

氏名（本（国）籍）	渡 邊 祐 策（岩手県）
主 指 導 教 員 名	岩手大学 教授 原 澤 亮
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第373号
学 位 授 与 年 月 日	平成24年9月18日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	野生ニホンジカおよびブタにおけるヘモプラズマの系統解析と疫学
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 板 垣 匡 副査 帯広畜産大学 教 授 猪 熊 壽 副査 岩 手 大 学 教 授 原 澤 亮 副査 東京農工大学 教 授 白 井 淳 資 副査 岐 阜 大 学 教 授 福 士 秀 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

ヘモプラズマは赤血球寄生性マイコプラズマの総称で、種特異性が比較的強く、反芻獣やイヌ、ネコ、ブタなど多くの動物種由来のものが報告されている。ヘモプラズマは *in vitro* での培養法が確立されていないため、その分類学的検討は 16S rRNA 遺伝子や *rnpB* などの塩基配列に基づいて行われている。

我が国では野生ニホンジカの個体数の増加に伴い、家畜やヒトへの感染症の感染源としての役割も危惧されているが、ヘモプラズマについては研究が進んでいない。また、飼養豚においても *Mycoplasma suis* と *Eperythrozoon parvum* の 2 種類のヘモプラズマの存在が知られているが、とくに *E. parvum* については研究が進んでいない。

本研究では野生ニホンジカと飼養豚におけるヘモプラズマの感染状況を調査し、またリアルタイム PCR 法による飼養豚におけるヘモプラズマの検出法の開発を行った。

第 1 章では、野生ニホンジカの血液 147 検体から DNA を抽出し、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 を実施した。その結果、13 検体（9%）においてヘモプラズマが検出された。

さらに陽性検体について 16S rRNA 遺伝子のほぼ全領域についての塩基配列を解析し、データベースに登録されたヘモプラズマの 16S rRNA 遺伝子と比較した。その結果、13 検体から得られた PCR 産物は塩基配列の違いにより 2 つのグループに分けられ、第 1 のグループは新種のヘモプラズマであることが示され、'*Candidatus M. erythroceruae*' と命名した。第 2 のグループはさらに *rnpB* の塩基配列についてもあわせて評価した結果、第 2 のグループも新たなヘモプラズマである事が示され、'*Candidatus M. haemocervae*' と命名した。以上、ニホンジカから 2 種の新菌種を発見し、命名した。

第 2 章では、飼養豚におけるヘモプラズマを検索した。臨床的に健康な肥育豚から得た血液 12 検体に対し、第 1 章と同様に 16S rRNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR によ

りヘモプラズマ感染を調べた。その結果、8 検体が陽性を示した。さらに、これら陽性 8 検体について第 1 章と同様に 16S rRNA 遺伝子のほぼ全領域の増幅を試みたところ、6 検体について塩基配列が決定された。得られた 6 個の塩基配列は 2 つのグループに分けられ、第 1 のグループはその塩基配列の相同性から *M. suis* である事が示唆された。第 2 のグループも *M. suis* の塩基配列と最も近縁だったが、相同性が 95%以下と低かったことから、さらに *rnpB* の塩基配列を決定した。その結果、やはり *M. suis* の塩基配列と最も近縁だったが相同性が 90%以下と低く、さらに *rnpB* の酵素活性に重要な回文様配列による立体構造にも違いが認められたことから、第 2 のグループは *M. suis* に近縁な別の菌種であることが示唆された。

ブタにおけるヘモプラズマのうち、*E. parvum* についてはこれまで遺伝子配列についての研究はなされておらず、マイコプラズマへの再分類がなされていなかったが、本研究により *E. parvum* の 16S rRNA 遺伝子と *rnpB* の塩基配列を明らかにし、これらを *E. parvum* のものとしてデータベースに登録し、さらに *E. parvum* をマイコプラズマの一種である *Mycoplasma parvum* として再分類することを提唱した。

第 3 章では、PCR 法によるブタのヘモプラズマの検出法を確立することを目的とした。*M. suis* および *M. parvum* の 16S rRNA 遺伝子を標的として、両者の共通配列を元にしたユニバーサルプライマーと、それぞれのヘモプラズマの固有配列を元にした種特異プライマーを作成し、第 2 章においてヘモプラズマの感染を確認した 6 つの血液検体について再度リアルタイム PCR およびエンドポイント PCR を実施した。その結果、種特異プライマーを使用したエンドポイント PCR およびリアルタイム PCR により 6 検体中 5 検体から *M. suis* が、3 検体から *M. parvum* が検出され、2 検体に混合感染があることが示された。また、リアルタイム PCR の方がエンドポイント PCR よりも結果が明らかであることも示された。ユニバーサルプライマーを使用した場合にはいずれの PCR でもヘモプラズマ感染が確認できたが、混合感染を確認することはできなかった。これらの結果から、ブタにおけるヘモプラズマの検出を行うには種特異プライマーを使用したリアルタイム PCR が最も適していることが判明した。

次に、11 農場から得られた 120 頭の臨床的に健康なブタの血液について、種特異プライマーを用いたリアルタイム PCR によりヘモプラズマ感染を調査した。その結果、6 農場 (54.5%) 18 頭 (15.0%) のブタが *M. parvum* 陽性で、1 農場 (9.1%) 6 頭 (5.0%) のブタが *M. suis* 陽性、3 頭 (2.5%) において両ヘモプラズマの混合感染が認められた。

本研究によるスクリーニングでは野生ニホンジカと飼養豚においては固有のヘモプラズマの感染が認められたが、その他の動物種で認められるヘモプラズマが検出されなかったことから、野生ニホンジカが家畜へのヘモプラズマの感染源になる危険性および飼養豚が他の動物からヘモプラズマの感染を受ける危険性はかなり低いということが示唆された。さらに、本研究により飼養豚における *M. parvum* の農場陽性率が 54%以上と高いことが確認され、ブタの複合感染症の原因としての役割の評価など、さらなる研究の必要があることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

赤血球寄生性を示すマイコプラズマであるヘモプラズマについて、野生ニホンジカと飼養豚の血液を材料とし、16S rRNA 遺伝子と *rnpB* を標的としたリアルタイムおよびエンドポイント PCR を実施して感染状況について調査し、さらに豚ヘモプラズマの検出法の開発を試みた。

第 1 章では野生ニホンジカにおけるヘモプラズマの感染を調査することを目的とし、野生ニホンジカの血液 147 検体についてリアルタイム PCR を実施し、13 のヘモプラズマ陽性検体を摘発した。さらにエンドポイント PCR による 16S rRNA 遺伝子および *rnpB* の塩基配列の決定により 2 種の新菌種を発見し、命名した。

第2章では飼養豚におけるヘモプラズマの感染を調査することを目的とし、飼養豚の血液12検体についてリアルタイムPCRを実施し、ヘモプラズマ陽性検体を検出した。さらに、16S rRNA 遺伝子および *rnpB* を標的としたエンドポイントPCRにより *Mycoplasma suis* と、*Eperythrozoon parvum* のものと思われる新たな塩基配列を決定し、さらに *E. parvum* をマイコプラズマの一種である *M. parvum* として再分類することを提唱した。

第3章ではブタのヘモプラズマの検出法を確立するために、*M. suis* および *M. parvum* の16S rRNA 遺伝子の共通配列を元にしたユニバーサルプライマーと、それぞれの種の固有配列を元にした種特異プライマーを作製し、第2章においてヘモプラズマの感染を確認した血液検体についてリアルタイムおよびエンドポイントPCRを実施した結果、種特異プライマーを用いたリアルタイムPCRによる豚ヘモプラズマの検出感度が最も高いことが示され、さらに *M. suis* と *M. parvum* の混合感染が成立することを初めて示した。さらに、種特異プライマーを用いたリアルタイムPCRを11農場から得た120頭のブタの血液について実施した結果、6農場(54.5%) 18頭(15.0%)のブタが *M. parvum* 陽性で、1農場(9.1%) 6頭(5.0%)のブタが *M. suis* 陽性、3頭(2.5%)において両ヘモプラズマの混合感染があることを示した。

本内容は、野生ニホンジカや飼養豚におけるヘモプラズマの浸潤状況を明らかとし、さらにブタにおけるヘモプラズマ症の診断に貢献できると考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*)
著 者 名 : Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Matsubara, K., Yamauchi, K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 72 (11) : 1527-1530, 2010
- 2) 題 目 : Two genetic clusters in swine hemoplasmas revealed by analyses of the 16S rRNA and RNase P RNA genes
著 者 名 : Watanabe, Y., Fujihara, M., Obara, H., Nagai, K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (12) : 1657-1661, 2011
- 3) 題 目 : Prevalence of swine hemoplasmas revealed by real-time PCR using 16S rRNA gene primers
著 者 名 : Watanabe, Y., Fujihara, M., Suzuki, J., Sasaoka, F., Nagai, K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : in press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : *Mycoplasma ovis* detected in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*
著 者 名 : Ohtake, Y., Nishizawa, I., Sato, M., Watanabe, Y., Nishimura, T., Matsubara, K., Nagai, K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (3) : 371-373, 2011

- 2) 題 目 : Acidic environments induce differentiation of *Proteus mirabilis* into swarmer morphotypes
著 者 名 : Fujihara, M., Obara, H., Watanabe, Y., Ono, H. K., Sasaki, J., Goryo, M. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 55(7) : 489-493, 2011
- 3) 題 目 : Molecular identification of '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in sheep with hemolytic anemia
著 者 名 : Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (8) : 1113-1115, 2011
- 4) 題 目 : Rapid identification of hemoplasma species by palindromic nucleotide substitutions at the GAAA tetraloop helix in the specificity domain of ribonuclease P RNA
著 者 名 : Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (11) : 1517-1520, 2011
- 5) 題 目 : Prevalence of hemoplasma infection among cattle in the western part of Japan
著 者 名 : Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Ooshita, K., Ano, H. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (12) : 1653-1655, 2011
- 6) 題 目 : Examination of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' and *Mycoplasma haemofelis*
著 者 名 : Sasaoka, F., Suzuki, J., Fujihara, M., Watanabe, Y., Nagai, K. and Harasawa, R..
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 74 (1) : 83-87, 2012
- 7) 題 目 : A feline hemoplasma, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', detected in dog in Japan
著 者 名 : Obara, H., Fujihara, M., Watanabe, Y., Ono, H. K. and Harasawa, R.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 73 (6) : 841-843, 2011