鳥由来検体からのオウム病クラミジアの遺伝子抽出法の検討

¹⁾国立感染症研究所ウイルス第一部, ²⁾岐阜大学農学部獣医学科,³⁾鳥根県保健環境科学研究所感染症疫学科

蔡 燕¹⁾ 小川 基彦¹⁾ スティヨノ・アグス¹⁾ 福士 秀人²⁾
 田原 研司³⁾ 安藤 秀二¹⁾ 岸本 寿男¹⁾

(平成 16 年 6 月 21 日受付)

(平成 16 年 12 月 16 日受理)

 Key words : *Chlamydomonas psittaci*, PCR, DNA extraction

〔感染症誌 79 : 153~154, 2005〕

序 文

オウム病は *Chlamydomonas psittaci* (オウム病クラミジア) を起因菌とする人獣共通感染症であり, オウムおよびインコ類をはじめとする鳥類が感染源となる¹⁾. ヒトは, 主に, 菌を含む排泄物などを吸入して感染する. ヒトの症状は軽症の上気道炎から重症例まで多様で, 治療が遅れると死の転帰をとることもある²⁾.

近年, 鳥が放し飼いにされているケージに人が入る展示形態や鳥とのふれあいを魅力とする鳥展示施設が増加し, 鳥とヒトの距離が近くなり, 感染源となりうる鳥のオウム病クラミジア検査の必要性が生じてきた. また実際, 国内のトリ展示施設において, オウム病の集団発生が起こった³⁾. そこで, 本研究では, 鳥類からのオウム病クラミジアの検出法を確立するため, 鳥の総排泄口擦過材料 (総排泄口スワブ) および糞便からの *C. psittaci* の遺伝子検出法について検討を行った.

材料と方法

S 動物展示施設の協力を得て, オウムおよびインコ類のトリの総排泄口スワブ 98 検体, 同トリの

ケージ内糞便 25 検体を用いた. また, 陽性コントロールとして, オウム病のアウトブレイクのおきた施設鳥由来の陽性総排泄口スワブ 10 検体を用いた. トリ由来検体からの DNA 抽出には, Puregene (フナコシ), セバジーン (三光純薬) および QIAamp DNA Stool Mini Kit (以下 QIAamp, キアゲン) DNA 抽出キットを用いた. 総排泄口スワブは PBS に浸しよく混和し, 糞便は PBS でおよそ 20% の乳剤を作成し, 低速で遠心後, その上清を各 DNA 抽出キットに用いた. 最終的に, 50μl の蒸留水に浮遊させ, そのうちの 5μl を外膜タンパク質を標的とした PCR 法⁴⁾に用いた.

結 果

S 施設鳥由来総排泄口スワブ 98 検体では, Puregene では 13 検体 (13%) が陽性, セバジーンでは 2 検体 (2.0%) が陽性であった (Table 1). また, 糞便 25 検体では, Puregene では 2 検体 (8.0%) が陽性, セバジーンでは 1 検体 (4.0%) が陽性であった. また, 陽性総排泄口スワブ 10 検体では, Puregene では 10 検体全て (100%) が陽性, セバジーンでは 8 検体 (80%) が陽性, QIAamp では 5 検体 (50%) のみが陽性であった.

考 察

我らは初めて現在日本で汎用している 3 つの

 別刷請求先 : (〒189-0024) 東京都新宿区戸山 1-23-1
 国立感染症研究所ウイルス第一部第五室

岸本 寿男

Table 1 Comparison of DNA extraction from birds' specimens

	PureGene DNA extraction kit		Sepagene		QIAamp DNA Stool Mini Kit	
	Cloacal swabs	Feces	Cloacal swabs	Feces	Cloacal swabs	Feces
Birds' specimens (unknown) ^{a)}	13/98 (13) ^{c)}	2/25 (8.0)	2/98 (2.0)	1/25 (4.0)	NT	NT
Birds' specimens (positive) ^{b)}	10/10 (100)	NT	8/10 (80)	NT	5/10 (50)	NT

^{a)} Bird's specimens were collected in S bird park. ^{b)} Positive birds' specimens were originated from an outbreak of Psittacosis in V bird park. ^{c)} Positive specimens/Total specimens (%)

DNA 抽出キットの効率を比較した。これまで、一部のキットでヒトや動物検体での検討および報告がされているが、鳥由来検体については報告がなかった^{5)~7)}。

今回の結果から、鳥由来検体からのオウム病クラミジアの検出には、Puregene が、他の2キットより検出率が高く有用であることが示された。一般に糞便やスワブ検体中には夾雑物が多く、実際検体中の蛋白質量もまちまちである。Puregene が優れていた理由として、強力な酵素 Proteinase K により（濃度を上げることも可能）蛋白質消化が効率よく行え、その後の蛋白質沈殿ステップにより、夾雑物などを沈殿物として効率よく排除できることが考えられた。一方で、セパジーンでは蛋白や夾雑物が多いと蛋白除去剤による除去が十分でなく、DNA 抽出液に不純物が混入するようである。また、QIAamp では、検体量および抽出 DNA 量が 200μl と、Puregene がそれぞれ 50μl であるのと比べるとスケールが大きく、陽性排泄口スワブを用いた結果では検出効率も悪かった。

また、Puregene では、1 検体あたりの価格も比較的安くて経済的であり、操作が簡便で大量の検体の処理にも適している。今後もさらに検討を進め、本法を鳥類におけるオウム病クラミジアの検査に応用していく予定である。

謝辞：本研究にご協力いただいた鳥展示施設の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Panigrahy B, Grimes JE, Rideout MI, Simpson RB, Grumbles LC : Zoonotic diseases in psittacine birds : apparent increased occurrence of chlamydiosis (psittacosis), salmonellosis, and giardiasis. J Am Vet Med Assoc 1979 ; 175 : 359—61.
- 2) Brnon AL : Microbiology of Chlamydia. In : Schachter J, ed. Overview of human diseases. Boca Raton, Fla : CRC Press, 1988 ; p. 153—65.
- 3) 田原研司, 板垣朝夫, 新田則之, 村下 伯, 足立行, 道越小雪, 他 : 鳥展示施設に関連したオウム病集団発生事例—鳥根県松江市. IASR 2002 ; 23 : 247—8.
- 4) Yoshida H, Kishi Y, Shiga S, Hagiwara T : Differentiation of Chlamydia species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. Microbiol Immunol 1998 ; 42 : 411—4.
- 5) Vandenberg N, Van Oorschot RA : Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA Stool Mini Kit. J Forensic Sci 2002 ; 47 : 993—5.
- 6) Li M, Gong J, Cottrill M, Yu H, de Lange C, Burton J, et al. : Evaluation of QIAamp DNA Stool Mini Kit for ecological studies of gut microbiota. J Microbiol Methods 2003 ; 54 : 13—20.
- 7) Gary AF, Steven HF : Comparison of six commercial DNA extraction kits for recovery of cytomegalovirus DNA from spiked human specimens. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 3860—3.

DNA Extraction of *Chlamydomydia psittaci* from Cloacal Swabs and Feces of Birds

Yan CAI¹⁾, Motohiko OGAWA¹⁾, Agus SETIYONO¹⁾, Hideto FUKUSHI²⁾,
Kenji TABARA³⁾, Shuji ANDO¹⁾ & Toshio KISHIMOTO¹⁾

¹⁾Department of virology I, Laboratory of Rickettsia & Chlamydia,
National Institute of Infectious Disease, Tokyo, Japan,

²⁾Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu, Japan,

³⁾Shimane Prefectural Institute of Public Health Environmental Science, Matsue, Japan