

Toxoplasma gondii Beverley 株のシスト, 増殖型及び オオシストのマウスに対する病原性

伊藤 義博 楠 禎人 土本 正明 土肥 美代子
古谷 正人 岡 好万 尾崎 文雄

徳島大学医学部寄生虫学教室

(昭和50年7月18日 受領)

ネコ回虫卵による *Toxoplasma gondii* の伝ばを試みた Hutchison (1965) の記録は、従来宿題的存在であつた *T. gondii* の生物学的知識の幾つかに解決の糸口を与えた。その後この部門の研究の急速な進展から *T. gondii* はネコを終宿主とする胞子虫であることが明らかになつた (Hutchison *et al.*, 1968; Work and Hutchison, 1969; Siim *et al.*, 1969; Hutchison *et al.*, 1971)。自然界における生活環の全ぼうはいまだ明らかでないが、マウス-ネコ-マウスの実験的伝達系の中に生活環が完成され (Frenkel *et al.*, 1970)、ネコふん便に排せつされる oocyst は新しい感染型として注目されるに至つた。従来 *T. gondii* の毒力の評価は主として虫体のマウスに対する致死能力、すなわちマウス体内における増殖力の強弱若しくは cyst 形成の有無によつて行われてきたが、これらは株の相違による以外に同一株でもマウス体内の継代維持によつても影響を受けること (Jacobs and Melton, 1954) も考えられる。更に新しく感染型として加えられた oocyst もまたマウスに対して致死感染を起こすことが知られている (Dubey and Frenkel, 1973)。

ここに述べる成績はこのような複雑な問題を整理するため同一株における cyst, cyst 由来原虫 (bradyzoite)、増殖型 (tachyzoite) 及び oocyst のマウスに対する病害度を測定し、更に cyst 及び oocyst を起源とする tachyzoite の腹腔内継代接種による病原性の変化を観察して得られたものである。

材料及び方法

原虫：Beverley (Bv) 株は1967年慶応義塾大学医学部寄生虫学教室から恵与され、マウスに継代し慢性感染状態で維持した。RH 株は1968年大阪市立大学医学部医

動物学教室から恵与され、マウス腹腔内接種で維持したものを使用した。

oocyst は coccidium-free の幼ネコ (2~3カ月齢) に Bv 株感染マウスの脳を与え、約5日後の便から Table 1-a の過程で調整し、2.5% potassium dichromate に浸せきして 25 C で成熟させ、7日後に液を交換して 4 C で保存した。感染マウス腹水中の原虫をすべて tachyzoite として扱い、急性感染では接種後3~5日の腹水から、cyst 及び oocyst 接種の場合は腹水が十分貯留するのを待つて、いずれも腹腔の生理食塩水洗浄液として採取し、遠心及びグラスフィルターを過により宿主細胞を可及的に除いた後実験に供した (Table 1-b)。

cyst は Bv 株慢性感染マウスの脳を軽く磨碎し、アラビアゴム密度勾配遠心法 (中林・本村, 1968) で分離した (Table 1-c)。cyst 由来原虫は分離 cyst を 0.25% trypsin で処理した後、tachyzoite と同様の過程 (Table 1-b) で調整した。

マウス：ddY 系の雌 (22~25g) を用い、1実験群は体重差 1g 前後として、恒温下で固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社 MF) と水道水で飼育した。

感染方法：腹腔内接種は矢追式2段針でマウス左下腹部に、静脈内は 1/4 静脈針で尾静脈にそれぞれ行い、経口は経口投与針で胃内に直接投与した。

病原性の判定：原虫のマウスに対する病原性は接種後60日まで死亡率及び死亡マウスの生存日数により判定した。

結果

1. cyst 及び cyst 由来原虫 (bradyzoite) の病原性
cyst をマウス腹腔内に接種した場合、少数 (1 及び10

Table 1 Preparation procedure of oocysts, cysts and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*

a)	b)
<u>infected cat feces</u>	<u>infected mouse brain</u>
—wash with physiological saline and centrifuge at 100×g for 10 min	—homogenize
sediment	—suspend in Earl's balanced salt solution
—suspend in 35% sucrose solution	—lay over 16 and 24% Arabic-gum solutions
—allow to stand at room temperature for 15 min	—centrifuge at 1,400×g for 30 min
—centrifuge at 1,000×g for 15 min	<u>sediment (cyst)</u>
supernatant	c)
—wash with physiological saline and centrifuge at 100×g for 10 min	<u>infected mouse ascites</u>
sediment	—dilute with Earl's balanced salt solution
—lay over 20% sucrose solution	—centrifuge at 50×g for 10 min
—centrifuge at 1,000×g for 15 min	supernatant
middle layer	—filtrate through glass filter(IKEMOTO No.3)
—wash with physiological saline and centrifuge at 100×g for 10 min	—centrifuge at 250×g for 10 min
<u>sediment (oocyst)</u>	<u>sediment (tachyzoite)</u>

Table 2 Pathogenicity of cysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in mice

	Inoculation dose	Number of mice			Percent death	Days of mean survival of dead mice
		inoculated	infected	died		
Cyst	1	5	5	0	0	
	10	7	7	1	14.3	27
	30	10	10	9	90	12.3±3.0
	50	16	16	12	75	9.6±0.3
Bradyzoite	1	5	5	0	0	
	10	8	8	0	0	
	10 ²	15	15	0	0	
	10 ³	15	15	0	0	
	10 ⁴	15	15	1	6.7	14
	10 ⁵	15	15	1	6.7	48

inoculation route: i.p. ± : standard error

Table 3 Pathogenicity of bradyzoites of *Toxoplasma gondii* in mice

Inoculation dose	Inoculation route	Number of			Percent death	Days of mean survival of dead mice
		inoculated	infected	died		
10 ⁴	i.v.	44	44	7	15.9	14.9±1.8
10 ⁴	subc.	34	34	3	8.8	16.0±2.5
10 ⁴	i.p.	29	29	22	75.9	16.5±4.3

± : standard error

Table 4 Effects of serial passages on pathogenicity of cyst-derived Beverley strain tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in mice

Passage No.	Inoculation dose		Number of mice inoculated		Days of mean survival of dead mice
				died	
1	100	cysts	20	18	18.5±1.7
2	10 ⁵	tachyzoites	10	8	29.5±0.8
3	10 ⁵	"	9	9	15.7±4.3
4	10 ⁴	"	9	9	8.7±0.6
5	10 ⁴	"	12	12	9.2±0.2
6	10 ⁴	"	6	6	10.5±0.4
7	10 ⁴	"	4	4	8.3±0.2
8	10 ⁴	"	5	5	7.8±0.8
9	10 ⁴	"	5	5	8.6±0.8
10	10 ⁴	"	9	9	7.7±0.7

inoculation route: i.p. ± : standard error

Table 5 Comparative pathogenicities of tachyzoites of RH and Beverley strain of *Toxoplasma gondii* in mice

Strain	Inoculation		Number of mice		Percent death	Days of mean survival of dead mice
	dose	route	inoculated	died		
Beverley*	10 ²	i.p.	10	10	100	8.1±0.1
	10 ³	"	10	10	100	7.4±0.3
	10 ⁴	"	10	10	100	6.4±0.3
	10 ⁴	subc.	5	5	100	8.8±0.5
RH	10 ²	i.p.	10	10	100	8.1±0.1
	10 ³	"	10	10	100	7.5±0.2
	10 ⁴	"	10	10	100	6.1±0.1
	10 ⁴	subc.	10	10	100	7.2±0.2

* : tachyzoites of the 18th passage generation

± : standard error

個)では大半が生残し、30及び50個で大半が死亡した (Table 2)。少数個と30個以上による死亡率の間には差異 ($p < 0.01$) が認められた。いずれの場合も生残マウスは発育不全、運動障害を呈し、接種10日後の腹水に生原虫を認め、特に30及び50個投与群では30日後もなお腹水が貯留し、その中に生原虫を観察した。

Bradyzoite 1, 10, 10²及び10³個の腹腔内接種では全例が30日以上生残し、10日の腹水には原虫を認めなかった (Table 2)。生残マウス中無作意に抽出した8匹はすべて cyst を持っていたが、いずれも症状は軽微であった。10⁴及び10⁵個接種では60日以内にそれぞれ1匹ずつ死亡し、生残マウスでは発育不全及び運動障害が強度であった。また10日後の検索でこれらマウスの腹水に多数の原虫を観察した。

Table 3 は bradyzoite の接種経路による病原性の差異を死亡率によつて比較した成績で、腹腔内接種は他経路より病原性が強かつた。

2. bradyzoite の病原性の変化

感染マウスの脳から分離した cyst 100個をマウス腹腔内に接種した成績 (Table 4) では、マウスは12~18日の間に90% (18/20) が死亡した。腹水貯留の最も著しい18日目に採取した原虫 10⁵個/マウスを腹腔内に接種した2代目マウスは27~32日で死亡し、更にその20日目の腹水中の原虫を接種したマウスは7~15日で大半が、40日までに全例が死亡した。以後接種量を 10⁴個/マウスとし、10代目まで観察した結果、生残マウスは得られず、継代を重ねるに従つて生存日数は7~9日に短縮した。

Table 6 Effects of preservation term and temperature on the pathogenicity of *Toxoplasma gondii* in mice

Preservation term	Preservation temperature	Inoculation dose	Number of mice			Percent death	Days of mean survival of dead mice
			inoculated	infected	died		
7 days	4 C	10 ³	10	10	10	100	9.2±0.6
7 days	25 C	10 ³	10	10	9	90	9.8±0.6
7 days	30 C	10 ³	10	10	9	90	9.7±0.7
7 days	37 C	10 ³	10	10	9	90	11.8±1.9
6 months	4 C	10	10	10	4	40	19.3±2.5
6 months	4 C	10 ²	10	10	8	80	17.3±3.0
6 months	4 C	10 ³	10	10	10	100	10.5±0.4
6 months	4 C	10 ⁴	10	10	10	100	7.8±0.8

preservation medium : 2.5% potassium dichromate
± : standard error

inoculation route : per os

Table 7 Effects of inoculation route on the pathogenicity of oocysts of *Toxoplasma gondii* in mice

Inoculation route	Inoculation dose	Number of mice			Percent death	Days of mean survival of dead mice
		inoculated	infected	died		
per os	10	10	4	4	40	14.0
	10 ²	10	8	8	80	11.4±1.2
	10 ³	10	10	10	100	9.9±0.7
	10 ⁴	10	10	10	100	7.5±0.8
i. p.	10	10	10	3	30	17.7±1.9
	10 ²	10	10	3	30	13.3±0.5
	10 ³	10	10	6	60	12.6±1.3
	10 ⁴	10	10	6	60	11.7±0.7

preservation medium : 2.5% potassium dichromate at 4 C for 10 days
± : standard error

Table 8 Pathogenicity of small number of oocysts of *Toxoplasma gondii* in mice

Inoculation dose	Number of mice			Percent death	Days of mean survival of dead mice
	inoculated	infected	died		
1	7	7	5	71.4	14.5±0.9
2	4	4	4	100	15.0±0.7
3	3	3	1	33.3	21.0±5.7
4	2	2	2	100	21.5±2.3
5	1	1	1	100	32

preservation medium : 2.5% potassium dichromate at 4 C for 10 days
inoculation route : per os ± : standard error

なお18代目原虫とRH(強毒)株原虫について死亡率、生存日数から病原性を比較した成績 (Table 5) では、死亡率はほぼ同等で、皮下接種の場合の生存日数はBv株18代目 thczyzoite が有意 ($p < 0.05$) に延長していた。

3. oocyst の病原性

Bv 株成熟 oocyst の病原性について、まず oocyst の保存温度及び期間の影響を Table 6 に示した。2.5% potassium dichromate 中7日間 4, 25, 30及び37Cで

Table 9 Effects of serial passages on the pathogenicity of oocyst-derived tachyzoites of *Toxoplasma gondii* in mice

Passage No.	Inoculation dose		Number of mice			Percent death	Days of mean survival of dead mice
			inoculated	infected	died		
2	10 ²	tachyzoites	15	15	1	7.8	20
	10 ³	"	14	14	0	0	
	10 ⁴	"	15	15	3	20	23.0±2.6
	10 ⁵	"	15	15	2	13.3	21.5±0.4
7	10 ²	"	10	10	9	90	10.9±0.6
	10 ³	"	10	10	9	90	10.0±0.6
	10 ⁴	"	10	10	10	100	8.3±0.5
	10 ⁵	"	10	10	10	100	7
19	10 ²	"	10	10	10	100	8.8±0.1
	10 ³	"	10	10	10	100	8.4±0.2
	10 ⁴	"	10	10	10	100	6.6±0.2
	10 ⁵	"	10	10	10	100	5.8±0.3

inoculation route : i.p.

± : standard error

保存した場合、死亡率には大差を認めず、生存日数は4 Cと37 Cとの間に差 ($p < 0.01$)が見られ、37 C保存でやや病原性が減弱した。なお4 C長期保存(6カ月)と7日間保存との間には有意差を認めなかつた (Table 6)。

4 Cで10日間保存した成熟 oocyst を経口及び腹腔内接種で比較した結果は、Table 7のとおり前者の方が高い病原性を示し、10個以上の接種で死亡率及び生存日数に有意差 ($p < 0.05$)を認めた。また oocyst 10³個経口投与と Bv 株18代目 tachyzoite 10⁴個の腹腔内接種(本実験で病原性を最も高く表した両接種経路)を比較した場合、死亡率は同等であつたが、生存日数は oocyst 投与群が長く、有意差 ($p < 0.05$)を認めた。

oocyst 1~5個の少数経口投与の実験成績は Table 8に示した。すなわち oocyst は1個でもマウスを感染死させる能力があり、死亡マウスの腹水、肝、脾及びリンパ節から原虫を検出し、生残マウスは赤血球凝集反応試験及び脳内 cyst の検索で感染を確認した。

4. oocyst 由来の tachyzoite の病原性の変化

cyst の場合に準じて oocyst の腹腔内接種マウスの腹水から tachyzoite を集め、その継代による病原性の変化を検討した。その結果 Table 9 に示すように、2代目では10²、10³、10⁴及び10⁵接種でいずれもマウスの大半が生残し病原性は低かつたが、7代目では10²及び10³個でそれぞれ90% (9/10)が死亡し、19代目になるといづれの投与量でも生残マウスは得られなかつた。

考 察

T. gondii の病原性は株によつて差のあることが多くの研究者から指摘されている。この多様性の理由は明らかでないが、一般に株の病原性は分離された動物に依存し、ヒトからの分離株は強毒で、他の不顕性感染の動物から得た原虫は弱毒であると言われている (Jacobs and Melton, 1954)。また実験室におけるマウスによる継代維持は一般に毒力を増加させ (Jacobs and Melton, 1954)、腹腔内継代が株の生物学的性状を変える可能性も示唆された (Dubey and Frenkel, 1973)。しかし RH 株の場合は初代からマウスに対し強毒的に働いた報告 (Sabin, 1941) もあり、株本来の性状も否定できない。更に RH 株については維持者により病原性に関する見解が異なり (山森, 1972)、使用マウスの系統によつても *Toxoplasma* 感受性の差異が認められている (新里, 1968)。このような株相互間の病原性の相違と継代による病原性の変化はしばしば認められている。したがつて感染死若しくは感染を指標とした動物実験において多くの支障がもたらされる。

我々はこれらの条件を整理するためマウスの系統及び原虫の株を規定して、生活環において cyst, tachyzoite 及び oocyst の病原性を比較し、更に cyst 及び oocyst から tachyzoite への移行による病原性の変化を観察した。

cyst の病原性：従来弱毒と言われた Bv 株の cyst が比較的高い病原性を有する成績が報告された(新里, 1968) が、それが原虫そのものの性質か、あるいは cyst 壁、宿主細胞(脳組織)等の共雑によるかは明らかでない。また、cyst 内原虫数は cyst の大小によつて変動するので接種量の規定も困難である。そこで分離 cyst を調整して可及的に宿主細胞、cyst 壁等を除き個々の原虫(bradyzoite)として実験に供した。

分離 cyst の場合、マウスに対する病原性は接種 cyst 数にほぼ平行し、10個以下では死亡率及び生存日数から見て弱毒と考えられる。共雑物を除去した bradyzoite の病原性もまた弱毒であり(Table 2)、100個以下の接種量でも十分感染したことから原虫分離過程における感染性への影響は少なかったと思う。これらの結果から bradyzoite そのものの病原性は弱毒であり、cyst 腹腔内接種で見られた強い病原性は、1つに本実験(Table 2)で認めたように接種量が多かったか、あるいは共雑物として存在した脳組織が cyst と共に接種され、狂犬病ワクチンで例証されたような自己アレルギー性脳脊髄炎(Weiser *et al.*, 1969)を起こしたためかも知れない。

tachyzoite の病原性：cyst 若しくは oocyst の腹腔内接種で得られた tachyzoite の病原性は容易に変動し、累代接種はその度ごとに病原性を高めた。cyst 及び oocyst 接種後初めて得られた2代目 tachyzoite には、マウスを100%死亡させる毒力はなかつたが、継代数の増加とともに死亡率の上昇と生存日数の短縮を認めた。また Bv 株18代目原虫と RH 株の比較において(Table 5)、Bv 株皮下接種に有意な病原性の強さを認めたことは、RH 株原虫が分離以後数千回に及び継代を重ねられているためと考えられる。tachyzoite の病原性が変動する詳細な理由は不明であるが、tachyzoite の集団から継代の繰り返しによつて病原性の高い原虫が選択され、更に原虫の宿主に対する適応が人為的感染の度ごとに付加され、腹腔がそれに適した場を提供したものと考えられる。

oocyst の病原性：保存条件を検討する基礎実験で2.5% potassium dichromate 中4C保存で好結果を得たので、この条件で蓄えた oocyst はすべて均一な性状のものとして実験に供した。接種後経路については経口の場合に高い病原性を認め、1 oocyst でもマウスを死に至らしめる場合があつた(Table 8)。経口の場合は宿主の消化液が oocyst に作用して脱 cyst を容易にすると考えられ、一方腹腔内接種でも感染の成立したことは、腹

腔マクロファージ等のどん食作用によつて oocyst 壁が消化されたことによると思われる。

本実験の成績から、Bv 株の3つの stage はそれぞれ異なつた病原性を示し、oocyst は強毒であつたが cyst 原虫(bradyzoite)は弱毒で、tachyzoite の場合弱毒から強毒へと変化する性質を示した。従来 Bv 株は弱毒と言われてきたが、多くの場合 cyst が使用されたため弱毒と表現されたことも考えられる。Dubey and Frenkel (1973)は株による *Toxoplasma* の病原性を oocyst の経口投与で比較し、急性及び慢性感染に導く2つの型を報告した。このように発育段階で最も安定していると考えられる oocyst による株の比較は、他の場合より原虫のより本質的な性状を観察することができるとと思われる。今回の実験で Bv 株 oocyst は1個でもマウスを感染死させる場合があり、この点から見ても Bv 株は弱毒でないと思われる。

まとめ

Toxoplasma gondii の生活環における3つの stage、すなわち cyst、tachyzoite 及び oocyst の感染及び病原性について、Beverley 株を用いてマウスにおける死亡率及び生存日数から比較検討した。

cyst は慢性感染マウスの脳からアラビアゴム密度勾配遠心で分離し、cyst 由来原虫(bradyzoite)は分離 cyst の trypsin 処理で得た。感染マウスの腹水から得た本原虫をすべて tachyzoite とし、RH 株 tachyzoite は強毒株の基準として使用した。oocyst は cyst を摂食させたネコのふん便から回収し、2.5% potassium dichromate 中で25C、5~10日間浸せきして成熟させ、使用時まで4Cで保存した。これら各時期の原虫は接種量及び経路を変えマウスに投与し60日間観察した。また cyst 及び oocyst の腹腔内接種マウスから得た tachyzoite は腹腔内累代接種で病原性の変化を調べた。以上の結果は次のとおりであつた。

1. cyst 1 及び10個の腹腔内接種でマウスの大半は生存し慢性症状を呈した。30及び50個の接種でマウスの大半は約10日で死亡した。

2. cyst 由来原虫は 10^4 及び 10^5 個腹腔内接種ではいずれも6.7%(1/15)のマウスを死亡させ、 10^3 個以下ではすべてが生残した。 10^4 個の静脈内、皮下及び腹腔内接種による死亡率はそれぞれ15.9(7/44)、8.8(3/34)及び75.9%(22/29)であつた。

3. oocyst は経口接種の場合1個でもマウスに対し

致死例があり, oocyst の 10^1 , 10^2 , 10^3 及び 10^4 個投与による死亡率はそれぞれ40(4/10), 80(8/10), 100(10/10)及び100%(10/10)であった。

4. マウス腹腔内に cyst を接種して得た tachyzoite は, 10^5 個で80%(8/10)のマウスを死亡させ, 3代目では全例(9/9)が平均16日で死亡した。以後の世代の原虫はいずれもマウスに100%致死的であり, 18代目原虫接種マウスの平均生存日数は約6日で, RH株とはほぼ同等であった。

5. oocyst 腹腔内接種で得た tachyzoite 10^5 個腹腔内接種によるマウスの死亡率は13.3%(2/15)であったが, 7代目では 10^2 個で90%(9/10), 10^4 及び 10^5 個では共に100%(10/10)となり, 19代目では 10^2 , 10^3 , 10^4 及び 10^5 個のいずれの場合も100%(10/10)で, 10^5 個接種によるマウスの平均生存日数は約6日であった。

文 献

- 1) Dubey, J. P. and Frenkel, J. K. (1973) : Experimental toxoplasma infection in mice. *J. Parasit.*, 59, 505-512.
- 2) Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L. (1970) : *Toxoplasma gondii* in cats : Fecal stage identified as coccidian oocyst. *Science*, 167, 893-896.
- 3) Hutchison, W. M. (1965) : Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* (London), 206, 961-962.
- 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., Work, K. and Siim, J. C. (1971) : The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 65, 380-399.
- 6) Jacobs, L. and Melton, M. L. (1954) : Modification in virulence of a strain of *Toxoplasma gondii* by passage in various hosts. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 3, 447-457.
- 7) 中林敏夫・本村一郎(1968) : アラビアゴム濃度勾配法によるトキソプラズマの無菌的集嚢子法。原生動物誌, 1, 25-26.
- 8) Sabin, A. B. (1941) : Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Am. med. Ass.*, 116, 801-807.
- 9) 新里仁達(1968) : *Toxoplasma gondii* の免疫に関する研究, 数種の系統マウスに対する Beverley(弱毒)株の病原性と防御抗原性について。寄生虫誌, 17, 429-435.
- 10) Siim, J. C., Hutchison, W. M. and Work, K. (1969) : Transmission of *Toxoplasma gondii* : Further studies on the morphology of the cystic form in cat faeces. *Acta path. microbiol. scand.*, 77, 756-757.
- 11) Weiser, R. S., Myrvik, Q. N. and Pearsall, N. N. (1969) : Fundamentals of immunology for students of medicine and related sciences, 1st ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 363pp.
- 12) Work, K. and Hutchison, W. M. (1969) : A new cystic form of *Toxoplasma gondii*. *Acta path. microbiol. scand.*, 75, 191-192.
- 13) 山森芬(1972) : トキソプラズマ慢性感染動物における強毒株再感染に対する抵抗力。寄生虫誌, 21, 201-221.

Abstract

PATHOGENICITY OF TACHYZOITES, CYSTS AND OOCYSTS OF
TOXOPLASMA GONDII BEVERLEY STRAIN IN MICE

YOSHIHIRO ITO, YOSHITO KUSUNOKI, MASAOKI TSUCHIMOTO, MIYOKO DOI,
MASATO FURUYA, YOSHIKAZU OKA AND HUMIO OSAKI
(*Department of Parasitology, School of Medicine,*
University of Tokushima)

Comparative infectivities and pathogenicities of tachyzoites, cysts and oocysts of *Toxoplasma gondii* Beverley strain were studied with reference to the mortality and the days of survival in mice.

Cysts were separated from the brain of chronically infected mice by Arabic-gum density gradient differential centrifugation and cyst-derived organisms, bradyzoites, were liberated by trypsinizing the cysts, while the parasites obtained from the peritoneal exudate of the infected mice were counted as tachyzoites. A toxoplasma-free cat was fed the cysts, and oocysts recovered in the feces were sporulated in 2.5 per cent potassium dichromate at 25 C for 5 to 10 days before they were stored at 4 C.

Mice were given the parasites of the above three stages in varying doses and routes, and observations were carried out for as long as 60 days. Changes in the pathogenicity of tachyzoites obtained from cysts and oocysts were examined by serial intraperitoneal passages in mice.

1) The majority of mice given 1 and 10 cysts intraperitoneally survived but retained chronic conditions and most of animals given 30 and 50 cysts died within approximately 10 days.

2) Intraperitoneal 10^4 and 10^5 cyst-derived organisms killed 6.7 per cent of mice and those of less than 10^3 failed to kill the animals. The mortality of mice inoculated 10^4 organisms intravenously, subcutaneously and intraperitoneally was 15.9, 8.8 and 75.9 per cent, respectively.

3) Oral 10^1 , 10^2 , 10^3 and 10^4 oocysts resulted in death in mice at 40, 80, 100 and 100 per cent, respectively.

4) Eight per cent of mice given tachyzoites derived from cysts died and all of the mice given tachyzoites of the 3rd passage generation died on study day 16 in average, but none of mice given tachyzoites of further passage generations survived. Mean days of survival of mice given tachyzoites of the 18th passage generation were approximately 6, being equivalent to those of mice given virulent organisms of RH strain.

5) Fatality rate of mice given 10^5 oocyst-derived tachyzoites was 13.3 per cent and that of mice given 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 of those of the 7th passage generation was 90, 90, 100 and 100 per cent, respectively. At their 19th passage generation, all of the mice given 10^2 , 10^3 , 10^4 and 10^5 parasites were fatal and mean days of survival of mice given 10^5 parasites were approximately 6.