

孵化 鷄卵內 닭 콕시듐 原蟲(*Eimeria tenella*)의 連續繼代 培養

金基錫 · 李希洙 · 鄭甲洙 · 崔尙鎭 · 金相羲 · 南宮 旋

家禽 生研究所

(1992. 6. 23. 접수)

Cultivation of Avian Coccidia(*Eimeria tenella*) in Chicken Embryonic Eggs by Serial Passage

, Hee-Soo Lee, Gab-Soo Chung, Sang-Ho Choi

Sang-Hee Kim and Sun-Namgoong

Veterinary Research Institute, RDA

(Received June 23, 1992)

SUMMARY

Sporozoite of *Eimeria tenella* inoculated into the allantoic cavities of embryonating eggs completed their life-cycle in the chorioallantoic membranes(CAM) and produced viable oocysts.

And the strain continued to adapt to the CAM through the period of the passages. In embryos, the reproduction of the strain, judged by oocyst production increased, but the pathogenicity, judged by mortality of embryo decreased, with increasing numbers of passage in eggs.

I. 緒 論

닭을 위시한 家畜, 家禽에 있어서 콕시듐 原蟲은 매우 중요하며, 따라서 이들을 研究하는 주된 理由는 이들의 行動樣式에 관해 보다 더 잘 理解함으로써 결과적으로 이들로 인한 疾病을 防除하는 방법을 추구하는데 있다.

그러나 이들 原蟲은 細胞內 寄生性으로서 그들의 大部分의 生活史가 潛行성이기 때문에 이들에 관한 研究가 어렵다. 따라서 이를 해결하기 위한 方便으로서 孵化鷄卵 細胞培養이 이들 研究에 유용한 도구로 사용되어왔다.

한편으로는 닭을 위시한 家禽에 있어서 콕시듐 原蟲의 重要性은 일반 가축들보다 훨씬 강조되고 있어 이 병의 急慢性 발생으로 인한 被害가 매우 크고 또한 이

병의 治癒 및 豫防 등 防除를 위해 사용되는 항콕시듐 약제의 물량이 단일품종으로서의 일반 抗菌劑를 비롯한 다른 어느 약제들의 추종을 불허할 정도로 단연 선두임은 주지의 사실이다. 따라서 近年에는 이 疾病에 대한 백신 사용의 가능성에 관해 많은 관심이 대두되어 닭 生體繼代에 의한 早熟原蟲이나 孵化鷄卵 및 세포배양에서의 發育適應 原蟲등을 이용한 生原蟲 백신의 개발에 관한 試驗研究가 많이 수행되어 왔다.

닭에 있어서 콕시듐 原蟲인 *Eimeria*의 sporozoite나 merozoite를 尿膜腔을 통해 孵化鷄卵內 接種함으로써 *Eimeria*의 닭 體內 生活史를 완성하려는 시도는 1965年 Long⁹⁾이 *Eimeria tenella*의 sporozoite를 시험하여 성공한 이래 계속 여러 연구가들에 의해 수행되어 原蟲種別 接種量이나 接種日齡, 培養溫度 및 부화란의 性別 등 부화 계란내 원충 발육에 영향을 미치는 要因 및 病理學的 影響의 深度 등에 관해 많은 진

전을 이루었다^{4, 10, 14-16)}.

한편 70年代 이후에는 孵化鷄卵內에서의 連續繼代에 의한 孵化卵 적응 또 純化 原蟲株를 작성하여 生原蟲 백신으로 사용코자 하는 연구가 활발히 진행되어 *E. tenella*,^{1, 8, 11, 13)} *E. necatrix*,^{1, 8, 18, 19)} *E. brunetti*^{2, 3)} 및 *E. mivati(mitis)*^{12, 17)} 등에 관한 연구 보고가 많으며 일부 이들 作成原蟲을 이용한 콕시듐병 백신이 생산되고 있는 실정이나 우리나라에서는 지금까지 전혀 이들 연구에 관하여 보고된 바가 없다.

따라서 著者등은 *Eimeria tenella* 의 sporozoite를 孵化鷄卵內 接種하여 成熟蟲卵으로 發育시킬 수 있었으며 연속계대에 의한 孵化鷄卵 적응 原蟲株를 작성하기 위한 시험을 수행하였기에 이를 報告하는 바이다

II. 材料 및 方法

1. 供試原蟲 및 닭

家畜衛生研究所에서 계대 보관중인 *Eimeria tenella* 를 公試하여 同 研究所에서 生産 飼育한 3~4週齡 SPF 닭에 首當 50,000개씩의 孢子蟲卵을 경구감염시키고 감염후 7일부터 9일까지 3일간 배설되는 糞便과 盲腸上皮 및 內容物을 수거하여 2.5% 중크롬산 수용액에 부유시킨 다음 waring blender로 분쇄한 후 1~2겹의 gauze를 통과시킨 여과액을 28℃에서 48~72시간 배양하여 포자충란을 얻었다. 이들 충란 부유액은 遠心에 의해 신선한 2.5% 중크롬산 수용액으로 교환하고 4℃에서 보관하면서 試驗에 제공하였다.

SPF 닭은 初生鷄時부터 항콕시듐약제 無添加 飼料로 격리 사육하면서 孢子蟲卵의 接種 前後 兩 1일간은 사료를 절식시키고 이후 試驗終了時 까지 脫脂粉乳를 급여하였다.

김 등⁵⁾의 방법에 따라 포화식염수 부유법 및 차아염소산 세척법에 의해 감염제와 부화계란으로부터 얻은 원충 부유액으로부터 分離된 滅菌純粹 原蟲을 얻었다.

2. Sporozoites 純粹分離

김 등⁶⁾의 방법에 따라 純粹分離된 충란으로부터 sporocyst를 유리한 다음 이들로부터 sporozoite 탈

남 시험을 거쳤으며 다시 김 등⁷⁾의 방법에 따라 percoll density-gradient 원심에 의해 鷄卵 純粹分離된 sporozoite를 얻었다.

3. 孵化鷄卵內 原蟲 培養法

1) 孵化鷄卵內 Sporozoite의 接種

가축위생연구소에서 생산된 SPF 種卵을 10일령까지 38℃에서 培養하고 이때 미리 준비된 sporozoite 부유액을 0.2ml 內에 접종한 다음 이후 계속 41℃에서 배양하였다.

원충의 漿尿管內 감염과정 동안 죽은 부화계란은 1일 2회 수거하여 세균이나 곰팡이의 오염 여부를 확인하였으며, 尿管腔內 다량의 혈액 출현 및 漿尿管上의 생활기별 원충의 鏡檢 등을 실시하여 콕시듐 원충감염에 의한 폐사율을 구하였다.

2) 孵化鷄卵으로부터 蟲卵의 回收 및 洗滌

Sporozoite 接種 6~8일 후에 파란하여 10ml 용적의 주사기를 이용해서 최대한의 혈액을 포함한 노막액을 제거한 다음 尿酸鹽 및 漿尿管 등 충란이 다수 출현하는 부위를 수거하였다. 수거한 尿酸鹽은 2.5% 중크롬산 수용액에서 waring blender로 분쇄하였고, 장노막 등은 분쇄후 0.5% 농도로 trypsin(Difco, 1:250 powder)를 함유하는 인산완충액(pH 8.0)에 넣고 41℃에서 30분간 진탕 배양한 후 1겹의 gauze를 통과시킨 다음 2.5% 중크롬산 수용액에 2회 원심세척으로 trypsin을 제거하였다.

준비된 蟲卵 浮遊液은 28℃에서 72시간 배양하여 충란을 포자형성시켰으며, 4℃ 냉장고에 보관하면서 계란 1개당 회수된 포자 충란의 數를 EPG(FHK Co.) 계산판을 이용하여 계산하였다.

III. 結果 및 考察

孵化鷄卵에서의 닭 콕시듐 원충의 발육 및 孵化鷄卵 馴化 原蟲을 작성할 目的으로 닭에서 繼代促管중인 *Eimeria tenella*의 oocyst로부터 純粹分離한 sporozoite를 계란내 接種시험하여 Table 1에서와 같은 結果를 얻었다.

最初에는 계란 1개당 70×10^3 개의 sporozoite를

Table 1. Reproduction of *Eimeria tenella* in embryonating egg of chickens during serial passage.

Passage no.*	No. of sporozoites given / egg ($\times 10^3$)	Hours after inoculation	No. of sporulated oocysts recovered / egg ($\times 10^3$)	Mortality (%)
1	70	190	8	0
2 ₁	100	165	11	81.4
3 ₂	50~100	164	153	34.3~79.1
4 ₃	50~100	161	60~213	48.3~50.0
5 ₄	50	163	270	24.4
6 ₄	50	168	64	27.4
7 ₄	30	168	866	20.0
8 ₄	30	172	463	10.0
9 ₄	30	171	531	21.9
10 ₄	30	176	13	9.5
11 ₄	30	172	473	25.0

* The No. of large size means times passaged in eggs and the further No. of small size means times passaged in chicken.

10일령 부화란의 尿酸腔內에 접종하고 每日 2회씩 異常有無를 관찰하였으며 3~4일때 부터는 少數의 接種란을 임의 선발하여 이들로부터 漿尿膜을 分離하고 顯微鏡下에서 관찰하였던 바 少數의 merozoite 및 schizont를 볼 수 있었으며 5일에서 6일 사이 사이에 가장 많은 數가 관찰되었다.

Sporozoite 접종후 190시간에 孵化卵內의 尿酸鹽 및 漿尿膜 등을 수거하였으며 鏡檢結果 少數의 성숙 및 미성숙 oocyst가 출현함을 알 수 있었다. 따라서 전체 供試卵으로 이들 내용물을 수거하여 처리과정을 거친 후 28℃에서 3日間 培養한 다음 포자 形成된 충란의 수를 계산하였던 바 孵化卵 1개당 8×10^3 개의 충란을 얻을 수 있었다.

그러나 이들 孵化卵으로부터 回收된 포자 충란의 數로써는 連續해서 次代에서의 孵化鷄卵內 繼代培養을 위한 sporozoite 接種량의 確保가 어려운 것으로 判斷되어서, 孵化鷄卵內 배양 충란의 일부를 닭에 계대 感染시켜 充分한 數의 충란을 얻은 다음 이들 충란의 sporozoite를 孵化鷄卵 1개당 100×10^3 개씩 接種하고 培養 165시간 후에 그 내용물을 수거하였던 바 鷄

卵 1개당 11×10^3 개의 孢子蟲卵을 回收하여 1대에서 도 보다 약간 더 많은 수의 충란이 얻어졌으나 이들 역시 次代에서의 부화란내 連續繼代 培養을 위해서는 不充分하였으며 3대째까지 닭에서의 間歇斷代가 요구되었다.

닭에서 3회의 間歇斷代를 거쳐 孵化鷄卵內 4대째 培養(4₃ 계대)시는 sporozoite의 接種량을 각각 50×10^3 개 및 100×10^3 개로 달리하여 接種하였으며 161시간 培養후 回收된 孢子蟲卵의 數가 各鷄卵 1개당 60×10^3 개 및 213×10^3 개로 增加하여 이때 처음으로 닭을 통한 간헐계대의 도움이 없이 차대에서 바로 孵化鷄卵內 接種이 가능한 정도의 sporozoite의 數를 確保할 수 있었다. 그러나 5대째(5₃ 계대)에서의 배양 결과 鷄卵 1개당 生産된 孢子蟲卵의 數가 극소하여, 4₃ 대째의 충란 일부를 다시 닭에서의 간헐계대를 통해 充分한 數의 충란을 구하여 재차 5대째(5₄ 계대) 孵化鷄卵內 接種하여 鷄卵 1개당 270×10^3 개의 충란을 얻었으며 이때부터 11대째(11₄ 계대) 까지 孵化鷄卵에서 孵化鷄卵으로의 連續斷代 培養이 可能하였다.

한편 孵化鷄卵內 sporozoite의 接種量은 初期에는

50×10³~100×10³에서 7대째부터 30×10³으로 감소 고정할 수 있었던 반면에 鷄卵 1개당 회수되는 孢子蟲卵의 수는 繼代回收에 따라 다소간의 差異는 있었으나 초기 1×10⁴ 미만에서 부터 계대회수가 거듭될수록 대폭 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 接種卵의 폐사율에 있어서도 폐사가 전혀 없었던 1대째를 제외하고는 80% 이상의 높은 폐사율에서 부터 20% 내외로 감소하였다.

Fig. 1과 2는 孵化鷄卵內 sporozoite를 접종한 후 漿尿膜上에서 원충의 발육 모습을 각각 나타낸 것으로서, Fig. 1은 접종 5일후 3~4회의 分裂에 의한 無性生殖의 말기에 많은 수의 merozoite를 함유하고 있는 다수의 成熟 schizont와 이들 schizont로부터 유리된 소수의 유주 merozoite의 출현을 보여 주고 있으며 Fig.2는 접종 7일후 有性生殖의 말기에 다수의 未成熟 및 소수의 成熟 蟲卵의 발육 모습을 보여 주고 있다.

본 시험 결과는 *E. tenella*의 sporozoite가 닭 생체 내에서와 마찬가지로 孵化鷄卵의 漿尿膜에서도 그들

의 생활사를 완성할 수 있음을 보여주고 있으며 또한 이들 원충의 孵化鷄卵內 연속계대에 의해 孵化鷄卵內 발육 적응이 되고 있음을 나타내었다. 여러 선인들의 研究報告^{10, 18)}에서 밝혀진 바와 마찬가지로 최초에는 成熟 蟲卵의 생산이 매우 빈약하였으며 따라서 初期數代에서는 닭 생체에서의 간헐적인 계대에 의한 원충의 증폭없이 孵化鷄卵間의 직접적인 연속계대가 불가능하였다. 그러나 5대째에서는 孵化鷄卵當 얻어진 孢子蟲卵이 2×10⁵개 이상으로 급격 생산 증가되었으며 이후 본 시험의 종료시 까지 부화계란간의 연속 계대가 가능하였으며 또한 接種 孵化卵의 폐사율에 있어서도 초기 80% 이상에서 繼代回收가 증가될수록 점차 20% 미만으로 감소하였는 바 이는 供試原蟲인 *E. tenella* 주가 점차 孵化鷄卵內 발육 적응되고 있는 것으로 풀이된다.

Long¹³⁾, Gore¹⁾ 등, Shirhey¹⁸⁾와 Shirhey¹⁹⁾ 등이 *E. necatrix* 또는 *E. tenella*의 孵化鷄卵內 연속계대에 의한 適應株를 작성하여 孵化鷄卵이나 닭에서의 蟲卵



Fig. 1. Mature and immature schizonts in the chorio-allantoic membrane 120 hours after inoculation of sporozoites(×250).



Fig. 2. Immature and mature oocysts in the chorio-allantoic membrane 168 hours after inoculation of sporozoites ($\times 250$).

生産性, 病原性 및 免疫原性 등을 시험 연구한 결과를 보면 계대 회수가 증가할수록 孵化鷄卵이나 닭에서의 病原性が 감소한 반면에 닭에 대한 免疫原性에 있어서는 차이가 없었으며 부화계란내 蟲卵 生産性이 증가한 것으로 나타나 이들 적응주를 이용한 닭 콕시듐병의 生原蟲 백신의 가능성을 보여주었다. 그러나 한편으로 이들은 孵化鷄卵內 繼代回收가 적은 상황에서는 닭에서 연속 계대시 이들 原蟲株의 病原性이 재현되는 것으로 보고하였으나 Long⁽¹³⁾은 *E. tenella*의 孵化鷄卵內 62계대주는 닭에서 연속 9계대 後에도 더 이상의 병원성을 재회득하지 않았던 것으로 보고하였다.

이상과 같은 선인들의 연구 결과를 종합해 볼 때 본 연구에 공시된 *E. tenella*에 있어서도 孵化鷄卵內 繼代回收의 증가에 의한 生原蟲 백신株로서의 사용 가능성이 있을 것으로 생각되며, 이를 위해서는 孵化鷄卵內 連續繼代는 물론 닭에서의 病原性 및 免疫原성에 관한 연구가 폭넓게 이루어져야 할 것이다.

IV. 摘 要

孵化鷄卵의 尿膜腔內로 접종된 *Eimeria tenella*의 sporozoites는 漿尿膜에서 그들의 생활사를 완성하였으며 살아있는 成熟 蟲卵을 생산하였다. 또한 이 原蟲은 孵化鷄卵에서의 連續繼代를 통하여 지속적으로 漿尿膜에 적응하여 孵化鷄卵內 繼代回收가 증가함에 따라 孵化鷄卵에서의 生産性은 증가되는 반면에 病原性은 감소하는 것으로 나타났다.

V. 引用文獻

1. Gore, T. C., P. L. Long, M. Kogut and J. Johnson, 1983. Attenuation of *Eimeria necatrix* and *E. tenella* of U. S. origin by serial embryo passage. Avian Dis. 27:569-576.

2. Ishii, T, and H. Onaga. 1971. Development of *Eimeria tenella* and *E. brunetti* in chicken embryos. Jpn. J. Parasitol. 20:45-51.
3. Itagaki, K., M. Tsubukura and Y. Taira. 1972. Basic biological studies on avian coccidium development of *Eimeria tenella*, *E. brunetti*, and *E. acervulina* in chick embryos. Jpn. J. Vet. Sci. 34:143-149.
4. Jeffers, T. K., and G. E. Wagenbach. 1970. Embryonic response to *Eimeria tenella* infection. J. Parasitol. 56:656-662.
5. 金基錫, 李希洙, 鄭甲洙, 權俊憲, 崔尙鎬, 尹熙貞, 金相義, 南宮 旋. 1990. 닭 콕시듐 원충의 순수분리 기법. 農試論文集 32(2):33-36.
6. 金基錫, 李希洙, 鄭甲洙, 權俊憲, 崔尙鎬, 尹熙貞, 金相義, 南宮 旋. 1990. 닭 콕시듐 原蟲의 試驗管內 sporozoite 脫囊에 관한 研究. 農試論文集 32(3):29-34.
7. 金基錫, 李希洙, 鄭甲洙, 權俊憲, 崔尙鎬, 尹熙貞, 金相義, 南宮 旋. 1991. Percoll density-gradient 遠心에 의한 純粹 *Eimeria* sporozoite의 大量分離 技法. 農試論文集 33(1):8-11
8. Kogut, M. H., T. C. Gore and P. L. Long. 1983. Serial passage of *Eimeria tenella* and *Eimeria necatrix* in turkey embryos. Parasitology. 86:199-209.
9. Long, P. L. 1965. Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. Nature. 86:199-209
10. Long, P. L. 1966. The growth of some species of *Eimeria* in avian embryos. J. Parasitol. 56:575-581.
11. Long, P. L. 1972. *Eimeria tenella* : reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. J. Comp. Path. 82:429-437.
12. Long, P. L. 1972. *Eimeria mivati* : reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. J. Comp. Path. 82:439-445.
13. Long, P. L. 1974. Further studies on the pathogenicity and immunogenicity of an embryo-adapted strain of *Eimeria tenella*, Avian Path. 3:255-268.
14. Reley, J. F. 1968. Chick embryo infections for the evaluation of anticoccidial drugs. Parasitology. 58:215-220.
15. Shibalova, T. A. 1969. Cultivation of coccidian endogenous stages in chicken embryos and tissue cultures. Progr. Protozool. (III Int. Cong. Protozool.) p. 355-356.
16. Shibalova, T. A. 1970. Cultivation of the endogenous stages of chicken coccidia in embryo and tissue cultures. J. Parasitol. 56:315-316.
17. Shirley, M. W. 1979. Studies on the pathogenicity of chicken maintained(virulent) and embryo-adapted(attenuated) strains of *Eimeria mivati*. Avian Path. 8:469-475.
18. Shirley, M. W. 1980. *Eimeria necatrix* : the development and characteristics of an egg-adapter(attenuated) line. Parasitology. 81:525-535.
19. Shirley, M. W., M. A. Bellatti and B. J. Mil-lard, 1982. An egg-adapted(attenuated) line of *Eimeria necatrix* : further studies on its reproduction, pathogenicity and immunogenicity. Parasitology. 84:215-226.