

日本産マウスからの *Eimeria falciiformis* の 分離, 同定, 及び Life cycle

小林 正規* 竹内 勤* 田辺 将信*
金田 良雅† 浅見 敬三* 藤原 達司‡

(昭和54年8月22日 受領)

緒 言

マウス (*Mus musculus*) を宿主とする *Eimeria* は現在までに15種記載されているが, life cycle の研究は比較的少なく, *Eimeria falciiformis* (Harberkorn, 1970; Owen, 1975), *E. falciiformis var. pragensis* (Mesfin and Bellamy, 1978), *E. vermiformis* (Ernst *et al.*, 1971; Todd and Lepp, 1971) 及び *E. ferrisi* (Levine and Ivens, 1965; Ankrom *et al.*, 1975) の四種を数えるのみである。

このうち *E. falciiformis* はマウスの *Eimeria* の type species と考えられていたが (Todd and Lepp, 1971), その life cycle については Harberkorn (1970) の研究に至るまで詳細に検討されていなかった。しかし現在に至るまで依然として *E. falciiformis* の発育環に関しては異なるデータが報告されており, Owen (1975) はこれらの混乱の多くは life cycle 観察中における他種 *Eimeria* の混合感染によるものと考えている。

従来から *E. falciiformis* の同定は主として merozoite, 及び oocyst の形態的観察によつていたので, 上述の発育環に関する混乱が Owen (1975) の云うように他種 *Eimeria* の混合感染によるものか否かは更に検討する必要がある。しかし, Harberkorn (1970) による詳細な研究は一応 *E. falciiformis* についての標準的な記載と考えてよいと思われる。

我々は従来から *Eimeria* 感染における再感染抵抗性獲得のメカニズムについて興味を持っていたが, 今般市

販マウスから自然感染している *Eimeria* を分離し, 同定する機会を得た。本報においては分離した *Eimeria* の発育環, 又, 各ステージの虫体の計測等について研究を行った結果, 本 *Eimeria* を *E. falciiformis* と同定したので概要を報告し, あわせて従来との比較検討を試みた。

材料及び方法

1) *Eimeria-free* マウスの作製, 及び飼育

当教室に飼育, 保存せる ICR 系マウス (5~7週齢) を滅菌ケージ内で飼育して, 7日間連続して検便を行ない, *Eimeria* の oocyst 排出のない雌雄マウスを選択した。次にこれらのマウスを交配させ, 妊娠直後のマウス5匹を選択し, これらを温湯で洗浄し, 70%アルコールで全身を消毒後, 乾燥, 更に日光に60分間晒した後, 殺菌灯を備えた滅菌室内に置いた滅菌ケージ内に移して飼育した。これらのマウスについても毎日検便を行ない, oocyst 排出のないことを確認した。更にマウスが分娩し, 仔が離乳後は親を除き, 仔のみで飼育, 繁殖させた。

飼育は原則として一日おきにケージ, 敷ワラ, 水 (何れも滅菌済) を交換し, 給水ビン, 及び餌箱は一週間毎に滅菌した。検便はケージ交換時に行ない, oocyst 排出のないことを確認した。

2) *Eimeria* の分離

まず当教室に保持せる市販マウスより自然感染マウスを選び, それより, oocyst を回収し, 2%重クロム酸カリ液中で sporulate させ, 上記の *Eimeria-free* のマウスに経口投与した。新しく排出された oocyst は同様に sporulate させ 4℃ に保存した。

分離した *Eimeria* の同定のためには上述のように保

* 慶応大学医学部寄生虫学教室

† 東海大学医学部寄生虫学教室

‡ 慶応大学電子顕微鏡研究室

存した oocyst を更に希釈して、一個の oocyst を含む試料を作製し、3匹の *Eimeria-free* マウスに投与した。その結果、2匹のマウスより oocyst の排出がみられたが、oocyst の形、大きさ、及び prepatent period などから同一と考えられ、又得られた2株の oocyst の混合感染が起ることを防ぐため、一匹のマウスから得られた oocyst 株について以下の如く同定を行った。

3) 感染実験、及び形態観察

前述の如く作製した *Eimeria-free* の5~7週齢の雌雄マウスを使用し、500個の sporulated oocyst (非致死量) を滅菌ゾンデにより経口投与した。*Eimeria* 感染後は更に自然感染が加わるのを防ぐため、一般動物室から隔離し、滅菌ビニールシートでおおった飼育棚内で飼育した。これらの飼育棚もやはり上述の殺菌灯存在下の滅菌室におき、ケージ、敷ワラ、餌箱、餌、飲料水、その他を毎日滅菌済のものと同交換した。

感染マウスは通常3群に分け、第1群は OPG (oocyst per gram of feces) を観察するグループ、第2群は生鮮標本観察、及びシャウジン固定後のハイデンハイン氏ヘマトキシリン染色による観察群、第3群はホルマリン固定後、組織切片を作製し HE、及びトリプル染色を行なった。

生活環の各ステージの虫体の大きさの計測は生鮮標本を用いて sporulated oocyst (500個)、sporocyst (150個)、sporozoite (500個)、merozoite (500個)、及び macrogametocyte (150個) の測定を倍率1,000倍でマイクロメーターを用いて行った。前記のカッコ内は測定したサンプル数をし、これらの測定値から平均、及び標準偏差値を算出した。一方、microgametocyte は生鮮標本では同定困難であったので、ホルマリン固定した同一標本にトリプル染色を行った組織標本とシャウジン固定後ハイデンハイン氏ヘマトキシリン染色を行った塗抹標本について測定した。ただし、トリプル染色を行った標本が最も microgametocyte の同定が容易であった。

4) 電子顕微鏡による観察

感染マウスの結腸上部を感染3~7日めの適当な時期に切除し、更に細切して、2.5%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液 pH 7.4で30分間、4C で固定し、更に1%オスミウム酸で60分間、4C で後固定を行った。試料は更にリン酸緩衝液を用いて洗浄し、エタノール・アセトン系列を用いて脱水した。包埋は Epon 812 を使用し、Porter-Blum MT-2B Ultramicrotome によつて超薄切片を作製した。観察には切片を酢酸ウラン、硝酸鉛で二重染色した後、日立 HU-12 AS 型の電子顕微鏡を用いた。

実験結果

1) Oocyst, 及び sporogony

Oocyst の形態の多くは長楕円型で、まれに球型のものも観察された。Oocyst 壁は厚さ1~1.5 μ で無色の滑らかな構造物として観察される。Sporulated oocyst の大きさは16~23 μ ×15~20 μ (20.1±1.32 μ ×17.8±1.22 μ) (Fig. 1) で oocyst residuum はみられなかつた。しかし1~3個の polar granule (1~3 μ ×1~2 μ) が観察された。

Sporocyst は11~13 μ ×6~8 μ (11.6±0.57 μ ×6.7±0.55 μ) の大きさで、Stieda body は明瞭であつた。Sporocyst residuum は4~5 μ ×3~5 μ (4.7±0.46 μ ×3.9±0.61 μ) の球型、又は長楕円型で顆粒状構造物の集合体として観察された (Fig. 2)。Sporozoite は一端をまげた状態で存在し (Fig. 3)、脱殻用培養液 (Doran 1973) 中では sporulated oocyst の先端部に径2.5~3 μ の micropyle を認め、sporozoite はこの micropyle より脱殻を行なう (Fig. 4)。Sporozoite の大きさは13~15 μ ×3 μ であつた (Fig. 5)。しかし、伸長時間には17~20 μ ×2.5~3 μ となり、2個の refractile body もそれに伴つて伸長するのがみられた。

2) Schizogony, 及び gametogony

Sporulated oocyst 500個投与後、8時間で sporozoite が盲腸にみられ、24時間で初めて mononuclear schizont (Figs. 6, 7) が形成され、感染後36時間で初めて Ist generation schizont がみられる (Fig. 8)。しかし、小腸では sporozoite の侵入、及びそれに引き続いての mononuclear schizont の形成はみられるが、それ以上の分化、発育は観察されず、そのまま宿主細胞と共に体外に排出されるものと思われる。

感染5日目の schizont は大体18~20 μ ×10 μ のサイズで、約8個体の merozoite (15~20 μ ×2 μ , 平均18.7±0.97 μ ×2 μ) を含み (schizont A) (Fig. 9)、電顕的には核、microneme, paired organelle 等が明確に観察される。これらの merozoite は感染6日目に形成される小さい merozoite (後述) の約3倍も大きく、又、この小型の merozoite に比して microneme 等の organelle の発達も良好であつた。Parasitophorous vacuole は一層の限界膜より成つていていると思われ、又、vacuole の膜から多数の小突起が現れるのがみられた。

まれに感染5日目でも schizont A よりやや小さい schizont (7~10 μ ×7~10 μ) (schizont B) が観察さ

れたが、この schizont B 内には前述の schizont A 内の merozoite より更に小型の約 8 個体の merozoite ($10\sim 13\mu \times 2\mu$, 平均 $11.7\pm 0.98\mu \times 2\mu$) がみられた (Figs. 12, 13). 又, Fig. 14 には schizont A, B が出現する感染 5 日目の結腸の組織像を示した. 又, 多重感染もしばしば観察され, 一個の粘膜上皮細胞内に少なくとも数個の parasitophorous vacuole が形成され, その各々で mononuclear schizont が形成されている像がみられた (Fig. 15). Fig. 16 には 1 個の細胞内に 3 個の成熟 schizont が形成されている像を示した. 感染 5~6 日目には merozoite が糞便中にも多数観察されるようになるが, 時に感染 4 日目からすでに観察される (Figs. 17, 18). 糞便中の merozoite は鎌状を呈し, その運動は活発で屈伸, 滑走様運動を示した. 又その運動性は 4C で 24 時間保存した後でも失われなかつた. 感染 6 日目の腸管上皮細胞には新たに 4 個の merozoite ($5\sim 8\mu \times 2\mu$, 平均 $6.9\pm 0.78\mu \times 2\mu$) を含む $5\sim 7\mu \times 5\sim 6\mu$ の小型の schizont (schizont C) が形成されているのがみられ (Fig. 19), schizont C 形成後更に 6~7 時間たつと schizont A-C の merozoite より更に小型の約 40~50 個の merozoite ($3\sim 5\mu \times 1.5\sim 2\mu$, 平均 $4.3\pm 0.76\mu \times 1.5\sim 2\mu$) を含む schizont ($5\sim 15\mu \times 3\sim 8\mu$) (schizont D) が盲腸, 結腸, 直腸の粘膜上皮細胞に多数みられる様になる (Figs. 20, 21, 22). Schizont C-D における merozoite は電顕的観察からは Schizont A-B に比して microneme の発達が極めて悪い. しかし分裂様式そのものは *E. falciiformis* (Pellérdy, 1974) と本来コクシジウムにみられる schizogony のメカニズム (Aikawa and Sterling, 1974) と大差ないものと思われた. Parasitophorous vacuole の小突起もやはり多数みられた (Figs. 23, 24). gametocyte は schizont D の形成直後 (感染 6.5~7 日)

に最も多数みられ, 主として盲腸, 結腸に分布する. このことから雌雄の gametocyte はこの schizont D の小型の merozoite から形成されるものと考えられた. 感染後 7 日目における macrogametocyte の大きさは $9\sim 20\mu \times 8\sim 17\mu$ ($13.7\pm 3.83\mu \times 12.0\pm 2.17\mu$) であり (Figs. 25, 26), 電顕的には二種の wall-forming body (WF), amylopectin 顆粒, 及びスポンジ様構造をした paired organelle 等を認める (Fig. 27). 又 WF の大きさは WF I ($0.3\mu\sim 0.5\mu$), WF II ($0.7\mu\sim 1\mu$) であり, WF I は WF II に比して小さい, そして WF II は均一な構造物として観察された. Microgametocyte は $8\sim 11\mu \times 6\sim 8\mu$ であつた (Fig. 28). Figs. 29, 30 には種々の段階の gametocyte がみられる感染 7 日目の結腸の組織像を示した. 電顕的には分裂後と思われる多数の核, 及び核と microgametocyte の細胞膜との間に centriole などが観察できた (Figs. 31, 32). 又, 少し分化した microgametocyte では鞭毛形成像も観察された (Figs. 33, 34). Microgamete は $3\times 0.3\sim 0.5\mu$ の大きさで, 約 5μ 長の 2 本の鞭毛を持つのがみられた. 電顕的には microgamete の鞭毛の種々の断面が観察された (Fig. 35). 以上計測した schizonts および gametocytes サイズを Table 2 にまとめた.

3) 反復感染と寄生部位の関係

Eimeria-free のマウスに sporulated oocyst を 1 回, 1,000 個投与した場合の寄生部位を Table 1 に示した. これから判るように寄生部位は主として盲腸, 及び結腸上部であり, schizont C, D, 及び gametocyte は結腸下部, 又, 結腸下部におけるよりは少数であるが直腸にも寄生がみられた.

Sporulated oocyst を 1 日 1 回 1,000 個ずつ 3 日連続して投与すると schizont A, B が回腸下部, 直腸にもみられ, gametocyte も多数回腸下部, 及び直腸に出現す

Table 1 Growth area of *Eimeria falciiformis* isolated in this study

Location	Schizont A, B (on 5 th day)	Schizont C, D (on 6 th day or 6 th day+6 hrs)	Gametocyte (on 7 th day)
Stomach	—	—	—
Jejunum	—	—	—
Ileum	—	—	±
Caecum	+++	+++	+++
Colon, upper	+++	+++	+++
Colon, lower	—	+++	+++
Rectum	—	++	++

Table 2 Measurements of mature schizonts and gametocytes in *Eimeria falciiformis* isolated in this study

Schizonts	Merozoite contained number	Size
Schizont A: 18-20 $\mu \times 10 \mu$ (observed on 5 th day)	8	18.7 \pm 0.97 $\mu \times 2 \mu$
Schizont B: 7-10 $\mu \times 7-10 \mu$ (observed on 5 th day)	8	11.7 \pm 0.98 $\mu \times 2 \mu$
Schizont C: 5-7 $\mu \times 5-7 \mu$ (observed on 6 th day)	4	6.9 \pm 0.78 $\mu \times 2 \mu$
Schizont D: 5-15 $\mu \times 3-8 \mu$ (observed on 6 th day + 6 hrs)	40-50	4.3 \pm 0.76 $\mu \times 1.5-2 \mu$
Gametocytes		
Macrogametocyte (observed on 7 th day)	13.7 \pm 3.83 $\mu \times 12.0 \pm 2.17 \mu$	
Microgametocyte (observed on 7 th day)	8-11 $\mu \times 6-8 \mu$	
Microgamete (observed on 7 th day)	3 \times 0.3-0.5 μ with two flagella (5 μ length)	

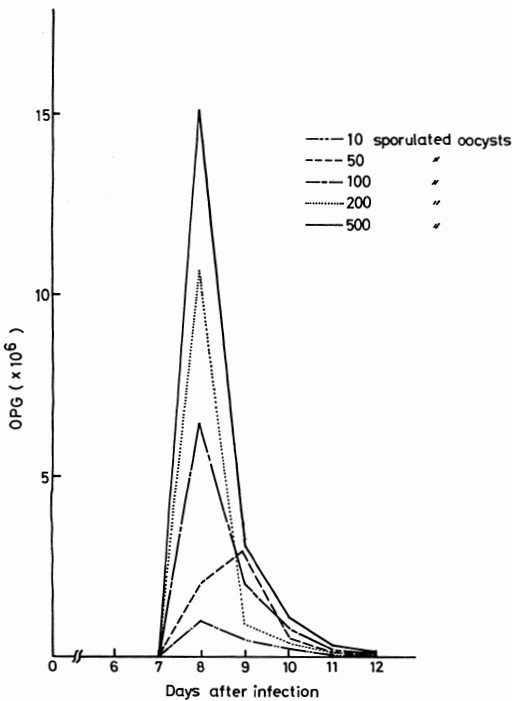


Fig. 37 Mean values of oocyst output in ICR mice (male, 5-6 weeks of age) with various numbers of sporulated oocyst 25 mice were used for each group.

るようになる。Fig. 36にこの反復感染によつて回腸下部に現れた schizont (schizont A, 又は B) を示した。

又, schizont C, D も反復感染によつて回腸下部にもみられるようになり, 反復感染によつて寄生部位がいくらか拡大することが示唆された。

4) Sporulated oocyst 投与数と oocyst 産生の関係

Fig. 37に示したように sporulated oocyst 10~500個程度の少ない投与数の範囲では投与数を増加するにつれて OPG 値も増加した。

考 察

我々が本実験において分離した *Eimeria* と他の研究者によつて記載されたマウスの *Eimeria* の比較を Table 3に示した。なお, この表にはその生活環が良く知られている種だけを載せた。本実験で分離した *Eimeria* の oocyst は Cerná and Sénand (1974) により記載された *E. falciiformis* var. *pragensis* とは大きさにおいて異なり, *E. ferrisi* (Levine and Ivens, 1965; Todd and Lepp, 1971) とは sporocyst residuum の形態が異なつた。そして *E. falciiformis* (Wenyon, 1926; Cordero dez Canpillo, 1959; Owen, 1975), *E. vermiformis* (Ernst *et al.*, 1971), 及び Mesfin and Bellamy (1978) により記載された *E. falciiformis* var. *pragensis* とは良く一致した。しかしながら *E. vermiformis* (Ernst *et al.*, 1971; Todd and Lepp, 1971) とはこの種が小腸にしか寄生しないことから本実験で分離した

Table 3 *Eimerian* species described in the mouse (*Mus musculus*)

<i>Eimeria</i> spp.	Oocyst size (μ m)	Sporocyst size (μ m)	Location	Prepatent period	Asexual stage	Peak of oocyst discharge	Merozoite discharge	Sporulation time	References
	20.1×17.8	11.6×6.7	caecum, colon ± lower ileum	7 days	?	8-9 days	4-6 days	4-5 days (16-21C)	Present study
<i>E. falciiformis</i>	?	?	stomach, small & large intestine	?	?	?	?	?	Jackson Clarke (1895)
	?	?	caecum, colon	?	?	?	?	4-6 days	Schuberg (1897)
	?	?	caecum, colon ± lower ileum	4-9 days	?	8-11 days	4-6 days	?	Reimer (1923)
	16-21× 11-17	breadth: width (2:3)	intestine	?	?	?	?	5-6 days	Wenyon (1926)
	?	?	?	5 days	?	7-10 days	4-5 days	3 days	Nieschulz & Bos (1931)
	21×18	10-12× 6-8	?	5 days	?	6-12 days	?	3 days (22-24C)	Cordero del Campillo (1959)
	(quotes cordero del campillo 1959)		caecum, colon ± lower ileum	4-7 days	4	9 days	4-6 days	1-6 days	Harberkorn (1970)
	18.4×15.6	11×7	caecum, colon	5 days	3	?	?	?	Owen (1975)
<i>E. falciiformis</i> <i>var. pragensis</i>	25×20	13.5×8.5	caecum, colon	7-8 days	4	?	?	3 days	Cérna' & Senaud (1969)
	21.2×18.3	12.2×7.2	caecum, colon ± lower ileum	7 days	4	8 days	?	3-3.5 days	Mesfin & Bellamy (1978)
<i>E. vermiciformis</i>	23.1×18.4	12.8×7.9	lower 2/3 of small intestine	7 days	2	10 days	?	?	Todd & Lepp (1971)
<i>E. ferrisi</i>	17×14	9.8×5.9	caecum, colon	3 days	3	?	?	?	Ankrom <i>et al.</i> (1971)

Eimeria とは明らかに異なり, *E. falciiformis var. pragensis* (Mesfin and Bellamy, 1978) とは merozoite の出現の仕方に違いを認めた。即ち *E. falciiformis var. pragensis* (Mestin and Bellemy, 1978) では4回の asexual generation の経過中, 大型 ($12.4 \sim 13.3 \mu \times 1.8 \sim 2.0 \mu$), と小型 ($4.5 \sim 5.0 \mu \times 1.2 \sim 1.6 \mu$) の merozoite が交互に出現し, 最終的には 4th generation の小型の merozoite より gametocyte が形成されるとされる (Mesfin and Bellamy, 1978) のに対し, 本実験で分離した *Eimeria* は感染経過に従って出現する merozoite の大きさは減少していき, 感染 6~6.5 日目における最も小型の merozoite 出現直後に gametocyte が出現する。しかし両者は, 大小の merozoite の出現の仕方は異なるが小型の merozoite から gametocyte が形成されるという点では一致した。又, schizont に含まれる merozoite の数においても最終世代の schizont では大きく異なり *E. falciiformis var. pragensis* (Mesfin and Bellamy, 1978) では18個の merozoite を含むのに対し本実験で分離した *Eimeria* では 40~50 個を含んでいる。そして Wenyon (1926) は *E. falciiformis* を感染させたマウスの腸上皮細胞中に 30 個以上の小型の merozoite を含む schizont を観察していることから, 我々は, 本実験で分離した *Eimeria* は *E. falciiformis var. pragensis* (Mesfin and Bellamy, 1978) と oocyst の大きさ, 形態, 寄生部位, prepatent period において極めて類似はしているが, 異なる種と考え, *E. falciiformis* と同定するのが妥当と考えた。しかし, *E. falciiformis* については以下に述べる多くの異った見解が示されている。

寄生部位では Table 3 にその概要をまとめたが, *E. falciiformis* における初期の研究では, stomach, small and large intestine としている研究者 (Jackson Clarke, 1895; Wenyon, 1926 より引用) もみられ, 又, Wenyon (1926) もその寄生部位を intestine としか明記していないため, 現在に至るまで混乱があるが, その後, 各研究者が実際に観察し記載したデータでは盲腸と結腸が主な寄生部位であるという点で一致している。我々の得た寄生部位についてのデータは Schuberg (1897), Reimer (1923), Harberkorn (1970) 及び Owen (1975) とほぼ同じで, 大型の schizont に関しては盲腸, 及び結腸上部が主な寄生部位という結論を得ている (Table 1)。Prepatent period, 及び asexual generation の回数についても寄生部位と同様 *E. falciiformis* においては一致した結論に達していない。Prepatent period についても Table 3 に

みる如く大体 4~9 日と一定しておらず, Harberkorn (1970) によれば理由は不明であるが prepatent period は sporulated oocyst 投与数を増やすと短縮するといわれ, 又, Owen (1975) は自然感染或いは二種以上の *Eimeria* の混合感染が起きていたためであろうと考えた。Harberkorn (1970) の観察した上記の現象は *E. falciiformis var. pragensis* (Mesfin and Bellamy, 1978) では, 観察されなかった。本実験条件下では prepatent period は 7 日であった。しかし, oocyst 排出の peak が大体 8~10 日という見解ではほぼ一致している。以上の様に *E. falciiformis* の prepatent period については更に詳細な研究が必要と考えられるが, *E. falciiformis* として包括されている種の中に変種が存在する可能性もあろう。Asexual generation の回数については 3 回 (Owen, 1975), 及び 4 回 (Harberkorn, 1970) と二通りの見解が存在する。本実験においては asexual generation の回数について詳細な検討は行なわなかった。

電顕的観察からは, 感染後 6~6.5 日目に出現する gametocyte に分化して行くと思われる小型の merozoite が電顕的にもつと早い時期に出現する大型の merozoite と大きさのみならず, organelle の発達等の点で異なることが示唆されたのは大変興味深く, 更に詳細な研究の対象となろう。又, 大型の merozoite には, 長大なミトコンドリアが観察され, おそらくこの merozoite には 1 個だけのミトコンドリアが存在するものと考えられた。そしてこの所見は Pellérdy *et al.* (1974) による *E. falciiformis* の merozoite のミトコンドリアがやはり長大な 1 個のミトコンドリアからなるという観察と一致した。本種の macrogametocyte については wall-forming body (WF) の形態が現在知られている *Eimeria* の中では *E. falciiformis* (Scholtyseck *et al.* 1971) だけがもつといわれる特徴と良く一致した。即ち WF I の大きさが WF II より小さく, WF II が均一な構造を示すことである。そして Scholtyseck *et al.* (1971) により記載された WF の大きさは WF I (0.3μ), WF II (1μ) であり, 我々の得た結果 WF I ($0.3 \mu \sim 0.5 \mu$) WF II ($0.7 \mu \sim 1 \mu$) とほぼ一致した。又, microgamete の鞭毛の数については, Scholtyseck *et al.* (1971) によれば, 2 本の長い鞭毛と虫体に沿った 1 本の短い鞭毛, 合計 3 本の鞭毛が存在するとされている。我々の観察からは光顕では明らかな 2 本の長い鞭毛を観察し, 電顕的には 2~3 本の鞭毛の存在が示唆された。

以上の如く、*E. falciiformis* に関しては、その寄生部位、prepatent period、及び asexual generation 等について依然種々の異なるデータが提出されているが、本論文に述べた根拠により、この *Eimeria* sp. を *E. falciiformis* と考えるのが妥当であろうと思われた。

要 約

市販マウスより分離した *Eimeria* 属原虫を検討し、以下の所見を得た。

1) Sporulated oocyst の大きさは $20.1 \pm 1.32 \mu \times 1.78 \pm 1.22 \mu$ で、1~3個の polar granule がみられ、sporocyst は $11.6 \pm 0.57 \mu \times 6.7 \pm 0.55 \mu$ で、顕著な stieda body と sporocyst residuum を認めた。

2) Sporozoite は静止時には $13 \sim 15 \mu \times 3 \mu$ 、伸張時には $17 \sim 20 \mu \times 2.5 \sim 3 \mu$ であった。

3) Ist generation schizont は感染36時間目に初めてみられ、感染5日目になると $18 \sim 20 \mu \times 10 \mu$ で約8個の大型の merozoite を含む schizont が盲腸、結腸上部にみられた。まれではあるが、ほぼ同時期にやや小型の merozoite を含む小型の schizont も認められた。これらの merozoite は感染6日目には、腸上皮細胞中に殆んどみられなくなり、変つて盲腸、結腸、直腸に4個の小型の merozoite を含む小型の schizont がみられる様になる。更に6~7時間後には $4.3 \pm 0.76 \mu \times 1.5 \sim 2 \mu$ と最も小型の40~50個の merozoite を含む schizont が認められた。又、感染5日目の大型の merozoite と6日目以降に現れる小型の merozoite では電顕的に organelle の発達に差がうかがえた。

4) Gametocyte は感染6.5~7日目に主として盲腸、結腸、直腸に、又まれに回腸下部に認められた。macro-、及び microgametocyte の大きさはそれぞれ $13.7 \pm 3.83 \mu \times 12.0 \pm 2.17 \mu$ 、 $8 \sim 11 \mu \times 6 \sim 8 \mu$ であり、microgamete は光顕的には $3 \times 0.3 \sim 0.5 \mu$ で約 5μ 長の2本の鞭毛を持つのがみられた。

5) Prepatent period、及び patent period は各々7日、6日であった。

6) Sporulated oocyst を反復感染させると感染5日目に大型の schizont が回腸下部、直腸にもみられ、寄生部位が拡大することが示唆された。

7) Oocyst 投与数の少ない場合、OPG は投与数が増えるにつれて増加した。

これらの実験結果、特に oocyst、merozoite 等の形態、寄生部位、その他を従来の記載と比較した結果、本原虫を *E. falciiformis* とするのが妥当と考えた。

文 献

- 1) Aikawa, M. and Sterling, C. R. (1974): Growth and multiplication. in "Intracellular parasitic protozoa", Academic press, New York, p. 15-19.
- 2) Ankrom, S. L. Chobotar, B. and Ernst, J. V. (1975): Life cycle of *Eimeria ferrisi*, Levine and Ivens, 1965, in the mouse, *Mus musculus*. J. protozool., 22, 317-323.
- 3) Cérná, Z., Sénaud, J., Mehlhorn, H. and scholtyssek, E. (1974): Étude, comparée des relations morphologiques et immunologiques chez les coccidies de la souris: *Eimeria falciiformis* et *Eimeria pragensis* (Coccidia, Eimeriidae). Folia Parasitol., 21, 301-309.
- 4) Cordero, del Compillo, C. (1959): Estudio sobre *Eimeria falciiformis* (Eimer 1870) parásito de ratón. 1. observaciones sobre el periodo prepatente, esporulacion, morfologia de los ooquistes y estudio biometrico de los mismos, produccion de ooquistes y pathogenicidad. Rev. Iberica de parasitol., 19, 351-368.
- 5) Doran, D. J. (1973): Excysting sporozoites. in "The Coccidia" (Hammond, D. M. and Long, P. L. eds), University park press, Baltimore, p. 432.
- 6) Ernst, J. V., Chobotar, B. and Hammond, D. M. (1971): The oocysts of *Eimeria vermiformis* sp. n. and *Eimeria papillata* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the mouse (*Mus musculus*). J. protozool., 18, 221-223.
- 7) Harberkorn, A. (1970): Die Entwicklung von *Eimeria falciiformis* (Eimer 1870) in der weissen Maus (*Mus musculus*). Z. Parasitenk., 34, 49-67.
- 8) Levine, N. D. and Ivens, D. (1965): The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of rodents. The University of Illinois Press, Urbana, pp. 131-135.
- 9) Mesfin, G. W. and Bellamy, J. E. C. (1978): The life cycle of *Eimeria falciiformis* var. *pragensis* (Sporozoa: Coccidia) in the mouse, *Mus musculus*. J. Parasitol., 64, 696-705.
- 10) Nieschulz, O. and Bos, A. (1931): Über der Infektionsverlauf der Mäusekokzidiosis. Z. Infektionskrankheiten und Hyg. Haustiere. 39, 160-168.
- 11) Owen, D. (1975): *Eimeria falciiformis* (Eimer, 1870) in specific pathogen-free and gnotobiotic mice. Parasitol., 71, 293-303.
- 12) Pellérdy, L. P. (1974): Coccidia and Cocci-

- diosis. 2nd ed. Akademiai Nyomda, Budapest, p. 592-604.
- 13) Reimer, O. (1923) : Zur Pathologie der Mause Kokzidiose. Diss Tierarztliche, Hochschule, Berlin
 - 14) Scholtyseck, E., Mehlhorn, H., and Hammond, D. M. (1971) : Fine structure of macrogametes and oocysts of coccidia and related organisms. *Z. Parasitenk*, 37, 1-43.
 - 15) Scholtyseck, E., Mehlhorn, H., and Harberkorn, A. (1971) : Die Feinstruktur der Makrogameten des Mausecoccids *Eimeria falciiformis*. *Z. Parasitenk*, 37, 44-55.
 - 16) Scholtyseck, E., Mehlhorn, H., and Hammond, D. M. (1972) : Electron microscope studies of microgametogenesis in coccidia and related groups. *Z. Parasitenk*, 38, 95-131.
 - 17) Schuberg, A. (1897) : Die Coccidien aus dem Darne der Maus. *Verh. naturhist-med. Vereins Heidelberg*, 5, 369-398.
 - 18) Todd, S. K. and Lepp, D. L. (1971) : The life cycle of *Eimeria vermiformis* Ernst, Chobotar and Hammond, 1971 in the mouse. *Mus musculus*. *J. Protozool.*, 18, 332-337.
 - 19) Wenyon, C. M. (1926) : Protozoology. A manual for medical men, veterinarians and zoologists. vol. 2, Baillieue, Tindall and Cox, London, pp. 848-851.

Abstract

STUDY ON *EIMERIA FALCIFORMIS*: ISOLATION FROM THE LABORATORY
MOUSE AND CHARACTERIZATION OF ITS LIFE CYCLE

SEIKI KOBAYASHI, TSUTOMU TAKEUCHI, MASANOBU TANABE,
YOSHIMASA KANEDA KEIZO ASAMI

(*Department of Parasitology, School of Medicine, Keio Uni-
versity, Shinjuku, Tokyo*)

AND TATSUSHI FUJIWARA

(*Electron Microscope Laboratory, Keio University, Shinjuku, Tokyo*)

A strain of *Eimeria* sp. was isolated from a laboratory mouse and the detail of its life cycle was characterized.

The size of sporulated oocyst was $20.1 \pm 1.32 \mu \times 1.78 \pm 1.22 \mu$ and contained 1-3 polar granules. The sporocyst was $11.6 \pm 0.57 \mu \times 6.7 \pm 0.55 \mu$ and was found to have a distinct stieda body as well as a sporocyst residuum. The size of sporozoite was $13-15 \mu \times 3 \mu$.

The 1st generation schizont was first detected at 36 hours of infection, and on 5th day of infection, numerous number of large schizonts containing about eight large merozoites were found in caecum as well as in upper colon. Although rather rare, the smaller schizonts containing smaller merozoites were also detected at the same time of infection. These merozoites are released, reenter the epithelial cells of caecum, colon or rectum and eventually develop into small schizonts containing 4 merozoites. In 6-7 hours, the schizonts appeared to develop to 40-50 contain small merozoites ($4.3 \pm 0.75 \mu \times 1.5-2 \mu$).

An electromicroscopical observation revealed that organelles of the larger merozoites observed on 5th day are much more developed than those of smaller merozoites on 6th day.

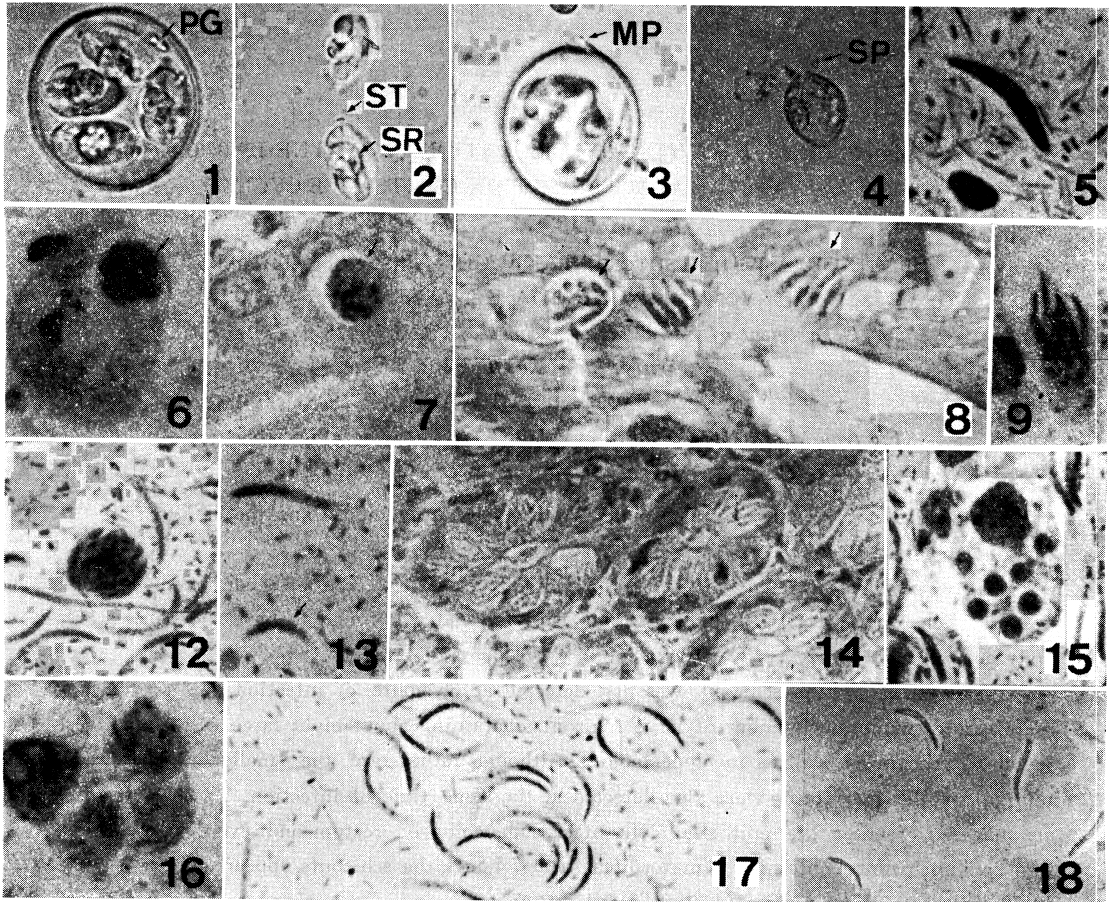
Gametocytes were primarily observed on 6.5-7th day of infection around caecum, colon and rectum, and also in lower ileum at much lower incidence. The size of macro- and microgametocyte was $13.7 \pm 3.83 \mu \times 12.0 \pm 2.17 \mu$ and $8-11 \mu \times 6-8 \mu$ respectively. The microgamete was measured to be $3 \times 0.3-0.5 \mu$ and found to have two flagella of 5μ length.

Prepatent and patent period were 7 and 6 days respectively.

When *Eimeria*-free mice were repeatedly infected with sporulated oocysts of the isolated *Eimeria* sp., the larger schizonts were detected not only in caecum and upper colon but in lower colon and rectum, suggesting that the growth area is expanded by repeated infection.

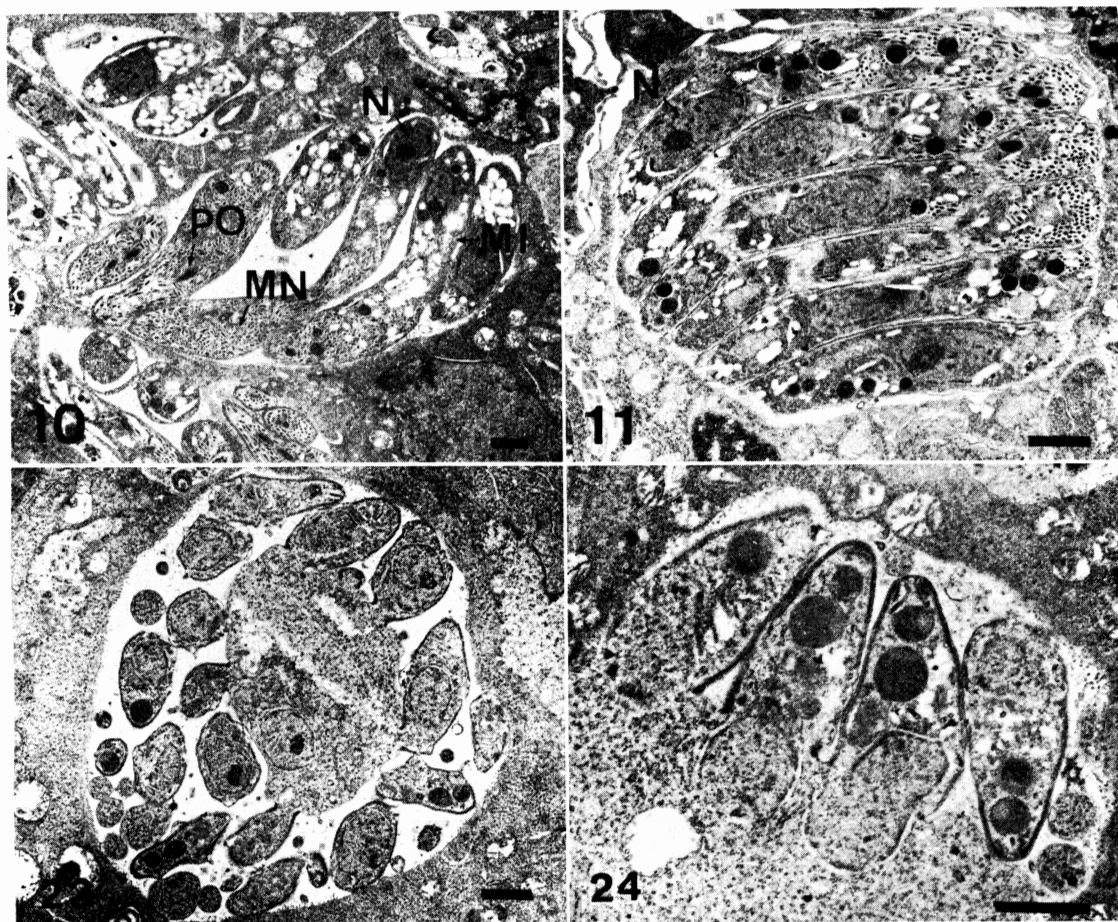
The OPG value increased almost in proportion to the number of sporulated oocysts given to the mice at the range of 10-500 oocysts per mouse.

As a result of examining the data obtained by previous workers, these findings, particularly the morphological ones on oocyst and merozoite and the ones on growth area, suggest that the parasite isolated in the present study is *Eimeria falciformis*.



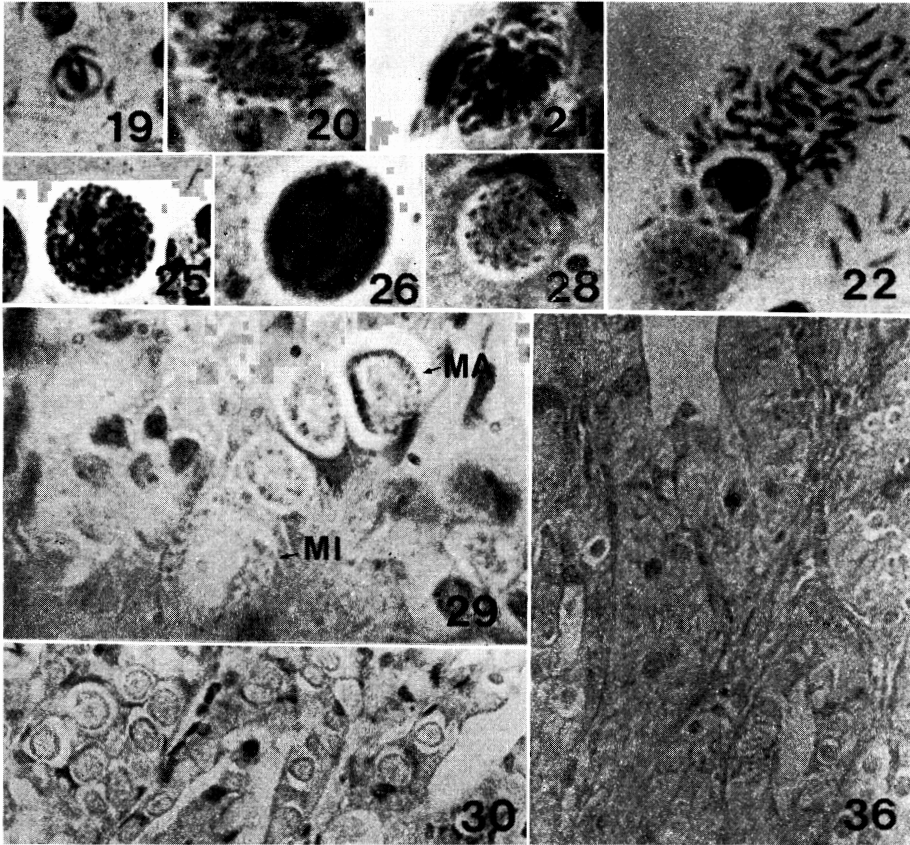
Explanation of Figures

- Fig. 1 A sporulated oocyst PG : Polar granule.
 Fig. 2 Two sporocyst ST : Stieda body ; SR : Sporocyst residuum.
 Fig. 3 Excystation of sporozoite MP : Micropyle.
 Fig. 4 Advanced stage of excystation of sporozoite SP : Sporozoite.
 Fig. 5 A sporozoite.
 Fig. 6 A mononuclear schizont at 24 hours of infection (Caecum).
 Fig. 7 Another mononuclear schizont at 24 hours of infection (Caecum).
 Fig. 8 1st generation schizonts at 36 hours of infectiot (Caecum).
 Fig. 9 A schizont A on 5th day of infection.
 Fig. 10 An electron mirograph showing schizont A or schizont B on 5th day of infection N : Nucleus ; PO : Paried organelle ; MN : Microneme MI. Mitochondrion Note well-developed organelles, particularly microneme ($\times 5,000$).
 Fig. 11 Another micrograph showing schizont A or schizont B on 5th nay of infection N : Nucleus ($\times 8,000$).
 Fig. 12 Schizont on 5th day of infection.



Explanation of Figures

- Fig. 13 Merozoites in intestinal lumen released from schizont B.
 Fig. 14 A view of upper colon exhibiting schizogony on 5th day of infection.
 Fig. 15 A multi-infected cell.
 Fig. 16 A cell showing three mature schizonts.
 Fig. 17 Merozoites in the feces on 6th day of infection.
 Fig. 18 Another view of merozoites in the feces on 6th day infection.
 Fig. 19 A schizont C on 6th day of infection.
 Fig. 20 A schizont D on 6th day + 6 hours.
 Fig. 21 and 22 Other views of schizont D on 6th day + 6 hours.
 Fig. 23 An electron micrograph of schizont C or schizont D ($\times 6,000$).
 Fig. 24 Another micrograph of schizont C or schizont D Note rather poor development of organelles, particularly microneme.
 Fig. 25 A macrogametocyte of 7th day of infection.
 Fig. 26 Another view of macrogametocyte on 7th day of infection.
 Fig. 27 An electron micrograph of macrogametocyte on 7th day of infection WF I: Wall-forming body of type I; WF II: wall-forming body of type II; AM: Amylopectin granule; ST: Sponge like structure of paired organelles ($\times 5,000$).



Explanation of Figures

- Fig. 28 A microgametocyte on 7th day of infection.
- Fig. 29 Gametocytes in the epithelial cells of the colon MA: Macrogametocyte; MI: Microgametocyte.
- Fig. 30 Gametocytes in the epithelial cells of the colon on 7th day of infection.
- Fig. 31 An electron micrograph of microgametocyte N: Nucleus; CE: Centriole. Note numerous nuclei after division ($\times 8,000$).
- Fig. 32 Another micrograph of microgametocyte AM: Amylopectin granule ($\times 12,000$).
- Fig. 33 Another micrograph of microgametocyte exhibiting exflagellation of microgamete (12,000).
- Fig. 34 Another micrograph of the exflagellation ($\times 12,000$).
- Fig. 35 An electron micrograph of microgametes ($\times 13,000$).
- Fig. 36 Schizonts observed in lower colon after repeated infection.

