

牛コクシジウム症感染モデル作出のための
Eimeria wyomingensis に関する研究

小田憲司

牛コクシジウム症感染モデル作出のための
Eimeria wyomingensis に関する研究

小田憲司

目 次

緒 言	-----	1
第 I 章 日本における牛のコクシジウムの種類と分布	-----	3
材料および方法	-----	3
1. 糞便材料の採取	-----	3
2. 材料の処理と同定	-----	3
成 績	-----	4
第 II 章 <i>E. wyomingensis</i> (岡山株) の由来と生物学的性状	-----	6
1. <i>E. wyomingensis</i> (岡山株) の由来	-----	6
2. <i>E. wyomingensis</i> の生物学的性状	-----	7
1) <i>E. wyomingensis</i> オーシストの形態学的特徴	-----	7
材料および方法	-----	7
(1) オーシスト	-----	7
(2) スポロシスト	-----	7
(3) スポロゾイト	-----	8
成 績	-----	8
(1) オーシストの形態と計測値	-----	8
(2) スポロシストの形態と計測値	-----	9
(3) スポロゾイトの形態と計測値	-----	9
2) <i>E. wyomingensis</i> の宿主体外における発育 (胞子形成)	-----	10

材料および方法	10
(1) オーシストの分離と培養条件	10
(2) 胞子形成過程の形態学的観察	11
(3) 胞子形成時間	11
成績	12
(1) 胞子形成過程における形態学的変化	12
(2) 胞子形成時間	14
3) <i>E. wyomingensis</i> の宿主体内における発育	16
材料および方法	16
(1) 供試動物と飼育管理	16
(2) <i>E. wyomingensis</i> オーシストの投与	17
(3) 材料の採取と観察方法	17
成績	17
(1) 各期虫体の発育	17
(2) プリパテントピリオドおよびパテントピリオド	20
第 III 章 <i>E. wyomingensis</i> の病原性と感染の程度の評価	22
材料および方法	22
1. 供試コクシジウム株	22
2. 供試動物および飼育方法	23
3. オーシストの投与	23
4. 実験設計	23
1) オーシストの単回投与	23

2) オーシストの反復投与 -----	25
5. 観察方法 -----	25
1) 糞便性状 -----	25
2) オーシストの排泄状況 -----	26
3) 病理学的観察 -----	26
4) 臨床病理学的検査 -----	27
5) D(+)-キシロース負荷試験 -----	28
成 績 -----	28
1. <i>E. wyomingensis</i> オーシストの単回投与による病原性 --	28
1) 臨床症状 -----	28
2) 体重および飼料摂取量 -----	29
3) オーシストの排泄状況 -----	29
4) 病理学的所見 -----	30
2. <i>E. bovis</i> オーシストの単回投与による病原性 -----	30
1) 臨床症状 -----	30
2) 体重および飼料摂取量 -----	31
3) オーシストの排泄状況 -----	31
4) 病理学的所見 -----	32
3. <i>E. alabamensis</i> オーシストの単回投与による病原性 -	33
1) 臨床症状 -----	33
2) 体重および飼料摂取量 -----	33
3) オーシストの排泄状況 -----	34
4) 病理学的所見 -----	34

4. <i>E. subspherica</i> オーシストの単回投与による病原性 ---	35
1) 臨床症状 -----	35
2) 体重および飼料摂取量 -----	35
3) オーシストの排泄状況 -----	35
5. <i>E. wyomingensis</i> オーシストの反復投与による病原性 --	36
1) 臨床症状 -----	36
2) 体重および飼料摂取量 -----	37
3) オーシストの排泄状況 -----	37
6. 糞便性状と便の水分含量 -----	37
7. 臨床病理学的検査所見 -----	38
1) 血液学的検査所見 -----	38
2) 生化学的検査所見 -----	38
8. D(+)-キシロース負荷試験 -----	39
考 察 -----	41
1. 日本における牛のコクシジウムの種類と分布 -----	41
2. <i>E. wyomingensis</i> の生物学的性状 -----	42
1) オーシストの形態学的特徴 -----	42
2) 孢子形成過程における形態学的変化 -----	45
3) 孢子形成時間 -----	46
4) 宿主体内における発育 -----	49
5) プリパテントピリオドおよびパテントピリオド -----	52
3. <i>E. wyomingensis</i> の病原性と感染の程度の評価 -----	53

1) <i>E. wyomingensis</i> の病原性	53
2) 感染の程度の評価	58
(1) 臨床症状およびオーシストの排泄	58
(2) 臨床病理学的所見	59
(3) D(+)-キシロース負荷試験	61
要 約	63
ABSTRACT	65
謝 辞	72
参考文献	73

表

図

写真

緒 言

牛のコクシジウムは、牛下痢症の最も重要な原因の一つとして知られ、世界各地に広く分布し、その経済的損失も非常に大きい[32, 90]。我が国においても、家畜衛生週報（農林水産省衛生課編集）に収載されているものだけでも毎年数十例の牛のコクシジウム症の発生が報じられ、伝染性疾患による牛の下痢症の中でも上位に位置し、症例に関する報告も多い[42, 43, 68, 89, 132, 134, 135]。牛のコクシジウム症の疫学についてはいまだ不明な点も多いが、一般に飼育密度が高くなるほど感染は増大すると考えられ[5, 45, 90, 103]、畜産の集約化とともに牛のコクシジウム症は今後より重要となることが予想される。

牛のコクシジウム症の予防剤として、デコキネート[10, 39, 40, 87], アンプロリウム[46], モネンシン[38, 84]およびラサロシド[10, 37, 130]など鶏コクシジウム症の予防のために開発された薬剤の応用が検討されているが、現在わが国においては、牛のコクシジウム症の予防剤として実用化されているものはない。わが国においては、牛のコクシジウム症の治療剤としてスルファジメトキシシンやスルファモノメトキシシンがしばしば用いられ[42, 43, 68, 134, 135]、その有効性を示唆する報告もみられるが、抗コクシジウム効果の裏付けとなる人工感染牛を用いた実験に関する報告はみられない。その理由として、薬効評価法について十分に検討されていないことがあげられる。すなわち、牛のコクシジウムでは、人工感染により安定した感染を作り出すことが難しく、感染結果に大きなばらつきを生じやすいことや[91]、鶏のコクシジウムのよう

に生物学的性状や病原性が明らかにされた reference strain が確立されていない。従って、牛のコクシジウム症の予防・治療剤の開発およびその評価においては、安定した感染が得られる試験系の確立と、その感染評価法の検討が必要であると考えられる。

我が国における牛のコクシジウムの分布調査を行った際に分離したコクシジウムの生物学的諸性状の観察のため、数種のコクシジウムを子牛に人工感染させたところ、*E. wyomingensis* と同定された原虫は、再現性の高い感染が得られることが明らかとなり、牛のコクシジウムの感染モデルとして薬効評価等に応用可能であることが示唆された。しかし、*E. wyomingensis* は、1942 年に Huizinga and Winger[58]により最初に報告されて以来、その分布やオーシストの形態学的観察に関する報告はいくつかみられるが、孢子形成や宿主体内の発育などの生物学的性状や病原性についてはほとんど明らかにされていない。従って、本研究は、*E. wyomingensis* の生物学的性状および病原性を明らかにし、牛のコクシジウム感染モデルとしての有用性を検討することを目的とした。

第 I 章 日本における牛のコクシジウムの種類と分布

我が国における牛のコクシジウムの分布に関する報告は、1954 年に渡辺および岩田が実施した新潟県下における調査[140]以降ほとんどみられない。また、我が国の牛から分離されたコクシジウムの生物学的性状や病原性について報告したものもみられない。そこで、我が国における牛のコクシジウムの分布の実態を明らかにすること、および生物学的性状や病原性を観察するための材料を得ることを目的とし、地域、月齢、品種、飼育方法等を考慮して牛から糞便材料を採取し、オーシストの検査、分離および同定を行った。

材料および方法

1. 糞便材料の採取

1985 年 9～11 月に 9 道県下 110 農場の飼育牛から合計 1,015 例の糞便材料を採取した。採材個体の品種、月齢別構成および各県別採材数はそれぞれ表 1 および 2 に示す通りである。

2. 材料の処理と同定

個体ごとに直腸便あるいは新鮮落下便をおよそ 200 g 採取し直ちに当研究室に輸送した。採取した各糞便材料のうち約 50 g を同量の水道水を加え十分に攪拌し、その糞液を 50 メッシュの金網でろ過し、ろ液を遠心(2000 rpm, 5 分)した。上澄みを除去した沈渣に飽和食塩液を加えて混和したものを 20 ml 試験管 2 本に分注し、1 時間静置した後上清

を鏡検(× 100)した。2本のうちのいずれからかオーシストが確認された場合は、プランクトン計算盤を用いて[133]糞便 1 g あたりのオーシスト数 (OPG) を計数した。

さらに、オーシスト陽性例では、残余の糞便材料を 50 および 100 メッシュの金網でろ過、遠心し、その沈渣から飽和食塩液遠心浮遊法 (2000 rpm, 5 分) によりオーシストを回収した。これを 2% 重クロム酸カリウム溶液に浮遊させたものをシャーレ中で 1 週間以上静置培養 (24~28℃) し、孢子形成させた。種の同定は、Levine and Ivens [72, 73] およびその他の報告 [11, 12, 23, 24, 95, 121] を参考として、オーシストの大きさ、壁の色・性状、ミクロパイルおよびミクロパイルキャップの有無、外部残体および極顆粒の有無、内部残体の有無等の孢子形成オーシストの形態学的特徴により行った。

成 績

コクシジウムのオーシストは、1,015 例中 599 例 (59.0%) から検出された。飼育形態では乳用 (全てホルスタイン種) および肉用肥育牛間 (黒毛和種および乳用種肥育牛を含む) に、また品種間 (ホルスタイン、黒毛和種) にコクシジウムの検出率に有意な差はみられなかった。一方、コクシジウムの検出率は採材個体の月齢に大きく依存し、6~11 か月齢で最大となり、その後は次第に減少し、24 か月齢以上の個体では 25% 以下に減少した (図 1)。

検出された 11 種のうち *E. wyomingensis* は全ての地域で検出されたが、検出率は平均 5.4% で、*E. subspherica* (4.5%) および *E.*

bukidnonensis(4.5%)を除いて最低であった。検出率が高かったのは、*E. bovis*（平均：34.8%）および *E. ellipsoidalis*（平均：34.3%）で、次いで、*E. aubrunensis*, *E. brasiliensis*, *E. cylindrica* の順に高かった（表 2, 3）。

第 II 章 *E. wyomingensis*（岡山株）の由来と生物学的性状

牛のコクシジウムには、20 数種の命名種があるが、その存在が確認されたものは 13～14 種である[72, 73]。また、そのうち宿主体内における発育等が明らかにされているものは数種に過ぎず、ほとんどは糞便中に排泄されたオーシストによってのみその存在が知られている。最もよく研究が行われている鶏のコクシジウムでは、1964 年に *E. mivati* が新種として報告[21]されて以来、本種の生物学的位置づけについて多くの議論がなされ[63, 64, 116]、その間 *Eimeria* 属原虫の同定に関する種々の問題点や種間の異同を明確にするためのいくつかの手法が明らかにされた[75, 93, 94]。今回は、これらをふまえて、*E. wyomingensis* のオーシストの形態学的特徴、孢子形成、宿主体内における発育について観察を行った。

1. *E. wyomingensis*（岡山株）の由来

今回の研究で用いた *E. wyomingensis* 株は、前述の牛のコクシジウム分布調査において、1985 年 11 月に岡山下の酪農専業農場で飼育されていた 8 か月齢雌の育成牛（ホルスタイン種）から採取された糞便中に見出されたもので、*E. ellipsoidalis* との混合寄生であった。その場合の OPG は両種とも 200 未満であった。この糞便材料から飽和食塩液浮遊法によりオーシストを回収し、2%重クロム酸カリウム溶液中で孢子形成させたものを出発材料として、これをコクシジウム感染のみられない 1 か月齢の離乳子牛 1 頭に投与した。オーシスト投与数は *E.*

wyomingensis では 8×10^4 個, *E. ellipsoidalis* では 3.6×10^4 個とした。投与後、子牛の糞便性状等に変化はみられなかったが、15～17 日目に黄褐色卵形大形のオーシストの排泄がみられたため、これを回収し培養した。出発材料中に含まれていた *E. ellipsoidalis* のオーシストは観察終了の 21 日目まで糞便中に排泄されなかった。オーシスト投与後 21 日目に供試子牛を剖検したところ、腸管内容中にごく少数の *E. wyomingensis* の遊離オーシストがみられたが、いずれの部位の粘膜内にも原虫は確認されなかった。なお、オーシストの顕微鏡的精査（500 個以上）によって、回収された *E. wyomingensis* のオーシスト中に他種の混入はないものと判断された。

2. *E. wyomingensis* の生物学的性状

1) *E. wyomingensis* オーシストの形態学的特徴

材料および方法

(1) オーシスト

人工感染牛から分離された新鮮孢子未形成オーシストおよび孢子形成オーシストについてその形態学的特徴を光学顕微鏡下($\times 400$)で観察した。オーシスト壁の構造はオーシストをカバーグラス下で圧平して観察した。

(2) スポロシスト

孢子形成オーシストを 5 ml テフロンホモジナイザーを用いて摩砕し（400 rpm, 5 分）、オーシスト壁を破壊してスポロシストを遊出させ

た。これを精製水で2回遠心洗浄(1,000 rpm, 5分)し夾雑物を除去した後、スポロシストは形態学的特徴について光学顕微鏡下(×400, ×1,000)で観察し、大きさを測定した。

(3) スポロゾイト

前述の方法で処理したスポロシスト浮遊液を遠心後(1,000 rpm, 5分)上清を除去し、沈渣にトリプシン(Difco 1:250) 0.3%およびグリコデオキシリコール酸(SIGMA) 0.2%を加えたPBS溶液(pH 7.6)を人工消化液として加え、40℃でインキュベートし、スポロゾイトを遊出させた[9, 59]。これをPBSで2回遠心洗浄し(1,000 rpm, 5分)、光学顕微鏡下(×400)でスポロゾイトの形態学的特徴を観察し、大きさを測定した。なお、オーシスト、スポロシスト、スポロゾイト等の計測はデジタル式顕微鏡測微装置(オリンパス工業㈱)を用いて行った。

成 績

(1) オーシストの形態と計測値

オーシストは、卵円形で、オーシスト壁は黄褐色の外層および無色の内層で構成される(図2, 写真1)。オーシストをカバーガラス下で圧平することにより、オーシスト壁は二層から構成されることが容易に観察できた(写真2)。オーシスト壁の外層表面には小顆粒が付着したものが多く(写真3)、時に外層表面に比較的大形の顆粒が密に付着したものがみられた(写真4)。オーシストの鋭端部にミクロパイルが認められたが、ミクロパイルキャップは欠如していた。オーシストの腹腔に

は、孢子未形成オーシストでは1個のスपोロント、孢子形成オーシストでは4個のスपोロシストを有する。外部残体および極顆粒は認められない。また、人工感染時には、パテントピリオド末期にしばしば外層を欠如したオーシストの排泄がみられた（写真5）。

オーシスト 200 個の計測値は、長軸長 $31.6 \sim 46.3 \mu\text{m}$ ($39.7 \pm 1.9 \mu\text{m}$)，短軸長 $23.7 \sim 33.1 \mu\text{m}$ ($28.9 \pm 1.2 \mu\text{m}$)，長短軸比 $1.09 \sim 1.69$ (1.38 ± 0.08) であった。図3はXおよびY軸をそれぞれ長軸長および短軸長として、オーシストの測定値をプロットしたものである。プロットはX軸方向に強く傾斜した分布を示し、回帰式 $Y=0.12X+24.13$ が得られた（図3，4）。

(2) スポロシストの形態と計測値

スポロシストは長楕円形、無色で一端に小形で明瞭な Stieda body が認められる。孢子形成が完了したものでは内部に2個のスプロゾイトを有する。内部残体は欠くものが多いが（写真6）、時には小顆粒が散在あるいは球形に凝集した残体を有するものが認められる（写真7）。スプロゾイトの鈍端部には通常1個の類球形ないし楕円形で大形の refractile globule がみられる。スポロシスト 200 個の計測値は、長軸長 $14.9 \sim 19.1 \mu\text{m}$ ($17.0 \pm 0.9 \mu\text{m}$)，短軸長 $7.0 \sim 11.0 \mu\text{m}$ ($9.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$) であった。

(3) スプロゾイトの形態と計測値

スポロシストを 40°C の人工消化液で処理した場合、スプロゾイトは

処理開始後 30 分以内に脱出し始め、60 分後にはほとんどのスポロゾイトが脱出を完了した。スポロゾイトは長紡錘形で、スポロシストから人工脱殻直後のものには緩やかな屈曲運動が認められる。時間の経過、おそらく浮遊液の温度低下に伴って運動は減衰し、多くは三日月形を呈する。スポロゾイトの内部には 1 個の大形で明瞭な refractile globule を認める。refractile globule はスポロゾイトがスポロシスト内にある場合は類球形から楕円形であるが（図 2）、スポロシストから脱出した後は長楕円形となり、スポロゾイトの鈍端部に接して位置することが多く、次第に内腔に広がり、ついにスポロゾイト長軸長の中央部以降まで占めるようになる（写真 8）。少数例では、refractile globule はスポロゾイト鈍端部との間にやや空隙を残して位置する。スポロゾイト 200 個の計測値は、長軸長 $13.8 \sim 21.2 \mu\text{m}$ ($18.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$)，短軸長 $2.5 \sim 5.6 \mu\text{m}$ ($4.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$)，refractile globule の長軸長は $5.8 \sim 11.8 \mu\text{m}$ ($9.3 \pm 1.3 \mu\text{m}$) であった。

2) *E. wyomingensis* の宿主体外における発育（孢子形成）

材料および方法

(1) オーシストの分離と培養条件

コクシジウムの自然感染を防止して飼育した子牛に、*E. wyomingensis* の孢子形成オーシスト 10^7 個を投与し感染させた。オーシスト投与後 15 日目に、感染子牛から直腸便を採取し、直ちに十分量の粉碎した氷を入れ、冷却した。これに、氷水を加え十分に攪拌した後、50 および 100 メッシュの金網で順次ろ過し、ろ液を遠心した。上清を

除去した後、沈渣に冷却した飽和食塩液を加えて混和、遠心(2000 rpm, 5 分)し、上清中のオーシストを毛細ピペットで回収した。

回収したオーシストを精製水で2回遠心洗浄(2000 rpm, 5 分)した後、2% 重クロム酸カリウム溶液に浮遊させた(5×10^4 個/ml)。オーシスト浮遊液の 50 ml を 200 ml 容のコニカルビーカーに分注し、開口部をビニールフィルムで封じ、29℃の恒温水槽中で振盪培養した[119]。なお、操作中のオーシストの活性を低下させるため、材料の採取以降、培養開始までのすべての操作は氷冷下で行った。

(2) 胞子形成過程の形態学的観察

培養開始後3時間ごとにオーシスト200個を抽出して胞子形成状態の観察を行い、その過程をNorton and Chard [93]の分類に従って、スポロントの凝集、スポロントの分裂、スポロシストの形成および胞子形成の完了の4過程に区分して計数した。区分の基準は、予備観察の結果をふまえて、スポロントがオーシスト内腔の中央部に完全に凝集した時点をスポロントの凝集、凝集したスポロントが4分し、スポロシストが形成されるまでの過程をスポロントの分裂、スポロブラストの鋭端部にStieda bodyが形成された時点をスポロシストの形成、スポロゾイト内のrefractile blobuleが大形の1個に集約された時点を胞子形成の完了とした。

(3) 胞子形成時間

胞子形成完了オーシストの出現率をアークサイン変換した値

($\theta = \sin^{-1} \sqrt{p}$, θ :ラジアン, p :孢子形成率) と培養開始後の経過時間(hr)との回帰式を求め、これから 50%および 95%孢子形成時間およびその 95%信頼区間を算出した[93]。

成 績

(1) 孢子形成過程における形態学的変化

培養開始後時間の経過に伴うオーシスト内部の形態学的変化は、以下の通りであった。

①排泄直後のスポロントは微細な顆粒状で外形は不整形で変化に富み、オーシストの内腔の大部分を占めるが、完全に充満することはない(図 5-1, 写真 9-1)。ついで、スポロントは粗い顆粒状となり、次第にオーシスト内腔の中央部に集合する(図 5-2)。

②培養開始 12 時間後、スポロントはオーシスト内腔の中央部にあり、 $22.4 \pm 0.9 \times 23.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ($n=42$)でほぼ球形に凝集する。スポロント内部は比較的細かい顆粒状で、その周辺部は光学的に均質無構造である(図 5-3, 写真 9-2)。スポロント内には、1 個の核が認められる。

③培養開始 36 時間後、スポロントの大きさに変化はみられないが、内部はさらに微細な顆粒状となり、その大きさは不揃いとなる。この時点において、発育中のほぼすべてのオーシストの両極の空隙に、5~10 個の refractile granule が出現する。refractile granule は均質無構造で、2~3 μm 大の球形を呈することが多く、時に不整形のものも認められる(図 5-4, 写真 9-3)。

④培養開始 39 時間後、スポロント周辺の均質部に大形の顆粒が出現し、

次第に周囲を包囲する。周辺部の均質部は消失する（図 5-5，写真 9-4）。

⑤培養開始 60 時間後、スポロントを囲む顆粒は大きくなり、スポロント自体はさらに凝集する（図 5-6，写真 9-5）。

⑥培養開始 72 時間後、スポロントを囲む顆粒は再び小形となる。スポロントの凝集は更に進行し、その大きさは $19.3 \pm 0.7 \times 19.5 \pm 0.7 \mu\text{m}$ ($n=31$) となる（図 5-7，写真 9-6）。

⑦培養開始 84 時間後、スポロントの内部の顆粒は再び大形となり、一時的に外形はやや不整となるが（図 5-8，写真 9-7）、再び輪郭明瞭なほぼ正球形となる（図 5-9，写真 9-8）。その後、スポロントの内部は顆粒状、外形は不整となり分裂の様相を呈し始め（図 5-10，写真 9-9）、完全に 4 分する（図 5-11，写真 9-10）。

⑧培養開始 87 時間後、4 分したスポロブラストは、それぞれ多角形（平面的には三角形）になり始める（図 5-12，写真 9-11）。さらに、スポロブラストは鋭角な頂点を有するいわゆるピラミッドステージとなる。内部は微細な顆粒状で、鋭角部のそれぞれに大形の refractile globule がみられる（図 5-13，写真 9-12）。

⑨培養開始 87 時間後、スポロブラストの鋭角部はしだいに丸みを帯び始める（図 5-14，写真 9-13）。この期のものはピラミッドステージへ移行中のもの（図 5-12）と外形はほぼ同じであるが、スポロブラストの内部の顆粒状構造がさらに微細であることから区別できる。ついで、スポロブラストは大形の refractile globule を有したまま、ほぼ球形となり（図 5-15，写真 9-14）、その後正楕円形となりスポロシストの輪

郭を形成する。スポロシストの内部は微細な顆粒状で、refractile globuleは集約され両端に配置される（図 5-16, 写真 9-15）。

⑩培養開始 132 時間後、スポロシストは正楕円形から変化し、長軸方向に鋭・鈍端部が識別されるようになり、鋭端部の先端には小形の Stieda body が出現する。スポロシストは長軸方向に 2 分し内部にスポロゾイトを形成する。スポロゾイトの内部は微細な顆粒状を呈し、4～6 個の refractile globule がみられる（図 5-17, 写真 9-16）。スポロゾイトの内部の微細顆粒は次第に減少し、refractile globule は大形の 2 個に集約され始め（図 5-18, 写真 9-17）、さらに内部の微細顆粒構造はほぼ消失し均質となる。refractile globule はほぼ同大の 2 個となる（図 5-19, 写真 9-18）。その後、2 個の refractile globule は互いに融合して一時的に長楕円形となり（写真 9-19）、さらに鈍端部の類球形ないし楕円形の 1 個だけとなって、スポロゾイトの形成が完了する（図 5-20, 写真 9-20）。多くの場合、内部残体は形成されないが、時に小形の顆粒がスポロシストの内部に散在するものや、小球形状に集合したものが認められる。

(2) 胞子形成時間

29℃における *E. wyomingensis* オーストの胞子形成過程を各発育過程、すなわちスポロントの凝集（図 5-3～5-9）、スポロントの分裂（図 5-10～5-15）、スポロシストの形成（図 5-16～5-19）および胞子形成の完了（図 5-20）に区分して、それぞれの出現率で示したのが図 6 である。スポロント凝集の過程は非常に速やかに進行し、培養開始 3

時間後から凝集の完了したオーシストがみられ始め、12 時間後までにはほぼ全てが凝集を完了した。スポロントの凝集像は、90 時間以降次第に減少し、150 時間後には認められなくなった。分裂開始像は、81 時間後からみられ、87 時間後にはピラミッドステージの出現が認められた。スポロントの分裂像の出現率は、95～105 時間後に最大約 30% に達した後は次第に減少し、144 時間後には、この期で死滅したものを除きほとんど認められなくなった。スポロシストの形成は、90 時間後からみられ始め、153～156 時間後には 90% 以上に達し、231 時間後まで認められた。孢子形成の完了は 141 時間後からみられ、シグモイド曲線を示して増数し、234 時間後にはほぼ最大値に達した。

図 7～10 は、同一条件下で実施した *E. subspherica*, *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis* および *E. aubrunensis* オーシストの孢子形成過程の経時的推移の観察結果を示したものである。*E. subspherica* と *E. wyomingensis* との間には時間的ずれがみられたが、各ステージの出現頻度の推移は両種で類似していた（図 7）。一方、後の 3 種では、孢子形成過程の進行は前の 2 種より明らかに速く、またスポロントの分裂とスポロシスト形成の出現率を示すカーブがピークに達する時間は明瞭に分かれ、また分裂像の最大出現率は、80% 以上に達した（図 8～10）。

E. wyomingensis オーシストの孢子形成完了の出現頻度をアークサイン変換した値と経過時間との間には有意な直線性が成立し、回帰式 $Y=0.014X-1.886$ （Y: 出現頻度のラジアン, X: 時間）が得られた（図 11）。これから算出された 50% および 95% 孢子形成時間はそれぞれ

191 時間および 231 時間であった。*E. subspherica*, *E. alabamensis*, *E. ellipsoidalis* および *E. auburnensis* においても孢子形成率のアークサイン変換値と経過時間の間に直線性が成立し、それぞれの回帰式、50%および 95%孢子形成時間は以下のとおりであった。

	回帰式	50%	95%
<i>E. wyomingensis</i>	$Y=0.014X-1.886$	191.0	231.0
<i>E. subspherica</i>	$Y=0.017X-1.963$	161.0	195.0
<i>E. alabamensis</i>	$Y=0.044X-3.274$	92.3	105.0
<i>E. ellipsoidalis</i>	$Y=0.028X-0.852$	58.5	78.5
<i>E. auburnensis</i>	$Y=0.038X-1.144$	50.8	65.5

3) *E. wyomingensis* の宿主体内における発育

材料および方法

(1) 供試動物と飼育管理

相模原市近郊農家から生後 1 週齢以内の哺乳期子牛を導入した。導入後は各個体ごとに畜舎内の単飼用牛房に個体別に収容し、代用乳を 1 日 2 回給与し、乾草および配合飼料は自由に摂取させた。各個体とも 1 か月齢時までに完全離乳させた。コクシジウムの自然感染を防止するため、牛房、給餌器およびその他の飼育管理用具は可能な限り熱湯消毒を施したものを使用し、履き物および着衣は専用のものを用いた。導入後は適宜、糞便検査を行いオーシスト排泄の有無を確認した。*E.*

wyomingensis の宿主体内発育の観察には、離乳後 1～4 週のコクシジウム感染のみられない子牛、計 23 頭を用いた。

(2) *E. wyomingensis* オーシスト の投与

あらかじめ子牛を用いて増数した *E. wyomingensis* の孢子形成オーシストを孢子形成終了後 3 週間以内に用いた。オーシスト投与数は、1 頭当たり $10^5 \sim 10^9$ 個とし、原則としてオーシスト投与後 9 日目までに剖検予定の個体では 5×10^7 個以上、10 日目以降に剖検予定のものでは $10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個とし、これを 1~2 ml の精製水に浮遊させたものを粉碎した少量の配合飼料に混じて強制経口投与した（表 6）。

(3) 材料の採取と観察方法

オーシスト投与後 3 日目以降、表 6 に示す実験設計に従い、感染子牛をキシラジン麻酔下で放血殺して、腸管を取り出した。腸管の全長を測定した後、上方から 3 m ずつを切り出し、その一部を中性緩衝ホルマリン液で固定した。残余の材料から粘膜の生鮮標本作製し直ちに鏡検した。固定材料からは定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色および PAS 染色標本作製した。遊離メロゾイの観察は塗抹標本のギムザ染色により行った。なお、原虫の計測は原則として生鮮材料を用いて行った。

成 績

(1) 各期虫体の発育

10^9 および 10^8 個のオーシストを投与した個体各 1 頭をそれぞれ 3 および 4 日目に剖検し、消化管各部位の粘膜の生鮮材料、ギムザ染色標本および組織標本(HE 染色)の観察を行ったが、いずれからも原虫を確

認することはできなかった。5 日目に剖検した個体において、小腸の下部 1/3 および回腸の腸陰窩細胞に成熟した初代シズントが確認された。これは、核の腺腔側に位置し、組織切片中の計測値は直径 10～13.8 μm で、内部に 10～14 個のメロゾイトが認められた（写真 10）。

6 および 7 日目には、小腸の下部 1/3 から回腸までの生鮮材料中に、細胞質内で発育中の小形の未成熟シズントが確認され（写真 11, 12）、その計測値は長軸長 5.3～11.6 μm 、短軸長 4.6～11.4 μm 、平均 $7.4 \times 8.6 \mu\text{m}$ ($n=7$) であった。さらに、7 および 8 日目には、2～6 個のメロゾイトを含む成熟シズントが観察された（写真 13, 14）。HE 染色標本では、シズントは絨毛上皮直下の固有層の細胞内にみられた（写真 15, 16）。6～9 日目には、粘膜の生鮮材料中に遊離メロゾイトが観察された。これは小腸の下部 1/3 から回腸のほぼ全域でみられ、特に小腸の下部 2/3 で多く認められた。メロゾイトは長軸長 10.1～14.7 μm 、短軸長 1.6～2.8 μm 、平均 $12.0 \times 2.0 \mu\text{m}$ ($n=10$) の長紡錘形ものと（写真 17）、長軸長 6.5～12.5 μm 、短軸長 1.5～3.5 μm 、平均 $9.3 \times 2.6 \mu\text{m}$ ($n=12$) のやや扁平なもの（写真 18）の 2 つのタイプのものがみられた。その出現時期やシズントの形態から、前者は初代メロゾイト、後者は第 2 代以降のメロゾイトと考えられた。

有性世代の発育は、9 日目以降にみられた。これらは、小腸の下部 1/3 から回腸の全域、特に小腸の下部 2/3 に多く認められた。極く少数が回盲口の周囲でもみられたが、小腸の上部および盲腸以降からは検出されなかった（図 12）。有性世代の多くは、絨毛上皮下の固有層でみられ、一部はさらに深部で認められた。絨毛や腺上皮ではみられなかつ

た。

10 日目の生鮮標本でのガモントの大きさは短軸長 6.4～10.5，長軸長 6.7～12.1，平均 $7.6 \times 8.2 \mu\text{m}$ ($n=7$)であった（図 13-1，写真 19）。この時期のマクロガモントおよびミクロガモントはほぼ同大で、生鮮標本では区別し難いが、HE 染色標本では、マクロガモントの細胞質および顆粒はエオジンに好染して赤く、ミクロガモントの細胞質は青染されることにより区別できた。ミクロガモントの核は濃青色顆粒としてみられ、数個から数十個が主として細胞質の辺縁部に並んで認められた（写真 20）。

12 日目には、多くの発育中のガモントと一部の成熟したミクロガモントやチゴートが認められた。ミクロガモントは大形化し、生鮮標本の観察でもマクロガモントとの区別は容易となった。生鮮標本の観察では、大形化したミクロガモントの内部は初期には微細顆粒が充満しているが（図 13-2，写真 21）、次第にやや大形の顆粒が出現し（図 13-3）、次いで隔壁様の構造が出現して内部が房状に分かれる（図 13-4，写真 22）。この間ミクロガモントの大きさには大きな変化はみられず、計測値は短軸長 36.1～100.6 μm ，長軸長 44.2～101.4 μm ，平均 $63.5 \times 73.0 \mu\text{m}$ であった。成熟したミクロガモント（図 13-5，写真 23）では、房状に分かれた虫体の中に多数のミクロガメートサイトが認められ、計測値は短軸長 57.1～105.1，長軸長 67.2～117.2 μm ，平均 $78.0 \times 98.8 \mu\text{m}$ で、成熟過程のものよりさらに大形となった。マクロガモントの内部は微細顆粒状であるが（図 13-6，写真 24）、受精の完了したチゴートは葡萄の房状となる（図 13-7，写真 25）。チゴートは短軸長 26.9～

32.5 μm , 長軸長 29.4~35.9 μm , 平均 29.7×32.3 μm のほぼ球形であるが、次第に楕円形となり、オーシストの形態をとるようになった（図 13-8, 写真 26）。14 日目には、未成熟のガモントは減少し、チゴートおよびオーシスト（図 13-9, 写真 27）が多数観察された。

HE 染色標本では、ミクロガモントの細胞質は淡青色に染まり、内部に濃青色の多数の核が散在してみられた（写真 28）。生鮮標本の観察結果と同様、染色性の弱い残体が隔壁状に出現し（写真 29）、核はその辺縁に沿って集合してみられ、次いでツメ状のミクロガメートサイトが形成された（写真 30）。マクロガモントの細胞質は淡赤色の顆粒状であるが（写真 31）、受精後のチゴートの辺縁部にはエオジン好性の球状顆粒が出現し、周囲に整然と配列していた（写真 32）。次いで、球状顆粒は壁へ移行し、チゴートはオーシストの形態をとるが、初期のものでは壁が赤色に染色される（写真 33）。PAS 染色では、チゴートのみが陽性で、ガモントおよびミクロガメートサイトはいずれも陰性であった（写真 34）。

(2) プリパテントピリオドおよびパテントピリオド

コクシジウム感染のない 1~2 か月齢の離乳子牛計 31 頭に *E. wyomingensis* のオーシスト $10^5 \sim 10^7$ 個を単回投与した場合におけるプリパテントピリオドは 14~15 日（ 14.2 ± 0.4 日）、パテントピリオドは 4~10 日（ 6.4 ± 1.9 日）であった。オーシスト排泄のピークは 15（18 例）あるいは 16 日目（13 例）にみられ、最大 OPG 値はオーシスト投与数や個体によるばらつきは少なく、2 例を除きいずれも 10^4 以上

で、最大でも 16.6×10^4 であった（表 7）。18 日目以降はオーシストの排泄数は著しく減少し、 10^3 以上の OPG を示すものはみられなかった。パテントピリオドが長い場合でも 18～19 日目以降はごく少数のオーシストが浮遊法により確認できる程度であった。オーシスト投与数とパテントピリオドの相関は明らかではなかった。なお、パテントピリオドの末期に、特にパテントピリオドが長い場合には外壁を欠き内部が顆粒状に変性したオーシスト（写真 5）の排泄が高い頻度で認められた。

第 III 章 *E. wyomingensis* の病原性と感染の程度の評価

牛のコクシジウムでは、*E. bovis* および *E. zuernii* が最も強い病原性を有するとされている[71, 73]。しかし、実際にはこの両種以外は数種について人工感染が行われているに過ぎず、これらの実験も各研究者により供試動物および飼育方法、感染方法、感染の評価方法等が異なった条件で行われているため、病原性に関して直接それらの成績を比較することはできない。今回は、*E. wyomingensis* の病原性を、病原性が強いとされる *E. bovis*、病原性が低いとされる *E. alabamensis* および *E. subspherica* を対照とし、これらをすべて同一条件下で感染させることにより比較検討した。感染評価のためには、臨床症状、オーシストの排泄状況、体重、飼料摂取量、便潜血反応、臨床病理学的所見、キシロース吸収能および病理学的所見について観察を行った。

材料および方法

1. 供試コクシジウム株

E. wyomingensis（岡山株）および比較対照として *E. bovis*, *E. alabamensis*, *E. subspherica* を用いた。*E. bovis* および *E. alabamensis* は 1985 年に神奈川県下の放牧牛、*E. subspherica* は同年当研究所に搬入された子牛の糞便から分離され、以後、当研究所において子牛を用いて継代維持されてきたものである。以下の各実験にはいずれも最終継代後 1 か月以内の新鮮孢子形成 オーシストを用いた。

2. 供試動物および飼育方法

相模原市近郊農家から生後1週齢以内の哺乳期子牛を導入した。導入後は畜舎内の個体別牛房に収容し、第II章2-3)で述べた方法に従いコクシジウムの自然感染を嚴重に防止して飼育した。代用乳を、乳首付き哺乳用バケツを用いて朝、夕の2回給与し、4～5週齢までに完全に離乳させた。離乳後は、乾草および配合飼料を自由に摂取させた。なお、離乳後も第二胃溝反射を維持させる目的で、代用乳給与に用いたのと同じ哺乳用バケツで適量の微温湯を、朝、昼および夕の3回給与した。

飼育期間中は適宜糞便検査を行い、オーシストの排泄が認められた個体（主として導入前に感染）は実験から除外した。以下の各実験にはいずれも離乳後10～14日の子牛で、一般状態、特に糞便性状に異常のみられない個体、計57頭を用いた。

3. オーシストの投与

供試子牛に、各種コクシジウムの孢子形成オーシストを所定数1～2 mlの精製水に浮遊させたものを30～40 gの餌付け用配合飼料に混ぜ、これを経口投与器（30 mlプラスチック製シリンジの先端を切り取ったもの）を用いて口腔深部に注入投与した。投与後は吐きもどしのないことを確認した。投与は朝の給餌前に実施した。

4. 実験設計

オーシストの単回投与と反復投与によるものに分けて実験を行った。

1) オーシストの単回投与

単回投与実験では、*E. bovis*, *E. alabamensis* および *E. subspherica* を比較対照とした。*E. wyomingensis* においては、3 感染群と非感染群の計 4 群を設定し、それぞれに子牛 3 頭を当てた。子牛 3 頭の各感染群に、*E. wyomingensis* の孢子形成オーシストをそれぞれ 10^5 、 10^6 、 10^7 個投与した。観察期間はオーシストの投与日を 0 日として -2 から 21 日目までとした。病理学的検査の目的で、これらのうち、 10^6 および 10^7 個投与の各 1 頭を投与後 21 日目に、さらにこれらとは別に 10^5 、 10^6 および 10^7 個を投与した各 1 頭を、投与後 14 日に剖検した。

E. bovis においては、2 感染群および非感染群の計 3 群を設定し、それぞれに 3 頭を当てた。各感染群の 3 頭に、Hammond *et al.* [52] および Fitzgerald [33,35] の報告を参考として、孢子形成オーシスト 10^5 または 10^6 個を単回投与した。観察期間は、オーシスト投与後 26 日目までとした。これらのうち、 10^6 個投与の 1 頭を投与後 26 日目に、別に 10^5 、 10^6 個を投与した各 1 頭を、投与後 20 日目に剖検した。

E. alabamensis においては、2 感染群および非感染群の計 3 群を設定しそれぞれに 3 頭を当てた。各感染群の 3 頭に、Davis *et al.* [15] および Soecardonno *et al.* [121] の報告を参考として、*E. alabamensis* の孢子形成オーシスト 10^7 または 10^8 個を単回投与した。観察期間は、オーシスト投与後 14 日目までとした。なお、これらとは別に、2 頭にオーシスト 10^8 個を投与し、投与後 5 および 7 日目に剖検した。

E. subspherica においては、2 感染群および非感染群の計 3 群を設定し、感染群にはそれぞれ 4 頭ずつ、非感染群には 3 頭を当てた。感染群の個体には、 10^6 および 10^7 個を単回投与した。観察期間は、オーシス

ト投与後 18 日目までとした。

2) オーシストの反復投与

E. wyomingensis の 3 感染群と非感染群の計 4 群を設定し、それぞれに 3 頭を当てた。感染群の 3 頭それぞれに、孢子形成オーシスト 10^6 個を単回、または 2×10^5 、 2×10^6 個ずつを 1 日おきに 5 回反復投与した。観察期間は、オーシスト投与後 28 日目までとした。

5. 観察方法

実験子牛については、一般状態、体重、飼料摂取量（配合飼料および乾草）のほか、糞便性状（肉眼観察）、便の水分含有率、便潜血反応、オーシストの排泄状況、臨床病理学的検査（血液学および生化学的検査）、D(+)-キシロース負荷試験および病理学的検査を実施した。観察および検査方法は次のとおりである。

1) 糞便性状

毎日、供試個体ごとに排泄便の性状、色調および組織・血液塊の混入の有無を肉眼的に観察した。糞便性状は程度によって－（正常）、＋（軟便）、++（下痢便）、+++（水様便）の 4 段階で記録した。また、採取した糞便をよく混和した後、その 2 g を正確にアルミニウム製容器に計り取り、乾燥器中（ 180°C ，30 分間）で水分を蒸発させ、重量減少量から便の水分含有率を算出した。

糞便性状に変化がみられた場合とオーシスト排泄期間中は毎日、便潜

血反応の有無および程度を便潜血反応試験紙（便潜血用スライド[®]，シオノギ製薬^株）を用いて、用法に従い、オルトリジン法（感度：ヘモグロビン濃度 0.5 mg/ml 以上）により便潜血の有無を確認し、グアヤック法（感度：ヘモグロビン濃度 25.0 mg/ml 以上）でその程度を判定した。

2) オーシストの排泄状況

実験期間中は毎日、各供試個体から直腸便を採取し、十分に攪拌した後、その約 50 g を取り検査材料とした。これに同量の水道水（0.5% 洗剤液添加）を加えて 50 メッシュの金網でろ過し、ろ液を遠心後(2,000 rpm, 5 分)、上清を除去し、沈渣を用いて飽和食塩液浮遊法を行った。鏡検によりオーシストが確認された場合は、プランクトン計算盤を用いて糞便 1 g 当たりのオーシスト数(OPG)を測定した[133]。なお、本法による検出可能な最小 OPG 値は 200 であるため、浮遊法によりオーシストが確認されなかった場合を“－”、浮遊法が陽性で OPG 値が 200 以下であった場合は“<200”または“0”と表記した。

3) 病理学的観察

実験設計に従って剖検を行い、病理的肉眼検査を行った。さらに、病変発現部位、病変が不明瞭で確認が困難な場合は腸管各部位の数か所から採材し、中性緩衝ホルマリン液で固定した後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して組織学的検査を行った。

4) 臨床病理学的検査

原則として、オーシスト投与前、臨床症状の発現時およびその前後に、血液学的検査および生化学的検査を実施した。頸静脈から血液を採取し、血液学的検査用と生化学的検査用に分け、血液学的検査は直ちに実施し、生化学的検査は血清分離後-80℃下で凍結保存した後に行った。それぞれのコクシジウムの検査時点および検査項目は、次の通りとした。

①検査時点

E. wyomingensis (単回投与) --投与前 2、投与後 5, 14, 18, 21 日
(反復投与) -投与前 2、投与後 14, 18, 21, 24,
28 日

E. bovis-----投与前 2, 投与後 10, 20, 23, 26 日

E. alabamensis-----投与前 2, 投与後 4, 7, 11, 14 日

E. subspherica-----投与前 2、投与後 5, 11, 15, 18 日

②血液学的検査

検査は、赤血球数, 白血球数, 血色素量, ヘマトクリット値, 血小板数, MCV, MCH, MCHC の項目について、自動血球計数装置 (東亜医用電子(株) CC-800) により行った。白血球百分率はメイギムザ染色標本の観察により算出した。

③生化学的検査

総蛋白、アルブミン, グロブリン, LDH, GPT, GOT, ALP の各項目について、生化学自動分析装置(日本電子(株)製、JCA-VS-100)を用いて行った。ナトリウム, カリウム, クロールについては、電解質自動分析装置 (東亜電波工業(株)製、NACL-1)を使用した。

5) D(+)-キシロース負荷試験

E. wyomingensis の反復投与牛および *E. subspherica* 感染牛を除き、投与前、臨床症状の発現時および回復時または観察終了時の3回、D(+)-キシロース負荷試験を行った。なお、本試験対象個体は離乳後も哺乳用バケツを用いて微温湯の給与を続け、第二胃溝反射を維持させた[99]。体重1 kg 当たり 500 mg[104]の D(+)-キシロース（和光純薬工業㈱）を微温湯で全量 500 ml としたものを、哺乳用バケツを用いて吸引摂取させた。これにより第二胃溝反射が惹起され、吸引された溶液は直接第四胃に達する[1, 99]。D(+)-キシロースの投与前および投与後180分まで30分ごとに頸静脈からヘパリン処理試験管に採血し、血漿を分離した。分離した血漿は測定に供するまで-20℃で凍結保存した。血漿を水酸化バリウムおよび硫酸亜鉛で除蛋白した後、p-ブロモアニリンの酢酸溶液で発色させ、分光光度計（島津製作所製、SPECTRONIC 20A）により 520 nm で比色定量した。

成 績

1. *E. wyomingensis* オーシストの単回投与による病原性

1) 臨床症状

感染後の糞便性状の推移を表8に示す。感染個体では、12～13日目から軟便あるいは下痢便の排泄が認められ、多くの個体では14～15日目には水様性下痢となり、18～20日目にはほぼ回復した。10⁵個投与の1例(No.1)で下痢の程度がやや弱かったほか、各個体で下痢の程度および持続期間に著差はみられず、オーシスト投与数との関係も明らかでな

かった。下痢の極期には、飲思欲の低下、沈鬱、後躯の汚れ、排糞失禁等が観察された。また、No.5, 2 および 7 で下痢の発生時期に一致して、赤色尿（おそらく血色素尿）の排泄が見られた。No.2 および 3 では、投与後 14 日目に軽度の潜血反応陽性便の排泄がみられたが、便の色調の変化および血液塊等の混入は認められなかった。その他の一般状態、体温に特に変化はみられなかった。

2) 体重および飼料摂取量

10^6 個投与の 3 例で、14～18 日目の間に体重の減少がみられ、その他の感染個体においても、10～14 あるいは 14～18 日目の増体が軽度に低下する傾向が見られたが、特に大きな変動はみられなかった(図 14)。配合飼料および乾草の摂取量に変動は見られなかった。

3) オーシストの排泄状況

各個体とも投与後 13 日目までオーシストの排泄は認められなかった。オーシストの排泄は 14 または 15 日目から認められ、その 1 または 2 日後に最大 OPG 値を示した。最も OPG 値が高かったのは 10^6 個投与個体 (No.5) の 165,600 で、その他の個体においても最大 OPG 値は 10^4 以上であった。18 日目には、いずれの個体ともオーシスト排泄数は著しく減少し、オーシストの排泄期間は 4～5 日であった(表 9)。非感染個体ではいずれも、観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

4) 病理学的所見

10^5 (No.13)、 10^6 (No.14)および 10^7 個(No.15)投与の各 1 例を投与後 14 日目に、 10^6 (No.6)および 10^7 個(No.9)投与の各 1 例を 21 日目に剖検した。

14 日目の剖検個体では、オーシスト 投与数にかかわらず回腸後半部の粘膜に微細赤色点の密在、消化管内容の水様化が認められた（写真 35）。組織学的には、空腸および回腸における絨毛の顕著な萎縮、腺窩内壊死塊がみられた（写真 36）。原虫は小腸後半部、特に回腸中央部以降に多数確認された。小腸上部および盲腸以降からは原虫は検出されなかった。この期にみられたのは有性世代およびオーシストで、これらは絨毛固有層の細胞内に認められた。21 日目の剖検例では腸管各部位とも肉眼および組織学的に特記すべき変化は認められず、腸管のいずれの部位からも原虫は検出されなかった。

2. *E. bovis* オーシストの単回投与による病原性

1) 臨床症状

No.31 および 36 を除く 2 例で、オーシスト投与後 16～18 日目から軟便ないし下痢便の排泄が見られ（表 10）、18～19 日目には糞便潜血反応はいずれも陽性となった（表 11）。しかし、下痢の程度および持続期間は個体によってばらつきがみられ、オーシスト投与数との関係も明らかでなかった。症状が最も強くみられた 10^5 個投与の 1 例(No.28)および 10^6 個投与の 1 例(No.31)では、19 日目以降排泄便は暗褐色ないし暗赤色水様となり、脱落した組織塊の混入が認められた。この症状は観

察終了日の投与後 26 日目以降まで認められた。No.30 および 32 では前 2 例より下痢の程度は軽く、24～25 日目には便潜血反応も陰転した。一方、No.29 では下痢の発生はこれらの個体よりも遅延し、20 日目から軟便の排泄が見られ、23～24 日目には潜血反応陽性の暗褐色下痢となり、その後は速やかに回復した。No.33 では観察期間中、便の性状に変化は見られず、潜血反応も全期間陰性であった。

下痢の程度および期間に一致して、食欲および飲思欲の低下、沈鬱、怒責、不穏、後躯の汚れ、軽度の体温上昇等が観察された。また、下痢の激しかった No.28 および 31 では、22～23 日目以降、激しい怒責を呈し、消瘦が顕著となり、さらに 25 日目以降には極度の衰弱状態に陥った。

2) 体重および飼料摂取量

感染個体の体重の推移を図 15 に示す。非感染個体および No.32, 33 を除き、発症時期に一致して増体の低下が見られた。特に、症状の強かった No.28 および 31 では、20～23 日目に顕著な体重減少が認められた。No.33 では、体重の推移に感染に起因すると思われる変動は見られなかった。症状の強かった No.28 および 31 では、症状の極期に、飼料摂取量の低下が認められ、特に、No.31 は、23 日目以降採食がほとんど停止した。その他の個体では、飼料摂取量の変動は明らかでなかった。

3) オーシストの排泄状況

各個体とも 17 日目までオーシストの排泄は認められなかった。感染個体では 18～20 日目からオーシストの排泄が認められ、その後 1～数日で排泄オーシスト数がピークとなった。表 12 に示すように OPG 値およびオーシスト排泄期間は臨床症状の程度にほぼ一致した。すなわち、症状が軽度であった No.30 および 32 では、 10^4 台のピーク値を示した後 23～24 日目以降オーシストの排泄は見られなくなった。臨床症状の発現が遅かった No.29 ではオーシスト排泄も遅延し、排泄ピーク値も強い下痢のみられた 23～25 日目に一致してみられた。一方、No.28 および 31 では、強い水様性血便のみられた 21～23 日目にはむしろ OPG 値は減少し、その後再び増加した後、オーシストの排泄は観察期間終了以降まで続いた。No.33 では観察期間中オーシストの排泄は認められなかった。非感染個体ではいずれも、観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

4) 病理学的所見

10^5 個(No.37)および 10^6 個投与の各 1 例を 20 日目に、 10^6 個投与の 1 例(No.31)を 26 日目に剖検した。

20 日目の剖検例ではオーシストの投与数にかかわらず、盲腸から直腸にいたる粘膜はほぼ全域にわたり肥厚し、表面は粗雑となり、粘膜ヒダに沿った小赤色点の密発が観察された(写真 37)。26 日目には、これらの部位の粘膜の肥厚、混濁はさらに顕著となり、特に盲腸－結腸移行部および直腸では、小丘状隆起の密発として観察された(写真 38)。組織学的には、絨毛の萎縮、固有層(特に、腺窩周囲)の線維

増生、腺窩内壊死塊の存在および上皮の再生像が認められた。20 日目の剖検では、原虫(有性世代およびオーシスト)は、盲腸、結腸および直腸の腺窩に多数確認された(写真 39)。26 日目の剖検においてもこれらの部位に少数の原虫の残存が確認された。また、この時期の原虫はその周囲を線維性細胞で包囲され変性に陥ったものが数多く観察された(写真 40)。

3. *E. alabamensis* オーシストの単回投与による病原性

1) 臨床症状

オーシスト投与の各個体とも、投与後 3～4 日目から軟～下痢便の排泄が認められ、4～7 日の経過でほぼ回復した。 10^7 および 10^8 個投与の各 1 例(No.50 および No.53)では下痢の程度はその他の個体より強く、その排泄期間もより長期であった(表 13)。下痢の強かった個体ではその発生時期に一致して、飲思欲の低下や沈鬱等が認められた。また、No.50 では下痢の発生に伴って、強度の血色素尿の排泄が観察された。その他の個体では下痢の発生以外、一般状態、体温等に異常はみられなかった。各個体とも、便潜血反応はすべて陰性であった。

2) 体重および飼料摂取量

下痢の程度の強かった No.50 および No.53 では投与後 4～7 日目に増体の低下がみられた(図 16)。配合飼料および乾草の摂取量は個体間あるいは同一個体にあっても測定期間によって比較的大きな変動が見られたが、No.53 では発症時期に一致して配合飼料摂取量の顕著な低下が

認められた。

3) オーシストの排泄状況

各個体とも投与後 6 日目までオーシストの排泄は見られなかった。投与後 7 日目には、 10^7 投与の 1 例(No.50)および 10^8 投与の全例でオーシストの排泄が確認され、8～9 日目をピークとして 4～7 日後まで排泄が見られた。プリパテントピリオドは 7～8 日、平均 7.3 日、パテントピリオドは 4～8 日、平均 5.3 日であった。オーシストの排泄数が最も多かったのは No.53 で、次いで No.50、No.51 の順となり、これは下痢の程度にほぼ比例した。すなわち、強い下痢を呈した個体では、 $10^6 \sim 10^7$ に達する非常に高い OPG 値がみられたのに対し、臨床症状の発現が軽度であったものでは、ピーク時の OPG 値も 10^4 以下の低値であった(表 14)。非感染の個体では、観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

4) 病理学的所見

投与後 5 日目の剖検例では、小腸後半部の粘膜に赤色化がみられ、特に小腸の下部 3/4 で強く認められた。また、盲腸および結腸内容の顕著な水様化が見られた。投与後 7 日目の剖検例では、小腸後半部の粘膜に 1 mm 大の灰白色点の散在とび慢性の微細赤色点が認められ、5 日目の例と同様に特に小腸の下部 3/4 で、病変の程度が強い傾向が見られた(写真 41)。組織学的には、灰白色点は主に原虫の集塊で、その他小腸後半部の粘膜における絨毛の萎縮および出血が認められた(写真 42)。

生鮮材料および組織標本の鏡検によって、5 および 7 日目に、空腸後部および回腸に原虫の寄生が認められ、特に盲腸移行部の上方 2～8 m で重度であった。空腸前半部、十二指腸からも少数の原虫が検出されたが、盲腸以下の部位からは検出されなかった。5 日目の剖検では、無性世代(おそらく第 2 代シゾン)、有性世代およびオーシストが混在してみられ、これらはいずれも絨毛上皮細胞の核内に認められた(写真 43)。7 日目には、5 日目と同様に有性世代およびオーシストが検出されたが、無性世代の原虫はほとんどみられなかった(写真 44)。

4. *E. subspherica* オーシストの単回投与による病原性

1) 臨床症状

各個体とも散発的に一過性の軟便の排泄が認められたが、感染との関係は明らかでなかった。その他一般状態、体温等に異常は認められなかった。なお、各個体とも糞便潜血反応は全期間を通して陰性であった。

2) 体重および飼料摂取量

体重および飼料摂取量に特に変動はみられなかった。

3) オーシストの排泄状況

各個体とも、投与後 9 日目まではオーシストの排泄は認められなかった。10⁶ 個投与の 1 例(No.60)および 10⁷ 個投与の 2 例(No.64 および 66)で 10 日目から、その他の個体では、11 日目からオーシストの排泄が認められ、1～5 日の経過で消失した。なお、No.61 では、全期間オーシ

ストの排泄は認められなかった（表 15）。オーシスト排泄のみられた 7 頭におけるプリパテントピリオドは 10～11 日（平均 10.6 日）、パテントピリオドは 2～5 日（平均 3.0 日）であった。 10^6 個投与の 1 例 (No.62), 10^7 個投与の 2 例 (No.63 および 64) では最大 OPG 値は、 10^2 台にとどまった。オーシスト排泄数の多かったものでも、最大 OPG 値は 10^4 台に達したに過ぎなかった。非感染個体ではいずれも、観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

5. *E. wyomingensis* オーシストの反復投与による病原性

1) 臨床症状

10^6 個を単回投与した個体では、オーシスト投与後 9～11 日目から下痢便の排泄がみられ、12～15 日目には水様性下痢となり、1 例 (No.17) では 17 日目、他の 2 例では 22～23 日目にほぼ回復した。 2×10^5 個を 5 回反復投与した個体では、12 日目から下痢便の排泄がみられ 17～18 日目には回復した。一方、 2×10^6 個を 5 回反復投与した個体では、9～12 日目から下痢便の排泄がみられ、19～27 日目には回復した（表 16）。すなわち、ほとんどの例で極期には水様性下痢便の排泄がみられ、その程度にオーシスト投与法や投与数による差はなかったが、下痢便の持続期間は、 10^6 個単回投与および 2×10^6 個の 5 回反復投与で長く、 2×10^5 個 5 回反復投与群で短くなる傾向がみられた。

反復投与では下痢の極期に単回投与の場合と同様の飲食欲の低下、沈鬱、後躯の汚れ、排糞失禁等が認められたが、血色素尿の排泄やその他の一般状態等に変化はみられなかった。便潜血反応はいずれの個体とも

すべて陰性であった。

2) 体重および飼料摂取量

感染群においては、多くの個体でオーシスト投与後 7～18 日にかけて発育の遅滞（図 17）とその間の飼料摂取量の低下がみられたが、投与法による差は明らかでなかった。

3) オーシストの排泄状況

オーシストの排泄はいずれの場合も 14 日目からみられた。オーシスト排泄のピークはほとんどの例で 15 日目にみられ、 5×10^4 以上の OPG 値を示した後、18～19 日以降は著しく減少し、投与法による差はみられなかった。 10^6 個単回投与の個体では、19 または 20 日目以降オーシストの排泄はみられなかった。一方、5 回反復投与の個体では、ごく少数のオーシストの排泄が持続してみられ、パテントピリオドは、 2×10^5 個 5 回反復投与の個体で 8～9 日(平均 8.3 日)、 2×10^6 個 5 回反復投与の個体では 8～10 日(平均 9.0 日)となり、単回投与の場合よりやや長くなる傾向がみられた（表 17）。非感染個体ではいずれも、観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

6. 糞便性状と便の水分含量

糞便性状の肉眼的評価区分と水分含有率の関係を表 18 に示す。4 種のコクシジウムでは感染時における糞便の肉眼的評価と水分含有率との間に差がみられず、種による評価基準の変動はなかった。肉眼的評価値の－～+++における平均水分含有率にはいずれも互いに有意な差がみら

れたが、“-”と“+”における水分含有率の分布には重複する部分が多かった（図 18）。

7. 臨床病理学的検査所見

1) 血液学的検査所見

E. wyomingensis, *E. bovis*, *E. alabamensis* の感染では、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量等の血液学的検査所見において感染に起因する変動はみられなかった。

2) 生化学的検査所見

E. wyomingensis オーシストを単回および反復投与したほとんどの個体で下痢の発生時期に、アルブミンの減少がみられ、その程度は下痢の程度にほぼ一致した（図 19, 20）。下痢の回復とともにアルブミン濃度は増加する傾向がみられた。これらの個体ではアルブミンの減少に伴う総タンパクの減少がみられたが、グロブリン濃度に大きな変動はみられなかった。*E. bovis* および *E. alabamensis* 感染個体においても、症状の強かった個体でアルブミンの低下がみられた（図 21, 22）。

E. wyomingensis 感染個体においては、14 日目にナトリウムおよびクロールが軽度に低下する傾向を示すものがみられたが変動は少なかった。逆に回復期（18 日目）には、ナトリウムおよびクロールの増加とカリウムの低下がみられた（図 23, 24）。*E. alabamensis* 感染個体においても、発症期（7～11 日目）および回復期（11 日目）に *E. wyomingensis* の場合と同様な電解質組成の変動傾向がみられた（図

26)。一方、*E. bovis* 感染により重篤な症状を呈した 2 個体では発症期にナトリウム、カリウムおよびクロールの著しい減少がみられたが、その他の個体では血清電解質組成に大きな変動はみられなかった（図 25）。

その他、*E. wyomingensis*, *E. bovis* および *E. alabamensis* の感染個体では、発症および回復期における ALP 活性の明らかな低下、トランスアミナーゼ活性の軽度の低下がみられた。しかし、*E. wyomingensis* および *E. alabamensis* 感染個体のうち血色素尿の排泄がみられた個体では、その時期に一致してトランスアミナーゼ活性の一過性の上昇がみられた。

8. D(+)-キシロース負荷試験

オーシスト投与前の 27 例における D(+)-キシロース負荷試験の成績を図 27 に示す。D(+)-キシロース 500 mg/kg を哺乳バケツを用いて投与した場合、血漿 D(+)-キシロース濃度は投与後 90～150 分でピークとなった。ピーク時における最高濃度は 12.6～44.6 mg/dl と個体によりややばらつきがみられたが、90～150 分における平均 D(+)-キシロース濃度は 23 mg/dl 以上であった。

E. wyomingensis, *E. bovis* および *E. alabamensis* の感染子牛においてそれぞれ下痢の極期および回復期に D(+)-キシロース負荷試験を行った。*E. wyomingensis* および *E. bovis* 感染子牛のうち下痢の程度の強かったそれぞれ 2 例の D(+)-キシロース負荷試験の結果を図 28 および 29 に示す。*E. wyomingensis* および *E. bovis* 感染時においては、下痢

の強くみられた個体であっても D(+)-キシロース吸収能に変動はみられなかった。

E. alabamensis 感染子牛のうち下痢の程度の強かった 2 例(NO.50, 53)では、オーシスト投与後 4 日目において、D(+)-キシロース血中濃度の上昇が遅延し、ピーク濃度もオーシスト投与前よりも低く、吸収能の低下が認められた。両個体とも 7 日目の D(+)-キシロース吸収能は投与前とほぼ同等であった（図 30-1）。一方、図 30-2 にその例

（No.48）を示すように、*E. alabamensis* 感染子牛においても下痢の程度の弱かった個体では、4 および 7 日目とも D(+)-キシロース吸収能に変化はみられなかった。

考 察

1. 日本における牛のコクシジウムの種類と分布

今回実施した牛のコクシジウムの分布調査の結果から、牛のコクシジウムは日本においても若齢牛を中心に高率かつ広域に分布していることが明らかとなった。なお、地域、飼養形態、品種間で検出率に差はみられなかったが、これは国土が狭く、頻繁な輸送移動などで地域による偏りが生じにくいこと、多くは舎飼い牛でその飼育方法に大きな差がないことによるものと考えられた。

調査を通じて、*Eimeria* 属の 11 種が検出され、*E. bovis*, *E. ellipsoidalis* について *E. aubrunensis* の検出頻度が高く、これは、諸外国における傾向とほぼ一致した（表 3）。一方、*E. wyomingensis*, *E. bukidnonensis* および *E. subspherica* の検出頻度は低かった。北アメリカにおいては、今回の検出種に *E. illinoisensis* および *E. pellita* を加えた計 13 種が現在までに検出されているが[24,, 72]、日本においてもその後の調査でこの 2 種の検出が報告されている[54]。

牛のコクシジウムの分布調査のうち検出頻度が記載されているものでは、いずれも *E. wyomingensis* の検出率は低く、約半数では検出されていない（表 3）。また、*E. brasiliensis*, *E. bukidnonensis*, *E. illinoisensis*, *E. pellita* 等の検出頻度も概して低い。牛のコクシジウムの多くの種ではその生物学的性状がほとんど知られていないため、このような検出率の差が生じる理由は明らかでない。

Ernst *et al.* [27]は、野外調査においては検出率の低いものほどその OPG 値が低かったことから、これらの種では検査時に見過ごされてしまう可能性が高いのではないかと推察している。また、彼らはその調査

の中で、*E. bukidnonensis* と *E. wyomingensis* が混同されていたことを認めており、同定の不正確さも否定できない。渡辺および岩田[140]は、肝蛭卵検査法による乳牛 454 頭におけるコクシジウムの検出率はわずか 8.37%で、4 種の *Eimeria* 属原虫が確認されたとし、多量の糞便材料を用いれば検出率はさらに高くなる可能性を述べている。野外自然感染牛、特に健康牛では糞便中に排泄されるオーシスト数は非常に少なく、今回の調査においても 50 g という比較的多量の糞便を検査に供したが、わずか数個程度のオーシストしか検出されない場合をしばしば経験した。従って、牛のコクシジウムオーシストの検査には、できる限り多量の糞便を用いることが必要と思われた。

2. *E. wyomingensis* の生物学的性状

1) オーシストの形態学的特徴

日本全国の分布調査において分離された 11 種のオーシストの測定値、および *E. wyomingensis* オーシストの著者らの観察と他の研究者のものとを比較した結果をそれぞれ表 4 および 5 に示す。*E. wyomingensis* のオーシストは牛のコクシジウムのうち *E. bukidnonensis* について大形で、今回の計測値は Huizinga and Winger [58] の原記載およびその他の報告[11, 70, 72, 100]のものとほぼ一致した。Levine and Ivens [72]は、オーシスト壁は 1 層から構成されるとしているが、今回の観察ではオーシストを圧平することによりやや厚い黄褐色の外壁と薄い無色の内壁の 2 層から構成されることが確認され、これは Courtney *et al.* [11]の知見と一致した。

E. wyomingensis のスポロシストは残体を欠くとされるが[11,100]、今回の観察成績は、Levine and Ivens [72]の結果と一致しており、少数

のオーシストで内部残体を有するものがみられた。内部残体は、孢子形成オーシストの観察でも確認は可能であったが、スポロシストを脱殻させることにより容易に観察できた。*E. alabamensis* も内部残体を欠くとされていたが[12,72]、その後 Soecardono *et al.* [121]は、少数のオーシストで小形顆粒状の内部残体が見られることを報告している。従って、内部残体の存否は同種内でも変異があるものと考えられる。

E. wyomingensis のスポロシストの形態、計測値およびスポロゾイトの鈍端部に大形の refractile globule がみられる点は、Courtney *et al.* [11]および Levine and Ivens [72]の観察結果と一致した。また、refractile globule の存在について Courtney *et al.* [11]は、スポロゾイト先端部寄りに時に小形の refractile globule がみられるとしている。しかし、今回の *E. wyomingensis* の観察では、先端部の refractile globule は確認されなかった。今回の孢子形成期の *E. wyomingensis* オーシストの観察において、孢子形成完了前のスポロゾイト内には一時的に複数個の refractile globule が出現し、最終的には 1 個となることが観察された。Soecardono *et al.* [121]は、*E. alabamensis* のスポロゾイトの refractile globule の数は研究者によって差が見られるが、その孢子形成過程の観察結果から、完全に孢子形成の完了したものでは 2 個以上の refractile globule はみられないことを報告している。従って、これらの種のスポロゾイトの refractile globule 数に関する知見の一部には、孢子形成完了前のオーシストの観察によるものが含まれている可能性も考えられる。

E. wyomingensis と *E. bukidnonensis* は、両種とも大形で黄褐色の厚い外壁をもち、スポロシストおよびスポロゾイトの性状にも共通する点が多いことからしばしば混同されてきた[72]。特に、野外調査において

は、両種とも検出頻度が低いため、両種が同一材料中に含まれることが希であることも一因となっているものと考えられる。しかし実際には、*E. bukidnonensis* のオーシストは明らかに大形で、長・短軸長とも *E. wyomingensis* とほとんど重複することはない（表 4）、さらにオーシスト外壁には放射状構造がみられること、鋭端部がややくびれた洋梨型を呈することなどで両種の識別は容易である。大きさの点で、*E. wyomingensis* と *E. auburnensis* の類似性を述べている報告もみられるが[65, 70]、オーシストの外観やスポロシスト内部の構造の相違で識別は容易である。同様に大きさの近似する *E. brasiliensis* はミクロパイルキャップを有することから区別が可能である。

オーシストの大きさは、排泄期間中に変化するが、形態はほぼ一定に保たれることから[19]、長軸および短軸長の比、いわゆる shape index はオーシストの形態を客観的に示しうるパラメーターとして広く用いられている[62, 75, 82]。一方、オーシストの形態は感染の程度により変化することも知られている[16, 105]。従って、長・短軸比は平均長軸長と平均短軸長の比を示すものであり、種々の長軸長と短軸長を有するオーシスト集団の分布の特性（広がりや傾き）を表すことはできない。Norton and Joyner [94]は、*E. acervulina* と *E. mivati* のオーシストの計測を行い、長軸および短軸長をプロットすることによって得られた回帰直線の傾きが両種で明らかに異なると述べている。*E. wyomingensis* の短軸長 (Y) に対する長軸長 (X) の回帰式を算出したところ $Y=0.12X+24.13$ が得られ、実測値のプロットはこの直線を軸に X 軸方向に強く傾斜した分布を示した（図 3）。すなわち、長軸長が取りうる範囲において、 $Y=0.73X$ （長・短軸比の逆数）は必ずしも成立しない。たとえば、*E. bovis*, *E. bukidnonensis*, *E. brasiliensis* のオーシスト

はほぼ近似した長・短軸比をもつが（表 4）、算出された回帰式からこれらはただ単に大きさの違いだけでなく、長・短軸長の分布の範囲や傾きにおいても互いに独立したものであることが明らかである。また、*E. cylindrica*, *E. ellipsoidalis*, *E. zuernii*, *E. subspherica* のオーシストはいずれも無色小形で、その他の性状も互いに類似するが、図 4 から互いに独立した集団から成り立っていることが読みとれる。*E. auburnensis* は今回計測を行った牛のコクシジウム 11 種のうち唯一負の傾きを示し、長軸長の長いものほど短軸長は短くなる傾向をもつことが大きな特徴であると考えられる。すなわち、オーシストの長・短軸長とそれから算出される回帰式は、オーシストの形状の特性を示す有効な指標となるものと考えられた。

2) 孢子形成過程における形態的变化

コクシジウムオーシストの孢子形成は、複雑な形態学的変化を経て完了することはよく知られており、その観察はコクシジウムの生物学的特性を知るうえで重要である。Marquardt [81]は、*E. brasiliensis* オーシストの孢子形成過程を観察し、スポロントの凝集と、その後スポロシストが形成されるまでのスポロプラズマ内部の顆粒状構造の変化について報告しているが、スポロプラズマ自体の形態学的変化、スポロシスト形成後の変化については言及していない。Davis *et al.* [15]および Soekardono *et al.* [121]は、*E. alabamensis* の孢子形成過程を観察し、前者は主としてオーシスト、スポロントおよびスポロブラストの計測値の変化、後者は、主として培養温度とその出現時間との関係について報告している。それ以外の牛のコクシジウムの孢子形成過程の形態学的変化に関して報告したものは少ない。牛以外の哺乳類寄生の *Eimeria* 属に

については、Vetterling [136]は豚のkokshium *E. debliccki* の孢子形成過程の形態学的変化を詳細に観察し、これを 16 ステージに分けて図示している。これは、スポロント凝集後の refractile granule の出現、スポロントの顆粒状構造の変化、明瞭なピラミッドステージの出現などの点で、今回の *E. wyomingensis* における所見と基本的に一致した。*E. alabamensis* では、スポロントの分裂初期にスポロブラストの一端に parachute-shaped cap が出現しこれが本種の特徴とされる[15]。犬kokshium の *I. rivolta* では、ピラミッドステージの出現はみられない[78]。

E. debliccki では、スポロゾイト内に 2 個の refractile globule とスポロシスト内部に残体を形成して孢子形成を完了するが[136]、*E. wyomingensis* ではスポロゾイト内部にみられた数個の refractile globule がまず 2 個の大形のものに集約され、ついに鈍端部の 1 個に融合して孢子形成を完了し、多くの場合、内部残体は形成されなかった。これは、*E. alabamensis* における孢子形成の所見[121]と同様であった。多くの牛のkokshium のオーシストも孢子形成の完了したものでは、2 個以上の refractile globule と内部残体を有するが[72]、これらは *E. debliccki* と同様の経過で孢子形成を完了するものと推察される。このように、孢子形成の最終形態を確認することは、孢子形成の完了時間を測定するうえでも重要である。

3) 孢子形成時間

いわゆる孢子形成時間は、排泄直後の未分化のオーシストが孢子形成を完了し、感染性を有するようになるまでに要する時間の意味で用いられ、種の同定上の重要なパラメーターの一つとされている[62, 75]。今

回の *E. wyomingensis* の観察では、29℃において、141 時間後から孢子形成の完了したものがみられ始め、234 時間後には孢子形成率が最大値の 95%に達した。*E. wyomingensis* の孢子形成時間は、Huizinga and Winger[58]の原記載では 120～168 時間とされているが、その培養条件については述べられていない。それ以降、室温（18～24℃）で 9 日 [100]、27℃では 72～120 時間[70]であるとする報告がみられる。これらの報告では、その他の牛のコクシジウムの孢子形成時間に関するものと同様に、孢子形成完了の定義が明確にされていない。孢子形成には、酸素の存在が必要でその速度は温度依存性であることから[83, 137, 138, 142]、このように異なった条件下で行われた実験の孢子形成時間を比較することは困難である。従って、コクシジウムの孢子形成の観察は一定の条件下で行われる必要があり、詳細な顕微鏡的観察によって得られるオーシストの孢子形成率の経時的観察により正確な孢子形成時間の算出が可能となる[75]。

E. alabamensis の観察では[121]、孢子形成過程を 6 つのステージに分類し、25℃におけるそれぞれの経時的出現率が示されている。*E. zuernii* [83]および *E. debliccki* [136]では、50%孢子形成時間を用いて培養温度と孢子形成速度の検討が行われているが、その算出法については述べられていない。一方、Norton and Chard [93]は鶏のコクシジウムの孢子形成過程をスポロントの凝集、スポロントの分裂、スポロシストの形成および孢子形成完了の 4 つに区分して、それぞれの経時的な出現率の観察を行い、孢子形成完了オーシストの出現率をアークサイン変換したものと経過時間との回帰式から 50%および 95%孢子形成時間を算出し、誤差の少ない 50%が最も有効なパラメーターとなり得ると述べている。また、実際に 7 種の鶏のコクシジウムの 50%孢子形成時間

には *E. brunetti* と *E. maxima* 相互間を除き、統計学的に有意な差がみられ、回帰式によって得られた最短孢子形成時間は、オーシストを実際にヒナに投与することによって得られた Edgar [20] の観察結果とほぼ一致したと報告している。

今回、Norton and Chard [93] の方法に従って得られた 29℃ における *E. wyomingensis* の 50% および 95% 孢子形成時間はそれぞれ 191 および 231 時間であった。比較のため、同一条件下における *E. alabamensis*, *E. aubrunensis*, *E. ellipsoidalis* および *E. subspherica* のオーシストの孢子形成時間の観察を行ったところ、これら各種の 50% 孢子形成時間の間には互いに明らかな差がみられた。50% 孢子形成時間に差がみられない場合においても、回帰直線の傾きや各ステージの出現率の推移を用いて比較できる[75]。今回の *E. wyomingensis* と *E. subspherica* においては、4 ステージの出現率のプロットには時間的なずれが認められるもののほぼ類似していたのに対し、他の 3 種との間にはスポロントの分裂像の出現頻度に大きな差がみられた。このように、牛のコクシジウムにおいても、50% 孢子形成時間の算出と 4 ステージの出現頻度の経時的観察データは、旧来の方法に比べ種の異同をより明確にできるものと考えられた。

前述のようにコクシジウムの孢子形成には酸素が必要でその速度は温度に依存する。従って、浅層培養法や送気培養法[117]および今回用いた振盪培養法[119]などにより十分量の酸素を供給することは可能であるが、培養温度は一定とする必要がある。今回は鶏のコクシジウムの孢子形成の観察に最も好適とされる 29℃[75]で観察を行った。これは、コクシジウムオーシストの培養で常用される 25～28℃ よりもやや高い。しかし、*E. zuernii* においては[83]、8～32℃ の間では孢子形成は正常

に行われるとされている。また、今回の *E. wyomingensis* および比較に用いた他種のオーシストにおいても、29℃で培養することにより孢子形成率の低下や異常分裂等の問題となる所見はみられなかった。牛のコクシジウムの孢子形成の完了までに要する時間は鶏の寄生種より明らかに長いため、29℃下での観察は孢子形成に悪影響を及ぼすことなく観察時間を短縮できるという点で有利であると考えられる。

4) 宿主体内における発育

E. wyomingensis は、2 代の無性生殖を経た後、有性世代に移行し、初代シゾントは腸陰窩上皮細胞、第二代シゾントおよび有性世代は絨毛の固有層の細胞で発育することが明らかとなった。これらの各発育期とも小腸の下部 1/3 以降の全域でみられ、小腸の上部や盲腸以降からは検出されなかった。これは基本的に *E. auburnensis* の生活環[7, 8, 17, 51]と同じであった。一方、*E. bovis* の初代シゾント[49]は小腸後部の絨毛の乳び管内皮細胞、第二代シゾントおよび有性世代は盲腸および結腸の上皮細胞にみられるとされている[49, 48]。*E. zuernii* も *E. bovis* と同様の部位に寄生するが、初代シゾントは固有層で発育する[124, 125]。*E. alabamensis*[15, 16]および *E. ellipsoidalis*[53]はその各ステージとも小腸中央部以降の上皮細胞で発育し、特に前者は核内で発育することが特徴である。

E. auburnensis, *E. bovis* および *E. zuernii* はともに非常に大形の初代シゾント、いわゆる giant schizont と小形の第二代シゾントを有する。*E. bovis* の初代シゾント中には、 10^4 個以上のメロゾイトが形成される[49]。一方、*E. wyomingensis* の初代シゾントは小形でメロゾイト数も 10 個程度であり、これらの種とは明らかに異なっていた。*E.*

wyomingensis の第二代シゾントは初代のものよりさらに小形でメロゾイト数も 2～6 個と少なく、増殖能は前 3 種に比べ明らかに低い。

E. wyomingensis の成熟初代シゾントはオーシスト投与後 5 日目にみられたが、*E. auburnensis* では 12～14 日[17]、*E. bovis* では 14 日以降[49]、*E. zuernii* では 10～16 日目[125]とされ、giant schizont を有する種ではその成熟に明らかに長い時間を要する。一方、成熟初代シゾントの出現からオーシストが糞便中に排泄されるまでの期間は *E. wyomingensis* では 8～9 日であり、逆にやや長い。また、*E. wyomingensis* の初代および第二代シゾントともメロゾイト形成数が非常に少ないにもかかわらず、10 日目以降には多数の有性世代の発育がみられることから、第二代以降、複数回の無性生殖が行われる可能性が示唆される。牛のコクシジウムでは、第三代以降の無性世代の存在が確認されたものはない。Long and Rose [76]は、*E. mivati* 感染ヒナにベタメサゾン投与した場合、無性世代の発育が繰り返えられることを報告している。無性世代の回数は宿主の免疫状態に影響されるものかもしれない。

E. wyomingensis は非常に大形のミクロガモントを形成することが観察された。*E. auburnensis* も固有層の細胞中に大形のミクロガモントを形成し、その大きさは平均 $79.5 \times 150 \mu\text{m}$ で最大 $287.5 \mu\text{m}$ に達するとされている[17]。*E. wyomingensis* のミクロガモントの成熟時の大きさは平均 $78.0 \times 98.8 \mu\text{m}$ で、*E. auburnensis* のものよりもやや小さい。*E. wyomingensis* のミクロガモントの核の分裂、残体の形成等の過程は *E. auburnensis* [7]に類似していた。しかし、*E. auburnensis* では、成熟ミクロガモントの中のミクロガメートサイトは PAS 染色陽性であるとされるが、*E. wyomingensis* では成熟したものであってもミクロガ

メートサイトは PAS 染色陽性を示さなかった。*E. bovis*, *E. ellipsoidalis* および *E. zuernii* の有性世代はともに上皮細胞で発育し、このような大形のミクロガモントを形成しないとされている。

牛のコクシジウムの宿主体内の発育を観察するには、感染歴のない動物を用い、非常に多数の単一種のオーシストを投与する必要があることから、その実施は容易ではない。特に、牛では腸管面積が鳥類や小形哺乳類に比べ非常に広いことから、初代シゾントの検出には詳細な観察が要求される。Chobotar *et al.*[8]は *E. auburnensis* の初代シゾントの検出のために、31 頭という多数の子牛を用い、その一部の個体に対してはスポロゾイトを外科的に直接小腸内に接種した。また、*E. zuernii* の生活環の観察においては[124]、感染子牛への副腎皮質ホルモンの投与と外科的手法が併用されている。牛のコクシジウムに関する実験では、感染を増強させるためにしばしば副腎皮質ホルモンの投与が用いられる[25, 41, 92, 126, 127, 128]。これらの処置が牛のコクシジウムの生活環に及ぼす影響は明らかでない。しかし、鶏のコクシジウム *E. tenella*[74]では、感染ヒナにデキサメタゾン投与することにより、異所寄生と考えられる肝臓内でのシゾントの発育がみられることや、*E. mivati*[76, 111]では、同様の処置により無性世代が繰り返えられることによりパテントピリオドが著しく延長されることが報告されている。そのため、今回の実験では、薬物投与をさけ、可能な限り多数 (10^7 個以上) のオーシストを投与することにより、無性世代の検出を行った。

E. alabamensis[59], *E. bovis*[28], *E. auburnensis*[9], *E. ellipsoidalis*[122], *E. zuernii*[106]では、スポロゾイトを培養細胞に接種することにより、発育の観察が行われており、いずれも好適条件下では成熟初代シゾントまで発育させることが可能である。*E. zuernii* の

初期の研究では、giant schizont の存在は確認されなかったが[14]、培養細胞を用いた観察でその存在が示唆され[106]、後に子牛を用いた実験でそれが確認されている[124]。また、*E. ellipsoidalis* を子牛に感染させた場合 10～14 日目に成熟シズントがみられるとされるが[53]、培養細胞に接種した場合、5 日目に成熟シズントがみられることから、子牛でみられたものは第二代以降のシズントではないかと推察されている[122]。しかし、培養細胞でみられる初代シズントの大きさ、メロゾイトの含有数、成熟までに要する時間は子牛でみられるものとは必ずしも一致しない[9, 59, 106]。

5) プリパテントピリオドおよびパテントピリオド

E. wyomingensis 感染子牛計 31 頭におけるプリパテントピリオドは 14～15 日 (14.2 ± 0.4 日), パテントピリオドは、4～10 日 (6.4 ± 1.9 日) であった。*E. wyomingensis* のプリパテントピリオドは 13～15 日, 平均 14.5 日[11]あるいは 14～16 日, 平均 14.2 日[25]、パテントピリオドは 2～5 日, 平均 3.5 日[11]あるいは 1～7 日, 平均 3.6 日[25]と報告されている。今回のプリパテントピリオドは平均値でこれらの報告とほぼ一致したが個体差はより小さく、またパテントピリオドは今回のものでは明らかに長かった。

Levine [71]は、牛のコクシジウムのうちプリパテントピリオドが報告されているものを要約して、*E. alabamensis* 6～11 日, *E. ellipsoidalis* 8～13 日, *E. bovis* 15～20 日, *E. zuernii* 15～17 日, *E. auburnensis* 18～20 日としている。*E. wyomingensis* のプリパテントピリオドはこれらのうちの間値を示している。また、*E. wyomingensis* を除くこれらの種のプリパテントピリオドは、研究者や個体によってさら

に大きなばらつきがみられるが、*E. wyomingensis* では今回のものを含めて研究者や個体よるばらつきは少ない。パテントピリオドは主として感染の程度に影響を受けるとされている[71]。

3. *E. wyomingensis* の病原性と感染の程度の評価

1) *E. wyomingensis* の病原性

コクシジウムの病原性は、投与したオーシストの数と活性、宿主動物の齢や品種・系統などの要因により影響される[31]。しかし、牛のコクシジウムの人工感染に関する報告はいくつかみられるが、動物の齢・品種、投与オーシストの活性、投与方法などは研究者によってさまざまである。今回の実験では、可能な限り明確に規定した条件、すなわち、コクシジウム感染歴のない離乳後 1～2 週 of ホルスタイン種子牛を用い、孢子形成完了後 1 か月以内の孢子形成オーシストを配合飼料に混じて投与する方法を用いて、*E. wyomingensis* の病原性を病原性が強いとされる *E. bovis*、弱いとされる *E. alabamensis* および *E. subspherica* と比較評価した。

今回の実験では *E. wyomingensis* のオーシストを投与した全例で感染が成立し、その全てで下痢の発生がみられ、極期にはほとんどの個体で水様性下痢便の排泄がみられたが、発症の程度に大きなばらつきはみられなかった。また、2 例で一過性の潜血陽性便の排泄がみられたが、便の色調に変化はみられなかった。Courtney *et al.* [11]は、2～3 週齢の子牛 10 頭に *E. wyomingensis* のオーシスト 10^6 または 2×10^6 個を投与したところ、8 頭で感染が成立し、5 頭で下痢がみられ、うち 2 頭では血塊の混入がみられたことを報告しているが、オーシストの排泄状況

や臨床症状の推移等の詳細については述べていない。一方、Ernst and Benz [25]は、2～4 週齢の子牛計 50 頭に *E. wyomingensis* のオーシスト $0.2 \times 10^4 \sim 10^7$ 個を投与し、41 頭中 32 例で感染が成立したが、感染による下痢便の排泄はみられなかったとしている。また、Courtney *et al.* [11]および Ernst and Benz [25]は、個体により感染の程度にばらつきがみられ、一部の個体では感染が成立しなかったとしており、今回の結果との相違の原因は明らかでないが、今回の実験では離乳子牛を用いたのに対し、前 2 報で用いられた子牛はその月齢から哺乳期間中のものと推察されることから、供試牛の齢の差に起因するのかもしれない。Davise *et al.* [15]は、*E. alabamensis* の人工感染の場合にも、3 週齢以下の子牛における感染率や感染の程度は、それ以上の齢のものより低かったと報告している。

あるコクシジウム種が感染モデルに用いられるための条件として、適度の病原性を有することと、実験感染におけるその再現性が高いことが要求される。今回の実験結果から、*E. wyomingensis* はこれらの条件を満たしうることが明らかとなった。オーシスト投与数と感染の程度の間係を検討したところ、*E. wyomingensis* のオーシスト 10^5 個投与の個体ではやや下痢の程度が低いものがみられたが、 10^6 個以上を投与した場合には、感染の程度やオーシスト排泄数に投与数による差はみられなかった。コクシジウム感染の程度は一般に投与されるオーシスト数が多いほど増大するが、非常に多数のオーシストが投与された場合には逆に感染の程度は低くなり、オーシスト排泄数も減少することが知られている。その理由として、多数の無性世代が寄生組織に障害を及ぼすため、次の有性世代の発育が抑制される現象、いわゆる群集効果が知られている[69,141]。今回の牛のコクシジウム感染の場合、宿主の腸面積の広さ

から考えて、投与オーシスト数による差がみられなかったのは単に群集効果によるものとは考え難いが、*E. wyomingensis* のオーシスト 10^6 個の投与により安定した病原性が得られおり、実験感染におけるオーシスト投与数は 10^6 個が適当と考えられた。

E. wyomingensis オーシストの単回投与および反復投与による病原性の比較を行ったところ、感染の程度は初回オーシスト投与数に依存することが示唆された。Fitzgerald [34]は、*E. bovis* のオーシスト 500～15,000 個を子牛に連続投与した場合、パテントピリオドは 7～15 日長くなったがオーシスト排泄数には投与数による差はみられなかったとしている。また、Lotze and Leek [77]は、羊のコクシジウム *E. intricata* のオーシストを反復投与した場合、感染期間は初期投与数に強く依存したことから、初期に投与されたものだけがオーシストを形成し、後に投与されたものは有性世代まで発育できないのであらうと述べている。同様の知見は、鶏のコクシジウム *E. necatrix* のオーシストの反復投与の場合にもみられる[86]。これらのことから、多数のオーシストの投与や、反復投与の場合、感染初期に宿主がなんらかの抵抗性を獲得するため、それ以降の発育が抑制されるのではないかと考えられる。

E. wyomingensis 感染個体では、下痢の発生は 10 日目からみられはじめ、14～15 日目には水様性下痢の排泄がみられた。これは、有性世代の出現と成熟期に一致しており、*E. wyomingensis* の病原性はガメートゴニーに起因するものと考えられる。*E. wyomingensis* の感染個体を、その症状の極期に剖検したところ、寄生部位を中心に顕著な絨毛の萎縮がみられた。同様の所見は鶏[30, 106, 118], 羊[107, 108]およびヒト[6]のコクシジウム感染時や線虫感染[29, 80]においてもみられている。また、今回の実験における *E. bovis* および *E. alabamensis* 感染におい

ても同様の所見がみられた。絨毛の萎縮は感染による機質的傷害によるものではなく、腸管の過敏性反応によるものとされている[29, 80]。

今回の実験においては、*E. bovis* のオーシスト 10^5 あるいは 10^6 個を投与した 6 頭中 5 例で感染が成立した。プリパテントピリオドは 18～20 日（平均 19 日）、パテントピリオドは 4～11 日以上（平均 7.8 日以上）であった。*E. bovis* のプリパテントおよびパテントピリオドは報告者によりかなり差がみられるが[73]、Fitzgerald [34]はプリパテントピリオドは 16～18 日、パテントピリオドは 5～7 日としており、今回の知見にほぼ一致する。感染の成立した 5 例では、18～19 日目から血便の排泄がみられ、症状の強かった個体は著しい衰弱状態に陥った。これは、Fitzgerald [33]および Hammond *et al.* [52]の知見にほぼ一致し、本種の強い病原性が確認された。しかし、感染の程度には個体によりばらつきがみられ、発症の程度とオーシスト投与数との関係も明らかではなかった。また、 10^6 個投与の 1 例では感染が成立しなかった。Fitzgerald [36]および Hammond *et al.* [52]も *E. bovis* のオーシストを投与した一部の個体で感染が成立しなかったことを報告している。

今回の実験では、*E. alabamensis* のオーシスト 10^7 および 10^8 個を投与した全例で感染が成立し、プリパテントピリオドは 7～8 日（平均 7.3 日）、パテントピリオドは 4～8 日（平均 5.3 日）であった。*E. alabamensis* のプリパテントピリオドは報告者により、6～8 日（平均 6.6 日）[121]、6～13 日（平均 8 日）[15]、7～9 日（平均 8 日）[120]、パテントピリオドは 1～13 日（平均 3.9 日）[15]、5～13 日[120]とされ、これらはほぼ今回の知見に一致する。Soecardonio *et al.* [121]は、*E. alabamensis* を子牛に人工感染させた場合、安定した感染を得るためには 10^7 個以上のオーシストの投与が必要であるとし、 80×10^6 ある

いは 100×10^6 個のオーシストを投与した個体では中程度の下痢がみられたが、水様性下痢やその他の症状はみられなかったことを報告している。一方、今回の実験では、感染の程度は個体によりばらつきがみられたが、 10^7 および 10^8 個投与の各 1 例では極期に強い水様性下痢便の排泄がみられ、これらの個体では最大 OPG は $10^6 \sim 10^7$ に達した。これは Davis *et al.* [15] の知見にほぼ一致し、*E. alabamensis* では多数のオーシストを子牛に投与した場合には下痢の原因となることが明らかとなった。

一方、*E. subspherica* のオーシスト 10^6 または 10^7 個を投与した子牛 8 頭中 7 例で感染が成立し、プリパテントピリオドは 10~11 日（平均 10.6 日）、パテントピリオドは 2~5 日（平均 3.0 日）であった。Ernst and Courtney [23] は、 $10^6 \sim 58 \times 10^6$ 個を 2~3 週齢の子牛に投与し、プリパテントピリオドは 7~18 日（平均 9.3 日）、パテントピリオドは 4~15 日（平均 11.1 日）であったと報告している。彼らは、プリパテントピリオドおよびパテントピリオドがそれぞれ 18 および 4 日であった個体は自然感染による可能性があるとしているが、これを除いても今回の知見よりプリパテントピリオドは短く、パテントピリオドは明らかに長い。この相違については明らかでないが、感染に用いた子牛の週齢の差に起因することも考えられる。Ernst and Courtney [23] は、*E. subspherica* 感染時の糞便性状の変化や OPG 等については述べていないが、予備試験の結果から本種による安定した感染を得るためには少なくとも 10^6 個以上のオーシストの投与が必要であるとしている。今回の実験においても、 10^6 あるいは 10^7 個の多数のオーシストの投与によっても、*E. subspherica* 感染による糞便性状等の変化はみられなかった。従って、これらの材料だけでは断定し難いが、*E. subspherica* の増殖

能は低く、少なくとも実験環境下での病原性は低いものと考えられる。

以上のことから、*E. wyomingensis* は子牛に人工感染させた場合、少なくとも今回の試験条件においては常に安定した感染が得られ、 10^5 個の投与により強い下痢を起こす病原性を有することが明らかとなった。また、比較に用いた *E. bovis* では、非常に強い出血性の下痢を引き起こし、*E. alabamensis* でも多数のオーシストを投与した場合には下痢を起こすことが確認されたが、両種とも感染の程度は個体により大きなばらつきがみられ、安定した感染を作りだすことはできなかった。また、*E. subspherica* の実験環境下における病原性は低いものと考えられる。

2) 感染の程度の評価

(1) 臨床症状およびオーシストの排泄

鶏のコクシジウム感染の場合、小腸寄生の *E. acervulina* では粘液便、*E. tenella* では血便の排泄などを伴うことから、糞便性状の変化がしばしば感染の程度の指標として用いられる。一方、牛のコクシジウムでは、*E. bovis* や *E. zuernii* 感染時の血便を除き、便性状は質的变化に乏しく主として水分含量の異常としてみられるため、糞便の形状により正常便，下痢便，水様性下痢便等に区分して表現されることが多いが、数量的に評価する試みは行われていない。今回の実験では、便の水分含有率を測定することにより、肉眼的観察所見の客観性を証明することができた。便性状の客観的表現の証明や再現性を確保するために水分含有率は有効な手法と考えられる。また、今回の結果から、出血性の下痢の場合には、便潜血反応を調べることにより、その程度をより客観的かつ正確に測ることができることが明らかとなった。

オーシスト排泄数は、感染の程度の指標として最も普通に用いられる。しか

し、鶏のコクシジウムにおいては、重感染時にはオーシスト排泄数が減少することや[69, 141]、ある種の抗コクシジウム剤を投薬した場合には非投薬のものよりむしろオーシスト排泄数が増加すること[109]など、感染評価の指標としての問題点が指摘されている。また、牛のコクシジウムの自然感染個体においては、多数のオーシストを排泄した個体であっても必ずしも臨床症状を伴わない場合[26]や、逆に強い症状を呈した個体であってもオーシスト排泄数は低値であること[97]が報告されている。しかし、今回の実験では、ほとんどの場合オーシスト排泄数は臨床症状の程度に比例して増加していることから、人工感染時においてオーシスト排泄数は牛のコクシジウム感染の程度の評価の有効な指標となり得るものと考えられる。

(2) 臨床病理学的所見

鶏のコクシジウムにおいては、非出血性の下痢を起こす *E. acervulina*[98]および *E. brunetti*[2]の感染時には、脱水を示すヘマトクリット値の上昇、また *E. tenella*[98]の感染時には出血によるヘマトクリット値の低下がみられる。一方、牛において出血性の下痢を起こす *E. bovis*[36]および *E. zuernii*[129]を人工感染させた場合には、その症状の極期に顕著なヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下がみられるが、個体によるばらつきが大きいこと、*E. bovis* 感染時においてもヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下はわずかであるとする報告がみられる[13]。今回の実験では、*E. wyomingensis* 感染のほとんどの個体と *E. alabamensis* 感染の一部個体で水様性下痢、*E. bovis* 感染の一部個体では強い出血性下痢がみられたが、脱水や貧血を示唆する所見はみられなかった。すなわち、牛などの大形の家畜では血液学的所見

に、鶏でみられるような典型的な変化が現れ難いものと推察される。

Fitzgerald [33]と Fitzgerald *et al.* [36]は *E. bovis* 感染時において、症状の極期にアルブミンおよび総タンパクの減少がみられたとしている。一方、*E. zuernii* 感染個体でヘマトクリット値およびヘモグロビン量の低下がみられたものであっても、総タンパクに大きな変動はみられないとする報告もみられる [129]。今回の実験においては、*E. wyomingensis*, *E. bovis* および *E. alabamensis* のいずれの感染時でも、症状の程度に比例してアルブミンと総タンパクの減少がみられた。また、これら 3 種のコクシジウムの感染時でも、トランスアミナーゼおよび ALP 活性の低下がみられた。これは、栄養状態の低下を示す所見と考えられる [88]。

E. bovis 感染時には、症状の強かった個体でナトリウムおよびクロールの低下がみられた。これは、下痢による体液の損失に起因するものと考えられ、*E. zuernii* 感染時にみられる所見 [129] と一致する。一方、Fitzgerald [33] は、*E. bovis* 感染時にはナトリウムおよびカリウムは動物が瀕死の状態になるまで大きな変化はみられず、死亡の直前においてのみ著しいカリウムの増加とナトリウムの低下がみられたとしている。今回の *E. wyomingensis* および *E. alabamensis* の感染時では、症状の極期におけるナトリウムとクロールの減少は明らかでなく、むしろ回復期にこれらの上昇とカリウムの低下がみられた。また、*E. wyomingensis* および *E. alabamensis* 感染の一部の個体で発症期に血色素尿の排泄がみられたが、これは下痢により脱水を起こした個体が、飲水を過剰摂取し、浸透圧が低下したことに起因する溶血性変化と考えられる。従って、*E. wyomingensis* および *E. alabamensis* 感染時においても、電解質組成の平衡が不安定な状態にあったことが推察される。

(3) D(+)-キシロース負荷試験

D(+)-キシロースは小腸において、なんら酵素の作用を受けることなく吸収されるため、これを用いた負荷試験は小腸粘膜の機質的傷害を測る指標として有効である。家畜では、馬[4, 18, 85, 110, 112], 犬[56], 猫[22]および七面鳥[44]でその応用が検討され、小腸の機質的傷害による消化異常の診断に有効であることが示されている。Hill *et al.* [57]は、鶏の小腸のコクシジウム *E. acervulina* の感染評価に D(+)-キシロース負荷試験を応用し、病変値[61]よりも感度の高い感染の程度の指標となり得ることを報告している。

しかし、牛などの複胃動物では、D(+)-キシロースは第一胃で分解されるため[102]、経口投与による本試験の実施は不可能である。Pearson *et al.* [104]は D(+)-キシロースを穿刺により直接成牛の第四胃に注入することにより、本試験の実施が可能であることを報告している。しかし、この方法は手技が繁雑であり、生体に及ぼすストレス等の影響も否定できない。今回は、対象動物に対し離乳後も乳首付き哺乳器による飲水を続けることにより食道溝反射を維持させ[1,99]、これを利用して D(+)-キシロースを第四胃内に投与した。キシロースの 500 mg/kg 投与後の血漿中濃度は 90～150 分後にピークとなり、この間の濃度は平均 23 mg/dl 以上であった。成牛の第四胃に穿刺により同量の D(+)-キシロースを投与した場合、90～150 分後に血中濃度はピークとなり、その時点の濃度は 13.8 mg/dl とされており[104]、ピーク時間は今回の子牛におけるものとほぼ一致したが、D(+)-キシロース濃度は子牛で高かった。D(+)-キシロース 500 mg/kg を犬、猫および馬に経口投与した場合、血中濃度はいずれも 60～90 分後にピークとなり、その時点における濃度は犬で 45 mg/dl 以上[56]、猫で 24.2 mg/dl[22]、馬では 20.6

mg/dl[4]とされる。子牛におけるピーク時の濃度は、猫および馬とほぼ同等であった。すなわち、子牛においては、第二胃溝反射を利用したD(+)-キシロース負荷試験の実施が可能であることが明らかとなった。

E. alabamensis 感染子牛では、下痢の程度の強かった個体でその発現時にD(+)-キシロース吸収能の明らかな低下がみられたが、下痢の程度の弱かった個体では、D(+)-キシロース吸収能に特に変化はみられなかった。すなわち、*E. alabamensis* は空・回腸粘膜の絨毛上皮に寄生することから、D(+)-キシロース吸収能の変化は、*E. alabamensis* 感染による空・回腸粘膜傷害の程度を反映したものと考えられ、Hill *et al.* [57]の報告した小腸絨毛上皮に寄生する *E. acervulina* 感染における知見とも一致した。*E. bovis* 感染子牛においては、下痢の極期においてもD(+)-キシロース吸収能に変化はみられなかった。これは、*E. bovis* による傷害部位は盲腸以降で、D(+)-キシロースの吸収部位である空・回腸に傷害が及ばないことから当然のことと考えられる。馬および牛においても大腸の傷害時には、D(+)-キシロース吸収能に変化はみられないとされている[4, 104]。一方、*E. wyomingensis* と *E. alabamensis* の寄生部位はほぼ重複するが、*E. wyomingensis* 感染子牛では、下痢の極期においてもD(+)-キシロース吸収能に変化はみられなかった。これは、*E. wyomingensis* は固有層で発育するため、絨毛上皮の傷害は *E. alabamensis* に比べ少ないためと考えられる。

以上のことから、D(+)-キシロース負荷試験は牛のコクシジウムにおいても、小腸の絨毛上皮に寄生する *E. alabamensis* 感染時には、その傷害の程度を計る有効な指標となり得る。

要 約

本研究は、牛のコクシジウムに対する薬効評価に用いる感染モデルとしてのコクシジウム種を選定するため行った。まずモデル候補種を採取するため日本に分布する牛のコクシジウム種とその寄生頻度を全国的に調査した。採取したコクシジウム 11 種についてモデル種としての適性を知るため、生物学的性状を詳細に調べ、有力候補種については人工感染実験により宿主体内の発育と病原性を確認した。さらにモデル種を用いた感染実験のための感染方法を確立し、また感染の程度を評価するための指標について検討した。

日本全国における牛のコクシジウムの分布を調査した結果、検出された 11 種のうち *E. wyomingensis* の検出率は諸外国と同様に低いことが明らかとなった。このことから本種を用いた人工感染実験の場合、同種のコクシジウムの自然感染による汚染が生じにくいことが考えられ、またオーシストの形態から他種との識別が容易であることと併せて、本種を感染モデルとした場合の利点の一つと考えられる。

E. wyomingensis の生物学的諸性状を詳細に観察した結果、他の牛のコクシジウム種との異同が明確になり、他種コクシジウムとの鑑別が正確かつ容易にできるようになった。また、宿主体内の発育は、現在までに知られているいくつかの牛のコクシジウム種のいずれとも異なっていた。

E. wyomingensis を子牛に人工感染させた場合、再現性の高い安定した感染が得られ、 10^5 個以上のオーシストの投与により一様に非出血性の下痢を起こす強い病原性が得られることから、本種は薬効評価などにおける牛のコクシジウムの感染モデルとして極めて有望である。なお、

安定した病原性を得るには離乳後 1 ないし 2 週齢の子牛を用い、 10^6 個のオーシストを単回投与することが適切な感染法と考えられた。

牛のコクシジウム感染における感染の程度の指標として体重、飼料摂取量、下痢の程度、オーシスト排泄数が有用であることが認められた。臨床病理学的指標としては、血清アルブミン濃度が安定した感染の指標になるものと考えられた。なお、便の潜血反応および D(+)-キシロース負荷試験は *E. wyomingensis* 感染では無効であるが、*E. bovis* と *E. alabamensis* の感染における腸管損傷の程度を測るのに有効な指標と考えられた。

Study on *Eimeria wyomingensis* as a causative agent of experimental bovine coccidiosis.

Kenji Oda

ABSTRACT

Bovine coccidia are known to be widely distributed in the world, and some species of them are thought to be important causative agents of bovine diarrhea. Some drugs for chicken coccidiosis have been studied on efficacy to bovine coccidiosis, however, it is difficult for bovine coccidia to produce sufficient and stable infections under experimental conditions. For study of the control of bovine coccidiosis, it is necessary to establish an experimental infection model, which should be reproducible and stable, and to elucidate parameters for evaluation of severity of infections.

In the course of experimental infections with some species of bovine coccidia collected from naturally infected cattle in Japan, *Eimeria wyomingensis* produced the most stable infections, so, it is supposed that infection with this species was a useful experimental model for evaluation of anticoccidial activities of drugs. But, there have been published only a few reports on biological characteristics and pathogenicity of *E. wyomingensis*. Accordingly, in the present study, *E. wyomingensis* was examined for morphological characteristics of oocyst, endogenous and exogenous development, and pathogenicity, and an application of this species for production of an experimental infection model and parameters for evaluation of

infections were discussed.

1. Prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan

A field survey on coccidial infections in cattle was carried out in 9 prefectures to elucidate prevalence and distribution of bovine coccidia in Japan and to obtain coccidial samples for examination of their biological characteristics and pathogenicity. A total of 1,015 fecal samples were collected from dairy and beef cattle varying in age, breed, and feeding procedure. Coccidial oocysts were found in 59.0% of the samples and 11 species of *Eimeria* were identified. *E. wyomingensis* was found in all the prefectures, but a mean prevalence of this species was only 5.4%. The low prevalence of *E. wyomingensis* seemed advantageous to experimental infections, because of less possibility of natural contamination with this species in the experiments.

2. A strain of *E. wyomingensis* and its biological characteristics

In the present study, a field strain of *E. wyomingensis* was used, which was originally isolated from a Holstein heifer, 8 months of age, in Okayama prefecture, Japan in 1985. For determination of biological characteristics of *E. wyomingensis*, morphological characteristics and sporulation process of oocysts, and endogenous development were observed.

Oocysts were typically ovoid and oocyst wall was composed of a yellowish brown outer layer and a colorless inner layer. Micropyle was detected at the narrower end of oocyst, but micropyle cap, oocyst residuum, and polar granules were absent. Two hundred

oocysts measured 31.6 - 46.3 by 23.7 - 33.1 μm with a mean of 39.7 by 28.9 μm , and a regression equation of width (Y) against length (X) was $Y=0.12X+24.13$. Sporocysts were elongate ellipsoidal with a clear Stieda body. Sporocyst residuum was generally absent. Two hundred sporocysts measured 14.9 - 19.1 by 7.0 - 11.0 μm with a mean of 17.0 by 9.3 μm . Sporozoites were elongate with a large refractile globule. Two hundred sporozoites measured 13.8 - 21.2 by 2.5 - 5.6 μm with a mean of 18.0 by 4.1 μm .

Freshly isolated oocysts of *E. wyomingensis* were suspended in 2% potassium bichromate solution and the suspension was incubated in a shaking bath at 29°C. Condensation of the sporont occurred within the first 12 hrs after incubation. Division of the sporont and formation of the sporocyst were first found at 81 hrs and 90 hrs, respectively, after the beginning of incubation. Completely sporulated oocysts were first found at 141 hrs and the sporulation rate reached the maximum at 234 hrs. For precise evaluation of the sporulation time, regression analysis of the complete sporulation rate transformed into arcsin and time after incubation was found to be available, by which the expected 50% sporulation time was determined to be 191 hrs.

For observation of endogenous development of *E. wyomingensis*, a total of 23 Holstein calves was used. They were prevented from natural infections with coccidia and were inoculated with 10^6 to 2×10^6 sporulated oocysts 1 to 4 weeks after weaning. Of the calves inoculated, one or more were killed daily for 15 days after

inoculation. Fresh smears and tissue sections stained with HE, PAS, or Giemsa of the intestinal tracts were examined. *E. wyomingensis* had at least 2 asexual generations before development of sexual stage. First generation schizonts were found in the epithelial cells of crypts, and second generation schizonts and gamonts were found in the cells of lamina propria. Development of all the stages occurred in anterior one third of small intestine, but in neither upper part of the small intestine nor the large intestine including the ceca. Endogenous development of *E. wyomingensis* was characterized by the small second generation schizonts (7.4 by 8.6 μm) which contained only 2 to 6 merozoites and the large microgamonts ($78.0 \times 98.8 \mu\text{m}$).

Prepatent and patent periods were 14 - 15 days with a mean of 14.2 days and 4 - 10 days with a mean of 6.4 days, respectively, in 31 calves, aged from 1 to 2 months and inoculated with 10^5 to 10^7 sporulated oocysts of *E. wyomingensis*.

Full observations of biological characteristics of *E. wyomingensis* could make it clear and easy to distinguish this species from the other species from cattle. And also, it appears that endogenous development of *E. wyomingensis* differs from that of the other species of bovine coccidia.

3. Pathogenicity of *E. wyomingensis* and evaluation of severity of infections

E. wyomingensis was examined for pathogenicity to calves, compared with a pathogenic species of *E. bovis* and low or non

pathogenic species of *E. alabamensis* and *E. subspherica* under a standardized condition of experimental infections. Holstein calves, 5 to 6 weeks of age, were orally inoculated with sporulated oocysts mixed with a small amount of concentrated feed 1 to 2 weeks after weaning. For evaluation of severity of infections, calves were examined for clinical symptoms, body weight gain, feed intake, oocyst discharge, fecal occult blood, hematological and biochemical findings, xylose absorption, and pathological changes.

When inoculated with 10^5 , 10^6 , or 10^7 sporulated oocysts of *E. wyomingensis*, all the calves became infected and passed watery diarrheal feces, negative for the occult blood test, from 14 or 15 days after inoculation. Although severity of the diarrhea was slightly lower in the calves inoculated with 10^5 oocysts, no variations were found in severity of infections in calves. Calves inoculated with 10^5 , 10^6 , or 10^7 oocysts were sacrificed and examined for pathological changes in the intestinal tract. In all the calves, numerous pin-hole reddish spots on the mucosal surface and watery contents were found in the lower ileum. In sections of the jejunum and ileum, villous atrophy and necrotic masses in the lumen of cripts were detected.

Calves inoculated with 10^5 or more oocysts of *E. bovis* showed hemorrhagic diarrhea, and those inoculated with 10^7 or more oocysts of *E. alabamensis* passed watery diarrheal feces. With both coccidian species, however, stable infections could not be produced, since severity of infections varied in calves. No clinical signs were

detected in calves inoculated with 10^7 oocysts of *E. subspherica*.

Repeated inoculation with *E. wyomingensis* oocysts, which are thought to be close to natural infection mode, were examined for pathogenicity to calves, compared with a single inoculation. When given a single inoculum of 10^6 , or 2×10^5 or 2×10^6 oocysts 5 times every other day, all the calves passed watery diarrheal feces and no difference was found in severity of clinical symptoms between both inoculation methods. Although no difference was found in duration of diarrhea between a single inoculation with 10^6 and repeated inoculations with 2×10^6 oocysts, the duration in calves inoculated 5 times with 2×10^5 oocysts for was shorter than in the other two inoculations. It was suggested that the severity of infections depended on the number of oocysts initially inoculated.

In *E. wyomingensis*, *E. bovis*, and *E. alabamensis* infections, calves reduced body weight gain and feed intake during the period with clinical symptoms, and the larger number of oocysts were passed in feces of calves showing more severe clinical symptoms. Of hematological and biochemical findings, serum albumin concentrations were reduced in calves severely infected calves with the three species of coccidia. Xylose absorption was reduced in calves infected with *E. alabamensis* during the clinical period but did not change in those infected with *E. wyomingensis* and *E. bovis*.

The present study showed that inoculation of *E. wyomingensis*

oocysts to calves could produce reliable and reproducible infections, and that this species of coccidia caused severe non-hemorrhagic diarrhea when inoculated at a dose of 10^5 or more oocysts.

Consequently, it was concluded that *E. wyomingensis* was available for establishment of an experimental infection model of bovine coccidiosis. To produce sufficient infection of *E. wyomingensis*, it is recommended that calves, 1 to 2 weeks after weaning, should be orally given a single inoculum of 10^6 oocysts.

Body weight gain, feed intake, severity of diarrhea, and oocyst discharge were useful parameters for evaluation of severity of infections. Of hematological and biochemical findings, serum albumin concentration was suggested to be available for evaluation of infections. The fecal occult blood test and xylose absorption test seemed to be useful for evaluation of *E. bovis* and *E. alabamensis* infections, respectively, but not for that of *E. wyomingensis* infection.

謝 辞

本研究の遂行に当たり、御懇篤なるご指導を頂いた麻布大学獣医学部寄生虫学教室 板垣 博教授に衷心より感謝いたします。また、本研究の実施に際し、終始ご協力頂いた（財）畜産生物科学安全研究所の研究員各氏に深謝いたします。

参考文献

1. Abe, M., Iriki, T., Kondoh, K., and Shibuya, H. 1979. Effects of nipple or bucket feeding of milk-substitute on rumen by-pass and on rate of passage in calves. *Br.J.Nutr.* 41: 175-181.
2. Allen, W.M., Berrett, S., Hein, H., and Hebert, C.N. 1973. Some physio-pathological changes associated with experimental *Eimeria brunetti* infection in the chicken. *J.Comp.Path.* 83: 369-375.
3. Balconi, R. 1963. Species of *Eimeria* of adult cattle in Guatemala. *J.Parasitol.* 49: 662.
4. Bolton, J.R., Merritt, A.M., Cimprich, R.E., Ramberg, C.F., and Streett, W. 1975. Normal and abnormal xylose absorption in the horse. *Cornell Vet.* 66: 183-197.
5. Bouthon, D.C. 1944. The causes of outbreaks of bovine coccidiosis. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 105: 74-77.
6. Brandborg, L.L., Goldberg, S.B., and Breidenbach, W.C. 1970. Human coccidiosis- a possible cause of malabsorption. *New Eng.J.Med.* 283: 1306-1313.
7. Chobotar, B. and Hammond, D.M. 1969. Development of gametocytes and second asexual generation stages of *Eimeria auburnensis* in calves. *J.Parasitol.* 55: 1218-1228.
8. Chobotar, B., Hammond, D.M., and Miner, M.L. 1969. Development of the first-generation schizonts of *Eimeria auburnensis*. *J.Parasitol.* 55: 385- 397.
9. Clark, W.N. and Hammond, D.M. 1969. Development of *Eimeria*

- auburnensis* in cell cultures. *J. Protozool.* 16: 646-654.
- 10 Conlogue, G., Foreyt, W.J., and Wescott, R.B. 1984. Bovine coccidiosis: protective effects of low-level infection and coccidiostats in calves. *Am. J. Vet. Res.* 45: 863-866.
 - 11 Courtney, C.H., Ernst, J.V., and Benzt, G.W. 1976: Redescription of oocysts of the bovine coccidia *Eimeria bukidnonensis* Tubangui 1931 and *E. wyomingensis* Huizinga and Winger 1942. *J. Parasitol.* 62: 372-376.
 - 12 Cristensen, J.F. 1941. The oocysts of coccidia from domestic cattle in Alabama (U.S.A.), with description of two new species. *J. Parasitol.* 27: 203-220.
 - 13 Dauschies, A., Akimaru, M., and Burger, H.-J. 1986. Experimental infections of calves with *Eimeria bovis*: 1. Parasitological and clinical observations. *Dtsch. tierarztl. Wschr.* 93: 393-397.
 - 14 Davis, L.R. and Bowman, G.W. 1957. The endogenous development of *Eimeria zuernii*, a pathogenic coccidium of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 18: 569-574.
 - 15 Davis, L.R., Boughton, D.C., and Bowman, G.W. 1955. Biology and pathogenicity of *Eimeria alabamensis* Christensen 1941, an intranuclear coccidium of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 16: 274-281.
 - 16 Davis, L.R., Bowman, G.W., and Boughton, D.C. 1957. The development of *Eimeria alabamensis* Christensen 1941, an intranuclear coccidium of cattle. *J. Protozool.* 4: 219-225.
 - 17 Davis, L.R. and Bowman, G.W. 1962. Schizonts and

- microgametocytes of *Eimeria auburnensis* Christensen and Porter 1939, in calves. *J. Protozool.* 9: 424-427.
- 18 Dietz, H.H. 1981. D(+)-Xylose absorption test in the horse. *Nord.Vet.Med.* 33: 114-120.
 - 19 Duszynski, D.W. 1971. Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *J. Parasitol.* 57: 948-952.
 - 20 Edger, S.A. 1955. Sporulation of oocysts at specific temperatures and notes on the prepatent period of several species of avian coccidia. *J. Parasitol.* 41: 214-216.
 - 21 Edgar, S.A. and Seibold, C.T. 1964. A new coccidium of chickens, *Eimeria mivati* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) with details of its life history. *J. Parasitol.* 50: 193-204.
 - 22 Emms, S.G., Hawkins, C.D., and Clark, W.T. 1983. The rate of D-xylose absorption in normal cats. *Aust.Vet.J.* 60: 30-31.
 - 23 Ernst, J.V. and Courtney, C.H. 1977. Prepatent and patent periods of bovine coccidium *Eimeria subspherica* Christensen 1941, with a redescription of the sporulated oocyst. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 44: 97-98.
 - 24 Ernst, J.V. and Todd, K.S. 1977. New geographic record and redescription of the sporulated oocyst of *Eimeria pellita* Supperer 1952 from Alabama cattle. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 44: 221-223.
 - 25 Ernst, J.V. and Benz, G.W. 1980. Attempts to produce experimental *Eimeria wyomingensis* infections in calves. *J. Parasitol.* 66: 625-629.

- 26 Ernst, J.V., Ciordia, H., and Stuedemann, J.A. 1984. Coccidiosis in cows and calves on pasture in North Georgia. *Vet.Parasitol.* 15: 213-221.
- 27 Ernst, J.V., Stewart, T.B., and Witlock, D.R. 1987. Quantitative determination of coccidian oocysts in beef calves from the costal plain area of Georgia (USA). *Vet.Parasitol.* 23: 1-10.
- 28 Fayer, R. and Hammond, D.M. 1967. Development of first generation schizonts of *Eimeria bovis* in cultured bovine cells. *J.Protozool.* 14: 764-772.
- 29 Ferguson, A. and Jarrett, E.E.E. 1975. Hypersensitivity reactions in the small intestine. I. thymus dependence of experimental "partial vilous atrophy" *Gut.* 16:114-117.
- 30 Fernando, M.A. and McCraw, B.M. 1973. Mucosal morphology and cellular renewal in the intestine of chickens following a single infection of *Eimeria acervulina*. *J.Parasitol.* 59: 493-501.
- 31 Fernando, M.A. 1982. Pathology and Pathogenicity. In: The Biology of The Coccidia (Long, P.L. ed.). University Park Press, Baltimore.
- 32 Fitzgerald, P.R. 1962. Coccidia in Hereford calves on summer and winter ranges and in feedlots in Utah. *J.Parasitol.* 48: 347-351.
- 33 Fitzgerald, P.R. 1964. Deviation in serum proteins associated with *Eimeria bovis* infections in calves. *J.Parasitol.* 50: 42-48.
- 34 Fitzgerald, P.R. 1967. Results of continuous low-level inoculations with *Eimeria bovis* in calves. *Am.J.Vet.Res.* 28:

659-665.

- 35 Fitzgerald, P.R. 1967. Effect of bovine coccidiosis on blood serum and potassium levels of calves. *Am.J.Vet.Res.* 28: 667-670.
- 36 Fitzgerald, P.R. and Mansfield, M.E. 1972. Effects of bovine coccidiosis on certain blood components, feed consumption, and body weight changes of calves. *Am.J.Vet.Res.* 33: 1391-1397.
- 37 Fitzgerald, P.R. and Mansfield, M.E. 1979. Efficacy of lasolocid against coccidia in cattle. *J.Parasitol.* 65: 824-825.
- 38 Fitzgerald, P.R. and Mansfield, M.E. 1984. Control of bovine coccidiosis with monensin in nonresistant newborn calves. *Am.J.Vet.Res.* 45: 1984-1988.
- 39 Fitzgerald, P.R. and Mansfield, M.E. 1986. Efficacy of decoquinate on the control of coccidiosis in young ruminating calves. *Am.J.Vet.Res.* 47: 130-133.
- 40 Fox, J. 1978. Bovine coccidiosis: A review, including field safety studies with decoquinate for prevention. *Modern Vet. Practice.* 599-603.
- 41 Friend, S.C.E., and Stockdale, P.H.G. 1980. Experimental *Eimeria bovis* infection in calves: a histopathological study. *Can.J.Comp.Med.* 44: 129-140.
- 42 淵上新蔵, 小川千早, 松下俊彦, 君付忠和, 北島秀生, 諏訪芳久
1988. 管内の下痢症子牛におけるコクシジウムと乳頭糞線虫の寄生
状況と治療結果. 家畜診療 299: 55-58.
- 43 淵上新蔵, 松下俊彦, 北島秀生, 諏訪芳久, 小川千早, 君付忠和
1988. 黒毛和種子牛のコクシジウムの発生状況ならびに治療成績.

臨床獸医 6: 44-50.

- 44 Goodwin, M.A., Latimer, K.S., and Fletcher, O.J. 1984.
Quantitation of intestinal d-xylose absorption in normal turkeys.
Poult.Sci. 63: 1742-1747.
- 45 Grafner, G., Graubmann, H.-D., Schwartz, K., Hiepe, Th., and
Kron, A. 1985. More studies into incidence, epizootiology, and
control of coccidiosis of cattle under conditions of high-
intensity indoor keeping. *Mn.Vet-Med.* 40: 41-44.
- 46 Greiner, E.C. and Saunders, J. 1984. Cost benefit analysis of
feeding amprolium crumbled to prevent clinical coccidiosis in
dairy calves. *Agri- Practice.* 5: 6-9.
- 47 Grisi, L. and Todd, A.C. 1978. Prevalence of gastrointestinal
parasitisms among cows in Wisconsin, Pennsylvania, and North
Carolina. *Am.J.Vet.Res.* 39: 51-54.
- 48 Hammond, D.M., Anderson, F.L., and Miner, M.L. 1963. The
occurrence of a second asexual generation in the life cycle of
Eimeria bovis in calves. *J.Parasitol.* 49: 428-434.
- 49 Hammond, D.M., Bowman, G.W., Davis, L.R., and Simms, B.T.
1946. The endogenous phase of the life cycle of *Eimeria bovis*.
J.Parasitol. 32: 409-423.
- 50 Hammond, D.M., Chobotar, B., and Ernst, J.V. 1968.
Cytological observations on sporozoites of *Eimeria bovis* and *E.*
auburnensis, and an *Eimeria* species from the ord kangaroo rat.
J.Parasitol. 54: 550-558.
- 51 Hammond, D.M., Clark, W.C., and Miner, M.L. 1961.

- Endogenous phase of the life cycle of *Eimeria auburnensis* in calves. *J.Parasitol.* 47: 591-594.
- 52 Hammond, D.M., Davis, L.R., and Bowman, G.W. 1944. Experimental infections with *Eimeria bovis* in calves. *Am.J.Vet. Res.* 5: 303-311.
- 53 Hammond, D.M., Sayin, F., and Miner, M.L. 1962. The life cycle and pathogenicity of *Eimeria ellipsoidalis*. *J.Protozool.* 9: 22.
- 54 Hasabullah, Akiba, Y., Takano, H., and Ogimoto, K. 1990. Seasonal distribution of bovine coccidia in beef cattle herd in the university farm. *Jpn.J.Vet.Sci.* 52: 1175-1179.
- 55 Hasche, M.R. and Todd, A.C. 1959. Prevalence of bovine coccidia in Wisconsin. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 134: 449-451.
- 56 Hill, F.W.G., Kidder, D.E., and Frew, J. 1970. A xylose absorption test for the dog. *Vet.Rec.* 87: 250-255
- 57 Hill, R.L., Goodwin, M.A., Cruz-Coy, J., and Long, P.L. 1985. The use of intestinal D-xylose absorption and other parameters to the pathogenicity of and immunity to *Eimeria acervulina*. *Poult.Sci.* 64: 1853-1858.
- 58 Huizinga, H. and Winger, R.N. 1942. *Eimeria wyomingensis*, a new coccidium from cattle. *Trans.Am.Micro.Soc.* 61: 131-133.
- 59 J.R.Sampson, J.R., Hammond, D.M., and Ernst, J.V. 1971. Development of *Eimeria alabamensis* from cattle in mammalian cell cultures. *J.Protozool.* 18: 120-128.
- 60 Jacobson, R.H.and Worley, D.E. 1969. Incidence and distribution of helminth parasites and coccidia in Montana cattle.

- Am.J.Vet.Res.* 30: 1113-1117.
- 61 Johonson, J. and Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drugs: Lesion coring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp.Parasitol.* 28: 30-36.
 - 62 Joyner, L.P. 1982. Host and site specificity. *In: The Biology of The Coccidia* (Long, P.L. ed.) University Park Press, Baltimore.
 - 63 Joyner, L.P. and Long, P.L. 1974. The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the coccidia of the fowl. *Avian Pathol.* 3: 145-157.
 - 64 Joyner, L.P. and Norton, C.C. 1980. The *Eimeria acervulina* complex: problems of differentiation of *Eimeria acervulina*, *E. mitis* and *E. mivati*. *Protozool.Abst.* 4: 45-52.
 - 65 Joyner, L.P., Norton, C.C., Davies, S.F.M., and Watkins, C.V. 1966. The species of coccidia occurring in cattle and sheep in the South-West of England. *Parasitology.* 56: 531-541.
 - 66 Kasim, A.A., and Al-Shawa, Y.R. 1984. Prevalence of *Eimeria* in faeces of cattle in Saudi Arabia. *Vet.Parasitol.* 17: 95-99.
 - 67 Kennedy, M.J. and Kralka, R.A. 1987. A survey on *Eimeria* spp. in cattle in central Alberta. *Can.Vet.J.* 28: 124-125.
 - 68 木原正視, 桧垣克己, 河原田圭三, 小倉与四夫, 角田清. 1971 牛の
コクシジウム症に対するスルファジメトキシンの効果
J.Jpn.Vet.Med.Ass. 24: 347-349.
 - 69 Krassner, S.T. 1963. Factors in host susceptibility and oocyst infectivity in *Eimeria acervulina* infections. *J.Protozool.* 10: 27-333.

- 70 Lee, P.R. and Armour, J. 1959. The coccidia oocysts of Nigerian cattle. *Brit.Vet.J.* 115: 6-17.
- 71 Levine, N.D. 1973. Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man. Bugess, Minneapolis, Minesota.
- 72 Levine, N.D. and Ivens, V. 1967. The sporulated oocysts of *Eimeria illinoisensis* n. sp. and of other species of *Eimeria* of the ox. *J.Protozool.* 14: 351-360.
- 73 Levine, N.D. and Ivens, V. 1970. The Coccidian Parasites (Protozoa, Sporozoa) of Ruminants. Illinois Biological Monographs, No.44, University of Illinois Prss, Urban.
- 74 Long, P.L. 1970. Development (schizogony) of *Eimeria tenella* in the liver of chickens treated with corticosteroid. *Nature* 225:290-291.
- 75 Long, P.L. and Joyner, L.P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. *J.Protozool.* 31: 535-541.
- 76 Long, P.L. and Rose, M.E. 1970. Extended schizogony of *Eimeria mivati* in betamethasone-treated chickens. *Parasitology* 60: 147-155.
- 77 Lotze, J.C. and Leek, R.G. 1970. Failure of development of the sexual phase of *Eimeria intricata* in heavily inoculated sheep. *J.Protozool.* 17: 414-417.
- 78 Mahart, J.L. 1968. Sporogony of *Isospora rivolta* oocysts from the dog. *J.Protozool.* 15: 308-312.
- 79 Majaro, O.M. and Dipeolu, O.O. 1981. The seasonal incidence of coccidia infections in trade cattle, sheep, and goats in Nigeria.

*Vet.Quart.*3: 85-90.

- 80 Manson-Smith, D.F., Bruce, R.G., and Parrott, D.M.V. 1979. Villous atrophy and expulsion of intestinal *Trichinella spiralis* are mediated by T cell. *Cell. Immunol.* 47: 285-292.
- 81 Marquardt, W.C. 1959. The morphology and sporulation of the oocyst of *Eimeria brasiliensis* Torres and Ildefonso Ramos 1939, of cattle. *Am. J. Vet. Res.* 20: 742-746.
- 82 Marquardt, W.C. 1973. Host and site specificity. In: The Coccidia (Hammond, D.M. ed.) University Park Press, Baltimore.
- 83 Marquardt, W.C., Senger, C.M., and Seghetti, L. 1960. The effect of physical and chemical agents on the oocyst of *Eimeria zuernii* (Protozoa, Coccidia). *J. Protozool.* 7: 186-189.
- 84 McDougald, L.R. 1978. Monensin for the prevention of coccidiosis in calves. *Am.J.Vet.Res.* 39: 1748-1749.
- 85 Meuten, D.J., Butler, D.G., Thomson, G.W., and Lumsden, J.H. 1978. Chronic enteritis associated with malabsorption and protein-losing enteropathy in the horse. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 172: 326-333.
- 86 Michael, E. and Hodges, R.D. 1972. The pathogenic effects of *Eimeria necatrix*: a comparison of single and repeated infections. *Vet.Rec.* 91: 258-262.
- 87 Miner, M.L. and Jensen, J.B. 1976. Decoquinate in the control of experimentally induced coccidiosis of calves. *Am.J.Vet.Res.* 37:1043-1045.
- 88 Mitruka, B.M. and Tawnsley, H.M. 1981. Clinical Biochemical

and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans, 2nd ed. Masson Publishing USA, Inc. New York.

- 89 Miyake, M., Matumoto, T., Miura, N., and Korogi, T. 1992. Incidence and influence of coccidiosis on the growth of calves in Iki island. *J.Amin.Protozool.* 3: 37-41.
- 90 Niilo, L. 1970. Bovine coccidiosis in Canada. *Can.Vet.J.* 11: 91-98.
- 91 Niilo, L. 1970. Experimental winter coccidiosis in sheltered and unsheltered calves. *Can.J.Comp.Med.* 34: 20-25.
- 92 Niilo, L. 1970. The effect of dexamethasone on bovine coccidiosis. *Can.J.comp.Med.* 34: 325-328.
- 93 Norton, C.C. and Chard, M.J. 1983. The oocyst sporulation time of *Eimeria* species from the fowl. *Parasitology* 86: 193-198.
- 94 Norton, C.C. and Joyner, L.P. 1981. *Eimeria acervulina* and *E. mivati*: oocysts, life-cycle and ability to develop in the chicken embryo. *Parasitology* 83: 269-279.
- 95 Nyberg, P.A. and Hammond, D.M. 1965. Description of the sporulated oocysts and sporozoites of four species of bovine coccidia. *J.Parasitol.* 51:669-673.
- 96 Nyberg, P.A., Helfer, D.H., and Knapp, S.E. 1967., Incidence of bovine coccidia in Western Oregon. *Proc.Helminthol.Soc.Wash.* 34: 13-14.
- 97 Obasaju, M.F., Obi, T.U., Olufemi, B.E., and Oduye, O.O. 1981. Coccidiosis in N'Dama cattle in Ibadan, Nigeria. *Trop.Anim.Hlth*

- Prod.* 13: 155-159.
- 98 Oikawa, H. and Kawaguchi, H. 1971. Changes of organ weight and blood components in avian coccidiosis caused by *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina*. *Jpn.J.Vet.Sci.* 33: 251-259.
 - 99 Orskov, E.R., Benzie, D., and Kay, R.N.B. 1970. The effect of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *Br.J.Nutr.* 24: 785-795.
 - 100 Parker, R. 1981. The occurrence in Australia of the bovine coccidia *Eimeria bukidnonensis* Tubanguí 1931 and *E. wyomingensis* Huizinga and Winger 1942. *J.Parasitol.* 67: 724-725.
 - 101 Parker, R.J. and Jones, G.W. 1978. The development of *Eimeria* infections during the first eight months of life in unweaned beef calves in a dry tropical region of Australia. *Vet.Parasitol.* 25: 1-7.
 - 102 Pasur, J.H., Shuery, E.W., and Georgi, C.E. 1958. The conversion of D-xylose into volatile organic acids by rumen bacteria. *Arch.Biochem.Biophys.* 77: 387-402.
 - 103 Pavlasek, I., Celeda, L., Urbanova, Z., Cerný, J., and Raskova, H. 1984. Coccidiosis in preruminating calves. The effect of management and short-term treatment on the spread of infection and reinfection. *Vet.Parasitol.* 14: 7-12.
 - 104 Pearson, E.G. and Baldwin, B.H. 1981. D-xylose absorption in the adult bovine. *Cornell Vet.* 71: 288-296.
 - 105 Pout, D.D. 1965. Coccidiosis in lambs. *Vet.Rec.* 77: 887-888.

- 106 Pout, D.D. 1967. Villous atrophy and coccidiosis. *Nature* 213:306-307.
- 107 Pout, D.D. 1974. Coccidiosis of lambs: III The reaction of the small intestinal mucosa to experimental infections with *E. arloingi* "b" and *E. crandallis*. *Br.Vet.J.* 130: 45-53.
- 108 Pout, D.D. 1974. Coccidiosis of lambs. IV. The clinical response to infections of *E. arloingi*"B" and *E. crandallis* in laboratory-reared lambs. *Br.Vet.J.* 130: 54-61.
- 109 Reid, W.M. 1975. Relative value of oocyst counts in evaluating anticoccidial activity. *Avian Dis.* 19: 802-811.
- 110 Roberts, M.C. 1974. The D(+)xylose absorption test in the horse. *Equine Vet.J.* 6: 28-30.
- 111 Rose. M.E. 1970. Immunity to coccidiosis: effect of betamethasone treatment of fowls on *Eimeria mivati* infection. *Parasitology* 60: 137-146.
- 112 Rovers, M.C. and Norman, P. 1979. A re-evaluation of the d(+) xylose absorption test in the horse. *Equine Vet.J.* 11: 239-243.
- 113 Ruiz, A.V. 1973. The seasonal incidence of coccidial infections in cattle of different ages in South Dakota (USA). *Zbl.Vet.Med.B*, 20: 405-407.
- 114 Ruiz, A.V. 1973. On the natural history of coccidial infections in feeder cattle. *Zbl.Vet.Med.B*, 20: 392-397.
- 115 Ruiz, A.V. 1973. On the natural history of coccidial infections in range and feeder cattle. *Zbl.Vet.Med.B*, 20: 594-602.
- 116 Ryley, J.F. 1980. Recent developments in coccidian biology;

- where do we go from here?. *Parasitology* 80: 189-209.
- 117 Ryley, J.F., Meade, R., Hazelhurst, J., and Robinson, T. 1976. Methods in coccidiosis research: separation of oocysts from faeces. *Parasitology* 73: 311-326.
 - 118 Ryley, J.F., Millard, B.J., and Long, P.L. 1972. Further studies of the life cycle of *Eimeria brunetti* Levine 1942. *Z.Parasitenk.* 40: 35-48.
 - 119 Saitoh, Y. and Itagaki, H. 1988. Culture conditions of chicken *Eimeria* oocysts with special reference to oxygen concentration in the medium. *J.Jpn.Vet.Med.Ass.* 41: 347-350.
 - 120 Smith, W.N. and Davis, L.R. 1965. A comparison of dry and liquid feeds as vehicles for coccidial infection of cattle and sheep. *Am.J.Vet.Res.* 26: 273-279.
 - 121 Soekardono, S., Ernst, J.V., and Benz, G.W. 1975. The prepatent and patent periods of *Eimeria alabamensis* and further description of the exogenous stages. *Vet.Parasitol.* 1: 19-33.
 - 122 Speer, C.A. and Hammond, D.M. 1971. Development of *Eimeria ellipsoidalis* from cattle in cultured bovine cells. *J.Parasitol.* 57: 675-677.
 - 123 Speer, C.A., DeVos, A.J., and Hammond, D.M. 1973. Development of *Eimeria zuernii* in cell cultures. *Proc. Helminthol.Soc.Wash.* 40: 160-163.
 - 124 Stockdale, P.H.G. 1976. Schizogony and gametogony of *Eimeria zuernii* (Rivolta, 1878) Martin, 1909. *Vet.Parasitol.* 1: 367-376.
 - 125 Stockdale, P.H.G. 1977. Proposed life cycle of *Eimeria zuernii*.

Br.Vet.J. 133: 471-473.

- 126 Stockdale, P.H.G. 1977. The pathogenesis of the lesions produced by *Eimeria zuernii* in calves. *Can.J.Comp.Med.* 41: 338-344.
- 127 Stockdale, P.H.G. and Niilo, L. 1976. Production of bovine coccidiosis with *Eimeria zuernii*. *Can.Vet.J.* 17: 35-37.
- 128 Stockdale, P.H.G. and Sheard, A. 1983. Resistance to *Eimeria bovis* produced after chemotherapy of experimental infections in calves. *Vet.Parasitol.* 9: 171-177.
- 129 Stockdale, P.H.G., Bainborough, A.R., Bailey, C.B., and Niilo, L. 1981. Some pathophysiological changes associated with infection of *Eimeria zuernii* in calves. *Can.J.Comp.Med.* 45: 34-37.
- 130 Stromberg, B.E., Schlthauer, J.C., Armstrong, B.D., and Brandt, W.E. 1982. Efficacy of lasalocid sodium against coccidiosis (*Eimeria zuernii* and *Eimeria bovis*) in calves. *Am.J.Vet.Res.* 43: 583-585.
- 131 Szanto, J., Mohan, R.N., and Levine, N.D. 1964. Prevalence of coccidia and gastrointestinal nematodes in beef cattle in Illinois and their relation to shipping fever. *J.Am.Vet.Med.Ass.* 144: 741-746.
- 132 平招亨, 志村亀夫. 1988. 一和牛生産牧場にみられた乳頭糞線虫とコクシジウムの濃厚感染例. 家畜衛試研究報告 92: 41-47.
- 133 角田清, 石井俊夫. 1973. 鶏コクシジウム検査法. 鶏病研究会.
- 134 津田茂浩, 桂のり子, 鬼丸利久. 1990. 繁殖用黒毛和種牛飼育 2 農

- 家におけるコクシジウムの寄生状況調査. 家畜診療 326: 31-35.
- 135 宇井彰, 清野昌男, 渡辺大作, 井場豊, 野崎敏浩, 小松智, 小林虎太, 酒井淳一, 阿部省吾. 1990. ビニールハウス内のカーフハッチに集団発生した牛コクシジウム病について. 家畜診療 328: 31-34.
- 136 Vetterling, J.M. 1968. Sporogony of the swine coccidium *Eimeria deblickei* Douwes 1921. *J. Protozool.* 15: 167-172.
- 137 Wagenbach, G.E. and Burns, W.C. 1969. Structure and respiration of sporulating *Eimeria stiedae* and *E. tenella* oocysts. *J. Protozool.* 16: 257-263.
- 138 Wang, C.C. 1976. Inhibition of the respiration of *Eimeria tenella* by quinolone coccidiostats. *Biochem. Pharmacol.* 25: 343-349.
- 139 Ward, J.K., Ferguson, D.L., and Parkhurst, A.M. 1979. Gastrointestinal parasites in beef cows. *J. Anim. Sci.* 49: 306-309.
- 140 渡辺昇蔵, 岩田神之介. 1956. 牛のコクシジウムに関する研究－健康牛のオオシスト保有率とその種類－. 日獣会誌. 9:261-263.
- 141 Williams, R.B. 1973. Effects of different infection rates on the oocyst production of *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella* in the chicken. *Parasitology* 67: 279-288.
- 142 Wilson, P.A.G. and Fairbairn, D. 1961. Biochemistry of sporulation in oocysts of *Eimeria acervulina*. *J. Protozool.* 8:410-416.

表

表1 牛のコクシジウム分布調査における採材個体の構成

飼養方法	品 種	月 齢 範 囲			不明
		1 ~ 11	12 ~ 23	>24	
乳 用 ^{a)}	ホルスタイン	177	150	146	7
肉 用 ^{b)}	ホルスタイン	128	20	2	
	和 牛	150	119	108	8

a) 乳用に育成(概ね2才まで) または搾乳されているもの。

b) 肉用として肥育されているもので、2才以上のものは繁殖種牛として飼育されているものを含む。

表2 採材地ごとの牛コクシジウムの種類別検出率

種	各県別検出率(%)									
	北海道	岩手	長野	群馬	兵庫	岡山	島根	熊本	鹿児島	全県
総検出率	59.2	54.7	69.3	70.0	67.0	53.3	54.6	47.5	60.0	59.0
<i>E. alabamensis</i>	18.4	5.0	18.8	13.0	11.9	21.5	8.2	8.1	9.1	12.0
<i>E. auburnensis</i>	23.3	17.4	27.7	43.0	37.1	17.8	27.8	12.1	32.7	25.6
<i>E. bovis</i>	35.9	31.8	43.6	34.0	38.1	42.1	30.9	25.3	33.6	34.8
<i>E. brasiliensis</i>	25.2	13.9	21.8	23.0	14.4	29.9	12.4	13.1	14.5	18.8
<i>E. bukidnonensis</i>	10.7	2.0	6.9	1.0	6.2	4.7	3.1	1.0	7.3	4.5
<i>E. canadensis</i>	11.7	15.9	14.9	18.8	21.6	15.9	12.4	15.2	16.4	15.8
<i>E. cylindrica</i>	10.7	12.9	19.8	24.0	32.0	12.1	18.6	15.2	27.3	18.5
<i>E. ellipsoidalis</i>	37.0	27.9	36.6	46.0	47.4	35.5	27.8	25.3	31.8	34.3
<i>E. subspherica</i>	4.9	4.0	1.0	7.0	6.2	2.8	6.2	3.0	6.4	4.5
<i>E. wyomingensis</i>	3.9	3.0	8.9	4.0	5.2	10.3	4.1	3.0	8.2	5.4
<i>E. zuernii</i>	13.6	4.5	10.9	15.0	14.4	5.6	11.3	13.1	6.4	9.9
採材個体数	103	201	101	100	97	107	97	99	110	1,015
採材農場数	10	9	11	9	7	10	28	13	13	110

表3 我が国および海外の牛のコクシウム分布調査における *E. wyomingensis* の検出頻度

報告者	年	国(地域)	調査頭数	コクシウムの 検出率(%)	<i>E. wyomingensis</i> の検出率(%)	文献番号
Watanabe and Iwata	1956	日本(新潟)	454	8.37	0	140
Hasche	1959	USA(Wisconsin)	355	83.5	0	55
Fitzgerald	1962	USA(Utah)	160	N.G. ^{a)}	0	32
Balconi	1963	Guatemala	100	69.0	0	3
Szanto <i>et al.</i>	1964	USA(Illinois)	795	85.0	6.0	131
Joyner <i>et al.</i>	1965	England	110	N.G.	13.6	65
Nyberg	1967	USA(Western Oregon)	86	72.0	0	96
Jacobson	1969	USA(Montana)	965	64.9	0	60
Ruiz	1973	USA(South Dakota)	823	54.7	0	113
Ruiz	1973	USA(Wisconsin)	706	67.3	0	114
Ruiz	1973	USA(Wisconsin)	1,779	64.8	0	115
Grisi and Todd	1978	USA ^{b)}	N.G.	^{b)}	0	47
Ward <i>et al.</i>	1979	USA(Nebraska)	2,005	33.4	0	139
Majaro	1981	Nigeria	2,600	56.0	0	79
Obasaju <i>et al.</i>	1981	Nigeria	117	N.G.	1.3	97
Ernst <i>et al.</i>	1984	USA(North Georgia)	1090(C), 719(A) ^{c)}	72.5(C), 10.2(A)	8.5(C), 0.9(A) ^{d)}	26
Kasim	1984	Saudi Arabia	205	34.1	2.9	66
Oda	1985	日本(全国)	1,015	59.0	5.4	
Ernst <i>et al.</i>	1987	USA(Georgia)	534	86.3	6.2	27
Kennedy <i>et al.</i>	1987	Canada	131	64.2	3.1	67
Parker and Jones	1987	Australia	2,083	N.G.	<2.0	101
Hasbullah <i>et al.</i>	1990	日本(宮城)	2,019	19.3	1.9	54
Miake <i>et al.</i>	1992	日本(長崎)	353	^{e)}	(+) ^{f)}	89

a) 記載なし b) Wisconsin (23.0%), Pennsylvania (37.3%), North Carolina (40.0%)

c) Wisconsin (23.0%), Pennsylvania (37.3%), North Carolina (40.0%)

d) *E. bukidhonensis* と *E. wyomingensis*

e) 1〜2 か月齢 (100%), 3〜4 か月齢 (89%), 10〜12 か月齢 (67%), 13 か月齢以上 (9%)

f) 極めて低率

表4 各種の牛のコクシウムオーストの計測値

	<i>E. wyomingensis</i>	<i>E. alabamensis</i>	<i>E. auburnensis</i>	<i>E. bovis</i>	<i>E. brasiliensis</i>	<i>E. bukidhonensis</i>
長軸長±SD(μm)	39.7±1.9	22.1±1.6	39.6±2.1	30.0±1.7	38.7±1.3	48.5±2.2
短軸長±SD(μm)	28.9±1.2	15.1±0.9	24.4±2.0	21.4±1.0	27.5±0.6	34.1±1.6
長短軸比±SD	1.38±0.08	1.46±0.09	1.65±0.19	1.41±0.08	1.41±0.05	1.42±0.07
回歸式 ^{a)}	Y=0.12X+24.13	Y=0.31X+8.30	Y=-0.03X+25.59	Y=0.25X+13.81	Y=0.12X+22.86	Y=0.31X+18.92
計測数	200	50	50	50	50	50

	<i>E. canadensis</i>	<i>E. cylindrica</i>	<i>E. ellipsoidalis</i>	<i>E. subspherica</i>	<i>E. zuernii</i>
長軸長±SD(μm)	35.0±2.2	24.6±1.3	22.2±1.0	14.5±0.7	20.1±1.1
短軸長±SD(μm)	23.7±1.1	16.2±1.0	17.4±0.6	12.3±0.7	17.1±0.9
長短軸比±SD	1.48±0.10	1.52±0.09	1.30±0.07	1.19±0.07	1.18±0.06
回歸式 ^{a)}	Y=0.14X+18.87	Y=0.38X+6.67	Y=0.09X+14.97	Y=0.24X+8.77	Y=0.42X+8.51
計測数	50	50	50	50	50

a) Y: 短軸長, X: 長軸長

表5 *E. wyomingensis* のオーシストの計測値の比較

研究者	年	文献番号	oocyst の大きさ (μm)		長短軸比		オーシスト壁	
			長軸長	短軸長	平均	範囲	平均	の数
著者ら								
Courtney et al.	1976	11	31.6-46.3	23.7-33.1	39.7±1.9×28.9±1.2	1.09-1.69	1.38	2
Huizinga and Winger	1942	58	36-44	26-30	39.9×28.3	1.3-1.6	1.41	2
Lee and Armour	1959	70	37.0-44.9	26.4-30.8	40.3×28.1	1.28-1.67 ^{a)}	1.45 ^{a)}	N.G.
Levine and Ivens	1967	72	35.6-46.4	26.6-31.5	39.9±0.268×28.3±0.138	1.30-1.59 ^{a)}	1.41 ^{a)}	2
Perker	1981	100	39-42	28-30	40.2×29.0	1.3-1.5	1.38	1
			36.1-44.0	26.7-29.9	38.9±2.1×28.3±0.9	N.G. ^{b)}	N.G.	N.G.

a) Shape Index として短軸/長軸が与えられているため変換

b) 記載なし

表6 宿主体内における*E. wyomingensis*の発育観察に対する試験設計

個体番号	オーシスト投与数	剖検日 ^{a)}
509	10^9	3
559	5×10^7	4
556	10^8	5
510	10^9	5
558	5×10^7	6
561	10^8	7
504	10^9	7
615	10^6	7
512	2×10^6	7
505	10^9	8
619	10^6	8
557	5×10^6	8
625	10^6	9
565	6×10^7	9
626	10^6	10
511	2×10^6	10
628	10^6	12
508	2×10^6	12
627	10^6	13
629	10^6	13
630	10^6	14
507	2×10^6	14
631	10^6	15

a) オーシスト投与後の日数

表7 *E. wyomingensis* 人工感染子牛におけるプリパテントピリオド，
パテントピリオド，最大OPG値および下痢の程度

個体 番号	オースト 月齢	投与数	プリパテント ピリオド	パテント ピリオド	最大OPG ($\times 10^4$)	下痢の程度 (極期)
1	1	10^5	15	5	9.5	++
2	1	10^5	14	5	7.3	+++
3	1	10^5	15	4	10.8	+++
8701	2	10^5	14	8	3.0	++
8710	2	10^5	14	7	4.5	+++
8702	2	5×10^5	14	10	8.4	++
8708	2	5×10^5	15	7	1.5	+++
8901	1	10^6	14	5	1.1	+++
8903	1	10^6	14	5	7.9	+++
8904	1	10^6	14	5	9.5	+++
9051	1	10^6	14	10	15.3	+++
9052	1	10^6	14	7	2.7	++
9053	1	10^6	14	9	8.4	+++
9107	1	10^6	14	7	6.5	+++
9110	1	10^6	14	7	13.1	+++
9112	1	10^6	14	4	4.0	+++
4	1	10^6	14	5	7.2	+++
5	1	10^6	15	4	16.6	+++
6	1	10^6	14	5	7.9	+++
16	1	10^6	14	5	7.9	+++
17	1	10^6	14	5	14.1	++
18	1	10^6	14	10	6.9	+++
8703	2	10^6	14	9	6.6	++
8706	2	10^6	14	8	0.6	++
8969	1	1.5×10^6	14	8	9.6	+++
8970	1	1.5×10^6	14	9	7.3	+++
9402	1	10^7	14	5	4.3	+++
9403	1	10^7	15	5	0.4	++
7	1	10^7	14	5	5.9	+++
8	1	10^7	14	5	1.5	+++
9	1	10^7	14	5	2.6	++
最大			15	10	16.6	
最少			14	4	0.4	
平均			14.2	6.4	6.9	
SD			0.4	1.9	4.3	

表8 *E. wyomingensis* オーシスト単回投与後の糞便性状の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	オーシスト投与後の糞便性状 ^{a)}													
		9 ^{b)}	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	10 ⁵	-	-	-	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	
2	10 ⁵	-	-	-	+	++	++	+++	++	+	+	+	-	-	
3	10 ⁵	-	-	-	++	++	+++	++	+	+	+	+	-	-	
4	10 ⁶	-	-	-	++	++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	
5	10 ⁶	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	
6	10 ⁶	-	-	-	++	++	+++	+++	++	+++	++	+	+	-	
7	10 ⁷	-	-	-	-	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	
8	10 ⁷	-	-	-	+	++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	
9	10 ⁷	+	-	-	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

a) - (正常) ~ +++ (水様性下痢)

b) オーシスト投与日を0日とした経過日数

表9 *E. wyomingensis* オーシスト単回投与後の OPG 値の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	OPG値 (× 10 ²)									
		13 ^{a)}	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	10 ⁵	-	-	10	950	245	8	2	-	-	
2	10 ⁵	-	4	734	734	38	4	-	-	-	
3	10 ⁵	-	-	720	1,080	187	0	-	-	-	
4	10 ⁶	-	0	720	386	14	0	-	-	-	
5	10 ⁶	-	-	10	1,656	274	8	-	-	-	
6	10 ⁶	-	0	72	792	158	0	-	-	-	
7	10 ⁷	-	2	187	590	4	4	-	-	-	
8	10 ⁷	-	0	158	40	0	0	-	-	-	
9	10 ⁷	-	0	259	115	2	0	-	-	-	

a)オーシスト 投与日を 0 日とした経過日数。
各個体とも 投与後13日目まで、対照では観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

表10 *E. bovis* オーシスト投与後の糞便性状の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	オーシスト投与後の糞便性状 ^{a)}													
		16 ^{b)}	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26			
28	10 ⁵	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
29	10 ⁵	-	-	-	-	+	+	+	++	++	+	-			
30	10 ⁵	-	-	+++	++	++	++	+++	++	+	-	-			
31	10 ⁶	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++			
32	10 ⁶	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+			
33	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

a) - (正常) ~ +++ (水様性下痢)

b) オーシスト投与日を0日とした経過日数

表11 *E. bovis* オーシスト 投与後の便潜血反応

個体 番号	オーシスト 投与数	オーシスト投与後の便潜血反応 ^{a)}										
		16 ^{b)}	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
28	10 ⁵	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
29	10 ⁵	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-
30	10 ⁵	-	-	++	++	++	++	+++	++	+	-	-
31	10 ⁶	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
32	10 ⁶	-	-	++	++	++	++	+	+	-	-	-
33	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) - (陰性) ~ +++ (強陽性)

b) オーシスト投与日を0日とした経過日数

表12 *E. bovis* オーシスト投与後の OPG 値の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	OPG値 (× 10 ³)														27	28	29
		17 ^{a)}	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	26	27	28	29
28	10 ⁵	-	-	58	346	36	16	58	245	6	12	4	2	0				
29	10 ⁵	-	-	-	2	331	302	590	547	576	4	0	-	-				
30	10 ⁵	-	-	2	0	10	0	-	-	-	-	-	-	-				
31	10 ⁶	-	2	4	1,440	2	52	18	230	230	28	NT ^{b)}	NT	NT				
32	10 ⁶	-	-	2	14	20	0	0	-	-	-	-	-	-				
33	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

a)オーシスト投与日を0日とした経過日数。 b)オーシスト投与後 26 日目に剖検
各個体とも投与後 13 日目まで、対照では観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

表13 *E. alabamensis* オーシスト投与後の糞便性状の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	オーシスト投与後の糞便性状 ^{a)}														
		0 ^{b)}	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
48	10 ⁷	-	-	-	+	++	++	++	++	-	+	+	+	-	-	+
49	10 ⁷	-	-	-	-	+	+	++	++	-	-	+	+	-	-	-
50	10 ⁷	-	-	-	-	++	+++	++	++	++	-	-	+	+	-	-
51	10 ⁸	-	-	-	+	+	++	+	+++	+	-	+	+	-	-	-
52	10 ⁸	-	-	-	+	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
53	10 ⁸	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a) - (正常) ~ +++ (水様性下痢)

b) オーシスト投与日を0日とした経過日数

表14 *E. alabamensis* オーシスト投与後の OPG 値の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	OPG 値 (× 10 ³)												
		7 ^{a)}	8	9	10	11	12	13	14					
48	10 ⁷	-	16	1	0	1	-	-	-					
49	10 ⁷	-	0	4	0	0	-	-	-					
50	10 ⁷	2	6,912	6,192	68	1	-	-	-					
51	10 ⁸	0	302	20	0	0	0	-	-					
52	10 ⁸	0	60	21	1	0	-	-	-					
53	10 ⁸	20	43,200	12,960	547	5	1	1	0					

a) オーシスト投与日を 0 日とした経過日数。
各個体とも投与後 6 日目まで、対照では観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

表15 *E. subspherica* オーシスト投与後の OPG 値の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	OPG 値 ($\times 10^2$)																
		9 ^{a)}	10	11	12	13	14	15	16	17	18							
59	10 ⁶	-	-	0	10	20	6	-	-	-	-							
60	10 ⁶	-	8	101	274	0	0	-	-	-	-							
61	10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
62	10 ⁶	-	-	0	8	-	-	-	-	-	-							
63	10 ⁷	-	-	4	0	-	-	-	-	-	-							
64	10 ⁷	-	4	158	2	-	-	-	-	-	-							
65	10 ⁷	-	-	2	4	-	-	-	-	-	-							
66	10 ⁷	-	0	10	10	-	-	-	-	-	-							

a) オーシスト投与日を 0 日とした経過日数。
各個体とも投与後 9 日目まで、対照では観察の全期間を通してオーシストの排泄はみられなかった。

表16 *E. wyomingensis* オーシスト反復投与例における糞便性状の変化

個体 番号	オーシスト 投与数	回数	オーシスト投与後の糞便性状 ^{a)}																		
			9 ^{b)}	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24			
16	10 ⁶	1	-	++	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-			
17	10 ⁶	1	-	-	+	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
18	10 ⁶	1	+	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	++	++	+	-	-	-			
19	2×10 ⁵	5	-	-	-	++	+	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-			
20	2×10 ⁵	5	-	-	-	++	++	++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-			
21	2×10 ⁵	5	-	-	-	++	+++	++	+++	++	+	-	-	-	+	-	-	-			
22	2×10 ⁶	5	-	-	-	++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-			
23	2×10 ⁶	5	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+			
24	2×10 ⁶	5	++	+	++	++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-			
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

a) - (正常) ~ +++ (水様性下痢)

b) オーシスト第1回目投与日を0日とした経過日数

No. 17では "+" が27日目までみられた

表17 *E. wyomingensis* オークシスト反復投与例における OPG 値の変化

個体 番号	オークシスト 投与数	回数	OPG 値 (X 10 ³)											
			13 ^{a)}	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
16	10 ⁶	1	-	331	792	29	6	2	-	-	-	-	-	-
17	10 ⁶	1	-	12	1,411	274	26	2	-	-	-	-	-	-
18	10 ⁶	1	-	4	691	418	42	0	0	0	0	0	0	-
19	2×10 ⁵	5	-	16	389	216	518	20	14	2	0	-	-	-
20	2×10 ⁵	5	-	14	749	144	86	4	6	2	0	0	-	-
21	2×10 ⁵	5	-	144	1,008	130	40	8	0	2	-	-	-	-
22	2×10 ⁶	5	-	12	677	619	28	0	0	0	0	0	-	-
23	2×10 ⁶	5	-	24	1,411	230	4	0	0	0	0	0	-	-
24	2×10 ⁶	5	-	202	1,886	115	10	0	0	0	0	-	-	-

a) オークシスト第1回目投与日を0日とした経過日数。
各個体とも投与後13日目まで、対照では観察の全期間を通してオークシストの排泄はみられなかった。

表18 糞便性状の肉眼的評価と水分含有率の関係

種類	肉眼的評価区分ごとの水分含有率(%) ^{a)}					
	-	+	++	+++		
<i>E. wyomingensis</i>	76.9±2.3 71~87	78.3±2.7 71~87	83.8±2.2 79~87	(n=17) 86.0±5.3 80~90	(n=51)	(n=3)
<i>E. alabamensis</i>	76.8±1.8 74~82	79.6±3.3 71~85	83.4±2.0 81~86	(n=5) 93 (n=1) 93	(n=32)	
<i>E. bovis</i>	77.1±2.6 67~85	80.8±2.5 76~86	84.2±2.7 79~90	(n=13) 91.3±2.8 86~96	(n=29)	(n=19)
<i>E. subspherica</i>	76.1±2.3 70~82	78.8±2.2 74~84	84.3±2.2 82~87	(n=4)		
平均	76.7±0.4	79.4±1.1	83.9±0.4	90.1±3.7		

a) 上段：平均±標準偏差（試料数），下段：最低～最高

b) -: 正常, +: 軟便, ++: 下利便, +++: 水様性下痢便



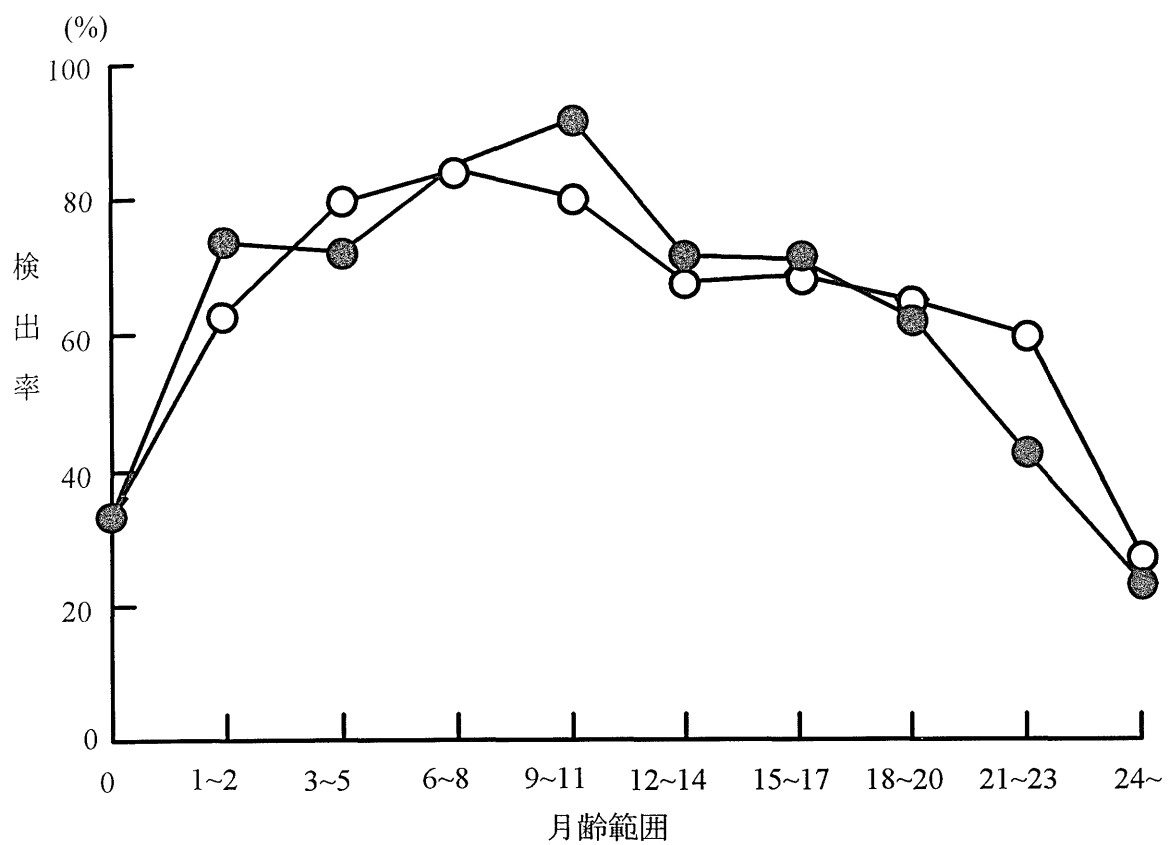


図1 牛のコクシジウムの月齢別検出率

● 乳用牛, ○ 肉用牛

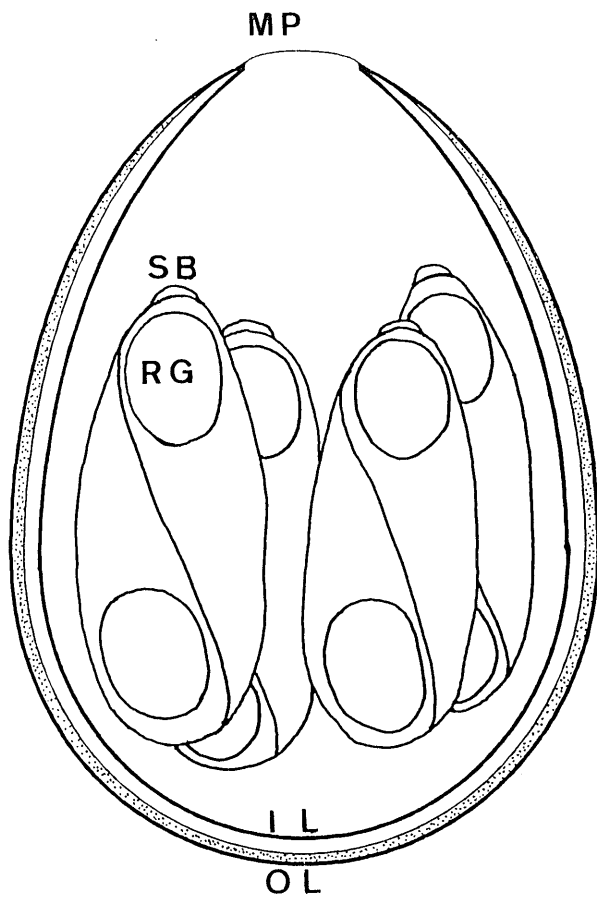


図 2 *E. wyomingensis* の孢子形成オーシスト

IL: オーシスト壁内層, OL: オーシスト壁外層

MP: ミクロパイル, SB: Stieda body,

RG: refractile globule

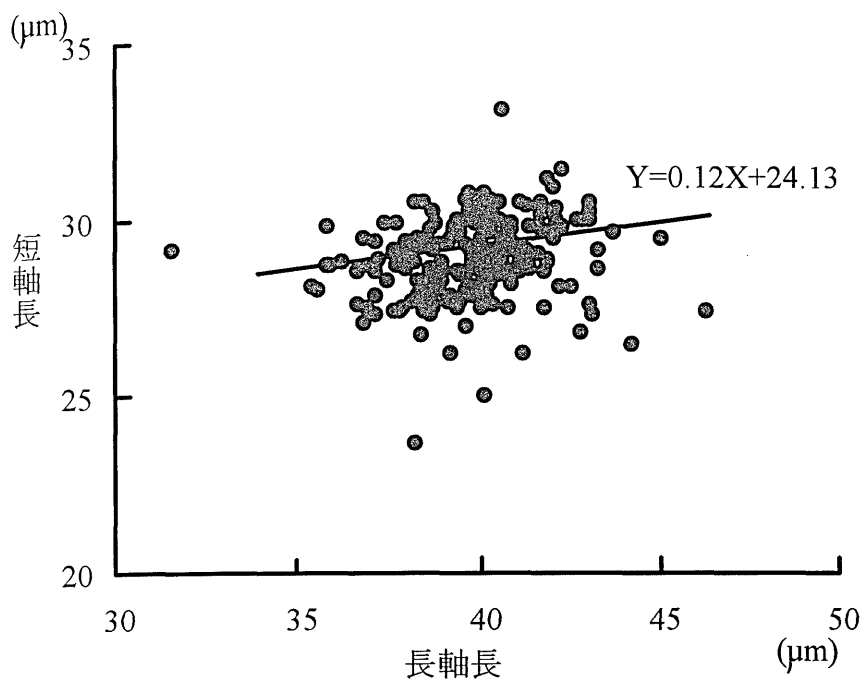


図3 *E. wyomingensis* オーシストの長・短軸長の散布図と回帰直線

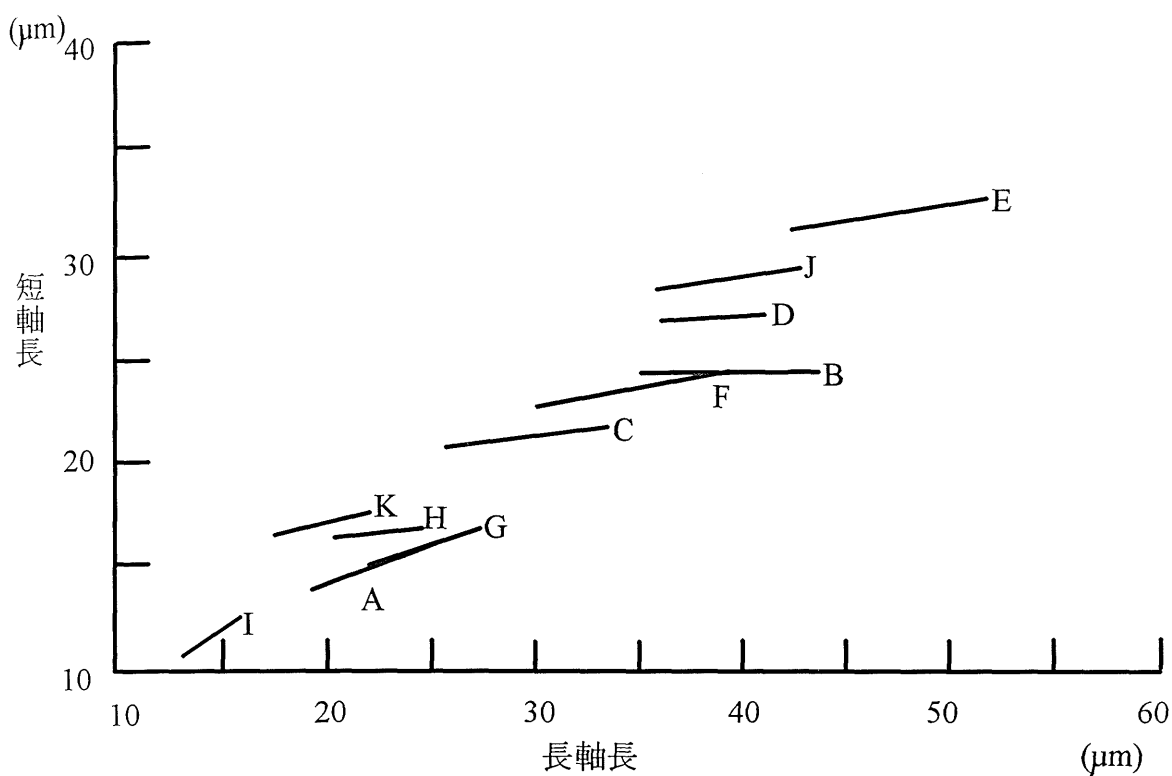


図4 牛のコクシジウム11種のオーシストの長・短軸長の回帰直線

A: *E. alabamensis* ($Y=0.31X+8.30$), B: *E. auburnensis* ($Y=-0.03X+25.59$),
 C: *E. bovis* ($Y=0.25X+13.81$), D: *E. brasiliensis* ($Y=0.12X+22.86$),
 E: *E. bukidnonensis* ($Y=0.31X+18.92$), F: *E. canadensis* ($Y=0.14X+18.87$),
 G: *E. cylindrica* ($Y=0.38X+6.67$), H: *E. ellipsoidalis* ($Y=0.09X+14.97$),
 I: *E. subspherica* ($Y=0.24X+8.77$), J: *E. wyomingensis* ($Y=0.12X+24.13$),
 K: *E. zuernii* ($Y=0.42X+8.51$)

図 5 の説明

図 5-1 排泄直後のオーシスト。

図 5-2 スポロントは未凝集であるが、大形の顆粒が出現したオーシスト。

図 5-3 スポロントが凝集したオーシスト（培養開始 12 時間後）

図 5-4 スポロントが凝集したオーシスト、内腔の両極に数個の refractile granule が出現する（培養開始 36 時間後）。

図 5-5 スポロントが凝集したオーシスト、大形の顆粒が出現する（培養開始 39 時間後）。

図 5-6 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は大形化し、スポロント自体はさらに凝集する（培養開始 60 時間後）。

図 5-7 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は小さくなる（培養開始 72 時間後）。

図 5-8 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は再び大形化し、外形はやや不整となる（培養開始 84 時間後）。

図 5-9 スポロントが凝集したオーシスト、輪郭明瞭でほぼ正球形となる（培養開始 84 時間後）。

図 5-10 スポロントの外形は不整となり、分裂を開始する（培養開始 84 時間後）。

図 5-11 スポロントが完全に 4 分したオーシスト（培養開始 84 時間後）。

図 5-12 スポロブラストが多角形となり始めたオーシスト（培養開始 87 時間後）。

図 5-13 ピラミッドステージのオーシスト（培養開始 87 時間後）

図 5-14 スポロブラストの鋭角部が丸みを帯び始めたオーシスト（培養開始 87 時間後）。

図 5-15 スポロブラストがほぼ球形となったオーシスト（培養開始 87 時間後）。

図 5-16 スポロブラストが楕円形となったオーシスト（培養開始 87 時間後）。

図 5-17 スポロシストの先端には Stieda body がみられ、内部が 2 分してスポロゾイトが形成される。sporozoite 内には数個の refractile globule がみられる（培養開始 132 時間後）。

図 5-18 スポロゾイト内の顆粒構造および refractile globule が減少したオーシスト（培養開始 132 時間後）。

図 5-19 スポロゾイト内の refractile globule が 2 個となったオーシスト（培養開始 132 時間後）。

図 5-20 胞子形成の完了したオーシスト。スポロゾイト内の refractile globule は鈍端部の 1 個となる（培養開始 132 時間後）。

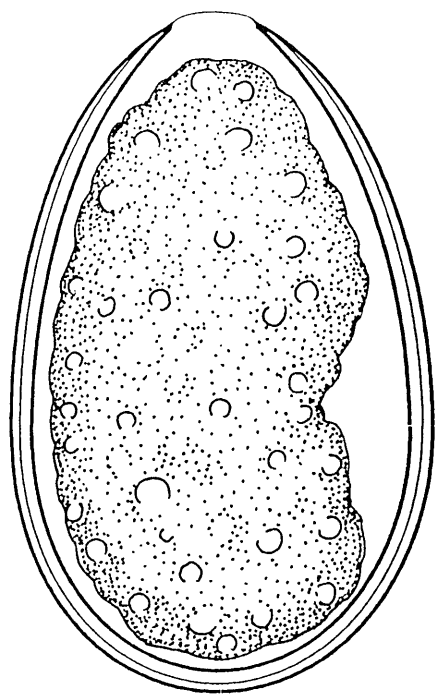


图 5-1

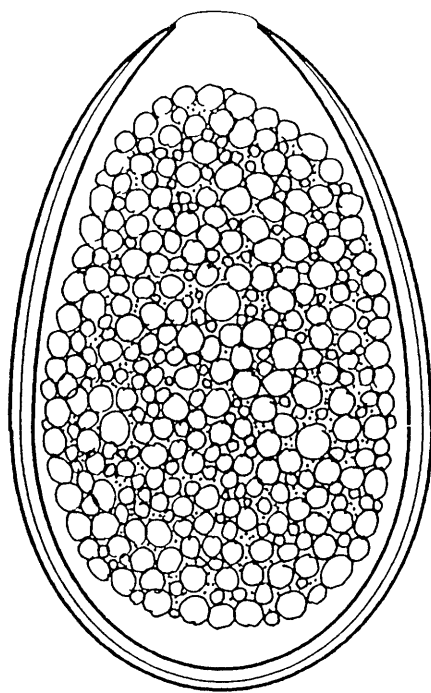


图 5-2

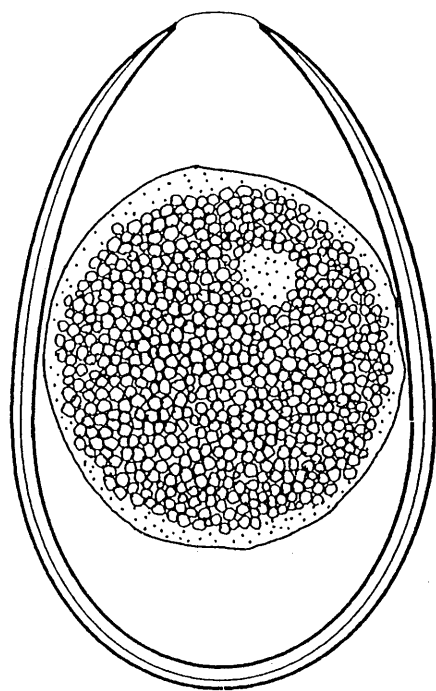


图 5-3

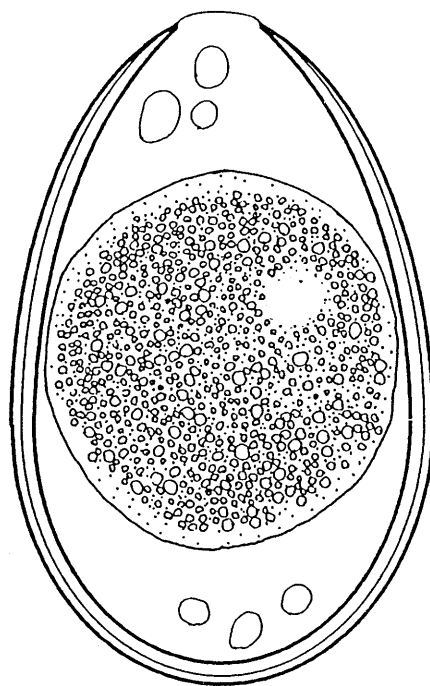


图 5-4

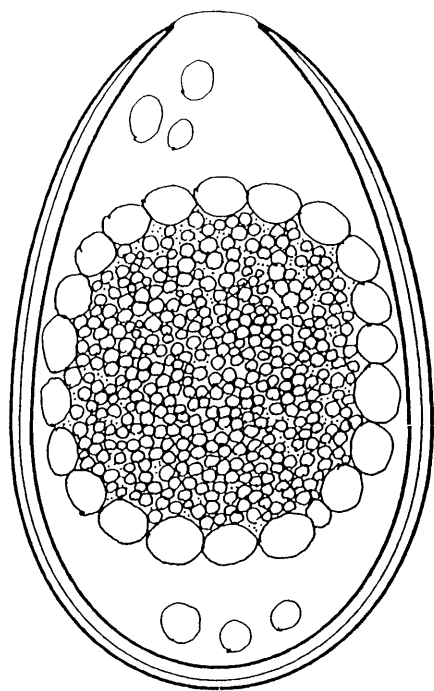


图 5-5

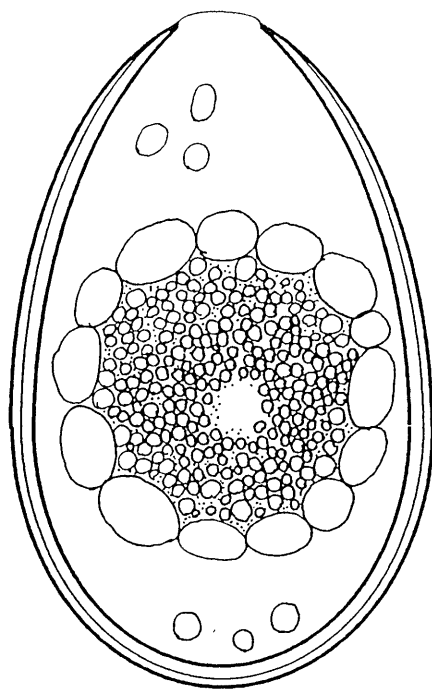


图 5-6

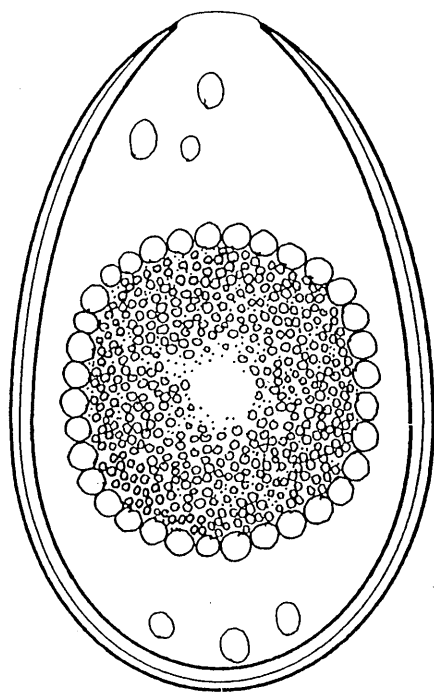


图 5-7

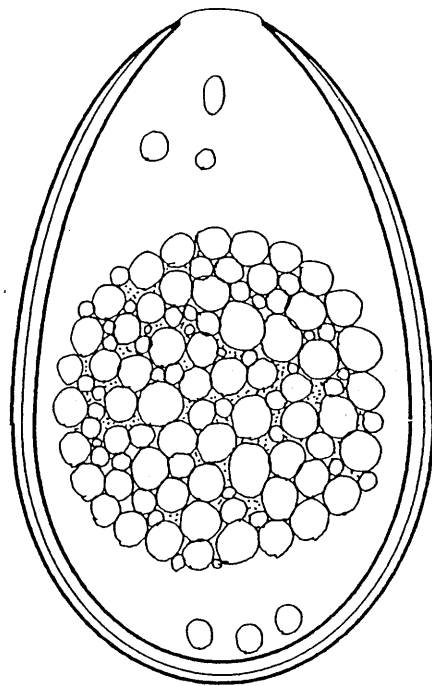


图 5-8

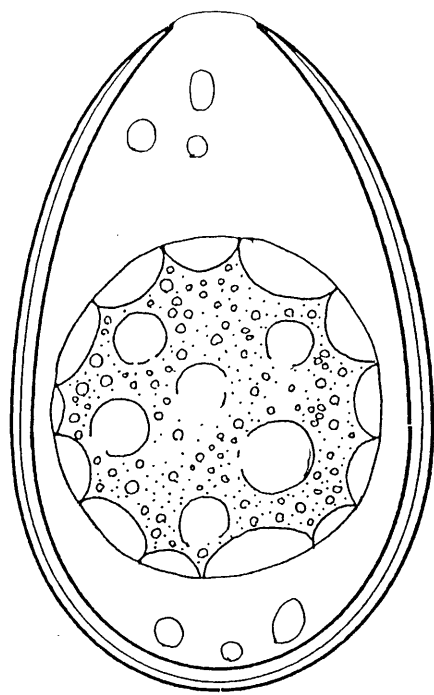


图 5-9

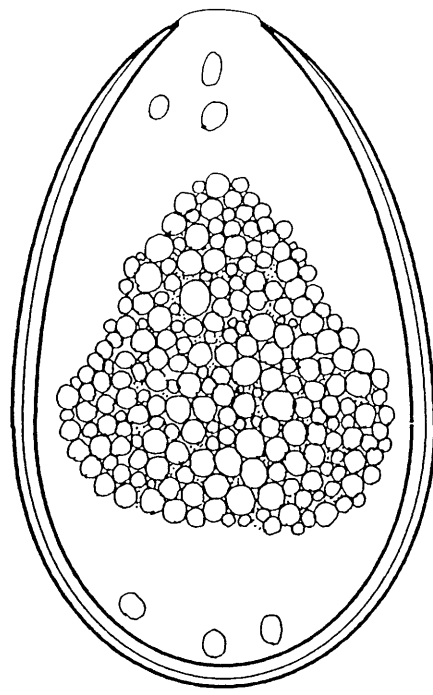


图 5-10

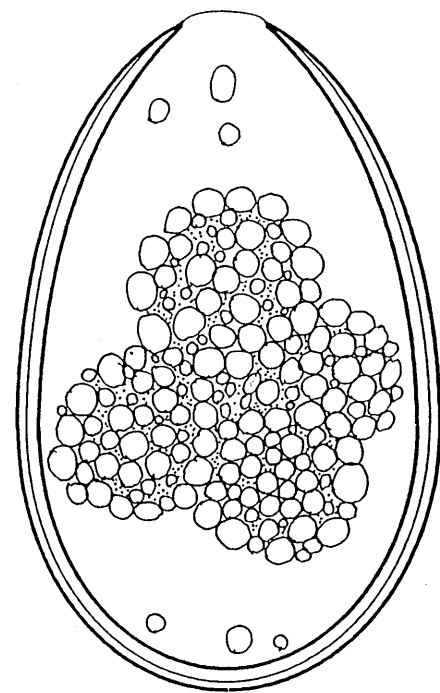


图 5-11

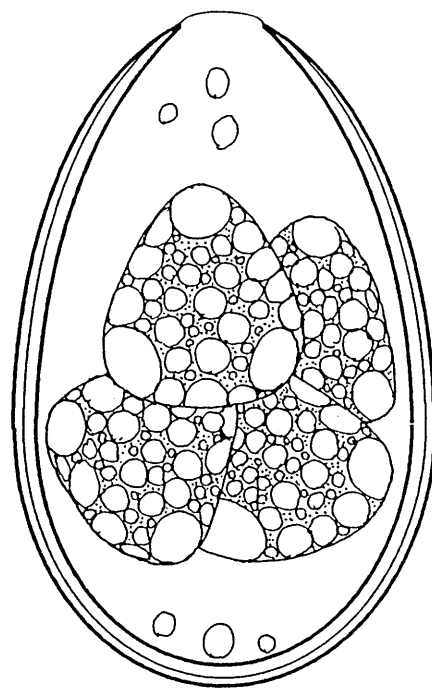


图 5-12

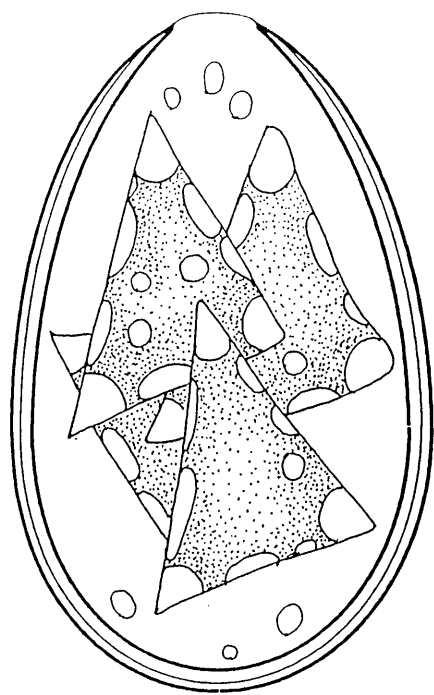


图 5-13

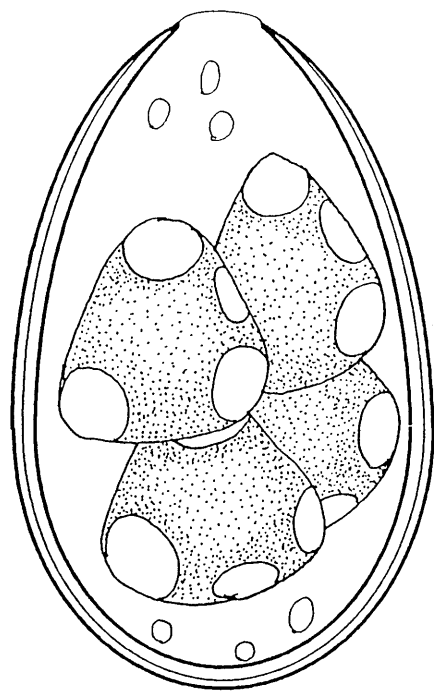


图 5-14

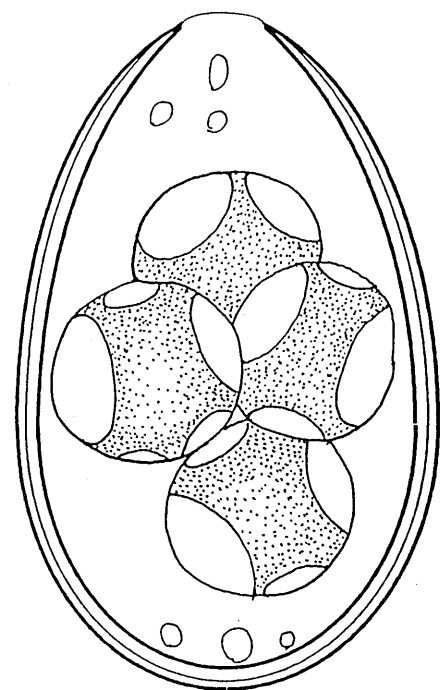


图 5-15

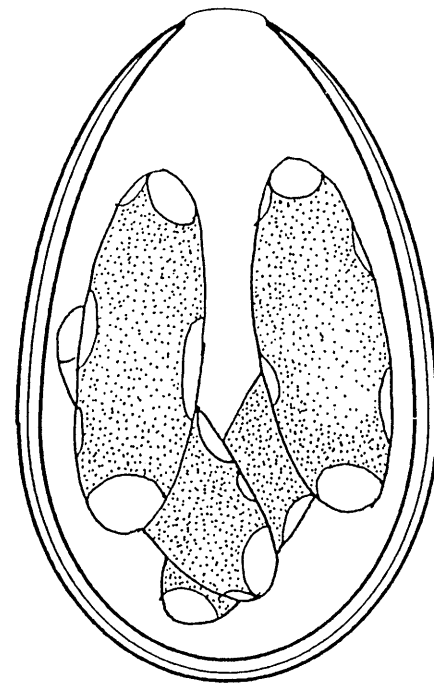


图 5-16

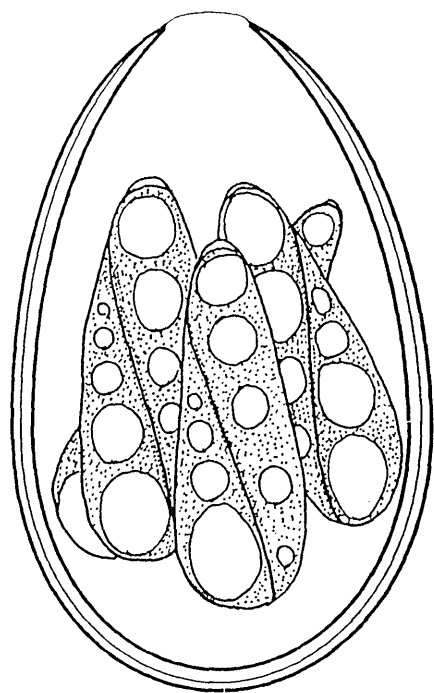


图 5-17

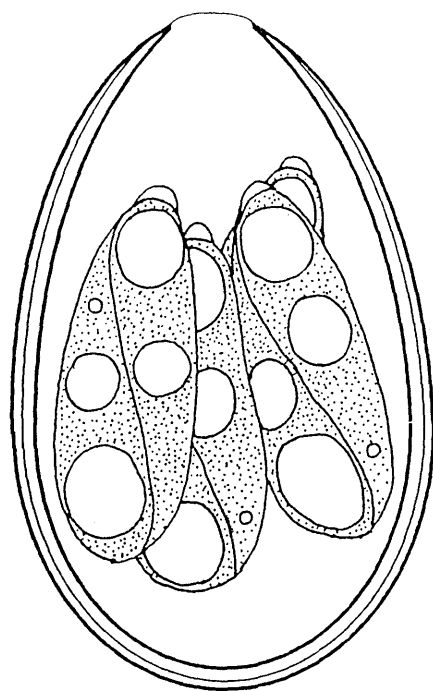


图 5-18

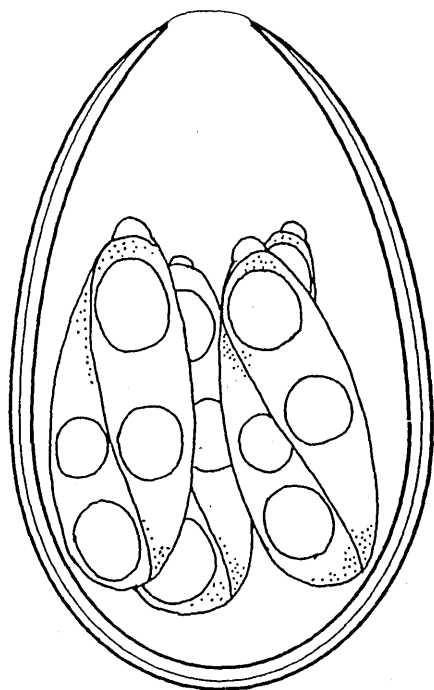


图 5-19

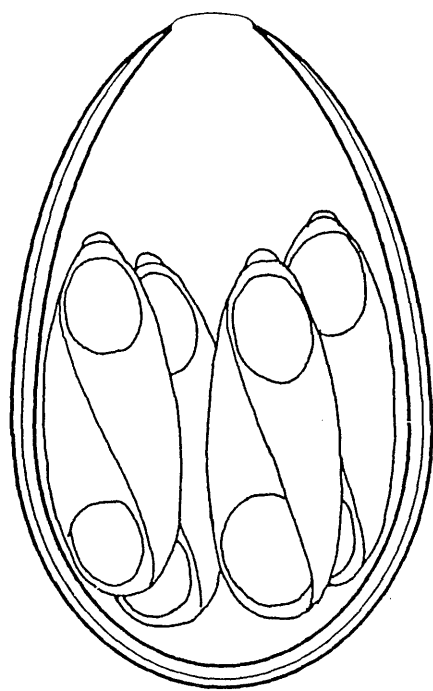


图 5-20

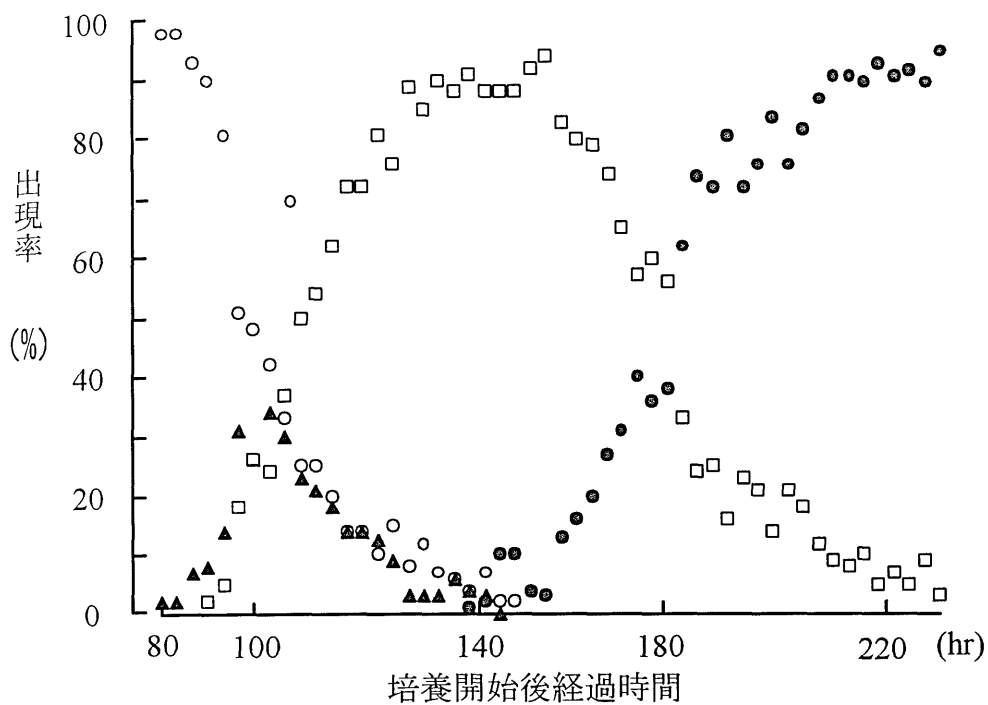


図6 29℃における *E. wyomingensis* オーストの胞子形成過程の経時的推移
○ スポロントの凝集, ▲ スポロントの分裂, □ スポロシストの形成, ● 胞子形成完了

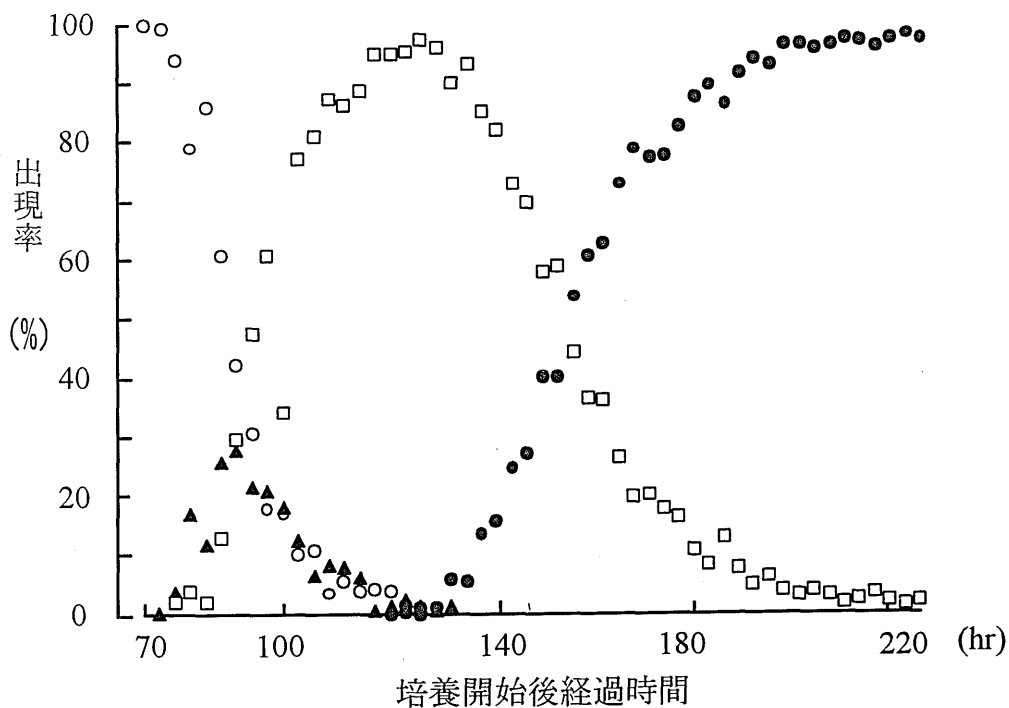


図7 29℃における *E. subspherica* オーストの胞子形成過程の経時的推移
○ スポロントの凝集, ▲ スポロントの分裂, □ スポロシストの形成, ● 胞子形成完了

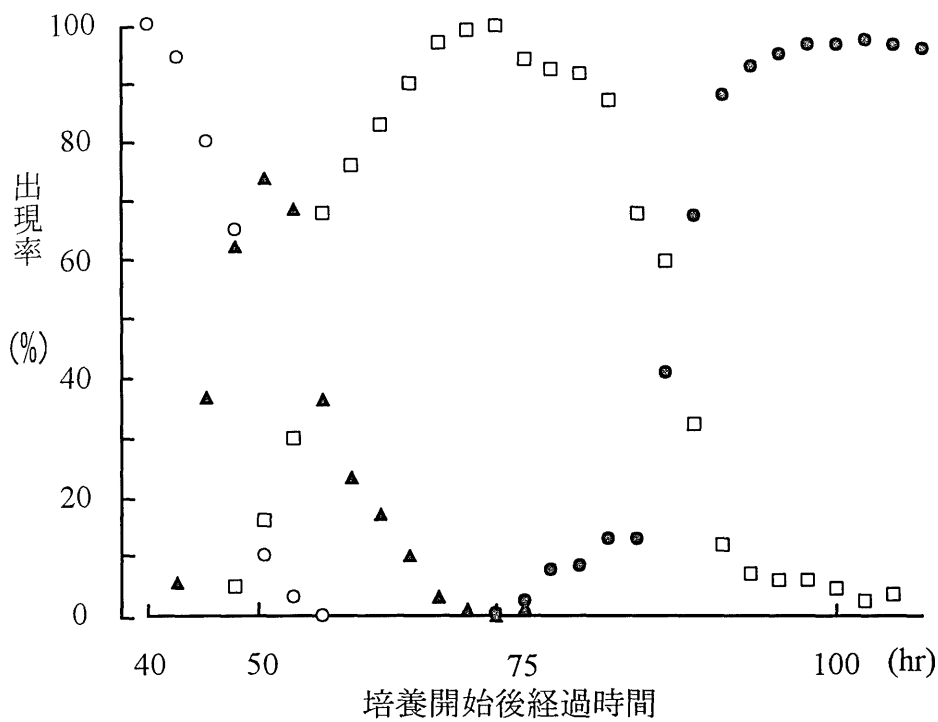


図8 29℃における *E. alabamensis* オーシストの胞子形成過程の経時的推移
○ スポロントの凝集, ▲ スポロントの分裂, □ スポロシストの形成, ● 胞子形成完了

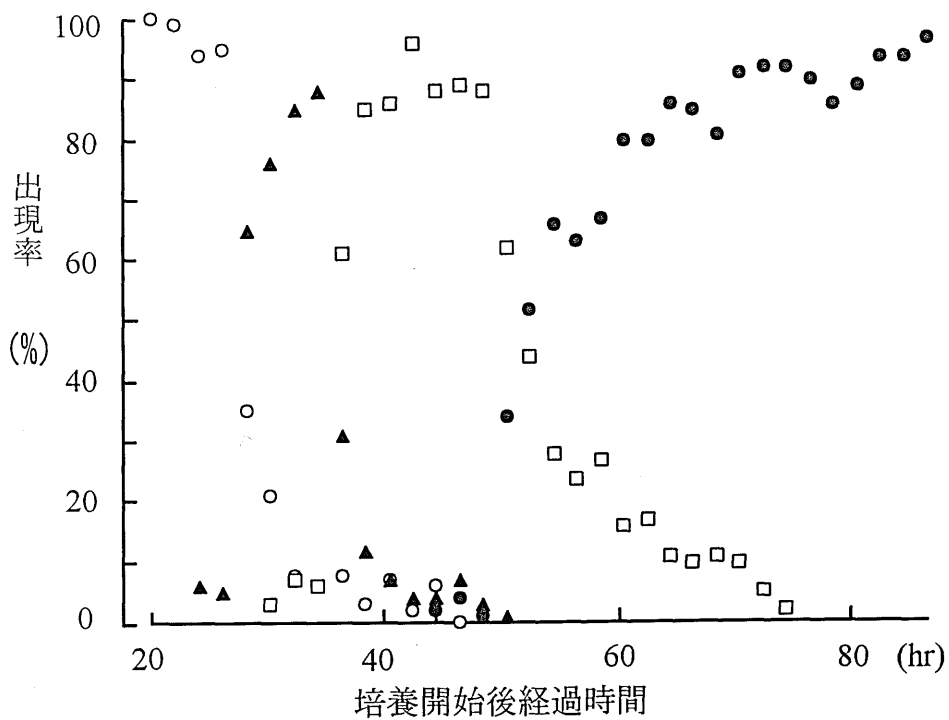


図9 29℃における *E. ellipsoidal* オーシストの胞子形成過程の経時的推移
○ スポロントの凝集, ▲ スポロントの分裂, □ スポロシストの形成, ● 胞子形成完了

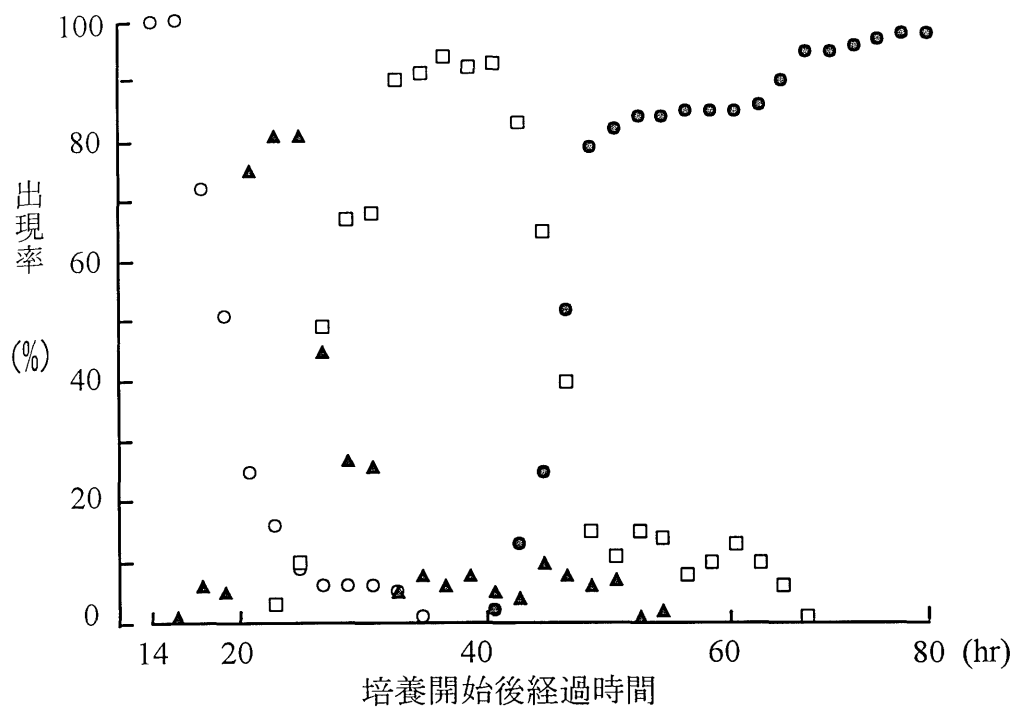


図 10 29℃における *E. auburnensis* オーストの胞子形成過程の経時的推移
 ○ スポロントの凝集, ▲ スポロントの分裂, □ スポロシストの形成, ● 胞子形成完了

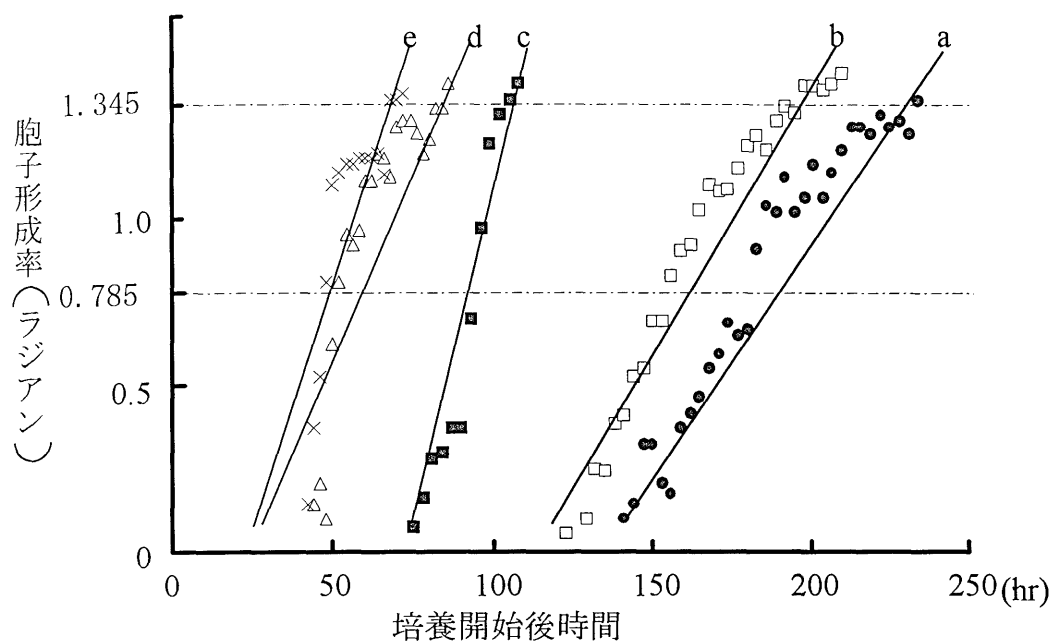


図 11 胞子形成率の角変換による観測プロットと回帰直線

● *E. wyomingensis* (a: $Y=0.014X-1.886$), □ *E. subspherica* (b: $Y=0.017X-1.963$),
 ■ *E. alabamensis* (c: $Y=0.044X-3.274$), △ *E. ellipsoidalis* (d: $Y=0.028X-0.852$),
 × *E. auburnensis* (e: $Y=0.038X-1.144$)

Y 軸の 0.785, 1.345 はそれぞれ 50%, 95%を示す。

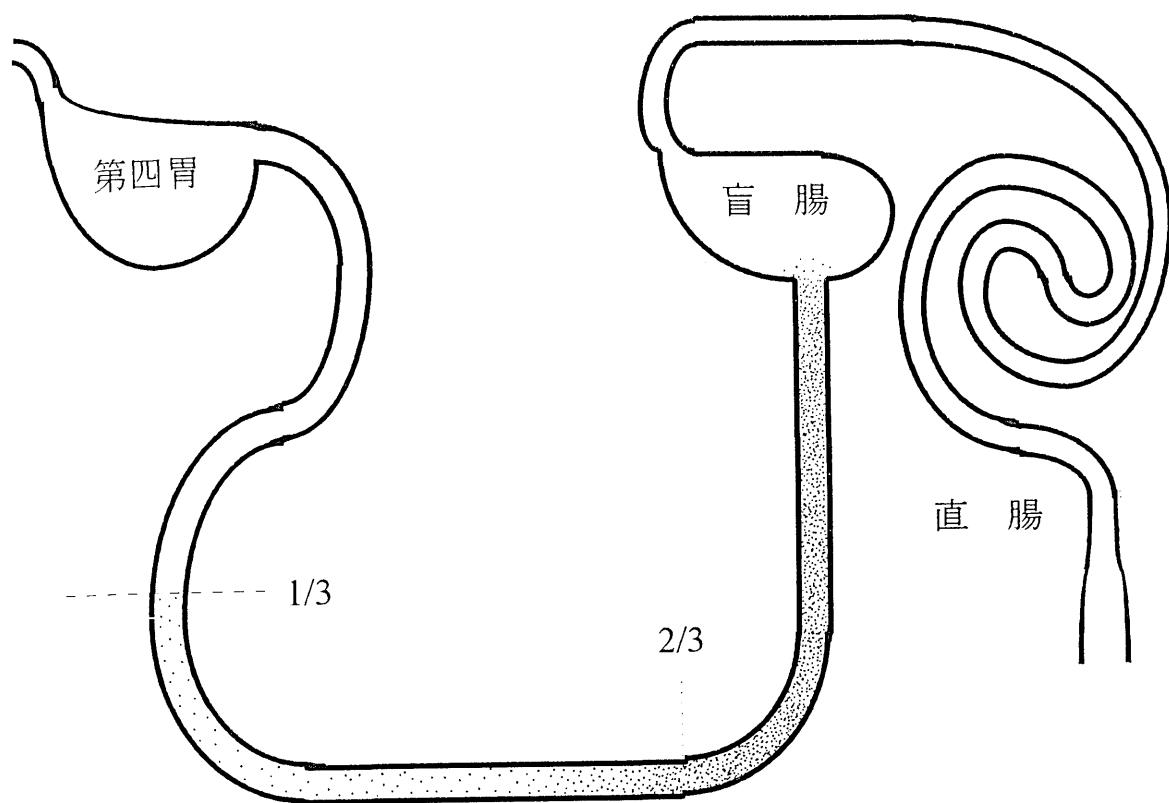


図 12 *E. wyomingensis* の寄生部位
点の濃度は寄生密度を示す。

図 13 の説明

- 図 13-1 宿主細胞(HC)内の未成熟ガモント(IGa) (オーシスト投与後10日目, HN: 宿主細胞の核)
- 図 13-2 宿主細胞(HC)内の未成熟ガモント(IGa) (オーシスト投与後10日目, HN: 宿主細胞の核)
- 図 13-3 宿主細胞(HC)内の未成熟ミクロガモント(IMi) (オーシスト投与後 12 日目, HN: 宿主細胞の核)
- 図 13-4 宿主細胞(HC)内の未成熟ミクロガモント(IMi)、隔壁様構造の出現 (オーシスト投与後 12 日目, HN: 宿主細胞の核)。
- 図 13-5 宿主細胞(HC)内の成熟ミクロガモント(MMi) (オーシスト投与後 14 日目, HN: 宿主細胞の核)
- 図 13-6 宿主細胞(HC)内の成熟マクロガモント(MMa) (オーシスト投与後 14 日目, HN: 宿主細胞の核)。
- 図 13-7 宿主細胞(HC)内のチゴート(ZY)、葡萄の房状の形態を示す (オーシスト投与後 14 日目, HN: 宿主細胞の核)。
- 図 13-8 宿主細胞(HC)内のチゴート(ZY)、楕円形となりオーシストらしい形となる (オーシスト投与後 14 日目, HN: 宿主細胞の核)。
- 図 13-9 宿主細胞(HC)内のオーシスト(Oo) (オーシスト投与後 14 日目, HN: 宿主細胞の核)。

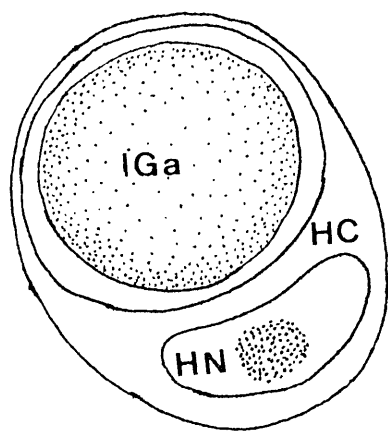


图 13-1

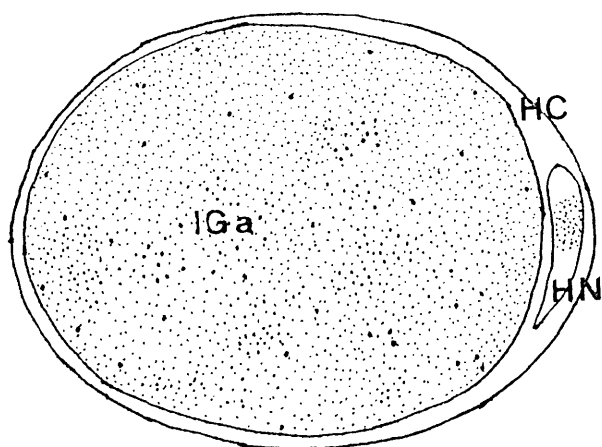


图 13-2

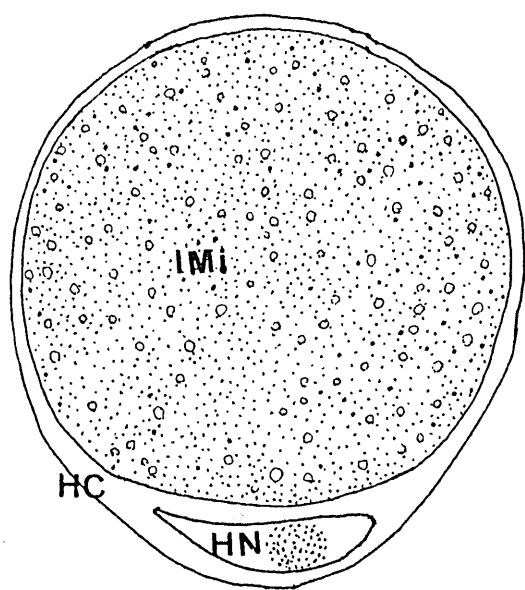


图 13-3

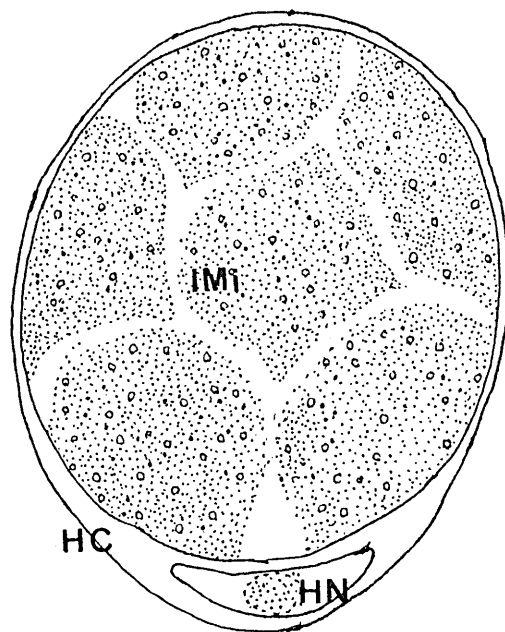


图 13-4

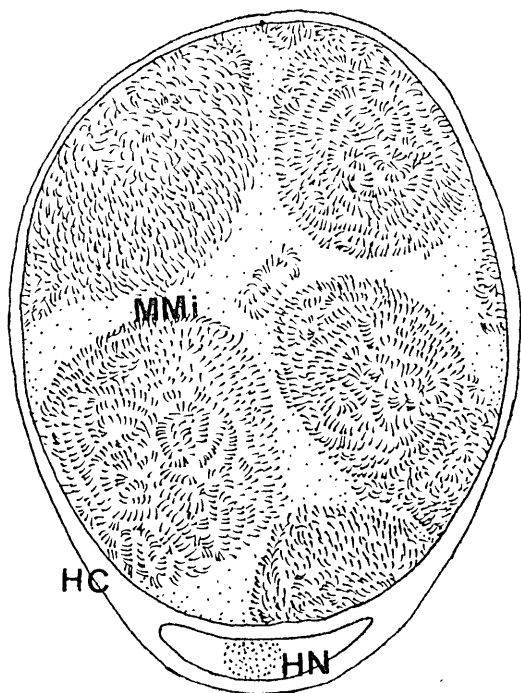


图 13-5

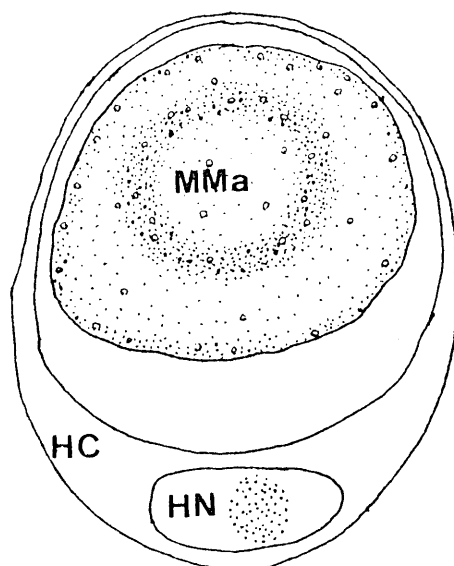


图 13-6

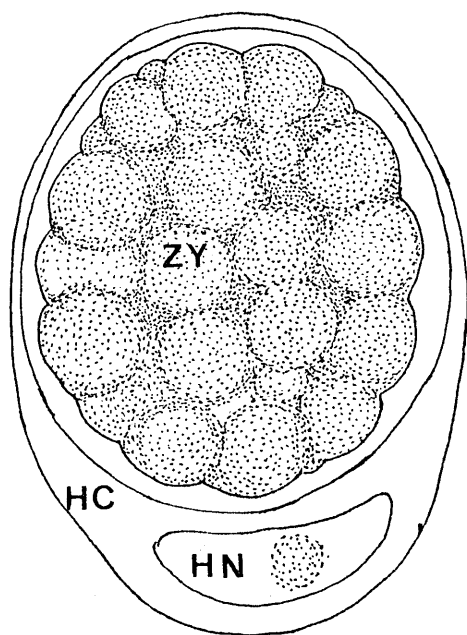


图 13-7

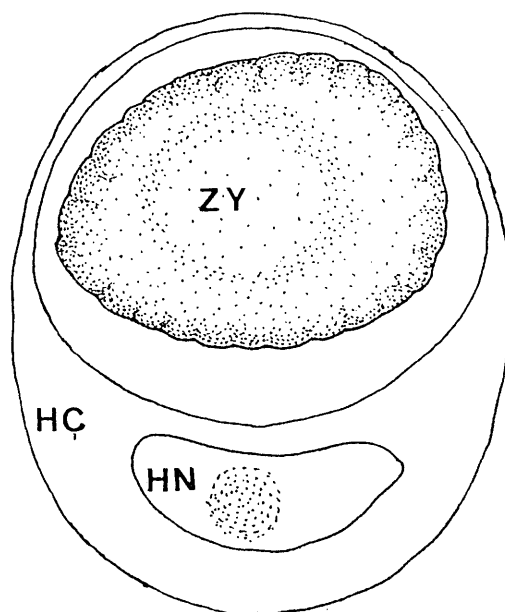


图 13-8

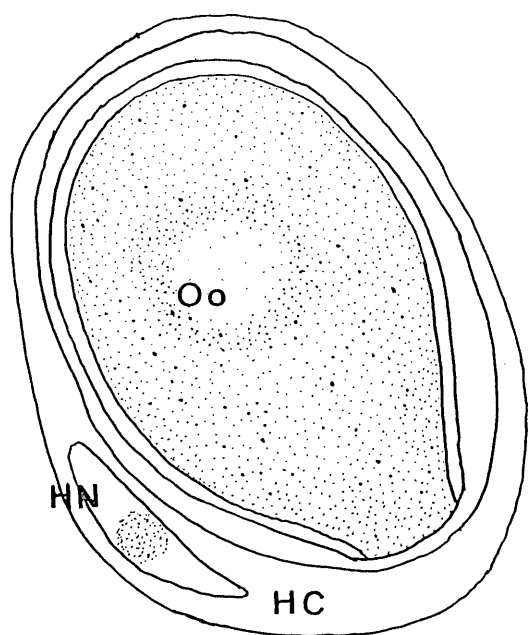


图 13-9

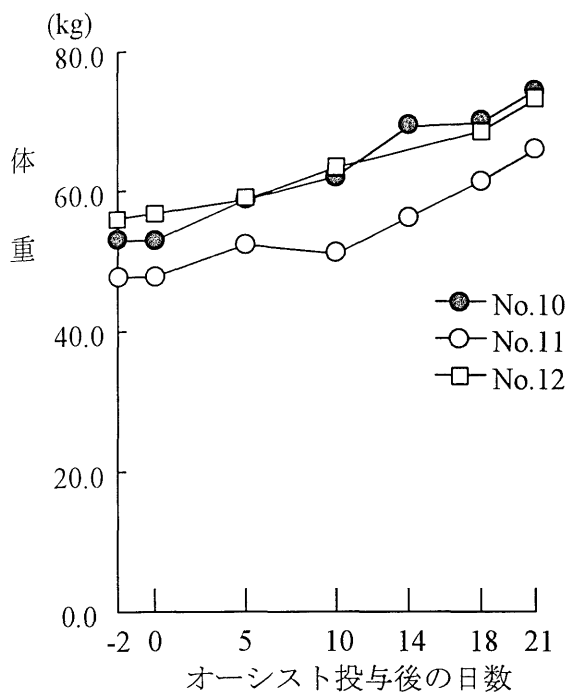


図 14-1 非感染個体における体重推移

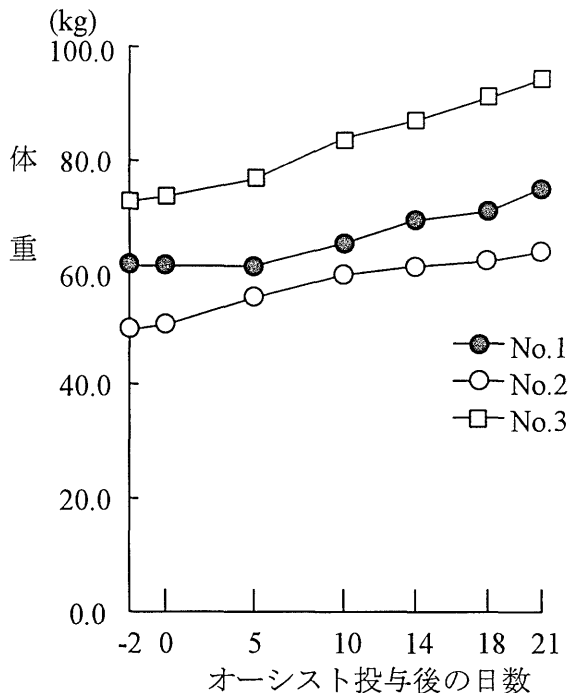


図 14-2 *E. wyomingensis* 10⁵個単回投与個体における体重の推移

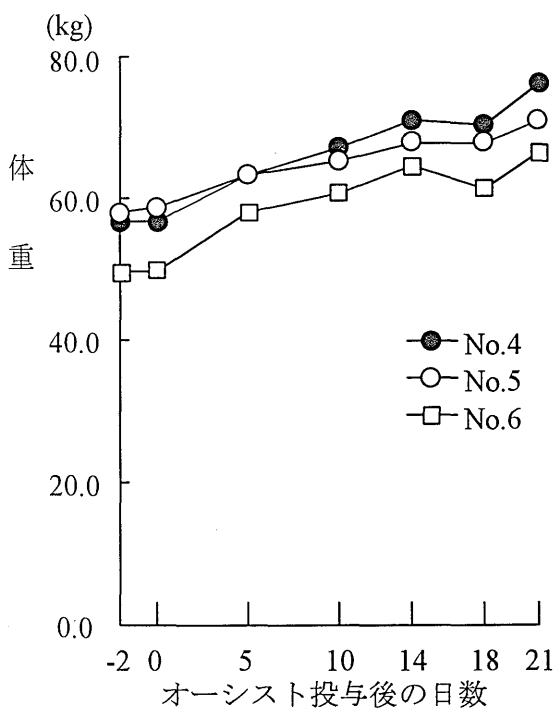


図 14-3 *E. wyomingensis* 10⁶個単回投与個体における体重の推移

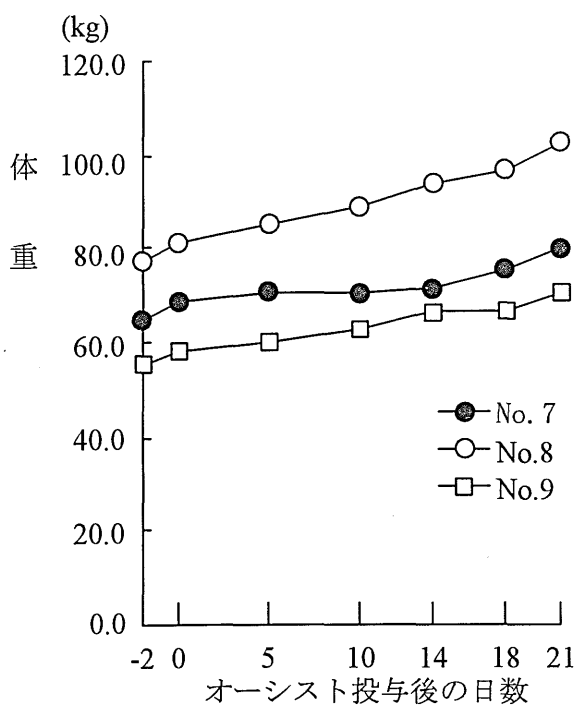


図 14-4 *E. wyomingensis* 10⁷個単回投与個体における体重の推移

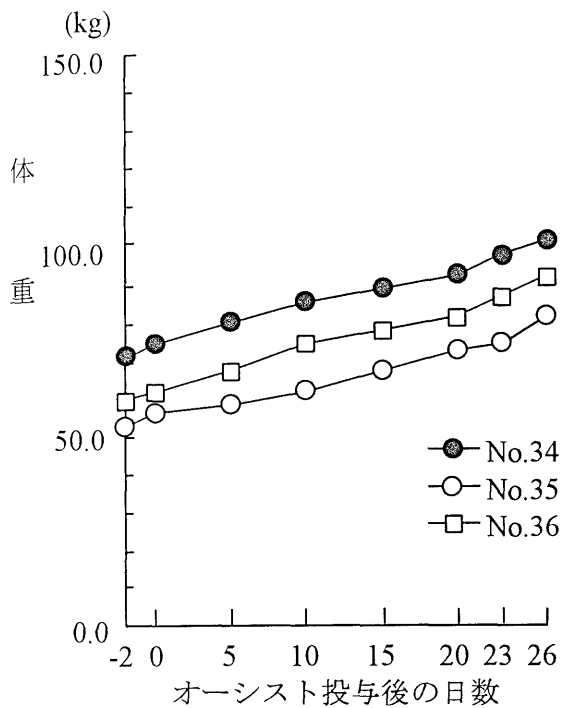


図 15-1 非感染個体における体重の推移

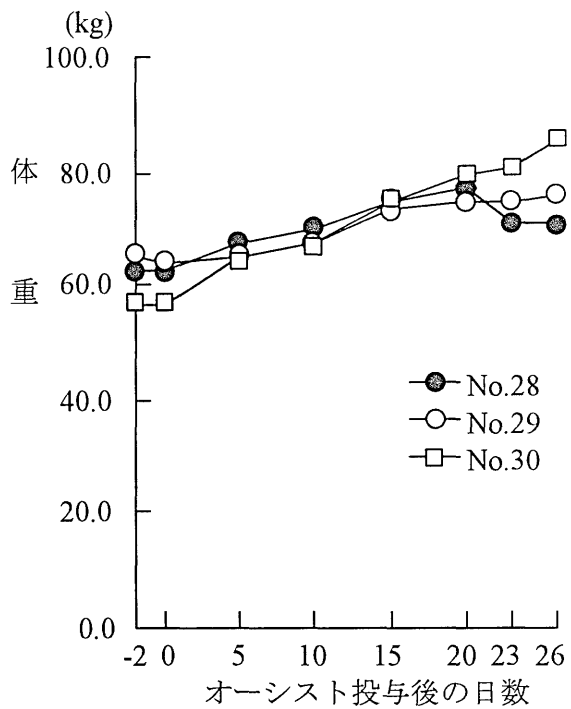


図 15-2 *E. bovis* 10⁵個投与個体における体重の推移

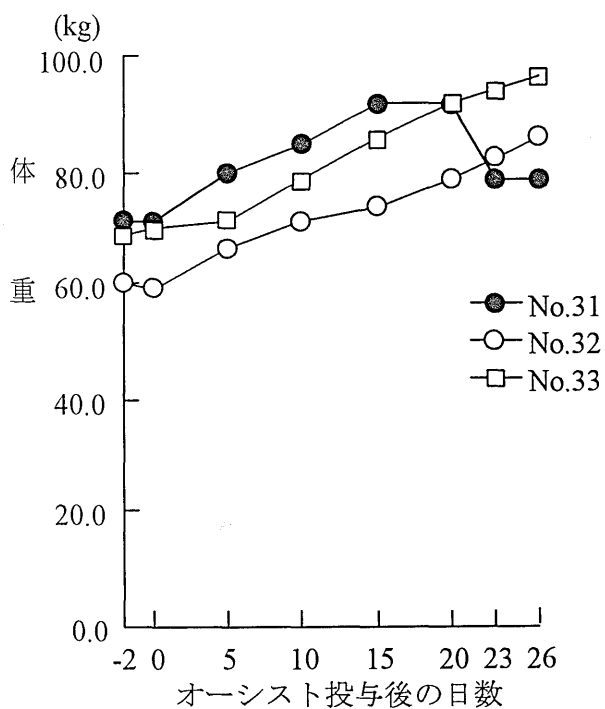


図 15-3 *E. bovis* 10⁶個投与個体における体重の推移

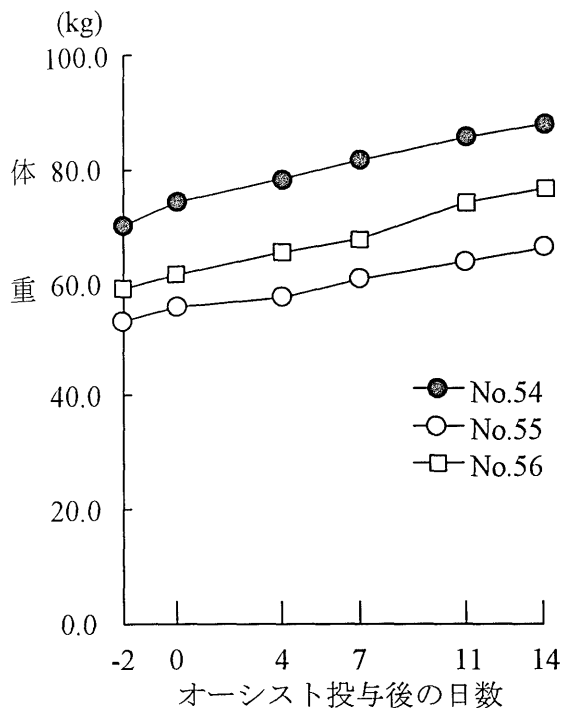


図 16-1 非感染個体における体重の推移

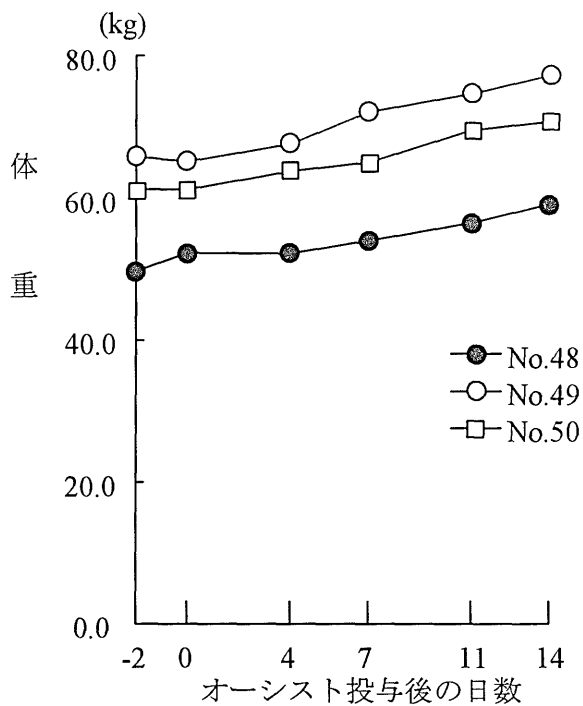


図 16-2 *E. alabamensis* 10⁷個投与個体における体重の推移

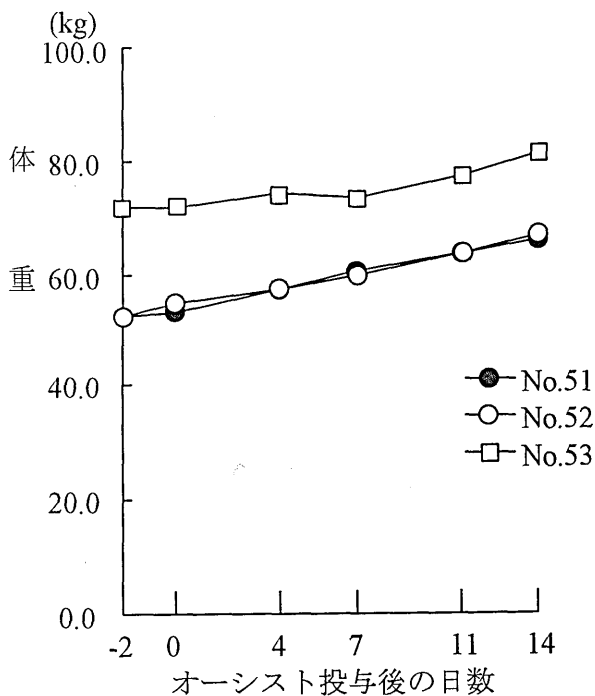


図 16-3 *E. alabamensis* 10⁸個投与個体における体重の推移

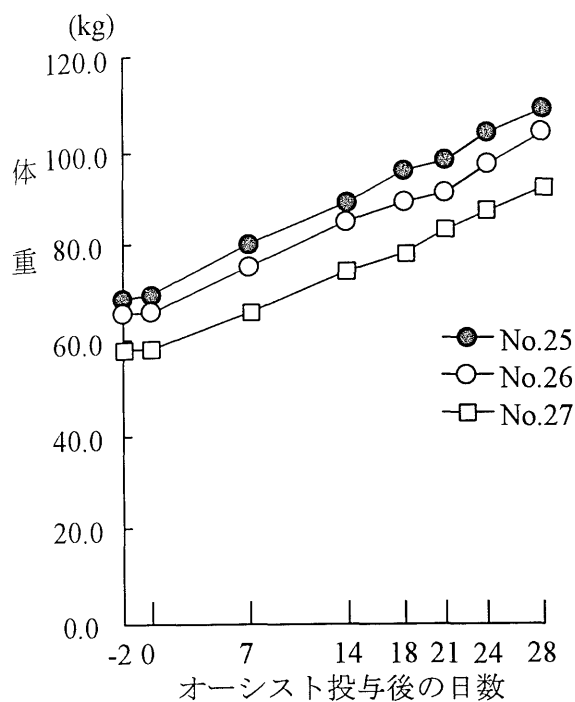


図 17-1 非感染個体における体重の推移

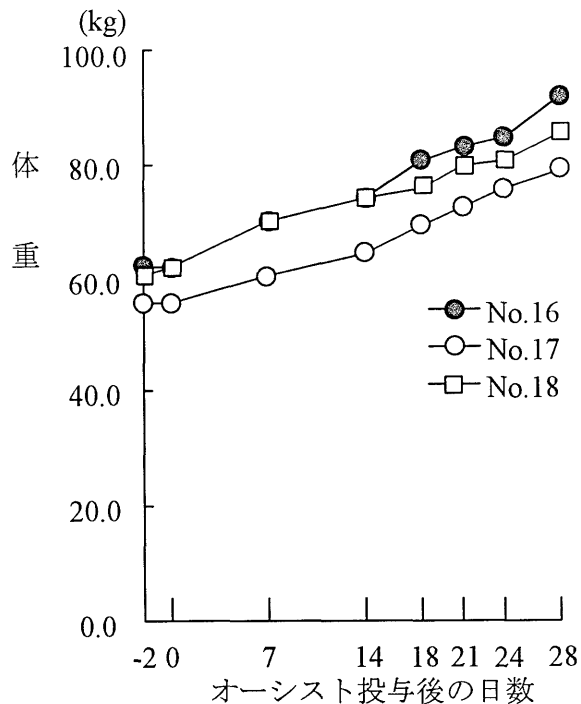


図 17-2 *E. wyomingensis* 10^5 個反復投与個体における体重の推移

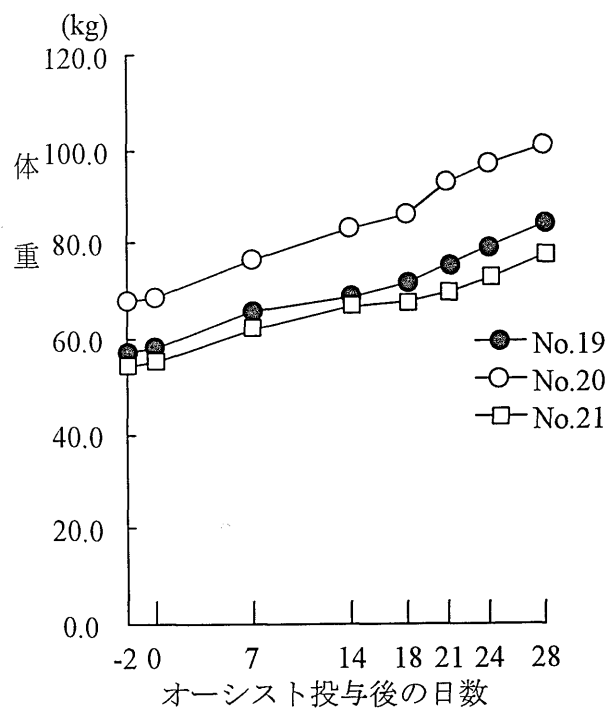


図 17-3 *E. wyomingensis* 2×10^5 個反復投与個体における体重の推移

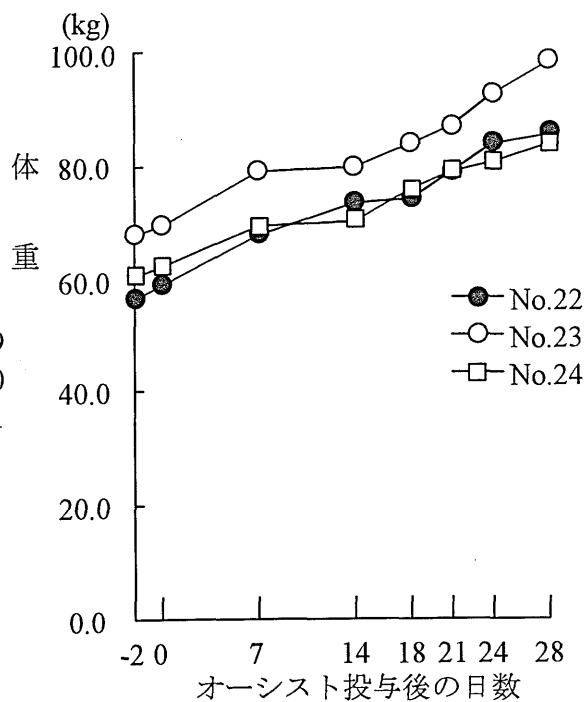


図 17-4 *E. wyomingensis* 2×10^6 個反復投与個体における体重の推移

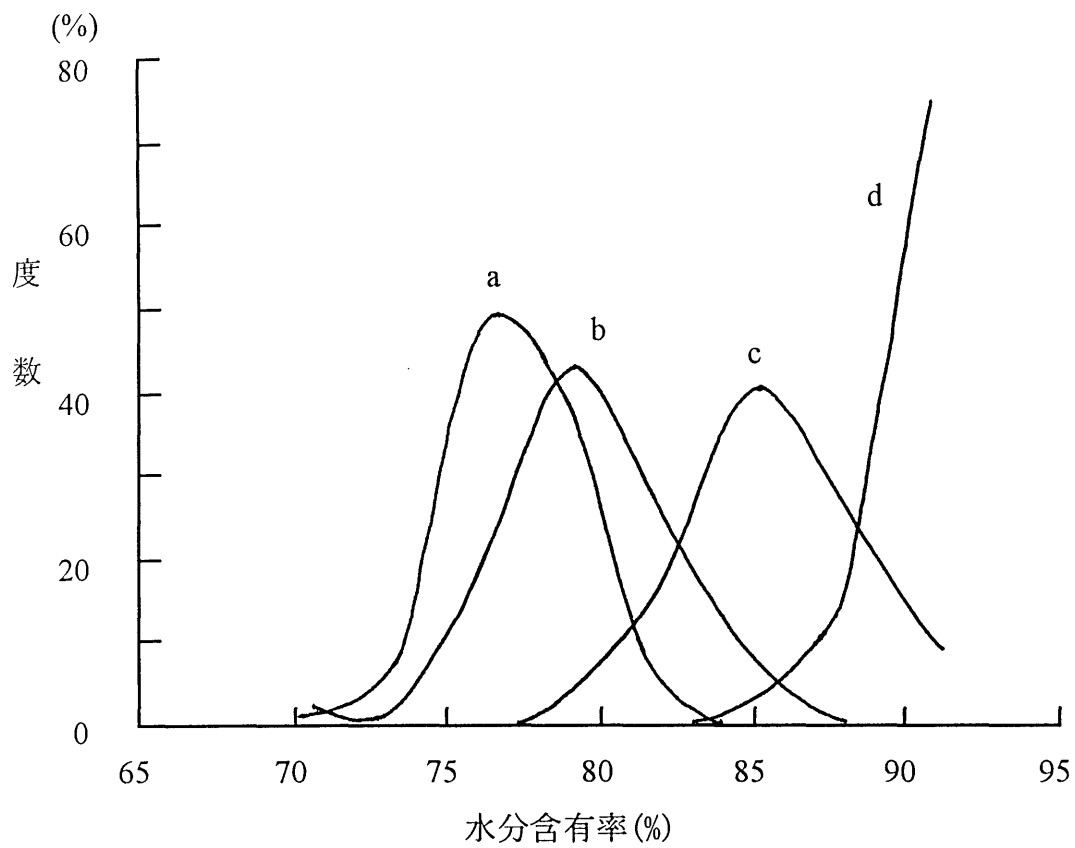


図 18 糞便性状の肉眼的評価区分と水分含量の分布
a: - (正常), b: + (軟便), c: ++ (下痢便), d: +++ (水様便)

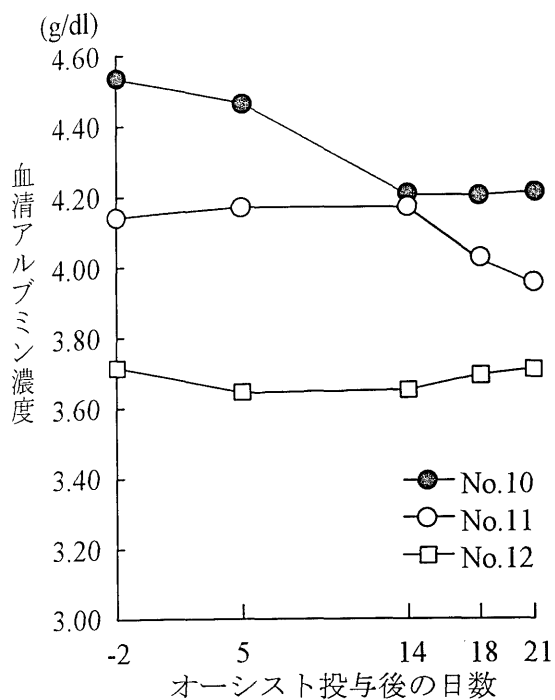


図 19-1 非感染個体における血清アルブミン濃度の推移

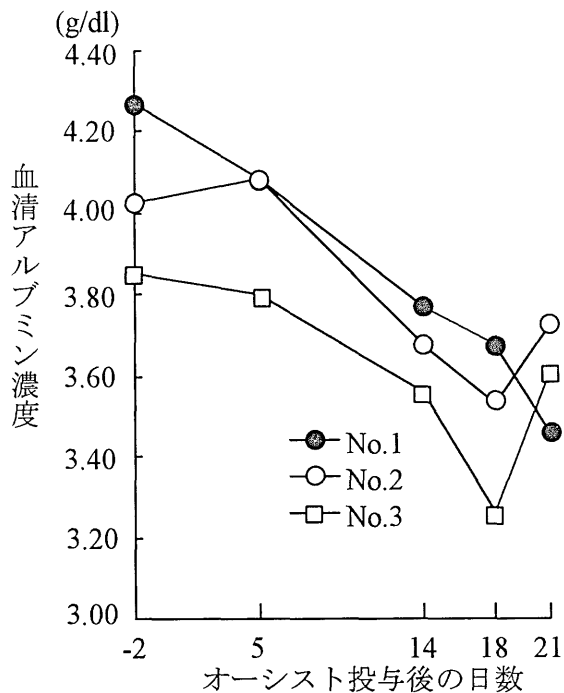


図 19-2 *E. wyomingensis* 10^5 個単回投与個体における血清アルブミン濃度の推移

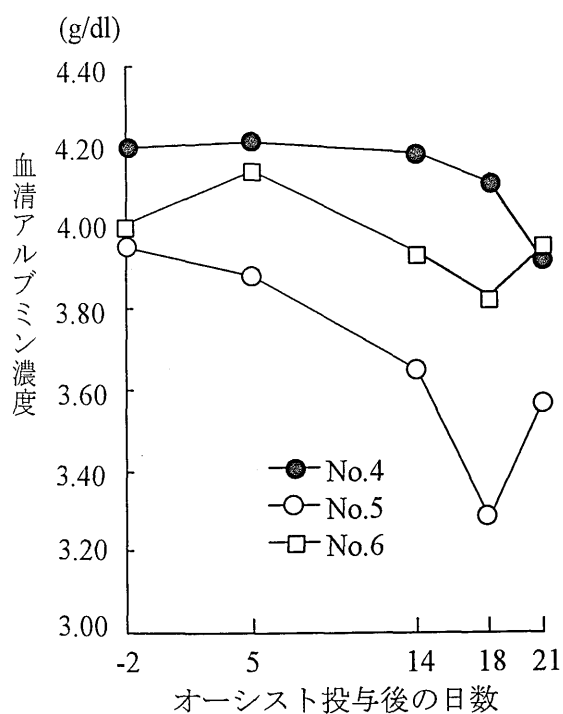


図 19-3 *E. wyomingensis* 10^6 個単回投与個体における血清アルブミン濃度の推移

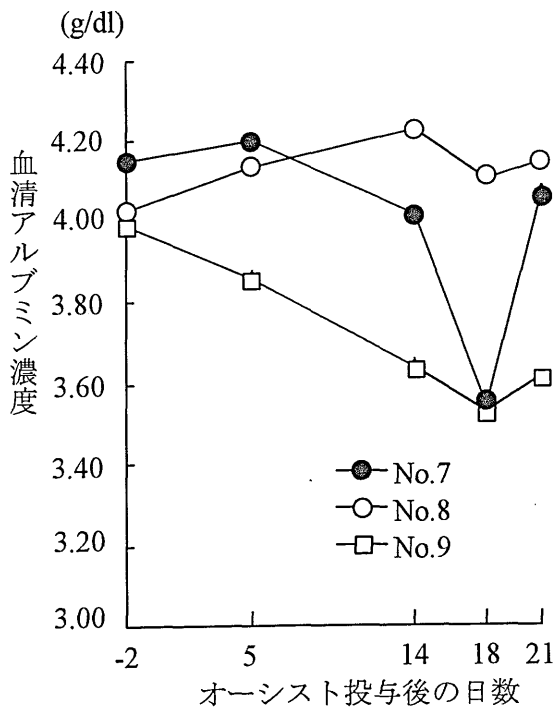


図 19-4 *E. wyomingensis* 10^7 個単回投与個体における血清アルブミン濃度の推移

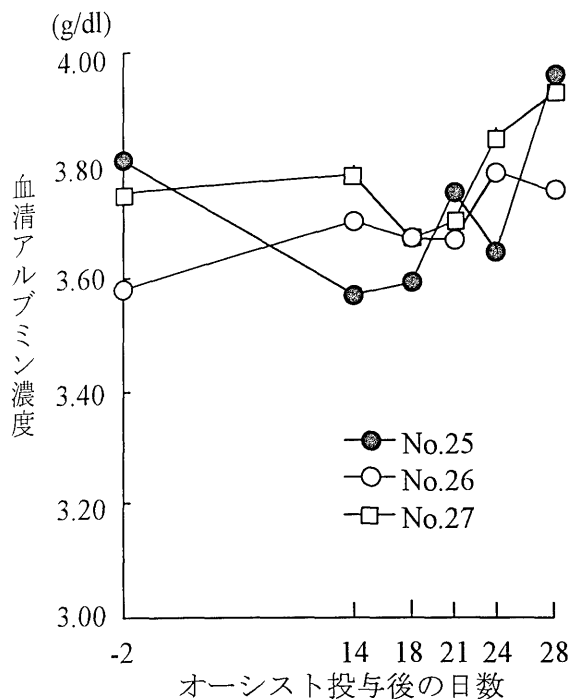


図 20-1 非感染個投与における血清アルブミン濃度の推移

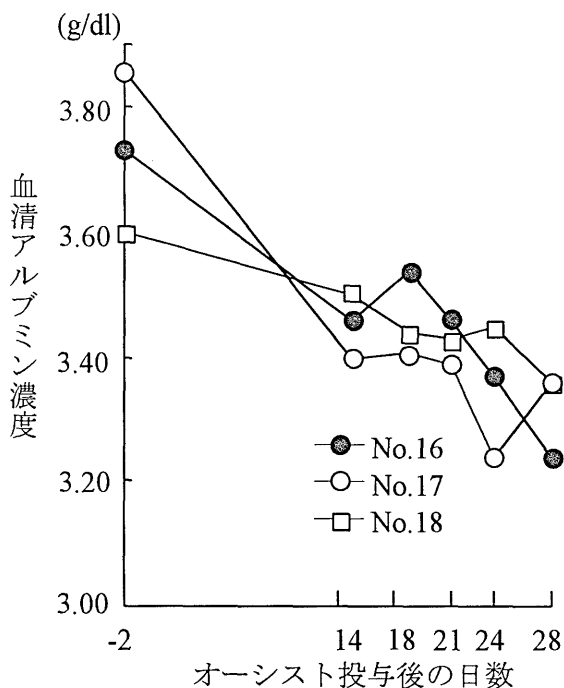


図 20-2 *E. wyomingensis* 10^6 個単回投与個体における血清アルブミン濃度の推移

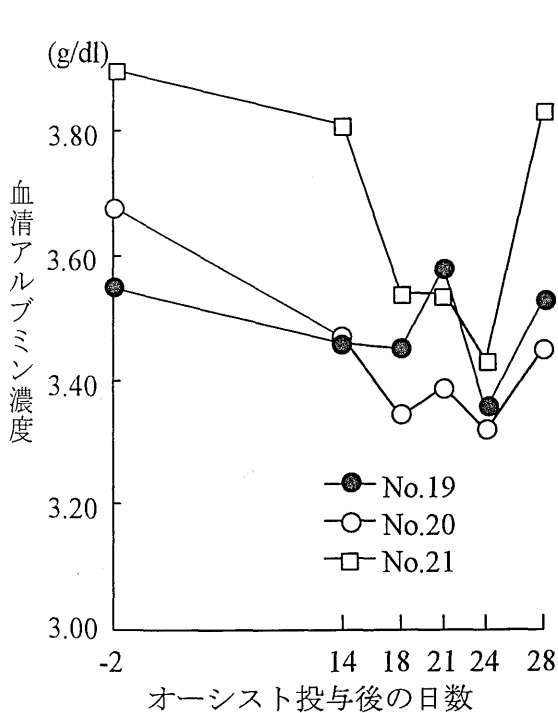


図 20-3 *E. wyomingensis* 2×10^5 個反復投与個体における血清アルブミン濃度の推移

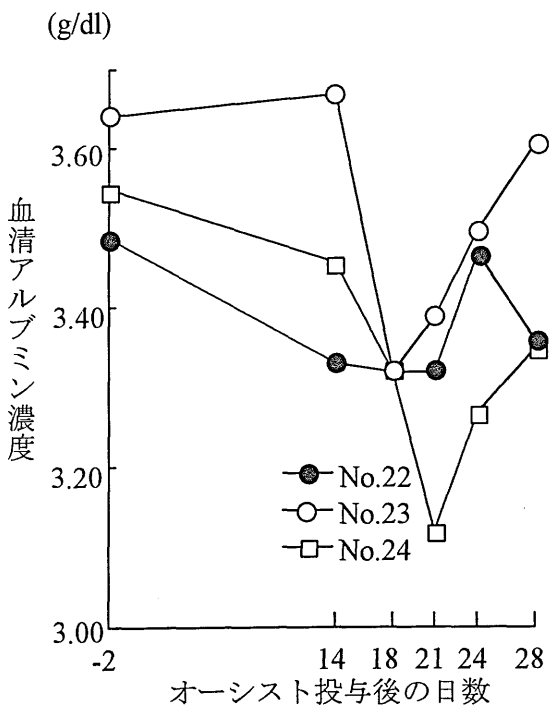


図 20-4 *E. wyomingensis* 2×10^6 個反復投与個体における血清アルブミン濃度の推移

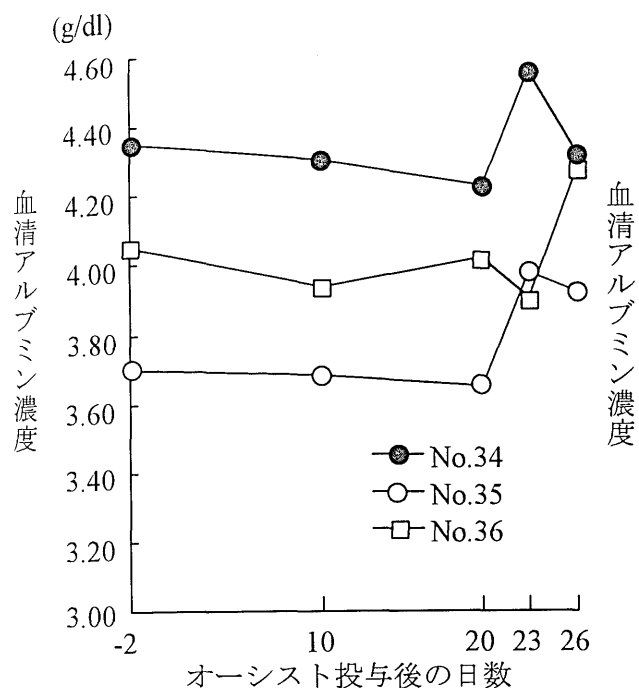


図 21-1 非感染個体における血清アルブミン濃度の推移

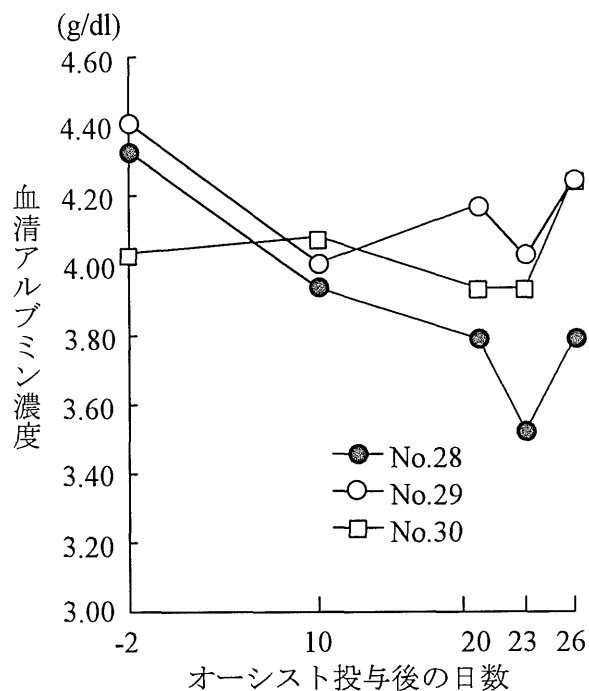


図 21-2 *E. bovis* 10⁵個投与個体における血清アルブミン濃度の推移

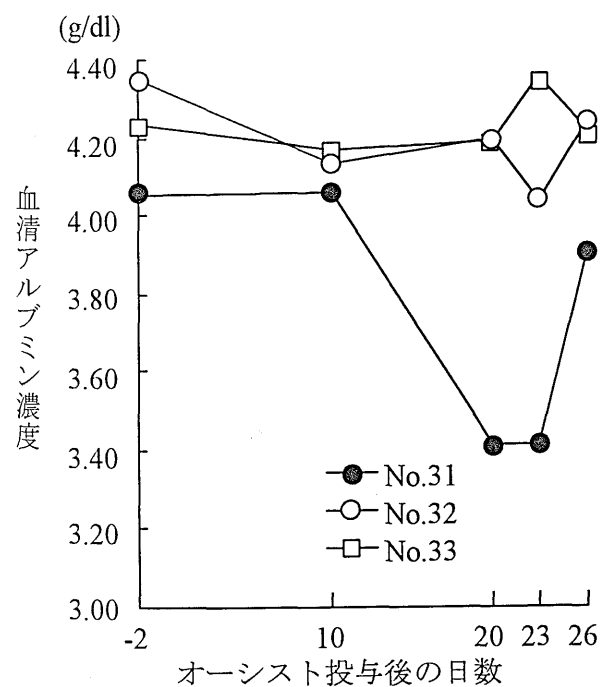


図 21-3 *E. bovis* 10⁶個投与個体における血清アルブミン濃度の推移

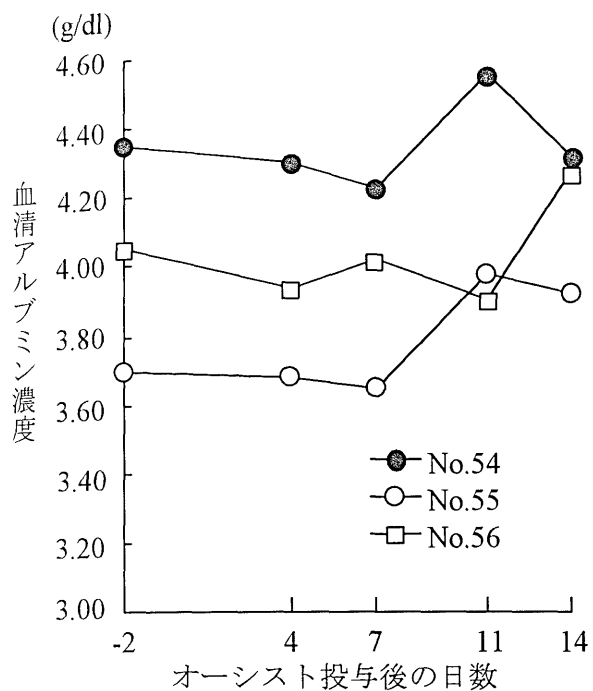


図 22-1 非感染個体における血清アルブミン濃度の推移

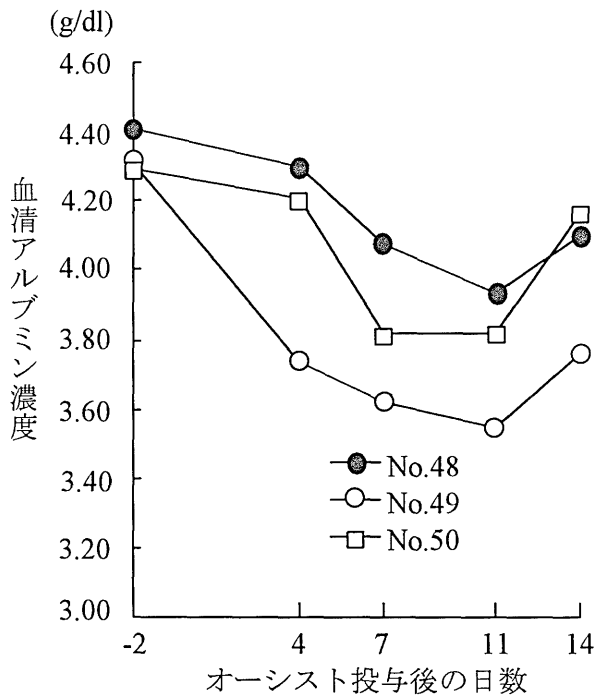


図 22-2 *E. alabamensis* 10⁷個投与個体における血清アルブミン濃度の推移

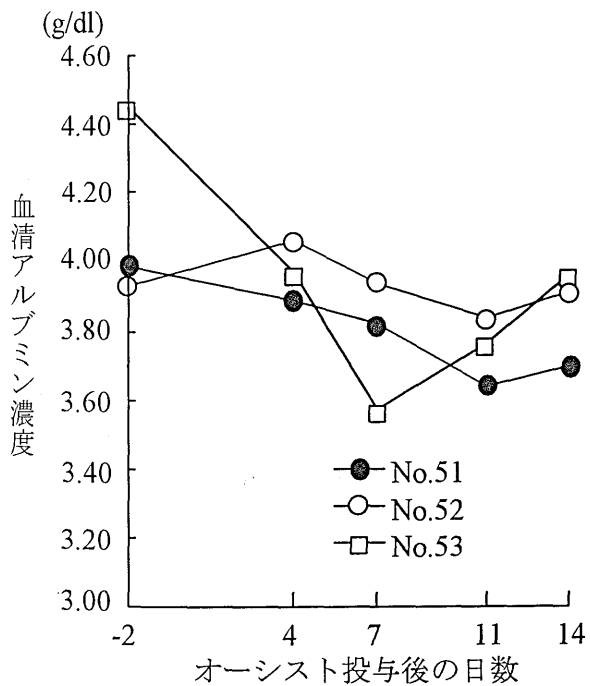


図 22-3 *E. alabamensis* 10⁸投与個体における血清アルブミン濃度の推移

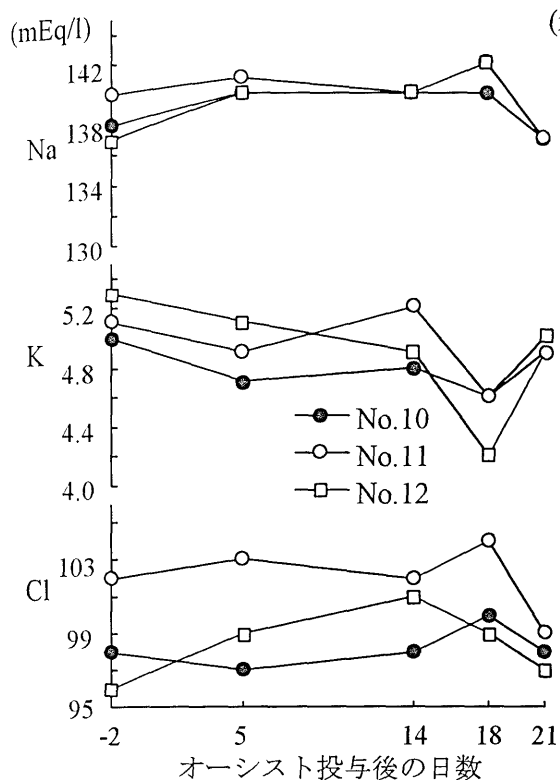


図 23-1 非感染個体における血清電解質組成の推移

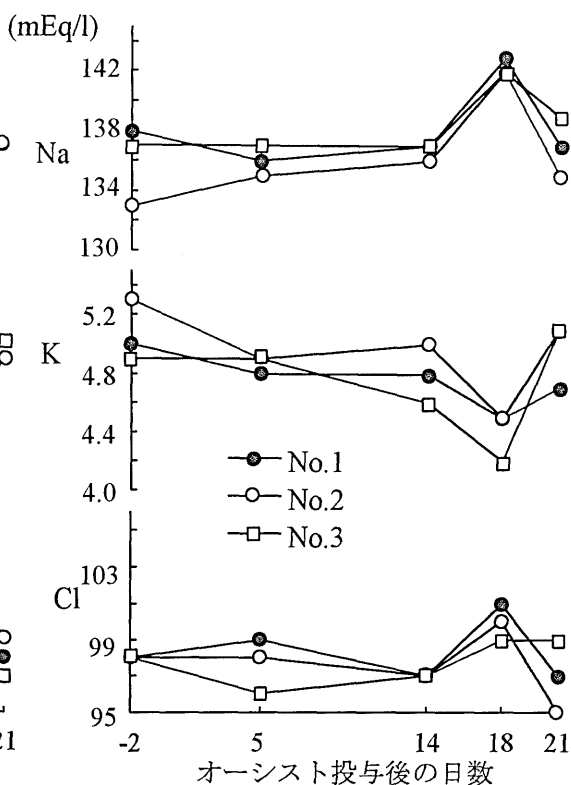


図 23-2 *E. wyomingensis* 10⁵個単回投与個体における血清電解質組成の推移

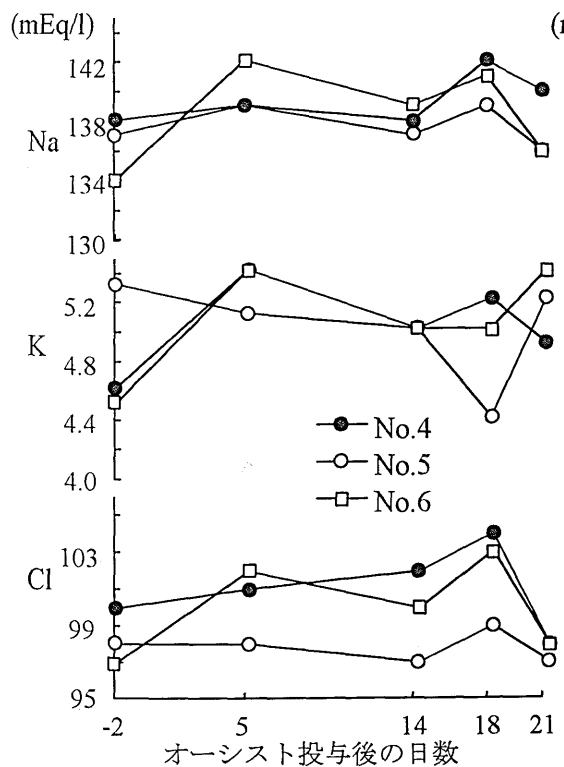


図 23-3 *E. wyomingensis* 10⁶個単回投与個体における血清電解質組成の推移

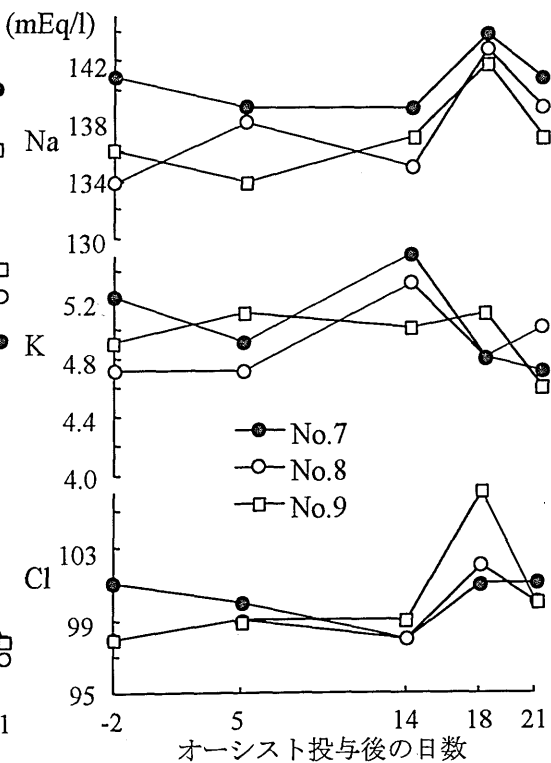


図 23-4 *E. wyomingensis* 10⁷個単回投与個体における血清電解質組成の推移

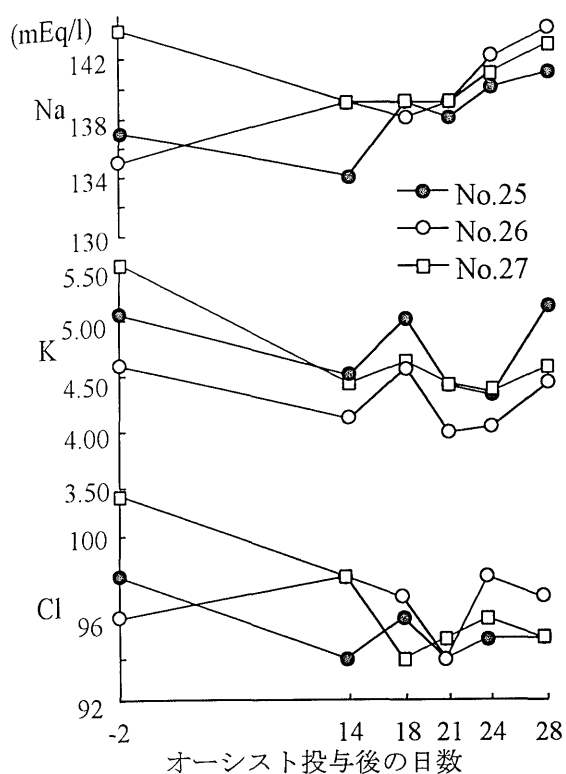


図 24-1 非感染個投与における血清電解質組成の推移

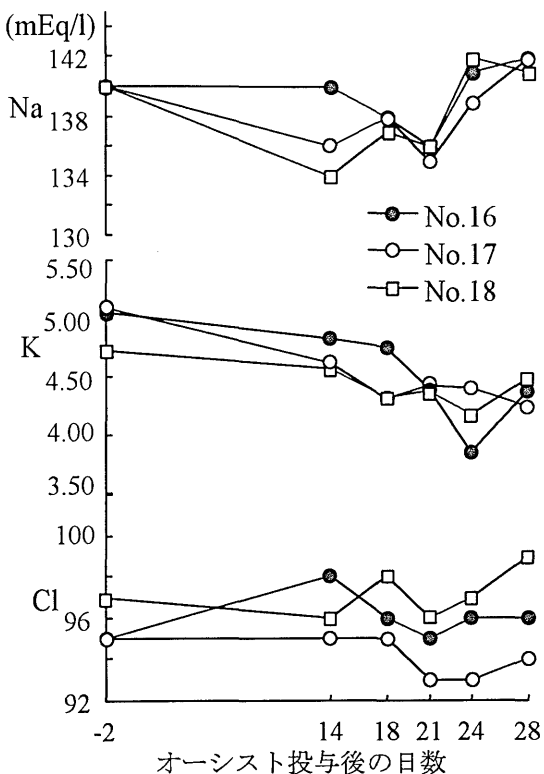


図 24-2 *E. wyomingensis* 10^6 個単回投与個体における血清電解質組成の推移

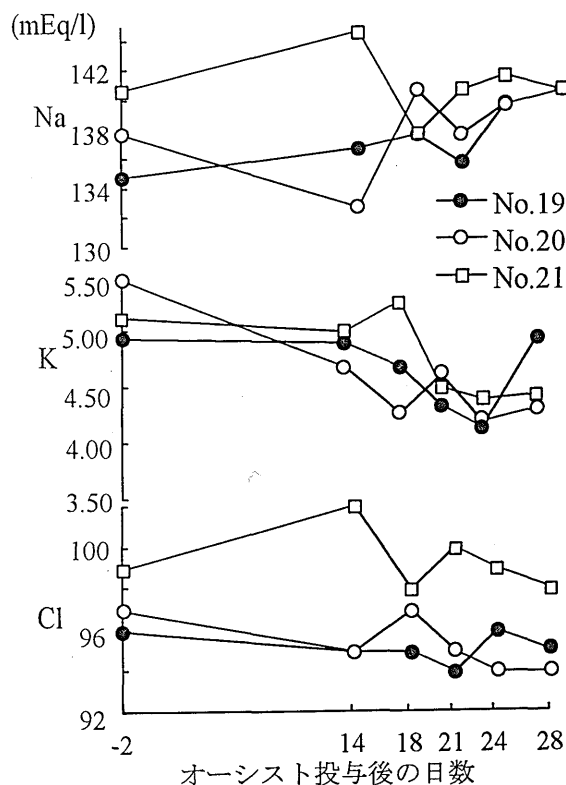


図 24-3 *E. wyomingensis* 2×10^5 個反復投与個体における血清電解質組成の推移

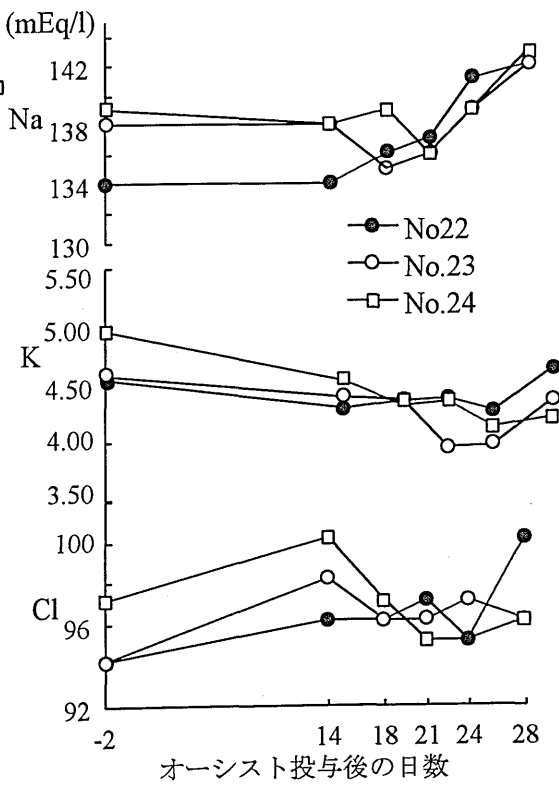


図 24-4 *E. wyomingensis* 2×10^6 個反復投与個体における血清電解質組成の推移

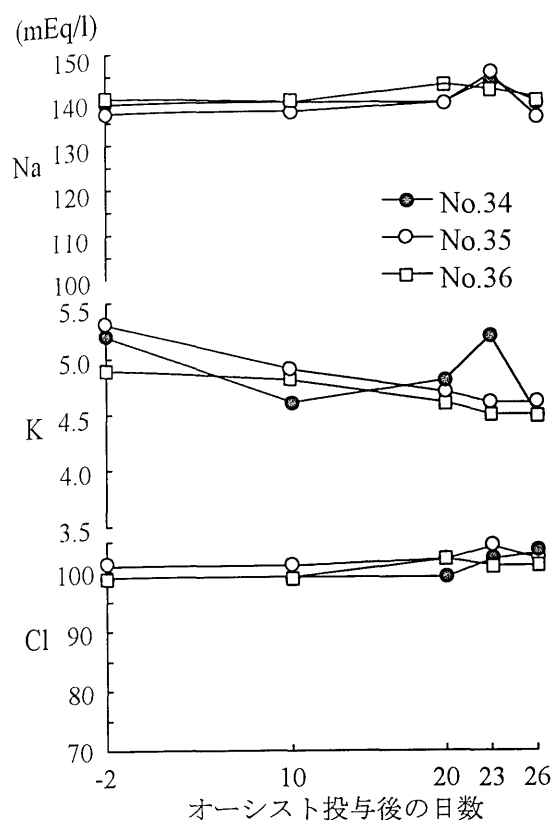


図 25-1 非感染個体における血清電解質組成の推移

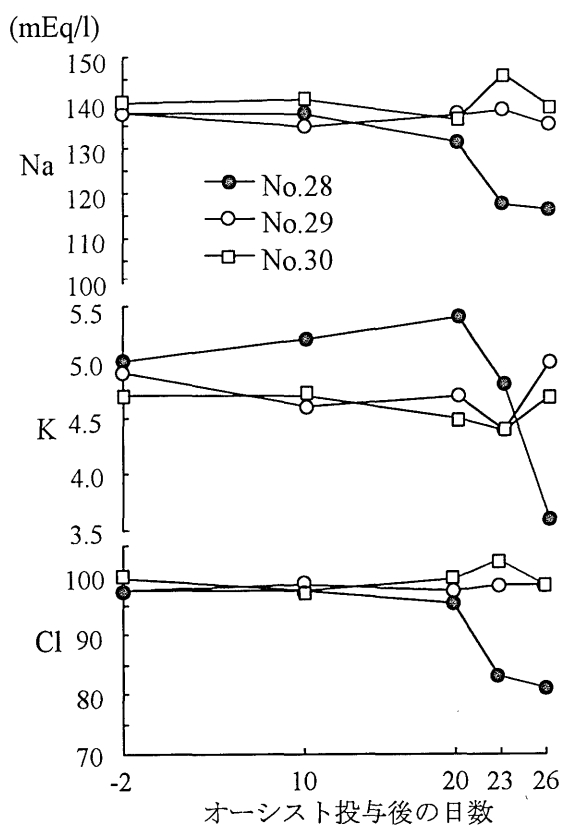


図 25-2 *E. bovis* 10⁵個投与個体における血清電解質組成の推移

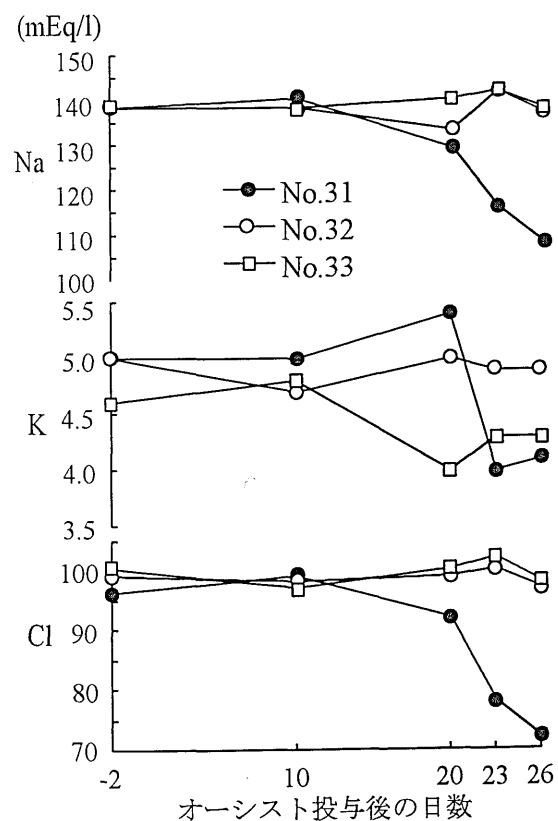


図 25-3 *E. bovis* 10⁶個投与個体における血清電解質組成の推移

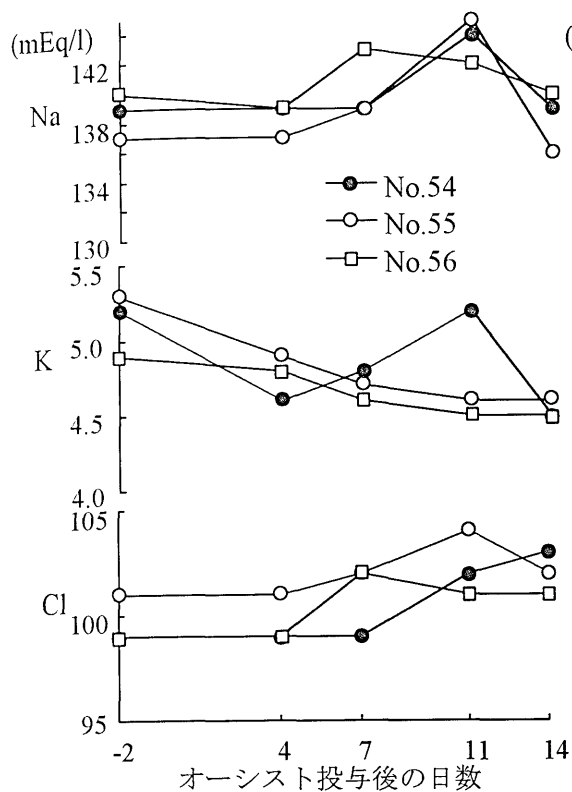


図 26-1 非感染個体における血清電解質組成の推移

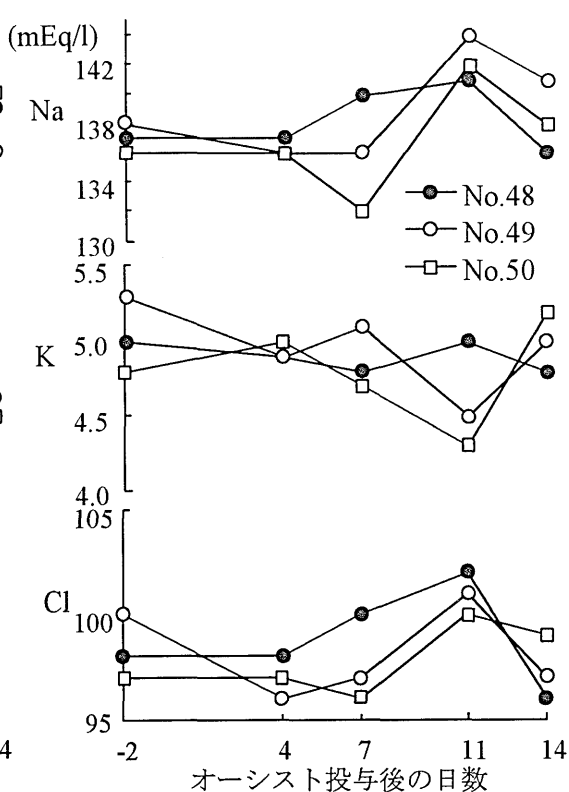


図 26-2 *E. alabamensis* 10⁷個投与個体における血清電解質組成の推移

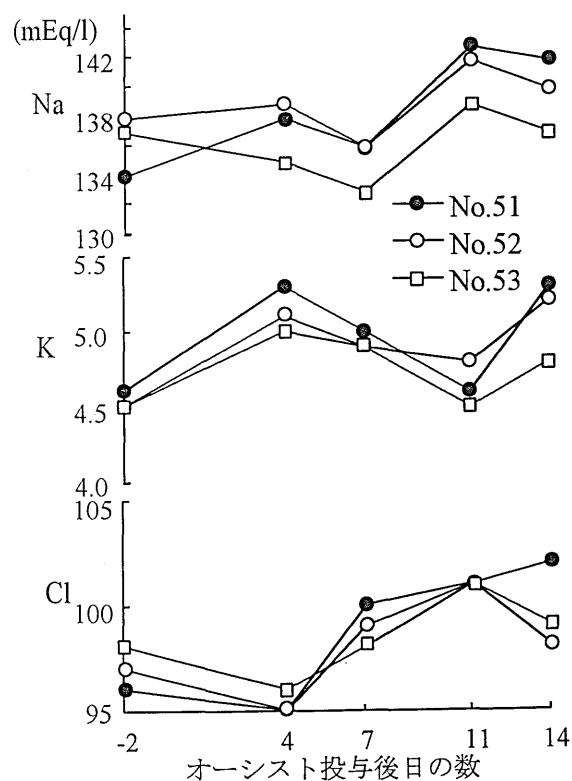


図 26-3 *E. alabamensis* 10⁸個投与個体における血清電解質組成の推移

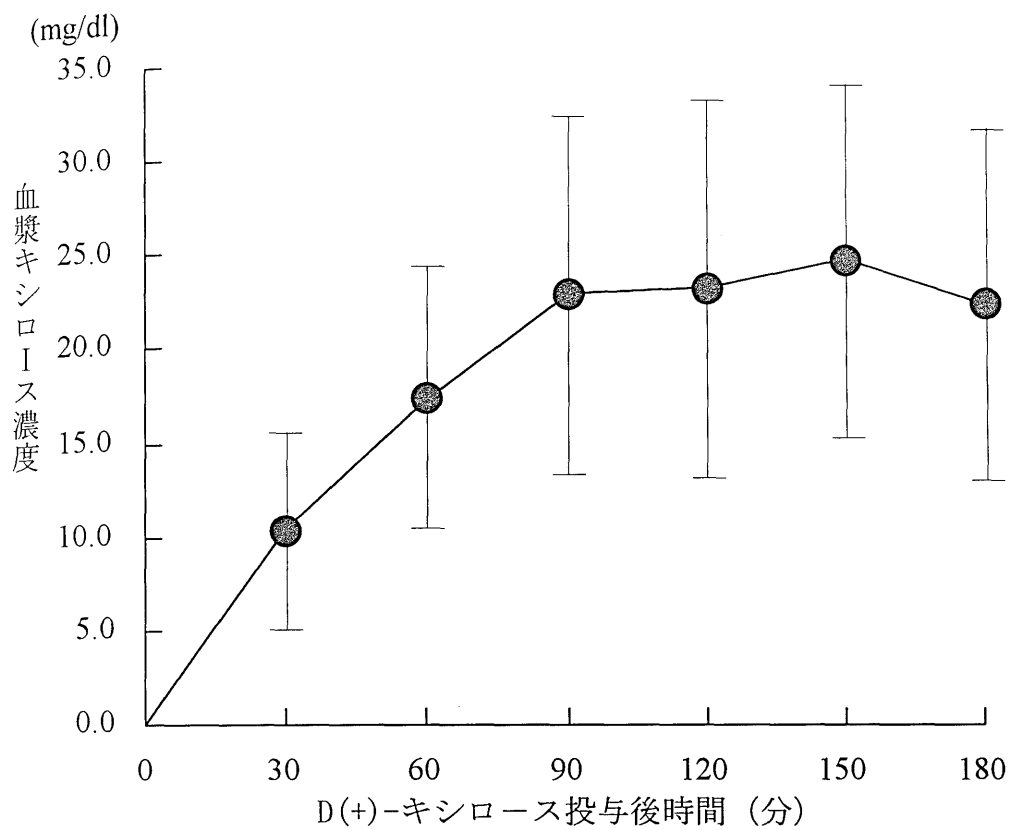


図 27 オーシスト投与前の 27 個体におけるキシロース吸引投与後の血漿濃度の時間推移
投与後各時点における平均濃度±SD

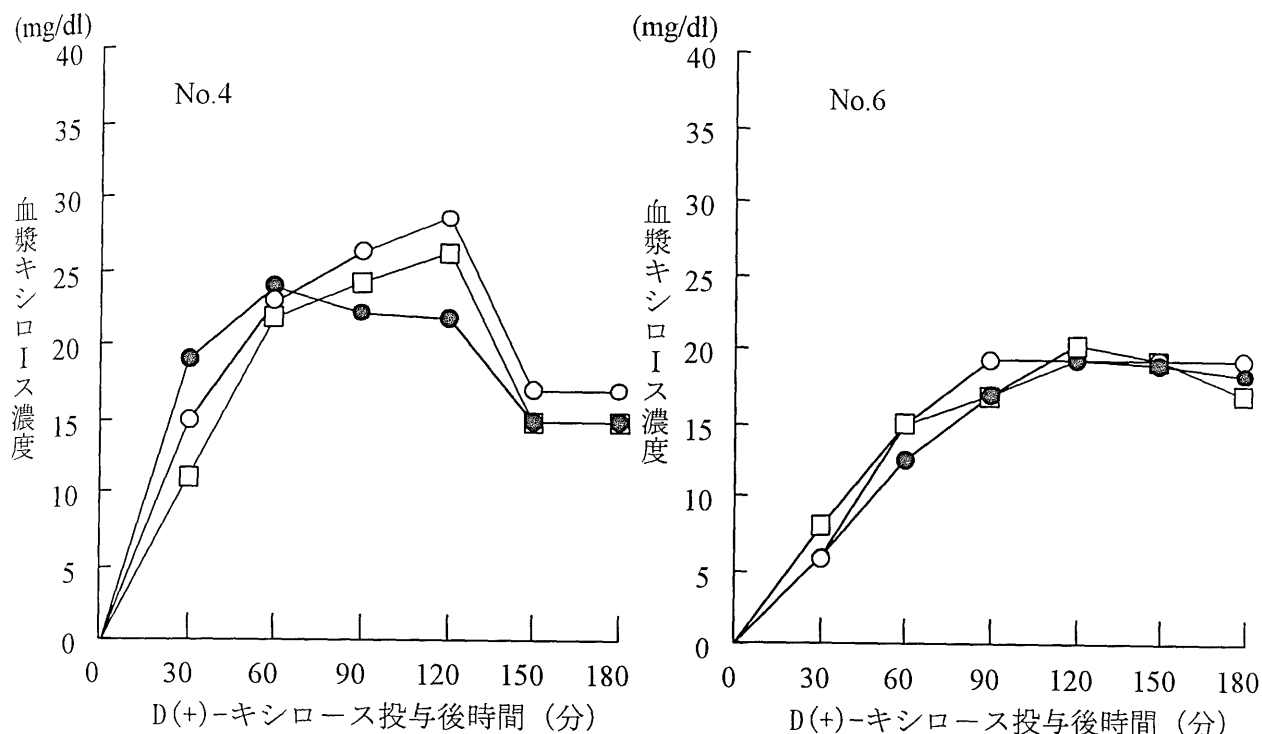


図 28 *E. wyoningensis* 感染による重度発症例(No.4, 6)におけるキシロース負荷試験
●, ○, □はそれぞれオーシスト投与前2, 投与後14および21日目

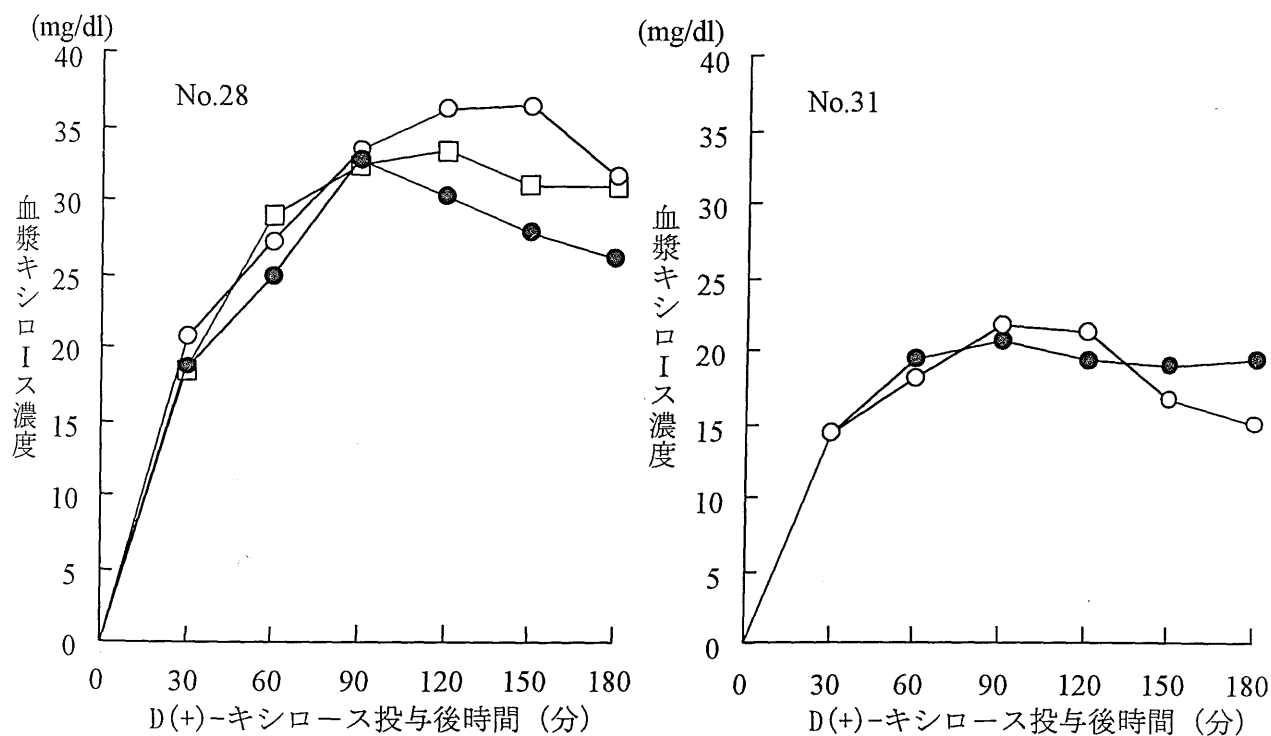


図 29 *E. bovis* 感染による重度発症例(No.28, 31)におけるキシロース負荷試験
●, ○, □はそれぞれオーシスト投与前2, 投与後20および26(No.30)日目

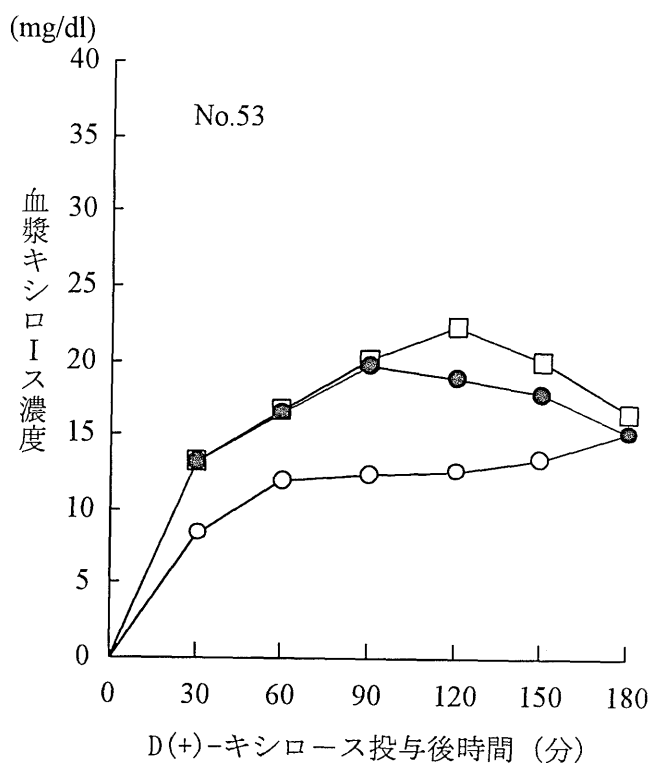
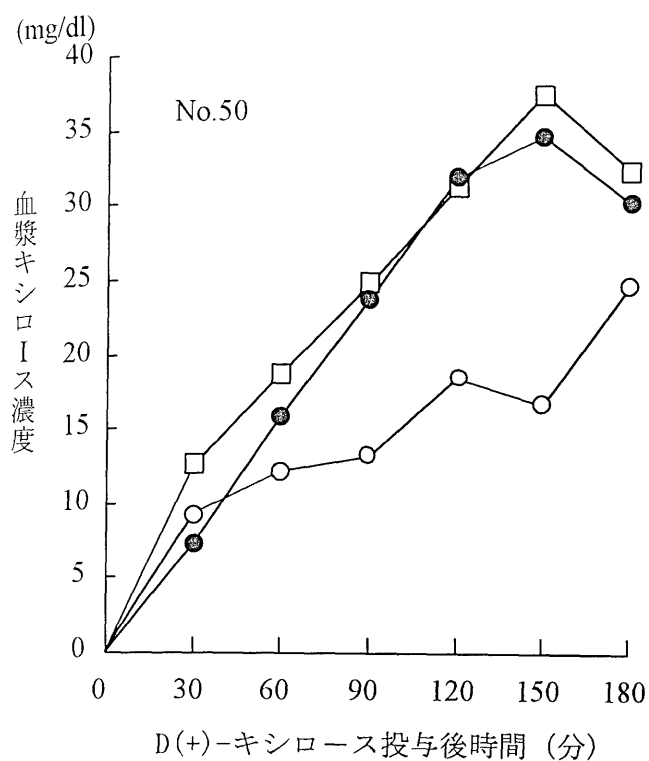


図 30-1 *E. alabamensis* 感染による重度発症例(No.50, 53)におけるキシロース負荷試験
●, ○, □はそれぞれオーシスト投与前2, 投与後4および7日目

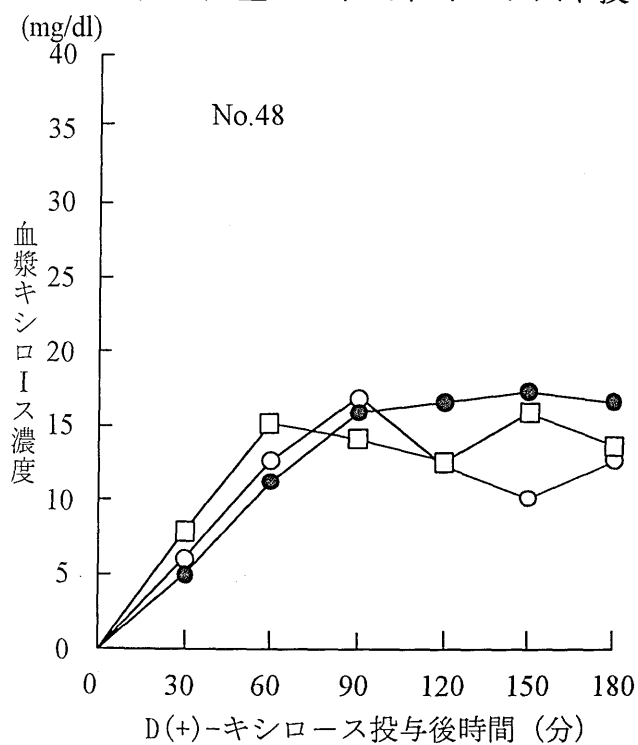


図 30-2 *E. alabamensis* 感染による軽度発症例(No.48)におけるキシロース負荷試験
●, ○, □はそれぞれオーシスト投与前2, 投与後4および7日目

写 真

写真説明

- 写真 1 *E. wyomingensis* の孢子形成オーシスト（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 2 *E. wyomingensis* の孢子形成オーシストをカバーガラス下で圧平したもの。オーシスト壁は黄褐色の外壁と無色の内壁の 2 層から構成される（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 3 *E. wyomingensis* の孢子形成オーシストを焦点をオーシスト壁に合わせて撮影したもの。外壁に小顆粒が付着する（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 4 *E. wyomingensis* の孢子形成オーシストの外壁に大型顆粒が密に付着したもの（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 5 パテント末期にみられた外層を欠くオーシスト（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 6 スポロシスト、内部残体を欠く（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 7 スポロシスト、内部残体が球形に凝集する（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 8 人工消化により脱殻したスポロゾイト、reflectile globule は長軸長の 1/2 以上に及ぶ（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 9-1 排泄直後のオーシスト、スポロントは凝集せずにオーシスト内腔の大部分を占める（傍線 = 10 μm ）。
- 写真 9-2 スポロントが凝集したオーシスト（培養開始 12 時間後、傍線 = 10 μm ）
- 写真 9-3 スポロントが凝集したオーシスト、内腔の両極に数個の refractile granule が出現する（培養開始 36 時間後、傍線 = 10 μm ）。

写真 9-4 スポロントが凝集したオーシスト、大形の顆粒が出現する（培養開始 39 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-5 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は大形化し、スポロント自体はさらに凝集する（培養開始 60 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-6 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は小さくなる（培養開始 72 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-7 スポロントが凝集したオーシスト、顆粒は再び大形化、外形はやや不整となる（培養開始 84 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-8 スポロントが凝集したオーシスト、輪郭明瞭のほぼ正球形となる（培養開始 84 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-9 スポロントの外形は不整となり、分裂を開始する（培養開始 84 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-10 スポロントが完全に 4 分したオーシスト（培養開始 84 時間後）。

写真 9-11 スポロブラストが多角形となり始めたオーシスト（培養開始 87 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-12 ピラミッドステージのオーシスト（培養開始 87 時間後，傍線 = 10 μm ）

写真 9-13 スポロブラストの鋭角部が丸みを帯び始めたオーシスト（培養開始 87 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-14 スポロブラストがほぼ球形となったオーシスト（培養開始 87 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-15 スポロブラストが楕円形となったオーシスト（培養開始 87 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-16 スポロシストの先端には Stieda body がみられ、中は 2 分して
スポロゾイトが形成されたオーシスト。sporozoite 内には数個
の refractile globule がみられる（培養開始 132 時間後，傍
線 = 10 μm ）。

写真 9-17 スポロゾイト内の顆粒構造および refractile globule が減少した
オーシスト（培養開始 132 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-18 スポロゾイト内の refractile globule が 2 個となったオーシスト
（培養開始 132 時間後，傍線 = 10 μm ）。

写真 9-19 2 個の refractile globule が融合し長楕円形となったスポロシス
ト（培養開始 132 時間後，傍線 = 10 μm ）。スポロシストは人
工脱殻させたもの。

写真 9-20 胞子形成の完了したオーシスト。スポロゾイト内の refractile
globule は鈍端部の 1 個となる（培養開始 132 時間後，傍線 = 10
 μm ）。

写真 10 空腸陰窩でみられた成熟初代シizont, 8 個のメロゾイトがみ
られる（矢印，オーシスト投与後 5 日目，HE 染色）。

写真 11 生鮮材料中の未成熟シizont（矢印，オーシスト投与後 7 日
目，傍線 = 10 μm ）

写真 12 未成熟シizont（矢印，オーシスト投与後 7 日目，ギムザ染色）

写真 13 生鮮材料中の成熟シizont, 4 個のメロゾイトがみられる（矢
印，オーシスト投与後 7 日目，傍線 = 10 μm ）。

写真 14 成熟シizont, 2 個のメロゾイトがみられる（矢印，オーシス
ト投与後 7 日目，ギムザ染色）。

写真 15 固有層細胞で発育中の未成熟シizont（矢印，オーシスト投与
後 7 日目，HE 染色）

- 写真 16 固有層細胞で発育中の成熟シizont, 2 個のメロゾイトがみられる (矢印, オーシスト投与後 7 日目, HE 染色)
- 写真 17 生鮮材料中の遊離初代メロゾイト (矢印, オーシスト投与後 7 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 18 遊離第 2 代メロゾイト (矢印, オーシスト投与後 7 日目, ギムザ染色)
- 写真 19 生鮮材料中の未成熟ガモント (矢印, オーシスト投与後 10 日目, 傍線 = 10 μm)
- 写真 20 固有層で発育中の未成熟ガモント (矢印, オーシスト投与後 10 日目, HE 染色)
- 写真 21 生鮮材料中の未成熟ミクロガモント (オーシスト投与後 12 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 22 生鮮材料中の未成熟ミクロガモント (矢印, オーシスト投与後 12 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 23 生鮮材料中の成熟ミクロガモント (矢印, オーシスト投与後 14 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 24 生鮮材料中の成熟マクロガモント (矢印, オーシスト投与後 14 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 25 生鮮材料中のチゴート (オーシスト投与後 14 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 26 生鮮材料中のチゴート (オーシスト投与後 14 日目, 傍線 = 10 μm)。
- 写真 27 生鮮材料中のオーシスト (オーシスト投与後 14 日目, 傍線 = 10 μm)。

- 写真 28 固有層で発育中の未成熟ミクロガモント。細胞質中に濃染する核が散在する（矢印，オーシスト投与後 12 日目，HE 染色）。
- 写真 29 固有層で発育中の未成熟ミクロガモント、隔壁様構造が出現する（矢印，オーシスト投与後 12 日目，HE 染色）。
- 写真 30 固有層で発育中の成熟ミクロガモント（矢印，オーシスト投与後 14 日目，HE 染色）。
- 写真 31 固有層で発育中の成熟マクロガモント（矢印，オーシスト投与後 12 日目，HE 染色）。
- 写真 32 固有層で発育中の成熟チゴート（矢印，オーシスト投与後 14 日目，HE 染色）。
- 写真 33 固有層で発育中のオーシスト（矢印，オーシスト投与後 14 日目，HE 染色）。
- 写真 34 固有層で発育中のガモント（オーシスト投与後 14 日目，PAS 染色）。チゴート（矢印）のみが陽性を示す。
- 写真 35 *E. wyomingensis* 感染による回腸後半部の病変。粘膜面に微細赤色点が散在する（オーシスト投与後 14 日目）
- 写真 36 *E. wyomingensis* 感染による空腸粘膜の絨毛の萎縮（オーシスト投与後 14 日目，HE 染色）。
- 写真 37 *E. bovis* 感染による結腸粘膜の病変。粘膜の肥厚，小赤色点が密在する（オーシスト投与後 20 日目）。
- 写真 38 *E. bovis* 感染による結腸粘膜の病変。粘膜の肥厚，小赤色点が密在する（オーシスト投与後 26 日目）。
- 写真 39 結腸陰窩で発育中の *E. bovis* の有性世代（オーシスト投与後 20 日目，HE 染色）。

- 写真 40 結腸粘膜で発育中の *E. bovis* の有性世代（オーシスト投与後 26 日目，HE 染色）。陰窩周囲を線維が囲む。
- 写真 41 *E. alabamensis* 感染による小腸後半部の病変。1mm 大の灰白色点が散在する（オーシスト投与後 7 日目）。
- 写真 42 *E. alabamensis* 感染による空腸粘膜の絨毛の萎縮（オーシスト投与後 7 日目）。
- 写真 43 回腸粘膜の絨毛上皮細胞の核内で発育中の *E. alabamensis* 虫体（オーシスト投与後 5 日目，HE 染色）
- 写真 44 回腸粘膜絨毛上皮細胞の核内で発育中の *E. alabamensis* 虫体（オーシスト投与後 7 日目，HE 染色）

写真 1



写真 2

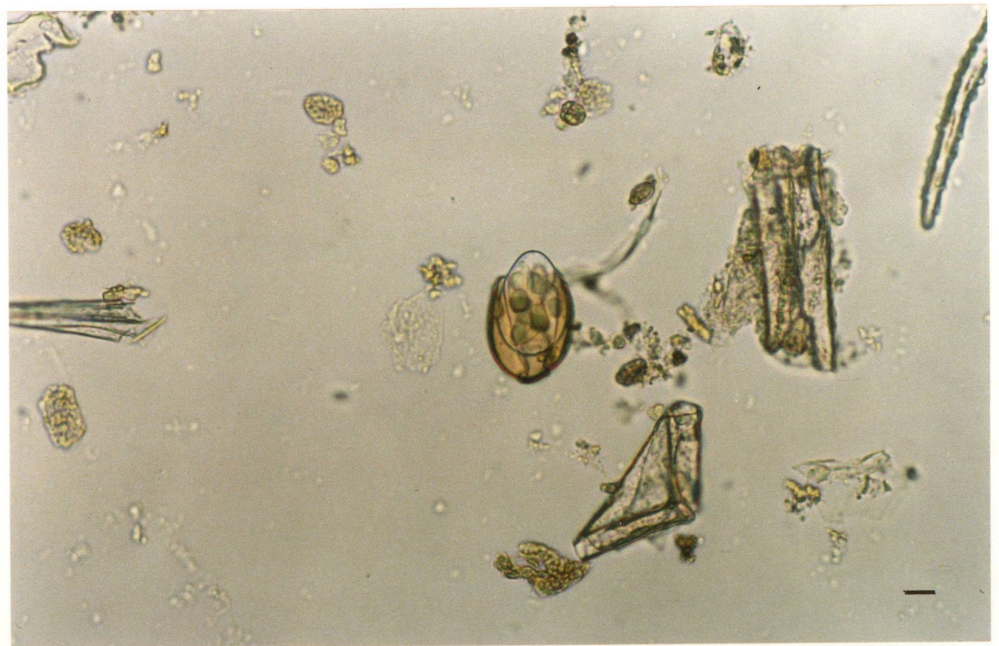


写真 3



写真 4



写真 5

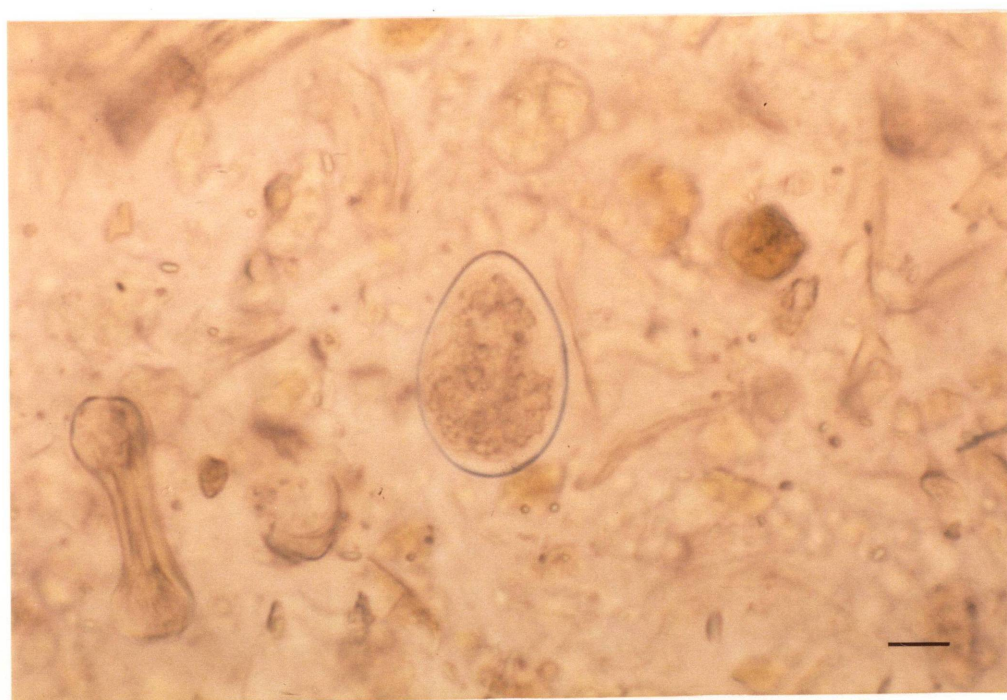


写真 6



写真 7



写真 8

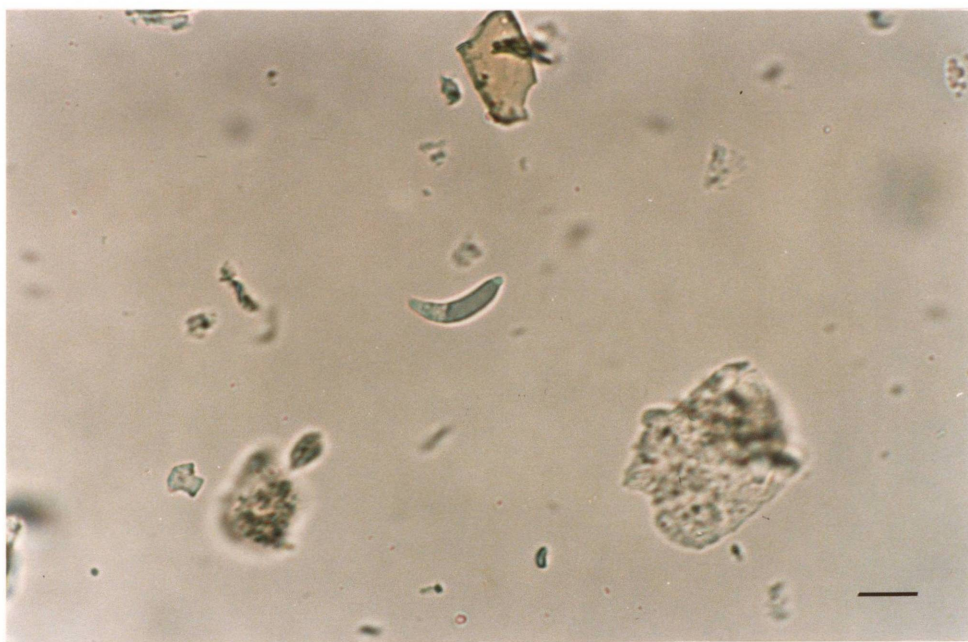


写真 9-1



写真 9-2



写真 9-3

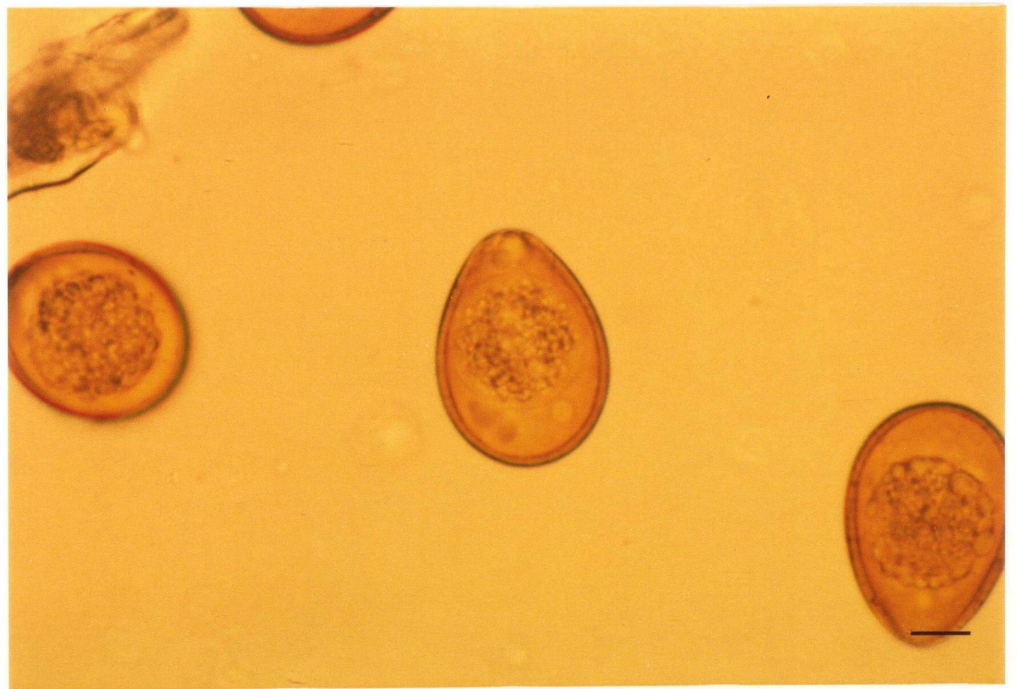


写真 9-4



写真 9-5



写真 9-6



写真 9-7



写真 9-8



写真 9-9



写真 9-10



写真 9-11



写真 9-12



写真 9-13



写真 9-14



写真 9-15



写真 9-16



写真 9-17



写真 9-18



写真 9-19



写真 9-20



写真 10

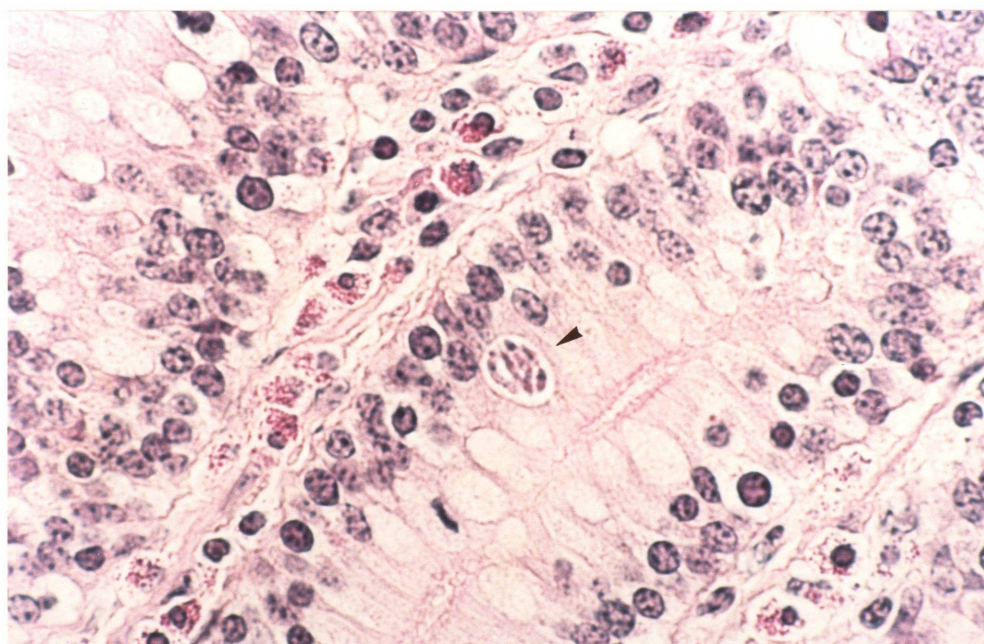


写真 11

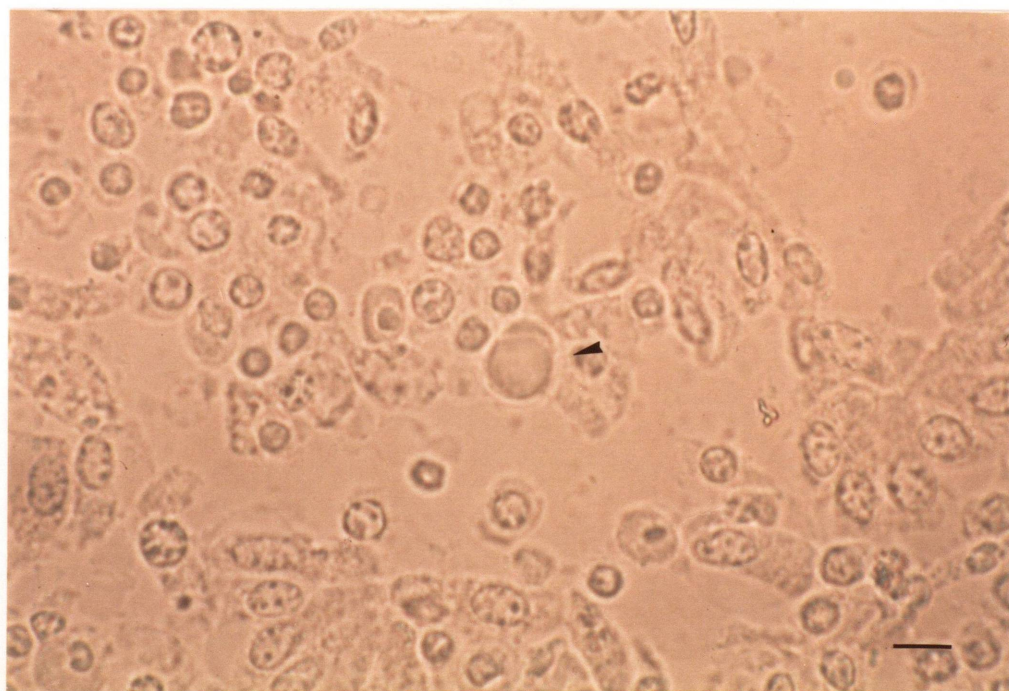


写真 12

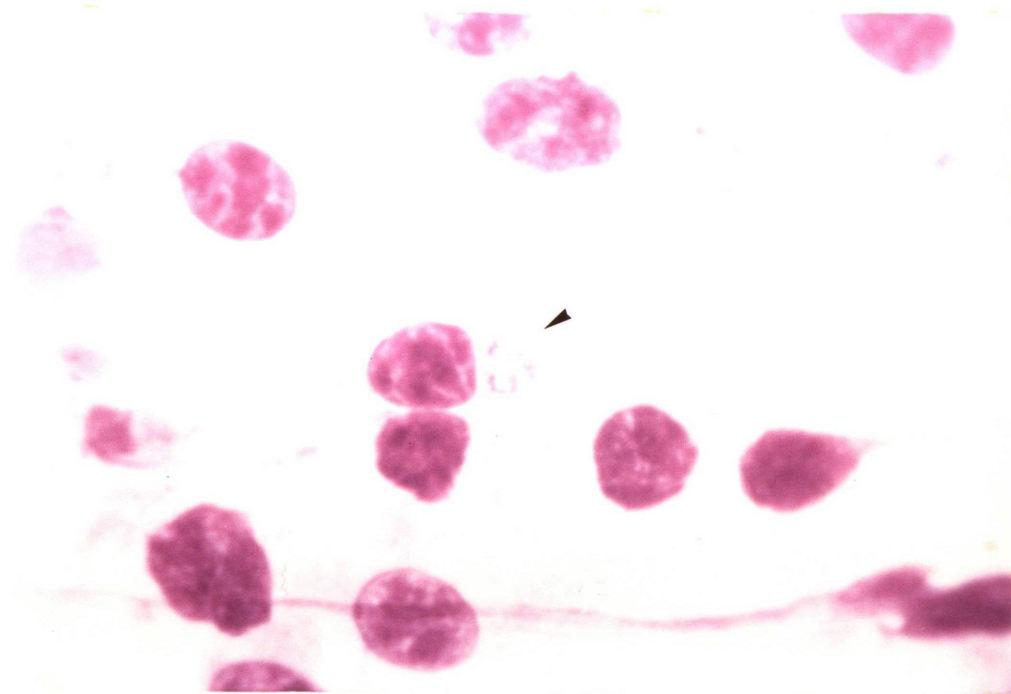


写真 13

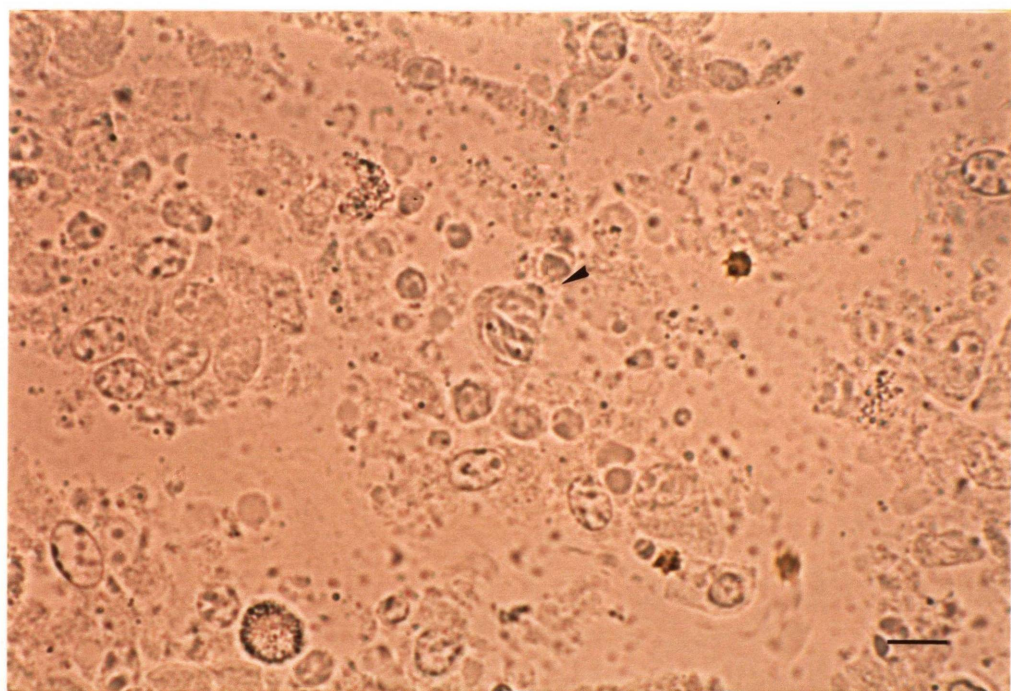


写真 14

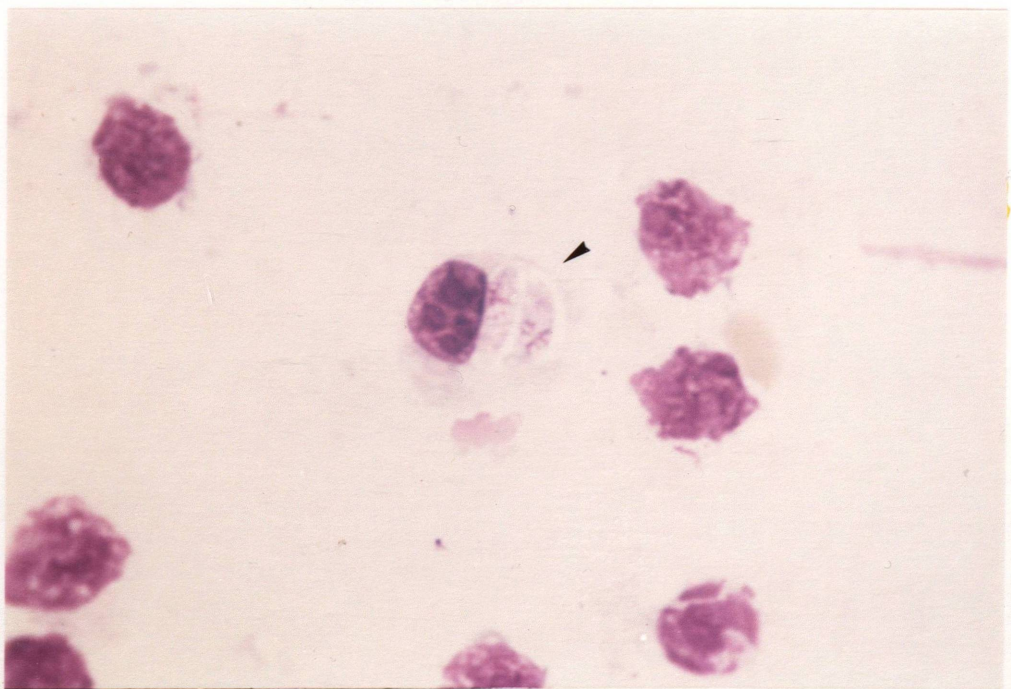


写真 15

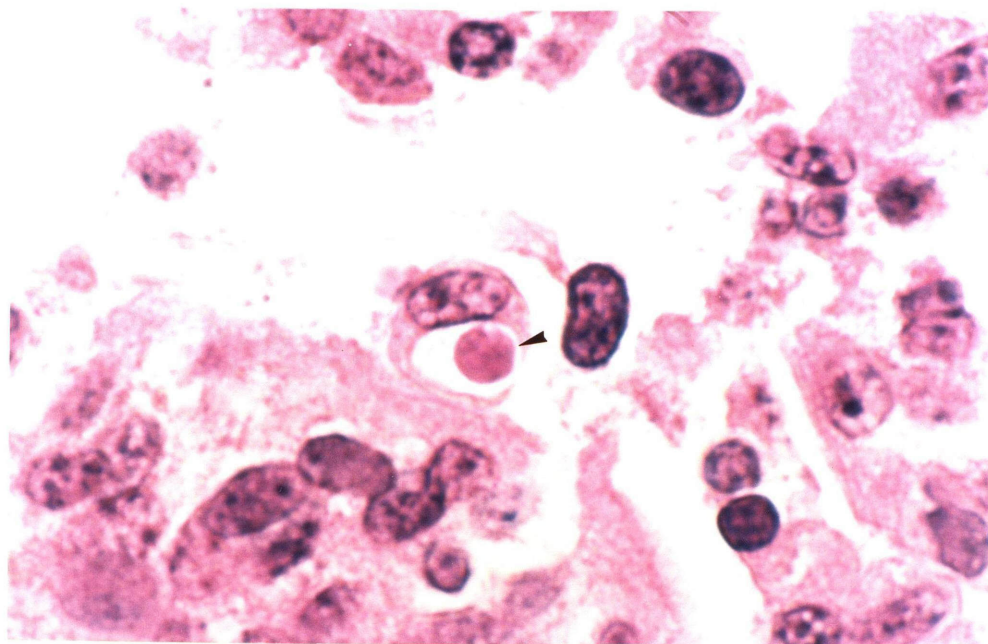


写真 16

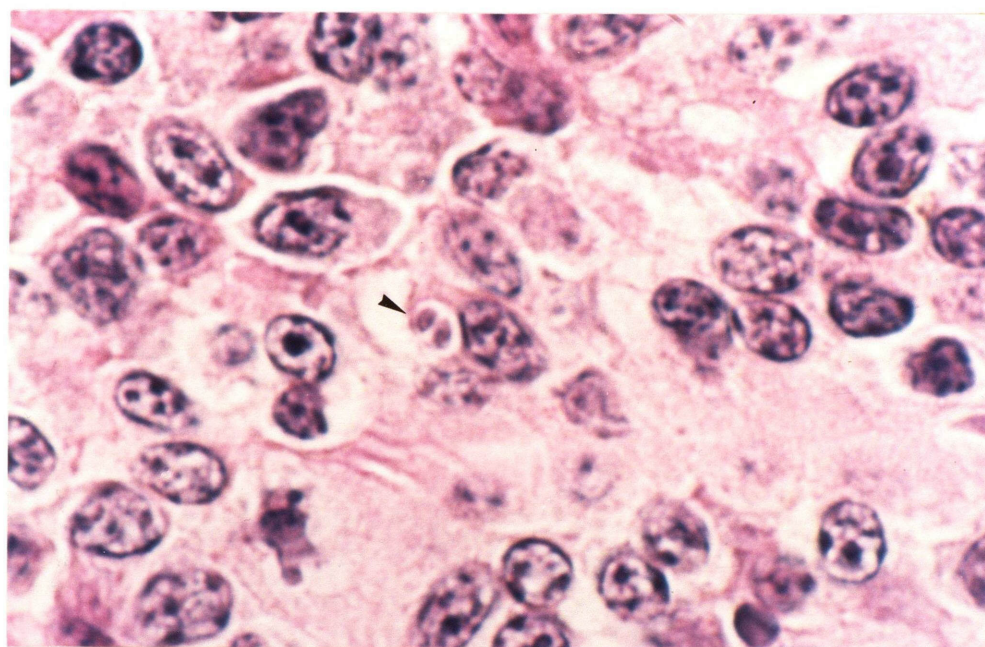


写真 17

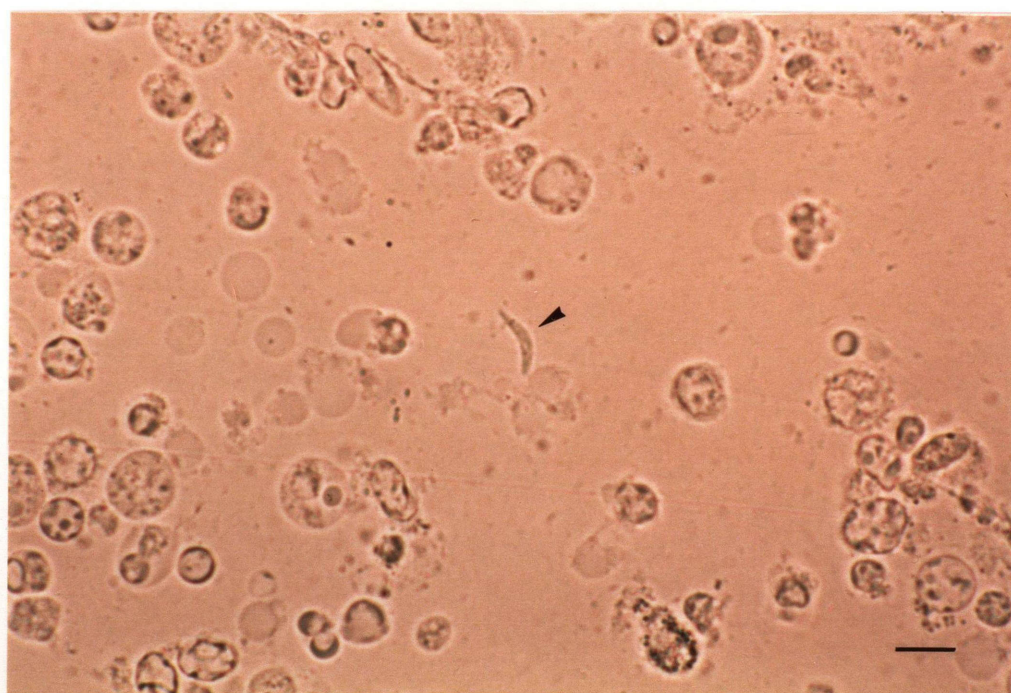


写真 18

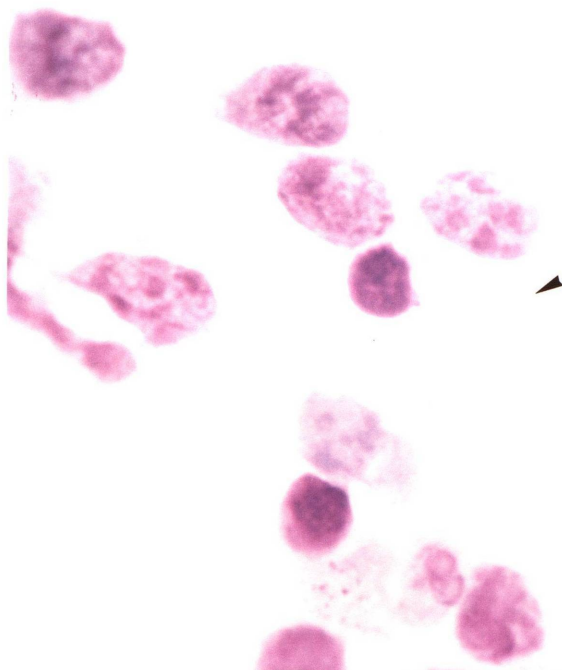


写真 19

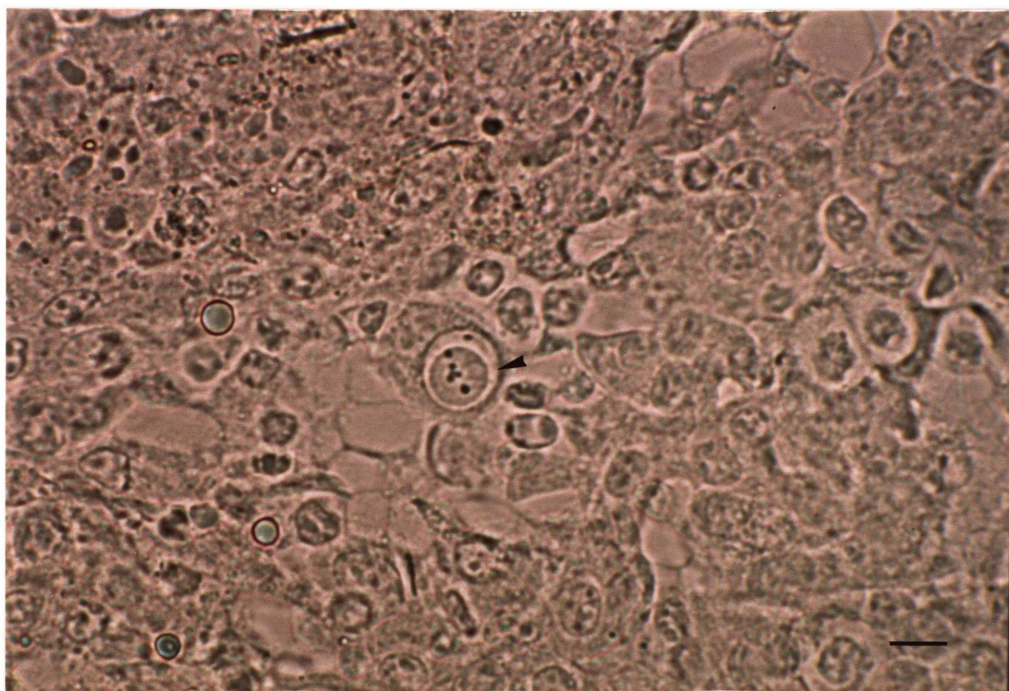


写真 20

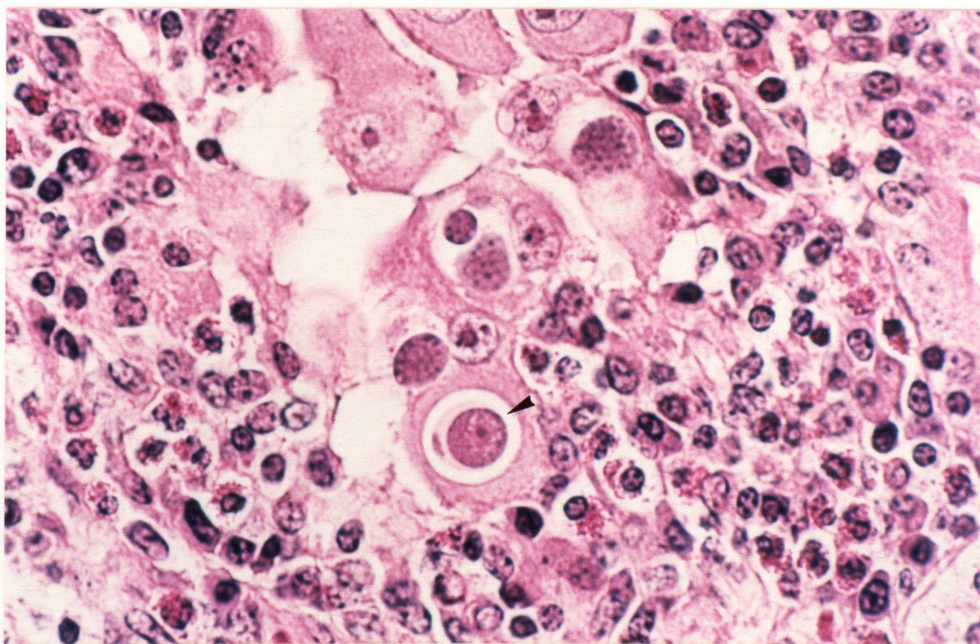


写真 21

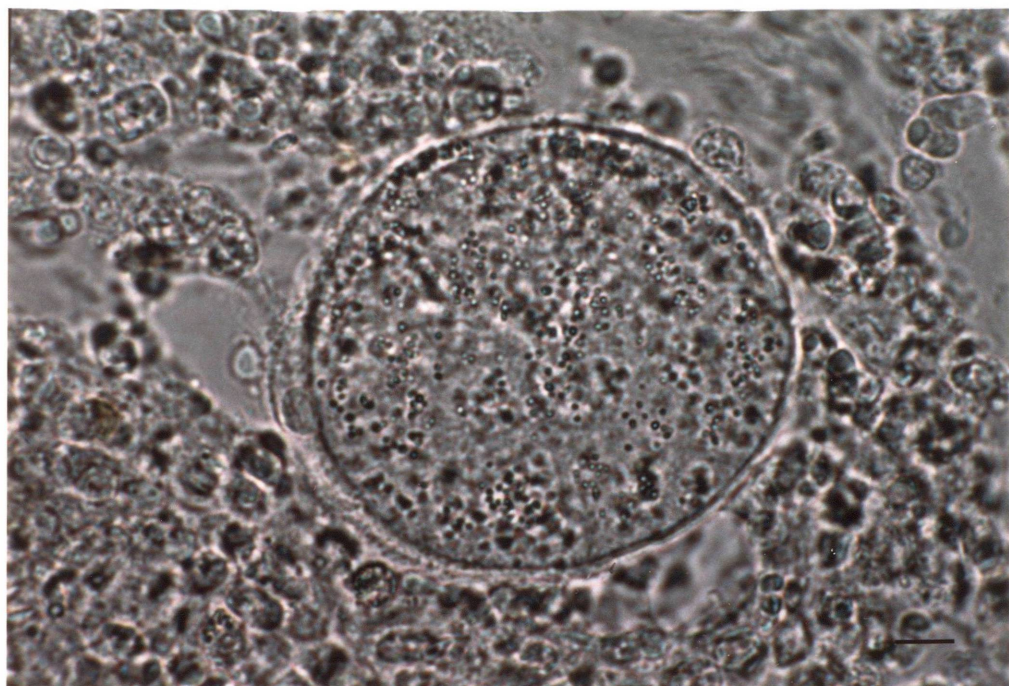


写真 22

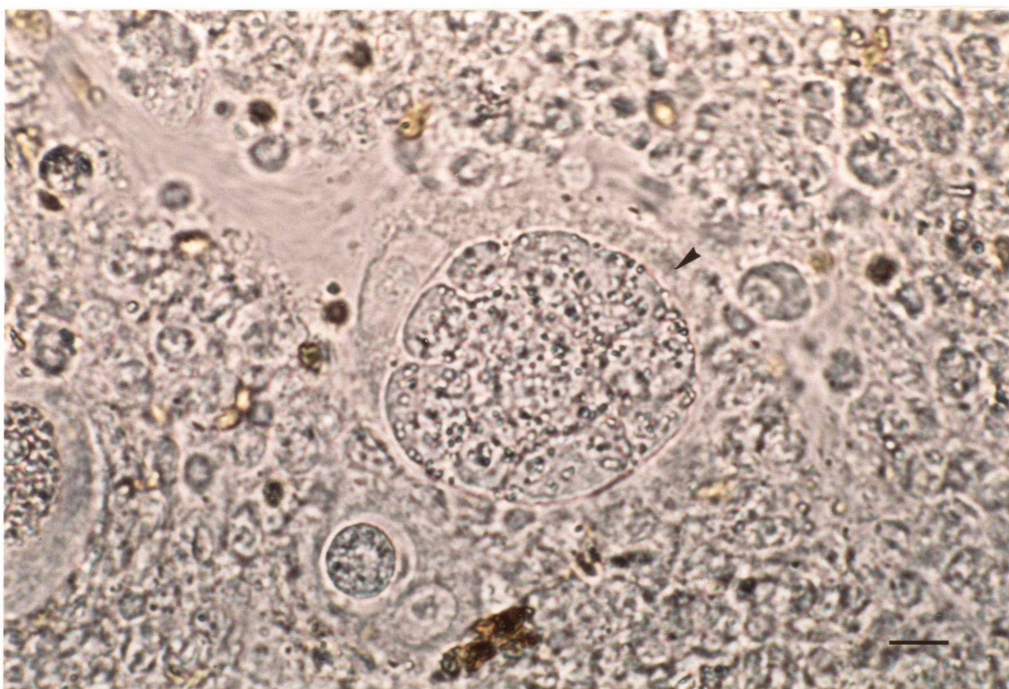


写真 23

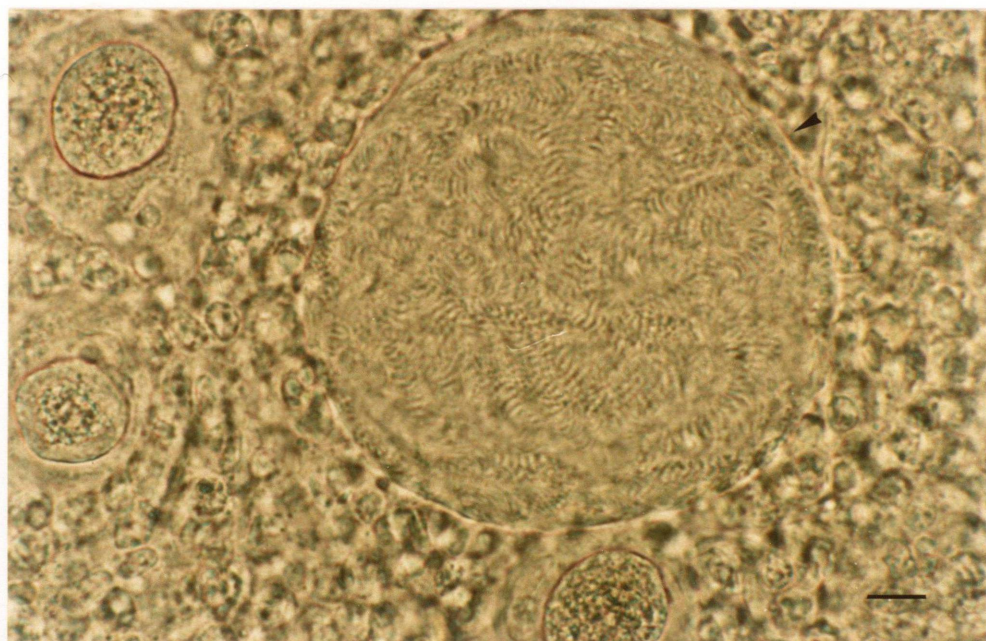


写真 24

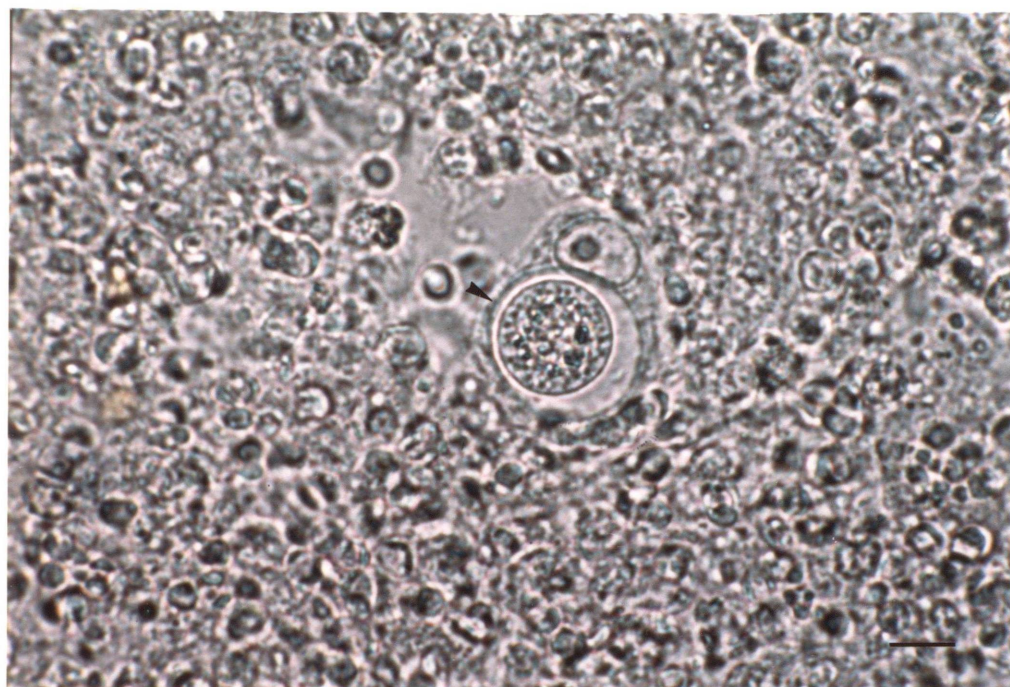


写真 25

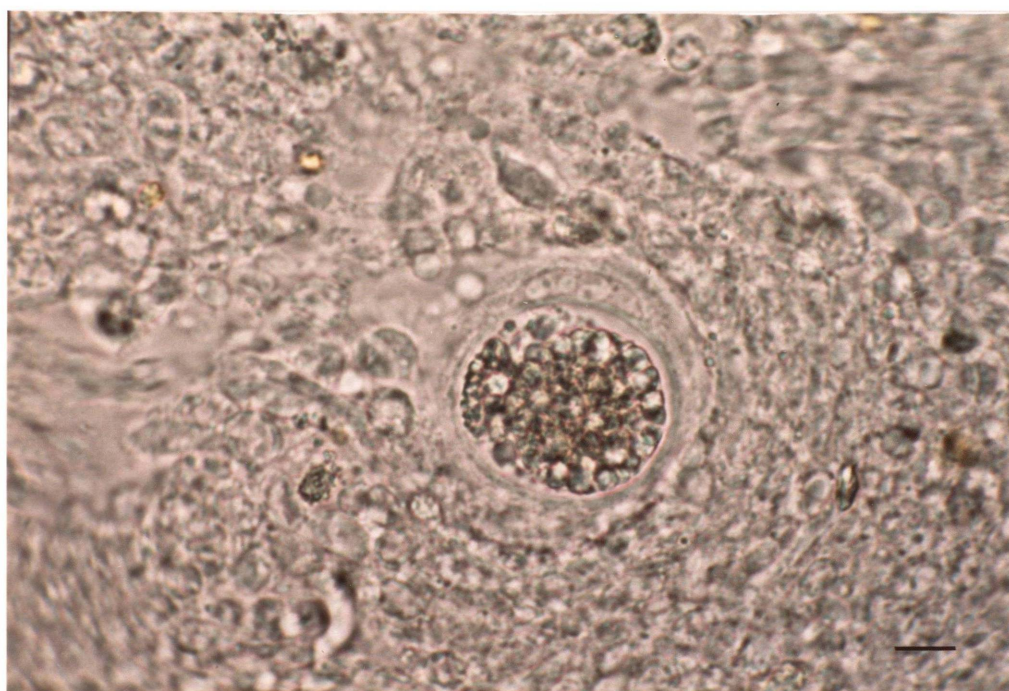


写真 26

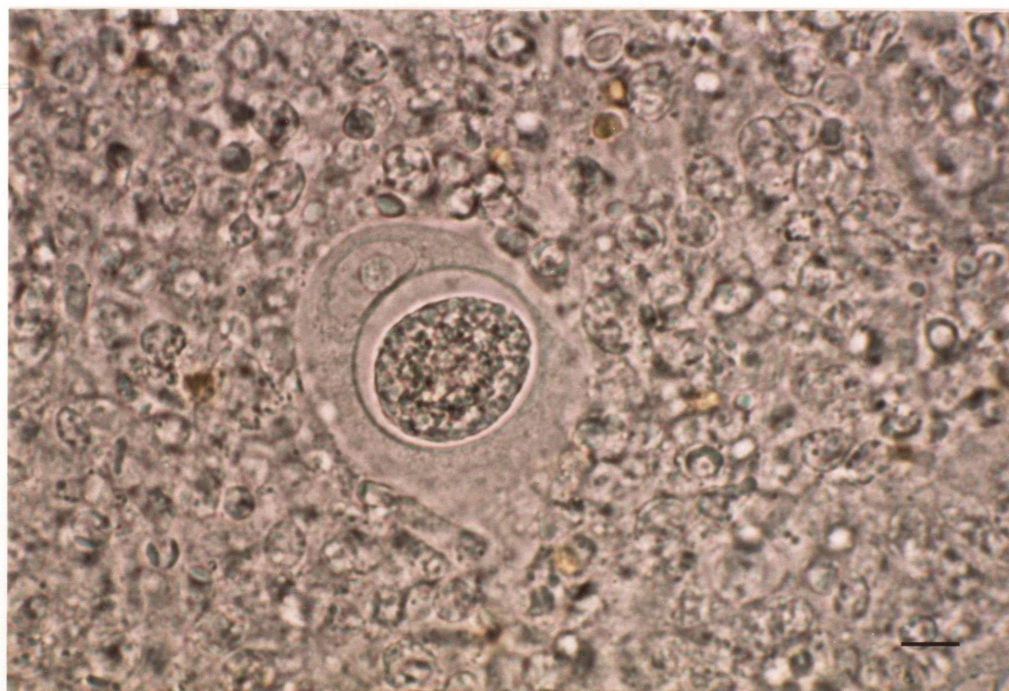


写真 27

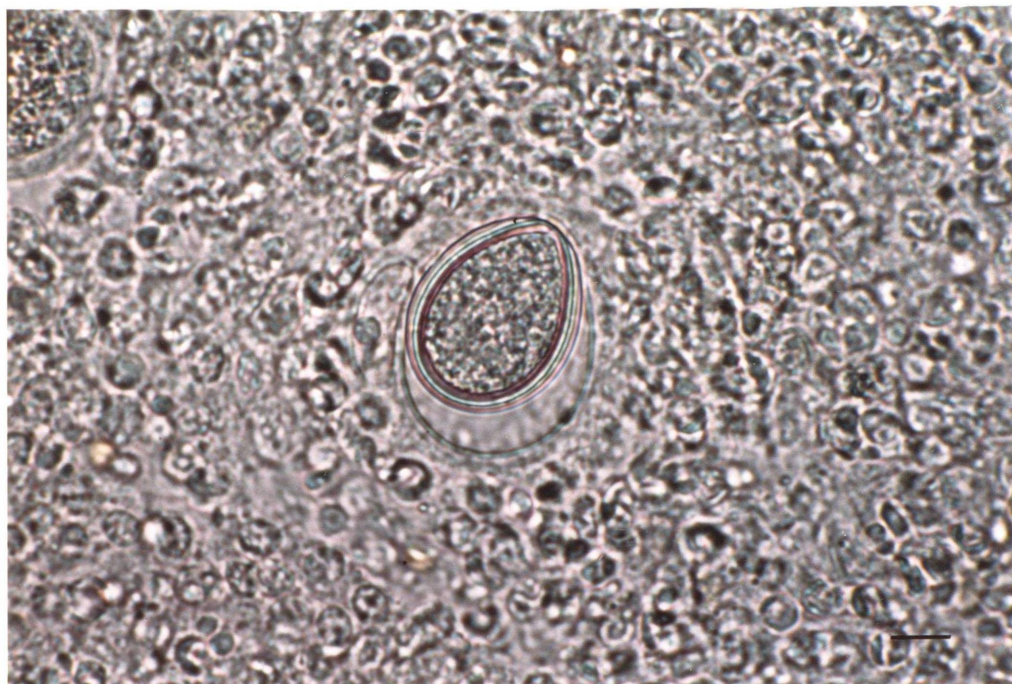


写真 28

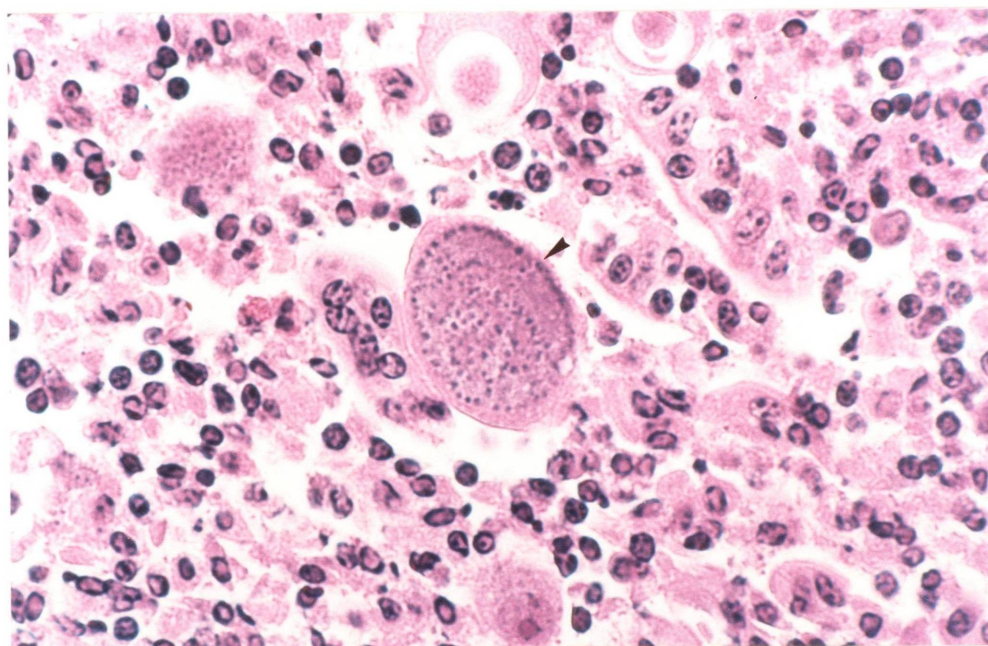


写真 29

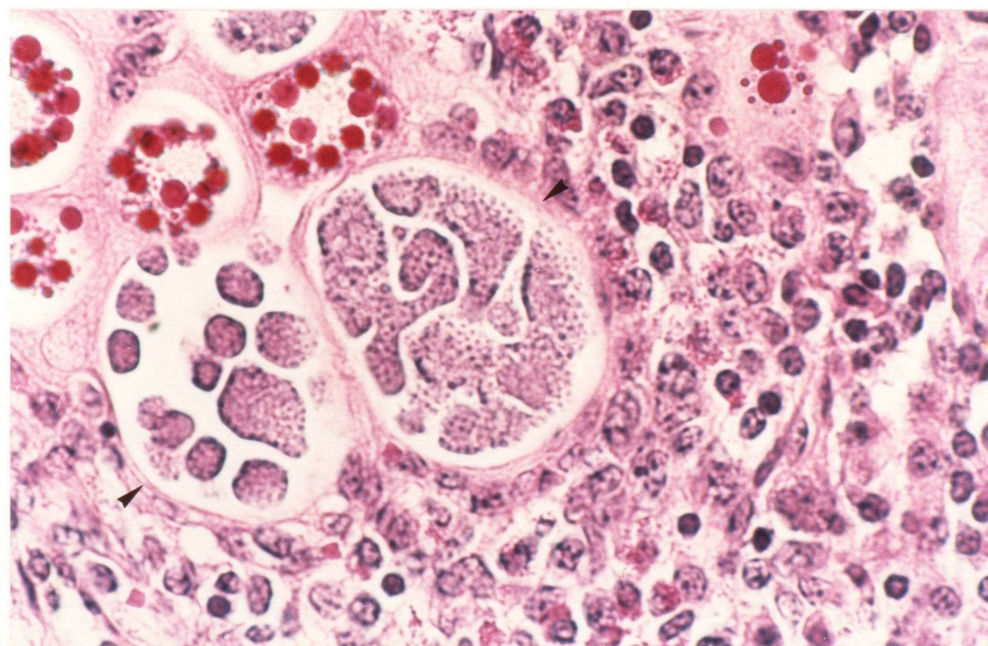


写真 30

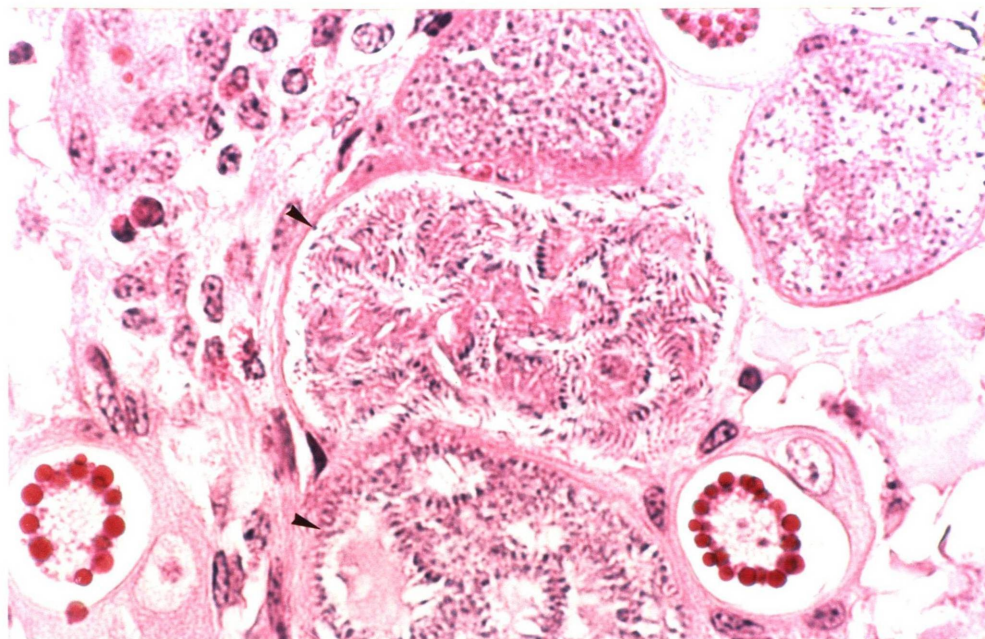


写真 31

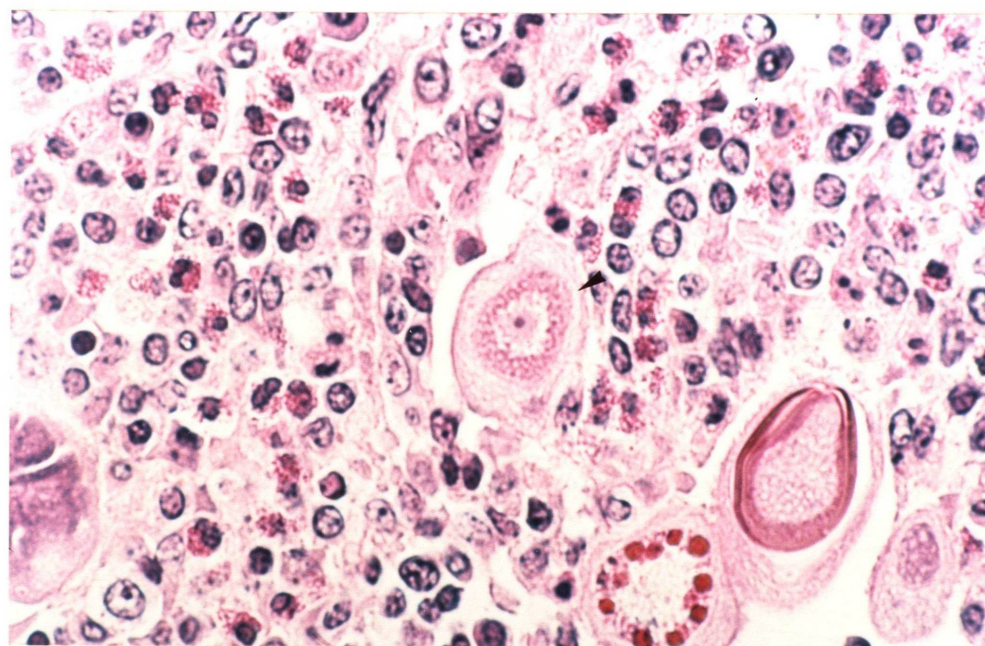


写真 32

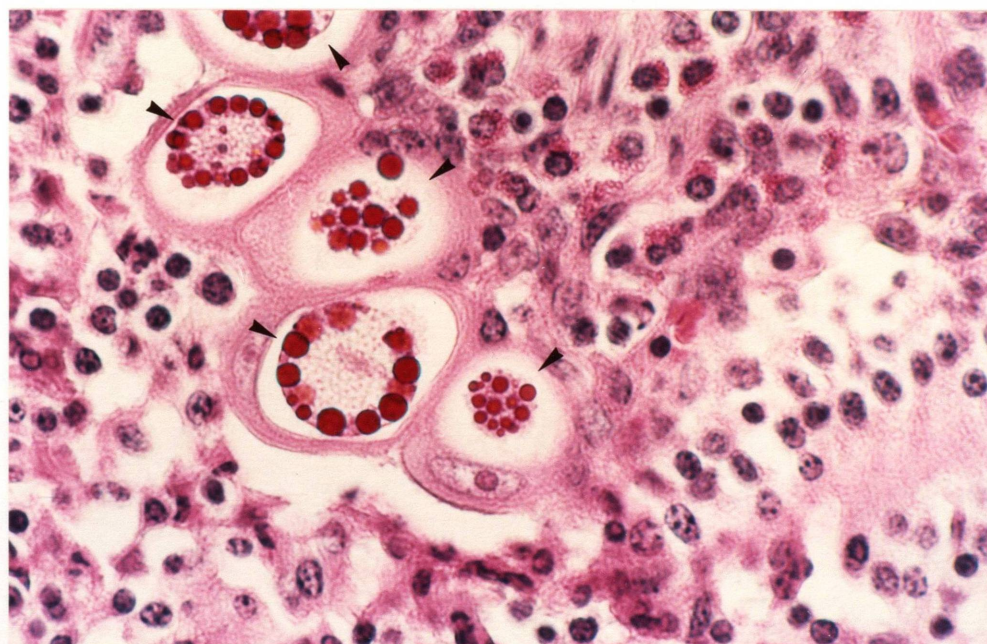


写真 33

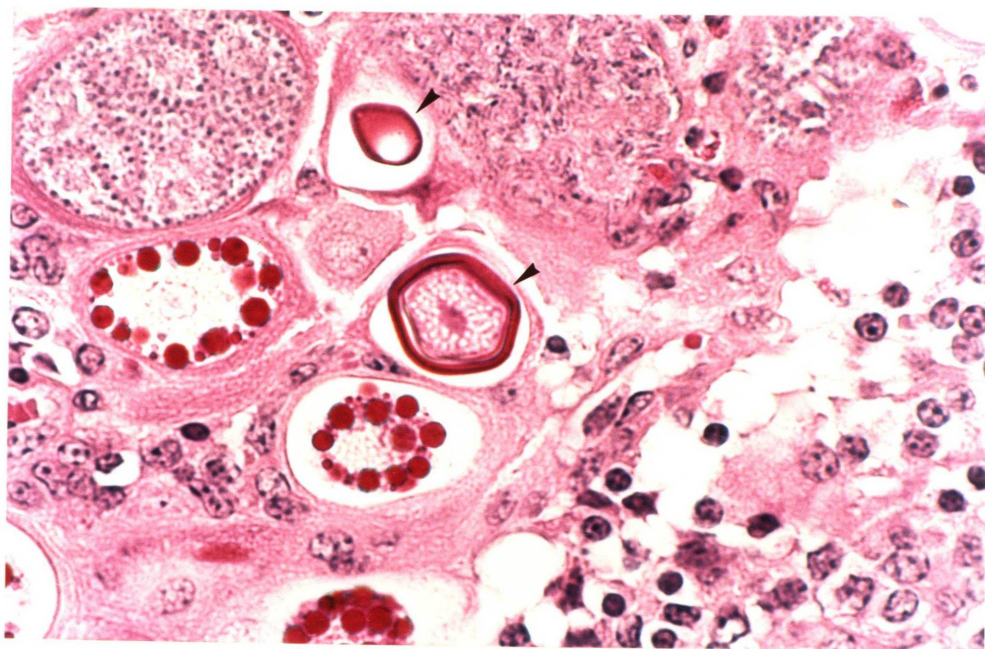


写真 34

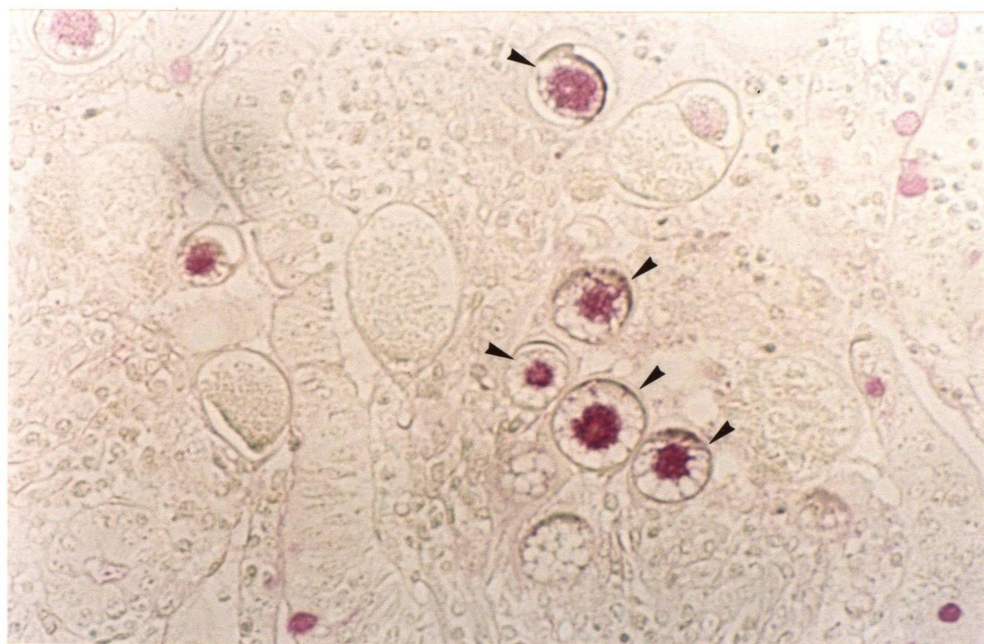


写真 35



写真 36

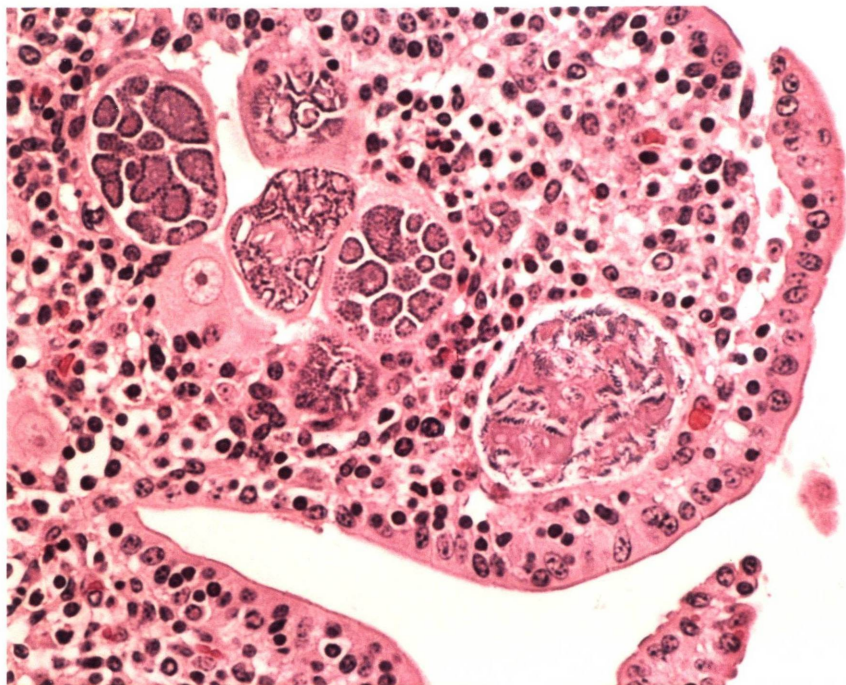


写真 37



写真 38

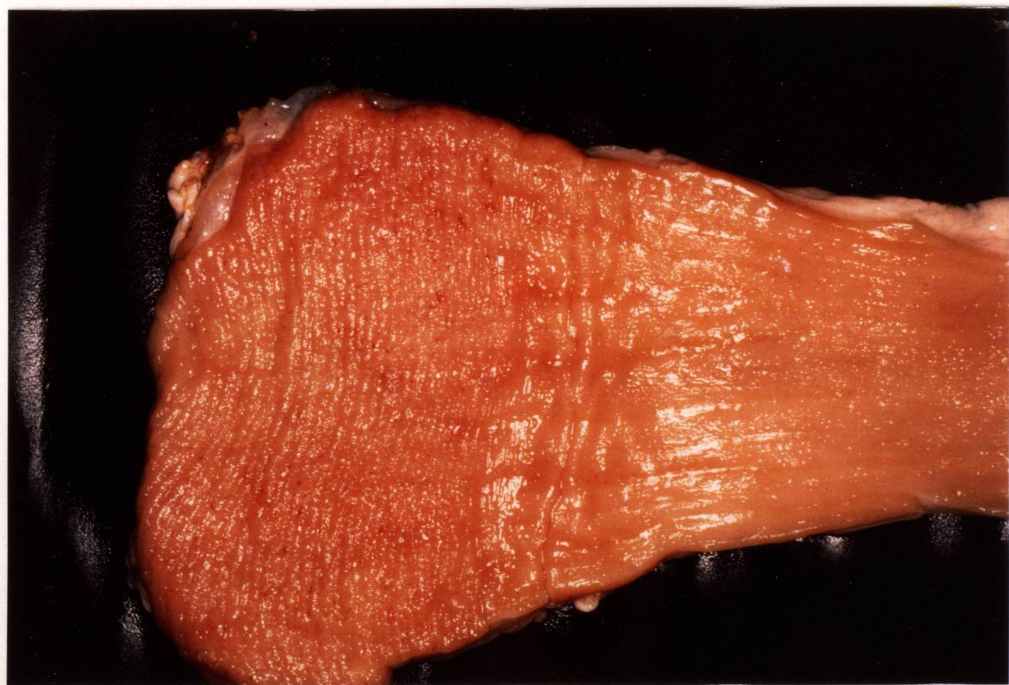


写真 39

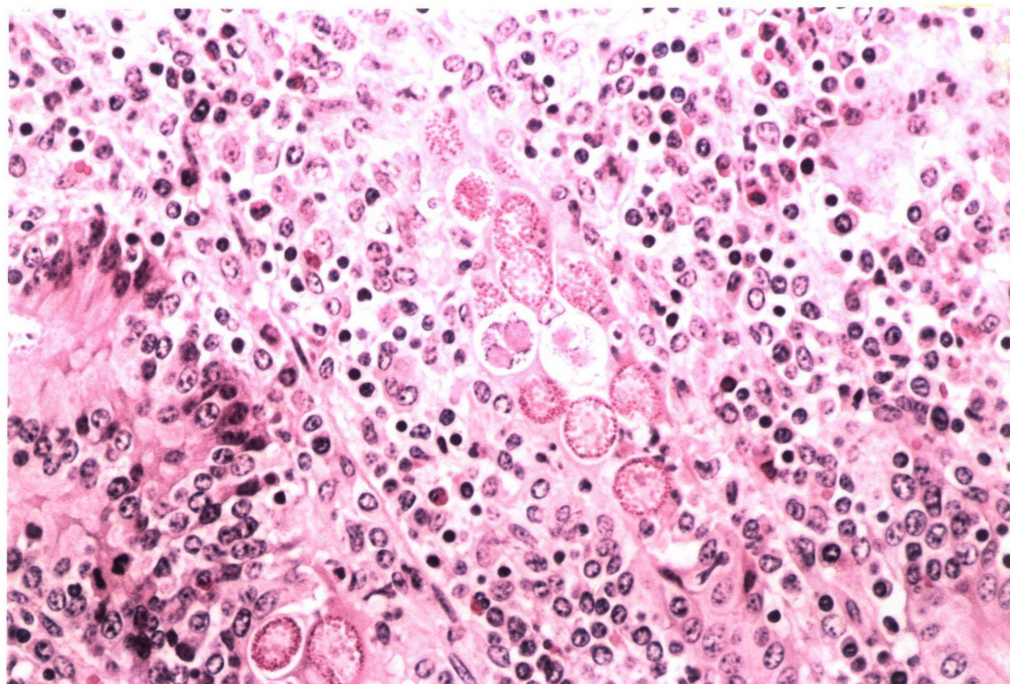


写真 40

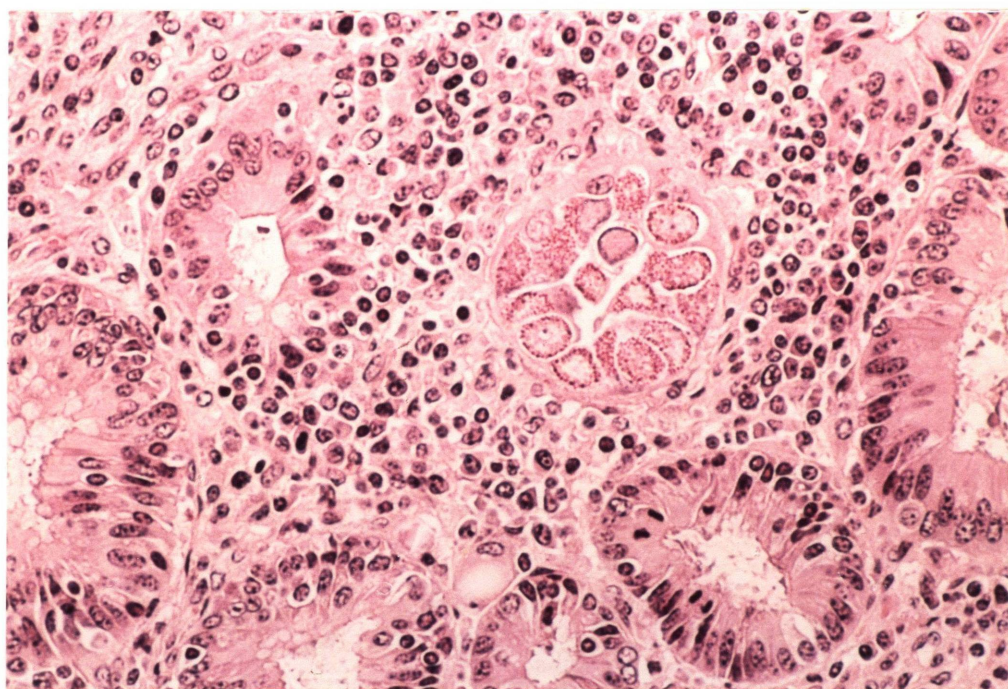


写真 41

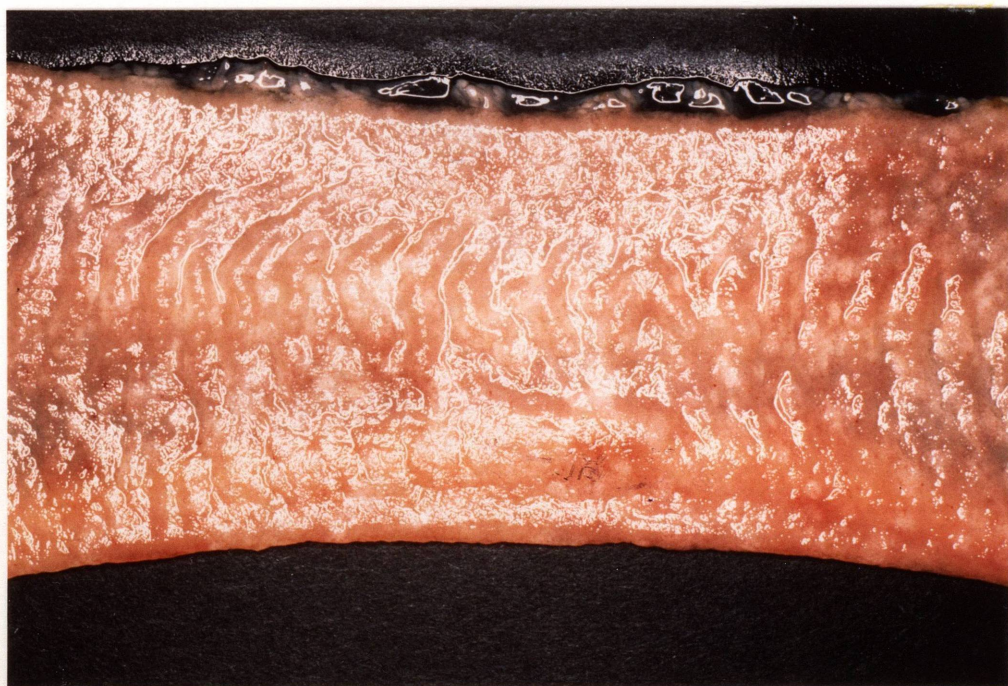


写真 42

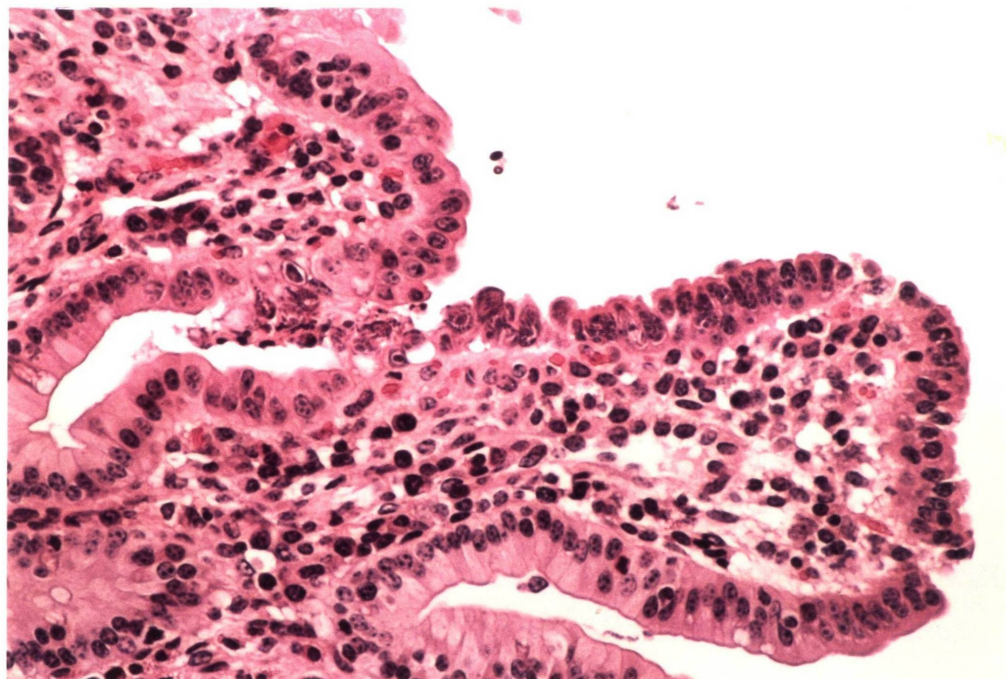


写真 43

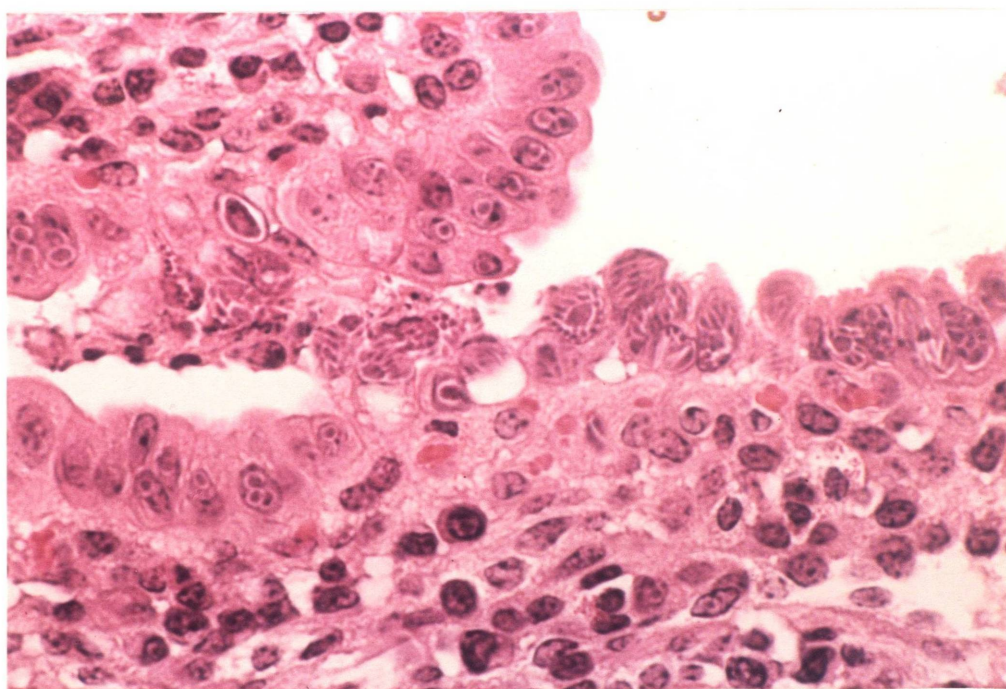


写真 44

