

称号及び氏名	博士(獣医学)	清水 優
学位授与の日付	2022年2月28日	
論文名	生産現場における牛の腸管寄生原虫の分子疫学調査および防除法に関する研究	
論文審査委員	主査	松林 誠
	副査	向本 雅郁
	副査	笹井 和美

論文要旨

緒論

子牛の下痢症は、日本を含め世界中の畜産現場で高頻度に発生する疾病である。下痢症を患った子牛は増体の減退により生産性が著しく低下する。そして、治療費や育成日数の延長に伴う経費の増額により、多大な経済的損失を引き起こす。子牛の下痢症の原因は、消化不良等の非感染性と病原微生物の感染による感染性のものに大別されるが、実際の生産現場においてはその特定が困難な場合も多い。感染性下痢症に関連する病原微生物は、ウイルス、細菌、および寄生虫等があげられる。ウシの腸管に感染する寄生虫は、線虫、吸虫、条虫および原虫に分けられるが、生産現場において診断、治療および対策が最も困難であるのは原虫である。これに該当するウシに寄生する原虫としては、*Cryptosporidium* spp.、*Giardia intestinalis* および *Entamoeba* spp. があげられるが、これらの原虫は微小であり、確定診断には特殊な染色や技術が必要となる。そのため、上述した原虫は農家において潜在的に存在すると想定されるが、国内外での分布状況や病原性等について十分な知見が得られていない。また、これらの原虫は各種消毒薬に対して極めて強い耐性を有し、環境中で長期間の生存が可能である。

原因の究明に向けた下痢症への原虫の関与、感染予防および対策には、原虫の正確な検出および遺伝子型を含めた種の同定が必要不可欠である。そこで本研究では、上述した課題の解決の一助として、生産現場において検出が難しく、かつ国内外でその分子疫学等の情報が不足している3種の腸管寄生原虫について、遺伝子型解析等による疫学調査によりその感染状況を詳細に明らかにし、さらに原虫の特性を考慮した防除対策を行いその有効性を評価した。

第1章 *Cryptosporidium parvum* および *Giardia intestinalis* の混合感染による子牛の致死性下痢症とその清浄化対策

クリプトスポリジウム症は *Cryptosporidium* spp. の感染に起因し、水様下痢を主徴とする。特に *C. parvum* は子牛において最も病原性が高いとされ、かつヒトにも感染性を有する。生産現場における *Cryptosporidium* spp. の診断は、シヨ糖遠心浮遊法等でのオーシストの検出による。しかし、オーシストは約 5 μm と非常に小さく検出には熟練を要するため、陰性と誤診されることが多い。現在のところ、本症に対する有効な治療法はなく、対症療法を実施し、他の個体への感染を防ぐしか方法がないとされる。しかし、各種消毒薬ではオーシストを殺滅できないため、飼養環境から感染源を排除することが困難であり、畜産現場において実行可能な対策は確立されていない。

G. intestinalis も人獣共に感染性を有するが、子牛の下痢症との関連性については結論が出ていない。糞便と共に排泄されるシストは外界において長期間の生存が可能であり、他の個体への感染源となる。*G. intestinalis* は近年、遺伝子型解析により assemblages A から H の 8 つの遺伝子型に分類されている。しかし、我が国においては、偶発的に検出された *G. intestinalis* の遺伝子型の解析が 2 報あるのみであり、また、*Cryptosporidium* spp. との混合感染例の報告はない。

第1章では、国内酪農場において、10年以上にわたり原因不明とされていた子牛の致死的な下痢症について、以下の解析を実施した。子牛4頭の糞便についてシヨ糖遠心浮遊法の変法により精査し、3頭から *Cryptosporidium* spp. のオーシスト、2頭から *G. intestinalis* のシストを検出した。うち1頭は国内初となる両原虫の混合感染例であった。顕微鏡観察では *Cryptosporidium* spp. のオーシストは薄いピンク色に発色し、*G. intestinalis* のシストは楕円形の片側が陥没し三日月のように観察される特徴を有していた。両原虫を分子生物学的手法により解析したところ、*Cryptosporidium* spp. は人獣共通の遺伝子型である *C. parvum* IIaA15G2R1 であり、*G. intestinalis* は海外において主に家畜で検出されている assemblage E 型と同定された。*C. parvum* IIaA15G2R1 は国内で広く存在することが示唆されており、子牛において高い致死性を有する可能性が示唆された。*G. intestinalis* assemblage E 型は近年、ヒトへの感染が報告されており、今後、国内外での分布状況を精査する必要がある。

糞便中に *C. parvum* が検出された死亡子牛を剖検したところ、腸管全域に充出血が確認された。この腸管組織に対し抗 *C. parvum* ポリクローナル抗体による免疫組織染色を実施した結果、腸管微絨毛に寄生する発育期虫体が多数認められた。両原虫の清浄化対策のため、同農場で飼育されていた成牛を含む全 60 頭について、同変法により糞便検査を実施した。その結果、いずれの個体からも両原虫は検出されず、汚染区域はカーフペンに局限していることが明らかとなった。そこで、子牛間の隔壁を新しいものと交換し、カーフペン内の敷き藁および糞便を除去し、周辺エリアを熱湯により消毒した。乾燥後、石灰乳を塗布し、感染源を封入した。対策を実施した後、両原虫は検出されず、下痢症による死亡事例はなくなった。対策前後の1年間の下痢発症頭数と月平均診療回数の比較では、いずれも対策後に有意に低下した ($p < 0.01$)。

これまで当該農場では、各種消毒薬による対策が実施され、また下痢症の原因とな

る主要な細菌、ウイルス、そして寄生虫等の各種病原体の検査も実施されていたが、陰性と判定されていた。原因の確定には存在し得る全ての病原微生物の検査を実施する必要があるが、本研究により致死性の下痢症の原因は *Cryptosporidium spp.* による感染が一因である可能性を示すことができた。今後、様々な飼養形態の農場での確認は必要であるが、実施された一連の解析手法、そして清浄化対策は感染源であるオーストおよびシストに対して有効な方法であると考えられた。

第2章 日本の牛における *Entamoeba bovis* の分子系統解析および病原性について

Entamoeba 属原虫は肉質鞭毛虫門に属し、極めて多くの種が存在する。病原性を有するのは *E. histolytica* および *E. invadens* のみとされており、これ以外では病原性は低い、または未解明である。従来、*Entamoeba spp.* は検出された宿主別およびシストの形態学的特徴により分類されてきた。しかしブタに感染し難治性下痢症を引き起こす *Entamoeba spp.* が、*E. histolytica* と誤認されていたことが明らかになる等、近年はこれまでの形態学的な特徴による分類から分子生物学的な解析を主軸とした再分類や確認の必要性が検討されている。

遺伝子解析により、反芻獣に寄生する *Entamoeba spp.* は *E. bovis* (ウシ、ヒツジおよびトナカイ)、*Entamoeba ribosomal lineage (RL) 1* (ノロジカ)、*RL2* (ウシ)、および *RL4* (ウシ) の4つの種および遺伝子型に分類され、さらに、*E. bovis* では数塩基の置換を伴う亜型がウシとヤギから分離されている。しかし、これまでにスウェーデン、アイスランド、リビアおよびウガンダの4ヵ国からしか報告がなく、反芻獣に寄生する *Entamoeba spp.* の世界的な分布状況は不明である。また、これらの原虫の病原性についての報告はなく、下痢症等との関連は不明である。これを明らかにするためには、原虫の有無を正確かつ高感度に精査し、さらに種および遺伝子型を同定する必要がある。本研究では、原虫の検出感度をあげるべく検査方法を改変して糞便検査を実施し、種および遺伝子型を決定できる領域を含むペアプライマーを独自に設計して遺伝子解析を行った。そして、飼育環境中の汚染状況を把握するために、土壤等の飼育環境中の原虫の有無を調査し、また一定期間、ウシ個体の感染状況を解析して臨床症状を観察することにより病原性を考察した。

ウシを飼養する国内6農場において、糞便25検体、飲水および土壤等、飼育環境から7検体を採取した。ショ糖勾配法によりシストを精製し、ヨード染色下で鏡検した。その結果、糞便16検体と飼育環境4検体から、大小不同の赤銅色円形のシストが検出された。18S rRNA 遺伝子領域のPCRでは、世界で広く使用されているペアプライマー Entam1 と 2 では増幅産物は得られず、GenBank に登録されている *E. bovis* の塩基配列を基に新たに設計した EntboF2 と R3 において増幅産物が得られた。これらの塩基配列を用いて分子系統樹を作成したところ、検出されたシストは全て *E. bovis* のクラスターに含まれた。さらに8~12ヶ月間、同じ個体について糞便検査を実施した。その結果、陽性個体は持続的にシストを排出していたが下痢等の臨床症状を示さず、*E. bovis* の病原性は低い可能性が示された。また、本解析で使用したペアプライマーは、*Entamoeba spp.* の遺伝子型の決定に有用であることが示唆された。

総括

- ・ 国内の農場において *C. parvum* IIaA15G2R1 亜型が子牛の難治性かつ致死性の下痢症を引き起こしている可能性を提示した。
- ・ 子牛の飼養施設において、消毒薬に強い耐性を有する腸管寄生原虫に対して、有効であると考えられる清浄化対策を提示した。
- ・ 国内 6 農場の牛および飼育環境から日本において初めて *E. bovis* を分子生物学的手法により同定し、継続調査により本原虫が低病原性である可能性を示した。

審査結果の要旨

下痢症は畜産現場において高頻度に発生する疾病である。本症は特に子牛で増体の著しい減退を招き、発症個体が重篤化した場合には死に至るため生産性の低下に直結する。下痢症は消化不良などによる非感染性によるものと病原微生物による感染性のものに分けられる。後者では、ウイルス、細菌および寄生虫などが含まれるが、この中で原虫は診断、治療および防除対策が極めて難しい。これに該当する牛寄生性の主な原虫は、クリプトスポリジウム、ジアルジアおよびアメーバがあげられる。クリプトスポリジウムは現在も予防法や治療法が確立しておらず、子牛に感染した場合に発症率や致死率は高い。ジアルジアは国内での分布状況は分かっておらず、アメーバについては世界的な感染状況および病原性も明らかにされていない。予防および対策として、まずはこれら原虫の検出および遺伝子型を含めた正確な種の同定が必要である。しかし、日常的に実施される顕微鏡観察において、約 5-10 μm の大きさのこれらの原虫を検出することは容易ではなく、陰性と誤って判定されていると推測される。また、検出に成功しても、上述した原虫類は各種消毒剤に対して極めて強い耐性を有するため清浄化が難しく、環境中で長期間生存できるため感染源として飼育下に存在し続けることになる。そのため、これらの原虫に関して長期的な分子疫学解析および防除対策の報告は限られ、同一の生産現場でさえ感染動態および病態発現状況が不明であった。本研究では、国内の牛の生産農家において、国内外で多くの点で課題となっているこれら 3 種の腸管寄生原虫の感染状況および環境中の原虫の有無について遺伝子型解析による疫学調査を実施し、さらに原虫の特性を考慮した防除対策を行いその有効性を評価した。

第 1 章では、10 年以上にわたり子牛の致死的な下痢症が発生し、その原因が不明であった酪農場において、国内外で一般的に利用されているショ糖遠心浮遊法を改変した方法によりクリプトスポリジウム原虫の検出を試みている。その結果、観察された原虫の形態学的特徴、さらに特異抗体による免疫蛍光染色によりクリプトスポリジウムの検出に成功した。さらに、死亡した個体の空腸から直腸の腸管粘膜の微絨毛に寄

生する発育中のクリプトスポリジウム原虫を検出し、下痢を引き起こす各種病原体が陰性であることから、本原虫による感染が原因である可能性を示した。さらに複数の遺伝子領域において遺伝子型解析を実施し、*Cryptosporidium parvum* IIaA15G2R1 亜型であることを同定した。本亜型は国内の牛で広く分布している可能性が示唆されていたが、子牛において高い致死性を有する可能性を示した。また、同変法によりジアルジアも検出可能であることを提示し、本研究で検出されたジアルジアは主に反芻獣で検出される *assemblage E* の遺伝子亜型であることが分かった。この亜型は近年、海外において人での感染が報告されている。

その後、同農場で飼育されている育成牛と成乳牛を含む全 60 頭の糞便検査を実施し、両原虫による感染区域は子牛を飼育していたカーフペンに局限し、それは同一の遺伝子亜型であることを明らかにした。酪農家の協力を得て実施した対策として、カーフペンを熱湯消毒した後に乾燥させ、石灰乳を塗布し感染源を封入し、子牛間の隔壁は新たなものと交換した。対策後、下痢症による子牛の死亡事例は発生せず、年間の下痢発症頭数と月平均診療回数がいずれも有意に低下した。今後、様々な飼育形態による確認は必要であるが、本研究で実施された一連の解析手法および清浄化対策は有効な方法であると評価できた。

第二章では、国内の 2 県 6 農場の牛からヨードカリウム染色によりアメーバ様原虫を検出し、その形態学的特徴を明らかにした。アメーバ属原虫の遺伝子型解析においては、これまで一般的に使用されてきたペアプライマーの不備に着目し、海外の反芻獣由来の *Entamoeba* 種の塩基配列を基に、種および遺伝子型を決定できる領域を含むペアプライマーを設計し、解析を行った。その結果、諸外国の牛で感染が報告されている *Entamoeba* RL2 や RL4 型は検出されず、本研究で検出された全ての株が *E. bovis* であることを明らかにした。また、2 農場において、約 10 ヶ月間にわたる長期検査を実施し、*E. bovis* に持続感染している個体に下痢などの臨床症状が確認されなかったことから、本種は低病原性である可能性を示した。以上の解析は、国内における初めての *E. bovis* の検出報告となり、世界で初めて *E. bovis* の病態を考察する結果となった。

本研究による成果は、獣医寄生虫学分野、特に牛の腸管寄生原虫において欠如している感染動態および病態発現について新たな知見を付与するものであり、また大動物診療の検査体制や防除対策に貢献すると判断され、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。