

ニワトリマラリア (*Plasmodium gallinaceum*) の 無性型発育環及び生殖母体の周期的出現性と 生存期間についての観察

常 多 勝 巳*

長崎大学熱帯医学研究所疫学部 (主任: 中林敏夫教授)

Observations on the asexual life cycle and on the production and surviving period of gametocyte in *Plasmodium gallinaceum*

Katsumi TSUNEDA (Department of Epidemiology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University)

Abstract : Several observations were made on the gametocytes of an avian malaria, *Plasmodium gallinaceum*, to assess the surviving period and the biological activity (infectivity for mosquitoes). Results achieved were summarized below : From the counting of the parasites by the developmental stages in thin blood-films prepared every 6 hours for 4 or 5 days from infected fowls, the growth of the asexual form in the peripheral circulation showed a 36-hour cycle and the young ring forms demonstrated a peak in number around midnight or midday with a 36-hour interval. The mature gametocytes in blood fluctuated in number along the course of time and the cyclic pattern was found to be similar to that of the young ring forms. The number of the intact young ring forms in blood of an infected fowl tended to reduce immediately after the intramuscular injection of chloroquine (60 mg base/kg) to the fowl and was cleared around 48 hours later without showing any further cyclic pattern. While, the mature gametocytes kept nearly the constant level in number up to 12 hours after the chloroquine administration, then turned to a gradual decrease and disappeared within 60 hours after the chloroquine injection. The exflagellation of the mature gametocytes by the Petri-dish method, which would be an evidence for demonstrating the infectivity for vector mosquitoes, was demonstrated as long as the mature gametocytes could be found in blood.

Tropical Medicine, 16(1), 11-20, March, 1974

緒 言

マラリア原虫の赤血球内増殖型である無性型(Asexual form)と患者の発熱との関係は、それが周期的同調性を持つが故に Laveran のマラリア原虫発見(1880年)以来多くの研究者の興味の対象となって来た。しかし、有性生殖型である生殖母体(Gametocyte)産生と、無性型発育環との関係及び生殖母体の血流中

に於ける生存期間、又は蚊への感染可能期間等については、まだ充分解明されていない。

最近 Hawking 等(1968)によって、24又は48時間周期をもつマラリア原虫について、生殖母体産生と無性型原虫発育環との関係、又、蚊の吸血時間と生殖母体出現数との関係が論じられているが、発育環周期が24、48時間以外のマラリア原虫種の生殖母体の観

* 現所属、長崎大学医学部整形外科学教室
長崎大学熱帯医学研究所業績 第697号

Received for Publication, February 8, 1974

察は十分ではない。かかる原虫種としては、人マラリアの1種である熱帯熱マラリア及び動物マラリアのニワトリマラリア等があり、これらの原虫の周期的発育環が盛んに論議されている。

著者は1970年来フィリピン共和国に於て不規則な発育環周期性をもつ熱帯熱マラリア (*Plasmodium falciparum*) 患者について、血流中に於ける生殖母体の経日的増減、及び、治療後生殖母体が消失するまでの期間を観察したが、その期間内の生物学的活性、即ち、伝搬蚊への感染可能性については十分に検討し得なかつた。

本研究はニワトリマラリア (*P. gallinaceum*) を用いて無性型発育環と生殖母体の動向との関係、及び生殖母体の生存期間について観察を行ったものであり、多少の知見を得たので報告する。

実 験 材 料

実験には体重 50 g 前後の健康白色レグホン約 70 羽を使用した。ニワトリマラリア (*P. gallinaceum*) 原虫株は 1971年、フィリピン共和国 マニラ市に在る WHO 所管の Malaria Eradication Training Center の Shute 氏より分与されたものである。原虫の実験室内維持は、直接に感染ニワトリ血液の健全ニワトリへの継代接種、又はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) を通しての継代によつた。なお *P. gallinaceum* の継代に用いた *Aedes aegypti* は当研究所の衛生動物部門で累代飼育されているものである。感染ニワトリの治療剤としては、抗血中繁殖型剤 (blood schizontocide) である 麟酸クロロキシン (Resochin solution, 150 mg/5ml, Bayer) を使用した。

実 験 方 法

50%以上の赤血球感染率 (全赤血球数に対する被感染赤血球の割合) を示し、1赤血球内に複数の原虫が侵入したものも、1個の被感染赤血球とした) をもつ *P. gallinaceum* 感染ニワトリの血液数滴を 1 ml の滅菌生食水で稀釈後、その 0.1 ml を健全ニワトリの皮下に接種、室温 15°Cないし20°Cの下で飼育し、約5日後に血液中に原虫の確認出来たものを実験に用いた。赤血球感染率が接種後10日を経ても1%に満たないニワトリは、接種原虫数の不足又は、抗感染機構が働いているものとみなし、実験用ニワトリから除外した。実験は大きく2つにわけ、まず

(1) 薬剤投与を行なわない群で、赤血球感染率の推移、無性型原虫 (幼若環状型、成熟栄養型、成熟分裂

型) の周期的出現数を観察し、又、これを成熟生殖母体の継時的出現数と比較した。原虫接種後5ないし9日目より実験を開始し、以後4ないし5日間にわたり6時間毎の定時採血 (6時、12時、18時、24時) を行い、薄層標本を作成後、メタノール固定、ギムザ染色を施して顕微鏡検査用標本とした。標本中の原虫は、下記の分類規準に従い、赤血球 (RBC) 10⁴ 個に対する各発育型原虫数を算出した。

(2) 薬剤投与例に於ては、原虫接種後5ないし7日目より実験を開始し、4日間6時間毎 (6時、12時、18時、24時) の定時採血を行い、薄層標本及び後述の鞭毛放出観察用の標本を作成した。なお薬剤の投与方法は実験成績の項で詳述するが、クロロキシン塩基として 60 mg/kg 量の麟酸クロロキシンを、幼若環状型の最も多く出現していると推定出来る時刻に1回の筋肉内注射で投与した。

原虫の各発育型についての分類規準：薄層標本中の原虫の各発育型は下記の規準に従つて判定した。

I 幼若環状型 (Young Ring Form)

赤血球核長径の $\frac{1}{2}$ 以下の大きさの原虫で、細胞質は核の周囲に拡がり淡青色を呈する。変性を起したものの (Degenerated Young Ring Form) は核が萎縮し黒味を帯びる。

II 成熟栄養型 (Mature Trophozoite)

赤血球長径の $\frac{1}{2}$ 以上の大きさを持つ単核期の原虫で、細胞質は不正形に拡がる。

III 前成熟分裂型 (Pre-mature Schizont)

核の分裂が見られるが、細胞質の分裂に至らず個々のメロソイト (Merozoite) の分離はまだ見られない。

IV 成熟分裂型 (Mature Schizont)

メロソイトが個々に遊離して観察出来るもので、通常その数は16個以下である。赤血球核は辺縁に圧迫される。

V 未成熟生殖母体 (Immature Gametocyte)

淡青色又は灰青色の細胞質をもち、時に繊細な空泡をもつ。核は赤血球核の約 $\frac{1}{2}$ 大で原虫の大きさは成熟分裂型に比し大である。

VI 成熟生殖母体 (Mature Gametocyte)

淡青又は紅青色に染る細胞質の中に、赤血球核とほぼ同等大の核を有し、赤血球核を辺縁に圧迫するか、又はそれを半月状に取り囲む。細胞質内には色素顆粒を有する。今回の実験では成熟生殖母体の雌雄を特に区別しなかつた。変性を起した生殖母体 (De-

generated Gametocyte) は灰色状の細胞質を有し、核は黒味を帯びた顆粒状として残る。多くは内部に空泡をもつ。

今回の実験では主として幼若環状型、成熟分裂型、成熟生殖母体の算出数を比較対象とした。

鞭毛放出 (Exflagellation): Shute 法 (1966) に準拠して実施した。末梢血液一滴をスライドグラス上に乗せ、通常の薄層標本よりやや厚目に塗抹する。直ちに、このスライド上に検者の息を吹きかけた後、予め用意したシャーレ内に置く。(実験用蓋付きシャーレは内側全面に濾紙を敷き、採血の2時間前に熱湯を含ませて、シャーレ内の湿度を100%とし、25°Cの恒温室に放置したものを用いた。) 室温25°C、湿度100%の条件下に、未乾燥塗抹標本スライドを保ち、15分後乾燥、固定の後ギムザ染色を施して鞭毛放出算出用の標本とした。生殖母体の活性の有無判定のために、赤血球 10^5 個に対する鞭毛放出生殖母体を算出した。

実験成績

〔1〕無性型原虫の経時的推移

接種後3日目の *P. gallinaceum* 感染ニワトリの末梢血中には、すでに各発育期の原虫が少数観察される。赤血球感染率は普通その後数日で、時には12時間以内に急速に上昇する。Fig. 1 は実験を開始してから末梢血流中への原虫の総出現数を把握する為に、赤血球感染率の推移を6時間毎に追跡したものである。接種後5又は6日目に5%以下であった赤血球感染率が、8日目には50%以上の濃厚感染に急激に進展するのがみられた。

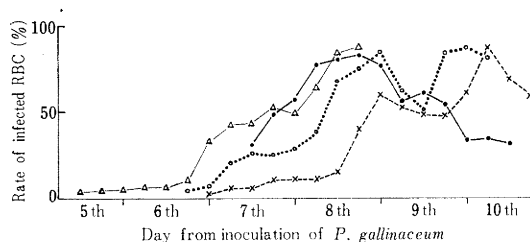


Fig. 1. Curves of the rate of infected RBC along the course of time.

-○ : Fowl No. 12
-● : Fowl No. 13
- ×.....× : Fowl No. 17
- △.....△ : Fowl No. 27

原虫全体としての出現数は、どの例に於ても8日目24時までには増加の一途を辿っているが、各発育期型の原虫を算出してみると、その出現数のパターンは異っている。例えば Fowl No. 17 に於てみると (Fig. 2) 幼若環状型 (Young Ring Form) 出現数のピークは 10^4 RBC につき接種後7日目6時に400、次は36時間後の8日目18時に5,270、次いで同じく36時間後の10日目6時に14,610となっている。又、成熟栄養型 (Mature Trophozoite) については、接種後7日目18時、次いで36時間後の9日目6時、更に36時間後の10日目18時に 10^4 RBC につき、それぞれ530, 5,840, 6,710のピークを認めることが出来た。成熟分裂型 (Mature Schizont) についてみると、最初のピークは判然としないが、第2のピークは8日目の12時に、230/ 10^4 RBC、次いで36時間後の9日目24時に830/ 10^4 RBC となっている。つまりどの発育期の原虫に於ても、1つのピークより次のピークに達するまでには、36時間を要していることが判明する。またカーブに示される様に各々の発育期の原虫数は36時間を経過する毎に増加している。

幼若環状型→成熟栄養型→成熟分裂型→幼若環状型の順に原虫発育のピークを追ってみると (Fig. 2) 幼若環状型のピークより12時間遅れて成熟栄養型のピークが現れ、更にその18時間後に成熟分裂型のピークが出現している。更に成熟分裂型のピークに遅れること6時間で元の幼若環状型の次のピークとなっている。幼若環状型が次第に生育して成熟分裂型となり、それが赤血球から遊離し、新しい赤血球に侵入するまで、つまり *P. gallinaceum* 原虫の無性生殖環が一巡するに要する時間は36時間であることが観察された。

Fowl No. 13 に於ては感染が進行してからの実験であった為 (赤血球感染率33%より開始)、同調した生活環は1回観察されたのみであったが、幼若環状型のピークは7日目24時と9日目12時に、成熟栄養型のそれは8日目6時と9日目24時、成熟分裂型原虫のピークは7日目24時と9日目6時にみられ、ピークの間隔はいずれの例でも36時間であった。幼若環状型→成熟栄養型→成熟分裂型→幼若環状型と無性生殖環を一巡する時間を辿ってみると、それぞれの間隔は6時間、24時間、6時間となっており、次の幼若環状型となるまでには Fowl No. 17 と同様36時間を要することがわかる。

Fowl No. 12 及び Fowl No. 27 に於ても幼若環状型のピークは概ね12時又は24時に位置し、36時間の

無性型発育環を有することが同様に観察された。なお実験は Fowl No.27 では原虫接種後 5 日目, Fowl No.12 及び Fowl No.17 では 6 日目, Fowl No.13 では接種後 7 日目より行った。

以上の所見を踏まえ、無性型発育環中、形態的にその同定と算出が容易な幼若環状型原虫を指標とし、次の生殖母体出現の消長を比較検討した。

〔2〕 幼若環状型と成熟生殖母体出現数の経時的推移の比較

一般に接種後 10 日目以内の感染初期に於ては、成熟生殖母体も経時的にその数を算定すると、幼若環状型と同様に出現数の周期的増減があることが観察された。しかも両者の出現数の増減パターンは、ほぼ同一の周期性をもつことが認められた。

例えば Fowl No.12 について、幼若環状型及び成熟生殖母体数がピークを形成する時刻とそれらの出現数は (Fig 3) 第 1 回目は接種後 6 日目 24 時で、幼若環状型及び成熟生殖母体が、それぞれ 10^4 RBC あたり 1,240, 80 であった。第 2 回目のピークは 8 日目 12 時で、それぞれ 3,660, 560 となり、第 3 回目のピークは 9 日目 24 時で、それぞれ 2,500, 280 となり、各ピーク間の間隔は成熟生殖母体に於ても 36 時間であった。

次に Fowl No.17 に於ては、幼若環状型原虫の第 1 回目のピークは、接種後 7 日目の 6 時で、RBC 10^4 個あたり 400 を算し、成熟生殖母体も同時刻にピークに達し、その数は 30 であった。又第 2 回目のピークは、幼若環状型、成熟生殖母体共に 8 日目 18 時であり、それぞれ 5,270, 250 を算出した。第 3 回目は

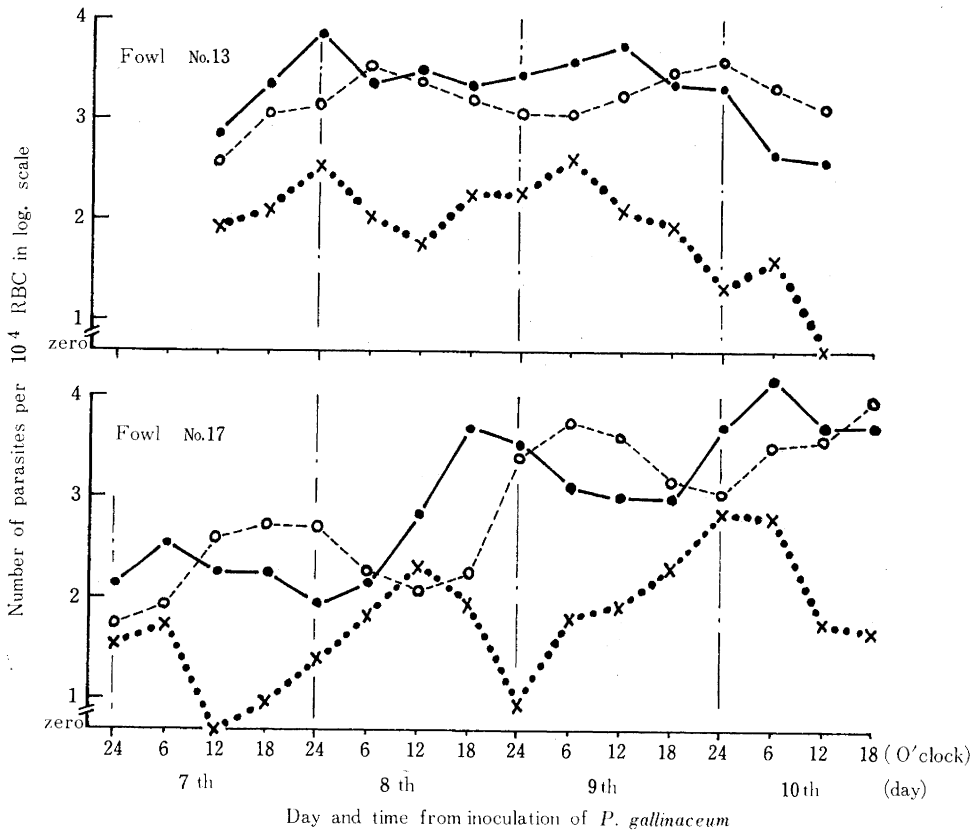


Fig. 2. Cyclic changes in numbers of young ring form, mature trophozoite, and mature schizont in bloods of infected Fowls No.13 and No.17.

●—● : Young ring form ○·····○ : Mature trophozoite
 ×·····× : Mature schizont

12日目の6時で、幼若環状型が 14,610、成熟生殖母体が 390 となって、幼若環状型と成熟生殖母体の出現数の増減パターンは一致し、ピーク間隔は両者共に 36時間であった。

Fowl No.13 に於ても前2者と同様、第1回目の幼若環状型、成熟生殖母体出現数のピークは、7日目24時に重なっている。36時間後の第2回目の両者のピークの比較では、6時間のずれが認められたが、ほぼ同一の出現パターンを示したものと受けとられた。

以上の結果より個々のメロツオイトが宿主赤血球に侵入し、36時間後にはひとつの無性生殖環を完了すると同様に、生殖母体となる運命をもつメロツオイトも、侵入した赤血球内で 36時間後には成熟生殖母体

となることがうかがえる。又、幼若環状型原虫と成熟生殖母体出現数のピークが 12時又は 36時間後の 24時と、ほぼ同じであることにより、幼若環状型原虫の出現数の算定のみからでも、成熟生殖母体の数的消長を推定することが出来ると判断された。

[3] 成熟生殖母体生存時間の推定

幼若環状型原虫の算定により、最初の最多出現時刻(多くは 12時、又は 24時)がわかると、その後 36時間では、幼若環状型原虫の次のピークが来ると同時に、成熟生殖母体の出現数も増加して来ることが前項の結果より予想される。この実験では、成熟生殖母体の増加している時期に、抗無性型剤であるクロロキン塩基 60 mg/kg 量を筋肉内に投与した。薬剤の作用

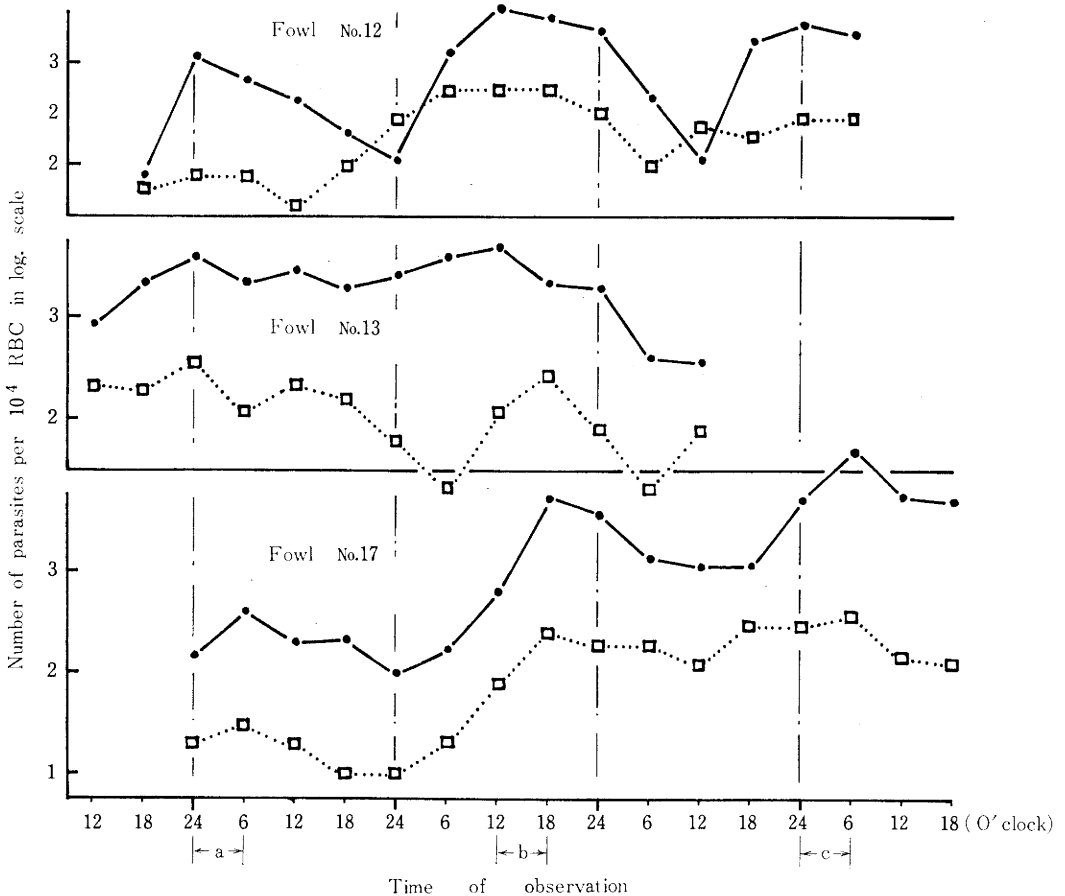


Fig. 3. Curves of the numbers of young ring form and mature gametocyte in bloods of infected fowls. The curves showed a growth pattern of the parasites with peak points at (a), (b), and (c). The first days of the observation were the 6th day from inoculation of *P. gallinaceum* in Fowl Nos. 12 and 17, and the 7th in Fowl No.13, respectively.

●—●—● : Young ring form □····□····□ : Mature gametocyte

で血流中の無性型原虫を殺滅一掃し、生殖母体の供給源を断つことにより、新たな生殖母体の産生を抑制し、すでに存在する成熟生殖母体の生存時間を推定する方法をとった。

幼若環状型についてみると、クロロキン投与後6時間では、すでに薬剤の影響を受けたと思われる原虫がみられ（細胞質及び核の萎縮）、24時間以後では85%以上が黒味を帯びる核のみとなり完全に変性死亡していることが観察された。

一方生殖母体については、投与後特別な形態上の変化はなく、変性生殖母体の数は、投与前及び後を通じて大差なく少数であった。クロロキン投与例に於る赤血球感染率の推移は Fig. 4 に見る如く、Fowl No. 16, 65 の軽度感染でも、Fowl No. 18, 67 の重症

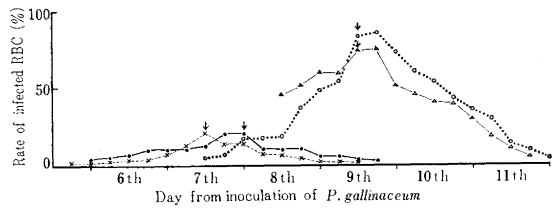


Fig. 4. Curves of the rate of infected RBC before and after the administration of chloroquine.

↓ : Time of administration of chloroquine 60mg/kg

- — • : Fowl No.16
- △ — △ : Fowl No.18
- × × : Fowl No.65
- ○ : Fowl No.67

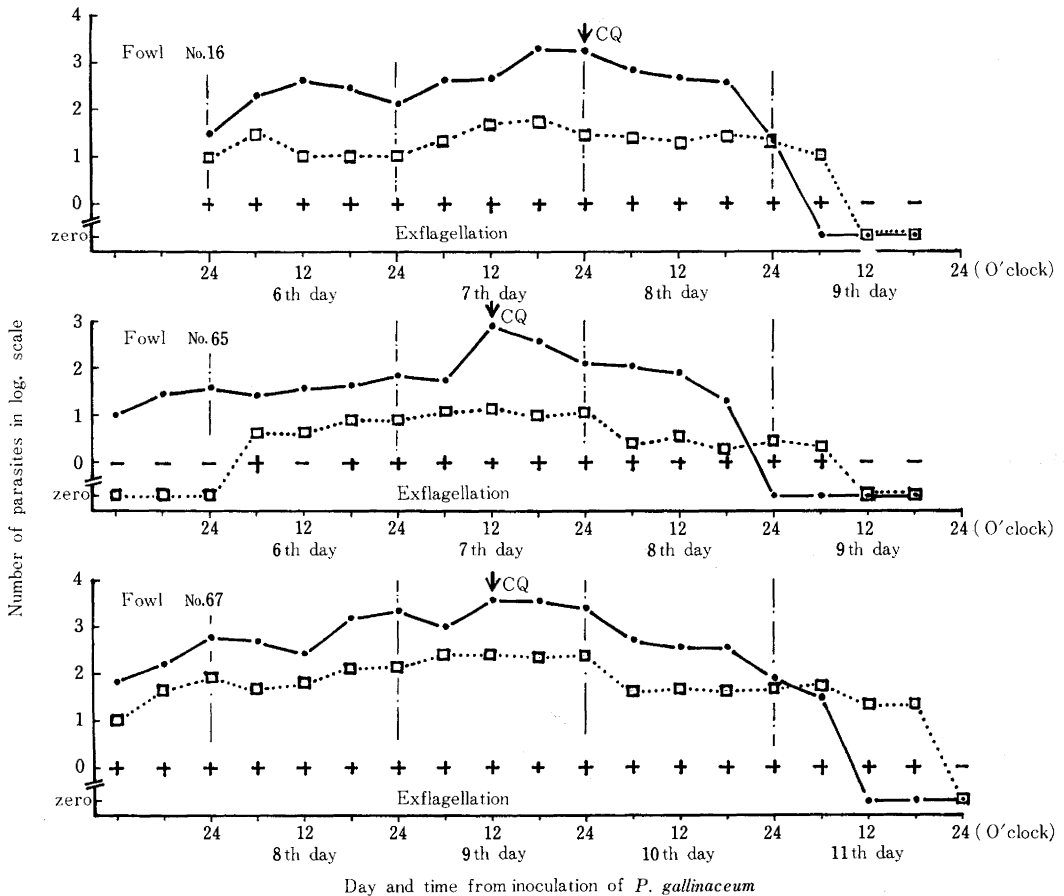


Fig. 5. Changes in numbers of young ring forms and mature gametocytes in bloods of infected fowls.

- — • : Young ring form
- □ : Mature gametocyte
- CQ : Chloroquine administration
- +, - : Exflagellation positive or negative

感染いずれの場合でも、薬剤投与後は急激に低下している。クロロキン塩基 60 mg/kg の投与前及び投与後の幼若環状型及び成熟生殖母体の出現数の推移は Fig. 5 に示される様に、クロロキン投与後は幼若環状型原虫はかなり急激にその数を減ずるが、成熟生殖母体は12時間を経過するまでは投与時の数値を維持している。

Fowl No.65 について詳細に原虫数の増減をおってみると、接種後第5日目の24時に幼若環状型の最初の小さいピークがあり、(40/10⁴ RBC)、7日目の12時に第2回目のピークが来ることが予想されたので、その時期をねらって薬剤を投与した。算出した幼若環状型原虫数の推移は、薬剤投与時及びその後6時間毎に RBC 10⁴ 個につき 790, 460, 150, 110, 80, 20 と急速に減少し、36時間後には0となって第3のピークは形成して来なかった。一方成熟生殖母体の算出数は RBC 10⁴ 個につき薬剤投与時の12が、6時間後 10, 12時間後に 13 とやや増加し、その後は次第にその数を減じて投与後 48時間の9日目 12時に完全に消失した。幼若環状型と異なり成熟生殖母体については、クロロキン投与後 12時間は出現数に著変がなく、その後漸減して 48時間後に消失したことは、投与されたクロロキンの作用によると考えるより、むしろ無性型の急速な減少により、生殖母体の産生源を断たれたことに大きな原因があると思われる。

他の実験例についても同様に、クロロキン投与後幼若環状型は急激に減少するが、成熟生殖母体は漸減して Fowl No.16 では 36時間後、Fowl No.67 では 60時間後に完全に消失した。

以上の結果より、無性型生殖環よりの新たな補給が

ない場合には、既存の成熟生殖母体は 36~60時間末梢血流中に見られることが判明した。

[4] 鞭毛放出現象による成熟生殖母体の生物学的活性の観察

末梢血流中に成熟生殖母体が検出されて、その血液より鞭毛放出が観察された時、元の成熟生殖母体に生物学的活性があると考えて良い。クロロキン投与後の鞭毛放出生殖母体の数は Table 1 に示した通りであり、末梢血流中に成熟生殖母体が多い程鞭毛放出は多く見られる。Fowl No.16 に於てはクロロキン投与後 30時間で成熟生殖母体及び鞭毛放出せる生殖母体の数はそれぞれ 10⁵ RBC につき 100, 3 であるが、以後の観察では両者共に 0 であった。Fowl No.65 では投与後 42時間で成熟生殖母体数 20, 鞭毛放出せる生殖母体数 3 であり以後は両者共検出されなかった。Fowl No.67 に於ては、投与後 54時間で成熟生殖母体数 200, 鞭毛放出せる生殖母体数 7 となり、それ以後は両者共検出されなかった。いずれの例に於ても成熟生殖母体が検出されなくなると、当然のことながら鞭毛放出原虫も見いだせなくなる。つまり、成熟生殖母体は、それが血流中に検出されている限りは、生物学的活性を有していることが示唆された。

考 察

P. gallinaceum の生物学的研究は古くより Lumsden ら (1940) により行われており、特に原虫の末梢血流中への定期出現性という点から研究が進められて来た。

著者らは(1970)フィリピン共和国に於て、熱帯熱マ

Table 1. The numbers of mature gametocytes and exflagellated gametocytes in infected fowls after chloroquine administration

Fowl No	Stage	Hours after chloroquine administration											
		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	
16	M. G.	300	300	200	300	200	100	0	0				
	Ex. G.	7	6	8	6	6	3	0	0				
65	M. G.	120	100	130	30	40	20	30	20	0	0		
	Ex. G.	17	13	25	3	5	10	3	3	0	0		
67	M. G.	2600	2440	2720	400	520	420	640	400	200	200	0	
	Ex. G.	57	130	140	53	73	54	60	15	7	7	0	

M. G. : Mature gametocyte

Ex. G. : Exflagellated gametocyte

The numbers in the table were converted to ones per 10⁵ RBC.

マラリア (*P. falciparum*) 感染患者約100名について、スルファメトピラジン、リン酸クロロキシン等を用いて治療実験を行なったが、無性型原虫の消失に伴い、臨床的治癒は見られるものの、蚊への伝搬能をもつ生殖母体が長く残存する症例が多いことを観察した。クロロキシン塩基 25 mg あるいは 35 mg/kg 量により治療した患者 44例のうち、14例が無性型原虫が消失したのにもかかわらず薬剤投与後2週間以上も生殖母体を保有していた。それらの中には1ヶ月以上も生殖母体を検出得たものが3例認められた。*P. falciparum* 生殖母体の長期出現及びその生死について Garnham (1960) は 2~3ヶ月間 (最高 128日) 末梢血流中に出現するが、その生存期間は最高 40~50日であろうと述べ、Stitt ら (Jeffrey, 1968 より引用) は *P. falciparum* について、生殖母体の生存期間は 30~60日間と推定した。一般に *P. falciparum* の生殖母体については長期生存説が多く、他種マラリア原虫生殖母体の短命説と比較される。今回著者は *P. gallinaceum* を用いて生殖母体の生存期間についての解明を試みた。

マラリア原虫生殖母体の周期的出現の因子としては多くの論拠があるが、未だに決定的な結論は出ていない。Shah (1934) は、カナリアマラリア (*P. cathemerium*) を用いた実験で、生殖母体は無性型原虫が多く出現する時間帯に多数観察され、その成熟時期は午後6時ごろであろうと述べている。又、Shah, Rozeboom, del Rosalio (1935) は、同じく *P. cathemerium* を用いた蚊への感染実験で、昼間より夜間に吸血させた方が感染率が高いことを示した。又、Stauber (1939) は *P. cathemerium*、無性型原虫の産生は12時間毎の外気の温度差によりコントロールされる一方、宿主の身体的活動及び睡眠による影響も考えられると述べている。最近、Hawking ら (1966, 1967, 1968, 1970, 1972) はミクロフィラリアの定期出現性にヒントを得て (1967)、サルマラリア、(*P. knowlesi*, *P. cynomolgi*)、カナリアマラリア (*P. cathemerium*) を用い、24 又は 48時間のサイクルを持つマラリア原虫の無性型及び生殖母体の出現周期を観察し、無性型生殖環が一定の周期を形成することにより、生殖母体の末梢血中への出現数も律せられると報告している。又、その無性型原虫の生活環を律しているものは、宿主の体温の変化であろうと推測している。

これらの報告で使用されたマラリア原虫は、全て24時間のサイクルを規準としており、*P. cathemerium*、*P. knowlesi* は 24時間、*P. cynomolgi* は 48時間の周期である。しかし、1サイクルが 24時間単位でない

マラリア原虫については、何が末梢血流中のサイクルを律するかを説明する報告は少ない。Hawking, Gammage (1970) は、キジマラリア (*P. lophurae*) が平均 40時間の無性生殖環を有し、その生殖環は昼夜の因子には作用されず、接種の時刻に影響され、たとえ chick embryo 内で観察しても温度の影響は受けないと述べている。上記の *P. falciparum* についても、無性型原虫の出現数は非周期性であり、又、生殖母体も長期に生存し、又、著者らの経験より、その出現に周期的な変化が少ないことから、*P. falciparum* について周期的出現性の解釈は該当しないと思われる。

この研究の成績では、*P. gallinaceum* 原虫の周期は 36時間であり、無性型、生殖母体共にその出現数のピークが 12時 (正午)、24時 (深夜) という相違する時刻に現れることが判明した。この事実は、気温、湿度、光量など外的因子、体温、副腎機能、血中の酸塩基平衡など内的因子によって説明することが困難で、全く別の角度から考察し検討してゆかねばならぬものと思われる。

末梢血流中の生殖母体の生物学的活性、つまり生殖母体の生殖能は鞭毛放出観察法により判断した。鞭毛放出は Dhanapala によると (Garnham, 1966 より引用) 生殖母体の急激な温度低下により起る現象であり *P. gallinaceum* の場合、40~42°C (宿主体温) から約 25°C (外気温) へ環境温度が変化することが刺激となっている。鞭毛放出は実際には伝搬蚊の中腸内で起る現象であるが、血流中に生殖母体をもつ感染ニワトリを *Aedes aegypti* に吸血させ、1週間後に中腸を取り出して観察すると、実際にオオンストの形成がみられ、更に 3~4日すると唾液腺内にスポロソイトの出現がみられる。著者らは (1973) *P. falciparum* でも同じ現象を観察しており、*in vitro* の鞭毛放出現象をもって血流中の生殖母体の生存、つまり生物学的活性の証明とした。

本研究ではクロロキシン塩基 60 mg 量を *P. gallinaceum* 感染ニワトリに投与し、無性型原虫を死滅させ、生殖母体の供給源を断つことにより生殖母体の生存期間を観察する方法をとった。しかしこの薬剤の生殖母体への影響は考慮しておく必要がある。この点に関し Garnham (1966) は一般に抗繁殖型剤は生殖母体に殆んど効果がないと述べ、Aikawa (1969) は、クロロキシン塩基 40 mg/kg 量を *P. gallinaceum* に作用させ、赤内型へ及ぼす変化を形態的に捉えているが、生殖母体についての追求は行っていない。Jef-

frey (1968) はクロロキンを *P. vivax* 原虫に与えてその形態の変化を観察し、生殖母体もやや影響をうけると報告している。著者は *P. falciparum* 患者でのクロロキン使用例に於て、生殖母体が正常の形態で長期観察出来た点、及び本実験に於て、末梢血流中の変性生殖母体は薬剤投与前後でその出現数に差がない点から、クロロキンの抗生殖母体作用は無視しても良いとの観点で研究を進めた。

今回の実験成績から、成熟生殖母体の末梢血流中への出現時刻は、無性型原虫のそれと概ね一致し、又、成熟生殖母体は比較的短命(60時間以内)であることが推測されたが、出現数の周期性を律する因子に関しては、今後の研究に待たねばならない。

結 論

1) *Plasmodium gallinaceum* 感染ニワトリの6時間毎の定時的採血による各種無性型原虫の出現数の算定から、本種マラリア原虫は36時間毎の発育環を持つことが推定された。特に幼若環状型の出現数のピークは24時(深夜)或いは12時前後に観察され、その周

期も36時間である。

2) 成熟生殖母体の末梢血流中への出現数も幼若環状型の出現数のピークに概ね一致して36時間毎の間隔をもって増加した。

3) クロロキン塩基 60 mg/kg を幼若環状型出現数のピーク時に筋肉内に注入すると、血流中の幼若環状型原虫数は急速に減少し、次のピークは見ないままに36時間後にはその殆んどが変性死滅した。

4) 成熟生殖母体はクロロキン投与後12時間はその出現数に著変がなく、その後は次第に数を減じ、投与後54時間まで検出し得た。更に、この期間中の成熟生殖母体は、鞭毛放出観察により、生物学的活性を有することが判明した。

稿を終るに臨み、始終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、ご協力いただいた数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25回日本寄生虫学会南日本支部大会(昭和47年10月10日於久留米)にて発表した。

参 考 文 献

- 1) Aikawa, M. & Beaudoin, R. L. (1969): Effects of chloroquine on the morphology of the erythrocytic stages of *Plasmodium gallinaceum*. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 18, 166-180.
- 2) Gambrell, W. E. (1937): Variations in gametocyte production in avian malaria. Amer. J. Trop. Med., 17, 689-727.
- 3) Garnham, P. C. C. (1966): Malaria parasites and other haemosporidia. Blackwell Scientific Publications, (Oxford).
- 4) Hawking, F. (1970): The clock of the malaria parasite. Sci. Amer., 222, 123-131.
- 5) Hawking, F. & Gammage, K. (1970): The timing of the asexual cycles of *Plasmodium lophurae* and of *P. cathemerium*. J. Parasit., 56(1), 17-26.
- 6) Hawking, F., Gammage, K. & Worms, M. J. (1967): The relation of the endoerythrocytic cycle of *Plasmodium knowlesi* and of *P. cynomolgi* to body temperature. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61(2), 199-210.
- 7) Hawking, F., Gammage, K. & Worms, M. J. (1972): The asexual and sexual circadian rhythms of *Plasmodium vinckei chabaudai*, of *P. berghei* and of *P. gallinaceum*. Parasitol., 65, Pt 2, 189-201.
- 8) Hawking, F., Worms, M. J., Gammage, K. & Goddard, P. A. (1966): The biological purpose of the blood-cycle of the malaria parasite *Plasmodium cynomolgi*. Lancet, 2, 422-424.
- 9) Hawking, K., Worms, M. J. & Gammage, K. (1968): Host temperature and control of 24-hour and 48-hour cycles in malaria parasites. Lancet, 4, 506-509.
- 10) Hawking, F., Moore, P., Gammage, K. & Worms, M. J. (1967): Periodicity of microfilariae XII. The effect of variations in host body temperature on the cycle of *Loa-loa*, *Monnigofilaria setariosa*, *Dirofilaria immitis* and other filariae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 61(5), 674-

683.

- 11) Hawking, F., Worms, M. J. & Gammage, K., (1968): 24-and 48-hour cycles of malaria parasites in the blood; their purpose, production and control. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62, 731-765.
- 12) James, S. P. (1934): The Shute method of making preparations of ex-flagellating gametocyte and ookinetes of malarial parasites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 28, 104-105.
- 13) Jeffrey, H. C. (1968): Morphological changes in *Plasmodium vivax* in patients under treatment with chloroquine. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62(1), 47-50.
- 14) Lumsden, W. H. R., & Bertram, D. S. (1940): Observations on the biology of *Plasmodium gallinaceum* Brumpt, 1935, in the domestic fowl, with special reference to the production of gametocytes and their development in *Aedes aegypti* (L.). *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 34, 135-160.
- 15) Nakabayashi, T., Tsukamoto, M., Motomura, I., Miyata, A., Tsuneda, K., Miyagi, I. & Dulay, I. S. Jr. (1973): Epidemiologic survey on malaria in some rural areas, especially in Palawan island, of the Philippines. *Trop. Med.*, 15(3), 154-168.
- 16) Nakabayashi, T., Tsukamoto, M., Miyata, A., Tsuneda, K., Yamaguchi, K., Miyagi, I., Dulay, I. S. Jr. & Puriran, J. A. (1974): Chloroquine resistant *Plasmodium falciparum* in the Iwahig Area, the Philippines. *Trop. Med.*, 16(1), 1-10.
- 17) Shah, K. S. (1934): The periodic development of sexual forms of *Plasmodium cathemerium* in the peripheral circulation of canaries. *Amer. J. Hyg.*, 19, 392-403.
- 18) Shah, K. S., Rozeboom, L. E. & del Rosario, F. (1935): Studies on the infectivity of *Plasmodium cathemerium* of canaries for mosquitoes. *Amer. J. Hyg.*, 20, 502-507.
- 19) Shute, P. & Maryon, M. (1966): Laboratory technique for the study of malaria, 2nd. ed., J. & A. Churchill Ltd., (London)
- 20) Stauber, L. A. (1939): Factors influencing the asexual periodicity of avian malarias. *J. Parasit.*, 25(2), 95-116.
- 21) 山口恵三, 原田尚紀, 赤嶺達生, 常多勝巳 (1973): 熱帯熱マラリアの1症例. 診断と治療, 61(7), 1237-1240.