

TABLE 4: Pools and seawater.

No.	Pool name	Remarks	Water system	Isolate	
				Aug. 2006	Feb. 2007
1	H1	Adjunct to the main pool	A	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
2	H2	Adjunct to the main pool	A	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	None
3	Main pool*	Dolphin shows	A	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	None
4	Lagoon shallow	Dolphin show of training for artificial fin, Touching dolphins every weekend, adjunct to lagoon main	B	<i>C. albicans</i>	None
5	Lagoon main	Dolphin show of training for artificial fin	B	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>
6	Lagoon H1	Adjunct to lagoon main	B	<i>C. tropicalis</i>	None
7	Lagoon H2	Adjunct to lagoon main	B	None	<i>C. albicans</i>
8	Studio	Independent pool from No. 1–7 supplied by as the same water system as pools No. 1–3.	A	None	<i>C. albicans</i>
9	Manatee female	Indoor and apart from dolphin pools	C	<i>C. albicans</i>	None
10	Manatee male	Indoor and apart from dolphin pools	C	None	None
11	Sea water	Discharge point for all pool water	D	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>	None

The genotypes A and B are common among *C. tropicalis* isolates from dolphins and environment. In addition, the genotype A was detected not only in isolates at the aquarium but also in the reference ones.

3.6. Antifungal Susceptibility. The susceptibilities to antifungal agents were shown in Tables 5 and 6. No isolate showed resistance to AMPB among the *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates from dolphins, environments, and reference.

Three of 15 (20%) from dolphins, 1 of 12 (8.3%) from the environments, and 1 of 12 (8.3%) from the references in *C. albicans* isolates showed resistance to 5-FC while none of *C. tropicalis* isolates regardless of origins showed resistance to 5-FC.

Thirteen of 15 (86.7%) from dolphins, 7 of 12 (58.3%) from the environments, and 1 of 3 (33.3%) from the staffs showed resistance or dose-dependent susceptibilities to FLCZ; however there was no isolate that showed resistance to the compound in the reference *C. albicans* isolates. Eight of 10 (80%) from dolphins, 1 of 6 (16.7%) from the environments, and 3 of 12 (25%) from the reference *C. tropicalis* isolates showed resistance or dose-dependent susceptibilities to FLCZ.

Twelve of 15 (80.0%) from dolphins, 10 of 12 (83.3%) from the environments, and 1 of 3 (33.3%) from the staffs showed resistance susceptibilities to ITZ; however no isolate showed resistance to the compound in the reference *C. albicans* isolates. Eight of 10 (80%) from dolphins, 3 of 6 (50%) from the environments, and 6 of 12 (50.0%) from the reference *C. tropicalis* isolates showed resistance or dose-dependent susceptibilities to ITZ.

There was no correlation between resistance or dose-dependent susceptibilities to antifungal agents and the

genotype of *MDR1* or *ITS rDNA* in either *C. albicans* or *C. tropicalis* isolates. In addition, one isolate derived from the captive pool no. 5 collected at the winter 2007 showed extremely resistant to MCFG as 16 µg/mL. The susceptibilities to MCZ were listed as reference data.

4. Discussion

4.1. Isolating Rates for Pathogenic Yeasts from Dolphins. According to Buck et al., the holding rates of *Candida* spp. in free-ranging dolphins were as follows: *C. albicans*, 7.0%; *C. tropicalis*, 14.3%; and *Candida* sp., 14.3% [35]. At the present study, the holding rates of *Candida* spp. in dolphins and captive-pools were 70% and 90.9%, respectively, which were higher than those of free-ranging dolphins. Similarly, another report by Buck et al. [35] demonstrated that the captive environments of dolphins showed a higher incidence, over 70%, in feces and pool waters of captive bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*). It suggested that the data from various aquariums or institutions might vary depending on the nursing conditions and the climates of the aquarium. Further studies will confirm the average data of the holding ratio of pathogenic yeast species in captive dolphins and their nursing environments with considerations of age, sex, and physiological data.

4.2. Relationship between Fungal Exhalation and Health. The relationship between fungal exhalation phenomena from blowholes and health condition has not been confirmed [3, 19], although many veterinarians, animal-keepers, and nurses in aquariums in Japan consider the isolations of *Candida* spp. from exhalation as being indicative of illness or weakness in dolphins [34]. We agree that a small numbers

TABLE 5: Antifungal susceptibility and genotypes of *C. albicans* isolates.

IFM No.	Animal No.	Susceptibility to antifungal drugs						MDR 1		ITSrRNA		Combined Genotype (A–X)
		AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITZ	MCZ	MCFG	Accession No.	Genotype (I–16)	Accession No.	Genotype (I–XII)	
Dolphin isolates												
55372	No. 1 (W)	0.5	<0.125	>64*	>8*	4	<0.03	AB379716	1	AB437006	V	A
55224	No. 3 (S)	0.5	<0.125	>64*	>8*	8	<0.03	AB379697	1	AB436989	VI	B
55374	No. 3 (W)	0.5	<0.125	>64*	>8*	2	<0.03	AB379717	1	AB437007	VI	B
55226	No. 4 (S)	0.25	0.25	32 ⁺	8*	2	<0.03	AB379699	16	AB436991	V	C
55376	No. 4 (W)	0.25	0.125	1	0.125	2	<0.03	AB379718	16	AB437008	V	C
55292	No. 5 (S)	0.5	<0.125	64*	8*	2	<0.03	AB379706	1	AB436997	VI	B
55267	No. 9 (S)	0.25	>64*	>64*	>8*	1	<0.03	AB379700	15	AB436992	VI	D
55378	No. 9 (W)	0.25	>64*	>64*	>8*	32	<0.03	AB379719	15	ND	ND	ND
55273	No. 11 (S)	0.25	0.125	>64*	>8*	4	<0.03	AB379701	15	AB436993	VI	D
55274	No. 11 (S)	0.5	<0.125	2	0.125	1	<0.03	AB379702	15	AB436994	V	E
55381	No. 11 (W)	0.25	<0.125	64*	2*	8	<0.03	AB379720	15	AB737009	XI	F
55276	No. 13 (S)	0.25	<0.125	>64*	>8*	4	<0.03	AB379703	7	AB436995	V	G
55382	No. 13 (W)	0.25	<0.125	64*	8*	4	<0.03	AB379721	7	AB437010	V	G
55281	No. 16 (S)	0.125	>64*	>64*	>8*	2	<0.03	AB379704	15	ND	ND	ND
55290	No. 17 (S)	0.5	<0.125	8	0.125	<0.06	<0.03	AB379705	1	AB436996	IX	H
Environmental isolates												
55384	Pool-No. 1 (A) (W)	0.5	<0.125	>64*	>8*	2	<0.03	AB379722	1	AB437011	VI	B
55385	Pool-No. 1 (A) (W)	0.5	<0.125	0.125	0.03	0.06	<0.03	AB379723	7	AB437012	V	G
55302	Pool-No. 2 (A) (S)	0.5	<0.125	>64*	>8*	2	<0.03	AB379710	1	AB737000	IX	H
55304	Pool-No. 2 (A) (S)	0.25	<0.125	64*	>8*	2	<0.03	AB379711	1	AB437001	VI	B
55298	Pool-No. 3 (A) (S)	0.5	<0.125	>64*	>8*	2	<0.03	AB379709	1	ND	ND	ND
55295	Pool-No. 4 (B) (S)	0.5	<0.125	4	>8*	2	<0.03	AB379707	1	AB436998	VI	B
55867	Pool-No. 4 (B) (S)	0.5	<0.125	4	2*	2	<0.03	AB379708	1	AB436999	IX	H
55388	Pool-No. 5 (B) (W)	0.25	<0.125	>64*	>8*	16	>16	AB379726	1	AB437015	V	A
55387	Pool-No. 7 (B) (W)	0.25	>64*	>64*	>8*	>32	<0.03	AB379725	15	AB437014	VIII	I
55386	Pool-No. 8 (A) (W)	0.25	<0.125	>64*	>8*	>32	<0.03	AB379724	1	AB437013	VIII	J
55871	Pool-No. 9 (C) (S)	0.5	<0.125	8	1*	2	<0.03	AB379712	15	AB707002	VIII	I
55319	Sea Water (D) (S)	0.25	<0.125	4	0.06	2	<0.03	AB379714	15	AB437004	VIII	I
Staff isolates												
55390	Staff-A	0.25	<0.125	>64*	>8*	8	<0.03	AB379727	16	AB437016	V	C
55392	Staff-B	0.5	<0.125	2	0.125	0.5	<0.03	AB379728	11	AB437017	V	K
55395	Staff-C	0.5	<0.125	0.5	0.03	2	<0.03	AB379729	5	AB437018	II	L
Reference isolates												
4953	Sputum (I)	0.25	<0.125	0.25	0.03	<0.06	<0.03	AB379730	9	AB437019	I	M
5633	Oral mucosa (I)	0.25	<0.125	0.25	0.03	0.06	<0.03	AB379731	13	AB437020	V	N
5713	Sputum (I)	0.25	<0.125	0.125	0.03	<0.06	<0.03	AB379732	10	AB437021	IV	O
40213	Blood (USA)	0.5	0.25	0.25	0.03	0.06	<0.03	AB379735	2	AB437024	V	P

TABLE 5: Continued.

IFM No.	Animal No.	Susceptibility to antifungal drugs						MDR 1		ITSrRNA		Combined Genotype (A-X)
		AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITZ	MCZ	MCFG	Accession No.	Genotype (1-16)	Accession No.	Genotype (I-XII)	
=ATCC 90028												
41419	Sputum (J)	0.25	<0.125	0.25	0.03	0.06	<0.03	AB379736	4	AB437025	X	Q
49764	Oral mucosa (J)	0.5	<0.125	0.25	0.03	0.06	<0.03	AB379741	4	AB437029	V	R
49765	Oral mucosa (J)	0.5	>64*	8	0.06	0.06	<0.03	AB379742	3	AB437030	III	S
49767	Tongue (J)	0.5	<0.125	1	0.06	0.25	<0.03	AB379743	6	AB437034	XII	T
54349	Sputum (J)	0.5	<0.125	0.25	0.03	0.06	<0.03	AB379751	8	AB437039	I	U
54381	Sputum (J)	0.5	<0.125	0.125	0.03	0.125	<0.03	AB379752	14	AB437040	V	V
54604	Clinical isolate (TW)	0.5	1	1	0.125	0.25	<0.03	AB379754	16	AB437041	XII	W
55046	Clinical isolate (J)	0.5	<0.125	0.125	0.03	0.06	<0.03	AB379756	12	AB437043	VII	X

S: collected at August 2006, W: collected at February 2007.

J: Japan, USA: the United States of America, TW: Taiwan.

A, B, C and D indicated at the environmental isolate indicated the water supply system.

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITZ: itraconazole, MCZ: miconazole, MCFG: micafungin.

*; resistant, and †; dose-dependent susceptibility based on CLSI M27-A2 protocol [42].

of total colonies in *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. tropicalis* isolates might be attached as normal fungal residents of mucous membranes, as described by Buck in 1980 [19], however, we had a doubt on the negative correlation between large numbers of *Candida* spp. colonies and a predictive sign of weakened health or preillness. There were 4 dolphins that died after August 2006; for example dolphin No. 5 died in August 21, 2006 by pneumonia and colitis, No. 18 in December 24, 2007, No. 14 in January 15, 2008, and No. 13 in April 3, 2008 by pneumonia with long-term treatments. Two out of 4 dolphins showed a large numbers of *Candida* spp. in the breath when sampled indicating the correlation between large numbers of *Candida* spp. colonies and a predictive sign of weakened health or preillness. On the other hand, dolphin No. 7 had 407 *C. tropicalis* colonies in the summer and none in the winter, dolphin No. 10 had 601 colonies in the summer and 428 colonies in the winter did not die, and the majority of live dolphins had low *Candida* spp. rates. We could not confirm the relationship between the number of *C. tropicalis* colonies and the health condition of dolphins from these findings.

Although some pathogenic mycelial fungal species such as *Aspergillus niger*, *Aspergillus* spp., *Phoma* sp., *Curvularia lunata*, *Aspergillus* sp., *Schizophyllum commune*, *Aureobasidium pullulans*, and *Fusarium* sp. were isolated from exhalation from blowholes, there was no correlation on the health of dolphins. We should wait for the accumulation of data on the fungal flora from exhalation and body conditions including blood and other physiological examinations, for judging the existence of the correlation.

4.3. Seasonal Characteristics on the Isolates. Interestingly, water source-derived *C. tropicalis* isolates disappeared in the winter, suggesting that *C. tropicalis* might have some difficulty surviving in winter conditions, and even in subtropical

areas. The average temperatures of the environment and captive pools in February were 19.2°C and 22.2°C, while those in August were 31.4°C and 28.8°C, respectively. It is considered that the differences in water temperature might be one of the factors for the existence of *C. tropicalis*. Future investigations may confirm this phenomenon.

4.4. Genotypes. Genotypes based on *MDR 1* seemed to be suitable for molecular epidemiological study in a confined area due to adequate sites of diversity [36, 39]. On the other hand, genotypes of *ITS rDNA* could be useful for the identification of some intraspecies diversity and strain differentiations [44], and could show correlations to geographic, regional, and/or host-dependent genotypes of pathogenic fungi determined by multiple gene analysis [45]. Furthermore, the combination of 2 genes; *MDR 1* and *ITS rDNA*, could indicate more detailed diversity of the genotypes of *Candida* spp. than those by *MDR 1* or *ITS rDNA* alone. Then we discussed on the distributions of genotypes for *C. albicans* and *C. tropicalis* isolated in the aquarium based on the combined genotypes of *MDR 1* and *ITS rDNA*. In the basis of these combinations, we could demonstrate the existences of coincident pathogenic yeast species and their genotypes in both *C. albicans* and *C. tropicalis* between or among dolphins, captive-pools and a staff member although Buck have denied the possibility that pathogenic yeasts are dispersed to other dolphins and environments [19]. Especially, the common genotype of *C. albicans* to both a dolphin and a staff member might be exchanged between them since the animal has been receiving medicine and surgical treatments from the staff member working as a veterinarian.

Interestingly, the genotype of *C. albicans* isolated from dolphin No. 5 which suddenly died of bacterial colitis and pneumonia was detected in the isolate from dolphin No. 3

TABLE 6: Antifungal susceptibility and genotypes of *C. tropicalis* isolates.

IFM No.	Animal No.	Susceptibility to antifungal drugs						MDR 1		ITSrRNA		Combined Genotype (A–M)
		AMPH-B	5-FC	FLCZ	ITZ	MCZ	MCFG	Accession No.	Genotype (I–11)	Accession No.	Genotype (I–V)	
Dolphin isolates												
55217	No. 1 (S)	0.25	<0.125	>64*	>8*	0.5	<0.03	AB379757	1	AB437044	I	A
55220	No. 2 (S)	0.25	<0.125	2	0.125	1	<0.03	AB379759	1	AB437046	I	A
55373	No. 2 (W)	0.5	<0.125	64*	4*	0.5	<0.03	AB379779	1	AB437066	I	A
55229	No. 5 (S)	0.25	<0.125	32 ⁺	8*	2	<0.03	AB379761	2	AB437048	II	B
55233	No. 7 (S)	0.25	<0.125	64*	4*	0.5	<0.03	AB379763	1	AB437050	I	A
55235	No. 7 (S)	0.5	<0.125	>64*	2*	1	<0.03	AB379765	3	AB437052	I	C
55269	No. 10 (S)	0.25	<0.125	>64*	>8*	0.5	0.06	AB379766	2	AB437053	II	B
55379	No. 10 (W)	0.5	<0.125	0.25	0.06	0.25	<0.03	AB379780	2	ND		ND
55277	No. 14 (S)	0.25	<0.125	64*	>8*	0.5	<0.03	AB379768	4	AB437055	I	D
55383	No. 14 (W)	0.25	<0.125	64*	2*	2	<0.03	AB379781	5	AB437067	I	E
Environmental isolates												
55294	Pool-No. 1 (A) (S)	0.5	<0.125	4	0.25 ⁺	1	<0.03	AB379770	6	AB437057	I	F
55297	Pool-No. 2 (A) (S)	0.5	<0.125	16 ⁺	1*	1	<0.03	AB379772	1	AB437059	I	A
55299	Pool-No. 3 (A) (S)	0.5	<0.125	1	0.25 ⁺	1	<0.03	AB379774	1	AB437061	I	A
55301	Pool-No. 5 (B) (S)	0.5	<0.125	0.25	0.06	0.25	<0.03	AB379775	2	AB437062	II	B
55303	Pool-No. 6 (B) (S)	0.5	<0.125	0.25	0.06	0.25	0.03	AB379777	2	AB437064	II	B
55318	Sea Water (D) (S)	0.5	<0.125	0.5	0.06	0.25	<0.03	AB379778	2	AB437065	II	B
Reference isolates												
5746	Clinical isolate (J)	1	<0.125	2	0.25 ⁺	0.5	<0.03	AB379783	7	AB437069	I	G
41420	Clinical isolate (J)*	0.5	<0.125	>64*	8*	0.5	<0.03	AB379785	1	AB437071	I	A
52008	Clinical isolate (J)*	0.5	<0.125	>64*	>8*	16	<0.03	AB379787	1	AB437073	I	A
52010	Clinical isolate (J)*	0.5	<0.125	>64*	>8*	8	<0.03	AB379788	8	AB437074	I	H
52013	Clinical isolate (J)*	0.5	<0.125	2	0.25 ⁺	0.25	<0.03	AB379790	9	AB437076	I	I
52938	Feline cystitis (J)	0.5	<0.125	1	0.06	0.5	<0.03	AB379791	10	AB437077	III	J
53910	Blood (J)	0.5	<0.125	0.5	0.03	0.125	<0.03	AB379794	8	AB437079	IV	K
54637	Pharynx (J)	0.5	<0.125	0.5	0.125	0.125	<0.03	AB379796	9	AB437081	I	I
54674	Pharynx (J)	0.5	0.125	2	0.125	0.5	<0.03	AB379797	8	AB437082	I	H
54675	Pharynx (J)	0.5	<0.125	1	0.125	0.25	<0.03	AB379798	9	AB437083	V	L
55049	Blood (J)	0.5	<0.125	0.5	0.25 ⁺	0.5	<0.03	AB379801	11	AB437085	I	M
55256	Ocular mycosis (J)	0.5	<0.125	>64*	2*	2	<0.03	AB379802	1	AB437086	I	A

S: collected at August 2006, W: collected at February 2007, J: Japan.

A, B, C and D indicated at the environmental isolate indicated the water supply system.

AMPH-B: amphotericin B, 5-FC: flucytosine, FLCZ: fluconazole, ITZ: itraconazole, MCZ: miconazole, MCFG: micafungin,

*; resistant, and ⁺; dose-dependent susceptibility based on CLSI M27-A2 protocol [42].

and captive pools numbers 1, 2, and 4. Those of *C. tropicalis* isolated from the same dolphin No. 5 have also been detected in the isolate from dolphin No. 10, from captive pools No. 5 and 6, and from drained seawater. The animal might be a dispersal source for both *C. albicans* and *C. tropicalis* to other animals as well as to the environment.

The source of pathogenic yeasts might be related to the environmental water since common genotypes among the dolphins and pool water samples were found in *C. albicans* and *C. tropicalis* isolates. Isolates from captive pools free of

dolphins had the same genotypes of *Candida* spp. isolates as the dolphins. Nevertheless, any systematic relationship of the water supply could not be found between pathogenic yeast species and captive pools or seawater. Exchanges of dolphins, common staff members for dolphins and manatees, and/or the influence of the audience might play roles in the dispersing, exchanging and introducing pathogenic yeasts. Further studies and detailed molecular profiles of the isolates may confirm the principle sources of the pathogenic yeasts.

The coincidence of genotypes in dolphins and in environmental isolates to the reference isolates of *C. tropicalis* suggested that such genotypes might be introduced from audiences or from sea water, and/or be very common in the world.

4.5. Attention for Sample Collection. Attention to plural isolates from the same animal at the same sampling period might be important. Although the differences in the colonies were slight with regard to size on CPDA or color on CHROMagar Candida, the clones showed different genotypes and/or susceptibilities to antifungal agents as detected in the *C. albicans* isolates IFM 55273 and IFM 55274 derived from dolphin No.11 isolated at the August 2006. Therefore, at least 2 or more colonies, depending on size and/or color, should be selected for identification, molecular biological analysis, and susceptibilities to antifungal drugs.

4.6. Risk to Be Audience. The fishy smell in the auditorium of the dolphin show indicates a possible spread of the breath, including pathogenic yeasts, to the audience, in spite of the fact that such pathogenic yeast isolates from air samples collected in the front of the dolphin shows were not detected. This suggests that the possibility of inhaling or being exposed to pathogenic *Candida* spp. from the exhalation of dolphins is relatively low. Nevertheless, it seems dangerous to approach the blowholes to a distance closer than 40 cm. For example, activities such as kissing or touching dolphins and, for pregnant women, swimming with dolphins should be approached with caution. The exact distance from the blowholes of dolphins from where it would be free of yeast-blow needs to be measured. Although there was no record of fungal infection caused by inhalation of the exhalation of dolphins, an immunocompromised person should be strongly urged to avoid such close contact with dolphins.

4.7. Characteristics on the Susceptibilities to Antifungal Drugs. The high ratio in isolations of pathogenic yeasts derived from the dolphins compared with the reference strains was the same as that in human oral fungal flora with HIV-infected or immunocompromised hosts [46, 47]. Frequent administrations of antibiotics and steroids might be one of the explanations, but data regarding the parameters concerning stress and immunosuppression, defense mechanisms against microorganisms, and drug metabolisms in the animals, even in normal immune data or blood chemical profiles, are not yet sufficient for meaningful discussion, although the correlation between the occurrence of lobomycosis and immune status of the dolphins was reported in Floridan bottlenose dolphins [10, 48–51].

Furthermore, the higher incidences of resistance to azole-related antifungal agents in the isolates from dolphins and environments might be related to the sodium chloride in sea water, a speculation drawn from the correlations among resistance to chemical compounds, pathogenicity, and sodium chloride [52].

4.8. Correlation between the Genotype and Resistance to Antifungal Agents. According to Tavanti et al., *MDR 1* alone cannot define the relationship between genotypes and profiles of antifungal agents [36]. In the present study, no correlation was found between resistance or dose-dependents susceptibilities to azole-related antifungal agents and the genotypes of *MDR1* and/or *ITS rDNA* in either *C. albicans* or *C. tropicalis*, since an identical genotype based on *MDR1* and *ITS rDNA* sequences has shown different profiles of susceptibilities to azole-related antifungal agents, regardless of origin. The reference isolates, giving a higher ratio of resistant isolates, could not help in determining the specific genotypes based on the combination of *MDR1* and *ITS rDNA* sequences.

5. Conclusions

The detection of common genotypes on *Candida* spp. among dolphins, environments, and staff members pointed to the dissemination of pathogens at the aquarium. Thus, it seemed to be important to consider the effects on audiences from dolphins and the reverse relations for controls of zoonotic infections. In addition, the sequence of *MDR 1* showed adequate numbers of variations, indicating that the gene might be useful for molecular epidemiological studies.

Acknowledgments

This study was supported by the Special Research Fund for Emerging and Re-emerging Infections of the Ministry of Health, Welfare, and Labor, Japan, and in part by the National BioResource Project of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan, cooperated by Drs. Katsuhiko Kamei and Ayako Sano.

References

- [1] G. Migaki and S. R. Jones, "Mycotic diseases in marine mammals," in *Pathobiology of Marine Mammal Diseases*, E. B. Howard, Ed., vol. 2, pp. 1–25, Boca Raton: CRC, 1983.
- [2] R. Higgins, "Bacteria and fungi of marine mammals: a review," *Canadian Veterinary Journal*, vol. 41, no. 2, pp. 105–116, 2000.
- [3] T. H. Reidarson, J. F. McBain, L. M. Dalton, and M. G. Rinaldi, "Mycotic Diseases," in *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, L. A. Dierauf and F. M. D. Gulland, Eds., Chapter 17, pp. 337–355, CRC Press, Washington, DC, USA, 2nd edition, 2001.
- [4] J. C. Sweeney, G. Migaki, P. M. Vainik, and R. H. Conklin, "Systemic mycoses in marine mammals," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 169, no. 9, pp. 946–948, 1976.
- [5] G. Migaki, M. G. Valerio, B. Irvine, and F. M. Garner, "Lobo's disease in an atlantic bottle-nosed dolphin," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 159, no. 5, pp. 578–582, 1971.
- [6] G. A. DeVries and J. J. Laarman, "A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*," *Aquatic Mammals*, vol. 1, pp. 26–29, 1973.
- [7] D. K. Caldwell, M. C. Caldwell, J. C. Woodard et al., "Lobomycosis as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821)," *American Journal of*

- Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 24, no. 1, pp. 105–114, 1975.
- [8] R. G. Baruzzi, C. S. Da Lacaz, and F. A. A. De Souza, "Natural history of Jorge Lobo's disease. Occurrence among the Caiabi Indians (Central Brazil)," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, vol. 21, no. 6, pp. 303–338, 1979.
- [9] E. M. Haubold, J. F. Aronson, D. F. Cowan, M. R. McGinnis, and C. R. Cooper, "Isolation of fungal rDNA from bottlenose dolphin skin infected with *Loboa lobo*," *Medical Mycology*, vol. 36, no. 5, pp. 263–267, 1998.
- [10] W. N. Durden, J. St Leger, M. Stolen, T. Mazza, and C. Londono, "Lobomycosis in Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 45, no. 3, pp. 849–856, 2009.
- [11] W. C. Symmers, "A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*)," *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique et de ses Filiales*, vol. 76, no. 5, part 2, pp. 777–784, 1983.
- [12] T. H. Reidarson, J. H. Harrell, M. G. Rinaldi, and J. McBain, "Bronchoscopic and serologic diagnosis of *Aspergillus fumigatus* pulmonary infection in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 29, no. 4, pp. 451–455, 1998.
- [13] L. A. Tell, "Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine," *Medical Mycology*, vol. 43, no. 1, pp. S71–S73, 2005.
- [14] M. Domingo, J. Visa, M. Pumarola et al., "Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*)," *Veterinary Pathology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–10, 1992.
- [15] S. B. Hong, S. J. Go, H. D. Shin, J. C. Frisvad, and R. A. Samson, "Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species," *Mycologia*, vol. 97, no. 6, pp. 1316–1329, 2005.
- [16] J. Barley, G. Foster, B. Reid, M. Dagleish, and F. Howie, "Encephalitis in a northern bottlenose whale," *Veterinary Record*, vol. 160, no. 13, p. 452, 2007.
- [17] J. L. Dunn, J. D. Buck, and S. Spotte, "Candidiasis in captive cetaceans," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 181, no. 11, pp. 1316–1321, 1982.
- [18] S. Nakeeb, S. P. Targowski, and S. Spotte, "Chronic cutaneous candidiasis in bottle-nosed dolphins," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 171, no. 9, pp. 961–965, 1977.
- [19] J. D. Buck, "Occurrence of human-associated yeasts in the feces and pool waters of captive bottlenosed dolphins (*Tursiops truncatus*)," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 16, no. 1, pp. 141–149, 1980.
- [20] H. H. Nollens, J. F. X. Wellehan, J. T. Saliki et al., "Characterization of a parainfluenza virus isolated from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)," *Veterinary Microbiology*, vol. 128, no. 3–4, pp. 231–242, 2008.
- [21] S. Mazzariol, G. Marrucchella, G. Di Guardo et al., "Post-mortem Findings in Cetacean Stranded along Italian Adriatic Sea coastline (2000–2006)," SC/59/DW6, http://72.14.235.104/search?q=cache:7gW1xaujfAJ:iwcoffice.org/_documents/sci.com/2006progreports/SC-58-ProgReplItaly.pdf+Post-mortem+Findings+in+Cetacean+Stranded+along+Italian+Adriatic+Sea+coastline&hl=ja&ct=clnk&cd=2&gl=jp&client=firefox-a.
- [22] W. G. Miller, A. A. Padhye, W. Van Bonn, E. Jensen, M. E. Brandt, and S. H. Ridgway, "Cryptococcosis in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) caused by *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 2, pp. 721–724, 2002.
- [23] N. Gales, G. Wallace, and J. Dickson, "Pulmonary cryptococcosis in a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*)," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 21, no. 4, pp. 443–446, 1985.
- [24] G. Migaki, R. D. Gunnels, and H. W. Casey, "Pulmonary cryptococcosis in an Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*)," *Laboratory Animal Science*, vol. 28, no. 5, pp. 603–606, 1978.
- [25] S. Frasca, J. L. Dunn, J. C. Cooke, and J. D. Buck, "Mycotic dermatitis in an Atlantic white-sided dolphin, a pygmy sperm whale, and two harbor seals," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 208, no. 5, pp. 727–729, 1996.
- [26] G. Migaki, R. L. Font, W. Kaplan, and E. D. Asper, "Sporotrichosis in a Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquoidens*)," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 39, no. 12, pp. 1916–1919, 1978.
- [27] T. Hoshina and Y. Sigiura, "On a skin disease and nematode parasite of a dolphin *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821)," *Scientific Whale Research Institute*, vol. 1, pp. 133–137, 1956.
- [28] T. R. Robeck and L. M. Dalton, "Saksenea vasiformis and Apophysomyces elegans zygomycotic infections in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), a killer whale (*Orcinus orca*), and pacific white-sided dolphins (*Lagenorhynchus obliquoidens*)," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 33, no. 4, pp. 356–366, 2002.
- [29] H. C. Gugnani, "Entomophthoromycosis due to *Conidiobolus*," *European Journal of Epidemiology*, vol. 8, no. 3, pp. 391–396, 1992.
- [30] P. B. Best and R. M. McCully, "Zygomycosis (phycomycosis) in a right whale (*Eubalaena australis*)," *Journal of Comparative Pathology*, vol. 89, no. 3, pp. 341–348, 1979.
- [31] T. H. Reidarson, L. A. Griner, D. Pappagianis, and J. McBain, "Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 34, no. 3, pp. 629–631, 1998.
- [32] E. D. Jensen, T. Lipscomb, B. Van Bonn, G. Miller, J. M. Fradkin, and S. H. Ridgway, "Disseminated histoplasmosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 29, no. 4, pp. 456–460, 1998 (Japanese).
- [33] M. B. Cates, L. Kaufman, J. H. Grabau, J. M. Pletcher, and J. P. Schroeder, "Blastomycosis in an Atlantic bottlenose dolphin," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 189, no. 9, pp. 1148–1150, 1986.
- [34] S. Shitomizu and Y. Nomura, "Zygomycosis in respiratory system in two bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*)," *Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 45–51, 1997.
- [35] J. D. Buck, R. S. Wells, H. L. Rhinehart, and L. J. Hansen, "Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal Gulf of Mexico and Atlantic ocean waters," *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 42, no. 3, pp. 536–544, 2006.
- [36] A. Tavanti, A. D. Davidson, E. M. Johnson et al., "Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 11, pp. 5593–5600, 2005.
- [37] J. S. Zeng and G. S. de Hoog, "Exophiala spinifera and its allies: diagnostics from morphology to DNA barcoding," *Medical Mycology*, vol. 46, no. 3, pp. 193–208, 2008.
- [38] T. J. White, T. Bruns, S. Lee et al., "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, M. H. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, Eds., pp. 315–322, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1990.

- [39] A. Tavanti, N. A. R. Gow, S. Senesi, M. C. J. Maiden, and F. C. Odds, "Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 8, pp. 3765–3776, 2003.
- [40] M. E. Bougnoux, S. Morand, and C. D'Enfert, "Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 4, pp. 1290–1297, 2002.
- [41] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition*, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, Wayne, Pa, USA, 2008, CLSI/NCCLS document M27-A3.
- [42] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Informational Supplement*, Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS, Wayne, Pa, USA, 3rd edition, 2008, CLSI/NCCLS document M27-S3.
- [43] T. Kanbe, T. Horii, T. Arishima, M. Ozeki, and A. Kikuchi, "PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes," *Yeast*, vol. 19, no. 11, pp. 973–989, 2002.
- [44] T. Sugita, A. Nishikawa, R. Ikeda, and T. Shinoda, "Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 37, no. 6, pp. 1985–1993, 1999.
- [45] F. Gilgado, J. Cano, J. Gené, and J. Guarro, "Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, no. 10, pp. 4930–4942, 2005.
- [46] J. Bagg, M. P. Sweeney, M. A. O. Lewis et al., "High prevalence of non-albicans yeasts and detection of anti-fungal resistance in the oral flora of patients with advanced cancer," *Palliative Medicine*, vol. 17, no. 6, pp. 477–481, 2003.
- [47] N. R. Melo, H. Taguchi, J. Jorge et al., "Oral *Candida* flora from Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 4, pp. 425–431, 2004.
- [48] J. S. Reif, M. S. Mazzoil, S. D. McCulloch et al., "Lobomycosis in Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 228, no. 1, pp. 104–108, 2006.
- [49] J. S. Reif, M. M. Peden-Adams, T. A. Romano, C. D. Rice, P. A. Fair, and G. D. Bossart, "Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with lobomycosis," *Medical Mycology*, vol. 47, no. 2, pp. 125–135, 2009.
- [50] J. S. Reif, P. A. Fair, J. Adams et al., "Evaluation and comparison of the health status of Atlantic bottlenose dolphins from the Indian River Lagoon, Florida, and Charleston, South Carolina," *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 233, no. 2, pp. 299–307, 2008.
- [51] M. E. Murdoch, J. S. Reif, M. Mazzoil, S. D. McCulloch, P. A. Fair, and G. D. Bossart, "Lobomycosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian river Lagoon, Florida: estimation of prevalence, temporal trends, and spatial distribution," *Ecohealth*, vol. 5, no. 3, pp. 289–297, 2008.
- [52] J. Schmid, P. R. Hunter, G. C. White, A. K. Nand, and R. D. Cannon, "Physiological traits associated with success of *Candida albicans* strains as commensal colonizers and pathogens," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 33, no. 11, pp. 2920–2926, 1995.

我が国のヒストプラズマ症と仮性皮疽

佐野文子・高橋英雄
村田佳輝・唐仁原景昭

日本獣医史学雑誌第48号

2011年2月20日発行

JAPANESE JOURNAL OF VETERINARY HISTORY

No.48, February 2011

我が国のヒストプラズマ症と仮性皮疽

佐野 文子¹・高橋 英雄²・村田 佳輝³・唐仁原景昭⁴

はじめに

ヒストプラズマ症(histoplasmosisまたは histoplasmoses)は、温度依存性二形性真菌による高度病原性真菌症のひとつである。我が国では、輸入症例だけでなく、国内感染症例が存在する。2010年8月末現在、ヒトで64例以上(<http://www.Pf.chiba-u.ac.jp/>)が報告されているが、その1~2割が国内感染と推定されている。動物でもラッコ3頭を除いて、イヌ8頭、ウマ1頭、ウシ4頭はすべて国内感染である。また戦前、ヒストプラズマ症の1病型の仮性皮疽として多数のウマ症例が記録されている。¹⁾

かつて、ヒストプラズマ症と仮性皮疽の原因菌は別種とされていたが、その区別は付けられないだけでなく、分子疫学的にも両者に差がないと報告されてきた。しかしながら、分子疫学データを再解析したところ、国内でヒトおよびイヌで発症したヒストプラズマ症原因菌の遺伝子型はウマの仮性皮疽と同じ型を示すことが明らかとなり、仮性皮疽がウマ以外の宿主に発生していることが示唆されている。²⁾ 今回、我が国のヒストプラズマ症と仮性皮疽の関係について、歴史のおよび分子疫学的考察をする。

1. 原因菌

ヒストプラズマ症の原因菌は *Histoplasma capsulatum* で、室温での発育が遅く、はじめ白色で次第に黄褐色の菌糸状集落となる。検体からの原因菌の分離・培養は難しい。顕微鏡的には多くの指状の突起をもつ大分生子と球形の小分生子が特徴であるが、温度依存性の二形性を示し、特殊な培養環境や宿主内では酵母形に変換する。また細胞内寄生性であることも本菌種の特徴である(図1)。¹⁾

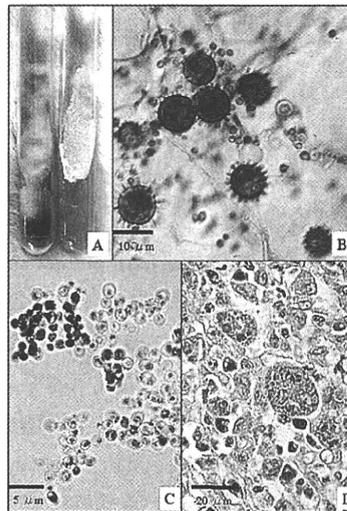
SANO Ayako, TAKAHASHI Hideo, MURATA Yoshiteru and TOUJINBARA Kageaki : Histoplasmosis and Pseudofarcy in Japan

1. 千葉大学真菌医学研究センター 〒260-8673 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1
2. エイ.ランドおゆみ野動物病院 〒266-0017 千葉県千葉市緑区おゆみ町3-71-7
3. むらた動物病院 〒299-4114 千葉県茂原市本納2016
4. 日本獣医史学会理事 〒283-0812 千葉県東金市福俣324-4
(2010年10月10日受付・2010年10月18日受理)

旧来、分布地域、寄生形態、症状、宿主などにより原因菌が分けられていたが、この点については菌名の変遷の項目で詳述する。

図1 原因菌の*Histoplasma capsulatum*

- (A) 菌糸型集落と酵母様集落
- (B) 大分生子と小分生子
- (C) 培養で得られた酵母細胞
- (D) 宿主内での酵母形細胞
(イヌ症例, PAS染色, x400)



2. 分布と感染経路

ヒストプラズマ症は全世界的に分布し、大河の流域に多い。原因菌は本来土壤中に生息し、ヒバリの巣、コウモリの糞を好む。呼吸器感染が主な感染経路であるが、創傷感染、接触感染、消化器感染も報告されている。¹⁾ 一方、『時重獣医学博士論文集』(1918)によれば、仮性皮疽も土壌、ウマの飼育環境、馬具だけでなく、アブ、ハエなどの昆虫により媒介され、皮膚の傷より感染する。しかし、ウマからウマへ直接感染することは極めて稀と報告されている。³⁾

3. ヒストプラズマ症と仮性皮疽の臨床症状

ヒトのヒストプラズマ症のカプスラーツム型およびズボアジ型ヒストプラズマ症の臨床症状は肺の初感染ではじまり、多くは無症状であるが、軽度の感冒様症状から全身感染まで様々である。(1)急性肺ヒストプラズマ症、(2)慢性肺ヒストプラズマ症、(3)播種性ヒストプラズマ症、(4)粘膜・皮膚の潰瘍・結節、消化管病変などを示すヒストプラズマ症に分けられている。¹⁾

ウマ等で発症する仮性皮疽(ファルシミノーズム型ヒストプラズマ症)は、頸部や脚のリンパ管やリンパ節を特異的に侵す。ヒト、ウシ、イヌ、ラクダでも発疹、潰瘍、肉芽腫形成など皮膚症状を示すことが知られている。また、重症では肺炎症状を伴うこともある。¹⁾ なお、現在もウマでは届出伝染病である。

4. 診断・治療など

真菌症の診断には原因菌の分離・同定が第一であるが、ヒストプラズマ症は菌分離率が低いことが確定診断の妨げとなっている。その上、本菌種は高度病原性真

菌であるから、分離培養は専門機関に相談することが第一である。

補助的診断方法として、血清学的診断、病理学的診断方法がある。血清学的診断方法でかつて行われていたヒストプラスミン反応は、補体結合反応による血清中の抗原検出の妨げになるうえ、播種性ヒストプラズマ症の患者では陰性となることもあるため、2000年以降、発売中止となっている。¹⁾⁴⁾

また、我が国のイヌ症例のほとんどは抗体検査、抗原検出ともに陰性で、病理組織学的検査と遺伝子検出による診断がなされている。検出キットが作成されたアメリカ合衆国由来株との抗原性の違いと考えている。¹⁾ また、我が国で50年以上前にヒストプラスミンによる皮内反応陽性率を調べ、約3,000人の調査で1%程度の陽性者が含まれるとの報告がある。⁵⁾

分子生物学的方法として臨床検体からのリボゾームRNA遺伝子のinternal transcribed spacer (ITS) 1-5.5S-ITS2領域の遺伝子検出と配列決定による診断も可能であり、遺伝子型の決定も可能である。¹⁾²⁾

ヒストプラズマ症の治療には抗真菌薬の長期投与が必要である。治療しなければ致死的になることがある。また、外科的切除が適応できた症例もある。¹⁾

5. ヒストプラズマ症原因菌の菌名変遷史

現在 *Ajellomyces capsulatus* (teleomorph), *Histoplasma capsulatum* (anamorph) とされているヒストプラズマ症原因菌の菌名には100年以上の歴史がある。その菌名の変遷を、分布地域、寄生形態、症状、宿主などにより分類されていた旧来の原因菌の variety と病型に沿って紹介する(表1)。なお、菌名に関する文献は表中に示したので特別な場合を除き割愛する。

表1. ヒストプラズマ症原因菌 *Histoplasma capsulatum* 命名の変遷

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum*

1906	<i>Histoplasma capsulatum</i> (var. <i>capsulatum</i>) Darling -J. Am. Med. Ass. 46:1283.
1919	<i>Cryptococcus capsulatus</i> (Darling) Castellani & Chalmers -Man. Trop. Med., ed. 3, p. 1076.
1933	<i>Torulopsis capsulata</i> (Darling) de Almeida -Anais Fac. Med. S. Paulo 9:76.
1934	<i>Posadia capsulata</i> (Darling) M. Moore -Annls Mo. Bot. Gdn 21:348.
1934	<i>Posadia pyriformis</i> M. Moore -Annls Mo. Bot. Gdn 21:347.

- 1935 *Histoplasma pyriforme* (M. Moore) C.W. Dodge
- Med. Mycol. p. 155.
- 1972 *Emmonsiaella capsulata* Kwon-Chung
- Science 177:368, 1972.
- 1979 *Ajellomyces capsulatus* (Kwon-Chung) McGinnis & Katz
- Mycotaxon 8:158.

Histoplasma capsulatum var. *duboisii*

- 1952 *Histoplasma duboisii* Vanbreuseghem
- Anns Soc. Belg. Md. Trop. 32:578.
- 1960 *Histoplasma capsulatum* Darling var. *duboisii*
(Vanbreuseghem) Ciferri
- Man. Micol. Med., ed. 2, p. 342.

Histoplasma capsulatum var. *farciminosum*

- 1873 *Cryptococcus farciminosus* Rivolt
- Paras. Veg. p. 246.
- 1895 *Cryptococcus rivoltae* Fermi & Aruch
- Centbl. Bakt. Parasitkde, Abt. 1, 17:593-600.
- 1895 *Saccharomyces equi* Marcone
- Atti R. Ist. Incoragg. Napoli, Ser. 5, 8-6:1-19.
- 1896 *Saccharomyces farciminosus* (Rivolta & Micelloni) Tokishige
- Centbl. Bakt. Parasitkde, Abt. 2, 19:105-112.
- 1901 *Saccharomyces farciminosus* (Rivolta) Vuillemin
- Revue Gen. Sci. Pures Appl. 12:740.
- 1901 *Cryptococcus tokishigei* Vuillemin
- Rev Gen Sci Pures Appl, 12:732-751.
- 1905 *Lymphosporidium equi* Gasperini
- Accad. Med. Fis. Fiorentina, Feb.
- 1908 *Leurocytozoon piroplasmoides* Ducloux
- C.R. Soc. Biol. 64:593.
- 1909 *Leishmania farciminosus* (Rivolta) Galli-Valerio
- Centbl. Bakt. Parasitkde, Abt. 1, 44:577-582.
- 1916 *Monilia capsulata* Lindner & Kreuth
- Zeitschr. Infekkrankh. Haustiere 17:299.
- 1917 *Endomyces farciminosus* (Rivolta) Negre & Bouquet
- Bull. Soc. Path. Exot. 10:274.

- 1918 *Parendomyces farciminosus* (Rivolta) Froilano de Mello & Fernandes
-Arq. Hig. Pat. Exot. 6:29.
- 1918 *Parendomyces tokishigei* Froilano de Mello & Fernandes
-Arq. Hig. Pat. Exot. 6:295.
- 1925 *Grubyella farciminosus* (Rivolta) Ota & Langeron
-Annls Parasit. Hum. Comp. 3:78.
- 1931 *Coccidioides farciminosus* (Rivolta) Vuillemin
-Champ. Paras. Myc. Homme Anim. p.140.
- 1933 *Torulopsis farciminosus* (Rivolta) de Almeida
-Anais Fac. Med. S. Paulo 9:76.
- 1934 *Histoplasma farciminosum* (Rivolta) Redaelli & Ciferri
-Boll. Sez. Ital. Soc. Int. Microbiol. 6:378.
- 1935 *Zymonema farciminosum* (Rivolta) C.W. Dodge
-Med. Mycol. p. 169.
- 1985 *Histoplasma capsulatum* Darling var. *farciminosum* (Rivolta)
Weeks, Padhye & Ajello
-Mycologia 77:969.

1) カプスラーツム型ヒストプラズマ症 (histoplasmosis capsulati): *H. capsulatum* var. *capsulatum* (*H. capsulatum*) を原因菌とし、ヒトの他各種動物も罹患し、古典型、アメリカ型、小型ヒストプラズマ症ともいわれ、全世界の温帯から熱帯にかけて、特に大河流域に分布する。⁶⁾⁷⁾

原因菌の発見は、Darling がパナマでの剖検症例を原虫症として報告したことに始まる。⁸⁾ 1972年に Kwon-Chung が交配試験により有性型 *Emmonsia capsulata* を提唱し、⁹⁾ その後この有性型という名称は McGinnis らに *Ajellomyces capsulatus* と改名され現在に至っている。¹⁰⁾ よって、現在はこの有性型の名称 *A. capsulatus* が GenBank データベースでは優先しているが、臨床現場ではヒストプラズマ症の病名を受けて *Histoplasma capsulatum* が使われている。

2) ズボアジ型ヒストプラズマ症 (histoplasmosis duboisii): *H. capsulatum* var. *duboisii* (*H. duboisii*) を原因菌とし、ヒトとヒヒが感染し、アフリカ大陸と我が国が流行地といわれている。別名にアフリカ型、大型ヒストプラズマ症がある。⁶⁾¹¹⁾

1943年に Duncan がアフリカの患者で、寄生した酵母細胞の大きさが大きいことに気づき議事録に記載後、1946年に論文として発表した。¹²⁾ 後に Vanbreuseghem が 1952年に *Histoplasma duboisii* Vanbreuseghem (1952) として発表後、¹³⁾ 1960年 Ciferri により *Histoplasma capsulatum* Darling var.

duboisii (Vanbreuseghem) Ciferri (1960) として *H. capsulatum* の1変種としての扱いとなっていた。¹⁴⁾

- 3) フェルシミノーズム型ヒストプラズマ症 (histoplasmosis farciminosi) : *H. capsulatum* var. *farciminosum* (*H. farciminosum*) によって発症し、全世界的に分布し、ウマ科動物のみが罹患するといわれてきた。すなわち、仮性皮疽 (African glanders, epizootic lymphangitis, Histoplasma farciminosum infection, Japanese farcy, Lymphangitis epizootica, Neapolitan farcy, pseudofarcy, pseudoglanders) である。^{6) 15)}

原因菌の variety は、Rivolta と Micelloni が仮性皮疽に罹患したウマの細胞内に均一で出芽している細胞を検出し、*Cryptococcus farciminosus* Rivolta & Micelloni (1873) として発表したことに始まる。¹⁶⁾

その後の命名変遷史のなかに時重初熊による *Saccharomyces farciminosus* (Rivolta & Micelloni) Tokishige (1896),¹⁷⁾ 太田正雄による *Grubyella farciminosus* (Rivolta) Ota & Langeron (1925)¹⁸⁾ が我が国の研究者の軌跡として残っており、特に時重初熊による原因菌の分離とその記載は国際的に高い評価を得ている。仮性皮疽の英語表記に Japanese farcy の名前があるのはその現れであると後に久地井によって紹介されている。¹⁹⁾

しかしながら、現在、*H. capsulatum* var. *capsulatum* と *H. capsulatum* var. *duboisii* 交配成立により、両 variety は同一 variety とされた。^{10) 20)} さらに、*H. capsulatum* var. *capsulatum* と *H. capsulatum* var. *farciminosum* の形態的同一性^{6) 15)} と分子生物学的特徴で同じ遺伝子型をとるクラスターに各種 variety が混在することから variety に分ける概念が否定されている。²¹⁻²³⁾

6. 我が国のヒストプラズマ症の歴史

ヒトのヒストプラズマ症は、1957年に Yamato ら²⁴⁾ が発表した海外渡航歴のない17歳の女性の症例が第1例目とされている。²⁴⁾ しかし、それより以前の1949年にヒストプラスミン反応試験により感染が示唆された症例が柳澤謙らにより発表されている。²⁵⁾ そこでは東京、大阪、埼玉、新潟、宮城、福島、山形の各都府県で6,173名の就学児童および未就学児にヒストプラスミンを接種し、48時間後の判定で直径5mm以上を示したものを陽性と判定したところ、1例の陽性例を検出している。患者は宮城県の10歳男児で胸部X線像に石灰化を伴い、ツベルクリン反応、ヒストプラスミン反応ともに陽性を示した症例があったと記録している。その発表に際し、駒野丈夫(東京通信病院結核科)は「日本におけるヒストプラズマ症の存否は

不明だが、この疾患がもし存在すれば臨床症状の末期は相当重篤であるはずなのだから、既に発見されているか、病理解剖例があるはずである。それらが無い点からして日本では存在しないのであろうか」とコメントし、柳澤は「恐らく日本には少ない病気であらう」と答えている。²⁵⁾

表2 国内で感染したと推測されるヒストプラズマ症

症例	年齢(歳)	性別	発祥地	症状	診断方法	予後	文献
ヒト							
1	17	F	岡山	全身播種	H	死亡	Acta Med Okayama 11:347-364, 1957.
2	24	M	熊本	呼吸器	H	不明	結核 36: 194, 1961.
3	67 ^a	M	新潟	全身播種	H	死亡	結核 59: 256-257, 1984.
4	72	M	群馬	皮膚	C,CL,H	治癒	J Dermatol 21: 586-589, 1994.
5	84	M	大阪	全身播種	H,MB	死亡	日本病理学会会誌 93: 387, 2004.
6	78	M	京都	全身播種	C,CL,H,MB	死亡	Tropical Medicine and Health 33: 40, 2005.
7	47	M	岡山	肺	H,MB	経過観察中	日本呼吸器外科学会雑誌22:92-96, 2008.
8	59	M	奈良	全身播種	H,MB	経過観察中	感染症学会雑誌 82: 588, 2008.
ウマ ^b							
1	4	F	栃木	全身播種	H,IA	死亡	Jpn Vet Med Sci 63: 1229-31, 2001.
ウシ ^c							
4	3ヶ月	F	岩手	全身播種	H	死亡	Jpn J Vet Sci. 34: 333-339, 1972.
イヌ							
1	8:雑種	F	東京	粘膜・皮膚	H,IH	治癒	J Vet Med Sci. 60: 863-5, 1998.
2	2.6:MD	M	東京	皮膚	H,MB	治癒	真菌誌 42: 229-35, 2001.
3	2.3:SZ	F	熊本	皮膚	H,MB	緩解・増悪	真菌誌 42: 229-35, 2001.
4	5:柴	F	東京	皮膚	H,MB	起立不能による安楽死	Vet Microbiol, 94: 219-24, 2003.
5	4:SH	M	東京	皮膚	C,H,MB	緩解その後追跡不可能	J Vet Med A 52: 472-480, 2005.
6	12:SZ ^d	M	東京	皮膚	C,MB	緩解・増悪	Medical Mycology 43:233-245, 2007.
7	8:BT	F	千葉	皮膚・全身播種	H,MB	死亡	Medical Mycology 43:233-245, 2007.
8	13:LR	F	千葉	肺	H,MB	死亡	今回紹介する症例
ラッコ ^e							
1	4.75	F	新潟	全身播種	H,IH	死亡	J Comp Pathol 125: 219-23, 2001.

a: 1984年までに岡山、鹿児島、熊本、長崎、久留米、福岡、大宮、新潟、山形など国内発症例13例(9例は病理組織、4例は臨床診断)が確認されていたと報告されている。

b: この他に仮性皮疽として国内および外地の症例として33,000頭以上が記録されていた。

c: 明治時代に5例が記載されていた(時重獣医学博士論文集: 214-216, 1918)。

d: 2005年2月老衰のため死亡。

e: 症例個体は日本で出生、親は輸入個体で、ヒストプラズマ症により死亡と推定されている。MD: ミニチュアダックスフント, SZ: シーズー, SH: シベリアンハスキー, BT: ポストンテリア, LR: ラブラドルレトリバー, C: 細胞学的診断, CL: 培養陽性, H: 病理組織学的診断, MB: 分子生物学的診断, IH: 免疫組学的診断。

その後、1959年までに藤野,²⁶⁾ Katayamaら,²⁷⁾ 星島ら,²⁸⁾ 美甘ら²⁹⁾ など各地で少数の陽性例を報告してきた。1960年には日比野が職業的に土壌と接触する機会の多い職業にヒストプラスミン陽性率が高いことを報告し、その原因は交叉反応によるもので*H. capsulatum*の感染によるものではないと考察していた。⁵⁾

現在、我が国で記録されているヒストプラズマ症の症例の約1~2割が国内感染例と推定されている。さらにイヌの国内感染例も8例に及ぶことから、ヒストプラズマ症は我が国に存在する最もバイオセーフティレベルの高い病原真菌による感染症であると認識されるようになってきた。¹⁾²⁾ ヒトと動物の主な国内感染症例を表2にあげた。なお文献は表中に記したので割愛する。

7. 我が国のイヌのヒストプラズマ症

流行地のアメリカ合衆国で、イヌのヒストプラズマ症は良性肺型(benign pulmonary form)と全身性(disseminated form)の2種に分ける方法と、急性・致死性・全身感染型(acute, fatal, disseminating disease), 進行性慢性型(advanced chronic form), 非致死型(non-fatal form)の3種とに分ける方法がある。流行地でのイヌのヒストプラズマ症の多くは全身性もしくは急性、致死性が多く、診断されても予後不良の症例が多い。¹⁾

一方、我が国のイヌのヒストプラズマ症の大多数は皮膚や粘膜の潰瘍、多発性皮膚結節など皮膚病巣を主とし、肺病変を伴う症例が少ないことが特徴である。¹⁾ また、ヒトの国内感染例で分離株の遺伝子型が*H. capsulatum* var. *capsulatum*と*H. capsulatum* var. *farcimosum*が混在するクラスターに属した症例は、皮膚病変を主とすると報告されている。²⁾ これらの皮膚症状は、*H. capsulatum* var. *farcimosum*によるウマの仮性皮疽との類似点であった(表2)。

しかしながら、この遺伝子型の感染では、ヒト、イヌともに致死的になった症例も報告されている。宿主の免疫力が関与していると推測される。¹⁾

8. 我が国のヒストプラズマ症の遺伝子型

GenBank上で公開されているリボゾームRNA遺伝子のITS領域の配列の信用できる配列を用いて解析しても、*H. capsulatum* var. *capsulatum*と*H. capsulatum* var. *farcimosum*が混在し、旧来のvarietyに沿った遺伝子型に分かれてくることはない。²¹⁻²³⁾ また主に*H. capsulatum* var. *duboisii*由来配列により構成されるクラスターにもアフリカ由来以外の*H. capsulatum* var. *capsulatum*配列が入っている。

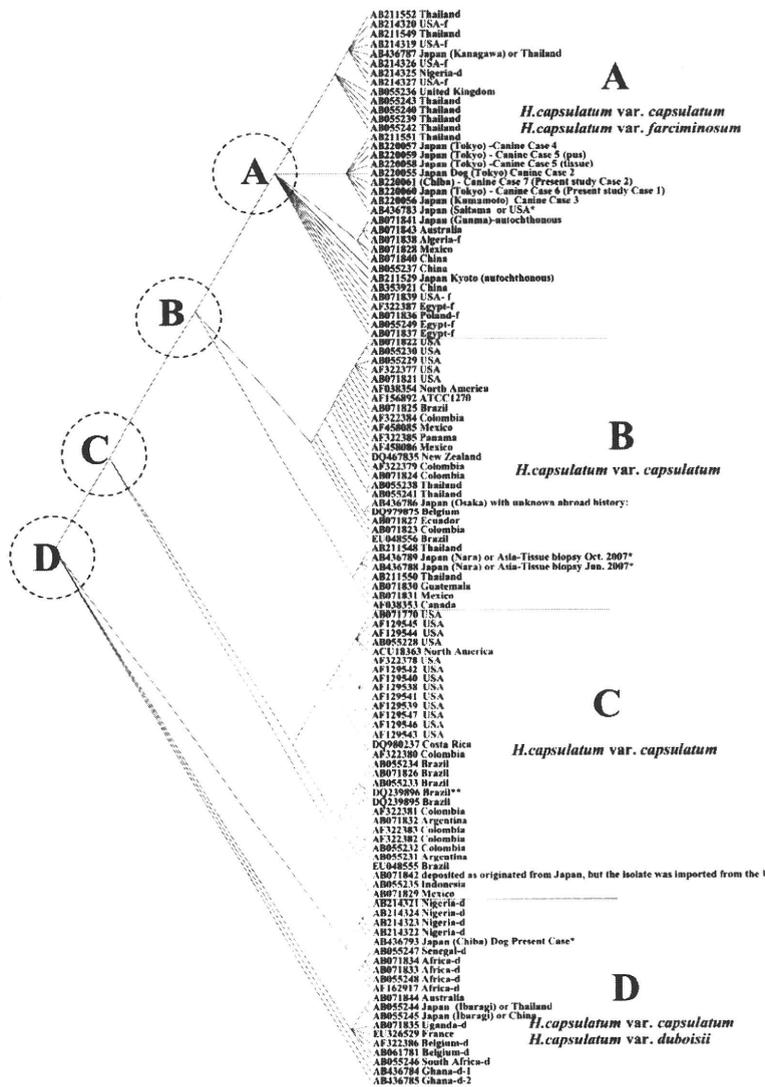


図2 *Histoplasma capsulatum* 由来リボゾームRNA遺伝子のInternal transcribed spacer (ITS)領域の配列を用いて作製した系統樹

解析は最大節約法 (maximum parsimony method), 樹形図はslanted cladogram.

A: *H. capsulatum* var. *farciminosum* と *H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来配列が混在するクラスター,

BとC: *H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来配列から構成されるクラスター,

D: *H. capsulatum* var. *duboisii* と *H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来配列からなるクラスター.

我が国のイヌ症例の1例由来配列; AB436793, 矢印. -d: *H. capsulatum* var. *duboisii* 由来配列.

-f: *H. capsulatum* var. *farciminosum* 由来配列. なし: *H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来配列.

しかし、この解析結果を再検討すると、大きく4つのクラスターに分けられ、*H. capsulatum* var. *farcinosum*と*H. capsulatum* var. *capsulatum*が混在するクラスター、*H. capsulatum* var. *capsulatum* 由来株から構成されるクラスターが2種(地域特異性を欠いているクラスターと主にアメリカ大陸由来配列で占められるクラスター)、*H. capsulatum* var. *duboisii*と*H. capsulatum* var. *capsulatum* からのクラスター(アフリカ、ヨーロッパ、日本症例由来配列で占められるクラスター)に分かれてきた(図2)。²⁾

なかでも*H. capsulatum* var. *farcinosum*と*H. capsulatum* var. *capsulatum*が混在するクラスターには、本邦で国内感染したヒトとイヌ症例由来の配列もこのクラスターに入ってきたことから、ウマの仮性皮疽と共通した遺伝子型がヒトやイヌに感染していることが示唆された。²⁾

また2007年に診断されたイヌ症例(詳細については後述)由来の配列は*H. capsulatum* var. *duboisii*と*H. capsulatum* var. *capsulatum* からのクラスターに位置したことから、我が国にアフリカ型ヒストプラズマ症が存在することが分子疫学的にも証明された。

このように*H. capsulatum*の遺伝子型と分離された地域はある程度の関連は認められるものの、地域依存性の多型は薄れつつある。ローマの十字軍、それよりもはるか以前から、ヒトはウマによる移動を行ってきた。このような人間活動に伴って、病原体の遺伝子型も拡散したと考えられる。今後、地域や宿主にとられない分子疫学的な variety 見直しが必要と思われる。²⁾

なお、現在のところ、カプスラーツム型のみからなるクラスターについては国内感染確定症例による検証がなされていないため、この型の存在は保留である。

9. 我が国のズボアジ型ヒストプラズマ症

Kwon-Chungらにより、アフリカから遠く離れた我が国もズボアジ型ヒストプラズマ症の流行地であることが示唆されてきた。¹⁷⁾³⁰⁾ズボアジ型を否定できない理由は、我が国で第1例目の症例の病理組織学的特徴で、細胞内寄生性酵母の直径が小型のもので3 μ m、大型のものでは10~15 μ mと大型であった²⁴⁾ことに由来する。³⁰⁾

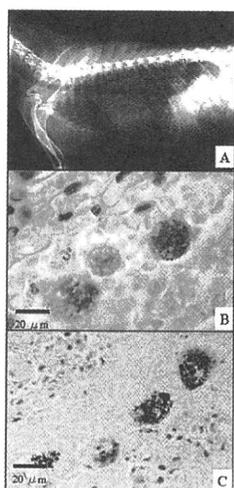
我が国がズボアジ型ヒストプラズマ症の流行地であるという推定は、感染地が日本またはタイが推定されるヒト症例由来配列の遺伝子型がズボアジ型に近縁であった²²⁾ことから、地域固有の遺伝子型が存在するという概念に混乱が生じていた。

さらに今回、海外渡航歴の無いイヌ症例由来の配列もズボアジ型と推定された

ことから、我が国でのズボアジ型の存在は否定できない。したがって、ズボアジ型はアフリカだけでなく、その他の地域にも分布していることが示唆された。

10. ズボアジ型遺伝子が検出されたイヌ症例

症例は13歳のラブラドルレトリバー、避妊雌、千葉市郊外で飼育されていた。海外渡航歴は無い。アレルギー性皮膚炎の増悪・緩解を9歳まで繰り返し、10歳時に卵巣・子宮の摘出を受けている。12歳でアレルギー性皮膚が再度増悪し、第4右乳腺に直径1.45cmの固形物を触知した。食欲不振、沈鬱、嘔吐が発現した。臨床検査では白血球の増加23,000/ml、赤血球の減少4,360,000/mlおよび有核化、高ヘマトクリット値33.5%、乳頭からの浸出液中での異形リンパ球の出現、鼻汁への癌性上皮細胞が出現し、抗生物質には反応しなかった。死亡3日前の胸部レントゲン写真はすりガラス状陰影を認めた(図3a)。0.5mg/kgのアムホテリシンBの静注を第4病日より行ったが、第5病日に死亡した。剖検で肺に直径1~3mmの多数の白班を認め、肺組織は悪性リンパ腫細胞で満たされ、マクロファージ内には直径1~6 μ mの酵母細胞をPAS染色および渡銀染色により検出した(図3b, c)。肺パラ



フィンブロック切片よりnested PCR法を用いて、リボゾームRNAの遺伝子配列を決定し、DDBJにAB436793として登録した。この配列は、*H. capsulatum* var. *duboisii* からなるクラスターに位置することが確認された(図2)。この症例は、源疾患が悪性リンパ腫で、日和見感染症としてヒストプラズマ症を併発したと推定した。

図3 ズボアジ型遺伝子が検出されたイヌ症例

- (A)死亡3日前の胸部レントゲン写真に現れたすりガラス状陰影
- 肺組織の病理所見で認められたマクロファージ内の酵母細胞
- (B)PAS染色
- (C)渡銀染色, x200

11. 今後のズボアジ型ヒストプラズマ症の考え方

Yamatoの症例²⁴⁾も、このイヌ症例と同様に*H. capsulatum* var. *duboisii* 遺伝子型による感染であった可能性を排除することはできない。我が国だけでなく、世界的に共通する事項であるが、分子生物学的診断のなされていなかった時代の症

例や酵母の直径が大きいことからカンジダ属菌種などによる感染と診断された症例の中に、ズボアジ型ヒストプラズマ症が埋もれている可能性もある。

12. 我が国の仮性皮疽

1) 昭和50年代4年制獣医学教育で行われていた仮性皮疽に関する教科書の内容

昭和50年代後半に教科書として用いられていた「獣医伝染病学」³¹⁾に書かれていた仮性皮疽の内容を以下に概説する。

仮性皮疽(流行性リンパ管炎) Pseudofarcy (Epizootic lymphangitis) は、*Histoplasma farciminosum* が感染してウマ、ロバ、ラバ、ウシなどの皮膚、皮下、リンパ管に化膿性、潰瘍性の炎症を起こす慢性伝染病である。原因菌、蛋白を含む培地でCO₂の存在下で培養すると10~15日で発育する。

仮性皮疽は、かつて地中海沿岸諸国で多発したが、今では中近東、ソ連、アジアの一部などに地域的に常在するだけで、先進国の多くではほとんどみられなくなった。わが国でも明治以前から発生があり、ウマカサと俗称されていた。明治の中期(1887~1895年)には関東、東北、北海道、九州などでおよそ20,000頭もの発生をみた。その後大正に入ってほとんど発生がみられなくなっていたが、1940年の日華事変の帰還軍馬が感染源になって、ふたたび関東、中国、九州で流行した。しかし、これらも短期間で終息し、現在の我が国では全くみられない。

仮性皮疽は感染してウマ、ロバ、ラバ、ウシなどの皮膚、皮下、リンパ管に化膿性、潰瘍性の炎症を起こす慢性伝染病である。感染源は病変部からの膿汁で、直接、間接的に皮膚、粘膜、特に鼻粘膜や結膜などの創傷から感染するので、最初の病変は傷を受けやすい部位や吸血昆虫の刺傷を受けやすい部位に現れる。

また本症は冬に多発する傾向があり、夏になって一旦治癒したようにみえても、冬になるとしばしば再発する。

感染後、普通2~3カ月の潜伏期のあと、感染部に特異な潰瘍と肉芽を形成するが、体表のリンパ管に索腫を形成しながら求心的に所属リンパ節が侵される。この際しばしば索腫線上に結節様の腫瘤が認められ、これが数日で膿瘍となり自潰して膿汁を漏出し、その痕が噴火口状で糜爛性の潰瘍となる。

また、菌の侵襲をうけたリンパ節は鶏卵から鶩卵大になり、ときに化膿、自潰する。まれに筋間結合織に病巣を形成し、体内、特に胸腔、腹腔のリンパ節が侵され、自潰して重篤な胸膜炎、腹膜炎を起こすこともある。このほか、眼、鼻腔、口腔あるいは生殖器の粘膜や性巣、肺などが侵されることもある。

一般に本症では、体表の病変が著しいにもかかわらず、全身症状に乏しく、軽