara M, et al. Cat-scratch disease with severe pleuritis in a 6-year-old girl. *Pediatr Int* 2015 ; **57** : 501-503.
 - 27) Yanagihara M, Tsuneoka H, Tanimoto A, et al. *Bartonella henselae* DNA in Seronegative Patients with Cat-Scratch Disease. *Emerg Infect Dis* 2018 ; **24** : 924-925.
 - 28) Yanagihara M, Tsuneoka H, Sugasaki M, et al. Multispacer typing of *Bartonella henselae* isolates from humans and cats, Japan. *Emerg Infect Dis* 2010 ; **16** : 1983-1985.

***Bartonella henselae* DNA in Seronegative Patients with Cat-Scratch Disease**

Masashi YANAGIHARA

Department of Surgery and Clinical Science (Surgery I.), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Cat-scratch disease (CSD) is a worldwide zoonosis caused by *Bartonella henselae*. Because isolation of *B. henselae* by culture is difficult, the standard laboratory diagnosis of CSD is serological tests using indirect fluorescent antibody assay (IFA). Detection of *B. henselae* DNA by PCR is also examined when lymph nodes are obtained. Isolation of *B. henselae* DNA from blood specimens of CSD patients has been

sporadically described. However, the usefulness of serological tests, coupled with the detection of *B. henselae* DNA from blood specimens, is not well described. We examined 80 patients with suspected CSD using IFA and real-time PCR (rPCR) on blood specimens, to confirm the clinical utility of the combined use of both assays. Of the 80 patients with suspected CSD, 17 (21.3%) were positive by IFA and 11 (13.8%) were positive by rPCR. Six patients were positive by both assays. CSD detection sensitivity increased from 21.3% (17/80) using IFA alone to 27.5% (22/80) with combined use of IFA and rPCR on blood specimens because *B. henselae* DNA was detected in 7.9% (5/63) of blood specimens from seronegative patients. The combined use of serological tests and rPCR on blood specimens is recommended for the prompt, noninvasive laboratory diagnosis of CSD.

