

鶏コクシジウム病の診断におけるリアルタイム PCR の活用

紀北家畜保健衛生所

○鳩谷珠希 亀位 徹

山田陽子 豊吉久美

【背景および目的】

鶏コクシジウム病は *Eimeria* 属原虫の寄生による腸炎を主体とする疾病で、育成率や産卵率などの生産成績を悪化させ、養鶏産業に多大な被害をもたらす。本県の病性鑑定成績においてもコクシジウムが関与した事例が少なくない。

本病の診断は、鶏の症状や糞便中のオーシスト数、病理組織検査により実施しているが、*Eimeria* 属の特定は形態学的観察のみでは困難であり、これまで *Eimeria. necatrix* 感染の一例を除き、本病と診断するのみであった（図 1）。そこで今回、国内で問題となっている 5 種類の *Eimeria* 属について、リアルタイム PCR (rPCR) による検出を試み、過去に本病と診断した事例について追加検討を行った。

【材料および方法】

2006～2013 年に鶏コクシジウム病と診断した 7 症例のうち、ホルマリン固定時間が長く、遺伝子検査に適さない症例を除く 5 症例（症例 1～5）の腸パラフィン標本、計 12 羽分を用いた。

腸パラフィン標本を薄切し、市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、必要に応じて DNA の精製と濃縮を行い、rPCR に供した（図 2）。川原らの報告（2008）をもとに、*Eimeria. acervulina* (Ea)、*E. brunetti* (Eb)、*E. maxima* (Em)、*E. necatrix* (En)、*E. tenella* (Et) にそれぞれ特異的なプライマーを作成した。rPCR は SYBR Green I を用いたインターカレーター法で行い、増幅産物の融解曲線分析で得られた波形と T_m 値により、陽性対照との相同性を確認した。なお、陽性対照は、日生研株式会社から分与されたものを用いた。

【結果】

陽性対照 5 種類の T_m 値は Ea、Eb、Em、En、Et の順にそれぞれ 87.0℃、81.5℃、80.0℃、79.0℃、86.5℃で川原らの報告と同様の傾向であった（図 3）。

< 症例 1 >

○ 概要

2013 年 5 月発生、採卵鶏 2 羽 (No. 1~2)、153 日齢、産卵率低下の原因究明。

○ 腸の解剖・病理組織所見 (図 4)

小腸粘膜に偽膜形成し、偽膜形成部位に出血と多数のシズント確認 (No. 2)。十二指腸～空回腸粘膜固有層深部に第 2 代シズント多数形成、異物巨細胞性肉芽腫形成 (No. 2)。

○ 推測される *Eimeria* 属

病理組織所見から En 感染と診断

○ rPCR 結果 (図 5)

No. 2 から En 検出

○ 最終診断

En 感染

< 症例 2 >

○ 概要

2012 年 10 月発生、採卵鶏 3 羽 (No. 1~3)、50 日齢、死亡羽数増加の原因究明。

○ 腸の解剖・病理組織所見 (図 6)

小腸腫大 (No. 1~3)。

十二指腸：粘膜表層～固有層に有性生殖期の虫体 (マクロガメート、ザイゴート、未熟オーシスト等) 多数寄生

空回腸：粘膜固有層～深部に有性生殖期の虫体多数寄生

盲腸：粘膜上皮～固有層に有性生殖期の虫体多数寄生

○ 推測される *Eimeria* 属

十二指腸、空回腸への Ea、Eb、Em、盲腸への Eb、Et 寄生

○ r-PCR 結果 (図 7)

3 羽全てから Eb、1 羽から Em 検出

○ 最終診断

Eb、Em の混合感染と診断した。

3 羽から Eb が検出され、Eb の病原性が比較的強いこと、1 羽から Em が検出され、Em の病原性はそれほど強くないことから、症状や病変は Eb 主体と判断した。

< 症例 3 >

○ 概要

2010 年 1 月発生、肉用鶏 3 羽 (No. 1~3)、82 日齢、斃死の原因究明。

○ 腸の解剖・病理組織所見 (図 8)

小腸粘膜充血 (No. 1)、内容物チーズ様 (No. 1, 2)

十二指腸：粘膜固有層～深部に有性生殖期の虫体多数寄生
(No. 1, 2)

空回腸：粘膜表層～固有層に有性生殖期の虫体多数寄生 (No. 1, 3)

盲腸：内容物に多数のオーシスト (No. 2, 3)

○推測される *Eimeria* 属

十二指腸、空回腸への Eb、Em、盲腸への Eb、Et 寄生

○rPCR 結果

1羽 (No. 3) から Et 検出

○最終診断

Et と *Eimeria* 属の混合感染と診断した。

No. 3 から盲腸に寄生する Et が検出されたが、十二指腸と空回腸に寄生する *Eimeria* 属が検出されなかったことから、rPCR による検出は不十分と判断した。

< 症例 4 >

○概要

2009 年 9 月発生、採卵鶏、46 日齢 (No. 1, 2)、中雛斃死の原因究明。

○腸の解剖所見

小腸内容血様物 (No. 1)、小腸粘膜点状出血 (No. 2)、小腸粘膜肥厚 (No. 1)、小腸に鶏回虫 1～2 匹寄生 (No. 1～2)

○腸の病理組織所見 (図 9)

十二指腸：粘膜上皮を中心に有性生殖期の虫体軽度～重度寄生
(No. 1, 2)、内容物に多数のオーシスト (No. 1)

空回腸：粘膜固有層深部に第 2 代シizont (No. 1, 2)

盲腸：粘膜上皮～固有層深部に有性生殖期の虫体 (No. 1, 2)、内容物に多数のオーシスト (No. 1, 2)

○推測される *Eimeria* 属

十二指腸への Ea、空回腸への En、盲腸への Eb、Et 寄生

○rPCR 結果

いずれの鶏からも *Eimeria* 属検出されず

○最終診断

En とその他 *Eimeria* 属の混合感染と診断した。

空回腸の病変から En 感染が特定できたが、rPCR で何も検出されなかったため、感染種を特定することはできなかった。

< 症例 5 >

○概要

2006 年 7 月発生、採卵鶏 2 羽 (No. 1, 2)、142 日齢、斃死の原因究

明。

○腸の解剖所見

空回腸腫大し偽膜形成 (No. 1, 2)

○腸の病理組織所見 (図 10)

空回腸：上皮～固有層に有性生殖期の虫体多数寄生 (No. 1, 2)、粘膜の壊死・剥離 (No. 2)

盲腸：粘膜出血 (No. 1, 2)、粘膜の壊死 (No. 2)、内容物に多数のオーシスト (No. 1, 2)

○推測される *Eimeria* 属

空回腸への Ea、Eb、盲腸への Eb、Et 寄生

○rPCR 結果

いずれの鶏からも *Eimeria* 属検出されず

○最終診断

鶏コクシジウム病 (Eb の関与疑う) と診断した。

空回腸と盲腸に有性生殖期主体のコクシジウムが確認され、発症日齢も 142 日齢と産卵開始時期であったことから Eb の関与を疑ったが確定することはできなかった。

【考察】

腸パラフィン標本から DNA を抽出し、rPCR を実施した結果、症例 1～2 では、病理組織検査でコクシジウムが確認された全ての鶏から *Eimeria* 属が検出され、感染種を特定することができた。しかし、症例 3～5 の過去 4 年以上前の症例では、1 羽から検出されたのみで、感染種を特定することはできなかった (図 11)。PCR の効率固定・包埋されたパラフィン標本の状態に直接左右されると言われており、時間経過等何らかの要因により遺伝子が検出されなかったものと推察した。パラフィン標本を用いて rPCR を実施する場合は、パラフィン標本の状態により遺伝子が検出されない場合があるので、病理組織検査を併用して検出漏れがないか確認することが必要と思われた。

症例 2 については、今回 rPCR を実施し内容を再検討した結果、Eb による発症事例と判明した。Eb による症状や病変はそれほど特徴的ではなく、他の *Eimeria* 属と混同されること等により、国内での発生報告事例は少ない。川原らは 2006～2007 年に国内浸潤状況調査を行い、Eb は特に種鶏および採卵鶏農場で高率に浸潤していたと報告している。Eb は病原性が比較的強いにも関わらず、ワクチンが開発されておらず、発症時期も一様でないことから、農場への浸潤が判明した場合は十分な注意が必要である。

パラフィン標本を用いた rPCR は、混合感染の場合等、病理組織検査等形態観察のみで *Eimeria* 属を特定できない場合に有用であ

ることがわかった。今後はパラフィン標本だけでなく、現場の状況に応じて、腸管や糞便材料にも rPCR を活用していきたい。

rPCR を鶏コクシジウム病の診断に取り入れることで、感染種を特定することが可能となった。*Eimeria* 属はその種類により、発症しやすい時期や病原性が異なる。特定した *Eimeria* 属に応じて、ワクチン接種等の衛生対策を検討し、これまでより踏み込んだ農場指導に役立てたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Kawahara, F. et al: Detection of Five Avian *Eimeria* Species by Species-Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Avian Dis*
- 2) 矢野敦史：パラフィン標本を用いたリアルタイム PCR による鶏コクシジウム病の分類．平成 22 年度全国家畜保健衛生業績発表会抄録
- 3) 川原史也：鶏コクシジウム症と壊死性腸炎を再考する．鶏病研究会報 49, 19-24(2013)
- 4) 川原史也：鶏コクシジウム症の対策および今後の戦略．鶏病研究会報 48, 185-191(2012)
- 5) 角田 清：コクシジウム病．日本畜産振興会, 253-263(1969)