

鶏コクシジウムオーシストの培養法の検討:

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	斎藤, 康秀 板垣, 博
巻/号	41巻5号
掲載ページ	p. 347-350
発行年月	1988年5月

鶏コクシジウムオーシストの培養法の検討 とくに培養液中の溶存酸素量との関連

斉藤康秀* 板垣 博*

(昭和 63 年 2 月 19 日受理)

Culture Conditions of Chicken *Eimeria* Oocysts with Special Reference to Oxygen Concentration in the Medium.

YASUhide SAITOH and HIROSHI ITAGAKI (Department of Parasitology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Fuchinobe, Sagami-hara-shi Kanagawa-ken 229)

SUMMARY

A series of experiments were performed to find the suitable oxygen concentrations for the culture of chicken coccidian oocysts in the laboratory.

Chicken faeces with 2.5×10^5 *E. acervulina* or *E. necatrix* oocysts were cultured in Petri-dishes by the static method after being washed three times with tap water by centrifugation and then suspended in 2.5% potassium dichromate solution (10 times the faecal volume). In this case sporulation rates were $75.7 \pm 7.35\%$ and $52.9 \pm 8.45\%$ respectively, but they varied widely with the nature of faeces and the volume of medium: the greater the volume of the medium, the higher the sporulation rate. When purified oocysts were cultured, on the other hand, much higher sporulation rates were obtained. When $10^5/\text{ml}$ and $10^6/\text{ml}$ oocysts isolated from faeces were cultured in Petri-dishes with 2.5% potassium dichromate solution by the static method, sporulation rates were $87.2 \pm 2.00\%$ and $49.2 \pm 15.55\%$ respectively. From this result, the number of oocysts must be less than $10^6/\text{ml}$ in static cultures, although the high sporulation rates of $86.2 \pm 3.10\%$ and $88.4 \pm 3.21\%$ were gained when $10^6/\text{ml}$ of purified oocysts were cultured by the aerating and the shaking methods respectively. The aerating method, however, was not so suitable for culturing oocysts, because oocyst bubbles were scattered around culture dishes and further excessive aeration resulted in the deformation of sporulated oocysts. Petri-dishes were not suitable as culture containers because the medium containing oocysts was frequently spilled when cultures were moved or removed.

Consequently, the cultivation of purified oocysts by the shaking method is the best to gain high sporulation rates and to prevent pollution of the laboratory with oocysts.

要 約

ニワトリコクシジウムのオーシストを培養する際の留意点、とくに、培養液中の溶存酸素の確保について孢子形成率を指標として実験した。十分に遠心洗浄した糞便に 10 倍量の培養液を加えシャーレで静置培養した場合、*E. acervulina* および *E. necatrix* のオーシストの孢子形成率はそれぞれ $75.7 \pm 7.35\%$ および $52.9 \pm 8.45\%$ であった。この方法では糞便に粘血液が多量に混入している場合には成績が安定しなかった。また、培養液量は多いほど孢子形成率が高い傾向にあった。安定した高い孢子形成率を得るには、材料として洗浄糞便よりも回収したオーシストを用いたほうが有利であった。回収したオーシストを静置培養した場合、その孢子形成率はオーシスト数に左右され、 10^5 個/ml では平均 $87.2 \pm 2.08\%$ 、 10^6 個/ml では平均 $49.2 \pm 15.55\%$ であった。回収したオーシストを通気または振盪培養した場合は、静置培養では孢子形成率が低下する 10^6 個/ml というオーシスト数でも、それぞれ平均 $86.2 \pm 3.10\%$ および $88.4 \pm 3.21\%$ という高い孢子形成率が得られた。ただし、通気培養では容器の形状にもよるが通気量を多くすると飛沫により実験室内汚染を招きやすいこと、また、通気量を必要以上に多くすると変形した孢子形成オーシストが増加する傾向にあ

* 麻布大学獣医学部 (神奈川県相模原市淵野部 1-17-71)

ること、および多数の検体を処理する場合に通気量を均一に保ちにくいことなどの欠点がある。また、シャーレを使用した培養は操作中に培養液をこぼしやすく、ある程度深さのある容器を用いる必要がある。

これらのことより、回収したオーシストを用いて振盪培養する方法が発育に必要な培養液中の溶存酸素を確保することからも、また、実験室内汚染を防ぐことから適当と判断された。

オーシストの生存・発育には酸素と水分の存在のうゑに適温(25℃～31℃)の保持が不可欠であり、無酸素状態では孢子形成が起こらないことが知られている^{1,2,9)}。

ニワトリコクシジウムのオーシストを培養する目的は、感染実験の投与材料としての孢子形成オーシストを得るため、あるいは孢子形成の有無により抗コクシジウム剤や殺オーシスト剤の効果を判定するためなどである。これらの場合、培養条件を一定にして常に安定した孢子形成率が得られることが望まれる。しかしながら、培養時に水分および温度を好適な状態に保つことは比較的やすいが、溶存酸素量を適度に保つことは材料によっては困難である。

本実験では、飽和食塩液または比重1.203の蔗糖液⁹⁾を用いた浮遊法によって回収したオーシスト、およびオーシストを含む糞便を繰り返し遠心洗浄することによって、可溶成分をできるだけ取り除いた材料を用い、実用的なオーシスト培養法について検討した。なお、実験室内汚染の防止および取扱の容易さについても検討した。

1. 材料と方法

1) コクシジウム

当教室で継代維持している *E. necatrix*, *E. acervulina* および *E. maxima* を用いた。

2) 雛

1日齢時に入手した白レグ系雄雛をコクシジウム・フリーに12日間飼育したものをを用いた。

3) オーシストの投与

E. necatrix では 10^8 個/羽または 2×10^4 個/羽、その他のものでは 10^8 個/羽の孢子形成オーシストをビベットを用いて嚙嚢内に直接投与した。

4) 糞便の採集

それぞれのコクシジウムについてプリバテント・ピリオド2日後に糞便を採集した。

5) オーシストの回収

比重1.203の蔗糖液または飽和食塩液を用い、術式には従って回収した^{3,6)}。

6) 小腸病変の観察

E. necatrix および *E. maxima* 感染鶏ではそれぞれのプリバテント・ピリオド3日後に剖検し、角田・石井(1971)の方法を参考にして腸病変を観察した⁹⁾。

7) 培養法

次の5通りの条件を与えて培養した。

① オーシストを含まない糞便を加えることによって、OPG値が 5×10^4 となるように調整した感染糞便5gに、10倍量の水を加え十分に混合攪拌し、これを径0.14mmの金網で濾過して夾雑物を取り除き、さらに、2,000rpm 3分間の遠心を3回繰り返して可溶成分を取り除いた。最終沈渣に3倍量、5倍量および10倍量の2.5%重クロム酸カリウム溶液を加え、これをそれぞれ径9cmのシャーレに液深が5mmになるように入れ、静置培養した。

② 浮遊法によって回収したオーシストに2.5%の重クロム酸カリウム溶液を加え、径9cmのシャーレに入れ液深を5mmとして静置培養した。

③ ②と同じようにして容量100mlのフラスコに入れ液深を5mm、10mmおよび50mmとし、静置培養した。

④ ③と同様であるが、液深が20mmになるように入力フラスコに入れ、これに約50ml/分の割合で通気をして培養した。なお、液深の20mmは予備試験の24時間ごとの観察で培養液の1/3以上が蒸散しない最低量より決定した。

⑤ ③と同様に液深を5mmとし、振盪恒温槽で培養した。なお、通気する場合は通気管を包み込むように開口部をアルミ箔で覆い、通気しないものではビニール片で開口部を包み、これを輪ゴムで止めた。なお、培養温度はすべて25℃とした。

8) 孢子形成率の算定

それぞれの方法で4日間培養した後、任意に500個のオーシストを観察して孢子形成オーシストを計数し、その百分比(%)を孢子形成率とし、平均±標準誤差として表記した。なお、検定にはスチューデントのt検定を用いた。

2. 成績

1) 遠心洗浄した感染糞便を用いた成績

(1) 培養液量の影響：*E. acervulina* のオーシストを含む遠心沈渣に10, 5, および3倍量の重クロム酸カリウム溶液を加え、シャーレで静置培養した各5回の実験における孢子形成率は、70.6～88.6%(平均75.7±7.32%)、62.0～76.6%(67.3±5.82%)、57.2～77.2%(63.9±8.00%)で、液量に比例して増加し、10倍量と3倍量との間には危険率5%で有意差がみられた。

(2) 糞便に含まれる粘血液量の影響：1羽当たり 10^8

表1 遠心洗浄糞便内オーシストの孢子形成率

コクシジウムの種類	雛1羽当たりの投与オーシスト数	糞便量に対する添加培養液量	平均孢子形成率* (範囲 %)
<i>E. acervulina</i>	10 ⁵	3	63.9±8.00 (57.2~77.2)
		5	67.3±5.82 (62.0~76.6)
		10	75.7±7.32 (70.6~88.6)
<i>E. necatrix</i>	2×10 ⁴	3	38.5±12.25 (24.8~51.2)
		10	68.9±6.62 (60.4~77.4)
		10	52.9±8.45 (40.6~62.2)
<i>E. maxima</i>	10 ⁵	10	56.5±18.25 (31.0~81.6)

注) *: 平均±標準誤差

個/羽および2×10⁴個/羽の *E. necatrix* のオーシストを投与した鶏の糞便を遠心洗浄したものに、10倍量の重クロム酸カリウム溶液を加えたそれぞれ5回の実験の孢子形成率は、60.4~77.4% (平均68.9±6.62%)、40.6~62.2% (平均52.9±8.45%) で、両者間には危険率5%で有意差がみられた。両者の平均腸病変程度はそれぞれ+および++~+++であり、孢子形成率は感染度に応じた糞便中の粘血液量に反比例する傾向がみられた。また、2×10⁴個/羽のオーシストを投与した鶏の糞便沈渣に、3倍量の重クロム酸カリウム溶液を加えた場合の孢子形成率は24.8~51.2% (平均38.5±12.25%) であり、希釈液量3および10倍間には有意差がみられなかった。*E. maxima* では10倍量の重クロム酸カリウム溶液を加えた場合の孢子形成率は31.0~81.6% (平均56.5±18.25%) で、実験ごとの変動が大きかった。

2) 回収したオーシストを用いた成績

(1) コクシジウム種間の孢子形成率の相異: 10⁵個/mlのオーシストに2.5%重クロム酸カリウム溶液を加え、これを径9cmのシャーレに液深が5mmになるように入れ、静置培養した場合の *E. acervulina*, *E. necatrix* および *E. maxima* の孢子形成率はそれぞれ85.4~92.8% (平均90.5±3.32%)、77.2~91.2% (平均85.9±5.35%) および77.4~88.6% (平均84.3±4.41%) で、危険率5%で *E. necatrix* の孢子形成率は *E. acervulina* のものより有意に低かった。

(2) 静置培養でのオーシスト数の影響: *E. acervulina* のオーシストを用い培養液深5mm、培養液1mlあたりのオーシスト数を10³, 10⁴, 10⁵, 5×10⁵ および10⁶個とした場合の孢子形成率はそれぞれ86.4~93.4% (平均90.2±2.68%)、86.8~92.4% (平均87.2±2.08%)、85.4~92.8% (平均90.5±3.32%)、72.8~86.4% (平均79.6±4.84%) および25.0~68.4% (平均49.2±15.55%)

表2 糞便内より回収したオーシストの各培養法による孢子形成率

コクシジウムの種類	培養液ml当たりの培養オーシスト数	培養法	培養液深 (mm)	平均孢子形成率* (範囲 %)
<i>E. necatrix</i>	10 ⁵	静置	5	85.9±5.35 (77.2~91.2)
			5	84.3±4.41 (77.4~88.6)
<i>E. acervulina</i>	10 ⁵	静置	5	90.2±2.68 (86.4~93.4)
			5	87.2±2.08 (86.8~92.4)
			5	90.5±3.32 (85.4~92.8)
			5	79.6±4.84 (72.8~86.4)
			5	49.2±15.55 (25.0~68.4)
			5	90.2±2.44 (86.4~92.6)
			10	89.6±3.83 (86.4~95.2)
			50	87.4±1.97 (84.2~89.0)
			20	89.4±4.54 (84.2~95.8)
			20	86.2±3.10 (83.4~90.2)
			5	90.2±1.80 (89.8~92.4)
			5	89.7±2.40 (86.4~92.4)
			5	88.8±2.78 (85.6~91.8)
			5	88.4±3.21 (86.4~92.4)
5	83.6±3.31 (82.0~86.0)			

注) *: 平均±標準誤差

** : 培養基当たりのオーシスト数

であり、10⁶個/ml群の孢子形成率は危険率5%で有意に低かった。

(3) 培養液深の影響: 単位培養液中のオーシスト数の影響を排除するために培養総オーシスト数を10⁵個と少なくし、培養液深を5mm、10mmおよび50mmとして静置培養した場合の孢子形成率はそれぞれ86.4~92.6% (平均90.2±2.44%)、86.4~95.2% (平均89.6±3.83%) および84.2~89.0% (平均87.4±1.97%) で処理群間に有意差はみられなかった。

(4) 通気の効果: 培養液1mlあたりの *E. acervulina* のオーシスト数を10⁵および10⁶個、培養液深を20mm、通気量を毎分50mlとした場合の孢子形成率は、それぞれ84.2~95.8% (平均89.4±4.54%) および83.4~90.2% (平均86.2±3.10%) で、10⁶個/ml群でも孢子形成率は高率であった。なお、通気量を毎分200mlとした

2回の実験の孢子形成率は平均 86.5% であったが、孢子形成オーシストのうち 37.2% のオーシスト壁に変形がみられた。

(5) 振盪培養の効果：培養液 1 ml あたり 10^5 , 5×10^5 , 7.5×10^5 , 10^6 および 10^7 個の *E. aceroulina* オーシストをそれぞれ 100 ml のフラスコに入れ、培養液深を 5 mm とし、1 分間 50 往復で振盪培養した。孢子形成率はそれぞれ 89.8~92.4% (平均 $90.2 \pm 1.80\%$)、86.4~92.4 (平均 $89.7 \pm 2.40\%$)、85.6~91.8% (平均 $88.8 \pm 2.78\%$)、86.4~92.4% (平均 $88.4 \pm 3.21\%$) および 82.0~86.0% (平均 $83.6 \pm 3.31\%$) で、処理群間に有意差は認められなかった。静置培養では孢子形成率が低下する 1 ml あたり 10^6 個以上のオーシスト数でも、孢子形成率の低下はみられなかった。

E. aceroulina のオーシスト 10^5 個/羽を投与した雛の糞便 30 g をプリパテント・ピリオド 2 日後に採取し、これより回収した全オーシスト (平均 6.8×10^7 個) を 100 ml のフラスコに入れ、これに 2.5% の重クロム酸カリウム溶液を液深が 5 mm になるように加え振盪培養した。50 回の実験の結果、孢子形成率は 75.6~97.4% (平均 $90.2 \pm 4.80\%$) であり、かなり安定していた。

3. 考 察

実験室内でオーシストを孢子形成させる場合、溶存酸素を確保するために防腐作用を持つ重クロム酸カリウムの 2~2.5% 溶液や硫酸の 0.1 規定液が培養液として用いられている。また、孢子形成には酸素を必要とするので、拡散による空中酸素の培養液中への浸透は液量に対する気相との接触面積が大きいほどすみやかであるので、培養液の深さは可能なかぎり浅くすべきであるとされている^{1,2)}。

WILSON と FAIRBAIRN⁷⁾ によれば、*E. aceroulina* のオーシスト 10^6 個/ml は孢子形成開始 1 および 10 時間後にはそれぞれ 3.5 および 2.0 μ l の酸素を消費するが、68 時間後には消費量は 0.24 μ l にまで低下するという。1 ml の水には 20°C で 31 μ l、30°C で 25 μ l の酸素が溶存している⁴⁾ ので、培養液中にオーシスト以外に酸素を消費するものがないとしても、拡散による酸素の溶解がなければ、 10^6 個/ml のオーシストは孢子形成開始 10 時間後には培養液中のすべての酸素を消費することになる。しかしながら、 10^5 個/ml のオーシストでは孢子形成中に酸素が不足することはない。このように静置培養する場合には単位培養液中のオーシスト数に限界がある。

洗浄した糞便を培養に用いた場合にはメッシュでの濾過をていねいにすればするほど、洗浄後も有機質が多く

残り、これの酸化やこれらを栄養源とする細菌の繁殖による酸素の消費によって容易に酸素不足を起こすものと推定される。このことが今回洗浄糞便を用いた実験で、オーシスト数が 10^5 個/ml より少なくても孢子形成率が低かった原因と考えられる。いっぽう、浮遊法によって可能なかぎりオーシストのみを回収したものを静置培養した場合には、オーシスト数が 5×10^5 個/ml の場合では平均 79.6% の孢子形成率であったが、その倍のオーシスト数では孢子形成率が平均 49.2% にまで低下した。これは空気中からの自然浸透による酸素の補給のみでは溶存酸素が不足したためと推定された。なお、シャーレを用いる場合には容器の高さが低いため、取り扱いに際して内容物をこぼしやすく実験室内汚染のおそれがあった。

強制的に溶存酸素を補給した通気および振盪培養の場合は、静置培養では酸素不足が起こるオーシスト数でも高い孢子形成率が得られた。しかしながら、通気培養では多数の検体を処理する時に通気量を一定に保つことが困難であり、また、通気量を多くすると培養液が飛沫となって周辺に飛び散り、実験室内の汚染を起こしやすかった。振盪培養は振盪恒温槽を必要とするのが多数のオーシストを一度に処理できること、オーシスト数を調整する必要がないことなどから、多量のオーシストまたは多数の検体を同時に処理する場合には最も適当な方法と判断された。

以上の結果から、孢子形成後のオーシストの保存および各種処理の手間などを考慮すると、浮遊法によりオーシストを回収した後、振盪培養する方法が最も有利であることがあきらかになった。

引用文献

- 1) AUSTIN, J. M. and VOGEL, M.: *Experiments and Techniques in Parasitology*, 138, W. H. FREEMAN, San Francisco (1970).
- 2) RONALD, F. and REID, W. M.: *The Biology of the Coccidia*, 460~461, Univ. Park, Baltimore (1982).
- 3) 石井俊雄, 上野 計, 板垣 博, 大林正士編: 家畜寄生虫学 (実習・実験), 37~41, 文永堂, 東京 (1981).
- 4) 生態学実習懇談会編: 生態学実習書, 44~47, 朝倉書店, 東京 (1967).
- 5) 角田 清: 獣医臨床寄生虫学 (獣医臨床寄生虫学編集委員会編), 687, 文永堂, 東京 (1979).
- 6) 角田 清, 石井俊雄: 鶏コクシジウム検査法, 30, 鶏病研究会 (1971).
- 7) WILSON, P. A. G. and FAIRBAIRN, D.: *J. Protozool.*, 8, 410~416 (1961).