

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 30 日

採択番号	25-共同-16		
研究部門	原虫病学	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	福本晋也 准教授
研究課題名	北海道十勝地方に棲息する野生鳥獣の腸管寄生性原虫相調査		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	ふるや てつや 古谷 哲也	東京農工大学農学部獣医学科 獣医微生物学教室 国際家畜感染症防疫研究教育センター 准教授	
研究分担者	ふくもと しんや 福本晋也	帯広畜産大学原虫病研究センター 節足動物衛生工学分野 准教授	
	おがわ はるこ 小川晴子	帯広畜産大学 動物・食品衛生研究センター 准教授	
研究期間	平成 25 年 4 月 1 日 ~ 平成 26 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	十勝地方には野鳥を始めとする多彩な野生動物が生息し、それらの野生動物に多くの原虫寄生虫が感染していることが分かっている。特に、腸管寄生性の寄生虫は、家畜感染レゼルボアとなっている可能性が高く、その実態についての理解が必要である。今回の研究は、原虫病研究センターの福本晋也准教授により住血原虫相の調査のために集められた十勝地方の鳥獣検体を用い、その腸管から腸管寄生虫を含む糞便検体を採取することで、感染原虫のより総合的な研究を行うことを目的とする。また、申請者の所属する国際家畜感染症防疫研究教育センターで稼働する次世代シーケンサーにより、網羅的な手法によって新種の原虫因子を発見することを目的とする。		
研究経過の概要	福本准教授の採集した帯広市周辺のハシボソカラスと、小川准教授が採取した北海道各地からのフクロウ、カモ、カモメ等の野鳥の糞便から QIAamp DNA Stool Mini Kit (キアゲン) により DNA を精製し、PCR によって腸管寄生性原虫の検出を行った。PCR プライマーは以前発表された論文に基づき、PCR 産物が 500bp 近辺になるものを選び、以下の 3 組を用いた。 <i>Cryptosporidium spp.</i> 18s rRNA (Johnson et al., Appl. Environ. Microbiol. 61:3849), <i>Eimeria spp.</i> internal transcribed spacer (Woods et al., Int. J. Parasitol. 30: 1019), <i>Toxoplasma gondii</i> 529bp repetitive fragment (Vet. Parasitol. 191:23)。PCR には AmpliTaq Gold(ABI)を用い、40 サイクルの PCR を行った。この結果、 <i>Cryptosporidium spp.</i> と特に <i>Eimeria spp.</i> について多くの陽性結果が見られた(次項参照)。このため、これらの寄生虫の種を同定し配列を解析するため、次世代シーケンサー(Miseq, Illumina)を用いて糞便中寄生虫ゲノム DNA の塩基配列解読を試みた。		

受理年月日	受理番号

<p>研究成果の概要</p>	<p>前項で説明した PCR の結果、ハシボソカラス 9 サンプル中 <i>Eimeria spp.</i> 陽性 7 例(78%)が検出され、野鳥 11 サンプル中 <i>Cryptosporidium spp.</i> 陽性 1 例(9.1%)、<i>Eimeria spp.</i> 陽性 1 例(9.1%)が検出された。前者では陽性サンプルから得られた PCR 産物が数種類の異なったサイズを示し、異なる <i>Eimeria spp.</i> の存在が示唆されたため、寄生虫種の同定および配列の解析と PCR プライマーで検出できない寄生虫種の検出のため、次世代シーケンスを行った。上記の陽性 20 検体を含む 24 検体から得られた DNA を 2 検体ずつの 12 グループに分け、これらグループの DNA から作製したライブラリに標識タグを付加することで、得られたシーケンスを識別できるようにした。この結果、総リード数 5,363,498 (50 塩基リード) を基として、13,076 のコンティグ配列を得た。このコンティグ配列を NCBI BLAST (BLASTN) のサーバー上でデータベース検索し、E-value 値の低いものから比較した。この結果、野鳥サンプルからは主に <i>Solanum</i>、<i>Fallopia</i> 等の植物と <i>Bacillus</i>、<i>Lactobacillus</i> 等の腸内細菌、ハシボソカラスのサンプルからは主として <i>Providencia</i>、<i>Salmonella</i>、<i>Escherichia coli</i> 等の腸内細菌配列が検出された。これらの結果から、今回の糞便由来 DNA を直接次世代シーケンスする手法では、野鳥においては食物とする植物や腸内細菌由来、ハシボソカラスにおいては腸内細菌由来の DNA がリード数で上位を占め、他の比較的微量な微生物の塩基配列をマスクしてしまっている可能性が示唆された。しかし、今回の結果から、9 検体のハシボソカラス中から 7 検体に <i>Eimeria spp.</i> が検出され、他の野鳥 11 検体中の 1 検体陽性よりもはるかに高い陽性率を示すことが示された。また、<i>Eimeria spp.</i> 陽性であった野鳥は <i>Cryptosporidium spp.</i> も陽性であったため、これら寄生虫陽性率の相関性は、将来、他の検体を用いて調べる必要があると考えられる。一方、高い <i>Eimeria spp.</i> 陽性率を示したハシボソカラスについては、今回の PCR の結果、数種類の異なる PCR 産物を検出したことから、異なる種の <i>Eimeria</i> が感染している可能性が示唆された。カラスは鶏舎近辺に多く集まり糞便を散布させているため、飼育ニワトリのкокシジウム症の流行に関与している可能性がある。この理由から、今後これらの PCR 産物のシーケンスによって、どのような種の寄生虫が感染しているかを研究することが重要であるとする。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<p>現在特になし。今後の研究成果に応じて、学会・論文発表を行う予定である。</p>