

パラフィン包埋切片を用いた種特異的 PCR による 子牛の出血性直腸炎におけるコクシジウムの 遺伝子学的同定

是枝輝紀^{1)†} 野尻麻里子²⁾ 堂下さつき²⁾ 松林 誠³⁾
芝原友幸³⁾ 岡野良一¹⁾

- 1) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)
2) 鹿児島県南薩家畜保健衛生所 (〒 897-0302 南九州市知覧町郡 4210-18)
3) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2014 年 12 月 24 日受付・2015 年 2 月 25 日受理)

要 約

鹿児島県内の黒毛和種を飼養する 1 農場で、5 カ月齢の子牛が下痢と脱水を呈して死亡したため、病性鑑定を実施した。剖検では空回腸と直腸粘膜の充出血、直腸粘膜に牛鞭虫の寄生を認めた。病理組織学的に直腸粘膜にコクシジウムの重度寄生による出血性腸炎を認めた。直腸病変部のパラフィン包埋切片から抽出した DNA を用いた PCR 検査で、*Eimeria (E.) bovis* と *E. zuernii* の特異遺伝子を認めた。また、同居子牛の糞便から *E. bovis* と *E. zuernii* に類似のオーシストと牛鞭虫卵を検出した。病理組織学的検索とパラフィン包埋切片を用いた遺伝子学的検索をあわせて実施することで、直腸炎の原因が *E. bovis* と *E. zuernii* と特定することができた。

—キーワード：*Eimeria (E.) bovis*, *Eimeria zuernii*, パラフィン包埋切片。

----- 日獣会誌 68, 297~300 (2015)

牛コクシジウム病の原因となる *Eimeria* 属原虫は、少なくとも 13 種類が知られており、国内でも 11 種類が確認されている [1, 2]。その中で、病原性が強く、各地で問題となっているのが *Eimeria (E.) bovis* と *E. zuernii* で、これらは小腸から大腸にかけて寄生し、子牛に重度の出血性下痢を引き起こし、時には死亡の原因となる [1, 3, 4]。病理組織学的には、腸管上皮内に無性及び有性生殖期の発育虫体の寄生と粘膜上皮の変性・脱落などを伴った出血性腸炎や偽膜性腸炎が認められるのが特徴である [5-7]。

これまで牛に寄生する *Eimeria* 属原虫の種の鑑別は、糞便中のオーシストの長径と短径、形状やマイクロパイルの有無など、形態学的特徴によりなされてきた [1]。しかし、その特徴が類似する種類もあり、正確な同定を行うには熟練を要する。その他の種鑑別法として、近年、Kawahara ら [8] は牛糞便材料を用いて、*Eimeria* 属

の Internal Transcribed Spacer (ITS)-1 領域をターゲットとした種鑑別 PCR 法を開発し、複数種が混在した材料でも種特異的な PCR 産物の増幅により種の同定が可能であることを報告した。しかしながら、いずれの場合も糞便中のオーシストを検査対象としており、特に PCR の鋳型とする場合には、浮遊法などによるオーシストの精製が行われた後、DNA が精製されている [8]。実際の生産現場における診断では、採材困難な死亡事例を含め、常に新鮮な糞便材料が手に入るとは限らず、糞便材料以外からの *Eimeria* 属原虫の確実な同定方法が求められている。

今回、病理組織学的にコクシジウムの寄生を認めた子牛の出血性腸炎事例において、病変部のパラフィン包埋切片から DNA を抽出し、*Eimeria* 属の種鑑別 PCR 法を初めて試みた。その結果、*E. bovis* と *E. zuernii* の混合感染であることを特定することができたので報告する。

† 連絡責任者：是枝輝紀 (鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678 ☎ 099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail : koreeda-terunori@pref.kagoshima.lg.jp

材料及び方法

鹿児島県内の黒毛和種繁殖雌牛36頭、子牛20頭、肥育牛220頭を飼養する農場で、2014年5月21日に5カ月齢の子牛1頭が元気消失、食欲廃絶、脱水、黄色水様性下痢を呈した。それ以前に重度な下痢や血便の病歴はなく、削瘦も認められなかった。補液、サルファ剤及び抗生物質などで加療するも、起立困難や痙攣を呈し、翌日昼に死亡したため、当日夕方に家畜保健衛生所で病性鑑定を実施した。当該農場では、繁殖雌牛に牛異常産3種混合不活化ワクチンを、子牛に牛5種混合生ワクチンと牛ヘモフィルス・ソムナス感染症不活化ワクチンを接種していた。

病理学的検査では、死亡子牛の病理解剖を実施し、肉眼的に病変を確認するとともに、大脳、小脳、中脳、延髄、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、第1～4胃、小腸、大腸、腸間膜リンパ節及び大腿筋を採材し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。翌日切り出しと再固定を行った後に、迅速にパラフィン包埋処理を実施した。その後薄切りし、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して鏡検した。

病理組織学的検査でкокシジウムの寄生が確認された直腸と空回腸のパラフィン包埋ブロックからDNAの精製を行った。すなわち、厚さ約5 μ mに薄切した組織切片4枚をチューブに回収し、市販キット(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, 株式会社キアゲン, 東京)を用いてDNAを抽出した。*Eimeria*属種特異的PCRは、Kawaharaら[8]の方法に基づき、6種の*Eimeria*属原虫(*E. alabamensis*, *E. auburnensis*, *E. bovis*, *E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*)の種特異的プライマーを用いて実施した。また、追跡調査として、死亡子牛と同じ牛房で飼養されていた子牛1頭(子牛No. 1:5カ月齢)及び隣接牛房Aで飼養されていた子牛2頭(子牛No. 2, 3:いずれも5カ月齢)の糞便について、比重1.2のシヨ糖液を用いた遠心浮遊法及びOリング法を実施後、OPG(oocysts per gram)を算出した。なお、子牛3頭に下痢は認められなかった。死亡子牛のいた牛房は死亡後に清掃、消毒及び敷料交換がなされていたが、当該牛房(2カ所:牛床No. 1, 2)及び隣接牛房A(3カ所:牛床No. 3-5)の牛床のオガクズについて、シヨ糖液を用いた遠心浮遊法を実施した。

細菌学的検査では、大脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節及び小腸内容を分離材料とし、5%綿羊血液加トリプトソイ寒天培地とDHL寒天培地を用いた好気培養、チョコレート寒天培地を用いた5%炭酸ガス培養、5%綿羊血液加GAM寒天培地を用いた嫌気培養を実施した。

ウイルス学的検査では、小腸内容を材料とし、牛ウイ

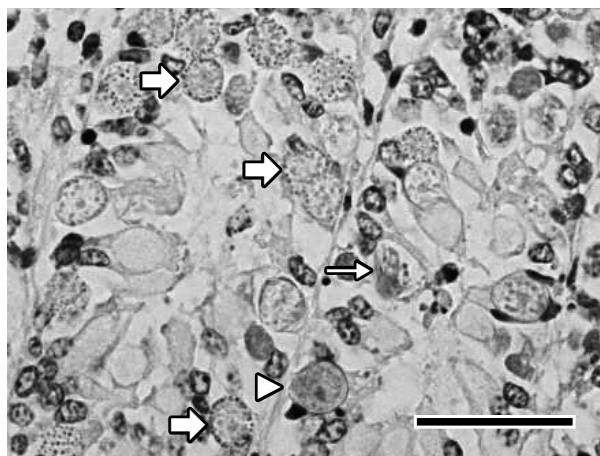


図1 直腸の病理組織像

陰窩上皮細胞内に多数のマクロガメトサイト(太い矢印)、メロント(細い矢印)及び未成熟オーシスト(矢頭)が認められる(HE染色 Bar=30 μ m)。

ルス性下痢ウイルス(BVDV)と牛コロナウイルス(BCoV)のPCR検査を実施した。

成績

剖検では、小腸及び大腸粘膜にび慢性の充出血や粘液の分泌亢進が認められ、直腸粘膜では牛鞭虫の寄生(平均1~2匹/4cm²)が認められた。脳脊髄液の増量や右肺中葉及び両側後葉に軽度な肝変化が認められた。

病理組織学的検査では、直腸の陰窩上皮内に*Eimeria*属原虫のガメトサイト、メロント及び未成熟オーシストなど種々の発育期虫体の寄生が認められた(図1)。陰窩腔はやや拡張し、粘膜固有層では出血、好酸球やリンパ球の浸潤が認められ、出血性直腸炎と診断した。また、管腔内や粘膜表層に牛鞭虫の虫体が認められ、虫体周囲の粘膜固有層では、多核巨細胞が認められた。

空回腸では、粘膜固有層に好酸球などの浸潤が認められたが、*Eimeria*属原虫の寄生は認められなかった。肺では、高度な充うっ血を伴った肺水腫が認められた。

*Eimeria*属の種特異的PCRによる検索では、直腸のパラフィン包埋切片から抽出したDNAサンプルで*E. bovis*と*E. zuernii*の増幅産物が認められた(図2)。追跡調査における子牛No. 1~3の糞便のOPGは、それぞれ400, 600及び200であり、形態的特徴から*E. bovis*, *E. zuernii*及び*E. auburnensis*のオーシストと推定された(図3)。また、Oリング法では検出されなかったが、遠心浮遊法で3頭からごく少数の牛鞭虫卵を検出した。牛床については牛床No. 3及びNo. 5から*Eimeria*属原虫のオーシストを検出した。

細菌学的検査で、病原菌の分離はなく、ウイルス学的検査で、BVDVとBCoVの特異遺伝子は検出されなかった。

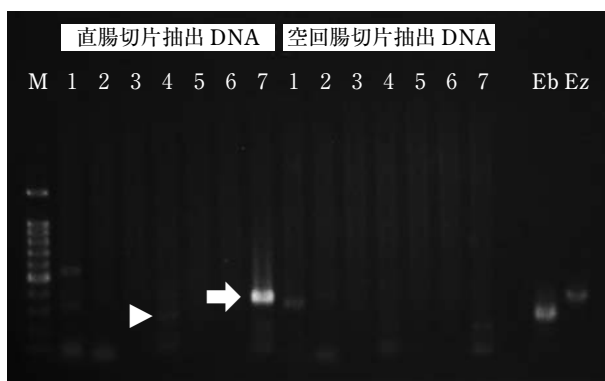


図2 直腸と空回腸のパラフィン包埋切片から抽出したDNAのPCR検査結果

直腸でのみ *E. zuernii* (矢印) と *E. bovis* (矢頭) の特異遺伝子がみられる (M: 100bp ラダーマーカー, 1: *Eimeria* ITS, 2: *E. alabamensis*, 3: *E. auburnensis*, 4: *E. bovis*, 5: *E. cylindrica*, 6: *E. ellipsoidalis*, 7: *E. zuernii*, Eb: *E. bovis* 陽性対照, Ez: *E. zuernii* 陽性対照).

考 察

近年、牛コクシジウム病の予防・治療対策として、トルトラズリル製剤が検証され、下痢の軽減、糞便中のオーシスト数の減少、体重減少の抑制などの有効性が報告されている [6, 9-11]. 一方、本症例では、サルファ剤による加療が実施されたが、その効果を認める前に死亡した。コクシジウム病を疑う死亡子牛の確定診断には、*Eimeria* 属原虫の検出とともに病理組織学的検査が重要となる。さらに、検出された *Eimeria* 属原虫については、種の同定を行うことが望ましい。これまで病理組織学的検査で *Eimeria* 属原虫の感染による腸炎を認めた症例は数多くあったが、組織切片上で形態学的に種鑑別を行うことは困難であった。組織切片上で観察された *Eimeria* 属原虫の種の同定が可能であれば、より確実に病原体と病態を関連づけることができる。

本症例では、病理組織学的に出血性直腸炎が認められたことから、寄生していた *Eimeria* 属原虫は病原性の強い *E. bovis* または *E. zuernii*, あるいはその両種の感染が予想された。そこで、病変部のパラフィン包埋切片を用いた種特異的PCRを行ったところ、両種の特異遺伝子が検出され、それらの混合感染と確認することができた。細菌学的及びウイルス学的検索では、いずれの病原体も検出されなかったことから、子牛の死亡原因はこの2種の *Eimeria* 属原虫の感染によるものと診断した。

死亡した子牛の直腸には、牛鞭虫の寄生も認められた。牛鞭虫に濃厚感染した場合、重度な下痢や衰弱を呈し、潰瘍を伴った壊死性結腸炎が認められることが報告されている [12, 13]. 本症例では、牛鞭虫の寄生数は

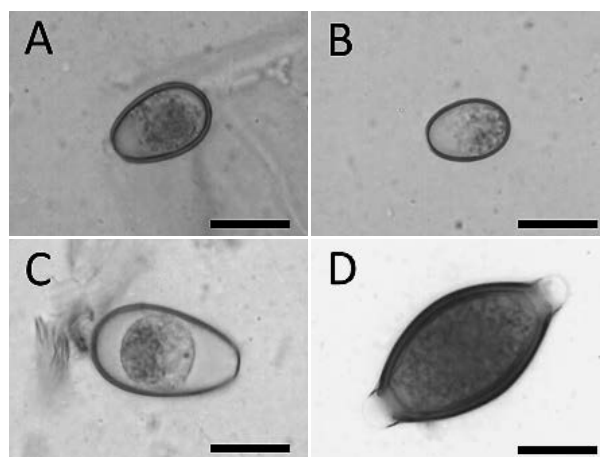


図3 同居子牛の糞便検査

3種類のコクシジウムオーシスト (A: *E. bovis*, B: *E. zuernii*, C: *E. auburnensis* と推定) と牛鞭虫卵 (D) が認められる (Bar=20 μm).

少なく、潰瘍などの病変は認められなかったことから、牛鞭虫寄生は死亡の主原因ではないと判断された。しかしながら、*Eimeria* 属原虫との混合感染により病態が増悪した可能性は否定できない。

死亡子牛の糞便検査は実施できなかったが、追跡調査の結果、当該農場にコクシジウムの浸潤が確認された。追跡調査した子牛のOPGはいずれも低値であったものの、死亡子牛のPCR検査で検出された *E. bovis* と *E. zuernii* に類似のオーシストが確認された。そのため、定期的な牛床の清掃、消毒及び敷料交換、適切な堆肥化処理の実施、トルトラズリル製剤などの予防的投薬などの発症予防対策について指導し、現在のところ当該農場に重篤な下痢を呈する子牛は認められていない。

パラフィン包埋切片からのPCRについては、パラフィンブロック作製過程の薬液及び加温、パラフィンブロックの保存期間または感染の程度による検出感度の影響など、不明な点は残っているものの、病理組織学的検索後に、当該切片から *Eimeria* 属原虫の種の同定が行えることは、病態をより正確に理解し、考察するうえで有用である。

稿を終えるにあたり、*Eimeria* 属のPCR検査を実施していただいた(一財)日本生物科学研究所 川原史也氏、張 国宏氏に感謝する。

引用文献

- [1] Dauschies A, Najdrowski M: Eimeriosis in cattle: Current understanding, J Vet Med B, 52, 417-427 (2005)
- [2] Oda K, Nishida Y: Prevalence and distribution of bovine coccidian in Japan, Jpn J Vet Sci, 52, 71-77 (1990)

- [3] Bangoura B, Mundt HC, Schmaschke R, Westphal B, Dausgies A : Prevalence of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in German cattle herds and factors influencing oocyst excretion, *Parasitol Res*, 109, 129-138 (2011)
- [4] Enemark HL, Dahl J, Enemark JMD : Eimeriosis in Danish dairy calves-correlation between species, oocyst excretion and diarrhoea, *Parasitol Res*, 112, 169-176 (2013)
- [5] Friend SCE, Stockdale PHG : Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: A histopathological study, *Can J Comp Med*, 44, 129-140 (1980)
- [6] Mundt HC, Bangoura B, Rinke M, Rosenbruch M, Dausgies A : Pathology and treatment of *Eimeria zuernii* coccidiosis in calves: Investigations in an infection model, *Parasitol Int*, 54, 223-230 (2005)
- [7] Stockdale PHG : The pathogenesis of the lesions produced by *Eimeria zuernii* in calves, *Can J Comp Med*, 41, 338-344 (1977)
- [8] Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, Nunoya T : 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 (2010)
- [9] Jonsson NN, Piper EK, Gray CP, Deniz A, Constantinoiu C : Efficacy of Toltrazuril 5% suspension against *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in calves and observations on the associated immunopathology, *Parasitol Res*, 109, 113-128 (2011)
- [10] 加藤敏英, 矢田谷健, 石崎孝久, 伊藤 貢, 小田憲司, 平山紀夫 : トルトラズリルの牛コクシジウム病に対する有効性および安全性に関する臨床的検証, *日獣会誌*, 61, 127-130 (2008)
- [11] Mundt HC, Bangoura B, Mengel H, Keidel J, Dausgies A : Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril under field conditions, *Parasitol Res*, 97, 134-142 (2005)
- [12] Perdrizet JA, King JM : Whipworm (*Trichuris discolor*) infection in dairy replacement heifers, *J Am Vet Med Assoc*, 188, 1063-1064 (1986)
- [13] Smith HJ, Stevenson RG : A clinical outbreak of *Trichuris discolor* infection in stabled calves, *Can Vet J*, 11, 102-104 (1970)

Genetic Identification of Coccidian Parasites in a Calf with Hemorrhagic Proctitis by Species-specific PCR Using Formalin-fixed Paraffin Embedded Sections

Terunori KOREEDA^{1)†}, Mariko NOJIRI²⁾, Satsuki DOHSHITA²⁾, Makoto MATSUBAYASHI³⁾, Tomoyuki SHIBAHARA³⁾ and Ryouichi OKANO¹⁾

- 1) Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichikicho, Hioki, 899-2201, Japan
- 2) Kagoshima Prefectural Nansatsu Livestock Hygiene Service Center, 4210-18 Kori, Chirancho, Minamikyushu, 897-0302, Japan
- 3) National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

SUMMARY

A five-month-old Japanese Black calf fed at a farm in Kagoshima Prefecture died as a result of severe diarrhea and dehydration. During necropsy, hyperemia and hemorrhages were found on the mucosa of the jejunum, ileum and rectum. Some *Trichuris discolor* worms were also observed in the mucosa of the rectum. Histopathological examination of the rectum with hemorrhagic enteritis revealed coccidian parasites of various developmental stages in the epithelial cells. Using DNA purified from sections of the rectum, species-specific PCR was conducted and consequently *Eimeria (E.) bovis* and *E. zuernii* specific genes were amplified. Through fecal examination of other calves on the farm, oocysts morphologically similar to those of *E. bovis* and *E. zuernii*, and eggs of *T. discolor* were detected. Consequently, we successfully identified *E. bovis* and *E. zuernii* from formalin-fixed paraffin embedded sections and identified a lethal case with these *Eimeria* species.

— Key words : *Eimeria (E.) bovis*, *Eimeria zuernii*, formalin-fixed paraffin embedded sections.

† Correspondence to : Terunori KOREEDA (Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center) 1678 Yuda, Higashiichikicho, Hioki, 899-2201, Japan
TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : koreeda-terunori@pref.kagoshima.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 297 ~ 300 (2015)