

# HeLa 細胞を用いた *Toxoplasma gondii* の 組織培養に関する研究

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 May 18, 1971)

## Studies on the Tissue Culture of *Toxoplasma gondii* with HeLa Cells

Kuan Yung HSU

(Kanyo JO, in Japanese)

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

(Director: Prof. Toshio NAKABAYASHI)

### Abstract

Several observations were made on the tissue culture of *Toxoplasma gondii* (RH strain) with use of HeLa cells for a host cell line, with the object of obtaining the fundamental knowledge of the growth of the parasite in the tissue culture. To assess the growth of the parasite in the tissue culture, the infection rate of HeLa cells and the relative number of infective parasites were counted: the former was expressed by the percentage value of the number of HeLa cells invaded by the parasite, among the total HeLa cells observed, and the latter by the total number of parasites found in 100 HeLa cells on a microscope. Results achieved were summarized as below:

1) The infection rate of HeLa cells ascended up to 6 hours after the parasite inoculation into the HeLa cell culture, then trended to a gradual descent. The relative number of infective parasites was found to keep a rise up to 9 hours after the parasite inoculation into the culture.

2) The addition of lysozyme (1 mg/ml or more) or hyaluronidase (6 units/ml or

more) into the tissue culture of the parasite brought about an increase of the infection rate of HeLa cells as well as the relative number of infective parasites.

3) The pretreatment of the parasite with sulfisoxazole (10 mg/ml) for 4 hours or sulfathiazole (10 mg/ml) for 2 hours shortly before the parasite inoculation into the HeLa cell culture did not appear to inhibit the growth of the parasite in a 6-hour cultivation.

4) The pretreatment of the parasite with 1% of the HA (Hemagglutination test) -positive human serum (HA-titre 4,096×) or 0.01% of the rabbit immune serum (HA-titre 65,536×) for 30 minutes or longer resulted in a noticeable reduction of the relative number of infective parasites in a 6-hour cultivation.

## 緒 言

*Toxoplasma gondii* (以下 Tp と略す) は 1908年北アフリカに於て, Nicolle と Manceaux によって, ヤマアラシの一種 *Ctenodactylus gondii* から初めて検出された病原性原虫である。以来多数の哺乳動物, 鳥類, 冷血動物および魚類に至るまで, 諸動物からも検出された。1939年 Sabin が初めて人体から Tp を検出し, その病原性を確証した。また 1940年には Wolf, Cowen および Paige, 1942年には Guimarães および Meyer が新生児の脳水腫患者より Tp を分離することに成功した。日本では1954年宮川等が2例の脳水腫患者の髄液より, Tp を検出したのが最初でその後も多くの研究者より次々と人体からの Tp 検出が報告されるに至った。

Tp は一種の Obligate intracellular parasite で, 通常の人工培地において, 保存, 培養することは, 現在のところ不可能とされており, 一般に動物体内に接種継代する以外に, Tp を維持する方法がなかった。

1937年 Sabin & Olitsky は鶏胎児抽出液を主成分とする Li-River medium 中で虫体の培養に成功し,

これが Tp 組織培養の始まりである。1953年 Lock は Tp の宿主として最も重要な哺乳動物の組織をもって, 虫体の培養を行った。その後 Vischer & Suter (1954) がマウス, ラッテ, ウサギの Macrophage 培養を用い, Chernin & Weller (1954, 1957) および Cook & Jacobs (1957) がともに, 人体組織培養中に接種して, かなり詳細なる観察を行った報告をしているが, 何れも単一の細胞株による試みではなかった。最近では子宮頸癌より分離された HeLa 細胞が広く組織培養に応用されて以来, 本細胞を用いた Tp の組織培養に関する研究がさかんになった。

この様な時点にかんがみ, 本研究では, HeLa 細胞による Tp の組織培養を試み, Tp の宿主細胞内への侵入性, 増殖度などを観察した。さらに Lysozyme, Hyaluronidase, 2, 3のサルファ剤, 免疫血清を培地に添加, あるいはそれらをもって, 原虫を前処理することによって, 原虫培養におよぼす影響を検討した。

## 実験材料および実験方法

### 1. 使用原虫株

実験に使用された Tp は, 大阪市立大学医学部医動物学教室より分与された RH 株 (強毒株) で, 当教室に於てマウス腹腔内に継代接種し, 維持してきた株である。

### 2. 使用細胞株

本実験の組織培養にはすべて純系の HeLa 細胞を使用した。この細胞は in vitro に於て, 一層性に増殖

させることができ, 一定の生物学的性状および増殖曲線を示し, 継代培養の可能な細胞で, 必要に応じ, 何時でも使用できるという利点を有する。

### 3. 組織培養液

Hanks 液に Lactalbumin hydrolysate 0.5%, 牛血清 10%, Penicillin 100u/ml., Streptomycin 100  $\gamma$ /ml, (以下 HLS と略す) を加え, pH 7.2~7.3 に修正し, 4℃ の冷蔵庫に保存したものをを用い

Table 1. Composition of tissue culture medium

Hanks' solution (10-fold concentration)	
(A). CaCl <sub>2</sub>	1.4 g
Aq. dest.	100 ml
(B). Glucose	10.0 g
NaCl	80.0 g
KCl	4.0 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.6 g
Aq. dest.	800 ml
(C). 0.2% Phenol red	100 ml
Culture medium	
(A). Hanks' solution (10-fold concentration)	50 ml
Aq. dest.	450 ml
7.5% NaHCO <sub>3</sub>	2.0 ml
Penicillin (200,000 U/5ml)	1.25 ml
Streptomycin (1.0 g/5ml)	0.25 ml
(B). 5% Lactalbumin hydrolysate	50 ml
(C). Bovine serum	50 ml
pH 7.2 ~ 7.3	

た。

#### 4. 組織培養法

HeLa 細胞の維持培養には、培養面が 5.0×10.0 cm<sup>2</sup> の角瓶(中角瓶)を用い、HeLa 細胞の HLS 浮游液 15 ml を分注し、ゴム栓で密封し、37℃ に静置培養を行った。細胞増殖の検査は倒立顕微鏡で毎日観察し、細胞が培養瓶の硝子面全体に一層性に広がるのを待ち、次いで培養液を棄て、0.25% Trypsin 液(Puck 液に 0.25% の Trypsin を含む)を加えて細胞を硝子面から剝離し、1,200 rpm (≒200G)、5 分間遠沈後、上清を棄て、再び Hanks 液で遠沈洗滌し、上清部を棄て、HLS にて細胞浮游液を作り、新たに培養瓶に分注して継代培養を行った。

Tp 組織培養のために必要な HeLa 細胞培養では、培養瓶は細胞培養面が 3.0×5.0 cm<sup>2</sup> (小角瓶)の角瓶に、短冊ガラス(1.5×1.0 cm<sup>2</sup>)を入れ、HeLa 細胞 HLS 浮游液 5 ml を分注して、37℃ に静置培養を行った。Tp 接種は予備実験に於て検討した結果、HeLa 細胞の 48 時間培養のものに実施することにした。

#### 5. 原虫の採集

マウス腹腔内に RH 株の Tp (原虫数約 10<sup>6</sup>) を接種すると、これら感染マウスは通常 4~5 日を経過

して死亡するが、死亡前の瀕死期に、生理的食塩水 1 ml を腹腔内に注入し、これを誘い水として、出来る限り多くの腹水を採取する。採取した腹腔洗滌液は 800 rpm (≒100 G)、5 分間遠沈して、腹腔内浸出細胞と組織の粗塊を除去し、上清液のみをさらに 3,000 rpm (≒1,500 G)、10 分間遠沈して、Tp 原虫を沈澱せしめ、この沈渣に Hanks 液を加え、均等にして原虫浮游液を作る。浮游原虫数は血球計算盤を用いて算定し、所定の濃度に稀釈した。

#### 6. 実験方法

感染マウス腹水より採取した Tp を材料として、HLS 液による原虫浮游液を作り、所定濃度に稀釈する。この原虫浮游液を培養材料として、以下の実験を行った。

1) 宿主細胞である HeLa 細胞中への Tp の侵入性および Tp 感染量について観察した。

2) Lysozyme(Worthington Bioch, Corp.製品)または Hyaluronidase(持田製薬スプレーゼを用いた)を培地に添加し、Tp 培養におよぼす影響を観察した。

3) サルファ剤として、N'-3, 4-Dimethyl-5-isoxazol sulfanilamide (山之内製薬、サイアジンを用いた。以下 Sulfisoxazole と記載)、および Sulfathiazole-N<sup>4</sup>•sodium dextrosulfonate (吉富製薬、サルゾール S を用いた。以下 Sulfathiazole と記載、使用量はすべて Sulfathiazole 量として表現した)を用い、これらと Tp とを予め所定時間接触せしめ、その後の Tp 培養がいかなる影響を受けるかを観察した。

4) 抗 Tp 家兔免疫血清または Tp 赤血球凝集反応(Tp HA-test)陽性人血清を用い、3) の場合と同様の操作を行った。

これらの実験に於て、血清およびサルファ剤と Tp との接触は次の如く実施した。小三角コルベン中で Tp の 1% 牛血清加 Hanks 液浮游液に、これらの血清または薬剤を加え、37℃ に静置し、所定時間毎にその一部を遠沈管中に移し、直ちに Hanks 液で 2 回遠沈洗滌して得られた Tp 浮游液を培養材料とした。

また、Tp の HeLa 細胞内への侵入性および Tp 感染度の判定は次の如き方法によった。所定時間培養後、短冊ガラスを取り出し、Hanks 液中で 1~2 回軽く洗滌し、室温下に乾燥させた後、無水メタノールで固定、ギムザ液で約 40 分間染色した。標本の乾燥後、カナダバルサムでスライドガラスに封じ、顕微鏡下に下記の HeLa 細胞感染率と Tp 感染量とを計算した。

## 7. HeLa 細胞感染率および Tp 原虫感染量の算定

顕微鏡下に HeLa 細胞 800 ないし 1,000 ケを観察し、その中で細胞質中に Tp 原虫を検出する細胞数をパーセントで表現し、HeLa 細胞感染率とした。すなわち感染率とは、宿主細胞中、Tp の侵入を受けた細胞数のパーセント表示である。

一方、同じ操作の元に観察した全 HeLa 細胞中に検出した Tp の総数を算し、これを HeLa 細胞 100 ケ中の Tp 数に換算したものを Tp 原虫感染量と表現することとした。すなわち、Tp 感染量とは、100 HeLa 細胞中の Tp 原虫総数としてあらわされるものである。この Tp 感染量は HeLa 細胞内に侵入した Tp 原虫の総数に加えて、その細胞内で遂行した増殖原虫数をも合せて表現するものとなり、前記 HeLa 細胞感染率とともに、Tp の組織培養の程度を推測する数値と考えられる。

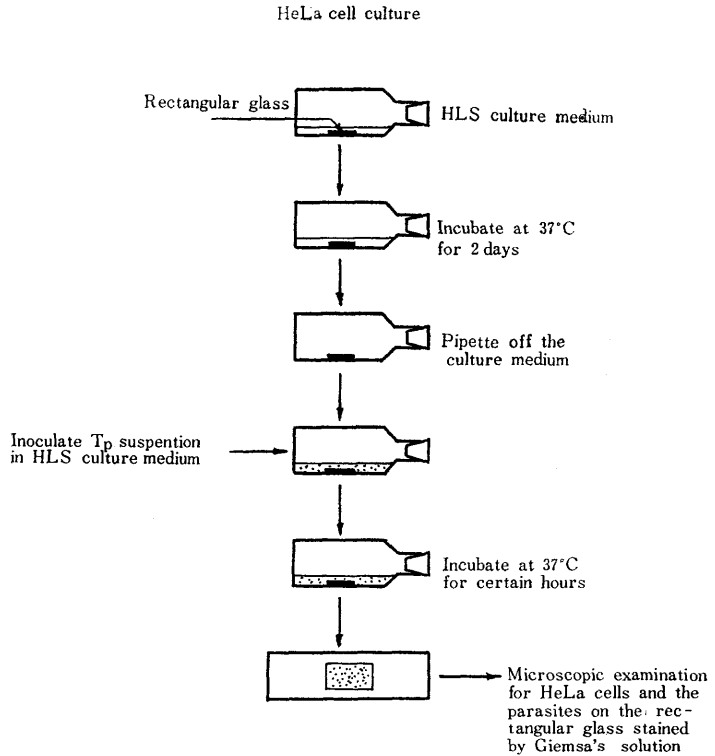


Fig. 1. Schema of experimental method

## 予 備 実 験

### 1. HeLa 細胞の増殖について

HeLa 細胞数が約  $15 \sim 20 \times 10^4$ /ml の HeLa 細胞 HLS 浮游液を 20本の小角瓶に正確に 5 ml ずつ分注し、37°C 静置培養に移す。以後 2 日毎に培養瓶 2 本を取り出して細胞数を測り、残りの培養瓶については培養液の交換を行い、ひきつづき培養を行った。細胞計測にあたっては、培養液をすてた後、0.25% Trypsin 含有の Puck 液 2 ml を注入し、約 5 分間 37°C に静置すれば、細胞はガラス面から剥離する。これに元の培養液と同容積 5 ml になる様に Hanks 液を加え、細胞浮游液が均等になる様にし、この浮游液中の HeLa 細胞数を血球計算盤で数回測り、培養瓶 2 本の平均値を取って HeLa 細胞数とした。

第 2 図は本実験に使われた HeLa 細胞の増殖曲線で、移植培養 2 日目より細胞の増殖が安定且つ急速となり、培養 6 日目で細胞数は最初の移植細胞数の約 8 倍になり、8 日目で最高値、約 8.5 倍に達する。その後、細胞は老廃化し、ガラス面より剥離して培養液に

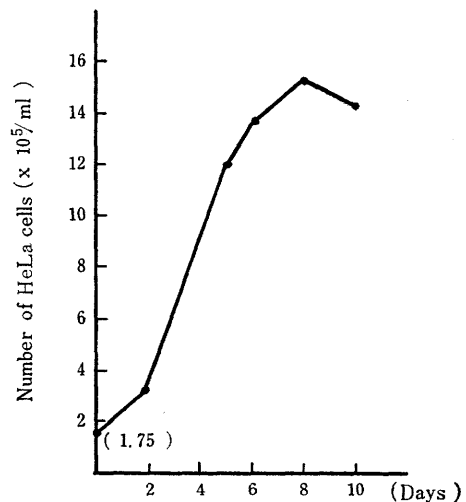


Fig. 2. Growth curve of HeLa cells.

Note: The culture medium was exchanged every other day.

浮游し、限られた培養面積に於る細胞はもはや増殖を示さず、むしろ減少する一方となる。この様に細胞は移植培養の 2 日以後に安定した増殖条件を得るので、

Tp 接種は培養 2 日目に実施するのが最も適当であると判断した。

## 実 験 成 績

### 1. Tp 組織培養における HeLa 細胞感染率の時間的推移

小角瓶 20本に各々短冊ガラスを入れ、 $16 \times 10^4/\text{ml}$  の HeLa 細胞浮游液 5ml を加えて培養し、2 日後培養液をすて、Tp の HLS 液浮游液 5ml ( $58 \times 10^4/\text{ml}$ ) を添加した。ひきつづき  $37^\circ\text{C}$  に静置し、2, 4, 6, 9, 12, 48時間後に各々培養瓶 2本ずつを取り出し、血球計算盤にて各培養瓶中の Tp 浮游濃度を計測し、2本の平均値を求めた。一方、各培養瓶の短冊ガラスを取り出し、乾燥、固定、染色後鏡検にて HeLa 細胞感染率を調べ、2枚一群の平均値を求めた。

第 3 図は培養時間毎の浮游原虫数および細胞感染率の時間的推移を表したものである。浮游原虫数は Tp の培養後、時間的経過とともに減少し、12時間後には最低値に達し、その後は少々増加の傾向を示した。これに反し、細胞感染率は 3~6 時間後まで急速に上昇し、以後徐々に低下した。このことは Tp の HeLa 細胞内への急速な侵入が Tp の培養後 3~6 時間までに行われることおよび 9~12 時間から以後はむしろ HeLa 細胞の破壊に伴って、遊離する原虫数が増加の傾向を持つことを示したものと解釈された。

この実験から Tp 接種後、6~9 時間までは、大部分の Tp が HeLa 細胞に侵入し、しかも HeLa 細胞の剝離が殆んどなく、Tp の HeLa 細胞侵入状態を検討するには最も適した時期であることが判明した。

### 2. 接種原虫数と HeLa 細胞感染率との関係

短冊ガラスを入れた小角瓶 40本 (1群 8本, 5群) に  $10 \times 10^4/\text{ml}$  の HeLa 細胞浮游液 5ml を注加し、2 日間静置培養する。マウス腹腔より採取した Tp で 5 種類の異った原虫浮游濃度を作り (ほぼ  $1/2$  位に順次稀釈して行く)、血球計算盤で各原虫浮游濃度を計測の結果、各々  $190 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $102 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $43 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $22 \times 10^4/\text{ml}$ ,  $14 \times 10^4/\text{ml}$  を得た。小角瓶の HeLa 細胞 1群 (8本) 毎に各濃度の原虫浮游液と液交換を行い、 $37^\circ\text{C}$  に静置培養した。3, 6, 9, 12 時間後にそれぞれ各群の培養瓶を 2本ずつ計 10本を取り出し、短冊ガラスを染色、鏡検して、HeLa 細胞感染率を求めた。

第 4 図は各原虫濃度に於ける HeLa 細胞感染率と時間との関係を示し、この実験では接種原虫濃度が高ければ高い程、細胞感染率も高く、しかも Tp 接種

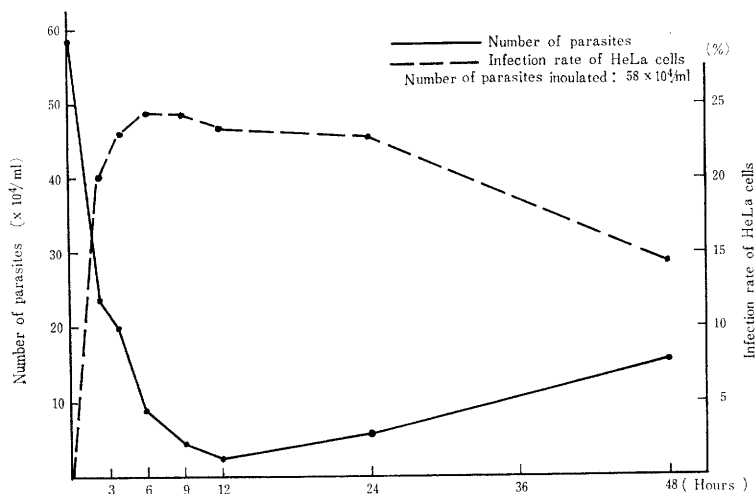


Fig. 3. Number of parasites in the liquid part of culture medium and the infection rate

6時間後にはいずれも感染率が最高値に達することを認めた。

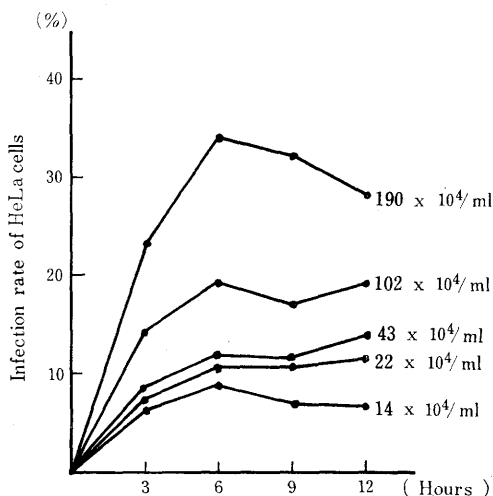


Fig. 4. Hourly measurement of the infection rate of HeLa cells with differed numbers of parasites in the cultures inoculated.

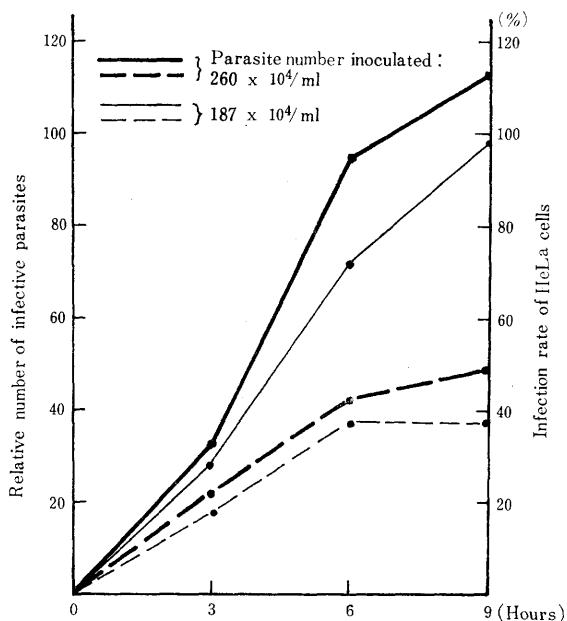


Fig. 5. The infection rate of HeLa cells and the relative number of infective parasites.

(Notes) Solid line : Relative number of infective parasites  
Dotted line : Infection rate of HeLa cells

### 3. HeLa 細胞感染率と Tp 感染量の関係

原虫浮游濃度が各々  $260 \times 10^4/\text{ml}$  および  $187 \times 10^4/\text{ml}$  の原虫浮游液で、前記 2), と全く同じ方法で HeLa 細胞に接種し、静置培養 3, 6, 9 時間後、短冊ガラスを染色、鏡検して、同一標本の HeLa 細胞感染率と Tp 感染量を調べて見た。

第 5 図は両者の関係を示したもので、培養初期の 3 時間値では、この両数値はほぼ同じ値で、Tp 感染量がわずかに高い数値を示した。この事は培養時間の経過とともに、単一の HeLa 細胞中に幾つもの Tp が侵入する頻度が高くなること、および早期に侵入した Tp の増殖が行われていることにより、Tp 感染量が HeLa 細胞感染率をはるかに凌駕するに至ったことを示すものと考えられた。

本実験ではその観点に応じて、この両数値を併用し、あるいは Tp 感染量のみで表現することとした。

### 4. Lysozyme または Hyaluronidase を添加した場合の Tp 組織培養成績

#### A) Lysozyme

3ケの三角コルベンに各々 HLS 培養液 40 ml を入れ、Tp 原虫浮游液を各コルベンに等量に分注し、 $260 \times 10^4/\text{ml}$  濃度の原虫浮游液を得た。2ケの原虫浮游液に各々 1 mg/ml, 10 mg/ml になる様に Lysozyme (Hanks 液にて溶解し、Millipore 濾過器で滅菌濾過した) を添加し、それぞれ小角瓶 18本 (6本を 1群とする) の培養 2日目の HeLa 細胞の培養液と液交換を行い、37℃に静置培養した。3, 6および 9時間後に各々 2本計 6本を取り出し、短冊ガラスを染色、鏡検した。なお、残り 1ケの三角コルベン中の Tp 浮游液は対照として、Lysozyme を添加しないで培養に供した。

第 6 および第 7 図に Lysozyme の濃度と HeLa 細胞感染率および Tp 感染量との関係を示した。原虫接種後 3, 6 および 9 時間では Lysozyme 濃度が 10 mg/ml の場合に於て、HeLa 細胞感染率は対照例に比し約 2.4倍, 1.3倍 および 1.2倍となり、1 mg/ml の場合に於てもやや対照例の感染率をうわまわる値を示した。また Tp 感染量においても、Lysozyme 添加例は対照例に比し、培養 3 および 6 時間値は明らかに高い数値を示した。

#### B) Hyaluronidase

本実験で使用された Hyaluronidase は新鮮な牛睾丸から抽出精製した日本薬局方注射用 Hyaluronidase を無菌的にアンプルに充填し、凍結乾燥したもので、

一管中 Hyaluronidase 500 単位 (unit) 含有するものである。培養に用いた Tp 原虫濃度は  $190 \times 10^4$  / ml で、Hyaluronidase は 6 u/ml および 60 u/ml になる様培養液に添加し、実験操作は Lysozyme の場合と同様であった。

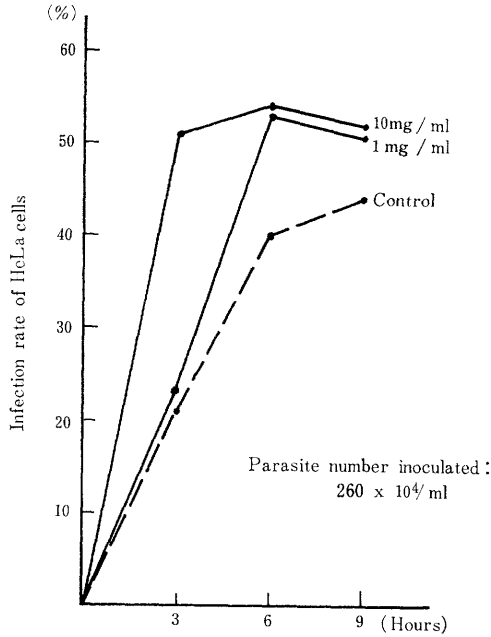


Fig. 6. The infection rate of HeLa cells by the addition of Lysozyme into the culture medium.

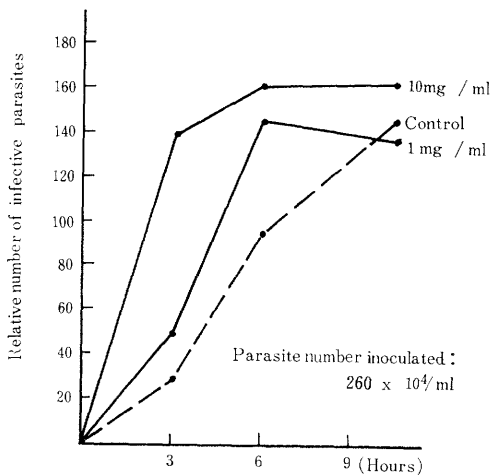


Fig. 7. Relative number of infective parasites by the addition of Lysozyme into the culture medium.

第8および第9図は Hyaluronidase の濃度と HeLa 細胞感染率および Tp 感染量を示したもので、原虫接種後 3, 6 および 9 時間では、Hyaluronidase 濃度が 60 u/ml の場合に於て、HeLa 細胞感染率は対照例に比し、各々約 1.3 倍, 1.2 倍, 1.2 倍となり、6 u/ml の場合に於ても対照例に比し、各々やや高い値を示した。また Tp 感染量に於ても Hyaluronidase 添加例は対照例に比し、明らかに高い数値を示した。

尚この実験で使用された培養液中の Lysozyme および Hyaluronidase の濃度は、予備実験に於て、HeLa 細胞の増殖および細胞の形態に何らかの影響を及ぼさないことを確認した上で決めた。

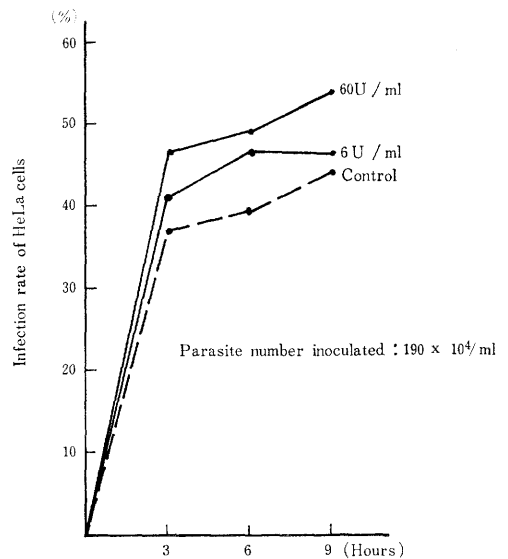


Fig. 8. The infection rate of HeLa cells by the addition of Hyaluronidase into the culture medium.

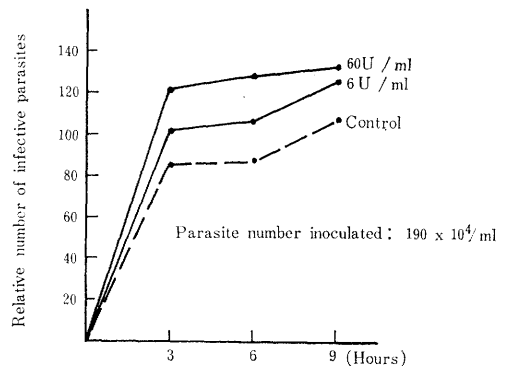


Fig. 9. The relative number of infective parasites by the addition of Hyaluronidase into the culture medium.

### 5. Tp 原虫を Sulfisoxazole または Sulfathiazole で前処理した場合の Tp 組織培養成績

Tp の HLS 浮游液に上記サルファ剤を所定濃度に加え、一定時間 37°C において接種させた後、浮游液を HLS に 2 回遠心洗滌し、再浮游した Tp を HeLa 細胞に接種し、6 時間静置培養した後に Tp 感染量を検査した。

#### A) Sulfisoxazole

Tp の HLS 浮游液を 3 ケの三角コルベンに等量分注し、それぞれ等量の生理的食塩水または Sulfisoxazole を加え、薬剤濃度が 0 (対照), 0.1 mg/ml および 10.0 mg/ml となる様に調製した。Tp 原虫濃度は  $335 \times 10^4$ /ml であった。これらの三角コルベンを 37°C に保ち、所定時間後に各々 10 ml ずつ取り出し、3,000 rpm (= 1,500 G), 5 分間遠沈後、上清をすて、更に Hanks 液で 2 回遠沈洗滌後、HLS 10 ml で均等な Tp 浮游液を作製した。この浮游液 5 ml を、小角瓶を用いた培養 2 日目の HeLa 細胞と液交換を行い、更に 6 時間静置培養後、短冊ガラスを取り出して固定、染色し、鏡検に供した。薬剤と接触しつつある Tp を恒温器より取り出し、2 回の遠心沈澱によって、薬剤との接触を絶ち、HeLa 細胞培養に接種するには約 15 分を必要とした。故に最初の接触

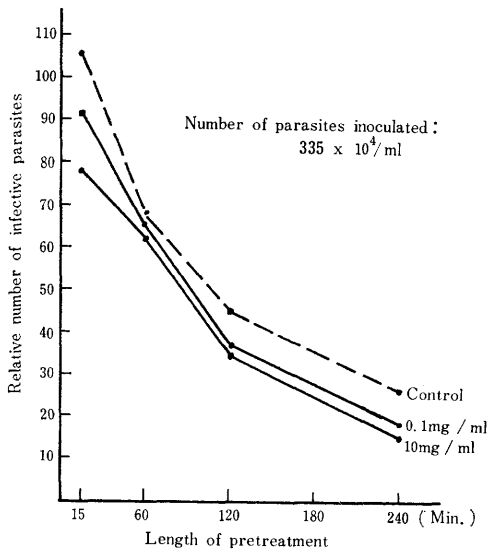


Fig. 10. Length of the pretreatment of parasites with Sulfisoxazole and the relative number of infective parasites.

Note: The concentration of Sulfisoxazole used were shown in the figure.

時間を 15 分とし、薬剤と原虫浮游液の混合後直ちに処理を行った。以後はこの処理時間を含めて、所定の接触時間とする様操作した。

第 10 図は Sulfisoxazole との接触時間と Tp 感染量との関係を示したもので、Sulfisoxazole と接触した Tp は対照例に比し、Tp 感染量はやや低下しているが、両者の間には著しい差は認められなかった。また 10 mg/dl と 0.1 mg/dl の薬剤濃度の間にもほとんど差は認められなかった。又実験群および対照群とも Tp が HeLa 細胞に接種するまでの時間が長い程、Tp 感染量が低下した。

#### B) Sulfathiazole

前記 Sulfisoxazole の実験と全く同じ方法で、Tp 原虫浮游濃度は  $385 \times 10^4$ /ml、実験群の Sulfathiazole の濃度も 0.1 mg/ml と 10 mg/ml である。

第 11 図は Sulfathiazole との接触時間と Tp 感染量との関係を示したもので、Sulfisoxazole の場合とほぼ同じ結果が得られた。即ち実験群と対照群の間にはほとんど差が認められず、又実験群でも 10 mg/ml 濃度と 0.1 mg/ml 濃度との間には著明な差を認めることが出来なかった。

この実験から Sulfisoxazole および Sulfathiazole は Tp の HeLa 細胞への侵入に対する抑制効果を発現したものと解釈することは出来なかった。

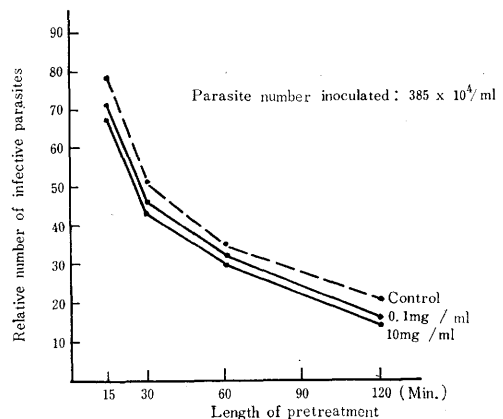


Fig. 11. Length of the pretreatment of parasites with Sulfathiazole and the relative number of infective parasites.

Note: The concentration of Sulfathiazole used were shown in the figure.



6. Tp 原虫を Tp HA-test 陽性の人血清または家兔免疫血清によって前処理した場合の Tp 組織培養成績

A) HA-test 陽性の人血清

本実験に使用した人血清は、信藤法で 4,096倍稀釈まで HA-test が陽性に出たものである。また対照用の人血清として、HA-test 陰性のものを使用した。

3ケの三角コルベンに各々 HL 培養液 (Hanks 液および Lactalbumin のみ) 50 ml を入れ、Tp 原虫浮游液を各コルベンに等量に分注し、 $250 \times 10^4$ /ml 濃度の原虫浮游液を得た。2ケの原虫浮游液に各々 1% および 6% になる様に HA-test 陽性人血清を添加し、残り 1ケの原虫浮游液は対照用として、HA-test 陰性人血清を 6% 含有する様に調製した。これらの三角コルベンを 37°C に保ち、所定時間後に各々 10 ml ずつ取り出し、3,000 rpm ( $\approx 1,500$  G)、5分間遠沈後上清をすて、次いで Hanks 液で 2回遠沈洗滌後、HLS 10 ml で均等な Tp 浮游液を作った。この浮游液 5 ml を小角瓶を用いた培養 2日目の HeLa 細胞と液交換を行い、更に 6時間静置培養後、短柵ガラスを取り出して固定、染色し、鏡検に供した。

第12図は Tp 原虫が HA-test 陽性の人血清との接

触時間と Tp 感染量を示したものである。接触15分後では実験群と対照群との間には著しい Tp 感染量の差が見られなかったが、接触 30分以後では Tp の HeLa 細胞への侵入が著しく低下し、対照群の約 50%位に抑制されていた。また同じ実験群でも 6% 含有のと 1% 含有のとでは両者の間に殆んど差が見られなかった。

B) 家兔免疫血清

本実験は家兔免疫血清を Tp 原虫浮游液に添加し、上記の HA-test 陽性人血清と同様に、ある所定時間接触させた後、HeLa 細胞に接種し、6時間後にその Tp 感染量を調べたものである。

家兔免疫血清は *Toxoplasma gondii* Beverley 株 (弱毒株) の Cyst-form 600 ケを家兔の腹腔内に注射し、30日経過後に採血して血清を分離し、ゼイツ型濾過器で滅菌した後、56°C、30分間加熱非働化したものである。この免疫血清は信藤法の HA-test で 16,384倍陽性でした。

実験方法は前記 HA-test 陽性人血清添加の場合と全く同じで、Tp 原虫浮游液の濃度は  $357 \times 10^4$ /ml であった。実験群には家兔免疫血清 1% および 10% の 2種類を調製使用した。なお対照群には正常家兔血清を 10% に添加した。

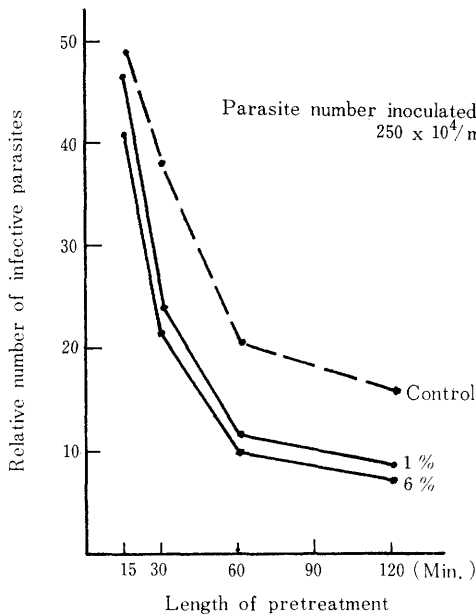


Fig. 12. Length of the pretreatment of parasites with the HA-positive human serum and the relative number of infective parasites.

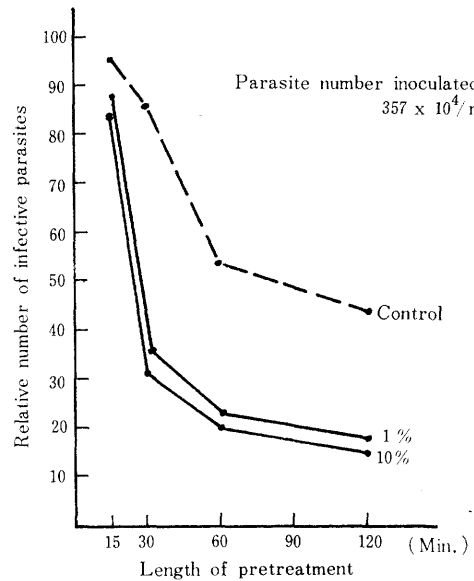


Fig. 13. Length of the pretreatment of parasites with the rabbit immune serum and the relative number of infective parasites (1).

第13図は Tp の家兎免疫血清との接触時間と Tp 感染量との関係を示したものである。15分間接触では実験群と対照群の間には著しい差は見られなかったが、接触 30分以後では実験群の Tp 感染量は対照群に比し、約40%に抑制されていることを認めた。また免疫血清の 1%と 10%の場合には、両者の間に著しい差は見られなかった。

次いで家兎免疫血清の濃度を順次稀釈し、どの稀釈濃度まで侵入抑制効果が見られるかを検討した。この時に使用した家兎免疫血清は信藤法の HA-test で 65,536倍稀釈まで陽性のもので、Tp 原虫濃度は  $320 \times 10^4/\text{ml}$  であった。実験群では免疫血清の濃度を 1%より  $1/10^5$  % まで段階稀釈とした。

第14図の下のグラフは 1%~0.01% まで稀釈した場合の抑制効果を示し、第14図の上のグラフは  $1/10^3$  ~  $1/10^5$  % まで稀釈したものを示した。即ち 0.01%稀釈まではなお抑制効果が見られたが、それ以上の稀釈濃度では、ほとんど抑制効果が見られなかった。

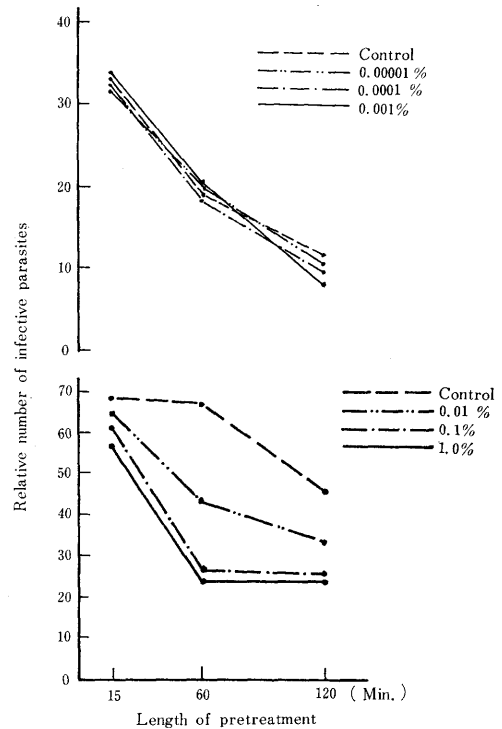


Fig. 14. Length of the pretreatment of parasites with the rabbit immune serum and the relative number of infective parasites (2).

## 考 察

*Toxoplasma gondii* は Obligate intracellular parasite である為、その形態乃至感染、分裂、増殖等の過程について、その究明はかなり困難なものと考えられて来た。故にこれらの基礎的研究としての *in vitro* に於る組織培養は、従来から多くの研究者によって試みられて来た。本原虫は組織培養中では容易に感染、増殖することが判明し、1951年 Gey によって、人子宮頸癌上皮細胞より HeLa 細胞が分離されて以来、HeLa 細胞を用いての Tp 組織培養による原虫の形態学的、病理学的研究成果が多くの学者によって報告されて来た。しかし組織培養液中に何かある物質を添加したり、Tp を前処理することによって、Tp の HeLa 細胞内への侵入性が促進または抑制されるかについての報告は未だに少ない。

本研究は、HeLa 細胞を用いた Tp 組織培養において、Tp の宿主細胞内への感染性、増殖度を検討し、得られた知見を基礎として、2, 3の物質の培養基内

へ添加または Tp に対する前処理が、培養成績にいかなる影響を及ぼすかを試みたものである。

Lysozyme および Hyaluronidase はともにムコ多糖類の加水分解酵素で、細胞膜および細胞間質に存在するある種のムコ多糖類に作用することから、細胞内透過性あるいは組織内浸透性を促進する効果をもつとされている。Tp が宿主細胞に侵入する機作については未だに充分解析されていない現状で、果して Tp 自身が侵入能力を持っているか、あるいは宿主細胞によって貪食されるかについても、未だに不明といわねばならない。これに関して、Guimarães and Meyer (1942), Pulvertaft et al. (1954), Lund, Lycke and Sourander (1961) らは宿主細胞内で増殖した Tp が細胞膜を破り、つづいて自動的運動性によって、別の細胞に侵入すると報告し、Tp の積極的侵入を主張している。E. Lycke (1964) らは 1 mg/ml の Lysozyme を Tp の浮游液に添加すれば、Tp の細

胞への侵入性が増加し、Hyaluronidase も同様に侵入を促進するが、その効果は Lysozyme よりも高いと報告している。著者は本実験に於て、Lysozyme を 1 mg/ml 添加した場合には、対照群に比し 1.7~1.5 倍の Tp 感染量を示し、10 mg/ml 添加の場合には 4.6~1.7 倍の Tp 感染量を示した。また Hyaluronidase を 6 u/ml 添加の場合では 1.2 倍、60 u/ml 添加では 1.4 倍の Tp 感染量の増加が示されることを認めた。

R. Norrby & E. Lycke (1966) らは Tp 原虫を破壊し、それを 80,000×G で遠沈した上清部には、Tp の宿主細胞侵入促進因子を含んでいると報告している。この促進因子の物質的追求はまだなされていないが、Lysozyme または Hyaluronidase に類似した酵素作用による可能性も考えられる。

1942年 Sabin and Warren が初めて実験動物における Tp 感染の治療にサルファ剤を使用し、Biocca (1943) は Sulfone group にも抗 Tp 効果があることを実証した。Weinman and Berne (1944) は Sulfapyrimidine が Tp 感染実験動物に延命効果を示すことを報告し、その後も多数の研究者によって Sulfadiazine, Sulfathiazole 等の延命効果が認められたが、サルファ剤の有効性を *in vitro* において検討した報告はさきわめて少い。苗加 (1958) は組織培養を用いて、Sulfisomidine および Sulfisoxazole の Tp 原虫増殖におよぼす影響を報告した。それによると、サルファ剤を添加してから培養 5 日後に最大の抑制効果が認められた。著者は Tp 原虫をサルファ剤と接触させた後、組織培養にて 6 時間静置培養し、HeLa 細胞への Tp 感染量を調べたが、サルファ剤による侵入抑制効果は殆んど見られなかった。このことは実験条件に基づくものと考えられ、殊に Tp とサルファ剤の接触時間がわずかに数時間にすぎなかったことが一

つの原因と考えられた。

1948年 Sabin & Feldman は免疫血清作用による原虫の色素不染色性として Dye-test を発表し、Toxoplasmosis の血清学的診断として、今日でも広く応用されている。1949年 MacDonald は胚芽卵の絨毛尿膜に 56℃、30分で非働化した免疫血清を加え、特に activator を加えなくても、抗 *Toxoplasma* 効果があると報告した。1965年 E. Lycke et al. は HA-test 64倍以上の人血清および activator とを加えて、組織培養における Tp の宿主細胞侵入を調べた。その成績では Tp を非働化した免疫血清と activator との混合液に 1 分間接触しただけで 79%の侵入抑制を示し、非働化しない免疫血清と activator を用いた場合は 92%の侵入抑制を示すことを報告した。著者は本実験に於て、信藤法で 4,096倍、栄研法で 2,048倍陽性の非働化人血清を抗血清として使い、activator を加えずに Tp と接触させ、遠沈洗滌後、HeLa 細胞に接種し、6時間静置培養した。接触30分以後では Tp 感染量が著しく抑制され、対照群の約50%に低下した。また、Tp の Beverley 株で免疫した家兎免疫血清を 56℃、30分非働化したものを用いた場合、接触 30分以後の Tp 感染量は対照群のそれに比し、約40%に抑制されることを認めた。この成績は E. Lycke et al. の免疫血清と activator の両者の存在が、宿主細胞へ侵入性抑制に必要であるとの報告とやや相違し、むしろ MacDonald の成績に近いもの様であった。

今回の実験成績から、直ちに HeLa 細胞を宿主とする Tp 組織培養を用いての抗 Tp 剤の検定や、血清学的応用を図りえるものではないが、今後、より詳細な検討を加えることにより、Tp 組織培養の実際的応用を期待しえるものと考えられる。

## 結 論

HeLa 細胞を宿主として、Tp (RH 株) の組織培養を試み、Tp の宿主細胞内侵入性、増殖度などに関する基礎的知見を求めるとともに、同培養法を用いての若干の実験的応用を検討した。

1) HeLa 細胞感染率は、Tp 接種 6 時間までは上昇し、以後は時間の経過とともに徐々に下降する傾向を示した。一方、Tp 感染量は接種 9 時間後までの観察期間中は上昇しつづけた。一般に接種 Tp 数が多い程、これら両値は高い値を示した。

2) Lysozyme (1 mg/ml 以上) または Hyaluronidase (6 u/ml 以上) の培地内への添加は、HeLa 細胞感染率および Tp 感染量の増加をもたらす傾向を示した。

3) Sulfisoxazole (10 mg/ml) または Sulfathiazole (10 mg/ml) と Tp との 4 時間までの予備接触によっては、Tp の組織培養に認め得べき変化を与えなかった。

4) 1%以上の HA-test 陽性人血清 (4,096倍陽

性)とTpとの予備接触では、接触30分以上で、組織培養におけるTp感染量が著明に抑制された。また家兎免疫血清(65,536倍陽性)の場合には、0.01%以

上の濃度、30分以上の予備接触で、Tp感染量の抑制が認められた。

稿を終るに臨み、終始ご懇切なるご指導並びにご校閲を賜りました本教室中林敏夫教授に対し、深甚なる謝意を表すと共に、ご協力いただいた教室員各位に深謝の意を表する次第である。本論文の要旨は第21回日本寄生虫学会南日本支部大会(1968. 11. 22. 於熊本)にて発表した。

### 参 考 文 献

- 1) 新井 博, 斉藤 博, 野村 隆: HeLa 細胞に対する *Toxoplasma* の感染実験. 日新医学, 45(11): 663-669, 1958.
- 2) 新井 博: 免疫血清を作用せしめた *Toxoplasma* 虫体の細胞化学的検討. 寄生虫学雑誌, 7(1): 61-68, 1958.
- 3) Eyles, D. E. and Coleman, N.: Antibiotics in the treatment of *Toxoplasmosis*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2, 64-69, 1953.
- 4) Eyles, D. E.: The present status of the Chemotherapy of *Toxoplasmosis*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2, 429-444, 1953.
- 5) 堀川 進, 大山昭夫: 組織培養の基本と実際. 日本臨床, 18(5): 169-190, 1960.
- 6) 城野健二郎, 岩見一郎, 戸田尚武, 泉谷武祥, 堀本豊信: *Toxoplasma* に対する各種薬剤の効力実験について(第一報). 阪市大医誌, 7(8): 19-23, 1958.
- 7) 城野健二郎 他13名: 各種培地における *Toxoplasma* 原虫の生存状況について. 阪市大医誌, 9(6): 1999-2005, 1960.
- 8) Katsuta, H., Takaoka, T., Furukawa, T., Kawana, M.: Cultivation of strain HeLa cell (cervical carcinoma of human uterus) in a protein-free medium. Japan. J. Exp. Med. 30(2): 147-157, 1960.
- 9) 勝田 甫: 組織培養法, 初版, 東京, 1955.
- 10) 門脇俊太: *Toxoplasma* の増殖に関する観察. 歯科学報, 60(1): 50-59, 1960.
- 11) Lund, E., Lycke, E. and Sourander, P.: Some aspects on cultivation of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Acta path. et microbiol. scandinav. 57: 199-210, 1963.
- 12) Lycke, E., Lund, E., and Strannegard, ö: Enhancement by lysozyme and hyaluronidase of the penetration by *Toxoplasma gondii* into cultured host cells. Brit. J. Exptl. 46: 189-199, 1965.
- 13) Lycke, E., Lund, E., Strannegard, ö. and Falsen, E.: The effect of immune serum and activator on the infectivity of *Toxoplasma gondii* for cell culture. Acta path. et microbiol. scandinav. 63: 206-220, 1965.
- 14) 本村一郎: *Toxoplasma gondii* の生物学的研究. 第一報, *Toxoplasma gondii* の各種理化学的条件に対する抵抗力に関する実験. 熱帯医学, 9(4): 201-225, 1967.
- 15) 苗加文男: *Toxoplasma gondii* に関する研究. 第一報: 諸種組織培養における *Toxoplasma gondii* の増殖. 第二報: *Toxoplasma* 感染に対する実験的治療法, 特に組織培養法による Screening test について. 京府医大誌, 63(6): 1041-1053, 1958.
- 16) 中井準之助 他: 組織培養—基礎と応用—, 初版, 東京, 1964.
- 17) Norrby, R. and Lycke, E.: Factors Enhancing the Host-Cell Penetration of *Toxoplasma gondii*. J. of Bact. 93: 53-58, 1967.
- 18) Shimizu, K.: Studies on *Toxoplasmosis*. V. Complementary observations on the tissue culture method, especially on the effect of the nutrient fluid upon the invasion and multiplication of the organisms. Jap. J. Vet. Res. 11(1): 1-11, 1963.
- 19) 清水亀平次: *Toxoplasmosis* に関する研究. Ⅲ. *Toxoplasma gondii* の組織培養について. 日本獣医学雑誌, 23(1): 33-44, 1961.
- 20) Summers, W. A.: The chemotherapeutic efficacy of 2,4-diamino-5-P-chlorophenyl-6-ethylpyrimidine (Daraprim) in experimental *Toxoplasmosis*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 2,

1037-1044, 1953.

21) **Takaoka, T. Katsuta, H. Furukawa, T. Kawana, M.** : A subline of strain HeLa cells

with glass-attaching ability in a protein-free medium. *Japan. J. Exp. Med.* 30(4), 319-326, 1960.