

クジラ型パラコキシジオイデス症に関する研究

(Studies on Paracoccidioidomycosis ceti)

皆 川 智 子

クジラ型パラコキシジオイデス症に関する研究

(Studies on Paracoccidioidomycosis ceti)

皆 川 智 子

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

(指導教授：和田 新平)

目次

第1章 緒論	1-5 頁
第2章 カマイルカのクジラ型パラコシジオイデス症自然発症例	6-39 頁
2-1 材料	10 頁
2-2 臨床経過	10-16 頁
2-3 検査材料採取法	17-20 頁
2-4 検査方法	21-25 頁
2-4-1 臨床病理学的検査	21 頁
2-4-2 病理組織学的検査	21 頁
2-4-3 微生物学的検査	21-22 頁
2-4-3-1 真菌培養	21 頁
2-4-3-2 抗酸菌培養	21-22 頁
2-4-4 分子生物学的検査	22-26 頁
2-4-4-1 真菌の PCR 検査	22-23 頁
2-4-4-2 抗酸菌の PCR 検査	23-26 頁
2-5 結果	27-34 頁
2-6 考察	35-38 頁
2-7 小括	39 頁
第3章 国内飼育鯨類血清を用いたクジラ型パラコシジオイデス症の免疫学的疫学調査	40-64 頁
3-1 材料	40-41 頁
3-2 検査方法	41-46 頁
3-3 統計学的解析	47 頁
3-4 結果	47-59 頁
3-5 考察	60-63 頁
3-6 小括	64 頁
第4章 総括	65-67 頁
謝辞	68 頁
引用文献	69-84 頁

第1章 緒論

動物からヒトへ、ヒトから動物へ伝播する感染症を「人獣共通感染症」という。Taylor *et al.* (2001) によると、ヒトの感染原因病原体は 1415 種にもなり、そのうち 868 種、すなわち 61%が人獣共通感染症である。中でも 175 種の原因病原体が新興感染症であるといわれている。

広く知られている人獣共通感染症として狂犬病、結核、オウム病、エキノコックスなどがあげられる。エキノコックスに関しては、以前は北海道に生息するキタキツネにのみ注意をしていたが、2014年4月には愛知で捕獲された野犬の糞便からエキノコックス虫卵遺伝子が検出された。また、最近では、鳥インフルエンザや蚊が媒介するジカ熱、主にマダニによる咬傷から感染する重症熱性血小板減少症候群 (severe fever with thrombocytopenia syndrome: SFTS) などがあり、2014年から2016年の厚生労働省の感染症発生動向調査によると日本での SFTS の致死率は 20%であった。サル類飼育施設では定期的に結核ワクチン接種を行っており、インコ類飼育施設ではオウム病に留意している。2017年2月にも、鳥インフルエンザの発生があり (https://www.tokyo-zoo.net/topic/topics_detail?kind=news&inst=ino&link_num=23978)、休園を余儀なくされた施設もあり、外飼育動物は野生動物からの感染防止は必須である。

また、国内の輸出入動物種であるが、家畜伝染病予防法に基づき指定検疫物以外の動物として、狂犬病予防法に基づく犬、猫、アライグマ、キツネ及びスカンクの輸出入検疫、感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律に基づくサルの輸入検疫、水産資源保護法に基づく水産動物の輸入防疫があり、このほかにも指定外動物も輸出されている。平成 27 年の輸入数は 53 万頭以上にも及び、輸出総数は約 16 万頭であった。そのうち指定外動物は約 15 万頭を占めた。このように世界と動物の輸出入が行われていることに伴い、人

獣共通感染症原因病原体も移動している可能性が考えられる。

(<http://www.maff.go.jp/aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-6.pdf>)

水族館における飼育動物は、魚類はもちろん爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類などがあげられ、生息環境が陸上動物と異なるものが多く、それら動物に感染する原因病原体は多岐にわたる。中でも水族館飼育哺乳動物は、飼育員も含めタッチングプールやふれあい施設などもあることから、ヒトと関わりをもつ機会が増えている。特に飼育員や獣医師は人獣共通感染症に罹患するリスクが高く、自身が感染症を媒介してしまう可能性も少なくない。また、水族館は年間多くの人々が来館する公共施設であることから、感染症が発生するとその風評被害による経済的損失も免れない。

これらのことから、罹患動物の治療はもちろん、細菌、真菌、寄生虫などの感染症原因病原体そのものを知ることは、動物を健康に飼育するためには不可欠である。また、施設の飼育環境も非常に重要であり、罹患個体の管理および病原微生物の蔓延防止、飼育関係者ならびに来館者への人獣共通感染症防止対策は重要である。

中でも真菌症は、園内感染や人獣共通感染症として多くの事例が報告されている (Bagnall *et al.*, 1972; Fischman *et al.*, 1987; Kearns *et al.*, 2000; Kuntze *et al.*, 1967; Takahashi *et al.*, 2008; Otcenasek *et al.*, 1978; Pal & Thapa, 1993; Pollock *et al.*, 2000; Rotstein *et al.*, 1999; Schöborn, 1971; Schöborn, 1970; Scott, 1986; Weiss, 1974)。動物園のトラから飼育関係者、その家族や友人、飼育されているペットにまで *Micosporum canis* が、感染した例もある (Kuntze *et al.*, 1967)。

クジラ型パラコキシジオイデス症とは、以前はジョージロボ病 (Jorge Lobo's disease)、ロボ病 (Lobo's disease)、ケロイド状分芽菌症 (keloidal blastomycosis)、ロボミコーシス (lobomycosis)、ラカジオーシス (lacaziosis) として知られており、ヒトと小型鯨類に感染する真菌症とされていた疾患であ

る (Horner and Raugi, 2017; Paniz-Mondolfi *et al.*, 2012)。高度病原性真菌症の一種で、大西洋沿岸の中南米諸国における人と小型鯨類の風土病で、慢性肉芽腫性ケロイド状皮膚炎を特徴とする人獣共通感染症と考えられていた。

1931年、Jorge Lobo によりアマゾン地域で発生していたケロイド状の皮膚病変を持つ患者について初の報告がなされ、その後、1938年にロボ病、1958年にロボミコーシス、2005年に Vilela *et al.* により、ヒトと小型鯨類が感染するラカジオーシスと疾患名は変遷した (Horner and Raugi, 2017)。1999年、Taborta *et al.* によりラカジオーシスの原因病原体は培養不能な *Lacazia loboi* であると定義された。

ラカジオーシスの多発地域は中南米の海拔 200 m 以下、平均気温が 24 °C 以上、年間 2,000 mm 以上の降水量がある熱帯、亜熱帯地域とされていた。ヒトの発症件数の 64%がブラジルでの発症例だが、他にもコスタリカ、パナマ、ベネズエラ、コロンビア、ギアナ、スリナム、フランス領ギアナ、エクアドル、ペルー、ボリビア、ホンジュラス、メキシコ、オランダ、アメリカ合衆国、カナダでも報告されている。ヨーロッパ、南アフリカ興和国などの大西洋沿岸地域でも症例が報告されている (Horner and Raugi, 2017)。

2016年、Vilela *et al.* により小型鯨類におけるラカジオーシスには paracoccidioidomycosis ceti (以下 PCM-C と略)、すなわちクジラ型パラコクシジオイデス症と言う疾患名が提唱され (Vilela *et al.*, 2016)、我が国の研究者が鑑別診断にこの疾患名を使用したことから、国内外に認められている (Ueda *et al.*, 2017)。また Vilela *et al.* (2016) は、分子生物学的検査に基づき培養不能な *Paracoccidioides brasiliensis* (Minakawa *et al.*, 2016) を PCM-C の原因としている。*P. brasiliensis* には少なくとも 4 つの菌種が含まれていると考えられ (Teixeira *et al.*, 2014)、*P. brasiliensis complex* という呼称も使用されてきたが、Turissini *et al.* (2017) は形態学および分子生物学的検討により *P. brasiliensis complex* には以下の 4 菌種が含まれることを報告した。すなわ

ち、*P. americana*、*P. restrepiensis*、*P. venezuelensis* および *P. brasiliensis sensu stricto* である。しかしながら、Vilela *et al.* (2016) が PCM-C 原因病原体とした *P. brasiliensis* がこれら 4 菌種のどれに相当するのか、これまでの研究では明確に示されていない。

一方、ヒトのラカジオーシスはアマゾン地域で *L. lobo* を原因病原体として発症したものに限定すると同時に定義された (Vilela *et al.*, 2016)。現時点で、ヒトのラカジーシスの原因病原体と考えられる *L. lobo* と、PCM-C 原因菌とされる *P. brasiliensis* および *Paracoccidioides* sp. とは、partial sequence of the 43 KDa glycoprotein coding gene (*gp43* 遺伝子)、kexin coding gene (*Kex* 遺伝子) ないし chitin synthase gene (*CHS4* 遺伝子) のいずれかを用いて類別される (Minakawa *et al.*, 2016; Ueda *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2016)。以上のように、かつてヒトと小型鯨類の両者に感染すると考えられていたラカジオーシスという疾患は、現時点では *Paracoccidioides brasiliensis* ないし *Paracoccidioides* sp. を原因病原体とする PCM-C と、*L. lobo* を原因病原体とするヒトのラカジオーシスに類別されている。しかしながら、PCM-C 原因菌がヒトに感染するか否かについては確定されていない。

本菌種の自然界での生態は明らかではないが、感染源としては主に土壌、植物、海水、淡水があげられる。人から人への感染は報告されていないが、オランダでは、分子生物学的データについては不明なものの、小型鯨類から飼育員への感染があったとの報告がある (Symmers, 1983)。

本研究は、将来的に人獣共通感染症として認識される可能性がある真菌症のクジラ型パラコキシジオイデス症による海棲哺乳類の事例について、新規知見を得たのでその症例を取りまとめるとともに、飼育関係者だけでなく、海洋国家である我が国の国民の健康を守るために役立つ情報を発信することを目的とし取りまとめたものである。

本論文の第 2 章は世界初記載症例となるカマイルカにおけるクジラ型パラコキシジオイデス症自然発症例および発症を強く疑う症例について述べ、日本国内でクジラ型パラコキシジオイデス症が飼育下小型鯨類の複数種に発生したことから、第 3 章では国内で飼育されている小型鯨類の血清を用いた免疫学的手法によるクジラ型パラコキシジオイデス症の抗体保有調査により、本症の疫学的情報を調査した結果を述べ、第 4 章は総括とした。

第2章 カマイルカのクジラ型パラコクシジオイデス症自然発症例

PCM-Cが発症したと確定された鯨類はバンドウイルカ (bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*) (Esperón *et al.*, 2012; Rotstein *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2016)、カマイルカ (Pacific white-sided dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*) (Minakawa *et al.*, 2016) の2種類である。また、ミナミバンドウイルカ (Indian Ocean bottlenose dolphin, *T. aduncus*) (Kiszka *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2014; Ramos-E-Silva *et al.*, 2009; Talhari S & Talhari C, 2012; Van Bresseem *et al.*, 2005)、ギアナコビトイルカ (costero estuarine dolphin, *Sotalia guianensis*) (De Vries and Laarman, 1973; Van Bresseem *et al.*, 2009)、ウスイロイルカ (Indian Ocean humpback dolphin, *Sousa plumbea*) (Lane *et al.*, 2014) は原因菌を分子生物学的に検出した症例ではないが、発症したと推測できる鯨種である。加えて、オーストラリアカワゴンドウ (Australian snubfin, *Orcaella heinsohni*) (Palmer and Peterson, 2014) と イラワジイルカ (Irrawaddy dolphin, *Orcaella brevirostris*) (Van Bresseem *et al.*, 2014) も画像をもとに感染発症した鯨種であると推測されている。表1はPCM-C (Esperón *et al.*, 2012; Minakawa *et al.*, 2016; Rotstein *et al.*, 2009; Ueda *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2016) と診断された症例を示す。外洋に棲息する鯨類では、黒斑状ないし白点状の皮膚病変 (Stefan and Barbara, 1997)、腫瘍やウイルス感染を疑うもの (Bossart *et al.*, 1996; Bossart *et al.*, 2005; Bossart, 2010) 等、様々な皮膚病変の報告があるが、PCM-Cを疑う外観所見を呈する鯨類の目撃事例は、ブラジル (Sacristán *et al.*, 2016; Simões-Lopes *et al.*, 1993; Van Bresseem *et al.*, 2009)、ベネズエラ (Bermudez *et al.*, 2009)、アメリカ合衆国テキサス州 (Cowan, 1993)、同国フロリダ州 (Reif *et al.*, 2006)、南アフリカ共和国 (Lane, 2014; Van Bresseem *et al.*, 2005)、スペイン (Symmers, 1983)、オース

トラリア (Palmer and Peterson, 2014)、インドおよびマレーシア周辺 (Van Bresseem *et al.*, 2014) から報告されている。加えて、モザンビークとマダガスカル周辺 (Kiszka, 2009; Van Bresseem *et al.*, 2005)、コロンビア、エクアドル、ブラジル (Van Bresseem *et al.*, 2005) でも同様な外観を呈する鯨類の目撃事例が報告されている。わが国では、鹿児島県の錦江湾 (Tajima *et al.*, 2015) 五島列島 (Van Bresseem *et al.*, 2012) や小笠原諸島 (<http://www.owa1989.com/admin/wp-content/uploads/0661.pdf>) でも同様の皮膚病変を持つ鯨類が確認されている (図1)。

本章では、国内施設で飼育されるカマイルカ (Pacific white-sided dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*) において PCM-C の発症が確認された症例、および PCM-C を強く疑う症例について、その臨床症状、治療経過、微生物学および分子生物学的検査結果について述べる。

表 1. 分子生物学的データに基づく PCM-C 感染症例

症例 年*	鯨種	Remarks			供試遺伝子領域** (Accession number)	参考文献 著者 (発行年)	
		性別	年 (飼育)	国			
1	2008	BD	オス	不明	アメリカ合衆国	LSU rRNA (none)	Rotstein <i>et al.</i> , (2009)
2	2009	BD	不明	不明	スペイン***	ITS rRNA (HQ413323)	Esperón <i>et al.</i> , (2012)
3	2010	BD	オス	17	日本	<i>gp43</i> (AB811031)	Ueda <i>et al.</i> , (2013)
4	2011	BD	メス	5	日本	<i>gp43</i> (AB811031)	Ueda <i>et al.</i> , (2013)
5	2014	PWSD	メス	14	日本	<i>gp43</i> (LC057206)	Minakawa <i>et al.</i> , (2016)
6	2003	BD	メス	不明	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239500)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
7	2003	BD	オス	15	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239501)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
8	2003	BD	オス	17	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239502)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
9	2003	BD	オス	18	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239503)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
10	1992	BD	メス	14	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239504)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
11	2007	BD	メス	19	アメリカ合衆国	<i>Kex</i> (KX239505)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
12	2008	不明	不明	不明	アメリカ合衆国	<i>CHS4</i> (KX267767)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)
13	2008	不明	不明	不明	アメリカ合衆国	<i>CHS4</i> (KX267768)	Vilela <i>et al.</i> , (2016)

BD, バンドウイルカ; PWSD, カマイルカ. * 採材、検出年; ** LSU rRNA=partial sequence of large subunit ribosomal RNA gene; ITS rRNA=internal transcribed spacer rRNA; *gp43*=partial sequence of the 43 KDa glycoprotein coding gene; *Kex*=kexin coding gene; *CHS4*=chitin synthase gene; *** キューバ産小型鯨類

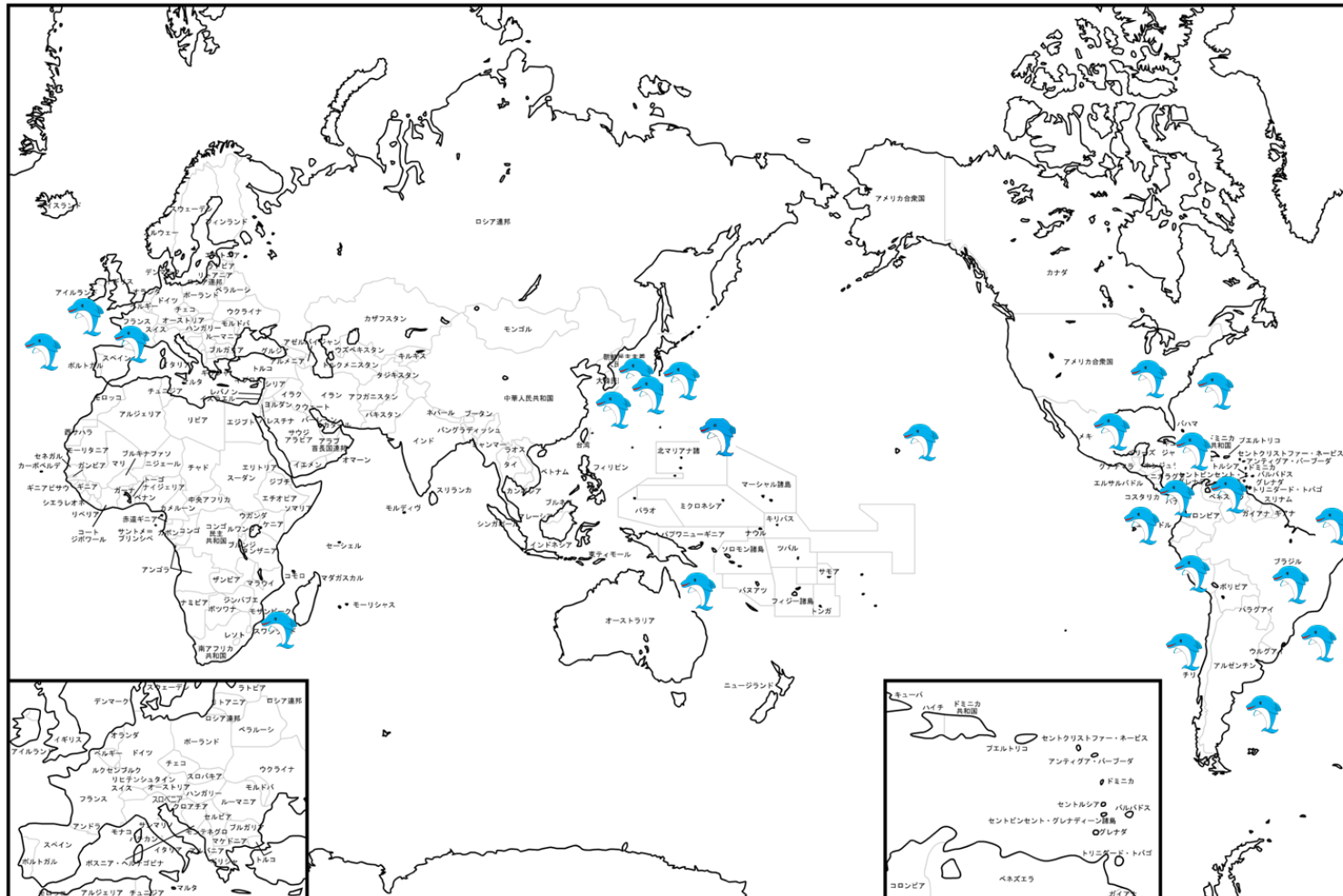


図 1. PCM-C 症例分布図

2-1 材料

症例 1：カマイルカ、メス、2001 年日本海にて捕獲、飼育歴 14 年（2015 年当時）、体重 79.8 kg（2015 年 1 月）。

症例 2：カマイルカ、オス、1996 年日本海にて捕獲、飼育歴 21 年（2016 年当時、推定年齢 26 歳以上）、体重 121.0 kg（2016 年 4 月）。

2-2 臨床経過

症例 1：2010 年初旬より、左体側尾柄部に軽度の糜爛性皮膚炎を呈し、2014 年 7 月に皮膚の肉芽腫病変兆候を呈すまで増悪寛解を繰り返していた。

2014 年 7 月より口腔内、背腹部、胸鰭、尾鰭など体表面随所に表面が潰瘍化し葉状で堅牢な肉芽腫が多発した。各病変の大きさは 1.2～10.0 cm 以上にもなった（図 2、3、4）。

個体はクラリスロマイシン（クラリスロマイシン 200 mg 錠、1.0～2.5 mg/kg、1 日 1 回～2 回、経口投与、武田テバファーマ株式会社）、クリンダマイシン塩酸塩（ダラシンカプセル 150 mg、1.88～3.75 mg/kg、1 日 3 回、経口投与、ファイザー）、ミノサイクリン塩酸塩（ミノマイシン 100 mg 錠、0.55～2.35 mg/kg、1 日 2 回、経口投与、ファイザー）などの抗生物質を少なくとも 4 日以上投薬されていたが、効果は認められなかった。

その後、イトラコナゾール（イトラコナゾール 50 mg 錠、1.18 mg/kg、1 日 1 回、経口投与、日医工株式会社）およびアモキシシリン水和物（パセトシン 250 mg 錠、2.94 mg/kg、1 日 3 回、経口投与、アスペンジャパン株式会社、東京）を 2014 年 8 月に 3 週間投与した。しかしながら、これらについても効果は認められず ALT も 123 U/L に上昇した（アラニンアミノトランスフェラーゼ alanine aminotransferase、正常値；30～90 U/L normal）。

2014 年 12 月より、ミコナゾール硝酸塩（ミコナゾール硝酸塩クリーム 1%、株式会社陽進堂）と白色ワセリン（日医工株式会社）を 1：1 に混合し 1

日 3 回塗布を開始した。加えて、白色ワセリン (丸石製薬株式会社) 10 g にアンホテリシン B 粉末 (ファンギゾン注射用、ブロストルマイヤーズスクイブ株式会社) 50 mg の割合で混和した軟膏を用いた局所塗布療法も、ミコナゾール硝酸塩軟膏塗布療法に追加して 1 日 3 回行った。以上の抗真菌剤を用いた治療は Murata *et al.* (2007) を参照して実施した。2015 年 1 月より、軟膏塗布に加え、イトラコナゾール 100 mg (イトラコナゾール 50 mg 錠、1 日 1 回、日医工株式会社) の経口投与を再開。ただし、今回は 1 週間の連続投与後、5 日間の休薬、2 日間の投与というサイクルで行った。その後、ミコナゾール硝酸塩と白色ワセリンの混合軟膏については効果が認められなかったが、アンホテリシン B 入り軟膏については病変の縮小や凹凸が平坦になるなどの効果が認められた。

以下に述べる血液検査結果の評価は、Bossart *et al.* (2001) を基準として行った。2015 年 2 月の血液検査 (セントラル医学検査研究所へ依頼) の結果、WBC (白血球数 white blood cell) と A/G 比 (アルブミン/グロブリン比 albumin/globulin ratio) は正常値を示したが BUN (尿素窒素 blood urea nitrogen 72.4 mg/dL、正常値 ; 30~43 mg/dL) の上昇も認められ、肝臓と腎臓の機能低下が示唆された。しかし、IP 値 (無機リン inorganic phosphorus、正常値 ; 3.0~6.0 mg/dL) と CRE 値 (クレアチニン creatinine、正常値 ; 0.7~1.1 mg/dL) は各々 4.82 mg/dL と 0.32 mg/dL で正常値範囲内であった。3 月の血液検査からは BUN も正常値を示し、肝臓の値もグルタチオンやウルソデオキシコール酸の経口投与にて改善した。

2015 年 1 月、我々は DV にて胸部レントゲンを撮影し、直径 0.5~1.0 cm の 2 つの嚢胞らしき構造物を確認した (図 5)。

症例 2 : 2008 年 9 月から尾鰭右端に灰色がかかった白色の皮膚小結節などの多様な傷を呈していた。病変は徐々に増加し、結節同士が結合、ケロイド状の外観を呈し 2016 年 8 月までに尾鰭のほとんどの部分を覆った。他にも右体側、

尾柄部の腹側にも同様の症状を呈した。個々の病変の直径は 1.0～2.0 cm 程度であったが、尾鰭の病変については 15 cm にもなった (図 6、7)。

局所療法として硫酸ゲンタマイシン (ゲンタマイシン硫酸塩軟膏 0.1% 「タイヨー」、武田薬品工業株式会社)、塩酸オキシテトラサイクリンと硫酸ポリミキシン B 合剤 (テラマイシン軟膏、塩酸オキシテトラサイクリン 30 mg/g、硫酸ポリミキシン B10000 単位/g 株式会社陽進堂)、塩酸オキシテトラサイクリンとヒドロコルチゾン合剤 (テラ・トリコール軟膏 塩酸オキシテトラサイクリン 30 mg/g、ヒドロコルチゾン 10 mg/g 株式会社陽進堂)、硫酸ゲンタマイシンと吉草酸ベタメタゾン合剤 (リンデロン-VG 軟膏、硫酸ゲンタマイシン 1 mg/g、吉草酸ベタメタゾン 1.2 mg/g 塩野義製薬株式会社) を少なくとも数日間塗布したが、効果は得られなかった。また、消毒剤として、ポピドンヨード (イソジン 10% Meiji Seika ファルマ株式会社)、ゲンチアナバイオレット B (消毒用エタノール 500 mL にゲンチアナバイオレット B の粉末をティースプーン 1 杯程混合、ゲンチアナバイオレット：キシダ化学株式会社、過酸化水素 (日本薬局オキシドール「昭和」P、過酸化水素：2.5～3.5%昭和製薬株式会社) の塗布も行った。これらの臨床的試みは数か月続けられたものの、皮膚病変に良化は認められなかった。血液検査結果については、血球検査値、血液生化学検査値ともに正常範囲内の測定結果であった。



図 2. 症例 1 全体像

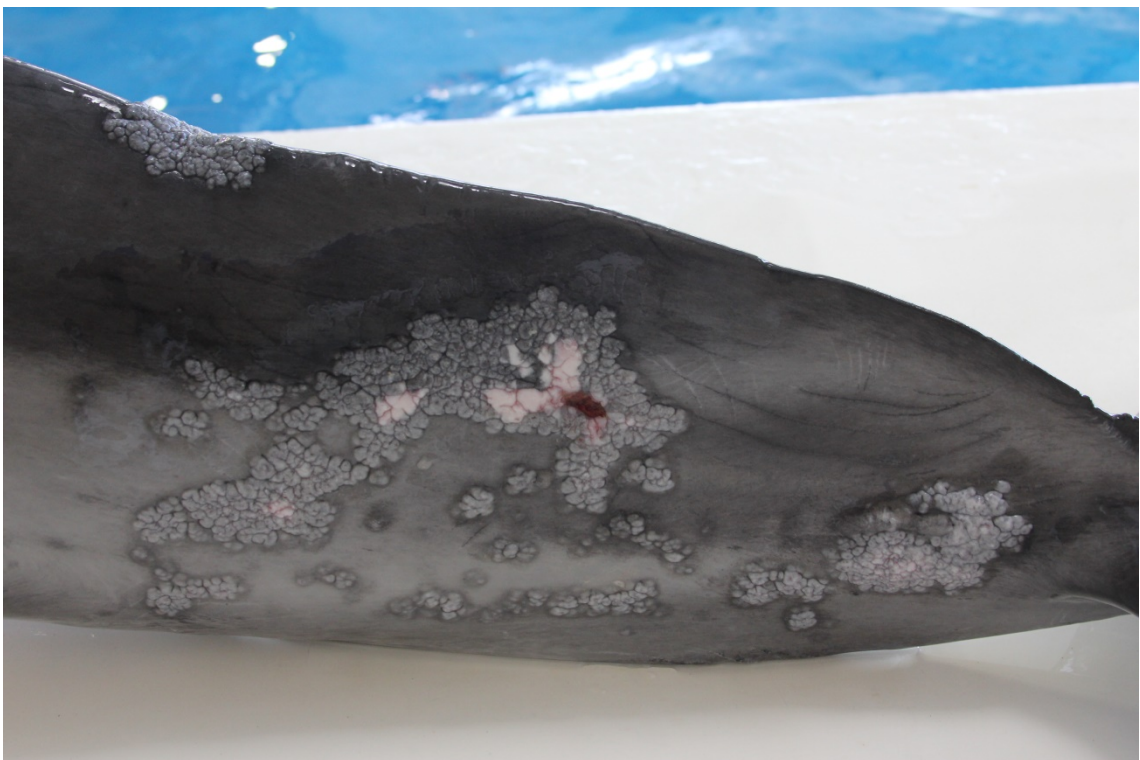


図 3. 症例 1 左側尾柄部



图 4. 症例 1 尾鳍

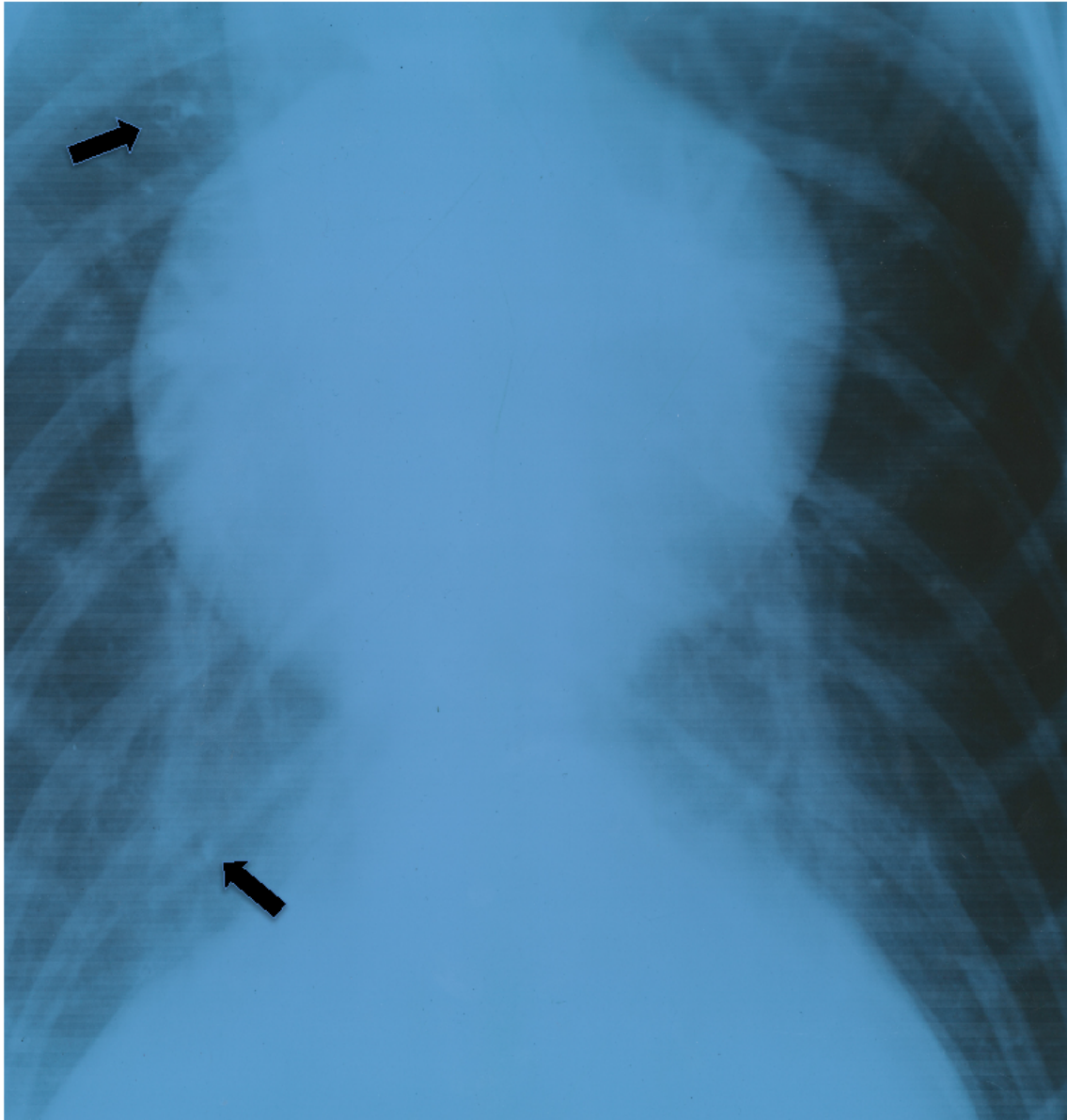


図 5. 症例 1 レントゲン DV 像 (矢印、嚢胞様構造物)



图 6. 病例 2 尾鳍



图 7. 病例 2 腹侧

2-3 検査材料採取法

症例 1 : 2014 年 10 月、2%アドレナリン加塩酸リドカイン (アスペンジャパン株式会社、東京) の 5~10 分の浸漬麻酔後、左体側パンチ生検 (直径 8 mm) 2 か所。2014 年 12 月、2%アドレナリン加塩酸リドカインの 5~10 分の浸漬麻酔後、メス、メツツェンを用い左体側 (2.0 cm×2.0 cm×1.0 cm)、右体側 (1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm)、尾柄部 (1.0 cm×1.0 cm×0.5 cm) からサンプリング。スタンプ標本作成後、各サンプルを 2 つに分け、さらにそのうち 1 つを 3 つに分割し、直ちに 10%リン酸緩衝ホルマリン液、70%エタノール及び純エタノールに浸漬し固定した。もう 1 つのサンプルは 48 時間以内に -20 °C で保存した。

症例 2 : 2016 年 8 月と 10 月、2%アドレナリン加塩酸リドカインの 5~10 分の浸漬麻酔後、サンプリングを行った。1 回目は尾鰭から 2 か所のパンチ生検 (直径 9 mm) に加え、血管に近かったことから表面の搔把 1 か所、右体側から 2 か所のパンチ生検 (直径 9 mm)、腹側 1 か所のパンチ生検 (直径 9 mm) を行った。2 回目は、尾鰭から 2 か所のパンチ生検 (直径 9 mm)、右側体側と尾柄部腹側から、メスを用いて各深さ 1.0 cm、周囲 0.25 cm²の大きさに 3 か所から皮膚を採取した。サンプリングで出血が認められた場所においては、熱したコテにて止血を行った。両日とも症例 1 同様にスタンプし各検査のために分割、保存した (図 8 麻酔風景、図 9 尾鰭サンプリング風景、図 10 体側サンプリング風景、図 11 止血、図 12 止血後)。

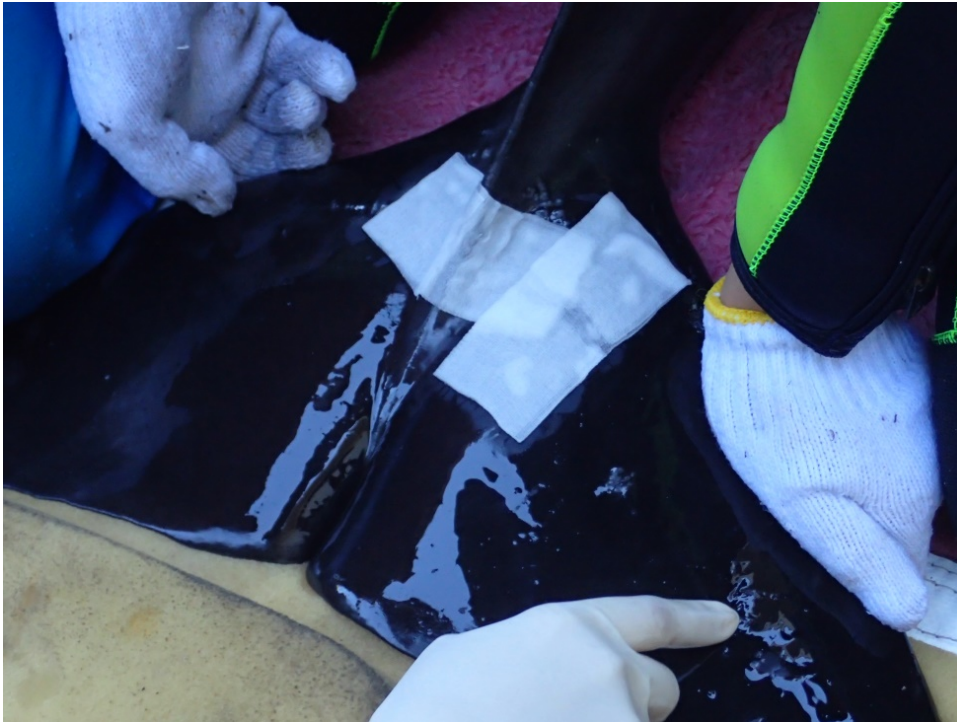


図 8. 麻酔風景



図 9. サンプルング風景



図 10. 体側サンプリング風景

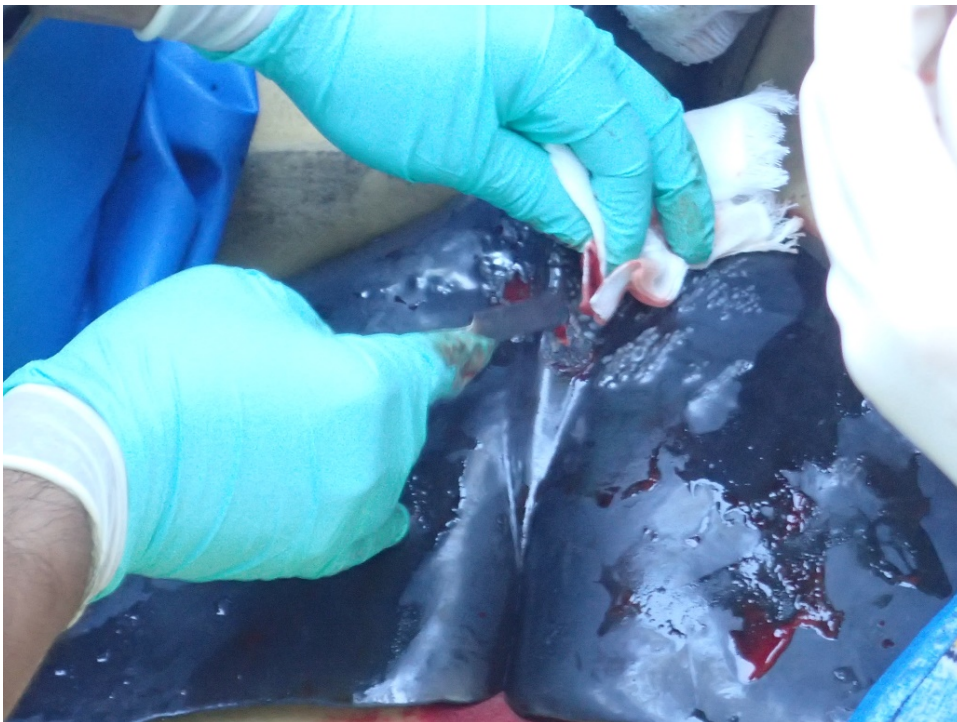


図 11. 止血

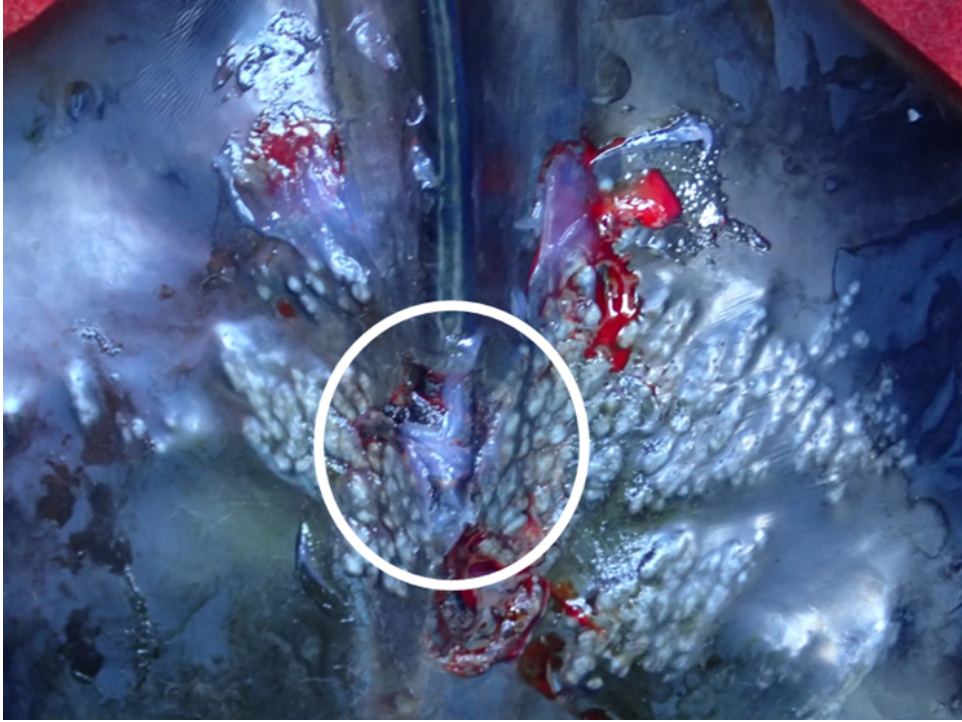


図 12. 止血後 (○内が止血部)

2-4 検査方法

2-4-1 臨床病理学的検査

両症例とも検体採集直後にスライドガラスに組織をスタンプ、風乾し、アルコール固定を行った。症例 1 はギムザ染色、症例 2 はギムザ染色に加え、過ヨウ素酸シッフ氏試薬反応法 (periodic acid Schiff's method: 以下 PAS 反応)、ゴモリ・メセナミン渡銀染色 (Gomori's Methenamine Silver-nitrate: 以下 GMS 染色) を行った。

2-4-2 病理組織学的検査

生検サンプルを 10%リン酸緩衝ホルマリン液で浸漬固定後、常法に従ってパラフィンブロックを作成し、4~5 μm の切片を作成した。これら切片にはヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 H&E 染色)、PAS 反応、GMS 染色、Ziehl-Neelsen 染色 (以下 ZN 染色) を施し、光学顕微鏡観察に供した。

2-4-3 微生物学的検査

2-4-3-1 真菌培養

皮膚の生検サンプルを用い 100 mg/L クロラムフェニコール (Wako) 添加ポテトデキストロース培地 (Difco)、マイコセル培地 (BBL, Becton, Dickinson and Company Japan)、1%酵母エキス (Difco) 及び 1%グルコース添加 (Wako) ブレインハートインフュージョン培地 (Difco) を 25°C 及び 35°C で 4 週間培養した。

2-4-3-2 抗酸菌培養

皮膚の生検サンプルより組織の一部を無菌的に 2 カ所切除し、それらに 15 mL の 1/15M、pH 6.7 リン酸緩衝液 (以下 PBS) を加えて 1.5 mL チューブ内でホモジナイズした。これら検体を 2 等分し、半量を 3,000 rpm で 20 分間遠

心分離した。上清をデカントし、沈渣に 2.0 mL の 1N HCl を添加して転倒混和し、15 分間静置した後に 1N NaOH を 3.0 mL 加えて中和し、3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。以後、この処理を酸処理と呼称する。残り半量を 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をデカントして沈渣に 1N NaOH を 2.0 mL 加えて転倒混和して 20 分間静置した。その後、PBS を 15 mL 加えて 3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。以後、この処理をアルカリ処理と呼称する。酸処理およびアルカリ処理後、上清をデカントして沈渣を Middlebrook 7H9 液体培地 (Difco) に懸濁させ、これらの検体を滅菌プラスチック接種ループにて、10%OADC (Becton, Dickinson and Company) 加 Middlebrook 7H11 寒天培地 (Difco) および 2%小川培地 (極東製薬工業株式会社) に接種し、25°C にて培養した。コロニーが確認できたものについては ZN 染色を施し、抗酸性を確認した。また、単一コロニーを得るため 10%OADC 加 Middlebrook 7H10 寒天培地 (Difco) にて純培養を行った。

2-4-4 分子生物学的検査

2-4-4-1 真菌の Nested-PCR 検査

新鮮な生検検体を 70%エタノールで 12 時間以上固定し、約 5 mm×5 mm×5 mm のサイズに分割した。滅菌水で 3 回洗浄後、5 分間 13,000 g で遠心分離を行い、DNA 抽出のために DEXPAT™ (TaKaRa) を 0.5 ml 加え、100 °C で 10 分間加温した。マイクロチューブに組織サンプルと DNA 抽出溶液を混合し氷で冷やした後、再度 10 分間 13,000 g にて遠心分離を行った。その後エタノール沈殿法にて精製し、遺伝子検出用の検体とした。DNA 量については、カマイルカの組織も含まれているため、この段階では未測定であった。

gp43 遺伝子領域を増幅するため、DNA 検体 2.5 µl、*P. brasiliensis* 特異的プライマーとして 20 pM 濃度の MAE (5'-TGC TGC GGC GGG GTT AAA CCA TGT C-3') と ATO (5'-GTT GTG GTA TGT GTC GAT GTA GAC G-3')

(Sano *et al.*, 2001) を用い、ファースト PCR を行った。すなわち、95°C 4 分で加熱後、94°C 1 分間、50°C 1.5 分間、72°C 2 分間を 40 サイクル行った後、72°C 10 分間で増幅させ、エタノール沈殿法による精製を行った。

続いて、セカンド PCR 用プライマーとして Ueda *et al.* (2013) により報告された SUM F1 (5'-GTC ATC GAT CTC CAT GGT GTT AAG-3') と SUM R2 (5'-GGC AGA RAA GCA TCC GAA A -3') を用い、ファースト PCR と同一条件で目的遺伝子の増幅を行った。

PCR 産出物はエタノール沈殿法にて精製し、DNA シークエンスは SUM F1 と SUM R2 プライマーでラベル化し、ABI PRISM 3100 sequencer (Applied Biosystems) を用いて解析した。得られた部分塩基配列は、GENETYX-MAC genetic information processing software (ver. 12.0, Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan) でアセンブルして配列情報を決定し、BLAST 解析 (National Center for Biotechnology Information) を行い、菌種の推定を行った。

2-4-4-2 抗酸菌の PCR 検査

皮膚の生検サンプルの純エタノール固定標本は細切して約 30 mg を、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてマニュアル通りに DNA を抽出した。

遺伝子領域として、16S rRNA 遺伝子、65-kDa heat-shock protein-encoding (以下 *hsp65*) 遺伝子、RNA polymerase β subunit (同 *rpoB*) 遺伝子、16S-23S internal transcribed spacer (同 ITS) 領域の 4 遺伝子を使用した。PCR に使用したプライマーのプライマー配列情報を表 2 に示す。

PCR 反応は Go Taq (Promega) を用いて実施した。使用したすべてのプライマーセットに同一の PCR 反応条件を適用した。

1 検体当たり、5×Colorless buffer 12.0 μL、2.5 mM dNTP mix 4.8 μL、H₂O 33.9 μL、Forward Primer (10 μM) 3.0 μL、Reverse Primer (10 μM) 3.0 μL、Go Taq 0.3 μL を混合し、抽出した DNA 3.0 μL をテンプレートとして添加した。

95°C 10 分間の熱変性の後、95°C 40 秒間の熱変性、55°C 40 秒間のアニーリング反応、72°C 90 秒間の伸長反応を 40 サイクル繰り返し、その後 72°C の伸長反応を 10 分間実施した。

得られた PCR 産物のうち 2 μL はエチジウムブロマイドを添加した 2%アガロースゲル (1×TBE buffer[0.04 M Tris-boric acid, 0.001 M EDTA pH 8.0]) 中で 100 V 30 分間電気泳動を行った。泳動後、アガロースゲルは UV トランスイルミネーターで PCR 産物を確認するとともに、非特異的な PCR 産物の有無を確認した。

特異的 PCR 産物のみが確認された場合、PCR 産物 58 μL をスピнкаラムに採取し、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。また、非特異的 PCR 産物が確認された場合は、PCR 産物 58 μL をエチジウムブロマイド添加した 2%アガロースゲルにて 100 V 40 分間電気泳動し、特異的 PCR 産物のみをメスで切り取った。切り取ったゲルは同様に QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。

精製された PCR 産物は、BigDye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) によりラベル化され、DNA シークエンサー (ABI PRISM 3730 DNA Analyzer, Applied Biosystems) で解析を行った。なお、これら PCR 産物のラベル化およびシークエンス解析は FASMAC Co. (Kanagawa, Japan) に依頼し実施された。

得られた部分塩基配列は、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX ver. 11.0 (GENETYX) を用いてアセンブルし配列情報を決定し、BLAST 解析

(National Center for Biotechnology Information) を行い、菌種の推定を行った。

表 2. 抗酸菌の検出に使用した PCR プライマー

Genes	Primers	Sequences (5' -3')
16S rRNA	8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
	1047R	TGCACACAGGCCACAAGGGA
	830F	GTGTGGGTTTCCTTCCTTGG
	1542R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA
<i>hsp65</i>	Tb11	ACCAACGATGGTGTGTCCAT
	Tb12	CTTGTCGAACCGCATAACCT
<i>rpoB</i>	MycoF	CGCCACTTCGGCAACCG
	MycoR	TCGATCGGGCACATCCGG
ITS	ITSF	TTGTACACACCGCCCGTC
	ITSR	TCTCGATGCCAAGGCATCCACC

2-5 結果

症例 1 の臨床症状は、顎、背、胸鰭、尾鰭の皮膚に潰瘍を伴った葉状で堅牢な肉芽腫が多発し、2015 年 4 月末時点でも存在していた。これらの病変は、2015 年 10 月に体表の様々な場所 (図 2、3、4) で確認することができ、他にも左体側尾柄部 (図 3)、尾鰭 (図 4) にも認められた。胸部レントゲンでは直径 0.5~1.0 cm の嚢胞らしきものも 2 箇所を確認した (図 5)。

生検サンプルの真菌および抗酸菌の分離培養はいずれも陰性であった。また、病理組織学的検査では PAS 反応及び GMS 染色を行ったが、酵母様構造物は認められず、ZN 染色に陽性を示す桿菌も観察されなかった。本症皮膚患部の病理組織学的特徴について、PCM-C とラカジオーシスとを峻別して記載した研究は見当たらず、旧診断名である「ロボ病」についてのみ報告がある。それらによると、ロボ病皮膚患部には、多核巨細胞とマクロファージの出現が顕著な、広範な肉芽腫性反応が観察され、表皮はおそらく病原体への反応性増殖により厚さが不均一となり、巨細胞およびマクロファージの細胞質内に屈折性のある類円形構造が観察されるとしている (Vries and Laaman, 1973; Cowan, 1993)。これら屈折性を有する類円形構造物が PAS 反応および GMS 染色に陽性を示す菌要素である。しかしながら、本研究で供試した症例 1 および症例 2 の皮膚患部には巨細胞性肉芽腫は観察されず、マクロファージと顆粒球を主とした細胞浸潤が顕著であり (図 13)、しばしば核の残渣を含み膿様の所見を呈する部位が散見された (図 14)。

一方、生検サンプルのスタンプ標本ギムザ染色にて、左体側、右体側および尾柄部の全ての部位において、連続する多極性出芽を示した細胞質を欠く球形の酵母様構造物、巨細胞に囲まれた球形の酵母様構造物が顕微鏡下で確認された (図 15、16、17、18)。母細胞の直径は 7~25 μm で、その娘細胞直径は 1~10 μm 、連鎖する細胞直径は 1~20 μm であった。

症例 1 の生検サンプル（右体側部検体）より抽出された DNA に対する 43kDa 糖蛋白抗原遺伝子領域 (*gp43*) の特異プライマーを用いた Nested PCR (Ueda *et al.*, 2013) により、381 bp の PCR 産物が得られた (図 19)。ダイレクトシーケンス解析により PCR 産物の部分塩基配列を決定し、GeneBank データベースに LC057206 として登録した。その部分塩基配列を BLAST 解析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) した結果、症例 1 の *gp43* 遺伝子配列は *P. brasiliensis sensu stricto* (U26160) (Turissini *et al.*, 2017) と 99%、*P. luzitii* (XM00279244) と 87.1%、*L. loboii* (EU109947) と 84.4%、そして Ueda *et al.* (2013) で報告されたバンドウイルカ症例由来の *Paracoccidioides* sp. の配列 (AB811031) とは 95.8% の相同性を示した。なお、Vilela *et al.* (2016) は Ueda *et al.* (2013) が報告した *Paracoccidioides* sp. が分子系統分類学的には *P. brasiliensis* に類別されると述べている。*gp43* 遺伝子の部分塩基配列を元に、フリーソフトウェア MEGA ver 6.0 にて近隣接合法を使用して分子系統樹を作成し、Kimura の two-parameter distance correction model で 1,000 回のブーツストラップ検定を行った。その結果、症例 1 の皮膚患部より増幅された *gp43* 遺伝子の部分塩基配列は *P. brasiliensis sensu stricto* と同一のクラスターを形成し、Ueda *et al.* (2013) のバンドウイルカ症例由来配列 (*P. brasiliensis*) とも近縁であることが示された (図 20)。なお、症例 1 に関して、抗酸菌検出のための遺伝子領域 (16SrRNA、*hsp65*、*rpoB*、ITS) のプライマーセットを用いた PCR では、明瞭なバンドが検出できなかった。

症例 2 では、病理組織学的検査、分離培養および分子生物学的検査のすべてにおいて、真菌感染ないし抗酸菌感染を示唆する所見は得られなかったが、臨床病理学的検査においては生検サンプルのスタンプ標本に PAS 反応と GMS 染色に陽性を示す直径 15~25 μm の多極性出芽を呈した典型的真菌要素を含む酵母様構造物が確認された (図 21)。

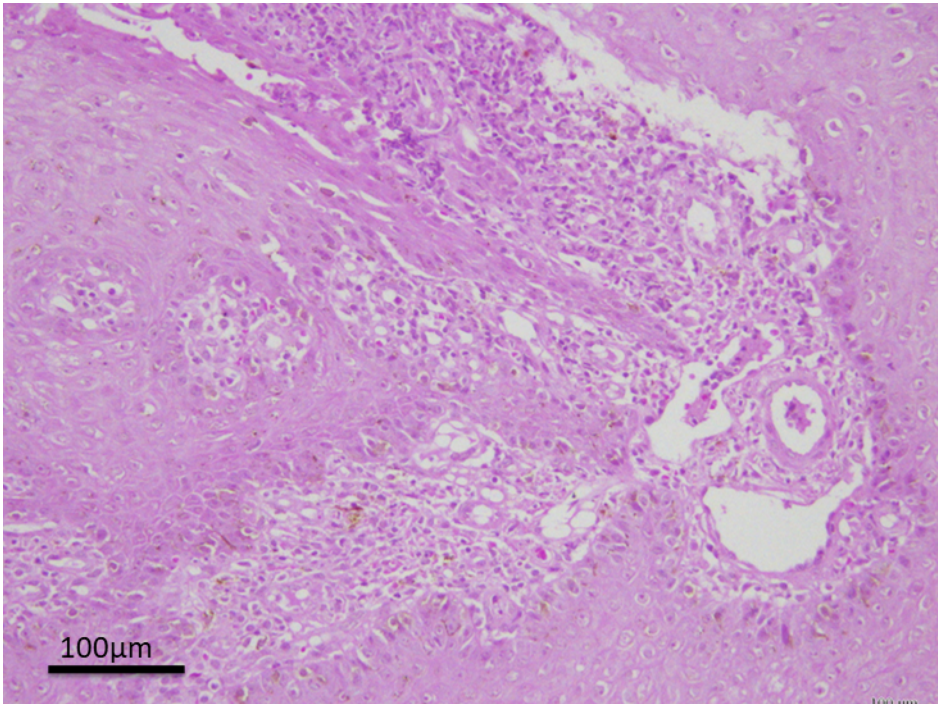


図 13. マクロファージと顆粒球を主とした細胞浸潤

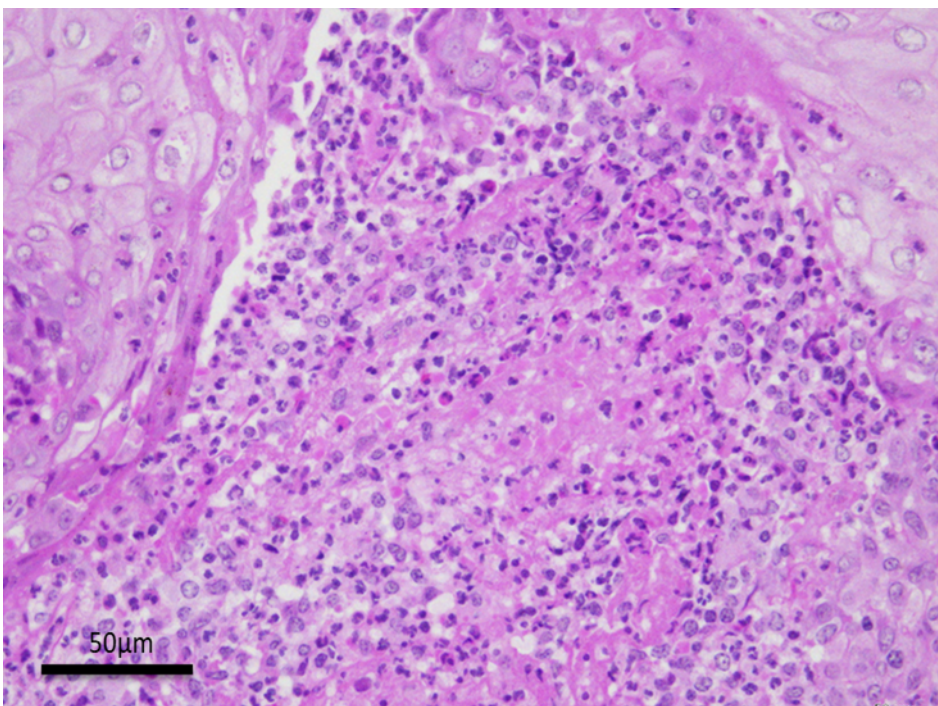


図 14. 核の残渣を含み膿様の所見を呈する部位

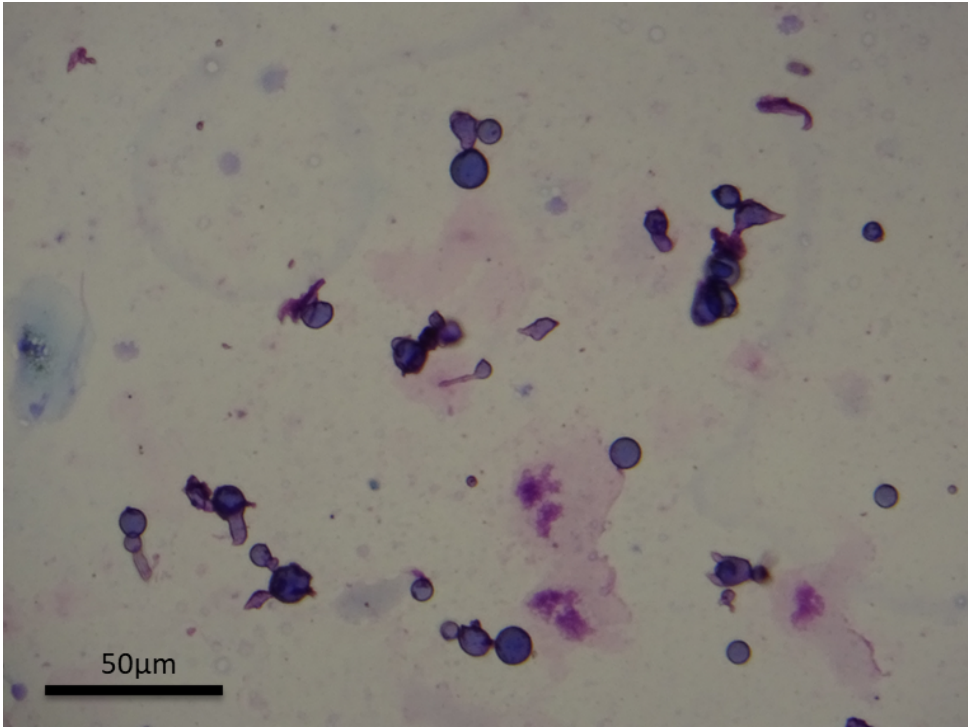


図 15. 酵母様構造物

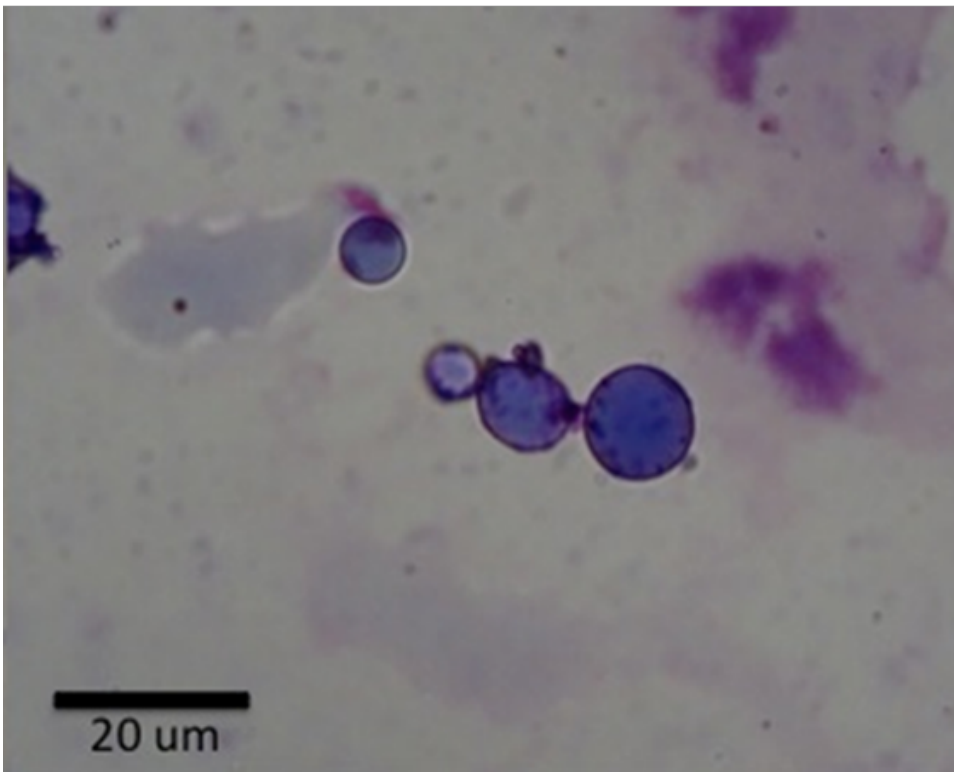


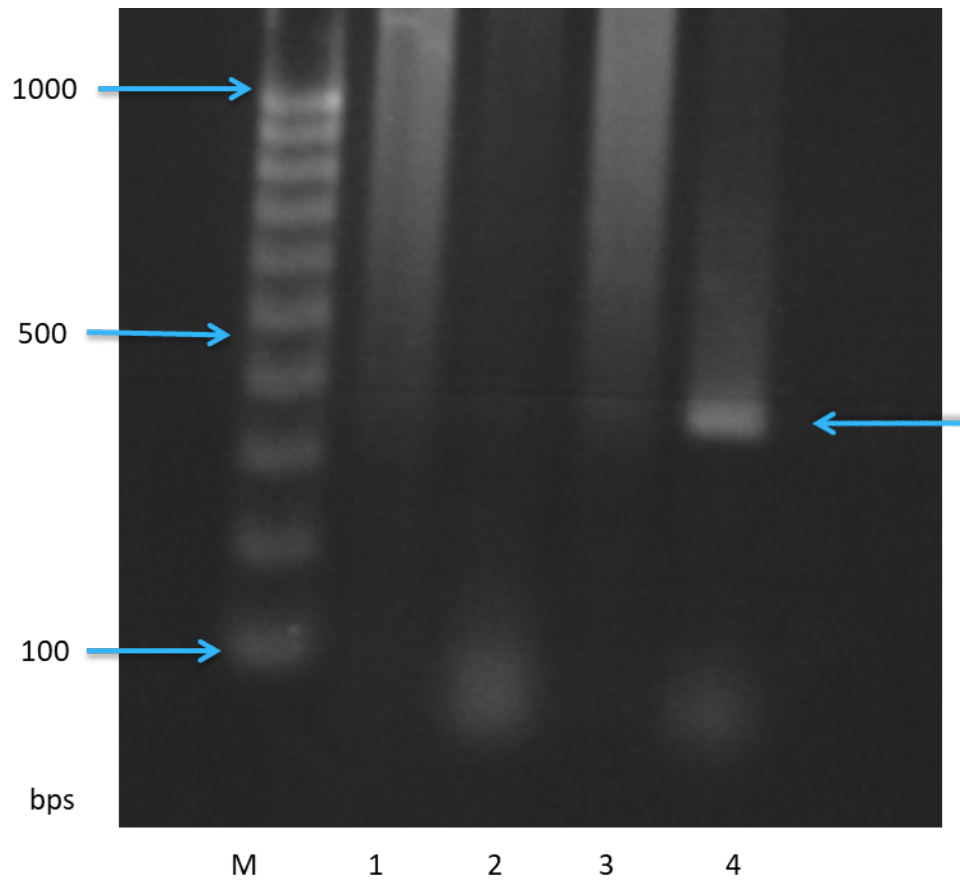
図 16. 酵母様構造物



図 17. 多極性出芽を示す酵母様構造物



図 18. 巨細胞と球状構造物



M:マーカー, 1, 2:左体側由来検体, 3,4:右体側由来検体

図 19. 症例 1 生検サンプルより抽出した DNA の *gp43* 遺伝子領域の Nested-PCR の結果。右体側検体では 361bp 付近に明瞭なバンドが観察される。

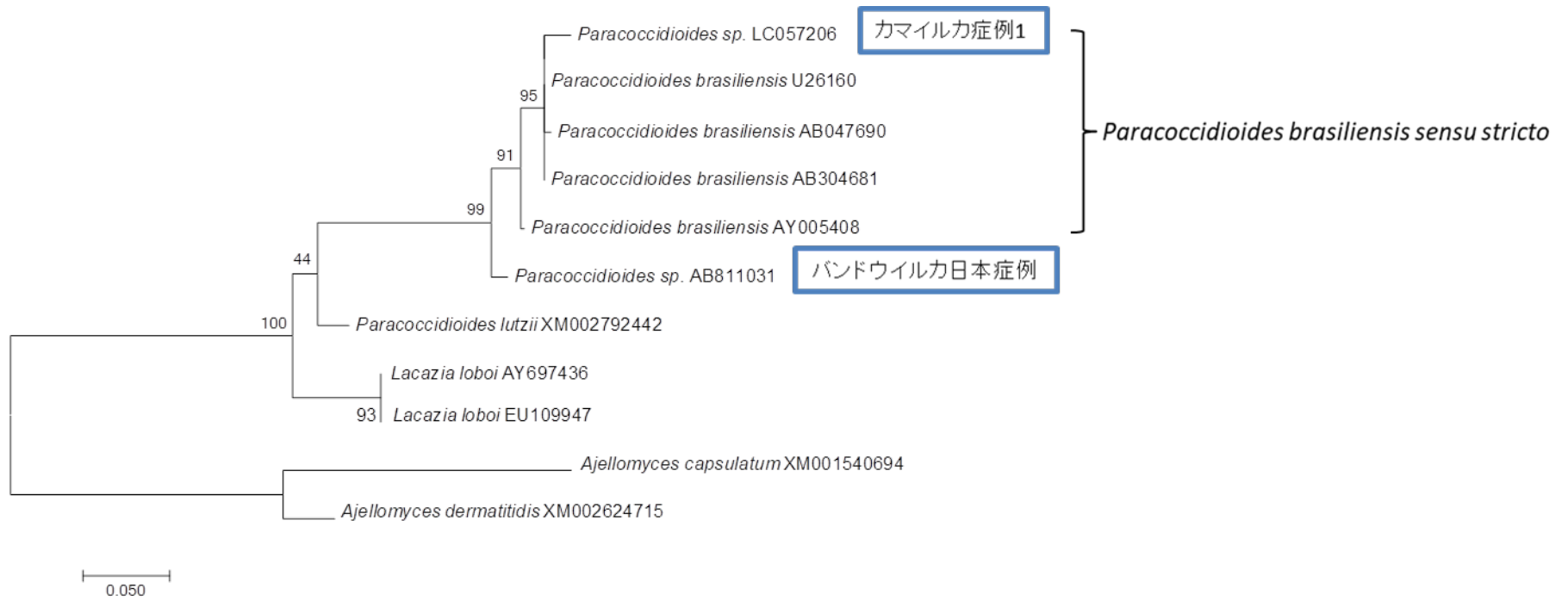


図 20. *gp43* 遺伝子の部分塩基配列より作成した分子系統樹

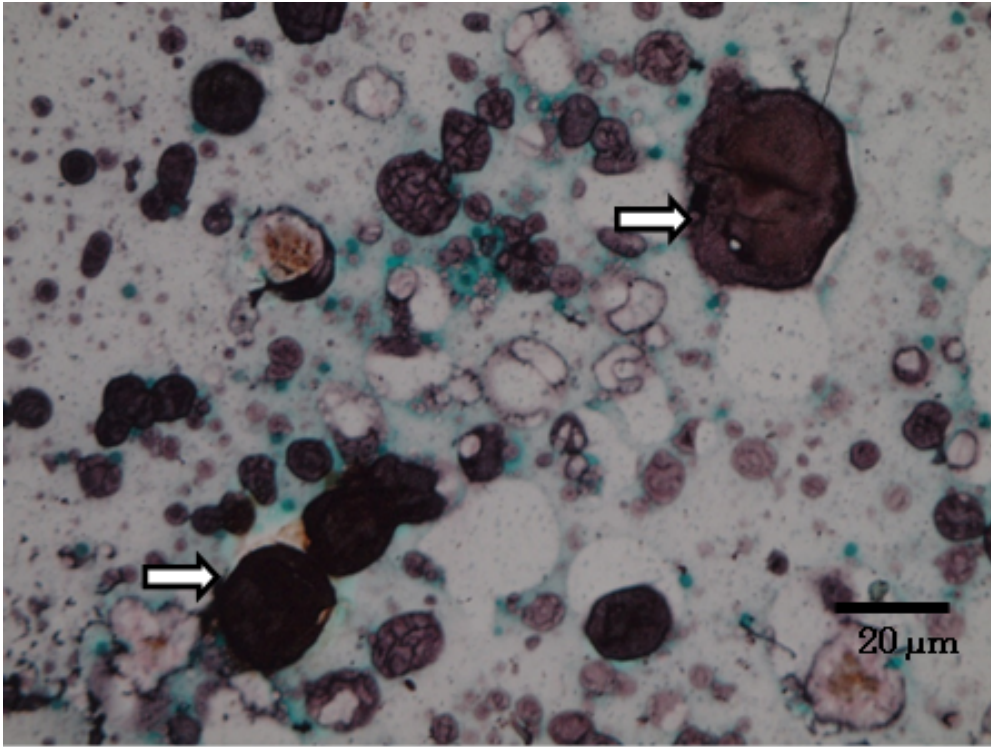


図 21. 症例 2 生検サンプルのスタンプ標本中に観察された多極性出芽を示す酵母様構造物 (GMS 染色)

2-6 考察

ラカジオーシスの原因菌とされていた *Lacazia loboi* は元来遺伝学的多様性があると考えられており、Esperón *et al.* (2012) によると、鯨類由来の *L. loboi* のリボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域はアマゾン地域の *L. loboi* と異なり、培養不能な *P. brasiliensis* と同じクラスターに入ると報告している。加えて、Ueda *et al.* (2013) は、*L. loboi* の 43kDa 糖蛋白抗原遺伝子 (*gp43*) 配列は Esperón *et al.* (2012) と同様、*P. brasiliensis* と 94.9%の相同性を示したと報告している。以前より *P. brasiliensis* と *L. loboi* は分子系統発生的に近縁種であるとされてきたが (Vilela *et al.*, 2009)、2016年に Vilela *et al.* は鯨類のラカジオーシスである PCM-C の原因菌を培養不能な *P. brasiliensis* であると報告し、日本初のバンドウイルカ症例原因菌とされた *Paracoccidioides* sp. (Ueda *et al.*, 2013) についても、分子系統分類学的に *P. brasiliensis* であると述べている。従来より、*P. brasiliensis* には4つの菌種が含まれることが示唆されており、*P. brasiliensis* complex と呼称されてきたが (Teixeira *et al.*, 2014)、Turissini *et al.* (2017) はそれを *P. americana*、*P. restrepiensis*、*P. venezuelensis* および *P. brasiliensis sensu stricto* に分類した。しかしながら、Vilela *et al.* (2016) が報告した、我が国初の小型鯨類の PCM-C 症例であるバンドウイルカ症例由来の *P. brasiliensis* が、前述の4つの菌種のどれに相当するののかについては、現時点では不明である。

症例1の皮膚患部より得られた43kDa糖蛋白抗原遺伝子シーケンスは、*P. brasiliensis sensu stricto* に99%相同性を示したことから、症例1は世界初のカマイルカの PCM-C 症例であると判断された。さらに、最新の *Paracoccidioides* 属真菌分類 (Turissini *et al.*, 2017) に記載された、*P. brasiliensis sensu stricto* が小型鯨類の PCM-C に関与することを示す初の知見でもあると判断される。

症例 1 の体表には、潰瘍化し多数の葉状で堅牢な肉芽腫病変が観察され、症例 2 でも症例 1 ときわめて類似した皮膚病変が認められた。これらはいずれも以前に国内で発生したバンドウイルカの PCM-C 症例 (Ueda *et al.*, 2013) や、他の PCM-C 罹患バンドウイルカ症例 (Bedrinana-Romano *et al.*, 2009; CaldDwell *et al.*, 1975; Cowan, 1993; Esperón *et al.*, 2012; Migaki *et al.*, 1971; Reif *et al.*, 2006; Rotstein *et al.*, 2009; Simões-Lopes *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2016)、および分子生物学的に原因菌を検出していないが、PCM-C に罹患していた可能性が強く示唆される鯨種 (De Vries and Laarman, 1973; Kiszka *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2014; Palmer and Peterson, 2014; Ramos-E-Silva *et al.*, 2009; Talhari S and Talhari C., 2012; Van Bresseem *et al.*, 2005; Van Bresseem *et al.*, 2009; Van Bresseem *et al.*, 2014) で報告された皮膚患部と類似していた。類似の外観所見を呈する皮膚病変は、バンドウイルカの *Trichosporon asteroides* (Ueda *et al.*, 2017) およびペルーガ (*Delphinapterus leucas*) の非定型抗酸菌感染 (Bowenkamp *et al.*, 2001) においても報告されているが、症例 1 および症例 2 とともに供試した微生物学および病理組織学的検査方法で検出可能な範囲において、不完全菌ないし非結核性抗酸菌の感染を示唆する所見は得られなかったことから、これらの感染症が当該症例に関与した可能性はほとんどないものと判断された。

Ueda *et al.* (2013) が報告したバンドウイルカ PCM-C 症例において、患部は皮膚の浅層から深層に局限していたが、症例 1 では胸部レントゲンにより肺に嚢胞様構造物が観察された。本研究ではこれら嚢胞様構造物が PCM-C に関連したものか否かを確定しておらず、過去の鯨類における PCM-C 症例でも皮膚患部以外の病変は報告されていない (Bedrinana-Romano *et al.*, 2009; CaldDwell *et al.*, 1975; Cowan, 1993; Esperón *et al.*, 2012; Migaki *et al.*, 1971; Reif *et al.*, 2006; Rotstein *et al.*, 2009; Simões-Lopes *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 2013; Vilela *et al.*, 2016)。しかしながら、中南米を流行地とするヒトや

動物に罹患する高度病原性真菌症のパラコキシジオイデス症では呼吸器に主病変が形成される事が報告されており (Queiroz-Telles and Escuissato, 2011)、今回の症例 1 の原因菌の遺伝子型は培養不能な *P. brasiliensis sensu stricto* であることから、症例 1 に呼吸器所見が認められたことは興味深く、今後さらなる研究、調査が必要である。

症例 2 において、PCM-C 感染を疑う所見としては生検サンプルのスタンプ標本で観察された、症例 1 において観察されたものに類似した多極性出芽を示す酵母様構造物のみであり、その他の真菌および非結核性抗酸菌感染を示す検査結果も得られなかった。しかしながら、症例 2 においても上述のように症例 1 に酷似した皮膚患部を認め、症例 1 に施した治療を参照してイトラコナゾール (Kaken Pharmaceutical CO., LTD) の経口投与、および局所療法としてアンホテリシン B の粉末入りの軟膏 (5 mg/g) (Murata *et al.*, 2007) の塗布を数か月間実施した後に、元のケロイド状の皮膚病変から比べると病変は縮小、凹凸もなくなり平坦になった。加えて、これまでに”lobomycosis-like disease”として報告された小型鯨類の症例のいくつかは、病理組織学的検査を実施せずに、あるいは菌要素の存在を証明することなく、皮膚患部の肉眼所見に基づいて記載されており (Bermudez *et al.*, 2009; Kiszka *et al.*, 2009; Tajima *et al.*, 2015; Van Bresseem *et al.*, 2007)、本疾患を病理組織学的にコンスタントに診断する事の困難さを示唆する所見と考えられる。以上の知見より、症例 2 に関しても何らかの真菌が皮膚患部を形成している要因の一つである可能性が考えられ、*Paracoccidioides* 属真菌が関与していた疑いは残りうる。今後、症例 2 については再検査を含めて継続的に検討を行う予定である。

症例 2 に関しては PCM-C に罹患していたと確定し得なかったが、以上の所見は PCM-C が既に日本近海に存在している可能性を示唆するものと考えられる。PCM-C は血清テストステロンレベルを減少させ (Ueda *et al.*, 2013)、鯨類に免疫障害を引き起こすこと (Reif *et al.*, 2009) が知られているが、現在ま

でのところ症例 1、2 ともに PCM-C によると思われる衰弱・死亡は認められていない。両症例に関連する施設においては、皮膚病変などの臨床症状の変化、病理組織学的検査による特徴的な円形の酵母様構造物の継続的な確認、血液検査とともに、微生物学および分子生物学的検討を今後とも継続すべきであろう。

P. brasiliensis の宿主域はヒト(Queiroz-Telles and Escuissato, 2011)、野生動物 (Bagagli *et al.*, 1998; Corredor *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 1995)、家畜 (Ferreira *et al.*, 2013; Richini-Pereira *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2008)、家禽 (Oliveira *et al.*, 2011) および愛玩動物 (de Farias *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2013) と広範囲であり、宿主特異性は低いと考えられる。また、パラコキシジオイデス症の流行地は、環太平洋を含むラテンアメリカの国々であるが (Restrepo *et al.*, 2000)、南極大陸のペンギンの糞便から *P. brasiliensis* が分離された事例もあり (Garcia *et al.*, 1993)、本菌が海水を介して世界中に拡散した可能性が考えられる。PCM-C は現時点ではヒトの感染症例とは類別されているが、宿主域の広さおよび地球規模での拡散の可能性を考慮すると、将来的に人獣共通感染症として認識される可能性もあり、注視していくべきと考える。

2-7 小括

分子生物学的検査の結果、症例 1 皮膚病変からは *P. brasiliensis sensu stricto* と 99% 相同する遺伝子型が検出され、世界初のカマイルカの PCM-C 症例であると判断された。さらに、本研究では最新の *Paracoccidioides* 属真菌の系統分類に記載された *P. brasiliensis sensu stricto* が小型鯨類の PCM-C に関与することを世界で初めて示すことができた。症例 2 は微生物学的、病理組織学および分子生物学的に PCM-C である確証を得ることができなかったが、症例 1 と同様な酵母様構造物が検出された皮膚病変を発症し、症例 1 と同様の抗真菌治療に反応して皮膚患部が緩解している事から、何らかの真菌性病原因子が病態に関与している可能性が否定できず、今後継続的な経過観察と再検査が必要であると考え。太平洋側におけるバンドウイルカ症例 (Ueda *et al.*, 2013) に続き、日本海側で捕獲されたカマイルカに初の PCM-C 症例が確認されたことにより、日本には PCM-C が既に存在している可能性が強く示唆された。

PCM-C は血清テストステロンレベルを減少させ (Ueda *et al.*, 2013)、鯨類に免疫障害を引き起こすこと (Reif *et al.*, 2009) が知られているが、現在までのところ症例 1、2 とともに PCM-C によると思われる衰弱・死亡は認められていない。両症例に関連する施設においては、種々の臨床検査とともに、微生物学および分子生物学的検討を今後とも継続すべきであろう。PCM-C は現時点ではヒトの感染症例とは類別されているが、宿主域の広さおよび地球規模での拡散の可能性を考慮すると、将来的に人獣共通感染症として認識される可能性もあり、注視して行くべきと考える。

第3章 国内飼育鯨類血清を用いたクジラ型パラコシジオイデス症の免疫学的疫学調査

PCM-C は世界の広い範囲に棲息する鯨類より報告があり（表 1）、また目視による目撃例も世界中から報告されている（図 1）。また、日本国内でも水族館飼育鯨類の中で太平洋由来のバンドウイルカで、さらに第 2 章で述べたように日本海由来のカマイルカで PCM-C と確定診断された症例が存在することから、本疾患が既に日本周辺の海域に存在している可能性が示唆される。そこで本章では、国内園館で飼育されている鯨類の PCM-C への感染状況とその疫学的特徴を解明することを目的に、免疫組織化学的検査を用いた血清疫学調査を実施した。さらに、免疫染色へ供する血清の希釈倍率を基準として、抗体保有個体における相対的な抗体量を評価した。

3-1 材料

国内 3 園館（A、B および C）から 28、8 および 10 頭の計 41 頭（2017 年 7 月時点で、国内の動物園水族館等で飼育されている鯨類を調査したところ、国内飼育頭数の 7% に相当）の臨床上健康な鯨類の血清を収集した。このうち、PCM-C 感染が記録されている鯨種およびそれらのハイブリッドは計 31 頭（バンドウイルカ 20 頭、ミナミバンドウイルカ 6 頭、バンドウイルカとミナミバンドウイルカのハイブリッド 2 頭、カマイルカ 3 頭を含む 75.6%）、PCM-C 感染記録がこれまでにない鯨種は計 10 頭（マダライルカ [*Stenella attenuata*] 2 頭、オキゴンドウ [*Pseudorca crassidens*] 6 頭、シワハイルカ [*Stenobredanensis*] 2 頭を含む 24.4%）であった。いずれの個体にも PCM-C と考えられるような皮膚病変は認められなかった。なお、協力園館のうち過去に PCM-C の発症個体が確認されているのは B のみであった。

ミナミバンドウイルカは、分子生物学的検査には基づいてはいないものの、病理学的診断により旧分類にあるロボマイコーシスやラカジオーシスとして、あるいは外観症状の目視による診断によりラカジオーシス様症例とする報告があるため (Kiszka *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2014; Ramos-E-Silva *et al.*, 2009; Talhari S and Talhari C, 2012; Van Bresseem *et al.*, 2005)、本研究では PCM-C 感染が記録されている鯨種に加えることとした。

協力園館等への風評被害を避けるため、個々の施設に関してそれらの名称、場所、鯨種、飼育頭数、個体情報（個体名、年齢、性別、飼育歴など）は記載しないこととする。

3-2 検査方法

収集した血清は、以下の手順に従い免疫組織学的検査に供した。

Ueda *et al.* (2013) によって報告されたバンドウイルカの PCM-C 症例から採取した感染皮膚患部組織を 10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、室温で保存した。この症例は葉状で堅牢な過形成肉芽腫を伴ったカリフラワー状の皮膚病変 (図 22) を呈していた。それら患部の表皮の下に存在する腫瘍の中で、円形の酵母様構造物が多く観察できる部位を免疫組織学的検査に使用した (図 23、24)。パラフィン包埋する前処理として、固定標本より切り出したサンプルを水道水の流水に一晩浸漬してホルマリンを除去した。その後、パラフィン包埋プロトコール

(<http://efrazkavir.com/filegallery/efrazkavir.com//pathology.pdf>) に従ってサンプルを室温で脱水処理し (70%エタノール→100%エタノール→50%リモゾール→100%リモゾール)、65°C でパラフィン包埋してブロックを作成した。これらのブロックより厚さ約 8 μm の切片を作成し、ポリ L リジンコートのスライドガラス (S7441; Matsunami Glass Ind., Ltd., Osaka, Japan) 上に貼りつけた。その後、100%リモゾールおよび 100%エタノールを用いて脱パラフィンを

実施した。抗原賦活化は、血清を 56°C で 30 分にて行った。免疫組織化学的検査に先立ち、これらのパラフィン切片には PAS 反応および GMS 染色を施し、PAS 反応陽性かつ GMS 染色で黒色に染色される、連鎖状もしくは多極性出芽を伴った円形の酵母様構造物を確認する事により、免疫組織化学的検査に供するための十分な真菌要素が含まれていることを判定した (図 25、26)。

続いて、リン酸緩衝食塩水 (PBS) (167-14491, Wako, PBS) で、標本を 3 回洗浄した後、同じ PBS で 5%に希釈したスキムミルク (198-10605, Wako) (以下、SM-PBS) 100 μ L を滴下し室温下で 15 分間静置し、非特異反応をブロッキングした。その後、余分な SM-PBS を廃棄した後、一次抗体として SM-PBS で 1,000、5,000、10,000、および 50,000 倍に希釈した被検血清を、標本の上に滴下しモイストボックス内において 4°C 下で 16 時間静置した。続いて標本を PBS で 3 回洗浄した後、PBS で 500 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ウサギポリクローナル抗イルカ IgG 抗体 (100 μ L; ab112789; Abcam, Cambridge, UK, HRP-AD) を標本に滴下し室温下で 30 分静置した。再度 PBS にて 3 回洗浄した後、3,3'-ジアミノベンジジン (ヒストファイン SAB-PO (M) Kit; 株式会社ニチレイバイオサイエンス、東京) を滴下し、室温下で 10 分間静置した。その後、標本をヘマトキシリン (131-09665, Wako) にて染色し、カナダバルサム (192-16301, Wako) にて封入し、光学顕微鏡下で観察した。

なお、本検査の陽性対照として、Vilela *et al.* (2016) による分類基準に従って診断された、PCM-C3 症例の血清を用いた。このうち、2 例 (症例 I、II) はバンドウイルカにおける *Paracoccidioides sp.* (Ueda *et al.*, 2013) による症例、もう 1 例は第 2 章で述べた症例 1 (症例 III) のカマイルカにおける *P. brasiliensis sensu stricto* を検出した症例である。症例 I の血清は死亡時に採取、症例 II は発症 6 ヶ月後、症例 III はおよそ発症 5 年後である (Minakawa *et al.*, 2016)。また、小型鯨類の陰性コントロールが入手不可能なことから、検査方

法が確立されていないため、陰性対照として **SM-PBS** を用いた。なお、供試した小型鯨類血清が自然抗体を含んでいた可能性は否めないが、**PCM-C** 患部の菌要素に対する小型鯨類自然抗体の反応を検討したデータは見当たらず、判断基準が存在しないことから、本研究では自然抗体の関与については考慮せずに検討を行った。



図 22. カリフラワー状病変



図 23. カリフラワー状病変断面



図 24. 酵母様構造物が多く確認できる部位

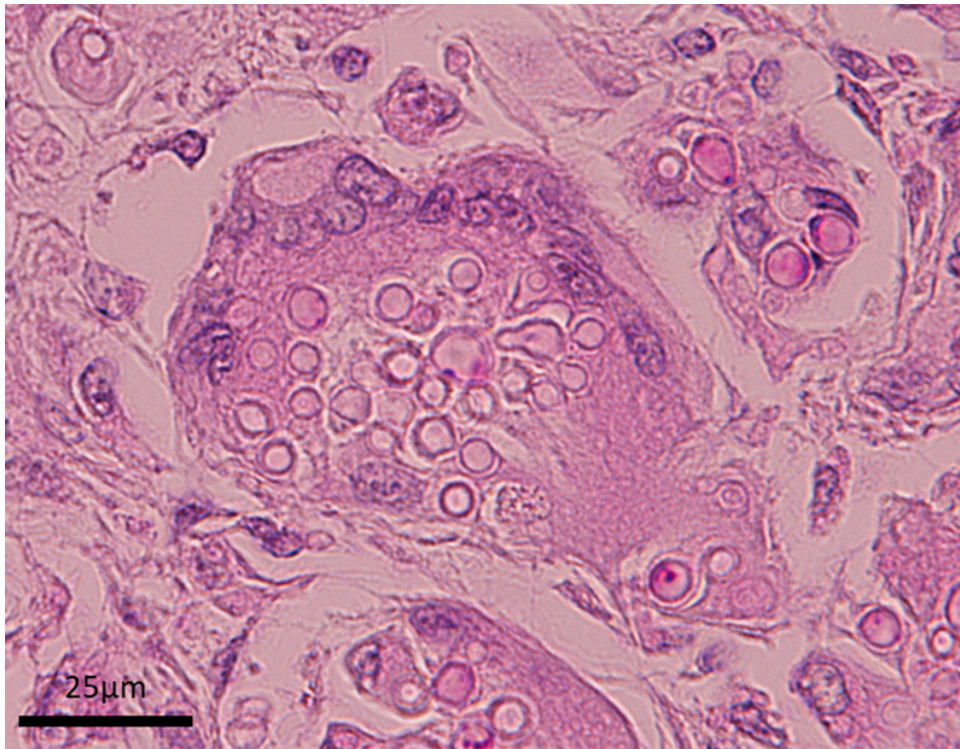


図 25. 同皮膚患部組織パラフィン切片の PAS 反応

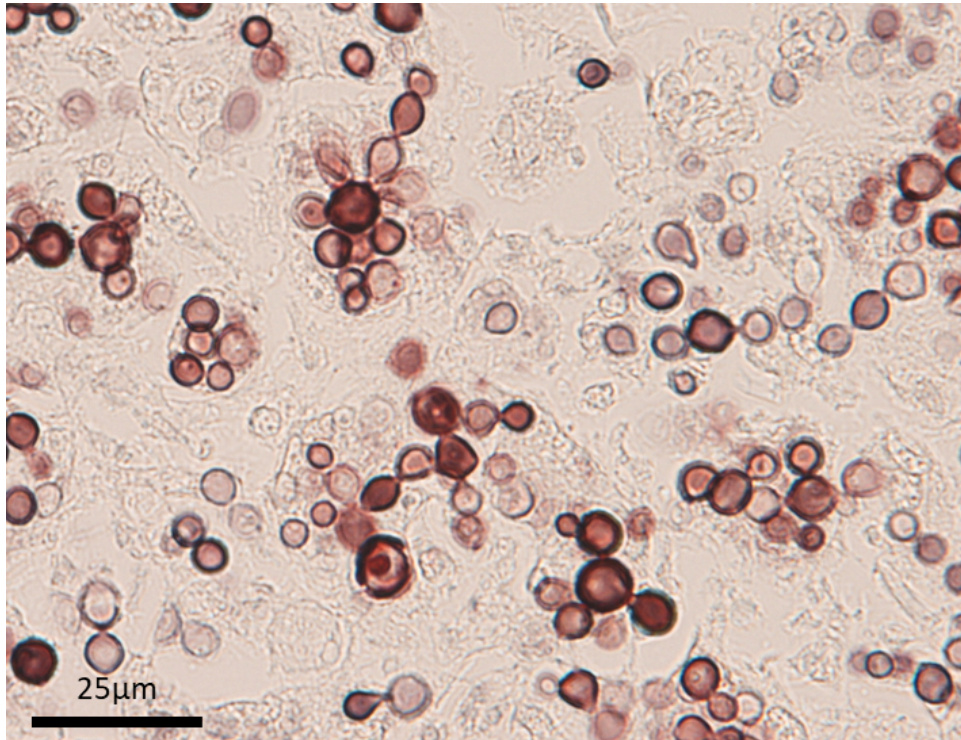


図 26. 同皮膚患部組織パラフィン切片の GMS 染色

3-3 統計学的解析

各供試個体の背景情報を把握するため、個体ごとの PCM-C 感染記録と由来園館の関係を統計学的に評価した。また、各希釈倍率で陽性反応を示した個体の特徴を取りまとめた。続いて、免疫組織学的検査の結果から、血清希釈倍率 1,000 倍における検査陽性個体を PCM-C 抗体保有個体、また供試検体に占める抗体保有個体の割合 (%) を抗体保有率と定義し、その 95%信頼区間を求めるとともに、PCM-C 感染記録の有無に基づく鯨种群間および園館間の差を統計学的に評価した。なお、PCM-C 感染報告のあるものを感染記録鯨種および感染記録個体と定義した。同様の評価は、5,000、10,000、及び 50,000 倍希釈血清の抗体陽性率に対しても実施した。以上の統計学的解析はデータ解析環境 R ver.3.0.2 のもと、フィッシャーの正確確率を用いて実施した。

3-4 結果

SM-PBS による陰性対照では、標本上の *Paracoccidioides* sp. の細胞壁は薄い褐色を呈するか、あるいは全く染色されなかった (図 27)。一方、陽性対照検体では、標本上の酵母様構造物の細胞壁は明るい褐色に染色され、症例 I、II、III の検体は、それぞれ 1,000 (図 28)、5,000 (図 29) および 10,000 (図 30) 倍希釈まで陽性反応を示した。すなわち、全ての陽性対照検体で少なくとも 1,000 倍希釈で陽性反応を示した。なお、本研究では、陽性対照 (症例 I) が抗体陽性反応を示した最も低い希釈倍率、すなわち 1,000 倍を陽性判定基準とした。

収集した血清の由来個体について、園館間での感染記録個体の割合は A、B および C でそれぞれ 69.6% (=16/23)、62.5% (=5/8) および 100% (=10/10) で、特に園館 C 由来個体は全て感染記録個体であったものの、これらに統計学的な差は認められなかった (表 3、P=0.09)。また前述のとおり、園館 A、B および C のうち、PCM-C 症例がこれまで確認されているのは B のみであった。

これらのことから、以下では A と C の生データは参考値として示すにとどめ、B を「発生園館」、A と C を合わせて「非発生園館」としてまとめたところ、発生園館と非発生園館で感染記録個体の割合に有意差は認められず（それぞれ 62.5% および 78.8%、 $P=0.38$ ）、本データにおける園館タイプと感染記録の有無は互いに独立していると判定された。

本研究に供したいずれの鯨種においても、1,000 倍希釈の段階で少なくとも一頭は陽性反応を示した。また今回の血清の最大希釈倍率である 50,000 倍で陽性反応を示したのは 3 頭だった（表 7）。この 3 頭はいずれも非発生園館 (A) 由来の、感染記録種であるバンドウイルカ 1 頭、感染未記録種であるオキゴンドウ 2 頭であった。

1,000 倍希釈血清における抗体保有率（とその 95% 信頼区間。以下、同じ。）は、全体として 61.0 (44.5、75.8) % であった。園館タイプ別では、発生園館では 37.5 (8.5、77.5) %、非発生園館では 66.7 (48.2、82.0) % と非発生園館の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=0.23$ 、表 4)。同様に、個体の感染記録の有無では感染記録個体では 64.5 (45.4、80.8) %、感染未記録個体では 50.0 (18.7、81.3) % と感染記録個体の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=0.47$ 、表 4)。

5,000 倍希釈血清における抗体陽性率（とその 95% 信頼区間。以下、同じ。）は、全体として 34.1 (20.1、50.6) % であった。園館タイプ別では、発生園館では 0% (陽性個体なし)、非発生園館では 42.4 (25.5、60.8) % と非発生園館の方が有意に高かった ($P=0.04$ 、表 5)。一方、個体の感染記録の有無では感染記録個体では 35.5 (19.2、54.6) %、感染未記録個体では 30.0 (6.7、65.2) % と感染記録個体の方がやや高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=1$ 、表 5)。

10,000 倍希釈血清における抗体陽性率（とその 95% 信頼区間。以下、同じ。）は、全体として 19.5 (8.8、34.9) % であった。園館タイプ別では、発生園

館では 0% (陽性個体なし)、非発生園館では 24.2 (11.1、42.3) %と非発生園館の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=0.32$ 、表 6)。同様に、個体の感染記録の有無では感染記録個体では 16.1 (5.5、33.7) %、感染未記録個体では 30.0 (6.7、65.2) %と感染未記録個体の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=0.38$ 、表 6)。

50,000 倍希釈血清における抗体陽性率 (とその 95%信頼区間。以下、同じ。)は、全体として 7.3 (1.5、19.9) %であった。園館タイプ別では、発生園館では 0% (陽性個体なし)、非発生園館では 9.1 (1.9、24.3) %と非発生園館の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=1$ 、表 7)。同様に、個体の感染記録の有無では感染記録個体では 3.2 (0.1、16.7) %、感染未記録個体では 20.0 (2.5、55.6) %と感染未記録個体の方が高かったが、統計学的な有意性は認められなかった ($P=0.14$ 、表 7)。

以上の全頭、園館タイプおよび個体の感染記録の有無について、血清希釈倍率ごとの陽性率を図 31、32 および 33 に示した。

全頭 ($n=41$) について、希釈倍率が高いほど抗体陽性率は線形的にかつ有意に低くなった ($P<0.0001$ 、図 31)。園館タイプ、感染記録の有無別においても同様の関係が認められた。ただし、発生園館で $P=0.045$ 、非発生園館で $P<0.0001$ 、感染記録個体で $P<0.0001$ 、および感染未記録個体で $P=0.642$ となっており、発生園館、非発生園館、感染記録個体では統計学的有意性が認められたが、感染未記録個体では統計学的有意性が認められなかった (図 32、33)。

また、本研究を進める中で、5,000 倍希釈時の感染記録鯨種間における抗体陽性率について所見が得られた。バンドウイルカ、カマイルカとミナミバンドウイルカの抗体陽性率を比較した結果、バンドウイルカ、カマイルカでは、23 頭中 5 頭 (21.7%) が抗体陽性を示したのに対し、ミナミバンドウイルカでは 6 頭中 5 頭 (83.3%) で抗体陽性反応を示した。カマイルカは極端に頭数が少な

いため、ここでは分子生物学的に PCM-C 宿主と確定しているバンドウイルカと合わせて検討することとした。

参考値ではあるが、バンドウイルカとミナミバンドウイルカの抗体陽性率を比較した結果、バンドウイルカは 20 頭中 5 頭 (25.0%) が抗体陽性を示したのに対し、ミナミバンドウイルカは 6 頭中 5 頭 (83.3%) で抗体陽性反応を示した ($P=0.02$)。

同様にミナミバンドウイルカとカマイルカの場合も 5,000 倍希釈時に抗体陽性反応を示した個体数はミナミバンドウイルカでは 6 頭中 5 頭であったのに対して、カマイルカでは 3 頭中 0 頭 ($P=0.047$) であり、検査頭数は少ないながら明らかにミナミバンドウイルカで抗体陽性反応が高率に出現する傾向が認められた。一方、感染未記録個体ではそのような傾向は認められなかった (表 8)。

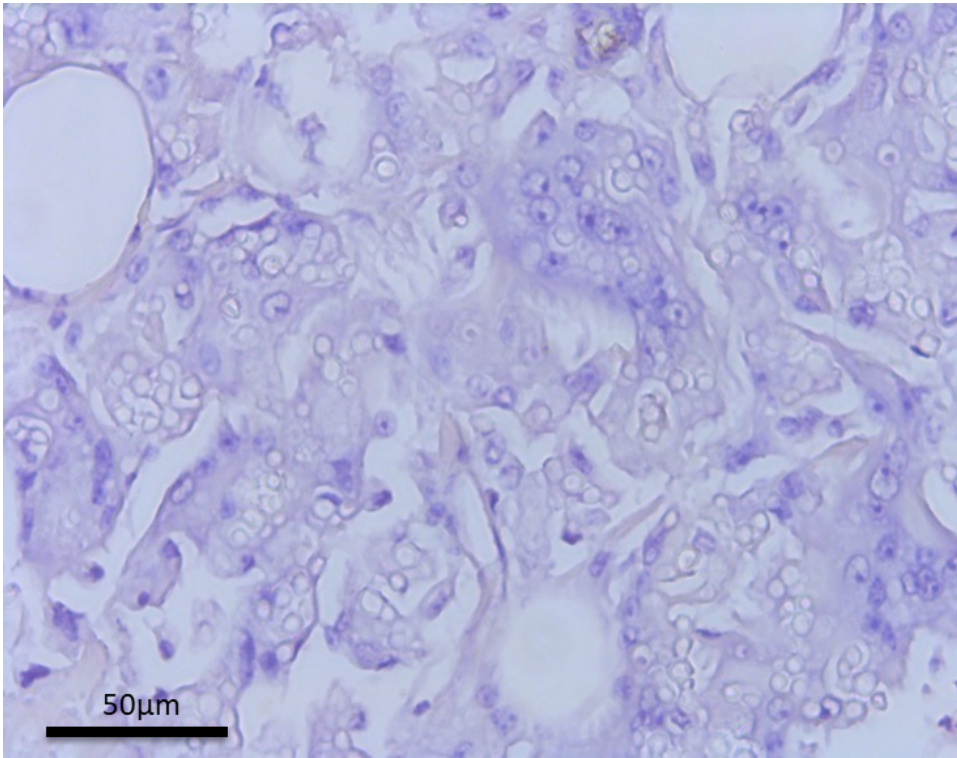


図 27. 陰性対照

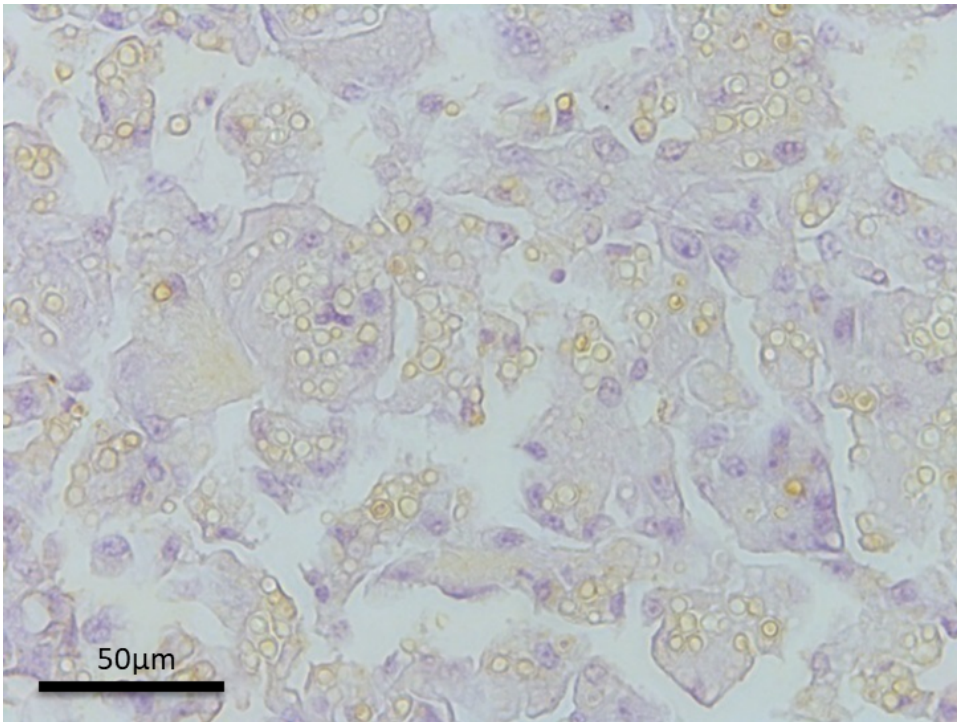


図 28. 国内初 PCM-C バンドウイルカの血清 1,000 倍希釈の陽性反応 (症例 I)

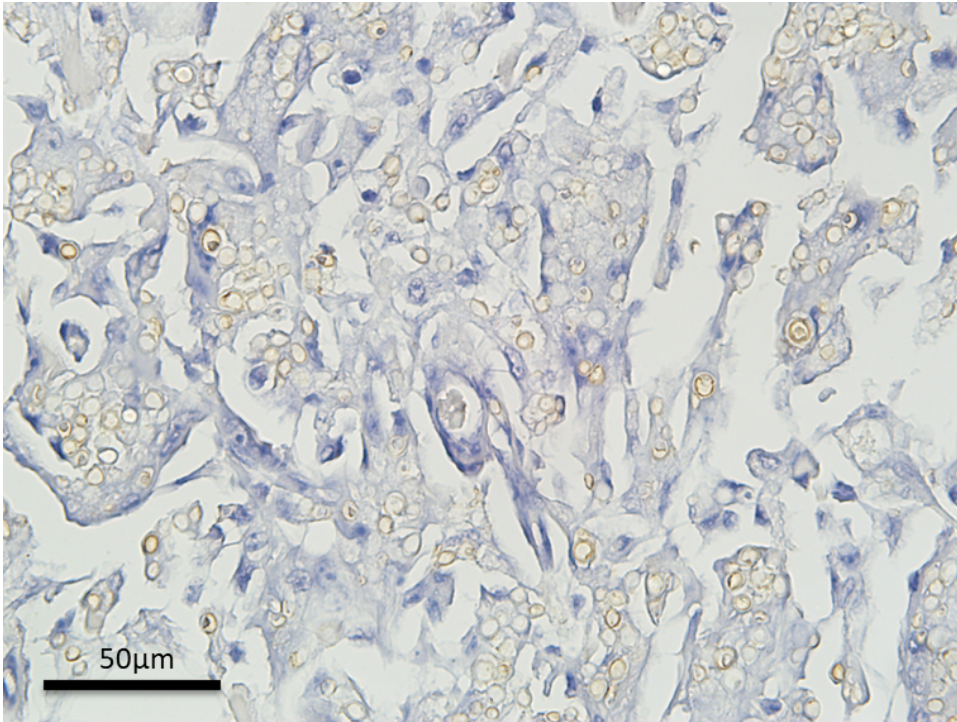


図 29. PCM-C バンドウイルカの血清 5,000 倍希釈の陽性反応 (症例Ⅱ)

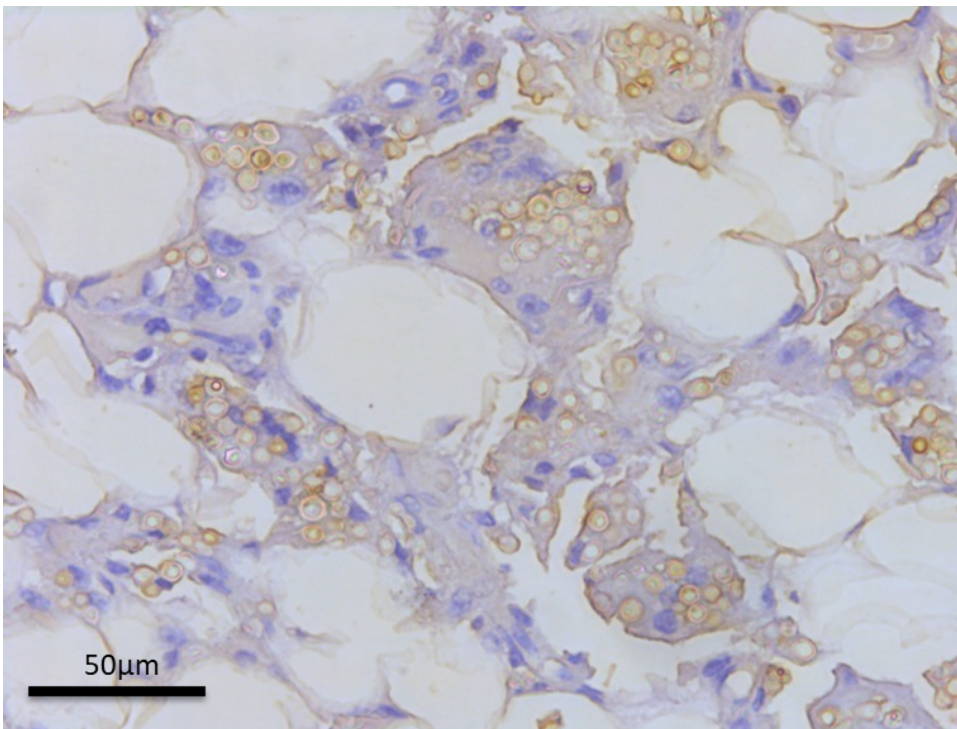


図 30. 初報告 PCM-C カマイルカの血清 10,000 倍希釈の陽性反応 (症例Ⅲ)

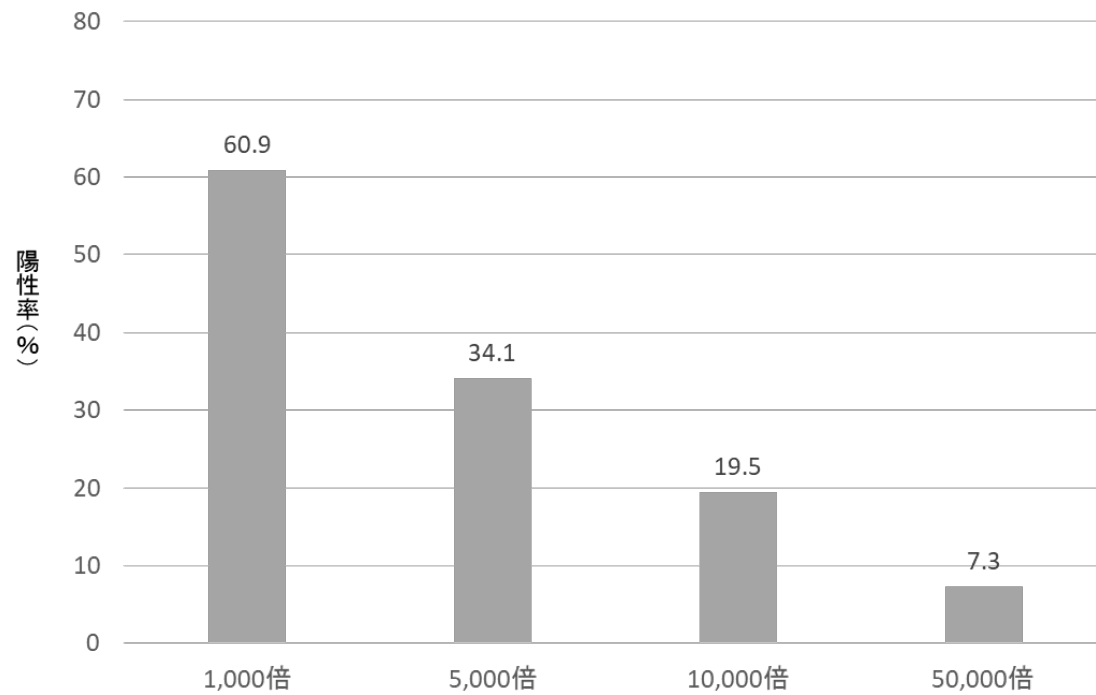


図 31. 血清希釈倍率ごとの抗体陽性率 (各希釈倍率とも n=41、バーの上の数値は陽性率を示す(%))

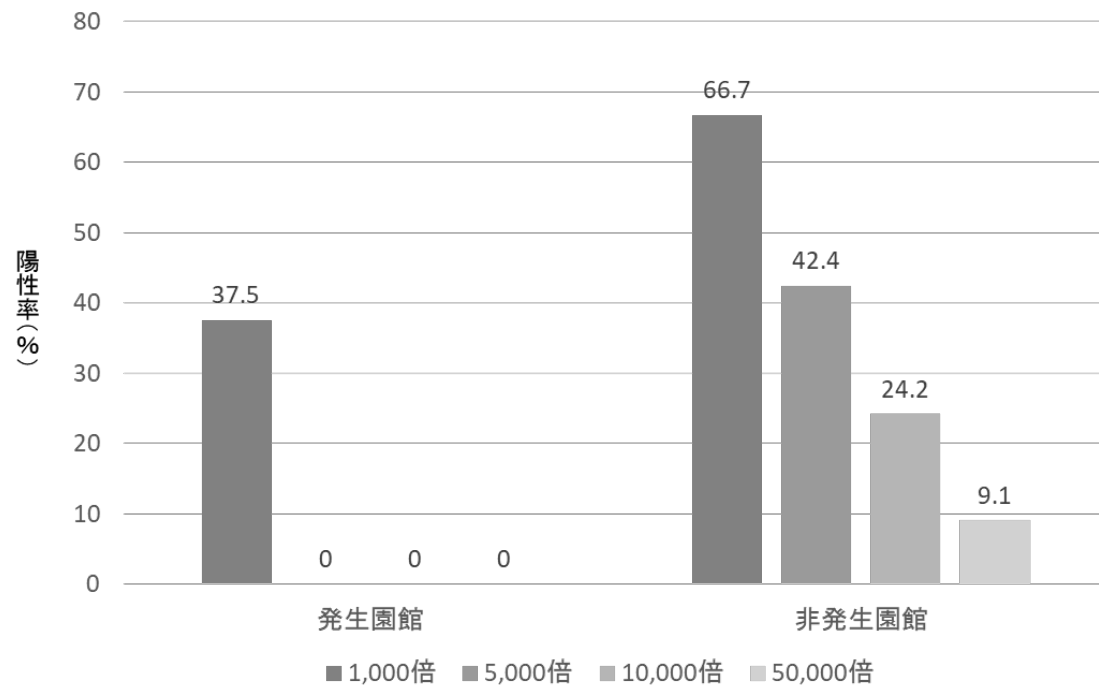


図 32. 園館タイプ別（発生園館 n=8、非発生園館 n=33）の希釈倍率ごとの抗体陽性率

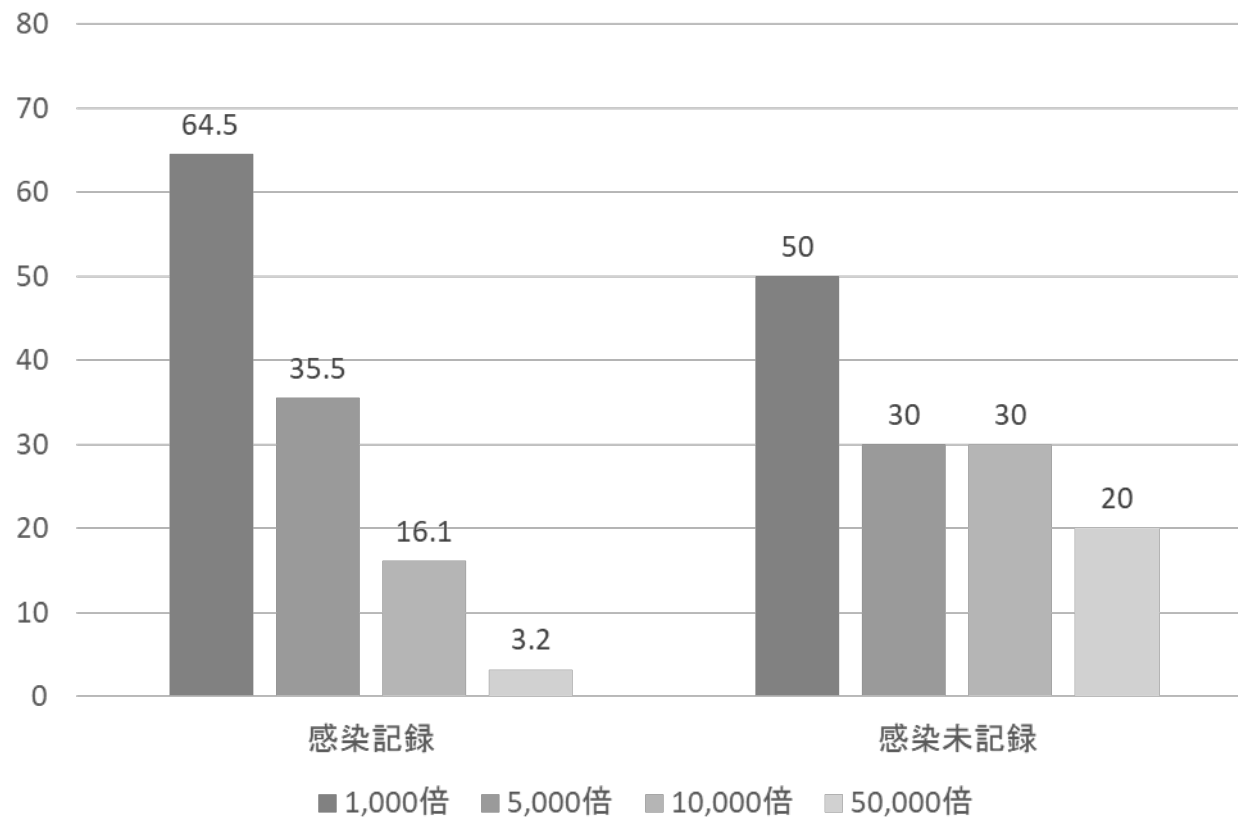


図 33. 感染記録別（感受性 n=31、非感受性 n=10）の希釈倍率ごとの抗体陽性率

表 3. 供試個体の感受性と由来園館の関係

		感染記録鯨種 (*2)	割合 (%)	感染未記録鯨種	割合 (%)	合計	P(*3)
園館	A	16	69.6	7	30.4	23	0.09
	B	5	62.5	3	37.5	8	
	C	10	100	0	0	10	
園館タイプ (*1)							
	発生	5	62.5	3	37.5	8	0.38
	非発生	26	78.8	7	21.2	33	
合計		31	75.6	10	24.4	41	

*1: 発生園館は B のみであり、A と C をまとめて「非発生」とした (以下の表 4、5、6、7 も同じ)。

*2: 感染記録個体は、バンドウイルカ、ミナミバンドウイルカ (およびこれらの交雑種) およびカマイルカを含む。感染未記録個体はマダライルカ、オキゴンドウおよびシワハイルカを含む (以下の表 4、5、6、7 も同じ)。

*3: フィッシャーの正確確率における P 値 (以下の表 4、5、6、7 も同じ)。

表 4. 国内園館 3 施設由来の鯨類 (n=41) の 1,000 希釈血清を用いた免疫組織学的検査結果と個体の疫学情報の関連

		陽性数	割合 (%) (*1)	陰性数	割合 (%)	合計	P
園館	A	16	69.6	7	30.4	23	0.32 (*2)
	B	3	37.5	5	62.5	8	
	C	6	60.0	4	40.0	10	
園館タイプ	発生	3	37.5	5	62.5	8	0.23
	非発生	22	66.7	11	33.3	33	
感染記録タイプ	感染記録	20	64.5	11	35.5	31	0.47
	感染未記録	5	50.0	5	50.0	10	
合計		25	61.0	16	39.0	41	

*1: 1,000 倍希釈血清において陽性反応を示した個体の割合を抗体保有率と定義

*2: 参考値

表 5. 国内園館 3 施設由来の鯨類 (n=41) の 5,000 希釈血清を用いた免疫組織学的検査結果と個体の疫学情報の関連

		陽性数	割合 (%)	陰性数	割合 (%)	合計	P
園館	A	13	56.5	10	43.5	23	0.002 (*1)
	B	0	0	8	100	8	
	C	1	10.0	9	90.0	10	
園館タイプ	発生	0	0	8	100	8	0.04
	非発生	14	42.4	19	57.6	33	
感染記録タイプ	感染記録	11	35.5	20	64.5	31	1
	感染未記録	3	30.0	7	70.0	10	
合計		14	34.1	27	65.9	41	

*1: 参考値

表 6. 国内園館 3 施設由来の鯨類 (n=41) の 10,000 希釈血清を用いた免疫組織学的検査結果と個体の疫学情報の関連

		陽性数	割合 (%)	陰性数	割合 (%)	合計	P
園館	A	8	34.8	15	65.2	23	0.02 (*1)
	B	0	0	8	100	8	
	C	0	0	10	100	10	
園館タイプ	発生	0	0	8	100	8	0.32
	非発生	8	24.2	25	75.8	33	
感染記録タイプ	感染記録	5	16.1	26	83.9	31	0.38
	感染未記録	3	30.0	7	70.0	10	
合計		8	19.5	33	80.5	41	

*1: 参考値

表 7. 国内園館 3 施設由来の鯨類 (n=41) の 50,000 希釈血清を用いた免疫組織学的検査結果と個体の疫学情報の関連

		陽性数	割合 (%)	陰性数	割合 (%)	合計	P
園館	A	3	13.0	20	87.0	23	0.40(*1)
	B	0	0	8	100	8	
	C	0	0	10	100	10	
園館タイプ	発生	0	0	8	100	8	1
	非発生	3	9.1	30	90.9	33	
感染記録タイプ	感染記録	1	3.2	30	96.8	31	0.14
	感染未記録	2	20.0	8	80.0	10	
合計		3	7.3	38	92.7	41	

*1: 参考値

表 8. 感染記録鯨種の 5,000 倍希釈血清を用いた免疫組織学的検査結果と個体の疫学情報の関連

	陽性数	割合 (%)	陰性数	割合 (%)	合計	P
バンドウイルカ+カマイルカ	5	21.7	18	78.3	23	0.01
ミナミバンドウイルカ	5	83.3	1	16.7	6	
合計	10		19			

3-5 考察

本章では、日本における鯨類の PCM-C 感染個体 (Ueda *et al.*, 2013) の皮膚患部組織中に存在する酵母様構造物を用いた免疫組織化学検査により、国内飼育されている健康鯨類血清中の抗体陽性率を指標にして、*P. brasiliensis sensu stricto* ないし *Paracoccidioides sp.* に対する抗体保有状況を検討した。

陽性対照 3 例より得た血清は、それぞれの原因菌の遺伝子型もしくは鯨種に関わらず、PCM-C 皮膚患部内の酵母様構造物に陽性反応を示した (Minakawa *et al.*, 2016; Ueda *et al.*, 2013)。また、本研究に供したいずれの鯨種においても、1,000 倍希釈の段階で少なくとも一頭は陽性反応を示した。発色が確認されていることから、これは、二次抗体であるホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ウサギポリクローナル抗イルカ IgG 抗体が今回の供試鯨種に対し反応することを示唆しているとともに、一次抗体が *P. brasiliensis sensu stricto* ないし *Paracoccidioides sp.* の両者に対して反応すると考えられた。

Camargo *et al.* (1998) は、アマゾン沿岸域で発症したヒトの PCM 感染患者の血清サンプルの 70~80% が *P. brasiliensis* 細胞外抗原および 43kDa 糖蛋白質に ELISA (enzyme linked immune solvent assay) 陽性を示す事を報告している。さらに、本研究で用いたものと同じバンドウイルカ PCM-C 症例 I の皮膚患部組織サンプル中の酵母様構造物 (*Paracoccidioides sp.* とされる) は、抗 *P. brasiliensis* ウサギ血清を用いた免疫染色に陽性反応し、また、日本におけるバンドウイルカ PCM-C 症例 2 個体の血清も同様に *P. brasiliensis* 由来の真菌細胞抗原に対する免疫拡散法において軽度の陽性反応を示した (Ueda *et al.*, 2013)。Sacristán *et al.* (2016) によると、ブラジルの鯨類のラカジオーシス症例からの組織サンプルからの酵母細胞は、当時なんの分子生物学的データもなかったが、*P. brasiliensis* 43kDa 糖蛋白質に対するウサギポリクローナル抗体を使い陽性であったと報告している。以上のことから、ヒトのラカジオーシス原因菌 *Lacazia loboi* と PCM および PCM-C 原因菌の *P. brasiliensis sensu*

stricto、*Paracoccidioides* sp. はきわめて類似した抗原性を有すると考えられる。

本章では、すべての陽性対照が抗体陽性反応を示した最も低い希釈倍率、すなわち 1,000 倍を陽性判定基準としたところ、今回の検体のうち 61.0%の個体で PCM-C 抗原に対する抗体陽性反応が検出された。以上の事から、3 園館という限られた施設数ではあるものの、PCM-C は既に日本に広く存在している可能性が示唆された。

アジェロミセス科 (*Ajellomyceteceae*) の真菌によって引き起こされる高病原性感染症 (Wheat *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997) については、バンドウイルカとカリフォルニアアシカ (*Zalophus californianus*) にブラストミセス症 (blastomycosis: 以下 BCM) (Cates *et al.*, 1986; Zwick *et al.*, 2000) とコクシジオイデス症 (coccidioidomycosis: 以下 CCM) (Reidarson *et al.*, 1998) の、またカマイルカ、オキゴンドウ、バンドウイルカのヒストプラズマ症 (histoplasmosis: 以下 HPM) (Jensen *et al.*, 1998; Reidarson *et al.*, 2001) の発症記録があるため、PCM-C との抗体の交叉反応性についても今後検討すべきと思われる。さらに、日本は HPM の発生地域であり、陸上動物だけではなく水棲動物であるラッコにおいても発症例 (Sano *et al.*, 2011) が報告されていることから、PCM-C 感染の診断の際には、HPM と PCM-C との交差反応については注意が必要と思われた。

例えば、Ferreira *et al.* (2013) は、ブラジルにおけるヤギの PCM と HPM のそれぞれの抗体の交叉反応性に関する血清学的調査は、重複感染が大いに考えられるため信用度は低いとされている。すなわち、重複感染が抗体を用いた高病原性真菌感染症の診断の精度を損なわせる原因となりうることが示唆されている。一方、周本ら (2017) は北米由来の数株の HPM に感染したマウスの血清を用いて CCM および PCM-C 罹患組織に対する免疫染色を施した結果、特定の一株に感染した血清のみが CCM および PCM-C 罹患組織に対して交差

反応を示したことから、日本における PCM-C の評価には HPM による交差反応の可能性を考える必要性は低いと報告している。また、PCM-C 感染鯨類血清は CCM 罹患組織に対し強い免疫学的交差反応を示したが、日本は CCM 流行地域ではない (Kamei *et al.*, 2003) ことから、CCM に関しても考慮する必要性はないと報告されている (周本ら, 2017)。

本章で評価した PCM-C 感染記録鯨種と PCM-C 感染未記録鯨種では、いずれの希釈倍率においても、PCM-C の抗体陽性率の差に統計学的有意性は見いだせなかった。このことは、今回対象個体に PCM と PCM-C が重複感染している個体が少なからず含まれており、両菌の類似した抗原性によって、交差反応を示している可能性が否定できない。従って、日本国内の施設で飼育されている鯨類の 61.0% という抗体保有率も、PCM-C 単独、PCM-C と PCM の混合、もしくは PCM 単独に感染している可能性も考えられる。また、これは供試したすべての飼育個体が、PCM-C 抗原に反応する、抗体産生を誘導可能な原因病原体に曝露されていたことを意味する所見であろう。感染記録鯨種と感染未記録鯨種における PCM-C 抗原に反応する抗体量について陽性反応を示す希釈倍率から評価すると、統計学的有意性は見られないものの感染未記録鯨種で高い抗体量を示していたが、これは感染未記録鯨種が抗体産生誘導可能な原因病原体に高濃度に曝露されても発症せず、すなわち病理学的表現である特異的な皮膚患部を発症することなく、潜伏状態のまま推移している可能性が示唆された。

一方、PCM-C 発生園館と非発生園館では、陽性基準である 1,000 倍希釈検体において抗体陽性率に有意差は認められなかったものの、5,000 倍希釈時に有意差が認められた。これは、各施設の飼育鯨種の PCM-C に対する感受性の違いに起因するのか、あるいは抗体量が多いのでこれまで施設 A と施設 C では PCM-C の発症がなかったのか、明らかにし得なかった。これらの事項を確認するためには調査個体数、鯨種を増やしての調査が必要であるが、しかしな

がら、今回は日本初の調査であり、個体数、鯨種が限られていたため、これらは今後の課題である。

また、PCM-C 感染記録鯨種の中ではバンドウイルカおよびカマイルカと比較してミナミバンドウイルカでは有意に高い抗体量を示していた。ミナミバンドウイルカは、分子生物学的検査には基づいていないものの、病理学的診断により旧分類法によるロボマイコーシスやラカジオーシスとして、あるいは目視による観察でラカジオーシス様症例として報告されたことがあるため (Kiszka *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2014; Ramos-E-Silva *et al.*, 2009; Talhari S & Talhari C, 2012; Van Bresseem *et al.*, 2005)、PCM-C の感染宿主鯨種の一つと見なすことが可能ではないかと考えられる (表 8)。バンドウイルカおよびカマイルカより PCM-C 原因病原体への感受性が高いこと、感染量、PCM への感染の可能性、感染からの期間の問題などの可能性が考えられる。

以上の事から、本章では供試血清の 61.0%が PCM-C 抗原に反応する明瞭な抗体陽性反応を示し、国内に PCM-C が既に日本に存在している可能性が示唆された。今後は、より迅速で高精度な検査法を確立するとともにさらに多くの国内の飼育下鯨類および近海で捕獲される野生鯨類における PCM-C についての疫学調査を進め、我が国における本疾患の実態をより明確にしていくとともに、その対策を検討していく必要があると考えられた。

3-6 小括

国内3カ所の施設で飼育されている、計41頭の鯨類（PCM-C感染記録鯨種31頭、PCM-C感染未記録鯨種10頭）について、それらの血清を用いてバンドウイルカPCM-C発症個体皮膚患部組織サンプル内の酵母様構造物に免疫組織化学的検査を施し、免疫染色へ供する血清の希釈倍率を基準として、抗体保有個体における相対的な抗体量を評価した。その結果、41頭中21頭（61.0%）の供試血清が1,000倍希釈で明瞭な抗体陽性反応を示した。

以上の所見より、国内で飼育されている鯨類の60%以上はPCM-C抗原に反応する抗体を誘導可能な原因病原体に曝露された可能性が高く、PCM-C感染記録鯨種のみナミバンドウイルカはバンドウイルカおよびカマイルカより本疾患に対する感受性が高い可能性が考えられた。すなわち、本章の結果は鯨種に関わらずPCM-Cが既に日本に広く分布している可能性が示唆された。

今後は、より迅速で高精度な検査法を確立するとともにさらに多くの国内の飼育下鯨類および近海で捕獲される野生鯨類におけるPCM-Cについての疫学調査を進め、我が国における本疾患の実態をより明確にしていくとともに、その対策を検討していく必要があると考えられた。

第4章 総括

海洋哺乳類を扱う獣医師は、海洋哺乳類に発症した疾患を診断・研究する責務を有し、それは飼育下罹患個体のQOLを向上させるだけでなく、野生の海棲哺乳類およびそれらにつながる海洋生態系の保全にも役に立つと考えられる。もちろん、その仕事は動物、環境、ヒトの健康は一つにつながっているという one health の理念 (Zinsstag, 2013) にも通じている。地球表面で海洋の占める面積の割合は約7割である。そこには様々な人獣共通感染症が病原体、感染個体あるいは潜伏感染ないし保菌個体として存在すると考えられる。それらの中には、今回のカマイルカに発症したPCM-Cのように一般的な検査方法では診断不能であり、分子生物学的手法を用いなければならない疾患も少なくないと考えられる。Bossart (2006) は、「高度な検査技術は病気の原因菌を特定する能力をさらに高めた」と述べたが、今後とも海洋環境中に存在すると考えられる既知の、そして未知の診断が困難な感染症について、詳細な研究が必要となる。

第2章では、日本海由来のカマイルカに特異的な皮膚患部が形成された症例を2例検討した結果、分子生物学的検査の結果、症例1皮膚病変からは *P. brasiliensis sensu stricto* と99%相同する遺伝子型が検出され、世界初のカマイルカのPCM-C症例であると判断された。さらに、本研究では最新の *Paracoccidioides* 属真菌の系統分類に記載された *P. brasiliensis sensu stricto* が小型鯨類のPCM-Cに関与することを世界で初めて示すことができた。症例2は微生物学的、病理組織学および分子生物学的にPCM-Cである確証を得ることができなかったが、症例1と同様な酵母様構造物が検出された皮膚病変を発症し、症例1と同様の抗真菌治療に反応して皮膚患部が緩解していることから、何らかの真菌性病原因子が病態に関与している可能性が否定できず、今後継続的な経過観察と再検査が必要であると考えられる。太平洋側におけるバンドウ

イルカ症例 (Ueda *et al.*, 2013) に続き、日本海側で捕獲されたカマイルカに初の PCM-C 症例が確認されたことにより、日本には PCM-C が既に存在している可能性が強く示唆された。

PCM-C は血清テストステロンレベルを減少させ (Ueda *et al.*, 2013)、鯨類に免疫障害を引き起こすこと (Reif *et al.*, 2009) が知られているが、現在までのところ症例 1、2 ともに PCM-C によると思われる衰弱・死亡は認められていない。両症例に関連する施設においては、種々の臨床検査とともに、微生物学および分子生物学的検討を今後とも継続すべきであろう。PCM-C は現時点ではヒトの感染症例とは類別されているが、宿主域の広さおよび地球規模での拡散の可能性を考慮すると、将来的に人獣共通感染症として認識される可能性もあり、注視して行くべきと考える。

国内 3 カ所の施設で飼育されている、計 41 頭の鯨類 (PCM-C 感染記録鯨種 31 頭、PCM-C 感染未記録鯨種 10 頭) について、それらの血清を用いてバンドウイルカ PCM-C 発症個体皮膚患部組織サンプル内の酵母様構造物に免疫組織化学的検査を施し、免疫染色へ供する血清の希釈倍率を基準として、抗体保有個体における相対的な抗体量を評価した。その結果、41 頭中 21 頭 (61.0%) の供試血清が 1,000 倍希釈で明瞭な抗体陽性反応を示した。

以上の所見より、国内で飼育されている鯨類の 60%以上は PCM-C 抗原に反応する抗体を誘導可能な原因病原体に曝露された可能性が高く、PCM-C 感染記録鯨種のミナミバンドウイルカはバンドウイルカおよびカマイルカより本疾患に対する感受性が高い可能性が考えられた。すなわち、本章の結果は鯨種に関わらず PCM-C が既に日本に広く分布している可能性が示唆された。

今後は、より迅速で高精度な検査法を確立するとともにさらに多くの国内の飼育下鯨類および近海で捕獲される野生鯨類における PCM-C についての疫学調査を進め、我が国における本疾患の実態をより明確にしていくとともに、その対策を検討していく必要があると考えられた。

近年、世界的に動物園水族館における鯨類の展示は非常に困難となり、同時にハズバンドリートレーニング等により動物を健康に維持することがとても重要なこととなった。これらトレーニングの際、鯨類に直接触れる飼育管理担当者のみならず、飼育下鯨類およびその飼育環境である飼育水に触れる機会がある観客の健康管理のためにも、日々の健康管理に加えて、人獣共通感染症およびその候補となりうる疾患については、定期的かつ詳細な微生物学・病理学・分子生物学的検査とともに、広域にわたる疫学調査を行うことで感染の予防はもちろん、繁殖や死亡率の低下を目指すことが可能となる。これからの海棲哺乳類の獣医学にとって、本研究が資するところがあれば幸いである。

謝辞

本研究をとりまとめるにあたり、終始ご懇篤なご指導とご鞭撻を賜り、さらに本稿をご校閲戴いた日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 病態獣医学部門 水族医学研究室 和田新平教授に衷心より深謝申し上げます。

本論文の研究にあたりまして、多大なるご指導並びにご協力を賜った、琉球大学 農学部 亜熱帯地域農学科 動物生産科学分野 家畜衛生学講座 佐野文子教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くのご助言並びにご協力を賜った、沖縄美ら島財団 総合研究センター 動物研究室 室長 植田啓一博士に深謝いたします。

本論文を執筆するにあたり、多くの励ましとご協力を賜りました農林水産省 消費・安全局 小林創太博士に心より感謝申し上げます。

本論文を執筆するにあたり多くの励ましとご助言をいただきました酪農学園大学 獣医疫学ユニット 蒔田浩平准教授に深謝いたします。

大学院研究生在籍中にご交誼を賜り、かつ症例の検査に協力を惜しまなかった、日本獣医生命科学大学水族医学研究室の学生諸君に厚く感謝の意を表します。

最後に3年にわたり、精神的に支えてくれた母親をはじめ姉妹、叔母、愛犬のモズク、マクラ、ニコに深く感謝の意を表します。

引用文献

Bagagli, E., Sano, A., Coelho, K. I. R., Alquati, S., Miyaji, M., Camargo, Z. P., Gomes, G. M., Franco, M. and Montenegro. M. R. (1998) Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 58, 505-512.

Bagnall, B. G. and Grunberg, W. (1972) Generalized Trichophyton mentagrophytes ringworm in Capuchin monkeys (*Cebus nigrivittatus*). *Br. J. Dermatol.*, 87, 565-570.

Bedrinana-Romano, B., Best, B., Brownell, C., Castro, F., Flores, G., Galletti, G., Kasuya, K., Marcondes, M., Moore, M., Ott, P-M., Parsons, P., Ridoux, R., Rogan, R., Rose, R., Sanino, S., Taylor, U. and Van Bresse, M. F. (2009) Report of the Workshop on cetacean Skin Diseases. *The Journal of Cetacean Research and Management*, 11, 503-514.

Bermudez, L., Van Bresse, M. F., Reyes-Jaimes, O., Sayegh, A. J. and Paniz-Mondolfi, A. E. (2009) Lobomycosis in Man and Lobomycosislike Disease in Bottlenose Dolphin, Venezuela. *Emerging Infections Diseases* 15, 1301-1303

Bossart G.D., Cray, S.J.L., Decker, S.J., Cornell, L.H. and Altman, N.H.(1996) Cutaneous papovaviral-like papillomatosis in a killer whale(*Orcinus orca*). *Marine Mammal Science*, 12, 274-281.

Bossart, G. D., Reidarson, T. H., Dierauf, L. A. and Duffield, D. A. (2001) Clinical Pathology (In CRC Handbook of Marine Mammal Medicine Second ed., ed. By Dieruf, L. A. and Gulland, F. M. D., CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washington, D. C.), pp. 383-436.

Bossart G. D., Ghim, S., Rehtanz, M., Goldstein, J., Varera, R., Ewing, R., Fair, P., Lenzi, R., Joseph, B., Hics, C., Schneider, L., McKinnie, C. J., Reif, J.S., Sanches, R., Lopez, A., Novoa, S., Bernal, J., Goretti, M., Rodriguez, M., Defran, R. H. and Jonson, A. B. (2005) Orogenital neoplasia in Atlantic bottlenose dolphins (*Tursionps truncatus*). *Aquatic Mammals*, 31, 473-480.

Bossart G. D. (2006) Marine mammals as sentinel species for oceans and human health. *Oceanography*, 19, 44-47.

Bossart, G. D. (2010) Morbillivirus infection in free-ranging Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Southeastern United States: Seroepidemiologic and pathologic evidence of subclinical infection. *Vet. Microbiol.*, 143, 160–166. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.024>

Bowenkamp, K. E., Fraska, S Jr., Draghi, A. II., Tsongalis, G. J., Koerting, C., Hinckley, L., De Guise, S., Montali, R. J., Goertz, C. E. C., Aubin, D. J St. and Dunn, J. L. (2001) Mycobacterium marinum dermatitis and panniculitis with chronic pleuritis in a captive white whale (*Delphinapterus leucas*) with aortic rupture. *J Vet Diagn Invest.*, 13, 524-530.

Caldwell, D. K., Caldwell, M. C., Woodard, J. C., Ajello, L., Kaplan, W. and McClure, H. M. (1975) Lobomycosis is as a disease of the Atlantic bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus* Montagu, 1821). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 24, 105-114.

Camargo, Z. P., Baruzzi, R. G., Maeda, S. M. and Floriano, M. C. (1998) Antigenic relationship between *Loboa loboi* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological method. Med Mycol., 36, 413-417.

Cates, M. B., Kaufman, L., Grabau, J. H., Pletcher, J. M. and Schroeder, J. P. (1986) Blastomycosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Journal of the Am Vet Med Assoc., 189, 1148-1150.

Corredor, G. G., Castaño, J. H., Peralta, L. A., Díez, S., Arango, M., McEwen, J. and Restrepo, A. (1999) Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. Revista Iberoamericana de Micología, 16, 216-220.

Costa, E. O., Diniz, L. S., Netto, C. F., Arruda, C. and Daggi, M. L. (1995) Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. Journal of Medical and Veterinary Mycology, 33, 39-42.

Cowan, D. F. (1993) Lobo's disease in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) from Matagorda Bay, Texas. *Journal of Wildlife Diseases*, 29, 488-489.

de Farias, M. R., Condas, L. A., Ribeiro, M. G., de Moraes Gimenes Bosco, S., Muro, M. D., Werner, J., Theodoro, R. C., Bagagli, E., Marques, S. A. and Franco, M. (2011) Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*, 172, 147-152.

De Vries, G. A. and Laarman, J. J. (1973) A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. *Aquatic Mammals*, 1, 1-8.

Esperón, F., García-Párraga, D., Bellière, E. N. and Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2012) Molecular diagnosis of lobomycosis-like disease in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) in captivity. *Med Mycol.*, 50, 106-109.

Ferreira, J. B., Navarro, I. T., Freire, R. L., Oliveira, G. G., Omori, A. M., Belrtardo, D. R., Itano, E. N., Camargo, Z. P. and Ono, M. A. (2013) Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dairy goats. *Mycopathologia*, 176, 95-99.

Fischman, O., Siqueira, P. A. and Baptista, G. (1987) *Microsporum Gypseum* infection in a gray wolf (*Canis lupus*) and a camel (*Camelus bactrianus*) in a zoological garden. *Mykosen*, 30, 295-297.

Garcia, N. M., Del Negro, G. M., Heins-Vaccari, E. M., de Melo, N. T., de Assis, C. M. and Lacaz, C da S. (1993) *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35, 227-235.

Gonzalez, J. F., Montiel, N. A. and Maass, R. L. (2010) First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 12, 659-662.

Horner, K. L. and Raugi, G. J. (2017) Lobomycosis on MedScap.
<http://emedicine.medscape.com/article/1092451-overview>. Updated April 17.

Jensen E. D., Lipscomb, T., Van Bonn, B., Miller, G., Fradkin, J. M. and Ridgway, S. H. (1998) Disseminated histoplasmosis in an Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Zoo Wildlife Med.*, 29, 456-460.

Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, M., Suzuki K., Uehara, Y., Okabe, N., Nishimura, K. and Miyaji M. (2003) The trend of imported mycoses in Japan. *J Infect Chemother*, 9, 16-20.

Kearns, K. S., Pallock, C. and G. Ramsay, E. C. (2000) Dermatophytosis in red pandas (*Ailurus fulgens fulgens*): A review of 14 cases. *J Zoo Wildl Med.*, 30, 561-563.

Kiszka, J., Van Bresse, M. F. and Pusineri, C. (2009) Lobomycosis-like disease and other skin conditions in Indo-Pacific bottlenose dolphins, *Tursiops aduncus*, from the Indian Ocean. *Dis Aquat Org*, 84, 151–157.

Kuntze, A., Gemeinhardt, H. and Bensch, G. J. (1967) On a *Microsporum canis* endemy in zoo animals, with occupational infection in man. *Mykosen*, 10, 7-18.

Lane, E. P., de Wet, M., Thompson, P., Siebert, U., Wohlsein, P. and Plön, S. (2014) A systematic health assessment of Indian ocean bottlenose (*Tursiops aduncus*) and Indo-Pacific humpback (*Sousa plumbea*) dolphins incidentally caught in shark nets off the KwaZulu-Natal Coast, South Africa. *PLoS One*, 9, e107038.

Lobo, J. (1931) Um caso de blastomicose produzido por uma especie nova encontrada em Recife. *Rev Med Pernambucana*, 1, 763-775.

Matute, D. R., McEwen, J. G., Puccia, R., Montes, B. A., San-Blas, G., Bagagli, E., Rauscher, J. T., Restrepo, A., Morais, F., Niño-Vega, G. and Taylor, J. W. (2006) Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 65-73.

Migaki, G., Valério, M. G., Irvine, B. and Garner, F. M. (1971) Lobo's disease in an Atlantic bottle-nosed dolphin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 5, 578-582.

Minakawa, T., Ueda, K., Tanaka, M., Tanaka, N., Kuwamura, M., Izawa, T., Konno, T., Yamate, J., Itano, E. N., Sano, A. and Wada, S. (2016) Detection of multiple budding yeast cells and a partial sequence of 43-kDa glycoprotein coding gene of *Paracoccidioides brasiliensis* from a case of lacaziosis in a female Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Mycopathologia*, 181, 523–529.

Murata, Y., Sano, A., Ueda, Y., Inomata, T., Takayama, A., Poonwan, N., Nanthawan, M., Mikami, Y., Miyaji, M., Nishimura, K. and Kamei, K. (2007) Molecular epidemiology of canine histoplasmosis in Japan. *Medical Mycology*, 45, 233-247.

Oliveira, G. G., Belitardo, D. R., Balarin, M. R., Freire, R. L., Camargo, Z. P. and Ono, M. A. (2013) Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia*, 76, 299-302.

Oliveira, G. G., Silveira, L. H., Itano, E. N., Soares, R. M., Freire, R. L., Watanabe, M. A., Camargo, Z. P. and Ono, M. A. (2011) Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*, 171, 197-202.

Otcenasek, M., Adamkova, A., Janeckova, V., Dvorak, J., Lavicka, M. and Micek, B. (1978) Dermatmycosis of the nilgai antelope (*Boselaphus tragocamelus*) caused by the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Vet Med (Praha)*., 23, 377-383.

Pal, M. and Thapa, B. R. (1993) An outbreak of dermatophytosis in barking deer (*Muntiacus muntjak*). *Vet Rec.*, 133, 347-348.

Palmer, C. and Peterson, A. (2014) First report of a lacaziosis-like disease (LLD) observed in the Australian snubfin dolphin (*Orcaella heinsohni*) in Darwin Harbour, Northern Territory, Australia. *North Territ Nat.*, 25, 3-6.

Paniz-Mondolfi, A., Talhari, C., Sander Hoffmann L., Talhari, S., Bermudez-Villapor, L., Hernandez-Parez, M. and Van Bresse, M. F. (2012) Lobomycosis: an emerging disease in humans and delphinidae. *Mycoses*, 55, 298–309.

Pollock, C. G., Rohrbach, B. and Ramsay, E. C. (2000) Fungal dermatitis in captive pinnipeds. *J Zoo Wildl Med.*, 31, 374-378.

Queiroz-Telles, F. and Escuissato, D. L. (2011) Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 32, 764-774.

Ramos-E-Silva, M., Aguiar-Santos-Vilela, F., Cardoso-de-Brito, A. and Coelho-Carneiro, S. (2009) Lobomycosis: literature review and future perspectives. *Actas Dermosifiliogr*, 100 (Suppl 1), 92-100.

Reidarson, T. H., Griner, L. A., Pappagianis, D. and McBain, J. (1998)
Coccidioidomycosis in a bottlenose dolphin. *Journal of Wildlife Diseases*, 34,
629-631.

Reidarson, T. H., McBain, J. F., Dalton, L. M. and Rinaldi, M. G. (2001)
“Mycotic Diseases,” in *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*, Dierauf
LA and Gulland FMD, Eds., Chapter 17, CRC Press, Washington, DC, USA,
2nd edition, pp. 337–355.

Reif, J. S., Mazzoil, M. S., McCulloch, S. D., Varela, R. A., Goldstein, J. D.,
Fair, P. A. and Bossart, G. D. (2006) Lobomycosis in Atlantic bottlenose
dolphins from the Indian River Lagoon, Florida. *Journal of the American
Veterinary Medical Association*, 228, 104-108.

Reif, J. S., Peden-Adams, M. M., Romano, T. A., Rice, C. D., Fair, P. A. and
Bossart, G. D. (2009) Immune dysfunction in Atlantic bottlenose dolphins
(*Tursiops truncatus*) with lobomycosis. *Med Mycol.*, 47, 125-135.

Restrepo, A., Baumgardner, D. J., Bagagli, E., Cooper, C. R., McGinnis, M.
R., Lazera, M. S., Barbosa, F. H., Bosco, S. M., Camargo, Z. P., Coelho, K. I.
R., Fortes, S. T., Franco, M., Montenegro, M. R., Sano, A. and Wanke, B.
(2000) Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments.
Medical Mycology, 38, 67-77.

- Rhodin, A. G. J. and Anver, M. R. (1977) Mycobacteriosis in turtles: cutaneous and hepatosplenic involvement in a phrynosoma hilari. *Journal of Wild Life Diseases*, 13,180-183.
- Ricci, G., Mota, FT., Wakamatsu, A., Serafim, R. C., Borra, R. C. and Franco, M. (2004) Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*, 42, 379-383.
- Richini-Pereira, V. B., Bosco, S. M., Theodoro, R. C., Barrozo, L., Pedrini, S. C. B., Rosa, P. S. and Bagagli, E. (2009) Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC research notes*, 17, 228.
- Rotstein, D. S., Burdett, L. G., McLellan, W., Schwacke, L., Rowles, T., Terio, K. A., Schltz, S. and Pabst, A. (2009) Lobomycosis in offshore bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), North Carolina. *Emerg Infect Dis.*, 15, 588–590.
- Rotstein, D., Tomas, R., Helmic, K., Citino, S. B., Tylar, S. K. and Dunbar, M. R. (1999) Dermatophyte infections in free-ranging Florida panthers (*Felis concolor coryi*). *Journal of zoo and wildlife medicine*, 30, 281-284.
- Sacristán, C., Réssio, R. A., Castilho, P., Fernandes, N., Costa-Silva, S., Esperón, F., Daura-Jorge, F. G., Groch, K. R., Kolesnikovas, C. K., Marigo, J., Ott, P. H., Oliveira, L. R., Sánchez-Sarmiento, A. M., Simões-Lopes, P. C. and Catão-Dias, J. L. (2016) Lacaziosis-like disease in *Tursiops*

truncatus from Brazil: a histopathological and immunohistochemical approach. Dis Aquat Organ., 117, 229-235.

Sano, A., Takahashi, H., Murata, Y. and Toujimbara, K. (2011)

Histoplasmosis and pseudofarcy in Japan. Jpn J Vet History, 48, 1-21.

Schöborn C. (1971) A dermatophyte (*Trichophyton tonsurans*) isolated from zoo animals. Mykosen, 14, 19-30.

Sano, A., Yokoyama, K., Tamura, M., Mikami, Y., Takahashi, I.,

Fukushima, K., Miyaji, M and Nishimura, K., (2001) Detection of *gp43* and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi, 42, 23–27.

Schöborn, C. (1970) The occurrence of a *Trichophyton rubrum*-like dermatophyte in beasts of prey (Carnivora). Mykosen, 13, 381-396.

Scott, WA. (1986) Ringworm outbreak. Vet Rec., 118, 342.

Silveira, L. H., Paes, R. C., Medeiros, E. V., Itano, E. N., Camargo, Z. P. and Ono, M. A. (2008) Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia. 65, 367-371.

Simões-Lopes, P. C., Paula, G. S., Xavier, F. M. and Scaramelo, A. C. (1993)

First case of lobomycosis in bottlenose dolphin from southern Brazil. Marine Mammal Sciences, 9, 329-331.

Stefan, H. and Barbara, J. B. (1997) Skin disorders in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*), resident in the Sado estuary, Portugal. Aquatic Mammals, 23, 59-68.

Symmers, W. S. (1983) A possible case of Lobo's disease acquired in Europe from a bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*). Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses Filiales, 76, 777-784

周本剛大、植田啓一、山口さやか、佐野文子 (2017) クジラ型パラコキシジオイデス症と高度病原性真菌症との血清学的交差反応. 第61回日本医真菌学会総会・学術集会プログラム・抄録集, p. 94.

Taborda, P. R., Taborda, V. A. and McGinnis, M. R. (1999) *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. J Clin Microbiol., 37, 2031-2033.

Tajima, Y., Sasaki, K., Kashiwagi, N. and Yamada, TK. (2015) A case of stranded Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*) with lobomycosis-like skin lesions in Kinko-wan, Kagoshima, Japan. J Vet Med Sci., 77 (8), 989-992.

Takahashi, H., Takahashi-Kyuhachi, H., Takahashi, Y., Yarita, K., Takayama, A., Inomata, T., Sano, A., Nishimura, K. and Kamei, K. (2008) An intrafamilial transmission of *Arthroderma benhamiae* in Canadian porcupines (*Erethizon dorsatum*) in a Japanese zoo. Medical Mycology, 46, 465-473.

Talhari, S. and Talhari, C. (2012) Lobomycosis. *Clin Dermatol.*, 30, 420-424.

Taylor, L. H., Latham, S. M. and Woolhouse, M. E. (2001) Risk factors for human disease emergence. *Philosophical transactions : Biological science*, 356, 983-989.

Teixeira, M. M., Theodoro, R. C., Nino-Vega, G., Bagagli, E., Felipe, M. S. S. (2014) *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLOS Pathology*, 10, e1004397.

Turissini, D. A., Gomez, O. M., Teixeira, M. M., McEwen, J. G. and Matute, D. R. (2017) Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.*, Jun 9;106:9-25. doi: 10.1016/j.fgb.2017.05.007. [Epub ahead of print].

Ueda, K., Nakamura, I., Itano, E. N., Takemura, K., Nakazato, Y. and Sano, A. (2017) *Trichosporon asteroides* isolated from cutaneous lesions of a suspected case of " paracoccidioidomycosis ceti " in a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Mycopathologia.*, May 25. doi: 10.1007/s11046-017-0147-3. [Epub ahead of print]

Ueda, K., Sano, A., Yamate, J., Itano, E. N., Kuwamura, M., Izawa, T., Tanaka, M., Hasegawa, Y., Chibana, H., Izumisawa, Y., Miyahara, H. and Uchida, S. (2013) Two cases of lacaziosis in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in Japan. *Case Report Vet Med.*, 318548. doi:10.1155/2013/318548.

Van Bresseem, M. F., Simões-Lopes, P. C., Félix, F., Kiszka, J. J., Daura-Jorge, F. G., Avila, I. C., Secchi, E. R., Flach, L., Fruet, P. F., du Toit, K., Ott, P. H., Elwen, S., Di Giacomo, A. B., Wagner, J., Banks, A. and Van Waerebeek, K. (2005) Epidemiology of lobomycosis-like disease in bottlenose dolphins *Tursiops* spp. from South America and southern Africa. *Dis Aquat Organ*, 117, 59–75.

Van Bresseem, M. F., Van Waerebeek, J., Reyes, J., Felix, F., Echegaray, S. S. (2007) A preliminary overview of skin and skeletal diseases and traumata in small cetaceans from South American waters. *Latin Am. J. Aqua. Mam.* 6, 7-42.

Van Bresseem, M. F., Santos, M. C. and Oshima, J. E. (2009) Skin diseases in Guiana dolphins (*Sotalia guianensis*) from the Paranaguá estuary, Brazil: a possible indicator of a compromised marine environment. *Mar. Environ Res.*, 67, 63-68.

Van Bessem, M. F., Shirakawa, M. and Amano, M. (2012) Cutaneous nodular disease in a small population of Indo-Pacific bottlenose dolphins, *Tursiops aduncus*, from Japan. *Marine Mammal Science*, 29, 525-532. DOI: 10.1111/j.1748-7692.2012.00589.x,

Van Bresseem, M. F., Minton, G., Sutaria, D., Kelkar, N., Peter, C., Zulkarnaen, M., Mansur, R. M., Porter, L., Vargas, L. H. and Rajamani,

L. (2014) Cutaneous nodules in Irrawaddy dolphins: an emerging disease in vulnerable populations. *Dis Aquat Organ.*, 107, 181-189.

Vilela, R., Mendoza, L., Rosa, P. S., Belone, A. F., Madeira, S., Opromolla, D. V. and Resenda, M. M. (2005) Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen. *Lacazia loboi*. *J Clin Microbiol.*, 43, 3657-3661.

Vilela, R., Rosa, P. S., Belone, A. F., Taylor, J. W., Diório, S. M. and Mendoza, L. (2009) Molecular phylogeny of animal pathogen *Lacazia loboi* inferred from rDNA and DNA coding sequences. *Mycological Research*, 113, 851-857.

Vilela, R., Bossart, G. D., St. Leger, J. A., Dalton, L. M., Reif, J. A., Schaefer, A. M., McCarthy, P. J., Fair, P. A. and Mendoza, L. (2016) Cutaneous granulomas in dolphins caused by novel uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. *Emerg Infect Dis.*, 22, 2063-2069.

Vries, G. A. and Laaman, J. J. (1973) A case of Lobo's disease in the dolphin *Sotalia guianensis*. *Aquatic Mammals*, 1, 26-33.

Weiss, R. (1974) Trichophytosis in broad-mouthed rhinos (*Ceratotherium simum*, Burchell). *Mykosen*, 17, 137-139.

Wheat, J., Wheat, H., Connolly, P., Kleiman, M., Supparatpinyo, K., Nelson, K., Bradsher, R. and Restrepo, A. (1997) Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis.*, 24, 1169-1171.

Yang, M. C., Magee, D. M., Kaufman, L., Zhu, Y. and Cox, R. A. (1997)
Recombinant *Coccidioides immitis* complement-fixing antigen: detection of
an epitope shared by *C. immitis*, *Histoplasma capsulatum*, and *Blastomyces*
dermatitidis. Clin Diagn Lab Immunol., 4, 19-22.

Zinsstag, J. Z. (2013) Convergence of ecohealth and one health. *EcoHealth*,
9,371-373.

Zwick, L. S., Briggs, M. B., Tunev, S. S., Lichtensteiger, C. A. and Murnane,
R. D. (2000) Disseminated blastomycosis in two California sea lions
(*Zalophus californianus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 31, 211–214.