

## 鶏コクシジウム症の免疫およびワクチン

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	大永, 博資
巻/号	42巻3号
掲載ページ	p. 145-152
発行年月	1989年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 鶏コクシジウム症の免疫およびワクチン

大 永 博 資\*

鶏コクシジウム症の免疫現象は古くからよく知られており、たびたび総説の対象とされ<sup>95,99,100</sup>、また Coccivac (Sterwin Lab. Inc.) に代表される生ワクチンの使用や計画感染 (planned immunization program<sup>22</sup>) などが、その対策として応用されてきた。近年、本原虫の弱毒化が進められ、弱毒化生ワクチンの実用化は今や時間の問題として期待され、また、米国においては遺伝子工学の手法を駆使したリコンビナントワクチンの開発なども進められている。本編では、現在文献上で明らかにされている鶏コクシジウム症の免疫現象を紹介し、また諸種ワクチンの実用上の問題について考察したい。

## 1. 免疫現象

鶏コクシジウム原虫の感染を経過した鶏の免疫は、見かけ上終生免疫として映る。確かに、ヒナにオーシストを繰り返し接種して、感染によりオーシストの生産を完全に防止できる程度の免疫を付与した場合、少なくとも4～5カ月間、大量のオーシストの攻撃に対して発病を予防できる<sup>30</sup>。その一方、オーシストの生産抑制を指標にして免疫の程度を評価すると、免疫期間はわずか1～2カ月間にすぎない<sup>46,53,103</sup>。したがって、野外における見かけ上の終生免疫は、免疫鶏が感染に対する感受性を回復し、軽度の再感染を受けて、それが新たな免疫刺激となるように、感染と免疫を繰り返すことによって出現する現象のように考えられる。また、鶏コクシジウム感染による免疫を、再感染に対する抵抗性としてみた場合、寄生部位を共有する *E. necatrix* と *E. maxima*<sup>90</sup> や *E. brunetti* と *E. maxima*<sup>89</sup> などに関しては、若干の交差が認められているが、後者については否定的な見解もあり<sup>29</sup>、一般的には感染種に特異的といわれている<sup>96,100,103</sup>。

免疫形成の優劣を種間で比較した場合、比較的免疫の形成の早い種、遅い種などの差異がみられ<sup>31,94,103</sup>、*E. maxima* で最も早く、一実験例ではわずか500個のオーシストによる1回の感染でヒナは強度の免疫を獲得し、2回目の感染による生産オーシスト数を極度に低下する(表1)。これに反して、*E. tenella* や *E. necatrix* では、少量のオーシストの初回接種による2回目感染のオーシスト生産抑制はたいして強くなく、軽度の感染による場合、強力な免疫を付与するには2回以上の感染の繰り返しが

必要である。

いっぽう、ヒナに小数のオーシストを長期間、毎日連続して接種した場合、その総数を一回に接種するより、攻撃感染に対して高度の免疫を付与することができ、少量であれ持続的免疫刺激は抵抗性獲得に効果的であることが判明している<sup>18,40,42</sup>。このオーシストの連続投与による感染は trickle infection と呼称され、計画感染の一方法として実用上の可能性も示唆されている。また、免疫力の差異は同種株間<sup>39</sup>や強毒株から作出された弱毒株の間にも示されており<sup>38,68</sup>、一般に弱毒株では強毒親株と比較して免疫力は低いようにいわれ、病原性と免疫力の間には密接な関係があるように推察される。

最近の報告<sup>20</sup>によると、ケージからケージへの移動により、しかも密飼いの度合を強めて強度の環境ストレスを与えた鶏群は、初感染において抵抗性を高め、また攻撃に対する免疫も増強されるといわれ、これはストレスが血液中の corticosterone レベルを高め、初期の細胞反応や細胞性免疫を進進させた結果とされている。

## 2. 抗原性

諸種の鶏コクシジウムに感染し耐過したヒナの血清は、酵素抗体法 (ELISA) によって感染種以外のオーシスト抗原に対しても強い交差性を示す<sup>83,107</sup>。また、鶏およびその他動物のコクシジウムのスポロゾイト抗原に対して作製された多くの単クローン性抗体が、作製元種のみでなく、他種のスポロゾイトに対しても間接蛍光抗体法により交差性を示す<sup>15</sup>。いっぽう、特定のコクシジウム種にのみ反応する種特異的単クローン性抗体<sup>13,15</sup>や、スポロゾイト<sup>17</sup>またはメロゾイト<sup>14</sup>にのみ反応するステージ特異的単クローン性抗体も作製されている。原虫抗原に対する単クローン性抗体の間接蛍光抗体による反応を *E. tenella* のスポロゾイトの例でみると<sup>14,15</sup>、それぞれ作製された抗体によりスポロゾイト全体に蛍光を発するもの、表皮膜にのみ蛍光を示すもの、スポロゾイト前部に示すもの、refractile body に示すものなどがあり、さらに refractile body については種間において抗原性の差異も示されている<sup>3</sup>。また、単クローン性抗体とフェリチンコンジュゲートを用いた電顕観察により、*E. tenella* スポロゾイトの表面膜とオーシストおよびスポロシスト壁で共通の抗原物質が確認されている<sup>115</sup>。以上の観察結果から、原虫は多数の抗原物質で構成されており、それ

\* HIROSHI ONAGA; (財)日本生物科学研究所 (東京都青梅市新町2221-1)

らの中に各種に共通の部分と種およびステージに特異的な部分があることが明らかである。

いっぽう、抵抗性獲得に関係する原虫の抗原ステージは、感染ステージを限定した免疫試験により、とくにメロゴニー期に示されており<sup>67,101</sup>、スポロゾイトでは弱く<sup>86</sup>、ガメトゴニー期にはほとんど認められないという<sup>101</sup>。また、間接蛍光抗体法により *E. tenella* の抗血清を各種ステージの原虫に作用させた実験では、とくに第2代メロゾイトに強い蛍光が認められ<sup>49</sup>、さらに、感染鶏の脾リンパ球を原虫のステージ特異的抗原で刺激した場合、スポロゾイトと比較してメロゾイトに高い活性が認められている<sup>49</sup>。このステージ間の免疫力の相違は、鶏コクシジウムの発育環を考慮した場合、増殖性による抗原物質の量的差異、免疫細胞への接触や免疫感作、または免疫応答を受けやすい原虫の形態的あるいは寄生部位の差異などに起因しているように推測される。なお、最近の報告では、免疫の主体が細胞性免疫に依存するため、T細胞を活性化する抗原物質がとくに重要な役割を果たすとされ、*E. acervulina* をモデルとして、DNA クローニングによるスポロゾイトやメロゾイト抗原の解析や再構築が進められている<sup>87</sup>。

### 3. 血清抗体

鶏コクシジウムに感染した、または死虫抗原を接種されたヒナの血清中には、約1週間で特異抗体が生産される。*E. tenella* スポロゾイトを抗原とし、感染ヒナ血清について間接蛍光抗体法を実施した試験では、IgM, IgA, IgG クラスの抗体がこの順位で検出され、初感染に限っては感染17日前後で抗体レベルは最高に達し、21日前後で下降しはじめるという<sup>2,52,118</sup>。

*In vitro* において *E. tenella* および *E. acervulina* 感染、耐過ヒナの新鮮血清をスポロゾイトまたはメロゾイトに作用させると、原虫の活動停止<sup>82</sup>および溶解が起こり<sup>7,82,62</sup>、感受性鶏に対する感染性を消失する<sup>82</sup>。しかし、非働化血清の作用では、原虫の収縮は認められるものの、溶解にまでは進行しないため<sup>7,61</sup>、反応は補体要求性と解釈されている。この反応は、最近 *E. tenella* スポロゾイトに対して作製された単クローン性抗体とフェリチンコンジュゲートを用いた電顕の観察により、スポロゾイト表皮膜の溶解として確認された<sup>114,115</sup>。なお、諸種の単クローン性抗体について、培養細胞への原虫の侵入抑制効果を検討した報告では<sup>4</sup>、表皮膜抗原に反応する単クローン性抗体にのみ活性が認められている。いっぽう、非働化した単クローン性抗体をスポロゾイト表皮に反応させ、フェリチンコンジュゲートを作用させた場合、表皮膜全体に付着したフェリチン顆粒がスポロゾイトの後部へ移動し、後端でキャップ状に貯留した後、スポロゾイトより離脱する現象が観察されており<sup>116</sup>、この

現象はフェリチン顆粒を介して、単クローン性抗体と結合した原虫表面抗原の移動を示すものであり、原虫の抗体による作用からの脱却を示すものと考察されている。しかし、これは原虫の溶解過程の一つの表現とも受け取れる。

*In vitro* で観察されるほかの反応にオプソニン作用があり、この現象は非感染ヒナ由来の培養腹腔マクロファージに *E. tenella* のスポロゾイト<sup>93</sup>やメロゾイト<sup>76</sup>を非働化免疫血清とともに接種して、またはヒナの腹腔に免疫血清とスポロゾイトを同時に接種して<sup>33</sup>、正常ヒナ血清添加の対照と比較した場合のマクロファージによる原虫取り込み数の増加として確認されている。この作用に関与する抗体の一つは IgG であり<sup>76</sup>、後述の細胞性免疫において一役を演ずるものと考えられる。

*In vitro* においては、このように抗原虫効果が認められるにもかかわらず、免疫血清を感受性鶏に接種しても攻撃感染に対する抵抗性は伝達されないとする報告<sup>87</sup>や、免疫鶏に由来するヒナが移行抗体による抵抗性を示さないとする報告<sup>61</sup>があり、また、ホルモンや免疫抑制剤による bursectomy の影響は、感染に対して血清抗体の生産抑制としては認められるものの、抵抗性獲得能力の減弱傾向としてはほとんど認められず<sup>49</sup>、反対に、T細胞系を特異的に障害する免疫抑制剤 (cyclosporin A) を投与したヒナでは、感染により血清抗体は生産されるものの、抵抗性は付与されないとする報告がある<sup>49</sup>。これらの現象から、血清抗体の抵抗性との関連を疑問視する向きもある。

いっぽう、免疫血清による受動免疫を肯定する報告<sup>92,95</sup>もあり、免疫抑制剤の効果については、その作用においてT細胞とB細胞の区分は明確にはされていないものの、若干の抗体生産抑制を伴って鶏コクシジウム感染におけるオーシスト排泄期間 (patent period) の延長や、ごく軽度の免疫抑制が惹起されるとする報告もあり<sup>41,63,91</sup>、また基本的に thymectomy や bursectomy の効果は強度の免疫抑制を発現するほど強くはないとする報告もある<sup>105</sup>。また、F囊を強く障害する強毒 IBD ウイルスを接種した後、*E. tenella* を感染させた場合、血清抗体の生産抑制とともに免疫抑制が起こるだけでなく<sup>82</sup>、初感染においてさえ症状が増悪されることも述べられている<sup>24</sup>。

Rose<sup>104</sup> はスポロゾイトの侵入刺激により腸管の透過性が変化を来し、抗体など液性成分の腸管腔への漏出を示唆しており、これを液性免疫の一機序として位置づけている。しかし、この現象は蠕虫寄生でみられる巨細胞のアミン放出の結果起こる過敏症とは異なるとされる<sup>108</sup>。

以上のように、血清抗体の *in vivo* における効果については肯定と否定の両面の見解があり必ずしも明確ではないが、*in vitro* 試験での効果は歴然としており、ヒナの複

雑な免疫機構において抗体が何等かの役割を演じていることは否定できないように思われる。

#### 4. 分泌型抗体

*E. tenella* に感染した鶏の盲腸内容物中に、スポロゾイトの培養細胞への侵入を阻止する物質が検出され、これは免疫拡散法により IgA であることが確認された<sup>19)</sup>。また、胆汁中にも鶏コクシジウムの抗原と反応する IgA 抗体が検出されており<sup>12, 49, 52)</sup>、前述のように、血清中にも確認されている。しかし、腸管腔内容物中の IgA 量は鶏コクシジウム感染に随伴して一時的に増加するのに対し、血清中の IgA はほとんど変動しないとされている。したがって、スポロゾイトの侵入阻止に関係する IgA は血清中の IgA が腸管腔に漏出したものではなく、腸粘膜に局在するプラズマ細胞により生産されたものと考察されている<sup>19)</sup>。

この IgA 抗体は原虫に対して直接的な中和効果は有せず、単に原虫の粘膜上皮細胞への侵入を阻止するにとどまり、その間に原虫にとって有害な諸種の物質に原虫を暴露することにより、結果的に殺原虫効果を発揮するように考えられており<sup>20)</sup>、免疫鶏の組織学的観察において<sup>45)</sup>、多くのスポロゾイトが粘膜細胞内に侵入した後、初代メロゴニーの途中で死滅することを論拠としている<sup>20)</sup>。

いっぽう、腸管粘膜細胞への侵入阻止は *Eimeria* の種によって異なり、腸管下部の寄生種である *E. tenella* や *E. adenoides* (七面鳥) 感染個体では、非感染鶏に比較し 55~36% の侵入スポロゾイトの減少が見られるのに対し、上部寄生種である *E. acervulina* や *E. meleagrimitis* (七面鳥) では逆に増加するとい<sup>5)</sup>、コクシジウムの種により分泌型抗体の効果は異なるように解釈される。

なお、前述の血清抗体と同様に免疫抑制剤を用いた *in vivo* の試験では、胆汁中の IgA 抗体の生産が抑制されても抵抗性の減弱は認められない。したがって、IgA 抗体の役割自体について懐疑的な見解もある<sup>49)</sup>。

#### 5. 細胞性免疫

現在、細胞性免疫は鶏コクシジウムの免疫機構において中核をなしているように扱われ、その背景になる実験も豊富である。*In vitro* においては、*E. tenella* 感染鶏の腹腔マクロファージによる<sup>77)</sup>、あるいは抗原添加脾臓リンパ球培養液による正常鶏腹腔細胞の遊走阻止反応<sup>73)</sup>などで、感染後約 1 週から 3~4 週間、遊走阻止活性が認められている。また、遊走阻止活性の高い時期に *E. tenella* 感染ヒナの脾リンパ球を培養し、スポロゾイト抗原で刺激した培養上清中には、正常ヒナ腹腔マクロファージを活性化させる因子が検出されている<sup>79)</sup>。これらの結果は、感染ヒナの脾リンパ球 (T細胞) を抗原で刺激することにより、遊走阻止因子やマクロファージ活性化因子など

のリンフォカインが生産されることを示す。また、感染ヒナの脾臓 T細胞を原虫抗原で刺激した場合、種により若干の差異はあるが、およそ 18~21 日で高い増殖活性が見られている<sup>48)</sup>。反応は *E. tenella* および *E. maxima* 感染において強く、*E. acervulina* 感染では低く、また、B 領域 MHC 遺伝子の異なる近交系鶏種 (ハイライン系 SC および FP) 2 系統間では発現の様相を異にし<sup>48, 50)</sup>、鶏コクシジウムの種や株、宿主の遺伝的背景などが免疫応答に関係するように示唆されている。なお、*E. maxima* 感染鶏の血清中にインターフェロン (INF) が生産され、また INF インデューサーである statoron を接種したヒナにおいて、本原虫感染に対する抵抗性が認められており<sup>59)</sup>、上記の細胞反応と INF- $\gamma$  との関連性も示唆される。

いっぽう、*in vivo* の試験では *E. tenella*<sup>97)</sup> および *E. necatrix*<sup>25)</sup> 感染免疫鶏で遅延型過敏反応陽性が確認され、加えて後者では末梢血リンパ球の抗原刺激による増殖反応との一致が示されている。免疫鶏の末梢血リンパ球は攻撃感染後 2 時間以内では著明な減少を示し<sup>98)</sup>、その後急速に増加するとい<sup>102)</sup>、腸管粘膜固有層の細胞浸潤との関連性が推察されている。また、Tリンパ球に対して選択的に、とくに IL-2 の生産や表現を抑制し、および IL-2 レセプター部位やトランスフェリン・レセプター部位を妨害する免疫抑制剤<sup>51)</sup>として知られる cyclosporin A を接種したヒナで、オーシスト生産を指標として判定した場合、*E. tenella* の免疫形成が抑制されることが認められている<sup>49)</sup>。さらに、*E. tenella* 免疫鶏の盲腸扁桃細胞を発育鶏卵に移入し、スポロゾイトで攻撃した試験では、非免疫鶏の細胞を移入した対照に比べて感染度合が低いことが述べられている<sup>106)</sup>。以上の知見は、細胞性免疫が鶏コクシジウム感染に対する抵抗性の主要部分を担当していることを示唆するものである。しかし、それを発現する effector 細胞 (E細胞) については、まだ確定されてはいない。

組織学的観察によると *E. tenella*<sup>85)</sup>、*E. necatrix*<sup>1)</sup>、*E. acervulina*、*E. brunetti*、*E. mixima*、*E. precocx*<sup>83, 85)</sup> などのスポロゾイトは絨毛の上皮に侵入したのち粘膜固有層に移行し、顆粒を有する単球に取り込まれて固有寄生部位である陰窩の上皮細胞へ移送されるという。古い報告<sup>11, 21, 84)</sup>では、移送細胞はマクロファージとされていたが、最近、電顕による観察でこの細胞はリンパ球の形態的特徴を示すため、機能的には未分析であるものの intra-intestinal (epithelial) lymphocyte (IEL) に位置付けることが提唱されている<sup>1)</sup>。なお、最近 IEL 集団内には鶏の腫瘍細胞の cell line に対して非特異的に細胞障害性を示す natural killer 細胞が含まれていることが確認された<sup>10)</sup>。IEL に取り込まれたスポロゾイトは固有寄生部位に限らず、広範に他部位に移送されるようであり、その一部は固有寄

生部位に帰還して感染に寄与するように推測されており、この現象は、実験的に感染させたヒナの感染早期の血液や肝臓、脾臓、腸粘膜の乳剤などを感受性鶏へ接種することにより、証明されている<sup>1)</sup>。この IEL が E 細胞として機能するように考えられたが、免疫鶏の試験<sup>85)</sup>では、IEL 内のスポロゾイトは形態的に傷害を受けた形跡を示さず、また感染性も消失せず、単に寄生部位への移送が数量的に制限されるにとどまり、実際には IEL が E 細胞の主体であるかどうか判断していない。

このため *in vitro* および *in vivo* における背景上、少なからず細胞性免疫の関連が支持されているにもかかわらず、実際の殺原虫作用の詳細については今後の研究に待たなければならない。

### 6. 非弱毒生ワクチン

生ワクチン使用の基礎となる免疫付与試験は多数報告されているが、その 1 例を示すと(表 1)、幼雛に 1 羽あたり 500 個の諸種のオーシストを経口接種し、1 週後にその 10 倍、さらに *E. necatrix* ではその 1 週後に初回の 100 倍を接種した場合、症状をまったく誘発せず高度の免疫を付与できる。このように少量のオーシストから開始し、1~2 週間隔で増量しつつ感染させる方法は、強毒株を用いる場合においてさえきわめて安全であるが<sup>81,103)</sup>、野外の平均い条件では初回感染により鶏糞中に排泄されたオーシストのほうが、2 回目の接種数よりむしろ多数になるため、実際上の価値はない。野外条件では、初回感染のみを投与オーシストに依存し、次回以後は排泄されたオーシストに依存する方式(計画感染法)が採られる。ただし、非弱毒オーシストを接種材料として用いる場合、鶏糞中のオーシストによる 2 回目以後の感染では、摂取数を制限できないため、大量のオーシストを摂取する結果としてヒナの発病をみることもあり、場合によっては治療剤の併用が必要とされる。ワクチン使用後の強度の感染による症状の軽減には、本来駆虫薬であるレバミゾールの非特異的な免疫賦活作用を利用

する可能性もある<sup>26,80)</sup>。なお、すでに述べたように鶏コクシジウム症の免疫は種特異的であるため、弱病原性種により全種に対する免疫は期待できず、生ワクチンの構成には免疫付与を目的とする当該種自体を使用する必要がある。

このような条件で現在実用化されている生ワクチンには、米国の Cocci Vac<sup>®</sup> (Sterwin Lab. Inc.)、およびカナダの Immucox (Cyanamid Canad Inc.) などがあり、前者は諸種の実験において免疫や混合感染の対照として利用され<sup>22,38,60)</sup>、また、後者では野外飼育鶏における効果が報告されている<sup>47)</sup>。これらのワクチンは、とくに弱毒化されたものではないようであり、場合によっては治療剤の併用が必要とされよう。非弱毒株生ワクチンは、後述の弱毒株生ワクチンと比較して安全性の面で若干の欠点を有するが、長所は免疫力に優れ、早期に強度の免疫付与が期待できることにある。

日本国内では、過去、一部の種鶏場において、独自でまたは他の機関を介してオーシストを調製し、免疫付与(計画感染)を実施してきた経緯がある。しかし、昭和 63 年 12 月 2 日付、畜産局長通達(62 畜 A 第 4887 号)により免疫付与用オーシストについてはワクチンとしての行政上の正式見解が示されたため、現在、オーシストの調製、配布にあたっては製造許可を受ける必要があり、安易に計画感染は実施できない状況になった。

### 7. 弱毒化生ワクチン

鶏コクシジウム原虫の弱毒化については、最近、JEFFERS<sup>35)</sup>により概要が示されたが、本項では、さらに簡単に説明したい。

古典的には、オーシストに対して紫外線照射をはじめとする物理化学的処理を加えて弱毒化が試みられたが<sup>35)</sup>、おおむね不成功に終わった。その後、発育鶏卵で鶏コクシジウム原虫の培養が可能となり、発育鶏卵による順化が *E. tenella*<sup>27,54,56,57,74,75)</sup>、*E. necatrix*<sup>27,109,110)</sup> および *E. mivati*<sup>55)</sup> で報告され、また *E. tenella* および *E. necatrix*

表 1 各種鶏コクシジウムの繰り返し感染による免疫効果 (ROSE and LONG, 1962)

感 染 種	免 疫 感 染			攻 撃 感 染	
	1 回(0 日)	2 回(7 日)	3 回(14 日)	1 回(38 日)	2 回(48 日)
<i>E. acervulina</i> 接種数 <sup>a)</sup>	500,000	5,000,000	10,000,000	20,000,000	20,000,000
再生産オーシスト指数 <sup>b)</sup>	1,026	12	(86:1) <sup>c)</sup>	— <sup>d)</sup>	—
<i>E. tenella</i> 接種数	500	5,000		100,000	100,000
再生産オーシスト指数	64,000	4,600	(14:1)	—	—
<i>E. necatrix</i> 接種数	500	5,000	50,000	100,000	100,000
再生産オーシスト指数	12,000	1,360	(9:1)	—	—
<i>E. maxima</i> 接種数	500	5,000		100,000	100,000
再生産オーシスト指数	30,000	5.2	(5,700:1)	—	—

注) a: オーシスト数/羽 b: 総生産オーシスト数/接種オーシスト数 c: 1 回接種の再生産指数: 2 回接種の再生産指数 d: オーシスト生産陰性を示す

については七面鳥の発育卵でも報告された<sup>44)</sup>。これらの種ではスポロゾイトを発育鶏卵の尿腔内へ接種することにより、漿尿管細胞内で発育環が完成され、オーシストが収集されるため、継代が可能である。長期間、発育鶏卵で継代された株は、ヒナおよび発育鶏卵双方に対して病原性を減弱させており、*E. tenella* 順化株感染ヒナにおける観察では<sup>56)</sup>、第2代メロント（シヅント）は通常の寄生部位である粘膜固有層から消滅し、粘膜上皮に限局して発育したという。しかも、通常より小型の形状を持ち、これが病原性減弱の原因とされている。しかし、弱毒化現象はすべての順化株に共通することではなく、長期間の継代にもかかわらず、病原性の減弱が認められない株も報告<sup>6)</sup>されている。

発育鶏卵順化株の性質は、とくに継代の若い時期には完全に確立されたものではないようであり、わずかに1回ヒナを通過させるだけで病原性の復帰が認められ<sup>54)</sup>、継代を重ねるにつれ、またクローン化により安定性が確保される現象も報告<sup>57, 68)</sup>されているが、継代数と安定性の関係については未知であり、また関連の報告も少ない。このような確立しにくい性質に加え、順化できる種は *in ovo* 培養の可能な種に限定されるため、実際 *E. tenella* の順化株に限っては平飼い免疫試験<sup>60)</sup>で、一応の成績を納めたにもかかわらず、現在の趨勢としてはワクチン化を指向しているようには見受けられない。

他の弱毒法である早熟株 (precoocious line) の作出は JEFFERS (1975)<sup>34)</sup> により開始され、その後、多くの研究者によりほぼ全種について試みられてきた(表2)。早熟株はヒナにオーシストを接種した後、最短期間で生産されたオーシストを次回の接種材料とし、繰り返し継代す

表2 早熟株 (precoocious line) の作出

コクシジウム種	株名	prepatent period (時間)	文 献
<i>E. tenella</i>	NIAH/P 20	112	43)
	Wis-F-125	125	67, 34)
	Wis-F-96	96	67)
	HP 38 S+5	109	68)
	Penn State	112	58)
<i>E. necatrix</i>	HP 41	117	68)
	HP 30	113	110)
	FS 105	120	58)
<i>E. acervulina</i>	HP	62	63, 64)
	H&C	72	58)
<i>E. mitis</i>	HP 14	67	66)
	FS 50	76	58)
<i>E. precox</i>	HP 20	49~64	111, 112)
	GA	66	58)
<i>E. maxima</i>	H13	5日	108)
	Mx 10	106	58)
<i>E. brunetti</i>	VA	75	58)

る間に徐々にオーシスト生産までの期間を短縮することによって作製され、機序的には早熟株の選抜増殖とされる。1例をとると、*E. tenella* の Wis-F 株の場合、150代継代までに短縮株の起源である Wis 株に比較して、接種後オーシストの生産されるまでの期間 (prepatent period) は約40時間短縮されている<sup>55)</sup>。短縮株の感染ヒナにおける組織学的観察では、種および株によって原虫の発育様相が異なり、第2代メロニーを欠除する場合<sup>34)</sup>、または第2代メロントの寄生部位には変化はないが形状が小型化し、かつ数量が減少した場合<sup>43, 68, 69)</sup>が報告されており、この第2代メロニーの変化が病原性低下の原因と考えられている。

早熟株の安定性はきわめて高く、1例として *E. tenella* の Wis-F 株では、早期に生産されるオーシストに限らず、全生産期間にわたり収集したオーシストを継代材料として25代継代しても病原性の復帰はないとい<sup>35)</sup>、この安定性はワクチン材料として絶大な長所と考えられている。

早熟株の強毒野外株の攻撃に対する免疫原性は基本的には確認されており<sup>64, 65)</sup>、実際、平飼い試験においても Wis-F-125 株により証明されている<sup>38)</sup>。しかし、高度に弱毒化した早熟株と強毒株の免疫力の差は一般的に認められている<sup>68)</sup>。一例をとれば、ヒナに強毒株と早熟株 (Wis-F-96) のオーシストをそれぞれ同数接種して免疫し、強毒株の攻撃に対する免疫力を比較した試験では、早熟株の免疫力は著しく低いことが示されており<sup>38)</sup>、強毒株と同程度の免疫状態を得るには免疫感染によって生産されるオーシスト数が同等になるまで接種オーシスト数を増加する必要があることが示されている<sup>67)</sup>。この現象は、両株のヒナ体内における抗原感作ステージの増殖性の差、言い替えれば抗原感作力の差に起因しているであろう。しかし、野外の平飼い条件で早熟株ワクチンが計画感染法にそって使用される限りでは、生産されたオーシストにより再感染が繰り返され、最終的に免疫付与は達成されるため、非弱毒生ワクチンに比較して免疫成立期間が若干遅延することはあっても、多少の免疫力の低さは事実上問題とならないように考えられる。

現在、早熟株は弱毒生ワクチンの有力候補とみなされ、近々、市場に出現する見通しであるが、その安全性の高さからある特定の種鶏に限定されず、ブロイラーやその他の鶏種にも応用されるものと予想されている。

## 8. リコンビナントワクチン

従来、スポロゾイトやメロゾイトなどにより調製した物質をヒナに注射しても、有効な抵抗性は得られないように考えられてきた<sup>100)</sup>。しかし、実際には関連の報告はきわめて少なく、この分野はまだ十分解明されていないように感じられる。おそらくその理由は、広範な免疫

試験に要する原虫抗原を十分に入手することの技術的および労力の困難性や、ましてやワクチン化などは到底望めないとする先入観によるように思われる。最近、2株 (Wis 株, Penn State Emb. 株) の *E. tenella* 感染ヒナ組織乳剤を感受性ヒナに腹腔内接種して、攻撃感染に対する効果を体重増加で判定した場合、有効であったという成績が得られているが、その他の株や、その他の種では無効であったという<sup>70)</sup>。

このような現状にもかかわらず、米国においてはリコンビナント DNA テクノロジーにより、リコンビナントワクチンの開発研究が進められている。

スポロゾイトの一抗原に匹敵する蛋白物質を DNA テクノロジーにより作製し、ヒナで免疫試験を実施した結果、わずかではあるが抵抗性付与の所見が確認されたこととされ、今後、検討すべき問題が多いものの、ワクチン化の可能性は一応示唆されている<sup>16)</sup>。いっぽう、別の研究グループでは、鶏コクシジウムの免疫の主要部分は細胞性免疫に依存するとして、*E. acervulina* のスポロゾイトおよびメロゾイトの表面蛋白に対応する、リコンビナント DNA テクノロジーにより作製した蛋白の、感染ヒナの T 細胞に対する活性化能力を検討し<sup>37)</sup>、リコンビナントワクチンの方向性を示唆している。

リコンビナントワクチンの特長は、高度の安全性とともに、大量製造が可能な点にあり、効力の面で保証されれば実用化の可能性はある。投与に関しては、例えば、ワクチンをふ化前の鶏胎児に接種する方法が考案されており (Embrex Inc., U.S.A.)、また非病原性大腸菌やある種のウイルスを発現ベクターとして用い、直接ヒナに経口投与する方法などが考えられている。

## 9. 免疫状態の評価

感染鶏の免疫状態は基本的には攻撃感染によって評価されるが、細胞性免疫についてはマクロファージや白血球の遊走阻止反応<sup>77)</sup>、リンパ球の幼若化反応<sup>48, 50)</sup>などが使用でき、また、血清抗体の検出には原虫溶解反応<sup>7, 61)</sup>、色素試験<sup>71)</sup>、寒天ゲル内沈降反応<sup>86, 87, 103)</sup>、間接蛍光抗体法<sup>2, 9, 73)</sup>、ELISA<sup>78, 81, 83, 107)</sup>などが使用できる。

野外条件では、経時的にオーストの生産状況を追跡することにより、おおよその免疫状態の推測はつくが、一回感染後のオースト排泄期間 (patent period) は、通常約 1 週間であり、しかも多量の排泄は最初の 3～4 日間にかたよるため、検出のタイミングが感染や免疫評価の重要な要素となる。したがって、評価の信頼性を高めるには、多数の検体による頻回検査が要求され、実際これは並み大抵の作業ではない。

いっぽう、感染鶏の血清抗体レベルを測定することにより免疫状態が推測でき、この場合とくに頻回検査を必要としない。諸種の感染血清抗体と原虫抗原の間には、

比較的高い交差性が認められるため<sup>83, 107, 114)</sup>、現在の血清診断法では感染種を特定できない欠点はあるが、感染種の明らかなワクチン接種鶏に限ってみれば、一応の評価法として利用できよう。なお、血清診断法に関しては、ELISA が最も実用的であり<sup>81)</sup>、大量の野外材料に適用しうるように思われる。

## おわりに

従来の鶏コクシジウム対策は、主として飼料中に添加される予防剤に依存してきた。しかし、選択できる有効な薬剤の品目が少ないことに加え、飼料安全法により予防剤の使用濃度および使用時期等は厳しく規制されており、また、常に薬剤耐性株の出現などの問題がつきまとうため、すべての鶏群にわたる予防法として、これは万全の策とはいえないのが実状である。また最近、とくに予防剤のあるものについては畜産製品への残留が問題となり、投薬プログラムの作成に支障をきたすようになってきている。いっぽう、長期間の飼育を要する種鶏では、予防剤の投与期間 (10 週齢まで) 以後の対策が求められ、とくに種卵の生産が開始された後の発病は著しい生産性低下をきたすため絶対に避けたいところである。

このような状況のもとに他の有効かつ実的な予防法として、生ワクチンの導入がとくに種鶏業者により要請されている。非弱毒、弱毒またリコンビナントワクチンなど、諸種のワクチンの開発・応用は世界的な趨勢となっており、国内においてもその必要性が痛感される。

本編はこのような背景を考慮に入れて記載した。また、収録した種を特定しない多くの試験成績は、おもに *E. tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina* などの感染により得られたものであり、記載内容は必ずしも全種に普遍性のあるものではなく、また各試験に対して共通性がない場合でも、文章構成の都合上、結論のみを組合せて流れをもたせた箇所もある。したがって、基本的な見解や個々の試験については異論のあることも予想されるが、その点はご容赦願いたい。

## 引用文献

- 1) AL-ATTAR, M. A. and FERNANDO, M. A.: *J. Parasitol.*, 73, 494~502 (1987).
- 2) ALI, N. A., MOVSESIJAN, M., SOKOLIC, A. and TANIELIAN, Z.: *Vet. Parasitol.*, 1, 309~316 (1976).
- 3) AUGUSTINE, P. C., DANFORTH, H. D. and Mc-ANDREW, S. J.: *J. Parasitol.*, 74, 653~659 (1988).
- 4) AUGUSTINE, P. C. and DANFORTH, H. D.: *Avian Dis.*, 29, 1212~1223 (1985).
- 5) AUGUSTINE, P. C. and DANFORTH, H. D.: *Avian Dis.*, 30, 347~351 (1986).
- 6) BEDRNIC, P.: *Arch. Geflügelkd.* 48, 209~215 (1984).

- 7) BURNS, W. C. and CHALLEY, J. R.: *J. Parasitol.*, 51, 660—668 (1965).
- 8) CARLSON, P. L.: *Avian Dis.*, 28, 1115~1119 (1984).
- 9) CERNA, Z.: *Acta Vet. Brno*, 39, 315~321 (1970).
- 10) CHAI, J. Y. and LILLEHOJ, H. S.: *Immunology*, 63, 111~117 (1988).
- 11) CHALLEY, J. R. and BURNS, W. C.: *J. Parasitol.*, 6, 238~241 (1959).
- 12) CLARE, R. A., STROUT, R. G., TAYLOR Jr. R. L. and AEED, P.: *Vet. Parasitol.*, 25, 33~38 (1987).
- 13) DANFORTH, H. D.: *J. Parasitol.*, 68, 392~397 (1982).
- 14) DANFORTH, H. D.: *Avian Dis.*, 31, 99~104 (1987).
- 15) DANFORTH, H. D. and AUGUSTINE, P. C.: *Poultry Sci.*, 62, 2145~2151 (1983).
- 16) DANFORTH, H. D. and AUGUSTINE, P. C.: *Avian Dis.*, 30, 37~42 (1986).
- 17) DANFORTH, H. D. and McANDREW, S. J.: *J. Parasitol.*, 73, 985~992 (1987).
- 18) DAVIS, P. J., BARRATT, E. J., MORGAN, M. and PARRY, S. H.: In: *Research in Avian Coccidiosis*, McDougald, L. R., JOYNER, L. P. and LONG, P. L., eds., 618, Univ. of Georgia (1986).
- 19) DAVIS, P. J., PARRY, S. H. and PORTER, P.: *Immunology*, 34, 879~888 (1978).
- 20) DAVIS, P. J. and PORTER, P.: *Immunology*, 36, 471~477 (1979).
- 21) DORAN, D. J.: *J. Protozool.*, 13, 27~33 (1966).
- 22) EDGAR, S. A.: In: *Research in Avian Coccidiosis*, McDougald, L. R., JOYNER, L. P. and LONG, P. L., eds, 617, Univ. of Georgia (1986).
- 23) FERNANDO, M. A., ROSE, M. E. and MILLARD, B. J.: *J. Parasitol.*, 73, 561~567 (1987).
- 24) GIAMBRONE, J. J., DONAHOE, J. P., DAWE, D. L. and EIDSON, C. S.: *Poultry Sci.*, 56, 243~246 (1977).
- 25) GIAMBRONE, J. J., KLESIVS, P. H. and EDGAR, S. A.: *Poultry Sci.*, 59, 38~43 (1980).
- 26) GIAMBRONE, J. J. and KLESIVS, P. H.: *Poultry Sci.*, 64, 1083~1089 (1985).
- 27) GORE, T. C., LONG, P. L., KOGUT, M. and JOHNSON, J.: *Avian Dis.*, 27, 559~568 (1983).
- 28) GROSS, W. B.: *Avian Dis.*, 29, 1018~1029 (1986).
- 29) HEIN, H. E.: *Exp. Parasitol.*, 29, 367~374 (1971).
- 30) HEIN, H. E.: *Exp. Parasitol.*, 38, 271~278 (1975).
- 31) HEIN, H. E.: *Exp. Parasitol.*, 40, 250~260 (1976).
- 32) HERLICH, H.: *J. Parasitol.*, 51, 847~851 (1965).
- 33) HUFF, D. and CLARK, D. T.: *J. Protozool.*, 17, 35~39 (1970).
- 34) JEFFERS, T. K.: *J. Parasitol.*, 61, 1083~1090 (1975).
- 35) JEFFERS T. K.: In: *Research in Avian Coccidiosis*, McDougald, L. R., JOYNER, L. P. and LONG, P. L., eds. 482~501, Univ. of Georgia (1986).
- 36) JEFFERS, T. K. and LONG, P. L.: *Exp. Parasitol.*, 60, 175~180 (1985).
- 37) JENKINS, M. C., LILLEHOJ, H. S. and DAME, J. B.: *Exp. Parasitol.*, 66, 96~107 (1988).
- 38) JOHNSON, J. and REID W. M.: *Poultry Sci.*, 58, 37~41 (1979).
- 39) JOYNER, L. P.: *Parasitology*, 59, 725~732 (1969).
- 40) JOYNER, L. P. and NORTON, C. C.: *Parasitology*, 67, 333~340 (1973).
- 41) JOYNER, L. P. and NORTON, C. C.: *Parasitology*, 68, 323~330 (1974).
- 42) JOYNER, L. P. and NORTON, C. C.: *Parasitology*, 72, 115~125 (1976).
- 43) KAWAGUCHI, H., KONISHI, T. and NAKAMURA, T.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50, 445~452 (1988).
- 44) KOGUT, M. H., GORE, T. C. and LONG, P. L.: *Parasitology*, 86, 199~209 (1983).
- 45) LEATHEM, W. D. and BURNS, W. C.: *J. Parasitol.* 53, 180~185 (1967).
- 46) LEATHEM, W. D. and BURNS, W. C.: *J. Parasitol.*, 54, 227~232 (1968).
- 47) LEE, E. H.: *Can. Vet. J.*, 28, 434~436 (1987).
- 48) LILLEHOJ, H. S.: *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 13, 321~330 (1986).
- 49) LILLEHOJ, H. S.: *Infect. Immun.*, 55, 1616~1621 (1987).
- 50) LILLEHOJ, H. S.: *Avian Dis.*, 32, 437~444 (1988).
- 51) LILLEHOJ, H. S., MALEK, T. R. and SHEVACH, E. M.: *J. Immunol.*, 133, 244~250 (1984).
- 52) LILLEHOJ, H. S. and RUFF, M. D.: *Avian Dis.*, 31, 112~119 (1987).
- 53) LONG, P. L.: *Palasitology*, 52, 89~93 (1962).
- 54) LONG, P. L.: *J. Comp. Pathol.*, 82, 429~437 (1972).
- 55) LONG, P. L.: *J. Comp. Pathol.*, 82, 439~445 (1972).
- 56) LONG, P. L.: *Parasitology*, 66, 55~62 (1973).
- 57) LONG, P. L.: *Avian Pathol.*, 3, 255~268 (1974).
- 58) LONG, P. L. and JOHNSON, J. K.: *Avian Pathol.*, 17, 305~314 (1988).
- 59) LONG, P. L. and MILNE, B. S.: *Parasitology*, 62, 295~302 (1971).
- 60) LONG, P. L. and MILLARD, B. J.: *Avian Pathol.*, 6, 77~92 (1977).
- 61) LONG, P. L. and ROSE, M. E.: *Exp. Parasitol.*, 12, 75~81 (1962).
- 62) LONG, P. L., ROSE, M. E. and PIERCE, A. E.: *Exp. Parasitol.*, 14, 210~217 (1963).
- 63) LONG, P. L. and ROSE, M. E.: *Parasitology*, 60, 147~155 (1970).
- 64) McDONALD, V., BALLINGALL, S. and SHIRLEY, M. W.: *Parasitology*, 84, 21~30 (1982).
- 65) McDONALD, V. and BALLINGALL, S.: *Parasitology*, 86, 361~369 (1983).
- 66) McDONALD, V. and BALLINGALL, S.: *Parasitology*,



- 86, 371~379 (1983).
- 67) McDONALD, V., ROSE, M. E., JEFFERS, T. K.: *Parasitology*, 93, 1~7 (1986).
- 68) McDONALD, V., SHIRLEY, M. W. and MILLARD, B. J.: *Avian Pathol.*, 15, 323~335 (1986).
- 69) McDONALD, V. and SHIRLEY, M. W.: *J. Parasitol.*, 73, 993~997 (1987).
- 70) MCKENZIE, M. E. and LONG, P. L.: *Poultry Sci.*, 65, 892~897 (1986).
- 71) MORITA, C., TSUTSUMI, Y. and SOEKAWA, M.: *Zbl. Vet. Med. B*, 19, 782~784 (1972).
- 72) MORITA, C., TSUTSUMI, Y. and SOEKAWA, M.: *J. Parasitol.*, 59, 199~200 (1973).
- 73) MOVESEIJAN, M., SOKOLIC, A., TANIELIAN, Z. and ALI, N. A.: *Acta Vet. (Beograd)*, 25, 59~64 (1975).
- 74) NAKAI, Y., KUWAHARA, M., OHASHI, K. and OGIMOTO, K.: *Jpn. J. Parasitol.*, 37, 59~61 (1988).
- 75) OGIMOTO, K. and NAKAI, Y.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 50, 553~555 (1988).
- 76) ONAGA, H. and ISHII, T.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 42, 211~219 (1980).
- 77) ONAGA, H. and ISHII, T.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 42, 345~351 (1980).
- 78) ONAGA, H., SAEKI, H., HOSHI, S. and UEDA, S.: *Avian Dis.*, 30, 658~661 (1986).
- 79) ONAGA, H., TAJIMA, M. and ISHII, T.: *Vet. Parasitol.*, 13, 1~11 (1983).
- 80) ONAGA, H., TAJIMA, M. and ISHII, T.: *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 256, 323~327 (1984).
- 81) ONAGA, H., TOGO, M., KUDO, Y., MOTOHASHI, T. and ISHII, T.: *Vet. Parasitol.*, in press (1989).
- 82) ONAGA, H., TOGO, M., OTAKI, Y. and TAJIMA, M.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 463~465 (1989).
- 83) OZ, H. S., MARKHAM, R. J., BEMRICK, W. J. and STROMBERG, B. E.: *J. Parasitol.*, 70, 859~863 (1984).
- 84) PATILLO, W. H.: *J. Parasitol.*, 45, 253~258 (1959).
- 85) PERRY, E. A. and LONG, P. L.: *Vet. Parasitol.*, 25, 9~17 (1987).
- 86) PIERCE, A. E., LONG, P. L. and HORTON-SMITH, C.: *Immunology*, 5, 129~152 (1962).
- 87) PIERCE, A. E., LONG, P. L. and HORTON-SMITH, C.: *Immunology*, 6, 37~47 (1963).
- 88) RILEY, D. and FERNANDO, M. A.: *J. Parasitol.*, 74, 103~110 (1988).
- 89) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 57, 363~370 (1967).
- 90) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 57, 567~583 (1967).
- 91) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 60, 137~146 (1970).
- 92) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 62, 11~25 (1971).
- 93) ROSE, M. E.: *Infect. Immun.*, 10, 862~871 (1974).
- 94) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 68, 35~45 (1974).
- 95) ROSE, M. E.: *Parasitology*, 68, 285~292 (1974).
- 96) ROSE, M. E.: *Vet. Rec.*, 98, 481~484 (1976).
- 97) ROSE, M. E.: *Exp. Parasitol.*, 42, 129~141 (1977).
- 98) ROSE, M. E.: *Infect. Immun.*, 45, 166~171 (1984).
- 99) ROSE, M. E.: In: *Research in Avian Coccidiosis*, McDUGALD, L. R., JOYNER, L. P. and LONG, P. L., eds. 449~469, Univ. of Georgia (1986).
- 100) ROSE, M. E.: In: *The Biology of the Coccidia*, LONG, P. L. ed., 329~371, Univ. Park Press, Baltimore (1982).
- 101) ROSE, M. E. and HESKETH, P.: *Parasitology*, 73, 25~37 (1976).
- 102) ROSE, M. E., HESKETH, P. and OGILVIE, B. M.: *Immunology*, 36, 71~79 (1979).
- 103) ROSE, M. E. and LONG, P. L.: *Immunology*, 5, 79~92 (1962).
- 104) ROSE, M. E. and LONG, P. L.: *Experimentia*, 25, 183~184 (1969).
- 105) ROSE, M. E. and LONG, P. L.: *Parasitology*, 60, 291~299 (1970).
- 106) ROSE, M. E. and LONG, P. L.: *Parasitology*, 63, 299~313 (1971).
- 107) ROSE, M. E. and MOCKETT, A. P. A.: *Parasite Immunol.*, 5, 479~489 (1983).
- 108) ROSE, M. E., OGILVIE, M. and BRADLEY, J. W. A.: *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 63, 21~29 (1980).
- 109) SHIRLEY, M. W.: *Parasitology*, 81, 525~535 (1980).
- 110) SHIRLEY, M. W., BELLATTI, M. A. and MILLARD, B. J.: *Parasitology*, 84, 215~226 (1982).
- 111) SHIRLEY, M. W. and BELLATTI, M. A.: *Avian Pathol.*, 13, 657~668 (1984).
- 112) SHIRLEY, M. W., McDONALD, V., CHAPMAN, H. D. and MILLARD, B. J.: *Avian Pathol.*, 13, 669~682 (1984).
- 113) SOKOLIC, A., MOVESEIJAN, M., ALI, N. A. and TANIELIAN, Z.: *Acta Vet. (Beograd)*, 24, 55~60 (1974).
- 114) SPEER, C. A.: *J. Parasitol.*, 69, 775~777 (1983).
- 115) SPEER, C. A., WONG, R. B. and SCHENKEL, R. H.: *J. Parasitol.*, 30, 548~554 (1983).
- 116) SPEER, C. A., WONG, R. B., BLIXT, J. A. and SCHENKEL, R. H.: *J. Parasitol.*, 71, 33~42 (1985).
- 117) TREES, A. J., CROZIER, S. J., MCKELLAR, S. B. and WACHIRA, T. M.: *Vet. Parasitol.*, 18, 349~357 (1985).