

氏名(本国籍)	田 川 道 人 (北海道)			
主指導教員名	帯広畜産大学 教授 横 山 直 明			
学位の種類	博士(獣医学)			
学位記番号	獣医博甲第421号			
学位授与年月日	平成26年3月13日			
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当			
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻			
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学			
学位論文題目	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			
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授	猪 熊 壽
	副査	帯広畜産大学	教授	横 山 直 明
	副査	岩手大学	教授	佐 藤 繁
	副査	東京農工大学	教授	竹 原 一 明
	副査	岐阜大学	教授	鬼 頭 克 也

学位論文の内容の要旨

ヘモプラズマは赤血球寄生マイコプラズマの総称であり、宿主に貧血、発熱、食欲不振などを引き起こす。牛では *Mycoplasma wenyonii* (Mw) および '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' (CMh) の2種が知られているが、感染種は宿主動物によって異なる。これら牛ヘモプラズマ2種の混合感染時における病原性や感染のリスク要因、牛白血病ウイルスや小型ピロプラズマ症など他の感染症とヘモプラズマが混合感染した際の病原性の相互作用、あるいはヘモプラズマ感染が牛の生産性に及ぼす影響、ヘモプラズマ感染症発症例における臨床病理学的所見等は不明である。また、羊や、野生偶蹄類であるエゾシカのヘモプラズマ感染種やその浸潤状況は不明な点が多い。そこで本研究では、牛ヘモプラズマ感染のリスク要因と牛の生産性に与える影響を明らかにし、また、羊とエゾシカ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、牛およびその他偶蹄類におけるヘモプラズマ感染症の疫学的性状を解明することを目的とした。

まず、第1章では、全血を用いた direct PCR 法による簡易迅速牛ヘモプラズマ検出法を開発した。牛末梢血液 49 検体およびプラスミド DNA を用いて direct PCR 法と従来の standard PCR 法と比較したところ、standard PCR では 33 検体、direct PCR では 35 検体が陽性であり、検出限界はそれぞれ 52 コピーおよび 5 コピーであった。さらに direct PCR は standard PCR と比較し、作業時間、コストを大幅に削減でき、疫学調査に応用可能であると思われた。以降の研究はこの direct PCR 法を用いて実施した。

次に、第2章では、北海道道東地区の1放牧地および3農場に飼養される牛343頭を対象としてヘモプラズマ感染のリスク要因解析を行った。その結果、農場飼育および1-3才において高率に感染が確認された。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ており、さらに、初産に伴うストレスが1-3才のヘモプラズマ感染に影響したものと思われる。また、牛白血病ウイルス感染はヘモプラズマ感染のリスク要因ではなかった。MwとCMhの混合感染の病原性は、CMh単独感染群と同等もしくはやや弱いものと思われる。さらに、牛ヘモプラズマと小型ピロプラズマの混合感染の影響を評価したところ、それぞれの単独感染と比較して混合感染が起きにくく、また、混合感染時には小型ピロプラズマの病原性が弱まり、寄生度も低下した。野外の放牧牛において両病原体の間にいわゆる干渉現象が存在することが示唆された。

次に、第3章では、妊娠牛93頭とその産子80頭を用いてヘモプラズマ感染が乳量、子牛体重、血液性状などに及ぼす影響を検討した。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、CMh群と、MwとCMhの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。ヘモプラズマ陽性牛の血液性状に異常は認められず、乳量低下および産子体重の低下の詳細な機序は不明であった。

また、ヘモプラズマ感染自然発症例を用いてヘモプラズマ感染が子牛の発育に及ぼす影響を評価した。PCVの変動とヘモプラズマコピー数には相関がみられ、症例の貧血はヘモプラズマの増殖に起因していた。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。

最後に第4章では、羊ヘモプラズマの感染種およびその浸潤状況を明らかにするため、羊のヘモプラズマ感染症自然発症例の解析と疫学調査を行った。発症例から *Mycoplasma ovis* および '*Candidatus Mycoplasma haemovis*', 2種のヘモプラズマが検出され、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る。さらに、同居羊および周辺農場に飼養される羊を用いた疫学調査では、両者ともヘモプラズマ感染が確認された。ヘモプラズマは、発症羊の輸入元であるオーストラリアから導入された可能性が考えられた。

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、23頭にヘモプラズマ感染（ '*Candidatus Mycoplasma haemocervae*' および '*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*' ）が認められ、遺伝子解析の結果から日本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要因とその病原性、他の感染症との相互作用が明らかとなり、さらにヘモプラズマ感染が牛の生産性に対し負の影響を与えていることが示された。また、羊およびエゾシカにおけるヘモプラズマ感染種とその浸潤状況が明らかとなった。

審査結果の要旨

ヘモプラズマは赤血球表面に寄生するマイコプラズマの総称であり、牛では *Mycoplasma wenyonii* (Mw) および '*Candidatus Mycoplasma haemobos*' (CMh) の2種が知られている。これら牛ヘモプラズマの病原性、感染のリスク要因、他の病原体との相互作用、牛の生産性に与える影響等は不明であり、また、牛以外の偶蹄類ヘモプラズマについても明らかではない。そこで申請者は、牛ヘモプラズマ感染の、リスク要因、生産性に及ぼす影響、お

よび牛以外の偶蹄類におけるヘモプラズマ感染性状について検討した。

まず、ヘモプラズマの簡易迅速診断を目的に、全血を材料とする direct PCR 法による検出法を開発した。本 PCR は従来法に比べて感度が高く、かつ作業時間とコストを大幅に削減でき、以降のヘモプラズマ研究の重要なツールとなった。

次に、北海道の牛を対象にヘモプラズマ感染のリスク要因を解析したところ、放牧が感染拡大に関与すること、および初産に伴うストレスが若牛の感染に影響する可能性が示唆された。また、牛白血病感染はヘモプラズマ感染のリスク要因ではなく、Mw と CMh の混合感染の病原性は、CMh 単独感染群と同等もしくは弱いことを明らかとした。小型ピロプラズマとの混合感染の影響を評価したところ、混合感染時には小型ピロプラズマの病原性が弱まり寄生度も低下する、いわゆる干渉現象が存在することを示した。さらに、ヘモプラズマ感染が牛の乳量および子牛体重に及ぼす影響を検討し、陽性牛の乳量は陰性牛より有意に低下しており、陽性牛産子の体重は陰性牛産子より低く、ヘモプラズマ感染が牛の生産性に悪影響を及ぼすことを明らかとした。

最後に羊とエゾシカのヘモプラズマ感染種について調査した。北海道内の羊の発症例からは *Mycoplasma ovis* および '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' が検出され、ヘモプラズマは輸入元であるオーストラリアから導入された可能性が考えられた。また、エゾシカからは '*Candidatus Mycoplasma haemocervae*' および '*Candidatus Mycoplasma erythroceruae*' が認められたが、遺伝子解析の結果から日本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、申請者は牛ヘモプラズマ感染のリスク要因とその病原性、および他の感染症との相互作用を明らかとし、さらにヘモプラズマ感染が牛の生産性に対し負の影響を与えている可能性を示した。また、羊およびエゾシカにおけるヘモプラズマ感染種を明らかとした。これらの知見は我が国におけるヘモプラズマ研究の発展に大いに貢献するものである。

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

基礎となる学術論文

- 1) 題 目: A clinical case of severe anemia in a sheep coinfecting with *Mycoplasma ovis* and '*Candidatus Mycoplasma haemovis*' in Hokkaido, Japan
著 者 名: Tagawa, M., Takeuchi, T., Fujisawa, T., Konno, Y., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Yokoyama, N. and Inokuma, H.
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年: 74(1): 99-102, 2012
- 2) 題 目: Prevalence and risk factor analysis of bovine hemoplasma infection by direct PCR in eastern Hokkaido, Japan
著 者 名: Tagawa, M., Ybañez, A. P., Matsumoto, K., Yokoyama, N. and Inokuma, H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 74(9) : 1171-1176, 2012

- 3) 題 目 : Interference between *Theileria orientalis* and hemotropic *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas) in grazing cattle

著 者 名 : Tagawa, M., Ybañez, A. P., Matsumoto, K., Yokoyama, N. and Inokuma, H.

学術雑誌名 : Veterinary Parasitology

卷・号・頁・発行年 : 195(1-2) : 165-168, 2013

- 4) 題 目 : Effect of chronic hemoplasma infection on cattle productivity

著 者 名 : Tagawa, M., Yamakawa, K., Aoki, T., Matsumoto, K., Ishii, M. and Inokuma H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 75(10) : 1271-1275, 2013

- 5) 題 目 : Prevalence and molecular analyses of hemotropic *Mycoplasma* spp. (hemoplasmas) detected in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan

著 者 名 : Tagawa, M., Matsumoto, K., Yokoyama, N. and Inokuma, H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : PCR detection of *Babesia ovata* from cattle reared in Japan and clinical significance of coinfection with *Theileria orientali*

著 者 名 : Sivakumar, T., Tagawa, M., Yoshinari, T., Ybañez, A. P., Igarashi, I., Ikehara, Y., Hata, H., Kondo, S., Matsumoto, K., Inokuma, H. and Yokoyama, N.

学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology

卷・号・頁・発行年 : 50(6) : 2111-2113, 2012

- 2) 題 目 : Overexpression of interleukin 2 receptor, thymidine kinase and immunoglobulin-associated alpha-1 messenger RNA in a clinical case of enzootic bovine leucosis

著 者 名 : Tawfeeq, M. M., Tagawa, M., Itoh, Y., Sugimoto, K., Kobayashi, Y. and Inokuma, H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 74(9) : 1203-1206, 2012

- 3) 題 目 : Specific molecular detection of *Anaplasma* sp. closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in ixodid ticks and cattle in a pastureland in Hokkaido, Japan

著 者 名 : Ybañez, A. P., Tagawa, M., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Yokoyama,

N. and Inokuma, H.

学術雑誌名：Vector-Borne and Zoonotic Diseases

巻・号・頁・発行年：13(1)：6-11, 2013

4) 題 目：黒毛和種育成牛にみられた小脳皮質変性症の一症例

著 者 名：田川道人，千葉史織，岡松弘之，小嶋由香，松本高太郎，古林与志安，
猪熊 壽

学術雑誌名：日本獣医師会雑誌

巻・号・頁・発行年：66(8)：545-548, 2013