

## 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（第二報）

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（本病）は*Eimeria*属原虫の寄生による腸炎を主体とする疾病で、それぞれの種によって病原性や症状、寄生部位に特徴があるものの、形態観察のみで種の特定は困難である。

昨年度、本病診断症例の腸パラフィン標本からDNAを抽出し、リアルタイムPCR（rPCR）による種の特定診断を実施した。本年度は管内で本病が3例発生し、いずれも*E. necatrix*（En）による急性小腸コクシジウム病と診断したが、診断に際し、腸内容を用いたrPCRが有用であったので報告する。

### 【材料および方法】

平成26年6月～9月に斃死や血便を呈した3例（症例1～3）について病性鑑定等を実施した。

#### （症例1）

平成26年6月、開放平飼いの地鶏飼養農場で、58日齢鶏が260羽中7羽斃死した。小腸は腫大し、内容物は粘液・血液を混じていた。斃死鶏の小腸1検体、盲腸1検体について検査を実施した。

#### （症例2）

平成26年7月、ウインドウレス平飼いで採卵育雛鶏を飼養する農場で45日齢鶏が2,900羽中数日間で10羽斃死した。小腸は腫大し、内容物は粘液・血液を混じていた。斃死鶏2羽について病性鑑定を実施した。

#### （症例3）

平成26年8月、開放平飼いの地鶏飼養農場で、35日齢鶏が103羽中2羽が血便を排泄して斃死した。小腸は腫大し、内容物は粘液・血液を混じていた。衰弱鶏3羽について、病性鑑定を実施した。

### <検査方法>

ウイルス、細菌、病理組織学的検査は定法に従い実施した。コクシジウム検査は次のとおり実施した。

#### （1）虫体の観察

シズントやメロゾイト等の無性生殖期虫体は、粘膜を含む腸内容

にPBSを滴下して、直接顕微鏡で観察した。オーシストは顕微鏡下で長径を計測し、 $19\ \mu\text{m}$ 以下を小型、 $19\sim 24\ \mu\text{m}$ を中型、 $24\ \mu\text{m}$ 以上を大型に分類した。また、腸内容 $1\text{g}$ あたりのオーシスト数(OPG)をマックマスター法により算出した。

## (2) 遺伝子検査

腸内容及び腸パラフィン標本(小腸、盲腸を含む)からDNAを抽出し、rPCRを実施した。

### 1) 腸内容からのDNA抽出(図1)

川原らの報告に基づき実施した<sup>1)</sup>。はじめに、腸内容のOPGを算出するとともに、オーシストのサイズを小、中、大型に分類した。その後、腸内容をPBSで10倍希釈し、この10倍希釈液 $1\text{ml}$ とり、ジルコニアビーズを $500\ \mu\text{l}$ 入れた破碎用チューブ(容量 $2\text{ml}$ )に入れて、組織破碎装置で破碎した。その後、破碎した溶液 $0.5\text{ml}$ をマイクロチューブ(容量 $2\text{ml}$ )に入れ、 $15,000\text{g}$ で10分間遠心した。その後、上清を除去し、沈査をPBS $200\ \mu\text{l}$ に溶解し、市販のDNA抽出キット(商品名:Dneasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN)でDNAを抽出した。また、オーシストの検出率を上げたい場合には、必要に応じてオーシストの回収操作を行った。オーシストは、腸内容を飽和食塩水で $10\sim 20$ 倍希釈して静置した後、上澄みを採取して回収した。オーシスト回収液は、蒸留水で5倍以上に希釈し、 $3,500\text{g}$ で10分間遠心後、上清を除去し、沈査を蒸留水 $1\text{ml}$ に溶解した。これを全量とり、ジルコニアビーズを入れた破碎用チューブに入れて破碎し、その後はPBSで希釈した場合と同様に処理し、DNAを抽出した。

### 2) 腸パラフィン標本からのDNA抽出

昨年度と同様に、小腸及び盲腸を含む腸パラフィン標本を薄切し( $5\ \mu\text{m}$ 、3枚)、パラフィン標本用のDNA抽出キット(商品名:TaKaRa DEXPAT)でDNAを抽出した。

### 3) リアルタイムPCR

rPCRは国内に存在する*Eimeria*属7種、すなわち*E. acervulina*(Ea)、*E. brunetti*(Eb)、*E. maxima*(Em)、*E. necatrix*(En)、*E. tenella*(Et)、*E. mitis*(Emi)、*E. praecox*(Ep)について実施した。プライマーは、Ea、Eb、Em、En、Etは川原らのプライマー<sup>1)</sup>、Emiは日生研株式会社のプライマー、EpはLewらのプライマー<sup>2)</sup>を用いて実施した。

## 【結果】

ウイルス、細菌検査の結果、全ての症例で有意な病原体の関与は認められなかった。

(症例1) 結果を図2に示した。小腸内容を観察したところ、無性生

殖期虫体は検出されなかったが、小腸内容のrPCRによりEnが検出され、急性小腸コクシジウム病（急性病）と診断した。病理組織検査でも小腸粘膜固有層深部にEnの第二代シズントが確認され、改めて急性病と確認した。

（症例2）結果を図3に示した。小腸内容を観察したところ、無性生殖期虫体は検出されなかったが、小腸内容のrPCRによりEnが検出され、急性小腸コクシジウム病と診断した。病理組織検査でも小腸粘膜固有層深部にEnの第一代シズントが多数確認され、改めて急性病と確認した。

盲腸OPGは $2.9 \sim 7.5 \times 10^5$ と多数検出された。オーシストのサイズは小型、中型で混合感染と判明した。盲腸内容のrPCRによりEn、Emi、Ea、Epが検出された。これらEimeria種のオーシストは小型、中型で、形態観察の結果と一致した。

腸パラフィン標本のrPCRではEn、Emiが検出され、Eimeria種の検出率は腸内容の法が良好であった。

（症例3）結果を図4に示した。小腸内容を観察したところ、 $50 \mu\text{m}$ を越える巨大なシズントと、周囲にメロゾイトが確認され、急性小腸コクシジウム病と診断した。盲腸OPG（3羽プール）は $5.5 \times 10^5$ と多数検出され、オーシストは小型、中型であった。盲腸内容のrPCRによりEn、Et、Emiが検出された。腸パラフィン標本のrPCRではEn、Emiが検出され、Etは検出されなかった。

### 【考察】

国内に存在するEimeria種は7種類あり、このうちEnとEtによる急性コクシジウム病は斃死率が高く被害が大きいことから古くからよく知られている。急性病は無性生殖期虫体を確認することにより診断するが<sup>3)4)</sup>、今回の発生3例はいずれも急性小腸コクシジウム病と診断したものの、腸内容の観察により、無性生殖期虫体を確認できたのは1例のみであった。この理由としては第一に、検査者が無性生殖期虫体の確認に慣れていないということが挙げられる。しかし、その他にも採材時期によっては検出しにくい時期があることや、材料が落下便しかない等、急性病でも無性生殖期虫体を確認できない場合があると考えられる。このような場合でも、今回、rPCRを実施することにより急性病の診断が可能で、また、病理組織検査より早く結果を得られ、有用であることがわかった。

症例3では、急性小腸コクシジウム病と診断したにも関わらず、盲腸からEtが検出されたことから、再度、盲腸の肉眼所見及び病理組織所見を確認した。その結果、盲腸に顕著な出血は見あたらず、また病理組織検査で認められた所見はEnによるものと改めて判断した。腸パラフィン標本からEtが検出されなかったことから、Etは

病変形成の主体ではないと考えられた。今回の発症はサルファ剤投与により収束したものの、Et感染が明らかになったことから、農場に対し、次回導入群についてはEtにも留意するよう注意を促した。

*Eimeria*種の検出については、腸パラフィン標本より腸内容の方が良好という結果であった。これは、腸パラフィン標本では厚さ5  $\mu$ mの組織切片3枚からDNAを抽出したのに比べ、腸内容では約1gの内容物に由来するコクシジウムからDNAを抽出していることから、腸内容の方が検出率が良好となったと考えられた。その一方で、症例2および3の腸パラフィン標本全てからEnが検出された。このことから、鶏の症状発現や病変形成に関与しているような、感染量の多い*Eimeria*種については、腸パラフィン標本からでも十分検出可能であることを改めて確認した。

昨年度に続き、rPCRを用いた本病の診断を試みたところ、今回、腸内容から*Eimeria*種を検出し、本病を診断することができた。コクシジウムは平飼い農場（特に土間）にいったん侵入すると、その清浄化は極めて困難であり、本県でも本病が継続発生している状況である。このような場合には、単に本病と診断するのみならず、感染する*Eimeria*種を明らかにして病態を把握し、対策を行うことが求められる。今回発生した2例では、次回導入群よりEnワクチンを使用することとなった。

今後もコクシジウムを疑う場合には、腸内容や糞便等の新鮮材料を用いたrPCRを実施して*Eimeria*種を特定し、検出された種類の病原性や鶏の症状、病理組織検査結果等と併せて本病を診断し、農場における飼養衛生指導やワクチンの選択に役立てていきたい。

#### 【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.* 52, 652-656 (2008)
- 2) A. E. Lew, G. R. Anderson, C. M. Minchin, P. J. Jeston, W. K. Jorgensen: Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology.* 112, 33-50 (2003)
- 3) 川原史也：鶏のコクシジウム検査法. 鶏病研究会報49, 219-222 (2013)
- 4) 角田 清：コクシジウム症. 鶏病診断, 411-422 (1982)