

B. 研究方法

1. サンプル・プロフィール (2004年度) : 昨年度報告した要領で収集されたカモ類サンプルは、秋田県: 5検体、新潟県: 10検体、石川県: 7検体、福井県: 7検体、北海道および青森県: 0検体の合計29検体が回収された。カモの種類としては、マガモ: 18、コガモ: 3、ヒドリガモ: 3、オナガガモ: 4、ホシハジロ: 1であった (表1)。採取期間は、2005年1月26日から2月17日までである。

2. サンプル収集 (2005年度) : 渡り鳥 (カモ類) のサンプル採取は、大日本猟友会の協力の下、北海道、青森県、秋田県、新潟県、石川県、福井県、兵庫県、島根県、山口県、福岡県、佐賀県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県、鹿児島県の16道県の方々に依頼した。

サンプルの採取と回収の方法については、ほぼ昨年度と同様であるが、ろ紙1枚だと得られるサンプル量が少ないので、今年度はろ紙2枚ずつ依頼した。また、昨年度はろ紙に血液を染みこませるのが不十分な物も見受けられたので、今年度は、その点に特に注意して採取してくれるよう依頼した。図1に同封した説明書を示す。昨年度と同様、記録用ラベルの記入も依頼した。

3. サンプル処理 (2005年度) : 1.8mlの0.5% BSA-PBSの入った2mlチューブ中に送付されてきた血液のついたろ紙2枚を入れ、4°Cで一晩、ローテーターで撹拌し抽出した。非動化した後、0.22 μ mのフィルターで濾過滅菌し、測定まで-80°Cで保存した。この場合の血清希釈はろ紙に十分血液が採取されていた場合、1:25と換算される。

4. 対照サンプル: CDCのDr. Komarより、WNV感染後のハト (Rock Dove) 血清の分与を受け、

WNV陽性対照として用いた。留鳥として、ナキアヒル (合鴨: 国内繁殖。4羽) の血清を入手し用いた。

5. 中和抗体の測定 (PRNT) : WNVはNY99-6922株、JEVはJaGA01株を用いた。25および100倍希釈サンプルとウイルス液 (200PFU/100 μ l) を等量混和し、37°C、1時間反応させた。その後、6wellプレート上のVero細胞に100 μ l/wellずつ追加、37°C、1時間培養後、セルロース添加培養液を重層し、4日間培養した。ホルマリン固定後、メチレンブルーで染色し、プラークを計数し、サンプル非添加対照のプラーク数に対するプラーク減少率を求めた。結果は、90%減少 (PRNT₉₀) を示すサンプル希釈濃度で示した。

6. 特異抗体の測定 (ELISA) : 抗原として不活化WNVまたはJEVを、96wellマイクロプレートにコーティングし、ブロッキング後サンプルを反応させた。次に、二次抗体を反応させ、OPD+H₂O₂を用いて発色を見た。二次抗体にはHRPO標識抗トリIgG-ヒツジIgG (ハト、アヒル、スズメ、ニワトリIgGで免疫。Bethyl) を用いた。

C. 研究結果

1. 2005年度のサンプル収集状況: 2006年2月27日現在、回収された血液サンプルのプロフィールを表2に示す。その内訳は、北海道: 7検体、青森県: 1、秋田県: 6、新潟県: 6、石川県: 5、福井県: 6、兵庫県: 4、島根県: 2、山口県: 9、福岡県: 12、佐賀県: 12、長崎県: 12、熊本県: 8、大分県: 10、宮崎県: 11、鹿児島県: 11の合計122検体である。カモの種類は、マガモ: 57羽、コガモ: 41、ヒドリガモ: 11、オナガガモ: 6、ハシビロガモ: 2、ホシハジロ: 1、オカヨシガモ: 1、スズガモ: 1、ヘラガモ: 1、不明: 2であった。採取期間は、昨年度の採取容器を用いて、北海道の5

検体が 2005 年 10 月 1-2 日、秋田県の 2 検体が 2005 年 11 月 1 日であったが、その他は今年度の採取容器を使用して、2005 年 11 月 29 日からとなっている。また、ろ紙に血液を染みこませるのも、昨年度より改善していた。これらのサンプルについては、すべての回収が終了した後、抗体の測定を実施する予定である。

2. 2004 年度サンプルの PRNT： 中和抗体活性を PRNT により測定したところ、WNV 感染ハト血清は、WNV に対してのみ希釈 75 倍で 90 %以上の抑制を示した（表 3）。カモサンプルは、石川県のオナガガモの 1 サンプル（検体番号 18）で、WNV に対して希釈 25 倍で 90 %以上の抑制を示したが、JEV に対しても同様に抑制を示した。他のサンプルはいずれも両者に対して 90 %以上の抑制を示さなかった（表 3）。国内産ナキアヒルも 90 %以上の抑制を示さなかった

3. 2004 年度サンプルの ELISA： 抗体を ELISA により測定したところ、WNV 感染ハト血清は、WNV に対してのみ希釈 400 倍で OD490 が 1.089 と高い値を示した（表 3）。カモサンプルは、新潟県のオナガガモの 1 サンプル（検体番号 13）で、WNV に対して希釈 100 倍で 1.239 (OD490) を示したが、JEV に対しては 0.167 と低かった。他のサンプルは、PRNT で抑制の認められた検体番号 18 を含めて、いずれも両者に対して低い値を示していた（表 3）。国内産ナキアヒルについては、どの個体も WNV および JEV に対して 1.0 以上 (OD490) を示していた。

D. 考察

渡り鳥（カモ類、2004 年度サンプル）の抗体保有状況を検討したところ、全 29 サンプルのうち 1 サンプルで、WNV に対して希釈 25 倍で 90 %以上の抑制を示した。しかしこのサンプルは JEV に対しても同様に抑制を示した。JEV な

ど他のフラビウイルスに対する抗体は WNV と交差反応を示すことが知られている。WNV の陽性対照として用いた CDC より入手した WNV 感染ハト血清では、WNV にのみ抑制を示し、JEV には抑制を示さなかった。このことから WNV および JEV に抑制を示したという結果が、本当に WNV に対する中和抗体の存在を示しているのか、それとも JEV に対する抗体の交差反応なのか、非特異的な何らかの抑制物質によるのかなど、さらに検討の必要があると考えられた。

ELISA では、CDC より入手した WNV 感染ハト血清では、WNV にのみ希釈 400 倍で 1.089 (OD490) を示した。それに対して国内繁殖のナキアヒルはすべて WNV および JEV に対して希釈 100 倍で 1.0 (OD490) 以上を示した。日本国内には JEV は常在しており国内のトリが自然界で感染している可能性もないとはいえ、ナキアヒルでの反応は JEV に対する抗体の交差反応による事も考えられた。渡り鳥サンプルでは、PRNT で抑制を示した上記サンプルとは異なる 1 サンプルが WNV に対して希釈 100 倍で 1.239 (OD490) を示した。しかしながら、この渡り鳥サンプルもナキアヒルのサンプルも、その ELISA での反応性に比べて PRNT では WNV および JEV に対して何らの抑制も見せていない。PRNT では中和抗体を、ELISA では中和活性を持たない抗体も含めてすべての抗体を測定するという、その反応性の違いはあるが、今回認められた PRNT と ELISA の結果の相違に関しては再検討する必要があると考えられた。すなわち、PRNT および ELISA、それぞれの反応の特異性に関してのみならず、Blocking ELISA や Western Blotting など、他の測定方法も用いた検証が必要であると思われた。

なお、2005 年度（回収継続中）のサンプルについては、すべての回収が終了した後、測定を実施する予定である。

E. 結論

WNV の国内への侵入に備えるため、渡り鳥(カモ類) の抗体保有状況を検討した。2004 年度末までに回収したサンプル中の WNV および JEV に対する中和抗体活性を PRNT により測定したところ、1 サンプルで、WNV および JEV に対して希釈 25 倍で 90 %以上の抑制を示した。また、ELISA では PRNT で抑制を示したサンプルとは異なる 1 サンプルが WNV に対して希釈 100 倍で 1.239 (OD490) を示した。JEV など他のフラビウイルスに対する抗体も WNV と交差反応を示すこと、またサンプル中の非特異的な抑制物質による可能性があることなどから、結果が本当に WNV に対する中和抗体や抗体の存在を示しているのか、それとも JEV に対する抗体の交差反応なのか、などについて PRNT と ELISA の結果の

整合性およびその精度の問題も含めて、さらに結果の検証が必要と考えられた。

F. 健康危害情報

なし。

G. 研究発表等

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1) 渡り鳥（カモ）サンプルの採取と回収方法に関する説明書（2005年度版）と記録用ラベル

カモ類血液サンプルの採取と送付のお願い

カモ類（留鳥・カルガモ以外）の血液を濾紙（スティック）にしみこませて、封筒に入れ、投函してください。

1. 容器の中に濾紙（スティック）が入っています。
2. 濾紙を取り出し、細い方に血液を十分しみこませます。
なるべく新鮮な血液を十分に染みこませてください。
3. 濾紙を振って、乾燥させます。
4. 濾紙を容器に戻し、ふたをしっかりと閉めます。
5. もう一本も同様にサンプルを採取します。
6. 記録ラベルに採取日・場所などを記入します。
7. ラベルを容器に巻きつけます。
8. 返信用封筒に入れ、封をして投函してください。

1つの封筒に2本の容器（1羽分）が入っています。
採取した物は、可能な限り、その日に投函をお願いします。
封筒の外側に血液が付着しないようご注意ください。

封筒にはろ紙入り容器2本、記録ラベル、返信用封筒、説明書が入っています。

まず、容器の中のろ紙を取り出します。

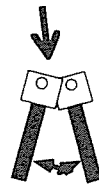
一羽につき二本お願いします

5. 返信用封筒に容器および記入用紙を入れなるべくその日のうちにポストに投函してください。
4. 記録ラベルに採取日・場所・採取者などを記入し、裏の両面テープで容器に止め、容器に巻きつけます。

1. ろ紙の細い部分全体に血を付ける



2. ろ紙を振って良く乾かす



3. ろ紙を容器に入れる。もう一本も、同様にする。



記録ラベル（記入後、チューブに巻きつけてください）				
採取日	月	日		
採取場所	市町村		採取者	責任者氏名
	地区			同住所
	メッシュ番号			協力者氏名

表1) 2004年度カモサンプルのプロファイル

a)

都道府県	検体数
秋田県	5
新潟県	10
石川県	7
福井県	7
合計	29

b)

種類	検体数
マガモ	18
コガモ	3
オナガガモ	4
ヒドリガモ	3
ホシハジロ	1
合計	29

表2) 2005年度カモサンプルのプロファイル (2005.2.27 現在)

a)

都道府県	検体数	都道府県	検体数
北海道	7	山口県	9
青森県	1	福岡県	12
秋田県	6	佐賀県	12
新潟県	6	長崎県	12
石川県	5	熊本県	8
福井県	6	大分県	10
兵庫県	4	宮崎県	11
島根県	2	鹿児島県	11
		合計	122

b)

種類	検体数
マガモ	57
コガモ	41
ヒドリガモ	11
オナガガモ	6
ハシビロガモ	2
ホシハジロ	1
オカヨシガモ	1
スズガモ	1
ヘラガモ	1
不明	1
合計	122

表3) 2004年度カモサンプルの JEV および WNV に対する中和抗体 (PRNT₉₀) と特異抗体 (ELISA)

検体	採取地	種類	PRNT (a)		ELISA (b)	
			JEV	WNV	JEV	WNV
1	秋田県河辺郡	マガモ-M	<25	<25	0.092	0.155
2	河辺郡	マガモ-M	<25	<25	0.123	0.105
3	秋田市	コガモ-F	<25	<25	0.076	0.120
4	秋田市	コガモ-M	<25	<25	0.073	0.106
5	秋田市	マガモ-M	<25	<25	0.077	0.146
6	新潟県新潟市	マガモ	<25	<25	0.130	0.272
7	新潟市	マガモ	<25	<25	0.070	0.114
8	新潟市	ヒドリガモ	<25	<25	0.077	0.253
9	新潟市	ヒドリガモ	<25	<25	0.102	0.299
10	新潟市	コガモ	<25	<25	0.075	0.122
11	南蒲原郡	オナガガモ-M	<25	<25	0.088	0.379
12	南蒲原郡	オナガガモ-F	<25	<25	0.134	0.563
13	南蒲原郡	オナガガモ-F	<25	<25	0.167	1.239
14	中之島町	マガモ-M	<25	<25	0.087	0.252
15	中之島町	マガモ-F	<25	<25	0.120	0.237
16	石川県七尾市	マガモ	<25	<25	0.075	0.174
17	七尾市	ヒドリガモ	<25	<25	0.089	0.239
18	七尾市	オナガガモ	25	25	0.061	0.153
19	七尾市	マガモ	<25	<25	0.142	0.150
20	七尾市	マガモ	<25	<25	0.190	0.261
21	七尾市	マガモ	<25	<25	0.098	0.137
22	鳥屋町	ホシハジロ	<25	<25	0.076	0.141
23	福井県春江町	マガモ-M	<25	<25	0.078	0.099
24	春江町	マガモ-M	<25	<25	0.069	0.079
25	春江町	マガモ	<25	<25	0.068	0.091
26	春江町	マガモ	<25	<25	0.071	0.091
27	坂井町	マガモ-M	<25	<25	0.085	0.120
28	春江町	マガモ-F	<25	<25	0.079	0.243
29	坂井町	マガモ-F	<25	<25	0.108	0.129
ナキアヒル -1			<25	<25	1.042	1.318
ナキアヒル -2			<25	<25	1.231	1.379
ナキアヒル -3			<25	<25	1.064	1.378
ナキアヒル -4			<25	<25	1.173	1.383
WNV感染ハト血清			<25	75	0.205 (c)	1.089 (c)

(a): PRNT90を示すサンプル希釈倍率

(b): サンプル 100倍希釈時のOD490

(c): サンプル 400倍希釈時のOD490

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症研究事業)分担研究報告書

リケッチア・クラミジアに関する研究

分担研究者	倉根一郎	国立感染症研究所 ウイルス第一部	部長
協力研究者	岸本壽男	国立感染症研究所 ウイルス第一部 第五室	室長
	安藤秀二	同	主任研究官
	小川基彦	同	主任研究官
	柳 陳堅	同	流動研究員
	佐藤 梢	同	協力研究員
	神山恒夫	国立感染症研究所獣医科学部第一室	室長
	宇根有美	麻布大学獣医学病理学教室	助教授
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司	同	助手
	松本 明	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科泌尿器病態学	特別研究員
	蔡 燕	オリエンタル酵母工業(株)長浜生物科学研究所	研究員
	岸澤有華	市立砂川病院小児科	
	渡部直己	同内科	部長
	三好正浩	北海道立衛生研究所	研究員
	上野弘志	酪農学園大学獣医公衆衛生学	助教授
	海部春樹	長崎市保健環境試験所細菌血清検査係	
	渡邊幸子	長崎市保健所	
	牟田隆也	松原牟田内科小児科	
	草場照子	聖フランシスコ病院	

研究要旨:動物由来感染症であるリケッチアならびにクラミジア関連疾患を対象に、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況の把握、サーベイランスを行うことを目的として、それらの特異的な診断法の開発と疫学調査を行った。クラミジアに関しては、本年度は蔡らが開発した *C. psittaci* を主に検出する one-step PCR 法について、特異性と感度の追加検討を行い有用性を確認した。次に人獣共通感染症として関与する可能性のある動物由来クラミジア種を網羅的に検出することを目的に、TaqMan probe 法を用いた multiplex real-time PCR による病原体検出法の開発を行った。特異性の検討や従来の PCR との感度の比較や臨床検体での実用化を検討し、有用性が示された。さらに *C. psittaci* のみを特異的に検出する TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法の開発を行い、特異性と感度の検討を行った。他に輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率について調査を行い、斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率は約 18% であることが明らかとなった。またヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株の

MOMP の特性を解析し、鳥類に高度に蔓延している血清型/遺伝子型 A はオウム病の原因となることが示唆された。事例として家族 4 名全員が肺炎を呈したオウム病感染例を経験し、臨床的検討を行った。

コクシエラに関しては、非常に高い抗体価を呈し国内感染が示唆された急性 Q 熱症例を経験し、臨床的検討を行った。感染源は特定できなかったが、国内にも典型的な急性 Q 熱症例が存在することが確認できた。

A. 研究目的

本研究では動物由来感染症であるリケチアならびにクラミジア関連疾患を対象として、動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況のサーベイランスを行うことを目的に、特異的で多検体を処理できる診断法の開発と実用化を目指し、さらに実際の検体を用いて実用性の確認を行い、疫学調査や臨床例に応用することとした。

I. クラミジアに関する研究

1. 蔡らの one-step PCR 法の特異性、感度の検討

以前蔡らが開発した Cpsi-1 と Cpsi-2 をプライマーとする one-step PCR 法(第 78 回日本感染症学会総会にて発表, 2004: 以下、蔡らの one-step PCR 法)は *C. psittaci* を主に検出し、ヒト由来のクラミジアは検出しないことは確認できていたが、その他のクラミジアや細菌等についての特異性については検討が残されていた。そこでまずこの one-step PCR 法について、特異性と感度の追加検討を行った。

2. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の検討

次に人獣共通感染症として関与する可能性のある動物由来クラミジアのすべてを検出することを目的に、TaqMan probe 法を用いた real-time PCR による病原体検出法の開発を行い、従来の PCR との比較や臨床検体

での実用化を検討した。

3. オウム病病原体 *C. psittaci* を特異的に検出する real-time PCR 法の開発

さらに *C. psittaci* のみを特異的に検出する TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法の開発を行い、特異性と感度の検討を行った。

4. 輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率についての調査

輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率について、特に斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率を検討した。

5. ヒトおよび鳥類より分離された

Chlamydophila psittaci 株 MOMP の特性の検討

ヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株の MOMP の特性を解析し、どのような株が鳥類に高度に蔓延しているか、またヒトに感染する株の特性はあるのかを検討した。

6. オウム病感染事例の臨床的検討

家族 4 名全員が肺炎を呈したオウム病感染例を経験し、臨床的検討を行った。

II. コクシエラに関する研究

コクシエラに関しては、非常に高い抗体価を呈し国内感染が示唆された急性 Q 熱症例を経験し、臨床的検討を行った。感染源は特定できなかったが、国内にも典型的な急性 Q 熱症例が存在することが確認できた。

B. 研究方法

1. 蔡らの one-step PCR 法の特異性、感度の検討

C. psittaci 6BC 株をモチーフとし、*C. psittaci* の外膜蛋白 (major outer membrane protein, MOMP) における保存領域をターゲットとして設計した。そのプライマーは次の通りである : Cpsi-1(forward): 5'-ATTGGCGTAAAC TGGTCAAGA-3' and Cpsi-2(reverse): 5'-CATTGATTAAGCGTGCTTCACC-3'。

特異性を検討するために用いたクラミジア属菌は、*C. psittaci* Cal-10, *C. psittaci* NJ 1, *C. psittaci* Bud-1, *C. abortus* B577, *C. caviae* OKM-2, *C. felis* Fe/C-56, *C. pneumoniae* TW 183, *C. pneumoniae* TWAR, *C. pneumoniae* AR39, *C. pecorum* IPA, *C. pecorum* Maeda, *C. trachomatis* A/G, *C. trachomatis* Ba/Ap, *C. trachomatis* C/TW, *C. trachomatis* Da/UW, *C. trachomatis* D/UW, *C. trachomatis* E/UW, *C. trachomatis* F/UW, *C. trachomatis* H/UW, *C. trachomatis* H/UW, *C. trachomatis* I/UW, *C. trachomatis* Ia/UW, *C. trachomatis* J/UW, *C. trachomatis* K/UW, *C. trachomatis* L1, *C. trachomatis* L2, *C. trachomatis* L2a, *C. trachomatis* L3, *C. muridarum* ならびに *C. suis* の 29 株であった。また、クラミジア属以外の一般細菌 23 株についても特異性の検討を行った。

感度については、属特異の CM1、CM2、real-timePCR と比較した。

2. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の検討

TaqMan MGB probe を用いた multiplex real-time PCR 法の開発を目的に、*C.*

psittaci 6BC 株をモチーフとし、動物由来クラミジアの 16S rRNA における保存領域をターゲットとして設計した。プライマーならびに TaqMan MGB probe の塩基配列は Table 1 に示した。

特異性試験では供試菌株は one-step PCR 法の特異性の検討と同様に 29 株のクラミジア属菌と、30 株のクラミジア以外の一般細菌を用いた。

検出感度は one-stepPCR 法の検出感度と比較検討した。また糞便からの検出についての検討として、20%クラミジア陰性鳥糞の乳剤に 10^6 乗の *C. psittaci* NJ1 の EB をスパイクし、その検出感度を one-stepPCR 法と比較検討した。

臨床検体からの検出については、動物園ならびにペットショップなどから提供された 239 検体の鳥糞サンプルを用いた。鳥糞便を SPG で 20%乳剤を調整し、その後、QIAamp stool DNA extraction Mini kit を用い、EB の DNA 抽出を行い、multiplex real-time PCR に用いた。

3. オウム病病原体 *C. psittaci* 特異的な検出法の検討

TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法として *C. psittaci* 6BC 株をモチーフとし、既知の *C. psittaci* の MOMP における保存領域をターゲットとして設計した。

特異性試験では供試菌株は上記の 29 株のクラミジア属菌と、30 株の一般細菌を用いた。

検出感度の検討は TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR 法の検出感度と比較検討した。臨床検体からの検出は現在検討中である。

4. 輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率に

ついでの調査

輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率について、特に斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率を検討した。材料と方法は平成14年10月から平成17年5月に、主に成田空港と関西空港で輸入された愛玩鳥のうち、134群を調査した。これらは、台湾、オランダ、南アフリカ等23カ国から輸入されたもので、到着時死亡鳥(1~7羽/群)を採取した。脾臓、呼吸器及び肝臓、消化管材料の3種類のプール材料について、Sepagene(三光純薬)により抽出したDNAを用い、クラミジア科検出PCRを実施した。また、当該PCR陽性検体について、*C. psittaci* 特異的プライマー(岐阜大学開発のもの)を用いたPCRを実施するとともに、呼吸器・肝臓及び消化管材料に抗生剤添加リン酸緩衝液を加えて20%乳剤を作成し、7~10日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内に接種して9~12日間培養で分離試験を実施した。開卵時に卵黄膜を回収してスタンプ標本作製し、クラミジアFA試薬「生研」(デンカ生研)を用いた蛍光抗体法(FA)による基本小体と封入体の観察及びPCRによるクラミジアの同定を行った。

5. ヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株 MOMP の特性の検討

本研究では、過去60年間に我が国および諸外国において、オウム病患者もしくは鳥類から分離された *Chlamydophila* 10株(*C. trachomatis* と *C. pneumoniae* は除く)の主要外膜蛋白質をコードする *ompA* 遺伝子全長と、プロモーターを含む領域の塩基配列を解読し、既報の各種クラミジアを含め、塩基配列および推定アミノ酸配列と既知の血清型および遺伝子型との相関を検討した。

6. オウム病感染事例の臨床的検討

オウム病感染例の臨床像の解析と、血清

学的診断、トリならびにヒト検体からの *C. psittaci* の検出を行った。また担当の衛生研究所と行政の対応を含めて協力連携をとりつつ原因究明と疫学調査を実施した。

II. コクシエラに関する研究

国内感染が示唆された急性Q熱症例の臨床像の解析を行った。また血清学的診断を各種の抗体測定系で比較検討した。感染源の特定のため疫学調査を行った。

C. 研究結果

1. 蔡らの one-step PCR の特異性、感度の検討

特異性については、本プライマーでは *C. psittaci* Cal 10 および *C. psittaci* Bud-1 には289bp相当のバンドが検出されたのに対し、*C. psittaci* NJ 1 には280bp相当のバンドが検出された。また、*C. abortus* B577, *C. caviae* OKM-2 および *C. felis* Fe/C-56 についても *C. psittaci* NJ 1 と同様に280bp相当のバンドが検出された。一方、ほかのクラミジア属 *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* ならび *C. pecorum* は検出されず、また一般細菌では増幅バンドが検出されなかった(Fig. 1)。これらのPCR産物を *AluI* で処理した結果、*C. psittaci* Cal 10 ならびに *C. psittaci* Bud-1 には211bpならび66bpの2本のバンドが検出されたのに対し、*C. psittaci* NJ 1 には202bpならび66bpの2本のバンドが検出された。また *C. abortus* B577, *C. caviae* OKM-2 および *C. felis* Fe/C-56 には異なる切断パターンが示された。

PCRのアニーリング温度を58~68℃まで検討した結果、*C. caviae* は65℃において検出できなかったが、*C. psittaci* および *C. felis* は66℃まで検出できた。(*C. abortus* は現在検討中)

検出感度を検討した結果、*C. psittaci* は 0.1pg/assay まで検出可能であり、CM1 および CM2 を用いたクラミジアやクラミドフィラ属を検出する PCR の検出感度より 10 倍高かった (Table. 2)。

2. 動物由来クラミジア感染症の病原体検出法の検討

two TaqMan MGB probe を用いた multiplex real-time PCR の特異性試験を行った結果、アニーリング温度 60°C において、動物由来クラミジアである *C. psittaci*、*C. abortus*、*C. caviae*、*C. felis* ならびに *C. pecorum* の遺伝子をすべて検出することができた。一方、アニーリング温度を 62°C に上げると、*C. pecorum* が検出されなくなった。

検出感度について検討した結果、*C. psittaci* ならびに *C. caviae* は 0.05pg/assay まで検出可能で (Fig. 2)、*C. pecorum* は 1pg/assay まで検出できた。したがって *C. psittaci* の検出感度は Cpsi-1 と Cpsi-2 を用いた one-step PCR と比較したところ、one-step PCR は 0.1pg/assay であり real-time PCR 法がやや高感度であった (Table 3)。

糞便からの検出についての検討として、20%クラミジア陰性鳥糞の乳剤に 10^6 乗の *C. psittaci* NJ1 の EB をスパイクし、その検出感度を検討した結果、multiplex real-time PCR 法は 40 個 EB まで検出可能であったのに対し、one-step PCR 法では 10^3 個 EB であった (Table 4)。

さらに、実際の臨床サンプルとしては、動物園ならびにペットショップなどから提供された鳥臨床サンプルを用い、本 multiplex real-time PCR 法で検出を試みた結果、239 検体のうち、4 検体から動物由来クラミジア

遺伝子が検出され、MOMP 領域における DNA 配列を解析した結果、その 4 検体はすべて *C. psittaci* であった。しかし、one-step PCR 法ではこれらの 4 検体はすべて陰性で検出されなかった。

3. オウム病病原体 *C. psittaci* を特異的に検出する real-time PCR 法の開発

TaqMan MGB probe を用いた real-time PCR の特異性を検討した結果、試験に用いた *C. psittaci* 株がすべて検出された、一方、ほかのクラミジア属菌は検出されなかった、また、一般細菌もすべて陰性であった。さらに、この real-time PCR の検出感度を検討した結果、0.05pg/assay まで検出可能であった。

4. 輸入鳥のオウム病クラミジアの保有率についての調査

クラミジア科検出 PCR の結果、134 群中 24 群が陽性 (17.9%) であった。種類別では、インコ類を含む群では 55 群中 11 群 (20.0%)、スズメ類を含む群では 67 群中 8 群 (11.9%)、ダチョウを含む群では 7 群中 2 群 (28.6%) が陽性であった。国別では、南アフリカが 11 群中 4 群 (36.4%) と高率で、オランダは 15 群中 5 群 (33.3%)、台湾は 47 群中 3 群 (6.4%) が陽性であった。クラミジア科検出 PCR 陽性の 24 群中 20 群で *C. psittaci* 検出 PCR 陽性 (83.3%) であった。クラミジア科検出 PCR 陽性の 24 群の分離試験では、1 群の呼吸器・肝臓及び消化管材料を接種した卵黄膜で FA 及び PCR 陽性となりクラミジア科と同定した。

5. ヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株 MOMP の特性の検討

10 株のうち 5 株 (Izawa、Itoh、N1、Nose、CP0315 株) の *ompA* 領域は同様の allele 型

を示し、*C. psittaci*血清型/遺伝子型 A の株と塩基配列およびアミノ酸配列で 99.9% の相同性を示した。鳥類との接触歴のない 2 例の肺炎患者より分類された KKCP1 および KKCP2 は同様の allele 型を示し、これらは血清型/遺伝子型 E と 99.5% の相同性を示した。ヒトのクラミジア症の流行が認められた鳥類展示施設のオウム類より分離された株は新規の *C. psittaci* 株であることが明らかになった。鼠径リンパ腫を呈した患者より分離された株は血清型/遺伝子型 E と、1944 年米国でオウム病の流行が起こった際に分離された Borg 株は血清型/遺伝子型 D とそれぞれ 100% の相同性を示していた。*ompA* 上流のプロモーター領域は全ての株において遺伝子レベルで保存されていた。

6. オウム病感染事例の臨床的検討

【症例】2005 年 3 月 26 日に 42 歳男性(症例 1)が発熱(39°C)、全身倦怠、咳嗽で近医を 27 日受診し、肺炎にてオウム病疑いと診断。N 市保健所による調査の結果、症例 1 を含む同居家族 4 名全員が呼吸器症状を呈しており、34 歳女性(症例 2)は 3 月 26 日に、72 歳男性(症例 3)と 66 歳女性(症例 4)は、4 月 1 日に発症していた。各患者の症状は、高熱、全身倦怠感、頭痛、咳嗽、咽頭痛等で、全員に胸部 X 線で肺炎が認められた。症例 1、2、3 は外来で NINO を投与され、症例 4 は、人工透析中のため入院治療となり CTM-HE の点滴投与であったが、いずれも概ね 2 週間で軽快した。

【感染源検索】飼育されていたオカメインコは、42 歳男性が、2005 年 3 月にペットショップにて購入、約 1 ヶ月飼育していたが 3 月 31 日に死んだ。インコの世話は、42 歳男性が中心に行い、34 歳女性は時々触れる程

度であった。当該ショップへの調査の結果、2005 年 1 月 1 日から 3 月 31 日までのショップの飼育鳥に異常は認めず、トリの飼育健康管理も適切であった。さらに、従業員 9 名の健康状態に特に異常はなく、顧客からの健康被害の届出もなかった。N 市保健所は、家族 4 人に対する衛生指導を実施するとともに、地域住民に対して、オウム病感染防止のための啓発活動を N 県と共に行った。

【病原体検索と確定診断】医療機関で実施した CF 抗体検査のみでは他のクラミジアとの鑑別がつかないため、インコの死骸等と、患者検体(咽頭ぬぐい液と血清)について病原体及び特異抗体に関する検索を行った。病原体検索では、インコ排泄口スワブ、糞便、肝臓、脾臓、肺から *C. psittaci* 遺伝子が PCR により検出され、分離も陽性となった。また患者血清を用いた血清学的検討では、*C. psittaci* に対する抗体価が患者 4 名全員ペア血清にて 4 倍以上の有意上昇を認め、オウム病と確診した。

II. コクシエラに関する研究

症例は 76 歳、男性。北海道在住。無職。最近の海外渡航歴および国内旅行歴なし。2005 年 5 月 6 日頃より 38°C を超える発熱を連日認め、5 月 13 日当科受診し入院。初診時 WBC 5700/mm³ と正常であったが、CRP 14.8mg/dl と高値、AST 318 IU/l、ALT 194 IU/l、 γ GTP 115 IU/l、ALP 605 IU/l と肝・胆道系酵素の上昇を認めた。右季肋部の圧痛があり、腹部エコー・CT にて胆嚢壁肥厚と胆嚢結石を認めたため、当初胆道感染症を疑いセフェム系、カルバペネム系(SBT/CPZ、MEPM)抗菌薬を使用したが無効であった。血液培養を繰り返すもすべて陰性であった。経過中炎症反応はさらに悪化し、連日の発

熱も 39℃を超えるようになり、新たに血性の浸出性胸水が出現。肝・胆道系酵素も高値で遷延していたため原因精査目的で肝生検を施行した結果、「Necrotizing granulomatous hepatitis」の病理所見が得られ、原因疾患として Q 熱の可能性が疑われた。この結果をもとに MINO の投与を開始した。当初解熱傾向等、効果も見られていたが、MINO に対する薬疹が出現したため中止し、LVFX 600mg/日投与に変更した。その後は炎症反応、肝・胆道系酵素ともに改善し、胸水も著明に減少した。その後も経過は良好で、退院後外来にて経過観察中である。

発症約 1 ヶ月後の 6 月 9 日の血清について Q 熱抗体価を民間ラボに測定依頼したところ、I 相菌 IgG 64、IgM 512、II 相菌 IgG 1024 以上、IgM 1024 以上と著明高値であり、急性 Q 熱と診断確定した。Q 熱抗体価の経時的な変化を、間接蛍光抗体法キット (Focus 社) を用いて検討したところ、5 月 16 日 (I 相菌 IgG 陰性、II 相菌 IgG 64 倍、I 相菌 IgM 陰性、II 相菌 IgM 512 倍)、6 月 9 日 (I 相菌 IgG 128 倍、II 相菌 IgG 8192 倍以上、I 相菌 IgM 1024 倍、II 相菌 IgM 8192 倍以上)、6 月 30 日 (I 相菌 IgG 512 倍、II 相菌 IgG 8192 倍以上、I 相菌 IgM 1024 倍、II 相菌 IgM 8192 倍以上)、7 月 11 日 (I 相菌 IgG 256 倍、II 相菌 IgG 8192 倍、I 相菌 IgM 2048 倍、II 相菌 IgM 8192 倍) と、急性期からの 4 倍以上の著明な抗体価上昇とともに I 相菌に比べ II 相菌に対する抗体価が明らかに高いという急性 Q 熱の抗体価推移を示した。また、ELISA キット (Panbio 社) についても検討したところ、急性期からの抗体上昇が確認されるとともに、IgG で最高値

20.85、IgM で最高値 28.02 (いずれも PANBIO UNIT) と陽性基準値 11 をはるかに超えるものであった。本症例の抗体の推移と症状は、欧米での報告例や輸入例と同様のいわゆる典型的な急性 Q 熱症例に一致し、これまでの国内報告例とは異なる点が多いと思われた。本人や患者家族の聞き取り、周辺の調査を行ったが明らかな感染源は見出せなかった。

D. 考察

クラミジアについては、動物由来クラミジア感染症として *C.psittaci* とともに動物由来の *C.abortus*、*C.caviae*、*C.felis* ヒトへの感染が報告されており、これらとヒト由来の *C.pneumoniae*、*C.trachomatis* との鑑別が可能な病原体検出法の開発は大きな意義がある。特にオウム病は感染源となる鳥類に関するデータが乏しく、また報告される症例の診断が必ずしも確実でないことなど多くの課題が残されている。本研究では、オウム病の疫学調査ならびに集団発生等での調査に対応するため、オウム病に特異的な遺伝子診断法の確立を検討してきた。蔡らの開発したプライマー、Cpsi-1 と Cpsi-2 を用いた one-step PCR 法は *C. psittaci* のみではなく、*C. abortus*、*C. caviae* および *C. felis* が検出され、また、*C. pneumoniae*、*C. trachomatis* ならび *C. pecorum* は検出されなかった。しかし、これら *C. abortus*、*C. caviae* および *C. felis* は本来鳥由来ではなく、他の哺乳動物が宿主であることから、本プライマーをトリ由来検体やオウム病疑いの患者検体に用いることに特に問題はないと考えられた。また、本 PCR 法は検出感度が従来の属特異 PCR より約 10 倍高かった。

次に今回開発した two TaqMan MGB probeを用いた multiplex real-time PCR 法は、動物由来の *C. psittaci*、*C. abortus*、*C. caviae*、*C. felis*ならびに *C. pecorum*のすべてのクラミジア遺伝子を検出可能であり、それ以外の人由来クラミジアや一般細菌は検出されなかった。また、検出感度は従来の PCR 法より優れていた。実際に陰性鳥糞便に EB をスパイクし、検出感度試験を行った結果でも、従来の PCR 法より高感度であった。ペットショップや動物展示施設から調査目的で送付された鳥糞便においても、one-step PCR に比べて検出率が高く、感度が高いことが示された。今後、multiplex real-time PCR 法を用いて、さらに臨床材料の検査データを蓄積し、サーベイランスや疫学調査における実用化を図る予定である。

さらに今回開発した TaqMan MGB probeを用いる *C. psittaci*特異的な real-time PCR 法は、*C. psittaci*以外のクラミジアや一般細菌は検出されず、*C. psittaci*のみを特異的に検出可能であった。また、その検出感度は従来の PCR 法より高かった。今後、臨床材料を用いた検査の検討を行う予定である。

今回輸入鳥のサーベイランスにおいて、斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率は約 18%であることが明らかとなった。PCR 陽性事例はインコ類を含む群に多く見られ、国内サーベイランス結果（インコ類の約 15%）と同様の傾向がみられた。また、陽性率の輸入時期による季節的変動は認められなかったが、同一時期に輸入された群で陽性率が高い傾向が認められた。クラミジア科検出 PCR で陽性であるが、*C. psittaci* 検出 PCR で陰性のものについて

は、*C. psittaci* 以外のクラミジア科の感染によるものと考えられる。クラミジア科の診断法は PCR が最も検出感度が高く、細胞培養法、発育鶏卵接種法の順であり、本調査での分離率が低かった要因として、死後長時間を経た材料では分離が困難となることが示唆された。

ヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株 MOMP の特性の検討では、鳥類に高度に蔓延している血清型/遺伝子型 A はオウム病の原因となることが示唆された。また、他の型の *C. psittaci* は自由生活を営む鳥類から偶発的にヒトへ感染し、非定型肺炎の原因となっている可能性が示唆され、非定型肺炎患者においては *C. psittaci*を鑑別対象とする必要性が明らかとなった。今後は、新しく同定された *C. psittaci*株の再分類と *C. psittaci*の哺乳動物に対する病原性について検討する予定である。

オウム病感染事例の臨床的検討では、今回のようなオウム病家族内発症事例は比較的多いが、トリの世話をしていない家族を含め、全員が肺炎を発症した事例は稀である。トリが死ぬような状況では、その直前までオウム病クラミジアが大量に排菌されていると思われ、家族全員の肺炎発症につながったものと推察される。実際に斃死したインコの保菌状況は大量排菌をうかがわせるものであった。今後も愛玩鳥の飼育者に対して、トリの飼育環境や健康状態の管理と、オウム病に対する認識の向上を求めていくことが望まれる。

コクシエラについては実態がまだ十分把握されていないのが現状であり、それは感染源と感染経路が不明な例が多いこと。国内症例の多くは外国症例と異なり抗体上昇が

著明でないと言われるが、日本の症例や株の特殊性があるのか現時点では不明なこと。客観性と再現性の高い診断システムが確立されていないこと。など明らかにすべき課題が残されている。今回我々が経験した事例は、臨床症状と高力価の血清抗体価から典型的な急性 Q 熱の一例と思われたが、残念ながら感染源や感染経路については明らかにできなかった。今後同地域で新たな症例が発生する可能性も含めて、注視していくことと、発生時の早期診断と迅速な感染源の特定が望まれる。

E. 結論

我々の開発した one-step PCR 法は、鳥由来の *C. psittaci* の検出が可能であり、オウム病が疑われるヒト検体や、トリ由来検体の検査に有用であった。また、two TaqMan MGB probe を用いた multiplex real-time PCR 法は動物由来のクラミジア遺伝子を検出可能で感度も良好であった。さらに *C. psittaci* のみを特異的に検出できる real-time PCR 法を確立した。実用化のため、さらに臨床検体での検討を進める必要があるが、これらを使い分けることで、より有効な動物、ヒト、環境、ベクター等の感染状況の把握、サーベイランスを行うことができると考えられる。

輸入鳥のサーベイランスにおいて、斃死輸入愛玩鳥類におけるクラミジア科の保有率は約 18% と高率であることが明らかとなった。輸入鳥の取り扱いには注意を要する。

ヒトおよび鳥類より分離された *C. psittaci* 株 MOMP の特性の検討では、鳥類に高度に蔓延している血清型/遺伝子型 A はオウム病の原因となることが示唆された。

コクシエラは依然として実態は不明な点が多い。今回のような典型的な急性 Q 熱の事

例の解析が、疫学調査とともに重要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表等

学会発表

1. 柳 陳堅, 安藤秀二, 小川基彦, 蔡 燕, 岸本寿男, 福士秀人: Real-time PCR 法による動物由来クラミジア遺伝子検出法の開発. 第 54 回日本感染症学会東日本地方会総会, 東京, 2005.
2. 柳 陳堅, 安藤秀二, 小川基彦, 蔡 燕, 岸本寿男, 福士秀人: Real-time PCR 法による動物由来クラミジア遺伝子検出法の開発. 第 23 回日本クラミジア研究会, 東京, 2005.
3. 米川和宏, 大野貴文, 衛藤真理子, 須永裕, 福士秀人: 輸入愛玩鳥におけるクラミジア保有状況. 第 23 回日本クラミジア研究会, 東京, 2005.
4. Rajesh Chahota, 小川寛人, 大屋賢司, 松本 明, 山口剛士, 福士秀人: ヒトおよび鳥類より分離された *Chlamydophila psittaci* 株 MOMP の特性. 第 23 回日本クラミジア研究会, 東京, 2005.
5. 海部春樹, 飯田國洋, 植木信介, 江原裕子, 島崎裕子, 渡邊幸子, 安西 仁, 武部和歌子, 牟田隆也, 草場照子, 岸本寿男, 安藤秀二: 家族 4 名全員が肺炎を呈したオウム病感染事例. 第 23 回日本クラミジア研究会, 東京, 2005.
6. 岸澤有華, 安藤秀二, 渡部直己, 三好正浩, 上野弘志, 岸本寿男: 非常に高い抗体価を呈し国内感染が示唆された急性 Q

熱症例. 第23回日本クラミジア研究会,
東京, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし。

I. 特許取得

なし。

J. 実用新案登録

なし。

K. その他

なし。

Fig. 1. One-step PCR の検出特異性



M. size marker

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. <i>C. psittaci</i> Cal 10 | 7. <i>C. pneumoniae</i> TW183 |
| 2. <i>C. psittaci</i> NJ 1 | 8. <i>C. pecorum</i> Maeda |
| 3. <i>C. psittaci</i> Bud-1 | 9. <i>C. trachomatis</i> D/UW |
| 4. <i>C. abortus</i> B577 | 10. <i>C. muridarum</i> |
| 5. <i>C. caviae</i> OKM-2 | 11. <i>C. suis</i> |
| 6. <i>C. felis</i> Fe/C-56 | 12. NTC |

One-step PCR* (蔡ら、第 78 回日本感染症学会総会にて発表, 2004)

Table 1. 動物由来クラミジアの遺伝子検出に用いたプライマーおよびプローブのシーケンス

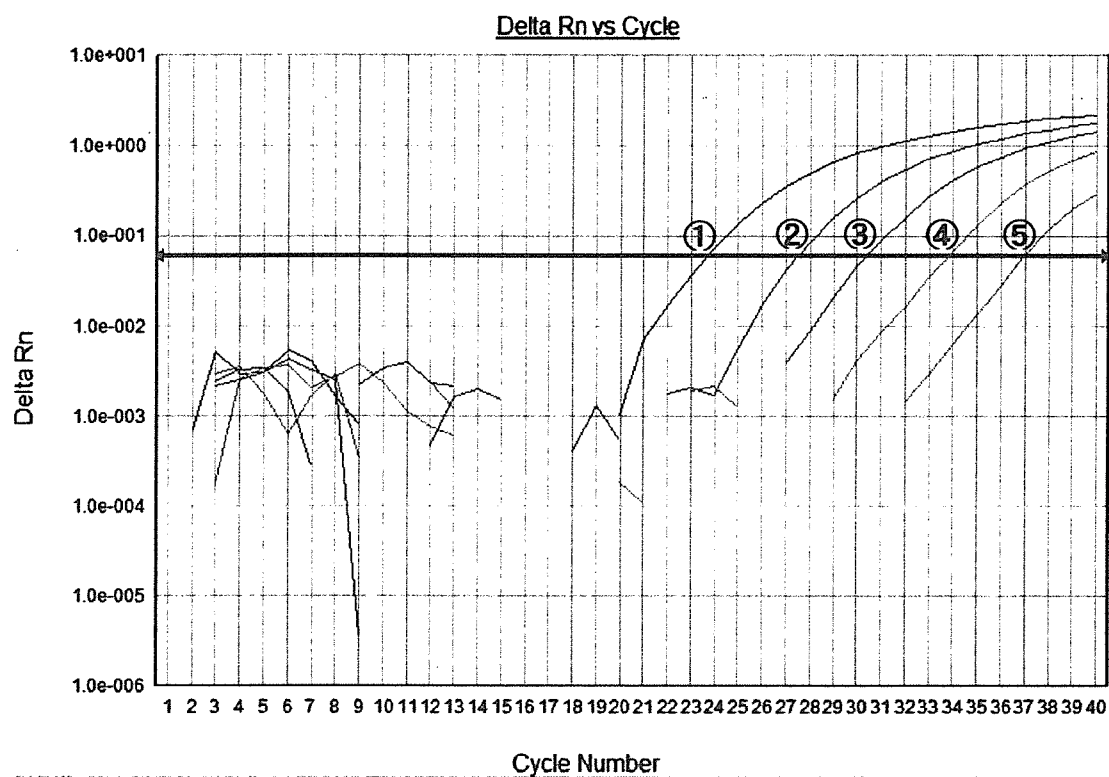
Primer/probe	Sequence 5'-3'	Dye
Psi16SF149	CGACCGCTAATACCGAATGTG	-
Psi16SR218	AAGGTCCGAAGATCCCCTTCT	-
Probe 1	TATGTTTAGGCATCTAAAAC	FAM
Probe 2	TGTGTTTAGGAATCTAAAAC	VIC

Table 2. Cpsi-1/Cpsi-2 を用いた PCR の感度試験の結果

Primer	PCR	DNA (fg/Assay)						
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
Cpsi-1/Cpsi-2	One-step	+	+	+	+	+	+	-
CM1/CM2 ^a	One-step	+	+	+	+	+	-	-

^a By Yoshida et al. 1998.

Fig. 2. multiplex real-time PCR の感度試験の結果



- ① 100 pg/assay
- ② 10 pg/assay
- ③ 1 pg/assay
- ④ 0.1 pg/assay
- ⑤ 0.05 pg/assay

Table 3. multiplex real-time PCR 法の感度試験の結果

Method	DNA pg/assay					
	100	10	1	0.1	0.05	0.01
Real-time PCR	+	+	+	+	+	-
One-step PCR*	+	+	+	+	-	-

One-step PCR* (蔡ら、第 78 回日本感染症学会総会にて発表, 2004)

Table 4. multiplex real-time PCR と One-step PCR の感度比較試験の結果
(陰性糞便中に EB をスパイクして検出)

Method	EBs count /assay							
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	(40)	(25)	10 ¹
Real-time PCR	+	+	+	+	+	+	-	-
One-step PCR*	+	+	+	+	-	-	-	-