

# 組換え抗原 ELISA を用いた県下全域の肉用牛における原虫感染症分布状況調査

正谷達膳

鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター

鹿児島市郡元 1-21-24

TEL: 099-285-8708

E-mail: masatani@vet.kagoshima-u.ac.jp

## 要旨

鹿児島県を中心とした島嶼地域を含む南九州において、黒毛和牛の血清を 570 検体分採材した。これら血清における、牛に感染し疾患を起こす病原原虫であるクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) 及びネオスポラ (*Neospora caninum*) に対する抗体の有無を、それぞれの原虫に対応した組換え抗原を用いた Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) によって判定した。結果として、クリプトスポリジウム陽性率は 93% であり、一方ネオスポラ陽性率は 18.4% であった。クリプトスポリジウムについては、月齢が増すごとに陽性率が高くなる傾向がみられたものの、各群間に有意な差は認められなかった。一方、ネオスポラ抗体陽性率は月齢が高くなるほど高くなったことから、当地域におけるネオスポラの感染様式が、母体から胎仔への垂直感染よりも、汚染された餌や水などといった外部環境からの水平感染がメインであることが示唆された。

## 1. 緒言

鹿児島県は全国有数の畜産県であり、中でも肉用牛の生産量は全都道府県で 2 位に登る。肉用牛の飼養衛生を管理する上で、感染症予防は必須である。そのため種々の病原体に対するワクチン投与が行われるが、原虫感染症にはワクチンが存在せず、予防するには農場周囲の蔓延状況・予想侵入ルートを把握し、病原体の侵入を阻止することが必要となる。しかし、鹿児島県下の牛における原虫感染症発生状況は不明な点が多い。

クリプトスポリジウム症は *Cryptosporidium* 属に含まれる原虫が引き起こす哺乳類及び鳥類の消化管感染症であり、水様性の下痢を主徴とする<sup>1,2)</sup>。とくに *Cryptosporidium parvum* は牛の新生仔に対して重篤な下痢を起こすことで慢性的な肉質・生産量低下を引き起こしうるため重要である。さらに本原虫は、人にも容易に感染する人獣共通感染原虫としても知られており、免疫不全の患者や小児・老人にとっては致死的感染を起こ

すこともある<sup>3)</sup>。

ネオスポラ症は、*Neospora caninum* が引き起こす牛の疾患である。*N. caninum* はイヌ科動物を終宿主とし、牛、羊を主な中間宿主とする<sup>4-7)</sup>。イヌ科動物の腸管内で有性生殖を行い、その糞便中に強固な外壁を持つオーシストとして排出される。牛への感染は、母親の胎盤を介する胎仔への垂直感染のほか、オーシストを含む土壌や食物、水の経口摂取に伴う水平感染によって成立する。*N. caninum* は犬に神経・筋肉麻痺を起こすほか、妊娠牛に感染することで死流産を起こすため農家にとって経済的打撃を与えることがある<sup>5, 8-12)</sup>。

本研究では、クリプトスポリジウム症及びネオスポラ症を対象とし、これらについて「どの地域で、どの規模で蔓延しているか」を解明することを目的とし、県下全域レベルで血清疫学調査を行った。具体的には、組み換え原虫抗原を利用した ELISA 系を立ち上げ、島嶼地域を含めた県下各地よりサンプリングした肉用牛の血清中に含まれる各原虫特異的抗体の有無を判定した。

## 2. 材料及び方法

### 2.1. 血清

鹿児島県下ならびに沖縄県石垣島で飼育されている黒毛和牛（3ヶ月齢以上）について、2014-2015年の間に570検体分の血清を採取した（33農場、17地域）。

### 2.2. 組換え抗原

ELISA 用抗原として使用するクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium parvum*) 由来組換え CpP23 蛋白質<sup>13)</sup> およびネオスポラ (*Neospora caninum*) 由来組換え NcSAG1-truncated 蛋白質<sup>14)</sup> について、既報の方法<sup>15)</sup> に基づいて大腸菌発現系を用いて作製・精製した。

### 2.3. ELISA

得られた組換え抗原を用いて、既報の方法<sup>15)</sup> に基づいて ELISA を実施した。測定には MultiSkan FC Microplate Photometer (サーモサエンティフィック社) を使用し、各検体の OD<sub>414nm</sub> を ELISA 値とした。陰性対照として、それぞれの原虫に対して感染歴のない牛の血清を使用した (クリプトスポリジウム: 7 検体、ネオスポラ: 9 検体)。これら陰性対照のそれぞれの ELISA 値を平均し、標準偏差に 3 を乗じた値をそれぞれの Cut off 値とした。各検体の ELISA 値について、それぞれの Cut off 値を上回ったものを陽性、下回ったものを陰性と判定した。

## 2. 4. 統計解析

各原虫における感染リスク解析は、カイ二乗検定によって行った。P<0.05 を有意差ありと判定した。95%信頼区間（95%CI）は、VassarStats ソフトウェア ([www.vassarstats.net](http://www.vassarstats.net))を用いて算出した。

## 3. 結果

採取した 570 検体の黒毛和牛血清について、クリプトスポリジウム抗原蛋白質である CpP23 を抗原として ELISA を実施した結果、549 検体（93%）が陽性となった。採材地域のうち、10 地域では陽性率が 100%となったのに対し、霧島市における陽性率は 50%であったものの、統計的解析を行った結果、採材地域間に有意な差は認められなかった（Table 1）。

**Table 1. Result of CpP23-ELISA to detect *C. parvum* antibody**

Regions	No. of farms	No. of sample	Positive	Negative	Prevalence (%)
Kagoshima city	2	122	122	0	100
Yusui	5	72	68	4	94.4
Soo	5	58	50	8	86.2
Satsumasendai	5	54	54	0	100
Hioki	3	31	31	0	100
Nagashima	1	25	25	0	100
Kinko	1	20	18	2	90.0
Shibushi	1	20	20	0	100
Satsuma	1	15	14	1	93.3
Minamikyushu	1	13	13	0	100
Izumi	1	11	10	1	90.9
Kirishima	1	8	4	4	50.0
Kimotsuki	1	2	2	0	100
Takabaru	1	49	49	0	100
Tanegashima Is.	1	24	24	0	100
Okinioerabu Is.	2	26	25	1	96.2
Ishigaki Is.	1	20	20	0	100
Total	33	570	549	21	96.3

次に、検体となった個体を月齢ごとに 4 群に分け（3-5 ヶ月齢、6-8 ヶ月齢、9-11 ヶ月齢及び 12 ヶ月齢以上）、それぞれの月齢群間において陽性率に差があるかどうか解析した。抗体陽性率は 3-5 ヶ月齢のものがもっとも低く 95.2%であり、12 ヶ月齢以上では 98.4%にのぼった（Table 2）。このように、月齢が増すごとに陽性率が高くなる傾向がみられたものの、各群間に有意な差は認められなかった。

**Table 2. *C. parvum* antibody prevalence by age group**

Month of age	No. of sample	<i>C. parvum</i>		
		Positive	Negative	Prevalence (%)
3-5	176	168	8	95.5
6-8	207	197	10	95.2
9-11	59	58	1	98.3
12<	126	124	2	98.4
Unknown	2	2	0	100
Total	570	549	21	96.3

次に、ネオスポラ抗原蛋白質である NcSAG1-truncated を抗原として ELISA を実施した結果、全体で 105 検体（18.4%）が陽性となった。地域ごとに見ると、鹿児島市の農場で採材した検体は 50%が陽性となったのに対し、志布志、南九州、出水、霧島、肝付及び種子島の農場にて採材した検体はすべて陰性であった(Table 3)。

**Table 3. Result of NcSAG1t-ELISA to detect *N. caninum* antibody**

Regions	No. of farms	Sample No.	Positive	Negative	Prevalence (%)
Kagoshima city	2	122	61	61	50.0
Yusui	5	72	7	65	9.7
Soo	5	58	1	57	1.7
Satsumasendai	5	54	4	50	7.4
Hioki	3	31	2	29	6.4
Nagashima	1	25	1	24	4
Kinko	1	20	6	14	30.0
Shibushi	1	20	0	20	0
Satsuma	1	15	2	13	13.3
Minamikyushu	1	13	0	13	0
Izumi	1	11	0	11	0
Kirishima	1	8	0	8	0
Kimotsuki	1	2	0	2	0
Takabaru	1	49	19	30	38.8
Tanegashima Is.	1	24	0	24	0
Okinierabu Is.	2	26	1	25	3.8
Ishigaki Is.	1	20	1	19	5.0
Total	33	570	105	465	18.4

統計学的解析の結果、鹿児島市にて採材したものは他地域のものに比べ有意に陽性率が高いことが示された。クリプトスポリジウム同様、4つの月齢群間における陽性率に差があるかどうか検定した結果、低い群では 4.5%(3-5 ヶ月齢)にとどまったのに対し、高い群では 51.6%(12 ヶ月齢以上)にのぼり、その値は他の月齢群のものに対して有意に高いことが示された (Table 4)。

**Table 4. *N. caninum* antibody prevalence by age group**

Month of age	No. of sample	<i>N. caninum</i>		
		Positive	Negative	Prevalence (%)
3-5	176	8	168	4.5
6-8	207	22	185	11.9
9-11	59	11	48	18.6
12<	126	65	61	51.6*
Unknown	2	0	2	0
Total	570	105	465	18.4

\* The seroprevalence of *N. caninum* increased with age and was higher in cattle older than 12 months than in the other groups ( $p < 0.01$ ).

#### 4. 考察

本研究では、鹿児島県を始めとした南九州（含島嶼部）において、黒毛和牛のクリプトスポリジウム及びネオスポラ抗体の有無を ELISA により検索した。これら地域における同様の調査は無く、本研究が初めてとなる。結果として、クリプトスポリジウム陽性率は 93% であり、一方ネオスポラ陽性率は 18.4% であった。

クリプトスポリジウム陽性率が非常に高いことは、本地域の畜産を考える上で非常に重要となる知見である。農林水産省の統計によると、2015 年において鹿児島県では 270,000 件以上もの牛の下痢が報告されている。これらの病原体の多くは検査がなされていないため不明であるが、現場獣医師の私信ではその半数以上がクリプトスポリジウム症と想定されている。クリプトスポリジウム症の確定診断には、糞便サンプルの顕微鏡観察または遺伝子診断が必要となる<sup>16)</sup>。しかし、仔牛の糞便中にクリプトスポリジウム虫体が排泄されるのは排泄開始から数日-13 日の間に限定され、上記の確定診断では排泄のピーク時期を逃すと検出が困難となることがある<sup>17)</sup>。一方、血清中の抗体は排泄終了後も長く存在し続けるため、クリプトスポリジウム感染歴のある個体を判定するには本研究で用いた ELISA のような血清診断が有用と考えられた。

CpP23 は *C. parvum* の表面蛋白質の 1 つであり、今回のような血清学的診断抗原としてだけでなくワクチン抗原の候補としても有用であるとされる<sup>18,19)</sup>。本抗原を使用した血清疫学調査は各地で実施されており、タイ北部の牛では 4.4%<sup>20)</sup>、エジプト南部の牛では 35.9% であった<sup>17)</sup>と報告されている。本研究で示した陽性率がこれら地域に比較して非常に高かった理由については、九州南部の高い湿度・温度、牛の品種、牛の飼育形態による可能性が考えられた。

ネオスポラについては以前、日本全国規模の血清疫学調査が実施されており、日本全国の飼育牛における陽性率は 5.7%、うち鹿児島県は 7.5% であったと報告されている<sup>21)</sup>。

本研究における陽性率は18.4%であり、先行研究よりも高い陽性率を示した。その理由として、今回実施した組換え抗原 ELISA の感度が先行研究で用いられた間接蛍光抗体法 (IFAT) に比べて高かったと考えられた。実際に、組換え抗原 ELISA と IFAT を同検体に実施したところ、前者のほうが高感度であったことが報告されている<sup>22)</sup>。

本研究で、月齢が高くなるほどネオスポラ抗体陽性率が高くなることが示された。これは、当地域におけるネオスポラの感染様式が、母体から胎仔への垂直感染よりも、汚染された餌や水などといった外部環境からの水平感染がメインであることを示唆している。したがって、感染源となるオーシストによる汚染を防ぐこと、オーシストを排出する可能性のある終宿主である犬を畜舎に近づけないこと、が感染予防に重要であると考えられた。

以上をまとめると、本研究は鹿児島県を中心とした南九州の黒毛和牛におけるクリプトスポリジウム及びネオスポラ抗体陽性率を明らかにした。特にクリプトスポリジウムは人にも感染し重篤な下痢を起こすことから、人獣共通感染症予防を徹底するうえでもそのコントロールは重要である。また、定期的にこのようなサーベイランスを実施することも、疾病を予防するには大切である。

## 5. 謝辞

本研究を助成いただきましたサンケイ科学振興財団に深く感謝いたします。

## 6. 引用文献

1. D. C. de Graaf, E. Vanopdenbosch, L. M. Ortega-Mora, H. Abbassi, J. E. Peeters, A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals, *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 1269-1287.
2. S. Thomson, C. A. Hamilton, J. C. Hope, F. Katzer, N. A. Mabbott, L. J. Morrison, E. A. Innes, Bovine cryptosporidiosis: impact, host-parasite interaction and control strategies, *Vet. Res.* 48 (2017) 42.
3. B. C. Anderson, Cryptosporidiosis in bovine and human health, *J. Dairy. Sci.* 81 (1998) 3036-3041.
4. J. P. Dubey, Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals, *Korean J. Parasitol.* 41 (2003) 1-16.

5. J. P. Dubey, G. Schares, L. M. Ortega-Mora, Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*, Clin. Microbiol. Rev. 20 (2007) 323-367.
6. M. M. McAllister, J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills, A. M. McGuire, Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*, Int. J. Parasitol. 28 (1998) 1473-1478.
7. L. F. Gondim, M. M. McAllister, W. C. Pitt, D. E. Zemlicka, Coyotes (*Canis latrans*) are definitive host of *Neospora caninum*, Int. J. Parasitol. 34 (2004) 159-161.
8. T. Dijkstra, H. W. Barkema, M. Eysker, J. W. Hesselink, W. Wouda, Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle, Vet. Parasitol. 105 (2002) 99-104.
9. A. C. Rosypal, D. S. Lindsay, The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here?, Trends Parasitol. 21 (2005) 439-440.
10. M. P. Reichel, J. T. Ellis, J. P. Dubey, Neosporosis and hammondiosis in dogs, J. Small Anim. Pract. 48 (2007) 308-312.
11. J. P. Dubey, D. Buxton, W. Wouda, Pathogenesis of bovine neosporosis, J. Comp. Pathol. 134 (2006) 267-289.
12. M. P. Reichel, M. A. Ayanegui-Alcérreca, L. F. Gondim, J. T. Ellis, What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion-dollar question, Int. J. Parasitol. 43 (2013) 133-142.
13. H. Bannai, Y. Nishikawa, J. Seo, C. Nakamura, S. Zhang, I. Kimata, Y. Takashima, J. Li, I. Igarashi, X. Xuan, Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant p23 for the detection of antibodies to *Cryptosporidium parvum* in cattle, J. Protozool. Res. 16 (2006) 9-15.
14. B. Chahan, I. Gaturaga, X. Huang, M. Liao, S. Fukumoto, H. Hirata, Y. Nishikawa,

H. Suzuki, C. Sugimoto, H. Nagasawa, K. Fujisaki, I. Igarashi, T. Mikami, X. Xuan, Serodiagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant truncated NcSAG1, *Vet. Parasitol.* 118 (2003) 177-185.

15. R. M. Fereig, M. R. AbouLaila, S. G. A. Mohamed, H. Y. A. H. Mahmoud, A. O. Ali, A. F. Ali, M. Hilali, A. Zaid, A. E. A. Mohamed, Y. Nishikawa, Serological detection and epidemiology of *Neospora caninum* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in southern Egypt, *Acta Trop.* 162 (2016) 206-211.

16. R. M. Chalmers, F. Katzer, Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis, *Trends Parasitol.* 29 (2013) 237-251.

17. S. Uga, J. Matsuo, E. Kono, K. Kimura, M. Inoue, S. K. Rai, K. Ono, Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan, *Vet. Parasitol.* 94 (2000) 27-32.

18. L. E. Perryman, S. J. Kapil, M. L. Jones, E. L. Hunt, Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein, *Vaccine* 17 (1999) 2142-2149.

19. P. Shayan, E. Ebrahimzadeh, M. R. Mokhber-Dezfouli, S. Rahbari, Recombinant *Cryptosporidium parvum* p23 as a target for the detection of *Cryptosporidium*-specific antibody in calf sera, *Parasitol. Res.* 103 (2008) 1207-1211.

20. T. Inpankaew, S. Jittapalpong, J. Phasuk, N. Pinyopanuwut, W. Chimnoi, C. Kengradomkit, C. Sunanta, G. Zhang, G. O. Aboge, Y. Nishikawa, I. Igarashi, X. Xuan, Seroprevalence of *Cryptosporidium parvum* infection of dairy cows in three northern provinces of Thailand determined by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant antigen CpP23, *Onderstepoort J. Vet. Res.* 76 (2009) 161-165.

21. M. Koiwai, T. Hamaoka, M. Haritani, S. Shimizu, Y. Zeniya, M. Eto, R. Yokoyama, T. Tsutsui, K. Kimura, I. Yamane, Nationwide seroprevalence of *Neospora caninum* among dairy cattle in Japan, *Vet. Parasitol.* 135 (2006) 175-179.



22. T. Inpankaew, S. Jittapalapong, T. J. Mitchell, C. Sununta, I. Igarashi, X. Xuan, Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cows in Northern provinces, Thailand, *Acta Parasitol.* 59 (2014) 305-309.

## **Serosurveillance of protozoan parasites, *Cryptosporidium parvum* and *Neospora caninum*, in beef cattle in the Kagoshima Prefecture by using ELISA based on recombinant antigens**

Tatsunori Masatani<sup>1</sup>

1) Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, Korimoto, Kagoshima, Japan

*Cryptosporidium parvum* and *Neospora caninum* are common parasites in domesticated cattle worldwide, including in Japan. We carried out a serological survey to detect *C. parvum* and *N. caninum* infection among cattle in the southern Kyushu region of Japan—mainly Kagoshima Prefecture including the small islands—by indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant antigens. We found that total seropositivity in 570 Japanese black cattle was 96.3% for *C. parvum* and 18.4% for *N. caninum*. Although seroprevalence was correlated with cattle age, differences in the seroprevalence of *C. parvum* among age groups were not statistically significant. On the other hand, *N. caninum* seroprevalence increased with age, suggesting horizontal transmission through ingestion of food or water contaminated with oocysts. These findings underscore the importance of monitoring *C. parvum* and *N. caninum* in cattle and implementing measures to prevent the spread of infection to other livestock and

to humans.