

氏名(本籍)	小田 憲 司 (広島県)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	乙第352号
学位授与の番号	学位規則第3号第2項該当
学位論文の要件	牛コクシジウム症感染モデル作出のための <i>Eimeria wyomingensis</i> に関する研究
論文審査委員	(主査) 板垣 博 (副査) 菅野 康 則 松浦 健 二

論文内容の要旨

牛のコクシジウムは、世界各地に広く分布し、牛下痢症の最も重要な原因の一つとして知られている。牛コクシジウム症の予防剤として、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。しかし、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から、薬効評価法について十分に検討されていない。従って、牛コクシジウム症の予防・治療剤の開発においては、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。

我が国の野外自然感染牛から分離された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、本種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。本研究では、薬効評価モデルとしての *E. wyomingensis* の有用性を検討するため、オーシストの形態学的特徴、宿主体外および体内における発育、病原性およびその評価法について検討した。

1. 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合計1015頭の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。

コクシジウムのオーシストは59.0%の牛から11種が検出された。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%と低かった。従って、本種を用いた人工感染実験の場合、同種の自然感染による汚染が生じにくいことが考えられ、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。

2. *E. wyomingensis* (岡山株) の由来と生物学的性状

本研究で用いた *E. wyomingensis* 株は、1985年11月に岡山県下の農場で飼育されていた8か月齢雌の育成牛の糞便中から回収されたものである。*E. wyomingensis* の生物学的性状を明らかにするため、

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。

オーシストは、卵円形で、オーシスト壁は黄褐色の外層と無色の内層で構成される。オーシストの鋭端部にマイクロバイルが認められるが、マイクロバイルキャップ、外部残体および極顆粒は認められない。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 $23.7\sim 33.1\mu\text{m}$ ($28.9\pm 1.2\mu\text{m}$)、短軸長(Y)に対する長軸長(X)の回帰式は $Y=0.12X+24.13$ であった。スポロシストは長楕円形で一端に明瞭な Stieda body が認められる。内部残体は欠くものが多い。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。スポロゾイトは長紡錘形で、内部には1個の大きな refractile globule を認める。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 $2.5\sim 5.6\mu\text{m}$ ($4.1\pm 0.6\mu\text{m}$) であった。

E. wyomingensis の新鮮孢子未形成オーシストを、2%重クロム酸カリウム溶液に浮遊させ29°Cで振盪培養した。スポロントの凝集は12時間後までにほぼ完了した。分裂開始像は81時間後、スポロシストの形成は90時間後からみられた。孢子形成の完了は141時間後からみられ、234時間後には最大値に達した。孢子形成時間の決定には、孢子形成完了オーシストの出現頻度のアークサイン変換値と経過時間の回帰式の応用が有効と考えられ、これから算出された50%孢子形成時間は191時間であった。

コクシジウムの自然感染を防止して飼育した離乳後1~4週の子牛合計23頭に、*E. wyomingensis* オーシスト $10^6\sim 2\times 10^6$ 個を投与した。これらを経時的に剖検し、腸管の生鮮材料および染色標本(HE, PAS, ギムザ染色)の観察を行った。*E. wyomingensis* は少なくとも2代の無性生殖を経た後、有性世代に移行し、初代シズントは腸陰窩上皮細胞、第二代シズ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。第二代シズントが平均 $7.4\times 8.6\mu\text{m}$ と小形であること、有性世代のミクロガモントは平均 $78.0\times 98.8\mu\text{m}$ と非常に大形であることが本種の特徴と考えられた。

1ないし2か月齢の子牛合計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のプリバテントピリオドは14~15日 (14.2 ± 0.4 日)、バテントピリオドは4~10日 (6.4 ± 1.9 日)であった。

以上、*E. wyomingensis* の生物学的諸性状を詳細に観察した結果、他種の牛コクシジウム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。

3. *E. wyomingensis* の病原性とその評価

E. wyomingensis の病原性を、強病原性とされる *E. bovis*、低病原性とされる *E. alabamensis* および *E. subspherica* を対照とし、これらを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、餌料摂取量、便潜血反応、臨床病理学的所見、キシロース吸収脳および病理学的所見について観察を行った。

離乳後1ないし2週の子牛に *E. wyomingensis* のオーシスト 10^5 、 10^6 、 10^7 個を投与したところ、全例で感染が成立し、14~15日目には水様性下痢がみられた。 10^5 個投与の個体で下痢の程度がやや軽かったほか、発症の程度に個体間でばらつきはみられなかった。 10^5 、 10^6 および 10^7 個を投与した個体を14日目に剖検したところ、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と消化管内

容の水様化がみられ、組織学的には空腸および回腸における絨毛の萎縮、腺窩内壊死塊の存在が認められた。

一方、*E. bovis* では 10^6 個の投与で出血性の下痢がみられ、*E. alabamensis* では 10^7 個の投与で水様性下痢がみられたが、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出すことはできなかった。また、*E. subspherica* では、 10^7 個の投与によって糞便性状等の変化はみられなかった。

野外での感染様式に近いと考えられる反復投与による病原性を単回投与によるものと比較するため、*E. wyomingensis* オースト 10^6 個単回、 2×10^5 または 2×10^6 個を5回反復投与したところ、いずれの場合も水様性下痢便の排泄がみられ、その程度にオースト投与法や投与数による差はなかった。しかし、下痢便の持続期間は、 10^6 個の単回および 2×10^6 個の5回反復投与で著差はなく、 2×10^5 個の5回反復投与で短くなる傾向がみられ、感染の程度は初回オースト投与数に依存することが示唆された。

E. wyomingensis, *E. bovis* および *E. alabamensis* 感染時とも、臨床症状の発現時に一致して増体量、餌料摂取量の低下がみられた。また、ほとんどの場合オースト排泄数は臨床症状の程度に比例して増加した。臨床病理学的検査においては、*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の減少がみられた。*E. alabamensis* 感染子牛では、下痢の発現時にキシロース吸収能の明らかな低下がみられたが、*E. wyomingensis* および *E. bovis* 感染時には、特に変化はみられなかった。

以上の結果から、*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、 10^6 個以上のオー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コクシジウム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、餌料摂取量、下痢の程度、オー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キシロース負荷試験は *E. wyomingensis* 感染では無効であるが、*E. bovis* 感染では便の潜血反応、*E. alabamensis* 感染ではキシロース負荷試験が、腸管損傷の程度を測るのに有効な指標と考えられた。

論文審査の結果の要旨

アイメリア属 *Eimeria* を原因とするコクシジウム症は鶏を始めとして、主に草食家畜の病気として重要である。牛に寄生するコクシジウム原虫は世界各地に広く分布し、その中のいくつかは下痢症の原因として重要である。アイメリア属コクシジウムによる疾病の研究は、特に鶏において著しい進歩を見ているが、その他の家畜においては鶏のコクシジウム症に関する知識を応用しているのが現状である。

抗コクシジウム剤の効果判定では、鶏の場合には使用する原虫種や株、感染実験の手法、薬効判定の基準などがほとんど確立されているが、牛のコクシジウムに関してはまったく検討されておらず、その試みさえもない。著者は動物薬の効果判定などの業務に従事してきたが、この点に著しい不便を感じ、その確立を目

指して研究を行ってきた。本論文は著者が長年、牛の抗コクシジウム剤の効果判定法の確立を目指して研究してきた結果をまとめたもので、好適コクシジウム種の選定および生物学的性状と宿主体内の発育の究明、感染程度を示す指標としての臨床所見の検討などについて述べたものである。

論文の要旨は次のようである。

1. 日本における牛のコクシジウムの種類と分布

我が国における牛寄生のコクシジウムの種類と分布を明らかにし、実験感染の材料として適当な種類を選択するため、月齢、品種、飼育方法などを考慮して、全国各地の牛、計1015頭から糞便材料を採取し、オーシストを分離し、種の同定を行った。その結果、59.0%の牛から11種のコクシジウムが分離された。検出された11種のうち *E. wyomingensis* はすべての調査地域で検出されたが、その検出率は平均5.4%と低かった。このことは、本種を感染実験に用いた場合、同種の自然感染による汚染が生じにくいことが考えられ、本種の利点の一つと考えられる。

2. *E. wyomingensis* (岡山株) の由来と生物学的性状

使用した株は、1985年11月、岡山県下の農場で飼育されていた8か月齢の雌の育成牛から回収したものである。この株の生物学的性状を明らかにするため、オーシストの形態学的特徴、孢子形成過程、宿主体内における発育について観察を行った。

オーシストは卵円形で、壁は黄褐色の外層と無色の内層で構成される。オーシストの鋭端部にマイクロバイルが認められるが、マイクロバイルキャップ、外部残体及び極顆粒は認められない。オーシスト200個の計測値は長軸長 $31.6-46.3\mu\text{m}$ ($39.7\pm 1.9\mu\text{m}$)、短軸長 $23.7-33.1\mu\text{m}$ ($28.9\pm 1.2\mu\text{m}$)、短軸長(Y)にたいする長軸長(X)の回帰式は $Y=0.12X+24.13$ であった。スポロシストは長楕円形で一端に明瞭な Stieda body が認められ、内部残体を欠くものが多い。スポロシスト200個の計測値は長軸長 $14.9-19.1\mu\text{m}$ ($17.0\pm 0.9\mu\text{m}$)、短軸長 $7.0-11.0\mu\text{m}$ ($9.3\pm 0.7\mu\text{m}$)であった。スポロゾイトは長紡錘形で、内部には1個の大きな refractile globule が認められる。スポロゾイト200個の計測値は長軸長 $13.8-21.2\mu\text{m}$ ($18.0\pm 1.4\mu\text{m}$)、短軸長 $2.5-5.6\mu\text{m}$ ($4.1\pm 0.6\mu\text{m}$)であった。本種オーシストは大形で色が濃褐色、卵円形であることが主要な特徴である。

E. wyomingensis の新鮮孢子未形成オーシストを2%重クロム酸カリウム液に浮遊させて29°Cで振盪培養した。スポロントの凝集は12時間後までにはほぼ完了した。分裂開始像は81時間後、スポロシストの形成は90時間後から見られた。孢子形成の完了は141時間後から見られ、234時間後には孢子形成率が最大値に達した。孢子形成時間の決定には、孢子形成完了オーシストの出現頻度のアークサイン変換値と経過時間の回帰式の応用が有効と考えられ、これから算出された50%孢子形成時間は191時間であった。

コクシジウムの自然感染を防止して飼育した離乳後1-4週の子牛、計23頭に *E. wyomingensis* オーシスト $10^6-2\times 10^5$ 個を投与した。これらの子牛を経時的に剖検し、腸管の生鮮材料及び染色標本(HE, PAS, ギムザ染色)について観察を行った。*E. wyomingensis* は少なくとも2世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の虫体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。これらの各発育期の虫体はいずれも小腸の下部1/3以降の全域に見られ、小腸の上部や盲腸以降からは検出されなかった。第二代シゾントが平均 $7.4\times 8.6\mu\text{m}$

と小形であること、有性世代のミクロガモントが平均 $78.0\mu \times 98.8\mu m$ と非常に大形であることが本種の特徴と考えられた。1ないし2か月齢の子牛、計31頭に *E. wyomingensis* のオーシスト $10^5 - 10^7$ 個を単回投与した場合のプリパテントビリオドは14-15日 (14.2 ± 0.4 日)、パテントビリオドは4-10日 (6.4 ± 1.9 日)であった。

以上の *E. wyomingensis* の生物学的性状を詳細に観察した結果、本種はオーシストの形態が特徴的で、他の牛寄生のコクシジウムとは容易に区別できた。また、宿主体内の発育は、現在までに宿主内の発育が明らかになっている牛のコクシジウム種のいずれとも異なっていた。

3. *E. wyomingensis* の病原性とその評価

E. wyomingensis の病原性を、強病原性とされる *E. bovis*、弱病原性とされる *E. alabamensis* および *E. subspherica* を対照とし、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、体重の変化、餌料摂取量、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。

離乳後1ないし2週の子牛にそれぞれ、*E. wyomingensis* のオーシスト 10^5 、 10^6 、 10^7 個を投与したところ、全例で感染が成立し、14-15日目には水様性下痢が見られた。 10^5 個投与の個体で下痢の程度がやや軽かった以外、発症の程度には個体間のばらつきはほとんど見られなかった。 10^5 、 10^6 および 10^7 個を投与した個体を14日目に剖検したところ、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発と消化管内容の水様化が見られ、組織学的には空腸および回腸における絨毛の萎縮、腺窩内に壊死塊の存在が認められた。

一方、*E. bovis* では 10^5 個の投与で出血性下痢が見られ、*E. alabamensis* では 10^7 個の投与で水様性下痢が見られたが、両種とも感染の程度は動物個体により大きなばらつきが見られ、安定した感染を作り出すことはできなかった。また、*E. subspherica* では 10^7 個の投与でも糞便性状等の変化は見られなかった。野外における感染様式に近いと考えられる反復投与による病原性を、単回投与によるものと比較するため、*E. wyomingensis* のオーシスト 10^5 個を単回、 2×10^5 個または 2×10^6 個を5回反復投与したところ、いずれの場合も水様性下痢便の排泄が見られ、その程度にオーシスト投与法や投与数による差は見られなかった。しかし、下痢便の持続期間は、 10^5 個の単回および 2×10^6 個の5回反復投与で短くなる傾向が見られ、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。

E. wyomingensis、*E. bovis* および *E. alabamensis* のいずれの感染においても、臨床症状の発現に一致して増体量、餌料摂取量の低下が見られた。また、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た。臨床病理学的検査においては、*E. wyomingensis*、*E. bovis* および *E. alabamensis* のいずれの感染においても、症状の程度に比例してアルブミンの減少が見られた。*E. alabamensis* 感染子牛では下痢の発現時にキシロース吸収能の明らかな低下が見られたが、*E. wyomingensis* および *E. bovis* 感染では特に変化は見られなかった。

以上の成績から *E. wyomingensis* を子牛に人工感染させた場合、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下痢を伴うかなり強い病原性が得られることから、本種は抗コクシジウム剤の効果判定を前提とした牛コクシジウム症の感染モデル作出のためのコクシジウム種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実験動物として離乳後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。また、牛のコクシジウム感染における感染の程度を示すものとして体重の変化、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感染の安定した指標になるものと考えられた。なお、便の潜血反応およびキシロース負荷試験は *E. wyomingensis* 感染では無効であるが、潜血反応は *E. bovis* 感染に、キシロース負荷試験は *E. alabamensis* 感染における腸管の損傷程度を測るのに有効な指標と考えられた。

以上のように本研究は牛のコクシジウム症に対する薬剤の効果判定に欠かせない、安定した感染モデルの作出に対して貴重なデータを提供するものであって、獣医寄生虫学、家畜伝染病学、獣医臨床の分野に対する貢献が著しく博士（獣医学）の学位を授与するに値するものと認める。