

## 10. クリプトスポリジウム症の事例と検査方法の検討

豊後大野家畜保健衛生所

○稲垣 望 (病鑑) 山田倫史

久々宮仁三、廣瀬啓二、佐藤文明

### 【はじめに】

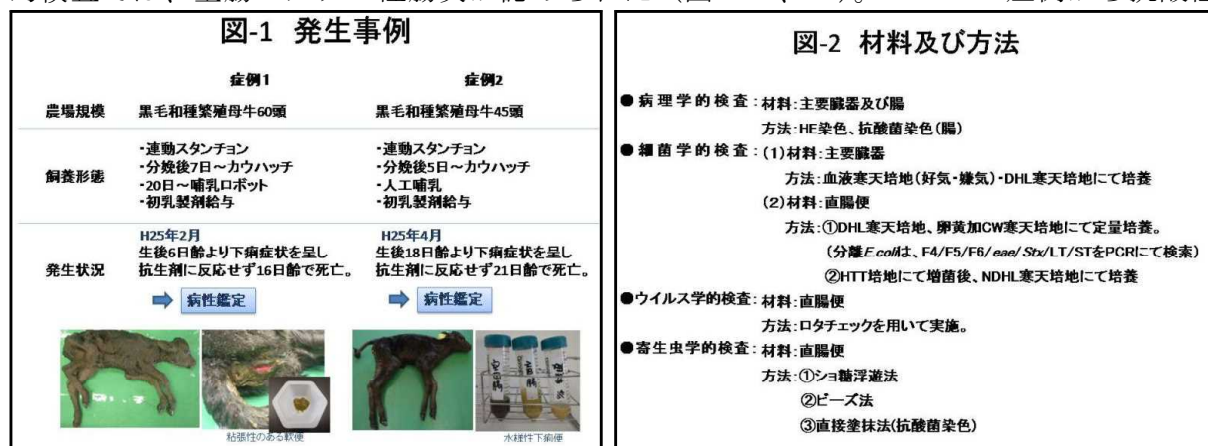
*Cryptosporidium parvum* (Cp) は孢子虫類アイリア亜目に属する原虫で、牛・豚以外にヒト、ネズミ等の哺乳動物にも感染する人獣共通の寄生虫であり、Cp による感染症は有効な治療法もないことから重要な疾病のひとつである。牛における *Cryptosporidium* の保虫率は 2.14%(家畜衛生週報 1997 年)と報告されており、なかでも Cp は主に子牛の下痢症の原因となるが、検査方法に熟練を要すること等から症例報告は少ない。

今回管内で初めて本症による子牛の死亡例を確認し、摘発のための新たな検査方法を検討したのでその概要を報告する。

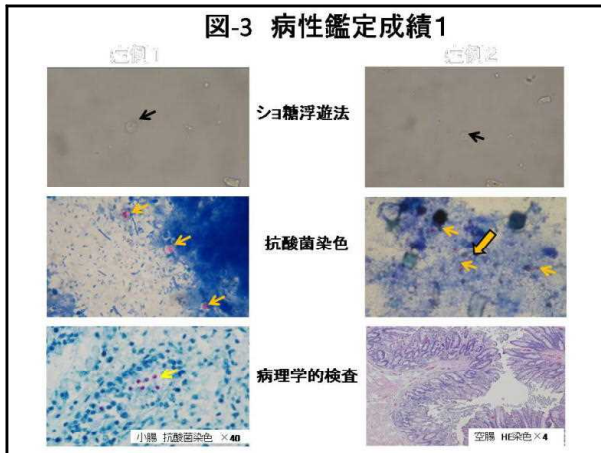
### 【発生状況】

症例 1 は黒毛和種繁殖母牛 60 頭規の農場で、生後 6 日より下痢症状を呈し、抗生剤に反応せず 9 日後に死亡した。病理解剖を実施した結果、寄生虫学的検査において直腸内容物よりシヨ糖浮遊法で微小のオーシストが確認され、抗酸菌染色で抗酸性を示した。また病理組織学的検査では、抗酸菌染色で小腸剥離粘膜上皮を含む滲出物内より抗酸性のオーシストが検出された。

症例 2 は、黒毛和種繁殖母牛 45 頭規模の農場で、生後 18 日より下痢症状を呈し、抗生剤に反応せず 3 日後に死亡した。病理解剖の結果、寄生虫学的検査で直腸内容物からシヨ糖浮遊法にて微少のオーシストを確認し、抗酸菌染色で抗酸性を示した。また病理組織学的検査では、空腸のカタル性腸炎が認められた (図-1、2)。 2 つの症例から抗酸性



のオーシストが確認されたため、直腸内容物を用いて抗 Cp の直接蛍光抗体法を実施したところ発色が確認され、Nested-PCR 法においても Cp の特異遺伝子が確認された。以上のことから、クリプトスポリジウム症と診断した (図-3、4)。



### 図-4 病性鑑定成績2

	症例1	症例2
病理学的検査	小腸のカタル性腸炎 小腸腔内に抗酸性のオーシスト像	小腸のカタル性腸炎
①主要臓器	分離陰性	分離陰性
②直腸便		
細菌学的検査		
<i>Clostridium perfringens</i> (CFU/g)	<10 <sup>2</sup>	<10 <sup>2</sup>
<i>E. coli</i> (CFU/g)	6.0×10 <sup>9</sup> (病原因子: 陰性)	1×10 <sup>9</sup> (病原因子: 陰性)
<i>Salmonella</i>	-	-
ウイルス学的検査	ロタウイルス	-
寄生虫学的検査	抗酸性のオーシスト	+
FA (抗 <i>C. Parvum</i> )		
Nested PCR (1999 Xiaoら)		
症例1	症例2	
M S N	M S N	
2nd	2nd	
819-825bp <i>C. Parvum</i>		
M: 100bp ladder, S: Sample, N: NC		

→ クリプトスポリジウム症と診断

そこで、症例2の農場について、病性鑑定後直ちに2回の浸潤調査を実施した結果、4頭中3頭でCpが確認され、同居牛に広く感染が拡大していることが判明した。また浸潤調査は、ショ糖浮遊法と抗酸菌染色法により実施したが、ショ糖浮遊法で陰性であったものが、抗酸菌染色では陽性となる個体があり、検査法により検出率に差が認められた。さらに、同一個体であってもオーシストの排泄は間欠的であった。

### 図-5 立入検査成績(症例2)

浸潤調査		検査日					
個体名	生年月日	4月18日			4月26日		
		日齢	ショ糖浮遊法	抗酸菌染色	日齢	ショ糖浮遊法	抗酸菌染色
1	H25.3.26	13	-	+	31	-	-
2	H25.3.26	13	-	+	31	-	-
3	H25.4.5	3	-	-	21	-	-
4	H25.4.15				11	-	+

①同居牛に広く感染が拡大  
②検査法により検出率に差  
③オーシストの排泄は間欠的

清浄性確認検査		検査日		
個体名	生年月日	8月23日		
		日齢	ショ糖浮遊法	抗酸菌染色
5	H25.6.25	59	-	-
6	H25.7.4	50	-	-
7	H25.7.20	34	-	-
8	H25.8.9	14	-	+
9	H25.8.6	17	-	-
10	H25.6.2	82	-	-

①常在化の傾向

症例2の農場では、その後消毒の徹底などの衛生管理対策を実施し、4ヶ月後に清浄性確認検査を行ったが、6頭中1頭でCpが確認され、常在化の傾向があることが推察された(図-5)。

#### 【課題と検討内容】

これらの結果より、①検査法の違いで感度が異なることや、一般的なショ糖浮遊法は検査に熟練を要することから、オーシストの検出方法について検討する必要があること、②1997年に行われた全国調査時の管内保虫率は、2.9%であったが、今回連続して2例でクリプトスポリジウム症が確認され、常在化の傾向もみられたこと等から、実際の保虫率はさらに高いことが推察され、管内の浸潤調査を実施する必要性があると考えた(図-6)。

### 図-6 課題と検討

- 今回の2例は、管内初のクリプトスポリジウム症。
- 農場内に広く浸潤しており、清浄化はできていない。
- ショ糖浮遊法は抗酸菌染色より検出率が低かった。
- オーシストの排泄は間欠的であった。

- 検査法の違いで検出率が異なり、一般的なショ糖浮遊法は検査に熟練を要する。
- 1997年に行われた全国調査時の管内の保虫率は、2.9%(全国2.1%)  
→ 実際の保虫率はもっと高いことが推察される。

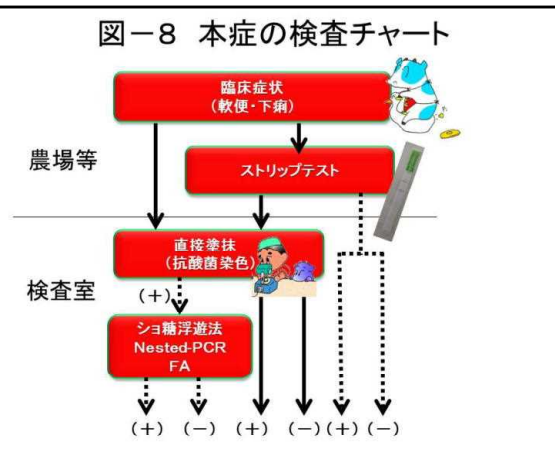
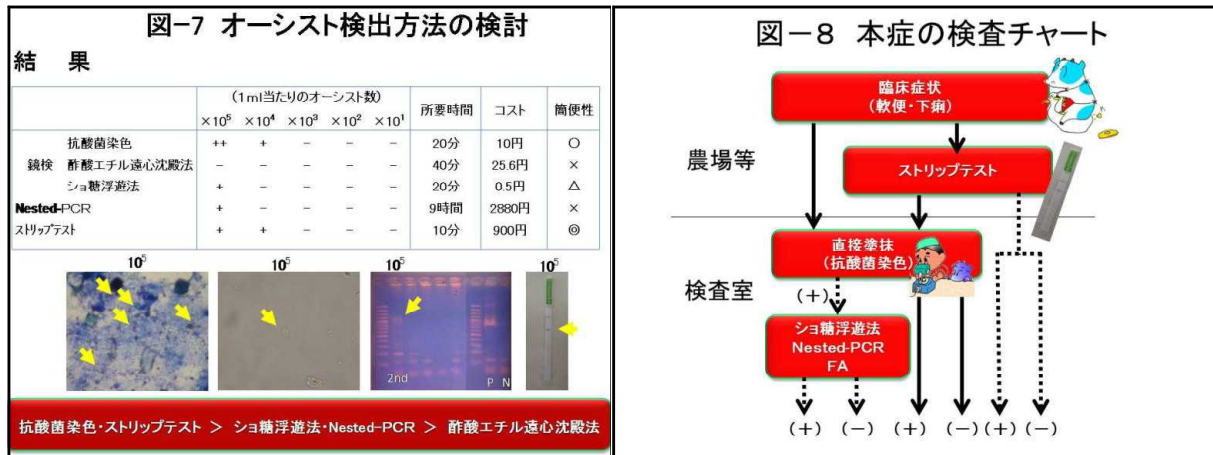
- オーシストの検出: 検査方法による感度試験と簡便化
- 管内の浸潤調査: ELISA法による抗体検索方法の検討

#### ①オーシスト検出方法の検討

症例2の結腸便を材料として、抗酸菌染色の直接塗抹により定量した10～10<sup>5</sup>OPGまでの10段階希釈液に対して、抗酸菌染色による直接塗抹鏡検、MGL沈殿法、ショ糖浮遊法、Nested-PCR(1999 LihuaXIAOらによる)及びストリップテスト(コスモ・バイ)の5種類の方法で検出感度を比較した。

その結果、抗酸菌染色及びストリップでは  $10^4$ OPG から、シヨ糖浮遊法及び Nested-PCR では  $10^5$ OPG から Cp が確認された (図-7)。

これに加え、所要時間、コスト、簡便性を考慮すると、本症の検査チャートとしては、ストリップテストを農場等現場での簡易検査として実施し、最終判定を直接塗抹で行う方法が有用であると考えられた (図-8)。

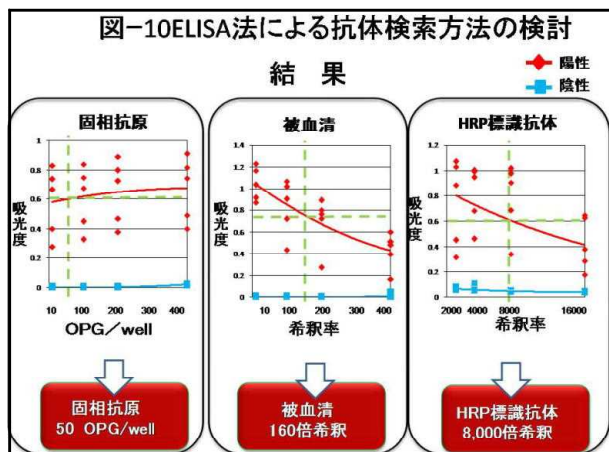
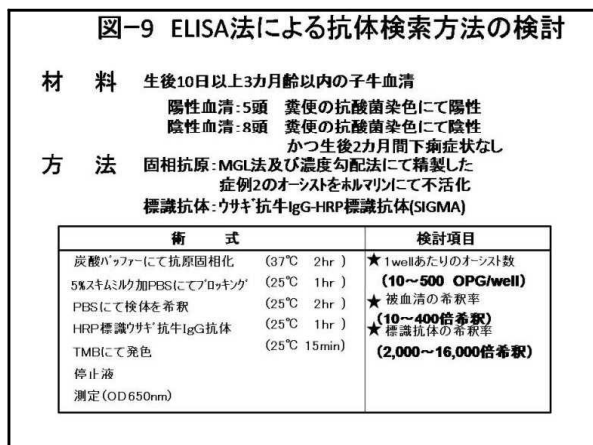


②ELISA法による抗体検索方法の検討

症例2の浸潤調査においてオーシストが間欠的に排泄していたことから、ELISA法による抗体検索方法を検討した。

まず、ELISA法の条件として、固相抗原における1wellあたりのオーシスト数、被血清の希釈率及び標識抗体 (ウサギ抗牛 IgG-HRP 標識抗体(SIGMA)) の希釈率を検討した。被血清は生後10日以上3カ月齢以内の子牛血清を用い、抗酸菌染色で陽性の血清5検体及び陰性血清8検体で実施した。固相抗原は、症例2のオーシストをMGL法及び濃度勾配法にて精製後、ホルマリンで不活化したのものを用いた (図-9)。

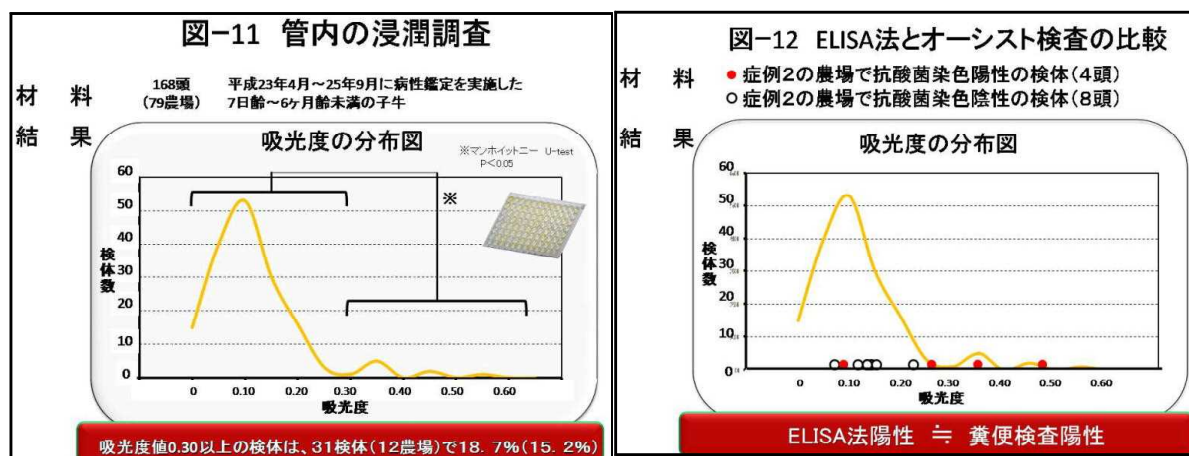
その結果、固相抗原は1wellあたり50OPG、被血清は160倍希釈、HRP標識抗体は8,000倍希釈の条件が最も良好であった (図-10)。



次に、このELISA法により、平成23年4月~25年9月までに管内で病性鑑定を行った7日齢~6ヶ月齢未満の子牛168頭の血清を用い、浸潤調査を実施した。

その結果、吸光度値は2峰性を示し、このグループ間で有意差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。そこでカットオフ値を0.30と設定し、これより高い吸光度は168検体中31検体 (18.7%) であった (図-11)。

また、症例 2 の農場立入検査成績と比較したところ、抗酸菌染色で陽性を示した個体の多くが 0.30 以上の吸光度を示したことから、今回の E L I S A 法は、糞便検査で陽性の検体が摘発できる検査法であると推察した（図-12）。



#### 【結果及び考察】

今回の症例は、管内初のクリプトスポリジウム症であり、農場内に広く感染が拡大していた。農場の立入検査では、検査法の違いにより検出率が異なり、オーシストの排泄は間欠的であった。このため、糞便検査の感度試験を実施したところ、抗酸菌染色及びストリップテストによる検査が最も有用と考えられた。

また、管内の Cp 浸潤調査を行うための E L I S A 法を検討した結果、固相抗原は 1well あたり 50 OPG、被血清は 160 倍希釈、HRP 標識抗体は 8,000 倍希釈が最も良好で、本法による管内の抗体陽性率は、18.7%であった。

今回の E L I S A 法と糞便検査成績を比較したところ、糞便検査陽性検体の多くが、高い吸光度値を示したことから、E L I S A 法による抗体検査は、本症の疫学調査を実施する有効な方法であると推察した。

以上のことから、子牛の下痢症状の病性鑑定では、本症についても検討することが重要であり、その方法は、抗酸菌染色法が有用と考えられた。また、E L I S A 法による、国内の牛の浸潤調査例はないが、本法は疫学調査の方法として有用であると推察され、今後さらに例数を重ね、特異性等について検討していきたい。