

## *Cryptosporidium* sp. のニワトリにおける オーシストの排泄状況と免疫原性

松井利博<sup>1)</sup> 森井 勤<sup>1)</sup> 藤野隆志<sup>1)</sup> TADEJA, S. L.<sup>2)</sup> 板倉智敏<sup>2)</sup>

(掲載決定:平成4年1月10日)

### 要 約

ニワトリ由来 *Cryptosporidium* sp. のオーシストをニワトリに接種し、ニワトリの週齢による感受性の差および接種オーシスト数とオーシストの排泄状況との関係について調べ、さらに初感染耐過鶏に同種オーシストを再接種してその免疫原性について検討した。

3~10と14週齢のニワトリ各1群3羽にオーシスト $3.5 \times 10^6$ 個を経口接種した結果、すべての群に6~7日目からオーシストの排泄が認められ、10週齢までの各群では7日目に $10^5$ 個台、10日目には $10^6$ 個台のOPG値(糞便1g中のオーシスト数)を示したが、14週齢群は10日目まで $10^4$ 個台のまま推移した。

オーシスト $3.5 \times 10^6$ 個とその10倍階段希釈系列を $10^2$ 個台まで作製して、3週齢と4週齢の白色レグホン各1群3羽にそれぞれ接種した。その結果、全群に6~9日目からオーシストの排泄が認められ、感染10日目までは接種オーシスト数が少ないほどOPG値も少なくなる傾向がみられ、接種オーシスト数とOPG値との間には相関関係がみられた。感染11日目以降のOPG値は不規則で、接種オーシスト数との間に顕著な差がみられなかったが、オーシスト排泄期間は4週齢の方が3週齢よりも短い傾向がみられた。これらの感染耐過鶏に対し、初感染後28日目に $3.5 \times 10^6$ 個のオーシストを再接種した結果、3週齢の全群と4週齢の3群からはオーシストの再排泄は全く認められなかった。再接種後にオーシストの排泄が認められたのは初感染時におけるオーシストの排泄数が最も少なかった4週齢の2群である。これらの成績から、本種はなかり強い免疫原性を有することが示唆された。

**Key words:** *Cryptosporidium*, Immunogenicity, OPG values

### 緒 論

コクシジアの大多数の種は宿主特異性が顕著であり(Marquardt, 1973), また宿主における感染状況を調べる上ではオーシストの排泄状況が重要視されている(Frenkel, 1973; Haberkorn, 1971; Matsui *et al.*, 1981, Stockdale and Cawthorn, 1981; 堤ら, 1973)。*Cryptosporidium* は、自然界でヒトおよび多くの動物から検出される最も小さなコクシジアの仲間で、実験動物への感染試験も行われているが(Fayer and Ungar, 1986), その宿主域が広く、オーシストの大きさにも変異があることから種の異同についてはまだ不明な点が多い。また本原虫では、宿主におけるオーシストの排泄状況についても一部の宿主を除いて明確にされていない。*Cryptosporidium* のヒトへの感染経路の解明や本症の

治療薬の開発・評価などには、まず本原虫のコクシジアにおける基礎的な生物学的性状について詳細に調べることが必要である。

今回、著者らは自然感染鶏から分離した *Cryptosporidium* のオーシストをニワトリに接種してそのOPG値(糞便1g中のオーシスト数)の推移を調べることにより、1) ニワトリの週齢による感受性の違い、2) 接種オーシスト数によるオーシスト排泄状況の違い、3) 本種の免疫原性について検討した。

### 材料および方法

供試したニワトリは3~14週齢の白色レグホンの雄で、実験前に数回蔗糖液浮遊法による糞便検査を行ない、オーシスト陰性であることを確認した後、*coccidium-free*の管理下で飼育した。

*Cryptosporidium* sp. は、自然感染鶏の糞便から分離したオーシストをニワトリに接種した後、そのファブリキウス嚢より純粋に分離したもので、オーシストの

<sup>1)</sup> 杏林大学医学部寄生虫学教室

<sup>2)</sup> 北海道大学獣医学部比較病理学教室



7日目から認められ、10週齢までの各群では10日目まではほぼ同様の推移をたどり、いずれも7日目に $10^5$ 個台を、また10日目には $10^6$ 個台のOPG値を示した。感染11日目以降では patent period に違いがみられたものの、週齢による顕著な差は認められなかった。一方、14週齢群は10日目まで $10^4$ 個台のまま推移し、10週齢までの各群に較べて低いOPG値を示した。

3週齢と4週齢のニワトリに $10^6 \sim 10^2$ 個台のオーシストを接種した結果、ともに感染10日目までは接種オーシスト数とOPGとの間に相関関係が認められた (Figs. 2, 3)。すなわち、 $10^5$ 個台と $10^4$ 個台接種群とは6~7日目からオーシストを排泄し、双方とも7日目に $10^4$ 個台を示し、8日目に一時下降した後、9日目には再び上昇して $10^5$ 個台接種群は $10^5$ 個台を、また $10^4$ 個台接種群は $10^4$ 個台のOPG値をそれぞれ示した。一方、 $10^3$ 個台と $10^2$ 個台接種群とは7ないし9日目からオーシストの排泄が認められたが、4週齢の $10^2$ 個台接種群が9日目に $10^4$ 個台に達した他は $10^3$ 個台またはそれ以下の値を示した。11日目以降では3週齢の方が4週齢よりも長期間オーシストを排泄する傾向がみられたが、接種数とOPG値との間には差が認められなかった。

なお、 $10^6$ 個台接種群はいずれもその典型的な推移を示した。

#### 免疫原性

3週齢と4週齢の初感染耐過鶏に再接種を行なった結果、4週齢5群のうち3群と3週齢の全群からはオーシストの排泄が全く認められなかった。しかし、4週齢の初感染時におけるオーシストの排泄数が最も少なかった2群の内、 $10^3$ 個台接種群が再接種後10日目に1日のみ蔗糖液浮遊法で、また $10^2$ 個台接種群は再接種直後から25日間に渡って $10^4 \sim 10^5$ 個台のOPG値を示した。なお、再接種時の対照群は接種後6ないし7日目からオーシストを排泄し、10日目には $10^6$ 個台のOPG値を示した (Figs. 2, 3)。

#### 考 察

一般に、コクシジアでは宿主におけるオーシストの排泄数は接種オーシストの数に依存しており (Long, 1973)、それらのOPG値のピークは種によって一峰性を示すものと (Mesfin and Bellamy, 1978)、二峰性を示すもの (Ito *et al.*, 1978) とがあることがよく知られている。これらの特性から、コクシジアではオーシストの排泄状況を見ることにより、その宿主における原虫の摂取数や宿主として好適か否かなどが推測でき、治療薬や免疫抑制剤の効果判定などにも応用されている (Dubey and Frenkel, 1974; 飯島ら, 1989; Long and Rose, 1970; 堤ら, 1974; Tsunoda *et al.*, 1968)。

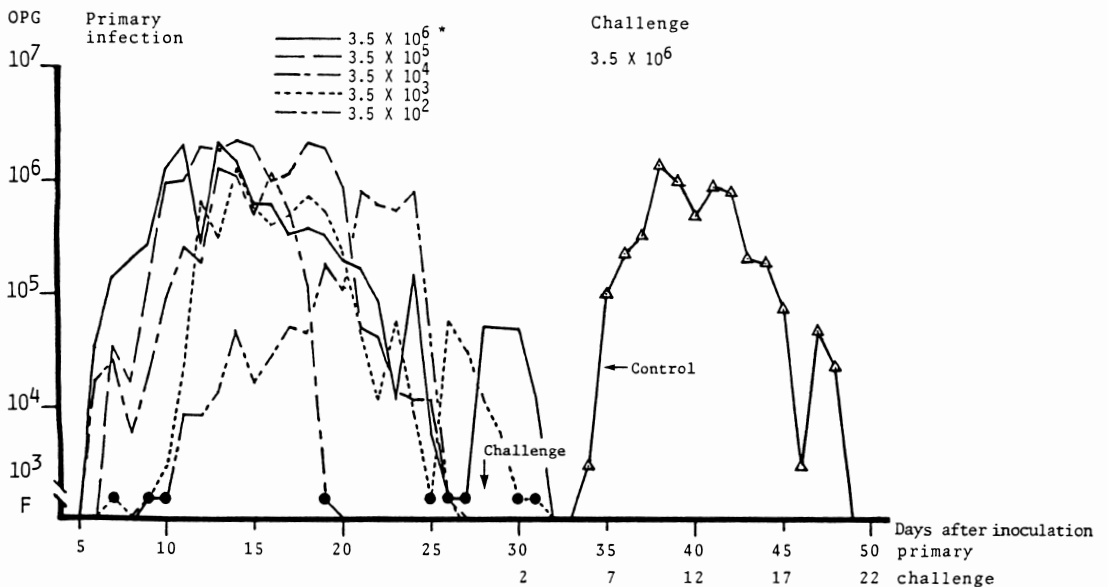


Fig. 2 Mean daily oocyst output in 3-week-old chickens inoculated with  $3.5 \times 10^6 \sim 10^2$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. after primary and challenge inoculation. (3 chickens/group).

\*: Number of oocysts inoculated primary.

Challenge: On day 28 after primary inoculation.

F: Oocyst detected by sugar flotation method.

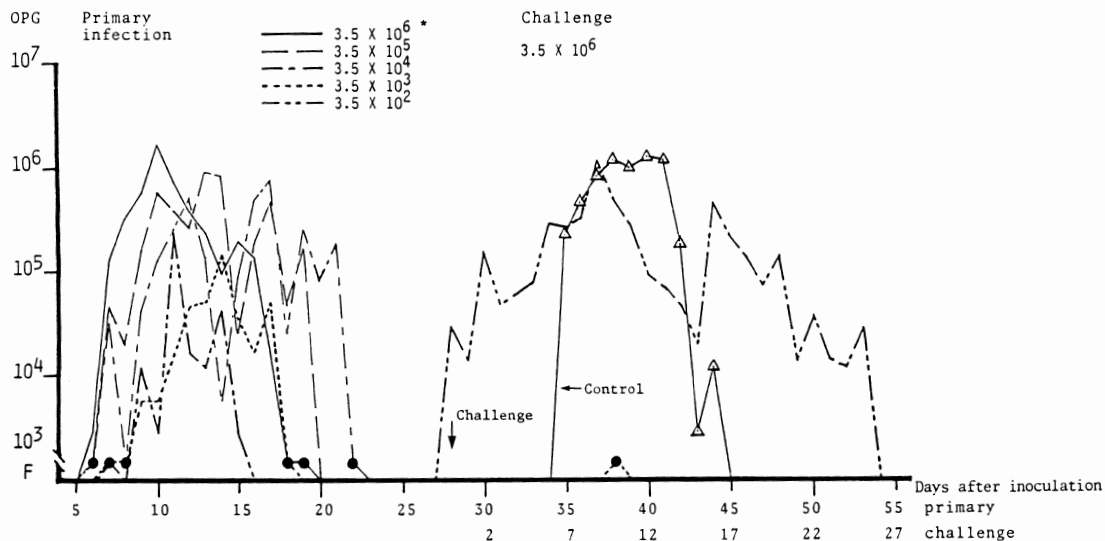


Fig. 3 Mean daily oocyst output in 4-week-old chickens inoculated with  $3.5 \times 10^6 \sim 10^2$  oocysts of *Cryptosporidium* sp. after primary and challenge inoculation. (3 chickens/group).

\*: Number of oocysts inoculated primary.

Challenge: On day 28 after primary inoculation.

F: Oocyst detected by sugar flotation method.

*Cryptosporidium* のオーシストの排泄状況については、Iseki *et al.* (1989) は *C. muris* のオーシスト  $1 \times 10^6$  個接種マウスが 1 日当たり  $10^5$  個台以上のオーシストを 20~46 日間排泄したことを、また Asahi *et al.* (1991) は実験感染ネコが数日間隔で OPG 値のピークを繰り返したことを報告している。しかしいずれも接種オーシスト数と排泄オーシスト数との関係などについては明らかにされていない。*Cryptosporidium* の種の解明には各種動物から分離された原虫について動物相互への交叉感染試験を行なう必要があることから、これらの原虫についてまずオーシストの排泄状況を調べ、もし接種数と排泄数との間に何等かの相関関係が認められるならば、OPG 値の推移を観察することにより宿主として好適であるか否かの判断の一助になるものと考えられる。

今回ニトリ由来 *Cryptosporidium* sp. について実験感染鶏におけるオーシストの排泄状況を調べた結果、10 週齢以前のニトリではオーシストを同一数接種するといずれも感染 10 日目まではほぼ同様の OPG 値の推移を示すこと、OPG 値の最高は  $10^6$  個台で、接種オーシスト数を減らすと OPG 値も低くなることから感染 10 日目までは認められることなどが明らかになった。しかし、感染 10 日目を降にはこれらの関係は認められなかった。したがって、本種では 10 週齢までのニトリにおける実験感染では、それらの OPG 値の推移から宿主における感染状況がある程度推測できるものと考えられた。

なお、本種 (Itakura *et al.*, 1984) の種名について Current *et al.*, (1986) は *C. baileyi* であろうと記載している。しかし *C. baileyi* のオーシストは  $6.6 \times 5.0 \mu\text{m}$  (Lindsay *et al.*, 1989), prepatent period は 3 日で盲腸への寄生は認められない (Current *et al.*, 1986) のに較べて、本種のオーシストはそれより小さく、prepatent period は長く、また Itakura *et al.*, (1984) は盲腸への寄生を認めていることから、本種が *C. baileyi* である可能性は少ないが、さらに検討を要するものと考えられる。

*Cryptosporidium* に対する有効な治療薬はまだ見当たらないが、本原虫のオーシストまたはスポロゾイトでウシを高度免疫し、その初乳を免疫能の低下した感染患者に経口投与した場合や、その投与後にオーシストを接種したウシやマウスでは下痢などの症状が軽減され、排泄オーシスト数の減少や消失もみられたことが報告されている (Tzipori *et al.*, 1986; Fayer *et al.*, 1989 a, 1989 b)。しかし、報告者によりそれぞれ独自の排泄オーシスト数の測定方法を用いているために、これらの *Cryptosporidium* はかなり強い免疫原性を有するものと考えられるものの、宿主における感染状況や免疫効果の程度についての比較が困難である。今回調べたニトリ由来の *Cryptosporidium* sp. では、初感染時に  $10^5$  個台の OPG 値を 10 日間前後示した宿主は、再接種による感染を完全に阻止したが、初感染時に主として  $10^4$

個台の低いOPG値を示した2群では、再接種後にオーシストの排泄が認められた。この内1群は再接種直後からその排泄が認められており、これは初感染時における原虫の増殖が少なかったために宿主の免疫反応が不十分で、初感染原虫が再燃したものではないかと考えられた。他の1群では蔗糖浮遊法でごく少数のオーシストが検出されたのみであることから、本種はかなり強い免疫原性を有することが示唆された。今後他の動物から分離された *Cryptosporidium* についても同様の試験を行ない、またそれらの原虫相互に交叉免疫原性があるか否かについて調べれば種の異同を解明することができるものと考えられる。

#### 謝 辞

御校閲を頂いた辻 守康杏林大学医学部教授に深謝します。

#### 文 献

- 1) Asahi, H., Koyama, T., Arai, H., Funakoshi, Y., Yamaura, H., Shirasaka, R. and Okutomi, K. (1991) : Biological nature of *Cryptosporidium* sp. isolated from a cat. *Parasitol. Res.*, 77, 237-240.
- 2) Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1974) : Immunity to feline toxoplasmosis : Modification by administration of corticosteroids. *Vet. Path.*, 11, 350-379.
- 3) Fayer, R. and Ungar, B. L. P. (1986) : *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.*, 50, 458-483.
- 4) Fayer, R., Perryman, L. E. and Riggs, M. W. (1989 a) : Hyperimmune bovine colostrum neutralizes *Cryptosporidium* sporozoites and protects mice against oocyst challenge. *J. Parasitol.*, 75, 151-153.
- 5) Fayer, R., Andrews, C., Ungar, B. L. P. and Blagburn, B. (1989 b) : Efficacy of hyperimmune bovine colostrum for prophylaxis of cryptosporidiosis in neonatal calves. *J. Parasitol.*, 75, 393-397.
- 6) Frenkel, J. K. (1973) : Toxoplasmosis : parasite life cycle, pathology, and immunology. *The Coccidia* (ed. D. M. Hammond with P. L. Long), University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 343-410.
- 7) 飯島利彦・松井利博・森井 勤・小林富美恵・藤野隆志 (1989) : *Eimeria caviae* 感染モルモットにおける Sulfadimethoxine と Sulfamonomethoxine の効果. *寄生虫誌*, 38, 129-134.
- 8) Iseki, M., Maekawa, T., Moriya, K., Uni, S. and Takada, S. (1989) Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.*, 75, 218-222.
- 9) Haberkorn, A. (1971) : Zur Wirtsspezifität von *Eimeria contorta* n. sp. (Sporozoa : Eimeriidae). *Z. Parasitenk.*, 37, 303-314.
- 10) Ito, S., Tsunoda, K. and Shimura, K. (1978) : Life cycle of the large type of *Isoospora bigemina* of the cat. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.*, 18, 69-82.
- 11) Long, P. L. (1973) : Pathology and pathogenicity of coccidial infections. *The Coccidia* (ed. D. M. Hammond with P. L. Long), University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 253-294.
- 12) Long, P. L. and Rose, M. E. (1970) : Extended schizogony of *Eimeria mivati* in beta-methasone-treated chickens. *Parasitology*, 60, 147-155.
- 13) Marquardt, W. C. (1973) : Host and site specificity in the Coccidia. *The Coccidia* (ed. D. M. Hammond with P. L. Long), University Park Press, Baltimore, Butterworths, London, 23-43.
- 14) Matsui, T., Morii, T., Iijima, T., Ito, S., Tsunoda, K., Correa, W. M. and Fujino, T. (1981) : Cyclic transmission of the small type of *Isoospora bigemina* of the dog. *Jap. J. Parasit.*, 30, 179-186.
- 15) Mesfin, G. M. and Bellamy, J. E. C. (1978) : The life cycle of *Eimeria falciformis* var. *pragensis* (Sporozoa : Coccidia) in the mouse, *Mus musculus*. *J. Parasitol.*, 64, 696-705.
- 16) Stockdale, P. H. G. and Cawthorn, R. J. (1981) : The coccidian *Caryospora bubonis* in the great horned owl (*Bubo virginianus*). *J. Protozool.*, 28, 255-257.
- 17) Tsunoda, K., Imai, S., Tsutsumi, Y. and Inoue, S. (1968) : Clinical effectiveness of sulfamonomethoxine and sulfadimethoxine in spontaneous coccidial infections in rabbits. *Jpn. J. vet. Sci.*, 30, 109-117.
- 18) 堤 可厚・保坂啓子・松室達郎・船橋史憲 (1973) : 養鶏場における日本ウズラの *Coxsackia* の感染とその病原性について. *日本家禽学会誌*, 10, 41-46.

- 19) 堤 可厚・松室達郎・船橋史憲 (1974) : ウズラ飼育場におけるコクシジウム感染ウズラに対する鶏コクシジウム剤の効果. 畜産の研究, 28, 1-4.
- 20) Tzipori, S., Roberton, D. and Chapman,

C. (1986) : Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. Br. Med. J., 293, 1276-1277.

[Jpn. J. Parasitol., Vol. 41, No. 1, 24-29, February, 1992]

Abstract

OOCYST PRODUCTION AND IMMUNOGENICITY  
OF *CRYPTOSPORIDIUM* SP. IN CHICKENS

TOSHIHIRO MATSUI<sup>1)</sup>, TSUTOMU MORII<sup>1)</sup>, TAKASHI FUJINO<sup>1)</sup>,  
SIMBORIO LUZUIMIMDA TADEJA<sup>2)</sup> AND CHITOSHI ITAKURA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Parasitology, Kyorin University School of Medicine,  
Shinkawa 6-20-2, Mitaka, Tokyo 181, Japan

<sup>2)</sup>Department of Comparative Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,  
Hokkaido University, Sapporo 060, Japan

Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium* sp. isolated from chickens were examined experimentally in chickens. Chickens used were 3- to 14-weeks-old White Leghorn. OPG values (the number of oocyst per gram of feces) were measured daily as follows; 1g of fecal sample was mixed with 4ml of water, added to 35ml of sugar solution with 1.266 gravity, stirred using magnetic stirrer for 10 min., then 0.1ml of the fecal suspension was placed onto the plankton counting chamber, and the number of oocysts was counted under a microscope.

To examine the relationship between the OPG values and the age of chickens, nine groups of 3 chickens being 3 to 10 and 14 weeks old were inoculated with  $3.5 \times 10^6$  oocysts and their OPG values were measured. All groups began to shed oocysts from day 6~7 PI. The OPG values of 3- to 10-weeks-old groups were  $10^5$  on day 7 and  $10^6$  on day 10 and they showed similar patterns. In contrast, the OPG values of 14-week-old group were  $10^4$  until 10 days.

To examine the relationship between the number of oocysts inoculated and the OPG values, 5 groups of chickens being 3 or 4 weeks old were inoculated orally with doses varying from  $3.5 \times 10^2$  to  $10^6$  oocysts. All groups began to shed oocysts from day 6~9 PI. The groups received severe infection showed higher OPG values than received mild infection until 10 days PI, and there was a correlation between the number of oocysts inoculated and mean OPG values. These chickens showed irregular changes of mean OPG values on and after the day 11 PI.

These infected chickens were challenged with  $3.5 \times 10^6$  oocysts on day 28 after primary infection. Two of the five 4-week-old groups, which were given  $10^3$  or  $10^2$  oocysts and shed small number of oocysts after primary infection, shed oocysts after challenge. However, the other groups did not shed any oocysts. These results indicates that *Cryptosporidium* sp. obtained from chickens has relatively strong immunogenicity.