

「小鳥のオウム病の検査方法等ガイドライン」

本ガイドラインは、国内の動物展示施設におけるオウム病集団感染事例の発生(注1)を受けて、迅速にトリのオウム病クラミジア (*C. psittaci*) の試験室内検査を実施するために必要な検体採取方法および検査方法と、検査の結果陽性となったトリの治療方法について、実地試験を含む検討を行って取りまとめたものである(注2)。

(注1) 病原微生物検出情報 IASR. Vol. 23, No. 10, 2002 参照

<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/23/272/tpc272-j.html>

発行：国立感染症研究所・厚生労働省健康局結核感染症課

(注2) 本ガイドラインをもって、平成14年1月22日付け厚生労働省結核感染症課事務連絡「小鳥のオウム病の検査方法等ガイドライン(暫定版)」を改訂するものである。

1. トリの試験室検査と治療のフローチャート

検査と治療の手順は以下のとおりである。

(検査と治療のフローチャート)	(ガイドラインの記載箇所)
トリの総排泄腔スワブ・糞便の採取等	2-1)-(1)
検体調整	2-1)-(2)
PCR 法による検査	2-1)-(3)
検査結果の判定	2-2)
陽性となったトリの治療	3-2)

2. 試験室内検査の詳細

1) 検査方法

(1) トリの総排泄腔スワブ・糞便の採取等

採取にはいずれもマスク、手袋を着用する等して感染に注意する。

総排泄腔スワブ

トリを保持固定し、滅菌綿棒を総排泄腔に挿入し、回転させて採取し、スクリューキャップ付きの容器に移して4℃で保存し輸送する。長期保存する場合は-80℃に凍結保存する。

糞便

できるだけ新鮮な便をディスポーザブルのヘラ等で採取し、スクリューキャップ付きのプラスチック容器に移して4℃で保存し輸送する。長期保存する場合は凍結保存する。

(2) 検体の調整

操作については実験室内感染に注意する。

総排泄腔スワブ

スワブが入っているチューブに滅菌した PBS 約 2ml を入れ、十分な Vortex をかけ、低速遠心し (1000 ~ 1500rpm、5 分程度)、上清を回収する。この回収した上清を DNA 抽出材料とする。

トリ糞便

糞便検体は溶けやすい場合、滅菌 PBS を加えて Vortex をかけ、低速遠心し (1000 ~ 1500rpm 5 分程度)、上清を回収する。この回収した上清をさらに 15000 rpm 30 分程度遠心し、沈渣を DNA 抽出材料とする。乾燥糞便で Vortex のみで溶けにくい場合は、10 ~ 20% 乳剤を作成した後、低速遠心後、同様に処理し、DNA 抽出材料とする。乳剤作成にはホモジナイザー (滅菌済み) を用いると良い。

(3) PCR による検査

DNA 抽出については、抽出キットが市販されているので利用すると良い。PCR および制限酵素切断による確認は、種々の方法が報告されているので、その方法に準じて行なう。(具体的な方法は後述の参考例を参照)

2) 検査結果の判定

(PCR 陽性の場合)

一見健全なトリでも *C.psittaci* の保菌率は 2 ~ 3 割と高率であるとされる。トリが病気になったり、体調を崩した際に大量に糞便中にクラミジアを排菌することは知られているが、健常時でも不規則に排菌するとされる。したがって陽性であった場合には治療の対象と判断する。

3. 治療について

1) 治療のタイミング

検査の結果が得られるまでには相当の期間を要することや、群れでの飼育では治療対象を区別することは困難である。これら種々の状況を考慮し、検体を採取した後、一斉に治療するという方法の選択が可能である。

2) 治療の実際

鳥種によって主食となる餌が異なるので、それぞれの鳥に合った投与法を考慮する必要がある。リキッドタイプ、ペレット等を主食とするトリでは餌に薬剤混入を行なう。シード餌 (種実類) を主食とするトリでは、シードと薬剤を混和 (まぶす) するが、薬剤がつきにくいいため、飲水添加が良い場合もある。

3) 薬剤の投与方法

以下に示す投与方法の容量、期間は病鳥に対する投与方法である。予防投与の場合は期間を半分程度に短縮すること。

(1) クロルテトラサイクリン (CTC) 投与期間は 30 ~ 45 日間

餌に混ぜる場合

- ・ 小型-大型のオウム目のトリ

1000 ~ 2000ppm (1 ~ 2%) の濃度でペレットおよびソフトフードに混入し与える。シード餌には、0.5 ~ 1.0%を混ぜる。

- ・ ヒンコ科のトリ (ゴシキセイガイ等の nectar feeders)

ネクターフード (液状のエサ) 1000ml に対し CTC500mg の割合で混ぜて与える。

- ・ 猛禽類

1日に体重あたり 250 mg/kg の薬用量となるように、適宜ネズミ等に CTC を入れて与える。

飲水に混ぜる場合

- ・ ほぼすべてのトリ

CTC 濃度 500mg/1000ml の薬液となるように調整して飲水として与える。薬液以外に水分は与えない。特に果物、野菜等水分の多い食物を多給すると、薬液を飲まない個体が多い。薬液は 8 ~ 12 時間毎に調整しなおし、交換する。

(2) ドキシサイクリン (DOXY) 投与期間は 45 ~ 60 日間

餌に混ぜる場合

- ・ 大型のオウム目

餌 (ソフトフード) に対して DOXY 1g/kg (0.1%)、又はシード餌に対して 0.3g ~ 10g/kg (0.03% ~ 1%) となるように調整したものを与える。

- ・ 小型インコ、カナリア

餌 (ソフトフード) に対して DOXY 1 g/kg (0.1%) となるように調整したものを与える。

- ・ 猛禽類

1日に2回、体重あたり 25mg/kg の DOXY をネズミ等に入れて与える。

飲水に混ぜる場合

- ・ ほぼ全ての鳥

DOXY 濃度 100mg/100 ~ 120ml (0.083 ~ 0.1%) の薬液となるように調整して飲水として与える。

直接経口投与

- ・ 良くなれた鳥や雛鳥および強制給餌している病鳥 (20 ~ 50mg/kg/24hr)

(3) 食欲のないトリや薬剤入りの餌を拒否するトリに対して、筋肉内注射を行なう。DOXY では 5 ~ 6 日毎に 60 ~ 100 mg/kg の濃度を行い、食欲が出た後、食餌療法に変える。小型鳥 (一

般には 100g 以下の鳥) では注射によりショック死をする可能性がある。

4) 治療効果の確認

治療によるトリの完全な除菌は困難なこともあるが、糞便への菌排出の陰性化を治療効果の指標とする。個体識別可能なトリでは、治療による健康状態回復の観察のみでなく、総排泄腔スワブの *C.psittaci* 検出が陰性化することを確認することが望ましい。群れでも治療前と同様の検討をして比較することが望ましいが、治療効果確認は困難なこともある。

参考 1：本ガイドラインの検査方法の選定に際して行った考察

(別添を参照)

参考 2：検査試薬等に関する情報

遺伝子検出法 (PCR 法)

DNA 抽出試薬 PUREGENE (GENTRA 社)

セバジーン (三光純薬)

参考 3：本ガイドラインに関する問い合わせ先

国立感染症研究所 ウイルス第一部リケッチア・クラミジア室

岸本寿男、小川基彦

TEL 03-5285-1111 (内線 2534) FAX 03-5285-1208

4. 別添

参考1：本ガイドラインの検査方法の選定に際して行った考察

1. 対象検体の選定について

- 1) 通常、トリにおける *C.psittaci* 感染の有無の確認は、トリを解剖しその臓器から、分離培養、抗原検出法、遺伝子検出法等の種々の検出法によって行なわれる。生きた状態での検査は排泄物（以下糞便）や分泌物、また総排泄腔のスワブから *C.psittaci* を検出する方法がある。
- 2) 本ガイドラインではトリが生存した状態で、また複数のトリの検査を迅速に行なうことを想定し、検体として得ることが比較的容易なものを提示した。

2. 総排泄腔スワブおよび糞便を用いた検査法

1) 分離培養

感染性の有無を確定できる方法であるが、実施に特別な施設や経験を要すること、またバイオハザードの観点からも習熟した施設以外で行なうことは困難である。

2) 抗原検出法

(1) 直接蛍光抗体法（DFA）による染色

クラミジア属特異性のモノクローナル抗体（クラミジア FA: デンカ生研）が市販されている。感染が明らかな場合に感染部位を擦過したスワブ等で抗原陽性を確認する場合や、分離の有無を確認するために封入体を染色する場合には、DFA 染色は非常に有用である。しかし、通常のスクリーニング検査として用いる場合、判定に経験を要し、特に夾雑物の多い検体ではアーチファクトが多く判定困難なこと等から、複数検体の迅速な検査にはあまり適さない。

(2) 市販のクラミジア抗原検出キットの応用

ELISA および免疫クロマト法等の市販キットを応用した成績の報告があるが、今回、市販抗原検出キットを用い、総排泄腔スワブ、糞便からの検出を検討した成績では、感度、特異性共に問題があり、現状の使用法では不適當と考えられる。（IASR. Vol. 23, No. 10, 2002）

3) 遺伝子検出法（PCR 法）

感度や特異性に優れている。DNA 抽出については、抽出キットが市販されているので利用すると良い。PCR は種々のプライマーが報告されているので、その方法に準じて行なう。属特異的なプライマーを用いて PCR を行なった後、制限酵素切断によるパターンで確認を行なう方法（Yoshida H, et al. Microbiol Immunol. 42, 411-414, 1998）や、nested PCR を用いるもの（Messmer TD, et al. J. Clin Microbiol. 35, 2043-2046, 1997）等がある。なお糞便では、インヒビターによる偽陰性の可能性も高くなることに注意する。参考として感染研で用いている方法を以下に紹介する。

(1) DNA 抽出

PUERGENE™ DNA 抽出キットを使う場合

500 µl 検体を 1500 µl マイクロチューブに入れ 15,000rpm、30 分遠心する。上清を抜き、300 µl Cell Lysis Solution および 3~4 µl Proteinase K Solution を入れ、十分に Vortex して沈殿を浮遊させる。56 °C で一晩インキュベートした後、室温まで冷やす。100 µl Protein Precipitation Solution を加え、20 秒激しく Vortex し、氷中に少なくとも 15 分置く。15,000rpm で 10~15 分遠心し、上清を新しい 1500 µl マイクロチューブに移す。300 µl 100% Isopropanol (2-propanol) を加え、50 回程度転倒混和した後、室温で 15 分以上インキュベートする。15,000rpm で、5 分間遠心して上清を抜き、300 µl 70% Ethanol を入れる。再び 15,000rpm、5 分間遠心し、丁寧に上清を完全に抜きとり (DNA を失わないように) 乾燥させる (約 10~15 分)。20~50 µl DNA Hydration Solution を入れ、Vortex し、65 °C で 1 時間インキュベートし、PCR 用 DNA とする。

(2) PCR

プライマーは、1st PCR に Yoshida らの CM1/CM2 を用いている。

プライマ - 1 : CM1 CAGGACATCTTGTCTGGCTT
CM2 CAAGGATCGCAAGGATCTCC

PCR 反応液 (50 µl / sample):

10×PCR Gold Buffer	5 µl
dNTP Mix (2mM each dNTP)	5 µl
25mM MgCl ₂ Solution	3 µl
プライマ - CM1 (40pmol/µl)	0.5 µl
プライマ - CM2 (40pmol/µl)	0.5 µl
AmpliTaq Gold (5U/µl)	0.25 µl
DW	30.75 µl
Sample	5 µl

(3) 結果判定

5%Gel を作成し、PCR の産物を 10 µl/well 点注して 100mV、25 分間電気泳動する。Gel を Ethidium bromide (1.5mg/L) に入れ、1 時間染色し判定する。261bp のバンドを呈したものをクラミジア遺伝子陽性と判定する。

陽性の場合、さらにその PCR 産物を制限酵素で切断し、表 1 に示すように切断パターンで種の特特定を行なう。

表 1 CM1/2 にて増幅されたクラミジア 3 種の制限酵素切断サイズ

<i>Chlamydia</i> spp.	bp	<i>A</i> <i>l</i> <i>u</i> (bp)	<i>P</i> <i>v</i> <i>u</i> (bp)
<i>C. trachomatis</i> L2	245	90, 89, 66	245
<i>C. psittaci</i> 6BC	259	190, 69	189, 70
<i>C. pneumoniae</i> TW-183	258	199, 59	258

「アライグマに寄生するアライグマ回虫の検査等のガイドライン」

北米原産のアライグマに寄生するアライグマ回虫は基本的にアライグマ以外の動物で成虫になることはないが、ヒトやその他の動物がその虫卵を誤って経口摂取すると幼虫移行症を引き起こし致命的な中枢神経障害の原因となる（参考 1）。アライグマの棲息数の多い米国では、乳幼児等が自宅庭の芝生の上等を這う等して感染した事例が報告されており、衛生当局も注意喚起を行なっている（参考 2）。

わが国にも北米からアライグマが移入されているが、一部の動物園に展示されていたアライグマからアライグマ回虫が見つかっており、そのアライグマに近接した場所で飼育されていた他の動物がアライグマ回虫に感染し、神経症状を呈して死亡した事例も報告されている（参考 3）。

このような経緯から、我が国の動物園等で飼育されているアライグマについて十分な衛生管理を図るべくアライグマ回虫の検査方法等と、陽性となった場合の対応（特に飼育展示区域の虫卵汚染対策）について本ガイドラインで示すものである。

なお動物園等で飼育されるアライグマ以外にも、我が国にはペットから野生化したアライグマが生息しているが、これまでの調査ではアライグマ回虫は見つかっていない。本ガイドラインは、このような野生化したものや、ペットのアライグマ（最近、ペットとして販売されるアライグマは激減しているといわれており、新たな個体の輸入もほとんど見られない状況である）についても適用可能であり、幅広い活用を期待する（参考 4）。

アライグマ回虫についての参考情報

- 参考 1 「アライグマ回虫による幼虫移行症」
感染症発生動向調査（週報：IDWR）第 4 巻第 42 号, 16-18, 2002
<http://idsc.nih.go.jp/kanja/idwr/idwr-j.html>
- 参考 2 アライグマ回虫による脳炎 2000 年、米国・シカゴ、ロサンゼルス
CDC, MMWR, 50, No51&52, 1153-5, 2002
<http://www.cdc.gov/mmwr/PDF/wk/mm5051.pdf> （邦訳文：別添）
- 参考 3 「動物園、観光施設でのアライグマ回虫卵汚染問題」
病原微生物検出情報 Vol. 23, No. 8, 10-11, 2002
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/23/270/kj2705.html>
- 参考 4 「我が国への動物の輸入状況」厚生労働省健康局結核感染症課
http://www.forth.go.jp/mhlw/animal/page_b/b03-8.html

1. アライグマ回虫卵の検査方法

アライグマの糞便検査の方法は、ホルマリンエーテル法等の集卵法を用いる。土壌からの虫卵検査はシヨ糖液を用いた浮遊法で検出する。アライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*) の虫卵は、大きさは $63 \sim 88 \times 50 \sim 70 \mu\text{m}$ (平均 $68 \sim 76 \times 55 \sim 61 \mu\text{m}$) の円形又は類楕円形で、卵殻が厚く蛋白膜を有し、排出時の卵内容は単細胞である。これは回虫卵に共通の形態的特徴であるが、他の種類の回虫卵との鑑別が必要となる。

なお、検査の実施に際し、国立感染症研究所に検査を依頼する場合にあっては、事前に自治体担当者あるいは地方衛生研究所から連絡のうえ、次の送付方法に従って送付を願いたい。

1) 問い合わせと検査の依頼先

国立感染症研究所・寄生動物部第二室長 川中正憲

TEL: 03-5285-1111 (内線 2734) (FAX: 03-5285-1173)

E-mail: mkawan@nih.go.jp

2) 検体の送付採取および方法

(1) 糞便の場合

- ・可能な限り個体ごとに採取する
- ・個体識別が不可能な場合はなるべく多くの糞塊から採取する
- ・各々につき約 5g 程度採取する
- ・採取した糞塊ごとに密閉容器に入れ密栓する
- ・容器には、採取日、採取場所 (野外の場合)、性別、成獣/幼獣の別等を記入する
- ・輸送中液洩れして汚染することがないように容器をビニール袋に入れ密封したうえで発送する

(2) 土壌の場合

- ・通常アライグマが糞をする場所等複数箇所から各々表土を 50g 程度採取する
- ・採取場所ごとに密閉容器に入れる
- ・容器には、採取日、採取場所等を記入する
- ・容器をビニール袋に入れ密封したうえで発送する
- ・採取場所の見取り図を添付する

(3) 採取上の注意

- ・採取に用いた器具は必ず焼却あるいは熱湯処理をする

2. アライグマ回虫による環境の虫卵汚染

アライグマ回虫陽性のアライグマによって、どのように環境の虫卵汚染が進むのか次の事項を認識しておくことが重要である。

1) アライグマ回虫の産卵数

1日に雌1匹が産卵する虫卵数 : 115,000 ~ 179,000

2) アライグマが糞を通じて外界に排出する虫卵数

雌の寄生数が10匹の場合 : 1,150,000 ~ 1,790,000

50匹の場合 : 5,750,000 ~ 8,950,000

(注:自然界でのアライグマ回虫の寄生率と寄生数)

幼獣(7~9カ月):寄生率90%以上 寄生虫数1~480匹(平均48~62匹)

成獣(19~21カ月):寄生率37~55% 寄生虫数1~257匹(平均12~22匹)

(1982年11月~12月、米国インディアナ州での調査)

3) 虫卵の感染能力持続期間

排出された虫卵は最適条件(22~25℃、湿度100%)では11~14日後、感染可能な「幼虫包蔵卵」となり、これらの虫卵は数カ月から数年にわたって感染能力を保持し感染の機会を待つと考えられている。幼虫包蔵卵は実験的には4℃の条件で9~12年にわたって感染性を保持していたという報告がある。

4) 土壌

アライグマは棲息域または飼育展示域内で特定の場所を「トイレ」として使う為に、糞便を介した土壌の虫卵汚染は高濃度に汚染された場所が特定されることが多い。このような土壌については特に注意が必要となる。

5) 風塵

糞便と共に土壌に散布された虫卵が風により土塵として舞い、それと共に虫卵が飛散する可能性がある。したがって、風塵対策も必要である。

6) 池水と底土

糞便と共に池に落ちた虫卵が底土を汚染する。したがって、アライグマ回虫の駆虫は虫卵による汚染を飼育展示場から完全に除去するという計画の一部として実施されなければならない。

3. アライグマ回虫卵の処理法

アライグマ回虫卵の処理法としては、米国で実施されている方法を参考として次に列挙する。

1) 薬剤処理

虫卵は薬品等に対して強い耐性を持つため、除去が難しく漂白剤等の通常の殺菌剤に対しても強い抵抗性を示す。ただ、汚染範囲が狭く適用面が溶媒耐性であれば、キシレン:エタノールの1:1混液で処理することができる。漂白剤(1%次亜塩素酸ナトリウム)は、卵殻表面の蛋白膜を溶解除去するため水で洗い流し易くなり有用であるが虫卵を死滅させることはできない。

2) 熱処理

加熱は虫卵を死滅させるための最も効果的な方法である。熱湯、プロパン火炎筒、スチームクリーナー、オートクレーブ、焼却等の手段によって、汚染された面積の大小を問わず土壌、コンクリート、金属ケージ、柵、繫留用檻、道具・機材に適用することができる。特に、プロパン火炎筒の炎を利用することが殺卵に最も効果がある。

(1) 土壌の処理

土壌表面は、火炎で十分に焼いた後に表土をシャベルやくま手で何度か土を掘り返し、その都度火炎で焼くことを繰り返す。高度に汚染された土壌については、火炎処理後、表面土壌を数 10 センチ程剥ぎ取り新たに土を入れるか、あるいは盛り土をして汚染部分を完全に被うことが必要である。

(2) 汚染物質の処理

展示場や屋内にあるアライグマの乾燥便やその他の汚染物質（干し草、藁、落ち葉）は、注意深く集めて焼却処分をする。除去しきれなかった残渣はバーナーで焼くか、蒸気クリーナー処理、あるいはフィルター付きの掃除機で吸い取る必要がある。

3) 汚染区域内での作業者に対する注意

汚染区域で作業する人は感染防止のために、ディスポーサブルのカバーオール、ゴム手袋、ゴム長靴、フィルター付きマスクを身につけるべきである。作業終了後、ディスポーサブル品は、焼却あるいはオートクレーブ処理した後に廃棄し、ゴム長靴等は熱湯処理をする。

4) モニタリング

汚染除去作業の期間中は、定期的に土壌等からの虫卵検出試験を行ない、汚染のモニタリングを行なって除去作業が確実に行われたことを確認する必要がある。

4. アライグマ回虫の駆虫法

陽性アライグマが見つかった場合、虫卵による環境汚染を広げない為にコロニーの全頭に対して駆虫薬を投与することが先ず必要になる。しかしながら、飼育展示環境から虫卵を完全に除去しない限り再感染が起きることは避けることが出来ない。したがって、アライグマ回虫卵による汚染を飼育展示場から完全に除去するという観点からアライグマ回虫の駆虫は実施されなければならない。

1) 駆虫薬

イヌ、ネコ等の回虫用に市販されている駆虫薬がアライグマ回虫の駆虫にも効果がある。Bauer & Gey は、実際に次の駆虫薬をキャットフードに混ぜてアライグマに与え 100%の駆虫効果を確認している：パモ酸ピランテル（20mg/kg）、アイバメクチン（1mg/kg）、モクシデクチン（1mg/kg）、アルベンダゾール（50mg/kg, 3日連用）、

フェンベンダゾール (50mg/kg, 3 日連用)、フルベンダゾール (22mg/kg, 3 日連用)
(Vet Parasitol 60, 155-159, 1995)

2) 虫卵汚染を防止する駆虫薬の予防的投与

アライグマ回虫が成虫となって産卵を開始するまでの期間については、幼虫包蔵卵の経口摂取では感染後 50～76 日、中間宿主を介しての幼虫を摂取した場合には感染後 32 日と云われている。したがって、新たに感染したアライグマによる環境の虫卵汚染を防ぐ為には、1 月に 1 度の定期的な駆虫薬投与が必要である。

5. アライグマ回虫対策のポイント (検査実施から対応まで)

1) 対応の基本

管内のアライグマを飼育する動物園等に対し、アライグマ回虫についての情報提供を行ない、園側の依頼に応じて糞便検査の実施を進める。また、アライグマの近くで飼育する動物の神経症状等の異常の有無についても確認する。さらに、アライグマの新規導入時の検疫 (糞便検査) の実施を指導する。

2) 検査結果陽性の場合の対応

- (1) 虫卵による汚染を飼育展示域から完全に除去する計画の立案について指導を行なう。
- (2) 飼育者と来園者の健康を一義的に考慮し、飼育の規模と環境を良く勘案したうえで、アライグマの駆虫計画の実施あるいは淘汰を指導する。
- (3) 飼育展示環境の汚染除去のモニタリングの継続を指導する。
- (4) 陽性個体の導入先等の情報収集を行ない、適宜、必要な情報提供を行なう。

6. その他

1) 我が国におけるアライグマの生息場所は、動物の展示施設の園等他、野生、ペットショップ、および家庭があり、それぞれの生息地に応じた個別の対応が必要である。本ガイドラインは、そのようなアライグマの対応にも適用できるものであり、そのポイントは上述した動物園等での対応に準じる。

2) アライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*) はベイリスアスカリス属の回虫であるが、これに非常に近縁な回虫がスカンクに寄生していることが報告されておりそれによる幼虫移行症の発生も懸念される。したがって、動物園等の展示施設に飼育されているスカンクに寄生する回虫 (*Baylisascaris spp.*) についても、順次、アライグマ回虫対策と同じように「検査実施から対応まで」実施される必要がある

7. 参考「アライグマ回虫による脳炎---2000年、イリノイ州シカゴおよびカリフォルニア州ロサンゼルス」

(CDC, MMRW, 50, No.51&52, 1153-1155, 2002. 邦訳文, 参考2)

アライグマ回虫 (*Baylisascaris procyonis*) はアライグマの小腸に普通に見られる線虫であるが、人を始めとする様々な哺乳動物および鳥類に激症あるいは致死的な脳炎(神経幼虫移行症)を引き起こす。さらに人の眼球や内臓の幼虫移行症を引き起こすこともある。人へのアライグマ回虫の感染は、アライグマ回虫卵を含む糞便で汚染された、土壌、あるいは樹皮、木材チップ等を口から摂取することで引き起こされる。幼児は、異食や糞食、あるいは汚染された指や玩具等を口に入れるため感染のリスクが高い。この報告書は、シカゴとロサンゼルスの居住者に見られた2件のアライグマ回虫による脳炎のケースについて述べ、米国都市部においてアライグマやその糞便への接触を回避することの重要性を述べる。

シカゴ

2000年7月、鉄欠乏性貧血と異食症歴を持つ2歳位の男の子がシカゴ病院に入院した。この子供は8日間微熱が持続し、入院の3日前からは嗜眠、刺激に対する過敏反応および機能傷害の進行が見られた。脳炎の診断は、臨床所見と、末梢血中の好酸球増多(白血球:21,000個/mm³中28%)、脳脊髄液好酸球増多(白血球80個/mm³中の32%)、脳波における遅延波の拡散等の臨床検査結果によった。患者は入院24時間以内に、強直性発作と除脳様の姿勢を伴う昏睡状態に陥った。磁気共鳴画像法(MRI)では両小脳半球の深部白質中に異常が認められた。脳炎を起こす疾患として、単純疱疹、アルボウイルスや腸内ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎、麻疹、細菌感染、真菌感染、寄生虫症(トキシカラ症や囊虫症)等があげられるが、血液と脳脊髄液に関する直接検査、培養、血清学的検査およびPCR試験の結果からそれらは否定された。

間接蛍光抗体法(IFA)により脳脊髄液と血清からアライグマ回虫に対する抗体が検出されたが、入院中の4週間にその値は数倍に上昇して高い値(血清は1:1,024、脳脊髄液は1:4,096)を示した。その子供にはアルベンダゾールとコルチコステロイドが処方されたが、症状の改善は見られなかった。4週間の入院後、彼はリハビリセンターへ移され数カ月間そこで療養した。その後、自宅に戻されたが神経症状の改善は見られず、継続的な介護が必要な状態である。

入院の18日前、アライグマが普通に見られるシカゴ郊外で、その子が庭の近くの藪の中で遊んでいたとき口の周りを汚していたのを、両親が目撃している。2000年9月に実施された現場調査では、その庭の数カ所で採取されたアライグマの便からアライグマ回虫卵が検出されていた。密生した木の根元と土壌からは感染性を有するアライグマ回虫卵が回収され、その虫卵をハツカネズミに投与すると幼虫移行による致死性脳炎を発症した。

ロサンゼルス

2000年1月、高度の発育障害と土食症歴を持つ17歳の少年が、持続性の緊張亢進と反射亢進を伴う昏睡状態でロサンゼルス病院に入院した。彼の口は堅く閉じられ、その眼球は素早く動き回り、疼痛刺激にのみ反応した。入院の2日前に、彼は微熱、眠気があり、体の動きに変調が見られた。臨床検査により末梢血中の好酸球増多(白血球:15,900個/mm³中15%)と脳脊髄液好酸球増多(白血球:19個/mm³中37%)が認められた。患者は抗生剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、駆虫剤(アルベンダゾール)、抗炎症剤を処置されたが、症状の改善は認められな

った。脳脊髄液と血液検査からは感染性の病原体は検出されなかった。脳バイオプシーによる病理学的検査において線虫断端が検出され *Baylisascaris* であることがわかった。

Baylisascaris 抗原による IFA では脳脊髄液、血清の何れに対しても強い陽性を示しその値は各々 1:256、1:4,096 であった。その後患者の状態は悪化し、MRI による脳の深部白質層の異常像は広がり続けた。2 カ月間の入院後、彼は長期療養施設に転送されたが、1 年後に死ぬまで意識不明のままであった。

患者は、ロサンゼルス郡にある青年および成人のための発達障害者グループ・ホームに滞在していた。2000 年 2 月、患者がいつも遊んでいた庭を野外調査したところ数箇所のアライグマ糞便がある場所を特定し、砂場のサンプルからはアライグマ回虫卵を検出した。彼が立ち入りした庭の隣接地の多数の地点からもアライグマ回虫卵を含むアライグマ糞便が見つかった。

編集ノート:

1981 年以来、この報告書にあげた 2 つの例を含め、少なくとも 12 例の重篤あるいは致死的なアライグマ回虫の幼虫移行による脳炎がアメリカのカリフォルニア、イリノイ、ミシガン、ミネソタ、ニューヨーク、オレゴンおよびペンシルバニアで確認されている。12 例中 10 例の患者が 9 カ月から 6 歳の子供であり、その内 8 人は生後 19 カ月以下であった。その他にアライグマ回虫による眼幼虫移行症の例も確認されている。

アライグマ回虫に感染しているアライグマはアメリカのほぼ全域に生息しているが、感染率が最も高いのは中西部、北東部、西海岸のアライグマ (68~82%) である。感染アライグマは普通 1 日当たり数百万個のアライグマ回虫卵を糞便と共に排泄し、排泄された虫卵はおよそ 2~4 週間で感染性を有する幼虫包蔵卵となる。虫卵はほとんどの環境条件下で耐性を有し、適切な湿度があれば何年でも生残する。

人への感染は、感染性を有する虫卵の摂取により成立し、孵化した幼虫は胃腸管壁から様々な身体組織、内臓、目および中枢神経系に移動する。人における神経症状の重篤さは摂取した虫卵数、および中枢神経系に移行した幼虫数に依存する。中枢神経組織中の幼虫は激しい反応と組織損害を引き起こし、肉芽腫内に被包される。

人、特に子供の場合、アライグマ回虫による脳炎の診断には、突発性の好酸球増多性脳炎の発症および感染源への暴露歴 (例えばアライグマ糞便あるいは汚染された土を摂取した可能性) があるかどうかを確認すべきである。診断的所見として、脳脊髄液及び末梢血中の好酸球増多、MRI による深部白質の異常所見、脳脊髄液と血清の血清学的検査による陽性反応があげられる。

中枢神経系の損傷は症状が出る前に起こっているため、発症した患者を駆虫剤あるいは抗炎症剤で処置しても症状の改善を見ないことがしばしばある。推定感染日の 1~3 日以内に駆虫剤処理 (albendazole: 25~50 mg/kg/日、10 日間連続投薬) を開始すれば、中枢神経系に達する前に幼虫を殺せるので臨床症状の発現を予防できる可能性がある。したがって感染が推測される場合は迅速な対処が求められる。

アライグマ回虫感染の危険性を少なくするためには、アライグマとの直接の接触や都市部生息地への立入を避けること、食物や餌場へのアライグマのアクセスを遮断すること、およびアライグマ糞便に汚染された可能性のある地域および物への接触を制限することが推奨される。アライグマは基本的に、木の根元やその盛り上がった上、あるいは落ちた丸木や幹あるいは大きな岩が高く盛り上がった上に排便する。またアライグマ糞便は薪の束の上、ベランダ、屋上、屋根裏、ガレージおよび干し草置場の中で発見されることもある。糞便は通常黒色の筒状で、

刺激臭があり、しばしば未消化物を含んでいる。アライグマ回虫卵を除去するには、糞便や汚染物を注意深く取り除き、焼却あるいは埋め立てし、あるいは埋め立て式ゴミ処分場に送らねばならない。作業は手や衣服が汚染しないよう注意が必要である。デッキ、テラス等の表面は熱湯処理することができる。排泄直後の虫卵が感染性を有するまでには少なくとも2~4週間かかるので、アライグマ糞便の迅速な除去および処分により汚染と感染のリスクを減らすことができる。

参考文献は省略 CDC, MMWR, 50, No51&52, 1153-5, 2002

「動物園におけるウエストナイル熱（米国での対応の紹介）」

1. 米国でのWNV流行状況について

ウエストナイルウイルス（WNV）はフラビウイルス科フラビウイルス属に属し、アカイエカ、チカイエカ等を主な媒介蚊とするウイルスであり、通常はトリと蚊の間で感染環が形成されている。本ウイルスはアフリカ、中東、ヨーロッパやロシア、インド、インドネシアの一部で流行しているが、西半球では1999年ニューヨークで初めて報告されて以来爆発的な勢いで感染が拡大している。本年1月8日現在アメリカ合衆国における本ウイルスによる感染者は3,955名、死者252名となっている。今回アメリカで流行しているウイルスの特徴の1つとして、鳥類に対する病原性が極めて高いことがあげられる。少なくとも138種類の死亡した鳥類からウイルスが分離されており、特にカラス類の感受性が高いとされている。また、ウマも極めて感受性が高く2002年には15,000例近くが確認されている。2001年の成績からは死亡率は30%を超える。また、他の脊椎動物における本ウイルスの感染も報告されており、本ウイルスは公衆衛生上の問題のみならず、野生動物あるいは動物園の収集した貴重な動物に対しても大きな脅威となっている。ここではWNVに対して、アメリカ動物園協会等が中心となって進めているサーベイランスについて紹介する。

2. 動物でのWNV感染について

1) 鳥類におけるWNV感染

既に述べたように138種類の鳥類で、ウイルス感染が確認されている。表にBronx動物園での成績を示した。調査した124種368羽の内、125羽がWNVに対する抗体陽性であり、その22%は何らかの症状を呈していた。また発症したトリでは75%が死亡している。

表 ブロンクス動物園における鳥類でのWNV感染

目	科	調査数	陽性率 (%)	有症数	死亡数	発症率 (%)	致死率 (%)
カモ	カモ	46	43	2	2	10	100
チドリ	カモメ	24	33	2	2	25	100
コウノトリ	サギ	1	100	0		0	
	コウノトリ	6	33	0		0	
	トキ	2	50	1	1	100	100
ハト	ハト	29	21	2	2	33	100
	サケイ	1	0				
ブッポウソウ	サイチョウ	3	0				

目	科	調査数	陽性率 (%)	有症数	死亡数	発症率 (%)	致死率 (%)
カッコウ	エボシドリ	1	100	0		0	
	ツメバケイ	4	0				
タカ	タカ	8	0				
	コンドル	5	80	0		0	
キジ	キジ	91	25	2	1	9	50
ツル	ツル	6	83	0		0	
	クイナ	1	0				
スズメ	カラス	8	75	5	5	83	100
	ホオジロ	2	50	0		0	
	コノハドリ	7	0				
	マネシツグミ	1	0				
	ヒタキ	4	50	0		0	
	フウチョウ	7	0				
	ムクドリ	7	0				
ペリカン	ペリカン	7	71	0		0	
	ウ	13	38	0		0	
フラミンゴ	フラミンゴ	46	61	4	3	14	75
オウム	ヒインコ	10	0				
	インコ	1	0				
ペンギン	ペンギン	7	43	3	0	14	75
フクロウ	フクロウ	4	75	3	0	100	0
	メンフクロウ	2	100	0		0	
シギダチョウ	シギダチョウ	13	0				

Ludwig et al. Am. J. Trop. Med. Hyg. 67, 67-75, 2002 より改変

発症したトリでの臨床症状に WNV 特異的なものは認められず、多くは前駆症状なしに死亡しているのが発見されている。中には頭や首の位置の異常、運動失調、震顫、回転、方向感覚障害、視力障害等の神経症状を呈する個体もある。また、ヒトと同様の一側性あるいは両側性麻痺を呈する動物も経験されている。一般的な徴候としては沈鬱、食欲不振、衰弱、体重減少、横臥等が認められている。臨床症状は通常 1 週以内であるが、1~24 日の経過を経て、回復あるいは死亡する。発症したトリの多くは死亡する。

2) 哺乳動物における WNV 感染

Bronx 動物園での調査成績では 18 科 7 目の 35 種 117 頭の内、抗体陽性であったのは 8%であった。内訳はインドゾウ、インドサイ、ワオキツネザル、レッサーパンダ、ユキヒョウ、バビルサであった。期間中 2 頭のインドサイが沈鬱、嗜眠、軽度の食欲不振、口唇下垂を示した。2 頭とも回復したが、調べた 1 頭では WNV に対す

る抗体の上昇が認められた。残りの 1 頭の病因は明らかではない。哺乳類での発症率は 11%であり、死亡例は認められなかった。

トロント動物園ではバーバリーマカクの死亡が報告されているが、このサルは 25 歳と老齢であり、ヒトと同様 WNV に対する感受性が高かったと推定されている。他にはコウモリ、シマリス、ハイイロリス、シマスカンク、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、シロイワヤギ、オオカミ（幼獣）、ラマ、アルパカの発症が知られている。

動物園には鳥類を含む他の野生動物が入り込んでくるが、これらの動物における WNV の動向にも注意を払う必要がある。

3) その他の動物

フロリダのワニ牧場のアリゲーターでも WNV によると思われる死亡が報告されている。

参考 http://www.nwhc.usgs.gov/research/west_nile/wnvaffected.html

3. アメリカ動物園協会等が行なっているサーベイランスについて

このような背景をもとに 2001 年 6 月、リンカーンパーク動物園（Lincoln Park Zoo）と疾病管理センター（CDC）はアメリカ合衆国の動物園における WNV のサーベイランスデータを国家レベルの公衆衛生データベースに統合することができるかについての会合を開き、その結果アメリカ動物園水族館協会（AZA）およびアメリカ動物園獣医師協会（AAZV）の連名で以下のような通知を会員施設に配布した。

（アメリカ動物園水族館協会（AZA）およびアメリカ動物園獣医師協会（AAZV）の会員宛て連名通知）

リンカーンパーク動物園は CDC と共に、農務省（USDA）、地質調査所（USGS）、州および地方の衛生、農業、野生動物関連部局、AZA、AAZV の代表者によるミーティングを 2001 年 6 月 21～22 日に開催した。この会議は動物園における WNV のサーベイランスデータを国家レベルの公衆衛生データベースに統合することができるかについて検討するためのものである。動物園における WNV サーベイランスは、機密保護、エキゾチック種における診断法の限界、経済的な負担等の理由により、体系的に行われたことはこれまでになかった。これらの問題点について今回の会議で詳細な検討がなされた。

それぞれの領域の代表者による今後の展望の報告の後、ラウンドテーブル討議がなされ、1) WNV 試験へのより多くの動物園の参加および 2) 公衆衛生当局側によるこれら“歩哨”データの全国的サーベイランスへの活用を達成するために必要なことが決定された。検体採取、診断および報告体制に関するワーキンググループが設立され、それぞれのグループからの提言を纏め、全国的なサーベイランス計画の立ち上げの可能性について検討された。このワークショップの内容は Surveillance for West Nile

Virus in Zoological Institutions として纏められており、www.aza.org あるいは www.aazv.org から入手できる。印刷体を希望する場合には事務局へ連絡すれば入手できる。

会議の結果 CDC が 2001 年の試験的事業に対し資金援助することが決められた。コーネル大学診断研究室が動物園からの検体の検査機関に決定した。将来更に検査機関を増やす可能性のあることも決定した。AZA 加盟機関での効率的利用のため集中的データベースを構築することになった。また、この会議の結果を踏まえ WNV サーベイランスのための標準化した計画を AZA と AAZV の協力で策定し、全ての加盟機関に提供することになった。資金援助が継続するならば本計画は動物並びにヒトの健康にとって重要な新興感染症の動物園におけるサーベイランスの標準法となることが期待される。

現時点で我々は本計画の第 1 相に取り掛かる準備ができていますので、貴機関の参加を期待する。第 1 相は次の動物から採取した検体を対象としている。

- ・ 全身症状を呈しているか死亡した AZA 加盟動物園における野外飼育の鳥類および哺乳類
- ・ 動物園の敷地内で死亡しているのが発見された、収集動物以外の野生動物
- ・ 搬送前に通常行なう検査（ウイルス分離あるいはウイルス遺伝子の検出は対象動物がウイルス血症を起こしていることを示しており、抗体検出は以前に感染していたことを示している）の対象となる野外飼育されている健康な鳥類および哺乳類。この試験結果が陽性であっても移動前の 10 日間の検疫が科せられているならば搬出を制限する必要はない。

米国では、検体は無料で WNV の存否について試験される。

この事業の第 2 相では血清学的遡及調査を行なうので、各動物園においては健康であってもリスクの高い動物（野外飼育）の血清を保存することが望まれる。また、全ての加盟動物園におけるウエストナイルの危害因子調査も計画されている。第 2 相の詳細は後に供覧する予定である。

CDC の財政支援を受けた本計画に参加することは貴機関の地域の衛生当局と情報の適正な共有をすることを意味していることを理解することは重要である。すなわち地域の公衆衛生部局の担当者と緊密な関係を樹立し、公衆衛生サーベイランスの必要性和各動物園の必要とする機密性とのデータのバランスをとることである。地域の衛生当局への報告に含まれる情報は州あるいは国への報告にも盛り込まれることになる。

機密保持に関するガイドラインは既に述べた会議報告書 Surveillance for West Nile Virus in Zoological Institutions に盛り込まれている。

本事業は CDC, AZA, AAZA によって承認されたものであり、参加を希望する場合は別添の検体採取および検体提出に関わるプロトコールを使用されたい。

(連名通知の別添)

予備的事業の第 1 相

第 1 相は全身症状を呈しているか死亡した AZA 加盟動物園における野外飼育の鳥類および哺乳類から得た検体の検査を行なう。更に非収集動物であっても敷地内で死亡していた場合にはその血液あるいは組織検体についても試験する。検体はウイルス分離、RT-PCR、および血清学等可能な方法を用いて行なう。試験は無料である。

また、搬送前に行なう通常の検査対象となる、野外飼育されている健康な鳥類および哺乳類からの血清も試験に供することができる。この際、試験結果が陽性であっても移動前に 10 日間の検疫が科せられているならば搬出を制限する必要はない。ウイルス分離あるいはウイルス遺伝子の検出は対象動物がウイルス血症を起こしていることを示しており、抗体検出は以前に感染していたことを示している。

検体

血液

0.5ml のクエン酸処理 (推奨) あるいはヘパリン処理全血

0.25ml のヘパリン処理血漿 (鳥類)

0.25ml の血清 (哺乳類)

- * 小型鳥類ではヘパリン血が 50 μ l あれば最低限の ELISA は可能である。しかし、ELISA は WNV に特異的ではないため陽性の場合には確認検査のため再度の採血が必要になることもある。

組織検体

剖検並びに組織のチェックリストは完全版の報告書に記載されているが、最低限、脳、心臓、腎臓の小片を 70 あるいは液体窒素中に保存すべきである。超低温槽がない場合は 20 でも 2~3 週間の保存は可能である。特にワークシヨップ報告書の付属書 V に記載の保存液を用いれば状態良く保存できる。ウイルス分離は Vero 細胞あるいは適切な種の初代培養細胞で行なう。

総排泄腔および鼻咽頭のスワブはウイルス輸送用溶液に浸し氷冷して輸送するか、70 に保存した後、ドライアイスで梱包して送付する。ウイルス輸送用溶液は無償でコーネル大学から提供される。

* ウイルス分離では他の病因ウイルスや迷入ウイルスが分離される場合もありえるが、WNV 以外の病原体に関する更なる検査結果あるいは同定成績は当該機関にのみ通知される。これらの試験も無償で行われるが、他の例えば細菌学的検査等は別途有償で依頼することができる。

検体提出

様式 幾種類かの様式はこのメールに添付した。(将来的にはコーネル診断研究室の web site からダウンロードできるようにする予定)。検体は登録様式に記載し、検体の概要、動物種、採取年月日を明記する。検体の入った容器は登録様式と一致するように表示すること。

輸送表示 参加機関は無償で検体を送ることができる。数枚のラベルがこのメールに添付されている。予め Dr. A. Glaser に e-mail あるいは電話で連絡しラベルを入手すること。

輸送容器 丈夫な容器を用いること。また容器は密封すること。検体の入った容器を吸収材で囲み漏れのない容器に収納する。ウイルス分離用検体は検体受領まで、溶解することのないよう十分なドライアイスを入れること。血清学的検査に供する検体は氷温で輸送する。凍結している必要はない。検体は火曜日から金曜日の間に到着するように手配すること。

報告体制

WNV 試験の結果はそれぞれの動物園とリンカーンパーク動物園に構築される集中データベースに報告される。検体提出機関は完全版に記されたとおり、地域の公衆衛生当局に検査結果を遅滞なく報告しなければならない。本計画に参加することは貴機関の地域の衛生当局と情報の適正な共有をすることに賛同したことを意味していることを理解することは重要である。検査にはおよそ 10 日を要する。この間完全版の報告に関する章に記載されているように、機密保護に関して、動物園側と衛生当局で討議しておく必要がある。事務局では州の公衆衛生獣医師あるいは疫学の専門家の協力を斡旋できる。他にワークショップの参加者リストも完全版報告書の末尾に用意されている。

第 2 相

第 2 相は血清学的遡及調査を行なうので、各動物園においては健康であってもリスクの高い動物（野外飼育）の血清を保存することが望まれる。また、全ての加盟動物園におけるウエストナイルの危害調査も計画されている。第 2 相の詳細は後に供覧する予定である。