

症例報告

日耳鼻 115: 682-686, 2012

茨城県で発見された
コリネバクテリウム・ウルセランスの1症例

鎌田 知子
畑中 章生
田崎 彰久
本田 圭司
角田 篤信*
喜多村 健*

総合病院土浦協同病院
耳鼻咽喉科

*東京医科歯科大学耳鼻咽喉科

飼い猫からジフテリア毒素産生性の *Corynebacterium ulcerans* に感染した症例を経験した。症例は51歳女性、難治性の咽頭痛を主訴に来院し、上咽頭後壁の厚い偽膜形成と黄色膿汁が認められた。理学所見と患者の動物飼育歴より *C. ulcerans* 感染症の可能性を考え、マクロライド系抗菌薬にて治療したところ症状は速やかに改善した。患者の咽頭の白苔および飼い猫の眼脂より *C. ulcerans* を検出し咽頭炎の起炎菌ならびに感染経路を確定することができた。*C. ulcerans* は人獣共通感染症を引き起こす菌の一つであり、本邦では本報告を含めて飼い猫からの感染例が数例報告されている。偽膜性咽頭炎の鑑別診断には必ず *C. ulcerans* 感染症を考慮し診察することが重要である。

キーワード：コリネバクテリウム・ウルセランス、人獣共通感染症
急性咽頭炎

はじめに

ジフテリア毒素を産生するコリネバクテリウム・ウルセランス（以下 *C. ulcerans*）は、人獣共通感染症を起こす細菌であり、英国をはじめとした欧州諸国では、ジフテリア症類似の臨床所見を呈する感染症として以前から問題になっている。2001年の千葉県での発症例以来、本邦でも *C. ulcerans* によるヒト感染例が散見されるようになった。また、本邦ではペットからの感染が疑われるような報告が多い。今回われわれは茨城県内で初めて確認された *C. ulcerans* 感染症を経験した。本症例では発症前にペットである猫が感冒様症状を呈しており、この猫の眼脂から *C. ulcerans* が検出されたため感染経路を特定することが可能であった。症例を報告するとともに、日本における *C. ulcerans* 感染の現状とその背景因子について検討したので報告する。

症 例

患者：51歳女性
既往歴：特記事項無し。ジフテリアワクチン歴は不明
家族歴：特記事項無し
生活歴：屋外に自由に出入りする猫を1匹飼育中
現病歴ならびに治療経過：2010年9月中旬より咽頭痛、嚥下時痛を自覚した。発症2日目に内科を受診し、経口抗菌薬（CDTR-PI）の内服を開始するも改善がみ

られなかった。発症9日目に近くの耳鼻咽喉科を受診したところ上咽頭に白色偽膜が認められ、同日当科に紹介、急性上咽頭炎の診断で緊急入院となった。初診時、上咽頭から中咽頭に厚く附着する白色の偽膜が認められた（図1）。入院当日よりABPC-ST 4.5g/dayの経静脈投与を開始した。入院翌日、患者の生活歴（ペット飼育歴）より *C. ulcerans* 感染症を疑ったためEM 1g/dayの経静脈投与に変更した。その結果、自覚症状ならびに上咽頭所見は速やかに改善を示した。しかし、患者が徐々にEM静注後に気分不快を訴えるようになり、第4病日よりCAM 400mg/dayの経口内服に変更した。第5病日には上咽頭所見はほぼ正常化し、第7病日退院となった。退院後もCAM 400mg/dayの経口投与を1週間継続し、症状は完全に消失した。その後は、8カ月の間再発を認めていない。初診時に提出した上咽頭偽膜からの培養よりグラム陽性桿菌が検出された。初診時より14日目に、菌は国立感染症研究所の細菌学的検査により起因菌は、*C. ulcerans* と同定され、さらにその2日後にジフテリア毒素を産生する *C. ulcerans* であることが確認された。患者にペットに関する詳しい問診を行ったところ、症状発現のおよそ1週間前に飼い猫が膿性鼻汁を伴う上気道感染に罹患していたことが判明した。そのため、飼い主である患者より承諾を得て飼い猫からの菌検査を行ったところ眼脂から *C. ulcerans* が検出された。

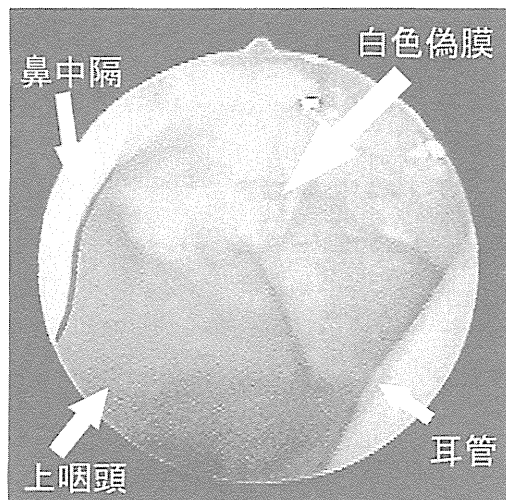


図1 来院時咽頭所見
上咽頭に偽膜形成を認める。

細菌学的検査：患者およびネコから分離された *C. ulcerans* の毒素原性を PCR 法、Elek 試験法、培養細胞法で試験した。その結果、すべての方法でジフテリア毒素の産生能が確認された。

考 察

C. ulcerans は、1928年に Gilbert と Stewart によって発見された人獣共通感染症を起こすグラム陽性桿菌である¹⁾。ヒトにはジフテリア症状を来すことが海外では比較的良好に知られている²⁾。宿主は哺乳類の家畜などから、野良犬、野良猫に加え、鳥類であるペンギンでの感染例も報告されており、ヒトも含めてかなり幅広い動物を宿主とする細菌である³⁾⁴⁾⁵⁾。*C. ulcerans* がヒトで感染を起こすと、咽喉頭の典型的なジフテリア様症状のみならず、皮膚炎、頸部リンパ節炎、腹膜炎など多彩な症状を呈することがある。本邦での初報告例などのように古典的ジフテリア症状を来すものもある⁶⁾。古典的ジフテリア症例では、ジフテリア毒素の神経障害のため不整脈を生じることがあるとされているが、われわれが渉猟した範囲では、*C. ulcerans* 感染例での不整脈の報告はみられなかった。海外でのヒト感染経路は牛、羊等との接触や、非加熱処理の乳製品摂取によるものが多いとされているが、愛玩動物からの感染報告もみられる⁷⁾。典型的と思われる厚い白色偽膜の咽喉頭所見を呈する感染症の鑑別診断として、溶連菌感染症、伝染性単核球症、古典的ジフテリア症、単純ヘルペスなどが挙げられる。今回の症例は厚く乳白色の偽膜の存在と患者のペット飼育歴から、*C. ulcerans* 感染症を疑い診断に至った。本疾患においては感染経路に関する問診も重要であり、ペッ

ト飼育歴があり、特に感冒症状を来したペットへの接触が存在した場合には、詳細な細菌学的検査など含め精査を進める必要がある。通常の細菌同定キットで *C. ulcerans* の同定はできないため、*Corynebacterium* 用の同定キットの使用が推奨される。より迅速な診断のためには、米国ではスクリーニング目的に PCR 法による毒素遺伝子の同定または発現の確認が推奨されている⁸⁾。感染経路が不明な例もあるが、ヒトからヒトへの感染や、院内感染などはこれまでのところ報告されていない。治療については、おおむね抗菌薬に対する感受性は良好とされているが、われわれの経験からはβラクタム系抗菌薬はあまり有効でなく、マクロライド系抗菌薬が有効であった。また、*C. diphtheriae* が産生するジフテリア毒素は心筋の神経伝達を障害する可能性があり、不整脈が生じたような重症例では抗ジフテリア毒素血清の使用が望ましいと考えられるが、*C. ulcerans* が産生するジフテリア毒素では不整脈が起きた事例の報告は現在までにはない。通常 *C. ulcerans* にはジフテリア毒素産生能はなく牛や馬の正常細菌叢として機能するものとされている。しかし、これまで国内で発見、報告された8症例に共通して、同定されたすべての *C. ulcerans* はジフテリア毒素産生能が認められた。*C. ulcerans* の産生する毒素は、*C. diphtheriae* の産生毒素やトキソイドで免疫した血清で中和される。国内で分離された *C. ulcerans* の症例はすべてジフテリア毒素産生性 (*C. ulcerans* と *C. diphtheriae* のジフテリア毒素遺伝子はアミノ酸配列の解析により異なることが判明している⁹⁾) で、その病因はジフテリア毒素に起因すると考えられている。さらに興味深い点として、報告されている全症例が50歳代で発症していた点が挙げられる。8例中3例では、飼い猫からの感染が強く疑われており、それ以外の症例でも動物からの感染が疑われる。東京都や厚生労働省健康局結核感染症課と国立感染症研究所感染症情報センターで5年ごとに行っているジフテリア抗体価調査によると、2005年および2010年度の統計において、50歳代では著明にジフテリア抗体価が低下していることが分かる (図2)¹⁰⁾¹¹⁾。50歳代の感染症例が多いことに関しては、この抗体価の低下が感染、発症の原因と推察される。

本症例の感染経路についても、飼い猫の眼脂から *C. ulcerans* が検出されたため、この猫が感染源であったと考えられる。本邦の第1例目の報告においても多数の猫の飼育歴があり、感冒症状を呈した猫の出現後に患者は発症したと報告されている。国立感染症研究所のホームページ (http://www.nih.go.jp/niid/bac2/Coryne_ulcerans/) によると、2011年11月現在、本邦で発見、報告されている全8例中5例において猫の飼育歴がある

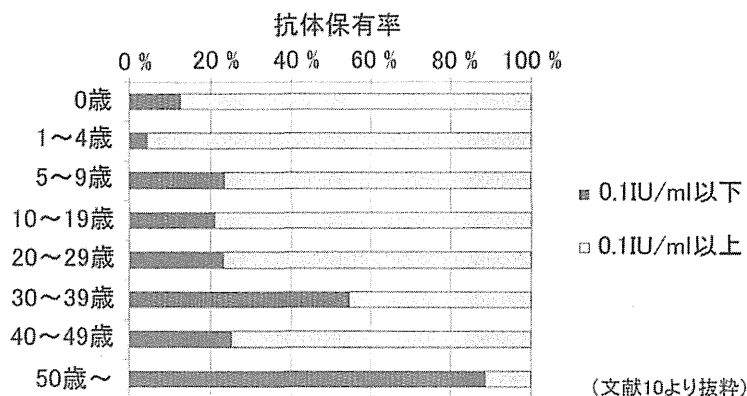


図2 年齢別ジフテリア抗体保有率 (東京都)

0.1IU/ml以上で感染防御レベルといわれているが、50歳以上では感染防御レベルに達しているのはごくわずか11%に過ぎない (文献10)より引用).

表1 国内発症例のまとめ (国立感染症研究所の報告12)より引用、一部改編)

NO	発生年月日	年齢	発生場所	症状	その他	毒素原性
1	2001/2	52	千葉県	呼吸困難, 咽頭痛, 発熱, 上咽頭と喉頭に偽膜	ネコ20匹飼育中 (1匹死亡後発症)	+
2	2002/10	54	千葉県	咽頭痛, 発熱, 上咽頭と右咽頭側索に偽膜	1例目と同地区に居住	+
3	2005/9	58	岡山県	右頸部腫脹, 軽度の咳	飼育犬が死亡後発症	+
4	2005/10	51	大分県	肺に多発性空洞病変, 咳, 痰, 発熱	ネコ12匹飼育	+
5	2006/7	57	神奈川県	咽頭痛, 上咽頭から中咽頭に偽膜, 咳, 発熱	インコ飼育	+
6	2009/1	57	東京都	咽頭痛, 中咽頭の偽膜, 鼻空後方の粘液	飼育していた感冒症状を呈したネコから感染	+
7	2010/9	51	茨城県	咽頭痛, 上咽頭から中咽頭の白苔	飼い猫から感染	+
8	2010/11	50	神奈川県	呼吸苦と左前胸部腫脹, 腋下リンパ節腫脹	飼い猫から感染	+

(表1). また, 本例を含めて3例で猫から *C. ulcerans* が検出されている. 飼い犬よりも飼い猫からの感染が疑われる症例が多い理由としては, 飼い猫は屋外において *C. ulcerans* を媒介する野良猫と接触を持つ機会が多いことが原因の一つと考えられる. 本症例においても感染源となった飼い猫は屋外で野良猫との接点があった. 厚生労働省研究班の報告によると, 保健所に収容されたイヌやネコの咽頭ぬぐい液の検査で *C. ulcerans* の分離, もしくはジフテリア毒素遺伝子の検出が以下のように確認されている. 大分県では9.8% (92例中9例), 岡山県

では5.9% (85例中5例), 愛媛県では5.0% (101例中5例) が報告されており, およそ5-10%の野良猫, 野良犬が *C. ulcerans* を保菌しているといえる¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾. これらの事実から, *C. ulcerans* は日本全土に広く存在しているものと考えられる. 典型的な *C. diphtheria* はヒトのみを宿主とするため, ワクチンなどによる感染予防策が比較的容易である. しかし, *C. ulcerans* は, 猫のような身近な動物を含めた多彩な動物を宿主とするため, その点で感染予防策がより困難である. 予防法として, ①動物からの感染予防としては風邪様症状 (鼻水, くしゃ

み等)や皮膚炎の動物と接触した後は手と衣類の消毒を徹底する。②50歳以上の方はジフテリア抗体の抗体価が極めて低くなっている可能性があり、特に動物を飼育している場合はジフテリアワクチン追加接種を検討する、の二つが推奨される。

病歴や生活歴からなどから *C. ulcerans* 感染症を疑った場合、病変の培養検査を提出後、速やかにマクロライド系抗菌薬の治療を行い、症状と経過にあわせて必要な対処をとるのが望ましい。英国および米国 CDC (Centers for Disease Control and Prevention) のガイドラインでは、抗毒素療法と抗菌薬 (エリスロマイシンやペニシリン G を 2 週間投与) の併用が推奨されている。特に *C. ulcerans* 感染症が強く疑われ、症状が重篤な場合には、菌種同定検査結果を待たずに抗毒素療法 (4 万-10 万単位) を併用する方法も推奨されている。抗毒素療法自体に静菌作用はないものの早期に抗毒素療法を行うことにより、気道からの *C. ulcerans* の除去の促進、毒素の新たな産生を抑制することが可能となり、その結果、患者を重篤な状態から救うことができるとされている⁹⁾。しかしながら、本邦では治療ガイドラインがなく、また抗毒素血清が入手困難であり、今後検討すべき課題である。また *C. ulcerans* 感染症が確定した場合は、厚生労働省健康局への情報提供が求められている。

まとめ

飼い猫から感染した *C. ulcerans* のヒト感染例を経験した。耳鼻咽喉科領域に関連した部位の症状を来すことが多く、また、古典的ジフテリア症状を呈した場合に重症化することもある疾患であるため、迅速かつ適切な検査による確定診断が重要である。われわれ耳鼻咽喉科医は、急性咽頭炎の鑑別疾患としてこの疾患を念頭に置き、的確に診断する必要があると思われる。

参考文献

- 1) Gilbert R, Stewart FC: J Lab clin Med 1927; 12: 756.
- 2) Kisely SR, Price S, Ward T: 'Corynebacterium ulcerans' a potential cause of diphtheria. Commun Dis Res CDR Rev 1994; 4: R63-64.
- 3) Hommez J, Devriese LA, Haesebrouck F, et al: Identification of nonlipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. J Clin Microbiol 1999; 37: 954-957.
- 4) Tejedor MT, Martin JL, Lupiola P, et al: Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. Can Vet J 2000; 41: 126-127.
- 5) Fox JG, Frost WW: *Corynebacterium ulcerans* mastitis in a bonnet macaque (*Macaca radiata*). Lab Anim Sci

1974; 24: 820-822.

- 6) Hatanaka A, Tsunoda A, Okamoto M, et al: *Corynebacterium ulcerans* Diphtheria in Japan. Emerg Infect Dis 2003; 9: 752-753.
- 7) Dewinter LM, Bernard KA, Romney MG: Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collected in Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. J Clin Microbiol 2005; 43: 3447-3449.
- 8) Tejpratap S. p. Tiwari, Anne Golaz, Diana T. Yu, et al: Investigations of 2 Cases of Diphtheria-Like Illness Due to Toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. Clinical Infection Diseases 2008; 46: 395-401.
- 9) 高橋元秀: ジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の感染症. 日獣会誌 2010; 63: 813-818.
- 10) 2005年および2010年の東京都感染症流行～ジフテリア抗体保有状況. 東京都微生物検査情報 2006; 27: 12. <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/2006/tbkj2712.html>
東京都微生物検査情報 2011; 32: 3. <http://idsc.tokyo-eiken.go.jp/epid/2011/tbkj3203.html>
最終更新日時 2011/11/30.
- 11) 平成20年度感染症流行予測報告書. 厚生労働省健康局結核感染症課. 国立感染症研究所感染症情報センター 2011; 201-216. <http://idsc.nih.go.jp/yosoku/Diphtheria/Serum-D2008.html>
最終更新日時 2011/11/30.
- 12) *Corynebacterium ulcerans* とジフテリア「国内の発生状況」. 国立感染症研究所 細菌第2部.
- 13) 若松正人, 人見 徹, 成松浩司, 他: 大分県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況. 国立感染症研究所病原微生物検出情報 2010; 31: 204-205.
- 14) 中嶋 洋, 大島律子, 石井 学, 他: 岡山県におけるイヌ・ネコの *C. ulcerans* 保菌状況. 国立感染症研究所病原微生物検出情報 2010; 31: 206-207.
- 15) 浅野由紀子, 烏谷竜哉, 田中 博, 他: 愛媛県でのイヌ・ネコにおけるジフテリア毒素原性 *Corynebacterium ulcerans* の保有状況. 平成21年度愛媛衛環研年報 12: 2009; 12: 1-7.

本稿を終えるにあたり、病理学的に *C. ulcerans* を同定してくださった、国立感染症研究所細菌第二部の小宮貴子先生、山本明彦先生、高橋元秀先生および、厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興再興感染症研究事業) ワンヘルズ理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究班に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、2011/5/19の日本耳鼻咽喉科学会 (京都) において報告した。

利益相反に該当する事項はない。

別刷請求先 〒300-0053 土浦市真鍋新町11-7

土浦協同病院耳鼻咽喉科 鎌田知子

(2011年7月8日受稿 2012年1月20日受理)

A Case of Acute Pharyngitis Caused by *Corynebacterium Ulcerans* in Ibaraki Prefecture

Tomoko Kamada, M.D., Akio Hatanaka, M.D., Akihisa Tasaki, M.D.

Keiji Honda, M.D., Atsunobu Tsunoda*, M.D. and Ken Kitamura*, M.D.

Tsuchiura Kyodo Hospital, Ibaraki, Japan

*Department of Otorhinolaryngology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

We report on the case of a 51-year-old woman who presented with refractory pharyngitis caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* (*C. ulcerans*). Thick pseudomembrane formations and yellowish pus were observed in her nasopharynx. Based on her clinical course and history of breeding cats, we considered *C. ulcerans* infection as the possible diagnosis. She was treated with macrolide administration and her symptoms immediately improved. *C. ulcerans* was identified in pus from the patient's pharynx as well as in discharge material from her cat's eyes, and *C. ulcerans* was thought to have caused her pharyngitis. *C. ulcerans* is one of the infecting bacteria which can cause a zoonotic infection. In Japan, some cases with *C. ulcerans* infection from cats have been reported. It is important that we should consider *C. ulcerans* infection as a differential diagnosis of refractory pharyngitis.

Keywords: *Corynebacterium ulcerans*, zoonosis, refractory pharyngitis

Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho (Tokyo) 115: 682-686, 2012

ネコにおけるジフテリア毒素産生型 *Corynebacterium ulcerans*および *Corynebacterium* 属菌保有状況調査 (2010-2011) 第2報

木全 恵子 嶋 智子 金谷 潤一 磯部 順子 嶋 一世 廣田 昌幸¹
保田 信一² 綿引 正則 佐多 徹太郎

Isolation of Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium* spp.
from Cats (2010-2011). Second Report

Keiko KIMATA, Tomoko SHIMA, Jun-ichi KANATANI, Junko ISOBE,
Ichiyo SHIMA, Masayuki HIROTA¹, Shin-ichi YASUDA², Masanori WATAHIKI
and Tetsutaro SATA

目的: *Corynebacterium* 属菌は人獣の皮膚や口腔内の常在菌の1つである。このうちジフテリア毒素を産生する *Corynebacterium diphtheriae* による感染症、ジフテリアはその感染力と症状の重篤度から2類感染症に指定されている [1]。

近年、この *C. diphtheriae* の近縁菌である *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* がジフテリア毒素 (*diphtheriae* toxin 以後 DT) と類似したジフテリア様毒素 (*diphtheriae* like toxin 以後 DLT) 産生性となり、ヒトにジフテリア様症状を引き起こす事例が報告された。特にジフテリア様毒素産生型 *C. ulcerans* (以下 *C. ulcerans*^{tox+}) によるヒト感染事例が欧米、日本で報告され [1-3]、厚生労働省は *C. ulcerans*^{tox+} によるジフテリア様症状について周知と感染者に関する情報提供を医療機関をはじめとする関係機関に依頼している [4,5]。また、2011年1月にはジフテリア届出基準の改正を行い、ジフテリア様毒素産生性の *C. ulcerans*・*C. pseudotuberculosis* と *C. diphtheriae* との鑑別に留意することを求めているが、*C. ulcerans*・*C. pseudotuberculosis* による感染症は現在、感染症法に基づく届出対象に含まれていない [6]。

日本では *C. ulcerans*^{tox+} によるヒト感染事例は2001年から2011年までに散発的に発生した事例9件が報告されている。うち3件からは患者と接触のあったネコから *C. ulcerans*^{tox+} が分離された [1,7-10]。これらの事例ではヒト-ヒト感染は確認されず、動物-ヒト感染が疑われたが、上記9例中7例はネコやイヌとの接触歴が確認されており、愛玩動物からの感染の可能性が示唆されている。高橋らは動物の *C. ulcerans*^{tox+} 保有状況の調査を行い、国内における *C. ulcerans*^{tox+} 分布状

況は明らかになりつつある [8]。また、海外では *C. ulcerans*^{tox+} に感染したネコ等の愛玩動物からの感染のほか、畜産動物及び生乳からの感染事例が報告されており、動物を媒介とする感染症として注目されている [11-13]。

我々は2009年に富山県内における *C. ulcerans*^{tox+} および *Corynebacterium* 属菌の愛玩動物における保有状況を調査する目的で、行政機関に引き取られたネコを対象に *Corynebacterium* の保有状況を調査し、報告した [14]。

引き続き2010・2011年について富山県内における *C. ulcerans*^{tox+} の愛玩動物における保有状況の調査を行ったので報告する。これらの調査は平成22年度・23年度厚生労働科学研究費補助金 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「ワンヘルズ理念に基づく動物由来感染症制御に関する研究 (研究代表者 国立感染症研究所 山田章雄)」における研究小班「コリネバクテリウムに関する研究: 研究分担者 国立感染症研究所 高橋元秀 (平成22年度)・山本明彦 (平成23年度)」の一環として行われた。

材料と方法: 2010・2011年に採取された147検体について *C. ulcerans*^{tox+} の分離を行った。その内訳は富山県動物管理センターに引き取られたネコの咽頭ぬぐいスワブ116検体、ネコ鼻汁スワブ6検体、開業獣医より採取されたネコ鼻汁スワブ23検体、イヌ鼻汁スワブ2検体である。

採取した咽頭ぬぐいスワブの分離培養は既報 [14] に従い行った。勝川変法荒川培地 (以下 K 培地, 日研生物医学研究所) にスワブを塗抹し 24・30・48・72時

1. 富山県動物管理センター, 2. ドリトル動物病院

平成24年12月14日

間後に生育したコロニーをヒツジ血液寒天培地（日水製薬）に採取した。K培地塗抹後のスワブを Bacto™ Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company) に振り出し、35°Cで一晩培養した。

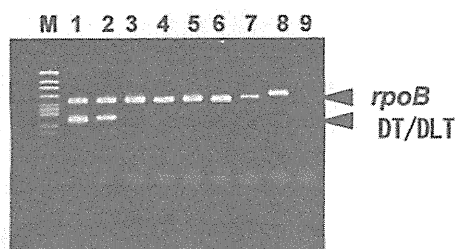
陽性対照株として国立感染症研究所より供与された *C.diphtheriae*^{Tox+} PW8, *C.ulcerans*^{Tox+} 旭0102を用いた。陰性対照株として *C.ulcerans* (国立感染症研究所より供与), *C.confusum* TC93, *C.ammoniagenes* TC300, *C.tuberculoostrepticum* TC527, *C.auriscanis* TC522[14]を用いた。

C.ulcerans^{Tox+}の保有する DLT 遺伝子のスクリーニングは以下の3つの方法で行った。DNA抽出は既報[14]に従い、①K培地上のコロニーの濃厚発育部分をかきとり鑄型 DNA とした Sweep PCR, ②ヒツジ血液寒天培地上で *C.ulcerans* を疑われる複数のコロニー（最大10コロニー）をひとつにまとめた混合鑄型 DNA を用いた Group PCR[15], ③増菌液抽出 DNA の PCR を行った。DT および DLT 遺伝子の検出は病原体検出マニュアル ジフテリア記載の DT プライマー [16]を用いた。

また、PCR によるスクリーニングの内部コントロールとして RNA ポリメラーゼ β サブユニット 遺伝子 *rpoB* を検出する *rpoB* プライマー [17]を用いた。これらの *rpoB* プライマーは、配列中に複数個所の重複塩基を保有しており (C2700F: CGWATGAACATYGGBCAGGT, C3130R: TCCATYTCRCCRAARCGCTG), *Corynebacterium* 属菌のほか他菌種の *rpoB* も増幅可能である (図1, レーン8, [17])。上記検体の

一部68検体について上記の DT プライマーと *rpoB* プライマーを混合した *rpoB*・DT duplex PCR 系を用い (図1), DT および DLT 遺伝子を指標としたスクリーニングを行った。*rpoB* プライマー C2700F, C3130R [17]を用い, *rpoB* 遺伝子の一部塩基配列434-452base の PCR 増幅が検出された *rpoB* 陽性・DT 陰性の場合 (図2A), DT 陰性として PCR によるスクリーニングは終了とした。*rpoB*・DT 共に陰性の場合 (図2B レーン20) はそれぞれ個別に *rpoB* と DT の PCR の再試を行った (図2C レーン25)。*rpoB*・DT 共に陽性の場合 (図2B レーン21) は、陽性となった混合鑄型 DNA を構成するコロニーごとに鑄型 DNA を抽出し, *rpoB*・DT の single PCR を行い, DT 陽性株を特定した (図2C レーン26-34)。*rpoB*・DT duplex PCR 反応液は 1×GoTaq® Hot Start Master Mix (Promega) に鑄型 DNA 2 μl (20-50 μg) と DT プライマー [16]と *rpoB* プライマー [17] 2組のプライマー各 0.2 μM を加え, 95°C 2分×1 サイクル, (95°C 20秒, 55°C 30秒, 72°C 1分)×35 サイクル, 72°C 10分×1 サイクルで行った。PCR 後, 3%アガロースゲル電気泳動と EtBr 染色により PCR 産物を分離・検出した。

C.ulcerans 同定検査は病原体検出マニュアル ジフテリア[16], 既報[15]に従い, DLT 遺伝子, *rpoB* 領域の塩基配列解析[14, 17], DSS 鑑別培地および Api Coryne (ピオメリュー) にて同定した。毒素産生性・毒素抗体価測定, PFGE は国立感染症研究所にて実施した。



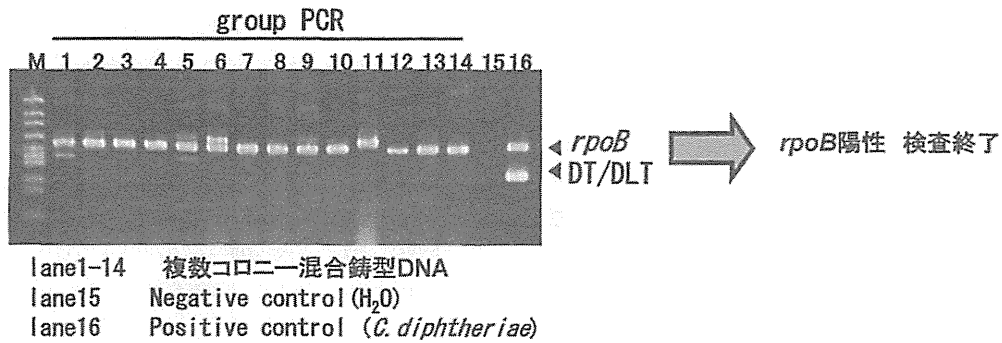
lane1 *C.diphtheriae*pw18 (Tox+)
lane2 *C.ulcerans* (Tox+)
lane3 *C.ulcerans* (Tox-)
lane4 *C.confusum* (Tox-)
lane5 *C.ammoniagenes* (Tox-)
lane6 *C.tuberculoostrepticum* (Tox-)
lane7 *C.auriscanis* (Tox-)
lane8 *E.coli*
lane9 H₂O
(M: φX174/Hinc II)

図1 ジフテリア毒素遺伝子・*rpoB* duplex PCR

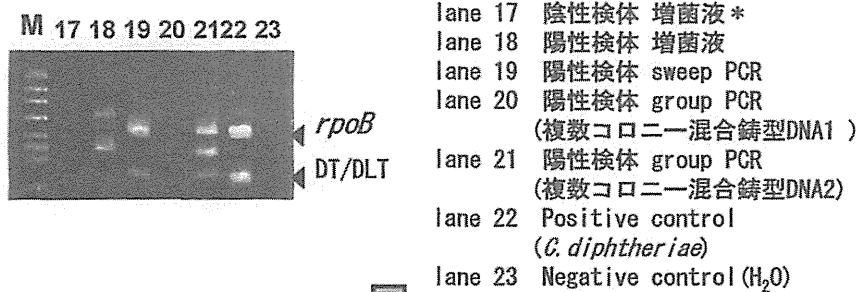
結果と考察： 2010-2011年に採取された147検体のうち *C.ulcerans*^{Tox+} は1検体のみ検出され, 残りの検体は全て DT 陰性もしくは DLT 陰性 (*C.ulcerans*^{Tox+} 陰性) であった。分離された株は DT PCR 陽性で ApiCoryne では *C.ulcerans* ID99.7% であった。分離株の DT PCR 産物と *rpoB* の塩基配列の一部 (419bp) を解析したところ, DLT 遺伝子および *C.ulcerans* type strain CIP106504 の *rpoB* の塩基配列と100%一致した。また, ジフテリア毒素産生性試験により産生性が確認され, 分離株は *C.ulcerans*^{Tox+} 同定された。PFGE ではこの分離株はヒト由来 *C.ulcerans*^{Tox+} 岡山株[18]とパターンが一致した。

一方, *C.ulcerans*^{Tox+} 陽性が分離されたネコは鼻汁症状であったが, 血清の抗毒素価は検出限界以下であり, 血中のジフテリア毒素は検出されなかった [19]。さらに同ネコの再検査では本菌は分離できなかった。これらのことから, 今回 *C.ulcerans*^{Tox+} 陽性となったネコの体内では *C.ulcerans*^{Tox+} の感染が成立しておら

A. 陰性検体



B. 陽性検体



lane20:*rpoB*陰性であるため、*rpoB*, DTのsingle PCRによる検証を行う。(Lane17 *増菌液の濁りがみられず平板上の生育菌もない陰性検体。培養液のコントロールとして使用)
lane21 :*rpoB*, DT/DTL陽性であるため、single colony PCRを行う。

C *rpoB*, DTのsingle PCR

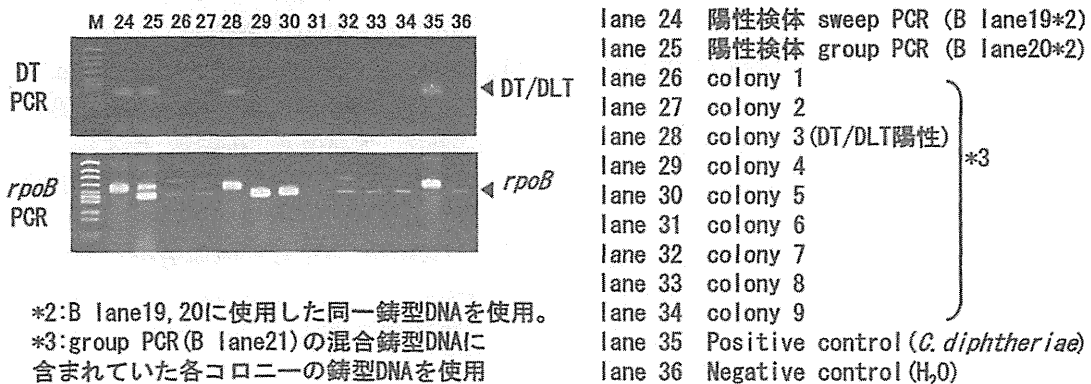


図2 ジフテリア毒素遺伝子・*rpoB*のduplex PCRによるスクリーニングの1例

ず、本菌は一時的な通過菌であり、鼻汁症状等の原因菌ではなかった可能性が考えられた。2009年調査分78検体を合わせ今回報告分の検体を合わせた225検体中本菌が検出された検体は1検体であり、全体の0.4%であった。以上から、本県においても環境中に*C.ulcerans*^{Tox+}は存在していたが、ヒトへの感染を仲介するネコ等の感染の可能性は低いと考えられた。

今回、本調査の検体の一部68検体について *rpoB*・DT duplex PCR を用いた。PCR でのスクリーニングには、鑄型 DNA 内の PCR 阻害物質による偽陰性の可能性を考慮に入れなければならない。今回 *Corynebacterium* 属菌の分離に特化した方法としてコリネ属菌の *rpoB* の一部を増幅するプライマーを利用した duplex PCR を試行した。その結果、Group

平成24年12月14日

PCRに用いた混合鋳型DNA 90サンプルのうち21.1%が *rpoB*・DT duplex PCRで *rpoB* 陰性・DT 陰性となり、*rpoB* PCR, DT PCRをそれぞれ再試した。duplex PCRでは *rpoB* が増幅しなかった鋳型DNAを single PCRに用いた場合、PCR増幅効率は低い。これらの鋳型DNAで *rpoB* の増幅が検出された。*rpoB* 陰性となった Group PCRの混合鋳型DNAを構成する菌株22株と *rpoB*陽性の混合鋳型DNAを構成する菌株8株について16S rDNAによる種同定を行ったところ、*Streptococcus* sp, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus* spが *rpoB* 陰性の混合鋳型DNAに多く存在していた。これらの菌種と上記の duplex PCRと single PCRにおける *rpoB* 増幅効率との関連性は不明である。以上の検討からDT PCRを *C.ulcerans*^{T⁺} 分離のスクリーニングの主要な手段として用いる場合、PCRの内部コントロールなどの精度管理の構築が重要であると考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、*C.ulcerans*^{T⁺} の解析について多大なご協力を頂きました国立感染症研究所細菌第二部の山本明彦先生、小宮貴子先生、高橋元秀先生に感謝致します。

文 献

1. 国立感染症研究所細菌第2部第3室他 (2006) 病原微生物検出情報, 27, 331-337
2. Lartigue, M., Monnet, X., Flèche, A., Grimont, P., A. D. et al. (2005) J. Clin. Microbiol., 43, 999-1001
3. Zoysa, A. D., Hawkey, P. M., Engler, K., George, R. et al. (2005) J. Clin. Microbiol., 43, 4377-4381
4. 健感発第1120001号厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (平成14年11月20日付け)
5. 健感発第0722第3号厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (平成21年7月22日付け)
6. 健感発第0114第1号厚生労働省健康局結核感染症課長通知 (平成23年1月14日付け)
7. 野田佳裕, 角田篤信, 小宮貴子, 山本明彦, 高橋元秀 (2009) 病原微生物検出情報, 30, 118
8. 高橋元秀, 若松正人, 人見徹, 烏谷竜哉, 浅野由紀子, 中嶋洋, 大畠律子他 (2010) 病原微生物検出情報, 31, 203-207
9. 吉村幸浩 (2010) 病原微生物検出情報, 31, 331
10. 畑中章生, 鎌田知子, 田崎彰久, 本田圭司, 山本明彦, 小宮貴子, 高橋元秀 (2011) 病原微生物検出情報, 32, 19-20
11. Schuëgger, R., Schoerner, C., Dlugaiczyk, J. et al. (2009) Emerg. Infect. Dis., 15, 1315-1316
12. Tiwari, T. S., Golaz, A., Yu, D. T., et al. (2008) Clin. Infect., Dis., 46, 395-401
13. 平成18年度希少感染症診断技術研修会
14. 木全恵子, 磯部順子, 嶋智子, 清水美和子, 金谷潤一, 倉田毅, 綿引正則, 廣田昌章 (2010) 富山県衛生研究所年報, 33, 109-117
15. 浅野由紀子, 烏谷竜哉, 田中博, 武智拓郎, 土井光徳, 佐々木俊哉 他 (2010) 平成21年度愛媛県立衛生環境研究所年報, 12, 1-7
16. 国立感染症研究所 地方衛生研究所協議会 病原体検出マニュアル (2003)
17. Khamis, A., Didier Raoult, D., and Scola, B. L. (2004) J. Clin. Microbiol., 42, 3925-3931
18. 中嶋洋, 大畠律子, 石井学, 岸本寿男, 大木有美, 木口修 他 (2010) 病原微生物検出情報, 31, 206-207
19. 山本明彦 (2012) 厚生労働科学研究費補助金 (新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業) 分担研究報告書 コリネバクテリウムに関する研究, 34-43

EXPERIMENTALLY INDUCED DISEASE

Kinetics and Pathogenicity of Oral Infection by Equine Herpesvirus-9 in Mice and Suckling Hamsters

E. El-Nahass^{*,‡}, N. El-Habashi^{*,§}, A. A. Abdelaziz^{†,¶}, M. Nayel^{†,#}, S. Kasem[†], H. Fukushi[†], H. Tuji^{*}, A. Hirata^{*}, H. Sakai^{*} and T. Yanai^{*}

^{*} Department of Veterinary Pathology, [†] Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Applied Biological Science, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan, [‡] Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Beni-Suef University, [§] Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Kafr El-Shikh University, [¶] Department of Poultry and Rabbit Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Suez Canal University and [#] Department of Animal Medicine and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Menofya University, Sadat City, Egypt

Summary

The pathogenesis and kinetics of oral infection by equine herpesvirus (EHV)-9 were studied in mice and hamsters. After oral inoculation of 10^5 plaque-forming units (PFU) of virus, 1-week-old suckling hamsters showed varying severity of neurological disease from 72 hours post inoculation (hpi) and all of these animals had died by 96 hpi. Four-week-old ICR mice inoculated orally with 4×10^4 PFU of virus showed no clinical signs, but they developed erosive and ulcerative gastritis from 36 hpi. Varying degrees of encephalitis were seen in infected mice and hamsters, and the hamsters also developed myelitis by 96 hpi. Immunohistochemistry performed on whole body sections of suckling hamsters revealed the kinetics of spread of the virus to the central nervous system. EHV-9 antigen was detected initially in macrophages of the oral and lingual submucosa. At 36 hpi virus antigen was detected in the nerve fibres and pseudounipolar neurons of the trigeminal ganglion and at 96 hpi antigen was present in the myenteric plexuses of the intestine. Virus antigen was also detected in the liver, lungs and heart of affected animals. EHV-9 DNA was detected by polymerase chain reaction in the brain, blood and spinal cord of suckling hamsters at 36, 48 and 96 hpi. These findings show that EHV-9 may spread via the trigeminal nerve when mice and hamsters are inoculated orally with virus.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: equine herpesvirus-9; ICR mice; oral inoculation; suckling hamsters

Introduction

Equine herpesvirus (EHV)-9 is the newest member of the EHV family and was initially isolated from an outbreak of disease in Thomson's gazelles (*Gazella thomsoni*) that died from fulminant encephalitis (Fukushi *et al.*, 1997). Serologically, EHV-9 is most closely related to the recently emergent neurotropic pathogen EHV-1, but its DNA fingerprint differs from that of EHV-1 and other EHV-9s. The virus is estimated to have sequence homology of 95% to EHV-1 and EHV-8 and 60% to EHV-4 based on analysis of

gene sequences encoding glycoprotein G and the conserved region of glycoprotein B (Fukushi *et al.*, 1997).

The infectivity of EHV-9 has been assessed in experimental infections by intranasal inoculation of mice and hamsters (Fukushi *et al.*, 2000), goats (Taniguchi *et al.*, 2000b), pigs (Narita *et al.*, 2000), horses (Taniguchi *et al.*, 2000a), dogs, cats (Yanai *et al.*, 2003a, b), common marmosets (Kodama *et al.*, 2007) and cattle (El-Habashi *et al.*, 2011). In those experiments, EHV-9 caused fatal encephalitis in all animal species except horses, which developed moderate encephalitis with less neuronal loss, moderate perivascular cuffing and gliosis. Recently, the virus was detected in a polar bear and a giraffe in an American

Correspondence to: T. Yanai (e-mail: yanai@gifu-u.ac.jp).

0021-9975/\$ - see front matter
doi:10.1016/j.jcpa.2011.05.003

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

zoo (Schrenzel *et al.*, 2008; Donovan *et al.*, 2009). This wide host range of infection, as well as the ease of transmission by the nasal route, which is considered to be the natural route of infection (El-Habashi *et al.*, 2010a), has raised fears of emerging EHV-9 infection.

The pathogenesis of EHV-9-induced encephalitis following infection by the nasal route was studied using a suckling hamster model. EHV-9 propagated in the olfactory epithelium 12–24 hours post inoculation (hpi) and then gained access to the brain through the olfactory nerve (El-Habashi *et al.*, 2010a).

In previous studies we have reported the infectivity of EHV-9 by different routes of inoculation, including the ocular, oral and intraperitoneal routes (El-Habashi *et al.*, 2010b), but with no accurate description of the mechanism of induction of encephalitis. Therefore, further investigation is required in order to determine how EHV-9 reaches the brain following infection by routes other than nasal inoculation and to identify the mechanisms of EHV-9-induced encephalitis following infection by these alternative routes of administration. To that end, we are currently conducting investigations of intraperitoneal (El-Nahass *et al.*, 2011) and ocular inoculation of the virus (unpublished data).

The primary site of propagation of EHV-9 following oral inoculation has not yet been identified, nor is it known how the virus gains access to the brain after this infection or how long this process takes. The pathogenesis of infection by other neurotropic viruses (e.g. EHV-1, Hasebe *et al.*, 2002; Theiler's virus and poliovirus, Villarreal *et al.*, 2006) has been reported.

The aim of the present study was to determine the pathogenesis and kinetics of infection by EHV-9 following oral inoculation of mice and suckling hamsters.

Materials and Methods

Virus Culture

Madine-Derby bovine kidney (MDBK) cells were used for the propagation of EHV-9. The inocula were prepared by culturing the virus from the original seed stocks of EHV-9 (P19, fifth passage in MDBK cells) in MDBK cells. The virus was titrated by plaque formation assay on MDBK cells.

Animals and Virus Inoculation

Animals were provided with a basal pellet diet (Oriental MF, Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) and bottled water *ad libitum*. The experiment was conducted in accordance with pertinent laws and related standard operating procedures on the treatment and use of laboratory animals. The experimental protocol

was approved by the Animal Experiment Committee of the Faculty of Applied Biological Science at Gifu University, Japan.

ICR Mice. Forty-four 4-week-old male ICR mice were purchased from a breeder (SLC Inc., Hamamatsu, Japan). The mice were housed in plastic cages and kept in an isolated biohazard cabinet for approximately 1 week of acclimatization. The mice were divided into eight groups for virus inoculation ($n = 5$) and one control group ($n = 4$). Each group was inoculated orally with a single dose of 50 μl of 2×10^6 virus solution (10^5 plaque-forming units [PFU]). Mice were killed at 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 and 144 hpi. Control mice were inoculated orally with minimum essential medium (MEM). Animals were checked for clinical signs at least three times daily.

Syrian Hamsters. Ten 10-week-old female Syrian hamsters at 10 days of gestation were purchased from a breeder (SLC Inc.). The animals were housed in plastic cages and left to give birth. After birth, forty-five 7-day-old suckling hamsters were inoculated orally with a single dose of 20 μl of 2×10^6 of EHV-9 virus solution (4×10^4 PFU). Five animals were killed at 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 and 144 hpi. Four of these five animals were used for histopathology and immunohistochemistry (IHC) and one provided samples for polymerase chain reaction (PCR). Animals were checked for clinical signs at least three times daily.

Collection and Processing of Tissues

The brain, different levels of the spinal cord, tongue, stomach, small and large intestine, liver, spleen, heart and lungs were collected from young adult ICR mice and fixed in 10% neutral buffered formalin. To examine the entire length of the digestive tract, a 'Swiss roll' technique was applied (Fig. 1) (Moolenbeek and Ruitenberg, 1981).

To examine the whole body in section for detection of virus antigen, the suckling hamsters were bisected sagittally and fixed in 10% neutral buffered formalin. Suckling hamsters prepared in this fashion did not require decalcification before sectioning (El-Habashi *et al.*, 2010a).

Immunohistochemistry

For IHC, sections from paraffin wax-embedded tissues of mice and hamsters were immunolabelled with rabbit antiserum specific for EHV-9 (Veterinary Microbiology Laboratory, Gifu University; 1 in 800 dilution) by the avidin–biotin complex (ABC) immunoperoxidase



Fig. 1. The 'Swiss roll' technique makes it possible to scan the entire intestinal tract, including the small and large intestines, in a single section. HE. Bar, 10 mm.

method (Yanai *et al.*, 1998), with ABC kits (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). The secondary antibody was biotinylated anti-rabbit IgG (DAKO Cytomation, Carpinteria, California, USA) and liquid DAB substrate chromogen system (DAKO) was used as the chromogen. Sections were counterstained with haematoxylin. Tissue sections from the EHV-9-infected hamsters and sera from a non-immunized rabbit and goat were used as controls.

DNA Extraction and PCR

DNA was extracted from spinal cord, brain and blood using the Sepagene kit for virus DNA detection (Sanko pharmacological Co., Tokyo, Japan). Viral DNA was detected using primers for the open reading frame (ORF)76-F (5'TTT CCC TCT CAG CGA TCA CTT TTC ACC ACC GAA GAA CAG GCC CTC ATC GG 3') and ORF76-R (5' GGG CTG TTG TGG GGT AAA AGG TGG TGT TAC GGA AAC ACG CGT GCC AAG AA 3'). PCR amplification was performed in 50 μ l volumes containing DNA (100 ng), 8 μ l of each dNTP, 0.5 μ l of each primer, 25 μ l LA Taq Buffer (Mg^{+2} plus) and 0.5 μ l Takara LA Taq™ DNA polymerase (Takara, Kyoto, Japan). The PCR conditions were as follows: 5 min at 94°C (initial denaturation), 30 cycles of 5 sec at 98°C, 30 sec at 68°C and 90 sec at 72°C, and finally 7 min at 72°C (final extension). The PCR product was separated in an agarose gel (0.9%) and stained with ethidium bromide.

Results

ICR Mice

ICR mice inoculated with EHV-9 showed no apparent clinical signs, except for a minimal loss of body weight. No gross abnormalities were observed in the viscera or central nervous system (CNS) at the time of necropsy examination.

Histopathological findings are summarized in Table 1. In mice killed at 36 hpi there was moderate hyperkeratosis of the stratified squamous epithelium of the forestomach (Fig. 2a). At 48–72 hpi there was moderate to severe gastritis with erosion or ulceration and multifocal neutrophilic infiltration of the submucosa, with dilation of submucosal blood vessels (Fig. 2b).

At 48 hpi the mice inoculated with EHV-9 had moderate interstitial pneumonia characterized by diffusely thickened alveolar septa with varying degrees of macrophage and neutrophil infiltration. There were multifocal areas of hepatocyte degeneration after 72 hpi.

The severity and distribution of CNS lesions are summarized in Table 2. There was meningoencephalitis at the level of the pons, characterized by moderate neuronal degeneration, gliosis and perivascular aggregation of lymphocytes, plasma cells and neutrophils, with mild meningeal lymphocytic infiltration at 72 hpi. At 96 hpi the lesions extended to the medulla oblongata and the cerebellum and hippocampus were moderately affected. At 120 hpi the moderate neuronal loss and gliosis extended to the olfactory bulb, especially affecting the granular cell layer, and there were frequent intranuclear inclusions in the neurons of the pons and medulla oblongata. By 144 hpi, meningoencephalitis had extended to involve most of the brain, including all layers of the olfactory bulb except the glomerular layer.

Table 3 shows the time-course distribution of EHV-9 antigen in the internal organs. At 12 hpi, EHV-9 antigen was seen in macrophages within the lingual muscles (Fig. 3). In addition, at 48 hpi virus antigen was detected in the stratified squamous epithelium of the forestomach and in inflammatory cells in the underlying submucosa.

Virus antigen was frequently detected in the bronchial and alveolar epithelium and alveolar macrophages at 48 hpi. At 72 hpi there was occasional labelling of the nuclei and cytoplasm of hepatocytes and at 120 hpi this labelling was more widespread and associated with the formation of inclusion bodies (Fig. 4). There was no EHV-9 antigen in the myenteric plexuses of the gastrointestinal tract.

The time-course distribution of EHV-9 antigen in the CNS in mice inoculated orally with EHV-9 is

Table 1
Time-course distribution and severity of microscopical lesions in organs of animals inoculated orally with EHV-9

Animal	ICR mice								Suckling Syrian hamsters					
	Hours post inoculation								Hours post inoculation					
	12	24	36	48	72	96	120	144	12	24	36	48	72	96
Oral cavity														
Mucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Submucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	++	+++	+++	+++	++
Tongue	+	++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+	++	++	+
Forestomach														
Mucosa	-	-	+	++	+++	+	+	-	-	-	+	+	++	++
Submucosa	-	-	+	+	++	++	+	-	-	-	-	+	+	++
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Glandular stomach														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Small intestine														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Large intestine														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+++
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Liver	-	-	-	-	+	+	++	++	-	-	-	+	++	+++
Lung														
Bronchi and bronchioles	-	-	-	+	+	++	++	+++	-	-	+	++	+++	+++
Alveoli	-	-	-	-	+	+	++	+++	-	-	+	+	++	+++
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Severity score: -, none; +, slight; ++, moderate; + + +, severe. ND, not detected.

shown in Table 4. After inoculation, EHV-9 antigen was first observed in the meninges and pons at 72 hpi, followed by the medulla oblongata and cerebellum at 96 hpi. EHV-9 antigen was observed in the granular layer of the olfactory bulb at 120 hpi. By 144 hpi, EHV-9 antigen was seen throughout the brain, including the midbrain, hippocampus and all

layers of the olfactory bulb except the glomerular layer.

Suckling Hamsters

Most of the inoculated suckling hamsters showed neurological signs in the form of depression and

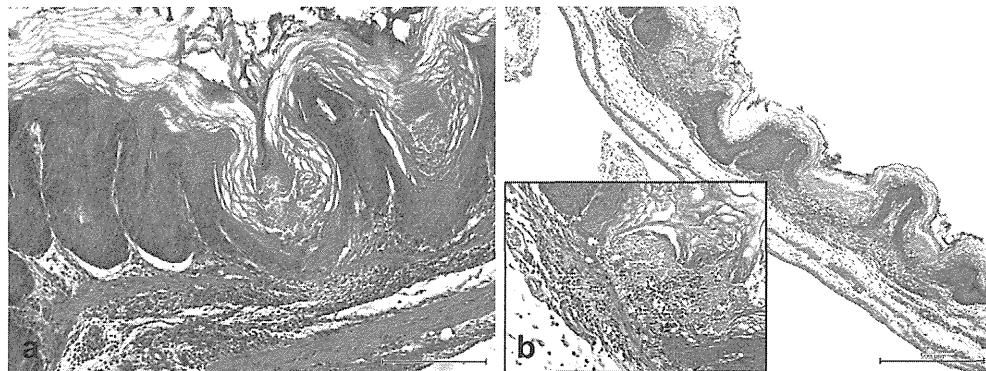


Fig. 2. (a) Forestomach of an ICR mouse at 36 hpi showing moderate hyperkeratosis with submucosal inflammation. HE. Bar, 200 µm. (b) Forestomach of an ICR mouse at 72 hpi showing multifocal ulceration and diffuse lymphocytic infiltration. HE. Bar, 500 µm (Inset, 100 µm).

Table 2
Time-course distribution and severity of microscopical lesions in the CNS of animals inoculated orally with EHV-9

Animal	ICR mice								Suckling Syrian hamsters					
	Hours post inoculation								Hours post inoculation					
	12	24	36	48	72	96	120	144	12	24	36	48	72	96
Trigeminal ganglia and nerve	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+	++	+++	+++
Brain														
Cerebrum														
Olfactory bulb														
Glomerular layer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Mitral layer	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++
Granular layer	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+
Thalamus	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+	++
Hippocampus	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+	++
Midbrain	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	+	+	+
Cerebellum	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+	++
Brainstem														
Pons	-	-	-	-	+	++	++	+++	-	-	-	+	++	+++
Medulla oblongata	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+	++
Meninges	-	-	-	-	+	+	++	++	-	-	-	+	++	+++
Spinal cord														
Cervical portion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dorsal root ganglia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meninges	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Severity score: -, none; +, slight; ++, moderate; +++, severe. ND, not determined.

Table 3
Time-course distribution of EHV-9 antigen in the organs of animals inoculated orally with EHV-9

Animal	ICR mice								Suckling Syrian hamsters					
	Hours post inoculation								Hours post inoculation					
	12	24	36	48	72	96	120	144	12	24	36	48	72	96
Oral cavity														
Mucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-
Submucosa	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	++	++	+	+	-
Tongue	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	++	+	+	-
Forestomach														
Mucosa	-	-	-	+	+	++	+	-	-	-	+	++	++	++
Submucosa	-	-	-	+	++	++	+	-	-	-	+	++	++	+
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Glandular stomach														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Small intestine														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Large intestine														
Mucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++
Submucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++
Myenteric plexuses	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Liver	-	-	-	-	+	++	++	+++	-	-	-	+	++	+++
Lung														
Bronchi and bronchioles	-	-	-	+	+	++	++	+++	-	-	-	+	++	+++
Alveoli	-	-	-	-	+	+	++	+++	-	-	-	+	++	++
Heart	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Presence of viral antigen: -, negative; +, occasional; ++, moderate; +++, frequent. ND, not determined.

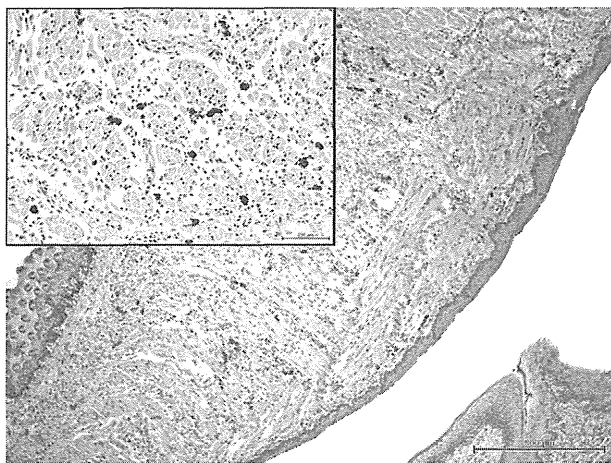


Fig. 3. Expression of EHV-9 antigen within macrophages in the tongue of an ICR mouse at 24 hpi. IHC. Bar, 500 μ m (Inset, 200 μ m).

uncoordinated movement at 72 hpi and thereafter, and the clinical signs continued until the end of the experiment at 96 hpi. All of the animals died during this hour so the planned schedule was not completed.

No gross abnormalities were detected in the internal organs of the hamsters inoculated orally with EHV-9.

The time—course distribution of microscopical lesions in the viscera is shown in Table 1. After inoculation (12 hpi) there was a slight inflammatory reaction, consisting mainly of macrophages, in the submucosa of the oral cavity and tongue, after which continuous moderate or severe inflammation was observed in the oral cavity. Starting from 36 hpi, slight to moderate inflammatory reactions, mainly lymphocyte and macrophage infiltrations, were observed in

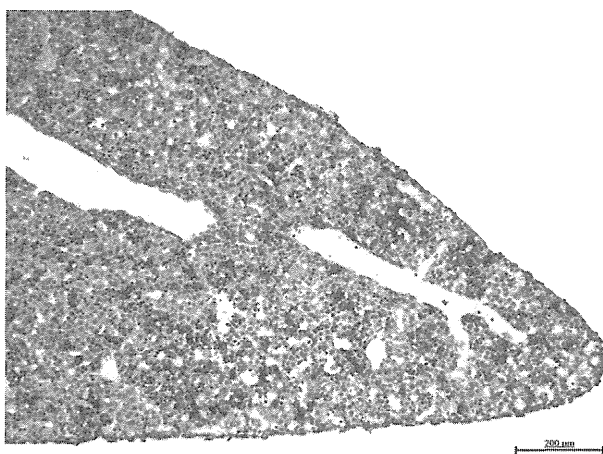


Fig. 4. Expression of EHV-9 antigen in the nucleus and cytoplasm of hepatocytes in an ICR mouse at 120 hpi. IHC. Bar, 200 μ m.

the submucosa of the forestomach, and the myenteric plexuses had slight degeneration at 72 and 96 hpi.

There were no significant lesions related to inoculation in the glandular stomach, except for moderate inflammation of the submucosa. In the small and large intestines, slight to moderate degenerative changes in the mucosal epithelium were observed after 48 hpi and slight degenerative changes and inflammatory reactions were seen in the myenteric plexuses at 72 hpi. At 96 hpi there was severe necrotic enteritis characterized by varying degrees of superficial necrosis of the villi with desquamation of the epithelium, and hyperaemia, haemorrhage, oedema and fibrinous exudation in the lamina propria, as well as lymphocytic inflammatory infiltration of the small and large intestines. In severely affected animals there was an associated peritonitis (Fig. 5a).

From 36 hpi there was slight to severe interstitial pneumonia characterized by extensive infiltration with inflammatory cells and thickened alveolar septa (Fig. 6a). In the liver there were mild to severe focal degenerative changes or necrosis of hepatocytes from 48 hpi, and frequent intranuclear inclusions appeared in the lesions in severely affected animals from 96 hpi.

Table 2 shows the time—course distribution and severity of microscopical lesions in the CNS. No abnormalities were detected in the CNS between 12 and 24 hpi. At 36 hpi, mild degeneration and vacuolation were observed in the nerve bundles of the trigeminal nerve, as well as in the pseudounipolar neurons of the trigeminal ganglia. These changes became more severe and were accompanied by inflammatory infiltration of lymphocytes into the trigeminal nerve and aggregation of lymphocytes in the ganglia by 48 hpi (Fig. 7a). At the same time (48 hpi), most of the affected hamsters exhibited mild lymphocytic meningoencephalitis characterized by various degrees of neuronal degeneration and necrosis, gliosis and perivascular aggregation of lymphocytes, plasma cells and neutrophils, starting around the root of the trigeminal nerve entrance at the level of the brainstem (Fig. 8a). There were also mild focal lymphocytic infiltrates in the meninges. In the spinal cord, at 96 hpi there was severe chromatolysis and/or karyorrhexis in degenerating neuronal cells. These cells (mainly in the cervical spinal cord) had frequent intranuclear inclusion bodies. In the grey matter of the spinal cord there was frequent necrosis of neurons, as well as gliosis and perivascular lymphocyte aggregation at 96 hpi (Fig. 9a).

Table 3 shows the time—course detection of EHV-9 antigen in hamsters inoculated with EHV-9. At 12 hpi there was intense labelling of EHV-9 antigen in migrating macrophages in the oral and lingual submucosa. Subsequently, more intense and frequent

Table 4
Time-course distribution of EHV-9 antigen in the CNS of animals inoculated orally with EHV-9

Animal	ICR mice								Suckling Syrian hamsters					
	Hours post inoculation								Hours post inoculation					
	12	24	36	48	72	96	120	144	12	24	36	48	72	96
Trigeminal ganglia and nerve	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	+	++	++	+
Brain														
Cerebrum														
Olfactory bulb														
Glomerular layer	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
Mitral layer	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	++
Granular layer	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	-	+
Thalamus	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	+	++
Hippocampus	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+	++
Midbrain	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	+	++	+++
Cerebellum	-	-	-	-	-	+	++	++	-	-	-	-	+	+
Brainstem														
Pons	-	-	-	-	+	++	+++	+++	-	-	-	+	++	+++
Medulla oblongata	-	-	-	-	-	+	++	+++	-	-	-	-	+	++
Meninges	-	-	-	-	+	++	++	++	-	-	+	++	++	+
Spinal cord														
Cervical portion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dorsal root ganglia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meninges	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++

Presence of viral antigen: -, negative; +, occasional; ++, moderate; +++, frequent. ND, not determined.

positive reactions were seen in macrophages in the oral cavity and tongue at 24 hpi; some of these cells were aggregating around nerve endings in this area (Fig. 10). In the forestomach, EHV-9 antigen was first detected in the stratified squamous epithelium at 36 hpi and thereafter was observed in the submucosa. The glandular stomach had no positive labelling, but the myenteric plexuses in this location expressed EHV-9 antigen later in the experiment. In the small and large intestines there was positive labelling of EHV-9 in the mucosa, especially in the small intestine, starting at 48 hpi and becoming more prominent afterwards (Fig. 5b). Intestinal myenteric plexuses expressed EHV-9 antigen at 96 hpi (Fig. 5c).

In the lungs, EHV-9 antigen was frequently observed in the bronchial and alveolar epithelium as well as the alveolar macrophages at 48 hpi and thereafter (Fig. 6b). In the liver, EHV-9 antigen was first observed in the hepatocytes at 72 hpi and thereafter, and continued to be present until the end of the experiment. Positive reactions were also observed in and around intranuclear inclusions in the hepatocytes at 96 hpi. In the heart, at 96 hpi there were frequent focal areas of labelling in the myocardium and these were observed less frequently in the pericardium (Fig. 11).

In the CNS (Table 4), EHV-9 antigen was detected in the nerve fibres of the trigeminal nerve (Fig. 7b) at 36 hpi and at 48 hpi in the nuclei and

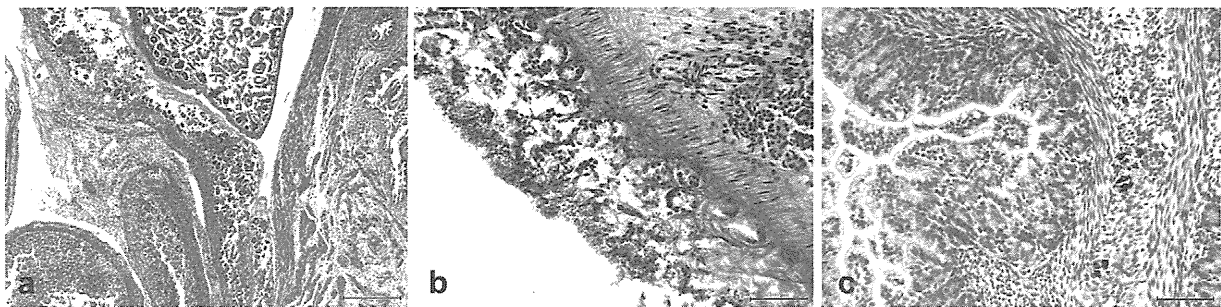


Fig. 5. (a) Necrosis of most villi and serosal adhesions of the small intestine of a suckling hamster at 96 hpi. HE. Bar, 500 μ m. (b) Expression of EHV-9 antigen in the mucosal layer of the small intestine of a suckling hamster at 96 hpi. IHC. Bar, 100 μ m. (c) Expression of EHV-9 antigen in the neurons of the myenteric plexus of a suckling hamster at 96 hpi. IHC. Bar, 100 μ m.

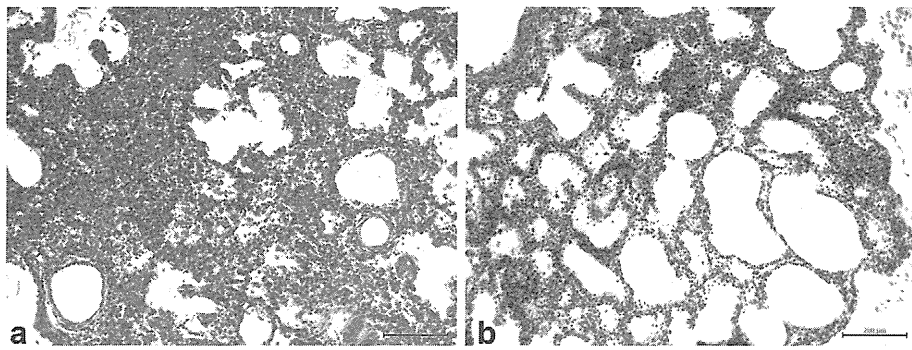


Fig. 6. (a) Interstitial pneumonia characterized by diffusely thickened alveolar septa with macrophage and neutrophil infiltration of the lung of a suckling hamster at 48 hpi. HE. Bar, 200 μ m. (b) Expression of EHV-9 antigen in the bronchial and alveolar epithelium and macrophages in the lung of a suckling hamster at 48 hpi. IHC. Bar, 200 μ m.

cytoplasm of pseudounipolar neurons of the trigeminal ganglia, the meninges and the brainstem (especially the pons and the root of the trigeminal nerve entrance) (Fig. 8b). EHV-9 antigen was found mainly in the pons at 48 hpi and had extended to involve the cerebellum, medulla oblongata, midbrain and glandular layer of the olfactory bulb by 72 hpi. By 96 hpi, EHV-9 antigen was detected in most parts of the brain, including all layers of the olfactory bulb, as well as in the spinal cord, especially the cervical portion (Fig. 9b). The time—course distribution of detection of EHV-9 antigen in the CNS is shown in Fig. 12a,b and c.

PCR Detection of EHV-9 DNA

EHV-9 DNA was detected in the brain of EHV-9 inoculated hamsters at 36 hpi and thereafter continued to be present until the end of the experiment at 96 hpi. In the spinal cord, EHV-9 DNA was detected only at 96 hpi. In the blood samples, EHV-9 DNA was first detected at 48 hpi and thereafter continued to be present for 3 days.

Discussion

EHV-9 is a newly recognized EHV that was first identified as the cause of fulminant encephalitis in a herd of gazelles in a Japanese zoo (Fukushi *et al.*, 1997). Unlike EHV-1, which is endotheliotropic (Edington *et al.*, 1986), EHV-9 shows strong neurotropism resulting in selective neuronal degeneration and necrosis. Fulminant EHV-9-associated encephalitis with marked neurological signs has now been detected in hamsters, rats, mice, dogs, cats, goats, common marmosets and cattle, raising fears of emerging EHV-9 infection.

A previous experimental study of the infectivity of EHV-9 to rodents by the nasal, oral, ocular, intravenous and intraperitoneal routes revealed that infection by the oral, intraperitoneal and ocular routes was possible, but did not explore the kinetics of the initial stages of infection (El-Habashi *et al.*, 2010b).

The aim of the present study was to clarify the pathogenesis of EHV-9-induced encephalitis after oral inoculation, which is thought to be among the most important routes for virus transmission not only for EHV-9, but also for other neurotropic viruses such

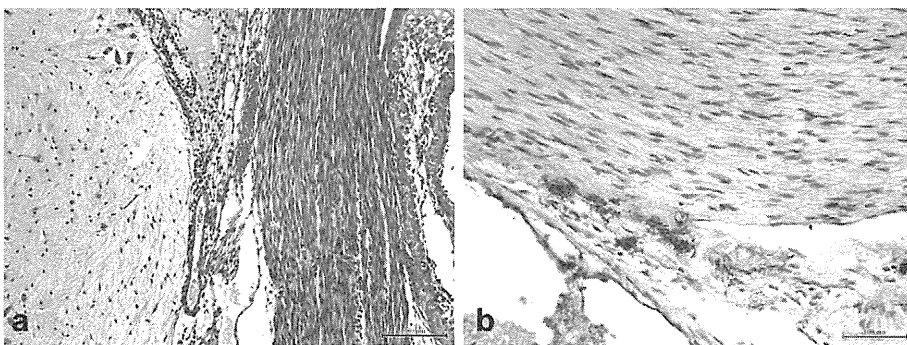


Fig. 7. (a) Neuritis of the trigeminal nerve and mild focal lymphocytic infiltration of the meninges of a suckling hamster at 36 hpi. HE. Bar, 200 μ m. (b) Expression of EHV-9 antigen in the trigeminal nerve fibres of a suckling hamster at 36 hpi. IHC. Bar, 100 μ m.

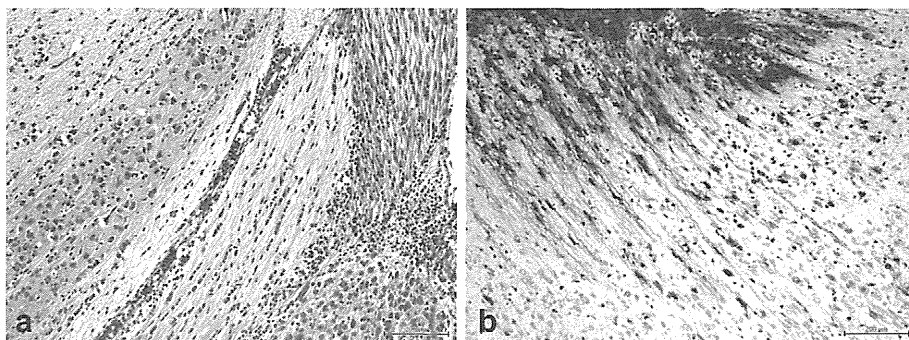


Fig. 8. (a) Neuronal degeneration and necrosis, gliosis and perivascular aggregates of lymphocytes, plasma cells and neutrophils at the root of the trigeminal nerve entrance into the brain of a suckling hamster at 48 hpi. HE. Bar, 200 μ m. (b) Expression of EHV-9 antigen at the entrance of the trigeminal nerve to the brain of a suckling hamster at 36 hpi. IHC. Bar, 200 μ m.

as pseudorabies virus, Theiler's murine encephalitis virus, bovine herpesvirus type-1 and herpes simplex type-1 (Hagemoser *et al.*, 1980; Ha-Lee *et al.*, 1995; Steiner and Kennedy, 1995). In order to focus on the time-course and distribution of infection, sections of the entire digestive tract, including the oral cavity, tongue, oesophagus, forestomach, glandular stomach and small and large intestines, were examined histologically and immunohistochemically. A Swiss roll technique (Moolenbeek and Ruitenbergh, 1981) was used to examine the entire intestinal tract in a single section. In order to examine the potential for the virus to move from the peripheral nerves or ganglia to the CNS, a suckling hamster model was employed (El-Habashi *et al.*, 2010a). Use of these animals made it possible to create sagittal sections that overviewed the nerve connections with the CNS in undecalcified tissue (El-Habashi *et al.*, 2010a). This model was particularly useful for accessing the trigeminal ganglia

and nerve with their connection to the brain at the level of the brainstem (pons), as well as connections between the dorsal route ganglia and spinal cord (El-Nahass *et al.*, 2011). By using both techniques, we were able to determine the time-course of infection and demonstrate the primary sites for virus propagation and replication.

In the present study, at 12 hpi EHV-9 viral antigen was detected in macrophages within the oral and lingual submucosa, suggesting a significant role for these cells in viral replication, propagation and transmission. At 24 hpi, a large number of infected macrophages had aggregated and invaded some nerve fibres related to the mandibular and maxillary branches of the trigeminal nerve, thus confirming the role of these structures in transmission of EHV-9 to nervous tissue and in facilitating virus transmission to the CNS. Macrophages may act as a trigger for the mechanism of virus propagation, transmission and spreading from macrophages to target cells, or may

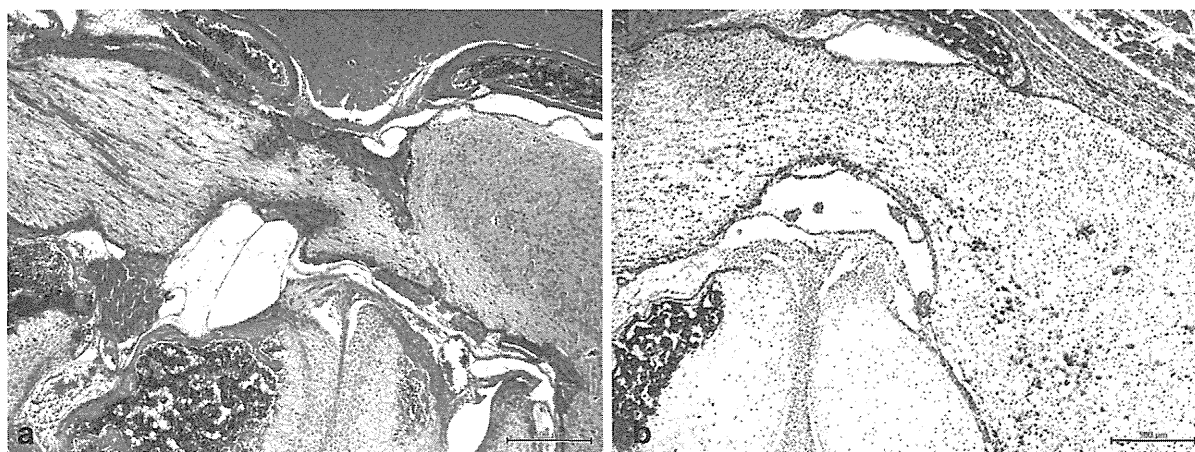


Fig. 9. (a) Meningomyelitis consisting of neuronal necrosis in the grey matter, gliosis and perivascular lymphocytic aggregation in the cervical spinal cord of a suckling hamster at 96 hpi. HE. Bar, 500 μ m. (b) Expression of EHV-9 antigen in the cervical spinal cord of a suckling hamster at 36 hpi. IHC. Bar, 500 μ m.

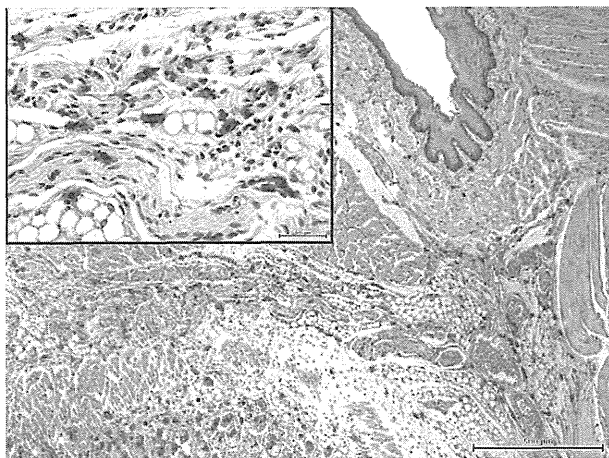


Fig. 10. Expression of EHV-9 antigen in macrophages in the submucosa of the oral cavity in a suckling hamster at 24 hpi. IHC. Bar, 500 µm (Inset, 100 µm).

serve as reservoirs for long-term infection (Bonina *et al.*, 1983; Wu, 2008; Waki and Freed, 2010). In the invasion of simian immunodeficiency virus (SIV) to the CNS, SIV-infected monocytes/macrophages are thought to play an essential role in virus trafficking. This phenomenon underlies the so-called 'Trojan horse theory' of neuroinvasion (Sasseville and Lackner, 1997). A similar mechanism may be involved in CNS infection with equine infectious anemia virus, maedi-visna virus, bovine immunodeficiency virus, caprine arthritis-encephalitis virus, feline immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus (Zink *et al.*, 2006). Other reports have suggested that macrophages and freshly recruited monocytes were responsible for the early capture of measles virus (MV), especially in acute infection (Roscic-Mrkic

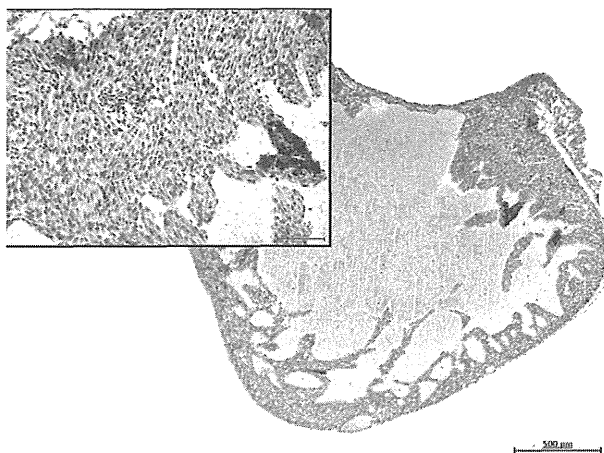


Fig. 11. Expression of EHV-9 antigen in the myocardium of a suckling hamster at 96 hpi. IHC. Bar, 500 µm (Inset, 100 µm).

et al., 2001). The significant role of macrophages has been reported not only after oral inoculation, but also following other routes of inoculation with some neurotropic viruses such as herpes simplex virus type-1, which was trapped by peritoneal macrophages and replicated in these cells following intraperitoneal inoculation of C3H/HeN mice (Bonina *et al.*, 1983) and EHV-9 following intraperitoneal inoculation (El-Nahass *et al.*, 2011).

Based on the results of the present study, it could be postulated that EHV-9 is transmitted mainly by the neuronal pathway, as indicated at 36 hpi by the development of multifocal trigeminal ganglionitis of varying degrees characterized by mononuclear cell infiltration, neuronophagia and neuronal loss in both the trigeminal ganglia and the root of the trigeminal nerve entrance into the brain. Furthermore, the detection of EHV-9 DNA in the brain of suckling hamsters at 36 hpi and from blood samples at 48 hpi was suggestive of a neuronal pathway in virus transmission, primarily via the trigeminal nerve, which is the largest cranial nerve and serves as the largest sensory nerve of the head and face, and the motor nerve of masticatory muscles.

Other reports support this model and show the neuronal transmission of some neurotropic viruses through the trigeminal nerve and ganglia to reach the CNS. This route of infection occurs with SIV, EHV-1, pseudorabies virus and herpes simplex virus. In SIV infection, the virus induces alterations in macaque trigeminal ganglia prior to the occurrence of encephalitis (Aleman *et al.*, 2001; Laast *et al.*, 2007; Pusterla *et al.*, 2010). In Aujeszky's disease virus (ADV) infection of pigs the virus disseminates through the maxillary nerve and trigeminal ganglia and can be isolated after 21 hpi from the trigeminal ganglia (Kritas *et al.*, 1995). Some herpesviruses have natural neurotropism to the trigeminal ganglia, as in the case of EHV-1 and -4 (Borchers *et al.*, 1997).

Another goal of this study was to detect and examine the pathological effects of EHV-9 in internal organs other than the CNS. After oral inoculation with EHV-9, focal erosive or ulcerative gastritis was induced in the forestomach of ICR mice without intestinal involvement, and more severe gastritis and diffuse necrotic enteritis with antigen detection in the myenteric plexuses were observed in the suckling Syrian hamsters. This might be attributed to a high susceptibility of suckling Syrian hamsters to EHV-9 compared with adult ICR mice. The observed necrotic enteritis was similar to that described in infection with ADV (Zhao *et al.*, 1996). Following oral inoculation of other neurotropic viruses (e.g. herpes simplex virus), the myenteric and Meisner's

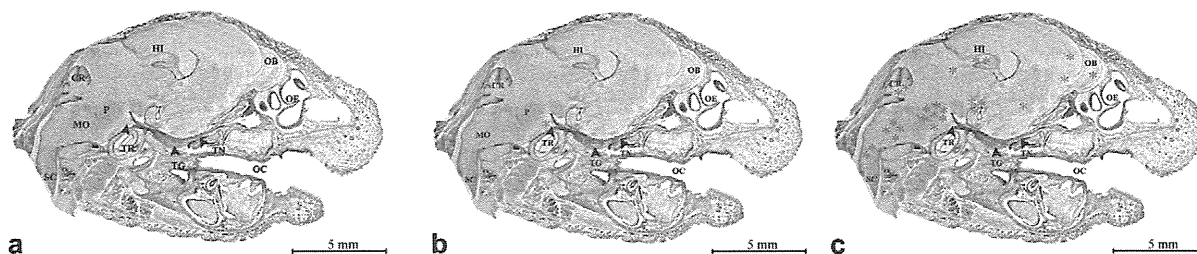


Fig. 12. Distribution of EHV-9 antigen in the brain of suckling hamsters (a) at 12 hpi, (b) at 48 hpi and (c) at 96 hpi. *Presence of viral antigen; OC, oral cavity; OE, olfactory epithelium; TN, trigeminal nerve; TG, trigeminal ganglia; TR, trigeminal root; OB, olfactory bulb; HI, hippocampus; CR, cerebellum; P, pons; MO, medulla oblongata; SC, spinal cord. IHC. Bar, 5 mm.

plexuses played essential roles in transmitting the virus to the CNS (Ha-Lee *et al.*, 1995; Gesser and Koo, 1996).

In the liver, foci of degenerative and necrotic hepatocytes, as well as the formation of intranuclear inclusions, were detected in the hepatocytes in both ICR mice and suckling hamsters. Moreover, positive EHV-9 immunolabelling implied virus replication, suggesting that the liver was a possible target organ for EHV-9 infection. Similar results were obtained after intraperitoneal inoculation of EHV-9 in suckling hamsters (El-Nahass *et al.*, 2011). A number of previous studies of EHV-1 infection have shown that the liver plays an important role in virus replication, especially during the initial stages of infection (Plummer *et al.*, 1973).

In conclusion, after oral inoculation of EHV-9 and based on time-course histopathological and immunohistochemical findings, it can be concluded that EHV-9 replicated and propagated in macrophages, especially in those in the submucosa of the oral cavity and tongue, and that these infected macrophages then spread to the maxillary and mandibular branches of the trigeminal nerve, followed by infection in the trigeminal ganglia and, finally, the CNS.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant-in-aid (emerging-general) for scientific research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan and a grant from the Ono Pharmaceutical Co, Ltd. We thank Miss C. Swift for proofreading the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with respect to their authorship or the publication of this article.

References

- Aleman N, Quiroga MI, Lopez-Pena M, Vazquez S, Guerrero FH *et al.* (2001) Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *Journal of Virology*, **75**, 469–479.
- Bonina L, Iannello D, Merendino R, Arena A, Mastroeni P (1983) Tumor-dependent resistance of rat peritoneal macrophages to herpes simplex virus. *Infection and Immunity*, **39**, 575–579.
- Borchers K, Wolfinger U, Lawrenz B, Schellenbach A, Ludwig H (1997) Equine herpesvirus 4 DNA in trigeminal ganglia of naturally infected horses detected by direct in situ PCR. *Journal of General Virology*, **78**, 1109–1114.
- Donovan TA, Schrenzel MD, Tucker T, Pessier AP, Bicknese B *et al.* (2009) Meningoencephalitis in a polar bear caused by equine herpesvirus 9 (EHV-9). *Veterinary Pathology*, **46**, 1138–1143.
- Edington N, Bridges CG, Patel JR (1986) Endothelial cell infection and thrombosis in paralysis caused by equid herpesvirus 1: equine stroke. *Archives of Virology*, **90**, 111–124.
- El-Habashi N, El-Nahass E, Fukushi H, Hibi D, Sakai H *et al.* (2010a) Experimental intranasal infection of equine herpesvirus 9 (EHV-9) in suckling hamsters: kinetics of viral transmission and inflammation in the nasal cavity and brain. *Journal of Neurovirology*, **16**, 1–7.
- El-Habashi N, El-Nahass E, Namihira Y, Hagiwara H, Fukushi H *et al.* (2011) Neuropathogenicity of equine herpesvirus 9 in cattle. *Journal of Equine Veterinary Science*, **31**, 72–77.
- El-Habashi N, Murakami M, El-Nahass E, Hibi D, Sakai H *et al.* (2010b) Study on infectivity of EHV 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. *Veterinary Pathology*, **47**, 1–7.
- El-Nahass E, El-Habashi N, Nayel M, Kasem S, Fukushi H *et al.* (2011) Kinetics and pathogenicity of equine herpesvirus-9 infection following intraperitoneal inoculation in hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, doi: 10.1016/j.jcpa.2011.01.009.
- Fukushi H, Taniguchi A, Yasuda K, Yanai T, Masegi T *et al.* (2000) A hamster model of equine herpesvirus 9 induced encephalitis. *Journal of Neurovirology*, **6**, 314–319.