

Pneumocystis carinii および *Pneumocystis carinii*

肺炎の研究

II 集シスト法

猪飼 剛 吉田 幸雄 荻野 賢二
竹内 滋 山田 稔

京都府立医科大学医動物学教室

(昭和52年8月22日 受領)

Pneumocystis carinii (以下 Pc と略記) およびこれによつて起こる *Pneumocystis carinii* 肺炎 (以下 Pc 肺炎と略記) の研究史の概要については既に述べたところであるが(吉田ら, 1976), 従来, 人体あるいは動物からの病原体の検索は, すべて肺 (時には肺以外の臓器) の塗抹標本 (スタンプ標本) または組織切片標本について実施された。従つてその検索はごく少量の材料について行われたものであり, 検出率の低いことが容易に想像される。我々は, Pc の培養が困難とされている現在, もし被検材料から病原体を能率よく集めることが可能となれば, 本症研究上裨益するところが大きいと考え, 集病原体法の確立を検討することにした。ごく最近, Pifer *et al.* (1977) は Pc の培養に成功したことを報じたが, たとえ培養が可能となつても集病原体法の価値を減ずるものではない。

Pc なる生物は目下のところシスト (cyst) と栄養型 (trophozoite) と考えられる時期のものしか知られていない。そしてこれが既報 (吉田ら, 1976) の図示したような生活環で増殖しているものと考えられている。栄養型はアメーバ状で, 周囲の環境に対する抵抗力が弱く, 集病原体法に用いる薬液などにより容易に変形・破壊されてしまうので, 今回は抵抗力の比較的強いシストを集める方法に重点を置いて検討を行った。従つて以後, 集シスト法と呼ぶことにする。

集シスト法の有用性は次の如く挙げることができる。まず人体剖検肺および動物肺などから Pc の潜在感染を摘発することができる。このことは Pc の各動物間における広がりをはっきりと明らかにし, 人への感染経路, ひいては感

染予防を考える上に役立つ。つぎに感染肺における Pc 濃度を定量的に表現することが可能となり, Pc 肺炎の程度の表示, 動物発症実験や治療実験の効果判定などに役立つ。さらに Pc の収集・純化により電顕材料・抗原作成・培養実験など, 今後の研究に役立つ可能性をもつ。

このような見地から, 我々は種々の集シスト法を比較検討した結果, 収集率が高く, かつ染色結果のよいコラゲナーゼ消化法を確立することができたのでここに報告する次第である。

実験材料

今回の実験に用いた材料は人の肺と動物の肺とである。人の肺は, 白血病や悪性リンパ腫あるいは各種内臓癌で死亡した患者から取り出した Pc 陽性のものであり, 動物の肺は, 体重150~200g のラットに酢酸コーチゾン25mg を週2回宛数週間にわたり皮下注射し, 実験的に Pc を発生・増殖させたものである。細かい実験方法は各項目で述べることにする。

成績

実験 I コラゲナーゼ, トリプシン, 塩酸ペプシンなどによる集シスト法の比較

肺胞内に粘稠な蜂窩状泡沫物質を形成して存在する Pc を取り出すためには肺組織をホモジナイズした上で何らかの消化酵素により組織を消化することが収集率を高めることになる。今回は上記3酵素の比較検討を行った。

方法: 湿重量1g の肺を秤量しホモジナイザー用試験管にとり, 生理食塩水5ml を加え, 約18,000 rpm 2

本研究は文部省科学研究, 一般研究(244032号)の補助を受けて行われた。記して謝意を表す。

分間ホモジナイズし、のち3,000rpm 5分間遠沈し上清を捨て、得た沈渣を以下の実験の材料とした。ホモジナイザーは全実験を通じ日本精機 HB II型を用いた。

1. コラゲナーゼ消化法

上記の沈渣に0.1%コラゲナーゼ2mlを加え、よく混和したのち37Cに保ち、時々攪拌しながら4時間おく。ついでガーゼ1枚で濾過し、濾液を3,000rpm 5分間遠沈し、上清を捨て、沈渣をピペットでよく混和したのちその全部をスライドグラスに塗布する。この標本は風乾後 toluidine blue-O 染色 (以下 TBO 染色と略記) や Gomori's methenamine silver 染色 Grocott 変法 (以下 GMS 染色と略記) を施して鏡検に供した。

2. トリプシン消化法

トリプシンはカルシウム塩とマグネシウム塩とを除いたリン酸緩衝液の0.25%溶液として用いた。上記の沈渣を50ml容のビーカーに入れ、それに37Cに加温したトリプシン溶液20mlを加え、室温で15分間マグネティックスターラーで攪拌する。ついで新しい37Cトリプシン溶液と交換して攪拌し、この操作を4時間くり返す。その後この溶液をガーゼ1枚で濾過し、3,000rpm 5分間遠沈し、その全沈渣を1と同様スライドグラスに塗布し、染色標本を作成した。

3. 塩酸ペプシン消化法

塩酸ペプシン溶液は、蒸留水100mlにペプシン(1:10,000)100mgと濃塩酸0.7mlを加え作成した。上記の沈渣にこの消化液10mlを加え、37Cで4時間、時々攪拌しながら保持する。ついで上記と同様ガーゼ濾過、遠沈の後全沈渣をスライドグラスに塗布して染色標本を作成した。

結果: まず消化状態はコラゲナーゼが最もよく、つぎは塩酸ペプシンであり、トリプシンではほとんど消化されず、生理食塩水だけを加えて37Cで4時間保持したものと殆んど同じであった。コラゲナーゼの場合はよく消化されているので濾過したガーゼに付着する残渣も最も少なかった。

つぎに染色標本作成の段階において、トリプシン消化および塩酸ペプシン消化を行った標本は共に、TBO染色において硫酸化の時に、またGMS染色においてクロム酸化の時に塗布した標本がスライドグラスから剝離し、完全な染色標本を作ることが困難であった。一方コラゲナーゼ消化法では、標本の厚さが厚い場合はGMS染色のクロム酸化の時に剝離することがあつたが、TBO染色ではかなり厚い標本でも全く剝離することなく、またPcの染色性もスタンプ標本と殆んど差なく良好であ

つた。生理食塩水のみで処理した標本でも、あまり剝離は起らず、Pcの染色性も良好であつたが、組織が消化されていないため、標本の厚さにむらが強くと、鏡検は400倍で行う必要を生じ実用化は困難であつた。これに比し、コラゲナーゼ消化標本は全体によく消化されており、Fig. 1, 2, 3に示す如く均一な組織残渣の中に、メタクロマジーを起こしたシストがほぼ均等にばらまかれて明瞭に判別された。少し慣れれば100倍ないし200倍の弱拡大で充分識別し、カウントすることが出来る。

以上の如く、Pc収集のための肺組織消化法としてコラゲナーゼ、トリプシン、塩酸ペプシンの3酵素を比較したところ、コラゲナーゼが格段優れていることが明らかとなつた。

実験 II コラゲナーゼ消化法による集シスト法および定量法の検討

上記実験 I によりコラゲナーゼ消化法を用いることによりPcの収集ならびに定量が可能と考えられるに至つたので、さらに本法を細部にわたつて検討した。ここでは我々が得た最良と思われる集シスト法術式をまず述べ、ついで種々の操作条件の比較検討結果を述べることにする。

A. コラゲナーゼ消化集シスト法および定量法の術式

1. 被検肺湿重量1gをホモジナイザー用遠沈管にとり、ハサミで細断する。
2. 生理食塩水5mlを加える。
3. ホモジナイザーを用い、約18,000rpm 2分間細切する。
4. 生理食塩水5~10mlを用いホモジナイザーの刀やシャフトを洗滌し、液はすべて遠沈管に集める。
5. 3,000rpm 5分間遠沈し上清を捨てる。
6. 沈渣に0.1%コラゲナーゼ (Sigma社 Collagenase type 1) 2mlを加え、ガラス棒でよく混和する。
7. 37C恒温室に入れ、20~30分毎にガラス棒で攪拌し、4時間保持する。
8. ガーゼ1枚で濾過する。
9. 濾液の0.01mlを3回とり、Fig. 4の如くスライドグラス上の3ヶ所に滴下する (3点標本)。
10. 残りの濾液を3,000rpm 5分間遠沈し上清を捨てる。
11. 沈渣をピペットでよく混和し、全沈渣を Fig. 5の如くスライドグラスに塗布する (沈渣標本)。
12. 3点標本および沈渣標本は風乾後、TBO染色を行う。その方法は Chalvardjian and Grawe (1963) ま

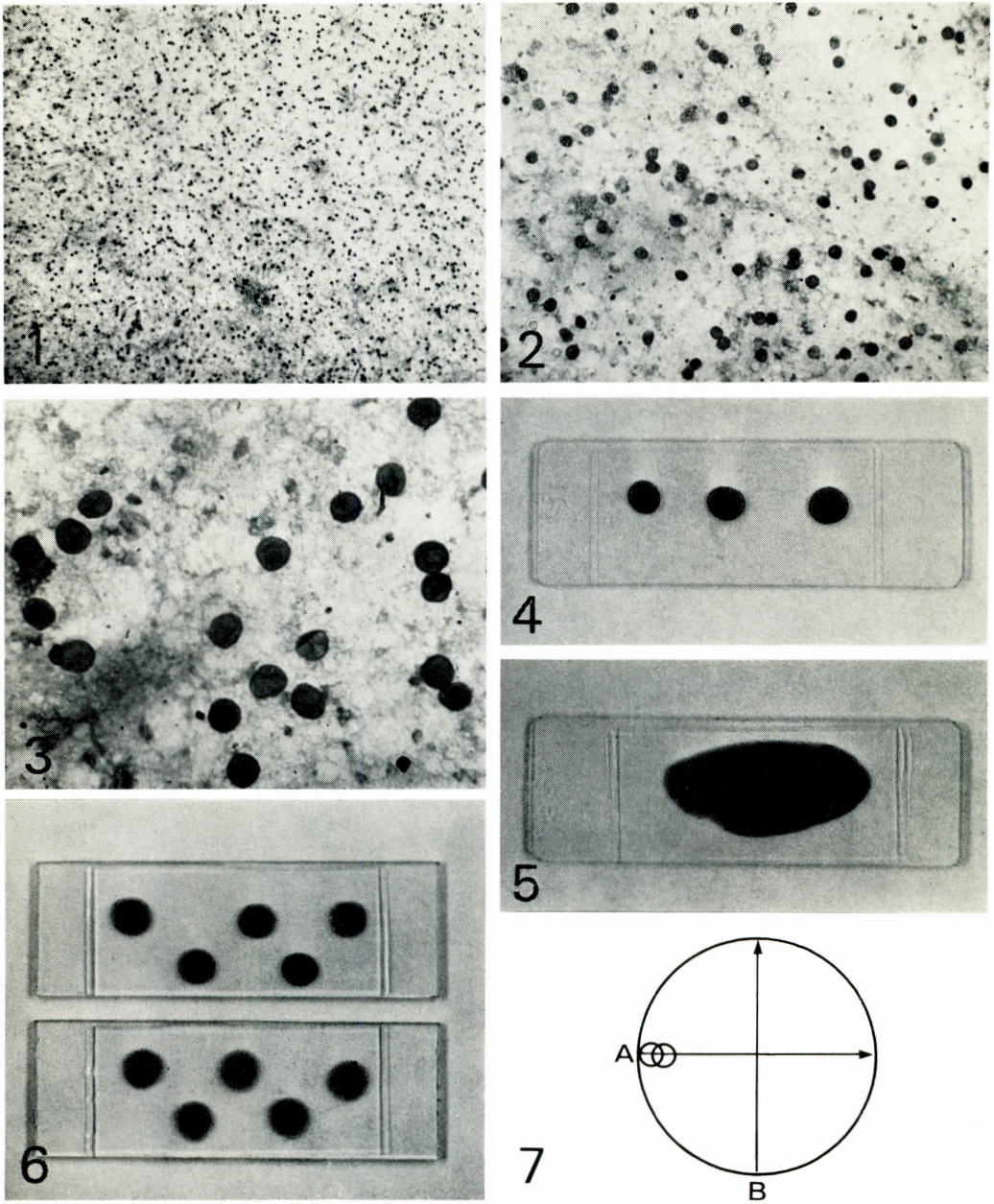


Fig. 1 *Pneumocystis carinii* cysts stained with toluidine blue-0 showing approximately uniform distribution of cysts in the concentration specimen (100×). Fig. 2 400× magnification of the same specimen as shown in Fig. 1. Fig. 3 1,000× magnification of the same specimen as shown in Fig. 1. Fig. 4 3-points specimens, each contains 0.01ml of the cyst suspension, for quantitation. Fig. 5 Sediment specimen which contains all the sediment obtained from 1g of the lungs after collagenase digestion. Fig. 6 10-points specimens for the examination of variations among drops (0.01 ml) of cyst suspension. Fig. 7 The number of cysts in a drop (0.01ml) of cyst suspension were calculated as follows: No. of cysts distributing along axis A (400×) × No. of microscopical field along axis B (400×) × 3.14/4.

たは吉田 (1977) を参照されたい。GMS 染色を行う場合は Grocott (1955) を参照されたい。TBO 染色の方がはるかに簡便である。

13. Pc の検出は沈渣標本の全視野を鏡検して行う。Pc を認めた時は次の定量を行う。

14. Pc の定量には上述の3点標本を用い、400倍拡大で Fig. 7 に示す如く、まずA軸に沿って鏡検し、Pc シストをカウントし、それにB軸における視野数を乗じ、さらに3.14/4 を乗じて0.01ml 中のシスト数とする。3標本の平均値を200倍し、肺1g 中のシスト数とする。100未満は四捨五入する。

シストが非常に多くてカウントし難い場合、例えばスタンプ標本で既にかなり多数のシストが認められている様な場合は、ガーゼ濾過の前に生理食塩水を加えて何倍かに稀釈しておき、濾過後、同様に0.01ml を3ヶ所にとり、それらの平均値に稀釈倍数を乗じて1g 中のシスト数を算出すればよい。

B. 定量で予想される誤差の検討

上述の集シスト定量法において、Pc 浮遊液0.01ml 中のシスト数がどの程度の変異を示すかを検討した。

方法はPc 陽性の肺1g をとり、上述の如く集シストを行い、ガーゼ濾過後、濾液から0.01ml のサンプルを10回とり、Fig. 6 に示す如くスライドグラス上に塗布し、風乾後 TBO 染色を行ってカウントし、肺1g 中のシスト数を算出して変異を比較した。

その結果を検出数の多い順にならべてみると Table 1 の如くである。シスト数の最も多い No. 1 を100%とすれば、最も少ない No. 10 は83.2%で、その単純変異幅

Table 1 Variations of counts of *P. carinii* cysts in the 3-points quantitation method

No. of specimen	Counts of cysts/g of the lungs	Average of No. 1, 2, 3, and No. 8, 9, 10	Average of No. 2, 3, 4, and No. 7, 8, 9
1	1,027,600 (100%)	1,004,600 (100%)	970,000 (100%)
2	1,001,700		
3	984,400		
4	923,900		
5	923,200	857,800 (85.4%)	869,500 (89.6%)
6	918,500		
7	890,200		
8	863,500		
9	854,900		
10	854,900 (83.2%)		

は16.8%である。今回我々の考案した定量法は3点標本を用いる方法であるから、極端な場合を考えてみると No. 1, 2, 3 と No. 8, 9, 10 の変異、すなわち前者の平均値1,004,600と後者の平均値857,800となり前者を100%とすれば後者は85.4%となり変異幅は14.6%となる。この様な極端なことは殆んどないから、少なくとも No. 2, 3, 4 と No. 7, 8, 9 の変異幅10%程度に収まるものと考えられる。

C. ホモジネーションによる影響

ホモジネーションによりシストが破壊され検出数の低下が起こるか否かについて検討した。その方法は、重さ数g のPc 陽性肺の1塊をとり、厚さ1~2mm に出るだけ薄くスライスし、生理食塩水5ml の中に浸し、ピンセットで軽く圧迫しながら肺組織が白くなるまで洗滌し、Pc を水中に遊離させる。さらにガラス棒でよく攪拌したのち、ガーゼ濾過し、その濾液0.01ml を3回、型の如くスライドグラス上に塗布する(前標本)。次に同濾液を約18,000回転2分間ホモジナイズした後3点標本を作成する。この操作を5回反復した。

その結果は Table 2 に示す如く、サンプルAではホモジネーションを行わない時のシスト数と、1~5回行った後のシスト数との間に殆んど差は認められなかったが、サンプルBにおいては4回目のホモジネーション以後やや減少を示した。しかし我々の集シスト法ではホモジネーションを1回行うのみであるので、その影響は殆んどないと考えてよい。

一方、ホモジネーション前後におけるシストの染色性と形態的变化についても検討を行ったが、差異はなかった。

D. 遠心沈殿の回転数および時間によるシスト収集効率

上述の集シスト法術式においてシストの遠沈収集には

Table 2 Influence of repetition of homogenation on *P. carinii* cysts

Frequency of homogenation	Counts of cysts/g of the lungs	
	Sample A	Sample B
0 (pre-homogenation)	4,739,800	6,198,400
1	4,751,600	5,495,000
2	4,984,800	6,096,300
3	4,839,900	5,543,700
4	4,171,200	5,077,400
5	4,889,000	5,259,500

Table 3 Efficiency of centrifugations in cyst concentration starting 1,000 rpm for 5 minutes

Centrifugation		Counts of cysts in each sediment			
rpm	minutes	Sample C		Sample D	
1,000	5*	92,600 (39.1%)	} (75.2%)	18,000 (17.7%)	} (68.8%)
1,000	10	85,600 (36.1%)		52,000 (51.1%)	
2,000	10	55,300 (23.4%)	} (98.6%)	29,300 (28.8%)	} (97.6%)
3,000	10	3,300 (1.4%)		2,400 (2.4%)	
4,000	10	0	} (100%)	0	} (100%)

* Supernatant was recentrifuged by next grade of centrifugation.

Table 4 Efficiency of centrifugations in cyst concentration starting 2,000 rpm for 3 minutes

Centrifugation		Counts of cysts in each sediment			
rpm	minutes	Sample E		Sample F	
2,000	3*	315,300 (80.9%)	} (96.3%)	242,700 (82.5%)	} (96.5%)
2,000	5	60,100 (15.4%)		41,300 (14.0%)	
2,000	10	12,200 (3.1%)	} (99.4%)	9,300 (3.2%)	} (99.7%)
3,000	10	2,300 (0.6%)		900 (0.3%)	

* Supernatant was recentrifuged by next grade of centrifugation.

Table 5 Efficiency of centrifugations in cyst concentration starting 3,000 rpm for 3 minutes

Centrifugation		Counts of cysts in each sediment			
rpm	minutes	Sample G		Sample H	
3,000	3*	177,500 (83.4%)	} (99.2%)	152,800 (84.2%)	} (99.2%)
3,000	5	33,700 (15.8%)		27,300 (15.0%)	
3,000	10	1,600 (0.8%)	} (100%)	1,400 (0.8%)	} (100%)

* Supernatant was recentrifuged by next grade of centrifugation.

3,000rpm 5分を用いているが、これは次の如き実験の結果決定されたものである。

Pc 陽性肺 1g に生理食塩水 5ml を加えてホモジナイズし、ガーゼで濾過した濾液を材料とした。まず 1,000 rpm からスタートした実験結果から述べると (Table 3), 上記濾液を 1,000rpm 5分間遠沈し、上清は別の遠沈管に移し、沈渣は 0.1% コラゲナーゼ 2ml を加え型の如く消化し 3点標本で定量する。上清はさらに 1,000rpm 10分間遠沈し、上清と沈渣に分け沈渣は定量を行う。上清はつぎに 2,000rpm 10分間遠沈を行う。この様にして 3,000rpm 10分間、4,000rpm 10分間まで実験を行った所、Table 3 に示す如く、サンプル C, D とも 2,000rpm 10分間で 97.6~98.6% の回収率があり、3,000rpm 10分間の遠沈でほぼ 100% 回収出来ることが明らかとなった。

次に 2,000rpm からスタートした実験結果は Table 4

に示す如く、2,000rpm 10分間で 99.4~99.7% の回収率を示した。さらに 3,000rpm の実験では Table 5 に示す如く、3分間では 83.4~84.2% の回収率であったが 5分間では 99.2% となった。

上記の結果から、2,000rpm 10分間あるいは 3,000rpm 5分間でほぼ回収の目的が達せられることが明らかとなったが、次の E において述べる如く 3,000rpm 10分間の遠沈でシストが変形または破壊されて検出率に影響するというような懸念はないので、実用上、短時間で処理する利便性から遠心沈殿は 3,000rpm 5分間を用いることに決定した。

E. 遠心沈殿のシストに及ぼす影響

この実験では遠心沈殿の操作によつて Pc シストが破壊されてカウント値が減少しないか、また形態的变化が生じないかについて 実用回転数 2,000~3,000rpm の範

Table 6 Effect of repetition of centrifugation on the counts of *P. carinii* cysts

Frequency of centrifugation	Counts of cysts/g of the lungs			
	2,000 rpm, 10 minutes		3,000 rpm, 10 minutes	
	Sample I	Sample I'	Sample J	Sample J'
0 (pre-centrifugation)	185,700	220,700	588,400	418,500
1	198,000	217,900	574,500	397,600
2	191,600	256,900	658,400	401,000
3	172,300	220,600	689,300	340,700
4	194,600	252,900	728,800	380,000
5	171,300	249,900	650,400	372,500

罫内で検討を行った。

方法は Pc 陽性肺 1g をとり、生理食塩水 5 ml を加え型の如くホモジナイズし、ガーゼで濾過し濾液を用意する。まずこれの 0.01ml を 3 点標本としてシスト数をカウントする。ついでサンプル I, I' では 2,000rpm, J, J' では 3,000rpm で共に 10 分間遠沈した後、混和して再び 3 点標本を作成する。これを 5 回繰り返して得た結果を Table 6 に示した。

この結果によれば 3,000rpm 10 分間の遠沈を 5 回反復するという外力を与えても、集シスト法の検出率には影響がないといえる。ちなみに集シスト法に用いている染色法すなわち TBO 染色や GMS 染色は比較的強靱なシスト壁を染色するのであり、少なくともシスト壁には影響がなかつたものと考えられる。

F. コラゲナーゼ消化法におけるコラゲナーゼの最適濃度の検討

Pc 陽性の肺を 1g とり、型の如くホモジナイズした沈渣を用い、これに 0.01% から 3% に至る種々の濃度のコラゲナーゼを作用させた。その結果、肺組織の消化状態はコラゲナーゼの濃度が高く、時間が長い程良好であつたが、0.05% 以下の濃度では 4 時間の 37C 保持で殆んど消化されなかつた。一方 Pc シストに及ぼす影響はコラゲナーゼ 1% 以上の濃度では 3~4 時間でシスト壁の変形を生じたが、0.5% 以下では変形ならびに TBO 染色での染色性の劣化は認められなかつた。従つて実用上なるべく消化時間を短縮し、Pc への影響を防ぎ、かつ経済性を考慮した結果、コラゲナーゼ濃度は 0.1%、消化時間は 4 時間を基準とすることとした。

実験 III 肺の塗抹標本ならびに組織切片標本と集シスト法との Pc 検出率の比較

従来 Pc の検出には肺の塗抹標本 (スタンプ標本) と組織切片標本とが用いられ、Pc の濃度についても、報

告者により色々な表現法が用いられてきた。ここでは今回我々の考案した集シスト法と従来の検出法との比較結果を述べることにする。

方法：本実験には種々の濃度の感染肺が必要となるので動物実験によることとした。すなわち酢酸コーチゾンを投与し、Pc を発生せしめたラット、およびそれらのコントロールとして無処置のまま飼育したラット、合計 33 匹を種々な経過後屠殺し、その肺を材料とした。屠殺後直ちに右上葉、右下葉、左下葉の断面から 2 枚ずつのスタンプ標本を作成し、1 枚はギムザ染色、他の 1 枚は TBO 染色を施した。組織切片は右下葉の一部について 7 μ の厚さで作成し、3 枚の TBO 染色標本を作つて検索した。集シスト法は残つた肺 1g について実施した。

結果：Table 7 に示す如く、使用したすべてのラットの肺から集シスト法で Pc が検出された。すなわち酢酸コーチゾンを投与しなかつた 5 匹のラット (いずれもシスト数は 1 万個以下) も Pc 陽性で、このことは動物舎内における潜在感染を示唆しているが精細については別途報告の予定である。

とにかく各ラットについて肺 1g 中のシスト数を 1 万個以下の軽感染から 100 万個以上の濃厚感染まで Table 7 の如く 5 段階に分類してみると、1 万個以下であつたラットは 12 匹であるが、これらはスタンプ標本および組織切片標本では全く検出することができなかつた。1 万ないし 10 万個を示したラットは 7 匹であるが、その内 2 匹がスタンプおよび切片標本で Pc を認めたにすぎない。10 万個以上になると、大いの場合、スタンプ標本および切片標本でも見出されるが数が少ないため時に見逃される。しかし 50 万個以上になると従来の方法でも見逃されるものはなくなる。この結果から集シスト法が従来の方法に比し Pc 検出率において格段優れていること

Table 7 Detection capability of *P. carinii* cyst from the lungs by smear, histological section, and concentration methods

Category of cyst counts revealed by collagenase concentration method	Number of rats positive for cyst revealed by		
	concentration method	smear preparation	histological section
less than 10,000	12	0	0
10,000~ 100,000	7	2	2
100,000~ 500,000	8	7	8
500,000~1,000,000	3	3	3
more than 1,000,000	3	3	3
Total of positive rats	33	15	16
Total of negative rats	0	18	17
positive rate (%)	100	45.5	48.5

が明らかである。

考 察

従来、病理解剖肺、生検肺、動物肺などから Pc を検索する方法としては、所謂スタンプ標本および組織切片標本を作成し、前者についてはギムザ染色および TBO 染色、後者については TBO 染色あるいは GMS 染色を施す方法が用いられてきた。我々はさらに合計22種類の染色法を試み Pc 染色性の優劣を論じ第1報として報告した(荻野ら, 1977)。

上述の様な検索法は使用する材料が極めて少量である為、軽度の感染は見逃される可能性が大きい。また感染濃度の定量的表現もなかなかむづかしい。しかし若干の研究者は従来の方法によって次の如き感染濃度の表現を行っている。例えば Frenkel *et al.* (1966) はラットを用いての Pc 発生実験においてスコアを次のような6段階に分けて評価した。すなわち肺組織切片所見上、Pc を認めないものを0、ごく稀に見出すもの1/2、少数の肺胞内に少数認めるもの1、多くの肺胞に少数づつ認めるもの2、ほぼ半分の肺胞に中等度の数の Pc を認めるもの3、半分以上の肺胞に Pc を認めるもの4、として表現した。また Hughes *et al.* (1974) は宿主の反応を加味しつつ、次の3段階評価を行った。すなわち stage I は肺胞壁の細胞内にシストが存在するか、あるいは何ら炎症性の細胞反応なしに肺胞内にシストが存在する場合、stage II は Pc の数がかなり多く、かつ肺胞壁にも少々の炎症反応があり、肺胞マクロファージの反応のみられる場合、stage III は炎症性反応強く、剝離性肺胞炎の像があり、肺胞中に Pc シストが多数みられる場合である。

我々も実験の初期段階(吉田ら, 1974)においてはラットを用いての Pc 発生実験において、肺スタンプ標本ギムザ染色で、1,000倍拡大で100視野中の Pc シストをカウントし、シストが認められないものを0(陰性)、1~19個を grade I (少)、20~49個を grade II (中等度)、50個以上を grade III (多)と分別評価した。

我々は上記の報告の中でも触れたように、さらに能率よくシストを集め、かつ定量的表現の必要性を考え検討を加えてきたのであるがコラゲナーゼ消化法に至った過程は次の如くである。

まず肺組織から Pc を収集しようとする試みは Norman and Kagan (1972) によつて最初に行われた。彼らは間接蛍光抗体法に用いるシスト懸濁液を作成する目的で、Pc に感染している人体肺をホモジナイズし、蔗糖濃度勾配法で夾雑物を出来るだけ除き、sonication によつてさらにシスト以外の宿主細胞を破壊し、出来るだけシストを純粋に採集しようとした。しかし本法は集シストを目的としたものではない。

次に肺組織はコラーゲンを多く含んでいるところから、Hinz and Syverton (1959) はインフルエンザウィルスの研究上、肺の上皮細胞を分離するためにコラゲナーゼを用い成功した。Hendley and Weller (1971) は、このコラゲナーゼ消化法を利用して Pc 感染濃度の定量を試みた。その方法は0.1g の肺に6 ml の0.1%コラゲナーゼを加え37C で数時間消化し、ガーゼ濾過後遠沈し、沈渣に Trowell's T-8 medium を加え1 ml とし、これを倍数稀釈し、1 μ l のサンプルをスライドに塗布し、TBO 染色を施してカウントした。この方法は定量法として大いに意義があるが用いる肺材料が少く、集シスト法としての能力に欠ける所がある。我々はこれらの

報告を参考として改良を加え集シスト効果と定量とを同時に行う方法を考案したわけである。

結 語

Pc の検出法として、肺組織をホモジナイズし、コラゲナーゼで処理する集シスト法を考案した。この方法は従来行われてきた肺スタンプ標本や肺組織切片標本での検索に比し、大量の肺組織を検索できるので検出率が極めて高く、簡便でかつ染色性もよく鏡検が容易である。これは Pc 感染濃度の低いものの検出に役立つのみならず、感染濃度を定量的に表現でき、今後の Pc 研究に大いに役立つものと考えらる。

参 考 文 献

- 1) Chalvardjian, A. M. and Grawe, L. A. (1963) : A new procedure for the identification of *Pneumocystis carinii* cysts in tissue sections and smears. *J. Clin. Path.*, 16, 383-384.
- 2) Frenkel, J. K., Good, J. T. and Shultz, J. A. (1966) : Latent pneumocystis infection of rats, relapse, and chemotherapy. *Lab. Invest.*, 15, 1559-1577.
- 3) Grocott, R. G. (1955) : A stain for fungi in tissue sections and smears. *Amer. J. Clin. Path.*, 25, 975-978.
- 4) Hendley, J. O. and Weller, T. H. (1971) : Activation and transmission in rats of infection with pneumocystis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 137, 1401-1404.
- 5) Hinz, R. W. and Syverton, J. T. (1959) :

- Mammalian cell culture for study of influenza virus. 1. Preparation of monolayer cultures with collagenase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 101, 19-22.
- 6) Hughes, W. T., McNabb, P. C., Makres, T. D. and Feldman, S. (1974) : Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 5, 289-293.
 - 7) Norman, L. and Kagan, I. G. (1972) : A preliminary report of an indirect fluorescent antibody test for detecting antibody to cysts of *Pneumocystis carinii* in human sera. *Amer. J. Clin. Path.*, 58, 170-176.
 - 8) 荻野賢二・吉田幸雄・竹内 滋・猪飼 剛・山田稔(1977) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎の研究. 1. *P. carinii* の染色法の比較検討. *寄生虫誌*, 26, 116-126.
 - 9) Pifer, L. L., Hughes, W. T. and Murphy, Jr. M. J. (1977) : Propagation of *Pneumocystis carinii* in vitro. *Pediat. Res.*, 11, 305-316.
 - 10) 吉田幸雄・荻野賢二・有菌直樹・近藤力王至・松野喜六(1974) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis* 肺炎に関する研究. (1) Cortisone 処理ラットにおける原虫の出現. *寄生虫誌*, 23(増), 23.
 - 11) 吉田幸雄・楠 智一・伊地知浜夫(1976) : ニューモチスチス・カリニ肺炎について, *日本医事新報*, 2735, 29-34.
 - 12) 吉田幸雄(1977) : 図説人体寄生虫学, 第1版, 254頁, 南山堂, 東京.

Abstract

STUDIES ON *PNEUMOCYSTIS CARINII* AND *PNEUMOCYSTIS CARINII*
PNEUMONIA II. METHOD FOR CONCENTRATION
AND QUANTITATION OF *P. CARINII* CYSTS

TSUYOSHI IKAI, YUKIO YOSHIDA, KENJI OGINO, SHIGERU TAKEUCHI

AND

MINORU YAMADA

(*Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural University
of Medicine, Kyoto, Japan*)

For the detection of *Pneumocystis carinii* from human or animal lungs, the smear and section of the lungs so far have been generally used. However, those methods are of little avail especially in the light infections because the quantity of material used is so small. The present study indicates a new method which would be able to concentrate the cysts efficiently, and express the density of infection quantitatively at the same time. The procedures are as follows:

- 1) 1 g of the lungs with 5 ml of saline is homogenized by 18,000 rpm for 2 minutes.
- 2) The homogenate is centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes.
- 3) The sediment is suspended in 2 ml of 0.1 % collagenase then incubated in 37C for four hours with several times of stir.
- 4) The digested fluid is filtered through a sheet of gauze.
- 5) Three drops, each contains 0.01 ml of the fluid were put on a slide glass (3-points specimen, see Figure 4).
- 6) The rest fluid is centrifuged, then all the sediment is spread on a slide glass (sediment specimen, see Figure 5).
- 7) These specimens are stained with toluidine blue-O or methenamine silver nitrate.
- 8) The sediment specimen is thoroughly examined for *P. carinii* cyst.
- 9) When cyst is found, the 3-points specimens are examined for quantitation under 400× magnifications. The number of cysts in 0.01 ml = number of cysts distributing along the axis A × number of microscopical field along the axis B × 3.14/4 (see Figure 7).
- 10) The number of cysts in 1 g of the lungs = average number of 3-points specimens × 200.

The efficiency of the concentration method mentioned above was practically compared with the usual methods, smears and sections. As shown in Table 7, the usual methods scarcely proved the cysts when the cysts per gram were less than 10,000.

This concentration and quantitation methods would be valuable not only in pointing out the organism in the light infections such as latent infection and post-treatment, but also in preparing materials for antigen, electron microscopy, culture and so on.