

東京都における動物由来感染症としての真菌検査と解析

千葉 隆司^a, 高橋由美^a, 上原さとみ^a

近年、海外で報告されている動物由来真菌症の一部が輸入動物を介して国内に持ち込まれたと考えられる事例が報告されている。このような状況を踏まえ、東京都では2001年から動物由来感染症の発生予防を目的に動物由来真菌の調査を実施している。本稿では鳥類の糞便、多頭飼育されていたネコの被毛、およびイヌ/ネコの外耳ふき取りを対象にした病原真菌と、その調査結果について概説する。調査の結果、一部の動物がヒトに対して病原性を示す真菌を保有していた。これらの病原真菌が直ちにヒトに対して感染症を起こすものではないが、動物由来感染症の未然防止には、今後も継続して動物における病原真菌の保有調査を行う必要がある。

キーワード：動物由来感染症，クリプトコックス症，皮膚糸状菌症，マラセチア症，塩基配列解析

はじめに

「動物由来感染症（ズーノーシス）」は、我が国では「人獣共通感染症」や「人と動物の共通感染症」とも呼ばれる動物からヒトに感染する病気の総称である^{1,2)}。世界保健機構（WHO）では、動物由来感染症を「脊椎動物とヒトとの間で自然に移行するすべての病気、又は感染症」と定義し、現在、WHOが把握している動物由来感染症は200種類以上とされている。本症の原因となる病原体については、一般にQ熱やサルモネラ症等の細菌性、狂犬病等のウイルス性、トキソプラズマ症やエキノコックス症等の原虫・寄生虫性などが知られているが、真菌が原因となる「動物由来真菌症」も存在している^{1,3)}。

動物由来真菌症としては従来からクリプトコックス症と皮膚糸状菌症が目立っており、それぞれハトを中心とする鳥類の糞便やペットや家畜の皮膚病巣が感染源とされてきた。しかし近年、輸入動物の増加や多様化により、今までは感染源として考えられていなかった動物から真菌に感染する例が増えている。また、動物を家族や友人として扱う「コンパニオンアニマル」という考え方が普及し、動物愛護の観点からも日常的にヒトと動物の距離が近くなっている。このような状況から、ペット動物を介したマラセチア症や薬剤耐性型カンジダ症の発生も報告されるようになった³⁻⁶⁾。

我が国では、医療現場や獣医領域において様々な動物由来真菌の感染症例が報告されているが、その多くは感染症法における報告対象疾患になっていないため、実態が十分に把握できていない。このような背景を踏まえ、東京都では動物由来感染症のまん延防止の一環として動物における各種の調査を実施し、当センターで細菌や寄生虫とともに真菌の保有調査を行っている。本稿では、2001年から2009年までに実施した鳥類糞便を対象にした *Cryptococcus* 属、多頭飼育されたネコの被毛を対象にした皮膚糸状菌、イヌ/

ネコの外耳ふき取りを対象にした *Malassezia* 属の調査結果を中心に、動物由来真菌症について概説する。

動物由来真菌と検査

1. ヒトに病原性を示す真菌

真菌の存在は、17世紀にAntonie van Leeuwenhoekが顕微鏡を考案した段階で既に認識されていた^{3,7)}。ヒトに対して疾病を起こす「病原真菌」については、1830年代には既に確認されており、皮膚糸状菌症や病原酵母の一種である *Candida albicans* が口腔内病変の原因として報告されている^{3,7)}。また、1910年にはRaymond Sabouraud（病原真菌の検査に現在でも使用されているサブロー培地の開発者）が皮膚糸状菌を中心とした病原真菌についてまとめ、その後、特定地域での「風土病」として発生していたコクシジオイデス症やヒストプラスマ症など、数々の真菌症が報告された^{3,7)}。我が国においては、1900年代に入ってからSabouraudの元で学んだ太田正雄を中心に真菌症についての基礎が築かれ、1915年には国内で発生したクリプトコックス症例が報告されている⁸⁾。このように、真菌がヒトに対して病原性を示すことは早くから認識されていたが、当時の真菌症は大半が比較的病状が軽い「表在性の皮膚疾患」であったことや、一般には免疫抑制状態で感染を起こす「日和見感染症」であったこと、また、ヒト-ヒト感染等の「伝染性」が明らかにされていなかったことから、その後、感染症研究の進展は細菌やウイルスに移って行った。しかし、それまで皮膚科領域が中心であった真菌症は臓器移植やガン治療など、医療の高度化に伴い大きく変化し、1960年頃から皮下組織や内臓などの深部が侵される「深在性真菌症」の発生が顕在化するようになった^{3,7)}。

このように、近年になってから医療現場での真菌症を取り巻く状況は大きく変化したが、動物由来真菌症についてもヒトと動物との関わりが多様化した結果、以前とは異なる

^a 東京都健康安全研究センター微生物部

る状況が生じている。具体的な事例として、皮膚糸状菌症については本邦に土着していなかった *Arthroderma benhamiae* が、1990年代以降にペットとして輸入されたげっ歯類やハリネズミなどを介して国内へ拡大・土着したことが報告されている^{5,9)}。また、マラセチア症については2000年代にペットを介したと考えられる *Malassezia pachydermatis* の院内感染事例が海外で報告されている¹⁰⁾。さらにクリプトコックス症については、1999年以降、北米大陸を中心に *Cryptococcus gattii* の感染拡大が続いており、我が国への侵入が懸念されている¹¹⁾。これらに加え、輸入真菌症として扱われているヒストプラズマ症の症例が海外渡航歴のないヒトや動物で報告されているほか、1993年には南米の洞窟でコウモリの撮影を行っていた日本人グループが、*Histoplasma capsulatum* による集団感染を起こした事例も報告されている^{3,5,7)}。

2. 真菌の検査法

真菌の検査(同定)は、長年、肉眼や顕微鏡(実体および光学)を利用した形態観察(分類学的な方法)が用いられてきた^{3,12,13)}。このような手法は電子顕微鏡を用いた微細構造の観察や生理・生化学的な方法、血清学的な識別などへ発展し、さらに近年では分子生物学的手法が広く用いられるようになってきている^{3,11,12,14-16)}。分子生物学的手法については真菌症の診断や治療のみならず、病原真菌の自然界での分布を含む疫学的な解析にも広く応用されており、動物由来真菌の検査にも大きな変革をもたらしている。

1) 培養温度・培地

動物由来真菌の検査では、通常、食品や環境の真菌検査と同様に分離培養が用いられる。真菌の発育温度は菌の種類によってまちまちであるが、通常は20~30℃付近に至適温度が存在する。このため、食品や環境の真菌検査では通常25℃(室温)で培養を行うが、ヒトや動物に対して疾病を引き起こす真菌は、宿主の体温(37~40℃)付近で発育する性状を有する。このため、通常より高めの培養温度(30~35℃)を併用している^{3,12,13)}。

培地については、食品真菌の検査では一般にポテトデキストロース寒天(PDA)培地が用いられているが、動物由来真菌を含む医真菌の分野では、ペプトンとグルコースが主成分であるサブロー培地が広く用いられてきた。近年は、これらに加えて皮膚糸状菌分離用としてシクロヘキシミドを加えたマイコセル寒天培地や、病原酵母分離用として各種の酵素基質培地も用いられている^{3,11,12,17)}。また、発育に際して脂質を要求する特殊な性状を有する *Malassezia* 属については試料を培地に塗布後、オリーブオイルを重層する方法などが用いられる^{14,17)}。

なお、菌の種類によっては培地上で特徴的な集落(コロニー)を形成する。本調査で対象とした *Cryptococcus* 属は、大きく粘性のある流動性(ムコイド状)のコロニーを形成する。また、*Malassezia* 属は培地上に形成されたコロニーが特有の臭いを呈する。

2) 光学顕微鏡による形態観察

分離培養後の平板での集落形状(図1)、顕微鏡を用いた微細形態の観察を行う(図2)。これらに加え、*Cryptococcus* 属については莢膜を形成する特徴がある。莢膜は、墨汁染色(ネガティブ染色)により菌体の外側に白く抜ける形で観察される(図3)。

3) 生理・生化学的検査(酵母)

形態的な特徴が乏しい酵母の検査では、炭素源や窒素源の利用能(資化性状)や尿素の分解能(ウレアーゼ試験)、発育温度等、生理・生化学性状を利用した方法が用いられ、その一部はキットとして市販されている^{3,12)}。本調査では、鳥糞の糞便から分離した酵母の同定においてAPI 20C AUX(シスメックス・ビオメリュー)を使用した。なお、*Malassezia* 属も酵母の一種であるが、発育に際し脂質を要求する特殊な性状を有するため、同定キットの使用は困難である。

4) 分子生物学的検査

真菌ゲノムを構成するDNAの塩基配列を確認する方法(塩基配列解析)は、菌の同定や類縁関係を推定する上で有力であり、現在、様々な分野の真菌検査に広く用いられている^{14,15)}。本法は客観性や再現性、迅速性の面で優れている上、菌種の絞り込み(簡易同定)にも利用できる。動物由来真菌を対象にした塩基配列解析では、他の微生物と同様にデータベースが充実しているリボソームRNA遺伝子(rDNA)の利用が一般的であり、このうち、解析には主として大サブユニットの一部(LSU-D1/D2)や内部転写スペーサー(ITS)領域が用いられている^{14,15)}。

なお、現在、真菌の分類については塩基配列データ等に基づき見直しが進められている。この過程では菌名等の変更が生じ、同一菌種の呼称が年代によって異なるなど、検査にも混乱を生じさせている^{10,15-17)}。一例として、代表的な動物由来真菌である *Cryptococcus neoformans* については分類学的に2度の変更を経た後、2011年以降、遺伝学的に分けられた *C. neoformans* / *C. gattii* を別種として扱うことが提唱されている^{15,16)}(図4)。

(1) PCRおよび塩基配列解析法

現在、各種メーカーから様々な種類の試薬キットが販売されている。基本的には、それぞれの試薬の添付文書に従い操作する。以下、本調査で使用した方法を述べる。

各種培養平板から分離した株についてアルカリ煮沸法によりDNAを抽出した後、解析対象領域のDNAをPCRにより増幅した。PCRは、TaKaRa EX Taq HS試薬(タカラバイオ)およびサーマルサイクラー GeneAmp 9700 (Applied Biosystems)を用いて行い、得られたPCR産物について精製した。次いで、PCR反応と同一のプライマーを用いたダイレクトシーケンス法による塩基配列解析を行った。シーケンス反応では、BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems)を使用し、ABI PRISM 3130 genetic

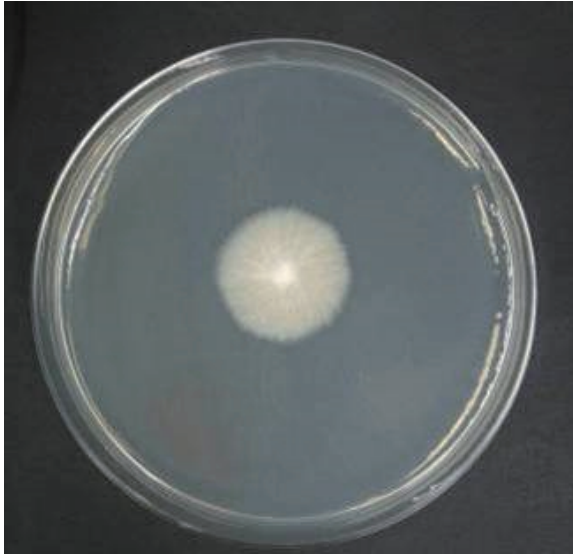


図1. 分離平板での集落形状 (マイコセル培地)
(左: *Microsporium* 属, 右: *Trichophyton* 属)



図2. 光学顕微鏡による微細構造 (孢子) の観察
(*Microsporium* 属: メチレンブルー染色)

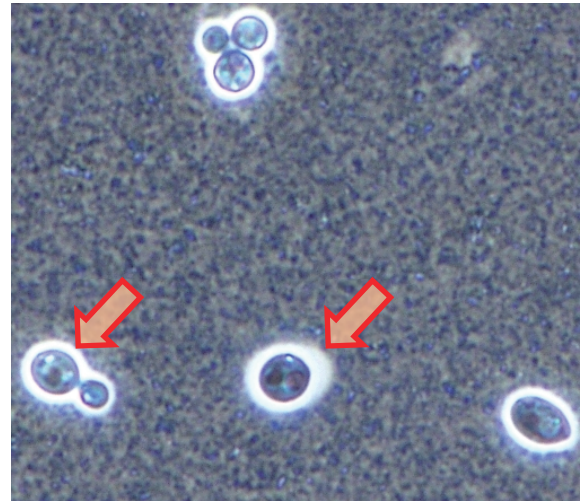


図3. 墨汁染色による莢膜の観察
(*Cryptococcus* 属: 矢印部分が莢膜)

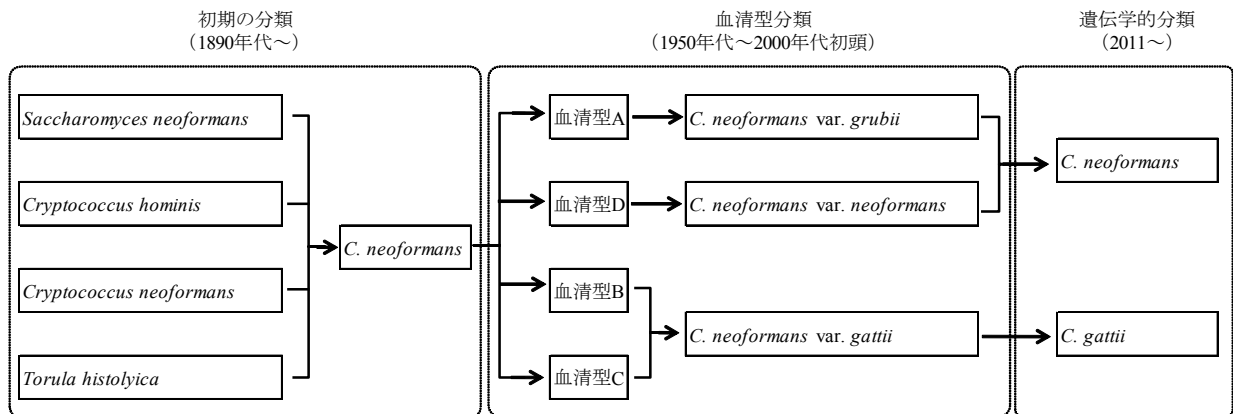


図4. *Cryptococcus neoformans* 分類の変遷^{11,16)}

analyzer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を取得した。得られた塩基配列について、GenBank / EMBL / DDBJ を利用したBLAST解析により菌種の推定を行った¹⁴⁾。

なお、本調査ではrDNA中のLSU-D1/D2およびITS領域に設定したプライマーに加え、*Cryptococcus* 属の調査ではIGS領域も対象にした^{11,15,16)}。

(2) 分子系統解析

近縁種の識別や感染経路の推定など、詳細な疫学情報が必要な場合は分子系統樹を利用した解析が有用になる。本調査では、*Malassezia* 属の検査でMaximum Composite Likelihood モデルによるNeighbor-Joining 法を用いた分子系統樹解析を行った¹⁸⁾。

動物由来真菌と東京都における調査結果

鳥類の糞便を対象にした *Cryptococcus* 属、ペット動物の被毛を対象にした皮膚糸状菌、イヌおよびネコの外耳ふき取りを対象にした *Malassezia* 属について調査を行った。以下にその概要と検査結果について記述する。

1. 鳥類糞便を対象にした *Cryptococcus* 属の調査

1) *Cryptococcus* 属の概要と関連疾患

Cryptococcus 属は、土壌や植物などの環境中に広く分布するキノコに近い担子菌系の酵母であり、現在、本属には300を超える種が分類されている^{3,11,16)}。クリプトコックス症は、*Cryptococcus* 属がヒトや動物に感染することで発症する感染症であり、主な原因菌種は *C. neoformans* と *C. gattii* である^{3,5,11,16,19)}。

C. neoformans は、以前から形態や生理生化学的性状、血清学的な相違に基づく変種が提唱されており、種複合体 (species complex) として扱われてきた^{11,16,19)}。特に荚膜抗原により A~D および AD の5つに分ける血清型は、本菌の識別に長年用いられてきた。近年、*C. neoformans* 種複合体は分子生物学的に *C. neoformans* と *C. gattii* の2菌種に分けられ、現在、両菌種は遺伝子型によりさらに細かく区別されている^{11,16,20)}。*C. neoformans* 種複合体の遺伝子型については、Meyer らが提唱した7つのハウスキーピング遺伝子を使用した multilocus sequence typing (MLST) による解析が用いられている²¹⁾。これにより、*C. neoformans* は VN I~VNIV と VNB の5タイプ、*C. gattii* は VG I~VGIV の4タイプに加え、さらに VG II は VG II a~VG II c の3亜型に分けられている^{16,21)}。

C. neoformans は、鳥の糞に含まれる窒素成分によって増殖が促進されるため、鳥類が排泄する糞に汚染された土壌が主な感染源になると考えられている^{3,5,22)}。*C. neoformans* の感染は、これら汚染土壌が乾燥により細粒子化して風で舞い上がり、動物に吸い込まれることで成立すると考えられている^{3,5,22)}。クリプトコックス症の本邦での臨床分離株は、ほぼ全例が *C. neoformans* であり、1980年代以降、本菌による感染症は AIDS 患者における主な死亡原因の一つ

として注目されている^{11,19,22,23)}。

一方、*C. gattii* はオーストラリアのユーカリ林を中心に熱帯から亜熱帯地域の動植物、土壌等の自然界に定着していると考えられていた^{3,11,24,25)}。従来から *C. gattii* はコアラの病原体として知られており、ヒトへの感染は稀とされていた^{3,11)}。これまで、本菌のヒトへの感染報告はオーストラリアやアフリカ、アジア、南米などの熱帯・亜熱帯地域からのものであった^{3,11,22)}。しかし1999年以降、温帯の北米大陸北西部での患者報告が増加し、カナダでは死亡例を含む100名以上集団感染が報告されるなど、米国を含む近接地域へ本菌感染症が拡大していることが判明した²⁶⁻²⁹⁾。また、これら集団発生の原因となった *C. gattii* は同じ遺伝子型 (VG II a: 北米流行型) であることが判り²⁶⁻²⁹⁾、さらに、我が国でも2007年に本菌の流行地域への明らかな渡航歴がない患者で同遺伝子型の *C. gattii* 感染例が報告された^{30,31)}。このように新たな形で発生している *C. gattii* 感染症は、*C. neoformans* に比べて重症例や健康人での発症例が多い特徴がある³²⁾。

北米流行型を含む *C. gattii* の自然環境での分布については、現在も不明な点が多い。しかし、上記のごとく海外での *C. gattii* による集団感染報告に加え²⁶⁻²⁹⁾、国内でも2007年の感染症例報告以降、2015年までに計5例の *C. gattii* 感染例が報告されている^{11,30,31)}。さらに、我が国では健康人において発症する深在性真菌症としてクリプトコックス症の頻度が高いことから、2014年9月19日に「播種性クリプトコックス症」が感染症法における全数把握対象疾患 (5類感染症) に追加された^{11,25)}。

2) 調査対象と検査結果

2001年~2007年まで都内で捕獲した野生のカラスや動物園、ペットショップ等で飼育されていたインコ、ニワトリ、アヒル等の鳥類から採取した糞便361検体を対象にした。各試料についてクロラムフェニコール加PDA (CP加PDA) 培地 (栄研化学) とサブローデキストロース寒天 (SDA) 培地 (日本製薬) に直接塗抹した後、30°C、3~4日間培養した。次いで、*Cryptococcus* 属が疑われる集落を中心に単離し、API 20C AUX (シスメックス・ビオメリュール) による検査を行った。また、分離株のうち *C. neoformans* (種複合体) と同定された株は塩基配列解析により *C. neoformans* / *C. gattii* の識別を行った。

鳥類の腸内容物及び糞便 361 検体中 13 検体から *Cryptococcus* 属が検出された。また、検出された *Cryptococcus* 属のうち *C. neoformans* (種複合体) が1株検出されたが、塩基配列解析により本菌は *C. neoformans* であることが判明した。なお、*Cryptococcus* 属以外の病原酵母では、15 検体からアレルギー性呼吸器疾患の原因菌である *Trichosporon* 属が検出され、1 検体からカンジダ症の原因となる *C. albicans* が検出された (表1)。

本調査では *C. gattii* は検出されなかったが、*Trichosporon* 属が全検体の4.2%で検出された。本菌は *Cryptococcus* 属

と同様に担子菌系の酵母であり、表在性、あるいは深在性のトリコスポロン症とともに、日本特有のアレルギー性疾患とされる夏型過敏性肺炎の原因菌とされている³⁾。夏型過敏性肺炎は *Trichosporon* 属の増殖に適した多湿の住居環境において多く発生することから、シックハウス症候群に含まれることもある³⁾。このようなことから、鳥類を室内で飼育する際には感染症のみならず、アレルギー防止対策の面からも、排せつ物の処理等に注意を払うことが必要と考えられる。

2. 動物の被毛を対象にした皮膚糸状菌の調査

1) 皮膚糸状菌の概要と関連疾患

真菌症のうち、表在性真菌症の発症患者数は深在性真菌症に比べてはるかに高いとされ、その中でもいわゆる「水虫」に代表される皮膚糸状菌症の発症例は表在性真菌症の90%以上を占めるとされている³⁾。

皮膚糸状菌症の原因菌は、分類学的には有性世代の *Arthroderma* 属と無性世代の *Trichophyton* 属 (白癬菌)、*Microsporum* 属 (小孢子菌)、*Epidermophyton* 属 (鼠径表皮菌) の3属から構成され、これらは一般には「皮膚糸状菌」と呼ばれている^{3, 5, 33, 34)}。皮膚糸状菌は、それぞれ感染源や宿主への親和性によって動物好性菌、ヒト好性菌、土壌好性菌に分けられている。動物好性菌のヒトへの感染は、直接あるいは間接的な動物との接触により発生する^{5, 33)}。

動物由来皮膚糸状菌症の原因菌種としては、従来から *Microsporum canis*、*Trichophyton verrucosum*、*Trichophyton mentagrophytes* が重要視されてきたが、近年のペット動物の多様化により、新たな菌種が国内に持ち込まれる事例も報告されている^{5, 33-36)}。代表的な動物好性菌である *M. canis* (イヌ小孢子菌) は、イヌやネコを主な宿主とするが、ヒトに感染すると強い炎症を呈する^{37, 38)}。本菌は、北海道に分布していたものが1970年代以降のペットブームに合わせて全国的に蔓延するようになったと考えられている⁹⁾。

近年、ヒトとペット動物との距離が近くなっていることから、一時下火であった *M. canis* 感染症が都市部を中心に再増加することが懸念されている。このような現状から、皮膚糸状菌の検査では感染経路解明に資する菌株のタイピングが重要となる。現在、一般的な皮膚糸状菌の検査では形態や生理学的性状による表現性状を利用した同定が行われているが、この方法は時間がかかる上、非定型的な形質を示す株では同定が困難になる場合がある^{6, 7, 39)}。また、検査法の問題に加え、近年では *T. mentagrophytes* を中心に皮膚糸状菌の分類自体に混乱を生じており^{9, 33)}、表現性状のみで同定やタイピングを行うことは容易ではない状態にある。そこで、皮膚糸状菌の検査では早い時期から分子生物学的な手法が導入されてきた⁴⁰⁾。その一例として、*M. canis* とその類縁菌 (*Arthroderma otae*, *Microsporum distortum*, *Microsporum equinum*, *Microsporum andouinii* および *Microsporum ferrugineum*) については、rDNAのITS1領域を用いた解析により6系統から成る近縁のクラスターを形

成することが報告されている^{41, 42)}。これら新たな知見を踏まえ、現在、本菌については再分類が提唱されている^{41, 42)}。

2) 調査対象と検査結果

2009年に都内の集団飼養施設を対象に、各施設で飼育されていたネコから採取した被毛135検体を検査に供した。各試料について滅菌生理食塩水で振り出した後、振り出し液1mLをCP加PDA培地、SDA培地、およびマイコセル寒天培地 (栄研化学) に塗布した。各平板について、30°C、5~7日間培養した。培養後、皮膚糸状菌が疑われる集落から観察用スライドを作成し、光学顕微鏡により形状を観察した (図2)。形態観察により皮膚糸状菌と同定された株については、さらに塩基配列解析を実施し、各菌株を比較した。

ネコ被毛135検体中28検体 (20.7%) から *Microsporum* 属が検出され、*Trichophyton* 属も1検体から検出された (表2)。合わせて、それぞれの施設から分離された株について解析した結果、各施設内での分離株の塩基配列が一致していた。この結果から、各施設で行われていた集団飼育により、皮膚糸状菌がそれぞれの施設内で伝播していたことが推察された。

M. canis は無症状のキャリアとなった動物からも感染することが知られており、ヒトにおける本菌感染症はイヌやネコとの接触機会の多い女性や子供に多くみられる^{35, 43)}。また、ヒトからヒトへの感染力も強いいため、家族内を含む集団感染例が報告されている³³⁾。本調査においても、明らかな皮膚疾患を呈していないネコから *M. canis* が検出されていたことから、室内飼育であってもペット動物と接触した際には手洗い等の感染予防を行う必要があろう。

3. イヌ/ネコの外耳ふき取りを対象にした *Malassezia* 属の調査

1) *Malassezia* 属の概要と関連疾患

ヒトにおける表在性真菌症のうち、でん風や脂漏性皮膚炎に代表される皮膚マラセチア症は皮膚糸状菌症や皮膚カンジダ症に次いで発症例が多いとされている³⁾。本症の原因菌である *Malassezia* 属は、ヒトや動物の皮膚に常在する担子菌系の酵母である^{44, 45)}。 *Malassezia* 属の大部分は発育に脂質を要求する性状を有し、皮脂が分泌される皮膚などに定着している。皮膚マラセチア症は、種々の理由で皮膚菌叢のバランスが崩れて本菌が過度に増加した場合に発症すると考えられている⁴⁵⁾。 *Malassezia* 属による疾病として、ヒトでは脂質要求性菌種である *Malassezia furfur*、*Malassezia obtusa*、*Malassezia sympodialis* などが「でん風」や「脂漏性皮膚炎」、「マラセチア毛包炎」などの原因菌とされてきた。近年では、本菌がアトピー性皮膚炎や喘息の増悪因子として働くことが報告され、さらに乾癬や挫瘡との関連についても注目されている⁴⁶⁻⁴⁹⁾。

一方、動物では脂質非要求菌種である *Malassezia pachydermatis* がペット動物等での難治性外耳炎や皮膚疾患の起原菌として重要視されてきた⁴⁵⁻⁴⁷⁾。しかし近年、ヒ

表 1. 都内で捕獲・飼育された鳥類（糞便）における病原酵母検出状況（2001年～2007年）

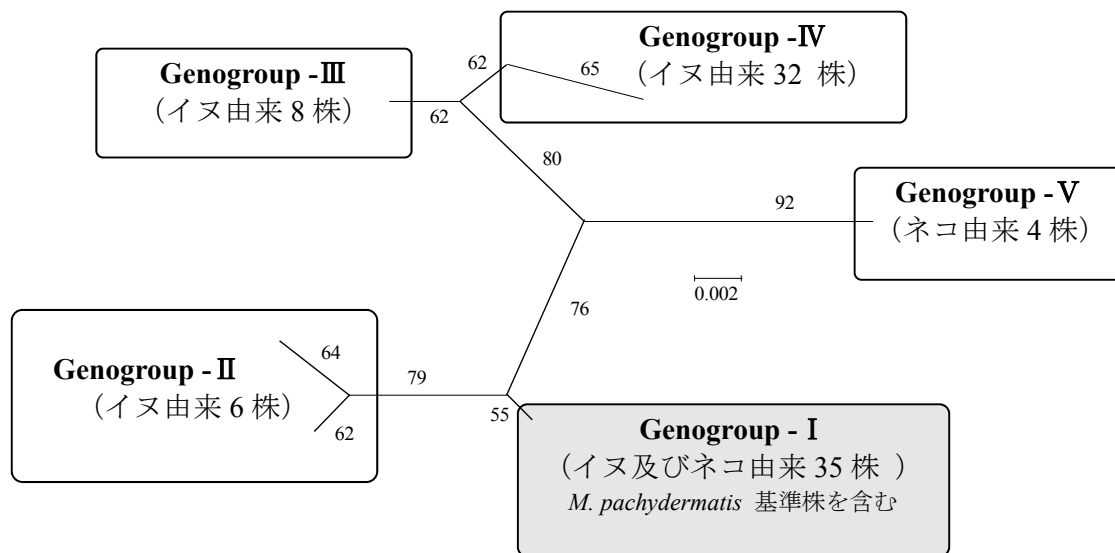
	検体数	検出数	検出率
合計	361	29	8.0%
<i>Cryptococcus</i> 属		13	3.6%
<i>C. neoformans</i>		1	0.3%
<i>C. albisus</i>		8	2.2%
<i>C. laurentii</i>		3	0.8%
<i>C. humicola</i>		1	0.3%
<i>Trichosporon</i> 属		15	4.2%
<i>T. asahi</i>		7	1.9%
<i>T. ovoides</i>		7	1.9%
<i>T. cutaneum</i>		1	0.3%
その他の病原酵母		1	0.3%
<i>Candida albicans</i>		1	0.3%

表 2. 都内集団飼育施設のネコ（被毛）における皮膚糸状菌の検出状況（2009年）

	検査数	検出数	検出率
調査施設	16	5	31.3%
皮膚糸状菌	135	29	21.5%
<i>Microsporum canis</i>		28	20.7%
<i>Trichophyton</i> 属		1	0.7%

表 3. 都内で捕獲・収容されたイヌ・ネコ（外耳ふき取り）における *Malassezia* 属の検出状況（2006年～2009年）

	イヌ			ネコ		
	検体数	検出数	検出率	検体数	検出数	検出率
<i>Malassezia</i> 属	182	109	59.9%	110	19	17.3%
動物常在菌種		100	54.9%		16	14.5%
ヒト常在菌種		9	4.9%		3	2.7%

図 5. *M. pachydermatis* の ITS 領域を用いた分子系統樹

トの常在菌と考えられていた脂質要求性菌種が動物の皮膚炎から分離された事例や、イヌや飼い主を介して病院内に持ち込まれた *M. pachydermatis* による院内感染事例などが報告されるようになり^{50,51}、ヒトと動物の濃厚接触により互いの常在菌が交差した結果として生じる新たな疾病の発生も懸念されている。

Malassezia 属は特殊な生理性状に加え、形態や生化学的性状が酷似した酵母であることから、従来から用いられてきた一般的な検査法の適用が難しい。そこで、本菌の解析では主に分子生物学的な方法が用いられている^{17,44}。この解析により、以前から不均一性が指摘されていた *M. furfur* が複数の種に再分類されるなど、1990年代までは3菌種であった *Malassezia* 属は2000年以降に急増し、現在、14菌種に分類されている^{52,53}。また、解析技術の向上は病因の解明にもつながっている。その一例として、*Malassezia* 属のアトピー性皮膚炎への関与が挙げられる^{44,45,54}。以前から *Malassezia* 属はアトピー性皮膚炎の増悪因子と考えられていたが、そのメカニズムについては不明な点が多かった。Nakabayashi らは、培養法によってアトピー性皮膚炎患者の *Malassezia* 属の菌叢を解析し、*M. furfur* や *M. globosa* が優勢であることを報告した⁵⁵。しかし、Sugita らが行った分子生物学的な解析では、*M. globosa* に加えて培養法では検出されにくい *M. restricta* の2菌種が優勢になっていること、また、これらの菌種が分子生物学的に種内多型を有していることが判明した⁵⁶。アトピー性皮膚炎患者においてこのような菌叢の偏りを生じている理由については、後に Hiragun らが汗に含まれるヒスタミン遊離活性物質がアトピー性皮膚炎の増悪因子であることに着目した解析を行い、*M. globosa* が産生するタンパク質の中に同様の物質が含まれていたことを報告した⁵⁷。

以上のように、*Malassezia* 属は微生物学的な特徴や各種疾患との関連性、疾病の発症メカニズム、自然界での分布等については未解明な部分が多い病原酵母であったが、検査技術の進展に合わせて分類学的な位置づけが明らかになるとともに医療現場で分離される機会が増え、各種疾患との関連性が解明されつつある。

2) 調査対象と検査結果

2006年から2009年に都内で捕獲・収容したイヌ182個体およびネコ110個体を対象に、それぞれの外耳をふき取った綿棒について *Malassezia* 属の検査を実施した。各試料(綿棒)について直接クロモアガー・マラセチア/カンジダ(関東化学)へ塗抹し、30°C、3~4日間培養した。次いで、平板に発育した *Malassezia* 属が疑われる独立コロニーをSDA培地およびオリーブオイル(和光純薬)を重ねたSDA培地へ接種し、脂質要求性を確認した。この検査で *Malassezia* 属と同定された株については塩基配列解析を実施し、*M. pachydermatis* と同定された株については、さらに分子系統樹解析を実施した。

イヌの外耳ふき取り 182 検体中 109 検体、ネコの外耳ふ

き取り 110 検体中 19 検体から *Malassezia* 属が検出された(表3)。また、これらの動物からヒトの常在菌と考えられている *M. japonica* や *M. slooffiae* が検出された。一般に、動物から分離される *Malassezia* 属は *M. pachydermatis* であると考えられてきたが、近年、ペット動物や家畜などの外耳炎や皮膚炎からヒト常在性 *Malassezia* 属の検出が報告されている^{48,51,58-60}。これらヒト常在性 *Malassezia* 属については動物に対してどのような危害性を有するか現時点では不明であるが、ヒトに対する病原性を考慮し、今後とも注意深く監視していく必要がある。

Malassezia 属の一部については、以前から特定の塩基配列に種内多型が存在することが報告されている^{44,61}。本調査で分離した *M. pachydermatis* の ITS1 領域塩基配列を用いて分子系統樹解析を行った結果、*M. pachydermatis* は大きく5つの遺伝子グループ(genotype-I~V)に分かれ、宿主動物と遺伝子グループの間に関連性が見られた(図5)。本調査において捕獲の時期や場所が異なる個体から得られた株でITS1領域に同一の塩基パターンが認められたことは、宿主間における交差感染や自然界における分布調査など、幅広い疫学的解析への応用を示唆するものと考えられる。

おわりに

真菌がヒトや動物に対して感染症を起こすことは、微生物研究の長い明期から認識されていた。しかし、感染症の中心が細菌やウイルスに移行し、また、検査法が煩雑で高い専門性が求められる分類学的な手法であったこともあり、20世紀の中頃までは真菌症の研究は停滞気味であった。このような状況は医療の高度化に伴う深在性真菌症の増加と検査方法の急速な進歩によって大きく変化し、21世紀にかけて真菌症の研究は飛躍的に発展した。特に分子生物学的な解析技術の進展は著しく、近年では次世代シーケンサーを用いた皮膚真菌叢の解析などが行われ、表在性真菌症の診断や治療への応用が期待されている⁶²⁻⁶⁴。また、質量分析技術を応用した新たな微生物同定法(MALDI-TOF MS)も開発され、*C. neoformans* 種複合体などの近縁種識別への利用が検討されている⁶⁵⁻⁶⁸。これらの手法は、様々な外来動物の輸入などによって新たな疾患の発生が危惧される動物由来真菌症の現状において、その応用が期待されている。

本稿で示した東京都での動物由来真菌症の調査では、一部でヒトに病原性を示す真菌を保有していることが明らかになった。これらの病原真菌が直ちにヒトに対して感染症を起こすものではないが、本調査結果はヒトと動物の関係が大きく変わった今日においても、動物との過剰な触れ合いを避けることや接触前後の手洗い励行など、感染症予防に必要な基本対策の重要性に変わりがないことを示唆している。このような現状から、特に室内飼育では疎かになりがちな基本的な感染予防策について、飼い主一人ひとりに対して正しい理解を促していくとともに、ヒトとの濃厚接触が認められる動物を中心に、今後も継続して病原真菌の保有調査を行うことが重要であろう。

文 献

- 1) 高橋幸子：モダンメディア, 53, 61-66, 2007
- 2) 厚生労働省健康局結核感染症対策課：動物由来感染症ハンドブック2015
- 3) 山口英世：病原真菌と真菌症, 2007, 南山堂, 東京.
- 4) 内田幸憲, 井村俊郎, 竹嶋康弘：感染症学雑誌, 75, 276-282, 2001.
- 5) 村田佳輝：日獣会誌, 67, 807-811, 878-885, 2014.
- 6) 榎村 浩一：日本細菌学雑誌, 62, 295-312, 2007.
- 7) 森健：真菌誌, 49, 5-25, 2008.
- 8) 螺良英郎：真菌と真菌症, 3, 50-55, 1962.
- 9) 高橋一朗：真菌誌, 44, 245-247, 2003.
- 10) Hirai, A.: *ViVeD interzoo*, 2, 199-202, 2006.
- 11) 梅山隆, 宮崎義継：モダンメディア, 61, 202-207, 2015
- 12) 小栗豊子, 阿部美知子, 池田 玲子ら： *Med. Mycol. J.*, 54, 345-360, 2013.
- 13) 西村和子：真菌誌, 50, 117-122, 2009.
- 14) 杉田隆, 西川朱實：真菌誌, 45, 55-58, 2004.
- 15) 杉田 隆, 高島昌子： *Med. Mycol. J.*, 52, 107-115, 2011.
- 16) 池田 玲子： *Med. Mycol. J.*, 52, 199-203, 2011.
- 17) 金子 孝昌： *Med. Mycol. J.*, 52, 297-303, 2011.
- 18) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. *et al.*: *Mol Biol Evol.*, 24, 1596-1599, 2007.
- 19) 掛屋弘, 河野 茂： *Med. Mycol. J.*, 52, 183-191, 2011.
- 20) Kurtzman, C. P., Fell, Jack, W.: *The Yeasts: a Taxonomic Study*, 5th ed., 2011, Elsevier, Amsterdam.
- 21) Meyer, W., Aanensen, D. M., Boekhout, T., *et al.*: *Med. Mycol.*, 47, 561-570, 2009.
- 22) 宮里明子： *Med Mycol. J.* 57, J27-J32, 2016
- 23) 照屋勝治, 安岡彰, 塚本美鈴： *IASR*, 36, 188-189, 2015.
- 24) 宮崎義継, 金子幸弘, 梅山 隆ら： *感染症*, 42, 172-175, 2012.
- 25) 金子幸弘： *IASR*, 36, 186-187, 2015.
- 26) Kidd, S. E., Hagen, F., Tschärke, R. L., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 17258-17263, 2004.
- 27) Byrnes, E. J. 3rd., Bildfell, R. J., Frank, S. A. *et al.*: *J. Infect. Dis.*, 199, 1081-1086, 2009.
- 28) Galanis, E., Macdougall, L.: *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 251-257, 2010.
- 29) Springer, D. J., Chaturvedi, V.: *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 14-20, 2010.
- 30) Okamoto, K., Hatakeyama, S., Itoyama, S. *et al.*: *Emerg. Infect. Dis.*, 16, 1155-1157, 2010.
- 31) 杉田隆, 張音実： *IASR*, 36, 187-188, 2015.
- 32) Sabiiti, W., May, R. C. : *Future Microbiol*, 7, 1297-1313, 2012.
- 33) 加納 墨, 長谷川篤彦： *Med. Mycol. J.*, 55, J73-J77, 2014.
- 34) 西本勝太郎：真菌誌, 50, 1-4, 2009.
- 35) 加納墨： *Med. Mycol. J.*, 53, 19-23, 2012.
- 36) 加納墨： *Med. Mycol. J.*, 53, 175-178, 2012.
- 37) 榮仁子, 野口博光, 市之川悠子, 他： *Med. Mycol. J.*, 52, 139-144, 2011.
- 38) 比留間政太郎：日皮会誌, 116, 1295-1302, 2006.
- 39) 阿部美知子, 久米光： *Med. Mycol. J.*, 54, 19-25, 2013.
- 40) Makimura, K., Mochizuki, T., Hasagawa, A., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2629-2633, 1998.
- 41) Makimura, K., Tamura, Y., Murakami, A., *et al.*: *Microbiol. Immunol.* 45, 209-216, 2001.
- 42) 望月隆, 杉田泰之, 榎村 浩一ら：真菌誌, 42, 81-86, 2001.
- 43) Bond, R.: *Clin. Dermatol.*, 28, 226-236, 2010.
- 44) 杉田 隆：真菌誌, 48, 179-182, 2007.
- 45) 清 佳浩：真菌誌, 47, 75-80, 2006.
- 46) Sugita, T., Tajima, M., Amaya, M., *et al.* : *Microbiol. Immunol.*, 48, 755-759, 2004.
- 47) Sei, Y., Hamaguchi, T., Ninomiya, J., *et al.* : *J. Dermatol.*, 21, 334-340, 1994.
- 48) Batra, R., Boekhout, T., Gueho, E., *et al.* : *FEMS Yeast Res.*, 5, 1101-1113, 2005.
- 49) Belkum, A. V., Boekhout, T., Bosboom, R. : *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2528-2532, 1994.
- 50) Chang, H. J., Miller, H. L., Watkins, N., *et al.* : *N. Engl. J. Med.*, 338, 706-711, 1998.
- 51) Weibel, S. F., Mcneil, M. M., Pramanik, A., *et al.*: *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 13, 104-108, 1994.
- 52) Cabañes, F.J., Theelen, B., Castellá, G., *et al.*: *FEMS Yeast Res.*, 7, 1064-1076, 2007.
- 53) 清 佳浩： *Med. Mycol. J.*, 53, 7-11, 2012.
- 54) 杉田隆, 張恩実, 田中貴文ら： *Med. Mycol. J.*, 54, 39-44, 2013
- 55) Nakabayashi, A., Sei, Y., Guillot, J.: *Med. Mycol.* 38, 337-341, 2000.
- 56) Sugita, T., Tajima, M., Ito, T., *et al.* : *J. Clin. Microbiol.* 43, 2824-2829, 2005.
- 57) Hiragun, T., Ishii, K., Hiragun, M. *et al.*: *J. Allergy. Clin. Immunol.* 132, 608-615, 2013.
- 58) Chen, T. A. and Hill, P. B. : *Vet. Dermatol.*, 16, 4-26, 2005.
- 59) Crespo, M. J., Abarca, M. L. and Cabañes, F. J. : *Medical Mycology*, 40, 115-121, 2002.
- 60) Cafarchia, C., Gallo, S., Capelli, G., *et al.* : *Mycopathologia.*, 160, 143-9, 2005.
- 61) 横山 耕治：真菌誌, 46, 151-156, 2005.
- 62) 川本進： *感染症学雑誌*, 80, 19-26, 2006.
- 63) Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., *et al.* : *Science*, 307, 1321-1324, 2005.
- 64) Grice, E. A., Segre, J. A. : *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 244-253, 2011.
- 65) McTaggart, L., Richardson, S. E., Seah, C., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, 49, 2522-2527, 2011.
- 66) Firacative, C., Trilles, L., Meyer, W.: *PLoS One.*, 7, e37566, 2012.

- 67) Posteraro, B., Vella, A., Cogliati, M., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2472-2476, 2012.
- 68) Danesi, P., Drigo, I., Iatta, R., *et al.*: *Med. Mycol.* **52**, 659-666, 2014.

Examination and Analysis of Zoonotic Fungi in TokyoTakashi CHIBA^a, Yumi TAKAHASHI^a and Satomi UEHARA^a

In recent years, there have been several reports of infectious fungal diseases being brought into Japan from overseas via imported animals. Consequently, the Tokyo Metropolitan Government has been investigating the prevalence of zoonotic fungi since 2001. In this paper, the results of tests for infectious fungi in animal samples (bird droppings, hairs of group-feeding cats, and ear canal swabs of companion animals) are described. It was found that some of these animals contained pathogenic fungi that can cause infectious diseases in humans. Therefore, although these pathogenic fungi are not necessarily causing these diseases in humans, the continual detection of zoonotic fungi is considered necessary to prevent this from occurring.

Keywords: Zoonosis, Cryptococcosis, Dermatomycosis, Malasseziosis, DNA sequence analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan