

大分県における *Eimeria subspherica* による 牛の核内コクシジウム症

河上 友^{1)†} 松林 誠²⁾ 山田美那子¹⁾ 人見 徹¹⁾
 笹井和美²⁾ 芝原友幸^{2),3)}

- 1) 大分県大分家畜保健衛生所 (〒870-1153 大分市小野鶴字原 442)
 2) 大阪府立大学生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北 1-58)
 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2018年1月15日受付・2018年4月16日受理)

要 約

牛の核内コクシジウム症について、2012～2016年に大分県にて病性鑑定に供された146農場の牛199頭の消化管材料について回顧調査を実施した。199頭中9頭(4.5%)の牛で核内コクシジウム感染が確認され、これらはすべて異なる農家の黒毛和種子牛で、慢性下痢及び発育不良を呈していた。肉眼的に小腸粘膜の肥厚(55.6%, 5/9頭)と腸間膜リンパ節の腫大(77.8%, 7/9頭)が認められた。組織学的に全例で小腸の腸絨毛の萎縮及び粘膜固有層における炎症細胞浸潤が認められた。また、粘膜上皮細胞の核内にさまざまなステージのコクシジウムが多数認められた。9頭中5頭(55.6%)の空腸のパラフィン切片から *Eimeria subspherica* 特異遺伝子が検出された。以上のことから、*E. subspherica* が牛の核内コクシジウム症の原因として大きな割合を占めることが示唆された。

——キーワード：子牛, *Eimeria subspherica*, 核内コクシジウム症。

-----日獣会誌 71, 568～572 (2018)

牛に感染するコクシジウムは20種類以上が知られており [1], そのうちの13種類が牛に病原性を示すとされている [2]。子牛に重篤な下痢や血便を引き起こす *Eimeria bovis* や *E. zuernii* も含め、そのほとんどが腸粘膜上皮細胞の細胞質内で発育するとされている [1]。一方、*E. alabamensis* については腸粘膜上皮細胞の核内に寄生し、水様性の下痢を呈することが海外で報告されており、国内でも2009年に北海道で *E. alabamensis* による牛の核内コクシジウム症が初めて報告された [3]。

国内では、これまでに3種類のコクシジウムによる牛の核内コクシジウム症が報告されている。前述した *E. alabamensis* による症例のほか、大分県では *Cyclospora* spp. と記載された核内コクシジウム症 [4] が確認され、最近では鳥取県、大分県及び鹿児島県で各1例ずつ *Eimeria subspherica* による核内コクシジウム症の報告 [5] がある。大分県ではこの1例の報告を受け、

県内における核内コクシジウムの発生状況を検討するため、過去5年間の病性鑑定牛199頭について回顧調査を行ったので、概要を説明する。

材料及び方法

材料：2012～2016年度の5年間に病性鑑定部に持ち込まれた146農場由来の牛199頭(0～152カ月齢)の腸管(十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸及び結腸)を対象とした。

病理組織学的検査：10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施したものを鏡検し、腸粘膜上皮細胞に核内コクシジウム寄生がみられた牛を選出した。また、それらの牛の消化管については、コクシジウムをより明瞭に観察するためにギムザ染色を行い、抗酸菌の関与についても検索するために Ziehl-Neelsen 染色を実施した。

† 連絡責任者：河上 友 (大分県大分家畜保健衛生所)

〒870-1153 大分市小野鶴字原 442

☎ 097-541-5241 FAX 097-542-0086

E-mail : kawakami-tomo@pref.oita.lg.jp

表1 核内コクシジウムの感染がみられた症例

No.	発生年月日	品種	月齢	性別	核内コクシジウムの寄生部位					核内コクシジウム特異遺伝子の検出	文献
					十二指腸	空腸	回腸	盲腸	結腸		
1	2012年 7月 5日	黒和	10	F	NT	+	+	-	-	-	
2	2012年 9月 10日	黒和	10	C	NT	+	+	-	-	-	
3	2012年 11月 7日	黒和	7	C	NT	+	NT	NT	NT	-	
4	2013年 12月 2日	黒和	11	F	NT	+	NT	NT	-	-	
5	2015年 3月 30日	黒和	7	C	NT	+	NT	NT	NT	<i>E. subspherica</i>	
6	2015年 9月 9日	黒和	12	F	NT	+	-	-	-	<i>E. subspherica</i>	
7	2016年 6月 23日	黒和	7.5	C	NT	+	NT	NT	NT	<i>E. subspherica</i>	
8	2016年 9月 16日	黒和	8	F	NT	+	+	-	-	<i>E. subspherica</i>	[5]
9	2016年 12月 1日	黒和	10	F	-	+	-	NT	NT	<i>E. subspherica</i>	

黒和：黒毛和種，F：雌牛，C：去勢牛，NT：採材なし

表2 各症例についての症状及び病理学的検査成績

No.	症状	外貌所見	剖検所見	組織所見
1	慢性下痢， 発育不良	削瘦， 褥瘡	左肺中葉の暗赤色化， 第一胃内にローブ	化膿性線維索性肺炎，小腸における核内にコクシジウム及び線虫寄生を伴った慢性腸炎
2	慢性下痢， 発育不良	削瘦	記録なし	小腸における核内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
3	呼吸器症状， 慢性下痢， 発育不良	削瘦， 尿石	肺前葉の暗赤色化，腎盂拡張， 小腸粘膜の肥厚， 腸間膜リンパ節腫大	化膿性気管支肺炎，小腸における核内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
4	慢性下痢， 発育不良	削瘦	肺前葉の暗赤色化， 腸内容は水様下痢状， 腸間膜リンパ節腫大	肺水腫，小腸における核内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
5	呼吸器症状， 慢性下痢， 発育不良	削瘦	腸内容は水様下痢状， 腸間膜リンパ節腫大	肝臓に巣状壊死，気管支間質性肺炎，小腸における核内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
6	慢性下痢， 発育不良	削瘦， 脱毛	水腎症，腎結石，小腸粘膜の肥厚， 腸間膜リンパ節腫大	慢性腎炎，諸臓器における石灰沈着，小腸における核内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
7	呼吸器症状， 慢性下痢， 発育不良	削瘦	小腸粘膜の肥厚， 腸間膜リンパ節腫大	小腸における核内及び細胞質内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
8	慢性下痢， 発育不良	削瘦	第一胃絨毛未発達，小腸粘膜の肥厚， 腸間膜リンパ節腫大	小腸における核内及び細胞質内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎
9	慢性下痢， 発育不良	削瘦	第一胃絨毛未発達，小腸粘膜の肥厚， 腸間膜リンパ節腫大	誤嚥性肺炎，小腸における核内及び細胞質内にコクシジウム寄生を伴った慢性腸炎

遺伝子学的検査：パラフィン包埋材料から4 μ mで薄切した切片5枚を用いてDNA (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, QIAGEN (株), 東京) を抽出した。既報の *Eimeria* 属の 18S ribosomal RNA 遺伝子領域を標的とした PCR 検査 (Esub-F1 : catggtgattcatagtaaccgaac と Esub-R1 : tacgacggtatctaactcgtctca, または Esub-F2 : gcttaattgcgtgtttgttggg と Esub-R2 : ctactaggcatt cctcgttgaaga) 及び増幅産物約 800bp のシーケンス解析を実施し、得られた塩基配列の Blast 検索により種の同定を実施した [5]。

結 果

核内コクシジウム感染牛：146 農場中 9 農場 (6.2%)，199 頭中 9 頭 (4.5%) で、小腸粘膜上皮細胞の核内にコクシジウムの寄生を認めた。9 頭 (No. 1~9) はすべて異なる農家の牛で、7~12 カ月齢の黒毛和種、その内訳は去勢雄が 55.6% (5/9 頭)、雌が 44.4% (4/9 頭) で、雌雄差はみられなかった (表1)。病性鑑定時の主徴は、すべて慢性下痢と発育不良であった。剖検時には小腸粘膜の肥厚が 55.6% (5/9 頭)、腸間膜リンパ節の腫大が 77.8% (7/9 頭) で確認されていた (表2)。

病理組織学的所見：核内コクシジウムの寄生がみられ

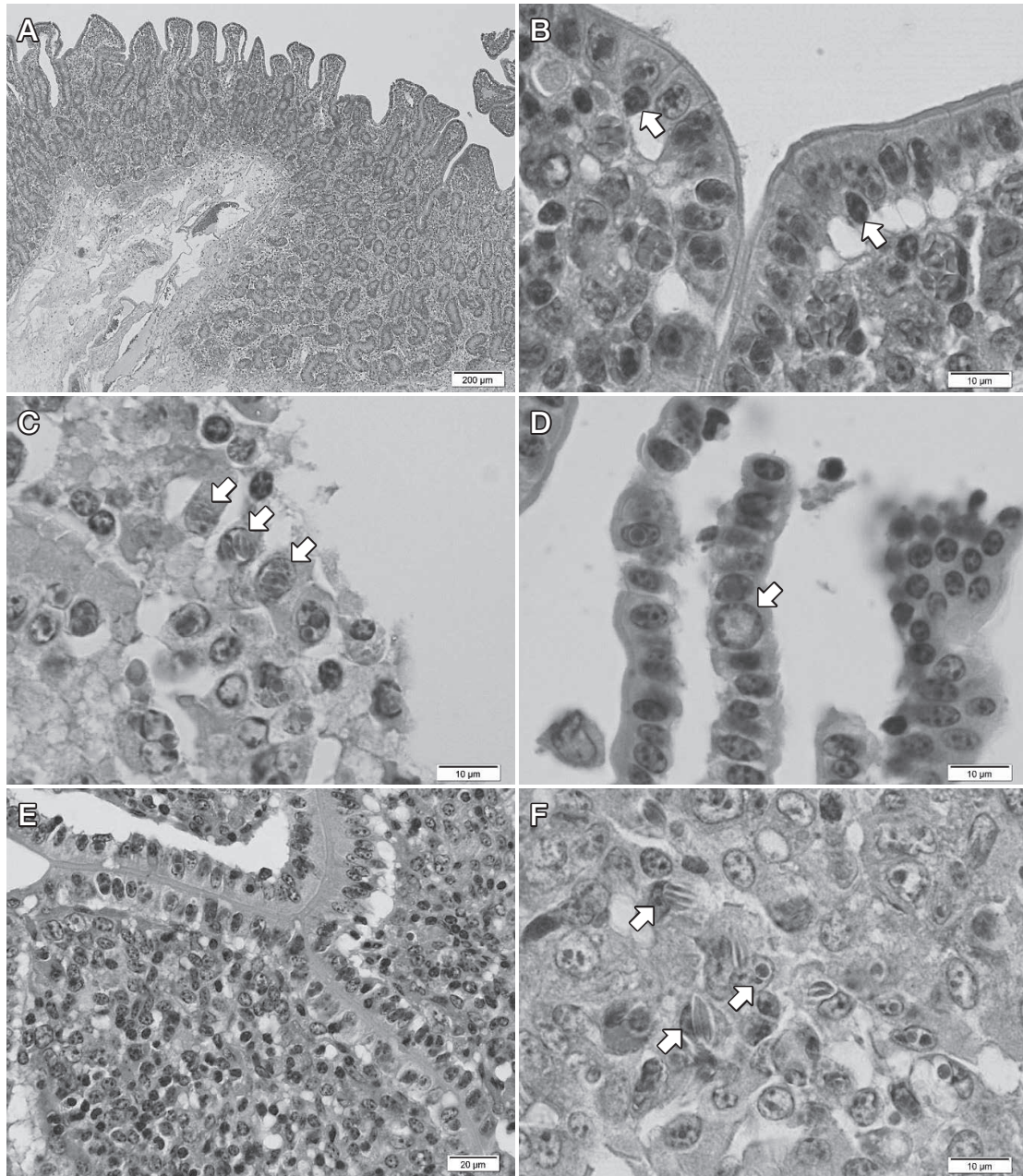


図 核内コクシジウムの寄生がみられた牛の空腸

- A: No. 3 空腸 腸絨毛は萎縮し、粘膜固有層では陰窩の増生がみられる。(HE染色 Bar=200 μ m)
 B: No. 3 空腸 腸絨毛の粘膜上皮細胞の核内に封入体様構造がみられ、上皮内にはリンパ球の浸潤(矢印)も認められる。(HE染色 Bar=10 μ m)
 C: No. 3 空腸 バナナ状のメロゾイトを含んだシゾン(矢印)が観察される。(HE染色 Bar=10 μ m)
 D: No. 7 空腸 有性生殖世代のガメトサイト(矢印)が観察される。(HE染色 Bar=10 μ m)
 E: No. 5 空腸 粘膜固有層にマクロファージや好酸球が浸潤している。(HE染色 Bar=20 μ m)
 F: No. 5 空腸 マクロファージ(矢印)によるシゾンの貪食像が認められる。(HE染色 Bar=10 μ m)

た腸管の部位は、空腸が100% (9/9頭)、回腸が83.3% (5/6頭)であった。それらの組織所見は共通しており、空腸や回腸において絨毛の萎縮や腸粘膜上皮細胞の脱落がみられ、粘膜固有層にはマクロファージや好酸球の浸潤、腸陰窩の増生が認められ、慢性腸炎の像を呈していた。多くの腸絨毛の粘膜上皮細胞の核内、また腸陰窩の上皮細胞の核内には封入体様構造物が認めら

れ、これらは長径8 μ m程度のコクシジウムで、無性生殖世代のシゾンや、有性生殖世代のガメトサイトなど、多様なステージが認められた。粘膜上皮内にはリンパ球の浸潤も認められた。粘膜上皮から固有層では、上皮細胞の核内に認められたものと同様の形態のコクシジウムを貪食しているマクロファージもみられた(図)。

また、これら9頭の牛でZiehl-Neelsen染色で赤色

に染色される菌体は認められなかった。

核内コクシジウムの種の同定：9頭中5頭 (No. 5～9, 55.6%) で、パラフィン包埋材料から *E. subspherica* の特異遺伝子が検出された。得られた塩基配列は、既報の *E. subspherica* のもの (Accession No. AB769644 や AB769644 等) と 100%一致した。

考 察

今回、2012～2016年の期間を対象として、大分県における牛の核内コクシジウム症の発生状況を調査したところ、5年間で199頭中9頭が核内コクシジウムに感染していたことが分かり、うち5頭については *E. subspherica* のPCR増幅産物が検出され、*E. subspherica* による核内コクシジウム症と考えられた。残りの4頭については、PCRによる増幅産物は得られなかった。これらは2012～2013年のもので、DNAの損傷や検査に供した材料に原虫DNA量が少なかった等の要因が考えられた。

大分県では、2010～2011年度に4件の *Cyclospora* spp. による牛の核内コクシジウム症が発生している [4]。 *Cyclospora* spp. は、そのオーシストが長径8 μ mで類円形を呈しているが、*E. subspherica* のオーシストも約11 \times 10.5 μ m、類円形であり [6]、両者は大きさに若干の差異はあるものの類似している。また、この牛の *Cyclospora* spp. の遺伝子配列は、18S ribosomal RNA 遺伝子領域の500bp以下のみ解読されている。この約500bpの塩基配列は、後に *E. subspherica* として報告されている塩基配列 (2,000bp) とほぼ一致している。したがって、過去に *Cyclospora* spp. とされていたコクシジウムは *E. subspherica* であった可能性が考えられている [5]。また、核内コクシジウム症を引き起こすものとして *E. alabamensis* も報告されているが、*E. alabamensis* のオーシストは16～24 μ m \times 12～16 μ m [7]で楕円形であり、*E. subspherica* のオーシストとは、その大きさや形態から判別することが可能である。さらに、遺伝子学的にも両者の塩基配列は大きく異なっている [5]。以上の点から、大分県における牛の核内コクシジウム症の原因として、*E. subspherica* が大きな割合を占めるものと考えられた。また、同遺伝子領域においてわれわれが設計したプライマーは、牛の *Eimeria* 種の鑑別に有用であると考えられた。

E. subspherica は、1941年に初めてその存在が報告され [8]、現在成書には低病原性のコクシジウムとして記載されている [9]。日本では、1985年秋に9県で実施された牛のコクシジウム感染率とその種の分布状況調査で、北海道から鹿児島県まで *E. subspherica* が浸潤し、黒毛和種及びホルスタイン種の牛で感染していたことが報告されている [10]。また、実験感染では10⁶～

10⁷のオーシストを経口接種すると感染が成立し、糞便中にオーシストを排出することが知られている [6, 11]。

今回報告した9頭の牛の核内コクシジウム症では、コクシジウムは空腸または回腸の粘膜上皮細胞の核内にみられ、マクロファージや好酸球の浸潤及び腸陰窩の増生によって、粘膜の肥厚を引き起こしていると考えられた。これらは他の核内コクシジウムも含めた既報の症例 [3-5] と類似しており、腸粘膜上皮細胞への核内コクシジウムの寄生によって消化・吸収不良を起こして慢性下痢を呈し、発育不良となることが推察された。

また、同様の症状や肉眼所見を呈するものには牛ウイルス性下痢・粘膜病やヨーネ病などがあり、これらの疾病との鑑別診断も重要である。

核内コクシジウム寄生がみられた9頭は、いずれも7～12カ月齢の黒毛和種子牛であった。これは、コクシジウム感染が成牛より若齢牛で高率・重篤となること [2]、市場への出荷や肥育を始める月齢であり、発育不良として廃用になったためと考えられた。牛の核内コクシジウム症の診断は、現在は病理組織学的検査と虫卵検査またはPCR法によって行われているが、生前の確定診断は難しい。発症の予防としては、他の *Eimeria* 属コクシジウムと同様に、環境中オーシストの減数や予防薬の投与によって感染数を減らすことで、糞便への排出を防ぎ、さらに感染や発症を防止するといった対策が考えられる。

E. subspherica が核内に寄生する機序についてはいまだに不明な点が多く、今後の症例の蓄積や病態の解明が求められる。また、慢性下痢や発育不良の一因として本症を鑑別診断に入れて検査を行う必要が考えられた。

遺伝子解析にてご協力をいただいた大阪府立大学の関口理香様に深謝する。

引用文献

- [1] Dauschies A, Najdrowski M : Eimeriosis in cattle: current understanding, J Vet Med B, 52, 417-427 (2005)
- [2] Lenvin ND : Apicomplexa: the coccidian proper, Veterinary protozoology, The Iowa State University Press, Ames, 130-232 (1985)
- [3] Nishida T, Hatama S, Ishikawa Y, Kadota K : Intranuclear coccidiosis in a calf, J Vet Med Sci, 71, 1109-1113 (2009)
- [4] Yamada M, Hatama S, Ishikawa Y, Kadota K : Intranuclear coccidiosis caused by *Cyclospora* spp. in calves, J Vet Diagn Invest, 26, 678-682 (2014)
- [5] Koreeda T, Kawakami T, Okada A, Hirashima Y, Imai N, Sasai K, Tanaka S, Matsubayashi M, Shibahara T : Pathogenic characteristics of a novel intranuclear coccidia in Japanese black calves and its genetic iden-

- tification as *Eimeria subspherica*, Parasitol Res, 116, 3243-3247 (2017)
- [6] Ernst JV, Courtney CH : Prepatent and patent periods of the bovine coccidium *Eimeria subspherica* Christensen, 1941, with a redescription of the sporulated oocyst, P Helm Soc Wash, 44, 97-98 (1977)
- [7] Kaufmann J : Parasites of cattle, Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual, 1st ed, Birkhauser, Basel, 23-143 (1996)
- [8] Christensen JF : The oocysts of coccidia from domestic cattle in Alabama (U.S.A.), with descriptions of two new species, J Parasitol, 27, 203-220 (1941)
- [9] Levine ND, Protozoan parasites of domestic animals and of man 2nd ed, Burgess, Minneapolis, Minnesota (1973)
- [10] Oda K, Nishida Y : Prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan, Jpn J Vet Sci, 52, 71-77 (1990)
- [11] Oda K, Nishida Y : Prepatent and patent periods, and production and sporulation of oocysts of *Eimeria subspherica* isolated in Japan, Jpn J Vet Sci, 53, 615-619 (1991)

Bovine Intranuclear Coccidiosis Caused by *Eimeria subspherica*
in Oita Prefecture, Japan

Tomo KAWAKAMI^{1)†}, Makoto MATSUBAYASHI²⁾, Minako YAMADA¹⁾,
Toru HITOMI¹⁾, Kazumi SASAI²⁾ and Tomoyuki SHIBAHARA^{2),3)}

1) *Oita Prefectural Oita Livestock Hygiene Service Center, 442 Onozuru, Oita, 870-1153, Japan*

2) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Science, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-oraikita, Izumisano, 598-8531, Japan*

3) *Division of Pathology and Pathophysiology, National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

An epizootiological survey using histopathological and molecular methods was conducted for bovine intranuclear coccidiosis in 199 diseased cattle at 146 farms in Oita Prefecture, Japan, from 2012 to 2016. Intranuclear coccidiosis was confirmed in nine out of 199 cattle (4.5%). They were Japanese black calves that originated from nine different farms, and showed chronic diarrhea and poor growth. Macroscopically, thickening of the small intestinal mucosa (55.6%, 5/9) and enlargement of the mesenteric lymph node (77.8%, 7/9) were observed. Histological lesions were characterized by atrophy of intestinal villi of the small intestine, inflammatory cell infiltration in the lamina propria and numerous parasites in the nucleus of epithelial cells in the small intestine. Through the molecular analyses of nine samples using *18S ribosomal RNA* gene-specific primers from *Eimeria* species, five samples (55.6%) were successfully amplified and the parasites were found to be closely related to *Eimeria subspherica*. These results suggested that *E. subspherica* plays a significant role in bovine intranuclear coccidiosis. — Key words : calf, *Eimeria subspherica*, intranuclear coccidiosis.

† Correspondence to : Tomo KAWAKAMI (Oita Prefectural Oita Livestock Hygiene Service Center)

442 Onozuru, Oita, 870-1153, Japan

TEL 097-541-5241 FAX 097-542-0086 E-mail : kawakami-tomo@pref.oita.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 568 ~ 572 (2018)