

## 組織培養におけるトキソプラズマのプラズマクロット 中での嚢子形成に対する抗血清の影響

神原 広二 GLORIA L. ENRIQUEZ<sup>1)</sup>

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

高 柳 坦

名古屋市立大学医学部医動物学教室

(昭和46年2月1日 受領)

トキソプラズマの細胞内増殖からシスト形成にいたる経過は宿主の産生する抗体と密接な関係があると言われている。Matsubayashi and Akao (1966) によればトキソプラズマのシストは宿主動物に産生された抗体の侵入を防ぎ原虫が抗体の影響を受けるのを防いでいると報告している。

一方、トキソプラズマに対する感染防御には血清抗体よりもむしろ細胞性抗体を重要視する報告がある (Vischer and Suter, 1954; Frenkel, 1967; 岡ら, 1969)。

この論文は生体の様々な条件を含まない組織培養を用いトキソプラズマの宿主細胞内の寄生からシスト形成にいたる過程とこれに対する血清抗体の影響について報告する。

### 材料と方法

原虫は *Toxoplasma gondii* の Beverley 株を用いた。原虫は HeLa 細胞により継代培養されているものであるが宿主細胞より培養液中に遊離した原虫を 2,000 rpm 10分間遠心して集めた。遠心により混入してくる原虫の感染した HeLa 細胞を破壊するため注射器(デイスポーザブル, 23G×1注射針)で吸入圧出を数回くり返し、まず1,000rpm 1分間遠心してこわれない HeLa 細胞を除去し、次に2,000rpm 10分間遠心して原虫のみを集め、最終原虫数を  $1 \times 10^5$ /ml に調製した。

HeLa 細胞の培養は Eagle-HeLa 液(大阪大学微生物病研究会)に20%の割合で仔牛血清(同大学同会)を加えた培養液で行なった。抗生物質はストレプトマイシ

ン50 $\gamma$ /ml, ペニシリン50u/ml を用いた。

実験にあたって、HeLa 細胞は小型培養瓶によるタンザク(2.4×0.8cm)培養を行なった。タンザク面全体が一樣に HeLa 細胞で被われる時期に  $1 \times 10^5$  原虫が移植された。この後、毎日培養液の交換を行ない、移植後4日目より2~256に倍数稀釈した抗血清を含む培養液で培養した。培養液の交換は24時間毎に行なった。プラズマクロットの作成は原虫移植後6日目に行なった。プラズマはエチルエーテルで麻酔したラットの心臓より全採血し直ちに3,000rpm 5分間遠心して採取した。この操作は0°~4°C でなされた。タンザクは原虫移植後15日目より5日間隔で培養瓶よりとり出され空気乾燥後3分間カルノア液で固定され、染色はトルイジンブルーで行なわれた。

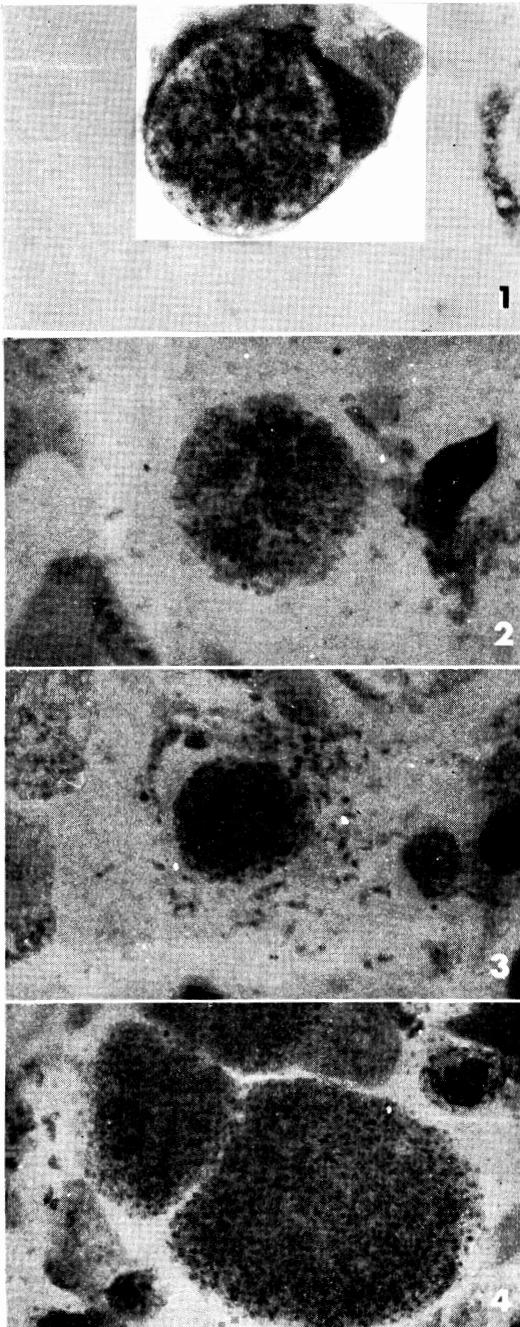
抗血清は家兎に Beverley 感染マウス脳懸濁液を筋注射し、7日間してピリメタミン(20mg/kg)にて治療しさらに30日間隔で2度、再感染を行ない最終注入後20日間して心臓せん刺により採血された。56°C, 30分非働化し、-23°C に保存した。使用に先立って抗血清は HeLa 細胞で37°C 1時間吸収された。赤血球凝集反応(Jacobs and Lunde 1957)によると用いた抗血清の力価は1:8,192であつた。

染色されたシストは顕微鏡下で観察され、シスト数は同一実験シリーズの5枚のタンザクの平均値として示した。

### 結 果

組織培養した HeLa 細胞に原虫を感染させると原虫はその細胞質中で増殖を行ない、感染後7~15日すると重感染により HeLa 細胞はタンザク面より脱落してし

1) 現住所: Department of Zoology, University of the Philippines, Diliman, Quezon City D-505, Philippines



Figures 1-3. Various stages in the development of cyst-like bodies cultured in Eagle-HeLa medium. Fig. 1. *Toxoplasma* organisms occupying the greater part of the HeLa cell cytoplasm 20 days after infection. Fig. 2. A cyst-like body 25 days after infection. The host cell is no longer observed. Fig. 3. A ruptured cyst-like body with the parasites scattered all over. Figure 4. A well-developed cyst-like body from a culture containing diluted antiserum (1 : 4) 30 days after infection.

まいその後の状態を観察出来ないので感染宿主細胞をプラズマクロットで被い重感染の状態におちいっても脱落を防いで原虫の観察を行なった。

HeLa 細胞に感染した原虫はその細胞質で増殖を続け感染後15日でその一部を占めるようになるがあるものは大部分が原虫によって占められ核が細胞質週辺におしやられているものも観察された。20日を過ぎると HeLa 細胞の原形質はほとんど認められなくなり細胞全体が原虫によって占められるようになる (Fig. 1)。しかも原虫の塊は宿主細胞よりも拡大成長し膜様物質 (恐らくいわゆるシスト壁) によって囲まれ、外界と区別されている。内部の原虫はトルイジンブルー染色ですき間なくぎつしりつまり、原虫の核のみが点々と濃染されあたかもマウスの脳組織にみられるシストの形態と酷似したものとなる (Fig. 2, 以後, シスト様体と記す)。このシスト様体はその出現頻度が25日で最高値を示すが、以後は時間と共に減少の傾向をたどる (Fig. 5)。これはシスト様体が破裂し原虫が plasma clot 中に遊離するためである (Fig. 3)。

抗血清添加により原虫のシスト様体形成にどのような影響が示されるかを調べるために4, 8, 16, 32, 64, 128 および 256 倍の各稀釈抗血清を培養液に添加した (Fig. 5)。1 : 256ではその消長は対照群とよく似た傾向を示し、抗血清の影響はあまりみられなかった。128では未処理群と同様20日にシスト様体が形成されはじめ25日に最も高い出現頻度に達するが30日を経過しても減少することなくシスト様体がプラズマクロット中で維持されている。これは原虫の増殖と抗血清のそれに及ぼす作用が平衡状態にあるためと思われる。64では25日で2例のみ認められ、30日では多少増加の傾向を示した。これは抗血清により成育がおさえられ増殖が極めておそいためと思われる。32では25日で1例のみ認めたがそれ以上の濃度ではもはやシスト様体の形成は全く認められなかった。

原虫が宿主細胞内でよく増殖した15日目より抗血清の添加を開始すると Fig. 4 に示すように1 : 4 稀釈においてもシスト様体が形成されるのが認められた。このこ

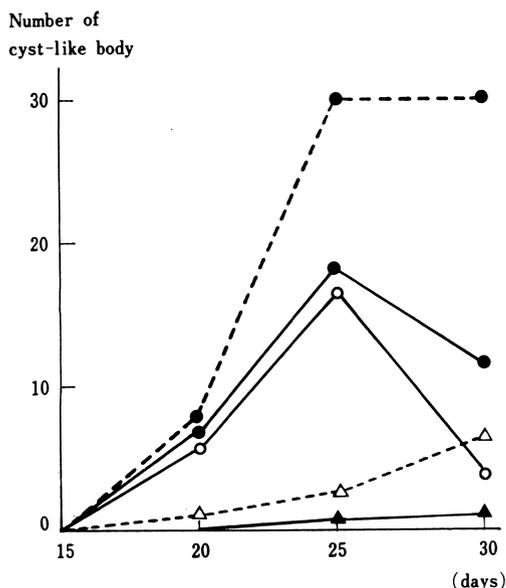


Figure 5. Number of the cyst-like bodies produced in culture medium with different antiserum dilution.

○—○ control, ●—● 256×, ●---● 128×, △---△ 64×, ▲—▲ 32×.

とは原虫が宿主細胞中で大いに増殖した状態になると抗血清に対して抵抗性を次第に増してくることを示している。

### 考 察

組織培養形での *Toxoplasma gondii* に関する報告は多数あるが、これらは感染細胞のガラス面よりの脱落を防ぐことが出来ないで最終的な追求はできない。

宿主細胞に侵入した原虫を宿主細胞共々支持体であるプラズマクロットに包埋固着せしめると原虫は増殖を続け、ついに宿主細胞はその形跡をとどめない状態になり原虫はシスト様体の形態をとる。しかし抗血清未処理の場合はこの成長増殖をおさえる条件がないので急速な増殖によりやがてシスト様体は破壊し遊離原虫が培養液中に放出され、いつまでもシスト様体の中にとまることはない。

シストと抗血清に関する報告のなかで Matsubayashi and Akao (1966) はフェリチン抗体を用いた電子顕微鏡による研究で、遊離原虫ではフェリチン粒子はその表層に認められるが宿主細胞内でシスト壁をもった状態では原虫にはフェリチンが認められず、シスト壁に粒子が認められると報告し、シスト壁が抗体侵入の防壁となつ

ている可能性を示した。

一方、原虫の抗原分析によると感染したマウスの抗血清には原虫の遊離抗原に対する抗体が強く認められることが報告された (高柳ら, 1970)。

以上のことと本実験の結果よりして次のことが考えられる。原虫が宿主細胞内に侵入するとシスト壁を形成しその内部に遊離抗原を貯える。宿主動物に産生される抗体とこれに対する遊離抗原の中和能との相互関係によってシスト数の増減が制約されるものと思われる。Beverley 株のような弱毒株は感染過程で宿主が十分な抗体を産生することが出来るのでそれに耐え得る状態のシストは残る。しかし分裂増殖はおさえられるので長期間宿主組織中に感染していることが出来るものと思われる。

### 結 論

*In vitro* の系で培養細胞をプラズマクロットで固定しトキソプラズマの増殖およびそれに対する抗体の影響を観察した。この結果プラズマクロット中にシスト様体の成生がみられた。抗血清処理では、適当な稀釈濃度で処理すると同様シスト様体を得た。その頻度は抗血清未処理の場合よりも多く出現したが、低稀釈抗血清処理ではシスト様体は認めることが出来なかつた。このことは抗血清は原虫増殖抑制効果あるのはさらに殺効果があることを示している。これらをもとにシスト、遊離抗原と抗血清の関係を検討した。

### 文 献

- 1) Frenkel, J. K. (1967) : Adoptive immunity to intracellular infection. *J. Immunol.*, 98, 1309-1319.
- 2) Jacobs, L. and Lunde, M. N. (1957) : A hemagglutination test for toxoplasmosis. *J. Parasitol.*, 43, 308-314.
- 3) Matsubayashi, H. and Akao, S. (1966) : Immuno-electron microscopic studies on *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 15, 486-491.
- 4) 岡好万・伊藤義博・古谷正人・奥木実・尾崎文雄 (1969) : *Toxoplasma* 再感染に対するマウスの特異抵抗性獲得の研究. *寄生虫誌*, 18, 226-231.
- 5) 高柳坦・神原広二・猪木正三・吉川勝美 (1970) : 寒天ゲル内沈降反応による *Toxoplasma gondii* 4 株の抗原構成. *寄生虫誌*, 19, 115-118.
- 6) Vischer, W. A. and Suter, E. (1954) : Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult mammalian macrophages cultivated *in vitro*. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 86, 413-419.

**Abstract**

THE EFFECTS OF ANTISERUM ON THE CYST FORMATION OF  
*TOXOPLASMA GONDII* IN TISSUE CULTURE

HIROJI KAMBARA, GLORIA L. ENRIQUEZ

*(Department of Protozoology, the Research Institute for Microbial Diseases,  
Osaka University, Osaka, Japan)*

TAN TAKAYANAGI

*(Department of Medical Zoology, Nagoya City University Medical  
School, Nagoya, Japan)*

The paper deals with the process of formation of cyst-like bodies in *Toxoplasma gondii* Beverley strain in tissue culture and the effects of the antiserum on its formation. Infected HeLa cells were axenically cultured in small culture tubes after they were placed on a coverslip and covered with rat plasma. This prevented the cells from detaching from the coverslip and facilitated examinations. The culture tubes were divided into groups each of which received varying dilution of the antiserum mixed with the culture medium (Eagle HeLa). All cultures were maintained at 37°C.

Cyst-like bodies were observed in the cells embedded in plasma clot 20 days after inoculation (Figs. 1-4). These bodies continued to increase in number up to the 25th day (Fig. 5). The number of cyst-like bodies was highest at the 25th day in antiserum dilutions of 1:128 showing no tendency of decrease of the cysts even after the 30th day. In higher concentrations, none or only a few such bodies were found. The same was true for cultures without antiserum. Cultures were maintained longer when antiserum was added.

Accordingly, the results indicate that cyst-like bodies are formed and maintained in tissue cultures mixed with appropriate amount of antiserum. With concentrated antiserum, suppression of the formation of cyst-like bodies occurred.