

*Corynebacterium bovis*によるげっ歯類の皮膚炎について

渡邊利彦
中外製薬(株)

要約

Corynebacterium bovis (*C. bovis*) は一般的に乳牛などで問題となる菌であるが、実験動物では免疫不全マウスに皮膚炎を起こす原因菌として近年注目されている。また、免疫系に異常を認めるような遺伝子改変動物においても今後は留意すべき菌と思われる。*C. bovis* はヒトや腫瘍などにより施設に持ち込まれ、日和見感染症として施設に蔓延すると、除染が難しい厄介な病原体である。今回は、*C. bovis* の特徴、検査方法や除染方法等について文献情報を元に紹介する。

1. *C. bovis* の特徴

1990年代までヌードマウスに皮膚炎を発症させるコリネバクテリウム菌は、*C. bovis* に近い菌と同定されていたが確定せず、論文等ではCHV (Corynebacterium-associated hyperkeratosis) と記載されていた。その後、1998年に16rRNA シークエンス解析により原因菌が*C. bovis* と同定された [3]。

C. bovis は、コリネバクテリウム属に属する。菌は非運動性、グラム陽性桿菌 (0.5–0.7 × 2.5–3.0 μm)、不定形で、分岐状のことが多い。生化学的にはカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、ブドウ糖、フラクトース、マルトースおよびグリセロールを発酵、硝酸塩を還元、βガラクトシダーゼを産生する。

コロニーはTween 80 (~0.1%) を添加した普通寒天培地に24時間培養で、直径1–2 mmの白からクリーム色円形でやや光沢がある特徴を示す [13]。

2. 感受性動物

C. bovis は、牛のミルクから検出され、乳房炎の原因菌として知られている。実験動物では、マウス、ラットで感染が報告されている、免疫機能に異常がない有毛の動物では不顕性感染であるが、ヌードマウスは感受性が高く、多くの感染事例が報告されている。また、ヘアレスマウス (SKH-1)、SCIDマウス、NOD-Scidマウス、NOGマウスも皮膚炎を発症する [3, 7, 19, 21]。

3. 感染様式

感染動物との直接接触や飼育管理者や実験者の手袋を介して感染する。また、*C. bovis* に汚染した腫瘍細胞株、感染動物の飼育室内に浮遊拡散している*C. bovis* を含む微粒子、不顕性感染している動物やヒトも感染源となる [4, 7–9]。

4. 病原性

C. bovis は感染力が非常に強く、施設に侵入すると感染が急速に拡大し、マウスの罹患率は80–100%になる。一方、死亡率は低く、感受性が高いヌードマウスでも離乳後の死亡率は1%以下である [7, 18]。ただし、哺乳マウスでは死亡率が高く100%に達する [16]。

ヌードマウスが*C. bovis* に暴露されると7–10日で、核が消失した角質細胞が肥厚・剥離し、黄白色の小薄片となって皮膚に付着した鱗屑性皮膚炎を発症する。この皮膚炎は、その皮膚の状態から、「ウロコ状の皮膚 (scaly skin)」 [7]、「トウモロコシの皮を除いたひき割り粉を塗した皮膚 (cornmeal coating)」 [8] あるいは、「粉吹き症」などの俗称で呼ばれることもある。皮膚病変は主に背部、側腹部および鼻口部に発現するが、重症例では全身に拡大する。

皮膚症状は発症後7–10日で自然に消失するが、臨床症状が消失した後も、感染した動物は長期間菌を排泄する。

皮膚症状以外には、体重減少 (食欲減退が原因と

推測されている), 飲水量の増加, 結膜の充血, 掻痒, 脱毛, 皮膚(眼と耳の周囲)の紅斑などが臨床症状として報告されている [7, 9, 10, 18, 19]。

病理組織学的には, 鱗屑性皮膚炎と関係する中程度の正角化亢進(核が消失した角化層の肥厚)と重度の有棘層肥厚(アカントーシス)が表皮で認められる。臨床症状が回復しても, アカントーシスは持続する。真皮には, マクロファージ, 好中球, リンパ球, プラズマ細胞, 肥満細胞などの軽度浸潤が認められる。また, 頻度は低いが毛包の扁平上皮化生も観察される。角化層には分岐状あるいは柵状に配列したグラム陽性菌が観察される [3, 7]。

C.bovis は免疫不全動物等の日和見感染と考えられており, ヌードマウスは感受性が高く, 重度の皮膚炎を発症する。しかし, 免疫機能に異常がないヘアレスマウス (SKH-1) でもヌードマウスと同様の皮膚炎を発症する。一方, SCID や NOD-scid などの免疫不全マウスはヌードマウスやヘアレスマウスよりも症状が軽度である [3, 7, 19]。

C.bovis に感染した動物では, 前述したような種々の臨床症状や病理組織学的所見に加え, 腫瘍の移植性低下, NK 活性への影響, 化学療法剤の毒性/効果の変化や死亡率の増加等の影響も報告されており [9, 10], 感染動物を実験に使用することは避けるべきである。

C.bovis 感染による皮膚炎の発症には, 皮膚の細菌叢, 湿度, ケージの種類, 被毛の発育サイクルなど多くの要因が関与していると考えられているが, まだ十分に解明はされていない [3, 7]。無毛である SKH-1 マウスがヌードマウスと同様の皮膚炎を発症することや, マイクロアイソレーションケージで飼育したマウスの方が発症しやすいこと等から, 無毛であることや湿度などが発症に重要な要因であることを示唆した報告もある [7]。

C.bovis に感染したヌードマウスやヘアレスマウスに見られる皮膚炎と同様の症状は *Staphylococcus xylosum* など他の微生物感染でも認められる [17] ため, 的確な微生物学的診断と組織学的検査が重要である。

5. 発生状況

C.bovis による感染症の報告は, 1976 年のヌードマウスへの感染が最初とされている [3]。

日本では, 1982 年 (Magaribuchi *et al.*) [14] および 1984 年 (Nomura) [15] に発生報告がある他, 2010 年 3 月に当研究所で 7 ヶ月間, アイソラックで飼育していた NOG マウスで感染を確認した [21]。

海外では, アメリカで 1990 年と 1995 年にヌード

マウスの発生例が報告され [7, 10, 16], 2006 年には 500 を超える北米の施設の検査から, 試料数にして 2.7% で陽性であったという報告がある [6]。2011 年には癌の研究施設で飼育しているマウス, ラットの各系統について感染状況を調査し, 免疫不全マウス以外にもヌードラットや SD ラットでの感染が確認されている [3]。また, イタリアでは, 1995 年に数か所のヌードマウス飼育施設での発症例 [18] が, 1998 年には, 異なる 6 繁殖場から導入した SCID マウスの発症例 [19] が報告されている。さらに, 1999 年には C57BL/6, BALB/C などマウスの感染例も報告されている [12]。

一方, 実験動物以外のげっ歯類については, 1999 年, ペットとして飼育されていたコマネズミの皮膚炎から *C.bovis* が分離された症例が報告 [11] されているが, 研究は進んでおらず, 感染実態の詳細は不明である。

6. 検査方法

C.bovis は培養検査や PCR による同定が可能である。採材は動物の皮膚, 糞便, 口腔はもとより汚染環境中や汚染腫瘍株等からも可能である。皮膚のふき取り, スクレーパーによる皮膚の採取および口腔のふき取りで培養検査を比較したところ, 無毛マウスでは皮膚のふき取りが, 有毛マウスでは口腔のふき取りの方が検出率が高いと報告されている [3]。汚染動物室中での落下細菌検査やエアサンプラーを用いた検査でも検出可能である [4]。

ハートインフュージョン寒天培地や血液寒天培地で培養するとコロニーは小さく針頭大だが, 二酸化炭素 5% 存在下, もしくは培地に tween80 を 0.1 ~ 1% 加えることにより発育が促進されることが報告されている [2, 20]。*C.bovis* は培養検査をしてもしばしば他の菌によって覆い隠されてしまうため [18], 採材前にアルコールで皮膚を消毒することにより共生細菌を減らすことが有効とされている [1]。

市販の生化学性状検査キットで同定は可能とされており [18], 少なくともグラム染色, コロニー形態, カタラーゼ産生, 硝酸還元, Tween80 を加えた培地での発育促進, β ガラクトシダーゼ産生を確認する必要がある [20]。なお, 弊社で分離された株では生化学性状では同定不能であり, PCR 検査もしくは 16SrRNA のシークエンスによる同定が有用であった。PCR 検査は腫瘍株, 環境のふき取り材料等からも検出可能である。なお, PCR 検査は同定が難しい場合や他の菌によって覆い隠されるような場合でも検出が可能である。

7. 感染対策

免疫不全動物では定期的な微生物学的モニタリングが望ましいと思われる。また、菌の除染には帝王切開や胚移植が有効である。テトラサイクリンやエンロフロキサシン、アンピシリンなどの抗生物質が有効であり [7]、これらによって症状を緩和することが可能である [5]。一方、アモキシシリン配合食やペニシリン-ストレプトマイシンスプレーは予防効果が無く、治療効果も限定的だったという報告がある [3]。

当社では免疫不全動物において感染を経験したが、感染拡大を防ぐために、発症個体を隔離し、数系統の免疫不全動物を一緒に飼育していたものを系統ごとに分離して飼育するようにして一定の効果をあげた。また、給餌飼料の頻度を高めたり、動物取扱前の手指消毒を徹底することも感染拡大防止に効果があった。

C. bovis 高圧蒸気滅菌や汚染器具の廃棄、次亜塩素酸系の消毒薬による施設の消毒が有効との報告 [18] があるがアルコール消毒は推奨されていない [9]。

C. bovis は環境中で長期にわたって生存することが懸念され、汚染されたマイクロアイソレータユニットなどで除染が不完全な場合に感染が起きた事例 [7] が報告されていることから十分な除染対策を講じる必要がある。その除染の有効性は PCR や培養検査によって確認する [5] ことが良いと報告されている。

8. 終わりに

C. bovis は情報が少なく、多くの国内施設において検査統御の対象として考えておらず、潜在的に汚染されている施設があるものと思われる。一度施設が汚染されると除染は難しいが、日和見感染として症状を併発すれば、癌や免疫系の研究成績に影響を与えるばかりではなく、動物に無用な苦痛を与え、動物福祉の観点からも好ましくないとされる。国内の検査体制を整えて行くとともに、感染実態を調査し、総合的な対策を講じて行く必要がある。これを機会に多くの施設が関心を持ち、本菌に関する研究を進めることを望んでいる。

参考文献

1. Besch-Williford, C., and Franklin, C. L. 2007. Aerobic gram-positive organisms, pp 389–406. *In: The mouse in biomedical research*, vol. 2, 2nd ed.: diseases. (Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W., and Smith A. L. eds.), Academic Press, New York.
2. Brooks, B. W. and Barnum, D. A. 1984. Characterization of strains of *Corynebacterium bovis*. *Can. J. Comp. Med.* 48: 230–232.
3. Burr, H. N., Lipman, N. S., White, J. R., Zheng, J., and Wolf, F. R. 2011. Strategies to prevent, treat, and provoke *Corynebacterium*–associated hyperkeratosis in athymic nude mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50: 378–388.
4. Burr, H. N., Wolf, F. R., and Lipman, N. S. 2012. *Corynebacterium bovis*: epizootiologic features and environmental contamination in an enzootically infected rodent room. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51: 189–198.
5. Charles river. [Internet]. Technical sheet: *Corynebacterium bovis*. [Cited 19 Feb. 2014]. Available at http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm_ld_r_corynebacterium_bovis
6. Clifford, C. B., and Cosentino, J. M. 2006 Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice. Abstracts of scientific papers 2006 AALAS National Meeting 45: 86.
7. Clifford, C. B., Walton, B. J., Reed, T. H., Coyle, M. B., White, W. J., and Amyx, H. L. 1995. Hyperkeratosis in athymic nude mice caused by a coryneform Bacterium: microbiology, transmission, clinical signs, and pathology. *Lab. Anim. Sci.* 45: 131–139.
8. Dole, V. S., Henderson, K. S., Fister, R. D., Pietrowski, M. T., Maldonado, G., and Clifford, C. B. 2013. Pathogenicity and genetic variation of 3 strains of *Corynebacterium bovis* in immunodeficient Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52: 458–466.
9. Field, G. 2006. An update on scaly skin disease. *ACLAM News.* 37: 5–8.
10. Field, K., Greenstein, G., Smith, M., Herrmann, S., and Gizzi, J. 1995. Hyperkeratosis-associated coryneform in athymic nude mice. *Lab. Anim. Sci.* 45: 469.
11. Gobbi, A. 1999. *Corynebacterium bovis* infection in waltzing mice. *Lab. Anim. Sci.* 49: 132.
12. Gobbi, A., Crippa, L., and Scanziani, E. 1999. *Corynebacterium bovis* infection in immunocompetent hirsute mice. *Lab. Anim. Sci.* 49: 209–211.
13. Collins, M. D., and Cummins, C. S., 1986. Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann 1896, 350 pp. 1266–1276. *In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, (Sneath, P. H., Mair, N.S., Sharpe, M. E., and Holt, J.G. eds.), Williams & Wilkins,

- Baltimore.
14. Magaribuchi, T., Matsui, T., Takano, M., Suzuki, K., and Koshimizu, K. 1982. Skin disease of nude mice caused by *Corynebacterium* sp. 17th Annu. Sci. Meeting. Jeara, Kagoshima, Japan.
 15. Nomura, T. 1984. Genetic and microbiological control of immunodeficient laboratory animals. pp. 160–171. *In: Immune-deficient animals, 4th international workshop on immune-deficient animals in experimental research* (Sordat, B. ed.), S. Karger, Basel.
 16. Richter, C. B., Klingenberger, K. L., Hughes, D., Friedman, H. S., and Schenkman, D. I. 1990. D2 coryneforms as a cause of severe hyperkeratotic dermatitis in athymic nude mice. *Lab. Anim. Sci.* 40: 545.
 17. Russo, M., Invernizzi, A., Gobbi, A., and Radaelli, E. 2013. Diffuse scaling dermatitis in an athymic nude mouse. *Vet. Pathol.* 50: 722–726.
 18. Scanziani, E., Gobbi, A., Crippa, L., Giusti, A. M., Giavazzi, E., Cavalletti, E., and Luini, M. 1997. Outbreaks of hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice in northern Italy. *Lab. Anim.* 31: 206–211.
 19. Scanziani, E., Gobbi, A., Crippa, L., Giusti, A. M., Pesenti, E., Cavalletti, E., and Luini, M. 1998. Hyperkeratosis-associated coryneform infection in severe combined immunodeficient mice. *Lab. Anim.* 32: 330–336.
 20. Watts, J. L., Lowery, D. E., Teel, J. F., and Rossbach, S. 2000. Identification of *corynebacterium bovis* and other coryneforms isolated from bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.* 83: 2373–2379.
 21. Yoshida, A., Yamagishi, H., Baba, A., Monnai, M., Ishimma, C., Sakamaki, Y., Nomaki, H., Ito, T., Watanabe, T., and Nakura, M. 2011. Skin lesion in NOG mice housed long-term. *Exp. Anim.* 60: 306.