

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660238

研究課題名(和文) 移行抗体存在下で利用できる子牛用ネオスポラ血清診断系の確立

研究課題名(英文) Establishment of neospora detection system for new born cattle without effect of passive immunization

研究代表者

高島 康弘 (Takashima, Yasuhiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20333552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、胎児期にネオスポラに感染した新生子牛が特定の虫体抗原に対してIgG抗体を産生していることが明らかになった。また、この虫体抗原の特定作業がほぼ終了し、近日中にタンパクを特定できるめどがついた。さらに、この抗原に対するIgGは母牛が産する初乳にはそれほど高濃度では含まれておらず、初乳の接種により新生子牛血中の抗体価は大きく動かないことが予想された。現在までに数組の親子でこのことを確認済みであるが、既に確保しているさらにいくつかの親子で再確認を行っている。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that newborn cattle which had been infected with *N. caninum* in its fetal life produced IgG antibodies against particular parasite-derived antigens. Concentration of the antibodies in colostrums was not so high.

研究分野：獣医寄生虫病学

キーワード：胎児免疫 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

牛の流産の原因として重要であるネオスポラ原虫はわが国を含む世界中の家畜に広く浸潤しており、その経済的被害は甚大である[Koiwai et al., 2006]。潜伏感染した牛が妊娠すると原虫が活性化し 50-90%の確率で胎児へ侵入し、その一部が流産に至る。牛における本原虫の主な感染ルートは母体から胎児への垂直伝播であり水平感染はごく少ない [Vertels et al., 2007]。したがって図 1 B の牛を繁殖に用いなければ本原虫の清浄化は可能なはずである。しかし B の牛といえども必ずしも流産するわけでない。約 90%の確率で一見正常な子牛を生むため一定の資産価値がある。このため血清診断の結果が陽性でも、それを根拠に直ちに淘汰することは畜産農家にとって受け入れがたい選択である。こうして潜伏感染牛はずるずると利用され続ける。このような悪循環を断ち切るためには無症状感染牛を新生獣の間に摘発し、次世代の繁殖牛として育成しない体制が必要である。すなわち子牛が市場に出る前の段階で、将来繁殖牛として利用できる牛とそうでない牛に区別するということである。なおこの段階で潜伏感染が判明すれば、はじめから肥育・食肉用にまわすなど次世代を残さない工夫が可能になり、無症状感染仔牛も無駄なく適切に利用できる。しかし子牛市場に出す以前の段階では母牛からの移行抗体の影響があり、既存の血清診断では新生仔牛の血清学的検査は不可能である。

研究開始当初、申請者は予備実験において胎児期に感染した牛は胎児期末期に既に抗ネオスポラ抗体を生産していること、

胎児の生産する抗体のバリエーションと母牛の生産する抗体のバリエーションが異なることまでを確認していた。本研究ではこのような予備的知見をもとに、仔牛の血清学的診断法確立の可能性を模索した。

## 2. 研究の目的

牛ネオスポラ症はオスポラ原虫に起因する流死産を主徴とする疾病でわが国にも広く浸潤している。しかし感染胎子のすべてが流産するわけではなく、無症状潜伏感染の状態で生まれる子牛も多い。このような無症状感染牛が後に繁殖用母牛として利用され、さらに次世代の牛へ原虫を引き継ぐことで被害は長期化する。この悪循環を断ち切るには、牛が繁殖年齢に達する前の段階で無症状感染個体を摘発し、これを繁殖に用いない体制を確立する必要がある。さらに牛の商習慣や経済性を勘案すれば、無症状感染牛を摘発するのは子牛市場で売買される前の段階が望ましい。しかしこの段階では母親からの移行抗体の影響があるため既存の血清学的診断法が利用できない。そこで本研究では新生子牛にも利用できる「移行抗体の影響を受けないネオスポラ血清診断法」の確立をめざす。

本研究では母子の作る抗体の違いを詳細に検討し、胎児でのみ抗体がつくられるネオスポラ抗原を複数同定し、この抗原を用いた診断系の確立を目指す。母体では当該抗体が作られず、かつ感染胎子が当該抗体をつくるのであるから、初乳を介した移行抗体に関係なく新生子牛の血清診断が可能になる。

## 3. 研究の方法

ネオスポラ無症状感染雌牛を農場で摘発し、これらの個体から生まれる無症状感染仔牛の血清を初乳摂取前に採材した。この時点の血清中に存在する抗ネオスポラ特異抗体にどのようなものがあるか調べた。さらに新生仔牛が産する抗体のうち、初乳中にはあまり含まれていない抗体を選び出した。これらの作業はネオスポラ虫体抗原を

抗原、新生仔牛血清や初乳を一次抗体として Western blotting 法を実施し、特異的バンドを見出す方法によって実施した。

さらに抗ネオスポラ抗体を有する母牛が産する初乳を採取し、非感染新生仔牛に与えた。この場合に当該抗体が仔牛血清中で上昇するか否か確認をした。

#### 4. 研究成果

ネオスポラ抗体陽性母牛から生まれた子牛のうち、(牛の血清学的診断法として広く用いられている)間接蛍光抗体法において陽性を示した個体のすべてについて、特定の虫体抗原に対する IgG 抗体を有していることが分かった。またこの抗原の同定が研究期間中に進み近くタンパクレベルで同定できる見込みである。

なお当該抗体は無症状感染母牛が産する初乳にもある程度の濃度で含まれていたが、他の抗原に対する抗体に比べてそれほど高い濃度ではなかった。すなわち、初乳に含まれる主たる抗ネオスポラ抗原ではないということである。抗ネオスポラ抗体をもたない非感染仔牛にこのような初乳を与え仔牛血清中に移行する抗体の様子を調べたところ、当該抗体濃度は仔牛血清中ではそれほど上昇しなかった。さらに胎児期にネオスポラに感染したと思われる新生仔牛に非感染母牛の産する初乳を飲ませて数日間仔牛血清中の抗体価を追跡した。その結果、少なくとも出生後数日間、当該抗体の抗体価は維持されることが明らかになった。

以上のことから、本研究で見出した抗体は胎児期にネオスポラに感染することで高濃度で産生されるが、初乳を介した移行免疫ではそれほど濃度が上がらないことが明らかになった。また、いったん産生された当該抗体は少なくとも出生後数日間は高濃度で維持されることが分かった。IgG の

半減期を考えれば、仮に出生後新たな当該抗体の産生が起こっていないと仮定しても、1 週間程度の間は簡単に検出できるものと思われる。

以上の研究成果から、今回見出した抗体を検出することで移行免疫に影響を受けない新生仔牛用の検査系が確立できる可能性が示された。

#### 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 1 件)

Takashima Y, Takasu M, Yanagimoto I, Hattori N, Batanova T, Nishikawa Y, Kitoh K. Prevalence and dynamics of antibodies against NcSAG1 and NcGRA7 antigens of *Neospora caninum* in cattle during the gestation period.

J Vet Med Sci. 2013. 75(11):1413-8. Epub 2013 Jun 19. 査読あり

<http://doi.org/10.1292/jvms.13-0198>

[学会発表](計 1 件)

2014年10月10日

場所：宮崎大学医学部 (宮崎市、宮崎)

発表者：高島康弘

第14回 日伊科学技術会議 宮崎国際会議

Prevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic animals for meat production.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

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(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

高島 康弘 (TAKASHIMA YASUHIRO)  
岐阜大学・応用生物科学部・准教授  
研究者番号：20333552