

令和 8年 4月 30日

## 令和7年度 共同研究報告書

研究代表者： 村越 ふみ

1. 研究課題名	日本語表記：マウスアイメリアをモデルとした「温度・持続感染ウイルス」に着目した畜産環境における新規アイメリアコントロール方法の確立 英語表記：Establishment of a novel Eimeria control method focusing on temperature and symbiotic viruses using a mouse intestinal Eimeria model		
2. 研究期間	令和 7年 4月 1日 ~ 令和 8年 3月 31日		
3. 共同研究者	氏 名	機関・所属部署名	職 名
	吉田 彩子	宮崎大学 産業動物防疫リサーチセンター 感染症研究・診断部門	教授
4. 研究目的 本研究では、家畜コクシジウム症の原因原虫である <i>Eimeria</i> 属に対する新規コントロール法の確立を目的とした。本原虫はオーシストとして環境中に排出され、消毒薬耐性が高く、環境からの排除が困難である。 本研究では、マウス感染系が確立されている <i>Eimeria pragensis</i> をモデルとして、以下の2点について検討を行った。 (1) オーシストに対する新規消毒法の検討 (2) 原虫持続感染ウイルスを利用した病原性制御の可能性の検討			
5. 研究内容・成果 <b>「マウスアイメリア(<i>E. pragensis</i>)のオーシストを用いた <i>Eimeria</i> 属オーシストの新規消毒法の検討」</b> <b>[成果]</b> 本研究では、プラズマナノミスト処理によるオーシスト不活化効果を検証した。その結果、 <i>C. parvum</i> においては脱殻率が0%となり、完全な機能的失活が確認された。一方で、 <i>E. pragensis</i> では感染抑制効果は認められなかった。 このことから、プラズマナノミスト処理は原虫種によって感受性が大きく異なることが明確に示された。特に、オーシスト壁構造や感染機構の違いが消毒効果に影響する可能性が示唆された。  <b>方法、結果、考察</b> まず、クリプトスポリジウム ( <i>Cryptosporidium parvum</i> ) オーシストに対して、次亜塩素酸処理を5分行った後に、プラズマナノミスト処理 PBS に懸濁し、25°C条件下（室温条件）で5分、10分、15分の反応時間を設定して処理を行った。その後、胆汁酸（1%タウロコール酸）を用いて37°Cの条件下で脱殻を誘導し、顕微鏡下で脱殻（図1B）の有無を観察することにより脱殻率を算出した。 アイメリアについては、プラズマナノミスト処理した <i>E. pragensis</i> オーシストをマウスに投与			

し、感染7日後から糞便を回収し、浮遊法によって糞便 1g あたりのオーシスト排出数(OPG)を評価することで、プラズマナノミスト処理による感染抑制効果を検討した。

*C. parvum* に対する脱殻試験の結果、プラズマ処理時間 15 分の条件において脱殻率は 0%となり、完全な機能的失活が示された(図 1A)。このことから、プラズマナノミスト処理はオーシストの脱殻過程を強く阻害することが示唆された。この結果は、プラズマ処理により生成される活性酸素種などの化学種がオーシスト壁および感染関連分子の酸化的損傷を引き起こした可能性を示唆するものである。一方、マウスアイメリアを用いた感染実験では、プラズマ処理群と対照群との間に、オーシスト排出量の有意な差は認められなかった(図 1B)。この結果は、クリプトスポリジウムとアイメリアにおけるオーシストの構造的特徴や感染機構の違い、あるいはプラズマにより生成される活性化学種に対する感受性の差異に起因する可能性が考えられる。特に、オーシスト壁の多層構造や耐酸性脂質膜の性質の違いが影響している可能性があり、原虫種ごとに最適な処理条件を検討する必要があると考えられる。

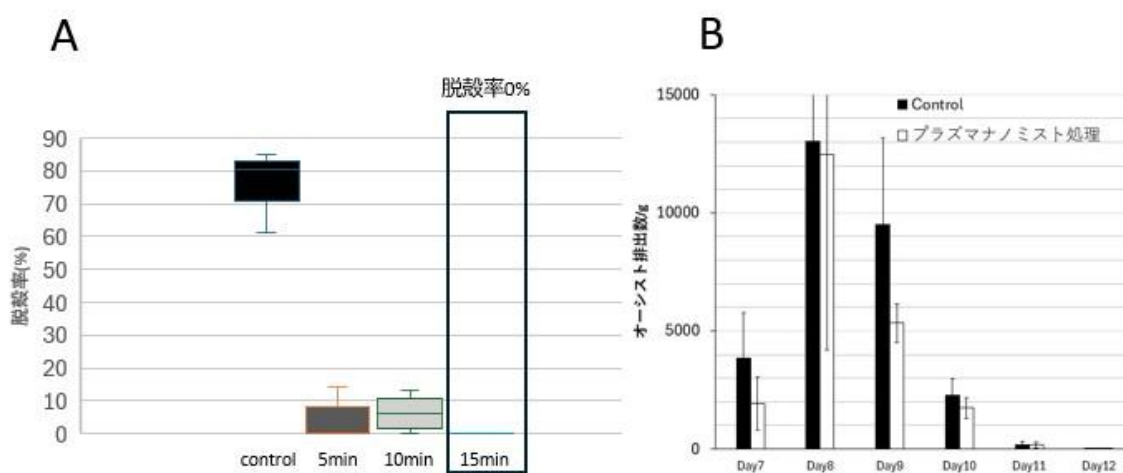


図 1 (A) クリプトスポリジウムの脱殻試験を用いたプラズマナノミスト処理の条件調整と(B)プラズマナノミスト処理を行った *E. pragensis* のマウスへの感染試験の結果

### 「原虫持続感染ウイルスを用いた原虫コントロール法の検討」

#### [成果]

*E. pragensis* における持続感染ウイルスの存在を検討したが、dsRNA バンドは検出されず、既知の *Eimeria* ウイルスも検出されなかった。

一方で、使用した試料量は既報と比較して少なく、ウイルスが存在する場合でも検出感度の限界に達していない可能性がある。したがって、本原虫における持続感染ウイルスの有無については、次世代シーケンス解析を用いた網羅的検討が必要である。

#### 方法、結果、考察

*E. pragensis* にウイルスが存在するかの調査を行った。まず、*E. pragensis* から全核酸を抽出し、その後 dsRNA 特異的なカラム抽出を行った。さらに、抽出した全核酸に対して *Eimeria tenella* RNA virus (ETV) および *Eimeria brunetti* RNA virus (EBV) を増幅するプライマーを用いた PCR を行い、既知の原虫ウイルスが *E. pragensis* に存在するかを調べた。

dsRNA の電気泳動の結果、dsRNA のバンドは確認されなかった(図 2A)。また、ETV および EBV のプライマーを用いた nested-PCR の結果、検出されたバンドはウイルス由来配列ではなかった(図 2B)。

今回 *E. pragensis* のオーシストを  $4.6 \times 10^6$  個使用したが、*C. parvum* や *Leishmania* のウイルスを検出する際には  $1 \times 10^7$  個程度の量を使用しないと、ウイルス陽性の場合でも dsRNA のバンドとして見え

てこないことが知られている。

今後は、次世代シーケンサーを用いて、*E. pragensis* に持続感染ウイルスがないか確認を行う予定である。

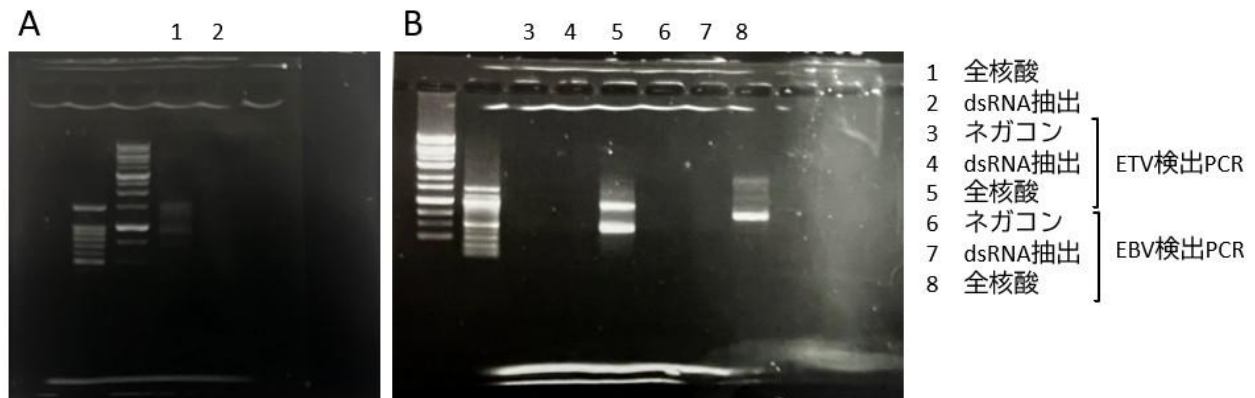


図 2 (A) *E. pragensis* から dsRNA 特異的な抽出を行った結果の電気泳動像および(B)既報の *Eimeria* のウイルスである ETV, EBV を対象とした PCR の結果

以上の結果より、原虫オーシストの消毒および病原性制御は原虫種ごとに異なる戦略が必要であることが示された。本研究で得られた知見は、畜産環境における原虫感染制御法の最適化に向けた基盤的情報となる。

(参考となる資料を添付してください。)

※ 必要に応じて、枠を広げて記載してください。

6. 成果となる論文・学会発表等

(※参考となる資料を添付してください。)

第 169 回日本獣医学会で発表予定

7. 産業動物防疫リサーチセンターへ訪問した回数

氏名	職名等	国籍	訪問回数・合計日数	訪問時期
村越 ふみ	准教授	日本	1回・5日	2月
菅田 菜月	M1	日本	1回・3日	2月

8. 利用した設備・施設等 ※必要に応じ様式の追加・削除可。

施設

室名	動物種	飼育数	期間
ABSL 3 施設			
ABSL 2 施設	マウス C57BL/6	10	1月30日～2月21日
ABSL 2 施設 (鳥類)			

設備・機器類

(I) 獣医棟 4, 5 階

機器名	使用した延日数
MALDI Biotyper (BRUKER)	
フローサイトメーター (ライフテクノロジーズジャパン)	
デジタル PCR (日本バイオラッド)	
キャピラリーシークエンサー (SeqStudio, Spectrum Compact)	
ナノポアシークエンサー (GridION)	
リアルタイム PCR 装置 (Quant Studio 3, 5)	
ポータブルリアルタイム PCR 装置 (PicoGene)	
リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス LoopampEXIA)	
ゲル・メンブラン撮影装置 (ChemiDog touch)	
PCR 装置 (BioRad, Applied Biosystems)	
自動核酸抽出装置 (magLead 12gC)	
NanoDrop 分光光度計 (Thermo ND-1000)	
マルチプレートリーダー (ThermoFisher Varioscanner)	
マイクロプレート洗浄装置 (Thermo WellWash)	
細菌検査用ホモジナイザー (オルガノ EXNIZER400)	
アイソレーター (マウス/ラット用) (Tokiwa T-BCC-Micro-M25)	
安全キャビネット (AIRTEC 等)	5
オートクレーブ (トミー精工 LSX-500, 平山製作所 HG-50)	5
蛍光顕微鏡 (EVOS M7000, KEYENCE BZ-9000)	
倒立位相差顕微鏡 (OLYMPUS CKX41)	
位相差顕微鏡 (OLYMPUS CK2)	
超遠心機 (HITACHI CP80WX)	
冷却遠心機 (KUBOTA, Thermo)	
卓上遠心機 (HITACHI, KUBOTA, eppendorf)	5
インキュベーター (SANYO MIR-153, LTE-510)	
CO <sub>2</sub> インキュベーター (ASTECC SCI-165D/APC, ThermoF370)	
超純水製造装置 (Milli-Q Advantage)	

(II) 産業動物教育研究センター

部屋名	機器名	使用した延日数
大中動物検査実験室	大中動物検査実験室	
	全身麻酔装置	

		埋込式回転診療台	
中動物陽圧実験室		手術台、无影灯 (2機)、麻酔装置、生体情報モニター、X線投下装置 (Cアーム) 一式	
MRI 室		3T MRI、MRI 用生体情報モニター、MRI 用麻酔装置一式	
		MRI オペレーター	
P2 検査実験室		アイソレーター (鳥類用)	
		安全キャビネット	
		オートクレーブ	
器具・薬品庫		ウサギ飼育用ケージ	
滅菌リネン庫		高圧蒸気滅菌装置	
		カートリッジ式酸化エチレンガス滅菌器	
動物飼育		動物飼育費	
		飼育管理員	

その他の装置・データ等

分類	名称	使用した延日数
データベース		
バイオリソース		
データ・文献		
装置	ホログラフィック顕微鏡 (Tomocube HT-X1)	1