

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08073

研究課題名(和文)牛寄生Eimeria属原虫の種識別法の開発と牛コクシジウム症診断への応用

研究課題名(英文)Development of discrimination methods among bovine Eimeria species and its utilization to diagnose bovine coccidiosis

研究代表者

板垣 匡 (Itagaki, Tadashi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80203074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、日本における牛寄生Eimeria属原虫の種識別法を開発し、牛コクシジウム症の新たな診断法を確立することを目的とした。牛寄生Eimeria属原虫10種(E. cylindrica、E. subspherica、E. wyomingensis、E. auburnensis、E. ellipsoidaris、E. zuernii、E. alabamensis、E. bovis、E. bukidnensis、E. canadensis)を識別し、複数種の同時検出も可能なnested multiplex PCR法の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

牛のコクシジウム症はEimeria属原虫の感染に起因し、世界の畜産業に甚大な経済損失を与えている。その診断には糞便中オーシストの検出とその形態的種同定が求められる。しかし、検査には寄生虫学的熟練と時間を要し、新たな検査法の開発が望まれている。本研究では、牛寄生Eimeria10種を遺伝子領域のDNA塩基配列の違いで識別できることを明らかにし、複数種の同時検出も可能なnested multiplex PCR法の開発に成功した。これにより、特別知識を要しないPCR検査法で牛のコクシジウム症を診断することが可能になった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop technique to discriminate between bovine Eimeria spp. and diagnostic method for bovine coccidiosis. Ten Eimeria species, E. cylindrica, E. subspherica, E. wyomingensis, E. auburnensis, E. ellipsoidaris, E. zuernii, E. alabamensis, E. bovis, E. bukidnensis, E. canadensis were discriminated by newly developed nested multiplex PCR available for field samples .

研究分野：寄生虫学

キーワード：牛コクシジウム症 nested multiplex PCR Eimeria 種識別

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

牛のクシジウム症は *Eimeria* 属原虫の感染に起因し、下痢などの消化器系症状を主徴として世界の畜産業に甚大な経済損失を与えている (損失額は年間でおよそ 723 百万ドル; Fitzgerald 1980)。その原因として *Eimeria* 21 種が確認されているが、種によって病原性が異なり *E. bovis* と *E. zuernii* の 2 種は高病原性種、他種は低病原性種とされている。日本では高病原性の 2 種を含めて 13 種の *Eimeria* 属原虫が研究代表者らの報告などにより確認されている (Kawanishi et al. 2016)。クシジウム症は、臨床症状に加えて糞便中オーシストを顕微鏡検査で確認することにより診断される。しかし、*Eimeria* 属のオーシストは種間で形態学的特徴が類似するため、形態による種同定は必ずしも容易ではない。近年、核リボソーム DNA やミトコンドリア DNA の遺伝子等をマーカーとした *Eimeria* 属の種同定法が開発されている。鶏寄生の *Eimeria* 属 7 種では、18S rRNA 遺伝子や internal transcribed spacer (ITS) 1 および ITS2 領域、NADH dehydrogenase 1 (*nad1*) や cytochrome oxidase subunit 1 (*cox1*) 遺伝子をマーカーとした種識別法が開発され、鶏クシジウム症の種レベルでの診断に応用されている (Morgan et al. 2009; Godwin, Morgan 2014)。一方、牛には 21 種と多種の *Eimeria* 属原虫が寄生することから識別マーカーに関する報告は少ない。近年、研究代表者らは、牛寄生 *Eimeria* 10 種を用いて 18S rRNA の種識別マーカーとしての可能性を検討したが、種間における塩基変異率は 0.1%-3.0% と低く、識別マーカーとしては適していないと考えられた (Kokuzawa et al. 2013)。また ITS1 領域については牛寄生 *Eimeria* 6 種でのみ識別が可能であり (Kawahara et al. 2010)、ITS2 領域の牛寄生種についての報告はない。最近、研究代表者らは牛寄生 *Eimeria* 10 種について、ITS2 領域の塩基配列を解明した (GenBank 登録 Itagaki and Kokuzawa, 2014)。10 種間の塩基変異率は 13.3%-50.9% と高く、塩基数も種間で異なることから、ITS2 領域の識別マーカーとしての可能性が示唆された。一方、牛寄生種の *nad1* や *cox1* 遺伝子に関する報告はない。鶏やシチメンチョウのクシジウム症では種識別マーカーを用いた検査法 (Multiplex PCR, capillary electrophoresis assay: CEA, Lamp 法など) が開発され、診断法として応用されている (Hafeez et al. 2015 など)。

2. 研究の目的

本研究は、日本における牛寄生 *Eimeria* 属原虫の種識別マーカーを明らかにし、牛クシジウム症を種レベルで診断する検査法の開発を目的とし、以下の 1~4 を明らかにすることを目的とした。

- (1) . これまでに解明された牛寄生 *Eimeria* 10 種に加えて、未解明の 3 種を含めて日本に分布する *Eimeria* 13 種の ITS2 領域の塩基配列を解明し、種識別マーカーとしての有用性を検証する。
- (2) . 牛寄生 *Eimeria* 13 種においてミトコンドリア DNA の *nad1* および *cox1* 遺伝子の塩基配列を解明し、種識別マーカーとしての有用性を検証する。
- (3) . 1 および 2 の成果から、有用性が確認された種識別マーカーを用いた検査法 (Multiplex PCR 法や PCR-RFLP 法、CEA 法など) を開発する。
- (4) . 3 で開発した *Eimeria* 種識別法を実際の野外例に応用し、牛クシジウム症の新しい診断法を確立する。

3. 研究の方法

(1). 牛寄生 *Eimeria* 属 13 種の ITS2、*nad1* および *cox1* の塩基配列の解明

13 種と分離株のオーシスト: 日本全国の牛診療獣医師の協力により異なる県・地域から牛の糞便を入手する。糞便はシヨ糖浮遊法により *Eimeria* 属オーシストを検査する。陽性糞便からオーシストを回収し、2%重クロム酸カリウム溶液中でスポロゾイト形成オーシストとし、その形態学的特徴から種を同定する。なお、国内から 13 種のオーシストが入手出来ない場合には海外研究協力者に依頼して入手する。

単一オーシストからの DNA 抽出: 種同定したオーシストを Kokuzawa et al. (2013) に従って 0.5% 次亜塩素酸ナトリウムで処理した後、凍結融解の繰り返しにより DNA を抽出する。

ITS2 領域の塩基配列の決定: 既に開発した nested PCR により ITS2 領域を増幅する。すなわち、プライマーセット (TK1, *ets2*) および (*ets2*-f, *ets2*-r) をそれぞれ 1st PCR、2nd PCR に用いて ITS2 領域を増幅し、ダイレクトシーケンシングまたは TA-クローニング後に塩基配列を決定する。

nad1 および *cox1* 遺伝子の塩基配列の決定: 牛寄生 *Eimeria* 種のミトコンドリア DNA 配列は殆ど未解明であるため、鶏やシチメンチョウ、齧歯類に寄生する *Eimeria* 属の GenBank 登録配列から牛寄生 *Eimeria* 属の *nad1* および *cox1* 遺伝子を増幅する nested PCR プライマーを設計する。増幅産物はダイレクトシーケンシングまたは TA-クローニングにより塩基配列を決定する。

(2). ITS2、*nad1* および *cox1* 遺伝子の塩基配列にもとづいた *Eimeria* 属 13 種の識別

同一種分離株の単系統群形成の確認: 各領域の塩基配列を最尤法で系統解析し、同一種の分離株が単系統群を形成することを確認する。

種特異的配列の検証と種識別検査法の開発: 各領域の解読配列をアライメントして配列の種内変異と種間変異を確認し、種特異的配列の有無を検証する。種特異的配列を利用した PCR プライマーの設計や

制限酵素認識配列の可能性を検証する。種特異的プライマーによる PCR 法や種特異的プライマーを混合した multiplex PCR 法、種特異的 PCR-RFLP 法の開発を検討する。また各領域の塩基数の違いを利用した capillary electrophoresis assay (CEA 法)の開発も検証する。なお種識別検査法は複数の検査法の組み合わせになる場合がある。核リボソーム DNA とミトコンドリア DNA は塩基置換速度が比較的に早い領域であるため、種内変異の発現により種特異的配列が得られない可能性もある。万が一、そのような状況になった場合には、高病原性種(*E. bovis*, *E. zuernii*)と低病原種(他 11 種)を識別・検出する方法の開発にシフトさせる。

(3)開発した *Eimeria* 種識別検査法の検出感度および特異性の評価

13 種の DNA: *Eimeria* 感染牛の糞便オーシスト 100 個が同一種と判定された糞便を一種感染とみなし、糞便から回収した 10^5 個オーシストから Kokuzawa et al. (2013)に従ってオーシスト壁を破壊した後、QIAmp DNA stool mini kit を用いて DNA を抽出する。各種の DNA は 10 倍段階希釈により 10^3 から 10^{-5} オーシストの抽出 DNA とする。なお、混合感染等により単一種感染の糞便が得られない場合には、牛を用いた感染実験で単一種オーシストを得る。

検出感度と特異性の評価:各種の DNA とその希釈液を用いて、識別検査法の単一種ごとの検出感度(推定検出オーシスト数)を評価する。また同時に種特異性についても評価する。次に、種識別検査法(特に multiplex PCR 法や CEA 法の場合)の複数種検出とその感度および特異性を評価する。

他種寄生虫との特異性の評価:*Eimeria* 属以外の寄生虫(*Giardia*, *Cryptosporidium*、各種の消化管内寄生線虫、肝蛭、双口吸虫などの牛の寄生虫)の DNA を用いて種識別検査法の特異性を評価する。

(4) *Eimeria* 種識別検査法の牛コクシジウム症診断法への応用

実際の野外症例を用いて診断法として評価する。フィールド牛の糞便を入手し、ショ糖遠心浮遊法、McMaster 法、ビーズ法により原虫類(シスト、オーシスト)ならびに蠕虫類(虫卵)について検査をする。寄生虫種とそれらの OPG, CPG, EPG 値を確認した糞便 200mg から前述方法で DNA を抽出し、それを用いて *Eimeria* 種識別検査法の検出感度や検出限界、特異性を評価することで牛コクシジウム症診断法として評価する。

4. 研究成果

本研究では、日本における牛寄生 *Eimeria* 属原虫の種識別法を開発し、牛コクシジウム症の新たな診断法を確立することを目的とした。29 年度は牛寄生 *Eimeria* 属 10 種について、核リボソーム ITS2 領域の塩基配列を決定し、その配列の違いに基づいた識別の可能性について検討した。まず日本各地から牛糞便を入手し、ショ糖浮遊法によりオーシスト検査を行い、陽性検体からオーシストを回収して培養し、スポロゾイト形成オーシストとした。形態学的特徴から種を同定した、単一オーシストから全 DNA を抽出し、nested-PCR 法により ITS2 領域を増幅した。増幅産物はダイレクトシーケンシングまたは TA クローニングにより塩基配列を決定した。その結果、ITS2 領域の塩基配列は *Eimeria* 種で大きく異なり、塩基数は 389bp (*E. bukidnonensis*) - 675bp (*E. cylindrica*)、塩基相同性は種間で 49.1- 87.6%、種内で 77.1-100%であり、すべての *Eimeria* 種に種内変異あるいは個体内変異がみられた。近隣結合 (NJ) 法による系統樹では、*Eimeria* spp. は 3 つのクラスター (A, B, C) に分かれ、クラスター A は *E. bovis*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*, クラスター B は *E. auburnensis*, *E. cylindrica*, *E. canadensis*, *E. wyomingensis*, クラスター C は *E. alabamensis*, *E. bukidnonensis*, *E. subspherica* より形成された。また、すべての *Eimeria* 種が単系統群のクレードを形成した。以上のことから、ITS2 領域は種同定マーカーとして有用であると考えられた。

30 年度では、日本における牛寄生 *Eimeria* 属原虫の種識別法を開発し、牛コクシジウム症の新たな診断法を確立することを目的とした。得られた *Eimeria* 種の ITS2 領域の配列に基づき、*Eimeria* 種特異的なプライマー(alr-1, auf-2, bor-2, bukir-3, car-1, cyf-4, cyr-1, elf-1, suf-2, sur-1, wyf-2, wyr-3, zuf-2)を設計した。また、18S rDNA 領域の配列を解析し、*Isospora belli*(DQ060658), *Cryptosporidium parvum*(AF040725)の配列より設計した *Eimeria* 属共通のプライマー-espf および espfz を設計した。espf および espfz を 1st PCR のプライマーとし、alr-1, auf-2, bor-2, bukir-3, car-1, cyf-4, cyr-1, elf-1, suf-2, sur-1, wyf-2, wyr-3, zuf-2 を 2nd PCR のプライマーとして組み合わせることで、*Eimeria* 種特異的な nested multiplex PCR 法を開発を試みた。*Eimeria* 各種のオーシストから抽出した total DNA を用いて種特異的増幅産物が得られたことから、日本における牛寄生 *Eimeria* 属原虫の種を識別する簡便な nested multiplex PCR 法の開発に成功した。31 年度は新規開発した nested

multiplex PCR法の臨床応用を検討することとした。その結果、新規設計した *Eimeria* 種特異的なプライマー(alr-1, auf-2, bor-2, bukir-3, car-1, cyf-4, cyr-1, elf-1, espf, ets2-r, suf-2, sur-1, wyf-2, wyr-3, zuf-2)を組み合わせて、*Eimeria* 属原虫の3~4種を同時にPCR増幅するnested multiplex PCRの可能性を評価した。*E. cylidrica*を増幅するプライマー(cyf-4, cyr-1)、*E. subspherica*を増幅するプライマー(suf-2, sur-1)および*E. wyomingensis*を増幅するプライマー(wyf-2, wyr-3)をミックスしたプライマーミックス、*E. auburnensis*を増幅するプライマー(auf-2, ets2-r)、*E. ellipsoidaris*を増幅するプライマー(elf-1, ets2-r)および*E. zuernii*を増幅するプライマー(zuf-2, ets2-r)をミックスしたプライマーミックス、*E. alabamensis*を増幅するプライマー(espf, alr-1)、*E. bovis*を増幅するプライマー(espf, bor-2)、*E. bukidnensis*を増幅するプライマー(espf, bukir-3)、および*E. canadensis*を増幅するプライマー(espf, car-1)をミックスしたプライマーミックス、により *Eimeria* 1種、2種、3種、または4種の同時識別が可能であることが明らかになった。以上から、牛寄生 *Eimeria* 属原虫10種(*E. cylidrica*, *E. subspherica*, *E. wyomingensis*, *E. auburnensis*, *E. ellipsoidaris*, *E. zuernii*, *E. alabamensis*, *E. bovis*, *E. bukidnensis*, *E. canadensis*)を識別し、複数種の同時検出も可能なnested multiplex PCR法の開発に成功した。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Ohari Yuma, Kuwahara Yasuhiro, Itagaki Tadashi	4. 巻 68
2. 論文標題 Morphological and genetic characterization of green-banded broodsacs of <i>Leucochloridium</i> (<i>Leucochloridiidae</i> : Trematoda) sporocysts detected in <i>Succinea lauta</i> in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 53~56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uday Kumar Mohanta, Takuya Watanabe, Anisuzzaman, Yuma Ohari, Tadashi Itagaki	4. 巻 69
2. 論文標題 Characterization of <i>Echinostoma revolutum</i> and <i>Echinostoma robustum</i> from ducks in Bangladesh based on morphology, nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial nad1 sequences	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.11.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayashi K, Ichikawa-Seki M, Mohanta UK, Shoriki T, Chaichanasak P, Itagaki T.	4. 巻 80
2. 論文標題 Hybrid origin of Asian aspermic <i>Fasciola</i> flukes is confirmed by analyzing two single-copy genes, <i>pepck</i> and <i>pold</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 98-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0406	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohari Y, Hayashi K, Mohanta UK, Kuwahara Y, Itagaki T.	4. 巻 79
2. 論文標題 First report of <i>Fasciola</i> larva infection in <i>Galba truncatula</i> (Muller, 1774) (Gastropoda, Lymnaeidae) occurring in the natural environment in Hokkaido, Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical science	6. 最初と最後の頁 1381-1383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0215.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuma Ohari, Kei Hayashi, Uday Kumar Mohanta, Tatsuo Oshida, and Tadashi Itagaki	4. 巻 40
2. 論文標題 Phylogenetic relationships between Lymnaeidae in relation to infection with Fasciola sp. in Hokkaido, Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molluscan Research	6. 最初と最後の頁 160-168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/13235818.2020.1716497	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shunsuke Takashima, Yuma Ohari, Tadashi Itagaki	4. 巻 75
2. 論文標題 The prevalence and molecular characterization of Acarapis woodi and Varroa destructor mites in honeybees in the Tohoku region of Japan.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ehsan Javanmard, Yuma Ohari, Amir Sadeghi, Kourosh Cheraghipour, Hamid Asadzadeh Aghdaei, Hamed Mirjalali, Mohammad Reza Zali, Tadashi Itagaki	4. 巻 80
2. 論文標題 Multigene typing and phylogenetic analysis of Fasciola from endemic foci in Iran.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 104202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.meegid.2020.104202	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----