

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：20K15665

研究課題名（和文）ウシ呼吸器病症候群の重篤化の要因となる病原体間の相互作用の分子メカニズムの解析

研究課題名（英文）The molecular mechanism of interaction between pathogens contributing to the exacerbation of bovine respiratory disease complex

研究代表者

山本 聡美 (YAMAMOTO, Satomi)

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：70801364

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：BRDCの一次要因と言われるウイルスとして、牛RSウイルス(BRSV)、常在細菌として4種類の細菌を用い、BRSV感染による細菌の細胞接着効率を指標にウイルスと細菌の相互作用の有無を検証した。その結果、BRSV感染が複数種の細菌の細胞への接着を増強すること、一部の細菌においてはウイルスタンパク質の一つが接着増強に関与し、その抗体によって接着が抑制されることを示した。この現象は、BRSVの遺伝子型、菌株、使用した培養細胞種に限定されず、広く引き起こされる現象であることが明らかとなり、BRSV感染が牛の常在細菌による感染症の重篤化を引き起こす可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内の飼養牛、特に肉用牛における肺炎等の呼吸器病は、ウイルス、細菌、マイコプラズマ等の混合感染と、それに様々な環境的な要因が重なって発症する複合病である。しかし、ウシの呼吸器感染症における混合感染時の重篤化の原因とその分子機構については不明な点が多い。本研究成果により、BRSV感染が複数の細菌の細胞接着を増強し、牛の常在細菌による感染症の重篤化を引き起こす可能性が強く示唆された。本研究成果を発展させその詳細な機構を解明することで、これまでに対応しきれなかったBRDCに対する新たな治療戦略へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The presence of interaction between the respiratory syncytial virus (BRSV) and bacteria was examined by the efficiency of bacterial cell adhesion with or without BRSV infection. The results revealed that BRSV infection enhances the adhesion of multiple bacterial species to cells. Furthermore, it was observed that one viral protein contributes to the enhanced adhesion in certain bacteria, which can be inhibited by the antibody against the protein. The enhancement of bacterial adhesion was not limited to specific BRSV genotypes, bacterial strains, and cell types. These findings suggest that BRSV infection may exacerbate respiratory infections in cattle caused by bacteria.

研究分野：ウイルス学

キーワード：牛RSウイルス 牛呼吸器病症候群

1. 研究開始当初の背景

国内の肉用牛における肺炎等の呼吸器病が原因による死産事故は 15.8%、病傷事故は 36.0%にのぼり、食用牛肉の生産を目的とした畜産業において大きな経済的問題となっている。さらに、そのうちの 8 割以上が感染性肺炎である(平成 29 年度家畜共済統計表より)。一方、肺炎等の呼吸器病は、ウイルス、細菌、マイコプラズマ等の混合感染と、それに様々な環境的な要因が重なって発症する複合病であり、これらを総称してウシ呼吸器病症候群(Bovine respiratory disease complex: BRDC)と呼んでいる。また、BRDC を防止するためのウイルス感染に対するワクチンが市販されており、国内の農家の 8 割以上がワクチンを使用している(小熊圭, 家畜感染症学会誌, 2018)にも関わらず、今なお発生が頻発していることから、その解決は大きな課題となっている。

ウシの感染性肺炎における混合感染については、その病態の複雑さゆえになかなか研究が進んでこなかった。ウイルスおよび細菌の単独感染でも呼吸器症状を呈するが、これらが混合感染すると症状が重篤化することが良く知られている(Earley B et al., Animal, 2017)。ヒトの呼吸器および消化器感染症においてもウイルスと細菌の混合感染による重篤化が問題となっており、近年の研究により複数の病原体が単に偶発的に同時に感染したのではなく、免疫系の攪乱を含む何らかの病原体同士の相互作用に重篤化の原因があることがわかってきたことが学術的背景としてある。しかし、ウシの呼吸器感染症における混合感染時の重篤化の原因とその分子機構については不明な点が多い。

ウシの呼吸器感染症の原因となる病原体のうち、特に報告例が多いウイルスはウシ RS ウイルス(Bovine Respiratory Syncytial virus: BRSV)である。BRSV 感染細胞における病原性細菌 *Pasteurella multocida* (*P. multocida*)の接着性が上昇することについては、すでに報告がある(Sudaryatma PE et al., Vet Microbiol. 2018)。このように BRSV 感染が、直接的な作用として、あるいは宿主細胞由来の因子を介した間接的な作用として細菌の細胞接着へ寄与していることが示唆され、それが重篤化に至る原因となる可能性が考えられるが、その詳細な分子機構は不明なままである。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスと細菌の混合感染によるウシの呼吸器疾患の重篤化に至る機序の分子機構を解明することを目的とし、BRSV 感染細胞への各種細菌の接着性に注目し、病原体間、あるいは宿主・病原体間の相互作用の存在とその分子機構の解明を目指した。具体的には、一次要因と言われるウイルスとし BRSV、ウシ呼吸器病の原因としても重要な常在細菌として *P. multocida*、*Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*)、*Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*)および *Histophilus somni* (*H. somni*)を用いて、BRSV 感染による細菌の細胞接着性増強機構の詳細を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

一次要因と言われるウイルスとして BRSV、常在細菌として *P. multocida*、*M. haemolytica*、*T. pyogenes* および *H. somni* を用い、BRSV 感染による細菌の細胞接着効率を指標に、細菌の細胞への接着性増強機構の解明を目指した。

(1) BRSV 感染細胞を用いた各種細菌の細胞への接着試験

BRSV に感染したウシ腎由来株化細胞 MDBK 細胞に常在細菌 *P. multocida*、*M. haemolytica*、*T. pyogenes* および *H. somni* を感染させ、BRSV 非感染細胞における細胞接着と比較して有意に高効率を示すものを BRSV 感染による接着増強を示す細菌とする。すでに、BRSV 感染により *T. pyogenes* の接着効率が上昇することを確認しているため、同様の接着試験により他種細菌の接着性増強の有無を明らかにする。

(2) 細菌の接着増強の原因となる BRSV 側の因子の同定と詳細な解析

細菌の接着増強に関与する BRSV 側の因子を同定するために、ウイルスタンパク質あるいはウイルスゲノムによる接着増強の有無を検討する。BRSV は約 15000 塩基からなる RNA をゲノムとして持ち、約 80~2500 アミノ酸からなる 11 種のタンパク質を合成する。そこで、それぞれのタンパク質を発現する細胞における細菌の接着増強の有無を確認し、細菌の接着増強の原因となる BRSV 由来のタンパク質を同定する。関与する BRSV 側の因子が同定できたのち、ランダムに遺伝子の一部を欠損させた変異体を用いて同様の実験を行うことで、接着性増強に関与する BRSV のウイルスタンパク質のアミノ酸配列を明らかにする。

(3) 関与因子に対する抗体を用いた接着抑制試験

BRSV 感染による細菌の細胞接着増強に関与する因子に対する抗体を用いて、BRSV 感染時の接着試験を行い、その抑制効果を検証する。さらに、その結果に基づき臨床応用への展開について検討を行う。

4. 研究成果

BRSV 感染は、今回使用した 4 種の細菌いずれにおいても細胞への接着を増強した。この接着増強は複数の異なる由来から分離した菌株で観察された(図 1)。また、特定の培養細胞株だけでなく、複数の培養細胞や、牛肺由来初代細胞でも観察された。

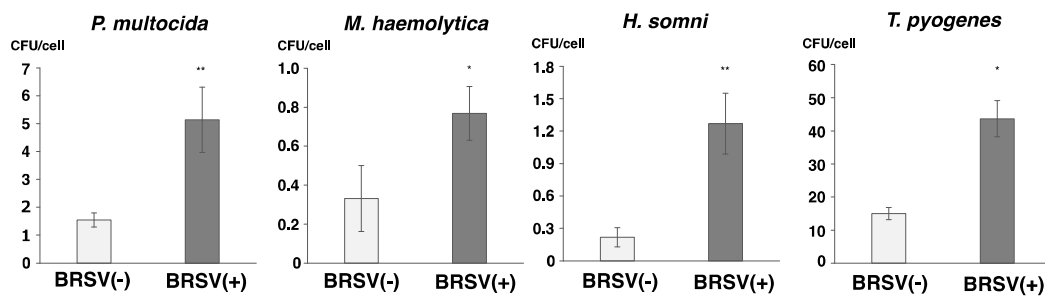


図1:BRSV感染は呼吸器常在細菌の細胞への接着を増強する (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

11 種類のタンパク質のうち、1 種類のタンパク質が、*P. multocida*、*T. pyogenes*、*H. somni* の細胞への接着を有意に増加させた(図 2)。一方でこのタンパク質は、*M. haemolytica* の細胞への接着は増強しなかった(図 2)。さらに、このタンパク質による *T. pyogenes* の接着増強は、現在日本で流行する遺伝子型のウイルス由来のタンパク質においても確認された。

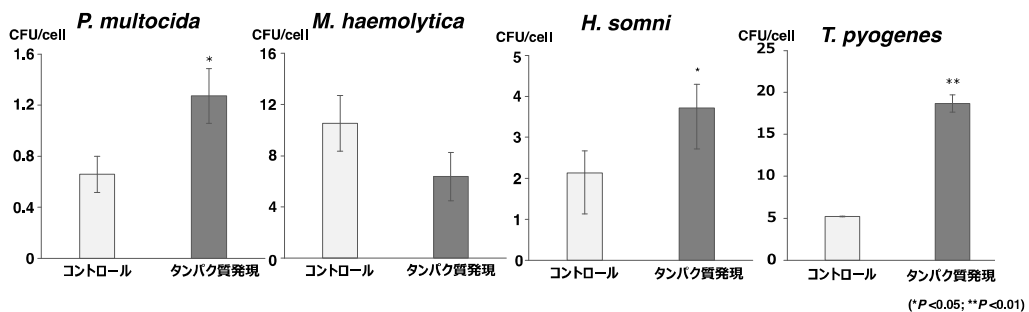


図2:BRSV由来のタンパク質は*P. multocida*、*H. somni*、*T. pyogenes*の細胞への接着を増強する (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)

ついで、3 種類の細菌の接着を増強させたウイルスタンパク質を精製し、そのタンパク質に対するポリクローナル抗体を作製した。細菌の接着の 1 時間前にポリクローナル抗体処理を行ったところ、*T. pyogenes* の接着増強が抑制された。その他の細菌については、今後検討を実施する予定である。

以上の結果から、BRSV 感染による細菌の接着増強は、BRSV の遺伝子型や菌株、培養細胞種に限定されず、広く引き起こされる現象であることが明らかとなり、BRSV 感染が牛の常在細菌による感染症の重篤化を引き起こしている可能性が強く示唆された。

BRSV 感染による細菌の細胞への接着性の増強は、BRSV 感染に起因した常在細菌による呼吸器疾患の重篤化に関与している可能性が高いので、その機構をさらに詳細に解明することで、これまでに対応しきれなかった BRDC に対する新たな治療戦略へと繋がり、波及効果として 畜産分野における経済的損失を減少させることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古林 梨紗、山本 聡美、黒川 真奈、田邊 太志
2. 発表標題 牛RSウイルス感染はTrueperella pyogenesの細胞への接着を増強する
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古林 梨紗、山本 聡美、黒川 真奈、田邊 太志
2. 発表標題 牛RSウイルス感染は常在細菌の細胞への接着を増強する
3. 学会等名 第74回日本細菌学会東北支部会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

—

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------