

DNA解析による動物の感染症の 確定診断と鳥類の性別

*Reliable diagnosis of infectious diseases in animals
and sexing of birds based on DNA analyses*

藤谷英男, 藤瀬 浩, 若尾義人

麻布大学大学院獣医学研究科

Hideo Fujitani, Hiroshi Fujise, Yoshito Wakao

Graduate School of Veterinary Sciences, Azabu University

Abstract: Four independent studies were carried out. They were: 1. Species identification by genome analyses of the genus *Helicobacter* that infected the cheetah, the swine and the monkey;
2. Usefulness of PCR-detection of viral genes in fecal samples from canine parvovirus infected dogs;
3. Sexing of birds by DNA analyses; and 4. DNA-sexing of a case of hermaphroditism found in a miniature dachshund. Results from each study will be described separately.

- 1. *Helicobacter*** Nucleotide sequence homology was examined for PCR-amplified segment of 16S rDNA to differentiate the *Helicobacter* species. The cheetah samples were classified into four species, including the closely related *Flexispira rappini*. On the basis of restriction site distribution, these were more conveniently grouped into three RFLP criteria, one consisting of the two *Helicobacter* species. Three *Helicobacter* species were identified in swine specimens, one at the fundus or pylorus, and two at the cardia. Although the three species from simian samples were highly homologous to the human bacteria, they were considered to be unique to monkeys after phylogenetic analysis.
- 2. Canine parvovirus (CPV)** Fecal samples proved to be convenient and satisfactory materials for differential PCR detection of CPV. With the first step primers CPV was divided into CPV-2 and a combination of its two subtypes. The second set of primers further divided the latter into CPV-2a and CPV-2b, thus clearly identifying the three known antigenic types of CPV by using dog feces.
- 3. Avian sexing** The avian sex chromosomes (W and Z) carries chromobox helicase-DNA binding (CHD) protein genes with its intron differing in length by sex. Taking advantage of the differences of this and the nucleotide sequence of sex chromosome-linked EE 0.6 region, the two PCR methods successfully identified snowy owl's sex (using blood sample), and the CHD-PCR, chicken's (using feather).
- 4. Sexing of a hermaphroditic dog** The highly accurate PCR/RFLP method we previously reported was applied to sexing of a case of hermaphroditic miniature dachshund that possessed a mixed external and internal genitalia. DNA from its nail showed that this dog had XX chromosome set and (essentially Y-specific) SRY sequence. It was concluded that this originally female dog had somehow acquired SRY segment, presumably during meiosis in one of its parents.

1. チーター、ブタおよびサルに感染するヘリコバクター属菌のゲノム解析による種分別同定の試み

目 的

近年、動物においてヘリコバクター属菌 (*Helicobacter*, 以下H属菌とする) による胃炎は深刻な問題を引き起こしているが¹⁾, その培養法が確立されていないため、菌種の同定や細胞学的診断は難しい。本研究では、チーター、ブタ、サルの各動物に感染しているH属菌の16S rDNAの一部の塩基配列情報に注目してH菌の分類を試みた。また、その配列の相違から、より簡便なRFLP (制限酵素断片長多型) 解析による菌種の同定も試みた。

方 法

H菌の感染が疑われる11頭のチーター、26頭のブタ、5頭のサルの胃および糞からDNAを抽出した。各種H菌の16S rDNA配列に共通のプライマーを用いてPCRによる増幅を行った²⁾。目的の大きさである約400塩基対の増幅産物の塩基配列をオートシーケンサーにより決定し、既存の配列との相同性検索を行った。チーターからのPCR増幅産物は、*Hha* Iと*Mbo* IIによる制限酵素処理を行った。

結果と考察

16S rDNA配列情報に基づいて、チーターから得られたH属菌は、①*H. heilmanni* 関連、②*H. felis* および*H. biszozeronii* 関連、③*H. bilis* 関連、*Flexispira rappini* の4つのグループに分けられた。また、16S rDNA増幅断片の*Hha* Iと*Mbo* II消化によるRFLP解析から、グループ①および②、グループ③、グループ④の3通りに識別できた。ブタから得られたH属菌は、①*H. suis* 関連、②*F. rappini*, ③*H. rappini* などその他のH属菌の3つのグループに分類できた。①はブタの胃底部および幽門部から得られ、②と③は噴門部から得られた。サルから得られたH属菌は、ヒトから分離された既知の*H. sp.*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae* と高い相同性を示したが、系統樹から別系統と考えられ、サル特有のH菌と思われた。

要 約

16S rDNA (一部) の塩基配列を解析することにより、チーターに感染するH属菌が少なくとも4種類あることがわかり、PCR-RFLP解析により、それらを3つのグループに分けることが可能であった。ブタでは少なくとも3種類のH属菌の感染が確認でき、胃内での存在部位により菌種が異なっていることがわかった。

文 献

- 1) Skirrow M. B., J. Comp. Pathol., 111, 113-149, 1994.
- 2) Fox J. G., Dewhirst F. E., Shen Z., Feng Y., Taylor N. S., Paster B. J., Ericson R. L., Lau C. N., Correa P., Araya. C., Roa I., Gastroenterology, 114, 755-763, 1998.

2. PCRによるイヌパルボウイルス感染症の遺伝子検査法の有用性

目 的

1970年にイヌ微小ウイルス (イヌパルボウイルス1型)¹⁾ が発見されて以来、1980年までにそれぞれ抗原型の異なるイヌパルボウイルス (以下CPVと略す) であるCPV2型 (CPV-2)²⁾, CPV-2a型³⁾ そしてCPV-2b型⁴⁾ の大規模な感染が報告されている。CPVの主な感染源は、感染した犬の糞便であり、排泄されたウイルスは糞便中に、少なくとも4ヶ月間は生存していると言われている。このため糞便は、ウイルス検出に好適な材料となる^{5, 6)}。糞便サンプル中のCPVは、細胞培養によるウイルスの増殖確認、電子顕微鏡によるウイルスの観察、HA (赤血球凝集反応) 法、さらにはウイルス抗原や抗体を検出するELISA法、DNAハイブリダイゼーション法等により検出されてきた^{7, 8)}。また最近ではPCR法が、その感度、特異性、迅速性の点から利用されている⁹⁻¹²⁾。PCR法では、CPV-2、CPV-2aとCPV-2bの3種類のCPVのカプシド遺伝子領域におけるヌクレオチド配列の相違に注目して¹³⁾, CPV-2aとCPV-2bの両方を検出するプライマー¹⁴⁾, CPV-2を検出するプライマー、さらにCPV-2bを検出するプライマーが設計されている¹⁵⁾。本研究では、CPV感染症が疑われ

るイヌの糞便からDNAを抽出し、PCR法によるCPVの検出とそのタイプ分けを試みた。

方法

市販の9種類のワクチンおよび24の糞便サンプル（このうちCPV感染症と疑われるのは14検体）から抽出したDNAを鋳型として使用し、既知のプライマーセットを用いてPCR増幅を行った。増幅産物は1.8%のアガロースゲルで電気泳動し、1 μ g/ml臭化エチジウム溶液で染色して泳動像を確認した。

結果と考察

市販されている8つのCPVワクチンのうち6種類の生ワクチンで、CPV-2由来の目的のサイズの明瞭なバンド（681塩基対）が見られた。しかし、CPV-2aまたはCPV-2b由来のバンドは検出されなかった。この結果は、市販のCPVワクチンの作製には、一般にCPVの古いタイプであるCPV-2株が用いられていることを反映していると考えられる。2種類の不活化ワクチンはPCRによる増幅には不適であった。CPV感染症が疑われた14検体の糞便サンプルでは、CPV-2由来のDNA断片の増幅は見られなかったのに対し、CPV-2aとCPV-2bの両方を検出するプライマーを用いたPCRおよびCPV-2bを検出するプライマーを用いたPCRでは、いずれも目的のサイズのバンド（681と427塩基対）が得られた。したがってこれらの糞便中で検出されたCPVはCPV-2bと考えられた。

要約

PCRは糞便サンプルからのCPVの検出および型判別に有効であることを確認した。まず、CPV-2型かCPV-2bまたは-2bかを検出し、後者だった場合は、さらにCPV-2bの判別をすることが可能だった。

参考文献

- 1) Binn, L. N., Lazar, B. C., Eddy, G. A., Kajima, M., *Infect. Immun.*, 1, 503-508, 1970.
- 2) Appel, M. J. C., Scott, F. W., Carmichael, L. E., *Vet. Rec.*, 105, 156-159, 1979.
- 3) Parrish, C. R., O'Connell, P. H., Evermann, J. F., Carmichael, L. E., *Science*, 230, 1046-1048, 1985.
- 4) Parrish, C. R., Aquadro, C. F., Strassheim, M. L.,

Evermann, J. F., Sgro, J. Y., Mohammed, H. O., *J. Virol.* 65, 6544-6552, 1991.

- 5) Carmichael, L. E. and Binn, L. N., *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 25, 1-37, 1981.
- 6) Green, C. E., Canine viral enteritis. In: C. E. Green (Editor), *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. pp. 437-460 Saunders, Philadelphia, 1984.
- 7) Mochizuki, M., Hida, S., Hsuan, S., Sato, H., *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46, 587-592, 1984.
- 8) Teramoto, Y. A., Mildbrand, M. M., Carlson, J., Collines, J. K., Winston, S., *J. Clin. Microbiol.*, 20, 373-378, 1984.
- 9) Mochizuki, M., Harasawa, R., Nakatani, H., *Vet. Microbiol.* 38, 1-10, 1993.
- 10) Hirasawa, T., Yono, K., Mikazuki, K., *J. Vet. Med. B.*, 42, 601-610, 1995.
- 11) Truyen, U., Platzer, G., Parrish, C.R., *Vet. Rec.* 138, 365-366, 1996.
- 12) Uwatoko, K., Sunairi, M., Nakajima, M., Yamaura, K., *Vet. Microbiol.* 43, 315-323, 1995.
- 13) Reed, A. P., Jones, E. V., Miller, T. J., *J. Virol.* 62, 266-276, 1988.
- 14) Senda, M., Parrish, C. R., Harasawa, R., Gamoh, K., Muramatsu, M., Hirayama, N., Itoh, O., *J. Clin. Microbiol.* 33, 110-113, 1995.
- 15) Pereira, C. A. D., Monezi, T. A., Mehnert, D. U., D'Angelo, M., Durigon, E. L., *Vet. Microbiol.*, 75, 127-133, 2000.

3. 鳥類のDNAによる性別判定

目的

鳥類は、一般に形態学的特徴から雌雄を判別することは困難である。動物園からの要望もあり、性染色体（WとZ染色体）のDNA塩基配列の相違に注目した性別判定法の導入を試みた。

方法

シロフクロウの血液から抽出したDNAおよびニワトリの羽毛から抽出したDNAを用いた。ZとWの各染色体上に存在するCHD（クロモボックスヘリカーゼDNA結合）遺伝子の各染色体上でのイントロンの長さの相違を利用したPCR検出法¹⁾とW染色体に存在するEE0.6配列（断片由来）の塩基配列の差異を利用したPCR検出法²⁾を実施した。

結果と考察

シロフクロウではいずれの方法においても雌雄で異なる目的のバンドが得られ、性判別が可能であった。ニワトリの羽毛から抽出したDNAでもCHDを利用したPCRにより雌雄判別が可能であることを確認した。

文 献

- 1) Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. G., Mol. Ecol. 7, 1071-1075, 1998.
- 2) Itoh Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K., Mizuno S., J. Hered., 92, 315-321, 2001.

4. ミニチュアダックスフントにみられた半陰陽例の性別鑑定

目 的

内部と外部の性器官が異常な組合せで発生したミニチュアダックスフントのDNA鑑定による性判別を試みた。

方 法

当該ミニチュアダックスフントの爪より抽出したDNAを用いて、性染色体上のジンクフィンガー蛋白質をコードする遺伝子 (ZFX/ZFY) の一部 (447塩

基対) をPCR増幅し、その制限酵素切断多型 (RFLP) に基づき¹⁾、性別を判定した。また、Y染色体上に存在し、性 (雄) を決定する遺伝子として知られているSRY (sex-determining region of Y) 遺伝子の一部 (HMG box領域) のPCR増幅を行った²⁾。

結果と考察

ZFX/ZFY増幅産物のRFLPから、イヌX染色体由来である241bpと162bpの2つのバンドのみが認められ、Y染色体由来の447bpのバンドはみられなかった。従って、本個体はXX染色体をもつ雌と考えられた。また、通常、イヌ雄個体にしかみられないSRY遺伝子由来の104bpのバンドが検出され、本個体でのSRY配列の存在が示唆された。

要 約

DNA鑑定により、本個体は通常の雌と同様にXX型染色体を示すが、雄特有のSRY遺伝子ももっている (おそらく減数分裂時の組換えによる) ことから半陰陽になったと考えられた。

文 献

- 1) Murakami M., Fujise H., Lee Y. S., Matsuba C., Fujitani H., J. Vet. Med. Sci., 63, 679-681, 2001.
- 2) Meyers-Wallen V. N., Palmer V. L., Acland G. M., Hershfield B., Mol. Reprod. Dev., 41, 300-305, 1995.