

4. Kaibu H, Ando S, Iida K, Ueki S, Ehara Y, Shimazaki Y, Watanabe Y, Anzai H, Takebe W, Muta T, Kusaba T, Kishimoto T: Psittacosis occurred in all the four family members in Nagasaki City, Japan. JJID (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

I. その他
なし。

平成 18 年度厚生労働科学研究補助金（新興・再興感染症研究事業）分担研究報告書

動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究（主任研究者 吉川泰弘）

伴侶動物由来バルトネラ症に関する研究

分担研究者 丸山総一 日本大学生物資源科学部 教授

研究要旨

東京都、神奈川県、静岡県の犬および猫の *Bartonella* 属菌感染状況を検討したところ、犬の 146 頭中 2 頭（1.4%）、猫の 169 頭中 4 頭（2.4%）から *Bartonella* 属菌が分離された。2 頭の犬から分離された 4 株はいずれも *B. clarridgeiae*、4 頭の猫から分離された 13 株のうち、3 頭から分離された 8 株は *B. henselae*、1 頭から分離された 5 株は *B. clarridgeiae* であった。また、犬から *B. vinsonii subsp. berkhoffii*、*B. clarridgeiae* に対する抗体は検出されなかったが、159 頭中 1 頭（0.6%）で *B. henselae* に対する抗体が検出された。猫の *B. henselae* に対する抗体陽性率は 145 頭中 28 頭（19.3%）であった。

B. henselae の主要抗原蛋白の熱ショック蛋白質 GroEL 蛋白(58kDa)の組換え蛋白 (rGroEL 蛋白)を作製し、その血清診断用抗原としての有用性について検討した。*B. henselae* の GroEL 抗原が全ての感染猫血清に認識されたことから、猫における *B. henselae* 感染の血清診断用抗原として有用であることが示唆された。しかしながら、*B. henselae* 組換え rGroEL/GST と *C. burnetii* 組換え rGroEL/GST を抗原として用いた ELISA 吸光度の相関性は低く *B. henselae* rGroEL/GST の診断用抗原としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

Bartonella vinsonii subsp. berkhoffii は犬を、*B. henselae*、*B. clarridgeiae* は猫を自然病原菌とする *Bartonella* 属菌で、人に対してはそれぞれ心内膜炎や猫ひっかき病を起こすことが知られている。本年度は、東京都、神奈川県、および静岡県の犬および猫における *Bartonella* 属菌の感染状況を細菌学的・血清学的に検討した。

また、猫ひっかき病 (Cat-Scratch Disease ; CSD) の血清診断には間接蛍光抗体 (IFA) 法が用いられている。しかしながら、手技や判定が煩雑であり、また、*Chlamydia* 属、*Coxiella* 属などの近縁の病原体との交差反応も報告されていることから、より簡便で特異的な診断方法の開発が望まれている。これまでの研究から、*B. henselae* の熱ショック蛋白質の一つである GroEL は、実験感染猫の抗体と最も強く

反応する主要抗原蛋白の一つであることが明らかとなっている。そこで、本研究では *B. henselae* の組換え GroEL 蛋白を作製し、その血清診断用抗原としての有用性について検討した。

B. 研究方法

【材料および方法】

1. 犬および猫検体

2004 年から 2005 年に東京都、神奈川県、および静岡県の動物病院において、犬の血液 146 検体、猫の血液 169 検体、および、犬の血清 159 検体、猫の血清 145 検体を採材し実験に供試した。

2. *Bartonella* 属菌の培養方法

冷凍保存していた犬および猫の血液は、室温で解凍、溶血させた後、3,700 回転、70 分間遠心分離した。その上清を取り除き、沈渣に *Bartonella* 培養用

に調整した Medium199 を 120 μ l 添加し、充分攪拌した。その 200 μ l をそれぞれ 2 枚の 5% 兎血液加ハートインフュージョン寒天培地に塗抹した後、35°C、5%CO₂ 条件下で 2~4 週間培養した。培地上に発育した *Bartonella* 属菌を疑うコロニーについてそれぞれ 1~5 株を釣菌し、純培養した。純培養した株については、16S-23S rRNA 遺伝子間領域における種特異的 PCR および、犬分離株についてはさらに *gltA* 遺伝子領域における DNA シークエンスにより菌種の同定を行った。

3. *Bartonella* 属菌の抗体検出法

犬血清は *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* (ATCC51672)、*B. henselae* (ATCC49882)、*B. clarridgeiae* (ATCC51734) を、猫血清は *B. henselae* (ATCC49882) をそれぞれ抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA 法) により IgG 抗体価を測定した。血清は 56°C、30 分間非働化した後、10% スキムミルク加 PBS で 32 倍~512 倍まで 2 倍階段希釈した。スライドガラス上の抗原と希釈した血清をモイスチャーボックス内で、37°C、40 分間反応させた。反応後、冷 PBS で 5 分間洗浄した後、PBS で 400 倍に希釈した二次抗体 (FITC 標識抗ヒト IgG-ヤギ IgG) と 37°C、40 分間反応させた。反応後、冷 PBS および精製水で洗浄した後、グリセリンで封入し、蛍光顕微鏡で観察した。特異蛍光を示した最も高い希釈倍率を抗体価とした。

4. *Bartonella henselae* 組換え GroEL 蛋白の作製法

B. henselae (Houston-1 株; H-1) の *groEL* 遺伝子を p-GEX-4T-1 ベクターに挿入し、大腸菌 (BL21 株) を用いて発現させた。発現した *B. henselae* GST 融合蛋白質 (*B. h.* rGroEL/GST) をアフィニティークロマトグラフィーで精製したものと、*B. henselae* の H-1 株と I6-1 株の可溶化菌体抗原の抗原性をウエスタンブロッティング (WB) および ELISA により比較・検討した。WB の一次血清には CSD 人血清 12 検体 (IFA 抗体価: 64~512 倍)、*B. henselae* 実験感染猫 6 検体 (同: 4,096 倍)、同自然感染猫 4 検体 (同: 64~512 倍) を、ELISA の一次血清には *B. henselae* 自然感染猫血清 12 検体 (同: 64~1,024 倍)、非感染猫血清 16 検体 (同: 32 倍以下) を用いた。さらに、Q 熱感染の類症鑑別のため、*Coxiella burnetii* の組換え GroEL 蛋白を作製し、ELISA 抗原として用い、*B. henselae* 感染猫血清との交差反応を検討した。

C. 研究結果および考察

1. *Bartonella* 属菌感染状況

分離培養では、犬の 146 頭中 2 頭 (1.4%) からわが国で初めて *B. clarridgeiae* が分離された (表 1)。また、猫の 169 頭中 4 頭 (2.4%) が *Bartonella* 属菌陽性で、3 頭から *B. henselae*、1 頭から *B. clarridgeiae* が分離された (表 2)。

犬からは *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii*、*B. clarridgeiae* に対する抗体は検出されなかったが、1 頭 (0.6%) から *B. henselae* に対する抗体が検出された (表 3)。猫の *B. henselae* 抗体陽性率は 19.3% (28/145 頭) で、ノミ寄生猫の抗体陽性率 (40%) は、ノミ寄生陰性猫の抗体陽性率 (15.3%) に比べ、有意に高い値であった ($P < 0.05$) (表 4)。

近年、猫ひっかき病の発症に猫が関与していない事例や犬が関与した事例なども報告されており、さらにその病態も様々であることが明らかとなってきた。今回、低率ではあるが 2 頭の犬の血液から *B. clarridgeiae* が分離されたことから、今後 *Bartonella* 感染症の犬の役割を解明するとともに、さらにダニ、ノミなどの節足動物の寄生との関係を明らかにする必要があると思われる。

また、猫の *Bartonella* 属菌の保菌率は 2.4% であったが、保菌率は 19.3% と高く、特にノミの寄生を受けている猫では 40% が陽性を示した。従って、猫ひっかき病の病原巣となる猫の割合を抑えるためには、猫ノミのコントロールが重要であると考えられる。

2. 組換え GroEL 蛋白の抗原性

ウエスタンブロット法 (WB) を用いて CSD 人血清 (12 検体)、*B. henselae* 実験感染猫血清 (6 検体)、自然感染猫血清 (4 検体) で検出される *B. henselae* (H1 株、I6-1 株) の抗原を検討した。その結果、人血清と *B. henselae* 菌体を抗原とした WB では、各血清により 28~84kDa の異なる抗原バンドが検出されたが、共通したバンドは認められなかった (図 1)。

猫血清を用いた WB では、両菌株の菌体抗原の間に 28kDa と 58kDa の共通した抗原バンドが検出されたことから、猫の *B. henselae* 感染に対する血清診断用抗原としてこれらの抗原蛋白質が有用であることが示唆された (図 2)。

B. henselae (H-1 株) の *groEL* 遺伝子を p-GEX-4T-1 ベクターに挿入し、大腸菌を用いて発現させた *B. henselae* rGroEL と *B. henselae* の可溶性菌体の抗原を ELISA で比較・検討した。ELISA には *B. henselae* に自然感染した猫の血清 (12 検体)、非感染猫血清 (16 検体) を用いた。さらに、*Coxiella burnetii* の組換え GroEL 蛋白を作製し、ELISA で *B. henselae* rGroEL との交差反応を検討した。*B. henselae* rGroEL 抗原を用いた ELISA では、感染猫血清の吸光度値 (0.315~1.156) は非感染猫血清の吸光度値 (0.099~0.659) と比較べて有意に高い値を示した (図 3)。これより、*B. henselae* rGroEL が ELISA 用診断抗原として応用できる可能性が示唆された。また、*C. burnetii* rGroEL と *B. henselae* rGroEL との ELISA 吸光度値の相関性は低く ($R^2=0.412$)、*B. henselae* rGroEL の診断用抗原としての特異性が高いことも示唆された。

D. 結論

今回、分離培養では、1.4%と低率ではあるが、わが国の犬から初めて *B. clarridgeiae* が分離された。また、猫の 169 頭中 4 頭 (2.4%) が *Bartonella* 属菌陽性で、3 頭から *B. henselae*、1 頭から *B. clarridgeiae* が分離された。猫の *B. henselae* 抗体陽性率は 19.3% (28/145 頭) であったが、特にノミ寄生猫の抗体陽性率 (40%) は、ノミ寄生陰性猫の抗体陽性率 (15.3%) に比べ、有意に高い値であった ($P < 0.05$)。近年、発症に猫が関与していない事例や犬が関与した事例なども報告されており、さらにその病態も様々であることが明らかとなってきた。したがって、伴侶動物が関与する *Bartonella* 症の予防対策をする上で、継続的なサーベイランスとベクターとなる猫ノミのコントロールが予防上重要である。

IFA 法に代わる簡便で特異的な血清診断法として、*B. henselae* の主要抗原蛋白の熱ショック蛋白質 GroEL 蛋白の組換え蛋白 (rGroEL 蛋白) が、猫における *B. henselae* 感染の血清診断用抗原として有用であることが示唆された。また、今後より特異性の高い診断抗原の開発と人の猫ひっかき病診断用抗原の開発が重要であると思われた。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chomel, B B., Boulois, H-J, Maruyama, S. and Breitschwerdt, E. B. 2006. *Bartonella* spp. in pets and effect on human health. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 389-394.
- 2) Chang, C-C., Lee, C-C, Maruyama, S., Lin, J-W., and Pan, M-J. 2006. Cat scratch disease in veterinary associated populations and in its cat reservoir in Taiwan. *Vet. Res.* 37: 565-577.
- 3) Kabeya, H., Sase, M., Yamashita, M. and Maruyama, S. 2006. Predominant T helper 2 immune responses against *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *Microbiol. Immunol.* 50: 171-178

2. 学会発表

- 1) 永野美由紀, 壁谷英則, 小野原 望, 丸山総一 (2006) : *Bartonella henselae*組換えGroELの血清診断用抗原としての検討, 第141回日本獣医学会 (茨城, 日生研)
- 2) Kabeya, H. and Maruyama, S. 2006. Cytokine production profiles in the experimentally *Bartonella henselae* infected cats. Joint meeting American society of Rickettsiology (USA).
- 3) Maruyama, S. and Kabeya, H. 2006. Situation of *Bartonella* infection in Japan: from humans to rodents. Symposium on Bartonellae as emerging zoonoses and emerging pathogens. (School of Veterinary Medicine, UC Davis and the WHO/PAHO collaborating center on new emerging zoonoses).

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1. 犬における *Bartonella* 属菌の保菌状況

地域	検体数	陽性数 (%)
東京都	96	2 (2.1) *
静岡県	50	0
計	146	2 (1.4)

*分離株は全て *B. clarridgeiae*

表 2. 猫における *Bartonella* 属菌の保菌状況

地域	検体数	陽性数 (%)
東京都	99	2 (2.0)
静岡県	50	0
神奈川県	20	2 (10.0)
計	169	4 (2.4) *

* 3 頭は *B. henselae*, 1 頭は *B. clarridgeiae* の感染

表 3. 犬における *Bartonella* 属菌に対する抗体保有状況

地域	検体数	陽性数 (%)		
		<i>B. henselae</i>	<i>B. clarridgeiae</i>	<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>
東京都	96	0	0	0
静岡県	50	1 (2.0)	0	0
神奈川県	13	0	0	0
計	159	1 (0.6)	0	0

表 4. 猫のノミ寄生と *B. henselae* 抗体保有状況の関係

寄生	検体数	陽性数 (%)
寄生あり	25	10 (40) *
寄生なし	98	15 (15.3)
不明	22	3 (13.6)
計	145	28 (19.3)

(* P<0.05)

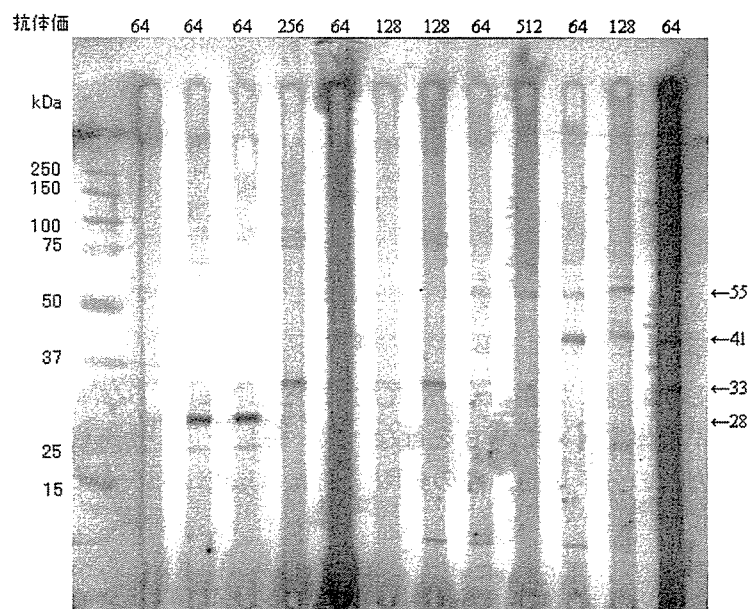


図 1. CSD 人血清と *B. henselae* (H-1 株) 菌体抗原を用いた WB

B. henselae (Houston-1 株) 菌体を抗原とし、CSD 陽性人血清を用いて WB を行なった。各レーンの上部の数値は IFA 抗体価を、左の数値は分子量マーカーの分子量を、右の数値はいくつかの検体から共通して得られた抗原バンドの分子量と位置を示す。

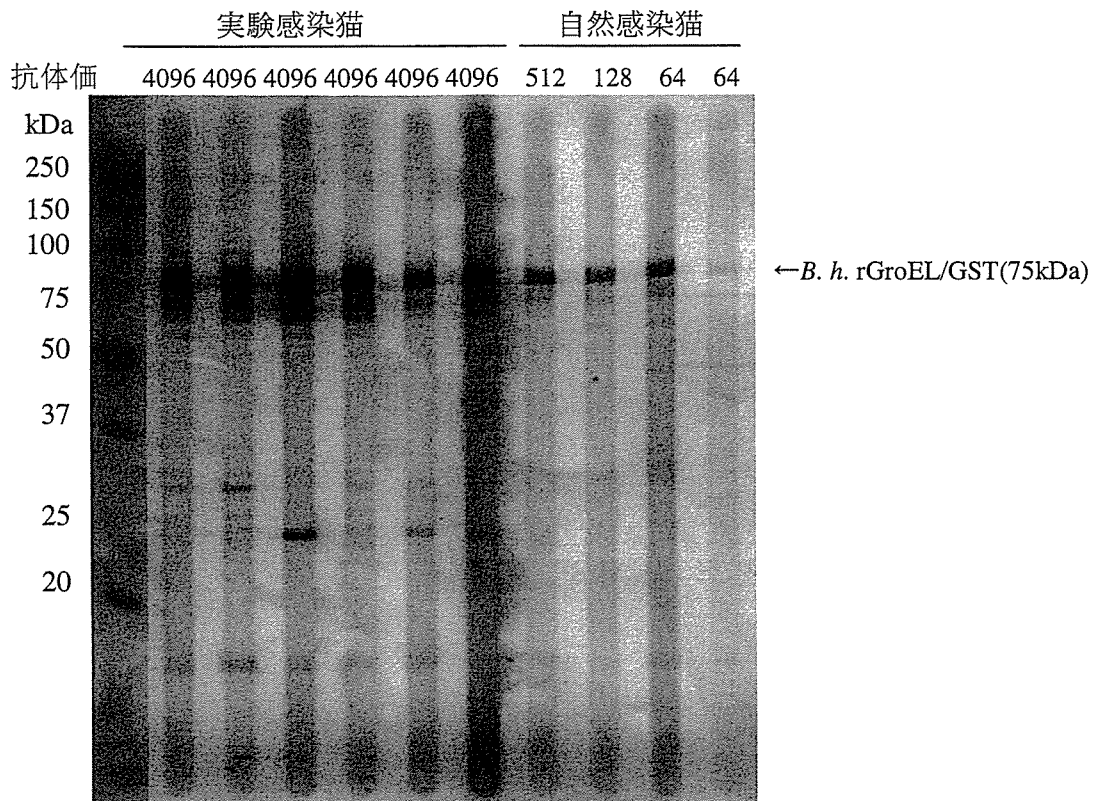


図2. IFA 陽性猫血清と *B. h.* rGroEL/GST 抗原を用いた WB

アフィニティークロマトグラフィーにより精製した *B. h.* rGroEL/GST を抗原とし、*B. henselae* 実験感染猫血清 6 検体、自然感染猫血清 4 検体を用いて WB を行なった。各レーンの上部の数値は IFA 抗体価を、左の数値は分子量マーカーの分子量を、右の矢印は *B. h.* rGroEL/GST をそれぞれ示す。

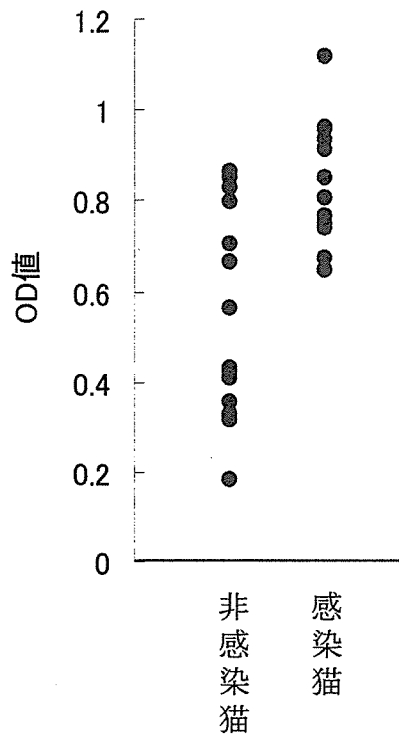


図3. 可溶化菌体抗原を用いた ELISA

B. henselae 自然感染猫血清 12 検体 (IFA 抗体価: 64~1,024 倍) および非感染猫血清 16 検体 (IFA 抗体価: 32 倍以下) をそれぞれ 160 倍に希釈し, 可溶化菌体抗原 (1 μ g/ml) を用いて ELISA を行なった。左の集団は非感染猫血清を, 右の集団は感染猫血清を, 縦軸は ELISA 吸光度値を示す。

研究協力報告書

動物由来感染症コントロール法の確立に関する研究

伴侶動物等に由来する真菌症等の診断, 予防法に関する研究

研究協力者 佐野文子 千葉大学真菌医学研究センター 助教授

研究要旨

1) 我が国のヒトとイヌのヒストプラズマ症の分子疫学: 高度病原性真菌症ヒストプラズマ症の原因菌 *Histoplasma capsulatum* は宿主や発症地域により 3 variety に分けられているが, 分子疫学的に地域多型はあるものの, variety に則した遺伝子型はないとするのが世界的通念となっている。今回, ribosomal RNA ITS 領域配列に基づいた樹系解析により, 6 つのクラスターに分けられ, そのうちの 1 つは var. *capsulatum* と var. *farcimosum* の混在するクラスターが存在することが証明された。我が国で発症しているイヌおよび渡航歴の無いヒト症例はこの遺伝子型による感染であった。よって, 旧来ウマ科動物にのみ感染し, 家畜伝染病予防法で届け出伝染病に指定されている仮性皮疽の原因菌と定義されていた var. *farcimosum* はウマに限らず, ヒト, イヌに感染することが示唆された。通常, 皮膚糸状菌症以外は真菌症で接触感染による感染は特殊な場合を除いて否定されている。しかし, ウマでのヒストプラズマ症は接触感染による強い伝播が知られているため, 感染した動物との接触によるヒトおよび他の動物個体への感染は否定できない。現在, ヒストプラズマ症は感染症法で指定された感染症ではないが, 我が国に存在する最も危険度の高い真菌感染症として, 全数の把握は急務と考えられ, 動物の場合, 淘汰措置も必要と考える。

2) 愛玩動物における新興真菌症の発生状況: 高度医療, 高齢化は愛玩動物でも同様で, これに伴って *Candida albicans* 以外で発症するカンジダ症, 稀な菌種による真菌感染症が報告されるようになってきた。世界的および我が国で報告された菌種について調査したところ, 我が国でも稀な菌種による真菌症は近年多く報告されるようになってきている。高齢や免疫機能の低下した飼育者の場合, 接触, 咬傷事故, ひっかき事故などによる直接感染が懸念された。

3) 水族館で飼育されているイルカの呼気に含まれる病原性酵母の保有率とその分離株の薬剤感受性: 沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカ20頭の呼気に含まれる病原性酵母を調査したところ, 14頭から病原性酵母が分離され, 半数は *Candida albicans* 以外であり, *C. albicans* を含めて薬剤抵抗性株が多く分離された。また, 1呼気あたり数百個の集落が分離された個体も4頭含まれていたことから, 飼育プールでのイルカとの接触やショーを観覧するとき, 高齢者, 免疫疾患を持つ場合の注意書きなどが必要と思われた。

- | | |
|---|---|
| 1. 我が国のヒトとイヌのヒストプラズマ症の分子疫学 | 知られている <i>H. capsulatum</i> variety <i>capsulatum</i> , ア |
| A. 研究目的 | フリカに限局して分布する <i>H. capsulatum</i> var. |
| 高度病原性真菌症ヒストプラズマ症の原因菌 | <i>duboisii</i> , ウマ科動物に限って感染し, 世界各国に |
| <i>Histoplasma capsulatum</i> は宿主や発症地域により | 分布する <i>H. capsulatum</i> var. <i>farcimosum</i> の 3 |
| 世界各国に分布し, ヒトおよび各種動物で感染が | variety に分けられているが, 分子疫学的に地域 |

多型はあるものの、variety に則した遺伝子型はないとするのが世界的通念となっている。一方、最近の真菌の分類は ribosomal RNA ITS 領域配列に基づいた樹系解析により分類することが便宜上優れているため、この領域での分類を再検討する動向もある。今回、我が国のイヌ症例から検出された遺伝子型と、海外渡航歴の無い、もしくは流行地への渡航歴の無いヒト症例分離株由来の遺伝子型および千葉大保存株の *H. capsulatum* 株を加えて、ribosomal RNA ITS 領域配列に基づいた樹系解析をおこなって、我が国土着のヒストプラズマ原因菌の遺伝子型を解析することを目的とした。

B. 研究方法

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) のデータベースより *Ajellomyces capsulatus* (*H. capsulatum* の有性型の名称) の ribosomal RNA ITS 領域配列のデータをダウンロードし、Clustal X によりアライメントをとり、PAUP v4.0b10 により最大節約法に沿った系統樹を探査し、TreeView により系統樹を作製した。これらの中にはイヌ症例から検出した配列確実に菌分離を伴い、渡航歴などから国内感染であることが証明されている 3 症例由来株の配列を含む。

C. 研究成果

H. capsulatum の ribosomal RNA 遺伝子 ITS 領域の遺伝子型は 6 つのクラスターに分けられ、おもに *H. capsulatum* var. *capsulatum* と同定された菌株由来の配列からなるクラスターが 4 種、*H.*

capsulatum var. *duboisii* からなるクラスターが 1 種、ともう 1 種は *H. capsulatum* var. *capsulatum* と *H. capsulatum* var. *farcinosum* の混在するクラスターが存在することが証明された(図1)。

我が国で発症しているイヌおよび渡航歴の無いヒト症例はこの遺伝子型による感染であった。

D. 考察

Ribosomal RNA ITS 領域配列に基づいた樹系解析で、*H. capsulatum* var. *capsulatum* と *H. capsulatum* var. *farcinosum* の混在するクラスターの解釈を、*H. capsulatum* var. *farcinosum* がウマ科動物だけではなく、ヒトやイヌにも感染を起こす遺伝子型であると解釈することにより、variety に則した遺伝子型が有ると考えられた。

H. capsulatum var. *farcinosum* は、旧来ウマ科動物にのみ感染し、家畜伝染病予防法で届け出伝染病に指定されている仮性皮疽の原因菌と定義されていたが、この遺伝子型はウマに限らず、ヒト、イヌに感染することが示唆された。

通常、皮膚糸状菌症以外は真菌症で接触感染による感染は特殊な場合を除いて否定されている。しかし、ウマでのヒストプラズマ症は接触感染による強い伝播が知られているため、感染した動物との接触によるヒトおよび他の動物個体への感染は否定できない。現在、ヒストプラズマ症は感染症法で指定された感染症ではないが、我が国に存在する最も危険度の高い真菌感染症として、全数の把握は急務と考えられる。

E. まとめ

ヒストプラズマ症はヒト、イヌともに国内で発症している最も危険度の高い病原性真菌による感染症で、接触感染伝播の危険性も否定できないことから、本症を全数把握感染症に取り上げてほしい。

F. 健康危険情報

2007年3月15日までのヒト症例は54症例で、確実に菌分離を伴い、渡航歴などから国内感染であることが証明されているのは3例である。またイヌ症例7例が報告されているが全て国内感染で、東京都が4例を占めた(表1)。ウマで仮性皮疽と診断されれば、その飼育群は全頭淘汰である。イヌでも同様の処置が必要かもしれない。まず、イヌでの診断基準の設定が必要である。菌分離・同定による診断が確定診断となるが、このような例は今までに報告されていない。よって、病理組織所見と、PCRによる遺伝子検出およびその配列決定により確定診断となると考えられた。感染拡大の防止策として、少なくとも、発症個体の隔離飼育は必要である。

2. 愛玩動物における新興真菌症の発生状況

A. 研究目的

高度医療、高齢化は愛玩動物でも同様で、これに伴って *Candida albicans* 以外で発症するカンジダ症、希な菌種による真菌感染症が報告されるようになってきた。そこで世界的および我が国で報告された愛玩動物における新興真菌症原因菌の菌種

について文献的検索をおこない、その発生状況を推測するための基礎データとすることを目的とした。

B. 研究方法

ヒトで掲げられている新興真菌症原因菌種をキーワードに PubMed, google, 医中誌などで検索したほか、現在症例発表準備中のものも含めて検索した。

C. 研究成果

表2に示した。

D. 考察

希な菌種による真菌感染症はその原因菌の同定、治療方針の決定が難しいばかりでなく、動物の場合、特殊な例として、ひっかき事故により感染することが知られている菌種もある。さらに全身感染に波及することが知られている菌種による症例も報告されていることから、動物が皮膚症状だけにとどまっている場合でも、飼育管理上の注意は重要である。

また、*Candida albicans* 以外で発症するカンジダ症は耐性菌が多いことが知られ、飼育管理上問題となる。特に、尿路感染では糞尿の処理時に直接触れる危険性があり、手荒いが不十分な場合、感染源となる。高齢や免疫機能の低下した飼育者の場合、接触、咬傷事故、ひっかき事故などによる直接感染が懸念された。

E. まとめ

新興真菌症を発症した動物はたとえ症状が皮膚に限局している場合でも、咬傷事故、ひっかき事故などによる直接感染が懸念されるため、前項のヒストプラズマ症もう含めて、原因菌の特定と飼育管理には厳重な注意が必要である。

F. 健康危険情報

現在のところ我が国では咬傷事故、ひっかき事故による新興真菌症の症例は報告されていないが、海外では報告されている。

3. 水族館で飼育されているイルカの呼気に含まれる病原性酵母の保有率とその分離株の薬剤感受性

A. 研究目的

沖縄美ら海水族館のイルカショーはとても人気があり、毎日多数の観客が訪れているばかりでなく、他の水族館も含めて、イルカとのタッチなど、至近で接触するチャンスも多い。また、近年、水族館で飼育されているイルカも真菌症により命を落とすことが知られるようになってきた。

そこで、イルカからの真菌感染の危険性を調査するにあたり、沖縄美ら海水族館は国家施設であり、研究もおこなっていることから同館を選び、直接呼気を浴びることが最もイルカ由来の真菌症が発生しやすい感染ルートと考え、呼気に含まれる病原性酵母の菌種とその薬剤感受性を調べた。

B. 研究方法

沖縄美ら海水族館で飼育されているイルカ 20 頭の呼気に含まれる病原性酵母を調査した。調査は 2006 年 7 月 31 日から 8 月 3 日の間におこなった。イルカの噴気孔の直上 40 センチメートルのところ、に真菌培養用のシャーレを保持し、1 呼気あたり 1 枚のシャーレを用い、4 呼気から得られた集落数、分離された病原性酵母の同定および薬剤感受性試験を行った。

C. 研究成果

20 頭中 14 頭から病原性酵母が分離され、また、1 呼気あたり数百個の集落が分離された個体も 4 頭含まれていた。分離株の半数は *Candida albicans* 以外であり、*C. albicans* を含めて薬剤抵抗性株が多く分離された(表 2, 3)。

D. 考察

観客席ではイルカが噴気をあげると、独特な臭気が漂うことがあることから、呼気の一部が観客席まで流れていることが示唆された。

解剖学的構造上、イルカの呼気には肺だけでなく、食道、口腔内の粘膜を通過した空気も流れ出ている。今回の呼気に含まれていた病原性酵母は呼吸器だけでなく消化器系に常在している菌が反映されているかもしれないが、病原性酵母を多数噴出している個体が飼育されているのは事実である。

ヒトの場合、健常者でも 3 割程度は病原性酵母を口腔内に保持していることが知られているが、今回調査したイルカでは 7 割の個体が病原性酵母保有陽性であった。飼育環境でのイルカのストレスを反映しているかもしれない。

また、この病原性酵母保有率ならびに生育菌数はイルカの健康管理の指標となる可能性もある。

現在、季節を変えて調査した結果との比較、飼育プールから分離された菌種、飼育関係者の口腔内から分離された病原性酵母との比較について、遺伝子解析を含めて検討中である。

E. まとめ

水族館で飼育されているイルカは高率に噴気から薬剤耐性の病原性酵母を噴出しているため、イルカの呼気を直接吸入することや、浴びることは危険であることが示唆された。

F. 健康危険情報

現在までにイルカを見学して真菌症に罹患した報告例はないが、飼育プールでのイルカとの接触やショーを観覧するとき、高齢者、免疫疾患を持つ場合の注意書きなどが必要と思われる。

G. 研究発表

1) 原著

1. Otori A, Endo S, Sano A, Yokoyama K, Yarita K, Yamaguchi M, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K: Rapid identification of *Ochroconis gallopava* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Vet Microbiol*, 114: 359-65, 2006.

2. Sano A, Miyaji M, Kamei K, Mikami Y, Nishimura K: Reexamination of *Coccidioides* spp. reserved in the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, based on a multiple gene analysis. *Jpn J Med Mycol* 47: 113-117, 2006.

3. Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y: Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *J*

Clin Microbiol 44: 1859-1862, 2006.

4. Murata Y, Sano A, Ueda Y, Inomata T, Takayama A, Poonwan N, Nanthawan M, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K, Kamei K: Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Med Mycol*. 2007. In press.

5. Pavanelli WR, Kaminami MS, Geres JR, Sano A, Ono MA, Camargo ICC, Itano EN: Protection induced in BALB/c mice by the High-Molecular-Mass (hMM) fraction of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia*, 2007. In press.

6. Murata Y, Sano A, Takeuchi Y, Matsui T, Inomata T, Nishimura K, Kamei K: A case of fungal cystitis caused by *Candida tropicalis* in a cat. *Jpn J Vet Clin Pathol*. 2007, In press.

7. Sakaeyama S, Sano A, Murata Y, Kamei K, Nishimura K, Hatai K: *Lecythyphora hoffmannii* isolated from a case of canine osteomyelitis in Japan. *Med Mycol*. 2007. In press.

2) 学会発表

1. Itano E, Tristao F, Bejar V, Ono E, Camargo Z, Sano A: partial characterization of immunogenic components of *Histoplasma capsulatum* and circulating specific IgG and soluble antigens in experimental murine histoplasmosis. Le Palais des Congres de Paris, Paris, France, Abstract: P-0607, 2006.6.25-29, Paris, France.

2. Murata Y, Sano A, Yarita K, Takayama A, Kamei K, Nishimura K: *Arthrographis kalrae* isolated from the oral cavity of a canine in Japan. The 16 th Congres of the International Society for Human and Animal Mycology, Le Palais des Congres de Paris, Paris, France, Abstract: P-0027, 2006.6.25-29, Paris, France.

3. Nishimura K, Kamei K, Sano A, Miyaji M: Mating behavior of *Schizophyllum commune* isolated from patients with bronchopulmonary mycosis in Japan with epidemiological data. Le Palais des Congres de Paris, Paris, France, Abstract: P-0526, 2006.6.25-29, Paris, France.

4. Sano A: Emerging fungal infections in Animals in Japan (Symposium). 8 th International Mycological Congress 21-25 August. 2006 Cairns Convention Centre, Queensland, Australia.

Abstract: pp142, Cairns, Australia, August 21-25, 2006.

5. Sano A, Yarita K, Murata Y, Takayama A, Yaguchi T, Takahashi Y, Kamei K, Nishimura K: Isolation of *Ochroconis gallopava* from hot springs in Japan and its pathogenicity (selected oral session). 8 th International Mycological Congress 21-25 August, 2006 Cairns Convention Centre, Queensland, Australia. Abstract: pp 258, Cairns, Australia, 2006.8.21-25

6. 佐野文子:真菌症原因菌としては稀な菌種(人獣共通真菌症原因菌を中心に)(指定演題). 第27回関東医真菌懇話会. 抄録集:20, 大手町サンケイプラザ, 2006.5.27.

7.木村 雅友, 佐野文子:アレルギー性真菌性副鼻腔炎の1例. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1):104, 東京, 2006.10.21-22.

8.畑井 喜司雄, 佐野文子, 西村 和子:オクロコニス属の新種に原因する養殖ヤマメの大量死亡例について. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p33, 東京, 2006.10.21-22.

9.植田 啓一, 宮原 弘和, 佐野文子, 内田 詮三:バンドウイルカの *non-albicans Candida* 感染症の治療について. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p112, 東京, 2006.10.21-22.

10.河合 浩樹, 佐野文子, 岩堀 裕之, 早川 富博, 西村 和子:肺の菌球から分離された *Scedosporium aurantiacum* 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p31, 東京, 2006.10.21-22.

11.高橋 容子, 佐野文子, 西村 和子, 亀井 克彦 4年間に3回再発したブラック・ドット型頭部白癬の経過観察と原因菌 *Trichophyton tonsurans* の薬剤感受性. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p81, 東京, 2006.10.21-22.

12.杉山 和寿, 佐野文子, 西村 和子, 亀井 克彦:若齢犬における *Chaetomium globosum* 感染症の1例. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p98, 東京, 2006.10.21-22.

13.村田 佳輝, 佐野文子, 高山 明子, 鎗田 響子, 西

村 和子, 亀井 克彦:ネコの難治性皮膚炎より分離された *Arthrographis kalrae*. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p100, 東京, 2006.10.21-22.

14.伊藤 淳二, 佐野文子, 亀井 克彦, 西村 和子, 宮治 誠, 三上 襄:*Coccidioides* 属のトポイソメラーゼ II 遺伝子(TOP2)及び関連遺伝子(TRF4)による同定法について. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p 27, 東京, 2006.10.21-22.

15.高山 明子, Itano Eiko Nakagawa, 佐野文子, Ono Mario Augusto, 鎗田 響子, 宮治 誠, 亀井 克彦, 西村 和子, 宇野 潤, 三上 襄:多遺伝子解析でアウトグループに位置した *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648 株について. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p17, 東京, 2006.10.21-22.

16.高橋 英雄, 植田 啓一, 鎗田 響子, 村田 佳輝, Itano Eiko Nakagawa, 高山 明子, 猪股 智夫, 矢口 貴志, 佐野文子, 西村 和子, 亀井 克彦:沖縄美ら海水族館で飼育されているバンドウイルカより分離された *non-albicans Candida* spp. 第50回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増1), p32, 東京, 2006.10.21-22.

17. 佐野文子, Itano Eiko Nakagawa, 高山明子, Ono Mario Augusto, 鎗田響子, 宮治 誠, 亀井克彦, 宇野潤. 三上襄, 西村和子:多遺伝子解析でアウトグループに位置した *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648 株 (An atypical isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* based on multiple gene analysis). 第47回日本熱帯医学会・第21回日本国際保健医療学会合同大会, Tropical Medicine and Health 34 (Supple 1):173, 長崎ブリックホール. 2006.10.11-13.

18.兼島 孝, 佐野文子:ペットショップの不適切な対応により飼い主の重症皮膚疾患の原因となったネコの1例. 第6回 人と動物の共通感染症研究会学術集会 講演要旨集 p8. JA ホール, 東京. 2006.11.3.

19. 村田佳輝, 森 俊士, 佐野文子, 鎗田響子, 高山明子, 西村和子, 亀井克彦:猫免疫不全症候群(FIV:猫エイズ)にみられた *Colletotrichum*

gloeosporioides の全身感染例 (セレクトッド・シンポジウム). 第 50 回日本医真菌学会総会, 真菌誌 47 (増 1), p99. 8.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

20. 佐野文子, 高山明子, Itano Eiko Nakagawa, Ono Mario Augusto, 鎗田響子, 宮治 誠, 亀井克彦, 宇野 潤, 三上 襄, 西村 和子: 各種遺伝子配列で低い相同性を示したブラジル・パラナ州患者由来の *Paracoccidioides brasiliensis* IFM 54648 株 について. 第 8 回真菌症フォーラム学術集会. O-18. p 68-9, 神戸, 2007.2.10.

21. 杉山和寿, 佐野文子, 村上 賢, 西村和子, 亀井克彦, 小川 高, 三島浩享, 大竹啓之, 杉山俊一: 若齢犬における *Chaetomium globosum* 感染症の 1 例. 平成 18 年度日本中医師会学年次大会 (さいたま). p 212. 大宮. 2007.2.23-25.

22. 森 俊士, 村田佳輝, 佐野文子, 亀井克彦: 猫免疫不全症候群 (FIV: 猫エイズ) に見られた真菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) の全身感染例. 平成 18 年度 (第 31 回) 千葉県獣医学会. p10. 千葉. 2007.3.4.

23. 村田佳輝, 松井 健, 井上敬子, 神明良典, 佐野文子, 亀井克彦: 全身性真菌感染症に見られた眼底異常について. 平成 18 年度 (第 31 回) 千葉県獣医学会. p13. 千葉. 2007.3.4.

24. 井隼ミキ, 山下 厚, 田山善男, 溝本朋子, 香本颯利, 吉田正明, 吉野慎太郎, 小島康裕, 佐野文子: 17 種漢方生薬配合薬の抗真菌活性と牛白癬への治療応用. 平成 18 年度 (第 31 回) 千葉県獣医学会. p51. 千葉. 2007.3.4.

3) 総説その他

著書

分担執筆: 河野 茂 編. 「深在性真菌症 Q & A」: II 病原真菌の真菌学・免疫・薬剤感受性 佐野文子: Q9 人獣共通の真菌症があるか?, pp. 31-33, 医薬ジャーナル社, 大阪, 2006.

総説

佐野文子: 真菌症を知ろう. 日本小動物獣医師会 Journal JSAVA 46: 45-60, 2006.

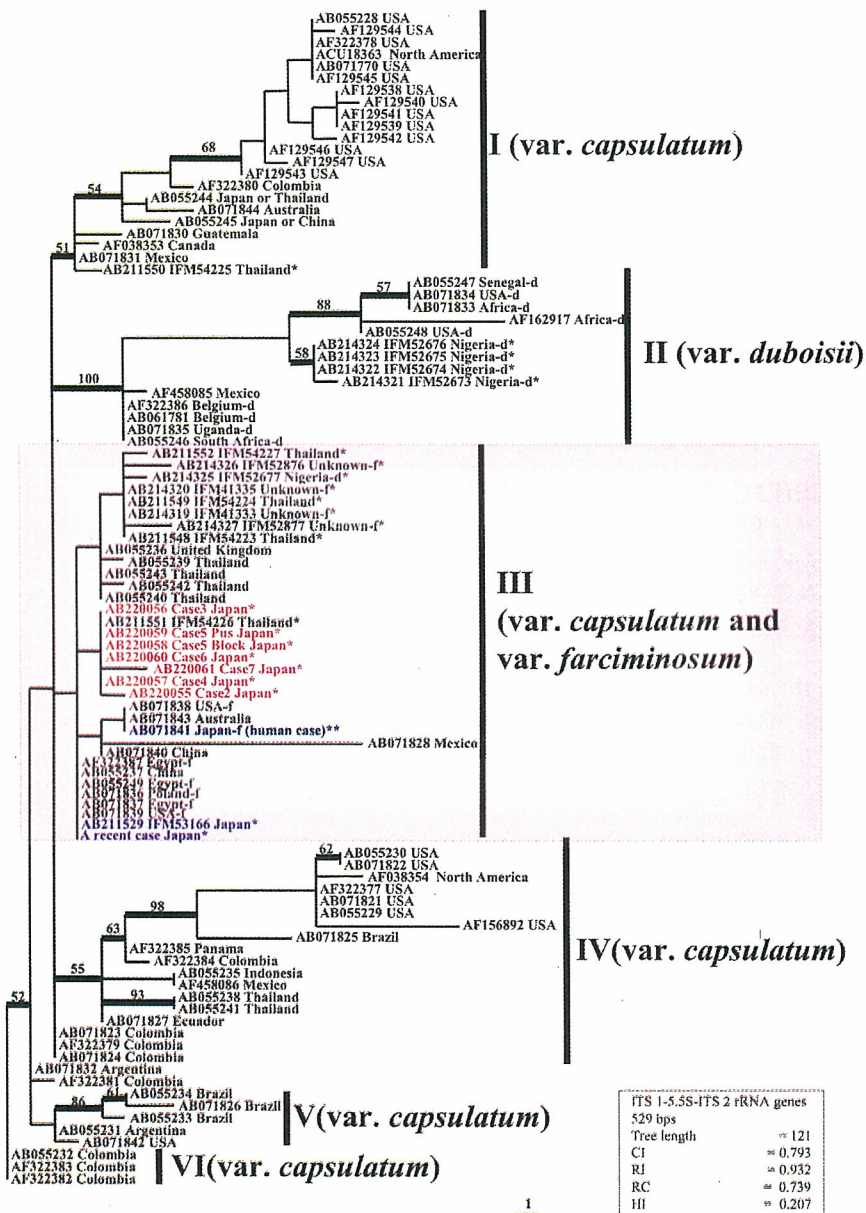


図 1. ヒストプラズマ症原因菌 *Histoplasma capsulatum* の ribosomal RNA 遺伝子 ITS 領域配列に基づいた樹形図. 我が国で発症したイヌ(赤)および土着の症例(青).

表1. 愛玩動物(動物園飼育動物も含む)で確認されている新興真菌症原因菌

輸入真菌症原因菌(高度病原性真菌)	接合菌	その他
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Acremonium hyalinum</i>
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Basidiobolus ranarum</i>	<i>Acremonium kiliense</i>
<i>Histoplasma capsulatum</i> *	<i>Cokeromyces recurvatus</i>	<i>Acremonium</i> sp.
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Conidiobolus</i> sp.	<i>Arthrographis kalrae</i> *
<i>Penicillium marneffe</i>	<i>Rhizomucor pusillus</i> など	<i>Chaetomium globosum</i> *
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> *
病原性酵母	病原性黒色真菌	<i>Chrysosporium</i> sp.
<i>Candida famata</i> *	<i>Alternaria</i> spp. (<i>A. alternata</i> , <i>A. infectoria</i>)	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Fusarium solani</i> *
<i>Candida guilliermondii</i> *	<i>Cladophialophora bantiana</i>	<i>Lagenidium</i> sp. (<i>L. giganteum</i>)
<i>Candida krusei</i>	(<i>Cladosporium trichoides</i> 旧名)	<i>Lecythophora hoffmannii</i> *
<i>Candida parapsilosis</i> *	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Exophiala dermatitidis</i> *	<i>Paecilomyces</i> sp.*
<i>Candida tropicalis</i> *	<i>Exophiala jeanselmei</i>	<i>Paecilomyces varioti</i>
<i>Cryptococcus albidus</i> *	<i>Exophiala spinifera</i>	<i>Penicillium</i> sp.*
<i>Rhodotorula</i> spp.	<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	<i>Pythium insidiosum</i>
<i>Trichosporon beigeli</i>	<i>Hortaea werneckii</i> *	<i>Prototheca</i> spp.*
<i>Trichosporon cutaneum</i>	<i>Ochroconis gallopava</i>	<i>Pseudallescheria boydii</i>
<i>Trichosporon domesticum</i> *	<i>Phialophora verrucosa</i> など	<i>Rhinosporidium</i> sp.
<i>Trichosporon pullulans</i>		<i>Scedosporium apiospermum</i> *
<i>Trichosporon</i> sp.など		<i>Scedosporium prolificans</i>
		<i>Schizophyllum commune</i> *
		<i>Sporothrix schenckii</i> *など

*:我が国のイヌ、ネコなどで症例が報告されている菌種。

表2 呼吸より分離された *Candida* spp.

個体番号	由来個体	動物種	性別	年齢	集落数*	同定
1	ゴン	オキゴンドウ	雌	推定30(飼育23年)	16	<i>Candida tropicalis</i>
2	スカイ	バンドウイルカ	雄	7	12	<i>Candida tropicalis</i>
3	サミ	ミナミバンドウイルカ	雌	7	9	<i>Candida albicans</i>
4	フジ	バンドウイルカ	雌	推定36(飼育30年)	1	<i>Candida albicans</i>
5	カナ	バンドウイルカ x ミナミバンドウイルカ F1	雌	9(8月21日死亡)	225	<i>Candida tropicalis</i>
6	オキ	ミナミバンドウイルカ	雌	推定33(飼育31年)	4	<i>Candida glabrata</i>
7	オキゴン4	オキゴンドウ	雌	推定12(飼育2年)	407	<i>Candida tropicalis</i>
8	カマ2	カマイルカ	雄	不明(飼育1年)	0	-----
9	コニー	バンドウイルカ x ミナミバンドウイルカ F1	雌	17	2	<i>Candida albicans</i>
10	チャオ	バンドウイルカ x ミナミバンドウイルカ F1	雄	11	601	<i>Candida tropicalis</i>
11	クロ	ミナミバンドウイルカ	雄	推定35(飼育31年)	13	<i>Candida albicans</i>
12	オキゴン1	オキゴンドウ	雄	推定11(飼育2年)	0	-----
13	ラーフ	シワハイルカ	雄	不明(飼育8年)	2	<i>Candida albicans</i>
14	オキゴン3	オキゴンドウ	雌	推定35(飼育2年)	291	<i>Candida tropicalis</i>
15	ムク	ミナミバンドウイルカ	雄	推定35(飼育31年)	0	-----
16	ダン	ミナミバンドウイルカ	雄	推定38(飼育31年)	20	<i>Candida albicans</i>
17	ポイ	ミナミバンドウイルカ	雄	推定35(飼育31年)	1	<i>Candida albicans</i>
18	ちゆら	オキゴンドウ	雌	6	0	-----
19	モモ	オキゴンドウ	雌	推定4(飼育2年)	0	-----
20	カマ1	カマイルカ	雌	不明(飼育1年)	0	-----

*:PDA およびクロモアガーカンジダ平板4枚より生育した集落の総計

表 3. イルカ呼気分離株の薬剤感受性試験

個体番号	株名(菌種)	菌種	薬剤					
			AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITZ	MCZ	MCFG
1	ゴンPY-1(白)	<i>Candida tropicalis</i>	1	0.125>	1	0.25	0.5	0.03>
2	スカイPY-1(白)	<i>Candida tropicalis</i>	1	0.125>	1	0.5	2	0.03>
3	サミCY-1(青紫)	<i>Candida albicans</i>	1	0.125>	64<	8<	32<	0.03>
4	フジCY-1(青)	<i>Candida albicans</i>	0.5	0.25	64<	8<	4	0.03>
5	カナPY-1(白)	<i>Candida tropicalis</i>	1	0.125>	64<	8<	4	0.06
6	オキPY-1(白)	<i>Candida glabrata</i>	1	0.125>	16	2	0.5	0.03>
7	オキゴン4PY-1(大)	<i>Candida tropicalis</i>	0.5	0.125>	16	8<	2	0.03>
9	コニーCY-1(青)	<i>Candida albicans</i>	0.5	64<	64<	8<	8	0.03>
10	チャオPY-1(白)	<i>Candida tropicalis</i>	1	0.125>	64<	8<	4	0.06
11	クロPY-1(白)	<i>Candida albicans</i>	1	0.25	64<	8<	8	0.03>
13	ラーフCY-1(青)	<i>Candida albicans</i>	1	0.125>	64<	8<	32<	0.03>
14	オキゴン3PY-1(白)	<i>Candida tropicalis</i>	0.5	0.125>	64<	8<	4	0.03>
16	ダンPY-1(白)	<i>Candida albicans</i>	1	0.25	64<	8<	32<	0.03>
17	ポイPY-1(白)	<i>Candida albicans</i>	1	0.125>	64<	8<	8	0.06

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITZ: itraconazole, MCZ: miconazole, and MCFG: micafungin,赤字は耐性, ピンク字は容量依存性耐性を示す。

「動物由来感染症のコントロール法の確立に関する研究」
分担研究報告書

分担課題：輸入蠕虫症の監視機構整備

分担研究者 太田伸生 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・国際環境寄生虫病学分野
研究協力者 赤尾信明（同上）・有菌直樹（京都府立医科大学）

研究要旨 動物由来の輸入蠕虫症の国内発生を監視して適切な医療対応をとるための制度構築を目指した。蠕虫症の国内発生動向に関する正確なデータが得られないため、蠕虫症診断のレファレンス機能を持つ国内の研究機関に事例登録の協力を求め、インターネットを介した情報把握システム立ち上げを開始した。今年度は 39 例の蠕虫感染症事例の登録を完了した。動物由来の蠕虫感染症は幼虫移行症となることが多く、その診断法は未だ確立していないものが多いため、本研究を通じてイヌ回虫症、旋尾線虫症の血清診断法確立を目指した。幼虫移行症診断のネックである抗原入手克服のために、診断用リコンビナント抗原作製を進め、旋尾線虫症については候補抗原の同定まで至った。イヌ回虫症については今日なお治療法が確立しておらず、特に眼トキソカラ症の治療法を動物モデルの開発を通じて検討した。病原体の同定も形態的特徴のみでは困難なものがあり、そのための遺伝子マーカーによる分類法構築を試み、条虫症、吸虫症についての事例検討を加えた。以上の検討を通じて国内の蠕虫症の発生動向を把握し、エビデンスに基づく必要な施策提言のための情報整備を進めた。

A. 研究目的

わが国の疾病構造が大きく変化した中で、蠕虫感染症は症状が不定愁訴にとどまり、診断法も感度・特異性を必ずしも十分に満たす状況にはないことから感染症の中でも実態把握がなされていないという意味で特異なものである。その一方で、わが国社会の国際化や生活スタイルの変化に伴い、新興・再興蠕虫感染症が増加しつつあるとの状況証拠も上がりつつある。行政の責任による発生動向把握の対象外にあるこれらの蠕虫症については情報が散逸し、エビデンスに基づくリスク予測や医療対応策定に大きな支障となっている。本分担課題において、わが国が抱えるそのような問題を解決するためのアプローチを図った。

発生動向の実態把握については能動的な情報取得が必要であり、そのためのデータベース的な情報整備が進めら

れるべきである。また、実態把握の困難要因として動物由来蠕虫感染症の持つ医学的な特殊性がある。ヒトが好適宿主でない場合は動物における診断法をヒトにそのまま応用することは出来ない。蠕虫の特定の発育ステージに体する生体反応を指標に診断することが必要であり、そのための診断法の開発と標準化が課題である。さらにヒトから回収された蠕虫の同定も困難である場合があり、分子的な同定を経てはじめて感染源となる動物の特定に至るが、分子的分類同定の方法を確立することも望まれている。

本研究では上記の課題解決に向けてエビデンスの収集を主たる目的として国内の輸入または動物由来蠕虫感染症にむけた対応を構築することを目的とした。

B. 研究方法

1. 蠕虫感染症例登録システム

国内の蠕虫感染症例の診断では多くが寄生虫関係研究機関にコンサルテーションを行なっている実態に鑑み、大学医学部および研究所の寄生虫学・医動物学研究室に呼びかけて擬診例も含めてインターネットによる登録を依頼した。東京医科歯科大学国際環境寄生虫病学内にファイルメーカーにより登録システムを作り、診断名とその根拠、患者の年齢、性別、国籍、推定感染地、症状の概要、転帰等の情報を求めた。個人情報保護の尊重に基づき、東京医科歯科大学の個人情報保護内規に従いパソコンの保管場所を定め、個人が特定されないことを徹底するべく、情報は提供者のみがアクセスできる制限公開とすることとした。

2. イヌ回虫症の診断・治療実験モデル

動物：網膜にメラニン色素を豊富に含有するために眼底検査が容易なダッチウサギを、経口感染群（2羽）と右眼内に生きた幼虫 30 隻を注入した眼内注入群（2羽）に分け供した。治療実験には、8週齢のスナネズミ（*Meriones unguiculatus*, aguti）を用いた。

寄生虫：イヌ回虫（*Toxocara canis*）雌成虫の子宮から虫卵を回収し、0.5%ホルマリン水中で2ヶ月以上発育させた幼虫包蔵卵を用いウサギに経口投与した。スナネズミには1000個を経口投与した。眼底観察：感染前の観察で網膜内に異常のないことを確認後、虫卵投与をおこない経時的に網膜病変の出現を観察した。スナネズミを用いた治療実験には、眼内に幼虫が確認できた個体のみを使用した。房水と涙液の採取：ダッチウサギを麻酔し、32G注射針を用いて房水を採取した。涙液は採血用濾紙（東洋濾紙）を眼球結膜に密着させ涙液を十分吸着させたのち

乾燥させ、密封して-30℃の冷凍庫で保存した。また、実験終了時に32G注射針を用いて硝子体液を採取した。

抗体測定：イヌ回虫幼虫分泌排泄物（LES）を抗原とする酵素抗体法により血清、眼内液、涙液中のLES特異的IgG、IgM、IgA、IgE抗体を測定した。

スナネズミの治療：眼トキシカラ症を発症した25匹のスナネズミを対象に、表1のごとく出血性病変が多くみられる時期（急性期）の11匹と滲出性病変や血管炎が主体となる時期（慢性期）の14匹に分けて、それぞれアルベンダゾール単独投与群、ステロイド単独投与群、両剤併用群に分けて観察した。

表 1. 治療実験に用いた投与薬剤とスナネズミ

投与薬剤	急性期	慢性期
ABZ 単独(100mg/Kg) 5days ×2回	5匹	7匹
ステロイド剤単独（デキサメタゾン 0.165mg/Kg） 5days×2回	3匹	4匹
併用群	3匹	3匹

治療効果の判定：薬剤の治療効果の判定は、個体毎に治療前後の眼底所見を比較し、以下の3項目の病変うちひとつ以上の項目が認められる時を「改善」、いずれの項目も観察されない時を「不変」、改善がない上に1項目以上悪化した時に「増悪」と判定した。