

Cryptosporidium muris の実験感染マウスにおける オーシストの排泄状況と免疫原性

松井利博 藤野隆志 小林富美恵 森井 勤 辻 守康

(掲載決定:平成6年6月3日)

要 約

Cryptosporidium muris の実験感染マウスにおけるオーシストの排泄状況と免疫原性について調べた。

マウスの週齢による感受性の異同を調べるために、3~29週齢のマウス各1群5頭にオーシスト 2.0×10^6 個を経口接種した結果、すべての群が7~10日目からオーシストを排泄し、10日目に $10^5 \sim 10^6$ 個台のOPG値(糞便1g中のオーシスト数)を示した。いずれも12~13日目に一時下降した後14日目には再び上昇して $10^5 \sim 10^6$ 個台を示したが、感染15日目以降には他のコクシジウム類でみられる様な規則的な推移は認められなかった。したがって、マウスの週齢による感受性の差は認められなかった。

接種オーシスト数と排泄オーシスト数との関係を調べるために、オーシスト 2.0×10^6 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5週齢のマウス各1群5頭にそれぞれ接種した。その結果、感染14日目まではともに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示され、両者の間に相関関係が認められた。なお、 10^2 個台接種群については、3週齢からはオーシストの排泄が認められず、5週齢でも 10^5 個台を15日間示した他は低いOPG値を示したことから、本種のマウスに対する感染成立の最少数は 10^2 個と考えられた。

これらの感染耐過マウスにおける原虫の免疫原性の程度を調べる目的で、初感染後60日または113日目に 2.0×10^6 個のオーシストを再接種した結果、初感染時に 10^2 個台を接種した2群を除きオーシストの再排泄が全く認められず、本種はかなり強い免疫原性を有することが示唆された。

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

緒 論

コクシジウム類ではオーシストの接種数と排泄数の推移との間に相関関係が認められることから、野外における動物の感染状況の把握や治療薬の効果判定などには排泄オーシスト数の推移が応用されている(Dubey and Frenkel, 1974; 飯島ら, 1989; Long and Rose, 1970; 堤ら, 1974; Tsunoda *et al.*, 1968)。しかし、*Cryptosporidium* ではオーシストが極めて小さいことから宿主におけるオーシストの排泄状況は、一部の宿主(Asahi *et al.*, 1991; Blagburn and Lindsay, 1987; Iseki *et al.*, 1989; Naciri *et al.*, 1993)を除いてその詳細については明らかにされていなかった。我々は、先ずオーシスト数の測定法について検討し、蔗糖液添加による測定法が有効であること、およびニワトリ由来

Cryptosporidium sp. の実験感染鶏においては感染10日目まで排泄オーシスト数は接種オーシスト数に依存していることなどを報告した(松井ら, 1992)。さらに山浦ら(1992)は、同様の方法でクマネズミ由来*Cryptosporidium* sp. のラットにおける排泄オーシスト数を測定し、濃感染と軽感染とでは差が認められたことを報告している。そこで、*Cryptosporidium muris* 感染におけるマウスの週齢による感受性の違い、接種オーシスト数と排泄オーシスト数との関係およびその免疫原性について調べ、*Cryptosporidium* でも他のコクシジウム類と同様に宿主におけるオーシストの排泄状況を調べることにより、その感染状況の把握や治療薬の効果判定などに応用できるか否かを検討した。

材料および方法

供試マウス

供試マウスはSPFの3~29週齢ICRの雌で、感染

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、*coccidia-free*の管理下で飼育した。

使用オーシスト

*C. muris*のオーシストは自然感染ドブネズミの糞便から分離し、これをマウスに接種して継代維持しているRN66株 (Iseki *et al.*, 1989)で、排泄後1ヶ月以内のオーシストを使用した。

OPG値 (Oocysts per gram) の測定

OPG (糞便1g中のオーシスト数)の測定は、まずピーカー内で糞便1gに9mlの水を加えてマグネチックスターラーで約30分間攪拌した後、その0.5mlを試験管内に移し、比重1.266の蔗糖液を3.5ml加えてさらに十分に混和して80倍の希釈液を作製した。この0.1mlをプランクトン計算盤に移して24×36mmのカバーガラスを掛け、約5分間放置して計算盤上でオーシストを浮遊させた後にその数を顕微鏡下で測定することにより行なった。

OPG値の推移

週齢の異なるマウスにおけるOPG値の推移の異同を調べる目的で、3～8の各週齢と12, 21および29週齢のマウス各1群5頭、1頭あたり 2.0×10^6 個のオーシストを経口接種し、そのOPG値の推移を経日的に調べた。なお、*Cryptosporidium*では幼若獣に強い感染性を示す傾向が知られているので (井関, 1984), 3週齢についてはさらに6群を追加試験した。

次に、接種オーシスト数とOPG値の推移との関係を調べる目的で、オーシスト 2.0×10^6 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5週齢のマウス各1群5頭に経口接種し、それらにおけるOPG値の推移を調べた。

免疫原性

接種オーシスト数とOPG値の推移との関係を調べた3週齢と5週齢のマウスに対して、それぞれオーシスト排泄終了を確認した後、初感染後60日または113日目に 2.0×10^6 個のオーシストを再接種し、その後におけるオーシストの排泄状況を調べるにより本原虫の免疫原性について検討した。

結 果

OPG値の推移

週齢の異なる感染マウスのOPG値の推移を調べた結果、15日目まではいずれにも大きな差が認められなかつ

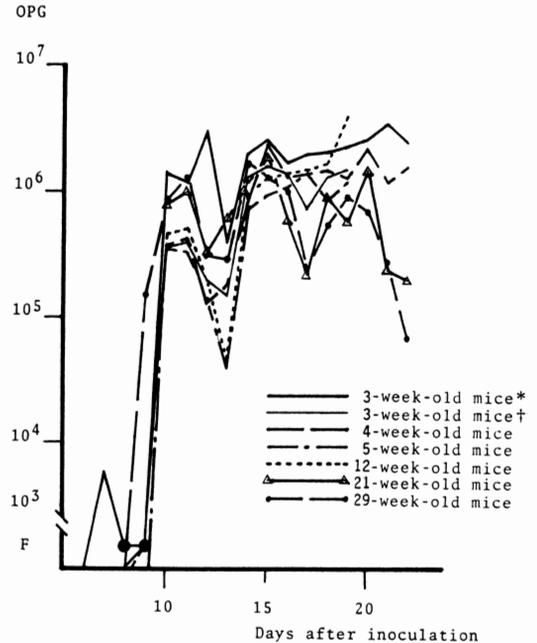


Fig. 1 Mean daily oocyst output in 3- to 29-week-old mice infected with 2.0×10^6 oocysts of *Cryptosporidium muris*. (5 mice/group)

F: Oocyst positive by the sugar flotation method.

*: The highest OPG values in 3-week-old mice.

†: The lowest OPG values in 3-week-old mice.

た。8週齢までの6群から3群を選抜し、これと12, 21および29週齢群との成績と、追加試験を行なった3週齢群の中から最も低い推移を示した1群の成績を加えてFig.1に示した。オーシストの排泄は接種7～10日目から認められ、15日目まではほぼ同様の推移をたどった。すなわち、いずれも10日目に $10^5 \sim 10^6$ 個台を示し、12ないし13日目に一時下降した後、14日目には再び上昇して $10^6 \sim 10^5$ 個台を示した。しかし、感染15日目以降には規則的な推移は認められなかった。

3週齢と5週齢とのマウスに $10^6 \sim 10^2$ 個台のオーシストをそれぞれ接種した結果、ともに感染14日目までに接種オーシスト数とOPG値との間に相関関係が認められた (Figs. 2,3)。すなわち、 10^6 個台接種群では前述と同様の推移を示し、 10^5 個台接種群では10日目に 10^4 個台を、11日および14日目には 10^5 個台を示し、 10^4 個台接種群では13日目まで 10^4 個台またはそれ以下の値を示した後、14日目には 10^5 個台に上昇した。 10^3 個台接種群では13ないし14日目まで蔗糖液浮遊法で検出されたのみで、 10^2 個台接種群では3週齢からはその排泄がまったく認

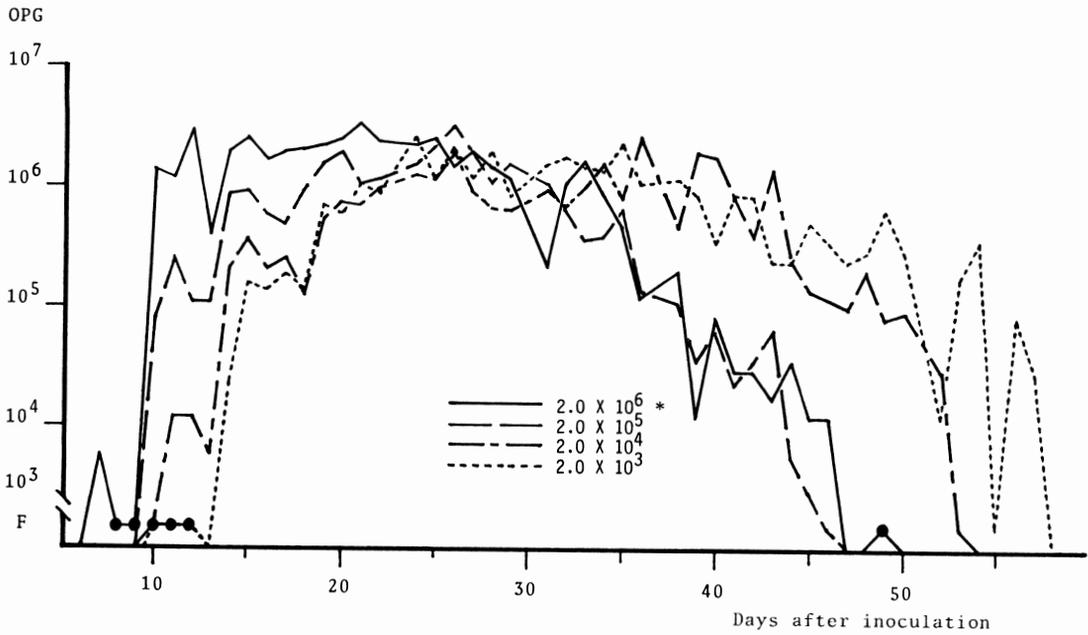


Fig. 2 Mean daily oocyst output in 3-week-old mice infected with $2.0 \times 10^6 - 10^2$ oocysts of *Cryptosporidium muris*. (5 mice/group)
 *: Number of oocysts inoculated.
 F: Oocyst positive by the sugar flotation method.
 Mice given 2.0×10^2 oocysts did not shed any oocysts.

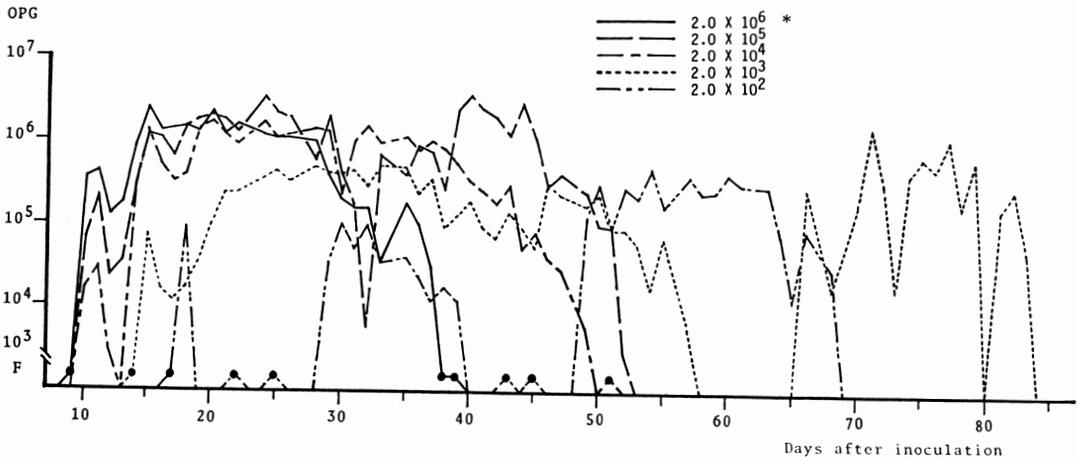


Fig. 3 Mean daily oocyst output in 5-week-old mice infected with $2.0 \times 10^6 - 10^2$ oocysts of *Cryptosporidium muris*. (5 mice/group)
 *: Number of oocysts inoculated.
 F: Oocyst positive by the sugar flotation method.

められず、5週齢でも17日目からオーシストの排泄が認められた。また、5週齢では 10^3 個と 10^2 個台接種群でオーシスト消失後にその再排泄が認められた。なお、15日目を以降の推移には他のコクシジウム類で認められる様な接種数との関係がみられなかった。

免疫原性

3週齢と5週齢のオーシスト接種マウスに再接種を行った結果、初感染時に 10^2 個台を接種した2群を除き、全群にその排泄がまったく認められなかった。しかし、初感染後にオーシストの排泄が認められなかった3週齢と、オーシストの排泄数が最も少なかった5週齢の 10^2 個接種群はいずれも再接種時の対照群と同様のOPG値の推移を示した。

考 察

Cryptosporidium では、一般に幼若獣ほど感染率が高く、強い症状を示すことが知られている(井関, 1984)。松井ら(1992)はニワトリ由来の*C. sp.*の実験感染鶏について、宿主の週齢によるオーシストの排泄状況を調べ、10週齢までは同様のOPG値の推移を示すが、14週齢はこれより低い推移を示すことを報告した。山浦ら(1992)はクマネズミ由来*C. sp.*実験感染ラットについて調べ、4, 8, 12週齢ともにOPG値の高さには大きな差が認められないものの、12週齢のみ *patent period* が7日間短縮したことを報告している。今回調べた*C. muris*では、3~29週齢のマウスに 10^5 個台のオーシストを接種した結果、最も若い3週齢で最高と最低のOPG値を示した2群の間に大きな差が認められず、他の週齢でも12および13日目の値に差が認められるものの、いずれも一時下降し、14日目には再び上昇して $10^5 \sim 10^6$ 個台のOPG値を示したことから週齢による大きな差は認められないものと考えた。従って、*Cryptosporidium*では宿主の週齢による感受性の差は原虫の種によって異なるものと考えられた。なお、OPG値が12~13日目に一時下降し、14日目に再び上昇する現象はすべての実験群で認められた。前川(1988)およびIseki *et al.* (1989)も*C. muris*実験感染マウスでOPD値(マウス1頭1日あたりの排泄オーシスト数)を調べているが、12~13日目の一時的な下降は認められていない。このことは排泄オーシスト数の測定方法の違いによるものではないかと考えた。

接種オーシスト数と排泄オーシスト数との関係については、前川(1988)が*C. muris*感染マウスについてOPD値の推移を調べ、 10^2 個接種群では感染が成立しない個体も存在し、感染してもOPD値は全般に低いこと、 10^3 個、 10^4 個接種群では全例に感染がみられたが、

OPD値の推移には個体差が大きいこと、 10^5 個以上の接種では個体差はあまりみられず、 $10^2 \sim 10^4$ 個接種群に較べて高いOPD値を示すことを報告している。著者らが今回*C. muris*感染マウスのOPG値についてその推移を調べた結果、感染14日目までは接種オーシスト数を減らすとOPG値も低くなる傾向が認められた。この成績は感染10日目までに両者の間に相関が認められたニワトリ由来の*C. sp.*での報告(松井ら, 1992)と類似していた。一方、山浦ら(1992)はクマネズミ由来*C. sp.*感染ラットについて著者らと同様の方法で調べ、 10^4 個以上と以下との接種群でOPG値に差が認められたことを報告している。このことから、*Cryptosporidium*では接種量と排泄量との間に関係が認められるものの、その関係は他のコクシジウム類と同様に原虫の種によって異なるものと考えられた。なお、前川(1988)は*C. muris*についてオーシスト 10^2 個接種群マウスに感染が成立しないものがあることを報告しており、今回の実験でも同様の成績が得られたことから、*C. muris*では 10^2 個がマウスに対する感染可能な最少数であることが示唆された。また、5週齢の 10^2 個と 10^3 個接種群にオーシストの再排泄がみられたが、この原因については汚染による再感染のためか、自家感染によるものか、原虫の再燃によるものかは明らかにできなかった。

免疫原性については、ニワトリ由来*C. sp.*で初感染時に 10^5 個台のOPG値を10日間前後示した場合は再感染が認められないこと(松井ら, 1992)、またクマネズミ由来*C. sp.*感染ラットでは初感染時にOPG値が $10^4 \sim 10^3$ 個台と低いためか、全例に再感染が認められたが、再感染後の排泄オーシスト数は極めて少数であること(山浦ら, 1992)などが報告されている。今回調べた*C. muris*では初感染時に 10^3 個台またはそれ以上を接種すると全群が 10^5 個台のOPG値を2週間以上示し、オーシスト排泄終了後に再接種してもその後はまったくオーシストの排泄は認められなかったことから、本種も松井ら(1992)が調べたニワトリ由来*C. sp.*や、山浦ら(1992)が報告したクマネズミ由来*C. sp.*と同様にかなり強い免疫原性を有することが明らかになった。また初感染時に 10^2 個台を接種した5週齢マウスはオーシストの排泄数が少なく、再接種後のOPG値は対照群と同様の推移を示した。ニワトリ由来の*C. sp.*では初感染後のオーシスト排泄数が少ない場合、再接種後のそれも少量である(松井ら, 1992)ことから、本原虫では初感染時に一部のマウスで感染が成立せずに再接種による感染を受けたものと考えられた。

今回の実験で得られた*C. muris*の成績はニワトリ由来*C. sp.*やクマネズミ由来*C. sp.*での成績と類似していたことから、*Cryptosporidium*では蔗糖液添加法に

よる OPG 値の測定が有効であり、その推移は他のコクシジウムと同様に宿主の感染状況の把握や治療薬の効果判定に応用できるものと考えた。

謝 辞

C. muris を分与して頂いた大阪市立大学医学部医動物教室、井関基弘先生に厚く御礼申し上げます。

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) Blagburn, B. L. and Lindsay, D. S. (1987): Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. *Poultry Science.*, 66, 442-449.
- 3) Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1974): Immunity to feline toxoplasmosis: Modification by administration of corticosteroids. *Vet. Path.*, 11, 350-379.
- 4) 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.
- 5) 井関基弘 (1984) : クリプトスポリジウム症. その基礎と臨床. *感染・炎症・免疫*, 14, 399-411.
- 6) 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.
- 7) Long, P. L. and Rose, M. E. (1970): Extended schizogony of *Eimeria mivati* in betamethasone-treated chickens. *Parasitology*, 60, 147-155.
- 8) 前川たかし (1988) : 胃腺に寄生するクリプトスポリジウム (*Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907) に関する基礎的研究. *阪市医誌*, 37, 679-700.
- 9) 松井利博・森井 勤・藤野隆志・Tadeja, S. L. 板倉智敏 (1992) : *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. *寄生虫誌*, 41, 24-29.
- 10) Naciri, M., Mancassola, R., Yvore, P. and Peeters, J. E. (1993): The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves. *Veterinary Parasitology*, 45, 199-207.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 山浦 常・白坂龍曠・松本克彦 (1992) : クマネズミ由来 *Cryptosporidium* sp. のラットにおける oocyst の排泄状況と免疫原性. *寄生虫誌*, 41, 365-372.

Abstract

OOCYST PRODUCTION AND IMMUNOGENICITY OF
CRYPTOSPORIDIUM MURIS IN THE EXPERIMENTAL MICE

TOSHIHIRO MATSUI, TAKASHI FUJINO, FUMIE KOBAYASHI,
TSUTOMU MORII AND MORIYASU TSUJI

*Department of Tropical Diseases and Parasitology, Kyorin University School of Medicine,
Shinkawa 6-20-2, Mitaka, Tokyo 181, Japan*

Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain RN66) isolated from the feces of a house rat were examined experimentally in mice. Mice used were 3- to 29-week-old ICR (SPF) mice. The numbers of oocysts per gram of feces (OPG values) were measured by the sugar solution method.

To examine the relationship between the OPG values and the age of mice, nine groups of 5 mice being 3 to 8, 12, 21 and 29 weeks old were inoculated orally with 2.0×10^6 oocysts and their OPG values were measured. All groups shed oocysts from days 7~10 post inoculation (PI). The OPG values of the all groups were $10^5 \sim 10^6$ on days 10 and 14 PI, though they decreased on days 12 and 13 PI. These mice showed irregular changes of mean OPG values on and after the day 15 PI.

To examine the relationship between the number of oocysts inoculated and the OPG values, 5 groups of mice being 3 or 5 weeks old were inoculated orally with doses varying from 2.0×10^2 to 2.0×10^6 oocysts. The results showed correlation between the number of oocysts inoculated and mean OPG values until 14 days PI.

After primary inoculation these mice were challenged with 2.0×10^6 oocysts on day 60 or 113. Eight groups inoculated primarily with $10^3 \sim 10^6$ oocysts did not shed any oocysts after the challenge infection. These results demonstrate that *C. muris* has strong immunogenicity to mice.