

Toxoplasma の細胞質内アクリジン オレンジ顆粒に関する研究

小 山 力
国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和47年10月31日 受領)

はじめに

Toxoplasma gondii は、哺乳類から鳥類にわたってひろく寄生し、医学上、脳水腫や脈絡網膜炎などの疾患を惹起する病原体として注目されている。

近年、市販豚肉および臓器内から栄養型虫体や、シスト型虫体が検出され (Jacobs *et al.*, 1960 b; 石井ら, 1962), しかもそれらによる経口感染の可能性が指摘されるに至っている。

さらに、ごく最近では、*Toxoplasma* は、猫の消化管壁では、コクシジウムと同じく無性および有性生殖期を経過し、耐久性の強いオーシストを排泄するという事実が見出された。この問題は、Hutchison (1965) によって追究の端緒がひらかれたのであるが、その後多くの追試者 (Hutchison *et al.*, 1970; Dubey *et al.*, 1970; Sheffield & Melton, 1970; Frenkel *et al.*, 1970) によって確認された。現在 こうした本虫生活史上の新事実、本症防遏方策を根底から考え直さねばならぬこととして深刻な問題をなげかけている。

さて、哺乳類および鳥類全般にひろく本虫の寄生のみられるのは確かに事実であるが、これらの間における蔓延状態、感染経路、宿主体内の分布状況などは、的確な虫体検出法の未開拓の現在、未だ完全には究明されていない。そこで、本研究では、簡易かつ正確な虫体検出法の開発を目的として、近年各分野で画期的寄与をとげているアクリジンオレンジ (AO) 虫体染色—螢光顕微鏡法を導入して、*Toxoplasma* 虫体の観察を試みてみたのであるが、まず第一に、同法によって出現する AO 顆粒の基礎的観察とその発色条件について検討し、次にこの検討結果にもとづいて、同法を本原虫の検出に適用したところ、極めて良好な結果が得られた。さらに、この観察を続けていくうちに、AO 顆粒の衰退過程が、感染能のそれと平行関係にあることが予想されたので、

これを実験的に追究して証明することに成功し、したがって、この顆粒の消長を観察することによって、同法はまた虫体生死の判別にも用い得ることを知った。ついで、AO 顆粒の正体を明らかにすることに興味をおぼえ、同上顆粒の生理学的検討に加えて、細胞化学的検討を重ねて、その性状を追究した結果、顆粒の本態は lysosome 様のものであると考えられた。以上が本研究の一連の目的と結果であるが、以下その内容について詳述する。

材料と方法

1. AO 顆粒の基礎的観察とその発色条件の検討。

用いた虫体は、*Toxoplasma gondii* RH 株感染後 3 日目のマウス腹水および各臓器内栄養型と、同 Beverly 株感染後約 1 カ月のマウス脳内のシスト型である。またシスト内虫体は、機械的にシスト壁をこわし遊離させて得たものである。使用マウスは、gpc 系雌、生後 4 週のもので (小林ら, 1959; 石井ら, 1959), 以下常にこのマウスを用いた。

螢光顕微鏡装置は NB 式 (日本 BCG) を用いたが、その概要は、光源 (東芝超高圧水銀灯 SHL-100UV), 光源フィルター (イワキ BG 12), 接眼フィルター (イワキ FY 4), 顕微鏡 (Zeiss, 集光器 N.A. 1.4) である。また供試螢光色素は Grüber 製アクリジンオレンジ (AO) である。以後の研究において、常に上述の装置および螢光色素が用いられた。

1) AO 顆粒の基礎的観察

AO 生理食塩水溶液と虫体材料を混合後螢光鏡検したが、この混液は McIlvaine 緩衝液で pH 7.0~7.5 に調整された。なお、その他の鏡検条件としては室温下 (24~26°C), AO 終末濃度 1~2 万倍などであった。この条件は、従来の経験から好適と考えられているものである (小山ら, 1962)。

2) AO 顆粒の発色条件の検討

a) 至適 AO 濃度

まず、腹水内虫体を遠沈集虫 (2,000 rpm 5分, 以下同じ) して、その一定虫数を一定量の既知濃度の AO 生理食塩水溶液中に浸漬して、色素量と虫数の関係を調べた (pH 7.2, AO 終末濃度 1 万倍, 室温下)。次に腹水内栄養型虫体またはシストの生理食塩水浮游液に、各種濃度になるように AO を加え、pH を McIlvaine 緩衝液で 7.5 に補整して蛍光鏡検した (小山ら, 1962; Robbins & Marcus, 1963)。また観察温度は室温であった。

b) 至適 pH

腹水内栄養型虫体またはシストの生理食塩水浮游液に、各種 pH の緩衝液を加えて蛍光鏡検した。用いた緩衝液は McIlvaine と Clark & Lubs である。また、この際の AO 濃度は常に 1 万倍とし (Rothstein & Diamond, 1959; 小山ら, 1962; 牧野, 1964)、室温下で観察した。

c) 染色時間と感染能の関係

RH 株感染マウス腹水と 1 万倍 AO 生理食塩水溶液を 1 : 1 に混合、無菌的に室温保存し、経時的にその一部を観察して染色工合と時間との関係を調べるとともに、AO の虫体に対する毒性をテストするため、他の一部をマウスの腹腔内に接種して感染能の推移を調べた。対照として 1 万倍 AO 生理食塩水溶液のかわりに、単なる生理食塩水溶液を用いたものを置いた。接種虫数は、マウス 1 匹あたり約 65 万であり、接種にあたり、1 匹あたりペニシリン 125 単位 および ストマイ 250 μg を添加した (常松ら, 1958)。マウス 1 匹あたりの抗生物質使用量は、本研究を通して常にこの量を用いた。

2. 感染臓器内虫体の検出

1) 感染マウスの腹水および臓器の蒸溜水処理

虫体として、RH 株感染後 3 日目のマウスの腹水および肝臓内のもの、シストとして Beverley 株感染後 1 カ月のマウス脳内のものを用いた。感染臓器を実験材料とする場合には、腹水由来の虫体による表面汚染が考えられる。これを除くために、虫体が浸透圧による影響を受け易い性質を利用して、感染臓器および腹水の短時間蒸溜水浸漬を検討した。脳の場合には腹水内虫体での汚染はないが、シストおよびシスト内虫体の蒸溜水による影響を、蛍光鏡検によつて検討する目的で、同じく蒸溜水浸漬をおこなつた。

a) 腹水の場合

感染マウス 1 匹分の腹水の半量を、100 倍容量の蒸溜水中に、5 分間室温浸漬後遠沈、その沈渣を蛍光鏡検する

とともに、一部をマウス 3 匹に腹腔内注入し、感染能の有無を調べた。また同上腹水の残部を、無処理対照群として、蛍光鏡検およびマウス接種をおこなつた。接種虫数は、実験群、対照群ともにマウス 1 匹あたり約 830 万であった。

b) 肝臓の場合

感染マウス 1 匹分の肝臓の半量を、そのまま 100 倍容量の蒸溜水中に 15 分間浸漬後とりだし、生理食塩水を加えて磨砕液とし、その一部を蛍光鏡検するとともに、他部をマウス 3 匹に腹腔内注入し、対照として残り半分の肝臓を蒸溜水処理をおこなわず直ちに磨砕液とし、蛍光鏡検およびマウス接種に供した。接種虫数はマウス 1 匹あたり約 100 万であった。

c) 脳の場合

感染マウス 3 匹分の脳を 100 倍容量の蒸溜水中にそのまま浸漬し、15, 30, 60 分の各時間毎に 1 匹づつとりだし、生理食塩水を添加して磨砕液とし、一部蛍光鏡検するとともに、他部をマウス 3 匹に腹腔内注入した。対照として感染マウス 1 匹分の脳をそのまま、何等の処置を加えず磨砕液とし、同様に蛍光鏡検およびマウス接種をおこなつた。接種シスト数はマウス 1 匹あたり約 700 であった。また、感染マウス脳 3 匹分に生理食塩水添加、磨砕液とし、その $\frac{3}{4}$ を 100 倍容量の蒸溜水中に浸漬後 3 分し、15, 30, 60 分の各時間毎にその一部をとりだし、遠沈後その沈渣の一部を蛍光鏡検するとともに、残部をマウス 3 匹に腹腔内注入した。対照としては、最初の磨砕液の残り $\frac{1}{4}$ を用いてそのまま何等の処置なしに蛍光鏡検とマウス接種をおこなつた。接種シスト数は、マウス 1 匹あたり約 500 であった。

2) 消化法併用による虫体検出試験

検出率の向上をはかるため、前処置として、まず臓器組織の消化をおこなつて集虫に努め、その後、AO 生体染色—蛍光顕微鏡法による虫体の検出を試みた。

a) 肝臓の場合

感染マウス 2 匹分の肝臓を、その約 100 倍容量の蒸溜水中に 15 分間浸漬後とりだして、生理食塩水を添加、磨砕し、ガーゼ 2 枚で濾過後、その濾液の半量に約 20 倍容量の消化液を混じ、37°C で 30 分および 60 分間消化をおこなつた。消化液の処方は、下記の如く Jacobs *et al.* (1960 a) およびその変法によつた。

ペプシン溶液：

{	ペプシン (Difco 1 : 10,000)	1.3 g
	食塩	2.5 g
	濃塩酸	3.5 ml
	蒸溜水を加えて 500 ml とする (pH 1.2)。	

トリプシン溶液：

トリプシン (Merck) 5.0 g
 生理食塩水を加えて500 ml とする
 重曹にて pH 8.2に調整

消化処理にあたっては、KM 式マグネチックスターラー (Iwaki, S-1A) を使用して攪拌した。消化後は、遠沈して沈渣を集め、生理食塩水で洗浄後、一部を蛍光鏡検、残りをマウス3匹に腹腔内注入した。濾液の残り半量は対照として消化処理をおこなわず、そのまま一部を蛍光鏡検、残りをマウス3匹に腹腔内注入した。マウス1匹あたりの接種虫数は、約100~200万であった。

b) 脳の場合

感染マウス脳2匹分に生理食塩水を加えて磨砕液をつくり、濾過後肝臓の場合と同様一部を消化実験に、残部を対照群にまわした。マウス1匹あたりの接種シスト数は1,000~2,000である。他の条件は、全く肝臓の場合と同じである。

マウスの感染は、マウスの発症致死および虫体の発見によつて確認したが、マウス接種後1カ月以上生残したものについては、脳内シストの発見に努めるとともに、シストの発見されなかつたものについては、さらに色素試験を実施して感染の有無を確かめた。

3. AO 顆粒と虫体感染能との関係

1) 虫体観察のための灯芯法の応用

AO 顆粒と虫体感染能の関係を正確に把握するためには、虫体の形態、発色色調、AO 顆粒の存否などの詳細な観察と、虫体数の正確な算定が必要である。しかし、実際には、(i) 遊離虫体は微小で浮動し勝ちであり、油浸鏡検の際、視野外に逸散し易く、算定、観察ともに困難である。また活性低下虫体は、蛍光が微弱となるから、その存在を確認するためには、同一視野の普通光源への切換による再鏡検が必要である。これらのためには、虫体を同一個所に固定しなければならぬ。(ii) 虫数算定にあたっては、本法下では暗視野となるため、その劃線が認められず、通常の血球計算盤は使用不能である。などの技術上改良を要する点がいくつかある。そこで案出されたのが、以下に述べる灯芯法である。

用いた虫体は、RH 株感染後3日目のマウス腹水内栄養型である。また本法においては、専ら灯芯 (イ, *Juncus effusus* var. *decepiens* の髓) を用いたが、ほかに、ニワトコ、ヤマブキ、キクイモ、ヒメムカシヨモギ、タケネグサなどの髓も試みた。まず、髓の軟化処理として、5%苛性カリ水溶液1日間、弗化水素酸1週間~10日間、90%エタノールに飽和した苛性ソーダ液6

日間のいずれかで処理後、必要に応じて5%醋酸に10分間浸漬し、水洗約1時間、その後エタノールにて脱水、クロロフォルム-パラフィン法にて封埋した (熊沢, 1956)。横断切片の厚さは、ユング式マイクロトームで200 μ 前後とした。切片をスライドガラスに貼付後、型通りに脱パラし、乾燥保存する。観察にあたっては、まず上記貼付切片上に1万倍 AO 生理食塩水を滴下、切片を染色し、余滴除去後、AO 染色虫体浮游液を同上切片上に滴下、カバーガラスでおおい、パラフィン・ワゼリン混合物にてその周縁を封じて観察する。つまり横断切片上に現われた灯芯細胞間隙に、虫体を封入して観察する方法である。

2) AO 顆粒の観察と虫体感染試験

被検虫体は、RH 株感染後3日目のマウス腹水内栄養型であり、遠沈管内に保存して虫体感染能と AO 顆粒の関係を追究した。この場合には、遊離虫体を集める意味で、採取腹水を低速遠沈 (500 rpm, 2分) にて宿主側の細胞成分をできるだけ除去し、次にその上清を A, B, C 部に3分し、A部は虫数算定ならびに pH 測定用とし、B部は抗生物質添加後、少量ずつ遠沈管内に分注し、無菌的に室温下で保存、C部は、遠沈 (3,000 rpm, 10分) 後、上清を生理食塩水と置換し、B部同様抗生物質添加後、分注保存した。抗生物質は、新井ら (1958)、Cook (1958) などにもとずき、ペニシリン100単位/ml、ストマイ100 μ g/ml 添加した。BおよびC部は、経時的にその一部をマウス腹腔に注入して感染能を調べ、他部を蛍光鏡検および pH 測定に用いた。マウス1匹あたりの接種量は、保存液0.2 ml に抗生物質含有液0.1 ml (抗生物質含有の生理食塩液で、抗生物質量については前出) を加えた計0.3 ml で、それぞれマウス3匹に接種した。接種虫数は、マウス1匹あたり900万であった。蛍光鏡検は、主に虫体の形態および AO 顆粒の存否に重点を置き、前述の灯芯法を用いて観察および個数算定をおこなった。AO 顆粒を示す虫体がすくなくなり、検出しにくくなった時は、遠沈集虫 (3,000 rpm, 5~10分) 後、蛍光鏡検した。B部を用いての検討をさらにもう一回追加したが、この際のマウス1匹あたりの接種虫数は610万で、他の条件は全く上記同様であった。生残マウスについては、すべて色素試験をおこなつて感染の有無を調べた。

4. AO 顆粒の生物学的ならびに細胞化学的観察方法

虫体は、すべて感染3日目のマウス腹水中よりえた栄養型で、専ら遊離虫体を用いた。

1) 普通鏡検と位相差鏡検による AO 顆粒の確認

普通鏡検法は全く通常のものであり、位相差鏡検は、Union UM 型万能顕微鏡（ユニオン光学）を用い、位相差レンズとしては、BM が好適であつた。

2) AO 顆粒の固定の検討

AO 顆粒が元来固定保存の可能な構造か否かの検討をおこなう目的で、固定液としては、メタノール、80%エタノール、80%イソプロパノール、Carnoy 液、Bodian 液、Baker 液、Serra 液、Schaudinn 液、Rossman 液、アセトン、10%緩衝ホルマリン、2%グルタルアルデヒド、オスミック酸蒸気などを使用し、固定前後における同一顆粒の追究には Palade 液 (Palade, 1952) を用いた。

3) AO 顆粒の細胞化学的検討

虫体含有腹水をスライドガラス上に塗抹し、室温下でオスミック酸蒸気により3分間固定し、水洗後各種の方法で染色した。細胞化学的研究のための固定液としてオスミック酸蒸気が適当かどうかをみるために、通常、細胞化学的研究に用いられる固定液での検討も合わせおこなつて、前者での結果と比較した (Table 11)。フォスファターゼ検出の場合にはオスミック酸蒸気、イソプロパノール、アセトンなどのいずれでも酵素活性が著しく低下するので、専ら、生理食塩水で稀釈した2%グルタルアルデヒドを、4°C、30分間作用させた。上記のほか、一般構造をみるために、オスミック酸蒸気固定後、Giemsa 染色と Heidenhain 鉄ヘマトキシリン染色も試みた。この時、McIlvaine 緩衝液で、pH を Giemsa 染色で5.0に、Heidenhain 鉄ヘマトキシリン染色で7.8に補正した (Koyama & Ilardi, 1968)。

対照実験として RNA 消去のための RNase 作用試験 (Pearse, 1961)、グリコーゲンの唾液消化試験 (Lillie, 1965)、ピリジンによる脂質抽出試験 (Pearse, 1961)、硝酸によるニンヒドリン-Schiff 反応阻害試験 (Pearse, 1961)、弗化ソーダによる酸性フォスファターゼ阻害試験 (Lillie, 1965) などをおこなつた。また、各試験において、基質除去群を必ず対照群として併置した。RNase は、Worthington Bioch. Corp. 製のものを 1 mg/ml の濃度で、蒸留水または McIlvaine 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し、37°C で1時間作用させた。ピリジンは室温で5分間作用させた。また各反応は、あらかじめ AO で染色したものと無染色のもの両者についておこなつた。

細胞化学的テクニックによる重複染色においては、Gomori 法 (Gomori, 1950, 1952) による酸性フォス

ファターゼ陽性顆粒の確認を中心として、同一顆粒についての他染色法による重複染色をおこなつた。すなわち、(i) 虫体塗抹→2%グルタルアルデヒド固定→水洗→Laybourn 液によるメタクロマジー反応 (Laybourn, 1924) →グリセリン封入→鏡検 (メタクロマジー顆粒の確認) →水洗→Gomori 法→鏡検 (酸性フォスファターゼ陽性顆粒の確認)。Laybourn 液によるメタクロマジー反応においては、酸性フォスファターゼ活性の低下を極力防止する目的で、加熱処理はおこなわず、グルタルアルデヒド固定後直ちに、1液で3分間、2液で1分間の短時間処理をおこない、一旦鏡検の後、直ちに Gomori 法を適用した。なお、前述の如く、Gomori 法には、弗化ソーダによる酵素阻害群、基質除去群などの対照群を置いた。また、操作途上での酵素活性の低下が心配されるので、通常、酸性フォスファターゼの分布状態の良く知られている正常マウス肝組織を対照にえらび、その塗抹標本による同一処理群をも併置して、虫体の場合と比較検討した。(ii) 虫体塗抹→2%グルタルアルデヒド固定→Laybourn 液によるメタクロマジー反応→(i) 同様に鏡検 (メタクロマジー顆粒の確認) →同染色の脱色を目的としてアセトンで洗う→水洗→Giemsa 染色 (McIlvaine 緩衝液で pH 7.0に補正) →水洗→ブタノール→キシロール→バルサム封入→鏡検 (メタクロマジー顆粒の確認)。(iii) 虫体塗抹→2%グルタルアルデヒド固定→Gomori 法→鏡検 (酸性フォスファターゼ陽性顆粒の確認) →オイルレッドOによる脂質染色 (Pearse, 1961) →鏡検 (脂質陽性顆粒の確認)

4) AO 顆粒の肥大現象の観察

この現象を観察するための培地は、5) AO 顆粒に対するリボヌクレアーゼ処理の影響の項で述べるものと同じものである。観察方法は、Robbins & Marcus (1963) に従つた。また、肥大前後の虫体の Gomori 法による酸性フォスファターゼ検出も試みた。

5) AO 顆粒に対するリボヌクレアーゼ処理の影響

本処理においては、RNase を 5.0, 1.0, 0.5 mg/ml の濃度を含む3種の培地それぞれ2 ml に、生虫体約9,000万ずつを浮遊、37°C に温浴して、生虫体に対する RNase の影響を蛍光鏡検によつて調べた (Brachet, 1956; Fotakis & Stammer, 1963)。実際には、Robbins & Marcus (1963) や Fotakis & Stammer (1963) などの方法を参考にして、まず培地として、Hanks 液と人血清を容量比9:1に混じたものに、人アルブミン (Nut. Bioch. Co.) 0.5%添加したのを用い、人血清

はトキソプラズマ抗体の無いものをえらび、培地の pH は 7.2~7.4 とした。対照群としては、(i) RNase を含まない培地、(ii) RNase 添加培地に RNase の阻害剤であるヘパリンを 5 mg (500 単位)/ml 加えたものなどを置いた。蛍光鏡検は、虫体浸漬後 1, 3, 6, 24, 53 の各時間毎におこない、同時にピロニン-メチルグリーン染色によつて RNA の推移も観察した。

成 績

1. AO 顆粒の基礎的観察とその発色条件

1) AO 顆粒の基礎的観察

AO 生体染色—蛍光顕微鏡法で、虫体内構造、特に AO 顆粒の観察および虫体と宿主細胞との分別(differentiation) に対して、従来好適と考えられている発色条件下 (AO 濃度 1~2 万倍, pH 7.0~7.5, 室温) では、栄養型虫体およびシスト壁を機械的にこわしてとりだしたシスト型虫体ともに、細胞質は鮮紅色に、核は黄緑色に発色して、虫体全体が最も鮮明にみえた。細胞質の赤色蛍光はおもにその中にはほぼ一様に分布する多数の (およそ 10 数個の)、大きさ 100~500 m μ の、球形赤色の顆粒にもとづくものであることを認め (小山ら, 1962) (Fig. 1), かつこの際の染色時間は 1~2 分で十分であることがわかった。この顆粒構造は、核を除いた細胞質内に広く分布しており、また、この構造以外の細胞質部分にも、通常多少の赤色蛍光を認める。また、宿主細胞は、上記の AO 処理条件下では、一部の遊走細胞を除いて、すべて黄緑色に発色するため、虫体をそれらと見分けることは容易である。宿主側の白血球の如き遊走細胞では、その細胞質内に *Toxoplasma* 同様に赤色顆粒が認められるが、*Toxoplasma* が特異な三日月型をとることと、小型であることとでこれまた容易に区別できる (Fig. 2)。シスト型虫体の細胞質内に存在する AO 顆粒は、栄養型虫体のそれに比して個数多く、全体として、その赤色蛍光の程度は栄養型虫体のそれより大であつた。ただし、シストを破壊せずにシスト全体を染めた場合は、染まりがたく、染色時間を 5~30 分に延長すると比較的良く染まつてはくるが、なお橙色程度の場合が多い。普通シストのみられる脳組織では、宿主細胞がほとんどすべて黄緑色に発色するので、橙色球体としてシストの存在は極めて容易に認められる。上記の AO 濃度をたかめると、シストは赤色となるが、宿主細胞も同様に赤色化の傾向を示すので、たがいに分別しがたくなる。また、通常、腹水中の栄養型虫体では、pH を特別に考慮せず、腹水と AO 生理食塩水溶液との混

合により、十分な赤色発色を認める (AO 濃度 1~2 万倍) が、肝、脾、脳など諸臓器内栄養型虫体は、それらの磨碎液中に含まれる虫数および宿主細胞数が増大するとともに、必ずしも、良好な発色を示さなくなる。これは、腹水を遠沈して集虫液を作つて観察した場合でも同様で、後述の発色条件の検討の項でも触れるが、含まれる細胞数の増大とともに、細胞 1 個あたりにとり込まれる AO の濃度低下に基因すると思われる。この場合には、AO 液を多量に用いることによつて発色を正常化することが可能である。最後に、虫体の顆粒構造を観察する場合には、封入試料をできるだけ少量にして標本をつくること、つまり、カバーガラスで虫体あるいはシストをやや圧平ぎみにして鏡検するとよく観察できる。

2) AO 顆粒の発色条件の検討

a) 至適 AO 濃度

まず、色素量と虫数の関係を調べた結果は、虫数 16×10^3 /ml ではほとんどすべての虫体は緑色で、AO 顆粒はほとんど認められない。 32×10^7 /ml では、細胞質赤色で、AO 顆粒も良く認められるが、更に虫数を減じて 16×10^7 /ml とすると、細胞質の赤色はさらに強くなり、AO 顆粒はかえつて認めにくくなる。従つて以後の研究においては、終始虫数と色素量の関係を考慮して実験を進めた。

さて、至適 AO 濃度については、Table 1 & 2 の如く、栄養型虫体、シスト、シストより遊離せしめた虫体の 3 者いずれも、AO 濃度 1~2 万倍で分別が良く、AO 顆粒も認め易かつた。

b) 至適 pH

Table 3 & 4 に示すように、栄養型虫体、シスト、シストより遊離せしめた虫体の 3 者を通じて、pH 7.0~7.5 で分別の良いこと、かつまた AO 顆粒の存在も最も認め易いことがわかる。また、虫体やシストを含む浮遊液に、緩衝液や AO を加えた混合後の pH は、初めに加えた緩衝液の pH と大差はなかつた。

c) 染色時間と感染能の関係

染色後 1 分で、すでに好適な発色をみせるが、時間の経過に伴ない、赤色蛍光は次第に強まり、核や AO 顆粒の分別は逆に悪くなる。これと同時に、感染能も急激な衰退を示し、Table 5 にみるように、対照との間に大差のあることが認められた。すなわち、対照群では、実験開始後 2 日でなお感染力を保持しているのに反して、AO 染色群では、染色後 3 時間ですでに生残マウスが現

Table 1 Fluorescence of RH trophozoites stained with acridine orange in various concentrations

Concentration of AO*	Nucleus	Cytoplasm	AO granules	Differentiation between nucleus and cytoplasm
1 : 500	Obscure	Red	Obscure	Poor
1 : 2,000	Obscure	Red	Obscure	Poor
1 : 5,000	Pale yellowish green	Red	Clear	Fairly good
1 : 10,000	Yellowish green	Red	Clear	Good
1 : 20,000	Yellowish green	Red	Clear	Good
1 : 50,000	Yellowish green	Pink	Obscure	Fairly good

* Acridine orange. Temperature : 24-26 C ; pH : 7.5.

Table 2 Fluorescence of Beverley cysts stained with acridine orange in various concentrations

Concentration of AO*	Whole cysts	Organisms liberated from cyst				Differentiation between nucleus and cytoplasm	Differentiation between cysts and host cells
		Nucleus	Cytoplasm	AO granules	Differentiation between nucleus and cytoplasm		
1 : 500	Red	Obscure	Red	Obscure	Poor	Poor	
1 : 2,000	Reddish orange	Yellowish green	Red	Obscure	Good	Poor	
1 : 5,000	Orange	Yellowish green	Red	Obscure	Good	Fairly good	
1 : 10,000	Orange	Yellowish green	Red	Clear	Good	Good	
1 : 20,000	Orange	Yellowish green	Pink	Clear	Good	Good	
1 : 50,000	Yellow	Obscure	Yellow	Obscure	Poor	Poor	

* Acridine orange. Temperature : 24-26 C ; pH : 7.5.

Table 3 Effect of pH on fluorescence of RH trophozoites

Buffered solution	pH	Nucleus	Cytoplasm	AO* granules	Differentiation between nucleus and cytoplasm
McIlvaine	3.15	Pale yellowish green	Yellowish green	Obscure	Poor
	4.09	Yellowish green	Yellowish orange	Obscure	Fairly good
	5.08	Yellowish green	Yellowish orange	Obscure	Fairly good
	6.04	Yellowish green	Orange	Clear	Fairly good
	6.97	Yellowish green	Pink	Clear	Good
	7.50	Yellowish green	Red	Clear	Good
	7.95	Yellowish green	Red	Clear	Good
Clark and Lubs	7.97	Yellowish green	Red	Clear	Good
	8.95	Yellowish green	Red	Clear	Good
	10.00	Yellowish green	Red	Clear	Good
Ascites (Control)	7.70	Yellowish green	Red	Clear	Good

* Acridine orange. Temperature : 24-26 C ; Concentration of acridine orange : 1 : 10,000.

Table 4 The effect of pH on fluorescence of Beverley cysts

Buffered solution	pH	Whole cysts	Mechanically excysted parasites				Differentiation between cysts and host cells
			Nucleus	Cytoplasm	AO* granules	Differentiation between nucleus and cytoplasm	
McIlvaine	3.15	--**	—	—	—	—	Poor
	4.15	—	—	—	—	—	Poor
	5.15	—	—	—	—	—	Poor
	6.10	Yellow	Yellowish green	Yellow	Obscure	Poor	Poor
	7.10	Orange	Yellowish green	Pink	Obscure	Good	Good
	7.50	Orange	Yellowish green	Red	Clear	Good	Good
	7.96	Red	Obscure	Red	Clear	Fairly good	Poor
Clark and Lubs	7.91	Red	Obscure	Red	Clear	Fairly good	Poor
	9.01	Red	Obscure	Red	Clear	Poor	Poor
	9.99	Red	Obscure	Red	Clear	Poor	Poor
Homogenate of infected mouse brain (Control)	6.64	Pale pink	Yellowish green	Pink	Obscure	Fairly good	Poor

* Acridine orange; ** Not fluorescent; Temperature: 24-26 C; Concentration of acridine orange: 1 : 10,000.

Table 5 The infectivity of RH trophozoites in the infected mouse ascites after various periods of storage in acridine orange-saline solution at room temperature

Suspending fluid	Storage period (hr.)	No. of mice dead / No. of mice inoculated*	Survival days		
Acridine orange-saline**	0	3/3	4.5	5.0	5.0 (4.8)***
	1	3/3	6.0	6.0	7.0 (6.3)
	2	3/3	9.0	10.0	13.0(10.7)
	3	2/3	10.0	10.0	
	6	0/3			
	12	0/3			
	24	0/3			
	36	0/3			
	48	0/3			
	72	0/3			
	96	0/3			
Saline (Control)	0	3/3	5.0	5.0	5.0 (5.0)
	1	3/3	4.0	5.0	6.0 (5.0)
	2	3/3	6.0	5.0	4.0 (5.0)
	3	3/3	4.5	5.0	5.0 (4.8)
	6	3/3	4.5	5.0	6.5 (5.3)
	12	3/3	4.5	4.5	5.5 (4.8)
	24	3/3	5.0	5.0	5.0 (5.0)
	36	3/3	5.5	5.5	6.5 (5.8)
	48	3/3	7.0	7.0	7.0 (7.0)
72	0/3				
96	0/3				

* The number of toxoplasmas inoculated is about 650,000 per mouse.

** Concentration of acridine orange is 1 : 20,000.

*** Average days of survival.

Table 6 The effect of distilled water on fluorescence of *Toxoplasma* parasites
Trophozoites (RH strain)

Materials tested	Storage period in distilled water (min.)	Fluorescence of trophozoites			No. of mice dead / No. of mice inoculated*
		Nucleus	Cytoplasm	Acridine orange granules	
Ascites from infected mouse	5	Yellowish green	Yellowish green	Obscure	0/3
Whole liver from infected mouse	15	Yellowish green	Red	Clear	3/3
Cysts (Beverley strain)					
Materials tested	Storage period in distilled water (min.)	Whole cysts	Fluorescence of cysts		No. of mice infected / No. of mice inoculated*
			Parasites in cysts		
			Nucleus	Cytoplasm	
Whole brain from infected mouse	15	Orange	Yellowish green	Reddish orange	3/3
	30	Orange	Yellowish green	Orange	3/3
	60	Orange	Yellowish green	Orange	3/3
Homogenate of brain from infected mouse	15	Pale orange		Slightly clear	0/3
	30	Pale orange		Obscure	0/3
	60	Pale orange		Obscure	0/3

* Three mice were each inoculated with ascites or tissue homogenate after the material was kept in distilled water for designated period of time. Temperature: 24-26 C.

われ、6時間ではほとんど感染力を消失している。

2. 感染臓器内虫体の検出

1) 感染マウスの腹水および臓器の蒸溜水処理

Table 6 にみる如く、腹水中の虫体は、蒸溜水内5分間浸漬ですでに虫体の AO 顆粒は認めにくくなり、マウスへの感染性も消失している。しかし、肝臓のような臓器の内部虫体は、臓器の15分間程度の蒸溜水浸漬では影響をうけず、その中の虫体は、AO 顆粒もマウスへの感染性も保有していた。なお、無処置虫体は、腹水内および肝内虫体ともに赤色蛍光を発し、それらを接種した対照群のマウスは、すべて感染斃死した。また、Beverley 株感染マウスの脳をそのまま蒸溜水に浸漬した場合でも、肝臓の場合と同様に、浸漬時間15~60分の範囲では、シスト全体の蛍光色調は橙色、シスト内虫体は橙赤色で変化なく、マウスへの感染能も確実に認められた (Fig. 3 & 4)。しかし、脳磨砕液の場合には、上述の時間内にシスト全体の蛍光色調は淡橙から黄色となり、内部虫体の輪郭は不明瞭となった (Fig. 5 & 6)。かようなシストをマウスに接種した場合には、接種マウスの脳内にシストを認めることなく、また、色素試験の結果も16倍陰性であったので、接種時に、これらのシストは、感染能を失っていたものと考えられる。なお、無処

置対照群では、虫体の橙赤蛍光を認めるとともに、マウスへの感染性も保持していた。

2) 消化法併用による虫体検出試験

消化液処理によつてシストは崩解し、シスト内虫体は遊離する。Table 7 を通覧して、栄養型虫体をペプシン処理した場合、処理時間30分で赤色蛍光は現われがたくなり、従つて顆粒の存在も明かかなくなる。また、すでに接種マウスの感染不成立がみられ、トリプシンの場合よりも虫体に対する害作用が強いように思われる。トリプシンの場合には、栄養型虫体、シスト型虫体両者ともに、消化60分までは確実にマウスへの感染能を保持しているばかりでなく、細胞質の赤色蛍光も残存していることがわかる (Fig. 7 & 8)。また宿主側の細胞成分もかなりよく消化するので、多量の材料を一度に処理できることとなり、遠沈集虫法と併用すれば、相当な検出率の向上が期待できる。消化液処理時の損傷には、ほかに、処理後の染色による虫体の形態変化がある。これは、シスト型虫体より栄養型虫体でより明瞭に認められ、正常な三日月型から楕円型に変形する。さらに進むと、染色前から不定形となりマウスへの感染能を消失した虫体が出現する。こうした事実から消化後の虫体は活性が低下していて、外要因の影響を受けやすいように思

Table 7 The effect of digestive fluids on fluorescence of *Toroplasma* parasites

Homogenate of tissue tested	Digestive fluids	Time of digestion (min.)	Structure of parasites		Fluorescence of parasites			No. of mice infected / No. of mice inoculated*	
			Before staining	After staining	Nucleus	Cytoplasm	Acridine orange granules and cytoplasm		
Liver from mouse infected with RH strain	Pepsin-HCl	30	Irregular	Irregular	Yellowish green	Yellowish green	Obscure	Poor	0/3
		60	Irregular	Irregular	Yellowish green	Yellowish green	Obscure	Poor	0/3
Brain from mouse infected with Beverley strain	Pepsin-HCl	30	Crescent	Crescent	Yellowish green	Pink	Obscure	Fairly good	3/3
		60	Crescent	Crescent	Yellowish green	Pink	Obscure	Fairly good	3/3
Liver from mouse infected with RH strain	Trypsin	30	Crescent	Crescent or ellipsoidal	Yellowish green	Red	Slightly clear	Good	3/3
		60	Crescent	Crescent or ellipsoidal	Yellowish green	Red	Slightly clear	Good	3/3
Brain from mouse infected with Beverley strain	Trypsin	30	Crescent	Crescent	Yellowish green	Red	Clear	Good	3/3
		60	Crescent	Crescent	Yellowish green	Red	Clear	Good	3/3

* Three mice were each inoculated with the tissue homogenate after the material was kept in digestive fluid for designated period of time.

われた。例えば、蛍光法に使用される紫外線によって、褪色が一層甚だしくなるのもその一つと思われる。ただしこうした傾向は、シスト型虫体より栄養型虫体で著しい。要するに、シスト型虫体は栄養型虫体に比して、すべての外的条件に対して抵抗性がより強いように思われるのである。

3. AO 顆粒と虫体感染能との関係

1) 灯芯法

この方法によると、Fig. 9 & 10 にみるように、灯芯の横断切片上に現われる細胞膜由来の隔壁が、橙色の蛍光を発するため、細胞間隙が明瞭な一区画として認められる。従つて、この間隙内への虫体の封入により、虫体を固定し、細胞内の観察と虫数算定が可能になる。つまり、虫体の静止によって、細胞質内の AO 顆粒の存否の確認、形態観察のほか、Fig. 10 にみるように、蛍光色調微弱で、発見しにくい活性低下虫体も、普通光源への切換えによって容易にその存否を確認できる。また虫数算定にあたっては、これらの区画が、血球算定盤のそれと同じ役割を果すことになる。なおイ以外の植物の髄では、内部構造の上から上記の目的を達することができず、以後の実験には使用しなかつた。

2) AO 顆粒の観察と虫体感染試験

腹水内に保存した虫体 (B部) のうち、AO 顆粒保持虫体の個数は、Table 8 でみるように、保存時間の経過とともに減少した。また保存とともに赤色色調は現われにくくなり、AO 顆粒そのものの輪郭も不明瞭となる。そして、遂には、細胞質の蛍光は淡黄色から無色と変わり、外部形態も初めの三日月型から楕円形ないし球形に変化し、大型の赤色胞状構造部保持虫体も出現するようになる。このような虫体では、いずれも AO 顆粒を認めにくい。虫体保存日数が長くなると、発色虫体が少くなるので、遠沈集虫法によつて AO 顆粒保持虫体の発見に努めた (Fig. 11 & 12)。また同時におこなつた保存虫体の接種によるマウス生存日数は、保存期間が長くなると

Table 8 Effects of storage of the infected mouse ascites on the fluorescence and infectivity of RH trophozoites (1)

Storage period (days)	% of parasites with AO* granules in all parasites in ascites	No. of parasites with AO granules injected into mice	No. of mice dead / No. of mice inoculated**	Survival days		
0	90-100	8.1-9.0×10 ⁶	3/3	4.5	4.5	5.5 (4.8)***
0.5	90-100	8.1-9.0×10 ⁶	3/3	3.5	4.5	4.5 (4.2)
1.0	80- 90	7.2-8.1×10 ⁶	3/3	4.5	5.5	5.5 (5.2)
1.5	80- 90	7.2-8.1×10 ⁶	3/3	4.5	4.5	5.0 (4.7)
2.0	80- 90	7.2-8.1×10 ⁶	3/3	4.5	4.5	5.5 (4.8)
2.5	50- 60	4.5-5.4×10 ⁶	3/3	5.0	5.0	5.5 (5.2)
3.0	10- 30	0.9-2.7×10 ⁶	3/3	5.5	6.5	6.5 (6.2)
3.5	10- 30	0.9-2.7×10 ⁶	3/3	4.5	5.5	5.5 (5.2)
4.0	1- 5	0.09-0.45×10 ⁶	3/3	6.5	6.5	6.5 (6.5)
5.0	0.3 -0.5	0.03-0.045×10 ⁶	3/3	6.5	7.5	7.5 (7.2)
6.0	0.01-0.02	900-1,800	3/3	8.0	8.0	8.0 (8.0)
7.0	0.001	113	3/3	9.5	9.5	11.0(10.0)
8.0	0.0003	23-30	1/3	9.5		

* Acridine orange.

Temperature: 24-26 C.

** About 9.0×10⁶ parasites were inoculated into each mouse after storage of ascites for designated period of days.

*** Average days of survival.

Table 9 Effects of storage of the infected mouse ascites on the fluorescence and infectivity of RH trophozoites (2)

Storage period (days)	% of parasites with AO* granules in all parasites in ascites	No. of parasites with AO granules injected into mice	No. of mice dead / No. of mice inoculated	Survival days		
0	90-100	5.5-6.1×10 ⁶	3/3	4.0	4.0	4.5 (4.2)***
1.0	90-100	5.5-6.1×10 ⁶	3/3	4.5	4.5	4.5 (4.5)
2.0	40-60	2.4-3.7×10 ⁶	3/3	4.5	4.5	5.0 (4.7)
3.0	5-10	0.3-0.6×10 ⁶	3/3	5.5	6.0	7.0 (6.2)
4.0	1-2	0.06-0.12×10 ⁶	3/3	8.0	8.0	8.0 (8.0)
5.0	0.02	1,200	3/3	9.5	10.5	10.5(10.2)
6.0	0.005	300	3/3	10.5	11.5	11.5(11.2)
7.0	0****	0	0/3			
8.0	0	0	0/3			
9.0	0	0	0/3			
10.0	0	0	0/3			

* Acridine orange.

Temperature: 24-26 C.

** About 6.1×10⁶ parasites were inoculated into each mouse after storage of ascites for designated period of days.

*** Average days of survival.

**** About 400,000 parasites were observed.

もに、延長の傾向、すなわち感染能の低下傾向をとり、8日目には、AO 顆粒保持虫体は被検虫体30~40万個のうちわずか1個となり、接種マウス3匹中2匹は生残するようになった。この実験でのマウス1匹あたりの接種虫数は900万であるが、各保存日におけるAO 顆粒保持虫体の出現率から計算すると、実際にマウス1匹あた

りに接種されたAO 顆粒保持虫体の実数はTable 8に示したようになる。この表は、AO 顆粒保持虫体出現率の低下傾向とマウスへの感染能の衰退傾向とが、ほぼ平行関係にあることを示している。この試験中の室温は22.5~24.0°C、試験開始時の虫体保存液はpH 7.9、終了時のそれは、pH 8.5であつた。上記試験の結果、さらに

Table 10 Effects of storage of RH trophozoites in saline on the fluorescence and infectivity of the parasites

Storage period (days)	% of parasites with AO* granules in all parasites in saline	No. of parasites with AO granules injected into mice	No. of mice dead / No. of mice inoculated**	Survival days
0	90-100	8.1-9.0×10 ⁶	3/3	3.0 4.5 5.5 (4.3)***
0.5	90-100	8.1-9.0×10 ⁶	3/3	4.5 4.5 5.5 (4.8)
1.0	90-100	8.1-9.0×10 ⁶	3/3	5.5 5.5 5.5 (5.5)
1.5	70-80	6.3-7.2×10 ⁶	3/3	5.0 5.5 5.5 (5.3)
2.0	60-70	5.4-6.3×10 ⁶	3/3	5.5 7.5 7.5 (6.8)
2.5	40-50	3.6-4.5×10 ⁶	3/3	5.5 5.5 6.5 (5.8)
3.0	1-5	0.09-0.45×10 ⁶	3/3	7.5 7.5 7.5 (7.5)
3.5	1-5	0.09-0.45×10 ⁶	3/3	7.5 7.5 7.5 (7.5)
4.0	0.05-0.1	4,500-9,000	3/3	8.5 8.5 10.0 (9.0)
5.0	0****	0	0/3	
6.0	0	0	0/3	
7.0	0	0	0/3	

* Acridine orange.

Temperature: 24-26 C.

** About 9.0×10⁶ parasites were inoculated into each mouse after storage of RH trophozoites in saline for designated period of days.

*** Average days of survival.

**** About 400,000 parasites were observed.

虫体保存8日以後の追加検討が必要と思われたので、くり返し実験をおこなった。

その結果は、Table 9のごとく、虫体保存後6日には、AO顆粒保持虫体は、虫体2万個中に1個発見できる程度で、接種マウスは3匹すべて感染死している。7日およびそれ以降では、虫体40万個程度調べてもAO顆粒保持虫体を見出せず、接種マウス3匹はすべて生残するというように、今回も、前回同様にAO顆粒保持虫体の出現率の推移とマウスへの虫体感染能のそれとが明らかに平行関係にあることを認めた。この試験中の室温は、24.5~27.0°C、および保存液のpH変動は8.3~8.7であった。

腹水の遠沈上清部を生理食塩水に置換保存した群(C部)での試験は、B部による第1回目の試験と同時に実施した。この時の保存液のpH変動は7.4~7.8であった。Table 10でみるように、この場合には腹水内保存の場合よりかなり早く、保存5日目からAO顆粒保持虫体は認めなくなり、同時に接種マウスはすべて生残している。したがって、AO顆粒保持虫体の色調の衰退およびマウスへの虫体感染能の低下の様子は、腹水保存群にくらべるとやや急ではあるが、やはり平行関係が認められる。最後に、全試験を通じて、生残マウスの色素試験をおこなったが、すべて陰性であった。

4. AO顆粒の本態

1) 普通鏡検と位相差鏡検によるAO顆粒の確認

普通鏡検下でAO染色をおこない、同一生虫体での染色前後における細胞質内顆粒の染まりを検討した結果、生虫体に認められる細胞質顆粒がAOで染色されるらしく、AOそのものの色調である淡橙色になることを確認した(Fig. 13 & 14)。また終始同一虫体を追究することにより蛍光鏡検によつて認めた赤色顆粒は、そのまま淡橙色の同一顆粒構造として普通鏡検でも認められた(Fig. 15 & 16)。そして蛍光鏡検で赤色蛍光の強いところほど、普通鏡検ではAO本来の色調である橙色が濃く、その部分のAO染着度の強いことを示した。色素は細胞質内全体にもとり込まれるが、色調ははるかに淡く、単位体積あたりの摂取色素量は、顆粒構造の場合にくらべて格段にすくないものと考えられる。またAO染色の有無にかかわらず、位相差鏡検によつて認めた顆粒は、そのまま普通鏡検でも認めることができ(Fig. 17 & 18)、普通鏡検で認めず、位相差鏡検ではじめて認めるような特別な顆粒構造は存在しなかった。

2) AO顆粒の固定の検討

一般に、固定後では、固定液そのものの個有蛍光が加わることで、虫体の収縮のためにAO顆粒を認めにくくなる。また、あらかじめAO染色後固定の場合でも、固定操作で脱色するから、やはりAO顆粒は認めにくい。虫体の収縮変形はほとんどの固定液で認められるが、グルタルアルデヒドとオスミック酸蒸気においては、比較的に収縮が少なく、普通および位相差鏡検で虫体

Table 11 Fixatives and cytochemical methods for various organic substances

Substances tested	Fixatives	Methods or reactions
Nucleic acids	Buffered formalin or osmic acid vapour	Pyronin-methyl green method (Kurnick, 1955)
Carbohydrates	Carnoy, Bouin, 80% ethanol or osmic acid vapour	PAS reaction (Lillie, 1965) or Alcian Blue 8 GS method (Lillie, 1965 after Steedman, 1950)
Lipids	Buffered formalin or osmic acid vapour	Oil Red O method or Sudan Black B Method
Proteins	100% ethanol or osmic acid vapour	Ninhydrin-Schiff method (Yasuma & Ichikawa, 1953)
Volutin	Unfixed or osmic acid vapour	Laybourn's method (Laybourn, 1924), Wachstein's method (Wachstein & Pisano, 1950) or Neisser's method (Takeya et al., 1959)
Acid phosphatase	Unfixed, acetone, 2% glutaraldehyde or osmic acid vapour	Lead method (Gomori, 1950, 1952)
Alkaline phosphatase	Unfixed, 70% isopropanol, 2% glutaraldehyde or osmic acid vapour	Calcium phosphate method (Lillie, 1965)

Table 12 Cytochemical reactions on the granular structure in the cytoplasm of RH trophozoites

Substances tested	Staining reagents or reactions used	Characteristics of granular structure				
		Cytochemical reaction	Colour	Number	Size (μ)	Remarks
	Giemsa		Red*	About 10	0.1-0.5	Throughout the cytoplasm
Carbohydrates	PAS reaction	+	Pink	Several or less	0.05-0.5	In the periphery of organisms Digestible with saliva
Lipids	Oil Red O	+	Red	Several	0.1-0.5	Extractable with pyridine
	Sudan Black B	+	Black	Several	0.1-0.5	
Volutin	Laybourn's reagent	+	Red*	About 10	0.1-0.5	Throughout the cytoplasm
	Wachstein's reagent	+	Brown-black*	About 10	0.1-0.5	
	Neisser's reagent	+	Red*	About 10	0.1-0.5	
Acid phosphatase	Gomori's reagent	+	Brown-black	About 10	0.1-0.5	Throughout the cytoplasm

* Metachromatically stained.

内部の顆粒構造が認められる。そして、この結果は、あらかじめ AO で染色しておいてもおかなくても同じである。次に、AO 顆粒保持生虫体の顕微鏡標本を作製し、スライドガラスとカバーガラスの間隙より Palade 液を注入して、普通鏡検下で、固定前後における同一 AO 顆粒を追跡した結果、この顆粒構造の固定保存されることを知った (Fig. 19 & 20)。また普通鏡検の範囲では、固定によって新たな顆粒構造の出現する形跡は認めなかつた。

3) AO 顆粒の細胞化学的検討

前述のごとく、固定液のなかでは、オスミック酸とグルタルアルデヒドの両者が比較的良好に顆粒構造を保存することがわかつたので、次に、これらの固定剤を用いて固定し、虫体の細胞化学的検討をおこなつた結果、次のような成績がえられた。すなわち、通常の細胞化学用固定剤使用の場合と、オスミック酸蒸気使用の場合とで比較したところ、細胞内諸物質の存否、分布などにつきほぼ一致した成績がえられた。したがって、オスミック酸蒸

気固定は、細胞化学的研究の場合にも十分使用可能と思われる。ただし、フォスファターゼの検出では、酵素活性の極度の低下をもたらすので成績はよくなく、従来よく用いられてきたアセトンでも同様である。さらに酵素活性を低下させない固定剤としては、グルタルアルデヒドが極めて優れていることも明らかとなった。なお、顆粒構造の細胞化学的検討でえられた成績は Table 12 に示した。核酸、蛋白質、アルカリフォスファターゼなどに関する反応では、特に反応陽性に染め出される顕著な顆粒構造は認められなかった。Table 12 でわかるように、上記以外の物質の細胞化学的検討では、一虫体あたりに出現する各反応陽性の顆粒構造は、個数、大きさ、分布などの点で、いずれも AO 顆粒に類似している。ただし、PAS 反応で染め出される顆粒構造は、おもに虫体周辺部に存在すること、大きさが他よりも小形のものが多く、個数もやや少ないことなどから、他の反応で認められた顆粒との類似性はやや低いように思われる。なお、あらかじめ AO で染色したものと無染色のもの間に、反応上の差は無かった。

次に、細胞化学的手法による重複染色においては、顕微鏡標本をまず前染色して鏡検の後、ステージよりはらずし、後染色後、再び同一部分を鏡下に探し出し、鏡検する。つまり同一虫体内の同一顆粒を徹底的に追究することによって、Laybourn 液による染色で出現するメタクロマジー顆粒（赤色）は、酸性フォスファターゼ陽性顆粒（黒褐色）と一致すること (Fig. 21 & 22)、Laybourn 液による染色で出現するメタクロマジー顆粒は、Giemsa 染色により出現するメタクロマジー顆粒（赤色）と一致すること (Fig. 23 & 24) などの成績をえた。Laybourn 染色と Giemsa 染色の比較の場合には、前染色、後染色のどちらもメタクロマジーの色調は赤色でまぎらわしいが、前染色で観察した後は、一度アセトンで脱色処理をおこない、完全に脱色したことを確認してから、後染色処理に入り、前染色の影響を除去するよう努めた。さらに、オイルレッド O 染色によって現われる赤色顆粒の一部は、また酸性フォスファターゼ反応陽性を示した (Fig. 25 & 26)。なお、酸性フォスファターゼ活性の消失を危惧しておこなった対照実験の一つ、すなわち、正常マウス肝組織の塗抹標本での Laybourn 法および Gomori 法の重複染色でも、実験群と全く同じ操作の後、同酵素活性の失われていないことを確認した。

4) AO 顆粒の肥大現象の観察

この観察において、*Toxoplasma* 虫体内の AO 顆粒が

肥大する現象を認めた (Fig. 27 & 28)。この現象を示した *Toxoplasma* 虫体に対しておこなった酸性フォスファターゼ検出試験において、同酵素陽性顆粒の肥大も認め (Fig. 29 & 30)、両顆粒の肥大現象が並行しておこることが示された。また、光顕レベルでは、これ以外の細胞器官で肥大するものは認められなかった。

5) AO 顆粒に対するリボスクレアーゼ処理の影響

AO 顆粒に対する RNase の影響を、蛍光鏡検によって観察した結果、作用後 6 時間までは、AO 顆粒が認められ、実験群と無処置群の間に差は認められなかった。同一経過を、ピロニン-メチルグリーン染色によっても追跡したが、実験群と無処置群との間で著差なく、いずれも前述の時間の範囲では、細胞質の赤色色調が残存した。6 時間以上 RNase を働かせた群では、変形および変性虫体の出現が著しくなるので、不相当と考え成績から除外した。

考 察

1. AO 顆粒の基礎的観察とその発色条件の検討

蛍光顕微鏡法によつて *Toxoplasma* を観察した報告が近年現われ始め (Rothstein, 1958; Armstrong & Fulton, 1959; 小山ら, 1962; 牧野, 1964)、同法が *Toxoplasma* 研究上に極めて優れた方法であることが知られるようになった。著者は、*Toxoplasma* 虫体の検出に、同法を導入することを目的として検討を重ね、その細胞質内に、特異な AO 顆粒の出現することおよびその他の種々興味ある知見をえたので、すでにその予備的観察の結果を報じた (小山ら, 1962)。本報告は、その後、特に、上記顆粒の性状に強い興味をもつて実施した一連の研究の結果であるが、まず、顆粒に関する基礎的観察と発色条件の検討について考察する。

さて、種々検討の結果、AO 濃度 1~2 万倍、pH 7.0~7.5、室温下が最適発色条件と考えられ、この条件下では、腹水内栄養型虫体およびシスト型虫体は、ともに 1~2 分の染色時間で美しい赤色蛍光を示すとともに、両者ともにその細胞質内に AO 顆粒の存在を認める。また核と細胞質の分別も良好であつた。しかし、シストの場合は、同一条件下で染色時間を 5~30 分と延長しても、美しい赤色蛍光は認められず橙色にとどまることを確かめた。これは、シスト壁の存在による AO 色素の流入阻害のほか、多数虫体の存在による虫体 1 匹あたりへの流入色素量の低下も一因となつていると考えられる。そこで、虫体 1 匹あたりの吸収色素量の多寡が発色色調に影響を及ぼす可能性を追究してみた。従来、

この点について詳しく触れた報告はあまりなく、Strugger (1949), Robbins & Marcus (1963) らの報告が散見される程度である。彼等は、蛍光発色の強弱は、細胞内にとり込まれた蛍光色素量に比例するのであつて、同一量の色素に対しては、少数細胞群は多数細胞群に比し、より強い蛍光発色をすと述べている。つまり蛍光色調の強さは、細胞のとり込む色素量に比例するというのである。著者の経験でも、臓器磨砕液や、遠沈による腹水内虫体の集虫液などのごとく、一定容積内に含まれる虫体数あるいは宿主細胞数が多くなると、発色色調が減弱することを認めた。この場合、これらの液の pH は、いずれも至適発色条件である弱アルカリにおさまることから pH の影響とは思われず、AO 液を多量に追加することによつて、発色色調を好転せしめえた。虫体が好調な発色を示すためには、1匹あたりある一定量以上の色素がとり込まれる必要があり、虫数あるいは宿主細胞の増加は、好適な発色のための AO 必要量に対して、その量的な不足をきたすものと思われる。したがつて、実際の染色にあつては、上述の最適発色条件を考慮しつつ、AO 液をすこしずつ添加していき、好適発色点を求めるのが上策であると考えられる。

さて上述のように簡単な条件設定のみで、*Toxoplasma* の栄養型虫体、シスト型虫体あるいはシストなどが、美しい蛍光像を示し、その発色色調の差から宿主側の組織細胞と区別が可能であるという事実は、本法が *Toxoplasma* の感染経路あるいは宿主体内移行の問題を追究する上に有効な虫体検出法になりうることを予想させる。この面の検討結果についての考察は後述する。

次に、AO 染色時間と、虫体感染能の関係についての成績から、AO 染色後は、虫体の感染能が急激に低下するので、できるだけ速やかに観察その他の処理を終了せしめるべきである。また著者の観察の範囲では、発色条件が適当であれば、虫体の染色後直ちに蛍光鏡検しても、常に美しい蛍光像を認めることができ、しかもこの方法によると、極めて低濃度の色素で生体染色が可能であるから、生体観察が比較的安全におこなえ、活性の高いうちに十分虫体の観察ができる。牧野 (1964) がいうように、色素液混合後30分ではじめて最高調の色調になるというのは、著者のいう分別が最良になるという意味ではなく、赤色色調が最強になるという意味と思われる。著者の経験では、AO による染色時間が長いと、次第に赤色色調は強くなるが、逆に細胞質の顆粒構造や核構造は認めにくくなつて細胞内分別は悪くなり、マウス

への感染能も低下するなど、虫体活性の衰退傾向を示すことが認められている。

2. 感染臓器内虫体の検出

AO 生体染色—蛍光顕微鏡法による *Toxoplasma* の検出について検討をおこなつたが、まず、感染マウスから取り出した内臓々器は、おもに腹水から由来する *Toxoplasma* によつて、その表面が汚染しているおそれがある。動物体内の *Toxoplasma* の分布を調べる時には、このように汚染された臓器を用いたのでは正確な成績はえられない。幸い栄養型虫体やシスト型虫体は、浸透圧の影響を受けやすい (Stone & Manwell, 1963; 木村, 1967) ので、まず蒸留水浸漬によつて、臓器内虫体には影響なく表面付着虫体のみを殺滅することを意図して実験をおこなつた。その結果、蒸留水処理によつて、内部虫体には影響なく、表面付着虫体のみを殺滅できることを知つた。従つて、このような実験の場合には、実施に先立つて、短時間の蒸留水処理をおこなうことが望ましい。蒸留水をえらんだ理由は、処理後の虫体への影響がすくないと考えたからである。AO 染色後、時間の経過に伴つて、赤色蛍光が次第に強まつていくが、核や AO 顆粒の分別は逆に悪くなつてくる。そしてこれと同時に、感染能も衰退していくということはすでに述べたが、一方、感染マウス腹水の蒸留水処理で、腹水内虫体の AO 顆粒が認めにくくなり、同虫体のマウスへの感染能の消失などが認められたとも記載したが、この両現象を、Robbins & Marcus (1963) の考えを参考にして次のように推定してみた。

すなわち、前者の場合は、一種の生体染色であつて、AO 染色後しばらくは、AO 顆粒が明らかに認められ、虫体は生きていたと思われる。この時には、細胞質内に浸透した AO を、異物として積極的に排除する働きが認められ、ある構造物内に AO の蓄積がおこつて AO 顆粒の形成をみるようにみえる。

さらに AO 内浸漬が続くと、核や AO 顆粒の分別が出来ないほどに細胞質内赤色蛍光が強まる。これは異物としての AO を特定の構造内で処理しきれず、細胞質内全体に拡散するようになったと理解される。こうした状態では、AO の毒性が強く虫体に働くことになり、衰退傾向を示して感染能の低下をまねく結果になると想像される。後者の場合は、最初の蒸留水処理で、直ちに虫体は強い影響を受け、AO が虫体内に浸透できないような変性が虫体側におこつたものではないかと思われ、そのために AO が虫体内に入らず、AO 顆粒の形成がみ

られないことになるのではないだろうか。

次に、実験上、感染動物体内から、虫体を検出する必要があるほか、実際には、*Toxoplasma* 汚染の疑いがある肉畜の臓器、筋肉などから検出率よく虫体を発見する (Krause, 1955; Jacobs *et al.*, 1960 b; 石井ら, 1962; Work, 1967) 必要があり、大量の試料を処理できたら始都合である。この目的のために、消化処理によつて、大量の材料からできるだけ多くの虫体を分離してマウスに接種し、検出率をたかめようとの試みがすでになされている (Jacobs *et al.*, 1960 b; Work, 1967) が、ここでは、消化法によつて、まず大量の材料から虫を集めた後、蛍光顕微鏡法によつて虫体の検出をおこなうという処理法を試みた。ここで重要なことは、*Toxoplasma* 栄養型虫体が環境諸要因に対して抵抗性が極めて弱いという事実 (Jacobs *et al.*, 1952, 1960 a; 柳沢, 1957; 木村, 1967) であり、小山ら (1962) がすでに指摘したように、蛍光鏡検によつて生鮮虫体で認めた AO 顆粒が、死虫体あるいは活性低下虫体では認められなくなり、細胞質全体が、宿主細胞と同色の淡黄緑色となるため、両者の区別ができず、虫体の検出が困難になるという事実と合せて考えるならば、蛍光鏡検による栄養型虫体検出に際しては、虫体の活性をできるだけ低下させないという配慮が必要である。さて、消化法併用による虫体検出試験の結果から、栄養型虫体およびそれよりやや抵抗性の強いシスト型虫体の両者ともに、トリプシンよりペプシンの影響を受けやすく、検出の目的には後者の使用は望ましくない。トリプシン使用の場合、消化 60 分までは確実にマウスへの感染性を有しており、AO 顆粒も残存していて、虫体は赤色蛍光を発し、他の未消化残渣と明らかに区別しうる。したがつて、大量の材料から能率よく虫体を検出するには、臓器の磨砕液をトリプシンで 30~60 分、37°C で処理後、蛍光鏡検すればよく、遠心集虫すればさらに検出率がたかまるであろう。ただ、臓器のトリプシン処理後 AO 染色をおこなうと、一部の虫体で楕円形に変形するものが認められるが、それでも、その特長な赤色蛍光と核の黄緑色蛍光とで残渣との区別は容易である。

さて蛍光顕微鏡法による感染臓器内虫体の検出に関しては、すでに小山 (1963)、牧野 (1964) などの報告があるが、牧野は、簡易な原虫検索法を求めて同法の活用を試み、まず固定標本による観察の結果、虫体は一樣な銅赤色に染色され、虫体内の細胞器官は判別しにくくなり、検出ならびに鑑別上、あまり良い結果はえられな

かつたとしている。このことは、後にも述べるように、著者も経験しているところで、固定虫体では虫体が一樣に発色し、顆粒構造は不明瞭となるばかりでなく、宿主側の細胞も同色に発色するため、宿主細胞と虫体との分別も困難となる。したがつて固定虫体は、細胞構造の研究あるいは虫体の検出などのためには不適である。さらに同氏は、生体蛍光処理法による観察結果を記載しており、その色調、至適発色条件などについては、おおむね著者の結果と一致しているが、RH 株感染マウス肝と脾の磨砕液に AO (1:10,000) 液を加えて、臓器内虫体の観察をおこなつた結果、全般的に、腹水内虫体におけるほど色調が鮮明でなく、蛍光度は弱いと述べている。著者がすでに述べたように、このような場合には、常に虫体一匹あたりの吸収色素量の多寡が問題で、多数の宿主細胞や虫体の存在する場合には、好適な発色を呈するために必要な色素量に、不足をきたすおそれのあることを、注意しなければならない。この場合には、被検材料に対して、大量の色素液を用いて十分攪拌した後、室温下で観察すれば、臓器内虫体といえども、発色性のたかまることを経験している。

3. AO 顆粒と虫体感染能の関係

著者の考案になる灯芯法を応用すると、生虫体細胞内の AO 顆粒の存否、その他の細かい構造が精査できるとともに、虫数の算定も正確におこなえて便利であり、ここに始めて、以下に述べるような AO 顆粒と虫体感染能の関係を詳細に検討することができた。蛍光鏡検法の分野でのこのような観察法は、今日まで知られていない。観察にあたり灯芯切片をあらかじめ染色しておくのは、虫体の発色を好適な状態に保つため、もし未染色なら、虫体側に染着している色素が灯芯切片側に移行する傾向があり、虫体の発色が悪化するからである。使用した植物の髄は、ほかに数種あるが、油浸顕微鏡で観察して一視野内に 1 ないし 2 個の区画の現われること、および、髄のパラフィン切片作製が可能なることの 2 条件に合致するものとして、イ (灯芯) が最適であつた。

AO 顆粒と虫体感染能の関係については、本実験全体を通じて、時間に伴う顆粒保持虫体の出現率の低下傾向は、マウスへの虫体感染能の衰退傾向と強い平行関係にあることがわかつた。そして、容易にこの顆粒保持虫体を発見しうる材料なら、接種によつてほぼ確実にマウスを斃しうるし、逆にこのような虫体を全然認めない材料なら、マウスを斃すことはほとんどなく、特に遠沈集虫法の併用によつて、かような虫体の存否をさらに確実に

知ることができた。保存液に腹水と生理食塩水の2種を使ったのは、前者で準自然棲息環境下での、また、後者で殺トキソプラズマ剤の発見、あるいはトキソプラズマの抵抗性試験を目的として、腹水成分を洗滌除去する場合を予想しての虫体の観察を、それぞれ意図したからである。その結果は、生理食塩水中での虫体の生残性は一般に低いといわれているが (Jacobs *et al.*, 1952; 柳沢, 1957), この実験でも、顆粒構造の消失、虫体感染能の低下が、腹水内における場合よりやや急速であることが認められた。しかも、AO 顆粒保持虫体の出現率の低下傾向と、マウスへの虫体感染能の衰退傾向との間の強い平行関係は、依然としてこの場合にも明らかであったので、上述のような諸試験における虫体生死の判別に際しても、この AO 顆粒の消長は利用できるものと考えられる。Table 8 の虫体保存期間 8 日の欄で、極めて少数の顆粒保持虫体含有材料で、時に接種マウスの発症致死の起らない例があつたが、虫体の生死と感染能の有無とは同じものとは考えられないから、この間に若干のずれが存在しても不思議ではないと考えている。

4. AO 顆粒の本態

AO 生体染色—螢光顕微鏡法によつて、*Toxoplasma* 栄養体に見出される AO 顆粒の本態については、従来、生細胞質内において RNA と AO との結合物が、顆粒形態をとつたものとの推測がなされてきた (小山ら, 1962) が、近年同顆粒が lysosome に相当するとのかなり確実な証拠がえられているので (Koenig, 1963; Robbins & Marcus, 1963; Robbins *et al.*, 1964; Allison, 1967; Dingle & Barrett, 1968; Norrby *et al.*, 1968), この点の検討を加味しつつ、本顆粒の本態について追究してみた。

そこでまず、AO による螢光鏡検に加えて、普通鏡検および位相差鏡検の併用によつて明らかになつたことは、螢光鏡検によつて認めた赤色顆粒は、本来実体を備えた細胞質内構造の一つであるということであり、しかも、すくなくともその一部は、AO 処理前の生虫体内にすでに認められるということである。Robbins & Marcus (1963) は、HeLa 細胞を低濃度 AO で染色後、螢光鏡検で AO 小顆粒を認めるのに、位相差鏡検では、同顆粒を認めないと述べているが、著者の *Toxoplasma* の場合にはそのようなことはなく、螢光鏡検で認めた AO 顆粒は、必ず位相差鏡検でも認めることができた。一方、内部の顆粒構造の固定、保存が可能か否かという点と、観察の難易という点について多くの固定液について

比較検討してみた結果、この観察の範囲では、オスミック酸蒸気とグルタルアルデヒドで比較的よく顆粒が固定保存できるし、虫体の収縮変形などもすくないことが明らかとなり、これら両固定液は、細胞質内顆粒の観察のために好適なものと考えられた。さて、このオスミック酸を含んだ Palade 液で、問題の AO 顆粒も固定保存できることがわかつたが、この AO 顆粒は、AO によつて染まつた実体を備えた細胞質内構造であり、光顕レベルで観察した場合、AO 処理前にすでに、すくなくともその一部が認められること、また固定保存も可能であることなどの諸事実は、従来明らかな記載がなかつたものである。

次に、AO 顆粒の固定保存が確認されたことから、これの細胞化学的追究が可能となつた。こうしてえられた細胞化学的成績をまとめたのが Table 12 に示してある。従来、*Toxoplasma* の細胞化学的研究に関する知見は甚だすくなく、Cross (1947), 阿部 (1958), Dasgupta & Kulasiri (1959) などが挙げられる程度であつたが、近年になつて酵素を対象とした細胞化学的研究や、さらに電顕的細胞化学の分野の業績が数多く報ぜられるに至つている (Hansson & Sourander, 1968; 赤尾・松林, 1970; 赤尾, 1971 a, b)。これらの成績のうちには、著者のものとの一致を思わせる部分もあるが、本研究のように光顕レベルでの特殊顆粒の追究を目的としたものではないことと、テクニックの異なることなどで、いきなり著者の成績と比較するわけにはいかない。さて、本成績を検討してみると、Giemsa でのメタクロマジー染色顆粒、PAS 染色顆粒、脂質染色顆粒、ボルチン顆粒 (異染顆粒)、酸性フォスファターゼ陽性顆粒などは、その数、大きさ、分布などの諸点でたがいによく類似している。しかもこれらの顆粒は、また AO 顆粒とも類似し、お互の異同を明らかにする必要が生じた。この点を解明するために、いくつかの染色剤を用いて、お互に重複染色を試みてみた。その結果、Giemsa 液やボルチン顆粒の染色剤である Laybourn 液などによつて出現するメタクロマジー染色顆粒は、酸性フォスファターゼ陽性顆粒と一致し、さらに脂質染色顆粒の一部も、酸性フォスファターゼ陽性顆粒と一致する結果をえた。近年、一般細胞において酸性フォスファターゼ陽性顆粒は lysosome に一致し、この lysosome はまた AO での生体染色によつて染め出され、検出が可能であると指摘された (Koenig, 1963; Robbins *et al.*, 1964; Allison, 1967)。そしてまた、*Toxoplasma* に関して

も、酸性フォスファターゼおよび lysosome の存在が知られるようになってきた (Lund *et al.*, 1966; Hansson & Sourander, 1968; Norrby *et al.*, 1968). 従つて、本研究において見出したフォスファターゼ陽性顆粒も AO 顆粒に一致し、ともに lysosome と考えてよさそうであるが、この考えは、本研究において、*Toxoplasma* の場合でも、Robbins & Marcus (1963) のような AO 顆粒の肥大現象と酸性フォスファターゼ陽性顆粒の現大肥象との平行関係を確認し、両顆粒が同一物である可能性が示されたことによつて強められるように思われる。しかしながら、実際には、AO 顆粒が酸性フォスファターゼ陽性顆粒、つまり lysosome に一致するという直接証明がなされ得なかつたことと、原虫においてのこの種の研究が未だ十分なされていない点から、AO 顆粒が lysosome に一致するとの結論を出すには、さらに多くの検討が必要であろう。ここに、酸性フォスファターゼ陽性顆粒がボルチン顆粒と一致し、また脂質染色顆粒の一部が酸性フォスファターゼ陽性顆粒と一致するという所見は、今まで、すくなくとも *Toxoplasma* で明らかにされたことはないが、メタクロマジー染色顆粒またはボルチン顆粒と呼ばれるもののなかに、酸性フォスファターゼ陽性顆粒、すなわち lysosome に一致するもののあることを示唆するものであつて、注目すべきものと思ふ。また、脂質染色顆粒のすくなくともその一部に、酸性フォスファターゼが含まれることは興味深いが、その意味については、今後の研究にまたねばならぬだろう。

次に、従来存在した AO は核酸と結びつくとする報告 (von Bertalanffy & Bickis, 1956; 小磯, 1963) の真偽は一体どうなのだろうか。この点を明らかにするために、通常自由生活性原虫や培養細胞でおこなわれているように (Brachet, 1956; 木本, 1961; Fotakis & Stammer, 1963)、生虫体に RNase を作用させて RNA の消去に努めつつ蛍光鏡検してみたが、AO 顆粒の蛍光色調は不変であつた。また、同時におこなつたピロニン-メチルグリーン染色の色調も変らなかつた。このことは、AO 顆粒が RNA と無関係である可能性を強く示すものかも知れぬが、一方、RNase がもともと虫体内に入らなかつたことや、入つても本生虫体の RNA には作用しなかつたことなども想定させ、結局明瞭な結果はえられなかつた。*Toxoplasma* の電顕的観察における現在までの知見を通覧してみても、ribosome のような RNA に富んだ成分は、ひろく細胞質内に分散していて、lysosome のように、特定数の顆粒となつて細胞質内に存在することは考えにくい。この考えは、ピロニン-

メチルグリーン染色で、明らかなピロニン顆粒が出現せず、ピロニン染着部位が細胞質内にひろく拡散しているという事実によつても支持される。この事實は、ほかに阿部 (1958) や Dasgupta & Kulasiri (1959) からも認めている。上述のように、RNA 成分に富んだ部位が AO 顆粒と一致するとは考えにくいことであるが、蛍光鏡検によつて虫体の染色経過を追つてみると、まず細胞全体が一様に染まり、その後次第に顆粒構造に色素またはその染着物質が分離してくるようみえる。このことは、Robbins & Marcus (1963) や Robbins *et al.* (1964) も同様に述べている。この細胞質全体が一様に染まつた時に、ただ AO が細胞質内全体に拡散しているだけなのかも知れぬし、また従来報告にみられるように、AO が RNA とある程度の結びつきをもつているものかも知れぬ。ともあれ、すくなくとも、AO 顆粒が、特に RNA 成分からなるという確かな証拠は今のところ存在しない。

最後に、Dasgupta & Kulasiri (1959) は、*Toxoplasma* 虫体の stage によつて細胞化学反応に差異ありとし、また、Norrby *et al.* (1968) は、HeLa 細胞に侵入後間もない *Toxoplasma* 虫体では、AO 顆粒を示すものはすくなく、同細胞内で増殖後の遊離虫体の大部分で、AO 顆粒を認めたとして、同顆粒の存否は虫体の stage と深い関連のあることを示唆した。一方、牧野 (1964) は、至適発色条件下で、ほとんどの *Toxoplasma* 虫体が銅赤色を示すのに、一部に終始細胞質が青緑色を示し、かつ運動性をもつた虫体を認め、その本態は不明であるといひ、AO 顆粒をもため虫体の存在を指摘しているが、こうした虫体は、Norrby *et al.* のような宿主細胞に侵入後間もない虫体の、鏡検処理に際して、宿主細胞から機械的に遊離せしめられたものを、たまたま観察したものかも知れない。ともあれ、この面の検討は目下ほとんどなされておらず、今後の研究にまたねばならない。

むすび

アクリジンオレンジ (AO) 生体染色-蛍光顕微鏡法を用いて、*Toxoplasma* 感染マウスからえた *T. gondii* 細胞質内に見出される AO 顆粒を検討した結果、次の成績をえた。

1) AO 顆粒の基礎的観察とその発色条件の検討

a) AO 顆粒のための最適発色条件は、室温下で、腹水内および臓器内の栄養型虫体と脳内シスト型虫体の両者ともに、AO 濃度 1~2 万倍、pH 7.0~7.5、染色

時間は、栄養型虫体で1～2分、シスト型虫体で5～30分、また、虫数や宿主細胞数に応じて AO 液量の増減をはかることなどである。

b) 両型虫体は、上記最適発色条件下では、ともに、細胞質は赤色に、核は黄緑色に発色し、かつ細胞質の赤色は、おもにそのなかに含まれる AO 顆粒の存在による。一方、シストは、同条件下では長時間染色しても橙色にとどまる。また、いずれの場合でも、この条件下では、宿主側の組織細胞はおおむね黄緑色に発色するのみであるのに、栄養型およびシスト型虫体は赤色三日月型、またシストは橙色大型球体として見出されるから、いずれの型の虫体も検出は容易である。

c) AO 染色後は、虫体感染能が急激に低下する。

2) 感染臓器内虫体の検出

a) 両型虫体は、ともに蒸留水の影響を受け易く、同処理によって、AO 顆粒の色調および虫体感染能の急激な衰退を認める。従って、臓器内虫体のみを実験に供する場合には、臓器の短時間蒸留水浸漬によって、おもに腹水内虫体からなると思われる臓器表面の汚染虫体の除去が可能である。

b) 感染臓器のトリプシン処理後蛍光鏡検した結果、両型虫体は、ともに消化処理60分までは、確実に AO 顆粒およびマウスへの感染能を有していた。従って、消化後、遠沈法の併用による蛍光鏡検により、大量の材料を扱うことが可能で、虫体検出率の大幅な向上が期待される。

3) AO 顆粒と虫体感染能の関係

a) 灯芯切片内の細胞間隙内に、感染マウス腹水内栄養型虫体を封入するという新法によって、虫体の動きを止め、AO 顆粒の観察と虫数算定ができた。

b) 同上虫体の蛍光鏡検に、遠沈法および灯芯法を併用し、時間に伴う AO 顆粒保持虫体の出現率低下傾向、すなわち、AO 顆粒の衰退過程と、マウスへの感染能のそれとの間に明らかな平行関係のあることを確認した。従って、AO 顆粒保持虫体の存否をもとに、接種材料の感染能の有無を推定することも可能である。

4) AO 顆粒の本態

a) 感染マウス腹水内虫体にみられる AO 顆粒構造のすくなくともその一部は、染色前の生虫体内にすでに認められるようで、AO によって強染する性質がある。

b) AO 顆粒は固定保存が可能である。

c) 細胞化学的検討では、酸性フォスファターゼ染色、ボルチン染色、脂質染色、Giemsa 液によるメタクロマジー染色などで、AO 顆粒に類似性の高い顆粒構造が染め出された。

d) 細胞化学的テクニックによる重複染色で、終始同一顆粒を追究した結果、酸性フォスファターゼ陽性顆粒、ボルチン顆粒検出のための Laybourn 液で染め出されるメタクロマジー顆粒、Giemsa 染色で出現するメタクロマジー顆粒、オイルレッドO染色顆粒の一部などは、すべて同一物であることを認めた。

e) AO 顆粒の肥大現象と、それと同一条件下における酸性フォスファターゼ陽性顆粒の肥大現象との間に、強い平行関係のあることを確認し、両顆粒が同一物である可能性を見出した。

f) 上記の諸性状に、さらに、顆粒の大きさ、形状、出現個数、分布状況などを加味して考えるとともに、文献的考察をおこなった結果、AO 顆粒を lysosome 様性状を強くもつた顆粒と考えた。

本論文の要旨は、第31、32、34、35回日本寄生虫学会総会（1962、1963、1965、1966）および第26回同学会東日本支部大会（1966）において発表した。

稿を終わるにあたり、懇切なる御指導、御校閲を賜った前国立予防衛生研究所長小宮義孝博士、同所寄生虫部長石崎達博士、新潟大学医学部大鶴正満教授、東京慈恵会医科大学小林昭夫教授に深謝いたします。また多くの御援助をいただいた国立予防衛生研究所寄生虫部の諸兄姉にも併せて謝意を表します。

文 献

- 1) 阿部道夫(1958) : *Toxoplasma gondii* の細胞化学的検索並に sulfa 剤投与後における虫体の細胞化学的变化. 慶応医学, 35, 193-208.
- 2) 赤尾信吉・松林久吉(1970) : *Toxoplasma* における acid phosphatase の電子顕微鏡による局在性について. 寄生虫誌, 19, 372-373.
- 3) 赤尾信吉(1971 a) : トキソプラズマの2～3の脱水素酵素の電子顕微鏡的細胞化学による証明. 寄生虫誌, 20, 379-385.
- 4) 赤尾信吉(1971 b) : 原虫におけるライソゾーム. 細胞, 3, 28-29.
- 5) Allison, A. (1967) : Lysosomes and disease concerning the role of bodies in the living cell that contain digestive enzymes. Scientific American, 217, 62-73.
- 6) 新井博・斉藤博・野村隆(1958) : HeLa 細胞に対する *Toxoplasma* の感染実験. 日新医学, 45, 663-669.
- 7) Armstrong, J. A. & Fulton, J. D. (1959) : Observations on the pathology of toxoplasmosis in the cotton rat. British J. Exp. Path., 40, 225-231.
- 8) Brachet, J. (1956) : Further observations on

- the action of ribonuclease on living amoebae. *Exp. Cell Res.*, 10, 255-256.
- 9) Cook, M. K. (1958) : The inhibitory effect of adenine and related compounds on the proliferation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J. Parasit.*, 44, 274-279.
 - 10) Cross, J. B. (1947) : A cytologic study of *Toxoplasma* with special reference to its effect on the host's cell. *J. Inf. Dis.*, 80, 278-296.
 - 11) Dasgupta, B. & Kulasiri, C. (1959) : Some cytochemical observations on *Toxoplasma gondii*. *Parasit.*, 49, 594-600.
 - 12) Dingle, J. T. & Barrett, A. J. (1968) : The uptake of biologically active substances by lysosomes. *Bioch. J.*, 109, 19 P.
 - 13) Dubey, J. P., Miller, N. L. & Frenkel, J. K. (1970) : The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J. Exp. Med.*, 132, 636-662.
 - 14) Fotakis, N. S. & Stammmer, A. (1963) : Vergleichende Untersuchung der Wirkung von Ribonuclease auf Hela- und FL-Zellkulturen. *Arch. Gesamte Virusforschung*, 14, 113-122.
 - 15) Frenkel, J. K., Dubey, J. P. & Miller, N. L. (1970) : *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167, 893-896.
 - 16) Gomori, G. (1950) : An improved histochemical technic for acid phosphatase. *Stain Tech.*, 25, 81-85.
 - 17) Gomori, G. (1952) : Microscopic histochemistry. Principles and practice. Univ. of Chicago Press.
 - 18) Hansson, H. & Sourander, P. (1968) : Ultrastructural demonstration of lysosomes in *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 74, 431-444.
 - 19) Hutchison, W. M. (1965) : Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, 206, 961-962.
 - 20) Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. Chr. & Work, K. (1970) : Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *British Med. J.*, 1, 142-144.
 - 21) 石井俊雄・小林昭夫・小山力・熊田三由・小宮義孝(1959) : 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. *寄生虫誌*, 8, 843-848.
 - 22) 石井俊雄・小林昭夫・小山力・熊田三由・小宮義孝・深沢平・齊藤正度・興水馨(1962) : トキソプラズマに関する研究(4) 豚肉からの虫体分離試験. *寄生虫誌*, 11, 184-191.
 - 23) Jacobs, L., Jones, F. E. & Melton, M. L. (1952) : The survival of *Toxoplasma gondii* in various suspending media. *J. Parasit.*, 38, 293-297.
 - 24) Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. (1960 a) : The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.*, 46, 11-21.
 - 25) Jacobs, L., Remington, J. S. & Melton, M. L. (1960 b) : A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasit.*, 46, 23-28.
 - 26) 木本哲夫(1961) : 生細胞に対するリボヌクレアーゼ (RNase I) の作用—形態学的・細胞化学的研究—。細胞化学シンポジウム, 11, 163-181.
 - 27) 小林昭夫・石井俊雄・小山力・熊田三由・小宮義孝(1959) : トキソプラズマに関する研究(1) 実験マウスの系統の検討. *寄生虫誌*, 8, 664-668.
 - 28) Koenig, H. (1963) : Vital staining of lysosomes by acridine orange. *J. Cell Biol.*, 19, 87 A.
 - 29) 小磯謙吉(1963) : 螢光色素アクリジン・オレンジによる核酸染色法—血液細胞学への応用—。医学のあゆみ, 44, 151-152.
 - 30) 小山力・小林昭夫・石井俊雄・熊田三由・小宮義孝・小机弘之(1962) : トキソプラズマに関する研究(3) 螢光顕微鏡による虫体の観察. *寄生虫誌*, 11, 178-183.
 - 31) 小山力(1963) : トキソプラズマに関する研究(11) 螢光顕微鏡法による感染臓器内虫体の検出について. *寄生虫誌*, 12, 287-288.
 - 32) Koyama, T. & Iardi, A. (1968) : Cytochemical studies on the leptomonad form of *Leishmania donovani*. *Parassitologia*, 10, 17-32.
 - 33) Krause, A. C. (1955) : *Toxoplasma* in tissues of man and pets, *J. Parasit.*, 41, 545-548.
 - 34) 熊沢正夫(1956) : 植物解剖学実験法. 生物学実験法講座 IVG, 中山書店.
 - 35) Kurnick, N. B. (1955) : Pyronin Y in the methyl-green-pyronin histological stain. *Stain Tech.*, 30, 213-230.
 - 36) Laybourn, R. L. (1924) : A modification of Albert's stain for the diphtheria bacillus. *J. Am. Med. Asso.*, 83, 121.
 - 37) Lillie, R. D. (1965) : Histopathologic technic and practical histochemistry. 3rd Ed., McGraw-Hill Book Comp., New York.
 - 38) Lund, E., Hansson, H., Lycke, E. & Sourander, P. (1966) : Enzymatic activities of *Toxoplasma gondii*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 68, 59-67.
 - 39) 牧野毅(1964) : 螢光顕微鏡法によるトキソプラズマの観察. *阪市大医雑*, 13, 297-319.

- 40) 本村一郎(1967) : *Toxoplasma gondii* の生物学的研究. 第1報. *Toxoplasma gondii* の各種理化学的条件に対する抵抗性に関する実験. 熱帯医学, 9, 201-225.
- 41) Norrby, R., Lindholm, L. & Lyck, E. (1968) : Lysosomes of *Toxoplasma gondii* and their possible relation to the host-cell penetration of *Toxoplasma* parasites. J. Bact., 96, 916-919.
- 42) Palade, G. E. (1952) : A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med., 95, 285-298.
- 43) Pearse, A. G. E. (1961) : Histochemistry, theoretical and applied. 2nd. Ed., J. & A. Churchill, Ltd., London.
- 44) Robbins, E. & Marcus, P. I. (1963) : Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelationships of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. J. Cell Biol., 18, 237-250.
- 45) Robbins, E., Marcus, P. I. & Gonatas, N. (1964) : Dynamics of acridine orange-cell interaction. II. Dye-induced ultrastructural changes in multivesicular bodies (acridine orange particles). J. Cell Biol., 21, 49-62.
- 46) Rothstein, N. (1958) : Vital staining of blood parasites with acridine orange. J. Parasit., 44, 588-594.
- 47) Rothstein, N. & Diamond, L. S. (1959) : Vital staining of parasitic protozoa for dark-field microscopy. J. Protozool., 6 (Suppl.), 8.
- 48) Sheffield, H. G. & Melton, M. L. (1970) : *Toxoplasma gondii* : The oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. Science, 167, 892-893.
- 49) Stone, W. B. & Manwell, R. D. (1963) : Viability of the proliferative form of *Toxoplasma* in distilled water. J. Parasit., 49, 1036-1037.
- 50) Strugger, S. (1949) : Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Schaper, Hannover.
- 51) 武谷健二・徳永徹・萩原義郷(1959) : 細菌の異染顆粒に関する研究. 九大結研紀要, 5, 409-415.
- 52) 常松之典・柳沢勝治・直江敏郎・斉藤正雄・小倉学・仁木和二郎・美甘正文(1958) : トキソプラズマの研究Ⅲ. 犬の実験的トキソプラズマ症に就て. 東京医事新誌, 75, 191-196.
- 53) von Bertalanffy, L. & Bickis, I. (1956) : Identification of cytoplasmic basophilia(RNA) by fluorescence microscopy. J. Histochem. Cytochem., 4, 481-493.
- 54) Wachstein, M. & Pisano, M. (1950) : A new staining technique for polar bodies. J. Bact., 59, 357-360.
- 55) Work, K. (1967) : Isolation of *Toxoplasma gondii* from the flesh of sheep, swine, and cattle. Acta Path. Microbiol. Scand., 71, 296-306.
- 56) 柳沢勝治(1957) : トキソプラズマの研究Ⅱ. 各種メジアにおけるトキソプラズマの生残性及び保存用メジアムについて. 東京医事新誌, 74, 459-462.
- 57) Yasuma, A. & Ichikawa, T. (1953) : Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. J. Lab. & Clin. Med., 41, 296-299.

Abstract

STUDIES ON THE ACRIDINE ORANGE GRANULES FOUND IN THE
CYTOPLASM OF *TOXOPLASMA GONDII* BY MEANS
OF FLUORESCENCE MICROSCOPY

TSUTOMU KOYAMA

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo 141, Japan*)

Red granules within the cytoplasm of *Toxoplasma gondii* recognizable by acridine orange (AO) vital fluorescent staining were studied for a possible usefulness as an index to know the viability of the parasite. The biological and cytochemical natures of the granules were also studied. The results obtained were as follows :

1) Optimum conditions for the fluorescence of AO granules.

The optimum conditions for the fluorescence of the granules were AO concentrations ranging from 1 : 10,000 to 1 : 20,000 dilution, pH values between 7.0 and 7.5 under room temperature for the RH trophozoites and the parasites liberated from Beverley cyst. Optimum time of exposure of the organisms to AO was 1-2 minutes for the trophozoites and 5-30 minutes for the cysts. Under the favorable condition, the nucleus of the trophozoite and the parasite liberated from the cyst fluoresces greenish yellow, while the cytoplasm red, the tint of which being due to many AO granules. The cysts are orange in colour even after the staining for a long time. By the use of AO fluorescent staining technique, the parasites could easily be differentiated from host cells; the trophozoites as red crescent or the cysts as orange ball in sharp contrast to greenish yellow host cells.

2) Detection of *Toxoplasma* in the tissue using AO fluorescence microscopy.

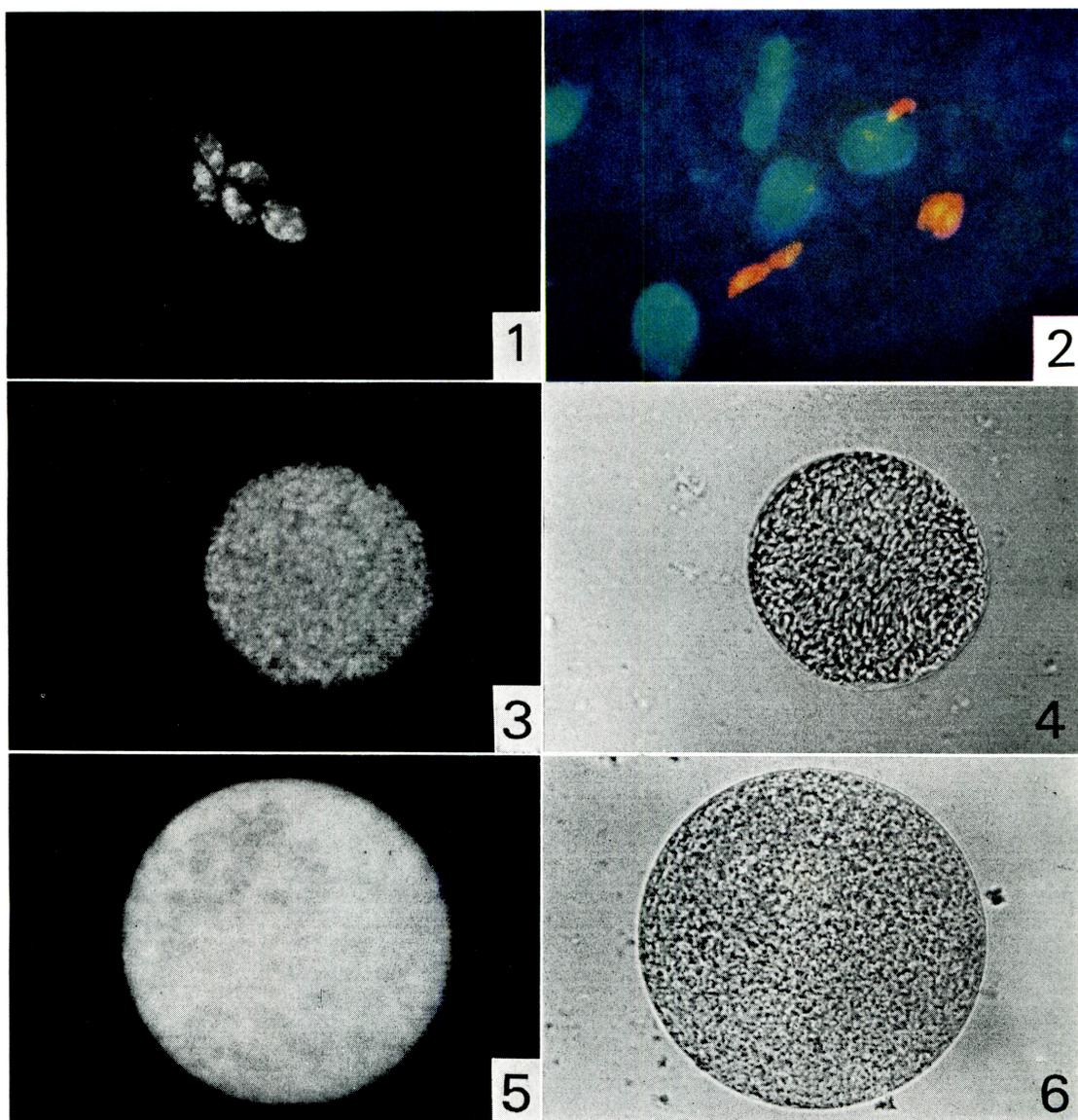
The parasites, either trophozoite or cyst, were destroyed rapidly in the distilled water, and the fading of red AO granules and the decrease of the infectivity of the parasites to mice were recognized. Both RH trophozoites and the parasites liberated from Beverley cyst still retained their infectivity to mice and AO granules even after 1 hr-exposure to 1% trypsin solution. Thus, the combined application of trypsin digestion technique and the AO fluorescence microscopy makes it much easier to detect viable toxoplasmas in a large amount of tissue material than use of either technique alone.

3) Relationship between the AO granules and infectivity of the parasites to mice.

For detailed observation on the AO granules within the parasite, it was necessary to settle the parasite in a limited space of a microscopic field. For this purpose, the use of a transverse section of the pith of rush (*Juncus effusus* var. *decipiens*) was proved to be useful as the settling bed for the parasite, the parasites placed onto the bed being well fixed within the intercellular space of the rush. By the application of this new technique, it was confirmed that the disappearance of the parasites with AO granules was associated with a marked drop in the infectivity to the mice. Thus, it is possible to discriminate fluoromicroscopically the viable microorganisms from the nonviable by the AO fluorescence microscopy.

4) Cytochemical nature of the AO granules.

It has been shown that a granular structure is found in the viable toxoplasmas by a light microscopic observation already before staining with AO and the dye is concentrated within the structure to form AO granules when the parasites are immersed in the dye solution. Moreover, the study of fixatives upon AO granules proved that the granules can be fixed and preserved. Several granular structures closely similar to AO granules were found as a result of the cytochemical investigation, e.g., acid phosphatase-positive granules detected by Gomori's method, metachromatic bodies visible after Giemsa's staining or Laybourn's staining for volutin granules and some of fat granules stained with Oil Red O. All these granules demonstrated were proved to be the same one another as a result of successive applications of any two of the different cytochemical methods to the parasite. When parasites were stained with high concentrations of AO for short time and incubated in a dye-free medium, AO granules were led to marked hypertrophy. On the other hand, acid phosphatase-positive granules also grew up under the same treatment. The results mentioned above may suggest that the AO granules in the parasites may be identical to lysosomes.



Figs. 1, 9-30. The trophozoites obtained from the peritoneal fluid of mouse infected with *Toxoplasma gondii* (the RH strain).

Fig. 2. The trophozoites in the liver of mouse infected with *Toxoplasma gondii* (the RH strain).

Figs. 3-8. The cysts and the parasites liberated from cysts obtained from the brain of mouse infected with *Toxoplasma gondii* (the Beverley strain).

Fig. 1. Fluorescence micrograph of acridine orange (AO) granules found in the trophozoites.

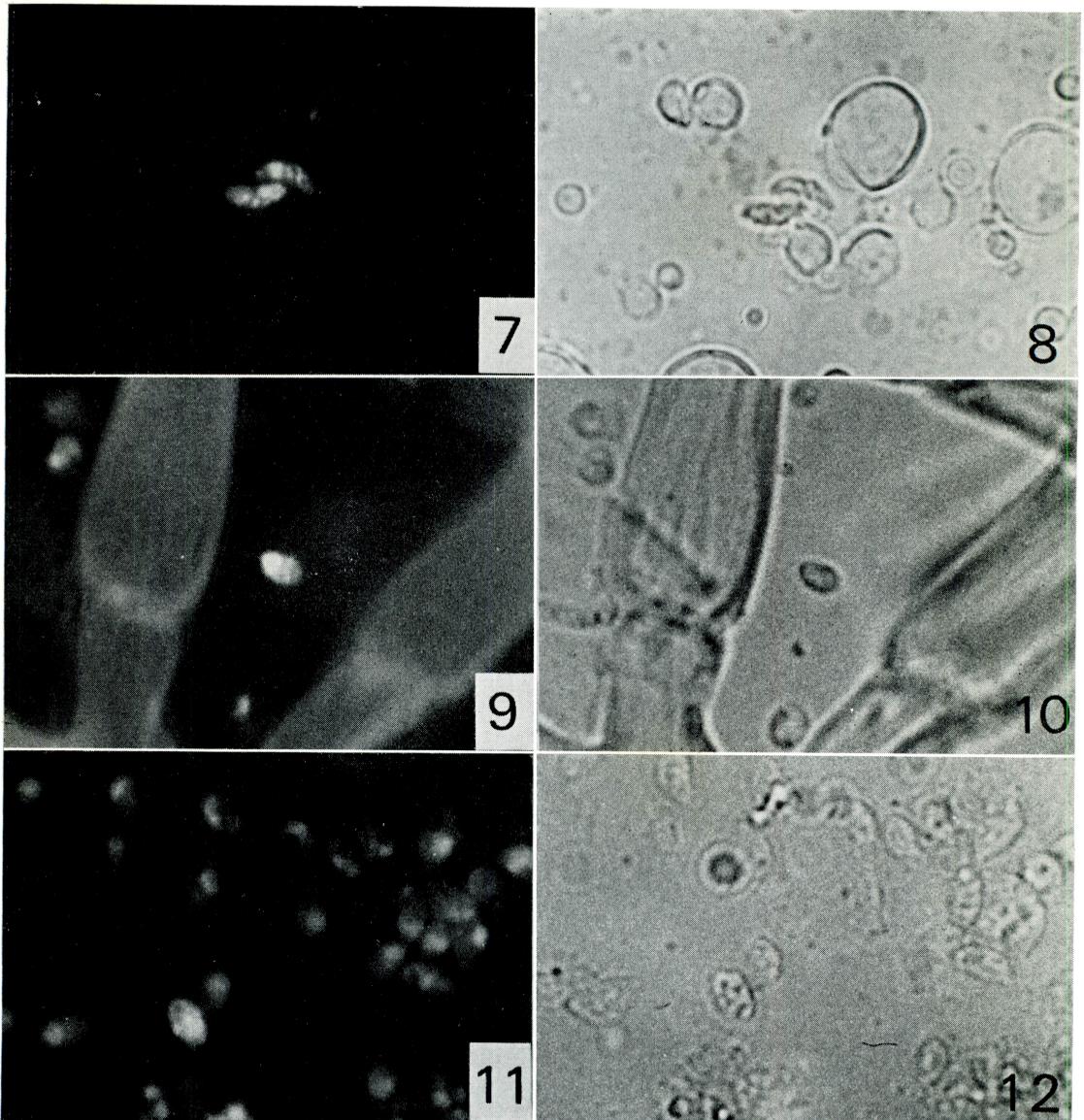
Fig. 2. Fluorescence micrograph of the trophozoites in the crushed liver tissue of mouse.

Fig. 3. Fluorescence micrograph of a cyst isolated from the brain of mouse which was exposed to distilled water for 30 minutes. Individual parasite in the cyst is clearly seen.

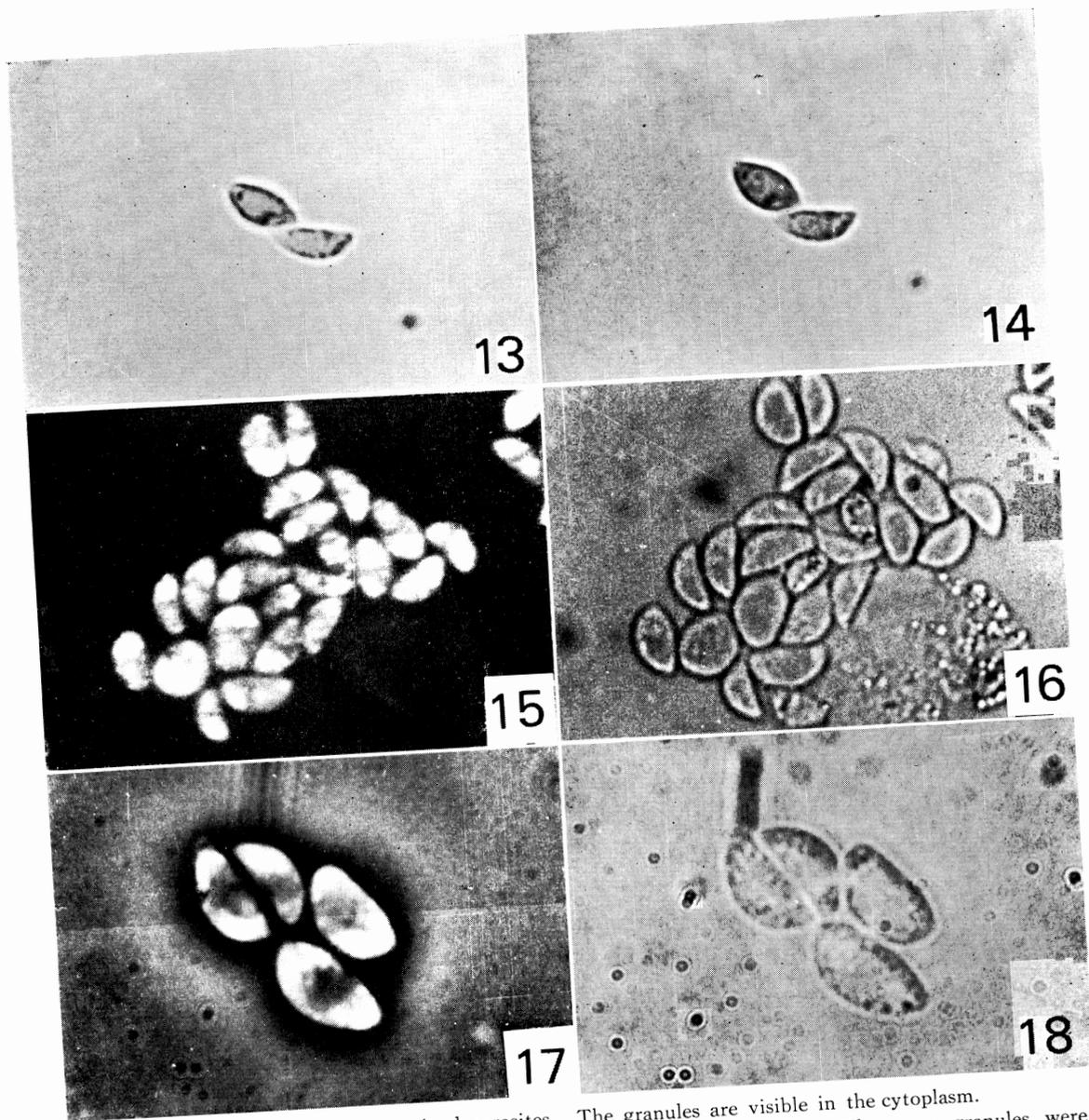
Fig. 4. Light micrograph of the same cyst that is shown in Fig. 3.

Fig. 5. Fluorescence micrograph of a cyst isolated from the homogenated brain of mouse which was exposed to distilled water for 1 hr. The internal feature of the cyst is obscure.

Fig. 6. Light micrograph of the same cyst that is shown in Fig. 5.



- Fig. 7. Fluorescence micrograph of the parasites released from cysts digested in 1% trypsin for 1 hr.
- Fig. 8. Light micrograph of the same parasites that are shown in Fig. 7.
- Fig. 9. Fluorescence micrograph of the parasites enclosed in the intercellular space in the cross section of the pith of the rush (*Juncus effusus* var. *decipiens*). A. parasite has AO granules in the cytoplasm, whereas others not.
- Fig. 10. Light micrograph of the same parasites that are shown in Fig. 9.
- Fig. 11. Fluorescence micrograph of the trophozoites exposed to physiological saline for 3.5 days. They were collected by centrifugation. Only one trophozoite has AO granules in the cytoplasm but others not.
- Fig. 12. Light micrograph of the same trophozoites that are shown in Fig. 11.



- Fig. 13. Light micrograph of unstained parasites. The granules are visible in the cytoplasm.
- Fig. 14. Light micrograph of the same parasites that are shown in Fig. 13. The same granules were stained with AO.
- Fig. 15. Fluorescence micrograph of AO-stained parasites. Note AO granules clearly shown in the cytoplasm of two parasites which are located in the center of this figure.
- Fig. 16. Light micrograph of the same parasites that are shown in Fig. 15. Same AO granules are also seen.
- Fig. 17. Phase contrast micrograph of the granular structure detected in the cytoplasm of trophozoites.
- Fig. 18. Light micrograph of the same granular structure that is shown in Fig. 17.

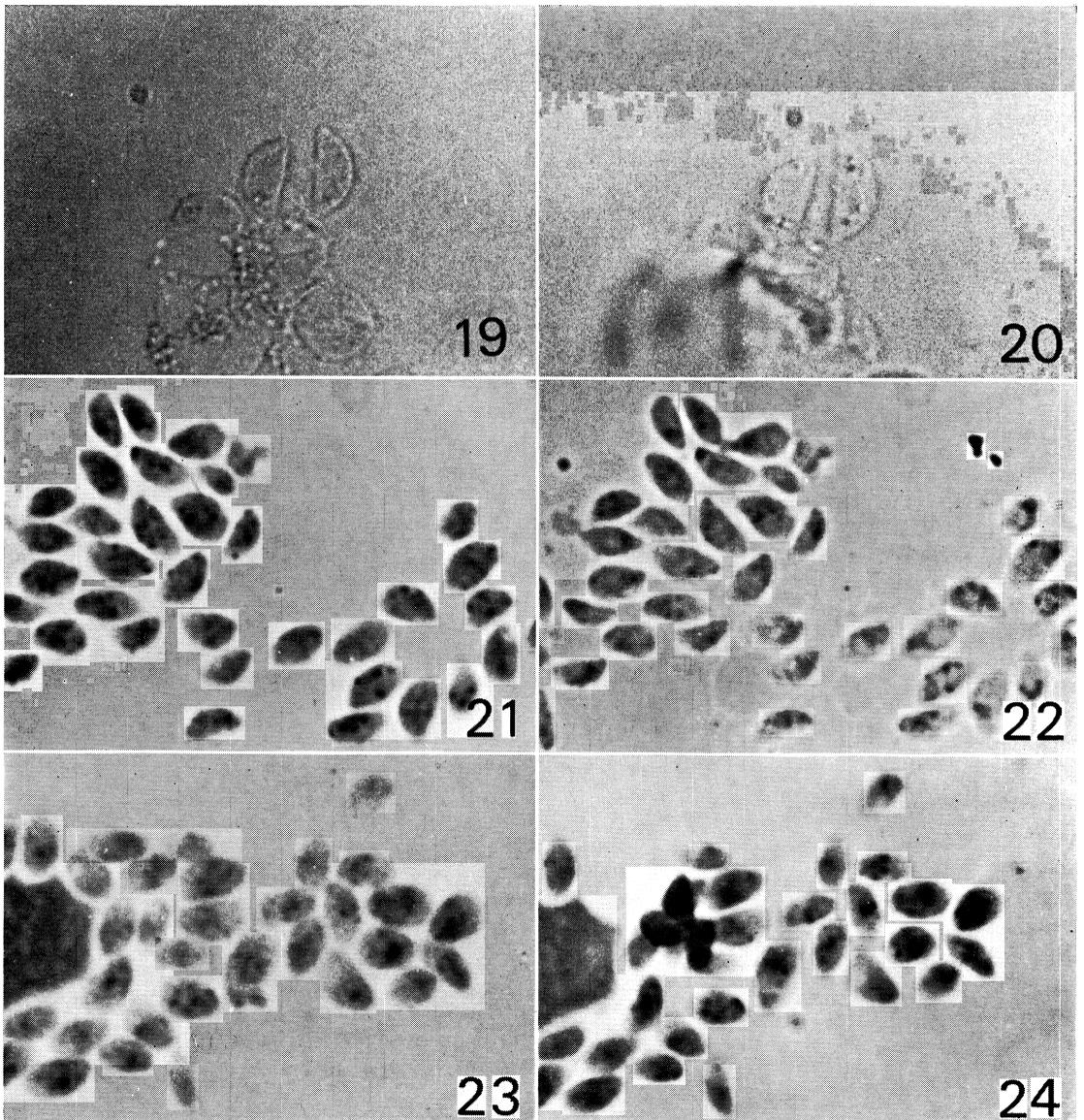


Fig. 19. Light micrograph of the AO-stained parasites. AO granules are visible in the cytoplasm.

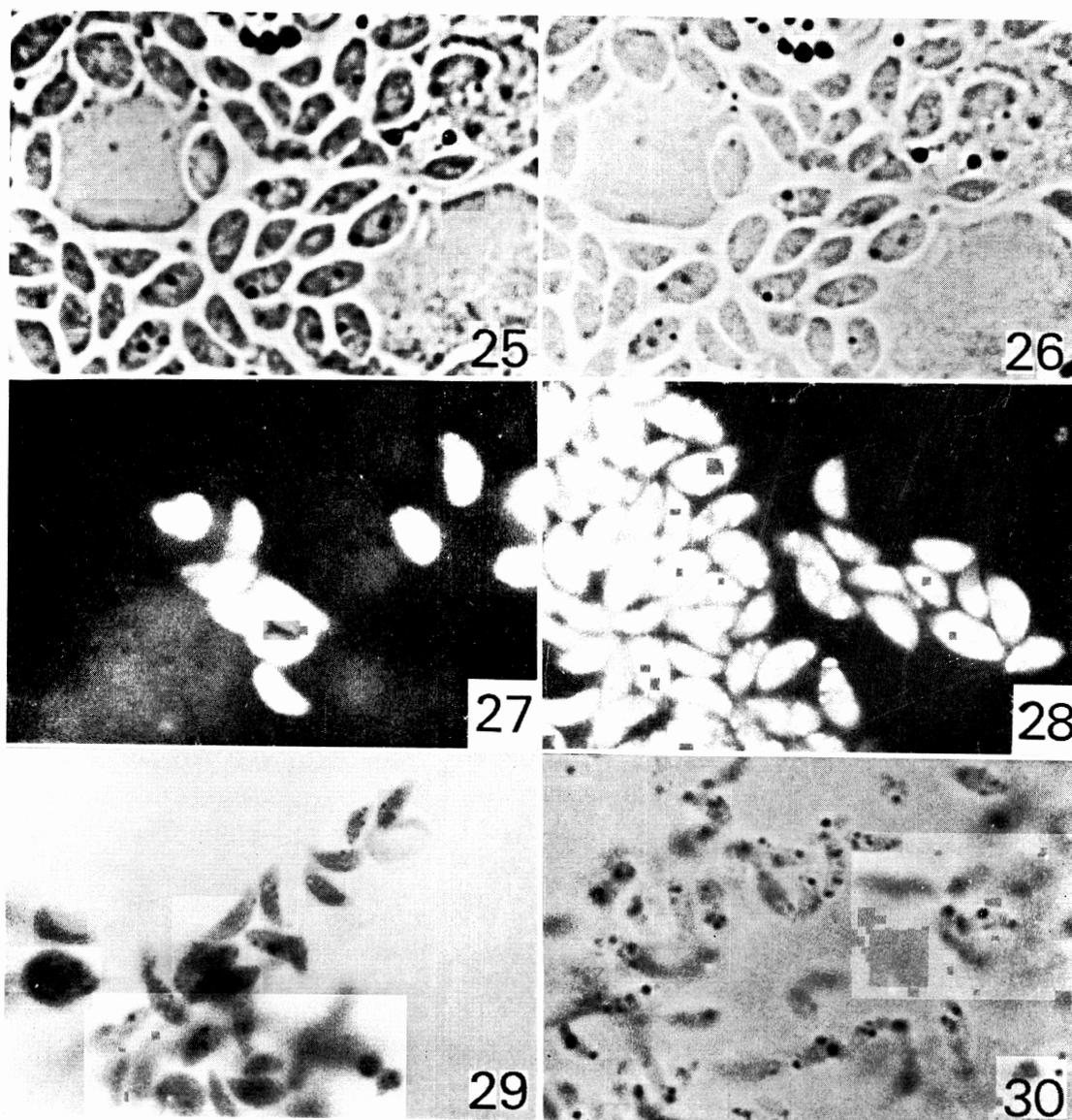
Fig. 20. Light micrograph of the same parasites that appear in Fig. 19. In this case, the parasites are fixed with Palade's fixative. Same granules are also visible in the cytoplasm. It is clear that AO granules can be fixed and preserved as seen from Figs. 19-20.

Fig. 21. Light micrograph of the parasites stained by Laybourn's method for volutin granules. Cytoplasmic granules are stained red.

Fig. 22. Light micrograph of the same parasites as those shown in Fig. 21. The staining with Laybourn's reagents was followed by the staining with Gomori's reagents and same granules were also stained blackish brown for acid phosphatase, suggesting identity of metachromatic bodies with acid phosphatase-positive granules.

Fig. 23. Light micrograph of the parasites stained with Giemsa's solution. Cytoplasmic granules are metachromatically stained red.

Fig. 24. Light micrograph of the same parasites as those shown in Fig. 23. The staining with Giemsa's mixture was followed by the staining with Laybourn's reagents. Same granules were also metachromatically stained red. It was proved that metachromatic granules visible after Giemsa's staining are identical with those visible after Laybourn's staining.



- Fig. 25. Light micrograph of the parasites stained with Oil Red O. Cytoplasmic granules are stained reddish orange.
- Fig. 26. Light micrograph of the same parasites that are shown in Fig. 25. The staining with Oil Red O was followed by the staining with Gomori's reagents and a part of Oil Red O-stained granules showed the acid phosphatase activity.
- Fig. 27. Fluorescence micrograph of trophozoites exposed to AO.
- Fig. 28. Fluorescence micrograph of trophozoites lead to marked hypertrophy of the AO granules in growth medium. AO granules have markedly increased in size.
- Fig. 29. Light micrograph of trophozoites stained for acid phosphatase. Black dots in the cytoplasm represent sites of enzyme activity.
- Fig. 30. Light micrograph of the trophozoites received the same treatment that the parasites shown in Fig. 28 did and stained for acid phosphatase. Acid phosphatase-positive granules have also markedly increased in size. The AO granules should be identical with the acid phosphatase-positive granules, because there is an exact parallelism on hypertrophy between both granules.