

highly conserved. These results would be useful for development of an effective avian-specific transient expression system based on the APV promoter.

In contrast to mammalian polyomaviruses, APV has a broad host range. Comparing with APVs from several orders including Psittaciformes, Falconiformes, and Piciformes, APVs show only minor genetic variability. The viral genome is relatively stable in agreement with previous reports (Johne and Muller, 1998; Phalen et al., 1999). A single amino acid substitution in VP2/VP3 determines whether the virus can replicate in cell culture related to specific avian origin such chicken in Galliformes *in vitro*. An analysis of protein sequences in the present study found no evidence of host range restriction. Further studies are required to identify which amino acids and/or viral proteins might determine the APV's host restriction *in vivo* and to clarify why APV has a broad host range.

References

- Bernier, G., Morin, M., Marsolais, G., 1981. A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. *Avian Dis.* 25, 1083–1092.
- Bozeman, L.H., Davis, R.B., Gaudry, D., Lukert, P.D., Fletcher, O.J., Dykstra, M.J., 1981. Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Dis.* 25, 972–980.
- Chahota, R., Ogawa, H., Mitsuhashi, Y., Ohya, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H., 2006. Genetic diversity and epizootiology of *Chlamydomphila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of ompA gene. *Microbiol. Immunol.* 50, 663–678.
- Daniels, R., Sadowicz, D., Hebert, D.N., 2007. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog* 3 e98, 928–938.
- Davis, R.B., Bozeman, L.H., Gaudry, D., Fletcher, O.J., Lukert, P.D., Dykstra, M.J., 1981. A viral disease of fledgling budgerigars. *Avian Dis.* 25, 179–183.
- Enders, F., Gravendyck, M., Gerlach, H., Kaleta, E.F., 1997. Fatal avian polyomavirus infection during quarantine in adult wild-caught red-faced lovebirds (*Agapornis pullaria*). *Avian Dis.* 41, 496–498.
- Ewing, B., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8, 186–194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8, 175–185.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits in phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Galtier, N., Gouy, M., Gautier, C., 1996. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 543–548.
- Hirai, K., Nonaka, H., Fukushi, H., Shimakura, S., Masegi, T., Mizoguchi, T., 1984. Isolation of a papovavirus-like agent from young budgerigars with feather abnormalities. *Nippon Juigaku Zasshi* 46, 577–582.
- Hsu, C.M., Ko, C.Y., Tsai, H.J., 2006. Detection and sequence analysis of avian polyomavirus and psittacine beak and feather disease virus from psittacine birds in Taiwan. *Avian Dis.* 50, 348–353.
- Johne, R., Jungmann, A., Muller, H., 2000. Agnoprotein 1a and agnoprotein 1b of avian polyomavirus are apoptotic inducers. *J. Gen. Virol.* 81, 1183–1190.
- Johne, R., Muller, H., 1998. Avian polyomavirus in wild birds: genome analysis of isolates from Falconiformes and Psittaciformes. *Arch. Virol.* 143, 1501–1512.
- Johne, R., Muller, H., 2001. Avian polyomavirus agnoprotein 1a is incorporated into the virus particle as a fourth structural protein, VP4. *J. Gen. Virol.* 82, 909–918.
- Johne, R., Muller, H., 2007. Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family. *J. Virol.* 81, 11554–11559.
- Johne, R., Paul, G., Enderlein, D., Stahl, T., Grund, C., Muller, H., 2007. Avian polyomavirus mutants with deletions in the VP4-encoding region show deficiencies in capsid assembly and virus release, and have reduced infectivity in chicken. *J. Gen. Virol.* 88, 823–830.
- Kaleta, E.F., Herbst, W., Kaup, F.J., Jank-Ladwig, R., Marschall, H.J., Drommer, W., Krautwald, M., 1984. Untersuchungen zur Virusätiologie einer mit Hepatitis und Befederungsstörungen einhergehenden Krankheit bei Wellensittichen (*Melopsittacus undulatus*). *Zbl. Vet. Med. B* 31, 219–224.
- Khan, M.S., John, R., Beck, I., Pawlita, M., Kaleta, E.F., Muller, H., 2000. Development of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian polyomavirus-specific antibodies. *J. Virol. Methods* 89, 39–48.
- Krautwald, M.E., Muller, H., Kaleta, E.F., 1989. Polyomavirus infection in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): clinical and aetiological studies. *Zentralbl. Veterinarmed. B* 36, 459–467.
- Literak, I., Smid, B., Dubska, L., Bryndza, L., Valicek, L., 2006. An outbreak of the polyomavirus infection in budgerigars and cockatiels in Slovakia, including a genome analysis of an avian polyomavirus isolate. *Avian Dis.* 50, 120–123.
- Liu, Q., Hobom, G., 2000. Agnoprotein-1a of avian polyomavirus budgerigar fledgling disease virus: identification of phosphorylation sites and functional importance in the virus life-cycle. *J. Gen. Virol.* 81, 359–367.
- Luo, D., Muller, H., Tang, X.B., Hobom, G., 1994. Expression and DNA binding of budgerigar fledgling disease virus large T antigen. *J. Gen. Virol.* 75, 1267–1280.
- Luo, D., Muller, H., Tang, X.B., Hobom, G., 1995. Early and late pre-mRNA processing of budgerigar fledgling disease virus 1: identification of viral RNA 5' and 3' ends and internal splice junctions. *J. Gen. Virol.* 76, 161–166.
- Ogawa, H., Chahota, R., Hagino, T., Ohya, K., Yamaguchi, T., Fukushi, H., 2006. A survey of avian polyomavirus (APV) infection in imported and domestic bred psittacine birds in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 743–745.
- Ogawa, H., Yamaguchi, T., Fukushi, H., 2005. Duplex shuttle PCR for differential diagnosis of budgerigar fledgling disease and psittacine beak and feather disease. *Microbiol. Immunol.* 49, 227–237.
- Pass, D.A., 1985. A papova-like virus infection of lovebirds (*Agapornis* sp.). *Aust. Vet. J.* 62, 318–319.
- Perez-Losada, M., Christensen, R.G., McClellan, D.A., Adams, B.J., Viscidi, R.P., Demma, J.C., Crandall, K.A., 2006. Comparing phylogenetic codivergence between polyomaviruses and their hosts. *J. Virol.* 80, 5663–5669.
- Phalen, D.N., Wilson, V.G., Gaskin, J.M., Derr, J.N., Graham, D.L., 1999. Genetic diversity in twenty variants of the avian polyomavirus. *Avian Dis.* 43, 207–218.
- Rott, O., Kroger, M., Muller, H., Hobom, G., 1988. The genome of budgerigar fledgling disease virus, an avian polyomavirus. *Virology* 165, 74–86.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Stern, C.D., 2005. The chick; a great model system becomes even greater. *Dev. Cell* 8, 9–17.
- Stoll, R., Hobom, G., Muller, H., 1994. Host restriction in the productive cycle of avian polyomavirus budgerigar fledgling disease virus type 3 depends on a single amino acid change in the common region of structural proteins VP2/VP3. *J. Gen. Virol.* 75, 2261–2269.
- Stoll, R., Luo, D., Kouwenhoven, B., Hobom, G., Muller, H., 1993. Molecular and biological characteristics of avian polyomaviruses: isolates from different species of birds indicate that avian polyomaviruses form a distinct subgenus within the polyomavirus genus. *J. Gen. Virol.* 74, 229–237.
- Tomaszewski, E., Wilson, V.G., Wigle, W.L., Phalen, D.N., 2001. Detection and heterogeneity of herpesviruses causing Pacheco's disease in parrots. *J. Clin. Microbiol.* 39, 533–538.

Q熱コクシエラのマヨネーズおよびその構成成分中 における生残性

福士秀人¹⁾ 井上和幸²⁾ 西藤 琳¹⁾ 大屋賢司¹⁾
指原信廣²⁾ 山口剛士³⁾ 平井克哉⁴⁾

- 1) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 2) キューピー(株)研究所基盤技術センター (〒183-0034 府中市住吉町5-13-1)
- 3) 鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)
- 4) 天使大学看護栄養学部 (〒065-0013 札幌市東区北13条東3-1-30)

Q熱コクシエラのマヨネーズおよびその構成成分中 における生残性

福士秀人^{1)†} 井上和幸²⁾ 西藤 琳¹⁾ 大屋賢司¹⁾

指原信廣²⁾ 山口剛士³⁾ 平井克哉⁴⁾

- 1) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 2) キューピー(株)研究所基盤技術センター (〒183-0034 府中市住吉町5-13-1)
- 3) 鳥取大学農学部附属鳥由来人獣共通感染症疫学研究センター (〒680-8553 鳥取市湖山町南4-101)
- 4) 天使大学看護栄養学部 (〒065-0013 札幌市東区北13条東3-1-30)

(2008年8月25日受付・2008年12月22日受理)

要 約

マヨネーズおよびその原材料中におけるコクシエラ菌の生残性を検討した。コクシエラの感染性はマヨネーズ中で時間経過とともに減少し、室温1週間では100分の1以下になった。マヨネーズの構成成分のうち酢酸では0.5%から2%、1週間では感染性に变化はなかった。卵白では感染性が減少する傾向がみられた。また、64℃7分間の加熱ではリン酸緩衝生理食塩水中で10分の1、卵黄中では100分の1に感染性が減少した。これらの結果からマヨネーズないし構成成分にコクシエラが混入したとしても、予想される汚染菌量や通常の流通過程を考慮すると、製造後7日以内に感染性が消失すると考えられる。——キーワード：コクシエラ、マヨネーズ、生残性。

----- 日獣会誌 62, 481~484 (2009)

Q熱はコクシエラ菌 (*Coxiella burnetii*) による熱性の人と動物の共通感染症である。欧米では家畜の流産および非加熱乳製品を感染源とした発生がみられている。コクシエラ菌の感染は多くの動物種でみられ、牛、ヤギ、羊、犬、猫、霊長類、野生げっ歯類、は虫類、両生類、鳥類をはじめ多くのダニが上げられる。動物における慢性感染では子宮および乳腺が感染部位となる。感染動物の出産では胎盤に多量のコクシエラ菌が含まれ、感染源となる。また、乳汁中にもコクシエラ菌が排泄されることがわかっている。しかしながらわが国の動物におけるコクシエラ菌感染症の実態は明確ではない。

人のコクシエラ菌感染症であるQ熱はわが国では感染症法において四類に指定され、全数届け出となっている。感染症法が施行された1999年から数年は20から30例の届け出がなされたが、最近数年の届け出数は一桁台と非常に少ない。また、各症例における感染源は不明である。

わが国にQ熱の感染源の一つとして卵が示唆された[1]、しかし、この報告における実験結果は追試によ

て否定された。すなわち、市販の鶏卵の調査においてコクシエラ汚染は検出されなかった[2, 3]。さらに汚染食品としてあげられたマヨネーズについても、当初の報告よりも多数の検体を調査したにも関わらず汚染はまったく検出されなかった[4]。このようにわが国における鶏卵のコクシエラ汚染は否定された。スイスにおいてもわが国からの報告をうけ調査したが、鶏卵からはまったくコクシエラ菌は検出されなかった[5]。しかしながら、鶏卵がコクシエラに汚染された場合に、卵成分を含む食品においてコクシエラがどの程度生残するかを明らかにすることは食品公衆衛生上の意義があると考えられる。

卵を原材料とする代表的な食品としてマヨネーズがある。マヨネーズにおける微生物の生残性に関する報告は少ない。鳥インフルエンザウイルスはマヨネーズ中で速やかに不活化されるが[6]、サルモネラについては自家製マヨネーズにおいて殺菌されるまでに数時間を要するとされている[7]。コクシエラ菌の汚染についてはPCR法によりまったく検出されなかったことが報告されている[3]。しかしながら、これまでにマヨネーズにコクシ

† 連絡責任者：福士秀人 (岐阜大学応用生物科学部獣医微生物学研究室)

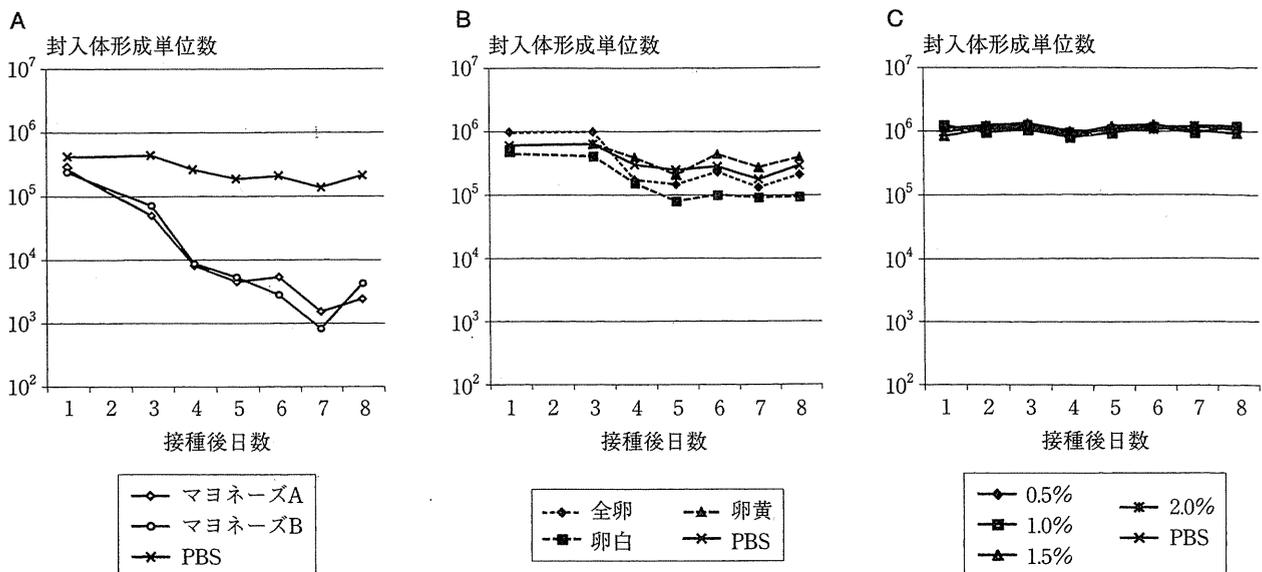


図1 マヨネーズ、卵成分および酢酸溶液におけるコクシエラ菌の生残性

マヨネーズ (A), 全卵・卵白・卵黄 (B) および0.5から2.0%酢酸 (C) におけるコクシエラ菌の生残性を測定した。生残性は各溶液中の封入体形成単位数として示した。いずれもコクシエラ菌と卵成分を混合後、室温で7日間調べた。対象としてPBSを用いた。

エラが混入した場合のコクシエラの感染性についての検討はない。そこで、本研究ではマヨネーズおよびその原材料中におけるコクシエラ菌の生残性を検討した。その結果、マヨネーズ中ではコクシエラの生残性は著しく低下することがわかった。

材料および方法

用いたコクシエラ菌：コクシエラ菌 Nine Mile II 相菌を実験対象とした。培養細胞としてサル腎臓由来BGM細胞およびVero細胞を用いた。両細胞にコクシエラ菌の感受性に差はなかったが、接種材料に対する耐性に応じ、いずれかの細胞を用いた。コクシエラ菌の培養はBGM細胞を用い、既報 [8] に従った。

マヨネーズ、全卵、卵黄、卵白および酢酸水溶液における生残性の定量：市販のマヨネーズを2種類および市販の鶏卵を用いた。鶏卵は手で割り、液卵とした。全卵はピーカー中で泡立て器を用い、均一になるまで攪拌混和した。卵白および卵黄はセパレーターでそれぞれを分取した後、泡立て器で均一にした。各液卵材料に抗菌剤としてストレプトマイシンを1mg/mlとなるように加えた。

次にマヨネーズ9gに菌液1.0mlの添加、もしくは各液卵材料(全卵、卵黄、卵白)4.5mlに菌液0.5mlを加えることにより、最終菌濃度 5×10^5 IFU (封入体形成単位)/mlとなるように調整した。また、酢酸含有菌液は酢酸濃度0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、菌濃度 10^6 IFU/mlとなるように調整した。

各混合液は室温(約23℃)におき、混合直後、なら

びに2日目から7日目まで毎日、50 μ lを採取した。酢酸含有菌はTris水溶液を最終濃度70mMになるように加え、中和した後に定量に用いた。

コクシエラ菌含有卵黄液は、56℃3.5分、60℃3.5分、61℃3.5分、54℃10分、58℃10分、59℃10分の法定殺菌条件および64℃7分間の割合で加熱した。加熱にあたっては、実際の液卵がそれぞれの温度に達してから一定時間加熱し、終了後は氷水で急冷した。

さらに、マヨネーズおよび液卵から50 μ lを採取し、450 μ lのPBS(0.1mg/mlストレプトマイシン含有)と混和後、10倍段階希釈した。

Vero細胞ないしBGM細胞を96穴プレートに 3.5×10^4 /穴となるようにまき、一晚培養後、検体を接種した。検体は0.1ml/穴、希釈あたり2穴、接種し、1時間吸着後、細胞を3回洗浄し液卵成分を除去した。5%牛胎児血清含有MEMを150 μ l/穴加え、5%CO₂存在下で5日間培養した。

その後、培養上清を除去し乾燥させた。メタノール固定を30分間行い、除去、乾燥させ、コクシエラ菌に対するモノクローナル抗体H106(1 μ g/ml) [9]を50 μ l/穴加え、1時間反応させた。またPBSで3回洗浄後、0.2% Evans-blue含有FITC標識抗マウス抗体液(200倍希釈)を25 μ l/穴加え、1時間反応させた。PBSで2回、蒸留水で1回洗浄し、乾燥させ、蛍光顕微鏡で観察し、1穴あたりの特異的な蛍光を発する封入体をすべて数えた。その際、各穴の平均封入体数により検体における単位体積あたりのIFU数を算出した。

それぞれの実験は2回繰り返し、平均値として示し

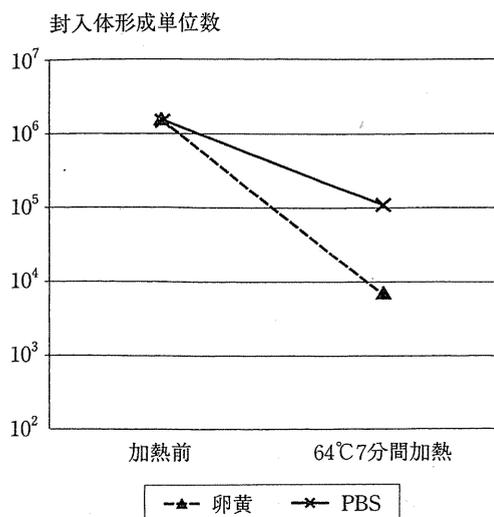


図2 卵黄の加熱によるコキシエラ菌の生残性
コキシエラ菌を卵黄と混合し64℃で7分間加熱した。対象としてPBSを用いた。

た。今回は実験回数が2回であり、統計検定は行わなかった。

成 績

マヨネーズおよびその構成成分におけるコキシエラ菌の生残菌数をIFU測定により定量した。マヨネーズおよび卵成分は粘性が高く、IFUの実測値にばらつきがあったが、経時的な変動には再現性がみられた。マヨネーズ中ではコキシエラの生残菌数は日をおって減少し、7日目では1/100以下となった(図1A)。2種類のマヨネーズでコキシエラ菌の生残性に差はみられなかった。

マヨネーズの構成成分のうち、どの成分がコキシエラ菌の生残性に影響を与えているかをみるため、液卵および酢酸中における菌の生残について検討した。食用油については食用油そのものとコキシエラ菌を混入すると、細胞への感染がみられずIFUの定量ができなかったため、今回は検討できなかった。

全卵、卵白および生卵黄におけるコキシエラ菌の生残性をみたところ、全卵および卵白では5日後に1/5から1/10程度に生残菌数が減少したが、その後は生残菌数は維持された(図1B)。卵黄では生残菌数の減少はみられなかった。酢酸水溶液中でのコキシエラ生残菌数は濃度に関わらず一定で、ほとんど減少しなかった(図1C)。

マヨネーズの製造においては液卵の加熱殺菌が行われる。そこで、加熱による影響をみた。その結果、64℃7分間の加熱により生残菌数が1/100以下に減少した(図2)。いっぽう、56℃3.5分、60℃3.5分、61℃3.5分、54℃10分、58℃10分、59℃10分の法定殺菌条件では生残菌数は変化しなかった(成績は示していない)。

考 察

今回の実験によりマヨネーズ中ではコキシエラ菌は生残しにくいことがわかった。マヨネーズ中でのコキシエラ生残性が著しく低下したことから、マヨネーズの構成成分のうちどれが有効かを調べた。基本的なマヨネーズの配合についてみると卵黄17%、食用油65から79%、食用酢9.5から13%、調味香辛料3.2から5%とされている[10]。食酢の酢酸濃度は一般に約4%であることから、マヨネーズ中の酢酸濃度は0.38から0.52%となる。

マヨネーズの成分のうち、卵黄中では生残菌数は5日目までで1/5になったがその後は変化がなかった。この生残菌数の減少は対象としたPBSでも同様であったことから卵黄の効果ではないと考えられる。卵白においては卵黄よりも生残菌数は少なかったが、マヨネーズ中より生残菌数は多かった。コキシエラ菌の培養に卵黄嚢内接種法が用いられることを考えると、卵黄や卵白がコキシエラの増殖や生残性に影響があるとは考えにくく、妥当な結果であると考えられた。

もう一つの成分である酢酸についてみると、今回の実験から少なくとも2%まではコキシエラ菌の生残に影響はないことがわかった。これはコキシエラ菌が細胞に感染後、酸性条件下のリゾソーム中で増殖可能であることと矛盾しない[11]。一般に食品中の酢酸は殺菌のないし静菌的な効果をもつとされるが[12, 13]、マヨネーズ中の酢酸濃度はコキシエラ菌には無効と考えられた。

マヨネーズ体積の大半をしめる食用油について今回は検索できなかった。これは油成分中のコキシエラ生残菌数を定量する実験系の構築が困難であったためである。

マヨネーズの製造工程で液卵の加熱処理が行われている。今回の実験から液卵の法定殺菌条件ではコキシエラ菌は死滅しないことがわかったが、64℃7分間の条件であれば、生残菌数を減ずることがわかった。今後は加熱殺菌条件をさらに検討する必要がある。

今回の実験では検体に 5×10^5 IFU/mlとなるようにコキシエラ菌を添加した。これは通常の実験室におけるコキシエラの培養条件とほぼ同等である。野外における食品や食材への混入があるとしても混入菌数はもっと少ないと考えられる。市販の鶏卵のコキシエラ汚染量は検出限界以下であることから1個あたり 10^2 IFU/ml以下であると考えられる。また $10^3 \sim 10^4$ IFU/個の鶏卵が混入しても他の汚染されていない鶏卵との混和により希釈され 10^2 IFU/ml以下となる。マヨネーズ中では数日で生残菌数が1/100以下になることを考慮すると、鶏卵にコキシエラ菌が混入したとしてもマヨネーズ製品中では製造後数日以内にほぼ死滅してしまうであろう。

さらに検討の余地があるものの、今回の実験結果から

はマヨネーズにコキシエラが混入しても人への感染源となる可能性はほとんどないと考えられた。

引用文献

- [1] 切明義孝, 喬 瑩, 巽 典之, 鷺尾政二, 山元一休, 中村尚人, 山口和男: 市販鶏卵から検出される *Coxiella burnetii* の感染力の検討, 医学のあゆみ, 209, 139-140 (2004)
- [2] 貞升健志, 新開敬行, 田部井由紀子, 平井昭彦, 鎌田信一, 甲斐明美, 諸角 聖: リアルタイム PCR 法による *Coxiella burnetii* の定量法および鶏卵中におけるコキシエラ菌の増殖性について, 日本食品微生物学会雑誌, 22, 155-158 (2005)
- [3] 平井昭彦, 金子誠二, 仲真晶子, 石崎直人, 小田桐恵, 甲斐明美, 貞升健志, 新開敬行, 矢野一好, 諸角 聖: 市販牛乳の *Coxiella burnetii* 汚染状況および鶏卵中のコキシエラ菌検査法の検討, 食品衛生学雑誌, 46, 86-92 (2005)
- [4] 小宮智義, 齋藤純子, 荒井節夫, 平井克哉: 卵および卵製品における *Coxiella burnetii* の疫学調査, 獣医畜産新報, 57, 657-658 (2004)
- [5] Fretz R, Schaeren W, Tanner M, Baumgartner A: Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *Int J Food Microbiol*, 116, 414-418 (2007)
- [6] 指原信廣, 大河内美穂, 長谷川峯夫, 伊藤壽啓: マヨネーズ中での鳥インフルエンザウイルスの不活化, 日本食品微生物学会雑誌, 21, 213-215 (2004)
- [7] 相川勝弘, 村上裕之, 猪俣恭子, 丸山 務, 藤澤倫彦, 高橋孝則, 山井志朗: 卵の保存および調理と関連する条件が *Salmonella Enteritidis* の増殖, 侵入および生残に与える影響, 食品衛生学雑誌, 43, 178-184 (2002)
- [8] Andoh M, Nagaoka H, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Comparison of Japanese isolates of *Coxiella burnetii* by PCR-RFLP and sequence analysis. *Microbiol Immunol*, 48 (12), 971-975 (2004).
- [9] Hotta A, Zhang GQ, Andoh M, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K: Use of monoclonal antibodies for analyses of *Coxiella burnetii* major antigens, *JVMS*, 66, 1289-1291 (2004)
- [10] 今井忠平: マヨネーズ・ドレッシングの知識, 107, 幸書房, 東京 (1993)
- [11] Voth DE, Heinzen RA: Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*, *Cell Microbiol*, 9, 829-840 (2007)
- [12] 円谷悦造, 浅井美都, 太田美智男: 調理食品での腸管出血性大腸菌 O157:H7 をはじめとする食中毒菌に対する食酢の抗菌作用, 日本栄養・食糧学会誌, 51, 101-106 (1998)

Survival rates of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and its constituents

Hideto FUKUSHI^{*†}, Kazuyuki INOUE, Lin Saito, KENJI Ohya, Nobuhiro SASHIHARA, Tsuyoshi YAMAGUCHI and Katsuya HIRAI

^{*} Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

The survivability of *Coxiella burnetii* in mayonnaise and its ingredients, including whole egg, yolk, albumen, and vinegar as an acetic acid was investigated. The infectivity of *C. burnetii* in mayonnaise decreased over time to be 1/100 after seven days at room temperature. No change in the infectivity of *C. burnetii* was observed for 0.5% to 2.0% acetic acid for seven days at room temperature. The incubation of *C. burnetii* in the albumen lowered the infectivity to 1/10. Heating the coxiella suspension at 64°C for seven minutes decreased the infectivity to 1/100 in yolk compared to 1/10 in PBS. These results indicated that contaminated *C. burnetii* in mayonnaise may be able to be eliminated with seven days. — Key words: *Coxiella burnetii*, mayonnaise, survivability.

† Correspondence to: Hideto FUKUSHI (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Yanagido 1-1, Gifu, 501-1193, Japan

TEL · FAX 058-293-2946 E-mail: hfukushi@gifu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 481 ~ 484 (2009)

オカメインコの開口不全症候群の 微生物学的・病理学的所見

松田紫恵¹⁾ 大屋賢司²⁾ 柳井徳磨^{1, 2)} 柵木利昭^{1, 2)} 福士秀人^{1, 2)†}

1) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

オカメインコの開口不全症候群の 微生物学的・病理学的所見

松田紫恵¹⁾ 大屋賢司²⁾ 柳井徳磨^{1, 2)} 柵木利昭^{1, 2)} 福士秀人^{1, 2)†}

1) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2008年3月17日受付・2008年6月10日受理)

要 約

臨床症状よりオカメインコの開口不全症候群と診断された1～2カ月齢のオカメインコの死亡例5例、口腔スワブ4検体を微生物学的、病理学的に検索した。複数種の細菌が分離され、最も高率に *Bordetella avium* (5/9例) が分離された。分離された *B. avium* の全菌株は、*Bordetella* 属菌が産生し病原性発現に関与する皮膚壊死毒素遺伝子を保有していた。組織学的検索では、咬筋をはじめとする嘴の開閉運動筋の筋線維は変性・壊死、消失、筋線維間には炎症細胞が浸潤、細菌塊が認められた。病変の進行した領域では線維芽細胞の増殖が著しく、高度に器質化していた。分離 *B. avium* の薬剤感受性試験を実施した結果、 β -ラクタム系、アミノグリコシド系およびテトラサイクリン系薬剤に高い感受性を示した。——キーワード：薬剤感受性、*Bordetella avium*、幼若オカメインコ、開口不全症候群。

----- 日獣会誌 62, 143～147 (2009)

オカメインコの開口不全症候群 (Cockatiel lockjaw syndrome : CLJS) は、オカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) 幼若鳥 (一般に2～10週齢) に発生し、くしゃみ、鼻水といった上部呼吸器症状を呈したのち開口が困難となる、特徴的な病態を示す症候群の総称である [1-3]。1994年にアメリカで初報告され [1]、わが国でも散発的に発生がみられる。発症鳥は採食困難に陥り、多くの場合全身状態が悪化し致死性の経過をたどるため、繁殖家や愛鳥家の間では深刻な問題になっている。米国では CLJS 発症例から *Bordetella avium* が分離され [1, 2]、本菌が CLJS の主要原因菌とされている。しかし多くの症例で複数種の細菌が分離され [2]、中には *B. avium* が分離されない例 [3] もあり、病因は確定していない。また本症の予防法や治療法も確立されていない。

今回、CLJS を発症したオカメインコを対象に微生物学・病理学的検索を行い、本症の病原体および病態について検討した。あわせてわが国における CLJS 発生状況を調査した。本症の化学療法の基礎を得るため、分離 *B. avium* の薬剤感受性試験を実施した。

材料および方法

疫学調査：わが国での CLJS 発生状況を調査するため、専門的に鳥類の診療を行っている全国34カ所の動物病院に、アンケートによる疫学調査を行った。CLJS の開口障害について明確な診断基準はないため、診断は各院の判断に委ねた。

検体：2007年5～10月にペットショップおよび動物病院より本研究室に送付された検体9例 (死亡例5羽、口腔スワブ4検体) を対象とした (表1)。

微生物学的検索：剖検例では気管、肺を含む主要臓器および鼻腔・口腔スワブを採材、血液寒天培地、DHL 寒天培地および GAM 寒天培地 (日水製薬株、東京) にスタンプした。口腔スワブは同培地に塗布した。37℃ 18～24時間培養後、常法に従い細菌同定検査キット (API, bioMérieux, France) により分離菌を同定した。剖検例の直腸便ないし口腔スワブから DNA 抽出キット (SepaGene, 三光純薬株、東京) により DNA を抽出、*B. avium*、*Chlamydophila psittaci* および *Mycoplasma* spp. を PCR 法により検出した [4-7]。使用プライマーを表2に示した。

病理学的検査：剖検後、主要臓器を採材、10%ホル

† 連絡責任者：福士秀人 (岐阜大学応用生物科学部獣医微生物学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2946 E-mail : hfukushi@gifu-u.ac.jp



図1 スワブ検体No. 9, 顎の可動域が減少し, 開口障害を呈している.

表1 開口不全を呈したオカメインコの材料および臨床症状

検体番号	材料	月齢	臨床症状
1	死亡例	1	開口障害
2	死亡例	1	鼻水, 開口障害
3	死亡例	1	開口障害
4	死亡例	2	くしゃみ, 鼻水, 開口障害
5	死亡例	2	鼻水, 開口障害
6	スワブ(口腔)	1	くしゃみ, 鼻水, 嘴の変形, 開口障害
7	スワブ(口腔)	2	くしゃみ, 鼻水, 血便, 開口障害
8	スワブ(口腔)	不明	開口障害
9	スワブ(口腔)	8	くしゃみ, 鼻水, 開口障害

表2 プライマーの塩基配列

名前	塩基配列	目的
CMGP-1F	5'-CCTTGTGATCCTTGCCTACTTG-3'	<i>Chlamydophila psittaci</i> 特異的遺伝子の検出
CMGP-1R	5'-GTGAGCAGCTCTTTCGTTGAT-3'	
CMGP-2F	5'-GCCTTAAACATCTGGGATCG-3'	
CMGP-2R	5'-GCACAACCACATTCCATAAAG-3'	
GPO-3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	<i>Mycoplasma</i> 特異的遺伝子の検出
MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAACTC-3'	
N- <i>avium</i>	5'-CGGCGTCAACACATACTCTTGAT-3'	<i>Bordetella avium</i> 特異的遺伝子の検出
C- <i>avium</i>	5'-AGGGAGGTCAGATAGCTCTAGAAT-3'	
DNT-1F	5'-GTGTCATTCCGGCCGATACTT-3'	<i>Bordetella avium</i> DNT遺伝子の検出
DNT-1R	5'-ATATCAATGGCGAGCTTTGG-3'	

マリン固定した。常法に従いギ酸脱灰, パラフィン包埋, ハマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施し, 鏡検した。

薬剤感受性試験: 分離 *B. avium* 16 菌株, 実験室保存 *B. avium* 15 菌株および基準株について, 薬剤感受性をディスク法 (SN ディスク, 日水製薬株, 東京) により調べた。用いたディスクはアンピシリン (ABPC), クラブラン酸・アンキモシシリン (CVA・AMPC), セファレキシム (CEX), セフォタキシム (CTX), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), アミカシン (AMK), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), オキシテトラサイクリン (OTC), ドキシサイクリン (DOXY), スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST), リンコマイシン (LCM), クリンダマイシン (CLDM), エリスロマイシン (EM), クラリスロマイシン (CAM), クロラムフェニコール (CP) の 17 薬剤である。米国臨床検査標準協会 (CLSI, 旧 NCCLS) の抗菌ディスク感受性試験実施基準 [8] に従い感受性 (3 段階評価: 感性, 中間, 耐性) を判定した。

PCR 法による皮膚壊死毒素 (DNT) 遺伝子検出: *B. avium* DNT 遺伝子塩基配列 (Accession No.

AM167904) に基づいてプライマーを設計した (表 2)。平板上の *B. avium* コロニー 1 エーゼを 100 μ l TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) に浮遊させ, 95 $^{\circ}$ C 10 分間加熱した。16,000 \times g で 1 分間遠心した上清を試料とし, DNT 遺伝子検出 PCR を行った。サーマルサイクラーの設定は 92 $^{\circ}$ C \cdot 1 分, 55 $^{\circ}$ C \cdot 1 分, 70 $^{\circ}$ C \cdot 2 分の 25 サイクルとした。

成 績

疫学調査: アンケートの結果, 2007 年 1 ~ 6 月に上部呼吸器症状を主訴に動物病院に来院したオカメインコ幼若鳥は, 15 院で合計 180 羽であった。うち 6 院で計 9 羽が CLJS と診断されていた。

微生物学的検査: No. 6 を除く全検体より複数種の細菌が分離され, 9 検体から 19 種が分離された (表 3)。最も高率に分離されたのは *B. avium* (5/9 例), 次いで *Escherichia coli* (4/9 例) であった。死亡例では *B. avium* の分離率が高く, 口腔スワブは *E. coli* の分離率が高かった。PCR による *B. avium* 特異的塩基配列の検出を行ったところ, 口腔スワブ 1/4 例で特異的遺伝子が認められた。*C. psittaci* および *Mycoplasma* 遺伝子は全

表3 死亡例およびスワブからの細菌分離成績

菌名	死亡例					口腔スワブ			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Acinetobacter</i> sp.									+
<i>Bordetella avium</i>	+	+	+	+	+	*			
<i>Clostridium</i> sp.				+					
<i>Enterobacter cloacae</i>	+								
<i>E. sakazakii</i>					+				
<i>Enterococcus</i> sp.			+						
<i>Escherichia coli</i>		+				+	+	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>									+
<i>Lactobacillus fermentum</i>		+							
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+								
<i>Pseudomonas</i> sp.	+								
<i>Serratia marcescens</i>			+						
<i>Staphylococcus</i> sp.					+				
<i>S. delphini</i>							+		
<i>S. epidermidis</i>				+	+				+
<i>S. gallinarum</i>									+
<i>S. haemolyticus</i>					+				
<i>S. warneri</i> A								+	
<i>S. warneri</i> B		+							

+は細菌が直接分離されたことを，*はPCRにより検出されたことを示す。

例で検出されなかった。

病理学的検査：剖検所見では，全例で嘴は開口困難を呈し，鼻腔内に漿液性または粘稠性滲出物が充満していた。胸腹水貯留が種々の程度で認められ，肝臓の褪色および脆弱化（4/5例），肺のうっ血性水腫（1/5例）の他に顕著な病変は無かった。咬筋に肉眼的な著変は認められなかった。組織所見では，鼻腔や副鼻腔の粘膜上皮は広範囲に変性・壊死し，粘膜固有層にマクロファージ，偽好酸球，リンパ球などの炎症細胞が高度に浸潤していた。腔内には滲出液が貯留し，線維素析出や剝離上皮細胞，細菌塊が認められた。おもに咬筋，外側・内側翼突筋，眼輪筋および下顎筋に筋線維の壊死，萎縮，断裂および硝子様変性がみられた。新旧の程度を異にする病巣が混在し，新鮮病巣では筋線維間は水腫状を呈し，炎症細胞が浸潤・集簇し，細菌塊が認められた。頭蓋骨骨組織では，骨梁の菲薄化や破骨細胞による吸収像がみられ，骨内の air space にも高度にマクロファージや偽好酸球が浸潤していた。陳旧病巣では慢性炎症像を呈し，線維芽細胞の増殖が著しく，器質化が進行していた。他に肝臓の多発性巣状壊死や，気管や肺への炎症波及を認める例もあったが，顕著な病変はみられなかった。全身性に結節性脂肪織炎および気嚢炎を呈した1例では，腹膜からも *B. avium* が分離された。

薬剤感受性試験：オカメインコより分離された *B. avium* 31株の薬剤感受性試験を行い，感性を示した株を感受性株と判定した。31株中に占める感受性株の割合（感受性率）を計算した（表4）。17種類の薬剤に対

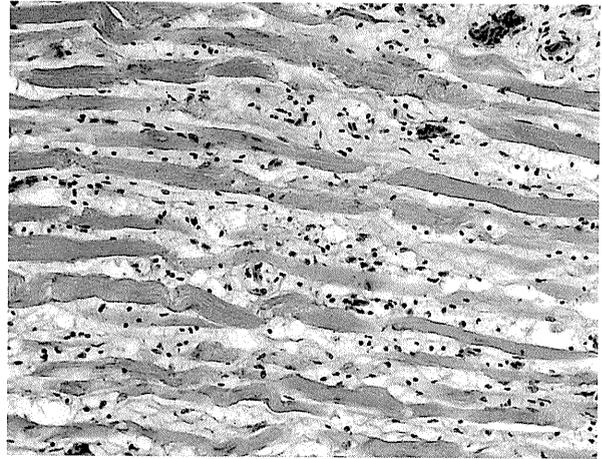


図2 死亡例No. 4, 内側翼突筋 (HE染色 ×200)
筋線維は変性し，筋線維間には炎症性細胞が浸潤，水腫性に疎開している。

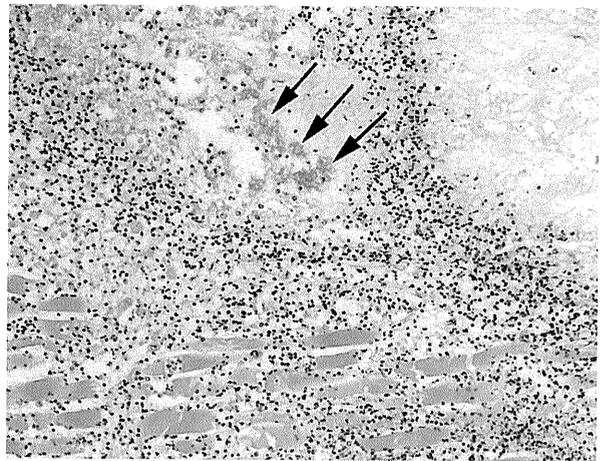


図3 死亡例No. 2, 内側翼突筋 (HE染色 ×200)
筋線維は変性し，筋組織内に膿瘍が形成され，細菌塊（矢印）を含む細胞退廃物が認められる。

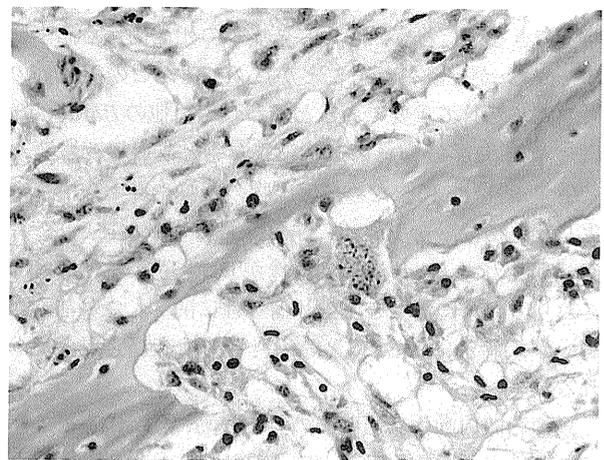


図4 死亡例No. 2, 下顎骨 (HE染色 ×400)
破骨細胞による骨吸収が起こり，骨梁は菲薄化している。

表4 *Bordetella avium*分離株の薬剤感受性

薬剤系	品名	略記号	阻止円直径の 平均値(mm)	感受性 株数	感受性率 (%)
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	30.7	31	100
β ラクタマーゼ阻害剤	クラブラン酸・アンキモシシリン	CVA・AMPC	35.5	31	100
経口セフェム系	セファレキシム	CEX	21.9	31	100
セファロスポリン系	セフォタキシム	CTX	29.4	26	83.9
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	SM	16.3	28	90.3
	カナマイシン	KM	22.2	31	100
	アミカシン	AMK	23.3	31	100
キノロン系	ノルフロキサシン	NFLX	16.6	19	61.3
	オフロキサシン	OFLX	21.5	31	100
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC	23.1	31	100
	ドキシサイクリン	DOXY	27.3	31	100
サルファ剤	スルファメトキサゾール・トリメトプリム	ST	24.7	30	96.8
リンコマイシン系	リンコマイシン	LCM	0	0	0
	クリンダマイシン	CLDM	0	0	0
マクロライド系	エリスロマイシン	EM	21.8	9	29.0
	クラリスロマイシン	CAM	22.5	31	100
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP	23.0	30	96.8

する感受性率は0～100%に分布し、100%の感受性を示した薬剤は、ABPC、CVA・AMPC、CEX、KM、AMK、OFLX、OTC、DOXY、CAMであった。LCM、CLDMには全株が耐性を示した。

PCRによる*B. avium* DNT 遺伝子検出: *B. avium* 31株についてPCR法によりDNT遺伝子保有状況を調べたところ、全株が本遺伝子を保有していた。

考 察

今回CLJS発症鳥から、*B. avium*をはじめ多種類の細菌が分離されたが、多くはオウム目呼吸器の常在菌や環境細菌と考えられる細菌であった[9-11]。CLJSはこれらの内因性および外因性の細菌による複合感染症であるため、必ずしも単一かつ同一の病原菌を原因として断定できないだろう。しかし発症鳥の死亡例から高率に*B. avium*が分離されたことから、本菌がこの症候群の増悪因子として重要であると思われる。他の*Bordetella*属菌同様、*B. avium*は気管細胞毒素と皮膚壊死毒素を産生する[12, 13]ため、滲出物の分泌や線毛の消失が生じ、免疫低下を引き起こすとされている[1, 14]。今回分離された*B. avium*全菌株がDNT遺伝子を保有しており、実際に毒素を産生し病原性に関与した可能性が高いが、確定にはELISA等免疫学的検査が必要と思われる。

鳥類の開口動作は顎関節の連携運動による。下顎を下げると支点となる方形骨が回転し、翼状骨および頬骨弓を前方に押し出す。そして前頭一鼻骨縫合で上顎が前上方へ上がり、開口する。この動作は解剖学的に眼窩下洞と関連する[2]。CLJSでは眼窩下洞および隣接する骨、軟部組織への炎症波及が顕著で、広範囲に線維化が起こ

る。これはオカメインコ幼若鳥の上部気道の局所免疫反応が弱く、また頭蓋のair sacや副鼻腔の解剖学的構造から、周囲の筋や神経、関節へ感染が容易に波及するためと考えられている[2]。臨床的にみられた開口障害は、嘴の開閉運動筋が結合組織に置換され、開口動作が機能不全に陥ったため生じたと考えられる。これは開口障害を呈した期間が全症例で5、6日であったが、筋組織の器質化は陳旧な病巣だったことから推測される。

オカメインコの呼吸器病巣から分離された*B. avium*株はLCMやCLDM、EMに多剤耐性であったが、Mortensenら[15]やBlackallら[16]の報告と同様、*B. avium*は多くの薬剤に感受性で、特に β -ラクタム系やアミノグリコシド系、テトラサイクリン系薬剤に高い感受性を示した。しかしながら*B. avium*による七面鳥コリーザでは、抗生剤治療は無効[1, 17]であり、臨床的効果についてはさらなる検討が必要となる。

アンケート結果から、わが国でCLJSの集団発生は無く散発的で、病原体を特定できないものの、臨床獣医師は臨床症状からCLJSとして診断・治療してきたことが伺われた。今回の結果は、*B. avium*がCLJSの重要な発症因子であることを示唆している。*B. avium*は水や敷き藁を介して伝播し、本菌は敷き藁中で6カ月間感染性を有するとの報告[1]もある。今後、わが国の飼い鳥における*B. avium*の伝播、そしてその病原性についてさらに検討する必要がある。

引用文献

- [1] Clubb SL, Homer BL, Pisani J, Head C: Outbreaks of bordetellosis in psittacines and ostriches, Proc Assoc Avian Vet, 63-68 (1994)

- [2] Fitzgerald SD, Hanika C, Reed WM : Lockjaw syndrome in cockatiels associated with sinusitis, *Avian Pathology*, 30, 49-53 (2001)
- [3] Greenacre CB, Wilson GH, Ritchie BW : *Enterococcus* species-associated temporomandibular arthritis in cockatiels, *Vet Med*, 94, 907-909 (1999)
- [4] Chahota R, Ogawa H, Mitsuhashi Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H : Genetic diversity and epidemiology of *Chlamydomphila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene, *Microbiol Immunol*, 50, 663-678 (2006)
- [5] Marois C, Oufour-Gesbert F, Kempf I : Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction, *Vet Microbiol*, 73, 311-318 (2000)
- [6] Savelkoul PH, de Groot LE, Boersma C, Livey I, Dugleby CJ, van der Zeijst BA, Gaastra W : Identification of *Bordetella avium* using the polymerase chain reaction, *Microb Pathog*, 15, 207-215 (1993)
- [7] Register KB, Yersin AG : Analytical verification of a PCR assay for identification of *Bordetella avium*, *J Clin Microbiol*, 43, 5567-5573 (2005)
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2nd ed, M31-A2, NCCLS, Pennsylvania (2002)
- [9] Drewes LA, Flammer K : Clinical microbiology, Clinical avian medicine and surgery, Harrison GJ, et al eds, 157-171, Saunders, Philadelphia (1986)
- [10] Gerlach H : Bacterial diseases, Clinical avian medicine and surgery, Harrison GJ, et al eds, 434-453, Saunders, Philadelphia (1986)
- [11] T-W-Fiennes RN : Disease of bacterial origin, Diseases of cage and aviary birds, Petrak ML, ed, 2nd ed, 497-515, Lea & Febiger, Philadelphia (1982)
- [12] 堀口安彦 : *Bordetella* 壊死毒の性状と作用, *日本細菌学雑誌*, 51, 963-972 (1996)
- [13] Temple LM, Weiss AA, Walker KE, Barnes HJ, Christensen VL, Miyamoto DM, Shelton CB, Orndorff PE : *Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro, *Infect Immun*, 66, 5244-5251 (1998)
- [14] Gentry-Weeks CR, Cookson BT, Goldman WE, Rimler RB, Porter SB, Curtiss R 3rd : Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*, *Infect Immun*, 56, 1698-1707 (1988)
- [15] Mortensen JE, Brumbach A, Shryock TR : Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates, *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 771-772 (1989)
- [16] Blackall PJ, Eaves LE, Fegan M : Antimicrobial sensitivity testing of Australian isolates of *Bordetella avium* and the *Bordetella avium*-like organism, *Aust Vet J*, 72, 97-100 (1995)
- [17] 高木昌美 : 七面鳥コリーザ, 動物の感染症, 清水悠紀編, 第2版, 276-277, 近代出版, 東京 (2004)

Microbiology and Histopathology of Cockatiel Lockjaw Syndrome

Shie MATSUDA*, Kenji OHYA, Tokuma YANAI, Toshiaki MASEGI and Hideto FUKUSHI†

* Department of Applied Veterinary Science, United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

Microbiological and histopathological examinations were carried out on five dead cockatiels ranging in age from one to two months, while oral swabs were taken from four live cockatiels with cockatiel lockjaw syndrome. Multiple bacterial agents were isolated from the lungs and from swabs of the nasal passage and oral cavity. *Bordetella avium* was isolated from five of the nine cockatiels. All isolates possessed a dermonecrotic toxin gene, which is thought to be responsible for pathogenicity. Histologically, skeletal muscles within the temporomandibular region showed denaturation and necrosis. Necrotic muscle fibers were organized by proliferated fibroblasts. Moderate to severe infiltrations of inflammatory cells and clusters of bacteria were observed. The antimicrobial susceptibility of *B. avium* isolates was investigated. The isolates were highly sensitive to common veterinary antibiotics such as beta-lactams, aminoglycosides and tetracyclines.

— Key words : antibiotics sensitivity, *Bordetella avium*, juvenile cockatiel, lockjaw syndrome.

† Correspondence to : Hideto FUKUSHI (Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

TEL · FAX 058-293-2946 E-mail : hfukushi@gifu-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 143 ~ 147 (2009)

オウム病

岐阜大学応用生物科学部 獣医微生物学感染症学研究室

福士 秀人

小児科臨床別刷

62 : 2009—4

3. オウム病

岐阜大学応用生物科学部 獣医微生物学感染症学研究室 ふくしひでと 福士秀人

KEY WORDS

オウム病, クラミジア

はじめに

オウム病はオウム病クラミジアを病原体とする人獣共通感染症である¹⁾。感染源はオウム、インコ、鳩などの鳥類である。ヒトが感染すると気道感染を主とする呼吸器疾患を引き起こす。感染症法による第4類の全数届け出疾患に指定されており、診断した医師はすぐに届け出る義務がある。我が国では年間20数例の届け出がある。

I. 病原体

オウム病の病原体はクラミジアである。クラミジアの特徴を表にまとめた。さらにクラミジアの特徴の一つである増殖環を図1に示した。ここで大切なのは、クラミジアに抗生物質は有効であるが、その時期は細胞内において2分裂増殖を行っている時期のみであるという点である。なおかつ、2分裂増殖はクラミジアが形成した封入体内で行われるため、抗生物質は感染細胞内に浸透し、さらに封入体膜を超え、分裂中のクラミジアに到達

する必要があるということである。

オウム病クラミジアは従来、*Chlamydia psittaci* と記載されてきたが、最近の分類により *Chlamydophila psittaci* に学名が変更された²⁾。しかしながら文献的には現在も両方の名称が使用されているので、文献検索にあたっては注意が必要である。

クラミジアの培養は発育鶏卵卵黄嚢内接種により行われてきた。近年は培養細胞を用いている。クラミジアは原核生物であるが、培養にあたってはウイルスとして扱われる。これはクラミジアが偏性細胞内寄生体であるためである。

クラミジアを保有する動物種は多種多様であるが、オウム病クラミジアは主として鳥類が保有している。したがって、オウム病の感染源は鳥類がほとんどである。オウム病の患者から他者への感染報告はあるが、非常に古い事例であり、現在はほとんどない。また、このヒト-ヒト感染を起こしたオウム病クラミジアは非常に毒力が強く、現在、一般に分離されるオウム病クラミジアはそれほど毒力

表 クラミジアの特徴

形態	基本小体（直径約200nmから300nm）および網様体（直径1,000nmから1,500nm）
細胞壁	ペプチドグリカンを欠く グラム陰性菌に類似した外膜を有する 外膜はリポ多糖体を含んでいる
分裂様式	封入体内における網様体の2分裂増殖
抗生物質感受性	テトラサイクリン系，キノロン系，マクロライド系 （ β ラクトム系抗生物質は可逆的な分裂阻害を起こすため使用は禁忌）
ゲノム	約1,000kbpから1,200kbpの環状DNA
主な抗原	科特異的抗原：リポ多糖体（LPS） 型特異抗原：主要外膜タンパク質（MOMP）

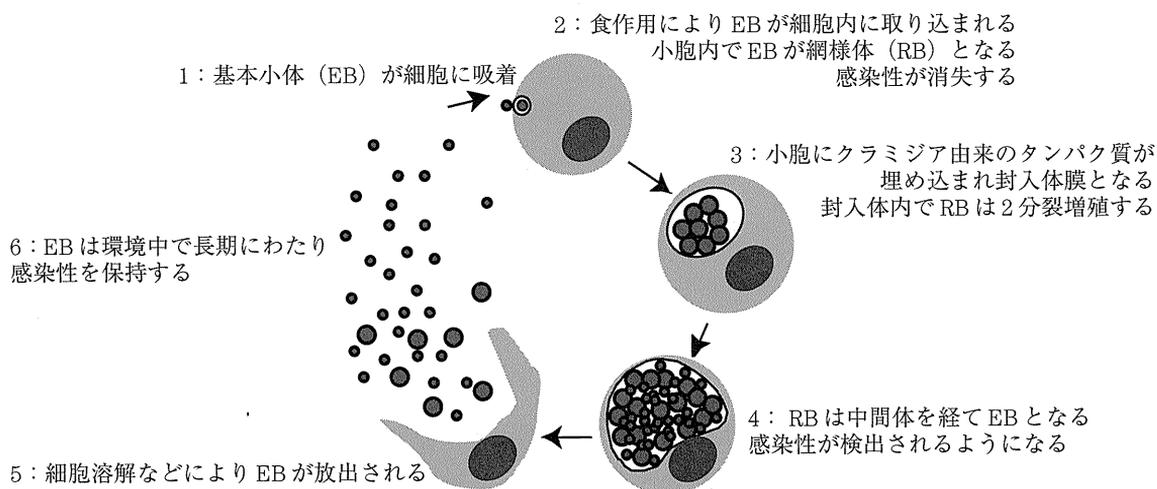


図1 クラミジアの増殖環

クラミジアの感染は基本小体 (EB) が感受性細胞に吸着することにより始まる(1)。吸着した EB は細胞に食作用を促すことにより細胞内に侵入する(2)。小胞内では EB から RB への形態変化が起きる。RB になると感染性が消失する。RB が産生するタンパク質が小胞膜に埋め込まれ、封入体膜が形成される(3)。この封入体内で RB が 2 分裂増殖を繰り返す。この時期は代謝活性が高く、抗生物質に感受性の時期である。ペニシリンなどの β ラクトムは RB の分裂を阻害するため巨大な RB になることが知られている。この巨大な RB は β ラクトム抗生物質の除去により再び分裂を始め、通常の RB に戻ることもわかっている。一定の分裂 (6 回から 7 回とされている) の後、RB は中間体を経て EB への形態変化が起きる(4)。EB が出現することにより感染性が検出されるようになる。EB が蓄積すると感染細胞が溶解し、EB は外部へ放出される(5)。EB は環境中で感染性を保持する(6)。条件にもよるが、数週間以上にわたる場合もあるとされている。この EB が細胞に吸着することにより再び感染が始まる。

は強くない。

クラミジアが有する抗原は菌体タンパク質抗原と菌体外膜のリポ多糖体が知られている。タンパク質抗原は種、型および亜型特異性を示し、リポ多糖体抗原は科特異性を示す。タンパク質抗原のうち主要な抗原は主要外膜タンパク質 (Major Outer Membrane Protein, MOMP) である。この MOMP 上に特異性の異なるエピトープが存在してい

る。

MOMP 遺伝子は遺伝子診断の標的ともなっている。MOMP 遺伝子型は分子疫学に用いられる。

II. オウム病の疫学 (我が国における発生状況)

我が国における発生届け出状況を図 2 に示した。1999年4月から2008年までで年間平均

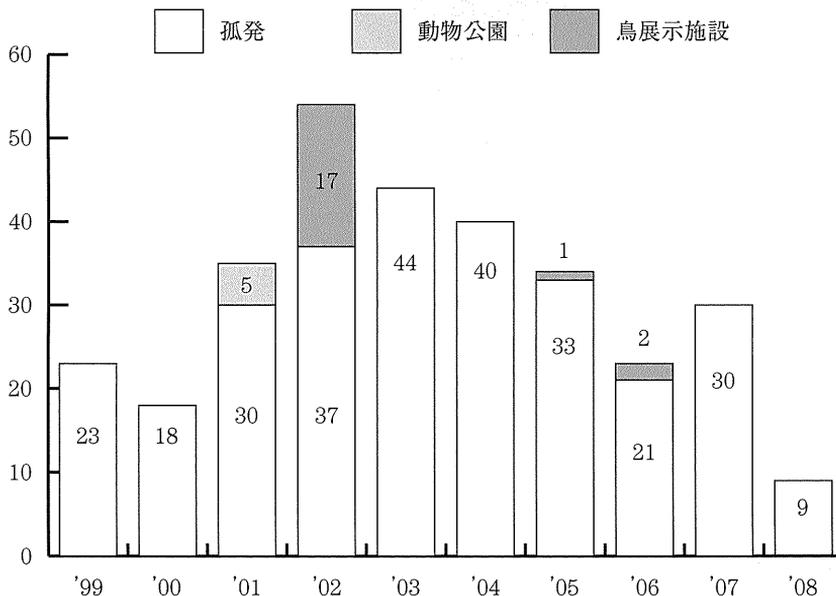
31例が届け出られている。2008年は9例と激減したが、その理由は不明である。一般健康人の抗体保有率は1%未満である。発生数を考慮すると妥当な抗体保有率であると考えられる。従来、オウム病は顕性発症のみであると考えられたときもあったが、現在は不顕性感染も知られている。

問題とされたのは鳥類の展示施設における集団発生である。1999年以降、2回の発生があった(図2)。2001年³⁾および2005年であった(届け出は2002年および2006年)。集団発生例では施設で飼育されていた鳥類ないし輸入直後の鳥類が感染源であった。しかし、一般の発生例では飼育鳥が感染源であった場合以外の感染例も知られている。これらの症例は野外での感染と考えられるが、多くの場合、感染経路や感染様式は不明となっている。

オウム病の届け出の内容についてまとめられた報告 (<http://idsc.nih.go.jp/disease/>

psittacosis/idwr200719.html) に基づき、以下に記述する。

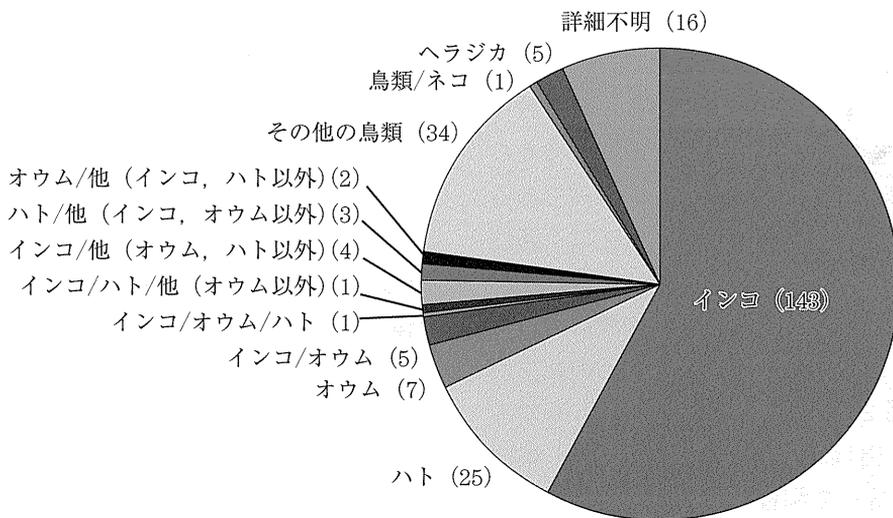
感染源となった鳥類の大半はオウムインコ類であったとされている(図3)。以前の報告では輸入鳥の大量死亡例について高率にクラミジアが検出されたとされているが、我々の研究室における動物病院からの検査依頼検体における愛玩鳥のクラミジア保有率調査では平均して5%程度である。感染症が疑われる死亡鳥であってもクラミジアが検出されるのは30%程度であった。国内で販売されている愛玩鳥におけるクラミジア汚染は非常に少なくなっているようである。しかしながら、輸入鳥を感染源とするオウム病の集団発生があったように、一部の輸入鳥についてはクラミジアにより高率に汚染されている場合もあるようなので注意が必要である。愛玩鳥を購入後に高熱が出るなどの症状がみられる場合にはオウム病を疑うことが必要であり、問診時に鳥の飼育や購入の様子を聞くことが大切



(出典：IDWR 感染症発生動向調査週報)

図2 我が国における発生届け出状況

1999年から2008年までの届け出数。孤発例が大半を占める。これまでに3回の集団発生があった。鳥展示施設での発生は年末であったため、届け出が翌年(2002年)ないし複数年(2005年および2006年)になっている。2007年より診断基準が厳密になった(本文参照)。



N = 247 (報告例中, 動物などからの感染が推定または確定として報告された例)

図3 感染源となった動物

感染源は主としてオウムインコ類であり, 全体のほぼ3/4を占める。次いでハトが感染源となっている。ヘラジカは動物公園における発生例の感染源として特定された。IDSC のデータ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/psittacosis/idwr200719.html>) による。

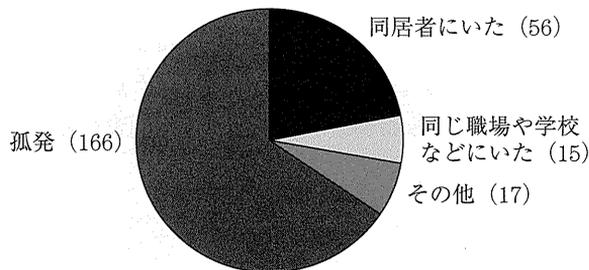


図4 同居感染の割合

届けられた症例において同じような症状を示した人が同居者ないし同じ職場などにいたとされる例が1/4にみられている。IDSC のデータ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/psittacosis/idwr200719.html>) による。

であると考えられる。

届け出状況を見ると, 家族や同じ職場でいた症状を示した人がいたとする例が全体の1/3となっている(図4)。したがって, オウム病の疑いをもたれた場合には, さらに同一感染源からの家族内発生を疑う必要があると思われる。

症例の年齢や性別分布については女性にやや多かったとされている。50歳代をピークとして幅広い年齢層にみられるが, 30歳以上が全体のほぼ90%であったとされている(図5)。

月別の発生状況を見ると4月から5月に多い(図6)。これは鳥の繁殖との関連性が示唆されている。繁殖がストレスとなり, 鳥からのクラミジア排出が増加するのではないかと考えられている。一方で, これまでの鳥展示施設における集団発生は冬であった。この集団発生の感染源は多くは輸入鳥であると推測されている。輸入の際に気温の変化があることによりオウムインコ類にストレスがかかり, オウム病クラミジアの排出が促進されたのかもしれないが, 実際のところは不明である。

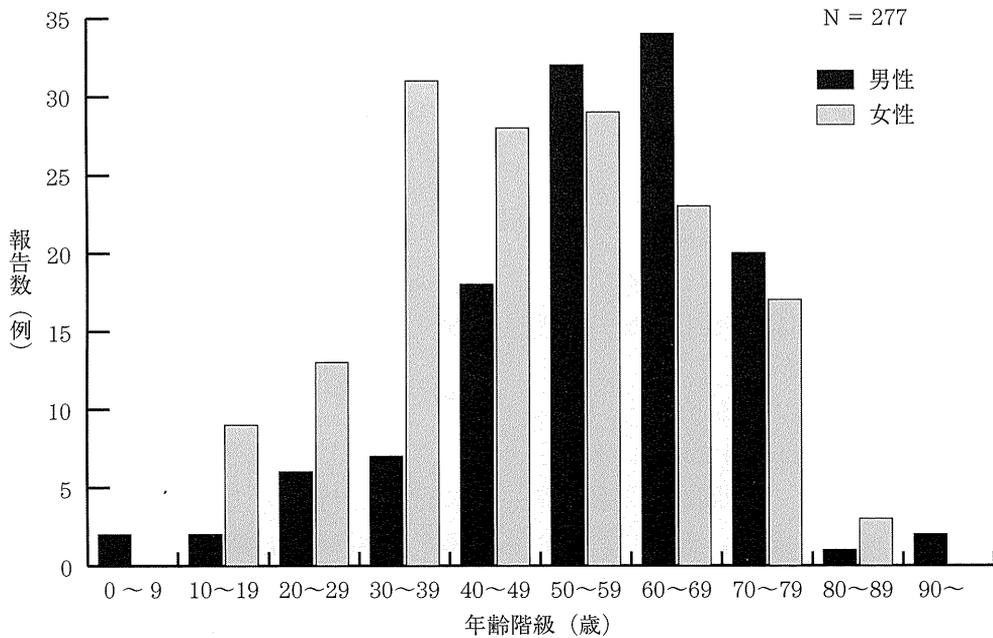


図5 オウム病患者の年齢分布

男性では60～69歳、女性では30～39歳にピークがみられる。20歳未満では女子が多い。IDSC のデータ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/psittacosis/idwr200719.html>) による。

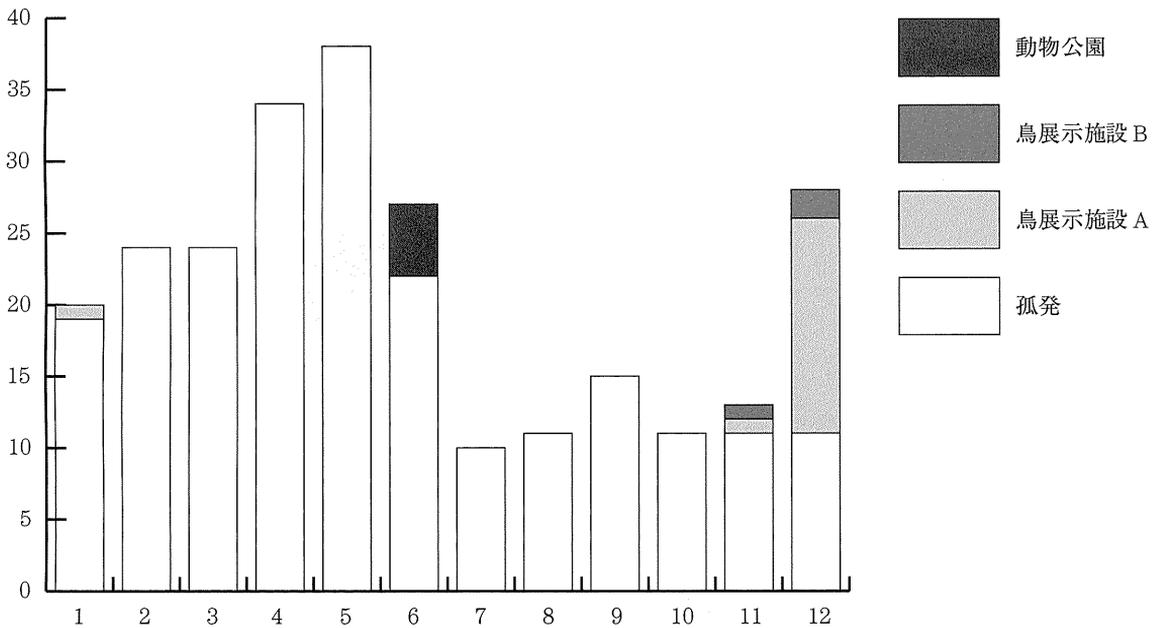


図6 オウム病の月別届け出数

これまでの届け出を月ごとにまとめたものである。4月から5月の届け出が多い、その一方で鳥展示施設における発生は11月から12月であった。春先の発生は鳥の繁殖時期との関連性が示唆されている。IDSC のデータ (<http://idsc.nih.go.jp/disease/psittacosis/idwr200719.html>) による。

III. オウム病の臨床症状

ヒトでの発症には急性型と徐々に発症する型があるとされている⁴⁾。軽度のインフルエンザ様症状から多臓器障害を伴う劇症型まで多彩である。インフルエンザ様症状を呈する異型肺炎あるいは肺臓炎型および肺炎症状があまり顕著でなく、敗血症様症状を呈する型の二つが通常みられるとされている。

感染経路は気道感染である(図7, 8)。潜伏期間は7日間から14日間である。悪寒を伴う高熱で突然発症し、1週間から2週間持続するとされている。頭痛、羞明、上部ないし下部呼吸器疾患および筋肉痛などのインフルエンザ様症状を主徴とする。悪心、嘔吐を伴う場合もある。呼吸器症状としては、頑固な乾性咳嗽ないし粘液痰を伴う咳がみられ、時に血痰を認めることもある。重症例では呼吸困難やチアノーゼがみられるという。治療を適切に施さない場合、発熱が2カ月以

上にわたり継続することもあるが、通常は2週目より徐々に解熱する。

オウム病に特徴的な検査所見はない。胸部X線所見としては、通常肺門から外側にかけて放射状に連続して広がる淡い陰影として認められることが多いという。マイコプラズマ肺炎あるいは原発性異型肺炎と類似の陰影を呈するようである。

IV. 診断

クラミジア検出用の材料は化学療法開始前に行う。材料としては患者の喀痰、咽頭拭い液、肺胞洗浄液、血液などが用いられる。オウム病クラミジアの分離は一般的ではないが、特定の研究室や検査機関に依頼することが可能である(感染症研究所、筆者の研究室など)。

血清抗体測定はペア血清が望ましい。診断基準では間接蛍光抗体法(Micro-IF)による抗体検出において、単一血清でIgM抗体

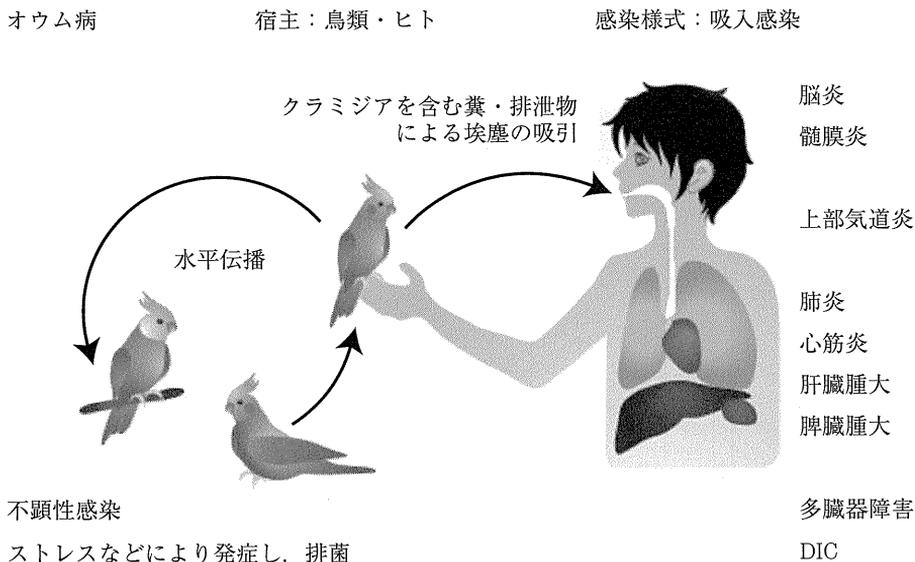


図7 オウム病の感染経路

オウム病クラミジアは鳥の間で伝播している。ヒナでは死亡することもみられるが、耐過した鳥は不顕性感染となる。発症せずに間欠的にクラミジアを排出する。この場合の排菌量は少ないようである。鳥にストレスがかかると顕性発症し、大量のオウム病クラミジアを排出する。排出されたオウム病クラミジアは糞便に含まれる。糞便が乾燥し、粉塵として飼育者などが吸引することにより感染が起きる。感染しても必ずしも発症するわけではないようである。発症した場合には、上部気道炎から肺炎などの呼吸症状を呈する。治療が遅れると多臓器障害を引き起こす。脳炎や髄膜炎を起こすと予後は不良となるとされている。

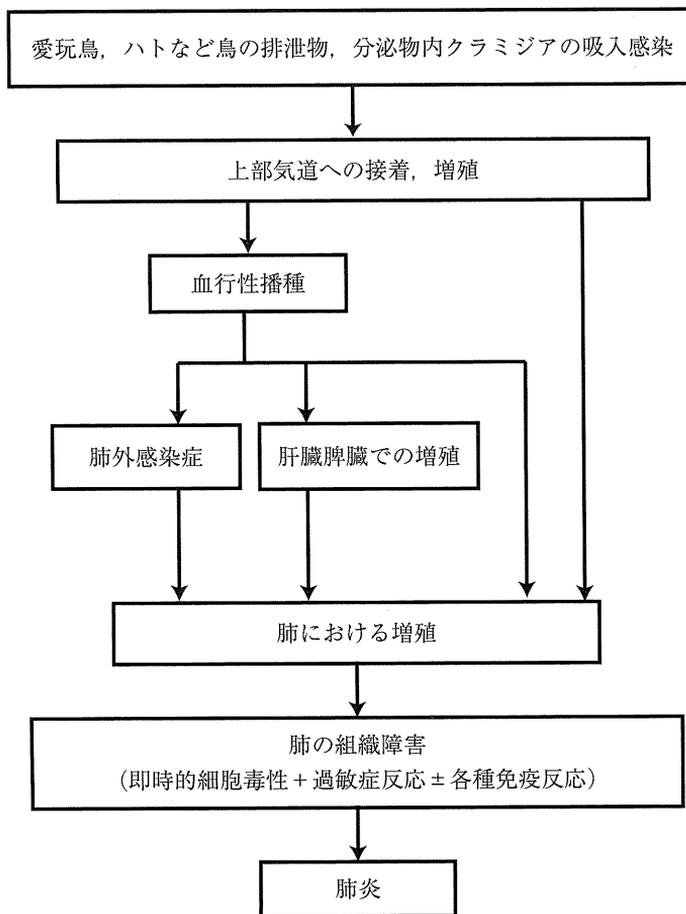


図8 オウム病の発病様式

上部呼吸器から侵入したオウム病クラミジアは局所で増殖した後、血行性の播種により肺外感染を起こす。その後、再び肺に感染が起き、肺炎を引き起こす。上部呼吸器感染から肺炎に至る場合もある（文献4による）。

の検出もしくは IgG 抗体256倍以上、またはペア血清による抗体陽転もしくは抗体価の有意の上昇が認められた場合、オウム病と診断するとされている (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-04-06.html>)。現在のところ、Micro-IF が可能な国内期間は感染症研究所しかない。各自治体の衛生研究所などを通じて感染症研究所に抗体検出を依頼する必要がある。

オウム病の病原体ないし抗原検出キットとして入手可能なのは直接蛍光抗体法用抗体である。これはリポ多糖体を認識抗原とする FITC 標識単クローン性抗体溶液である。検体におけるクラミジア基本小体の検出ができる。ただし、このキットではクラミジアとし

て検出するので、オウム病クラミジアかどうかの同定は別個に実施する必要がある。しかしながら、クラミジアであれば治療方針は同じなので、化学療法の方針を決定するには十分に有用であろう。近年は抗原検出よりも遺伝子診断の方が実施しやすくなっている。喀痰や咽頭スワブなどの呼吸器検体から DNA を抽出し、PCR 法によりオウム病クラミジア DNA を検出する。リアルタイム PCR も開発され、定量も可能となっている。残念ながらベッドサイドで実施可能な簡易検出キットはない。

☯ V. 化学療法

血清診断の結果が出ていなくても、明らか