

の排泄状況から、屋外においては、必ずしも従来の患者発生の季節消長にとらわれず、年間を通じてその感染源となり得ると考える必要がある。また、集団発生、家族内発生などを含む患者発生動向調査のデータとも照合すると、実際のオウム病の発生条件としては、愛玩鳥のように閉鎖系における高濃度の接触が感染リスクを上げていると考えられる。

## F. 健康危害情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, Garry MEYERS, 岸本寿男, 安藤秀二, 奥田秀子, 福士秀人: オウム病クラミジア集団発生事例分離株ゲノム配列決定とその意義. 獣医畜産新報 vol.63: 804-806, 2011.

2) Watanabe M, Hasegawa S, Obara M, Ando S, Yamauchi T, Takizawa T: Long-term analysis of the population dynamics of *Culex tritaeniorhynchus* and *Anopheles sinensis*, and serological survey of Japanese encephalitis virus among swine in Toyama Prefecture, Japan, from 1969 to 2003. *Scalarfactory*, 2011

3) Yoshii K, Mottae K, Omori-Urabe Y, Chiba Y, Seto T, Sanada T, Maeda J, Obara M, Ando S, Ito N, Sugiyama M,

Sato H, Fukushima H, Kariwa H, Takashima I: Epizootiological study of tick-borne encephalitis virus infection in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 73:409-412, 2011

### 2. 学会発表

1) Ohya K, Ibrahim E, Kuroda M, Meyers G, Kishimoto T, Ando S, Fukushi H: *Chlamydia psittace* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of *Chlamydia* species. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, Sapporo, 6-10 Sep, 2011

2) 安藤秀二: ブーノーシスとしての偏性細胞内寄生細菌の自然界におけるリスク, 第11回日本バイオセーフティ学会, 平成23年12月, 筑波

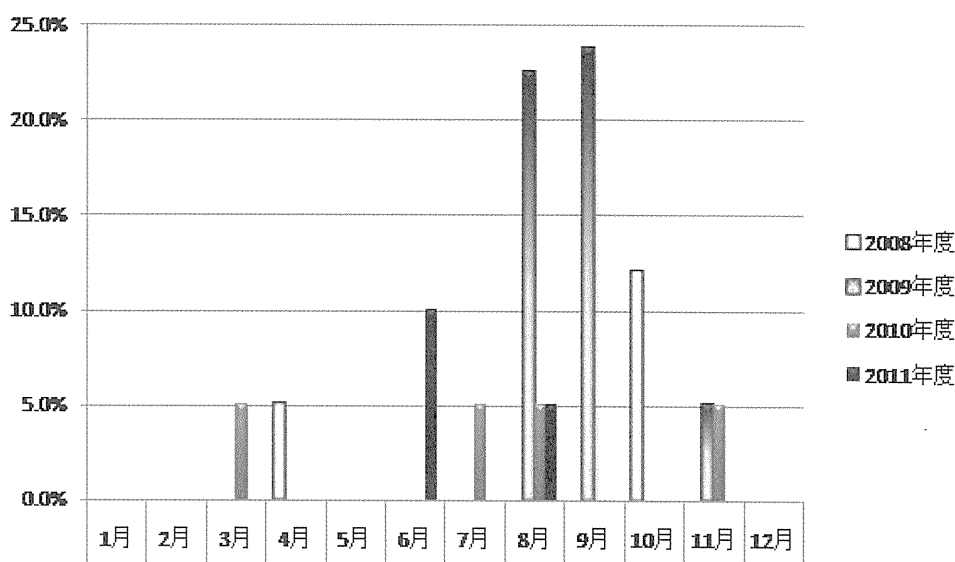
3) Ibrahim RABIA, 大屋 賢司, 黒田 誠, 関塚 剛史, 安藤 秀二, 福士 秀人: Rapid Multiplex PCR Assay for simultaneous Detection of *Chlamydia* causing abortion in ruminants . 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪, 平成23年9月

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- |           |      |
|-----------|------|
| 1. 特許取得   | 該当なし |
| 2. 実用新案登録 | 該当なし |
| 3. その他    | 該当なし |

表1. 平成23年度に検討した検体の*C. psittaci*検出状況

採材月	季節	検体数	陽性数 (陽性率)
2010年12月	冬	20	0(0%)
2011年1月	冬	20	0(0%)
2011年2月	冬	20	0(0%)
2011年3月	春	20	0(0%)
2011年4月	春	20	0(0%)
2011年5月	春	20	0(0%)
2011年6月	夏	20	2(10.0%)
2011年7月	夏	20	0(0%)
2011年8月	夏	20	1(5.0%)
2011年9月	秋	20	0(0%)
2011年10月	秋	20	0(0%)
2011年11月	秋	20	0(0%)
合計検体数		240	3(1.25%)



月別*C. psittaci*検出状況(2008~2011年)

表2. ハト糞便採材日に測定した気温および湿度(定点)2011年度調査

年	2010			2011								
採材月	12月	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月
季節	冬		冬	春			夏			秋		
天気	晴れ	晴れ	快晴	晴れ	晴れ	曇り	晴れ	晴れ	晴れ	晴れ	晴れ	曇り
気温(°C)	18.8	15.1	24.0	20.5	25.0	22.5	36.6	33.4	33.3	26.9	23.5	14.9
湿度(%)	36%	29%	40%	28%	53%	52%	38%	52%	61%	43%	40%	47%

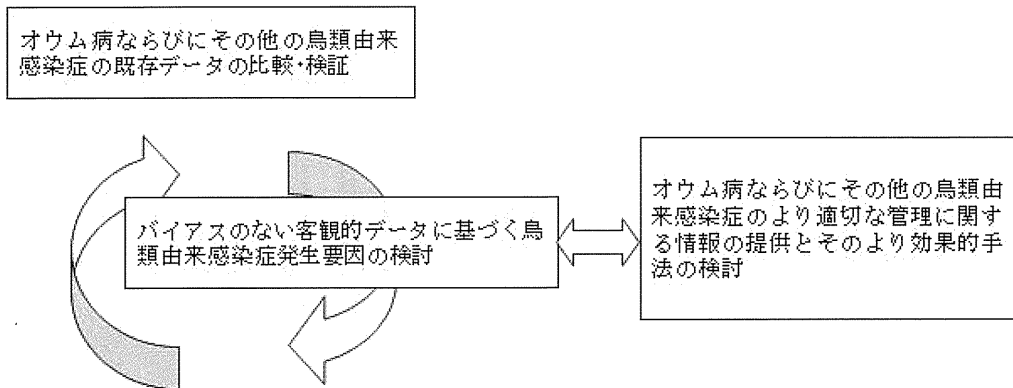
2011年陽性検体一覧

採材月	検体No.	トリの種類	DNA抽出	Realtime PCR	サイクル数	PCR(Mesmer)	備考
6	778	ハト	pure gene	Chlamy+	34	陽性	種特異的Nested PCRで陽性
6	782	ハト	pure gene	Chlamy+	35	陽性	種特異的Nested PCRで陽性
8	821	ハト	pure gene	Chlamy+	36	陽性	種特異的Nested PCRで陽性

<参考>オウム病発生報告数の年次変化

1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
23	18	35	54	44	40	34	22	29	9	21	11

\*2010年は暫定数



## 野生動物・輸入動物に関する研究グループ

「げっ歯類、爬虫類、野鳥類等の由来感染症に関する研究」

- ・ 神経症状を主徴とするフェレットの犬ジステンパーウイルス感染症の  
発生と分離株による再現実験
- ・ 輸入フクロモモンガの *Streptococcus gallinaceus* 集団感染事例
- ・ 鳥類におけるデルマトフィルス属細菌の感染

麻布大学：宇根 有美

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

神経症状を主徴とするフェレット (*Mustela putorius furo*) の  
犬ジステンパーウイルス感染症の発生と分離株による再現実験

分担研究者：宇根有美	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
研究協力者：松原千尋	共立製薬株式会社
大嶋貴寿	共立製薬株式会社
望月雅美	元共立製薬株式会社、 現内閣府食品安全委員会事務局
栗林大幸	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
高橋映里佳	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室
中村進一	麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

研究要旨：

2003 年都内で神経症状を呈するフェレットに咬まれた人に狂犬病曝露後発病予防のワクチン接種が行われた。人を咬み、死亡したフェレットより、のちに犬ジステンパーウイルス (CDV) が検出されたが、フェレットの CDV 症でこのような病態は知られていない。

我々はカナダより輸入されたフェレットにおいて、神経症状を主徴とする CDV 症の集団発生を経験したので報告する。今回の事例は、一般的なフェレットの犬ジステンパー感染症と異なり、皮膚病変や滲出物は軽微で、中枢神経系病変を主体としていた。感染実験を実施したところ、同様の臨床徴候、中枢神経系病変が再現された。ウイルス学的に今回、分離・同定されたウイルスは、国内で分離されたことのないウイルスであったため、海外で感染し、輸送ストレスなどにより発症、同居および隣接ケージのフェレットに水平感染したと考えられた。

フェレットに攻撃性を増す CDV 症が存在することを周知しておくことは、咬症事故後の対応を適切かつ確実にを行うために重要である。

A. 研究目的

2003 年都内で神経症状を呈するフェレットに咬まれた人に狂犬病曝露後発病予防のワクチン接種が行われた。人を咬み、死亡したフェレットより、のちに犬ジステンパ

ーウイルス (CDV) が検出されたが、フェレットの CDV 症でこのような病態は知られていない。咬症事故後の対応を適切かつ確実にを行うために、攻撃性を増すフェレット CDV 症の存在の周知が重要である。今回、我々

は、カナダより輸入されたフェレットに神経症状を主徴とする CDV 症の集団発生を経験したので紹介する。この研究では、i) 自然発生した神経向性 CDV 感染症の病性鑑定を行い、感染ウイルスによる病変を明らかにし、分離ウイルス株のウイルス学的解析を実施することで、感染ウイルスの由来について検討した。ii) 本ウイルスの病原性を確認するため、フェレットへの実験感染を行い、再現実験を実施、iii) 自然発生性事例と実験感染の中樞神経系病変について比較した。

## B. 材料と方法

### i) 神経向性 CDV 感染症の病性鑑定

対象とした動物：カナダの繁殖施設より輸入された 1.5 ヶ月齢のフェレット、150 匹のうち発症した 5 匹を検査対象とした。いずれの個体も、日本への輸出の 3 日前に繁殖施設において、ミンク用 CDV 生ワクチン (Distem-R TC、Schering-Plough Animal Health) を接種されていた。

ウイルス学的検査担当者：松原千尋、大嶋貴寿 (共立製薬株式会社)、望月雅美 (現、内閣府・食品安全委員会事務局)。

ウイルス学的検査材料と方法：スワブ材料 (眼漏、直腸)、臓器 (リンパ節、脾臓、肺、胸腺、小腸、大脳、小脳) からのウイルス分離と分離ウイルスの H 遺伝子系統樹解析、アミノ酸配列アラインメント解析を実施した。病理学的検査：病理解剖後、全身諸臓器をホルマリン固定し、定法に従って、パラフィン切片を作成し、HE 染色および抗 CDV ウサギポリクローナル抗体 (池田株、日生研分与) を用いてウイルス抗原の分布を調べた。

### ii) 分離ウイルス株による再現実験

対象とした動物：CDV ワクチン未接種の 1.5 ヶ月齢のフェレット、2 頭を対象とした。

接種ウイルスと方法：病性鑑定個体から分離されたウイルス株を使用。培養ウイルスを  $10^{6.2}/\text{mL}$  のウイルス力価に調整。接種法 (投与量) には、経口 (0.5mL) と経鼻 (左右の鼻孔に 0.25mL) にて計 1mL 投与した。投与から 3 週間の経過観察後、安楽死した。

### iii) 自然感染例と再現実験での病変の比較

自然感染例および再現実験例とも、類似した臨床徴候および中樞神経系の病変が認められた。病変の比較と抗犬 CDV 抗原抗体を用いた免疫染色によりウイルス抗原の局在と病変の関連性を評価した。

## C. 研究結果

### i) 病性鑑定

輸入された 150 頭のフェレットは、5~6 匹毎に 1 ケージへ収納されており、隣接する 2 ケージ、5 匹の発症が確認された。1 頭目の発症は、繁殖施設でのワクチン接種の 6 週後 (輸入後 40 日目) に認められ、その後 4 頭も 1 ヶ月以内に連続して発症しており、急性経過により死亡する個体が多かった (3 頭が発症 3 日以内に死亡した) (図 1)。発症個体の臨床徴候から以下の 2 型に分類した：興奮型 (4 匹)、奇声を発するなど興奮状態が特徴的で、攻撃性を増し、食欲廃絶後に発作や痙攣を起こし、死亡した。痙攣発作型 (1 匹)、奇声を発するなどの興奮状態は認められず、激しい痙攣発作を繰り返し、随意運動が不能となり死亡した。共通の臨床徴候としては、眼漏などの滲出、皮膚の発赤、硬蹠症が認められたが、一般的な CDV 感染症と比較してこれらの変化はごく軽微であった。

自然発生例で、肉眼的に諸臓器で観察された所見は、肺炎と脳表面の軽度の血管拡張のみであった。組織学的には、大脳灰白質にび漫性のグリア細胞の増生やグリア結節が散見された(図2)。また、限局的に皮質神経細胞の変性、壊死像が認められ、個体により神経食現象も観察された(図2)。これらの病変部に一致して、CDV 抗原陽性の神経細胞とグリア細胞が認められたが、封入体形成はみられなかった。痙攣発作を認めた個体では、髄膜炎や囲管性細胞浸潤がみられた。肺では、化膿性肺炎に加え、肺胞上皮、肺胞マクロファージ内に好酸性細胞質内封入体の形成がみられた。免疫染色による CDV 抗原の検出では、呼吸器系(気管、気管支、肺胞上皮)、消化器系(胃、直腸)、リンパ装置(脾臓、胸腺、リンパ節)、膀胱において陽性細胞が認められた。

ウイルス学的検索では、発症フェレットの各臓器から CDV が分離培養され、H 遺伝子の系統樹解析により America 1 (Old, Vaccine 群) に属するウイルスと同定、Ferret1017 株と命名した(図3)。また、Ferret1017 株のアミノ酸配列アライメント解析を実施したところ、ワクチン株との相同性が高かったものの、国内で流行している野生株や国内で使用されているワクチン株のいずれとも完全に一致しなかった。

病理学的、ウイルス学的検査結果から、斃死した5頭のフェレットを CDV 感染症と診断した。本事例では、典型的フェレットの CDV 感染症と異なり神経症状を主徴とすることから、Ferret1017 株の神経向性が示唆された。

#### ii) 分離ウイルス株による再現実験

実験に使用したフェレット2頭において、

接種後2日目に下痢を認めた。1頭目は接種後12日目に旋回運動を示し、14日目には攻撃的な行動がみられるようになり、一時的に搔痒感を呈していた。2頭目は下痢以外に臨床徴候を示さなかったが、16日目に反復する痙攣発作を発現した。本実験において、自然発生 CDV 事例で認められた攻撃性増加と痙攣発作が再現された(図4)。

病理学的検査結果では、CDV 抗原陽性の非化膿性脳炎がみられたが、他臓器には封入体形成や CDV 抗原陽性細胞は認められなかった。なお、搔痒感を呈していた個体には、皮膚病変はみられなかった。

#### iii) 自然感染例と再現実験での病変の比較

自然発生性、実験感染の両事例にみられた中枢神経系病変について比較した(表1)。全症例において、神経細胞の変性と壊死、グリア結節やび漫性のグリア細胞の増生がみられた。また、免疫組織学的な CDV ウイルス抗原の検索では、大脳皮質と間脳の神経細胞やグリア細胞に陽性像が認められた。これらの病変の程度は、実験感染群にて高度で、加えて髄膜炎、囲管性細胞浸潤、軽度の脱髄を認めた。

#### D. 考察

以上の結果から、今回認められた犬ジステンパーウイルス感染症は、神経症状を主徴とし、病理学的にも中枢神経系病変(大脳の神経細胞の変性と壊死、グリア結節やグリア細胞の増生)が主体であった。諸臓器から分離されたウイルスは、塩基配列、アミノ酸配列の解析結果から、既存のワクチン株や国内で流行する野生株とは異なっており、America 1 (Old, Vaccine 群) に属する新種のウイルスと同定、Ferret1017 株

と命名された。ワクチン接種後に発症していることから、繁殖施設で接種したワクチンが有効でなかったと推察される。ウイルス学的検査結果から、自然発生事例は、本ウイルス株に海外で感染した後、輸送ストレスなどにより発症、同居および隣接ケージのフェレットに水平感染したと考えられた。しかしながら、CDV 発症が輸入後 40 日目であり、発生も限定されたケージのみであったことから、感染源を特定することはできなかった。

神経向性を示す CDV の感染ルートや、ウイルス学的特徴を明示するためにも、カナダで接種されたワクチン株の性状を解析する必要がある。

フェレットに攻撃性を増す CDV 症が存在することを周知しておくことは、咬症事故後の対応を適切かつ確実にを行うために重要である。

#### E. 参考文献

なし

#### G. 健康危機管理情報

なし

#### H. 研究発表等

学会発表

1) 栗林大幸、高橋映里佳、中村進一、松原千尋、松尾加代子、大嶋貴寿、望月雅美、宇根有美. 神経症状を主徴とするフェレット (*Mustela putorius furo*) の犬ジステンパーウイルス感染症の発生と分離株による再現実験. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 北海道. 2010 年 9 月 16 日～18 日.



	個 体 NO.	滲 出 物	硬 化	発 赤	1月	2月		
					ケージ1		1	+
		2	/	/	/	27 30 奇声 死	経過 4日	
		3	+	-	-		1 3 奇声 死	経過 3日
ケージ2		4	+	+	-	経過 7日	4 9 10 ワクチン接種 奇声 安楽死	
		5	+	-	+	経過 9日	8 13 16 発赤 痙攣 死	

\* No. 2はホルマリン固定材料のみのため不明。  
網掛け部分の数字は日にち

図1. 発症動物の経過

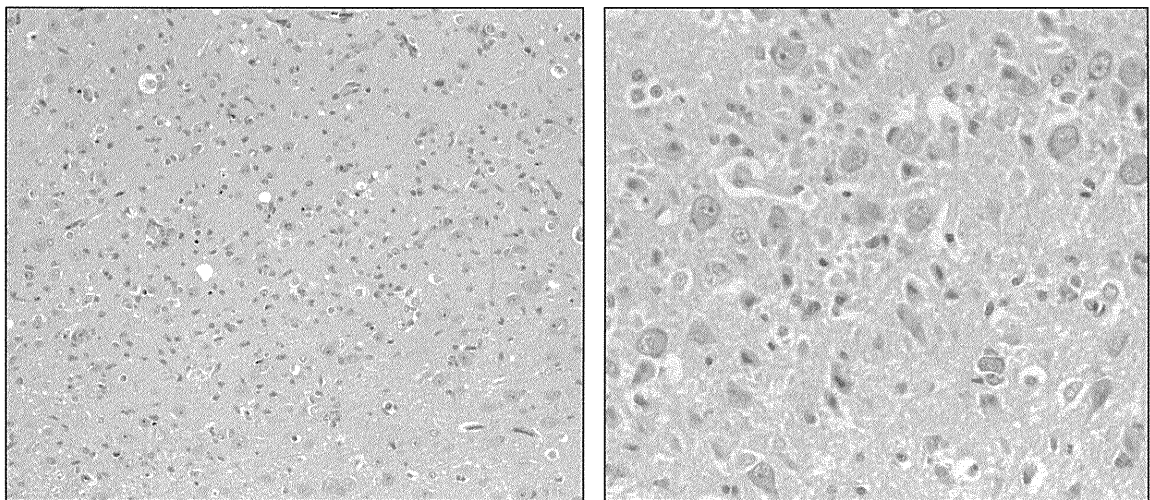


図2. フェレットにみられた大脳病変 神経細胞の壊死

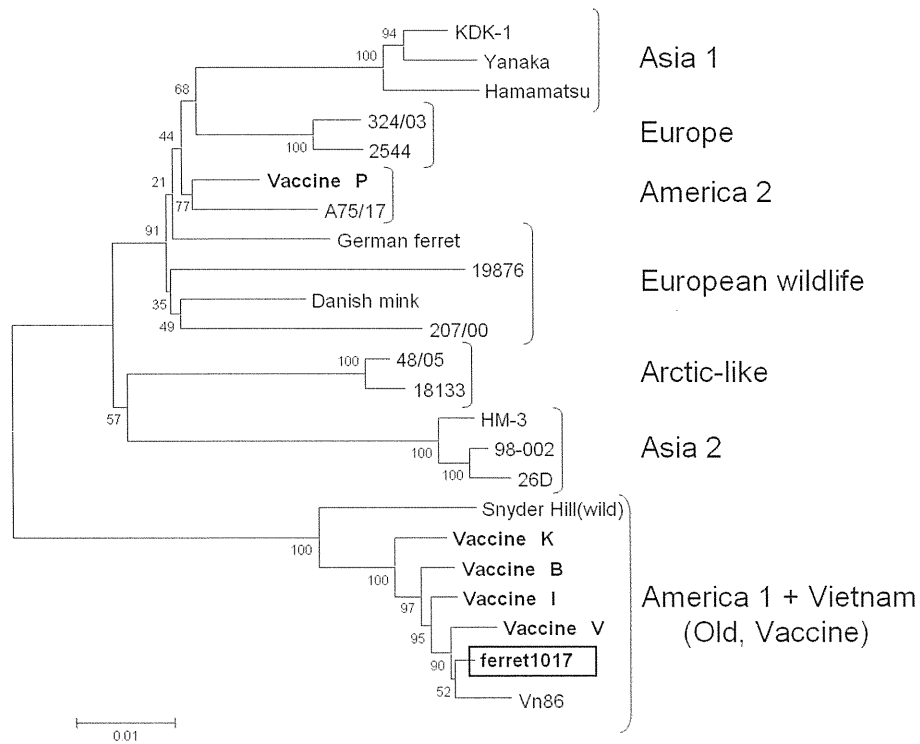


図 3. H 遺伝子の塩基配列に基づく系統樹解析

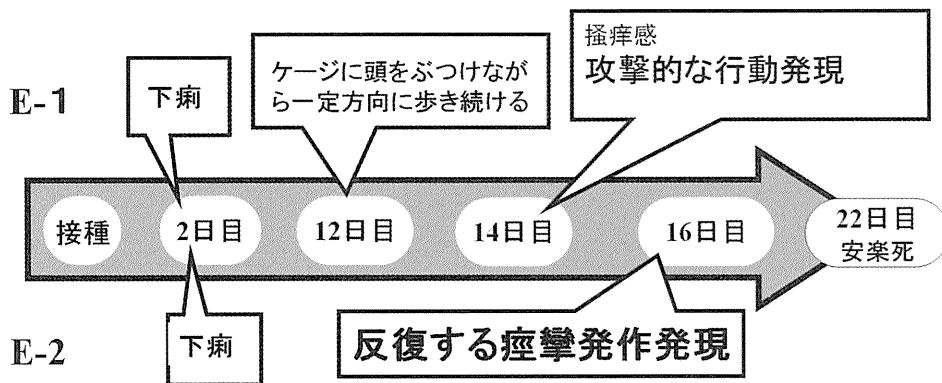


図 4. Ferret1017 株実験感染後の動物の経過

表 1. 自然発症症例と実験感染例における脳病変の比較

	神経細胞の変性・壊死	グリア細胞の増生 (グリア結節)	髄膜炎	血管性細胞浸潤	脱髄
奇声 異常興奮 (n=5)	+	+	-	-	-
痙攣発作 (n=2)	2+	2+	+	+	±

\* 抗原は、ともに大脳皮質、間脳に分布。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

## 輸入フクロモモンガ (*Petaurus breviceps*) の *Streptococcus gallinaceus* 集団感染事例

分担研究者：宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

研究協力者：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

馬場 寛 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

工藤朝雄

研究要旨：

*Streptococcus gallinaceus* (*S. gallinaceus*) は、2002 年にブロイラーの流行性敗血症・細菌性心内膜炎事例から分離、同定された連鎖球菌で、ヒトへの感染報告もあり、新興感染症として重要と考えられる。近年、輸入数の激増しているフクロモモンガの死亡事例において、*S. gallinaceus* が高率に分離、同定された。臨床徴候は顔面腫脹のみで、下痢や呼吸器症状はみられなかった。特徴的な病理学的所見として、多臓器における菌塊形成、頭部皮下水腫、脾臓の萎縮、肺水腫、骨髓低形成、舌苔形成、咽頭炎などがあった。抗 *S. gallinaceus* 抗ウサギ血清を作製、死亡および発症個体を検索したところ、全個体の病変に陽性菌が観察され、本菌に関連するであろう病変も認められ、複数臓器から菌が分離・同定されたことから *S. gallinaceus* 感染症と診断、敗血症に陥っていたものと判断した。本感染症の発症要因として年齢、ストレスが考えられ、発生状況から同居群内での水平感染が示唆された。本菌の伝播方法については、食肉処理場でヒトに感染が成立した報告もあることから、経口、経気道性が考えられた。ヒトとブロイラー以外では *S. gallinaceus* の分離報告例はなく、本事例はヒト以外の哺乳類における初の報告となる。ペット用動物での本感染症の流行は公衆衛生上、十分注意すべき事例と考える。

### A. 研究目的

*Streptococcus gallinaceus* (*S. gallinaceus*) はグラム陽性連鎖球菌で、ブロイラーの流行性敗血症・細菌性心内膜炎事例から分離・同定、2002 年に初めて報告された。2005 年に

は、ブロイラーに *S. gallinaceus* を実験感染させ、同様の病態が再現されることが明らかになった。2006 年には、食肉処理場でヒトに *S. gallinaceus* 感染が成立した報告もあり、新興感染症として重要と考えられ

る。一方、フクロモモンガは近年ペットとして人気のある小型有袋哺乳類で、飼育個体数が激増しており、年間で推定 9,000 頭が輸入されている。

タイよりペット用に輸入されたフクロモモンガが、輸入後 1 ヶ月以内に次々と死亡した (14/30 匹; 46.7%) ため、病性鑑定を実施した。検査結果から、発症個体より *S. gallinaceus* が分離された。本事例におけるフクロモモンガに対する *S. gallinaceus* の病原性、感染経路について検討した。

## B. 材料と方法

### 1) 病理学的検査

2010 年冬、動物輸入業者が、タイのフクロモモンガ繁殖施設にて、生後 2 ヶ月齢の個体 30 匹を購入、日本に輸入した。日本に到着直後 8 匹が死亡し、2 週間後に更に 6 匹が死亡した。死亡個体について病性鑑定を実施、細菌感染症が疑われたためサルファ剤の投薬治療を開始した。同様の症状がしばらく継続していたが、治療を行うようになって死亡数が減少した。結果的に輸入した動物の 63%が発症した。これらの動物のうち 11 匹 (死亡個体 6 匹; 発症 3 匹; 治療 2 匹) を検査対象とした (図 1)。

### 2) 微生物学的検査

検査対象としたフクロモモンガ 11 匹から、剖検時に脾臓、肝臓、肺を採材、細菌の分離・同定を実施した。連鎖球菌、腸球菌の同定は、ラピッド ID 32 ストレップアピにより選択後、16S rRNA 塩基配列解析を実施、DDBJ (DNA Data Bank of Japan) に登録されている配列との相同性により菌種を同定した。腸内細菌群の同定は、各種培地 (LIM、TSI、VP、SC、MR)、ID テスト・

EB-20 による生化学試験を実施した。

### 3) 抗 *S. gallinaceus* 抗ウサギ血清を用いた病原体の検出

分離した *S. gallinaceus* を Trypticase soy broth にて増菌培養後、ホルマリン不活化により *S. gallinaceus* 死菌液 ( $1.0 \times 10^9$  CFU/mL) を作製した。免疫動物はニュージーランドホワイトラビットを使用、動物の頸背部皮下にオイルアジュバンド (Complete Freund's adjuvant, Difco) と死菌液を等量混合した溶液を 3 回接種して免疫賦与を行った。抗体価の上昇は、耳静脈より採血した末梢血を使用して、ELISA 法 (*S. gallinaceus* 死菌を固層化した計測系を確立) により確認した。初回免疫後の 3 週間後に吸入麻酔下にて全採血を行い、安楽死した。血清の採取は、採取血液を遠心分離 (3000rpm、15 分間) することで行った。作製した抗血清を使用して、フクロモモンガ組織における *S. gallinaceus* 分布、病変との関連性を検討した。

## C. 研究結果

### 1) 病理学的検査

#### i) 臨床徴候

高度の顔面腫脹を認めたのみで、下痢や呼吸器症状はみられなかった。発症後、約 2 日の急性経過で死亡した。

#### ii) 抗生剤に対する反応

サルファ剤投与により、重篤な個体を除いて回復した。

#### iii) 外景所見

外景検査では、削瘦と頭部皮下水腫による顔面腫脹が顕著で、舌苔形成も高頻度に認められた。また、死亡および発症個体では、肺水腫がみられた (図 2)。

#### iv) 組織所見

脾臓の萎縮、肺水腫が 11 匹全てにおいて認められ、これらの個体では血管内における好中球増多もみられた。また、骨髓低形成も高頻度に認められた (7/9 匹 ; 77.8% \*2 匹では骨髓を検索できず)。肉芽腫性腎炎 (5/9 匹 ; 55.6%)、壊死性偽膜性咽頭炎 (1/9 匹 ; 9.1%) は、死亡および発症個体に特化した所見として観察された。

#### 2) 微生物学的検査

微生物検査の結果から、死亡および発症個体の 77.8% (7/9 匹) から *Streptococcus gallinaceus* が分離、同定された (16S rRNA 塩基配列の解析にて 97%以上の相同性を示した)。一方、治療個体からは、*Streptococcus gallinaceus* は分離されなかった。グラム陰性菌では、*Klebsiella pneumoniae* が全個体の 45.5% (5/11 匹 ; 死亡および発症個体 3 匹/治療個体 2 匹) から分離された (表 1)。

#### 3) 抗 *S. gallinaceus* 抗ウサギ血清を用いた病原体の検出

死亡および発症個体では、脾臓 (44.4% ; 4/9 匹)、肺 (66.7% ; 6/9 匹)、舌 (77.8% ; 7/9 匹)、肝臓 (55.6% ; 5/9 匹)、腎臓 (55.6% ; 5/9 匹) のいずれかの臓器にウサギ抗 *S. gallinaceus* 抗血清陽性を示す菌体が確認された (表 1)。治療個体では、2 匹の諸臓器に陽性菌は認められなかった。なお、作製した抗血清は、他の *Streptococcus* 属菌に交差性を示さないことを確認している。

以上、何らかの方法で、発症および死亡個体すべてで *S. gallinaceus* が確認された。

#### D. 考察

死亡および発症個体の全てから *S. gallinaceus* が確認され、本菌に関連するで

あろう病変も認められたことから、*S. gallinaceus* 感染症と診断した。菌分布、病変の拡がりや質から、敗血症に至っていたものと判断した。*S. gallinaceus* 感染症の発症要因として、年齢 (生後 2 ヶ月齢)、冬季の寒冷および輸送によるストレスが考えられた。本事例では、輸入当初、死亡が相次ぎ、一旦小康状態になったのちに、翌月になり同様の症状を示すものがみられるようになったことから、同居群内での水平感染が疑われた。また、タイ繁殖施設内でも顔面腫脹を示す個体が確認され、その後も、同様の症状を示す個体が動物病院を受診していることから、*S. gallinaceus* の感染場所は、タイ国内と考えた (図 3)。本菌の伝播方法については不明な点が多いが、本事例においては、本菌が口腔内、消化管内に存在し、敗血症化して、腎臓を始め体内に広く分布していたことから、排泄物を感染源として、経口感染したものと推察した。実際、食肉処理場でヒトに感染が成立した報告もあることから、経口に加え経気道性や他の連鎖球菌症のように創傷感染も考えられた。

なお、対象とした動物に高頻度で脾臓の萎縮や骨髓低形成が認められ、免疫抑制状態が示唆された。しかしながら、これが、本菌の感染に起因するのか、他の原因に関連するものなのか判断できなかった。

*S. gallinaceus* は、ヒトとブロイラー以外では分離 報告例はなく、本事例は、ヒト以外の哺乳類における初の *S. gallinaceus* 感染症の報告となる。動物が関連するヒトの *S. gallinaceus* 感染症も報告されていることから、ペット用動物での流行は公衆衛生上、十分注意すべき事例と考える。

E. 参考文献

Balm MN, Truong HT, Choudhary AS, Robinson GM, Blackmore TK. Streptococcus gallinaceus bacteraemia in an abattoir worker presenting with a febrile illness. *J Med Microbiol.* 2006 55(Pt 7):957-9.

Chadfield MS, Bojesen AM, Christensen JP, Juul-Hansen J, Nielsen SS, Bisgaard M. Reproduction of sepsis and endocarditis by experimental infection of chickens with Streptococcus gallinaceus and Enterococcus hirae. *Avian Pathol.* 2005;34(3):238-47.

Hedegaard L, Christensen H, Chadfield MS, Christensen JP, Bisgaard M. Association of Streptococcus pluranimalium with valvular endocarditis and septicaemia in adult broiler parents. *Avian Pathol.* 2009

38(2):155-60.

G. 健康危機管理情報

なし

H. 研究発表等

学会発表

1) 馬場寛、畑中律敏、田向健一、岡谷アレシヤンドレ友三、宇根有美. 輸入フクロモモンガの *Streptococcus gallinaceus* 集団感染事例. 第152回日本獣医学会学術集会. 大阪. 2011年9月18日~21日

2) 馬場寛、岡谷アレシヤンドレ友三、畑中律敏、村上賢、田向健一、宇根有美. 輸入フクロモモンガにおける *Streptococcus gallinaceus* 感染症の流行. 第11回人と動物の共通感染症研究会学術集会、東京、2011年11月5日

図1. *S. gallinaceus* 感染症の発生状況

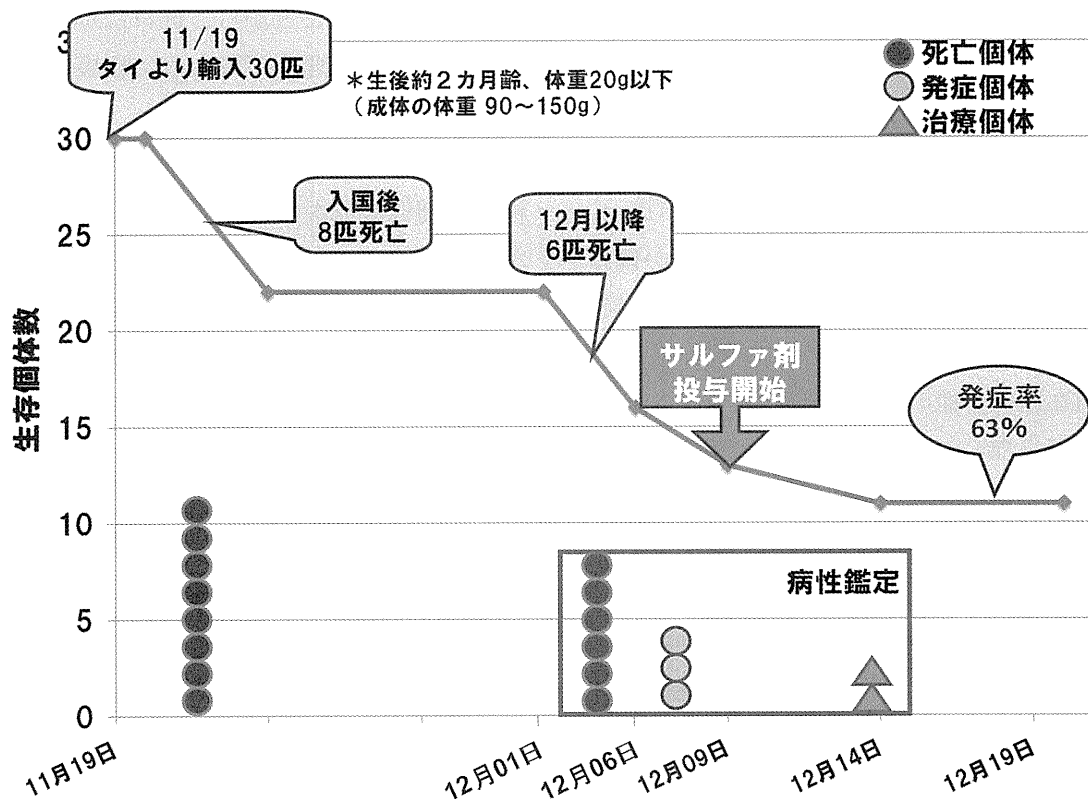


図 2. *S. gallinaceus* 感染症に特徴的であった肉眼所見

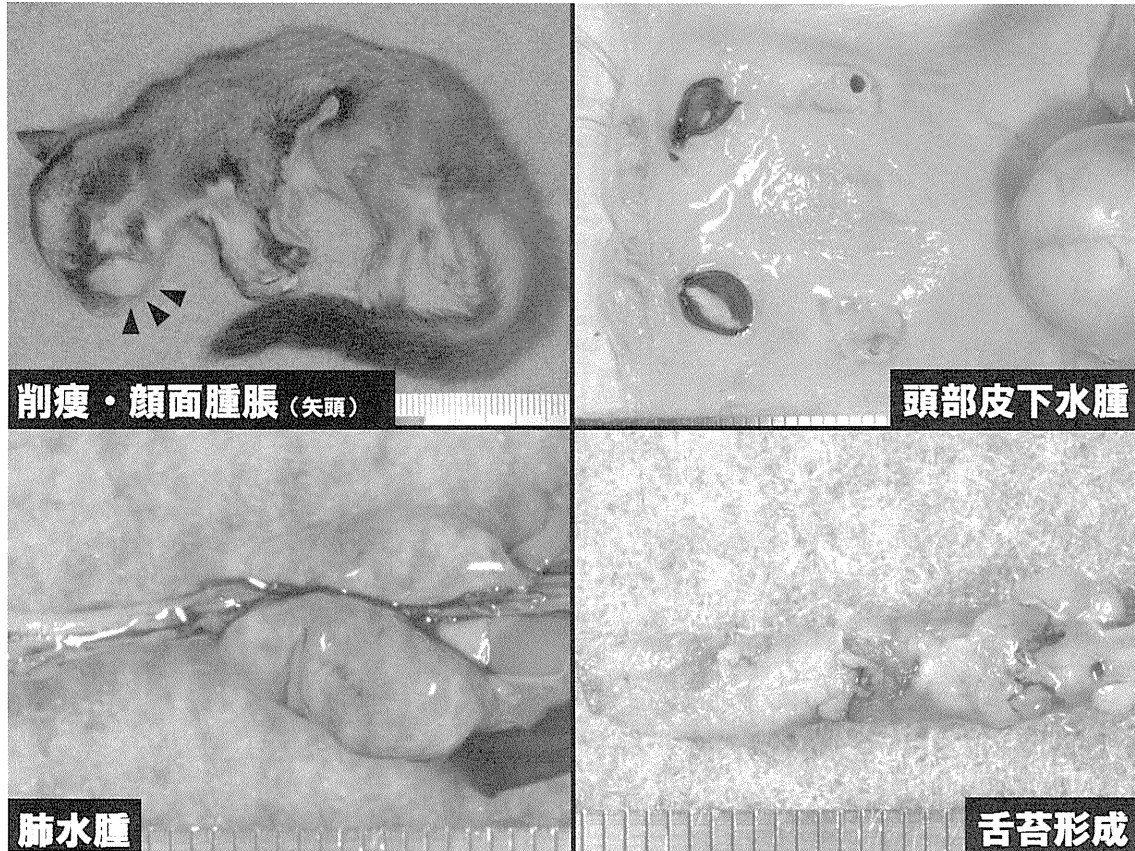


図 3. *S. gallinaceus* の感染経路

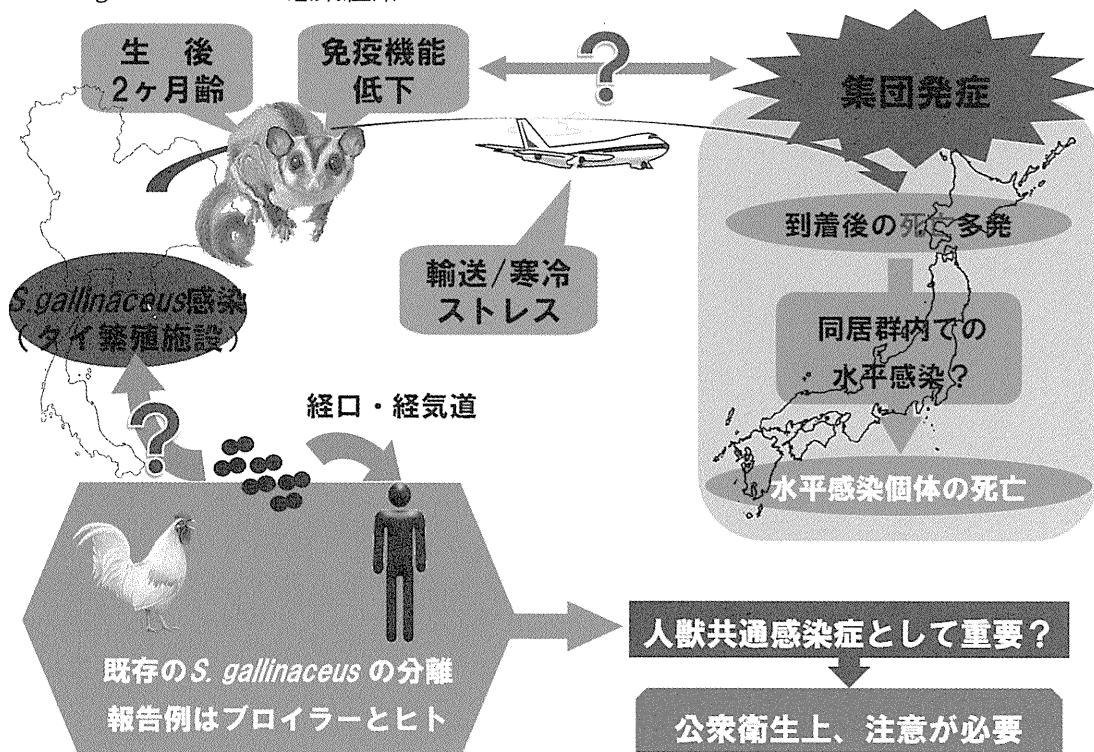




表 1. *S. gallinaceus* の分離、検出状況と病変の関連性

個体No.	臓器	病理学的検査	微生物学的検査	主要病変	個体No.	対象臓器	病理学的検査	微生物学的検査	主要病変
<b>死亡個体</b>					<b>発症個体</b>				
No. 1	脾	+	<i>S. g.</i>	+	No. 7	脾	-	<i>S. p.</i>	+
	肝	+	<i>S. g.</i>	-		肝	+	<i>S. p.</i>	-
	肺	+	<i>S. g.</i>	+		肺	+	<i>S. g.</i>	+
	腎	+	NA*	-		腎	+	NA	+
	骨髄	+	NA*	+		骨髄	-	NA	+
No. 2	脾	-	<i>Lc. l.</i>	+	No. 8	脾	-	<i>S. g.</i>	+
	肝	-	<i>S. i.</i>	-		肝	-	<i>S. g.</i>	-
	肺	-	<i>Leu. l.</i>	+		肺	+	<i>S. g.</i>	+
	腎	+	NA	+		腎	+	NA	+
	骨髄	NA	NA	NA		骨髄	-	NA	+
No. 3	脾	-	<i>S. g.</i>	+	No. 9	脾	-	<i>S. p.</i>	+
	肝	-	<i>S. g.</i>	-		肝	-	<i>S. p.</i>	-
	肺	+	<i>S. g.</i>	+		肺	+	<i>S. p.</i>	+
	腎	+	NA	+		腎	-	NA	-
	骨髄	-	NA	+		骨髄	-	NA	+
No. 4	脾	+	<i>S. g.</i>	+	<b>治療個体</b>				
	肝	+	<i>S. g.</i>	-	No. 10	脾	-	-	+
	肺	+	<i>S. g.</i>	+		肝	-	-	-
	腎	+	NA	-		肺	-	-	+
骨髄	+	NA	+	腎		-	NA	-	
No. 5	脾	+	<i>S. g.</i>	+		骨髄	-	NA	-
	肝	+	<i>S. a.</i>	-	No. 11	脾	-	-	+
	肺	-	<i>S. g.</i>	+		肝	-	-	-
	腎	+	NA	-		肺	-	-	+
骨髄	-	NA	+	腎		-	NA	-	
No. 6	脾	+	<i>S. g.</i>	+		骨髄	-	NA	-
	肝	+	<i>S. g.</i>	-	* NA Not Available				
	肺	-	<i>S. g.</i>	+	同定細菌名 <i>S. g.</i> : <i>Streptococcus gallinaceus</i> <i>S. p.</i> : <i>Spasteurianus penumoniae</i>				
	腎	+	NA	+	および略称 <i>Lc. l.</i> : <i>Lactococcus lactis</i> <i>S. i.</i> : <i>S.intermedius</i>				
	骨髄	NA	NA	NA	<i>Leu. l.</i> : <i>Leuconostoc lactis</i> <i>S. a.</i> : <i>S.agalactiae</i>				

## 鳥類におけるデルマトフィルス属細菌の感染

分担研究者：宇根有美 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室  
研究協力者：小倉麻理乃 麻布大学獣医学部獣医学科病理学研究室

### 研究要旨：

*Dermatophilus congolensis* は放線菌属の 1 種で、広い宿主域をもち、ヒトにも感染する。今回、趾瘤症を有するペンギンの趾瘤病変に *Dermatophilus* 属細菌の感染を病理組織学的、免疫組織化学的および電子顕微鏡学的に確認し、鳥類で初めてデルマトフィロシスを見出した。また、特異的かつ高感度の *Dermatophilus* 属細菌の検出法として、PCR 法の確立を試みた。また、10 種類の鳥類 69 羽（ペンギンおよび水禽類）の足底部スワブを対象として PCR 法により *Dermatophilus* 属細菌の感染状況を検討した。その結果、4 羽に明らかな *Dermatophilus* 属細菌の感染を確認した。これらの細菌は *D. chelonae* に比較的近縁な細菌で、ヒトへの感染性の低いものと考えた。

### A. 研究目的

デルマトフィルス症は、*Dermatophilus congolensis* (*D. congolensis*) を原因とする急性から慢性の表在性滲出性皮膚感染症であり、羊および馬では経済損失に関わる重要な感染症で、かつ非常に広域な宿主域をもち、ヒトにも感染する。しかし、鳥類は高い抵抗性を持つとされ、感染の報告はない。

趾瘤症は鳥類、特に水禽類やペンギンで良く知られた疾患であり、病理学的には趾蹠部の膿瘍形成、炎症性変化、肉芽組織の形成が主体となる。発症機序としては、趾蹠部の虚血性変化、外傷などによる外皮の壊死が先行することで、同部が微生物の侵入門戸となり、炎症性病変が引き起こされ

と考えられている。

現在、*Dermatophilus* 属細菌の検出および診断は、主として直接顕微鏡下における形態学的観察と培養によって行われている。しかし、発症し病変が形成されている場合、菌体の確認は容易であるが、不顕性感染症例では、光学顕微鏡による菌の確認は困難である。また、培養による検出に際しても、表在性皮膚感染症のため、他の細菌による汚染もあり、しばしば、培養・同定できない。そして、病原体同定に一般的な検査法である PCR 法は確立されていない。今回、ペンギンにおいて *D. congolensis* 感染を伴った趾瘤症を発見したため、詳細な検索を実施した。また、飼育下水禽類における本菌の浸淫状況調査を長期目標として、

*Dermatophilus* 属細菌の PCR 検査法の確立を目指した。

## B. 材料と方法

### 1) 病理組織学的検査

アミロイド症により斃死したマゼランペンギン 4 羽の趾（趾瘤）を病理組織学的に検索した（図 1）。中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従いパラフィンブロックを作製、3~5 $\mu$ m に薄切した。趾瘤内の病原体検査のため、Gram 染色、Grocott 染色を実施した。加えて、抗 *D. congolensis* 抗血清を用いて、趾瘤組織に免疫染色を行った。また、趾瘤のホルマリン固定材料からエポキシ樹脂ブロックを作製した。ウルトラミクロトームを使用して、超薄切片を作製、酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色後に透過電子顕微鏡観察した。

### 2) 分子生物学的検査法の確立

*D. chelonae* の培養死菌から NucleoSpin® Tissue を用いて DNA の抽出を行った。National Center for Biotechnology Information より *D. congolensis* (NBCR105199 株)、*D. chelonae* (NBCR105200 株) の 16s rRNA 配列を参照して、Primer 3Plus を用いて増幅領域が 1kbp になるようにプライマー 2 セット（各 20bps：セット 1 Forward DF-2、Reverse D-congo2；セット 2 Forward DF-2、Reverse D-chelo2）を設計した（資料 1）。これらのプライマーを用いて *Dermatophilus* 属菌を検出するために PCR 法の条件設定を行った。DNA ポリメラーゼは、TaKaRa Ex Taq®（タカラバイオ株式会社）を使用した。反応系は 25 $\mu$ L で設定し、反応液の組成、サイクル数は固定として、

アニーリング温度について検討した（50、55、60 $^{\circ}$ C）（資料 2）。得られた PCR 産物は、定法に従い 1.5%アガロースゲルを作製、135Vにて 20~40 分間、電気泳動した。先の条件で PCR 産物が得られた場合、50 $\mu$ L の反応系で再度 PCR を実施、シーケンス解析を委託した（Macrogen Japan）。解析結果の検討には、Serial Cloner、Finch TV を使用して行った。

### 3) 鳥類における PCR 法を用いた *Dermatophilus* 属菌の感染状況の検索

動物園で飼育されている 10 種類の鳥類 69 個体から 1 本ずつの足底部スワブを採取し検体とした。「NucleoSpin® Tissue」を用いてスワブから DNA の抽出を行い、2) の検討の結果に基づいて PCR を行った。

## C. 研究結果

### 1) 病理組織学的検査

趾瘤の大きさに関わらず、同質の病変が認められた。趾瘤のかなりの部分が角化亢進した厚い角質層からなっており、表層には gram 陽性球菌や糸状菌が観察された（図 2、3）。内部には変性した炎症細胞と長く連鎖、分岐する好塩基性の糸状菌が多数みられた。同部の真皮では、結合組織の増生と炎症細胞浸潤が認められたが、一般的な水禽類の趾瘤症で見られるような膿瘍形成は観察されなかった。また、一部の症例では、真皮内にも糸状菌が存在していた。特殊染色の結果では、gram 染色陽性を示し、Grocott 染色にて railroad tracks と呼ばれる *Dermatophilus* 属細菌に特徴的な構造が確認された（図 3）。また、抗 *D. congolensis* 抗血清を用いた免疫染色で、これらの糸状菌は陽性を示した（図 4。電

子顕微鏡検索で、糸状菌様にみえた構造物は、縦割および横割により分裂・連鎖する菌体より成っていた (図4)。

## 2) 分子生物学的検査法の確立

培養死菌 *D. chelonae* を対照として、2つのプライマーセットの PCR 至適条件を検討したところ、セット1は55°C、セット2は55、60°Cで1kbpの位置にバンドが観察された (図5)。また、そのPCR産物の塩基配列を解析したところ *D. chelonae* (NBCR105200株)の16s rRNA配列と100%一致した。よって、プライマーセット1 (*D. congolensis*) は、*D. congolensis* 特異的プライマーではないことがわかった。

## 3) 鳥類における PCR 法を用いた *Dermatophilus* 属菌の感染状況の検索

結果を表1に示した。鳥類の足底部スワブ69検体中4検体に特異的バンドが認められ、5検体では再現性が不安定な陽性結果が得られた。4検体D-A2、8、12、28のPCR産物の塩基配列を解析したところ、No.D-A8、12、28の解析の結果は一致し、*D. chelonae* (NBCR105199株)の配列と98%一致した配列と95%類似した配列の2つの配列が混在していた。

## D. 考察

アミロイド症により斃死したマゼランペンギン4匹の趾 (趾瘤) を検査した結果、家禽などで報告されている趾瘤とは異なり、明らかな膿瘍形成は認められず、高度の角化亢進により肥厚した角質層中に Gram 陽性の長く連鎖する糸状菌が多数観察された。

この菌は railroad tracks 様配列をとり、抗 *D. congolensis* 抗血清を用いた免疫染色に陽性を示したこと、電顕観察により縦割、横割により分裂、連鎖する菌体を認めたことから、*Dermatophilus* 属菌と考えられた。

迅速診断法の検討として、*D. chelonae* 培養死菌を用いて PCR 法による簡便な *Dermatophilus* 属細菌の検出法を検討した。その結果、*D. chelonae* を検出するプライマーセットや条件が設定されたが、その特異性と感度にさらなる検証が必要と考えた。なお、菌種の特定には至らなかったが、鳥類の足底部皮膚に *D. chelonae* 近縁の *Dermatophilus* 属細菌が感染していることが明らかになった。*D. chelonae* は、*D. congolensis* よりヒトへの感染性は低いとされているため、鳥類で確認された *Dermatophilus* 属細菌のヒトへの公衆衛生上のリスクは低いと考えられるが、よりの確な判定には、培養株を用いた感染実験などによる病原性の検討が欠かせない。

## E. 参考文献

なし

## G. 健康危機管理情報

なし

## H. 研究発表等

なし