

## *Plasmodium berghei* の発育中に出現する 特異な形態について

小早川隆敏 小山力 熊田三由

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和48年3月23日 受領)

### 緒言

近來マラリア原虫の培養は、おもに *Plasmodium knowlesi* を用いて手法、培地の開発がなされ、有性世代までへの成長はみないまでも、schizogony を2世代以上おこさせ、虫数も数倍に増加させることが可能になってきた (Geiman *et al.*, 1946; Trigg, 1968, 1969; Butcher & Cohen, 1971).

しかしながら、ネズミマラリアの1種 *P. berghei* では、今日までほとんどこうした培養が行われていない。そこで、著者らは、golden hamster に継代中の同虫体を用いて、試験的に簡易な培養を試み、経時的に Giemsa 染色と pyronin-methyl-green 染色 (以下 PM 染色と略す) で原虫の発育を追求してみた。この追求にあたっては、培養の経過にともなつての各期虫体の個数算定をおこない、発育時期の進行を確認する必要があるが、被寄生赤血球の増多とともに、本種では、発育形態上に異常な複雑多様性を示し、いずれの時期の虫体かを決めかねるものも出現し、所期の目的を果しえなかつた。従つて、培養に関する成績については、後日検討の上報告することとし、とりあえず本論文では、この観察で認めた特異な形態の記載と文献の考察をおこなつた。

### 実験材料および方法

使用虫体と継代方法：用いられた *P. berghei* は、東大医科研より譲り受けた Yoeli 株 (NK 65) で、体重20g前後の DDY 系マウスに腹腔内注射で継代した。注射にあつては、感染1週後に心臓採血(含ヘパリン)で約0.5mlを得たのち、生理食塩水で40倍に希釈し、その0.5, 0.3, 0.1mlを各々3匹のマウスに腹腔内接種した。0.5ml接種で、被寄生赤血球数は約 $2.5 \times 10^7$ /mlであつた。継代間隔は1週間で、生残マウス血液のうちで被寄生赤血球の多いものをえらんで、使用した。 *in vitro*

培養に用いた虫体は、1回目は、マウスで約60代継代した後、さらに約20日間隔で体重120g前後の golden hamster に継代し、その6代目の個体から感染後12日目に、また2回目は、マウスで約80代継代後、さらに golden hamster で継代し、その4代目の個体から感染後18日目に採血してえたものである。培養とは別に、感染 golden hamster や感染マウスの血液像を随時観察したが、前者の場合は、継代の際採血したものを、後者の場合は、約110代継代したものを、ほぼ3時間毎に尾部より採血し材料とした。

培養容器・培地・気相：培養容器は、Falcon Plastics 社の組織培養用シャーレ (35×10mm) を用いた。培地は、Ball(1945)が開発し、Trigg & Gutteridge(1971)によつて簡易化された Harvard medium を作製し使用した。使用時の各種条件は、すべて彼等のものによつた。ふ卵器の気相は5%CO<sub>2</sub>+95%空気とした。

培養方法：培養に際しては感染 golden hamster より心臓採血(含ヘパリン)で約10mlの全血を採取し、500rpm, 5分遠沈ののち上清を捨て、沈渣を培地液で1回遠沈洗浄し、最後に培地液の2mlを加えて血球浮遊液とした。一方、あらかじめ培地液2mlずつを分注し、ふ卵器内に納めておいた培養容器のそれぞれに上記血球浮遊液を0.2mlずつ入れた。その際の赤血球の寄生率は約50~70%であつた。なお、培養中は、培養容器内の赤血球の堆積を防止するために適宜振とうした。

観察方法：標本作製に際しては、4時間毎に培養容器を1個ずつ取り出し、その内容を500rpm, 5分遠沈ののち沈渣より塗抹標本を2枚作製し、1枚は Giemsa 液で染色し、他の1枚はカルノア固定を経て PM 染色して観察した。コントロールの意味で、感染 golden hamster や感染マウスの血液像も観察したが、それらも Giemsa 染色標本とした。

### 結果および考察

*in vitro* 培養のものは、24時間後でも Giemsa および PM 染色による虫体の染まりは良く、特に merozoite は染色性が良く保存されているようであった (Fig. 1)。さらに、merozoite の数も12時間以後に増加する傾向があつたので、一応この程度の培養で、24時間後まで赤血球、原虫ともに生残したと予想された。

その後、さらに、この培養虫体の発育傾向を確認するために、培養開始後一定時間毎の各期虫体の出現比率を求めてみた。しかしながら、この観察時に、発育形態上の複雑多様性に直面し、この種の形態上の再検討なしには、発育過程に関する以後の追求や、記載が困難と考えられた。こうした複雑性は文献的には、Vincke (1954)、Yoeli & Most (1960)、Garnham (1966) らの報告に記載があるが、同時に、従来記載がないと思われる特異な形態 (Figs. 7, 10) をも認めた。

すなわち、おもに Giemsa 染色標本上の形態観察であるが、schizont に達すると、形態はかなり複雑になり、その成熟したものでは、小型で多数の核を有するものと大型で少数の核を有するものがみられた。(以下これらを小型および大型成熟 schizont と呼ぶ) (Figs. 1, 3, 5, 8)。これらの形態についての著者らの観察結果では、小型成熟 schizont は、直径7~8 $\mu$ で、10数個~20数個の核を有し、また、その放出 merozoite は長径1~2 $\mu$ である。一方大型成熟 schizont は、直径10~11 $\mu$ で、核の数はすくなく10個前後であり、本体、核ともに大型である。この核は、schizont 本体の辺縁部に分布する傾向があり、染色色調は、基質が桃色で、中に赤味の濃い部分が認められるいわゆる two tone homogenous であることが特徴的である。schizont の細胞質は、おおむね灰黄色を加えた青色に、ただし周辺はそれよりやや濃い青色に染つてみえる。また、有性世代のそれほど顕著ではないが、黄色を基調とした黒褐色の色素顆粒が細胞質内にみられる。(Figs. 5, 8)。小型および大型成熟 schizont の両者が同一赤血球内に混在する場合も、又有性世代の虫体とこれら無性世代の虫体が混在する場合もあつた。

schizont の2型に関する明らかな記載は従来ほとんどなく、わずかに Corradetti & Verolini (1951) が、附図中にそれらしい構造を示しているが、彼等の本文中には、何の説明もない。すなわち彼等は、ただ schizont の2型のみを図示し、わずかに図の説明として、次のよ

うに述べている。“Vari stadi del processo schizogonico in globuli rossi maturi.” また “Vari stadi del processo schizogonico in eritrociti immaturi.” 前文で述べたものは著者らのいう小型 schizont に、また後文で述べたものは、大型 schizont に類似していた。こうした schizont に2型の生ずる現象は、宿主細胞に原因があるのか、専ら虫体側だけの問題なのか、目下のところ全く明らかにされていない。

Yoeli & Most (1960) は、schizont に関して、growth form と larger growth form の2型を図示したが、これは、虫体の株によつては、schizont が大型化することを示したもので、著者らの述べたような同一株内の2型を意味したものではない。なお、この報告でも、両型の存在を示しただけでそれ以上の説明はしていない。

小型成熟 schizont は、我々の観察では、やがて通常の merozoite を放出すると思われる。これは、Figs. 2, 4 でみられるような像が顕微鏡標本上でとらえられているばかりでなく、小型成熟 schizont および、その内部の merozoite の形態学的特徴、それに、schizont 内形成 merozoite 数など、すべて従来の記載に全くよく一致しているからである (Vincke, 1954; Yoeli & Most, 1960; Garnham, 1966)。つまり、この schizont が通常認められているタイプのものであろう。

大型成熟 schizont の場合にも merozoite の放出寸前を思わせる像 (Figs. 6, 9) を観察し、かつそれら内部 merozoite と、形態上極めて良く似た長径4~5 $\mu$ の遊離の大型 merozoite 様体も血液中にみられたので (Figs. 7, 10)、おそらく、後者は、大型成熟 schizont から由来したものであり、やはりこの場合にも merozoite 形成類似の過程があつたものと想像している。この大型 merozoite 様体については、現在までに報告がないようで、本報が初めての記載と思われる。その形態は、球状または洋梨状であり、大型成熟 schizont でみられたと同様に、核は大型であり、また two tone homogenous な染りを示し、さらに細胞質の辺縁部には、黒褐色の色素顆粒がみられた。*in vitro* 培養4時間目の PM 染色でも、虫体の1/3程も占める大型の核が DNA の存在を示して緑色に染まっているのを観察した。

大型 merozoite 様体の形態は、Giemsa 染色標本で精査したところ、Garnham (1966) の成書に述べられている *P. berghei* の生殖母体にも類似した特徴を示すように思われた。即ち、濃い色素顆粒を持つが、その色は黄金色で黒褐色が混じること、核は細胞質の辺縁部に偏在

性で内外2部分(外部は桃色, 内部は同色でさらに濃染)に染め分けられることなどである。こうした大型 merozoite 様体と有性生殖期との関連, その後の運命などについては現在全く不明であり, 今後の検討にまたねばならない。

*in vitro* 培養材料に対するコントロールとして塗抹標本をつくつた感染実験動物の血液内からも, 上述の大型成熟 schizont および大型 merozoite 様体に一致するものが見出された。従つて, これらの特異な形態は, *in vitro* 培養にともなつて特に出現するものとは考えられない。

Vincke (1954) は, blood passage を繰り返すと, 有性世代の形態が無性世代のそれと区別しにくくなるので, 有性世代の研究のためには, 分離したての strain を用いることをすすめて, Garnham (1966) も, Vincke (1963) の研究結果を引用し, 長期にわたる blood passage による無性世代の monstrous な増殖と有性生殖力の衰退を指摘している。我々の場合も, 約2年半にわたり, 蚊を仲介とせず, 一定間隔でマウスおよび golden hamster に継代してきたもので, 大型 merozoite 様体の出現が, こうした長期継代と全く関係がないとはいへない。この点も今後の研究に待ちたい。

### 結 語

*Plasmodium berghei* 感染 golden hamster の赤内型虫体を用いて, 簡易な24時間培養の経過を観察中, 通常の成熟 schizont に比し大型な成熟 schizont およびそれから放出されたと思われる大型 merozoite 様体を見出した。その後, これらの形態は, 培養と関係なく, 感染動物の血液内でも, 普通に見出されることが明らかになつてきた。

Giemsa 染色による大型成熟 schizont の特徴は, 大きさ直径10~11 $\mu$ , 核数約10, 核は細胞質の辺縁部に位置し, 核の色調は, 桃色で内部に赤染部あり (two tone homogenous), 細胞質の色調は, 辺縁の青色を除き全体灰黄色を加えた青色, 細胞質内色素顆粒の色調は, 黄褐色などである。大型 merozoite 様体の特徴は, 長さ4~5 $\mu$  の洋梨状であるほかは, 大型成熟 schizont のそれに一致した。

以上の諸特徴は, 本種の生殖母体のそれにも酷似しているが, 有性生殖期との関係を含めて, これらの本態については現在全く不明である。

本研究に関し, 御指導下さつた国立予防衛生研究所寄生虫部の石崎達部長および同部の諸先生方, 並びに, 新

潟大学医学部大鶴正満教授に深謝いたします。また培養技術につき多大の御援助をいただいた国立予防衛生研究所ウイルス・リケッチャ部の奥村秀夫先生, 並びに同部の諸先生方にも厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Ball, E. G., Anfinsen, C. B., Geiman, Q. M., McKee, R. W. and Ormsbee, R. A. (1945) : In vitro growth and multiplication of malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. Science, 101, 542-544.
- 2) Butcher, G. A. and Cohen, S. (1971) : Short-term culture of *Plasmodium knowlesi*. Parasit., 62, 309-320.
- 3) Corradetti, A. and Verolini, F. (1951) : Relazioni tra *Plasmodium berghei* e cellule della serie rossa durante l'attacco primario nel ratto albino. Rivista di Parassitologia, 12, 69-84.
- 4) Garnham, P. C. C. (1966) : Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Sci. Pub., Oxford.
- 5) Geiman, Q. M., Anfinsen, C. B., McKee, R. W., Ormsbee, R. A. and Ball, E. G. (1946) : Studies on malarial parasites. VII. Methods and techniques for cultivation. J. Exp. Med., 84, 583-606.
- 6) Trigg, P. I. (1968) : A new continuous perfusion technique for the cultivation of malaria parasite in vitro. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 62, 371-378.
- 7) Trigg, P. I. (1969) : Some factors affecting the cultivation in vitro of the erythrocytic stages of *Plasmodium knowlesi*. Parasit., 59, 915-924.
- 8) Trigg, P. I. and Gutteridge, W. E. (1971) : A minimal medium for the growth of *Plasmodium knowlesi* in dilution cultures. Parasit., 62, 113-123.
- 9) Vincke, I. H. (1954) : Natural history of *Plasmodium berghei*. Indian J. Malariol., 8, 245-256.
- 10) Vincke, I. H. (1963) : Le paludisme des rongeurs en Afrique. Proc. 7th. Int. Congr. Trop. Med. Malar., Rio de Janeiro. (Quoted from Garnham, P. C. C., 1966)
- 11) Yoeli, M. and Most, H. (1960) : The biology of a newly isolated strain of *Plasmodium berghei* in a rodent host and in experimental mosquito vectors. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 54, 549-555.

**Abstract**

THE PECULIAR FORMS FOUND IN THE COURSE OF THE  
DEVELOPMENT OF *PLASMODIUM BERGHEI*

Takatoshi KOBAYAKAWA, Tsutomu KOYAMA and Mitsuyoshi KUMADA  
(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo 141)

In the course of a simple in vitro cultivation of the erythrocytic stage-parasites obtained from golden hamsters infected with *Plasmodium berghei* (Yoeli-NK 65 strain), the larger mature schizonts and the larger merozoite-like organisms (Figs. 5-10) than those so far described (Figs. 1-4) were found. They were detected also in the blood of golden hamsters and mice infected with the parasites.

In this observation, the Harvard medium simplified by Trigg & Gutteridge (1971) was used as a culture medium, and the petri dish made in Falcon Plastics Comp. as a culture vessel. The other culture techniques were based mainly upon them. The smear preparations of the cultivated parasites stained with Giemsa's solution were microscopically investigated.

Characteristics of the large-sized mature schizonts are as follows: 10-11  $\mu$  in diameter, about ten large nuclei which locate in the periphery of the body and have pinkish colour with red in the inner part ("two tone homogenous nuclei"), the yellowish blue cytoplasm with bluish peripheral zone and the yellowish brown pigment granules in the cytoplasm (Figs. 5-6, 8-9).

Characteristics of the large-sized merozoite-like organisms are very similar to those of the large-sized mature schizont except the size (4-5  $\mu$  in length) and the pear-like shape (Figs. 7, 10).

Both forms closely resemble also to the gametocytes of this species on the property of having "two tone homogenous nuclei", yellowish brown pigment granules and others.

These peculiar organisms have hardly been known apart from the report of Corradetti & Verolini (1951) in which they illustrated the parasites suggestive of such schizont and merozoite-like organism. The morphological features of such peculiar forms, the real nature of which must be left for a future study, have been described in detail in the present paper.

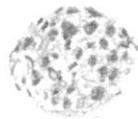
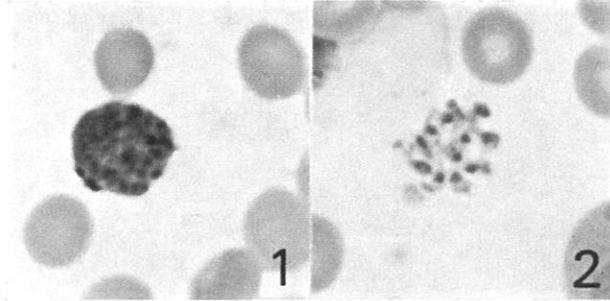
#### Mxplanation of Figures

Figs. 1-3, 5, 6, 8-10 represent the parasites obtained from the blood of golden hamster infected with *Plasmodium berghei* (Yoeli-NK 65 strain).

Figs. 4, 7 represent the parasites from the blood of the infected mouse.

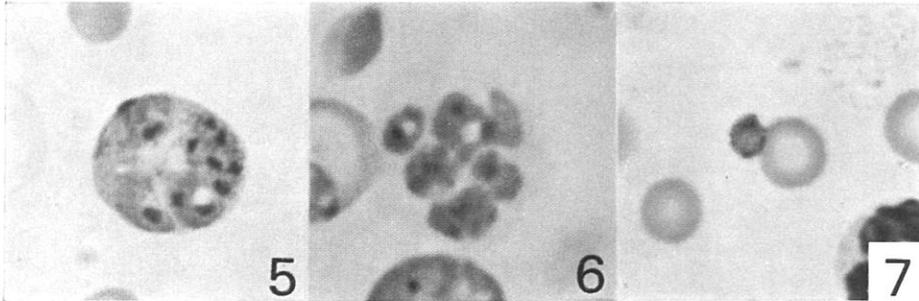
All figures were obtained from Giemsa-stained microscopic slides.

Fig. 1. A mature schizont previously described. Fig. 2. The merozoites released from a mature schizont previously described. Fig. 3. The sketch of the parasite in the same stage that is shown in Fig. 1. Fig. 4. The sketch of the parasites in the same stage that is shown in Fig. 2. Fig. 5. A large mature schizont. Fig. 6. The large merozoite-like organisms in a host cell. Fig. 7. A released large merozoite-like organism. Fig. 8. The sketch of the same parasite that is shown in Fig. 5. Fig. 9. The sketch of the same parasites that is shown in Fig. 6. Fig. 10. The sketcl of the parasites in the same stage that is shown in Fig. 7.



3

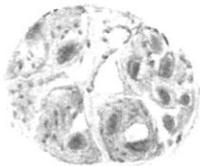
4



5

6

7



8

9

10

