

「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](#)

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。

1. 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°C で保存し輸送する。長期保存する場合は -80°C に凍結保存する。

2. 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°C 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。

1. 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。

2. 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、健全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) 薬剤の投与法

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

(1) クロルテラサイクリン(CTC)投与期間は 30～45 日間

1. 餌に混ぜる場合

- ・小型-大型のオウム目のトリ

1000～2000ppm(0.01～0.02%)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・/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。

2. 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

1. 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 DOXY1g/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。

2. 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。

3. 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 μ g/ml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)

セパジーン(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相当と考えられる。(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.Clinic 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

PUERGENETM DNA 抽出キットを使う場合

500 μ l 検体を 1500 μ l 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 μ l Cell Lysis Solution および 3~4 μ l Proteinase K Solution を入れ、十分に Vortex して沈殿を浮遊させる。56 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした後、室温まで冷やす。100 μ l 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 μ l マイクロチューブに移す。300 μ l 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 μ l 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 μ l DNA Hydration Solution を入れ、Vortex し、65 $^{\circ}$ 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。

プライマー-1: CM1 CAGGACATCTTGTCTGGCTT
CM2 CAAGGATCGCAAGGATCTCC

3. PCR 反応液(50 μ l / sample):

10xPCR Gold Buffer	5 μ l
dNTP Mix(2mM each dNTP)	5 μ l
25mM MgCl ₂ Solution	3 μ l
プライマー CM1(40pmol/ μ l)	0.5 μ l
プライマー CM2(40pmol/ μ l)	0.5 μ l
AmpliTaq Gold (5U/ μ l)	0.25 μ l
DW	30.75 μ l
Sample	5 μ l

4.

5. 結果判定

5%Gel を作成し、PCR の産物を 10 μ l/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

Chlamydia spp.	bp	Alu ⁺ (bp)	Pvu ⁺ (bp)
C.trachomatis L2	245	90,89,66	245
C.psittaci 6BC	259	190,69	189,70
C.pneumoniae TW-183	258	199,59	258