

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580419

研究課題名(和文)ニワトリ類を宿主とする亜熱帯性の人獣共通皮膚糸状菌症原因菌の全国的疫学調査

研究課題名(英文)Epidemiological studies on zoonotic dermatophyte endemic in subtropical area originated from chickens

研究代表者

佐野 文子 (Sano, Ayako)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：10345001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯地方を流行地とする人獣共通皮膚糸状菌症原因菌 *Microsporium gallinae* の移入経路の解明、全国的な分布状況を明らかにする目的で行った。

成果は *Isolation of Microsporium gallinae from a fighting cock (Gallus gallus domesticus) in Japan*. が *Medical Mycology* に掲載された(2013 Feb;51(2):144-9)。現在、昨年度末までに国内で調査した793羽(ニワトリ645羽, シャモ148羽)について、*Mycopathologia* に投稿, 印刷中。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to investigate the immigrant route and distribution of zoonotic fungal specie: *Microsporium gallinae*, endemic in stropical area in our country. As a report; *Isolation of Microsporium gallinae from a fighting cock (Gallus gallus domesticus) in Japan (Medical Mycology, 2013 Feb; 51 (2) :144-9)* was published. In addition, another report on the fungal specie and related ones from 793 birds (chicken 645 birds, 148 birds Shamo) is in press, in *Mycopathologia*.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：人獣共通感染症 真菌 タムシ

## 1. 研究開始当初の背景

*Microsporium gallinae* は鶏類を宿主とする人獣共通皮膚糸状菌原因菌で、ヒトでの臨床症状は他の皮膚糸状菌と同様に発赤、水泡をともなった円形紅斑など体部白癬(タムシ)、頭部白癬(シラクモ)および爪白癬(爪水虫)である。また免疫不全患者では皮膚全体に波及し、重篤な症状に至ることが知られている。

*M. gallinae* は熱帯・亜熱帯地方に棲息する菌種と言われ、インド、イラン、パキスタン、ナイジェリア、アメリカ、ロシア南部、オーストラリア、ブラジルなどでシャモを含めたニワトリの保有率や分離例が報告されている。

一方、ヒト感染例はニワトリ類での保有が調査されている地域や熱帯・亜熱帯地域(パキスタン、イラン、ナイジェリア、イスラエル、プエルトリコ、ベネズエラ)だけでなく、近年ヨーロッパなどの寒冷な地域(フランス、スペイン、スウェーデン、旧チェコスロバキア、ドイツ)でもヒトや他の動物症例が報告されていることから、全世界的な拡散が示唆されている。

さらに従来、我が国には *M. gallinae* は存在しないとされてきたが、2008年、琉球大学のグループと共同研究で、沖縄県の男性に発生した飼育しているシャモが関連すると推測されたニワトリの白癬菌 *M. gallinae* による体部白癬症例を発表した(Miyasato et al., 2010) ことから、我が国も流行地であることが証明されている。

しかしながら、わが国ではニワトリを感染源とする皮膚糸状菌原因菌 *M. gallinae* についての生態調査は行われたことがなかった。

現在まで、我が国で *M. gallinae* によるニワトリ類の感染やヒトへの感染がほとんど問題視されなかったのは、本菌種にヒトが罹患するのは世界的にも稀であることに加え、ニワトリ類の症状は軽微で、皮膚の落屑が若干増加する程度であることが背景にある。

我が国の闘鶏家や日本鶏愛好家の聞き取り調査によると、シャモやニワトリの肉冠に落屑が発生すると馬油を塗って治療しており、抗真菌薬による積極的治療が行われていない。さらに我が国の闘鶏および日本鶏の品評会は全国的な交流により行われ、個体の交換も頻繁に行われているとの情報を得た。

そこで予備的に闘鶏の盛んな千葉県で闘鶏用シャモ14羽を調査したところ、1羽から *M. gallinae* が分離された。同時に同県および近隣の東京都、茨城県、静岡県などの日本鶏保存施設のニワトリ約300羽を調査したところ、*Chrysosporium* spp. が多数分離されたものの、本菌種は分離されなかった。

沖縄県でのヒト感染例および千葉県の闘鶏用シャモからの *Microsporium gallinae* の分離例は、我が国での本菌種の感染と感染源の存在を証明したことになり、医学、獣医学領域の微生物学、公衆衛生学などの教科書の記

述が変わる重要事項である。現在のところ、その他の地域についての調査を行っていないが、闘鶏の盛んな東北地方以北の調査によって、*M. gallinae* の我が国における北限が解明され、地球温暖化の生物学的指標としての意義をあわせ持つと考えられた。その他の地域の調査により、伝播経路の分子疫学的な解明も可能となると予測される。

さらに皮膚糸状菌症関連菌種の *Chrysosporium* 属菌種は多種分離されることが予測され、これらの菌種は新興真菌症原因菌およびその疫学の指標となるばかりでなく、産業用有用微生物としての価値を見いだせる可能性も含まれている。

従って *M. gallinae* は沖縄県地方だけでなく闘鶏により全国的に拡散していること、闘鶏にかかわっていない日本鶏保存施設のシャモやニワトリから本菌種が分離されなかったことから、闘鶏が *M. gallinae* の伝播にかかわっていることが示唆された。さらに *M. gallinae* および関連菌種の保有率調査と分子疫学的解析により地球温暖化に伴うわが国における人獣共通皮膚糸状菌原因菌の菌種変化の解明の基礎データとなることが予測された。

## 2. 研究の目的

今回の研究では、シャモを中心に保存日本鶏、産卵鶏などの *M. gallinae* および関連菌種の保有率を全国的に調査するとともに、沖縄県については本島だけでなく、南西諸島の主な島嶼(種子島~与那国島)を調べることに着想した。そして、分離菌株の遺伝子型を調べることにより、分子疫学的に *M. gallinae* および関連菌種の伝搬経路、移入経路を解明する基礎データおよび地球温暖化の生物指標としての有用性を評価することを目的とした。

## 3. 研究の方法

琉球大学の動物実験委員会の承認を受けて、日本国内で飼育されているニワトリとシャモを調査した。

18 mm 幅の Scotch tape (Sumitomo 3A, Tokyo, Japan) を 10 cm 用いた。両端 1 cm は折り曲げ、約 6 cm 長の接着面でニワトリなどの肉冠を挟み、落屑、フケを採集した。採集後、テープを 42°C で 4 時間加温し、ダニの除去を行った。このテープを chloramphenicol (100 mg/liter, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を添加した BBL™ Mycosel™ Agar (Becton Dickinson [BD]; Sparks, MD, USA) 平板培地、2枚にスタンプし、35°C で 28 日まで培養し、白色の集落集落を鈎菌し、A potato dextrose agar (Difco™ Potato Dextrose Agar; PDA, BD) スラントに植え替え、25°C で保管し、菌学的、分子生物学的同定を行い、本州と南西諸島に分けて比較した。

#### 4. 研究成果

総計 793 羽(ニワトリ 645 羽, シャモ 148 羽)の肉冠について皮膚糸状菌および関連菌種の保有率を調査した. 目的とした菌種は 793 羽中 195 羽 (24.6%) から分離された. 分離菌株は 224 株で *Arthroderma* (*Ar.*) *multifidum* 111 株, *Aphanoascus* (*Ap.*) *terreus* 83 株, *Uncinocarpus queenslandicus* 5 株, *U. reesii* 2 株, *Ap. pinarensis*, 2 株, *Amauroascus* (*Am.*) *kuehnii*, *Ar. simii*, *Gymnoascus petalosporus* および *Microsporium gallinae* がそれぞれ 1 株, *Chrysosporium*-like (*Chrysosporium* spp.) が 28 株であった. 温帯地域の本州と亜熱帯地域の南西諸島, 性, 鶏種, 飼育状況 (個人飼育と農場) および飼育環境 (ケージ飼育と平飼) を比較したところ, 本州では *Ap. terreus*, 南西諸島では *Ar. multifidum* が主要分離菌種であった. ヒトおよび動物に病原性があると報告されている菌種は *M. gallinae* と *Ar. simii* がそれぞれ一株ずつ分離され, 全体の 0.025% にすぎなかった. また, 配列は GenBank database に AB861650-AB861872 として登録した.

*M. gallinae* は *M. gallinae* が千葉県で飼育されている 10 ヶ月齢のシャモから分離された. 肉冠は丸冠型で白色の落屑が認められた (写真 1).



写真1. *Microsporium gallinae* が分離されたシャモ.

初代分離株はやや黄色を帯びた白色綿毛状で, 35°C 培養, 2 週間目に直径 1.2 cm の培地内に鮮紅色の色素を拡散した集落として Mycosel<sup>TM</sup> 平板培地上に出現した.

この分離株を SDA 平板培地上で 25°C, 21 日間培養したところ, 直径は 5.7 cm, わずかに培地中にイチゴ赤色の色素を拡散していた. 一方, 同様に培養した PDA 平板培地上では集落はピンク色を帯びた灰白色フェルト状で, 直径は 3.7 cm, 培地中に鮮紅色の色素を拡散していた (写真 2).

SDA 寒天ブロックで 25°C, 28 日間培養した標本では, 隔壁のある菌糸に少数の 4~6 細胞性の大分生子 (4 - 7 × 12 - 18 μm) および単細胞性で卵円形または洋梨型で直径 1 から 2 μm の小分生子が菌糸に直角に

付着しているのが観察された. 一方, PDA ブロックでは菌糸のみ生育し, 分生子はほとんど観察されなかった (写真 3).

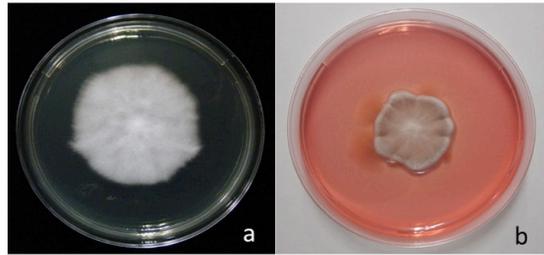


写真2. SDA (a) および PDA (b) 平板培地上の集落. (25°C, 21 日)



写真3. (a) SDA 寒天ブロックで 25°C, 28 日間培養した標本では, 隔壁のある菌糸に少数の 4~6 細胞性の大分生子 (4 to 7 × 12 to 18 μm) および単細胞性で卵円形または洋梨型で直径 1 から 2 μm の小分生子が菌糸に直角に付着しているのが観察された. (b) PDA ブロックでは菌糸のみ生育し, 分生子はほとんど観察されなかった. バーは 10 μm を示す.

*M. gallinae* および *A. grubyi* を用いた交配試験ではいかなる組み合わせにおいても孢子囊殻は形成されなかった.

ITS1-5.8S-ITS 2 region of the rRNA 遺伝子は 597 塩基からなり, GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) の accession number AB455805 (IFM 56900 : 沖縄の患者由来株の同領域の配列) と 99% 相同であった.

なお, 本分離株は千葉大学真菌医学研究センターのナショナルバイオリソースプロジェクトの一環として IFM 58803 と登録し, 遺伝子配列は AB667976 として GenBank database に登録した.

*M. gallinae* の ITS1-5.8S-ITS 2 region of the rRNA 遺伝子型は maximum parsimony tree を作成したところ, 2 つのクラスターに分かれた. 一つのクラスターは主に *M. gallinae* によって構成され, もう一つのクラスターは主に *A. grubyi* で構成されていた.

今回の分離株も沖縄県の患者由来の分離株も遺伝子配列は異なるものの, 同じクラスターに属していた.

一方, ヒトの *Ar. simii* 感染は前世界的に分布していると海外では報告されているが, 輸入されたチンパンジーでの分離例がわが国で報告されているが, 今回のシャモから分離された株は, 土着の動物からの初分離例である.

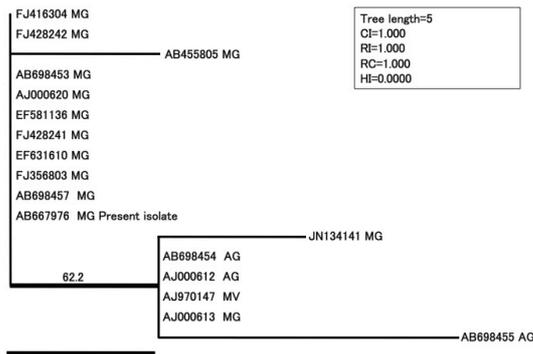


写真4. ITS1-5.8s-ITS2 rRNA 遺伝子配列を用いて作成した maximum parsimony tree. 50%以上のブートストラップ値の分岐点を図中に示した。バーは1塩基の違いを示す。データは accession numbers と菌種で示した。MG, *Microsporium gallinae*; AG, *Arthroderma grubyi*; MV, *Microsporium vanbreuseghemii*. CI, consistency index. RI, retention index. RC, rescaled consistency index. HI, homoplasy index.

飼育地域、性別、品種、飼育状況および飼育形態別の分離率をしらべたところ、本州は南西諸島に比べ優位に高い保有率( $P < 0.001$ )でオッズ比は 1.6216 であった。

雄の保有率は雌より優位に高く( $P < 0.001$ )、オッズ比は 1.9657 であった。本州では雌雄差は認められなかった。一方、南西諸島の雄は雌より優位に高い保有率で( $P < 0.001$ )、オッズ比は 2.2203 であった。

シャモの皮膚糸状菌関連菌種の保有率は性別に関係なくニワトリよりも優位に高く( $P < 0.001$ )、オッズ比は 1.9762 であった。雌のニワトリとシャモを比較するとシャモが優位に高く( $P < 0.001$ )、オッズ比は 4.6344 であった。本州ではシャモが優位に高い保有率で( $P < 0.001$ )、オッズ比は 3.1674 であった。しかし、南西諸島ではニワトリとシャモの保有率に優位差は認められなかった。

飼育状況では個人飼育の方が農場よりも優位に高い保有率で( $P < 0.01$ )、オッズ比は 1.6718 であった。雄、雌ともに飼育形態での差は認められなかったが、南西諸島では個人飼育で優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 2.0849 であった。

飼育形態では平飼のほうがケージ飼育よりも優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 2.7769 であった。雄では飼育形態での差は認められなかったが、雌では平飼のほうがケージ飼育よりも優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 3.7012 であった。本州でも飼育形態による差は認められなかったが、南西諸島では平飼で優位に高い保有率を認め( $P < 0.001$ )、オッズ比は 4.0629 であった。

*Ar. multifidum*, *Ap. terreus* および 1. 研究 *Chrysosporium* spp. は飼育地域、性別、品種、飼育状況および飼育形態に関係なく分離された。*U. queenslandicus* は本州の個体ごとにケージで飼育されているニワトリで、雌雄ともに分離された。その他の菌種は南西諸島に限られていた。*U. reesii* はシャモで分離された。*Ap. pinarensis* は雌のニワトリから、*Am. kuehnii* は雄のニワトリから、*Ar. simii* はシャモより分離され、これらの個体はいずれも個人飼育でケージを用いて飼育されていた。一方、*G. petalosporus* は農場で飼育されている雌のニワトリから分離された。

*Ar. multifidum* は南西諸島で優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 7.4622 であった。本菌種はニワトリで高い保有率を示し( $P < 0.05$ )、オッズ比は 1.9518 であった。*Ap. terreus* は本州で優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 4.7866 であった。*Ar. multifidum* ( $P < 0.001$ ; オッズ比 1.9861)および *Ap. terreus* ( $P < 0.001$ ; オッズ比 4.1033)は個人飼育で優位に高い保有率を示した。また、*Ar. multifidum* はケージ飼育で優位に高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 2.4464 であった。一方、*Ap. terreus* は平飼で高い保有率を示し( $P < 0.001$ )、オッズ比は 3.2430 であった。

*M. gallinae* のシャモ殻の分離について考察すると、最近、*M. gallinae* の流行地はヨーロッパ各国での症例が報告されている事から、熱帯や亜熱帯地域に限らず、温帯地域にも広がっているのは明らかである。Miyasato らのヒト症例の報告に続き、今回のシャモからの分離株によって、日本も *M. gallinae* の流行地の一つである事が示唆された。

興味ある事に、今回の分離株と我が国の患者分離株の ITS1-5.8S-ITS 2 region of the rRNA 遺伝子の配列が異なる事から、少なくとも 2 位電子型が存在する事は明らかである。また、付加としてこの遺伝子の系統解析から、*M. gallinae* と *A. grubyi* は別種である事が示唆された。また、今回交配が成立しなかったことも別種である事を示唆していた。

現在のところ我が国では 2 例しかないのに *M. gallinae* がどのようにして移入してきたのかは不明である。ヒト症例が報告される以前のニワトリについての報告は見当たらない。しかしながら、シャモにおける *M. gallinae* 感染は軽微であり、ヒトの白癬もほかの皮膚糸状菌 (例えば *M. canis*) によって発症するものと極めて類似している事から、多数のヒト症例および動物症例が見逃されてきたと考えられる。

気象庁のデータによると本州の温帯地域を代表とする東京の平均気温は 16.8°C、一方、南西諸島を代表とする那覇は 23.1°C である。本州のニワトリの皮膚糸状菌および

関連菌種の保有率は南西諸島よりも優位に高かったことから、平均気温との関連性は無い事が示唆された。

雄の方が雌より、シャモのほうがニワトリよりも高い保有率は活発な行動と関連していると思われた。また、個人飼育の方が高い保有率を示した事は2011年11月まで法律で届け出義務が科せられていなかったため、飼育管理が行き届いていないことが示唆された。土壌との直接接触も飼育環境の真菌叢を反映して、高い保有率に関連していると思われた。

今回の調査研究で、病原性真菌は *Ar. simii* と *M. gallinae* がそれぞれ1株ずつ分離されたにすぎず、保有率としては2/793、すなわち0.025%であった。さらにこれらの菌種はまれに人獣共通真菌感染症を引き起こすにすぎないと考えられた。

興味ある事に、*Ar. multifidum* と *Ap. terreus* は地域的分布に特徴が見られた。*Ar. multifidum* は南西諸島に、*Ap. terreus* は本州に多い菌種で、おそらく気候や環境に起因すると思われた。

これらの主要分離菌種はおそらく非病原性である。Chanasee らによると *Ar. multifidum* のモルモットの皮膚に対する病原性は陰性であると報告されている。よって現在のところ、*Ar. multifidum* による感染は特別な注意は必要ないと思われた。*Ap. terreus* はケラチン好性菌として知られ、土壌や鳥類から分離されているが、病原性については報告されていない。

*Uncinocarpus queenslandicus* (*Chrysosporium queenslandicus* anamorph) はインドの屋内、エジプトやクウェートの土壌から分離されている。この菌種はヘビに病原性があると報告されている。また今回の分離例はわが国では初めての分離例に相当した。

*U. reesii* は高度病原性真菌症原因菌、例えば *Coccidioides spp.* や *Paracoccidioides spp.* に関連した菌種である。本菌種はインド、エジプトで記録されているが、この菌種もわが国では初分離例である。

今回分離された *Ap. pinarensis* はキューバの分離株 (AJ439433) と ITS 領域の配列が99%相同であった事から菌種を決定したが、菌学的に記載されている本菌種に特徴的な子嚢胞子は観察されなかった。

*Am. kuehnii* はインドの土壌からの分離例が報告されている。しかしながら、ITS 領域の遺伝子配列において本菌種内の種内多型は10%以上ある。本菌種の ex-type strain CBS 539.72 由来配列との相同性は98%であったが、その他の配列とは99%以上であり、BLAST サーチの簡易クラスター解析では同一クラスターに位置した事から、*Am. kuehnii* と同定した。

*G. petalosporus* は野鳥保護区から分離されていることから、ニワトリの飼育環境と

関連した菌種である事が示唆された。

*Chrysosporium spp.* に関しての詳細な同定は将来の課題である。*Chrysosporium spp.* は、家きん類で病原性真菌が報告されているばかりでなく、頻繁に鳥類の羽や動物に関連した環境から分離されている。ヒトでは爪真菌症や全身感染症が報告されている。しかしながら、今回の分離株では病原性 *Chrysosporium spp.* に一致する ITS 領域の配列は認められなかった。

以上より、今回の調査で本州の主要菌種は *Ap. terreus*、一方、南西諸島は *Ar. multifidum* と判明した。また病原性菌種は *M. gallina* と *Ar. simii* で、全体の0.025%であった。ニワトリ類は人獣共通皮膚糸状菌症原因菌の温床となる危険は少ないが、ゼロリスクではないことを記憶しておきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Yamaguchi S, Sano A (ほか19名, 含む連携研究者全員): Isolation of dermatophytes and related species from domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*). Mycoapthologia, 2015, in press. (DOI: 10.1007/s11046-014-9758-0). 査読あり
2. Murata M, (ほか14名, 含む連携研究者: 知花, 村上, 細川, 上里) Sano A: Isolation of *Microsporum gallinae* from a fighting cock (*Gallus gallus domesticus*) in Japan. Medical Mycology, 51: 144-149, 2013. 査読あり
3. 佐野文子: エキゾチックペットの新興・再興真菌症. 獣医畜産新報 66:109-115, 2013. 査読なし

[学会発表] (計2件)

1. 山口さやか, 佐野文子, ほか18名 (含む連携研究者全員): ニワトリの皮膚糸状菌症原因菌および関連菌種の保有率調査. 第13回 人と動物の共通感染症研究会学術集会. 平成25年11月2日, 国立感染症研究所・戸山研究庁舎 (東京).
2. M. Murata, A. Sano, ほか10名: Isolation of *Microsporum gallinae* from a fighting cook (*Gallus gallus domesticus*) in Japan. ISHAM: International Society for Human and Animal Mycology. 2012年06月11日~2012年06月15日. Berlin, Germany.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.u-ryukyu.ac.jp/wp/ayasan>

o

普及活動（招聘講演）

佐野文子：皮膚真菌症の検査. 千葉県獣医師会 講習会. 2013年10月6日, カンデオホテルズ千葉（千葉県千葉市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐野 文子 (SANO Ayako)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：10345001

### (2) 研究分担者：なし

### (3) 連携研究者

平川守彦 (HIRAKAEA Morihiko)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：90175555

伊村嘉美 (IMURA Yoshimi)

琉球大学・農学部・准教授

研究者番号：40336326

川本康博 (KAWAMOTO Yasuhiro)

琉球大学・農学部・教授

研究者番号：90214709

寺嶋芳江 (TERASHIMA Yoshie)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授

研究者番号：20521909

知花博治 (CHIBANA Hiroji)

千葉大学・真菌医学研究センター・准教授

研究者番号：30333488

村上 賢 (MURAKAMI Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

細川 篤 (HOSOKAWA Atsushi)

AM皮膚科クリニック

研究者番号：10181497

上里 博 (Uezato Hiroshi)

琉球大学・医学部・教授

研究者番号：60160157