

氏名(本籍)	平井昭彦(東京都)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第23号
学位授与年月日	平成24年7月11日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	Development of a Method for Detecting <i>Coxiella burnetii</i> in Cheese Samples (チーズからの <i>Coxiella burnetii</i> 検出法の開発に関する研究)
論文審査委員	(主査) 松田基夫 (副査) 山本静雄 古畑勝則

#### 論文内容の要旨

*Coxiella burnetii*は偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトに熱性疾患であるQ熱を引き起こす。本菌はニュージーランドを除くほぼ世界中に分布しており、家畜、野生動物、野鳥、マダニが保菌している。Q熱の病態には発熱、筋肉痛等のインフルエンザ様症状を呈する急性Q熱と、このうち1～3%の患者が発症する慢性Q熱があり、慢性Q熱を発症すると心内膜炎や肝炎を呈して予後不良である。

本症のヒトへの感染経路は主に経気道感染である。本菌に感染したヤギ、ヒツジ、ウシなどの家畜、イヌやネコなどのコンパニオンアニマルは、尿、糞便、乳や出産時の胎盤・羊水等の中に大量の本菌を排菌して環境を汚染する。本菌は環境中で長期間生存できることから、塵芥と共に風に巻き上げられた本菌が呼吸器を介してヒトに感染する。近年オランダで発生したQ熱アウトブレイクは、酪農用ヤギと羊農場が原因と推定されている。

一方、生乳や乳製品による経口感染も示唆されており、フランス、カナダおよびギリシャで発生したQ熱アウトブレイクでは、それぞれ未殺菌乳や乳製品、ヤギ乳チーズあるいは田園地帯で作成されたチーズの摂取などが感染経路と推定されている。しかしながら、本菌の経口感染に関しては未だ不明な点も多く、また乳製品の本菌汚染についても調査報告はほとんど無く実態は不明である。そこで、本菌による乳製品の汚染状況に関する基礎的研究として、多量のタンパク質と脂肪を含み検査が困難であるチーズからの本菌検出方法を開発した。また、開発した方法を用いて市販チーズの汚染実態を調べ、以下の結果を得た。

- 1) *C. burnetii*は培地で培養できないため、チーズから直接DNAを抽出し本菌に特異的な遺伝子をPCR法で検出する遺伝子検査を、スクリーニング検出法として用いることとした。最初にタンパ

ク質と脂肪を除去し菌体を分離する方法を検討した。ソフト、セミハードおよびハードの3タイプのチーズを使用し、各チーズ10gにPBS20mlを加え、45℃、50℃および56℃で加熱後ストマッキングし、チーズの溶解性を検討した。その結果、ハードタイプチーズは、45℃あるいは50℃加熱では一部固形物が残るが、56℃加熱では完全に溶解することが判明し、加熱温度には56℃を採用することとした。

- 2) 次に、タンパク質を含む固形分と脂肪を除去する方法について、低温・低速遠心法を検討した。乳剤を900×gあるいは400×gで20分間4℃にて遠心し、水層（中間層）を分取して容量を計測し、分離状況を調べた。遠心後、チーズの脂肪は4℃の低温で上層に固化し、容易に水層との分別が可能であった。また、分取した水層の容量は900×gで14.8ml（回収率74.2%）、400×gで14.5ml（回収率72.6%）であり、900×gの回収率がやや高い成績であった。さらに、それぞれの水層を22,000×gで20分間4℃で遠心し、沈渣の重量を比較した。900×gから分取した水層からの沈渣は0.53gであり、400×gの水層からの沈渣は0.68gであった。以上の検討から、900×gの遠心の方が水層の回収率が高く、また残渣重量が少ないことが明らかとなり、低速遠心には4℃、900×gを採用することとした。
- 3) 固化した脂肪と固形分からの菌の再抽出について、上記と同様の検討を行った。脂肪と固形分にPBSを再度加え加熱後ストマッキングした結果、3タイプ全てのチーズが全ての温度で溶解し、差異は認められなかった。また、乳剤から再抽出時にPBSを分離する遠心力も、900×gあるいは400×gの水層で差異は認められず、また沈渣重量にも差異は認められなかった。以上の検討結果を基に、チーズから沈渣として菌体を得る方法を確立した。
- 4) 沈渣からのDNA抽出は、既報の検査法を基にして、チーズの遠心沈渣から効果的に抽出できるよう修正した。沈渣をPBSに再浮遊し、SDS、proteinase Kおよびglycogenを加えて56℃1時間消化した。消化後、沃化ナトリウムとイソプロピルアルコールを加えてDNAを抽出し、70%エチルアルコールで洗浄、乾燥した後50μlの蒸留水に溶解してDNAテンプレートとした。PCR法による*C. burnetii*の遺伝子検出には、*com1*（増幅産物438bp）、*htp-B*（増幅産物325bp）および*icd*（増幅産物370bp）とそれぞれ異なる部位の遺伝子をターゲットとしたnested PCR法を用い、3遺伝子全ての増幅が確認された場合を陽性と判定することとした。
- 5) 標準菌株として、*C. burnetii* Nine Mile株を用いた。本菌をBGM（Buffalo green monkey）細胞を用いて、7～10日間CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養後、培養液を分取し、低速遠心で細胞成分を除いた後、上清を高速遠心して菌体を沈渣として回収し、ホルマリン加生理食塩水に再浮遊させて不活化した。PBSで洗った後PBSに再浮遊し、菌数を計測した後使用時まで-80℃で保存した。この試験は、バイオセーフティレベル（BSL）3実験室内で実施した。
- 6) 開発した検査法の検出感度を検討した。あらかじめ*C. burnetii*が陰性であることを確認したセミハードタイプチーズに、標準菌株を1g当たり $6.0 \times 10^3$ 、 $6.0 \times 10^2$ 、 $6.0 \times 10^1$ および $6.0 \times 10^0$ 添加して抽出操作を行い、PCR法により検出を行った。各濃度5検体について検討した結果、3遺伝子全て

が増幅され陽性と判定したものは、チーズ1g当たり $6.0 \times 10^2$ 以上添加した試料であり、 $6.0 \times 10^1$ 添加した試料では*com1* 遺伝子で100%、*htp-B* 遺伝子で60%および*icd* 遺伝子で80%陽性と結果が安定しなかった。このことから本検査法の検出感度は $6.0 \times 10^2/g$ とした。

- 7) 本検査法を用いて、東京都内で市販されていた市販チーズ147検体について*C. burnetii*の汚染実態を調査した。調査期間は2005年6月から2008年12月まで、検体は殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ96検体、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ41検体およびプロセスチーズ10検体である。また、117検体は輸入品、30検体は国産品である。実態調査の結果、28検体(19.0%)が陽性となった。陽性数は、殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ96検体中20検体(20.8%)、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ41検体中7検体(17.1%)およびプロセスチーズ10検体中1検体(10.0%)であった。原産国別では、フランス76検体中15検体(19.7%)、日本30検体中6検体(20.0%)およびイタリア14検体中7検体(50.0%)であり、これらの検体には*C. burnetii* 遺伝子の存在することが明らかとなった。
- 8) PCRで増幅された生成産物は精製後にシーケンス解析を行なった。その結果、3遺伝子全てにおいて検体間での差異は認められなかった。次に、添加試験に使用したNine Mile株と比較した結果、*icd* 遺伝子の745位がNine Mile株ではグアニンであるのに対し、検体では全てアデニンであり、点変異が認められた。*icd* 遺伝子配列を比較した報告によれば、745および1089位における点変異がNine Mile株とPriscilla株を型別可能としており、今回の検体はPriscilla株のグループに属することが明らかとなった。また、これらの結果から、今回のスクリーニング結果が、添加試験に使用したNine Mile株の汚染による誤陽性ではないことも確認された。
- 9) スクリーニング検査法で陽性となった28検体について、冷凍保存した検体から菌を抽出し*C. burnetii*の生存性を検討した。このとき、最初の抽出のための加熱温度を50℃とし、本菌の不活化を極力防ぐこととした。遠心沈渣はsucrose phosphate glutamateに再浮遊し、サイクロフォスファミドにより免疫抑制処理をしたマウスの腹腔内に接種し、3週間後にマウス体内で増殖したか否を検討した。その結果、全ての検体がマウス脾臓消化物のPCR検査で陰性、脾臓スタンプ標本をギムザ染色・鏡検して菌体を認めなかったことから、*C. burnetii*はマウス体内で増殖していないと考えられ、スクリーニング陽性検体中には死菌または遺伝子のみが存在していたものと考えられた。この生存性確認試験は、当センターの動物実験許可を得てBSL3実験室内で実施した。

以上の結果から、加熱溶解温度、低温・低速での遠心、再抽出法等を最適化することにより、タンパク質と脂肪に富むチーズから効果的にDNAを抽出することが可能となった。本法による*C. burnetii* 遺伝子の検出感度は $6.0 \times 10^2/g$ であり、既報の牛乳、鶏卵あるいはマヨネーズからの*C. burnetii* 遺伝子検出感度と同等、あるいはより高感度であった。

また、本法を用いた汚染実態調査により、市販チーズの19%に*C. burnetii* 遺伝子が存在することが確認された。また、輸入チーズのみならず、国産チーズの20%にも*C. burnetii* 遺伝子が存在すること

が明らかとなった。フランスおよびイタリア産の陽性検体には、未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズ7検体も含まれていた。遺伝子検査で陽性であった検体について生存性試験を行なった結果、本菌が生存しているものは認められなかった。これらの結果は、本菌に感染した家畜が乳中に本菌を排菌し、チーズの原料乳を汚染していることを示唆するものであり、チーズ製造方法によっては人への感染源となる可能性も否定できないことが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

ヒトに熱性疾患であるQ熱を引き起こす *Coxiella burnetii* は、偏性細胞内寄生性細菌であり、家畜、野生動物、野鳥、マダニが保菌している。この *C. burnetii* はヒトへは主に経気道感染の感染経路をとるが、生乳や乳製品を介した経口感染の経路も示唆されている。しかし、本菌の経口感染については未だ不明な点も多く、また、乳製品の汚染実態についても不明のままである。そこで本研究では、筆者は乳製品の本菌汚染状況を明らかにすることを目的として、チーズからの本菌 *C. burnetii* の検出方法を新たに開発し、その開発した方法を用いて市販チーズの汚染実態を調べた。

まず、タンパク質と脂肪の豊富なチーズからDNAを効果的に抽出する方法について、チーズの溶解温度、低温・低速遠心によるタンパク質・脂肪の除去方法等を検討し、チーズからDNAを抽出する新たな方法を開発した。更に、*C. burnetii* は人工培地で培養できないため、スクリーニング検査には遺伝子検出法を用いた。即ち、*C. burnetii* ゲノムDNA中の異なる3部位 [*com1* (*Coxiella* outer membrane protein 1), *htp-B* (heat shock protein B), *icd* (isocitrate dehydrogenase)] の遺伝子をターゲットとした新たな nested PCR法を開発し、3遺伝子全ての増幅が確認されたものを陽性と判定した。不活化した *C. burnetii* をチーズに添加して検討した本法の検出感度は  $6.0 \times 10^2/g$  であり、既報の牛乳、鶏卵あるいはマヨネーズからの検出感度と同等あるいはそれらより高感度であった。

次に、開発した方法を用いて、東京都内の市販チーズ147検体について汚染実態調査を行なったところ、28検体 (19.0%) がPCR陽性となり、これら検体市販チーズ中での *C. burnetii* 遺伝子の存在が明らかとなった。また、輸入チーズのみならず国産チーズの20%にも *C. burnetii* 遺伝子部分の存在することが明らかとなった。次いで、これらPCR産物の塩基配列を決定したところ、これらは *Priscilla* 株のグループに属することが明らかとなった。また、3遺伝子全てにおいて検体間での差異は認められなかったが、用いた標準株 *Nine Mile* 株と比較すると供試株で、*icd* 遺伝子の点突然変異 (G745A及びG1,089A) が認められた。更に得られた結果は、標準株の混入による誤陽性ではなかった。陽性検体中の *C. burnetii* の生存性を、サイクロフォスファミドにより免疫抑制処理をしたA/J系マウスを用いて調べたところ、チーズ中に生菌の *C. burnetii* は存在しないことが明らかとなり、死菌または遺伝子部分のみがチーズ検体中に存在しているものと推定された。

これらの結果は、本菌に感染した家畜がその乳中に本菌を排菌し、チーズの原料乳を汚染していることを示唆するものであり、チーズの製造方法によっては人への感染源となる可能性も否定できない

ことが示唆された。

このように、本学位申請論文は、*Coxiella burnetii* 及び *C. burnetii* を起因菌とする「ヒトQ熱及び動物のコクシエラ症」の公衆衛生学の基礎的研究の発展に貢献するものであり、それ故に博士（学術）を授与するにふさわしい研究論文であると審査員一同判断した。