

琉球大学学術リポジトリ

IV.

発育鶏卵の感受性(鶏の実験的トキソプラズマ症に関する研究)(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 俊夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4472

鶏の実験的トキソプラズマ症に関する研究

IV. 発育鶏卵の感受性

金城 俊 夫*

Toshio KINJO: Experimental toxoplasmosis in chickens IV. Susceptibility of embryonated eggs

I 緒 言

鶏の発育卵がトキソプラズマ (Tp) 感染に対し高い感受性をもつことについては、既に多くの研究報告があるが、卵令、接種部位およびTp数等の種々の条件を変えて、感受性の変動を追究した報告はない。そこで本実験では種々の発育段階にある発育鶏卵を用い、また漿尿膜、尿膜腔、卵黄嚢等と接種方法を変えてTpの感染実験を行なった。

II 実験材料および方法

1. 発育鶏卵

市販の受精卵を37°C孵卵器内に納置したものを供試した。

2. Tp接種法

感染3日目のマウス腹水中のTpを用い、漿尿膜、尿膜腔および卵黄嚢内にそれぞれ所要量接種したが、具体的な方法については成績の項で記載する。

3. 観察法

接種後は毎日2回検卵し、胎児の生死を観察した。死亡卵については卵殻から胎児その他を取り出し、漿尿膜、羊膜等については白斑形成の状況、尿膜腔液、羊水、卵黄嚢および胎児各臓器については肉眼的に病変の有無を観察した。

* 琉球大学農学部畜産学科

琉球大学農学部学術報告 19: 421~429 (1972)

またこれら各部位でのTpの分布状況は塗抹染色標本の鏡検によって観察し、マウス接種によるTp検索は行なわなかった。

4. その他の方法

特に記載しないその他の方法については、すべて前報 (2,3,4) のそれらに準じた。

III 実験成績

1. 漿尿膜接種試験

漿尿膜接種可能な6,10,12および14日の各発育鶏卵を使用した。

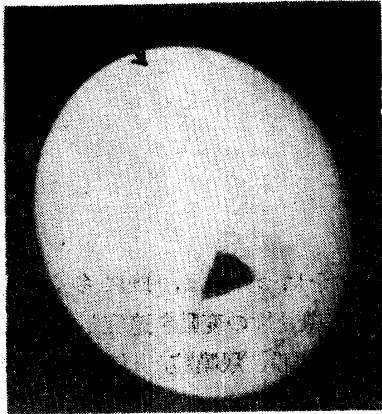


図 1. Tpの発育鶏卵漿尿膜接種

Fig. 1. Inoculation of Tp onto chorioallantoic membrane of embryonated hens' egg

接種方法は検卵器を用いて、卵の気室部の位置および漿尿膜がよく発育し、しかも大きな血管のない部分を確認してから図1の如く気室部の中央(図の↓部)に卵殻膜までつらぬく小孔を作る。また漿尿膜の部分に卵殻を1辺10mm程度の正三角形の窓を鋸でけづりとり、現われた卵殻膜の中央部に滅菌生食1滴々下し、注射針の先で卵殻膜のみに傷をつける。その時生食は卵殻膜と漿尿膜の間に浸透していく。空気を追い出したゴム帽を気室部の小孔に密着させ、静かに気室内の空気を吸引すると、窓の部分の漿尿膜が卵殻膜からはがれて人工気室ができる。この窓をとおして所要Tp数を0.25 mlの生食に含ませて漿尿膜上に滴下接種した。接種後は滅菌パラフィン・ワセリン合剤を窓の周囲に塗布し、カバーグラスで蓋をして、また気室部の小孔も同様に封じて孵卵器内で静置培養し観察した。

その成績は表1に示す如くである。

表から明らかな如く、接種量および発育時期の如何を問わずほとんど各例Tpにより死亡している。接種Tp数の多い群程早期に胎児が死亡する傾向は、どの発育段階の卵でも同じように認められる。この成績から感染性を有するTpのごく微量接種によっても胎児を感染斃死せしめることができるものと思われる。

12日あるいは14日卵の如く、発育のかなり進んだ時期の卵に少量のTp接種を行なった場合、孵化日に至るも胎児を斃死せしめ得ないことがあるが、その際正常孵化する場合と、破殻不完全の状態で斃死する場合が観察された。しかし前者においても孵化後1~2日でTpにより斃死している。このように卵殻内で感染を蒙った胎児は一見正常孵化の経過で雛になっても、Tpは雛体内でなお増殖を続け、遂に斃死せしめるものと思われる。

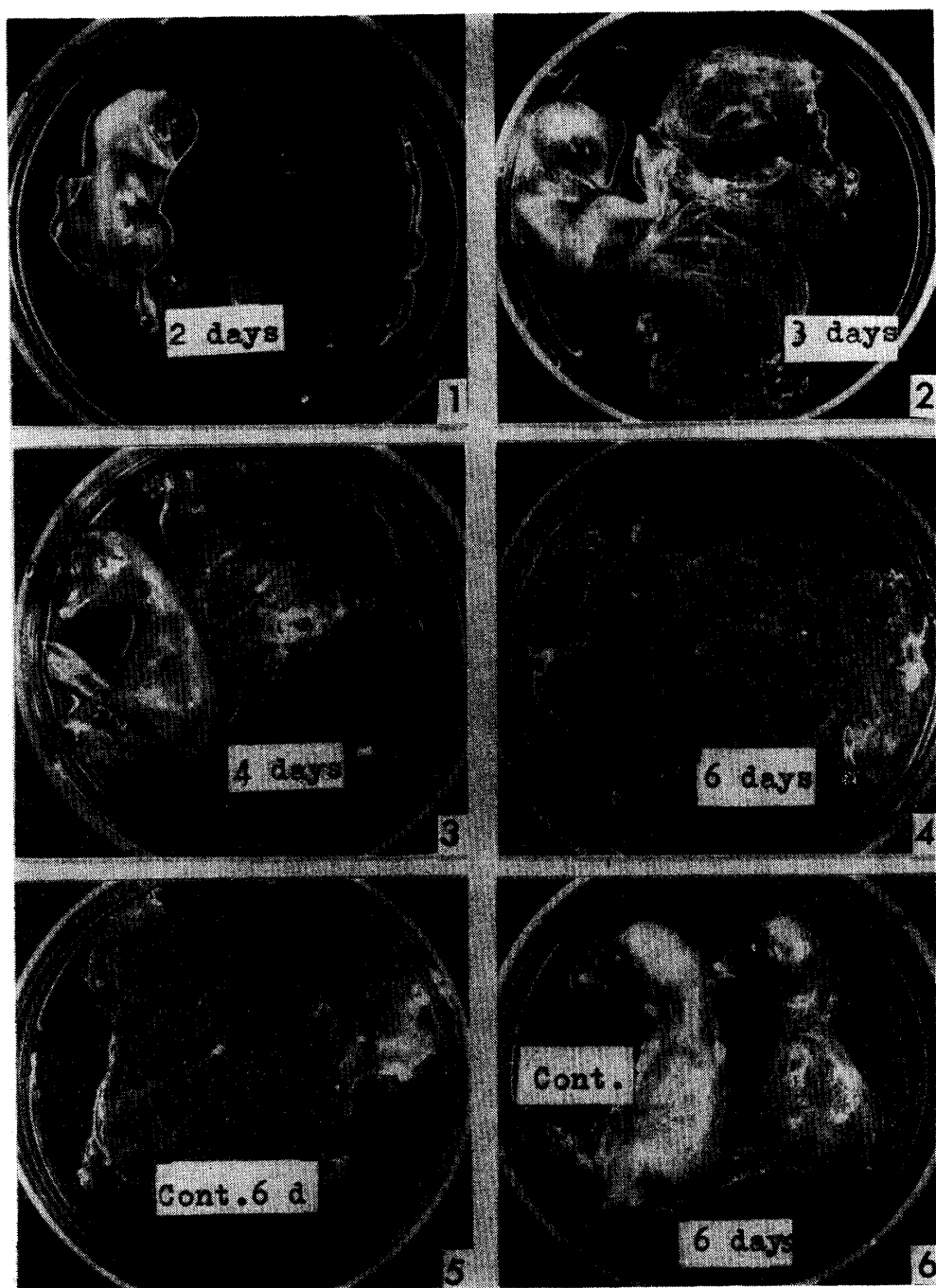
Table 1. Inoculation of Tp onto chorioallantoic membrane of 6 to 14 day-old chicken embryos

表 1. 発育鶏卵漿尿膜への Tp の接種試験

Age of embryo in days	Egg No.	No. of Tp inoculated	Days of death	Pock formation	Distribution of Tp															
					Ac.	Af.	Yo.	Br.	Liv.	Sp.	Lu.									
6	1	1.5×10 ⁴	6	++	+	+	-	-	+	-	-									
	2	"	6	6.0	++++	++	-	-	-	++	+	++								
	3	"	x																	
	4	1.5×10 ³	7										+++	+++	+	-	+	++	++	+
	5	"	x	7.5	++	++	-	-	-	+	-	+								
	6	"	8																	
	7	1.5×10 ²	11	10.7	+++	+++	+	-	-	++	+	+								
	8	"	10										++	++	-	-	-	+	-	-
	9	"	11										+++	++	-	-	-	++	-	-
	10	1.5×10	6	10.0	++	-	-	-	+	+	-	-								
	11	"	12										+	-	-	-	-	+	+	+
	12	"	12										++	+	-	-	-	++	+	+
10	1	2×10 ⁶	5	++	++	N	-	+	++	++	+++									
	2	"	5	5.3	+++	++	-	-	+	++	++	+								
	3	"	6										++	++	+	-	+	++	++	++
	4	2×10 ⁴	6										+++	++	+	-	-	++	+	+
	5	"	x	6.5	+++	+	N	-	-	-	+	+								
	6	"	7																	
	7	2×10 ²	8	7.7	++	+	N	-	-	+	+	-								
	8	"	7										+++	+	N	-	-	+	-	-
	9	"	8										++	N	N	N	-	++	-	-
	10	2×10	x	10.5	N	N	N	-	+	+	+	+								
	11	"	10										N	N	N	N	-	+	-	+
	12	"	11										N	N	N	N	-	+	-	+
12	1	5×10 ⁵	3	+	+	+	-	-	++	+	+									
	2	"	4	3.3	++++	+++	+	+	+	++	+	++								
	3	"	3										++	+	+	-	-	+	+	+
	4	5×10 ⁴	x																	
	5	"	5	5.0	+++	++	-	-	-	+	+	-								
	6	"	5										+++	+++	N	-	+	+++	+	-
	7	5×10 ²	7	7.5	++	++	N	-	-	-	-	+								
	8	"	8										++	+	-	-	-	++	-	++
	9	"	x																	
	10	5	9*	8.7	N	N	N	-	-	++	+	-								
	11	"	8										-	N	N	-	-	++	+	+
	12	"	9*										N	N	N	-	+	+	+	+
14	1	1.5×10 ⁵	3	++	N	-	-	+	++	+	++									
	2	"	4	3.3	+++	+	-	-	-	+	+	+								
	3	"	3										+++	+	-	-	+	+	+	
	4	1.5×10 ⁴	7*										N	N	N	-	-	-	+	+
	5	"	4	5.3	-	-	-	-	+	+	-	-								
	6	"	5										+	+	-	-	-	++	++	-
	7	1.5×10 ³	7*	7.3	N	N	N	N	-	+	-	-								
	8	"	7*										N	N	N	-	-	++	+	-
	9	"	8*										N	N	N	N	-	+	+	+

Notes x : Accidental death * : Hatched and died N : Not or could not tested
 Ac. : Allantoic cavity Af. : Amniotic fluid Yo. : Yolk
 Br. : Brain Liv. : Liver Sp. : Spleen Lu. : Lungs

感受性の面で発育日数により差があるか否かを検討したが、特に著明な差は認められなかった。しかし感受性の面で卵の個々のばらつきが少ないこと、少量接種に対して敏感であることなどの条件を勘案すると、漿尿膜接種として、他の細菌学やウイルス学の分野で常用されている12日卵が他に比べ感受性が高いように見受けられた。



Note : Embryos were 10 days old at time of inoculation.

図 2. Tp 漿尿膜接種卵の経日的変化

Fig. 2. Changes in embryonated eggs after inoculation of Tp onto chorioallantoic membrane

次に死亡卵にみられる特徴的变化は図2-3,4にみられる如く、漿尿膜上に径1~5mmのほゞ円形の黄白色乃至白色の斑点(以下白斑)の病巣が形成されることである。この白斑は接種部位を中心に膜全面に広くわたり、その中に多数のTpを包含している。白斑は特に接種量、孵化日令とに関係なく、ほゞ3日目頃から認められる。またその他胎児の発育が正常発育卵のそれに比して劣り(図2-6)、体表面に出血斑が多数認められる。さらにTpの増殖と平行して尿膜腔液、羊水等がこん濁し、粘稠性を示す場合が比較的多く観察された。

Tpの分布をみると、表示した如く尿膜腔液にはかなり高率に認められ、一方胎児では主として肝に、次いで脾および肺にも多く分布しているが、脳には稀である。また卵黄には僅か1例に認めれたに過ぎない。Tp分布の上からは接種Tp数および発育日数による影響は認められない。

2. 尿膜腔内接種試験

発育10, 12および14日卵を用いた。

検卵により漿尿膜がよく発達し、しかも太い血管のないところと気室部の境界に印をつける。卵を気

Table 2. Inoculation of Tp into allantoic cavity of 10 to 14 day-old chicken embryos

表 2. 発育鶏卵尿膜腔へのTpの接種試験

Age of embryo in day	Egg No.	No. of Tp inoculated	Days of death	Pock for-mation	Distribution of Tp													
					Ac.	Af.	Yo.	Br	Liv	Sp.	Lu.							
10	1	2×10^6	5	+++	+++	++	-	+	+	-	+							
	2		x									5.0						
	3		5										+++	++	++	-	++	++
	4	2×10^4	7	+++	++	N	-	-	++	++	++							
	5		5									+++	+	+	-	+	++	++
	6		5									++	+	+	-	-	++	++
	7	2×10^2	11	-	++	N	-	+	++	++	+							
	8		6									+	+++	N	-	+	+	+
	9		7									++	++	N	-	+	++	++
	10	2×10	8	+++	++	N	-	-	++	+	+							
	11		12*									N	N	N	N	+	+	+
	12		x															
12	1	5×10^4	x	+++	+++	++	-	-	++	-	++							
	2		5									5.0						
	3		5										+++	++	++	-	++	++
	4	5×10^3	x	+++	++	+	-	+	++	+	+							
	5		7									7.0						
	6		x															
	7	5	6	++	+	+	-	-	+	-	-							
	8		9									7.5<						
	9		S										N	N	N	N	-	+
14	1	1.5×10^5	4	+++	N	N	-	-	+	+	++							
	2		5									4.3						
	3		4										++	+	N	-	-	++
	4	1.5×10^3	6	+	+++	N	-	-	++	++	-							
	5		9*									7.3						
	6		7*										N	N	N	N	-	+

Abbreviations and symbols used are same with those of table 1. S : Hatched and survived

室部を上にして固定し、印をつけた部分より2~3 mm気室部側の卵殻に消毒後小孔をあける。1/2針をつけた注射器をこの窓をとおして直角にほゞ1 cm位さし込み、所要Tp数を含んだ0.25 mlの接種材料を注入接種する。接種後は小孔を封じ、孵卵器内に静置培養して、前項同様の観察を行なった。

その成績は表2のとおりである。

尿膜腔接種によっても、漿尿膜接種と同様各発育日令の卵、何れもほとんど差なく高い感受性を示している。しかし12日卵の微量接種No.9では正常に孵化し、1週間以上生残した。これを孵化後10日目に殺処分し、マウス接種で各臓器のTpを検索したが全く陰性であった。しかし同数接種のNo.7および8は感染が成立していることから、おそらく稀釈のエラー等により接種材料中に感染性を有するTpが含まれてなかったかあるいは卵の個体差によって正常孵化したものと考えられる。

また同群のNo.7はやゝ死期が短い、尿膜腔液および肝の細菌培養の結果、グラム陰性の桿菌を検出した。これは前項の6日卵No.10においても認められたことであるが、細菌感染と相俟って死亡時期がやゝ短縮されたものと思われる。しかし接種時あるいは他の機会に侵入したと思われる細菌感染によって死亡した例は比較的早期に死亡し、細菌培養で菌は証明し得てもTpは検出できない。従ってこのような例は表では×印を附し、検索の対象外とした。発育の進んだ段階で感染を蒙った例で、孵化日に破殻不完全の状態で斃死するものと、あるいは孵化してもその後1~2日目で斃死する例など存することは前項と全く同様であるが、孵化が1日位延びる例が多い。

死亡卵の状況は漿尿膜接種とほとんど同じで、白斑形成も著明である。特に尿膜腔液のTp数は多く、例えば10日卵のNo.1ではほゞ250万/ml程度にTpの増殖が認められた。

Tpの分布は卵黄には1例も認められず、胎児脳も稀であるが、他の臓器では表2の如くかなり多数のTp増殖を認めた。

孵化日令によって感受性に著明な差は認められない。しかし何れの時期でも接種量の少ない場合、個々のばらつきが大きく現われ成績が不均一になる傾向がある。

また同時期の卵について漿尿膜接種と尿膜腔接種の成績を比べても特に差なく、両接種法による感染の機序は同じものと考えられる。

3. 卵黄囊内接種試験

発育6日卵を使用した。検卵により気室中央部に印をつけ、そこを上にして固定し、印の部分に小孔をあけ1/2針をつけた注射筒で垂直に根元まで挿入し、内筒を静かに引いて卵黄の逆流を認めてから、接種材料を静かに注入する。

Table 3. Inoculation of Tp into yolk sac of 6 day-old chicken embryos

表 3. 発育鶏卵卵黄囊内へのTpの接種試験

Egg No.	No. of Tp inoculated	Days of death	Pock for- mation	Distribution of Tp							
				Ac.	Af.	Yo.	Br.	Liv.	Sp	Lu.	
1	1.5×10 ³	6	+ - -	- - -	+ - ++	- - -	- - -	+ + ++	+ - -	- - +	
2		9									7.3
3		7									
4	1.5×10 ²	8	+ - -	- - N	- - N	- - -	- - -	+ + -	- - -	- + -	
5		9									10.3
6		14									
7	1.5×10	10	- - N	- - N	- - N	- - -	- - -	- - +	- - -	- - -	
8		S									12.0<
9		14									

Abbreviations and symbols used are same with those of tables 1 and 2.

接種量は各稀釈 0.25 ml で、接種後は形の如く小孔を封じ観察した。その結果は表3の如くである。

9例中8例が死亡し、同日令の漿尿膜接種の成績と平均生存日数で差はなく、高い感受性が認められる。しかしTpの分布状況はかなり狭ばまり、しかも増殖の程度も弱く、少量接種例のNo.6, 7では全くTpを認め得ない。また1例No.8は正常孵化し生残したが、これを10日目殺処分してTpの検索を行った結果は陰性であった。

前2項で特有の病変として認められた漿尿膜上の白斑形成もNo.1および4に僅かに認められただけである。これは侵襲部位が違うためと思われるが、接種部の卵黄にTpをほとんど検出し得なかった点興味がある。

以上の成績から卵黄嚢内接種によっても高い感受性を示すが、Tpの増殖程度は弱く、従ってTpの検索を目的とする接種には漿尿膜あるいは尿膜腔内接種が優れているといえる。

IV 考 察

各发育段階の鶏のTp感染に対する感受性の変動を明らかにする実験の一環として、本実験においては、发育鶏卵を用いて実験を行なった。

发育鶏卵のTp感染実験に関しては、既に述べた如く多くの報告があるが、そのほとんどがTpの保存用培地あるいは血清反応抗原の作成を目的としたもので、感受性について多角的に検討したものは少ない。

その中で Levaditi ら (1929), Wolf ら (1940) はTp接種を行なった14日卵は死亡することなく孵化したが、雛は数日後に死亡し、その組織から多数のTpを認めたと述べている。Weinman (1944) は感受性がマウス接種に劣らず高いことを認め、鶏卵もTpの分離あるいは検出に利用できることを示唆している。また Warren and Russ (1948) は6~12日卵を用いRH株感染鶏胎児脳乳剤を漿尿膜、卵黄嚢、羊膜で覆っている。内に接種して、接種後8日位で胎児は死亡し、その胎児に多数のTpの増殖を認め、さらに漿尿膜上に白斑の形成を観察している。

また MacFarlene and Ruchman (1948) は6~11日卵でRH株卵黄嚢内接種後5~6日でほとんど死亡することを認め、漿尿膜上の白斑の形成状況でTpの量を算定できるすなわち白斑計数法の可能性を示した。大久保 (1960) も1日卵胚盤下、7日卵卵黄嚢内、12日卵漿尿膜接種試験で、何れも高い感受性を認め、特に1日卵の胚盤下接種によってTpの中和試験が可能なることを示唆している。

著者は接種ルートおよびTp数を変えてその感受性の差を検討したが、その結果、漿尿膜、尿膜腔、卵黄嚢内接種何れの場合も感染性Tpの極めて微量接種でも胎児を死亡させるものと推測しうる成績を得、しかも接種Tp数と胎児の生存日数との間にマウスで認められる(1,7)と同様な直線関係があることを認めた。従って何れの場合でも、Tpの定量的分離検出に使用できるといえる。しかし感受性の面で卵黄嚢接種は他に比してやや低く、また14日卵など发育のすすんだ卵では、感染胎児も外見上正常に孵化することがあるため、これらのことを考慮して、Tpの分離検出のためには发育10~12日卵を用い、漿尿膜接種を行なうことが最も効果的な方法といえる。

一方、疫学的な面から发育鶏卵の役割を考えてみると、感染鶏の産んだ受精卵にTpの移行があった場合、孵卵器内で胎児の成長と共にTpの増殖も起るものと想像され、その結果胎児の死を拓くであろう。また例えば移行Tp数が少なく、正常に孵化してももし確実に感染性Tpが残存しているとすれば、孵化後まもなく雛をたおす程に増殖可能であることが、実験結果から推測される。従って、雛白痢等に見られる成鶏→卵→雛→成鶏というサイクルでTpが伝播していくことはなさそうである。しかし感染発

育鶏卵が雄雛として正常に孵化した場合、雄雛の処分の方法如何によっては他種動物の感染源となりうる危険性があるし、同様に死ごもり卵についてもその処置に注意する必要がある。

Tpは一般に生体外に出された場合、外界の感作に対して抵抗性が弱いものとされているが、蛋白成分を含む培地では長く生残し、特に鶏卵の液状培地では7週間も生残しうると報告されている(11)。このことは受精卵にあっても孵化前の保存期間がほぼ1ヶ月以内であれば、移行Tpが生残しうることを示すものであろう。

各種動物におけるTp症の自然界での伝播の様式について、なお不明の点が多い現在、不顕性感染の経過をとる鶏とその卵の果す役割について注目する必要があると思われる。こ面かのらの検討をさらに深めていきたい。

V 総 括

種鶏卵の発育6~14日卵を用い、Tpに対する感受性を漿尿膜、尿膜腔および卵黄囊内等接種ルートを変えて比較検討し、次の如き結果を得た。

1. 接種ルート、Tp数の如何を問わず、発育卵はTp感染に対し非常に高い感受性を示し、そのほとんどがTpにより感染死を起した。また正常孵化したと思われる例でも孵化後1~2日で斃死することが多く、その体内にはTpの増殖が認められる。
2. 感染卵の生存日数はどの発育日令のものでもまたどの接種ルートでも、接種Tp数の多いもの程短縮され、接種Tp数との間に負の相関々係が成立つ。また発育日令による感受性の差は著明でない。
3. 漿尿膜および尿膜腔内接種による特徴的病変は接種3日目から形成される漿尿膜上の白斑形成である。この中には鏡検により多数Tpが認められる。しかし白斑は卵黄囊内接種によつては形成されることが少ない。
4. 死亡卵におけるTpの増殖は胎児では脳を除く肝、脾、肺に主として認められるが、特に肝に最も多く検出される。胎児外では漿尿膜、尿膜腔内接種では接種部位を中心として増殖し、卵黄にはほとんど認められない。また卵黄内接種ではどの部分にも認められず、Tp分布の上から前2者と感染の機序が異なるものと考えられる。
5. 以上の成績より、発育鶏卵は孵卵日令による差がなく、感染性Tpのごく少量接種によつても感染死を来す程高い感受性を有しているものといえる。

文 献

1. Eyles, D. E. and Coleman, N. 1956 Relationship of size of inoculum to time to death in mice infected with *Toxoplasma gondii*, J. Parasit., **42**: 272~276
2. 金城俊夫 1971 鶏の実験的トキソプラズマ症に関する研究 I. 産卵鶏の感染態度, 琉大農学報, **18**: 211~223
3. ———— 1971 ———— II. 70-120日令鶏の感染態度, 琉大農学報, **18**: 224~238
4. ———— 1972 ———— III. 30-40日令鶏および初生雛の感染態度, 琉大農学報, **19**: 407~420
5. Levaditi, C., Sanchis-Bayarii, V., Lepine, P. and Schoen, R. 1929 Etude sur l'Encephalo-myélite provoquée par le *Toxoplasma cunicli*, Ann. Inst. Pasteur, **43**: 673~736

6. MacFarlane, J. O. and Ruchman, I. 1948 Cultivation of toxoplasma in the developing chick embryo, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **67** : 1~4
7. 越智勇一, 佐藤平二 1959 家畜のトキソプラズマ症の研究 (2)マウスに於ける *Toxoplasma* 虫の病原性, *日獣学誌*, **21** : 110~115
8. 大久保憲治 1960 発育鶏卵を用いたトキソプラズマの感染実験, *お茶の水医学誌*, **8** : 432~438
9. Warren, J. and Russ, S. B. 1948 Cultivation of toxoplasma in embryonated egg : an antigen derived from chorio-allantoic membrane, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **67** : 85~89
10. Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B. H. 1940 Toxoplasmic encephalomyelitis IV. Experimental transmission of the infection to animals, *J. exp. Med.*, **71** : 187~214
11. 柳沢勝治 1957 トキソプラズマの研究 (II) 各種メジウムにおけるトキソプラズマの生残性及び保存用メジウムについて, *東京医事新誌*, **74** : 459~462

Summary

Susceptibility of embryonated hens' eggs to toxoplasmic infection was examined. The embryos of 6 to 14 days old were used for these experiments and were inoculated into the chorioallantoic membrane, amniotic cavity and yolk sacs.

The results are briefly summarized as follows :

1. Regardless of the route of inoculation and number of Tp inoculated, the embryos showed very high susceptibility and were died. Even if they were hatched, the almost chickens succumbed to Tp within 2 days after hatch.
2. Survival periods of inoculated embryos were not depending upon the route of inoculation or age of embryos but largely upon the number of Tp inoculated. There are a close relation between number of Tp and duration of survival.
3. The most characteristic lesions in the embryonated eggs inoculated chorioallantoic or amniotic route were yellowish-white pocks, scattered throughout the allantoic membrane. The pocks were detectable about 3 days after inoculation and contained many parasites.
4. The dead embryos were deeply haemorrhagic. The parasites multiplied well in embryos' organs except the brain, and also in the chorioallantoic membrane and in the allantoic cavity.

However, the case of yolk sac inoculation, the parasites were detectable only in a few organs with small in numbers.

5. From the results described above, it seems likely that embryonated eggs are highly susceptible as like as mice to toxoplasmic infection not according to their ages and the route of inoculation.