

## *Toxoplasma gondii* ホモジネート及び遠心分画物の の Maus における感染防御抗原性

土 本 正 明

徳島大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年6月7日 受領)

トキソプラズマ症に対する特異抵抗性の機序は、防御抗原の分析と宿主の免疫発現様式との両面から追究されているが、いまだ説得力のある解答は得られていない。Weinman (1952) は、感染に耐えた宿主の長期にわたる高い抵抗性は細胞性免疫応答に依存することを主張した。その後、死虫あるいは虫体分画物の免疫原性の研究から、防御反応の中で抗体の役割並びに抗原中に存在する核酸の非特異的抵抗増強作用も示唆されたが、結局宿主に十分な抵抗力を付与するには細胞性免疫応答を高めることが必要である (中山, 1969; Krahenbuhl *et al.*, 1972; Araujo and Remington, 1974) と思われる。

実験トリコモナス症に対する免疫学的研究から岡ら (1970) は、防御抗原としての有効因子は原虫のリボソームに局在することを認め、更にモルモットにおける遅延型皮内反応の実験から、リボソームは細胞性免疫の成立に必要な抗原活性基を具備するが、防御能発動のためには Freund の完全アジュバントの共存を要求することを述べた (岡ら, 1976)。

トキソプラズマ症に対しても多くの研究者がこれに類似した問題に取り組んできたが、実験条件の差が成績に著しく影響し、細部では意見の一致が見られていない。その理由の一つに、強毒株 tachyzoite の組織内接種という攻撃方法が挙げられる。この場合攻撃原虫の病原性と安定度とは、免疫効果判定の重要なかぎとなり得る。tachyzoite は外的環境に対する抵抗性が低く不安定であり、株による病原性の差異も著しい。その反面組織内接種が感染力を助長し、攻撃状態を過度にすることも予測され、成績の解析を混乱させることが考えられる。そこで著者は、既に病原性の明らかな Beverley (Bv) 株

oocyst を自然感染に近い状態で攻撃に採用 (伊藤ら, 1976) して、原虫ホモジネート及び遠心分画画分で免疫したマウスの oocyst 感染に対する防御能を検討し、トキソプラズマ症における感染防御機構の究明を進めた。

### 材料及び方法

マウス: dd Y系雌 (22~25g) を用い、1実験群 (10~14匹) は体重差 1g 前後に整え、恒温下で固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, MF) 及び水道水で飼育した。

原虫: *Toxoplasma gondii* 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、3~5日ごとにマウス腹腔内に接種して維持した。Bv 株は1967年慶応義塾大学医学部寄生虫学教室から分与され、マウスに継代維持したものを使用した。oocyst は Bv 株感染マウスの脳を摂食させたネコのふん便から採取し、伊藤ら (1976) の方法によつて分離成熟させたものを用いた。

抗原: RH 株感染マウス腹水中の tachyzoite を集めて生理食塩水で遠心洗浄し、グラスフィルター (池本理工株式会社, No.3) でろ過の上、アセトン・ドライアイスによる凍結融解を5回繰り返した。この破壊原虫をテフロングライNDERで十分均等にし、りん酸緩衝食塩水で $10^9$ 原虫/ml 分のホモジネートとした。

その一部は更に Table 1 の過程により 5~10C の温度下で遠心分画して、 $13,000 \times g$  沈渣 (Sed 1) 並びに  $100,000 \times g$  沈渣 (Sed 2) 及び上清 (Sup) を得、沈渣はりん酸緩衝食塩液で素原料のホモジネートの量と等量になるよう再浮遊して使用した。

生虫免疫のためには、Bv 株 cyst 内原虫を遊離させ、

Table 1 Preparation procedure of centrifugal cell fractions of *Toxoplasma gondii* tachyzoites

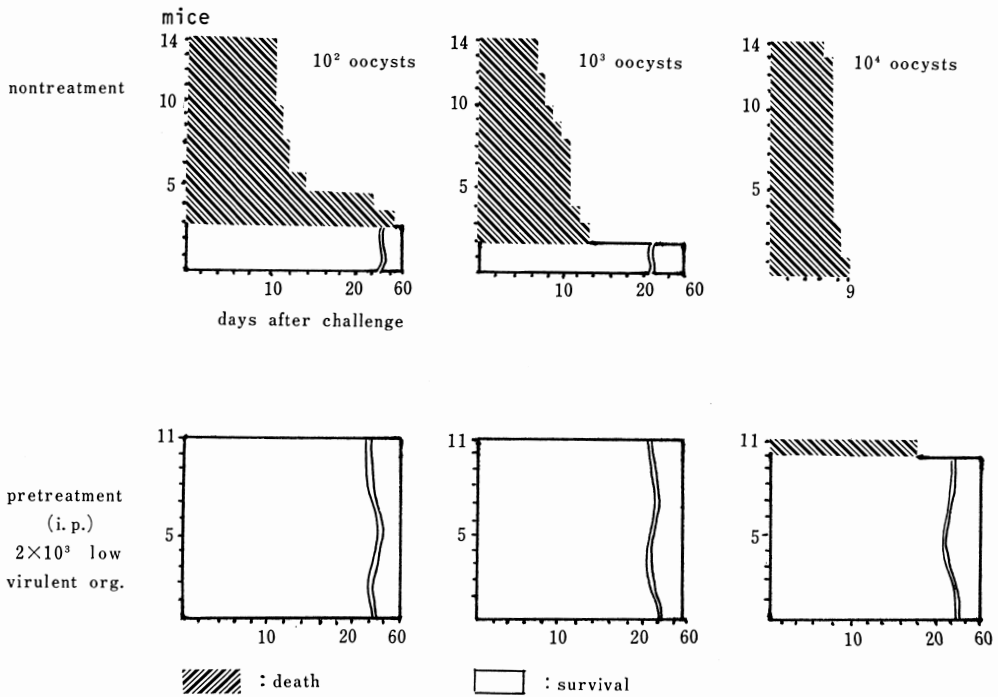
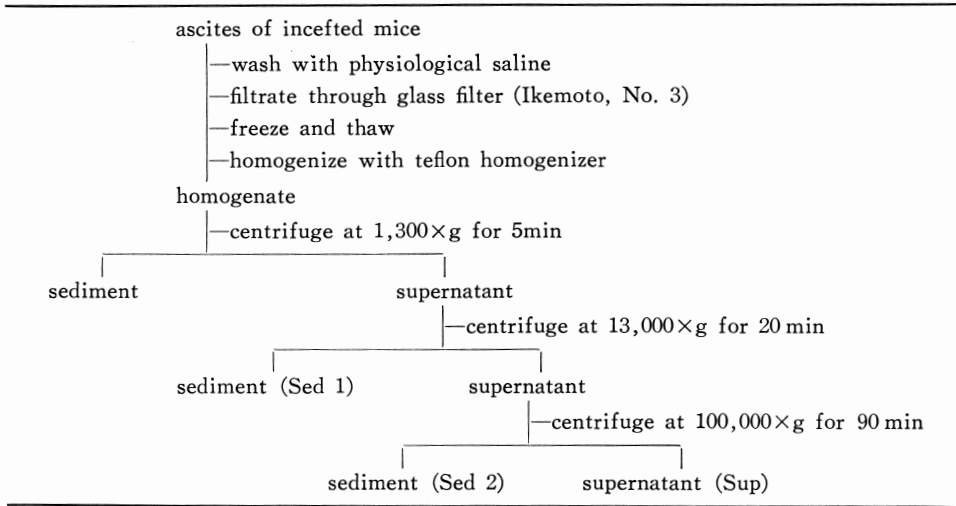


Fig. 1 Effects of the challenge dose of oocyst on resistance in mice pretreated with low virulent *Toxoplasma gondii*.

その  $2 \times 10^3$  個/マウスを腹腔内に接種した。

免疫及び攻撃：調製した各抗原の0.1ml ( $10^8$ 原虫相当量)を単独若しくは等量の Freund の complete adjuvant (FCA) と共にマウス腹腔内に接種し、10日後に同

量の抗原単独で腹腔内に追加免疫した。

攻撃には初回免疫30日後に規定量の oocyst を経口投与針でマウス胃内に接種し、攻撃後30日まで毎日定時に観察して生死を記録した。なお生存マウスは攻撃60日後

に放血し、脳内 cyst の有無を調べた。

各抗原の防御抗原としての評価には、免疫マウスの生存率及び死亡マウスの平均生存日数を対照と比較し、t 検定で有意差を算出した。

電子顕微鏡観察：細胞分画物中の細胞成分の分布を調べるため、試料を等量の2%りんタングステン酸 (pH 6.4) と混ぜ、10分後コロジオン膜を張ったマイクログリッドに乗せ、カーボン蒸着して倍率 100,000~50,000 で観察した。

化学組成の分析：各抗原から Schneider (1945) の方法でタンパク質、RNA、脂質、及び糖質を分画し、それぞれフォーリン・フェノール反応 (Lowry *et al.*, 1951)、オルシノール反応 (Mejbaum, 1939)、有機りん測定法 (Fiske and Sabbarow, 1929)、及びアンスロン法 (Hodge and Hofreiter, 1962) で定量した。

血清抗体価の測定：攻撃3日前に免疫マウスの尾静脈から採血、分離した血清と抗原感作乾燥血球 (栄研化学株式会社、トキソテスト) との赤血球凝集反応から力価を求めた。なお血球は同一ロットの製品を使用した。

## 成 績

生虫免疫マウス群及び対照群は $10^2$ 、 $10^3$ 、及び $10^4$ 個の oocyst で攻撃した。Fig. 1 に示すように対照群 (各群 14匹) マウスの致死率はそれぞれ 78.6、85.7、及び 100% を示し、致死動物の平均生存日数はそれぞれ  $14.2 \pm 2.2$ 、 $9.8 \pm 0.6$ 、及び  $7.2 \pm 0.2$  であった。

しかるに、免疫群 (各群 11匹) マウスは $10^2$ 及び $10^3$ 個の oocyst の攻撃に対し 100% 生存し、 $10^4$  攻撃に対しても 1匹の感染死を見たにすぎなかった (Fig. 1)。

ホモジネートの防御抗原性については、まず接種経路を検討した結果、腹腔内接種が最も有効であった (Table 2) ので以下の実験の免疫はすべて腹腔内に行った。次いでマウス当たり $10^6$ 、 $10^7$ 、及び $10^8$ 原虫の抗原濃

度とし、その免疫効果を求め、更に FCA 添加の効果についても検討した。その結果、Fig. 2 に示すように無処置及び FCA 対照群 (各群 10匹) は全例死亡し、その平均生存日数はそれぞれ  $10.2 \pm 0.3$  及び  $9.9 \pm 0.4$  であった。ホモジネート単独の免疫では $10^8$ 原虫の場合のみ 80% (8/10) のマウスが生存し、他はすべて死亡した。死亡マウスの平均生存日数は $10^8$ 、 $10^7$ 、及び $10^6$ 群それぞれ  $10.0$ 、 $12.4 \pm 0.6$ 、及び  $11.4 \pm 0.6$  であり、いずれも対照との差を認めなかった。

FCA を加えた場合 $10^8$ 、 $10^7$ 、及び $10^6$ 原虫量でそれぞれ 70 (7/10)、40 (4/10) 及び 20% (2/10) のマウスが生存し、死亡マウスの平均生存日数はそれぞれ  $11.3 \pm 0.5$ 、 $15.9 \pm 2.4$ 、及び  $10.3 \pm 1.0$  で、 $10^7$ 原虫の場合のみ有意な ( $P < 0.05$ ) 延命が認められた。

細胞分画物は、マウス当たり $10^8$ 原虫分に調製して FCA と共に初回免疫し、更に10日後分画物単独で追加刺激した。その結果、Sed 1 及び 2 並びに Sup による免疫宿主はそれぞれ 60 (6/10)、40 (4/10) 及び 20% (2/10) が攻撃に耐えて生存し、致死動物の平均生存日数はそれぞれ  $10.0$ 、 $14.7 \pm 2.6$ 、及び  $10.1 \pm 0.5$  であった。また、Sed 1 及び 2 はいずれも対照の無処置群及び FCA 単独処置群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) な延命効果を示した (Fig. 3)。

細胞構成成分としての抗原分画物の位置付けは電子顕微鏡像から解析した (Photo 1, 2)。Sed 1 には主として大きな膜破片 (Photo 1 a)、paired organelle と呼ばれている構造物の断片 (Photo 1 c)、及び粗面小胞体の断片 (Photo 1 b) が見られ Sed 2 はリボソーム (モノマー及び亜粒子) 及び膜小片であった (Photo 2 a, 2 b)。

画分における化学組成の分布については、Table 3 のとおりタンパク質の過半量は Sup に集まり、構造タンパク質は主として Sed 1 に回収された。RNA は大半が

Table 2 Effects of immunization route on resistance to the challenge with oocysts in mice immunized with *Toxoplasma* cell homogenate

Route	Number of mice	Number of survivals	Per cent survival	Mean survival days of the dead mice
per os	10	0	0	$8.9 \pm 0.4$
subc.	10	2	20	$11.6 \pm 0.9$
i. p.	10	7	70	$12.0 \pm 0.2$
nontreatment	10	0	0	$8.8 \pm 0.3$

± : standard error

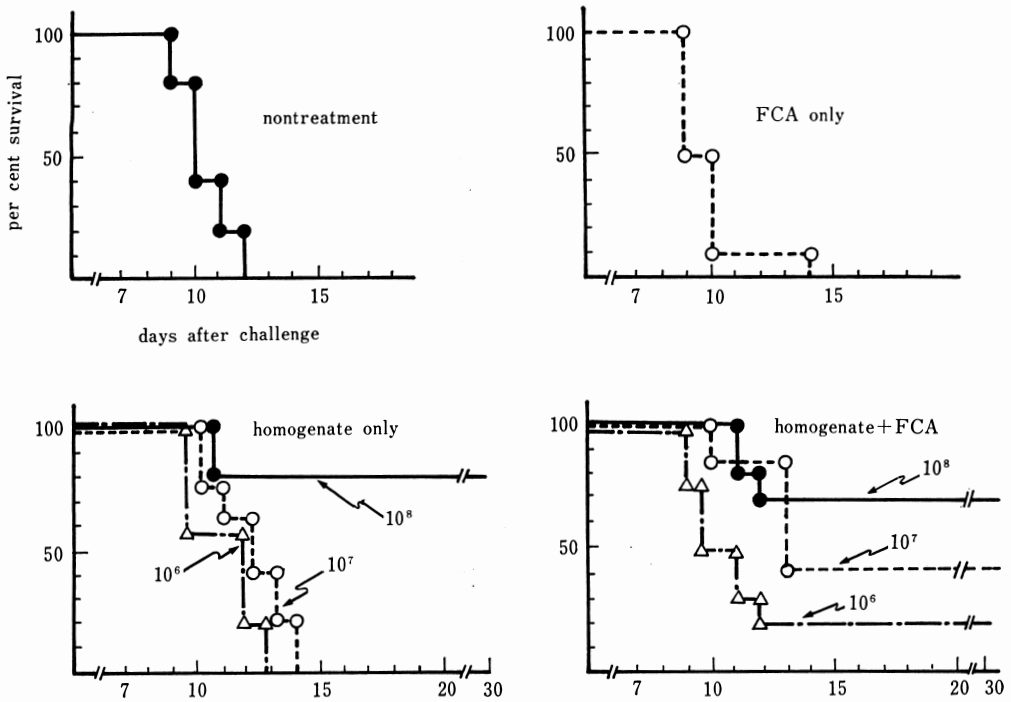


Fig. 2 Resistance to the challenge with oocysts in mice immunized with cell homogenate of *Toxoplasma* tachyzoites in the presence and absence of Freund's complete adjuvant.

FCA : Freund's complete adjuvant

Table 3 Comparative analyses of chemical components of centrifugal cell fractions in *Toxoplasma* tachyzoites

	Protein μg/ml	RNA μg/ml	Phospholipid μg/ml	Saccharide μg/ml
13,000×g sediment (Sed 1)	640	46	1,003	198
100,000×g sediment (Sed 2)	260	43	50	168
100,000×g supernatant (Sup)	1,520	26	trace	217

沈渣 (Sed 1, 2) に回収され、これはリボソーム由来と考えられる。膜構成成分のりん脂質の大部分は Sed 1 に検出され、糖類もほぼ同程度であった。

赤血球凝集反応による免疫マウスの血清抗体価 (Fig. 4) は、平均値及び標準偏差を  $2^n$  の指数で算出し、平均値の t 検定で有意差を求めた。その結果、FCA 添加ホモジネート群が免疫群中最高の力価 (6,028倍;  $P < 0.05$ ) を示した。Sed 2 免疫群のうち 2 例は 8,192 倍であったが、平均値は Sed 1 及び Sup と大差なかった。

なお、攻撃 60 日後の生存マウスに対する脳の検索でそ

れらのすべてに cyst を検出した。

総括及び考案

*Toxoplasma* 感染に対する防御の研究は弱毒生虫免疫に始まり (Weinman, 1952), その優れた効果は幾度か再現された (Cutchins and Warren, 1956; 上田, 1960; Nakayama, 1964). 本原虫の持つ広範な感染スペクトルと偏性細胞内寄生という特性は、感染防御の研究の上にも興味ある刺激をもたらした。しかし、死虫免疫は弱毒生虫免疫に比べはるかに劣った結果しか得られず

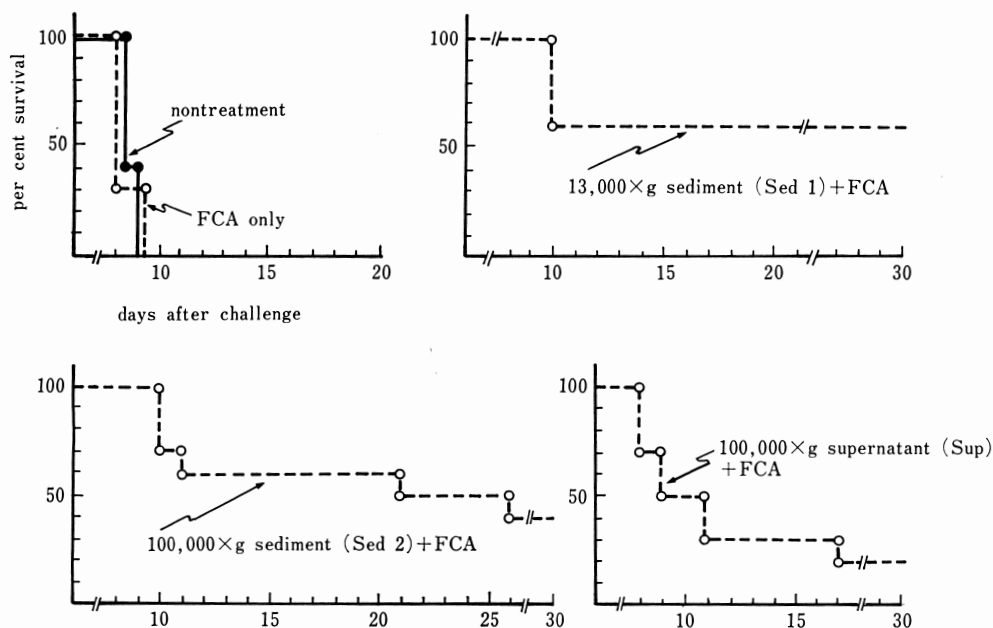


Fig. 3 Resistance to the challenge with oocysts in mice immunized with centrifugal cell fractions of *Toxoplasma* tachyzoites in the presence of Freund's complete adjuvant.

FCA: Freund's complete adjuvant

(Nakayama, 1965), 抗原解析に別な方向を求める端緒を与えた。著者は、従来宿主免疫能力の判定に適用されている攻撃方法が強毒株 tachyzoite の組織内接種であることに注目し、この方法では免疫宿主がその防御能を発揮する前に感染が進展し、抗原情報の確認及びそれによつて誘発される免疫学的応答の解析には著しく不利であると考えた。かかる観点から現今自然界感染形として注目されている oocyst を攻撃に採用し、経口投与により免疫効果の判定を試みた。

まず、oocyst 攻撃に対する生虫免疫の効果を観察した結果、過剰と思われた $10^4$ 個の oocyst 攻撃に対しても過半の宿主が耐過することを認め (Fig. 1), 生虫免疫が oocyst 感染に対しても防御応答能の点で優れていることを確認した。この成績を参考に、その後の試験の効果判定には  $3 \times 10^3$  個を攻撃量に選んだ。

ホモジネートによる免疫はその接種ルートからの検討から始めた。その結果、腹腔内接種が最も効果的で、たとえ経口攻撃の場合でも経口免疫は無効に近いことを知った (Table 2)。更にホモジネートの使用量あるいは FCA 添加による免疫効果の有無を観察した。その結果、ホモ

ジネート単独免疫で感染に耐え得る量としては  $10^8$  原虫分を必要としたが、FCA 添加の場合は  $10^7$  原虫分で 40% (4/10),  $10^6$  分でも 20% (2/10) が生存した (Fig. 2)。なお、この結果を基に細胞分画物による免疫には FCA を添加した。

細胞分画画分中 Sed 1 が最も高い免疫効果を表し、これに次ぐ Sed 2 は生存率で Sup より高く、致死動物の平均生存日数も明らかに ( $P < 0.05$ ) Sup を上回った (Fig. 3)。この成績は有効な抗原因子が沈渣に存在したことを示唆し、沈渣の細胞成分 (Photo 1, 2) 及び化学組成値 (Table 3) から膜構造及びリボソームに有効因子を求めることができると思う。実験トリコモナス症において岡ら (1967) は膜構造及びリボソームに防御抗原性を認めたが、更にその後の研究 (岡ら, 1970) から膜画分の有した抗原性は混在したリボソームあるいはリボソームタンパク質に由来するものと推定した。Araujo and Remington (1974) はトキソプラズマの実験で Freund の incomplete adjuvant を加えて遠心分画の抗原性を検索し、リボソーム由来の RNA に特異抗原性を予測したが、合成ポリヌクレオチド及びリステリ

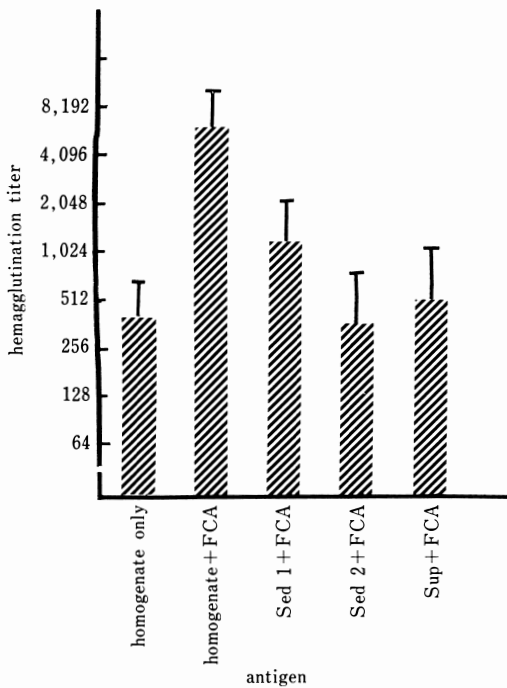


Fig. 4 Hemagglutination titers in mice immunized with *Toxoplasma* cell homogenate and centrifugal cell fractions in the presence of Freund's complete adjuvant.

FCA : Freund's complete adjuvant

ア菌感作マウスのマクロファージ由来 RNA でも同様の効果が得られることから、RNA の抗トキソプラズマ作用は非特異的で、宿主の抵抗力を強化するものと考えた。

本実験における Sed 1 及び 2 の RNA 値はほぼ等しく (Table 3), 免疫効果は Sed 1 の方が顕著であったことから、Sed 1 及び 2 にほぼ等しく分布した RNA が防御の主役であるとは考え難い。むしろ、Sed 1 に回収された多量のりん脂質から膜構造の存在が考えられる。この膜構造の抗原性若しくは補助作用 (岡ら, 1970) による働きが Sed 1 接種マウスの高い生存率として表れたものと思われる。なお攻撃60日後の生存マウスに対する脳内 cyst の検索で、すべてのマウス特にホモジネート及び分画物で免疫したマウスに cyst が存在したことは、攻撃原虫が cyst の形で潜在していることを意味している。

防御における抗体の役割は補体との関係で意味付けら

れ (常松, 1963), 原虫の侵入に対し抑制的に働くが、細胞内増殖には影響を及ぼし得ないと言われている。今回の実験で最も高い抗体価を上げたのは FCA 添加ホモジネートで、Sed 1 がこれに次いだ。この両者の範囲ではいずれも高い生存率 (Fig. 2, 3) を示しているのので、凝集抗体が体液中に遊離した原虫に働いたものと思われる。しかしこの関係は他の抗原感作では見られず、ホモジネート単独、Sed 2, 及び Sup の場合の抗体価はほぼ同程度であったが、生存率はそれぞれ 70 (7/10), 40 (4/10), 及び 20% (2/10) と開きがあり、両者は相関しなかった。特に Sup の刺激で誘発された凝集抗体には感染防御における役割は少ないと考えられた。防御における抗体の働きは、原虫の細胞内侵入をできる限り抑え、免疫担当細胞の増強に時間を貸す役割かも知れない。強い感染力のある原虫を抗体独自で完全に殺滅することは不可能と思われる。一方、腸管における分泌形 IgA の防御効果を期待して経口免疫を行ったが、得られた成績から見て侵入抑制は果たされなかったものと考えられる。

#### 要 約 .

*Toxoplasma gondii* の防御抗原解析の系統的研究のために、原虫細胞分画物による免疫マウスに oocyst の経口攻撃を行って、有効抗原の所在の判定を試みた。

抗原素材として *T. gondii* RH 株 tachyzoite を凍結融解後テフロングラインダーを用いてホモジネートに調製した。これを  $1,300 \times g$  5 分間遠心し、上清を更に  $13,000 \times g$  沈渣 (Sed 1),  $100,000 \times g$  沈渣 (Sed 2), 及び最終上清 (Sup) に分画して、マウスを免疫した。生虫免疫は Beverley 株 (弱毒) 感染マウスの cyst から遊離した bradyzoite で行った。攻撃には、Beverley 株感染ネコのふん便から分離し、十分に成熟させた oocyst を用いた。免疫は初回に Freund の complete adjuvant (FCA) を添加し、10日後に抗原単独で追加免疫した。攻撃は初回免疫 30 日後に oocyst  $3 \times 10^8$  個を経口投与して行い、その後 30 日間観察した。なお攻撃 3 日前に各群のマウス 5 匹ずつを放血し、血清中のトキソプラズマ抗体を間接赤血球凝集試験で測定した。

1. 生虫免疫マウスは  $10^2$  及び  $10^3$  個の oocyst の攻撃に全例耐過し、 $10^4$  攻撃においても 91% (10/11) が生存した。

2.  $2 \times 10^8$  原虫相当のホモジネートで腹腔内、皮下、及び経口免疫した場合の生存率はそれぞれ 70 (7/10), 20

(2/10), 及び0% (0/10)であった。ホモジネート単独の腹腔内免疫で $2 \times 10^6$ 及び $2 \times 10^7$ 原虫分の場合は無効であったが、 $2 \times 10^8$ 原虫分で80% (8/10) が生存した。ホモジネートに FCA を添加した場合 $2 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^7$ , 及び $2 \times 10^8$ 原虫分でそれぞれ20 (2/10), 40 (4/10), 及び70% (7/10) が耐過した。

3. 電子顕微鏡観察で膜成分は主として Sed 1 に、一部小破片として Sed 2 に認められた。リボソームは Sed 1 及び 2 に分布し、両画分の RNA 量から見てほぼ等量であった。タンパク質の大半は Sup に含まれ、リボソームのモノマー及び亜粒子は両沈渣画分に見られた。

4. Sed 1 及び 2 並びに Sup で免疫したマウスは oocyst 攻撃に対しいずれも有意な抵抗性を示し、生存率はそれぞれ60 (6/10), 40 (4/10), 及び20% (2/10) であった。

5. 免疫マウスの攻撃前血清の平均抗体価はホモジネート, Sed 1, 及び 2 並びに Sup 群についてそれぞれ6,028, 1,178, 388, 及び512倍であった。

以上の成績から、*T. gondii* oocyst の経口感染に対し、原虫ホモジネートは宿主に高い抵抗性を付与する能力を有し、細胞分画物中沈渣の画分にその防御抗原因子の存在が示唆された。また、血清抗体は防御に何らかの形で関与するが、そのみでは十分な防御は得られないと考えられた。

## 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の各位に感謝致します。

## 文 献

- 1) Araujo, F. G. and Remington, J. S. (1974) : Protection against *Toxoplasma gondii* in mice immunized with *Toxoplasma* cell fractions, RNA and synthetic polyribonucleotides. *Immunology*, 27, 711-721.
- 2) Cutchins, E. C. and Warren, J. (1956) : Immunity patterns in the guinea pig following *Toxoplasma* infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. *Am. J. Trop. Med.*, 5, 197-209.
- 3) Fiske, C. H. and Sabbarow, Y. (1929) : Phosphocreatin. *J. Biol. Chem.*, 81, 629-679.
- 4) Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. (1962) : Methods in Carbohydrate Chemistry, 1st ed., vol. 1, Academic Press, N. Y., 380 pp.
- 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, 133-149.
- 6) Krahenbuhl, J. L., Ruskin, J. and Remington, J. S. (1972) : The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, 108, 425-431.
- 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 256.
- 8) Mejbbaum, W. (1939) : Estimation of small amount of pentose especially in derivatives of adenylic acid. *Z. Physiol. Chem.*, 258, 117-120.
- 9) Nakayama, I. (1964) : Persistence of the virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* in the brain of immune mice. *Keio J. Med.*, 13, 7-12.
- 10) Nakayama, I. (1965) : Effects of immunization procedures in experimental toxoplasmosis. *Keio J. Med.*, 14, 63-72.
- 11) 中山一郎 (1969) : トキソプラズマ死虫ワクチン注射動物における感作血球凝集反応抗体価の持続性と強毒株攻撃に対する抵抗性. *寄生虫誌*, 18, 539-549.
- 12) 岡 好万・伊藤義博・新里仁達・尾崎文雄 (1967) : 原虫細胞の免疫原性の解析 20 *Trichomonas foetus* の microsome から分離した膜構造と ribosome の防御抗原性. *医学と生物学*, 75, 17-20.
- 13) 岡 好万・新里仁達・尾崎文雄 (1970) : 原虫細胞の免疫原性の解析 26 *Trichomonas foetus* の ribosomal protein および membrane structure の抗原的役割と complete adjuvant 添加の意義. *寄生虫誌*, 19, 182-188.
- 14) 岡 好万・林 弘三・石川富士郎・富吉富貴子・尾崎文雄・伊藤義博・古谷正人 (1976) : *Trichomonas foetus* ribosome で感作したモルモットの細胞性および抗体性免疫応答. *医学と生物学*, 93, 335-339.
- 15) Schneider, W. C. (1945) : Phosphorus compounds in animal tissue: extraction and estimation of desoxyribose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.*, 161, 293-303.
- 16) 常松之典 (1963) : 感染防御抗体. *日本医学会第16回総会学術講演集*, 2, 744-749.
- 17) 上田春人 (1960) : *Toxoplasma* (チステ形成株)

の毒力及び免疫について. 慶応医学, 37,  
1631-1638.

18) Weinman, D. (1952) : *Toxoplasma* and toxo-

plasmosis. *Ann. Rev. Microbiol.*, 6, 281-  
298.



**Abstract**

PROTECTIVE ANTIGENICITY OF CELL HOMOGENATE AND CENTRIFUGAL  
CELL FRACTIONS OF *TOXOPLASMA GONDII* IN MICE

MASAAKI TSUCHIMOTO

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

Protective antigenicity of cell components of *Toxoplasma gondii* against oocyst infections was studied in mice toward the elucidation of protection mechanism in toxoplasmosis.

Tachyzoites of RH strain *T. gondii* were disrupted by freezing and thawing, and then homogenized with teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at  $1,300\times g$  for 5 minutes and the supernatant was fractionated into  $13,000\times g$  sediment (Sed 1),  $100,000\times g$  sediment (Sed 2), and the final supernatant (Sup). Bradyzoites liberated from the cysts of mice infected with Beverley strain (low virulent) parasites were used as a live vaccine. Oocysts recovered from the feces of cat infected with Beverley strain parasites were fully matured before they were employed for the challenge. Mice were immunized initially with antigen in Freund's complete adjuvant (FCA) and a booster was given after 10 days in the absence of adjuvant. Thirty days after initial immunization, mice were challenged orally with  $3\times 10^8$  oocysts and observed for thirty days. Five mice of each of the immunized group were bled three days before challenge and their sera were tested by passive hemagglutination for *Toxoplasma* antibody.

1. All of the mice immunized with  $2\times 10^8$  living organisms and challenged with  $10^2$  and  $10^8$  oocysts survived and also 91 per cent of the animals conquered the challenge with  $10^4$  oocysts.

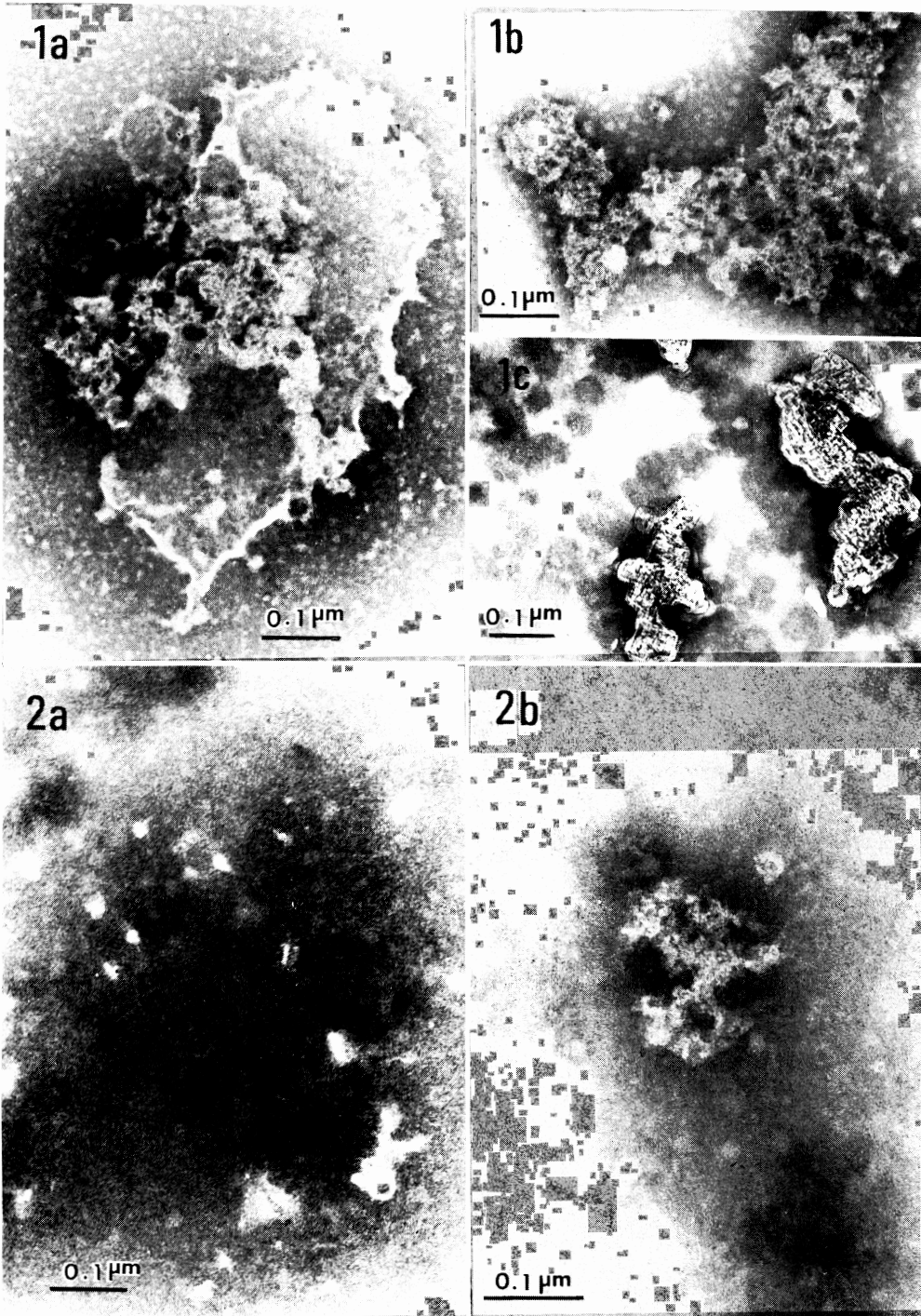
2. Per cent survival of mice immunized intraperitoneally, subcutaneously, and orally with the homogenate of  $2\times 10^8$  cells was 70, 20, and 0, respectively. Protective ability in mice immunized intraperitoneally with the homogenate of  $2\times 10^6$ ,  $2\times 10^7$ , and  $2\times 10^8$  cells were examined in the presence and absence of FCA. No protective activity was induced in mice by inoculation with the homogenate of  $2\times 10^6$  and  $2\times 10^7$  cells in the absence of FCA while eight of ten mice given the homogenate of  $2\times 10^8$  cells survived. On the contrary, per cent survival of the mice immunized with the homogenate of  $2\times 10^6$ ,  $2\times 10^7$  and  $2\times 10^8$  cells in the presence of FCA was 20, 40, and 70, respectively.

3. Membrane structure of the parasite cells were recovered mostly from Sed 1 and a part from Sed 2 as fragments. The distribution of ribosomes in Seds 1 and 2 were approximately equivalent to the RNA content of both fractions. The great part of protein was contained in Sup. Ribosomal monomers and their subparticles were observed in Seds 1 and 2 under the electron microscope.

4. Mice immunized with the above three cell components fractionated from the homo-

genate demonstrated a significant resistance to the challenge with oocysts and per cent survival was 60, 40, and 20, respectively.

5. Mean value of serum antibody titers in mice immunized with the homogenate, Sed 1, Sed 2, and Sup was 1:6,028, 1:1,176, 1:388 and 1:512, respectively.



#### Explanation of Photographs

Photos. 1, 2 Electron micrographs of negative stained 13,000×g sediment (1) and 100,000×g sediment (2) of *Toxoplasma* homogenate