

平成 25 年度東北大学大学院農学研究科博士論文

ウシコクシジウムの浸潤調査と病原性種の遺伝子解析

Field Survey and Genetic Analysis of Pathogenic Species of Bovine Coccidia

東北大学大学院農学研究科

資源生物学専攻

資源動物群制御科学分野

佐藤 臨太郎

SATO Rintaro

目次

第1章 緒論

1.1 研究の背景と目的.....	1
-------------------	---

図表.....	5
---------	---

第2章 野外におけるウシコクシジウムの感染状況調査

2.1 緒言.....	8
-------------	---

2.2 材料と方法.....	11
----------------	----

2.2.1 材料.....	11
---------------	----

2.2.2 ウシの月齢区分.....	11
--------------------	----

2.2.3 糞便検査.....	12
-----------------	----

2.2.4 統計解析.....	12
-----------------	----

2.3 結果.....	13
-------------	----

2.3.1 川渡農場で飼養された放牧牛群を対象としたコクシジウム感染状況調査.....	13
---	----

2.3.2 宮城県大崎市と岡山県津山市におけるコクシジウム感染状況調査.....	16
--	----

2.3.3 下痢症状を示した個体におけるコクシジウム感染状況調査.....	17
---------------------------------------	----

2.4 考察.....	19
-------------	----

図表.....	24
---------	----

第3章 ウシコクシジウム病原性種の 18S rRNA 遺伝子と CO1 領域の系統解析

3.1 緒言.....	40
-------------	----

3.2 材料と方法.....	40
----------------	----

3.2.1 Singke Oocyst Multiplex PCR(SOM-PCR)による DNA 増幅と配列決定.....	42
--	----

3.2.2 決定した配列の分子系統解析.....	42
--------------------------	----

3.3 結果.....	42
-------------	----

3.3.1 単離した <i>E. zuernii</i> と <i>E. bovis</i> の PCR 増幅と配列決定したオーシストの形態的特徴.....	45
--	----

3.3.2 単離した <i>E. zuernii</i> と <i>E. bovis</i> オーシストの決定した配列.....	45
--	----

3.3.3 18S rRNA 遺伝子と CO1 の塩基配列に基づいた分子系統解析.....	46
---	----

3.4 考察.....	47
-------------	----

第4章 総合考察.....	61
---------------	----

引用文献.....	66
-----------	----

第1章

緒論

1.1 研究の背景と目的

2011年度の国際連合食糧農業機構（Food and Agriculture Organization : FAO）の調査結果では、世界における家畜の飼養頭数はウシが約 14 億頭、ブタは約 9.4 億頭、めん羊と山羊は各々、約 10 億頭、家禽は約 207 億羽となり（表 1-1）、現在、世界では、地方種や在来種を含めて 200 品種以上もの家畜ウシが飼養されている。また、肉用牛、乳用牛および生乳の産出額は、平成 24 年度の我が国の畜産総生産額の 49.3 % を占め、ウシは、わが国においても重要な家畜と言える。

わが国の畜産は、集約化かつ大規模を遂げてきたが、その結果、感染症が蔓延しやすい環境が形成されている（鎌田ら, 2001）。すなわち、安定した家畜生産と安全な生産環境を構築するため、細菌、原虫、蠕虫やウィルスのような病原体による感染症の制御による家畜の健康な状態を維持と衛生面の管理がさらに重要と言える。

家畜に感染する原虫性疾患として、コクシジウム症がある。コクシジウム症を引き起こす原虫は、アピコンプレックス門（Apicomplexa）のコクシジウム亜綱（Coccidiasina）、真コクシジウム目（Eucoccidiorida）、アイメリア亜目（Eimeriina）、アイメリア科（Eimeriidae）、アイメリア属（*Eimeria*）に属する。アイメリア亜綱には、真コクシジウム目の他に 3 つの寄生性原虫が含まれるが、これらを総称してコクシジウムと呼ぶ場合がある。しかし、獣医学分野でコクシジウムおよびコクシジウム症を示す場合は、*Eimeria* 属原虫と *Isospora* 属原虫による感染病を指す（中井 裕, 2013）。コクシジウム症は、*Eimeria* 属原虫の腸管寄生により、家禽や家畜に重篤な症状を引き起こし、大きな産業的損失を招くことから、これまで獣医学・畜産学分野で重要視されてきた。

Eimeria 属原虫が宿主とする動物は、爬虫類、鳥類、哺乳類など系統的に多岐にわたる。一宿主性（homoxenous）であり、同一宿主内で無性生殖と有性生殖を行う。*Eimeria* 属原虫は、宿主体外においてオーシストと呼ばれる形態をとる（図 1-1）。オーシスト壁はきわめて強固であり物理的・化学的抵抗性を示す。耐環境性を有するため、一度汚染された環境の完全な浄化は非常に

困難である。コクシジウムの感染は、感染性のあるオーシストの経口感染により引き起こされ、感染個体はやがて糞便中にオーシストを排出するようになる。以下 ウシコクシジウムである *Eimeria bovis* の生活環を示す (図 1-2)。糞中の未成熟な核相 $2n$ のオーシストは宿主体外で減数分裂が起こり、孢子形成 (sporulation) によって成熟オーシストとなる。経口摂取により宿主体内に取り込まれた成熟オーシストは腸管内で脱殻し、回腸の粘膜上皮細胞を通過して、絨毛の乳び管 (毛細リンパ管) の内皮細胞に侵入する。その後、球形のトロフォゾイト (trophozoite) となり、初代メロント (meront) へと発展する。初代メロントは $200\ \mu\text{m}$ 以上になり、巨大メロント (macromeront) とよばれ、内部には 10^5 個以上のメロゾイトが含まれる。メロントが崩壊すると遊離したメロゾイトが、再び宿主細胞に感染する。メロントからメロゾイトが形成される無性的な増殖過程は、メロゴニー (merogony) と呼ばれる。メロゴニーを数世代経ると、感染する原虫数は爆発的に増加する。有性生殖 (gamogony) に入ると、メロゾイトは雌性のマクロガモント (macrogamont) および雄性のミクロガモント (microgamont) へ分化する。ミクロガモント内にはミクロガメート (microgamete) が形成され、游出し、マクロガモントと接合し、ザイゴート (zygote) となる。ザイゴートは、オーシスト壁をもつオーシストとなって糞中に放出される (Behrendt et al., 2004; Dauschies and Njdrovski, 2005)。オーシストが腸管内で宿主細胞に再感染することはない。初代メロゴニーは回腸にほとんど影響を与えないが、2 代メロゴニーとガモゴニーは強い病原性を示す (Dauschies and Najdrovski, 2005)。重度の感染は、上皮細胞の剥落、固有層および毛細血管の露出を生じ、盲腸および大腸で激しい出血を起こす。特に、若齢牛の重度に感染は、血液やフィブリン、粘膜、腸の組織が混じった下痢を起こす。この時、発熱、腹痛、貧血、脱水、衰弱、食欲不振、体重減少を起こし、全身の衰弱、消瘦を伴い、時に死に至らしめる場合がある (Stockdale et al., 1981; Bürger, 1983; Dauschies et al., 1986; 中井 裕, 2013)。子ウシの死亡例も国内外問わず多数報告されている (Stockdale et al., 1981; Dauschies et al., 1986; 渡辺ら, 1988)。また、予後にも成長が著しく遅延する報告もある (Fitzgerald, 1980; Bürger, 1983; Gräfner et al., 1985)。

ウシに感染する *Eimeria* 属原虫では、スイギュウや数種の野牛から分離された *Eimeria* 属原虫が家畜ウシ (*Bos taurus*) へ感染することが実証されてから (Sayin, 1969)、分類の再検討が行われてきている。家畜ウシに寄生する *Eimeria* 属原虫として、Rivolta (1878) が分離した *E. zuernii* が

ウシ *Eimeria* 属原虫の初記載であり、次いで Züblin (1908) により *E. bovis* が記載された。そして、今日までに家畜ウシへ感染する *Eimeria* 属原虫は 14 種が記載されている (Levine and Ivens, 1970; Ernst and Todd, 1977; Oda and Nishida, 1990; Faber et al., 2002) (表 1-2)。

ウシコクシジウム症は世界各地の農場に広域に蔓延しており、臨床的なコクシジウム症は 3 週間から 6 ヶ月齢の子ウシや若齢牛 (12 ヶ月齢未満) を中心に見られる (Oda and Nishida, 1990; Dauschies and Njdrowski, 2005)。しかし、*Eimeria* 属原虫に汚染された農場で飼養されるすべての個体でコクシジウム症が発病するわけではなく、*Eimeria* 属原虫の種構成やウシの年齢構成、飼養環境と気候条件などが発症に関与するとされている (Dauschies and Njdrowski, 2005)。とくに *E. zuernii* と *E. bovis* の 2 種は出血を伴った下痢を示したウシから分離されることが多く、これら 2 種は高い病原性を示すウシの *Eimeria* 属原虫と考えられている (Stockdale et al., 1981; Bürger, 1983; Chibunda et al., 1997)。しかし、病原性種の感染においても、摂取オーシスト数が少ないなどの軽度な感染では、軽微な下痢を示す程度か、あるいは臨床症状を示さないこともある (Cornelissen et al., 1995; Busato et al., 1998)。また、細菌やウイルスなどの他の病原微生物が重篤な病態を悪化させると報告もある (伊藤と榊原, 1999; Collier et al., 2008; 加納ら, 2010; 桐野, 2013)。そのため宿主の臨床症状と病原性種の関係については未だ明確ではない。

本研究では、放牧牛のウシコクシジウムの感染様式の解明、農家ごとのコクシジウム感染状況の解明、臨床症状と検出された原虫種の関係の解明を目的に野外におけるコクシジウム調査を行った。また野外調査で検出された病原性と疑われる原虫種は分子分類のために遺伝子解析を行った。

第 2 章では、東北大学大学院附属複合生態フィールド教育研究センター (川渡農場) において、放牧地で飼養された牛群を対象とし、新生子ウシ、育成牛および成牛の各月での陽性率、感染原虫種構成および OPG の変化を調査した。そして、現在の感染状況を把握するために、宮城県北部地域の農家および岡山県の農家を国内の感染状況のモデル地域とし、農家ごとに詳細な感染状況調査を行った。また、出血を伴った下痢症状を示した個体やコクシジウム症と診断されたウシ個体を対象とし、種と症状の関係性について解析した。そして、今現在のウシコクシジウム症の疫学について重要となる基礎的知見を得ることを目的とし、ウシ *Eimeria* 属原虫種別の感染状況の把

握することを目的に行った。第3章では、下痢を示したウシ個体から分離した *E. zuernii* と *E. bovis* の遺伝的多様性や両原虫種の *Eimeria* 属原虫における進化系統関係を明らかにすることを目的とし、下痢を示したウシ個体から分離した *E. zuernii* と *E. bovis* の遺伝子解析を行った。第4章では、第2章で明らかにした放牧地におけるコクシジウム感染状況や農家ごとにおけるコクシジウム感染状況および下痢を示した個体におけるコクシジウム感染状況の結果について、第3章で明らかにした *E. zuernii*, *E. bovis* の遺伝的多様性および進化系統関係の結果についてこれまでの過去の知見を含めながら、総合的に考察した。

表 1-1 世界と日本における主な家畜飼養頭数と家畜単位(アニマルユニット)

国	家畜	飼養頭数	アニマルユニット (AU)
世界	家禽	20708002(1000羽)	207080020
世界	アヒル	1323854(1000羽)	-
世界	ガチョウ、ホロホロチョウ	381213(1000羽)	-
世界	ウサギ	894955(1000羽)	-
世界	齧歯類、その他	18425(1000羽)	-
世界	シチメンチョウ	467685(1000羽)	46768500
世界	ロバ	43230790(頭)	21615395
世界	スイギュウ	195397515(頭)	195397515
世界	ウシ	1426389031(頭)	1426389031
世界	ヤギ	924145893(頭)	92414589.3
世界	ウマ	58472151(頭)	58472151
世界	ラバ	10457135(頭)	
世界	ブタ	967164630(頭)	193432926
世界	ヒツジ	1093566764(頭)	109356676.4
日本	家禽	175917(1000羽)	1759170
日本	シチメンチョウ	3(1000羽)	60
日本	ウシ	4230000(頭)	4230000
日本	ヤギ	15500(頭)	1550
日本	ウマ	16000(頭)	16000
日本	ブタ	9768000(頭)	1953600
日本	ヒツジ	12500(頭)	1250

アニマルユニットは、FAO(2011)より算出した。

ウシ:1, ブタ:1/5, ヒツジ: 1/10, ヤギ: 1/10, 家禽: 1/10, ロバ: 1/2, シチメンチョウ: 1/50 (清水寛一, 1993 を参照)

表 1-2 世界の家畜ウシから分離された *Eimeria* 属原虫とその形態的特徴

種名	形態	長径 × 短径 (μm)	微細構造				日本国内での		原記載
			外部残体	極小体	ミクロバイル	スターダボデー	内部残体	分離例	
<i>E. zuernii</i>	類円型	12-29 × 20-21	-	+	-	+	+	+	Rivolta, 1878
<i>E. bovis</i>	卵円型	23-34 × 17-23	-	-	+	+	+	+	Zublin, 1908
<i>E. auburnensis</i>	長卵円型	32-46 × 19-28	-	+	+	+	+	+	Christensen and Porter, 1939
<i>E. alabamensis</i>	卵円型	13-25 × 11-17	-	-	-	+	-	+	Christensen, 1941
<i>E. canadensis</i>	卵円型	28-38 × 20-29	-	-	+	+	+	+	Becker and Frye, 1929
<i>E. ellipsoidalis</i>	卵円型	12-32 × 10-29	-	-	-	+	+	+	Bruce, 1921
<i>E. cylindrica</i>	長楕円型	16-30 × 12-17	-	+	-	+	+	+	Wilson, 1931
<i>E. subspherica</i>	類円型	9-14 × 8-13	-	-	-	+	-	+	Christensen, 1941
<i>E. pelita</i>	卵円型	36-41 × 26-30	-	-	+	+	+	+	Supperer, 1952
<i>E. wyomingensis</i>	卵円型	36-46 × 26-32	-	-	+	+	-	+	Huizinga and Winger, 1942
<i>E. bukidonensis</i>	梨型	43-54 × 29-39	-	-	+	+	-	+	Tubangui, 1942
<i>E. illinoisensis</i>	長楕円型	24-29 × 19-22	-	-	-	+	+	+	Levine and Ivens, 1967
<i>E. brasiliensis</i>	長楕円型	31-49 × 21-33	+	-	+	+	+	+	Torres and Ramos, 1939
<i>E. mundaragi</i>	卵円型	36-38 × 25-28	+	-	-	?	+	-	Hiregaudar, 1956

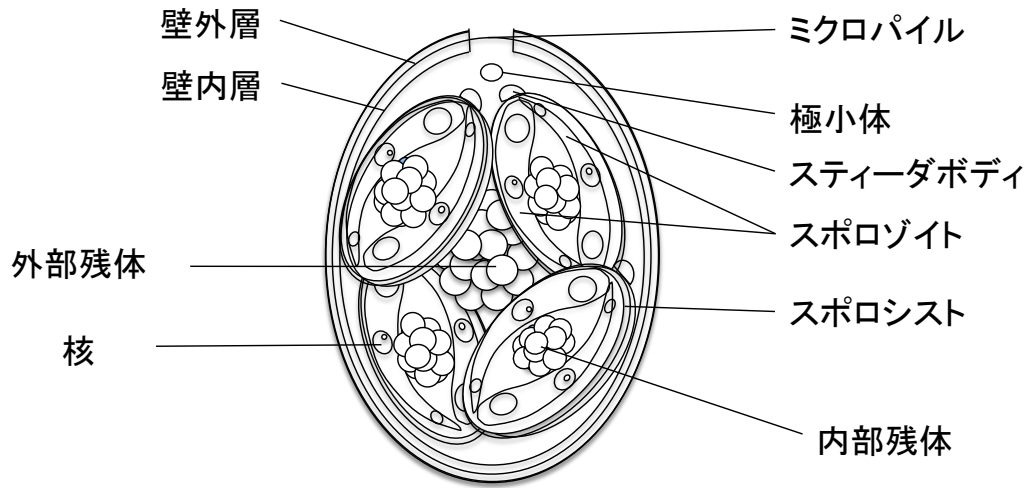


図 1-1 *Eimeria* sp. 成熟オーシストの基本形態

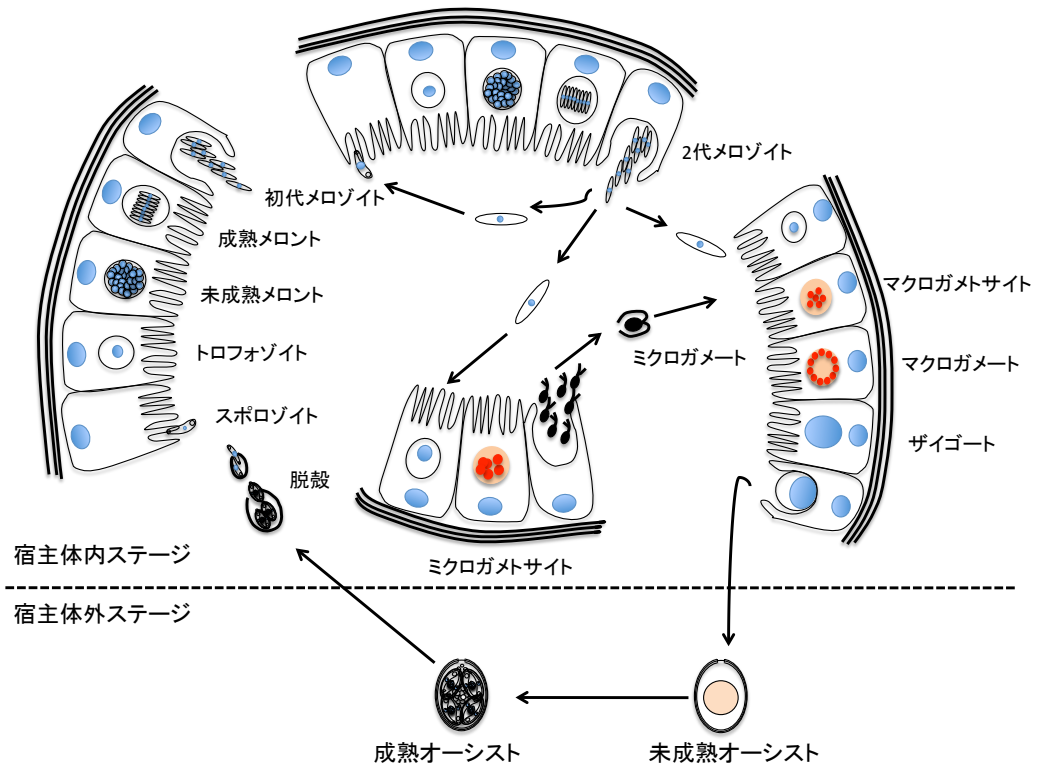


図 1-2 ウシ *Eimeria* sp. の生活環
Hammond (1963) より転載

第2章

野外におけるウシコクシジウムの感染状況調査

2.1 緒言

家畜ウシにおけるウシコクシジウム感染状況の調査は、これまで世界中で行われている。わが国では、小田と西田（1985）が9道県（北海道、岩手、長野、群馬、兵庫、岡山、島根、熊本、鹿児島）にて、ウシコクシジウム調査を1019頭のホルスタイン種および黒毛和種より行っている。この結果、コクシジウム陽性率は約59%（599/1019）であり、また、ウシの品種間でコクシジウム陽性率に差は見られなかったとしている。さらに、陽性率が宿主の月齢に強く依存することが示されており、0～11ヶ月齢のウシが常に80%以上の高い陽性率であったと記している。陽性率がウシの月齢に依存して高くなる傾向は、これまで海外でも観察され（Waruiru et al., 2000; Clcek et al., 2007; Abebe et al., 2008; Lassen et al., 2009; Rehaman et al., 2010）、普遍的な現象だと考えられており、若齢牛の免疫は未発達であることが主な要因と言われている（Gräfner and Graubmann, 1979）。また、コクシジウムの感染が季節にともなって変動することが、知られている（Hasbullah et al., 1990; Tauseef et al., 2010）。例えば、Hasbullah（1990）らが1986年4月から1987年1月にかけて放牧牛群を対象にしたコクシジウム感染の調査では、舎飼から放牧に移る5月に、コクシジウム陽性率とOPGはともに最も高くなることが示されている。また、コクシジウムの感染とそのOPG（糞便1gにおけるオーシスト数）には季節による変動が観察された。しかし、OPGの季節変動がオーシストを排出する各個体で起こる季節変動によるものかは不明である。

飼養環境の要素とウシコクシジウムの陽性率が相関したとする報告もある。例えば、Rehamanらは、餌の供給方法、飲料水の供給源、牛床の違い、飼養規模、施設の構造を挙げ、これらの飼養形式や収容構造の違いがコクシジウムの陽性率と強く相関し、調査地域におけるコクシジウムの感染リスク要因になっていたことを言及した。また、千葉県酪農家における

子ウシのコクシジウム感染状況調査では、敷料交換の有無とコクシジウムの感染状況の違いについて言及し、敷料交換を行う農家では、しない農家よりも、コクシジウムオーシストの検出および OPG が低い傾向であった (海老沼ら, 2009)。これは、オーシストは、未成熟で感染能を持たない状態で排泄され、敷料中で成熟し感染能を獲得するため、交換されない敷料中にあ
るオーシストが新たな感染源になるためだと考えられる。

これまで国内のウシより、*Eimeria* 属原虫 13 種 (*Eimeria bovis*, *E. zuernii*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica*, *subspherica*, *E. brasiliensis*, *E. wyomingensis*, *E. bukidonensis*, *E. illinoiensis*, *E. pellita*) と複数の *Isospora* 属原虫が分離されている (Oda and Nishida, 1990; Hasbullah et al., 1990)。中央ヨーロッパ (Faber et al., 2001) やアメリカとカナダ (Levine and Ivens, 1967; Ernst and Todd, 1977; Faber et al., 2002) の家畜ウシ (*Bos taurus*)、中国の上海 (Hui Dong et al., 2012) の家畜化されたヤク (*Bos grunniens*) では、国内で検出された 13 種と同じウシ *Eimeria* 属原虫が分離されている。

家畜ウシから分離された 13 種の *Eimeria* 種の病原性についていくつかの報告がある。これまでに、家畜ウシから分離されてきた *Eimeria* 属原虫 13 種の中で、出血を伴う下痢便を示したヘレフォード種より、*E. zuernii* および *E. bovis* が、 1.0×10^5 以上の OPG が検出された (Fitzgerald, 1962; Ruiz, 1973)。また *E. alabamensis* では、 10^7 以上の OPG が検出された個体では、臨床症状が確認されている (Hooshmand-Red et al., 1994)。また、*E. alabamensis* 感染によるものとされる臨床症例としてドイツ、スウェーデン、オランダ、イギリスで生後 2 週齢の放牧された子ウシの報告がある (Gräfner et al., 1985; Svensson et al., 1993, 1994; Marshall et al., 1998; Svensson, 2000; Snoep and Porrhers, 2004)。また我が国では、2009 年に舎飼された黒毛和種より *E. alabamensis* による臨床例と細胞核内寄生が初めて報告されている (Nishida et al., 2009)。加えて、下痢を呈した個体より、*E. auburnensis* や *E. ellipsoidalis* の 2 種が確認されている

(Mielke et al., 1993)。国内における報告として、出血を伴う下痢便内では *E. zuernii* オーシストが優占していたとの例 (渡辺ら, 1988; 桐野, 2013) がある。また、千葉県の酪農家における調査では、*E. bovis* と潜血便に強い関連がある可能性が報告されている。したがって、*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidalis* の *Eimeria* 属原虫 5 種は病原性がある種だと考えられる。これら 5 種のうち 2 種について、病原性の評価を目的とした感染実験が行われてきた。*E. bovis* が 95% 含まれた 1.0×10^5 個のオーシストの経口接種した結果、腸粘膜の損傷が観察された (Friend and Stockdale, 1980)。しかし、この症状が、*E. bovis* の感染と増殖によって引き起こされたものであるかは不明である。また、 1.5×10^5 個の *E. zuernii* のオーシストを経口接種した結果、感染させたすべての個体が、出血を伴う下痢を排泄した。しかし、接種したオーシスト懸濁液には *E. ellipsoidalis* のオーシストが約 3% 含まれていた (Bangoura and Dauschies, 2007)。そのため、*E. zuernii* と出血を伴う下痢との因果関係が明瞭に示されていない。そのため、国内で検出された原虫種と出血を伴う便との関係は、未だ明確になっていないといえる。また、国内の新生子ウシについて、各月ごとにコクシジウム感染初期の月齢および排出した個体を追跡した報告例はない。

本章では、放牧地でのウシコクシジウム感染様式の解明、農家ごとの牛コクシジウム感染状況の解明、臨床症状と検出された原虫種の関係について調査した。事例研究として東北大学大学院附属複合生態フィールド教育研究センター (川渡農場) で飼養された放牧牛におけるウシコクシジウムの感染状況調査と宮城県大崎市と岡山県津山市を対象としたウシコクシジウムの感染状況調査を行った。調査区である大崎市と津山市は、飼養形式の違いとコクシジウムの感染状況の関係を解析するために行った。また、下痢症状を示した個体と糞便より検出される原虫種との関係について明らかにすることを目的とした。

2.2 材料と方法

2.2.1 材料

2010年5月から10月にかけて川渡農場で放牧された日本短角種、黒毛和種およびその交雑種より直腸便試料を753頭（5月より104頭、6月より114頭、7月より134頭、8月より134頭、9月より1345頭、10月より134頭）から採取した。宮城県と岡山県を調査区とし、ウシの直腸便試料を採取した。宮城県では、2010年4月に大崎市で乳用牛を飼養する3カ所（A, B, C）の農家より採取した。採取した直腸便試料は、ホルスタイン種124頭より（A農家より47頭、B農家より44頭、C農家より33頭）採取した。岡山県では、2012年8月に津山市で肉用牛を飼養する6ヶ所（D, E, F, G, H, I）の農家より、黒毛和種の60頭（D農家より4頭、E農家より5頭、F農家より13頭、G農家より26頭、H農家より5頭、I農家より7頭）より直腸便試料を採取した。獣医師によってウシコクシジウム症と診断された黒毛和種において、宮城県北部域の農家30戸にて、直腸便試料を採取した。この採取は、2010年5月から7月にかけて34試料、また、2011年5月から7月にかけては24試料が得られた。宿主の病勢と検出されたウシコクシジウム原虫種の関係は、地域による違いを考慮した解析として、2012年8月に岡山県の6農家より採取した同じ糞便試料を供した。

2.2.2 ウシの月齢区分

川渡農場における調査対象牛は、月齢ごとに区分を行い、生後0-6ヶ月齢未満を子牛、生後6-18ヶ月齢未満を育成牛、18ヶ月齢以上を成牛とした。宮城県と岡山県における調査対象牛は、ウシの個体識別番号から、独立行政法人家畜改良センター（NLBC）の提供している月齢の情報に基づいて、川渡農場の調査と同様に月齢区分を行った。ウシコクシジウム症と診断された個体の月齢は、いずれも生後6ヶ月齢未満であることから、すべて子牛に区分した。

2.2.3 糞便検査

糞便検査は、宮城県大崎市の A, B, C 農場および川渡農場で採取した 877 個の糞便は、形状（正常便、泥状便、水様便）に基づいて区分し、肉眼的観察によって出血の有無を調べた。獣医師によってウシコクシジウム症の個体から採取された糞便、および岡山県で採取された糞便は、獣医師の診断によって形状および出血の有無が獣医師の診断によって区分された。OPG の算出は、McMaster 法 (Maff, 1986) に準拠して行った。同時に未成熟オーシストの形態的特徴（類円、楕円、卵円、長楕円、マイクロパイルの有無）に基づく種の同定を行い、種ごとの OPG も算出した。

McMaster チャンバースライドに注入した糞液は、15 ml チューブに回収し、14 ml の滅菌水を加え、1800 g, 5 min 遠心後、上清を除去して洗浄した。その後、5 ml の滅菌水で懸濁後、2.5 % sodium dichromate 溶液を加え、25 °C で適宜攪拌しながら 1 週間インキュベートし、孢子形成処理を行った。後にノマルスキー型微分干渉顕微鏡を用いて成熟オーシストの大きさ（長径、短径）、またオーシスト内の微細構造（外残体、内残体、スティーダボディ、極小体の有無）の特徴を記録した。

2.2.4 統計解析

調査した月や農場の間でのコクシジウム陽性率および種間の平均 OPG についての差に関する検定は、Fisher の正確検定により行なった後、等分散のものは Student *t* 検定、非等分散のものは Wilcoxon の Mann Whitney U 検定で行った。病勢と種ごとの OPG の関係についての差では、群内比較は一元配置分散分析を行い、Bohofelm の多重比較検定を行った。統計処理には R を使い、いずれも有意水準を 0.01 とした。

2.3 結果

2.3.1 東北大学大学院附属農場で飼養された放牧牛群を対象としたコクシジウム調査

2.3.1.1 各月で月齢ごとのコクシジウム陽性率と陽性個体の平均 OPG

川渡農場の放牧牛群より、2010年5月から10月にかけて採取した直腸便753試料について、157試料からコクシジウムが検鏡観察によって確認された。調査月ごとの陽性率は、新生子ウシでは、5月は0%、6月は22.7%、7月は28.6%、8月は32.1%、9月は14.3%、10月は7.1%であった。育成牛では、5月は55.6%、6月は32.1%、7月は44.1%、8月は11.8%、9月は0%、10月は5.9%であった。成牛では、5月は0%、6月は22.7%、7月は28.6%、8月は32.1%、9月は14.3%、10月は7.1%であった(表2-1)。子ウシの陽性率は、6月から8月にかけて高くなり、9月以後は減少する傾向であった。育成牛や成牛では、陽性率は、5月がもっとも高く、6月から7月以後は減少する傾向であった(図2-1)。また、9月にコクシジウムオーシストを排出した育成牛は確認されなかった。ただしこれは、検出限界値以下であった可能性はある。

次に、コクシジウム陽性であった子牛、育成牛、成牛の平均 OPG は、いずれの月齢においても7月から8月にかけて高くなり、その後減少する傾向であった(図2-1)。しかし、子牛、育成牛、成牛の間や各月の間で OPG に有意な差は見られず、(図2-2)。最も高い OPG が観察された月は、月齢に関係なく7月であり、子ウシは 1.4×10^4 、育成牛は 8.9×10^3 、成牛は 1.2×10^4 であった(表2-2)。

2.3.1.2 放牧牛群より検出されたコクシジウム原虫種

川渡農場の放牧牛群では、12種のコクシジウム原虫が検出された(図2-3)。検出された種を宿主の月齢によって分けると、新生子ウシでは *Eimeria zuernii*、*E. bovis*、*E. auburnensis*、*E. alabamensis*、*E. canadensis*、*E. ellipsoidalis*、*E. cylindrica* の7種、育成牛では、*E. zuernii*、*E. bovis*、*E. auburnensis*、*E. alabamensis*、*E. canadensis*、*E. ellipsoidalis*、*E. cylindrica*、*E. subspherica*、*E. pellita*、*E. wyomingensis*、*E. bukidonensis*、*E. brasilinensis* の12種、成牛では、*E. zuernii*、*E. bovis*、*E.*

auburnensis, *E. alabamensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica*, *E. subspherica*, *E. pellita*, *E. wyomingensis* の 9 種が検出された。これは表 2-3 に示した。

2.3.1.3 コクシジウム陽性個体の種構成の変化

供した子ウシは、2010 年 4 月から 6 月に生まれた 28 頭の個体である。5 月から 10 月にかけて、一度でもコクシジウム陽性となった個体は 14 頭であり、一度もオーシストの排出が認められなかった個体も 14 頭であった。もっとも早くオーシストの排出が確認された個体は約 1 ヶ月齢（生後 28 日）であり、最も遅く排出された個体は約 3.7 ヶ月齢（生後 111 日）であった。陽性が確認された 14 個体のうち、13 個体で *Eimeria bovis* の陽性が確認された。*E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica* の 6 種は、一度限りしか検出されなかった個体も存在したが、10 頭の陽性個体で 1- 4 ヶ月にわたる長期的なオーシストの排出が観察された。*E. zuernii* が陽性と認められた個体は、6 月および 7 月のみで観察され、オーシストを排出する期間は、他の種に比べ短かった。感染する原虫種 of オーシスト排出期間は、種によって異なっていた（表 2-3）。育成牛は 32 頭を供した。これらは、2009 年度に調査放牧地で生まれた個体であり、調査期間中に一度でもコクシジウム陽性が認められた個体は 21 頭であり、一度でもオーシストの排出が観察されなかった個体は、11 頭であった。*E. bovis* および *E. alabamensis* のオーシストの排出期間は 1-3 ヶ月間であり、これら 2 種では、長期的にオーシストを排出した個体が存在した。一方、*E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis* の 3 種のオーシストの連続した排出期間は長くても 2 ヶ月間で、散発して検出された。*E. zuernii*, *E. cylindrica*, *E. subspherica*, *E. pellita*, *E. wyomingensis*, *E. bukidonensis*, *E. brasilinensis* の 7 種では、連続した 2 ヶ月で検出され続けたものはいなかった（表 2-4）。供した成牛は 74 頭であり、そのうち一度でもコクシジウム陽性であった個体は 30 頭であった。

それら 30 頭について、長期的なオーシストの排出が考えられる個体は 24 頭存在した。この 24 頭について、コクシジウム種ごとの検出期間をまとめた。調査開始した 5 月にコクシジウム陽性であった 22 頭のうち、19 頭が *E. bovis* が陽性であった。また、*E. bovis* のオーシストは、育成牛と同様に 1-5 ヶ月と長期的にオーシストの排出が観察された。*E. auburnensis*、*E. alabamensis*、*E. canadensis*、*E. ellipsoidalis*、*E. subspherica* の 5 種は 1-3 ヶ月と *E. bovis* に次いで長期的にオーシストを排出した個体が存在した（表 2-5）。

川渡農場の放牧地で飼養されたウシコクシジウム感染状況調査では、月齢に関係なく、長期的にオーシストの排出が観察された個体が多く見られた。これは長期的なオーシストの排出があった種では、複数回の反復的な感染あるいは持続的な感染が起きている可能性を示唆している。

2.3.1.4 想定される初感染した日齢

これまで記載された種のプレパテントピリオドより、本調査で供した新生子ウシより検出された各 *Eimeria* 属原虫種の想定される初感染の日齢を検証した。*E. bovis* の想定される感染時期は他の種に比べて早く、7-12 日齢であった（表 2-7）。*E. zuernii*、*E. auburnensis*、*E. alabamensis*、*E. ellipsoidalis* の 5 種の想定される感染時期は、種間で違いはなく 22-35 日齢の間であり、これら 5 種間に大きな違いは見られなかった。

2.3.1.5 母子におけるコクシジウム検出の経時的变化

調査した放牧地において、母から子へコクシジウムが感染伝播している可能性がある。そこで、新生子ウシと親ウシ間でのコクシジウムオーシストの排出を各月ごとに観察した。供試した親子のペアは 27 組あった。また子ウシの N1002 と N1003 は、同じ親ウシとしている。調査した期間でコクシジウムが一度でも陽性であった母子は 14 組であり、これには母子ともに一

度でもコクシジウム陽性であったペアは9組、母のみ陽性は0組、子ウシのみ陽性は4組が
ふくまれている。両方ともに陰性は13組観察された(表2-8)。母子ともに陽性であった組に
ついて、検出された原虫種構成を調べた。これより、*E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E.*
canadensis, *E. ellipsoidalis* の5種は母子ともに検出された。一方、*E. zuernii* は子のみ陽性ま
たは、母のみ陽性であった。

2.3.2 宮城県大崎市と岡山県津山市におけるコクシジウム調査

2.3.2.1 農場別コクシジウム陽性率と検出された *Eimeria* 属原虫種

宮城県大崎市に位置する3農家(A, B, C)、岡山県津山市の6農家(D, E, F, G, H, I)にお
けるコクシジウム原虫の感染状況調査より、8農家でコクシジウム原虫のオーシストが検出さ
れた(図2-4)。概要は表2-9に示した(A農家: 4.3%, B農場: 18.2%, C農場: 12.1%, D農家: 50%、
E農家: 40%、F農家: 38.5%、G農家: 46.2%、I農家: 71.4%)。

検出されたコクシジウム原虫の種を同定すると、*E. zuernii* は大崎市のA, B, C農家より検出
されず、*E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica* の6
種であった。一方、津山市では、大崎市で確認された6種に加え、*E. zuernii* と *E. bovis*, *E.*
auburnensis, *E. alabamensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis*, *E. cylindrica* の8種が確認された(表
2-10)。

2.3.2.2 大崎市と津山市の農家の飼養形式

敷料は、A, B, C農家で乾燥したワラを使用し、交換時期は、2週に1回の頻度で行っていた。
津山市の6農家では、H農家を除くすべての5農家において、パドックによる多頭飼育を行っ
ており、牛床は土壌であり、敷料は使用していない農家とコンポストや乾燥した砂を使用し
ていた。敷料を使用していた農家において、敷料の交換時期は2週に1回の頻度で行っていた。

コクシジウム原虫が検出されなかった H 農家では、個体ごとに単頭飼育を行っており、牛床はセメントであり、敷料は乾燥させたおがくずとかんな屑を混ぜ合わせたものを使用していた。

2.3.3 下痢症状を示した個体におけるコクシジウムの感染状況調査

2.3.3.1 下痢を排泄した個体の平均 OPG

2010年に採取した下痢症状を示したウシ個体の平均 OPG を比較した。これより、出血を伴う下痢便の平均 OPG は、出血を伴わない下痢便の平均 OPG よりも有意に高いことが確認された。また、2011年においても、2010年と同様に、出血を伴う下痢便の平均 OPG は、出血を伴わない下痢便の平均 OPG よりも有意に高かった。津山市で採取した下痢症状を示したウシ個体においても、大崎市と同様に、出血を伴う下痢便の平均 OPG が出血を伴わない OPG が有意に高いことが確認された（図 2-9）。これは高い OPG は、宿主の症状の増悪すると相関する従来知見と相違ない結果であった。

2.3.3.2 下痢症状を示した個体より検出された種と種別平均 OPG

2010年に大崎市で採取された出血を伴う下痢便から検出された種は、*E. zuernii*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. canadensis*, *E. cylindrica* の5種であった。一方、出血を伴わない下痢便では、前述の5種に加えて、*E. alabamensis* と *E. ellipsoidalis* の2種が観察された。2011年に大崎市の農家より採取した出血を伴う下痢便、および津山市で採取した出血性下痢便より *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis* の2種の検出が観察された。採取した地域や年度に関係なく、肉眼的に出血が観察された下痢便より *E. zuernii* が有意に多く排出され、次いで *E. bovis* や *E. auburnensis* が排出されていると示された。一方、肉眼的に出血が観察されなかった下痢便では、検出された各種の平均 OPG 間に有意な差はみられなかった（図 2-7）。

出血が観察された下痢便から *E. zuernii* と *E. bovis* の平均 OPG が有意に高く排出される傾向

が見られた。そのため、これら2種に注目し、詳細に解析した。その結果、出血が観察された下痢便を示したすべての個体より *E. zuernii* の検出が認められた。出血が肉眼的に観察されなかった下痢便では、*E. zuernii* が検出されなかった個体は、大崎市で3頭、津山市で1頭であった。

そこで出血が認められた下痢便と出血が認められなかった下痢便の *E. zuernii* の平均 OPG を比較した結果、採取した地域や年度に関係なく、出血が認められた下痢便の平均 OPG が有意に高い傾向であった。

2.4 考察

本研究で調査を行った 2010 年では、5月13日から放牧を開始しており、調査日の5月27日には、未だ舎飼で感染したコクシジウム原虫を体内で感染、増殖している可能性があり、環境の変化によるストレスの影響が残っていると考えられる。そのため、育成牛や成牛のコクシジウム陽性率が、5月にもっとも高くなっていた。Hasubulla (1987) らの調査でも、放牧直後の5月や放牧終了後の10月で陽性率はピークを示しており、環境や飼料の変化によるストレスとコクシジウムの感染が関与している可能性を示唆している。一方、成牛と育成牛とは異なり、新生子牛のコクシジウム陽性率は6月から8月にかけて上昇し、その後下降した。しかし、個体ごとに見るとコクシジウム陽性個体の有無を解析した結果、個体ごとに長期的にオーシストを排出する個体と排出しない個体が存在し、季節による変動は観察されなかった。したがって、新生子ウシにおけるコクシジウム種の感染様式は、季節による変動ではないことが示された。5月から10月の調査期間中に一度もオーシストの排出が確認されなかった個体が14個体存在したことから、放牧地でもすべての新生子ウシがコクシジウム原虫に感染するわけではないといえる。また、初めて感染が確認されたすべての個体において、*E. bovis* のオ

ーシストの排出が確認され、*E. bovis* が長期的にオーシストの排出が観察された個体は、9 個体存在した。そして、長期的にオーシストが排出された種は、月齢に関係なく、*E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis* の 3 種であり、ニワトリに感染する *Eimeria tenella* に対して免疫をもつ個体に、再びオーシストを接種すると、同一種の再感染を強く抑制し、発育にも影響を及ぼすことが知られている (McDermott and Stauber, 1954; 東条と岡本, 1971; Augustine and Danforth, 1986)。これは、*E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis* の 3 種は、免疫原性が低く、調査期間中に複数回の反復的な感染あるいは持続的な感染が起きている可能性が示された。一方、月齢に関係なく、*E. zuernii* のオーシストが排出された期間は、最大でも 2 ヶ月間であり、*E. bovis* のオーシスト排出期間と比較すると短い傾向であった。そのため、両種を比較すると、*E. zuernii* は宿主体内で増殖する期間が短い可能性が考えられた。*E. zuernii* のスポロゾイトは、ウシの腸管上皮細胞に感染し、粘膜固有層まで侵入すると考えられている (Friend and Stockdale, 1980; Bangoura and Dauschies, 2007)。種によって免疫による影響が異なることはニワトリ *Eimeria* に対する免疫のメカニズムが寄生する種や部位によって異なることが示されている (Speer et al., 1985; Augustine and Danforth, 1986; Rose, 1987)。ウシ *Eimeria* においても同様の免疫のメカニズムが種によって異なる場合、オーシストの排出期間に影響を及ぼす可能性は考えられる。そのため、他の種と比較すると、*E. zuernii* のオーシスト排出期間は、宿主の免疫防御を免れるために短い傾向であることが考えられる。

本調査において病原性のある可能性が疑われる *E. zuernii*, *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. auburnensis* の 5 種のコクシジウム陽性が確認された糞便は、出血や水様性の下痢といった臨床症状は観察されなかった。ドイツやスウェーデンの放牧地で飼養されたウシ個体に水様下痢を引き起こした原因とされる *E. alabamensis* (Gräfner et al., 1985; Svensson et al., 1993) は

本調査でも検出されたが、OPG も 10^2 から 10^4 未満と低く、水様下痢も観察されなかった。

そのため、これら 5 種が感染しても、必ず臨床症状を示すわけではなかった。

母子間におけるコクシジウム種構成の変化の調査結果では、*E. bovis*, *E. aubunensis*, *E. alabamensis*, *E. canadensis*, *E. ellipsoidalis* の 5 種において、親子ともに同じ月で陽性が観察された。したがって、これら 5 種が母から子へ感染伝播している可能性があった。しかし、調査期間中に陰性の母ウシの子が陽性の場合も多く見られ、必ず母から子へ感染伝播するのではなく、環境中や他の個体への接触により、感染伝播する可能性は考えられる。

大崎市ではホルスタイン種、津山市で黒毛和種と飼養されていた種は異なったが、小田と西田の調査より (1990)、黒毛和種とホルスタイン種の間におけるコクシジウム陽性率に差はなく、また、パキスタンにおけるウシコクシジウムの野外調査においても、サヒワール種、ジャージー種、フリージアン種などウシの品種間で陽性率に有意な差はないことが報告されている (Tauseef et al., 2010)

大崎市と津山市におけるコクシジウム調査において、津山市のコクシジウム陽性率は、大崎市のそれより高くなる傾向が観察された。大崎市で調査した農家は牛床がセメントの上にワラを敷いていたものを用いていた。一方、津山市の農家では、コクシジウム感染が観察されなかった H 農家を除き、すべてパドック内での多頭飼養であり、また牛床は砂地や土壌であった。一方、津山市の H 農家では、個体ごとのカウハッチとして、牛床にセメントの上におが粉とかなな屑を併せた敷料を用いていた。Tauseef ら (2010) は、農家の規模や牛床により感染リスクが異なることを示唆している。また、Lassen ら (2013) は、土壌中に糞便が存在するとオーシストは長期間存在し、他のウシ個体に感染する可能性を指摘している。これらの結果を考慮すると、本調査でのコクシジウム陽性率が異なった可能性は、敷料や牛床の違いによると考えられる。

重篤な下痢症状を示した個体の糞便内におけるコクシジウム調査では、同じ下痢症状においても出血の有無によって、検出された OPG や存在する種が異なる結果となった。また、検出されたコクシジウム種別の OPG は、多くにおいて、*E. zuernii* が最も優占し、続いて、*E. bovis* が検出された。糞便中に出血のある場合では、すべてにおいて *E. zuernii* が検出された。また、すべての陽性試料において、*E. zuernii* の OPG は 10^4 以上であった。一方、出血なしの糞便内における *E. zuernii* の OPG は、すべてが 10^3 以下であった。岡山県における出血を呈した症例糞便内のコクシジウム調査においても同様の傾向が観察された。そして、両県において、出血の有無に関わらず、ほとんどから *E. zuernii* が検出されていることが明らかとなった。ドイツの下痢症状を示した個体における *E. zuernii* と *E. bovis* の OPG に着目した調査では、下痢症状と *E. zuernii* の OPG は相関していることが明らかとなっている (Bangoura et al., 2010)。また、国内の調査においても、出血性腸炎を引き起こした牛個体の直腸便から *E. zuernii* は優占的に検出されている (渡辺ら, 1988; 桐野ら, 2013)。これらの報告と我々が行った調査結果は一致した。したがって、*E. zuernii* には強い病原性があると考えられ、また、*E. zuernii* が一定量の閾値をこえて感染すると、宿主個体に出血を伴う下痢症状を引き起こすことが示された。一方、もう一方の強い病原性を示すとされてきた *E. bovis* は、症状に関係なく、 10^3 以上程度は常に排出されていたことが示唆された。海老沼ら (2009) の調査では *E. bovis* の OPG と潜血便と相関した傾向が観察された。この結果は、*E. bovis* と *E. zuernii* の寄生・増殖する位置や感染様式の違いが考えられる。*E. zuernii* は粘膜固有層まで侵入するのに対し、*E. bovis* は、腸管上皮細胞で増殖していることが知られている (Friend and Stockdale, 1980; Bangoura and Dauschies, 2007)。そのため、出血の度合いが 2 種の間で異なる可能性が考えられる。しかし、本調査では糞便内の潜血については調べていないため、*E. bovis* の OPG と潜血便の関係についてはわからなかった。今後は重傷度や *E. zuernii* や *E. bovis* に感染

した個体の病理組織について精査な調査が必要であるが、原虫種によって寄生・増殖する戦略が異なる可能性が考えられた。また調査した地域では、*E. zuernii* は病原性が強い種であり、出血が伴うコクシジウム症を引き起こす原因となっている可能性が示された。

表 2-1 各月での月齢ごとのコクシジウム陽性率とその概要

月齢区分	調査月日					
	5月	6月	7月	8月	9月	10月
子ウシ	0 (0/14)	22.7 (5/22)	28.6 (8/28)	32.1 (9/28)	14.3 (4/28)	7.1 (2/28)
育成牛	55.6 (15/27)	32.1 (9/28)	44.1 (15/34)	11.8 (3/34)	0 (0/34)	5.9 (2/34)
成牛	34.9 (22/63)	32.8 (21/64)	25.7 (19/74)	12.2 (9/74)	10.8 (8/74)	8.1 (6/74)

括弧内は、検査頭数およびコクシジウム陽性頭数を示した。

採取日は5月22日、6月27日、7月27日、8月26日、9月16日、10月26日

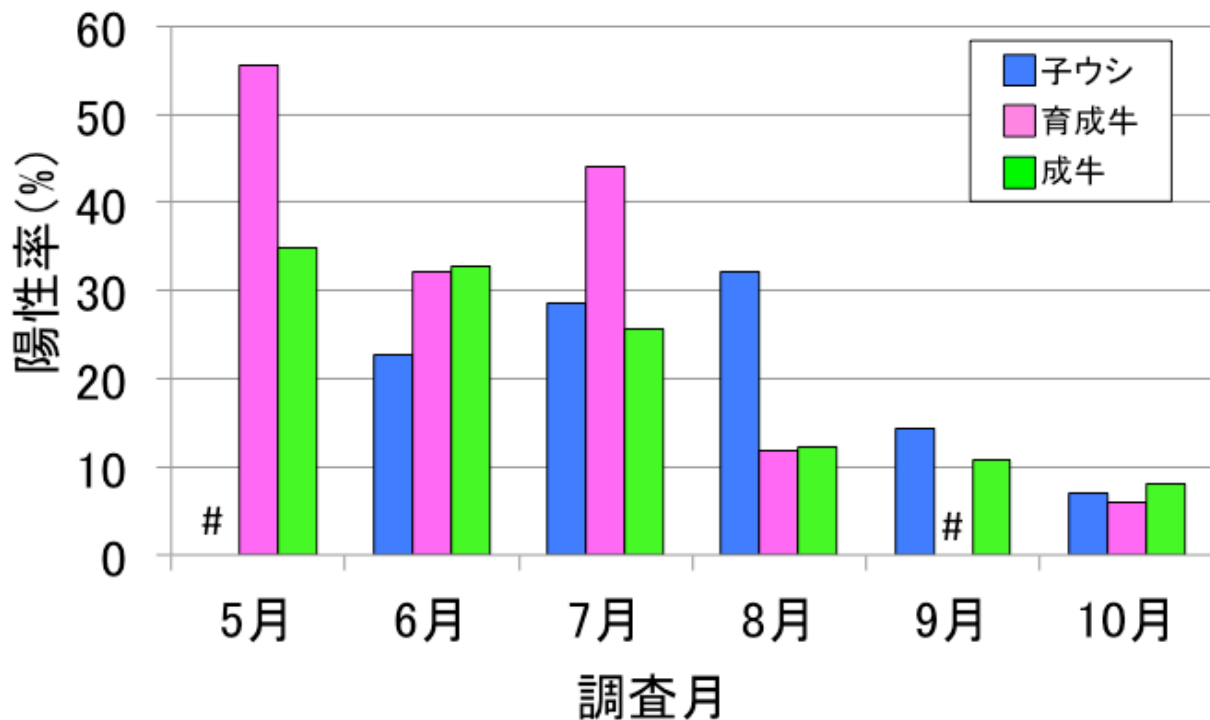


図 2-1 各月での月齢ごとのコクシジウム陽性率
コクシジウム未検出は # で示した。

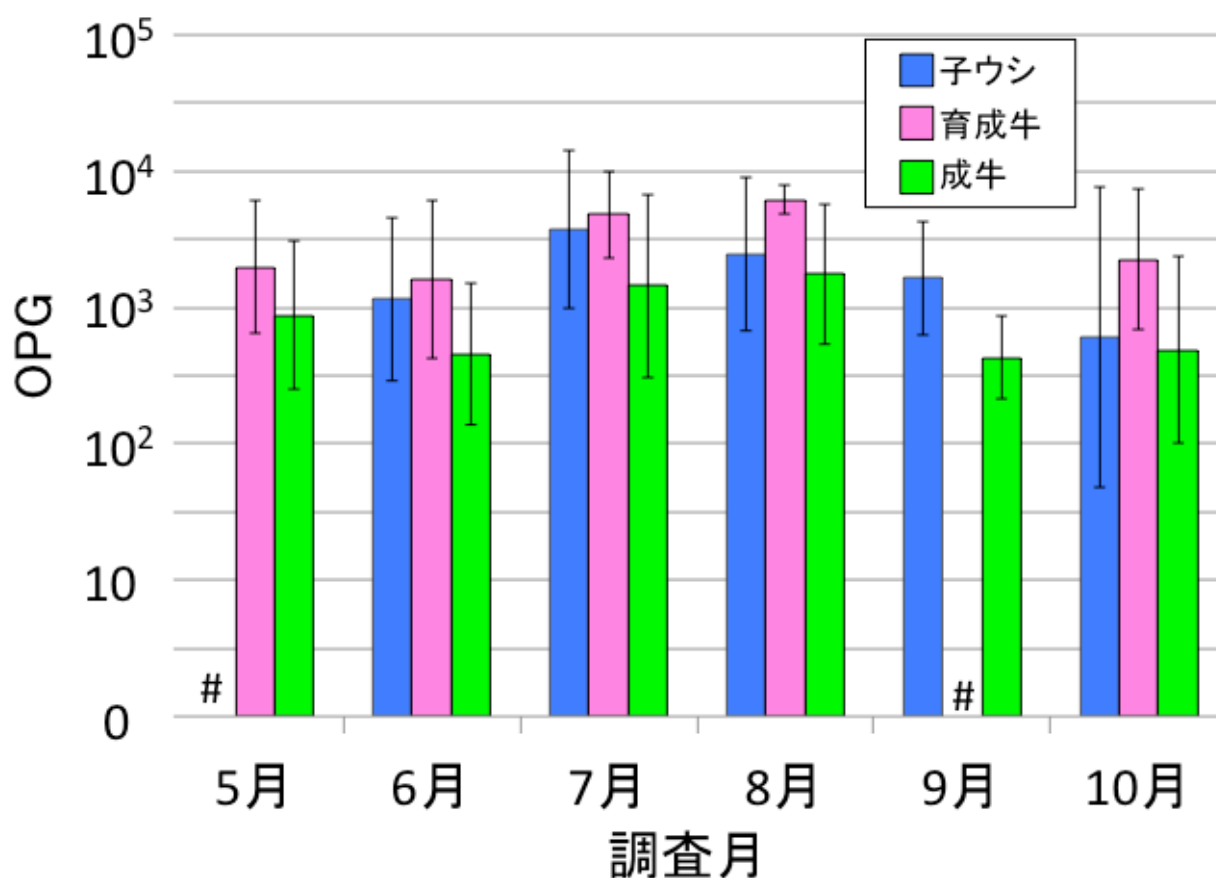


図 2-2 各月での月齢別平均 OPG

各月ごとのコクシジウム陽性個体の平均 OPG を示した。縦軸は Log scale で示した。コクシジウム未検出は # で示した。

表 2-2 月齢別コクシジウム陽性個体の最大 OPG

月齢区分	5月	6月	7月	8月	9月	10月
子ウシ	-	2.4×10^3	1.4×10^4	7.4×10^3	5.9×10^3	3.6×10^3
育成牛	5.4×10^3	3.8×10^3	8.9×10^3	7.1×10^3	-	3.8×10^3
成牛	9.7×10^3	5.8×10^3	1.2×10^4	7.9×10^3	8.0×10^2	5.8×10^3

表は、各月で観察されたコクシジウム陽性個体のもっとも多くオーシストを排出した個体の OPG を月齢ごとに示した。

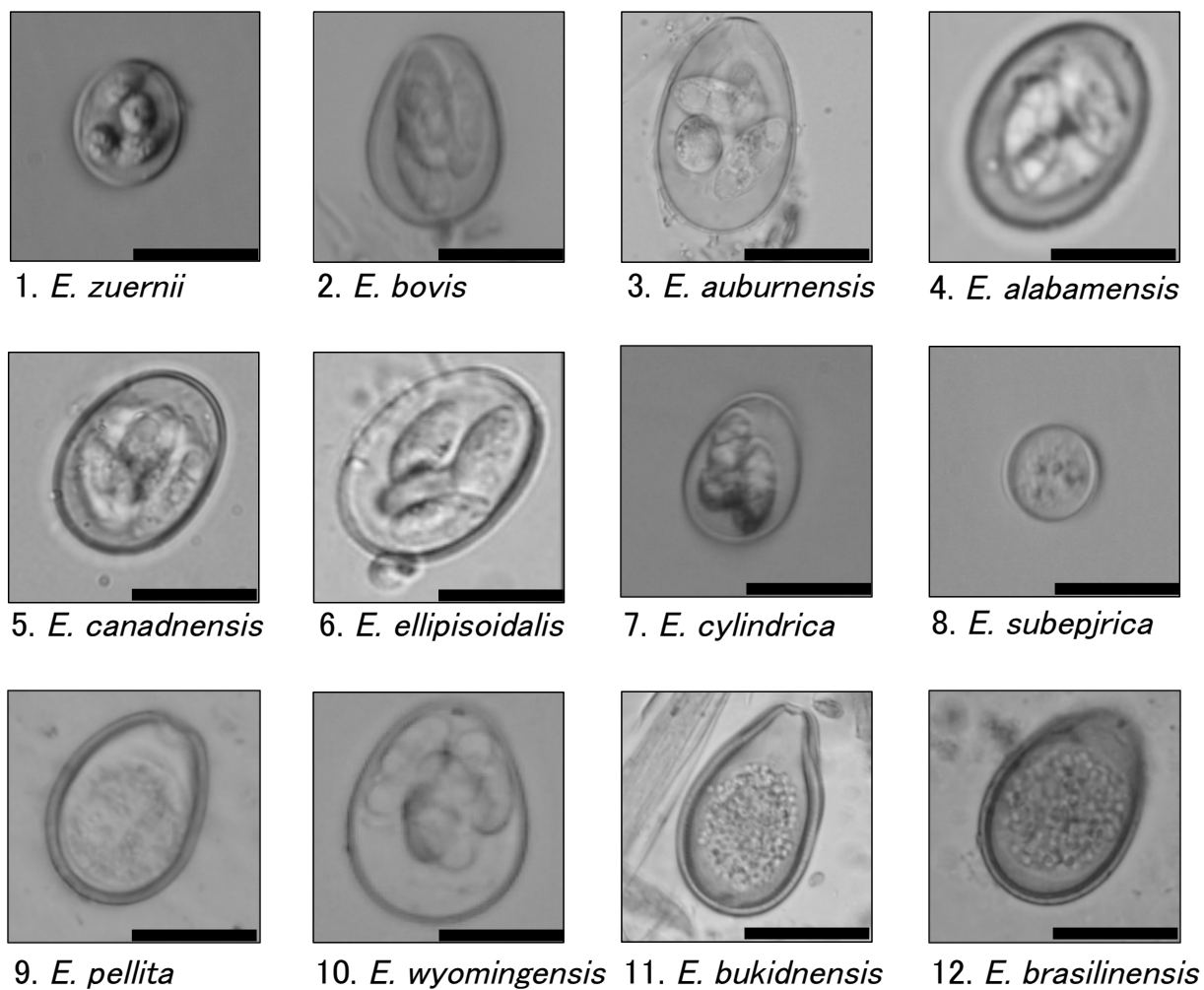


図 2-3 放牧牛より検出された *Eimeria* 属原虫のオーシスト

川渡農場で放牧されたウシから検出されたオーシスト。8, 9, 11, 12 は未成熟オーシスト

図中の Bar : 20 μ m

表 2-3 子ウシより検出された *Eimeria* 種構成の変化

個体No.	生年月日	採取月					初めてオーストが 排出された日齢
		5月	6月	7月	8月	9月	
B1709	2010.4.15		<i>Eb, Eal, Eca</i>				68
N1001	5.7				<i>Eb</i>	<i>Eb</i>	111
N1002	5.12		<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eca</i>			41
N1003	5.12		<i>Eb, Eel</i>				41
B1712	5.17		<i>Eb</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eca</i>	<i>Eb, Eau, Eca</i>		36
B1713	5.18			<i>Eb, Eau, Eca</i>	<i>Eb, Eau, Eca</i>		70
N1005	5.18			<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>	<i>Eb, Eal, Eca, Ecy</i>	70
N0982	5.25		<i>Eb</i>				28
N1007	5.26			<i>Ez, Eb, Eal, Eca</i>	<i>Eb, Eal</i>		62
N0983	5.27				<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>		91
N1008	5.27			<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>	<i>Eb</i>		61
N1009	6.1	<i>bb</i>		<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>		56
B1724	6.21	<i>bb</i>			<i>Eb, Eau, Eal</i>	<i>Eb, Ecy</i>	66
B1725	6.22	<i>bb</i>		<i>Eb, Eca</i>			35

各月でコクシジウム陽性が認められた子ウシより検出された *Eimeria* 種を示した。出生前を *bb* で示した。

Eb: *E. bovis*, *Ez*: *E. zuernii*, *Eau*: *E. auburnensis*, *Eal*: *E. alabamensis*, *Eca*: *E. canadensis*, *Eel*: *E. ellipsoidalis*, *Ecy*: *E. cylindrical*
出生前を *bb* で示した。

表 2-4 育成牛より検出された *Eimeria* 種構成の変化

個体No.	調査開始		採取月				
	時の月齢	5月	6月	7月	8月	9月	10月
B1702	10.8 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal</i>		<i>Eb, Eal, Esu, Epe, Ewy</i>	<i>Eb, Eal, Eca</i>		
N0970	11.0 ヶ月齢	<i>Eb, Esu</i>		<i>Ez, Eb, Eau, Eel, Ewy</i>			
B1694	11.3 ヶ月齢	<i>Eal, Eca, Eel</i>					
N0977	11.4 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>		<i>Eb, Eal, Eca</i>		<i>Eb, Eau, Eal,</i>	
N0511	11.5 ヶ月齢	<i>Eb, Eau</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb, Eau</i>			
N0513	11.5 ヶ月齢			<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>			<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>
N0515	11.5 ヶ月齢	<i>Eb, Esu</i>		<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>			
B1688	11.5 ヶ月齢	<i>Eb</i>	<i>Eb, Eal, Eel, Ecy</i>	<i>Eel, Epe</i>			
N0973	11.7 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Eel, Esu, Epe</i>		<i>Eb</i>			
N0975	11.7 ヶ月齢	<i>Eau, Eal, Eca</i>		<i>Eb, Eal, Eel</i>		<i>Eb, Eal, Eca, Eel</i>	
B1682	12.0 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Esu</i>					
B1683	12.0 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Esu, Ebu, Ebra</i>	<i>Eb, Eal, Eel</i>		<i>Eau, Eal, Eel</i>		
B1684	12.0 ヶ月齢		<i>Eb, Eal, Eel</i>				
N0972	12.0 ヶ月齢		<i>Eau, Eal, Eca, Esu, Epe</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eel</i>			<i>Eb, Eal, Eca, Eel</i>
N0508	12.1 ヶ月齢		<i>Eca</i>	<i>Eb, Eal</i>			
N0971	12.2 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Eel, Ecy, Esu</i>	<i>Ez, Eb, Eal</i>				
B1680	12.2 ヶ月齢	<i>Eb, Eel</i>					
B1681	12.2 ヶ月齢	<i>Eb, Eau, Eal, Eca</i>	<i>Eb, Eel</i>	<i>Ez, Eb, Eca</i>			
B1678	12.4 ヶ月齢		<i>Eb, Eca</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eel, Ecy, Esu</i>			
B1679	12.4 ヶ月齢	<i>Eb, Eau</i>					
N0507	12.4 ヶ月齢		<i>Eb, Eau, Eal, Eca, Ebu</i>				

各月でコクジラム陽性が認められた育成牛より検出された *Eimeria* 種を示した。

Eb: *E. bovis*, *Ez*: *E. zuernii*, *Eau*: *E. auburnensis*, *Eal*: *E. alabamensis*, *Eca*: *E. canadensis*, *Eel*: *E. ellipsoidalis*, *Ecy*: *E. cylindrica*, *Esu*: *E. subspherica*, *Epe*: *E. pellita*,

Ewy: *E. wyomingensis* *Ebu*: *E. bukidonensis*, *Ebra*: *E. brasiliensis*

表 2-5 成牛より検出された *Eimeria* 種構成の変化

個体No.	採取日					
	5月	6月	7月	8月	9月	10月
N415		<i>Eal</i>			<i>Eb</i>	<i>Eb</i>
N420	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel</i>	<i>Eb, Eau, Eal</i>				
N421		<i>Eoa</i>	<i>Eal, Eoa, Ecy, Esu</i>			
N427	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel</i>	<i>Eb, Eau, Eal</i>	<i>Eb</i>			
N428				<i>Eb, Eau, Eal, Eel</i>		
N444	<i>Eb, Eal</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb, Eoa</i>		<i>Eb</i>	
N463	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel, Eoy</i>	<i>Eb, Eal</i>	<i>Esu</i>	<i>Eb, Eoa</i>	<i>Eb, Ecy, Epe</i>	<i>Eb</i>
N469	<i>Eb</i>			<i>Eb, Eau, Eal</i>	<i>Eb, Eel</i>	
N478				<i>Eal</i>		
N487		<i>Eb, Eau, Eal, Eoa</i>	<i>Ez, Eb, Eau</i>	<i>Ez, Eb, Eau</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>
N495	<i>Eb, Eau, Eoa</i>		<i>Eb, Eal, Eal</i>			
N499	<i>Eb, Eoy</i>	<i>Eb, Eel</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel, Esu, Epe</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>
N501		<i>Eb</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>		<i>Eb</i>
N504	<i>Eb</i>	<i>Eb, Eau</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eal, Eal</i>		<i>Eb, Eau, Eal</i>	
N893	<i>Eb, Eau</i>		<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Ewy, Ebu</i>	<i>Ez, Eb</i>	<i>Ez, Eal, Eal</i>	<i>Eb, Eel</i>
N903			<i>Eb, Eal</i>			
N917	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel, Ecy</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel, Ecy, Esu</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel, Ecy, Esu</i>			
N930	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>			
N960	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>	<i>Ez, Eb, Eau, Eal</i>			
N965	<i>Eb, Eal</i>	<i>Eb, Eal, Eoa</i>	<i>Eb</i>			
B1051	<i>Eb, Eau</i>	<i>Eb, Eau</i>	<i>Eb, Ecy</i>			
B1067	<i>Eb, Eau</i>	<i>Eal</i>				
B1118	<i>Eb, Eau</i>	<i>Eb</i>				
B1187	<i>Eau, Eal, Eoa, Eel</i>	<i>Eb, Eau, Eal</i>				
B1190	<i>Eel</i>					
B1548			<i>Eb, Eau, Eal, Eel, Ecy</i>			
B1566	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa, Eel</i>	<i>Eau, Eal, Eoa</i>				
B1592	<i>Eb</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa</i>	<i>Eb, Eau, Eal, Eoa</i>			
B1613	<i>Eb</i>					
B1639	<i>Ez, Eau</i>	<i>Eb</i>	<i>Eb</i>			

各月でコクシジウム陽性が認められた成牛より検出された *Eimeria* 種を示した。

Eb: *E. bovis*, *Ez*: *E. zuernii*, *Eau*: *E. auburnensis*, *Eal*: *E. alabamensis*, *Eoa*: *E. canadensis*, *Eel*: *E. ellipsoidalis*, *Ecy*: *E. cylindrica*, *Esu*: *E. subspherica*, *Epe*: *E. pellita*,

Ewy: *E. wyomingensis* *Ebu*: *E. bukidonensis*

表 2-6 コクシジウムオースリストが初検出された子ウシの日齢と想定される初感染日齢

<i>Eimeria</i> 属原虫	本研究		既知の知見			引用文献
	n	初めてオースリストが排出された日齢	想定される初感染日齢	プレパテントピリオド	パテントピリオド	
<i>E. zuernii</i>	4	39-63	22 - 24	15-17日	11日	Mundt et al., 2005
<i>E. bovis</i>	14	28-111	7 - 12	16-21日	18-21日	Davis and Bowman, 1944
<i>E. auburnensis</i>	7	41-71	25 - 26	16-17日	2-4日	Chobotar, 1968
<i>E. alabamensis</i>	8	41-71	30 - 35	6-11日	1-10日	Davis et al., 1955
<i>E. canadensis</i>	8	35-71	—	記載なし	記載なし	—
<i>E. ellipsoidalis</i>	3	41-70	28 - 33	8-13日	記載なし	Hammond et al., 1963
<i>E. cylindrica</i>	0	70-87	50 - 59	11-20日	1-5日	Wilson, 1931

表の想定される初感染した日齢は、過去の記載された種ごとのプレパテントピリオドを参考に想定した。

表 2-7 親子間で検出されたコクシジウム種構成の変化

親子 個体番号	採取月									
	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月
親 B1500	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 B1709	—	Eb, Eal, Eca	—	—	—	—	—	—	—	—
親 N487	Eb, Eau, Eal, Eca	Ez, Eb, Eau	Ez, Eb, Eau	—	—	—	—	—	—	—
子 N1001	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
親 N415	—	Eal	Eal	—	—	—	—	—	—	—
子 N1002	—	Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eal	Ez, Eb, Eau, Eal, Eca	—	—	—	—	—	—	—
親 N415	—	Eal	—	—	—	—	—	—	—	—
子 N1003	—	Eb, Eal	—	—	—	—	—	—	—	—
親 B1531	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 B1712	—	Eb	Ez, Eb, Eau, Eca	Eb, Eau, Eca	—	—	—	—	—	—
親 B1625	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 B1713	—	—	Eb, Eau, Eca	Eb, Eau, Eca	—	—	—	—	—	—
親 N469	Eb	—	—	Eb, Eau, Eal	Eb, Eal	—	—	—	—	—
子 N1005	—	—	Ez, Eb, Eau, Eal, Eca, Eal	Eb, Eau, Eal, Eca, Eal	Eb, Eal, Eca, Ecy	Eb, Eal, Eca, Ecy	—	—	—	—
親 N927	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 N0982	—	Eb	—	—	—	—	—	—	—	—
親 N478	—	—	Eal	—	—	—	—	—	—	—
子 N1007	—	—	Ez, Eb, Eal, Eca	Eb, Eal	—	—	—	—	—	Eb
親 N897	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 N0983	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
親 N444	Eb, Eal	Eb	Eb, Eau, Eal, Eca	Eb, Eau, Eal, Eca	—	—	—	—	—	—
子 N1008	hb	—	Eb, Eau, Eal, Eca	Eb	—	—	—	—	—	—
親 N463	Eb, Eau, Eal, Eca, Eal, Ecy	Eb, Eal	Eb, Eau, Eal, Eca	Eb, Eau, Eal, Eca	Eb, Eca	Eb, Ecy, Epe	—	—	—	Eb
子 N1009	hb	—	Eb, Eau, Eal, Eca	Eb, Eau, Eal, Eca	—	—	—	—	—	—
親 B1051	—	Eb, Eau	Eb, Ecy	—	—	—	—	—	—	—
子 B1724	hb	—	—	Eb, Eau, Eal	Eb, Ecy	—	—	—	—	—
親 B978	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
子 B1725	hb	—	Eb, Eca	—	—	—	—	—	—	—

各月でコクシジウム陽性が認められた親子より検出された *Eimeria* 種を示した。

Eb: *E. bovis*, Ez: *E. zuernii*, Eau: *E. auburnensis*, Eal: *E. alabamensis*, Eca: *E. canadensis*, Eel: *E. ellipsoidalis*, Ecy: *E. cylindrica*, Esu: *E. subspherica*, Epe: *E. peilita*,

Ewy: *E. wyomingensis* Ebu: *E. bukidonensis*

表 2-8 宮城県と岡山県に位置する農家別コクシジウム調査結果

採取地 農場	宮城県					岡山県			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
検査頭数	47	43	28	4	5	13	26	5	7
陽性数	2	8	4	2	2	5	12	0	5
陽性率	4.3	18.2	12.1	50	40	38.5	46.2	0	71.4

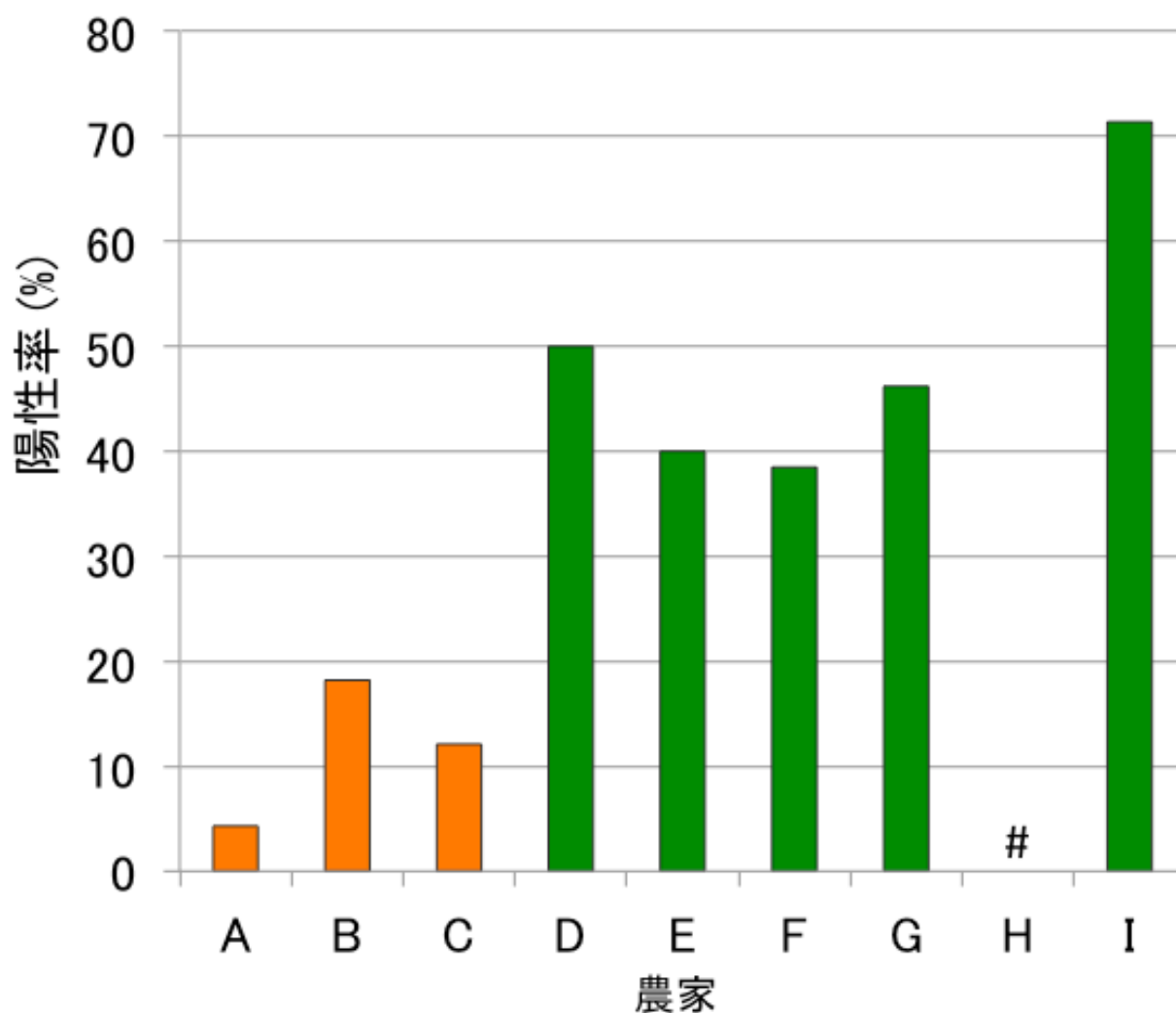


図 2-4 大崎市と津山市に位置する農家ごとのコクシジウム陽性率

A - C 農家:大崎市、D - I 農家:津山市

はコクシジウム未検出を示す。

表 2-9 調査農家で検出された *Eimeria* 属原虫種とその陽性頭数

<i>Eimeria</i> 属原虫	陽性頭数							
	大崎市			津山市				
	農場							
	A	B	C	D	E	F	G	I
<i>E. zuernii</i>	0	0	0	1	2	5	8	2
<i>E. bovis</i>	1	3	3	1	1	1	9	2
<i>E. auburnensis</i>	3	3	3	2	1	5	10	1
<i>E. alabamensis</i>	2	0	1	2	2	2	4	1
<i>E. ellipsoidalis</i>	2	1	2	0	1	3	8	1
<i>E. canadensis</i>	1	1	2	0	1	2	4	1
<i>E. cylindrica</i>	0	2	0	1	1	2	0	0
コクシジウム陽性頭数	4	5	5	2	2	5	15	2
検査頭数	47	43	29	4	5	13	26	7

D 農家



G 農家



I 農家



H 農家



図 2-5 津山市に位置する農家の飼養風景
H 農家はコクシジウムが検出されなかった農家

表 2-10 調査農家の飼育様式の一覧と過去 5 年間の病気の発症歴

採取地	農家	ウシ種	飼育	牛床	敷料	敷料の交換	コクシジウム の有無	過去5年間の発症歴
大崎市	A	ホルスタイン	ストール飼育	セメント	ワラ	2週に1回	+	コクシジウム症
	B	ホルスタイン	ストール飼育	セメント	ワラ	2週に1回	+	なし
	C	ホルスタイン	ストール飼育	セメント	ワラ	2週に1回	+	なし
	D	黒毛和種	パドック、多頭飼育	土壌	なし	なし	+	なし
	E	黒毛和種	パドック、多頭飼育	土壌	なし	なし	+	なし
	F	黒毛和種	パドック、多頭飼育	土壌	コンポスト、ワラ	月に1回	+	牛カンピロバクター症
	G	黒毛和種	パドック、多頭飼育	土壌	砂地	なし	+	クリプトスポリジウム検出
	H	黒毛和種	カウパッチ、単頭飼育	セメント	おが粉、かんな屑	2週に1回	-	なし
	I	黒毛和種	パドック、多頭飼育	土壌	なし	なし	+	なし

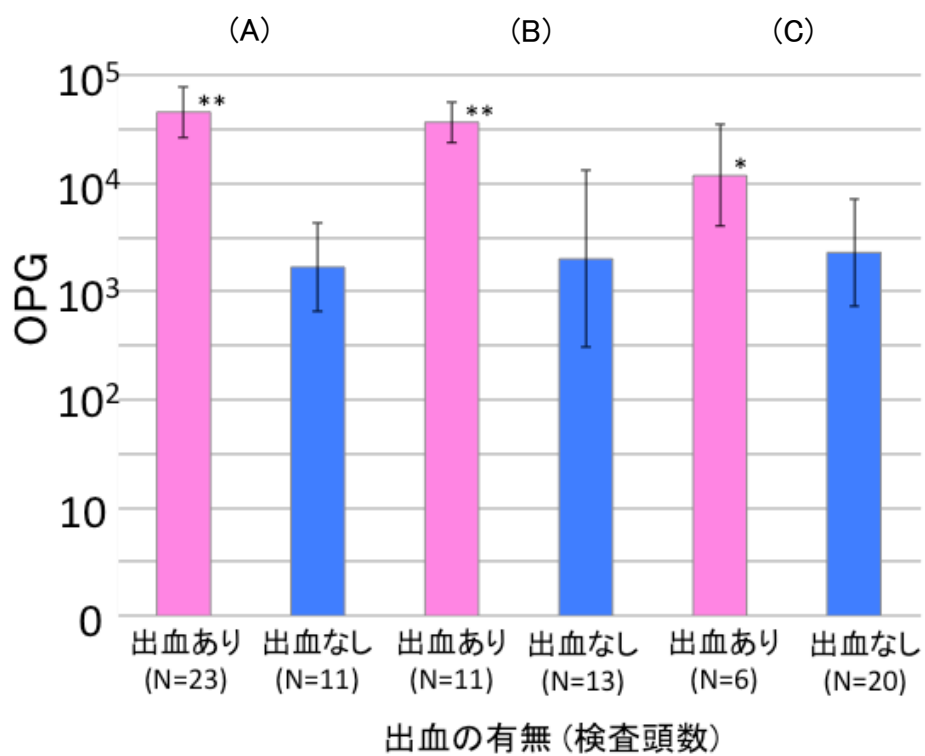
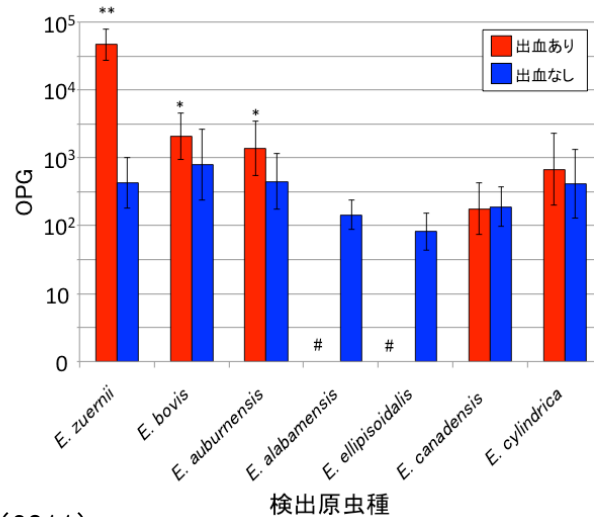


図 2-6 下痢を排泄した個体の平均 OPG

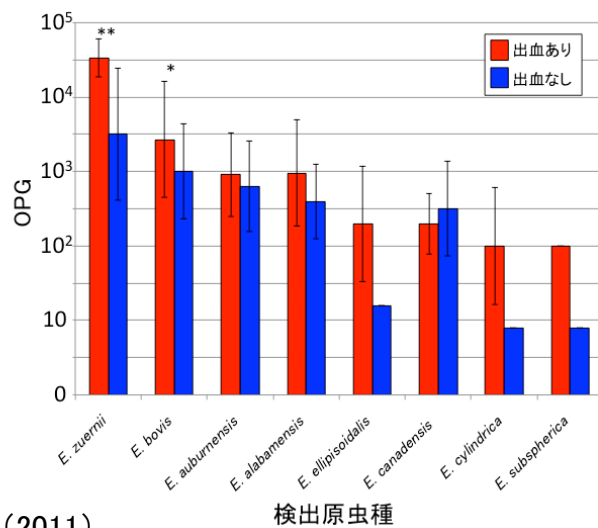
(A) : 大崎市 (2010)、(B) : 大崎市 (2011)、(C) : 津山市 (2012)

出血の有無における有意水準は 0.01 より小さいと**、0.05 より小さく、0.01 以上では*で示した。

A:大崎市(2010)



B:大崎市(2011)



C:津山市(2011)

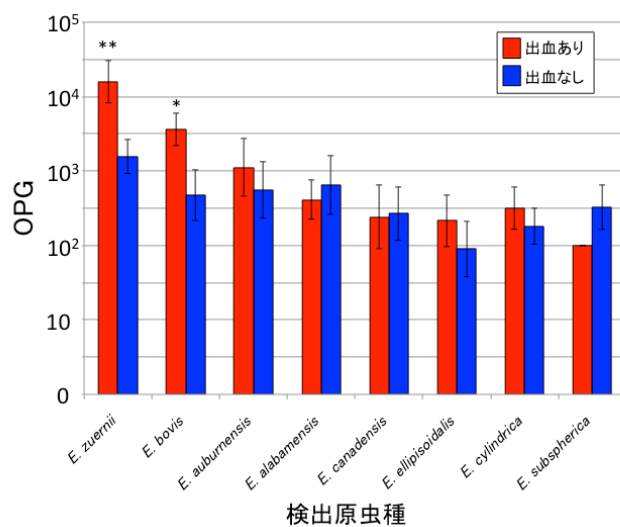


図 2-7 下痢を排泄した個体より検出された種別平均 OPG

出血の有無における有意水準は0.01より小さいと**、0.05より小さく、0.01以上では*で示した。

表 2-11 下痢を排泄した個体のコクシジウム感染状況

下痢(出血あり)				陽性頭数	
<i>E. zeurnii</i>	<i>E. bovis</i>	その他	<i>Eimeria</i>	大崎市 (N=58)	津山市 (N=26)
+	+	+		28/34	5/6
+	+	—		3/34	0/6
+	—	—		3/34	1/6

下痢(出血なし)					
+	+	+		15/24	13/20
+	+	—		3/24	0/20
—	+	+		3/24	4/20
+	—	+		2/24	1/20
+	—	—		1/24	0/20
—	—	+		0/24	2/20

表は下痢を排泄した個体のコクシジウム感染状況を示した。大崎市の供した 58 頭は 2010 年、2011 年の試料をまとめて示した。

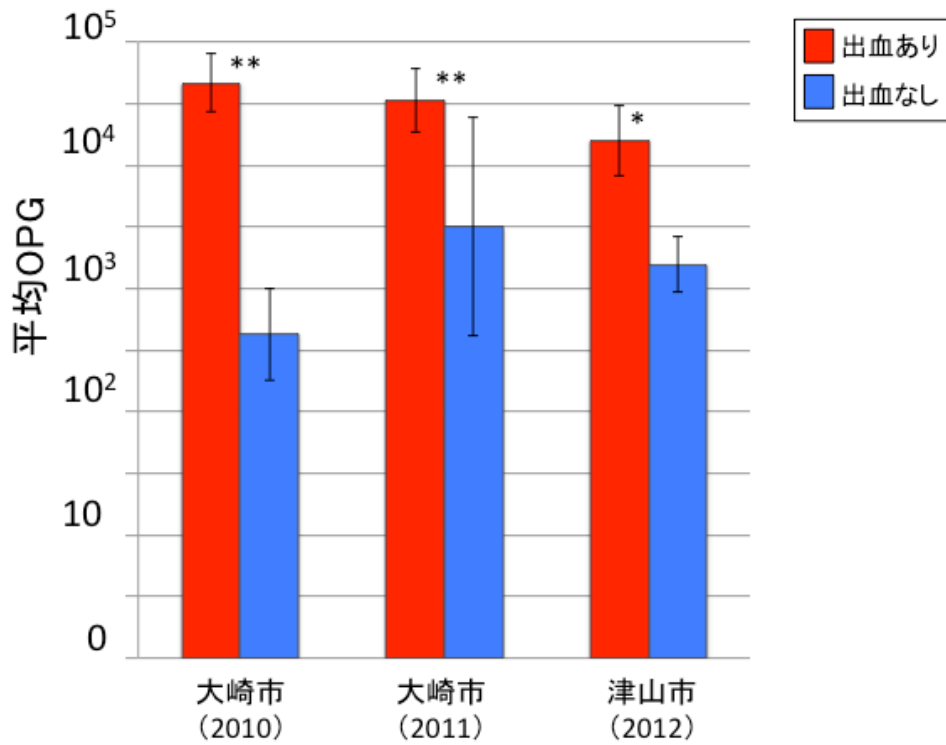


図 2-8 下痢を排泄した個体より検出された *E. zuernii* の平均 OPG
 出血の有無における有意水準は 0.01 より小さいと**、0.05 より小さく、0.01 以上では*で示した。

表 2-12 下痢を排泄した個体より検出された *E. zuernii* の最大および最少 OPG

採取地	大崎市(2010)		大崎市(2010)		津山市(2011)	
	+	-	+	-	+	-
Max	9.0 × 10 ⁴	9.0 × 10 ³	6.2 × 10 ⁴	9.0 × 10 ³	5.0 × 10 ⁴	3.2 × 10 ³
Min	1.0 × 10 ⁴	1.0 × 10 ³	1.3 × 10 ⁴	1.0 × 10 ²	1.0 × 10 ⁴	7.0 × 10 ²

第3章

病原性ウシコクシジウム種の 18S rRNA および CO1 遺伝子における分子系統解析

3.1 緒言

これまで、コクシジウム原虫の分類は、オーシストの大きさや内部の微細構造に基づいて行われてきた。分子情報に基づく系統解析では、同じ形態のオーシストが多系統となること、あるいは、異なる形態のオーシストがまったく単一種と見られるクレード内に分岐することが知られている。例として、ツルに感染するコクシジウム原虫では、*E. reichenowi* 種と分類された複数のオーシストが、進化系統的に全く異なる位置へ分岐したことが示されている (Honma et al., 2011)。また、齧歯類やツルのコクシジウムにおいて、オーシストの長短径や微細構造は単一種でも、多型に富むことが報告されている (Gardner and Duszynski, 1971; Courtney et al., 1975; Parker and Duszynski, 1986)。そこで同定したウシコクシジウムの各オーシストから得た配列を比較し、形態に基づく分類とそれぞれの系統関係の整合性を検証することが重要である。

アピコンプレックス門原虫の系統解析には、18S rRNA 遺伝子の塩基配列が広く用いられており (Morrison, 2008)、その配列情報も多く蓄積されている。Ogedengbe ら (2011) は、ミトコンドリアゲノムにある Cytochrome c Oxidase subunit 1 (CO1) と 18S rRNA 遺伝子と組み合わせた系統解析から、ニワトリコクシジウムの種間あるいは種内の系統関係をより高い解像度で解析できることを示している。そこで、本研究では、マーカー遺伝子は、18S rRNA 遺伝子およびミトコンドリアゲノムの CO1 遺伝子とした。

本研究では、複数のコクシジウム種が混在するサンプルから特定のオーシストを選別し、DNA が増幅できるという利点があるシングルオーシスト PCR 法 (Honma et al., 2007)

を応用した。大崎市と津山市のコクシジウム調査で異なる病勢を示した個体の糞便から分離された *E. zuernii* と *E. bovis* について、それら 2 種を比較し、地域や病勢との関連する多型を検証した。また *Eimeria* 属内の進化系統関係を解析した。

2. 材料と方法

2.1 Single Oocyst Multiplex PCR(SOM-PCR)による DNA 増幅と配列決定

2.1.1 供試原虫

供した試料は、大崎市内の 12 頭、津山市内の 10 頭の子ウシ糞便試料から採取された *Eimeria zuernii* と *E. bovis* のオーシスト 92 個である。

2.1.2 オーシストの単離と形態的特徴の記録

オーシストを滅菌水へ懸濁し、滅菌水のドロップを 2 つのせたシャーレへドロップとしてのをせた。このシャーレを倒立顕微鏡におき、マイクロピペットを用いて、単一のオーシストを採取し、滅菌水のドロップを二度通す事によって、オーシストを洗浄した。浮遊するスポロシストの混入に、細心の注意を払った。分離した各オーシストは、デジタルカメラ (Lumix DMC-GH1、Panasonic、日本) で撮影し、形態情報を記録した後、約 1 μ l の滅菌水と共に PCR チューブへ移した。記録した形態的特徴は、オーシストの形および長短径、微細構造の特徴 (マイクロパイル、マイクロパイルキャップ、オーシスト残体、スポロシスト残体、極小体、スティーダボディの有無およびその形状) である。

2.1.3 単離したオーシストからの DNA 抽出

PCR チューブに回収したオーシストに、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 3 分と $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 秒を 1 サイクルとし

た凍結融解処理を 5 回行い、オーシスト壁を破砕した (Honma et al., 2007)。各 PCR チューブに 4 μ l の reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.01% Proteinase - K, 0.01% sodium dodecyl sulphate) を加えて、Total 5 μ l とし、37 °C, 60 min, 95 °C, 10 min のインキュベーションを行い、オーシストのタンパク質分解処理とした。タンパク質分解処理後の 5 μ l の全量を PCR のテンプレートとした。

2.1.4 DNA 増幅に用いたプライマー

本研究において、PCR 増幅とシーケンシング解析に用いたプライマーは、表 3-1 に示す。ウシコクシジウムの核ゲノムの 18S rRNA 遺伝子配列 (SSU) のほぼ全長を標的とした PCR は、ERIB1、ERIB20 を用いた。また、ミトコンドリアゲノムの CO1 遺伝子は、Cocci_CO1F、Cocci_CO1R を用いて増幅した。Erib20 は、*Eimeria tenella* (AF026388) と *Toxoplasma gondii* (X75453) の 18S rRNA 遺伝子配列全長において、保存性の高い領域から、Primer 3 v4.0 を用いて設計した。シーケンス解析のプライマーウォーキングに用いた CO1_300F と CO1_700R は以下のようにして作成した。*E. zuernii* strain Guraph (HM771687) と *E. tenella* (HM771676) の配列を比較し、Cocci_CO1F と Cocci_CO1R の存在する保存性の高い領域から、Primer 3 v4.0 により作成した。18S rRNA 遺伝子全長のシーケンス解析におけるプライマーウォーキングは、608-22F、1105_21R (Honma et al., 2007) を用いた。

2.1.5 Single Oocyst Multiplex PCR による DNA 増幅

Multiplex PCR の増幅は、Multiplex Assay Kit (Takara) のマニュアルに従って行った。多くの増幅産物を得るため、1st PCR と同じ 2 組のプライマーを用いて 2 nd PCR を行っ

た。得られた PCR 産物についてアガロースゲルによる電気泳動を行い、エチジウムブロマイドによる染色したのち UV イルミネーターで標的とした遺伝子の増幅を確認した。

2.1.6 クローニング、シーケンシング解析

得られた PCR 産物を UV イルミネーターで確認後、アガロースゲルより切り出し、Wizard[®] Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製処理を行った。また、CO1 遺伝子は、Promega pGEM T Easy Cloning kit (Promega) をマニュアルに従ってクローニングを行った。構築されたクローンライブラリについて、T7 プロモータープライマーと M13 reverse プライマーによりコロニーダイレクト PCR を行い、インサートの有無と長さを確認した。予想長の産物を含むクローンでは、ExoSAP-IT で処理し、ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と ABI Genetic Analyzer 3130xl (Applied Biosystems) を用いて、各遺伝子の塩基配列を決定した。決定した 18S rRNA 遺伝子配列および CO1 遺伝子の部分配列は、既存の配列と比較するために NCBI が提供する BLAST により相同性検索を行った。ただし、*E. bovis* の CO1 遺伝子の配列は、未だ登録されていないので、*E. zuernii* の部分配列と比較した。

2.1.7 決定した配列の分子系統解析

シーケンシング解析により得られた塩基配列は、MEGA5 v5.2.2 (Tamura et al., 2011) に備わっている MUSCLE (Edgar, 2004) を用い、初期設定にてアライメントを行った。

アライメントを行った 18S rRNA 遺伝子と CO1 領域の塩基配列に基づく分子系統解析は、最尤法 (ML 法) および近隣結合法 (NJ 法) を用いた。18S rRNA 遺伝子では、ギ

ギャップを含む座位を排除した 1360 bp のアライメント配列を用いた。CO1 領域では、解析に用いた全生物種で共通した 635 bp の領域の塩基配列を用いた。両遺伝子の塩基配列の NJ および ML 法による系統解析と樹形の描画には MEGA5 を用いた。NJ 法の p-distance の計算には Maximum Composite Likelihood method を用いた。推定された系統樹の信頼性を検定するために 1000 回の反復でブートストラップ解析を行った。ML 法による系統解析において、最適な塩基置換モデルは MEGA5 のオプションである Find Best DNA/ Protein Model を用いて推定し、ブートストラップ解析は 200 回の反復で行った。

3. 結果

3.1. 単離した *E. zuernii* と *E. bovis* の PCR 増幅結果と配列決定したオーシストの形態的特徴

倒立顕微鏡下で単離した *E. zuernii* および *E. bovis* オーシスト 92 個より、40 個にて PCR 増幅に成功した。配列が得られたオーシストの形態的特徴は表 3-2、3-3 にまとめた。*E. zuernii* のオーシストは、卵円に近い類円型オーシストであり、長径: 17-19.8 μm , 短径 : 15.3-18.2 μm であった。一方、*E. bovis* と同定したオーシストも従来通り卵円型であり、サイズは長径: 19.8-28.1 μm , 短径 : 17.2-20.5 μm であった。*E. zuernii* オーシスト 20 個において、17 個のオーシストは、極小体が 1 つであり、3 個のオーシストは、複数の極小体を持つことが観察された。しかし、極小体の多型は、宿主の病勢と関係なく観察された。

3.2. 単離した *E. zuernii* と *E. bovis* のオーシストの決定した配列

本研究で決定した両原虫のクローンは、登録された配列とは異なっていた。各オーシ

ストより得られた *E. zuernii* の 18S rRNA 遺伝子配列は、大崎市で 1 クローン (zr1)、津山市で 1 クローン (zr2)、*E. bovis* の 18S rRNA 遺伝子配列は、大崎市で 1 クローン (br1)、津山市で 2 クローン (br1、br2) であった。一方、*E. zuernii* の CO1 遺伝子配列は、大崎市と津山市で 1 クローン (zc1) であり、*E. bovis* の CO1 遺伝子配列は、大崎市で 1 クローン (bc1)、津山市で 1 クローン (bc2) であった。本研究で得られた *E. zuernii* および *E. bovis* の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列を NCBI に登録された両原虫種の 18S rRNA 遺伝子配列と比較すると、*E. zuernii* では 2-3 bp、*E. bovis* では 3-7 bp で異なる塩基が観察された。

各オーシストより得られた 18S rRNA 遺伝子のほぼ全長、CO1 遺伝子の部分塩基配列を用いた BLAST による相同性検索の結果は、表 3-2、3-3 に示した。18S rRNA 遺伝子については、*E. zuernii* のオーシストから得られた配列はいずれも *E. zuernii* に最も近縁 (相同性 99%) であった。*E. bovis* のオーシストから得られた配列はいずれも *E. bovis* と最も近縁 (相同性 99-100 %) であった。CO1 遺伝子については、*E. zuernii* のオーシストから得られた配列はいずれも *E. zuernii* に最も近縁 (相同性 99 %) であった。*E. bovis* のオーシストから得られた各配列を比較した結果、相同性は 99-100% であった。また、本研究で決定した *E. zuernii* と同定したオーシストの CO1 遺伝子の塩基配列および登録された *E. zuernii* の CO1 遺伝子の塩基配列との比較を行った結果、相同性は 95-96 % であった。出血が認められた下痢症状を示した個体の糞便から単離した *E. bovis* および *E. zuernii* と、出血が認められない糞便から単離した両原虫では、いずれの遺伝子においても、得られた配列のクローンと症状に関係はなかった。

3.3 18S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統解析

Single Oocyst Multiplex PCR で増幅し、得られた 18S rRNA 遺伝子の配列に基づく

Eimeria 属原虫の分子系統樹では、NJ 解析において、ウシ *Eimeria* は、ヒツジ *Eimeria* を含むクラスターA、B と齧歯類 *Eimeria* を含むクラスターC へ分岐した。また、本研究で得られた *E. zuernii* と *E. bovis* のオーシストの配列は、クラスターB に含まれた。これらクラスターB の内部を見ると、本研究で得られた *E. zuernii* のオーシストの配列および既存の *E. zuernii* の配列は、ブートストラップ値 85 で支持される単系統群へ分岐した。次に、ヒツジ *Eimeria* である *E. ovinoidalis* が分岐し、*E. ellipsoidalis* と *E. bovis* が分岐した。また、本研究で得られた *E. bovis* のオーシストは、既存の *E. bovis* の配列とブートストラップ値 66 と低いですが、単系統群を形成した。したがって、*E. zuernii* および *E. bovis* について、オーシストの形態に基づく分類群と分子情報による単系統群は一致した。また、ML 解析においても、NJ 解析と同様に分岐し、本研究で得られた *E. zuernii* および *E. bovis* において、単系統性が支持された (*E. zuernii* : 81, *E. bovis* : 66)。

ヒツジ *Eimeria* を含むクラスターA、B において、クラスターA では、ウシ *Eimeria* である *E. cylindrica*, *E. auburnensis*, *E. wyomingensis*, *E. canadensis* の4種とヒツジ *Eimeria* である *E. faurei* を含む単系統群 (NJ : 33, ML : 40)、またヒツジ *Eimeria* である *E. weybridgensis*, *E. crandalis*, *E. ahsata*, *E. ovinoidalis* の4種とウシ *Eimeria* である *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis*, *E. bovis* は、よく支持された単系統群 (NJ : 97, ML : 96) を形成した (NJ : 99, ML : 100)。一方、クラスターC は (NJ : 38, ML : 34)、でまとめ、ここにはウシ *Eimeria* に加えて、齧歯類の *Eimeria* やウサギ *Eimeria* を含む。そして、ウシ *Eimeria* である *E. subspherica*, *E. bukidonensis*, *E. alabamensis* の3種がブートストラップ値 98 で単系統群を形成した。

3.3 CO1 遺伝子に基づいた分子系統解析

本研究で得られた *E. zuernii* と *E. bovis* オーシストの CO1 遺伝子の部分配列に基づいた分子系統樹では、*E. zuernii* と *E. bovis* のそれぞれの単系統性が高いブートストラップ値で支持された (*E. zuernii*: 100, *E. bovis*: 99) (図 3-5)。また、これは、ML 系統樹でも高いブートストラップ値で単系統性が支持された (*E. zuernii*: 100, *E. bovis*: 98) (図 3-6)。したがって、18S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統樹と同様に、CO1 遺伝子に基づく分子系統樹においても、*E. zuernii* および *E. bovis* の形態情報と分子情報は一致した。

4. 考察

オーシストのサイズは、これまでの記載によるものとオーシストサイズと相違ない値であった。また *E. zuernii* オーシスト内部の微細構造では、極小体の数に多型が観察された。症状との関係や系統関係には反映されなかった。オーシストサイズや内部の微細構造については、Gardner と Duszynski (1971) が同じ *Eimeria* 種内のサイズや微細構造の多型を報告している。そのため、*E. zuernii* にも極小体の数に多型があることが示された。

ニワトリ由来の *E. mitis* の 18S rRNA 遺伝子には、2 つの遺伝子型が存在することが報告されてきた (Vrba et al., 2011)。しかし、本研究で得られた *E. bovis* および *E. zuernii* と、登録されたこれら両原虫種の 18S rRNA 遺伝子の塩基配列の種内相同性は極めて高い相同性を示したが、複数の遺伝子型があることが示された。

18S rRNA 遺伝子に基づいた分子系統樹より、ウシ *Eimeria* は、ヒツジ *Eimeria* を含むクラスター A、B と齧歯類 *Eimeria* とウサギ *Eimeria* を含むクラスター C の 3 つに分岐し、本研究で得られた *E. zuernii* と *E. bovis* オーシストは、*E. ellipsoidalis* およびヒツジ *Eimeria* である *E. ovinoidalis* を含む単系統群を形成することが明らかとなっ

た。*E. zuernii* と *E. bovis* の単系統群の中に *E. ellipsoidalis* を含む結果は、Kokuzawa ら (2013) と同様の結果であった。一方、Kawahara (2010) がウシコクシジウムの核 DNA にコードされる ITS1 領域を用いた分子系統樹と異なる。この結果の違いは、供試した試料の違い、あるいは、系統解析に用いた遺伝子の違いによるものだろう。これらの事は、ウシ *Eimeria* の系統解析には、ITS や 18S に加え、より多くの遺伝子を用いる必要性を示している。本研究において、*E. zuernii* は、*E. ovinoidalis*、*E. ellipsoidalis* と *E. bovis* がクラスターBを形成した。これは、Li ら (2006) による、ウシ由来の *Cyclosora* および反芻類の *Eimeria* の 18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果と合致している。ウシとヒツジは共に反芻類であり、近い関係にある。しかし、ウシ由来 *Eimeria* の内部にヒツジ *Eimeria* である *E. ovinoidalis* は分岐している。このことから、*E. ovinoidalis* がウシ *Eimeria* への Host switch、もしくは、ウシとヒツジの両方に感染できる可能性を示している。

本研究では 18S rRNA 遺伝子配列と CO1 遺伝子配列を用いた。さらに単一オーシストから各遺伝子配列を得ることができた。その結果により近縁な種間の単系統性を支持する結果となり、両遺伝子配列内において、解析対象配列内に分子マーカーとして有効な配列が得られた。この分子マーカーを糞便から抽出した genomic DNA に適用することにより、野外調査をより簡便化かつ高い解像度の解析を行うことに期待できる。また、本研究で明らかとなったウシ *Eimeria* とヒツジ *Eimeria* および齧歯類 *Eimeria* の単系統群の形成をより詳細に解析するためには、ヒツジコクシジウムも本研究と同様に、形態ごとに単離したオーシストより配列を決定することができれば、より詳細な反芻類を含む *Eimeria* 属原虫の分子系統進化を推定できると考えられる。

表 3-1 ウシコクシジウムTMの遺伝子解析に用いたプライマー

名称	配列 (5'-3')	用途	Ref.
Erib1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	増幅 および シークエンス	Berta et al., 1997
Erib20	AACTCGTTGCATGCATCAG	増幅 および シークエンス	本研究
Cocci_CO1F	GGTTCAGGTTGTTGGTGAC	増幅 および シークエンス	Ogedenabe et al., 2011
Cocci_CO1R	AATCCAATAACCGCACCAAG	増幅 および シークエンス	Ogedenabe et al., 2011
608_22F	AAAGCTCGTAGTTGGAITTTCTG	シークエンス	Honma et al., 2007
1105_21R	AAGTTTCAGCCTTGGCACCAT	シークエンス	Honma et al., 2007
CO1_300F	TGTTGGGTGTTGCTAATGGA	シークエンス	本研究
CO1_700R	TCATGAAGAGCTACATCTACAGCAG	シークエンス	本研究

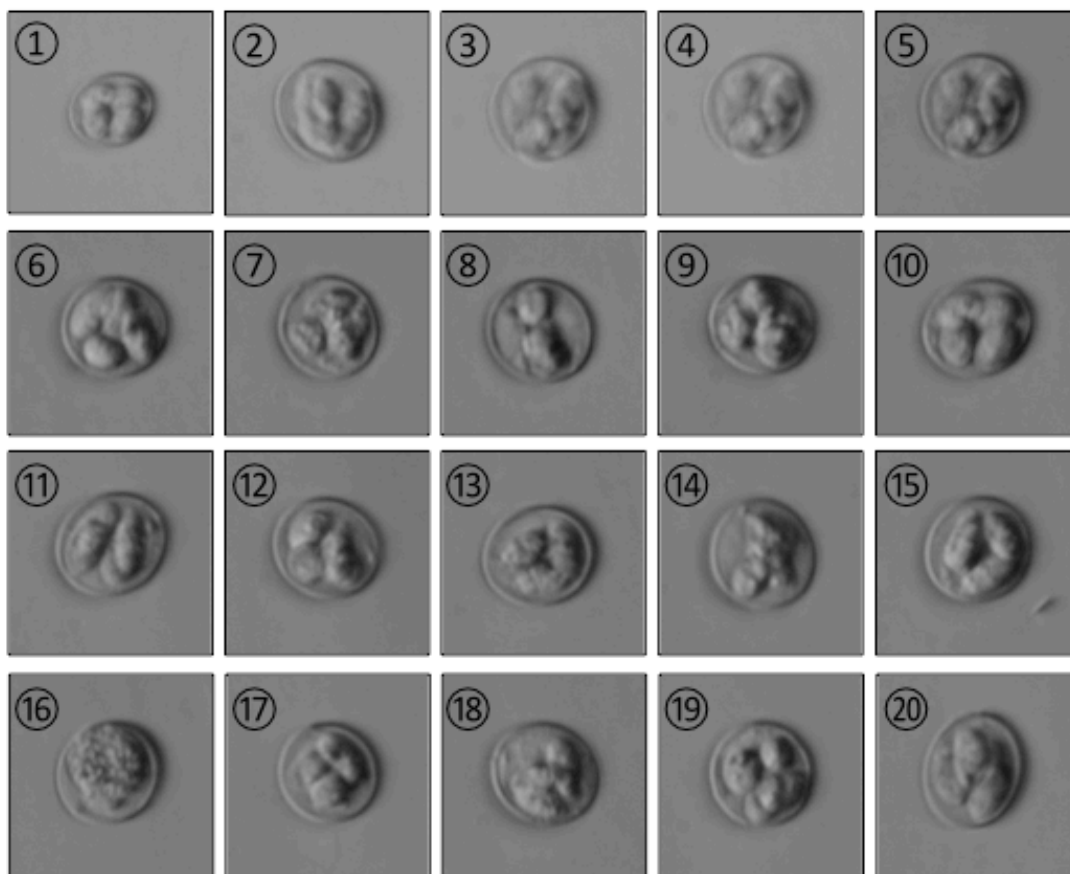


図 3-1 SOM - PCR により 18S rRNA と CO1 遺伝子断片を増幅した *Eimeria zuernii* オーシスト
 ①から⑩は大崎市で採取した下痢便から単離した *E. zuernii* オーシスト、⑪から⑳は津山市で
 採取した下痢便から単離した *E. zuernii* オーシスト。①から⑤、⑪から⑮は、出血を伴った下痢
 便から単離したオーシスト、⑥から⑩、⑯から⑳は、出血を伴わない下痢便から単離したオーシ
 スト。

表 3-2 *E. zuernii* より得た 18S rRNA 遺伝子および CO1 の塩基配列の Blast による相同性検索結果とオーストの形態的特徴

番号	採取地	形態	長さ	短径	長さ×短径比	18S rRNA		CO1				
						クローン名	断片長 (bp)	最近縁種 (アクセシオン番号)	相同性(同一塩基数)	クローン名	断片長 (bp)	最近縁種 (アクセシオン番号)
①	大崎市	類円型	19.8	17.2	1.15	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : 4-1 (AB769665) 99% (1759)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
②	大崎市	類円型	17.3	17	1.02	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1759)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
③	大崎市	類円型	19.8	18.2	1.09	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1759)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
④	大崎市	類円型	17.2	17	1.01	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1759)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑤	大崎市	類円型	19.8	18.2	1.09	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1759)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑥	大崎市	類円型	19.8	17.2	1.15	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑦	大崎市	類円型	19.8	17.2	1.15	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑧	大崎市	類円型	19.8	17.2	1.15	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑨	大崎市	類円型	17.2	17	1.01	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑩	大崎市	類円型	17.2	17	1.01	zr1	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1759, 1)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (804)
⑪	津山市	類円型	17	15.3	1.07	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 3-4 (AB769664) 99% (1759, 1)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑫	津山市	類円型	17.6	16.5	1.07	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑬	津山市	類円型	17.3	16.9	1.02	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑭	津山市	類円型	18.3	15.6	1.17	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑮	津山市	類円型	17	15.3	1.11	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑯	津山市	類円型	17.6	16.5	1.07	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑰	津山市	類円型	17.3	16.9	1.02	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 3-4 (AB769664) 99% (1759, 1)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑱	津山市	類円型	18.3	15.6	1.17	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑲	津山市	類円型	19.2	17.8	1.08	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)
⑳	津山市	類円型	18.5	17.9	1.03	zr2	1762	<i>Eimeria zuernii</i> : isolate: 4-1 (AB769665) 99% (1760)	zcl	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	99% (800)

①から⑳は図 3-1 に示した各オーストに相当する。

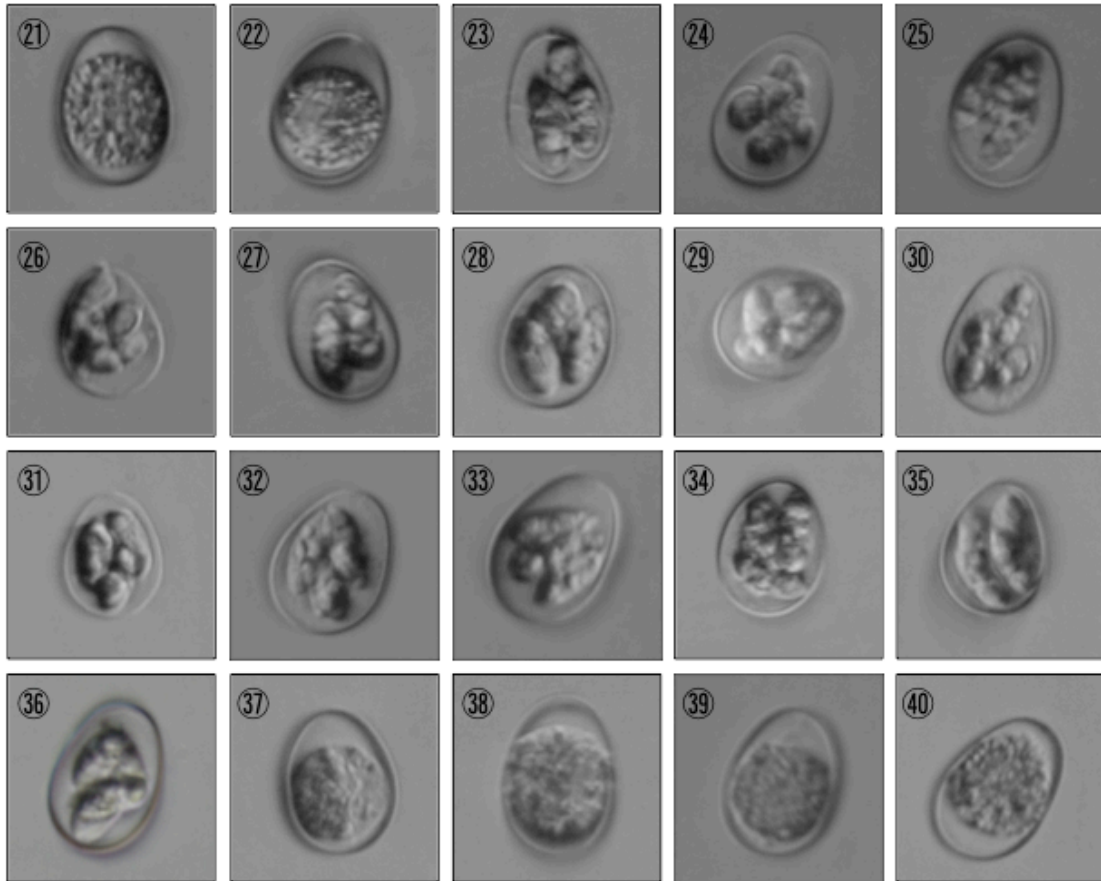


図 3-1 SOM - PCR により 18S rRNA と CO1 遺伝子断片を増幅した *Eimeria bovis* オーシスト
 ②①から③⑩は大崎市で採取した下痢便から単離した *E. bovis* オーシスト、③①から④④は津山市で採
 取した下痢便から単離した *E. bovis* オーシスト。②①から②⑤、③①から③⑤は、出血を伴った下痢便か
 ら単離したオーシスト、②⑥から③⑩、③⑥から④④は、出血を伴わない下痢便から単離したオーシスト。

表 3-3 E. bovis より得た 18S rRNA 遺伝子および CO1 の塩基配列の Blast による相同性検索結果とオーストの形態的特徴

番号	採取地	形態	長径	短径	長径×短径比	18S rRNA		CO1					
						クローン名	断片長 (bp)	最近縁種 (アクセツジョン番号)	相同性(同一塩基数、ギヤツ)	クローン名	断片長 (bp)	最近縁種 (アクセツジョン番号)	相同性(同一塩基数)
㉑	大崎市	卵円型	26.2	19.8	1.32	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 3-1 (AB769585)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉒	大崎市	卵円型	25.1	20	1.26	br1	1760	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1755, 2)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉓	大崎市	卵円型	23.2	19.3	1.2	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 3-1 (AB769578)	99%(1755)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉔	大崎市	卵円型	25.1	20.2	1.24	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 3-1 (AB769578)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉕	大崎市	卵円型	24.5	19.2	1.28	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 3-1 (AB769578)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉖	大崎市	卵円型	23.2	19.2	1.21	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 1-1 (AB769572)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉗	大崎市	卵円型	28.1	19.3	1.46	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 1-1 (AB769572)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉘	大崎市	卵円型	24.5	19.2	1.28	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 1-1 (AB769572)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉙	大崎市	卵円型	23.2	19.3	1.2	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 1-1 (AB769572)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉚	大崎市	卵円型	25.1	20.2	1.24	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 1-1 (AB769572)	99%(1756)	be1	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	95%(768)
㉛	津山市	卵円型	27.6	20.5	1.35	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1753)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㉜	津山市	卵円型	27.3	19.6	1.39	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㉝	津山市	卵円型	27.5	19.6	1.4	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㉞	津山市	卵円型	28.1	20	1.41	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㉟	津山市	卵円型	28.1	19.3	1.41	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1755)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㊱	津山市	卵円型	24.5	19.2	1.28	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㊲	津山市	卵円型	23.2	19.3	1.2	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㊳	津山市	卵円型	25.1	20.2	1.24	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㊴	津山市	卵円型	24.5	19.2	1.28	br2	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1752)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)
㊵	津山市	卵円型	23.2	19.2	1.21	br1	1759	<i>Eimeria bovis</i> isolate: 6-4 (AB769587)	99%(1756)	be2	810	<i>Eimeria zuernii</i> (JN18105)	96%(780)

㉑から㊵は図 3-2 に示した各オーストに相当する。

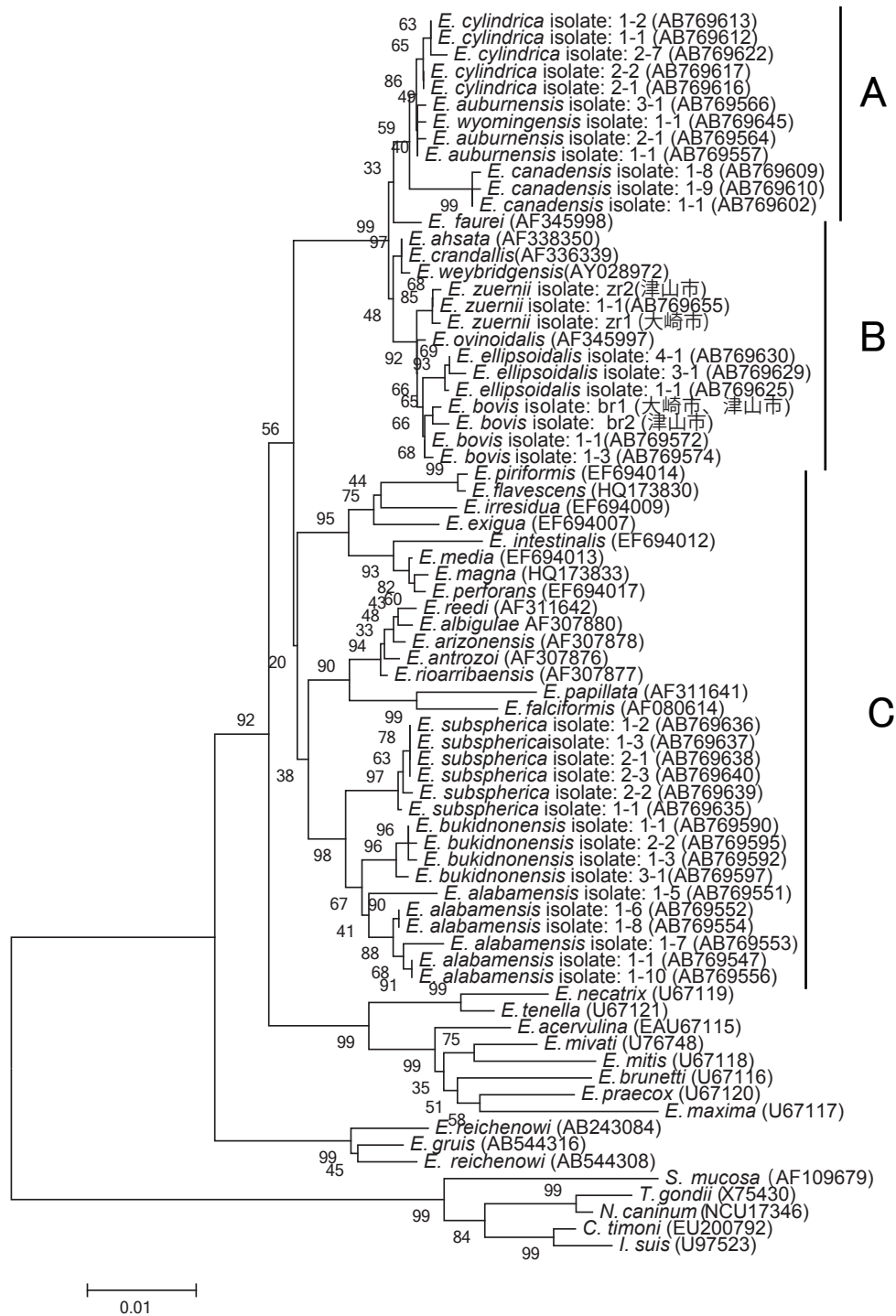


図 3-3 18S rDNA 遺伝子の塩基配列に基づいて計算した *Eimeria* 属原虫の近隣結合法系統樹
 ウシコクシジウムが含まれる単系統群は A, B, C で示す。本研究で決定した配列は B に含まれる。
 1000 回の反復で得られた各枝のブートストラップ値を示す。括弧内に各配列のアクセッション
 番号を示す。各座位あたりの置換数は図中の縮尺に示した。

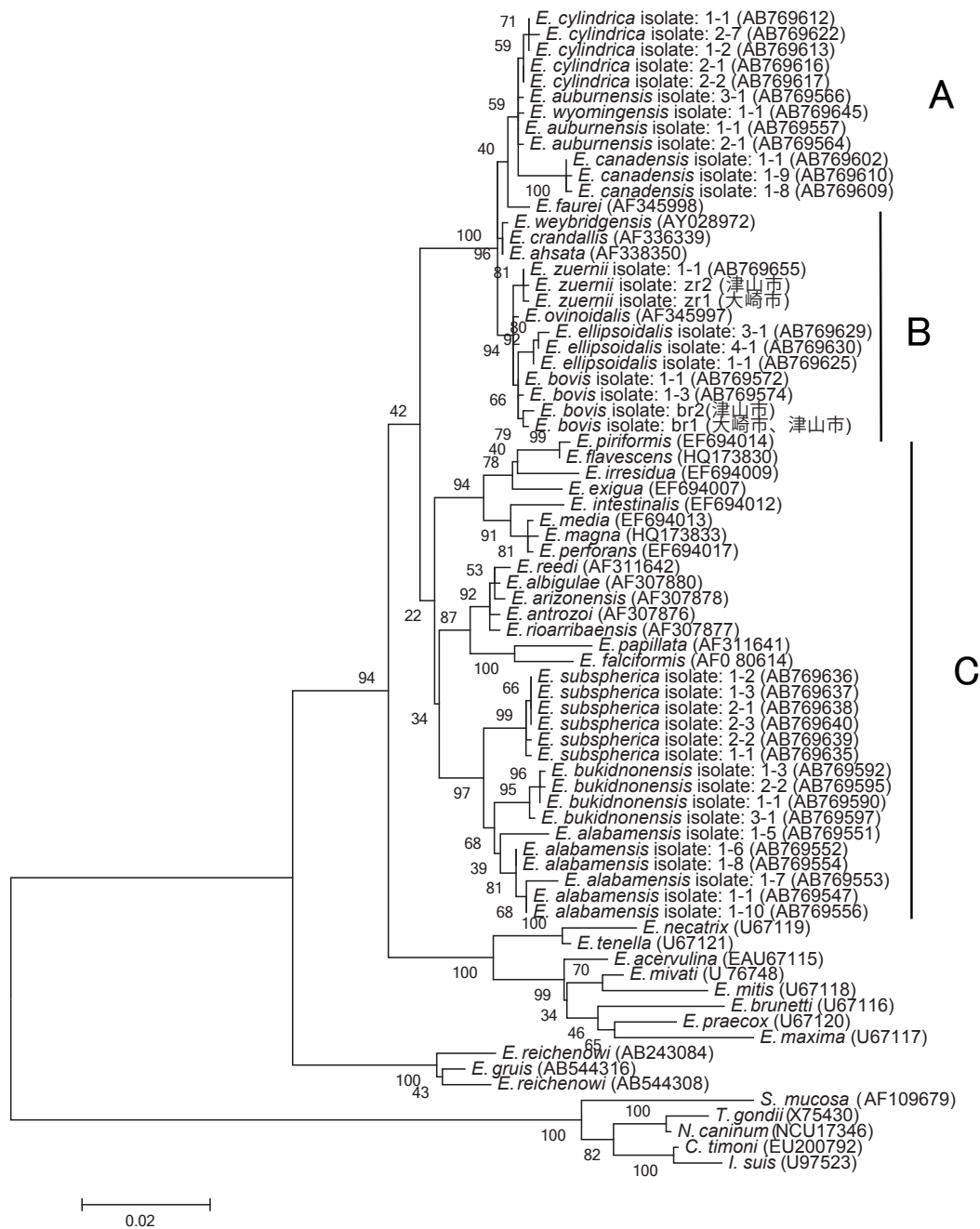


図 3-4 18S rDNA 遺伝子の塩基配列に基づいて計算した *Eimeria* 属原虫の最尤法系統樹
ウシコクシジウムが含まれる単系統群は A, B, C で示す。本研究で決定した配列は B に含まれる。200 回の反復で得られた各枝のブートストラップ値を示す。括弧内に各配列のアクセッション番号を示す。各座位あたりの置換数は図中の縮尺に示した。塩基置換モデルは Tamura-Nei モデルを選択した。不変領域(I)=0.57, ガンマ・パラメーター(G)=0.47

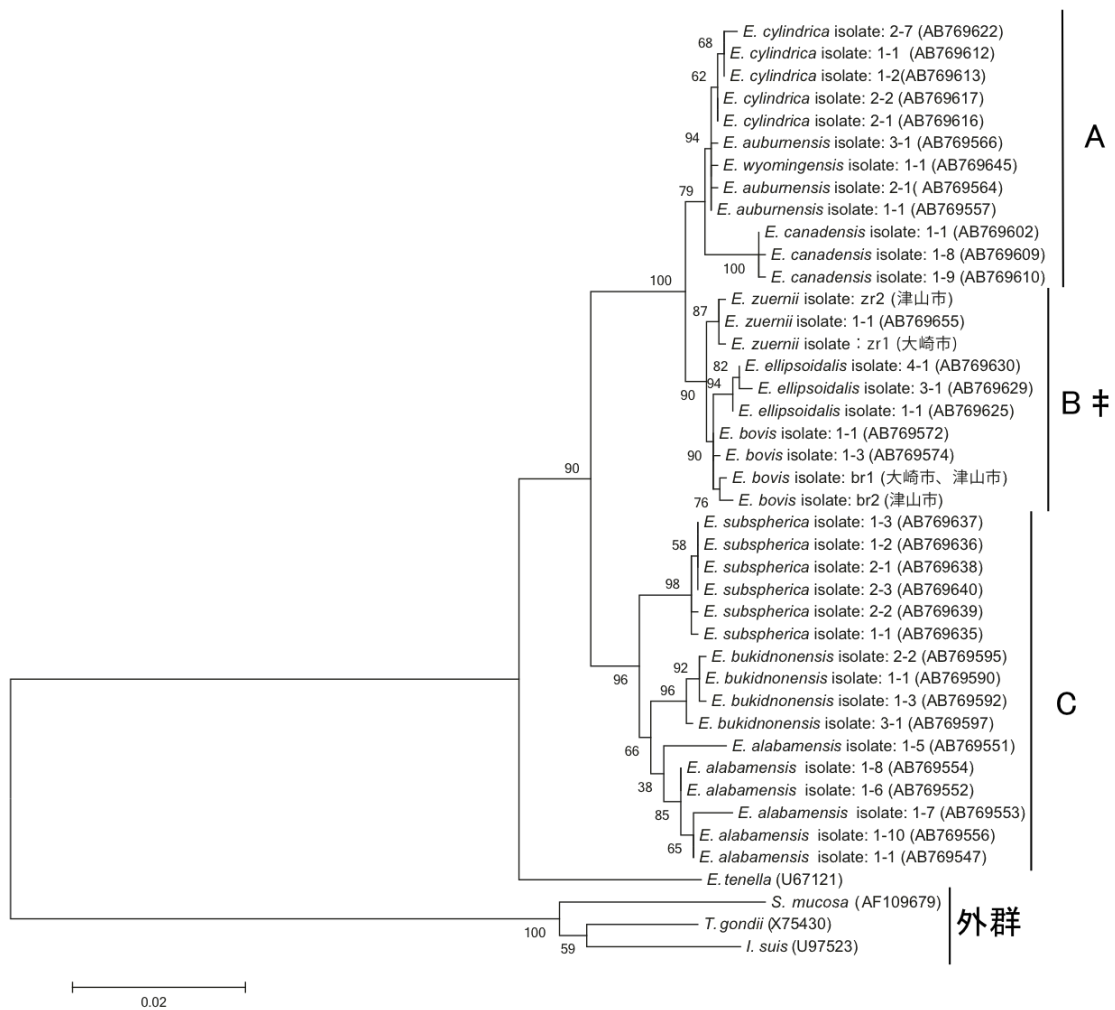


図 3-5 18S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて計算したウシコクシジウム原虫の最尤法系統樹
 本研究で決定した配列は B#に含まれる。200 回の反復で得られた各枝のブートストラップ値を示す。括弧内に各配列のアクセッション番号を示す。各座位あたりの置換数は図中の縮尺に示した。塩基置換モデルは Tamura-Nei モデルを選択した。不変領域 (I)=0.47, ガンマ・パラメーター (G)=0.50

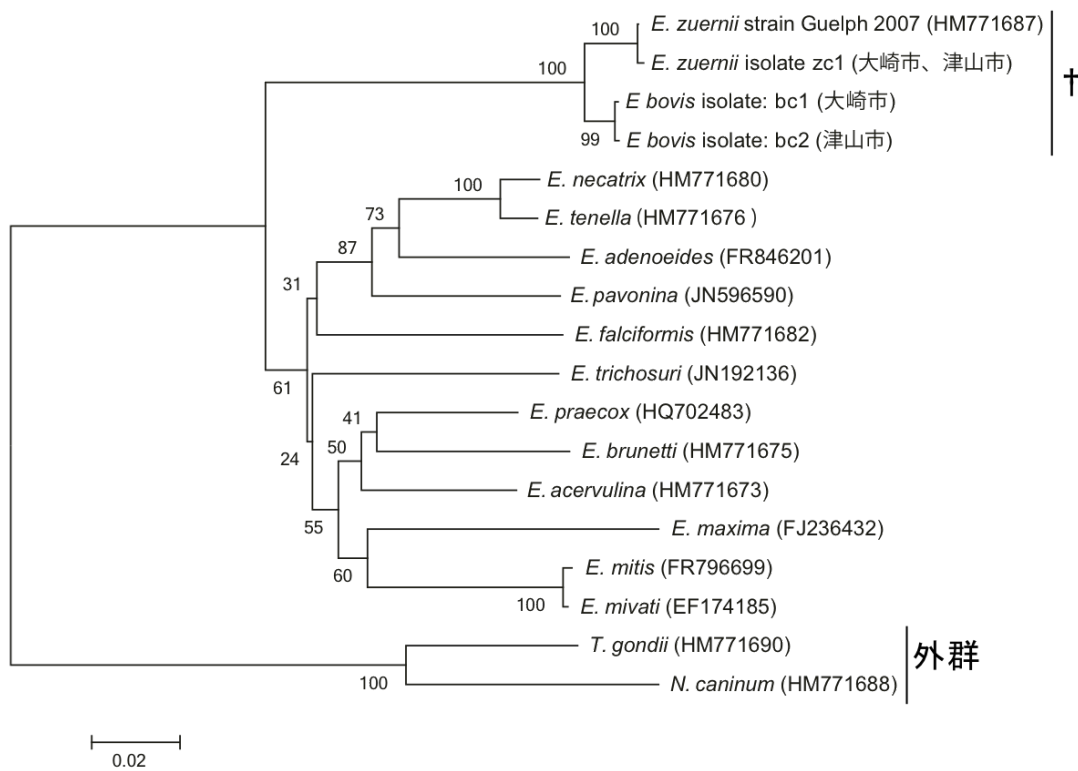


図 3-6 CO1 の塩基配列に基づいて計算した *Eimeria* 属原虫の近隣結合法系統樹

ウシコクシジウムの単系統群は+で示す。1000 回の反復で得られた各枝のブートストラップ値を示す。括弧内に各配列のアクセッション番号を示す。各座位あたりの置換数は図中の縮尺に示した。

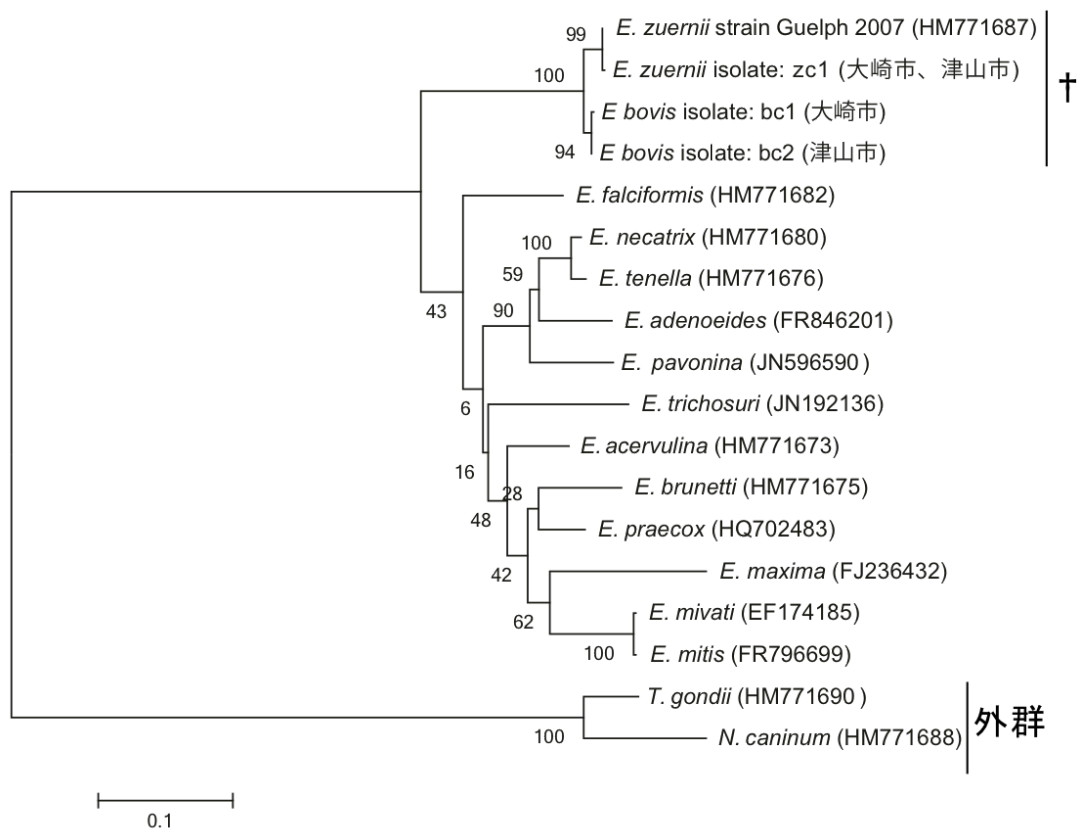


図 3-7 CO1 の塩基配列に基づいて計算した *Eimeria* 属原虫の最尤法系統樹

ウシコクシジウム単系統群は†で示す。200 回の反復で得られた各枝のブートストラップ値を示す。括弧内に各配列のアクセッション番号を示す。各座位あたりの置換数は図中の縮尺に示した。塩基置換モデルは、Tamura-Nei モデルを選択し、ガンマパラメーター=0.52

第4章

総合考察

ウシは肉用牛、乳用牛および生乳の生産額は、平成24年度のわが国の畜産総生産額の49.4%を占め、ウシは、わが国の重要な家畜である。わが国の畜産は、集約化かつ大規模を遂げてきた（鎌田ら, 2001）が、その結果、感染症が蔓延しやすい環境が形成されてきた。現在、安定した家畜生産と安全な生産環境を構築するため家畜の健康な状態を維持と衛生面の管理はより重要となっている。

原虫による家畜の感染疾病であるコクシジウム症は古くから知られ、これまでさまざまな研究が行われてきた。しかし、*Eimeria zuernii* と *E. bovis* は高い病原性を示すとされるが、他のウシ *Eimeria* 属原虫である *E. alabamensis*, *E. auburnensis* および *E. ellipsoidalis* についても下痢便内から検出されていることから、未だ宿主の臨床症状と病原性種の関係については未だ明確ではなく、また、我が国のウシコクシジウム症の疫学調査は、1990年以降乏しく、臨床現場において、検出される原虫種と臨床症状との関係については明らかとなっていない。そして、新生子ウシが初期感染からどのようにオーシストの排出や感染原虫種の構成が変化するのかは、特定の原虫種のみ着目しており、十分な研究は行われてこなかった。そこで本研究では、現在の我が国におけるウシコクシジウム原虫の感染状況を把握し、出血を伴う臨床症状を示す原因となる病原性種を明らかにすること、下痢症状から多量に検出された種について、遺伝的多様性および分子系統学的位置を明らかにすることを目的とした。本研究の成果をまとめると以下のようなになる。

(A) 新生子ウシにおける感染は、生後1ヶ月齢未満で観察され、飼養された場所の汚染状況によっては感染しない個体も存在する(第2章)。

(B) 育成牛や成牛において、一度感染した可能性がある個体でも、持続的な感染は起こり、他のウシ個体への感染キャリアになりえる可能性が示唆された(第2章)。

(C) 放牧地における母子間の感染伝播経路は、必ずしも母ウシ由来ではないことが明らかとなった(第2章)。

(D) コクシジウム原虫の感染は、敷料をつねに乾燥状態に保ち、また牛床を洗浄しやすいセメントにすると制御できる可能性が示唆された(第2章)。

(E) 下痢症状を示した個体において、出血を伴う原因となる原虫種は、*Eimeria zuernii* であり、OPGの増加によって出血が引き起こされることが、強く示唆された(第2章)。

(F) 18S rRNA 遺伝子と CO1 遺伝子の分子系統解析により、*E. zuernii* と *E. bovis* のオーシストは形態的特徴に基づく分類と同様の分子分類となることが明らかとなった(第3章)。

(G) 18S rRNA 遺伝子に基づく分子系統樹より、ウシコクシジウムはヒツジコクシジウムや齧歯類のコクシジウムを含む3つのクラスターに分岐し、ウシコクシジウム原虫とヒツジコクシジウム原虫は近縁な関係にある(第3章)。

これまで我が国におけるウシコクシジウム原虫の感染状況調査では、臨床現場において検出される原虫種と宿主の症状の関係や感染初期の排出される種構成の変化について十分な研究は行われてこなかった。そこで、事例研究として、東北大学大学院附属複合フィールドセンターの川渡農場で各月ごとに新生子ウシ、育成牛、成牛のコクシジウム原虫の感染における経時変化について調査した(A, B, C)。若齢牛で陽性率が高くなるわけではないことが明らかとなった。そして、必ずしもプレパレントピリオド(原虫

が感染してから排出されるまでの日数)によって、厳密にオーシストが排出されるわけではなく、個体の免疫状態や飼養される汚染状況によって異なってくる可能性が考えられる。川渡農場で *Eimeria zuernii* に感染したにも関わらず、臨床症状を示さなかった個体については、初期の感染量と増殖する量が少なかったため、排出される数も少なく、広範囲にわたる放牧地では、感染するリスクも低減したと考えられる。出血を伴う下痢症状を示した個体内から検出された *E. zuernii* の OPG からも、その可能性を強く示唆される。そのため、*E. zuernii* の検出とその OPG は、今後の出血を伴ったウシコクシジウム症の発症を制御する上で重要な要因となると言える。

ウシコクシジウムの分子系統解析は、近年、進みつつある (Kawahara et al, 2010; Kokuzawa et al., 2013)。しかし、まだ十分に評価されているとはいえない。なぜならば、Kawahara らの ITS-1 領域を用いた分子系統解析結果と Kokuzawa らの 18S rRNA に基づいた系統解析結果を比較すると、同じようにウシコクシジウムは3つのクラスターを形成することは明らかであるが、*Eimeria ellipisoidalis* の系統学的位置は異なっていた。そのため、*E. ellipisoidalis* の 18S rRNA 遺伝子や ITS-1 領域以外の遺伝子にも注目し、分子系統学的位置を推定していく必要がある。

これまでウシコクシジウムの仲間であるツルに感染するコクシジウム原虫では、オーシストの形態が多様であること (Parker and Duszynski, 1986) と分子系統解析においても、類似した形態においても多系統であることが明らかとなっている (Honma et al., 2011)。一方、ウシコクシジウム原虫は、オーシストの形態は、種ごとに明確に分類されてきていると同時に、本研究および Kokuzawa ら (2013) の結果から、各原虫種のオーシストの形態に基づく分類と分子分類の結果が一致したことからも、ウシ類の中で、古くから維持されてきた可能性が考えられる。この現象を証明するためには、今後、世

界中に分布するウシコクシジウム原虫について、シングルオーシスト PCR を適用し、地理的多様性を明らかにされていけば、ウシコクシジウム原虫の分子系統進化を推定することが可能かもしれない。

ウシコクシジウムの高い陽性率や持続的感染が、必ずしも宿主個体の症状を増悪するわけではないことが明らかとなり、宿主の免疫状態や感染する原虫種の構成および特定の種の OPG や感染初期の量および増殖量によって異なる結果となることが示唆された。また、我が国の場合は、*Eimeria zuernii* の感染量や宿主体内における増殖量が、宿主の状態を増悪する要因となりえることが示唆された。そのため、*E. zuernii* の病原性について、今後より詳細に解析するために、*E. zuernii* の感染が疑われる個体について、病理組織切片を作製し、その標本に分子マーカーを適用することで十分に評価できる可能性が考えられる。そして、本研究の結果は、その解析を行うための重要な基礎的知見になり得るであろう。ウシは、我が国だけでなく、世界中で飼養されおり、その生産物は、重要な資源となっている。その生産性を脅かす原因となるウシコクシジウム症の起因となる原虫の制御は、今後重要な課題であり、さらなる研究が進められることが期待される。

引用文献

- Bangoura B, Mundt HC, Schmäscke R, Westphal B, Dauschies A (2011) Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion. *Parasitol Res.* 109: 129–138
- Barta, J. R., Martin, D.S., Liberator, P.A., Dashkevich, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkins-Barrow, A., Jenkins, M.C., Danforth, H.D., Ruff, M. D., Profous-Juchelka, H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J. Parasitol.* 83: 262–271.
- Beck HP, Blake D, Dardé ML, Felger I, Díaz P, Regidor-Cerrillo J, Gomez-Bautista M, Ortega-Mora LM, Putigna L, Shiels B, Tait A, Weir W (2009) Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *International Journal for Parasitology* 39: 175-189
- Behrendt JH, Milde H, Weber WM, Kowlik S, Zahner H, Bürger HJ, Clauss (2000) Intracellular calcium and pH conditions of cultured cell with *Eimeria bovis* or *E. separata*. *Parasitology Research* 86: 294-300
- Bürger, H. J., H. Weinandy, G. Eller, and K. Failin (1995) Eimeriosen beim Rind: Dynamik der Oozystenausscheidung und Entwicklung eines Modells. Proceedings of the Meeting of the DVG Section ÔEpidemiologie und DokumentationÕ, 30 August to 1 September, Giessen, Germany, pp: 117–127.
- Boore, J (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1767–1780.
- Chibunda RT, Muhairwa AP, Kambarage DM, Mtambo MMA, Kusiluka LJM, KazwalaRR (1997) Eimeriosis in dairy cattle farms in Morogoro municipality of Tanzania. *Preventive Veterinary Medicine* 31: 191-197
- Cornelissen, A.W., Versteegen, R., van den Brand, H., Perie, N.M., Eysker, M., Lam, T.J., Pijpers, A (1995) An observational study of *Eimeria* species in housed cattle on Dutch dairy farms. *Vet. Parasitol.* 56: 7–16.
- Chibunda, R., Muhaorwa, A. P., Kambarage, D.M., Mtambo, M.M., Kusiluka, L.J., Kazwala, R.R (1997) Eimeriosis in dairy cattle farms in Morogoro municipality of Tanzania. *Prev. Vet. Med.* 31: 191-197.
- Dauschies A and Najdrowski M (2005) Eimeriosis in Cattle: Current Understanding. *Journal of Veterinary Medicine* 52: 417-427

- Duszynski, D.W (1971) Increase in Size of *Eimeria separata* Oocysts during Patency. The Journal of Parasitology. 57(5): 948-952.
- Dong H, Zhao Q, Han H, Jiang L, Zhu S, Li T, Kong C, Huang B (2012), Prevalence of coccidial infection in dairy cattle in Shnghai, China. J. Parasitol 98: 963-966
- Ernst JV, Todd KS (1977) New geographic record and redescription of the sporulated oocyst of *Eimeria pellita* Supperer, 1952 from Alabama cattle. Proc. Helminthol. Soc.Wash. 44: 221–223.
- Ernst, J.V., Todd, K.S (1977) New geographic record and redescription of the sporulated oocyst of *Eimeria pellita* Supperer, 1952 from Alabama cattle. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 44: 221–223.
- Faber, J. E., Kollmann, D., Heise, A., Bauer, C., Failing, K., Bürger, H.J., Zahner, H (2002) *Eimeria* infections in cows in the periparturient phase and their calves: oocyst excretion and levels of specific serum and colostrum antibodies. Vet. Parasitol. 104: 1–17.
- Fitzgerald, P. R (1980) The economic impact of coccidiosis in domestic animals. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 24: 121–143.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 294–299.
- Fox, J. E (1985) Coccidiosis in cattle. Mod. Vet. Pract. 66: 113–116.
- Gardner, S.L. and Duszynski, D.W (1990) Polymorphism of Eimerian Oocysts Can Be a Problem in Naturally Infected Hosts: An Example from Subterranean Rodents in Bolivia. The Journal of Parasitology. 76(6): 805-811.
- Gräfner, G., H. D. Graubmann, H. Daetz, H. Müller, N. Meinke (1985) Zur Epizootologie der *Eimeria alabamensis*-Kokzidiose bei Jungrindern. Mh. Vet. Med. 40: 44–47.
- Hammond DM, Long PL (1964), Coccidiosis of Cattle No. 30
- Hasbullah, Akiba Y, Takano H, Oogimoto K (1990) Seasonal distribution of bovine coccidian in beef cattle herd in the unibersity farm, J. Vet. Med. Sci. 52 (6): 1175-1179
- Hikosaka, K., Nakau, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N.M., Toyama, T., Honma H., Horii, T., Kita K., Tanabe K (2011) Concatenated mitochondrial DNA of the coccian parasite *Eimeria tenella*. Mitochondrion. 11: 273-278
- Kawagara F, Zhang G, Mingala N. C, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, Nunoya T (2010), Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites Vet. Parasitol 174: 49-57

- Kokuzawa T, Ichikawa M, Itagaki T (2013), Determination of Phylogenetic relationships among *Eimeria* species, which Parasitize Cattle, on the Basis of Nuclear 18S rDNA Sequence, *J. Vet. Med. Sci.* 75 (11): 1427-1431
- Levine ND and Ivens V (1970), The Coccidian Parasites (Protozoa Sporozoa) of Ruminants
- Levine and Ivens (1967) The sporulated oocysts of *Eimeria illinoisensis* n. sp. and of other species of *Eimeria* of the ox. *J. Protozool.* 14: 351–360.
- Li, G., Xiao, S., Zhou, R., Li, W., Wadeh, H (2007) Molecular characterization of *Cyclospora*-like organism from dairy cattle. *Parasitol. Res.* 100: 955–961.
- Marshall, R.N., Catchpole, J., Green, J.A., Webster, K.A (1998) Bovine coccidiosis in calves following turnout. *Vet. Rec:* 143, 366–367.
- Morris GM, Gasser RB (2006) Biotechnological advances in the diagnosis of avian coccidiosis and the analysis of genetic variation in *Eimeria*. *Biotechnology Advances* 24: 590-603
- Nalbantoglu S, Sari B, Clcek H, Karer Z (2008) Prevalence of Coccidian Species in the Qater Buffalo (*Bubalus Bubalis*) in the Province of Afyon, Turkey. *Acta vet. Brno* 77: 111-116
- Nishida T, Hatama S, Ishikawa Y, Kadota K (2009), Intranuclear Coccidiosis in Calf. *J.Vet. Med. Sci.* 71(8): 1109-1113
- Oda, K., Nishida, Y., 1990. Prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52: 71–77.
- Parker B B, Duszynski D W (1986), Coccidiosis of sandhill cranes (*Grus canadensis*) wintering in New Mexico. *J. Wild. Dis.* 22: 25-35
- Sayin F (1968) The sporulated oocysts of *Eimeria anlarensis* N. SP. and of Other Species of *Eimeria* of Buffalo in Turkey and Transmission of Four species of *Eimeria* from Buffalo to Cow calves. *Ankara Universitesi Veteriner Fkultesi dergisi* 15: 282-300
- Stockdale PHG, Bainborough, AR, Bailey CB, Niilo L (1981)
Some pathophysiological changes associated with infection of *Eimeria zuernii* in calves. *Can. J. Comp. Med.* 45: 34–37.
- Svensson, C (2000) Excretion of *Eimeria alabamensis* oocysts in grazing calves and young stock. *J. Vet. Med. B* 47: 105–110.
- Svensson, C., P. Hooshmand-Rad, B. Pehrson, M. Törnquist, and A. Ugglå (1993) Excretion of *Eimeria* oocysts in calves during their first three weeks after turn-out to pasture. *Acta Vet.*

- Scand. 34: 175–182.
- Tamura K, Peterson D, Perterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods
- Tauseef U. R, Muhammad N. K, Muhammad S. S, Rao Z. A, Muhammad A, Zafar I. A. I (2011) Epidemiology of *Eimeria* and associated risk factors in cattle of district Toba Tek Singh, Pakistan. Parasitol res 108: 1171–1177
- Vrva V, Poplstein M, Pakandl M (2011) The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as an independent species. Vet. Parasitology 183 47–53
- Duszynski DW, Couch L, Upton SJ (2001), The Coccidia of the World,
URL: <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/BOVIDAE>
- 国際連合食糧農業機構の生産年報
URL: <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/index.html>
- 石井俊雄、今井壯一 (2007) 改訂獣医寄生虫学・寄生虫病学 1. 講談社サイエンティフィック, 東京
- 伊藤英雄、榊原秀夫 (1999) 黒毛和種牛に発生したコクシジウム感染を伴った壊死性腸炎、畜産の研究 53 713-716
- 鎌田信一、清水 晃、永幡 肇 (2001)、動物の衛生 文永堂出版
- 加納茂太、吉田裕貴、高橋知也、松田敬一、小野秀弥、一条俊浩 (2011)、黒毛和種子牛のコクシジウム症における糞便性状の回復遅延と糞便中 *Clostridium perfringens* の増殖、家畜診療 58 679 – 684
- 桐野由美、野中成晃、堀井洋一郎、牛コクシジウム症コントロールの重要性とその背景 (2013)、家畜診療 60 343-350
- 東条英昭、古賀 脩 (1971)、鶏の *Eimeria tenella* の免疫に関する研究、日本家禽学会誌 9、225-230
- 中井 裕 (2013) IX 原虫病 コクシジウム病 明石博臣, 江口正志, 神尾次彦, 加茂前秀夫, 酒井 豊, 芳賀 猛, 眞鍋 昇 (編)牛病学<第3版> 近代出版 in press
- 松井 淳、Felix R.、宝来 聡、長谷川政美 (2008)、霊長類のミトコンドリア DNA における進化速度、統計数理 56 101 – 116
- 渡辺大作、河野あきら、酒井淳一、宇井 彰、山口 純、佐藤淳一、大場正昭、岡崎光幸、今野宏美、種市 淳 (1988) 放牧牛に集団発生した牛コクシジウム病に対するサルファ剤の治療効果と増体に及ぼす影響 日獣会誌 (41) 119 – 122

謝辞

東北大学大学院農学研究科環境システム生物学分野 中井裕教授には、研究計画の立案から論文の執筆に至るまであらゆる面でご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。

東北大学大学院農学研究科動物微生物学分野 磯貝恵美子教授ならびに動物生殖科学分野 種村健太郎准教授には、本論文の副査を快諾していただくとともに審査を担当していただき、貴重なご意見を賜りました。東北大学大学院農学研究科生物共生科学分野 清和研二教授、沿岸生物生産システム学分野 池田実准教授ならびに生物海洋学分野 遠藤宜成教授には最終試験委員を快諾していただき、貴重なご意見を賜りました。厚く御礼を申し上げます。

東北大学大学院農学研究科環境システム生物学分野 多田千佳准教授ならびに福田康弘助教には、研究計画の立案の段階から実験について、終始貴重なご意見とご助言を賜りました。厚く御礼を申し上げます。

NOSAI 家畜診療センターの高橋知也獣医師、沼津敬治所長ならびに高橋清治獣医師には、宮城県大崎市のサンプリングにおいて多大なるご協力を賜るとともに、多くの貴重な情報をご提供していただきました。NOSAI 岡山北部基幹家畜診療所の森田康弘獣医師、若槻拓司獣医師、吉村遥子獣医師ならびに小村昭正所長には、岡山県のサンプリングにおいて多大なるご協力を賜るとともに、多くの貴重な情報をご提供していただきました。心より御礼を申し上げます。

東北大学大学院農学研究科 陸圏生態学分野 吉原佑助教ならびに同大大学院 栽培植物環境科学 田島亮介助教、山形大学理学部生物学科 植物生態学分野 富松裕准教授に

は統計解析について多大なるご助言を賜りました。心より御礼を申し上げます。

東北大学大学院農学研究科環境システム微生物分野の職員ならびに資源動物群制御科学分野の学生の皆様には、研究の全般にわたり励ましとご協力をいただきました。深く感謝いたします。加藤佑樹氏、須藤佳子氏、琴賀岡朋絵氏、千葉由規氏には宮城県北部域でのサンプリングにおいて多大なるご協力をしていただきました。また同期である馬場保徳氏にはたくさんの励ましとご助言をいただきました。深く感謝いたします。

最後に、博士後期課程への進学に理解を示すとともに、惜しみない援助を与えてくれた両親に感謝します。