

PCR を活用しためん羊コクシジウムの同定

秋田県北部家畜保健衛生所 防疫班

○川畑海渡 三橋洋貴 李英輝

要 旨

管内のめん羊飼養農場で定期的に行っている糞便検査において、糞便 1 g あたりのコクシジウムオーシスト数(OPG)が著しい高値を示す肥育めん羊が散見。農場に浸潤しているコクシジウムの病原性検討のため、PCR による同定を実施。肥育めん羊 9 頭の糞便プール検体を用いて、めん羊コクシジウム 11 種における 18S rRNA 遺伝子または Internal transcribed spacer 1(ITS-1)を標的とした PCR の結果、病原性が最も高いとされる *Eimeria ovinoidalis* を含むコクシジウム 3 種で特異的増幅を認めた。PCR によるめん羊コクシジウム同定の既報例は少なく、オーシスト形態のみによらない診断法として有効と推察。今後、コクシジウム病は①無症状でも発育不良の原因となりうること、②腸内細菌叢の変化をもたらすとの報告から、クロストリジウム感染症等による死廃頭数が増加しうることを注意喚起し、抗コクシジウム薬投与や畜舎消毒等の指導により、事故防止や生産性向上に結びつけたい。

序 論

めん羊のコクシジウム病はすべて *Eimeria* 属原虫が原因である[1]。現在、*E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. ahsata* など、病原性や寄生部位の異なる 13 種が知られており[2]、前述の 3 種は病原性が高いとされている[3]。

成熟オーシストの経口摂取により感染し、小腸から大腸に寄生する[1]。病原種の感染を受けた場合、急激な下痢や粘血便、慢性例では消瘦や発育不良を示し、経済的損失をもたらす。2 - 6 か月齢の子羊が発症しやすいとされている。

めん羊のコクシジウムは種により病原性が異なるため、対策実施の判断には種同定が必須である。

種同定の基本的手法はオーシスト形態による鑑別であるが、これには熟練を必要とする[4]。ま

た、糞便中のオーシストは未成熟であるため、極冠 polar cap や微小突起 micropyle など、オーシストの大きさや形以外の情報を得るには成熟オーシストまで培養しなければならず、結果が得られるまでに時間を要する[3]。

このような理由から、簡便かつ迅速に実施可能な PCR 法を用いた同定が注目されている。

コクシジウムを含む真核生物の rDNA には、5' 末端側から 18S rRNA、5.8S rRNA、26S rRNA をコードする遺伝子があり、18S rRNA と 5.8S rRNA、5.8S rRNA と 26S rRNA の間に、それぞれ Internal transcribed spacer-1 (ITS-1)、ITS-2 という non-coding DNA が存在する(図 1)。

種同定のための PCR には、18S rRNA、ITS-1 および ITS-2 が標的として用いられる[4,5]。この領域は反復配列をなすため増幅効率が高く、分子進化速度が比較的早いいため多くの生物で種の鑑

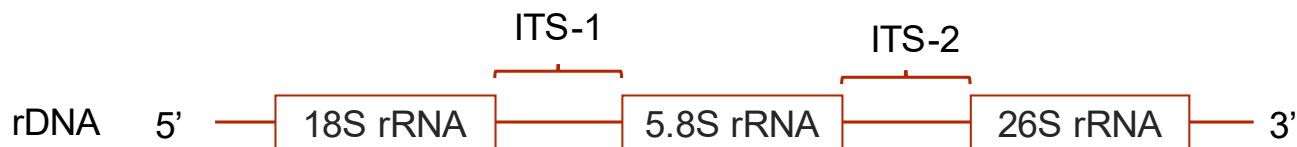


図 1 真核生物におけるリボソーム DNA の模式図(ITS: internal transcribed spacer)

別に用いられている[6]。

国内では、牛や鶏で PCR を用いたコクシジウムの同定を行った例が報告されている [4,7]が、めん羊での報告は海外のみにとどまっている[8–10]。

当所管内には県内最大規模のめん羊飼養農場があり、駆虫薬投与やその効果確認のための糞便検査等を定期的に実施している。糞便検査では特に肥育めん羊においてコクシジウムオーシストが散見されたが、前述の理由からオーシスト形態による種同定には至らなかった。

そこで、当該農場で得られた糞便検体を用いて PCR 法によるめん羊コクシジウムの同定を実施し、農場におけるコクシジウムの浸潤状況を検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

(1) 農場の概要

当該農場は 1987 年よりサフォーク種の飼養を開始した[11]。2012 - 2013 年に北海道より繁殖めん羊 100 頭を導入するなど、ラム肉のブランド化に向けた取組を推進し、2023 年 4 月現在は県内最大規模となる 277 頭(繁殖雌 111、種雄 7、育成雌 39、肥育 120)を飼養している。

繁殖めん羊は春から秋にかけ放牧され、冬は舎飼いとなる。肥育めん羊は常時舎飼いされている。

2023 年、当該農場では繁殖めん羊 23 頭、肥育めん羊 11 頭が死亡し、繁殖、肥育とも夏季に死亡

表 1 当該農場における月ごとの死亡頭数(2023 年)

農場管理者からの報告により作成。当所で病性鑑定を実施した個体で死因が診断されたものについては、その死因ごとに分類した。

月	繁殖めん羊							計	肥育めん羊			
	捻転 胃虫症	仮性 結核	CL	細菌性 肺炎	細菌性 子宮 内膜炎	死因 不明	検査 せず		CL	細菌性 肺炎	検査 せず	計
1								0				0
2			1		1			2				0
3				1				1				0
4							1	1				0
5	1						1	2				0
6		1					1	2			1	1
7	2					1	2	5			1	1
8	1	1				1	4	7		1	3	4
9		1	1				1	3	1		2	3
10								0			1	1
11								0	1			1
12								0				0
計	4	3	2	1	1	2	10	23	2	1	8	11

(注) CL: クロストリジウム感染症(疑い含む)

検査せず: 休日の死亡や死体腐敗等により病性鑑定を実施できず、死亡獣畜取扱場へ埋却

頭数が増加する傾向がみられた(表 1)。繁殖めん羊は夏季の捻転胃虫症や *Corynebacterium pseudotuberculosis* による仮性結核での死亡が目立った。また、クロストリジウム感染症(疑い含む)については、後述のように 5 種混合ワクチン接種済にもかかわらず繁殖および肥育めん羊がそれぞれ 2 頭死亡した。以上から、これらの 2 疾病が農場における主な問題となっている。

このような現状と、2013 および 2016 年に銅中毒の発生があった[11]ことを踏まえ、当該農場では衛生対策として①駆虫薬の投与、②クロストリジウム 5 種混合ワクチンの接種、③血液生化学検査(GOT および GGT)による銅中毒のモニタリング、④血液生化学検査(捻転胃虫症モニタリングとしての TP 測定)および糞便検査による駆虫薬の効果確認が定期的に実施されている。

衛生対策は毎年 4 - 11 月頃に月 1 - 3 回程度の頻度で実施している。当所職員のほか、農場管理者や管理獣医師も参加し、三者が協力しながら実施する体制となっている。

なお、コクシジウムについて積極的な対策は実施しておらず、下痢などの臨床症状を呈する個体が見られた場合は ST 合剤を投与している。

(2) 糞便検査

当該農場で採取しためん羊の糞便(直腸便)は、当日中に O リング法により 1 g あたりのコクシジウムオーシスト数(OPG)を算出した。その概略を以下に示す。

糞便 0.1 g をガーゼに通して水道水 5 mL に懸濁し、2,500 rpm で 5 分間遠心した。上清を捨てて残った沈殿に飽和食塩水 1.7 mL を添加してオーシストを浮遊させ、この液をスライドグラスに貼り付けた O リング 2 個に満たし、カバーグラスで押さえつけて 5 分以上静置した。その後鏡検により

O リング 2 個分についてコクシジウムオーシストの個数を数え、これに 100 を乗じた数を OPG とした。

2023 年に実施した検査で作製した検体の一部は、後に実施する DNA 抽出のため -80℃で保存した。

(3) DNA 抽出

保存した肥育めん羊 9 頭(0 - 715,200 OPG)の糞便浮遊液についてオーシストの破碎処理を行い、市販キット(HighPure PCR Template Preparation Kit, Roche)を用いて DNA 抽出を行った。その概略を以下に示す。

-80℃で保存していた糞便浮遊液を 4℃で一晩静置後、上清を蒸留水で 10 倍以上に希釈し、3000 rpm、5 分間遠心してオーシストを沈殿させた。上清を捨て、沈殿に Lysis buffer(キットの構成成分)を 200 µL 添加し、ビーズ入りマイクロチューブに移した後、ビーズショッカーで 4,000 rpm、120 秒間処理してオーシストを破碎し、全量を新たなマイクロチューブに移した。

以降はキットのプロトコルに従い DNA 抽出を実施した。DNA は Elution buffer 200 µL で溶出後、NanoQuant(TECAN)にて 260 nm および 280 nm における吸光度を測定し、DNA の純度と濃度を決定した。

(4) PCR

PCR に用いたプライマーの塩基配列と増幅産物の想定塩基長を表 2 に示す。Eimeria 種共通プライマーとして、既報[4]のものを使用した。また、めん羊コクシジウム 11 種(*E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. weybridgensis*, *E. faurei*, *E. granulosa*, *E. marsica*, *E. parva*, *E. ovina*, *E. intricata*, *E. pallida*)の特異的プライマーとして、前の 4 種(*E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E.*

weybridgensis)は 18S rRNA 遺伝子を増幅する既報[5]のものを使用し、あとの 7 種(*E. faurei*, *E. granulosa*, *E. marsica*, *E. parva*, *E. ovina*, *E. intricata*, *E. pallida*)は NCBI(アメリカ国立生物工学情報センター)の GenBank 上にある ITS-1 配列の情報を基に新規設計した。

テンプレート DNA には、めん羊 9 頭分の DNA 抽出液のプール検体(DNA 濃度:12.3 ng/μL)を用いた。また、*Eimeria* 種共通プライマーの陽性対照とするため、コクシジウム病罹患鶏 1 羽の盲腸内容(2,780 OPG)についても同様に DNA 抽出を行い、PCR を行った(DNA 濃度:77.2 ng/μL)。

PCR 試薬(Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0), タカラバイオ)を 12.5 μL、プライマーを 1.25 μL、テンプレート DNA を 1.25 μL、滅菌蒸留水を 10 μL 入れて総量を 25 μL とし、サーマルサイクラーにて PCR 反応を行った。PCR 条件は、既報[4]に従い、初期変性:94℃, 30 秒、(変性:94℃, 10 秒、アニーリング:55℃, 30 秒、伸長:72℃, 30 秒)×35 サイクル、最終伸長:72℃, 2 分とし、得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動により特異的増

幅を確認した。

結 果

(1) 肥育めん羊における OPG の推移

2021 年 5 月 - 2023 年 11 月に実施した糞便検査から得られた肥育めん羊の OPG の推移から、毎年 4 - 7 月に高 OPG を示す個体が出現し、ばらつきが大きくなる傾向が認められた(図 3)。また、この期間には、45,000 - 715,200 OPG(データには示していない)という著しい高値の個体が散見された。

(2) PCR によるめん羊コクシジウムの同定

めん羊検体(9 頭分プール)および鶏検体に対し *Eimeria* 種共通プライマーを適用したところ、めん羊検体(図 4 のレーン A)の増幅は確認できず、鶏検体(図 4 のレーン B)でのみスメア状であるが 600 - 700 bp にバンドが認められた。

表 2 PCR に用いたプライマー

Eimeria 種共通プライマー(No.1)は文献[4]、*E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis* および *E. weybridgensis*(No.2 - 5)は文献[5]に記載のものを用い、その他(No. 6 - 12)は新規に設計した。

No	種	Accession	配列		塩基長 (bp)
			Forward	Reverse	
1	<i>Eimeria</i> 種共通	-	GCAAAAGTCGTAACACGGTTTCCG	CTGCAATTCACAATGCGTATCGC	348 - 546
2	<i>E. ahsata</i>	KT184334.1	TGCGTTGTGTTGCGGAACCTT	CAAATTAAGCCGCAGGCTCC	463
3	<i>E. ovinoidalis</i>	AF336339.1	AGCCAAGGTAGGCATTTCCC	GGCTTTCTTCCTGTAGCCGT	377
4	<i>E. crandallis</i>	AF336339.1	TACGAATGCCCCCAACTGTC	CGGGTAACGGGAATTAGGG	537
5	<i>E. weybridgensis</i>	AY028972.1	TACGAATGCCCCCAACTGTC	GGCTTTCTTCCTGTAGCCGT	200
6	<i>E. faurei</i>	MG774398.1	GGAATGCTCTTGGGTATGACCT	CACGAGCCAAGACATCCATT	387
7	<i>E. granulosa</i>	MG836231.1	GCATTCGCAAGACTGGTCTCATAA	CCTTCATCGATGCACGAGCC	351
8	<i>E. marsica</i>	MG836232.1	CATCAGGATAGATCCTCTGTGGC	CCTTCATCGATGCACGAGCC	369
9	<i>E. parva</i>	MG836233.1	GTGGCATTGCAAGAGACTGG	TGCCTGGTTGGCGTAGAAGT	227
10	<i>E. ovina</i>	MG836234.1	TAGCGGTTATGGGGGTTCGAT	TTCATCGATGCACGAGCCAA	189
11	<i>E. intricata</i>	MG836235.1	GACCTATCCATAACGGGGGT	CTTCTCCAAGGCAGAACCCAAA	383
12	<i>E. pallida</i>	MG836236.1	GGTAGTTAGTTCCTTGTGGCA	CTTTCATCGATGCACGAGCC	364

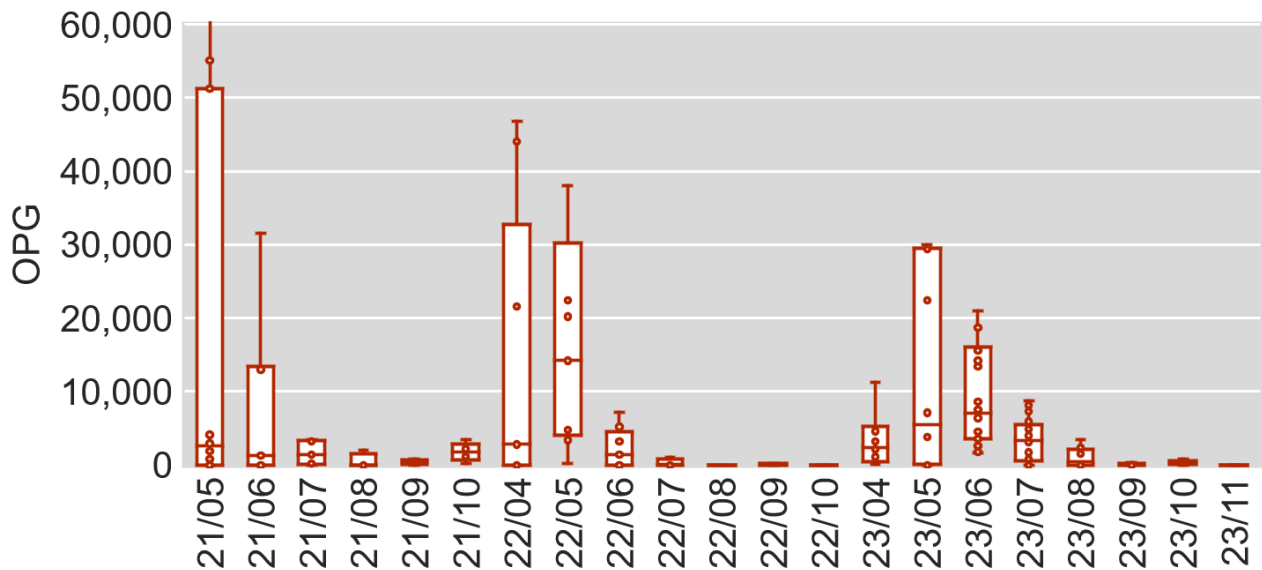


図 3 肥育めん羊における OPG の推移(2021 年 5 月～2023 年 11 月)

毎年夏季に OPG 中央値のピークがみられ、高 OPG を示す個体のために OPG のばらつき(箱の長さ)が大きくなった。
 なお、四分位範囲の 1.5 倍を超えた値を外れ値と定義し、外れ値の個体および 2021 年 5 月の検査で最高 OPG を示した個体(116,400 OPG)をグラフの視認性向上のため除外して表示した。

一方、めん羊検体に対し、めん羊コクシジウム 11 種のプライマーを適用したところ、*E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis*, *E. granulosa*(図 4 中のレーン 2, 4, 6)においてそれぞれ 377, 200, 351 bp に対応する単一バンドが確認され、これら 3 種の農場への浸潤が示唆された。

考 察

めん羊の出産期は晩冬から早春のため、当歳の子めん羊は夏季にコクシジウム症を発症しやすいとされる 2 - 6 か月齢を迎える。過去 3 年間の OPG の推移を調べたところ、毎年 4 - 7 月に OPG が高値を示す肥育めん羊が出現していた(図 3)

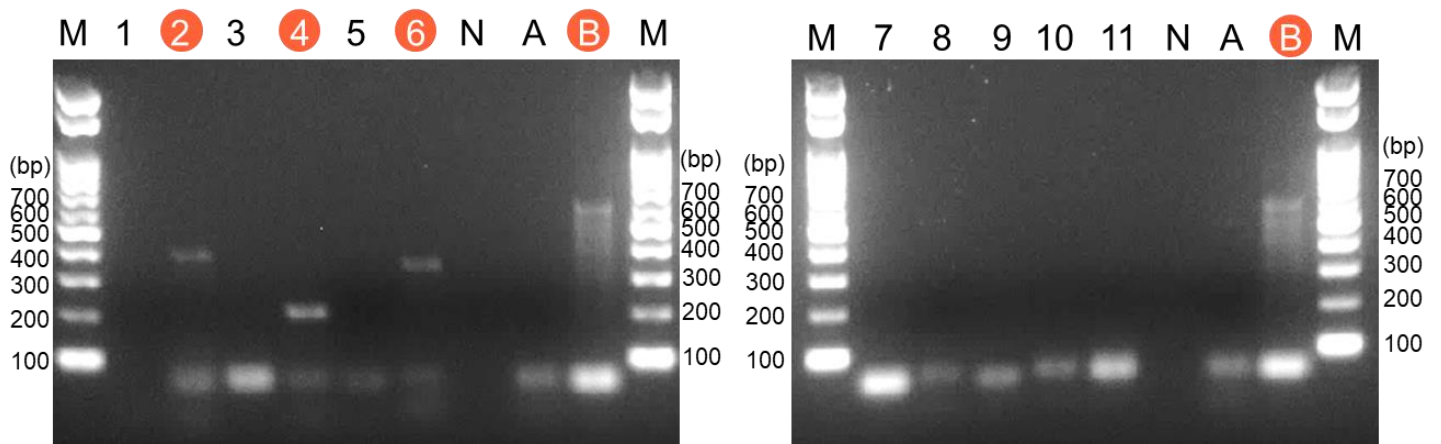


図 2 PCR 結果

特異的増幅が認められたレーン(2, 4, 6, B)に色をつけた。

1:*E. ahsata*, 2:*E. ovinoidalis*, 3:*E. crandallis*, 4:*E. weybridgensis*, 5: *E. faurei*, 6:*E. granulosa*, 7:*E. marsica*, 8:*E. parva*, 9:*E. ovina*, 10:*E. intricata*, 11:*E. pallida*, N:陰性対照(水), A/B: Eimeria 種共通(検体にめん羊(A)または鶏(B)を使用)

のはそのためと考えられた。

農場に侵入するコクシジウムの病原性を検討するためには種同定が必須であるが、現状の検査体制でオーシスト形態のみで同定することは技術的に困難であった。

当該農場では捻転胃虫症による死亡が問題となっているため、その予防として定期的な駆虫薬投与を実施している。糞便検査の主目的は、その効果確認としての捻転胃虫卵数のカウントであるため、鏡検は捻転胃虫卵が容易に確認できる対物 10 倍で行っている。図 4 は 2023 年 5 月に実施した糞便検査の一例(対物 10 倍)であり、オーシストの大きさや色、形状の違いからおそらく 4 種類のコクシジウムがいることは推定できるが、この倍率で種を同定することは非常に困難である。強拡大にするとオーシストの詳細な構造を観察できるが、今まで観察していた視野から外れてしまい、どこまで捻転胃虫卵をカウントしていたのかわからなくなる。

そこで、PCR によるコクシジウム同定を肥育めん羊 9 頭分の糞便を用いて実施したところ、当該

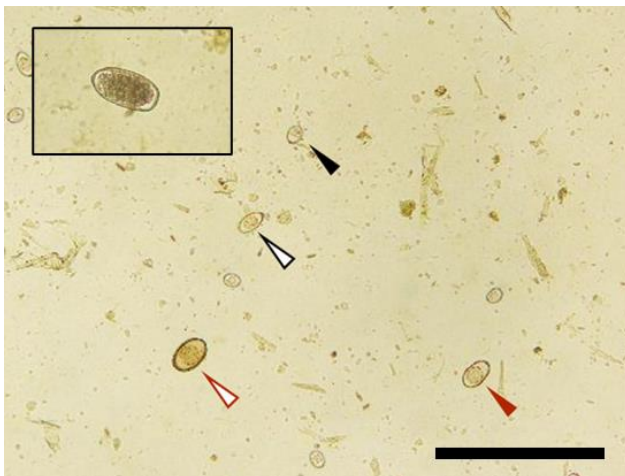


図 4 肥育めん羊の糞便検査の一例(2023 年 5 月)

オーシスト(大きさ、色、形状から 4 種類と推定)を黒または赤の矢頭で示している。左上は同倍率で観察した際の捻転胃虫卵である。バー:200 μm 。

農場には 3 種類のコクシジウム(*E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis*, *E. granulosa*)が浸潤していることが示唆された(図 2)。これら 3 種のオーシストはいずれも大きさや形状が類似しており(図 5:文献[12]より引用)、現状の検査体制では見過ごされてきたが、本調査によりそのような病原体が生産性に悪影響を及ぼしている可能性が示唆された。

よって、PCR を活用しためん羊コクシジウムの同定はオーシスト形態のみによらない方法として有用であることが確認できた。

しかしながら、本調査は PCR 増幅産物の塩基長のみを同定の根拠としているため、判断材料が少ないことに注意しなければならない。今後、増幅産物の塩基配列とデータベースとの比較を行い、正しく同定できているかの検証を行うべきである。

その際、異種間で配列と長さが不均一[4]な ITS-1 の全長が塩基配列解析のターゲットとして望ましいが、今回、ITS-1 領域を増幅する *Eimeria* 種共通プライマーのめん羊検体に対する反応性を確認したところ、特異的増幅が確認されなかつ

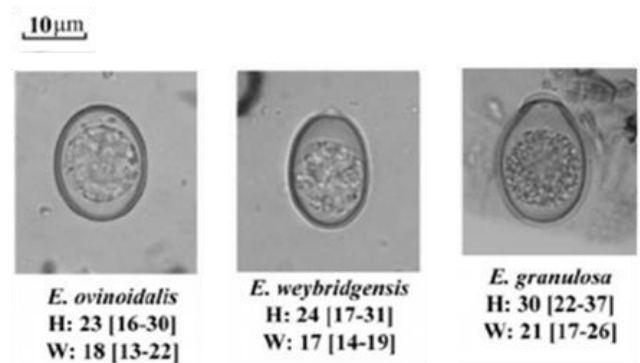


図 5 同定されたコクシジウムのオーシスト(一例)

文献[12]を一部改変して引用。左から *E. ovinoidalis*, *E. weybridgensis*, *E. granulosa* のオーシスト形態の一例を示す。高さ(H)および(W)の平均値[実測値]が併記されている。

た。鶏検体では、泳動像がスメア状であるもののバンドが確認できることから、反応性の差異は検体によるものと推察された。

このプライマーは、*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* および *Toxoplasma gondii* の共通配列を基に ITS-1 の全長およびその前後の配列を増幅するように設計されている[4]。めん羊における共通プライマーの反応性を NCBI が提供しているツール (Primer BLAST) で検証したところ、*E. ovinoidalis*, *E. weybridgeensis*, *E. granulosa* は共通プライマーがアニーリングできる塩基配列を有していないことが確認された。したがって、めん羊のkokシジウムで ITS-1 全長を増幅できるプライマーを新たに設計する必要がある。

また、PCR によるkokシジウムの同定を検査法として確立するためには、オーシスト形態による同定との一致性についても検討しなければならない。糞便検査で鏡検中に同定を行うのは時間的および労力的な制約から困難であるが、5%ホルマリン糞液を 10℃ で保存すれば 1 年以内は十分検査可能であり、スポロゾイト形成もみられる[13]。これを活用すれば、検査後に糞液を保存し、余裕をもって形態観察を行うことが可能と考えられる。

さらに、PCR の検出感度(同定可能な最小 OPG)

の追究や、同定種のマルチプレックス化も含めた、より迅速で簡便かつ確実な検査法の確立を目指したい。

2023 年に悪性水腫(疑い)と診断された肥育めん羊の病理検査で、小腸におけるkokシジウム寄生が確認された(図 6)。本症例における寄生種は未確認であるが、*E. ovinoidalis* はめん羊のkokシジウムのうち病原性が最も高い種であり、感染による腸内細菌叢の変化や成めん羊の死亡例も報告[2,3,14]されており、今回の調査において本種が農場へ侵入している状況から、本種とクロストリジウム属細菌の混合感染が危惧される。

反芻獣におけるkokシジウムと *Clostridium perfringens* の混合感染は牛で報告されている[15]が、めん羊では明らかになっていない。しかしながら、今回めん羊でもkokシジウム病がクロストリジウム感染症の発生要因となる可能性が示唆されたことから、kokシジウム対策が当該農場で問題となっているクロストリジウム感染症の対策にもつながることが期待される。一方、症例の蓄積やホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本からの PCR による寄生種の同定も今後必要になると考えられる。

現在のところ、当該農場で明確なkokシジウム

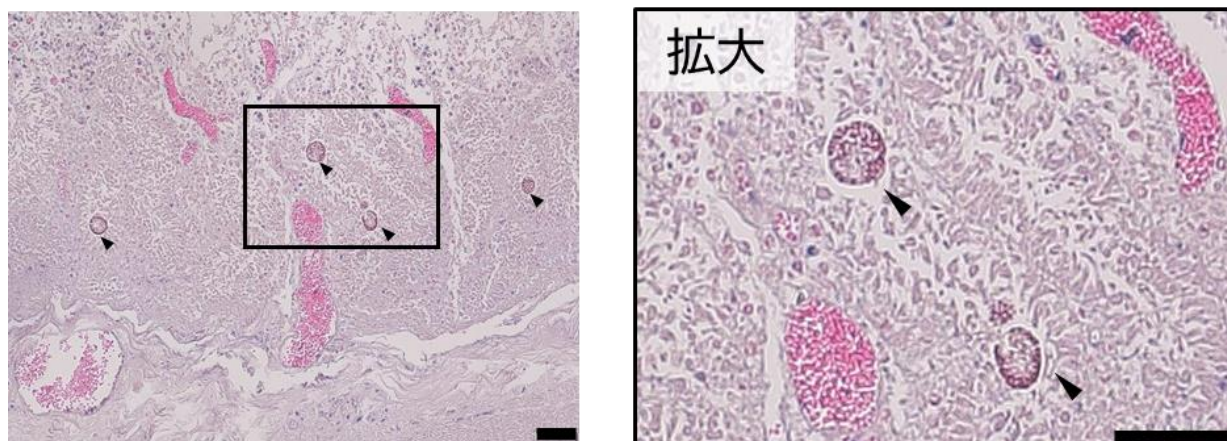


図 6 悪性水腫疑いと診断された肥育めん羊におけるkokシジウムの寄生(小腸、HE 染色)
kokシジウムの寄生を矢頭に示す。小腸粘膜は死後変化により評価不能であった。バー:50 μm。

症の臨床症状を呈する個体は認められず、積極的なコクシジウム対策は行われていない。しかし、本調査により病原性の高い *E. ovinoidalis* が農場へ侵入していることが明らかとなり、生産性への悪影響が懸念された。

したがって、今後、農場へコクシジウムは発育不良による生産性低下やクロストリジウム感染症リスクの増加を招きうることを注意喚起し、コクシジウム対策を実施する必要がある。

対策の具体的な手法としては、羊舎の清掃および消毒による環境中オーシスト数の低減や、抗コクシジウム薬の投与が挙げられる。トルトラズリルはコクシジウム病に有効な薬剤であり、生後 12 - 21 日齢でのトルトラズリル投与によりジクラズリルに比べオーシストの排泄とコクシジウム病罹患率を有意に減少させるという報告がある[16]ことから、この日齢でのトルトラズリル投与を検討したい。

さらに、対策効果の実証とコクシジウムが生産性に及ぼす影響を検討するため、対策実施区と非実施区を設け、OPG、寄生種および増体重の比較も必要と考えられる。

今回得られた結果を農場におけるコクシジウム対策の出発点とし、事故防止や生産性向上に結びつけたい。

参 考 文 献

- [1] 志村亀夫. コクシジウム. 新版獣医臨床寄生虫学(産業動物編), 1995, p. 45-51.
- [2] Andrews A, Andrews AH. Coccidiosis of Sheep MSD MANUAL Veterinary Manual. n.d.
- [3] Chartier C, Paraud C. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. Small Ruminant Research 2012;103:84-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022>.
- [4] Kawahara F, Zhang G, Mingala CN, Tamura Y, Koiwa M, Onuma M, et al. Genetic analysis and development of species-specific PCR assays based on ITS-1 region of rRNA in bovine *Eimeria* parasites. Vet Parasitol 2010;174:49-57. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.001>.
- [5] Alsadoon Z, Haider MS. Morphological and Molecular study of *Eimeria* spp in sheep in Wasit province. 2019. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27179.90407>.
- [6] 鶏病研究会. 鶏コクシジウムの遺伝子検査法およびその混合感染症. 鶏病研報 2016;52:167-74.
- [7] 鳩谷珠希, 亀位徹, 山田陽子, 豊吉久美. 鶏コクシジウム病の診断におけるリアルタイムPCRの活用(第二報). 和歌山県家畜保健衛生・畜産技術検討会 2016.
- [8] Trejo-Huitrón G, Bautista-Gómez LG, Martínez-Castañeda JS, Romero-Núñez C, Trejo-Castro L, Espinosa-Ayala E. Morphological characterization and first molecular identification of the eleven *Eimeria* species that infect sheep from Mexico. Parasitol Res 2020;119:115-22. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06477-6>.
- [9] Ekawasti F, Nurcahyo RW, Nashrulloh MF, Priyowidodo D, Prastowo J. Development of a multiplex polymerase chain reaction technique for detection and discrimination of *Eimeria* spp. In cattle in Indonesia. Vet World 2022;15:975-80. <https://doi.org/10.24245/vetworld.2022.150975>.

[//doi.org/10.14202/vetworld.2022.975-980](https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.975-980).

- [10] Majeed NM, A'aiz NN, Niemah AJ. Molecular study to detect the eimeria species in sheep in al-diwanayah province, Iraq. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 2020;34:377–81. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2019.126064.1225>.
- [11] 富野里櫻子. 管内めん羊飼養農場で発生した銅中毒事例. 第62回秋田県獣医畜産技術研究発表会 2016:15–9.
- [12] Lassen B, Jarvis T, Mägi E. Gastrointestinal parasites of sheep on Estonian islands. Agraarteadus: Journal of Agricultural Science 2013;24:7–14.
- [13] 平 建介. 牛・豚のコクシジウム病と実務的な糞便検査法. 動物の原虫病 2011;26:12–6.
- [14] Olmos LH, Colque Caro LA, Avellaneda-Cáceres A, Medina DM, Sandoval V, Aguirre DH, et al. First record of clinical coccidiosis (*Eimeria ovinoidalis*) in adult sheep from northwestern Argentina. Vet Parasitol Reg Stud Reports 2020;21. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100429>.
- [15] 白川ひとみ, 上野多可子, 牧野淳, 山根俊治, 横山淳史. 壊死性腸炎とコクシジウム病の合併症による肥育牛の死亡事例. 日獣会誌 2001;54:92–4.
- [16] Mundt HC, Dittmar K, Dauschies A, Grzonka E, Bangoura B. Study of the comparative efficacy of toltrazuril and diclazuril against ovine coccidiosis in housed lambs. Parasitol Res 2009;105. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1505-y>.