HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Parasitological analyses of Eimeria infections in domestic animals and the development of molecular methods for species discrimination [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	川原, 史也
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6982号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62073
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Fumiya_Kawahara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）　　氏名：川原　史也

学位論文題名

Parasitological analyses of *Eimeria* infections in domestic animals and the development of molecular methods for species discrimination

（家畜におけるアイメリア感染の寄生虫学的研究と種鑑別のための分子生物学手法の開発）

コクシジウム原虫の感染の有無は、糞便中に排出されるオーシストを検出および定量する糞便検査により調べられている。疾病の診断や疫学調査などにおいて、コクシジウム原虫種を鑑別する上では、検出されたオーシストの大きさや色などの形態的特徴が指標とされる。しかしながら、オーシストの形態的特徴による種鑑別法は、観察者の主観に負うところが大きく、習熟が容易ではない。また、同一のコクシジウム原虫種であっても個々のオーシストの形態はバラつきが大きく一様ではないために、実際には、異なるコクシジウム原虫種間で形態的特徴が重複することが多い。従って、複数種のコクシジウム原虫が同時に感染している場合には、正確な原虫種鑑別および診断が極めて困難である。そこで、本研究では、形態的特徴に代わる客観的なコクシジウム原虫の種鑑別法を確立することを目標とした。さらには、新たな種鑑別法を検討し、確立していく過程で得られたコクシジウム原虫に関する新たな知見についても、取りまとめて考察した。

第 1 章では、牛コクシジウム原虫の種特異的な DNA の塩基配列を利用した種鑑別法の確立について記述した。*Eimeria alabamensis*、*E. auburnensis*、*E. bovis*、*E. cylindrica*、*E. ellipsoidalis* および *E. zuernii* の 6 種の牛コクシジウム原虫を対象にし、まずリボソーム RNA をコードする遺伝子間にある Internal Transcribed Spacer-1 (ITS-1)と呼ばれる領域をクローニングして、その塩基配列を決定した。*E. bovis* と *E. zuernii* の 2 種間の ITS-1 領域の塩基配列の相同性が最も高く、系統樹を作成して解析したところ、一つのクラスターを形成した。この二種はオーシストの形態的特徴は全く異なっているにも関わらず、牛コクシジウム原虫の中で極めて病原性が高いという共通点がある。分子進化の観点から解析した場合、二種の起源が近いことを示唆しており、両者の進化と宿主に対する病原性が関連している一方で、オーシストの形態的特徴とは関連しないことが推察された。

次いで、解析に供した 6 種の牛コクシジウム原虫の ITS-1 領域の塩基配列の中から、それぞれの種に特異的な塩基配列を決定した。それらに基づいて、種毎に検出することのできるプライマーを設計し、PCR 法の反応条件を確定した。本 PCR 法は種毎の特異性が高い上に、感度も一般的な糞便検査と比べて高い成績であった。

これまでに、牛コクシジウム原虫種を鑑別する PCR 法は報告されておらず、この研究で構築した PCR 法は、客観的かつ正確な牛コクシジウム病の診断および牛コクシジウム原虫の疫学調査において極めて有用である。

第 2 章では、鶏コクシジウム原虫の定量が可能な種特異的リアルタイム PCR 法の確立について記述した。これまでに、鶏コクシジウム原虫種を検出および鑑別できる PCR 法については既に報告があった。しかしながら、定量が可能なリアルタイム PCR 法についてはわずか 1 報しか報告がなく、低コストでアッセイが可能でありかつ汎用性の高いサイバーグリーン色素を用いた系は本研究で初めて確立された。*E. acervulina*、*E. brunetti*、*E. maxima*、*E. necatrix* および *E. tenella* の 5 種の鶏コクシジウム原虫の陽性対照検体を用いて検討したところ、本法の定量限界および検出限界ともに 1 検体あたり概ねオーシスト 10 個から 100 個であり、一般的な糞便検査と同等かそれ以上の感度を示した。次いで、野外の養鶏場から収集した糞便 32 検体を用いて本法による検出を試みた。その結果、32 農場中 21 農場の検体から *E. brunetti* が検出され、ついで 16 農場から *E. maxima* および *E. necatrix*、12 農場から *E. tenella*、8 農場から *E. acervulina* が検出された。これまで、日本国内には *E. brunetti* はほとんど浸潤していないと考えられてきたが、この調査により多くの農場に汚染が広がっていることが初めて確認された。

第 3 章では、第 2 章の研究で日本に蔓延していることが明らかとなった鶏コクシジウム原虫の 1 種 *E. brunetti* について、国内分離株を用いて実施した性状解析の成績を記述した。鶏に 1 羽あたり 1×10^3 個以上投与した場合には極めて顕著な増体の抑制が認められ、1 羽あたり 1×10^5 個を投与した場合には 10 羽中 3 羽の死亡を認めた。肉眼的に認めた腸管病変は軽度から中程度であったが、組織学的には十二指腸から直腸に及ぶ広い領域に渡って多数の虫体の寄生が認められ、粘膜上皮や腸絨毛の脱落が観察された。鶏に投与した後、概ね 5 日目から 10 日目まで糞便中へのオーシスト排出が認められため、プレパテント期およびパテント期は 5 日であると確認された。一般に利用されている予防剤、治療剤に対する国内分離株の薬剤感受性は良好であり、サルファ剤やラサロシドを投与された鶏では国内分離株の感染はほぼ完全に阻害された。この研究により、*E. brunetti* 国内分離株は、海外で報告されている株とほぼ同等の性状、病原性を保有することが初めて明らかとなった。

種特異的なゲノム DNA 配列を利用した種鑑別 PCR 法は、形態的特徴による種鑑別法に比べて、格段に客観性が高く、検出感度も同等かそれ以上である。本研究で記述した新たな牛コクシジウム原虫および鶏コクシジウム原虫の種鑑別法を用いれば、より正確な疾病の診断および疫学調査が可能となるであろう。そして、これまで知られていなかったコクシジウム原虫種の日本への浸潤や日本国内のみで見つかる新種の同定などに役立つものと期待される。