

総説

クリプトスポリジウム症の疫学情報および IgY を用いた予防対策について

水戸康明

所属機関名：岡山県農業共済組合 備中家畜診療所
所在地住所：〒719-0303 岡山県浅口郡里庄町浜中 93 番地 269
連絡責任者：水戸康明
所属：岡山県農業共済組合 備中家畜診療所
住所：〒719-0303 岡山県浅口郡里庄町浜中 93 番地 269
電話番号：0865-64-4141
FAX：0865-64-2926

【要約】

新生子牛のクリプトスポリジウム (Cr) 症は *Cryptosporidium parvum* の感染によって引き起こされ、下痢症を起こすことが問題である。Cr 症の適切な予防を行なうためには、本疾病の疫学的な特徴を把握する必要がある。そこで、岡山県内の子牛の Cr 症の発生状況を調査した。下痢便中に Cr が検出された子牛の多くは 30 日齢未満であり、Cr 陽性の子牛の診療回数は Cr 陰性の子牛と比較して多いことが分かった。Cr に対するワクチンや原因療法に使える薬品が市販されておらず、治療期間が長引いていることが原因であると考えられた。新生子牛の病原体に対する感染防御には母子免疫が重要であり、母牛の Cr に対する抗体保有状況は新生子牛の Cr 発症に影響すると考えられる。そこで Cr に対する抗体保有状況を調べたところ、母牛の抗体保有状況は全体的に低いものであった。これは母牛への Cr 感染の割合が低いためであると考えられた。母牛の Cr に対する抗体保有率は低いため、初乳中の抗 Cr 移行抗体も少ないものと考えられる。Cr のワクチンも市販されておらず、Cr に特異的な免疫による予防は難しい。そこで、Cr 抗原 (P23) で免疫した鶏から作製した鶏卵黄抗体 (Immunoglobulin Yolk : IgY) を経口投与することで受動免疫を行い、下痢症の予防効果について検討した。IgY を投与した群では投与していない群と比べて、粘液便、軟便、下痢の発生割合が低く、Cr の検出率は低かった。これらの結果は IgY が Cr の下痢症に対する予防に有用である可能性を示唆している。

キーワード：子牛、下痢、クリプトスポリジウム症

はじめに

牛のクリプトスポリジウム (Cr) 症は、原生動物界アピコンプレクサ門アイメリア亜目クリプトスポリジウム科に分類される原虫によって引き起こされる感染症である。人畜共通の病原体として公衆衛生上問題となっているが、産業

動物分野では特に *Cryptosporidium* (Cr) *parvum* によって引き起こされる新生子牛の下痢症が問題となっている。Cr による下痢を発症した個体から大量のオーシストが排出され、環境中に排出されたオーシストを他の子牛が経口摂取することにより感染が広がる。子牛から排出されたオーシストは半年から 1 年間生存可能であり長期間環境中に存在しているので、同じ場所で子牛を飼養すると新規導入した子牛に感染し、下痢症の発症が継続する可能性がある。

受付：2024年10月1日

受理：2024年10月1日

それでは子牛を導入する前に消毒すればよいと考えるが、オーシストは一般的な消毒薬（塩素系、ヨード系、逆性石鹼など）は効果が期待できない。すなわち、これらの消毒薬の使用では環境中からオーシストを排除することが難しい。また、Cr に有効な駆虫薬は市販されておらず、効果的な治療法はない。ワクチンも市販されていないことから免疫学的な予防も難しい現状にある。

岡山県内における Cr による 子牛下痢症の発生調査

Cr 症の適切な予防を行なうためには、本疾病の疫学的な特徴を把握する必要がある。そこで、岡山県における Cr 症の発生状況を調査した。2017 年 9 月～2021 年 3 月の間に下痢を発症した 2～257 日齢の子牛 411 頭の糞便 418 検体（黒毛和種：123 検体、F1：120 検体、ホルスタイン種：169 検体、その他：6 検体）を対象に Cr 検出用ストリップテスト（DipFit Cryptosporidium sp, コスモバイオ社、東京）及び牛ロタウイルス A（RVA）検出用ストリップテスト（DipFit Bovine Rotavirus, コスモバイオ社、東京）を用いて検査を実施した。家畜共済病傷カルテから子牛の診療回数、発症日齢、品種、診療年月日、転帰（死亡もしくは治癒）などの情報を収集し、Cr 症の発症に相関する因子を統計学的に解析した。品種と死亡率（死亡転帰数 / 全転帰数、転帰不明なものは除く）、診療回数（5 回未満もしくは 5 回以上）、発症日齢（30 日齢未満もしくは 30 日齢以上）、転帰、発症季節（10～3 月もしくは 4～9 月）、性別については χ^2 独立性の検定を行なった。診療回数と初診日齢に関しては Mann-Whitney の U 検定を用いて解析した。統計解析ソフトは Statcel4 を用いた。

Cr の抗原検出検査による陽性率（陽性検体数 / 検査検体数）は 29.5%（127/418）であった。品種別の Cr の陽性率は黒毛和種 14.6%（18/123）、F1 45.8%（55/120）、ホルスタイン種 32.0%（54/169）であり、黒毛和種、F1 と黒毛和種とホルスタイン種間で 1% の有意水準で有意差認められ、F1 とホルスタイン種間で 5% の有意水準で有意差が認められた。また、RVA の抗原検出検査による陽性率は 22.4%

（94/418）であり、一部の検体 4.54%（19/418）では RVA との混合感染が確認された。Cr 陽性群（以下、陽性群）の平均診療回数は 8.59 ± 7.43 回、平均発症日齢は 10.73 ± 6.35 日、死亡率 13.2%（15/114）であり、一方 Cr 陰性群（以下、陰性群）の平均診療回数は 5.87 ± 5.02 回、平均発症日齢は 31.02 ± 42.01 日、死亡率 10.3%（28/271）であった。陽性群と陰性群の間で平均診療回数と平均発症日齢に有意差（ $p < 0.001$ ）が認められた。また、診療回数（5 回未満もしくは 5 回以上 $p < 0.001$ ）、発症日齢（30 日齢未満もしくは 30 日齢以上、 $p < 0.001$ ）、性別（ $p = 0.03$ ）で有意差が認められた。死亡率に有意差は認められなかった。

品種間では黒毛和種での発症が少なく、次いでホルスタイン種、F1 の順番であった。F1 の Cr 陽性率が高かった要因として、今回の疫学的解析でも示されたが 30 日齢以上の子牛では Cr 症がほとんどみられないことが影響していると考えられる [3, 6]。本県においては酪農家で生産された F1 は出生後 30 日以内に出荷されることが多いため、診療する牛は 30 日未満の牛が多い。黒毛和種では、市場出荷の 8～9 カ月齢まで飼養することが多いことから 30 日齢以上の牛も診療することになり、Cr 陽性率が低下したものと考えられた。また、性別については、ホルスタイン種の雄も 30 日齢未満で出荷されることが多いことから、先の理由と同様に Cr 陽性率がメスより高くなったものと考えられた。また、もう一つの理由として、和牛繁殖農家と酪農家の飼養頭数規模の違いがあげられる。剣崎らは飼養頭数が多くなるほど、Cr 陽性割合が高かったと報告している [1]。本県における肉用牛と乳用牛の飼養頭数の違いを共済加入牛成牛頭数で調べたところ、1～10 頭飼養している農家の割合は乳用牛で 6.8% に対して肉用牛では 55.3% であり、肉用牛では飼養頭数が少ない農家が多かった。飼養頭数の違いにより黒毛和種の Cr 陽性率が低く、F1、ホルスタイン種で Cr 陽性率が高かったのではないかと考えられた。また、Cr 陽性群の平均診療回数は陰性群より多かった。これは、Cr の治療には原因療法として使える医薬品が発売されていないことから、対症療法に頼らざるをえないことから治療が長引いているものと考えら

れた。さらに陽性群における発症日齢は低く、幼若な牛で発症していることが治療を長引かせる要因のひとつであると考えられた。

岡山県内における Cr に対する 抗体保有状況調査

Cr 症は幼若子牛で発症率が高く、ほとんどが1カ月齢以内に発生している。新生子牛の病原体に対する感染防御には母子免疫が重要であり、母牛の Cr に対する抗体保有状況に影響すると考えられる。そこで、岡山県内に飼養されている牛における Cr の抗体保有状況を調査した。試験検体には、1.9～10.0歳の乳用種母牛（ホルスタイン種 87 検体、ジャージー種 21 検体）の血清 108 検体、1.2～14.2歳の黒毛和種母牛の血清 17 検体、59～322日齢の子牛 11 検体を用いた（平成 28 年 8 月～12 月の期間に採材）。*C. parvum* オーシストを固相抗原とした ELISA 法にて抗 Cr IgG 抗体の検出を行った。なお、山田らの報告をもとに、カットオフ値は ELISA OD 値 0.3 以上を抗 Cr 抗体陽性とした [8]。

抗 Cr 抗体価（血清中 ELISA OD 値）は、乳用種母牛の 62.0%、黒毛和種母牛の 94.1% が 0.3 以下を示し、子牛では 11 例中 10 例で 0.3 以下であった。今回、母牛における抗 Cr 抗体の保有状況は、全体的に低いものであった。佐伯らの報告によると兵庫県下で飼育されていた屠場搬入牛の糞便における Cr の検出結果は、*C. muris* が 1.5% (9/582)、*C. parvum* が 0.2% (1/582) であった [5]。また、鈴木らの報告では静岡県内の屠場に搬入された 2 歳以上の成牛の糞便における Cr の検出結果は 2.8% (14/500) であり、すべて *C. muris* であった [7]。これらの報告からも成牛で Cr に感染している割合は低いものであり、今回の抗体検査結果と一致していた。母牛が Cr に野外感染している割合が低い状況を反映したのと考えられた。しかしながら、新生子牛の感染防御は初乳を介した母子免疫が重要である。母牛の抗体が初乳を介して移行するため、初乳中の抗 Cr 移行抗体も少ないと考えられる。新生子牛に対して受動免疫の賦与が少ないことが、Cr 症の下痢が他の原因によって生じる下痢と比較して重症化する原因の一つと考えられた。

IgY を用いた子牛下痢症予防対策

母子免疫を含む受動免疫を利用した下痢症対策として、母牛への下痢症に対するワクチン注射、免疫初乳の連続給与、代用初乳や初乳サプリメントの給与が行われている。しかしながら、母牛の Cr に対する抗体保有率も低く、Cr のワクチンは市販されていないため Cr に特異的な免疫による予防は難しい。そこで、Cr 抗原 (P23) で免疫した鶏から作製した鶏卵黄抗体 (Immunoglobulin Yolk : IgY) を経口投与することにより受動免疫を行い、下痢症の予防効果について検討した。IgY 体内動態の確認試験から、IgY を新生子牛へ投与すると IgY が血中へ移行し、糞便中からも検出された。野外の農場で下痢症の予防効果と投与方法を検討した。

試験には母牛の初乳を摂取していない出生直後の黒毛和種子牛を用いた。出生直後から IgY 含有製剤 5g を 1 日 2 回 6 日間、計 12 回投与した群の 5 頭【連続投与群】、初回の代用初乳投与時に IgY 含有製剤 60 g を 1 回投与した群の 10 頭【1 回投与群】を試験群とした。初回の代用初乳投与時に牛初乳乳清製剤 100 ml を投与した群の 4 頭【初乳乳清群】を対照群とした。各個体から糞便を生後 5 日以内、2 週後、4 週後に採取し、血液を生後 5 日以内に採取した。採血した血液から血清分離し、ELISA 法による総 IgY 濃度測定と抗 Cr 抗体 (P23) に対する抗体検査を行なった。糞便については、病原体検出検査と ELISA 法による総 IgY 濃度測定と抗 Cr 抗体 (P23) に対する抗体検査を実施した。病原体の検出には、Cr は直接蛍光抗体 (FA) 法、RVA はイムノクロマト法検査キット、K99 線毛産生大腸菌とサルモネラは細菌培養を実施した後、免疫血清による凝集試験を実施した。試験群にて脱水や水様性下痢など重度の臨床症状を呈した牛はおらず、試験採材時の糞便の状態、粘液便や軟便から軽度の下痢を呈したものを異常便の排泄陽性とした (図 1)。

【初乳乳清群】が【1 回投与群】よりも 2 週後において異常便陽性の割合が有意に高く、異常便からは主に Cr が検出された (表 1)。糞便の病原体検出検査では Cr がすべての群の 2 週後と 4 週後で検出されたが、Cr の検出率は

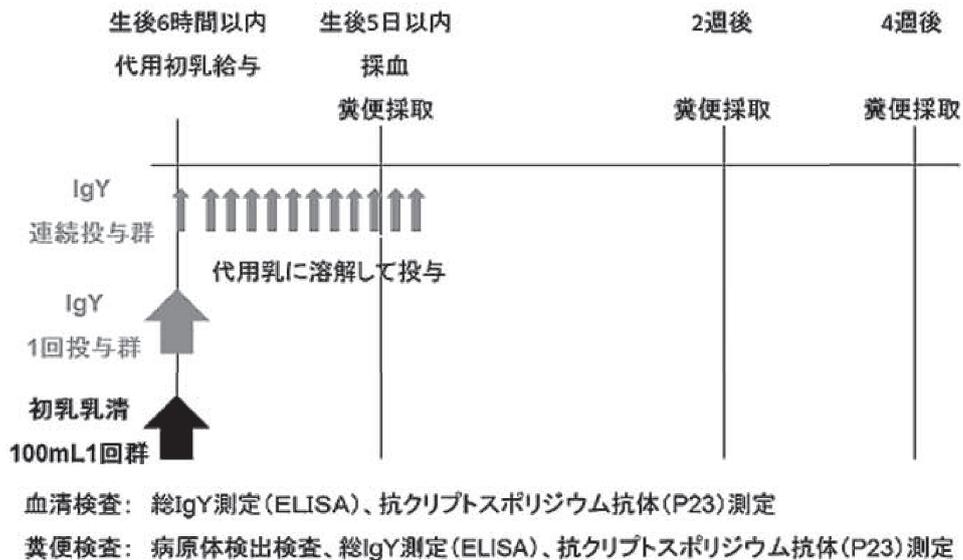


図1 試験スケジュール

表1 採材時の糞便の性状

群	採材時期		
	出生後	2 週後	4 週後
IgY 連続投与	0/5	2/5 (K99大腸菌、 クリプトスポリジウム)	0/5
IgY 1回投与	0/10	1/10 ^a (なし)	2/10 (クリプトスポリジウム)
初乳乳清	0/4	4/4 ^b (クリプトスポリジウム)	1/4 (クリプトスポリジウム)

(粘液便、軟便～下痢陽性頭数/試験頭数) ()内は異常便の検出病原体

ab群間: P<0.01

IgY 含有製剤を投与した群で低い値を示し、【連続投与群】および【1回投与群】ともに【初乳乳清群】と比べて2週後で有意差を認めた(表2)。また、FA法によるCrオーシスト定量検査の結果においても、【1回投与群】のほうが【初乳乳清群】より2週後で有意に低い値を示した(図2)。生後1～5日齢における血清中総IgY濃度は、【1回投与群】が【連続投与群】より高い値であり、糞便中総IgY濃度は【連続投与群】が【1回投与群】より高い値であった(図3)。加えて、抗Cr P23 IgYのELISA値についても総IgY濃度と同様の傾向を示した(図4)。【初乳乳清群】の血清および糞便検体から

IgYは検出されなかった。本試験に用いたIgY含有製剤には、Crが腸粘膜細胞に付着と侵入する際に関与するとされている共通糖タンパクP23に対する抗体が含まれており、in vitro試験にて付着侵入阻害効果等が報告されている[2, 4]。今回の試験結果より、本IgY含有製剤を出生直後に経口投与したことで抗Cr P23 IgYが子牛の血清中や糞便中にも検出されており、この抗体がCrの腸粘膜細胞への付着侵入を阻害しCr症による下痢を予防したと示唆された。

表2 糞便中の病原体検査結果

群	採材時期	Rota Virus	<i>Cryptosporidium</i>	K99 <i>E.coli</i>	<i>Salmonella</i>
IgY 連続 投与	出生後	0/5	0/5	1/5	0/5
	2週後	0/5	1/5 ^a	1/5	0/5
	4週後	0/4	1/4	0/4	0/4
IgY 1回 投与	出生後	0/10	0/10	2/10	0/10
	2週後	1/10	2/10 ^b	0/10	0/10
	4週後	0/10	7/10	2/10	0/10
初乳 乳清	出生後	0/4	0/4 ^c	0/4	0/4
	2週後	0/4	4/4	0/4	0/4
	4週後	0/4	4/4	0/4	0/4

ab,ac群間P<0.05

陽性頭数/試験頭数

Log10 oocyst/g

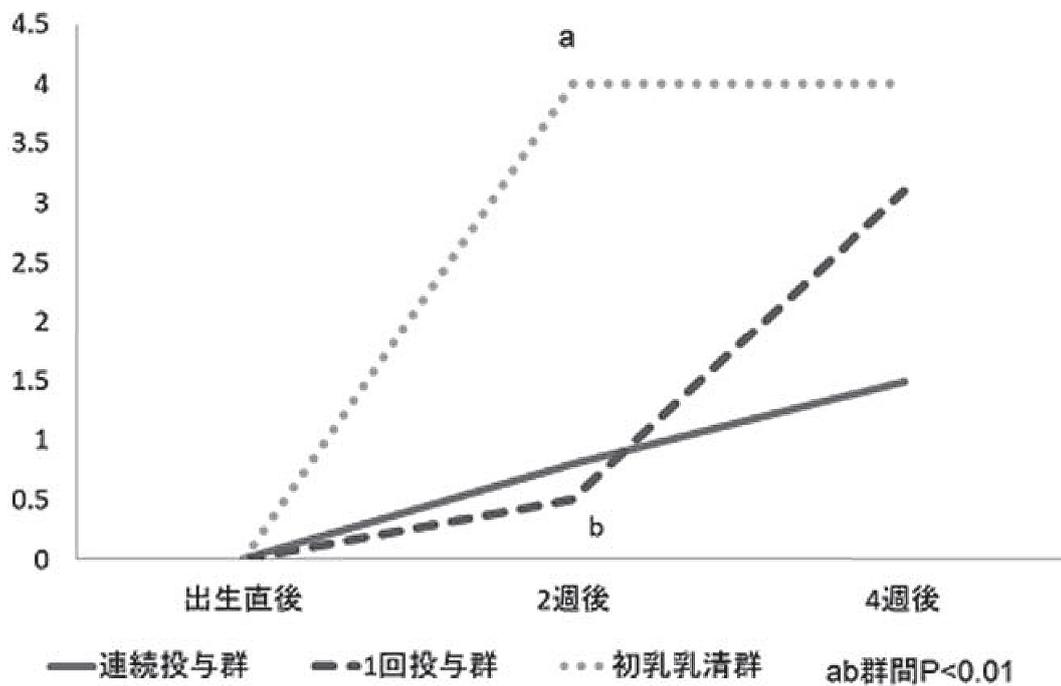


図2 クリプトスポリジウムオーシストの定量検査結果

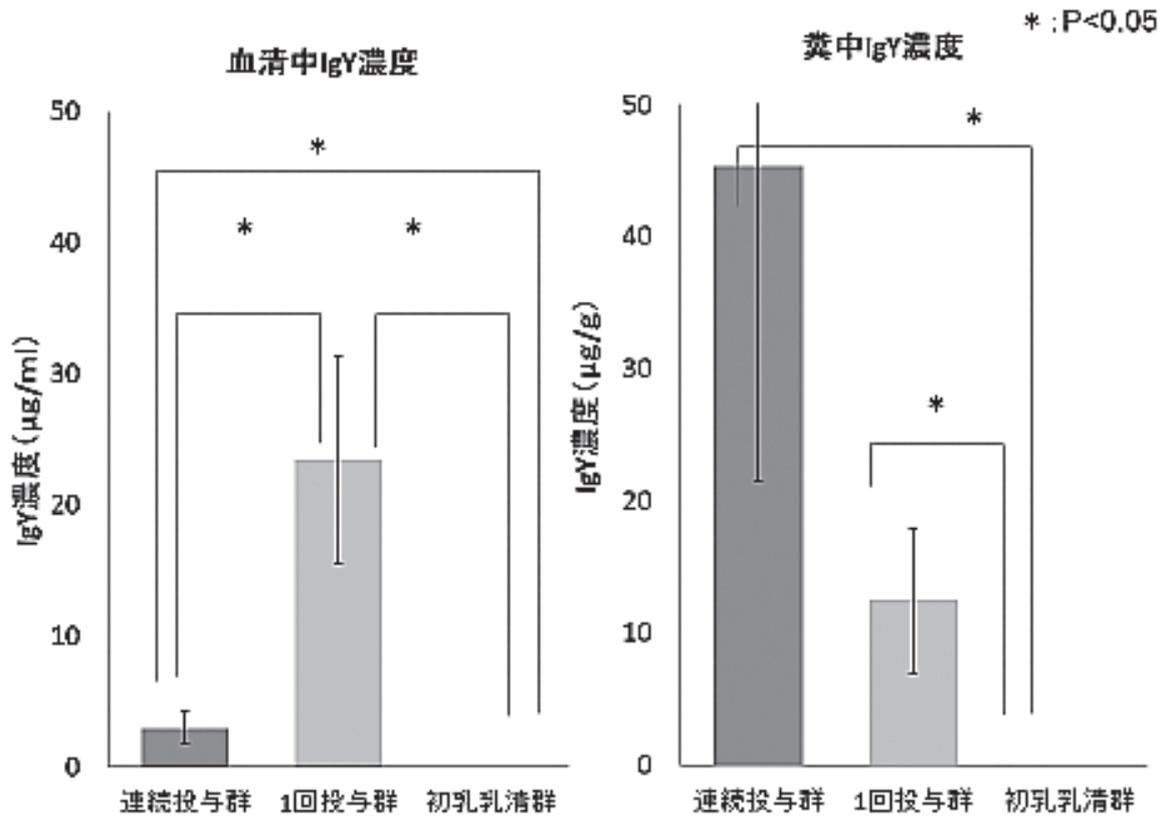


図3 給与方法による血中及び糞便中の総IgY濃度比較 (出生1～5日齢)

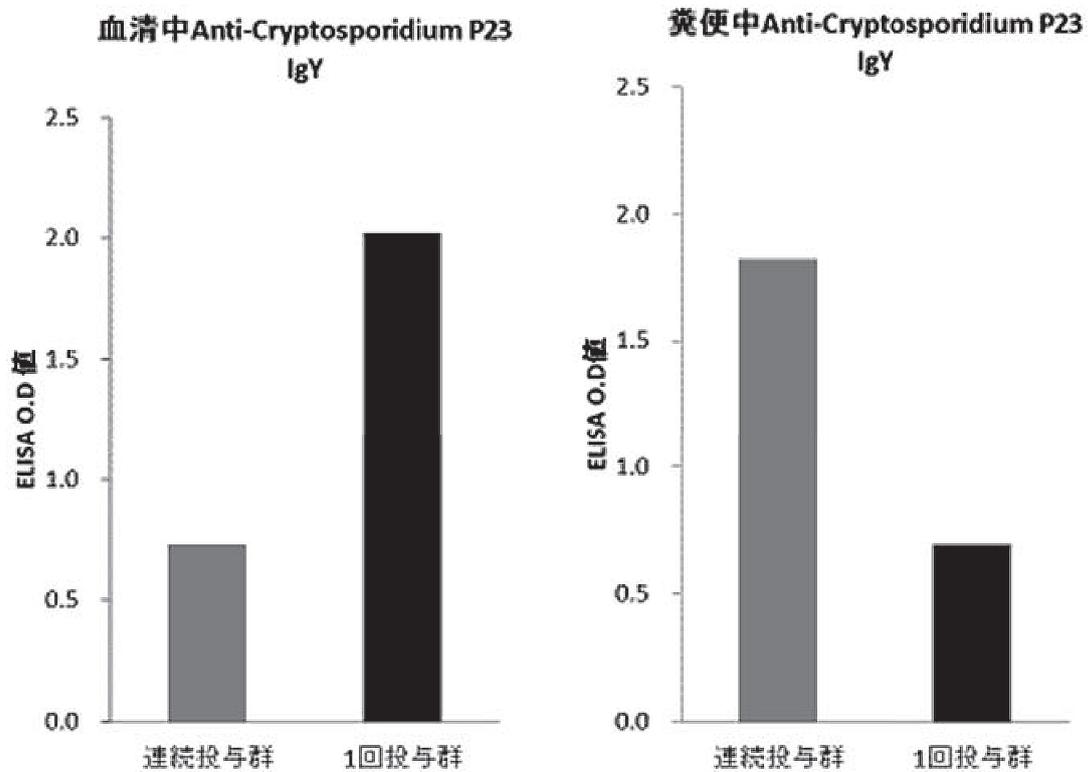


図4 給与方法による血中及び糞便中のAnti-Cryptosporidium P23 IgY ELISA値の比較 (出生1～5日齢)

まとめ

Cr 症のコントロールは、30 日齢までの子牛にいかにか下痢を発症させないかにかかっている。これは、一つの方法で解決できるものではなく、環境中の Cr を減少させる哺乳牛舎の消毒や母牛の分娩末期の栄養管理などによる健康な子牛の生産に加えて、IgY を予防的に投与することで Cr オーシストの排出を抑えることが重要と考えている。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、多大なるご助言を頂いた土赤忍先生（大阪公立大学 獣医学研究科）、サンプルの提供、試験実施にご協力頂いた梅田浩二先生（EWNJ）に深謝いたします。

引用文献

- [1] 剣崎真司、和田三枝、犬塚一歩ら. 2016. 下痢症研究用診断キットを用いた下痢診断と生菌剤または下痢 5 種混合不活化ワクチンを用いた下痢症の予防対策、家畜診療、63、727-734
- [2] 児玉義勝、ラハマン・ショフィクル、梅田浩二ら. 2014. “クリプトスポリジウム P23 糖タンパク抗原に対する機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk:IgY) を用いた経口受動免疫の野外応用,” 臨床獣医, 32, 41-45
- [3] 松田智行. 2010. 管内 3 酪農場における哺乳子牛の *Cryptosporidium parvum* 浸潤状況調査, 家畜診療, 57,557-560
- [4] Omidian Z,Ebrahimzadeh E,Shahbazi P et al.2014. Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention, Parasitol Res,113, 229-237
- [5] 佐伯晋吾、稲田一郎、福水章二ら. 2000. 兵庫県下におけるクリプトスポリジウムの汚染実態調査 – と畜場搬入牛のオーシスト排泄状況 –、日獣会誌, 53, 25-29
- [6] 志村亀夫.2006. 牛のクリプトスポリジウム症, 動物の感染症、小沼操、明石博臣、菊池直哉ら編、第二版、150, 近代出版, 東京
- [7] 鈴木覚、佐原啓二、仁科徳啓ら.1998. と場搬入牛からの *Cryptosporidium muris* の検出, 日獣会誌, 51, 163-165
- [8] 山田倫文、稲垣望. 2015. クリプトスポリジウム症の事例と検査方法の検討, 臨床獣医, 33, 16-20

Epidemiological survey on cryptosporidiosis and preventive measures using IgY

Yasuaki Mito[†]

Bicchu Livestock Clinic, Okayama Agricultural Mutual Aid Association,
93-269 Hamanaka, Satoshou, Asakuchi, Okayama, 719-0303 Japan

[Abstract]

Cryptosporidiosis (Cr) in newborn calves is caused by infection with *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) and is a problem because it causes diarrhea. We investigated the incidence of Cr in calves in Okayama Prefecture to understand the epidemiologic characteristics of this disease. Most of the calves with diarrhea that tested positive for *C. parvum* were less than 30 days old. It was found that the number of treatment times was higher for calves that tested positive for the antigen than for calves that tested negative for the antigen. We also examined antibodies to *C. parvum* in adult cattle and found that antibody titers in adult cattle were generally low. Because the antibody titers to *C. parvum* in adult cattle are low, it is thought that the amount of maternally derived anti-*C. parvum* antibodies in colostrum is also low. Since there is no commercially available vaccine against *C. parvum*, it is difficult to prevent it by specific immunity. Therefore, we investigated the effect of passive immunity by oral administration of egg yolk antibodies (IgY) produced by chickens immunized with *C. parvum* antigen (P23) on the prevention of diarrheal effects. The incidence of mucous stools, soft stools, and diarrhea was lower in the IgY-treated group than in the untreated group, and the detection rate of *C. parvum* was also lower. These results suggest that IgY may be useful in the prevention of *C. parvum*-induced diarrhea.

Keywords: calves, cryptosporidiosis, diarrhea