

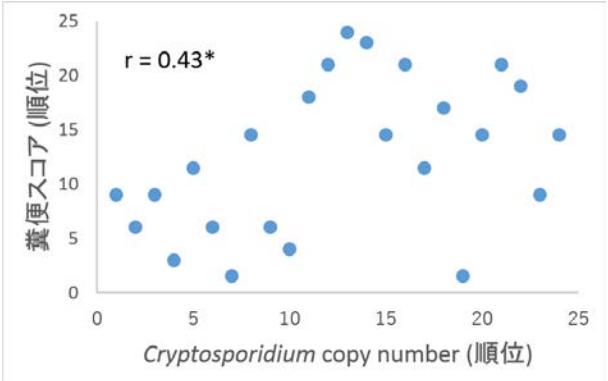
受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

平成 29 年 5 月 30 日

採択番号			
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	クリプトスピロジウム症に対する初乳中の抗体による予防効果の検討		
研究代表者	(ふりがな) 氏名 (せき まどか) 関 まどか	所属部局等・職名 岩手大学・農学部共同獣医学科・助教 研究材料の入手および糞便検査	
研究分担者	(にしかわ よしふみ) 西川 義文	帯広畜産大学原虫病研究センター・准教授 <i>C. parvum</i> 抗体価の測定	
研究期間	平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日		
目的・趣旨	<i>Cryptosporidium parvum</i> は新生子牛の下痢症の原因として最も重要であり、畜産業に甚大な経済被害を与えていた。獣医臨床現場では、十分な初乳の給与が発症の予防に有効であることが経験的に知られてきたが、それを支持する科学的根拠は明確でない。そこで本研究では、初乳により付与された新生子牛血清中の <i>C. parvum</i> 抗体とクリプトスピロジウム症の症状との相関を解析することで、初乳中の抗体による予防効果の有無を明らかにする。		
研究経過の概要	<p>H28 年度はクリプトスピロジウム陽性農家から、(1) 新生子牛 25 頭分の糞便サンプルと血清を収集した。糞便については糞便スコアを用いて、臨床症状に基づく下痢症の重篤度の指標とした。また、(2) 分子学的な重篤度の指標として、qPCR により糞便中の原虫量を定量し、(3) 臨床的・分子学的指標の相関について検討した。</p> <p>今後、提供を受けた血清を ELISA に供し、初乳中から移行した抗クリプトスピロジウム抗体を定量して、臨床的・分子学的指標との相関を検討する予定である。</p> <p>(1) 新生子牛 25 頭分の糞便サンプルの収集と糞便スコアによる下痢症の重篤度の評価</p> <p>これまでに共同研究チームはクリプトスピロジウム症の症例数が非常に多い大規模農場と協力関係を築くことに成功した。本年度は当該農場から、新生</p>		

受理年月日	受理番号

研究成果の概要	<p>子牛 25 頭分の糞便サンプルと血清の提供を受けた。出生後から 20 日齢まで毎日糞便スコア（1:固形便 2:軟便 3:泥状便 4:水様便）を記録し、記録期間の平均値を算出して、臨床的な観点から下痢症の重篤度を評価した。</p> <p>(2) qPCRによる糞便中の <i>C. parvum</i> オーシスト量の定量</p> <p>クリプトスピロジウム症の症状の指標として、糞便 1gあたりのオーシスト数 (oocyst per gram : OPG) が用いられる。しかしながら、一般的な OPG 算出法は手技が煩雑で、多検体の検査には適用しにくい。そこで本研究では、分子学的なクリプトスピロジウム症の重篤度の指標として、昨年度の本共同研究で確立した qPCR により新生子牛の糞便中に排泄された <i>C. parvum</i> のオーシスト量を定量した。</p> <p>予備試験により、調査対象農場では生後 8 日から 10 日齢の間に糞便中に排泄される <i>C. parvum</i> のオーシスト量がピークに達することが明らかになった。そこで本研究で採材対象とした新生子牛 25 頭については、生後 8 日から 10 日齢の糞便をそれぞれ採取した。各個体の糞便から DNA を抽出し、qPCR に供した。qPCR では、プライマーのターゲット領域を組み込んだ pUC118 をスタンダードとする絶対定量法により <i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数を定量した。各個体について、8 日から 10 日齢の間で最もコピー数が多かった日齢を選択し、その日齢の <i>C. parvum</i> オーシストの DNA コピー数をクリプトスピロジウム症の分子学的な指標とした。</p> <p>(3) 臨床的・分子学的指標の相関の検討</p> <p>(1)と(2)で得られた臨床的、分子学的指標の相関をスピアマンの順位相関係数を用いて検討したところ、中位の正の相関が認められたため、オーシスト排泄数が多い個体ほど下痢が重篤である傾向が明らかになった。</p>  <table border="1"> <caption>Data points estimated from the scatter plot</caption> <thead> <tr> <th>Cryptosporidium copy number (順位)</th> <th>Fecal score (順位)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>9</td></tr> <tr><td>2</td><td>5</td></tr> <tr><td>3</td><td>11</td></tr> <tr><td>4</td><td>3</td></tr> <tr><td>5</td><td>10</td></tr> <tr><td>6</td><td>2</td></tr> <tr><td>7</td><td>14</td></tr> <tr><td>8</td><td>6</td></tr> <tr><td>9</td><td>1</td></tr> <tr><td>10</td><td>4</td></tr> <tr><td>11</td><td>19</td></tr> <tr><td>12</td><td>21</td></tr> <tr><td>13</td><td>24</td></tr> <tr><td>14</td><td>22</td></tr> <tr><td>15</td><td>14</td></tr> <tr><td>16</td><td>11</td></tr> <tr><td>17</td><td>16</td></tr> <tr><td>18</td><td>13</td></tr> <tr><td>19</td><td>2</td></tr> <tr><td>20</td><td>14</td></tr> <tr><td>21</td><td>20</td></tr> <tr><td>22</td><td>19</td></tr> <tr><td>23</td><td>14</td></tr> <tr><td>24</td><td>8</td></tr> </tbody> </table> <p>今後、追加で採材した新生子牛 25 頭分のサンプルについて、同様の解析を実施する。さらに、提供された血清を昨年度の本共同研究で確立したリコンビナント抗原 (CpP23-GST、CpP2-GST、CpGP15-GST、CpGP40-GST) を用いた ELISA に供し、移行抗体により付与された抗クリプトスピロジウム抗体の量を定量する。得られた抗体量と臨床的・分子学的なクリプトスピロジウム症の重篤度の指標を比較することにより、初乳中の移行抗体によるクリプトスピロジウム症の防除効果を検討する予定である。</p>	Cryptosporidium copy number (順位)	Fecal score (順位)	1	9	2	5	3	11	4	3	5	10	6	2	7	14	8	6	9	1	10	4	11	19	12	21	13	24	14	22	15	14	16	11	17	16	18	13	19	2	20	14	21	20	22	19	23	14	24	8
Cryptosporidium copy number (順位)	Fecal score (順位)																																																		
1	9																																																		
2	5																																																		
3	11																																																		
4	3																																																		
5	10																																																		
6	2																																																		
7	14																																																		
8	6																																																		
9	1																																																		
10	4																																																		
11	19																																																		
12	21																																																		
13	24																																																		
14	22																																																		
15	14																																																		
16	11																																																		
17	16																																																		
18	13																																																		
19	2																																																		
20	14																																																		
21	20																																																		
22	19																																																		
23	14																																																		
24	8																																																		
研究成果の発表	現時点での研究成果の発表は行っていないが、昨年度確立した抗クリプトスピロジウム抗体を測定するための ELISA に関して論文投稿の準備が完了し、投稿前の最終確認をしている段階である。																																																		