

牛およびその他偶蹄類における
ヘモプラズマ感染に関する疫学的研究

2013年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

田川 道人

目次

序論.....	1
第1章 Direct PCR法を用いた牛ヘモプラズマ診断法の確立.....	7
1 緒言.....	7
2 材料および方法.....	8
3 結果.....	11
4 考察.....	12
5 小括.....	13
第2章 北海道道東地区における牛ヘモプラズマ感染症のリスクファクターおよび 小型ピロプラズマとの混合感染時の病態評価.....	16
緒言.....	16
第1節 北海道道東地区における牛ヘモプラズマ感染症のリスクファクターの解析	
1 序論.....	18
2 材料および方法.....	18
3 結果.....	19
4 考察.....	21
第2節 放牧牛における小型ピロプラズマとヘモプラズマの干渉現象の検討	
1 序論.....	29
2 材料および方法.....	30
3 結果.....	31
4 考察.....	33
小括.....	34
第3章 ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響および子牛での発症例の観察	42
緒言.....	42
第1節 ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響	
1 序論.....	44
2 材料および方法.....	44
3 結果.....	46
4 考察.....	47

第2節	ヘモプラズマ感染により貧血および発育不良を呈した子牛の一例	
1	序論.....	53
2	症例.....	53
3	経過.....	55
4	考察.....	55
	小括.....	57
第4章	牛以外の偶蹄類に感染するヘモプラズマに関する研究.....	64
	緒言.....	64
第1節	羊ヘモプラズマの臨床例と疫学調査	
1	序論.....	66
2	材料および方法.....	66
3	結果.....	68
4	考察.....	69
第2節	エゾシカに感染するヘモプラズマ病原体の検索	
1	序論.....	75
2	材料および方法.....	76
3	結果.....	78
4	考察.....	80
	小括.....	81
	総括.....	88
	謝辞.....	91
	文献.....	93

略語一覧

PCR	polymerase chain reaction
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
FeLV	猫白血病ウイルス
FIV	猫免疫不全ウイルス
BLV	牛白血病ウイルス
CBC	全血球計算
RBC	赤血球
HB	ヘモグロビン量
PCV	ヘマトクリット値
MCV	平均赤血球容積
MCH	平均赤血球ヘモグロビン量
MCHC	平均赤血球ヘモグロビン濃度
PLT	血小板
WBC	白血球
Sta	桿状核好中球
Seg	分葉核好中球
Lym	リンパ球
Mon	単球
Eos	好酸球
Bas	好塩基球
BUN	血中尿素窒素
Cre	クレアチニン
AST	aspartate aminotransferase
ALP	alkaline phosphatase
LDH	乳酸脱水素酵素
Glu	血糖値
T.chol	総コレステロール
TP	総蛋白
Alb	アルブミン
Glob	グロブリン
Na	ナトリウム
K	カリウム
Cl	塩素
IGF-1	インスリン様成長因子 1

序論

ヘモプラズマ感染症とは、赤血球表面に寄生するマイコプラズマの感染により生じる溶血性貧血を主徴とする疾患である。本病原体は、以前はリケッチアの一種と考えられており、*Haemobartonella* (犬、猫など)、*Eperythrozoon* (牛、羊など) と呼ばれていたが、その後、分子生物学的解析法の発達により病原体の 16S rRNA 遺伝子解析が行われ、*Mycoplasma* 属菌の一種であることが明らかとなった (57)。本疾患の病原体として犬では *Mycoplasma haemocanis*、‘*Candidatus M. haematoparvum*’ (9, 84)、猫では *M. haemofelis*、‘*Candidatus M. haemominutum*’、‘*Candidatus M. turicensis*’ (44, 106)、羊では *M. ovis*、‘*Candidatus M. haemovis*’ (12, 36)、豚では *M. suis* (34) などが知られている。

牛のヘモプラズマ病原体は、以前から赤血球表面寄生性の *Eperythrozoon wenyonii*、血漿中寄生性の *E. tejanodes*、血小板寄生性の *E. tuomii* の 3 種とされていたが、その区別は光学顕微鏡によるものであり明確ではなかった (41, 79, 95)。これら 3 種のうち、現在 *E. wenyonii* のみが *Mycoplasma* 属に分類されている (*Mycoplasma wenyonii*) (94)。Hoelzle ら (32) は *E. tejanodes* の 16S rRNA 遺伝子配列が *M. wenyonii* と 99.8% の相同性をもち、これら 2 種が同一種もしくは 16S rRNA 遺伝子が同一な別種である可能性を示しており、他の遺伝子解析を含めたさらなる検討が必要であるとしている。*M. wenyonii* は 1934 年に Adler ら (2) が世界で初めてエルサレムの牛から検出し、現在では世界中に分布していることが知られている (79)。わが国では 1960 年に脾臓摘出牛から発見されている (43)。また、2008 年、分子生物学的手法により *M. wenyonii* とは異なる新規牛ヘモプラズマ病原体の ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’ が牛末梢血液から検出され (88)、現時点では *M. wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’ の 2 種が牛のヘモプラズマ病原体であると考えられている。

ヘモプラズマ感染症の診断は従来、血液塗抹標本により行われてきた。病原体はギムザ染色において赤紫色に染まり、赤血球表面や血漿中に浮遊する直径 0.3~1.5 μm の円盤状、桿菌状あるいはリング状の寄生体として観察される (54)。また、アクリジンオレンジ染色を用い蛍光顕微鏡下で観察すると、蛍光を発する寄生体が観察できる (80)。血液塗抹標本の作製においては、EDTA 保存血では病原体が赤血球より離脱することが報告されており (92)、消失により検出が困難になることから、血液採取後、可能な限り早急に塗抹を引くことが推奨される。しかし、末梢血液中に病原体が観察されるのは急性期のみであること、さらに染色液の沈殿物、アーチファクトによる赤血球の陥凹、ハウエルジョリー小体、好塩基性斑点、バベシア、アナプラズマ、小型ピロプラズマなどの他の住血微生物との鑑別が必要であることから、顕微鏡観察だけで確定診断を行うことは困難であり、感染種の鑑別も不可能である (92)。現在、高感度な PCR 法を用いたヘモプラズマ病原体の検出系が確立しており、様々な動物種で報告されている (9, 36, 44, 52, 54)。しかしながら、従来の PCR 法による検出を行う前には、血液材料からの DNA 抽出が必要であり、作業工程時におけるサンプル同士のコンタミネーションの危険性が高まるばかりでなく、多検体を用いた疫学調査を実施する際には作業の手間、時間、コストがしばしば問題となる (98)。近年、それらの問題点を克服可能な direct PCR 法が開発され、*Babesia gibsoni* や犬猫のヘモプラズマ感染症の診断に応用されている (98, 101)。しかし、牛ヘモプラズマ感染症における direct PCR 法の有効性は示されていない。

ヘモプラズマの伝播様式は、以前よりダニ、シラミ、ノミ等の吸血節足動物による生物学的または機械的伝播および輸血等の医原性感染によると考えられているが (104)、いまだ明確ではない。犬では感染実験によりクリイロコイタマダニ (*Rhipicephalus sanguineus*) が *M. haemocanis* のベクターであることが示されており (76)、また、猫ではヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*)、キチマダニ (*Haemaphysalis flava*) から

‘*Candidatus M. haemominutum*’、ネコノミ (*Ctenocephalides felis*) から ‘*Candidatus M. haemominutum*’ および ‘*Candidatus M. turicensis*’ の DNA 断片が検出されている (37, 91)。一方、牛では、現在マダニおよびシラミによって感染が拡大する可能性は低いとされ(35, 38)、サシバエ、ウマバエ、蚊といった吸血昆虫から牛ヘモプラズマの DNA 断片が検出されていることから、これらによる機械的伝播が感染の主軸を担っていると思われる (39, 48)。また、本病原体の母子感染が低率ではあるが報告されている (39)。

発症機序にはいくつかのメカニズムが関与していることが知られている。病原体がフリーラジカルを発生することで宿主細胞表面に酸化ダメージを与えるほか、細網内皮系の活性化により感染赤血球および障害を受けた赤血球の貪食が行われることで貧血が進行する (54)。犬と猫では二次的な抗赤血球抗体の産生により免疫介在性溶血性貧血が生じるとされているが (93, 97)、牛での報告はない。ヘモプラズマ感染症の病態は、末梢血液中に多数の病原体出現が認められる急性期と血中への出現が非常に軽微または認められない慢性期により異なる。急性期の牛では貧血の発現とともに、40℃以上の発熱、元気、食欲廃絶、黄疸、ヘモグロビン尿とともに急激な乳量低下や四肢の浮腫などが認められる (55, 79)。これらの臨床症状は脾臓摘出牛において顕著であり、野外例では若齢牛や免疫力の低下した成牛で発症するとされているが、正確な発症要因は不明である (19, 54)。一方、ヘモプラズマ感染後、そのほとんどは慢性期に移行すると考えられている (54)。これまで牛ヘモプラズマの多くは不顕性感染であり、慢性期には顕著な病原性を示さないものと考えられてきた (54)。しかし、牛ヘモプラズマ慢性感染牛の血液検査の結果から、感染牛は非感染牛に比べると軽微な貧血を呈することが明らかとなった (89)。なお、病原性は種によって異なるとされ、猫においては *M. haemofelis* は ‘*Candidatus M. haemominutum*’ および ‘*Candidatus M. turicensis*’ と比較し、より重篤な臨床症状を引き起こすことが報告されており (15, 99)、これら 3

種が混合感染した場合、病原性が増強されることが知られている (107)。また、犬においても *M. haemocanis* と ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ の病原性の相違が疑われており (45, 103)、混合感染時における病原性も評価されている (59)。牛においても新規に検出されたヘモプラズマ病原体である ‘*Candidatus M. haemobos*’ は、*M. wenyonii* よりも高い病原性を持つことが示されているが (89)、両者の混合感染時における病原性はこれまで評価されていない。さらに、犬、猫ではヘモプラズマ感染のリスクファクターが詳細に検討されており、ヘモプラズマの感染率に影響を与えているものとして、地域、生活環境、年齢、品種などが知られている (25, 59, 105, 107)。とくに猫では FeLV や FIV がヘモプラズマの発症と症状の悪化に関与し、感染を増加させる重要なリスクファクターであると考えられている (21, 25, 49)。一方、牛におけるヘモプラズマ感染のリスクファクターはこれまで検討されておらず、不明な点が多い。また、牛にはバベシア、アナプラズマ、小型ピロプラズマなどによる血液寄生感染症が多く認められる。とりわけ血液寄生原虫疾患である小型ピロプラズマ病は、ヘモプラズマ同様、放牧牛で認められやすい感染症であるにも関わらず、両者の共感染時における病原性はこれまで評価されていない。過去に、脾臓摘出を行った子牛を用いた実験感染において、牛ヘモプラズマが末梢血液中出现し、小型ピロプラズマが消退したことをもって両者の間に“干渉現象”が存在するとした報告 (43) があるが、これまで野外感染例における“干渉現象”の存在は知られていない。

ヘモプラズマが家畜の生産性に与える影響に関して、豚では重篤な貧血や発熱といった顕著な臨床症状を呈さない慢性感染期において、発情の遅延や早期胚死滅、流産が見られることが知られており (108)、さらには感染母豚から産まれた子豚の体重が低く、死産数が増加することが報告されている (113)。一方、牛ヘモプラズマでは一過性の乳量低下、流産や発情の遅延が急性発症例で認められているものの (69, 79, 81)、ヘモプラズマの慢性感染が牛の生産性に与える影響はこれまで知られてない。また、ヘモプラ

ズマの発症例は一般に若牛や脾臓摘出牛、さらには重篤な併発疾患に伴う免疫抑制時に認められるとされる(19)。しかし、これまで子牛における自然発症例の報告は少なく、臨床病理学的所見やその後の成長に与える影響は知られていない。

さらに、牛以外の家畜や野生動物からもヘモプラズマが検出されている。羊のヘモプラズマである *M. ovis* は 1934 年に南アフリカの羊で初めて報告され(58)、その後世界各地で感染例が報告されている(56)。また、2008 年に新規の羊ヘモプラズマである ‘*Candidatus M. haemovis*’ が検出され(36)、国内においても軽度の貧血を呈する羊から検出されている(83)。しかし、わが国では羊のヘモプラズマ症の報告はあるものの、重篤化および死亡例は報告されておらず、疫学調査も行われていない。また、シカ科動物のヘモプラズマに関して、これまでアメリカおよび南米に生息する野生シカから *M. ovis* 近縁種を含む 3 系統のヘモプラズマが検出されている(8, 23)。国内に生息するニホンジカからは ‘*Candidatus M. haemocervae*’ および ‘*Candidatus M. erythroceruae*’ が検出され(100)、海外のシカ由来ヘモプラズマとの関連性が指摘されているがその比較は不十分である(23)。北海道に生息する主要な野生動物であるエゾシカは近年その生息数を増やしており、牛、羊といった家畜と接触する機会の多い動物種と言える。しかし、これまでエゾシカに感染するヘモプラズマの報告はなく、感染種や浸潤状況など不明な点が多い。

そこで本研究では、牛ヘモプラズマの病原性、感染と発病に関するリスクファクターの検索と生産性に与える影響を明らかにするとともに、羊およびエゾシカに感染するヘモプラズマの疫学およびその性状を解明することを目的として研究を実施した。

第 1 章および第 2 章では、direct PCR 法を用いた牛ヘモプラズマの検出系の確立と、それを応用した乳牛のヘモプラズマ感染のリスクファクター解析を行うとともに、野外例におけるヘモプラズマと小型ピロプラズマの共感染時における病態解析を行った。第 3 章では、牛ヘモプラズマが生産性に与える影響を調査するため、慢性感染期における

乳牛への影響を疫学的に調査し、また子牛における急性感染例の病態解析を行った。さらに、第4章では北海道内に飼養される羊のヘモプラズマ感染例および疫学調査と、野生エゾシカに感染するヘモプラズマの系統学的解析を行った。

第1章 Direct PCR 法を用いた牛ヘモプラズマ診断法の確立

1. 緒言

ヘモプラズマとは赤血球寄生マイコプラズマの総称であり、宿主に軽度の貧血を引き起こす (54)。感染種は宿主動物によって異なり、牛では *M. wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’ の2種が知られている (88)。*M. wenyonii* は世界中に分布していることが知られており (79)、『*Candidatus M. haemobos*’ はこれまでドイツ、日本、スイス、中国、ブラジル、イギリス等で検出されている (6, 22, 33, 82, 88)。

以前は、ヘモプラズマの診断は血液塗抹標本の観察によって行われてきた (79)。感染率が高い場合には、赤血球表面や血漿中に浮遊する直径 0.3~1.5 μm の円盤状、桿菌状あるいはリング状の寄生体がギムザ染色において赤紫色に観察され (54)、アクリジンオレンジ染色を用い蛍光顕微鏡下で観察すると、蛍光を発する寄生体が観察できる (80)。しかし、それらの方法では染色液の沈殿物、アーチファクトによる赤血球の陥凹、ハウエルジョリー小体、好塩基性斑点、バベシア、アナプラズマなどの他の住血微生物との鑑別が困難であり、EDTA 保存血液では病原体が赤血球より離脱し、観察が困難になることが報告されている (52, 92)。また、末梢血液中に病原体が観察されるのは急性期のみであり、慢性期のヘモプラズマ感染を血液塗抹により検出することは極めて困難である (54)。犬、猫のヘモプラズマは種によってその大きさが異なり、形態学的に鑑別が可能とされるが (21, 84)、牛ヘモプラズマ病原体の形態を詳細に観察した報告はなく、種による違いも知られていないことから、形態観察による種の鑑別は困難であると思われる。現在、高感度な PCR 法を用いたヘモプラズマ病原体の検出系が確立しており、犬、猫をはじめ様々な動物種で報告され、広く疫学調査、臨床例の検索等に用いられている (9, 36, 44, 52, 54)。主に 16S rRNA 遺伝子配列をもとにプライマーが設計されており、2種の牛ヘモプラズマ病原体も容易に鑑別可能である (88)。

従来の PCR 法（以下 standard PCR）では、検出を行う前にサンプルからの DNA 抽出が必須であり、作業工程中におけるサンプル間のコンタミネーションの危険性が高まるばかりでなく、多検体を用いた疫学調査を実施する際には作業の手間、時間、コストがしばしば問題となる（53, 98）。それらの問題を解決するため、末梢血液そのものを反応系のテンプレートに用いる direct PCR 法の検討が行われてきたが、採血時に使用される抗血液凝固剤や血液中に含まれる様々な物質によって PCR 反応が阻害されることが知られており、DNA を用いる standard PCR と比較し検出感度が低下する可能性が指摘されている（5, 11, 53）。しかし、近年、PCR 試薬の改善とともにそれらの問題点を克服可能な direct PCR 法が開発され、獣医学領域においても *Babesia gibsoni* や猫ヘモプラズマなどの血液寄生病原体の診断に応用されている（98, 101）。牛においても、direct PCR 法を用いた乳房炎起因 *Mycoplasma* 属菌の検出による、大規模な疫学調査が実施されている（31）。

以上のことから、牛ヘモプラズマの検出に direct PCR 法が適応可能と思われるが、その検出感度は検討されていない。そこで本章では、全血を用いた direct PCR 法による牛ヘモプラズマ検出感度を standard PCR 法と比較し、疫学調査に応用可能かどうかを検討することを目的とした。

2. 材料および方法

2-1 材料

2011 年 6 月に北海道釧路管内の放牧地に飼養される牛 49 頭から末梢血液を採取し、EDTA 処理をおこなった。採取した末梢血の 200 μ l を用い、QIAamp DNA Mini Kit（QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany）により DNA を抽出した。各サンプルの DNA は 200 μ l の TE buffer 中に抽出し、使用するまで -30°C で保存した。また、残りの血液は direct PCR 用として別途 -30°C で保存した。

2-2 Standard および direct PCR

ヘモプラズマ遺伝子の増幅には、ヘモプラズマ類の 16S rRNA 遺伝子の特異的に増幅するプライマーである F2/R2 を用いた (Table 1-1; 44)。本プライマーを用いた場合、*M. wenyonii* は 193 bp、‘*Candidatus M. haemobos*’ は 170 bp 付近に陽性バンドが検出されることから、両者の鑑別は容易である (88)。

Standard PCR の反応液は、10×PCR buffer 2.5 μl、2mM dNTP 2.5 μl、50mM MgCl₂ 1.0 μl、Taq DNA polymerase 0.75 U (Invitrogen、USA)、前述のプライマー10 μM を各 1.0 μl、滅菌蒸留水 11.35 μl の混合液 19.5 μl にテンプレート DNA 0.5 μl を添加し、反応液量を 20 μl として PCR 反応を行った。DNA 増幅反応は、95°C 5 分のプレヒーティング後、熱変性 95°C 30 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 72°C 90 秒を 1 サイクルとし、Gene Amp® PCR system 9700 (Applied Biosystems、CA、USA) を用いて計 35 サイクル行い、72°C 5 分経過後 PCR 産物は 4°C で保存された。

Direct PCR の反応液は、2×Ampdirect Plus® 10 μl (島津製作所、京都市、日本)、Nova Taq TM Hot Start DNA Polymerase 0.5 U (Novagen、UK)、前述のプライマーを各 1.0 μl、滅菌蒸留水 7.4 μl の混合液にテンプレートとして全血を 0.5 μl 添加し、反応液量を 20 μl として PCR 反応を行った。増幅反応は、80°C 15 分、95°C 10 分のプレヒーティング後、熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長反応 72°C 90 秒を 1 サイクルとし、計 35 サイクル行い、72°C 7 分経過後、4°C で保存された。なお、PCR 産物 5 μl に 10×loading buffer (Maxim Biotech、USA) 0.5 μl を添加し、ethidium bromide 1.25 μg/ml 添加 2.0% アガロースゲルを用いて 100V 約 30 分電気泳動を行った。その後、紫外線を当てて増幅産物を確認した。分子量マーカーとして 100 bp DNA ladder (New England BioLabs、USA) を用いた。

2-3 内部標準遺伝子の確認

Standard PCR に用いた DNA および direct PCR に用いた全血の内部標準遺伝子の確認を行うため、牛 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) gene (GenBank accession no. NM001034034)を参考に 478bp の増幅産物が得られるようプライマーセット (CG218f/CG694r; Table 1-1) を作製、前述の PCR 反応と同じ条件で増幅反応を行った。なお、PCR 産物の確認は前述の通り行った。

2-4 検出感度の比較

Standard および direct PCR の検出感度を比較するため、recombinant DNA plasmid を用いた PCR 反応を行った。前述の PCR 産物 (‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性検体を使用) を TOPO TA Cloning Kit pCR 4-TOPO Vector (Invitrogen、USA) に導入し、培養した大腸菌 (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* ; Invitrogen、USA) から Plasmid Mini kit (QIAGEN、USA) を用い plasmid DNA を抽出した。plasmid DNA 溶液は NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific、USA) を用い DNA 濃度を測定、プラスミドおよび挿入遺伝子の塩基配列から copy 数を算出し (1.036×10^8 copy/ μ l)、10 倍ごとに多段階希釈し、 10^{-1} から 10^{-8} 倍の溶液を作製、PCR 反応のテンプレートとして用いた。なお、希釈溶液には standard PCR は滅菌蒸留水、direct PCR はヘモプラズマ非感染の正常牛血液を用いた。陽性バンドが検出された最終希釈濃度を検出限界とし、同様の実験を 3 回繰り返し、再現性を確認した。

2-5 塩基配列の決定

Direct PCR にて陽性であった検体について、ランダムに選出し塩基配列を決定した。各 PCR 産物は Qiaquick PCR purification kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) を用いて精製し、それらをテンプレートとし、BigDye® Terminator Ready Reaction

Mix (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) 0.5 µl、BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer 2.0 µl、10 µM forwardあるいはreverse プライマー1.0 µl、および滅菌蒸留水 4.5 µl の混合液 8.0 µl に、精製した PCR 産物を 2.0 µl 添加し、反応容量 10 µl としてシーケンス反応を行った。シーケンス反応は、95°C 5 分間のプレヒーティング後、熱変性 95°C 10 秒、アニーリング 50°C 5 秒、伸長反応 60°C 4 分を 1 サイクルとし、Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて計 30 サイクル行った。シーケンス反応産物 10 µl に 125mM 2Na-EDTA 5 µl、100%エタノール 60 µl を添加し、室温で 15 分静置した。その後、4°C で 15,000 rpm 30 分遠心し、上清を捨て 70%エタノール 60 µl を添加した。再び 4°C で 15,000 rpm 10 分遠心した後、上清を捨て 30 分程度暗所で乾燥させた。こうして沈殿させた DNA は Applied Biosystems 3730x DNA Analyzer を用いて塩基配列を決定した (Greiner bio-one. co., ltd. Japan)。決定された塩基配列は BLAST プログラム (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用いて、GenBank に登録されている既知の遺伝子配列との相同性を検索した。

3. 結果

Standard PCR では 49 検体中 33 検体 (67.3%) が陽性であり、そのうち 17 検体が *M. wenyonii*、11 検体が ‘*Candidatus M. haemobos*’ であり、5 検体が混合感染であった。一方、direct PCR では 49 検体中 35 検体 (71.4%) で陽性であり、そのうち 18 検体が *M. wenyonii*、11 検体が ‘*Candidatus M. haemobos*’ であり、6 検体が混合感染であった。Standard PCR で陽性であった検体は、direct PCR においても全て陽性であり、感染種は両者で一致した。Direct PCR で陽性であった検体を用いダイレクトシーケンスを行った結果、*M. wenyonii* (HM538191) および ‘*Candidatus M. haemobos*’ (EU367965) とそれぞれ 99.33%および 99.21%の相同性を示し、本 PCR

法が正常に牛ヘモプラズマ遺伝子を増幅していることが確認された。また、全ての検体で内部標準遺伝子である *GAPDH* 遺伝子が検出された。

Recombinant DNA plasmid を用いた検出感度の比較では、standard PCR は 10^{-6} 希釈まで陽性バンドが検出され、その検出限界は 52 copy/PCR であった。一方、Direct PCR は 10^{-7} 希釈まで陽性バンドが検出可能であり、検出限界は 5 copy/PCR であった (Fig. 1-1)。なお、同一の検討を 3 度実施したが、全てで再現性が得られた。

4. 考察

Standard PCR で陽性バンドが検出された検体は direct PCR においても全検体で陽性であり、direct PCR により増幅された遺伝子は、牛ヘモプラズマの遺伝子配列と一致していたことから、PCR 反応のテンプレートに全血を用いた場合であっても問題なく牛ヘモプラズマ遺伝子が増幅可能であることが示された。また、その検出感度は standard PCR と比較し、10 倍高感度であった。一般に、末梢血液を PCR 反応のテンプレートに用いる direct PCR 法は、血液中に含まれるラクトフェリン、ヘモグロビン、ヘパリンといった様々な物質によってその反応が阻害されることが知られており (5, 11)、DNA 抽出物をテンプレートに用いる standard PCR 法と比較し、検出感度が低下する可能性があることが報告されている (98, 101)。今回用いた試薬である Ampdirect Plus® (島津製作所、日本) は、阻害物質を中和することにより円滑な PCR 反応が可能になるとされ (3)、血液や体液、菌体など様々なものをテンプレートとして直接 PCR 反応に加えることができ、良好な結果が得られている (4, 31)。今回の検討においても Ampdirect Plus® の PCR 阻害物質に対する中和作用が十分働き、良好な結果をもたらしたものと思われた。

今回、standard PCR と比較し、全血を用いる direct PCR は 10 倍高感度であった。さらに両検査系の所要時間および用いた試薬の費用を比較したところ、standard PCR で

は DNA 抽出に 1 時間、PCR 反応に 3 時間 (計 4 時間) を要したが、direct PCR は PCR 反応のみであり、所要時間は 3 時間であった。また費用面でも standard PCR は DNA 抽出に 500 円、PCR 反応に 120 円 (計 620 円) であったのに対し、direct PCR は 170 円であった。これらのことから、全血を用いる direct PCR は、牛ヘモプラズマ感染をより高感度で迅速、簡便、安価に検出できる診断ツールとして有用であり、大規模な疫学調査などに応用可能であるものと思われた。

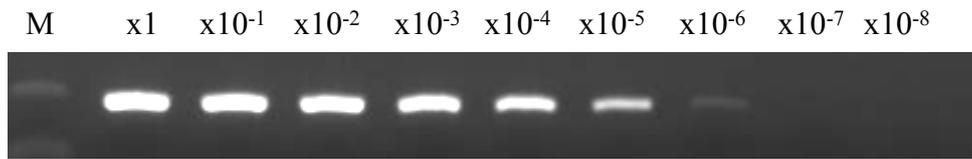
5. 小括

全血を用いた direct PCR 法による牛ヘモプラズマ検出感度を standard PCR 法と比較し、その後の疫学調査に応用可能かどうかを検討するため、北海道釧路管内に飼養される牛末梢血液 49 検体および牛ヘモプラズマ遺伝子をクローニングした recombinant DNA plasmid を用い検出感度の比較を行った。その結果、49 検体を用いた検討では standard PCR が 49 検体中 33 検体 (67.3%) 陽性、direct PCR が 35 検体 (71.4%) 陽性であり、recombinant DNA plasmid を用いた検討では standard および direct PCR の検出限界はそれぞれ 52 copy/PCR および 5 copy/PCR であった。なお、全ての検体で内部標準遺伝子である *GAPDH* 遺伝子が検出され、direct PCR の陽性検体をシーケンス解析したところ、牛ヘモプラズマ遺伝子 (*M. wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’) と一致した。さらに direct PCR は standard PCR と比較し、作業時間、コストを削減できることから、疫学調査への応用が期待された。

Table 1-1. Sequences of primers used in this study.

Primer name	Oligonucleotide (5'-3')	Reference
Hemoplasma screening PCR		
F2	ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA	44
R2	ACGCCCAATAAATCCGRATAAT	44
Internal control (<i>GAPDH</i>)		
CG218f	CCATCTTCCAGGAGCGAGA	This study
CG694r	GGAAGGCCATGCCAGTGAG C	This study

A. Standard PCR (using DNA)



B. Direct PCR (using whole blood)

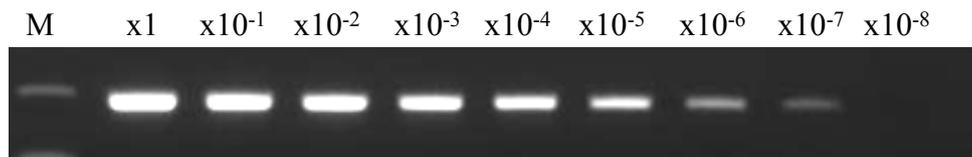


Fig. 1-1. PCR detection limits for hemoplasma DNA using a sequence-specific plasmid. (A) Standard PCR detected a positive band in a DNA solution diluted at 10⁻⁶ (B) Direct PCR detected a positive band in a blood sample diluted at 10⁻⁷. M: 100 bp ladder marker.

第2章 北海道道東地区における牛ヘモプラズマ感染症のリスクファクターおよび 小型ピロプラズマとの混合感染時の病態評価

緒言

ヘモプラズマとは赤血球表面に寄生するマイコプラズマであり、宿主赤血球に直接的および間接的に障害を与え、溶血性貧血を引き起こす病原体である。主な感染経路は吸血節足動物による機械的感染や子宮内感染による垂直感染であり、感染した場合、発熱、貧血、元気食欲の低下、四肢の浮腫等の臨床症状が認められる (39, 76, 104)。

ヘモプラズマは宿主の動物種ごとに感染種が異なるが、いずれの種においても *in vitro* での培養は困難であり、これまで成功した報告はない (75)。このことがヘモプラズマの疫学調査や病原性の評価といった詳細な検討の制限となっていた (20)。しかしながら、PCR 検査法の確立によりヘモプラズマ感染症の検出が容易となり、これまで様々な研究が行われている。犬、猫では多数の研究グループが疫学調査を実施しており、とくに感染と発病に関するリスクファクターの解析が詳細に行われている。欧州における犬ヘモプラズマの報告では、国ごとに陽性率が大きく異なり、飼養状況、年齢、品種、疥癬の感染歴などがヘモプラズマ感染と関連していた (59)。また、*Babesia* 症や *Bartonella* 症などの他の節足動物媒介疾患との混合感染が多く、ヘモプラズマとの関連性が指摘されている (13, 72)。猫においても性別、年齢、外出の有無、季節などがリスクファクターとして知られており (20, 85, 105)、とくに FeLV や FIV はヘモプラズマ感染を増加させる重要な因子であるとともに (25, 49, 86)、ヘモプラズマが混合感染した場合、貧血がより重度になることが報告されている (21, 28)。また、病原性に関しても詳細な検討が行われており、犬では *M. haemocanis* が ‘*Candidatus M. haematoparvum*’ よりも強い病原性を持つことが知られており (45, 103)、両者の混合感染時における病原性が評価されている (59)。猫では同様に *M. haemofelis* が

‘*Candidatus M. haemominutum*’よりも強い病原性を持ち、近年新たに報告された‘*Candidatus M. turicensis*’は他の2種の猫ヘモプラズマと共感染した際に、病原性が増悪することが知られている(107)。

一方、牛においてはこれまでヘモプラズマの感染、発病に関するリスクファクター解析は行われておらず、その疫学的性状は不明な点が多い。また、FeLVやFIVと同様、牛の代表的なレトロウイルスであるBLVは牛ヘモプラズマの感染および病態悪化に関与する可能性が考えられるが、これまで両者の関係は明らかとなっていない。牛ヘモプラズマの病原性に関して、明らかな臨床症状を伴わない慢性感染期においても牛に軽微な貧血を呈することが明らかとなっており、さらに、犬、猫のヘモプラズマ同様

‘*Candidatus M. haemobos*’は、*M. wenyonii*よりも高い病原性を持つことが示されているが(89)、両者の混合感染時における病原性はこれまで評価されていない。

放牧牛の代表的な慢性感染症としてタイレリア病(小型ピロプラズマ病)があり、ヘモプラズマ同様、感染牛に貧血を引き起こすことが知られている(26)。小型ピロプラズマと牛ヘモプラズマに関して、両者は放牧牛にみられやすい疾患であるにも関わらず、混合感染時の病原性はこれまで評価されていない。過去に石原(43)は、ヘモプラズマ感染が小型ピロプラズマの増殖を抑制する“干渉現象”を実験感染で証明したが、これまで野外例での報告はなく、末梢血液中にヘモプラズマ病原体が観察されない慢性感染期においても小型ピロプラズマが影響を受けるかどうかはわかっていない。

そこで本章では、第1章で検討を行ったdirect PCRを用い、第1節では道東に飼養される牛のヘモプラズマ感染におけるリスクファクター解析を行うとともに、その病原性の解析を行うこと、第2節では放牧牛を用いてヘモプラズマと小型ピロプラズマの間に存在する“干渉現象”を疫学的に検討することを目的とした。

第1節 北海道道東地区における牛ヘモプラズマ感染症のリスクファクターの解析

1. 序論

犬、猫のヘモプラズマでは感染と発病に関するリスクファクターの解析が詳細に行われている (20, 49, 59, 85, 105)。一方、牛においてはこれまでヘモプラズマの感染、発病に関するリスクファクター解析は行われておらず、‘*Candidatus M. haemobos*’ は *M. wenyonii* よりも高い病原性を持つものの (89)、両者の混合感染時における病原性はこれまで評価されていない。

そこで本節では、牛のヘモプラズマにおける感染と発病の因子および病原性を明らかにするため、リスクファクター解析及び血液検査値の比較を行った。

2. 材料と方法

2-1 材料

2011年および2012年、北海道十勝管内および釧路管内の1放牧地 (Group A ; 91頭)、3農場 (Group B ; 46頭、Group C ; 150頭、Group D ; 56頭) に飼養される牛計343頭から末梢血液を採取し、EDTA処理をおこなった (Table 2-1)。Group Aの牛は放牧地の周辺地域の農場から導入されており、放牧地内でいくつかの区画に分けて飼養されていた。Group Bは出生直後の子牛が半数含まれている。また、Group Cはフリーストール牛舎 (牛を繋かず、自由に歩き回れるスペースを持った牛舎形態)、Group Dはタイストール牛舎 (牛の首を鎖で繋ぎ、限られたスペースで寝起きする牛舎形態) で飼養されており、両農場は比較的近距離に位置している。なお、採血を行った牛の飼養地域、飼養形態、年齢を同時に記録した。採取した末梢血液は、一部を分注し、Celltac α MEK-6350 (日本光電工業(株)、日本) を用いCBCを実施した後、direct PCRに使用するまで -30°C で保存した。

2-2 ヘモプラズマの検出

ヘモプラズマの検出には、第1章で示した direct PCR 法を用いた。陽性検体については、バンドの長さをもとに *M. wenyonii*、‘*Candidatus M. haemobos*’ および混合感染を判断した。

2-3 BLV 抗体検査

BLV 抗体の検出は、末梢血液の一部を分注し、1,500 rpm、5 分の遠心により得られた血漿を用いて、寒天ゲル内沈降反応 (AGID) 法により行った (71)。なお、抗原には牛白血病診断用抗原「北研」(北里研究所、埼玉県、日本) を用い、判定は使用説明書に従い、反応開始後 48 時間に沈降線が明瞭に出現したものを陽性、反応微弱および陰性のものは 96 時間後に再度確認、判定を行った。

2-4 統計解析

リスクファクター解析のため、検体の飼養地域、飼養形態、年齢、BLV 抗体保有状況を χ^2 検定によりヘモプラズマ陽性群と陰性群で比較した。また、血液検査値の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。統計処理には Statcel ver. 3 を用い、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判定した。なお、今回品種および性別は検体間での偏りが強いため解析から除外した。

3. 結果

Direct PCR の結果、343 検体中 222 検体 (64.7%) が陽性であり、そのうち 132 検体 (38.5%) が *M. wenyonii*、134 検体 (39.1%) が ‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性であり、44 検体 (12.8%) が混合感染であった (Table 2-2)。

Group ごとのヘモプラズマ陽性率は、Group A で 49.5%、Group B で 52.2%、Group C で 75.3%、Group D で 71.4%であった。飼育地域によってヘモプラズマ陽性率が有意に異なり ($P<0.001$)、とくに '*Candidatus M. haemobos*' の陽性率は Group C (56.0%) および D (42.9%) では他の Group (A ; 15.4%、B ; 26.1%) と比較し陽性率が高かった ($P<0.001$; Table 2-2)。飼養形態の比較では、農場で飼養される牛 (70.2%) は放牧地で飼養される牛 (49.5%) と比較し、有意に高いヘモプラズマ陽性率 ($P<0.001$) であり、その差は '*Candidatus M. haemobos*' で顕著であった ($P<0.001$; Table 2-3)。また、年齢とヘモプラズマ陽性率の間にも有意な関連がみられ、1 歳以上の牛は 1 歳未満と比較しより高い感染率を有し、とくに 1~3 歳の陽性率 (92.4%) は最も高かった ($P<0.001$; Table 2-3)。BLV 抗体検査を実施した 206 検体中、42 検体 (20.4%) が BLV 抗体を保有していた。BLV 抗体陽性牛におけるヘモプラズマ陽性率 (81.0%) は BLV 抗体陰性牛のヘモプラズマ陽性率 (72.6%) と同等であり、BLV 抗体保有率とヘモプラズマ陽性率の間に、有意な関係は認められなかった ($P=0.27$; Table 2-3)。

CBC を 343 検体中、291 検体で実施し、血液検査値はヘモプラズマ陰性群と、*M. wenyonii* 陽性群、'*Candidatus M. haemobos*' 陽性群および混合感染群の間で各項目を比較した。*M. wenyonii* 陽性群は、ヘモプラズマ陰性群と比較し RBC (683.3 ± 142.4 vs 747.0 ± 180.6 ; $P<0.01$)、PCV (29.6 ± 3.2 vs 30.6 ± 5.5 ; $P<0.05$) が有意に低く、MCV (44.4 ± 6.8 vs 42.4 ± 7.7 ; $P<0.05$) が有意に高値を示した。'*Candidatus M. haemobos*' 陽性群は、ヘモプラズマ陰性群と比較し RBC (634.6 ± 93.8 vs 747.0 ± 180.6 ; $P<0.001$)、HB (10.0 ± 1.0 vs 10.6 ± 1.7 ; $P<0.001$)、PCV (28.5 ± 3.2 vs 30.6 ± 5.5 ; $P<0.001$)、WBC (86.3 ± 29.3 vs 101.8 ± 35.4 ; $P<0.001$) が有意に低く、MCV (45.3 ± 3.8 vs 42.4 ± 7.7 ; $P<0.001$) は有意に高かった。また、混合感染群は、ヘモプラズマ陰性群と比較し RBC (649.4 ± 106.6 vs 747.0 ± 180.6 ; $P<0.01$)、HB (10.2 ± 1.2 vs 10.6 ± 1.7 ; $P<0.05$)、PCV (29.3 ± 3.5 vs 30.6 ± 5.5 ; $P<0.05$) が有意に低く、

MCV (45.5 ± 4.5 vs 42.4 ± 7.7 ; $P < 0.001$) が有意に高く、これらの所見はヘモプラズマ感染によって軽度の再生性貧血が引き起こされたことを示す所見であると思われた (Table 2-4)。一方、*M. wenyonii* 陽性群、‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群および混合感染群間に有意な差は認められなかった。

さらに、ヘモプラズマ陽性群の血液検査値を BLV 抗体の有無で比較したところ、BLV 抗体陽性群と陰性群の間に、WBC を除いて有意な差は認められなかった (Table 2-5)。

4. 考察

今回、北海道道東地区の 1 放牧地および 3 農場でのヘモプラズマ陽性率は 64.7% であった。過去に国内で行われた疫学調査における陽性率は、北海道で 22.3% (89)、33.3% (88)、広島県で 69.4% (17)、宮崎県で 93.8% (17) であり、南方ほど高い陽性率となる要因として、ベクターとなる吸血節足昆虫の増加が示唆されている (17)。今回、過去に北海道で行われた調査 (88, 89) よりも高率にヘモプラズマが検出された要因として、検出感度の差や、過去の報告の検体に偏りがみられる (搬入病畜) ことが考えられ、北海道においても、感染拡大に寄与する吸血節足昆虫が十分存在し、飼養頭数も膨大であることが、高率にヘモプラズマ感染がみられる一因であると思われた。飼養地域でヘモプラズマ陽性率が有意に異なっており、Group C、D で増加していた。Group A は他のグループと異なり、放牧地であること、Group B は半数が子牛であることから、陽性率に差が生じたものと思われた。また、Group C および D で ‘*Candidatus M. haemobos*’ の陽性率が顕著に高かった。両農場が比較的近隣に位置していることから、地域によってヘモプラズマ感染種に偏りがみられる可能性が示唆された。

統計解析の結果、飼養形態では農場で飼養された牛のヘモプラズマ陽性率は放牧地の牛と比較して有意に高かった。これは放牧地の牛の採血時期が放牧開始直後であったこと、農場の牛はそのほとんどが放牧地の牛より高齢であり、密集した飼養環境にあるこ

とで感染が蔓延しているものと思われた。年齢別のヘモプラズマ陽性率は1歳以下で最も低く、1-3歳で最も高くなり、それ以降は漸減した。1-3歳は退牧直後であり、また初産のストレスが加わる時期と一致する。つまり、放牧地における吸血節足昆虫等によるヘモプラズマの媒介と、妊娠による免疫能の低下が高率なヘモプラズマ感染を引き起こしているものと考えられた。また、3歳以上の牛は、それより若齢の牛と比較し成熟した免疫能を有すると思われ、そのことが血中から病原体の消失を促したものと思われた。年齢に関して、ヘモプラズマ陽性の犬は陰性の犬と比較し、有意に年齢が低いことが報告されている(59)。猫では、3歳未満で最も高い陽性率であった報告や(25)、10歳以上では陽性率が低下する報告がある(20)。年齢に関して、今回牛で得られた結果は、犬や猫のデータと類似しているものと思われるが、両者の生活環境は大きく異なるためさらなる検討が必要と思われた。

猫では、FeLV および FIV がヘモプラズマ感染率の増加および発病に関わる重要なリスクファクターと考えられており(21, 25, 28, 49, 86)、その一因として、感染経路が同一であることが示唆されている(20)。BLV の伝播に関して、経胎盤または初乳を介した垂直感染の他、吸血節足昆虫、医原性感染といった水平感染が報告されている(42, 47, 51)。また、サシバエなどの吸血節足昆虫および出生直後の子牛から牛ヘモプラズマの遺伝子断片が検出されており、牛ヘモプラズマの伝播においても水平、垂直感染ともに関与しているものと思われる(39)。また、FeLV との混合感染が貧血の増悪を招くことが知られている(21)。しかしながら、今回の研究では牛ヘモプラズマおよび BLV の間に有意な関係は認められなかった。このことは、両者の主要な感染経路が異なる可能性や、両病原体の牛に対する感受性の差なども考えられるが、今回用いた農場が BLV 高度汚染農場であったことから、BLV 対策を実施している農場との比較など、さらなる検討が必要と思われた。

ヘモプラズマ陽性の3群は陰性群と比較し、有意に低い RBC、PCV と高い MCV を

示し、ヘモプラズマ感染が牛に軽微な貧血を引き起こしている可能性が示唆された。また、有意差は認められないものの、‘*Candidatus M. haemobos*’ 群および混合感染群は *M. wenyonii* 群と比較し、RBC、PCV、HB が低下しており、MCV は高値であった。これまで牛ヘモプラズマにおいて、*M. wenyonii* と ‘*Candidatus M. haemobos*’ の混合感染時の病原性は評価されていない (89)。今回の研究では、両者の混合感染群の病原性は、‘*Candidatus M. haemobos*’ 群のものと同等もしくはやや弱いものと思われた。しかし、今回得られた血液検査値は、ほとんどが正常範囲内であり、各群での平均値は非常に近接している。従って、感染種の相違によって宿主である牛に与える影響が異なるかどうかは不明であった。慢性期の牛ヘモプラズマ症の病原性を評価した報告は少なく、さらなる検討が必要と思われた。

本研究において、牛ヘモプラズマ感染には飼養地域、飼養環境、年齢が関わっており、牛独自の飼養形態がその一因となっている可能性が示唆された。また、BLV 感染はヘモプラズマ感染と関連していなかった。ヘモプラズマ感染牛は有意に低い RBC、HB、PCV と高い MCV を有しており、混合感染時の病原性は、‘*Candidatus M. haemobos*’ 感染群と同等もしくはやや弱いものと思われた。

Table 2-1. Sample characteristics of each group.

Variable	Group ^a			
	A (n=91)	B (n=46)	C (n=150)	D (n=56)
District	Kushiro	Kushiro	Tokachi	Tokachi
Living condition	Pastureland	Farm	Farm	Farm
Breed				
Holstein-Friesian	91	30	150	56
F1 ^b	0	16	0	0
Gender				
Female	91	37	150	56
Male	0	9	0	0

^a Group A: cattle pastured in Kushiro District. Group B: cattle fed in Kushiro District. Group C: cattle fed in a free stall barn in Tokachi District. Group D: cattle fed in a tie stall barn in Tokachi District.

^b First filial generation: Holstein-Friesian and Japanese Black.

Table 2-2. Numbers and percentages of cattle infected with hemoplasma detected by direct PCR in each sample group.

PCR-result	No. of PCR-positive cattle (%)					P value ^b
	Group A ^a n=91	Group B ^a n=46	Group C ^a n=150	Group D ^a n=56	Total n=343	
Total hemoplasmas	45 (49.5)	24 (52.2)	113 (75.3)	40 (71.4)	222 (64.7)	<0.001
Mw	38 (41.8)	19 (41.3)	49 (32.7)	26 (46.6)	132 (38.5)	0.24
CMh	14 (15.4)	12 (26.1)	84 (56.0)	24 (42.9)	134 (39.1)	<0.001
Mw + CMh	7 (7.7)	7 (15.2)	20 (13.3)	10 (17.9)	44 (12.8)	0.30

^a Group A: cattle pastured in Kushiro District. Group B: cattle fed in Kushiro District. Group C: cattle fed in a free stall barn in Tokachi District. Group D: cattle fed in a tie stall barn in Tokachi District.

^b P values in bold are statistically significant ($P < 0.05$) in comparisons of groups A, B, C and D by using the χ^2 test.

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’

Table 2-3. Sample prevalence of bovine hemoplasma infections according to living conditions, age and BLV status.

Variable	Total number	PCR result (%)			
		Mw positive	CMh positive	Dual positive	Total hemoplasma positive
Living condition (n=343)					
Pastureland	91	38 (41.8)	14 (15.4)	7 (7.7)	45 (49.5)
Farm	252	94 (37.3)	120 (47.6)	37 (14.7)	177 (70.2)
<i>P</i> value ^a		0.45	<0.001	0.09	<0.001
Age (n=343)					
<1 year	128	35 (27.3)	10 (7.8)	3 (2.3)	42 (32.8)
1 ≤ years < 3	105	57 (54.3)	70 (66.7)	30 (28.6)	97 (92.4)
3 ≤ years < 5	55	19 (34.5)	31 (56.4)	4 (7.3)	46 (83.6)
≥ 5 years	55	21 (38.2)	22 (40.0)	6 (10.9)	37 (67.3)
<i>P</i> value ^b		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
BLV status (n=206)					
BLV positive	42	17 (40.5)	22 (52.4)	5 (11.9)	34 (81.0)
BLV negative	164	58 (35.4)	86 (52.4)	25 (15.2)	119 (72.6)
<i>P</i> value ^c		0.54	0.99	0.58	0.27

P values in bold are statistically significant ($P < 0.05$).

^a *P* value: comparison of pastureland and farm in each hemoplasma group by using the χ^2 test.

^b *P* value: comparison of each age groups in each hemoplasma group by using the χ^2 test.

^c *P* value: comparison of samples that were BLV positive and BLV negative in each hemoplasma group by using the χ^2 test.

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’

Table 2-4. Comparison of hematological findings among Mw alone, CMh alone, dual positive and negative groups.

Parameters (Mean ± SD)	PCR results			
	Mw positive alone (n=78)	CMh positive alone (n=79)	Dual positive (n=37)	Negative (n=97)
RBC (x10 ⁴ /μl)	683.3 ± 142.4**	634.6 ± 93.8***	649.4 ± 106.6**	747.0 ± 180.6
HB (g/dl)	10.4 ± 1.1	10.0 ± 1.0***	10.2 ± 1.2*	10.6 ± 1.7
PCV (%)	29.6 ± 3.2*	28.5 ± 3.2***	29.3 ± 3.5*	30.6 ± 5.5
MCV (fl)	44.4 ± 6.8*	45.3 ± 3.8***	45.5 ± 4.5***	42.4 ± 7.7
MCHC (g/dl)	35.1 ± 1.2	35.2 ± 1.2	35.0 ± 1.0	34.7 ± 1.4
WBC (x10 ² /μl)	102.7 ± 35.4	86.3 ± 29.3***	92.8 ± 27.9	101.8 ± 35.4

The statistics of each hemoplasma-positive group were compared with those of the negative group.
 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (vs the negative group).

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: 'Candidatus Mycoplasma haemobos'

Table 2-5. Comparison of hematological findings between hemoplasma positive-BLV positive and hemoplasma positive-BLV negative groups.

Parameters (Mean \pm SD)	Hemoplasma positive	
	BLV positive (n=29)	BLV negative (n=96)
RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	605.2 \pm 59.2	605.1 \pm 70.1
HB (g/dl)	9.8 \pm 0.8	9.8 \pm 0.9
PCV (%)	27.7 \pm 2.2	27.7 \pm 2.5
MCV (fl)	45.9 \pm 3.2	46.1 \pm 3.3
MCHC (g/dl)	35.3 \pm 1.0	35.4 \pm 1.1
WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)	110.7 \pm 40.3***	77.8 \pm 20.9

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

第2節 放牧牛における小型ピロプラズマとヘモプラズマの干渉現象の検討

1. 序論

小型ピロプラズマ病は日本に広く分布し、マダニによって媒介される赤血球内寄生原虫疾患である (26)。病原体である *Theileria orientalis* は、良性タイレリア種のひとつであるが、放牧や妊娠、分娩を契機に牛に発熱、貧血等を引き起こすことから、重要な放牧病のひとつとして注視されている (111)。一方、ヘモプラズマとは赤血球表面に寄生するマイコプラズマの総称であり、主に吸血節足動物によって媒介される (54)。牛に感染するヘモプラズマは *M. wenyonii* と ‘*Candidatus M. haemobos*’ の2種が知られており、宿主に軽度の貧血を引き起こす (88, 89)。

2種の病原体を用いる感染実験において、一方がもう一方の増殖を抑制する現象が知られており、‘干渉現象’と呼ばれている。Footeら (16) は脾臓摘出牛において *Eperythrozoon wenyonii* (*M. wenyonii*) の増殖が、*Anaplasma marginale* の再発を防ぐことを報告しており、Raynaudら (70) も両病原体の間に同様の現象がみられたことを報告している。また、*T. orientalis* と *A. marginale* の混合感染牛にも抑制しあう現象が認められている (18)。

小型ピロプラズマと牛ヘモプラズマに関して、両病原体は放牧牛にみられやすい疾患であるにも関わらず、混合感染時の病原性はこれまで評価されていない。過去に石原 (43) は、感染実験牛の末梢血液中にヘモプラズマが出現しているとき、小型ピロプラズマの増殖が抑制されることを示したが、これまで野外例における“干渉現象”の報告はなく、末梢血液中にヘモプラズマ病原体が観察されない慢性感染期においても小型ピロプラズマが影響を受けるかどうかはわかっていない。そこで本節では、放牧牛におけるヘモプラズマと小型ピロプラズマ感染とその臨床病理学的所見を経時的に観察し、“干渉現象”を疫学的に検討することを目的とした。

2. 材料および方法

2-1 材料

北海道標茶町の2放牧地に飼養される牛から90頭（牧野A：40頭、牧野B：50頭）を抽出し、2011年5月から7月の間、約2週間間隔で計5回の経時採血を行った。全てホルスタイン種牛であり月齢は6～21ヶ月齢であった。末梢血液はEDTA処理後、一部を分注し、Celltac α MEK-6350（日本光電工業㈱、日本）を用いて全血球算定（CBC）を実施するとともに、血液塗抹標本を作製、メタノール固定後、ギムザ染色（ギムザ染色液、武藤化学、日本）を行った。残りの末梢血液はDNA抽出およびdirect PCRに使用するまで-30℃で保存した。また、小型ピロプラズマ検出に用いるため、末梢血液200μlからQIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany）によりDNAを抽出した。各サンプルのDNAは200μlのTE buffer中に抽出し、検出に使用するまで-30℃で保存した。

なお、両牧野とも毎年5月～9月の間、近隣農家より育成牛を400頭前後受け入れており、以前より小型ピロプラズマの発症例が散発、その蔓延が危惧されている放牧地であった。また、対象牛のマダニの制御を目的とし、フルメトリンピアオン製剤（1 mg/100 kg、バイチコール®、Bayer Japan）が定期的に塗布された。

2-2 マダニの調査

両牧野における小型ピロプラズマ感染のリスク調査を行う目的で、2011年5月～6月の放牧前に、旗振り法を用いてマダニを採取した。マダニは実体顕微鏡を用い同定後、QIAamp DNA Blood Mini KitによりDNAを抽出した。各サンプルのDNAは200μlのTE buffer中に抽出し、PCRに使用するまで-30℃で保存した。

2-3 小型ピロプラズマおよびヘモプラズマの検出

小型ピロプラズマの検出には、血液、マダニから抽出された全ての DNA サンプルを用い、小型ピロプラズマ主要膜抗原 (MPSP) 遺伝子を標的とした PCR を行った (63)。

ヘモプラズマの検出には、第 1 章で示した direct PCR 法を用いた。陽性検体については、バンドの長さをもとに *M. wenyonii*、‘*Candidatus M. haemobos*’ および混合感染を判断した。

2-4 小型ピロプラズマの寄生度

作製した血液塗抹標本を光学顕微鏡下で観察、小型ピロプラズマの寄生度を測定した。なお、判定は石原法に従い、強拡大 (1,000 倍視野) で鏡検し、各視野に寄生赤血球が 10 個以上を++++、各視野に 1 個~10 個未満を+++、10 視野に 1 個以上を++、10 視野に 1 個未満を+、未検出を - とした (63)。

2-5 統計解析

PCR 結果および得られた血液性状をもとに統計解析を行った。小型ピロプラズマとヘモプラズマの陽性率は χ^2 検定により比較した。また、血液性状および寄生度の比較には Mann-Whitney U 検定 (2 群) および Kruskal-Wallis 検定、Steel-Dwass 法 (3 群以上) を用いた。統計処理には Statcel ver. 3 を用い、 P 値 < 0.05 を有意差ありと判定した。

3. 結果

牧野 A では、小型ピロプラズマが 2 回目の採血以降急速に増加し、5 回目の採血では 36 検体中 34 検体 (94.4%) で陽性となった。一方、ヘモプラズマ感染は 1 回目では 40 検体中 12 検体 (30.0%) が陽性であり、その後 5 回目の採血まで陽性率に変化はほとんどみられなかった (Fig. 2-1)。なお、牧野 A では 3 回目採血で 2 頭、5 回目採血で

4頭が他疾患の治療のため下牧しており、採血から除外された。牧野 B では、小型ピロプラズマ感染の増加は緩徐であり、5回目の採血時では50検体中14検体(28.0%)のみが陽性であった。ヘモプラズマに関しては初回採血の時点で34検体(64.0%)が陽性であり、その後増減はあるものの、5回目採血まで60%前後を推移した(Fig. 2-1)。4、5回目採血において小型ピロプラズマおよびヘモプラズマの単独感染牛の数は両者の混合感染牛と比較し、有意に増加していた(Table 2-6)。

採取されたマダニは両牧野合わせて772個体であり、同定の結果、ヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*) 303個体、ダグラスチマダニ(*Haemaphysalis douglasi*) 252個体、シュルツェマダニ(*Ixodes persulcatus*) 217個体であった。小型ピロプラズマは3種のマダニ全てから検出され、その陽性率は牧野 A で6.9%、牧野 B で6.0%であり、牧野間の陽性率に有意な差は認められなかった(Table 2-7)。

小型ピロプラズマ陽性群、ヘモプラズマ陽性群、混合感染群および陰性群間でそれぞれの血液性状を比較した。牧野 B の1、2回目採血時において、ヘモプラズマ陽性群のRBCは陰性群と比較し有意に低下していた。さらにヘモプラズマ陽性群は陰性群と比較し、1回目採血時のMCVが有意に高値、2回目採血時のMCHCが有意に低値を示した(Fig. 2-3)。両牧野とも小型ピロプラズマ陽性群、混合感染群のRBC、HB、PCVは徐々に低下し5回目採血時に最も低値を示した。牧野 A では、混合感染群のPCV(27.5±5.8%)とHB(9.5±2.0 g/dl)は、小型ピロプラズマ陽性群(23.4±4.0%; 8.0±1.5 g/dl)と比較し有意に高値を示した($P<0.05$; Fig. 2-2)。牧野 B においても同様に混合感染群のPCV(29.7±6.0%)、HB(10.4±2.3 g/dl)が小型ピロプラズマ陽性群(26.4±3.3%; 9.3±1.2 g/dl)のものと比較し高値を示したが、有意差は認められなかった(Fig. 2-3)。また、牧野 B の5回目採血時において小型ピロプラズマ陽性群、混合感染群ともにヘモプラズマ陽性群、陰性群に対し、有意にMCVが高値を示し(Fig. 2-3)、牧野 A においても有意差は認められないものの、同様の傾向を示した(Fig. 2-2)。なお、

WBCは4群間で有意な変化は観察されなかった。

小型ピロプラズマの寄生度を小型ピロプラズマ単独感染群（中央値；++++）と混合感染群（同；+++）で比較したところ、5回目採血時において小型ピロプラズマ単独感染群は有意に高い小型ピロプラズマ寄生度を示した（ $P<0.05$ ；Fig. 2-4）。

4. 考察

今回、2つの牧野に放牧される育成牛を用い、分子生物学的な手法により小型ピロプラズマおよびヘモプラズマを検出し、両病原体の陽性率の推移と、混合感染が放牧牛に与える影響を評価した。両牧野とも、放牧開始前である1回目の採血の時点でヘモプラズマ感染が認められており、牧野B（64.0%）は牧野A（30.0%）と比較し、高い陽性率であった。2回目採血以降、小型ピロプラズマの感染が拡大していったが、ヘモプラズマの陽性率が低い牧野Aでは、ほとんどの牛（94.4%）に小型ピロプラズマ感染が認められたのに対し、ヘモプラズマ陽性率の高い牧野Bでは、小型ピロプラズマ感染の拡大は緩徐であり、30%に満たなかった。放牧地における小型ピロプラズマの感染には、マダニが重要な役割を担っていることが報告されている（63, 111）。今回放牧前に採取されたマダニから小型ピロプラズマが検出されたが、牧野間に陽性率の差は認められず、両牧野のマダニ対策は同等に行われていた。また、4回目、5回目採血において、混合感染は両病原体の単独感染と比較し、有意に起きにくいことが明らかとなった。過去に行われた‘干渉現象’の報告（18）においても、詳細な機序は明らかとなっていないが、両病原体を認識する免疫反応が交差性を示した可能性や、共通のレセプターを介した感染の可能性が示唆されている。今回みられた放牧牛の小型ピロプラズマ感染は、マダニによる媒介以外に、ヘモプラズマ感染によって成立した免疫反応、もしくは感染に用いるレセプターの競合といった影響を受けていた可能性が考えられた。

血液性状の比較では、両牧野ともに混合感染群、小型ピロプラズマ陽性群のRBC、

HB、PCVは徐々に低下していったが、5回目採血において混合感染群は小型ピロプラズマ陽性群と比較し、HB、PCVが高く貧血は軽度であった。また、小型ピロプラズマの寄生度をヘモプラズマ感染の有無で比較したところ、ヘモプラズマが混合感染している群の寄生度は、小型ピロプラズマ単独感染群のものと比較し有意に低下していた。小型ピロプラズマの病原性に関して、赤血球に対する酸化障害、自己抗体の産生の他、Th1 および Th2 免疫両者の上昇による免疫バランスの異常が貧血の顕在化を導くとされている (77, 78, 109)。一方、ヘモプラズマ感染症では、赤血球膜への酸化障害や自己抗体の産生、脾臓における感染赤血球の捕食が貧血を誘導することにより病原性が発現するとされるが、明確な機序はわかっていない (54)。慢性感染期のマイコプラズマは宿主免疫の抑制を引き起こすことや (54)、豚を用いた感染実験においてヘモプラズマ感染が宿主の T リンパ球機能を抑制することが報告されており (112)、ヘモプラズマ感染が小型ピロプラズマの異常免疫動態を是正した可能性も考慮される。両牧野ともに、5回目採血時の混合感染群、小型ピロプラズマ感染群において赤血球の再生性変化の指標である MCV が顕著に上昇していたことから、脾臓による貪食といった血管外溶血の存在が示唆され、類似する機構が貧血の発症を干渉した可能性も考えられた。ヘモプラズマが小型ピロプラズマの増殖と病原性の発現に何らかの影響を与えているかどうか、更なる検討が必要と思われた。

小型ピロプラズマおよびヘモプラズマの単独感染と比較し、混合感染が起きにくいこと、混合感染時には小型ピロプラズマの寄生度が低下し、病原性も弱まることは、野外の放牧牛における両病原体間の“干渉現象”の存在を示唆するものと思われた。今後、両者の間に観察された“干渉現象”の機序を明らかにする必要があると思われた。

小括

第1章で、その有用性を確認した direct PCR 法を用い、道東の1放牧地および3農

場に飼養される牛を対象としたリスクファクター解析を行った。その結果、牛ヘモプラズマ感染は飼養地域により陽性率が異なり、農場飼育および1～3歳において高率にヘモプラズマ感染が確認された。今回用いた放牧牛の検体は入牧直後のものであり、退牧直後の1-3才で高率にヘモプラズマ感染が認められたことから、放牧が感染拡大に関与し、その後の農場における高密度な飼養形態が高い陽性率の持続と関連しているものと思われる。さらに、初産に伴うストレスが1-3歳のヘモプラズマ感染に影響したものと思われた。また、BLV感染はヘモプラズマ感染と関連していなかった。ヘモプラズマ感染牛は非感染牛と比較し有意に低いRBC、HB、PCVと高いMCVを有しており、混合感染時の病原性は、‘*Candidatus M. haemobos*’感染群と同等もしくはやや弱いものと思われた。

さらに、ヘモプラズマ同様、放牧地に代表的な血液感染病原体である小型ピロプラズマとの混合感染時の影響を評価したところ、小型ピロプラズマおよびヘモプラズマの単独感染と比較し、混合感染が起きにくく、混合感染時には小型ピロプラズマの寄生度が低下し、病原性も弱まることから、野外の放牧牛において両病原体の間に“干渉現象”が存在することが示唆された。

Table 2-6. Percentage of cattle infected with *Theileria orientalis* and/or hemoplasmas at each sampling. *P* values in bold are statistically significant ($P<0.05$).

Sampling time		PCR results of <i>T. orientalis</i>		Positive rate of <i>T. orientalis</i> (%)	<i>P</i> value ^a
		Positive	Negative		
PCR results of hemoplasmas					
1st	Positive	0	44	0	- ^b
	Negative	0	46	0	
2nd	Positive	6	39	13.3	0.50
	Negative	8	35	18.6	
3rd	Positive	12	21	36.4	0.31
	Negative	27	30	47.4	
4th	Positive	13	27	32.5	<0.01
	Negative	32	18	64	
5th	Positive	15	23	39.5	<0.01
	Negative	33	15	68.8	

^a; Statistical analysis was performed using Chi-square test.

^b; Statistical analysis was not performed.

Table 2-7. Classification and PCR results for *Theileria orientalis* in ticks collected from each pasture.

Tick species	Pasture A	Pasture B	Total
<i>Ixodes ovatus</i>	9/89 (10.1) ^a	19/214 (8.9)	28/303 (9.2)
<i>Haemaphysalis douglasi</i>	5/62 (8.1)	7/190 (3.7)	12/252 (4.8)
<i>Ixodes persulcatus</i>	0/51 (0.0)	8/166 (4.8)	8/217 (3.7)
Total	14/202 (6.9)	34/570 (6.0)	48/772 (6.2)

^a Number of PCR positive ticks/total number of ticks (%).

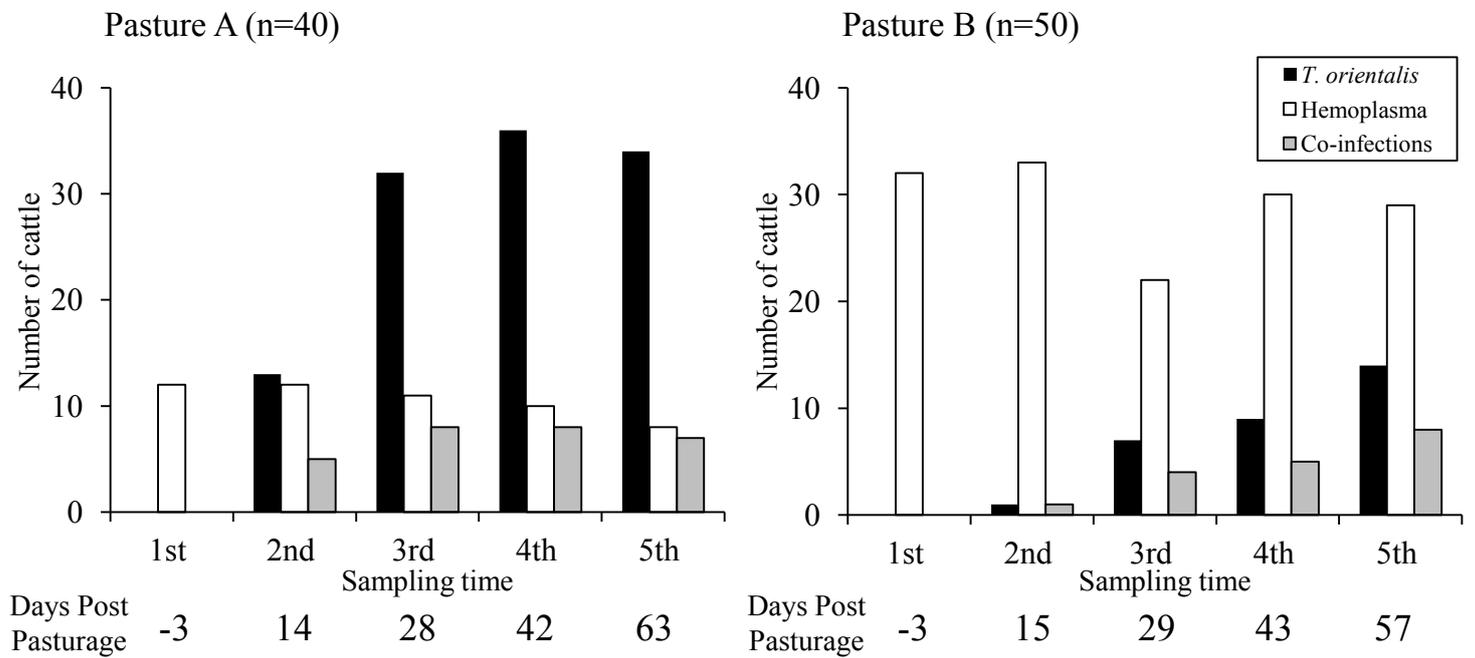


Fig. 2-1. Number of cattle grazing in two pastures that have positive PCR results for *Theileria orientalis* (black bar), hemoplasma (white bar) and co-infections (gray bar). The numbers of samples at the 3rd and 5th sampling in pastureland A were 38 and 36, respectively.

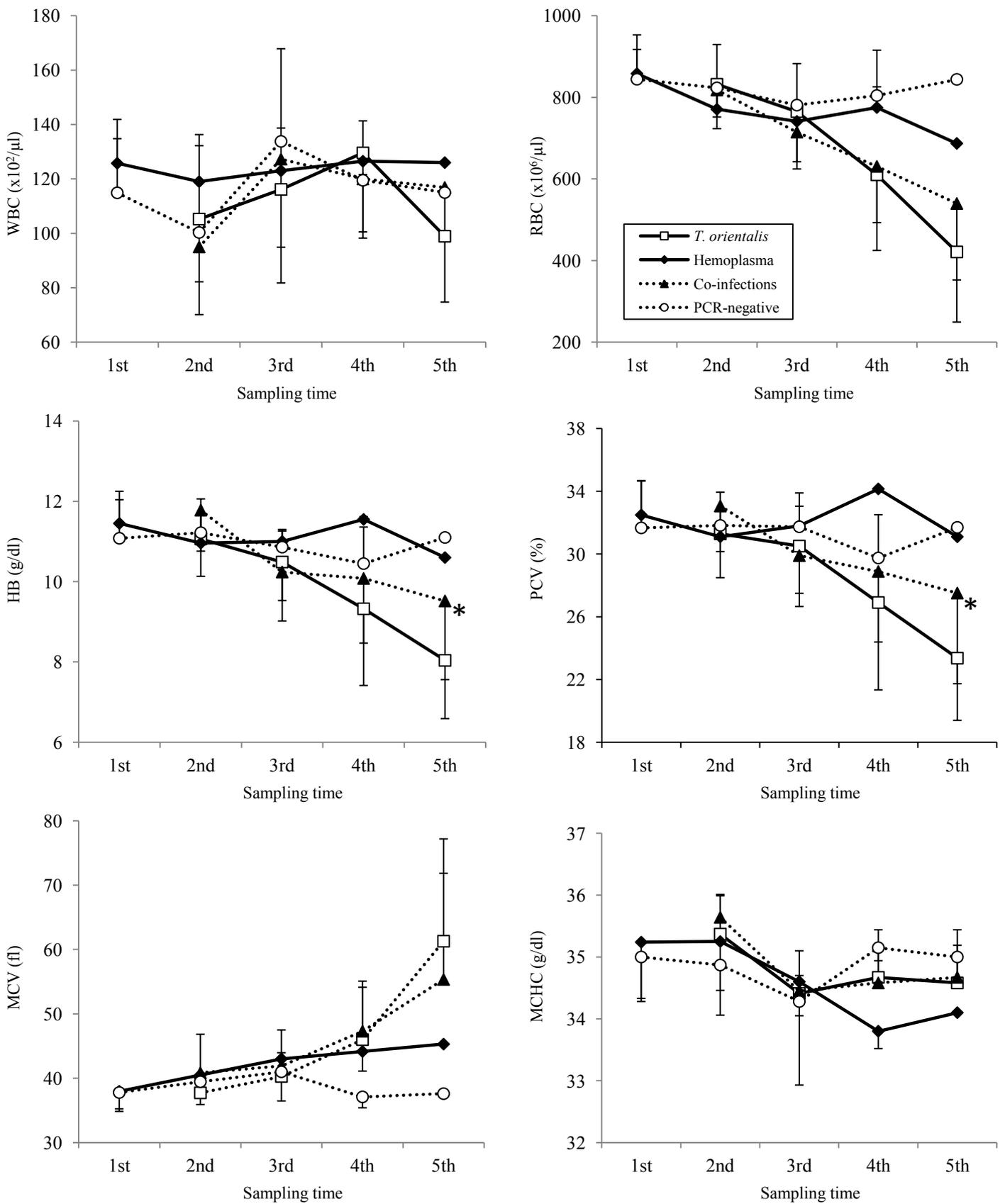


Fig. 2-2. Changes on the hematological parameters of cattle that were PCR-negative (open circles), hemoplasma-infected (black diamonds), *Theileria orientalis*-infected (open squares), and co-infected (black triangles) from pasture A (n=40). The asterisk (*) reflects significant difference compared to *T. orientalis*-infected by using Mann-Whitney *U* test ($P < 0.05$). At the 1st sampling, all cattle were PCR-negative or hemoplasma-infected.

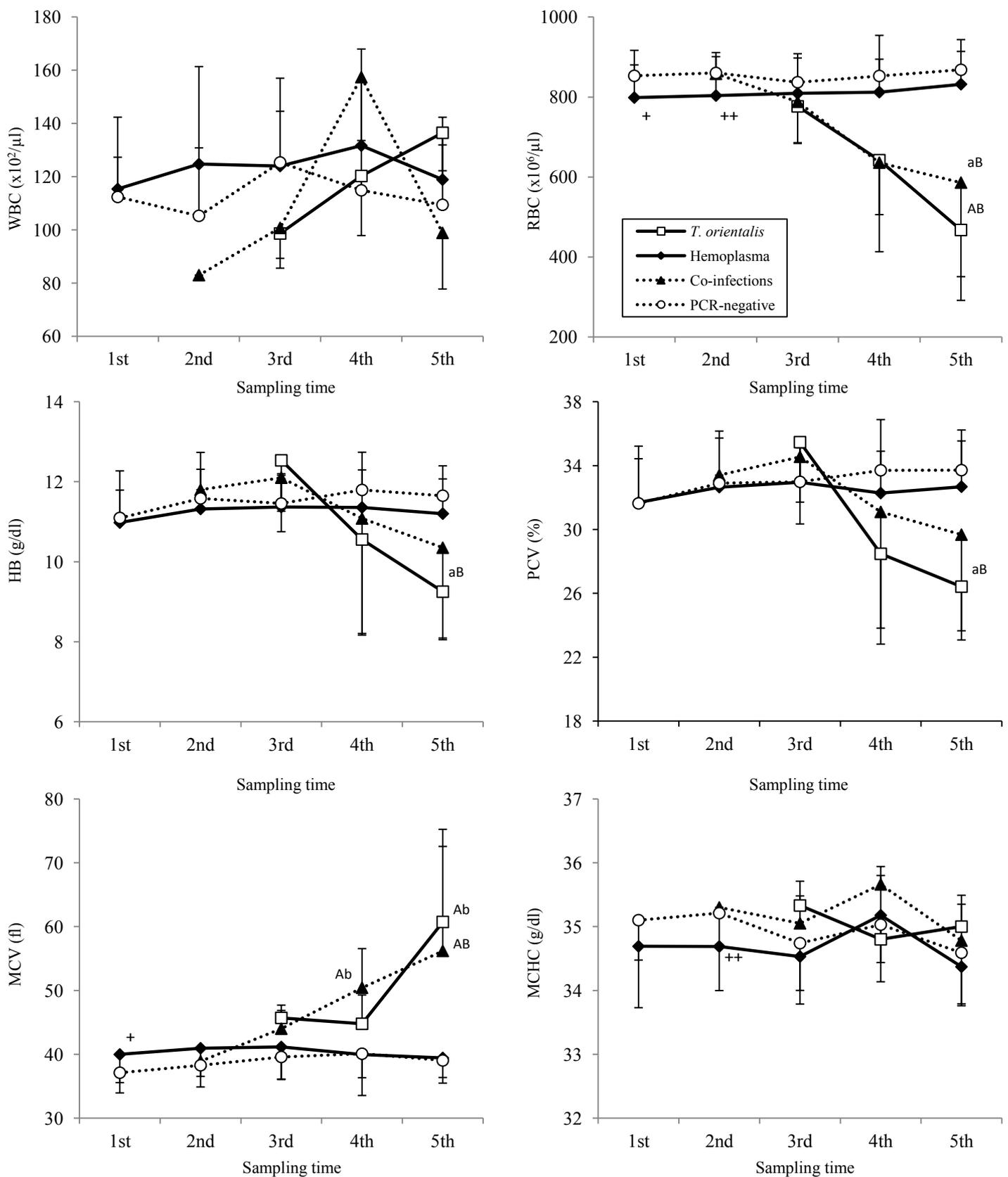


Fig. 2-3. Changes on the hematological parameters of cattle that were PCR-negative (open circles), hemoplasma-infected (black diamonds), *Theileria orientalis*-infected (open squares), and co-infected (black triangles) from pasture B (n=50). The superscripts ^{a,b,A,B} reflect significant differences compared to hemoplasmas-infected ^{A,a}; or PCR-negative ^{B,b} (a, b; $P < 0.05$. A, B; $P < 0.01$). The plus sign (+) reflects significant difference compared to *T. orientalis*-infected by using Mann-Whitney *U* test (+; $P < 0.05$. ++; $P < 0.01$). At the 1st sampling, all cattle were PCR-negative or hemoplasma-infected.

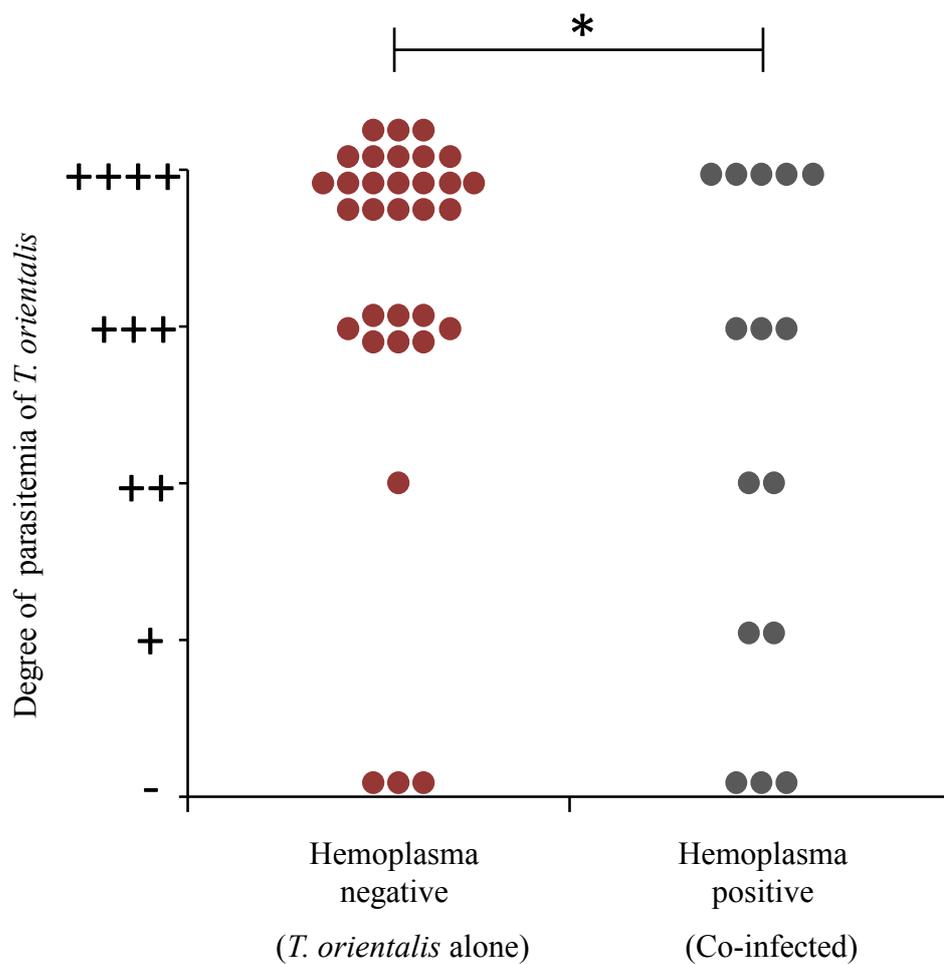


Fig. 2-4. Comparison of parasitemia of *Theileria orientalis* between hemoplasma negative and hemoplasma co-infected groups. Parasitemia level was evaluated by counting the number of infected red blood cells per field using following guide by Ishihara's method in Japanese literature : -; no detection, +; 1 parasite in 10 fields (<0.05%), ++; >1 parasite in 10 fields (0.05-0.5%), +++; more than 1 parasite in 1 field (0.5-5%), +++++; more than 10 parasites in 1 field (>5%). The asterisk (*) reflects significant difference by using Mann-Whitney *U* test ($P<0.05$).

第3章 ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響および子牛での発症例の観察

緒言

牛に感染するヘモプラズマには、これまで *M. wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’ の2種が知られている(88)。牛ヘモプラズマに感染した場合、急性期には発熱に伴う元気食欲の低下、貧血、四肢の浮腫等がみられ、重篤な場合は死に至るとされるが(55, 79)、多くは不顕性感染となり無症状のまま耐化する(54)。牛の急性期ヘモプラズマ感染において、乳量の急激な減少、流産や発情遅延など、生産性への影響が報告されている(69, 79, 81)。一方、豚では無症候性のヘモプラズマ感染が、母豚における発情遅延、早期胚死滅、流産と、新生子豚における状態悪化および発育遅延といった生産性の低下に関与しており(34, 108)、また、母豚とその子豚におけるヘモプラズマの抗体調査では、ヘモプラズマ抗体価の上昇と子豚の体重減少や死産の増加との関連が報告されている(113)。しかしながら、明確な臨床症状を伴わない慢性期のヘモプラズマ感染が、牛の生産性にどのような影響を与えているかはわかっていない。

第1章および第2章の結果により、牛ヘモプラズマは農場内に広く蔓延していることが明らかとなった。成牛では重度の肺炎といった感染症等に伴う免疫抑制状態の牛でヘモプラズマ発症例が散発的に報告されている(19, 55, 79)。牛ヘモプラズマが垂直感染を起こすことが示唆されていることから(39)、子牛においてもなんらかの併発疾患により免疫能が低下した際に発症すると思われる。しかしながら、これまで若齢子牛における発症例の報告は脾臓摘出子牛もしくは実験感染子牛のみであり(10, 68, 81)、自然発症例の臨床病理学的所見や、その後の成長に与える影響など不明な点が多い。

そこで本章では、牛ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響を評価する目的で、第1節では慢性期ヘモプラズマ感染牛の乳量、子牛の出生体重および臨床病理学的所見

を疫学的に解析し、第 2 節では、出生直後より貧血を呈したヘモプラズマ発症子牛の臨床病理学的所見および体重変化等の観察を行った。

第1節 ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響

1. 序論

ヘモプラズマ感染が家畜の生産性に与える影響に関して、これまで豚では様々な研究が行われている。急性期のヘモプラズマ感染は、子豚、肥育豚、妊娠豚などに重度の貧血を引き起こし、時に致死性である(34)。とくに哺乳子豚では重篤となり、高熱、体重減少、皮膚の蒼白などが認められ、免疫能の低下により二次感染を引き起こすとされる(29, 112)。また、ヘモプラズマ感染は臨床症状を伴わない慢性期においても豚の生産性に悪影響を与えることが知られており、(i) 発情遅延、早期胚死滅、妊娠後期での流産による生殖障害、(ii) 新生子豚での軽度の貧血、黄疸、虚弱、(iii) 成長遅延に伴い出荷が遅れる‘delayed marketing syndrome’、(iv) 肥育ストレスに伴う貧血、の4つがあげられる(30)。さらに、豚ヘモプラズマの抗体価を用いた報告では、高い抗体価は産子体重の低下および死産数の増加と関連していた(113)。

一方、牛ヘモプラズマでは、急性発症の後、乳量の減少や流産、発情遅延などが認められたとの報告(69, 79, 81)があり、生産性への影響が示唆されているが、明確な臨床症状を伴わない慢性期のヘモプラズマ感染が生産性に与える影響はこれまで評価されていない。

そこで本節では、慢性期のヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響を評価するため、1農場に飼養される妊娠牛とその産子を用いて、疫学的にその影響を比較検討した。

2. 材料および方法

2-1 材料

2011年8月から2012年8月、北海道十勝管内の1農場に飼養されるホルスタイン乳牛93頭と、それらの産子のうち死産であった13頭を除いた80頭の子牛を対象とし

た。採血は EDTA 採血管およびプレーン採血管を用い、母牛は分娩前 1 週間以内、子牛は出生後 1 週間以内に実施した。EDTA 血は一部を分注後、Celltac α MEK-6350（日本光電工業(株)、日本）を用いて PCV を、プレーン管は血清分離後、TBA-120FR（東芝メディカルシステムズ(株)、日本）を用い、TP、Alb、Glob、Glu、T.Chol を測定した。残りの EDTA 血は direct PCR に使用するまで -30°C で保存した。

2-2 ヘモプラズマの検出

ヘモプラズマの検出には、第 1 章で示した direct PCR 法を用いた。陽性検体については、バンドの長さをもとに *M. wenyonii* 陽性群、‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群および混合感染群に分類した。

2-3 乳量および臨床データ

乳量は(社)北海道酪農検定検査協会が作成する検定成績表に基づき、分娩後 1~4 ヶ月の計 4 回記録した。また、母牛の年齢、産次数、妊娠期間、産後の周産期疾病（ケトosis、乳熱、第四胃変位、胎盤停滞）の発生、子牛の出生時体重、死産数、性別を帯広畜産大学、動物医療センターの診療カルテをもとに記録した。

2-4 統計解析

PCR 結果に基づき、母牛は *M. wenyonii* 陽性群、‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群、混合感染群および PCR 陰性群の 4 群に分けられた。また、子牛は母牛の PCR 結果および子牛の PCR 結果に基づきそれぞれ 4 群に分類し解析を行った。周産期疾病の発生数および死産数などには χ^2 検定、乳量、子牛体重、血液性状などには Mann-Whitney U 検定（2 群間）または Steel-Dwass 検定（3 群以上）を用いた。統計処理には Statcel ver. 3 を用い、 P 値 <0.05 を有意差ありと判定した。

3. 結果

母牛から得られた末梢血 93 検体を用いた PCR 検査の結果、83 検体 (89.2%) が陽性であり、そのうち 33 検体 (35.5%) が *M. wenyonii* 単独、18 検体 (19.4%) が ‘*Candidatus M. haemobos*’ 単独感染であり、32 検体 (34.4%) が混合感染であった。子牛で血液採取が行われたのは 80 頭中 71 頭であり、PCR 検査の結果、10 検体 (14.1%) が陽性であり、そのうち 5 検体 (7.0%) が *M. wenyonii* 単独、2 検体 (2.8%) が ‘*Candidatus M. haemobos*’ 単独感染であり、3 検体 (4.2%) が混合感染であった。なお、全ての母牛の検体と子牛 64 検体で血液検査を実施した。

分娩後 1 カ月目の乳量は、ヘモプラズマ陽性の 3 群 (*M. wenyonii* 陽性群; 32.7 ± 12.4 kg、‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群; 33.4 ± 8.6 kg、混合感染群; 32.9 ± 11.7 kg) すべてでヘモプラズマ陰性群 (46.0 ± 10.4 kg) と比較し、有意に低く、‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群 (36.0 ± 10.1 kg) および混合感染群 (36.6 ± 11.3 kg) は 2 カ月目の乳量も陰性群 (47.8 ± 8.0 kg) と比較し有意に低かった。3 カ月目には、ヘモプラズマ陽性の 3 群は陰性群と比較し、乳量が低下する傾向が認められたが、有意差は得られなかった。4 カ月目の乳量は全ての群で有意な差は認められなかった (Table 3-1)。また、母牛の年齢、産次数、妊娠期間、産後の周産期疾病および死産の発生数は各群間で有意な差は認められなかった (Table 3-2)。子牛の体重は 4 群で比較したところ、ヘモプラズマ陽性の 3 群は陰性群と比較して低い傾向が得られたが、各群間に有意な差は認められなかった。しかし、子牛をヘモプラズマ陽性群および陰性群の 2 群に分け解析を行ったところ、ヘモプラズマ陽性群 (41.6 ± 7.2 kg) の子牛体重は陰性群 (47.0 ± 5.4 kg) と比較し有意に低値を示していた ($P=0.04$)。なお、子牛の性差に有意な差は認められなかった (Table 3-2)。

血液検査結果については、全ての項目で母牛、子牛ともに各群間で有意差を認めなかった (Table 3-3)。

また、子牛のヘモプラズマ陽性数が少ないため、統計解析はヘモプラズマ陽性群と陰性群の2群間で行われた。その結果、子牛の体重および血液検査項目に有意な差は認められなかった (Table 3-4)。

4. 考察

今回、対象となった全ての牛において、発熱、重度の貧血、後肢の浮腫といったヘモプラズマ急性期に特徴的な臨床症状や、末梢血液中への多量の病原体出現は観察されておらず、ヘモプラズマ感染は慢性期と思われた。ヘモプラズマ陽性群の分娩後の乳量は陰性群と比較し低下していた。一般に、母牛の系統、栄養、年齢、産次数など様々な要素が乳量に関与しているとされ、産後の周産期疾病は乳量低下の一要因と考えられている (7)。今回、対象となった母牛の年齢、産次数および産後の周産期疾病の発生数に有意な差は認められなかったことから、少なくともそれらの因子は乳量の差に影響を与えていないものと思われた。‘*Candidatus M. haemobos*’ 陽性群および混合感染群は2ヵ月目の乳量も有意に低下していたが、*M. wenyonii* 陽性群と陰性群の間に有意な差は認められなかった。過去の報告において、‘*Candidatus M. haemobos*’ は *M. wenyonii* と比較し、より強い病原性を有するとされており (89)、‘*Candidatus M. haemobos*’ 感染は長期的な乳量低下により強く関与している可能性が示唆された。

母牛、子牛ともに血液検査値の全項目に有意な差は認められなかった。慢性期のヘモプラズマ感染においても、軽微な貧血を呈することが報告されている (89)。また、これまでヘモプラズマ感染時に血液生化学検査を評価した報告は稀であり、血液検査値について、更なる検討が必要と思われた。

ヘモプラズマ陽性群の母牛から産まれた子牛の体重は、陰性群のものと比較し有意に低下していた。子牛の体重には、乳量同様様々な因子が影響しており、種牛、子牛の性別、母牛の体高、妊娠期間などが含まれる (73)。妊娠期間および子牛の性差には各群

間に有意差はみられなかったことから、それらの影響は低いものと思われた。

本研究において、10 頭の子牛でヘモプラズマが陽性であった。牛ヘモプラズマの感染経路は不明な点が多いが、分子生物学的手法を用いた報告において、吸血節足昆虫による水平感染および子宮内感染が示唆されている (39)。今回、採血は子牛の出生後 1 週間以内に行われているものの、出生直後ではないため、どちらの経路によって感染が起こったかは不明であった。また、子牛は出生後早期に母牛の初乳を給餌させるが、初乳は 60 度 30 分の加熱処理が行われるため、初乳がヘモプラズマの垂直感染に関与した可能性は低いものと思われる。猫に感染血液を接種した研究では、接種後 PCR 陽性となるまで 8 日程度を要している (15)。節足動物による機械的伝播では、極めて微量な血液によって感染が成立することから、PCR が陽性になるまでより日数を必要とすると思われ、今回の子牛は垂直感染によってヘモプラズマが移行した可能性が示唆された。

ヘモプラズマ陽性群の乳量およびその子牛体重は、陰性群と比較し有意に低値を示したことから、慢性感染期においてもヘモプラズマは牛の生産性に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、ヘモプラズマ陽性牛の血液性状に異常は認められず、乳量低下などの詳細な機序は不明であった。乳量及び子牛体重は様々な因子に影響を受けることから、それらを考慮した更なる検討が必要と思われた。

Table 3-1. Comparison of monthly milk yield of breeding cows among Mw positive, CMh positive, dual positive and PCR-negative groups.

Sampling time	Monthly milk yield* (kg; Mean±SD)			
	Mw positive (n=33)	CMh positive (n=18)	Dual positive (n=32)	Negative (n=10)
1st	32.7±12.4*	33.4±8.6*	32.9±11.7*	46.0±10.4
2nd	37.9±11.2	36.0±10.1*	36.6±11.3*	47.8±8.0
3rd	36.7±10.8	37.8±8.7	35.4±9.9	45.8±9.5
4th	32.0±9.9	33.0±9.2	34.5±9.57	35.3±9.7

$P < 0.05$ vs negative group (Steel-Dwass test)

*; obtained from dairy herd performance test which was recorded every one month

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’

Table 3-2. Comparison of background characteristics, incidence of postpartum diseases and calf status of breeding cows and their calves among Mw positive, CMh positive, dual positive and PCR-negative groups.

Parameters	PCR results (Mean±SD)				P value ^{a)}
	Mw positive (n=33)	CMh positive (n=18)	Dual positive (n=32)	Negative (n=10)	
Age (months)	44.1±21.3	43.6±20.1	41.2±15.2	58.4±32.2	-
Parity	1.39±1.56	1.50±1.38	1.19±1.12	2.20±1.87	-
Pregnancy period (days)	277.3±7.6	277.8±4.4	278.7±3.6	282.3±5.3	-
Number of postpartum disease cases	8	3	10	3	0.36
Number of stillbirths	6	2	4	1	0.85
Calf birth weight (kg)	40.8±6.7	41.2±7.7	42.7±7.6	47.0±5.4	-
Calf gender					
Male	13	4	15	6	0.28
Female	12	11	9	3	
Unknown	8	3	8	1	

* $P < 0.05$ vs negative group (Steel-Dwass test)

^{a)}: Comparison by χ^2 test

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: 'Candidatus Mycoplasma haemobos'

Table 3-3. Comparison of blood parameters of breeding cows and their calves among Mw positive, CMh positive, dual positive and PCR-negative groups.

Parameters	PCR results (Mean±SD)			
	Mw positive	CMh positive	Dual positive	Negative
Breeding cows	(n=33)	(n=18)	(n=32)	(n=10)
PCV (%)	32.4±2.0	32.6±3.0	32.0±2.7	31.2±4.1
TP (g/dl)	6.45±0.62	6.68±0.61	6.52±0.73	6.83±0.44
Alb (g/dl)	3.28±0.20	3.32±0.18	3.30±0.21	3.28±0.21
Glob (g/dl)	3.2±0.6	3.4±0.6	3.2±0.7	3.6±0.46
Glu (mg/dl)	63.3±9.9	67.8±13.7	64.4±9.1	61.7±6.3
T.Chol (mg/dl)	79.5±16.8	82.0±14.3	92.3±41.9	68.4±16.2
Calf	(n=20)	(n=15)	(n=21)	(n=8)
PCV (%)	33.0±7.3	32.3±6.1	31.4±4.7	33.0±6.0
TP (g/dl)	6.01±1.06	5.60±0.59	6.28±1.12	5.84±0.75
Alb (g/dl)	2.96±0.17	2.98±0.11	2.87±0.18	3.00±0.18
Glob (g/dl)	3.06±1.17	2.62±0.55	3.41±1.17	2.85±0.65

* $P < 0.05$ vs negative group (Steel-Dwass test)

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: 'Candidatus Mycoplasma haemobos'

Table 3-4. Comparison of body weight and blood parameters of calves among Mw positive, CMh positive, dual positive and PCR-negative groups.

Parameters	PCR results (Mean±SD)			
	Mw positive (n=4)	CMh positive (n=2)	Dual positive (n=1)	Negative (n=57)
Body weight (kg)	41.1±5.7	49.0±5.7	33.5	43.9±7.2
PCV (%)	32.7±6.6	35.2±1.5	19.4	31.5±7.2
TP (g/dl)	5.48±0.79	6.10±1.18	5.84	5.7±0.8
Alb (g/dl)	3.05±0.04	2.86±0.08	2.66	2.9±0.2
Glob (g/dl)	2.43±0.82	3.20±1.27	3.18	2.8±0.9

Mw: *Mycoplasma wenyonii*

CMh: ‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’

第2節 ヘモプラズマ感染により貧血および発育不良を呈した子牛の一例

1. 序論

これまでの調査により、牛ヘモプラズマは農場内に広く蔓延しており、出生直後の子牛においても一定の割合でヘモプラズマ感染が認められることが明らかとなった。牛ヘモプラズマの発症例に関して、成牛では重篤な感染症等に伴う免疫抑制状態の牛で散発的に報告されているが(19, 55, 79)、これまで若齢子牛における発症例の報告は脾臓摘出子牛もしくは実験感染子牛のみであり(10, 68, 81)、どのような併発疾患が発症に関与するのか、また発症時の臨床病理学的所見や、その後の成長に与える影響など不明な点が多い。そこで本節では、出生後、ヘモプラズマ感染により貧血を呈したホルスタイン種子牛の臨床例を用い、その臨床病理学的所見および体重変化等の観察を行うことで、子牛におけるヘモプラズマ感染症の病態を明らかにすることを目的とした。

2. 症例

2-1 概要

症例は20日齢のホルスタイン種雄子牛であり、出生時からの矮小体型を理由に廃用となり2011年9月、帯広畜産大学に搬入された。搬入時(第1病日)、体温39.1℃、心拍数144回/分、呼吸数28回/分であり、哺乳欲はあるものの体重32.5kgと矮小体型であり、可視粘膜は蒼白であった(Fig. 3-1)。また、3cm大の臍ヘルニアを認め、頸部胸腺は触知不可であった。

2-2 血液検査所見

血液検査では、RBC、HB、PCVともに低下しており、小球性貧血を呈していた(Table 3-5)。血液塗抹では、ヘマカラ染色(Hemacolor® staining kit, Merck, Germany)および蛍光顕微鏡下でのアクリジンオレンジ染色(アクリジンオレンジ溶液、和光純薬㈱、

日本)においてリング状を呈する微細な寄生体が赤血球表面及び血漿中に多数観察された (Fig. 3-2)。血液生化学検査では、ALP の増加、T.Chol、LDH、TP の低下がみられた。血清蛋白分画では γ -Glob の著しい低下による A/G 比の増加がみられた。インスリン様成長因子である IGF-1 は 10 ng/ml 以下であり、測定限界以下であった (Table 3-5)。

2-3 PCR 検査

ヘモプラズマの検出には、第 1 章で示した direct PCR 法を用いた。その結果、明瞭な陽性バンドが検出され、そのバンド長から *M. wenyonii* の感染が確認された。16S rRNA 遺伝子の全長を増幅するため、末梢血液の DNA を抽出後、ユニバーサルプライマーである fD1/Rp2 (Table 3-6; 102) を用い、fD1/R2 および F2/Rp2 の組み合わせで PCR を行い、それぞれの増幅産物を併せて fD1/Rp2 の塩基配列を得た。なお、用いた試薬および増幅反応はアニーリング温度 (fD1/R2 ; 58°C、F2/Rp2 ; 52°C) を除き、第 1 章の standard PCR 法のものと同じとした。得られた増幅産物は、前述の通りシーケンス解析を行い、GenBank にすでに登録されている遺伝子配列との相同性を検索した。その結果、1393bp の塩基配列が得られ、*M. wenyonii* (AY946266) と最も高い相同性を示した (99.86%)。

2-4 Real-time PCR

Real-time PCR 法により、ヘモプラズマコピー数の測定を行った。プライマーは既知の *M. wenyonii* の配列をもとに作製し (Mw64f/Mw256r; Table 3-6)、反応液は Power SYBR® Green Master Mix (×2) (Applied Biosystems, CA, USA) 10.0 μ l、滅菌蒸留水 7.0 μ l、10 μ M の各プライマー 1.0 μ l とし、19.0 μ l の混合液に、テンプレート DNA 1.0 μ l を添加、反応液量を 20 μ l として PCR 反応を行った。DNA 増幅反応は、プレヒ

ーティング 95°C 10 分の後、熱変性 95°C 15 秒、アニーリング／伸長反応 62°C 1 分を 1 サイクルとする計 40 サイクルを Step one Real-Time PCR System (Applied Biosystems、CA、USA) を用い行った。なお陽性コントロールには、上記のプライマーセットにより増幅した牛ヘモプラズマ DNA (シーケンスにより *M. wenyonii* であることを確認) を用いて、第 1 章で用いた TOPO TA Cloning Kit pCR 4-TOPO Vector (Invitrogen、USA) および Plasmid Mini kit (QIAGEN、GmbH、Hilden、Germany) により recombinant DNA plasmid を作製、その溶液の DNA 濃度をもとに $10^3 \sim 10^7$ copy/ μ l となるよう 5 段階の 10 倍希釈溶液を作製し、使用した。

3. 経過

症例は一般状態が良好であったことから、1～5 日間隔で採血を実施し、PCV、TP の測定を行うとともに、無治療にて経過観察を行った。観察中、症例の PCV は緩徐に増加したが、発熱と PCV の低下が間欠的に認められた (Fig. 3-3)。また、PCV の低下と real-time PCR により定量したヘモプラズマのコピー数の上昇が一致して認められた (Fig. 3-4)。症例の体重は経過中 40kg まで増加したが、それ以上増加せず、同日齢の正常体重 (74.12 ± 4.23 kg ; 61) と比較すると著しい低体重であった。その後、症例は下痢、肺炎等により状態が悪化し、78 日齢 (第 59 病日) に斃死した。

病理学的検索の結果、高度の発育不良と消瘦、全身脂肪の膠様化がみられ、胸部胸腺は中等度に菲薄化していた。また臍帯部に直径 2 cm 大の欠損孔がみられ、右肺前葉前部、前葉後部、中葉の一部は暗赤色無気肺様であり、断面では気管支内に黄色膿汁を容れていた。

4. 考察

ヘモプラズマの発症報告は脾臓摘出牛や若齢牛など免疫機能低下時に認められるが、

ほとんどは感染後、不顕性感染となり臨床例として報告されることは稀である。また、成牛においては重篤な感染症等に伴う免疫抑制状態の牛で散発的に報告されている(19, 55, 79)。体格の矮小、胸腺低形成、免疫機能低下、IGF-1 低下などを伴う虚弱子牛の発生が知られており、それらの子牛の病態は様々であることから、虚弱子牛症候群(Weak calf syndrome ; WCS)と呼ばれている(46, 87)。WCS 子牛は、T リンパ球機能低下やグロブリン濃度減少といった免疫能の低下が示唆されており、二次的な肺炎、下痢等により早期に斃死、もしくは著しい成長不良を呈するとされ(62)、また、低体重子牛では液性免疫、細胞性免疫ともに低下していたとの報告もある(61)。本症例は矮小体型、胸腺低形成、 γ -グロブリンと IGF-1 の低値など、WCS にみられる所見に矛盾しておらず、WCS に伴う免疫能の低下が、ヘモプラズマ発症に繋がったものと考えられた。WCS においても貧血がみられるとされるが(87)、PCV の低下とヘモプラズマコピー数の上昇がある程度一致しており、相関がみられたことから、本症例の貧血にはヘモプラズマが関与していたものと思われた。

血液検査において、血液塗抹標本上、軽度に再生像がみられるものの、本症例の貧血は小球性貧血であった。小球性貧血は一般に慢性疾患に伴う貧血や鉄欠乏、栄養不良などでみられる。本症例では血清鉄濃度を測定しておらず、慢性疾患に伴う貧血および鉄欠乏性貧血の関与は不明であった。しかし、T.Chol の低下がみられたことから、栄養状態の悪化により小球性貧血が認められた可能性が考えられた。

ヘモプラズマ発症牛では、発熱、貧血の他、抗赤血球抗体の産生増加に伴う免疫複合体の沈着が血管炎を引き起こし、後肢の浮腫がみられる場合がある(79)。犬、猫では二次的な自己抗体の産生により激しい溶血性貧血が発症するとされている(54)。本症例では後肢の浮腫はみられず、溶血所見および貧血の急激な進行も認められなかったが、直接クームス試験による自己抗体の証明を行っていないため関与は不明であった。

本症例のヘモプラズマ発症は、WCS に伴う免疫能低下によって引き起こされたもの

と思われ、持続する貧血が本症例の発育不良の増悪に関与した可能性が考えられた。出生直後にヘモプラズマを発症した子牛はこれまで報告されていない。しかし、第2章の結果から、少数ながら出生直後から子牛にヘモプラズマ感染が認められることが明らかとなっており、これまで子牛のヘモプラズマ感染症は見過ごされてきた可能性が考えられた。今後、貧血を伴う発育不良子牛に遭遇した場合、血液塗抹の詳細な観察や PCR 検査を実施することで、ヘモプラズマ感染を見落とさないことが重要であると思われた。

小括

ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響を明らかにするため、妊娠牛およびその産子を用いてその乳量、子牛体重、血液性状を比較検討した。その結果、ヘモプラズマ陽性牛の乳量は、陰性牛と比較し有意に低下しており、さらに病原性が強いとされる '*Candidatus M. haemobos*' 群と混合感染群は、より長期に乳量が低下していた。また、ヘモプラズマ陽性牛から産まれた子牛の体重は、陰性群のものと比較し、低下していた。慢性感染期においてもヘモプラズマは牛の生産性に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、ヘモプラズマ陽性牛の血液性状に異常は認められず、乳量および産子体重の低下の詳細な機序は不明であった。

次に、子牛におけるヘモプラズマの影響を評価するため、発症例を用いて検討を行った。PCV の変動とヘモプラズマコピー数に相関がみられたことから、症例の貧血は栄養状態の悪化に加え、ヘモプラズマ感染がさらなる増悪を引き起こされたものと思われた。症例は、虚弱子牛症候群に伴う免疫能低下によってヘモプラズマを発症し、持続する貧血が症例の発育不良の増悪に関与した可能性が考えられた。

Table 3-5. Hematology, blood serum chemistry profile and IGF-1 concentration of the infected calf. Parameters in bold are abnormal value.

Parameters	unit	Reference ranges ^a	Parameters	unit	Reference ranges ^a		
RBC	4.74	x10 ⁶ /μl	5.00-10.00	BUN	15.7	mg/dl	20.0-30.0
HB	4.9	g/dl	8.0-15.0	Cre	1.1	mg/dl	1.0-2.0
PCV	16.2	%	24.0-46.0	AST	55	U/l	43-127
MCV	34.2	fl	40.0-60.0	ALP	761	U/l	27-107
MCH	10.3	pg	11.0-17.0	LDH	641	U/l	697-1445
MCHC	30.2	g/dl	30.0-36.0	T.Chol	68	mg/dl	80-120
PLT	47.4	x10 ³ /μl	10.0-80.0	TP	4.8	g/dl	6.7-7.5
WBC	10800	/μl	4000-12000	Alb	3.0	g/dl	3.0-3.6
Sta	0	/μl	0-120	α-Glob	0.9	g/dl	0.8-0.9
Seg	1836	/μl	600-4000	β-Glob	0.7	g/dl	0.8-1.1
Lym	7668	/μl	2500-7500	γ-Glob	0.2	g/dl	1.7-2.2
Mon	1296	/μl	25-840	A/G	1.68		0.84-0.94
Eos	0	/μl	0-2400	Na	140	mEq/l	132-152
Bas	0	/μl	0-200	K	5.3	mEq/l	3.9-5.8
				Cl	100	mEq/l	97-111
				IGF-1	< 10	ng/ml	50.2±7.1 ^b

a; Smith, B. P. (2009). Large Animal Internal Medicine 4th ed. Mosby A Harcourt Health Company, St. Luis.
b; Abribat, T. et. al. (1990). Domest. Anim. Endocrinol. 7, 93-102.

Table 3-6. Sequences of primers used in this study.

Primer name	Oligonucleotide (5'-3')	Reference
Universal primers for 16S rRNA gene		
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	102
Rp2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	102
<i>M. wenyonii</i> specific PCR		
Mw64f	GCAAACGGGCGAGTAATACA	This study
Mw256r	CTTTACCCCGCCA ACTACCT	This study

(A)

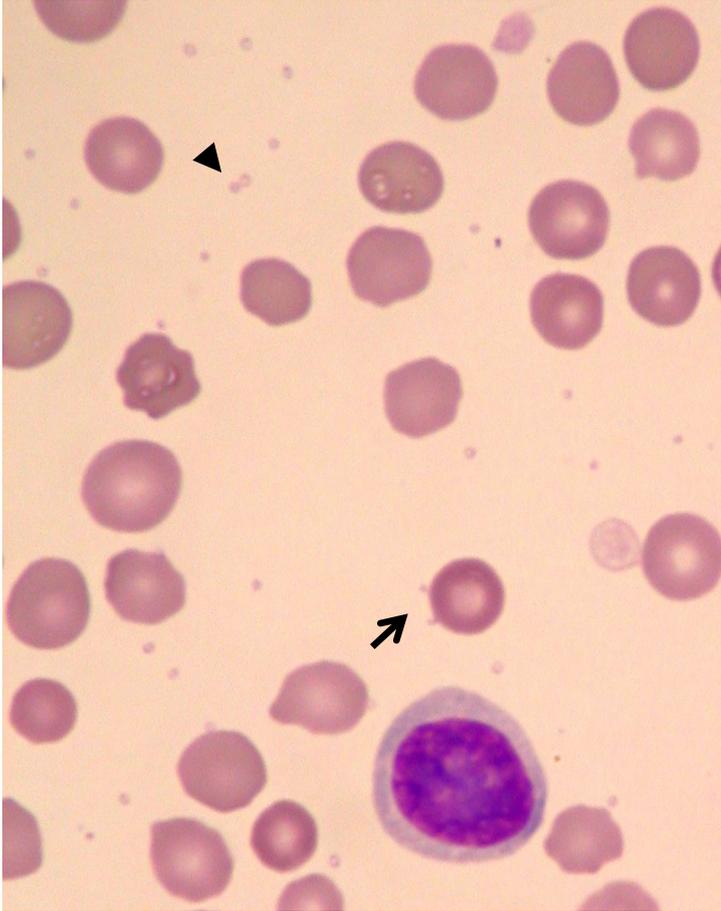


(B)



Fig. 3-1. A clinical case of bovine hemoplasma infection in a calf. (A) The calf was dwarfishness and had an exomphalos (arrow). (B) Pale oral mucous membrane was seen.

(A)



(B)

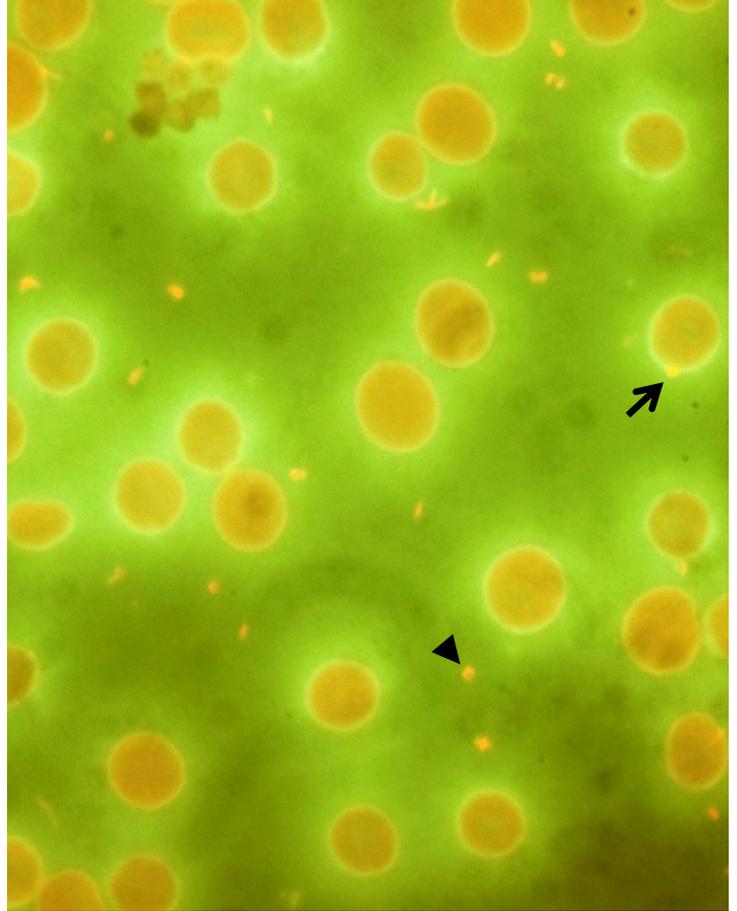


Fig. 3-2. Blood smear of the case. ‘Ring form’ organisms were seen in the plasma (arrowhead) and the surface of erythrocytes (arrow). (A) Hemacolor® staining. (B) Acridine orange staining.

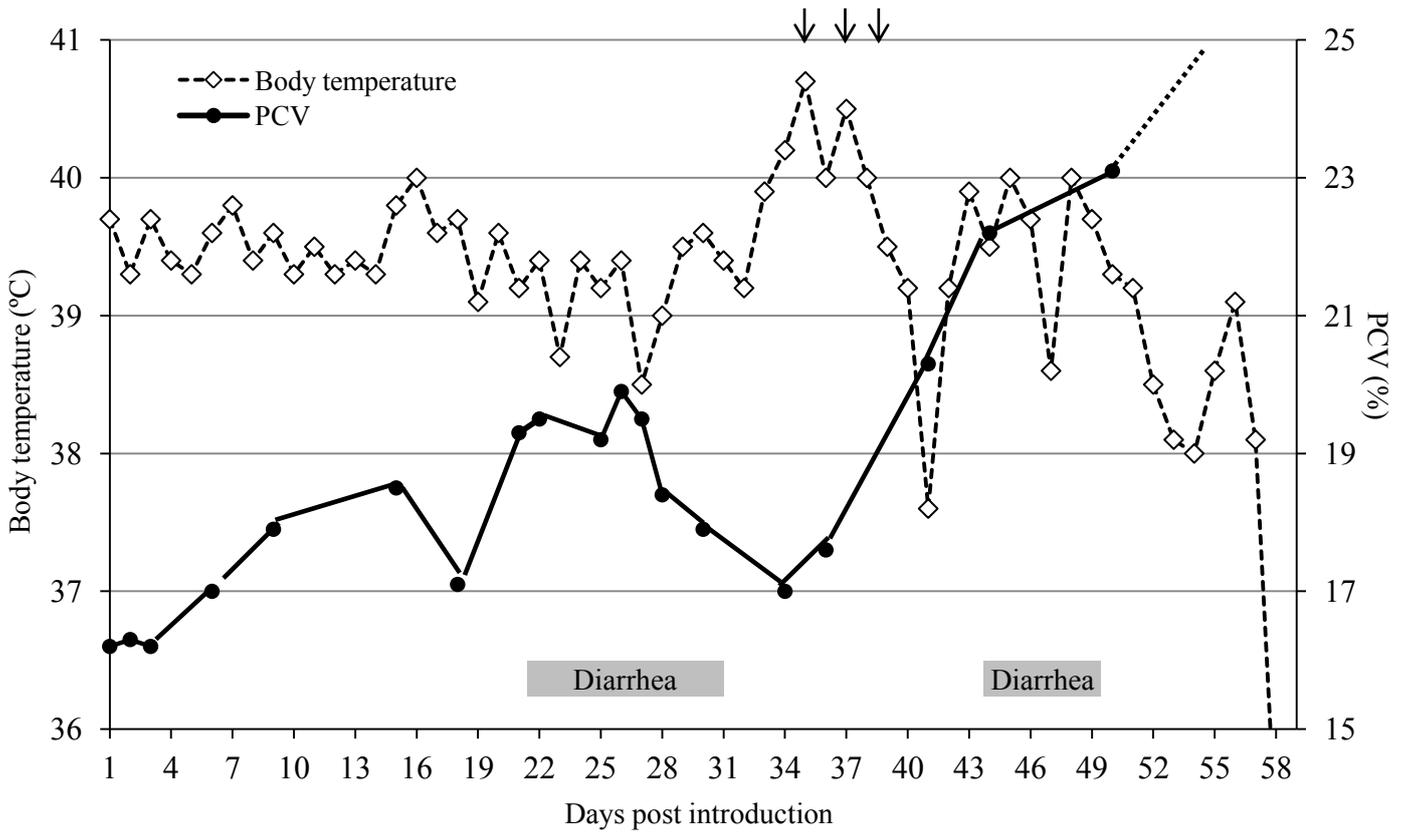


Fig. 3-3. Changes in the body temperature (°C, left y axes, open diamonds) and the PCV (% , right y axes, black circles) of the case. X axes show the days after the first medical examination. The case was treated with antibiotic (benzylpenicillin procaine/dihydrostreptomycin sulfate mixture; arrow).

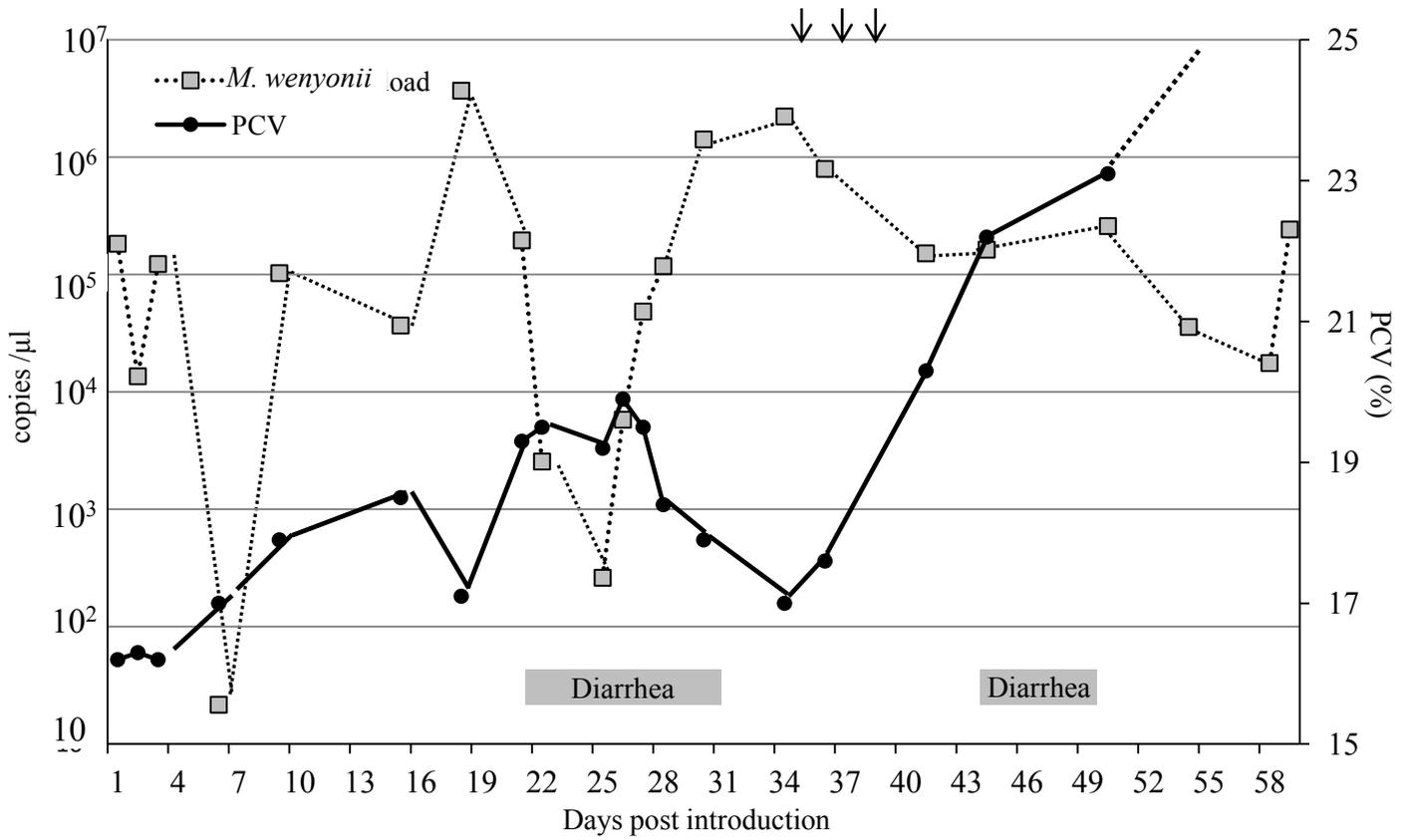


Fig. 3-4. Changes in the *M. wenyonii* load (copies /μl, left y axes, gray squares) and the PCV (% , right y axes, black circles) of the case. X axes show the days after the first medical examination. The case was treated with antibiotic (benzylpenicillin procaine/dihydrostreptomycin sulfate mixture; arrow).

第4章 牛以外の偶蹄類に感染するヘモプラズマに関する研究

1. 緒言

ヘモプラズマとは、赤血球寄生マイコプラズマの総称であり、感染種は動物種により異なり種特異性が高いことが知られている (54)。感染した場合、発熱、貧血、黄疸などを呈し死に至る場合もあるが、ほとんどは不顕性感染となることから、見落とされがちな感染症の一つといえる (54)。ヘモプラズマは犬、猫といった様々な動物種で感染が報告されているが (9, 15, 79)、牛と豚を除く家畜動物および野生動物に感染するヘモプラズマに関しては、いまだ不明な点が多い。

羊のヘモプラズマ感染症は、1934年に Neitz ら (58) により *Eperythrozoon ovis* (現; *Mycoplasma ovis*) が南アフリカの羊より初めて報告された。わが国では *M. ovis* は 1975年に羊の自然感染例から報告されているものの、その後 2011年にニホンカモシカ (*Capricornis crispus*) から *M. ovis* の遺伝子断片が検出されたのみである (60)。また、2008年、ハンガリーで新規の羊ヘモプラズマである '*Candidatus M. haemovis*' が検出され (36)、国内においても軽度の貧血を呈する羊から検出されている (83)。このように、わが国では羊のヘモプラズマ症の報告およびヘモプラズマ病原体の検出はあるものの、重篤化および死亡例は報告されておらず、疫学調査も行われていない。

また、家畜である牛、羊と同じ偶蹄類に属し、国内に生息する野生動物としてシカがあげられる。シカ科動物に感染するヘモプラズマに関して、これまでいくつかの報告があり、Stoffregen ら (80) はトナカイ (*Rangifer tarandus*) には少なくとも 2 系統のヘモプラズマが感染することを報告している。また、アメリカおよび南米に生息する野生シカ (Dwarf Brocket deer; *Mazama nana*, Red Brocket deer; *Mazama americana*, Marsh deer; *Blastocerus dichotomus*, White-tailed deer; *Odocoileus virginianus*, Pampas deer; *Odocoileus bezoarticus*) から *M. ovis* 近縁種を含む 3 系統のヘモプラ

ズマが検出され (8, 23)、さらに近年の報告 (50) では、アメリカの White-tailed deer から *M. ovis* 近縁種を含む別の 3 系統のヘモプラズマが 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子を用い検出されている。国内においては、ニホンジカ (*Cervus nippon centralis*) から 2 系統のヘモプラズマ DNA が検出されており、16S rRNA および RNase P RNA (*rnpB*) 遺伝子解析から '*Candidatus M. haemocervae*' および '*Candidatus M. erythroceruae*' と名付けられたが (100)、海外と国内のシカ由来ヘモプラズマを 16S rRNA、23S rRNA、*rnpB* 遺伝子を用い比較検討した報告はない。

また、北海道に生息するシカ科の野生動物であるエゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) は近年その生息数を増やしており、牛、羊といった家畜と接触する機会の多い動物種と言える。しかし、これまでエゾシカに感染するヘモプラズマの報告はなく、感染種や浸潤状況など不明な点が多い。

そこで本章では、牛以外の偶蹄類、とくに羊とエゾシカを対象とし、第 1 節では羊ヘモプラズマ感染症の臨床例とその後に行われた疫学調査により、羊ヘモプラズマの臨床病理学的特徴およびその浸潤状況調査を行った。第 2 節では、エゾシカに感染するヘモプラズマを明らかにし、その遺伝子解析を実施することで国内シカおよび海外シカヘモプラズマの系統学的解析を行った。

第1節 羊ヘモプラズマの臨床例と疫学調査

1. 序論

羊のヘモプラズマ感染症は *M. ovis* により引き起こされ、発熱、貧血、体重減少などを呈する。感染は子羊もしくは若齢羊に多くみられ、死亡例も報告されているが (12)、成羊での発症はまれである (67)。また、*M. ovis* は山羊にも感染し、より重篤な症状を発現する (56)。本病原体は 1934 年に Neitz ら (58) により南アフリカにおいて初めて検出されており、わが国では *M. ovis* は 1975 年に報告されて以後、詳細な検討は行われていない。また、2011 年にニホンカモシカ (*Capricornis crispus*) から *M. ovis* の遺伝子断片が検出されたものの (60)、羊の *M. ovis* との関連は不明である。2008 年、新規の羊ヘモプラズマである '*Candidatus M. haemovis*' がハンガリーの羊から検出され (36)、国内においても軽度の貧血を呈する羊から同病原体が検出されている (83)。以上のように、わが国では羊のヘモプラズマ症の報告はあるものの、羊ヘモプラズマ症の臨床病理学的特徴およびその浸潤状況など不明な点が多い。

そこで本節では、重度の貧血を呈し斃死したヘモプラズマ症例羊を用い、その臨床病理学的所見を論述するとともに、症例の飼養されていた農場およびその近隣農場の疫学調査を実施した。

2. 材料および方法

2-1 症例

症例はイーストフリーズアン種、雌、2 歳齢、2009 年 5 月に 68 頭の羊とともにオーストラリアから北海道空知管内の農場に導入された。同年 8 月、分娩後に伝染性膿疱性皮膚炎を発症した。皮膚症状は同年 9 月に回復したが、元気消失は継続したため、血液検査を実施したところ、PCV14%と貧血が認められ、血液塗抹標本では多染性赤血球の出現を伴う再生性変化と、赤血球表面および血漿中に浮遊する多数のリング状の寄生体

が観察された (Fig. 4-1)。

2-2 疫学調査

症例の飼養されていた農場において、同時に導入された 12 頭、他の農場から導入された 5 頭から採血を行った。また、発症農場との間で羊同士の接触がない近隣農場の羊 16 頭から採血を行った。なお、近隣農場の羊はすべて自家産または道内からの導入であった。血液は全て EDTA 処理し、PCV および TP を測定後、PCR に使用するまで -30°C で保存した。

2-3 PCR 検査

採取した末梢血液の 200 μl を用い、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) により DNA を抽出した。ヘモプラズマの検出にはスクリーニングプライマーである F2/R2 (Table 4-1 ; 44) を使用し、第 1 章で示した standard PCR 法を用いて行った。

2-4 TA クローニング

ヘモプラズマの 16S rRNA 遺伝子の全長を解析するため、症例の DNA サンプルから、ユニバーサルプライマーセットである fd1/Rp2 (Table 4-1 ; 102) を用いアニーリング温度を 52°C とした以外は前述の通りに PCR を行い、増幅産物を得た。その後、TOPO TA Cloning Kit pCR 4-TOPO Vector (Invitrogen, USA) に導入し、plasmid DNA を培養した大腸菌から Plasmid Mini kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) を用い抽出した。得られた Plasmid は、前述の通りシーケンス解析を行い、GenBank にすでに登録されている遺伝子配列との相同性を検索した。

2-5 系統解析

ヘモプラズマ類を中心とした 16S rRNA 遺伝子配列による系統樹を CLUSTAL W software (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) および MEGA software version 5.05 (90) を用いて作製し、neighbor-joining method (74) により系統学的な分類を実施した。

3. 結果

症例の末梢血 DNA を用いたヘモプラズマスクリーニング PCR では、200bp 前後に近接する 2 本の陽性バンドが検出された (Fig. 4-2)。ユニバーサルプライマーを用いた PCR により得られた陽性バンドをクローニングし、シーケンス解析を行った結果、1,314~1,374bp の 8 クローンが分離され、そのうちクローン No. 1、2、3、6、7 は ‘*Candidatus M. haemovis*’ (EU166531) と 99.19~99.41%、クローン No. 4、5、9 は *M. ovis* (AF166510) と 99.41~99.71%の相同性を示した。遺伝子配列をもとに系統解析を行ったところ、8 つのクローンは全て同一クレードに属した (Fig. 4-3)。なお、今回得られた遺伝子配列は GenBank に以下の通り登録した。‘*Candidatus M. haemovis*’ : JF931131、JF931132、JF931133、JF931136、JF931137 ; *M. ovis* : JF931134、JF931135、JF931138。

疫学調査では、症例と同時にオーストラリアから導入された羊 12 頭中 6 頭 (50.0%)、道内の別農場から導入された症例の同居羊 5 頭中 1 頭 (20.0%)、症例羊と接触のない近隣農場の羊 16 頭中 1 頭 (6.3%) がスクリーニング PCR で陽性となった。なお、すべての陽性検体で 2 本のバンドが確認された。陽性羊の PCV、TP に異常は認められなかった。オーストラリアから導入された羊および近隣農場の羊の陽性検体をランダムに選び、クローニングおよびシーケンス解析を行った結果、132bp と 149bp の 2 種類の配列が得られ、132bp のものは ‘*Candidatus M. haemovis*’ (EU166531)、149bp の

ものは *M. ovis* (AF166510) と全て 100%一致した。

4. 考察

貧血を発症した羊の血液塗抹中に大量の寄生体が観察され、PCR 検査において ‘*Candidatus M. haemovis*’ および *M. ovis* が検出されたことから、本症例の貧血の原因は 2 種のヘモプラズマの混合感染によるものと思われた。羊におけるヘモプラズマ感染症は、おもに若齢羊の疾患として知られており、成羊で発症することはまれである (56)。一般に成羊がヘモプラズマに感染した場合、ほとんど症状のみられない慢性感染となることが知られている (27)。過去の報告では、肺炎による免疫能の低下が成羊のヘモプラズマ発症に関与したとされており (67)、本症例においては、分娩およびその後の伝染性膿疱性皮膚炎が発症の引き金になったものと思われ、病原性の増悪には 2 種のヘモプラズマの混合感染が関与したものと思われた。しかしながら、‘*Candidatus M. haemovis*’ および *M. ovis* の 16S rRNA 遺伝子配列は比較的類似しており、大きな違いは ‘*Candidatus M. haemovis*’ にみられた 17bp の欠損のみであった。加えて、両者は系統解析においても同一のクレードに位置していることから、犬猫のように 2 種間で病原性が異なるかどうかは不明である (36)。両者の病原性や他の遺伝子解析など、さらなる比較検討が必要と思われた。

疫学調査において、症例と同時にオーストラリアから導入された羊から高率にヘモプラズマが検出され、全て今回の症例と同様、‘*Candidatus M. haemovis*’ と *M. ovis* の混合感染であった。また、症例と同じ農場の国産羊においても ‘*Candidatus M. haemovis*’ および *M. ovis* の混合感染が認められた。国内で飼養される羊のほとんどはオーストラリアもしくはニュージーランドから導入された羊もしくはその子孫であることから、今回のヘモプラズマ病原体はそれら輸入国から羊とともに導入された可能性が考えられた。当該農家の羊と交流のない近隣農場においても、混合感染が 1 頭確認

された。*M. ovis* は蚊などの吸血節足昆虫によって媒介されることが示唆されているが (14, 40)、発症農場から感染が拡大したのか、近隣農場にもともと存在したものは不明であった。

Table 4-1. Sequences of primers used in this study.

Primer name	Oligonucleotide (5'-3')	Reference
Hemoplasma screening PCR		
F2	ACGAAAGTCTGATGGAGCAATA	44
R2	ACGCCCAATAAATCCGRATAAT	44
Universal primers for 16S rRNA gene		
fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	102
Rp2	ACGGCTACCTTGTACGACTT	102
Species specific PCR for deer hemoplasmas		
CMhc	CCGCGAGTAGGATAGCAGCC	This study
CMec	GCAAGGGGTTCCGCGTAAAA	This study
23S rRNA gene PCR for deer hemoplasmas		
Deerhemo F	AAAGAGTGC GTAACAGCTCAC	This study
Deerhemo R	TCACGCCGGAATTCTTACTT	This study
23S rRNA gene PCR		
23S Fw	RNAKGGGAGTGAAATAGA	23
23S Rv	TTAGGACCGTTATAGTTAC	23
<i>mnpB</i> gene PCR		
80F1	GAGGAAAGTCCRYGCTWGCAC	66
290R1	TCCCYTACCRAAATTTRGGTTTCT	66

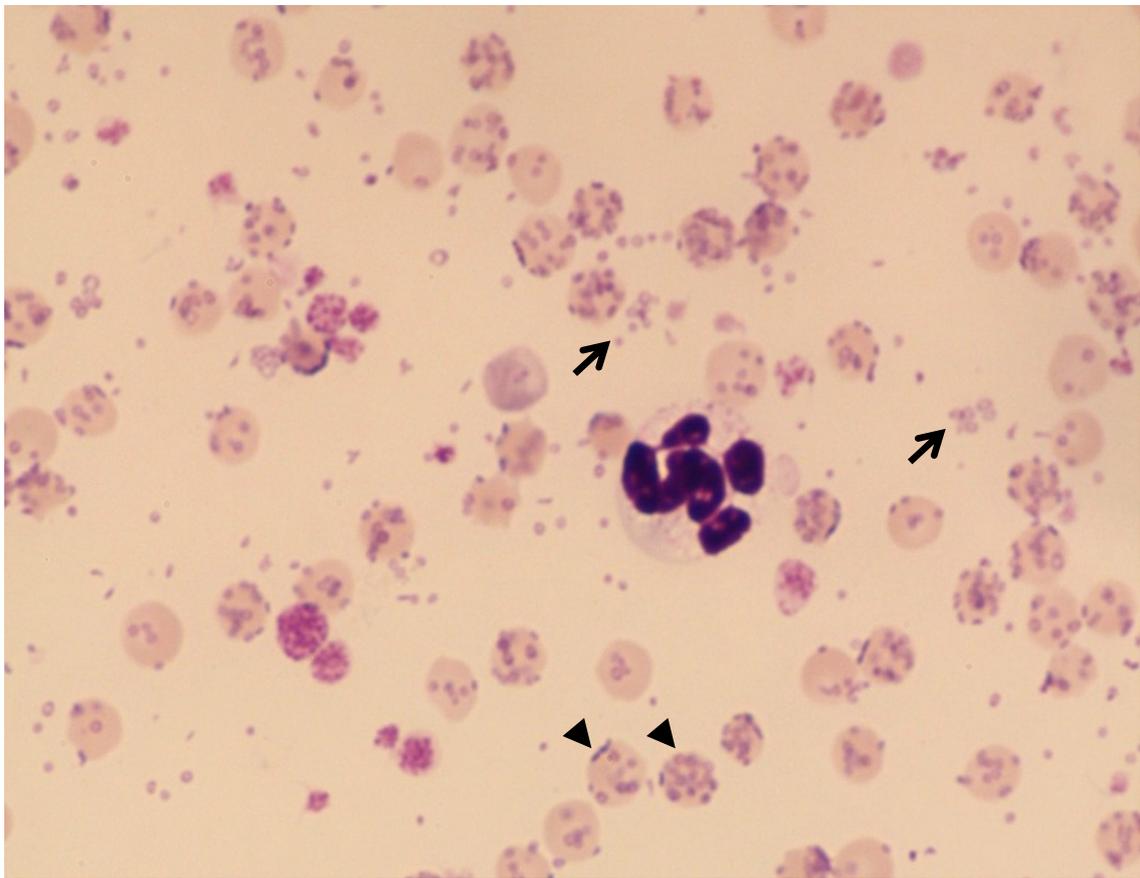


Fig. 4-1. Giemsa-stained blood smear from the anemic sheep with *Mycoplasma ovis* and 'Candidatus *M. haemovis*'. Hemoplasmas were detected in plasma (arrow) and on the surface of erythrocytes (arrow head).

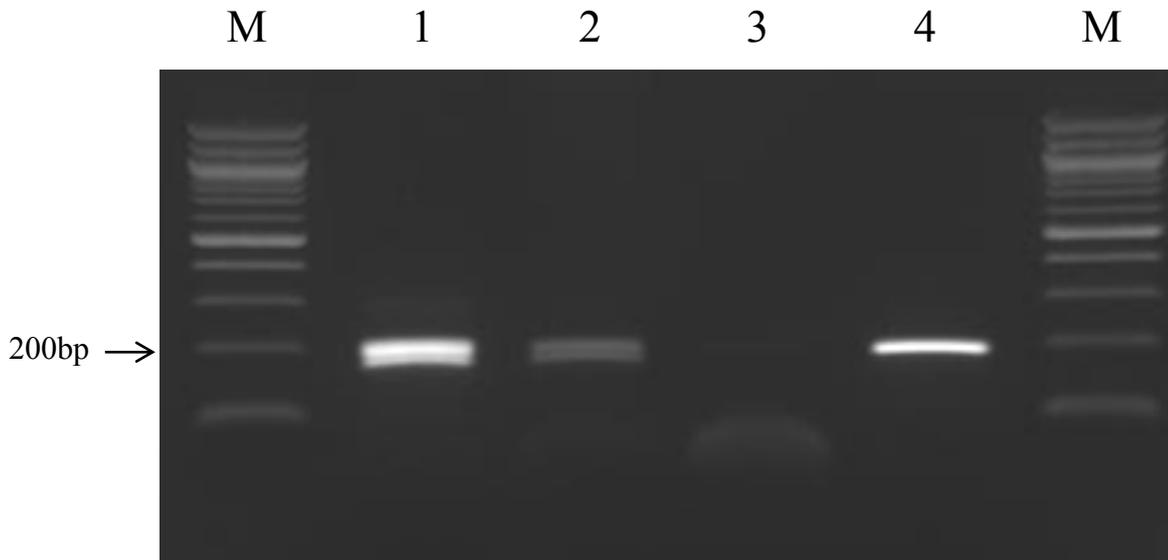


Fig. 4-2. Representative results of PCR analysis using the hemoplasma-specific F2/R2 primer set. Two bands of approximately 200 bp were detected. Lane 1: infected ewe with anemia; Lane 2: 3-month-old lamb, which lived with the infected ewe; Lane 3: negative control (DW); Lane 4: positive control (*M. haemofelis*); Lane M: molecular size marker.

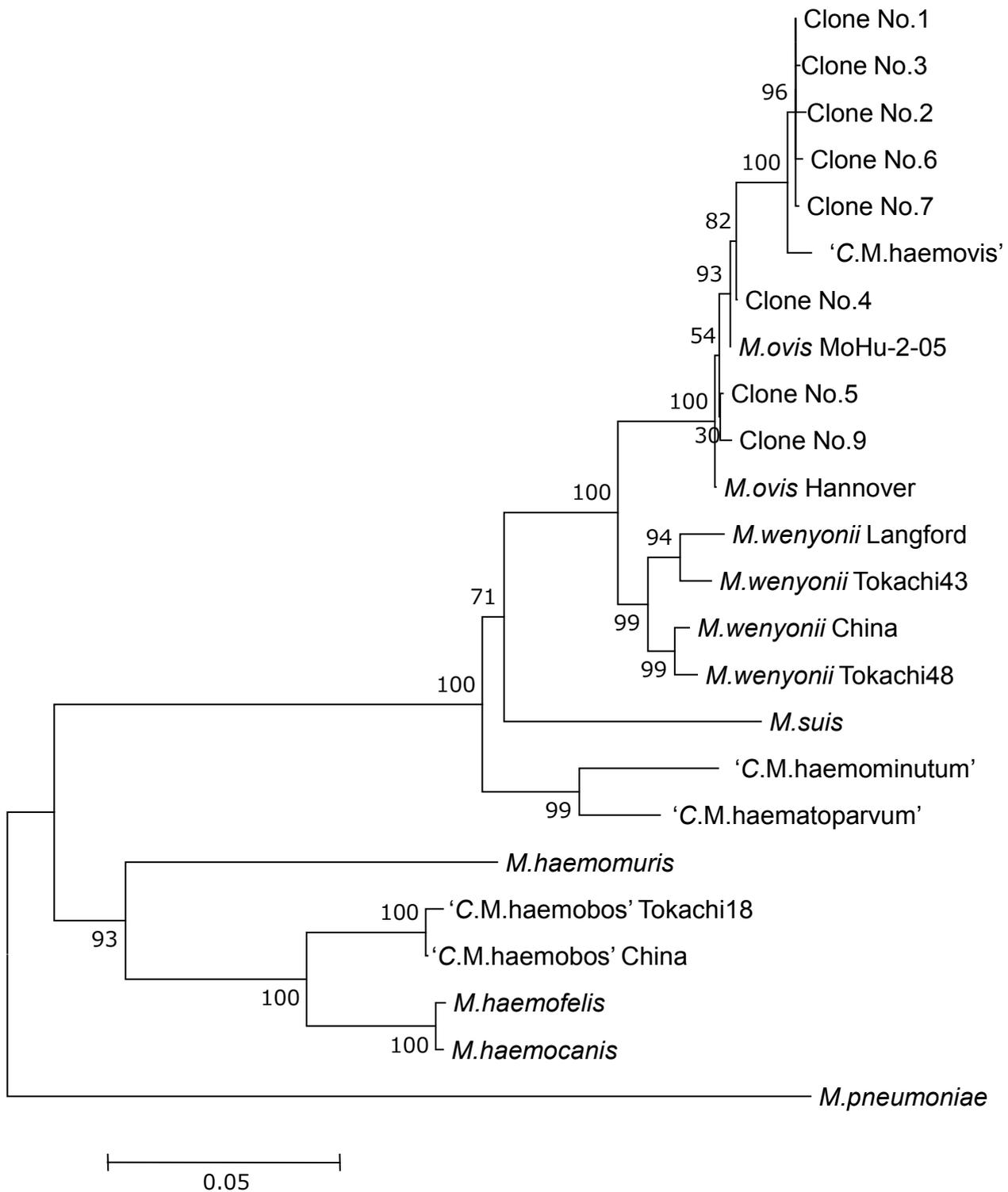


Fig. 4-3. Phylogenetic relationship of hemoplasma isolate from the anemic sheep (Clone No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 9) and the other hemoplasma species based on 16S rRNA gene using a neighbor-joining method. *M. wenyonii* strains, China (AY946266); Langford (DQ641256); Tokachi43, (EU367964); Tokachi48 (EU367963); ‘C. M. haemobos’ strains, China, (EF460765); Tokachi18, (EU367965); *M. ovis* strains, Hannover, (AF338268), MoHu-2-05, (EU165509); ‘C. M. haemovis’, (EU828579); *M. suis*, (U88565); ‘C. M. haemominutum’, (AF271154); *M. haemofelis*, (AY150976); ‘C. M. haemoparvum’, (AY383241); *M. haemocanis*, (AY150973); *M. haemomuris*, (U82963) are shown. *M. pneumoniae* (M29061) was used as an outgroup.

第2節 エゾシカに感染するヘモプラズマ病原体の検索

1. 序論

シカ科動物に感染するヘモプラズマに関して、Stoffregen ら (80) はトナカイ (*Rangifer tarandus*) に少なくとも 2 種のヘモプラズマが感染することを報告しており、1 つは *M. ovis* と最も近縁であり、もう 1 つは *M. haemofelis* および *M. haemocanis* と近縁であり ‘*Candidatus M. haemotarandirangiferis*’ と名付けられた。日本においては、ホンシュウジカ (*Cervus nippon centralis*) から 2 種のヘモプラズマが検出されており、16S rRNA および *rnpB* 遺伝子の比較から ‘*Candidatus M. haemocervae*’ および ‘*Candidatus M. erythroceruae*’ とされた (100)。また、アメリカおよびブラジルに生息する野生シカ (Dwarf Brocket deer ; *Mazama nana*, Red Brocket deer ; *Mazama americana*, Marsh deer ; *Blastocerus dichotomus*, White-tailed deer ; *Odocoileus virginianus*, Pampas deer ; *Odocoileus bezoarticus*) から 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子に基づき、*M. ovis* 近縁種 (*M. ovis*-like sp.) を含む 3 種のヘモプラズマが検出されている (8, 23)。それら 3 種のヘモプラズマのうち、Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) から検出された 1 種は、‘*Candidatus M. erythroceruae*’ と近縁であり、同一種の可能性が指摘されている (23)。さらに ‘*Candidatus M. haemocervae*’ は、*M. ovis*-like sp. と遺伝子配列が近縁であり、系統学的な位置も近いことが判明している。近年、アメリカの White-tailed deer から *M. ovis*-like sp. を含む別の 3 系統のヘモプラズマが 16S rRNA および 23S rRNA 遺伝子を用い検出されている (50)。しかしながら、国内と海外のシカ由来ヘモプラズマの比較は 16S rRNA のみで行われており、種間の相同性の検討は十分とは言えない。つまり、国内シカおよび海外シカ由来ヘモプラズマの関連性、系統学的位置付けは不明瞭であると言える。

また、北海道に生息するシカ科の野生動物であるエゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) は近年その生息数を増やしており、牛、羊といった家畜と接触する機会の多い動物種で

ある。しかし、これまでエゾシカに感染するヘモプラズマの報告はなく、その浸潤状況は不明である。

そこで本節では、エゾシカのヘモプラズマ浸潤状況を明らかにし、16S rRNA、23S rRNA および *rnpB* の複数遺伝子の解析を行い、海外シカ由来ヘモプラズマとの比較を行うことで、国内シカ由来ヘモプラズマの系統学的位置付けを明らかにすることを目的とした。

2. 材料および方法

2-1 材料

2011年6月～7月、北海道釧路管内において食肉加工を目的に捕獲され、一定期間飼養されていた野生のエゾシカ 51頭から末梢血液を採取し、EDTA 処理をおこなった。また、同時にエゾシカの年齢、性別を記録した。その後、末梢血液 200 μ l から QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) により DNA を抽出した。各サンプルの DNA は 200 μ l の TE buffer 中に抽出し、PCR に使用するまで -30°C で保存した。

2-2 スクリーニング PCR

ヘモプラズマのスクリーニング PCR は F2/R2 プライマー (Table 4-1 ; 44) を使用し、第 1 章で示した standard PCR 法を用いて行った。

2-3 種特異的 PCR

国内で検出されているシカのヘモプラズマである ‘*Candidatus M. haemocervae*’ (AB558899)、‘*Candidatus M. erythroceruae*’ (AB558897、AB558898) の配列をもとに、特異的プライマー (CMhc F/CMec F ; Table 4-1) を作製、前述の R2 プライ

マー (44) を併用し、CMhc F/R2 を ‘*Candidatus M. haemocervae*’、CMec F/R2 を ‘*Candidatus M. erythroceruae*’ に対する種特異的 PCR として反応を行った。なお、アニーリング温度は両 PCR とも 60°C とした。各 PCR は、シーケンスにより確定したエゾシカの検体を用いて特異性を確認した後、スクリーニング PCR にて陽性であった全検体で実施した。

2-4 遺伝子解析

スクリーニング PCR で陽性だった検体の中から、ランダムに 6 検体を選び 16S rRNA 全長の遺伝子解析を行った。第 3 章で示した通り、ユニバーサルプライマーである fd1/Rp2 (Table 4-1 ; 102) を使い、fd1/R2 および F2/Rp2 の組み合わせで PCR を行い、それぞれの増幅産物を併せて fd1/Rp2 の塩基配列を得た。なお、用いた試薬および増幅反応はアニーリング温度 (fd1/R2 ; 58°C、F2/Rp2 ; 52°C) を除き、第 1 章の standard PCR 法のものと同じとした。

23S rRNA 遺伝子の増幅には *M. ovis*-like sp. (HQ197750、HQ197751、HQ197752) の配列をもとにプライマー (Deerhemo F/Deerhemo R ; Table 4-1) を設計し、23S Fw/23S Rv (Table 4-1 ; 23) とともに、23S Fw/Deerhemo R および Deerhemo R/23S Rv の組み合わせで PCR を行い、それぞれの増幅産物を併せて 23S Fw/23S Rv の塩基配列を得た。なお、アニーリング温度は両者とも 55°C とした。

rnpB 遺伝子の増幅には、80F1/290R1 プライマー (Table 4-1 ; 66) を使い、アニーリング温度は 50°C とし、前述の通り PCR 反応を行った。なお、陽性バンドが確認されたものに関しては全て QIAquick PCR purification kit もしくは QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, GmbH, Hilden, Germany) を用いて精製し、前述の通りシーケンス解析を行い、GenBank にすでに登録されている遺伝子配列との相同性を検索した。

2-5 系統解析

ヘモプラズマ類を中心とした 16S rRNA 遺伝子配列による系統樹を CLUSTAL W software (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) および MEGA software version 5.05 (90) を用いて作製し、neighbor-joining method (74) により系統学的な分類を実施した。

2-6 統計解析

ヘモプラズマ感染のリスク要因の解析には Mann-Whitney U 検定を用い、ヘモプラズマ陽性群および陰性群間で年齢、性別を比較した。統計処理には Statcel ver. 3 を用い、 P 値 <0.05 を有意差ありと判定した。

3. 結果

スクリーニング PCR の結果、51 検体中 23 検体 (45.1%) が陽性であった。種特異的 PCR では '*Candidatus M. haemocervae*' において 439bp、'*Candidatus M. erythroceruae*' において 363bp の増幅産物が得られ、それぞれ特異的な増幅が確認された (Fig. 4-4)。スクリーニング PCR 陽性であった 23 検体中、種特異的 PCR において '*Candidatus M. haemocervae*' が 12 検体、'*Candidatus M. erythroceruae*' が 17 検体みられ、そのうち混合感染が 6 検体であった (Table 4-2)。統計解析の結果、年齢、性別に有意差は認められなかった (Table 4-2)。

16S rRNA 遺伝子解析は 6 検体で行われ、No. 12、16、33、34 は '*Candidatus M. haemocervae*' (AB558899) と最も近縁であり、99.86~99.32%の相同性であった。No. 16 はアメリカの White-tailed deer から検出されたヘモプラズマである *M. ovis-like* sp. (FJ824847) と 98.32%の相同性であった。また、No. 13、49 は '*Candidatus*

M. erythroceruae' (AB558898) と最も近縁であり、99.79~99.71%の相同性であった。No. 49 は Marsh deer 由来の *Mycoplasma* sp. (HQ634379) と 97.75%の相同性であった (Table 4-3)。23S rRNA 遺伝子配列は No. 16、33、49 で得られ、No.16 は White-tailed deer 由来の *M. ovis-like* sp. (HQ197752) と最も近縁であり、その相同性は 97.67%であった。No. 49 は Marsh deer 由来の *Mycoplasma* sp. (HQ634381) と最も近縁であり、その相同性は 95.70%であった。なお、*rnpB* 遺伝子は No. 16、33、34 は '*Candidatus M. haemocervae*' (AB561882) と最も近縁であり、相同性は 99.46%であった (Table 4-3)。No. 16 は *Mycoplasma* sp. (JQ610624) と 92.73%、No.49 は最も近縁なもので *Mycoplasma* sp. (JQ610624、JQ610628) と 92.59%の相同性であった (Table 4-3)。

なお、今回得られた遺伝子配列は GenBank に以下の通り登録した。16S rRNA gene: KF306246 (No. 12), KF306247 (No.13), KF306248 (No.16), KF306249 (No.33), KF306250 (No.34), KF306251 (No.49) and for 23S rRNA gene: KF306252 (No.16), KF306253 (No.33), KF306254 (No.49) and *rnpB* gene: AB836744 (No. 13), AB836745 (No. 16), AB836746 (No. 33), AB836747 (No. 34), AB836748 (No. 49)。

16S rRNA 遺伝子を用いた系統樹解析では、'*Candidatus M. haemocervae*' である No. 12、16、33、34 はブラジルおよびアメリカのシカより検出された *M. ovis-like* sp. とは近縁であるものの、別のクラスターを形成した (Fig. 4-5)。また、'*Candidatus M. erythroceruae*' である No. 13、49 は、Marsh deer 由来 *Mycoplasma* sp. (HQ634379) と異なるクラスターに位置した (Fig. 4-5)。23S rRNA においても、同様に No. 16、33 は *M. ovis-like* sp. と、No. 49 は Marsh deer 由来 *Mycoplasma* sp. (HQ634381) と別のクラスターを形成した (Fig. 4-6)。なお、*rnpB* 遺伝子では、No.16、33、34 は *M. ovis-like* sp. と近縁とされる *Mycoplasma* sp. (JQ610624) とは別のクラスターを形成した (Fig. 4-7)。

4. 考察

本研究では、北海道に生息するエゾシカ 51 検体中、23 検体 (45.1%) でヘモプラズマが検出された。岩手県の野生ニホンジカで行われた調査では、陽性率は 8.8% (13/147 検体) であった (100)。しかしながら、アメリカ、ブラジルで行われた調査では陽性率は 88.9% (8/9)、87.1% (27/31) と極めて高いものであった (8, 24)。それらの報告で用いた検体は集団飼育されたものであり、個体同士の接触に伴うベクターの伝播および傷口の接触が陽性率の増加に関与したものと推察されている (24)。今回用いたエゾシカも一定期間集団で飼養していたことから、岩手県の調査と比較しヘモプラズマ陽性率が上昇したものと思われた。また、有意差は認められなかったものの、ヘモプラズマ陽性群の年齢は陰性群と比較し高値を示した。高齢になるほど、吸血節足昆虫などによるヘモプラズマとの接触機会が増加するものと思われた。

今回、エゾシカから得られた '*Candidatus M. haemocervae*' は、*M. ovis*-like sp. と 16S rRNA 遺伝子 (FJ824847) で 98.32%、23S rRNA (HQ197752) で 97.61% の相同性を示す一方、*rnpB* 遺伝子 (JQ610624) とは 92.73% と低い相同性であった。また、同様に '*Candidatus M. erythroceruae*' の 16S rRNA と 23S rRNA 遺伝子は Marsh deer 由来の *Mycoplasma* sp. (HQ634379, HQ634381) とそれぞれ 97.75% および 95.70% の相同性であった。細菌の種を分別する際、主に 16S rRNA 遺伝子配列が用いられるが、近年、そのカットオフとして 99% 以上の相同性が提唱されている (1, 110)。他の研究では、ほとんどの種で 16S rRNA の種内変異が 1% 未満であった (64)。23S rRNA においては種を分別するカットオフ値の検討はされていないものの、同一種内における変異率の閾値は 1.15% とされており、2% を超えるものは 1 つの種のみであった (65)。国内のエゾシカから検出された '*Candidatus M. haemocervae*' および '*Candidatus M. erythroceruae*' と、海外のシカ由来ヘモプラズマ遺伝子の相同性は、16S rRNA、23S rRNA 遺伝子ともに同種である基準を満たしておらず、海外のシカ由

来ヘモプラズマとは別種であることが示唆された。また、系統解析においても両者は別種であると思われた。

rnpB 遺伝子は 16S rRNA 遺伝子と比較し、種間の variation が大きい点で系統解析により適しているとされている (66)。また、RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) や 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer (ITS) は *Mycoplasma* 属細菌の系統解析において信頼性が高く、有用であることが示されていることから (96)、それらを含めた、さらなる遺伝子解析が必要と思われた。

小括

貧血を発症した羊から、‘*Candidatus M. haemovis*’ および *M. ovis*、2 種のヘモプラズマが検出された。発症機序および病態の重篤化には、伝染性膿疱性皮膚炎および 2 種のヘモプラズマの混合感染が関与したものと思われた。さらに、疫学調査において症例の飼養されていた農場およびその近隣農場においてもヘモプラズマ感染が確認された。

また、エゾシカにおけるヘモプラズマ浸潤状況および海外種との比較を行うため、北海道釧路管内で捕獲されたエゾシカを用い、PCR 解析を行った。その結果、高率にヘモプラズマ感染が認められ、ヘモプラズマ陽性群のエゾシカは陰性群と比較し年齢が高かった。遺伝子配列の結果から、国内のシカヘモプラズマは海外のシカ由来のものとは別種である可能性が示唆された。

Table 4-2. Prevalence and risk factors of hemoplasma infected deer.

PCR result (n=51)	No. of infected deer (%)	Risk factor		
		Age	Gender	
Screening PCR			Male	Female
Positive	23 (45.1)	3.2±1.5	11	12
Negative	28 (54.9)	2.6±1.4	13	14
<i>P</i> value		0.09 ^a	0.98 ^b	
Sp. -specific PCR				
‘ <i>C. M. haemocervae</i> ’	12 (23.5)			
‘ <i>C. M. erythroceruae</i> ’	17 (33.3)			
Dual infection	6 (11.8)			

^a; Statistical analysis was performed using Mann-Whitney *U* test.

^b; Statistical analysis was performed using Chi-square test.

Table 4-3. Sequence identities (%) among (a) 16S rRNA, (b) 23S rRNA and (c) *rnpB* genes of ‘*Candidatus M. haemocervae*’ (isolate 16) and ‘*Candidatus M. erythroceruae*’ (isolate 49) detected in Hokkaido sika deer. Isolate 16 and 49 are one representative sequence of ‘*Candidatus M. haemocervae*’ and ‘*Candidatus M. erythroceruae*’. Genbank accession numbers of each hemoplasmas detected in the other family *Cervidae* are in parenthesis..

Sample No.	<i>M. ovis</i> -like sp. Deer-Fawn	<i>Mycoplasma</i> sp. B62-2	<i>Mycoplasma</i> sp. B88-3	<i>Mycoplasma</i> sp. Group B	<i>Mycoplasma</i> sp. Group C
(a) 16S rRNA	(FJ824847)	(HQ634379)	(HQ634380)	(KC512403)	(KC512402)
Isolate 16	98.32	95.91	95.10	96.30	95.77
Isolate 49	95.92	97.75	93.58	97.79	97.80
(b) 23S rRNA	(HQ197752)	(HQ634381)	(HQ634382)	NA	NA
Isolate 16	97.61	93.08	90.83	-	-
Isolate 49	92.64	95.70	90.83	-	-
(c) <i>rnpB</i> gene	(JQ610624)*	NA	NA	(JQ610626)	(JQ610628)
Isolate 16	92.73	-	-	92.78	88.89
Isolate 49	92.59	-	-	91.84	92.59

NA ; not available

* ; *Mycoplasma* sp. isolate from White-tailed deer in America (Group A) (50).

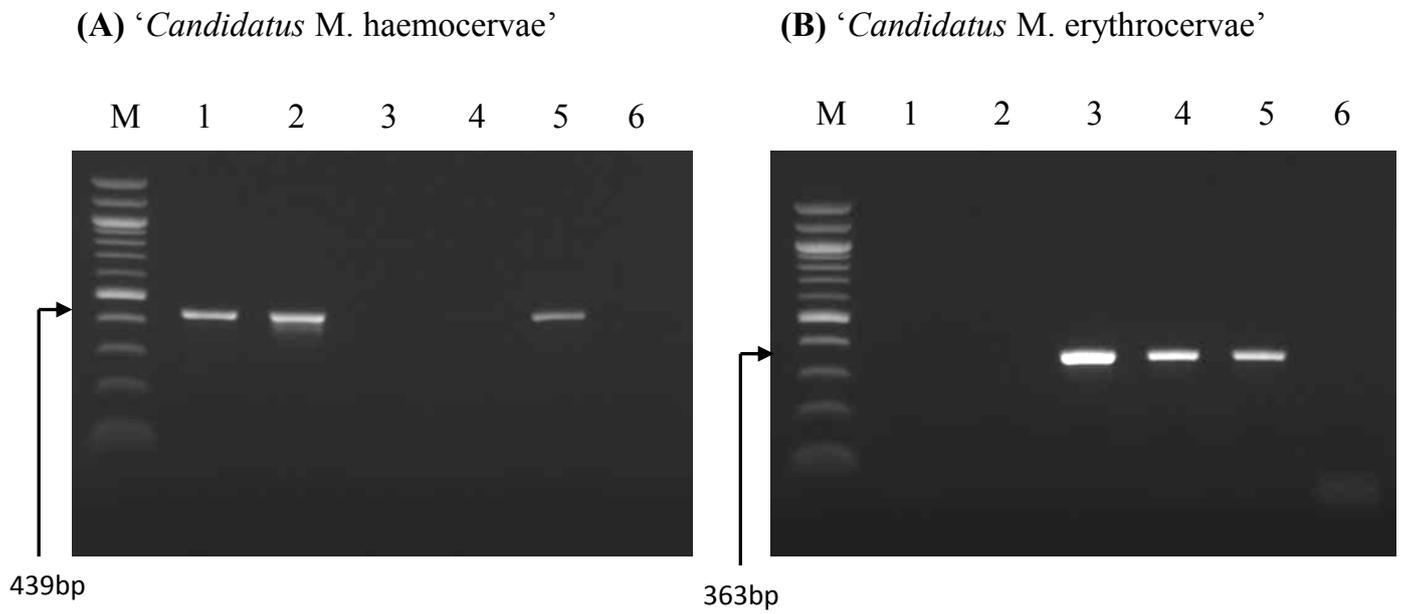


Fig. 4-4. Specificity of the species-specific PCR for (A) '*Candidatus M. haemocervae*' and (B) '*Candidatus M. erythroceruae*'. Lanes 1 and 2: '*Candidatus M. haemocervae*'; lanes 3 and 4: '*Candidatus M. erythroceruae*'; lane 5: dual infection; lane 6: negative control (DW); lane M: molecular size marker (100 bp).

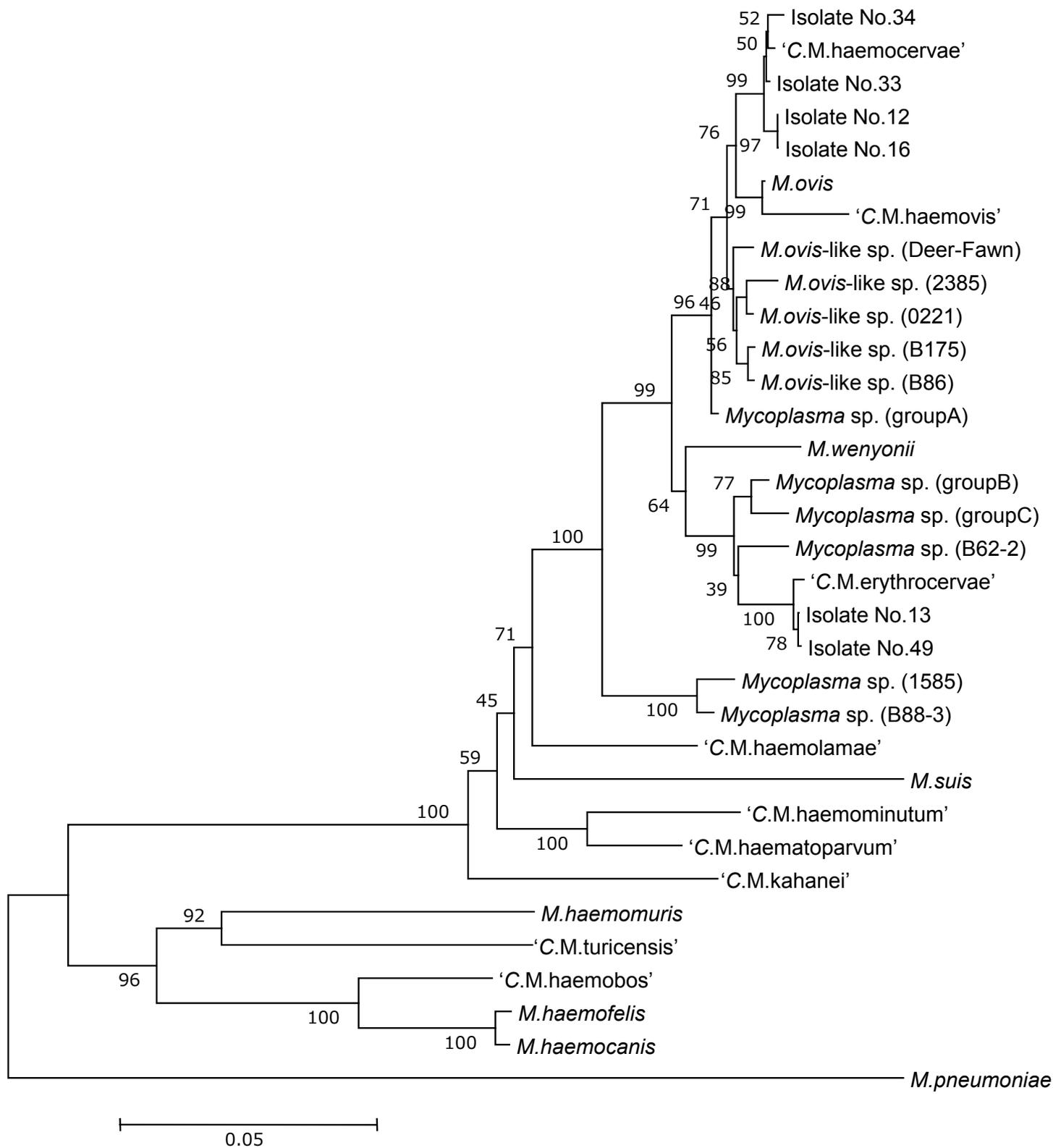


Fig. 4-5. Phylogenetic relationship of deer hemoplasma isolates (Nos. 12, 13, 16, 33, 34 and 49) and the other hemoplasma species based on 16S rRNA gene using a neighbor-joining method. *M. ovis*-like sp. isolates B86, B175, Deer-Fawn, 0221, 2385 (HQ634377; HQ634378; FJ824847; HQ197746; HQ197748), *M. ovis* (JF931135), 'Candidatus *M. haemovis*' (JF931131), 'Candidatus *M. haemocervae*' (AB558899), *M. wenyonii* (AY946266), *Mycoplasma* sp. isolates B62-2, 1585, B88-3, group A, group B, group C (HQ634379, HQ197747, HQ634380, KC512404, KC512403, KC512402), 'Candidatus *M. erythrocervae*' (AB558898), 'Candidatus *M. haemominutum*' (AY150980), 'Candidatus *M. haematoparvum*' (AY383241), *M. haemomuris* (U82963), 'Candidatus *M. turicensis*' (DQ825454), 'Candidatus *M. haemobos*' (EU367965), *M. haemofelis* (U88563), *M. haemocanis* (AY150973), *M. suis* (EU603330), 'Candidatus *M. haemolamae*' (NR074478), 'Candidatus *Mycoplasma kahanei*' (AF338269) are shown. *M. pneumoniae* (M29061) was used as an outgroup.

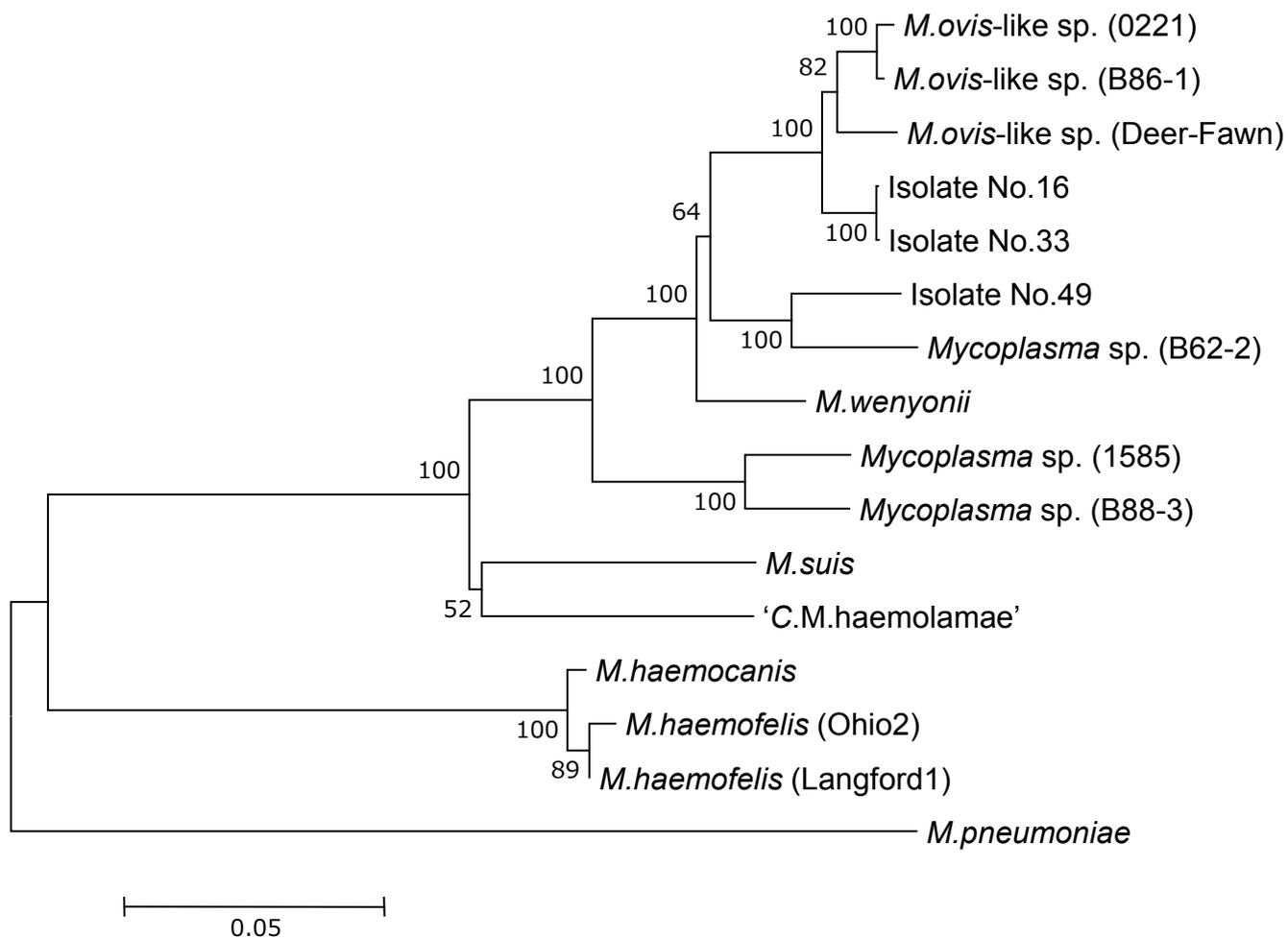


Fig. 4-6. Phylogenetic relationship of deer hemoplasma isolates (Nos. 16, 33 and 49) and the other hemoplasma species based on 23S rRNA gene using a neighbor-joining method. *M. ovis*-like sp. isolates 0221, B86-1, Deer-Fawn (HQ197751; HQ634383; HQ197752), *Mycoplasma* sp. isolates B62-2, 1585, B88-3 (HQ634381; HQ197750; HQ634382), *M. wenyonii* (NR076982), *M. suis* (NC015153), *M. haemocanis* (NR076944), *M. haemofelis* isolates Ohio2, Langford1 (NC017520; NC014970), '*Candidatus Mycoplasma haemolamae*' (NR076983) are shown. *M. pneumoniae* (NR077056) was used as an outgroup.

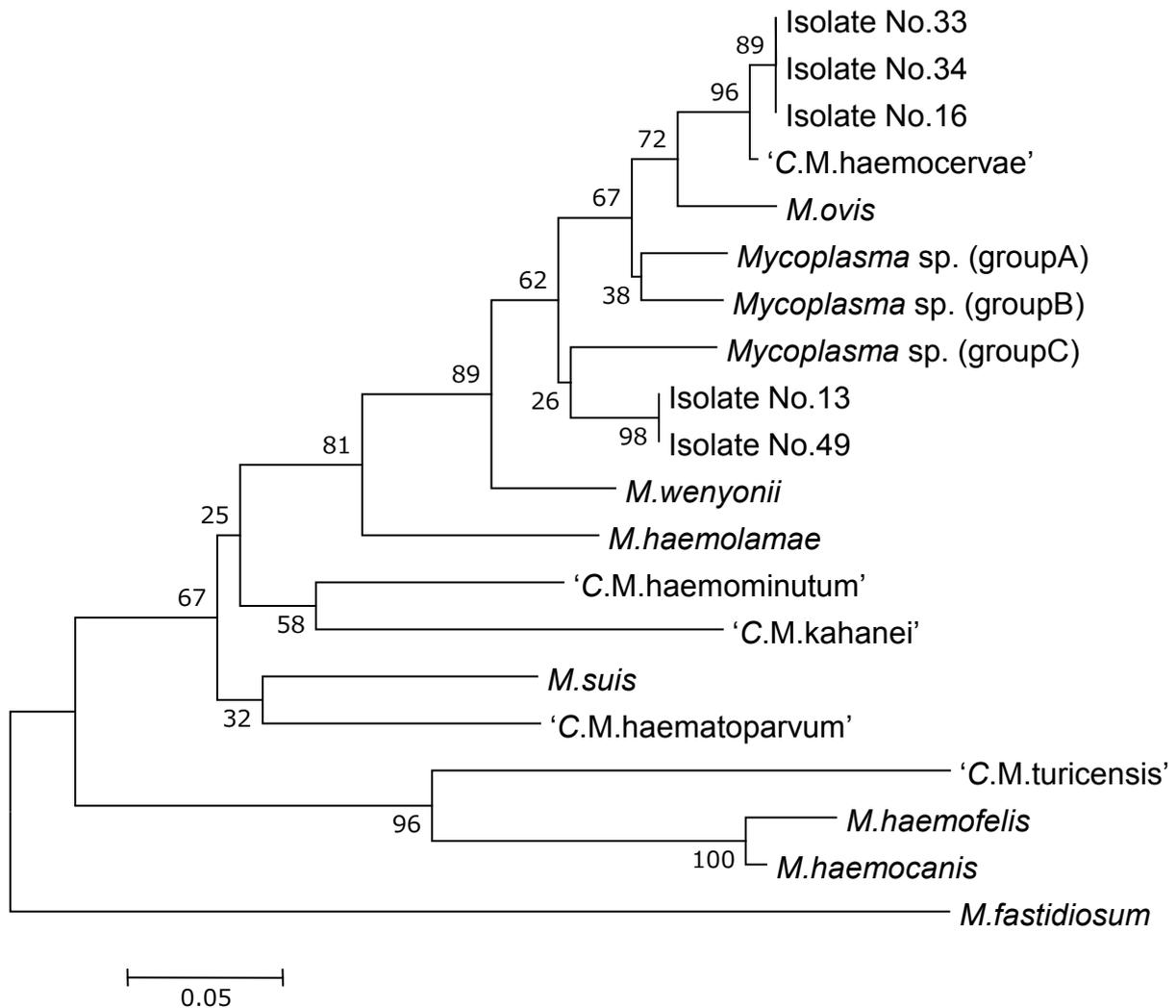


Fig. 4-7. Phylogenetic relationship of deer hemoplasma isolates (Nos. 13, 16, 33, 34 and 49) and the other hemoplasma species based on *rnpB* gene using a neighbor-joining method. 'Candidatus *M. haemocervae*' (AB561882), *Mycoplasma* sp. isolates group A, group B, group C (JQ610624, JQ610626, JQ610618), *M. ovis* (EU078612), *M. wenyonii* (EU078610), *M. haemolamae* (EU078613), 'Candidatus *M. haemominutum*' (EU078614), 'Candidatus *M. haematoparvum*' (EU078616), *M. suis* (EU078611), 'Candidatus *M. turicensis*' (EF212002), *M. haemofelis* (EU078617), *M. haemocanis* (EU078618), 'Candidatus *Mycoplasma kahanei*' (EU078615) are shown. *M. fastidiosum* (EU078609) was used as an outgroup.

総括

ヘモプラズマとは、赤血球表面に寄生するマイコプラズマの総称であり、宿主に溶血性貧血を引き起こす。牛ヘモプラズマ感染症の病原体には *Mycoplasma wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’ の 2 種が知られているが、それらの病原性とその増悪因子、感染のリスク要因や生産性に与える影響、発症例における臨床病理学的所見は不明である。また、牛以外の家畜動物である羊や、同じ偶蹄類の中で、家畜と密接な生息環境を有する野生動物であるエゾシカのヘモプラズマ感染種とその浸潤状況は不明な点が多い。

そこで本研究では、ヘモプラズマ病原体の牛における感染のリスク要因とその病原性、他の血液感染疾患と混合感染した際の相互関係、生産性に与える影響を明らかにし、また、他の偶蹄類として家畜である羊と野生動物であるエゾシカを取り上げ、それらにおけるヘモプラズマ病原体の浸潤状況および系統学的位置付けを明らかにすることで、ヘモプラズマ病原体の疫学的役割を解明することを目的とした。

第 1 章では、全血を用いた direct PCR 法による牛ヘモプラズマ検出感度を、standard PCR 法と比較し、北海道釧路管内に飼養される牛末梢血液 49 検体および牛ヘモプラズマ遺伝子をクローニングした recombinant DNA plasmid を用い検出感度の比較を行った。その結果、49 検体を用いた検討では standard PCR が 49 検体中 33 検体 (67.3%) 陽性、direct PCR が 35 検体 (71.4%) 陽性であり、recombinant DNA plasmid を用いた検討では standard および direct PCR の検出限界はそれぞれ 52 copy/PCR および 5 copy/PCR であった。direct PCR の陽性検体をシーケンス解析したところ、牛ヘモプラズマ遺伝子 (*M. wenyonii* および ‘*Candidatus M. haemobos*’) と一致した。Direct PCR は standard PCR と比較し、高感度であり、作業時間、コストを削減できることから、疫学調査に応用可能であると思われた。

第2章では、第1章でその有用性を確認した direct PCR 法を用い、道東の1放牧地および3農場に飼養される牛を対象としたリスクファクター解析を行った。その結果、牛ヘモプラズマ感染は飼養地域により陽性率が異なり、農場飼育および1～3歳において高率にヘモプラズマ感染が確認された。今回用いた放牧牛の検体は入牧直後のものであり、退牧直後の1-3歳で高率にヘモプラズマ感染が認められたことから、放牧が感染拡大に関与し、農場における高密度の飼養がその後の高い陽性率の維持に影響しており、さらに、初産に伴うストレスが1-3歳のヘモプラズマ感染に影響したものと思われた。また、BLV感染はヘモプラズマ感染と関連していなかった。ヘモプラズマ感染牛は有意に低いRBC、HB、PCVと高いMCVを有しており、混合感染時の病原性は、‘*Candidatus M. haemobos*’陽性群と同等もしくはやや弱いものと思われた。

さらに、ヘモプラズマと同様、放牧地において代表的な血液感染病原体である小型ピロプラズマとの混合感染時の影響を評価したところ、小型ピロプラズマおよびヘモプラズマの単独感染と比較し、混合感染が起きにくく、混合感染時には小型ピロプラズマの寄生度が低下し、病原性も弱まることから、野外の放牧牛において両病原体の間に“干渉現象”が存在することが示唆された。

第3章では、ヘモプラズマ感染が乳牛の生産性に与える影響を明らかにするため、分娩牛およびその産子を用いてその乳量、子牛体重、血液性状などを比較検討した。その結果、ヘモプラズマ陽性群の乳量は、陰性群と比較し有意に低下しており、さらに病原性が強いとされる‘*Candidatus M. haemobos*’陽性群と混合感染群はより長期間に渡って乳量が低下していた。また、ヘモプラズマ陽性牛から産まれた子牛の体重は、陰性群のものと比較し、低下していた。慢性感染期においてもヘモプラズマは牛の生産性に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、ヘモプラズマ陽性牛の血液性状に異常は認められず、乳量低下などの詳細な機序は不明であった。

次に、子牛におけるヘモプラズマの影響を評価するため、発症例を用いて検討を行っ

た。PCV の変動とヘモプラズマコピー数に相関がみられたことから、症例の貧血はヘモプラズマによって引き起こされたものと思われた。症例は、虚弱子牛症候群に伴う免疫能低下によってヘモプラズマを発症した稀な一例であり、持続する貧血が症例の発育不良の増悪に関与した可能性が考えられた。

第4章では、貧血を発症した羊から、‘*Candidatus M. haemovis*’ および *M. ovis*、2種のヘモプラズマが検出された。発症は、伝染性膿疱性皮膚炎および2種のヘモプラズマの混合感染に起因したものと思われた。さらに、疫学調査において症例の飼養されていた農場およびその近隣農場においてもヘモプラズマ感染が確認された。また、エゾシカにおけるヘモプラズマ浸潤状況および海外種との比較を行うため、北海道釧路管内で捕獲されたエゾシカ 51 頭を用い、PCR 解析を行った。その結果、45.1%にヘモプラズマ感染が認められ、年齢が感染のリスク要因になりえる可能性が示唆された。また、遺伝子解析の結果から、国内のシカヘモプラズマは海外のシカ由来のものとは別種である可能性が示唆された。

以上、本研究において牛ヘモプラズマ病原体の感染のリスクファクターとその病原性、他の感染症との相互作用が明らかとなり、さらに生産性に対し負の影響を与えている可能性が示唆された。また、羊におけるヘモプラズマ感染症の病原性とその浸潤状況が明らかとなった。北海道において、牛、羊と生活圏の近接する野生動物であるエゾシカに高率にヘモプラズマが浸潤していたが、その感染種が他の家畜に伝播する可能性は低いと思われた。牛およびその他の偶蹄類におけるヘモプラズマ感染症の疫学的役割が明らかとなった。今後、ヘモプラズマ病原体の重要性を認識し、本病原体の感染様式、感染時における病態や免疫動態に加え、慢性感染期の試験的治療による生産性向上の評価など更なる検討が必要と思われた。見落とされがちなヘモプラズマ感染症ではあるが、生産現場においてその影響を考慮し、生産性の向上に繋げていくことが重要であると思われた。

謝辞

本稿を終えるにあたり、帯広畜産大学臨床獣医学研究部門予防獣医療学分野の猪熊壽教授、並びに診断治療学分野の松本高太郎講師には、終始懇切なるご指導を賜りましたことを、心より御礼申し上げます。

学位論文審査にあたり、主査をお引き受けいただき、ご指導を賜りました帯広畜産大学原虫病研究センター高度診断学分野の横山直明教授、副査である岩手大学農学部生産獣医療学研究室の佐藤繁教授、東京農工大学農学部共同獣医学科農学研究院動物生命科学部門の竹原一明教授、岐阜大学応用生物科学部獣医学過程獣医寄生虫病学教室の鬼頭克也教授に深謝致します。なお、横山直明教授、鬼頭克也教授には、第一及び第二副指導教員として懇切丁寧なご指導を賜りましたことを、改めて深謝致します。

血液採取、血液塗抹標本作成など多大なご協力を賜りました釧路地区農業共済組合標茶家畜診療所の前野和利先生、松井伸一先生、実験計画の了解、ご助言を賜りました帯広畜産大学臨床獣医学研究部門予防獣医療学分野の石井三都夫准教授、並びに滄木孝弘助教、ゆうべつ牛群管理サービスの山川和宏先生、血液サンプルの採取、データの情報提供にご協力頂いた帯広畜産大学大動物特殊疾病センター大動物巡回臨床分野の学生諸君、貴重な症例を紹介頂きました十勝農業共済組合浦幌家畜診療所の下タ村圭一先生、及び症例の病理検索を行って頂いた帯広畜産大学基礎獣医学研究部門病態予防学分野の古林与志安教授、岐阜大学大学院連合獣医学研究科 3 年の千葉史織先生並びに病態予防学分野の学生諸君、羊の臨床データを提供して頂いた北海道日高家畜保健衛生所の今野泰博先生、北海道空知家畜保健衛生所の山本慎二先生には、この場を借りて御礼申し上げます。

また、本研究においてサンプルの DNA 抽出や解析補助、実験手技などご指導、ご尽力を賜りました帯広畜産大学原虫病研究センターの山本宏子様、帯広畜産大学臨床獣医

学研究部門の富川明子様、同卒業生で現いぶり農業共済組合の竹内俊彦先生、現香川県農業共済組合の藤澤哲郎先生、Visayas State University、Assistant Professor の Adrian Patalinghug Ybañez 先生に深謝致します。

最後に、本研究を行うに当たり様々なご助言、ご協力を賜りました帯広畜産大学臨床獣医学研究部門内科学研究室の卒業生、学生諸君と、精神的、経済的に支えて頂いた家族に深く感謝し、本論文の謝辞とさせていただきます。

文献

1. Adékambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D., Drancourt, M. (2008). Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 1807-1814.
2. Adler, S., Ellenbogen, V. (1934). A note on two new blood parasites of cattle, *Eperythrozoon* and *Bartonella*. *J. Comp. Pathol. Ther.* 47, 219-221.
3. Alhassan, A., Iseki, H., Kim, C., Yokoyama, N., Igarashi, I. (2007). Comparison of polymerase chain reaction methods for the detection of *Theileria equi* infection using whole blood compared with pre-extracted DNA samples as PCR templates. *Trop. Anim. Health. Prod.* 39, 369-374.
4. AlShahni, M. M., Makimura, K., Yamada, T., Satoh, K., Ishihara, Y., Takatori, K., Sawada, T. (2009). Direct colony PCR of several medically important fungi using Ampdirect Plus. *Jpn. J. Infect. Dis.* 62, 164-167.
5. Al-Soud, W. A., Radstrom, P. (2001). Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39, 485-493.
6. Ayling, R. D., Bisgaard-Frantzen, S., Adler, A., Blowey, R. W., Barlow, A. M., Millar, M. F., van der Burgt, G. M. (2012). Detection of '*Candidatus Mycoplasma haemobos*', *Mycoplasma wenyonii* and *Anaplasma phagocytophilum* from cattle in England. *Vet. Rec.* 170, 543.
7. Bath, D. L., Dickinson, F. N., Tucker, H. A. and Appleman, R. D. (1978). *Dairy Cattle: Principles, Practices, Problems, Profits*, 2nd ed., Lea & Febiger, Philadelphia.
8. Boes, K. M., Goncarovs, K. O., Thompson, C. A., Halik, L. A., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., Feutz, M. M., Holman, P. J., Vemulapalli, R., Messick, J. B. (2012). Identification of a *Mycoplasma ovis*-like organism in a herd of farmed white-tailed deer (*Odocoileus*

- virginianus*) in rural Indiana. *Vet. Clin. Pathol.* 41, 77-83.
9. Brinson, J. J., Messick, J. B. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay for detection of *Haemobartonella canis* in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1943-1945.
 10. Brocklesby, D. W. (1970). *Haemobartonella bovis* detected in the blood of British cattle. *Vet Rec.* 87, 761.
 11. Burekhardt, J. (1994). Amplification of DNA from whole blood. *Genome Res.* 3, 239-243.
 12. Campbell, R. W., Sloan, C. A., Harbutt, P. R. (1971). Observation on mortality in lambs in Victoria associated with *Eperythrozoon ovis*. *Aust. Vet. J.* 47, 538-541.
 13. Compton, S. M., Maggi, R. G., Breitschwerdt, E. B. (2012). *Candidatus* *Mycoplasma haematoparvum* and *Mycoplasma haemocanis* infections in dogs from the United States. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 557-562.
 14. Daddow, K. N. (1980). *Culex annulirostris* as a vector of *Eperythrozoon ovis* infection in sheep. *Vet. Parasitol.* 7, 313-317.
 15. Foley, J. E., Harrus, S., Poland, A., Chomel, B., Pedersen, N. C. (1998). Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1581-1588.
 16. Foote, L. E., Levy, H. E., Torbert, B. J., Oglesby, W. T. (1957). Interference between anaplasmosis and eperythrozoonosis in splenectomized cattle. *Am. J. Vet. Res.* 18, 556-559.
 17. Fujihara, Y., Sasaoka, F., Suzuki, J., Watanabe, Y., Fujihara, M., Ooshita, K., Ano, H., Harasawa, R. (2011). Prevalence of hemoplasma infection among cattle in the western part of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1653-1655.
 18. Gale, K. R., Leatch, G., Dimmock, C. M., Gartside, M. G. (1997). Increased resistance to *Anaplasma marginale* infection in cattle chronically infected with *Theileria buffeli* (syn. *T. orientalis*). *Vet. Parasitol.* 69, 187-196.

19. Genova, S. G., Streeter, R. N., Velguth, K. E., Snider, T. A., Kocan, K. M., Simpson, K. M. (2011). Severe anemia associated with *Mycoplasma wenyonii* infection in a mature cow. *Can. Vet. J.* 52, 1081-1021.
20. Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M. E., Willi, B., Bacci, M. L., Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *J. Feline Med. Surg.* 11, 277-285.
21. George, J. W., Rideout, B. A., Griffey, S. M., Pedersen, N. C. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1172-1178.
22. Giroto, A., Zangirólamo, A. F., Bogado, A. L., Souza, A. S., da Silva, G. C., Garcia, J. L., Vilas Boas, L. A., Biondo, A. W., Vidotto, O. (2012). Molecular detection and occurrence of 'Candidatus *Mycoplasma haemobos*' in dairy cattle of Southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 342-344.
23. Grazziotin, A. L., Duarte, J. M., Szabó, M. P., Santos, A. P., Guimarães, A. M., Mohamed, A., Vieira, R. F., de Barros Filho, I. R., Biondo, A. W., Messick, J. B. (2011). Prevalence and molecular characterization of *Mycoplasma ovis* in selected free-ranging Brazilian deer populations. *J. Wildl. Dis.* 47, 1005-1011.
24. Grazziotin, A. L., Santos, A. P., Guimaraes, A. M., Mohamed, A., Cubas, Z. S., de Oliveira, M. J., dos Santos, L. C., de Moraes, W., Vieira, R. F., Donatti, L., de Barros Filho, I. R., Biondo, A. W., Messick, J. B., (2011). *Mycoplasma ovis* in captive cervids: prevalence, molecular characterization and phylogeny. *Vet. Microbiol.* 152, 415-419.
25. Grindem, C. B., Corbett, W. T., Tomkins, M. T. (1990). Risk factors for *Haemobartonella felis* infection in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 96-99.
26. Gubbels, M. J., Hong, Y., van der Weide, M., Qi, B., Nijman, I. J., Guangyuan, L., Jongejan,

- F. (2000). Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. *Int. J. Parasitol.* 30, 943-952.
27. Gulland, F. M., Doxey, D. L., Scott, G. R. (1987). The effects of *Eperythrozoon ovis* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 43, 85-87.
28. Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M., Baneth, G. (2002). Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet. Rec.* 151, 82-85.
29. Heinritzi, K. (1990). The diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection. *Tierarztl. Plax.* 18, 477-481.
30. Henry, S. C. (1979). Clinical observations on eperythrozoonosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 174, 601-603.
31. Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Ohta, T., Obayashi, T., Hirose, K., Ito, N., Yokota, H., Tamura, Y., Nagahata, H. (2010). A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 12, 191-193.
32. Hoelzle, K., Hofmann-Lehmann, R., Hoelzle, L. E. (2010). 'Candidatus Mycoplasma haemobos', a new bovine haemotrophic *Mycoplasma* species? *Vet. Microbiol.* 144, 525-526.
33. Hoelzle, K., Winkler, M., Kramer, M. M., Wittenbrink, M. M., Dieckmann, S. M., Hoelzle, L. E. (2010). Detection of *Candidatus Mycoplasma haemobos* in cattle with anaemia. *Vet. J.* 187, 408-410.
34. Hoelzle, L. E. (2008). Haemotrophic mycoplasmas: recent advances in *Mycoplasma suis*. *Vet. Microbiol.* 130, 215-226.
35. Hornok, S., Hofmann-Lehmann, R., de Mera, I. G., Meli, M. L., Elek, V., Hajtós, I., Répási, A., Gönczi, E., Tánzos, B., Farkas, R., Lutz, H., de la Fuente, J. (2010). Survey on blood-sucking lice (Phthiraptera: Anoplura) of ruminants and pigs with molecular detection

- of *Anaplasma* and *Rickettsia* spp. Vet. Parasitol., 174, 335-338.
36. Hornok, S., Meli, M. L., Erdos, A., Hajtós, I., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2009). Molecular characterization of two different strains of haemotropic mycoplasmas from a sheep flock with fatal haemolytic anaemia and concomitant *Anaplasma ovis* infection. Vet. Microbiol. 136, 372-377.
37. Hornok, S., Meli, M. L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2010). Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. Vet. Microbiol. 140, 98-104.
38. Hornok, S., Micsutka, A., Fernández de Mera, I. G., Meli, M. L., Gönczi, E., Tánzos, B., Mangold, A. J., Farkas, R., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R., de la Fuente, J. (2012). Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. Res. Vet. Sci. 92, 30-35.
39. Hornok, S., Micsutka, A., Meli, M. L., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2011). Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. Vet. Microbiol. 152, 411-414.
40. Howard, G. W. (1975). The experimental transmission of *Eperythrozoon ovis* by mosquitoes. Parasitology 71, 33.
41. Hoyte, H. M. D. (1962) *Eperythrozoon teganodes* sp. nov. (Rickettsiales), parasitic in cattle. Parasitology 52, 527-532.
42. Inoue, E., Matsumura, K., Maekawa, K., Nagatsuka, K., Nobuta, M., Hirata, M., Minagawa, A., Osawa, Y., Okazaki, K. (2011). Genetic heterogeneity among bovine leukemia viruses in Japan and their relationship to leukemogenicity. Arch. Virol. 156, 1137-1141.
43. Ishihara, T. (1962). Eperythrozoonosis in cattle in Japan. Nat. Inst. Anim. Hlth Quart. 2,

21-30.

44. Jensen, W. A., Lappin, M. R., Kamkar, S., Reagen, W. J. (2001). Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of *Haemobartonella felis* in naturally infected cats. *Am. J. Vet. Res.* 62, 604-608.
45. Kenny, M. J., Shaw, S. E., Beugnet, F., Tasker, S. (2004). Demonstration of two distinct hemotropic mycoplasmas in French dogs. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5397-5399.
46. Kitagawa, H., Kitoh, K., Ito, T., Ohba, Y., Nishii, N., Katoh, K., Obara, Y., Motoi, Y., Sasaki, Y. (2001). Serum growth hormone and insulin-like growth factor-1 concentrations in Japanese black cattle with growth retardation. *J. Vet. Med. Sci.* 63, 167-170.
47. Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Hayama, Y., Kameyama, K., Konishi, M., Murakami, K. (2010). Risk factors associated with within-herd transmission of bovine leukemia virus on dairy farms in Japan. *BMC Vet. Res.* 6, 1.
48. Lindh, J. M., Terenius, O., Faye, I. (2005). 16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7217-7223.
49. Macieira, D. B., de Menezes, R. de C., Damico, C. B., Almosny, N. R., McLane, H. L., Daggy, J. K., Messick, J. B. (2007). Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro--Brazil. *J. Feline Med. Surg.* 10, 120-129.
50. Maggi, R. G., Chitwood, M. C., Kennedy-Stoskopf, S., DePerno, C. S. (2013). Novel hemotropic *Mycoplasma* species in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* (in press)
51. Martin, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., Gómez-Lucía, E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the

- detection of bovine leukaemia virus. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 48, 97-106.
52. McAuliffe, L., Lawes, J., Bell, S., Barlow, A., Ayling, R., Nicholas, R. (2006). The detection of *Mycoplasma* (formerly *Eperythrozoon*) *wenyonii* by 16S rRNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Vet. Microbiol. 117, 292-296.
53. McCusker, J., Dawson, M. T., Noone, D., Gannon, F., Smith, T. (1992). Improved method for direct PCR amplification from whole blood. Nucleic Acids Res. 20, 6747.
54. Messick, J. B. (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin. Pathol. 33, 2-13.
55. Montes, A. J., Wolfe, D. F., Welles, E. G., Tyler, J. W., Tepe, E. (1994). Infertility associated with *Eperythrozoon wenyonii* infection in a bull. J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 261-263.
56. Neimark, H., Hoff, B., Ganter, M. (2004). *Mycoplasma ovis* comb. nov. (formerly *Eperythrozoon ovis*), an eperythrocytic agent of haemolytic anaemia in sheep and goats. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 365-371.
57. Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 891-899.
58. Neitz, W. O., Alexander, R. A., Du Toit, P. J. (1934). *Eperythrozoon ovis* (sp. nov) infection in sheep. Onderstepoort J. Vet. Sci. 3, 263-271.
59. Novacco, M., Meli, M. L., Gentilini, F., Marsilio, F., Ceci, C., Pennisi, M. G., Lombardo, G., Lloret, A., Santos, L., Carrapiço, T., Willi, B., Wolf, G., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2010). Prevalence and geographical distribution of canine hemotropic mycoplasma

- infections in Mediterranean countries and analysis of risk factors for infection. *Vet. Microbiol.* 142, 276-284.
60. Ohtake, Y., Nishizawa, I., Sato, M., Watanabe, Y., Nishimura, T., Matsubara, K., Nagai, K., Harasawa, R. (2011). *Mycoplasma ovis* detected in free-living Japanese serows, *Capricornis crispus*. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 371-373.
61. 大塚浩通, 吉敷芙友子, 安藤貴朗, 向井真知子, 小比類卷正幸, 田波絵里香. (2011). 哺乳期におけるホルスタイン種子牛の発育と内分泌および免疫状態との関係. *日本獣医師会雑誌*, 64, 294-299.
62. Ohtsuka, H., Fukunaga, N., Hara, H., Fukuda, S., Hayashi, T., Hoshi, F., Yoshino, T. O., Koiwa, M., Kawamura, S. (2003). Changes in peripheral leukocyte populations of weak calf syndrome of Japanese black calves. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 793-796.
63. Ota, N., Mizuno, D., Kuboki, N., Igarashi, I., Nakamura, Y., Yamashina, H., Hanzaike, T., Fujii, K., Onoe, S., Hata, H., Kondo, S., Matsui, S., Koga, M., Matsumoto, K., Inokuma, H., Yokoyama, N. (2009). Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 937-944.
64. Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S. M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K., Pei, Z. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3886-3897.
65. Pei, A., Nossa, C. W., Chokshi, P., Blaser, M. J., Yang, L., Rosmarin, D. M., Pei, Z. (2009). Diversity of 23S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *PLoS One.* 4(5), e5437.
66. Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., Hoelzle, L. E., Willi, B., Meli, M., Hofmann-Lehmann, R., Tasker, S. (2008).

- RNase P RNA gene (*rnpB*) phylogeny of Hemoplasmas and other *Mycoplasma* species. J. Clin. Microbiol. 46, 1873-1877.
67. Philbey, A. W., Barron, R. C. J., Gounden, A. (2006). Chronic eperythrozoonosis in an adult ewe. Vet. Rec. 158, 662-664.
68. Purnell, R. E., Brocklesby, D. W., Young, E. R. (1976). *Eperythrozoon wenyoni*, a possible cause of anaemia in British cattle. Vet. Rec. 15, 411.
69. Quinlan, J. F. (1985). Suspected eperythrozoonosis in dairy cows (letter). Ir. Vet. J. 39, 27.
70. Raynaud, J. P. (1962). Splénectomie des bovines et parasites sanguins. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 37, 755-766.
71. Reed, V. I. (1981). Enzootic bovine leukosis. Can. Vet. J. 22, 95-102.
72. Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M. D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., Francino, O., Shaw, S. E., Tasker, S. (2010). Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 270-274.
73. Roy, J. H. B. (1990). The Calf, Management of Health, 5th ed., Butterworths, London.
74. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.
75. Schreiner, S. A., Hoelzle, K., Hofmann-Lehmann, R., Hamburger, A., Wittenbrink, M. M., Kramer, M. M., Sokoli, A., Felder, K. M., Groebel, K., Hoelzle, L. E. (2012). Nanotransformation of the haemotrophic *Mycoplasma suis* during *in vitro* cultivation attempts using modified cell free *Mycoplasma* media. Vet. Microbiol. 160, 227-232.
76. Seneviratna, P., Weerasinghe, N., Ariyadasa, S. (1973). Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Res. Vet. Sci. 14, 112-114.
77. Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S., Nakamura, I. (2003). Oxidative damage and phosphatidylserine expression of red blood cells in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*. Parasitol. Res. 89, 228-234.

78. Shiono, H., Yagi, Y., Kumar, A., Yamanaka, M., Chikayama, Y. (2004). Accelerated binding of autoantibody to red blood cells with increasing anaemia in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 51, 39-42.
79. Smith, J. A., Thrall, M. A., Smith, J. L., Salman, M. D., Ching, S. V., Collons, J. K. (1990). *Eperythrozoon wenyonii* infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 1244-1250.
80. Stoffregen, W. C., Alt, D. P., Palmer, M. V., Olsen, S. C., Waters, W. R., Stasko, J. A. (2006). Identification of a haemomycoplasma species in anemic reindeer (*Rangifer tarandus*). *J. Wildl. Dis.* 42, 249-258.
81. Sutton, R. H., Charleston, W. A. G. and Collins, G. H. (1977). *Eperythrozoon wenyonii* – a blood parasite of cattle. A first report in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 25, 8-9.
82. Su, Q. L., Song, H. Q., Lin, R. Q., Yuan, Z. G., Yang, J. F., Zhao, G. H., Huang, W. Y., Zhu, X. Q. (2010). The detection of ‘‘*Candidatus Mycoplasma haemobos*’’ in cattle and buffalo in China. *Trop. Anim. Health Prod.* 42: 1805-1808.
83. Suzuki, J., Sasaoka, F., Fujihara, M., Watanabe, Y., Tasaki, T., Oda, S., Kobayashi, S., Sato, R., Nagai, K., Harasawa, R. (2011). Molecular identification of '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in sheep with hemolytic anemia. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1113-1115.
84. Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L., Fry, M. M. (2005). '*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 27-30.
85. Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., Leutenegger, C. M. (2007). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *J. Vet. Intern. Med.* 21, 685-693.
86. Sykes, J. E., Terry, J. C., Lindsay, L. L., Owens, S. D. (2008). Prevalences of various hemoplasma species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. *J. Am.*

- Vet. Med. Assoc. 232, 372-379.
87. Takasu, M., Shirota, K., Ohba, Y., Nishii, N., Murase, T., Miyazawa, K., Kitagawa, H. (2008). Thymic hypoplasia in Japanese black calves with stillbirth/perinatal weak calf syndrome. J. Vet. Med. Sci. 70, 1173-1177.
88. Tagawa, M., Matsumoto, K., Inokuma, H. (2008). Molecular detection of *Mycoplasma wenyonii* and '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' in cattle in Hokkaido, Japan. Vet. Microbiol. 132, 177-180.
89. Tagawa, M., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H. (2010). Comparison of the effect of two hemoplasma species on hematological parameters in cattle. J. Vet. Med. Sci. 72, 113-115.
90. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739.
91. Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., Itamoto, K., Okuda, M., Inokuma, H. (2005). Detection of DNA of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. J. Vet. Med. Sci. 67, 1277-1279.
92. Tasker, S., Lappin, M. R. (2002). *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. J. Feline Med. Sci. 4, 3-11.
93. Tasker, S., Peters, I. R., Pappasouliotis, K., Cue, S. M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., Knowles, T. G., Day, M. J., Helps, C. R. (2009). Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. Vet. Microbiol. 139, 323-332.
94. Uilenberg, G. (2009). *Candidatus Mycoplasma haemobos*. Vet. Microbiol. 138, 200-201.

95. Uilenberg, G. (1967). *Eperythrozoon tuomii*, n.sp. (Rickettsiales), the 3rd species of *Eperythrozoon* of cattle in Madagascar. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 20, 563-569.
96. Volokhov, D. V., Simonyan, V., Davidson, M. K., Chizhikov, V. E. (2012). RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular markers in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family *Mycoplasmataceae*. Mol. Phylogenet. Evol. 62, 515-528.
97. Warman, S. M., Helps, C. R., Barker, E. N., Day, S., Sturgess, K., Day, M. J., Tasker, S. (2010). Haemoplasma infection is not a common cause of canine immune-mediated haemolytic anaemia in the UK. J. Small Anim. Pract. 51, 534-539.
98. 渡辺征, 久末正晴, 相馬武久, 並河和彦, 池原秀壺, 土屋亮, 山田隆紹. (2007). 血液サンプルからの直接 PCR 法による犬バベシア感染診断の検討. 動物臨床医学 16, 87-91.
99. 渡辺征, 久末正晴, 相馬武久, 並河和彦, 瀬川和仁, 根尾櫻子, 土屋亮 (2011). 日本の飼い猫における新規なヘモプラズマ, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ 感染の検出. 日本獣医師会雑誌 64, 150-153.
100. Watanabe Y, Fujihara M, Obara H, Matsubara K, Yamauchi K, Harasawa R. (2010). Novel hemoplasma species detected in free-ranging sika deer (*Cervus nippon*). J. Vet. Med. Sci. 72, 1527-1530.
101. Watanabe, M., Hisasue, M., Souma, T., Ohshiro, S., Yamada, T., Tsuchiya, R. (2008). Molecular detection of *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ infection in cats by direct PCR using whole blood without DNA extraction. J. Vet. Med. Sci. 70, 1095-1099.
102. Weisburg, W. G., Burns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA

- amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173, 697-703.
103. Wengi, N., Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Riond, B., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2008). Real-time PCR-based prevalence study, infection follow-up and molecular characterization of canine hemotropic mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 126, 132-141.
104. Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2007). Real-time PCR investigation of potential vectors, reservoirs, and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3798-3802.
105. Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2006). Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 44, 961-969.
106. Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M. L., Reusch, C., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2005). Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2581-2585.
107. Willi, B., Tasker, S., Boretti, F. S., Doherr, M. G., Cattori, V., Meli, M. L., Lobetti, R. G., Malik, R., Reusch, C. E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. (2006). Phylogenetic analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4430-4435.
108. Wu, J., Yu, J., Song, C., Sun, S. and Wang, Z. (2006). Porcine eperythrozoonosis in China. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 280-285.

109. Yamaguchi, T., Yamanaka, M., Ikehara, S., Kida, K., Kuboki, N., Mizuno, D., Yokoyama, N., Narimatsu, H., Ikehara, Y. (2010). Generation of IFN-gamma-producing cells that recognize the major piroplasm surface protein in *Theileria orientalis*-infected bovines. *Vet. Parasitol.* 171, 207-215.
110. Ybañez, A. P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Inokuma, H. (2012). Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. *Vet. Microbiol.* 157, 232-236.
111. Yokoyama, N., Sivakumar, T., Ota, N., Igarashi, I., Nakamura, Y., Yamashina, H., Matsui, S., Fukumoto, N., Hata, H., Kondo, S., Oshiro, M., Zakimi, S., Kuroda, Y., Kojima, N., Matsumoto, K., Inokuma, H. (2012). Genetic diversity of *Theileria orientalis* in tick vectors detected in Hokkaido and Okinawa, Japan. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1669-1675.
112. Zachary, J. F., Smith, A. R. (1985). Experimental porcine eperythrozoonosis: T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. *Am. J. Vet. Res.* 46, 821-830.
113. Zinn, G. M., Jesse, G. W., Dobson, A. W. (1983). Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 369-371.