

氏 名 (国 籍)	T O H O (ベトナム社会主義共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 3 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 1 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Molecular Epidemiology of Q Fever and Immunochemistry of <i>Coxiella</i> <i>burnetii</i>
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉 副査 帯広畜産大学 教 授 白 幡 敏 一 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 小 川 益 男 副査 岐 阜 大 学 教 授 源 宣 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

Coxiella burnetii は人畜共通病原体で世界各国に広く分布している。宿主域は家畜、愛玩動物、鳥類など極めて広い。感染動物は微熱などの軽い症状を示すが、ヒトの本症は急性呼吸器疾患、肝炎、心内膜炎などを示し、欧米では古くから重要な疾患として関心が高い。日本では1950年代にヒトおよび家畜にCF抗体が低率に検出されたが、ヒトや動物の症例がなく、日本にはQ熱(コクシエラ症)が存在しないと考えられていた。著者の属する研究室では、1990年からヒトと動物に*C. burnetii*に対する抗体が高率に検出されること、また、ウシの生乳から本菌が分離されることから、日本にも本症が存在することを示唆してきた。著者は異型肺炎患者の血清学的および病原学的研究、ウシの各種材料や牧場のダニから病原体分離、分離株のリポ多糖体およびポリペプチドの性状、ならびに分離株の生物学的および免疫化学的性状について明らかにした。

小児の異型肺炎患者58名の血清について血清学的および病原学的に解析した。抗体検出は間接蛍光抗体法(IF)、遺伝子検出はnestedPCR法および分離はマウスで行った。IF抗体は58例中20例が陽性を示した(34.5%)。このうちIgM抗体は13例から、またIgMおよびIgG抗体は7例から検出された。遺伝子および本菌は23 (39.7%)から検出された。3例は抗体が陰性で、遺伝子検出および分離が陽性であった。したがって、PCR法による

遺伝子検出はIF法や分離に比較して迅速診断に応用できると考えられた。このように、日本の呼吸器疾患患者、特に小児の異型肺炎患者にQ熱が存在することを病原学的に明らかにした。

ウシの各種材料や牧場のダニから病原体の分離を試みた。繁殖障害牛の生乳214検体中36例(16.8%)、子宮スワブ61検体中13例(21.3%)、健康牛乳房50検体中4例(8%)、流産胎子4検体中2例(50%)およびダニ15プール検体中4例(26.7%)から*C. burnetii*が分離された。したがって、日本の家畜およびダニに本菌が広く存在することを病原学的に明らかにした。

分離12株のモルモットに対する病原性を発熱と脾臓および精巣の腫脹を指標として調べた。3株(3M, 60M, 53U)は高熱(40℃以上)と脾臓および精巣の重度な腫脹が、2株(58T, 605P)は微熱(38.9-39.9℃)および脾臓の軽度な腫脹が、また7株(1M, 27M, 82M, 50F, 57T, TK-1P, 307P)は正常体温を示したが4株に脾臓の軽度な腫脹が認められた。このことから、日本には病原性の異なる*C. burnetii*が存在する可能性が示唆された。

日本分離株の生化学的および免疫学的性状を国外分離株と比較解析した。まず、分離株の大量培養法および精製法を確立した。すなわち、本菌を発育鶏卵で3代から5代継代後さらにBGM細胞で3代から5代継代すると最もよく増殖することが判った。また、精製はWilliamsの方法を改良し蔗糖およびリノグラフィン密度勾配遠心法により行った。

国内分離9株のリポ多糖体(LPS)は5株(3M, 53U, 307P, TK-1P, 1M)がI相、2株(27M, 82M)がII相および2株(50F, 58T)が中間型のパターンに分けられた。新鮮株は強毒のI相菌であるが、*in vitro*で50代以上継代すると弱毒のII相菌に相変異することが知られている。国内分離株はわずか4代から5代の継代歴でもII相菌のLPSパターンを示すことから、病原性の弱いII相菌が野外に存在する可能性が示唆された。

国内分離12株のポリペプチドを国外分離13株と比較解析した。国内分離株は分子量約8 kDaから137 kDaの広い範囲に認められ、主要ポリペプチドは13, 15.7, 19.5, 28, 29.5, 45 および 67 kDaであった。その他微量な30 から40のポリペプチドが検出された。29.5 kDa以上のポリペプチドパターンは国外分離株と同一であったが、29 kDa以下の低分子領域のポリペプチドは国外分離株も含めて株による相異が認められ、5群に分けられた。

国内分離12株のポリペプチドの抗原性状を感染マウス耐過血清のイムノブロッティングにより国外分離13株と比較解析した。交差反応から本菌は5群に大別された。1群には国内および国外分離株を含め牛乳、流産胎子、ダニおよび急性Q熱患者由来の17株が属した。2群には国外の急性Q熱患者由来株および羊流産胎盤由来2株が属した。3、4 および 5 群には慢性Q熱患者由来6株が属した。したがって、*C. burnetii*にはポリペプチドの抗原性状の異なる株が存在することをはじめて明らかにした。なお、国内分離株は急性Q熱由来株と同一の反応を示した。

以上の結果を総合すると、日本にQ熱(コクシエラ症)が存在することを病原学的に証明し、また、国内外の*C. burnetii*には生物学および免疫化学的性状の相異なる株があることを明らかにした。本研究の成果はコクシエラ菌の病原性発現機構の基盤になり、また、コクシエラ感染症の制御に基礎資料を提供すると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

Coxiella burnetii は人畜共通病原体で世界各国に広く分布している。宿主域は家畜、愛玩動物、鳥類など極めて広い。感染動物は微熱などの軽い症状を示すが、ヒトの本症は急性呼吸器疾患、肝炎、心内膜炎などを示し、欧米では古くから重要な疾患として関心が高い。日本では1950年代にヒトおよび家畜にCF抗体が低率に検出されたが、ヒトや動物の症例がなく、日本にはQ熱(コクシエラ症)が存在しないと考えられていた。著者の属する研究室では、1990年からヒトと動物に*C. burnetii*に対する抗体が高率に検出されること、また、ウシの生乳から本菌が分離されることから、日本にも本症が存在することを示唆してきた。著者は異型肺炎患者の血清学および病原学的研究、ウシの各種材料や牧場のダニから病原体分離、分離株のリボ多糖体およびポリペプチドの性状、ならびに分離株の生物学および免疫化学的性状について明らかにした。

小児の異型肺炎患者58名の血清について血清学および病原学的に解析した。抗体検出は間接蛍光抗体法(IF)、遺伝子検出はnestedPCR法および分離はマウスで行った。IF抗体は58例中20例が陽性を示した(34.5%)。このうちIgM抗体は13例から、またIgMおよびIgG抗体は7例から検出された。遺伝子および本菌は23(39.7%)から検出された。3例は抗体が陰性で、遺伝子検出および分離が陽性であった。したがって、PCR法による遺伝子検出はIF法や分離に比較して迅速診断に応用できると考えられた。このように、日本の呼吸器疾患患者、特に小児の異型肺炎患者にQ熱が存在することを病原学的に明らかにした。

ウシの各種材料や牧場のダニから病原体の分離を試みた。繁殖障害牛の生乳214検体中36例(16.8%)、子宮スワブ61検体中13例(21.3%)、健康牛乳房50検体中4例(8%)、流産胎子4検体中2例(50%)およびダニ15プール検体中4例(26.7%)から*C. burnetii* が分離された。したがって、日本の家畜およびダニに本菌が広く存在することを病原学的に明らかにした。

分離12株のモルモットに対する病原性を発熱と脾臓および精巣の腫脹を指標として調べた。3株(3M, 60M, 53U)は高熱(40℃以上)と脾臓および精巣の重度な腫脹が、2株(58T, 605)は微熱(38.9-39.9℃)および脾臓の軽度な腫脹が、また7株(1M, 27M, 82M, 50F, 57T, TK-1, 307)は正常体温を示したが4株に脾臓の軽度な腫脹が認められた。このことから、日本には病原性の異なる*C. burnetii*が存在する可能性が示唆された。

日本分離株の生化学的および免疫学的性状を国外分離株と比較解析した。まず、分離株の大量培養法および精製法を確立した。すなわち、本菌を発育鶏卵で3代から5代継代後さらにBGM細胞で3代から5代継代すると最もよく増殖することが判った。また、精製はWilliamsの方法を改良し蔗糖およびリノグラフィン密度勾配遠心法により行った。

国内分離9株のリポ多糖体 (LPS)は 5 株(3M, 53U, 307, TK-1, 1M)が I 相, 2 株(27M, 82M)がII 相 および 2 株 (50F, 58T) が中間型のパターンに分けられた。新鮮株は強毒の I 相菌であるが、*in vitro* で 50 代以上継代すると弱毒の II 相菌に相変異することが知られている。国内分離株はわずか 4 代から 5 代の継代歴でもII 相菌のLPS パターンを示すことから、病原性の弱い II 相菌が野外に存在する可能性が示唆された。

国内分離 12 株のポリペプチドを国外分離13株と比較解析した。国内分離株は分子量約 8 kDaから137 kDa の広い範囲に認められ、主要ポリペプチドは 13, 15.7, 19.5, 28, 29.5, 45 および 67 kDa であった。その他微量な30 から40のポリペプチドが検出された。29.5 kDa 以上のポリペプチドパターンは国外分離株と同一であったが、29 kDa 以下の低分子領域のポリペプチドは国外分離株も含めて株による相異が認められ、5群に分けられた。

国内分離 12 株のポリペプチドの抗原性状を感染マウス耐過血清のイムノブロットティングにより国外分離13株と比較解析した。交差反応から本菌は5群に大別された。1群には国内および国外分離株を含め牛乳、流産胎子、ダニおよび急性Q熱患者由来の17株が属した。2 群には国外の急性Q熱患者由来株および羊流産胎盤由来 2 株が属した。3、4 および 5 群には慢性Q熱患者由来6株が属した。したがって、*C.burnetii*にはポリペプチドの抗原性状の異なる株が存在することを始めて明らかにした。なお、国内分離株は急性Q熱由来株と同一の反応を示した。

以上の結果を総合すると、日本にQ熱（コクシエラ症）が存在することを病原学的に証明し、また、国内外の*C.burnetii*には生物学的および免疫化学的性状の相異なる株があることを明らかにした。本研究の成果はコクシエラ菌の病原性発現機構の基盤になり、また、コクシエラ感染症の制御に基礎資料を提供すると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。