

## 総説

# エキゾチックアニマルとワイルドアニマルの動物由来感染症

宇根 有美\*

[ 受付 : 2007年12月5日 ]

## REVIEW

### ZOONOSIS IN EXOTIC ANIMALS AND WILD ANIMALS

Yumi UNE

Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine,  
Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Sagami-hara-shi,  
Kanagawa-ken, 229-8501, Japan

[ Received for publication : December 5, 2007 ]

Discussed are the current imports of animals, pathogen-bearing status of imported exotic animals (rodents and reptiles), and infectious diseases of captive and free-range wild animals.

#### 1. はじめに

「エキゾチックアニマル」という言葉に明確な定義はなく、「exotic」が、外来の、外国産の、風変わりなと訳されることから、漠然と外国産の動物、変わった動物という意味で、日常的に犬や猫以外のペットに対して用いられている。昨今、愛玩動物に対する嗜好の変化、住宅事情や生活パターンの変化で、ペットとしてのこの種の動物を見聞きすることが多い。エキゾチックペットは、犬や猫を含む家畜に比較して、一般に人と関った期間が短いため、生態、生理、疾病に関する情報が乏しい。さらに、動物由来感染症対策では、潜在的に存在する病原体の危険性が問題となっている。

ペットは、人の居住空間とはほぼ同一の空間を共有し、人と濃密な接触が日常的に繰り返されることがある。家畜としての歴史も浅く、極端な場合、新種登録後数年もたらずにペットとして売買されたり、野生動物として捕獲された動物が、1週間以内に子供や老人のいる家庭に持ち込まれることが実際に起きている。野生動物を輸入するということは、その動物が生息していた自然の一部を切りとり、そこで営まれていた様々な動物の営み、生活環(宿主と病原体の生活環を含めて)をそのまま家庭に持ち込むということで、動物由来感染症のリスクが高い。

動物由来感染症は、自然状態でヒト-脊椎動物間で相互に移行しうる感染症、あるいは感染と定義され、人に感染する病原体1,709のうち49%が動物由来感染症である。2004年に改正された感染症法の疾病類別表にも多くの動物由来感染症が掲載されている。さらに昨今、世界的規模で問題となっている新興感染症156のうち75%が動物由来感染症である。すなわち、人の感染症のコントロールには、様々な面で動物のコントロールが欠かせない。

動物由来新興感染症の発生は、宿主と寄生体との関係(片利共生状態)を人為的に崩壊させたり、自然界に存在しない宿主と寄生体の組み合わせを作る(寄生体に新たな宿主を与える)ことが主因のようである。

本項は、動物の輸入状況、輸入動物の病原体保有状況(細菌類と爬虫類)、飼育下野生動物の感染症、野生動物の感染症について、自験例を中心に紹介する。

#### 2. 動物の輸入状況

日本には、家畜、ペット、実験動物および展示動物 など多種多様な、多くの動物が世界各国から輸入され

\* 麻布大学獣医学部病理学教室・准教授 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺1-17-71

ているが、これらの動物の輸入実態を、正確に、一目で把握できる統計資料はない。このため、動物の輸入状況を把握するためには、①農林水産省動物検疫年報

※1、②人の感染症をコントロールするために施行された輸入動物届け出制度 ※2および③財務省貿易統計 ※3などを利用することになる。このうち、③は、関税法に基づいて申告される貨物に関するもので、20万円以下の少額貨物は貿易統計には計上されないため、輸入状況を正確に反映していないものと考えられるが、概要を捉えることはできる。

#### ※1 農林水産省動物検疫年報

日本では家畜伝染病予防法に基づき、家畜の伝染病が日本に侵入するのを防止するため牛、豚、山羊、めん羊、馬、鶏、あひる、七面鳥、うずら、がちょう、犬、兎、みつばちなどの動物と、それらの動物から作られる肉製品などの畜産物を対象に輸出入検査を行っている。また、狂犬病予防法に基づき、狂犬病が日本に侵入することを防止するため、犬、猫、あらいぐま、きつね、スカンクについて、輸出入時に検査を行っている。加えて、感染症法に基づき、サルについても、エボラ出血熱やマールブルグ病のような国内ではまだ発生していないサルから人へ感染する病気が日本に侵入するのを防止するため、輸入時に検査を行っている。この動物検疫所の輸入検疫実績がこの年報に掲載されている。

#### ※2 動物の輸入届出制度

厚生労働省が、輸入動物を原因とする人の感染症の発生を防ぐため、平成17年9月1日から導入した制度。http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekakukansenshou12/index.html

#### ※3 財務省貿易統計

日本では関税法に基づき、輸出入を行なう者はその貨物について税関に申告しなければならない。貿易統計は、日本から輸出されたまたは日本に輸入された貨物に関する統計である。全国の税関に提出された輸出入申告書等をもとに作成され、輸出入統計品目表に基づき、相手国、数量、金額のみが公表される。また、税関官署別の統計も入手可能。ただし、少額貨物(20万円以下の貨物)は、貿易統計に計上されない。

グラフ (Fig. 1) は、先に述べた財務省貿易統計に基づいて2002年から2006年の5年間の動物輸入数を表したものである。漸次、動物輸入数は減少している。これは、2003年にはSARS(重症急性呼吸器症候群)流行のため、動物の輸入自粛が行われ、特に中国からの輸入が止まったことや、2003~2004年には、アジア諸国で鳥インフルエンザH5N1亜型が流行し、動物、特に鳥の輸入が制限され、現在でも、鳥インフルエンザH5N1亜型の流行が確認されている国々からの輸入の制限が随時行われていること、さらに、2005年9月に輸入動物届け出制度が施行されたことなどによる。

しかしながら、このような状況下でも、輸入される動物の種類が変わったものの、動物の輸入数は劇的に減少していない。特に規制されにくい種類の動物の輸入数が急増するといった事態も起きている(例:有袋類)。

このように輸入される動物の内訳を、2004年の輸入統計でみると、グラフ (Fig. 2) のように、爬虫類が58%と一番多く、哺乳類は37%で二番目に多い。さらに、哺乳類の内訳をみると87.0%が齧歯類である。そして、最も注目すべきは、爬虫類のほとんどすべて、齧歯類の76.5%がペット用として輸入されている。

### 3. 輸入動物の病原体保有状況

前述のように、日本には多数の動物がペット用として、生きたまま輸入されているが、この種の動物が公衆衛生上、どの程度リスクを持っているかを検討した調査はなかった。そこで、筆者は、厚生労働省新興・再興感染症吉川泰弘研究班の分担研究者として、これらの動物の病原体保有調査を以下のメンバーとともに実施した。丸山総一(日本大学生物資源科学部獣医公衆衛生学研究室)、増澤俊幸(千葉科学大学薬学部免疫微生物学研究室)、荻和宏明(北海道大学大学院獣医学研究科環境獣医学講座公衆衛生学教室)、藤田博己(大原総合病院附属大原研究所)、加藤行男、岡谷友三アレシャンドレ(麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室)、佐藤宏(山口大学農学部獣医寄生虫学教室)、青木英雄、飯塚信二(横浜検疫所)、鈴木荘介(神戸検疫所)、高橋英之、森川茂(国立感染症研究

所)、黒木俊郎(神奈川県衛生研究所)、磯貝浩(札幌医科大学医学部動物実験施設部)、小菅旬子(宮崎大学農学部内人獣共通感染症教育部)、太田周司(東京検疫所川崎支所)(敬称略)

#### 1) 齧歯類

現在、我が国には2006年1年間で475,000頭余りと多くの齧歯類が輸入されているが、この中には実質上、野生捕獲種は含まれていない。しかし、輸入届出制度施行以前2005年8月までには多種種の野生捕獲種が含まれていた。

齧歯類は、ハンタウイルス肺症候群、腎症候性出血熱、リンパ球性脈絡膜膜炎、アルゼンチン出血熱、ポリオ出血熱、ペネズエラ出血熱、ラッサ熱、サル痘、ライム病、ペスト、野兔病、エルシニア症、鼠咬症、

ツツガ虫病、レプトスピラ症など14種類以上の病原体を媒介し、特に野生種の場合、必然的にその危険度も高くなる。我々は、平成15～17年の3年間に26種類512匹の齧歯類について病原体保有状況を調査し、以下の各種病原体を検出した (Table. 1)。

ジアルジア：ヒトに病原性を示すジアルジアと酷似する形態を示すものが、北南米産齧歯類から高率に検出され、特にデグーでは93%の割合で検出された。

サルモネラ：8種類34匹が保有していた。アジア産齧歯類で比較的多く検出され、同一業者から同じ日に搬入された動物の陽性率が高く、流通経路での汚染も考えられた。

皮膚では、黄色ブドウ球菌：26種類中19種類、168匹 (33%) と非常に高率で、アフリカ産齧歯類の中には、全頭から分離された齧歯類が4種あり、菌量も多かった。水虫の原因菌である白癬菌や、アフラトキシンなどカビ毒を産生する真菌も分離された。

レプトスピラが25種類中12種類 (樹上性齧歯類7種類のうち5種類、アフリカ産14種類のうち7種類) 32匹から検出された。特に、アフリカヤマネとアメリカモモンガの腎臓に大量の菌が観察され、相当数の排菌が予想された。実際、本調査に用いたアメリカモモンガを輸入した貿易会社の従業員2名が発症し、感染源としてアメリカモモンガが特定された。

ボレリア：25種類中15種類54匹から検出された。多くの患者が発生している北米だけではなく、アフリカ産齧歯類にも各種のボレリアに対する抗体を保有する動物がみられた。

## 2) 爬虫類

爬虫類の輸入数は哺乳類より多く (Fig. 1, 2)、増加傾向にある。爬虫類の動物由来感染症としてサルモネラ症が良く知られている。2005年にはミシシippiaカミミガメに関連する小児重症サルモネラ症が2例、イグアナに関連する乳児下痢症1例が報告されている

(Table. 2)。爬虫類のサルモネラ保菌率は他の動物に比べて非常に高く、輸入直後のトカゲ類60.6% (43/71)、カメ類40.0% (8/20) の割合で保菌しており、ペットショップで販売されているトカゲ類では74.6% (44/59)、カメ類72.2% (13/18)、ヘビ100%とする報告がある。また、2006年に神奈川県衛生研究所黒木俊郎先生らによる長崎県、沖縄県自治体とともに行ったミシシippiaカミミガメ調査においても、幼体70/94 (74.5%)、成体3/31 (9.7%) と高率に汚染されていることがわかった。

文献によると、爬虫類の肉芽腫性病巣から抗酸菌や *Chlamydia pneumoniae* が検出されることから、宮崎大学後藤義孝教授とともに、前述のサルモネラ調査で用いたカメを対象に抗酸菌調査も行った。その結果、114匹中87匹、76.3% (ミシシippiaカミミガメ：83/107、カミツキガメ：3/5、ワニガメ：1/2) から合計230株の抗酸菌が分離された。検体別では、皮膚で127株 (114匹中83匹、72.8%)、肝臓で38株 (114匹中32匹、28.1%)、肺で30株 (114匹中18匹、15.8%)、腸で35株 (114匹中27匹、23.8%) と皮膚からの分離率が最も高かった。遺伝子解析の結果、*M. terrae* (86株)、*M. fortuitum* (19株)、*M. senegalense* (2株)、*M. arupense* (2株)、*M. intracellulare* (1株)、*M. chelonae* (1株)、*M. szulgai* (1株) などが同定された。残る117株は、大部分がRunyonの分類でⅢまたはⅣ群に属することが分かったものの菌種は同定できなかった。カメ等の爬虫類から免疫力の低い老人や子供に非定型抗酸菌 (*Mycobacteria other than tubercle bacilli*: MOTT) の一種 *M. chelonae* が感染した例も報告されている。また、創傷感染した *M. terrae* による手指の慢性腱鞘膜炎の発生もある。

さらに、爬虫類のダニからは哺乳類にも感染する病原性リケッチャが分離されている。以上のように哺乳類と爬虫類とで種の障壁があるとはいえ、充分注意する必要がある。

## 4. 飼育下野生動物の感染症

麻布大学病理学研究室では、飼育下野生動物間で集団発生する感染症に注目して病性鑑定を行っている。以下に発生頻度の高い疾患と公衆衛生上重要と思われる代表的な疾患を紹介する。

### 1) エルシニア症

エルシニア属細菌、特に *Y. pseudotuberculosis* による展示施設での集団発生事例が多い。

①エルシニア属細菌：腸内細菌科に属する通性嫌気性グラム陰性桿菌で、4℃以下でも発育可能な低温発育性を有する。11菌種に分類され、病原性をもつエルシニア属菌としては、3種類 1) *Y. pestis*, 2) *Y.*

*enterocolitica*, 3) *Y. pseudotuberculosis* がある。2) と3) は、人と動物に急性腸管感染症を引き起こし、これらを一般的にエルシニア症という。両菌種は、哺乳類、鳥類および爬虫類など75種以上の動物から検出されているが、国内では圧倒的に動物の *Y. pseudotuberculosis* 感染症が多い。人では食中毒菌として *Y. enterocolitica* がよく知られている。

*Y. pseudotuberculosis* の血清型は、O抗原によって血清群1～15型に分けられ、さらに、血清群1, 2, 4および5には数亜群あるため、21の血清群がある。うち、病原性があるのは血清群1～6群および10群の7つである。なお、血清型によって病原性に差はない。

エルシニア属細菌は、冷たくきれいな水の中（井戸水、清水）で生存する。しかし、自然環境中では、他の細菌と競合して長く生きられない（ドブ水などでは生息不可）。このため、土壌を長く汚染することはない。保菌動物により維持されると考えられている。

冬季、春季の流行は、このようなエルシニア属菌の性状と冬期に熱帯産動物の抵抗性が低下することに関係している。

②動物への病原性：サル類は、一般に *Y. pseudotuberculosis* に対して高感受性で、欧米および日本で、多くの集団発生報告があり、国内飼育下のサルにおける発生状況は、ロリス科ショウガラゴ、オナガザル科サバンナモンキー、マントヒヒ、スーティマンガベ、ブラッザモンキー、パタスモンキー、マンドリル、クロザル、オマキザル科フサオマキザル、リスザル、テナガザル科シロテナガザル、フクロテナガザル、オラウータン科チンパンジー、オランウータンなど多くのサルの死亡例があり、自験例10施設のうち9施設が集団発生である。（Fig. 3, 4）

③流行パターン：周期的に流行が起きている施設が多く、飼育施設周囲に保菌動物が常時存在していることが伺える。リスザルの集団発生が一般的であるが、リスザル以外の動物にも発生する。

④血清型：4b型が最も多く7施設、1b型3施設、6と7型が各1施設であった。同じ施設でも、流行毎に血清型が異なることもあった。これは、飼育施設周囲に種々の血清型のエルシニアを保有する保菌動物が存在していることを示している。文献では3型、1b型、6型がリスザルから分離されている。

⑤エルシニア症とエルシニア属細菌の問題点：人獣共通感染症で、サル類のみならず、キャピバラ、マウラ、オオハシ、ニホンリス、ハイラックスなどにも流行し、広宿主域である。屋外・半屋外といった展示施設では、保菌動物の侵入を阻止することが困難であり、コントロールが難しい。このため、突発的あるいは反復流行する施設が多い。*Y. pseudotuberculosis* のみならず、*Y. enterocolitica* O8（強毒株）の集団発生も国内で起きている。

## 2) 結核

人型結核 (*Mycobacterium tuberculosis*) は、人への感染性が高く、人をレゼルボアとする。このため、動

物の人型結核症の感染には、何らかの形で人が関与している。結核が疑われる症例の剖検に際しては留意する必要がある。

ここでは、危険性の高い高病原性結核菌群について紹介する。

① *Mycobacterium tuberculosis* complex：結核菌群（高病原性）としては、*M. tuberculosis*（ヒト）、*M. bovis*（ウシ）、*M. africanum*（ヒト）、*M. microti*（ハタネズミ）、*M. canettii*（ヒト）がある。*M. tuberculosis* と *M. bovis* は特に高病原性で、遺伝子が99.5%一致する。*M. tuberculosis* がナイアシン strip 試験陽性で、硝酸塩還元能を持つなどの生物学的性状と遺伝子で同定する。非結核性抗酸菌としては、*M. avium*、*M. intracellulare*、*M. kansasii* などがある。

## ②診断法

a. ツベルクリン反応：発病者と接触後6週間以上経過した時点で実施する（4週間で免疫反応が成立する）。

結核菌感染とBCG接種の反応と区別できない。さらに非定型（非結核性）抗酸菌症の感染と区別できない。特異性や感度は思ったほど高くない。特にオランウータンなどの類人猿に用いるときには、接種量の検討や非特異的な反応に注意する必要がある。

b. インターフェロンγ全血測定法：現在、医学領域で注目されている方法。動物への応用が検討されている。

c. 胸部レントゲン検査（暴露後6ヶ月以上で陰影）

d. 喀痰検査（直接塗抹、培養、PCR法）

## ③結核菌の特徴

a. 消毒薬、乾燥や低温に抵抗性

b. 感染力が高い（10個程度の吸引で半数の人を発症させることができる）

c. 空気感染（飛沫感染ではない）

④人型結核菌が分離された動物：霊長類：ゴリラ、オランウータン、チンパンジー、ニホンザル、カニクイザル、アカゲザル、キツネザル、コロブス、フサオマキザル、草食獣：ゾウ（アメリカでは定期的に検査）、サイ、バク、ロッキーマウンテン山羊、鹿、オリックス、アダックス、その他：ハイラックス、イノシシ、肉食獣：犬、猫、海獣、オウム・インコ類など多種類に及ぶ。

## 5. 野生動物の感染症

—スズメ (*Passer montanus*) の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 感染症—

2005年12月から2006年5月までの間に、北海道札幌市、旭川市、登別市、苫小牧市、室蘭市などで、例年にはない数のスズメの斃死体が見つかった。当時、これらの地域ではスズメの個体数が少なくなったことや、餌台に来るスズメが弱って死亡することなどが報告さ

れていた。道庁によると回収された死体の数は、2006年7月末までに、1517羽に達したが（Fig. 5）、他の種類の野鳥の集団死はみられず、5月以降、スズメの死体はほとんど発見されなくなった。過去、国内でこのようなスズメの大量死の報告がなく、情報が不足し

ていたこともあって、当初、諸機関が調査を実施したが、大量死を説明できるような原因を見出すことはできなかった。

しかしながら、海外に目を向けると、1955年スイスで最初に *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ネズミチフス菌) によるスズメの大量死が確認・報告されてから、欧米諸国では、この細菌によるスズメの大量死が数多く報告されている。そこで、筆者は、北海道スズメネットワークより、大量死の起きていた時期および地域で回収されたスズメの死体の提供を受け、精査したところ、かなりの確率で *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を検出し、かつ典型的な病理像を確認した (Fig. 6)。さらに、翌年の2007年極寒期に、前年に大量死が起きていた地域で、小規模の流行があり、このときに回収した死体すべてに典型的な病理像を認め、かつ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を分離、培養した。このことから、北海道のスズメの大量死の主たる原因を *Salmonella enterica* serovar Typhimurium と特定した。さらに、細菌の指紋といわれるファージ型 (DT) を型別したところ、今まで国内で、人を含めて家畜から分離されたことのないDT40であることを明らかにした。この項では、スズメの *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 症について解説する。

1) 種類: サルモネラには2菌種あり、さらに、多くの血清型があるが、人への病原性が高く、食中毒菌として問題になっているのは、主として腸炎菌 (*Salmonella* Enteritidis: ゲルトネル菌ともいう) やネズミチフス菌 (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) である。一般的に病原性はネズミチフス菌の方が強い。

2) フィンチの大量死の原因: フィンチ類、特にスズメの大量死の原因として、イギリス、北アメリカ、ノルウェー、カナダ、ニュージーランドなどで *Salmonella enterica* serovar Typhimurium が注目されている。流行地域では、スズメの生息数が激減し、ロンドンでは、25年間にフィンチ類の95%が減少したとされている。フィンチ類はサルモネラに高感受性である。

3) 人獣共通感染症: サルモネラは食中毒菌として良く知られている。我が国では *Salmonella enterica* serovar Enteritidis による食中毒が主体で、ニワトリに関連する食品が原因となることが多い。これに比較すると *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の感染症は少ないが、現在も患者は毎年発生している。いづれにしても感染源は食品であり、野鳥に関連する胃腸炎の報告は見当たらない。しかしながら、2001年にニュージーランドで、発生数の少ない *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 感染症患者が急増し、疫学調査により、サルモネラで死亡したスズメに関係

することが報告された。

#### 4) 家畜への影響

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium 感染症: 1991~2003年にかけて、国内各地で各種動物 (ダチョウ、水禽、牛、豚、山羊、アイガモ、鶏、ウズラ、カラス) 計55件の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 感染症の報告がある。しかし、野鳥が感染源として証明されたものはない。

海外では、スズメの *Salmonella enterica* serovar Typhimurium に起因するアヒルやウズラの致死例が発生し、産業動物への伝播が危惧されている。実際、今回の北海道の大量死に際して、スズメの大量死が起きていた登別の、黒毛和種繁殖農家で、斃死した牛や環境中から分離された *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の培養性状とパルスフィールド電気泳動法パターンがスズメのそれと一致した。スズメは、餌を求めて至る所に出没するため、スズメが *Salmonella enterica* serovar Typhimurium で大量死している場合、そのエリアのスズメの保菌率が高い上、大量に排菌している可能性が高い。周囲の環境や動物が大量の菌に暴露されると、感染率・発症率・致死率とも上昇することから、「スズメは *Salmonella enterica* serovar Typhimurium の増幅動物」と考えられ、十分な注意が必要である。

5) 宿主域とその特徴: 広域、人を含む哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類など多くの動物の腸管内から検出され (野鳥の保菌率は低い※1)、人畜共通感染症を引き起こす。感受性が動物種によって異なり、感染しても全ての動物が発症せず、保菌動物として無症状の動物も多い。人はある程度の菌量が摂取されれば、健康な成人でも発症する。免疫システムが未熟あるいは低下した動物では重篤化しやすい。

※1: 2004年宮城県調査: カラス43、ハト11、キジ6、白鳥6、ツグミ4、ヒヨドリ3、ホオジロ3、スズメ2、セキレイ2、ムクドリ1、サギ2、カモ2、アヒル1、シギ1、フクロウ1、計15種88羽のうち *Salmonella enterica* serovar Typhimurium が3検体 (カラス、キジ、サギ) (3.4%)。1998年愛知県調査: ドバト114、キジバト38、ムクドリ3、カラス1計153羽のうちドバト11羽から *Salmonella enterica* serovar Typhimurium を分離 (7.2%)。

6) 感染方法: 経口感染。通常、糞中に排菌されたサルモネラに汚染された食品や水が感染源となる。

7) 症状: 人の場合、潜伏期は通常5~72時間で、平均約15時間。発熱 (38~40℃)、腹痛、水様便が継続し、通常1週間程度で回復する。症状の程度は個体およびその他の各種の条件によって異なり、死亡率は0.1~0.2%で、死因は内毒素によるショックである。死亡例は高齢者および小児に多い。経過は通常1~4日である。ブンチョウを用いた感染実験では、接種後20日以内に死亡する。鳥の種類によって経過は多様と

考えられる。

8) 治療：サルモネラのみならず細菌性胃腸炎では、発熱、下痢による脱水の補正、腹痛など胃腸炎症状の緩和を中心に対症療法を行うのが原則である。強力な止瀉薬は除菌を遅らせたり、麻痺性イレウスを引き起こす危険があるので使用しない。解熱剤はニューキノロン薬と併用禁忌のものがある上、脱水を悪化させる可能性があり、できるだけ使用を避ける。抗菌薬は軽症例では原則使用しない。

9) 消毒・殺菌：熱に弱く、60℃、10～20分の加熱により死滅。一般の消毒薬で消毒可能。

10) 予防：鳥の捕獲などの際には、マスクを着用する。手袋装着が勧められるが、作業終了時の手洗い励行が重要。経口感染のため、水や食品の汚染が起きないようにする。

※以上、国立感染症研究所資料などを改変。

最後に、北海道で大量死したスズメ由来の *Salmonella enterica* serovar Typhimurium のファージ型は40であったが、この型は、イギリス、北米およびノルウェーのスズメ大量死事例で確認されている。どのようなルートで、国内に侵入したか定かではないが、海外から持ち込まれた病原体の可能性が高い。

## 6. おわりに

我が国には、様々な種類の動物が大量に輸入されており、専門家がこれらの動物の危険性について指摘していたが、実際の病原体保有率や、その危険性に対する科学的資料が乏しかった。しかし、各種輸入動物の病原体保有調査を継続することで、これらの動物の病原体保有率が明らかとなり、さらに、実際これらの動物を感染源とする人のレプトスピラ症の発生を経験し、輸入動物の危険性が科学的に実証された。このように感染源の特定にまで至る事例はきわめて稀で、輸入動物を介した病原体侵入のリスクを評価する目的で調査を実施していたことが、この事例の全容を解明できた主因であると思われる。

2005年9月から、我々の行なってきた調査結果を科学的資料として利用した輸入動物届出制度が施行された。この制度により、公衆衛生上リスクの高い野生動物の輸入が著しく制限され、全ての哺乳類と鳥類の輸入状況が把握できるようになった。このため、以前ほど容易かつ大量に生きた野生動物が輸入されることはなくなった。しかしながら、輸入される動物種は多少変わったものの、愛玩用動物（哺乳類と鳥類）の輸入は増加している。しかも、過去の輸入数が少なかった動物が注目され、多量に輸入されたりする事象が起きている。これらのことから、継続して輸入届出制度の目的の1つである「公衆衛生上のリスクが高いエキゾチックアニマルの輸入制限」が確実になされているかどうか検証する必要がある。また、爬虫類輸入に関しての法的規制はなく、現在、検疫・検査はされていない。

いずれにしても、現在も多数の動物が海外から輸入され続けている状況を鑑み、動物、特に愛玩用動物を介した動物由来感染症のコントロールのためには、今後もこのようなモニタリングを継続する必要がある。また、このような調査で得られた情報を迅速に、関係機関（輸入貿易商、ペットショップ、自治体など）に配信し、感染症拡大防止のための適切な動物の取り扱いを周知させる注意を喚起し、公衆衛生的、疫学的な対応を考えておく必要がある。

最後に、現在、飼育されている動物であっても、潜在的に保菌している病原体の顕化、あるいは、何らかのルートを経る病原体の侵入がいつでも起こりうることを想定して、情報を収集しておくと同時に、発見時の対処方法などを、予め検討しておくことが望まれる。

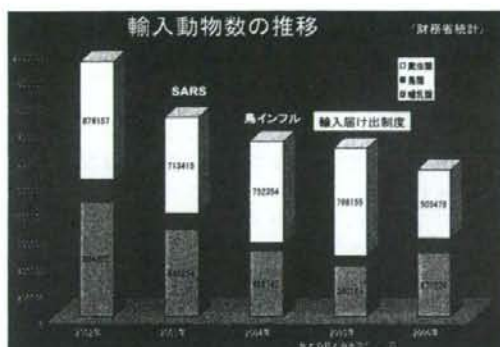


Fig. 1 輸入動物数の推移

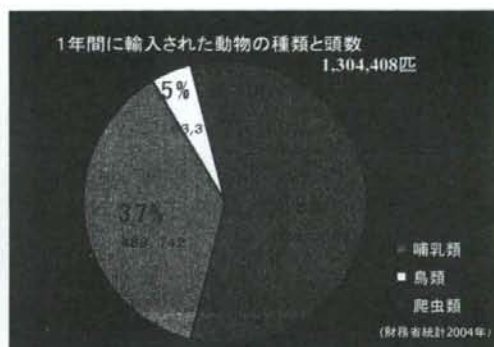


Fig. 2 1年間に輸入された動物の種類と頭数

Table 1 愛玩用齧歯類病原体保有状況

産地	種類	全頭数	皮膚				腸内容								血液			
			Serratia		Aeromonas		Yersinia enterocolitica		Salmonella		Mycobacterium		Pseudomonas aeruginosa		Clostridium		Staphylococcus	
			陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率	陽性数	保有率
アメリカ・中米	フタオサレシズミ	15	5	33%	1	7%	1	7%	—	—	0/10	—	—	—	—	—	—	—
	アレキサンダー	8	8	100%	1	13%	—	—	—	—	0/2	—	—	—	—	—	—	—
	アフリカヤマネ	10	—	—	—	—	—	—	1	10%	—	—	—	—	—	—	—	—
	アフリカヤマネ	20	5	25%	2	10%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	8	—	—	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8	100%
	ヒメリスビシズミ	16	—	—	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	63%
	シロリスビシズミ	4	0	0%	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ロイヤルマウス	28	26	93%	14	50%	1	4%	—	—	1/8	13%	—	—	—	—	—	0/20
	ハウスマウス	4	3	75%	—	—	—	—	—	—	0/2	—	—	—	—	—	—	—
	ロイヤルマウス	13	13	100%	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
アジア	デブスマウス	11	10	91%	1	9%	—	—	—	—	—	—	—	7	64%	10	91%	—
	ブサヤマネ	10	0	0%	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	10	10	100%	—	—	—	—	7	70%	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	10	10	100%	0	0%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	43	31	72%	50	116%	4	9%	1	2%	—	—	—	—	1	2%	—	—
	ヒメリスビシズミ	20	7	35%	1	5%	—	—	5	25%	0/10	—	—	—	—	—	0/20	13/20
	ヒメリスビシズミ	20	4	20%	2	10%	—	—	5	25%	0/10	—	—	—	—	—	0/10	—
	ヒメリスビシズミ	24	7	29%	0	0%	—	—	0	0%	0/10	—	—	—	18	75%	3/18	100%
	ヒメリスビシズミ	49	9	18%	1	2%	—	—	3	6%	1/10	10%	—	—	4	8%	—	10/18
北米	ヒメリスビシズミ	10	1	10%	—	—	—	—	3	30%	—	—	—	—	10	100%	—	—
	ヒメリスビシズミ	40	6	15%	—	—	—	—	6	15%	0/10	—	5	13%	12	30%	1/20	3%
	ヒメリスビシズミ	30	3	10%	—	—	10	33%	—	—	0/10	10%	—	—	19	63%	1/20	5%
	ヒメリスビシズミ	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	13	4	31%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	17	33%	—	3/18
	ヒメリスビシズミ	22	20	91%	—	—	1	5%	—	—	0/2	—	—	—	—	—	—	0/20
	ヒメリスビシズミ	10	10	100%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10	100%	—	—
	ヒメリスビシズミ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ヒメリスビシズミ	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
合計			522	187	36%	117	22%	17	3%	34	6%	4/94	5	5%	102	19%	5/101	58/132

Table 2 国内における爬虫類に関連するサルモネラ症事例

血清型	病原体種類	患者の年齢、性別	症状	発生年	発生場所
S. Breenderup	ミドリガメ	1歳3ヶ月女児	菌血症	2005	千葉県
S. Paratyphi B	ミドリガメ	6歳2ヶ月女児	急性菌血症・敗血症	2005	千葉県
S. IV(45:z,-)	イグアナ	生後27日男児	菌血症	2004	千葉県
S. Saintpaul	カメ	2ヶ月男児	菌血症	2004	秋田県
		3歳女児	菌血症		
S. Typhimurium	スッポン刺身	成人10人	菌血症	2004	秋田県
Salmonella (O7)	スッポン料理	0～75歳の男性5人、女性6人	菌血症	2004	愛媛県
Salmonella (O4)	ミドリガメ	62歳女性	敗血症性ショック	2003	宮城県
S. Urbana	ミドリガメ	5歳男児	中枢神経症状	2000	和歌山県
S. Typhimurium	スッポン刺身	13, 46, 47歳男性, 43歳女性	菌血症	1993	広島県
S. Litchfield	ミドリガメ	生後10ヶ月男児	菌血症	1992	青森県
S. Litchfield	ミドリガメ	2歳男児	菌血症	1987	福岡県
S. Itami	ゼニガメ	小学生	菌血症	1986	石川県
S. Paratyphi B	ミドリガメ	70歳女性, 7歳男児	菌血症	1985	福岡県
S. Muenchen	ミドリガメ	5歳女児	菌血症	1975	広島県
S. Typhimurium	ミドリガメ	5歳男児	菌血症	1975	広島県



Fig. 3 リスザルのエルシニア症  
小腸バイエル板に一致する偽膜性壊死性病変

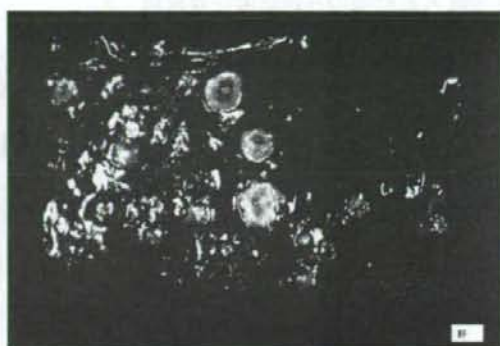


Fig. 4 オラウータンのエルシニア症  
肝臓の多発性小膿瘍



Fig. 5 北海道スズメ死亡分布図

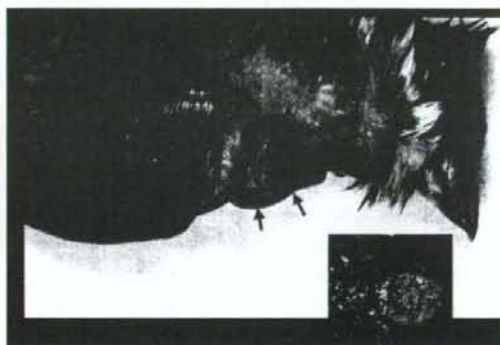


Fig. 6 スズメの*Salmonella enterica*  
serovar Typhimurium 症  
壊死性そ嚢炎 (矢印)。挿入はそ嚢剖面

# 本州におけるスズメ (*Passer montanus*) の *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium 感染症の集団発生

三部あすか<sup>\*1</sup> 仁和岳史<sup>\*2</sup> 鈴木 智<sup>\*2</sup> 加藤行男<sup>\*2</sup>  
川上和人<sup>\*3</sup> 泉谷秀昌<sup>\*4</sup> 渡辺治雄<sup>\*4</sup> 宇根有美<sup>\*1</sup>

## 要 約

2006年7月、本州において発生したスズメの集団死の原因究明およびスズメの生息環境におけるサルモネラの汚染状況の調査を目的として病理学的、微生物学的研究を行った。病理検査した61羽のスズメから平均57.4%の割合で *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium が分離され、スズメの斃死体が観察された同エリアに飛来するスズメの糞、同エリアで死亡した飼育鳥類、飼育中の鳥類、哺乳類の糞からも同一菌が検出され公衆衛生上注意を要する。また、今回検出された菌のファージ型 DT40 は諸外国の野鳥大量死事例および2006年の北海道におけるサルモネラ症事例と同一であり、感染源など何らかの関連があるものと推察される。

## はじめに

2006年7月頃より、関東のあるエリアでスズメの斃死体が発見されるようになった。そこで、スズメ集団死の原因を究明するため疫学的、病理学的および微生物学的に検索を行ったのでその概要を報告する。

## 材料および方法

7月31日からの13日間で斃死体6羽、瀕死期のスズメ2羽、生体2羽を回収し、その後9月に斃死体1羽を回収した。また、サルモネラの浸淫調査として流行の起きていた8月に生体50羽を捕獲し（その内3羽は捕獲後間もなく死亡）、その後9～12月の間に同エリアとその付近に飛来するスズメの糞214検体を回収した。併せて、同エリアで同時期に死亡した飼育鳥および野鳥計63羽の病性鑑定と、飼育中の鳥類、哺乳類計113検体の糞便の細菌検査を実施した。スズメ61羽については病理組織学的検査用に全身臓器をホルマリン固定後、定法に従いパラフィン切片を作成しHE染色、グラム染色およびサルモネラO4型診断血清を一次抗体として免疫染色を行った。また、スズメ61羽、飼育鳥および野鳥63羽は、主として腸管、肝臓、脾臓を微生物学的に検索し、分離された菌についてPFGE法、ファージ型別を行った。

## 結 果

平均57.4% (35/61) のスズメから *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium が分離され、7～8月に死亡あるいは瀕死のスズメ11例100%、8月に捕獲したスズメ50%の割合でサルモネラが分離され、9月に

<sup>\*1</sup> Asuka SANBE (写真左・コメント) & Yumi UNE (写真右): 麻布大学獣医学部病理学研究室 (〒229-8501 神奈川県横浜市中区野辺1-17-1)

<sup>\*2</sup> Yukio KATO, Takeshi NIWA, Satoru SUZUKI: 麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室

<sup>\*3</sup> Kazuto KAWAKAMI: 森林総合研究所 (〒305-8687 茨城県つくば市松の里1)

<sup>\*4</sup> Hidemasa IZUMIYA & Haruo WATANABE: 国立感染症研究所細菌第一部 (〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1)



昨年夏より卒論として本州におけるスズメサルモネラ症について病理検索を行っています。宇根先生のご指導の下、ここまで論文をまとめることができました。ご指導して下さった宇根先生、剖検等で協力してくれた病理学研究室の皆さんに深く感謝申し上げます。

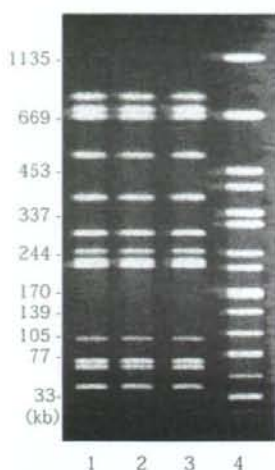


図1 PFGE法

- 1: 死亡したスズメ肝臓  
2: 捕獲したスズメ肝臓  
3: 死亡したカンムリヅル脾臓  
4: Molecular marker



図2 死亡したスズメにみられた特徴的な肉眼病変

- A: 脾臓 白色結節の集合 (矢印)  
B: 脾臓 高度に腫大し、白色結節が多発 (矢印)  
C: 肝臓 高度に腫大し、白色結節が多発

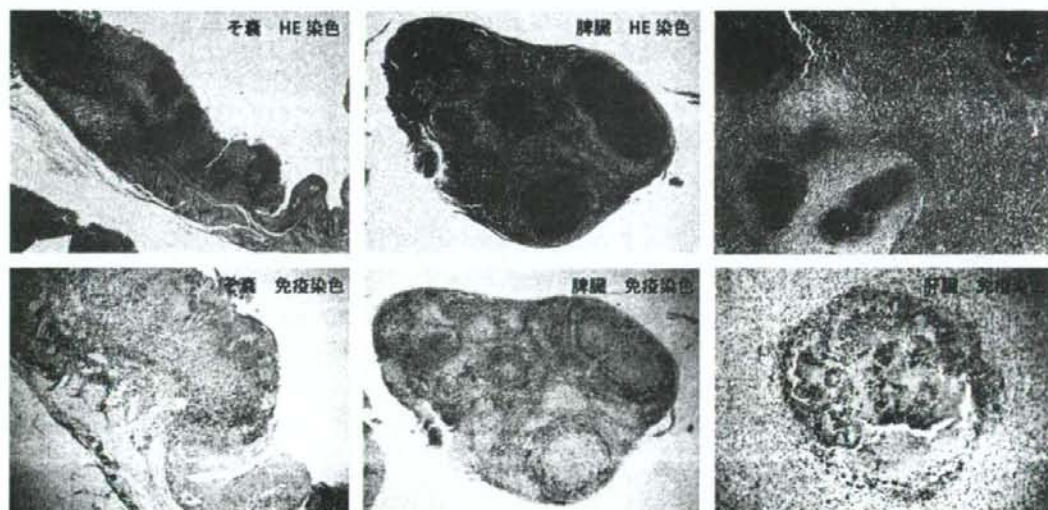


図3 死亡したスズメの組織写真  
上段: HE染色, 下段: 免疫染色

斃死した1例は陰性であった。また、飼育鳥および野鳥4.8% (アヒル、ホロホロ鳥、カンムリヅル)、飼育動物の糞4.4% (エミュー、ツル、オオカミ、ハイエナ、サーバ

ル)、スズメの糞2.3%の割合でサルモネラが分離された。また、PFGE法のバンドパターンは一致し (図1)、ファージ型はDT40であった。サルモネラを発症していたスズメ

に高率に観察された病変（図2）は、肝臓、脾臓の腫大と白色結節形成で、脾臓病変は全てのスズメに、肝臓病変は1羽を除いて全てにみられ、そ嚢病変は白色結節が2羽、壁の肥厚が1羽にみられた。また、組織学的に壊死性化膿性炎が観察され、病変部にみられた菌体はグラム陰性で、免疫染色では菌体に一致して陽性像が得られた（図3）。

### 考 察

以上の病理学的、微生物学的所見より、本州におけるスズメの集団死は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium に起因するものと判断した。これらの所見は諸外国の野鳥のサルモネラ症事例<sup>1-3)</sup> および2006年の北海道のサルモネラ症事例<sup>4)</sup> と一致していた。また、今回確認されたファージ型 DT40 は諸外国の野鳥大量死事例および北海道事例で検出された型と同一で、過去

国内で検出されたことのないファージ型であることから菌が何らかの方法で海外から持ち込まれた可能性があり、感染源等何らかの関連があるものと推察される。なお、スズメの斃死体が発見された同エリアで死亡した飼育鳥類、スズメの糞、飼育動物の糞からも同一菌が分離されており、動物衛生上および公衆衛生上注意が必要である。

### 引用文献

- 1) Pierre, Y.D., Daniel, G.B., Lyn, F. et al. (2000) : *Can. Vet. J.* 41, 54-59.
- 2) Alley, M.R., Connolly, J.H., Fenwick, S.G. et al. (2002) : *New Zealand Vet. J.* 50, 170-176.
- 3) Refsum, T., Vikoren, T., Handeland, K. et al. (2003) : *J. Wild. Dis.* 39, 64-72.
- 4) 宇根有美, 三郎あすか, 加藤行男ほか (2007) : 病原微生物検出情報 28 (2), 9-21.

図2

# スズメ *Passer montanus* の *Salmonella* Typhimurium 感染症

宇根有美\*<sup>1</sup> 三部あすか\*<sup>1</sup> 鈴木 智\*<sup>2</sup> 仁和岳史\*<sup>2</sup> 加藤行男\*<sup>2</sup> 川上和人\*<sup>3</sup>

## 要 約

北海道で発生したスズメの大量死の原因解明を目的として8羽のスズメを対象として病理学および微生物学的検査を行なった。3例でそ嚢壁の顕著な肥厚を伴うグラム陰性桿菌の集落を伴うそ嚢炎がみられた。そ嚢と肝臓や腸から増菌培養によって *Salmonella* が分離され、*Salmonella* Typhimurium (以下 ST と略す) と同定された。欧米、ニュージーランドでは野鳥の ST による大量死が多数報告されているが、国内ではこれまで報告がなかった。鳥の拡散と相まって、ST も拡散する可能性が極めて高く、公衆衛生上、動物衛生上及び種の保全も含めて十分な警戒が必要である。

## はじめに

2005年12月頃より北海道でスズメの死体が頻繁に観察されるようになり、その数は2006年7月28日現在1,517羽に達し、旭川市を中心に6支庁と広域で確認されている(道庁公表)。これらの検体について諸機関で調査が実施されているが、未だ原因は解明されていない。今回、旭川市と登別市で発見されたスズメを病理学および微生物学的に検査したので、その概要を報告する。

## 材料と方法

大量死が観察された2006年4月に登別と旭川から回収された各6羽と2羽計8羽のスズメを対象とした。発見時すでに腐敗が進行しており、直ちに冷凍保存された。解凍後、剖検、病理組織学的検査用に全身臓器を採材し、ホルマリン固定後、常法に従い、パラフィン切片を作製、HE染色とグラム染色、*Salmonella* O4型診断血清を一次抗体として、免疫染色を行った。微生物学的検査用として、そ嚢、肝臓、腸を無菌的に採材し、一般細菌検査と定法に従って *Salmonella* の分離を行うとともに、*Salmonella* と同定された株については、血清型を決定した。また、増菌した *Salmonella* を用いて RAPD 解析による遺伝子検査を行った。

## 結 果

登別の2羽(No.1,2)、旭川の1羽(No.8)で同様の肉眼像がみられた。腐敗のため、内臓諸器官の観察は不十分であったが、3羽に共通して、そ嚢壁のびまん性肥厚が顕著で、壁厚は1mmに達し、粘膜面は粗造で、内腔に少量のふやけた穀物を含んでいた(図1)。組織学的には細菌性

\*<sup>1</sup>Yumi UNE (写真左・コメント) & Asuka SANBE (写真右): 麻布大学獣医学部病理学研究室 (〒229-8501 相模原市瀬野辺1-17-71)

\*<sup>2</sup>Yukio KATO, Satoru SUZUKI & Takeshi NIWA: 麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室

\*<sup>3</sup>Kazuto KAWAKAMI: 森林総合研究所 (〒305-8687 茨城県つくば市松の里1)



スズメを始め鳥類の病性鑑定を担当している三部あすかとの1ショットです。ひょんなことから、北海道のスズメが麻布に舞い降りて、鳥に興味を持っていた三部がスズメに取りつかれてしまいました。今、スズメのサルモネラ症を卒業論文としてまとめるために奮闘しています。「勉強不足で分からないことが多いですが何とか頑張っています。今後さらにスズメ等の野鳥の研究が進んでいけば良いと思います。」三部伝



図1 旭川市で回収されたスズメ No.8  
そ嚢が拡張し(矢印)、そ嚢壁が顕著に肥厚(右下)



図2 *Salmonella* O4 抗原に対する抗体を用いた免疫染色

そ嚢炎が特徴的で、組織中にグラム陰性桿菌の集落がみられた。これらの細菌は *Salmonella* O4 型診断血清を用いた免疫染色で陽性となった（図2）。直接培養では検出されなかったが、増菌培養によって No.1（そ嚢、肝臓）、No.2（そ嚢と腸）および No.8（そ嚢）から *Salmonella* が分離され、*Salmonella* Typhimurium（以下 ST と略す）と同定された。RAPD 解析により、全ての株のバンドパターンがほぼ一致し（図3）、同一起源をもつ可能性が示唆された。

### まとめ

欧米およびニュージーランドでは、フィンチなどの野鳥（主としてスズメ）の ST による大量死が多数報告されており、この種の鳥の個体数の激減の原因として注目されている<sup>12)</sup>。フィンチ類の ST 感染症では、肝腫、脾腫と白色結節形成が頻りに観察され、特徴的所見としてそ嚢炎が挙げられており、今回の3羽にもそ嚢炎が認められた。このため、細菌学的検査結果と併せて、ST 感染症と診断した。北海道各地で報告されているスズメの大量死と今回見出された ST 感染症とが、どのような関連があるのか、検体数が少ないので現在のところ判断できないが、斃死例の中には ST 感染症が含まれていることを念頭に今後調査する必要がある。ニュージーランドでは、スズメの集団死と時期同じくして、人の ST 感染症の集団発生があり、その感染源としてスズメが考えられている<sup>3)</sup>。また、アヒルやウズラでも、スズメに起因する ST による致死例が発生し、産業動物への伝播が危惧されている。

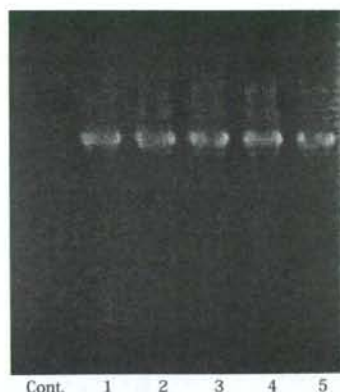


図3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法による分離株のパターン解析  
1: No.1 所嚢, 2: No.1 肝臓, 3: No.2 所嚢,  
4: No.2 腸, 5: No.8 所嚢

スズメの行動圏は季節により異なり、なわばりを持つ成鳥では約 200 m と狭いが、秋になると若鳥は集団をなし、近隣でなわばりをもてなかった場合、数 10km、ある報告では 100 ~ 400km を移動するとされている。このため、登別市と旭川市の少数の発生であっても、鳥の拡散と相まって、ST も拡散する可能性が極めて高く、公衆衛生上、動物衛生上および種の保全も含めて十分な警戒が必要である。

**補 足:** その後の研究により、今回、分離されたすべての *Salmonella* Typhimurium の薬剤感受性パターンが一致し、さらに、国立感染症研究所 泉谷秀昌先生のご協力、ファージ型を検討したところ、国内では確認されたことのない DT40 であったことが明らかになった。この内容については、病原微生物検出情報 Vol.28 No.2 (2007.2), 21 (51) に掲載した。

### 引用文献

- 1) Deaths in Finches and Sparrows. (Veterinary Science Division, Avian Health Unit, Ayr) <http://www.bvpa.org.uk/papers/penn01wb.htm>
- 2) Salmonellosis in Michigan Songbirds. (Michigan.gov Home) [http://www.michigan.gov/dnr/0,1607,7-153-10370\\_12150\\_12220-27268--,00.html](http://www.michigan.gov/dnr/0,1607,7-153-10370_12150_12220-27268--,00.html)
- 3) Thornley, C.N., Simmons, G.C., Callaghan, M.L. et al. (2003) : *Emerg. Infect. Dis.* 9, 493-495.

*M. genavense* infections occur only rarely in persons other than AIDS patients (as in the present case), but they always occur in immunocompromised persons (7,8). To date, only 1 case of disseminated infection has been reported in a solid-organ (kidney) transplant recipient; the diagnosis was made by molecular identification in isolates from blood and marrow cultures. That patient died of complications from *M. genavense* infection (9). Because *M. genavense* is a fastidious organism, the infections it causes are difficult to diagnose and their frequency is probably underestimated, which may change with increased use of direct molecular biological methods.

Optimal treatment of *M. genavense* infections has not been established (10). Experience with *M. genavense* infections in AIDS patients and with other nontuberculous mycobacteria infections in solid-organ transplant recipients suggests that at least 2 antimicrobial drugs should be used for a prolonged period; when possible, immunosuppressive drugs should be concurrently reduced (1,3,6,10). Outcome of nontuberculous mycobacteria infections in transplant patients is highly variable (1,5) but was satisfactory in the present patient, who was treated with quintuple antimicrobial-drug therapy and reduced immunosuppressive therapy.

This case of a disseminated infection due to *M. genavense* in a heart transplant recipient was diagnosed early. Universal 16S rRNA gene sequencing after amplification directly from intestinal biopsy specimens enabled fast diagnosis and appropriate management.

We gratefully acknowledge a grant (to I.P.) from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (Innovations et Centre d'Investigation Biomédicale; Transfert de technologies en biologie ou en imagerie).

Victoire de Lastours,\*†  
Romain Guillemain,\*†  
Jean-Luc Mainardi,\*†§  
Agnès Aubert,\*†  
Patrick Chevalier,\*†  
Agnès Lefort,\*¶  
and Isabelle Podglajen,\*†§

\*Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France; †Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France; ‡Université Paris-Descartes, Paris, France; §Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; and ¶Hôpital Beaujon, Paris, France

#### References

- Doucette K, Fishman JA. Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2004;38:1428-39.
- Dumouneau JM, Fonteyne PA, Realini L, Van Gossom A, Van Vooren JP, Portela F. Species-specific *Mycobacterium genavense* DNA in intestinal tissues of individuals not infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2514-5.
- Botter EC, Teske A, Kirschner P, Bost S, Chang HR, Beer V, et al. Disseminated "*Mycobacterium genavense*" infection in patients with AIDS. *Lancet*. 1992;340:76-80.
- Reiman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. Identification of the uncultured bacillus of Whipple's disease. *N Engl J Med*. 1992;327:293-301.
- Novick RJ, Moreno-Cabral CE, Stinson EB, Oyer PE, Starnes VA, Hunt SA, et al. Nontuberculous mycobacterial infections in heart transplant recipients: a seven-year experience. *J Heart Transplant*. 1990;9:357-63.
- Pechère M, Opravil M, Wald A, Chave JP, Bessens M, Sievers A, et al. Clinical and epidemiologic features of infection with *Mycobacterium genavense*. *Arch Intern Med*. 1995;155:400-4.
- Krebs T, Zimmerli S, Bodmer T, Lammle B. *Mycobacterium genavense* infection in a patient with long-standing chronic lymphocytic leukaemia. *J Intern Med*. 2000;248:343-8.
- Bogdan C, Kern P, Richter E, Tannapfel A, Rüsche-Gerdes S, Kirchner T, et al. Systemic infection with *Mycobacterium genavense* following immunosuppressive therapy in a patient who was seronegative for human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 1997;24:1245-7.
- Nurmohamed S, Weenink A, Moeniralan H, Visser C, Bemelman F. Hyperammonemia in generalized *Mycobacterium genavense* infection after renal transplantation. *Am J Transplant*. 2007;7:722-3.
- Albrecht H, Rusch-Gerdes S, Stellbrink HJ, Gerten H. Treatment of disseminated *Mycobacterium genavense* infection. *AIDS*. 1995;9:659-60.

Address for correspondence: Isabelle Podglajen, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Européen Georges Pompidou, Service de Microbiologie, 20 rue Leblanc, 75908 Paris CEDEX 15, France; email: isabelle.podglajen@hop-egp.ap-hop-paris.fr

## Isolation of Novel Adenovirus from Fruit Bat (*Pteropus dasymallus yayeyamae*)

To the Editor: Bats are thought to be one of the most important reservoirs for viruses such as Nipah virus, severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus, and Ebola virus (1). These pathogens became known after extensive surveys of bats following outbreaks. As a first step in investigating unidentified pathogens in bats and to help forecast the potential threat of emerging infectious diseases, we tried to isolate and characterize viruses that persistently infect bats. In the process, we isolated a novel adenovirus from a fruit bat in Japan.

*Pteropus dasymallus yayeyamae*, or Ryukyu flying fox, is a fruit bat of Japan. With the permission of the governor of Okinawa, we caught 1 adult male bat of this species and used its spleen and kidneys to establish primary cell cultures. On the 4th passage of the primary adherent cells derived from the spleen, a cytopathic effect (CPE) appeared without any visible

microbe, indicating that the cell culture contained a virus. The virus, tentatively named Ryukyu virus 1 (RV1), caused apparent CPE on primary kidney cells derived from a Ryukyu flying fox and on our established bat kidney T1 (BKT1) cells, which were derived from the kidney of a horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) and transformed with expression plasmid DNA encoding the large T antigen of replication origin-defective simian virus 40.

To identify the virus, RV1, we applied the rapid determination of viral RNA (RDV) system version 1.0 (2). However, no viral nucleic acid sequence was detected from an RNA sample in the RV1-infected BKT1 cells. For detection of viral DNA, we developed a system for rapid determination of viral DNA sequences (RDV-D) by minor modification to the RDV system for RNA viruses (2–4). The results indicated that 2 of the fragments were homologous to the gene encoding the precursor of terminal protein (pTP) of adenoviruses. Further RDV-D analysis showed that 6 fragments (139 bp, DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AB302970) were homologous to the pTP gene and that another

6 fragments (316bp, DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AB302971) were homologous to the gene encoding the precursor of protein VI (pVI) of adenoviruses. These results indicated that RV1 must belong to the family *Adenoviridae*.

To further confirm that RV1 isolate was an adenovirus, we used PCR and sequencing. We performed the first reaction with the outer primer pair (polFouter and polRouter) of a nested PCR method, targeting the viral DNA polymerase gene with highly degenerate consensus primers that have been described recently (5). A fragment of  $\approx 550$  bp was amplified from RV1 as well as from human adenoviruses-1, -3, -4, and -7 (data not shown). Sequence analysis of the amplified product (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AB303301) showed that RV1 was homologous to tree shrew adenovirus 1 (70.0% amino acid sequence identity), porcine adenovirus 5 (69.2%), canine adenovirus 1 (68.9%), human adenoviruses-3, -16, -21 and -50 (68.9%), and other viruses (>64.8%) in genus *Mastadenovirus*, but less homologous (46.7%–57.8%) to viruses in other genera, *Siadenovirus*,

*Aviadenovirus*, and *Atadenovirus*. In addition, a phylogenetic tree based on amino acid sequences indicated that RV1 belongs to family *Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus* (Figure).

Electron microscopy of RV1-infected BKT1 cells indicated that RV1 accumulated in the nucleus and that the size of capsids was 60–70 nm (data not shown). Restriction endonuclease analysis of the RV1 genome indicated that the genome was  $\approx 20$ –30 kbp (data not shown). These features are consistent with RV1 being an adenovirus.

Until now, a number of RNA viruses have been isolated from bats, but isolation of DNA virus is rare (1). The isolation of the novel adenovirus seems to be possible because of usage of the primary cells originated from the host; DNA viruses might have more restricted host range than RNA viruses and require host-originated cells for the growth. In addition, our success in DNA virus isolation might have resulted from usage of the adult animal latently and persistently infected with DNA viruses such as adenovirus and herpesvirus.

In conclusion, we isolated a novel virus from a fruit bat. This virus was isolated from a healthy bat, which suggests that the virus may persistently infect fruit bats. Although its pathogenicity for humans is still unknown, knowledge of RV1 will be useful in epidemiologic studies of infectious diseases emerging from bats because persistently infecting viruses might be isolated together with primary pathogens. We are planning to establish cell lines from bats and isolate more viruses from persistently infected bats.

#### Acknowledgments

We thank Shunken Shimoji and Kazuya Motomura for collecting bats.

This work was supported in part by a grant-in-aid from the Japan Society for Promotion of Science, Tokyo, Japan, and from the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

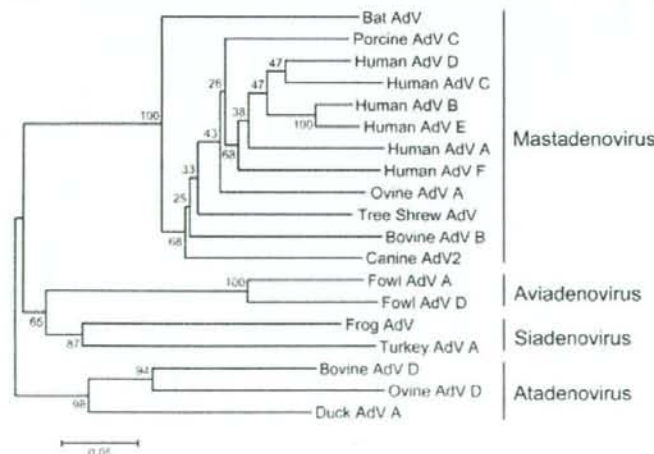


Figure. Phylogeny of adenoviruses based on analysis of partial amino acid sequences of DNA polymerase protein. Trees were estimated by using the neighbor-joining method based on the amino acid pairwise distance and MEGA 4.0 software ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)). Numbers represent percentage bootstrap support (100 replicates).

Ken Maeda,\* Eiichi Hondo,\*  
Junpei Terakawa,\* Yasuo Kiso,\*  
Numekazu Nakaichi,\*  
Daiji Endoh,† Kouji Sakai,‡  
Shigeru Morikawa,‡  
and Tetsuya Mizutani‡

\*Yamaguchi University, Yamaguchi, Japan;

†Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Japan;

and ‡National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

#### References

1. Calisher CH, Childs JE, Field HE, Holmes KV, Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:531-45.
2. Mizutani T, Endoh D, Okamoto M, Shirato K, Shimizu H, Arita M, et al. Rapid genome sequencing of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 2007;13:322-4.
3. Sakai K, Mizutani T, Fukushi S, Saijo M, Endoh D, Kurane I, et al. An improved procedure for rapid determination of viral RNA sequences for avian RNA virus. *Arch Virol* 2007;152:1763-5.
4. Kihara Y, Satho T, Eshita Y, Sakai K, Kotaki A, Takasaki T, et al. Rapid determination of viral RNA sequences in mosquitoes collected in the field. *J Virol Methods* 2007;145:372-4.
5. Wellehan JFX, Johnson AJ, Harnach B, Benko M, Pessier AP, Johnson CM, et al. Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the Adenovirus. *J Virol* 2004;78:13366-9.

Address for correspondence: Ken Maeda, Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi 753-8515, Japan; email: kmaeda@yamaguchi-u.ac.jp

#### Letters

Letters commenting on recent articles as well as letters reporting cases, outbreaks, or original research are welcome. Letters commenting on articles should contain no more than 300 words and 5 references; they are more likely to be published if submitted within 4 weeks of the original article's publication. Letters reporting cases, outbreaks, or original research should contain no more than 800 words and 10 references. They may have one figure or table and should not be divided into sections. All letters should contain material not previously published and include a word count.

## Fluoroquinolone-Resistant Group B Streptococci in Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis

**To the Editor:** Fluoroquinolones (FQs) that are active against streptococcal species (e.g., levofloxacin and moxifloxacin) have been recommended by numerous national health authorities and international organizations for treating acute exacerbations of chronic bronchitis and pneumonia in adults (1). However, use of these antimicrobial drugs for treating community-acquired infections has led to an increase in FQ-resistant strains in bacteria such as *Streptococcus pneumoniae*. Group B streptococci (GBS, e.g., *S. agalactiae*) are the leading cause of invasive infections (pneumonia, septicemia, and meningitis) in neonates, GBS are also associated with bacteremia, endocarditis, and arthritis, and are responsible for deaths and illness in nonpregnant women with underlying diseases and in elderly adults (2). We describe, to our knowledge, the first GBS clinical isolate in France resistant to FQ: the isolate was from a patient treated with levofloxacin.

GBS CNR0717 strain was isolated as the predominant bacterium in a culture ( $>10^7$  CFU/mL) from 2 purulent sputum samples from an 80-year-old man (leukocytes  $>25$ , epithelial cells  $<10$ ) obtained 8 days apart. This patient was treated for 2 weeks with levofloxacin, 750 mg/day, for acute exacerbation of chronic bronchitis. No other relevant respiratory bacterial pathogens were present in

these samples. GBS CNR0717, a capsular serotype IV strain, was suspected to have reduced susceptibility to FQs because no inhibition zone was observed around disks containing norfloxacin and pefloxacin disks, and reduced diameters were observed around disks containing ciprofloxacin and levofloxacin. Antibigrams were performed according to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (3) on Mueller Hinton agar (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) supplemented with 5% horse blood. This strain was susceptible to all other antimicrobial drugs usually active against GBS (penicillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, rifampicin, vancomycin) and showed low-level resistance against aminoglycosides. MICs for 6 FQs (Table) indicate that GBS CNR0717 was highly resistant to pefloxacin and norfloxacin, with MICs  $>64$  mg/L, and showed increased MICs for ciprofloxacin, sparflaxacin, levofloxacin, and moxifloxacin. No reduction of FQ MICs was observed with reserpine (10 mg/L), which indicated that resistance to FQ was not caused by an active efflux pump system.

Three major mutations have been reported for FQ resistance in streptococci at codon positions 81 in *gyrA* and 79 or 83 in *parC* (4). DNA sequence analysis of these regions showed a mutation in *parC* (Ser 79  $\rightarrow$  Tyr) but not in the wild-type susceptible strain (NEM316). No mutation was detected in the *gyrA* gene. FQ resistance in streptococci is acquired through a stepwise process and has been extensively studied in *S. pneumoniae*. First-step mutants conferring low-level resistance generally result from mutations in either *gyrA* or *parC*. There is also

Table. MICs of fluoroquinolones for strains of group B streptococci (GBS), France

Strain	MIC (mg/L)*					
	Pef	Nor	Cip	Spa	Lev	Mox
GBS CNR07017	>64	>64	4	1	4	1
GBS NEM316	16	8	2	0.5	1	0.25

\*Pef, pefloxacin; Nor, norfloxacin; Cip, ciprofloxacin; Spa, sparflaxacin; Lev, levofloxacin; Mox, moxifloxacin.

# Short Communication

## Diagnosis and Assessment of Monkeypox Virus (MPXV) Infection by Quantitative PCR Assay: Differentiation of Congo Basin and West African MPXV Strains

Masayuki Saijo\*, Yasushi Ami<sup>1</sup>, Yuriko Suzuki<sup>1</sup>, Noriyo Nagata<sup>2</sup>, Naoko Iwata<sup>2</sup>, Hideki Hasegawa<sup>2</sup>, Momoko Ogata, Shuetsu Fukushima, Tetsuya Mizutani, Itoe Izuka, Koji Sakai, Tetsutaro Sata<sup>1</sup>, Takeshi Kurata<sup>2</sup>, Ichiro Kurane and Shigeru Morikawa

Special Pathogens Laboratory, Department of Virology 1, <sup>1</sup>Laboratory of Animal Experimentation and

<sup>2</sup>Laboratory of Infectious Disease Pathology, Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

(Received August 28, 2007. Accepted December 26, 2007)

**SUMMARY:** Human monkeypox, an infectious disease caused by monkeypox virus (MPXV), is endemic to western and central Africa. A LightCycler quantitative PCR (LC-qPCR) system was developed for the diagnosis of this disease, targeting the A-type inclusion body gene (ATI gene) of MPXV. One naïve monkey was infected with MPXV Zr-599 (Congo Basin strain) and one with MPXV Liberia (West African strain). Another three monkeys were immunized with smallpox vaccine on 0, 3, or 7 days, respectively, before infection with MPXV Zr-599. Peripheral blood cell (PBC) and throat swab (TS) specimens were serially collected. The LC-qPCR was validated for the diagnosis of monkeypox using virus isolation. Sequencing of the partial ATI gene revealed the insertion of a unique 453-nucleotide residue in the West African strains but not in the Congo Basin strains. Specific reverse primers for Congo Basin and West African strains were designed based on the unique sequence insertion. The LC-qPCR detected the MPXV genome, but not those of the other orthopoxviruses tested nor the varicella-zoster virus. Both the sensitivity and specificity of the LC-qPCR were over 90% in comparison to virus isolation when TS specimens were tested. Fourteen of the 15 virus isolation-positive PBC specimens showed positive reactions in the assay. Further, most PBC specimens collected from symptomatic monkeys in the later stage of illness showed positive reactions in the assay but negative reaction in virus isolation. It was possible to differentiate between these two groups with the LC-qPCR. Thus, the newly developed LC-qPCR is a useful and reliable diagnostic tool for MPXV infection.

Monkeypox virus (MPXV) infection in humans, known as human monkeypox and having symptoms similar to those of smallpox, is endemic to the western and central regions of Africa (1,2). MPXV belongs to the Family *Poxviridae*, Genus *Orthopoxvirus*. A sporadic human monkeypox outbreak was reported in the United States in 2003, suggesting that the disease must be regarded as an important re-emerging infectious disease (3-7). MPXVs form two genetically distinct clades, Congo Basin and West African strains, which are prevalent in the central and western regions of Africa, respectively (7). It has been reported that human monkeypox in western Africa is less severe than that in central Africa (3). Therefore, a rapid diagnostic tool for MPXV infection with the ability to differentiate the two clades is desirable. In the present study, quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) for amplification of the MPXV genome and differentiation of the two clades was developed, and its efficacy in the diagnosis of monkeypox was examined.

MPXV strains, Zr-599, Congo-8, Sierra Leone, Orangutan, Copenhagen, Liberia, SEN-79, and clinical isolates (1996-97 isolates in DRC) recovered from patients with human monkeypox in the Democratic Republic of Congo in 1996 and 1997 were used (8). Ectromelia virus (strain Hampstead),

camelpox virus (strain JIE3), cowpox virus (strain Brighton Red) and vaccinia virus (strain Lister) were also used. Cynomolgus monkeys were immunized with smallpox vaccine, LC16m8 (8,9). DNA of varicella-zoster virus (VZV) (strain Webster), whose infections (chickenpox and zoster) are important virus infections that need to be differentiated from monkeypox, was used.

Five male cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) weighing 3,080-4,500 g were used in the experiments. Three monkeys were immunized with a smallpox vaccine, LC16m8, and another 2 monkeys were mock-immunized. The 3 LC16m8-monkeys, Zr-LC-0, Zr-LC-3, and Zr-LC-7, were inoculated subcutaneously with the challenge virus ( $10^6$  pfu, MPXV Zr-599) at either 0, 3, or 7 days post immunization, respectively. One of the mock-monkeys, Zr-Mock, was inoculated with MPXV Zr-599 and the other, Liberia-Mock, with MPXV Liberia at the same dose.

Before and after the MPXV challenge, 5 ml of total peripheral blood cells (PBC) was drawn and the surface of the throat of each monkey was swabbed with a cotton-tipped swab every 3-4 days. The swab was inoculated onto and mixed in 2 ml of MEM supplemented with 2%FBS (MEM-2FBS). The virus was isolated using Vero E6 cell-monolayers from buffy-coat fractions obtained from monkeys challenged with MPXV as reported previously (8). The throat swab (TS) specimens were centrifuged at 3,500 rpm for 5 min, and 1 ml of the supernatant fraction was inoculated onto Vero E6 cell monolayers seeded in a 25-cm<sup>2</sup>-culture bottle for virus isolation.

\*Corresponding author: Mailing address: Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771 ext. 320, Fax: +81-42-561-2039, E-mail: msaijo@nih.go.jp

After incubation for 1 h, the cells were cultured in MEM-2FBS for 5 days. When a cytopathic effect (CPE) was observed in the cell culture, the CPE agent was confirmed as MPXV by indirect immunofluorescence assay. Plaque numbers were then counted after fixation of cells with a 10% formalin solution and staining with crystal violet solution.

The nucleotide sequence of the A-type inclusion body (ATI) gene of MPXV strains used in the present study was determined by the direct sequencing method. The partial ATI gene was amplified from the DNA of MPXV using primer set ATI-up-1 (5'-AATACAAGGAG GATCT-3') and ATI-low-1 (5'-CTTAACCTTTTCTTTCTC-3') (10). The PCR product was used as a template for direct sequencing.

DNA was isolated from 200 µl of PBC and TS specimens using a Viral Nucleic Acid purification kit<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Purified DNAs were used as templates. The LightCycler real-time quantitative PCR (LC-qPCR) was developed using primers and probes that were designed based on the sequence of ATI gene in the MPXV genome (8). The sequences of the primers and probes were as follows: LC-forward primer, 5'-GAGATTAGCAGACT CCAA-3'; fluorescein (FC)-probe, 5'-GCAGTCGTTCAACT GTATTCAAGATCTGAGAT-3'-Fluorescein; LCRed640 probe, 5'-LCRed640-CTAGATTGTAATCTCTGTAGCATT TCACGGC-3'-phosphorylation; and reverse primers (Reverse primer 1: 5'-GATTCAATTCCAGTTTGTAC-3' and Reverse primer 2: 5'-TCTCTTTTCCATATCAGC-3'). The reverse primers, Reverse primer 1 and 2, were designed according to the specific nucleotide sequences in MPXV Congo Basin and West African strains, respectively. The LC-qPCR using the Reverse primer 1 and Reverse primer 2 were designated "LC-qPCR-C" and "LC-qPCR-W", respectively. Internal controls for the measurement of viral genome copy numbers of the MPXV Congo Basin and West African strains were pGEM-T-easy vectors (Promega, Madison, Wis., USA) carrying the ATI gene of MPXV Zr-599 and Liberia strains, respectively, and included in each assay. Amplification conditions were 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 57°C for 10 s, and 72°C for 6 s, and melting reaction.

PCR products, which were amplified from each of the MPXV strains by PCR using the primer set ATI-up-1 and ATI-low-1, were classified into 2 groups (1,520 bp and 1,070 bp, respectively, including the primer lesions) based on the size of the product (data not shown). An additional 453 nucleotide residues were present in the ATI gene of the Liberia, Copenhagen, SEN-79, Sierra Leone, Anteaton, and Orangutan MPXV strains at a point corresponding to position 2147/2148 of the nucleotide sequence of MPXV strain Gabon (one of the MPXV Congo Basin strains), counted from the initiation codon (GenBank accession no. MVU84504), resulting in a larger-size PCR product. On the other hand, Zr-599, Congo-8, and the 1996-97 isolates in DRC showed a smaller-size PCR product. These results indicate that the West African strains of MPXV have a longer ATI gene than the MPXV Congo Basin strains.

The LC-qPCR detected at least several copies of the MPXV ATI gene. Twenty-four PBC specimens and 24 TS specimens were serially collected from 4 monkeys on days 0-21 after infection with MPXV-Zr-599. Seven PBC specimens and 7 TS specimens were also serially collected from one monkey on days 0-21 after infection with MPXV-Liberia (Table 1). All the 18 virus-isolation-positive TS specimens showed a positive reaction in the LC-qPCR, while 12 of the 13 virus isolation-negative specimens showed a negative reaction.

Table 1. Relationship between the results of virus isolation and LC-qPCR among PBC- and TS-specimens

	LC-qPCR with					
	TS-specimens			PBC-specimens		
	+	-	Total	+	-	Total
Virus isolation						
+	18	0	18	14	1	15
-	1	12	13	7	9	16
Total	19	12	31	21	10	31

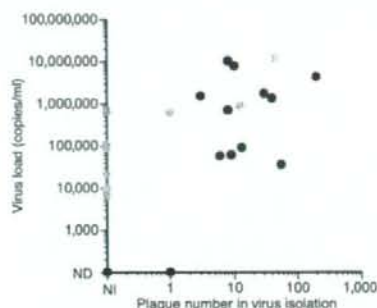


Fig. 1. Relationship between the virus load determined by the LC-qPCR and the plaque number in the virus isolation among PBC specimens. The specimens, which showed positive reactions in either virus-isolation or LC-qPCR, collected between day 0-10 and day 11-21 are shown in black circle and gray circle, respectively. The specimens, which showed positive reactions both in virus isolation and qPCR are also shown in black circle. "ND" and "NI" indicate "undetectable" and "not isolated", respectively.

The sensitivity and specificity of the LC-qPCR were 100% (12/12) and 93% (12/13), respectively, in comparison with the virus isolation method. In contrast, 14 of the 15 virus isolation-positive PBC specimens showed a positive reaction in the LC-qPCR, while only 9 of the 16 virus isolation-negative specimens showed a negative reaction (Table 1). Most of the PBC specimens collected from symptomatic monkeys (Zr-Mock, Liberia-Mock, and Zr-LC-0) in the later stage of illness showed a negative reaction in virus-isolation negative but a positive reaction in the LC-qPCR (Fig. 1). IgG-response is usually demonstrated in monkeys subcutaneously infected with MPXV after approximately 10 days post inoculation (8). It is speculated that the discrepancy between the virus isolation and the LC-qPCR in PBC specimens in the later stage of illness is due to IgG-response. The antibody reactive to MPXV may make the virus isolation test negative, even though MPXV is represented in the PBC specimens.

The LC-qPCR-C detected only MPXV Congo Basin strains, whereas LC-qPCR-W detected only MPXV West African strains. The LC-qPCR detected MPXV DNA, but not the DNAs of camelpox virus, cowpox virus, ectromelia virus, vaccinia virus, or VZV, whereas the DNAs of these viruses were detected by conventional PCR methods using the primer set, ATI-up-1 and ATI-low-1, or the in-house primer set designed for the thymidine kinase gene of VZV (data not shown). There is a unique specific nucleotide sequence with a unique 8-nucleotide residue deletion only in the ATI gene of MPXV (11). An LCRed probe was designed to anneal this MPXV-specific nucleotide sequence. The specific reaction to MPXV in the LC-qPCR is thought to be due to the specific nucleotide sequences (11). The DNA of variola virus, the

causative agent for smallpox, expected to show a negative reaction in the LC-qPCR, as variola virus does not contain the specific 8-nucleotide residue deletion. The fact that the homology of the target region in MPXV with the corresponding region in the variola virus is lower than those with the corresponding regions in the orthopoxviruses tested supports this assumption.

We succeeded in producing various levels of clinical symptoms in 4 MPXV-infected monkeys. The naïve-monkey (Zr-Mock) died, while the Zr-LC-0 and Zr-LC3 monkeys survived. The Zr-LC-7 monkey did not show any symptoms. The viremia level determined by LC-qPCR in the Zr-Mock PBC continued to increase during the course of illness, while viremia was not demonstrated in the asymptomatic monkey, Zr-LC-7, by the assay. LC-qPCR is considered to be efficacious not only in diagnosis of MPXV infections but also in the assessment of the severity of MPXV infection-associated symptoms and outcome.

Recently, there have been several reports that describe real-time qPCR assays for the detection of MPXV genomes (12-16). These real-time qPCR assays, including that described herein, are sensitive, rapid, and useful in the diagnosis of MPXV infections. The significant advantage of this newly developed assay, LC-qPCR, over previously reported methods is that it enables the differentiation of MPXV into West African and Congo Basin strains.

In summary, we developed a sensitive, specific, and rapid LC-qPCR system for detection of the MPXV genome targeting specific nucleotide sequences in the ATI gene. This technology should offer great benefits in the control of outbreaks of MPXV infections and in the assessment of the course of MPXV infections.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. N. Inoue for providing us with the DNA of varicella-zoster virus Webster strain.

The monkeys were born and raised in the Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Japan (formerly the Tsukuba Primate Center for Medical Science, NIID). The challenge experiments with MPXV were conducted in a highly containment laboratory at the NIID, Tokyo, Japan. The animal experiments were conducted with the approval from the Ethical Committee on Animal Experiments, NIID, Japan.

The study was conducted with the financial support through a grant-in-aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.

#### REFERENCES

- Marennikova, S.S., Seluhina, E.M., Mal'ceva, N.N., et al. (1972). Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man. *Bull. World Health Organ.*, 46, 599-611.
- Mukinda, V.B., Mwema, G., Kilundu, M., et al. (1997). Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. *Monkeypox Epidemiologic Working Group. Lancet*, 349, 1449-1450.
- Chen, N., Li, G., Liszewski, M.K., et al. (2005). Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology*, 340, 46-63.
- Centers for Disease Control and Prevention (2003). Multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *JAMA*, 290, 30-31.
- Centers for Disease Control and Prevention (2003). Update: multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 52, 642-646.
- Reed, K.D., Melski, J.W., Graham, M.B., et al. (2004). The detection of monkeypox in humans in the Western Hemisphere. *N. Engl. J. Med.*, 350, 342-350.
- Likos, A.M., Sammons, S.A., Olson, V.A., et al. (2005). A tale of two clades: monkeypox viruses. *J. Gen. Virol.*, 86, 2661-2672.
- Saijo, M., Ami, Y., Suzuki, Y., et al. (2006). LC16m8, a highly attenuated vaccinia virus vaccine lacking expression of the membrane protein B5R, protects monkeys from monkeypox. *J. Virol.*, 80, 5179-5188.
- Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., et al. (2005). An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.*, 79, 11873-11891.
- Meyer, H., Ropp, S.L., and Esposito, J.J. (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *J. Virol. Methods*, 64, 217-221.
- Neubauer, H., Reischl, U., Ropp, S., et al. (1998). Specific detection of monkeypox virus by polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 74, 201-207.
- Kulesh, D.A., Loveless, B.M., Norwood, D., et al. (2004). Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3'-minor groove binder TaqMan assays on the Roche LightCycler. *Lab. Invest.*, 84, 1200-1208.
- Olson, V.A., Laue, T., Laker, M.T., et al. (2004). Real-time PCR system for detection of orthopoxviruses and simultaneous identification of smallpox virus. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 1940-1946.
- Panning, M., Asper, M., Kramme, S., et al. (2004). Rapid detection and differentiation of human pathogenic orthopox viruses by a fluorescence resonance energy transfer real-time PCR assay. *Clin. Chem.*, 50, 702-708.
- Espy, M.J., Cockerill, I.F., Meyer, R.F., et al. (2002). Detection of smallpox virus DNA by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40, 1985-1988.
- Li, Y., Olson, V.A., Laue, T., et al. (2006). Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *J. Clin. Virol.*, 36, 194-203.

## Entry from the Cell Surface of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus with Cleaved S Protein as Revealed by Pseudotype Virus Bearing Cleaved S Protein<sup>†</sup>

Rie Watanabe,<sup>1</sup> Shutoku Matsuyama,<sup>1</sup> Kazuya Shirato,<sup>1</sup> Masami Maejima,<sup>1</sup> Shuetsu Fukushima,<sup>2</sup> Shigeru Morikawa,<sup>2</sup> and Fumihiro Taguchi<sup>1\*</sup>

Departments of Virology III<sup>1</sup> and I,<sup>2</sup> National Institute of Infectious Diseases, Murayama Branch, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

Received 8 July 2008/Accepted 3 September 2008

Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus (SARS-CoV) is known to take an endosomal pathway for cell entry; however, it is thought to enter directly from the cell surface when a receptor-bound virion spike (S) protein is affected by trypsin, which induces cleavage of the S protein and activates its fusion potential. This suggests that SARS-CoV bearing a cleaved form of the S protein can enter cells directly from the cell surface without trypsin treatment. To explore this possibility, we introduced a furin-like cleavage sequence in the S protein at amino acids 798 to 801 and found that the mutated S protein was cleaved and induced cell fusion without trypsin treatment when expressed on the cell surface. Furthermore, a pseudotype virus bearing a cleaved S protein was revealed to infect cells in the presence of a lysosomotropic agent as well as a protease inhibitor, both of which are known to block SARS-CoV infection via an endosome, whereas the infection of pseudotypes with an uncleaved, wild-type S protein was blocked by these agents. A heptad repeat peptide, derived from a SARS-CoV S protein that is known to efficiently block infections from the cell surface, blocked the infection by a pseudotype with a cleaved S protein but not that with an uncleaved S protein. Those results indicate that SARS-CoV with a cleaved S protein is able to enter cells directly from the cell surface and agree with the previous observation of the protease-mediated cell surface entry of SARS-CoV.

A causative agent of the severe acute respiratory syndrome (SARS) that spread worldwide in 2002 to 2003 is a newly identified SARS coronavirus (SARS-CoV) (29). SARS-CoV is an enveloped virus with a positive-sense, single-stranded genome RNA of 29 kilobases (25) and is classified into the group 2 CoVs (34).

SARS-CoV spike (S) protein is a class I fusion glycoprotein having a molecular mass of ca. 200 kDa and is responsible for attachment to its receptor and subsequent entry into cells (6, 35, 40). During the maturation of the SARS-CoV S protein, its cleavage by intracellular protease is not observed (6, 35), which is similar to findings with the S protein of group 1 CoVs, such as human CoV 229E and transmissible gastroenteritis virus (4, 17, 19, 31). However, cleaved S1 and S2 (cl-S) subunits are detected on virions and in cells infected with murine CoV mouse hepatitis virus (MHV) and some other group 2 CoVs (36, 39). Although Bergeron et al. reported that certain pro-protein convertases facilitate the processing of SARS-CoV S protein (3), others failed to find any subunits corresponding to S1 and S2 in cells infected with SARS-CoV or transfected with an S protein expression plasmid (27, 32, 35, 39). Uncleaved S proteins of SARS-CoV and others consist of regions that correspond to the S1 and S2 subunits of the MHV S protein. The receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV is located at

amino acids 270 to 510 of the S1 subunit (2), making it similar to the RBD of group 1 CoVs (4, 10, 39) but different from that of MHV, which has its RBD in an N-terminal, 330-amino-acid region of the S1 subunit (21). Membrane-anchored S2 subunits of CoVs and corresponding regions in SARS-CoV S protein are structurally similar to the class I fusion proteins of other enveloped viruses (6, 7, 12). However, the fusion peptide that plays a crucial role in virus-to-cell fusion is located at the N terminus of the membrane-anchored subunit in influenza virus and human immunodeficiency virus (HIV), which in SARS-CoV and other CoVs is located in an internal region of the S2 subunit (6, 8, 12, 18, 24, 30, 37).

SARS-CoV was reported to enter target cells by two different pathways, one via an endosome and the other from the cell surface (27, 32, 33). In the endosomal pathway, the virus particle that attached to its receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) (23), is trafficked into the endosome, and then the S protein is cleaved at amino acid position 678 by an endosomal protease, cathepsin L (CPL), which activates the S protein fusion activity (5). This results in a fusion of the viral envelope and endosome membrane and subsequent internalization of the virus genome into cells (5, 33). On the other hand, the virion S protein attached to cell surface ACE2 is activated for fusion by proteases such as trypsin, which induces cleavage at amino acid position 667 of the S protein, 11 amino acids upstream of the CPL cleavage site (5, 22), which results in the fusion of the virus envelope and plasma membrane and subsequent viral entry from the cell surface (27). Entry from the cell surface is therefore possible only in the presence of proteases that activate the S protein. In both pathways, the

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratory of Respiratory Viral Infections and SARS, National Institute of Infectious Diseases, Murayama Branch, 4-7-1 Gakuen, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan. Phone: 81-42-561-0771, ext. 3533. Fax: 81-42-567-5631. E-mail: ftaguchi@nih.go.jp.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 10 September 2008.