

## トキソプラズマのシスト内原虫数の推定と感 染マウス脳内シストの発育及び分布について

本村 一郎・徐 寛 容

長崎大学熱帯医学研究所疫学部 (主任: 中林敏夫教授)

(Received for Publication June 26, 1970)

Estimation of the Number of Parasites contained within  
a Cyst, and Growth and Distribution of Cysts in the  
Brains of Mice infected with *Toxoplasma gondii*

Ichiro MOTOMURA and Kanyo JO

*Department of Epidemiology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University*

(Director: Prof. Toshio NAKABAYASHI)

### Abstract

I. When separating toxoplasma from man or animal deemed to have died due to toxoplasmosis, brain tissue is often used as the inoculation material. However, using a whole brain for separation of toxoplasma is not easy in that a large number of small experimental animals are required. Accordingly, it becomes necessary to know in what regions of a brain are toxoplasmas distributed more. In the present experiment, the authors used Beverley strain of toxoplasma and examined inoculated mice as to the growth of cysts with the progress of infection and the number of cysts in various brain regions (olfactory lobe, cerebrum, cerebellum, interbrain, pons and medulla).

In the brain of mice, cysts were distributed most in the cerebral region throughout the period from 15 days to 210 days after inoculation, accounting for 57.8~86.4% of the total number of cysts. In the meantime, the number of cysts in pons and medulla was smallest, accounting for only 0.5~6.4% of the total number of cysts. On the other hand, cysts in cerebellum accounted for 2.1~29.2% and those in interbrain 4.9~19.5% of the total number of cysts respectively. From the respective numbers of cysts, the numbers per 1 mg of brain were determined to obtain density indices, as a result of which the index of cerebrum was found to be 120.9~181.3 as against 0~59.1 for

pons and medulla, indicating distribution of a large number of cysts in cerebrum.

From the results of this experiment, it is considered that cerebrum is suitable as an examination material in an experiment to separate or detect cysts from the brain of mice infected with toxoplasma.

II. In the experiment on infection of mice using toxoplasma cysts, the number of inoculated toxoplasmas is expressed in terms of the number of cysts, but it cannot be said to be an indistinct expression. The reason is that even one cyst varies in its size with the progress of infection and the number of toxoplasmas contained therein is considered to range from scores to tens of thousands. Up to the present, no report is available, which has elucidated the relation between the size of cyst and the number of toxoplasmas existing in the cysts. In the present experiment, the authors studied the relationship between the diameter of cyst and the number of toxoplasmas involved in the cysts. That is, cysts were purely separated from the brain of mice infected with Beverley strain by multi-layer centrifugation with gum arabic solution (Nakabayashi & Motomura, 1968) and in respect of 72 cysts having a diameter of less than  $50\mu$ , cyst diameter and the number of toxoplasmas in the cysts were actually measured. To dissolve cyst membrane, 1% trypsin-Puck solution heated to  $37^{\circ}\text{C}$  was employed. The number of all the toxoplasmas escaping from each cyst were measured using a microscope of 400 magnifications. As a result, a regression line of  $Y=1.04X+0.87$  was calculated. In respect of cysts having a diameter of less than  $50\mu$ , if one measures cyst diameter and utilizes this regression line, it is possible to estimate the number of toxoplasmas in a cyst simply.

## 結 言

疑似トキソプラズマ症例から原虫を分離するために用いられている動物接種法は、極めて有用な診断法の一つであるが、接種材料として通常用いられている髄液及び生検材料中に原虫が存在する頻度は比較的少ない。

トキソプラズマ (Tp) 症によって死亡したと思われる人や大動物の死後診断として脳組織を接種材料に用いて原虫の分離に成功したという報告 (Jacobs et al., 1952; Eyles et al., 1957) は接種材料の選択において多くの示唆を与えるものである。然し乍ら、大動物から得られた脳組織全体を原虫分離に使用することは、多数の実験用小動物を必要とするため容易ではない。従って、脳の如何なる部位に原虫がより多く分布しているかを知ることが必要となってくる。

Walls et al. (1963) は人の死体15例から脳を採取し、脳組織片を5gずつ無作意抽出して Tp の分離を試みたが、14例からは原虫の検出ができなかったが、残る1例は全脳5gを用いて原虫の分離に成功したと

報告している。この報告は脳の1部分を接種材料に用いることは原虫を見落とす危険性のあることを暗示している。

本報は Tp の Beverley 株を用いて接種マウスの感染経過に伴ない、脳内におけるシストの発育と分布について検討したものである。

次に、Tp のシストを用いたマウス感染実験においては、接種原虫数はシストの数をもって表現されているが、これは極めて不明確な表現法と云わざるを得ない。何故ならば、1個のシストと雖も感染の経過に従ってシストの大きさに差異があり、その中に包蔵されている原虫数は数十個から数万個にも及ぶと考えられているからである。

現在までのところ、シストの大きさとシスト内原虫数との関係を検討したという報告は未だ見られない。本報は、シスト内原虫数がシストの半径の3乗に比例して増大するとの仮説のもとに、シストの大きさとシスト内原虫数との関係を検討したのでここに報告する。

## 実験材料および方法

### I 実験材料

#### 1. 供試原虫

実験に使用した原虫は、われわれの研究室においてマウス腹腔内接種により継代維持している *Toxoplasma gondii* の Beverley 株である。

#### 2. 供試動物

実験に用いた動物は体重20g前後の健常な dd 系マウスであって、実験には雌雄の区別なく使用した。

### II 実験方法

#### 1. Tp 感染マウス脳内におけるシストの分布

直径20乃至30 $\mu$ のシスト36個ずつを多数のマウスの腹腔内に接種し、接種後15, 20, 25, 45, 60, 114, 185及び210日を経過したマウス3~5匹の脳を採取し、1個の脳を図1に示すように、嗅葉、大

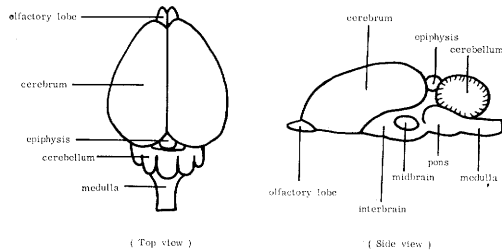


Fig.1. Schematic illustration of mouse brain

脳、小脳、間脳及び橋・延髄の5部位に分割した。各部位の組織片はそれぞれ乳鉢内に入れてよく磨碎し、次いで、各乳鉢内に嗅葉：2cc、大脳：10cc、小脳：5cc、間脳：4cc及び橋・延髄：2cc量のHanks液を加えて脳乳剤を作成した。

各脳乳剤を0.1ccずつ正確に採り、スライドガラス板上に数箇所滴下して倍率200倍の顕微鏡下で全視野隈なくシストを算え、0.1cc当りのシスト数を計算した。同様の操作を再び行ない、合計2回測定した平均値と上記Hanks液の添加量から各部位におけるシスト総数を求めた。

対照として、Beverley株接種後45日を経過したマウス20匹の脳を採取し、各脳組織は嗅葉、大脳、小脳、間脳及び橋・延髄の5部分に分割し、各部位の重量を測定して、その平均値をもって各部位の重量とした。

#### 2. シスト内総原虫の算定法

Beverley株シスト50個をそれぞれ60匹のマウスの腹腔内に接種し、このうち生残ったマウスは接種

後15日目から約3週間隔で180日間8回にわたって、各時期に3匹のマウスを屠殺して脳を採取した。採取した脳は3個を1つの乳鉢内に入れてよく磨碎し、これに生理的食塩水を約20cc加えてよく攪拌した後、二重のガーゼで濾過して粗大な組織塊を除去した。この脳乳剤からアラビアゴム重層遠心沈澱法(Nakabayashi and Motomura, 1968)によってシストを分離した。

分離したシストはHanks液を用いて十分に稀釈して、稀釈液1滴中にシスト1個が浮游するように調製した。このシスト浮游液を清浄なスライドガラス上に1滴とりカバーガラスを被覆せずに直接、ミクロメーターを用いて倍率200倍の顕微鏡下でシストの直径を計測した。

あらかじめ、37°Cに加温した1% Trypsin-Puck液(TPS)を1滴カバーガラス上に滴下し、カバーガラスを裏返して液面を下に向けて上記スライドガラス上のシスト浮游液の上に被覆した。Trypsinの酵素作用をうけて、シスト膜は直ちに一部分溶解してシスト内部から原虫の脱出が認められた。この時カバーガラスの上から軽く圧迫することによって、容易にシスト膜は破壊されて、シスト内のすべての原虫はシストの外へ脱出した。1個のシストから脱出した全ての原虫数を400倍率の顕微鏡を用いて実測した。

#### 3. シスト内原虫の生死判定法

生細胞は色素液を取込まず、死細胞だけが染色されるような色素を利用して、原虫の生死を判別する目的で行なった予備実験の結果、シスト内原虫の生死判定には1% Eosin加Trypsin-Puck液(ETPS)が適当であると考えたので実験に使用した。この液は1% Trypsin-Puck液10ccに0.1gのEosin(水溶性)を加えて作成したものである。

原虫の算定法は前項目2と同様にして行なうが、原虫がETPSと接触して赤く染まったものを死虫体とし、全く染まらないものを生虫体と仮定した。ETPSと原虫との接触時間は15分から40分以内と規定して、この時間内に生、死原虫数を算定した。

感染マウスの脳からアラビアゴム法を用いて分離したシストは少なくとも6時間以内にすべての検査を終えた。

実験方法の詳細は実験成績の各項目毎に記載することにする。

## 実 験 成 績

## 実験 I. (予備実験)

## 1. Beverley 株シストを腹腔内接種したマウスの感染経過日数と脳内シストの直径との関係

Beverley 株接種マウスの感染経過日数と脳内に出現するシストの直径との関連を調べる目的でこの実験を行なった。

マウス46匹の腹腔内に36個のシストをそれぞれに接種した。接種後、45日目までは5日間隔とし、その後は60日、80日及び100日目にマウス3匹を屠殺して脳を採取した。採取した脳3個をまとめて1つの乳鉢内に入れてよく磨砕し、生食水を加えて脳乳剤を作成した。この脳乳剤の1滴をスライドガラス上にとり、脳乳剤中に出現するシストのうち無作意的に20個のシストの直径をマイクロメーターを用いて計測した。

図2は縦軸にシストの直径を、横軸には感染マウスの経過日数を取り、各群20個のシストの直径の平均値と5%の水準における信頼限界を示したものである。この図表からも明らかのように、接種後15日目から30日目までは約4 $\mu$ ずつシストの直径が増大したが、その後100日目までの期間ではシストの大きさも不揃いとなり、直径も顕著な増大はみられないが、徐々ではあるが漸次増大の傾向を示した。

## 2. 色素排除によるシスト内原虫の生死判別実験

生細胞は染まらず、死細胞のみ染まるような色素を利用して細胞の生死を判別する、所謂、色素排除試験が培養細胞について広く利用されているので、この方法をシストに応用して、シスト内原虫の生死判別に役立てようとしてこの実験を行なった。

この目的のために使用した色素は、Trypan blue, Nigrosin 及び Eosin である。これらの色素は1% TPS に溶解させて、Trypan blueは0.5%, Nigrosin は0.4%とし、Eosin は1%溶液とした。しかし、これらの色素のうち Trypan blue と Nigrosin は使用の結果、シスト内原虫の生死判定上明瞭に区別できなかったため以後の使用を中止し、実験には Eosin のみを使用した。

実験方法は、Beverley 株シスト50個を腹腔内接種して感染させたマウスを30日後に屠殺して脳を摘出し、脳乳剤を作り、これをアラビアゴム分離法によってシストを分離した。分離したシストは生食水をもって稀釈し0.1cc 中に40個のシストが浮遊するようにシスト浮遊液を作成した。これを2つに分け、1部は60°C 5分間加温処置し、残る1部は無処置のままでおき実験の対照に供した。

加温処理したシスト浮遊液を1滴スライドガラス

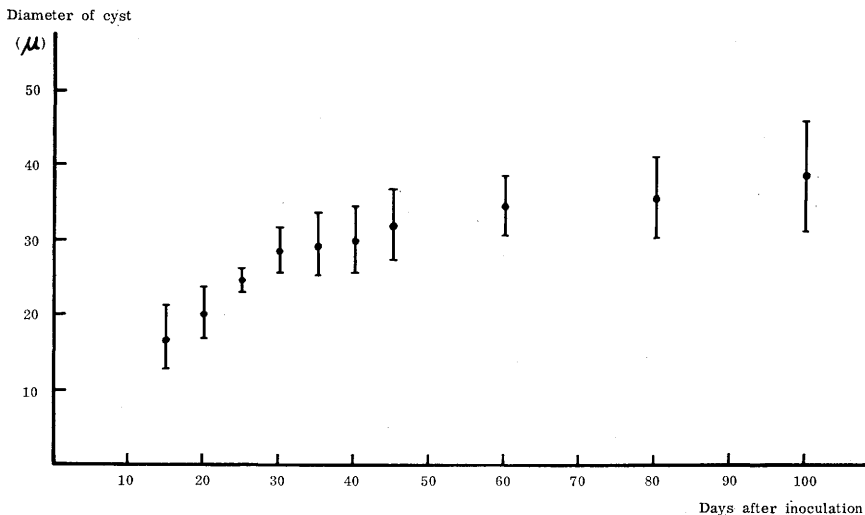


Fig. 2. Relationship between the diameter of cyst in the mouse brain and the days after inoculation intraperitoneally with Beverley strain

Notes: Three mice consisted a group and 95% confidence limits were plotted for all mean values

**Table 1.** Infectivity and stain-ability of cysts after heating at 60°C for 5 minutes

Heating	Staining with ETPS	No. of cysts inoculated	Mice inoculated	Fate of mice after inoculation	Detection of <i>T. gondii</i>	
					Prolif. form	Cyst form
Heating at 60°C for 5 minutes	+	80	M 1	S*(35)**	—	—
			M 2	S (35)	—	—
			M 3	S (35)	—	—
Without heating (for control)	—	50	M 4	D*** (20)	+	+
			M 5	S (35)	—	+
			M 6	S (35)	—	+

Notes : ETSP: Trypsin-Puck solution containing 1% of Eosin  
 S\* : Survival  
 D\*\*\* : Death  
 ( )\*\* : The survival days of mice

上にとり、1% Eosin 加 TPS (ETPS) を1滴滴下したカバーガラスをこの上に被覆して鏡検した。この結果、シスト内の全ての原虫は核と細胞質が赤く染色されていたが、一方、無処理のシスト浮游液についても同一方法で鏡検したが、1個のシストの中で約98%以上の原虫が染まっていないことを認めた。

加温処理したものと無処理のシスト浮游液をそれぞれマウス3匹ずつに0.2cc 腹腔内接種してシストの感染性の有無を調べた成績が上の表1である。

この表からも明らかのように、加温処理後鏡検して全部赤く染まった原虫を接種したマウス3匹は無症状のまま生残したので、接種後35日目に屠殺して腹水と脳を採取して原虫の有無を検査した。その結果いずれからも原虫は検出できず感染不成立と判断した。一方、対照として無処理のシスト浮游液を接種したマウス3匹のうち、1匹は20日後に死亡したので、脳を摘出して圧平標本（これは大脳部の小片を2枚のスライドガラスの間に挟んで強く圧平した脳の生鮮標本である）を作り、鏡検した結果、脳内に多数のシスト形成を認め、腹水中にも多数虫体を見とめた。残る2匹のマウスは接種後35日目に殺処分して腹水と脳を検査し、脳内にも多数のシストを検出した。

以上の実験成績から ETPS により赤く染まった原虫はマウスに対する感染性を喪失しており、また、死虫体はすべて ETPS によって短時間内に赤く染まることが明らかとなった。生原虫は ETPS によって赤く染まらないが、ETPS に長い時間接触させると赤染虫体の数が多くなり、このことから以後の実験では、原虫が ETPS と接触して短時間内に赤染したものを死虫体とし、染まらない虫体を生きて

いる原虫と仮定して実験を進めた。また、シスト膜は何時の場合でも ETPS によって赤染した。

### 3. シスト内原虫の長さ幅

シスト内に生活する原虫1個はどの位の体積をもつものなのか、また感染経過日数と原虫の大きさとの関係はどうであろうかなどを調べる目的でこの実験を行なった。

シスト50個をマウスに接種後15日目と45日目のマウス各々3匹から採取した脳について、シストのみをアラビアゴム法によって分離し、TPSを加えてシスト膜を溶解後、脱出遊離した生原虫50個について、油浸レンズを用いて倍率1000倍の顕微鏡下で生原虫の長さ幅をマイクロメーターを用いて計測した。

**Table 2.** Length and width of the parasite within a cyst

Days after inoculation	Length ( $\mu$ )	Width ( $\mu$ )
15	6.14 $\pm$ 1.76	2.86 $\pm$ 0.84
45	6.80 $\pm$ 1.83	2.13 $\pm$ 0.61

Notes: 50 parasites were measured.  
 $\pm$  : 95% confidence limits

その結果、表2に示すように、1個の生鮮原虫は接種後15日目では平均6.14  $\pm$  1.76  $\mu$  の長さ2.86  $\pm$  0.84  $\mu$  の幅をもち、45日目の生原虫は6.80  $\pm$  1.83  $\mu$  の長さ2.13  $\pm$  0.61  $\mu$  の幅を有していた。マウスの感染日数とシスト内原虫の大きさとの間には、5%の水準において有意の差は認められなかった。

### 実験II (本実験)

#### 1. Tp 感染マウス脳内におけるシストの分布

従来、Tp シストの検出には感染動物の脳組織が広く用いられているが、脳の如何なる部位に原虫が

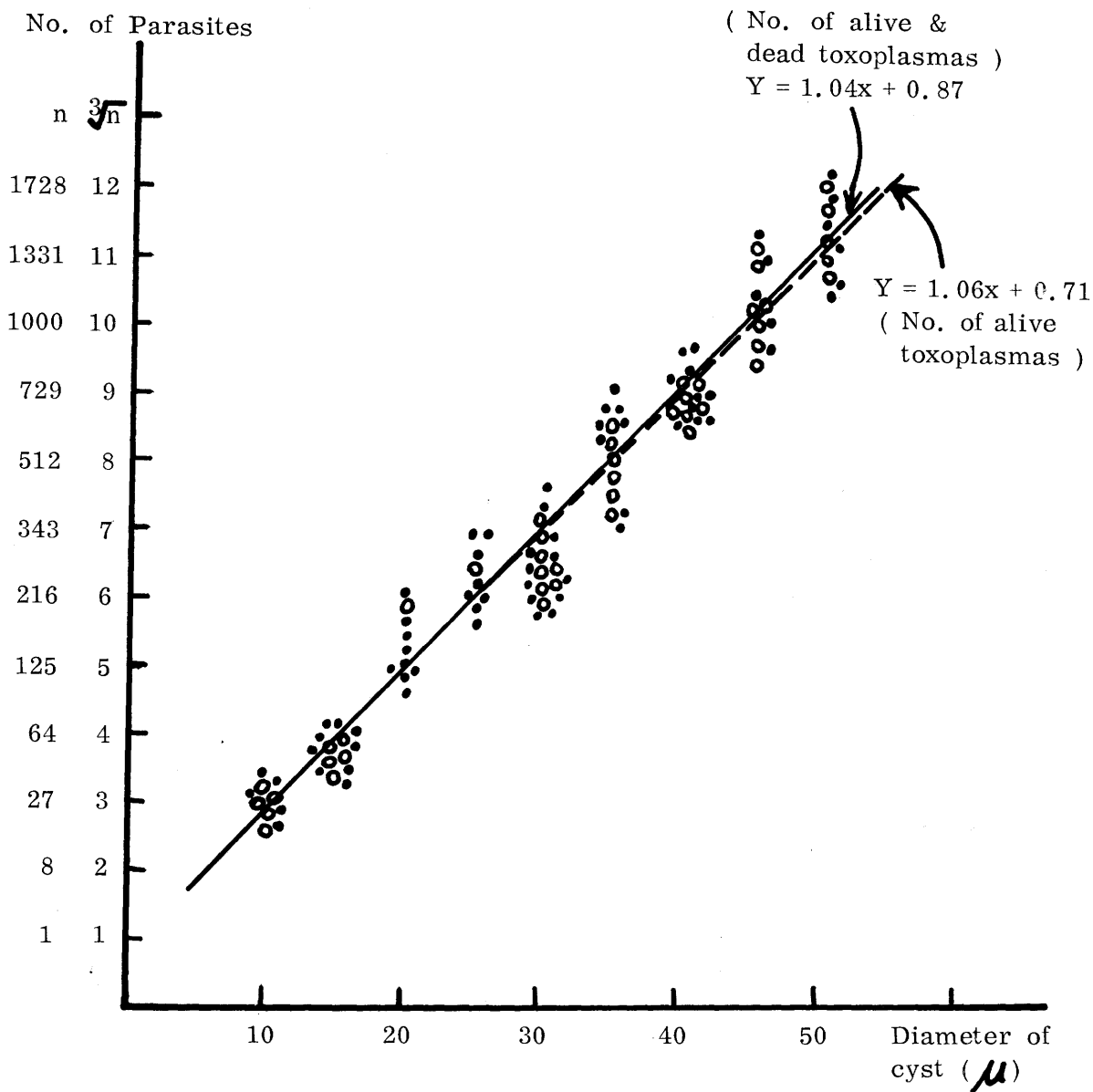


Fig. 3. Relationship between the diameter of cyst and the total number of toxoplasmas involved in the cyst

多く分布されているかを知ることは重要である。この実験は Tp の Beverley 株を用いて接種マウスの感染経過と脳内各部位（嗅葉，大脳，小脳，間脳及び橋・延髄）におけるシスト数について検討した。

次頁の表 3 に示す如く，マウス脳内におけるシストは，接種後 15 日目から 210 日の全期間を通じて，大脳部に最も多く分布し，全シスト数の 57.8%~86.4% を占めていた。一方，橋・延髄の部位におけるシ

スト数は最少で，総数の僅か 0.5%~6.4% を占める程度であった。また，小脳部は全シスト数の 2.1%~29.2% を，間脳部は全シスト数の 4.9%~19.5% であった。これより，密度指数〔各部位 1mg 当りのシスト数/脳全体 1mg 当りのシスト数〕×100 を求めると，大脳は 120.9~181.3 となり，橋・延髄の 0~59.1 と比較してはるかに高密度のシストが大脳部に分布していた。

**Table 3.** Number of cysts in different brain regions of mice inoculated intraperitoneally with Beverley strain

Days after inoculation	No. of mice examined	No. and density index	Brain regions					Whole brain
			Olfactory lobe	Cerebrum	Cerebellum	Interbrain	Pons & Medulla	
15	5	Total No. of cysts (%)	0 (0.0%)	5,050 (57.8%)	2,550 (29.2%)	1,000 (11.4%)	140 (1.6%)	8,740 (100%)
		No. of cysts per mg of Region	0	5.2	6.6	2.6	0.6	4.3
		Density index*	0	120.9	153.5	60.5	14.0	100.0
20	5	Total No. of cysts (%)	40 (0.2%)	17,400 (84.5%)	500 (2.4%)	2,560 (12.4%)	100 (0.5%)	20,600 (100%)
		No. of cysts per mg of region	0.8	17.8	1.3	6.7	0.5	10.2
		Density index	7.8	174.5	12.7	65.7	4.9	100.0
25	5	Total No. of cysts (%)	3,910 (5.7%)	46,550 (68.3%)	8,140 (12.0%)	6,580 (9.7%)	2,930 (4.3%)	68,110 (100%)
		No. of cysts per mg of region	73.9	47.6	21.1	17.2	13.4	33.8
		Density index	218.6	140.8	62.4	50.9	39.6	100.0
45	5	Total No. of cysts (%)	320 (1.3%)	15,300 (63.7%)	2,970 (12.4%)	4,640 (19.3%)	800 (3.3%)	24,030 (100%)
		No. of cysts per mg of region	6.0	15.6	7.7	12.1	3.7	11.9
		Density index	50.4	131.0	64.7	101.7	31.1	100.0
60	3	Total No. of cysts (%)	140 (2.9%)	3,600 (73.9%)	100 (2.1%)	870 (17.9%)	160 (3.3%)	4,870 (100%)
		No. of cysts per mg of region	2.6	3.7	0.3	2.3	0.7	2.4
		Density index	108.3	154.2	12.5	95.8	29.2	100.0
114	4	Total No. of cysts (%)	720 (3.8%)	11,900 (63.6%)	1,250 (6.7%)	3,640 (19.5%)	1,200 (6.4%)	1,8710 (100%)
		No. of cysts per mg of region	13.6	12.2	3.2	9.5	5.5	9.3
		Density index	146.2	131.2	34.4	102.2	59.1	100.0
185	4	Total No. of cysts (%)	400 (8.1%)	3,600 (72.6%)	200 (4.0%)	760 (14.5%)	0 (0.0%)	4,960 (100%)
		No. cysts per mg of region	7.8	3.7	0.5	2.0	0	2.5
		Density index	312.0	148.0	20.0	80.0	0	100.0
210	3	Total No. of cysts (%)	40 (1.2%)	2,800 (86.4%)	100 (3.1%)	160 (4.9%)	140 (4.3%)	3,240 (100%)
		No. of cysts per mg of region	0.8	2.9	0.3	0.4	0.6	1.6
		Density index	50.0	181.3	18.8	25.0	37.5	100.0
Weight of each brain region (mg)**			10.6 (2.6%)	195.6 (48.5%)	77.0 (19.1%)	76.6 (19.0%)	43.6 (10.8%)	403.4 (100.0%)

Notes: \*Density index =  $\frac{\text{No. of cysts per mg of a brain region}}{\text{No. of cysts per mg of whole brain}} \times 100$

\*\*.....Average weight of a brain region of 20 mice sacrificed 45 days after inoculation.

## 2. シストの直径とシスト内原虫数との関係

シスト内原虫数はシストの半径の3乗に比例して増大するとの仮説のもとにこの実験を行なった。

実験の結果、50 $\mu$ 以下のシスト72個についてシストの直径とシスト内の総原虫数との関係を調べ、 $Y=1.04X+0.87$ の回帰直線を算出した(図3)。

直径50 $\mu$ 以下のシストにおいては、シスト内原虫数はシストの半径の3乗に比例して増大するものと判断した。

次に、1個のシスト内部における原虫の生死に関しては現在不明の点が多いので、以下の実験はシストの直径とシスト内の生原虫数との関係を調べたものである。

実験方法は前項の実験と同様であるが、Beverley株シストを接種後、感染したマウスを約3週間隔で殺処分した後、脳内シストをアラビアゴム分離法によって分離した。分離したシストはHanks液をもって稀釈浮遊液とし、マイクロメーターを用いて個々

のシストの直径を測定した。その後、ETPSを用いて1個のシスト内に存在する原虫の生死を判定した。アラビアゴム法で分離したシストは、少なくとも6時間以内に実験を終了し、ETPSと原虫との接触時間は15分後から40分までと規定して原虫の生死を判定した。

この結果、50 $\mu$ 以下のシスト45個について、シスト内の生原虫数と死原虫数とを調べ、シストの直径とシスト内生原虫数との関係を検討し、 $Y=1.06X+0.71$ なる回帰直線を求めることが出来た(図3の破線を参照)。

ここにおいて、直径50 $\mu$ 以下のシストについては、シスト内の生原虫数はシストの半径の3乗に比例して増大するとの結論を得た。また、1個のシスト内では死原虫と思われるものは少数であり、総原虫数の88~100%の原虫は生きた原虫と判断された。とくに、感染初期のシストのうち10~15 $\mu$ の直径を有する小型のシストについて検査した結果、殆んど生原虫のみによって占められていることが判明した。

## 考

トキソプラズマ原虫は鞭毛、繊毛、波動膜及び虚足といった特殊な運動小器官を具備していない原虫であるため、運動性によって原虫の生死を判別することは困難である。そのため、通常、実験動物への接種または組織培養法によって原虫の生死及び感染力を証明する方法がとられている。然し、これらの方法は個々の原虫の生死を調べるためには不適當である。莫大な数の実験用小動物や培養細胞を必要とし、宿主側の抵抗力の影響も無視できないからである。

このため、今回われわれは、原虫の機能として持っている色素選択性を応用して生原虫は取込まず、死原虫だけが染色されるような色素を利用して原虫の生死を判別しようと考えた。これが色素排除試験である。今回われわれの用いた色素液はEosinであるが、これを原虫の生死判別に利用して一応納得できる成果が得られた。然しこの場合、色素を排除する機構が生きている原虫の機能によるものと考えられるが、果して死虫体だけが排除できないかどうかを決めるのは難しい問題である。われわれの観察によれば、明らかに死虫体と考えられる加温処理後の原虫は、ETPSと接触させると瞬時に赤く染まり、全く染まらない原虫は1個もなかった。しかし、生原虫と雖も、長時間ETPSと接触させておくと赤く染まった虫体の数が若干増していくことから、色素液の原虫に及ぼす毒性

## 察

も或る程度考慮しなければならないものとする。従って判定時間はできるだけ短時間内に留めた。このような色素による生死判別法は飽迄も実用的、便宜的な方法であって、本質的な原虫の生死の解明と直接繋がるものとは考えていない。

既に緒言において記載した如く、大動物から得られた脳組織全体を原虫分離に使用することは多数の実験動物を必要とするために容易ではない。従って、脳の如何なる部位に原虫がより多く分布しているかを知ることが必要となってくる。既に述べたWalls et al. (1963)の報告は脳の小部分を接種材料に用いることは、部位の如何によっては原虫を見落とす危険性のあることを暗示している。

Nakayama and Matsubayashi (1962)らはBeverley株感染マウス脳内シストの分布は前脳部に最も多く、橋・延髄部では最少で、前脳部におけるシスト数の最大値は脳組織1mg当り134.52であったと報告している。

Verma and Bowles (1967)らはTp感染動物(マウス、家兎及び豚)の脳組織中の原虫分布を検討し、全シスト数の80~97%のシストが前頭部(嗅葉と大脳)に存在することを認めたと報告している。今回われわれの行なった実験成績では、マウス脳内から最初にシストを検出したのはTpの腹腔内接種後15日目



であり、その後100日目までの間シストは次第に発育し、その大きさを増して行く。また、マウス脳内におけるシストは接種後15日から210日間で大脳に最も多く分布し、全シスト数の57.8%~86.4%を占めていた。一方、橋・延髄の部位におけるシスト数は最も少なく、総数の0.5%~6.4%であった。これを脳1mg当りの密度指数に換算しても大脳は120.9~181.3となり他の部位に比較して多数のシストが大脳部に分布していた。

本実験の結果から、Beverley株感染マウスの脳からシストを検出する実験においては、検査材料として大脳が好適であると考えられる。

トキソプラズマには増殖が迅速な強毒株とそれが緩慢な弱毒株とがあり、実験に用いたBeverley株は後者に属する原虫であるが、接種後の急性感染期を耐過した宿主の体内で、個々の虫体は脳に到達し、主として脳内の大脳部の細胞に侵入し、そこで緩慢な増殖を繰返すものと思われる。やがて虫体の周囲に虫体自身の産生する限界膜が形成されシストとなる。この時期が接種後2週間前後の頃であって、それ以前にも虫体の集塊はある程度形成されていると考えられるが限界膜の形成までに到らず、顕微鏡的検査の時破壊して検出できなくなるためであろう。一旦、限界膜が形成されると、シストは当初よりも日が経つにつれてその直径を増して行き、大きなシストへと成長していく。このことは、シストの内部において個々の原虫が分裂増殖を続けてその数を増しているからであると考えられる。然るに、現在までのところ、シストの大きさとシスト内原虫数との関係を検討したという報告は殆んどみられない。僅かにBeverley(1958)の報告があるが、この報告によればBeverley株の中等大のシスト内には15,000個の原虫が包蔵されており、大型のシスト内には60,000個の原虫が包含されているとのみ簡単に記載されていて詳細な説明は見られない。

今回、われわれが個々のシストの直径と内蔵する原虫数との関係を実測した結果、 $Y = 1.04X + 0.87$ なる回帰直線が得られた。この回帰直線は直径 $50\mu$ 以下のシストについて算定したものであるから、当然のことながら $51\mu$ 以上の直径を有するシストについては適用されない。直径 $51\mu$ 以上のシストはシスト内原虫数も、数千個を超えるため、顕微鏡下での実測は困難であり大きな誤差を生じやすいため算定範囲から除外した。また、予備実験の成績でも明らかなように、感染経過日数とシスト内の生原虫の大きさとの関係を調べた結果、1個の生鮮原虫は接種後15日目の感染初期のもの

で平均 $6.14 \pm 1.76\mu$ の長さとし、 $2.86 \pm 0.84\mu$ の幅をもち、45日目の生原虫は $6.80 \pm 1.83\mu$ の長さとし、 $2.13 \pm 0.61\mu$ の幅を有していた。ここに云う長さとは原虫の最大長径であり、幅とは最大短径を意味している。このように、マウスの感染経過日数とシスト内原虫の大きさとの間には5%の水準において有意の差は認められなかった。

ここで、1個の原虫の体積は実測困難であるため、便宜上、円形の切断面を有する楕円体と仮定して計算することにしたが、 $30\mu$ の直径を有するシスト内原虫数は平均の長さ $6.80\mu$ 、幅が $2.13\mu$ であるから、原虫1個の体積は計算上 $16.30\mu^3$ となる。一方、直径 $30\mu$ のシストの体積は、シストを球形と仮定すれば、 $14,130\mu^3$ であるから、原虫の構造を無視してシスト内に一杯に詰込んだとしても理論的には約867個の原虫を包蔵することが出来ると考えられる。

今回の回帰直線から直径 $30\mu$ のシスト内原虫数を求めると、平均約340個と推定される。このように、推定値と計算上の数値との間に差があるのは、シスト内において原虫が一定の形態と機能を保持して生活していくためには、かなりの空間が必要となってくるためであろうと考える。既に記した如く、Beverleyは中等大のシスト内には15,000個の原虫が、大型のシスト内には60,000個の原虫が包蔵されていると述べているが、もし、原虫の大きさに大差がないものとすれば、15,000個の原虫を容れるシストの直径は最小限 $77.6\mu$ 以上であり、60,000個の原虫を容れるシストの直径は少なくとも $123.0\mu$ を超える超大型のシストでなければならない。しかし、これは原虫の構造を全く無視した計算であるから、原虫の生活空間を考慮すれば、実際にはもっと大型のシストであるべきで、このような超大型のシストには日常の感染実験では殆んど遭遇することはない。

今回の実験中、われわれが観察した最大のシストは直径 $105\mu$ のものであった。われわれの観察によれば、Tp接種後3~4週のマウスにおいて形成されるシストは大きさもほぼ同様であり、漸次その直径を増していくが、5週以後に至ると大きさが不揃いとなり大小不同のシストが多数混在している。時には、大型シストのシスト膜の一部から小さな膨隆突起がみられ、恰かも、瓢箪状となったシストを認めることがある。このことから考えるに、シストが大型化するにつれて、そのシスト膜の一部から出芽状に派生した小型のシストの遊離やシストから脱出した原虫によって新しく形成されたシスト、または何等かの原因によるシストの

破裂、宿主側の抵抗因子または抗体産生の影響を受けてシスト側にも生成消滅があるため、このような大小不同のシストが混在しているものと思われる。

日常 Beverley 株を用いた感染実験においては、直

径 $50\mu$ 以下のシストが大半を占めている(藤田1960; Nakayama et al., 1962)ことから考えれば、この回帰直線は今後、通常の感染実験に十分応用できるものと考えられる。

## 結

1. トキソプラズマの Beverley 株を用いて接種マウスの感染経過に伴うシストの発育と脳内各部位(嗅葉, 大脳, 小脳, 間脳, 橋・延髄)におけるシスト数について検討し次の成績を得た。

マウス脳内においてシストは接種後15日から210日に至る全期間を通じて、大脳部に最も多く分布し、全シスト数の57.8%~86.4%を占めていた。一方、橋・延髄の部位におけるシスト数は最少であり、総数の僅か0.5~6.4%を占める程度であった。また、小脳部は全シスト数の2.1%~29.2%, 間脳部は全シスト数の4.9%~19.5%であった。これを脳1mg当りのシスト数に換算し、密度指数を求めた結果でも、大脳は120.9~181.3となり他の部位と比較して多数のシストが大脳部に分布していた。

2. シストの直径とシスト内に包蔵されている原虫数との関係を検討し次の成績を得た。Beverley 株感

## 語

染マウスの脳からアラビアゴム重層遠心法によって分離した直径 $50\mu$ 以下のシスト72個について実測した結果、 $Y=1.04X+0.87$ の回帰直線を算定した。この直線は1個のシスト内にある全ての原虫数とシストの直径との関係を示したものであって、シスト内の生原虫との関係は $Y=1.05X+0.71$ の回帰直線によって求められる。

直径 $50\mu$ 以下のシストについては、シストの直径を計測し、この回帰直線を利用するならば、容易にシスト内原虫数の推定も可能である。

稿を終るに当り、終始有益な助言と御校閲を賜わった当研究室の中林敏夫教授ならびに実験資料の統計学的処理において懇切なる指導を賜わった塚本増久助教授に衷心より感謝致します。

本論文の要旨は第2回日本原生動物学会(昭和43年12月12日、大阪市)において口演発表した。

## 参 考 文 献

- 1) Beverley, J. K. A.: A rational approach to the treatment of toxoplasmic uveitis. Trans. Ophtal. Society. 78:109-121, 1958.
- 2) Eyles, D. E., C. L. Gibson, N. Coleman, and F. E. Jones: Laboratory aids in the diagnosis of toxoplasmosis. J. Tenn. State Med. As. 50:408-415, 1957.
- 3) 藤田憲三: *Toxoplasma* の Pseudocyst の二、三の生物学的性状について。慶応医学37: 971-975, 1960.
- 4) Jacobs, L., M. L. Melton and E. F. Jones: The prevalence of toxoplasmosis in wild pigeons. J. Parasit. 38: 457-461, 1952.
- 5) Nakabayashi, T. and I. Motomura: A method for separating cysts of *Toxoplasma gondii* from the infected mouse brains by multi-layer

centrifugation with gum arabic solution. Trop. Med. 10 (2): 72-80, 1968.

6) Nakayama, I. and H. Matsubayashi: On the distribution and the growth of cyst of *Toxoplasma gondii* in the central nervous system and eyes of mice in the experimental infection. Keio J. Med. 11: 69-80, 1962.

7) Verma, M. P. and L. Bowles: Concentration of *Toxoplasma gondii* in the brain tissue of animals: A histological study confirmed by biological isolations. J. Parasit. 53: 254-257, 1967.

8) Walls, K. W., J. J. Taraska and M. Goldman: Isolation of *Toxoplasma gondii* from cysts in human brains. J. Trop. Parasit. 49: 930-931, 1963.