

ネズミマラリア原虫に関する研究

I. 不連続密度勾配液による原虫感染赤血球 とメロゾイトの分離精製法

藤 岡 寿 川 本 文 彦 熊 田 信 夫

(昭和58年1月31日 受領)

Key words: *Plasmodium berghei*, merozoite isolation, murine malaria
metrizoic acid, discontinuous density gradient

緒 言

マラリアは人類の歴史が始まって以来、多くの人命を奪ってきた重要な疾病のひとつであり、現在なお世界各地の熱帯・亜熱帯地域に広く蔓延し、毎年約2億人の患者が発生している (WHO, 1976). さらに近年の国際交流の増加に伴って、日本その他の非流行地域でも輸入マラリアの症例が増大傾向を示している (Nakabayashi *et al.*, 1976; 大友ら, 1976; 大鶴, 1977).

約100年前、人マラリアの病原体 (*Plasmodium falciparum* Welch, 1897) が Laveran (1880) により発見されて以来、マラリアに関する研究は急速に進展し、さらに1948年にネズミマラリア (*Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948) が発見され、引き続きアフリカ各地から数種のネズミマラリア原虫が発見されてマラリア原虫の実験系として広く利用されるようになった。ネズミマラリア原虫はヒトのマラリア原虫と同様に無核赤血球内で増殖し肝細胞を組織型原虫形成の場とするなど、マラリア原虫の生化学的、病態学および免疫学的研究を行うのに適当なモデルとしての役割をはたしてきた。しかし、マラリア原虫の生化学的研究またはマラリアワクチンの開発等の応用的研究を行う場合には、宿主の非感染血液細胞とメロゾイト、および感染赤血球と正常赤血球とを分離して、各発育段階別に取り扱う必要がある。しかしながら、分離方法が未確立なためにこの方面の研究が遅滞しており、永年にわたって分離精製法の改良を目的とする幾多の試みが積み重ねられてきた。

Bass and Johns (1915-1916) が、マラリア原虫 [*Plas-*

名古屋大学医学部医動物学教室

modium vivax (Grassi and Feletti)] に感染すると赤血球の比重が正常赤血球に比べて軽くなる事を報告して以来、この成績に基づいて種々の密度勾配液を用いたマラリア原虫感染赤血球の分離法に関する多数の報告が見られるようになった (Ferrebee and Geiman, 1946; Williamson and Cover, 1966; Rowley *et al.*, 1967; Miller and Chien, 1971; McAllister and Gordon, 1976; Lunde and Powers, 1976; Eling, 1977; Pasvol *et al.*, 1978; Sterling, 1978; Eugui and Allison, 1979; Mrema *et al.*, 1979; Tosta *et al.*, 1980; Saul *et al.*, 1982). このほか、最近では赤血球が concanavalin A に吸着することを利用したメロゾイトの分離法 (David *et al.*, 1978), 感染赤血球と正常赤血球との電気泳動移動度の差を利用した分離法 (Heidrich *et al.*, 1979; Suzuki *et al.*, 1979), およびマラリア原虫を蛍光色素結合 DNA で標識し、蛍光の強弱によって cell sorter を用いて分離する方法 (Brown *et al.*, 1980) なども報告されている。しかし、一連の分離精製操作によつて、マラリア原虫の発育段階別感染赤血球ばかりでなく、遊離メロゾイトの確実な分離精製にも成功したという報告はみられない。

Eugui and Allison (1979) は、メトリザマイド [2-(3-acetamido-5-N-methylacetamido-2, 4, 6-triiodo-benzamido) -2-deoxy-D-glucose] 溶液を用いた連続密度勾配液遠心法で、3種のネズミマラリア原虫 (*Plasmodium yoelii*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium chabaudi*) の感染赤血球の分離精製について検討し、かなり良好な成績を示しているが、メロゾイトの分離精製には成功していない。ただし、彼等の用いたメトリザマイド溶液は、同じ比重のショ糖液や Ficoll 液と比較して粘調度が低く、さらに血液とほぼ等張なので、感染赤血

球と内部の原虫に対する変性効果が少ないという特性を有していた (Rickwood and Birnie, 1975; Eugui and Allison, 1979). 我々は、この特性に着目し、広く尿路・血管造影剤として使用されているメトリゾ酸カルシウム・メグルミン塩溶液 (イソパーク®280) [3-acetamido-2, 4, 6-triiodo-5-(N-methylacetamido) benzoic acid] を利用することにより、マラリア原虫感染血球および遊離メロゾイトの分離精製法の改良を試み、Eugui and Allison (1979) の方法より広い比重域の連続密度勾配液を採用することによつて、極めて良好な結果を得たので報告する。

材料および方法

1) マラリア原虫と実験動物

実験に用いたネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948; NK 65株) は、1979年2月に岐阜大学医学部の大友弘士教授から分与を受け、その後当教室で継代中のものである。継代は原則として1週間隔で行い、ACD (acid-citrate-dextrose) 溶液で希釈した感染赤血球約 1×10^6 個を5~7週齢のICR系マウス(雌)の腹腔内に接種した。分与後180代にわたつて継代中である。この間、病原性・感染力等に変化は認められず、約 1×10^6 個の感染赤血球を接種したマウスは平均8日で死亡する。

Table 1 The composition of discontinuous metrizoic acid gradients

| Density (18C) | Volume (ml) | Density (18C) | Volume (ml) |
|---------------|-------------|---------------|-------------|
| 1.082 | 1.0 | 1.136 | 1.5 |
| 1.094 | 1.0 | 1.145 | 1.5 |
| 1.110 | 1.0 | 1.156 | 1.0 |
| 1.117 | 1.0 | 1.169 | 1.0 |
| 1.126 | 1.0 | 1.320 | 0.5 |

2) 不連続密度勾配液

分離精製の不連続密度勾配液は次の様な方法で作製した。すなわち、Munthe-Kaas and Seglen (1974) の緩衝液 (以下 MS 緩衝液と略記する) に牛胎児血清 (FCS, GIBCO) 2%を加え、さらに60.2w/v%のメトリゾ酸カルシウム・メグルミン塩溶液 (イソパーク®280, 鳥居薬品; 以下 MZA 溶液と略記する) を加えて10段階の異なる比重 (1.320~1.082) を持つ MZA 溶液を調整した (Table 1)。MS 緩衝液の組成は次に示すとおりである: 蒸留水 1 l 中に NaCl 7.14g, KCl 0.5g, CaCl₂

2H₂O 0.18g, HEPES 2.4g を溶解し、1MNaOH で pH 7.4に調整する。

10段階の比重系列を持つ MZA 溶液を、Table 1に示した容量の組み合わせによつて Beckman SW 41Ti 型水平ローター用遠心管 (14×89mm) に重層し、分離用不連続密度勾配液とした。

3) 感染赤血球の分離

分離精製操作はすべて18C~21Cで行つた。ICR系マウス(雌)の腹腔内に1頭あたり約 1×10^6 個の *P. berghei* 感染赤血球を接種し、1週間後感染赤血球率が約80%に上昇した時点で、血液の凝固を防ぐために ACD 液を容れたツベルクリン用注射筒を用いて心臓採血を行ない、ただちに2回遠心洗浄操作を行つた。ついで、FCSを2%添加したMS緩衝液に沈渣を浮遊させ、glass beads column と cellulose powder column に通して白血球と血小板を取り除き、感染赤血球浮遊液とした。この浮遊液を上記の分離用不連続密度勾配液上に1ml宛重層し、5,000g 30分間遠心した。遠心操作後、遠心管の底部、側面あるいは上部から注射器あるいはピペットによつて分画した。分画後ただちにMS緩衝液 (FCS 2%添加) または RPMI 1640培地 (GIBCO, FCS 10%添加) を用いて各画分の遠心洗浄を数回くり返し、洗浄後の沈渣を感染実験および光学顕微鏡と電子顕微鏡用標本の作製に用いた。

3) 各画分内原虫の感染実験

各画分中の細胞 (メロゾイトおよび感染・非感染赤血球を含む) 数を 1×10^7 個/ml に調整し、5~6週齢のICR系マウス(雌)の腹腔内に0.1ml宛接種した。接種後2日ごとに尾部から血液を採り、塗抹ギムザ染色標本を作成し顕微鏡によつて感染赤血球率を調べた。なお、各画分毎に5匹のマウスを感染実験に用いた。

4) 電子顕微鏡観察

メロゾイトまたは感染赤血球の画分を1.5%グルタルアルデヒド-カコディレート緩衝液により5C 1時間固定後、5,000g 5分間遠心操作を行い、沈渣を0.05Mカコディレート緩衝液で洗浄したのち、2%オスミウム酸-カコディレート緩衝液で1時間固定した。固定・脱水後エポン812で包埋し、LKB 2,088型マイクロームで超薄切片を作製した。この切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色し、日立11DS型電子顕微鏡 (加速電圧75KV) により観察した。

結果

1) 不連続密度勾配液による分離

Table 2 Differential counts of *Plasmodium berghei*-parasitized erythrocytes and free merozoites, following density gradient centrifugation in metrizoic acid

| Band | Density | Differential counts (%) | | | | |
|------|---------|-------------------------|-----------|-------------|----------|-----------|
| | | Uninfected RBC | Ring-form | Trophozoite | Schizont | Merozoite |
| I | 1.200 | 86.3 | 9.1 | 0 | 0 | 4.6 |
| II | 1.158 | 16.2 | 80.2 | 0.7 | 0 | 2.9 |
| III | 1.147 | 1.9 | 36.6 | 57.8 | 0 | 3.7 |
| IV | 1.138 | 1.7 | 21.4 | 71.1 | 0 | 5.8 |
| V | 1.125 | 1.4 | 16.9 | 78.8 | 1.1 | 1.8 |
| VI | 1.111 | 1.0 | 0.8 | 83.4 | 8.6 | 6.2 |
| VII | 1.094 | 0 | 0 | 5.7 | 88.4 | 5.9 |
| VIII | 1.078 | 0 | 0 | 1.2 | 9.3 | 89.5 |

マラリア原虫感染赤血球浮遊液は、MZA 溶液を用いた10段階の不連続密度勾配液による遠心操作の結果、8本のバンド (I~VIII) に分離された (Photo. 1-A, B). 各バンドの比重は、遠心管底から1.200 (I), 1.158 (II), 1.147 (III), 1.138 (IV), 1.125 (V), 1.111 (VI), 1.094 (VII), 1.078 (VIII) であった (Table 2). なお、正常赤血球を上記の方法と同様に処理すると、バンド I と同じ位置に1本のバンドを形成した (Photo. 1-C). 各バンドを採取し遠心洗浄したのち、沈渣から塗抹標本を作製し、1,000個の細胞を光学顕微鏡で観察したところ、バンド I の画分には非感染赤血球が86.3%、バンド

II の画分には輪状体が80.2%含有されていた (Table 2). アメーバ状期から成熟期にわたる栄養型は、バンド III からバンド VI までの各画分に分布し、各画分の含有率はそれぞれ57.8%, 71.1%, 78.8%, 83.4% であった (Table 2). バンド VII の画分には分裂期を88.4%含み、さらにバンド VIII の画分はメロゾイトを89.5%の高率に含むまでに分離精製され、少数の成熟期と分裂期原虫の混入が認められただけであった。メロゾイトはバンド I ~ VII の画分にも1.8%~6.2%の範囲で認められたが (Table 2), これらはすべて赤血球膜表面に付着した状態で観察された。なお、各バンドの塗抹標本からは白血球と血小板は見い出されなかった。

2) 分離精製後の感染性

各画分 (バンド I ~ VIII) 中の細胞を、5 ~ 6 週齢の ICR 系マウス (雌) の腹腔内に約 1×10^6 個宛接種し、その感染性について調査した。接種細胞の内訳は、たとえばバンド I の画分では約 8.63×10^5 個の非感染赤血球、約 0.91×10^6 個の輪状体および約 0.46×10^6 個のメロゾイトから成っている。バンド I ~ VIII の画分接種群のマウスでは、接種後 6 日 ~ 8 日で赤血球感染率が65%~85%に上昇し、マラリア原虫感染赤血球を約 1×10^6 個接種した対照区の赤血球感染率と比較した場合、接種マラリア原虫数にほぼ比例した赤血球感染率の上昇が認められ、強い感染性が維持されていることを示した (Fig. 1). さらに、バンド II ~ VIII の各画分の接種を受けたマウスは接種後 9 日目までに、バンド I の画分の接種を受けたマウスも接種後 11 日目までに、すべて死亡した。

3) 分離精製後の形態変化

MZA 溶液の不連続密度勾配遠心法による分離精製メロゾイト (バンド VIII) と分裂期 (バンド VII) の形態変化

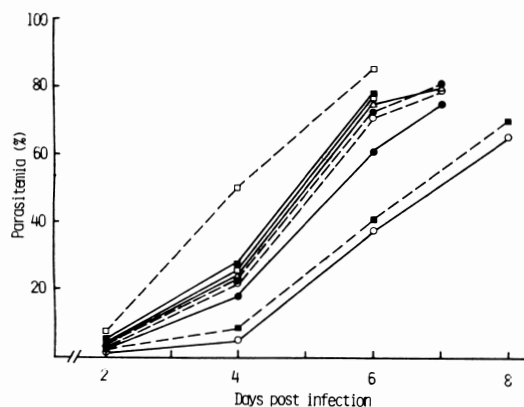


Fig. 1 Time course of parasitemia in mice inoculated with 1×10^6 erythrocytes (including normal and parasitized cells) or merozoites purified by the present method. Mice received intraperitoneal injection of:

○—○ Band I ●—● Band II ○—○ Band III ●—● Band IV
 □—□ Band V ■—■ Band VI ○—○ Band VII ●—● Band VIII
 ▲—▲ control

について検討した結果、ギムザ染色標本についての顕微鏡観察で変化がなく (Photos. 2, 3), さらに上記の2画分ともに電子顕微鏡観察により形態変化をほとんど認めず, 典型的な分裂期原虫とメロゾイトを示した (Photos. 4, 5). さらに, 各比重の分離用 MZA 溶液中で, マラリア原虫感染・非感染赤血球の溶血は全く認められなかった。

考 察

Bass and Johns (1915~1916) は, 三日熱マラリア原虫感染赤血球の比重が正常赤血球の比重より軽くなることを報告し, その後種々の密度勾配液によるマラリア原虫感染赤血球の分離方法に関する研究が多数報告された。しかし, Kreier (1977) が論じている様に, 密度勾配液を用いてマラリア原虫感染赤血球を分離精製する場合, 溶媒の浸透圧の影響には十分注意しなければならない。密度勾配液にショ糖などの低分子の溶質を用いると, 赤血球ばかりでなくマラリア原虫に対しても高張となるために, 比重を変化させ, 代謝や感染性にも影響し, 実験材料としては不適当な感染赤血球が分離されることになる。また Ficoll を用いて分離する方法 (Lunde and Powers, 1976; Eling, 1977) も高浸透圧による悪影響があり (Rickwood and Birnie, 1975), さらに, その操作に長時間を必要とするので, 分離精製されたマラリア原虫の感染性が低下し, 実験材料としては不適当である。また血清アルブミンによる分離精製法 (Eisen, 1977) は, アルブミンがマラリア原虫の膜表面に吸着するので, 分離された原虫を免疫学的・生化学的研究に使用することは不適当である。

最近では密度勾配法以外の分離精製法についても幾つかの報告がある。Cell sorter による感染赤血球の分離法 (Brown *et al.*, 1980) は, マラリア原虫内の DNA を蛍光色素で標識し, 蛍光の強弱に基づいて分離する方法であるが, 赤血球内にしばしば2個以上のメロゾイトが侵入する *P. falciparum* や *P. berghei* などの分離にこの方法を用いると, 多数のメロゾイトが侵入した赤血球と分裂期の原虫とを分離することが困難である。また, 赤血球は concanavalin A に吸着されるのに対してメロゾイトは吸着されないことを利用した方法 (David *et al.*, 1978) では, メロゾイトの分離精製だけが可能で, 感染赤血球を同時に分離することはできない。

我々は, 一連の操作によりマラリア原虫の発育段階別感染赤血球と, 同時にメロゾイトの分離精製も可能とする方法について種々検討した結果, Eugui and Allison

(1979) の方法を改良することにより, 生化学的・免疫学的研究に利用価値の高い均一な材料の分離精製を可能とした。Eugui and Allison (1979) は, メトリゾ酸ナトリウム (以下メトリザマイドと略記, Nyegaard and Co. A/S, Oslo) を用いた連続密度勾配液を用いて, マラリア原虫感染赤血球の分離を行っている。メトリザマイド溶液は粘調度が低く, 温度差による浸透圧の変化が少ない特性をそなえているが, この溶液は光にあたるとヨウドを放出するので, 遮光して溶解しなければならない (Rickwood and Birnie, 1975)。しかし, 我々が用いた MZA は尿路・血管造影剤として溶液で市販されているので, 溶解時のヨウド放出に注意を払う必要はなく, ただちに分離用密度勾配液を作製することができる。分離に用いた各比重系列の MZA 溶液について厳密な浸透圧測定は行わなかったが, 各比重液中で溶血現象は全く認められず, 細胞の萎縮変形像も認められなかったもので, 浸透圧の差による悪影響はなかったものと考えられる。Eugui and Allison (1979) が連続密度勾配液による分離法で用いた遠心管よりも, 我々は, 遠心管の長さ対口径比が6.2:1と細長の遠心管を用い, 比重域を拡大した不連続密度勾配液を作成して分離精製を行った。その結果, 分離精製度が一段と高まり, メロゾイトの分離精製も可能になったばかりでなく, 発育段階別にマラリア原虫感染赤血球がバンドを形成して分離されるので, 分画採取が容易で研究上利用価値の高い画分を得ることができることとなった。最近, Percoll の3段階不連続密度勾配液を用いて, 培養した *P. falciparum* 感染赤血球の分離が報告されたが (Saul *et al.*, 1982), メロゾイトの分離は行っていない。しかし, 彼等が用いた Percoll 溶液も MZA 溶液と同様に等張液を作成することが容易であるので, 比重域を変えることでメロゾイトの分離も可能と考えられる。Saul *et al.* (1982) が, *P. falciparum* を同調培養し感染赤血球の分離を試みた様に, *P. berghei* の同調培養法が確立された場合には, 本分離精製法との組み合わせによつて各種の研究目的に沿った発育段階別の原虫材料が容易にかつ大量に得られるようになり, マラリア原虫の代謝機構や生化学的特性に関する研究の進展に貢献することが期待される。

また本法はネズミマラリア原虫感染赤血球のみならず, 各種の原虫種の分離精製に应用可能なものと考えられる。

要 約

ネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* Vincke and Lips (NK 65) の生化学的・免疫学的研究を行うには、多数のメロゾイト・分裂体を感染血液から分離する必要があり、発育段階別の分離精製を目的として、簡便かつ高精度の方法の実用化について検討した。

感染マウス (ICR) から心臓採血後、遠心沈澱法により洗浄し、glass beads column と cellulose powder column を通して白血球と血小板を除去し、得られた感染赤血球浮遊液を遠心分離に用いた。尿路・血管造影剤として広く使用されているメトリゾ酸カルシウム・メグルミン塩溶液 (インパーク®280) が低粘調度で血球細胞との等張性を示す特性に着目し、この溶液を用いて10段階の不連続密度勾配液を作製し、遠心分離を行った。その結果、感染赤血球浮遊液は8本のバンドに分画され、赤血球型原虫は発育段階別に分別された。すなわち、分別された各バンドはIが非感染赤血球 (86.3%)、IIが輪状体 (80.2%)、IIIがアメーバ状期 (57.8%) と輪状体 (36.6%)、IVからVIが成熟体でそれぞれ71.1%、78.8%、83.4%、VIIが分裂体 (88.4%)、VIIIがメロゾイト (89.5%) という構成を示した。分離された感染赤血球およびメロゾイトはマウス (ICR) に対し強い感染性を維持しており、また光学顕微鏡・電子顕微鏡観察による形態変化も認められなかった。従つて、*P. berghei* のメロゾイトおよび発育段階別分離精製法として本法はきわめてすぐれた方法であると考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、有益な御助言を頂いた須藤千春博士、技術的援助を頂いた水野さほ子技官に深謝します。

文 献

- 1) Bass, C. C. and Johns, T. M. (1915-1916) : A method of concentrating malaria plasmodia for diagnostic and other purposes. Am. J. Trop. Dis., 3, 298-303.
- 2) Brown, G. V., Battey, F. L. and Russel, J. H. (1980) : Separation of stages of *Plasmodium falciparum*-infected cells by means of a fluorescence-activated cell sorter. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 1147-1149.
- 3) David, P. H., Hommel, M., Benichou, J., Eisen, H. A. and Pereira, S. (1978) : Isolation of malaria merozoites: Release of *Plasmodium chabaudi* merozoites from schizonts bound to immobilized concanavalin A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5081-5084.
- 4) Eisen, H. (1977) : Purification of intracellular forms of *Plasmodium chabaudi* and their interactions with the erythrocyte membrane and with serum albumin. Bull. Wld. Hlth. Org. 55, 333-338.
- 5) Eling, W. (1977) : Ficoll fractionation for the separation of parasitized erythrocytes from malaria infected blood. Bull. Wld. Hlth. Org. 55, 105-114.
- 6) Eugui, E. M. and Allison, A. C. (1979) : Separation of erythrocytes infected with murine malaria parasites in metrizamide gradients. Parasitology, 79, 267-275.
- 7) Ferrebee, J. W. and Geiman, Q. M. (1946) : Studies on malarial parasites. III. A procedure for preparing concentrates of *Plasmodium vivax*. J. Infec. Dis., 78, 173-179.
- 8) Heidrich, H. G., Rüssmann, L., Bayer, B. and Jung, A. (1979) : Free-flow electrophoresis for the separation of malaria infected and uninfected mouse erythrocytes and for the free parasites (*Plasmodium vinckei*) : A new rapid technique for the liberation of malaria parasite from their host cell. Z. Parasitenkd., 58, 151-159.
- 9) Kreier, J. P. (1977) : The isolation and fractionation of malaria infected cells. Bull. Wld. Hlth. Org. 55, 317-331.
- 10) Laveran, A. (1880) : Note sur un nouveau parasite trouvé dans le sang de plusieurs malades atteints de fièvre palustre. Bull. Acad. Med., 9, 1235.
- 11) Lund, M. M. and Powers, K. S. (1976) : The preparation of malaria haemagglutination antigen. Ann. Trop. Med. Parasitol., 70, 283-291.
- 12) McAllister, R.O. and Gordon, D. H. (1976) : Schizont-infected cell enrichment in rodent malaria. J. Parasitol., 62, 664-669.
- 13) Miller, L. H. and Chien, S. (1971) : Density distribution of red cells infected by *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium coatneyi*. Exp. Parasitol., 29, 456-460.
- 14) Mrema, J. E., Campbell, G. H., Miranda, R., Jaramillo, A. L. and Rieckman, K. H. (1979) : Concentration and separation of erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum* by gradient centrifugation. Bull. Wld. Hlth. Org. 57, 133-138.
- 15) Munthe-Kaas, A. C. and Seglen, P. O. (1974) : The use of metrizamide as a gradient medium for isopycnic separation of rat liver cell. Feb. Let., 43, 252-256.

- 16) Nakabayashi, T., Ebisawa, I., Ohtomo, H. and Ishizaki, T. (1976) : Investigation of imported malaria cases in Japan in 1972-1974. *J. Trop. Med. Hyg.*, 79, 247-251.
- 17) 大友弘士・中村敏夫・海老沢 功・石崎 達 (1976) : 1975年の国内マラリア発生状況. 公衆衛生情報, 6, 40-45.
- 18) 大鶴正満 (1977) : 日本の輸入マラリア. 日本医学雑誌, 77, 117-125.
- 19) Pasvol, G., Wilson, R. J. M., Smalley, M. E. and Brown, J. (1978) : Separation of viable schizont-infected red cell of *Plasmodium falciparum* from human blood. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 72, 87-88.
- 20) Rickwood, D. and Birnie, G. D. (1975) : Metrizamide, a new density-gradient medium. *Feb. Let.*, 50, 102-110.
- 21) Rowley, P. T., Siddiqui, W. A. and Geiman, Q. M. (1967) : Separation of malarial parasites according to age by density gradient centrifugation. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 933-937.
- 22) Saul, A., Myler, P., Elliott, T. and Kidson, C. (1982) : Purification of mature schizonts of *Plasmodium falciparum* on colloidal silica gradients. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 60, 755-759.
- 23) Sterling, C. R. (1978) : A rapid method for concentrating spleen-derived schizonts in *Plasmodium berghei* malaria. *J. Parasitol.*, 64, 747-749.
- 24) Suzuki, M., Sawasaki, Y., Waki, S., Iwaoka, H., Asada, T. and Nakajima, H. (1979) : Separation of *Plasmodium berghei*-parasitized rat erythrocytes by means of carrier-free electrophoresis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57, 129-132.
- 25) Tosta, C. E., Sedegah, M., Henderson, D. C. and Wedderburn, N. (1980) : Isolation of infected erythrocytes from blood by colloidal silica gradient centrifugation. *Exp. Parasitol.*, 50, 7-15.
- 26) Vincke, I. H. and Lips, M. (1948) : Un nouveau *Plasmodium* d'un Rongeur sauvage du Congo *Plasmodium berghei* n. sp. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 28, 97-104.
- 27) Williamson, J. and Cover, B. (1966) : Separation of blood-cell-free trypanosomes and malaria parasites on a sucrose gradient. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyd.*, 60, 425-427.
- 28) World Health Organization. Tropical diseases. Geneva. WHO. (1976) p. 7.

Abstract

STUDIES ON MURINE *PLASMODIUM*

I. SEPARATION OF MEROZOITES AND PARASITIZED ERYTHROCYTES
FROM THE MOUSE BLOOD INFECTED WITH *PLASMODIUM*
BERGHEI BY MEANS OF DISCONTINUOUS GRADIENTS

HISASHI FUJIOKA, FUMIHIKO KAWAMOTO AND NOBUO KUMADA

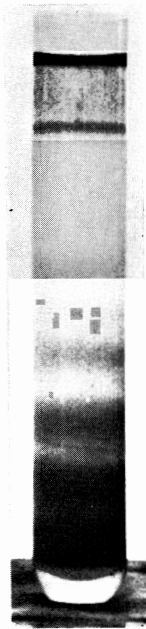
(Department of Medical Zoology, Nagoya University School
of Medicine, Nagoya, 466 Japan)

A discontinuous density gradient method with metrizoic acid [Isopaque® 280, 3-acetamido-2, 4, 6-triiodo-5-(N-methylacetamido) benzoic acid] was investigated to purify merozoites and parasitized erythrocytes of *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948 (NK65) from the infected blood of mice. After the blood was collected by cardiac puncture with ACD (acid-citrate-dextrose) solution, leucocytes and platelets were removed from the blood through columns of glass beads and cellulose powder. Then the suspension of the *P. berghei*-infected erythrocytes was centrifuged in the discontinuous gradients of metrizoic acid at 5,000 g for 30 min. The best result was obtained when the gradients were prepared as a series of 10 discontinuous densities (1.320, 1.169, 1.156, 1.145, 1.136, 1.126, 1.117, 1.110, 1.094, 1.082); the erythrocyte suspension was separated into 8 bands. Each of these bands was examined by light microscopy for the ratio of erythrocytes infected with different stages of the parasites. From the bottom, Band I (d=1.200) mainly consisted of uninfected erythrocytes (av. 86.3%), and Bands II-VI contained different developmental stages. The ring forms were found in Band II (80.2%, d=1.158) and III (36.6%, d=1.147), whereas the trophozoites were distributed rather widely in Band III (57.8%, d=1.147), IV (71.1%, d=1.138), V (78.8%, d=1.125) and VI (83.4%, d=1.111). Band VII (d=1.094) and VIII (d=1.078) were mostly composed of the schizonts (88.4%) and merozoites (89.5%), respectively. Infectivity of all the fractions was tested by intraperitoneal inoculation into groups of ICR mice; all the mice died of high parasitemia within 9-11 days. Light and electron microscopically, no detectable morphological change was observed between purified and non-purified parasites.

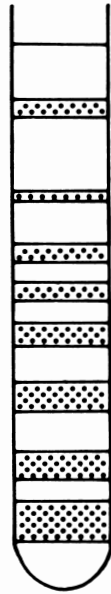
From these results, we conclude that this method is very useful in isolating different developmental stages of the malarial parasites from the infected blood and in providing enough quantities of purified merozoites and other stages of the parasite for the further biochemical and immunological studies.

Explanation of Photographs

- Photo. 1-A *Plasmodium berghei*-infected erythrocytes separated by density gradient centrifugation in metrizoic acid, in which 8 bands can be observed.
- Photo. 1-B Schema for Photo. 1-A.
- Photo. 1-C Normal erythrocytes separated into a single band.
- Photo. 2 Photomicrograph of Band VII showing schizonts obtained by density gradient centrifugation. Bar=10 μ m.
- Photo. 3 Photomicrograph of Band VIII showing merozoites obtained by density gradient centrifugation. Bar=10 μ m.
- Photo. 4 Electron micrograph of a separated schizont in Band VII. N, nucleus; R, rhoptry. Bar=0.5 μ m.
- Photo. 5 Electron micrograph of a separated merozoite in Band VIII. A, apical end; N, nucleus; R, rhoptry. Bar=0.5 μ m.



A



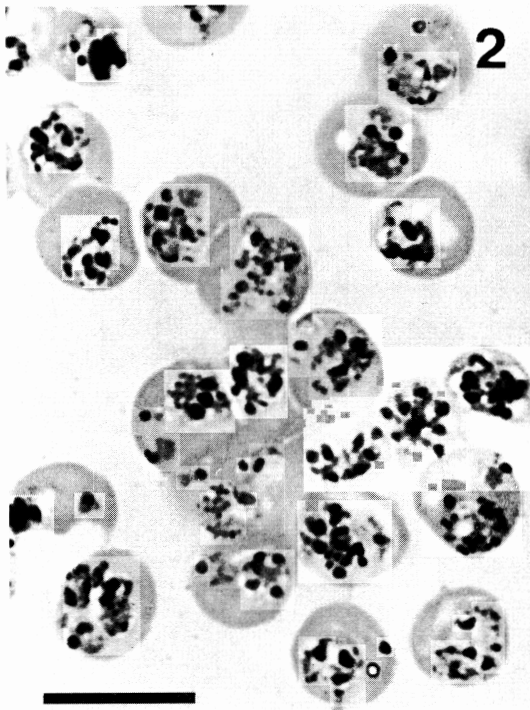
B

VIII
VII
VI
V
IV
III
II
I

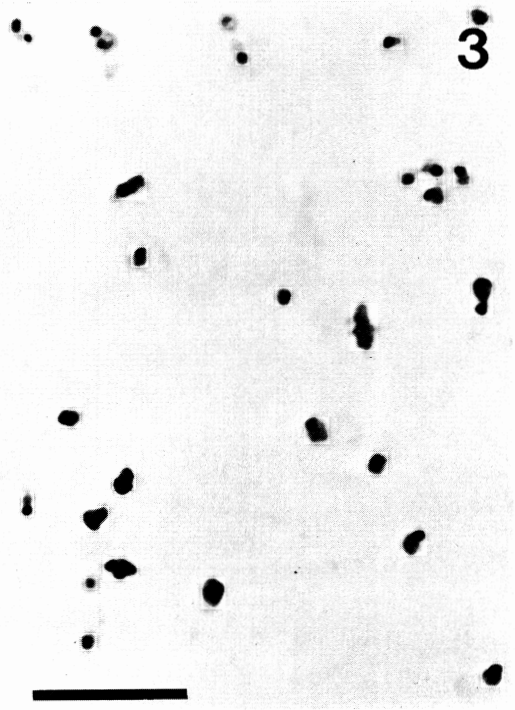


C

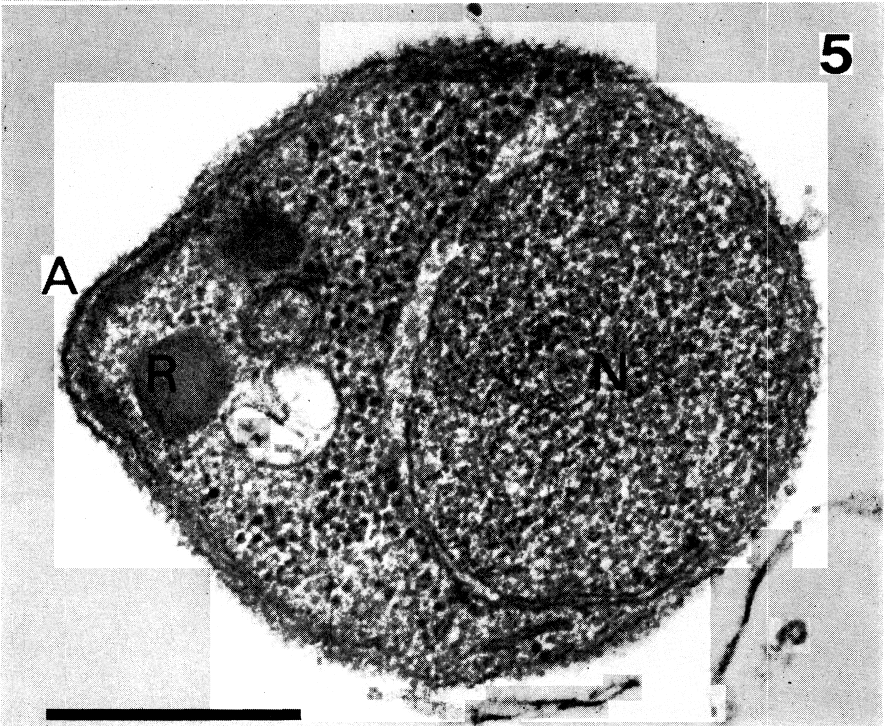
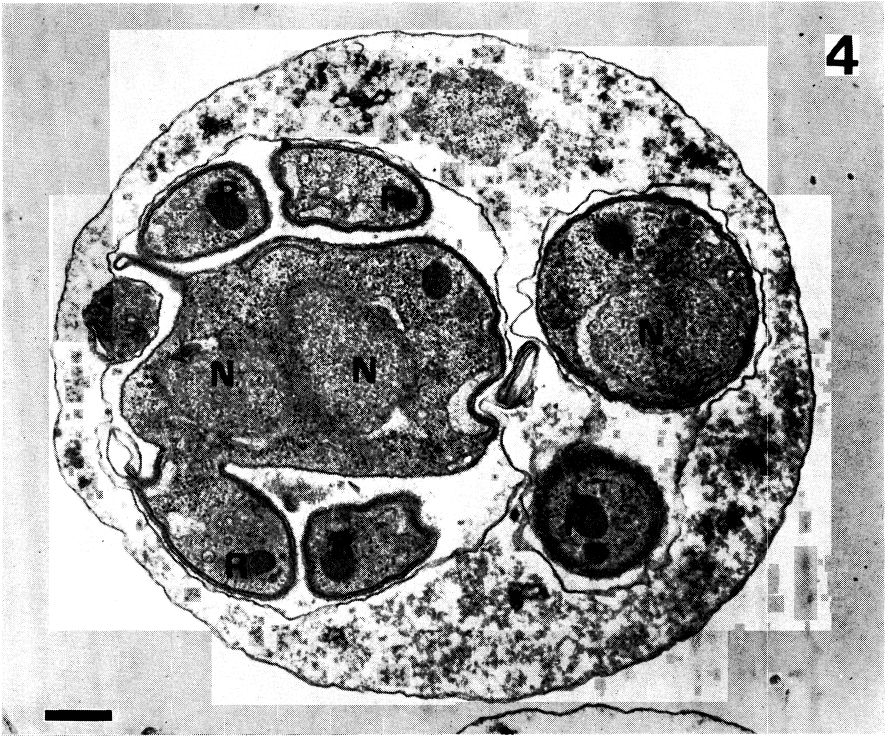
1

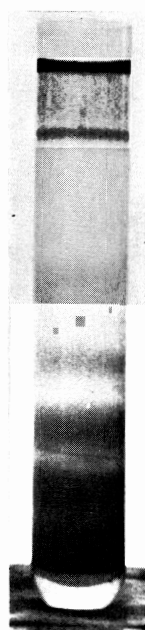


2

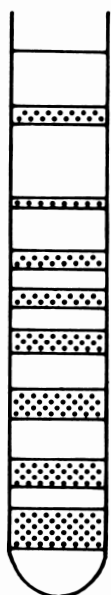


3



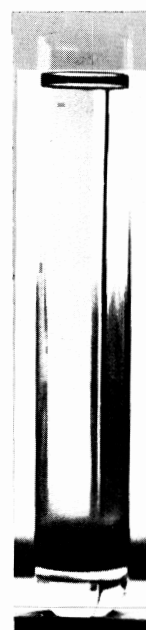


A



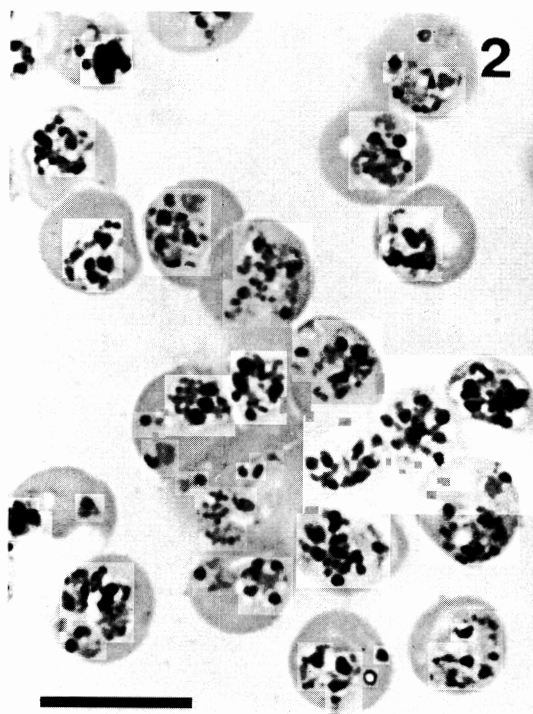
B

VIII
VII
VI
V
IV
III
II
I

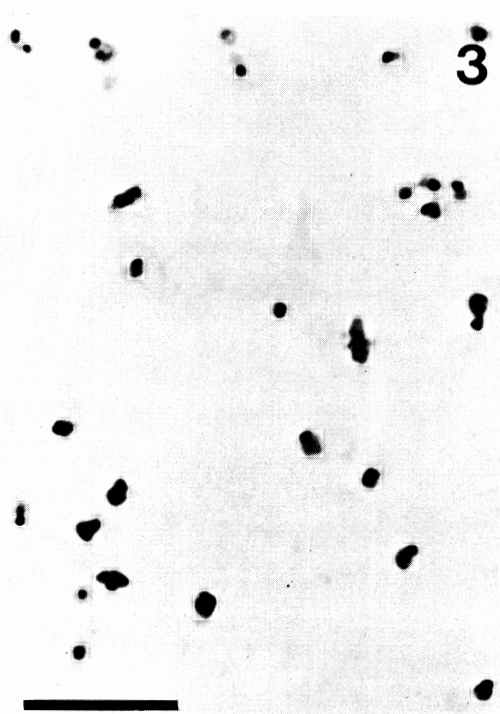


C

1



2



3

