

Toxoplasma gondii sporozoite の *in vitro*

における培養細胞内侵入性と増殖性の研究

楠 禎 人

徳島大学医学部寄生虫学教室

(昭和51年12月6日 受領)

Nicolle and Manceaux (1908) が *Toxoplasma gondii* を *Ctenodactylus gondi* (ヤマアラシに近いげっ歯類) の寄生原虫として発見して以来, 自然界における感染スペクトルの非常に広いことが次第に分かってきた。しかしその生活史に関しては最近まで幾つかの不明な点が残され, これが感染様式と寄生現象の解明を困難にしていた。Hutchison(1967) のネコ回虫卵による伝播実験を契機にこの方面の研究が著しく進展し, ネコ属が *T. gondii* の終宿主であり, そのふん便中に排出される oocyst が自然界の感染形として経口的に侵入することが明らかにされた (Frenkel *et al.*, 1970)。

従来, 本原虫の感染は, 豚などの脳, その他の組織から検出される cyst の経口摂取と, 組織及び体液中に見られる増殖形原虫 (tachyzoite) の胎盤通過及び創傷部からの侵入に因ると考えられていた。しかし, oocyst の発見によつて感染様式は一層多岐にわたることが分かり, その侵入と増殖はトキソプラズマ症の研究上重要な問題と考えられるに至つた。

本研究は oocyst の感染増殖機序の *in vitro* での究明を終局の目的とし, oocyst を人工消化して得た sporozoite を培養細胞に接種し, その侵入と増殖性を追究し, cyst 内原虫 (bradyzoite), tachyzoite 両者の性状と比較検討した。

材料及び方法

マウス: ddY 系の雌 (22±2 g) を恒温下で固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社 MF) と水道水で飼育し, マウスへの感染は矢追式2段針で左下腹部の腹腔内に, 1/4 針で尾静脈にそれぞれ接種し, また経口投与針で胃内に直接投与した。病原性の判定はマウスの死亡率及び死亡マウスの生存日数により行い, 接種後60日まで観察した。

培養細胞及び培養液: 徳島大学医学部生理学第一教室から分与されたマウス由来繊維芽細胞 (L-929) を, 10% 子牛血清加 Eagle 最小基礎培地 (MEM; 日水製薬株式会社) にストレプトマイシン (200 µg/ml) 及びペニシリン (200 U/ml) を添加し, 7% 重炭酸ナトリウムで pH 7.2 に調整した培養液に単層法により 37°C で増殖させ, 3~4 日ごとに継代して維持した。

原虫株: *T. gondii* 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, マウスに慢性感染状態で維持したものを, また 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継代維持したものを使用した。

各期原虫体: Bv 株慢性感染マウス脳を coccidium-free の2~3カ月齢のネコに食わせ, 5~10日後のふん便から oocyst を集め, 25°C の2.5% 重クロム酸カリウムに1週間浸せきして成熟させ, 4°C に保存した。sporozoite は成熟 oocyst を十分洗浄した上で Table 1 に示す過程で分離し, 実験直前に培養液に懸濁した。Bv 株 tachyzoite は oocyst をマウス腹腔内に累代接種して強毒化したもの (伊藤ら, 1976) を使用した。Bv 及び RH 株 tachyzoite 感染マウスの腹水をガラスフィルター (池本理工株式会社, No. 3) でろ過して宿主細胞を可及的に除いた。

bradyzoite (Bv 株) は慢性感染マウスの脳を軽く磨砕後, アラビアゴム密度差勾配遠心法 (伊藤ら, 1976) によつて分離した cyst を, 0.25% トリプシンで処理して原虫を遊離させ, 更にガラスフィルターを過して宿主細胞及び未処理 cyst を除き, 培養液で遠心洗浄したものを使用した。

L細胞の調整: 48~72時間培養の単層L細胞をゴムへらで軽くはぎ, ピペットを用いて細胞を分散させ, (2~5) × 10⁴ 個/ml 培養液とし, その2 ml をガラススリッ

Table 1 Preparation procedure of *Toxoplasma gondii* sporozoite

oocyst	
—washing thrice with physiological saline	
—homogenization by teflon-coated tissue grinder for 5 min	
—centrifugation at 2,000 rpm for 10 min	
sediment (sporocyst)	
—incubation with 0.25% trypsin and 1.0% sodium deoxycholate in PBS* at 37C for 60 min	
—centrifugation at 2,000 rpm for 10 min	
sediment	
—washing twice with Eagle's minimum essential medium	
—centrifugation at 1,000 rpm for 2 min	
supernatant (sporozoite)	

* PBS: Dulbecco's phosphate buffered solution

プ (9 × 18 mm) を入れた培養試験管に取り、37C で水平に静置し、5 時間以内に細胞の付着したスリップを原虫懸濁液に移して実験に供した。

侵入原虫数計測法：5 × 10⁴ 個/ml 培養液に調整した原虫懸濁液を、培養試験管に 2 ml ずつ分注し、先に用意した L 細胞付着スリップを入れ、水平に保つて 37C で所定の時間まで原虫と接触させた。観察は L 細胞を原虫懸濁液に入れた後 1, 3, 6, 12 及び 24 時間目に行い、時間ごとに 2 ~ 4 本の試験管からスリップを取り出し、培養液で洗浄後メタノール固定、次いでギムザ染色を施して光学顕微鏡下 1,000 倍で細胞数及び原虫数を計測した。なお、sporozoite については培養液に対する安定性を検討するため、無細胞培地に原虫を入れ 37C、6 時間放置後 L 細胞に接触させた実験系をそう入した。

侵入原虫数の計測は染色スリップの 5 箇所（四すみと中央部）について、1 箇所当たり 20 ~ 30 視野を観察し、その中に含まれるすべての L 細胞及び細胞内原虫を対象にした。なお、L 細胞の空胞 1 個に 2 個以上の原虫が認められた場合は原虫の分裂増殖とみなし、侵入原虫は 1 個に数えた。得られた原虫数を L 細胞 1 個当たりの数に換算したものに 100 を乗じ、相対値 (RNIU; Lycke and Lund, 1964 a, b; Norrby and Lycke, 1967) として表した。

増殖原虫計測法：増殖性を観察するため、L 細胞への原虫の侵入を 3 時間で停止させた。すなわち細胞付着スリップを原虫懸濁液に 3 時間接触させた後取り出し、培養液中で軽く洗浄後新しい培養液に移した。スリップの固定及び染色は侵入性観察の場合と同様に行い、侵入原

虫の分裂像を経時的に観察した。分裂像は 1 空胞内で 3 回の分裂 (8 merozoites) まで記録し、4 回分裂 (16 merozoites) 以上の場合は計数困難なため 4 ≤ で表した。また感染細胞 100 個中の総原虫数を経時的に数え、Pulvertaft *et al.* (1954) に準じ相対的増殖数を対数で図示 (Fig. 3) し、3 点が直線になる部分、すなわち対数増殖期から世代時間を算出した。

電子顕微鏡観察：sporozoite の細胞侵入後の形態を観察するため、平四角培養びんで単層培養した L 細胞に sporozoite を接種し、24 ~ 48 時間後に 2% グルタルアルデヒド (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) で固定し、細胞を静かにはぎ取りその遠心沈渣を 2% 四酸化オスミウム (0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) で後固定した。次いでアセトンにより脱水後エポキシ樹脂に包埋し、薄切後 2% 酢酸ウラニール及びクエン酸鉛で染色して 5,000 ~ 30,000 倍で観察した。

成 績

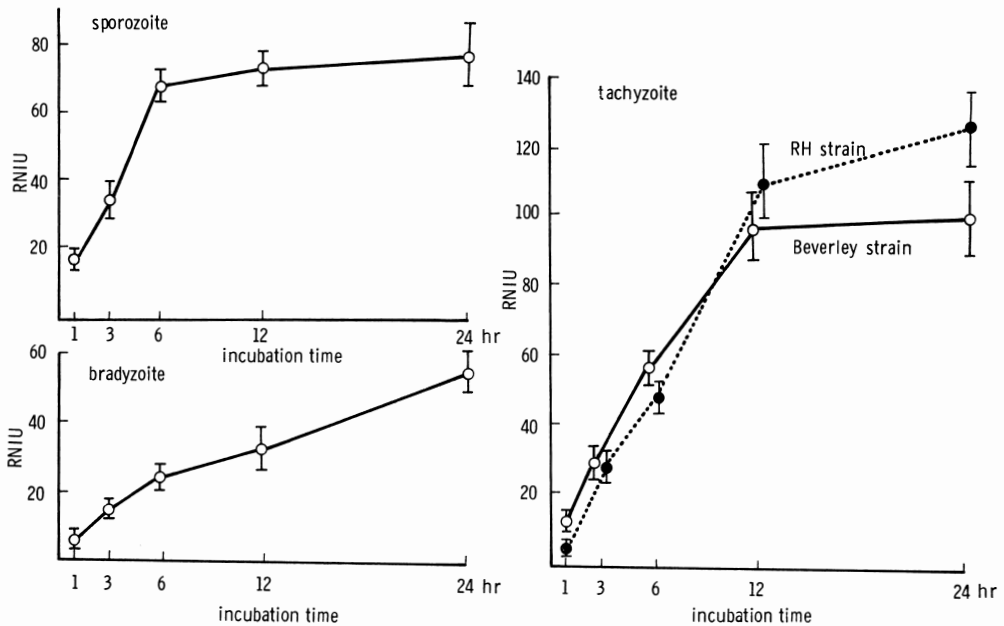
sporozoite のマウスに対する病原性：成熟 oocyst から人工的に sporozoite を遊離させる過程で理化学的処理が原虫の生存能力に影響を与えると考えられるので、あらかじめ得られた sporozoite のマウスに対する病原性を検討した。その結果、Table 2 のように sporozoite の致死感染性は、対照の oocyst 経口投与の場合よりやや低かつたが、十分感染力を保持していることを示した。

sporozoite の細胞内侵入性：細胞内侵入性は L 細胞に接種して 1, 3, 6, 12 及び 24 時間後における細胞内

Table 2 Pathogenicity of sporozoites and oocysts of *Toxoplasma gondii* in mice

	Inoculation		Number of		Per cent death	Days of mean survival of dead mice
	dose	route	mice	deaths		
Sporozoite	8×10^3	i. p.	10	7	70	20.9 ± 2.5
	8×10^3	i. v.	5	4	80	15.3 ± 0.5
Oocyst	10^3	i. p.	10	6	60	14.5 ± 0.9
	10^3	per os	10	10	100	9.2 ± 0.6

± : standard error mouse : 22 ± 2 g, ddY strain, female



RNIU: invaded parasites/100 L cells

Fig. 1 Comparative invasions of sporozoites, tachyzoites and bradyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* into cultured L cells.

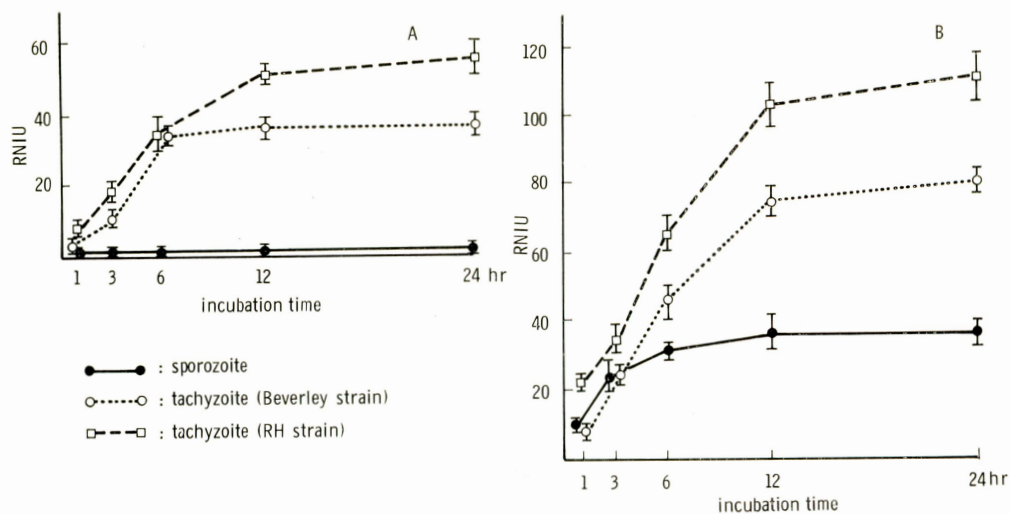
侵入原虫数を、同様に処理した tachyzoite 及び bradyzoite と比較計測した (Fig. 1). sporozoite の侵入は 6 時間までは活発に進み、侵入数は時間とともに増加し、6 時間後 (68.6 ± 2.7 RNIU) には 1 時間後 (14.8 ± 2.6 RNIU) の約 5 倍に達した。6 時間以後はほとんど侵入が見られず、12 及び 24 時間で侵入数はそれぞれ 74.4 ± 2.7 及び 76.6 ± 9.2 RNIU であった (Fig. 1)。

Bv 株 tachyzoite は接種後 1 時間から 12 時間まで経時的に侵入数が増加し、以後はほとんど増加が認められず、1, 3, 6, 12 及び 24 時間後における侵入数はそれぞれ 11.6 ± 1.9 , 29.2 ± 4.3 , 55.8 ± 4.8 , 97.1 ± 9.7 及び 100.1 ± 9.8 RNIU であった、RH 株の tachyzoite では 12 時間までは Bv 株 tachyzoite とほぼ同様で、24 時

間の侵入総数 (125.0 ± 10.0 RNIU) は Bv 株よりやや上回っていた (Fig. 1)。

bradyzoite の侵入は sporozoite より遅く (Fig. 1), 1, 3, 6, 12 及び 24 時間でそれぞれ 5.6 ± 0.9 , 14.9 ± 1.4 , 23.1 ± 2.0 , 32.2 ± 4.6 及び 54.9 ± 2.9 RNIU であり、12 時間以後もなお侵入原虫が認められた。

なお、sporozoite の侵入に及ぼす培養液の影響を検討するため、37C で 6 時間無細胞培養液に静置した予備実験では、Fig. 2 の A に示すように、sporozoite は全く侵入力を失い、対照として観察した Bv 及び RH 株の tachyzoite は、無処理の場合と比較していずれも侵入力は低下したが (Fig. 2 の B), なお侵入力が認められ 6 ~ 12 時間では侵入数が増加した。



RNIU: invaded parasites/100 L cells

A: preincubated with the medium for six hours

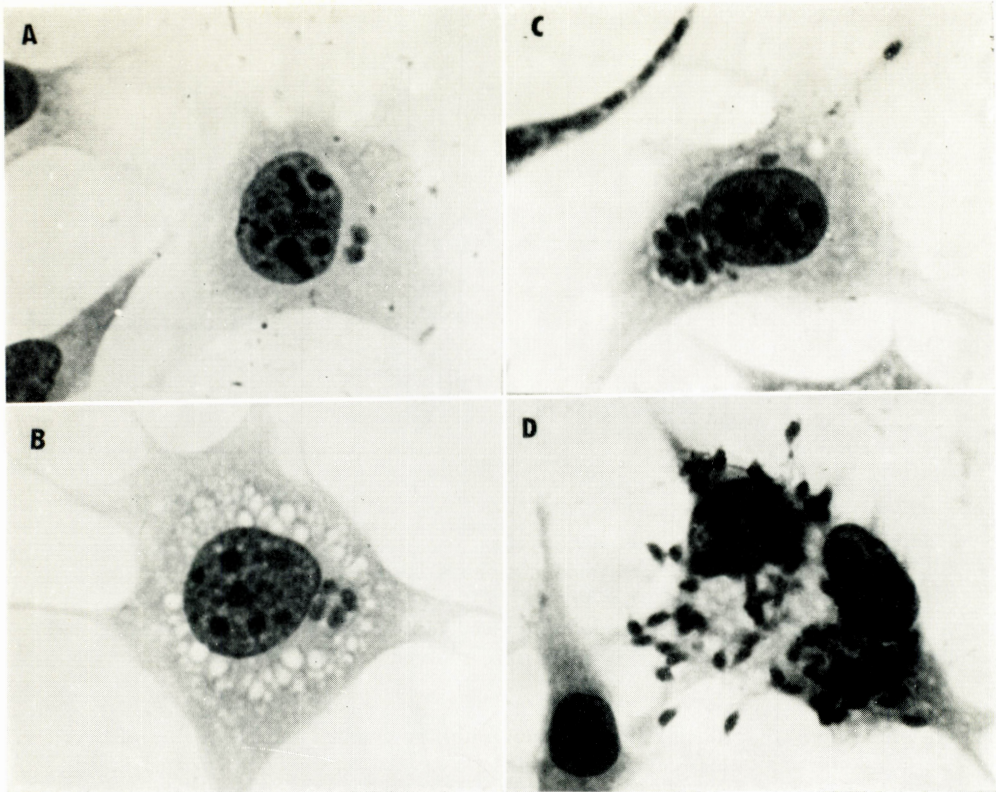
B: not preincubated

Fig. 2 Comparative invasions of sporozoites and tachyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* into cultured L cells.

Table 3 Comparative cell divisions of sporozoites, bradyzoites and tachyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* in cultured L cells

Parasite	Incubation time	Frequency of cell divisions				
		0	1	2	3	4 \leq
Sporozoite	3 hr	100				
	6	100				
	12	92.3 \pm 1.2	7.7 \pm 1.2			
	24	22.0 \pm 0.8	72.3 \pm 1.2	5.7 \pm 0.9		
	36	17.0 \pm 2.4	29.7 \pm 1.2	48.7 \pm 2.9	5.0 \pm 0.8	
	48	20.6 \pm 0.5	40.6 \pm 1.3	16.0 \pm 2.8	18.7 \pm 1.7	4.2 \pm 1.0
Bradyzoite	3	100				
	6	100				
	12	100				
	24	87.8 \pm 2.0	12.2 \pm 2.0			
	36	25.2 \pm 3.8	65.2 \pm 2.9	9.7 \pm 2.1		
	48	22.3 \pm 7.5	21.3 \pm 4.1	45.0 \pm 2.8	11.3 \pm 3.6	
Tachyzoite (Beverley strain)	3	100				
	6	90.3 \pm 1.5	9.7 \pm 1.5			
	12	32.5 \pm 1.7	67.5 \pm 1.7			
	24	17.3 \pm 1.4	33.3 \pm 1.8	49.3 \pm 2.1		
	36	21.3 \pm 2.1	20.5 \pm 3.1	24.3 \pm 2.7	27.8 \pm 2.1	6.2 \pm 0.7
	48	25.7 \pm 3.4	27.0 \pm 4.6	18.3 \pm 3.5	23.8 \pm 2.7	5.2 \pm 0.8
Tachyzoite (RH strain)	3	100				
	6	82.5 \pm 1.7	17.5 \pm 1.7			
	12	32.2 \pm 2.4	65.3 \pm 1.7	2.5 \pm 1.0		
	24	12.7 \pm 2.8	32.5 \pm 7.6	41.7 \pm 7.2	13.0 \pm 1.5	
	36	27.7 \pm 3.4	25.8 \pm 2.5	12.3 \pm 1.6	21.8 \pm 2.5	12.5 \pm 2.9
	48	29.5 \pm 2.4	37.0 \pm 3.2	11.2 \pm 1.9	13.8 \pm 2.2	8.4 \pm 1.7

\pm : standard deviation



×2,500

Photo. 1 Oil-immersion photomicrographs of *Toxoplasma gondii* sporozoites in cultured L cells 24 (A), 36 (B) and 48 (C and D) hours after inoculation.

sporozoite の細胞内増殖性：L細胞に侵入後の sporozoite の増殖過程は、分裂細胞の百分比及び細胞内総原虫数の経時的増加で観察した。Table 3 にはその各時間における分裂細胞の百分比を示した。sporozoite は接種後 12 時間までほとんど分裂せず、24 時間では 1 回分裂のもの (Photo. 1 の A) が 50% を超えた。2 回分裂細胞 (Photo. 1 の B) は 36 時間で約 50% を占め、その一部は 3 回分裂に進み、またロゼット型 (Photo. 1 の C) が認められた。48 時間では 3 回分裂及び 4 回又はそれ以上がそれぞれ 18.7 ± 1.7 及び 4.2 ± 1.0 % に達したが、大半は未分裂及び 1 回分裂であった。なお、36 時間以後感染 L 細胞の崩壊が起こり (Photo. 1 の D)、48 時間における未分裂及び 1 回分裂像は崩壊 L 細胞から遊離した原虫の再侵入したものがかなりの部分を占めると思われる。

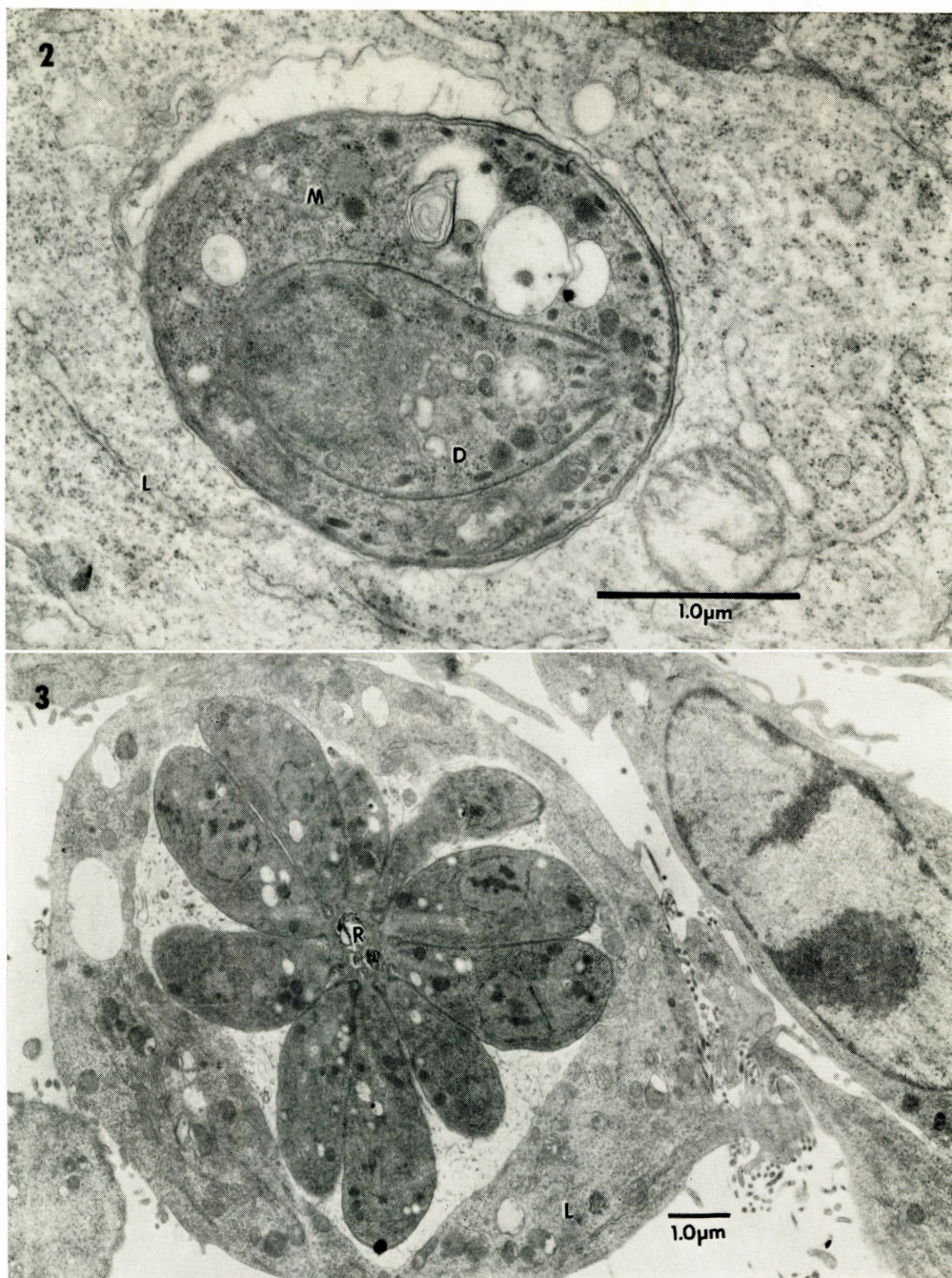
bradyzoite の分裂開始は sporozoite より遅れ、36 時間でようやく過半数 (65.2%) が分裂し、2 回分裂は 9.7% にすぎなかった。48 時間では 11.3% が 3 回分裂まで進んだがそれ以上の分裂像は観察されなかった。

Bv 株 tachyzoite の場合、12 時間で 67.5% が 1 回分裂し、24 時間では約半数 (49.3%) が 2 回分裂した。更に 36 時間では 3 回分裂像 (27.8%) 及びごく少数の 4 回又はそれ以上の分裂像が認められ、48 時間では再び未分裂及び 1 回分裂細胞が大半を占めた。一方 RH 株 tachyzoite でも Bv 株 tachyzoite とほぼ同様のパターンを示した。

以上のように細胞分裂から見た sporozoite の増殖性はその開始が他の stage のものと異なり、tachyzoite より遅く bradyzoite より早かつた。

接種後 48 時間における sporozoite の分裂像を電子顕微鏡で観察した結果は Photo. 2 及び 3 に示した。Photo. 2 は細胞内出芽増殖を示し、母細胞内に 1 個の娘細胞を認めた。しかし、Photo. 3 のように中心に残体 (remnant) を有するロゼット型の分裂像を観察し、sporozoite の分裂増殖は内部出芽法 (endodyogeny) による 2 分裂とロゼット型分裂の両者によると考えられる。

次に 100 個の感染 L 細胞内の総原虫数から sporozoite



L: L cell D: daughter parasite M: mother parasite
 R: remnant of mother parasite

Photos. 2 and 3 Electron micrographs of invaded *Toxoplasma gondii* sporozoites into cultured L cells.

Table 4 Comparative multiplications of sporozoites, tachyzoites and bradyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* in cultured L cells

Incubation time	Number of parasites/100 infected L cells			
	Sporozoite	Bradyzoite	Bv tachyzoite	RH tachyzoite
3 hr	150.7± 4.5	106.5±1.6	161.3± 6.9	183.5± 8.2
6	150.3± 3.4	107.0±1.6	179.0±11.5	212.5±13.6
12	155.6± 3.1	106.2±1.5	279.3±10.0	347.0±21.1
24	303.6±10.8	121.7±2.9	600.3±13.0	816.0±25.2
36	572.6±30.9	209.0±8.7	751.3±28.7	1,116.0±42.9
48	588.0±38.3	353.5±7.9	755.5±35.3	1,018.5±37.4

±: standard deviation Bv: Beverley strain RH: RH strain

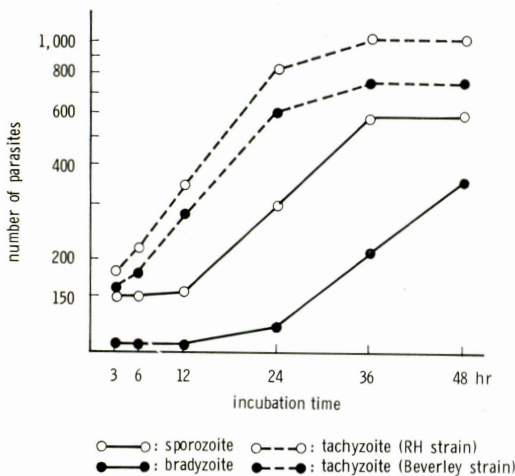


Fig. 3 Comparative multiplications of sporozoites, tachyzoites and bradyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* in cultured L cells.

の増殖を観察した。Table 4 及び Fig. 3 には対照として用いた tachyzoite 及び bradyzoite の場合も併せて示した。いずれも L 細胞に 3 時間接触させた後培養液で 1 回洗浄して新しい培養液に移し、以後の原虫侵入を防止した。Fig. 3 の横軸は原虫接種後の時間を示す。3 時間目の原虫数が 3 者それぞれ異なっているのは、侵入性の差異 (Fig. 1) に因るものである。

sporozoite の増殖は 12 時間後から始まり 36 時間まで対数的に増加し、その後は定常となった。tachyzoite は Bv, RH 両株共 3 時間から 6 時間にかけて原虫数が増加し、24 時間まで対数的に増加し、以後 36 時間までは増殖速度が落ち、その後は定常となった。bradyzoite は 12 時間まで増殖が認められず、以後 24 時間までわずかに

進み、24 時間から 48 時間までは増殖が対数的であった。Bv 株 sporozoite, tachyzoite 及び bradyzoite は対数増殖に入る時期を異にし、それぞれ 12 時間、3 時間以内及び 24 時間であった。

対数増殖期における sporozoite の平均世代時間は 12.5 時間であり、RH 株 tachyzoite 並びに Bv 株 tachyzoite 及び bradyzoite ではそれぞれ 8.0, 10.0 及び 15.5 時間であった。

Kaufman and Maloney (1962) は細胞内侵入後の原虫が分裂を開始するまでの準備期間 (休止相) が 3 強毒株間で差異のないことを認めた。Fig. 4 はこの記載に準じて sporozoite, tachyzoite 及び bradyzoite を比較したもので、休止相はそれぞれ 11.5, 4.5 及び 21.0 時間であった。

総括並びに考案

T. gondii の細胞内侵入性と増殖性を知る上で、培養細胞の利用は定量的説得性を与える有利な手段として早くから注目されている。1942年 Guimarães and Mayer が多種培養細胞での *in vitro* 実験を紹介して以来、培養技術の向上とともに *Toxoplasma* の各種研究目的に役立てられるに至った。

本研究は近年解明された *T. gondii* の自然界における感染形すなわち oocyst に含まれている sporozoite を取り上げ、その細胞内侵入及び無性生殖による増殖性を精査するために計画した。sporozoite の培養細胞に対する態度については豚由来細胞を用いた実験 (Sheffield and Melton, 1970) があるが、侵入及び増殖性についての *in vitro* 実験はいまだ報告されていない。そこで Bv 株の sporozoite の侵入並びに増殖性を同一株の tachyzoite 及び bradyzoite と比較検討し、あわ

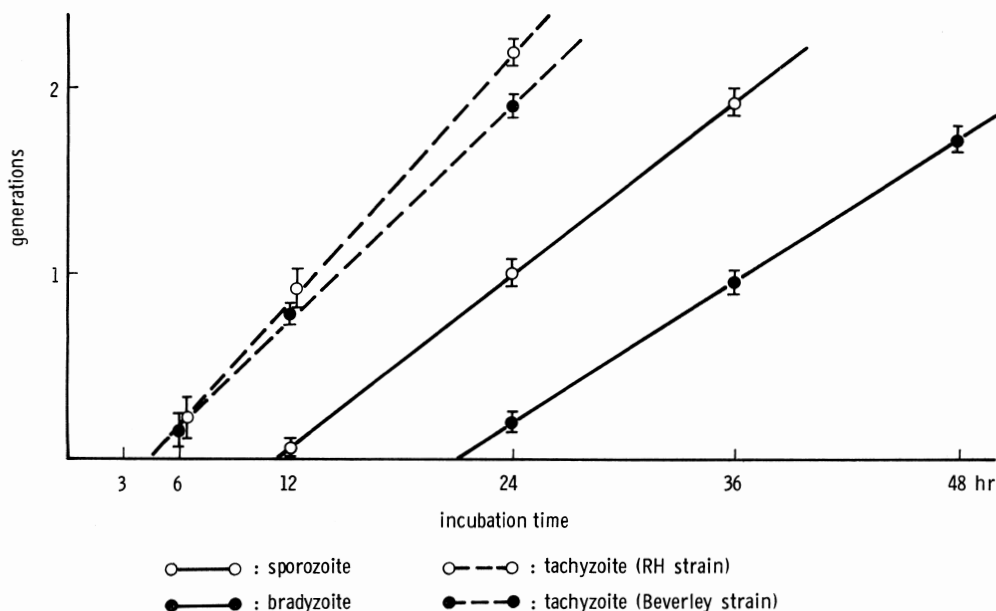


Fig. 4 Comparative resting phases and exponential growth rates of sporozoites, tachyzoites and bradyzoites of Beverley strain and tachyzoites of RH strain of *Toxoplasma gondii* in cultured L cells.

せて、より多くの実験例のある RH 株 tachyzoite を対照に選んで実験を進めた。

1. sporozoite の細胞内侵入性

sporozoite の細胞内侵入は、L細胞に接触後6時間を超えなかつた (Fig. 1)。このことは接種原虫のすべてが6時間以内に侵入を完了するのか、あるいは培養液中で生命と侵入性を維持できる限度が6時間であるのかのいずれかであると考えられるので、原虫をあらかじめ Eagle の MEM 培養液 (37C) 中に6時間静置した上でL細胞に接触させた。その結果宿主細胞内原虫数から見て、sporozoite は明らかに侵入力を失ったが、Bv 及び RH 株の tachyzoite はなお侵入力を残していた (Fig. 2 の A, B)。対照 (Fig. 2 の B) における sporozoite の侵入数は同一条件の前の実験 (Fig. 1) と比較してやや少なかつたが、このことは sporozoite が培養液その他の外的変化に鋭敏に反応し、侵入性を失いやすいことを示唆している。すなわち経口接種の oocyst は消化液の作用を受け sporozoite を遊離するが、細胞外では長時間生存できないと考えられる。Fig. 1 における侵入数から見て6時間までは sporozoite と tachyzoite とは侵入数の増加傾向がほぼ同等であり、侵入力は両者匹敵すると考えられた。bradyzoite

が接種時から漸増し24時間後もなお増加したのに比べ、sporozoite, tachyzoite の両者は共に6及び12時間後にほとんど侵入が停止していた。このことから bradyzoite は他の2者と性状を異にし、強い生命力を保持して緩徐ではあるが持続性のある感染力を有していると考えられる。

2. sporozoite の増殖性

L細胞における sporozoite の増殖性については、まず分裂像の経時的推移と電子顕微鏡像を観察した。分裂像の推移は増殖速度とほぼ比例すると考えられるが、sporozoite が終宿主 (ネコ属) 以外の宿主細胞に侵入した場合の増殖が、従来の増殖形で観察されたような縦2分裂を主とするか、他の方法によるかは興味深い問題である。sporozoite の増殖性を tachyzoite 及び bradyzoite と比較した結果、3者における増殖開始時期、すなわち1回分裂像出現時期を異にしていた (Table 3)。すなわち tachyzoite では接種6時間後、sporozoite 及び bradyzoite はそれぞれ12及び24時間後に初回の分裂像が観察された。これは分裂のための準備期間若しくは休止期と考えられ、増殖速度とは異なる現象であった。またいずれにおいても大半の原虫が初回分裂時に低率 (10%前後) ながら既に2回目の分裂像を示し、時間

の経過とともに分裂像のパターンは更に広がり、同時に各種の像が観察された (Table 3). このことは少なくとも分裂増殖における一つの原点とも考えられる sporozoite においても本実験条件では同調分裂できないことを示唆し、これは培養条件に因るものか、それとも sporozoite の持つ性質の中に分裂方法を異にする幾つかのタイプがあることに因るものと考えられる。

sporozoite の電子顕微鏡観察によつて細胞内出芽による2分裂像 (Photo. 2) とロゼット型分裂像 (Photo. 3) とが認められ、sporozoite はこの二つの方法により分裂増殖を繰り返すものと思われる。Sheffield and Melton (1968) は RH 株 tachyzoite で培養細胞内分裂像を観察し、内部出芽2分裂と多数分裂の2様の像を提示したが、多数分裂においては残体 (remnant) を中心にした内部2分裂の繰り返しにすぎないことを指摘した。著者も本実験でのロゼット型分裂像は内部出芽の2分裂を原則としていると考える。

Toxoplasma 原虫における無性生殖で多数分裂を“schizogony”と呼ばず“endopolygeny”とする考え方 (Piekariski *et al.*, 1971; Hammond and Long, 1972) もあるが、反論 (Jacobs, 1974) も挙げられ、いまだ明確な証拠は立てられていない。しかし、この内部2分裂と多数分裂の二つの分裂方法がそれぞれ異なつた時間で進むならば、本実験 (Table 3) における分裂の像が時間の進展とともに多様になる現象に説明を与え得るかも知れない。

sporozoite の分裂増殖速度は感染L細胞における総原虫数で表し (Table 4), Fig. 3 は対数目盛で表して増殖期を求めた。この成績から sporozoite は12時間の誘導期 (lag phase) を有し、続いて24時間 (接種後12~36時間) 対数的に増殖し、後定常となることを知つたが、この増殖態度は tachyzoite 及び bradyzoite の場合と明らかに異なつてゐる。1回分裂に要する時間についても sporozoite は12.5時間で、bradyzoite の15.5時間及び tachyzoite の10.0時間と差があり、その増殖速度は bradyzoite 及び tachyzoite に対してそれぞれ有意差 ($p < 0.05$) を認めた。更に Fig. 4 における休止相についても sporozoite, tachyzoite 及び bradyzoite はそれぞれ11.5, 4.5及び21.0時間で差異は顕著であつた。

T. gondii の毒力若しくは病原性の表示には、宿主対原虫の相互反応が大きな支配力を持つてゐる。したがつて原虫自身の持つ性状、例えば toxotoxin (Weinman

and Klatchko, 1950) のような外毒素、またリゾチーム、ヒアルロニダーゼ等の侵入促進因子 (Norrby and Lycke, 1967) などの産出において3者間に相違があるかも知れない。また侵入原虫数、世代時間及び休止相は宿主細胞の破壊に関連し、原虫 (あるいは株) の毒力表示に重要な役割を持つと考えられている (Kaufman and Maloney, 1962)。本実験から侵入性は tachyzoite, sporozoite, bradyzoite の順で強く、世代時間及び休止相は tachyzoite, sporozoite, bradyzoite の順に短く、伊藤ら (1976) がマウスで検討した Bv 株の病原性の成績とほぼ一致した。更に bradyzoite 接種マウスの大半が生残し、慢性感染に移行したこと (伊藤ら, 1976) は、bradyzoite の侵入及び増殖性が他と比較して低く、休止相が最も長いことと関係があると考えられる。すなわち低調な侵入性は他よりも感染量の少ないことを示唆し、より長い休止相と緩徐な増殖性は宿主に特異抵抗性獲得の時間的余裕を与えるものと考えられ、その間に宿主の抵抗力が増し、表面的には原虫の毒力が弱いように解釈されるのかも知れない。例えば感染による刺激で始動した免疫機構が、休止期及び増殖が速やかでない時期に体液性抗体 (IgM) を産生し、そのため原虫は抗体濃度の低い脳などに押し込められて慢性状態に移行するとも考えられる。

要 約

Toxoplasma gondii の自然界における感染形 oocyst による感染の様相解明の一助として Beverley 株 sporozoite の細胞内侵入並びに増殖性を追究するため、マウス繊維芽細胞 (L-929) による *in vitro* 実験を企図した。sporozoite は成熟 oocyst から人工的に遊離させ、静置法で培養したL細胞への侵入数、分裂像及び増殖原虫数の経時的観察を行い、同様の方法による tachyzoite 及び bradyzoite の成績と比較評価した。

1. sporozoite の侵入性は培養L細胞における原虫数の経時的増加で観察した。その結果、接種後6時間までの sporozoite の増加態度は tachyzoite とほぼ同様で、bradyzoite よりは高値を示した。しかし37C 無細胞培養液中に6時間放置した場合 sporozoite は全く侵入力を失つた。

2. sporozoite の分裂像における経時的展開で、第1回目の分裂が大半を占めたのは接種後24時間であり、36時間にはロゼット型を観察した。この時間的推移は tachyzoite より遅く、bradyzoite より速かつた。

電子顕微鏡観察で sporozoite の分裂が内部出芽による2分裂とロゼット型分裂の二つの方法によることを認めた。

3. sporozoite の培養L細胞内における増殖には、細胞内侵入後約12時間の誘導期 (lag phase) があり、その後24時間にわたり対数的に増殖して定常となった。一方 tachyzoite 及び bradyzoite の誘導期はそれぞれ3時間以内及び24時間であった。

sporozoite, tachyzoite 及び bradyzoite の平均世代時間はそれぞれ12.5, 10.0及び15.5時間であった。

謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導御校閲を賜った徳島大学医学部寄生虫学教室尾崎文雄教授及び徳島大学養護教諭養成所岡好万教授並びに直接御指導いただいた伊藤義博助教授及び教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Frenkel, J. K., Dubey, J. P. and Miller, N. L. (1970) : *Toxoplasma gondii* fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, 167, 893-896.
- 2) Guimarães, F. N. and Mayer, H. (1942) : Cultivo de "*Toxoplasma*" Nicolle et Manceaux, 1909, em culturas de tecidos. *Rev. Brasil. Biol.*, 2, 123-129 (cited by Hammond, D. M. and Long, P. T., 1973).
- 3) Hammond, D. M. and Long, P. T. (1973) : *The Coccidia*, ed. 1, University Park Press, Baltimore and Butterworth, London, 45-79.
- 4) Hutchison, W. (1967) : The nematodes transmission of *Toxoplasma gondii*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61, 80-89.
- 5) 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 (1976) : *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. *寄生虫誌*, 25, 133-140.
- 6) Jacobs, L. (1974) : Symposium on toxoplasmosis. *Toxoplasma gondii*: Parasitology and transmission. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 50, 128-145.
- 7) Kaufman, H. E. and Maloney, E. D. (1962) : Multiplication of three strains of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. *J. Parasit.*, 48, 358-361.
- 8) Lycke, E. and Lund, E. (1964a) : A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii* 1. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 60, 209-220.
- 9) Lycke, E. and Lund, E. (1964b) : A tissue culture method for titration of infectivity and determination of growth rate of *Toxoplasma gondii* 2. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, 60, 221-233.
- 10) Nicolle, C. and Manceaux, L. (1908) : Sur une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 147, 763-766 (cited by Kozojed, V., 1970, *Toxoplasmosis* 2, Gustav Fischer, Stuttgart, 278).
- 11) Norrby, R. and Lycke, E. (1967) : Factors enhancing the host-cell penetration of *Toxoplasma gondii*. *J. Bact.*, 93, 53-58.
- 12) Piekarski, G., Pelster, B. and Witte, H. M. (1971) : Endopolygenie bei *Toxoplasma gondii*. *Z. Parasitenk.*, 36, 122-130.
- 13) Pulvertaft, R. J., Valentine, J. C. and Lane, W. F. (1954) : The behavior of *Toxoplasma gondii* on serum agar culture. *Parasitol.*, 44, 478-485.
- 14) Sheffield, H. G. and Melton, M. L. (1968) : The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasit.*, 54, 209-226.
- 15) Sheffield, H. G. and Melton, M. L. (1970) : *Toxoplasma gondii*: The oocyst, sporozoite, and infection of culture cells. *Science*, 167, 892-893.
- 16) Weinman, D. and Klatchko, H. J. (1950) : Description of toxin in toxoplasmosis. *Yale J. Biol. Med.*, 22, 323-326.

Abstract

IN VITRO STUDY ON THE INVASION AND MULTIPLICATION OF
TOXOPLASMA GONDII SPOROZOITES IN CULTURED CELLS

YOSHITO KUSUNOKI

(Department of Parasitology, School of Medicine, the University of Tokushima)

An *in vitro* experiment using fibroblasts of mice (L-929) was designed to investigate the attitude of Beverley strain sporozoites toward both intracellular invasion and multiplication as a help of elucidating the mode of infection due to oocysts which are thought to be the infective form of *Toxoplasma gondii* in the nature. Sporozoites were artificially released from mature oocysts and time-course changes in the number of invaded sporozoites into L-cells cultivated by stationary method, patterns of division and the number of parasites multiplied were observed. The findings obtained were compared with those in tachyzoites and bradyzoites observed in the same manner and the following results appear to be justified:

1. Invasiveness of sporozoites was assessed with respect to increases in the number of parasites with time in cultivated L-cells. The extent of increase in six hours was nearly equal to that in tachyzoites and larger than that in bradyzoites. The invasiveness was lost completely when the parasites were allowed to stand in non-cellular liquid media at 37 C for six hours.

2. The majority of sporozoites accomplished the first cell-division in 24 hours after inoculation, whereas rosette forms were observable 36 hours after inoculation. The time-course change was slower in sporozoites than in tachyzoites and still more slower in bradyzoites. An electron microscopic examination disclosed that the types of reproduction of sporozoites were endodyogenic binary and rosette-forming fissions.

3. A lag phase of approximately twelve hours was noticeable in the multiplication of sporozoites in L-cells after invasion being followed by a logarithmical increase as long as 24 hours before the multiplication became kept constant. The lag phases of tachyzoites and bradyzoites were less than 3 and 24 hours, respectively. The average generation times of sporozoites, tachyzoites and bradyzoites were 12.5, 10.0 and 15.5 hours, respectively.