原 著

オカメインコの開口不全症候群の
微生物学的・病理学的所見松田紫恵¹⁾ 大屋賢司²⁾ 柳井徳磨^{1, 2)} 柵木利昭^{1, 2)} 福士秀人^{1, 2)†}

1) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) 岐阜大学応用生物科学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2008年3月17日受付・2008年6月10日受理)

要 約

臨床症状よりオカメインコの開口不全症候群と診断された1～2カ月齢のオカメインコの死亡例5例、口腔スワブ4検体を微生物学的、病理学的に検索した。複数種の細菌が分離され、最も高率に*Bordetella avium* (5/9例) が分離された。分離された*B. avium*の全菌株は、*Bordetella*属菌が産生し病原性発現に関与する皮膚壊死毒素遺伝子を保有していた。組織学的検索では、咬筋をはじめとする嘴の開閉運動筋の筋線維は変性・壊死、消失、筋線維間には炎症細胞が浸潤、細菌塊が認められた。病変の進行した領域では線維芽細胞の増殖が著しく、高度に器質化していた。分離*B. avium*の薬剤感受性試験を実施した結果、 β -ラクタム系、アミノグリコシド系およびテトラサイクリン系薬剤に高い感受性を示した。——キーワード：薬剤感受性、*Bordetella avium*、幼若オカメインコ、開口不全症候群。

日獣会誌 62, 143～147 (2009)

オカメインコの開口不全症候群 (Cockatiel lockjaw syndrome : CLJS) は、オカメインコ (*Nymphicus hollandicus*) 幼若鳥 (一般に2～10週齢) に発生し、くしゃみ、鼻水といった上部呼吸器症状を呈したのち開口が困難となる、特徴的な病態を示す症候群の総称である [1-3]。1994年にアメリカで初報告され [1]、わが国でも散発的に発生がみられる。発症鳥は採食困難に陥り、多くの場合全身状態が悪化し致死性の経過をたどるため、繁殖家や愛鳥家の間では深刻な問題になっている。米国ではCLJS発症例から*Bordetella avium*が分離され [1, 2]、本菌がCLJSの主要原因菌とされている。しかし多くの症例で複数種の細菌が分離され [2]、中には*B. avium*が分離されない例 [3] もあり、病因は確定していない。また本症の予防法や治療法も確立されていない。

今回、CLJSを発症したオカメインコを対象に微生物学・病理学的検索を行い、本症の病原体および病態について検討した。あわせてわが国におけるCLJS発生状況を調査した。本症の化学療法的基础を得るため、分離*B. avium*の薬剤感受性試験を実施した。

材 料 お よ び 方 法

疫学調査：わが国でのCLJS発生状況を調査するため、専門的に鳥類の診療を行っている全国34カ所の動物病院に、アンケートによる疫学調査を行った。CLJSの開口障害について明確な診断基準はないため、診断は各院の判断に委ねた。

検体：2007年5～10月にペットショップおよび動物病院より本研究室に送付された検体9例 (死亡例5羽、口腔スワブ4検体) を対象とした (表1)。

微生物学的検索：剖検例では気管、肺を含む主要臓器および鼻腔・口腔スワブを採材、血液寒天培地、DHL寒天培地およびGAM寒天培地 (日水製薬株、東京) にスタンプした。口腔スワブは同培地に塗布した。37℃ 18～24時間培養後、常法に従い細菌同定検査キット (API, bioMérieux, France) により分離菌を同定した。剖検例の直腸便ないし口腔スワブからDNA抽出キット (SepsGene, 三光純薬株、東京) によりDNAを抽出、*B. avium*、*Chlamydophila psittaci* および *Mycoplasma* spp. をPCR法により検出した [4-7]。使用プライマーを表2に示した。

病理学的検査：剖検後、主要臓器を採材、10%ホル

† 連絡責任者：福士秀人 (岐阜大学応用生物科学部獣医微生物学研究室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2946 E-mail : hfukushi@gifu-u.ac.jp

図1 スワブ検体No. 9, 顎の可動域が減少し, 開口障害を呈している。

表1 開口不全を呈したオカメインコの材料および臨床症状

検体番号	材料	月齢	臨床症状
1	死亡例	1	開口障害
2	死亡例	1	鼻水, 開口障害
3	死亡例	1	開口障害
4	死亡例	2	くしゃみ, 鼻水, 開口障害
5	死亡例	2	鼻水, 開口障害
6	スワブ (口腔)	1	くしゃみ, 鼻水, 嘴の変形, 開口障害
7	スワブ (口腔)	2	くしゃみ, 鼻水, 血便, 開口障害
8	スワブ (口腔)	不明	開口障害
9	スワブ (口腔)	8	くしゃみ, 鼻水, 開口障害

表2 プライマーの塩基配列

名 前	塩 基 配 列	目 的
CMGP-1F	5'-CCTTGTGATCCTTGGCGCTACTTG-3'	<i>Chlamydophila psittaci</i> 特異的遺伝子の検出
CMGP-1R	5'-GTGAGCAGCTCTTTCGTTGAT-3'	
CMGP-2F	5'-GCCTTAAACATCTGGGATCG-3'	
CMGP-2R	5'-GCACAACCACATTCCCATAAAG-3'	
GPO-3	5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCT-3'	<i>Mycoplasma</i> 特異的遺伝子の検出
MGSO	5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'	
N- <i>avium</i>	5'-CGGCGTCAACACATACTCTTGAT-3'	<i>Bordetella avium</i> 特異的遺伝子の検出
C- <i>avium</i>	5'-AGGGAGGTCAGATAGCTCTAGAAT-3'	
DNT-1F	5'-GTGTCAATTCGGCCGATACTT-3'	<i>Bordetella avium</i> DNT遺伝子の検出
DNT-1R	5'-ATATCAATGGCGAGCTTTGG-3'	

マリン固定した。常法に従いギ酸脱灰, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施し, 鏡検した。

薬剤感受性試験: 分離 *B. avium* 16 菌株, 実験室保存 *B. avium* 15 菌株および基準株について, 薬剤感受性をディスク法 (SN ディスク, 日水製薬㈱, 東京) により調べた。用いたディスクはアンピシリン (ABPC), クラバン酸・アンキモキシリン (CVA・AMPC), セファレキシム (CEX), セフトキシム (CTX), ストレプトマイシン (SM), カナマイシン (KM), アミカシン (AMK), ノルフロキサシン (NFLX), オフロキサシン (OFLX), オキシテトラサイクリン (OTC), ドキシサイクリン (DOXY), スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST), リンコマイシン (LCM), クリンダマイシン (CLDM), エリスロマイシン (EM), クラリスロマイシン (CAM), クロラムフェニコール (CP) の 17 薬剤である。米国臨床検査標準協会 (CLSI, 旧 NCCLS) の抗菌ディスク感受性試験実施基準 [8] に従い感受性 (3 段階評価: 感性, 中間, 耐性) を判定した。

PCR 法による皮膚壊死毒素 (DNT) 遺伝子検出: *B. avium* DNT 遺伝子塩基配列 (Accession No.

AM167904) に基づいてプライマーを設計した (表2)。平板上の *B. avium* コロニー 1 エーゼを 100 μ l TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) に浮遊させ, 95 $^{\circ}$ C 10 分間加熱した。16,000 $\times$ g で 1 分間遠心した上清を試料とし, DNT 遺伝子検出 PCR を行った。サーマルサイクラーの設定は 92 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分, 55 $^{\circ}$ C $\cdot$ 1 分, 70 $^{\circ}$ C $\cdot$ 2 分の 25 サイクルとした。

成 績

疫学調査: アンケートの結果, 2007 年 1 ~ 6 月に上部呼吸器症状を主訴に動物病院に来院したオカメインコ幼若鳥は, 15 院で合計 180 羽であった。うち 6 院で計 9 羽が CLJS と診断されていた。

微生物学的検査: No. 6 を除く全検体より複数種の細菌が分離され, 9 検体から 19 種が分離された (表3)。最も高率に分離されたのは *B. avium* (5/9 例), 次いで *Escherichia coli* (4/9 例) であった。死亡例では *B. avium* の分離率が高く, 口腔スワブは *E. coli* の分離率が高かった。PCR による *B. avium* 特異的塩基配列の検出を行ったところ, 口腔スワブ 1/4 例で特異的遺伝子が認められた。*C. psittaci* および *Mycoplasma* 遺伝子は全

表3 死亡例およびスワブからの細菌分離成績

菌 名	死亡例					口腔スワブ				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<i>Acinetobacter</i> sp.										+
<i>Bordetella avium</i>	+	+	+	+	+	*				
<i>Clostridium</i> sp.				+						
<i>Enterobacter cloacae</i>	+									
<i>E. sakazakii</i>					+					
<i>Enterococcus</i> sp.			+							
<i>Escherichia coli</i>		+				+	+	+		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>										+
<i>Lactobacillus fermentum</i>		+								
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+									
<i>Pseudomonas</i> sp.	+									
<i>Serratia marcescens</i>			+							
<i>Staphylococcus</i> sp.					+					
<i>S. delphini</i>							+			
<i>S. epidermidis</i>				+	+					+
<i>S. gallinarum</i>										+
<i>S. haemolyticus</i>					+					
<i>S. warneri</i> A							+			
<i>S. warneri</i> B		+								

+は細菌が直接分離されたことを、*はPCRにより検出されたことを示す。

例で検出されなかった。

病理学的検査：剖検所見では、全例で嘴は開口困難を呈し、鼻腔内に漿液性または粘稠性渗出物が充満していた。胸腹水貯留が種々の程度で認められ、肝臓の褪色および脆弱化（4/5例）、肺のうっ血性水腫（1/5例）の他に顕著な病変は無かった。咬筋に肉眼的な著変は認められなかった。組織所見では、鼻腔や副鼻腔の粘膜上皮は広範囲に変性・壊死し、粘膜固有層にマクロファージ、偽好酸球、リンパ球などの炎症細胞が高度に浸潤していた。腔内には渗出液が貯留し、線維素析出や剝離上皮細胞、細菌塊が認められた。おもに咬筋、外側・内側翼突筋、眼輪筋および下顎筋に筋線維の壊死、萎縮、断裂および硝子様変性がみられた。新旧の程度を異にする病巣が混在し、新鮮病巣では筋線維間には水腫状を呈し、炎症細胞が浸潤・集簇し、細菌塊が認められた。頭蓋骨組織では、骨梁の菲薄化や破骨細胞による吸収像がみられ、骨内の air space にも高度にマクロファージや偽好酸球が浸潤していた。陳旧病巣では慢性炎症像を呈し、線維芽細胞の増殖が著しく、器質化が進行していた。他に肝臓の多発性巣状壊死や、気管や肺への炎症波及を認める例もあったが、顕著な病変はみられなかった。全身性に結節性脂肪織炎および気嚢炎を呈した1例では、腹膜からも *B. avium* が分離された。

薬剤感受性試験：オカメインコより分離された *B. avium* 31株の薬剤感受性試験を行い、感性を示した株を感受性株と判定した。31株中に占める感受性株の割合（感受性率）を計算した（表4）。17種類の薬剤に対

図2 死亡例No. 4, 内側翼突筋 (HE染色 ×200)
筋線維は変性し、筋線維間には炎症性細胞が浸潤、水腫性に疎開している。

図3 死亡例No. 2, 内側翼突筋 (HE染色 ×200)
筋線維は変性し、筋組織内に膿瘍が形成され、細菌塊（矢印）を含む細胞退廃物が認められる。

図4 死亡例No. 2, 下顎骨 (HE染色 ×400)
破骨細胞による骨吸収が起こり、骨梁は菲薄化している。

表4 *Bordetella avium*分離株の薬剤感受性

薬 剤 系	品 名	略記号	阻止円直径の 平均値(mm)	感受性 株数	感受性率 (%)
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	30.7	31	100
β ラクタマーゼ阻害剤	クラブラン酸・アンキモシシリン	CVA・AMPC	35.5	31	100
経口セフェム系	セファレキシム	CEX	21.9	31	100
セファロスポリン系	セフトキシム	CTX	29.4	26	83.9
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	SM	16.3	28	90.3
	カナマイシン	KM	22.2	31	100
	アミカシン	AMK	23.3	31	100
キノロン系	ノルフロキサシン	NFLX	16.6	19	61.3
	オフロキサシン	OFLX	21.5	31	100
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC	23.1	31	100
	ドキシサイクリン	DOXY	27.3	31	100
サルファ剤	スルファメトキサゾール・トリメトプリム	ST	24.7	30	96.8
リンコマイシン系	リンコマイシン	LCM	0	0	0
	クリンダマイシン	CLDM	0	0	0
マクロライド系	エリスロマイシン	EM	21.8	9	29.0
	クラリスロマイシン	CAM	22.5	31	100
クロラムフェニコール系	クロラムフェニコール	CP	23.0	30	96.8

する感受性率は0～100％に分布し、100％の感受性を示した薬剤は、ABPC、CVA・AMPC、CEX、KM、AMK、OFLX、OTC、DOXY、CAMであった。LCM、CLDMには全株が耐性を示した。

PCRによる*B. avium* DNT遺伝子検出：*B. avium* 31株についてPCR法によりDNT遺伝子保有状況を調べたところ、全株が本遺伝子を保有していた。

考 察

今回CLJS発症鳥から、*B. avium*をはじめ多種類の細菌が分離されたが、多くはオウム目呼吸器の常在菌や環境細菌と考えられる細菌であった[9-11]。CLJSはこれらの内因性および外因性の細菌による複合感染症であるため、必ずしも単一かつ同一の病原菌を原因として断定できないだろう。しかし発症鳥の死亡例から高率に*B. avium*が分離されたことから、本菌がこの症候群の増悪因子として重要であると思われる。他の*Bordetella*属菌同様、*B. avium*は気管細胞毒素と皮膚壊死毒素を産生する[12, 13]ため、滲出物の分泌や線毛の消失が生じ、免疫低下を引き起こすとされている[1, 14]。今回分離された*B. avium*全菌株がDNT遺伝子を保有しており、実際に毒素を産生し病原性に関与した可能性が高いが、確定にはELISA等免疫学的検査が必要と思われる。

鳥類の開口動作は顎関節の連携運動による。下顎を下げると支点となる方形骨が回転し、翼状骨および頬骨弓を前方に押し出す。そして前頭―鼻骨縫合で上顎が前上方へ上がり、開口する。この動作は解剖学的に眼窩下洞と関連する[2]。CLJSでは眼窩下洞および隣接する骨、軟部組織への炎症波及が顕著で、広範囲に線維化が起こ

る。これはオカメインコ幼若鳥の上部気道の局所免疫反応が弱く、また頭蓋のair sacや副鼻腔の解剖学的構造から、周囲の筋や神経、関節へ感染が容易に波及するためと考えられている[2]。臨床的にみられた開口障害は、嘴の開閉運動筋が結合組織に置換され、開口動作が機能不全に陥ったため生じたと考えられる。これは開口障害を呈した期間が全症例で5、6日であったが、筋組織の器質化は陳旧な病巣だったことから推測される。

オカメインコの呼吸器病巣から分離された*B. avium*株はLCMやCLDM、EMに多剤耐性であったが、Mortensenら[15]やBlackallら[16]の報告と同様、*B. avium*は多くの薬剤に感受性で、特に β -ラクタム系やアミノグリコシド系、テトラサイクリン系薬剤に高い感受性を示した。しかしながら*B. avium*による七面鳥コリーザでは、抗生剤治療は無効[1, 17]であり、臨床的效果についてはさらなる検討が必要となる。

アンケート結果から、わが国でCLJSの集団発生は無く散発的で、病原体を特定できないものの、臨床獣医師は臨床症状からCLJSとして診断・治療してきたことが伺われた。今回の結果は、*B. avium*がCLJSの重要な発症因子であることを示唆している。*B. avium*は水や敷き藁を介して伝播し、本菌は敷き藁中で6カ月間感染性を有するとの報告[1]もある。今後、わが国の飼育鳥における*B. avium*の伝播、そしてその病原性についてさらに検討する必要がある。

引 用 文 献

- [1] Clubb SL, Homer BL, Pisani J, Head C: Outbreaks of bordetellosis in psittacines and ostriches, Proc Assoc Avian Vet, 63-68 (1994)

- [2] Fitzgerald SD, Hanika C, Reed WM : Lockjaw syndrome in cockatiels associated with sinusitis, *Avian Pathology*, 30, 49-53 (2001)
- [3] Greenacre CB, Wilson GH, Ritchie BW : *Enterococcus* species-associated temporomandibular arthritis in cockatiels, *Vet Med*, 94, 907-909 (1999)
- [4] Chahota R, Ogawa H, Mitsuhashi Y, Ohya K, Yamaguchi T, Fukushi H : Genetic diversity and epidemiology of *Chlamydophila psittaci* prevalent among the captive and feral avian species based on VD2 region of *ompA* gene, *Microbiol Immunol*, 50, 663-678 (2006)
- [5] Marois C, Oufour-Gesbert F, Kempf I : Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction, *Vet Microbiol*, 73, 311-318 (2000)
- [6] Savelkoul PH, de Groot LE, Boersma C, Livey I, Dugleby CJ, van der Zeijst BA, Gaastra W : Identification of *Bordetella avium* using the polymerase chain reaction, *Microb Pathog*, 15, 207-215 (1993)
- [7] Register KB, Yersin AG : Analytical verification of a PCR assay for identification of *Bordetella avium*, *J Clin Microbiol*, 43, 5567-5573 (2005)
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards : Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2nd ed, M31-A2, NCCLS, Pennsylvania (2002)
- [9] Drewes LA, Flammer K : Clinical microbiology, *Clinical avian medicine and surgery*, Harrison GJ, et al eds, 157-171, Saunders, Philadelphia (1986)
- [10] Gerlach H : Bacterial diseases, *Clinical avian medicine and surgery*, Harrison GJ, et al eds, 434-453, Saunders, Philadelphia (1986)
- [11] T-W-Fiennes RN : Disease of bacterial origin, *Diseases of cage and aviary birds*, Petrak ML, ed, 2nd ed, 497-515, Lea & Febiger, Philadelphia (1982)
- [12] 堀口安彦 : *Bordetella* 壊死毒の性状と作用, *日本細菌学雑誌*, 51, 963-972 (1996)
- [13] Temple LM, Weiss AA, Walker KE, Barnes HJ, Christensen VL, Miyamoto DM, Shelton CB, Orndorff PE : *Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro, *Infect Immun*, 66, 5244-5251 (1998)
- [14] Gentry-Weeks CR, Cookson BT, Goldman WE, Rimler RB, Porter SB, Curtiss R 3rd : Dermonecrotic toxin and tracheal cytotoxin, putative virulence factors of *Bordetella avium*, *Infect Immun*, 56, 1698-1707 (1988)
- [15] Mortensen JE, Brumbach A, Shryock TR : Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates, *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 771-772 (1989)
- [16] Blackall PJ, Eaves LE, Fegan M : Antimicrobial sensitivity testing of Australian isolates of *Bordetella avium* and the *Bordetella avium*-like organism, *Aust Vet J*, 72, 97-100 (1995)
- [17] 高木昌美 : 七面鳥コリーザ, 動物の感染症, 清水悠紀臣編, 第2版, 276-277, 近代出版, 東京 (2004)

Microbiology and Histopathology of Cockatiel Lockjaw Syndrome

Shie MATSUDA*, Kenji OHYA, Tokuma YANAI, Toshiaki MASEGI and Hideto FUKUSHI†

* Department of Applied Veterinary Science, United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

Microbiological and histopathological examinations were carried out on five dead cockatiels ranging in age from one to two months, while oral swabs were taken from four live cockatiels with cockatiel lockjaw syndrome. Multiple bacterial agents were isolated from the lungs and from swabs of the nasal passage and oral cavity. *Bordetella avium* was isolated from five of the nine cockatiels. All isolates possessed a dermonecrotic toxin gene, which is thought to be responsible for pathogenicity. Histologically, skeletal muscles within the temporomandibular region showed denaturation and necrosis. Necrotic muscle fibers were organized by proliferated fibroblasts. Moderate to severe infiltrations of inflammatory cells and clusters of bacteria were observed. The antimicrobial susceptibility of *B. avium* isolates was investigated. The isolates were highly sensitive to common veterinary antibiotics such as beta-lactams, aminoglycosides and tetracyclines.

— Key words : antibiotics sensitivity, *Bordetella avium*, juvenile cockatiel, lockjaw syndrome.

† Correspondence to : Hideto FUKUSHI (Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

TEL · FAX 058-293-2946 E-mail : hfukushi@gifu-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 143 ~ 147 (2009)