

トキソプラズマ オーシストの
胞子形成過程の観察

東京女子医科大学寄生虫学教室 (主任: 白坂竜暁教授)

山 浦 常・教授 白 坂 竜 暁
ヤマ ウラ ヒサシ シラ サカ リユウ コウ

(受付 昭和50年4月8日)

Sporogony of *Toxoplasma gondii* Oocyst**Hisashi YAMAURA, D.V.M. and Ryukoh SHIRASAKA, M.D.**

Department of Parasitology (Director: Prof. Ryukoh SHIRASAKA, M.D.)

Tokyo Women's Medical College

- 1) Sporogony of *Toxoplasma gondii* oocyst was studied by observation of individual oocyst at incubation temperature of 25°C. Results are summarized in Figs. 1-28. Sporulation process of *T. gondii* oocyst was similar to that of *Isoospora rivolta* and *Isoospora felis*.
- 2) Sporocyst was containing four sporozoites and one residual body, but a Stieda body was absent.
- 3) Time course of sporulation process of *T. gondii* oocyst was observed at incubation temperature of 25°C. Results are shown in Table 1. Only the sporont stage was recognized until 12 hr. Sporoblast stage and sporocyst stage was observed later than 15 hr and 18 hr respectively. Sporozoite stage appeared from 30 hr, rate of it was 30% at 42 hr, 71% at 48 hr and 81% at 72 hr.

I. 緒 言

Toxoplasma gondii (以下 Tp と略す) オーシストの存在は、すでに、Kühn & Weiland (1969)¹⁾, Frenkel et al (1970)²⁾, Hutchison et al (1970)³⁾, Witte & Piekarski (1970)⁴⁾らによつて確認され、今日ではそれがネコのコクシジウムの一型である *Isoospora bigemina* (Stiles, 1891) Lühe, 1906 の小型種のそれと形態学的に一致することも報告されてきた (西川ら, 1972)⁵⁾。

ネコから排泄された直後の Tp オーシストには感染力はないが、数日の間にそれは胞子形成を完了して、感染力を有するようになる。このようにオーシストが、宿主外で胞子形成を行ない、これを経て始めて発育環を完結することは、コクシ

ウム類の特徴の一つである。しかしながら、Tp オーシストの胞子形成はこれまでに、Weiland & Kühn (1970)¹⁾, Dubey et al (1970)²⁾によつて観察されているが、経時的で詳細な追跡は行なわれていない。

著者らは、25°C培養における、Tp オーシストの胞子形成の経過について観察したので報告する。

II. 実験材料および方法

実験に使用した Tp は東京大学医科学研究所、細菌感染研究部で分離された Fukaya 株である。

1. Tp オーシスト浮遊液の作成

オーシストの採取に当り、Fukaya 株に慢性感染したマウス 8 匹の脳の生理食塩水乳剤を作つて、ネコ 1 匹当

り3 ml ずつ (マウス2匹分の脳に相当する) を経口投与した。

オーシストは Tp 投与4日目にネコの糞便中に排泄された直後の新鮮なものを実験に使用した。供試ネコは、体重が370~420gのもの4匹で、予めコクシジウムに感染していないことを確認したものである。オーシストを含む糞便を採取し、直ちに適量の清水を加え、冷蔵庫内のマグネチックスターラーで攪拌し、カユ状とした後で50および100メッシュの二重の金網で濾過した。濾液は、2,000rpm 5 min, 1回の遠沈洗浄を行なった。その沈渣に少量の清水を加えてよく攪拌したのち、さらに10倍量の2%重クロム酸カリウム溶液を加えて Tp オーシスト浮遊液を作成した。

2. 観察方法

a) 胞子形成の過程……前述のオーシスト浮遊液をスライドガラスに1滴取り、カバーガラス(24×18mm)で覆い、その周囲をワセリンで封じた。鏡検は、室温を25°Cに保ち、予め定めておいた数個のオーシストについて5分から30分の間隔で実施した。

b) sporocyst の観察……sporocyst の観察は、圧迫法(角田, 石井, 1971¹⁹⁾) に準じて行なわれた。すなわち蔗糖液(比重1.27)浮遊法で集めたオーシストを含む液をスライドガラス上に1滴取り、32×24mmのカバーガラスをかけて25°Cに放置した。スライドガラスとカバーガラスの間の液が蒸発した時、カバーガラスを指でおさえ、数回こすりつけてオーシストから sporocyst を遊出させ、これを鏡検した。

c) 胞子形成の経時的経過……オーシスト浮遊液は、直径9 cm, 高さ2 cmのシャーレに液の深さが4 mmから5 mmになるように入れて25°Cに放置した。オーシストの各分裂期を, Vetterling (1968) に従って, sporont 期, sporoblast 期, sporocyst 期, sporozoite 期, の4つに分けた。観察は培養液を原則として6時間, または12時間毎に取り出して, 100個のオーシストがそれぞれの分裂期にあるかを調べた。

胞子形成時間は, 70%以上のオーシストが胞子形成を完了した時間とした。

III. 観察結果

1. 胞子形成過程の観察について

宿主より体外に排泄されたオーシストは, 時間の経過とともに, Figs. 1~28に示したような経過をたどった。

排泄直後の新鮮なオーシストは, sporont がオ

ーシスト内に充満していた (Figs. 1, 13). しかし培養開始後3.5時間目には, まず sporont の長軸が (Figs. 2, 14), ついで5時間目には短軸がそれぞれやや収縮し, sporont はほぼ円形を呈するようになった (Fig. 15). 10時間目には, sporont の表面にやや凸凹がみられるようになり (Figs. 3, 16), 12.5時間目にはそれが多角形を呈するようになった (Figs. 4, 17). 12時間45分目には, sporont のほぼ中央部がくびれてきて (Figs. 5, 18), 5分を経過するとその部分に割面が入り (Figs. 6, 19), さらに10分後には2分裂をして sporoblast ができた。分裂直後の sporoblast は, 円形又は類円形を呈し, ほぼ中央の部分には透明にぬけた部分が認められた (Figs. 7, 20). その後 sporoblast は長く伸びて, 透明な部分は両端に移行し (Fig. 21), 14時間目にはその部分がほぼ三角形を呈するようになった (Figs. 8, 22). 15.5時間目になると sporoblast は一旦丸みをおびたが (Figs. 9, 23), その後再び長円形を呈し, 20.5時間目には sporocyst 形成期には散在していた顆粒は, sporocyst 内の Cytoplasm の中心部に集合していた (Figs. 10, 24). 培養開始から27時間を経過したオーシストは, sporocyst の内部に sporozoite が形成され始めた (Figs. 11, 25). やがて29時間目になると, sporocyst 内の顆粒はさらに収縮して, 各4個の sporozoite ができ, 内部残体も出現し始めた (Figs. 26). その後内部残体はは次第に小さくなり, 培養開始から32時間目以後, 胞子形成過程を完了したことが確認された。

2. sporocyst の観察

胞子形成を完了したオーシストは, 圧迫法で sporocyst を遊出させ, その内部構造を観察した (Fig. 28). その結果, sporocyst の内部には4個の sporozoite と1個の内部残体が観察されたが, Stieda body は認められなかつた。

3. 胞子形成の経時的経過について

胞子形成の経時的な経過は, Table 1に示した。

すなわち, 培養開始後12時間目までは sporont 期のオーシストのみが認められた。15時間目にな

Table 1. Percentage of *Toxoplasma gondii* oocysts at each stage of sporulation at incubation temperature of 25°C

| Hours of Sporulation | Percent of oocyst 25°C | | | | |
|----------------------|---------------------------|-----|----|----|----|
| | *Dg | Sr | Sb | Sc | Sz |
| 0 | 0 | 100 | | | |
| 6 | 0 | 100 | | | |
| 12 | 0 | 100 | | | |
| 15 | 0 | 57 | 43 | | |
| 18 | 0 | 33 | 62 | 5 | |
| 24 | 0 | 19 | 54 | 27 | |
| 30 | 0 | 16 | 36 | 47 | 1 |
| 36 | 1 | 12 | 26 | 50 | 11 |
| 42 | 0 | 11 | 8 | 51 | 30 |
| 48 | 1 | 10 | 2 | 16 | 71 |
| 60 | 0 | 11 | 2 | 13 | 74 |
| 72 | 0 | 10 | 1 | 8 | 81 |
| 84 | 1 | 10 | 1 | 4 | 84 |
| 96 | 1 | 9 | 0 | 1 | 89 |

*Dg=degenerated oocyst. Sr=sporont.
Sb=sporoblast. Sc=sporocyst.
Sz=sporozoite.

ると43%のオーストが sporoblast 期へ移行し、18時間目には5%のオーストが sporocyst へと移行した。sporozoite 期は、30時間目より始まり36および42時間目にはこの期のオーストがそれぞれ11%、30%と増加した。48および72時間目になると sporozoite 期のオーストは、71~81%になってそのほとんどが孢子形成を完了した。

すなわち、Tp オーストの孢子形成時間は、25°Cでは48時間から72時間であつた。

IV. 考 察

従来、コクシジウム類の孢子形成は、Isospora 属では、*I. rivolta* は Mahrt (1968)⁸⁾、西川ら (1972)¹⁰⁾に、*I. felis* は富村 (1957)¹²⁾、Shah (1970)¹¹⁾に、そして *Eimeria* 属のそれは、Vetterling (1968)¹⁴⁾に詳細な報告がみられる。

Tp がネコのコクシジウムの一種と同定されて以来、その生物学的性状については多くの研究報告がなされてきた (Weiland & Kühn, 1970¹⁵⁾、Dubey et al, 1970¹⁾、伊藤ら, 1971⁴⁾、1972⁵⁾⁶⁾)。しかしながら、Tp オーストの諸性状について

はまだ不明な点が多いので、これを研究する際には他のコクシジウムとの比較検討が重要である。

Dubey et al (1970)¹⁾は、Tp オーストの孢子形成を室温で観察し、オースト内に充満していた sporont はやがて収縮し、6~9時間の間にそれが2分裂をして9~12時間後に sporoblast ができ、その後、それは長くのびては18時間後には sporocyst ができた。そして、sporocyst の末端には核と思われる明るい領域が認められたと報告している。

しかし、著者らの観察では、培養12.5時間目から13時間目の sporoblast 形成過程 (Figs. 4~6, 17~19) で sporont が多角形を呈し、その後それが2分裂をして、sporoblast ができ、分裂直後の sporoblast のほぼ中央部には透明にぬけた部分が認められた (Figs. 7, 20)。また14時間目の sporoblast から sporocyst へ移行する過程でも、sporoblast の両端に移行した部分が、ほぼ三角形を呈するようになり (Figs. 8, 22)、20.5時間目にははこれまでに散在していた顆粒は、sporocyst 内の Cytoplasm の中心部に集合していた (Figs. 10, 24)。

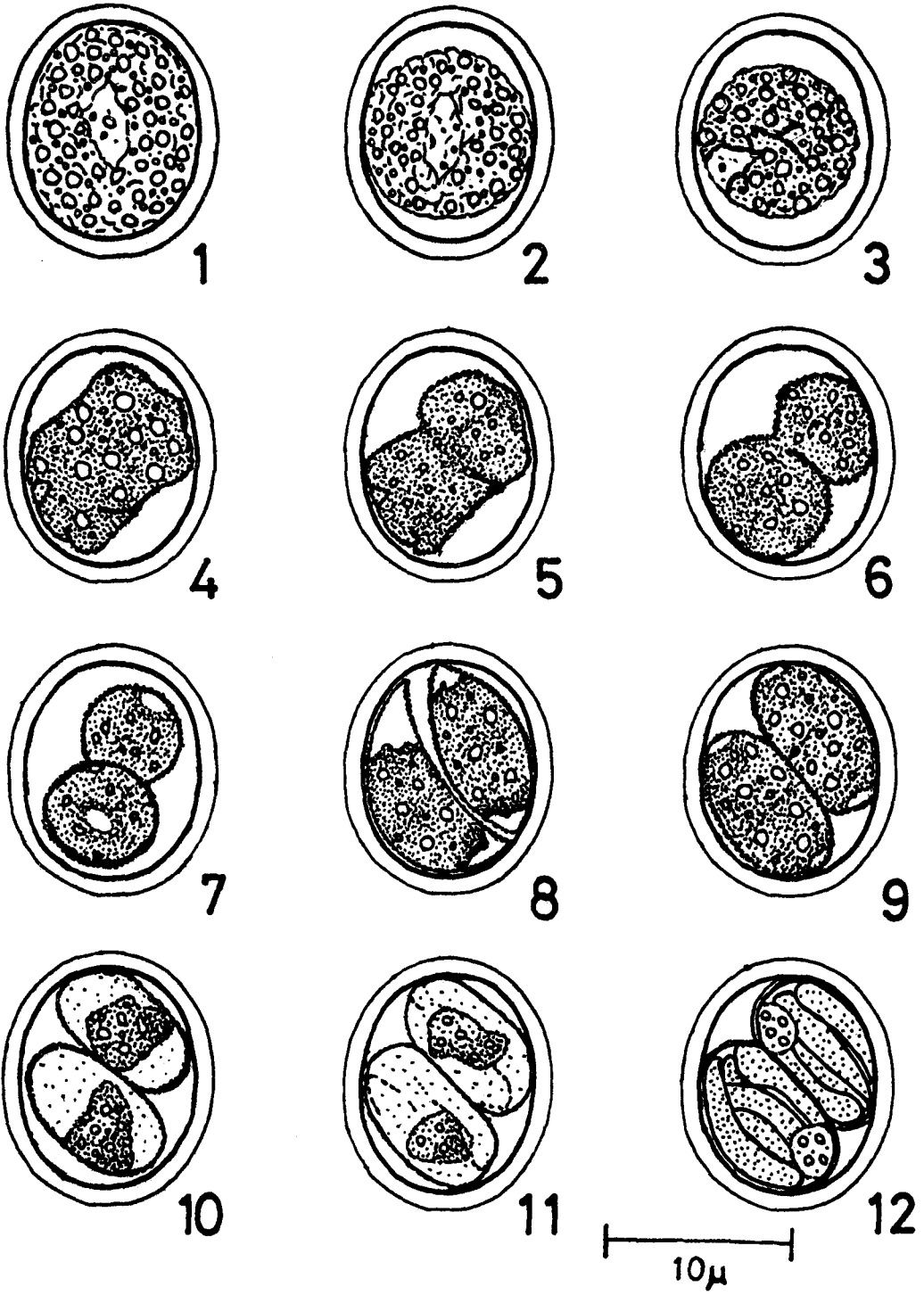
これらの経過の一部は *I. rivolta* および *I. felis* のそれと一致していた。すなわち (Figs. 4~6, 17~19) の過程は、Mahrt および西川らの記載と一致しは (Figs. 7, 20) の過程で認めた透明にぬけた部分は、Mahrt, Shah が核と呼んでいるものと一致していた。

また (Figs. 8, 22) で認めた過程は、Mahrt が “double pyramid stage” と呼んでいるものと一致していた。

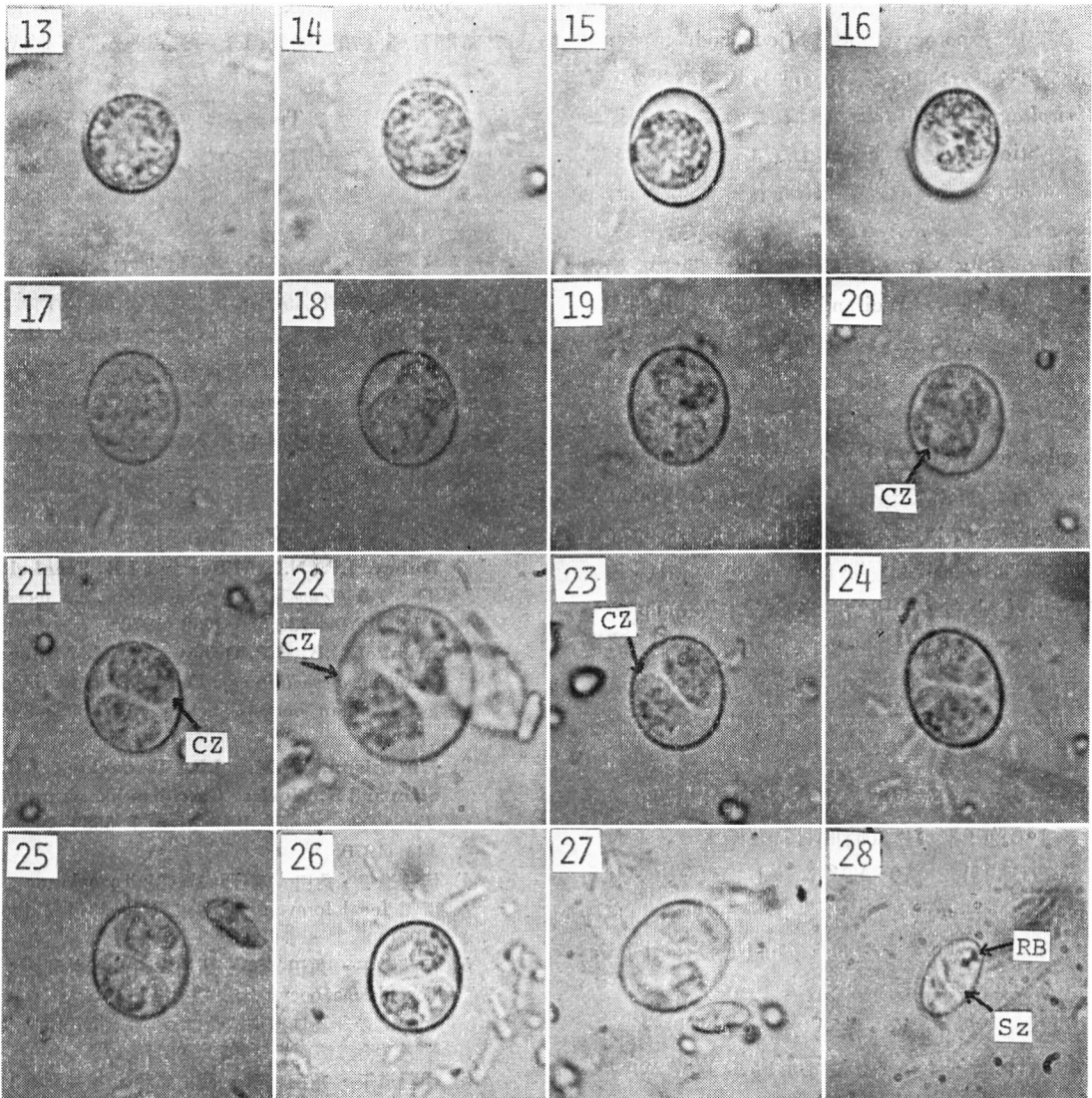
Mahrt および Shah は、排泄後の sporont 期のオーストには1個の核が存在し、その後、核にいわゆる “nuclear streak” が出現すると報告している。Vetterling は、排泄時のオーストに1個の核を認め、それはその後3回分裂して4個の核となり、その後 sporont に “line of cleavage” ができると報告している。しかし著者らの観察では、核およびそのような過程は認められなかつた。

山浦・白坂論文付図〔I〕

Sporogony of *Toxoplasma gondii* oocyst



山浦・白坂論文付図〔Ⅱ〕



Figs. 1, 13. Oocyst in unsporulated state, freshly passed in feces. Oocyst with sporont occupying the entire inner mass.

Figs. 2-3, 14-16. Oocyst with contracted sporont.

Figs. 4, 17. Oocyst with a polygon sporont.

Figs. 5, 18. Oocyst with sporont beginning cleavage.

Figs. 6, 19. Oocyst with sporont nearly divided into sporoblasts.

Figs. 7, 20. Sporoblasts complete, each with one clear zone.

Fig. 21. Sporoblast with two clear zones at each pole.

Figs. 8, 22. Sporoblast with triangular clear zones at each pole.

Figs. 9, 23. Oocyst with newly formed sporocyst with clear zones at each pole.

Figs. 10-11, 24-25. Sporocyst granules clump towards center.

Figs. 12, 26-27. Completion of sporulation with the differentiation of the cytoplasm into sporozoites and residual body.

Fig. 28. Sporocyst with four sporozoites and one residual body, but a Stieda body was absent.

RB=residual body; Sz=sporozoite. CZ=clear zone.

一般に *Eimeria* 属の孢子形成では, sporoblast 形成過程に pyramid stage が出現し, 孢子形成を完了した sporocyst には, Stieda body の存在することが知られている. しかしは現在のところ, *I. rivolta* および *I. felis* では, このような過程および Stiedabody は報告されていないようである. やはり著者らの観察でもこれらは認められなかつた.

Tp オーストのは孢子形成時間に関する報告は多く見られる. Weiland & Kühn (1970)¹⁵⁾ は色々な温度条件における孢子形成時間を調べて, 28°Cで3日, 24°Cで4日はそして8°Cでは孢子形成は行なわれなかつたと報告している. また Frenkel et al (1970)²⁾ は24°Cで2~3日, 15°Cで5~8日, 11°Cで14~21日, Witte & Piekalski (1970)¹⁶⁾ は, 24°Cで2日, そして伊藤ら (1971)⁴⁾ は25°Cで48~96時間を要したと報告している. Dubey et al (1970)¹⁾ は, 25°Cにおける Tp オーストの孢子形成は24~28時間の間に始まり, それが10倍に達するのは28~32時間の間で, 最大量のオーストが孢子形成を完了するには48時間を要したと報告している.

著者らの観察結果では, 25°Cにおける Tp オーストの孢子形成は30時間目より始まり, それは48~72時間目では70~80%に達しており, これらの報告とほぼ一致していた.

すなわち, Tp オーストの孢子形成時間は, 25°Cでは48~72時間であつた.

V. 結 論

1) Tp オーストの孢子形成の過程について, 25°C培養で経時的に観察した.

2) Tp オーストの孢子形成では, その経過中に *I. rivolta* および *I. felis* のそれとほぼ一致した過程が認められた.

3) 圧迫法で遊出した sporocyst の内部には, 4個の sporozoite と1個の内部残体が観察されたが Stieda body は認められなかつた.

4) 孢子形成の経時的観察では, 培養開始から12時間目までは sporont 期のはオーストのみが認められ, sporoblast 期のもの, および sporocyst

期のものは, 各々15時間, 18時間目より認められた. Sporozoite 期は, 30時間目より始まり, 48~72時間目では70~80%のオーストが孢子形成を完了した.

5) したがって Tp オーストの孢子形成時間は25°Cで48~72時間であつた.

稿を終えるに当り, 終始ご指導ご助力をいただきました農林省家畜衛生試験場の伊藤進午, 角田清両博士, ならびに松岡科学研究所の松井利博氏, Fukaya 株を分譲いただきました東京大学医科学研究所常松之典教授, 亀井喜世子技官, 種々ご援助をいただいた本学寄生虫学教室松本克彦助教授, 和田芳武講師および教職員各位に感謝致します.

文 献

- 1) **Dubey, J.P., N.L. Miller and J.K. Frenkel:** The *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces. J Exptl Med **132** 636~662 (1970)
- 2) **Frenkel, J.K., J.P. Dubey and N.L. Miller:** *Toxoplasma gondii* in cat: Fecal stages identified as coccidian oocysts. Science **167** 893~896 (1970)
- 3) **Hutchison, W.M., J.F. Dunachie, J.C. Siim and K. Work:** Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. Brit Med J **5689** 142~144 (1970)
- 4) 伊藤進午・角田 清・西川洋昭: *Toxoplasma* の所謂 fecal form について. 日獣誌 **33**(補) 146 (1971)
- 5) 伊藤進午・角田 清・西川洋昭・松井利博: *Toxoplasma* oocyst および他のコクシジウム oocyst の非経口感染試験について. 第75回日本獣医学会講演要旨 (1972) 96頁
- 6) 伊藤進午・角田 清・西川洋昭・松井利博: *Toxoplasma* oocyst のマウスに対する感染試験について. 第75回日本獣医学会講演要旨 (1972) 96頁
- 7) **Kühn, D. and G. Weiland:** Experimentelle *Toxoplasma*-Infectionen bei der Katze. I. Wiederholte Übertragung von *Toxoplasma gondii* durch Kot von mit Nematoden infizierten Katzen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr **82** 401~404 (1969)
- 8) **Mahrt, J.L.:** Sporogony of *Isospora rivolta* oocyst from the Dog. J Protozool **15** 308~312 (1968)
- 9) 西川洋昭・伊藤進午・角田 清・松井利博:

- Toxoplasma** 自然感染ネコからの fecal form の証明. 第74回日本獣医学会講演要旨 (1972) 133頁
- 10) 西川洋昭・伊藤進午・角田 清・松井利博: ネコの *Isospora rivolta* の sporogony およびそれに及ぼす温度感作の影響について. 第75回日本獣医学講演要旨 (1972) 95頁
- 11) **Shah, H.L.:** Sporogony of the oocysts of *Isospora felis* Wenyon, 1923 from the cat. J Protozool **17** (4) 609~614 (1970)
- 12) 富村 保: 犬及び猫における Coccidium 症に関する実験的研究, (1) *Isospora felis* の Oocyst の形態, Sporogony 及び同虫の猫への感染試験. 寄生虫誌 **6** (1) 12~24 (1957)
- 13) 角田 清・石井俊雄: 鶏のコクシジウム検査法. 鶏病研究会 (1971) 6頁
- 14) **Vetterling, J.M.:** Sporogony of the Swine Coccidium *Eimeria deblickei* Douwes, 1921. J Protozool **15** 167~172 (1968)
- 15) **Weiland and D. Kühn:** Experimentelle Toxoplasma Infectionen bei der Katze. II. Entwicklungsstadien des parasiten im Darm. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr **83** 128~132 (1970)
- 16) **Witte, H.M. and G. Piekalski:** Die Oocysten-Ausscheidung bei experimentell infizierten Katzen in Abhängigkeit von *Toxoplasma*-stamm. Z. Parasitenk **33** 358~360 (1970)