

短 報

オルソ剤と飽和水酸化カルシウム水溶液の相乗効果による

*Cryptosporidium parvum* オーシストの不活化

松原立真<sup>1</sup>・村越ふみ<sup>2</sup>・多田千佳・福田 康弘・中井裕<sup>3</sup>

東北大学大学院農学研究科動物環境システム学分野

宮城県大崎市鳴子温泉, 複合生態フィールド教育研究センター, 989-6711

現<sup>1</sup> ベルン大学, Hochschulstrasse Bern Switzerland 3000-3030

現<sup>2</sup> 京都府立医科大学, 京都府京都市上京区, 602-8566

現<sup>3</sup> 新潟食料農業大学, 新潟県胎内市平根台, 959-2702

**要約** クリプトスポリジウム症は下痢を主徴とする人獣共通感染症で、家畜の生産性の低下や水系汚染による家畜およびヒトの集団感染を引き起こす。本原虫のオーシストは様々な消毒剤に対する抵抗性をもつため、効果的な消毒方法の開発が望まれている。本研究では、オルソ剤を消石灰液（飽和水酸化カルシウム水溶液）で希釈してオーシストに感作させたところ、純水の希釈よりも有意に高いオーシスト不活化能が得られた。また消石灰液で希釈したオルソ剤では、低薬剤濃度でも全オーシストの不活化が観察された。畜産現場で広く使用されている消石灰液を希釈に用いることは、オルソ剤のオーシスト不活化能を維持しつつ経済性を向上させる新たな技術になる。

キーワード：クリプトスポリジウム, 水酸化カルシウム, 消石灰液, オルソ剤

受領日: 03.07.2021. 受理日: 15.09.2021

日本畜産環境学会会誌 No.21(1) pp32-38. 2022

緒 言

クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium* spp.) は様々な脊椎動物の消化管上皮細胞へ寄生する原虫であり、下痢を主徴とした人獣共通感染症であるクリプトスポリジウム症の原因となる (Fayer, 2004)。原虫の感染は原虫オーシストを経口的に摂取することから始まり、宿主個体内で増殖した原虫は再びオーシストとして糞便中へ排出され、新たな宿主へ伝播する。畜産業においてクリプトスポリジウム原虫は、若齢個体における感染が衰弱死や発育不良

などの経済的損失をもたらすことに加え、不顕性感染の成畜から排出された莫大な数のオーシストが、水系汚染による集団感染の潜在的リスクになることが指摘されている (Thompson, 2003)。したがってクリプトスポリジウム原虫の制御は、生産性の維持のみならず、公衆衛生の向上においても重要な課題である。だが、クリプトスポリジウム原虫オーシストは水処理で広く用いられる次亜塩素酸に対して強い耐性を示すため (Fayer, 1997)、安全かつ効果が高いクリプトスポリジウム原虫オーシスト不

活化法の開発が求められている。

畜産現場では、クリプトスポリジウム原虫と同様の生活環をもつアイメリア原虫 (*Eimeria* spp.) やイソスポラ原虫 (*Isospora* spp.) を制御するため、様々な市販薬剤が用いられている。これらのうち一部のオルソ剤は、クリプトスポリジウム原虫オーシストの不活性化に効果を示すことが確認されている (関, 2004)。また薬事法外となるが、消石灰水溶液 (水酸化カルシウム水溶液) を用いて希釈されたオルソ剤は、水で希釈された薬剤よりもニワトリコクシジウム原虫のオーシストや豚回虫卵の不活性化について優れることが知られている (今井ら、未発表)。そこで本研究では、水および水酸化カルシウム水溶液を用いて希釈された市販オルソ剤によるクリプトスポリジウム原虫オーシストの不活性化を解析し、畜産現場におけるクリプトスポリジウム原虫制御への応用と経済性の向上を検討した。

### 材料と方法

#### 1. クリプトスポリジウム原虫

本試験では、重度免疫不全 (SCID) マウスで継代されたクリプトスポリジウム原虫 (*Cryptosporidium parvum* HNJ-1 株) を供試した。原虫の維持およびオーシストの精製は Amer ら (2010) の記載に準じたショ糖浮遊法を用いて行われた。精製されたオーシストは純水へ懸濁して 4 °C で保存し、精製から 3 ヶ月以内に下記の実験へ供した。

#### 2. 供試薬剤 (オルソ剤) の調製

本研究では市販オルソ剤としてトライキル® (田村製薬株式会社) を供した。オルソ剤の希釈で用いた基剤は、薬事法で規定された純水、または畜産現場で慣用されている消石灰水として飽和水酸化カルシウム水溶液を用いた。希釈液に含まれるオルソ剤終濃度は、0.5%、0.25%、0.125% (それぞれ 200 倍希釈、400 倍希釈、800 倍希釈) とした。

希釈の基剤として用いる飽和水酸化カルシウム水溶液は、下記のように調製した。まずコニカルチューブ (50 mL) へ過剰量の水酸化カルシウムをとり、純水を 50 mL 加えた。一夜程度の転倒混和で十分に攪拌した後、24 時間静置した。その後、回収した上清をオルソ剤の希釈へ用いた。なお飽和水酸化カルシウム水溶液の調製では、pH の調整は行わなかった。

本研究では、オルソ剤を加えない純水のみ (0%) の条件を対照とした。これは、Zintl et al. (2010) による報告など、水酸化カルシウム水溶液のみの感作はクリプトスポリジウム原虫オーシストを不活性化しないことが確認されているためである。

#### 3. クリプトスポリジウム原虫オーシストへのオルソ剤感作とオーシスト不活性化の評価

1.5 mL チューブへ  $1.0 \times 10^6$  オーシストを取り、遠心 (1,400 g, 3 分間) した後上清を除去した。続いて希釈オルソ剤を 100  $\mu$ L 加え、ボルテックスで混和した。感作は室温 (約 26 °C) で行った。感作時間 (5 分, 30 分, 60 分 および 120 分) の経過後、再び混和し、10  $\mu$ L を回収してスライドグラスへ載せた。カバーグラスをかけて周囲を樹脂で封入した後、顕微鏡で原虫オーシストを観察した。顕微鏡観察は、100 倍の対物レンズ (UPlanApo 100 $\times$ , NA=1.35, Olympus) による微分干渉観察法を用いた。

オルソ剤感作によるクリプトスポリジウム原虫オーシストの不活性化は、原虫オーシストの形態から評価した。正常なオーシストは球形をなし、その内部には 4 つのスプロゾイトが観察される (図 1A)。だがオルソ剤を感作後では、オーシストを覆うオーシスト壁に形態的な変化が生じたもの (図 1B) や内容物の流出が認められたオーシスト (図 1C) が確認された。これらのオーシストについて、不活性化されたと判断した。顕微鏡 5 視野について正常オーシストを計数し、それらの平均値と標準偏差を求

## オルソ剤のオーシスト不活性化能

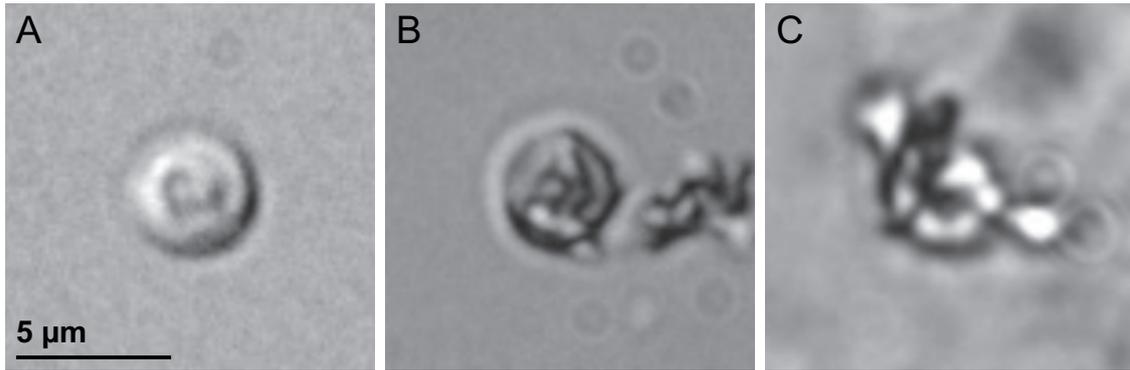


図1. オルソ剤で感作されたクリプトスポリジウム原虫オーシストの微分干渉観察像

A: ショ糖浮遊法で精製された正常オーシスト。B: 飽和水酸化カルシウム水溶液で希釈されたオルソ剤 (0.125%) にて 5 分間の感作を受けたオーシスト。均一な厚さのオーシスト壁が認められず、またオーシストの形状はいびつな球である。このため不活性化されたオーシストとみなした。C: 飽和水酸化カルシウム水溶液で希釈されたオルソ剤 (0.125%) にて 30 分間の感作を受けたオーシスト。オーシスト壁は既に崩壊しており、内部のスポロゾイトも認められない。

めた。また各感作時間において Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test に基づく統計解析を行った。有意水準は  $p < 0.01$  とした。

### 結果および考察

オルソ剤を一定時間感作した後、正常な形態を示すオーシスト数を図 2 へ示した。対照として純水へ懸濁されたオーシストを計数したが、その数は本研究の最大感作時間である 120 分を経過した後も変わらなかった (23.6 オーシスト,  $STD = 3.5$ )。したがって純水による 120 分の処理は、オーシストの生存性に影響を与えず、正常オーシスト数の変化はオルソ剤と、その希釈で用いた基剤の違いを反映することが示唆される。以降では、各感作時間におけるオルソ剤のクリプトスポリジウム原虫不活性化の効果を述べる。

#### 感作 5 分

0.5% および 0.25% 濃度のオルソ剤感作では、その希釈で用いた基剤の種類によらず、正常な形態を示すオーシストの数が対照よりも有意に低い値であった。一方、純水で調製された 0.125% オルソ剤の感作では、正常オーシス

ト数が対照と同程度であった。したがってオルソ剤のクリプトスポリジウム原虫オーシストに対する不活性化効果を 5 分間の感作で求める場合は、オルソ剤は 0.25% よりも濃く調製しなければならず、希釈で用いる基剤は純水でよいことが明らかになった。

水酸化カルシウム水溶液を用いて調製された 0.125% オルソ剤では、その感作後に観察された正常オーシスト数は、対照よりも有意に低い値であり、より濃く調製されたオルソ剤が示した不活性化効果との間においても、差は認められなかった。純水にて希釈された 0.125% オルソ剤感作後に観察された正常オーシスト数との間において、有意水準 ( $p < 0.01$ ) での差は棄却された。ただし、観測された  $p$  値は 0.0105 であり、また純水で調製された 0.125% オルソ剤を 5 分間感作した後に得られた正常オーシスト数の標準偏差が 15.6 であったことを考慮すると、水酸化カルシウム水溶液で調製された 0.125% オルソ剤は、オーシストを不活性化する効果をもつことが示唆される。

#### 感作 30 分

純水を用いて調製された 0.125% オルソ剤の感作では、観察された正常な形態オーシスト

## オルソ剤のオーシスト不活化能

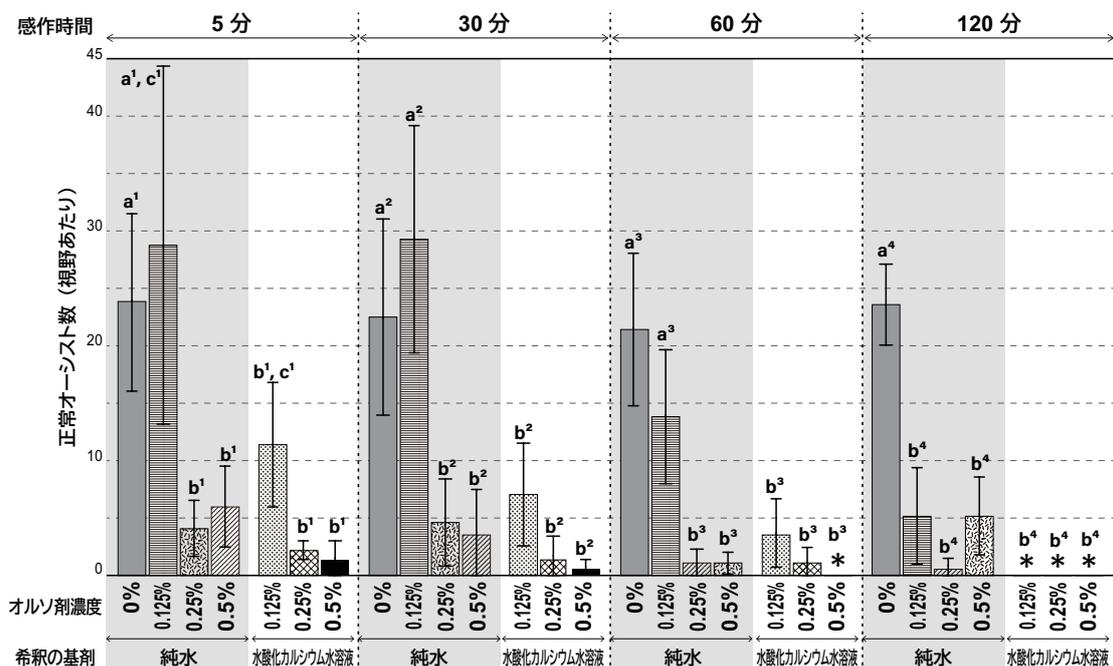


図2. オルソ剤処理後に確認された生存クリプトスポリジウム原虫オーシスト数

縦軸は観察された生存オーシスト数（顕微鏡 5 視野の平均値）である。標準偏差を誤差範囲として示した。有意差検定は Tukey HSD Test を用いて、感作時間ごとに行った。有意差の閾値は  $p < 0.01$  とした。アルファベットは、有意差が認められなかった区間を示し、またアルファベットの右肩に記した数字は、有意差を検定した各感作時間（5 分 = 1, 30 分 = 2, 60 分 = 3, 120 分 = 4）をあらわす。\* は生存オーシストが全く観察されなかったことをあらわす。

の数は対照と同程度であった。しかし水酸化カルシウム水溶液を基剤に用いて調製された 0.125% オルソ剤では、感作後に確認された正常オーシストの数は、より高濃度のオルソ剤を感作して得られた結果と同程度まで減少しており、すなわちオーシスト不活化能が認められた。

### 感作 60 分

観察された結果は、おおむね感作 30 分と同様の傾向であった。但し純水で調製された 0.125% オルソ剤の感作においても、有意性は棄却された ( $p$  値; 0.0246) もの、感作後に観察された正常オーシストの数は対照よりも減少する傾向であった。また、水酸化カルシウム水溶液で調製された 0.5% オルソ剤の感作後では、正常な形態を示すオーシストが認められなかった点は註記したい。

### 感作後 120 分

希釈で用いた基剤の種類、またオルソ剤の濃度によらず、オルソ剤感作後の観察から確認された正常オーシストの数は対照よりも有意に減少した。したがって 120 分を超える感作条件では、その希釈に用いた基剤の種類に因らず、0.125% まで希釈されたオルソ剤でも、より高い濃度のオルソ剤と同程度の効果を得られることが明らかになった。また統計的有意性は棄却されたが、純水で調製されたオルソ剤ではいずれの濃度においても正常オーシストが観察された一方で、水酸化カルシウム水溶液で調製されたオルソ剤では全く観察されなかったことは、大変興味深い結果であった。

オルソ剤の感作を受けたオーシストでは、その崩壊が顕微鏡観察によって確認された。クリプトスポリジウム原虫のオーシストがもつ高

## オルソ剤のオーシスト不活化能

い薬剤耐性は、そのオーシスト壁が堅牢であるためと考えられている。したがってオーシストの崩壊を伴うオルソ剤の感作は、オーシストを不活化していると強く示唆される。

経済性は畜産農家の重要な課題であるため、最大限の希釈をしつつも確実な効果が得られる技術開発が強く求められている。本研究で供試されたオルソ剤を用いた場合、0.25%（400倍希釈）よりも高い濃度ならば、感作5分でも希釈に用いる基剤によらずオーシストに対する有意な不活化が確認された。しかし0.125%では、水を基剤として希釈した場合、オルソ剤による有意なオーシスト不活化能が確認されるまで120分もの感作時間を要した。一方で、水酸化カルシウム水溶液を基剤として調製された場合は、感作5分でも対照に対する有意な不活化能が認められた。また高いオルソ剤濃度から得られた結果との比較においても、不活化の効果は同程度であると示唆された。

水酸化カルシウム水溶液を用いて調製されたオルソ剤は、0.5%で60分、または0.125%で120分の感作によって、オーシストの完全な不活化を達成した。しかし純水で希釈されたオルソ剤では、希釈倍率や感作時間によらず完全な不活化は得られなかった。希釈で用いた基剤の違いによるオーシスト不活化能の差は、統計解析により有意性が棄却されている。だが畜産現場への適応を考慮すると、オーシスト不活化についてより確実な条件が望ましいため、水酸化カルシウム水溶液を希釈基剤としたオルソ剤の感作後に正常オーシストが全く認められなかった結果は、極めて示唆的である。水酸化カルシウム水溶液を用いたオルソ剤の調製は、クリプトスポリジウム原虫オーシストの完全な不活化へつながる重要な技術であると考えられる。

これらを総括すると、オルソ剤を希釈する場合は水酸化カルシウム水溶液を用いることが望ましく、濃度0.125%（800倍希釈）の希釈

液による感作でも5分を超えると有意なオーシストの不活化能が得られることが明らかになった。また、水酸化カルシウム水溶液を用いて調製されたオルソ剤は、0.5%で60分以上、または0.125%で120分以上の感作は、オーシストを100%不活化することも示唆された。

本試験の結果、飽和水酸化カルシウム水溶液を用いてオルソ剤の希釈することで、クリプトスポリジウム原虫オーシストに対する不活化能が有意に高く維持されることが明らかになった。本技術の主な応用例は、踏み込み槽、あるいは浸け置きによる器具の予備洗浄が想定される。これらの処理でオルソ剤を用いる場合、水酸化カルシウムを添加した洗浄槽で薬剤を調製することにより、本研究で検証された条件に近いものが再現できると考えられる。水酸化カルシウムは畜産業において多岐にわたって用いられる薬剤であるため、踏み込み槽や予備洗浄槽への投入で新たに生じるコストは多くなく、オルソ剤濃度の希釈がもたらすコスト削減で相殺できることも考えられる。このような点から、オルソ剤の調製において水酸化カルシウム水溶液を用いることは、畜産業におけるクリプトスポリジウム症の予防に繋がる技術として、ひろく活用されることが望まれる。

### 謝辞

本研究は田村製薬株式会社の研究費によって実施され、同社の関令二博士よりご助言を賜りました。ここに感謝の意をあらわします。

### 文献

- [1] Amer S., Matsubara R., Murakoshi F., Nakai Y. (2010) Molecular analysis of *Cryptosporidium parvum* HNJ-1 isolated in Japan. J Vet. Med. Sci: 72(12):1647-1649.
- [2] Fayer R. (1997) The general biology of *Cryptosporidium*. In *Cryptosporidium*

## オルソ剤のオーシスト不活化能

- and Cryptosporidiosis. Fayer R. Ed., CRC Press, Boca Raton, 1-41.
- [3] Fayer R. (2004) *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol.: 126(1-2): 37-56.
- [4] 関令二 (2004) 畜産現場におけるコクシジウムの消毒. Journal of animal protozoosis: 19(1): 1-24
- [5] Thompson R. C. A. (2003) The zoonotic potential of *Cryptosporidium*, Thompson R. C. A., Armson A., Ryan U. M., (2003) *Cryptosporidium*: From molecules to disease, 113-119, Elsevier, Amsterdam
- [6] Zintl A., Keogh B., Ezzaty-Mirhashemi M., De Waal T., Scholz D., Mulcahy G. (2010) Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts in the presence of hydrated lime, Vet. Record: 166(10):297-301

Short Communication

**Synergistic oocysticidal effect of Ortho-reagent and saturated calcium hydroxide solution against *Cryptosporidium parvum***

Ryuma Matsubara<sup>1</sup>, Fumi Murakoshi<sup>2</sup>, Chika Tada, Yasuhiro Fukuda, Yutaka Nakai<sup>3</sup>

Laboratory of Sustainable Animal Environment, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Ohsaki, Miyagi, 969-6711, Japan

Currently: <sup>1</sup>University of Bern, Hochschulestrasse, Bern, 3000-3030, Switzerland

<sup>2</sup> Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Kyoto, 602-8506, Japan

<sup>3</sup> Niigata Agro-Food University, Tainai, Niigata, 959-2702, Japan

Cryptosporidiosis remains a significant cause of diarrhea in farms worldwide, leads to financial loss and presents a risk of waterborne outbreaks. *Cryptosporidium* oocyst bears remarkable resistance against a broad spectrum of disinfectants, posing the need for efficient decontamination protocols. In this report, we show that Ortho-reagent (combination of Cresol and 1,2-Dichlorobenzene) effectively destroys *Cryptosporidium parvum* oocyst in the presence of saturated calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>). Complete inactivation was achieved with 0.5% Ortho-reagent (1 h) or 0.125% (2 h) in Ca(OH)<sub>2</sub> solution, whereas viable oocysts remained in all trials with Ortho-reagent only (without Ca(OH)<sub>2</sub>). Ortho-reagent and calcium hydroxide (Limewater) are commonly accepted disinfectants. These reagents, synergistically, demonstrated the oocysticidal effect against *Cryptosporidium*, providing a new way of cryptosporidiosis control.

Key word: *Cryptosporidium*, Calcium hydroxide, Limewater, Ortho-reagent

**Corresponding:** Yutaka NAKAI yutaka-nakai@nafu.ac.jp

Yasuhiro FUKUDA yasuhiko.fukuda.b7@tohoku.ac.jp

Receipt of Ms: 03.07.2021. Accepted: 15.09.2021.

Journal of Animal Production Environment Science No21 (1) pp32–38. 2022