

国内の飼育下鳥類における消化管寄生原虫感染症に
関する研究

日本大学大学院 獣医学研究科 獣医学専攻
博士課程

泉沢 幾子

2019

目次

第1章 序論.....	1
第2章 愛玩鳥類における消化管寄生原虫保有状況.....	7
2.1 はじめに.....	8
2.2 材料および方法.....	9
2.2.1 対象個体	
2.2.2 消化管寄生原虫の検査	
2.2.3 原虫陽性個体に対する治療	
2.3 成績.....	10
2.4 考察.....	11
2.5 小括.....	13
第3章 コザクラインコにおけるクリプトスポリジウム感染状況の解明 および治療.....	16
3.1 はじめに.....	17
3.2 材料および方法.....	18
3.2.1 対象症例	
3.2.2 原虫オーシストの検出および感染強度の計測	
3.2.3 オーシスト陽性個体を対象とした X線検査による消化管の形態学的変化の 検討	

3.2.4	糞便からの DNA 抽出	
3.2.5	PCR による原虫のアクチン遺伝子部分領域の増幅	
3.2.6	電気泳動	
3.2.7	ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定	
3.2.8	遺伝子解析	
3.2.9	治療	
3.3	成績.....	21
3.3.1	オーシストの排出状況、形態および OPG	
3.3.2	X 線検査による消化管の形態学的変化	
3.3.3	原虫の分子系統解析	
3.3.4	治療結果	
3.4	考察.....	23
3.5	小括.....	25
第4章	オオフクロウにおけるクリプトスポリジウム感染および臨床経過.....	35
4.1	はじめに.....	36
4.2	材料および方法.....	37
4.2.1	対象症例の履歴および来院時の症状	
4.2.2	シヨ糖浮遊法検査による原虫オーシストの検出および感染強度計測	
4.2.3	糞便からの DNA 抽出	
4.2.4	PCR によるクリプトスポリジウム原虫の遺伝子増幅	
4.2.5	電気泳動	

4.2.6	増幅された塩基配列の決定	
4.2.7	遺伝子解析	
4.3	成績.....	41
4.3.1	来院後の処置および経過	
4.3.2	原虫オーシストの検出および OPG 経時的変化	
4.3.3	遺伝子解析結果	
4.3.4	購入元のブリーダー飼育下の他のフクロウ類における原虫保有状況	
4.4	考察.....	43
4.5	小括.....	45
第5章	シロフクロウに見られたコクシジウムの感染状況.....	55
5.1	はじめに.....	56
5.2	材料および方法.....	57
5.2.1	対象個体および原虫感染経緯	
5.2.2	原虫オーシストの検出および感染強度の計測	
5.2.3	原虫オーシストの培養	
5.2.4	糞便からの DNA 抽出	
5.2.5	PCR による原虫 18SrRNA 遺伝子部分領域の増幅	
5.2.6	電気泳動	
5.2.7	ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定	
5.2.8	遺伝子解析	

第 1 章

序論

近年、国内で鳥類を伴侶動物（以下愛玩鳥類）として飼育している世帯は2016年の推計で全世帯の1.7%であり、およそ94万羽以上が飼育されていると考えられる。この推定飼育規模は、イヌ（14.2%；飼育頭数9,878,000頭）、ネコ（9.9%、飼育頭数9,847,000頭）、キンギョ（4.1%）、メダカ（3.4%）、カメ（2.1%）に次いで多い（ペットフード協会、2016）。国内の愛玩鳥類の種類は、オウムインコ類、フィンチ類、フクロウ類、ワシタカ類、ハト類など多様であり、その多くは国内で繁殖されたと推定されるが、一部海外からも輸入されており、2018年度には13,259羽が輸入された（厚生労働省、動物の輸入届出制度、2018）。

国内の獣医療においても、愛玩鳥類の診療件数は増えており、鳥類を専門とする動物病院も増加している。神奈川県藤沢市のふじさわアビアン・クリニックでは、2013年6月15日から2019年9月30日までに愛玩鳥類124種4,764羽が来院しており、内訳は38%がセキセイインコ（*Melopsittacus undulates*）、15%がオカメインコ（*Nymphicus hollandicus*）、11%がブンチョウ（*Padda oryzivora*）8%がコザクラインコ（*Agapornis roseicollis*）、3%がフクロウ類（Strigiformes）であった（表1-1）。

このような我が国の獣医学における診療対象動物種の多様化に伴い、鳥類の臨床に関する専門的知見を共有し情報交換をはかる機会の必要性が生じ、1996年には鳥類を専門とする獣医師を中心とした「鳥類臨床研究会」が設立され、今日まで積極的な学術的活動が継続されている（鳥類臨床研究会ホームページ、<http://jacam.ne.jp/>）。

愛玩鳥類にも様々な疾患が知られており、各種感染症も含まれるが、国内の個体における総括的な消化管寄生原虫保有状況については、これまで2件のみ報告されている。まず、愛玩動物販売業者が所有する飼育下鳥類534羽中108羽（20.2%）にジアリジア（*Giardia*）、コクシジウム（*Eimeria* または *Isospora*）、クリプトスポリジ

ウム (*Cryptosporidium*)、サルコシステイス (*Sarcocystis*)、ヘキサミタ (*Hexamita*) が認められた (Tsai et al., 1992)。また、2000年から2004年までに千葉県および埼玉県動物病院に来院した愛玩鳥類 4,768羽中 629羽 (13.2%) に、ヘキサミタ、ジアルジア、トリコモナス、イソスポラいずれかが認められた (西森ら, 2009)。

ヘキサミタはディプロモナス目ヘキサミタ科ヘキサミタ亜科に分類され、オカメイインコの糞便から頻繁に確認される。病原性は不明であるが、軟便やメレナと関係があるとの報告がある (Levy et al., 2015)。本原虫は、近年遺伝学的に消化管寄生原虫である *Spironucleus* 属と近縁であることが示され、ヘキサミタではなく *Spironucleus* 属の一種として、*S. meleagridis* の種名が提案されている (Levy et al., 2015)。

イソスポラは主にブンチョウに寄生する *Isospora luminaris* が近年国内で報告されており、幼鳥で下痢、血便、突然死などの症状を示す場合がある (Tokiwa et al., 2016)。

ジアルジアはディプロモナス目ヘキサミタ科ジアルジア亜科に分類され、国内のセキセイインコの腸に寄生する *Giardia psittaci* が知られており、下痢、体重減少などに関与する可能性があると考えられている (Abe et al., 2012)。

トリコモナスはトリコモナス目トリコモナス科に分類され、セキセイインコなどその嚢に寄生する *Trichomonas gallinae* が報告されており (Mckeon et al., 1997; Martínez-Herrero et al., 2019)、上部消化管に重度炎症を起こし、死に至ることもある。国内でもセキセイインコ、ブンチョウのその嚢内に感染が知られているが (西森ら, 2009; 西谷, 2010)、論文報告が少なく、保有状況はいまだに不明である。

クリプトスポリジウムは鳥マラリア原虫 (*Plasmodium*) と同様にアピコンプレックス門に属し、全国的に家禽での感染が知られており、感染ニワトリでは呼吸器への

影響が報告されている (Blagburn et al., 1991)。一方で愛玩鳥類のコザクラインコ、オカメインコ、ブンチョウおよびマメルリハ (*Forpus celestial*) に散見される本原虫の感染では、嘔吐、胃の肥大、下痢などおもに消化器系の症状を示すことが知られている (Abe et al., 2004, 2010, 2015, 2016; Makino et al., 2010)。そのため、愛玩鳥類寄生種とニワトリ寄生種との相違が示唆されているが、愛玩鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの分類・同定は不十分である。また、本原虫の有効な治療薬は開発されておらず、効果が期待される薬剤 (パロモマイシン、ニタゾキサニド) の投与が試みられているが、投与後も原虫オーシストが消失しないなど駆虫は困難である (Makino et al., 2010)。

鳥類を宿主とするコクシジウムは真コクシジウム目、アイメリア科の *Eimeria* 属原虫およびアイメリア亜科の *Isospora* 属原虫などの総称であり、特に *Eimeria* 属原虫の感染によって起こるニワトリにおけるコクシジウム症は養鶏における生産性への影響が大きい。そのため、国内では家禽における *Eimeria* 属原虫の保有状況、診断、治療および予防対策などが解明、確立されている。一方、愛玩鳥類でもコクシジウム感染が報告されているが、原虫保有率、原虫系統、感染個体の病状および治療結果など明らかにされていない。同様に動物園等展示施設の飼育下鳥類 (以下展示鳥類) におけるコクシジウム保有状況も不明な点が多い。

以上のように、国内の飼育下鳥類では各種消化管寄生原虫感染が散見されているが、家禽以外の愛玩鳥類を含めた飼育下鳥類における消化管原虫、特にクリプトスポリジウムおよびコクシジウム感染の実態は不明な点が多い。特に愛玩鳥類は、その種類の多様性や特異な生態から、イヌやネコなどの愛玩動物よりも疾患および治療法はもとより、原虫を含む感染症に関する獣医学的知見も不足している。さらに愛玩鳥類は、ヒトとの距離が極めて近い環境で飼育されており、消化管寄生原虫には上述のクリプ

トスポリジウムのように人獣共通に感染する種も知られており、感染リスク管理のためには、これら原虫の疫学情報などの基盤的知見が必要である。そこで本研究では、国内の愛玩鳥類を中心とした飼育下鳥類を対象に、消化管寄生原虫の保有状況を概観し、特にクリプトスポリジウムおよびコクシジウムについて、原虫保有状況、原虫種、感染動態、病原性、治療方法等を検討し、感染制御に資する獣医学的知見を得ることを目的とした。

はじめに、動物病院に来院した愛玩鳥類を対象に原虫保有状況を解明し(第2章)、特にコザクラインコのクリプトスポリジウム保有状況と症状を検討した(第3章)。次にオオフクロウで見られたクリプトスポリジウム症を対象に、病原体の遺伝子解析および治療を試みた(第4章)。さらに展示鳥類として、シロフクロウにおけるコクシジウム感染状況を検討した(第5章)。

表 1-1. ふじさわアビアン・クリニック（神奈川県藤沢市）に来院した鳥種および
来院数（2013年6月15日～2019年9月30日）

鳥種	来院数（%）
セキセイインコ	1,829（38.4）
オカメインコ	714（15）
ブンチョウ	509（10.7）
コザクラインコ	371（7.8）
フクロウ類※	147（3.1）
大型インコ類※	105（2.2）
アキクサインコ	101（2.1）
マメルリハ	101（2.1）
サザナミインコ	95（2.0）
中型インコ類※	95（2.0）
キンカチョウ	86（1.8）
小型インコ類※	24（0.5）
その他	587（12.3）
合計	4764

※複数の鳥種が含まれる

5.3 成績.....	60
5.3.1 オーシストの形態および OPG	
5.3.2 オーシストの培養結果	
5.3.3 原虫 DNA の増幅および分子系統解析	
5.4 考察.....	61
5.5 小括.....	63
第6章 総括.....	68
謝辞.....	74
引用文献.....	75
業績一覧.....	85

第 2 章

愛玩鳥類における消化管寄生原虫保有状況

2.1 はじめに

近年国内で伴侶動物として飼育されている鳥類（以下愛玩鳥類）は 94 万羽以上と推定され（日本ペットフード協会、2016）、その種類は、オウム・インコ類、フィンチ類、フクロウ類、ワシタカ類、など多様である。これら愛玩鳥類の多くは国内繁殖個体と推測されるが、海外からの輸入個体も含まれ、2018 年度の厚生労働省の統計では、13,000 羽が輸入されている（厚生労働省、2018）。

愛玩鳥類に見られる疾患には様々な感染症も含まれるが、総括的な消化管寄生原虫保有状況についてはこれまで以下の 2 件が報告されているのみである。Tsai et al. (1992) は愛玩動物販売業者が所有する飼育下鳥類を病理学的に検索した結果、534 羽中 108 羽 (20.2%) にジアルジア (*Giardia*)、コクシジウム (*Eimeria* または *Isospora*)、クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*)、サルコシステイス (*Sarcocystis*)、ヘキサミタ (*Hexamita*) などの消化管寄生原虫寄生を報告している。また、西森ら (2009) は 2000 年から 2004 年までに関東地方（千葉県および埼玉県）の動物病院に来院した愛玩鳥類の糞便およびそ嚢液を検査した結果、4,768 羽中 629 羽 (13.2%) にヘキサミタ、ジアルジア、トリコモナス、イソスポラのいずれかの消化管寄生原虫を認めている。以降、コザクラインコのクリプトスポリジウム感染 (Makino et al., 2010)、セキセイインコのジアルジア感染 (Abe et al., 2012) およびブンチョウのイソスポラ感染 (Tokiwa et al., 2017) が散発的に報告されているが、近年の国内の愛玩鳥類における消化管寄生原虫の感染の全容については不明な点が多い。さらに、これら消化管寄生原虫感染個体における病原性や治療効果についてもほとんど報告されていない状況である。

そこで本章では、2013年から2016年に神奈川県藤沢市の動物病院に来院した愛玩鳥類2,192羽を対象に、消化管寄生原虫保有状況について調査するとともに、病原性の有無や治療効果について検討を試みた。

2.2 材料および方法

2.2.1 対象個体

2013年6月15日から2016年12月31日までの間、ふじさわアビアン・クリニック（神奈川県藤沢市）に来院した愛玩鳥類2,192羽を対象とした。

2.2.2 消化管寄生原虫の検査

常法に従い、以下の糞便検査およびそ嚢液検査を行った。来院時に個別に糞便を採取し、スライドグラス上で生理食塩水を加えて直接塗抹した検体を光学顕微鏡（BA210E; Shimadzu, Kyoto, Japan）を用いて鏡検した（直接塗抹検査）。また、スライドグラス上で比重1.2のショ糖液と糞便を混合して光学顕微鏡下で鏡検した（簡易迅速ショ糖浮遊法検査）。さらに、経口胃ゾンデを用いて生理食塩水を対象個体のそ嚢内に投与し、採取した洗浄液を鏡検した（そ嚢液検査）。

2.2.3 原虫陽性個体に対する治療

原虫駆虫を目的として、ヘキサミタ、ジアルジア、トリコモナス感染が認められた個体には、メトロニダゾール（100mg/kg/day）あるいはチニダゾール（80mg/kg/day）

を飲水に混入するか、あるいは経口投与した。また、コクシジウム（イソスポラ、アメリア）感染が認められた個体には、スルファメトキサゾール・トリメトプリム（ST合剤：96mg/kg/day）あるいはトルトラズリル（10～15mg/kg/day）を飲水に混入するか、あるいは経口投与した。

2.3 成績

2,192羽中179羽（8.1%）から、各種消化管寄生原虫が検出された（表1）。内訳は、トリコモナス（*Tricomonas* spp., 64例）、ヘキサミタ（53例）、クリプトスポリジウム（32例）、コクシジウム（19例）、ジアルジア（8例）および分類未確定の消化管寄生原虫（3例）であった。また、鳥種別では、ブンチョウからもっとも多く消化管寄生原虫が検出され（59/243、24.2%）、次いでオカメインコ（57/327、17.4%）、マメルリハ（8/53、15%）、コザクラインコ（2/174、6.9%）であり、もっとも来院件数が多いセキセイインコは1.7%（13/774）であった（表1）。

ヘキサミタが検出された個体には臨床症状が認められず、投薬は行わなかった。

ジアルジアが検出された個体では軟便が認められることもあったが、ほぼ無症状であった。2.2.3に記載の方法により2～4週間投薬した結果、糞便から原虫シストは検出されなくなり、その後も再発は認められなかった。

そ嚢液中からトリコモナスが検出された個体では、臨床症状を認めない場合も多かったが、セキセイインコの一部では口腔内粘液の増加、食欲不振などの症状がみられ、重症化すると頸部食道閉塞、呼吸困難がみられた。2.2.3に記載の方法により2～4週間投薬した結果、そ嚢液から原虫が検出されなくなる個体も多かったが、重症化した

個体では食道閉塞による餓死、感染巣からの出血による死亡が認められた。

コクシジウムが検出された個体では、臨床症状を認めない場合が多かったが、軟便、粘膜便、血便などの消化器症状が認められた場合もあった。ST 合剤を 2~4 週間投与後もオーシストが消失しなかった個体にトルトラズリルを用いたところ、投与 7 日後には糞便から原虫オーシストが検出されなくなった。

2.4 考察

2013 年から約 3 年半の間に、神奈川県の一動物病院に来院した愛玩鳥類における消化管寄生原虫の保有率は 8.1%であった。確認された原虫種は、トリコモナスがもっとも多く、次いでヘキサミタ、クリプトスポリジウム、コクシジウムおよびジアルジアであった。1992 年の国内での報告では、愛玩動物販売業者が所有する飼育下鳥類 534 羽中 108 羽 (20.2%) で何らかの消化管寄生原虫が検出され、今回よりも高い保有率であった (Tsai et al. 1992)。Tsai et al. (1992) によると、内訳はジアルジアがもっとも多く (86 羽)、トリコモナスは検出されておらず、ヘキサミタも少なかった。しかし Tsai et al. (1992) は対象鳥類の各臓器を病理組織学的に検索する検出方法であり、糞便検査を実施しておらず、そのため細胞内に寄生しないトリコモナスやヘキサミタを検出できていなかった可能性が考えられる。なお、今回は病理組織検査を行っておらず、細胞内寄生性で Tsai et al. (1992) が報告した *Sarcocystis* の寄生は確認できなかった。西森らは 2000 年から 2004 年の間に関東圏内の動物病院に来院した愛玩鳥類 4,768 羽を対象に、本研究と同手法による糞便およびそ嚢液検査を行い、さらにライトギムザ染色を行い形態学的に原虫の検出を行ったところ、629 羽

(13.2%) でヘキサミタ、ジアルジア、トリコモナス、イソスポラのいずれかが見つかった (西森ら, 2009)。西森らはオカメインコの 38.2% に消化管原虫を検出しており、本研究の 17.4% よりも高い保有率であった。そのほとんどがヘキサミタ原虫であり、ライトギムザ染色によるシストおよび栄養体の検出が可能であったことが考えられる。

今回検出された原虫保有個体では、ヘキサミタ等では症状は認められず、駆虫薬を投与しなかった。しかし、levy らによると、オカメインコのヘキサミタ感染個体は、下痢や血便に関係すると報告されている (Levy et al., 2015)。本原虫は、近年遺伝学的に消化管寄生原虫である *Spiroucleus* 属と近縁であることが示され、ヘキサミタではなく *Spiroucleus* 属の一種として、*S. meleagridis* の種名が提案されている (Levy et al., 2015)。本研究においてジアルジアに感染したセキセイインコは無症状であったが、サザナミインコ (*Bolborhynchus lineola*) では食欲不振および軟便が認められている (Abe et al., 2012)。本研究および先行研究ともにジアルジアの種類は確認されていないが、原虫種、宿主鳥種と病原性との関係は不明であるため。今後も検討していく必要があると考えられる。

トリコモナスはブンチョウでは症状が認められないことが多かった。一方、本原虫はセキセイインコの上部消化管に重度炎症を起こし、死亡する場合もあることが報告されている (Mckeon et al., 1997; Martínez-Herrero et al., 2019)。今回の調査でも、トリコモナスに感染していたセキセイインコでは、上部消化管の重度炎症によって食道閉塞が起こり、死亡した例も認められたため、今後も注意が必要である。

鳥類の消化管寄生原虫には、宿主に病原性が認められない種もあり、多くの原虫は宿主に適応していると考えられるが、他の感染症や疾病に罹患している場合、適切な宿主-寄生体関係のバランスが保たれず、何らかの症状を示す可能性も考えられる。さらに、国内の愛玩鳥類における各種消化管寄生原虫類の全国的な保有状況については、系統立った調査方法が確立されておらず、調査機会も十分ではなく、全容は解明されていない。国内の愛玩鳥類を販売するブリーダーや輸入元の国々で、対象とする鳥類における消化管寄生原虫保有状況を明らかにすることは、経済的諸事情により困難だと考えられる。しかし、*C. meleagridis* のように一部の原虫種はヒトにも感染することから（浅野ら 2006）、今後も国内の愛玩鳥類における消化管寄生原虫の保有状況の把握は重要であると考えられる。本研究の原虫保有率は 8.1% であり、Tsai et al. (1992) の行った病理検査による原虫保有率結果 (20.2%) および西森ら (2009) が行った原虫保有率結果 (13.2%) よりも低い結果となった。消化管原虫はその大きさより光学顕微鏡下での判別には限界があると考えられ、今後は遺伝子検査による原虫の保有率検査も考慮する必要があると考えられる。

2.5 小括

2013 年から約 3 年半の間、神奈川県内の愛玩鳥類の各種消化管寄生原虫の保有率は 8.1% であった。鳥種別の保有率は、ブンチョウが 24.2% でもっとも高く、次いでオカメインコが 17.4% であった。原虫種別ではトリコモナスおよびヘキサミタが多い傾向であった。他にはクリプトスポリジウム、コクシジウム (*Isospora* および *Eimeria*) およびジアルジアが検出され、多くの原虫種が感染している状況が明らかになった。

一部のクリプトスポリジウムはヒトにも感染することが知られており、ヒトとの距離が非常に近い環境で飼育される愛玩鳥類では、今後も消化管寄生原虫保有状況について留意する必要があると考えられる。

表 2-1. 神奈川県内の動物病院に来院した愛玩鳥類における消化管原虫保有状況

(2013～2016 年)

鳥種	個体数	陽性数 (%)	検出された原虫種
セキセイインコ	774	13(1.7)	ジアルジア：8 トリコモナス：5
オカメインコ	327	57(17.4)	ヘキサミタ：43 トリコモナス：2 クリプトスポリジウム：12
ブンチョウ	243	59(24.2)	コクシジウム：13 トリコモナス：44 クリプトスポリジウム：2
コザクラインコ	174	12(6.9)	クリプトスポリジウム：11 ヘキサミタ：1
アキクサインコ	105	4(3.8)	ヘキサミタ：4 トリコモナス：1
マメルリハ	53	8(15)	クリプトスポリジウム：6 ヘキサミタ：2
フクロウ目	50	3(6)	コクシジウム：2 (シロフクロウ) クリプトスポリジウム：1
その他	466	23(4.9)	トリコモナス：12 ヘキサミタ：3 コクシジウム：4 その他原虫：3
合 計	2,192	179(8.1)	

第 3 章

コザクラインコにおけるクリプトスポリジウム 感染状況の解明および治療

3.1 はじめに

鳥類のクリプトスポリジウムには、遺伝的に *C. meleagridis*、*C. baileyi*、*C. galli* および *C. avium* の4種に加えて12の遺伝子型が報告されており (Ryan et al., 2003, 2010, Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009, 2014, 2015; Qi et al., 2011; Holubová et al., 2016; Chelladurai et al., 2016)、国内の愛玩鳥類におけるクリプトスポリジウム感染は、これまでオカメインコ (*Nymphicus hollandicus*)、コザクラインコ (*Agapornis roseicollis*)、セキセイインコ (*Melopsittacus undulates*)、マメルリハ (*Forpus coelestis*)、キエリクロボタンインコ (*Agapornis personata*) およびブンチョウ (*Padda oryzivora*) で確認されている (Abe et al., 2004, 2010, 2015, 2016; Makino et al., 2010; Iijima et al., 2018)。しかし本原虫のオーシストは非常に微小なため、通常の形態学的種同定は困難であり、愛玩鳥類における保有原虫種が不明な場合が多い。

これまで筆者らは2008～2009年に横浜市内の動物病院に来院したコザクラインコの糞便からクリプトスポリジウムのオーシストを検出し、原虫の small subunit ribosomal RNA (18SrRNA) およびアクチン遺伝子 DNA の増幅および塩基配列解析により検出されたクリプトスポリジウムは、鳥類寄生性の *Cryptosporidium avian genotype III* であることを報告した (Makino et al., 2010)。さらに、慢性嘔吐、衰弱、下血が認められたオーシスト陽性コザクラインコの腺胃からも同じ遺伝子型のクリプトスポリジウムを確認し、寄生部位を特定した。なお、感染個体には国内ではクリプトスポリジウム治療薬として認可されているパロモマイシンを投与したが、原虫は消失しなかった (Makino et al., 2010)。

以上のように、国内のコザクラインコにはクリプトスポリジウム感染が見られるが、2009年以降の状況は不明であり、原虫の駆虫も困難な状況である。そこで本章では、2013～2019年に藤沢市の動物病院に来院したコザクラインコを対象に、クリプトスポリジウムのオーシスト陽性率、感染強度、症状、発症年齢および原虫の分子系統を検討し、2010年までの状況（Makino et al., 2010）と比較した。

3.2 材料および方法

3.2.1 対象症例

2013年6月15日から2019年9月30日までの間、ふじさわアビアン・クリニック（神奈川県藤沢市）に来院したコザクラインコ371羽中（表1-1）糞便検査を行った275羽を対象とした。対象の年齢は2ヵ月齢から17歳齢までであった。

3.2.2 原虫オーシストの検出および感染強度の計測

来院時に個別に糞便を採取し、スライドグラス上で少量の糞便と比重1.2のショ糖液と混合し光学顕微鏡（BA210E; Shimadzu, Kyoto, Japan）で鏡検する簡易迅速ショ糖浮遊法検査により、原虫オーシストの有無を調べた。残った糞便は4℃で保存し、感染強度を調べるため、糞便1g中のオーシスト数（Oocysts per gram; OPG）の計測を行った。OPGは個々の糞便から0.02gをそれぞれ採取し、スライドグラス上でショ糖液と混和し、光学顕微鏡（BX41; Olympus, Tokyo, Japan）下でオーシスト数をカウントした。得られたオーシスト数に0.02を除してOPGを算出した。

オーシストの大きさは光学顕微鏡（BX41）で鏡検し、ソフトウェア（Micro Studio; WRAYMER, Osaka, Japan）によって長径と短径を計測した。

3.2.3 オーシスト陽性個体を対象とした X 線検査による消化管の形態学的変化の検討

オーシスト陽性のコザクラインコ 15 羽を対象に、X 線撮影装置 (VPX-40A ; Toshiba, Tokyo, Japan) で撮影後、Regius Σ II (Konica-Minolta, Tokyo, Japan) で画像診断を行い、消化管の形態学的変化の有無を調べた。

3.2.4 糞便からの DNA 抽出

光学顕微鏡下でオーシストが確認された 8 症例の糞便を用いて、QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) により DNA の抽出を行った。

3.2.5 PCR による原虫のアクチン遺伝子部分領域の増幅

抽出された DNA を用いて、既報に従いクリプトスポリジウムのアクチン遺伝子部分領域を標的とした nested-PCR を行った (Sulaiman et al., 2002)。PCR は PCR Thermal Cycler Dice® *Touch* (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い、2 μ l の DNA template、160 μ M の deoxynucleotide、10 \times PCR Buffer、1U の Ex-Taq (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い、20 μ l の反応溶液中で行った。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C で 5 分の熱処理後、94 $^{\circ}$ C で 45 秒間の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 45 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後 72 $^{\circ}$ C で 10 分間の最終伸長反応を行った。2nd PCR 反応は 1st PCR 産物を 1 μ l 使用し、アニーリングの温度を 45 $^{\circ}$ C で 45 秒間で行った以外は 1st PCR と同じ工程で行った。

3.2.6 電気泳動

TBE buffer を MupidII 電気泳動槽 (Mupid, Tokyo, Japan) に入れた後 1.5%アガロースゲル (AgaroseS : Nippon Gene, Tokyo, Japan) を泳動槽に設置した。PCR 産物 4 μ l に対して 1 μ l の 6 \times Loading Buffer Double Dye (Nippon Gene) を混和し、その全量をゲルのウェル内に添加した。また、DNA サイズマーカーは 100bp DNA ladder (Nippon Gene) を 4 μ l 使用した。100V で約 15-20 分泳動した後エチジウムブロマイドにゲルを浸漬し、約 20 分間静置した。紫外線ゲル撮影装置 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いてゲルの写真を撮影し、増幅産物の有無を確認した。

3.2.7 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定

PCR により増幅シグナルが認められたサンプルについて、PCR 産物の精製を Agencourt AMPure[®] XP (Beckman Coulter, California, USA) を用いて行った。精製された DNA は Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, California USA) を用い、サイクルシーケンス反応は 96 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理後、96 $^{\circ}$ C で 10 秒の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 5 秒のアニーリング、60 $^{\circ}$ C で 4 分の伸長反応を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。

シーケンス反応液は Clean SEQ (Beckman Coulter) によって Dye Terminator を除去した。

精製されたシーケンス反応物は ABI Prism[®] 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystem) により塩基配列を決定した。

3.2.8 遺伝子解析

得られた塩基配列は MEGA7.0 ソフトウェア (MEGA7.0; Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms) (Kumar et al., 2018) を用いて解析し、NCBI Nucleotide BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて塩基配列との相同性を比較検討した。系統解析は Clustal W によるアラインメントの後、Kimura-2 パラメーターを用いて各サンプル間の遺伝的距離を推定した。分子系統樹は近接結合法 (Neighbor-joining ; NJ 法) を用いて作成し、系統樹の内部枝の統計学的支持値をブートストラップ法 (1,000 回) で算出した。分子系統樹作成時のアウトグループには、*Plasmodium vivax* (GenBank Accession No. HQ230241) を用いた。

3.2.9 治療

慢性嘔吐症状を呈するオーシスト陽性個体に、制吐剤 (メトクロプラミド 0.5mg/kg) および胃粘膜保護剤 (アルジオキサ : 0.5mg/kg およびテプレノン : 20mg/kg) を経口投与し、鳥用栄養補給剤 (フォーミュラーAA® : Roudybush, California, USA) も給与して症状の変化を観察した。

3.3 成績

3.3.1 オーシストの排出状況、形態および OPG

コザクラインコ 275 羽中 18 例の糞便から、長径×短径が $7.38 \pm 0.16 \times 5.98 \pm 0.17 \mu\text{m}$ (mean \pm SE、n=10)、楕円形で明るいピンク色のオーシストが認められた (図

3-1)。性別はオス 9 羽、雌 6 羽、性別不明 3 羽であった。オーシスト陽性率は 6.5% であり、既報の 14.6% (175 羽中 25 羽、Makino et al., 2010) よりも低かった。OPG は 250~190,000 個/g と多様であった。オーシスト陽性 18 羽中 10 羽で、削瘦の他に慢性嘔吐、食欲減退、消化管出血などの消化器症状が認められた (図 3-2)。

3.3.2 X 線検査による消化管の形態学的変化

X 線検査を行ったオーシスト陽性 15 羽中 7 羽に、腺胃および中間帯の腫瘤状陰影が認められた (図 3-3. a-e)。1~4 歳齢では症状は認められなかったが、8 歳齢以上の陽性個体すべての個体に腺胃・中間帯の拡大を伴う消化器症状が認められた (表 3-2)。

3.3.3 原虫の分子系統解析

オーシストが確認された 8 羽の糞便を用いて検出された原虫遺伝子 DNA (679bp) は、すべて鳥類の胃寄生性クリプトスポリジウム群である *C. avian genotype III* と 100%一致し、前回調査時の感染例から検出された系統 (Makino et al., 2010) と同じ原虫種であると考えられた (図 3-4)。

3.3.4 治療結果

嘔吐症状を示した 10 羽中 7 羽で、症状の改善を認めた。しかし依然としてオーシストが糞便中に排出されており、原虫感染が持続していることが示唆された。

3.4 考察

今回、国内の愛玩飼育コザクラインコにクリプトスポリジウム感染が認められ、保有原虫種はこれまで国内の同鳥種から検出された *C. avian genotype III* であることが明らかになり、依然として本原虫系統がコザクラインコに感染していることが示唆された。*C. avian genotype III* は、オーストラリアのオカメインコ、モモイロインコおよびコガネメキシコインコから初めて検出され (Ng et al., 2006)、続いてブラジルのコザクラインコ (Nakamura et al., 2009)、さらに日本のコザクラインコから検出された (Makino et al., 2010)。*C. avian genotype III* は、分子系統的に胃寄生性のクリプトスポリジウムグループに分類され (図 3-4、Type A)、病理学的所見から腺胃および中間帯に寄生することが知られている (Makino et al., 2010)。今回も、原虫感染個体の X 線検査で腺胃および中間帯の腫瘤状陰影が認められたことから、本原虫系統はコザクラインコの消化器に影響していると考えられる。そのため、クリプトスポリジウム症の診断には、撮像による消化管の形態観察も有効であると考えられる。

今回の調査におけるクリプトスポリジウム保有率は 10 年前の先行研究 (Makino et al., 2010) より低かった。2012 年から 2018 年まで、日本における小鳥の飼育頭数は約 90 万羽以上であり、ほぼ変化がないと推測されるが (ペットフード協会、2016)、海外から輸入された鳥類の数は 2008 年度の約 11 万羽 (主な輸入元は台湾、次いでベルギー) から年々減少し、2018 年度では 1 万 3 千羽 (主な輸入元はベルギー、次いでタイ) になった。(厚生労働省、2018)。輸出国のコザクラインコにおけるクリプトスポリジウム保有率が不明なため、輸入数の減少が国内のコザクラインコのクリプトスポリジウム保有率に関係するかどうかは不明であるが、近年、*C. avian genotype III* はオーストラリア、ブラジルの他、中国などアジア地域からも報告されているため

(Ng et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Xiao et al., 2015; Yao et al., 2017)、注意が必要と考えられる。

Holubová らによるオカメインコおよびニワトリへの *C. avian genotype III* の感染実験では、オカメインコのみ感染が成立したが臨床症状は認められなかった (Holubová et al., 2019)。しかし、本研究では 8 歳齢以上の原虫陽性コザクラインコ 7 羽に消化器症状を認め、X 線検査で胃の中間帯の腫瘤状陰影が確認されたが、1 ~4 歳齢では症状が認められず、X 線検査でも形態学的変化は認められなかった。Makino らによると、慢性嘔吐を示し、X 線検査で胃の中間帯に腫瘤状病変を認めたコザクラインコでは、腺胃および中間帯の胃粘膜上皮細胞の過形成が認められ、慢性肥厚性胃炎から胃の内腔への圧迫が慢性嘔吐の原因であることが示唆されている (Makino et al., 2010)。よって、感染継続年数あるいは加齢が本原虫感染時の症状および中間帯の形態学的変化に関係することが考えられる。

クリプトスポリジウム症の治療にはパロモマイシンなどの薬剤が使用されているが、ヒトのクリプトスポリジウム感染症例においても健常者に対しては対症療法による治療がおこなわれる (浅野ら、2006)。第 3 章におけるオオフクロウの治療では、今回と同様の胃粘膜保護剤、栄養の改善等を行い良好な結果を得たが、本章で試みた治療では改善効果が認められなかったため、コザクラインコにおける *C. avian genotype III* の胃内感染は難治性である可能性がある。

3.5 小括

最近 6 年間で調査した国内の愛玩飼育下のコザクラインコでは、10 年前と同一のクリプトスポリジウム系統 (*Cryptosporidium avian genotype III*) が感染していた。本系統感染個体では消化器症状が多く見られ、特異的な腺胃、中間帯の腫瘤状陰影が確認された 8 歳以上の陽性個体で消化器症状が認められ、コザクラインコのクリプトスポリジウム感染では症状と年齢との関連が示唆された。なお、発症個体に対する治療により症状は寛解したが、駆虫は困難であった。

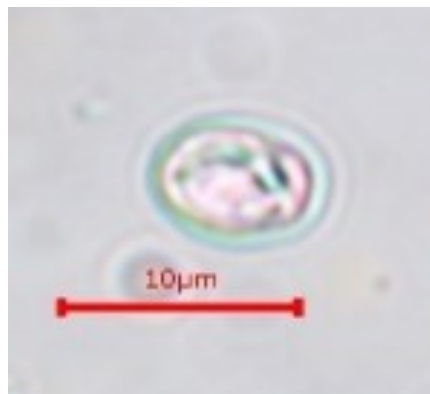


図 3-1. ショ糖浮遊法によりコザクラインコの糞便から検出されたオーシスト
長径×短径は $7.38 \pm 0.16 \times 5.98 \pm 0.17 \mu\text{m}$ (mean \pm SE、n=10)、
楕円形で明るいピンク色を呈していた。

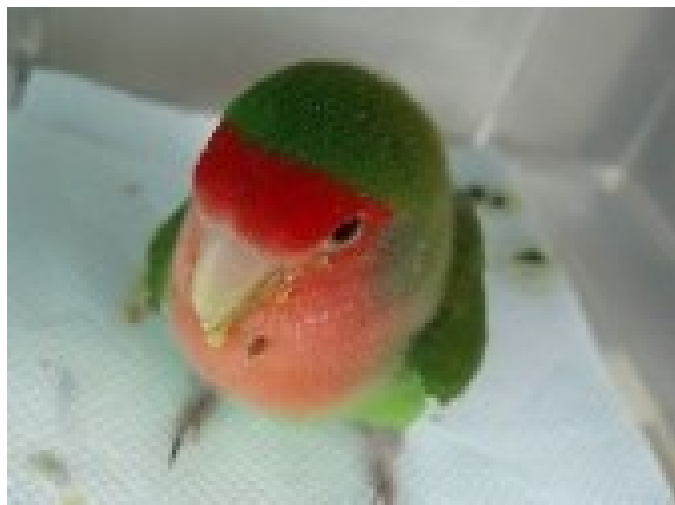


図 3-2. 慢性嘔吐症状を示したコザクラインコ



図 3-3a. クリプトスポリジウムオーシスト陽性、非発症個体における VD およびラテラル像（表 3-1, 症例 A）

点線の部分は腺胃および中間帯を示す。

腺胃、中間帯ともに異常は認められなかった。



図 3-3b. クリプトスポリジウムオーシスト陽性、非発症個体における VD およびラテラル像（表 3-1, 症例 O）

点線部分は腺胃および中間帯を示す。

腺胃、中間帯ともにやや拡大が認められた。

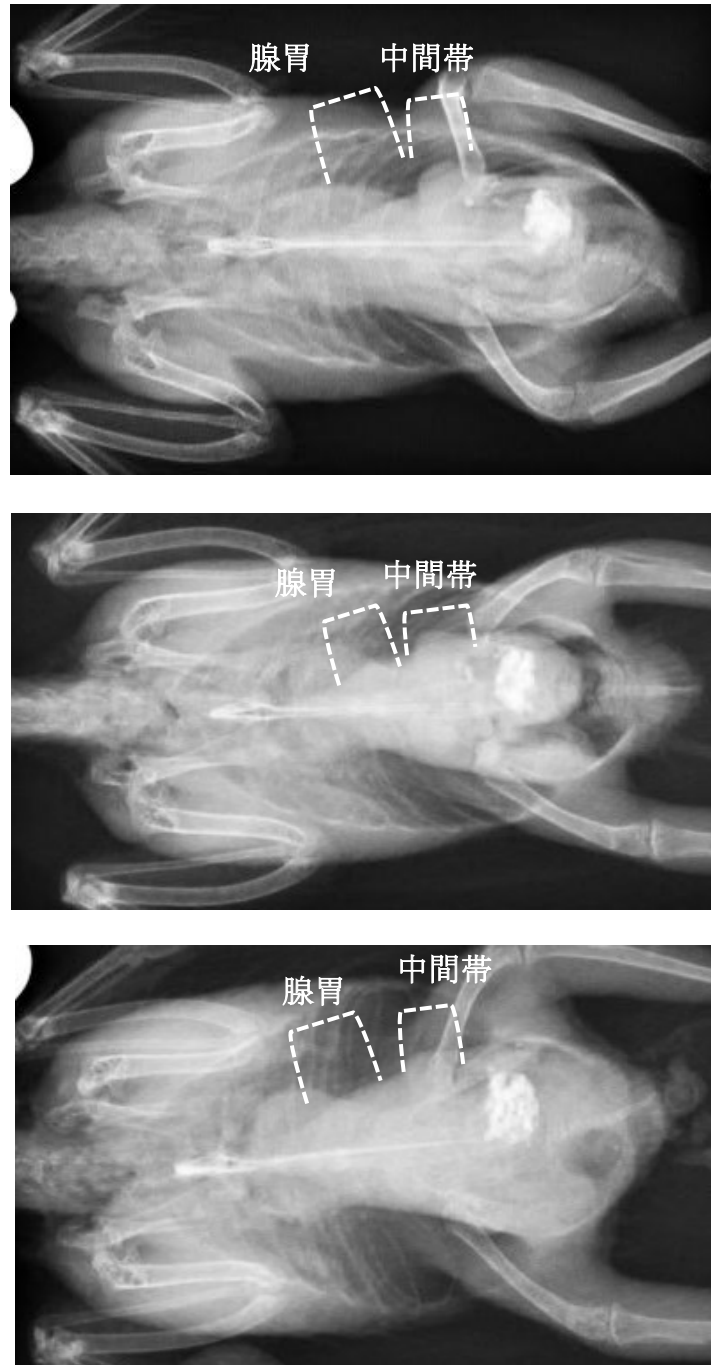


図 3-3c. クリプトスポリジウムオーシスト陽性、発症個体における VD 像

(表 3-1, 症例番号 L, N, O)

点線の頭側部分は腺胃、尾側は中間帯を示す。

重度慢性症状を呈する個体は腫瘤状陰影が大きい傾向にあった。

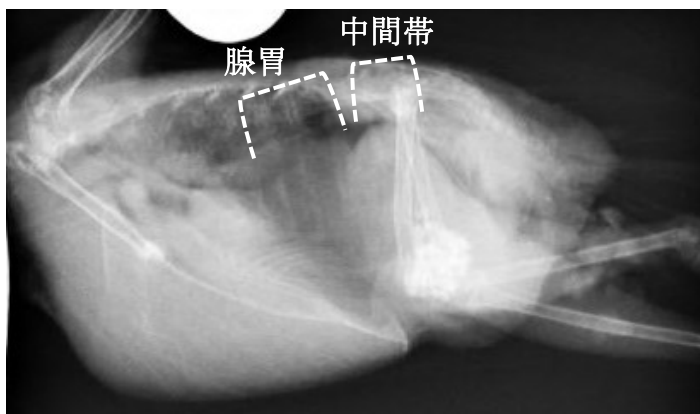
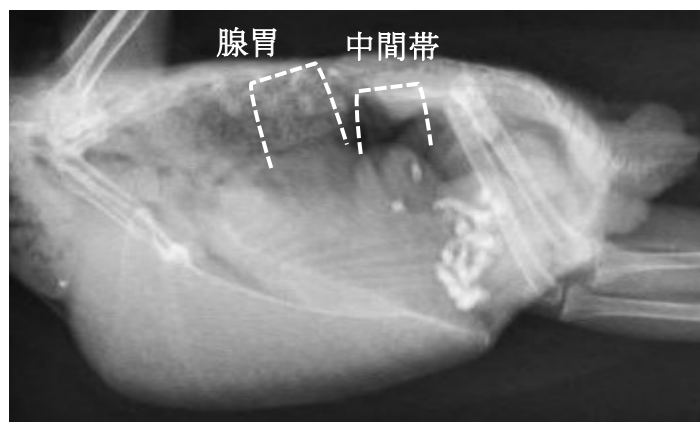
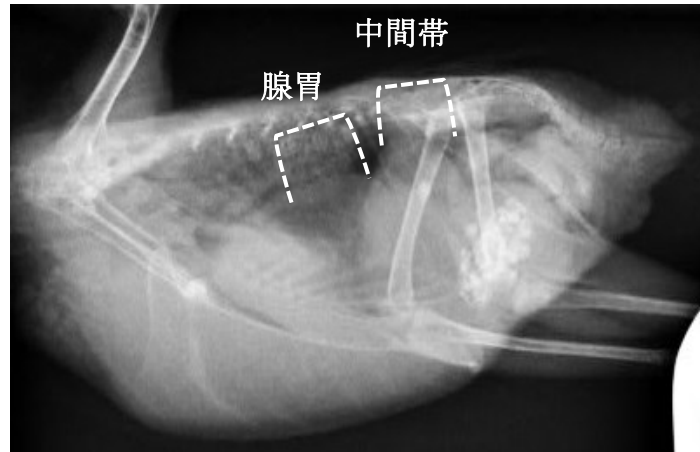


図 3-3d. クリプトスポリジウムオーシスト陽性、発症個体におけるラテラル像

(表 3-1, 症例番号 L, N, O)

点線の頭側部分は腺胃、尾側は中間帯を示す。

腺胃および中間帯の膨隆が顕著。

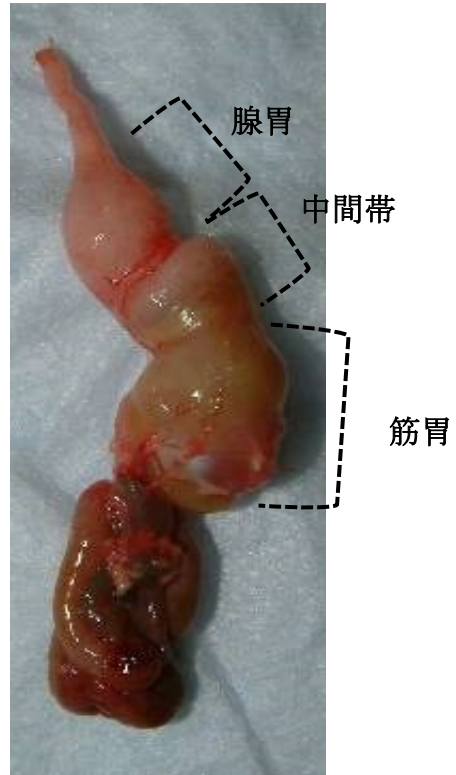


図 3-3e. クリプトスポリジウムオーシスト陽性、発症個体の剖検所見
腺胃と筋胃の間の中間帯の膨隆が認められた。

表 3-2. オーシスト陽性個体の履歴、OPG、遺伝子解析結果

	現在の年齢	性別	嘔吐動作	X線像	OPG	遺伝子解析
A	6歳 3ヶ月	オス	なし	異常なし	ND	Avian genotypeIII
B	6歳 1ヶ月	不明	なし	やや拡大	11651	Avian genotypeIII
C	1歳 6ヶ月	オス	なし	異常なし	ND	ND
D	4歳 9ヶ月	不明	あり	やや拡大	ND	ND
E	3歳 7ヶ月	メス	なし	ND	ND	ND
F	8歳 0ヶ月	メス	あり	中間帯及び消化管膨隆	ND	ND
G	11歳 5ヶ月	オス	あり	中間帯腫瘤状陰影	ND	ND
H	3歳 9ヶ月	オス	なし	異常なし	ND	ND
I	4歳 11ヶ月	メス	なし	異常なし	189,146	Avian genotypeIII
J	7歳 2ヶ月	オス	あり	中間帯腫瘤状陰影	9,766	AviangenotypeIII
K	6歳 3ヶ月	メス	あり	ND	ND	ND
L	7歳	メス	あり	中間帯膨隆	ND	Avian genotypeIII
M	1歳 8か月	不明	なし	異常なし	3,450	Avian genotypeIII
N	9歳	オス	あり	中間帯腫瘤状陰影	ND	ND
O	1歳 8か月	メス	あり	中間帯腫瘤状陰影	123,750	AviangenotypeIII
P	2歳 4か月	オス	なし	やや拡大	86,550	AviangenotypeIII
Q	15歳	オス	あり	ND	ND	ND
R	15歳	オス	あり	中間帯腫瘤状陰影	ND	ND

ND=未検査

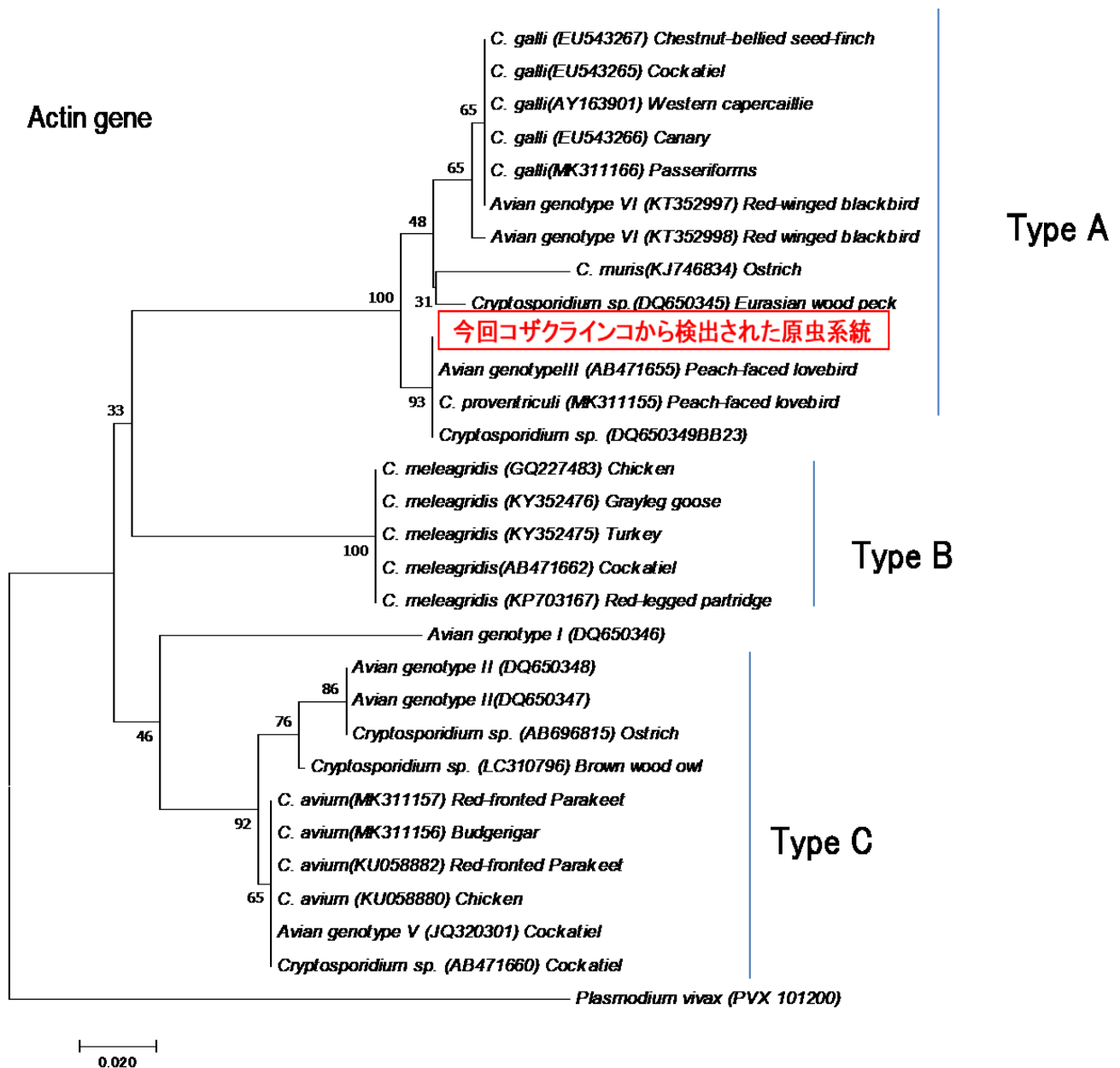


図 3-4. 検出されたクリプトスポリジウム属原虫の分子系統樹

Type A は胃寄生のクリプトスポリジウム群、Type B は腸寄生 (*C. meleagridis*)、Type C はクロアカ、気管、消化管寄生群。

第4章

オオフクロウにおけるクリプトスポリジウム 感染および臨床経過

4.1 はじめに

近年、国内ではフクロウ類 (*Strigiformes*) が愛玩鳥類として注目されて飼育数が増えており、小型のオウム・インコ類 (*Psittaciformes*)、ブンチョウ (*Padda oryzivora*) に次いで来院件数も多くなっている (序章 表 1-1)。しかしフクロウ類は食性 (肉食性) や生活様式 (夜行性) がインコやブンチョウなどの一般的な愛玩鳥類とは異なり、その生態も不明な点が多い。そのため、生理学的知見や各種臨床的知見はもとより、感染症に関する知見、特に消化管寄生原虫に関する報告も少ない。

これまでに、フクロウ類におけるクリプトスポリジウム感染については、スペインのコノハズク (*Otus scops*) 保護個体に見られた *Cryptosporidium baileyi* の角膜および呼吸器感染 (Molina-Lopez et al., 2010) および日本の展示施設飼育下のシロフクロウ (*Bubo scandiacus*) における *C. baileyi* の胃内感染 (Nakagun et al., 2017) が報告されているのみである。愛玩鳥類からは多様な種、遺伝型のクリプトスポリジウムが検出されていることから (Abe et al., 2004, 2010, 2015, 2016; Makino et al., 2010)、フクロウにも *C. baileyi* 以外の寄生種、遺伝子型が寄生し、病態も異なる可能性が考えられるが、フクロウ類に対する本原虫感染の影響についてはまだ十分に明らかになっておらず、治療方法も確立していない状況である。

そこで本章では、消化器症状を示した愛玩飼育下のオオフクロウ (*Strix leptogrammica*) におけるクリプトスポリジウム感染状況および臨床経過の解明、原虫遺伝子型の解析および治療を試みた。

4.2 材料および方法

4.2.1 対象症例の履歴および来院時の症状

本症例は、茨城県で他のフクロウ類と一緒に人工ふ化後、神奈川県の大ブリーダーに導入され、多くのフクロウ類とともに展示されていた1ヵ月齢（雛相当）のオオフクロウ（*Strix leptogrammica*）である。来院10日前に愛玩飼育目的で一般人が大ブリーダーから購入し、飼育開始後3日目から食欲不振を認め、来院前日に水様便および嘔吐が認められたため、神奈川県藤沢市のふじさわアビアン・クリニックに来院した。来院前は室内で単独で飼育され、鳥類を含め他の動物は飼育されていなかった。本症例は総合ビタミン、水道水と、腸を除去し-4°Cで凍結保存したウズラを解凍して与えられていた。

初診時の体重は251g、キールスコア（Keel score、以下KS；鳥類におけるボディーコンディションスコア、1～5の5段階に分かれ3が正常）は2+で、やや瘦削しており、重度の脱水で衰弱していたため入院治療となった。

4.2.2 ショ糖浮遊法検査による原虫オーシストの検出および感染強度計測

来院時に糞便を採取し、スライドグラス上で少量の糞便と比重1.2のショ糖液と混合し光学顕微鏡（BA210E；Shimadzu, Kyoto, Japan）下で鏡検する簡易迅速ショ糖浮遊法検査により、オーシストの有無を調べた。

糞便の残りは4°Cで保存し、原虫感染強度を調べるため、糞便1g中のオーシスト数（Oocyst per gram: OPG）を計測した。OPGの計測は、糞便を計量し、ガラス製の試験管に入れ、比重1.2のショ糖液を加えて懸濁し、試験管の8分目になるまでショ糖液を加えながら攪拌し2,000回転で5分遠心した。遠心後の混合液の表面から白

金耳でスライドガラス上に数回浮遊物を含む混合液を滴下し、カバーガラスで覆い、カバーガラス直下に認められる浮遊したオーシスト数を計測した (Abbassi et al., 2000 を改良)。

オーシストの大きさは光学顕微鏡 (BX41; Olympus, Tokyo, Japan) で鏡検し、ソフトウェア (Micro Studio; WRAYMER, Osaka, Japan) によって長径と短径を計測した。

4.2.3 糞便からの DNA 抽出

光学顕微鏡下でオーシストが確認された糞便について、3.2.4 に記載の方法を用いて DNA の精製・抽出を行った。

4.2.4 PCR によるクリプトスポリジウム原虫の遺伝子増幅

検出されたクリプトスポリジウムの種または遺伝子型を同定するために、3つの遺伝子領域 (18S rDNA、HSP ; heat shock protein 70 およびアクチン) を各々 nested-PCR により増幅した。

アクチン遺伝子部分領域を標的とした nested-PCR は Sulaiman et al., (2002) に従って実施した。PCR は GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems, California, USA) を用い、0.5 μ M のそれぞれのプライマー、2.5 μ l の DNA template、250 μ M の deoxynucleotide、1 \times PCR Buffer、2mM の MgCl₂、1.25U の ExTaq HotStart Version (TaKaRa, Shiga, Japan) に精製水を加えた 25 μ l の反応溶液で行った。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C で 5 分の熱処理後、94 $^{\circ}$ C で 45 秒間の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 45 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして 35 サイク

ル行った。また、すべてのサイクルが終了した後 72°Cで 10 分間の最終伸長反応を行った。2nd PCR 反応は 1st PCR 産物を 1μl テンプレートとして使用し、アニーリングの温度を 45°Cで 45 秒間行った以外は 1st PCR と同じ工程でおこなった。

18SrDNA の遺伝子部分領域を標的とした nested-PCR は Xiao et al., (1999, 2000) に従って実施した。PCR は GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) を用い、0.5μM のそれぞれのプライマー、2.5μl の DNA template、250μM の deoxynucleotide、1×PCR Buffer、2mM の MgCl₂、1.25U の ExTaq HotStart Version (TaKaRa) に精製水を加えた 25μl の反応溶液で行った。PCR 反応は 94°Cで 5 分の熱処理後、94°Cで 45 秒間の熱変性、60°Cで 45 秒間のアニーリング、72°Cで 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後 72°Cで 10 分間の最終伸長反応を行った。

HSP 遺伝子の部分領域を標的とした nested-PCR は Sulaiman et al., (1998, 2000) に従って実施した。PCR は GeneAmp PCR System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) を用い、0.5μM のそれぞれのプライマー、2.5μl の DNA template、250μM の deoxynucleotide、1×PCR Buffer、2mM の MgCl₂、1.25U の ExTaq HotStart Version (TaKaRa) に精製水を加えた 25μl の反応溶液で行った。PCR 反応は 94°Cで 5 分の熱処理後、94°Cで 45 秒間の熱変性、55°Cで 45 秒間のアニーリング、72°Cで 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後 72°Cで 10 分間の最終伸長反応を行った。2nd PCR 反応は 1st PCR 産物を 1μl 使用し、アニーリングの温度を 45°Cで 45 秒間で行った以外は 1st PCR と同じ工程で行った。

4.2.5 電気泳動

TAE buffer を Mupid 電気泳動槽 (Mupid, Tokyo, Japan) に入れた後 3%アガロースゲル (NuSieve 3:1 agarose, Lonza Japan) を泳動槽に設置した。PCR 産物 3 μ l に対して 3 μ l の 6 \times Loading Buffer を混和し、その全量をゲルのウェル内に添加した。また、DNA サイズマーカーは 100bp DNA ladder (TaKaRa) を 3 μ l 使用した。100V で約 45 分から 50 分間泳動した後エチジウムブロマイドにゲルを浸漬し、約 20 分間静置した。紫外線ゲル撮影装置 (ATTO, Tokyo, Japan) を用いてゲルの写真を撮影し、増幅産物の有無を確認した。

4.2.6 増幅された塩基配列の決定

PCR により増幅シグナルが認められたサンプルについて、PCR 産物の精製を QIAquick PCR Purification kit または QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) を用いて行った。精製された DNA は Big Dye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem, California USA) を用い、サイクルシーケンス反応は 96 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理後、96 $^{\circ}$ C で 10 秒の熱変性、50 $^{\circ}$ C で 5 秒のアニーリング、60 $^{\circ}$ C で 4 分の伸長反応を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。

シーケンス反応液 BigDye X Terminator Purification kit (Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, USA) によって Dye Terminator を除去した。

精製されたシーケンス反応物は ABI Prism[®] 3130xL Genetic analyzer (Applied Biosystem) により塩基配列を決定した。

4.2.7 遺伝子解析

得られた塩基配列は MEGA6.0 ソフトウェア (MEGA6.0; Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms, Kumar et al., 2018) を用いて解析し、DNA データベース登録配列との相同性を NCBI Nucleotide BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて比較検討した。また、NJ plot software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>) 用い、Tamura-Nei 法パラメータを用いてサンプルの遺伝子距離を推定し、近接接合法を用いて分子系統樹を作成し、系統樹内部枝の統計的支持値をブートストラップ法 (1,000 回反復) により算出した。分子系統樹作成時の 18SrRNA、HSP およびアクチン遺伝子の塩基配列に対するアウトグループには、それぞれ *Eimeria faurei* (GenBank Accession No. AF345998)、*Plasmodium falciparum* (GenBank Accession No. M19753) および *P. falciparum* (GenBank Accession No. M19146) を用いた。今回得られた 18SrRNA、HSP およびアクチン遺伝子の塩基配列に対するアクセッション番号 (Accession Number) は、それぞれ LC310795、LC310796 および LC310797 である。

4.3 成績

4.3.1 来院後の処置および経過

第 1 病日の体重は 251g でやや削瘦しており (KS2+)、目は落ちくぼんでおり、重度脱水、下痢、衰弱していることが確認された (図 4-1)。脱水改善のためリンゲル液を 1 日 2、3 回皮下に点滴投与した。また、止瀉薬 (塩化ベルベリン)、胃腸薬 (アルジオキサおよびテプレノン) および 2 次感染予防薬 (クラブラン酸アモキシシリン)

を犬猫用療法食の退院サポート® (Royal Canin, Gard, France) に混和して胃ゾンデにより胃内へ強制投与した。第 3 病日には下痢および脱水は改善し、体重も 309g に増加した。第 13 病日には体重は 475g で KS3 になり退院させた。その後、体重は第 20 病日に 538 g、第 51 病日に 718g まで増加した (図 4-3)。

4.3.2 原虫オーシストの検出および OPG 経時的変化

シヨ糖浮遊法検査より第 1 病日の糞便から長径×短径が $5.25 \pm 0.13 \times 4.0 \pm 0.08 \mu\text{m}$ (mean±SE、n=10) の楕円形、明るいピンク色のオーシストを確認した (図 4-2)。第 6 病日までは多数のオーシストが認められ、OPG は 2,000 個/g 以上であった。OPG は症状の改善とともに減少し、第 51 病日には 0 となり、原虫 DNA の増幅も認められなかった (図 4-3)。第 119 日目には体重は 804g に増加し換羽も見られた (図 4-4)。

4.3.3 遺伝子解析結果

18SrRNA、HSP およびアクチン遺伝子を標的とした PCR の結果、各遺伝子共に増幅シグナルが認められた。相同性解析の結果、得られた 18SrRNA の部分塩基配列 (773bp)、アクチンの部分塩基配列 (995bp) および HSP の部分塩基配列 (1848bp) は、*C. avium* にそれぞれ 98.87%、98.7% および 96.9% 一致したが、これまで報告されていない新たな遺伝子型の可能性が示唆された。系統解析の結果、得られた 3 つの遺伝子は、ともに *C. avium* のクラスターであることが確認された (図 4-5-7)。

4.3.4 購入元のブリーダー飼育下の他のフクロウ類における原虫保有状況

本症例に見られたクリプトスポリジウムの感染源を検討するため、購入先のブリーダーで同室の別のテナ内に飼育されていた他の症例の糞便を採取し、4.3.3.と同様にクリプトスポリジウムのアクチン遺伝子の増幅および遺伝子解析を行った。対象鳥類は、オオフクロウ 2羽、カラフトフクロウ (*Strix nebulosi*) 1羽、メンフクロウ (*Tyto alba*) 1羽、チゴハヤブサ (*Falco subbuteo*) 1羽、マレーワシミミズク (*Bubo sumatranus*) 1羽、ケープワシミミズク (別名マッキンダーワシミミズク ; *Bubo capensis*) 1羽、マレーモリフクロウ (*Strix seloputo*) 1羽、ユーラシアワシミミズク (亜種のシベリアワシミミズク含む ; *Bubo bubo*) 5羽、ミナミワシミミズク (別名ベンガルワシミミズク ; *Bubo bengalensis*) 2羽、アフリカワシミミズク (*Bubo africanus*) 5羽計 11種 20羽であった。

アクチン遺伝子の部分解析の結果、マレーモリフクロウ (3ヵ月齢) からのみ、本症例と 100%一致する遺伝子型のクリプトスポリジウム原虫 DNA が検出された (表 4-8)。なお、このマレーモリフクロウに症状は認められなかった。

4.4 考察

今回、国内で初めて愛玩飼育下のオオフクロウにクリプトスポリジウム感染が確認された。フクロウ類のクリプトスポリジウム感染は、スペインの猛禽類リハビリセンターで保護されていたコノハズクに *C. baileyi* 感染が認められ、角膜・呼吸器症状も認められている (Molina-Lopez et al., 2010)。また、国内の展示飼育下のシロフクロウに *C. baileyi* の胃内感染が報告されているが (Nakagun et al., 2017)、フクロウ類

におけるクリプトスポリジウム感染例は世界的にも報告が少ない。

本症例のクリプトスポリジウムは分子系統的に *C. avium* (Abe et al., 2015; Nakamura et al., 2015) に近縁であることが示唆された。*C. avium* は、排泄腔、消化管に寄生し、削瘦、下痢と関係する可能性が示唆されており、本症例で見られた下痢、削瘦などの症状がクリプトスポリジウム感染が原因となった可能性が示唆される。しかし、今回は下痢の原因となる他の因子 (*Candida* spp.、大腸菌、*Salmonella* spp.、ウェルシュ菌および各種ウイルス) については検査しておらず、合併症の影響についても検討していく必要があると考える。

今回、本症例と同じブリーダーが飼育していた3ヵ月齢のマレーモリフクロウからも同一の遺伝子型のクリプトスポリジウムが検出された。よって、本原虫の感染源はこのブリーダーあるいは孵卵場であることが考えられる。

鳥類のクリプトスポリジウム感染は、慢性感染による症状の発現が疑われる *C. avian genotype III* (Makino et al., 2010) を除き、国内では雛および若齢個体で報告され、雛では下痢、削瘦などの症状との関連性が指摘されている (Abe et al., 2004, 2010, 2015, 2016)。本症例と同じブリーダー飼育下で、同一の遺伝子型のクリプトスポリジウムが検出されたマレーモリフクロウは換羽が始まった3ヵ月齢で、特に症状は認められなかった。今回症状が認められたオオフクロウは1ヵ月齢であり、比較症例数が少ないものの、クリプトスポリジウム感染では、雛で重症化する可能性も示唆される。

鳥類のクリプトスポリジウムでは、*C. meleagridis* が人獣共通に感染することが知られていたが (Yagita et al., 2001; Qi et al., 2011; Ryan et al., 2010, 2014)、ヒトの免疫不全患者から *C. baileyi* が検出されるなど (Dirtrich et al., 1991)、*C. meleagridis*

以外の種もヒトに感染する可能性がある。今回検出されたクリプトスポリジウムがヒトに病原性を示すかは不明であるが、フクロウ類が一般家庭で愛玩用に飼育される機会が増加しているため、今後も愛玩飼育用のフクロウ類における本原虫保有状況について留意する必要がある。

4.5 小括

消化器症状を示した愛玩鳥のオオフクロウ幼鳥に、国内で初めてクリプトスポリジウム原虫感染が認められた。検出された原虫は、クリプトスポリジウム原虫の新たな遺伝子型である可能性が示唆された。

本症例は主に下痢を呈していたが、オーシストの減少とともに症状が改善されたため、*C. avium* のように腸に寄生する種である可能性が考えられる。

また、本症例を飼育していた同じブリーダーにおいて、3 ヶ月齢のマレーモリフクロウから本症例と同じ原虫遺伝子型が検出されたが、症状は見られなかったことから、本原虫種は幼鳥で病原性を示す可能性が考えられた。

国内では一般家庭でもフクロウ類を飼育する機会が増えており、今後同様の症例がみられる可能性がある。本症例のクリプトスポリジウムがヒトに感染する可能性は不明だが、フクロウ飼育数が増加しており、留意する必要がある。



図 4-1. 下痢、削瘦、脱水を呈したオオフクロウ（雛、1 ヶ月齢）

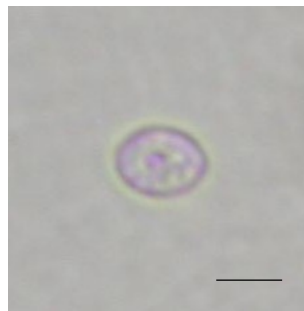
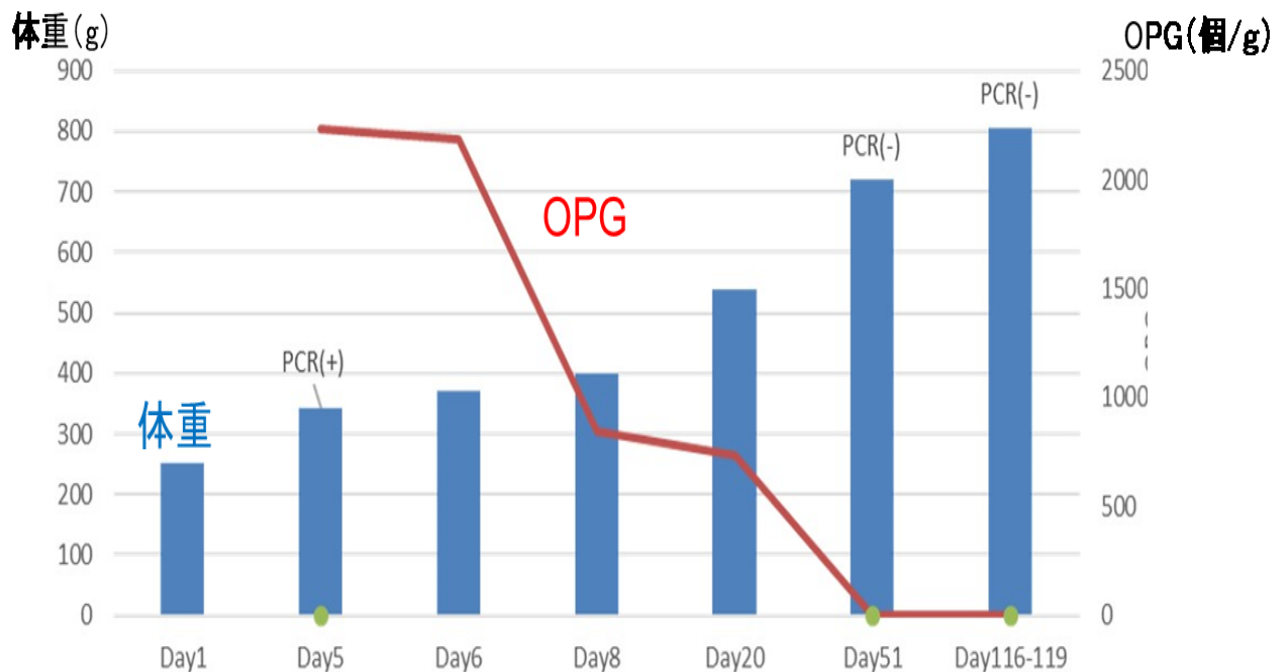


図 4-2. ショ糖浮遊法によりオオフクロウ糞便から検出されたオーシスト

スケールバー=5 μ m



臨床経過

第1病日: 重度脱水、下痢、衰弱、虚脱 **入院・治療開始**
 第3病日: 下痢および脱水は改善し体重増加
 第13病日: 退院
 第20病日: 状態良好、冷凍ウズラをよく食べる
 第51病日: 体重増加および換羽を認める
 第119病日: 下痢は再発せず、状態は良好

図 4-3. オオフクロウの体重と OPG の経時的変化および臨床経過

第5病日の糞便からクリプトスポリジウムの 18SrRNA、HSP およびアクチン遺伝子 DNA の増幅が認められたが、第51病日、116病日には認められなかった。

18SrRNA

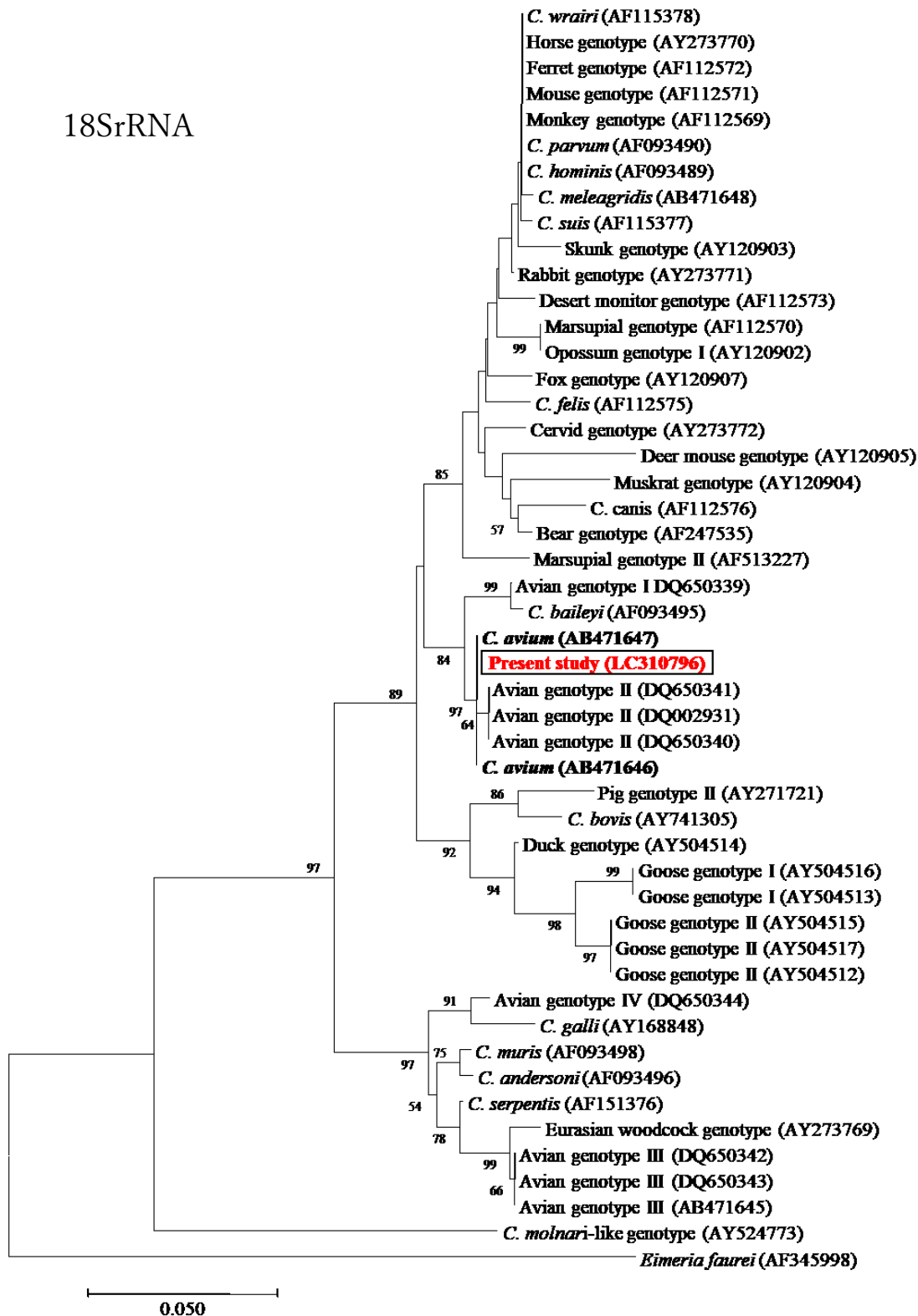


図 4-5. オオフクロウの糞便から検出された鳥類のクリプトスポリジウム原虫遺伝子の分子系統関係 (18SrRNA)

actin gene

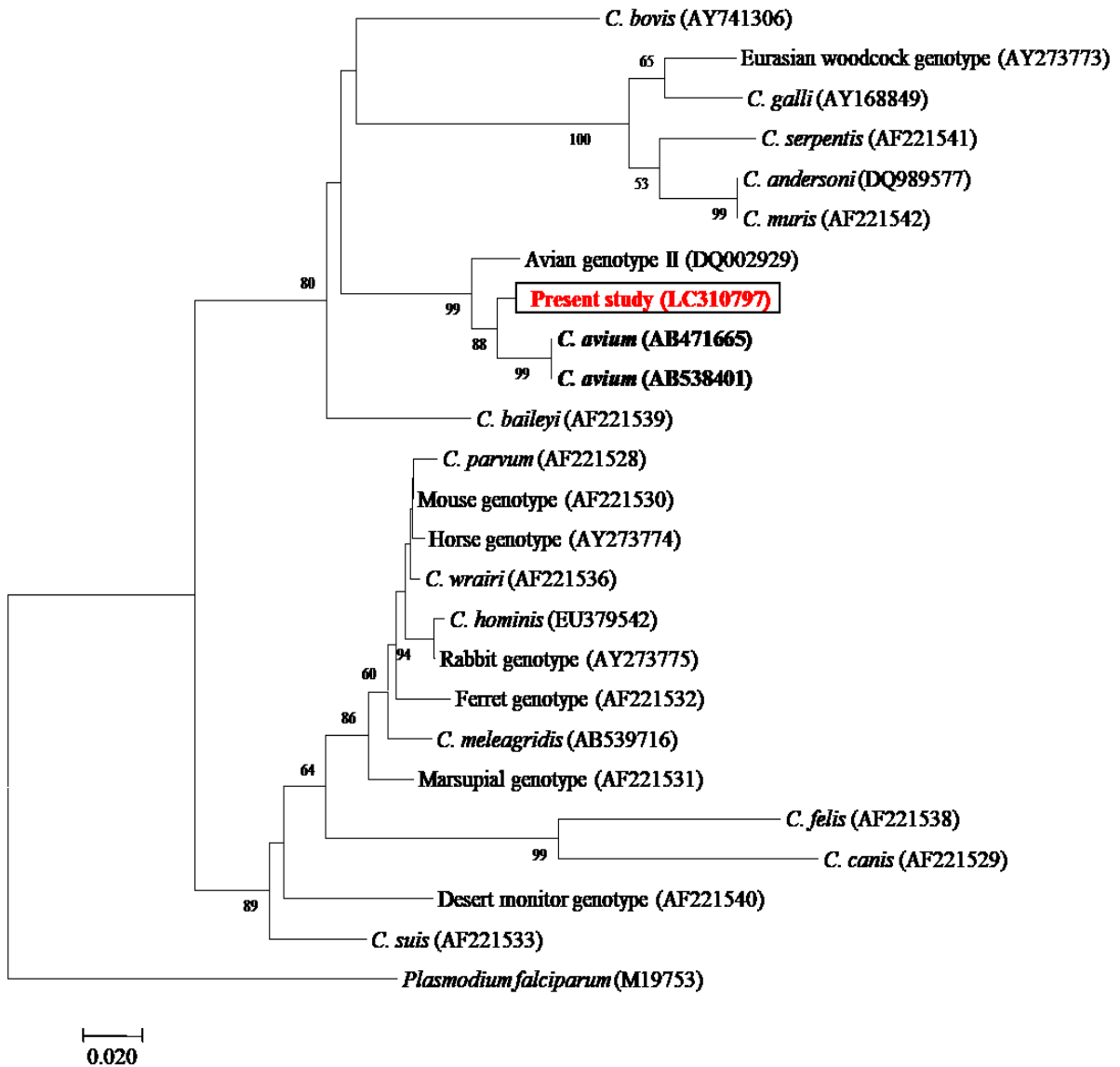


図 4-6. オオフクロウの糞便から検出された鳥類のクリプトスポリジウム原虫遺伝子の分子系統関係 (アクチン)

HSP gene

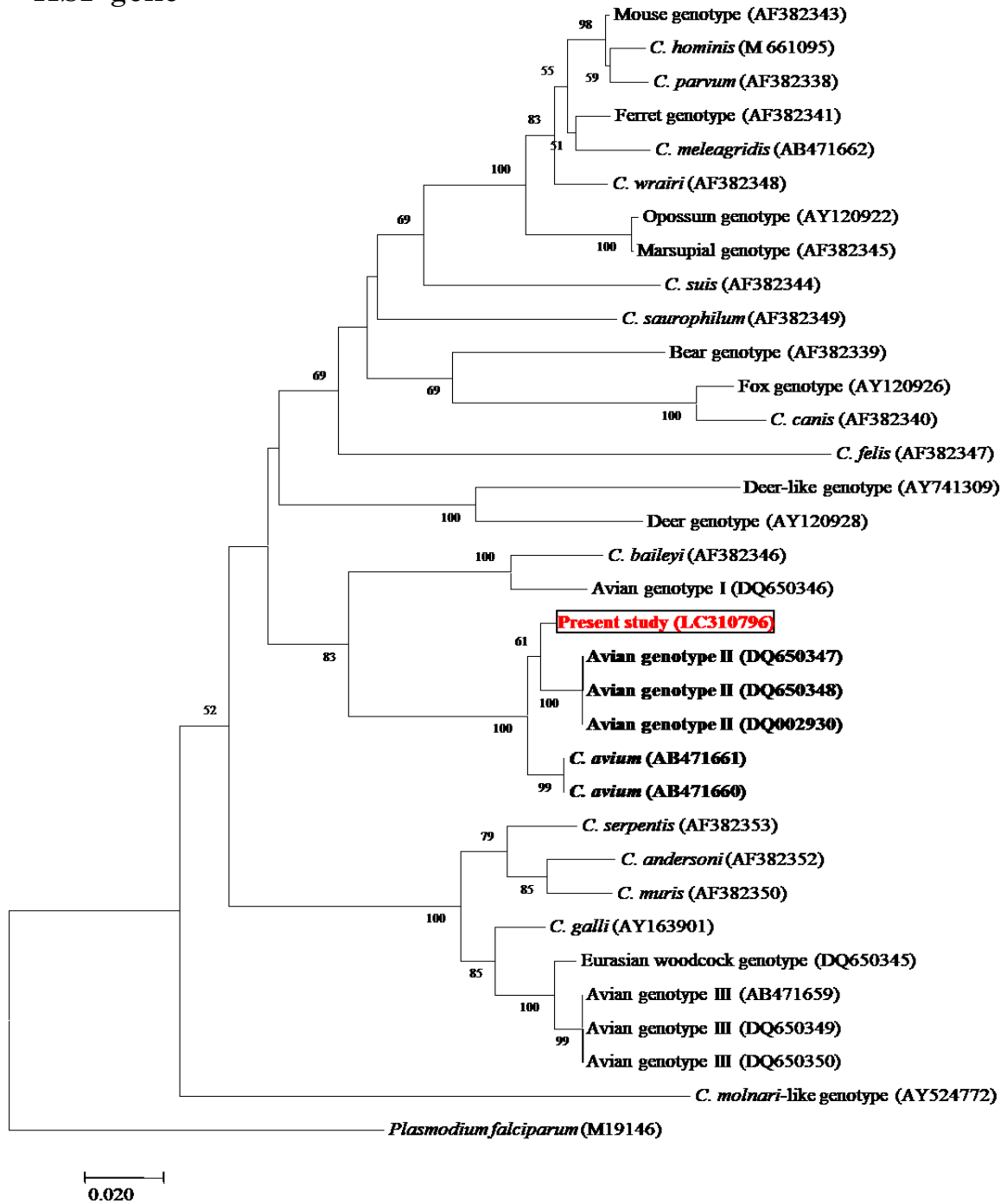


図 4-7. オオフクロウの糞便から検出された鳥類のクリプトスポリジウム原虫遺伝子の分子系統関係 (HSP)

表 4-1. 本症例が飼育されていたブリーダーにおける他の鳥の原虫保有状況

症例番号	鳥種	PCR (アクチン)	シーケンス結果
A	オオフクロウ	+	new genotype (本症例)
B	カラフトフクロウ	-	
C	メンフクロウ	-	
D	チゴハヤブサ	-	
E	オオフクロウ	-	
F	マレーワシミミズク	-	
G	マッキンダーワシミミズク	-	
H	マレーモリフクロウ	+	new genotype (Aと同じ遺伝子型)
I	ユーラシアワシミミズク	-	
J	ユーラシアワシミミズク	-	
K	ユーラシアワシミミズク	-	
L	ベンガルワシミミズク	-	
M	ベンガルワシミミズク	-	
N	アフリカワシミミズク	-	
O	アフリカワシミミズク	-	
P	アフリカワシミミズク	-	
Q	アフリカワシミミズク	-	
R-U	アフリカワシミミズク 2 羽 + ユーラシアワシミミズク 1 羽 + シベリアワシミミズク 1 羽の混合便	-	

第5章

シロフクロウに見られたコクシジウムの感染状況

5.1 はじめに

鳥類を宿主とするコクシジウムは、*Eimeria* 属や *Isospora* 属原虫を含み、主に消化管寄生性の原虫グループであり、糞便から排出された原虫オーシストの経口摂取により宿主に感染する。排出直後の未成熟オーシストには感染性はないが、数日後に成熟して感染性を有するようになり、環境中の感染源となる。鳥類に感染するコクシジウムには、ニワトリで病原性が問題となる *E. tenella*、*E. necatrix*、*E. acervulina*、*E. maxima*、*E. brunetti* などが知られている（今井、2007）。オーシストで汚染された環境では感染防除が困難であり、家禽の生産性に影響するニワトリのコクシジウムは獣医学的にも重要な原虫である。

一方で、フクロウ類のコクシジウム感染は、アメリカのカラフトフクロウ (*Strix nebulosa*) (保護個体) から *E. bemricki* (Averbeck et al., 1998)、チェコの飼育下シロフクロウ (*Nyctea scandiaca*) から *E. nyctae* (Volf et al., 1999) が報告されているが、いずれも症状は認められなかった。また、アメリカのアメリカワシミミズク (*Bubo virginianus*) (保護個体) から、*E. bubonis* および *E. megabubonis* (Jankovsky et al., 2017; Woodyard et al., 2019) が報告されており、*E. bubonis* は腎臓に寄生し、集合管上皮の肥厚が認められたが、症状は認められなかった。しかし、国内のフクロウ類におけるコクシジウム感染状況は不明である。本原虫は宿主特異性が高く、国内に分布しているニワトリ寄生種が他の鳥類に感染する可能性は低いが、希少種も含むフクロウ類の感染状況の解明は野生動物保護の観点からも必要である。また、本原虫による国内のフクロウ類への影響については十分に明らかになっておらず、治療方法も確立していない状況である。

そこで本章では、コクシジウム類似のオーシストが検出された国内の動物園の飼育下シロフクロウについて、保有原虫種および臨床症状の解明を試みた。

5.2 材料および方法

5.2.1 対象個体および原虫感染経緯

秋田市大森山動物園に飼育されているシロフクロウ雌雄 2 ペア（ペア A およびペア B）、計 4 羽を対象とした。ペア A のオスは 2012 年福岡県の動物園生まれ、メスは 2011 年千葉の繁殖場生まれであった。ペア B のオスは 1999 年東京都の動物園生まれ、メスは 2016 年にペア A から生まれた個体であった。これら 4 羽はペアごとに野外ケージ内で飼育されており、冷凍マウスおよびウズラを与えられていた。2015 年にペア A のケージ内の落下糞便からコクシジウムに類似したオーシストが確認された。同年に同ペアから生まれた雛が複数羽死亡し、剖検で腸炎が認められ、糞便からはオーシストが確認された。2016 年にペア B が元気を消失し、糞便からコクシジウムに類似したオーシストが検出された。ペア A は 2015 年から、ペア B は 2016 年から駆虫薬であるトルトラズリル（Baycox; Bayer Leverkusen Germany）を餌に混入して複数回投与したが駆虫はできていなかった。その後の原虫保有状況を検討するため、2019 年 7 月 31 にペア A およびペア B のケージごとに落下糞便を採取し（個体識別不明）、日本大学生物資源科学部獣医学科実験動物学研究室に冷蔵便で送付後、4°C で保存した。

5.2.2 原虫オーシストの検出および感染強度の計測

原虫オーシストの感染強度を調べるため、常法に従いショ糖浮遊法により原虫オーシストを検出し、糞便 1g 中のオーシスト数 (Oocysts per gram: OPG) の計測を行った。小型乳鉢に肝蛭卵用 100 メッシュ金網を入れ、糞便 2 g を計量して金網内に置き、比重 1.2 のショ糖液 (比重 1.2) 58mL を加えて小型乳鉢内に濾過した。得られた濾液を EPG 計算盤 (富士平工業、東京、日本) 2 区画に注入し、各区画のオーシストを光学顕微鏡 (BX41; Olympus, Tokyo, Japan) 観察下で計測、合計し、得られた数値に 100 を乗じて OPG を算出した。

また、オーシストの長径と短径を光学顕微鏡 (Olympus) およびソフトウェア (Micro Studio; WRAYMER, Osaka, Japan) を用いて計測した。

5.2.3 原虫オーシストの培養

オーシストの形態的特徴は成熟状態で確認できるため、糞便に 2%ニクロム酸カリウムを加え、20°C、25°C (室温) および 38°C で保存培養し、0, 5, 8 および 12 日目に形態学的観察および成熟オーシストの割合を計算した。

5.2.4 糞便からの DNA 抽出

5.2.2 によってオーシストが確認された糞便を用いて再度ショ糖浮遊法によりオーシストの検出を行った。浮遊液を倒立顕微鏡 (CKX3-SLP; Olympus, Tokyo, Japan) で観察しながらマイクロピペッターを用いてオーシストを大型と小型の 2 つに分取した。分取したそれぞれのサンプル 100 μ l に蒸留水 900 μ l を加え、20,000 回転で 10 分間遠心分離した。沈殿 200 μ l を -80°C で 10 分凍結、解凍を 5 回繰り返す、

REDEExtract-N-Amp™ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて DNA の精製・抽出を行った。

5.2.5 PCR による原虫 18SrRNA 遺伝子部分領域の増幅

抽出された DNA を用いて、既報に従いコクシジウムの small subunit RNA (18SrRNA) 遺伝子部分領域を標的とした PCR を行った (Jinneman et al., 1997)。

PCR Thermal Cycler Dice® Touch (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い、4 μ l の DNA template、160 μ M の deoxynucleotide、10 \times PCR Buffer、1U の Ex-Taq (TaKaRa, Shiga, Japan) を用い、20 μ l の反応溶液中で行った。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C で 5 分の熱処理後、95 $^{\circ}$ C で 45 秒間の熱変性、52 $^{\circ}$ C で 45 秒間のアニーリング、72 $^{\circ}$ C で 60 秒間の伸長の工程を 1 サイクルとして 35 サイクル行った。また、すべてのサイクルが終了した後 72 $^{\circ}$ C で 7 分間の最終伸長反応を行った。

5.2.6 電気泳動

3.2.6 に記載の方法で電気泳動を行い、紫外線ゲル撮影装置を用いて PCR 増幅産物の有無を確認した。

5.2.7 ダイレクトシーケンス法による DNA 塩基配列の決定

3.2.7 に記載の方法でダイレクトシーケンスを行い、DNA の塩基配列を決定した。

5.2.8 遺伝子解析

得られた塩基配列は 3.2.8 に記載の方法で遺伝子解析を行った。分子系統樹作成時のアウトグループには、*Cryptosporidium parvum* (GenBank Accession No. L25642) を用いた。

5.3 成績

5.3.1 オーシストの形態および OPG

両ペアから長径×短径が $18.9 \pm 0.39 \times 17.4 \pm 0.32 \mu\text{m}$ (mean \pm SE、n=21) の小型で円形の小型のオーシスト (図 5-1a) および $39.4 \pm 0.15 \times 33.3 \pm 0.07 \mu\text{m}$ (mean \pm SE、n=12) の大型で卵円形のオーシスト (図 5-1b) の 2 型のオーシストが確認された。

OPG は、ペア A では大型 10,200・小型 1,900 であり、ペア B では大型 600・小型 21,800 であった。

5.3.2 オーシストの培養結果

小型のオーシストはペア A および B とともに 25°C (室温) で培養した結果、5 日目にはスポロシストが確認され、成熟オーシストまで発育が確認され、12 日目には成熟オーシストの割合が 90%以上になった。大型のオーシストは培養 8 日目にはすべて死滅した (表 5-2、図 5-2)。

5.3.3 原虫 DNA の増幅および分子系統解析

18SrRNA 遺伝子を標的とした PCR の結果、両ペアの小型のオーシストから増幅シグナルが認められた。系統解析の結果、両ペアから得られた塩基配列はどちらも同一であり、鳥類の *Eimeria* のグループに位置付けられ (図 5-3)、相同性解析の結果、アメリカワシミミズク寄生種である *E. bubonis* と 96.6%一致した。大型のオーシストからは増幅シグナルは得られず、種の推定には至らなかった。

5.4 考察

今回、国内で初めて展示施設の飼育下シロフクロウから、鳥類寄生性のコクシジウムの感染が確認され、少なくとも 2 種類が感染している可能性が示された。検出された小型のコクシジウムは、分子系統的にアメリカワシミミズクから検出された *E. bubonis* と近縁であることが示唆された。*E. bubonis* は腎臓に寄生し、集合管上皮細胞の過形成を起こすことが知られているが (Jankovsky et al., 2017)、今回検出された原虫がシロフクロウで見られた元気消失や雛の死亡に関与したかは不明である。しかし、希少種であるシロフクロウの域外保全上、今後も保有原虫種の解明や感染源の推定などが必要である。

検出された小型のオーシストは培養後にスポロシストが確認できる成熟オーシストまで発育し、原虫 DNA の増幅も可能であったが、大型のオーシストはすべて死滅した。そのため、大型のオーシストの種は不明であるが、小型オーシストとは別種であり、今回用いたプライマーでは DNA が増幅されないコクシジウム系統である可能性が考えられる。

ペア A および B から検出された小型オーシストは同じ遺伝子型であることが示された。2015 年にペア A の糞便からオーシストが確認され、2016 年にペア B のメスがペア A より生まれたため、ペア B のコクシジウムはペア A より感染した可能性がある。2015 年以前のペア A および 2016 年以前のペア B のオスの糞便検査結果は不明のため、感染源の特定はできなかったが、感染拡大防止のため、繁殖前に駆虫薬を投与し、駆虫できるまでペアリングさせないなどの対策が必要であると考えられる。

今回、感染個体に対して駆虫薬トルトラズリルを複数回投与したが、原虫オーシストは継続して排出されていた。トルトラズリルは牛のアイメリア予防薬として認可されているが、今回検出されたコクシジウムともっとも近縁な *E. bubonis* に対する効果は不明である。今回の感染個体も含め、フクロウ類のコクシジウム感染に対する治療は海外でも報告が少なく (Redig, 2009)、現在のところ治療が困難であると考えられる。他薬剤の併用あるいはトルトラズリルの投与間隔の短縮などの投薬方法の検討や、対症療法も併用するなど、効果的な治療方法を検討する必要がある。さらに、近年国内では愛玩飼育目的で、一般家庭でもシロフクロウを飼育しており、飼育フクロウ類の QOL の維持および向上のためにも、国内のフクロウ類におけるコクシジウム感染状況の把握と継続的な獣医学的管理方法の検討も必要であると考えられる。

5.5 小括

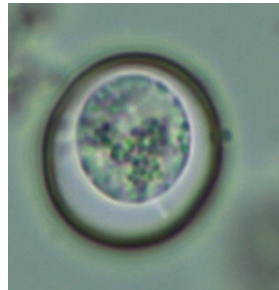
国内で初めて動物園飼育下のシロフクロウからコクシジウム (*Eimeria* spp.) 感染が確認された。感染個体は元気消失など、重篤ではないものの感染の影響が示唆された。糞便からは大小 2 型のオーシストが検出され、小型のオーシストは 80%以上が成熟オーシストに発育可能であることが示された。検出された小型のオーシスト由来 DNA の塩基配列解析の結果、本系統は鳥類寄生性のコクシジウムでアメリカワシミズクに寄生する *E. bubonis* ともっとも近縁であった。

本原虫系統のシロフクロウに対する詳細な病原性や感染源鳥種は不明であったが、駆虫が困難であることから、今後も原虫保有状況および感染個体の経過を把握することは、国内で飼育数が増加し、希少種も含まれるフクロウ類の健康管理上重要であると考えられる。



図 5-1 ペア A および B の糞便から確認されたオーシスト

小型オーシスト（左）の大きさは長径×短径が $18.9 \pm 0.39 \times 17.4 \pm 0.32 \mu\text{m}$ （mean \pm SE、n=21）であり、大型のオーシスト（右）の大きさは $39.4 \pm 0.15 \times 33.3 \pm 0.07 \mu\text{m}$ （mean \pm SE、n=12）であった。



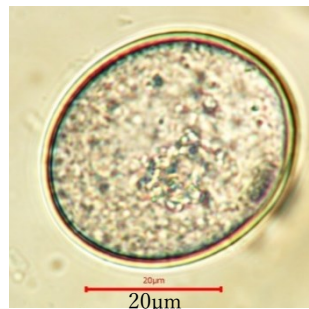
未成熟



成熟



未成熟



死滅

図 5-2. オーシスト培養結果

小型オーシスト：培養開始前（左上）および培養 8 日目（右上）。

成熟オーシストに 4 つのスポロシストが認められる。

大型オーシスト：培養開始前（左下）および培養 8 日目（右下）。

表 5-2. ペア A および B における培養による小型オーシストの発育結果

	ペアA		ペアB	
	未成熟(%)	成熟(%)	未成熟(%)	成熟(%)
0日	(100)	(0)	(100)	(0)
5日	15(84)	3(16)	10(91)	1(9)
8日	4(40)	6(60)	5(42)	7(58)
12日	9(10)	87(90)	4(20)	16(80)

スポロシストが確認された場合を成熟と判断した

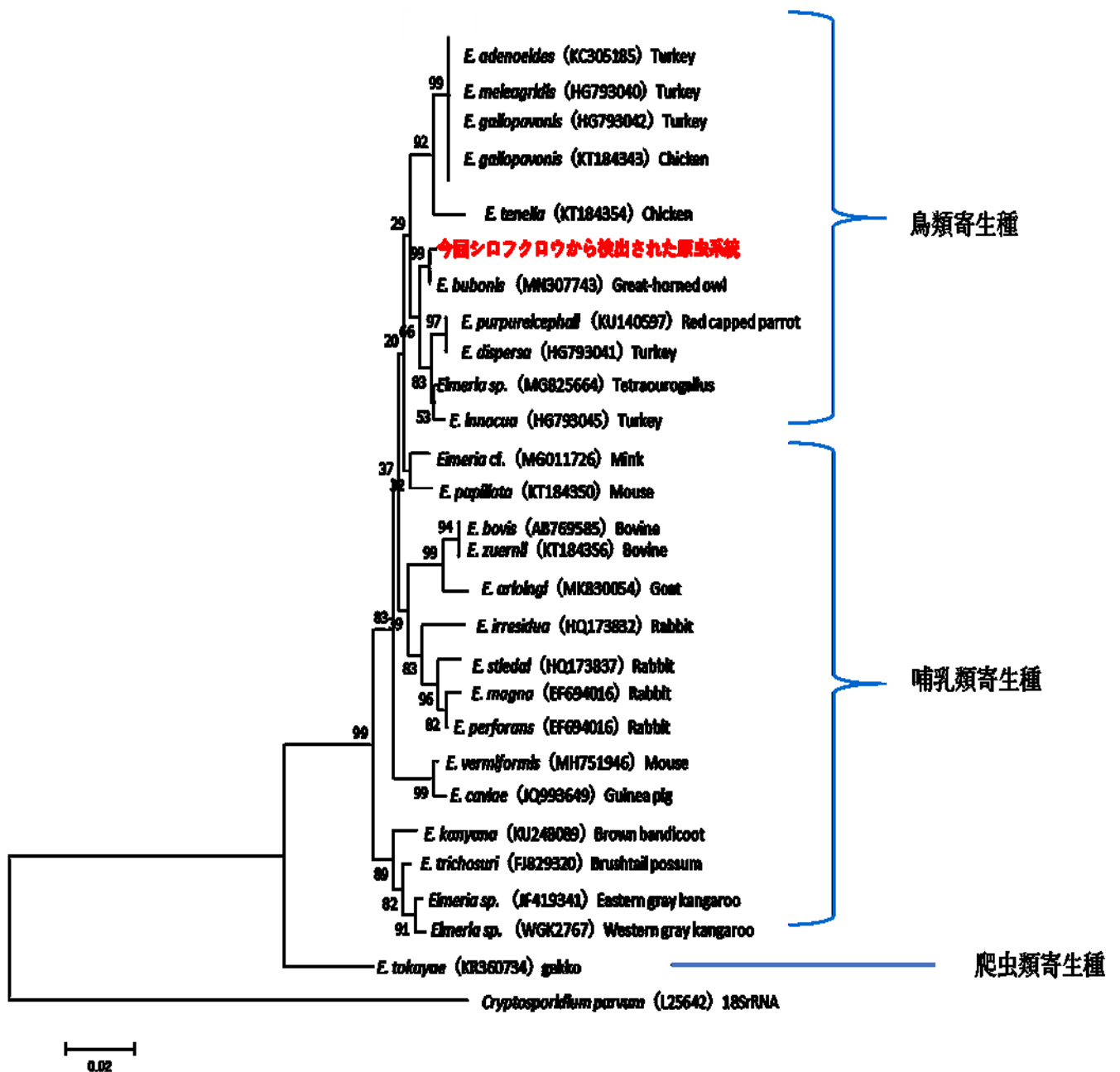


図 5-3. 小型オーシスト由来 DNA (18SrRNA) から得られた塩基配列の分子系統的な位置付け

括弧内は Accession 番号、系統樹内の数値はブートストラップ値を示す。

第 6 章

総括

国内で愛玩用に飼育されている動物の多くはイヌやネコであるが、近年では鳥類も増加しており、産業動物としてのニワトリに対する獣医療に加えて、愛玩鳥類に対する治療が求められるようになってきている。そのため、愛玩鳥類を専門とする動物病院も増えており、診療件数も多くなり、鳥類の獣医学的知見がさらに必要とされている。国内の愛玩鳥類における様々な疾患には感染症も含まれるが、消化管に寄生する原虫類に関する知見は散見されるものの、近年の分布状況や臨床症状は十分に得られていなかった。

愛玩鳥類の消化管寄生原虫は様々な種類が報告されており、国内ではヘキサミタ、ジアルジア、コクシジウム、クリプトスポリジウムなどの感染が知られている。

コクシジウムは養鶏の生産性への影響が大きいいため、家禽の原虫保有状況、診断、治療および予防対策などが解明、確立されているが、愛玩鳥類では、原虫保有率、原虫系統、感染個体の病状および治療結果などは明らかにされていない。同様に動物園等展示施設の飼育下鳥類（以下展示鳥類）における原虫保有状況も不明な点が多い。

クリプトスポリジウムは家禽での感染が全国的に知られており、呼吸器への影響が報告されている。愛玩鳥類では感染時に嘔吐、胃の肥大、下痢など、主に消化器系の症状を示す。鳥類のクリプトスポリジウムはヒトにも感染する種類が知られているが、愛玩鳥類に寄生するクリプトスポリジウムの分類・同定は不十分である。また、本原虫の有効な治療薬は開発されておらず、効果が期待される薬剤の投与が試みられているが駆虫は困難である。

ほとんどの愛玩鳥類は、ヒトとほぼ居住区間を同一にして飼育されており、消化管寄生原虫にはクリプトスポリジウムのようにヒトにも感染する種もあり、公衆衛生学

的な感染リスク管理のためにも、原虫に関する基盤的知見が必要である。そこで本研究では、国内の愛玩鳥類を中心とした飼育下鳥類を対象に、近年の消化管寄生原虫の保有状況を調べ、特にクリプトスポリジウムおよびコクシジウムについて、原虫保有状況、原虫種、感染動態、病原性、治療方法等を検討し、原虫感染制御に資する獣医学的知見を得ることを目的とした。

6.1 愛玩鳥類における消化管寄生原虫保有状況

2013～2016年の間、神奈川県藤沢市の動物病院に来院した愛玩鳥類 2,192羽を対象に、糞便およびそ嚢液を検査して消化管寄生原虫の保有状況を調査した。その結果、ジアルジア、トリコモナス、ヘキサミタ、コクシジウム、クリプトスポリジウムおよび分類未確定の計 7 属の消化管寄生原虫感染が認められ、いずれかの原虫保有率は 8.1%であった。鳥種別の保有率は、ブンチョウが 24.2%でもっとも高く、次いでオカメインコが 17.4%、マメルリハが 15%、コザクラインコが 6.9%であり、来院数をもっとも多いセキセイインコは 1.7%であった。原虫種別では、トリコモナスおよびヘキサミタが多く、他にクリプトスポリジウム、コクシジウム（アイメリア、イソスポラ）、ジアルジア、分類未確定の原虫も検出され、多くの原虫種が感染している状況が明らかになった。感染個体の多くは特に症状は認められなかった。一部の原虫は種によっては人獣共通に感染することから、今後も国内の愛玩鳥類における消化管寄生原虫の保有状況の把握は重要であると考えられる。

6.2 コザクラインコにおけるクリプトスポリジウム感染状況の解明および治療

クリプトスポリジウムは鳥類でもよく見られ、これまでに4種12遺伝子型が確認されており、愛玩鳥類の感染例も散見されている。しかし本原虫のオーシストは非常に微小で形態学的種同定が困難であり、愛玩鳥類における保有原虫種は明らかにされていない。国内のコザクラインコではクリプトスポリジウム感染が見られ症状も確認されているが、近年の感染状況は不明である。そこで、2013～2019年に藤沢市の動物病院に来院したコザクラインコを対象に、本原虫のオーシスト保有率、感染強度、症状、発症年齢および原虫の分子系統を検討し、これまでの状況と比較した。その結果、原虫保有率は6.5%であり、検出された原虫系統は、10年前と同一のクリプトスポリジウム avian genotype III であった。8歳以上の感染個体では、特異的な腺胃、中間帯の腫瘤状陰影が確認され、コザクラインコのクリプトスポリジウム感染では症状と年齢との関連が示唆された。なお、発症個体に対する対症治療により症状は寛解したが、原虫の駆虫はできなかった。

6.3 オオフクロウにおけるクリプトスポリジウム感染および臨床経過

国内ではフクロウ類の愛玩飼育数が増えており、来院件数も多くなっているが、一般的な愛玩鳥類と比べて生態が不明な点が多く、臨床的知見、特に消化管寄生原虫に関する報告は少ない。そこで、消化器症状を示した一般家庭飼育下のオオフクロウの幼鳥におけるクリプトスポリジウムの感染状況および臨床経過を解明し、原虫遺伝子型の解析および治療も試みた。下痢、脱水、衰弱を示した本症例からは原虫オーシストが検出され、遺伝子解析の結果、クリプトスポリジウム原虫の新たな遺伝子型である可能性が示唆された。本症例は主に下痢を呈していたが、オーシストの減少とともに

に症状が改善されたため、寄生していた原虫は *Cryptosporidium avium* のように主に腸管に寄生する種である可能性が考えられた。また、本症例の購入元のブリーダーで飼育されていた 3 ヶ月齢のマレーモリフクロウから本症例と同一遺伝子型の原虫が検出されたが、症状は見られなかった。よって本原虫種は幼鳥で病原性を示す可能性が考えられた。

6.4 シロフクロウに見られたコクシジウムの感染状況

鳥類に感染するコクシジウムには、ニワトリで病原性が問題となる種がよく知られているが、フクロウ類では、これまで海外の各種フクロウで感染が報告されているものの、国内のフクロウ類ではほとんど知られていない。感染個体への影響も不明であり治療方法も確立されていないため、希少種も含む国内のフクロウ類の感染状況の解明は重要である。そこで、コクシジウム類似のオーシストが検出された国内の動物園の飼育下シロフクロウを対象に、保有原虫種および臨床症状の解明を試みた。その結果、糞便から大小 2 型のオーシストが検出され、小型のオーシストは 80%以上が成熟オーシストに発育可能であることが示された。検出された小型のオーシスト由来 DNA の塩基配列解析の結果、本系統はアメリカワシミミズクに寄生する *Eimeria bubonis* ともっとも近縁であった。感染個体では元気が消失するなど、重篤ではないものの感染の影響が示唆された。本原虫系統のシロフクロウに対する詳細な病原性や感染源鳥種は不明だが、駆虫が困難であることから、今後も原虫保有状況および感染個体の経過を把握することは、希少種も含まれるフクロウ類の健康管理上重要であると考えられる。

以上、本研究では、国内の愛玩鳥類および展示鳥類における近年の各種消化管寄生原虫の保有状況を中心に解明した。多くの消化管寄生原虫種の感染が確認された中、特にクリプトスポリジウムやコクシジウム感染が依然として継続している状況を明らかにした。また、感染個体の一部では治療が可能なものの、病原性が不明な種も分布している状況を明らかにした。さらに、愛玩鳥類はヒトとの距離が極めて近い環境で飼育されており、人獣共通に感染する種も知られている鳥類のクリプトスポリジウムについては今後も保有原虫種や原虫保有状況を把握しておく必要があるとも考えられた。

よって、本研究成果は、今後の国内における鳥類の消化管寄生原虫の感染制御や人獣共通感染症の感染リスク管理のための基盤的知見となり、飼育下鳥類に対する効果的な治療法の確立にも貢献すると思われる。

謝辞

本研究の実施に際して、終始ご指導を賜りました日本大学大学院 獣医学研究科 佐藤雪太 教授に深甚なる謝意を表します。また、学位論文執筆に際して専門的見地から種々の有益なご助言を賜りました同研究科 鯉江 洋 教授と松本 淳 教授のご両名に深く御礼申し上げます。さらに、本研究の実施にあたり、特にサンプル解析について様々な技術的ご助言とご協力を賜りました地方独立研究法人 大阪健康安全基盤研究所 阿部仁一郎博士と、本学生物資源科学部くらしの生物学科 炭山大輔 助教に心より御礼申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり貴重な検体を提供していただきました愛玩鳥類の飼い主の皆様と、秋田市大森山動物園関係各位に篤く御礼申し上げます。

最後に、各種実験を実施するにあたり、様々な形にて御協力をいただいた本学生物資源科学部獣医学科実験動物学研究室室員、同学部くらしの生物学科くらしのバイオ研究室諸氏に対し、篤く感謝致します。

引用文献

Abbassi, H., Wyers, M., Cabaret, J., Naciri, M., (2000) Rapid detection and quantification of *Cryptosporidium baileyi* oocysts in feces and organs of chickens using a microscopic slide flotation method. Parasitol Res. 86 (3) : 179–187.

Abe N., Iseki M. (2004) Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol. Res. 92 (6) : 523–526.

Abe N., Makino I. (2010) Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels (*Nymphicus hollandicus*), Japan. Parasitol. Res. 106 (6) :1491–1497.

Abe N., Makino I., Kojima A., (2012) Molecular characterization of *Giardia psittaci* by multilocus sequence analysis. Infect. Genet. Evol. 12 (8) : 1710–1716.

Abe, N., Matsuo, K., Makino, I., (2015) *Ascaridia nymphii* n. sp. (Nematoda: Ascaridida) from the alimentary tract of a severely emaciated dead cockatiel *Nymphicus hollandicus*. Parasitol. Res. 114: 4281–4288.

Abe N., Makino I., Kojima A. (2016) Molecular identification of *Cryptosporidium* isolates from pet birds in Japan. Jan.J. Vet. Parasitol. 15 (1) :

1491-1497.

Averbeck G. A., Cooney J. D., Guarnera T. R., Redig P., Stromberg B. E.,
(1998) Exogenous stages of *Eimeria bemricki* n. sp. (Apicomplexa:
Eimeriidae) from the great gray owl, *Strix nebulosa* (Foster) . J. Parasitol. 84
(5) :976–977.

Blagburn B. L., Lindsay D. S., Hoerr F.J., Davis J.F., Giambrone J.J. (1991)
Pathobiology of cryptosporidiosis (*C. baileyi*) in broiler chickens. J. Protozool.
38 (6) :25-28.

Chelladurai, J.J., Clark, M.E., Kváč, M., Holubová, N., Khan, E., Stenger, B.L.,
Giddings, C.W., McEvoy, J., (2016) *Cryptosporidium galli* and novel
Cryptosporidium avian genotype VI in North American red-winged blackbirds
(*Agelaius phoeniceus*). Parasitol. Res. 115 (5) : 1901–1906.

Ditrich O., Palkovic L., Stěrba J., Prokopic J., Loudová J., Giboda M. (1991)
The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. Parasitol. Res. 77 (1) : 44–
47.

Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S.,

McEvoy J., Kváč M. (2016) *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. Parasitol. Res. 115 (6) : 2243–2251.

Iijima Y., Itoh N., Phrompraphai T., Ito Y., Kimura Y., Kameshima S. (2018) Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. among companion birds kept in pet shops in Japan. Korean J. Parasitol. 56 (3) : 281–285.

Jankovsky M. J., Brand M., Gerhold W. R. (2017) Identification of a novel renal coccidian (Apicomplexa: Eimeriidae) from the great-horned owl (*Bubo virginianus*), USA. J. Wildl. Dis. 53 (2) : 368–371.

Levy M. G., Powers L. V., Gore K. C., Marr H. S. (2015) *Spiroucleus meleagridis*, an enteric diplomonad protozoan of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) : Preliminary molecular characterization and association with clinical disease. Vet. Parasitol. 208 (3-4): 169–173.

Makino I., Abe N., Reavill D.R. (2010) *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). Avian Dis. 54 (3) : 1102–1107.

Martínez-Herrero M. D. C., Garijo-Toledo M. M., González F., Bilic I., Liebhart

D., Ganas P., Hess M., Gómez-Muñoz M. T. (2019) Membrane associated proteins of two *Trichomonas gallinae* clones vary with the virulence. PLoS One. 14 (10) : e0224032.

McKeon T. (1997) . *Trichomonas gallinae* in budgerigars and columbid birds in Perth, Western Australia. Aust. Vet. J. 75 (9) :652–655.

Molina-Lopez A. R., Ramis A., Martin-Vazquez S., Gomez-Couso H., Ares-Mazas E., Caccio S. M., Leiva M., Darwich L. (2010) . *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus Scops*) in a rehabilitation centre. Avian Pathol. 39 (3) : 171–176.

Nakagun S., Horiuchi N., Sugimoto M., Tomikawa S., Watanabe K., Kobayashi Y. (2017) Proventriculitis associated with *Cryptosporidium baileyi* in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and its epidemiological investigation. J. Parasitol. 103 (5) : 451–457.

Nakamura, A.A., Simões, D.C., Antunes, R.G., da Silva, D.C., Meireles, M.V., (2009) Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. Vet. Parasitol. 166 (1-2) :47–51.

- Nakamura, A.A., Homem, C.G., da Silva, A.M. J., Meireles, M.V., (2014)
Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR
assay. *Vet. Parasitol.* 205 (1-2) : 7–13.
- Nakamura, A.A. and Meireles, M.V., (2015) *Cryptosporidium* infections in
birds - a review. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 24 (3) : 253–267.
- Ng, J., Pavlasek, I., Ryan, U., (2006) Identification of novel *Cryptosporidium*
genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (12) , 7548–7553.
- Qi, M., Wang, R., Ning, C., Li, X., Zhang, L., Jian, F., Sun, Y., Xiao, L., (2011)
Cryptosporidium spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health
significance. *Exp. Parasitol.* 128 (4) : 336–340.
- Redig P. T. Raptors. In : Tully TZN, Dorrestein GM, Jones AK, eds. (2009)
Avian Medicine. Edinburgh: Saunders Elsevier: 209–242
- Ryan, U. M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R.,
Pavlasek, I., (2003) A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999
(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89 (4) : 809–813.

Ryan, U., (2010) *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp. Parasitol.* 124 (1) : 113–120.

Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., (2014) *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitol.* 141 (13) : 1667–1685.

Sulaiman I. M., Xiao L., Yang C. (1998) Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerg. Infect. Dis.* 4 (4) :681–685

Sulaiman I. M, Lal A. A., Xiao L. (2002) Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *J. Parasitol.* 88 (2) :388–394.

Tokiwa T., Kojima A., Sasaki S., Kubota R., Ike K. (2017) *Isospora lunaris* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the domestic Java sparrow in Japan. *Parasitol. Int.* 66 (2) : 100–105.

Tsai S. S., Hirai K., Itakura C. (1992) Histopathological survey of protozoa, helminths and acarids of imported and local psittacine and passerine birds in Japan. *Jpn. J. Vet. Res.* 40 (4) : 161–174.

Volf J., Koudela B., Modrý D. (1999) *Eimeria nyctea* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new parasite species from the snowy owl, *Nyctea scandiaca* Folia Parasitologica 46: 168–170.

Woodyard E. T., Rush S. A., Rosser T.G. (2019) Redescription of *Eimeria megabubonis* Upton, Campbell, Weigel & McKown, 1990 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the great horned owl *Bubo virginianus* (Gmelin) . Syst. Parasitol. 96 (7) :585–594.

Yagita K., Izumiyama S., Tachibana H., Masuda G., Iseki M., Furuya K., Kameoka Y., Kuroki T., Itagaki T., Endo T. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. Parasitol. Res. 87 (11) : 950–955.

Yao Q., Zhang X., Chen K., Ma J., Zheng W., Xu X., Zhu X. (2017) Prevalence and genetic characterization of *Cryptosporidium* infection in Java sparrows (*Lonchura oryzivora*) in northern China. Biomed. Res. Int. Article ID 2318476, <https://doi.org/10.1155/>

浅野由紀子, 烏谷竜哉, 奥山正明, 高見俊才, 大瀬戸光明, 井上博雄, 山本浩二, 青陰純子, 佐伯紀之, 藤原正方, 白石光伸, 内田和彦, 佐伯裕子, 鈴木美紀子, 山本 公, 宇高雅稔, 菅 恭, 松浦榮美, 木村真理. (2006) 高校の寮生における集団下痢症事例からのクリプトスポリジウム. 平成 18 年度愛媛県立衛生環境研究所年報 9: 21-26.

板倉智敏. (1984) 鳥類のクリプトスポリジウム感染について. 鶏病研究会会報 20 (3) : 123-131.

今井壮一, 板垣匡, 藤崎幸蔵. 編 (2007) 最新家畜寄生虫病学 第 2 章 消化管に寄生する原虫症.

厚生労働省. (2018) website 統計情報 ;

https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou12/pdf/04c_01.pdf,

<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000334034.pdf> (2020. 01. 15 参照)

西森 (大塚) 永理子, 眞田直子, 眞田靖幸, 竹内好恵, 浅川満彦. (2009) 飼育下鳥類における消化管寄生原虫類の保有状況とその検査・駆虫に関する一試み. 鳥類臨床研究会会報 12 : 9-23.

西谷英. (2010) . セキセイインコにみられたトリコモナス症の 1 例. エキゾチック

ク診療. 2 (2) :64-66, インターズー

日本ペットフード協会. (2016) <https://petfood.or.jp/index.html> (2020.01.15 参
照)

業績一覧

学位論文に関する主論文

1. **Makino I**, Inumaru M, Abe N, Sato Y. 2018. A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea. Parasitol. Res. 17(9):3003-3008. doi: 10.1007/s00436-018-5951-2.

参考論文

1. Abe N, Matsuo K, **Makino I**. 2015. *Ascaridia nymphii* n. sp. (Nematoda: Ascaridida) from the alimentary tract of a severely emaciated dead cockatiel *Nymphicus hollandicus*. Parasitol Res. 114(11):4281-4288.
2. Abe N, **Makino I**, Kojima A. 2012. Molecular characterization of *Giardia psittaci* by multilocus sequence analysis. Infect Genet Evol. 2(8):1710-1716.
3. **Makino I**, Abe N, Reavill DR. 2010. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). Avian Dis. 54(3):1102-1107.
4. Abe N, **Makino I**. 2010. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. Parasitol Res. 106(6):1491-1497.

学会発表

1. Makino I, Abe N, Sumiyama D. Sato Y. 2019. Prevalence of *Cryptosporidium* infection in household's peach-faced lovebirds during last decade in Japan. Exotic Con 2019, St Louis, USA.
2. 牧野幾子, 阿部 仁一郎, 佐藤雪太. 2017. クリプトスポリジウム症が疑われたオオフクロウの一例. 第 160 回日本獣医学会学術集会, 鹿児島大学.