

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

東部家畜保健衛生所

矢野敦史

1. はじめに

鶏コクシジウム病の原因となる *Eimeria* (以下 *E.*) 属の分類は、オーシストの形態 (以下、糞便検査) や生体の病理検査による感染部位の詳細な検査により実施している。糞便検査だけで分類することは難しいことから、2008 年に日生研・川原らがリアルタイム PCR を使って糞便中のオーシストを分類する方法を報告している。野外症例では糞便中のオーシストが少ない場合もあり、病理検査で寄生部位、増殖形態等から推察して分類することも少ない。病理検査では 2 種以上の *Eimeria* が寄生する場合、クロストリジウムなどの細菌が混合感染する場合、死亡後に持ち込まれた場合などは分類が難しい。しかし発生農家からは、分類による確定診断を求められているのが現状である。今回、病理検査で分類が可能な事例、困難な事例のそれぞれに遭遇したため、パラフィン標本を材料としたリアルタイム PCR による分類を試み、一定の成果を得られた。

2. 材料および方法

材料は 2007 年～2010 年に鶏コクシジウム病と診断された 5 症例のうち病理検査で分類可能であった 3 症例と分類が困難であった 2 症例のパラフィン標本を用いた。陽性対照として、日生研のコクシジウム生ワクチンのネカトリックス単身とテネラ、アッセルブリーナ、マキシマの 3 種混合を用いた。これらの材料には主に十二指腸、空回腸、盲腸、腸管内容物が含まれるパラフィン標本を選択した。スピнкаラム方式で DNA を抽出し、川原らの文献をもとに、アイメリア・アッセルブリーナ (EA)、ブルネッティ (EB)、マキシマ (EM)、ネカトリックス (EN)、テネラ (ET) に特異的なプライマー組をそれぞれ設計し、リアルタイム PCR を実施した。この 5 種を分類するには Tm 値を用い、EA は 88.8 度、EB は 83.5 度、EM は 81.6 度、EN は 80.2 度、ET は 88.3 度を基準値とした。ただ、この Tm 値はリアルタイム PCR の機器や PCR 酵素によって多少の誤差が生じるため、得られた DNA 産物について電気泳動を実施し、目的とする塩基配列であるかどうかを確認した (図 1)。

材料及び方法

<材料>

- 検査材料: 2006～2010年鶏コクシジウム病と診断した 5症例
 - 病理検査で分類可能な 3症例 (A, B農場)
 - 病理検査で分類困難な 2症例 (C農場)
- 陽性対照: 鶏コクシジウム生ワクチン NECA 及び TAM (日生研)

<方法>

- パラフィン標本 (十二指腸・空回腸・盲腸・腸内容物) から DNA を抽出
- 生ワクチンから DNA を抽出
- リアルタイム PCR (2008年川原ら)
 - ① *E. acervulina* (EA), *E. brunetti* (EB), *E. maxima* (EM), *E. necatrix* (EN), *E. tenella* (ET) の各プライマー組み
 - ② Tm (°C) 値*により 5種に分類 * 機器、酵素等で誤差あり
EA: 88.8 EB: 83.5 EM: 81.6 EN: 80.2 ET: 88.3

図 1

3. 陽性対照による方法の確認

陽性対照を用いて、機器および酵素による誤差を確認するため、陽性対照の解離温度を確認した。ネカトリックス、マキシマ、テネラ、アッセルブリーナを Tm 値で分類でき、これらの値は川原らの報告 Tm 値と近似していた (図 2)。

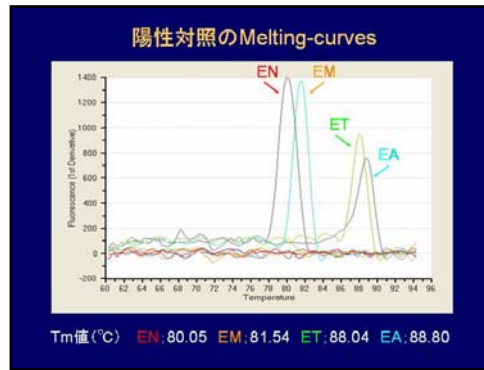


図 2

4. 成績

(1) 病理検査で診断可能な症例

①病理検査成績

分類可能であった症例は、2007年にA農場、B農場で2008年、2010年の2回発生した計3症例で、いずれも種鶏である。図3に発生年月日、発生日齢、ワクチンの種類、剖検所見、糞便内1g中のオーシストの数、病理検査結果を記載した。A,B農場ともワクチン接種済みであった。病理検査結果は、3症例とも空回腸が腫大し、小腸粘膜内に第2代シズントが観察され、小腸内にオーシストはみられず、盲腸内に稀にみられる程度であった(図4,5)。以上からの病理像から3症例ともアイメリア・ネカトリックスを疑った。

発生年月		農場名		ワクチン	鶏No	剖検時	CPG (×10 ³)	組織所見			病理診断
日齢	用途	種類	小腸粘膜シズント					小腸内オーシスト	盲腸内オーシスト		
2007.7	A	50	TAM NECA	空回腸の腫大	1	18	++	-	+	EN	
					2	13	++	-	-		
					3	3	++	-	-		
					4	903	+++	-	-		
					5	0	+++	-	-		
2008.6	B	176	TAM NECA	空回腸の腫大	1	NT	+	-	-	EN	
					2	NT	+++	-	-		
					3	NT	+++	-	-		
2010.8	B	88	TAM NECA	空回腸の腫大	1	0	+++	-	+	EN	
					2	19	+++	-	+		
					3	286	+++	-	+		

図 3



図 4

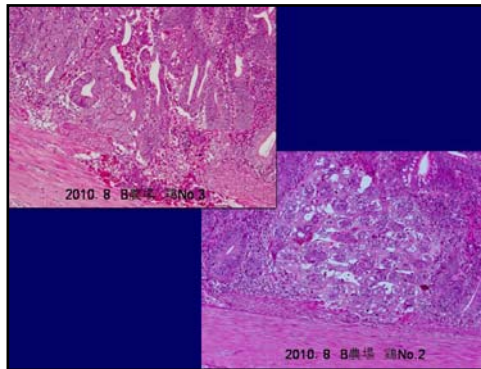


図 5

②リアルタイム PCR の成績

2007 年 7 月に A 農場で発生した例は、リアルタイム PCR により全検体、ネカトリックと分類され、病理検査結果と一致した。ただ、No. 3 のみ、リアルタイム PCR により、マキシマとの混合感染が明らかになった。ネカトリックストとマキシマの病変は類似するため、病理検査だけでは混合感染を検出できなかった。2008 年 6 月に B 農場で発生した例では、病変が弱かった No. 1 を除いて、リアルタイム PCR によりネカトリックと分類され、病理検査結果と一致した。B 農場で 2010 年 8 月に発生した例でもリアルタイム PCR で全検体がネカトリックと分類され、病理検査結果と一致した。ただ、No. 3 のみリアルタイム PCR により、テネラとの混合感染が明らかになった (図 6)。

成績 (分類)							
発生年月	農場名	ワケチン	鶏 No	リアルタイムPCR		病理診断	
用途	日齢			Tm値 (°C)	分類		
2007.7	A	50	TAM NECA	1	80.51	EN	EN
				2	80.55	EN	
				3	80.56	EN	
				4	81.54	EM	
				5	80.40	EN	
2008.6	B	176	TAM NECA	1	—	—	EN
				2	80.92	EN	
				3	80.63	EN	
2010.8	B	88	TAM NECA	1	80.36	EN	EN
				2	80.46	EN	
				3	80.49	EN	
				3	88.60	ET	

図 6

(2) 病理検査が困難であった症例

①病理検査成績

分類が困難であった症例は、2010 年に C 農場で 7 月と 9 月に発生した 2 症例 (図 7)。空回腸が腫大し、偽膜がみられ、泥状便が貯留していた。7 月の発生例では小腸内にオーシストがみられ、9 月の発生例では小腸粘膜内のシズントが僅かにみられる程度で、小腸内にオーシスト、盲腸内にもオーシストがみられた。これらの所見から、2 症例ともアイメリア・アッセルブリーナ、ブルネティ、マキシマの感染を疑った (図 8, 9)。

成績 (病理検査)

発生年月 農場名 用途	ワク チン	鶏 No	剖検 回数	OPG (×10 ⁴)	組織所見			病理診断
					小腸粘膜 シフト	小腸内 オンスト	盲腸内 オンスト	
2010.7 C 196 無 採卵鶏		2	1	—	+	—		
		3	空回腸 の腫大	188	—	+	—	EA?
		5		0	—	—	—	EB?
		6		1	—	—	—	EM?
		7	空回腸 盲腸 の腫大	400	—	++	+	
		1		0	—	—	—	EA?
		2	空回腸 の腫大	933	+	++	++	EB?
2010.9 C 114 無 採卵鶏		3		1,870	+	++	++	EM?

図 7



図 8

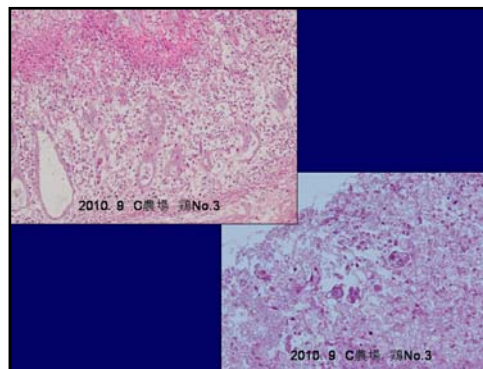


図 9

②リアルタイム PCR の成績

2010年7月に発生した例では、リアルタイムPCRによりNo.2,3,7がブルネッティと分類された。病理検査では小腸の病変からアッセルブリーナ、ブルネティ、マキシマのいずれかの感染が推察されたが、ブルネッティを特定することはできなかった。No.7ではリアルタイムPCRの結果、ネカトリックスとの混合感染が明らかになった。この検体は死亡例であったため、粘膜の死後変化が強く、病理検査では、混合感染を発見できませんでした。2例目の9月の発生例でも、No.2,3がブルネッティと分類された。これも病理検査で分類することが難しい症例であった(図10)。

成績 (分類)

発生年月 農場名 用途	ワク チン	鶏 No	リアルタイムPCR		病理診断
			Tm値 (°C)	分類	
2010.7 C 196 無 採卵鶏		2	83.61	EB	
		3	83.56	EB	
		5	—	—	EA?
		6	—	—	EB?
		7	83.35	EB	EM?
		7	80.08	EN	
	2010.9 C 114 無 採卵鶏		1	—	—
	2	83.67	EB	EB?	
	3	83.55	EB	EM?	

図 10

5. まとめ及び考察

パラフィン標本を用いたリアルタイム PCR により、アイメリア属を分類することができた。病理検査の結果が特徴的でネカトリックスと分類が可能であった。病理検査で分類が可能であった 3 症例は、リアルタイム PCR の結果も一致し、確定診断することができた。ただ混合感染している症例は、病理検査での確定診断は難しく、リアルタイム PCR による分類が必要と思われた。病理検査で分類が困難であった 2 症例は、最終的な分類にはリアルタイム PCR が必要だった。従来の糞便検査、病理検査、オーシストのリアルタイム PCR 検査に今回のリアルタイム PCR を追加することで、鶏コクシジウム病の確定診断が可能にあり、ワクチン接種などの適切な衛生指導に有用と思われた。またパラフィン標本のリアルタイム PCR は、過去の症例を分類することも容易であり、多くの症例を容易に分析できるため、鶏コクシジウム病の病態解明に有用と思われた。