

実験動物感染症の現状

ティザー菌 (*Clostridium piliforme*)

國田 智

自治医科大学 実験医学センター

要 約

ティザー病は *Clostridium piliforme* の感染によって起こる疾病であるが、正常免疫機能を有する動物では一般に臨床症状や病変がみられない。このような感染症の防除対策としては、検疫や定期的な微生物モニタリングによる不顕性感染動物の摘発が重要である。しかし、*C. piliforme* は人工培地で発育しないこと、感染個体から短期間で病原体が排除されるため PCR による検査に限界があること、抗体検査で腸内フローラとの交差反応に基づく非特異反応が見られることなど、スクリーニングや確定診断が困難な病原体である。さらに、*C. piliforme* は芽胞形成菌であり、環境中に感染源が長期に残存し続けるという問題点もある。近年は実験用マウス・ラットにおける感染例は激減しているものの、統御上の死角がでしやすい *C. piliforme* 感染の特性ゆえに、僅かながらも散発的に感染個体が発見されているのが現状である。免疫不全動物での致死的感染のリスクも考慮し、引き続き重要なモニタリング対象微生物の1つとして注視する必要がある。

病原体と宿主

ティザー病 (Tyzzer's disease) は、グラム陰性、芽胞形成性の桿菌 *Clostridium piliforme* に起因する感染病である。ティザー病は、1917年にマウスの疾病として報告され [14]、その後ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミなどの小型実験動物やイヌ、ネコ、サル類での感染例も報告された。家畜では、ウマの疾病として問題となることがあり、特に子ウマでは致死性の疾病として知られている。その他の家畜での感染例は稀であるが、世界中の多くの野生哺乳動物種で感染が認められる。各動物種由来の *C. piliforme* 株は宿主特異的な病原体であると考えられるが、宿主動物種の特異性がどの程度厳密かは必ずしも明確にされていない [3]。

病原体の性状

ティザー菌は、細菌学的な分類が不明であったため過去には Tyzzer's organism と呼ばれていた。その後 *Bacillus piliformis* の学名を経て、1993年に16S rRNA の配列から *Clostridium* 属に分類され、現在では *Clostridium piliforme* の学名に統一されている [2]。本菌は、偏性細胞内寄生性で、芽胞を形成し、周毛

性鞭毛を有する針状のグラム陰性長大桿菌である。感染肝などのスタンプ標本をギムザ染色すると、菌体上に数個のアズール顆粒が確認される。人工培地には発育しないが、発育鶏卵やマウス胎児由来線維芽細胞株の3T3細胞、バッフアローラット由来肝細胞株のBRL3A細胞を用いた組織培養により、菌分離や増菌が可能である [10]。

本菌の栄養型は、生体外ではきわめて不安定で、感染組織あるいは乳剤中の菌体は、4℃でも数時間で感染性が消失する。一方、芽胞は抵抗性が強く、乾燥状態においても感染性は長期間維持される。室温で放置された汚染床敷内で本菌の芽胞が1年以上も感染力を保持したとの報告がある [14]。また、60℃で30分間の熱処理や70%エタノール消毒、4%クロルヘキシジン消毒に対しても、本菌芽胞は抵抗性である。芽胞の不活化には、100℃以上の加熱やヨード系消毒薬 (1%ヨードホル) 、塩素系消毒薬 (0.015%次亜塩素酸ナトリウム) 等が有効である。

感染経路と病原性

環境中や感染動物の糞便中に存在するティザー菌芽胞を経口摂取することにより感染する。芽胞は環境中において1年以上の長期間に渡って感染力を保

持している。

ティザー菌の病原性は、分離株や宿主動物の違いにより多様である。ティザー菌の一部は毒素を産生し、一般に毒素産生株が非産生株よりも強い病原性を示す [11]。これは感染マウスの肝病変を比較して毒素産生株が肝壊死巣の形成を強く誘導するという知見に基づいているが、毒素と病原性を関連づける機序については不明である。一方、マウスの系統によっても肝病変の形成には差違がみられる。静脈内への実験感染の結果から、DBA/2 は本菌に感受性、C57BL/6 は抵抗性系統とされている [15]。

臨床症状と病変

感染動物は臨床症状を示さない不顕性感染例が多く、通常は感染後数週間で宿主体内から本菌は排除される。一方、免疫不全動物や免疫抑制処置を受けた宿主では、臨床症状や病変を伴う顕性感染がみられる。また、飼育環境等によるストレスや、一部の抗菌剤（サルファ剤等）の投与により、発症しやすくなることも知られている。典型的な症状は離乳直後の動物で現れることが多い。食欲欠如、削瘦、立毛のほか、ラットでは腹部の膨大、ウサギでは下痢といった症状が見られる場合が多い。スナネズミやハムスターは高感受性であり、下痢や肝炎を起こす。ヌードマウスにおける自然感染例で3か月間に40%以上の個体が発症し、発症後は急性の経過で衰弱、死亡に至ることが報告されている [8]。

自然感染例における共通の剖検所見は、腸炎と肝炎であり、心筋炎をとまなう場合もある。腸炎では、回・盲・結腸部の出血、固有層・粘膜下組織の水腫や壊死があり、主として粘膜上皮細胞ときには平滑筋細胞に菌体を認める。腸間膜リンパ節の腫大を認めることもある。ラットでは、回腸の肥大が顕著である。肝炎では、肝腫大、白色壊死斑が特徴的に見られ、肝細胞に菌体を認める。また、心筋炎例では退色した壊死病巣を形成し、心筋細胞に菌体が認められる。

ヒトでの感染例としては、HIV-1 感染患者1名でみられた皮膚病変を本菌の感染によるものと診断した症例報告がある。この症例では、痂皮形成や有疣性の慢性皮膚病変が認められ、病変部と一致して本菌が検出されている [13]。

汚染状況

現在の市販実験動物や近代的な動物実験施設の飼育動物では、本菌の感染はほぼ見られなくなった。

しかし、近年でも国内で本菌によるラットの感染例が僅かながら確認されている。2011年の国内検査機関による調査では、本菌陽性施設の割合はマウスで0%、ラットで0.97%と報告されている [7]。ペットとして飼育されている動物や野生動物における本菌の保有状況は明らかではないが、ペットショップで販売されているマウスを対象とした調査では、日本国内で全調査個体が本菌陰性であったのに対し、米国では16.7%、ドイツでは10.7%の個体が陽性であったとの報告がなされている [1, 6, 12]。分離株ごとの宿主特異性が高いものの、広範な動物種が本菌を保有している可能性があることから、野生動物や家畜、ペット等の飼育動物との直接あるいは間接的な接触を避けることが、実験動物の感染防止対策として重要である。

診断方法

人工培地により本菌は分離できないため、通常は抗体検出によるスクリーニングが行われている。また、PCR法による本菌の検出も実施されている。

抗体検査としては、培養細胞で増殖させた全菌体を抗原とするELISA法、MFIA法あるいはIFA法が一般的である [9, 16]。これらの抗体検査法は高感度なスクリーニング法として優れているが、腸内フローラ（特に近縁の*Clostridium*属菌）に対する抗体が交差反応することによって起こる非特異反応が問題になることがある [4, 9]。

PCRによって糞便中に存在する本菌を検出する検査方法も利用されている [5]。しかし、正常な免疫状態の動物では、本菌に感染しても早期に体内から排除されるため、PCRによる陰性結果は検査個体の感染履歴が陰性であることの証明にはならない。すなわち、本菌の検査の場合、健康な動物を対象とするスクリーニングあるいは正常免疫動物をおとり動物とする微生物モニタリングの目的にはPCR法は適していない。抗体陽性でPCR陰性の検査結果が得られた場合には、抗体検査の結果が擬陽性であるのか、一過性のティザー菌感染があったのか、あるいはPCR検査の結果が擬陰性なのかを精査する必要がある [9]。この場合、免疫抑制剤投与による誘発試験や免疫不全動物を用いた検査を実施することになる。PCR法は、病変を伴う症例の確定診断や上述した誘発試験での組織病理診断の補助として、極めて有効である。また、糞便検体のPCR検査は、感染源となる芽胞排出の有無を調べる目的でも利用価値がある。PCRの特異性に関して、従来から利用されているPCR法は16S rRNA配列を標的領域とする方法が多

いが、多数のティザー菌株や近縁菌間での標的配列情報の比較解析や特異性の検証が十分でないとの指摘がある。16S rRNA 遺伝子の3'末端からスペーサー配列の5'末端の領域を標的とするげっ歯類とウサギ由来のティザー菌に特異的なPCR検査法では、従来の16S PCR検査法で陽性と判定されていた検体が陰性判定となり、当該飼育集団中での臨床所見陰性の結果と一致することが報告されている[4]。

組織病理学的な検査方法としては、病変部スタンプ標本中の菌体検出が迅速かつ簡便である。肝臓や心臓の壊死斑あるいは回腸粘膜の肥厚など本菌感染が疑われる病変を見つけた場合、病変部のスタンプ標本のギムザ染色を行い、アズール顆粒を有する針状の桿菌あるいは芽胞が細胞内に見いだされれば、本菌感染の簡易診断ができる。病変部スタンプ標本の間接蛍光抗体法によっても菌体を確認することができる。ただし、抗体検査やPCR検査も実施し、同時に確認することが必要である。また、病変部の薄切病理標本で菌体検出を行う場合、本菌はHE等の一般染色法で染まりにくいので、鍍銀染色やWarthin-Starry染色を行って針状の桿菌を確認する。

感染発生時の対応

本菌が検出された集団は、全淘汰することが推奨される。本菌はテトラサイクリンに感受性であるが、治療効果は確実ではない。本菌に対する治療は感染を長期化させ、キャリアー動物として感染源を集団内に残す危険性が高い。上述したように、検査によって健康個体群から感染個体を漏れなく摘発することは困難であることから、感染個体が発見された際には集団全体を淘汰・再構築することが推奨される。感染動物集団から本菌陰性の動物集団を再構築するにあたっては、胚移植や帝王切開により本菌を除去することが可能である。また、動物の淘汰に加え、環境中の芽胞を不活化することが再感染の防止に重要であり、飼育環境の十分な清浄化の後に本菌陰性の動物集団を再構築する必要がある。

おわりに

以上、ティザー菌の性状、病原性、診断方法の現状を中心に概説した。本菌はスクリーニングや確定診断が困難な病原体であることに加え、芽胞を形成して環境中に感染源が長期間残存するという特徴もある。近年は実験用マウス・ラットにおける本菌の感染例が激減しているものの、統御上の死角ができてきた。C. piliforme 感染の特性ゆえに、僅かながらも

散発的に感染個体が発見されているのが現状である。免疫不全動物での致死的感染のリスクも考慮し、引き続き重要なモニタリング対象微生物の1つとして注視する必要がある。

参考文献

1. Dammann, P., Hilken, G., Hueber, B., Köhl, W., Bappert, M.T., and Mähler, M. 2011. Infectious microorganisms in mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Germany. *Lab. Anim.* 45: 271–275.
2. Duncan, A.L., Carman, R.J., Olsen, G.J., and Wilson, K.H. 1993. Assignment of the agent of Tyzzer's disease to *Clostridium piliforme* comb. nov. on the basis of 16S rRNA sequence analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 314–318.
3. Franklin, C.L., Motzel, S.L., Besch-Williford, C.L., Hood, R.R., and Riley, L.K. 1994. Tyzzer's infection: host specificity of *Clostridium piliforme* isolates. *Lab. Anim. Sci.* 44: 568–572.
4. Feldman, S.H., Kiavand, A., Seidlein, M., and Reiske, H.R. 2006. Ribosomal RNA sequences of *Clostridium piliforme* isolated from rodent and rabbit: re-examining the phylogeny of the Tyzzer's disease agent and development of a diagnostic polymerase chain reaction assay. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 45: 65–73.
5. Furukawa, T., Furumoto, K., Fujieda, M., and Okada, E. 2002. Detection by PCR of the Tyzzer's disease organism (*Clostridium piliforme*) in feces. *Exp. Anim.* 51: 513–516.
6. Hayashimoto, N., Morita, H., Ishida, T., Uchida, R., Tanaka, M., Ozawa, M., Yasuda, M., and Itoh, T. 2015. Microbiological survey of mice (*Mus musculus*) purchased from commercial pet shops in Kanagawa and Tokyo, Japan. *Exp. Anim.* 64: 155–160.
7. Hayashimoto, N., Morita, H., Ishida, T., Yasuda, M., Kameda, S., Uchida, R., Tanaka, M., Ozawa, M., Sato, A., Takakura, A., Itoh, T., and Kagiya, N. 2013. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan. *Exp. Anim.* 62: 41–48.
8. Livingston RS, Franklin CL, Besch-Williford CL, Hook RR and Riley LK. 1996. A novel presentation of *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer's disease) in nude mice. *Lab Anim Sci*; 46: 21–25.

9. Pritt, S., Henderson, K.S., and Shek, W.R. 2010. Evaluation of available diagnostic methods for *Clostridium piliforme* in laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab. Anim.* 44: 14–19.
10. Riley, L.K., Besch-Williford, C., and Waggie, K.S. 1990. Protein and antigenic heterogeneity among isolates of *Bacillus piliformis*. *Infect. Immun.* 58: 1010–1016.
11. Riley, L.K., Caffrey, C.J., Musille, V.S., and Meyer, J.K. 1992. Cytotoxicity of *Bacillus piliformis*. *J. Med. Microbiol.* 37: 77–80.
12. Roble, G.S., Gillespie, V., and Lipman, N.S. 2012. Infectious disease survey of *Mus musculus* from pet stores in New York City. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51: 37–41.
13. Smith, K.J., Skelton, H.G., Hilyard, E.J., Hadfield, T., Moeller, R.S., Tuur, S., Decker, C., Wagner, K.F., and Angritt, P. 1996. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1: confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 34: 343–348.
14. Tyzzer, E.E. 1917. A fatal disease of the Japanese waltzing mouse caused by a spore-bearing bacillus (*Bacillus piliformis*, N. sp.). *J. Med. Res.* 37: 307–338.
15. Waggie, K.S., Hansen, C.T., Ganaway, J.R., and Spencer, T.S. 1981. A study of mouse strains susceptibility to *Bacillus piliformis* (Tyzzer's disease): the association of B-cell function and resistance. *Lab. Anim. Sci.* 31: 139–142.
16. Waggie, K.S., Spencer, T.H., and Ganaway, J.R. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-*Bacillus piliformis* serum antibody in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 37: 176–179.