

Toxoplasma 再感染に対するマウスの 特異抵抗性獲得の研究

岡 好 万

徳島大学養護教諭養成所

伊 藤 義 博 古 谷 正 人
奥 木 実 尾 崎 文 雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

(1969年3月29日 受領)

緒 言

Toxoplasma gondii の再感染に対する特異抵抗性獲得については、現在までに幾つかの重要な提案がなされたように思う。しかし実験的、理論的に説得性をもち、常に再現が可能であるという結果は得られていない。killed parasite の接種あるいは living parasite の感染により、様々の液性抗体の産生が証明されるが (Cutchins & Warren, 1956; Lunde & Jacobs, 1963), これらの抗体が再感染阻止の中心的役割をもつ証拠は得られていない (Levaditi *et al.*, 1928; Cutchins & Warren, 1956). 他方、弱毒株の感染を経過した動物は再感染に抵抗的であるという結果は次第に増加している (Vischer & Suter, 1954; Frenkel, 1956; Nakayama, 1964, 1966; Weinman, 1943). しかし、われわれの研究室において弱毒株の様々の接種量とルートで感染を経過したマウスが再感染を完全に防御し得ないことを公表した (新里, 1968). この相違点が何に基づくかは明らかでないが次の2点は重要であると思う。(1) *T. gondii* の感染スペクトルは広範であると同時に、宿主の感受性の幅も様々である。特にマウスは実験動物のなかでも最も敏感であり、RH株の数コで致命的である (新里, 1968). (2) *T. gondii* の増殖は絶対細胞依存性である。

もし、マウスを抵抗性獲得の実験に使用するのであれば、免疫状態をつくり出すまでに上記の2点から幾つかの問題を解決しなくてはならないように思う。ここに述べた結果は次の仮定に基づいたものである。

T. gondii は弱毒株、強毒株をとわず、動物に接種す

るとその後、食細胞に摂食された原虫の一部は抗原として免疫成立の方向に役立つであろうが、他は積極的に宿主の別の細胞群 (免疫に関与しない) に侵入し、感染進展の方向に向かうであろう。特に感受性の高いマウスでは後者が有利に進む可能性が強い。そこでマウスを使用する際、免疫処置か再感染の前に、腹腔内に免疫に関与する細胞を誘導し、抗原細胞が十分捕捉され、宿主の他の細胞群への侵入を阻止するため glycogen か complete adjuvant の処置を試みた。それと同時に免疫接種量の均一性を保つため cyst をさけ trophozoite を用いた。

実験材料と実験方法

供試株：免疫処置に用いた *T. gondii* Beverley (Bv) 株は慶応義塾大学医学部、寄生虫学教室、松林久吉教授より cyst-form で分与を受けた。これをマウス腹腔内 (i. p.) に接種し、感染の初期に i. p. に現われる trophozoite を用いた。又再感染に用いた *T. gondii* RH (RH) 株は大阪市大医学部、医動物学教室、田中英雄教授より分与を受け、以後規定のごとくマウス i. p. 接種により継代中の trophozoite を供試した。免疫及び再感染量は、それぞれ Bv 株約 200コ及び RH 株 10~60コであり、これらの虫体浮遊液は 0.85% NaCl 液で調製した。

動物：われわれの教室で自家繁殖している CF#1系マウスであり、恒温状態で固型飼料と水道水で飼育管理した体重20g前後のものを雌雄の別なく使用した。

宿主細胞の誘導法 (誘導処置)：0.1% glycogen-NaCl 液 (0.1% gly) あるいは complete adjuvant 液 (adj) を用いた。前者は 0.1%、後者は50%を0.85% NaCl に

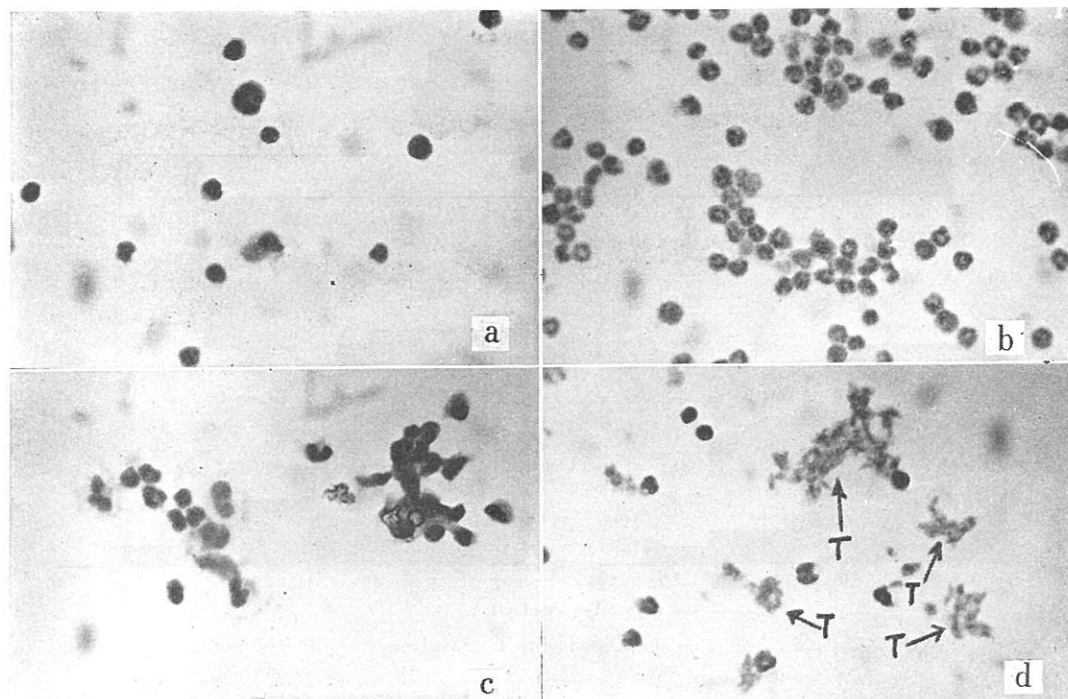


Fig. 1 Cell-patterns of peritoneal fluid in different conditions in mice. (Arrow indicates the parasites)
T: *Toxoplasma gondii*

含まれるよう調製した。0.1% gly は 1ml を, adj は 0.5ml を i. p. に処置した。誘導処置, 免疫接種及び再感染の組合せにより 6 実験群 (A~F) に分けたが, その詳細は成績の項で述べる。

実験成績

A 群: 誘導処置及び免疫接種に対する対照群である。11例のマウスは RH 感染後 6 日から臨床症状が顕著となり 9 日で 9 例死亡し, 残りの 2 例も 10 日で死亡した。11例の平均生存日数は 9.2 日であった。全例の腹水の鏡検からおびただしい数の遊離原虫と, それにまじって所々に原虫の細胞内増殖像が見られた (Fig. 1-d 及び Fig. 2)。

B 群: 誘導処置対照群である。Bv 株の免疫接種を受けた 12 例は全部一過性に臨床症状を呈したが, その後回復したので 33 日後に RH 株の再感染を施した。再感染後 13 日までに 75% (9 例) が死亡し, 25% (3 例) は 50 日の観察期間に耐えた。死亡 9 例の平均生存日数は 12.2 日であった。腹水の鏡検において生残例に原虫が証明できなかったのみでなく死亡例においても観察できなかった (Fig. 2)。

C 群: 免疫接種前 5 日と再感染前 4 日に 0.1% gly を i. p. 処置した。この処置によりリンパ細胞が i. p. に増加するのを観察した (Fig. 1-a)。実験 14 例は再感染後 10 日から 23 日の間に 100% 死亡し, 平均生存日数は 13 日であった。すなわち A 群に比較して 3.8 日の延長を示した。鏡検から 11 死亡例では腹水中に原虫を証明できなかったが, 残りの 3 例ではようやく発見しうる程度の原虫を認めることができた (Fig. 3)。

D 群: 免疫接種 5 日前のみに 0.1% gly i. p. 処置を施し, それ以外は C 群と同様に処置した。実験 15 例は再感染後 10 日から 26 日までに 100% の死を来し, 15.3 日の平均生存日数 (A 群より 6.1 日の延長) を示した (Fig. 3)。又死後の鏡検から 1 例だけにきわめて少数の原虫をみた。

E 群: この実験群は C 群の 0.1% gly 処置を adj に置き換えただけである。adj 処置後 4 日目の i. p. 観察で非常に特異的に食細胞群の滲出がおり, リンパ球はきわめて少数であることがわかった (Fig. 1-b)。実験 11 例のうち 9 例は再感染後 11 日から 24 日までに死亡した。これは全実験群のうちで最も平均生存日数が長く (A 群より 8.1 日の延長) 17.3 日であった。11 例中 2 例

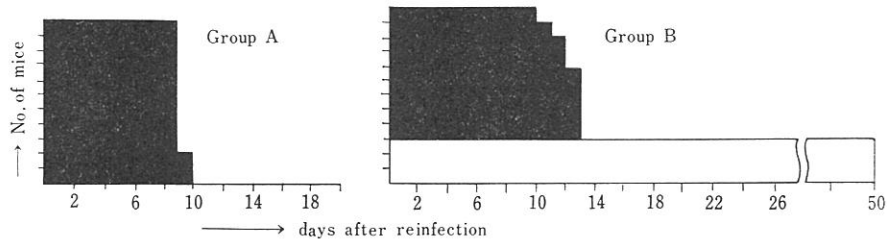


Fig. 2 Resistance of mice treated only with Beverley strain to reinfection.

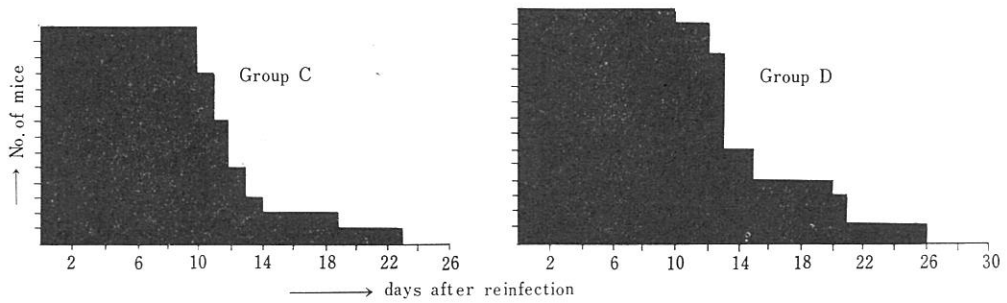


Fig. 3 Resistance of mice pretreated with 0.1% glycogen saline to reinfection.

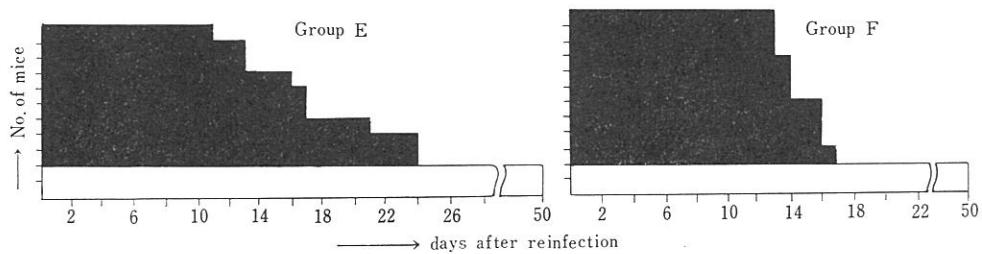


Fig. 4 Resistance of mice pretreated with complete adjuvant to reinfection.

(18.2%)は生残したが、一過性の臨床症状を現わした。E群すべてのマウスの腹水の鏡検から原虫は一樣に発見できなかった (Fig. 1-c 及び Fig. 4)。

F群：再感染4日前の adj i. p. 処置を省略した以外はE群と全く同一である。実験12例のうち10例は再感染後13日から17日までに死亡し、平均生存日数は14.6日 (A群より5.4日の延長) であつた。他の2例は50日間の観察に耐えた。鏡検では死亡例のうちただ1例に少数の原虫を発見したにとどまつた (Fig. 4)。

生残動物に再攻撃をした成績：上記実験群のうちB群3例、E及びF群に各2例の生残をみたので50日の観察期間直後、再びRH 10~60コの再攻撃を試み、果たしてこれに耐えるかを検討した。20日間の観察において生残したのはB群2例のみであつた。この生残2例とE群の18日死亡1例について脳、肝、脾及び肺の乳剤(0.5

g当たり0.85% NaCl 5ml) と腹水をそれぞれ3例ずつのマウスに i. p. 接種 (0.1ml) することにより各臓器内の原虫の存在を検討した。その結果は Table 1 に示した。

生残マウス (No. 1 及び 2) のうち No. 1 は各臓器に多数の原虫が存在したことは、臓器別に接種したすべてのマウスが6~10日で100%死亡したことから明らかである。しかし、No. 2の肝及び脾の接種群は全例が生残し、腹水では8日で3例とも死亡し、又脳では1例が死亡したのみである。ただ肺では生存期間が著しく延長した後2例が死亡した。この肺の結果はRHに因るかどうか疑問である。No. 3 (死亡例)の結果はNo. 1とほぼ同一であり、すべての臓器に多数の原虫が存在することを示している。

Table 1 Comparative surviving term of mice inoculated with organ emulsions and ascites of mice from different experimental groups

Materials inoculated	Mice of material source								
	Group B (No. 1) (surviving)			Group B (No. 2) (surviving)			Group E (No. 1) (dead)		
brain	6	6	6	8	liv	liv	6	7	8
liver	7	7	7	liv	liv	liv	6	6	6
spleen	7	8	8	liv	liv	liv	6	6	6
lung	7	7	7	30	38	liv	6	6	6
ascites	9	10	10	8	8	8	6	6	8

Numbers indicate the days of survival. liv indicates living mouse.

総括及び考案

T. gondii は再増殖のためには宿主細胞に侵入する必要がある。その侵入を助長する因子として幾つかの酵素 (Garnham *et al.*, 1962; Hansson & Sourander, 1968; Lund *et al.*, 1966; Lycke & Norrby, 1966) と、いわゆる “penetration-enhancing factor” (Norrby *et al.*, 1968; Lycke *et al.*, 1968) が公表された。けれどもこの両者がどのように関連性をもっているのか明らかでないと同時に、そのような因子が病原性や免疫原性と直接関係をもつのかも不明確である。又原虫自身の宿主細胞に積極的に侵入する性質のなかには、自己の増殖に都合のよい細胞を選別できる能力も含まれているように思われる。*T. gondii* は非常に幅広い感染スペクトルを持ちながら、モルモットとマウスの間においてさえ、すでに著しい感受性の相違 (Foster & McCulloch, 1968; 新里, 1968) が見られるが、このような現象は原虫側の上記の性質と宿主の間の相互反応の様式が決定するのではなからうか。特にマウスのように感受性の高い動物では、反応が原虫側に有利に進行する可能性が高い。

われわれは、病原側に有利な反応をできる限り抑制し、相互反応を抵抗性獲得の方向に導くために、まず、免疫あるいは再感染の場合、免疫に関与する宿主細胞を多数集合せしめる処置を必要と考えた。この目的のために 0.1% gly と adj の i. p. 処置を選んだ。0.1% gly の i. p. 処置は 4~5 日後に食細胞の滲出が顕著であるという記録 (三橋・大町, 1966) があるが、われわれの経験ではリンパ細胞の増加を観察し、食細胞の増加はむしろ adj 処置の場合に顕著であった。宿主が新しい抗原に接触した際、その抗原情報を免疫母細胞に伝達するのが食細胞かリンパ細胞かについては現在の討論 (Rowley, 1966; Stuart, 1967; Argyris & Askonas,

1968; Nelstrop *et al.*, 1968) から結論は得られていない。しかし、一度免疫された宿主のリンパ細胞及び食細胞は抗原細胞の増殖を強く阻止することは確かである。0.1% gly あるいは adj を使用した実験群が、他の対照群 (A及びB) よりも平均生存日数が延長し、特にE群ではA群の約2倍に延びたことは腹腔滲出細胞と重要な関係のあることを示唆していると思う。

次にわれわれの実験条件において、再感染に対する生残率の上昇に関しては評価されるほどの結果が得られなかった。しかし免疫現象に興味ある観察は得られている。すなわち、実験成績の項で述べたように、免疫学的に無防備のマウスが RH 感染をきたすと、それらすべての腹腔内に、多数の遊離原虫及び宿主細胞内で増殖しつつある原虫像が観察されたが、これに反して免疫処置を施したマウスは再感染により多数死亡したにもかかわらず、それらの腹腔には光学顕微鏡的にはほとんど原虫が証明されなかったことである。この現象は確かに免疫と関係あることを示していると思う。それにもかかわらず感染に至るのは、他の臓器、組織の病理がどれほど重大であり、又免疫とその病理がどんな関係にあつたかが問題点として残されている。

B, E 及び F 群ではわずかではあるが、生残例 (25~16.6%) をみることができた。生残動物は Bv 及び RH の接種後一過性の症状を一応示した事実から少なくとも免疫状態がつくられたものと思う。しかし、実験群が少数例であることから生残率が評価の対象にならなかつたことと、50日後の再攻撃にほとんど抵抗できなかつたことは更に解析を深める要がある。

結 論

マウスの *Toxoplasma* 再感染に対する特異抵抗性獲得の条件を分析する手段として免疫あるいは再感染前に 0.1% glycogen か complete adjuvant の腹腔内接種を

試み下記の結論を得た。

1. 0.1% glycogen 処置はリンパ細胞の、又 complete adjuvant では食細胞の滲出が顕著である。
2. このような処置により平均生存日数を延長させることができ、特に complete adjuvant を免疫前及び再感染前に用いた群では、対照群の約2倍に延びた。しかし、生残率の上昇は認めなかった。
3. 死亡した対照群マウス腹腔には多数の原虫が観察されたが、免疫各群では死亡マウスといえども鏡検により腹腔内に原虫を認めることは困難であった。

文 献

- 1) Argyris, B.F. and Askonas, B.A. (1968) : Mouse peritoneal cell : Their ability to elicit or produce antibody after exposure to antigen. Immunol., 14, 379-392.
- 2) Cutchins, E. C. and Warren, J. (1956) : Immunity patterns in the guinea pig following toxoplasma infection and vaccination with killed toxoplasma. Am. J. trop. Med., 5, 197-209.
- 3) Foster, B. G. and McCulloch, W. F. (1968) : Studies of active and passive immunity in animals inoculated with *Toxoplasma gondii*. Canad. J. Microbiol., 14, 103-110.
- 4) Frenkel, J. K. (1956) : Pathogenesis of toxoplasmosis and of infection with organisms resembling toxoplasma. Ann. N. Y., Acad. Sci., 64, 215-251.
- 5) Garnham, P. C., Baker, J. R. and Bird, R. G. (1962) : Fine structure of cystic form of *Toxoplasma gondii*. Brit. med. J., 1, 83-84.
- 6) Hansson, H. A. and Sourander, P. (1968) : Ultrastructural demonstration of lysosomes in *Toxoplasma gondii*. Acta pathol. microbiol. scand., 68, 59-67.
- 7) Levaditi, C., Lepine, P. and Schoen, R. (1928) : L'immunité antitoxoplasmique. Compt. Rend. Soc. Biol., 99, 1130-1133.
- 8) Lunde, M. N. and Jacobs, L. (1963) : Toxoplasma hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. J. Parasitol., 49, 932-936.
- 9) Lund, E., Hansson, H. A., Lycke, E. and Sourander, P. (1966) : Enzyme activities of *Toxoplasma gondii*. Acta pathol. microbiol. scand., 68, 59-67.
- 10) Lycke, E. and Nooby, R. (1966) : Demonstration of a factor of *Toxoplasma gondii* enhancing the penetration of toxoplasma parasites into cultured host cells. Brit. J. exp. Pathol., 47, 248-256.
- 11) Lycke, E., Norrby, R. and Remington, J. (1968) : Penetration-enhancing factor extracted from *Toxoplasma gondii* which increase its virulence for mice. J. Bacteriol., 96, 785-788.
- 12) 三橋進・大町和千代(1966) : マクロファージと抗体産生。蛋白質核酸酵素, 11, 243-256.
- 13) Nakayama, I. (1964) : Persistence of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* in the brain of immune mice. Keio J. Med., 13, 7-12.
- 14) Nakayama, I. (1966) : On the survival of high virulent strain of *Toxoplasma gondii* inoculated intravenously into immune mice. Keio J. Med., 15, 13-24.
- 15) Nelstorp, A. E. Taylor, G. and Collard, P. (1968) : Studies on phagocytosis (II) In vitro phagocytosis by macrophages. Immunol., 14, 339-346.
- 16) Norrby, R., Lindholm, L. and Lycke, E. (1968) : Lysosomes of *Toxoplasma gondii* and their possible relation to the host-cell penetration of toxoplasma parasites. J. Bacteriol., 96, 916-919.
- 17) Rowley, D. (1966) : Phagocytosis and immunity. Experientia, 22, 1-64.
- 18) 新里仁達(1968) : *Toxoplasma gondii* の免疫に関する研究, 数種の系統マウスに対する Beverley (弱毒) 株の病原性と防御抗原性について。寄生虫誌, 17, 429-435.
- 19) Stuart, A. E. (1967) : The effect of immunised lymphoid cells on tissue culture preparations of macrophages. J. Path. Bact., 93, 673-677.
- 20) Vischer, W. and Suter, E. (1954) : Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult mammalian macrophage cultured in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 86, 413-419.
- 21) Weinman, D. (1943) : Chronic toxoplasmosis. J. inf. Dis., 73, 85-92.

AbstractACQUIREMENT OF SPECIFIC RESISTANCE TO *TOXOPLASMA* REINFECTION IN MICE

YOSHIKAZU OKA

(Training School for Nurse Teachers, Tokushima University, Tokushima, Japan)

YOSHIHIRO ITO, MASATO FURUYA, MINORU OKUGI AND HUMIO OSAKI

(Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima, Japan)

In an attempt to analyze the conditions for the acquirement of specific resistance to re-infection of *Toxoplasma* in mice, 0.1% glycogen or complete adjuvant was given prior to the immunization and/or reinfection, and the following results were obtained.

1. Liberation of lymphocytes and phagocytes into mouse peritoneal fluid was accelerated by pretreating with glycogen or complete adjuvant.
2. Longevities were observed in most of pretreated cases and the group received complete adjuvant preceding the immunization and/or reinfection survived twice as long as controls. Increase in survival rate, however, was not significant.
3. The parasites were abundant in the peritoneal fluid of dead mice in the control group but were hardly seen in the peritoneal fluid of those in immunized groups microscopically.