

## トキソプラズマに関する研究

## (2) 実験動物としての gpc 系マウスの週令および性別による感受性の差について

石井俊雄 小林昭夫 小山力  
熊田三由 小宮義孝

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和 34 年 5 月 20 日受領)

微生物対実験動物の関係のうち、後者の側に求められる因子としては、動物の種類、系統、性、年令、飼料、および管理状態などが挙げられている。以上の諸因子のうち動物種について著者らは前報(小林ら, 1959)において、トキソプラズマの接種実験に用いられるべきマウスに関して当時入手の容易であつた dd/Y, gpc, C57 BL/6 および CFW の 4 系統について比較を行い、gpc 系マウスを最適なものと認め、以後すくなくともマウスの生存日数、採取腹水量、あるいは虫数に判定基準をおく実験には gpc 系マウスを使用することとした。

爾余の因子のうち、飼料については前報にも述べた如く特定の飼料(オリエンタル固型飼料 NMF)のみを使用し、飼育管理に関しては高温多湿な盛夏の候を除けばほぼ一定な環境条件を保持し得るので、当面の検討すべき因子としてのマウスの週令と性について実験を行った。

なお本実験に先立ち、生理食塩水浮游虫体の室温保存による感染能(トキソプラズマのマウス腹腔内接種により、これを感染致死せしめる能力を意味する。以下同断)の検討を予備実験として行つたので併せてここに報告する。

## I. 予備実験. 生理食塩水浮游虫体の感染能に対する保存の影響について

トキソプラズマは生理食塩水で稀釈浮游された場合比

TOSHIO ISHII, AKIO KOBAYASHI, TSUTOMU KOYAMA, MITSUYOSHI KUMADA and YOSHITAKA KOMIYA: Studies on Toxoplasma (2) The influence of age and sex of mice on susceptibility to toxoplasmas (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

較的速かにその感染能が低下するため、その接種実験にあつては可及的速かに行うべきであるといわれている(Jacobs, *et al.* 1952; 柳沢, 1957; 渡辺ら, 1959)。しかるに今回著者らが企図したマウスの週令と性の検討に関する実験に、各週令マウスのそれぞれに雌雄を用いこれを同時に行うときは、その接種にあたり相当長時間を要することが想像される。従つて、接種開始時と同終了時とでは接種するトキソプラズマの感染能に差が生じ、これが観察の際の主な判定基準となるマウスの生存日数に影響を及ぼすことが当然考へられてくる。しかもこのトキソプラズマの感染能の低下の実態は、メジウムの性状、稀釈度および温度に関連した問題であつて、上記諸氏の実験結果をそのまま著者らの今回企図する本実験に当てはめることは出来ない。そこで、本実験に先立つて生理食塩水に稀釈(80,000 コ/cc)し、室温に保存した場合のトキソプラズマの感染能の時間的推移について検討する必要が生じ、ここに予備実験としてとりあげた。

## 実験材料と方法

トキソプラズマは前報の通り RH 株で gpc 系マウスに 4 日毎に継代されてきたものである。これをマウスの腹腔より採取し直ちに 0.85% 生理食塩水を以て 80,000 コ/cc (マウスには後述の如く 0.3ml 宛注射するのでマウス 1 匹当り 24,000 コとなる)になるように稀釈して実験に供した。

マウスは gpc 系マウスの 4~5 週令の♀のみを 30 匹用い、これを 5 匹宛 6 群に分け、第 1 群は上記のトキソプラズマ稀釈液を調整直後(マウスの腹腔より採取後 20 分—(以下 20 分群)、第 2 群は採取 1 時間後(以下 1 時間群)、第 3 群は 2 時間後(以下 2 時間群)、第 4 群は 4 時間後(以下 4 時間群)、第 5 群は 8 時間後(以下 8 時間群)、

本研究は文部省科学研究費の補助によつた。ここに記して謝意を表する。

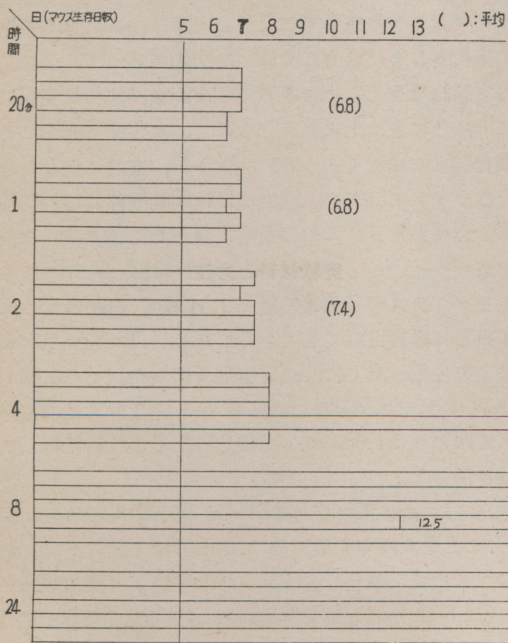
第6群は24時間後(以下24時間群)にそれぞれ上記稀釈液の0.3 ml 宛を腹腔内に注入した。なおこのとき、各群5匹のマウスに接種するに要した時間はそれぞれほぼ3分であつた。

トキソプラズマ稀釈液の24時間に亘る保存中の温度は20~22°Cであつた。

観察は、マウスの死亡に至るまでの日数について各群ともそれぞれ12時間間隔に記録し、同時にトキソプラズマによる死亡であることを確認するため採取腹水量と同腹水中の虫体数を前報と同様の方法を以て計量し判定の補助に資した。

成績

第1図および第1表に示す如く、20分群と1時間群では全く差は見られず、2時間群で生存日数が約半日延長する傾向を認めた。すなはち、20分群および1時間群の95%信頼限界はともに7.14日 $\geq m \geq 6.46$ 日、90%信頼限界は7.06日 $\geq m \geq 6.54$ 日であり、2時間群のそれは、それぞれ7.68日 $\geq m \geq 7.12$ 日、および7.61日 $\geq m \geq 7.19$ 日であつた。いいかえれば、5~10%の危険率を以てすればこの間に有意の差を認め得ることになる。4時間群では1例が、8時間群では4例が、24時間群では全例が生



接種虫体数: 24,000 コ 室温: 20~22°C

第1図 生理食塩水中におけるトキソプラズマの生残性

第1表 生理食塩水中におけるトキソプラズマの生残性 (接種マウスの生存日数, 採取腹水量および同腹水中の虫体数)

保存時間	生存日数	採取腹水量 (ml)	腹水中の虫体数 (万)
20分	7.0	0.35	1807
	7.0	0.40	12461
	7.0	0.65	8267
	6.5	0.95	7920
	6.5	0.57	7943
1時間	7.0	0.35	4807
	7.0	0.70	12247
	6.5	0.43	11782
	7.0	0.50	1663
	6.5	0.75	9844
2時間	7.5	0.80	4465
	7.0	0.35	18006
	7.5	0.68	13211
	7.5	1.00	5200
	7.5	0.00	7140
4時間	8.0	0.75	16613
	8.0	0.50	14858
	8.0	0.82	23589
	—	—	—
	8.0	0.60	10134
8時間	—	—	—
	—	—	—
	12.5	0.40	5321
24時間	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—
	—	—	—

残し、保存時間の経過とともに感染能が減退してゆくのが明らかに認められた。同時にこれらの群での死亡例は前3群に比して生存日数に延長傾向がみられるようであつた。4時間以後に接種した3群で斃死に至らなかつたマウスが出てはいるが、これらは全例とも一過性の食思・飲思の不振、被毛直立、運動不活潑などの症状を呈したことから、感染一発症一耐過という経過を一応たどつたものと思はれる。またこれらの症状も24時間群で最

も軽く、浮游液の放置時間に応じて虫体の感染能が減退していくのがうかがはれた。

小 括

以上の予備実験から、上述の実験方法による接種実験には(1)トキソプラズマの採取稀釈後1時間以内に所定浮游液の調整・接種などの全ての操作を完了しなければ安定した成績が得られないこと、(2)マウス5匹の接種にほぼ3分を要すること、(3)しかも所定稀釈濃度の虫体浮游液を調整するためにはほぼ20分を要することが分つた。

II. マウスの週令および性別によるトキソプラズマ感受性の差の検討

トキソプラズマ材料および浮游液の調整、接種方法、観察ならびに対照群の処置は前報および予備実験と全く同様に行い、且つ全マウスへの接種を1時間以内におさめた。

マウスに関しては、予備実験の結果は時間的制約を、つまり接種可能な頭数の制約を意味する。したがって同一 source の虫体を用いて行う同時実験には、およそ40~50匹のマウスを用いるのが限度となってくるのでそのように計画した。すなはち、週令による差の比較試験には gpc 系マウスの 3, 4, 5, 6, 7 および 8 週令の ♀ を各週 5 匹づつを使用し、性別による比較試験には同じく gpc 系マウスの 3, 5 および 8 週令の ♂ を 5 匹づつを同時に使用した。なお各群につきそれぞれ 5 匹づつの対照群をおいた。

成 績

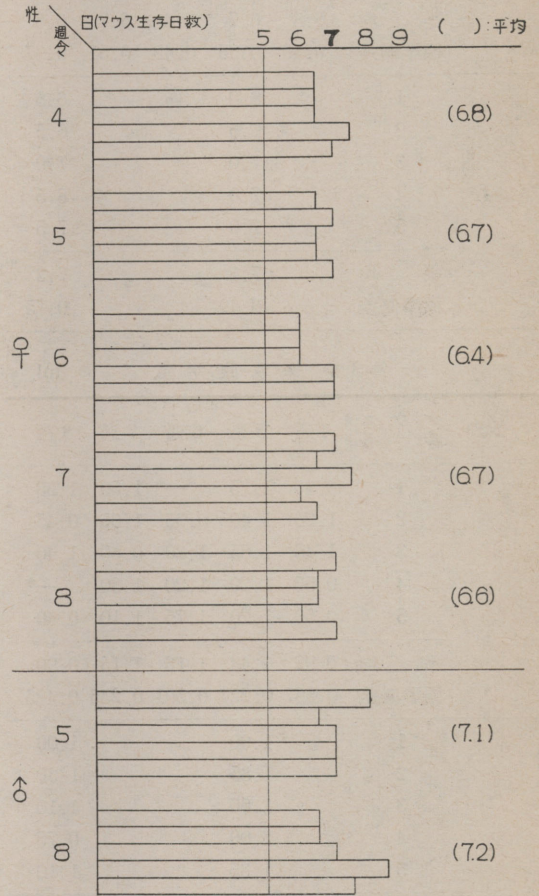
3 週令マウスは、♀の実験群で 5 匹中 4 匹が、他の 3 群(♀の対照群、♂の実験群および対照群)でそれぞれ 5 匹中 1 匹が注射ショックにより死亡し極めて不安定であった。この成績は 4 週令以上のマウスの場合とは別の観点から考察すべきものと考え、表から除外した。

1. ♀マウスの 4~8 週令による生存日数の差をみると、全例が 6~7.5 日の間に死亡し、各週の群平均は 6.8, 6.7, 6.4, 6.7 および 6.6 日を示し極めて近接した成績が得られた。しかも 95% 信頼限界は全て重複し 4~8 週に亘つての週令による感受性の差は認められなかった(第 2 図および第 2 表)。

同様に採取腹水量は 0.35~1.75ml の間に分布し、やゝ個体差による開きが認められたが、群平均はそれぞれ

0.92, 1.44, 1.13, 1.15, および 0.90ml を示しこれにも有意の差は認められなかった(第 3 表)。

腹水中の虫体数についても同様に、特に一定の傾向を云々することが出来ない。またこの場合は個体差が特に目立つが、これは採取にあつたつての技術的な問題と、前報に記載した腹腔内の病理的性状の差が大きく関連してくるものと思われる(表 4 表)。



第 2 図 各週令マウスの生存日数

2. 性別による生存日数の差は、♀が 5 週群の平均 6.7 日、8 週群の平均 6.6 日に對し、♂はそれぞれ 7.1 日および 7.2 日でやや延長する傾向が認められた。しかしその 95% 信頼限界は全て重複し有意の差とは云えない(第 2 図および第 2 表)。

採取腹水量および同腹水中の虫体数の何れについてもそれぞれ(♀, ♂)の間に差を認めることは出来なかつ

第2表 接種後のマウス生存日数

性別	マウス番号	4週	5週	6週	7週	8週
♀	1	6.5	6.5	6.0	7.0	7.0
	2	6.5	7.0	6.0	6.5	6.5
	3	6.5	6.5	6.0	7.5	6.5
	4	7.5	6.5	7.0	6.0	6.0
	5	7.0	7.0	7.0	6.5	7.0
平均		6.8	6.7	6.4	6.7	6.6
標準偏差		0.40	0.25	0.49	0.51	0.37
♂	1		8.0			6.5
	2		6.5			6.5
	3		7.0			7.0
	4		7.0			8.5
	5		7.0			7.5
平均			7.1			7.2
標準偏差			0.49			0.75

第3表 採取腹水量 (ml)

性別	マウス番号	4週	5週	6週	7週	8週
♀	1	0.90	1.75	—*	1.50	1.35
	2	1.20	1.40	0.35	1.05	0.45
	3	1.45	1.65	1.20	0.80	1.40
	4	0.55	1.20	1.20	1.30	—*
	5	0.50	1.20	1.75	1.10	0.40
平均		0.92	1.44	1.13	1.15	0.90
標準偏差		0.367	0.227	0.501	0.236	0.425
♂	1		1.00			1.00
	2		1.85			1.30
	3		1.00			1.10
	4		1.00			0.75
	5		1.35			1.10
平均			1.24			1.05
標準偏差			0.334			0.179

\*: 死後変化甚しく採取計量不能であつたもの  
従つて統計処理からは除外した

た(第3表, 第4表)。

#### 総括ならびに考察

予備実験として0.85%食塩水に稀釈浮游させたトキソプラズマの感染能の消退状況を時間的に観察し, 次いで

第4表 腹水中の虫体数 (単位: 万)

性別	マウス番号	4週	5週	6週	7週	8週
♀	1	8112	3230	+	12578	11158
	2	6325	4444	3216	17294	3536
	3	5874	4558	4200	17651	15464
	4	16561	5203	2394	6708	+
	5	24588	7119	8408	10091	46240
平均		12292	4911	4556	12864	19100
標準偏差		7262	1350	2314	4200	16241
♂	1		13580			3600
	2		9118			17738
	3		8720			12710
	4		10020			17775
	5		4089			14391
平均			9105			13243
標準偏差			3039			5203

+: 虫体は証明できたが, 腹水量が計量できず, 虫数の計数不能であつたもの。従つて統計処理からは除外した

この成績に基いてマウスの週令および性による感受性の差を検討した。

トキソプラズマは生理食塩水のような簡単な無機塩類の溶液中にとり出された場合, 比較的早くその感染能を失うことが知られている。Jacobs (1952) は生理食塩水中では数時間後には明らかにその感染能を失うと云い, 柳沢 (1957) は食塩水中における遊離トキソプラズマの生残状況は  $10^{-1}$  管では4時間までは漸次減少する感染能を有するが,  $10^{-3}$  稀釈管では1時間にしてすでに感染能を消失したと報告している。また渡辺ら (1959) は生理食塩水中で10~15時間で完全に感染能が消失し, さらに稀釈倍数の大きいもの程早く感染能を失うことを述べている。

これらの現象は全てトキソプラズマ浮游液の稀釈濃度, 保存時間および保存温度に関連するものであるが, 総合的に見れば濃度は濃い程, また温度は或る程度低い方が感染能の保持にはよいように見受けられる。いずれにもせよ比較的短時間のうちに感染能は減退あるいは消失することを示している。

著者らは  $80,000$  コ/cc 稀釈,  $20\sim 20^{\circ}\text{C}$  保存で1時間以内ならばトキソプラズマの感染能に差が認められないという結果を得たが, これはいはば予備実験的な意味を

もつもので、濃度や温度に関する検討の詳細は後日に譲るが、おむね上記諸家の成績とその傾向を一にするものと思われる。

♀の4～8週の間では週令による感受性の差は認められなかった。

一般に実験動物の病原体に対する抵抗性は常に幼令のものより成熟したものの方が強いというのが通則となっている(田嶋, 1956)。Donovick (1949) は結核菌に対し4～6週令では差はなく、10～12週でやや生存日数が長くなり、6カ月マウスで更に長くなると述べ、また染谷 (1955) は C57BL/6 を用い結核菌の T C 50 株に対し4～8週の間では差がなく、263株では4週のものがやや早く死ぬことを述べている。原虫については Greenberg (1953) が *Plasmodium berghei* について1～12カ月のマウスを用いて幼令マウスの生存日数が短いことを挙げています。

一方マウスはほぼ3カ月に成熟し、その寿命はほぼ1年であることからみると、著者らは比較的幼令に属する範囲のマウスを用いたがために週令による差が出てこなかったものと思われる。しかしこれは、マウスを使用するにあつての実際面から、すなわち一般に感受性や育成技術上の問題を考慮した上で通常4～5週マウスが、また時にはこれらよりやや成長したマウスが用いられているという面から一応4～8週のものを検討すべくこの範囲のものを実験に供したのである。またマウスの成長曲線は生後6週頃までは急増を示し、7・8週になるとやや緩慢になってくることから、成長の極めて旺盛な時期と、やや緩慢になった時期とを比較する意味をも兼ねたものであつた。

何れにせよ、さらに広い範囲の年齢層についての比較を行えば、年齢の増加とともにマウスの抵抗力、つまり生存日数は或る程度延長を示すことも想像される。このことは逆にいえば幼令マウスの方が感受性が高いことを意味する。そして若しその差が明らかであるならば、検査材料からトキソプラズマを分離するような場合に或はより鋭敏な反応を示し有利な場合があるかも知れぬと考えられるので、3週マウスを用いて同様の実験を行つてみたのである。この場合は実験群、対照群とも接種直後に注射ショックにより死亡するものがあり所期の目的を達することは出来なかつた。これは注射量を4週以上のものと同量の0.3mlとしたためやや過量であつたことによるものかも知れない。3週目は丁度マウスの離乳期にあたる点、また菲弱である点など飼育管理上やや困

難な点はあるが、注射量や虫数をさらに検討すれば、この3週マウスは多くの興味ある問題を含んでいると思われる。

次に性による感受性の差について田嶋 (1956) は「概して細菌、原虫に対しては♀の方が抵抗力が強い傾向の報告が多く見られた」と述べ多くの報告を引用し、「いづれにしても一つの感染に対して性別により抵抗力に差が見られる場合があることは確実で、あらかじめ性別による差を検討することなしにも♀とを一つの実験に混用することは避けるべきであろう」といつている。トキソプラズマに関するこの種の報告は見られないが、原虫では Greenberg (1953) が *Plasmodium berghei* に関して♀の方が生存日数の長いことを報じている。著者らの実験結果からは、♂の方に生存日数の長いものを含み、平均としてはやや延長する傾向を示しているがその信頼限界は重複し有意の差とはいえないようである。しかしこれも限られた週令のものについてであるので、これからたゞちに性別による差を速断することは許されないのは勿論であるが、しかし明らかならずとはいえずに角♂の方に延長傾向とフレがみられ、両者は全く同質のものとは言い切れない点から、すくなくとも雌雄の混用は避けるべきは当然と思われる。また♂の方に僅かながら分散が大きい傾向が見られることは、この種の実験が均一性を要求する点から、その使用にはやや難があるのではなからうかと思われる。

## 要 約

1. 保存時間の経過による生理食塩水中のトキソプラズマの感染能の減衰状態を検討した。

トキソプラズマをマウスの腹腔から採取し、0.85%生理食塩水に80,000コ/ccになるように稀釈浮游し、20～22°Cの室温に保存した場合、1時間以内の保存では感染能の減退は見られず、2時間以上の保存ではこれの減退が明らかに認められた。

2. マウスの週令による感受性の差について検討した。

4, 5, 6, 7および8週令の♀にトキソプラズマ浮游液を接種し、生存日数、採取腹水量および同腹水中の虫体数について比較したところ、何れについても各週令間に差を認めなかつた。

3. マウスの性別による感受性の差について検討した。

この場合、両性間に特に著しい差異は認められなかつ

たが、もにやや生存日数の延長傾向と成績の変動が示された。

4. 以上から、トキソプラスマの接種実験に際し、上述の実験条件では、腹水採取後1時間以内に所定稀釈液の調整、接種などの全ての操作を終了すべきこと、またマウスとしては4～8週令の♀を使用すればよいと思われる。

稿を終るにあたり、マウスの供給に種々御便宜を賜わつた予研獣疫部今泉部長ならびに関係各位に対し厚く感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Donovan, R., McKee, M., Jambor, W. P. & Rake, G. (1949): The use of the mouse in a standardized test for antituberculous activity of compounds of natural or synthetic origin. II. Choice of mouse strain. *Am. Rev. Tuberc.*, 60, 109-120; 安東・田嶋(1956)動物実験法より引用。—2) Greenberg, J., Nadel, E. M. & Coatney, G. R. (1953): The influence of strain, sex and age of mice on infection with *Plasmodium berghei*. *J. Inf. Dis.*, 93 (1), 96-100. —3) Jacobs, L. Jones, F. L. & Melton, M.L. (1952): The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media. *J. Parasit.*, 38 (4), 293-297. —4) 小林昭夫・石井俊雄・小山 力・熊田三由・小宮義孝 (1959) トキソプラスマに関する研究 (I) 実験マウスの系統の検討, 寄生虫学雑誌, 8 (5), 664-668. —5) 染谷四郎・林 治・田嶋嘉雄・遠藤元清・今井昭浩・金子順一 (1955) マウスの結核菌感染に関する基礎的研究, 第1報, 系統別, 性別及び生後日数による感受性の差, 実験動物集報, 4, 65-67; 安東・田嶋 (1956) 動物実験法より引用。—6) 田嶋嘉雄 (1956) 安東・田嶋 (1956) 動物実験法, 朝倉書店, 東京。—7) 渡辺喜郎・城野健次郎・指宿孝博 (1959) 衛生動物, 10 (2) 83. —8) 柳沢勝治 (1957) トキソプラスマの研究 (II) 各種メジウムにおけるトキソプラス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 (8), 459-462.

## Summary

1) The effect of storage of toxoplasmas in physiological saline solution on their infectivity was investigated.

The suspension of *Toxoplasma gondii* (RH strain) was prepared from peritoneal fluid of previously infected mouse, and was adjusted by dilution in the saline solution (80,000/ml.). After 20-minute, 1-, 2-, 4-, 8- and 24-hour storage at 20-22°C, the suspensions were inoculated intraperitoneally into 4-week-old female mice of gpc strain.

When the inoculations were performed at 20 minutes and 1 hour after removal of parasites from the host, there was no difference between these two series of mice in the survival time. It could be seen, however, that the survival time of mice infected with suspension after 2-hour storage prolonged by a half day. After 4 or more hours, the infectivity of stored parasites decreased considerably.

2) Effect of age of mice on the susceptibility to toxoplasmas was investigated.

For this purpose, 4-, 5-, 6-, 7- and 8-week-old female mice were inoculated with toxoplasma suspension. There were no significant differences in the survival time of mice, quantity of peritoneal fluid and the number of parasites in the fluid among all of them.

3) Effect of sex of mice on the susceptibility to toxoplasmas was investigated.

No marked differences were observed between male and female in the development of infections. But it seems that the male showed a little tendency to extend in survival time.

4) Above these findings indicate that all the handlings of inoculation should be completed within one hour after the removal of organisms from the previously infected animal, and 4- to 8-week-old female mice of gpc strain may be recommendable for the inoculation.