

トキソプラズマ感染マウスの抵抗性に対する 抗リンパ球血清注射の影響

中山 一郎 青木 豊 治

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和45年8月28日 受領)

トキソプラズマ (Tp と略記) 症に関する免疫学的研究, 特に流血抗体に関する研究は従来盛んに行なわれてきた. 患者からの Tp 虫体検出は急性症を除いて非常に困難であるために流血中の抗体価を検して診断の資とすることは既に古くから一般に応用されている. Tp 寄生宿主体内で産生されるこの流血抗体は生体内である程度, 虫体の増殖を抑圧する能力はあるが, 虫体を根絶させるほど強力なものではない. 本来, Tp は細胞内寄生の原虫であり, 増殖するためには細胞の存在が絶対に必要である. 多くの細胞内侵入の細菌類 (結核, ブルセラ, 野兔病, リステリア症, サルモネラ感染症など) にみられるように当然細胞性免疫の形成されることは Tp 症の場合にも想定される. 弱毒 Tp 株に感染した動物が強毒株の攻撃接種による再感染をうけた後にかかりの数において耐過生存するという事実から考えて, 細胞性免疫の形成は流血抗体より, むしろ Tp 虫体に対して強力に作用するであろうとも考えられる.

本文では抗リンパ球血清 (ALS と略記) を用いて, マウス体内の細胞性免疫の形成を抑圧して, 感染致死率の低い弱毒株の感染による耐過性を主として, 2, 3 の観察を試みた.

材料および方法

実験動物として当教室にて飼育繁殖させた体重約20gの ICR マウスを使用した.

Tp 株は主として Beverley 株 (Bev と略記) を使用した. 本株は Beverley によつてウサギから分離され, マウスに対する毒性の比較的低い株で研究用に一般に広く使用されている. 本株の慢性感染マウスでは多数のシストが脳実質内に検出されるが, これらのシストをマウス腹腔内に接種した場合, 腹腔内に検出される増殖型遊離虫体の数は少い. そこでマウス腹腔内にシスト接種と同時に Cortisone acetate 0.1 ml (2.5mg) を3日間隔

にて2回大腿皮下に注射して腹腔内の栄養型虫体の増殖をはかつた. その後, 腹腔内に2mlの生食水を注入, 吸引して, この中に含まれる遊離虫体を材料として, 0.5ml中の虫数を約1万コになるように調製して腹腔内に接種感染させた. また, 一部のマウスには S-273株を使用した. 本株はわが国で信藤らによつてブタから分離されたもので, マウスに対する毒性が Bev より遙かに弱い株である. すなわち, 本株のシストを接種されたマウスは殆ど死亡せず生存を続け脳にシストを形成するが, そのシスト数は Bev によるものに比して明らかに少い. S-273株感染後5週のマウスの脳の生食水乳濁液0.5ml中にシスト20コを含むものをマウス腹腔内に接種して感染させた. これらのマウスは後に脳を検してすべてのマウスからシストが検出されている. Bev および S-273株で慢性感染したマウスの攻撃接種には強毒 RH 株を使用した. この株も広く研究室にて使用され, 感染マウスはすべて短期間に死亡する. RH 株感染3日のマウス腹腔内に生食水2ml注入後, 吸引採取した腹腔洗滌液中の虫数を0.3ml 3,000コに調製したものを腹腔内攻撃接種に用いた.

ALS は次のようにして得られた. まず, 正常マウス10匹をエーテル麻酔して, 死の直前に開胸し心臓左心室より20mlの還流液 ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_7 \sim 0.027\text{M}$, $\text{NaCl} \sim 0.14\text{M}$, $\text{KCl} \sim 0.0005\text{M}$, $\text{NaHCO}_3 \sim 0.00025\text{M}$) を注入して血液の流出をはかり, その後, 腋窩, ソケイおよび腸間膜リンパ腺と胸腺を摘出した. これらを還流液中で小剪刀にて細切し, この目的のために用意した特種の摂子で圧潰してリンパ球を遊出させ, これを滅菌した婦人用ナイロン・ストッキングを通して濾過した. このリンパ球浮遊液に型の如く Mycobacteria 死菌液を加えて Freund complete adjuvant を作製し, ウサギの両大腿筋内数カ所に注射した. 注射量は5mlで, これに含まれる

リンパ球数は3～5億コであった。注射後1カ月経過して Booster injection として、さらにほぼ同数のリンパ球浮遊液2mlを3日間連続して耳静脈内に注入した。最終注射後10日経過のウサギ耳静脈より3ml採血して、血清を分離後に非動化してリンパ球凝集能力を検したところ、その値は大部分のウサギでは1:512を示し、一部では1:256を示した。その翌日これらのウサギの全採血を行い、血清を分離して非動化後-20°Cの冷凍器中に保存し使用に供した。ALSの1回の注射量は0.15mlで実験開始のマウスのBev接種と同時に注射を開始し、1週間まで1日1回宛腹腔内に注射し、以後は3日間隔にて観察終了時の5週間まで継続投与した。なお、ALSの腹腔内使用による効果と比較するため全く同様にALSを皮下に注射する実験をあわせて行った。5週間後生存のマウスにはRH株3,000コを腹腔内に攻撃接種して、マウスの耐過性について検した。

ALSを腹腔内に注射した実験例は4群で各群のマウス数は実験動物20～30匹で、対照としたALSのみ注射したマウス、およびBevのみ注射したマウス数は各群10～15匹であった。また、ALS皮下注射のマウスは3群で、各群のマウス数は実験例20匹、対照としたALSのみ注射例およびBevのみ注射例はいずれも各群10匹であった。これらをそれぞれ集計して実験成績とした。対照を含めて各群より無選択的に少数のマウスをとり出し、実験開始後10～14日の間および5週後に眼球より採血して、花木、信藤、佐藤法(1963)によつて化血研製Tp感作血球を抗原として感作血球凝集値(HAT)を測定した。なお、一部少数のマウスについて実験開始2および3週後に麻酔下でマウスの開胸を行い、直接心臓より採血し、血清分離後非動化してTp抗体価を色素試験によつて測定した。

腹腔内遊離Tp虫体数および大食球を含む大細胞数の増減を知るため、実験開始10日後にALSの腹腔内および皮下使用例のうちから、それぞれ無選択的にマウスをとり出した。これらマウスの腹腔内に生食水2mlを注入した後、吸引採取した腹腔洗滌液を材料として使用した。材料は生鮮のまま洗滌液1ml中の虫数および細胞数を顕微鏡下で算定して、その平均値を求めた。これらの対照として、ALSのみ注射例、Bevのみ接種例および全く無処置の正常マウスについても同様に腹腔内の虫数または細胞数を検して、これらのそれぞれの平均値と実験例のそれとを比較検討した。

ALS注射によるリンパ球減少の状況を知るため、実

験例および前記対照群よりそれぞれ無選択的に少数のマウスをとり出した。これらマウスはいずれも眼球より採血し、チルク氏液を用いて型の如く白血球数を測定して平均値を算出した。同時に血液の薄層標本を作りギムザ染色後、白血球100個中のリンパ球数を算定した。これらのリンパ球数の平均値を求めて白血球中のリンパ球%を算出した。

実験成績

1. ALS腹腔内注入の場合

マウスの生残率とRH株虫体による攻撃に対する耐過性：130匹のマウス腹腔内にBev栄養型虫体1万コを接種した直後にALS0.15mlの腹腔内注射を開始した。ALS注射は当初の1週間は1日1回宛連続して行い、以後は3日間隔にて5週間まで継続投与した。其結果、2週後の生存マウス数は80匹で以後も多数のマウス死亡し、観察終了時の5週間には12匹(9.2%)のマウスが生残したにすぎなかった(第1表)。これら12匹のマウスにはRH株虫体3,000コの攻撃接種を行ったが、正常マウスにRH株虫体を同じく接種した対照と同様に接種2週間までにすべて死亡した。実験例の死亡マウスはすべて脳から直接に成熟したシストが検出された。これらシストはその大きさとRH株攻撃後の期間から考えてBevのシストと決定できる。対照としたBev虫体を接種せずALSのみ注射された58匹のマウスは5週後35匹(60.3%)が生残し、RH攻撃によりすべて攻撃後2週までに死亡した。また、対照としてALSを使用せずBevのみ接種されたマウス115匹は5週後98匹(85.2%)が生残し、RH攻撃により57匹が攻撃後5週まで耐過生存した。

BevにかえてS-273株20シストを20匹のマウス腹腔内に接種し、他は上記したように全く同様にALSを使用した。その結果、Bev使用の場合と同様に、週数の経過とともに生存マウス数は減少し、5週間には2匹(10%)のマウスが生残したにすぎなかった。これら生存マウスもその後のRH株の攻撃に耐過せずRH株のみ接種した対照と同様に死亡した。ALS注射せずS-273株20シストのみ注射した対照は僅かに1匹死亡したのみで19匹(95.0%)が5週間まで生存した。これら生存マウスのうち12匹はRH株の攻撃に耐えて生存を続けた。

マウス腹腔内のTp虫数と大細胞数：実験開始10日後に実験マウスおよび対照マウスを無選択的にとり出し、それぞれ2mlの生食水を腹腔内に注入した後、吸引して材料とした。これら腹腔洗滌液1ml中のTp虫

Table 1 Survival of mice injected with antilymphocyte serum (ALS) immediately after Beverley or S-273 infection and resistance of survived mice to the RH-challenge

Injection route of ALS	Injection	No. of mice exam.	No. of survived mice					RH-challenge No. of mice surv./ exam.
			1wk.	2	3	4	5	
Intraperitoneal	Bev and ALS	130	127	80	37	14	12 (9.2%)	0/12
	S-273 and ALS	20	20	17	14	6	2 (10.0%)	0/2
	ALS only (control)	58	58	55	48	40	35 (60.3%)	0/35
Subcutaneous	Bev and ALS	60	59	44	26	20	19 (31.7%)	4/19
	ALS only (control)	30	30	25	23	22	21 (70.0%)	0/21
	Bev only (control)	115	114	104	101	99	98 (85.2%)	57/98
	S-273 only (control)	20	20	19	19	19	19 (95.0%)	12/19

Approximately 10^4 trophozoites of Beverley strain or 20 cysts of S-273 strain were inoculated into each mouse intraperitoneally.

ALS in amount of 0.15ml per day was injected for 7 days and after that at the intervals of 3 days up to 5 weeks. The agglutination titer of ALS used was more than 1 : 256.

Numbers of RH trophozoites used for challenge were 3,000.

Table 2 Average number of trophozoites and large cells in the abdominal cavity of mice 10 days after the injection of ALS and Beverley trophozoites

Injection route of ALS	Injection	No. of mice exam.	Average number of	
			trophozoite	cells
Intraperitoneal	ALS and Bev	15	241×10^3	5850×10^3
	ALS only (control)	15	—	2390×10^3
Subcutaneous	ALS and Bev	10	233×10^3	8450×10^3
	ALS only (control)	10	—	2080×10^3
	Bev only (control)	25	6×10^3	4120×10^3
	Normal mice (control)	10	—	2480×10^3

Abdominal fluid of mice was withdrawn into the same syringe immediately after the intraperitoneal injection with 2ml saline and used as a material for examination. Average number of trophozoite and cells indicates the number per ml.

数および細胞数を算定して、それらの平均値を表示した (第2表). Bev 感染と同時に ALS 注射を開始した実験例はマウス15匹について検し、その平均数は虫数24.1万コであり、細胞数は585万コを示した. 対照の ALS のみ注射例15匹の細胞についてみると、平均数は239万コであるのに対して、無処置の正常マウス10匹の平均数は248万コを示し、この両者間に有意の差は認められなかった. また、対照として Bev のみを注射した25匹について検査すると、平均虫数は6,000コの少数であり、細胞の平均数は412万コであった. これらの成績から ALS 使用により細胞数には影響を与えないが、虫体は著明に増殖してその数を増すことを知った.

血流中のリンパ球数: 実験開始10日後、無選択的にとり出したマウスの流血中のリンパ球数について、実験マ

ウスおよび対照マウスの眼球より採血し検索した. Bev 接種と同時に ALS 注射を行った実験マウス5匹の平均値は白血球数 $4200/\text{mm}^3$ でリンパ球数 $294/\text{mm}^3$ (7.0%) であつた (第3表). 対照の ALS のみ注射したマウス5匹の平均値は白血球数 $3,000/\text{mm}^3$, リンパ球数 $414/\text{mm}^3$ (13.8%) であり、無処置の正常マウス8匹の平均値は白血球数 $6,800/\text{mm}^3$, リンパ球数 $4,357/\text{mm}^3$ (62.2%) を示した. また、対照の Bev 虫体のみ接種のうけたもの11匹の平均値は白血球数 $6,400/\text{mm}^3$, リンパ球数 $2,163/\text{mm}^3$ (33.8%) であつた. 以上の成績から ALS 使用マウスの白血球数の減少はリンパ球数の減少に起因することを知った.

2. ALS 皮下注入の場合

マウスの生残率と RH 株虫体による攻撃に対する耐

Table 3 Number of lymphocyte in blood stream 10 days after the injection of ALS and Beverley trophozoite

Injection route of ALS	Injection	No. of mice exam.	Average number of		
			leucocyte no.	%	lymphocyte no.
Intraperitoneal	ALS and Bev	5	4200	7.0	294
	ALS only (control)	5	3000	13.8	414
Subcutaneous	ALS and Bev	6	5400	5.7	308
	ALS only (control)	6	4700	9.0	423
	Bev only (control)	11	6400	33.8	2163
	Normal mice (control)	8	6800	62.2	4357

Average number of leucocyte and lymphocyte indicates the numbers in 1ml of blood.

過性：ALS の注入ルートを経皮下としたほかは Bev の接種、ALS の注射の回数と量および攻撃に使用した RH 株虫数はすべて前記 ALS 腹腔内使用の場合と全く同一に行った。その結果、ALS 使用し Bev 虫体接種を受けた実験マウス60匹中5週後の生存マウス数は19匹(31.7%)であった(第1表)。これら19匹のマウスに RH 株の攻撃接種を行ったところ、攻撃後5週に4匹が耐過生存していた。ALS 皮下使用の場合、マウスの生残率および攻撃接種に対する耐過性に腹腔内使用の場合との間に差が認められた。これは皮下使用の場合、注射の回数を重ねるにしたがって皮下に硬結、壊疽を形成し、ALS のマウス体内への吸収が不良となるため、ALS 注射の影響が減弱するものと考ええる。対照の ALS のみ注射されたマウスは30匹で、そのうちの21匹(70.0%)が5週後まで生存しており、これらは RH 株虫体の攻撃によつて全部死亡した。

マウス腹腔内の Tp 虫数と大細胞数：ALS 腹腔内使用の場合と全く同一方法で同一時期の実験開始の10日後に検して Tp 虫体および細胞の平均数を表示した(第2表)。Bev 感染と同時に ALS 注射を開始した実験例はマウス10匹について検して、その平均数は Tp 虫数23.3万コ、細胞数845万コであり、Tp 虫数の平均値は腹腔内使用の場合とほぼ同数を示した。ALS を使用せず Bev のみの感染マウスよりその数は遙かに多い。ALS のみ使用マウス10匹の細胞数の平均値は208万コであり、ALS 腹腔内使用例および正常マウスの腹腔内細胞数とほぼ同一であった。

血流中のリンパ球数：ALS 腹腔内使用の場合と全く同一方法によつて同一の時期の実験開始から10日後に検した。Bev 接種と同時に ALS 注射を開始した実験マウス6匹の平均値は白血球数5400/mm³ およびリンパ球数308/mm³ (5.7%) であった(第3表)。対照の ALS

のみ注射マウス6匹の平均値は白血球数4700/mm³、リンパ球数423/mm³ (9.0%) であり、これらの成績は ALS 腹腔内使用の場合と大差は認められなかった。

マウス腹腔内の Tp 虫数と細胞数および血流中のリンパ球数を検査した実験開始から10日後の時期は未だ ALS 皮下注射部位に硬結、壊疽を形成せず ALS の吸収がよかつたため、ALS 腹腔内使用の場合と大差ない成績が得られたものと考ええる。

3. ALS 注射マウスの Tp 抗体価

各群から無選択的に一部のマウスをとり出し採血して、HAT を検査し、その価1:256またはそれ以上を陽性値とした。ALS 腹腔内使用の場合、実験開始後9~14日の間に27匹を検し、そのうちの20匹が陽性値を示した。ALS を使用せず Bev のみ接種した対照マウスも同数検して、23匹が陽性値を示し、Bev を接種せず ALS のみ注射されたマウスは13匹を検して、5匹が陽性値を示した。実験開始から5週後に検した実験マウス8匹および Bev のみ接種の対照マウス10匹はすべて陽性値を示し、ALS のみ注射の対照マウス5匹はすべて陰性であった。

ALS 皮下注射の場合、実験開始から8~10日の間に6匹を検し、4匹が陽性値を示し、対照の Bev のみ接種したものは6匹のすべてが陽性であった。この場合、対照の Bev を接種せず ALS のみ注射した6匹はすべて1:1,024かそれ以上の陽性値を示した。

上記したように Tp を接種せず ALS のみの注射マウスがしばしば陽性値を示すので、異つたウサギから得られた10コの ALS そのものについて、同一方法によつて HAT を検した。その結果はすべてが陽性値を示し、その価1:4,096以上の高い値を示したものが2コに認められた。そこで、これらの ALS のうちから2コをとり出し、医科学研究所および予防衛生研究所に抗体価の測

定を依頼して、著者らの成績と対比した。著者らのそれから2コのALSのHATは1コは1:4,096以上、1コは1:1,024であり、医科研のHATは凝集の型が多少異なるようであったが、両者とも1:8,192の高い値を示した。予研での色素試験による成績は両者とも1:4以下の陰性値が得られた。以上の成績からBev接種と同時にALS注射開始の実験マウスがTp抗体価陽性と断定することは不能と考へて、実験開始から2および3週後にALS腹腔内注射されBev接種をうけた実験マウスそれぞれ3匹および4匹の色素試験を行った。また、同一時期に对照のBevのみ接種マウス各3匹計6匹およびALSのみ注射マウス各3匹計6匹についても色素試験を行った。その結果は実験マウスおよびBevのみ接種マウスはすべて陽性値を示し、前者において1匹が1:16を示し、他はすべて1:64以上の抗体価を示した。ALSのみ注射マウスはすべて1:4以下の陰性値であった。したがって、実験マウスは一般に抗体価陽性と考へる。

考 察

弱毒Tp株の慢性感染動物に強毒株の攻撃接種した場合、動物の延命または生残などの何等かの免疫効果が認められることはWolf *et al.* (1940), Weinman (1943), Ruchman *et al.* (1948), Frenkel (1952, 1956), Jacobs *et al.* (1955), Vollbrechtshausen (1955), 上田 (1960), Beattie (1963), Stahl *et al.* (1964), Nakayama (1964, 1967) ら、その他の多数の研究者によって報告されている。ただ、新里 (1968) のみはこのような免疫効果を全く否定している。これら慢性感染した動物の体液性抗体の存否および持続性について知るために、中山 (1969) はマウス及びウサギを用いて検索したところ、マウスは生存期間の年余にわたってシストを保有し、マウス、ウサギともに陽性値を持続保持したことを知った。そこで、Tp死虫ワクチンの頻回にわたる注射を行い、体液性抗体を陽転させたマウスについて、注射終了後2週迄の短期間に強毒Tp虫体の攻撃を行った。その結果58匹中16匹(27.6%)のマウスが攻撃株を潜有しながら、攻撃に耐過生存した。しかし、4週以後は抗体価陽性を示した期間中であるにもかかわらず、ほとんどすべてのマウスには死虫ワクチンの効果は認められず、攻撃後短期間に死亡している。このように弱毒株の生虫体免疫と死虫体免疫との間に攻撃後のマウス生残数に明瞭な差の認められることから、生虫体接種によって虫体が細胞内に侵入するため産生される細胞性抗体が動物を感染死から守るための主役を演ずるであろうこ

とは一応想定される。

マウスにALSを腹腔内注射して細胞性免疫の形成を抑制したと考へた場合の弱毒株感染による感染5週経過のマウスの生残は本実験の成績では僅かに約10%のマウスに認められたにすぎなかつた。対照として弱毒株に感染してALSを使用しなかつたマウスは約90%において5週後生残が認められた。このように実験例と対照例との間に生残率に明確な差異が認められる一因としてALSの副作用を考へる必要がある。そこで、ALSのみを同様に使用して、5週後のマウス生残率を検したところ、60%のマウスの生残が認められたので、上記両者の差異がALSそのものの副作用に起因するものと思われぬ。これらの成績は亀井ら (1969) が抗胸腺細胞グロブリン分画を腹腔内に注射し、Bevシストを接種したマウスの生残状況とほぼ一致している。結局彼等はTpの免疫にはリンパ球が大きな役割を担っていると考えられると述べている。また、上記本実験例の生残マウスに強毒RH株の攻撃接種を行ったところ、すべてのマウスは死亡し、対照の弱毒株のみの感染例は約60%のマウスが攻撃に耐過生存した。この両者間の攻撃耐過における明瞭な差異も以下に述べるように、実験例ではALS継続投与のため細胞性抗体の産生が阻害された結果と考へる。

5週間の観察期間中対照および実験例のマウスから無選択的に一部のマウスを取り出し色素試験によつて流血抗体を検したが、対照のBevのみ感染させたマウスはもちろん、実験例のマウスもすべて陽性値を示した。そこで、攻撃後のマウス生残についての実験例と対照例との差異が産生された流血抗体のみによる差異とは考へ難く、むしろALSの使用によつてリンパ球が減少を来たした結果と考へられる。すなわち、リンパ組織系、殊にリンパ球の介在がTpの感染致死防禦機構に重要な役割を演ずるであろうことが考へられる。しかし、その具体的役割については未解明である。なお、実験および対照例のマウスについて感作血球凝集反応によるTp抗体価を検したが、リンパ系細胞による吸収の操作を省いたため、Tp虫体の接種をうけずALSのみ注射されたマウスにおいてもしばしば陽性値を示した。そこで、ALSそのものを同じ方法で検したが陽性を示した。同一検体の色素試験による検査では陰性を示し、ALSのみ注射されたマウスもすべて陰性であった。上記両テストは反応形態が異なるので当然の結果といえる。Tp感作血球凝集反応はマウス腹腔内で増殖させたTp虫体を抗原として使用するため、使用の抗原中にマウス腹腔内細

胞が混在するので、ALS を使用する本実験の場合には純化した Tp 抗原を用いて感作血球を作製するか、腹腔内細胞による吸収の操作を行わない限り、不適な方法である。

ALS 注射によるリンパ球の変動を知るため、実験マウスおよび ALS のみ注射された対照マウスについて流血中の白血球数及びリンパ球の百分率を実験開始の10日後に検したが、無処置正常マウスのそれに比して両者共減少した。殊に、リンパ球の百分率は正常マウスのほぼ10分の1に著減していた。したがって、白血球の減少はリンパ球の著減に起因するものと思われる。多田隈ら(1967)もほぼ同一の成績を報告し、さらに ALS の投与を中止すると白血球数の上でも、また、血液像の上からいつても、約1週間で正常に回復するであろうと述べている。また、同じ時期に ALS のみ投与したマウスと正常マウスの腹腔内の大食球を含む大細胞数を検したが、両者に有意差は認められず、一般にいわれているように ALS は極めて特異的にリンパ球のみに作用するものと思われる。この時期に細胞数の検査と同時に ALS を投与され Bev 虫体の腹腔内接種を受けた実験マウスの腹腔内栄養型虫数を検して、Bev 感染のみの対照マウスのそれと比較した。その結果、実験マウスでは対照マウスの約40倍の虫数が検出された。これは ALS 投与によつて、リンパ球の減少を来たし、さらには免疫抑制作用を起したためと考える。しかも、ALS による腹腔内遊出の細胞数の減少は認められず、Tp 腹腔内接種のため逆に細胞数は正常マウスのほぼ2~4倍に増加し、これが Tp 増殖の良き培地となるためと考える。腹腔内細胞がマウス腹腔内に接種された Tp 増殖のよき拠点となるであろうことは次の点からもうかがわれる。すなわち、強毒 Tp 株保存のため継代接種中、感染3~4日後のマウス腹腔内には一見して非常に多数の虫体が検出されるが、その後、特に虫数が増加するとは思われず、一定多数の虫体を保持するが、細胞数は非常に少数であるのが普通のものである。これは細胞内に Tp が侵入して増殖を繰返しているうちに、細胞の遊出が Tp の侵入、増殖の速度に間に合わなくなり、多数の細胞が破壊されるため、細胞の減少を来したものであろう。その後は胞細数少数のため十分な増殖が行なわれず一定した多数の虫体が検出されたものと考え。また、われわれは Colchicin を注射して、腹腔内細胞の分裂、増殖を抑圧し、強毒 Tp 虫体をマウス腹腔内に接種したが、これらのマウスは無処置感染の対照マウスに比して明らかに延命されたことを認めている。この事実もまた、Tp 感

染の初期には大食球が Tp 増殖のよき培地である証拠と考えたい。他面、大食球は感染後の日時の経過とともに自身が産生する特異的な抗体をもつようになることも考えられる。

Mitsuhashi (1966, a, b) は自身および多くの研究者の成績を総括して、大食球は抗原を採食するだけでなく、抗原から RNA 性の伝達因子をつくる役割をもつものと述べている。すなわち、免疫大食球中に細胞性抗体をもち、免疫大食球の培養濾液を正常の培養大食球に入ると、細胞性免疫が伝達されるし、免疫大食球を集めて抽出液を作り、そのなかから RNA 分画をとつて正常動物の脾またはリンパ細胞中に入ると抗体産生をするようになることから、形質細胞、リンパ系細胞に加えて大食球は抗体産生系の一員であると結論している。大町(1970)もこの点について、大食球のおかれた生理的条件、液性因子、その他の要因によつて、あるときは清掃細胞として、あるときは抗体産生誘導細胞として、二面的な役割を果たしうるのであるかもしれないと述べている。Nakayama and Matsubayashi(1961) は Bev シストをマウス腹腔内に接種後、栄養型虫体の腹腔内の出現期間について観察し、接種7~11日後に最多数の虫体の検出をみて、その後は漸減し、18日後に顕微鏡下で検出されたのが最後であつた。これは2~3週を要して大食球内で細胞性抗体が形成され、その結果、虫数の減少を来したものと解釈すれば無理なく考えられる。また Nakayama (1965) は diffusion chamber を用いて免疫大食球を含む腹腔内細胞は正常腹腔内細胞より Tp 虫体の増殖をより強く抑圧することを認めている。今回の実験で細胞数および Tp 虫数を算定した時期は感染の10日後であつたので、この時期には ALS によるリンパ球の減少のため大食球内での細胞性抗体の産生も抑圧されたであろうため、対照に比して虫数の著明な増殖が認められ、さらには細胞数が正常または ALS のみ注射の対照例および Bev のみ接種の対照例より増加したものと考える。さらに日数が経過すれば Bev 虫体のみ接種の対照例では、前記の想定から細胞性抗体が大食球内にも形成されて虫数はさらに減少し、このため細胞数も減少するであろう。

Stahl *et al.* (1965, 1966 a, b, c.) は Bev 感染マウスについて、脾臓摘出または Cortisone, 6-mercaptopurine (6-MP) を投与されたマウスには感染による組織の病的变化が著明に出現し、脳内に多数のシストの集塊を認め、大部分のマウスが死亡したので、これらの処置でマウスの免疫形成が抑制されたため、組織内の虫体の増殖

が続き、血行を介する脳への虫体の移行が盛んになったと考えている。中山ら (1970) は前処置として Tp 死虫ワクチン注射して抗 Tp 剤を投与されたマウスは抗 Tp 剤のみを投与されたマウスより Tp 強毒株感染に対して遙かに高率な生残を認めている。これらの実験成績から宿主体内で産生される流血抗体も Tp の増殖を抑圧する作用があるものと考えられる。亀井ら (1968, 1969, b, c, d.) は Bev シスト感染マウスに免疫抑制剤として Cyclophosphamide, 6-MP の投与および r 線照射を行って、いずれも感染マウスの抵抗性を著しく低下させ、しかも、これらの処置されたマウスの Tp 抗体価は HA 試験および色素試験で陰性値を示したと述べている。さらに、彼等はこれら抵抗性の減弱したマウスに Bev 慢性感染の免疫脾細胞を移入することによって抗体価の上昇と抵抗性の回復を認めたが、移入細胞として免疫大食球を使用した場合は全く効を奏さなかつたことを明らかにした。Nakayama (1965) も免疫大食球の移入は同様に無効であることを述べている。これらの成績から、亀井らは流血抗体の出現がマウスを感染死から防ぐことに、どの程度の意味をもっているかは議論のあるところであり、この役割を担うものが細胞性免疫であるか、液性免疫であるか、あるいは両者であるのか不明であるが、いずれにせよ移植された免疫細胞がマウスに抵抗を与えていることは明らかであると述べている。今回の実験成績は Tp 免疫にリンパ球が大きな役割を演ずるものであることを述べたものであつて、流血抗体の影響を全く否定するものではなく、おそらく、細胞性および液性抗体が協調的に作用し、特に前者は宿主を感染死からより強力に防禦するものであろうと考える。

ALS を皮下に注入した場合には本実験成績の示す通り、注射回数の少ない間はよく吸収されて、腹腔内注入の場合と同様な効果を示す。しかし、注射回数を増すと注射部位をかえて行なつても、その附近に硬結、ついには壊疽を形成し、ALS の吸収不良になるためか、注射の目的を達し難くなる。したがつて、マウスのような小動物に ALS を投与するときは、腹腔内に注入することによって確実にその目的が達せられるものと考えられる。

結 語

ALS を継続注射されたマウス体内では細胞性免疫の産生が抑圧されると考えられる。そこで、マウスに ALS 注射開始と同時に Tp 弱毒株に感染したマウスの感染に対する抵抗性を主として観察し、次の結果を得た。

1) Bev 栄養型虫体約 1 万コを腹腔内に接種すると

同時に ALS の腹腔内注射をうけたマウス 130 匹中 12 匹 (9.2%) が観察終了時の 5 週後まで生残し、S-273 株 20 シストの接種と同時に ALS 使用マウスも 20 匹中 2 匹 (10%) が 5 週後まで生残した。これらマウスの 5 週後の生残率は対照の ALS のみ注射されたマウスおよび Bev または S-273 株のみ接種されたマウスのそれに比して明らかに低い。実験例の生残マウスは強毒 RH 株の攻撃接種ですべて短期間に死亡したが、Bev または S-273 株のみ接種された対照例では約 60% のマウスが RH 株攻撃に耐過生存した。皮下に ALS を注射した場合は 60 匹中 19 匹 (31.7%) のマウスが 5 週後まで生残し、このうち 4 匹は RH 株攻撃に耐過生存した。ALS 腹腔内および皮下使用の場合の両者間に差のあることは、皮下に継続して使用した結果、注射部位に硬結、壊疽を形成するため ALS の吸収不良に起因するためと考える。

2) ALS 注射し Bev 感染した上記実験マウスの実験開始後 10 日の腹腔内における Tp 虫数および大細胞数を検し、対照の Bev のみ感染マウスのそれらと比較して増減について観察した。2 ml の生食水を腹腔内に注入後、吸引して得られた腹腔洗滌液 1 ml 中に含まれる虫数および細胞数を算定し、それらの平均値を算出した。実験例では ALS 腹腔内および皮下注射の場合の Tp 虫数の平均値はそれぞれ 24.1 万コおよび 23.3 万コでほぼ等しく、対照の Bev のみ接種例では 0.6 万コであつた。すなわち、ALS 使用により腹腔内虫数の増加が認められた。細胞数については ALS 使用の如何にかかわらず、この検査時期では Tp 感染の有無によって左右された。すなわち、Bev 感染マウスはその数多く 400 万以上で非感染マウスの ALS のみ注射されたマウスおよび正常マウスでは 250 万以下であつた。

3) 上記実験マウスの実験開始 10 日後の流血中のリンパ球の減少状態について検した。ALS 腹腔内および皮下使用の実験例では白血球数はそれぞれ $4,200/\text{mm}^3$ および $5,400/\text{mm}^3$ で、リンパ球は 7% および 5.7% を示し、対照の正常マウスの白血球数 $6,800/\text{mm}^3$ 、リンパ球 62.2% に比較すると明らかに少数、低率である。また対照の Bev のみの感染例は白血球数 $6,400/\text{mm}^3$ 、リンパ球 38.8% を示した。この成績から、ALS 使用によりリンパ球の減少が認められ、これが白血球数減少の主因であることが判然とした。なお、対照として ALS のみ注射されたマウスにおいても白血球およびリンパ球の減少が認められた。

4) 上記の実験マウス中から無選択的に一部のマウスをとり出し、Tp 抗体価を検した。その結果、すべて陽

性値を示したので、ALS を使用したとき Tp 感染による血流中の抗体価は陽転するが、弱毒株 Tp 感染に対する抵抗性は著しく減弱し、RH 株攻撃に対する耐過性は喪失する。これらの事実から、Tp 流血抗体のほかに細胞性免疫が Tp 感染に対する抵抗性および強毒株攻撃に対する耐過性により強力に作用するものと考えられる。

終りに、抗リンパ球血清の医科研法による Tp HA 抗体価の測定を戴いた東京大学医科学研究所亀井喜世子技官、および色素試験による測定を戴いた慈恵会医科大学小林昭夫助教授に深謝し、マウス血清の色素試験の労を賜った国立予防衛生研究所熊田三由技官に深甚の謝意を表します。

本論文の要旨は昭和45年4月の第39回日本寄生虫学会総会において発表した。

文 献

- 1) Beattie, C. P. (1963) : Immunity of *Toxoplasma*. A symposium of the British Society for Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 253-258.
- 2) Frenkel, J. K. (1952) : Effect of vaccination and sulfamide therapy on experimental toxoplasmosis. Fed. Proc., 11, 468-469.
- 3) Ibid. (1956) : Pathogenesis of toxoplasmosis and infections with organisms resembling *Toxoplasma*. Ann. New York Acad. Sci., 64, 215-251.
- 4) 花木琢磨・信藤謙蔵・佐藤卯三郎(1963) : トキソプラズマ血球凝集反応の BOB 結合、凍結乾燥感作血球 (B 抗原) の創製について. 第23回日本寄生虫東日本支部大会記事, 10.
- 5) Jacobs, L. and Melton, M. L. (1955) : Immunity in murine toxoplasmosis. J. Parasit., 41 (Supp.), 20.
- 6) 亀井喜世子・中野康平・常松之典(1968) : γ 線照射マウスのトキソプラズマ感受性(1) 線量の影響. 寄生虫誌, 17, 562.
- 7) 亀井喜世子・中野康平(1969, a) : 抗リンパ球血清投与のトキソプラズマ感受性に及ぼす影響. 寄生虫誌, 18, 646-647.
- 8) 亀井喜世子・中野康平(1969, b) : 6-MP 投与のトキソプラズマ感受性に及ぼす影響. 寄生虫誌, 18, 647.
- 9) 亀井喜世子・中野康平・常松之典(1969, c) : γ 線照射マウスのトキソプラズマ感受性(2) 免疫細胞移入による抵抗性の付与. 寄生虫誌, 18, 374.
- 10) 亀井喜世子・中野康平・常松之典(1969, d) : Cyclophosphamide 投与のトキソプラズマ感受性に及ぼす影響. 寄生虫誌, 18, 375-376.
- 11) Mitsuhashi, S. (1966, a) : A new cell line of antibody formation. 1. Formation of cell-bound antibody by mononuclear phagocyte. Proc. Jap. Acad., 42, 184-187.
- 12) Ibid. (1966, b) : A new cell line of antibody formation. 11. Antibody formation of mononuclear phagocyte and its transfer agent. Proc. Jap. Acad., 42, 280-284.
- 13) Nakayama, I and Matsubayashi, H. (1961) : Comparative studies on the growth of high and low virulent strains of *Toxoplasma gondii*, with special reference to the production of cyst. Keio J. Med., 10, 43-57.
- 14) Nakayama, I. (1964) : Persistence of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* in the brain of immune mice. Keio J. Med., 13, 7-12.
- 15) Ibid. (1965) : Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis. Keio J. Med. 14, 63-72.
- 16) Ibid. (1967) : A method of detection of *Toxoplasma* infection in man. Jap. J. Parasit., 16, 381-388.
- 17) 中山一郎(1969) : トキソプラズマ死虫ワクチン注射動物における感作血球凝集反応抗体値の持続性と強毒株攻撃に対する抵抗性. 寄生虫誌, 18, 539-549.
- 18) 中山一郎・青木豊治(1970) : トキソプラズマ死虫ワクチンによる免疫が感染と治療に及ぼす影響. 寄生虫誌, 19, 290-295.
- 19) 大町和千代(1970) : 抗体産生におけるマクロファージの役割. モダンメディア, 16, 144-150.
- 20) Ruchman, I. and Johnsmann, R. J. (1948) : Biological properties of a strain of *Toxoplasma* recovered from a fatal case of congenital toxoplasmosis. Am. J. Trop. Med., 28, 687-695.
- 21) 新里仁達(1968) : *Toxoplasma gondii* の免疫に関する研究, 数種マウスに対する Beverley (弱毒) 株の病原性と防禦抗原性について. 寄生虫誌, 17, 429-435.
- 22) Stahl, W. and Akao, S. (1964) : Immunity in experimental toxoplasmosis. Keio J. Med., 13, 1-6.
- 23) Stahl, W., Matsubayashi, H. and Akao, S. (1965) : Effects of 6-Mercaptopurine on cyst development in experimental toxoplasmosis. Keio J. Med., 14, 1-12.
- 24) Ibid. (1966, a) : Experimental toxoplasmosis : Effects of suppression of the immune response of mice by cortisone and splenectomy. Keio J. Med., 15, 1-12.
- 25) Ibid. (1966, b) : Murine toxoplasmosis : Development of bizarre clusters of cysts. Jap.

- J. Parasit., 15, 44-47.
- 26) Ibid. (1966, c) : Modification of subclinical toxoplasmosis in mice by cortisone, 6-mercaptopurine and splenectomy. Am. J. Trop. Med. Hyg., 15, 869-874.
- 27) 多田隈卓夫・根本一郎・秋山武久・牛場大蔵・大谷武彦・横山拓也・大村敏郎(1967) : 抗リンパ球血清の免疫抑制作用 (I) 抗マウスリンパ球血清の諸種免疫反応の成立に及ぼす効果. 移植, 2, 166-174.
- 28) 上田春人(1960) : *Toxoplasma* (チステ形成株) の毒力及び免疫について. 慶応医学, 37, 1631-1638.
- 29) Vollbrechtshausen, R. (1955) : Tierexperimentelle Untersuchungen zur Frage der aktiven immunisierung bei Toxoplasrose. Zeitsch. Trop. Parasit., 6, 159-165.
- 30) Weinman, D. (1943) : Chronic toxoplasmosis. J. Inf. Dis., 73, 85-92.
- 31) Wolf, A., Cowen, D. and Paige, B. H. (1940) : Toxoplasmic encephalomyelitis, IV. Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. J. Exp. Med., 71, 184-214.

Abstract

THE INFLUENCE OF ANTILYMPHOCYTE SERUM ON THE RESISTANCE OF MICE TO THE TOXOPLASMA INFECTION

ICHIRO NAKAYAMA and TOYOHARU AOKI

(Department, of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo)

It has been previously reported (Nakayama) that the multiplication of *Toxoplasma* is suppressed to a certain extent by toxoplasmic humoral antibody produced after the hyper-immunization with killed *Toxoplasma* vaccine. The present paper deals with the resistance of mice to the low or avirulent strain of *Toxoplasma* after the successive injection of antilymphocyte serum (ALS).

The 10,000 trophozoites of Beverley strain were inoculated into abdominal cavity of mice, and 0.15 ml of ALS was also injected intraperitoneally. ALS was administered every day for the first 7 days and after that, at intervals of 3 days up to the end of observation period, 5 weeks. The 12 (9.2%) of 130 experimental mice survived the 5 weeks period. All the surviving mice died after inoculation with 3,000 trophozoites of RH strain. As a control, mice injected with ALS only or Beverley trophozoites only survived 5 weeks period in 60.3% or 85.2% respectively. After RH challenge, all mice died in the case of the former and 57 (58.2%) of 98 mice survived in the case of the latter. Mice were also inoculated with 20 cysts of avirulent S-273 strain, instead of Beverley trophozoites, and almost the same results were obtained.

The second phase of the work dealt with effect of ALS on lymphocyte and trophozoite. Mice were injected with 2ml of saline intraperitoneally and the fluid was withdrawn back into the same syringe 10 days after the start of experiment. The number of Beverley trophozoites in the fluid was counted. The average number of trophozoites from 15 experimental mice was 241×10^3 /ml, although the average number of trophozoites in control mice which were only inoculated with Beverley trophozoites was 6×10^3 /ml. According to the findings, the injection of ALS is considered to be able to suppress a development of cellular immunity in mice. As the result, the multiplication of trophozoites took place very easily and the difference between experimental and control mice was apparently recognized in number of trophozoites. The number

of large cells in the fluid was not influenced by the injection of ALS, but increased due to the Beverley infection. At the same time, the number of lymphocytes in blood stream was counted. The average per cent of lymphocyte decreased to 7% in the experimental mice, while the average was 62% in normal mice. Leucocytes in the experimental mice also decreased in number apparently, because of decreasing of lymphocyte. The average per cent of lymphocyte in control mice which were injected with ALS only or Beverley trophozoites only was 13.8% or 33.8% respectively.

In the case of administration of ALS subcutaneously, the data expected, that being similar to administrating ALS intraperitoneally, was not obtained, probably because of poor absorption of ALS due to a developing of induration and necrosis at the injected part.

Examination for *Toxoplasma* antibody were made on random samples of experimental and Beverley infected mice without administration of ALS. All the mice examined showed to have positive titer. When a development of cellular immunity was suppressed by administration of ALS, inspite of showing a positive titer, mortality rate of mice increased substantially and the mice could not survive the challenge of RH trophozoites.

According to these findings, it is hypothesized that cellular immunity is more effective than humoral antibody in a protection of mice against death from *Toxoplasma* infection.