

日本の飼い猫における新規なヘモプラズマ, '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' 感染の検出

渡辺 征¹⁾ 久末正晴^{1)†} 相馬武久²⁾ 並河和彦¹⁾
瀬川和仁¹⁾ 根尾櫻子¹⁾ 土屋 亮¹⁾

1) 麻布大学獣医学部 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)
2) マルピー・ライフテック(株) (〒563-0011 池田市伏尾町103)

(2010年8月5日受付・2010年10月12日受理)

要 約

新規な猫住血マイコプラズマである '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (CMt) の日本の飼い猫501頭における感染の検出を通常のシングル・ステップPCR法により行ったところ、66例(13.2%)の陽性例を検出した。本PCRの検出感度はCMt DNAの47コピーであった。本研究ではCMt感染猫の66頭中では7歳以上(平均10.7±3.27歳)の加齢猫が48例(72.7%)と多く、高齢の猫のCMt感染率が高かった。海外のCMt感染は常に他のヘモプラズマとの複合感染が多いと報告されたが、本研究では26例(5.2%)のCMt単独感染例を検出し、その他40例は *Mycoplasma haemofelis* (17例) および '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (20例) との複合感染例であり、また3種による3重感染が3例存在した。——キーワード: 猫の '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' 感染, PCR診断。

----- 日獣会誌 64, 150~153 (2011)

猫のヘモプラズマ症は、猫赤血球表面に付着するグラム陰性細菌である *Mycoplasma* の感染により溶血性貧血が発症する疾患である。本邦における猫ヘモプラズマの流行に関しては、*Mycoplasma haemofelis* (Mhf) と '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' (CMhm) の感染が報告されている [1, 2]。いっぽう、'*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (CMt) は2005年に3番目のヘモプラズマとしてスイスの猫から新たに検出、同定された [3]。CMtの猫に対する病原性は低いものとされており、他のヘモプラズマとの重複感染やFeLVおよびFIVとの共感染に依存することが報告されている [4, 5]。海外では大規模なCMt感染の疫学調査 [6-8] が行われているのに対し、日本におけるCMt感染診断は、60頭の猫について実施されたのみである [9]。そこで今回、日本の飼い猫501頭におけるCMt感染の流行状況について新たに開発した通常のPCR法によりCMt感染の検出を試みたので報告する。

材 料 お よ び 方 法

猫症例血液: EDTA・2Kおよびヘパリンにて抗凝固した血液は、麻布大学附属動物病院、一般動物診療施設

およびマルピー・ライフテック(株)より提供されたものを用いた。

PCR法による遺伝子診断: DNAはわれわれが報告した方法に従って猫血液からゲノムDNAを抽出した [2]。CMtの検出系は、既知の16S rRNA塩基配列 (GenBank accession No. DQ157150) を基に設計した特異的フォワード・プライマー (MtrcF3, 5'-TCCTATAGTTCCTCCATCAGACA-3') と他のヘモプラズマと共通配列であるリバース・プライマー (00CB-r1, 5'-ATGGTATTGCTCCATCAGACTTTCG-3') を用いた。他のMhfおよびCMhmの検出は、以前われわれが報告したプライマーを用いて行った [2]。PCR反応は1X PCR buffer, 0.4 μm GeneAmp dNTP mix, AmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (5U/μl, Applied Biosystems, U.S.A.) から成るPCR反応液を作成し、これにゲノムDNAを1 μl加え反応条件として94℃5分間の変性後、94℃45秒, 58.4℃45秒, 72℃45秒を1サイクルとする35サイクルをT-gradientサーマル・サイクラー (Biometra, Analytik GmbH, Germany) を用いてPCRを行った。増幅産物は234bpで、これをTOPO TA PCR2.1ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.)

† 連絡責任者: 久末正晴 (麻布大学獣医学部内科学第2研究室)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

☎・FAX 042-769-1636 E-mail: hisasue@azabu-u.ac.jp

ヘクローニングを行いシーケンスから塩基配列を解析した。

検出感度：PCR法による検出感度を算出するためにCMtのPCR産物を上記ベクターにクローニングした組み換えプラスミド (105ng/μl) を用い、猫ヘモプラズマに非感染の犬の健康血液由来のDNAで10倍連続希釈した。その後各希釈DNAについてCMtのPCRを行い、PCR産物の2%アガロース・ゲル電気泳動によりDNAバンドの見られる最終希釈からDNA濃度を算出した。さらにKibbeのOligoCalcソフトウェアから感染コピー数を算出した [10]。

統計処理：統計処理は、GraphPad PRISM (version 5.01, GraphPad software Inc., Tokyo) を用いてt検定を実施した。結果は危険率0.05以下を持って有意差ありと判定した。

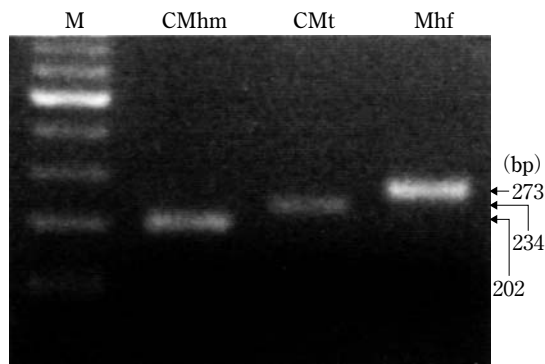
成 績

PCRによるCMt感染の検出：合計501例についてCMt感染の有無を通常のPCR法により検出を試みた。図1aに示すようにCMtのPCRでは、2%アガロース・ゲル電気泳動 (1XTBE) を行って234bpのPCR産物が増幅される場合を感染陽性と判定した。本PCR法による検出感度の検定を行ったところ、図1bに示すように 10^{-7} (0.0105pg) 希釈までDNAバンドが認められた。さらに、増幅された遺伝子産物はCMtの塩基配列と98%の相同性を有していた。KibbeによるOligoCalcソフトウェアを用いて予想増幅DNA長、プラスミド分子量、最大希釈検出濃度から感染検出感度を算出したところ、CMtの最小検出コピー数は血液1μlあたり47コピーであった。

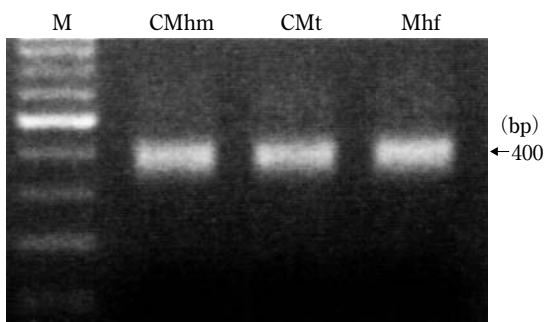
PCRを実施した501例のうち、CMt感染が陽性となったのは66例 (13.2%) であった (表1)。そのうちCMt単独感染は26例 (5.2%) で、その他のヘモプラズマとの重感染はCMtとMhfが17例 (3.4%)、CMtとCMhmが20例 (4.0%)、CMt、Mhf、CMhmによる3重感染が3例 (0.6%) 存在した。いっぽう、CMt以外のヘモプラズマ感染はMhfによるものが49例 (9.8%)、CMhmによるものが72例 (14.4%)、MhfとCMhmによる2重感染が10例 (2.0%) 存在した。その結果、ヘモプラズマ感染陽性数の合計は197例 (39.3%) に認められた。このように最も多いヘモプラズマ感染種はCMhmによるものであり、CMt感染はMhfよりも多数認められた。

ヘモプラズマ感染猫の年齢分布：CMt感染猫の特徴としてはCMt単独感染猫の平均年齢が 9.6 ± 5.2 歳 (n = 26) と高齢猫であった (表1)。いっぽう、Mhf単独感染猫の平均年齢は 4.4 ± 3.9 歳 (n = 36) で、CMhm単独感染猫は 6.4 ± 5.2 歳 (n = 51)、Mhfと

a Panel A : 16S rRNA gene



Panel B : FG3PDH gene



b CMt PCR産物組み込みプラスミドの10倍連続希釈健康犬DNA

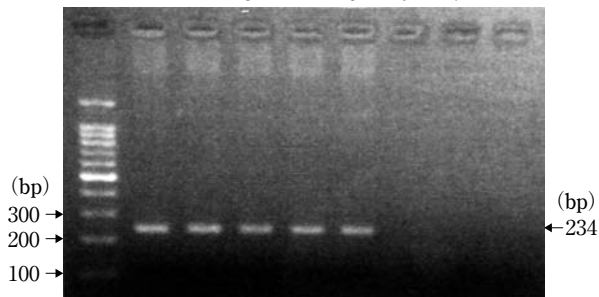


図1 a 猫におけるヘモプラズマ感染のPCR診断の結果を示す。

Panel A : 3種のヘモプラズマそれぞれの16S rRNA遺伝子の増幅を感染と診断する。

Panel B : それぞれの感染猫の内在性遺伝子(G3PDH)の増幅を示す。

b CMt PCRの検出感度はレーン5 ($\times 10^{-7}$ 希釈) までであった。5以外のレーン1~7はそれぞれ $\times 10^{-3}$, $\times 10^{-4}$, $\times 10^{-5}$, $\times 10^{-6}$, $\times 10^{-8}$, $\times 10^{-9}$ 希釈を示す。(M, 100bp DNA ladder marker)

CMhm複合感染猫は 3.3 ± 2.3 歳 (n = 7) であることから、CMt感染は高齢猫に多かった。CMt、MhfおよびCMhmの単独感染の個体群にてt検定を実施したところ、CMt感染猫の年齢は、MhfおよびCMhmに比べて有意に高い傾向を示した (図2)。

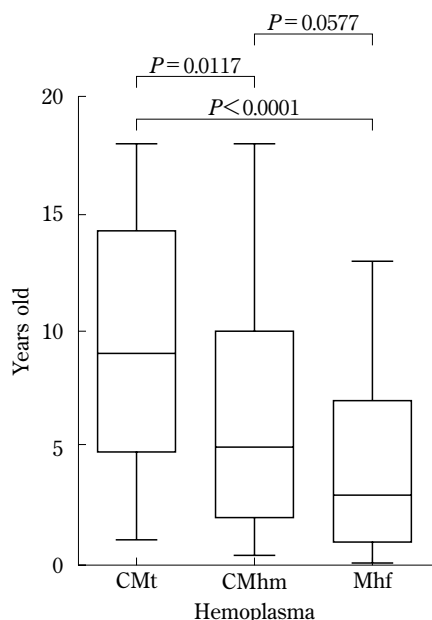


図2 CMt感染猫とその他のヘモプラズマによる感染猫の間の年齢差のt検定。横軸は感染ヘモプラズマ種、縦軸は感染猫の年齢を示す。

表1 日本の飼い猫におけるCMt感染およびその他のヘモプラズマ種による流行状況

ヘモプラズマ感染形態	感染数 (%)	年齢 (歳) [n]
CMt	26 (5.2)	9.6±5.21 [26]
CMt+Mhf	17 (3.4)	6.7±4.2 [17]
CMt+CMhm	20 (4.0)	8.4±3.4 [19]
CMt+Mhf+CMhm	3 (0.6)	7±4 [3]
Mhf	49 (9.8)	4.4±3.9 [36]
CMhm	72 (14.4)	6.4±5.2 [51]
Mhf+CMhm	10 (2.0)	3.3±2.3 [7]
合計	197 (39.3)/501	

CMt, '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'; Mhf, *Mycoplasma haemofelis*; CMhm, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'

考 察

本研究においては、日本の猫501例についてCMtの感染を検討したところ、66例(13.2%)に感染が認められた。海外のCMt感染の流行に関する報告では、Santosら[11]はブラジルの飼い猫371頭のうち17頭(4.6%)にCMt感染を通常PCR法により検出した。また、Williら[8]は713頭中17頭(4.6%)、Sykesら[6]は310頭中20頭(6.5%)のCMt感染陽性猫をいずれもリアルタイムPCRにより検出した。いっぽう、藤原ら[9]はヘモプラズマ感染疑いの猫60頭について解析を実施したところ、6頭(10%)に感染が認められ本報告と類似していた。このように海外におけるCMt感染率は、本報告の11.3%と比べると低い傾向が認め

られた。この理由として、本邦ではヘモプラズマ感染リスクを増大させるFIVおよびFeLVの感染率が高いことが考えられた。また、われわれが今回解析した血液は何らかの臨床症状を示し、動物病院および検査機関にて収集したものであるため、実際の健常個体を含めたすべての飼い猫における感染比率は若干低下することが予想される。

今回われわれは、定性的PCR法によってCMtの検出を行った。われわれの検出系ではCMtの検出感度は47コピー/ μ l血液と高感度であった。他のヘモプラズマに関する報告では、その検出は定量的PCR法により行われている。これら検出系の感度は、1-10コピー/ μ lと定性的PCRより高い傾向を示している[7, 12]。もちろん、定量的PCR法を実施した方が定性的PCR法にて検出できない低寄生率のヘモプラズマ感染を検出できる可能性はある。しかし、定量的PCR法では3つのプライマーを利用して検出を行うため、PCR反応の際にプライマー設計部位に変異があった場合には反応が阻害され、偽陰性となる可能性がある。実際にSykesら[7]の報告のように、定量的PCR法と定性的PCR法の検出感度を比較した場合には、定性的PCR法の方が感度が高かったとの報告もある。しかし、厳密にこれら2つの方法を比較した報告は限られており、今後詳細に検討すべきであろう。

今回、少数ではあるがCMt単独感染の猫の年齢について検討を行ったところ、Mhf単独感染およびCMhm単独感染に比べて有意に高い傾向を示した。残念ながらCMt感染に関する報告はまだ比較的少ないこともあり、CMt感染が高齢猫に比較的多い理由については不明なままである。しかし、2007年にSykesら[7]が報告しているように、Mhfは若齢猫に感染が多いとの成績が示されている。さらに、その理由としてMhf罹患猫では比較的FeLV感染が多いと指摘されている。したがって、CMtやCMhm感染の猫に高齢猫が多いというよりも、むしろ若齢猫におけるMhf感染が多い可能性が高いと推測している。今回の解析では、FIVやFeLVといったレトロウイルス感染まで同時に評価できておらず、さらにFeLV感染と各ヘモプラズマ感染の関連性については明らかにできなかった。今後は、いまだ議論されているCMtの病原性を含めて、FIVやFeLV感染の影響についても検討すべきであろう。

最後に、この研究は、日本私立学校振興・共済事業団の私学助成により著者一同は麻布大学教育動物病院から多数の猫症例血液の提供を受けたことに対し、担当獣医師には深甚なる感謝を申し上げる。

引用文献

- [1] Inokuma H, Taroura S, Okuda M, Hisasue M, Itamo-

- to K, Une S, Nakaichi M, Taura Y : Molecular survey of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' Infection in cats in Yamaguchi and surrounding areas, *J Vet Med Sci*, 66, 1017-1020 (2004)
- [2] Watanabe M, Hisasue M, Hashizaki K, Furuichi M, Ogata M, Hisamatsu S, Ogi E, Hasegawa M, Tsuchiya R, Yamada T : Molecular detection and characterization of *Haemobartonella felis* in domestic cats in Japan employing sequence specific polymerase chain reaction (SS-PCR), *J Vet Med Sci*, 65, 1111-1114 (2003)
- [3] Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland, *J Clin Microbiol*, 43, 2581-2585 (2005)
- [4] George JW, Rideout BA, Griffey SM, Pederson NC : Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats, *Am J Vet Res*, 63, 1172-1176 (2002)
- [5] Willi B, Tasker S, Boretti FS, Doherr MG, Cattori V, Meli ML, Lobetti RG, Malik R, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R : Phylogenetic analysis of *Candidatus Mycoplasma turicensis* isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection, *J Clin Microbiol* 44, 4430-4435 (2006)
- [6] Sykes JE, Terry JC, Lindsay LL, Owens SD : Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis, *J Am Vet Med Assoc*, 232, 372-379 (2008)
- [7] Sykes JE, Drazenovich NL, Ball LM, Leutenegger CM : Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats, *J Vet Intern Med*, 21, 685-693 (2007)
- [8] Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V, Meli ML, Reusch CE, Lutz H, Hofmann-Lehmann R : Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland, *J Clin Microbiol*, 44, 961-969 (2006a)
- [9] Fujihara M, Watanabe M, Yamada T, Harasawa R : Occurrence of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' infection in domestic cats in Japan, *J Vet Med Sci*, 69, 1061-1063 (2007)
- [10] Kibbe WA : OligoCalc : an online oligonucleotide properties calculator, *Nucleic Acids Research*, 35, 43-46 (2007)
- [11] Santos AP, Messick JB, Biondo AW, Oliveira ST, Pedralli V, Lasta CS, Lacerda LA, Esteves VS, Hofmann-Lehmann R, Willi B, Gonzalez FH : Design, optimization of a conventional PCR assay with an Internal control for detection of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' 16S rRNA in domestic cats from Brazil, *Vet Clin Pathol*, 38, 443-452 (2009)
- [12] Peters IR, Helps CR, Willi B, Hofmann-Lehmann R, Tasker S : The prevalence of three species of feline haemoplasmas in samples submitted to a diagnostics service as determined by three novel real-time duplex PCR assays, *Vet Microbiol*, 126, 142-150 (2008)

Detection of New Hemoplasma 'Candidatus Mycoplasma turicensis' Infection in Domestic Cats in Japan

Masashi WATANABE *, Masaharu HISASUE †, Takehisa SOMA, Kazuhiko NAMIKAWA, Kazuhito SEGAWA and Ryo TSUCHIYA

* Laboratory of Internal Medicine II, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 252-5201, Japan

SUMMARY

A novel feline hemoplasma strain, the 'Candidatus Mycoplasma turicensis' (CMt) infection, was detected in 66 out of 501 (13.2%) domestic cats in Japan using conventional single-step PCR. The sensitivity of this PCR was estimated to be 47 copies/ μ l of CMt. In the present study, 72.7% of the 66 CMt-infected cats were over 7 years old (mean : 10.7 ± 3.27 years old), meaning that CMt infection was frequently seen in older cats. Previous reports on CMt infection stated that it was coinfecting with other hemoplasma species, but we detected 26 single infections (5.2%) of the CMt strain. The other 40 CMt-infected cats were coinfecting : 20 with C.M. haemominutum and 17 with *M. haemofelis*, and the three remaining CMt-infected cats had triple infections.

— Key words : Feline 'Candidatus M. turicensis' infection, PCR diagnosis.

† Correspondence to : Masaharu HISASUE (Laboratory of Internal Medicine II, School of Veterinary Medicine, Azabu University)

1-17-71 Fuchinobe, Sagamihara, 252-5201, Japan

TEL · FAX 042-769-1636 E-mail : hisasue@azabu-u.ac.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 64, 150 ~ 153 (2011)