

2009J1050A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明

ー比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 大屋 賢司

平成 22 (2010) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告	1
動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査 —研究総括と実験担当	
大屋 賢司	
II. 分担研究報告	13
動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診断法の開発と実態調査 —PC を用いたゲノム情報の解析	
福士 秀人	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	20
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	22

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）総括
研究報告書

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診
断法の開発と実態調査
—研究総括と実験担当

研究代表者：大屋 賢司 岐阜大学応用生物科学部 准教授

研究要旨：オウム病クラミジア *Chlamydophila psittaci* は、人獣共通感染症であるオウム病の原因となり、全数把握の4類感染症に指定されている。また、オウム病を始めとした動物由来クラミジアに関しては、動物における保有状況の把握が公衆衛生学上重要となるが、不明の点が多いのが現状である。本課題では、異なる動物種由来クラミジアの比較ゲノム解析および種特異的な診断法開発と実態調査を行い、自然界における存在様式を解明することを目的としている。今年度は、従来法より感度・所要時間共に向上した *C. psittaci* 遺伝子検出リアルタイムPCRの系を樹立することができた。また、血清診断用抗原候補として多型膜蛋白質 Pmp を同定し、診断用抗原としての有用性を検討した。ネコクラミジア *C. felis* に関して、ワクチン接種個体と感染個体を鑑別可能なELISAの系を確立することができた。*C. psittaci* 国内分離株の全塩基配列を決定し、比較ゲノム解析および種特異的診断法開発のための基礎的情報をえることができた。今年度の研究により、動物由来クラミジアの自然界における存在様式に迫るための技術基盤を構築することができた。

研究分担者：福士 秀人 岐阜大学応用
生物科学部 教授

研究協力者：

安藤 秀二 国立感染症研究所 ウイル
ス第一部 室長

黒田 誠 国立感染症研究所
病原体ゲノム解析センター 室長

関塚 剛史 国立感染症研究所
病原体ゲノム解析センター 研究員

A.研究目的

クラミジアは、多様な宿主体・病態を呈する。なかでも *Chlamydophila psittaci* は人獣共通感染症であるオウム病の原因となり、病原性は一般的に他種クラミジアより強く、全数把握の4類感染症に指定されている。しかしながら、*C. psittaci* に関しては、検査室レベルで実施可能な検査法が確立されておらず、5

類感染症に指定されている性器クラミジアおよび肺炎クラミジアとの鑑別が困難なことが行政上の支障となっている。また、オウム病を始めとした動物由来クラミジアに関しては、動物における保有状況の把握が公衆衛生学上重要となるが、不明の点が多いのが現状である。申請課題では、異なる動物種由来クラミジアの比較ゲノム解析および種特異的な診断法開発と実態調査を行い、自然界における存在様式を解明することを目的とする。

B.研究方法

1. リアルタイム PCR による *C. psittaci* 遺伝子検出系の開発

クラミジア外膜蛋白質 *envB* 遺伝子において、*Chlamydophila* 属内で高い相同性を示す領域を標的とするプライマーを設計した。コピー数を定量するため、pGEM-T vector に *envB* 遺伝子を挿入したプラスミド (pEnvB) を鋳型として検量線を作成した。検出感度の測定には *C. psittaci* の基本小体 (EB) を接種したトリ糞便から抽出した DNA を用いた。検出系の特異性は一般細菌を用いて検討した。動物病院から提供されたトリ糞便を用いて、従来法と比較した。

2. 動物クラミジア血清診断法の開発

2. 1. *C. psittaci* 多型膜蛋白質 Pmp の抗原性解析

C. psittaci Mat116 株多型膜蛋白質 Pmp の遺伝子塩基配列解析、及び GST

融合 Pmp 蛋白質の作製を行い、Pmp の抗原性をマウス感染血清・ウサギ免疫血清を用いて酵素抗体法 (ELISA) 及びウエスタンブロットで評価した。

2. 2. *C. felis* 感染特異抗原 CF0218 を抗原とした ELISA (CF0218-ELISA) による、*C. felis* 感染ネコとワクチン接種ネコ、非感染ネコの鑑別。

被検血清として 2005 年から 2006 年にかけて全国の動物病院に来院したネコ 714 検体の血清を用いた。血清は、飼い主への同意を得たうえで採血し、稟告によりネコクラミジアワクチンを含むワクチン接種履歴が判明している。被検血清を、*C. felis* 感染 HeLa 細胞を抗原とした間接蛍光抗体法 (IFA)、大腸菌を用いて作製した組み換え CF0218 を抗原とした CF0218-ELISA に供し、ワクチン接種歴を含め考察した。

3. 自然界における *C. psittaci* 存在状況の実態調査

鳥類の保有する *C. psittaci* 実態調査として、岐阜県獣医師会依頼の学校飼育鳥、全国の動物病院・動物園からの依頼 83 検体、及び岐阜大学内で採取した野生ハト 15 検体について実施した。これまで研究室で行ってきた方法に準じ、糞便から抽出した DNA を鋳型として nested PCR もしくはリアルタイム PCR により *C. psittaci* 遺伝子検出を試みた。

(倫理面への配慮)

クラミジアの取扱は、「クラミジア感染症の診断法開発および病態解析」として岐阜大学より組み換え DNA 実験として承認を得ている。実際の実験は、認可を得た P2 レベルの実験室・施設にて行っており、安全キャビネット内での作業等、安全対策には充分配慮している。個人情報の取扱等、人権の保護に関しては、今年度の実施項目では該当しない。申請者、研究分担者、いずれも岐阜大学大学院医学研究科が主催した「医学研究等倫理講習会」を修了しており、人患者血清の使用等必要が生じた際は岐阜大学の倫理委員会に諮ることのできる体制を整えている。

C.研究結果

1. リアルタイム PCR による *C. psittaci* 遺伝子検出系の開発

C. psittaci envB 領域を標的とした本法の検出感度を測定した結果、精製プラスミド DNA (pEnvB) は 1 コピーから検出可能であったが、定量的な検出には 10 コピー以上が必要だった (図 1)。EB を接種したトリ糞便からは 10 感染単位まで検出された。*Chlamydia* および *Chlamydophila* 属の中では、*C. psittaci* と近縁である反芻重クラミジア *C. abortus* およびネコクラミジア *C. felis* において反応が認められ、他のクラミジアでは反応が認められなかった。また、一般細菌の DNA を鋳型とした場合は全て

反応が認められなかった (表 1)。

2. 動物クラミジア血清診断法の開発

2. 1. *C. psittaci* 多型膜蛋白質 Pmp の抗原性解析

C. psittaci ライブラリーの免疫学的スクリーニングによって得られたクローンにコードされている遺伝子の配列を決定したところ、候補遺伝子は 1140 塩基対からなり、pmp をコードしていることが推定された。これは羊流産菌 (*C. abortus*) のオルソログとは全長が大きく異なっていた。大腸菌を用いて可溶性の組み換え Pmp を得ることができた (図 2A)。抗原として ELISA に供したところ、感染マウス血清の希釈倍数依存性の反応が認められた (図 2B)。また、組換え Pmp を抗原としたウエスタンブロットにおいては、感染マウス血清と同様に、他の *C. psittaci* 株免疫ウサギ血清とも反応した (図 3)。

2. 2. *C. felis* 感染特異抗原 CF0218 を抗原とした ELISA (CF0218-ELISA) による、*C. felis* 感染ネコとワクチン接種ネコ、非感染ネコの鑑別。

IFA において、714 検体中 164 検体 (23.0%) が感染細胞における封入体と反応し陽性と判定された (図 4)。

CF0218-ELISA の cutoff 値を IFA 陰性検体の吸光度より算出したところ、120 検体 (16.8%) が陽性と判定された。ネコクラミジアワクチン未接種ネコ 670 検体において、CF0218-ELISA の結果は IFA の

結果に対して、感度は 78.3% (95%信頼区間 : 74.6-80.3%)、特異性は 99.1% (同 : 98.0-99.6%) であった。これら検体における CF0218-ELISA の吸光度と IFA における抗体価は統計学的に有意に相関していた (図 5)。ネコクラミジアワクチン接種歴のある 44 検体においては、21 検体 (47.7%) が IFA 陽性であったが、3 例を除き 41 検体 (93.2%) は CF0218-ELISA 陰性であった。

3. 自然界における *C. psittaci* 存在状況の実態調査

今年度は 1 例を除き全て陰性であった。実態調査は現在も引き続き進行中である。

D. 考察

1. リアルタイム PCR による *C. psittaci* 遺伝子検出系の開発

C. psittaci envB 領域を標的としたリアルタイム PCR の系を樹立した。当研究室で用いている、主要外膜蛋白質をコードする *ompA* 遺伝子を標的とした nested PCR の系 (Chahota ら、Microbiol Immunol, 2006) における検出感度は、1 反応液あたり、クラミジア菌体 (EB) 10^4 感染単位 (IFU) であった。本法では 10 IFU と従来法より 1000 倍高感度であった。また、今回樹立したリアルタイム PCR による検出系では、ヒトのクラミジア症の原因となる肺炎クラミジア *C. pneumoniae* および性器クラミジア *C. trachomatis* は検出されなかった。 *C.*

pneumoniae および *C. trachomatis* は 5 類感染症に指定されており、4 類感染症に指定されている *C. psittaci* と鑑別可能な本法は医療行政上の有用性も高いと思われる。リアルタイム PCR は、nested PCR に比べ 1 反応で検査が終了し、また反応後の泳動による確認が不要であり検査に要する時間を大幅に短縮することができた。さらに通常の臨床検体として用いられる糞便中の一般細菌は増幅されないため、日常の検査において非常に有用であると考えられる。

2. 動物クラミジア血清診断法の開発

2. 1. *C. psittaci* 多型膜蛋白質 Pmp の抗原性解析

クラミジアの外膜蛋白質 Pmp は、*C. trachomatis* において強い免疫原性を有する菌体表面抗原として同定された。また、Pmp はクラミジアゲノム上でファミリーを形成しており、その構成はクラミジア種間で異なる。今回同定した *C. psittaci* Pmp は、他種クラミジアのオルソログと分子量、等電点が異なっている。*C. psittaci* 感染および免疫血清を用いた解析の結果、抗原性も非常に高く、*C. psittaci* 特異的な血清診断用抗原の候補として有用であり、現在解析を続けている。

2. 2. *C. felis* 感染特異抗原 CF0218 を抗原とした ELISA (CF0218-ELISA) による、*C. felis* 感染ネコとワクチン接種ネコ、

非感染ネコの鑑別。

今年度は、我々が 2008 年に同定した *C. felis* 感染特異抗原 CF0218 (Ohya ら、Clin Vaccine Immunol, 2008) の血清診断用抗原としての有用性を、飼いネコ 714 検体の血清を用いて検討した。我が国においては、*C. felis* に対する不活化ワクチンが市販されており、クラミジア精製菌体を抗原とした微量蛍光抗体法や、精製菌体、LPS、感染細胞を抗原とした IFA ではワクチン接種ネコと感染ネコの鑑別が困難である。CF0218-ELISA は、従来の IFA に比べ感度は多少劣るものの

(78%)、ワクチン接種ネコ、非感染ネコと *C. felis* 感染ネコを鑑別可能であった。CF0218 は、TMH (transmembrane head) と呼ばれるファミリーに属する。TMH ファミリーは、*C. pneumoniae* や *C. trachomatis* には存在せず、*C. abortus* や *C. psittaci* 等動物由来クラミジアに特徴的なファミリーである (*C. psittaci* に関しては、分担研究報告書を参照)。また、株間における保存性は高いものの、クラミジア種間における相同性は低い (Ohya ら、Clin Vaccine Immunol, 2008)。そのため、TMH ファミリーは、*C. psittaci* を始めとした他の動物由来クラミジア種特異的な血清診断用抗原の候補となり得ることが示唆された。

3. 自然界における *C. psittaci* 存在状況の実態調査

今年度は、十分な検体数を確保するこ

とができず、陽性例はわずか 1 検体であった。今年度樹立したリアルタイム PCR 法により、高感度、迅速な検査が可能となったため、次年度以降は各方面の協力を得て精力的に実態調査を進め、*C. psittaci* の自然界における存在様式の解明に迫りたい。

E. 結論

平成 21 年度に得られた成果の要約は以下の通りであり、次年度以降にむけた技術基盤を構築することができたと考えている。

1) *C. psittaci* 国内分離株の全ゲノム配列決定

今年度は、鳥展示施設における人への集団感染時に分離された *C. psittaci* Mat116 株の全ゲノム配列を決定した (詳細は分担研究報告書を参照)。得られた情報は、種特異的診断法開発にむけた標的決定のための貴重な情報となった。本成果は、研究代表者を筆頭演者として第 83 回日本細菌学会総会にて発表した。

2) *C. psittaci* 種特異的な血清診断用抗原候補の同定

クラミジア種間で多様性に富む、多型膜蛋白質 Pmp を *C. psittaci* において同定した。その抗原性を解析し診断用抗原としての有用性を示唆するデータをえることができた。

3) ネコクラミジア *C. felis* 血清診断法の確立

飼いネコ 714 検体を用いて、*C. felis* 感

染特異抗原として同定した CF0218 の診断用抗原としての有用性を評価した。本成果は Vet Microbiol 誌に受理された。

4) リアルタイム PCR による *C. psittaci* 遺伝子検出系の確立

C. psittaci 外膜蛋白質 *envB* 領域を標的としたリアルタイム PCR による検出系を確立し、感度・所要時間共に向上した検出系を樹立することができた。本成果は現在論文投稿中である。

5) 自然界における *C. psittaci* 存在状況の実態調査

鳥類の保有する *C. psittaci* 実態調査として、岐阜県獣医師会依頼の学校飼育鳥、全国の動物病院・動物園からの依頼鳥及び岐阜大学内で採取した野生ハトについて実施した。今年度は 1 例を除き全て陰性であった。今年度開発したリアルタイム PCR の系をもちい、実態調査は現在も引き続き進行中である。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

Ohya K, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, **Fukushi H**: Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydomonas felis* infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats. Vet. Microbiol. In press.

※クラミジア以外の人獣共通感染症および鳥類の感染症に関する発表論文は研究分担報告書に記載した。

著書

大屋賢司, 岸本寿男, **福土秀人**. オウム病. p. 121-122. In: ズーノーシスハンドブック. メディカルサイエンス社, 2009.

2. 学会発表

大屋賢司, 黒田誠, 関塚剛史, Meyers Garry, 岸本寿男, 安藤秀二, **福土秀人**: オウム病クラミジア *C. psittaci* 日本分離株の全ゲノム配列決定、第 83 回日本細菌学会総会、H22.3.27-29 (横浜)

奥田秀子, **大屋賢司**, 杉浦尚子, 山口剛士, **福土秀人**: *Chlamydomonas psittaci* 外膜蛋白質 Pmp の診断用抗原としての有用性、第 148 回日本獣医学会学術集会、H21.9.25-27 (鳥取)

大屋賢司, 奥田秀子, 前田貞俊, 山口剛士, **福土秀人**: ネコクラミジア感染特異抗原 CF0218 の診断用抗原としての有用性、第 147 回日本獣医学会学術集会、H21.4.2-4 (宇都宮)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

表 1 : 一般細菌および他のクラミジア種における反応性

一般細菌	反応	他のクラミジア種	反応
<i>Bacillus subtilis</i>	-	<i>Chlamydophila abortus</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>C. felis</i>	+
<i>Salmonella enterica</i>	-	<i>C. caviae</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-	<i>C. pecorum</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>C. pneumoniae</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	<i>Chlamydia trachomatis</i>	-
<i>Pasteurella multocida</i>	-		
<i>Proteus sp.</i>	-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-		

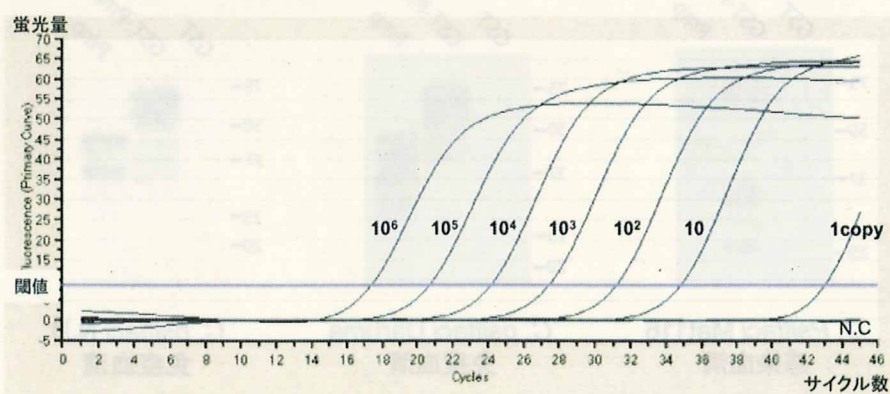


図 1 : *C. psittacii envB* 領域を標的としたリアルタイム PCR の感度検定。
C. psittacii envB を組み込んだ pEnvB を鋳型にしてリアルタイム PCR 反応を行った。
 1 反応液あたり 10 コピーの pEnvB より検出、定量可能であった。

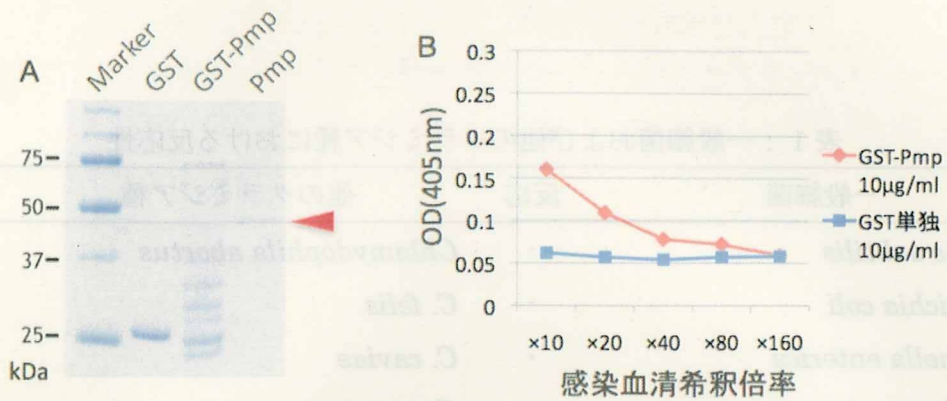


図2：組換え Pmp の発現と ELISA による抗原性の検討。

A: GST 融合組換え Pmp と GST を切断した Pmp の CBB 染色像。予想されるサイズにバンドが確認された。B: GST-Pmp を抗原とした ELISA の系を樹立した。C. psittaci 感染マウス血清希釈倍数依存的な反応が認められ、Pmp の診断用抗原としての有用性が示唆された。

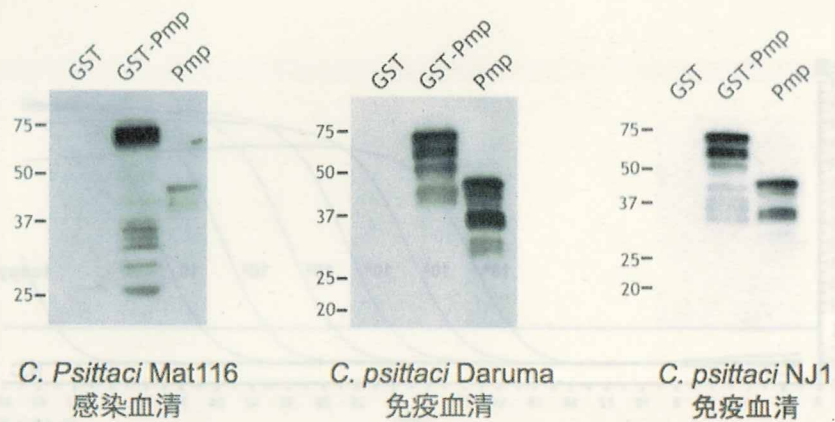


図3：組換え Pmp の各 *C. psittaci* 株免疫血清との反応。

組換え Pmp を抗原としたウエスタンブロットにて、各種 *C. psittaci* 株免疫血清との反応性を検討した。いずれも予想される分子量で反応が認められ、Pmp の診断用抗原としての有用性が強く示唆された。

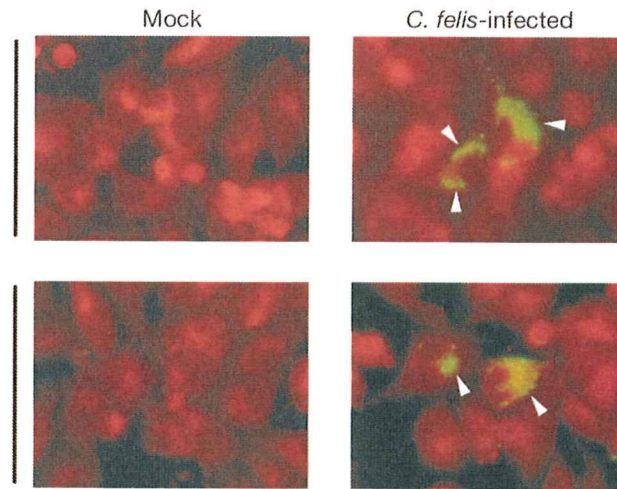


図4：間接蛍光抗体法による *C. felis* 感染細胞と *C. felis* 感染ネコ血清の反応性。HeLa 細胞に *C. felis* を感染させ、72 時間後に固定した細胞を用いた。被検ネコ血清を一次抗体として、FITC 標識抗ネコ免疫グロブリン抗体を2次抗体として用いた。対比染色としてエバンスブルー染色を行った。非感染細胞 (Mock) および感染細胞の、*C. felis* 感染ネコ血清による代表的な染色像を示す。矢頭は、*C. felis* の封入体を示す。

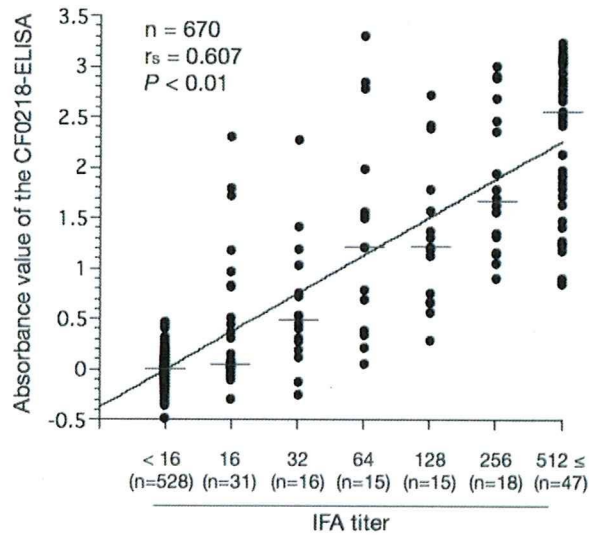


図5：CF0218-ELISA と IFA 抗体価の相関

斜線は、ワクチン未接種ネコ 670 検体における、CF0218-ELISA 吸光度と IFA 抗体価の関係を示す。Rs は相関係数を示す ($P < 0.01$)。垂直線は、CF0218-ELISA の中央値を示す。

厚生労働省科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）分担
研究報告書

動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明-比較ゲノム解析及び種特異的診
断法の開発と実態調査

—PC を用いたゲノム情報の解析

研究分担者 福士 秀人 岐阜大学応用生物科学部 教授

研究協力者

安藤 秀二 国立感染症研究所 ウイルス第一部 室長

黒田 誠 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析センター 室長

関塚 剛史 同 研究員

研究要旨：*Chlamydophila psittaci* によるオウム病は四類感染症に指定され、国内でも
集団発生を含む年間 40 例前後の発生が見られる人獣共通感染症である。クラミジアの
ゲノムに関しては、性器クラミジア *Chlamydia trachomatis* や肺炎クラミジア *C.*
pneumoniae 等において公開されているが、人獣共通感染症の起因菌として重要な *C.*
psittaci ゲノムに関して公開されているものはない。そこで、*C. psittaci* の病原性解析
及び種鑑別診断系開発を、比較ゲノム解析の視点から行うために、*C. psittaci* 日本分離
株 Mat116 株の全ゲノム配列決定を試みた。感染細胞より精製した菌体からゲノム
DNA を抽出し、解析に供した。ドラフト配列を既読クラミジアゲノム配列と比較し、
コンティグの並びを推定し、ギャップクローズ、アノテーションを行った。Mat116 株
ゲノムは全長 1,163 kbp、GC 含量は 39.1%、推定コード配列（CDS）は 999 個であっ
た。既読クラミジアゲノムとの総当たり BLAST 解析の結果、*C. psittaci* 固有の CDS
は 3 個であった。羊流産クラミジア *C. abortus* やネコクラミジア *C. felis* 等の動物由来
クラミドフィラに固有の transmembrane-head (TMH) 領域は *C. psittaci* ゲノムにおい
ても存在していた。*C. abortus* ゲノムとの比較解析の結果、*C. psittaci* には約 18 kb
相当の領域が挿入されていた。ゲノム解析の結果得られた *C. psittaci* 固有の領域、蛋
白質は、*C. psittaci* の自然界における存在様式の解明や、特異診断法開発のための基礎
的情報となる。

A. 研究目的

C. psittaci 感染により生じるオウム病

は、年間 40 例程の発生が認められ、感染
症法にて 4 類感染症に指定されている全

数把握疾患であり、その臨床上的重要性は明らかであるが、ゲノム配列は未解読である。そこで本分担課題では、オウム病クラミジアを始めとした動物由来クラミジアの自然界における存在様式の解明を、比較ゲノム解析の視点から行うために、*C. psittaci* ゲノム配列の解読と比較解析を行う。これらから得られる知見から、我が国において発生したオウム病クラミジアの宿主特異性や病態発現機序の実像解明を目的とする。また、得られたゲノム情報を元に、属・種特異的抗原の探索による簡易・迅速診断法の開発のための基礎的情報とすることを目的とする。

B. 研究方法

C. psittaci Mat116 株ゲノム解読に関して、今年度はこれまでに決定していた暫定ゲノムのアノテーションを行った。アノテーションは NCBI annotation pipeline 上で行った。アノテーション後、得られたデータをデータベース上に公開されている既読他種クラミジアの配列と比較解析した。他種クラミジアとの比較解析には ACT (Artemis Comparison Tool; <http://www.sanger.ac.uk>) を利用した。ゲノム解析には、国立感染症研究所の安藤秀二室長、黒田誠室長、関塚剛史研究員の協力も得た。

(倫理面への配慮)

クラミジアの取扱は、「クラミジア感染症の診断法開発および病態解析」として岐阜大学より組み換え DNA 実験として

承認を得ている。個人情報の取扱等、人権の保護に関しては、今年度の実施項目では該当しない。申請者、研究分担者、いずれも岐阜大学大学院医学研究科が主催した「医学研究等倫理講習会」を修了しており、人患者血清の使用等必要が生じた際は岐阜大学の倫理委員会に諮ることのできる体制を整えている。

C. 研究結果

1. *C. psittaci* 塩基配列の特性

ギャップクローズ、アノテーションの結果、*C. psittaci* Mat116 ゲノムの全長は 1,163 kbp、GC 含量は 39.1%、CDS は 999 個であった。既読他種クラミジアとの比較を表 1 に、ゲノム DNA の環状マップを図 1 に示した。

2. *C. psittaci* 固有の遺伝子、領域

反芻獣クラミジア *C. abortus* との比較解析の結果、*C. psittaci* には *C. abortus* には存在しない、約 18 kb におよぶ領域が存在することが明らかとなった (図 1、図 2)。また、既読クラミジアとの総当たり BLAST 解析の結果、*C. psittaci* に固有の配列が少なくとも 3 個存在した (データ示さず)。

3. TMH 領域

TMH (transmembrane head) 領域は、*C. trachomatis* および *C. pneumoniae* ゲノム上には存在せず、動物由来クラミジ

ア特徴的な領域と推定されている。*C. psittaci*ゲノム上にも TMH 領域が存在することが明らかとなった (図 3)。

D. 考察

*C. psittaci*ゲノムは、旧 *C. psittaci* に属する *C. abortus* および *C. felis* とよく似た構造をしていることが明らかとなった。例えば、研究代表者の課題で診断用抗原候補として同定した Pmp ファミリーの数は *C. felis* と同じ 20 の存在が確認された。Pmp ファミリーの構造はクラミジア種毎に異なることが報告されており、例えばヒトのみを宿主とする *C. trachomatis* においては 9 しか存在しない。また、他種クラミジアゲノムとの比較解析の結果、*C. psittaci* に固有の領域、遺伝子が見いだされた。*C. abortus* には存在しない、18-kb の領域には、adherence factor や phospholipase 等、病原性への寄与が示唆される遺伝子がコードされていた。また、動物由来クラミジアに特有とされている TMH 領域の存在も確認された。しかしながら、今年度得られた結果はあくまでも *C. psittaci* Mat116 株 1 株の結果である。今後は *C. psittaci* 他株においても同様の解析が必要である。さらにこれらの遺伝子 (領域) について、その発現、機能等を詳細に解析することにより、*C. psittaci* の多様な宿主域に関する手がかりが得られるかも知れない。今年度同定された *C. psittaci* 固有の遺伝子については、*C. psittaci* 種

特異的な診断法開発のための標的となりうる。特に総あたり BLAST 解析の結果同定した遺伝子、および TMH 領域は医療行政上鑑別の必要な *C. trachomatis* や *C. pneumoniae* との鑑別に有効な標的となりうると考えられる。

E. 結論

今年度は、*C. psittaci* 日本分離株の全塩基配列を決定し、診断法開発や宿主域決定機構解明のための基礎的情報をえることができた。今後は、同定した遺伝子 (領域) の詳細な解析に加え、*C. psittaci* 他株の配列決定と比較解析を行うことにより、目的の達成を目指したい。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

Ohya K, Okuda H, Maeda S, Yamaguchi T, **Fukushi H**: Using CF0218-ELISA to distinguish *Chlamydomphila felis* infected cats from vaccinated and uninfected domestic cats. *Vet Microbiol* In press.

Murao W, Wada K, Matsumoto A, Fujiwara M, **Fukushi H**, Kishimoto T, Monden K, Kariyama R, Kumon H: Epidemiology of *Chlamydomphila*

caviae-like *Chlamydia* Isolated from Urethra and Uterine Cervix. *Acta Med Okayama* 64:1-9, 2010.

Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, Tersteeg C, Masegi T, Hotta A, Yamaguchi T, **Fukushi H**, Hirai K, McMurray DN, Samuel JE: *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect Immun* 77:5640-5650, 2009.

Katoh H, **Ohya K**, Kubo M, Murata K, Yanai T, **Fukushi H**: A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of Siadenovirus. *Virus Res* 144:294-297, 2009.

Katoh H, **Ohya K**, Une Y, Yamaguchi T, **Fukushi H**: Molecular characterization of avian polyomavirus isolated from psittacine birds based on the whole genome sequence analysis. *Vet Microbiol* 138:69-77, 2009.

福士秀人、井上和幸、西藤林、**大屋賢司**、指原信廣、山口剛士、平井克哉：Q熱コクシエラのマヨネーズおよびその構成成分中における生残性。 *日本獣医師会雑誌* 62:481-484, 2009.

松田紫恵、**大屋賢司**、柳井徳磨、柵木利昭、**福士秀人**：オカメインコの開口不全症候群の微生物学的・病理学的所見。 *日本獣医師会雑誌* 62:143-147, 2009.

福士秀人：オウム病。 *小児科臨床* 62:709-716, 2009.

著書

大屋賢司、岸本寿男、**福士秀人**。オウム病。 p. 121-122. In: *ズーノーシスハンドブック*。メディカルサイエンス社, 2009.

2.学会発表

大屋賢司、黒田誠、関塚剛史、Meyers Garry、岸本寿男、安藤秀二、**福士秀人**：オウム病クラミジア *C. psittaci* 日本分離株の全ゲノム配列決定、第83回日本細菌学会総会、H22.3.27-29（横浜）

奥田秀子、**大屋賢司**、杉浦尚子、山口剛士、**福士秀人**：*Chlamydophila psittaci* 外膜蛋白質 Pmp の診断用抗原としての有用性、第148回日本獣医学会学術集会、H21.9.25-27（鳥取）

大屋賢司、奥田秀子、前田貞俊、山口剛士、**福士秀人**：ネコクラミジア感染特異抗原 CF0218 の診断用抗原としての有用性、第147回日本獣医学会学術集会、H21.4.2-4（宇都宮）

3.講演会

福士秀人：健康をまもる社会基盤の再構築-安全・公正・交流-、第68回日本公衆衛生学会、H21.10.21（奈良）

福士秀人：最近の鳥インフルエンザウイルスの知見、平成21年度 産業動物・小動物・公衆衛生研修会（日本獣医師会中部支部）、H21.10.28（羽島）

福士秀人：人獣共通感染症についてI、平成21年度動物取扱責任者研修会、H21.11.16（名古屋）

福士秀人：人獣共通感染症についてII、

平成21年度動物取扱責任者研修会、H22.1.27（名古屋）

福士秀人：人獣共通感染症についてIII、平成21年度動物取扱責任者研修会、H22.2.12（名古屋）

H.知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

表1： *C. psittaci* ゲノムと他種クラミジアゲノムの比較

	<i>Cp. naitsoi</i> (Mait116)	<i>Cp. abortus</i> (52753)	<i>Cp. felis</i> (F61C-55)	<i>Cp. caerie</i> (GPIG)	<i>Cp. pneumoniae</i> (AR39)	<i>C. trachomatis</i> (D11W-3)
Genome size (kbp)	1,163	1,144	1,166	1,173	1,229	1,042
GC content (%)	39.1	39.9	39.4	39.2	40.6	41.3
# of CDS	999	961	1,005	1,009	1,130	894
# of Pmp ¹ proteins	20*	18	20	18	21	9
# of tRNA	35	38	38	38	38	37
# of rRNA operons	1	1	1	1	1	2
reference	this study	Genome Res. 15:629-640, 2005	DNA Res. 13:15-23, 2006	Nucleic Acids Res. 31:2134-2147, 2003	Nucleic Acids Res. 26:1397-1406, 2003	Science 282:754-759, 1998

1: polymorphic membrane protein

* including 5 frameshifts

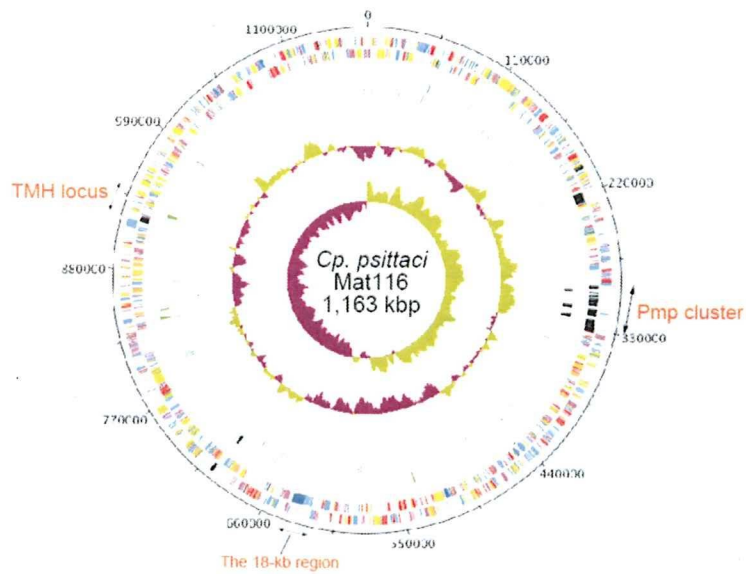


図 1 : *C. psittaci* Mat116 株の環状ゲノムマップ

トラック 1 と 2 はそれぞれ、時計回りおよび反時計回りに転写される遺伝子である。トラック 3 は”misc_feature”、トラック 4 は tRNA、トラック 5 と 6 は GC 含量と GC skew を示す。アノテーションの結果から、コードされる遺伝子の産物は推定される機能毎に以下のように色分けした。赤：膜蛋白質、排出蛋白質；青：病原因子、III 型分泌関連；水色：conserved/hypothetical；紫：アミノ酸・エネルギー・脂質代謝；黄：DNA 複製・修復・転写関連；濃青：シグナル伝達、細胞分裂；オレンジ：蛋白質フォールディング、ソーティング、分解；茶：Inc/TMH ファミリー；黒：Pmp・OMP 蛋白質。

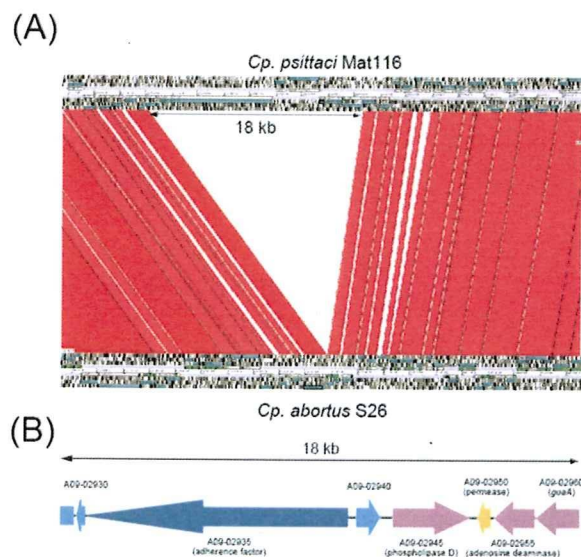


図 2 : *C. psittaci* ゲノム上に存在し *C. abortus* ゲノム上には存在しない 18-kb の領域

A : Artemis Comparison Tool を用いて解析した、*C. psittaci* と *C. abortus* ゲノムの比較。ゲノム上の位置は図 1 を参照。B : A の領域のコード遺伝子を図示。遺伝子の色分けは図 1 を参照。

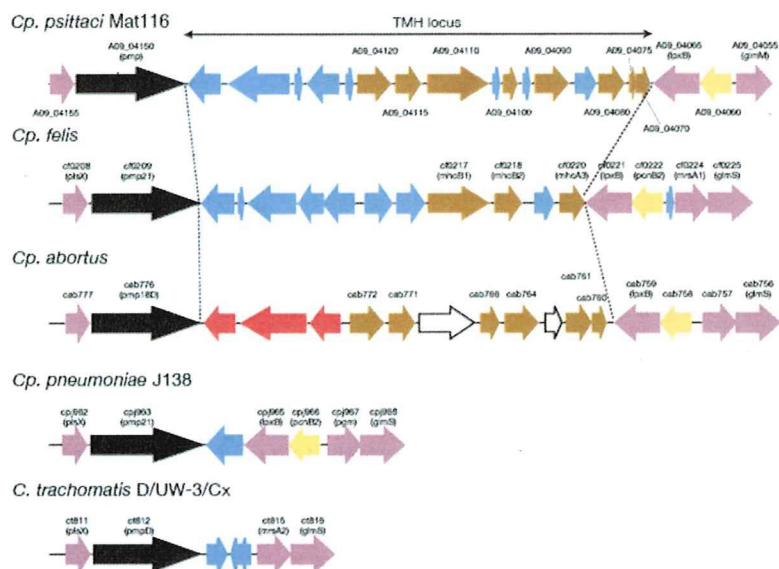


図 3 : 各種クラミジアにおける TMH 領域

各種クラミジアの TMH 領域を図示。ゲノム上の位置および遺伝子の色分けは図 1 を参照。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者	タイトル	編集者	書籍名	出版社	出版地	出版年	頁
大屋賢司、岸本寿男、 <u>福士秀人</u>	オウム病	岸本寿男、山田章雄	ゾーン ーシス ハンド ブック	メディカル サイエンス 社	東京	2009	121-122

雑誌

著者	タイトル	誌名	巻号	頁	発表年
Murao W, Wada K, Matsumoto A, Fujiwara M, <u>Fukushi H</u> , Kishimoto T, Monden K, Kariyama R, Kumon H	Epidemiology of <i>Chlamydo-philae</i> -like <i>Chlamydia</i> Isolated from Urethra and Uterine Cervix.	Acta Med Okayama	64 (1)	1-9	2010
Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MW, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, Tersteeg C, Masegi T, Hotta A, Yamaguchi T, <u>Fukushi H</u> , Hirai K, McMurray DN, Samuel JE	<i>Coxiella burnetii</i> isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever.	Infect Immun	77 (12)	5640-5650	2009
Katoh H, <u>Ohya K</u> , Kubo M, Murata K, Yanai T, <u>Fukushi H</u>	A novel budgerigar-adenovirus belonging to group II avian adenovirus of Siadenovirus.	Virus Res.	144 (1-2)	294-297	2009
Katoh H, <u>Ohya K</u> , Une Y, Yamaguchi T,	Molecular characterization of avian	Vet Microbiol	138 (1-2)	69-77	2009

Fukushi H	polyomavirus isolated from psittacine birds based on the whole genome sequence analysis.				
福士秀人 、井上和幸、西藤林、 大屋賢司 、指原信廣、山口剛士、平井克哉	Q熱コクシエラのマヨネーズおよびその構成成分中における生残性	日本獣医師会雑誌	62 (6)	481-484	2009
松田紫恵、 大屋賢司 、柳井徳磨、柵木利昭、 福士秀人	オカメインコの開口不全症候群の微生物学的・病理学的所見	日本獣医師会雑誌	62 (2)	143-147	2009
福士秀人	オウム病	小児科臨床	62 (4)	709-716	2009