

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580382

研究課題名（和文） 我が国における牛消化管内線虫の駆虫薬剤耐性に関する研究

研究課題名（英文） Anthelmintic resistance of bovine gastrointestinal nematodes to macrocyclic lactones in Japan

研究代表者

工藤 上（KUDO NOBORU）

北里大学・獣医学部・准教授

研究者番号：20153306

研究成果の概要（和文）：2009年と2010年の5月～10月に、青森県内の農場3カ所と北海道内の農場2カ所を対象に、イベルメクチンポアオン製剤の通常量投与による牛消化管内線虫の駆虫試験（Fecal egg count reduction test）を行った。その結果、糞便内線虫卵の大半を占める *Cooperia* 属線虫の虫卵減少率は、青森県内の農場1カ所と北海道内の農場2カ所において8月の駆虫後に薬剤耐性の目安となる90%を大きく下回り、我が国の牛におけるイベルメクチン耐性線虫の存在が初めて確認された。

研究成果の概要（英文）：Fecal egg count reduction tests using ivermectin pour-on formulation were conducted to investigate the prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes on cattle farms in Aomori and Hokkaido, northern Japan, in 2009 and 2010. The egg count reductions of predominant infecting nematodes, *Cooperia* spp., were lower than 90% on one farm in Aomori and two farms in Hokkaido after ivermectin treatment on August. The egg count reductions below 90% strongly suggest the presence of anthelmintic resistance. This is the first confirmation of ivermectin-resistant nematodes in cattle in Japan.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国では飼料自給率の向上を目的に休耕田や畑作放棄地を利用した牛の放牧、飼料作物の栽培が推進されている。食料生産県として位置づけられる青森県においても、遊休地を利用した放牧による肉牛生産が開始されたが、消化管内線虫症に代表される放牧

病の発生が問題となった。そこで、マクロライド系駆虫薬（イベルメクチン）を用いた駆虫プログラムを実施したところ、夏期の寄生虫感染増多時に十分な駆虫効果を得ることができず、虫卵培養で得た感染幼虫の遺伝子学的同定から、イベルメクチンに耐性を有する *Cooperia* 属線虫の存在が疑われた。近年、

海外ではイベルメクチン耐性 *Cooperia* 属線虫の発生が相次いで報告され、問題となっている。我が国においても牛消化管内線虫のイベルメクチン耐性に関する早急な調査が必要である。

(2) 現在、牛消化管内線虫のマクロライド系駆虫薬に対する耐性調査については、in vivo の FECR 試験(Fecal egg count reduction test)のみが有効とされており、in vitro 試験は確立されていない。in vivo 試験は多大な労力を要するため、薬剤耐性線虫の調査は遅々として進展しておらず、より平易に実施可能な in vitro 試験の確立が望まれている。

2. 研究の目的

(1) これまで我が国において不明な状況にあった牛消化管内線虫のマクロライド系駆虫薬に対する耐性に関して、初の知見を得ようとするものである。すなわち、牛消化管内線虫の薬剤感受性試験として国際的に推奨されている FECR 試験の実施により、北日本の牛におけるイベルメクチン耐性線虫の存否を明らかにすることを目的とした。

(2) 未だ確立されていない in vitro における牛消化管内線虫のマクロライド系駆虫薬に対する感受性試験に関して、その有用性が指摘されている幼虫移行阻止試験(Larval migration inhibition test)を in vivo 試験の FECR 試験と併行して行い、同 in vitro 試験の有効性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 青森県における調査

2009年5月～10月の期間に、青森県内の放牧肥育農場2カ所(A、B農場)と慣行肥育農場1カ所(C農場)において、日本短角種(A、B農場)と黒毛和種(C農場)の肥育牛各7～16頭を対象に、イベルメクチンポアオン製剤の通常量投与(イベルメクチン 500 µg/kg 体重)による FECR 試験を行った。試験はA農場で4回(放牧2週、8週、15週、退牧時)、B農場とC農場で各1回(夏期)行い、駆虫薬投与時(投与0日)と投与14日後における糞便内線虫卵の EPG(egg per gram)を蔗糖遠心浮遊法(ウイスコンシン変法)により算出した。また、糞便内線虫卵を寒天培地で培養し、得られた感染幼虫について rDNA-ITS 領域遺伝子の塩基配列の解析ならびに制限酵素 *Hinf* I を用いた PCR-RFLP 法を行い、遺伝子学的に種を同定した。ウイスコンシン変法により算出された駆虫薬投与0日と14日後の EPG ならびに感染幼虫の遺伝子学的同定による寄生種構成割合を基に虫卵減少率計算ソフト FECR4 を用いて供試牛群における線虫種毎の虫卵減少率を算定した。

(2) 北海道における調査

2010年6月～10月の期間に、北海道内の放牧肥育農場(D農場)と放牧育成農場(E農場)の2カ所において、交雑肥育牛19頭(D農場)とホルスタイン育成牛20頭(E農場)を対象に、イベルメクチンポアオン製剤の通常量投与による FECR 試験を行った。試験はD農場で3回(放牧4週、12週、退牧時)、E農場で1回(放牧13週)の計4回行い、青森県の調査と同様に駆虫薬投与0日と14日後における糞便内線虫卵の EPG ならびに感染幼虫の遺伝子学的同定による寄生種構成割合から虫卵減少率を算定した。

(3) 幼虫移行阻止試験(LMIT)

イベルメクチンポアオン製剤の FECR 試験において、5月にイベルメクチン感受性を示し、8月に耐性を認める *Cooperia* 属線虫の存在が確認された青森県内のA農場を対象に、FECR 試験による虫卵減少率の算定と幼虫移行阻止試験を併行して行った。すなわち、FECR 試験で各々86%と26%の線虫卵減少率を示した5月と8月のイベルメクチン製剤投与0日の牛糞便から消化管内線虫の感染幼虫を虫卵培養により作出し、0.1～30 µg/ml 濃度のイベルメクチン溶液に20時間暴露した同幼虫250匹の20 µm 径メッシュ透過数から各薬剤濃度の幼虫移行阻止率を求め、EC50(50%移行阻止濃度)を算出した。なお、メッシュ透過幼虫については FECR 試験と同様に遺伝子学的に種を同定した。

4. 研究成果

(1) 青森県における調査成績

イベルメクチン製剤投与時に検出された全線虫卵の平均 EPG は、A農場の放牧2週(5月)、8週(6月)、15週(8月)および退牧時(10月)の試験で各々48.5、67.1、187.4 および65.1を示し、夏期に線虫感染の増多を認めた。B農場では放牧20週(9月)の試験で20.7、C農場の舎飼牛を対象とした8月の試験では放牧牛をかなり下回る4.3の EPG であった。これら線虫卵の薬剤投与14日後の減少率は、A農場で5月85%、6月76%、8月53%および10月16%、B農場とC農場で各々97%と100%を示し、A農場において薬剤耐性が疑われる基準(報告により減少率90%あるいは95%以下)を下回った(表-1)。殊にA農場の8月と10月の虫卵減少率は顕著に低い値であった。

薬剤投与0日に検出された線虫卵は、いずれも我が国の牛に一般的な寄生種であった。すなわち、形態学的に判別可能な牛捻転胃虫(*Mesistocirus digitatus*)、乳頭糞線虫(*Strongyloides papillosus*)、*Capillaria* 属線虫および *Nematodirus* 属線虫の虫卵と、形態による同定が困難な線虫卵(未同定線虫

卵)で構成され、いずれの農場においても未同定線虫卵が全体の90%以上を占めた。未同定虫卵については、虫卵培養で得られた感染幼虫の遺伝子学的同定により、*Cooperia oncophora*、*C. punctata* および *Ostertagia ostertagi* から成ることが判明した(図-1)。また、これら3種の薬剤投与0日における構成割合はA農場の5月と8月の試験で *C. oncophora* が各々77%と65%、*C. punctata* が8%と12%、*O. ostertagi* が14%と23%を示し、イベルメクチン耐性牛消化管内線虫の出現が確認されている海外の報告と同様に *C. oncophora* が優勢であった。

上記の薬剤投与0日と14日後の寄生種構成割合を基に算定した寄生種毎の虫卵減少率は、A農場の5月の試験で *C. oncophora* 85%、*C. punctata* 86%および *O. ostertagi* 98%、同8月では各々56%、0%および100%を示し、*Cooperia* 属2種の8月の虫卵減少率は薬剤耐性が疑われる基準を大きく下回った。海外ではイベルメクチン製剤の FECR 試験で73%の虫卵減少率を示した *C. oncophora* をイベルメクチン耐性と判断している。今回の *Cooperia* 属2種の減少率はそれを明らかに下回ることから、我が国の牛において初めてイベルメクチン耐性線虫の存在が明らかになった。

Cooperia 属線虫はイベルメクチンの投与量を規定する線虫種(dose-limiting species)とされ、イベルメクチンに対する耐性が発現しやすいと考えられている。A農場の試験では、5月の駆虫開始以降、徐々に虫卵減少率が低下したことから、イベルメクチン耐性 *Cooperia* 属線虫の出現は5月からの反復的な薬剤投与による耐性線虫の選別効果に起因するものと考えられた。

(2) 北海道における調査成績

イベルメクチン製剤投与0日に検出された全線虫卵の平均 EPG は、D農場の放牧4週(6月)、12週(8月)および退牧時(10月)の試験で各々25.9、69.7および63.6を示し、E農場の放牧13週(8月)の試験では93.1であった。これら線虫卵の薬剤投与14日後の減少率は、D農場で6月82%、8月36%、10月98%、E農場で16%を示し、いずれの農場においても薬剤耐性が疑われる基準を8月に大きく下回った(表-2)。

薬剤投与0日に検出された線虫卵は、青森県の調査と同様に、形態学的に判別可能な牛捻転胃虫、乳頭糞線虫、*Capillaria* 属線虫、*Nematodirus* 属線虫および牛鞭虫の虫卵と、形態による同定が困難な線虫卵(未同定線虫卵)で構成され、いずれの農場においても未同定線虫卵が全体の95%以上を占めた。また、未同定線虫卵の培養で得られた感染幼虫の遺伝子学的同定成績も青森県の調査に類似

し、未同定線虫卵はおもに *C. oncophora*、*C. punctata* および *O. ostertagi* で構成されていた。これら3種の薬剤投与0日における構成割合はD農場の8月と10月の試験で *C. oncophora* が各々85%と61%、*C. punctata* が7%と33%、*O. ostertagi* が7%と6%、E農場の8月の試験で *C. oncophora* が93%、*O. ostertagi* が7%であった。

薬剤投与0日と同14日後の寄生種構成割合を基に算定したD農場とE農場の8月の試験における寄生種毎の虫卵減少率は、D農場で *C. oncophora* 32%、*C. punctata* 9%、*O. ostertagi* 100%、E農場で *C. oncophora* 7%、*O. ostertagi* 87%を示し、青森県内の農場に続いて北海道の農場においてもイベルメクチン耐性と判断される低い虫卵減少率を *Cooperia* 属線虫に認めた。これにより、我が国では北日本の牛にイベルメクチン耐性の *Cooperia* 属線虫が広く分布している可能性が示唆された。

なお、D農場の退牧時(10月)における *Cooperia* 属線虫の虫卵減少率は、いずれもイベルメクチン感受性を示し(*C. oncophora* 100%、*C. punctata* 94%)、退牧時にイベルメクチン耐性を認めた青森県のA農場の成績とは明らかに異なった。この相違に関しては、イベルメクチン耐性線虫の出現が単に薬剤の反復投与による選別効果に起因するだけでなく、他の要因の関与を示唆する所見と思われた。

(3) 幼虫移行阻止試験(LMIT)

A農場の5月と8月の牛糞便内線虫卵に由来する感染幼虫のLMI試験におけるメッシュ透過阻止率はいずれもイベルメクチン濃度依存性に増加した(図-2)。また、FECR試験の寄生種別の解析で5月に84%、8月に31%の虫卵減少率を示した *C. oncophora* の EC50 は、メッシュ透過幼虫の遺伝子学的同定により、5月 0.296 $\mu\text{g/ml}$ (95%信頼範囲: 0.268–0.324 $\mu\text{g/ml}$)、8月 0.892 $\mu\text{g/ml}$ (0.763–0.995 $\mu\text{g/ml}$)を示し、8月の EC50 は5月の値を有意に上回った($p<0.05$)。なお、幼虫移行阻止試験に用いた幼虫の60%以上は *C. oncophora* が占めた。これらの成績は、海外における *C. oncophora* のイベルメクチン感受性株と耐性株の感染幼虫を用いたLMI試験の最新報告に良く一致し、*in vitro* における牛消化管内線虫のイベルメクチン感受性試験としてLMI試験が有効であることを強く示唆した。

一方、LMI試験を野外におけるイベルメクチン耐性調査に広く応用するためには、線虫の多様な薬剤感受性との相関を検討する必要がある。A農場の5月と8月のLMI試験では、イベルメクチン濃度0.3と1 $\mu\text{g/ml}$ において両月のメッシュ透過阻止率に大差を

認めた。そこで、A 農場の牛 20 頭について個体毎に FECR 試験と、イベルメクチン濃度を 1 µg/ml に固定した LMI 試験を実施し、両試験成績を比較したところ、両者の間に強い正の相関(相関係数 0.96、 $y=0.48x+19.65$)を認めた(図-3)。これにより、LMI 試験は野外でのイベルメクチン耐性調査に有効であると推察された。

(4) 今後の課題

我が国の主要な肥育・繁殖用素牛の生産地である青森県と北海道において、イベルメクチン耐性 *Cooperia* 属線虫の寄生が牛に確認されたことは、その分布が全国に波及している可能性をうかがわせるものであり、西日本を含めた全国的な調査が必要と思われる。また、牛におけるイベルメクチン耐性 *Cooperia* 属線虫の病原性は同感受性のものに比べて強いとされていることから、その防除法を早急に検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 工藤 上、釜井莉佳、横山萌美、小川俊彦、溝上まりえ、小山田 隆、北海道の放牧牛におけるイベルメクチン製剤の消化管内線虫に対する駆虫効果、第 153 回日本獣医学会学術集会 (2012 年大宮)
- ② 工藤 上、吉岡俊朗、渡邊泰士、寺園有紀、武内信乃、堂之本琢人、中島健介、一杉香里、小山田 隆、FECR 試験によるイベルメクチン製剤の牛消化管内線虫に対する駆虫効果の検討、第 151 回日本獣医学会学術集会 (2011 年東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 上 (KUDO NOBORU)
北里大学・獣医学部・准教授
研究者番号：20153306

(2) 研究分担者

小山田 隆 (OYAMADA TAKASHI)
北里大学・獣医学部・教授
研究者番号：80050665

表-1 青森県内の農場におけるイベルメクチン製剤の牛消化管内線虫に対する駆虫効果の検討—FECR 試験による虫卵減少率

	A 農場				B 農場	C 農場
	2009 年 5 月 (放牧 2 週) n=16	6 月 (8 週) n=16	8 月 (15 週) n=16	10 月 (25 週) n=16	9 月 (20 週) n=12	8 月 (舎飼) n=7
全線虫卵	85% (70 - 92%) ^a	76 (39 - 91)	53 (0 - 79)	16 (0 - 69)	97 (93 - 99)	100
未同定線虫卵	87 (74 - 93)	76 (40 - 91)	53 (0 - 79)	16 (0 - 69)	97 (93 - 99)	100
<i>Cooperia oncophora</i>	85 (71 - 92)	nd ^b	56 (0 - 81)	nd	nd	nd
<i>C. punctata</i>	86 (72 - 93)	nd	0 (0 - 30)	nd	nd	nd
<i>Ostertagia ostertagi</i>	98 (96 - 99)	nd	100	nd	nd	nd

^a 95%信頼下限—上限, ^b 検査せず

図-1 *Hinf*I による rDNA-ITS 領域遺伝子の切断パターン

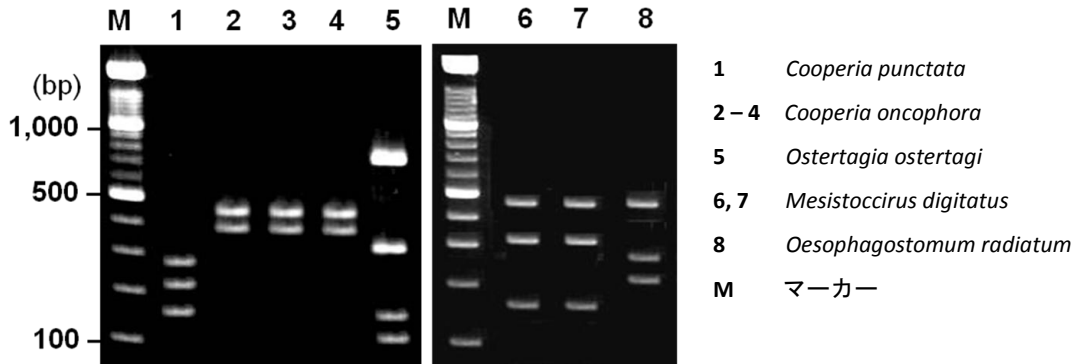


表-2 北海道内の農場におけるイベルメクチン製剤の牛消化管内線虫に対する駆虫効果の検討—FECR 試験による虫卵減少率

	D 農場			E 農場
	2010年6月 (放牧4週) n=19	8月 (12週) n=19	10月 (23週) n=19	8月 (13週) n=20
全線虫卵	82% (58-92%) ^a	36 (0-68)	98 (89-100)	16 (0-67)
未同定線虫卵	82 (55-93)	36 (0-68)	98 (89-100)	13 (0-65)
<i>Cooperia oncophora</i>	nd ^b	32 (0-67)	100	7 (0-63)
<i>C. punctata</i>	nd	9 (0-55)	94 (68-99)	—
<i>Ostertagia ostertagi</i>	nd	100	100	87 (67-95)

^a 95%信頼下限—上限, ^b 検査せず

図-2 青森県内の A 農場における 5 月と 8 月の牛糞便内虫卵培養で得られた感染幼虫の in vitro イベルメクチン感受性試験—LMI 試験による幼虫移行阻止率

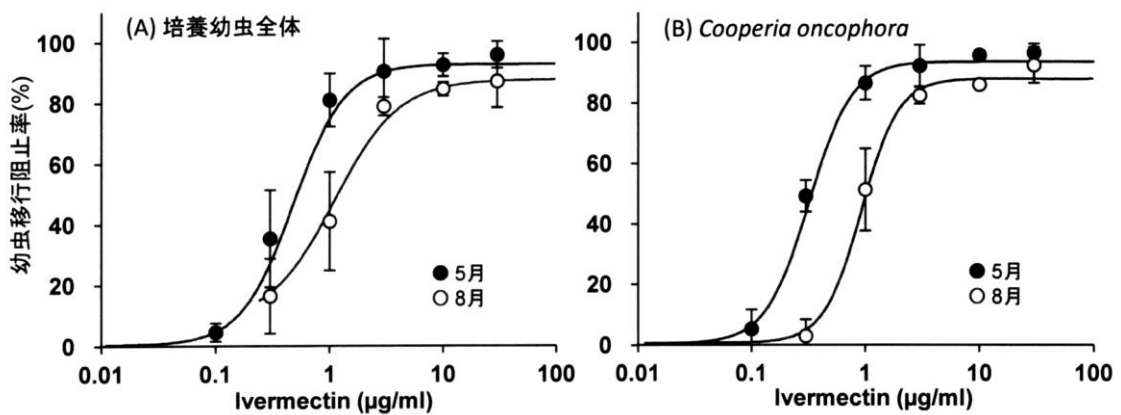
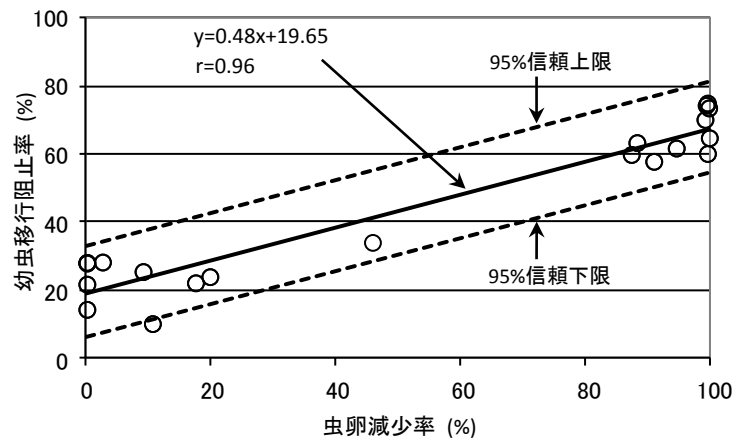


図-3 FECR 試験による虫卵減少率と LMI 試験による幼虫移行阻止率の相関図



虫卵減少率は未同定線虫卵(*C. oncophora*、*C. punctata*、*O. ostertagi*)と *M. digitatus* の虫卵を合わせて算出し、幼虫移行阻止率は全培養幼虫を対象に算定した。