

氏 名 (国籍)	Pudjiatmoko (インドネシア共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第39号
学 位 授 与 年 月 日	平成9年3月14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 Epidemiology of Feline Chlamydiosis and Molecular Taxonomy of <i>Chlamydia psittaci</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 品川 森一 副査 岩手大学 教授 品川 邦汎 副査 東京農工大学 教授 本多 英一 副査 岐阜大学 教授 源 宣之

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

クラミジア(*Chlamydia*)は特有な増殖環を有する偏性細胞内寄生性微生物である。クラミジア属には現在4種、*C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* および *C. pecorum* が知られている。*C. trachomatis* および *C. psittaci* はヒトの病原体である。*C. psittaci* は鳥類およびネコ、モルモット、ウシ、ヒツジなど種々の哺乳類の病原体である。*C. pecorum* はウシ、ヒツジ、ブタおよびコアラに様々な疾病を引き起こす。*C. psittaci* には各鳥種および動物種の他に爬虫類と両生類からの分離株も含まれ、多彩な特性を示す。最近、ハムスターやブタから *C. trachomatis* が、また、ウマおよびコアラから *C. pneumoniae* が分離された。これら多種多様な宿主由来クラミジアの遺伝学的な系統発生については進展していない。本研究の目的は、1) *C. psittaci* の日本のネコにおける最近の侵淫状況を明かにし、抗原多様性を解析すること、2) 動物由来クラミジアのDNA多型性を明かにすること、3) クラミジアの分子生物学的な系統発生を解明すること、および4) 簡便で迅速な種の検出・同定法を確立することである。

ネコのクラミジア感染症の侵淫状況を明かにするため、11県で1985年および1993年から1995年に収集された232血清について検索した。ネコ由来6株、トリ・モルモット由来*C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* および *C. trachomatis* の各1株を抗原とし、間接蛍光抗体法により抗体を検出した。IgG抗体陽性率は1985年に34.4%、1993年から1995年は16.5%から

21.4%であった。IgM抗体は1985年に8.2%，1993年から1995年に6.6%から14.3%であった。ネコ由来6株に対する抗体の反応性は株により異なっていた。以上の結果から、日本のネコにクラミジア感染症が広く存在し、また抗原の多様性があることを血清疫学的に示唆した。

ネコ由来株の多様性を解析するため、多型DNAランダム増幅 (random amplification of polymorphic DNA, RAPD) フィンガープリンティングを行なった。ネコ由来6株、トリ由来10株、ヒツジおよびモルモット由来各1株のDNAを10ヌクレオチド(nt)プライマーおよび>18-ntプライマーにより増幅した。RAPDにより *C. psittaci* は4つのグループに分けられた。グループIはオウム、インコ、ヒト、ハトおよびシチメンチョウ由来株、グループIIはインコおよびヒツジ由来株、グループIIIはネコ由来株およびグループIVはモルモット由来株であった。さらに、ネコ由来株には2つの型が示された。以上の結果から、RAPD型別はクラミジア感染症の分子疫学的研究に有用であることを示唆した。

クラミジアの分子系統発生を明かにするため、16S rRNA遺伝子の塩基配列を比較解析した。クラミジア属27株の16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読し、遺伝子データベースから得た7株の配列と共に解析した。その結果、クラミジアには少なくとも8つの遺伝学的グループが存在し、これらのグループは2つのクラスターを構成した。第1のクラスターは5つのグループ、*C. pecorum*, *C. pneumoniae*, トリ-ヒト-ヒツジ由来 *C. psittaci*, ネコ由来 *C. psittaci* およびモルモット由来 *C. psittaci* グループであった。第2のクラスターはヒト由来 *C. trachomatis*, ブタ由来 *C. trachomatis* およびげっ歯類由来 *C. trachomatis* グループから構成されていた。各グループ内の株間の遺伝距離は互いに同様であった。以上の結果は著者が所属する研究室の以前の成績、ゲノムDNA、主要外膜タンパク質遺伝子および生物型と良く一致した。したがって、クラミジアを分類する基準の一つに16S rRNA遺伝子の遺伝距離が重要であることを明かにした。

遺伝学的グループを同定するため、16S rRNA遺伝子由来プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を開発した。1次PCRにより16S rRNA遺伝子を増幅し、属特異的およびグループ特異的プライマーをそれぞれ用い2次増幅を行った。3種のプライマーを同時に用い、1回の反応でトリ-ヒト-ヒツジ由来株、ネコ由来株およびモルモット由来株をそれぞれ同定することができた。本法はヒトの咽頭拭液、インコの肝臓およびカラスの糞からトリ-ヒト-ヒツジ由来株グループのクラミジアを、また、ヒトの咽頭拭液およびネコの結膜擦過物からネコ由来株グループのクラミジアを検出同定することができた。以上の結果から、本法はクラミジアの検出同定法として有用であることを示唆した。

以上の結果を総合すると、日本のネコにクラミジア感染症が蔓延していること、ネコ由来クラミジアには多様性が存在すること、クラミジアは遺伝学的な系統発生から8つのグループから成り、これらのグループは2つのクラスターを構成していることが明らかになった。さらに、各遺伝学的グループの検出・同定法を確立した。本研究の成果はクラミジアの分類を再構築する基盤になり、クラミジア感染症制圧の基礎資料になると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

クラミジア (*Chlamydia*) は特有な増殖環を有する偏性細胞内寄生性微生物である。クラミジア属には現在4種、*C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* および *C. pecorum* が知られている。*C. trachomatis* および *C. psittaci* はヒトの病原体である。*C. psittaci* は鳥類およびネコ、モルモット、ウシ、ヒツジなど種々の哺乳類の病原体である。*C. pecorum* はウシ、ヒツジ、ブタおよびコアラに様々な疾病を引き起こす。*C. psittaci* には各鳥種および動物種の他に爬虫類と両生類からの分離株も含まれ、多彩な特性を示す。最近、ハムスターやブタから *C. trachomatis* が、また、ウマおよびコアラから *C. pneumoniae* が分離された。これら多種多様な宿主由来クラミジアの遺伝学的な系統発生については進展していない。本研究の目的は、1) *C. psittaci* の日本のネコにおける最近の侵淫状況を明らかにし、抗原多様性を解析すること、2) 動物由来クラミジアのDNA多型性を明らかにすること、3) クラミジアの分子生物学的な系統発生を解明すること、および4) 簡便で迅速な種の検出・同定法を確立することである。

ネコのクラミジア感染症の侵淫状況を明らかにするため、11県で1985年および1993年から1995年に収集された232血清について検索した。ネコ由来6株、トリ・モルモット由来 *C. psittaci*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae* および *C. trachomatis* の各1株を抗原とし、間接蛍光抗体法により抗体を検出した。IgG抗体陽性率は1985年に34.4%、1993年から1995年は16.5%から21.4%であった。IgM抗体は1985年に8.2%、1993年から1995年に6.6%から14.3%であった。ネコ由来6株に対する抗体の反応性は株により異なっていた。以上の結果から、日本のネコにクラミジア感染症が広く存在し、また抗原の多様性があることを血清疫学的に示唆した。

ネコ由来株の多様性を解析するため、多型DNAランダム増幅 (random amplification of polymorphic DNA, RAPD) フィンガープリンティングを行なった。ネコ由来6株、トリ由来10株、ヒツジおよびモルモット由来各1株のDNAを10ヌクレオチド (nt) プライマーおよび>18-nt プライマーにより増幅した。RAPDにより *C. psittaci* は4つのグループに分けられた。グループ I はオウム、インコ、ヒト、ハトおよびシチメンチョウ由来株、グループ II はインコおよびヒツジ由来株、グループ III はネコ由来株およびグループ IV はモルモット由来株であった。さらに、ネコ由来株には2つの型が示された。以上の結果から、RAPD型別はクラ

ミジア感染症の分子疫学的研究に有用であることを示唆した。

クラミジアの分子系統発生を明かにするため、16S rRNA遺伝子の塩基配列を比較解析した。クラミジア属27株の16S rRNA遺伝子の塩基配列を解読し、遺伝子データベースから得た7株の配列と共に解析した。その結果、クラミジアには少なくとも8つの遺伝学的グループが存在し、これらのグループは2つのクラスターを構成した。第1のクラスターは5つのグループ、*C. pecorum*, *C. pneumoniae*, トリ-ヒト-ヒツジ由来*C. psittaci*, ネコ由来*C. psittaci* およびモルモット由来*C. psittaci* グループであった。第2のクラスターはヒト由来*C. trachomatis*, ブタ由来*C. trachomatis* およびげっ歯類由来*C. trachomatis* グループから構成されていた。各グループ内の株間の遺伝距離は互いに同様であった。以上の結果は著者が所属する研究室の以前の成績、ゲノムDNA, 主要外膜タンパク質遺伝子および生物型と良く一致した。したがって、クラミジアを分類する基準の一つに16S rRNA遺伝子の遺伝距離が重要であることを明かにした。

遺伝学的グループを同定するため、16S rRNA遺伝子由来プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を開発した。1次PCRにより16S rRNA遺伝子を増幅し、属特異的およびグループ特異的プライマーをそれぞれ用い2次増幅を行った。3種のプライマーを同時に用い、1回の反応でトリ-ヒト-ヒツジ由来株、ネコ由来株およびモルモット由来株をそれぞれ同定することができた。本法はヒトの咽頭拭液、インコの肝臓およびカラスの糞からトリ-ヒト-ヒツジ由来株グループのクラミジアを、また、ヒトの咽頭拭液およびネコの結膜擦過物からネコ由来株グループのクラミジアを検出同定することができた。以上の結果から、本法はクラミジアの検出同定法として有用であることを示唆した。

以上の結果を総合すると、日本のネコにクラミジア感染症が蔓延していること、ネコ由来クラミジアには多様性が存在すること、クラミジアは遺伝学的な系統発生から8つのグループから成り、これらのグループは2つのクラスターを構成していることが明かになった。さらに、各遺伝学的グループの検出・同定法を確立した。本研究の成果はクラミジアの分類を再構築する基盤になり、クラミジア感染症制圧の基礎資料になると考えられる。

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。