

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658251

研究課題名（和文）住血マイコプラズマの試験管内人工培養から迅速同定まで

研究課題名（英文）From in vitro cultivation to rapid diagnosis of hemotropic mycoplasmas

研究代表者

原澤 亮 (HARASAWA RYO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：70159101

ヘモプラズマ (hemoplasma) は哺乳動物の赤血球に寄生して増殖するマイコプラズマの総称で、感染した動物に溶血性貧血を引き起すことが知られており、ウシには2菌種のヘモプラズマが感染する。しかし、わが国のウシにおける感染状況はこれまでに明らかにされていない。そこで、国内におけるウシヘモプラズマの浸潤状況を調査し、広く感染がみられることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Hemoplasma is a prokaryote that parasites on mammalian erythrocytes and causes a hemolytic anemia in the infected animals. However, its prevalence in the Japanese cattle has remained unknown. Therefore, hemoplasma infection in cattle was examined in this study. Here we demonstrated a wide prevalence of hemoplasma infection among cattle population in Japan.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：ヘモプラズマ、マイコプラズマ

1. 研究開始当初の背景

ヘモプラズマは赤血球寄生性のマイコプラズマの総称で、これにはかつてリケッチア目アナプラズマ科のヘモバルトネラ属あるいはエペリスロゾーン属に置かれていた菌種のほか、新たに発見された無細胞壁原核生物が含まれる。これら住血性のマイコプラズマはいずれも、16S rRNA 遺伝子あるいは RNase P RNA 遺伝子の塩基配列の相同性、宿主細胞外での増殖、および細胞壁ペプチドグリカンの欠如などの性状からマイコプラズマ属の菌種として認定されたものであるが、

試験管内での人工培養が成功していないため性状解析ならびに分類学的な検討が遅れている。

ヘモプラズマ感染は宿主の免疫を攪乱するとともに溶血性貧血を引き起すことがあるため、抵抗力の乏しい個体においては警戒を要するもののひとつである。これまで知られているヘモプラズマは哺乳動物の赤血球膜上に見い出されているが、豚を宿主とする *M. suis* については赤血球内へも侵入するという報告がある。

ヘモプラズマは感染動物の血液塗抹標本

をギムザ染色すると青く染まる小顆粒として光学顕微鏡によって観察される。

PCRによってヘモプラズマを検出するときには、菌種に特異的なプライマーを用いる場合と、ヘモプラズマを一括して検出するための普遍的プライマーを用いる場合とがある。前者はほかのヘモプラズマ菌種と相同性のない塩基配列領域をプライマーとするため、検出と同時に菌種の同定が行える。後者はすべてのヘモプラズマに共通の塩基配列をプライマー領域に設定するもので、PCRで陽性結果が得られれば、ヘモプラズマ感染と診断することができるが、その菌種を同定するためには、PCR産物の塩基配列を調べるか、もしくは前者と同様に種特異的プライマーを用いたPCRを再度行わなければならない。いずれの場合もPCRの最終産物をアガロースゲル電気泳動によって分画して判定することになる。このようなエンドポイントPCRによらず、リアルタイムPCRを用いた検出法も広く用いられていて、その場合も種特異的プライマーを用いる方法と普遍的プライマーを用いる方法がある。

リアルタイムPCRでは反応後にPCR産物の熱融解温度 (T_m : melting temperature) を測定することにより、得られたPCR産物が示す固有の T_m 値に基づいて菌種を推定することが可能である。PCR産物のサイズはエンドポイントPCRの場合は500 bp前後に設計するが、リアルタイムPCRのためにはそれよりも短い方が好ましいとされ、300 bp以下になるようにプライマーを設計することが多い。

2. 研究の目的

ヘモプラズマは住血性のマイコプラズマ (hemotropic mycoplasma) とも呼ばれ、哺乳動物の赤血球表面に寄生する無細胞壁原核生物の総称で、これにはかつてリケッチア

目アナプラズマ科のヘモバルトネラ属あるいはエペリスロゾーン属に属していた菌種のほか、新たに発見された菌種が含まれている。これらヘモプラズマ菌種はいずれも、16S rRNA 遺伝子あるいはRNase P RNA 遺伝子の塩基配列相同性、宿主細胞外での増殖、および細胞壁ペプチドグリカンの欠如などの性状からマイコプラズマ属の菌種として認定されたものであるが、試験管内での人工培養が成功しないため性状解析ならびに分類学的な検討が遅れている。

本研究では、とくにウシを宿主とする2菌種のヘモプラズマについて、報告者らが開発したリアルタイムPCR法を用いてわが国における感染状況を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

宮城県、岩手県、広島県、宮崎県で飼育されている乳牛から採取した全血 (EDTA 添加) から QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて抽出した DNA を被検サンプルとして、ヘモプラズマの 16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイムPCRを試みた。ウシのヘモプラズマ2菌種に共通の Forward プライマー : 5' -ATATTCCTACGGGAAGCAGC-3' (*M. wenyonii* 16S rRNA 遺伝子の 328~347 番目の塩基配列に相当) および Reverse プライマー : 5' -ACCGCAGCTGCTGGCACATA-3' (*M. wenyonii* 16S rRNA 遺伝子の 503~522 番目の塩基配列に相当) を設計し、スマートサイクラー (Cepheid 社) を用いてPCRを行い、最後に 60°C から 95°C まで、毎秒 0.2°C ずつ昇温させて、PCR産物の熱融解温度 (T_m 値) を測定し、その違いに基づいて菌種を同定した。

次は牛にみられるヘモプラズマを検出するためのリアルタイムPCRの例である。牛では *Mycoplasma wenyonii* と *Candidatus*

Mycoplasma haemobos (*haemobovis*)' の少なくとも 2 種類のヘモプラズマが知られている。両者を検出するための共通プライマーを以下の組み合わせで用意し、PCR 終了後に 60°C から 95°C まで昇温させて熱融解曲線を描かせ、 T_m 値を求める。

これらのプライマーにより増幅される牛ヘモプラズマの DNA 領域を比較すると、両者には下図のように大きなギャップがみられるため増幅される牛ヘモプラズマ PCR 産物の T_m 値はつぎのとおりとなる。

Mycoplasma wenyonii: 81.77~82.31°C (82.04 ± 0.27°C)

'*Candidatus M. haemobos*': 86.86 ~ 87.10°C (86.86 ± 0.12°C)

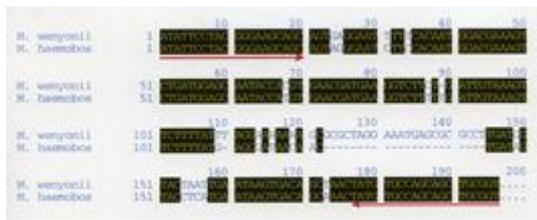


図 1) プライマー領域の位置 (赤矢印)

DNA 分子の T_m 値は溶媒の塩濃度が一定であれば塩基配列と GC 含量によりほぼ一義的に決まる。従って、同じプライマーを用いて増幅された PCR 産物であっても、PCR 産物の塩基配列に違いがあればその T_m 値も異なったものになる。

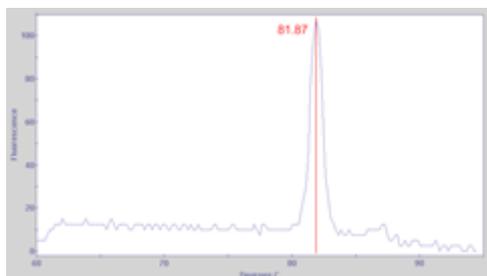


図 2) *M. wenyonii* の T_m 値

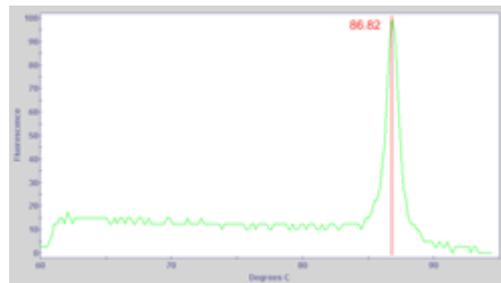


図 3) '*Ca. M. haemobos*' の T_m 値

4. 研究成果

(成績) ウシに感染する 2 種類のヘモプラズマのうち、*Mycoplasma wenyonii* の T_m 値は 82.04 ± 0.27°C であり、一方 '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' のそれは 86.86 ± 0.12°C であることから、これを基準にして菌種を同定した。その結果、広島県と宮城県においてそれぞれ 69.4% (25/36), 93.8% (30/32) のウシのヘモプラズマ感染が見つかった。広島県のウシ 36 頭のうち 18 頭は 1 歳から 2 歳で残りの 18 頭は成牛であったが、年齢とヘモプラズマ感染を関連づける証拠はみつからなかった。宮城県では非常に高いヘモプラズマ感染がみられ、生後 3 ヶ月以内で冬に生まれたウシからもヘモプラズマが検出された。

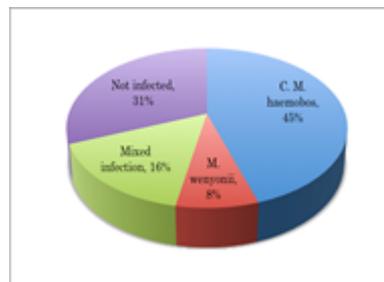


図 4) 宮城県における感染状況

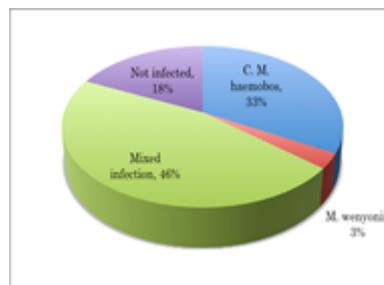


図 5) 岩手県における感染状況

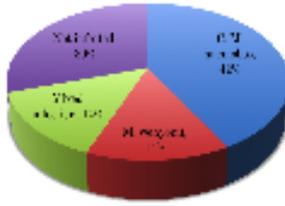


図6) 広島県における感染状況

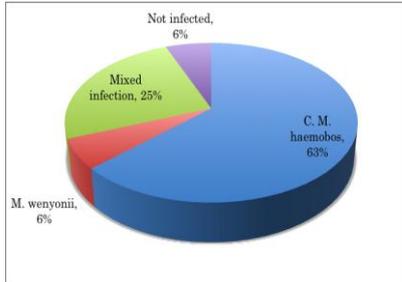


図7) 宮崎県における感染状況

(考察) 本研究において、ヘモプラズマに感染しているウシはヘモプラズマ感染による顕著な臨床症状を示さなかった。ウシのヘモプラズマ感染はスイスにおいて溶血性貧血を起こした乳牛で発見、報告されたものであるが、今回の調査ではヘモプラズマ感染とヘマトクリット値に有意な関連性を見出すことはできず、貧血との関係は確認できなかった。PCRによりヘモプラズマ感染陽性と判定されたウシのうち、重篤な貧血を起こしていた個体はおらず、またすべてのウシがヘモプラズマ症とは関連のない症状を呈しており、臨床所見等からこれ以上詳細な分析は不可能であった。本研究により、広島県と宮崎県において飼育されており貧血の症状が顕著ではないウシの間で '*Candidatus M. haemobos*' が広汎に存在しており、感染個体は臨床症状が消失した後も慢性的にキャリアとなっている可能性が高いと考えられた。さらに、ヘモプラズマの持続感染はレトロウイルスによる疾病、腫瘍性疾患、免疫介在性疾患などを進行させる原因になる可能性も指摘されている。また、今回の調査では冬季

に生まれた生後3ヶ月以内のウシにもヘモプラズマ感染が確認された。ベクターのいなくなる期間における新生子への感染は垂直感染の可能性を示していた。

(結論) ウシを宿主とする住血マイコプラズマ感染がわが国で飼育されているウシに広く蔓延していることが判明した。多くは持続感染状態にあり、不顕性であるが、感染牛の免疫系を攪乱して複合感染を引き起こす要因となることが想定される。したがって、感染牛については抗生物質による治療が必要になると思われる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計14件)

1. Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., Nagai, K., and Harasawa, R. (2012) Examination of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' and *Mycoplasma haemofelis*. J. Vet. Med. Sci. 74: 83-87. 査読有
2. Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K., and Harasawa, R. (2012) Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers. J. Vet. Med. Sci. 74: 1315-1318. 査読有
3. Giangaspero, M., Nicholas, R.A., Hlusek, M., Bonfini, B., Osawa, T., Orusa, R., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., Harasawa, R., and Ayling, R.D. (2012) Seroepidemiological survey of sheep flocks from northern Japan for *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Mycoplasma agalactiae*. Trop. Anim. Health Prod. 44: 395-398. 査読有
4. Giangaspero, M., Osawa, T., Bonfini, B., Orusa, R., Robetto, S., and Harasawa, R. (2012) Serological screening of *Coxiella burnetti* (Q fever) and *Brucella* spp. in sheep flocks in the northern prefectures of Japan in 2007. Vet. Ital. 48: 357-365. 査読有
5. Ohtake, Y., Nishizawa, I., Sato, M., Watanabe, Y., Nishimura, T., Matsubara, K., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) *Mycoplasma ovis* detected in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. J. Vet. Med. Sci. 73: 371-373. 査読有

6. Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H.K., and Harasawa, R. (2011) A feline hemoplasma, 'Candidatus Mycoplasma haematominum', detected in dog in Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 841-843. 査読有

7. Giangaspero, M., and Harasawa, R. (2011) Species characterization in the genus Pestivirus according to palindromic nucleotide substitutions in the 5' -untranslated region. J. Virol. Methods 174: 166-172. 査読有

8. Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Molecular identification of 'Candidatus Mycoplasma haemovis' in sheep with hemolytic anemia. J. Vet. Med. Sci. 73: 1113-1115. 査読有

9. Fujihara, M., Obara, H., Watanabe, Y., Ono, H.K., Sasaki, J., Goryo, M., and Harasawa, R. (2011) Acidic environments induce differentiation of *Proteus mirabilis* into swarmer morphotypes. Microbiol. Immunol. 55: 489-493. 査読有

10. Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., and Harasawa, R. (2011) Rapid identification of hemoplasma species by palindromic nucleotide substitutions at the GAAA tetraloop helix in the specificity domain of ribonuclease P RNA. J. Vet. Med. Sci. 73: 1517-1520. 査読有

11. Giangaspero, M., Ibata, G., Savini, G., Osawa, T., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011) Epidemiological survey of Border disease virus among sheep from northern districts of Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 1629-1633. 査読有

12. Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K., and Harasawa, R. (2011) Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes. J. Vet. Med. Sci. 73: 1657-1661. 査読有

13. Giangaspero, M., Osawa, T., Orusa, R., Frossard, J.-P., Naidu, B., Robetto, S., Tatami, S., Takagi, E., Moriya, H., Okura, N., Kato, K., Kimura, A., and Harasawa, R. (2011) Epidemiological survey for visna-maedi among sheep in northern prefectures of Japan. Vet. Ital. 47: 437-451. 査読有

14. Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Ooshita, K., Ano, H., and Harasawa, R. (2011) Prevalence of hemoplasma infection among

cattle in the western part of Japan. J. Vet. Med. Sci. 73: 1653-1655. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原澤 亮 (HARASAWA RYO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 70159101