

資料

小学校等で飼育されている鳥類の  
*Chlamydophila psittaci*  
保有状況

寺西 大<sup>1</sup>, 古川一郎<sup>1</sup>, 長谷川幸江<sup>1\*</sup>,  
尾上洋一<sup>1</sup>, 高野博道<sup>2</sup>, 木村真紀子<sup>2</sup>,  
小野内章<sup>2</sup>, 澁谷世司<sup>2</sup>, 大坂周蔵<sup>2</sup>

Prevalence of *Chlamydophila*  
*psittaci* from Birds, Bred in  
Elementary School.

Hiroshi TERANISHI<sup>1</sup>, Ichiro FURUKAWA<sup>1</sup>,  
Yukie HASEGAWA<sup>1\*</sup>, Youichi ONOUE<sup>1</sup>,  
Hiromichi TAKANO<sup>2</sup>, Makiko KIMURA<sup>2</sup>,  
Akira ONOUCHI<sup>2</sup>, Seiji SHIBUYA<sup>2</sup>  
and Shuzou OSAKA<sup>2</sup>

オウム病は、オウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* (*Chlamydia psittaci*) を病原体とし、オウム、インコ類などの愛玩鳥からヒトに感染する動物由来感染症である。ヒトにおいては、インフルエンザ様の症状を呈し、重篤な例では、肺炎や脳炎に発展する。

わが国では1999年4月に感染症法が施行され、本症が4類感染症として届け出が義務化され、発生数が把握されるようになった。2001年末から2002年初頭にかけての鳥根県の動物展示施設での、飼育担当職員及び来園者の17名のオウム病集団発生は大きな社会問題となった。

現在国内での飼育鳥の *C.psittaci* 分離率は10～53%にも及び<sup>1)</sup>、この *C.psittaci* 保菌鳥からヒトへの感染の危険性が疑われている。また、その多くは不顕性感染と推定される。

神奈川県では2000年4月から厚生労働省の「動物由来感染症予防体制整備事業」に基づき、県民の健康維持、公衆衛生の向上を図る目的で動物由来感染症に関する正しい知識の普及、様々な感染症の病原体保有状況に関する情報を調査分析する事業を、動物保護センター、衛生研究所が中心となって、関係機関の協力を得て実施している。

今回、県内小学校等で飼育されている鳥類の糞便につ

いて、*C.psittaci*の検出を試みたので、その調査結果及び対応について報告する。

2002年10月～2003年7月まで、県内の津久井地域及び足柄地域の小学校35校及び動物保護センター禽舎の計36施設で飼育されている鳥類56検体の糞便を採取し検査に供した。また、2003年10月～2004年2月までの期間に県中央地域の小学校47校で飼育されている鳥類48検体の糞便を同様に採取し、検査に供した。1禽舎に対して1検体試料を採取するものとし、同じ禽舎で複数飼育されていても、複数羽の糞便を集めて1検体とした。

検査の結果、*C.psittaci*が検出された場合には、治療し、再検査を行い、陰性化を確認した。

検査は「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン(暫定版)」<sup>2)</sup>に準拠したEIA法及びPCR法によりクラミジア科(*Chlamydophila*属及び*Chlamydia*属)抗原の検出を試みた。

2003年10月以降の検体については、2003年3月に改訂された「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン」<sup>3)</sup>に準拠してPCR法で検査を行った。

EIA法はイデアPCEクラミジア(協和メディックス)を使用した。このキットは、クラミジア科共通抗原を認識するため、スクリーニングとして使用し、PCR法で確認した。

Template DNA作製のためQIAamp<sup>®</sup> DNA Stool Mini Kit(キアゲン)を用いて糞便から試料調製を行った。

200mgの検体を2.0mlのマイクロチューブに入れて氷上に置き、Buffer ASL 1.4mlを添加後、1分間ボルテックスミキサーにより混合した。この懸濁液を70℃で5分間加熱後、15秒間ボルテックスを行い、15,000rpmで1分間遠心した。上清 1.2mlを新しい2.0mlのマイクロチューブに入れ、Inhibit EX錠1個を添加し、直ちに1分間ボルテックスを行った。室温で1分間静置後、15,000rpmで3分間遠心し、すべての上清を新しい1.5mlのマイクロチューブに入れ、15,000rpmで3分間遠心した。新しい1.5mlのマイクロチューブに15μlのProteinase Kを入れておき、これに遠心後の上清0.2mlとBuffer AL 0.2mlを加えてボルテックス後、70℃で10分間加熱した。この試料に99.5%エタノール(和光純薬)を0.2ml加えてボルテックス後、QIAamp スピнкаラムに添加した。

15,000rpmで1分間遠心して濾過液を除去し、QIAamp スピнкаラムにBuffer AW1を0.5ml添加し、15,000rpmで1分間遠心後、濾過液を除去した。さらにBuffer AW2を0.5ml添加し、15,000rpmで3分間遠心後濾過液を除去した。新しい1.5mlのマイクロチューブにQIAamp スピнкаラムを設置し、Buffer AEを0.2ml添加して室温で1分間静置後、15,000rpmで1分間遠心した。

1 神奈川県衛生研究所 微生物部  
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1  
\* 現 神奈川県衛生研究所 地域調査部  
2 神奈川県動物保護センター

回収した約0.2mlをTemplate DNA溶液として以下のPCRに使用した。なお、上記のDNA抽出は、すべてキットの試薬を使用した。

PCR反応のプライマーは、Yoshidaら<sup>4)</sup>により報告されたクラミジア科に特異的なMajor Outer Membrane Protein (MOMP) 遺伝子内の245-259bpを増幅させるために設計された2種類の合成オリゴヌクレオチド (CM1: CAGGACATCTTGTCTGGCTT, CM2: CAAGGATCGCAAGGATCTCC) を用いた。PCR反応液は、10XPCR GOLD Buffer 5  $\mu$ l, dNTP Mix (2mM each dNTP) 5  $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> Solution 3  $\mu$ l, AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l (以上アプライドバイオシステムズ社), プライマー (20pmol/ $\mu$ l)を各1  $\mu$ lずつ, Template DNA溶液を5  $\mu$ l, 滅菌精製水30  $\mu$ lを加えて全量を50  $\mu$ lとした。反応はタッチダウンPCRを行った。すなわち、94 10分の後、94 20秒, 65 20秒, 72 30秒を10サイクル繰り返すが、このときアニーリング温度を1サイクルごとに1  $\mu$ ずつ下げ、さらに94 20秒, 55 20秒, 72 30秒を35サイクル繰り返し、72 5分の最終伸長反応を行った。反応後、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによる染色後、紫外線照射により245-259bpのDNA断片の有無を確認した。クラミジア科遺伝子が検出された検体について、残りのPCR反応液からDNA精製キットGeneClean (BIO101)を用いて検出DNAを精製し、制限酵素処理を行った。PCR反応液から精製されたDNA断片について、Yoshida

ら<sup>4)</sup>の方法に従い、*Alu* (タカラバイオ) 及び *Pvu* (タカラバイオ) の2種類の制限酵素を用いてクラミジア科の種の同定を試み、PCRで増幅されたDNAが、これら2種類の制限酵素により切断されたことで *C.psittaci*を確認した。

2002年10月に採取した検体は、スクリーニング検査としてEIA法を用いて検査を行った結果、56検体中51検体(91.1%)がクラミジア科抗原陽性になった。確認のためにPCR検査を実施したところ、36施設で飼育されている鳥類56検体中7施設7検体から *C.psittaci*が検出された。陽性率は12.5%であった(表1)。2003年10月以降の検査はEIA法がガイドラインから削除されたため、PCR法のみでの検査を実施し、47施設で飼育されている鳥類48検体で2施設2検体から *C.psittaci*が検出された。陽性率は4.2%であった(表2)。

陽性の検体については、治療後再検査を行い、陽性検体の認められた動物保護センターの禽舎に侵入した、野生のスズメの糞便1検体についても検査を行った。

2003年2月の再検査では前回検査で陽性だった7検体のうち1検体が死亡したため、6検体について検査を実施したが1検体が再度陽性になり、治療を継続し、2003年7月の再々検査で陰性化した。野生のスズメの糞便1検体からも *C.psittaci*が検出された(表3)。

2003年10月の検査で陽性となった2検体は治療後の再検査でいずれも陰性化した(表4)。

表1 飼育鳥類糞便禽舎別のPCR法による *Chlamydophila psittaci*検出状況 (2002年10月実施)

種 類	検体数	<i>C. psittaci</i> 検出数	陽性率(%)
ニワトリ等	40	6	15.0
ハト	6	0	0
インコ等小鳥	8	0	0
アヒル等水鳥	1	0	0
キンケイ	1	1	100
合 計	56	7	12.5

表2 飼育鳥類糞便禽舎別のPCR法による *Chlamydophila psittaci*検出状況 (2003年10月実施)

種 類	検体数	<i>C. psittaci</i> 検出数	陽性率(%)
ニワトリ等	35	1	2.9
インコ等小鳥	9	1	11.1
キンケイ	1	0	0
ニワトリ, インコ	1	0	0
ニワトリ, アイガモ	1	0	0
ウコッケイ, キジ	1	0	0
合 計	48	2	4.2

表3 *Chlamydophila psittaci*感染鳥治療成績

No.	種 類	飼育施設	検査結果	再検査結果	再々検査結果
			2002年10月実施	2003年2月実施	2003年7月実施
1	ウコッケイ	A 小学校禽舎	+	-	
2	チャボ	B 小学校禽舎	+	-	
3	チャボ	C 小学校禽舎	+	-	
4	ウコッケイ, チャボ	D 小学校禽舎	+	+	-
5	キンケイ	E 小学校禽舎	+	-	
6	チャボ	動物保護センター禽舎	+	-	
7	スズメ(野鳥)	動物保護センター禽舎	+		

表4 *Chlamydophila psittaci*感染鳥治療成績

No.	種 類	飼育施設	検査結果	再検査結果
			2003年10月実施	2004年2月実施
1	セキセイインコ	F 小学校禽舎	+	-
2	チャボ, ウコッケイ, 雑種	G 小学校禽舎	+	-

*C.psittaci*が検出された小学校においては、動物保護センター職員が禽舎の清掃・消毒について指導を行った。また、児童による清掃等は自粛してもらった。併せて開業獣医師による抗生剤治療を行った。治療方法は、餌または飲水に抗生剤を混ぜる方法で、水分の多い野菜等の給餌は控えてもらった。動物保護センターにおける陽性鶏についても禽舎の清掃・消毒および隔離を行った。治療については、抗生剤1日1回筋肉注射を7日間連続実施と併せて、抗生剤飲水投与を1ヵ月半行った。同居陰性鶏についても同様に、予防措置として飲水投与治療を行った。また、陽性鶏の認められた禽舎については、金網等により野鳥の侵入を防ぐ措置と、定期的な消毒等の予防措置を行っていくこととした。

2002年1月に示された暫定版のオウム病の検査法等ガイドラインでは、EIA法によるスクリーニング検査は有効としていたが、2003年に改訂されたガイドラインではEIA法は削除されている。これは、国立感染症研究所が実施したPCR法との比較試験でEIA法のキットは特異性と感度の点で劣り、トリからのオウム病クラミジア抗原の検出におけるスクリーニング検査としては適当でないことが判明したためである。今回の成績においても2002年10月に実施したEIA法によるスクリーニング検査では非特異反応と考えられる陽性例が多数認められ、91.1%が陽性と判定されており、このことを裏付けていると推察された。

今回の調査で、小学校飼育鳥に*C.psittaci*感染が認められたが、オウム病の症状を示している個体は認められず、不顕性感染であることが示唆された。

小学校で飼育されることの多いニワトリやインコ類は*C.psittaci*に抵抗性を示し、不顕性感染となる例が多いので、その飼育には十分な注意が必要である。また、トリの治療に抗生物質を投与しても、わずかでも抗生物質が存在していればクラミジアが分裂せずに、細胞内に基本

小体として潜伏する<sup>9)</sup>ため、持続感染している*C.psittaci*を完全に排除できない場合がある。これは、基本小体に代謝活性がなく、ほとんどの抗生物質が効力を発揮しないことによる。従って、治療により、いったんは陰性化した個体でも定期的な調査が必要であると考ええる。

また、今回、禽舎に侵入する野生のスズメの糞便から*C.psittaci*を検出しており、禽舎に侵入する野鳥も*C.psittaci*を保菌していることが確認された。学校飼育鳥をオウム病感染から防ぐためにも、禽舎は野鳥の侵入を防ぐ構造にする必要がある。

学校飼育動物は鳥類が多く、それらの動物由来感染症に関する調査はほとんど行われていない。今後も調査を継続し、オウム病をはじめ人獣共通感染症に関する知見を集め、児童が安全に動物たちの近くで直に観察できる環境を整備していくことが必要と考える。

(平成16年7月28日受理)

#### 文 献

- 1) 三宅恭司, 森下高行: 鳥類のオウム病, 獣医畜産新報, No.802, 290-296 (1988)
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症課: 平成14年1月22日付事務連絡「小鳥のオウム病の検査法等ガイドライン(暫定版)」, 厚生労働省, (2002)
- 3) 岡部信彦: 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業「動物展示施設における人と動物の共通感染症対策ガイドライン」作成に関する研究分担研究報告書, (2003)
- 4) Yoshida, H., Kishi, Y., Shiga, S. and Hagiwara, T.: Differentiation of *Chlamydia* Species by Combined Use of Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Analysis, *Microbiol. Immunol.*, 42, 411-414 (1998)
- 5) 真田直子, 真田靖幸: 鳥クラミジア症, 獣医畜産新報, 57, 380-386 (2004)