

初生雛の実験的結膜クリプトスポリジウム症

松田紫恵 御領政信[†] 岡田幸助

岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2007年1月15日受付・2007年4月24日受理)

要 約

Cryptosporidium sp. (Cr) 感染F嚢洗浄液の初生雛への点眼接種実験を行い、鶏の結膜Cr症について検討した。Crオーシスト点眼接種実験として糞便由来オーシスト点眼接種群 (I群)、Cr感染F嚢洗浄液点眼接種実験群用として糞便由来オーシスト経口接種群 (A群)、Cr感染F嚢洗浄液点眼接種群 (B群) および未接種対照群 (C群) を設定した。A群を14日齢時、I、B、C群を4、7、10、14および21日齢時に剖検し、病理組織学的に検索した。結膜寄生はI群では10日齢から、B群では4日齢から全例で認められ、結膜Cr症が再現された。Cr寄生は、眼瞼結膜から角膜に連続する重層円柱上皮細胞からなる眼球結膜にまで及んでいた。糞便由来オーシストを含まないB群において、I群よりも迅速にCr寄生が成立したことから、結膜Cr症には自家感染性を有するスポロゾイトおよびメロゾイトが重要であると推測された。——キーワード：自家感染、結膜クリプトスポリジウム症、点眼接種、オーシスト。

日獣会誌 60, 858~862 (2007)

Cryptosporidium (Cr) は孢子虫綱に属する原虫で、世界各地で人を含む哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類等のおもに腸粘膜上皮細胞に寄生し、下痢症を引き起こす人獣共通感染症の病原体である [1, 2]。オーシストはきわめて小さく、ほとんどの消毒薬が無効なため、水道汚染による集団感染が問題となっている [3]。鳥類では鶏の *Cryptosporidium baileyi*、七面鳥の *C. meleagridis* の2種が存在するが、未同定の場合が多く、*Cryptosporidium* spp.として報告されている [4]。Crは鶏のファブリキウス嚢 (F嚢)、総排泄腔および上部気道等に寄生し、多くは不顕性感染を示すが、上部気道感染では呼吸器症状を引き起こす [2, 5]、以前当研究室では、菊地ら [6] が産卵鶏の尿管Cr症より分離したCrを数代継代することにより、従来の寄生部位の他、結膜や上部気道にもCr寄生が増加することを報告した。鳥類における結膜Cr寄生は、自然発生でクジャク [7]、七面鳥 [8]、キジ [9]、ハイロガン [10] 等において報告されているが、これらは呼吸器Cr症の他、細菌もしくはウイルス感染を伴っていた。実験的にはLindsayら [11] が、Cr感染鶏のF嚢から分離したCrオーシストを保存培養したものを、7日齢の幼雛に点眼接種することにより、鶏でも結膜Cr寄生を示しており、菊地ら [6] は、継代により従来よりも広域に感染するCrが出現した可能性を示唆している。今回、広域化したCr寄生部位の中でも特に結膜寄生に着目し、鶏の結膜Cr症の再現および

本態を明らかにするために、Cr感染F嚢洗浄液の初生雛への点眼接種実験を行い、病理組織学的に検索した。

材 料 お よ び 方 法

動物実験：実験雛は、研究室で継代維持しているP2系の白色レグホン種の有精卵を孵化して用いた。実験は、岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施され、雛はジエチルエーテル麻酔殺後に剖検された。

Crオーシスト点眼接種実験：Crオーシストの病原性を検討するため、糞便由来オーシスト点眼接種群 (I群) 24羽を設定し、初生雛に点眼接種する感染実験を行った。供試Cr株は研究室で維持している未同定の *Cryptosporidium* sp. [6] で、荒木ら [12] が尿管Cr症を呈した野外例の糞便より採取し、研究室において継代維持されている株を用いた。2.5%ニクロム酸カリウム溶液にて4℃で保存・培養されていたオーシスト保存液は、ニクロム酸カリウムを除去するために繰り返し遠心洗浄された。シヨ糖遠心浮遊法 (比重1.2) [13] によりオーシストを収集、 2.5×10^3 個/0.02ml/片目/羽に調整、接種材料とした。P2系白色レグホン種鶏の初生雛24羽にオーシスト浮遊液を両眼に点眼接種し、4、7、10、14および21日齢時に各群5羽ずつ (21日齢のみ4羽) 剖検した。

Cr感染F嚢洗浄液点眼接種実験：実験群としてCr感染F嚢洗浄液採取用の糞便由来オーシスト経口接種群

[†] 連絡責任者：御領政信 (岩手大学農学部獣医学科獣医病理学研究室)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail: goryo@iwate-u.ac.jp

表1 Crオーシスト点眼接種実験におけるCr寄生状況

組織	I群				
	4日齢	7日齢	10日齢	14日齢	21日齢
結膜	0/5*	0/5	1/5	2/5	3/4
鼻腔	0/5	0/5	0/5	1/5	0/4
唾液腺	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4
喉咽頭	0/5	0/5	0/5	2/5	4/4
気管	0/5	0/5	0/5	1/5	1/4
気管支	NE	NE	NE	0/5	0/4
総排泄腔	0/5	5/5	5/5	5/5	4/4
F囊	0/5	4/5	5/5	5/5	4/4
腸管	0/5	2/5	1/5	2/5	0/4
腎臓集合管	NE	NE	NE	0/5	0/4
尿管(上部)	NE	NE	NE	0/5	0/4
尿管(下部)	0/5	0/5	0/5	0/5	1/4

*陽性例数/検索例数
NE: Not examined (検索せず)

表2 Cr感染F囊洗浄液点眼接種実験におけるCr寄生状況

組織	A群 ¹⁾		B群			
	14日齢	4日齢	7日齢	10日齢	14日齢	21日齢
結膜	2/10*	5/5	5/5	5/5	5/5	2/2
鼻腔	0/10	0/5	3/5	1/5	3/5	2/2
唾液腺	0/10	0/5	0/5	0/5	1/5	0/2
喉咽頭	2/10	3/5	5/5	4/5	5/5	2/2
気管	0/10	0/5	0/5	0/5	0/5	1/2
気管支	NE	NE	NE	NE	0/5	0/2
総排泄腔	10/10	5/5	5/5	5/5	5/5	2/2
F囊	10/10	2/5	5/5	5/5	5/5	2/2
腸管	2/10	5/5	3/5	2/5	2/5	0/2
腎臓集合管	NE	NE	NE	NE	0/5	0/2
尿管(上部)	NE	NE	NE	NE	0/5	0/2
尿管(下部)	2/10	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2

1) 経口接種
*陽性例数/検索例数
NE: Not examined (検索せず)

(A群) 10羽, Cr感染F囊洗浄液点眼接種群 (B群) 22羽, 未接種対照群 (C群) 10羽の3群を設定した。供試鶏としてP2系白色レグホン種鶏の雛を用い, A群には, Crオーシスト点眼接種実験例と同方法で 2×10^4 個/0.2ml/羽に調整したCrオーシスト浮遊液を初生時に経口接種した。A群は14日齢時に全羽剖検し, F囊をはじめとする主要臓器を採材した。F囊内部をリン酸緩衝液(PBS)でピペティングし, 10羽分のF囊洗浄液を約2ml作製した。B群としてF囊洗浄液を0.03ml/片目/羽で初生時に両眼に点眼接種した。4, 7, 10, 14および21日齢時にB群は5羽ずつ(21日齢のみ2羽), C群は2羽ずつ剖検した。

病理組織学的検索: 実験鶏は剖検後, 検体の主要臓器を採材し, 10%ホルマリン液にて固定, 常法に従いパラフィン包埋ブロックを作製した。薄切標本を作製, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し, 光学顕微

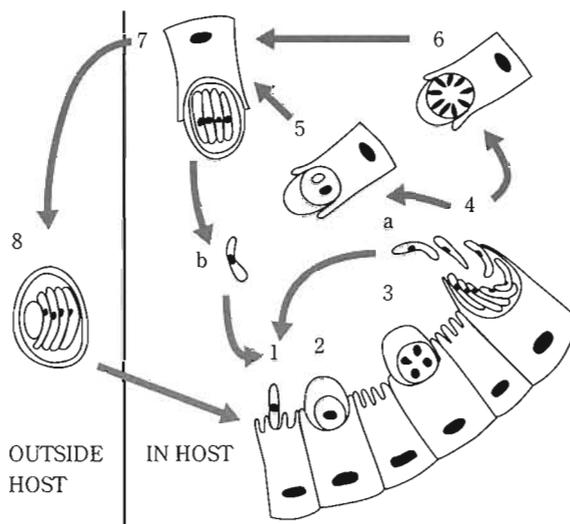


図1 クリプトスポリジウムの生活環

- 1~4: 粘膜上皮細胞微絨毛への虫体侵入後の無性生殖過程
- 5~7: 有性生殖によるオーシストの形成過程
- 8: 体外に排出された成熟オーシスト
- a: 無性生殖で増殖した虫体メロゾイト
- b: 成熟オーシストから遊離した虫体スポロゾイト

鏡にて検索した。Cr寄生部位については特殊染色としてPAS反応を施した。

成 績

Crオーシスト点眼接種実験: I群では喘鳴等が認められる例もあったが, それ以外の顕著な臨床症状はみられず, 結膜にも著変は認められなかった。剖検例の全例において, 肉眼所見に著変は認められなかった。I群の主要臓器におけるCr寄生状況は表1に示すとおりで, 従来の寄生部位であるF囊および総排泄腔へのCr寄生が7日齢から高率に認められた。結膜寄生は10日齢から認められ, 21日齢では2例の両眼結膜にCrが寄生していたが, それ以外の例では片眼結膜にのみ寄生が認められた。

Cr感染F囊洗浄液点眼接種実験: A, B両群において, 喘鳴等が認められる例もあったが, それ以外の顕著な臨床症状はみられず, 結膜にも著変は認められなかった。剖検例の全例において, 肉眼所見に著変は認められなかった。C群では, 臨床症状はみられず, 剖検例の全例において, 肉眼所見に著変は認められなかった。A, B両群の主要臓器におけるCr寄生状況は表2に示すとおりで, A群では, 14日齢での剖検例の全例において, F囊および総排泄腔へのCr寄生が認められた。2例に結膜寄生が認められたが, 片側性の寄生であった。B群では, 総排泄腔への寄生は4日齢から, F囊への寄生は7日齢以降全例で認められた。結膜寄生は4日齢から全例で認められ, 観察期間中のすべての日齢でみられた。C

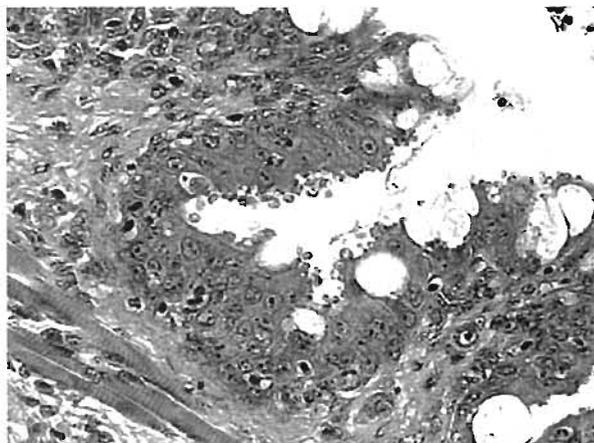


図2 眼結膜 (点眼接種実験, B群, 4日齢, No. 2, HE染色 × 350)

4日齢では粘膜上皮自由表面にCr虫体が認められ、上皮細胞は腫大、杯細胞も散見される。

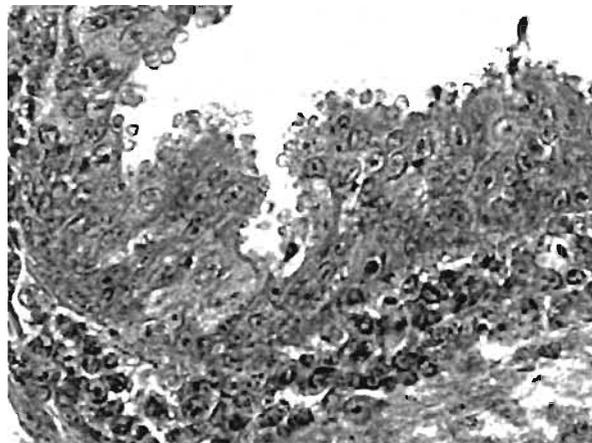


図4 眼結膜 (点眼接種実験, B群, 10日齢, No. 4, HE染色 × 350)

10日齢では、粘膜上皮細胞は腫大および乳頭状に増生、粘膜上皮の褶曲化が認められる。また、杯細胞の消失、粘膜固有層には偽好酸球をはじめとする円形細胞が重度に浸潤している。

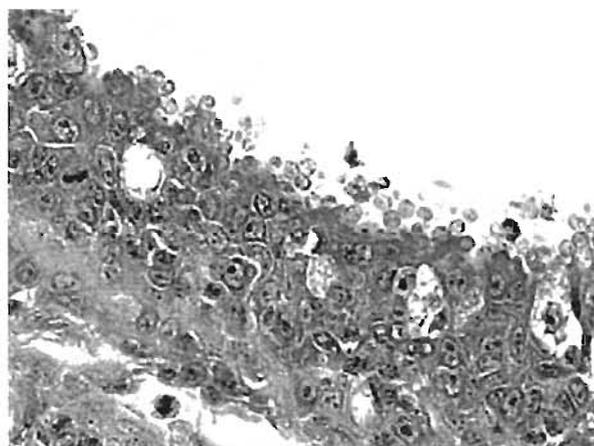


図3 眼結膜 (点眼接種実験, B群, 7日齢, No. 1, HE染色 × 350)

7日齢では、粘膜の軽度肥厚を認め、上皮細胞は腫大、杯細胞数の減少が認められる。

群では、いずれの臓器にもCr寄生は認められなかった。

病理組織学的にCrは、どの寄生部位においても、粘膜上皮細胞の自由表面ないし腔内に遊離した直径2～5μmのヘマトキシリンに淡染する類円形物であった。PAS反応標本ではCrはPAS陽性を示し、赤染した。各臓器におけるCr寄生部位では共通して、上皮細胞は腫大し、乳頭状に増生、重層化していた。上皮細胞間には偽好酸球が浸潤し、粘膜固有層には種々の程度でリンパ球、形質細胞を主体とする円形細胞が浸潤していた。結膜においても、Cr寄生部位では粘膜上皮細胞は腫大し、乳頭状に増生していた。上皮細胞間および粘膜固有層には、偽好酸球をはじめ円形細胞が重度に浸潤し、結膜炎を呈していた。結膜炎は、B群では4,7日齢では軽度であり、10日齢以降に顕著に重篤化していた(図2～4)。Cr寄生は、B群では4日齢では全例で、結膜浅部の眼瞼

結膜のみにしか認められなかったが、7日齢以降寄生部位が拡大し、全例で深部の眼球結膜にまで寄生が認められた。4日齢では粘膜上皮細胞間には杯細胞が散見されたが、7日齢以降は減数・消失し、粘膜上皮細胞の腫大・増生は顕著で、円形細胞浸潤も重度となった。

考 察

結膜Cr寄生は、I群では多くは片側性に10日齢から認められ、B群では、全例で両側性に4日齢から認められた。これは糞便由来のオーシストを点眼接種しても、結膜への直接感染性はないが、F囊洗浄液は、結膜を含め、迅速かつ広域に感染するCr感染因子を含むことを示唆している。Crの生活環(図1)[2, 4, 14]から考慮すると、結膜寄生にはF囊洗浄液に含まれる自家感染性をもつthin-walled oocysts由来のスプロゾイトと、メロント由来のメロゾイトが重要ではないかと推測される。つまり、糞便中には従来のthick-walled oocystsの他、スプロゾイトやメロゾイトも排出されていて、まれに見られる結膜Cr症は、環境中に存在するこれらの虫体が偶然結膜に付着し、感染が成立したことが推測される。

Lindsayら[11]の点眼接種実験では、接種材料はCr感染鶏F囊から分離したCrオーシストを保存培養したもので、結膜Cr寄生は投与後10日目以降に認められた。この接種材料は保存培養期間が長いことと考えられ、今回の糞便由来オーシストを点眼接種したI群の成績は、Lindsayら[11]の実験同様、結膜寄生が投与後10日目以降で成立し、実験結果は一致するものであった。

結膜は解剖学的に、眼瞼の内側面に位置する眼瞼結膜

から、角膜縁付近で角膜前面に連続する眼球結膜までの、連続した薄い粘膜の総称で、鶏の眼は哺乳類と異なり、瞬膜（第三眼瞼）が非常に発達し [15]、結膜は表層から順に眼瞼結膜、瞬膜結膜、そして眼球結膜へと移行する。組織学的には、眼瞼結膜は眼瞼表面と連続する重層扁平上皮細胞から重層円柱上皮細胞に移行し、杯細胞も散在する。眼球結膜は重層円柱上皮から角膜の重層扁平上皮へと移行する。Crの増殖には、寄生体胞形成のために粘膜上皮細胞に微絨毛が必要である [2, 4]。CrはB群4日齢では浅部の眼瞼結膜円柱上皮細胞のみに寄生が認められたが、日齢の進行とともにCr寄生部位は深部へと拡大し、7日齢からは角膜に連続する眼球結膜円柱上皮細胞にもCr寄生が認められた。眼球結膜は哺乳類では重層扁平上皮から構成される [16] が、鶏の眼球結膜は、杯細胞を含む重層円柱上皮細胞と重層扁平上皮への移行部から構成されており、この組織構成が、鶏においてCr寄生が結膜深部まで波及する要因となっていることが示唆された。

引用文献

- [1] Current WL: Cryptosporidiosis, Diseases of Poultry, Calnek BW, et al eds, 10th ed, 883-890, Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. (1997)
- [2] 板倉智敏: 鳥類のクリプトスポリジウム感染について, 鶏病研報, 20, 111-122 (1984)
- [3] 井関基弘: 水系感染クリプトスポリジウム症の集団発生と環境水の汚染防止対策の必要性, 日獣会誌, 50, 375-379 (1997)
- [4] 板倉智敏: クリプトスポリジウム, 獣医臨床寄生虫学, 382-384, 文永堂, 東京 (1995)
- [5] Dhillon AS, Thacker HL, Dietzel AV, Winterfield RW: Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens, Avian Dis, 25, 747-751 (1981)
- [6] 菊地聡美, 御領政信, 岡田幸助: マレック病ウイルスとクリプトスポリジウムの混合感染による実験的尿管クリプトスポリジウム症, 鶏病研報, 42, 32-39 (2006)
- [7] Mason RW, Hartley WJ: Respiratory cryptosporidiosis in a peacock chick, Avian Dis, 24, 771-776. (1980)
- [8] Hoerr FJ, Ranck FM Jr, Hastings TF: Respiratory cryptosporidiosis in turkeys, Am J Vet Med Assoc, 173, 1591-1593 (1978)
- [9] Randall CJ: Conjunctivitis in pheasants associated with cryptosporidial infection, Vet Rec, 118, 211-212 (1986)
- [10] Chvala S, Fragner K, Hackl R, Hess M, Weissenböck H: Cryptosporidium infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization, J Comp Pathol, 134, 211-218 (2006)
- [11] Lindsay DS, Blagburn BL, Hoerr FJ, Giambone JJ: Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts, Avian Dis, 31, 355-357 (1987)
- [12] 荒木千尋, 御領政信, 岡田幸助: 産卵鶏における尿管クリプトスポリジウム症, 鶏病研報, 41, 81-88. (2005)
- [13] 井関基弘: クリプトスポリジウム症, 原虫性疾患, 臨床病理, 臨時増刊 特集第108号, 191-197, 臨床病理刊行会, 東京 (1998)
- [14] Iseki M: *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the domestic cat, Jpn J Parasitol, 28, 285-307 (1979)
- [15] William J: 眼, カラーアトラス獣医組織学, 月瀬 東他訳, 231-246, チクサン出版社, 東京 (1997)
- [16] 加藤嘉太郎: 副眼器 (I), 家畜比較解剖図説下巻, 第5版, 298-299, 養賢堂, 東京 (2002)

Experimental Conjunctival Cryptosporidiosis in Chicks

Shie MATSUDA*, Masanobu GORYO[†] and Kosuke OKADA

* Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan

SUMMARY

Conjunctival cryptosporidiosis was induced in chicks by ocular inoculation of oocysts of *Cryptosporidium* sp. (CR) or a wash-solution of the bursa of Fabricius infected with CR. Day-old chicks obtained from P2 White Leghorn chickens were divided into the following groups; ocular inoculation of mature oocysts for chronological examination (Group I); oral inoculation of mature oocysts (Group A); ocular inoculation of wash-solution of the bursa of Fabricius of Group A (Group B); and non-inoculation control group (Group C). Chicks of Group A were necropsied 14 days post inoculation (PI), while Groups I, B and C were necropsied 4, 7, 10, 14 and 21 days PI. Conjunctival cryptosporidiosis was observed in all chicks in Group B, but it was only observed 10 days PI in Group I. Developmental stages of CR were observed in the palpebral and bulbar conjunctiva composed of stratified cuboidal columnar epithelium. The stool of chickens infected CR might have contained mature oocysts, however the wash-solution from the bursa of Fabricius in this study did not contain mature oocysts because of immediate preparation after autopsy. These results suggest that conjunctival infection may occur as a result of direct infection of sporozoites and merozoites derived from meronts and thin-walled oocysts of CR life cycles in the bursa of Fabricius.

— Key words : auto infection, conjunctival cryptosporidiosis, ocular inoculation, oocysts.

[†] Correspondence to : Masanobu GORYO (Department of Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Iwate University) 3-18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan

TEL 019-621-6217 FAX 019-621-6274 E-mail : goryo@iwate-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 60, 858 ~ 862 (2007)

日本産業動物獣医学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎澤田 勉 (元・大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
○小川 博之 (日本動物高度医療センター)
川村 清市 (元・北里大学獣医畜産学部)
佐藤 繁 (岩手大学農学部)
八木 行雄 (動物衛生研究所研究管理監)
明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
今井 壯一 (日本獣医生命科学大学獣医学部)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)
月瀬 東 (日本大学生物資源科学部)
中市 統三 (山口大学農学部)
中澤 宗生 (動物衛生研究所疫学研究チーム)
(◎委員長, ○副委員長)

編集発行人 日本産業動物獣医学会
会長 加茂前 秀夫

『*投稿を希望される方は、学会誌投稿規程(本誌885頁)及び三学会誌投稿の手引き(本誌889頁)をご参照ください』