総　説

クリプトスポリジウムの基礎と応用、そして今後の課題

松林　誠

大阪公立大学大学院　獣医学研究科
〒598-8531 大阪府泉佐野市りんくう往来北1番地の58
TEL：072-463-5056
FAX：072-463-5093
E-mail: matsubayashi@omu.ac.jp

［要　約］
クリプトスポリジウムは、ヒトや動物の消化管に寄生する原虫である。主な症状は、水様性の下痢であるが、子牛では致死性の病態をたどることが少なくない。今なお、著効を示す治療薬やワクチン投与を含む予防法等は開発されていない。治療としては、対症療法を実施し、自然治癒を待つしかない。感染個体からは、多量のオーシストが糞便と共に排出される。このオーシストは、各種消毒薬にも耐性を有し、環境中で長期間生存できる。そのため、生産現場での清浄化は困難を極め、感染個体が出た農家では、継続的に感染を繰り返すことになる。本原虫に関しては、診断、治療そして環境対策、さらに基礎、応用研究、いずれにおいても課題が多い。本稿では、未だその予防や治療法が確立していないクリプトスポリジウムによる感染症について、基本情報、診断における注意点、また今後の課題等を含め紹介する。

キーワード：牛、課題、クリプトスポリジウム、診断

【はじめに】

クリプトスポリジウムは、ヒトや動物の消化管に寄生する原虫で、主に下痢を引き起こす。1990年代までは、獣医学関連のテキストにも掲載されておらず、一般には知られていない原虫であった。感染個体からは、オーシストと呼ばれる虫体が糞便と共に多量に排出される。当初は、オーシストが比較的小型でヒトや動物の小腸に寄生するものとして *Cryptosporidium parvum*、大型でマウス等の齧歯類の胃に寄生する *C. muris* の2種類が主に存在するとされていた。しかし、その後、様々な動物種から検出され、さらに分子生物学的手法により詳細な解析がなされ、現在は44種、120以上の遺伝子型があるとされている［4］。

クリプトスポリジウムが国内で広く知られる事となった契機は、1994年、神奈川県平塚市、そして1996年に埼玉県の生越町で発生したヒトの集団感染事例である。それぞれ、461人［2］と8,812人［6］の感染者が出ており、クリプトスポリジウムが人獣共通寄生性原虫として着目されるようになった。いずれの場合も、同原虫が混入した水道水が原因であり、そのため感染者数が多くなっている。水を介して感染するために水系感染症、また当時は、新興感染症とも呼ばれた。ちなみに、世界最大規模の事例は、1993年、米国のウィスコンシン州のミルウォーキーで発生した集団感染事例で、40万人以上の感染者が出た［3］。

クリプトスポリジウムのオーシストの直径は

受付：2024年10月1日
受理：2024年10月1日

約5～8μmであり、糞便から検出される他の寄生虫卵や原虫のオーシストやシストと比較して極めて小さい。また、上水の消毒に使用される塩素に対して耐性を有し、アルコール等の一般に使用できる消毒薬でも不活化できない。そのため、浄水システムにおいて濾過装置の設置、紫外線照射等の対策が実施され、水道水を介した集団感染事例は減少している。しかし、近年、生産現場、特に牛農家でのクリプトスポリジウムによる感染が問題となっている。本稿では、未だその予防や治療法が確立していないクリプトスポリジウムによる感染症について、基本情報から診断における注意点、また今後の課題等を含め紹介する。

【生活環】

感染個体の糞便と共に多量のオーシストが排出される。オーシストの内部にはスポロゾイトと呼ばれる感染型虫体が4つ包蔵されており、排出直後から感染性を有している。これを経口的に摂取すると消化管内でスポロゾイトが脱殻し、消化管粘膜の上皮細胞の微絨毛に侵入する。細胞質内、さらに粘膜深層には寄生しない。そして、無性生殖を行い、メロントとよばれる虫体を形成する。このメロント内部には、新たな侵入型虫体であるメロゾイトが8つ形成され、放出される。このメロゾイトは、再度、消化管粘膜に侵入し、メロントを形成して4つのメロゾイトを包蔵する。この2回の無性生殖の後、雄型とされるミクロガメート、雌型のマクロガメートと分化し、接合後、最終的にオーシストを形成する。この時、オーシスト壁の薄いものと厚いものが形成される。前者のオーシストは、糞便と共に外界には出ず、消化管内でスポロゾイトが脱殻して消化管粘膜に侵入し、上記の生活環をたどる（自家感染）。

【症状】

成牛で症状が出る事は少なく、子牛では白色から黄白色の水様性下痢を呈する。これに伴い、元気消失、食欲減退、脱水や発熱等がみられる。症状は10日程続き、快方に向かうが、子牛ではこの間に致死する場合がある。

【診断】

糞便中のオーシストを検出する。方法は、比重約1.2のショ糖液を用いて浮遊法を実施する。参考までに、筆者らは図に示すような方法で、浮遊後はカバーガラスを用いずにニクロム線ループにより上層面を回収している（図1）。上述した通り、クリプトスポリジウムのオーシストは微小であるため、浮遊法を実施した後、顕微鏡下での観察には注意が必要である。つまり、カバーガラスとスライドガラスの間で浮遊するオーシストの検出は難しい。そのため、スライドガラスに上層を回収してカバーガラスをのせた後、液量にもよるが、5～20分程度、乾燥を防ぐために少量の水を入れた箱等で静置する（図2）。この時、回収されたオーシストは、カバーガラスの直下まで自然に浮遊する。観察の際には、カバーガラスの直下にピントを合わせる。少しでもピントがずれている場合は、カバーガラスの直下のオーシストは検出できない。さらに、ショ糖液中では、オーシストは淡いピンク色を呈する。また、4つのスポロゾイトを確認することは困難であるが、オーシスト内部には、残体とよばれる構造物が、黒い小さな点として確認できることが多い。同様の形態、大きさで酵母が検出されるが、これらは薄い緑色を呈する。顕微鏡のコントラストや光源の種類等により、薄いピンク色に見えない場合もあるが、クリプトスポリジウムのオーシストの検出には有用である。これまで、ショ糖浮遊法で陰性と判定された検体について、筆者が依頼を受けて観察した結果、オーシストが検出された例が数多くある。浮遊法は容易ではあるが、検出にはピントを合わせる等の顕微鏡操作が重要となる。

浮遊法以外に、抗酸染色による検査法もあるが、特異性は低いとされている。また、蛍光顕微鏡が必要であるが、オーシスト壁を染色するモノクローナル抗体が市販されている。特異性が高く、ポジティブコントロールも同封されており、有用である。また、検出感度は不明であるが、近年は、テストストリップ型の簡易キットも活用できる。

牛に寄生するクリプトスポリジウムは、*C. parvum*、*C. bovis*、*C. ryanae*、そして *C. andersoni*

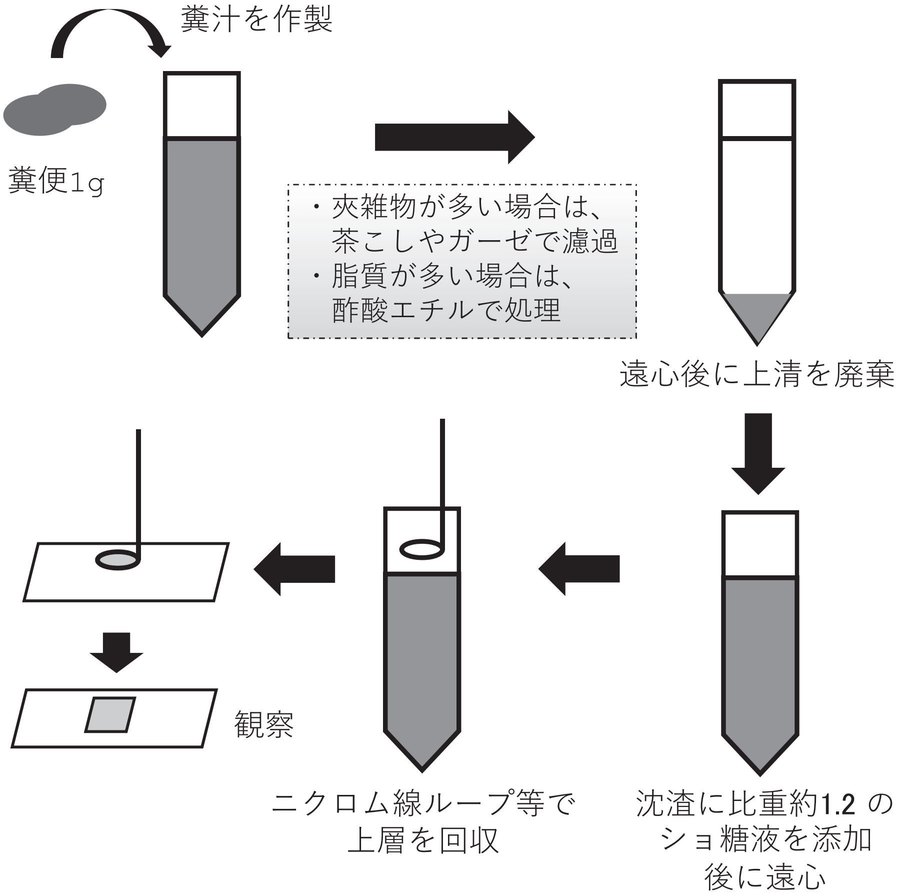

図1　ニクロム線ループによるショ糖遠心浮遊法の概要
遠心後にショ糖を添加し、再度遠心した後、ニクロム線ループを用いて、上層部を回収する。最表面のオーシストを効率良く、簡便に回収できる［5］。観察のポイントは図2を参照。

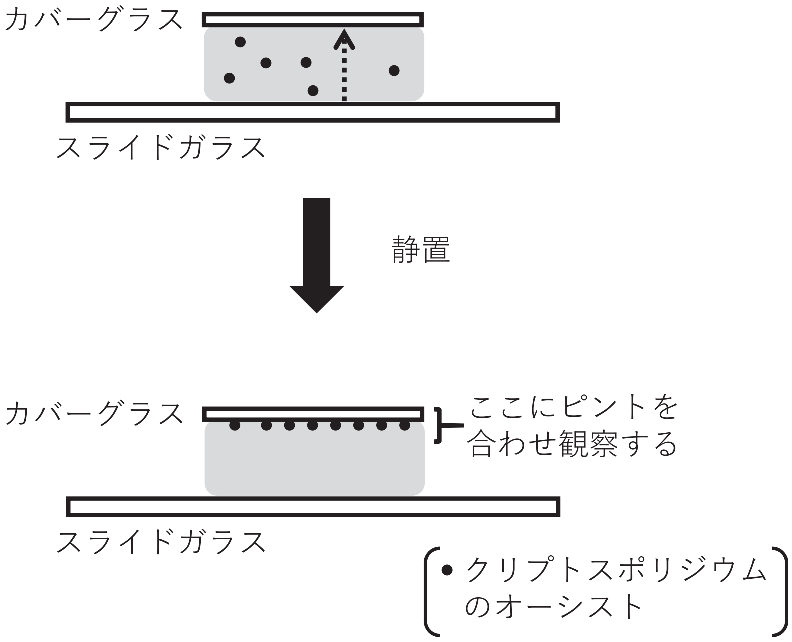

図2　ショ糖浮遊法により上層を回収した後の観察のポイント
湿潤箱等で5～20分程度静置し、オーシストをカバーガラスの直下まで自然浮遊させる。顕微鏡での観察では、カバーガラスの直下にピントを合わせる。

の4種が知られている［1］。*C. parvum* は、主に2カ月齢までの子牛で検出されることが多く、下痢症状を引き起こし、病態が悪化した場合、致死的となる。ヒトにおいても感染例が多いのは、この *C. parvum* である。*C. bovis* と *C. ryanae* は、4週齢以降、6カ月齢までの子牛で感染が多い。前3種は小型のオーシストであり、小腸に寄生する。*C. andersoni* は離乳後の子牛、または成牛で感染がみられる。オーシストは大型であり、第四胃に寄生する。特に前3種は、オーシストの形態のみからは鑑別できず、種の同定は、PCR等の分子生物学的手法を用いる必要がある。

【治療および感染対策】

現在のところ、著効を示す駆虫薬やワクチン等の予防法もない。そのため、補液等の対症療法や乳酸菌製剤の投与による下痢症状の改善を試み、自然治癒を待つ。現在、サプリメントや卵黄抗体製剤等の給与も試みられている。

クリプトスポリジウムのオーシストは、環境中において数カ月以上も生存可能である。そのため、オーシストが飼育環境中に存在することになるため、継続的、または断続的に飼育牛が感染し、発症することになる。

防除は、感染源対策としてオーシストを排出している感染個体の特定、そして、非感染個体との隔離が必要である。そして、環境対策として、残存する糞便を取り除き、洗浄する。オーシストは各種消毒薬に耐性を有するが、乾燥には弱い。そのため、十分な乾燥期間を設ける事が必要である。また、加熱により不活化できるため、対策が必要な規模が小さい場合には、熱湯やスチームクリーナー等による処理も有効である。ただし、糞便塊が残っていると、熱が内部まで伝わりにくいため、事前に除去することが必須である。また、石灰乳の塗布は、オーシストを封じ込めるため有効である。

【今後の課題】

クリプトスポリジウムは、現在のところ、マラリアやトキソプラズマ等の同門の原虫とは異なり、試験管内で培養ができない。そのため、試験材料の確保には、海外の製薬企業からの購入、野外の感染牛からの採取、または当所属ラボのように免疫不全マウスに実験感染させて糞便を回収して精製し、準備するしかない。そのため、同門の他の原虫と比較して、外部遺伝子を組み込む、または欠損させて解析を行う遺伝子操作技術も大きな遅れをとっている。

さらに、クリプトスポリジウムのオーシストは微小であるため、糞便中に含まれるオーシストの定量評価も難しい。そこで、当研究室では、迅速、簡便に糞便中のオーシスト数を定量できる方法の開発に取り組んでいる。また、培養細胞にクリプトスポリジウムを感染させても全生活環を再現することはできないが、メロントを形成させるまではできている。しかし、感染虫体のカウントに多大な労力がかかっているため、これについても省力化を試みている。本プレゼンテーションでは、これらの経過を報告すると共に、現在、鹿児島大学や長崎大学等と共同で進めているワクチンや駆虫薬の開発等についても、時間のある限り紹介したい。

【引用文献】

［1］ Bartley, P.M., Standar, J.H. and Katzer, F. 2023. Genetic characterisation of *Cryptosporidium parvum* in dairy cattle and calves during the early stages of a calving season. Curr. Res. Parasitol. Vector Borne Dis. 5 : 100160.

［2］ 黒木俊郎 , 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志朗, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣 勲, 井関基弘. 1996. 神奈川県内で集団発生した水系感染 *Cryptosporidium* 症. 感染症学雑誌. 70：132-140.

［3］ 真砂佳史. 2007. 米国におけるクリプトスポリジウム症. モダンメディア. 53：40-48.

［4］ Ryan, U., Feng, Y., Fayer, R. and Xiao, L. 2021. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia*–a 50 year perspective (1971–2021). Int. J. Parasitol. 51:1099-1119.

［5］ Takano, A., Morinaga, D., Teramoto, I., Hatabu, T., Kido, Y., Kaneko, A., Hatta, T., Tsuji, N., Uni, S, Sasai, K., Katoh, H. and Matsubayashi, M. 2024. Evaluation of the detection method by a flotation method using a wire loop for gastrointestinal parasites. Vet. Med. Sci. 10:e70007.

［6］ Yamamoto, N., Urabe, K., Takaoka, M., Nakazawa, K., Gotoh, A,, Haga, M., Fuchigami, H., Kimata, I. and Iseki, M. 2000. Outbreak of cryptosporidiosis after contamination of the public water supply in Saitama Prefecture, Japan, in 1996. Kansenshogaku Zasshi 74:518-526.

Basic and applied information on cryptosporidiosis, and problems in the future

Makoto Matsubayashi

Faculty of Veterinary Medical Sciences, Osaka Metropolitan University
598-8531 1-58 Rinku Ourai Kita, Izumisano city, Osaka, Japan
TEL: +81-72-463-5056
FAX: +81-72-463-5093
E-mail: matsubayashi@omu.ac.jp

【Abstract】

Cryptosporidium spp. are protozoan parasites which infect intestinal mucosa of humans and animals. The parasites mainly cause watery diarrhea in the infected hosts, sometimes resulingt in the death especially in calves. So far, effective drugs and prevention measures against the parasites are not available. Numerous oocysts are shedded in the feces of the hosts, and they possess tolerance to disinfectants and can survive in the environment. Because it is difficult to inactivate or remove the oocysts, these oocysts can be potential source of infections in the farms for a long period. Now, many problems in diagnoses, therapies, or environmental controls remain unresolved. Here, to contribute to understanding of these parasites, basic and applied information and problems in the future are summarized.

Keywords: cattle, *Cryptoporidium*, diagnosis, problem