

学 位 論 文 要 旨

氏 名 小 嶋 篤 史

題 目 *Macrorhabdus ornithogaster* の分子生物学的解析法と治療法開発に向けた基礎技術の開発

(Development of basic technologies for molecular biological analysis and development of therapeutic methods for *Macrorhabdus ornithogaster*)

*Macrorhabdus ornithogaster* (MO) は世界中の鳥類に分布する病原真菌であり、日本で最も一般的なペット鳥であるセキセイインコにおいて高い保有率と発症率、死亡率が知られており、胃癌との関連も報告されていることから、MO感染症は非常に重要な感染症と言える。MO についてはいまだ不明な点が多く、特に培養が困難であることがさまざまな研究を妨げている。また、安全で確実な治療法について詳細な研究報告がない。特に現在最も広く使用されている AMPH-B 単剤による治療は耐性菌などにより有効性が低いことが示されており、新規治療法の報告が喫緊の課題である。

そこで本研究では、日本のペット鳥の MO 感染症について治療成績を含めた疫学調査を行い、次いで MO の培養と薬剤感受性試験の開発を行った。さらに、MO の分子疫学的解析法を開発し、これを用いて日本に蔓延する MO の分子疫学的な調査を実施した。

第一章の疫学調査では、MO の感染に対する差がなく、発覚年齢が幼若鳥に集中している傾向が示された。治療開始3週間内での陰転率は AMPH-B 単剤療法が 66.7%、AMPH-B・MCFG 併用療法が 75.0% であり、有意差を認めなかったが、AMPH-B 単剤療法で陰転しなかった個体に対し MCFG や FLCZ (あるいは両方) を併用し、最大 6 週まで治療を継続した場合の陰転率は 97.9% まで上昇した。これは海外において報告されている AMPH-B 単剤療法の陰転率 (16.6%) をはるかに上回る成績であった。一方で 3 週内に胃炎で死亡している個体も存在していたことから、初回から多剤併用療法を検討すべきと考えられた。また、多剤耐性株の存在が明らかとなり、新たな効果的な治療薬の発見が大きな課題として提示された。

第二章における培養実験では、培養管による汚染の軽減、強酸性培養液による除菌、培養上清の 5~10% 添加による増殖強化、適正な植え継ぎ期間の設定、冷凍保存の成功により、培養を成功させるための情報が蓄積された。また、培養した株により表現型の違いが明らかとなり遺伝子型との関係に興味を持たれた。

第三章では、第二章で培養に成功した株を基に感受性試験法の確立が行われた。酵母様真菌 DP “栄研” を用いた感受性試験では、判定時間を 72~120 h とする案が提案された。Candida spp. における CLSI M27 ガイドラインを参考に、それぞれの薬剤の感受性試験結果を解釈したところ、MCFG、CPFZ、FLCZ、VRCZ は感性であり、ITCZ は用量依存的感性、5-FC は耐性となった。AMPH-B は株によっては耐性となった。MCZ は ITCZ に近い MIC が得られ、効果は同等と考えられた。これまで MO に対しては AMPH-B による治療が主として行われてきたが、これまで鳥の MO に対して使用報告のない CPFZ、VRCZ や、AMPH-B と MCZ の大量経口投与が新たな有効な治療方法として提案された。

第四章では、日本において初めて MO の分子生物学的な研究が行われた。特異的なプライマーを用いた semi-nested PCR あるいは nested PCR によって、糞便サンプルから直接塩基配列を取得することが可能となり、分子疫学調査が容易

となった。また病原性真菌の解析では一般的な、IGS 配列の解析がMO でも可能となった。開発した方法を持ちいてMO の系統解析が行われ、日本において形態学的にMO と同定された酵母が遺伝的にもMO であることが確認された。また、ブンチョウにおけるMO 感染の初報告となった。D1D2、ITS、IGS1、IGS2A 各領域における遺伝子解析では、IGS2A 領域におけるギャップを含めた塩基の変異率が 29.3% と非常に高く、MO の rDNA 内ではIGS2A 領域が最も遺伝子解析に適した領域であることが示された。しかし、これら領域の遺伝子解析は、発症の違いや、MO 形態の違い、宿主鳥の種類を区別できず、rDNA 領域はMO の分子疫学的解析に適していない可能性が提示され、rDNA 以外の領域での調査を含むさらなる研究が必要と考えられた。

本研究では、日本のペット鳥の治療成績を含めた疫学調査を行い、世界で広く用いられている AMPH-B 単剤療法よりも効果的なMCFG を含む多剤併用量について報告した。さらに、糞便由来のMO の継代培養に成功し、MO において初となった薬剤感受性試験により、幾つかの新たな治療選択法を提示した。これら研究成果はマクロプラズマ症の治療成績を大幅に改善し、世界中の多くのペット鳥の命を救うことができると考えられる。また、糞便をサンプルとしたMO の系統解析法を開発したことで、大規模な分子疫学的調査が可能となり、日本に蔓延するMO がrDNA 領域において比較的単一の配列グループであることを明らかにした。

- (備考) 1 学位論文題目が日本語の場合は英訳を、英語の場合は和訳を( )内に記入すること。(英語の表記は、論文目録と同じ。)
- 2 日本語の場合は、2, 000 字程度とする。
  - 3 英語の場合は、1, 200 語程度とする。
  - 4 図表は、この要旨には記載しないこと。
  - 5 枚数は1枚を超えても差し支えありません。