

## 鶏コクシジウムの孵化鶏卵培養

石井俊雄 大永博資

日本生物科学研究所

(昭和45年12月10日 受領)

鶏コクシジウムに関する研究の歴史は極めて長いものであるにもかかわらず、固有宿主であるニワトリ(ヒナ)を用いることなしに行われた感染試験で、生活史の完成をみたものはなかった。ところが Long (1965) は *Eimeria tenella* のスポロゾイトを孵化鶏卵の尿液腔、羊膜腔および静脈内に接種し、このうち尿液腔内に接種した場合はオーシストにまで発育し得ることを、続いて (1966) *E. brunetti* および *E. micati* でも *E. tenella* と同様にオーシストにまで、*E. necatrix* ではシゾンにまでそれぞれ発育し得ると報告した。その後 Ryley (1968) はこの Long の行なつた孵化鶏卵培養法を、主として抗コクシジウム剤の評価、スクリーニング・テストなどに応用し得るや否やという見地から検討した。そして *E. tenella* に関してはほぼ Long と同傾向の成績を挙げたが、*E. brunetti* に関しては不成功であつたとした。

著者らもまたヒナに代る鶏コクシジウムの感染の場を求めるところを目的とし、孵化鶏卵培養法につき検討を行なつてきた。本報告は *E. tenella* および *E. brunetti* のスポロゾイトを用いて行なつた Long および Ryley の報告の追試、とくに *E. brunetti* に関する両者の成績の喰い違いの解明、および未だ試みられていない漿尿膜接種法、卵黄の内接種法などの観察結果に関するものである。

### 実験材料および方法

1. スポロゾイト浮游液の調整: 接種材料は *E. tenella* および *E. brunetti* のオーシストより得たスポロゾイトである。

スポロゾイトの人工脱殻操作は第1表に要約した。

要点は、(1) オーシストの夾雑物からの分離と滅菌、(2) 機械的外力を加えてのオーシスト壁の破砕、つまりスポロシストのオーシストからの人為的脱殻、(3) 人工消化液によるスポロゾイトのスポロシストからの游出、という3点になる。ここに掲げた方法

は、Farr and Doran (1962) の方法に準拠したという Long (1966), Ryley (1968) の方法などを参照しつつごく僅かの変更を加えたものであるが、本質的には原法と変つてない。

なお、著者らは LH をメジウムとして用いたが、この理由は Strout (1965) および Patton (1965) らの *Eimeria* sp. の組織(細胞)培養に関する報告を参照したもので、このような成分のものはスポロゾイトの活力保持に最も良好なものであらうと考えられたため、実際

Table 1 Preparation of sporozoite suspension

<i>Oocyst suspension</i>	
	Added to equal volume of 50% Antiformin in an ice bath for 20 min.
	Washed by centrifugation in saline 3 times at 1000 rpm for 5 min. each
	Crushed the oocyst wall by Teflon homogenizer at 130 rpm for 10 min.
<i>Sporocyst</i>	
	Treated with artificial digestive juice
	Composition: 0.3% Trypsin (1:250) 95 parts Chicken bile 5 parts
	Stirred in a water bath at 37°C for 1 hr. against <i>E. tenella</i> for 25 min. against <i>E. brunetti</i>
	Centrifuged and washed 3 times
<i>Sporozoite</i>	
	Suspended in medium
	LH (Lactoalbumin hydrolysate Hanks) or PBS, pH 7.6; with Penicillin 500 u/ml and Streptomycin 100γ/ml
	Counted in a haemocytometer chamber

にはしかるべき塩類溶液であれば、作用時間は短いことであるし、何であつても差し支えないものであらうと考えている。現に Long は PBS を用いている。

2. 鶏卵：白色レグホン種の孵化鶏卵を用いた。卵令は8～10日のものである。

3. 接種方法と接種量：漿尿膜接種、卵黄のう内接種、および尿液腔内接種の3法につき、何れも常法による接種を行なつた。接種量は0.1mlから0.5mlに及んだこともあつたが、0.2ml位が操作上最も適当であつたので、なるべくそのようになるようにスポロゾイト数(各成績の項に記載)を調整した。

羊膜腔内接種および静脈内接種は行なわなかつた。

4. 観察方法：接種した後、所定日に卵を孵卵器より取り出し、これを冷蔵庫に移して氷冷死せしめ、漿尿膜、あるいは卵黄のうを採り出した。まず出血、肥厚の有無などの肉眼的観察を行なつたのち、スライドガラス上に圧平し、そのままカバーガラスをかけ生鮮標本として鏡検した。

なお尿液腔内接種の場合は尿液を採取、遠沈し、その沈渣についても検索した。

## 成 績

### 1. *E. tenella*

1) 漿尿膜接種：10個の9日令卵に40,000個ずつのスポロゾイトを接種し卵を用い、5日後および8日後にそれぞれ5個ずつについて検査した。5日後の観察で、接種部位にのみ限局して少数のシズントがみとめられた(写真1)。この場合接種部位は軽度白濁、肥厚している感もたれた。しかし8日後には何も検出されなくなつた。

2) 卵黄のう内接種：接種スポロゾイト数、卵令、した卵の個数および検査日などは上述した漿尿膜接種の場合と同様である。5日後には卵黄と胎児との接合部(卵黄柄)の組織中にシズントが比較的多数みとめられた(写真2)。この部位以外、例えば卵黄のうちの底部にはシズントを見付けることはできなかつた。8日後の観察ではシズントはみとめられたが減数しているようであつた。またこの時期に期待されたガメートやオーシストはみとめられず、したがつてシズントから先の発育は疑わしいように思われた。

シズントのみとめられる時期の前後からは、卵黄中に遊離したメロゾイトが検出される筈のもと考えられるので検出を試みたが、不成功に終つた。

3) 尿液腔内接種：尿液腔内接種は1回に20～30個の

卵を使用し、接種1日後より毎日2～3個ずつ10日間に亘り検索することを基準とした。接種スポロゾイト数は30,000～50,000、9～10日令の卵を用いた。以下に述べる成績は3回のくり返し実験の結果であるが、常に同様の成績を得、再現性は極めて高いものと思考された。

尿液腔内の接種では、4日後頃から漿尿膜組織中に多数のよく発育したシズントが観察されるようになり(写真3)、同時に尿液中にはメロゾイトがみとめられた(写真4)。以後順次発育し、ガメートがみとめられるようになり、8日以後になると尿液中に新生オーシストがみとめられるようになった(写真5)。以後日を逐つて観察を続ければ検出されるオーシストは増数すべきものと期待されたが、実際には鶏胎児が発育するに従つて尿液は減少し、尿液が減少するに従つてオーシストの検出は何故か困難になつてきた。因に、尿液は通常ほぼ13日令を頂点として減少していくものである。

4) 鶏胎児への感染の有無：何れの接種法によつた場合でも、スポロゾイトが鶏胎児へ移行し、そこで発育することもあり得るのではないかという疑いを捨てておくことはできない。そこで鶏胎児組織の検査を消化管を中心に試みた。しかし感染の痕跡は全く見出すことはできなかつた。

5) スポロシスト、オーシストの接種：スポロゾイトを得るに至る過程において得られるスポロシストおよびオーシストをそれぞれ洗滌し、スポロゾイトの場合と同様の接種メジウムに浮遊せしめて尿液腔内に接種した。何れの場合も感染が成立したと推定される形跡は全くみとめられなかつた。

### 2. *E. brunetti*

*E. brunetti* の孵化鶏卵培養はスポロシストの消化処理時間を25分、スポロゾイト数を1卵当り200,000とし、10日令卵の尿液腔内および卵黄のう内に接種することにより行なわれた。

この結果4～5日後の観察時には漿尿膜組織中にシズントを、7日後には尿液中にオーシストをみとめることができた(写真6.7)。シズントは写真6にみるごとく、*E. tenella* のそれに比して形は小さく、また内蔵するメロゾイト数も少ない。検出されるシズント数も接種量の割に少なく、感染の困難さを物語つていた。従つて形成されるオーシストも極く少数に止まつた。

卵黄のう内接種の結果は陰性に終つた。

## 考 察

前述したごとく、鶏 *Coxsackium* の孵化鶏卵培養は

Long (1965)によつて始めて報告された。彼はまず *E. tenella* のスポロゾイトを孵化鶏卵の尿液腔、羊膜腔および静脈内に接種し、このうち尿液腔内に接種した場合にのみオーシストにまで発育せしめ得たといつている。羊膜腔内接種の場合では全例(8/8)が24時間以内に出血死し、静脈内接種の場合では6個中5個が72時間以内に死に、残りの1個は7日後の検査で陰性であつたという。以上の試みで尿液腔内接種においてのみ良い結果を得たことから、引続いて(1966) *E. tenella* の他に *E. brunetti*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. maxima* および *E. acervulina* など6種の鶏コクシジウムのスポロゾイトを尿液腔内に接種し、発育の可否、程度などに関しての比較実験を行なつた。そして *E. brunetti* および *E. mivati* では *E. tenella* と同様にオーシストにまで、*E. necatrix* ではシズントにまで発育することをみとめた。*E. acervulina* および *E. maxima* では不成功であつたという。

Long はこれら *Eimeria* の種による孵化鶏卵内での発育の可否、程度の差を、これらの種のメロゾイトを直接ヒナの盲腸へ接種した場合の感染成立の可否と関連のあるものと論じている。

このような孵化鶏卵培養法はその後 Ryley (1968) によつても試みられた。彼は上述した Long の方法を、主として抗コクシジウム剤の評価、スクリーニングテストなどに応用し得るや否やという見地から検討した。そして *E. tenella* に関してはほぼ Long に準ずる成績を得たが、*E. brunetti* に関しては不成功に終わったといふ。なおこの Ryley の場合はオーシストにまで発育せしめることなく、スポロゾイトの多量接種による発育途中段階における鶏胎児の生死を観察し、へい死阻止を以て薬剤の効果判定の資としている。

著者らもまたコクシジウムの孵化鶏卵培養法を確立すべく心掛けてきた。そして上記2者の報告に接するに及び、(1)接種部位に関して、卵黄のう内接種、漿尿膜接種などを実施し、これらと尿液腔内接種と比較検討すること、(2)Long, Ryley の2者の結果に喰い違いを生じている *E. brunetti* に関して検討し、出来得ればさらに他種のものに関しても接種の比較実験を実施してみる、という2点を当面の目標として本実験を行なつてきた。

接種部位に関しては成績の項で述べた如く、漿尿膜接種、卵黄のう内接種は何れもオーシストを形成するに至らず、この意味からは適当な接種方法とは言えないように思われた。しかし卵黄のう内接種法は、シズントの検出される部位が卵黄柄のみに限局されてくるので、こ

の点は検出に当つての採材が容易であるとして利点となり得るかと思われる。

Long の成績と併せてみても、尿液腔内接種が鶏コクシジウムの孵化鶏卵培養に当つての好適な接種部位であるといえるようである。

接種量(スポロゾイト数)としては *E. tenella* の場合1卵当り  $3 \sim 5 \times 10^4$  を基準とした。この量では著者らの場合、卵の出血を明らかにみとめたものはなく、へい死例は10%以下に留まつた。 $10^5$  単位の接種ではじめて出血は明瞭に観察されるようになり、へい死率も上昇するようであつた(50%をこえることもあつた)。接種量と検出されるシズント数、出血ならびにへい死などの定量的関係は必ずしも直線的ではなく、大略の傾向を示すに止まつていたが、検出効率に接種量の多い方が優つていたとは言える。よつて、鶏胎児のへい死はシズントが十分に発育する接種5日後頃にみられることを考慮すれば、生活史の完成を必要としない場合、例えばシズントを求める場合には  $10^5$  以上の接種がむしろ有利かと思われた。

*E. brunetti* の孵化鶏卵培養に関しては前述したごとく、Long は可能であつたといひ、Lyley は不成功であつたとした。著者とも当初は *E. tenella* について行なつたと全く同様の方法により *E. brunetti* の培養を行なつたが、成功を収めることはできなかつた。

一方、スポロゾイトの游出時間に関して、Long は *E. tenella* の方が *E. brunetti* よりも長時間を要したといひ、さらに *E. acervulina* に関しては短時間であつたといふ。Farr and Doran (1962) は数種の *Eimeria* の人工および自然脱殻について検討し、*E. acervulina* は *E. tenella* に比し短時間で脱殻が行なわれることを報告した。この時間は腸内における寄生部位に関連し、嚥下されたオーシストが寄生部位に到達するまでの時間に密接に関連するものとしている。

著者らの人工脱殻操作による処理時間と脱殻率との関係を第1図に示した。この図は縦軸にスポロゾイトを游出させたスポロシストの百分率(脱殻率)を、横軸に処理時間をとつたものである。図にみるごとく、*E. brunetti* では *E. tenella* に比べてスポロゾイトの游出時間は短かつた。すなわち、*E. tenella* の1時間処理で得られる数字(27.9%)は *E. brunetti* ではほぼ20~25分で得られている(19.4~32.9%)。なお、培養に成功せず、従つて本稿からは除き、図からも省いた *E. acervulina* の脱殻時間は最も短く、3分間の処理ですでに82.8%、5分

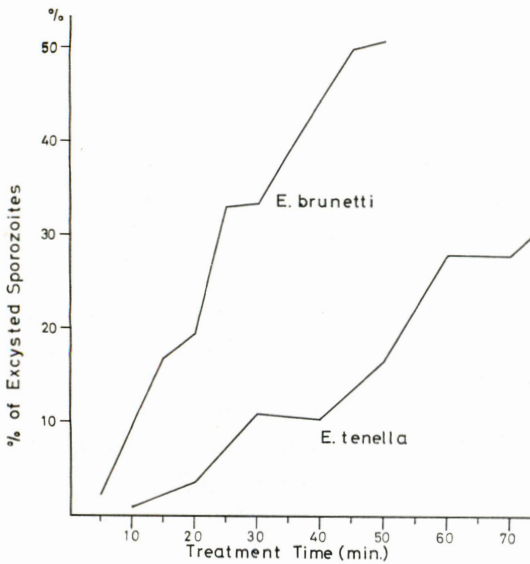


Fig. 1 Artificial excystation of *Eimeria tenella* and *E. brunetti*.

間の処理で94.3%という高い脱殻率をしめした。この傾向は上述した Farr and Doran の観察結果とよく一致するものといえる。彼等は *E. brunetti* については触れてないが、彼等の脱殻時間の長短は寄生部位に関連ありとする見解は、著者らの *E. brunetti* について得た数値についてもそのまま受け入れられようものかと考えている。

游出したスポロゾイトを長時間に亘つて消化液の作用下に放置しておく、輪郭の不鮮明になるものや、形状の崩れてくるものなどの変性崩壊過程にあると思われるものが現われるようになってくることが経験された。このようになったスポロゾイトは活動力も低下、あるいは失われているものと想像される。

孵化鶏卵への接種に当つては「十分に活動力のある新鮮なスポロゾイトの十分量を以て行なうこと」が成否を分かち鍵となつていふものと考えられる。この見地から、所要量のスポロゾイトが一応揃い、且つ消化液の影響を必要以上に受けるに至つてないような時間として、*E. brunetti* に関しては20~25分がまず妥当なところとなつていふかと思考された。これに対して *E. tenella* は60分、あるいは90分位までが適当と思われた。

また予備的試行において *E. brunetti* の孵化鶏卵への感染率は、*E. tenella* のそれに比して非常に低いものと推定されたので、*E. brunetti* の孵化鶏卵接種は最終的にスポロシストの消化処理時間を25分、スポロゾイト数

を1卵当たり 200,000とし、尿液腔に接種することを主眼とした。

鶏コクシジウムの孵化鶏卵培養法の意義について、Long は宿主の抵抗性の最小である場で行なわれるべき性質の研究に適すること、またヒナを使つての実験と異なり混合感染の危険がない点などを利点として挙げている。一方、Ryley はこの手技を抗コクシジウム剤の効果の評価、選択試験などに応用できるや否やについて考察を試みている。薬剤の評価にはスポロゾイトの  $10^6$  を接種し、同時に薬剤を与え、5日目頃に期待される鶏胎児の出血死を阻止するや否やによつて判定しようとした。そして十数種の薬剤に関して行なつた試験成績は、*in vivo* の場合と必ずしも一致するものではないことを示している。

本稿の範囲からは、孵化鶏卵培養法の意義についてとくに付け加えるべき事新しい見解をここに表面することは困難であるが、上に述べてきた Long や Ryley の見解には賛同できる。それとともに、発育途中段階のコクシジウムを比較的容易に観察し得ること、とくにこれら無菌的に採り出し得ることは本法の利点の最たるものと考えている。何れにせよ孵化鶏卵は、固有宿主の固有場所以外では発育しないとされていた鶏コクシジウムの新しい感染の場の一つとして認識されるべきものであろう。

今までの段階では孵化鶏卵の尿液腔内接種により、*E. tenella* および *E. brunetti* ではオーシストにまで発育したというものの、量的には甚だ効率が悪かつた。このため孵化鶏卵による継代、ヒナへの復帰試験などは成功してない。これらの問題は今後の課題として検討していく所存である。

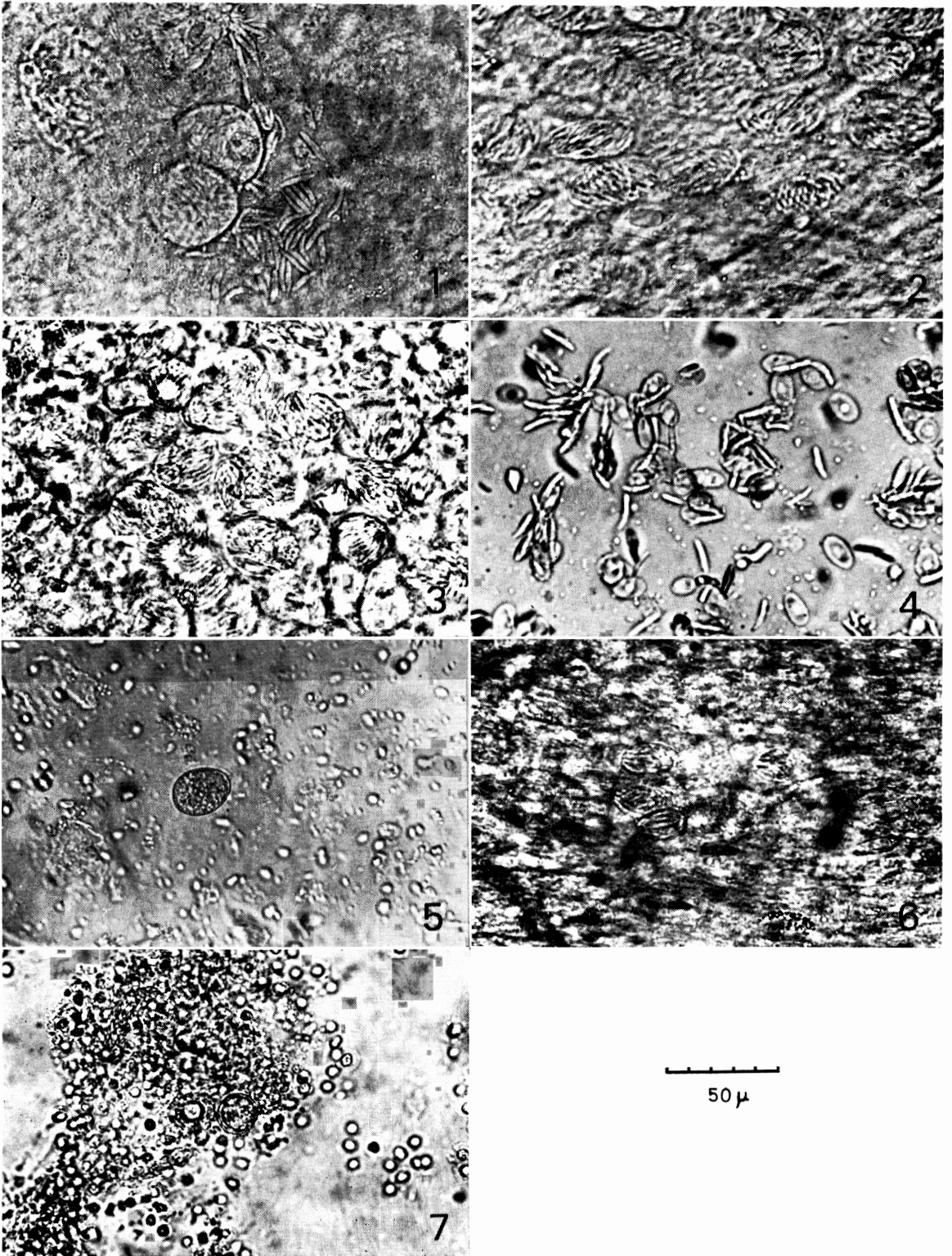
## 要 約

人工的に脱殻せしめた *Eimeria tenella* および *E. brunetti* のスポロゾイトを孵化鶏卵に接種し、原虫の発育状況を観察した。

### 1. *E. tenella*

1) 9日令卵の漿尿膜に40,000個のスポロゾイトを接種した場合、5日後の観察で接種部位にのみ限局し、ごく少数のシズントがみとめられた。しかし8日後には全くみとめられなかつた。

2) 9日令卵の卵黄のうに40,000個のスポロゾイトを接種した場合、5日後に卵黄柄の組織中に比較的多数のシズントがみとめられた。しかし8日後にはこの部位でも少数のシズントがみとめられるのみとなり、ガメート



やオーシストなどは全く検出されなかつた。

3) 8~10日令卵の尿液腔に30,000~50,000個のスプロゾイトを接種した場合、4日後頃より漿尿膜組織中に多数のシゾントが観察され、以後順次発育し、8日後頃よりはオーシストがみとめられるようになった。

#### 2. *E. brunetti*

*E. brunetti* の孵化鶏卵培養は、スプロシストの消化処理時間を *E. tenella* の場合より短くし(60分に対し25分)、スプロゾイトの数を1卵当たり200,000とし10日令卵の尿液腔に接種して行なわれた。接種4日後の観察でシゾントを、7日後の観察では僅かながらオーシストがみられるに至つた。

本稿の要旨の一部は第38回日本寄生虫学会(1969)において、また一部は第68回日本獣医学会(1969)において報告した。

### 文 献

- 1) Doran, J. D. and Farr, M. M. (1962) : Excystation of the poultry coccidium, *Eimeria acervulina*. J. Protozool., 9, 154-161.
- 2) Farr, M. M. and Doran, J. D. (1962) : Comparative excystation of four species of poultry coccidia. J. Protozool., 9, 403-407.
- 3) Long, P. L. (1965) : Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. Nature, 208, 509-510.
- 4) Long, P. L. (1966) : The growth of some species of *Eimeria* in avian embryos. Parasit., 56, 575-581.
- 5) Patton, W. H. (1965) : *Eimeria tenella* : Cultivation of the asexual stages in cultured animal cells. Science, 150, 767-769.
- 6) Ryley, J. F. (1968) : Chick embryo infections for the evaluation of anticoccidial drugs. Parasit., 58, 215-220.
- 7) Strout, R. G., Solis, J., Smith, S. C. and Dunlop, W. R. (1965) : *In vitro* cultivation of *Eimeria acervulina* (coccidia). Exp. Parasit., 17, 241-246.

---

### Explanation of Photographs

- Photo. 1. *E. tenella* schizont in chorioallantoic membrane(CAM) 5 days after CAM inoculation.
- Photo. 2. *E. tenella* schizont in the tissue of stalk 5 days after yolk sac inoculation.
- Photo. 3. *E. tenella* schizont in CAM 5 days after allantoic cavity (AC) inoculation.
- Photo. 4. *E. tenella* merozoite in allantoic fluid 5 days after AC inoculation.
- Photo. 5. *E. tenella* oocyst in allantoic fluid 8 days after AC inoculation.
- Photo. 6. *E. brunetti* schizont in CAM 5 days after AC inoculation.
- Photo. 7. *E. brunetti* oocyst in allantoic fluid 7 days after AC inoculation.

**Abstract**DEVELOPMENT OF *EIMERIA TENELLA* AND *E. BRUNETTI*  
IN CHICK EMBRYOS

TOSHIO ISHII AND HIROSHI ÔNAGA

*(Nippon Institute for Biological Science, Tachikawa City, Japan)*

Artificially excysted sporozoites of *Eimeria tenella* and *E. brunetti* were introduced respectively into 8-10 day old chick embryos for obtaining their further developing stages.

Results obtained were as follows :

1. *E. tenella*

(1) The embryos inoculated with 40,000 sporozoites onto the chorioallantoic membrane produced small numbers of schizonts in a limited site of the inoculation after 5 days. The parasites were no longer demonstrated 8 days after inoculation.

(2) When the embryos were inoculated with the same numbers of sporozoites into the yolk sac, considerable numbers of schizonts were found in the tissue of stalk after 5 days. Although the schizonts could be yet found after 8 days, neither gamete nor oocyst could be detected.

(3) Inoculation of 30,000-50,000 sporozoites into the allantoic cavity resulted in a good yield of the parasites. Large numbers of developing schizonts were found in the tissue of chorioallantoic membrane 4-7 days after inoculation. In addition, small numbers of oocysts were found in the allantoic fluid when examined on the 8-10 th days.

2. *E. brunetti*

Sufficient numbers of sporozoites of *E. brunetti* were usually available after 25 min digestion of the oocysts that differs from *E. tenella* in which at least 60 min was required (Fig. 1). The schizonts were produced in the tissue of chorioallantoic membrane 4 days after inoculation with 200,000 or more of the sporozoites into the allantoic cavity. The oocysts were also found in the allantoic fluid though they were in small numbers.