ダチョウから検出されたクリプトスポリジウム

植木秀彰[†] 池田 学 小山田敏文 吉川博康 吉川 堯

北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

(2000年3月2日受付・2000年6月26日受理)

要 約

1998年、青森県のある牧場に新規導入された20羽のダチョウが持続性の乳白色下痢を示し、相次いで死亡した。これらのうち5例について検索したところ、1例から *Salmonella* Typhimurium とクリプトスポリジウムが検出された。病理組織学的に、空腸および回腸の絨毛が著しく短縮し、粘膜表面線条縁に多数の微小球状物が観察された。球状物は抗 *Cryptosporidium parvum* 抗体を用いた免疫組織化学的染色に陽性を示し、超微形態学的にもクリプトスポリジウムであることが確認された。寄生部位は腸管（特に空回腸）に限られ、胃や気管支粘膜を含め他組織での寄生は認められなかった。——キーワード：クリプトスポリジウム、病理組織学、免疫組織化学、ダチョウ、超微形態学。

日獣会誌 54, 9~12 (2001)

クリプトスポリジウムは孢子虫綱、真コクシジウム目、アイメリア亜目、クリプトスポリジウム科に属する原虫で、*Cryptosporidium muris*, *C. parvum*, *C. baileyi* および *C. meleagridis* の4種が広く知られている。日本におけるダチョウのクリプトスポリジウム感染症の発生例はなく、また、海外においてもその報告は少ない [2, 5, 6, 11, 12]。上記4種のうち、鳥類に感染性を示すのは *C. baileyi* および *C. meleagridis* の2種とされているが、ダチョウから検出されたオーシストは他の鳥類に感染性がなく、また形態的にも異なっている点があることから、ダチョウのクリプトスポリジウムはダチョウに特異的な種と考えられている [6]。

1998年、青森県のある牧場で *Salmonella* Typhimurium に感染したダチョウの1例からクリプトスポリジウムが検出された。本論文は日本におけるダチョウのクリプトスポリジウム感染症の初発生報告である。

材 料 お よ び 方 法

青森県内のある牧場にダチョウのヒナ20羽を新規導入したところ、翌日より虚脱や乳白色下痢を呈し、最終的に全羽が死亡した。これらのうち5例が北里大学獣医病理学教室に搬入され、クリプトスポリジウム感染が認められた1例を今回の検索対象とした。

病理解剖によって採取された全身諸臓器は10%中性緩衝ホルマリンにて固定され、常法に従いヘマトキシリン・エオジン重染色 (HE 染色) が施された。また、パ

ラフィン包埋された腸組織切片に対し抗 *C. parvum* オーシストマウス抗体^{a)} (160倍希釈) を用いたストレプトアビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合法^{b)} (sABC法) が実施された。

一方、クリプトスポリジウム虫体は透過型電子顕微鏡^{c)} および走査型電子顕微鏡^{d)} を用いて形態学的に観察された。

成 績

搬入された5例について詳細な検索を行ったところ、削痂が著しかった生後25日の1例からクリプトスポリジウムが検出された。剖検時、同症例の腹腔内諸臓器は悪液質性の貧血状態で、腸管は菲薄化し、管内に水溶性内容物が貯留していた。また胸腺はみられず、肝臓は脂肪肝を呈していた。腸内容物を採取し、細菌の分離・同定を試みたところ、*Salmonella* Typhimurium が検出された。

病理組織学的所見：腸壁は空腸から結腸に至るまで菲薄化していた。空腸および回腸では絨毛は著しく短縮し、粘膜表面はほぼ平坦となり、線条縁には多数のクリプトスポリジウム虫体が寄生し (図1)、同時に桿菌の感染が認められた。虫体はまた腸内容物中にも存在していた。これら球状物は抗 *C. parvum* オーシストマウス抗

a) ケミコン, CHEMICON International Inc, California, U.S.A.

b) ヒストファインSAB-POキット, ニチレイ, 東京。

c) 日立H-7000, 日立, 東京。 d) 日立S-4300, 日立, 東京。

[†] 連絡責任者：植木秀彰 (北里大学獣医畜産学部獣医病理学教室)

〒034-8628 十和田市東23番町35-1 ☎0176-23-4371 FAX 0176-23-4484

体を用いたsABC法で陽性を示した。杯細胞は増数し、固有層には多数の単核細胞の浸潤がみられた。しかし粘膜上皮の剝離は著しくなく、むしろ明瞭な核小体と細胞質を持つ再生性の細胞形態を示していた。

ファブリキウス嚢は個々のリンパ小節の萎縮によりブドウ房状の構造を示していた。リンパ小節は、頻繁な細

図1 ダチョウのクリプトスポリジウム感染症例における空腸粘膜の光学顕微鏡像。粘膜絨毛は短縮し、表面線条縁に多数の微小球状のクリプトスポリジウム虫体が寄生している (HE染色 ×750)。

図2 空腸粘膜の走査型電子顕微鏡像。卵円状から球状のクリプトスポリジウム虫体が微絨毛に半ば埋められるように寄生している (×4,000)。

胞崩壊と幼若リンパ球様細胞によって構成され、胚中心や傍皮質領域は不鮮明となっていた。脾臓は幼若な細胞によって構成され、白脾髄、赤脾髄、脾洞およびリンパ小節といった構造が認められず、不明瞭ながら血管や脾柱を判別できるのみであった。

クリプトスポリジウム虫体の超微形態：走査型電子顕微鏡での観察で、卵円状から球状形態を示すクリプトスポリジウム虫体が粘膜上皮細胞表面の微絨毛に半ば埋められるようにして認められた (図2)。寄生のみられない上皮細胞微絨毛は整然と配列しているのに対し、寄生部位の上皮細胞では微絨毛の配列は粗く不整で、虫体周りで長くなっており、あたかも水面に石を投げ入れたようであった。

透過型電子顕微鏡による観察で、腸管内に遊離するオーシスト以外のステージの虫体は parasitophorous membrane によって覆われた parasitophorous vacuole (寄生体包) 内に認められた。虫体と宿主細胞の付着部では宿主細胞側に electron dense band が、虫体側では

図3 左図：スポロゾイトないしメロゾイト。rhoptries (矢印), electron dense granule (矢頭), microneme (白矢印) (×16,000)。右図：トロフォゾイト。明瞭な核小体を持ち、虫体は2層のparasitic pellicle (黒矢印) で覆われる。parasitophorous membrane (白矢印) (×20,000)。

表1 クリプトスポリジウム属オーシストの大きさ

	検索症例 平均 (範囲)	<i>Cryptosporidium</i> sp. of ostriches 平均 (範囲) ^{a)}	<i>C. baileyi</i>		<i>C. meleagridis</i>	<i>C. parvum</i>
			平均 (範囲) ^{b)}	平均 (範囲) ^{c)}	平均 (範囲) ^{d)}	平均 (範囲) ^{e)}
長径 (μm)	4.58 (2.49~6.22)	4.6 (3.0~6.1)	6.2 (5.6~6.3)	6.6 (6.0~7.5)	5.2 (4.5~6.0)	5.0 (4.5~5.4)
短径 (μm)	4.43 (2.65~6.23)	4.0 (3.3~5.0)	4.6 (4.5~4.8)	5.0 (4.8~5.7)	4.6 (4.2~5.3)	4.5 (4.2~5.0)
Oocyst shape index (長径/短径)	1.01 (0.71~1.46)	1.15 (1.00~1.38)	1.4 (1.2~1.4)	1.3 (1.0~1.8)	1.1 (1.0~1.3)	1.1 (1.0~1.3)

a) Gajadhar (1994) [5]

b) Current et al. (1986) [3]

c) Lindsay et al. (1989) [10]

d) Lindsay et al. (1989) [10]

e) Upton et al. (1985) [16] より改変。

図4 左図：核分裂する発育中のメロント，feeder organelle (矢印) ($\times 20,000$)，右図：7つのメロゾイト (Mz) を持つI型メロント ($\times 20,000$)。

図5 左図：ミクロガモント，ミクロガメート (矢印) が residual body (Rb) より発芽中 ($\times 24,000$)，右図：マクロガモント，大きなlipid body (Lb) を持つ，アミロペクチン顆粒 (矢頭)，parasitic pellicle (矢印) ($\times 16,000$)。

ヒダ状を成す膜からなるfeeder (attachment) organelleが観察された。オーシストの長径は4.58 (2.49～6.22) μm ，短径は4.43 (2.65～6.23) μm であった (表1)。

スポロゾイトおよびメロゾイト；両者の形態はほぼ同一で，microneme, rhoptries, electron dense granule やリボゾームが観察された (図3左)。

トロフォゾイト；発達初期の虫体は核小体の明瞭な1個の核と多量のリボゾームを有し，発育につれゴルジ装置や小胞体の形成がみられた。虫体は2層のparasitic pellicleで覆われていた (図3右)。

メロント；発達初期では細胞質塊を中心とした核分裂が観察された (図4左)。またresidual bodyからのメロゾイトの出芽や，4～8個のメロゾイトを持つI型メロントが確認された (図4右)。residual bodyにはゴルジ装置，小胞体，リボゾーム，electron dense granuleが認められた。

ミクロガモント；Residual bodyを中心として寄生体

図6 左図：未熟なオーシスト，アミロペクチン顆粒 (矢頭)，lipid body (Lb) ($\times 16,000$)，右図：4つのスポロゾイト (Sz) を有する成熟オーシスト ($\times 20,000$)。

包内にミクロガメートが形成されていた (図5左)。

マクロガモント；虫体は2層のparasitic pellicleで覆われ，原形質には大小のlipid body，アミロペクチン顆粒，原形質内空胞が観察された (図5右)。

オーシスト；未熟オーシストはリボゾーム，アミロペクチン顆粒，lipid bodyを持ち (図6左)，成熟オーシストには4つのスポロゾイトが含まれていた (図6右)。

考 察

光学顕微鏡的に回腸粘膜線条縁上に認められた微小球状物は，電子顕微鏡検索によってクリプトスポリジウムであることが確認された。HE染色で確認された微小球状物は，抗*C. parvum* オーシストマウス抗体を用いたsABC法によって陽性反応を示したが，今回使用した抗オーシスト抗体は*C. muris* オーシストにも交叉反応性を示すことが報告されており [1]，その特異性は明らかでなく，種の判定は不可能である。*C. muris*と*C. parvum*はその大きさによって区別が容易であるが [16]，ダチョウのオーシストは大きさだけでは*C. parvum*や他の種との判別は難しい。今回検出されたオーシストの大きさは過去に報告されているダチョウのオーシストや*C. parvum*に近似し [5, 16]，*C. baileyi*，*C. meleagridis*とは若干異なるようである [3, 10] (表1)。

クリプトスポリジウムは種によって内部構造に差はないが，大きさは異なっている。現在広く認められているのは*C. muris*，*C. parvum*，*C. baileyi*および*C. meleagridis*の4種であるが，鳥類に感染性を示すのは*C. baileyi*および*C. meleagridis*の2種とされている [10, 13]。ダチョウから検出されたクリプトスポリジウムは他の鳥類に感受性がなく，ダチョウ特有の種と考えられており，現在まで分類は確定していない [6]。

検索症例では絨毛の短縮が著しく，腸粘膜は菲薄・平

坦になりながらも、上皮の剥離はみられなかった。しかし、粘膜面を覆う上皮細胞は一様に幼若であったことから、過去に激しい障害を受けた粘膜上皮が後に再生した粘膜であると推察される。また腸内容物からの細菌分離により *S. Typhimurium* が検出されたことから、これら粘膜の変化はクリプトスポリジウムのみによってもたらされたものではなく、*S. Typhimurium* が何らかの病原性を発現している可能性も無視できない。さらには *S. Typhimurium* 感染により衰弱したことが感染、発症要因となっているとも推察され、また免疫低下状態における易感染性が指摘されていることから [14, 15], *C. parvum* の異種感染である可能性もある。本症例から検出されたクリプトスポリジウムの種を同定するには、他の動物種への実験感染や、遺伝子解析が不可欠であろう。

本報告は日本では初めてのダチョウのクリプトスポリジウム感染症である。今回の検索例は自然発生例であり、かつサルモネラ感染の影響を無視できないため、ダチョウに対するクリプトスポリジウムの病原性について単純に言及することはできない。

クリプトスポリジウムのオーシストは自然界（土壌中、水中）で抵抗性を示し [4, 7, 9], また抵抗性の減じた個体に容易に感染が成立することが知られている [14, 15]。近年、日本におけるダチョウの飼養頭数は増加しており、今後の衛生管理に参考になれば幸いである。

引用文献

[1] Anusz KZ, Mason PH, Riggs MW, Perryman LE : J

- Clin Microbiol, 28, 2770-2774 (1990)
 [2] Bezuidenhout AJ, Penrith M-L, Beurger WP : J S Afr Vet Assoc, 64, 156-158 (1993)
 [3] Current WL, Upton SJ, Haynes TB : J Protozool, 33, 289-296 (1986)
 [4] Fricker CR, Crabb JH : Advances in Parasitology, Baker JR, et al eds, Vol 40, 241-298, Academic Press, London (1998)
 [5] Gajadhar AA : Can Vet J, 34, 115-116 (1993)
 [6] Gajadhar AA : Parasitol Res, 80, 316-319 (1994)
 [7] 井関基弘 : 日獣会誌, 50, 375-379 (1997)
 [8] 板倉智敏, 藤原三男, 大内紀章, 高山介作, 小沢清一郎, 荒木光治, 御領政信, 梅村孝司 : 日獣会誌, 38, 796-801 (1985)
 [9] 黒木俊郎, 渡辺祐子, 浅井良夫, 山井志郎, 遠藤卓郎, 宇仁茂彦, 木俣 勲, 井関基弘 : 感染症誌, 70, 132-140 (1996)
 [10] Lindsay DS, Blagburn BL, Sundermann CA : Proc Helminthol Soc Wash, 56, 91 (1989)
 [11] Penrith M-L, Bezuidenhout AJ, Burger WP, Putterill JF : Onderstepoort J Vet Res, 61, 283-289 (1994)
 [12] Penrith M-L, Burger WP : J S Afr Vet Assoc, 64, 60-61 (1993)
 [13] Slavin D : J Comp Pathol, 65, 262-266 (1955)
 [14] Snyder SP, England JJ, McChesney AE : Vet Pathol, 15, 12-17 (1978)
 [15] Turnwald GH, Barta O, Taylor HW, Kreeger J, Coleman SU, Pourciau SS : J Am Vet Med Assoc, 192, 79-81 (1988)
 [16] Upton SJ, Current WL : J Parasitol, 71, 625-629 (1985)

Cryptosporidium sp. Isolated from an Ostrich in Japan

Hideaki UEKI[†], Manabu IKEDA, Toshifumi OYAMADA,
 Hiroyasu YOSHIKAWA and Takashi YOSHIKAWA

Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences,
 Kitasato University, 35-1 Higashi 23 Bancho, Towada 034-8628, Japan

SUMMARY

Cryptosporidium sp. and *Salmonella* Typhimurium were isolated from an ostrich being kept in Aomori Prefecture, Japan. The bird was emaciated and prostrate and demonstrated persistent diarrhea. Histologically, the villi of the jejunum and ileum were markedly shortened; and numerous round-to-ovoid structures could be observed within or attached to the surface of the villous epithelium. These organisms were immunohistochemically stained by the monoclonal antibody against the *Cryptosporidium parvum* oocyst. In addition, *Cryptosporidium* was ultrastructurally identified. *Cryptosporidia* were localized in the jejunum and the ileum and could be detected in no other organs, including the crop and the bronchus.

— Key words : *Cryptosporidium*, histopathology, immunohistochemistry, ostrich, ultrastructure.

[†] Correspondence to : Hideaki UEKI (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University)
 35-1 Higashi 23 Bancho, Towada 034-8626, Japan
 TEL 0176-23-4371 FAX 0176-23-4484

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 54, 9 ~ 12 (2001)