

図 1. マゼランペンギンの趾瘤症。左：両趾蹠に大小の趾瘤形成を認める。右：左趾の断面。皮膚損傷部を中心に黄色～褐色部が存在、結合織増生と中心部の出血を認める。

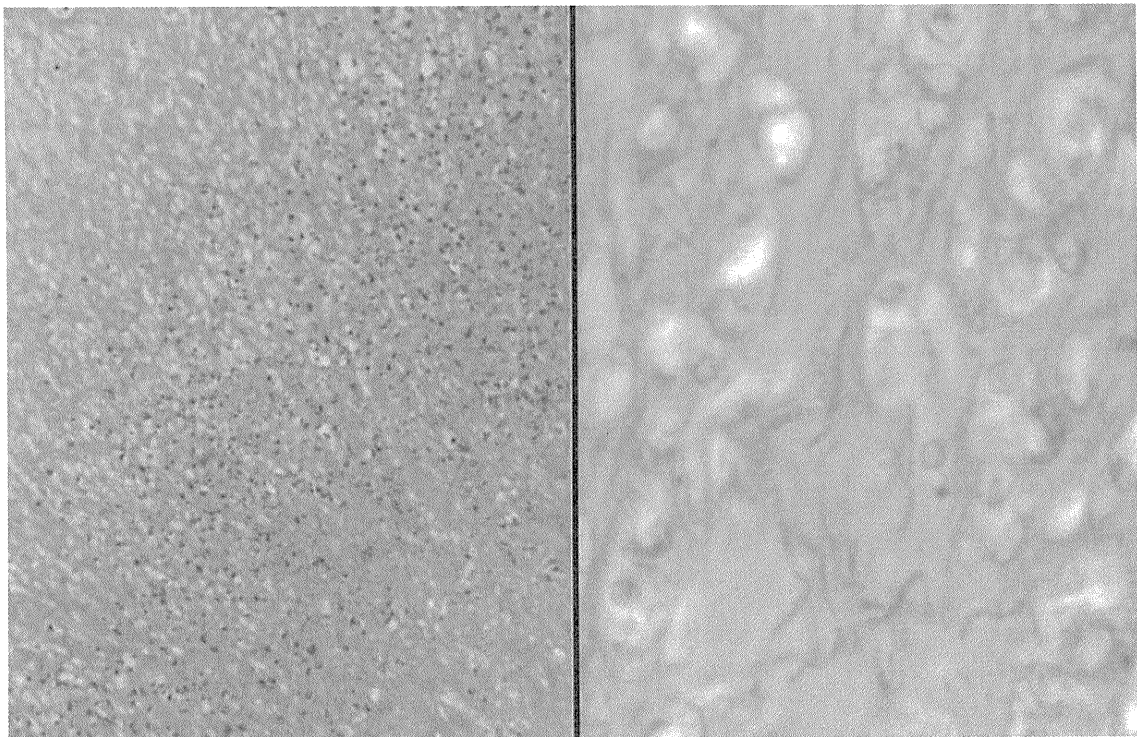


図 2. マゼランペンギンの趾瘤症。左：趾瘤は角化上皮にて形成されており、軽度の偽好酸球浸潤がみられる。HE 染色。右：角化上皮内には、長く連鎖、分岐する好塩基性の糸状菌が多数みられる。HE 染色。

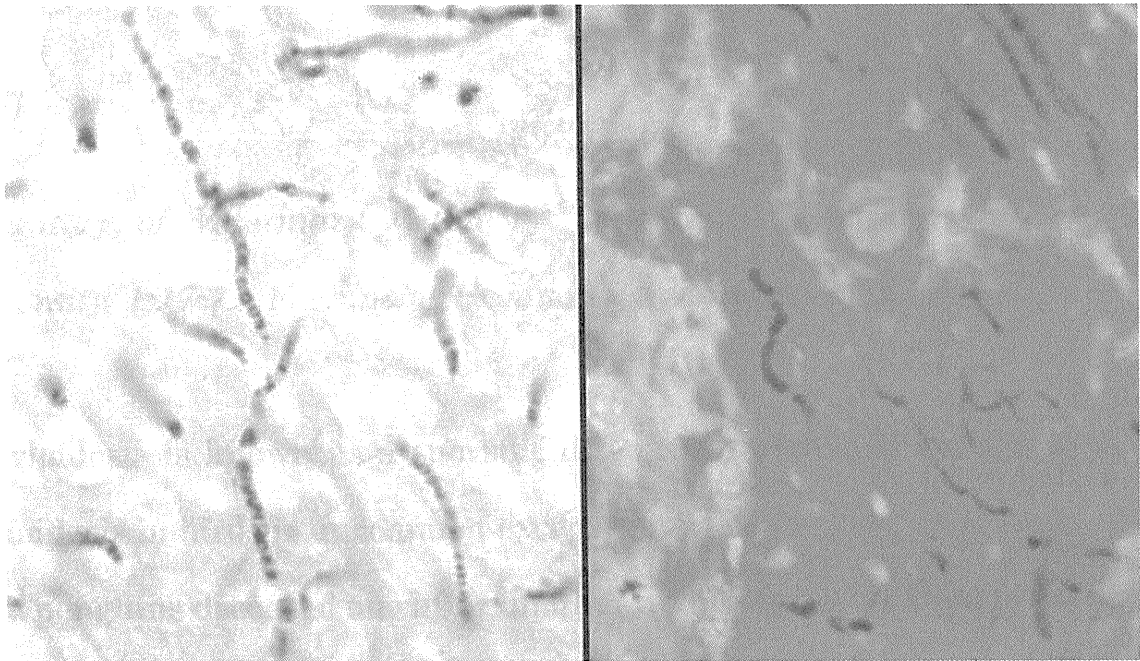


図 3. マゼランペンギンの趾瘤症。左：糸状菌は Gram 染色陽性を示す。Gram 染色。右：*Dermatophilus* 属菌に特徴的な railroad tracks 構造がみられる。Grocott 染色。

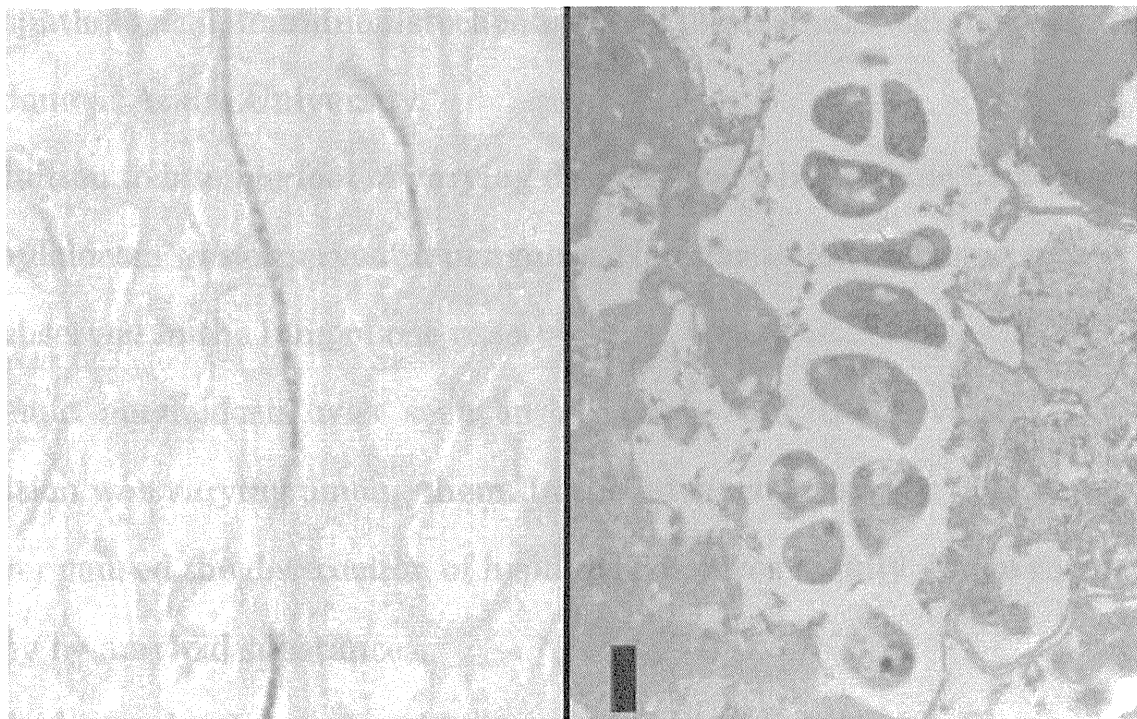


図 4. マゼランペンギンの趾瘤症。左：菌体は抗 *D. congolensis* 抗血清に陽性を示す。抗 *D. congolensis* 抗血清を用いた免疫染色。右：縦割、横割により分裂連鎖する菌体が観察される。透過型電子顕微鏡観察像、酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色。Bar 5 μ m。

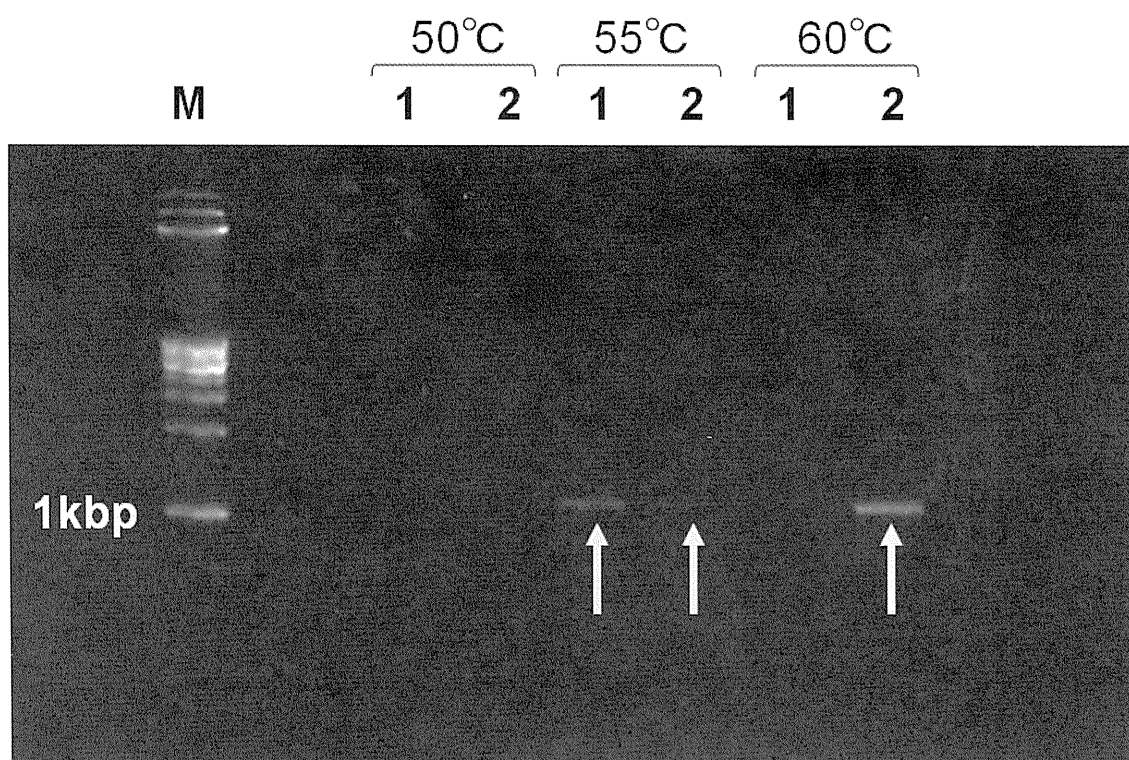


図5. アニール温度によるPCR検出結果。プライマーセット1は55°C、プライマーセット2は55、60°Cで1kbpの位置にバンドを認める。

M 1kb マーカー； 1 プライマーセット1； 2 プライマーセット2。

資料1 実験系に使用したプライマーセット

	Forward	Reverse
Primer set 1	(DF-2) ACATGCAAGTCGAACGATGA	(D-congo2) ACCATTACGTGCTGGCAAC
Primer set 2	(DF-2) ACATGCAAGTCGAACGATGA	(D-chelo2) AAGTGCTGGCAACATGGAAC

資料 2 PCR 検出系の設定条件

反応溶液の組成

鋳型 DNA	1 μ L
dNTP	2 μ L
Primer	
Forward	1 μ L
Reverse	1 μ L
DNA ポリメラーゼ	0.25 μ L
10X Buffer	2.5 μ L
dH ₂ O	17.25 μ L
	<hr/>
	25 μ L

反応条件

(変 性)	98 °C、3 min	
(変 性)	98 °C、0.5 min	} 1 サイクルとして、35 サイクル実施
(アニーリング)	各条件温度、1min	
(伸 長)	72 °C、1min	
(伸 長)	72 °C、5 min	

* 反応終了後はサーマルサイクラー内にて 4°C で保存

表1 供試鳥類の内訳

No.	動物種	性別	年齢(歳)	バンド形成	sequencing	趾瘤症
D-A1	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	1	△	ND	○
D-A2	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	1	○	○	○
D-A3	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	7カ月齢	×	ND	×
D-A4	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	15	×	ND	×
D-A5	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	不明	2	×	ND	×
D-A6	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	32	×	ND	×
D-A7	ジェンツーペンギン (<i>Pygoscelis papua</i>)	♂	不明	△	ND	×
D-A8	カナダガン (<i>Branta canadensis</i>)	不明	0	○	○	○
D-A9	カナダガン (<i>Branta canadensis</i>)	不明	0	×	ND	×
D-A10	カナダガン (<i>Branta canadensis</i>)	不明	0	×	ND	○
D-A11	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	不明	×	ND	×
D-A12	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	不明	○	○	×
D-A13	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	不明	×	ND	×
D-A14	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	0	×	ND	○
D-A15	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	0	×	ND	×
D-A16	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	不明	0	×	ND	○
D-A17	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A18	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A19	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A20	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A21	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	10	×	ND	○
D-A22	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	9	×	ND	○
D-A23	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	9	×	ND	○
D-A24	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	9	×	ND	○
D-A25	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	8	×	ND	○
D-A26	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	5	×	ND	○
D-A27	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	4	×	ND	○
D-A28	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	4	○	○	×
D-A29	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	3	×	ND	○
D-A30	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	3	×	ND	○
D-A31	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	3	×	ND	○
D-A32	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♀	3	×	ND	○
D-A33	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	♂	2	×	ND	○
D-A34	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	不明	1	×	ND	○
D-A35	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	不明	1	×	ND	○
D-A36	フンボルトペンギン (<i>Spheniscus humboldti</i>)	不明	1	×	ND	○
D-A37	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♂	不明	△	ND	○
D-A38	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A39	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A40	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	不明	不明	△	ND	○
D-A41	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	不明	不明	×	ND	○
D-A42	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	不明	不明	×	ND	○
D-A43	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A44	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A45	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A46	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A47	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♂	不明	×	ND	○
D-A48	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♂	不明	×	ND	○
D-A49	アオクビアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	不明	×	ND	○
D-A50	ハクガン (<i>Anser caerulescensis</i>)	♀	老齢	×	ND	×
D-A51	ハクガン (<i>Anser caerulescensis</i>)	♂	老齢	△	ND	○
D-A52	ハクガン (<i>Anser caerulescensis</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A53	コクチョウ (<i>Cygnus atratus</i>)	♂	老齢	×	ND	○
D-A54	コクチョウ (<i>Cygnus atratus</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A55	ハワイガン (<i>Branta sandvicensis</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A56	ハワイガン (<i>Branta sandvicensis</i>)	♂	老齢	×	ND	○
D-A57	ハワイガン (<i>Branta sandvicensis</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A58	ハワイガン (<i>Branta sandvicensis</i>)	♂	老齢	×	ND	○
D-A59	ハワイガン (<i>Branta sandvicensis</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A60	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♂	4	×	ND	○
D-A61	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	3	×	ND	○
D-A62	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♂	4	×	ND	○
D-A63	シロアヒル (<i>Anas platyrhynchos</i>)	♀	3	×	ND	○
D-A64	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♂	10	×	ND	×
D-A65	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♂	10	×	ND	×
D-A66	アイガモ (<i>Ahas platyhnhos</i>)	♂	10	×	ND	×
D-A67	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	♂	老齢	×	ND	○
D-A68	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	♀	老齢	×	ND	○
D-A69	シナガチョウ (<i>Anser cygnoides</i>)	♀	10	×	ND	○

○: 明瞭なバンド形成

△: 再現性が低かった。

×: バンド形成が認められなかった。

野生動物・輸入動物に関する研究グループ

「高病原性真菌症等に由来する動物由来感染症に関する研究」

- ロボミコーシスの迅速診断法に関する研究
- ペンギンの *Trichosporon asteroides* による皮膚感染症とその対策
- 都市型げっ歯類の *Arthroderma vanbreuseghemii* 保有率の調査

千葉大学：佐野 文子

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)
研究協力報告書

動物由来感染症リスク分析手法等に基づくリスク管理の在り方に関する研究
高病原性真菌症等に由来する動物由来感染症に関する研究

分担研究者：佐野文子	千葉大学真菌医学研究センター
研究協力者：山手丈至	大阪府立大学獣医学部
桑村 充	同上
井澤武史	同上
田中美有	同上
長谷川優子	同上
植田啓一	(財)海洋博覧会記念公園 美ら海水族館
内田詮三	同上
毛塚千穂	須磨海浜公園水族園
村上 賢	麻布大学獣医学部
村田倫子	同上
比留間政太郎	順天堂大学医学部皮膚科
角本浩太郎	大阪海遊館
伊東隆臣	同上
伊藤このみ	同上
林 成幸	同上
春成常仁	イカリ消毒(株) 技術研究所
谷川 力	同上
宮城洋実	厚生労働省 那覇検疫所

研究要旨

1) ロボミコーシスの迅速診断法に関する研究

ロボミコーシス(ラカジオーシス)の原因菌は *Lacazia loboi* で、培養困難な高度病原性真菌である。ヒト、イルカを宿主とし、ケロイド状肉芽腫性結節性慢性皮膚炎を示す。感染源は土壌、植物、水系で、イルカとの接触による感染も示唆されている。流行地は大西洋に面した中南米と考えられていたが、昨年、我が国で本症に罹患したバンドウイルカが発見された。今回、この症例と同時期に捕獲され、関西地域で飼育されているバンドウイルカの左右眼瞼上部の皮膚および体幹部の外傷性瘢痕に多発性肉芽腫性結節性慢性皮膚炎が発症した。

しかしながら生検組織塗抹標本ならびに細胞診、病理標本内での菌体は確認されたものの、組織からの遺伝子検出に至らず確定診断に難渋していた。外科的切除後、この個体は再発が見られ、生検の塗抹標本内に *L. loboi* の特徴を示す直径約10 μmの球形の酵母細胞が証明され、この生検組織からnested-PCR系により遺伝子検出によりと配列決定に至りロボミコーシスの確定診断に至った。なおこの症例由来の遺伝子配列は昨年の症例と100%相同であった。さらに、この症例で遺伝子検出に至っていなかった生検組織からも同様に遺伝子検出と配列決定が出来たことから、このnested-PCR系は我が国で発生したロボミコーシスの診断には有用であったと言える。

さらに昨年の症例および今回の症例の血清を近縁菌種の *Paracoccidioides brasiliensis*

抗原と沈降反応させたところ、弱い沈降線を形成した。一方、感染個体と同居飼育されていた個体およびその他の個体では沈降線は陰性であった。

現在までに、我が国で複数例のロボミコーシスが確認されたことから、この感染症の発生は偶発的ではないと考えられた。また、感染したイルカからトレーナーが感染した疑いが海外で報告されていることから、水族館関係者に注意喚起を行った。

2) ペンギンの *Trichosporon asteroides* による皮膚感染症とその対策

水族館で飼育されているペンギンの両足脚鱗部病変から *Trichosporon asteroides* が分離された。本菌種は鳥類での感染は極めて稀であることから、その感染源の推定と治療、感染防御対策を行った。

3 か月齢の飼育下イワトビペンギン (*Eudyptes chrysocome*) の両足脚鱗部に角化亢進を呈する病変が発生した。鳥類の皮膚真菌症は稀であるが、病理組織学検査より酵母用真菌の存在が確認されたことから、皮膚真菌症が疑われた。また、ペンギンの飼育水、同一飼育エリアの他個体からも本菌種が分離されたことから飼育環境が感染源であることが示唆された。対策として本菌種の各種消毒薬への抵抗性について調査したところ本菌株は低水準消毒薬でも効果があったことから、次亜塩素酸ソーダなど通常用いられている消毒方法で対応できることが示唆された。なお、当該個体の皮膚病変は抗真菌剤の塗布により改善した。本症例は鳥類での *T. asteroides* による皮膚真菌症の初めての症例であり、本菌種も皮膚真菌症の原因菌となり得ることが示唆された。

3) 都市型げっ歯類の *Arthroderma vanbreuseghemii* 保有率の調査

本菌種による感染は我が国でも人獣共通感染症として散見され、げっ歯類（ドブネズミなど）が保菌し、ネコがネズミを捕獲することにより感染し、そのネコにヒトが接触して感染すると推測されている。今年度は、千葉県6頭、神奈川県1頭、東京都22頭、沖縄県21頭、ベトナム58頭のドブネズミ（106頭）およびクマネズミ（2頭）、総計108頭の被毛を調べた。しかし、今回の調査では本菌種は分離されなかった。

1) ロボミコーシスの迅速診断法に関する研究

A. 研究目的

ロボミコーシス（ラカジオーシス）の原因菌は *Lacazia loboi* で、培養困難な高度病原性真菌である。ヒト、イルカを宿主とし、ケロイド状肉芽腫性結節性慢性皮膚炎を示す。感染源は土壌、植物、水系で、イルカとの接触による感染も示唆されている。また、最近、マウスでの継代実験中に感染した症例も報告されており、動物からの感染が危惧されている。

流行地は大西洋に面した中南米と考えられていたが、昨年、我が国で初めて本症に罹患したバンドウイルカが発見された。今回、この症例と同時に捕獲され、関西地域で飼育されているバンドウイル

カでの発症が確認されたので、我が国でも迅速診断の確立が必要である。

2例目の症例を検討することにより、分子生物学的な診断方法の確立、血清学的診断方法の検討を目的とした。

B. 研究方法

<症例>

バンドウイルカ (*Tursiops truncatus*)、雌、推定年齢5歳は昨年報告した症例（症例1）と同群に属し、日本近海で同時に捕獲され、2009年2月まで症例1と同じ飼育施設にて飼育され、同月24日から現在の飼育施設（須磨海浜公園水族園）にて飼育されている。

体長240 cm、体重175 kg.

2011年2月より左右上眼瞼皮膚に潰瘍部を伴った肉芽状の溼かい病変が出現し、3月には拡大傾向を示した（図1）。

飼育施設では2011年4月に症例1の存在を知り、ロボミコーシスを疑い、病変部の生検を行ったところ、病変部の塗抹標本で酵母様菌体を確認したが、1視野に限られていただけでなく、病理組織標本での菌体の検出にいたらなかった。また同時に行った遺伝子検出も陰性であった。しかしながら、このときに呼気から *Candida glabrata* が検出された。

4月に病変部の生検し、塗抹標本内にギムザ染色で酵母様構造物を検出した

(図2)。この検体では昨年度の症例と同じ方法を用いた生検組織の遺伝子検査では遺伝子は検出されなかった。

5月に病変部の生検サンプル採集と焼烙処置を行った。生検組織の培養および呼気からの *C. glabrata* および *Aspergillus niger* が培養されたので、この結果をふまえて、患部にケトコナゾールクリームを塗布、ミカファンギンの静脈内投与、イトラコナゾールの内服を開始した。また、口腔内にも同様の腫瘤を認めた。この時の病理組織から酵母様の菌体が確認された(図3)。4月の検体同様、遺伝子は検出されなかった。

6月以降、経時的に行っているベータグルカンの値は8-41 pg/mlと陽性で推移していた。

9月、新たな病巣が左眼瞼病巣の上部に出現するとともに、過去にサメによる咬傷を受けた部分にも同様の腫瘤が出現し、これらの病巣の生検塗抹、病理検査、遺伝子検出の材料とするとともに、病巣の焼烙を行った。

このときの生検塗抹標本で *L. loboi* に特徴的な球形で狭い接着面で連結した酵母細胞の集団を確認するとともに(図4)、今回開発された遺伝子検出系により、症例1と100%一致する部分配列382塩基が得られたことから、ロボミコーシスと確定した。また、この方法で4月と5月に採集した生検組織を用いて遺伝子検出を行ったところ、いずれも昨年度の症例由来の配列と100%相同な部分配列382塩基が得られた。

現在、9月におこなった焼烙部位からの再発はなく、週末のみのイトラコナゾールの内服を続けながら経過観察中である。

<分子生物学的診断方法の確立>

昨年報告した症例由来の43kDa糖タンパク抗原遺伝子(*gp43*)の配列は近縁菌種の *Paracoccidioides brasiliensis* に相同性が高いことが判明しているだけでなく、決定した領域は GenBank データベース上の *Lacazia loboi* の同遺伝子配列とアライメントを取ることが可能である。そこで *P. brasiliensis*, *L. loboi* および昨年の症例由来配列のアライメントをとり、昨年の症例由来配列の内側にプライマーを設計して nested-PCR 系として遺伝子検出を試みた。

今回の nested-PCR で用いられたプライマーはファースト PCR が MAE: 5'-TGC TGC GGC GGG GTT AAA CCA TGT C-3' および ATO: 5'-GTT GTG GTA TGT GTC GAT GTA GAC G-3', セカンド PCR が SUMF1: 5'-GTC ATC GAT CTC CAT GGT GTT AAG-3 および SUMR2: 5'-GTC ATC GAT CTC CAT GGT GTT AAG-3 を用いた。

PCR 条件はいずれも 95°C, 4 分ののち、94°C : 1 分—50°C : 1 分半—72°C : 2 分を 40 回、最後に 72°C, 10 分を用いた。この遺伝子検出系はイルカ、ヒト、ラット、牛、豚、山羊、イヌ、ネコ、および主な病原真菌の *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paecilomyces liacinus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium solani*, *Absidia corymbifera*, *Candida albicans*, *Trichosporon asahii*, *Exophiala dermatitidis*, *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Sporothrix scenckii* および *Penicillium marneffei* での増幅は確認されなかったが、近縁菌種の *P. brasiliensis* では同サイズのバンドが増幅された。

なお、昨年の症例のパラフィン包埋組織から抽出した DNA はセカンド PCR 用プライマーのダイレクト PCR でもバンドが検出された (図 5)。

<血清学的診断方法の検討>

今後の国内で簡便にできるロボミコーシスの診断方法の一つとして、ロボミコーシスの血清学的検査の有効性を検証した。

まず、ロボミコーシスは菌の培養が出来ないことより、菌体から抗原を作ることが不可能である。海外では抗原性に交差反応が知られているパラコクシジオイデス症の原因菌による抗原を用いた沈降反応による簡易診断も有用とされている。

しかしながら我が国ではパラコクシジオイデス症原因菌の菌体は千葉大学真菌医学研究センターで保存されているものの、生菌の取り扱いが極めて難しく、現在生菌の取り扱いを中止しているため、国内で抗原を作成して血清学的診断を行うことは不可能である。

そこでブラジル国ロンドリーナ州立大学生物科学研究所のイタノ・エイコ・ナカガワ教授のラボにおいてパラコクシジオイデス症の原因菌による抗原を用いた沈降反応の有効性を検討した。

その結果、国内で病理学的検査結果によりロボミコーシス症と診断されていた昨年の症例と今回の症例は沈降反応で弱い沈降線を形成し「陽性」が確認された。しかしながら、肉眼で判定できたものの、画像での判別は出来なかった。

同じく同居個体と無作為に採取した他個体の血清では、全て「陰性」であることが確認された。

今回実施したパラコクシジオイデス症の原因菌 *P. brasiliensis* 菌体抗原を用いた血清学的診断方法は、有用であることが判明した。なお今回の沈降線はパラコクシジオイデス症患者血清との共通沈降線ではなかった。

C. 結果

以上より、臨床症状、細胞学的検査、遺伝子検出、血清学的検査を総合して、本症例をロボミコーシスと診断した。

今回使用した nested-PCR 系はロボミコーシスの迅速診断に有用であった。

また、沈降反応による血清学的診断は反応が微弱なものの、迅速診断法としては簡便で有用であった。

D. 考察

今回設計した nested-PCR 系による遺伝子検出法は遺伝子抽出から 2 回の PCR および泳動による増幅された遺伝子の確認までのプロセスがおおよそ 24 時間以内、配列の決定までが最短で 72 時間である。また、病原部に大量の菌体を含む症例ではセカンド PCR 用プライマーセットを用いたダイレクト PCR が可能であったことから、検出感度は高いことが示唆された。

近縁菌種の *P. brasiliensis* では増幅されたことからプライマーの特異性については改良の余地がある。しかしながら、パラコクシジオイデス症はロボミコーシスと臨床症状が異なり、リンパ節の腫脹、肺病変を主兆とし皮膚病変の肉芽腫や潰瘍も孤立性であることから、鑑別できる。よって現在のところ、配列決定をしなくとも、この検出系で遺伝子増幅を認めることにより、臨床症状、病理組織学、細胞学的診断結果とあわせてロボミコーシスを疑うことは可能と考えている。

なお我が国で発生した 2 症例は同一の遺伝子型であったことから、偶発的な発生とは言えず、我が国沿岸で生息しているバンドウイルカの中で流行している遺伝子型であることが示唆された。

昨年ならびに今回の症例よりも以前に、我が国周辺海域でもロボミコーシス様症状を呈したイルカ症例の目撃例が報告されていたが、病理組織学および分子生物学的データに基づいた診断は行われていなかった。ストランディングにより検体採集が可能な場合には、軽微な皮膚病変でも調査することが重要である。

また、血清学的診断法は24時間で判定できることから、国内で抗原を作成し、補助診断に備えることが望まれる。

治療法としては抗真菌薬の投与と外科的切除であるが、1度の切除では完全な切除は難しいことが示唆された。現在のところ2011年9月より再発は認められず、経過観察中である。

また今回の症例が発症したときの同居個体および水系のつながった飼育環境にあった個体についての観察も続けている。さらに全国の飼育個体の識別番号から昨年度の症例と今回の症例と同時に捕獲された個体が国内数カ所で飼育されていることが判明している。これらの個体も同様に観察を続けている。

我が国では現在までにヒトでの感染例は見当たらないが、ロボミコーシスの病型は軽微な皮膚炎程度から激しいケロイド状の肉芽腫性病巣まで多種に及ぶため、軽微な症例は見逃されてきた可能性は否定できない。今後は皮膚科医との協力のもと、軽微な皮膚炎、ケロイド状皮膚炎などを対象とした調査が必要であると考えている。

E. 結論

現在、結論に至っていない。

F. 健康危険情報

特になし。

安全対策として、内田詮三「沖縄 美ら海水族館」顧問による(社)日本動物園水族館協会 鯨類会議 代表幹事 名にて全国で鯨類を飼育している動物園水族館の園長宛に「飼育バンドウイルカに発症した新興真菌感染症について」の文書を送付して、ロボミコー시스に関する注意喚起を行った(参考資料)。

研究協力者：植田啓一，山手丈至，桑村充，井澤武史，田中美有，長谷川優子，内田詮三，毛塚千穂，比留間政太郎

2) ペンギンの *Trichosporon asteroides* による皮膚感染症とその対策

A. 研究目的

Trichosporon 属菌種は、もともと環境中に広く生息している担子菌系の不完全酵母であり、夏型過敏性肺炎のアレルゲンとしてや、易感染性宿主に発症する重要な新興日和見感染症の一つとしても注目されている。

ヒト病原性の *Trichosporon* 属菌種は、現在では少なくとも 8 菌種があげられる。そのうち深在性真菌症の原因菌として *T. asahii*, *T. mucoides* まれに *T. japonicum* および *T. loubieri*, 表在性真菌症の原因菌として *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. inkin* および *T. ovoides* が知られている。

鳥類における *Trichosporon* 属菌種による感染例は非常に稀であり、*T. asahii* による全身性トリコスポロン症がコンゴウインコ (*Ara. Chloroptera*) で、好酸球性皮膚炎がオカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) で発生した例があるが、ペンギン類での発生は知られていない。

今回、飼育下のイワトビペンギン (*Eudyptes chrysocome*) の両足脚鱗部の角化亢進を呈する病変より *Trichosporon* 属菌種が分離されたので、その同定、感染経路、飼育環境への対策について報告する。

B. 研究方法

水族館で飼育されている 3 ヶ月齢のイワトビペンギンの両足脚鱗部病変 (図 6) から鱗屑を採取し、シクロヘキシミドとクロラムフェニコールを添加したポテトデキストロース寒天平板培地にて 35°C で 28 日間培養した。分離された菌株について、集落や分生子の形態学的観察ならびに、rRNA 遺伝子の ITS 領域、IGS 領域の配列により、分子生物学的に同定した。温度試験、各糖利用能、薬剤感受性試験を行い、分離菌株の性状を調べた。また、各種消毒薬に対する分離菌株の抵抗性を調べた。

環境中への拡散を調査するために飼育海水 500 ml を採集し、同様に菌分離を行った。

さらに rRNA 遺伝子 IGS 領域について、GenBank に登録されている配列と MP 法によるクラスター解析を行った。

なお、本症例個体はフロリド軟膏 1 日 2 回塗布を約 2 ヶ月間行い、完治した。

C. 結果

特徴的な分節型分生子 (図 7) や IGS 領域の配列が既知配列と 100% の相同を示したことから、分離株は *T. asteroides* と同定された。なお ITS 領域の配列では *T. asteroides* または *T. japonicum* 100% の相同性を示した。本分離株の最高発育温度は 39°C で、糖利用能から菌種の同定を行う API ID32C では *T. asahii* が 99.1%、*T. asteroides* または *T. ovoides* の可能性が示唆された。

薬剤感受性試験では MCFG 耐性、AMPH-B と 5-FC 低感受性、アゾール系感受性であった。消毒薬の抵抗性試験ではクロルヘキシジングルコン酸塩、過酸化水素以外の消毒薬で発育が阻止された (表 1)。

また、飼育海水からも同様の性状の *T. asteroides* が分離され、同一の遺伝子型であった (図 8)。

今回分離された菌株は、国内の他施設のペンギン由来 *T. asteroides* や同一飼育施設のラッコ由来 *T. asteroides* と同じクラスターに属した (図 8)。

D. 考察

今回ペンギンの両足脚鱗部より分離された真菌は、培養検査・分子生物学的同定法により *Trichosporon asteroides* と同定され、*T. asteroides* もペンギン類の皮膚真菌症の原因菌となり得ることが明らかとなった。また、飼育水や同一施設内のラッコからも同一遺伝子型の *T. asteroides* 株が分離されており、環境中への蔓延が示唆された。

対策は水族館で一般的に使用されている複合次亜塩素酸系消毒薬やアルコール系消毒薬を用いることにより、感染の拡大を防ぐことができると考えられる。

E. 結論

T. asteroides はペンギン類の皮膚真菌症の原因菌となることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

研究協力者：角本浩太郎，伊東隆臣，伊藤このみ，林 成幸，村田倫子，村上賢

3) 都市型げっ歯類の *Arthroderma vanbreuseghemii* 保有率の調査

A. 研究目的

皮膚菌糸状症はヒトと動物の間での接触により感染する人獣共通真菌症で、ヒトが動物由来の皮膚糸状菌に感染すると激しい炎症を起こすことはよく知られている。主な原因菌は *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* (無性型), *Trichophyton verrucosum*, *Microsporum gypsum* などがあげられる。なかでも *T. mentagrophytes* は *M. canis* について2番目に症例が多い人獣共通皮膚糸状菌症原因菌である。

T. mentagrophytes の有性型は *Arthroderma vanbreuseghemii*, *A. benhamiae*, *A. simii* が知られている。このうち *A. vanbreuseghemii* は古くからわが国でも多くの症例が報告されており、ヒトは愛玩動物および実験動物用げっ歯類との接触による感染が報告されている。また、Drouot らによれば海外ではネズミを捕る習性のあるネコで本菌種の感染率が高いことから、ネズミが感染に関与していることが示唆されている。

昨年度までにわが国でも都市型野生動物としてのげっ歯類が *A. vanbreuseghemii* を保有し、ドブネズミの10.3%が保有していることが判明している。

今回、これらの調査に引き続き、2011年6月より2011年12月までに関東地方(29頭：千葉6頭、東京都22頭、神奈川県1頭)、沖縄県(21頭)およびベトナムのハノイ郊外農村地域(58頭)で捕獲されたドブネズミ(106頭)、クマネズミ(2頭)、総計108頭について調査した。

B. 研究方法

いずれのネズミも外見に脱毛、貧毛などの変化を認めなかった。エーテル吸入による軽麻酔下で、市販の歯ブラシで被毛表面を20回こすり、歯ブラシに付着した被毛、落屑をアクチジオンと抗生物質を添加したポテトデキストロース寒天平板培地にて、35℃、14日間培養した。

C. 結果

今回調査したネズミからは皮膚糸状菌症原因菌は分離されなかった。

D. 考察

今回の調査で皮膚糸状菌症原因菌が全く分離されなかった背景としてまず、調査したドブネズミの約7割はベトナム検体も含めて港湾もしくは農業地帯で捕獲された個体であることから、一般人の生活と隔絶された場所で棲息しているため、保菌もしくは菌の付着する機会に乏しかったことが推測された。

ネズミを捕る習性のあるネコで本菌種の感染率が高かったという海外の報告は、国土のほとんどを寒冷地が占めるスイスからの報告である。一方、今回の調査の約7割は沖縄もしくはベトナムの個体で亜熱帯、熱帯地域の検体である。気候の違いも要因の一つと考えられるが、皮膚糸状菌症は、温暖な気候を好むとされてきたので、現在のところ気候との関連は不明である。

E. 結論

A. vanbreuseghemii の感染経路に都市型野生動物のげっ歯類の関与が明らかであるものの、地域や気候による保有率の違いが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

研究協力者：春成常仁、谷川 力、宮城洋実

研究発表

1.著書

Ayako Sano and Kyoko Yarita: Chapter 55: *Ochroconis*, In Molecular detection of human fungal pathogens, Dongyou Liu Ed. CRC Press. 2011.pp459-468.

2.原著

1) Miyasato H, Yamaguchi S, Taira K, Hosokawa A, Kayo S, Sano A, Uezato H, Takahashi K: Tinea corporis caused by *Microsporum gallinae*: The first clinical case in Japan. The Journal of Dermatology. 38: 1-6, 2011.

2) Tanaka M, Izawa T, Kuwamura M, Nakao T, Maezibi Y, Ito S, Murata M, Murakami M, Sano A, Yamate J: Deep granulomatous dermatitis of the fin caused by *Fusarium solani* in a False Killer Whale (*Pseudorca crassidens*). The Journal of Veterinary Medical Science. 2012, In press.

3.総説・翻訳・その他

佐野文子：ヒストプラズマ症（皮膚，呼吸器，全身）．特集 治療シリーズ Vol. 13 —私はこうしている—「感染症．SA Medicine No. 76. 13 (6): 43-46, 2011.

4.学会発表

1) Murata Y, Inoue K, Hayashi D, Asakawa K, Yoshida K, Harada M, Murata M, Sano A: Diagnosis and treatments for *Candida* cystitis in dogs and cats. P-MY14-1 Saturday, 10 September, IUMS2011, Sapporo, 2011 Sep. 6-10.

2) Sano A, Ueda K, Murata M, Yamate J, Kuwamura M, Izawa I, Tanaka M: A case of lobomycosis (Lacaziosis) in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in Japan. Saturday, 10 September, IUMS2011, Sapporo, 2011 Sep. 6-10.

3) 村田 佳輝, 井上 敬子, 林 大輔, 浅川 幸一, 吉田 佳子, 原田 未生, 村田 倫子, 佐野 文子: 動物における膀胱カンジダ症の診断および治療の検討. 日本獣医師会関東三学会神奈川大会: 平成23年度関東・東京合同地区三学会, (2011.9.11, 神奈川, 日本大学生物資源学部)

4) 村田 倫子, 林成幸, 伊藤このみ, 伊東隆臣, 角本浩太郎, 佐野文子, 村上賢: *Trichosporon asteroides*による皮膚病変を呈したペンギンの一例. 第17回日本野生動物医学会大会 (2011 9/29~10/2, 東京農工大学 府中キャンパス) 第17回日本野生動物医学会大会講演要旨集 p102.

5) 佐野 文子: 基礎・臨床セミナー2「黒色真菌と黒色真菌感染症」黒色真菌とその感染症—黒色真菌原因菌の分離・同定—, 第55回日本医真菌学会学術集会BS2-1 (2011.10.20-22, 東京, 椿山荘).

6) 佐野 文子, 植田 啓一, 内田 詮三: イルカに発症したロボミコーシスの1例. 第55回日本医真菌学会学術集会O2-4-5, P-082 (2011.10.20-22, 東京, 椿山荘).

7) 村田 佳輝, 佐野 文子: 動物における膀胱カンジダ症の診断および治療の検討. O2-3-4, P-072 (2011.10.20-22, 東京, 椿山荘).

8) 平澤 祐輔, 比留間 政太郎, 池田志孝, 菊池 賢, 佐野 文子, 矢口 貴志: 易感染性宿主に発見されたケタマカビ (*Chaetomium* 属) 感染症. O2-8-6, P-040 (2011.10.20-22, 東京, 椿山荘).

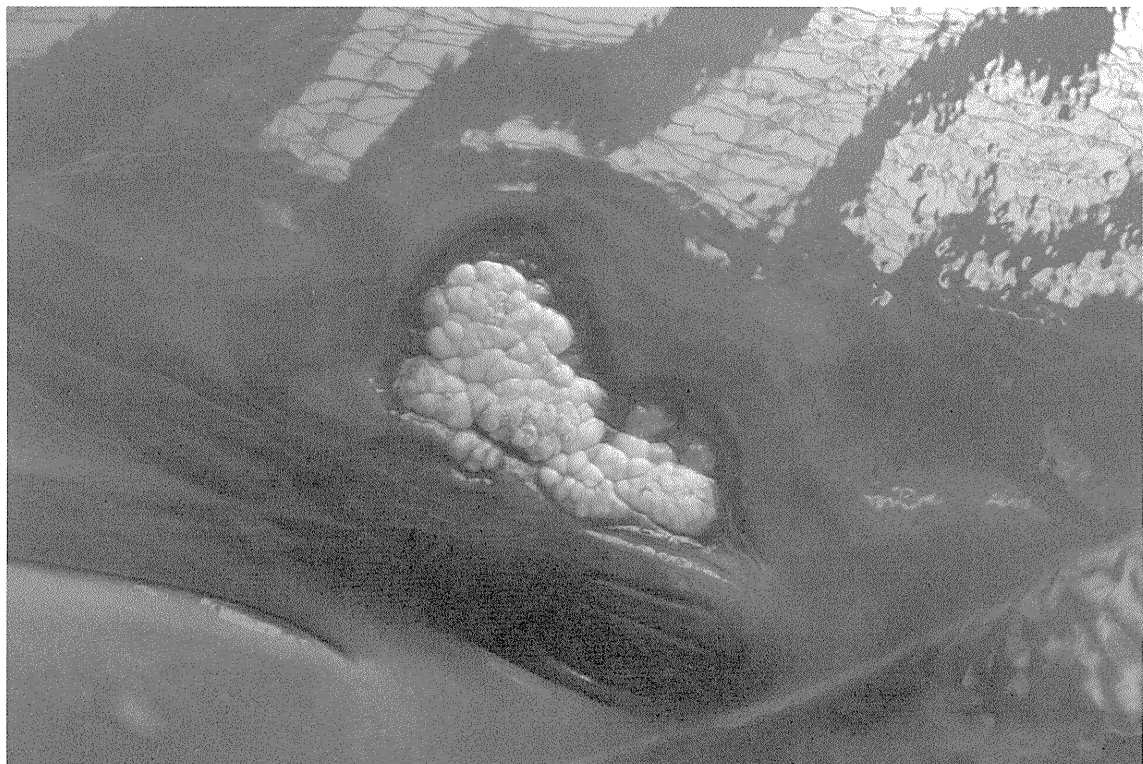


図1. 2011年2月に左右上眼瞼皮膚に出現した潰瘍部を伴った肉芽状の溲かい病変.
上：全体像および同居個体，下：病変部拡大.

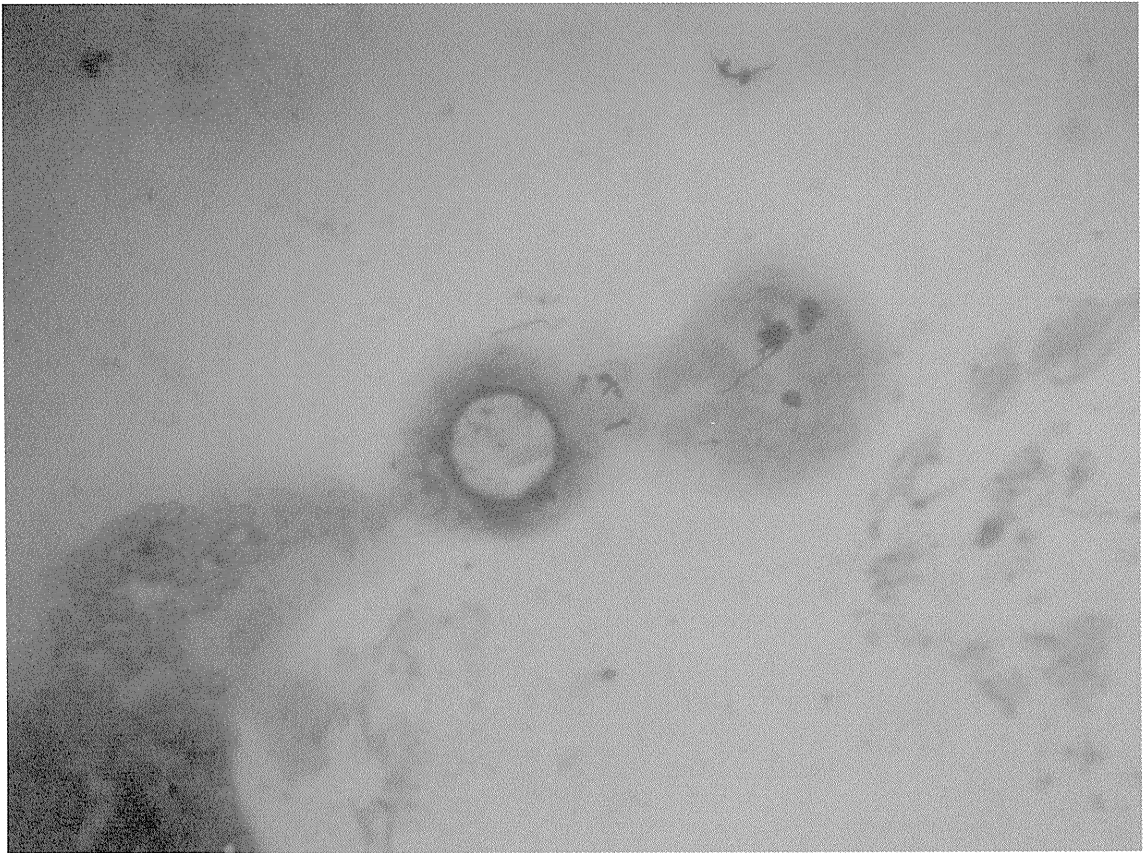


図 2. 2011 年 4 月に行った病変部の生検サンプル内に認められた酵母様の構造物.
X400, ギムザ染色.

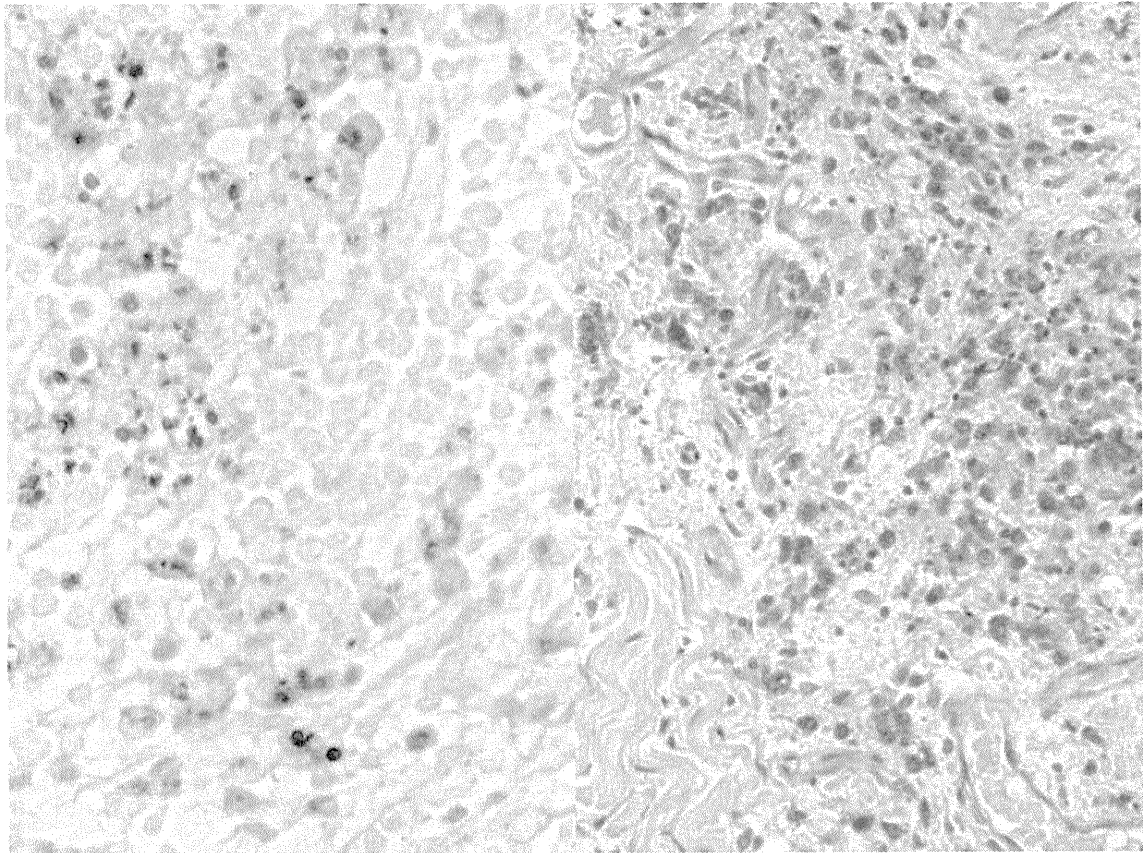


図3. 2011年5月に行った病変部の生検サンプル内に認められた酵母様の構造物.
左：GMS染色，右：PAS染色，x200.

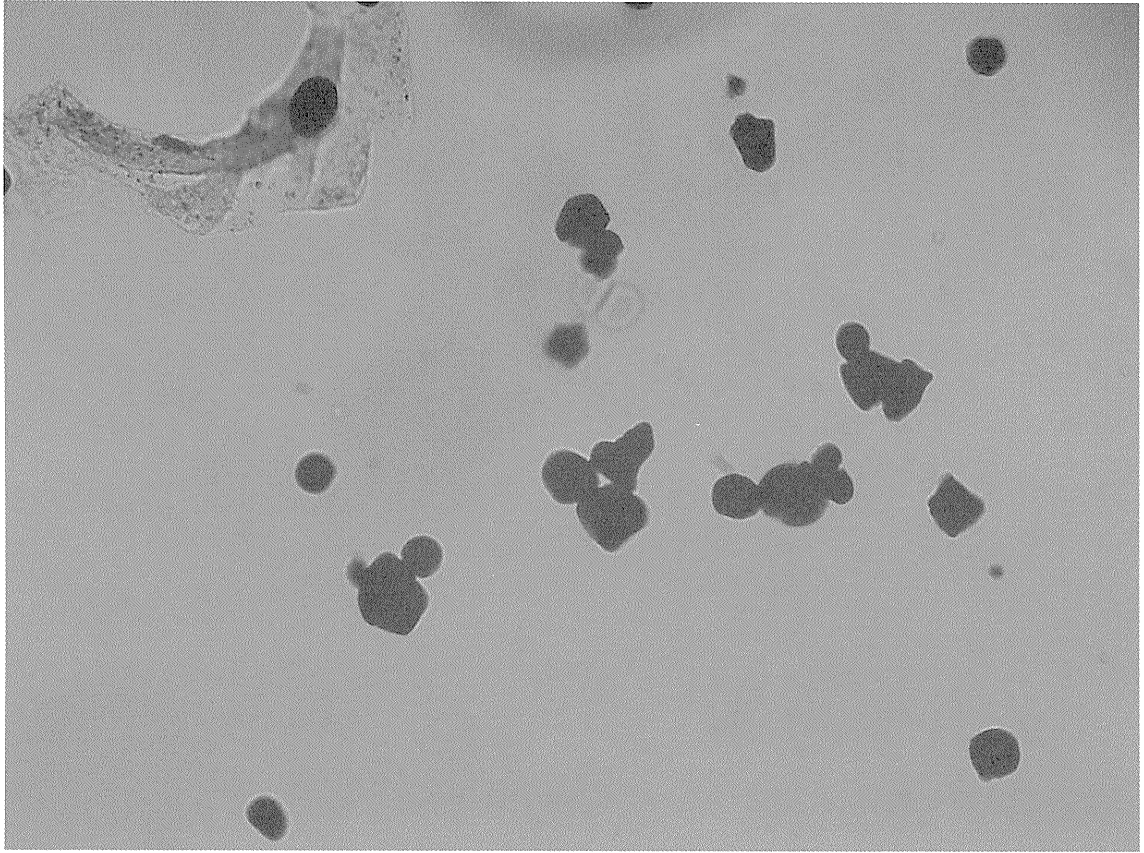


図4. 2011年9月に行った病変部の生検塗抹標本で確認された酵母様構造物.
*L. loboi*に特徴的な球形で狭い接着面で連結した酵母細胞の集団. GMS染色,
x400.

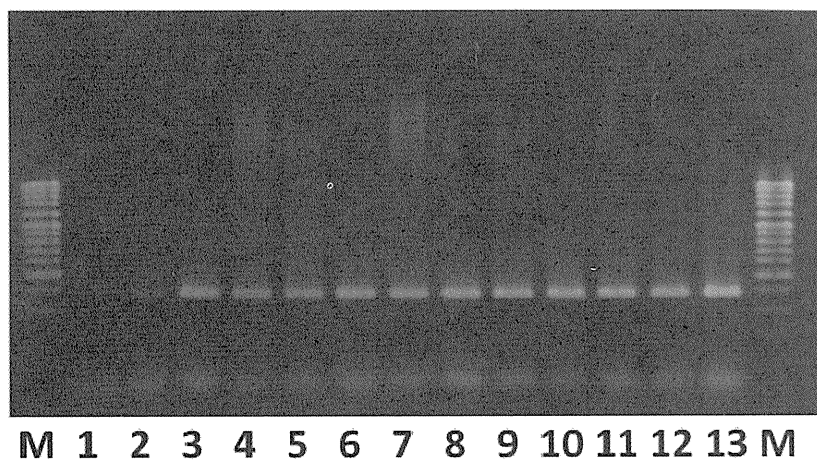


図 5. 2011 年 4 月, 5 月および 9 月に行った生検組織から nested-PCR 系により増幅された同一サイズの遺伝子バンド.

M: マーカー, 1: 陰性コントロール,

2: パラフィン包埋組織から抽出した昨年の症例の DNA (セカンド PCR 用プライマーセットでダイレクト PCR により検出),

3: 2011.4.27 の生検組織 (左眼瞼上皮病巣),

4: 2011.5.27 の生検組織 (右眼瞼上皮病巣),

5: 2011.5.27 の生検組織 (左眼瞼上皮病巣),

6: 2011.5.27 の生検組織 (外側皮膚サメ咬傷跡),

7: 2011.9.27 の生検組織 (左眼瞼上皮病巣),

8: 2011.9.27 の生検組織 (頭側背ビレ小病変),

9: 2011.9.27 の生検組織 (背ビレ下サメ咬傷跡),

10: 2011.9.27 の生検組織 (右側尾側サメ咬傷跡),

11: 2011.9.27 の生検組織 (尾部正中サメ咬傷跡),

12: 2011.9.27 の生検組織 (腹部サメ咬傷跡),

13: 2011.9.27 の生検組織 (新病巣).