

1 3 . ヒストモナス病における遺伝子及び抗体検査を活用した 補助診断の確立

大分家畜保健衛生所

○病鑑 武石秀一 病鑑 壁村光恵 病鑑 内田雅春

【緒言】

ヒストモナス病は、*Histomonas meleagridis* 原虫（以下H.m）の感染によっておこる疾病で、盲腸、肝臓に病変を形成し、生産性の低下を引き起こす。感染は、H.mを含む鶏盲腸虫もしくはそれを捕食したミミズが媒介することから^{1,2)}、発生の多くは平飼い飼育で認められる^{2,3,4,5)}。

病性鑑定マニュアルによる診断指針では、病性鑑定施設における病理組織学的検査で診断することになっているが、診断までに1週間程度の時間を要し、感染初期の診断は難しい等の課題がある。糞便中にH.m原虫のオーシストを確認することは困難で、抗体検査についても、ELISAの研究⁶⁾はされているものの実用化されたものはなく、生前検査や浸潤状況等の把握ができない等、対応に苦慮している。

そこで、診断の迅速性及び精度を向上させる補助診断として、「PCR法による遺伝子検査」及び「抗体検出SAB法による抗体検査」の有用性について検討したので報告する。

【発生概要】

2013年4月から7月にかけて、ヒストモナス病が散発。発生農場は、地鶏飼育農家3戸、採卵鶏平飼い農家1戸の計4農場に発生が認められた（図1）。

ヒストモナス病と診断した10羽の病性鑑定結果は、表1に示すとおり。

解剖所見では、盲腸の腫大、白色硬化、肝臓の腫大及び菊花状の壊死斑がみられた。

病理組織所見では、全羽の盲腸に、壊死性腸炎及びPAS陽性の原虫、5羽の肝臓に多発性巣状壊死及びPAS陽性の原虫が認められた（写真1）。

図1 ヒストモナス病の発生状況(2013.4～7)

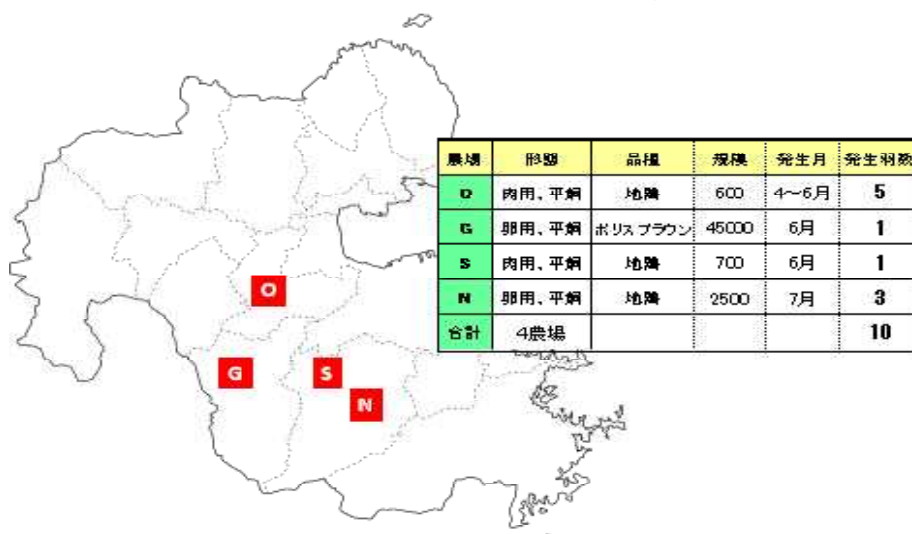
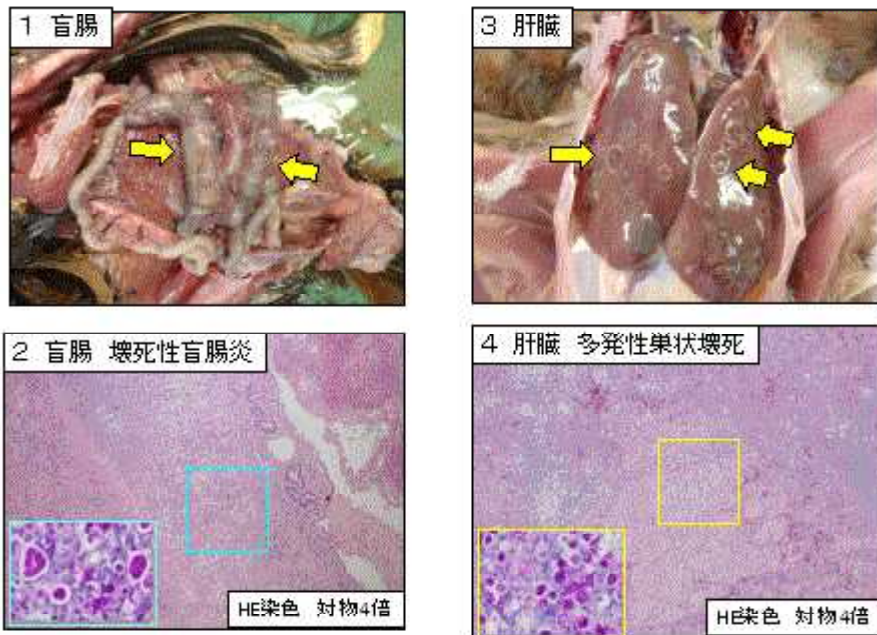


表1 ヒストモナス病の病性鑑定結果

農場	O					N			S		G
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	1	
【解剖所見】											
盲腸 腫大、白色硬皮	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
肝臓 腫大、壊死斑	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
【病理組織所見】											
盲腸 壊死性腸炎	+++	++	++	++	++	+++	+++	+	+++	+	+
〃 :PAS陽性	+++	++	++	+	+	++	++	+	++	+	+
肝臓 多発性巣状壊死	+++	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-	-
〃 :PAS陽性	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
【病原検索】											
カンジウム感染	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
マレック病	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

写真1 ヒストモナス病の解剖所見及び組織所見



【材料および方法】

1. 試験1 PCR法によるH. m特異遺伝子の検出

ヒストモナス病発症鶏からH. m原虫を特異的に検出するために、PCR法を用いたH. m特異遺伝子の臓器別検出状況（調査1）、H. m特異遺伝子の生材料とパラフィン切片の検出感度の比較（調査2）、野外における応用性の評価（調査3）を行った。

なお、PCR法を行うに当たり、プライマーを、K. Huberら⁷⁾の報告に基づき作成し、定法に従い、遺伝子検査を実施した。以下、プライマーの塩基配列を示した。

[HIS5F (5' -CCTTTAGATGCTCTGGGCTG-3') and HIS5R (5' -CAGGGACGTATTCAACGTG-3')]

(1)調査1 ヒストモナス病発症鶏3羽と非発症鶏3羽(陰性コントロールとして4日齢の雛)の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓と盲腸の生材料を用いて、PCR法を実施し、H. m特異遺伝子の検出を行った。

(2)調査2 ヒストモナス病発症鶏3羽の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓と盲腸のそれぞれ生材料とパラフィン切片を用いて、PCR法を実施し、H. m特異遺伝子の検出を行った。

(3)調査3 ヒストモナス病発症鶏10羽、発生農場の同居鶏(非発症)5羽、発生農場と疫学的に関連のある農場の鶏(非発症)2羽、過去の病性鑑定材料22羽をサンプルとして、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓を含むパラフィン切片と盲腸のパラフィン切片を用いて、PCR法を実施し、H. m特異遺伝子の検出を行った。

2. 試験2 H. m原虫に対する抗体測定の有用性

H. m原虫による感染抗体を測定するために、組織スライドガラスを用いた抗体検出SAB法(以下A-SAB法)の評価(調査1)、野外におけるA-SAB法の応用性評価(調査2)を行った。

A-SAB法は、図2に示すとおり、ヒストモナス病発症鶏のH. m原虫を多数含む盲腸のパラフィン切片を、4穴スライドガラスに貼り、それを抗原プレートとした。SABキットは、フナコシより販売されている抗鶏IgYのキットを使用した。

(1)調査1 ヒストモナス病発症鶏4羽の血清と、非発症鶏10羽(陰性コントロールとして4日齢未満の雛)の血清を用い、A-SAB法にて測定した。

(2)調査2 モニタリング事業等で保存されている17農場の血清を用い、3羽分を1プールして、A-SAB法で測定した。

図2 組織スライドガラスを用いた抗体検出SAB法(A-SAB法)

- ・抗原プレートは、発症鶏のパラフィン包埋された盲腸組織(H. mを多く含む)を4穴スライドに貼ったものを使用
- ・SAB法は、Anti-chicken IgY,Immuno HRP-DAB,Ready-to-use IHC Kit(フナコシ)を用いて、被検血清を4℃一晩インキュベート後、常法によりSAB反応-DAB発色させ、発色により抗体価を判定



【結果】

1. 試験1 PCR法によるH. m特異遺伝子の検出

(1) 調査1 PCR法を用いたH. m特異遺伝子の臓器別検出状況 (表2)

ヒストモナス病発症鶏3羽の心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、盲腸の生材料のうち、H. m特異遺伝子が検出されたのは、心臓、肺は1/3、肝臓、腎臓、脾臓は3/3、盲腸は2/3であった。陰性コントロール鶏の全ての臓器からは、H. m特異遺伝子は検出されなかった。図2は、PCR電気泳動像で、209bpの領域に陽性バンドがみられる。

(2) 調査2 H. m特異遺伝子の生材料とパラフィン切片の検出感度の比較 (表2)

調査1と同じ臓器のパラフィン切片のうち、H. m特異遺伝子が検出されたのは、肝臓と盲腸のみで、ともに3/3であった。

(3) 調査3 野外における応用性の評価 (表3)

ヒストモナス病発症鶏10羽のうち、H. m特異遺伝子が検出されたのは、主要臓器5/10、盲腸10/10であった。発生農場の同居鶏 (非発症) 5羽では、主要臓器2/5、盲腸0/5、発生農場と疫学的に関連のある農場の鶏 (非発症) 2羽では、主要臓器2/2、盲腸0/2であった。また、過去の病性鑑定材料22羽については、主要臓器および盲腸いづれからも、H. m特異遺伝子は検出されなかった。

表2 調査1及び2

H. m 特異遺伝子の臓器別検出成績及び生材料とパラフィン切片の検出感度の比較分析

	H.m特異遺伝子検出					
	心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓	盲腸
【発症鶏(n=3)】						
凍結生材料	1	1	3	3	3	2
パラフィン切片	0	0	3	0	0	3
【陰性コントロール(n=3)】						
凍結生材料	0	0	0	0	0	0

図2 PCR電気泳動像

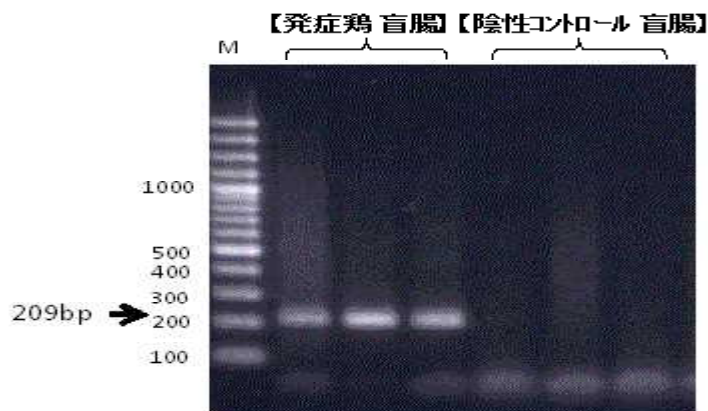


表3 調査3 野外での応用結果

区分	項目	発症鶏(4農場)										同居鶏(3農場)					N・S農場との関連農場(1)		
		O					N			S	G	O		S			G	1	2
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	1	2	
盲腸	盲腸炎	+++	++	++	++	++	+++++	+	+++	+	-	-	+	+	-	+	-		
	PAS反応	+++	++	++	+	+	++	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	
	PCR検査	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	-	-	-	-	-	-	-	
肝臓	肝炎	+++	+++	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
	PAS反応	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	PCR検査※	O	O	O	O	O	-	-	-	-	O	O	-	O	-	-	O	O	

※全主要臓器を含むパラフィン切片

2. 試験2 H.m原虫に対する抗体測定の有用性

(1) 調査1 組織スライドガラスを用いた抗体検出SAB法(以下A-SAB法)の評価(図3)

ヒストモナス病発症鶏4羽の抗体価は、1,280倍から5,120倍で、GM平均2,152倍を示した。陰性コントロール10羽の抗体価は、すべて500倍未満を示した。図3の左図はHE染色像、中央はヒストモナス病発症鶏の陽性像、右図は陰性コントロールを示す。この結果から、抗体陽性の基準を、1,000倍とした。

(2) 調査2 野外におけるA-SAB法の応用性評価

モニタリング検査事業などで保管されている17農場の血清を測定したところ、陽性は4農場、陰性は10農場、3農場については、弱陽性を示した。

陽性の4農場は全て平飼いの地鶏飼育農家であった。

図3 調査1 A-SAB法の評価

抗体価

発症鶏の血清(n=4) 抗体価(GM) 2,152倍
(1,280 ~ 5,120倍)

陰性コントロール血清(n=10).....すべて500倍未満

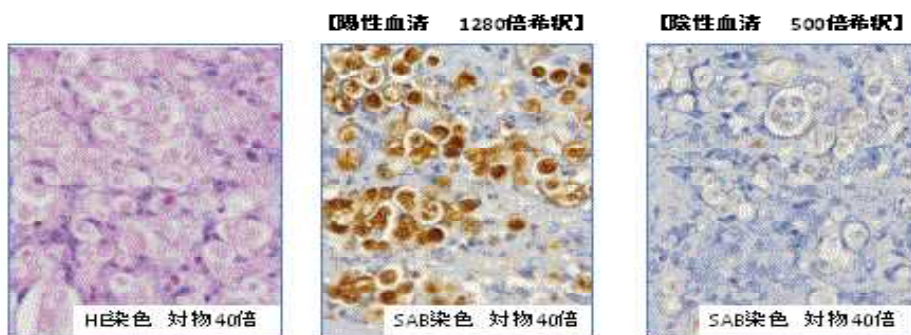
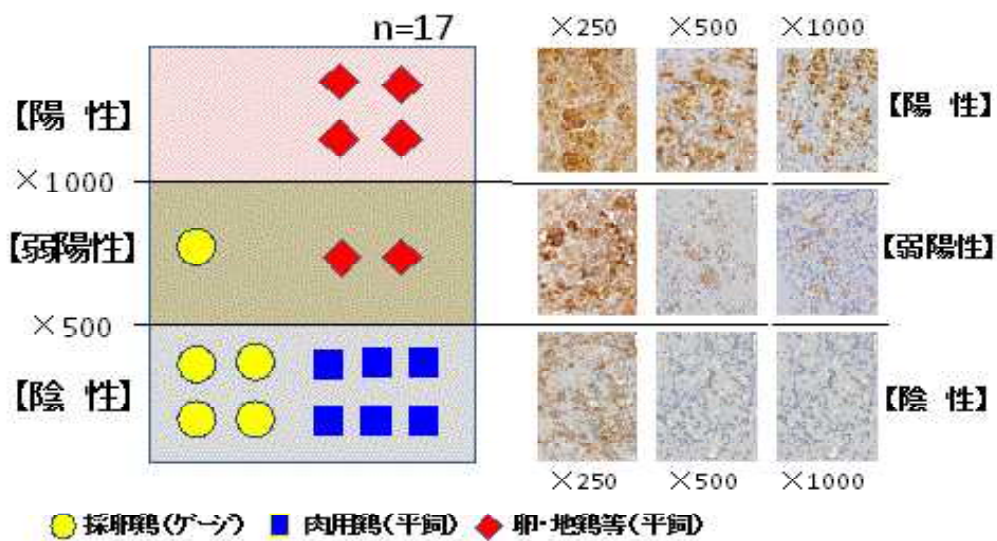


図4 調査2 A-SAB法の野外における評価



【まとめおよび考察】

4月から7月にかけて、ヒストモナス病が4農場10羽に認められた。検査チャートの課題として、①病理組織診断に時間がかかる、②感染初期の診断が難しい、③生前検査ができない等があり、これらを解決するために、遺伝子検査および抗体検査について、その有用性を検討した。

遺伝子検査では、検査時間が1日以内と迅速性に富み、H. m特異遺伝子がヒストモナス病発症鶏すべてにおいて検出、非発症鶏ではすべて検出されなかったことから、特異性が高いことがわかった。また、ヒストモナス病とは診断されなかった発生農場の同居鶏や発生農場と疫学的に関連のある農場の鶏からもH. m特異遺伝子が検出され、これらはヒストモナス原虫の感染初期をとらえているものと思われ、感度が高いことが示唆された。これらより、遺伝子検査は、補助診断として有用であると思われた。

次に、A-SAB法による抗体検査は、ヒストモナス病発症鶏において高い抗体価を持ち、また、野外応用で4農場を摘発することができたことから、有効な検査方法と思われた。ただし、感染抗体の消長や他の原虫との交差反応等不明な点もあることから、抗体検査は、スクリーニング検査として、農場への浸潤状況を早期に捉え、早めの対策を可能とするものとして、有用であると思われた。

近年、地鶏や自然農法などの養鶏に対する意識やアニマルウェルフェア等により、鶏の飼養環境の多様化が想定される中、今後、平飼い飼育の増加が見込まれる。平飼い飼育では、一般的に糞便と接触する機会が多く、農場によっては、オールインオールアウトができず、また、敷料を搬出せずに再利用するなど、寄生虫病の発生が危惧される。一旦侵入すると清浄化は困難であることから、平飼い農場への寄生虫病に対する飼養衛生管理の徹底等の普及、啓発、診断技術を活用した早期疾病対策が重要と考えられた。

参考文献

- 1)板垣博ら：黒頭病p248－251，新版家畜寄生虫病学，朝倉書店（1995）
- 2)大庭千早ら：七面鳥のヒストモナス症の発生例，鶏病研報，30,36-41（1994）
- 3)矢島佳代：平飼い採卵鶏群におけるヒストモナス症の発生とその対応，畜産技術，704,38-41(2014)
- 4)稲見健司：愛玩鶏飼育場の軍鶏に認められたヒストモナス症の一例，鶏病研報，44,193（2008）
- 5)佐野元彦ら：地鶏におけるヒストモナス症の発生，鶏病研，25,209-213(1989)
- 6)Harold M, Arjan Stegeman :Development of a blocking-ELISA for the detection of antibodies against *Histomonas meleagridis* in chickens and turkeys, *Vet Parasitology*, 171, 216-222(2010)
- 7)Huber K, Chauve C, Zenner L. :Detection of *Histomonas meleagridis* in turkeys cecal droppings by PCR amplification of the small subunit ribosomal DNA sequence, *Vet Parasitology*, 131, 311-316(2005)