

平成27年度
動物由来感染症予防体制
整備事業報告書

平成28年2月

山口県環境生活部生活衛生課

はじめに

動物から人に感染する「動物由来感染症」については、人の感染症の半数以上を占めているとされます。

日本は温帯で島国であるという地理的要因及び家畜衛生対策等の徹底により、これまで動物由来感染症の発生が比較的少ない国でした。

しかし、海外では、狂犬病や中東呼吸器症候群（MERS）、鳥インフルエンザ、ジカウイルス感染症等の動物由来感染症が流行しており、交通機関がめざましく発達し、短時間で膨大な人と物が行きかう現代、海外の感染症が国内に侵入する危険性は高く、常に注意を払っておく必要があります。

こうした状況のなか、県においては、県民の皆様に動物由来感染症病原体の保有状況や動物との正しい接し方を理解していただくために、平成12年度からペット動物等の病原体や抗体等の保有状況を調査し、パンフレットやホームページ等で情報提供してきたところです。

今年度は、げっ歯類等のレプトスピラ、鳥類のカンピロバクター属菌、ふれあい動物の腸管出血性大腸菌、クリプトスポリジウム及びジアリジアの保有状況調査を実施しました。

その結果、愛玩用の鳥類の糞便からカンピロバクター属菌が、ふれあい動物のウシ、ヤギ、ヒツジ、リヤマの糞便及びヤギの唾液から腸管出血性大腸菌が分離されたことから、ふれあい体験などで動物に接した後の手洗いの徹底など、感染予防に十分注意することの必要性が示唆されました。

なお、本事業の実施に当たっては、環境保健センター保健科学部に検査の実施や報告書作成に多大な協力をいただきましたことを感謝申し上げます。

平成28年2月

山口県環境生活部生活衛生課長

酒井 理

目 次

I	事業の目的	1
II	事業の内容	1
III	平成 27 年度動物由来感染症病原体保有実態調査結果	7
1	レプトスピラ感染症	7
2	カンピロバクター感染症	9
3	腸管出血性大腸菌感染症	12
4	クリプトスポリジウム感染症	16
5	ジアルジア感染症	18

I 事業の目的

「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」で規定される感染症の多くは動物由来感染症(人の感染症のうち、病原体が動物に由来する感染症)であり、ペット等私たちの身近な動物の病原体保有状況を把握することは、予防対策を講じる上で大変重要である。

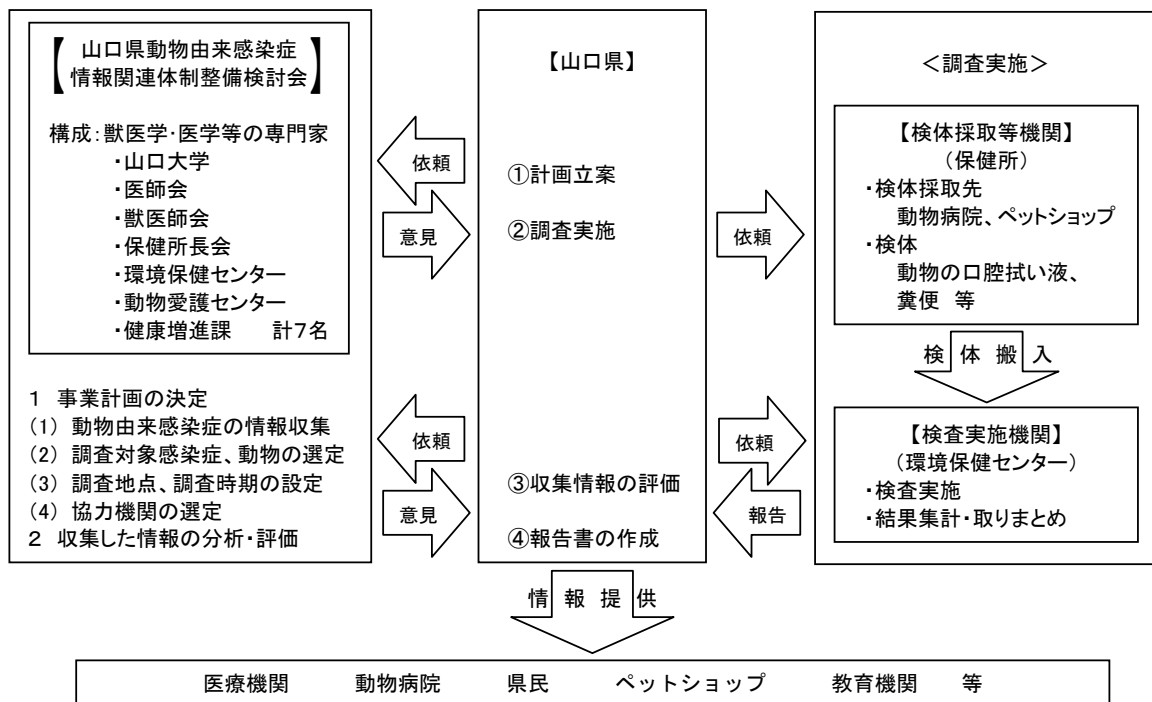
本事業は、事業名を「動物由来感染症予防体制整備事業」として、本県の動物における動物由来感染症病原体の保有状況等を調査するとともに、発生状況及び動向に関する情報を収集し、これらを取りまとめた関係機関へ情報を提供することにより動物由来感染症予防体制の整備を図るものである。

II 事業の内容

1 事業の概要

- (1) 医学、獣医学等の専門家及び関係行政機関の職員から構成される山口県動物由来感染症情報関連体制整備検討会(以下「検討会」という。)を設置し、調査の手段並びに調査結果等の分析・評価及び情報提供等に関する事業計画を決定する。
- (2) 動物の飼育、管理又は棲息状況等を勘案して、調査地点及び時期等を定め、獣医師会等の関係機関の協力のもと、発生状況及び動向等疫学情報を収集する。
- (3) 動物由来感染症による健康危害防止対策等を迅速かつ適切に講じることができるよう、検討会での分析・評価結果を踏まえ、収集情報を報告書として取りまとめ、これを医療機関及び獣医療機関等に提供する。
- (4) 保健所及び動物愛護センター等の関係行政機関を通じて、報告書を県民及び動物取扱業者等に提供する。

事業の概念図は以下のとおり。



2 平成27年度事業の実施状況

(1) 検討会の設置等

ア 検討会設置（平成27年7月16日）

検討委員名簿

所 属	職 名	氏 名
国立大学法人山口大学共同獣医学部	教授	前 田 健
一般社団法人山口県医師会	常任理事	今 村 孝 子
公益社団法人山口県獣医師会	公衆衛生部会長	山 縣 宏
山口県保健所長会	会長	西 田 秀 樹
山口県環境保健センター	所長	調 恒 明
山口県動物愛護センター	所長	中 野 壽美生
山口県健康福祉部健康増進課	課長	西 生 敏 代

イ 検討事項

- ① 事業計画の検討
 - a 調査対象感染症・動物等の選定
 - b 調査地点、調査時期の設定
 - c 協力機関の選定
- ② 調査結果等の分析・評価

ウ 検討会会合の開催状況

- ① 第1回
日時：平成27年7月27日
場所：県庁4階共用第5会議室
議題：動物由来感染症予防体制整備事業の概要について
平成27年度事業計画案について
- ② 第2回
日時：平成28年2月5日
場所：県庁12階環境生活部2号会議室
議題：平成27年度調査結果について
平成27年度事業報告書について
山口県狂犬病（疑い）対応マニュアルについて

(2) 事業計画の決定

ア 調査対象感染症の選定方針

- ① 本調査は、感染症法で規定する感染症であって、国内発生がある動物由来感染症を対象とする。
- ② 感染症発生動向調査等を参考に、継続的なサーベイランスを要する感染症又は国内発生が認められた等の理由により新たに調査が必要な感染症を選定する。

イ 調査対象感染症の選定及び選定の具体的な理由

- ① 国の感染症発生動向調査で報告数の多い「腸管出血性大腸菌感染症」（全数把握による報告数が例年最多）、「感染性胃腸炎」（小児科での定点把握による報告数が例年最多）は、継続的なサーベイランスが必要な感染症であることから、調査対象として選定する。
- ② 「感染性胃腸炎」は、動物からヒトへの接触感染が懸念され、公衆衛生上重要とされている「カンピロバクター症」を調査対象として選定する。
- ③ 「クリプトスポリジウム感染症」及び「ジアルジア感染症」は、平成26年6月に国内のふれあい動物での感染事例があり、昨年度から調査を実施したが、評価に十分な検体数が確保できていないことから、引き続き調査を実施する。
- ④ 「レプトスピラ症」は、代表的な動物由来感染症であり、感染症発生動向調査においても、毎年全国で一定数の発生報告のある疾患であり、定期的なサーベイランスが必要と考えられることから調査対象として選定する。
- ⑤ 検査対象動物については、これまでの調査状況、発生事例及び動物飼育等の状況などから、「腸管出血性大腸菌」、「クリプトスポリジウム感染症」及び「ジアルジア感染症」は「ふれあい動物」、「カンピロバクター症」は「ペットショップで販売される鳥類」、「レプトスピラ症」は「ペットショップで販売されるげっ歯類」を選定する。

平成 27 年度の調査対象感染症とその選定の具体的な理由

調査対象感染症	具体的な理由
腸管出血性大腸菌感染症 H12～13 年度: イヌ・ネコで実施 H18～21 年度: ウシで実施 H25,26 年度: ふれあい動物で実施 H27 年度: ふれあい動物で実施	<ul style="list-style-type: none"> ○ 感染症発生动向調査において報告数が多いことから持続的なサーベイランスが必要 <ul style="list-style-type: none"> ・全数把握による報告数、小児科での定点把握による報告数が例年最多 ○ 更なるデータの蓄積が必要であることから、引き続き調査を実施
クリプトスポリジウム感染症 H14～16 年度: イヌ・ネコで実施 H26 年度: ふれあい動物で実施 H27 年度: ふれあい動物で実施	<ul style="list-style-type: none"> ○ 平成 26 年 6 月に長野県のふれあい体験施設を訪問した小学生がクリプトスポリジウムに集団感染する事例が発生していることから緊急的に調査を実施 ○ 更なるデータの蓄積が必要であることから、調査を継続する
ジアルジア感染症 H14～16 年度: イヌ・ネコで実施 H26 年度: ふれあい動物で実施 H27 年度: ふれあい動物で実施	<ul style="list-style-type: none"> ○ 「水道におけるクリプトスポリジウム等対策指針」(厚生労働省作成)ではクリプトスポリジウムとジアルジアが対象であることから、クリプトスポリジウムとともに緊急的に調査を実施 ○ 更なるデータの蓄積が必要であることから、調査を継続
カンピロバクター症 H12～13 年度: イヌ・ネコで実施 H27 年度: 鳥類で実施	<ul style="list-style-type: none"> ○ 「感染性胃腸炎」は感染症発生动向調査において報告数が多いことから持続的なサーベイランスが必要 ○ 「感染性胃腸炎」のうち、公衆衛生上重要な「カンピロバクター症」を対象 ○ 県内のペットショップ等で販売される鳥類の保有状況が不明 <ul style="list-style-type: none"> ・平成 12,13 年度、イヌ・ネコで調査を実施 ・岐阜大学の調査では、インコの 69%が <i>C.jejuni</i>を保菌
レプトスピラ症 H12 年度: イヌで実施 H21～23 年度: イヌで実施 H27 年度: げっ歯類で実施	<ul style="list-style-type: none"> ○ 感染症発生动向調査において報告数が多いことから持続的なサーベイランスが必要 ○ ペットショップ等で販売されるげっ歯類等の保有状況に関する調査報告はなく県内の状況も不明 <ul style="list-style-type: none"> ・平成 12 年度、平成 21～23 年度にイヌで調査を実施 ・野生げっ歯類での保菌報告有

○調査対象動物及び検査法

対象感染症	動物種	検体	検査法	検体数
腸管出血性大腸菌感染症	ふれあい動物	口腔拭い液	<ul style="list-style-type: none"> ・菌分離同定 ・血清型別検査 	20
		糞便	<ul style="list-style-type: none"> ・薬剤感受性試験 ・病原因子保有検査 	20
クリプトスポリジウム感染症	ふれあい動物	糞便	オーシストの検出	20
ジアルジア感染症	ふれあい動物	糞便	オーシストの検出	20
カンピロバクター症	鳥類 (ペットショップ)	糞便	<ul style="list-style-type: none"> ・菌分離同定 ・薬剤感受性試験 	50
レプトスピラ症	げっ歯類等 (ペットショップ)	尿	鞭毛遺伝子 (flaB) の検出	50

(合計 180)

※検査法の詳細は、Ⅲの 1～5 の(2)材料と方法に記載

ウ 調査地点、調査時期の設定

① 調査地点

県下 16 か所（検体採取施設は以下のとおり）

げっ歯類等及び鳥類の糞便はペットショップで、ふれあい動物の糞便及び口腔拭い液はふれあい体験を実施する動物展示施設等で採取

a ペットショップ（15 施設）

地 域	施設数
岩国環境保健所管内	1
柳井環境保健所管内	1
周南環境保健所管内	2
山口環境保健所管内	3
山口健康福祉センター防府支所管内	2
宇部環境保健所管内	5
萩環境保健所管内	1

b ふれあい体験実施施設（4 施設）

地 域	施設数
柳井環境保健所管内	1
周南環境保健所管内	1
山口環境保健所管内	1
宇部環境保健所管内	1

② 調査時期

平成 27 年 8 月～11 月（検体搬入月日は以下のとおり）

採取施設	採取期間	検体搬送日
ペットショップ	10月16日(金)～10月19日(月)	10月19日(月)
	11月1日(日)～11月2日(月)	11月2日(月)
ふれあい体験実施施設	8月31日(月)	8月31日(月)
	9月14日(月)	9月14日(月)

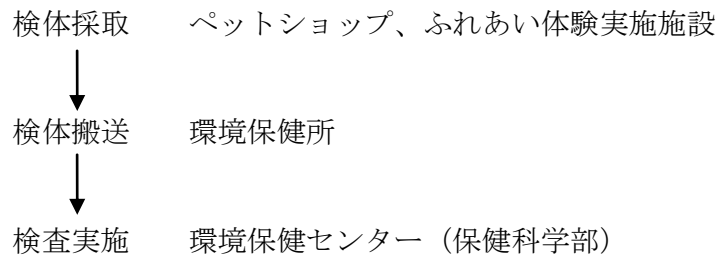
エ 調査の役割分担

実施内容	実施機関等
飼育状況調査	環境保健所
検体採取	ペットショップ、ふれあい体験施設
検体搬送	環境保健所
検査実施	環境保健センター

(3) 調査の実施

ア 飼育状況調査の実施
環境保健所が実施

イ 検査の実施



(4) 調査結果の分析・評価
検討会で実施

(5) 情報提供
報告書を作成し、県医師会、県獣医師会等の関係機関に配布するとともに山口県ホームページに掲載

Ⅲ 平成 27 年度動物由来感染症病原体保有実態調査結果

1 レプトスピラ感染症

(1) 背景

レプトスピラ症は、病原性レプトスピラによって引き起こされる急性熱性疾患であり、重要な人獣共通感染症のひとつとされている。病原性レプトスピラはげっ歯類を中心とした多くの哺乳動物の腎臓に定着し、尿中へと排泄される。ヒトは、この尿との直接的な接触あるいは尿に汚染された水や土壌との接触により感染する。臨床症状は、軽度のインフルエンザ様症状から、黄疸、腎不全、髄膜炎、呼吸不全を伴う肺出血など重篤な症状を引き起こすなど多様であり、ワイル病、秋やみ、七日熱等とも呼ばれている。人への感染は、保菌動物の尿との接触の機会が多い、農作業や下水道での作業など職業活動、レクリエーション活動（アウトドアスポーツ）など様々であるが、近年の事例ではレクリエーション活動を介しての感染について注意が喚起されている。

近年、ハムスターやウサギなどの小型のげっ歯類等がペットとして販売及び飼育されている中で、野生動物については、同菌の保菌状況が報告されているが、ペットとして飼養されるげっ歯類等については、保菌状況は不明である。このことから、本県内のペットショップで販売されているげっ歯類等の尿中のレプトスピラの保有状況を調査することとした。

(2) 材料と方法

ア 材料

本県内のペットショップで販売されているげっ歯類等(11施設)の尿を材料とした。1施設当たり 2～5 検体とし、51 検体について、尿をろ紙あるいはおがくずに浸み込ませ、搬入日まで常温で保存した。

検体採取対象としたげっ歯類等の種類はそれぞれ表 1 のとおりである。

対象動物の当該施設での飼養期間は、4 日～1 年 6 か月であった。また、ケージ内に単独飼育されていたものは 33 検体、2 匹以上複数飼育されていたものが 18 検体であった。

表 1 げっ歯類等の種類と検体数 ()内は検体数

ネズミ目 6科18種39検体		ウサギ目 1科4種12検体
<u>ネズミ科(17)</u> ブルーサファイアハムスター(3) ジャンガリアンハムスター(3) ハムスター(2) ロボロフスキー(2) カラージャービル(2) ゴールデンハムスター(1) グレージャンガリアン(1) パールホワイトハムスター(1) ホワイトフェイスロボロフハムスター(1) パンダマウス(1)	<u>テンジクネズミ科(8)</u> モルモット(7) 短毛モルモット(1) <u>デグー科(5)</u> デグー(4) デグーマウス(1) <u>リス科(4)</u> フクロモモンガ(2) リチャードソンジリス(2) <u>チンチラ科(4)</u> チンチラ(4)	<u>ウサギ科(12)</u> ウサギ(7) ミノウサギ(2) ネザーランドドワーフ(2) ネザーランド(1)
<u>ハリネズミ科(1)</u> ピグミーハリネズミ(1)		

イ 方法

① DNA 抽出

検体をストマッカー袋に入れて秤量後、約 3 倍量のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を加え、30 秒間ストマッカー処理を行った。室温で 2~3 時間静置後、再度混和し、PBS 懸濁液を 50mL 遠沈管に回収した。600rpm、5 分間遠心分離し、(浮遊物が多い場合はさらに 1,500rpm、5 分間遠心分離)、上清を別の遠沈管に回収した。上清 200 μ L を 1.5mL チューブに移し、DNA 抽出キット (DNeasy Blood&Tissue Kit, QIAGEN) を用いて DNA を抽出した (DNA 試料 1)。また、残りの上清を再度 3,500rpm、30 分間遠心分離後、上清を捨て、沈渣から DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出した (DNA 試料 2)。

② Nested PCR 法

病原体検出マニュアル「レプトスピラ症」に基づき、レプトスピラ鞭毛遺伝子である *flaB* 遺伝子を標的とした nested-PCR 法を実施した。プライマーは、1st PCR には L-*flaB* F1/R1、2nd PCR には M-L-*flaB* F2/R2 を使用し、1st PCR では 790bp、2nd PCR では 732bp の遺伝子増幅産物が認められたものを陽性と判定した。なお、陽性コントロールとして、国立感染症研究所細菌第一部から分与された 1st PCR で 400bp、2nd PCR で 350bp の増幅産物が得られるプラスミド DNA を用いた。

(3) 結果

げっ歯類等の尿 (51 検体) からレプトスピラ *flaB* 遺伝子は検出されなかった。

(4) 考察

ア げっ歯類等におけるレプトスピラの保有状況について

愛玩用に輸入される野生げっ歯類のレプトスピラの保菌率は平均 7.5% であり、調査した 22 種類のうち 12 種類のげっ歯類がレプトスピラを保有しており、5 種類の菌種が分離された報告もある。

また、宮城県が行った調査では、野生げっ歯類のレプトスピラ保有率は、年度により変動はあるが、20%~80% であった。

本県の今年度の調査結果では、ペットショップで販売されているげっ歯類の尿からレプトスピラ遺伝子は検出されなかった。

レプトスピラは、愛玩用げっ歯類で流行しておらず、野生動物との接触の機会がない環境で飼育されている愛玩用げっ歯類においては、感染の可能性は低いと推察された。

イ レプトスピラ症対策について

レプトスピラ症の感染源の多くは、レプトスピラに汚染された食品や水 (水道水、井戸水、沢水) とされている。また、時に保菌動物との接触によっても感染が成立する。

ハムスター等のげっ歯類やウサギは、小型でおとなしく、扱いやすいという理由からペットとして飼養されるだけでなく、学校飼育動物として学校内で飼養されたり、動物園等でふれあい展示用の動物として利用されたりしている。

今回の調査結果から、ペットショップで販売されるげっ歯類等においては、レプトスピラ症の感染は認められなかった。野生動物との接触など、げっ歯類にレプトスピラの感染の機会を与えないよう飼育環境に注意が必要である。

2 カンピロバクター感染症

(1) 背景

カンピロバクター属菌(*Campylobacter* spp.)のなかで、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ (*Campylobacter jejuni/coli*) は公衆衛生上最も重要で、ヒトの散発性下痢症や集団食中毒の原因となる。

本菌は、動物や鳥類の腸管内に保菌されており、これらの保菌動物は一般的には無症状であるが、腸炎や肝炎を引き起こすこともある。ヒトは本菌に汚染された食品の喫食により感染する。また本菌を保有したイヌやネコとの接触による感染も報告されている。本県の過去の調査では、イヌの 0.7%(1/149)及びネコの 1.8%(1/57)がカンピロバクター属菌を保有していた(平成 12~13 年度)。

鳥類のうち、ニワトリ等の家禽はカンピロバクター属菌を高率に保菌していることが知られている。しかし、インコ等愛玩用鳥類に関しては調査報告が少ない。

このように、特に小児においては、カンピロバクターを保菌する動物との接触に注意を要するため、小児のいる家庭や小学校などで飼育されることが多いインコ等愛玩用鳥類のカンピロバクター保有状況を調査し、動物との接触による感染のリスクを評価することとした。

(2) 材料と方法

ア 材料

本県内のペットショップ 10 施設で販売されている鳥類の糞便 52 検体を材料とした。検体搬入当日あるいは前日に滅菌綿棒(キャリーブレア：栄研化学)を用いて糞便を採取し、搬入時まで冷蔵保管した。

検体を採取した鳥類の種類は表 1 のとおりである。

対象動物の当該施設での飼養期間は、1 週間~4 年 6 カ月であった。また、ケージ内に単独飼育されていたものは 12 検体、2 羽以上複数飼育されていたものが 40 検体であった。

表 1 鳥類の種類と検体数 ()内は検体数

オウム目 2科14種24検体	スズメ目 2科9種26検体	キジ目 1科2種2検体
<u>インコ科(20)</u> セキセイインコ (8) ジャンボセキセイインコ(1) ハゴロモセキセイインコ(1) ナナイロメキシコインコ(1) コガネメキシコインコ(1) ホオミドリウロコインコ(1) ワカケホンセイインコ(1) アキワサインコ(1) ビセイインコ(2) ボタンインコ(1) コザクラインコ(2)	<u>カエデチョウ科(22)</u> キンカチョウ(5)※ ジュウシマツ(6)※ ヨーロッパジュウシマツ(1) ブンチョウ(5) コキンチョウ(2) シロブンチョウ(1) シルバーブンチョウ(1) ヒノマルチョウ(1)	<u>キジ科(2)</u> チャボ(1) ウコッケイ(1)
<u>オウム科(4)</u> オカメインコ(2) オキナインコ(1) ヨウム(1)	<u>アトリ科(5)</u> カナリア(5)	

※キンカチョウとジュウシマツが同一ケージで飼養されていたため両方に計上

イ 方法

① 増菌培養

綿棒を 2mL の滅菌生理食塩水に十分懸濁し、その 1mL を 9mL のプレストン培地 (OXOID) 及び 9mL のボルトン培地 (OXOID) にそれぞれ接種し、42°C、48 時間、微好気条件下で選択増菌培養した。微好気培養にはアネロパック・微好気 (三菱ガス化学株) を使用した。

② 分離培養

培養液 1~3 白金耳量を CCDA 寒天番地 (OXOID) 及びバツラー寒天培地 (OXOID) に塗抹し、42°C、24~48 時間、微好気条件下で培養した。

③ 同定方法

各選択分離培地においてカンピロバクターを疑うコロニーを 3~5 個釣菌し、5%羊血液加コロンビア寒天培地 (OXOID) に塗抹し、37°C、24~48 時間、微好気条件下で純培養した。カンピロバクター属菌の同定は、グラム染色性、形態、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、好気条件下での発育、ラテックス凝集反応 (カンピロバクター LA「生研」: デンカ生研) 及び 23S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法により実施した。カンピロバクター属菌と同定された株について、馬尿酸加水分解試験及び PCR 法により 5 菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*) の鑑別を実施した。

④ 薬剤感受性試験

カンピロバクターと同定された菌株について、センシ・ディスク (日本ベクトン・ディッキンソン) を用いた Kirby-Bauer 法により実施した。寒天培地には 5%羊血液加コロンビア寒天培地を使用した。供試薬剤はナリジクス酸 (NA)、オフロキサシン (OFLX)、ノルフロキサシン (NFLX)、シプロフロキサシン (CPFX)、エリスロマイシン (EM) 及びテトラサイクリン (TC) の 6 薬剤を用いた。判定は 37°C、48 時間、微好気培養後に実施した。

(3) 結果

ア カンピロバクター属菌の分離成績

表 2 に示すとおり、12 検体からカンピロバクター属菌が分離された。分離株は 1 株を除き *C. jejuni* であった。また、*C. jejuni* が検出された鳥類の飼養施設は 6 施設で、各施設の仕入れ先等は、山口県、B 県及び C 県が各 3 検体、自家施設及び自家施設/D 県が各 1 検体であった。

表 2 鳥類からのカンピロバクター属菌分離状況

動物の種類	施設	仕入れ先等	菌種
キンカチョウ	A 施設	A 県	同定不能※
キンカチョウ	B 施設	B 県	<i>C. jejuni</i>
キンカチョウ	C 施設	B 県	<i>C. jejuni</i>
キンカチョウ・ジュウシマツ	D 施設	C 県	<i>C. jejuni</i>
ブンチョウ	E 施設	山口県	<i>C. jejuni</i>
ブンチョウ	D 施設	C 県	<i>C. jejuni</i>
ハクブンチョウ	C 施設	B 県	<i>C. jejuni</i>
セキセイインコ	D 施設	C 県	<i>C. jejuni</i>
セキセイインコ	B 施設	自家施設	<i>C. jejuni</i>
ヒノマルチョウ	B 施設	山口県	<i>C. jejuni</i>
カナリア	D 施設	山口県	<i>C. jejuni</i>
コキンチョウ	F 施設	自家施設及び D 県	<i>C. jejuni</i>

※23S rRNA の遺伝子を標的とした *Campylobacter* 属菌検出用 PCR は陽性であったが、検査を実施した 5 菌種 (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. lari*, *C. upsaliensis*) の特異的遺伝子は陰性であった。なお、23S rRNA を標的とした PCR では、*Campylobacter* 属菌の他、*Acrobacter* 属菌や *Helicobacter pylori* も陽性となることから、*Campylobacter* 属菌以外の菌の可能性も否定できない。

イ 薬剤感受性試験の成績

分離されたカンピロバクター属菌 12 株のうち、発育不良であった 9 株を除く 3 株について、薬剤感受性試験を実施した。成績は表 3 のとおりであり、3 株とも供試した 6 薬剤すべてに感受性であった。

表 3 薬剤感受性試験の成績 (S : 感性 I : 中間 R : 耐性)

動物の種類	菌種	NA	OFLX	NFLX	CPFX	EM	TC
セキセイインコ	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	S	S
セキセイインコ	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	S	S
カナリア	<i>C. jejuni</i>	S	S	S	S	S	S

(4) 考 察

ア 鳥類のカンピロバクター属菌の保有状況について

今回、鳥類の糞便から検出された *C. jejuni* は、医療機関において急性胃腸炎の患者から頻繁に分離され、主に食中毒事件の原因となる菌である。また、カンピロバクター属菌検出用 PCR は陽性であったが同定不能となった 1 検体は、*Arcobacter* 属菌や *Helicobacter pylori* の可能性があり、前者は *C. jejuni* と同様、食中毒の原因となる可能性が示唆されており、後者は胃潰瘍等の症状を引き起こすなど、いずれもヒトへの病原性が確認されている。

本県の今回の調査では、52 検体中 11 検体 (陽性率 : 21.2%) が *C. jejuni* 陽性であった。既報では、愛玩用鳥類の *C. jejuni* の保菌率は、セキセイインコ 69.2% (18/26 : ペットショップ)、小鳥 21.9% (21/96 : ペットショップ)、小鳥 1.0% (1/105 : 家庭飼育) となっており、愛玩用の鳥類を介して、カンピロバクターに感染する可能性があるが示唆された。

なお、*C. jejuni* が検出された鳥類の仕入れ先に相関はなく、県内に流通する愛玩用鳥類に広く汚染があるものと推察される。

イ カンピロバクター感染症対策について

今回の調査結果から、ペットショップ等で販売されている鳥類がカンピロバクター属菌を保菌していることが判明したことから、動物取扱業者や所有者に対し、飼養施設の清掃・消毒の徹底による汚染拡大防止、清掃作業後などの手洗いの励行による感染症防止など、感染防止に十分に注意することが重要である。

3 腸管出血性大腸菌感染症

(1) 背景

腸管出血性大腸菌 (EHEC) 感染症は血清群 O157、O26、O111 などを主とするベロ毒素産生性の EHEC に汚染された食物などを経口摂取することによって起こる。その症状は軽度の下痢から激しい腹痛、水様便、著しい血便や溶血性尿毒症症候群 (HUS)、脳症などの重篤な合併症を起こして死に至るものまで様々である。毎年、国内で 3,000～4,000 件の発生届出があり、2014 年には 4,153 件の発生の届出があった。

EHEC は、牛などの反芻動物が保菌していることが知られており、1996 年～1998 年に行われたと畜場搬入牛の糞便検査では、O157 の保菌率は 2.0% であり、2008 年に本県の肉牛飼養施設における保有状況を調査したところ、50 頭中 11 頭 (22.0%) から EHEC が分離された。また、2012 年には県内において飼養している牛との濃厚接触による感染を強く疑う O26 感染事例も発生しており、牛は EHEC 感染症の感染源として重視されている。

また、県外においては、近年、動物とのふれあい体験実施施設における動物との接触が原因と疑われる EHEC 感染事例が報告されるようになったことから、動物との接触による感染のリスクを評価するため、ふれあい体験に使用される動物の EHEC 保有状況を調査することとした。

(2) 材料と方法

ア 材料

県内の動物ふれあい体験を実施する 4 施設 (動物展示施設、牧場、観光農園) で実際にふれあい体験に使用されている動物 5 種類 20 頭 (表 1) の糞便及び口腔拭い液を材料とした。

糞便は滅菌容器に採取し、口腔拭い液は、ふきとりエース L (栄研化学) を用いて口腔内を拭き取って採取し、付属のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に懸濁後、冷蔵保管した。

表 1 ふれあい動物の種類と検体数

動物種	ウシ	ヤギ	ヒツジ	ブタ	リヤマ
検体数	2	8	5	3	2

イ 方法

① 増菌培養

糞便約 10g を秤量し、ストマフィルターに入れ、90mL のノボビオシン加 mEC 培地 (日水製薬) を加えて混和後、42°C、18～20 時間選択増菌培養を行った。口腔拭い液は、全量 (約 20mL) をストマフィルターに入れ、180mL の緩衝ペプトン水 (OXOID) を加えて混和後、37°C、18～20 時間増菌培養を行った。

② VT 遺伝子のスクリーニング

培養液 0.1mL をチューブに採取し、アルカリ熱抽出法により DNA を抽出した。Cycleave PCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0 (タカラバイオ) を用いたリアルタイム PCR 法により、VT 遺伝子を検出した。サーマルサイクラーは StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を使用した。VT 遺伝子が陽性あるいは判定不能となった検体について、以降の分離培養を行った。

③ 腸管出血性大腸菌の分離、同定

血清群 0157、026 及び 0111 については、培養液 1.0mL をそれぞれの免疫磁気ビーズ(ベリタス)を用いて濃縮し、その 25 μ L を CT 加マッコンキーソルビトール寒天培地(日水製薬)、クロモアガー-0157TAM(クロモアガー)及びクロモアガー-STEC (クロモアガー)(以上 0157 分離用)、CT 加 1%ラムノース加マッコンキー寒天培地、CT 加 Vi RX026(栄研化学)及びクロモアガー-STEC (以上 026 分離用)、CT 加 1%ソルボース加マッコンキー寒天培地及びクロモアガー-STEC(以上 0111 分離用)に画線塗抹後、37 $^{\circ}$ C、18~20 時間培養した。またその他の O 血清群の大腸菌については、培養液 1 白金耳量を XM-G 寒天培地(日水製薬)、DHL 寒天培地(栄研化学)、クロモアガー-0157TAM 及びクロモアガー-STEC にそれぞれ画線塗抹後、37 $^{\circ}$ C、18-20 時間培養した。なお、リアルタイム PCR 法によるスクリーニング検査で判定不能となった検体については、直接塗抹のみ実施した。疑わしいコロニーを可能な限り多く釣菌し、トリプトソイ寒天培地(日水製薬)上で純培養した。アルカリ熱抽出法により DNA を抽出後、0-157 PCR Typing Set Plus (タカラバイオ)を用いた PCR 法により VT1 及び VT2 遺伝子を検出した。VT 遺伝子が検出された菌株について、TSI 寒天培地(極東製薬工業)、LIM 培地(極東製薬工業)、SIM 培地(栄研化学)及び CLIG 培地(極東製薬工業)に接種して生化学性状を確認後、ID テスト EB-20(日水製薬)により大腸菌であることを確認した。血清型は市販の免疫血清(デンカ生研)を用い、O 群、H 抗原を決定した。

④ 薬剤感受性試験

センシディスク(日本ベクトン・ディッキンソン)を用いた Kirby-Bauer 法により実施した。供試薬剤は、アンピシリン(ABPC)、セファロチン(CET)、セフトキシム(CTX)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、ナリジクス酸(NA)、シプロフロキサシン(CPFX)、トスフロキサシン(TFLX)及びホスホマイシン(FOM)の 12 種類を用いた。

(3) 結果

ア ふれあい動物の EHEC の保有状況について

リアルタイム PCR 法による VT 遺伝子のスクリーニングの結果、口腔拭い液 7 検体(ヤギ 3 検体、ウシ 2 検体、ヒツジ及びリヤマ各 1 検体)から VT 遺伝子が検出された。また、糞便 20 検体のうち、17 検体は判定不能であった。

VT 遺伝子陽性あるいは判定不能であった計 24 検体について分離培養を実施した結果、2 施設で飼養されているヤギ 3 検体、ウシ 2 検体、ヒツジ 2 検体、リヤマ 1 検体の糞便(陽性率 40.0%)及びヤギ 3 検体の口腔拭い液(陽性率 15.0%)から EHEC が分離された(表 2)。

糞便由来株の血清型・毒素型は、0157:H7 VT2 が 3 株、O 群型別不能(OUT):NM VT2 が 2 株、091:H42 VT1+2、OUT:H21 VT2、OUT:NM VT1+2、OUT:NM VT2 が各 1 株であった。口腔拭い液由来株の血清型・毒素型は、3 株とも 0157:H7 VT2 であった。

表2 ふれあい動物からの腸管出血性大腸菌分離状況

動物の種類	施設	検体の種類	血清型	毒素型
ヤギ	A 施設	糞便	0157:H7	VT2
		口腔拭い液	0157:H7	VT2
ヤギ	A 施設	糞便	0157:H7	VT2
		口腔拭い液	0157:H7	VT2
ヤギ	A 施設	糞便	0157:H7	VT2
		口腔拭い液	0157:H7	VT2
ウシ	A 施設	糞便	OUT:NM	VT2
ウシ	A 施設	糞便	OUT:H21	VT2
ヒツジ	B 施設	糞便	091:H42	VT1+2
ヒツジ	B 施設	糞便	OUT:NM	VT2
リヤマ	B 施設	糞便	OUT:NM	VT1+2

イ 薬剤感受性試験の成績

分離された EHEC 11 株の薬剤感受性試験の成績は表 3 のとおりであり、薬剤耐性を示す株が 3 株あった。すべての株が複数の薬剤に耐性であった。

ヤギ 2 頭の口腔拭い液から分離された 0157:H7 が ABPC、SM に耐性を示し、ウシの糞便から分離された OUT:NM は SM、CP に耐性を示した。

表 3 薬剤感受性試験の成績 (S: 感性 I: 中間 R: 耐性)

動物種	検体	血清型	ABPC	CET	CTX	SM	KM	GM	TC	CP	NA	CPFX	TFLX	FOM
ヤギ	糞便	0157:H7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	口腔拭い液	0157:H7	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ヤギ	糞便	0157:H7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	口腔拭い液	0157:H7	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
ヤギ	糞便	0157:H7	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
	口腔拭い液	0157:H7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ウシ	糞便	OUT:NM	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
ウシ	糞便	OUT:H21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ヒツジ	糞便	091:H42	S	I	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S
ヒルジ	糞便	OUT:NM	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S
リヤマ	糞便	OUT:NM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

(4) 考 察

ア ふれあい動物の EHEC の保有状況について

今回の調査の結果、検体採取を行った 4 施設中 2 施設 (50.0%) で飼育されているふれあい動物 8 頭の糞便 (40.0%) 及び 3 頭の口腔拭い液 (15.0%) から EHEC が分離された。国内での EHEC の保菌調査は、主に家畜あるいは野生動物を対象に実施されてきたが、本県の 3 年間に亘る調査により、ふれあい体験に供される各種動物も本菌を保菌していることが明らかとなった。

分離株は型別不能株を除き、0157 及び 091 の 2 種類に群別された。このうち血清群 0157 は国内で人から最も分離頻度の高い血清群である。また 091 については無症状保菌者からの分離頻度が高いが、時に HUS 等を引き起こすこともあるため、注意が必要である。

昨年度の調査では糞便からのみ EHEC が分離されたが、今年度は同一施設で飼養されるヤギ 3 頭の糞便及び口腔拭い液から EHEC が分離された。分離株はすべて 0157:H7 VT2 であったが、薬剤感受性パターンは異なっていた。このため、水平伝搬等の感染経路は不明であるが、今後詳細な検討が必要と考えられた。

イ EHEC 対策について

ふれあい体験施設でのふれあい動物からの EHEC の感染は国内でも報告されている。

今回の調査結果で、ふれあい動物の糞便及び口腔拭い液から EHEC が分離されたことから、糞便の適切な処理、定期的な動物の健康状態の確認、動物とふれあった後の手洗いの励行等、感染防止に十分に注意することが重要である。

4 クリプトスポリジウム感染症

(1) 背景

クリプトスポリジウム感染症は糞便中に含まれるオーシストの摂取によって起こり、ヒトが感染すると、腹痛を伴う激しい水様性下痢が 3～7 日間程度続き、嘔吐や発熱を伴うこともある。特に免疫不全者では、重篤な下痢症を引き起こし、長期化すれば致死的となる。

クリプトスポリジウムは世界中に広く分布しており、ヒト、ウシ、ブタ、ヒツジ、イヌ、ネコ等種々の動物の消化管内に寄生し、ヒトを含めた一部の動物の下痢症の原因となっている。

平成 26 年 6 月には、長野県のふれあい体験施設で搾乳体験等をした小学生がクリプトスポリジウムに集団感染する事例が発生している。同様の体験施設は県内にも複数存在しているが、これまで本県ではイヌ、ネコ以外の動物でのクリプトスポリジウムの保有状況は調査したことがなく、ふれあい動物の保有状況が不明であることから、本県内のふれあい体験施設で展示されている動物の糞便中のクリプトスポリジウムの保有状況を調査することとした。

(2) 材料と方法

ア 材料

県内の動物ふれあい体験を実施する 4 施設（動物展示施設、牧場、観光農園）で実際にふれあい体験に使用されている動物 5 種類 20 頭（表 1）の糞便を滅菌容器に採取し材料とした。

表 1 ふれあい動物の種類と検体数

種 類	ウシ	ヤギ	ヒツジ	ブタ	リヤマ
検体数	2	8	5	3	2

イ 方法

① 検査材料の前処理

糞便 1g を 15mL 遠心管に採取し、ホルマリン水で固定処理をした後、酢酸エチルを使用した遠心沈殿法(MGL 法)により沈さを得た。さらに沈さを蒸留水で浮遊した後、シヨ糖液を使用した密度勾配遠心法を実施し、得られた沈さに 1mL の蒸留水を加え、試料液とした。

② 直接蛍光抗体染色(湿式)によるオーシストの検出

試料液 10 μ L について、Easy Stain C&G FITC(和光純薬)を用いて、直接蛍光抗体染色標本を作製し、蛍光顕微鏡 FSX-100(オリンパス)で全視野を観察し、クリプトスポリジウムのオーシストを検索した。

③ リアルタイム PCR 法による遺伝子の検出

試料液 20 μ L を使用し、SDS 法による核酸精製を行った。精製した核酸テンプレート 2 μ L について、クリプトスポリジウム属の 18SrRNA 遺伝子をターゲットにして、Cycleave RT-PCR Cryptosporidium(18SrRNA) Detection Kit(TaKaRa)を使用し、逆転写反応を行った後、サイクリングプローブ法による PCR をそれぞれ実施した。リアルタイム PCR 装置には、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems)を使用した。

(3) 結 果

ふれあい動物の糞便からクリプトスポリジウムのオーシスト及び遺伝子は検出されなかった。

(4) 考 察

国内の家畜に関する調査では、特に若齢のウシやブタでクリプトスポリジウムの保有率が高いことが報告されている。

今回の調査では、昨年度に引き続き、ふれあい動物からクリプトスポリジウムは分離されなかった。検体数の不足によるものか、保有していないのかの判断が必要である。

5 ジアルジア感染症

(1) 背景

ジアルジア感染症はランブル鞭毛虫の感染により起こる疾患で、ヒトが感染すると、腹痛を伴う下痢を呈するが、健常者では不顕性感染に終わる事例が多い。

動物では、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、綿山羊、ウサギ、リス、ネズミ等多くの動物での感染が報告されており、動物からヒトに感染する可能性も示唆されている。

本県では平成 14～16 年にイヌ、ネコで調査を行ったが、いずれも保有率は低かった（イヌ：1.1%、ネコ：4.7%）。

ふれあい体験施設には、幼児等、動物と接触する際に注意を要する人が多く訪れるが、これまでふれあい動物での保有状況は不明であることから、ふれあい体験施設で展示されている動物のジアルジア保有状況を調査することとした。

(2) 材料と方法

ア 材料

県内の動物ふれあい体験を実施する 4 施設（動物展示施設、牧場、観光農園）で実際にふれあい体験に使用されている動物 5 種類 20 頭（表 1）の糞便を滅菌容器に採取し材料とした。

表 1 ふれあい動物の種類と検体数

種 類	ウシ	ヤギ	ヒツジ	ブタ	リヤマ
検体数	2	8	5	3	2

イ 方法

① 検査材料の前処理

糞便 1g を 15mL 遠心管に採取し、ホルマリン水で固定処理をした後、酢酸エチルを使用した遠心沈殿法(MGL 法)により沈さを得た。さらに沈さを蒸留水で浮遊した後、シヨ糖液を使用した密度勾配遠心法を実施し、得られた沈さに 1mL の蒸留水を加え、試料液とした。

② 直接蛍光抗体染色(湿式)によるシストの検出

試料液 10 μ L について、Easy Stain C&G FITC(和光純薬)を用いて、直接蛍光抗体染色標本を作製し、蛍光顕微鏡 FSX-100(オリンパス)で全視野を観察し、ジアルジアのシストを検索した。

③ リアルタイム PCR 法による遺伝子の検出

試料液 20 μ L を使用し、SDS 法による核酸精製を行った。精製した核酸テンプレート 2 μ L について、ジアルジア属の 18SrRNA 遺伝子をターゲットにして、Cycleave RT-PCR Giardia(18SrRNA) Detection Kit(TaKaRa)を使用し、逆転写反応を行った後、サイクリングプローブ法による PCR をそれぞれ実施した。リアルタイム PCR 装置には、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems)を使用した。

(3) 結 果

ふれあい動物の糞便からジアルジアのシスト及び遺伝子は検出されなかった。

(4) 考 察

今回の調査では、昨年度に引き続き、ふれあい動物からジアルジアは検出されなかったが、検体数の不足によるものか、保有していないのかの判断が必要である。