

トキソプラズマ・オーシストに関する研究

I. 低温および乾燥に対する抵抗性について

山 浦 常

東京女子医科大学寄生虫学教室

(昭和50年12月25日 受領)

緒 言

Toxoplasma gondii (以下 Tp と略す) が、ネコのコクシジウム的一种と同定されて以来 (Kühn und Weiland, 1969; Hutchison *et al.*, 1970; Frenkel *et al.*, 1970), その生物学的性状, 疫学, 病原性等々に関する報告は, 枚挙にいとまがない。

ネコの糞便中に排泄される, Tp オーシストの抵抗性は非常に強く, 屋外に46~76日間放置したり, ペプシンなどの消化酵素を1時間作用させても, 感染力は失なわれない (Yilmaz and Hopkins, 1972; Dubey *et al.*, 1970)。

またこのように強い抵抗性を有するオーシストは, 汚染地域や養豚場付近の土壤からも検出され (Ruiz *et al.* 1973; 伊藤ら, 1974), 我国では, 1%前後のネコがオーシストを自然排泄していることも報告されている (Werner and Walton, 1972; Ito *et al.*, 1974; 山浦ら, 1975a)。

これらのことから, 自然界に広く存在すると考えられるオーシストが, Tp 症の重要な感染源として注目されてきた。しかしながら, 今日までに Tp オーシストの低温および乾燥に対する抵抗性に関する報告は, 数少ない。一般に, コクシジウム類のオーシストが, 凍結および乾燥に対して抵抗性の弱いことは知られており (Schneider *et al.*, 1972), Tp オーシストについてもこれらと同様なことが考えられる。

これらの見地から, 著者は Tp オーシストの低温および乾燥に対する抵抗性について実験を行なつたので報告する。

実験材料および方法

オーシストの採取に使用した Tp は, 当教室において, ネコからオーシストとして分離された NO1 株 (山

浦ら, 1975a) と 東京大学医科学研究所から分与された, Fukaya 株であつた。

1. オーシスト: オーシストの採取方法は, 山浦ら (1975b) の報告に準じて行なわれた。

NO1 株と Fukaya 株を投与4日目のネコ (体重380~450g) から得た糞便に, それぞれ適当量の水道水を加えて, カユ状とした後で二重の金網 (50および100メッシュ) で濾過した。濾液は2,000rpm 5分間で3回遠沈洗浄をくり返し, 沈渣に少量の水道水を加えて攪拌, さらに10倍量の2%重クローム酸カリ溶液を加えた。

このようにして作成した両株のオーシスト浮游液は, 直径9cm, 高さ2cm のシャーレに液の深さが4~5mm になるように入れて25C で培養した。実験には培養直前-0時間 (A), 15時間目 (B) および24時間目 (C) のスポロゾイトが未形成のオーシスト (以下孢子未形成オーシストと記す) と, 72時間培養し, ほとんどのオーシストが Sporogony を完了したもの (以下孢子形成オーシストと記す) を使用した。Table 1 に示した, オーシスト発育の各時期は, 山浦ら (1975b) の報告に準じた。

2. 実験方法

1) 低温に対する抵抗性: 実験は, NO1 株と Fukaya 株の孢子未形成オーシストおよび孢子形成オーシストについて実施した。

温度条件は, $4 \pm 2 C$, $-5 \pm 3 C$, $-20 \pm 2 C$ および $-80 \pm 2 C$ で, 対照のそれは25C とした。前述したオーシストをそれぞれ直径4.5cm, 高さ1.5cm のシャーレに液の深さが4~5mm になるように入れて, 所定期間, 各温度で処理した。フタをしたシャーレの周囲をビニールテープで封じて水分の蒸発を防いだ。

各条件によつて処理されたオーシストの生死判定は, 孢子未形成オーシストについては, 25C で3日間培養による, 孢子形成の有無によつておこない, また孢子形

Table 1 Development of *Toxoplasma* oocysts following incubation in 2% potassium dichromate at 25C

Incubation time (hr)	Strain	% Oocysts at stage of.....			
		Sporont	Sporoblast	Sporocyst	Sporozoite
0	NO 1	100			
	Fukaya	100			
12	NO 1	100			
	Fukaya	100			
15	NO 1	54	46		
	Fukaya	57	43		
24	NO 1	18	51	31	
	Fukaya	21	55	24	
30	NO 1	11	38	49	2
	Fukaya	14	41	44	1
72	NO 1	10	2	5	83
	Fukaya	13	6	8	73

成オーシストでは、水道水を加えて、2,000rpm 5分間5回遠沈洗浄後、その沈渣に再び水道水を加えて、NO 1株は8,000個/0.1ml, Fukaya 株では12,000個/0.1mlになるよう調整し、各々3匹のマウスに経口投与し、感染性の有無によつて行なつた。Tp 感染の有無は、4週間以内に死亡したマウスは、腸間膜リンパ節、肺についてTp 原虫の有無を調べた。4週間生存したマウスは、その血清について dye test (小林ら, 1967)を行ないTp 抗体の有無を調べ、脳内シストの検索も実施した。

2) 乾燥に対する抵抗性：実験は、NO 1およびFukaya 両株の胞子形成オーシストについて実施した。1 ml 中500個のオーシストを含む様調整した浮游液0.1 ml を、長さ10cm, 径2 cm の試験管に分注した。これを、1,500rpm 3分間で遠沈し、上清を1 cm×0.5cm の濾紙で吸収除去して各湿度条件下に放置した。湿度条件は25C の温度でデシケーター中に水および硫酸ナトリウム(Na₂SO₄)、礮化ナトリウム(NaBr・2H₂O)、炭酸カリウム(K₂CO₃・2H₂O)、酢酸カリウム(CH₃COOK)、

の各飽和塩類溶液を入れて作成した。これらの相対湿度を、エース鋭感湿度計で測定したところ、それぞれ98%、82%、58%、43%、21%を示した。

オーシストの生死は、各試験管に1 ml の水道水を加えて、1日放置した浮游液の0.2ml をそれぞれ3匹のマウスに経口投与して、感染性の有無によつて判定した。

実験結果

1. 低温に対する抵抗性

1) 胞子未形成オーシスト：実験結果は、Table 2 および3に示した。

4C において30日処理した場合、NO 1株のA (培養直前-0時間)のものでは21%、B (15時間培養)では22%そしてC (24時間培養)のオーシストでは34%の胞子形成率を示し、Fukaya 株のそれでは、それぞれ18%、19%、28%とやや低値を示した。60日間処理した場合、A、B、C のオーシストは、NO 1株ではそれぞれ8%、9%、18%が、そしてFukaya 株では、3%、7%、12%が

Table 2 Effects of a low temperature (4C) on oocyst sporulation

Strain	Pre-incubation time at 25C before exposure (hr)	Rate of sporulation of immature oocysts exposed to 4C for days of.....						
		1	7	14	30	60	90	120
NO 1	A (0)	80%	59%	42%	21%	8%	0%	0%
	B (15)	81%	57%	39%	22%	9%	0%	0%
	C (24)	82%	64%	47%	34%	18%	4%	0%
Fukaya	A (0)	69%	51%	35%	18%	3%	0%	0%
	B (15)	70%	51%	34%	19%	7%	0%	0%
	C (24)	73%	59%	43%	28%	12%	0%	0%

Samples were cultured at 25C for 3 days after exposure.

Table 3 Effects of lower temperatures (-5C, -20C, -80C) on oocyst sporulation

Strain	Pre-incubation time at 25C before exposure (hr)	Rate of sporulation of immature oocysts exposed to lower temperatures for days of.....								
		-5C				-20C			-80C	
		1	7	14	30	1	7	14	1	7
NO 1	A (0)	46%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	B (15)	48%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	C (24)	55%	19%	5%	0%	13%	0%	0%	0%	0%
Fukaya	A (0)	41%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	B (15)	40%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
	C (24)	46%	11%	0%	0%	8%	0%	0%	0%	0%

Samples were cultured at 25C for 3 days after exposure.

処理後の培養で孢子形成可能であつた。90日間処理した場合、NO1株のAおよびB、Fukaya株では全てのオーシストが孢子形成を阻止され、NO1株のCだけが4%の孢子形成率を示した。120日の処理では、全てのオーシストが死滅した。

-5C, 7日処理の場合、NO1株のA, B, Cのオーシストは、それぞれ8%、4%、19%そしてFukaya株では、4%、3%、11%の孢子形成率を示したが、14日の処理では、NO1株のA, BとFukaya株の全てのオーシストは、孢子形成能力を失なつた。しかし、NO1株のCでは5%のオーシストが孢子形成可能で、それは30日の処理で死滅した。

-20Cでは、NO1株とFukaya株のAおよびBは、1日の処理で孢子形成を阻止され、両株のCのみが、各々13%、8%の孢子形成率を示した。7日の処理では、

全てのオーシストが死滅した。-80Cでは、両株の全てのオーシストが1日以上処理で死滅した。

両株の対照のオーシストは、Table 1に示した如く、25Cにおける72時間の培養で、それぞれ、83%、73%の孢子形成率を示した。

2) 孢子形成オーシスト: 実験結果は、Table 4に示した。

NO1株およびFukaya株とも-5Cで40日処理した場合、全例の投与マウスが、それぞれ12~18日、13~15日後に死亡して、Tp原虫が証明された。120日の処理では、オーシストを投与したマウスは全例4週間生存したが、剖検の結果、脳からTpのシストが検出された。

-20Cの場合、両株とも14日の処理では、これらの投与によりマウスは10~16日後に死亡し、Tp原虫が証明された。40日の処理では、全例のマウスが生存し、3

Table 4 Effects of lower temperatures on the infectivity of sporulated oocysts to mice

Strain	Temperature	Days of survival of mice inoculated with sporulated oocysts that had been exposed to lower temperatures for.....											
		1	14	20	30	40	60	120days					
NO 1	-5C	8. 8. 9	8. 8. 9	8. 8. 10	8. 9. 10	12. 14. 18	16. 18. +	+. +. +					
	-20C	8. 9. 10	10. 10. 14	+. +. +	+. +. +	+. +. -	-. -. -	N.D.					
	-80C	+. +. +	+. -. -	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.	N.D.					
	25C	7. 8. 9	7. 8. 8	6. 7. 9	8. 8. 8	9. 10. 10	9. 10. 12	10. 11. 12					
Fukaya	-5C	N.D.	8. 9. 9	N.D.	10. 11. 13	13. 15. 15	18. +. +	+. +. +					
	-20C	N.D.	10. 12. 16	N.D.	+. +. +	+. -. -	-. -. -	N.D.					
	-80C	+. +. +	N.D.	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.	N.D.					
	25C	8. 9. 10	8. 9. 9	9. 10. 11	10. 11. 11	10. 11. 12	11. 12. 12	10. 11. 13					

+ : Infected mice survived and *Toxoplasma* was detected.
 - : Infected mice survived and *Toxoplasma* was not detected.
 N.D. : Not done.

Table 5 Effects of dryness on the infectivity of sporulated oocysts to mice

Relative humidity (%)	Strain	Detection of <i>Toxoplasma</i> from mice inoculated with sporulated oocysts that had been treated under different humidity for days of.....				
		3	7	14	30	60
98	NO 1	+. +. +	+. +. +	+. +. +	+. +. +	+. +. +
	Fukaya	+. +. +	+. +. +	+. +. +	+. +. +	+. +. +
82	NO 1	+. +. +	+. +. +	+. +. +	-. -. -	-. -. -
	Fukaya	+. +. +	+. +. +	+. -. -	-. -. -	-. -. -
58	NO 1	+. +. +	+. +. +	+. -. -	-. -. -	-. -. -
	Fukaya	+. +. +	+. +. +	-. -. -	-. -. -	-. -. -
43	NO 1	+. -. -	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.
	Fukaya	-. -. -	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.
21	NO 1	-. -. -	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.
	Fukaya	-. -. -	-. -. -	-. -. -	N.D.	N.D.

+ : *Toxoplasma* was detected from inoculated mice.

- : *Toxoplasma* was not detected from inoculated mice.

N.D. : Not done.

例から Tp 原虫が検出された。

60日処理の場合、全例のマウスが生存、Dye test 陰性で、Tp 原虫も検出されなかつた。-80C の場合、7日および14日の処理でも、投与マウスは全例生存したが、Tp 原虫が検出され、20日の処理で、Dye test, Tp とも陰性となつた。なお25C では、全期間を通じて全例の投与マウスが NO 1 株では7~12日、Fukaya 株では8~13日後に死亡して Tp 原虫が証明された。

2. 乾燥に対する抵抗性：結果は、Table 5 に示した。相対湿度98%では、両株とも60日の曝露で、オーシスト投与マウス全例から Tp 原虫が証明された。82%で、両株とも14日の曝露でそれぞれ全例、3例中1例の投与マウスから Tp 原虫が検出され、30日では両株の各オーシストは、感染性を失なつた。58%では、両株とも7日の曝露で Tp が検出された。しかし、14日の曝露では、NO 1 株を投与したマウス3例中1例から Tp 原虫が検出され、30日ではオーシストの感染性は消失した。

43%では、3日の曝露で NO 1 株投与マウスの3例中1例のみが Tp 陽性であつた。しかし、NO 1 株のオーシストも7日の曝露では感染性を失なつた。21%では、両株のオーシストとも、はやくも3日の曝露で感染性を失なつた。

考 察

一般に、人の Tp 抗体保有率は、高温多湿地域に高く、寒冷乾燥地域に低いことは知られている。また、Tp オーシストの孢子形成温度については、多くの研究者によつて報告され (Weiland und Kühn, 1970; Frenkel *et al.*, 1970; Witte und Piekarski, 1970),

屋外、特に日陰に放置したオーシストの抵抗性は強いことも報告されている (Yilmaz and Hopins, 1972)。

オーシストが孢子形成を完了するためには、28~11C の温度と適度の水分が必要なことはすでに明らかであるが、さらに検討の結果8C以下の温度では孢子形成は進行しないが、そのまま長期間放置した後でも、適温にもどすと孢子形成が認められるという事実をつきとめた (山浦, 未発表)。従つて温度と水分の関係をさらに明らかにするために、Tp オーシストの低温および乾燥に対する抵抗性について検討した。

コクシジウム類のオーシストの低温条件に対する抵抗性については、今日までに多数の報告が認められ、それは Schneider *et al.* (1972) の総説によつて紹介されている。それによると、*Eimeria tenella* のオーシストは、-12~-20C では96時間で死滅し、4C では、4週間の処理でも孢子形成が可能である。

湿度条件については、*E. tenella* は38~39.5C, 50~60%の湿度では21日で死滅し、*E. zuerni* では13~30C, 25%の湿度で、2~12日でもオーシストの孢子形成率が低下する。

また、西川ら(1973)も、ネコの *Isospora rivolta* のオーシストは-20C, 1日以上感作で孢子形成が阻止されたと報告している。

これらの報告の如く、死滅した孢子未形成オーシストは適温で培養しても、孢子形成を行なわないため、従来オーシストの生死判定はこれを利用して行なわれている。著者は、孢子未形成オーシストについてはこれに準じ、孢子形成オーシストではマウスに投与し、感染性の有無によつて判定した。両オーシストの生死判定の基準

は厳密には同一ではないが、前述のことを考えると、生死判定はほぼ確実である。その結果、培養直前—0時間目の孢子未形成オーシストは、これらの報告および Frenkel and Dubey (1973) の Tp オーシストについての報告と同様に、凍結に対して抵抗性の弱いことが認められた。しかし、4Cでは、60日の処理でも孢子形成が可能で *E. tenella* のそれより長期間にわたる処理でも強い抵抗性を示した。

孢子形成オーシストの低温に対する抵抗性は、-20Cで40日、-80Cでは14日の処理でも感染性を保持しており、-5Cではさらに120日の長期にわたる処理でも感染性を保持していた。Hutchison *et al.* (1968) は、Tpの孢子形成オーシストは-10Cで1週間、Frenkel and Dubey らは、-6Cおよび-21Cでは28日の処理でも感染性を保持していたと報告している。

著者の実験結果とこれらの報告を比較すると、Frenkel and Dubey らの報告と同様に、孢子形成オーシストは、孢子未形成オーシストに比べて強い抵抗性が認められたが、その感染性はさらに長期におよぶことも確認された。しかし、同じ孢子未形成オーシストでも、24時間培養して孢子形成オーシストに近づいたオーシストCでは、培養0時間目のAおよび15時間目のBのオーシストより強い抵抗性が認められた。この原因として、オーシストの培養が15時間以内では Sporocyst 期のオーシストが出現せず、24時間目で出現するため (Table 1)、これが強い抵抗性を示すものと思われた。NO1株と Fukaya 株の比較では、NO1株に若干強い抵抗性が認められた。

乾燥に対する孢子形成オーシストの抵抗性は、Dubey *et al.* (1970)、大島ら (1975) によつて報告されている。Dubey らによれば相対湿度37.1%では3日で感染性を失なうが、58.3%および80.5%では7日でも感染性を保持することが報告されている。今回の結果では、21%では3日で感染性を失なうが、43%では3日、58%および82%では14日の曝露でも感染性を保持しており、Dubey らの報告に比べて、若干強い抵抗性が認められた。

このように、Tp オーシストも他のコクシジウムのオーシストと同様に乾燥に弱いことが確認された。

以上の結果から、Tp オーシストは乾燥に弱く、又孢子未形成オーシストは、凍結に対しては弱いが、4Cの如き低温では強い抵抗性を示すことが判明した。孢子形成オーシストは、日本の冬期のような低温条件でも、その感染性はさらに長期におよぶことも確認され、Tp 症

の感染源として、重要と思われた。

結 論

1. Tp 症の疫学的見地から、オーシストの低温および乾燥に対する抵抗性について実験した。実験には、NO1株と Fukaya 株のオーシストを使用した。

2. 孢子未形成オーシストの低温(4C, -5C, -20C, -80C)に対する抵抗性は、培養直前—0時間(A)と15時間(B)培養したオーシスト間では差は認められないが、これらに比べ培養24時間目(C)のオーシストは抵抗性が認められた。

特に、4Cで90日間処理した場合、AおよびBのオーシストでは両方とも、孢子形成が阻止されたのに反して、NO1株のCのオーシストは、4%の孢子形成率を示した。又、-5Cにおける14日の処理でも、AおよびBでは両株とも孢子形成が不可能であつたが、NO1株のCでは、処理後の培養で5%のオーシストが孢子形成可能であつた。

3. 孢子形成オーシストは、-80Cで20日、-20Cでは60日の処理でマウスに対する感染性を失なつたのに反し、-5Cでは120日の処理でも感染性を保持しており、全体として孢子未形成オーシストに比べて強い抵抗性が認められた。

4. 乾燥に対する抵抗性は、相対湿度98%~58%では、60日~14日の曝露でもマウスに対する感染性を保持したが、それ以下の湿度、すなわち43%、21%では、各々7日、3日の曝露で感染性を失なつた。

稿を終えるに当り、御指導御校閲を賜りました本学寄生虫学教室白坂龍曠教授、種々御援助をいただいた松本克彦助教授、和田芳武講師および教室員各位に感謝致します。

(本論文の要旨は、第35回日本寄生虫学会東日本大会に於て発表した)。

文 献

- 1) Dubey, J. P., Miller, N. L. and Frenkel, J. K. (1970): Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.*, 56, 447-456.
- 2) Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L. (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167, 893-896.
- 3) Frenkel, J. K. and Dubey, J. P. (1973): Effects of freezing on the viability of *Toxoplasma* oocysts. *J. Parasit.*, 59, 587-588.

- 4) Hutchison, W. M., Dunachie, J. F. and Work, K. (1968) : The fecal transmission of *Toxoplasma gondii*. Acta. Path. Microbiol. Scand., 74, 462-464.
- 5) Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. C. and Work, K. (1970) : Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. Med. J., 5689, 142-144.
- 6) Ito, S., Tsunoda, K., Nishikawa, H. and Matsui, T. (1974) : Small type of *Isospora bigemina*: Isolation from naturally infected cats and relations with *Toxoplasma* oocyst. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 14, 137-144.
- 7) 伊藤進午・角田清・飯田辰夫・佐々木栄英・提可提・松井利博・西川洋昭(1974) : オーシスト感染による豚トキソプラズマ病の集団発生について. 第34回日本寄生虫学会東日本大会講演要旨, 24頁.
- 8) 小林昭夫・熊田三由・常松之典(1967) : トキソプラズマ色素試験の基準化に関する研究 (1) 反応に及ぼす抗凝固剤の影響. 寄生虫誌, 16, 494-503.
- 9) Kühn, D. und Weiland, G. (1969) : Experimentelle *Toxoplasma*-infektionen bei der Katze. I. Wiederholte Übertragung von *Toxoplasma gondii* durch Kot von mit Nematoden infizierten Katzen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 82, 401-404.
- 10) 大島慧・星野光夫・小林昭夫・西川洋昭(1975) : トキソプラズマ・オーシストの乾燥, 温度に対する抵抗性. 寄生虫誌, 24巻(増刊号), 75頁.
- 11) 西川洋昭・伊藤進午・角田清・松井利博(1972) : ネコの *Isospora rivolta* の Sporogony およびそれに及ぼす温度感作の影響について. 第73回日本獣医学会講演要旨, 95頁.
- 12) Ruiz, A., Frenkel, J. K. and Cerdas, L. (1973) : Isolation of *Toxoplasma* from soil. J. Parasit., 59, 204-206.
- 13) Schneider, D., Ayeni, A. O. und Dürr, U. (1972) : Zur physikalischen Resistenz der Kokzidienoocysten: Dtsch. Tierärztl. Wschr., 79, 545-572, 613-636.
- 14) Weiland, G. und Kühn, D. (1970) : Experimentelle *Toxoplasma*-Infektionen bei der Katze. II. Entwicklungsstadien des Parasiten im Darm. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 83, 128-132.
- 15) Werner, J. K. and Walton, B. C. (1972) : Prevalence of naturally occurring *Toxoplasma gondii* infections in cats from U.S. military installations in Japan. J. Parasit., 58, 1148-1150.
- 16) Witte, H. M. und Piekarski, G. (1970) : Die Oocysten-Ausscheidung bei experimentelle Infizierten. Katzen in Abhängigkeit von *Toxoplasma*-stamm. Z. Parasit., 33, 358-360.
- 17) 山浦常・白坂龍曠・松本克彦・石川敬子(1975a) : 東京近辺のネコからの *Toxoplasma* oocyst の分離について. 東女医大誌, 45, 405-409.
- 18) 山浦常・白坂龍曠 (1975b) : トキソプラズマ・オーシストの孢子形成過程の観察. 東女医大誌, 45, 531-537.
- 19) Yilmaz, S. M. and Hopkins, S. H. (1972) : Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. J. Parasit., 58, 938-939.

Abstract

 STUDIES ON *TOXOPLASMA* OOCYSTS

 I. EFFECTS OF LOW TEMPERATURE AND DRYNESS ON THE
 VIABILITY OF THE OOCYSTS

HISASHI YAMAURA

 (Department of Parasitology, Tokyo Women's Medical College,
 Tokyo, Japan, 162)

Effects of low temperature and dryness on the viability of *Toxoplasma* oocysts were studied. The oocysts used were the "NO 1" and "Fukaya" strains.

Unsporulated oocysts excreted in the infected cat feces were incubated in 2% potassium dichromate at 25 C for 0 hr (A), 15 hrs (B), 24 hrs (C) and 72 hrs (D) to obtain various developmental stages (Table 1).

Oocysts of A, B and C groups were unsporulated and those of D group were sporulated.

After the exposure to each of the experimental conditions, the unsporulated oocysts of A~C groups were cultured at 25 C for 3 days for check of possibility of further growth, and the sporulated oocysts of D group were fed to mice for the evaluation of infectivity. Results obtained were as follows:

1) The unsporulated oocysts of group A of the "NO 1" strain lost their developmental ability after exposure to either 4 C for 90 days, -5 C for 14 days, or -20 C for 1 day. The resistance to those condition of group B was almost the same as that of group A. However, a little higher resistance was shown with the oocysts of group C against such low temperatures. The resistance of unsporulated oocysts of the "Fukaya" strain was found to be slightly lower than that of the "NO 1" strain (Tables 2 and 3).

2) The resistance of the sporulated oocysts to low temperatures were proved to be much higher than that of unsporulated oocysts.

The infectivity was lost by exposure to -20 C for 60 days or -80 C for 20 days, but not by exposure to -5C even for 120 days. There were recognized no appreciable differences in the resistance between the two strains (Table 4).

3) Low humidities were proved to be harmful to *Toxoplasma* oocysts. Under a relative humidity of 82%, the sporulated oocysts lost their infectivity to mice within 30 days. The oocysts exposed to much lower humidities deprived of the infectivity more rapidly. The oocysts kept under 21% humidity completely lost their infectivity to mice after 3 days (Table 5).

No significant differences were observed in the resistance between the two strains.