

総説

管内の下痢を呈した子牛における腸内細菌叢の判定と クリプトスポリジウム感染状況調査

島田 亘¹⁾、羽石敬史¹⁾、齋藤雄太¹⁾、水野ミキ²⁾

- 1) 千葉県農業共済組合連合会中央家畜診療所
(〒 299-0126 千葉県市原市天羽田 736)
- 2) 千葉県農業共済組合連合会南部家畜診療所
(〒 294-0005 千葉県館山市安東 86)

連絡担当者：島田 亘

Tel:0436-66-8111 Fax:0436-66-8110

E-mails:chuo@nosai-chiba.or.jp

【要 約】

子牛の下痢の原因は、細菌、ウイルス、原虫の感染によるものや食餌性の消化不良によるものなどが考えられるが、日常の診療では原因を特定しないまま抗生物質の投与を続ける治療を長期化させている例も見られる。そこで、今回我々は2014年4月から2015年3月の1年間、往診依頼があった60日齢以下の子牛473頭について腸内細菌叢と寄生虫の感染状況を調査した。腸内細菌叢の判定は、糞便を直接塗抹した後、グラム染色により行い、寄生虫の検出はウイスコンシン変法により行った。その結果、腸内細菌叢は正常細菌叢が72.5% (473頭中343頭)、グラム陰性菌主体が16.7% (473頭中79頭)、グラム陽性菌主体が10.8% (473頭中51頭)であった。また、寄生虫の感染は、クリプトスポリジウム (以下Cr) が49.5% (473頭中234頭)、コクシジウムが2.5% (473頭中12頭)であった。下痢の主な原因であると考えていたグラム陰性菌による下痢は比較的少ないと思われ、Crが子牛下痢の原因の約半数から検出されたことから、初診時や下痢が長引いている場合には、糞便の腸内細菌叢の判定や寄生虫検査を行うことにより、抗生物質の乱用を防ぎ、今後の治療方針の決定や的確な治療に結びつくと思われた。

キーワード：ウイスコンシン変法、クリプトスポリジウム、子牛下痢症、腸内細菌叢、糞便直接塗抹検査法

【材料および方法】

1. 調査期間

2014年4月から2015年3月。

2. 調査対象

管内の下痢を呈した1～60日齢以下の子牛

473頭 (ホルスタイン種、交雑種および黒毛和種)。

3. 調査方法

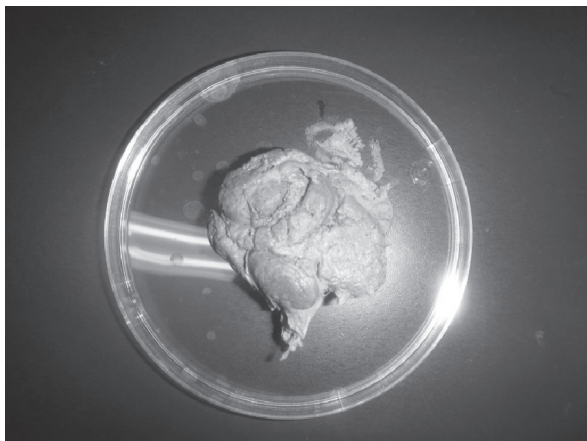
腸内細菌叢の調査は、園部らの方法 [12] を参考に行った。初診時に直腸検査用手袋を装着し調査対象牛の直腸内から直接採取した。糞便は10gを定量し重量比で約1:1になるように水道水で希釈・混和した後、スライドグラスに

受理：2015年11月2日

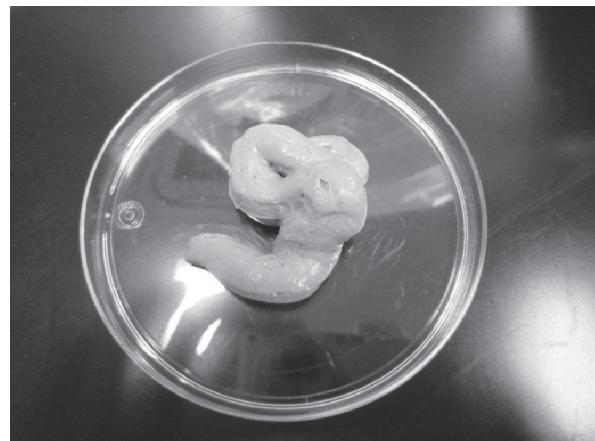
一白金耳塗抹，火炎固定し，グラム染色を実施した。グラム染色は，市販の染色キット（フェイバーGセット，日水製薬株式会社）を用いた。判定は染色後，光学顕微鏡によって，油浸レンズを用い1,000倍下で鏡検した。腸内細菌叢の判定はおおまかに1視野中の菌数をカウントし，様々な種類の細菌が観察されたものを正常細菌叢とし，同一染色性・同一形態を示す菌が1視野中に多く見られた場合を異常とした。寄生虫はウイソコンシン変法にて検出した。光学顕微鏡400倍にて10視野以上を検査し，Crオーシストが1つ以上検出されたものをCr陽性と判定した。糞便を図1に示したように性状別で4段階（スコア1:正常便，スコア2:軟便，スコア3:泥状便，スコア4:水様便）にスコアリングした。

4. 調査項目

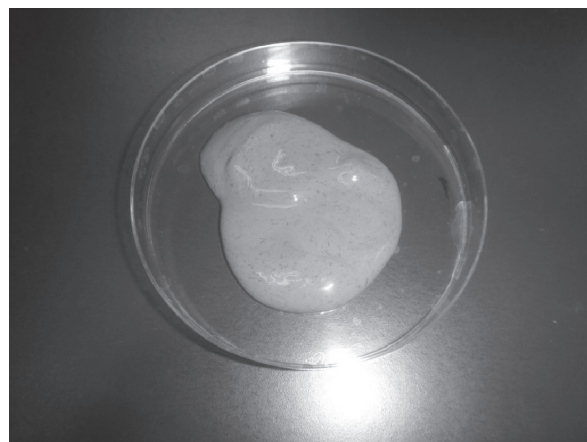
- 1) 下痢発症子牛の糞便の腸内細菌叢およびCr検出状況を調査した。
- 2) 下痢発症子牛における生後日齢別，月別のCr検出頭数を調査した。
- 3) 使用B点数・薬価点数・診療回数・補液回数をカルテより調査した。
- 4) Cr陽性・陰性別の死亡率を調査した。
- 5) Crが検出された農家を「検出あり農家」，下痢を呈したが検出されなかった農家あるいは下痢の診療依頼がなく検査しなかった農家を「検出なし農家」として下痢発症率（下痢発症率 = 検出頭数 / 出生頭数）を比較した。



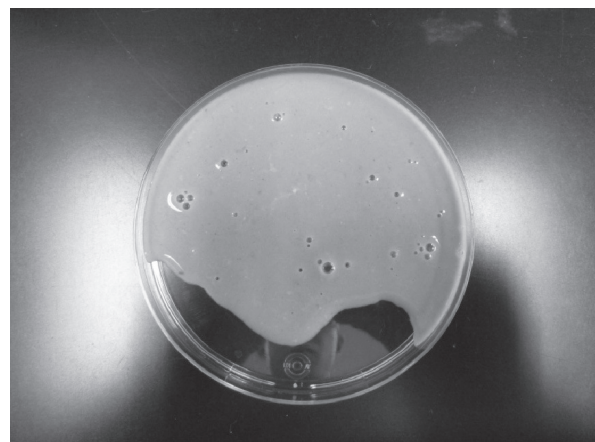
スコア1：正常便



スコア2：軟便



スコア3：泥状便



スコア4：水様便

図1 糞便スコア

[結果]

下痢発症子牛における腸内細菌叢の判定およびCr検出状況を表1に示した。腸内細菌叢を判定した結果, 正常細菌叢が72.5% (343/473), グラム陰性菌主体が16.7% (79/473), グラム陽性菌主体が10.8% (51/473)であった。また, 寄生虫はCrが49.5% (234/473)と約半数感染していた。コクシジウムは2.5% (12/473)であった。また, Cr陽性群の平均下痢発症日齢は10.3 ± 4.3日であり, 陰性群の21.1 ± 13.5日に比べ有意に低かった。

表1 子牛下痢症における細菌検査およびCr検出状況

n=473	Cr検出あり	Cr検出なし
頭数(頭)	234(49.5%)	239(50.5%)
平均発症日齢(日)	10.3 ± 4.3 ^{**}	21.1 ± 13.5 ^{**}
正常細菌叢(頭)	164	179
グラム陰性菌(頭)	43	36
グラム陽性菌(頭)	27	24

^{**}p < 0.01

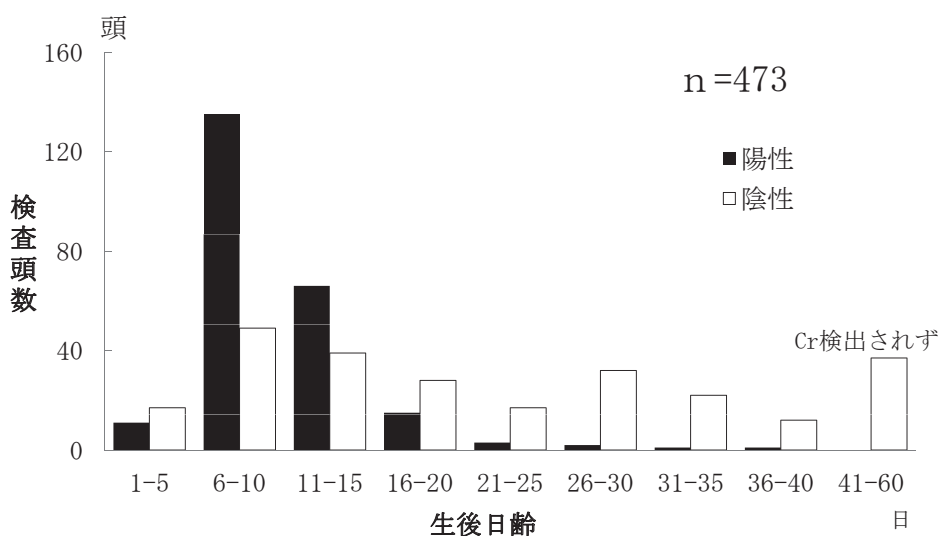


図2 下痢発症子牛における生後日齢別のCr検査頭数

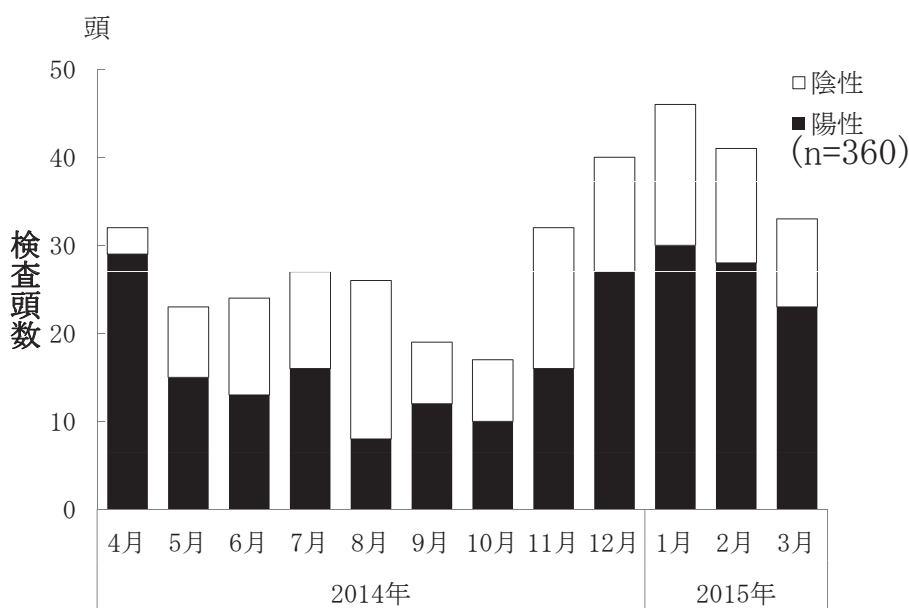


図3 下痢発症子牛における月別のCr検査頭数 (20日齢以下)

下痢発症子牛における生後日齢別のCr検出頭数を図2に示した。Crが検出された頭数は6～10日齢で最も多く、その後は減少していき41日齢以降では検出されなかった。また、Cr陽性子牛の97.0% (227 / 234) が20日齢以下であったため、以降の検証については20日齢以下を対象とした。尚、20日齢以下の下痢発症子牛のうち、Cr陽性率は63.1% (227 / 360) であった。

下痢発症子牛における月別のCr検出頭数を図3に示した。Cr陽性率は4月が高く8月が低い傾向にあったが、年間を通じてCrの検出が認められた。

診療病日における糞便スコア3以上の割合の推移を図4に示した。Cr陽性群・陰性群ともに第1病日では糞便スコアが3以上の割合は80%以上であり第13病日には0%となったが、陽性群は陰性群に比べて便性状の改善に時間がかかる傾向にあった。

Cr陽性・陰性別に使用B点数・薬価点数・診療回数・補液回数を比較すると、補液回数以外の3項目でCr陽性が陰性に比べて、いずれも有意に高かった(図5)。腸内細菌叢の判定結果と合わせると、Cr陽性でグラム陽性菌が主体だった下痢で補液回数がやや多かったものの、他の項目では差が見られなかった(図6)。

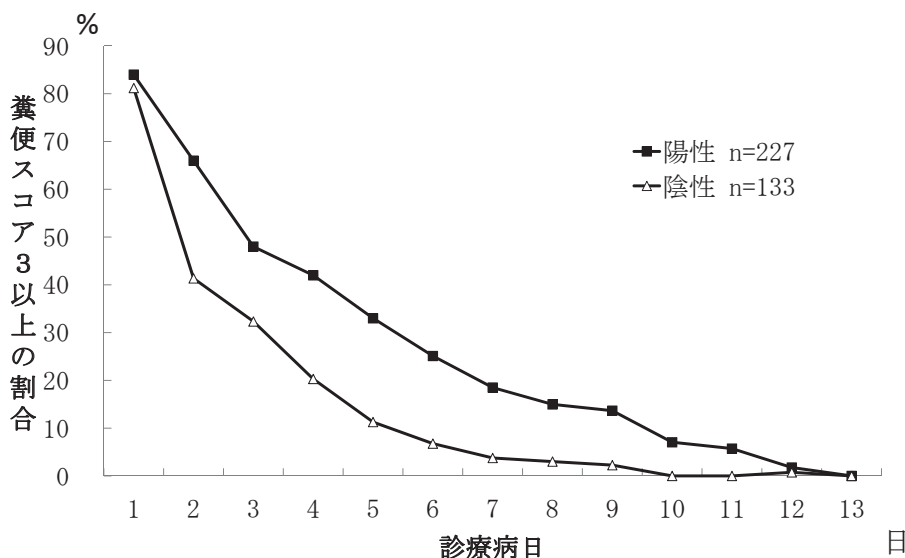


図4 診療病日における糞便スコア3以上の割合の推移 (20日齢以下)

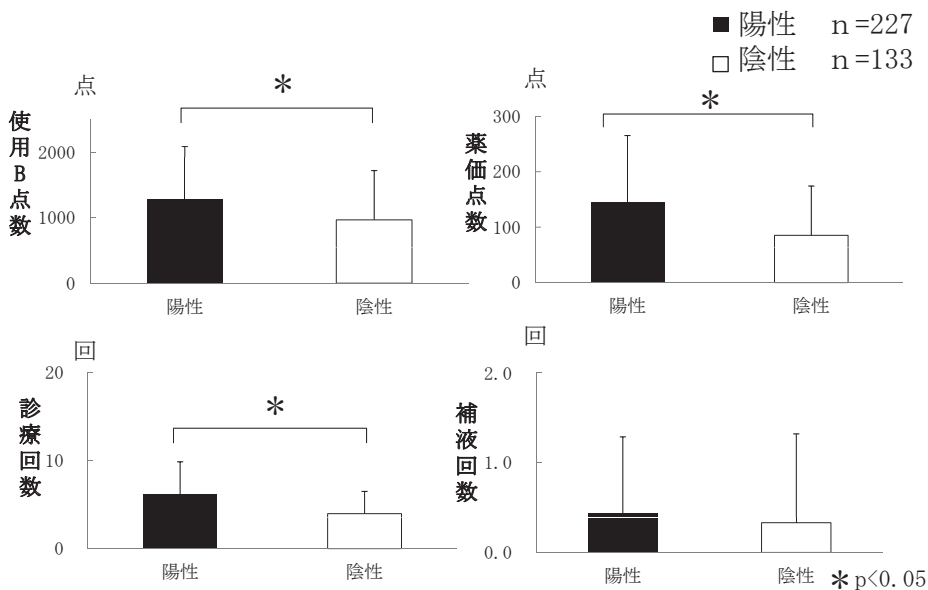


図5 Cr要請・陰性別の使用B点数・薬価点数・診療回数・補液回数の比較 (20日齢以下)

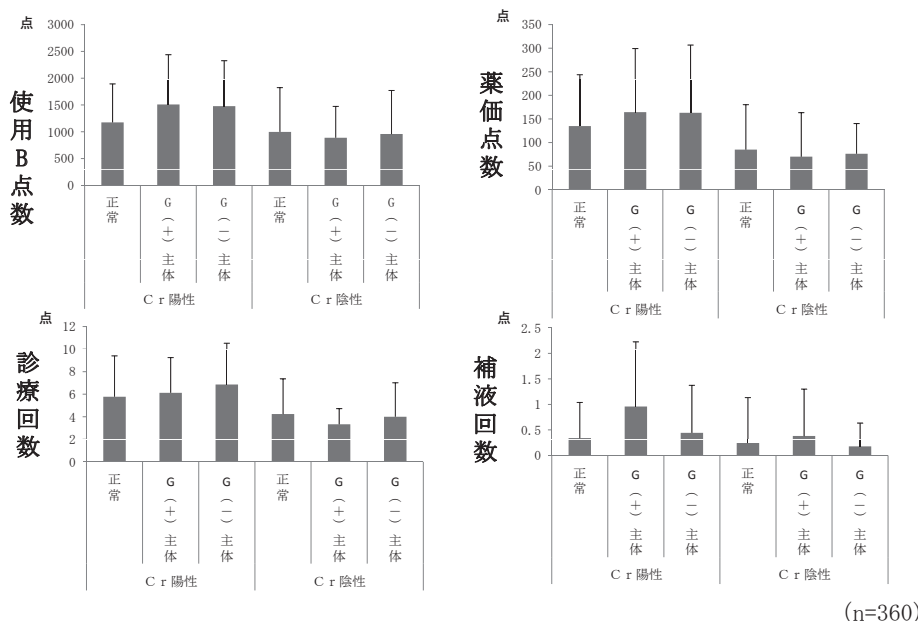


図6 細菌検査結果別の使用B点数・診療点数・回数・補液回数 (20日齢以下)

Cr陽性・陰性別の死亡率を表2に示した。陽性群で2.6%，陰性群は2.3%であり有意差はみられなかった。

管内の農家86戸のCr感染状況とCr検出の有無による下痢発症率を表3に示した。「検出あり農家」は42戸、「検出なし農家」は44戸(Crが検出されなかった農家13戸+下痢の診療依頼がなかった農家31戸)であり、下痢発症率は「検出あり農家」で優位に高かった。

表2 Cr陽性・陰性別の死亡頭数と死亡率 (20日齢以下)

	Cr陽性 n=227	Cr陰性 n=133
死亡頭数(頭)	6	3
死亡率(%)	2.6	2.3

表3 Cr検出あり・なし農家別の下痢発症率

	検出あり農家	検出なし農家	
		検出なし	下痢の診療依頼なし
農家戸数(戸)	42	13	31
下痢発症率(%)	28.5 (336 / 1180)	3.8 (24 / 634)	

(下痢発症率=検査頭数/出生頭数)

【考察】

下痢の原因について以前ちばNOSAIでアンケートを実施したところ、グラム陰性菌によるものと考えて治療を開始していると回答した人が多かった。また、下痢の原因をCrの感染と考えている回答はなかった。

しかし、腸内細菌叢の判定をすると、正常細菌叢が72.5%と最も多く、グラム陰性菌が主体と思われた下痢は10.8%であった。食物は、摂取されて消化管を通過していく間に消化吸収されていく。消化管各部位で環境条件が違いそれぞれ最も適した菌種が増殖しては移送されており、連続培養管となっている [6]。哺乳している子牛の腸内細菌叢は、多少の個体差はあるもののさまざまな細菌が混在しているのが正常細菌叢であり、そのバランスが崩れると偏った細

菌叢になっていた。その原因として哺乳しているミルクの汚染や環境中にある汚染されたものを食べてしまうことが考えられたが、下痢の主な原因として考えていた細菌感染による割合は低いと思われた。

国内における Cr の感染状況についてはいくつか報告があり、北海道石狩地方の 120 日齢までの子牛の調査では 23% (25 / 107) [7]、宮城県では 2 ~ 90 日齢の下痢症を呈した子牛の 5.6% (5 / 90) [10]、千葉県東部地域では 1 ヶ月齢以下の子牛の 11.9% (5 / 42) [2]、および大規模な全国一斉調査では 1 ヶ月齢未満の子牛で 2.65% [8] の検出率であったと報告している。今回の千葉県内の当家畜診療所管内での調査では 49.5% と他の報告よりも高い検出率であり、管内農家でも約半数の農家に Cr が浸潤していることが確認された。これらの報告と今回の調査結果から、Cr は全国的に浸潤している可能性が示唆される。

また子牛における Cr の発症は 1 ヶ月齢以下が多く、1 週齢から 2 週齢がピークとされている [11]。Cr 検出頭数のピークは 6 ~ 10 日齢でありそのほとんど (97.0%) が 20 日齢以下、平均発症日齢も 10 日前後であった。稀に 100 日齢や 8 ヶ月齢の個体でも Cr が検出されたという報告 [3] もあるが、今回の調査で Cr は 41 日齢以降では検出されなかった。Cr のプレパテントピリオドを考えると、Cr の感染のほとんどは出生後間もない時期 (生後 0 ~ 1 日) から 1 ヶ月齢以内であると考えられる。

Cr の感染に季節性はなく年間を通じて検出されたものの、Cr は単独感染以外に細菌やウイルスと混合感染することが知られており、混合感染した場合には重篤化しやすく死亡することもあるといわれている。今回の調査では、細菌感染によって重症化した例はなかったと考えられた。重症化を防ぐには、細菌感染の原因として哺乳させているものからなのか、環境性のものからなのかを見極めて、感染経路を絶ってやるのが重要だと考えられた。

Cr 感染症の死亡率は、板倉らの報告では 32.1% (9 / 38) [3]、佐藤らは 7.8% (7 / 90) [10] と報告しているが、今回の死亡率は 2.6% と低く、Cr 検出の有無による死亡率には差が見られなかった。また、ウイルスの調査は実施して

いないため、死亡率については混合感染も含めたさらなる検討が必要であると思われた。

牛に寄生する Cr には小腸寄生性 (小型) の *C. parvum*, *C. bovis*, *C. rynae* と第四胃寄生性 (大型) の *C. andersoni* の 4 種が知られており、小腸寄生性の Cr を顕微鏡観察下での形態的差異によって区別するのは困難である。今回検出された Cr は形態学的な分類は行っていないが、高病原性である *C. parvum* は 1 ヶ月齢以下の子牛にのみ認められるという報告 [11] と、症状や発症日齢から小腸寄生性の *C. parvum* である可能性が高いと考えられる。

Cr に感染した子牛は糞便中に多量のオーシストを排出し、排出されたオーシストは自然環境中、特に水中や湿潤環境中では数ヶ月以上死滅しないと言われている [9]。また、一般的に市販されている消毒剤の通常使用の濃度ではほとんど抵抗性を示すため [1]、Cr オーシストに汚染された農場を清浄化するのは困難である。さらに有効な治療方法がないことから、Cr 陽性の子牛は陰性の子牛よりも便性状の改善に時間を要し、その結果診療が長引き薬剤の使用量もより多くなる傾向があると示唆された。

Cr は出生後間もない時期から感染していることが予想され、分娩直後から出生子牛の衛生管理には十分注意する必要があると考えられる。Cr は一旦農場に侵入すると下痢が頻発し感染拡大が懸念される上に、子牛の発育遅延や治療の長期化など農家の経済的損失は大きいものと考えられる。Cr が検出された農場から Cr を完全に排除するのは困難であり、いかに農場への Cr の侵入を阻止できるかが重要である。

下痢症を呈した子牛の診療の際に細菌性によるものなのか、また農場での Cr 検出により適切な治療や飼養管理を行うためにも糞便検査は非常に重要であると感じた。今後はウイルスの混合感染についての調査を行うとともに、Cr の清浄化対策および予防についても検討すべきであると考えられる。

[引用文献]

- [1] Fayer, R. 1997. The general biology of *Cryptosporidium*. In *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis, Fayer R. Ed., CRC Press, Boca Raton, p1.
- [2] 古屋聡子、村上覚史、斉藤基雄ら. 1997. 子牛のクリプトスポリジウム症の発生と千葉県東部地域における乳牛の本原虫浸潤調査. *Journal of Animal Protozooses* 11:13-16.
- [3] 板倉智敏、藤原三男、大内紀章ら. 1985. 子牛のクリプトスポリジウム感染症. *日獣会誌*. 38 (12) : 796-801.
- [4] 家畜共済における臨床病理検査要領. 1997. 全国農業共済協会, 東京, 528-537.
- [5] 前出吉光、小岩政照. 2002. 新版 主要症状を基礎にした牛の臨床. デーリィマン社, 北海道, 282-288.
- [6] 光岡知足. 1980. 腸内菌の世界, 叢文社, 15-24.
- [7] Murakoshi, F., Tozawa, Y., Inomata, A. et al. 2013. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from calves in Ishikari District, Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med.* 75 (7) :837-840.
- [8] 農林水産省畜産局衛生課. 1997. 家畜衛生週報, 2480: 5-6.
- [9] Robertson, L. J., Campbell, A. T., Smith, H. V. et al. 1992. Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (11) :3494-3500.
- [10] 佐藤 繁、南館君夫、高橋清治ら. 1987. 宮城県内の下痢症子牛におけるクリプトスポリジウム感染. *家畜診療*, 285:17-20.
- [11] 志村亀夫. 2001. クリプトスポリジウム症. *研究ジャーナル*, 24 (8) :41-45.
- [12] 園部隆久. 2007. *家畜診療* .54 (9) :553-557.

The infection status of intestinal flora and cryptosporidium among calves with diarrhea within the jurisdiction

Toru Shimada¹⁾, Takashi Haneishi¹⁾, Yuta Saito¹⁾ and Miki Mizuno²⁾

1) Chiba Prefectural Agricultural Mutual Aid Association Federation Central Veterinary Clinical Center

2) Chiba Prefectural Agricultural Mutual Aid Association Federation Southern Veterinary Clinical Center

Contact person: Shimada Toru

Chiba Prefectural Agricultural Mutual Aid Association Federation Central Veterinary Clinical Center

Amouda 736, Ichihara, Chiba 299-0126, Japan

Phone: 0436-66-8111 Fax: 0436-66-8110

E-mail: s-chuo@nosai-chiba.or.jp

[Abstract]

There are a variety of causes of neonatal calf diarrhea, such as dietary indigestion and the infection of bacteria, viruses, and protozoa. Yet, antibiotics are often administered for a prolonged period of time without specifying its causes in a daily clinical practice. Therefore, we investigated the infection status of intestinal flora and parasites among 473 calves from birth to 60 days of age from April 2014 through March 2015. A smear of stool was examined using Gram's staining method for detecting intestinal flora. The detection of parasites was done by the modified Wisconsin method. On the intestinal flora normal bacteria flora, gram-negative bacteria, and gram-positive bacteria were found out in 343 (72.5%), 79 (16.7%), and 51 (10.8%) among 473 calves, respectively. On the infection of parasites cryptosporidium (Cr) and coccidium were found out in 234 (49.5%) and 12 (2.5%) among 473 calves, respectively. The results showed that diarrhea by gram-negative bacteria was not so common although it has been considered that it was one of the main cause of neonatal calf diarrhea. The finding that Cr was detected in about a half of cases suggests that the detection of intestinal flora and parasites in stool samples contributes to decide on courses of treatment and prevent the abuse of antibiotics at the first medical examination or when diarrhea is persistent.

Key words: calf diarrhea, cryptosporidium, direct smear fecal examination, intestinal flora, modified Wisconsin method