

2 と畜場に搬入された牛におけるクリプトスポリジウムの保有状況

豊橋市食肉衛生検査所 ○下司 高弘 菅 麻美子 塚田 真樹
本島 雅昭 細井 美博

はじめに

Cryptosporidium (以下 Cr) は真コクシジウム目に属する原虫で世界中に広く分布する。そのオーシストは塩素耐性を有するため、ヒトの水系感染症として諸外国でも多くの報告がある。わが国では 1994 年に神奈川県平塚市で、1996 年には埼玉県越生町で上水道の *Cryptosporidium parvum* (以下 *C. parvum*) 汚染による集団下痢症が発生している。

近年、家畜における Cr の感染実態が明らかになり、その糞便中に排泄されるオーシストが環境汚染の大きな原因の一つと考えられている。そこで今回、と畜場に搬入された牛を対象に Cr の保有状況を調査し、1997 年から 1998 年に同と畜場で調査された保有状況と比較した。また、オーシストを保有した牛の寄生部位の病理組織学的検索を行ったのでその概要を報告する。

材料及び方法

1 Cr オーシストの保有状況調査

2007 年 6 月から 2008 年 12 月に A と畜場に搬入された牛を、無作為に 2,198 頭 (1 歳以上の肥育牛 1,911 頭、1 歳未満の子牛 77 頭、経産牛 210 頭) 選び、その盲腸便または直腸便を検体とした。オーシストの検出は、シヨ糖遠心沈殿浮遊法で行った。1 頭につき 0.6g の糞便を 2~4 頭分混合し、比重 1.2 のシヨ糖液 10ml に溶解後ガーゼでろ過し、2,000rpm で 5 分間遠心後液面をループ状エーゼでスライドガラス上に採り、カバーガラスを載せて 200~400 倍で鏡検した。大型 (長径約 8 μ m で楕円形) または小型 (直径約 5 μ m で類円形) で、特徴的なピンク色を呈し、内部に顆粒状物質が認められたものを陽性と判定した。陽性と判定した集合検体について、個別検体ごとにシヨ糖遠心沈殿浮遊法を実施し、陽性個体を特定した。また、特定した陽性個体の糞便は 2.5% 重クロム酸カリウム液と混合後 4°C で保存し、後日直接蛍光抗体染色を実施した。直接蛍光抗体染色は、保存材料に 1% 牛血清を滴下し、室温で 10~15 分反応させ、抗体試薬 (ベリタス社 AquaGlog/Cdirect) を滴下、遮光し 37°C で 60 分間反応させた後、PBS で洗浄、乾燥させ、水性封入剤で封入し、落射蛍光顕微鏡でオーシストを確認した。

2 牛の Cr 寄生部位の病理組織学的検索

糞便中から小型及び大型オーシストを検出した牛の第 4 胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸及び結腸を採材し、これらを定法に従い処理し、ヘマトキシリン・エオジン染色及び直接蛍光抗体染色を実施して組織学的に検索した。

成 績

1 Cr オーシストの保有状況

牛 2,198 頭中 89 頭からオーシストを検出し、保有率は 4.0% (前回保有率: 3.6%) であった。検出したオーシストは、86 頭が大型で、3 頭が小型であった。

性別による保有状況は、去勢 1,158 頭中 71 頭 (6.1%)、未経産 803 頭中 16 頭 (2.0%)、経産 210 頭中 1 頭 (0.5%)、雄 27 頭中 1 頭 (3.7%) であった。

品種別保有状況は表 1 のとおりであった。黒毛和種ではオーシストを検出せず、交雑種の保有率が 4.3% と、前回に比べて高い値を示した。

表 1 品種別保有状況

品種	2007 年 6 月～2008 年		1997 年 7 月～1998 年	
	検査頭数	保有頭数 (%)	検査頭数	保有頭数 (%)
ホルスタイン種	706	32 (4.5)	1278	54 (4.2)
黒毛和種	174	0 0	320	7 (2.1)
交雑種	1314	56 (4.3)	652	13 (1.9)
ジャージー種	2	0 0	0	0
ブラウンスイス種	2	1 (50.0)	0	0

月齢別保有状況は表 2 のとおりであった。3 ヶ月齢未満の子牛でオーシストを検出したのは 3 頭 (2 週齢、4 週齢、2 ヶ月齢) で、いずれも小型であり、その保有率は前回に比べて低い値を示した。また、前回の調査でも小型のオーシストを検出したのはすべて 3 ヶ月齢未満であった。

表 2 月齢別保有状況

月 齢	2007 年 6 月～2008 年			1997 年 7 月～1998 年		
	検査頭数	保有頭数 (%)		検査頭数	保有頭数 (%)	
		大型	小型		大型	小型
3 ヶ月齢未満	26	0	3 (11.5)	23	0	8 (34.8)
3～12 ヶ月齢	60	1 (1.7)	0	1	1 (1.3)	0
13 ヶ月齢以上	2,112	85 (4.0)	0	2,151	73 (3.4)	0

農場別では、検査頭数 10 頭以上の 62 農場のうち 30 農場で保有牛を認め (48.4%)、そのうち 10% 以上の保有率を示したのは 7 農場であった (A 農場: 28.6% (14/50 頭)、B 農場: 20.0% (5/25 頭)、C 農場: 18.2% (2/11 頭)、D 農場: 15.8% (3/19 頭)、E 農場: 14.3% (2/14 頭)、F 農場: 12.5% (3/24 頭)、G 農場: 11.3% (7/62 頭))。

季節別保有状況は表 3 のとおりであり、全体での季節性は認められなかった。

表3 季節別保有状況

季節	検査頭数	保有頭数(%)
春季(3～5月)	540	24 (4.4)
夏季(6～8月)	643	27 (4.2)
秋季(9～11月)	497	20 (4.1)
冬季(12～3月)	518	18 (3.5)

2 牛の Cr 寄生部位の病理組織学的検索

小型オーシストを検出した子牛では、回腸絨毛の粘膜上皮細胞の刷子縁に埋没するように、ヘマトキシリンに淡染する球状小体を複数認めた。また、大型オーシストを検出した牛では、第4胃の固有胃腺部の胃小窩において、粘膜上皮細胞の自由縁に接するように同様の小体を多数認めた。また、直接蛍光抗体染色で、それぞれ同部位に発光するオーシストを確認した。

考 察

今回の調査における Cr オーシストの保有状況は、3ヶ月齢未満の子牛での保有率が前回よりも低い値を示したが、全体に対する保有率は前回調査結果とほぼ同様の値であり、10年が経過しても経年変化が少ないことがわかった。また検査頭数10頭以上の農場のうち半数近くが Cr に汚染されており、季節性も認められなかったことから、Cr は生産現場で広く蔓延し、牛は四季を通じてオーシストを排泄していることが示唆され、畜舎や農場の土壌から完全にオーシストが除去されない限り、Cr 保有率は短い振幅で増減を繰り返していくと推測された。また、今回検出された大型オーシストと小型オーシストは、月齢による保有状況、寄生部位及び形態学的相違から、大型の Cr は *Cryptosporidium muris* (以下 *C. muris*)、小型の Cr は *C. parvum* と同定した。なお、今回陽性であった子牛の便の性状はいずれも泥状便で、下痢症を呈している個体はなかった。子牛は生後2週齢前後に Cr の感染率が高くなり、1ヶ月齢を過ぎるとオーシストの排泄が減少するという報告もあることから、今回の陽性個体のいずれも重篤な下痢症の発症にまでは至らなかったと考えられる。

C. muris は免疫不全患者以外ではヒトへの感染報告はなく、牛への影響も増体量の低下以外病原性はないと言われている。一方で、*C. parvum* はヒトや子牛に対し強い病原性を示し、治療には抗生物質や抗コキシジウム薬を含む抗原虫薬、駆虫薬などもほとんど効果を示さないという報告がある。特に免疫不全患者や小児などでは重篤な症状に陥る場合もあり、人畜共通感染症あるいは水系感染症として重要視されている。特に水系感染では、不特定多数のヒトが短期間のうちに感染するため、公衆衛生上重要な問題である。

平成8年10月に厚生労働省生活衛生局がとりまとめた「クリプトスポリジウム等原虫類総合対策」を受けて、当所においても家畜における保有状況の調査を開始し、その実態が解明されつつある。今後も幼齢牛を対象に調査を継続し、*C. parvum* が検出された飼養農家に対しては糞便処理方法や畜舎環境の改善法などについて注意喚起を施し、また未発生農家に対しても家畜の飼養衛生管理方法について啓蒙していくことで、家畜の感染防止及び家畜糞便による環境汚染の拡大を防ぐ一助としていきたい。