

201123015B

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～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 大屋 賢司

平成 24 (2012) 年 5 月

目次

I. 総合研究報告	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 大屋 賢司	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
III. 研究成果の刊行物・別刷り	30

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）
（総合）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。研究期間を通じて得られた成果は以下の通りである。1) 動物由来クラミジアのゲノム解析とその利用：*C. psittaci* 国内集団発生事例分離株配列の完全決定；*C. psittaci* Mat116 株近縁他種株配列の解読（進行中）；解読したゲノム情報を元にした鑑別診断法開発、遺伝子発現プロファイル解析のための技術基盤構築。2) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法の開発：*C. psittaci* 多型膜タンパク質 Pmp を抗原とした ELISA 系の樹立；動物由来クラミジアを広範に検出する高感度リアルタイム PCR 系の樹立；反芻獣流産クラミジアを鑑別する multiplex PCR 系の樹立；*C. psittaci* を迅速・簡便・高感度に検出する LAMP 系の樹立。3) 自然界における動物由来クラミジアの実態調査：飼いネコにおけるネコクラミジア *C. felis* 保有状況の実態調査；国内飼育鳥における *C. psittaci* 保有状況の実態調査。特にゲノム解読に関しては、実施期間内に終了できなかったことが悔やまれるが、診断系に関しては、予想通りの効果を挙げる事ができた。課題遂行を通じて得た知見を元に、引き続き動物由来クラミジアの実態調査と、病原性・宿主域の解析を進めていきたい。

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、多様な宿主域・病態を呈する。なかでも *Chlamydomphila 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) 動物由来クラミジアのゲノム解析

1. *C. psittaci* Mat116 株ゲノム解読

ゲノム解析に供したゲノム DNA は以下のように調製した。クラミジアの培養には浮遊型マウス L 細胞 (SL 細胞) を用いた。十分に封入体を形成しているクラミジア感染 SL 細胞 (11 程度) を回収し、超音波により細胞を破壊し菌体を溶出させた。培養上清中の菌体は、10,000g で 1 時間遠心し沈殿させた。両者を合わせ、DNAase 処理により宿主細胞由来 DNA を破壊したのち、ショ糖密度勾配遠心法

に供し、菌体を精製した。調製したゲノム DNA を Roche454 GS20 解析に供した。得られたリードのレファレンスには既読の羊流産菌 *C. abortus* ゲノム配列を用いた。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。決定した Mat116 株ゲノムを、Illumina Genome Analyser (GA) II 解析に供試、再解読を行い、フレームシフトやギャップの想定される領域を修正し、完全配列とした。

2. *C. psittaci* 近縁他種株の配列解析

C. psittaci 近縁他種株として *C. psittaci* Daruma 株、Borg 株、*C. pecorum* Maeda 株の 3 菌種株を選択した。いずれのゲノム DNA も Mat116 株に準じて抽出し、GA II 解析に供し、Mat116 株配列をレファレンスにコンティグの並びを推定した。

2) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法の開発

1. *C. psittaci* 多型膜蛋白質 Pmp の抗原性解析

血清診断抗原候補として得られた Pmp については、GST 融合蛋白質を作製し、抗原性をマウス感染血清・ウサギ免疫血清、人患者血清を用いて評価した。

2. 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

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。検出感度の測定には *envB* をクローニングしたプラスミドおよび *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。

3. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

各種クラミジア固有の遺伝子は、GeneBank より得たゲノム配列 (*C. psittaci* に関しては本課題で解読した Mat116 株を使用) より ORF を抽出し、各種クラミジア間で総当たり BLAST 検索を実施して抽出した。*C. psittaci* 固有であるとした A2940 遺伝子に関して、栄研化学の開発した LAMP 法用プライマー設計支援ソフトウェア PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/>) を用いて、LAMP 法用のプライマーをデザインした。反芻獣に流産を起こすクラミジア 3 種 (*C. psittaci*、*C. abortus*、*C. pecorum*) の multiplex PCR に関しては、*C. psittaci* A2940 と同様に抽出した *C. abortus* CAB295、*C. pecorum* に関しては、既報 (BMC Microbiol. 9:130, 2009) にて使用された CPC gene を標的とし、定法に従いプライマーをデザインした。LAMP、multiplex PCR 法いずれの評価も、「2」2. リアルタイム PCR による *C. psittaci* 遺伝子

子検出系の開発」に準じて、感度、特異性を評価した。

3) 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

1. *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。

2. 国内飼育鳥における *C. psittaci* 保有状況の実態調査

研究期間を通じて、鳥類の保有する *C. psittaci* 実態調査として、全国の動物病院・動物園からの依頼検体、及び岐阜大学内で採取した野生ハトの糞便 133 検体を検査した。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 (Chahota ら 2006) もしくはリアルタイム PCR

(Okuda ら 2011) により *C. psittaci* 遺伝子検出を試みた。

4) *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析

1. クラミジアアレイによる解析

解読した *C. psittaci* Mat116 株配列を基に、推定遺伝子コード領域およびフレームシフト領域 1420 配列を標的に作製された DNA アレイを用いた。アレイに供する RNA は、HeLa 細胞に *C. psittaci* Mat116 株を感染させ、経時的に抽出した全 RNA を用いた。全 RNA 中の宿主細胞由来 RNA は、真核細胞のリボソーム RNA および oligo dT をコートしたマグネチックビーズ (Microbenrich; Ambion) を用いて選択的に除去し、クラミジア由来 RNA を濃縮して用いた。調製した RNA より cRNA を合成し、Cy3 標識してアレイにハイブリダイズさせ解析した。

2. RNA-seq 解析

蔗糖密度勾配法により精製した *C. psittaci* Mat116 株精製菌体 (EB) と HeLa 細胞に MOI = 40 で感染後 6 時間経過したものを RNA 調製材料とした。精製 EB からは定法に従い全 RNA を調製した。感染 6 時間後の細胞からは、全 RNA を調製後、MicrobEnrich を用いて、宿主由来 mRNA と rRNA をできるだけ除去した。全 RNA の短鎖 RNA を絡む精製にて除去した後、断片化した RNA を鋳型として二本鎖 cDNA を合成、アダプターの連結、PCR による増幅を行い RNA-seq ライブラリーを構築した。この後、大量に存在

するであろう宿主由来 rRNA を分解し、相対的に mRNA を濃縮する目的で、二本鎖 DNA 分解酵素 (duplex-specific nuclease: DSN) によるノーマライゼーションを行い、次世代シーケンサー HiSeq 2000 (Illumina) に供した。

(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。開発した診断法の評価に用いた患者血清は、国立感染症研究所にてすでに保管済みの連結不可能匿名化されたものを用いたため、研究実施場所である岐阜大学において個人情報とは特定できない。取扱に関しては、国立感染症研究所および岐阜大学双方の医学研究倫理委員会に諮り承認を得て、実験を行った。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、その他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研究を実施した。

C. 研究結果

1) 動物由来クラミジアのゲノム解析

1. *C. psittaci* Mat116 株ゲノム解読

決定した *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。他種クラミジアとの比較解析の結果、Mat116 ゲノム上にも、クラミジアゲノムに特徴的な多型膜タンパク質 Pmp および transmembrane head (TMH) 領域が存在することが明らかとなった (図 2)。

2. *C. psittaci* 近縁他種株の配列解析

C. psittaci ゲノム配列の比較解析を行うために、*C. psittaci* 近縁他種株の配列解析を開始した。対象としたのは表 2 に示す 3 菌種株、強毒株としての Borg 株、他種クラミジア (*C. abortus*) との中間型としての Daruma 株、*C. psittaci* より独立した *C. pecorum* Maeda 株である。GA II 解析により得られたリードを Mat116 株配列をレファレンスにコンティグの並びを推定し、現在ギャップクローズを行っている。

2) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法の開発

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り得られた Pmp (Pmp G11; 図 2 参照) について、オウム病患者血清を用いて診断用抗原としての有用性を評価した。ELISA における組換え Pmp の患者血清との反応は、*C. psittaci*

精製菌体を抗原とした MIF 法にて測定した抗 *C. psittaci* IgG 価と正の相関を示し (図 3)、組換え Pmp の診断用抗原としての有用性が示唆された。

2. 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、10 コピーより定量的な検出が可能であった (図 4)。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。

3. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

解読したゲノム情報を元に、動物由来クラミジアを鑑別可能な遺伝子検査系の樹立を試みた。各種クラミジア間の全 ORF の総当たり BLAST 解析によって各種クラミジア固有の ORF を抽出した。

C. psittaci に関しては、少なくとも 3 種の固有遺伝子候補が得られたが、そのうち A2940 (全長 762 bp) を標的候補とした。A2940 遺伝子は、肺炎クラミジア *C. pneumoniae*、性器クラミジア *C. trachomatis*、猫クラミジア *C. felis*、羊

流産菌 *C. abortus* などの他種クラミジアゲノムには存在せず、Daruma 株を除いた *C. psittaci* ゲノム上に存在した (図 5a)。

BLAST 解析により検索した種固有遺伝子に関して、*C. psittaci* 以外では、羊流産菌 *C. abortus* CAB295 (全長 224 bp) に着目し、動物由来クラミジアを鑑別可能な multiplex PCR 法の樹立を試みた。*C. psittaci*、*C. abortus* に加え、これら 2 菌種と同様に反芻獣の流産の原因となる *C. pecorum* を鑑別対象とした。*C. pecorum* に関しては、既報の CPC gene を標的とした。これら 3 種の遺伝子を標的とした multiplex PCR の系を検討したところ、3 種のクラミジアを一反応で鑑別可能なことが示された (図 5b)。

multiplex PCR の系に加え、等温増幅法 (LAMP 法) の樹立を試みた。標的は *C. psittaci* A2940 を選択した。PrimerExplorer を用いて A2940 に対する 4 種のプライマーをデザインした。これらのプライマーを用いて各種クラミジア遺伝子の増幅を検討したところ、*C. psittaci* でのみ目視可能な蛍光反応が認められた。LAMP 法による A2940 検出感度を検討したところ、1 反応当たり 10^2 コピーより、目視可能な蛍光反応、電気泳動により特徴的なラダーを観察することができた (図 6a)。尚、反応に要する時間は 50 分以内であった (図 6b)。

3) 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

1. *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 7)。

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、敏感度は 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 8)。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。

2. 国内飼育鳥における *C. psittaci* 保有状況の実態調査

これまでに開発した遺伝子検出法を用いて、全国の動物病院からの依頼検体を初めとした計 487 検体について調査した。研究期間中の陽性率は 5.8% であった (表 3)。

4) *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解析

1. クラミジアアレイによる解析

C. psittaci Mat116 株感染 HeLa 細胞より経時的 (6, 12, 24, 36, 48, 60 時間後) に全 RNA を抽出した。全 RNA よりクラミジア由来 RNA を選択的に濃縮した。調製した RNA の純度を解析したところ、クラミジア由来 RNA が濃縮されていることが示された。このように調製した RNA をアレイ解析に供した。クラミジアの細胞内増殖に重要と思われる遺伝子群について感染ステージ毎に変動が認められた。代表的なものとして外膜蛋白質群の発現プロファイルのヒートマップを示す (図 10)。クラミジアの外膜蛋白質のうち、最も発現量の多い主要膜蛋白質 (MOMP) は、感染時期を通じて顕著な変動は認められなかった。しかしながら、Pmp 関連蛋白質群に関しては、感染ステージにより発現量の増大するものと、感染初期にピークを迎えるものに分けられた。

2. RNA-seq 解析

C. psittaci 精製菌体、および感染 6 時間後の HeLa 細胞より全 RNA を抽出し、RNA-seq を試みた。特に感染 6 時間後のサンプルでは、宿主由来 RNA が殆どであったため、真核生物 mRNA や rRNA を吸着するマグネチックビーズ、rRNA を分解する DSN 処理等を行い、できる限りクラミジア由来 mRNA を濃縮し解析に供した。得られたリードは精製 EB では 27,554,746、感染 6 時間後のサンプルでは 61,069,109 であった。Mat116 株配

列へのマッピング、発現量、新規発現領域の算出は現在進行中である。

D. 考察

1) 動物由来クラミジアのゲノム解析

1. *C. psittaci* Mat116 株ゲノム解読

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、*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、TMH 領域の存在も明らかとなった。代表者は、*C. felis* TMH 蛋白質が *C. trachomatis* との鑑別が可能な診断用光源として有用なことを報告しており

(Ohya ら、Clin. Vaccine Immunol., 2008)、*C. psittaci* TMH の領域も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。

2. *C. psittaci* 近縁他種株の配列解析

強毒株 (Borg)、中間型 (Daruma)、近縁他種株 (*C. pecorum*) 配列決定については、Mat116 株配列をレファレンスに、

現在ギャップクローズ作業中であるが、現時点でも興味深い知見が得られつつある。例えば、*C. psittaci*と*C. abortus*の中間型とされる*C. psittaci* Darumaにおいては、後述する総当たり BLAST により抽出した*C. psittaci*固有のA2940は存在せず、逆に*C. abortus*固有のCAB295遺伝子が存在する(図5b参照)。また、Borg株においては、Mat116株には存在しないプラスミドが確認された(データ示さず)。研究期間内に達成できなかったことは悔やまれるが、コアのデータは取り終えており、これら近縁他種株の完全配列決定により、分類、病原性、宿主域に関する詳細な解析が可能となるであろう。

2) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診断法の開発

1. *C. psittaci* 多型膜蛋白質 Pmp の抗原性解析

組換え Pmp は、感度の点で問題があるものの ELISA において患者血清と反応することが示された。Mat116 株ゲノム解析の結果、抗体を用いたスクリーニングで得られた本抗原は、その遺伝子の並びから PmpG ファミリーに属する PmpG11 であることが明らかとなった(図2参照)。PmpG11 は、その近傍に存在する PmpG12 と非常に相同性が高い(データ示さず)。組換え PmpG11 に対する抗体を作製し、精製菌体および感染細胞を抗原としたウェスタンブロットを行ったと

ころ、PmpG11 の予想分子量約 40 kDa のところにバンドは認められず、約 90 kDa のところにバンドが認められた(データ示さず)。PmpG12 の予想分子量は約 90 kDa であることから、スクリーニングで得られた分子は PmpG11 であるものの、実際の感染動物・患者体内で認識されているのは PmpG12 なのであろう。本か題で同定した *C. psittaci* Pmp は、本菌の診断用抗原として有用であると考えられる。

2. 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。

3. ゲノム情報を利用した各種クラミジア特異的遺伝子検出法の開発

これまでに解読した *C. psittaci* ゲノム情報を元に、動物クラミジア鑑別診断法の樹立を試みた。バイオインフォマティクスの手法を用いて代表的なクラミジア種それぞれに固有の遺伝子を抽出した。この中でも特に *C. psittaci* A2940 を標的として、multiplex PCR、LAMP それぞれの系を検討した。A2940 遺伝子は、他クラミジア種ゲノムには存在せず、レファレンスに用いた Mat116 株以外の *C. psittaci* ゲノム上に存在したことから、本遺伝子が鑑別診断系の標的として有用であることが強く示唆された。A2940 と同様に抽出した *C. abortus* CAB295 遺伝子、既報の *C. pecorum* CPC gene の 3 遺伝子を標的とした multiplex PCR の系を樹立することができた。しかしながら、検出感度においては、1 反応当たり $10^5 \sim 10^6$ コピーであり、我々がこれまでに開発した nested PCR (10^4 コピー) やリアルタイム PCR (10^2 コピー) におとる。感度に関しては、PCR 反応に用いる酵素の種類等の検討を行ってより実用化に資する系の樹立を試みている。家畜衛生の場に

おいては、*C. abortus* による緬羊・羊の流産は、家畜伝染病予防法で届け出伝染病に指定されており他のクラミジアによる流産との鑑別が必要である。従来の方法（例えば我々の開発した nested PCR、リアルタイム PCR 法）では、産物の塩基配列解読をして初めて種の同定が可能であったが、本法を用いることにより、1 反応で種の同定が可能となれば、より迅速な行政対応が可能になると思われる。本課題で試みたアプローチ法は、他のクラミジア種でも有用であり、現在は、感染症法において行政鑑別の必要な肺炎クラミジア、性器クラミジア、オウム病クラミジアの multiplex PCR 法を検討中である。

multiplex PCR に加え、LAMP 法の樹立も試みた。LAMP 法は、1 つの標的遺伝子の 6 つの領域に対してプライマーをデザインし等温で増幅させる方法である。従来の PCR 法に比べて、特異性に優れ、反応時間も短時間（1 時間以内）、産物の電気泳動が必要なく、蛍光や濁度などの目視により反応を確認できる、等の利点がある。*C. psittaci* A2940 に関して、LAMP 法を樹立することができた。達成した感度は、1 反応当たり 10 コピーであり、従来の検出系よりも大幅に向上した。また、反応時間も 1 時間以内（概ね 50 分程度）、産物の電気泳動が不要、なことから、より実態調査に適した簡便な系が樹立できたと考えている。

3) 自然界における動物由来クラミジアの実態調査

1. *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。

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 (図 2 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。また、陽性率が 16.8% であ

ることから、我が国の飼い猫には普遍的に *C. felis* が存在することが示された。

2. 国内飼育鳥における *C. psittaci* 保有状況の実態調査

我々の研究室にて実施した、鳥類における *C. psittaci* 保有状況について 2006 年度からのデータを表 3 にまとめた。本課題がスタートしてからの 3 年間における陽性率は 5.8% であった。2003 年におこなった調査時には 14.8% であったことを考えると、クラミジアの清浄化が進んでいると示唆される。更にこのデータを鳥種別に表 4 にまとめた。検体数が大きく異なるものの、オカメインコ、セキセイインコ、コザクラインコといった主に国内で繁殖・生産される小型鳥は、ヨウム等主に海外から輸入される大型鳥に比べ陽性率は約 2% と低値であった。陽性例の遺伝子型を系統解析すると、ヨーロッパに多い C, D, F 型とは異なるグループに属するが、特定の遺伝子型に偏っているわけではないことが明らかとなった

(図 9)。これらのデータは、販売業者等の認知度向上による清浄化 (検疫の徹底等) が進んだためであると思われる。我々のグループでは販売業者からの検査依頼や衛生指導を積極的に受け付けており、他にも講演等により本病原体の認知度向上・清浄化に多少なりとも貢献できているのではないかと考えている。

4) *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル

解析

1. クラミジアアレイによる解析

本研究で取り扱うクラミジアが他の病原細菌と決定的に異なる点は、代謝活性をもたない基本小体 (EB) が宿主細胞に侵入後、膜構造 (封入体) 中で網様体 (RB) へと変換し分裂増殖するという、形態・性状的にも全く異なる 2 種類の生活環を有することである。EB、RB 各世代における遺伝子発現プロファイルは異なると予想され、それを解析することにより本菌の細胞内動態を解明することが可能となると考えられる。解読した *C. psittaci* Mat116 配列を基に、クラミジアアレイを作製し、感染細胞より経時的に調製した RNA を用いた遺伝子発現動態解析を行った。予想された通り、クラミジアの感染ステージに応じて遺伝子発現パターンは異なっていた。一例として挙げた外膜蛋白質群は、MOMP に関しては感染時期を通じて一定の発現動態を示していた。しかしながら、20 以上のファミリーを形成している Pmp に関しては、感染ステージにより発現するセットが異なることが示唆された。図に示した以外にも、DNA 複製に関わる分子、III 型分泌関連蛋白質群についても同様の傾向が確認された。次年度以降の、詳細なクラミジア遺伝子発現動態解析にむけた貴重な情報を得ることができた。

2. RNA-seq 解析

RNA-seq による、クラミジアの感染細

胞内における whole transcriptome を試みた。解析の材料としたのは、本来遺伝子転写が殆ど行われていないとされる基本小体 EB と、感染 6 時間後の細胞より調製した RNA である。感染 6 時間後は、細胞に侵入した EB が分裂型の RB へと転換する時期に相当する。すなわち、EB→RB への転換時に起こるイベントを網羅的に解析するために行った。予想されたことであるが、EB (元々転写量が少ない)、感染 6 時間後 (まだ分裂を開始していないため、宿主細胞由来 RNA に比べクラミジア RNA の絶対量が少ない) ともに十分なリード数を得ることができなかった。データは現在解析中であるが、現在までに新規遺伝子転写領域は見つかっていない。RNA-seq に関しては、現在、別プロジェクトにより今後の解析を進めていく予定である。今回の解析で明らかとなった技術上の問題を精査し、EB、感染 6 時間後に加え、十分に RB が 2 分裂増殖した感染 24 時間後のデータを加える予定である。RNA-seq の結果と、アレイの結果をあわせ、感染細胞内におけるクラミジア遺伝子転写の全容を少しでも明らかにしたいと思っている。

E. 結論

本研究課題の実施によって得られた結果は以下の通りである。

(1) 動物由来クラミジアのゲノム解析

・*C. psittaci* 国内集団発生事例分離株配列の完全決定。

・ *C. psittaci* Mat116 株近縁他種株配列の
解読（進行中）。

(2) 動物由来クラミジアの遺伝子・血清診 断法の開発

・ *C. psittaci* 多型膜タンパク質 Pmp を抗
原とした ELISA の系を樹立。

・ *C. psittaci* リアルタイム PCR の系を樹
立。

・ ゲノム情報より同定した遺伝子を標的
に、multiplex PCR による各種クラミジ
ア鑑別系、LAMP 法による *C. psittaci* 検
出系それぞれを樹立。

(3) 自然界における動物由来クラミジア の実態調査

・ 飼いネコ（714 検体）における *C. felis*
の血清疫学調査（陽性率は約 17%）。

・ 学校飼育鳥、全国の動物病院・動物園か
らの依頼検体、野生のハト計 487 検体に
おけるクラミジア保有状況検査（陽性率
は 4.1%）。

※ 2003 年に行った調査における陽性率
は 14.8% であり、クラミジアの清浄化
が進んでいることを示唆した。我々の
グループは、ガイドライン策定や自治
体への技術指導に関与してきており、
クラミジアの清浄化に多少なりとも
貢献できているのではと考えている。

(4) *C. psittaci* 遺伝子発現プロファイル解 析

下にあげる方法により感染細胞内でお
こるイベントを解析するための技術的基
盤を構築できた。

・ 配列したゲノム情報を元にクラミジア

アレイを作製。

・ クラミジア感染細胞より抽出した RNA
の RNA-seq を行った。

(1)から(4)の項目のうち、特にゲノム解読
に関しては、実施期間内に終了できな
かったこと、誌上発表が予定通り進んで
いないことが悔やまれるが、診断系に関し
ては、予想通りの効果を挙げることがで
きた。課題遂行を通じて得た知見を元に、
引き続き動物由来クラミジアの実態調査
と、病原性・宿主域の解析を進めていき
たい。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

クラミジアに関する発表

原著論文

大屋賢司、黒田誠、関塚剛史、Garry
Meyers、岸本寿男、安藤秀二、奥田秀子、
福士秀人

オウム病クラミジア集団発生事例分離株
ゲノム配列決定とその意義。

獣医畜産新報 64:804-806, 2011.

Okuda H, Ohya K, Shiota Y, Kato H,
Fukushi H

Detection of *Chlamydophila psittaci* by
Using SYBR Green Real-Time PCR.

J. Vet. Med. Sci. 73:249-254, 2011.

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. 146:366-370, 2010.

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.

著書・総説

福士秀人、大屋賢司

クラミジア

p. 132-137. In: 獣医微生物学 (第3版) .文
永堂, 2011.

福士秀人: コクシエラ・クラミディア感染
症. 最新医学 66: 2721-2725, 2011.

福士秀人: 鳥類のクラミジア感染症.
INK+ 8: 8-9, 2010.

福士秀人: オウム病. 小児科臨床
62:709-716, 2009.

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.

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
原著論文

Katoh H, Yamada S, Hagino T, **Ohya K**,
K, Sakai H, Yanai T, Masegi T,
Yamaguchi T, **Fukushi H**
Molecular Genetic and Pathogenic
Characterization of Psittacid
Herpesvirus Type 1 Isolated from a
Captive Galah (*Eolophus roseicapillus*)
in Japan.
J. Vet. Med. Sci. 73: 1341-1345, 2011.

Ogawa K, Yamaguchi K, Suzuki M,
Tsubota T, **Ohya K**, **Fukushi H**
Genetic characteristics and
antimicrobial resistance of *Escherichia*
coli from Japanese macaques (*Macaca*
fuscata) in rural Japan.
J. Wildl. Dis. 47:261-271, 2011.

Katoh H, **Ohya K**, Ise K, **Fusushi H**
Genetic Analysis of Beak and Feather
Disease Virus Derived from a Cockatiel
(*Nymphicus hollandicus*) in Japan.
J. Vet. Med. Sci. 72:631-634, 2010.

Kasem S, Yu MH, Yamada S, Kodaira
A, Matsumura T, Tsujimura K,
Madbouly H, Yamaguchi T, **Ohya K**,

Fukushi H

The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology* 400:259-270, 2010.

Ogawa H, Katoh H, Sanada N, Sanada Y, **Ohya K**, Yamaguchi T, **Fukushi H** *Virus Genes* 41:231-235, 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.

総説・著書

福士秀人、**大屋賢司**

リケッチア

p. 128-132. In: 獣医微生物学 (第3版) . 文永堂, 2011.

Katoh H, Ogawa H, **Ohya K**, **Fukushi H**

A Review of DNA Virus Infections in Psittacine Birds.

J. Vet. Med. Sci. 72: 1099-1106, 2010.

小川恵子, **福士秀人**: 野生動物が保有する耐性菌について. *感染 炎症 免疫* 40: 66-68, 2010.

2.学会発表

Ohya K, Ibrahim E, Kuroda, M,

Sekizuka T, Okuda H, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: *Chlamydia psittaci* specific genes, which are identified by comparative genomic analysis, can be used for differential diagnosis of chlamydia species. 2011 International Union of Microbiological Societies Congress, 2011 Sep 6-10, 2011 (Sapporo).

Ibrahim R, 大屋賢司, 黒田誠、関塚剛史、安藤秀二、福士秀人: Rapid Multiplex PCR Assay for simultaneous Detection of Chlamydia causing abortion in ruminants. 第 152 回日本獣医学会学術集会、H23.9.19-21 (大阪)

Ohya K, Okuda H, Kuroda M, Sekizuka T, Meyers G, Kishimoto T, Andoh S, Fukushi H: Complete genome sequence of Chlamydia psittaci Mat116 strain isolated in Japan. 2011 Chlamydia basic research meeting, Mar. 18-21, 2011 CA

大屋賢司、福士秀人：オウム病クラミジアのゲノム解析:鑑別診断法開発と病態解明を目指して、平成 22 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (招待講演)、H23.2.11 (岐阜)

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集団発生事例分離株の全ゲノム配列決定、第 10 回人と動物の感染症研究会、H22.10.30 (東京)

奥田秀子、大屋賢司、福士秀人：日本国内における鳥類のオウム病クラミジアの保菌調査、第 150 回日本獣医学会学術集会、H22.9.16-18 (帯広)

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：*Chlamydia 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)

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>C. psittaci</i> Mat116	<i>C. psittaci</i> RD1	<i>C. psittaci</i> 6BC	<i>C. abortus</i> S26/3	<i>C. felis</i> Fe/C-56	<i>C. caviae</i> GPIC	<i>C. pneumoniae</i> AR39	<i>C. trachomatis</i> D/UW-3
Genome size (kbp)	1,163	1,156	1,172	1,144	1,166	1,173	1,229	1,042
Host & Disease	human/bird Pisttacosis	human/bird Pisttacosis	human/bird Pisttacosis	ruminant Abortion	cat Conjunctivitis	gunia pig Conjunctivitis	human Pneumonia	human STD
GC content (%)	39.1	38.8	39.1	39.9	39.4	39.2	40.6	41.3
CDS	999	959	967	961	1,005	1,009	1,130	894
tRNA	38	36	38	38	38	38	38	37
rRNA operons	1	1	1	1	1	1	1	2
Pmp proteins	20	17	22	18	20	18	21	9
Reference	This study	J Bacteriol. 193 (5): 1282-1283, 2011	GenBank: CP002549.1	Genome Res. 15: 629-640, 2005	DNA Res. 13: 15-23, 2006	Nucleic Acids Res. 31: 2134-2147, 2000	Nucleic Acids Res. 28: 1397-1408, 2000	Science 282: 754-759, 1998

表 2 : 本課題で配列解析の対象とした *Chlamydomphila* spp.

種名	<i>C. psittaci</i>			<i>C. pecorum</i>
株名	Mat116	Borg	Daruma	Maeda
由来	アカハラヒメコ ンゴウインコ	ヒト	ダルマインコ	ウシ
疾患	オウム病	オウム病	オウム病	肺炎
参考文献	Matsui ら、 Epidemiol. Infect., 2007	Olsen ら、Pub. Health Rep., 1944	Fukushi ら、J. Bacteriol., 1989	Fukushi ら、Int. J. Syst. Bacteriol., 1992
備考	鳥展示施設にお ける集団発生事 例時に分離。	ヒトでの死亡 例・二次感染あ り。	DNA fingerprint 解析により <i>C.</i> <i>psittaci</i> と <i>C.</i> <i>abortus</i> の中間型 とされる。	遺伝学・血清学的 解析により、 <i>C.</i> <i>psittaci</i> から独立 した種となった。

表 3 : 鳥類における *C. psittaci* 保有状況

	検査数 (羽)	陽性数 (羽)	陽性率 (%)
2006 年	996	16	1.6
2007 年	328	7	2.1
2008 年	353	2	0.6
2009 年	202	8	4.0
2010 年	152	6	3.9
2011 年	133	14	10.5
合計	2164	53	2.4

表 4 : 鳥種別 *C. psittaci* 保有状況

鳥種	検査数 (羽)	陽性数 (羽)	陽性率 (%)
オカメインコ	282	6	2.1
セキセイインコ	97	1	1.0
コザクラインコ	39	1	2.6
ヨウム	24	1	4.2
コガネメキシコインコ	17	1	5.9
キガシラアオハシインコ	12	1	8.3
ショウジョウインコ	5	2	40.0
テンジクバタン	4	1	25.0
パナマボウシインコ	3	1	33.3
ソデシロインコ	2	1	50.0
ハツハナインコ	2	1	50.0
ギニアエボシドリ	7	1	14.3
アヒル	35	1	2.9
上記以外の鳥種	1421	10	0.7
鳥種不明	71	3	

※赤字:主に国内繁殖・生産されている小型鳥。青字:主に海外から輸入される大型鳥。