

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月1日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380146

研究課題名（和文）減投薬畜産システムの確立に向けた子豚子牛の保健診断法開発

研究課題名（英文）Establishment of animal production system with reduced use of antimicrobials by profiling the specific gravity of white blood cell

研究代表者

牛田 一成（Ushida Kazunari）

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183017

研究成果の概要（和文）：減投薬畜産のために診断法開発の基礎研究を実施した。仔ブタ白血球を比重によって分離するとともに、血液や糞便スワブ等から病原体の検出を行ったところ、白血球の比重と呼吸器系の不顕感染スコアに負の相関が認められた。比重 1.072-1.084 に分離される白血球に変化が大きく、その主体である顆粒球の変化が反映していた。不顕感染によって顆粒球の比率低下が証明され、仔ブタ呼吸器系感染症の早期診断の基準になると期待された。仔ウシは、試験施設で実施したため生産農場で実施した仔ブタのような関係が発見できなかった。

研究成果の概要（英文）：

Removal or reduced use of antimicrobials in integrated animal production is a current issue for the safe animal production policy. We have developed a rapid test for in-apparent infection of piglets and calves using specific gravities of white blood cells. When the relationship between change in specific gravity of white blood cells and the scores for presence of pathogens in blood, or swabs of feces and pharynx, tested with piglets at various stages, a significant negative correlation was observed. In particular, change in blood cells of 1.072-1.084 g/ml was evident. Granulocytes were the major components of this particular fraction of white blood cells, therefore, percentages of the granulocytes in that fraction was measured. There was a significant negative correlation between percentages of this specific granulocyte and scores for presence of respiratory pathogens. This substantiates the possibility of the present methodology for the rapid test of in-apparent respiratory infection in piglets. In case of calves, tested animals were all raised in experimental farms and numbers of animals were limited. The detection of relationships between the specific gravities of white blood cells and in-apparent infection was not observed due to the relative clean environment to commercial pig production facilities. Further studies are required to confirm the reliability of the methodology in calves.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

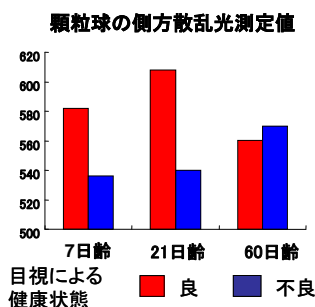
科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：減投薬家畜生産・不顕感染・健康診断システム・白血球比重

1. 研究開始当初の背景

離乳期の幼動物の保健衛生は、畜産における最重要課題である。これまでは、抗菌剤の飼料添加によって対応してきたが、安全・安心を求める消費者心理や抗菌剤の環境中への放出を考慮して抗菌剤使用が制限されるようになった。しかし、我が国の家畜生産現場では、一部の疾病では、ワクチン導入が進むものの、全般的にはこうした状況変化に対応できておらず衛生費によって経営が圧迫されている。実用可能な減投薬畜産システムを開発するには、体調不良動物の早期発見とくに不顕感染を評価して隔離ないしは適切な治療を施す必要がある。

予備的に行った実験で、免疫系の発達の一つの指標として末梢血中の単核球を分離し



て培養を試みた。この時、調整段階でパーコール密度勾配遠心法によって得られる単核球の比重が日齢によって異なることが示された。また、興味深いことに

同じ日齢でも健康状態によって単核球の比重に違いが見られた。得られた単核球分画をフローサイトメトリーで解析したところ、比重が異なる理由が顆粒球細胞内部構造の構築の違いに由来するという示唆を得た。内部構造の複雑性の評価値が有意に低下することは、核の分葉がおこっていない幼若な顆粒球が多くなっていることを示唆している。これまで、ブタの顆粒球の比重が低下することが豚コレラウイルス感染で報告されている (Summerfield ら 1998)。CSFV に感染した子ブタでは顆粒球の比重が軽くなるが、フローサイトメトリーによる解析によると、これらの顆粒球は未成熟であることが示唆され、これらの未熟な顆粒球が CFSV の主要なターゲットであると結論づけられている。末梢血単核球の比重低下を扱った既報の論文はこの報告以外に見あたらないが、我々の得た予備的な結果とよく一致する。そのため、感染初期の不顕性の状態を把握するには、単核球の複雑性を確認することが有用と考えられた。

2. 研究の目的

現場で採材後速やかに結果が得られる診断手法として種々考慮した結果、上述の末梢血白血球の比重に着目した。この方法論は、動物から採血したのち血液をパーコール溶液に重層して遠心分離するだけであり、目視によって比重の推定ができるため、通常の臨床獣医療現場で十分対応が可能な方法である。種々の感染症が、比重の軽い未熟な顆粒球を増加させる可能性がある。そのため、本研究では、仔ブタと仔ウシの末梢血から単核球を比重で区分し、フローサイトメトリーを用いて顆粒球のそれぞれの比重分画への分布を明らかにすることと、同時に同じ個体の血液からウイルスや細菌を検出し、顆粒球を主体とする白血球分画の異同を相関づけようとした。

3. 研究の方法

(1) パーコール重層遠沈管

① 十段階不連続グラジエント遠沈管法

比重によって単核球分画を細胞種ごとに分離するためパーコールをもちいて連続密度勾配を作成し血球の分離を試みた。しかし、異なる比重のパーコールは約 2 時間程度で混和し均一な比重のパーコール溶液になってしまうこと、②連続密度勾配で作成したパーコール溶液はこの混和がおこる時間的状況が判断しづらく安定した結果が得られない、③用時調整は、野外では不可能なこと、などから不連続密度勾配を作製することにした。なお、異なる比重のパーコール溶液が、遠沈管の中で混和しても発見が容易なように、比重の一段階おきにパーコールを着色し、目視を可能にした。単核球の分離に常用される比重を中心に 10 段階の比重グラジエントをステップワイズに作成した。Percoll™(GE Healthcare)と 1.5 M NaCl を 9:1 の割合で混合した SIP (Stock Isotonic Percoll) を作製し、0.15 M NaCl を適宜混合し、1.062, 1.064, 1.066, 1.068, 1.070, 1.072, 1.075, 1.078, 1.080, および 1.090 g/ml の溶液を調製した。

② 二段階不連続グラジエント遠沈管法

上述の SIP (Stock Isotonic Percoll) を作製し、その後 SIP と 0.15 M NaCl を混合して 1.072 または 1.084 g/ml の比重を持つパーコール溶液を調製した。

(2) 血球の比重分離

① ブタ用十段階不連続グラジエントパーコール遠沈管法の確立と評価

22 年度は、京都府立大学で飼養中の去勢仔

ブタ4頭をもちいて、連続グラジエント遠沈管と不連続グラジエント遠沈管の性能評価を行うとともに、1.062、1.064、1.078、1.090 g/ml のパーコールで分離される白血球をフローサイトメトリーで解析し、それぞれの比重分画に含まれる顆粒球の割合を FACS Calibur™ フローサイトメーターで測定した。X 軸方向に細胞の大きさ（前方散乱光 Forward Scatter : FSC）、Y 軸方向に細胞内部の複雑さ（側方散乱光 Side Scatter : SSC）を取るドットプロット図を作成し、顆粒球の割合を求めた。また、試験施設(A試験場)で飼養されている20日~81日齢の三元交雑種(ランドレース×ラーゼホホワイト×デュロック)ブタ14頭(♂3頭・♀11頭)と、野外試料として、隣接する一貫経営農家(B農場)で飼育されている同系統の育成豚12頭(去勢6頭・♀6頭、40~52日齢)から検体を採取した。仔ブタの頸静脈から採取したヘパリン処理血2mlをリン酸緩衝生理食塩水{PBS(-); pH 7.4}で2倍希釈し、4mlを上述の重層パーコール溶液に静かに重層した。470x g、22°Cで30分間遠心分離し、分離された細胞層を目視により確認し、白血球の比重を記録した。

②ブタ用二段階不連続グラジエントパーコール遠沈管法の確立と評価

23年度も、上述のA試験場とB農場の仔ブタを試験に供試した。A試験場の三元交雑種(34-76日齢)12頭(♂5頭♀7頭)、B農場の三元交雑種(40-80日齢)20頭(♂♀各10頭)から頸静脈血を採取し、ヘパリンナトリウム処理を行った。ヘパリン処理血2mlをリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-); pH 7.4)で2倍希釈し、希釈血液4mlを1.084 g/mlパーコール溶液4ml上に静かに重層した。重層後、470×g、22°Cで30分間遠心分離し、分離された細胞層を回収し、さらに1.072 g/mlパーコール溶液4ml上に静かに重層した。再び470×g、22°Cで30分間遠心分離を行い、遠心分離後パーコール層上に形成された白血球層(比重:<1.072 g/ml)および沈殿したペレット(比重:1.072-1.084 g/ml)をそれぞれ回収し、フローサイトメトリーで顆粒球の存在比率を求めた。

③仔ウシ用十段階不連続グラジエントパーコール遠沈管法の確立と評価

和牛の単核球の比重に対する日齢や疾病の影響は知られていないため、ブタの試験手順と同様に十段階のパーコール不連続グラジエント遠沈管を作製した。比重の範囲は、1.056、1.060、1.064、1.067、1.071、1.074、1.077、1.080、1.084、および1.090 g/mlである。パーコール溶液を比重の重い溶液から順に1mlずつ15ml遠沈管(BD Falcon)に重層した。各個体の頸静脈から末梢血を採取し、ヘパリンナトリウム処理を行った。各個体のヘパリン処理血2ml

をPBSで2倍希釈し、その3mlを作製した重層パーコール溶液に静かに重層した。470×g、22°Cで30分間遠心分離し、分離された細胞層を記録した。

(3)野外試験における病原体の検出

① 仔ブタ

不顕性の感染を検出するために、A試験場およびB農場の仔ブタの鼻腔、咽頭および肛門から、滅菌済綿棒を用いて、スワブを採取し、核酸(RNA、DNA)を抽出した。抽出DNAあるいはcDNAを鋳型としてPCR検出を行った。対象とした病原体とその標的遺伝子は以下の通りである。

Actinobacillus pleuropneumoniae, *omlA* (211-1162), *Haemophilus parasuis*, *thyA* (459-701), *Mycoplasma hyopneumoniae*, 16SrRNA (155-1148), *M. hyorhinis*, 16S rRNA (144-818), *Pasteurella multocida*, *toxA* (861-1062), Porcine circovirus typeII ORF2 (1535-1633), Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, ORF5 (15188-15371), *Brachyspira* spp. 16S rRNA (428-803), *Brachyspira hyodysenteriae*, *tlyA* (514-1040), *B. pilosicoli*, 16S rRNA (174-802), *Clostridium perfringens*, *cep* (529-683), *Escherichia coli*, *stx2* (404-511), *Escherichia coli*, *eaeA* (188-436), *Escherichia coli*, heat-labile enterotoxin (66-506), *Escherichia coli*, heat-stable enterotoxin (294-483), Rota virus, vp7 (898-1060), *Salmonella* spp., *invA* (287-571)

② 仔ウシ

Bovine respiratory syncytial virus glycol-protein (5355-5424), Bovine herpesvirus glycoprotein B (56315- 56411), Bovine adenovirus hexon (1992-2060), Bovine viral diarrhea virus 5'UTR (136-210), Bovine coronavirus nucleocapsid protein (29641-29701), *M. bovis* 16S rRNA (244-312), *Mycoplasma* spp. 16S-23S rRNA spacer, *Mannheimia haemolytica mod* (3452-3532), *Pasteurella multocida toxA* (861-1062), *Salmonella* spp. *invA* (287-571)

③血液由来のRNAを対象とした次世代シーケンス技術による網羅解析

②で検査を行った牛は、呼吸器系疾病の病原体すべてが陰性であった。わずかに1頭が *Mycoplasma bovis* 陽性であった。そこで、血液中の病原体の網羅解析を行うため、1頭の血漿試料から核酸を抽出した。まず、方法論の確立のために、常法に従い QIAamp viral RNA kit (Qiagen) を使用して血漿からRNAを抽出したが、ゲル電気泳動後に薄くスミアが認められるだけであった。そこで、Mag Max™ Viral RNA Isolation kit (Ambion) で再度試みたが、抽出されなかった。最終的に Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche Applied Science) を用いて逆転写し、cDNAを合成し、illustra GenomiPhi V2 kit (GE

Healthcare)を用いて増幅を試みた。このとき、キット付属のランダムヘキサマー以外に既報(Shanら2011)に従ってオクタマープライマーを使用した。これらの操作の改変で得られた核酸量は増加したが、おそらく血液中に存在している短いRNA断片を増幅しているだけであると判断し、解析不能として一旦、作業を中止した。

(4) 仔ブタ実験感染試験

研究協力者中西信夫獣医師の指導に基づいて京都動物検査センターの実験飼育施設内で三元交雑種仔ブタを用いた実験感染試験を行った。試験は、呼吸器系感染症と消化器系感染症の原因菌をそれぞれ対象とした。

8週齢の去勢ブタを8頭使用し、そのうち3頭に*P.multocida* 5.0×10^8 CFU/頭を気管内に1回接種した。残りの5頭に*A. pleuropneumoniae* 1.0×10^8 CFU/頭を鼻腔内に1回接種した。攻撃後8日で剖検を行うまでに計10回の採血を行い、その際の体温および臨床症状も記録した。25日齢の去勢ブタを9頭使用し、3頭ずつの3群(非感染群、易熱性エンテロトキシン産生大腸菌攻撃群、耐熱性エンテロトキシン産生大腸菌攻撃群)を設けた。攻撃菌を $3.0 \sim 5.0 \times 10^8$ CFUに調製し、腸溶カプセルに充填した。この量の攻撃菌を1日1回ずつ3日間連続して強制経口投与した。攻撃開始から9日後に剖検を行うまで、計6回の採血を行い、その際に糞便を採取し、臨床症状の記録を行った。

(5) 仔ウシへの適用

京都大学農学部付属牧場で飼養されていた黒毛和牛仔ウシ3頭を対象とした。月齢の進行にあわせて、合計4回の採材を行った。市販配合飼料とイタリアンライグラス乾草を給与されていた。三重大学附属動物飼育施設で飼育されていた5ヶ月齢の交雑種の牛(黒毛和種×ホルスタイン種)から約3週間ごとに採材を行った。これらの牛は同施設内で個別に飼育されており、市販配合飼料およびイタリアンライグラスを一日にそれぞれ1.2kgずつ給餌し、飲水を自由摂取させた。いずれも仔ブタと同様に、ヘパリン採血管に頸静脈血を採取し、グラジエント遠沈管に重層した。

(6) 統計解析

① 十段階不連続グラジエント遠沈管法

10段階不連続グラジエント遠沈管法で得られた比重の異なる白血球の分布値と病原体の検出から得た不顕性感染状況のスコアの相関関係を検定した。白血球の分布に関して比重をスコア化して各検体の固有の数値を求めた。具体的には、軽い比重1.062 g/mlに「1」をあて、そこから段階的に大きな数値をあてはめ、1.090 g/mlに「10」をあてた。

呼吸器系疾患原因病原体および消化器系疾患原因病原体が検出された場合、不顕感染

と見なし、疾病の重篤度から罹患スコアを求めた。呼吸器の疾患の場合、単独では症状がなく、複合感染の可能性があるものを「1」(PCV II)、単独では症状がなく、複合感染で症状がでるものを「2」(*M.hyorhinis*)、単独で症状がでるものを「3」(*H.parasuis*, *M.hyopneumoniae*, *P.multocida*, PRRSV)、単独ででる症状が重篤なものを「4」(*A.pleuropneumoniae*)とした。消化器系疾患のスコアリングは、軽度の症状しかでないもの「1」(*B.pilosicoli*)、死には至らないが下痢などの症状がでるもの「2」(*B.hyodysenteriae*, *C.perfringens*, 各種の大腸菌、ロタウイルス)、死に至る可能性があるもの「3」(腸管出血性大腸菌、*Salmonella* spp.)とした。同一個体における白血球比重スコアと罹患スコアの相関関係を、スピアマンの順位相関係数の検定によって解析した。

② 二段階不連続グラジエント遠沈管法

末梢血中白血球の顆粒球の存在比率と呼吸器系疾患罹患スコアの相関関係を、比重ごとにスピアマンの順位相関係数の検定で解析した。このとき、顆粒球の比率が最も高くてた比重1.072-1.084 g/mlの回収細胞中の顆粒球比率をもちいた。

4. 研究成果

(1) 十段階不連続グラジエント遠沈管法の作製と現場における使用

仔ブタの白血球は実験に用いたどの個体でも10の比重のうち1.062 g/mlから1.078 g/mlの範囲で、特定の4から7層に分離された。1.062 g/mlの白血球は検査した全個体でみられた。1.064 g/mlの白血球はA試験場の81日齢のブタ1頭、B農場の40日齢のブタ1頭の計2頭のみしか観察されなかった。1.066 g/mlの白血球は、A試験場の38日齢のブタ1頭を除く全個体にみられた。1.068 g/mlの白血球は、全26個体中22個体で観察された。1.070 g/mlの白血球は農場に差がみられA試験場の仔ブタでは14頭中11頭で観察されたのに対し、B農場の仔ブタでは12頭中5頭しか観察されなかった。1.072 g/mlの白血球は、両試験地の仔ブタに大きな違いがなく約50%であった。1.075 g/ml白血球は、いずれの農場でも1.072 g/mlよりも多くなった。1.078 g/mlでは、A試験場が14頭中2頭の陽性率であったのに対し、B農場では12頭中6頭の陽性率を示した。1.080 g/mlと1.090 g/mlの比重では白血球が分離されることはなかった。

(2) 病原体の検出

*M.hyopneumoniae*が、A試験場の9頭、B農場の7頭から検出され、*M.hyorhinis*はA試験場とB農場のそれぞれ10頭から検出された。多くの個体は、*M.hyopneumoniae*と*M.hyorhinis*の双方に感染していた。PCV2が

B農場の全被検個体から検出され、A試験場では47日齢以上のブタ8頭のうち6頭から検出された。PRRSVはA試験場からは検出されなかったが、B農場では8個体から検出された。*Brachyspira* spp および *B. pilosicoli* はA試験場の被検個体からは検出されなかったが、B農場では *Brachyspira* spp が全被検個体から、*B. pilosicoli* が5頭から検出された。*C. perfringens* がA試験場の3頭から検出されたが、B農場のブタからは検出されなかった。

腸管病原性大腸菌および毒素原性大腸菌はA試験場では様々な日齢の個体5頭から、B農場でも日齢に偏りなく4頭から検出された。毒素原性大腸菌はA試験場では2頭から、B農場では7個体から検出された。Heat-labile enterotoxin 遺伝子、heat-stable enterotoxin 遺伝子、Rota virus はA試験場のブタからは検出されなかったが、B農場では heat-labile enterotoxin 遺伝子が1頭から、heat-stable enterotoxin 遺伝子と Rota virus が、それぞれ3頭ずつから検出された。罹患スコアを求めたところ、呼吸器系疾患罹患スコアが、A試験場 4.2 ± 3.0 、B農場 6.6 ± 2.3 、消化器系疾患罹患スコアがA試験場 1.7 ± 1.5 、B農場 4.0 ± 2.0 となった。罹患スコアをマン・ホイットニのU検定で比較したところ、全個体を対象とした場合、呼吸器系疾患スコアはB農場が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

(3)白血球比重スコアと疾患罹患スコアの相関関係

白血球比重スコアと疾病罹患スコアの相関関係からスピアマンの順位相関係数を求め、その有意差を検定した結果、消化器系疾患スコアには相関関係がみられなかった。しかし、呼吸器系疾患スコアでは40日齢の被検ブタに負の相関関係がみられた。罹患状態が重篤なほど比重が重い白血球層が消失することになる。特に呼吸器罹患スコアが高いと、 1.078 g/ml のパーコールで分離される白血球の検出率が低下した。顆粒球は分化段階で、細胞内に蓄える顆粒の量や、核の分葉が変化するため、比重が変化しやすい細胞である。また、ブタの末梢血中の約40%を占める細胞であるため、「パーコール上の白血球の層」として比重の変化が視認しやすい細胞種である。顆粒球の比重が変化する要因としては、①血液から感染部位への顆粒球の動員が増加すると未分化の顆粒球が末梢血液中に現れる、②ウイルスが単核球を直接の標的とすることで骨髄微環境の機能不全が生じ未熟な単核球が放出される2つの可能性がある (Simmons et al., 1994)。本研究で明らかになったことは、呼吸器疾患とは異なり、消化器系疾患の罹患スコアには白血球比重スコアと

の相関関係が全くみられなかったことである。末梢血中の白血球の比重や細胞構成は、腸管免疫系よりも全身免疫系の変化を反映しやすいものと考えられる。

(4)二段階不連続グラジエント遠沈管法の作製と現場における使用

22年度の研究では、 $1.084 \sim 1.072 \text{ g/ml}$ の比重の白血球が罹患状況に応じてもっとも顕著に変動していた。また、変動の主たる要因は、末梢血中に動員される顆粒球によるものと判断された。そこで、23年度の研究では、現場使用により適するように、比重グラジエントの簡便化を図ることにして、比重を2段階に限定した。疾病による白血球の比重変動の主原因と考えられる顆粒球の存在比率を比重 $1.072 \sim 1.084 \text{ g/ml}$ で回収された細胞集団に対して測定した。消化器感染症は、末梢血中の白血球の比重や顆粒球の複雑性に影響しないことが分かったので、病原体の現出は呼吸器系の感染症に限定して行った。(1)と同じ試験場および農場から採材した。A試験場の被検ブタが示す当該比重域の白血球中の顆粒球存在比は43日齢 $18.4 \pm 3.9\%$ ($n=4$)、63日齢 $16.1 \pm 3.4\%$ ($n=3$)、73日齢 $19.1 \pm 7.0\%$ ($n=3$) となり、56日齢の2個体はそれぞれ 22.1% および 21.9% であった。B農場の被検ブタは34日齢 $38.4 \pm 11.3\%$ ($n=5$)、48日齢 $60.0 \pm 12.3\%$ ($n=3$)、51日齢 $38.3 \pm 5.7\%$ ($n=3$)、63日齢 $29.5 \pm 4.5\%$ ($n=3$)、76日齢 $19.8 \pm 4.1\%$ ($n=5$) となり、48日齢で最も顆粒球の割合が多く、その後成長に従って減少する傾向を示した。B農場の平均が $35.2 \pm 4.4\%$ 、A試験場は $18.6 \pm 2.1\%$ となり、B農場が高値を示した ($p < 0.01$)。

(5)呼吸器系疾患の病原体検出

H. parasuis および *M. hyorhinis* が両農場で高頻度に検出された。一方、*M. hyopneumoniae* は全例で陰性であった。*P. multocida* はA試験場の25%から検出されたのに対し、B農場30%から検出された。PRRSVはB農場35%、A試験場は8%検出された。*A. pleuropneumoniae* とPCV2はB農場から10%および80%検出された。日齢ごとの呼吸器疾患罹患スコアは、A試験場43日齢 5.7 ± 0.8 、63日齢 6.0 ± 1.0 、73日齢 5.3 ± 1.5 となった。B農場34日齢 9.2 ± 1.0 、48日齢 7.0 ± 0.8 、51日齢 8.3 ± 0.9 、63日齢 8.0 ± 1.2 、76日齢 7.8 ± 1.2 となった。Mann-WhitneyのU検定で比較したところ、B農場がA試験場より有意に高値を示し、前年度同様、生産農場への呼吸器系病原体の浸潤は試験施設よりも重篤であることがうかがわれた。

(6)呼吸器疾患罹患スコアと顆粒球存在比の相関関係

顆粒球の存在比と呼吸器疾患罹患スコアの相関をスピアマンの順位相関係数で検定した。A 試験場では日齢による変化は認められず、図に示す

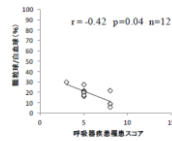


図 A 試験場 43-73 日齢における顆粒球存在比率と呼吸器疾患罹患スコアの相関関係

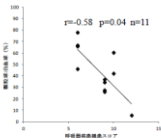


図 B 農場 34-51 日齢における顆粒球存在比率と呼吸器疾患罹患スコアの相関関係

ように 43 日齢から 73 日齢のブタで両者に有意な負の相関関係が見られた。B 農場では 34 日齢から 51 日齢までは顆粒球の存在比と呼吸器疾患罹患スコアに有意な負の相関が見られた。B 農場は、一般の生産農場ということもあって罹患スコアの平均値が高く、豚舎では発咳等の臨床症状も見られた。この農場では、34-51 日齢の被検ブタで PCV2 の検出率が高値を示していた(80%)。PCV2 の感染によってマクロファージや抗原提示細胞の機能が低下するので、他の細菌とくにマイコプラズマとの複合感染に発展し、顆粒球の増加を伴う比較的重篤な疾患へ発展していた可能性がある。

(7) 実験感染系における二段階不連続グラジエント遠沈管法の有効性

App および Pm の実験感染では、上記のように呼吸器疾患罹患により特定比重の白血球中の顆粒球比が増加することを確認できた。一方、消化器病の実験感染系では呼吸器疾患で見られたような顆粒球存在比の増加は観察されなかった。したがって、本研究における野外試験で最終的に呼吸器系疾患と顆粒球の関係を検討した妥当性が証明された。

(8) 仔ウシへの適用

全ての被検試料で仔ウシの末梢血白血球は 4-7 層に分離され、1.056-1.090 の全ての比重に分布した。そのうち、1.056、1.060、1.071 g/ml の比重に分離される白血球が全ての個体のすべての被検試料で確認された。一方、1.064、1.067、1.074、1.077、1.080、1.084、1.090 の比重に分離される白血球は個体や週齢に依存していた。被検牛から採取したサンプルは *Mycoplasma species* が 20 週齢の全ての個体と 24 週齢と 40 週齢のそれぞれ 1 個体から検出され、うち 1 頭は *M. bovis* も陽性であった。*M. haemolytica* は 20 週齢の 1 個体で陽性であった。ブタ野外試料のように病原体を検出することができなかったため、ブタのように白血球の比重分布や顆粒球存在比率と不顕感染の相関関係を知ることができなかった。そこで、予備的に血液から病原体を網羅解析することにしたが、方法に記載のように、もともと不顕感染という病原体が血液中にはきわめて微量で存在している状況で、

血液中に存在する短かな RNA 断片の影響を除くことが達成できなかった。その後、別の検体で実施したところ、増幅を得ることができたが、結果の再現性に問題があり、今後も検討を続ける必要を認めた。仔ウシに関しては、試験場の繋養個体であったことから、衛生管理も十全で、ブタのように生産農場で採材を行う必要を認めるものであった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

本研究に関連した研究発表

①牛田 一成 (2010)「自然界における薬剤耐性菌汚染一環境の視点から」臨床と微生物(近代出版)36 巻 6 号 623-628

②牛田一成・朴鐘吉・塚原隆充・伊藤貢・中西信夫(2011) *Brachyspira* 属細菌の養豚野外試料からの検出.*Brachyspira* 2(1): 18-27.

〔学会発表〕(計 4 件)

①日本畜産学会 第 114 回大会 2011 年 8 月 26 日 北里大学 原山智子・井上亮・塚原隆充・福田菊人・牛田一成「仔豚の免疫担当細胞の分画と哺乳期における経目的変化」

②日本畜産学会 第 115 回大会(招待講演) 2012 年 3 月 28 日 名古屋大学 井上亮「免疫学、栄養学のおよび遺伝子発現という観点から仔ブタの離乳時期を考える」

③日本畜産学会 第 115 回大会 2012 年 3 月 28 日名古屋大学 原山智子・井上亮・塚原隆充・牛田一成「遺伝学的系統の異なる豚繁殖障害・呼吸障害症候群ウイルスに対する細胞性獲得免疫の応答」

④日本畜産学会 第 116 回大会 2013 年 3 月 30 日安田女子大学 中谷麻紗子・塚原隆充・井上亮・福田菊人・牛田一成「初生からの仔ブタ腸管免疫発達と離乳時期が免疫発達に及ぼす影響」

ホームページ等

http://seika.kpu.ac.jp/~k_ushida/ushida_intro.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田一成 (USHIDA KAZUNARI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50183017

(2) 研究分担者

井上亮 (INOUE RYO)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926

塚原隆充 (TSUKAHARA TAKAMITSU)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・特任講師

研究者番号：90562091