

# ヌードマウス肺における *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎の 透過型電子顕微鏡的研究

山 田 稔

(昭和61年4月2日 受領)

**Key words:** *Pneumocystis carinii*, *Pneumocystis carinii* pneumonia, nude mouse, ultrastructure

## 緒 言

*Pneumocystis carinii* Delanoë et Delanoë, 1912 (以下 Pc と略) は広く地球上に分布し、ヒトをはじめ種々の哺乳動物の肺胞内に寄生している。Pc は日和見感染病原体の1つで、たとえ肺胞内に寄生していても宿主の免疫能が正常な場合は、その増殖が抑制され病原性を示さない。ところが宿主が何らかの原因によって免疫不全状態に陥った場合には著明に増殖し、重篤な肺炎すなわち Pc 肺炎を起こす。従って本肺炎は①先天性免疫不全症、②白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫、臓器癌などに対する抗癌化学療法経過中、③臓器移植後や自己免疫疾患などの際の免疫抑制療法の経過中、④後天性免疫不全症候群 (AIDS)、などに併発する (Burke and Good, 1973; Walzer *et al.*, 1973, 1974; Murray *et al.*, 1984)。

本肺炎は一たび発症すると極めて致死率が高く、適切な治療を行わない場合はほぼ全例が死亡する (Walzer, 1977; Young, 1982)。本症の診断に際しても、患者に対する侵襲の少ない病原体検出法や免疫学的診断法が試みられている (Walzer, 1977; Pifer *et al.*, 1978) が一般的に普及していないのが現状である。病原体である Pc についても、その生活史、感染経路、培養法に関して多くの研究がある (Vavra and Kucera, 1970; Hendley and Weller, 1971; Matsumoto and Yoshida 1984; Smith and Bartlett, 1984) が、未だ分類学上の位置など多くの点について未解決の問題を残している。

さて、ヌードマウスは遺伝的に胸腺を欠如している動物であるが、このヌードマウスコロニーに Pc 肺炎が自

然流行的に発症したことを Ueda *et al.* (1977) が報告した。そして既感染ヌードマウスと正常なヌードマウスとを同居させることにより、免疫抑制剤などを投与しなくても感染が移行し発症することも報告された。このヌードマウス由来の Pc は上記上田らより分与され当教室で維持されている。

以上の理由から、ヌードマウスは Pc および Pc 肺炎の研究、とくにステロイドなど免疫抑制剤を投与しないで発症する Pc 肺炎の研究に好適な実験モデルになると考えられている (Walzer *et al.*, 1977)。しかし今までにヌードマウスを用いて Pc の研究を行った報告は少なく、とくにヌードマウスにおける Pc 肺炎の電子顕微鏡的研究は今迄に Tamura *et al.* (1978) の報告があるのみである。

今回、ヌードマウスの肺で発育増殖した Pc の寄生態度、Pc と宿主細胞との関係および Pc の微細構造などについて電子顕微鏡的に観察したので報告する。

## 材料および方法

ヌードマウス (BALB/c, nu/nu) は購入時、生後4～6週の雄を用い、既感染ヌードマウスとケージを別にして同じビニールアイソレーター内で10週間以上接触させ感染させた。飲料水、飼料、全ての器具、器材は滅菌したものを用い、飲料水には細菌の増殖を抑制するため塩酸テトラサイクリンを 1 mg/ml の割合で添加した。

剖検の手順は以下の通りである。すなわちビニールアイソレーターからヌードマウスをとり出し、すぐに sodium pentobarbital を腹腔内に注入して深麻酔に導き、肋軟骨部を切断して開胸し、直ちに右心室に小切開を入れ、Matsumoto and Yoshida (1984) の方法で肺の灌流固定を行った。すなわち capillary tube を接続

したペリスタポンプを用いて氷水中で冷却した2.5% グルタルアルデヒド固定液 (0.05Mカコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4) を右心室より肺に灌流させて行った。その後、直ちに左心房を切開し、脱血して灌流が充分行われるように配慮した。これと同時に、あらかじめ喉頭部まで露出させておいた気管に小切開を加え、カニューレを気管内に挿入し、灌流に用いたものと同じ固定液を、肺が静かに膨らむ程度に注意して注入した。肺が胸腔内に拡がった時点で、固定液の注入を止め、カニューレを取り除き、固定液の逆流を防ぐために気管を結紮した。上述の操作中は肺表面が乾燥しないように、常に生理食塩水で湿潤状態を保った。

灌流終了後、気管と共に肺を胸腔より取り出し、そのまま冷却した上記固定液に30分～1時間浸漬した。ついで肺を細切した後、新鮮な冷却固定液の中に2時間浸漬し、吸引ポンプを用いて静かに肺胞中の残留空気を脱気した。また microtubules の保存のために、Matsumoto and Yoshida (1984) の方法で2.0%タンニン酸加2.5% グルタルアルデヒド固定液 (0.05Mカコジル酸ナトリウム緩衝液, pH 6.8) を用いた。固定時間は上記の場合と同様であった。その後材料は4時間ないし1晩、ショ糖で浸透圧を調整した冷却緩衝液を繰り返し交換することにより充分洗浄し、固定液を洗い流した。つづいて1.0% 緩衝オスミウム酸液に2時間浸漬することにより後固定を行った。以上の操作はすべて氷水中または冷蔵庫内で行った。その後、常法に従い室温下でアセトン上昇系列により脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。またあ

る材料では、オスミウム酸による後固定後、約1.5% 酢酸ウラン染色液でブロック染色した。その後は常法に従い包埋した。

超薄切片は Porter Blum MT-1 ultramicrotome により作製し、Watson (1958) の方法による酢酸ウラン染色および Venable and Coggeshall (1965) の方法によるクエン酸鉛染色を施した。観察は JEM-100S 透過型電子顕微鏡を用いて 80~100 KV で行った。

## 成 績

### I. Pc 感染ヌードマウス肺胞における Pc と宿主細胞との相互関係

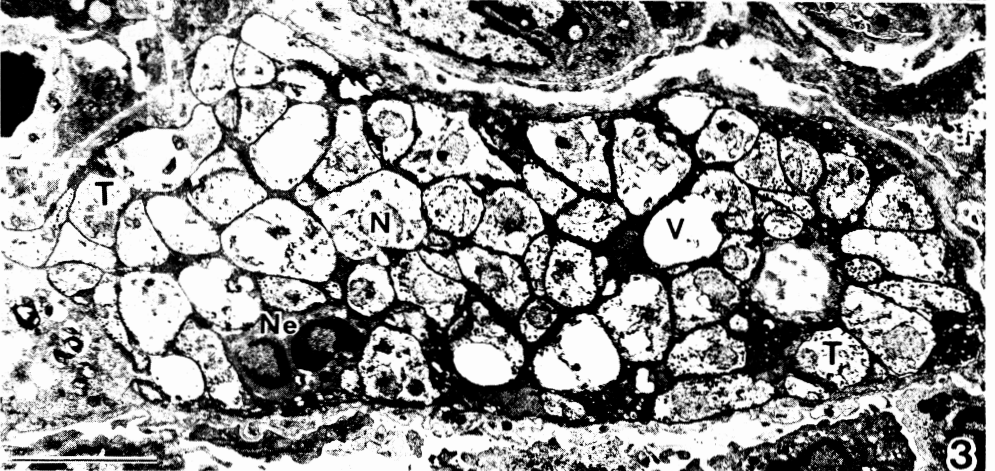
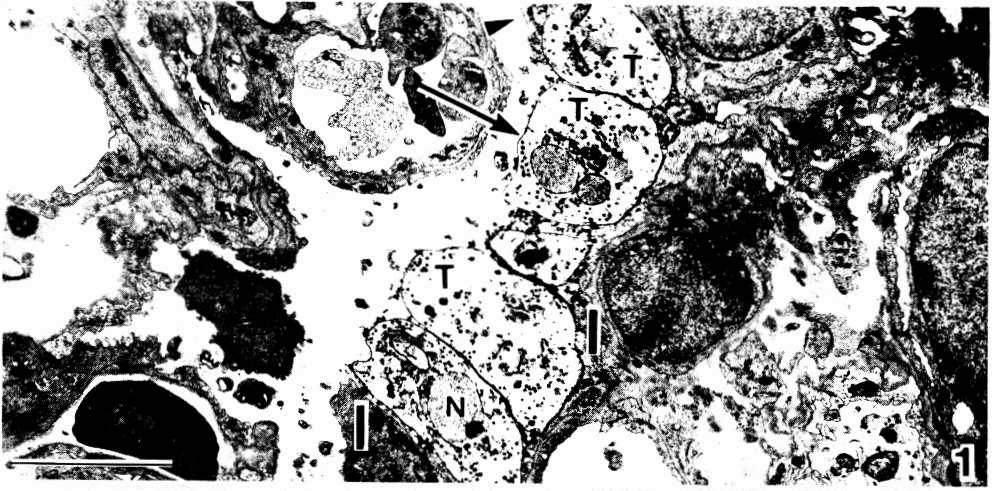
Pc はヌードマウス肺胞内において宿主細胞と複雑な相互関係を保ちつつ増殖している。それを感染の経過に従い全体的に観察してみると、まず比較的軽度感染肺胞内においては Pc は I 型肺胞上皮に密接に付着し単層をなして寄生し (図1)、次第に虫体数が増加して中等度感染になると2重あるいは3重の層をなして I 型肺胞上皮を覆うようになる (図2)。さらに増加してくると Pc は石垣状をなして肺胞内に充満し、air space は全くみられなくなっていた (図3)。

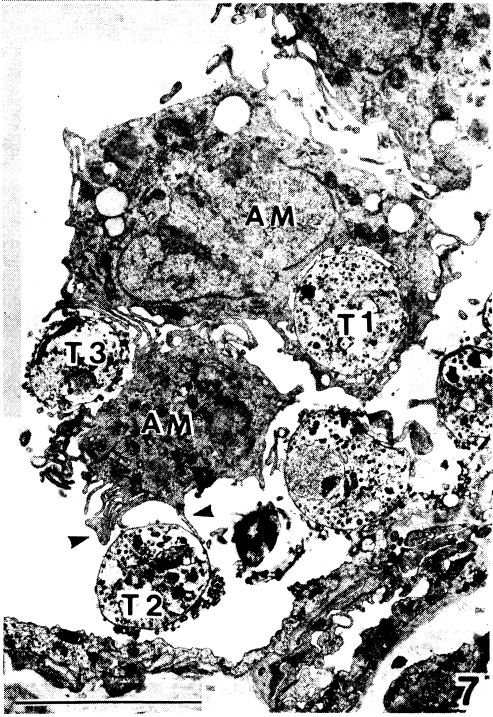
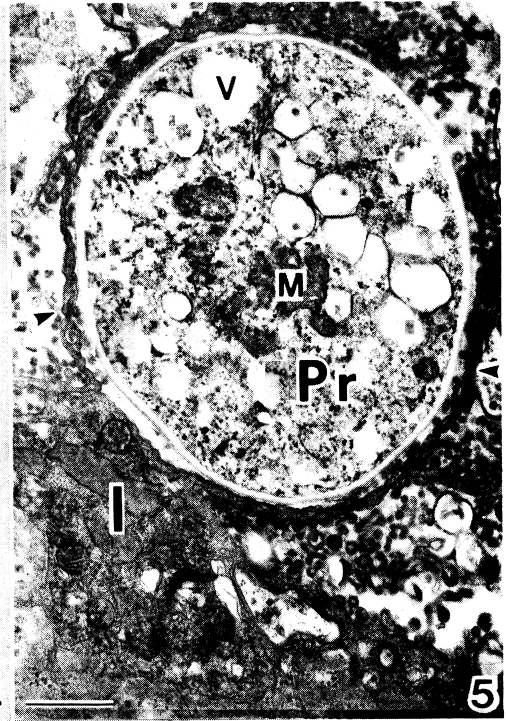
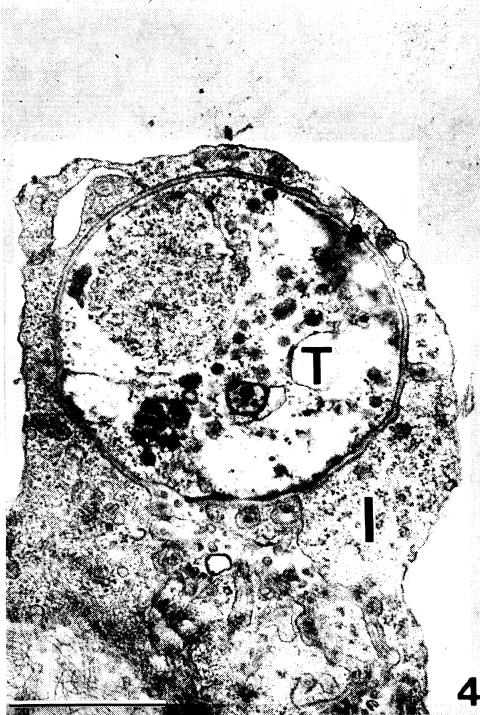
Pc は一般に肺胞上皮を覆う肺胞被覆層中に存在した。例えば、図2にみられる如く、重層した Pc はラメラ様構造物などと共に、表面膜 (surface film) で肺胞腔内気相と明瞭に境された肺胞被覆層 (alveolar lining liquid layer) の hypophase 内に存在することが明らかとなった。すなわち、生理的に存在する肺胞被覆層内

## Abbreviations:

AM	Alveolar macrophage	Ne	Neutrophil
C	Cyst	ORB	Osmiophilic round body
H	Hypophase	P	Pellicle
I	Type I alveolar epithelial cell	Pr	Precyst
IB	Intracystic body	RC	Ruptured cyst
M	Mitochondrion	RER	Rough endoplasmic reticulum
N	Nucleus	SER	Smooth endoplasmic reticulum
n	Nucleolus	T	Trophozoite
NAO	Nucleus-associated organelle	t	Tubular expansion
NE	Nuclear envelope	V	Vacuole

Figs. 1-3 Behaviour of *Pneumocystis carinii* in the alveoli of nude mice lung: 1. Light infection. Some trophozoites line up along the type I alveolar epithelial cells. One of the trophozoites (arrow) has two uuclei. The alveolar lining layer (arrow head) is partially visible. Bar=5  $\mu$ m. 2. Moderate infection. Many trophozoites and a cyst are existing in the alveolar lining layer which consists of surface film (arrow head) and hypophase. Bar=5  $\mu$ m. 3. Heavy infection. An alveolus filled with many trophozoites. A neutrophil infiltrated into the alveolar lumen is visible. Bar=5  $\mu$ m.







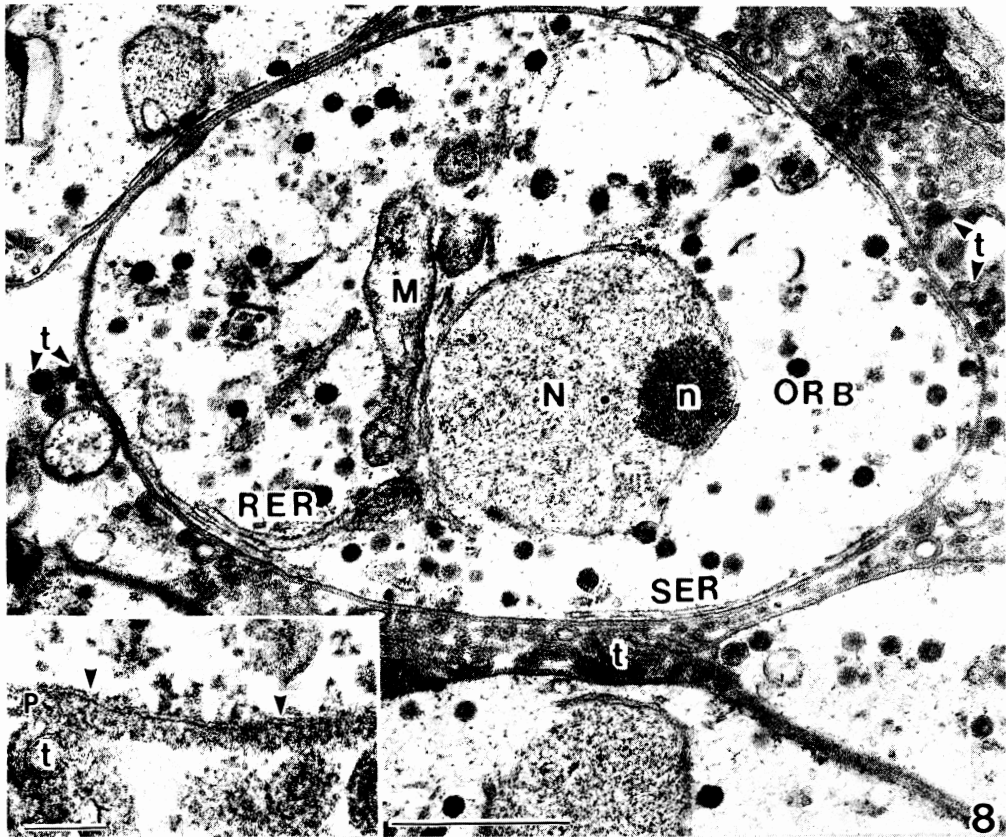


Fig. 8 A typical trophozoite of *P. carinii*: a large nucleus with a nucleolus, mitochondria with poorly developed cristae, a rough endoplasmic reticulum, numerous osmiophilic round bodies, a smooth endoplasmic reticulum just beneath the pellicle, numerous free ribosomes, and glycogen granules are visible. Many tubular expansions are also found around the pellicle. Bar=1  $\mu$ m. (Inset) A higher magnification of the pellicle of a trophozoite, which is thin and composed of an inner unit membrane (arrow head) and an electron-dense outer layer. Bar=1  $\mu$ m.

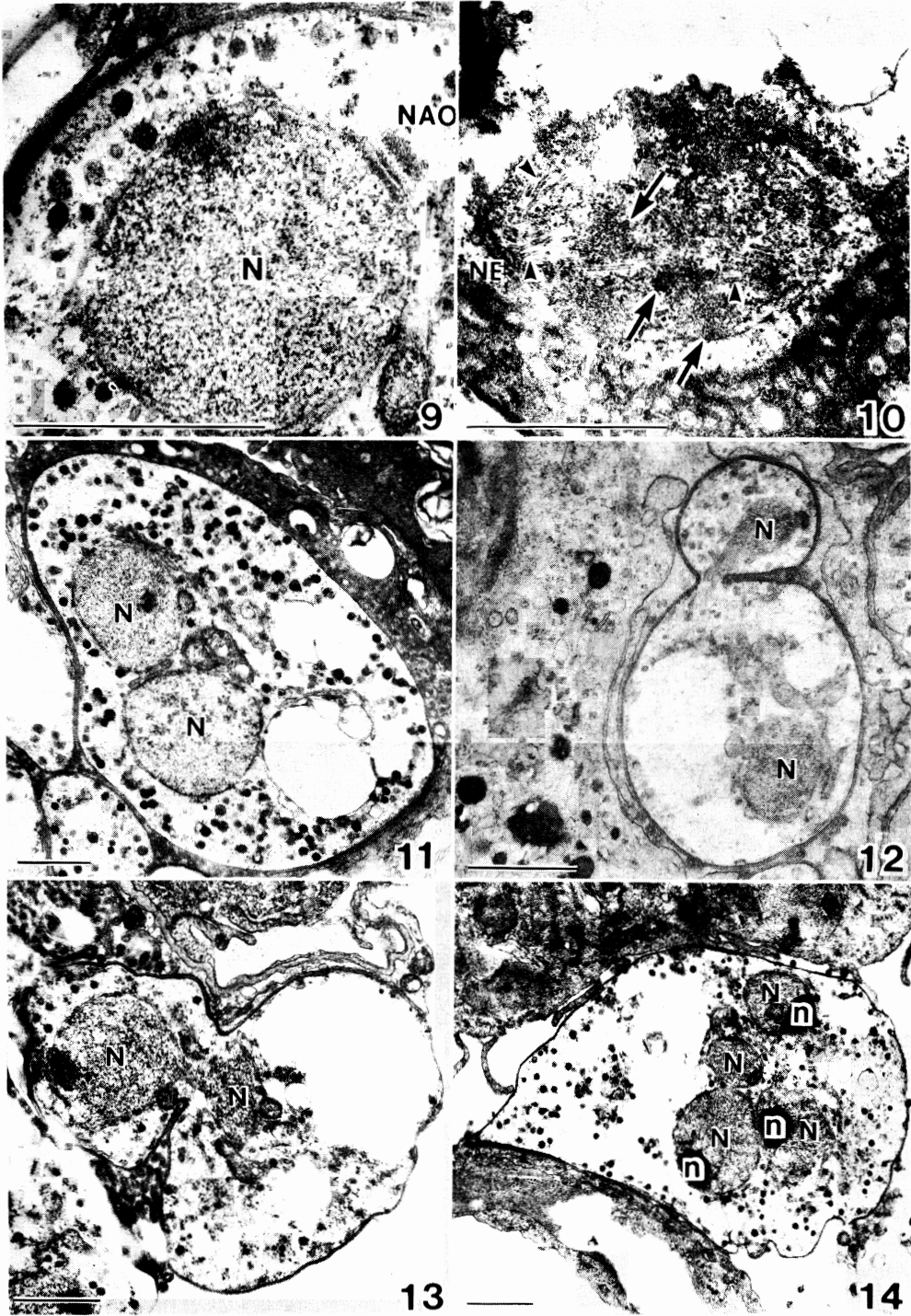
に Pc 虫体は存在し、その虫体の肺胞側は直接気相に接していなかった。図1においてもこの肺胞被覆層が一部認められる。軽度あるいは中等度感染肺胞内において、Pc は微絨毛を有するII型肺胞上皮には接着せず、表面の滑らかなI型肺胞上皮の表面に好んで接着する傾向をみせた。まれに Pc がI型肺胞上皮内(図4)やII型肺胞上皮内に観察されたり、I型肺胞上皮の細胞性の突起にとり囲まれたりしていた(図5)。

一方肺胞腔内には、好中球あるいは肺胞マクロファージの遊出しているのがしばしば見出され、それらの多くは Pc を貪食していた(図6, 7)。時に好中球やマクロファージの細胞質突起が虫体の pellicle と接触している像を認めた(図7)。

## II. Pc の微細構造

ラットの肺で増殖した Pc 虫体を電顕的に観察すると、栄養型 trophozoite, 前嚢子 precyst, 嚢子 cyst お

Figs. 4-7 Interaction between the organisms and the host alveolar cells and reaction of host cells to the organisms: 4. A trophozoite possibly surrounded by a type I alveolar epithelial cell. Bar=1  $\mu$ m. 5. A precyst surrounded by protrusions (arrow head) of a type I alveolar epithelial cell. Bar=1  $\mu$ m. 6. A neutrophil which contains two cysts. Many trophozoites and a ruptured cyst surround it. Bar=5  $\mu$ m. 7. Two alveolar macrophages, one of which contains a trophozoite (T1) within a phagosome and another of which is in contact with two trophozoites (T2 and T3) by the protrusions (arrow head). Bar=5  $\mu$ m.



よび嚢子内小体 intracystic body が容易に見出される。ところが今回観察された虫体は殆んどが栄養型であり、前嚢子や嚢子は稀にしか観察されなかった(図3)。すなわちヌードマウスにおいては栄養型が圧倒的に多いことが特徴の一つといえる。以下に各発育期虫体の微細構造上の特徴を示す。

#### 1. 栄養型 trophozoite (図8~14)

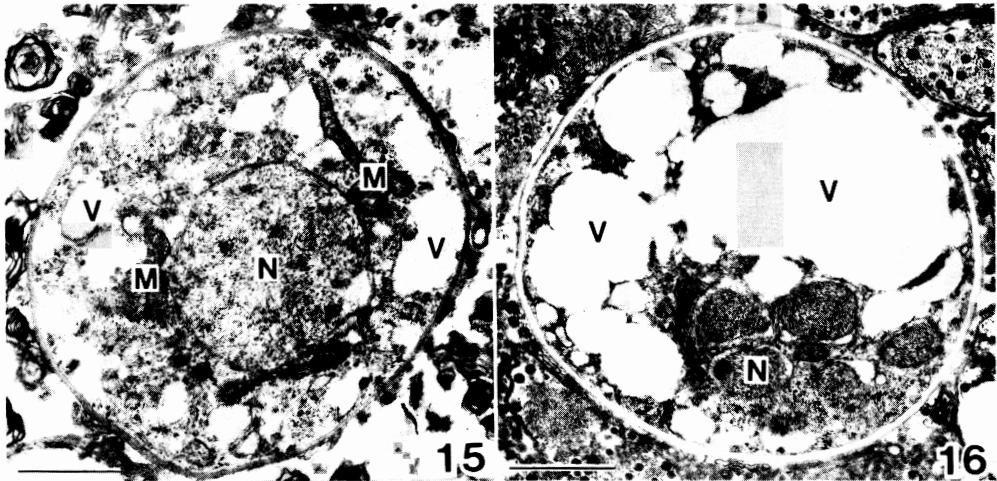
栄養型の大きさは  $2\sim 8\ \mu\text{m}$  と変異に富み、外形は楕円形(図8)を示すもの、あるいは不整形を示すものなど種々であった。pellicle の構造は内側の単位膜と外側の電子密度の高い層の二つの層からなっており、その厚さは  $20\sim 40\ \text{nm}$  であった(図8の Inset)。

また虫体の周囲すなわち虫体と虫体との間および虫体とI型肺胞上皮との間には、横断面が輪状で直径  $70\sim 120\ \text{nm}$  の管状突起(tubular expansion)が多数認められた(図8の t)。管状突起の構造から内腔とそれを包む単位膜と電子密度の高い外層よりなっており虫体の pellicle の構造に一致した。

細胞質にはオスミウム好性の、ほぼ一定の直径を有する円い小体が豊富に認められた(図8の ORB)。その他、空胞(図3の V)、粗面小胞体(図8の RER)、pellicle の直下の滑面小胞体(図8の SER)、クリスタの発達した悪い球形から棒状のミトコンドリア(図8の M)、リボゾーム、グリコーゲン様顆粒なども観察された。

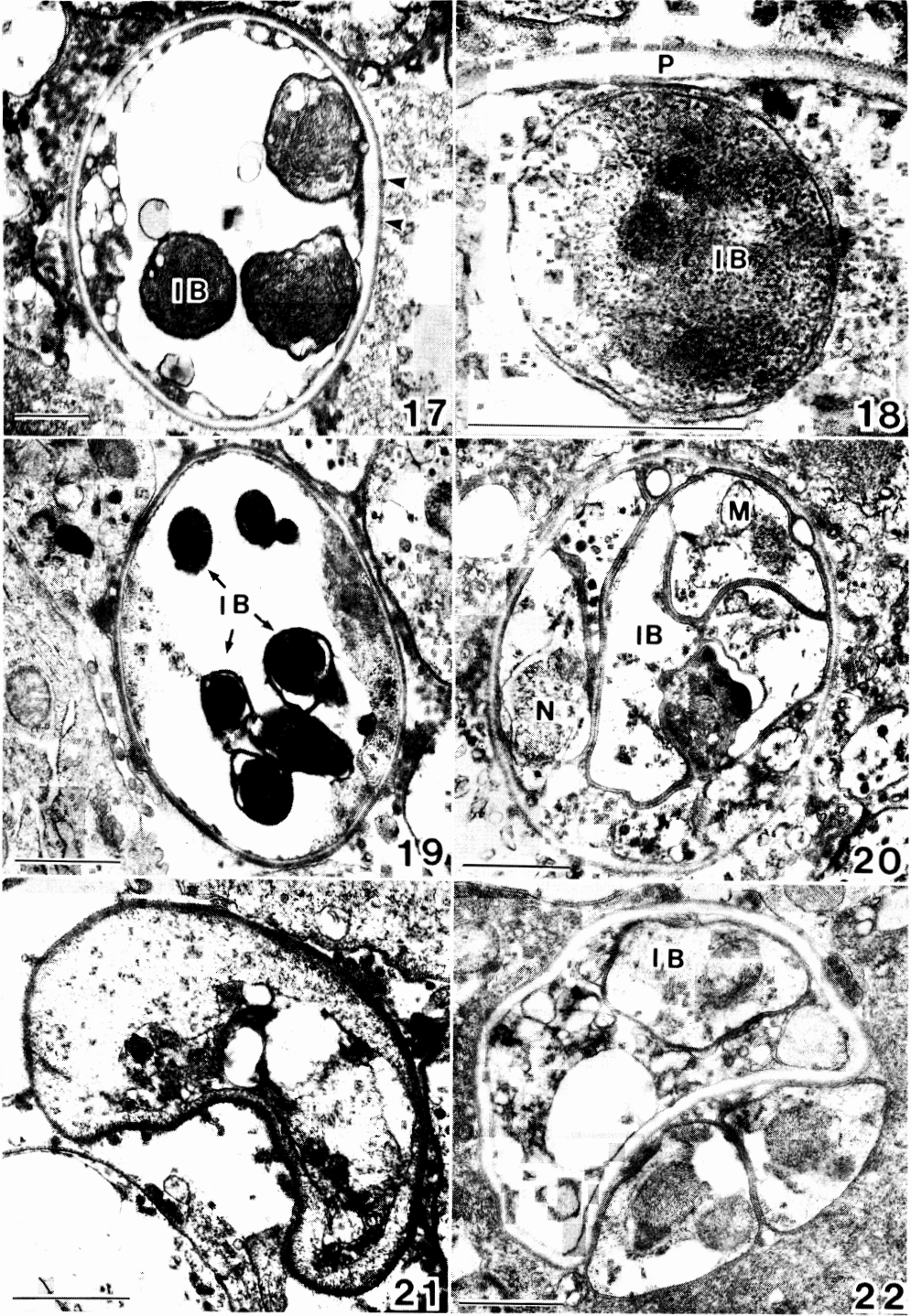
核は通常円形で、大きさは  $1\sim 3\ \mu\text{m}$  の範囲にあり(図8)、時に核がベル状を呈し、一端が突出する核も認められた。また多くの場合、核内には核膜に附着して核の辺縁あるいは核内に電子密度の高い大きな物質が認められ、これは仁と考えられた(図8の n)。核には核膜に接して NAO (nucleus associated organelles) と呼ばれる構造が1個あるいは1対認められることもあった(図9の NAO)。また分裂期の核においては、核膜は消失することなく残存し、時に紡錘体(spindle microtubules)や染色体(chromosome)も観察された(図10の夫々、矢頭印、矢印)。

栄養型において、しばしば核の断面が2個観察され



Figs. 15-16 Precyst of *P. carinii*: 15. An early stage precyst characterized by oval shape, a thin pellicle, a large nucleus, and a clump of mitochondria. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 16. A moderately developed precyst in which nuclear division is in progress. The pellicle becomes thicker and consists of three layers: an innermost unit membrane, an electron-lucent middle layer, and an electron-dense outer layer. Bar= $1\ \mu\text{m}$ .

Figs. 9-14 Cell division of trophozoites: 9. A nucleus with a nucleus-associated organelle. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 10. A longitudinal section of spindle microtubules (arrow head) and chromosomes (arrow). A nuclear envelope exists during the division of trophozoite. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 11. A binucleated trophozoite. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 12. A binucleated trophozoite presumably in the course of cell division. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 13. A trophozoite whose nucleus is in the course of division. Bar= $1\ \mu\text{m}$ . 14. A four-nucleated trophozoite. Note that each nucleus has a nucleolus. Bar= $1\ \mu\text{m}$ .



(図11, 12, 13), 時に虫体にくびれを生じた栄養型も観察された(図12, 13). 通常2つの核は隣接して認められた(図11)が, 虫体にくびれを生じた栄養型では, 各々の核がくびれの相方に分れるような像を示した. 核の断面が4個認められた栄養型(図14)では, その核の大きさは一般に $2\mu\text{m}$ 以下で, 各々の核には仁が認められた.

## 2. 前嚢子 precyst (図15~16)

前嚢子は栄養型から嚢子に至る過程の虫体である. Pcに重度感染している肺胞を観察すると, 栄養型は極めて多く認められるのに対し, 前嚢子は明らかに少数であった. 検出された前嚢子の形態をのべると, まず外形は楕円形ないし円形で(図15, 16), 大きさは $3.0\sim 4.5\times 3.0\sim 6.0\mu\text{m}$ であった. 前嚢子のpellicleの構造は, 栄養型と同じく2層からなる虫体(図15)から, 単位膜と外側の電子密度の高い層との間に電子密度の低い中間層が現れて3層を示す虫体(図16)まで種々の段階があり, その厚さは $60\sim 120\text{nm}$ と広い幅を示した.

pellicleの構造が2層よりなっている前嚢子は栄養型から移行した若い前嚢子と考えられ, 通常大形でかつ円形の核を1個有しpellicleの厚さは約 $60\text{nm}$ と栄養型よりやや厚い程度であった(図15). その核の周囲には小球状ないし棒状のミトコンドリアの集塊が認められ, その他, 空胞やグリコーゲン顆粒, リボゾームなども観察された.

pellicleの構造が3層を示す前嚢子では, 核は1個から数個(図16)まで認められ, その核は小形化し電子密度も高くなっていた. pellicleの厚さは $70\sim 120\text{nm}$ と厚くなり嚢子のpellicleに類似していた. 細胞質にはミトコンドリアの集塊と多数の空胞が観察された.

## 3. 嚢子 cyst (図17~20)

ヌードマウスにおいてはPcの嚢子は前嚢子と同じく栄養型に比しいちじるしく少数しか認められなかった.

観察された嚢子は円形ないし楕円形で大きさは $3.0\sim 3.5\times 4.0\sim 5.0\mu\text{m}$ であり, そのpellicleの構造は3層から成り, 厚さは通常 $70\sim 140\text{nm}$ と厚く, 嚢子内には円形またはアメーバ状の嚢子内小体が認められた. ほぼ

円形を示す嚢子内小体(図17, 18)の直径は $0.5\sim 1.6\mu\text{m}$ でその中に核や粗面小胞体, ミトコンドリアなどがみられた. 嚢子の中には図19に示す如く電子密度の極めて高い嚢子内小体を有するものが多く, その内部構造やpellicleも判然としなかった.

ある嚢子では図20に示す如く多形性の嚢子内小体が充滿していた.

## 4. 空の嚢子 ruptured cyst (図21~22)

嚢子内小体が脱嚢した後の空の嚢子が見出された. pellicleの構造は3層からなって厚く, 外形は通常, 虚脱して碗状ないし三日月状を呈していた(図21, 22). 時に図22に示す様に嚢子内になお嚢子内小体が残存する像も観察された.

## 考 察

今回ヌードマウスを用いて研究を行った理由は, ヌードマウスがヒトの先天性免疫不全症などステロイド非投与Pc肺炎の実験モデルとなり得ると考えたからである. すなわち通常のラット, マウスなどにPc肺炎を誘発させるためには免疫抑制剤の長期大量投与が必要であるが, ヌードマウスでは, 免疫抑制剤を投与しなくとも重篤なPc肺炎を誘発し得ると考えた.

今回の研究はこの様な背景の下にヌードマウス由来のPcおよびPc肺炎を, 従来多くの報告があり, かつ著者も経験してきたラット由来のPcおよびPc肺炎(Barton and Campbell, 1969; Vara and Kucera, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Lanken *et al.*, 1980; Takeuchi, 1980; Yoneda and Walzer, 1980; Yoshida *et al.*, 1984)と種々の角度から比較検討した.

### 1. 栄養型と嚢子の比率について

光学顕微鏡的ならびに電子顕微鏡的観察を通じてまず気付くことは, ラット, マウスなどの場合に比較し, ヌードマウスでは圧倒的に栄養型が嚢子に比し多いことである. この意義については後述の生活史の項において再び触れることにするがヌードマウスにおけるPc肺炎の1つの特徴といえる.

Figs. 17-22 Various forms of *P. carinii* cysts: 17. A cyst containing round intracystic bodies. The pellicle of the cyst is thicker than that of the precyst and consists of three layers. The pellicle usually shows an especially thickened portion (arrow head). Bar= $1\mu\text{m}$ . 18. Higher magnification of a round intracystic body which is surrounded by double unit membrane. Bar= $1\mu\text{m}$ . 19. A cyst containing round to oval intracystic bodies, which are too dense to distinguish their structures. Bar= $1\mu\text{m}$ . 20. A cyst containing irregularshaped intracystic bodies. Bar= $1\mu\text{m}$ . 21. A crescent-shaped ruptured cyst. Bar= $1\mu\text{m}$ . 22. A crescent-shaped ruptured cyst, from which intracystic bodies may have escaped. Bar= $1\mu\text{m}$ .



## 2. スードマウスの Pc 感染肺胞における虫体と宿主細胞との相互関係

肺胞内における Pc の寄生態度、ならびに Pc と宿主細胞との関係についてはラットを用いた研究が多い (Barton and Campbell, 1969; Vavra and Kucera, 1970; Vossen *et al.*, 1978; Lanken *et al.*, 1980; Yoneda and Walzer, 1980; Yoshida *et al.*, 1984) が、スードマウスを用いた報告は Tamura *et al.* (1978) 以外みられない。

周知の如く肺胞を覆う上皮細胞には I 型肺胞上皮と II 型肺胞上皮の 2 種類がある。一般に I 型肺胞上皮は扁平で、II 型肺胞上皮は立方形である。II 型肺胞上皮の表面には多くの微絨毛が存在し、その細胞質には層状の封入体、多数のミトコンドリアを有することが知られている (Meyrick and Reid, 1970)。Lanken *et al.* (1980)、Yoneda and Walzer (1980) および Yoshida *et al.* (1984) らがラットにおいて観察したところによると、Pc は I 型肺胞上皮には接着寄生していたが、II 型肺胞上皮には接着するものはなかった。今回のスードマウスでの観察も全く同様で II 型肺胞上皮細胞の表面に接着するものは認められなかった。これは II 型肺胞上皮の表面に多数の微絨毛が存在するためではないかと考えられる。

Pc は通常、肺胞腔内に寄生し、増殖するのであるが、これが宿主細胞内あるいは組織内に侵入するかどうかは病原性を論ずる上で重要である。Vossen *et al.* (1978) は、Pc 感染ラット肺胞上皮内に栄養型を見出し、そこで栄養型は増殖しようと考えたが、虫体の侵入機構、細胞内増殖様式、虫体の細胞からの遊離方法は未だ不明であると述べた。Yoneda and Walzer (1980) は栄養型が肺胞上皮に接着することにより肺胞上皮が変性に陥り、基底膜が露出すること、および栄養型を間質に見出したことから、虫体は肺胞上皮に侵入するものと考えた。Yoshida *et al.* (1984) はラットにおいて Pc の栄養型を肺胞上皮細胞下または肺胞上皮細胞内に認めたが、1枚や2枚の薄切像では Pc が肺胞上皮に嵌入しているものの横切像と区別することが難しく、かつ Pc が肺胞上に接着するとき、上皮細胞がこれをとりかこむ像も認められることから、Pc の積極的な侵入性を速断できないと述べた。今回スードマウス肺で得られた所見も、これと同様で、Pc の栄養型および前嚢子が I 型および II 型肺胞上皮内に見出されたが、肺胞上皮はしばしば Pc しぼを包み込むことがあり、この所見をもって直ちに Pc の栄養型に組織侵入性があり、よって細胞内寄生性の生

物であると判断することは躊躇された。

ラットにおいて Pc は肺胞被覆層中に存在し増殖することが報告されている (Lanken *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1984)。今回スードマウスにおいても Pc はこの肺胞被覆層中に存在することが明らかとなった。このことは、Pc は直接空気にはふれず液状の肺胞被覆層内に存在し、これから栄養物を摂取し、増殖する可能性を示している。また肺胞腔に Pc が充滿してくるとガス交換が強く障害され、宿主は換気障害を起こし死の転帰をとることは電顕所見からも容易に理解された。

一方、Pc に対する宿主細胞の反応として虫体を排除しようとする働きも存在する。Tamura *et al.* (1978) はスードマウスにおいてマクロファージが Pc を貪食し処理している像を示した。ラットにおいてはすでに Von Behren and Pesanti (1978)、Lanken *et al.* (1980)、Yoneda and Walzer (1980) および Yoshida *et al.* (1984) らが Pc 虫体を貪食した好中球、マクロファージを観察し報告している。今回のスードマウスにおいても肺胞マクロファージならびに好中球を Pc 貪食している像が時に認められた。Pc の排除機能がマクロファージや好中球に備わっていると考えられるが、Pc の感染防御におけるこれらの役割については未だ十分には明らかにされていない。

## 3. Pc の微細構造

Pc の微細構造については今までにかなり多数の報告があるがその殆んどはステロイドを投与されたラットの肺 (Barton and Campbell, 1969; Vavra and Kucera, 1970; Vossen *et al.*, 1976, 1977, 1978; Takeuchi, 1980; Matsumoto and Yoshida, 1984) およびヒトの肺 (Bommer, 1961; Barton and Campbell, 1967; Campbell, 1972) における観察である。著者も既にステロイドを投与したラットおよびウサギの肺に増殖した Pc についてその微細構造と寄生態度の研究を行い報告した (山田ら, 1984; Yoshida *et al.*, 1984)。

一方、ステロイドを投与しないで Pc 肺炎を起こした動物の Pc の微細構造も報告されている (McConnell *et al.*, 1971; Shively *et al.*, 1973; Chandler *et al.*, 1976)。

しかしながら先天性胸腺欠損動物であるスードマウスの Pc の微細構造については Tamura *et al.* (1978) の報告以外に認められない。

### 1) 栄養型

スードマウスにおける Pc の栄養型は、ラットにおける Pc の栄養型と基本的には殆んど変わることはなかつ



た。しかし精細に観察すると、まず栄養型の数が前嚢子、嚢子より圧倒的に多いこと以外に、栄養型の外形がアメーバ状不整形を示すものより楕円形を示すものが多く、また2個の核の断面を認めるものがかなりあり、時には各々に仁をもった4個の核を認めるものもあった。以上のことは明らかに栄養型虫体の内部で核分裂が進行することを示し、前嚢子や嚢子が極めて少ないことからヌードマウスにおけるPcの増殖は栄養型の分裂によるのが主と考えられた。また細胞質内にosmiophilic round bodyが豊富に存在することも特徴の1つであった。osmiophilic round bodyはlipid globuleと考えられている(Barton and Campbell, 1969)。もしそうであるならばこのosmiophilic round bodyはヌードマウス栄養型の代謝に強く関係しているものであろう。

## 2) 前嚢子および嚢子

今回、少数ではあるが観察された前嚢子は構造上ラットの前嚢子と基本的に異なるところはなかった。Tamura *et al.* (1978) はヌードマウス由来のPcを観察したが、前嚢子については記載していない。おそらく、前嚢子期の虫体が非常に少なかったためであろう。

嚢子の一般形態もラットにおける嚢子と基本的には変わらなかった。異なる点としては、ヌードマウスでは殆ど嚢子内小体が一樣に電子密度が高く、内部構造を判別し難かったことである。Vossen *et al.* (1978) はラット由来のPcについてバナナ型ないし半月状で電子密度の高い嚢子内小体はリボゾームが豊富なためであり、この嚢子内小体は球形の嚢子内小体から発育した正常のものだと判断した。しかしTakeuchi (1980) は、逆にpellicleの剥離した半月状で電子密度の高い嚢子内小体は変性過程にあると考えた。Tamura *et al.* (1978) もヌードマウスにおけるPcの嚢子を観察し、嚢子内小体の変性過程にあると判断している。今回ヌードマウスにおいて観察された電子密度が高く、かつ内部構造の判然としない嚢子内小体も、同様に変性過程にあるものと考えたいが、結論をうるにはさらに追究が必要である。

## 4. 生活史

### 1) 嚢子形成による増殖 trophozoite-to-cyst cycle

栄養型が前嚢子を経て8個の嚢子内小体を有する嚢子に発育することは、ラット由来のPcを用いて多くの研究があるが、詳細は永い間不明であった。最近Matsumoto and Yoshida (1984) は、Pcの前嚢子期をさらに前期、中期、後期に分け、前嚢子の前期の核にシナプトネマ構造(synaptonemal complex)を見出し、嚢子内小体は減数分裂によって形成されることを初めて報告

した。減数分裂の後、成熟した嚢子内小体は脱嚢して再び栄養型になり、栄養型同志による接合の結果、再び前嚢子に移行すると考えた。

しかし今回のヌードマウスでの結果は、前嚢子や嚢子が著しく少ないことから、ラットに比較して嚢子形成による増殖は殆んど行われたいのではないかと考えられた。

### 2) 栄養型による増殖 trophozoite-to-trophozoite cycle

上述のような理由により、著者はヌードマウスにおけるPcの増殖は主として栄養型の分裂によるものと考えた。従来報告されている栄養型の分裂様式の1つは、Vossen *et al.* (1978) が観察したendogeny(栄養型の中にいくつかの娘栄養型が形成される)であり、いま一つの様式はVavra and Kucera (1970) が示した栄養型による2分裂または出芽による増殖である。

今回のヌードマウス の所見は、既に述べた如く栄養型が嚢子に比し著しく多いこと、栄養型の核分裂像や2個の核の断面をしばしば認めたこと、詳細に検索したにもかかわらずendogenyの像は認めることができなかったことなどから、栄養型は主として2分裂によって増殖しているものと考えた。

ヌードマウスにおけるPcの増殖様式とラットその他におけるPcの増殖様式との違いは果してどのような理由によるものか、Pcの種あるいは系統の違いによるものか、あるいは先天的細胞性免疫欠損動物とステロイド投与による免疫抑制動物との違いに帰すべきかは目下解明に至らず将来の検討にまたねばならない。

## ま と め

免疫正常動物にPc肺炎を発症させるには、副腎皮質ステロイドなど免疫抑制剤を長期間大量投与するが、ヌードマウスでは、Pc既感染ヌードマウスと同居させるだけで、免疫抑制剤などの投与なしに重度の感染を引き起こすことができる。今回、ヌードマウスに発生したPcおよびPc肺炎の性状を電子顕微鏡を用いて種々の角度から比較検討した。

1. ヌードマウス肺で増殖したPcは栄養型が圧倒的に多く、前嚢子や嚢子は稀にしか見出されなかった。またendogenyの像も見出されなかった。ところが栄養型の核分裂像はしばしば見出された。これらのことから、ヌードマウスではラットにおけるような嚢子形成による増殖は殆んど行われず、栄養型の2分裂による増殖が主であると考えられた。しかしこの違いがヌードマウス由来のPcが種または系統を異にするためによるの

か、あるいは先天的胸腺欠損動物とステロイド投与による免疫抑制動物との違いのためによるものなのか、あるいはその他の理由によるのか、未だ結論を得るに至っていない。

2. ヌードマウス肺においても、ラット肺におけると同様、Pc は I 型肺胞上皮表面に接着して寄生し、II 型肺胞上皮には接着し難いようであった。また虫体はすべて肺胞被覆層の中に存在し、虫体の一部を気相に暴露しているものではないことが明らかとなった。

3. 少数の Pc が I 型および II 型肺胞上皮内に見出された。しかしこの所見は上皮の凹所へ嵌入了した Pc の横切像や、上皮が Pc を切り取り囲んだ像と区別できず、この所見をもって直ちに Pc 栄養型に組織侵入性があると判断することは誤りであると考えられる。

4. 肺胞マクファージならびに肺胞内に現れた好中球が Pc を貪食している像が観察された。

5. ヌードマウス肺に見出された栄養型はその外形がアメーバ状不整形を示すものより楕円形を示すものが多く、また 2 個の核の断面を認めるものもあった。また細胞質内に、osmiophilic round body を豊富に有していた。また嚢子内小体は電子密度が高く、内部構造も判然とせず、変性過程にあるのではないかと考えられた。

以上の如く、本研究によって ヌードマウス由来の Pc とラット由来の Pc とは形態的ならびに生態的にいくつかの違いが明らかにされた。しかしこれらをもって直ちに ヌードマウス由来の Pc を新種とするには問題があり、現時点では *Pneumocystis carinii* (nude mouse origin) と呼んで他と区別することを提唱するにとどめる。

## 謝 辞

本研究にあたり終始御指導、御教示をいただいた京都府立医科大学医動物学教室 吉田幸雄教授に深謝の意を表し、多大な御援助をいただいた同教室 松本芳嗣博士に感謝の意を表す。

本論文の要旨は、第51回日本寄生虫学会総会（昭和57年東京）、第39回日本電子顕微鏡学会（昭和58年名古屋）、第27回日本熱帯医学会（昭和60年神戸）において発表した。

## 文 献

- 1) Barton, E.G., Jr. and Campbell, W.G., Jr. (1967): Further observations on the ultrastructure of *Pneumocystis*. Arch. Path., 83, 527-534.
- 2) Barton, E.G., Jr. and Campbell, W.G., Jr. (1969): *Pneumocystis carinii* in lungs of rats treated with cortisone acetate. Ultrastructural observations relating to the life cycle. Am. J. Path., 54, 209-236.
- 3) Bommer, W. (1961): Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Pneumocystis carinii* aus menschlichen Lungen. Dtsch. Med. Wochenschr., 86, 1309-1313.
- 4) Burke, B. A. and Good, R. A. (1973): *Pneumocystis carinii* infection. Medicine, 52, 23-51.
- 5) Campbell, W.G., Jr. (1972): Ultrastructure of *Pneumocystis* in human lung. Life cycle in human pneumocystosis. Arch. Path., 93, 312-324.
- 6) Chandler, F. W., McClure, H. M., Campbell, W.G., Jr. and Watts, J.C. (1976): Pulmonary pneumocystosis in nonhuman primates. Arch. Pathol. Lab. Med., 100, 163-167.
- 7) Hendley, J.D. and Weller, T.H. (1971): Activation and transmission in rats of infection with *Pneumocystis carinii*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 137, 1401-1404.
- 8) Lanken, P. N., Minda, M., Pietra, G.G. and Fishman, A. P. (1930): Alveolar response to experimental *Pneumocystis carinii* in the rat. Am. J. Path., 99, 561-588.
- 9) Matsumoto, Y. and Yoshida, Y. (1984): Sporogony in *Pneumocystis carinii*: Synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. J. Protozool., 31, 420-428.
- 10) McConnell, E. E., Basson, P. A. and Pienaar, J. G. (1971): Pneumocystosis in a domestic goat. Onderstepoort J. Vet. Res., 38, 117-126.
- 11) Meyrick, B. and Reid, L. (1970): The alveolar wall. Brit. J. Dis. Chest., 64, 121-140.
- 12) Murray, J. F., Felton, C. P., Garay, S. M., Gottlieb, M. S., Hopewell, P. C., Stover, D. E. and Teirstein, A. S. (1984): Pulmonary complications of the acquired immunodeficiency syndrome. Report of a national heart, lung and blood institute workshop. N. Engl. J. Med., 310, 1682-1688.
- 13) Pifer, L. L., Hughes, W. T., Stagno, S. and Woods, D. (1978): *Pneumocystis carinii* infection: Evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. Pediatrics, 61, 35-41.
- 14) Shively, J. N., Dellers, R. W., Buergett,

- C. D., Hsu, F. S., Kabelac, L. P., Moe, K. K., Tennant, B. and Vaughan, J. T. (1973) : *Pneumocystis carinii* pneumonia in two foals. J. Am. Vet. Med. Assoc., 162, 648-652.
- 15) Smith, J. W. and Bartlett, M. S. (1984) : In vitro cultivation of *Pneumocystis*. In *Pneumocystis carinii* pneumonia. Pathogenesis, Diagnosis, Treatment, Lung Biology in Health and Disease, Vol. 22, ed. by Lowell S. Young, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 107-137.
  - 16) Takeuchi, S. (1980) : Electronmicroscopic observation of *Pneumocystis carinii*. Jpn. J. Parasit., 29, 427-453.
  - 17) Tamura, T., Ueda, K., Furuta, T., Goto, Y. and Fujiwara, K. (1978) : Electron microscopy of spontaneous pneumocystosis in a nude mouse. Jpn. J. Exp. Med., 48, 363-368.
  - 18) Ueda, K., Goto, Y., Yamazaki, S. and Fujiwara, K. (1977) : Chronic fatal pneumocystosis in nude mice. Jpn. J. Exp. Med., 47, 475-482.
  - 19) Vavra, J. and Kucera, K. (1970) : *Pneumocystis carinii* Delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. J. Protozool., 17, 463-483.
  - 20) Venable, J. H. and Coggeshall, R. (1965) : A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Cell. Biol., 25, 407-408.
  - 21) Von Behren, L. A. and Pesanti, E. L. (1978) : Uptake and degradation of *Pneumocystis carinii* by macrophages in vitro. Am. Rev. Resp. Dis., 118, 1051-1059.
  - 22) Vossen, M. E. M. H., Becker, P. J. A., Meuwissen, J. H. E. Th. and Stadhouders, A. M. (1976) : Microtubules in *Pneumocystis carinii*. Z. Parasitenk., 49, 291-292.
  - 23) Vossen, M. E. M. H., Beckers, P. J. A., Meuwissen, J. H. E. Th. and Stadhouders, A. M. (1978) : Developmental biology of *Pneumocystis carinii*. an alternative view of the life cycle of the parasite. Z. Parasitenk., 55, 101-118.
  - 24) Vossen, M. E. M. H., Beckers, P. J. A., Stadhouders, A. M., Bergers, A. M. G. and Meuwissen, J. H. E. Th. (1977) : New aspects of the life cycle of *Pneumocystis carinii*. Z. Parasitenk., 51, 213-217.
  - 25) Walzer, P. D. (1977) : *Pneumocystis carinii* infection. Southern. Med. J., 70, 1330-1337.
  - 26) Walzer, P. D., Perl, D. P., Krogstad, D. J., Rawson, P. G. and Schultz, M. G. (1974) : *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States: Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. Ann. Intern. Med., 80, 83-93.
  - 27) Walzer, P. D., Schnelle, V., Armstrong, D. and Rosen, P. P. (1977) : Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. Science, 197, 177-179.
  - 28) Walzer, P. D., Schultz, M. G., Western, K. A. and Robbins, J. B. (1973) : *Pneumocystis carinii* pneumonia and primary immune deficiency diseases of infancy and childhood. J. Pediatr., 82, 416-422.
  - 29) Watson, M. L. (1958) : Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. J. Biophys. and Biochem. Cytol., 4, 475-478.
  - 30) 山田 稔・猪飼 剛・荻野賢二・松本芳嗣・塩田恒三・吉田幸雄(1984) : *Pneumocystis carinii* および *Pneumocystis carinii* 肺炎の研究Ⅷ. ウサギおよびモルモットにおける誘発実験. 寄生虫誌, 33, 535-544.
  - 31) Yoneda, K. and Walzer, P. D. (1980) : Interaction of *Pneumocystis carinii* with host lungs: an ultrastructural study. Infect. Immun., 29, 692-703.
  - 32) Yoshida, Y., Matsumoto, Y., Yamada, M., Okabayashi, K., Yoshikawa, H. and Nakazawa, M. (1984) : *Pneumocystis carinii*: Electron microscopic investigation on the interaction of trophozoite and alveolar lining cell. Zbl. Bakt. Hyg., A256, 390-399.
  - 33) Young, L. S. (1982) : Trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of adults with pneumonia due to *Pneumocystis carinii*. Rev. Infect. Dis., 4, 608-613.

Abstract

TRANSMISSION-ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATIONS OF  
*PNEUMOCYSTIS CARINII* AND *PNEUMOCYSTIS CARINII*  
PNEUMONIA IN NUDE MICE

MINORU YAMADA

(Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural University of Medicine,  
Kyoto 602, Japan, Director: Professor Y. Yoshida)

*Pneumocystis carinii* is an important opportunistic pathogen which causes fatal pneumonia to the patients suffered from congenital immunodeficiency or to the recipients of immunosuppressive drugs. This pneumonia has recently become well known as a disease frequently associated with acquired immune deficiency syndrome (AIDS).

In 1977, Ueda and his colleagues isolated *P. carinii* from athymic nude mice without the use of any immunosuppressive drug. This nude mouse-originated *P. carinii* has been kept in our laboratory since then. In our preliminary observations it was found that *P. carinii* in nude mice was different in some points from that grown in cortisone-treated rats. An attempt was made to obtain informations on the detailed morphology, life cycle, and behaviour of *P. carinii* grown in BALB/c nude mice through transmission-electron microscopic observations.

At autopsy, the lungs of each nude mouse were perfused with 2.5% v/v glutaraldehyde in cacodylate buffer at pH 7.4 through the right ventricle of the heart using a peristaltic pump attached to a capillary tube (Matsumoto and Yoshida, 1984). For the preservation of microtubules, 2.5% glutaraldehyde, in cacodylate buffer at pH 6.8 containing 2.0% w/v tannic acid, was also used (Matsumoto and Yoshida, 1984) as a fixative. The lungs were removed from the chest cavity, minced, and kept in the same fresh fixative for 2 hours, and then post-fixed with 1.0% w/v osmium tetroxide in the same buffer for 2 hours. Some tissue blocks were stained en block with about 1.5% uranyl acetate in 50% ethanol for 1 hour after post-fixation with 1.0% osmium tetroxide.

*Pneumocystis carinii* can generally be divided into three stages: trophozoite, precyst, and cyst. It is worthy of notice that there were huge numbers of trophozoites in company with only a few cysts and precysts in nude mice compared with the results previously obtained in rats and humans. On the other hand, the author frequently found trophozoites that had two nuclei or that were in the process of nuclear division. These results suggest that *P. carinii* in nude mice multiplies mainly by trophozoite-to-trophozoite cycle and by binary fission, whereas *P. carinii* in rats more frequently by trophozoite-to-cyst cycle. The reason for the difference mentioned above remains unknown. It is plausible however, that the reason is linked to the difference between two strains of *P. carinii*, nude mouse origin and rat origin, or the difference between two immunosuppressive conditions of the host, one by congenital athymism and the other by immunosuppressant.

The trophozoites usually attached strongly to type I alveolar epithelial cells in the alveolar lining liquid layer. They seemed to dislike adhering to type II alveolar epithelial cells which have a tremendous number of microvilli on the surface. Occasionally, they seemed to exist intra-epithelially. Macrophages

and neutrophils were present in the alveolar lumen and they sometimes contained the organisms within their phagosomes.

The ultrastructures of *P. carinii* found in nude mice showed some differences from those found in cortisone-treated rats, namely, more spherical trophozoites, more abundant osmiophilic round bodies and more electron dense intracystic bodies. Most electron dense intracystic bodies in these organisms were supposed to be going through the process of degeneration. To designate this *Pneumocystis* organism found in nude mice as a new species, more studies will be required, because there are only a few taxonomical evidences at the present time.