

氏名(本(国)籍)	奥田 秀子(福井県)
主指導教員名	岐阜大学 教授 福士 秀人
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第371号
学位授与年月日	平成24年9月18日
学位授与の要件	学位規則第3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 Avian Chlamydiosis and Establishment of the Diagnostic System for Chlamydia psittaci Infection (オウム病の疫学および診断法確立に関する研究)
審査委員	主査 岐阜大学 教授 石黒直隆 副査 帯広畜産大学 教授 横山直明 副査 岩手大学 教授 原澤 亮 副査 東京農工大学 教授 竹原一明 副査 岐阜大学 教授 福士秀人

論文の内容の要旨

クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌である。クラミジアは様々な宿主に多彩な病原性を発揮する事が知られている。中でも *Chlamydia psittaci* が病原体となるオウム病は、鳥からヒトへと伝播する人獣共通感染症である。オウム病は感染症法において四類感染症に指定されている全数把握疾病である。オウム病は1998年以降、日本国内において年間20症例前後が報告され、数年前には集団感染が発生した。本疾病の実態を知り、制御することは、公衆衛生上重要である。オウム病は、インフルエンザ様症状や異型肺炎の病態を呈し、的確な診断・治療が遅れば重症化し、死に至ることもある。我が国において、オウム病の感染源は、その半数がインコ類であったとされているが、愛玩鳥を主体とした保菌実態調査を行った報告は少ない。一方、オウム病の診断には、病原体の探索や遺伝子診断、血清診断が実施されているが、本菌は実験室内感染の危険性が高いため、その分離同定には専門的な設備や技術が必要とされる。感染性菌体であるクラミジア基本小体を不活化し抗原として用いる微量間接蛍光抗体法(マイクロIF法)による抗体の検出が、基準法とされているが、菌体を取り扱う手技は繁雑である。さらに、クラミジア肺炎(*C. pneumoniae*を病原とする肺炎)抗体との交差反応の問題も指摘されている。これらより、臨床の現場においては早期確定診断・治療開始が困難な状況と

なっている。本研究は3章から構成されている。第1章で鳥類オウム病の実態調査を行うと共に、第2章では *C. psittaci* を検出する迅速な遺伝子診断法の開発、さらに第3章において *C. psittaci* 特異的であり且つベッドサイドレベルで診断可能な血清診断法の確立を目的とした抗原/抗体探索解析を行った。

第1章では、2005年1月から2009年12月にかけて、愛玩鳥販売業者及び動物病院から検査依頼のあった愛玩鳥、鳥類展示施設飼育鳥ならびに保護された野鳥などの検体に関して *C. psittaci* 保菌状況を調査した。各施設にて採材された、鳥の糞便もしくはクロアカスワブ、または血液のいずれかからDNAを抽出し、主要外膜タンパク質 (*ompA*) 遺伝子領域を増幅する Nested PCR 法を用いて本菌の検出を行った。全2339検体中、45検体 (1.9%) が *C. psittaci* 陽性であった。年別では、2005年2.3%、2007年1.6%、2008年0.6%、2009年4.0%の保菌率であった。鳥目別にみると、一般に愛玩鳥として飼育されているオウム目で多くの陽性が認められた。また鳥種別では、セキセイインコやオカメインコなどの小型インコ類の陽性率に比べ、大型インコ類の陽性率が高いことが判明した。

第2章では、*C. psittaci* 検出用診断法として Real-time PCR を確立した。本章では、クラミジア属内で保存性が高く、また種特異性の高い領域である Cysteine-rich envelope タンパク質をコードする *envB* 遺伝子を標的とした検出系を作出した。確立された本法は *envB* 遺伝子を挿入した精製プラスミドDNAを10コピーから定量的に検出可能とし、さらに、既知の力価のクラミジア基本小体を混入した糞便からの抽出DNAを用いて従来法と比較した結果、100倍の感度で病原菌を検出することができた。また検査時間も従来半分の時間で終わることができた。クラミジア種内の鑑別で問題となっている肺炎クラミジアの病原菌 *C. pneumoniae* との交差反応は認められなかった。ここで確立された診断法は、従来方法に比べ *C. psittaci* を迅速且つ定量的な結果を得ることを可能にした。

第3章では、*C. psittaci* Mat116株から作製したλZAPライブラリーをスクリーニングし得られた陽性クローンがコードするクラミジア蛋白質の診断用抗原としての有用性を検討した。当該クローンの塩基配列解読結果、および同株ゲノム暫定全塩基配列データを用いて解析した結果、得られたクローンはクラミジアに特異な、多型外膜タンパク質 (Polymorphic membrane protein (Pmp)) のサブファミリーとして分類される PmpGファミリーの11番目の遺伝子をコードしていた。*pmpG11* 遺伝子断片を用いてGST融合組換えタンパク質を作成、精製した組換え PmpG11を抗原としたELISAでは、マウス感染血清は用量依存性に抗体を検出することができた。この組換え抗原は、*C. psittaci* Mat116株マウス感染血清及び、*C. psittaci* 他株のウサギ感染血清それぞれに反応することがウエスタンブロット法で認められた。作成した組換え PmpG11から作出した抗血清を *C. psittaci* Mat116感染細胞および精製EBで評価したところ、予想よりも高分子量である90kDaのタンパク質を検出した。これは、PmpG11と相同性が高いが、より高分子量のPmpG12との交差反応と考えられた。PmpG12も含めた抗原性の解析が今後の検

討課題である。*C. psittaci* に対する血清力価既知のヒトオウム病患者血清を用いて、組換え PmpG11 抗原との反応性を ELISA により比較した。*C. psittaci* IgG 力価が 2048 倍以上を示していた検体については高吸光度が認められる傾向が得られた。以上より、*C. psittaci* において免疫原性を保持していたクローンは PmpG11 であることを同定・解析し、その組換え体は動物およびヒトの *C. psittaci* 感染血清と反応することを明らかにした。

本研究により、我が国の鳥類における *C. psittaci* 保菌実態が明らかにされた。従来法より迅速且つ定量的な遺伝子診断法が確立された。*C. psittaci* 診断用抗原候補 PmpG11 の解析から血清診断法確立に向けての基礎的知見が得られた。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は *Chlamydia psittaci* により引き起こされるオウム病について、鳥類における実態調査、*C. psittaci* を検出するために必要とされる迅速な遺伝子診断法の開発、ならびに *C. psittaci* 特異的であるとともにベッドサイドレベルで実施可能な血清学的診断法の確立に関して研究したものである。本論文は 3 章から構成されている。

第 1 章では、2005 年から 2009 年にかけて愛玩鳥販売業者及び動物病院から検査依頼があった愛玩鳥、展示施設飼育鳥ならびに保護野鳥などに関して、*C. psittaci* 保菌状況を調査した。全 2339 検体中、45 検体 (1.9%) が *C. psittaci* 陽性を示した。年別では、2005 年 2.3%、2007 年 1.6%、2008 年 0.6%、2009 年 4.0% の保菌率であった。鳥目別にみると、オウム目で多くの陽性が認められた。セキセイインコやオカメインコなどの小型インコ類の陽性率に比べ、大型インコ類の陽性率が高いことが判明した。

第 2 章では、*C. psittaci* 感染症に対する診断法を確立した。本研究では、クラミジア属内で保存性が高く、また種特異性の高い領域である Cysteine-rich envelope タンパク質をコードする *envB* 遺伝子を標的とした Real-time PCR 検出系を作出した。本法は *envB* 遺伝子を挿入した精製プラスミド DNA を 10 コピーから定量的に検出可能とした。さらに、既知の力価のクラミジア基本小体を混入した糞便からの抽出 DNA を用いて従来法と比較した結果、100 倍の感度で病原菌を検出することができた。検査時間は従来の半分の時間であった。

第 3 章では、*C. psittaci* Mat116 株から作製した λ ZAP ライブラリーをスクリーニングし得られた陽性クローンの診断用抗原としての有用性を検討した。得られたクローンはクラミジアに特異な、多型外膜タンパク質 (Polymorphic membrane protein (Pmp)) のサブファミリーとして分類される PmpG ファミリーの 11 番目の遺伝子をコードしていた。組換え PmpG11 は *C. psittaci* Mat116 株マウス感染血清及び、*C. psittaci* 他株のウサギ感染血清それぞれに反応した。*C. psittaci* に対する血清力価既知のヒトオウム病患者血清を用いて、組換え PmpG11 抗原との反応性を ELISA により比較した。*C. psittaci* IgG 力価 2048 倍以上の検体については高い吸光度が認められた。

以上の結果から、日本における鳥類の *C. psittaci* 保菌実態が明らかにされ、従来法より迅速且つ定量的な遺伝子診断法が確立された。*C. psittaci* 診断用抗原候補 PmpG11 の解析では、血清診断法確立に向けての基礎的知見を得ることができたと考えられた。

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があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Detection of *Chlamydophila psittaci* by using SYBR green real-time PCR
著 者 名 : Okuda, H., Ohya, K., Shiota, Y., Kato, H. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (2) : 249-254, 2010

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydophila felis*-infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats
著 者 名 : Ohya, K., Okuda, H., Maeda, S., Yamaguchi, T. and Fukushi, H.
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 146 (3-4) : 366-370, 2010