

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 26 年 5 月 27 日

採択番号 25-共同-10			
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	西川 義文
研究課題名	日本各地におけるクリプトスポリジウム症の疫学調査		
研究代表者	(ふりがな) 氏 名	所属部局等・職名	
	いちかわ まどか 市川 まどか	岩手大学農学部共同獣医学科・助教・研究の統括と推進、 糞便検査および DNA 解析	
研究分担者	いたがき ただし 板垣 匡	岩手大学農学部共同獣医学科・教授・DNA 解析	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<p>クリプトスポリジウム属は脊椎動物の消化管に寄生して下痢を引き起こす。20 日齢以下の子牛はクリプトスポリジウムに感受性が高く、下痢症が慢性化した場合、有効な治療薬がないことから重度の栄養不良と代謝性アシドーシスを呈して死亡する例もある。牛寄生のクリプトスポリジウムには、小腸粘膜に寄生する <i>Cryptosporidium parvum</i> と、第 4 胃粘膜に寄生する <i>C. andersoni</i> に加えて他 5 種の報告がある。特に <i>C. parvum</i> は家畜やヒトの下痢症の原因となる人獣共通感染症として公衆衛生学的にも重要である。クリプトスポリジウム症が畜産業に与える経済的損失は甚大であるため有効な治療薬および消毒法の開発が急務である。これらの研究開発には、各地域のクリプトスポリジウムの流行種および遺伝的多様性について正確な情報を得ることが第一に求められる。しかしながら、我が国において疫学調査は十分に実施されていない。そこで、本研究では日本各地から子牛の下痢便を採取し、各地域のクリプトスポリジウムの遺伝的多様性の有無について調査することを目的とする。</p>		
研究経過の概要	<p><b>1. 日本各地におけるクリプトスポリジウムの採取</b>          沖縄県、岩手県、鹿児島県種子島の獣医師から郵送によりクリプトスポリジウム症が疑われる子牛の下痢便サンプルの提供を受けた。</p> <p><b>2. ショ糖遠心浮遊法による OPG (oocyst per gram) の算出</b>          ショ糖遠心浮遊法によりクリプトスポリジウムの OPG を算出した。</p> <p><b>3. クリプトスポリジウム症の DNA 診断</b>          下痢便から QIAamp® DNA stool mini kit を用いて DNA を抽出し、SSUrRNA 領域を種同定マーカーとして分子学的種同定を行った。また、種内サブタイピングマーカーとして 60kDa glycoprotein (<i>GP60</i>) 領域を PCR 増幅した。各増幅産物の塩基配列を決定し、<i>GP60</i> 領域については原虫病研究センターで実施された北海道における疫学調査結果と比較し、GenBank 登録配列とともに系統解析を実施した。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の 概要</p>	<p><b>1. 沖縄県</b> 3 ヲ月齡以下の黒毛和種 50 頭から下痢便を採取した。シヨ糖遠心浮遊法により 25 検体から <i>Cryptosporidium</i> 属原虫のオーシストが検出された。オーシスト陽性であった検体の SSUrRNA 遺伝子を解析した結果、全て <i>C. parvum</i> と同定された。一方、オーシストが検出されなかった 4 検体において、SSUrRNA 遺伝子を解析した結果、<i>C. parvum</i> の DNA が検出された。</p> <p><b>2. 岩手県</b> 2 週齡以下のホルスタイン 27 頭から下痢便を採取した。シヨ糖遠心浮遊法により全ての検体から <i>Cryptosporidium</i> 属原虫のオーシストが検出された。また、SSUrRNA 遺伝子を解析した結果、全て <i>C. parvum</i> と同定された。</p> <p><b>3. 鹿児島県種子島</b> 3 ヲ月齡以下の黒毛和種 25 頭から下痢便を採取した。シヨ糖遠心浮遊法により 10 検体から <i>Cryptosporidium</i> 属原虫のオーシストが検出された。また、SSUrRNA 遺伝子を解析した結果、全て <i>C. parvum</i> と同定された。</p> <p><b>4. 北海道（原虫病研究センターにおいて実施）</b> 1 ヲ月齡以下の黒毛和種およびホルスタイン 25 頭から下痢便を採取した。シヨ糖遠心浮遊法により全ての検体から <i>Cryptosporidium</i> 属のオーシストが検出された。SSUrRNA 遺伝子を解析した結果、全て <i>C. parvum</i> と同定された。</p> <p><b>5. 各地の <i>C. parvum</i> の遺伝的比較</b> 種内サブタイピングマーカーである <i>GP60</i> を解析した結果、由来地域にかかわらず全ての <i>C. parvum</i> が IIaA15G2R1 型を示したため、地理的に遠く離れた地域に同一の分子学的特徴を示す <i>C. parvum</i> が分布することが明らかになった（図）。また、この遺伝子型は人獣共通感染性があることが知られているため、日本各地の畜産現場においてウシだけでなくヒトに対してもクリプトスポリジウム症のリスクがあることが示された。</p> <div data-bbox="906 707 1493 1355" style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> </div> <p>図. <i>GP60</i> 領域の塩基配列に基づく近隣結合法による系統樹. 太字が本研究で解析したサンプル. 枝上の数値はブートストラップ値.</p>
<p>研究成果の 発表</p>	<p>1. 国内学会発表</p> <p>磯 雄大, 関 (市川) まどか, 正谷達膳, 板垣 匡, 西川義文 (2013)      沖縄県の黒毛和種子牛における <i>Cryptosporidium parvum</i> の疫学調査. 第 59 回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会. 2013 年 10 月 5 日</p>