

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18785

研究課題名(和文)牛マイコプラズマ肺炎の病態診断に関する研究

研究課題名(英文) Immunological and pathological study of Mycoplasma bovis pneumoniae in cattle

研究代表者

上村 涼子 (Uemura, Ryoko)

宮崎大学・農学部・助教

研究者番号：90529190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：牛のMycoplasma bovis感染症は、日和見感染とされるが、近年、その発生数が著しく増加し、高く注目されている。本菌の病原性は十分明らかにされておらず、効果的な治療・予防法がない。本研究では、M. bovis肺炎の病態進行について、肺胞マクロファージの産生するIL1、TNF、IL8により好中球が誘導され、その後B細胞が誘導され病変を形成することを明らかにした。また、T細胞について、感染初期に一過性に機能亢進するものもあるが、慢性肺炎では機能が著しく減退していることを示した。また、免疫応答には個体差があること、また免疫刺激性にはM. bovisの株間に違いがあることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mycoplasma bovis infectious disease in cattle is considered to be opportunistic infection, but the number of the outbreak increases remarkably in recent years. The pathogenicity of the bacteria has not been clarified enough, thus there is no effective control methods. In this study, the progression of M. bovis pneumonia was analyzed. The infiltration of neutrophils was caused following the cytokine(IL1, TNF, IL8) production from alveolar macrophages. B cells were secondarily infiltrated. In cattle with chronic pneumonia, the function of the T cell decreased remarkably. Therefore, this host was suggested to be in a compromised condition. In addition, it was suggested there was the individual difference in host immune response level, and there was the immune stimulating difference between the isolations of M. bovis.

研究分野：産業動物獣医学

キーワード：Mycoplasma bovis 牛 肺炎

1. 研究開始当初の背景

牛マイコプラズマ肺炎は、宿主の抵抗性の低下が発症要因となる日和見感染症と考えられているが、発症後の経過が長いと、発育不良や廃用となるなど経済的損失が大きい。主要原因菌の *Mycoplasma bovis* は、国内に広く認められ、農場に侵入すると群内に速やかに浸潤し、農場からの排除が極めて困難である。さらに予防ワクチンが開発されておらず予防法が確立されていない。従って、汚染農場では、発症を抑え、たとえ発症しても重篤化させない管理が重要となるが、病態進行過程が不明なため、そのコントロールが困難である。*M. bovis* は、バイオフィルムの形成や過酸化水素放出による細胞障害のほか、間接的に宿主免疫を攪乱させる。牛由来細胞を用いた *in vitro* 試験や牛への感染実験で、免疫担当細胞への *M. bovis* の作用および感染牛のサイトカインの動きが報告されはじめてきている。しかしながら、病態進行メカニズムの解明には至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1)牛マイコプラズマ肺炎の病態進行メカニズムの解明 (2) *M. bovis* 浸潤農場での易感染個体把握システムおよび発症個体の病態診断システムの開発を行い、最終的に、*M. bovis* 浸潤農場における牛マイコプラズマ肺炎による損耗低減化のための飼養管理技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 宮崎大学に搬入された *M. bovis* 性肺炎牛(黒毛和種牛)10頭の肺について、病態の異なる肺葉 (a: 乾酪壊死巣、b: 病変移行部、c: 肉眼的に正常な部位) ごとに採取し、免疫組織学的染色 (一次抗体として抗 *M. bovis* 抗体、各種細胞表面マーカー) フローサイトメトリーによる免疫担当細胞のサブセット解析および real-timePCR を用いたサイトカイン mRNA 解析を行い、集簇する免疫担当細胞および局所におけるサイトカイン (TNF、IFN、IL1、IL8、IL12 等を質的・量的に解析した。

(2) 宮崎県内の牛マイコプラズマ肺炎が多発する黒毛和種牛繁殖農場で飼育された子牛 16 頭 23 検体および宮崎大学に搬入された *M. bovis* 慢性肺炎牛(黒毛和種牛)6 頭から採取した末梢血単核球についてリンパ球幼若化試験を行った。マイトージェンとして、コンカナバリン A (ConA) およびフィトヘマグルチニン P (PHA) を感作させ、72 時間培養後に MTT 法で吸光度を測定し、Stimulation Index (SI) 値を求めた。農場採取牛について、呼吸器症状が有り *M. bovis* が鼻腔拭い液から分離された個体について、感染初期牛とした。健常同居牛と区別した。

(3) 宮崎大学附属農場で飼育されている健常黒毛和種牛 23 頭から末梢血単核球を分離調整し、リンパ球幼若化試験を行った。刺激は ConA および PHA に加え *M. bovis* を単独または重感染させ、*M. bovis* がマイトージェン刺激に対して直接作用するかどうか確認した。供試 *M. bovis* 株は由来の異なる 4 株 (基準株 PG45、肺炎由来 2 株 (うち全葉性の重度肺炎由来 1 株)、健常牛鼻腔由来 1 株) とし、株による違いについても検証した。

また、同農場で飼育している健常黒毛和種牛 11 頭から内視鏡を用いて採取した肺胞洗浄液 (BALF) から肺胞マクロファージを分離・調整し、*M. bovis* 3 株 (基準株 PG45、重度肺炎由来株 1 株、健常牛鼻腔由来 1 株) をそれぞれ感染重度 MOI=5 で感作させた際のサイトカイン発現量を real-timePCR を用いた mRNA 解析により求めた。

4. 研究成果

(1) *M. bovis* 性肺炎の特徴所見として、壊死、肉芽腫、石灰化および肉芽組織の増生 (図 1)・癒痕化が認められ、肺の呼吸機能を著しく阻害し、不可逆的に進行する肺病変が特徴といえた。サブセット解析においては、*M. bovis* 肺炎牛では好中球が増加 (相対比)、重症化に伴い MHC class + 細胞 (B 細胞) が増加し、CD14+ 細胞 (マクロファージ) が逆に減少していることが確認された (図 2)。*M. bovis* 抗原は、壊死部および気管支腔内の細胞退廃物中、マクロファージ様細胞質内および型肺胞細胞様細胞質内で検出され (図 1)、リンパ濾胞過形成部では検出されなかった。重度病変部や正常部に比較して、病変移行部 (肝変化部) では、IL8 や IL1 の産生量が高く、強い炎症が誘導されていることが示唆された。すなわち、*M. bovis* 肺炎に集簇する免疫細胞は、肺炎の進行とともに、マクロファージ、好中球からリンパ球へと移行すると考えられた。肉眼的に正常と思われる部位であっても、好中球の気管支腔内への浸潤が認められることから、全葉性の炎症が生じていることが明らかとなった。このことから、*M. bovis* はマクロファージを活性化 (IL1、IL8 発現量を増加) させ、好中球の遊走を促していることが示唆された。一方、本菌は過酸化水素を産生するため、*M. bovis* 増殖部では非常に高濃度の過酸化水素が蓄積し、遊走してきた好中球を障害または *M. bovis* を貪食した好中球を内部から酸化的に破壊させるとともに、肺胞上皮細胞に障害を与えていることが考えられた。*M. bovis* 感染では MHC class 分子により抗原提示され免疫を誘導するとされているが、今回、B 細胞は増加したが、CD4+T 細胞は増加しておらず、感染牛の T 細胞球誘導性または T 細胞機能が減弱している可能性が考えられた。このことを裏付けるように、IL2 の産生は肺炎の病変の重症化に伴い減少していた。

以上より、*M. bovis* は、好中球およびマクロファージを直接的に刺激し、MHC class II の抗原提示を受けて賦活化されたリンパ球（特に B 細胞）が病態の進行とともに間接的に刺激され集簇していると推察された。

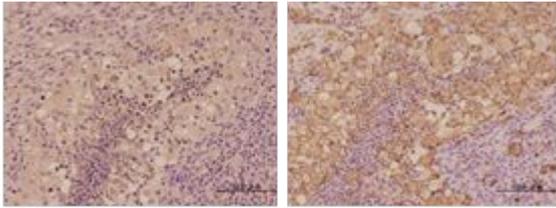


図1 *M. bovis* 性肺炎における *M. bovis* 抗原の分布と変性好中球の集簇ならびに肉芽腫の形成。一次抗体：*M. bovis* 抗体（左図）、抗 Iba1 抗体（右図）

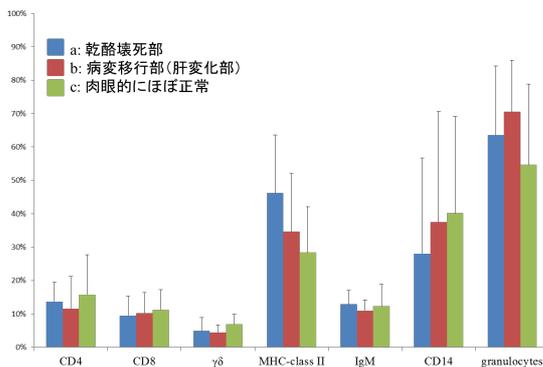


図2 病変の異なる3肺葉のサブセット解析

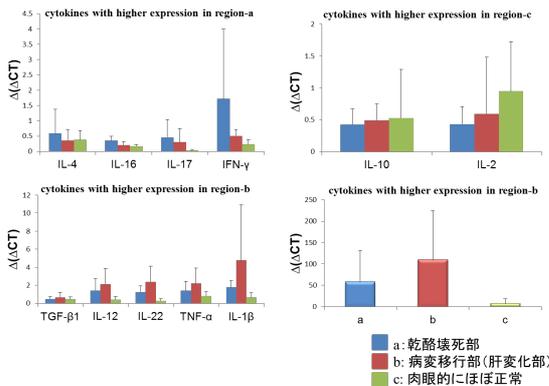


図3 病変の異なる3肺葉のサイトカイン発現量

(2) 農場飼養牛由来血液サンプル 23 検体のうち、検体採取時 *M. bovis* 感染発症牛由来サンプルは 10 検体、*M. bovis* 陰性健常牛由来サンプルは 13 検体であった。牛マイコプラズマ肺炎が疑われた病性鑑定牛 6 頭の肺からは全て *M. bovis* が分離された。*M. bovis* 感染発症初期牛、*M. bovis* 陰性健常牛および *M. bovis* 感染慢性肺炎牛の血液由来単核球を用いたリンパ球幼若化試験の結果、発症初期の SI 値 (ConA; 6.26 ± 1.12 , PHA; 6.40 ± 1.25) は、*M. bovis* 陰性健常牛 (ConA; 3.20 ± 0.28 , PHA; 2.82 ± 0.26) および *M. bovis* 陽性慢性肺炎牛 (ConA; 3.40 ± 0.66 , PHA; 2.36 ± 0.24)

に比較して、有意に高い値を示した ($P < 0.05$) (図 4)。*M. bovis* は健常牛由来末梢血リンパ球への直接刺激では反応を抑制させるとの報告があるが、本試験は、感染個体の末梢血由来リンパ球の異物応答を見ているものであり、感染個体内では、*M. bovis* 感染で刺激されたマクロファージの産生するサイトカイン (IL1、TNF など) 刺激により、T リンパ球の抗原刺激反応が過剰に高まっている可能性がある。この刺激応答性には、個体間の差が大きかったが、これが個体差なのか感染ステージによる違いなのかは言及できなかった。さらに、このリンパ球反応性の亢進は、慢性経過をたどり廃用となった牛では認められなかった。このことから、慢性肺炎牛では、T リンパ球の刺激応答性も失われ、易感染状態になっていることが示唆された。

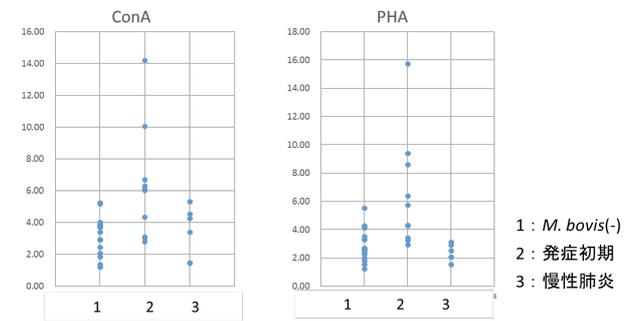


図4 病態ステージごとの *M. bovis* 感染牛由来末梢血単核球のリンパ球幼若化反応

(3) 健常牛由来末梢血単核球に対して、感作した株によって増殖率を増加させる株 (重度肺炎由来株 1 株) と抑制する株 (健常牛鼻腔由来 1 株) があり、株による刺激の違いが確認された。また、マイトージェン刺激に対する影響 (交互作用) として、重度肺炎由来株には、PHA 刺激を増強する作用が認められた。これまでに、株による作用の違いを言及した報告はほとんど無く、株による病原性の違いを紐解く鍵となると考えられる。また、健常牛 BALF 由来マクロファージのサイトカイン発現では、重症肺炎由来株で刺激したときのみ、IL12、TNF および IFN が増加しており、株による刺激性の違いが示唆された。また、BALF を採取した個体ごとに、反応性の高い個体と低い個体が存在し、*M. bovis* 感染時の免疫誘導に個体間差があることが示唆された。

以上の試験結果から、免疫誘導性の高い *M. bovis* 株が感染した場合、感染初期に肺胞マクロファージを刺激し、IL12、TNF、INF などのサイトカインを発現し、好中球を誘導させることが分かった。本来、*M. bovis* はこれらの免疫誘導により排除されるが、排除に至らなかった場合には刺激誘導性は持続し、二次応答としてリンパ球を集簇させると考

えられた。しかしながら、慢性肺炎牛では、Tリンパ球の遊走は少なく、異物刺激に対する反応性も減弱していることから、Tリンパ球機能が減弱し、ほとんど反応していないことも示唆された。このことから、*M. bovis*肺炎による肺の機能障害のみならず、免疫力低下（易感染性状態）による二次感染のリスクも高まっていると推測できる。

さらに、感染する *M. bovis* 株による刺激誘導性の違いに加えて、宿主免疫応答性にも個体間差があることから、病原性の強い株および易感染宿主の存在について、さらに試験解析を進めていく必要があるが、本研究において、感染初期の病態進行メカニズムと易感染宿主の存在の可能性については言及できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 8 件）

Sukmawinata E., Sato W., Uemura R.^{*}, Sueyoshi M. Antimicrobial resistant *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and other *Enterococcus* species isolated from foal feces in Japan. *Journal of Equine Veterinary Science*, 63, 51-54, 2018. (査読有)

Uemura R., Katsuge T., Sasaki Y., Goto S. and Sueyoshi M. Effects of zinc supplementation on Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* in vitro. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(10):1637-1643, 2017. (査読有)

Sabike II., Uemura R., Kirino Y., Mekata H., Sekiguchi S., Farid AS, Goto Y, Horii Y, Yamazaki W. Assessment of the *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in broiler chicken ceca by conventional culture and loop-mediated isothermal amplification method. *Food control*, 74: 107-111. 2017. (査読有)

Sabike II., Uemura R., Kirino Y., Mekata H., Sekiguchi S., Okabayashi T., Goto Y., Yamazaki W. Use of direct LAMP screening of broiler fecal samples for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in the positive flock identification strategy. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1582, 2016. (査読有)

國保健浩，真瀬昌司，亀山健一郎，池口厚男，田中康男，吉田和生，山田俊治，大橋誠一，深井克彦，森岡一樹，小野里洋行，堀井 洋一郎，西脇亜也，飛佐学，佐伯雄一，井戸田幸子，上村涼子，末吉益雄，川島健司。2010年に宮崎で発生し

た口蹄疫の防疫措置終了後に農場内に留置された家畜排泄物のウイルス残存性調査。産業動物臨床獣医学雑誌. 7(1): 1-8. 2016. (査読有)

Higa Y., Uemura R.^{*}, Yamazaki W., Goto S., Goto Y. and Sueyoshi M. An improved loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycoplasma bovis*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(8):1343-1346, 2016. (査読有)

Sasaki Y., Furusho K., Ushijima R., Tokunaga T., Uemura R. and Sueyoshi M. Body surface temperature of suckling piglets measured by infrared thermography and its association with body weight change. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 50(4): 361-368, 2016. (査読有)

Yamazaki W., Uemura R., Sekiguchi S., Dong J Bao., Watanabe S., Kirino Y., Mekata H., Nonaka N., Norimine J., Sueyoshi M., Goto Y., Horii Y., Kurogi M., Yoshino S. and Misawa N. *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: Results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6):1711-22. 2016. (査読有)

〔学会発表〕（計 13 件）

Kanda T., Suwanruengsri M., Sukmawinata E., Uemura R., Yamaguchi R., Sueyoshi M. Bovine endocarditis caused by *Mycoplasma bovis*. Joint Congress of The 7th Meeting of the Asian Organization for Mycoplasma (7th AOM), The 45th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasma (45th JSM) (2018.5.18-20 感染研、東京)

森脇祥江、上村涼子、末吉益雄。抗菌剤飲水投与による豚離乳後大腸菌症対策。平成 29 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (2018.2.10-12 大分市)

磯貝勇輔、行友俊弥、上村涼子、小林郁雄、末吉益雄。噴霧、塗布および煙霧の各種消毒法による牛舎消毒効果の検証と適用の改善。平成 29 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (2018.2.10-12 大分市)

佐藤航、Eddy Sukmawinata、上村涼子、上林義範、草野寛一、末吉益雄。国内現役競走馬の糞便由来大腸菌の薬剤感受性調査。平成 29 年度日本獣医師会獣医学術学会年次大会 (2018.2.10-12 大分市)

日高勇一、竹島大貴、Naik Mrunmayi Vishwanath、澤田淳也、都築直、上村涼

子、中村公香、後藤義孝. 胸骨の骨髓炎および膿瘍形成がみられた黒毛和種子牛の1例. 第38回動物臨床医学会年次大会(2017.11.17-18. 大阪市)

神田卓弥、上村涼子、末吉益雄. 牛の *Mycoplasma bovis* 疣贅性心内膜炎. 第160回日本獣医学科学術集会(2017.9.13-15 鹿児島市)

Sukmawinata E., Sato W., Uemura R., Sueyoshi M. Antimicrobial Resistance Enterococci isolated from foal feces in Japan. 第160回日本獣医学科学術集会(2017.9.13-15 鹿児島市)

山崎涉, 上村涼子, 関口敏, 谷口喬子, 三澤尚明. 鶏盲腸におけるカンピロバクターへのプロバイオティクス探索を目的としたパイロシーケンス解析. 第36回日本食品微生物学会学術総会(2015.11.12-13. 川崎市)

福家直幸, 平井卓哉, 萩尾光美, 上村涼子, 後藤義孝, 衛藤誠, 山口良二. *Mycoplasma bovis* およびレンサ球菌複合感染による関節炎を呈した黒毛和種. 平成27年度日本産業動物獣医学会(九州)(2015.10.16. 熊本市)

山崎涉, 上村涼子, 関口敏, 谷口喬子, 三澤尚明. 鶏盲腸におけるカンピロバクターへのプロバイオティクス探索を目的としたパイロシーケンス解析. 平成27年度日本公衆衛生獣医学会(九州)(2015.10.16. 熊本市)

三城せいら, 上村涼子, 保田昌宏, 北野智一, 水永夕葉, 後藤伸也, 佐々木羊介, 末吉益雄. 食肉処理場に出荷された経産母牛における *Mycoplasma bovis* 保菌調査. 平成27年度日本産業動物獣医学会(九州)(2015.10.16. 熊本市)

後藤伸也, 上村涼子, 保田昌宏, 小林郁雄, 佐々木羊介, 末吉益雄. *Mycoplasma bovis* 野外分離株が子牛末梢血単核球の分裂増殖に及ぼす影響. 平成27年度日本産業動物獣医学会(九州)(2015.10.16. 熊本市)

Azizi AFN, Uno S., Kumamoto M., Uemura R., Yasuda M. Different cytokines expression in 3 lung regions of clinically infected calves. 第158回日本獣医学会(2015.9.7-9. 十和田市)

〔図書〕(なし)

〔産業財産権〕

出願状況(なし)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(なし)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 涼子 (UEMUERA, Ryoko)
宮崎大学・農学部獣医学科・助教
研究者番号：90529190

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()