

家庭での愛玩鳥および動物園飼育環境下における
Avian Gastric Yeast 症の原因真菌 *Macrorhabdus ornithogaster* の
蔓延および感染機序に関する研究

Study on the spread and infection mechanism of *Macrorhabdus ornithogaster*, the causative
fungus of Avian Gastric Yeast Disease in domestic pet birds and zoo birds.

麻布大学 生命・環境科学部 食品生命科学科 小林 直樹
Naoki Kobayashi, Azabu University

キーワード： *Macrorhabdus*、感染、系統関係、インコ目、スズメ目

keywords： *Macrorhabdus*, infection, phylogenetic relationship, Psittaciformes, Passeriformes

1. 背景と目的

Avian Gastric Yeast (AGY) 症の原因真菌 *Macrorhabdus ornithogaster* は、特徴的な針状の形態を示す酵母である¹⁾。致死性の感染症を引き起こす一方で、無症状個体の不顕性感染も一定数あることが確認されている。感染の成立は、繁殖時の垂直感染が主な経路と考えられており、家庭で飼育されるインコ・オウム類やフィンチ類で蔓延していることが大きな問題となっている。これらの鳥種の他にも、ダチョウ目、キジ目、ハト目、キツツキ目、コウノトリ目での報告があり、鳥類において幅広い系統で感受性があると考えられる²⁾。また有症状の野生個体の感染例は調査例自体が少なく全貌は明らかになってはいないが、いくつかの報告がある²⁾。

M. ornithogaster は、2003 年に新種記載された¹⁾。未だ遺伝子塩基配列を用いた研究報告が少ないため、真菌における分類学的研究や、種内の遺伝的多様性に関する研究は、他の真菌に比べて進んでいない。他の微生物で広く行われるリボゾーム RNA 遺伝子 (rDNA) の関連遺伝子群の解析としては、過去に、AGY 症によって死亡した個体の組織や消化管内容物等から分離された菌体を用いていくつかの研究で行われた例があるものの^{1,3)}、糞など非侵襲性のサンプルからの分離株を用いた研究は非常に少ない。Kojima ら (2022)⁴⁾ は、罹患鳥個体の糞サンプルから直接抽出した DNA を鋳型として rDNA

の一部関連領域の配列を決定して分子系統解析を行ったが、本研究においても動物園で飼育される個体に関しては検討されておらず、家庭・動物園等での飼育の場合において、*M. ornithogaster* 感染個体が搬入された場合には AGY 症の蔓延が発生するリスクがあると考えられるが、本菌の分類と鳥種ごとの感染特異性や鳥の生息環境を関連付けた感染の危険度が認識されていない。そこで本研究では、家庭および動物園での飼育鳥類において、本菌の分布状況を把握することを目的に、次世代シーケンス法 (Next generation Sequencing ; NGS 法) を活用することで、生存する鳥類から非侵襲性に採取した糞サンプルから *M. ornithogaster* を高感度に検出する方法を検討した。

2. 材料と方法

家庭で飼育される AGY 症の罹患鳥の糞サンプルを動物病院から収集した。動物園で飼育される鳥類については、症状の有無にかかわらず糞サンプルを収集した。動物病院 2 病院 (病院 A、病院 B)、動物園 3 園 (動物園 a、動物園 b、動物園 c) の、5 機関合計で 272 個体からサンプルを得た。動物病院および動物園それぞれで糞サンプルを採取した鳥種のリストを表 1 および 2 に示した。糞サンプルはシードスワブ g1 号 (栄研化学株式会社) 中に採取し、実験に供するまで 4℃ で保存した。一部のサンプルでは

個体の識別が難しかったため、1本のスワブチューブ中に同種の複数個体のサンプルを採取し、まとめてこの後の試験を実施した。

表 1. 供試検体一覧

1) 動物病院			
分類 (目)	個体数		
インコ目	57		
スズメ目	5		
合計	62		
2) 動物園			
分類 (目)	個体数	分類 (目)	個体数
インコ目	57	ツル目	5
エポンドリ目	2	ハト目	6
カモ目	10	ハヤブサ目	1
キジ目	13	ヒクイドリ目	6
キツツキ目	3	フクロウ目	16
コウノトリ目	1	ブッポウソウ目	6
サイチョウ目	3	フラミンゴ目	1
スズメ目	1	ペリカン目	13
タカ目	20	ペンギン目	52
ダチョウ目	1	ヨタカ目	1
チドリ目	4		
小計	115	小計	107
		合計	212

採取した糞サンプルは培養し、培養物から *M. ornithogaster* 検出を試みた。培養法は Hannafusa らの報告⁵⁾を参照し実施した。培養後、顕微鏡観察を行い、*M. ornithogaster* 様の針状胞子の有無を確認した。顕微鏡観察による本菌検出の有無にかかわらず、培養液 1 mL を分取し、NucleoSpin Soil (タカラバイオ株式会社) を用いて DNA を抽出してこれを鋳型とした。プライマー ITS5⁹⁾ および NL4¹⁰⁾ を用いて rDNA 遺伝子 (rDNA) 18S partial-ITS1-5.8S-ITS2-28S partial 領域の塩基配列を、3730xl DNAanalyzer (Thermo Fisher Scientific 株式会社) を持ち手のサンガーシーケンス法によって取得した。得られたデータファイルを ATGC (株式会社ゼネティックス) へ取り込み、波形データの補正および配列のアセンブリを行った。

さらに、並行して NGS アンプリコンシーケンスによる *M. ornithogaster* 検出を試みた。培養法で菌体が観察されない、または PCR 増幅が見られなかった培養液サンプルについても実施した。rDNA-ITS 領域をターゲットとしたアンプリコンライブラリを作製し、MiSeq (Illumina 株式会社) を用いてシーケンスを行った。ライブラリ作製法は Izawa らの報告¹¹⁾を参照した。得られた NGS リードを属または種レベルで同定し、各糞サンプルに含有する真菌の検出を行った。この中から、*M. ornithogaster* の ITS1 領域塩基配列を抽出した。

サンガーシーケンス法または NGS 法によって本研究において取得した *M. ornithogaster* の ITS1 領域塩基配列および GenBank データベースから収集した配列について、Mega 11⁶⁾ に搭載されたマルチプルアライメントツール MUSCLE を用いてアライメントした後、分子系統樹を構築し *M. ornithogaster* 種内の系統推定を行った。分子系統解析は Neighbor-Joining 法 (NJ 法)⁷⁾ にて実施し、無根系統樹とした。この際、塩基置換モデルに maximum composite likelihood を使用し、各枝の信頼度は 1,000 回繰り返しでのブートストラップ確率にて評価した。得られた系統情報を参照し、宿主の鳥類の分類や飼育環境等の要因を考慮し考察した。

3. 結果と考察

本研究によって、家庭で飼育される複数の生きている AGY 罹患鳥から非侵襲性に採取したサンプルの培養から、*M. ornithogaster* の多数の菌体を得ることに成功した。糞サンプル培養物中の菌体の顕微鏡観察像を図 1 に示した。菌体観察像が得られた糞サンプル培養物から抽出した DNA からは、PCR とサンガーシーケンス法によって rDNA 遺伝子群の塩基配列が得られた。動物園飼育下個体の糞サンプル培養液からは培養菌体の観察像は得られなかったが、これは、ほぼ無症状の個体だったために培養液中の初発菌数が少なかったためと考えられた。さらに、



図 1. AGY 症罹患ブンチョウサンプル由来菌体培養像

同一の培養サンプルからの抽出 DNA を用いて NGS 法によるアンプリコンシーケンス解析を行った。この際には、上述のサンガーシーケンス法によって ITS1 領域増幅産物が得られなかった DNA についても解析を実施した。

以上の結果、動物病院サンプルでは病院 A のマメルリハ・セキセイインコ・キエリクロボタンインコ・オカメインコ・キンカチョウ・ブンチョウおよび病院 B のボタンインコの計 6 鳥種、動物園サンプルでは動物園 a のスミレコンゴウインコおよび動物園 b のエミュー・シロフクロウ・ケープペンギンの計 4 鳥種、合計で 10 鳥種 13 個体から、*M. ornithogaster* の ITS1 領域塩基配列を検出できた。

本研究において決定した塩基配列およびデー

データベースダウンロード ITS1 領域塩基配列をもとに系統解析を行い、得られた *Macrorhabdus ornithogaster* 無根系統樹を図 2 に示した。サンプル由来鳥類の分類や飼育環境等と照らし合わせて解析した結果、今回供試した *M. ornithogaster* 配列データはサンプル採取機関および由来個体の飼育下・野生に関わらず、「インコ目クレード」および「非インコ目クレード」を形成し、検出された *M. ornithogaster* の

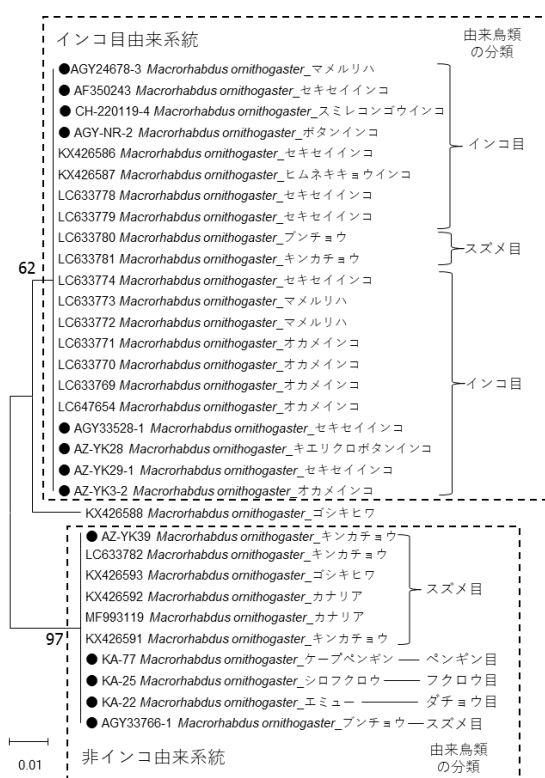


図 2. 野生または飼育下鳥類由来の *Macrorhabdus ornithogaster* の ITS1 領域塩基配列に基づく無根系統樹

本研究において配列決定した菌株は●を記したうえで菌株名および由来鳥種を示した。GenBank 登録配列はその accession number および由来鳥種を示した。ダウンロード配列には野生個体ゴシキヒ由来 2 配列が含まれた。

種内分類は宿主の鳥種の分類と一致した。「非インコ目クレード」に属する *M. ornithogaster* は、野生または飼育下の、地理・年代的に離れた地点で取得された独立性の高いスズメ目鳥類由来の配列が多く含まれたことから、これらの菌は元来スズメ目の鳥種で蔓延しやすくこれが起源となった可能性、少なくともインコ目由来ではないことが考えられた。このことから、「非インコ目クレード」に属する *M. ornithogaster* は、宿主特異性が比較的低く、インコ目以外の幅広い鳥の系統に感染するリスクがあることが示唆された。

本研究の結果から、*M. ornithogaster* の種内に

は、菌由来の鳥種がインコ目またはこれ以外に偏った 2 系統が存在することが示された。また、スミレコンゴウインコ、エミュー、シロフクロウおよびケープペンギン由来の *M. ornithogaster* 遺伝子検出を始めて報告した。この中でもフクロウ目およびペンギン目からは初、特に水鳥全体ではシロトキ⁵⁾以来の検出となったことが特筆される。*M. ornithogaster* は水環境に生息する鳥類にも感染することが示唆された。さらに、日本国内の動物園飼育下個体からの *M. ornithogaster* 遺伝子検出も初の報告となった。今後は、動物園も含めて飼育下鳥類への *M. ornithogaster* の感染機序を解明し蔓延を防止するため、サンプル数や分析する鳥種を増やして検討を継続し、鳥種と特定の系統に属する菌株との間の感染特異性や、当該菌の蔓延と宿主の飼育環境との関係性、および現在蔓延する菌株の起源等について解明する必要がある。

4. 引用および参考文献

- 1) Tomaszewski, E.K., et al. Phylogenetic analysis identifies the ‘megabacterium’ of birds as a novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 53: 1201–1205 (2003)
- 2) Phalen, D.N. Update on the diagnosis and management of *Macrorhabdus ornithogaster* (formerly Megabacteria) in avian patients. Vet. Clin. Exot. Anim., 17:203–210 (2014)
- 3) Abdi-Hachesoo, B., Sharifiyazdi, H., Haddad-Marandi, M.R., et al. Phylogenetic evaluation of *Macrorhabdus ornithogaster* isolated from a case of canary (*Serinus canaria*). Comp. Clin. Pathol., 28:275–278 (2019)
- 4) Kojima, A., et al. Validation of the usefulness of 26S rDNA D1/D2, internal transcribed spacer, and intergenic spacer 1 for molecular epidemiological analysis of *Macrorhabdus ornithogaster*. J. Vet. Med. Sci., 84: 244–250 (2022)
- 5) Hannafusa, Y., et al. Growth and metabolic characterization of *Macrorhabdus ornithogaster*. J. Vet. Diagn. Invest., 19:256–265 (2007)
- 6) Tamura, K., et al. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Mol.

Biol. Evol., 38:3022-3027 (2021)

- 7) Saitou, N., Nei, M. The Neighbor-Joining method:
a new method for reconstruction phylogenetic trees.
Mol. Biol. Evol., 4:406-425 (1987)