

昭和45年8月
August, 1970

原生動物学雑誌

第3卷 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 3 No 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生物誌
Jap. J. Protoz.

原生動物学会誌 第3巻 第1号

目 次

原 著

「活性汚泥棲原生動物群集の生態学的研究」……………盛 下 勇

第3回日本原生動物学会概況

講演目次

特別講演 1「コクシジウム研究の諸問題」……………角 田 清

特別講演 2「トキソプラズマとその免疫反応」……………常 松 之 典

一般講演

第3回国際原生動物学会会議に出席して……………樋 渡 宏 一

本会記事

会員名簿

投稿規定

原稿作製上の注意

日本原生動物学会会則

編集後記

日本原生動物学会 幹事

猪 木 正 三 (会長)

阿 部 徹 稲 葉 文 枝 尾 崎 文 雄 木 下 治 雄 高 田 季 久

津 田 松 苗 中 林 敏 夫 中 村 健 児 樋 渡 宏 一 藤 田 潯 吉

牧 野 佐 二 郎 松 林 久 吉 柳 生 亮 三

原生動物学会雑誌 編集委員

猪 木 正 三 (委員長)

稲 葉 文 枝 尾 崎 文 雄 高 田 季 久 柳 生 亮 三

Studies on protozoa-populations in activated sludge of sewage and waste treatment plants

Isamu Morishita

Department of Research and Development, Ebara Inflico Co. Tokyo

(Received 10 March 1970, in revised form 11 August 1970)

1. SUMMARY

The protozoa in samples of activated sludge were examined and results were as follows.

1) In the activated sludge specimens investigated 187 species of 85 genera and 3 subphyla were identified. The predominant protozoa were Peritrichida of the Ciliophora. The Peritrichida found constituted 61 species of 7 genera and 2 families, the genus *Vorticella* being predominant.

2) The Peritrichida appeared to be almost universally distributed but different genera and species were unique to different environments (water quality).

3) Different raw water (sewage) systems, and the compositions of the activated sludge protozoa-populations in different activated sludges showed unique relationships with the species of Peritrichida.

4) Based on the above results the Peritrichida could be used in indices of the nature of activated sludge, purity of sample and quality of water.

2. INTRODUCTION

Activated sludge plants are being installed in increasing numbers of places, and there have been many useful studies and reports on activated sludge recently. These include studies on the bacteria in activated sludge and basic studies on activated sludge itself. However, there are no reports of ecological studies on living matter and populations of organisms in activated sludge.

An interesting problem is the protozoa-population in activated sludge and the actual conditions are relatively easy to investigate. Accordingly, I studied the protozoa-populations in various activated sludges. This paper reports some of the results of this investigation, including those on the composition and change of the protozoa communities in activated sludge.

3. MATERIALS AND METHODS

Some of the samples of activated sludge investigated were sampled directly by the author and others were supplied from various localities. They were classified, roughly as specimens from combined system sewage, separated system sewage (housing site system sewage) and human excrement. As fresh specimens as possible were examined and specimens fixed in formalin were also studied. Samples were taken from systems which were operating and functioning stably and specimens from systems in an initial stage of operation or the operating under unstable conditions were excluded. Species and genera were identified following the Hall Classification (1953) for Mastigophora and Sarcodina, and the Corliss Classification (1961) for Ciliophora. Reference was also made to reports in the literature. Identification was usually based on morphological characters.

The process of identification was as follows: Fresh specimens were observed directly by the naked eye. Then, photographs were taken under the microscope. Internal and external structures were examined after staining with Nolnad solution, acetic acid camine or other fixalive dyes. With specimens fixed in formalin, protozoa which appeared to be similar were observed from various angles and photographs or sketches are of parts of them were combined to reproduce the whole. Existing data, if judged reliable, were also used in the survey.

4 RESULTS

4-1 *Genera and species of protozoa found*

About 150 specimens of activated sludge from combined system sewage, separated

Table 1. Numbers of genera and species of protozoa in activated sludge (Aug. 1963)

Subphylum	Order	Genus	Species
Sarcodina	Amoebida	3	8
	Testacida	9	13
	Heliozoida	3	6
Mastigophora	Chrysomonadida	1	1
	Cryptomonadida	1	2
	Euglenida	4	7
	Protomastigida	5	8
Ciliophora	Gymnostomatida	20	26
	Trichostomatida	3	7
	Suctorida	5	8
	Hymenostomatida	9	13
	Peritrichida	7	61
	Heterotrichida	6	10
	Hypotirichida		

Note: Identification of Mastigophora and Sarcodina according to Hall (1953) Classification, and Ciliophora following the Corliss (1961) classification.

system sewage, waste water, etc. were examined. In these 187 species of protozoa have been identified to date, other species will probably be identified later, especially if activated sludges from various waste waters are investigated.

The numbers of genera and species identified at present are as follows.

Sarcodina, 27 species of 15 genera

Mastigophora, 18 species of 11 genera

Ciliophora, 142 species of 59 genera

Total, 187 species

The Sporozoa subphylum should be added to the above in a survey of general protozoa. This subphylum, however, is purely parasitic and so was not detected in the present investigation. The above list shows that Ciliophora are the dominant protozoa in activated sludge. Subclassification of each subphylum into classes is shown in Table 1.

From the numbers of orders, genera and species in each class, it is seen that: Amoebal and Testacea predominate in the Sarcodina: Phytomastigophora and Zoomastigophora

Table 2. Peritrichida protozoa detected.

<i>Carchesium aselli var parvum</i>	<i>Zoethamnium aseli</i>	
<i>Carchesium epistylis</i>	<i>Zoothamnium mucedo</i>	
<i>Carchesium gemellum</i>	<i>Zoothamnium pygmaeum</i>	
<i>Carchesium limbatum</i>		3 Species
<i>Carchesium polypinum</i>	<i>Epistylis sectostyla</i>	
<i>Carchesium polypinum f corymbosum</i>	<i>Epistylis mesostylis</i>	
	<i>Epistylis elliptica</i>	
	<i>Epistylis marginalis</i>	
	<i>Epistylis hiratsukaensis</i>	
	<i>Epistylis lacustris</i>	
	<i>Epistylis plicatilis</i>	
	<i>Epistylis umbilicata</i>	
	<i>Epistylis pyriformis</i>	
	<i>Epistylis elongata</i>	
	<i>Epistylis cambari</i>	
	<i>Epistylis dicorpora</i>	
	<i>Epistylis anastaticae</i>	
		13 Species
<i>Vorticella longifillum</i>	<i>Opercularia glomerata</i>	
<i>Vorticella alba</i>	<i>Opercularia coarctata</i>	
<i>Vorticella aequilata</i>	<i>Opercularia assellicola</i>	
<i>Vorticella bivacuolata</i>	<i>Opercularia minima</i>	
<i>Vorticella compnula</i>	<i>Opercularia phyganeae</i>	
<i>Vorticella convallaria</i>		5 Species
<i>Vorticella cuculus</i>	<i>Pyxidium vernale</i>	
<i>Vorticella dicorpora</i>	<i>Pyxidium urceolatum</i>	
<i>Vorticella extensa</i>	<i>Pyxidium collare</i>	
<i>Vorticella longimacronucleata</i>	<i>Pyxidium invaginatam</i>	
<i>Vorticella macronucleata</i>	<i>Pyxidium hennegugi</i>	
<i>Vorticella magna</i>		5 Species
<i>Vorticella microstoma</i>	<i>Rhabdostyla vernalis</i>	
<i>Vorticella monilata</i>	<i>Rhabdostyla pyriformis</i>	
<i>Vorticella muralis</i>	<i>Rhabdostyla conipes</i>	
<i>Vorticella neburifera</i>		3 Species
<i>Vorticella nutans</i>		
<i>Vorticella octava</i>		
<i>Vorticella octava var asellicola</i>		
<i>Vorticella partita</i>		
<i>Vorticella picta</i>		
<i>Vorticella punctata</i>		
<i>Vorticella pusilla</i>		
<i>Vorticella putrina</i>		
<i>Vorticella pyrum</i>		
<i>Vorticella submicrostoma</i>		
		26 Species

predominate in the Mastigophora; and Peritrichida is predominate followed in order by Gymnostomatida, Hypotrichida, Hymenostomatida, Heterotrichida, Suctorida and Trichostomatida in the Ciliophora. Thus, in activated sludge the number of species of Ciliophora is greatest and of these Peritrichida protozoa predominate.

The Peritrichida found were 61 species from 2 families 7 genera, *Vorticella* species being predominant the names of the genera and species of Peritrichida detected are shown in Table 2.

The above results show that Peritrichida predominate, in terms of the number of genera or species in activated sludge. (Results on the protozoa-populations in activated sludges at different stages will be reported later.)

4-2 Protozoa-populations in various sewage systems

Various sewage systems are applied to the activated sludge process and for convenience, they are roughly classified as follows.

- (1) Combined systems
- (2) Separate systems
- (3) Human excrement (supernatant) systems
- (4) Organic waste water systems

In practice a strict classification is not possible, and the organic waste water systems (4) is particularly unsuitable as a category. Therefore, results on the category are not included in this report.

- (1) Combined systems

The chemical properties of combined systems differ in detail, and the operational conditions of the activated sludges in different combined systems are not the same.

Table 3 shows the protozoa found in eleven specimens of activated sludge from plants for combined systems.

The activated sludges in different cities probably differ in composition, but to some extent the data reflect the actual conditions at the plants because specimens were taken in summer when the plants then were operating under nearly optimal conditions. (A-C: Kanto district, D-F: Kansai district, G-K: southern areas of Kanto)

From Table 3 shows that some genera are present in all or nearly all eleven plants. For instance, *Vorticella*, *Epistylis*, *Opercularia* and *Amoeba* were found in specimens from *Aspidisca*, *Tokophrya* and *Lionotus* in 10 of 11, and *Chilodonella* in 9. From these data (and others not included), *Vorticella*, *Epistylis*, *Opercularia*, *Amoeba*, *Aspidisca*, *Tokophrya* and *Lionotus* almost always seem to be basic genera of protozoa in combined systems. These genera are also basic, at other seasons. Thus, the protozoa-population in combined systems can be described in terms of the composition of Peritrichida as follows.

$$Vorticella + Epistylis + Opercularia = \text{VEO type}$$

- (2) Separate systems

Separate systems are mainly sewage systems of small cities, and in this paper they refer to systems from a housing sites. There are many plants for sewage from housing sites in this country, but in Table 4, shows results on ten plants from which samples were taken.

Table 4. Composition of the protozoa-populations in activated sludge of separate sewage systems.

Genus	Location										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
<i>Amoeba</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Pelomyxa</i>				+							
<i>Vohlkampfia</i>		+		+							
<i>Arcella</i>	+	+	+	+		+			+	+	
<i>Diffugia</i>			+								
<i>Euglypha</i>		+	+								
<i>Bodo</i>	+	+	+		+			+	+	+	
<i>Monas</i>	+		+		+			+	+	+	
<i>Peranema</i>		+	+								
<i>Linotus</i>	+		+	+	+	+	+		+	+	
<i>Loxophyllum</i>		+		+							
<i>Uronema</i>	+		+	+							
<i>Colpoda</i>	+			+	+			+		+	
<i>Vorticella</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Rhabdostyla</i>			+	+	+						
<i>Opercularia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Epistylis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Carchesium</i>					+						
<i>Zoothamnium</i>					+						
<i>Tokophrya</i>		+			+						
<i>Podophrya</i>	+		+		+		+				
<i>Anisonema</i>					+						
<i>Synura</i>					+						
<i>Acineria</i>					+						
<i>Trychelophyllum</i>					+						
<i>Urozona</i>					+						
<i>Colpidium</i>					+						
<i>Aspidisca</i>			+	+	+				+		
<i>Amphileptus</i>				+							
<i>Chilodonella</i>				+							
<i>Dichilum</i>					+						
<i>Centropyxis</i>			+								

Note : A = Minamihiyoshi, B = Minamiurawa, C = Sōkamatsubara
D = Yurigaoka, E = Makomanai, F = Higashimurayama,
G = Nishikeyaki H = Sunagawa I = Tsuruse J = Higashikurume

The protozoa vary somewhat from those in the separate systems mentioned above, but again some genera appear to be generally present. Quantitative comparison of the genera is impossible from Table 4, but the basic genera can be seen. They varied slightly in numbers and in individual characters in different separated systems.

The basic genera were *Amoeba*, *Vorticella*, *Opercularia* and *Epistylis*, *Tokophrya*. *Chilodonella*, *Aspidisca*, etc. did not predominate as they did in combined systems. The order of the frequency of numbers was *Vorticella* > *Opercularia* > *Epistylis* in separated systems and *Vorticella* > *Epistylis* > *Opercularia* in combined systems. Thus the protozoa-population in

separate systems can be described as the VOE type.

(3) Human excrement (supernatant) systems

Most of human excrement systems are the supernatant fluid of digested human excrement. The quality of the activated sludge in these systems depends on the quality of the water used for dilution of the supernatant (river water, spring water, tap water, sea water etc.) and the dilution ratio or load. These facts affect the protozoa-population. In the present report, river water, underground water and tap water were used at dilution ratios of 10 to 20 (average 10). Data on samples obtained under these conditions are shown in Table 5.

When spring water was used for dilution, 7 genera of protozoa were detected in the supernatant system of activated sludge, for fewer than in the other two types of systems described above, these protozoa included 2 species of: *Opercularia* 1 of *Epistylis* and 2 of *Vorticella*. The protozoa-populations in the supernatant system on dilution with river water, service water or underground water are regarded as resembling those on dilution with spring water and the Peritrichida in the populations are described as follows.

Opercularia + *Epistylis* + *Vorticella* = OEV type

The orders of dominance based on the number of individuals dominance is *Opercularia* > *Epistylis* > *Vorticella*. In general the supernatant systems in this country may have this type of composition, but the protozoa-population in any particular system depends largely on the dilution ratio, and type of water used for dilution as mentioned above.

These are various other type of activated sludge in addition to the three types of systems described above. For instance, activated sludge in a raw human excrement system diluted about 60 fold has the *Vorticella* type, and a special combined system characterized by a high content of dyeing waste water containing dye has the VC type (*Vorticella* + *Carchesium*). In the case of organic waste water, the protozoa-population differs considerably with the chemical composition of the waste water, but it is frequently of the VEO type or VOE type. Table 6 summarizes the compositions and types of protozoa-populations in various sewage systems.

4-3 Protozoa vs. water quality

As described above, different raw water systems have different protozoa-populations. The probable causes of the differences are in the quality of water and operation conditions (load, composition of influent raw water amount of air water temperature, etc.). It is uncertain how the quality of the different raw water systems should be characterized.

Table 5. Composition of the protozoa-populations in activated sludge of digested supernatant system.

Location	A	B	C	D	E	F
<i>Opercularia</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Epistylis</i>	+		+	+		
<i>Vorticella</i>		+				
<i>Pyxidium</i>		+				
<i>Colpoda</i>		+				
<i>Amoeba</i>		+				
<i>Monas</i>	+	+				

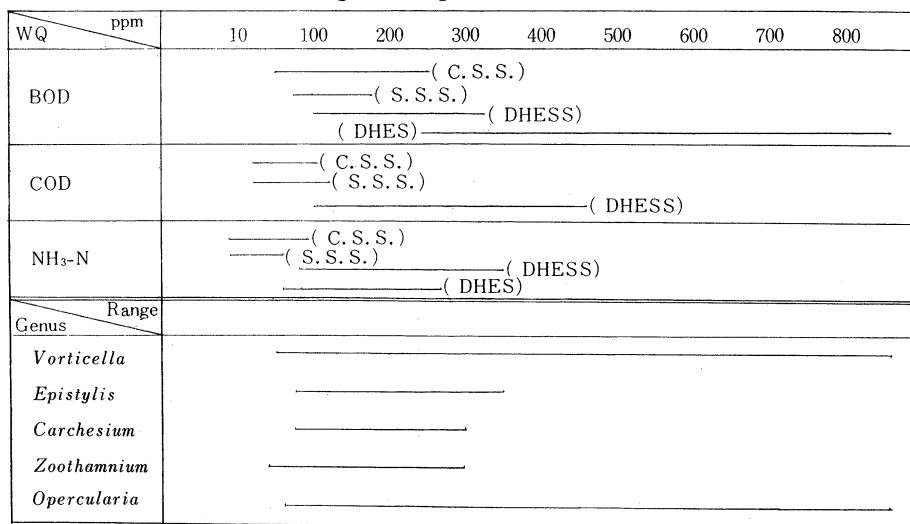
Note A=Arao, B=Konan, C=Hiratsuka, D=Kumamoto, E=Tsubame, F=Wakamatsu.

Table 6. Composition of protozoa-population vs. sewage system.

Raw Water	Dominant Genera in population structure	population type
Combined sewage systems	<i>Amoeba, Aspidisca, Vorticella, Epistylis, Opercularia</i>	VEO
Separated sewage systems (housing sites sewage)	<i>Amoeba, Lionotus, Vorticella, Opercularia, Epistylis</i>	VOE
Supernatant of digested human excrement	<i>Opercularia, Epistylis Vorticella</i>	OEV
Diluted raw human excrement system	<i>Vorticella</i>	V
Special combined sewage system	<i>Vorticella, Carchesium</i>	VC

Note : This classification of population types are based on the composition of the Peritrichida in the protozoa-population. Typical waste water systems and their types are as follows. Butchery, protein, beer waste water, etc. : VEO type. Dyeing waste water, weak phenol waste water, etc. : V type. Antibiotics, Alcohol waste water, etc. : OEV type

Fig.1. Ranges of Peritrichida



Note : C. S. S.=Combined Sewage System D. H. E. S.=Digested Human Excrement Supernatant System
S. S. S.=Separate Sewage System D. H. E. S.=Diluted Human Excrement System

Using the BOD concentration of the influent raw water (aeration tank) for this purpose, Fig. 1 is obtained which shows the range of BOD concentrations at the time of investigation and the concentration ranges of the basic genera of Peritrichida detected in the activated sludge.

This figure shows the ranges of concentrations (maximum-minimum), at which the protozoa were detected not there quantitative distribution. The range shown for each genus is the combined ranges of the different species detected in the genus. For example in the genus of *Vorticella*, *Vorticella Companula* and *Vorticella alba* were detected at

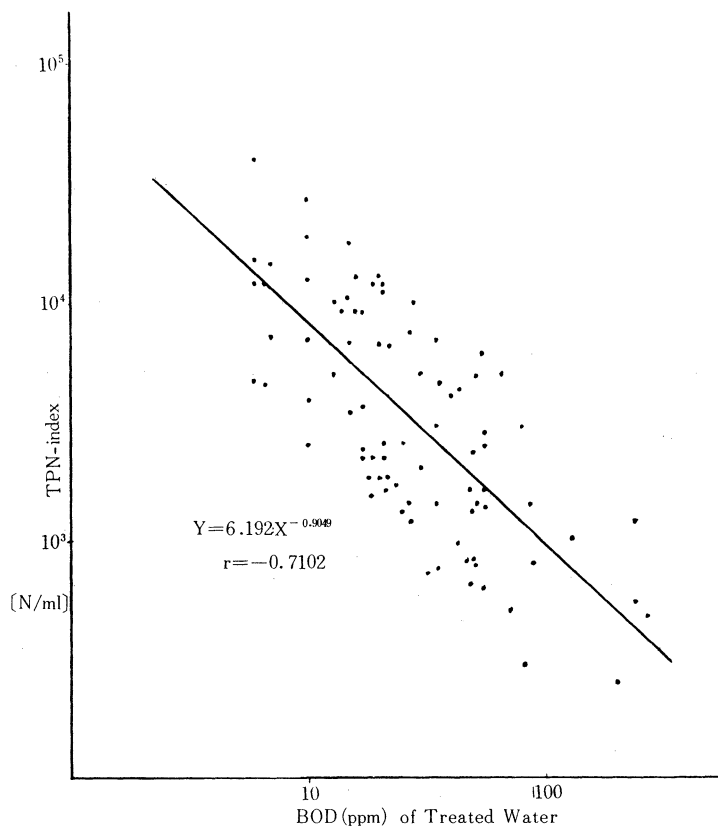
low BOD concentrations, and *Vorticella microstoma* at high concentrations and thus the range of *Vorticella* is very wide. This point confirms the idea that *Vorticella* and *Opercularia* have the greatest ecological value in the Peritrichida.

4-4 Indication of water quality or condition in terms of Protozoa

The Peritrichida are very widely distributed so the possibility of assessing the water quality or conditions in terms of Peritrichida was examined. There have been many previous attempts to indicate the purifying nature of activated sludge in terms of the protozoa in them, notably those of Horasawa in this country. The author has devised various indices based on the Peritrichida which are in sewage sample. These were based on the following:

- 1.a. The type of Peritrichida present
 - Peritrichida index
- b. The condition of the Peritrichida in the activated sludge protozoa-population
 - Protozoa index (2P+G)
 - PC index (P/C method)
- 2.a. The total number of cells of Peritrichida in a unit volume of activated sludge
 - TNP index

Fig. 2. TPN index vs. BOD concentration of treated water



- b. The number of specific cells of Peritrichida in a unit volume of activated sludge -NSP index

These indices were examined in relation to the water quality or conditions at the time of sampling of the activated sludges. First, each system will be described briefly.

a) Peritrichida index

This system classifies the activated sludge of a raw water system (sewage system) as VEO type, OEV type or in terms of the composition of Peritrichida in it, and can be used to determine the general kind of raw water system or to estimate the approximate BOD concentration.

b) Protozoa index and PC index (Peritrichida/Ciliophora $\times 100$)

The protozoa index is given by $2P+G$ where P denotes Peritrichida and G all the other genera identified of the protozoa-populations in the activated sludge. It is a fair index of the BOD of influent water or treated water, COD of treated water, or BOD removal rate (%). The PC index is based on the protozoa index, but it is the ratio of P (Peritrichida) to C (Ciliata).

c) TNP index and NSP index

Both indices are based on the protozoa index or PC index, but numbers of cells of

Fig. 3. V-NSP index vs BOD loading (BOD. kg/MLSS-k/D) of aeration tank.

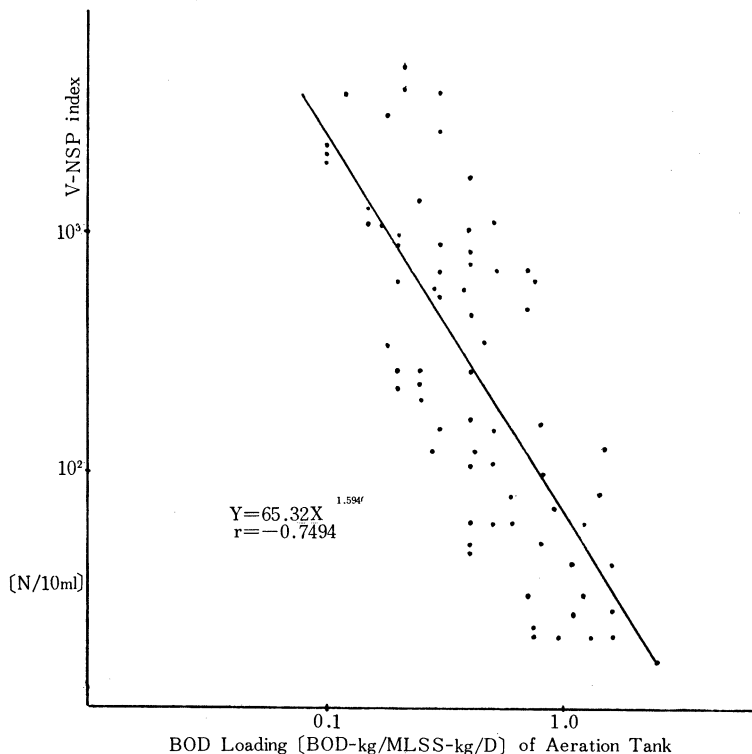
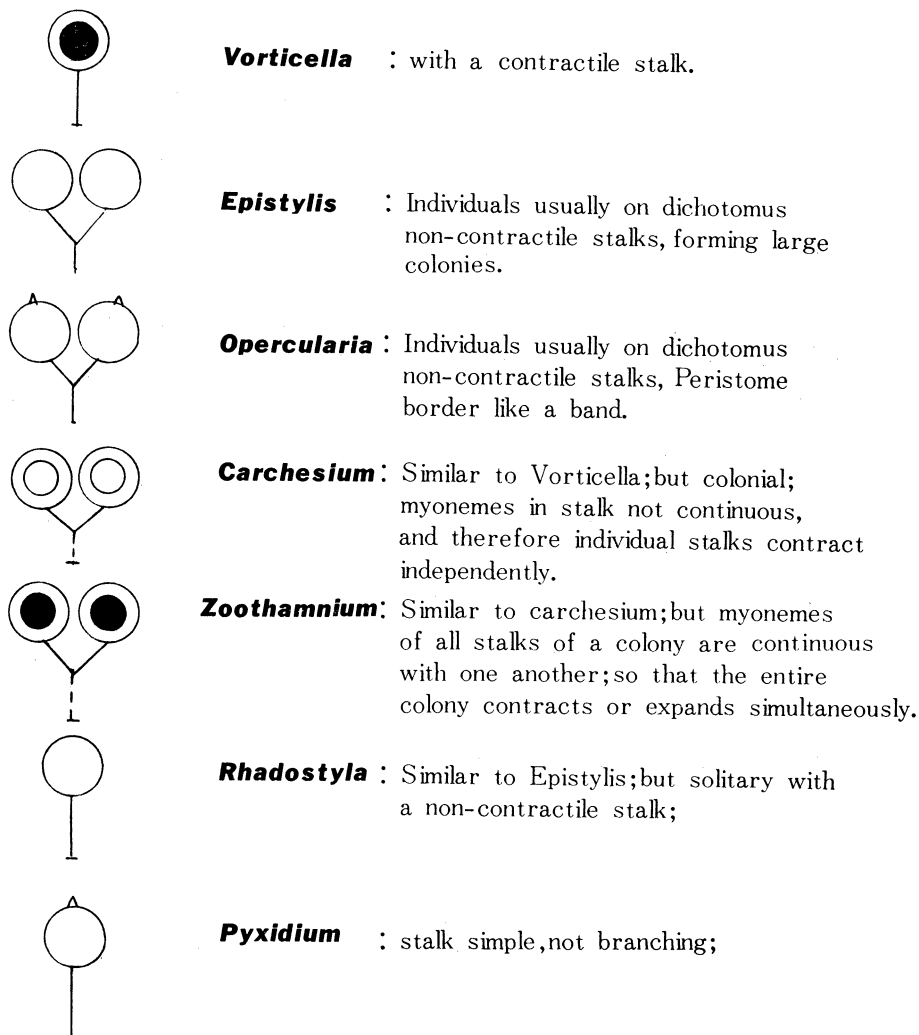


Fig. 4. Characters of peritrichida



Peritrichida in activated sludge are used. The TNP index is given by the total number of Peritrichida, and the NSP by the number of any specific genus such as *Vorticella* or any specific species of Peritrichida such as *Vorticella microstoma* in a unit volume of activated sludge. The relationships shown in Figs. 2 and 3 were obtained with these indices, and can be used to deduce the water quality or condition of the system. The results obtained with these indices are more exact than those with the other indices mentioned above. (In practice, the NSP index on *Vorticella* is called V-NSP index on *Vorticella microstoma* is called the Vm-NSP index, etc.)

These various indices based only on the Peritrichida present mentioned above do not give a complete indication of the conditions of any particular system: many more indices and further detailed examination are necessary. Efforts to find such relations, however, will lead to more exact maintenance and control of each plant from the

Table 7. Index systems and their application

Index	Purpose	Remarks
Peritrichida index	Classification of Raw water (Sewage System)	VEO type : combined system V type : raw human excrement (Diluted) VOE type : separated sewage system OEV type : Digested supernatant human excrement
	BOD concentration	VE type : BOD 75 to 200 ppm VO type : BOD 100 to 300 ppm O type : BOD 850 ppm min. V type : BOD 50 ppm max.
Protozoa index	Influent Water BOD Treated Water BOD Treated Water COD BOD removal (%)	Protozoa index < 15 : BOD 100 ppm min. Protozoa index > 10 : BOD 15 ppm max. Protozoa index > 10 : COD 15 ppm max. Protozoa index > 10 : BOD Removal 80% min.
PC index	Treated Water BOD BOD removal (%)	PC index > 50 : BOD 10 ppm max. PC index > 40 : BOD Removal 80% min.
TPN index	Treated Water BOD	$y = 6.192x^{-0.905}$ $r = -0.712$ $y = \text{TPN} - \text{index}$, $x = \text{treated water BOD}$
NSP index (V-NSP)	BOD Loading	$y = 65.32x^{-1.5940}$ $y = \text{V} - \text{NSP index}$, $x = \text{BOD Loading}$ $r = -0.7494$

biological point of view, than the present time-consuming methods such as chemical analysis. Values of indices presented in this report are averages of values for various raw waters, ranging from combined systems to waste water, and will differ slightly from raw water systems of actual plants.

Fukada and Nigami reported similar results on the sewage plant in the Central area of Fukuoka-city. Their data also show that indices on Peritrichida are practical.

To facilitate the application of this method, various characters of Peritrichida are shown in Fig. 4. Using this table, even a person who is not familiar with protozoan taxonomy will be able to apply the TNP index or NSP index with relative ease.

A few examples of the applications of these indices are shown in Table 7. Selection of a particular index should be determined by the purpose for which it is required. The TNP-index and NSP-index may be the most generally.

5. DISCUSSION

The species of protozoa present in activated sludge have not yet been fully identified. Further knowledge on the effects of various conditions on activated sludge and careful laboratory experiments are necessary. This report described qualitative and quantitative studies on the compositions of the protozoa-populations in activated sludge specimens

from various actual plants. The compositions of the protozoa-populations investigated are reported together with index systems developed based on the results.

Few theoretical considerations of the results were given to reduce the length of the paper, and so unfortunately readers may not fully understand the results. However, this paper shows that Peritrichida provide a good indication of the conditions of activated sludge, its purity and the quality of the water.

Establishment of operational standards for each sewage system or plant require for the study. Values in this report only apply to the general conditions in the systems. Thus they are only approximate, and values for particular branch systems will differ from those of the stem system.

Technical matters such as definitions of a unit volume of activated sludge (sample size), Peritrichida identification standard, etc. used in this investigation were also omitted from this paper. Details of these matters, and for the data on species of protozoa identified will be published separately.

The author wishes to thank all the many people who helped in this work in sampling of activated sludge, examination or treatment of data, etc. Criticism, instruction or supply of appropriate data from any person interested in this subject will be appreciated.

REFERENCES

- 1) Hall, R.P. (1953) Protozoology, Prentice-Hall, pp. 682.
- 2) Corliss, J. (1961) The Ciliated Protozoa, Pergamon Press, pp. 310.
- 3) Curds, C.R. and Vandyke, J.M. (1966) The feeding habits and growth rates of some fresh water ciliates found in activated sludge plants. *J. appl. Ecol.*, 3. 127-128.
- 4) Curds, C.R., Cockburn, A. and Vandyke, J.M. (1968) An experimental study of the role of the ciliated protozoa in the activated sludge process. *J. Inst. Wat., Poll. Cont.*, No. 3 2-19.
- 5) Fukada, T. and Nikami, T. (1968) Studies on activated sludge fauna of the sewage treatment plant for the central area of Fukuoka-city. Abstract. Japan Sewage Works Association (in Japanese)

第3回日本原生動物学会大会記事特集

日本原生動物学会概況

大会長 尾崎佳正博士

会場 広島平和記念館 広島市中島町1～2

会期 昭和44年10月29日(水)

日程

—午 前—

10:00～10:05 開会のことば
 10:05～10:50 総 会
 幹事報告
 11:00～12:00 特別講演 1

—午 後—

13:00～14:00 特別講演 2
 14:10～16:40 一般講演 1～7
 16:40 閉会のことば

講演目次

特別講演

- 1 コクシジウム研究の諸問題……………角田 清 (家畜衛試)
- 2 トキソプラズマとその免疫反応……………常松之典 (東大, 医科研)

一般講演

- 1 テトラヒメナの同調性誘導の分子的機構……………渡辺良雄 (予研, 病理)
- 2 移植活性汚泥の順応過程における原生動物群集の挙動について
……………盛下 勇 (荏原インフィルコKK, 研究部)
- 3 *Trichomonas vaginalis* のリンゴ酸脱水素酵素の活性と局在について
……………○浅見敬三, 田中耕誠
河村信夫, 竹内勤 (慶大, 医・寄生虫)
- 4 コクシジウム原虫の宿主特異性
……………角田 清 (家畜衛試), ○堤 可厚 (第1製薬), 野亦克弥 (日本大学)
- 5 *Microsporidia* における Polar filament に関して
……………松林久吉, ○赤尾信吉 (慶大, 医・寄生虫)
- 6 血液ならびに組織所見からみたマウス実験 *Toxoplasma* 症の検討
……………○奥木 実, 古谷正人, 伊藤義博
岡 好万, 尾崎文雄 (徳島大, 医・寄生虫)
- 7 *Toxoplasma* 症の Immune Adherence Hemagglutination Test
……………○鈴木 守, 常松之典 (東大, 医科研)

特 別 講 演

1 コクシジウム研究の諸問題

角 田 清
農林省家畜衛生試験場

Some Problems on the Studies of Coccidia

Kiyoshi Tsunoda

National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo

一般に孢子虫類は異なる2つの宿主間で無性、有性生殖を行なうものが多いが、*Coccidia* は同一宿主内で、これら2つの生殖を行なうという性質を持っている。このため孢子虫類の研究には最も適した材料の一つといえる。

Coccidia のうち、脊椎動物、特に温血動物に寄生するものは往々宿主に致命的な障害を与えるものがあり、そのほとんどが *Eimeria* 属のものであることから、*Eimeria* についての研究は多い。しかしこれらは主に病原体としてあつかわれているため、病原性の有無の識別については、くわしく研究されているものがあるが、その生物学的性状、特に生化学的研究は比較的近年に開始され、その数も少ない。

分類学的には従来 oocyst の形態を重視してきたため、1つの動物に寄生する *Coccidia* の種類についても、その同定には多くの混乱がみられる。一方家畜のように多くの品種、系統が人為的に作り出されたものについては、その祖先形動物と同一の *Coccidia* が寄生しているかどうか、についても資料が少ない。

Coccidia の無性生殖体は、その増殖の形態が *Plasmodia*, *Leucocytozoon*, および *Toxoplasma* の増殖形虫体ともよく似ている。更に形態だけでなく、その生理機能も類似していると推定される。たとえば、*Coccidia* の schizont を選択的に殺滅する 6-sulfanilamido・2・4-dimethoxyprymidine などは上記の各種原虫の schizont に同様の殺虫効果を示す。

2 トキソプラズマ症の免疫学的研究

とくに体液性免疫に関する諸問題

常 松 之 典
東京大学医科学研究所

Immunological Studies on Toxoplasmosis:

Humoral Factors Involved in Immune Cytolysis Phenomenon

Yukinori Tsunematsu

Department of Bacterial Infection, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo

原虫感染症の免疫学は病原原虫の実験室内取扱にまつわる種々の困難性のために、他の微生物感染

症のそれとくらべ、進歩が遅れがちである。しかし、トキソプラズマ（以下Tと略す）は取扱いが比較的容易であるので、T感染症の免疫学的研究は、原虫感染症のモデルとして注目されるべき立場にある。

我々の教室ではT感染症の体液性免疫と細胞性免疫について、基礎と応用の両局面について関心をはらってきた。現在それらについて系統的に記述しうる段階ではないが、本稿ではとくに体液性免疫に関する諸問題について、現在までにえられた知見の概要を述べることにしたい。

〔1〕 T原虫の糖と脂肪酸

Tsunematsu の方法¹⁾によって純化したT原虫を用い、ガスクロマトグラフィーによって Yamakawa & Ueta が構成糖をしらべたところリボース、マンノース、グルコースが証明された²⁾。また構成脂肪酸としてはミリスチン酸、パルミチン酸、hexadecenoic acid、ステアリン酸、octadecenoic acid、octadecadienoic acid が見出された（未発表）。このことは糖と脂肪酸の構成においてT原虫が一般の動物細胞と近似していることを示すものである。抗原との関係は不明である。

〔2〕 抗原の純化と化学的性質

抗原については沈降反応によって4種の存在が Chordi ら³⁾によって認められたが、純化して化学的性質を明らかにした報告はない。抗原の所在については Lunde & Jacobs⁴⁾が色素試験抗原は膜に、赤血球凝集試験抗原は細胞質に主としてであると報告し、Suzuki & Tsunematsu⁵⁾は immune adherence test に関与する抗原は不安定ないし易溶出性の膜抗原であろうと推定しているに過ぎない。

我々は赤血球凝集試験に関与する抗原の純化を試み分画遠心、カラムクロマトグラフィー、塩析、蔗糖密度勾配超遠心などを検討したが、抗原活性の純化・濃縮には機械的に破壊した原虫の抽出液を出発材料とし、まず 100,000×g 超遠心上清をとり、これを Sephadex G-200 のカラムにかけてゲル濾過して第1ピークをとるか、あるいは60%硫酸飽和して塩析しその沈澱を透析して、ついで蔗糖密度勾配超遠心すると、いずれの場合も活性が 6.9S 分画に集中し、硫酸分画の場合では蛋白質当りの比活性が230倍に達し、収量も極めて良いという成績をえた。また活性はトリプシン消化による蛋白質の分解と平行して減弱することから、抗原の蛋白性を推定した⁶⁾。なお、沈降速度および Sepharose 4B または 2B によるゲル濾過における態度よりみて、本抗原は兎の IgG 抗体とはほぼ同一の分子量を有するものと考えている⁷⁾。純化抗原分画は皮内反応活性、補体結合試験活性を有していた。

〔3〕 T感染における IgM, IgG 抗体の出現情況

兎の実験的T感染における IgM, IgG 抗体の出現、消長を、経時的に採取した血清の Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーによる分画の抗体活性の測定およびメルカプトエタノール処理による活性低下の有無から追求したところ、赤血球凝集試験活性は2,3週目には主に IgM 分画にあり、4週以後は IgG 分画にうつること、色素試験活性も同様であるが IgG 分画の活性が5週以降低下の傾向にあること、補体結合試験活性は IgM 分画では抗補体作用のため不明であるが、IgG 分画では4週以後に発現し、比較的早期に減少していくことが分かった⁸⁾。全血清のメルカプトエタノール処理による抗体活性の低下あるいは間接蛍光抗体法による IgM 抗体の証明は、Remington ら⁹⁾によってT感染の時期の推定に役立つことが報告されている。

〔4〕 抗体構造と抗体活性

T感染兎血清より IgG 抗体を純化し、これをペプシン消化して 5S の F(ab')₂ のフラグメントとし、さらに還元して 3.5S の F(ab') フラグメントとし、各々の抗体活性をしらべたところ、IgG 抗体は色素試験、補体結合試験、赤血球凝集試験において活性を有し、F(ab')₂ フラグメントは赤血球凝

集試験のみについて活性があり、F(ab')₂ はいずれの試験においても活性を示さなかった。Fc フラグメントを欠く F(ab')₂ が色素試験陰性であることは、色素試験が complement dependent であることを間接的に示唆する証拠として注目される¹⁰⁾。

〔5〕 色素試験に及ぼす抗凝固剤の影響

色素試験は抗体と accessory factor がT原虫に作用したときにおきる免疫溶解現象を虫体のメチレン青染色性の喪失によって判定する試験である。T感染における体液性免疫を in vitro で如実に示す試験といえることができる。accessory factor source としては新鮮人血清が用いられるが、現在のところ accessory factor の本態あるいは新鮮人血清にふくまれている諸因子の免疫溶解現象に及ぼす影響については多くの問題が残されている。

我々は小林ら(予研)との協同研究において、従来フィブリンの析出を防ぐ意図のもとに添加されていた抗凝固剤の意義について検討し、クエン酸塩の適量をもっとも良い試験成績を与えること、その原因はメジウム中における Ca⁺⁺、Mg⁺⁺ イオン量をコントロールして、新鮮人血清中にふくまれている非特異反応因子(恐らくは抗T自然抗体)の作用をおさえ、しかも特異抗体の作用を十分に發揮しうる条件をととのえることにあると想定した^{11,12)}。この研究は色素試験の標準化、accessory factor source 検索の選択幅の拡大に貢献するものである。

〔6〕 Accessory factor source としてのモルモット血清

従来、動物血清は accessory factor source としては不適であるとされていた。我々は上記の研究結果を考慮にいれ、モルモット血清を人血清に代用しうる方法について検討をすることにし、まず幼若なモルモットの血清について、クエン酸塩のある場合とない場合におけるモルモット血清単独のT原虫に対する作用を検討したところ、Hartley 系モルモットの10日令より115日令にいたる210匹の血清について、80%以上のT原虫の染色性を示すものは、クエン酸非存在下には2匹の血清にすぎないが、存在下では100匹(48%)の血清に及ぶこと、このような102例の血清を accessory factor source として色素試験を行なってみると、陰性対照で90%以上のT原虫が染色され、陽性血清対照で所定またはそれ以上の抗体価を与える血清が67例(全モルモット血清の31%)に達することが判明した¹³⁾。より高日令のモルモット血清についての検討が望まれるが、この知見は供給者の選択と確保がむづかしい人血清に代えるにモルモット血清が用いられることを明示したもとして評価されよう。

〔7〕 色素試験における補体の意義

補体成分を選択的にこわす薬剤または物理的処理によって、新鮮人血清が容易に accessory factor 能を失うことから、色素試験には補体が必須であろうと想像されてきた。またプロペルジンの関与を示す報告もある¹⁴⁾。

我々は癌センターの協力をえて鳥巣らが集めた約10,000の人血清中 CH₅₀ ≤ 2 の低補体価を示す血清7例について accessory factor 能をしらべたところ、全例において能力が極度におとる成績をえた。また別に我々の室で accessory factor 能のない人血清が見つかり、それについて補体の9成分の定見を行なったところ、C'4 が極度に低く、さらに別の正常人血清よりC'4を精製してこの血清に加えたところ、accessory factor 能が相当程度現われてきた¹⁵⁾。これ等の事実は自然の補体欠損人血清を利用して補体の必要性を証明した例となるが、尚間接的証拠にとどまっている。accessory factor の本態が果して補体だけで充分であるのか、あるいはプロペルジンその他の諸因子も関係しているのかどうかは、今後の興味ある問題として残されている。

〔8〕 人血清中の抗マウス細胞因子と色素試験

人血清にはマウス細胞に対する自然抗体様因子がふくまれ、T感染マウスの腹腔液に感染人血清を

加え、兎の皮内に注射して中和試験が成立するのは、マウス細胞内のT原虫が人血清によるマウス細胞の溶解によって細胞外に追出され、T抗体にふれることによって成立するためであることが岩崎ら¹⁶⁾によって明らかにされた。

教室の鈴木は抗マウス細胞因子はIgMに属し、この因子の存在は色素試験においても反応の進行を促進してclear cutな成績をあげる為に貢献していることを、色素試験の進行とマウス細胞破壊の進行の経時的追求より、明らかにしている¹⁷⁾。抗マウス細胞因子を多くふくむ人血清がaccessory factor sourceとしてより好ましいとの結果もえられているが、抗マウス細胞因子はaccessory factorの本態とは関係ないものと考えられる。

〔9〕培養細胞を用いての体液性免疫実験

豚腎由来のPS細胞、RH株T原虫、感染モルモットまたは感染人血清、accessory factor様新鮮人血清の系を用い、PS細胞へのT原虫の侵入とPS細胞内のT原虫の増殖に及ぼす抗体血清、accessory factor血清および両者の影響を検討したところ、(1) T原虫の細胞侵入性については抗体血清単独ではみるべき影響がなく、accessory factor血清の協同作用があってはじめて微量の抗体血清でも阻止作用を発揮する。(2) 細胞内のT原虫の増殖は抗体血清とaccessory factor血清が高濃度に存在してもみるべき影響がないという実験結果をえている¹⁸⁾。この実験では実験系が複雑に過ぎ、結果の意味付けも困難であることが考えられるので、単純な実験系による追試の必要があらうと思われる。

原虫性疾患の免疫は一般にinfection immunityといわれ、体液性免疫の役割りが軽視されている嫌いがあるが、T感染においては細胞外にあるT原虫に対しては体液性免疫が比較的強力に作動していることが想像されるので、これに関係する諸因子の解明と体液性免疫の免疫において占める意義の評価がさらに追求されてしかるべきであらう。

文 献

- 1) Tsunematsu, Y. (1960) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 9: 556-561.
- 2) Yamakawa, T. & Ueta, N. (1964) *Jap. J. Exp. Med.* 34: 37-51.
- 3) Chordi, A., Walls, K.W. & Kagan, I.G. (1964) *J. Immunol.* 93: 1034-1044.
- 4) Lunde, M.N. & Jacobs, L. (1967) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16: 26-30.
- 5) Suzuki, M. & Tsunematsu, Y. (1970) 原生物誌 3: (一般講演7).
- 6) Fujita, K., Kamei, K., Fujita, T., Shioiri-Nakano, K. & Tsunematsu, Y. (1969) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 892-901.
- 7) 亀井喜世子, 中野康平, 常松之典 (1968) 寄生虫誌 17: 563-564 (会報).
- 8) 亀井喜世子, 藤田紘一郎, 鈴木 守, 常松之典, (1968) 寄生虫誌 17: 315 (会報).
- 9) Renington, J., S., Miller M. J., Browklee, I., (1968) *J. Lab. Clin. Med.* 71: 855-866.
- 10) Fujita, K., Kamei, K. & Shioiri-Nakano, K. (1969) *Exptl. Parasitol., (in press)*.
- 11) Kobayashi, A., Kumada, M. & Tsunematsu, Y. (1968) *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 21: 71-89.
- 12) 小林昭夫, 熊田三由, 常松之典, (1967) 寄生虫誌 16: 494-503. 同上. (1998) 同誌17: 81-85.
- 13) Kobayashi, A., Kumada, M., Suzuki, M. & Tsunematsu, Y. (1969) *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 22: 327-336.
- 14) Grönroos, P. (1955) *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniae.* 33: 310-315.
- 15) 鈴木 守, 中野康平, 常松之典, 鳥巢要道, (1968) 寄生虫誌 17: 564-565 (会報).
- 16) Iwasaki, N. & Yanagawa, R. (1966) *Jap. Vet. Res.* 14: 91-102.
- 17) 鈴木 守. (1969) 寄生虫誌 18: 159-165.
- 18) 常松之典. (1963) 第16回日本医学会総会講演集. II: 744-749.

— 一般講演

1 *Molecular basis of synchrony induction in Tetrahymena pyriformis*

Yoshio Watanabe

Department of Pathology, National Institute of Health of Japan, Tokyo

Previously, we found a phenomenon designated as “synchronous rounding”: when amino acid-starved *Tetrahymena* cells are exposed to the cyclic temperature treatment for synchronization, they attain sphericity synchronously with no accompanying division at the time when synchronous division in ordinary proteose-peptone medium occurs. The first and second synchronous roundings after the end of the heat-treatment (EHT) appear with the lapse of time which is clearly shorter than that of the cell cycle, in spite of no increase in DNA, RNA and protein amounts per cell (about 70–80% of net amounts of log-phase cell remain constant). Pulse or pulse-chase experiments with ^{14}C -thymidine, ^{14}C -uridine or ^{14}C -amino acid mixture in the induction process of synchronous rounding showed that DNA synthesis is not prerequisite to synchrony induction. Furthermore, it is shown that some redundant RNA or protein in the amino acid-starved cells may be decomposed and remodelled to essential macromolecules for the induction of synchrony and for the progression of the abortive cell cycle (rounding cycle).

On the other hand, in the induction process of synchronous rounding, conversions of water-insoluble protein to water-soluble protein and of water-soluble protein to water-insoluble protein occurred at the beginning of the heat-treatment for synchronization and in the period from EHT up to synchronous rounding, respectively. These changes were revealed from the quantitative assay of the two protein fractions and from the distribution of the pulse-labeled proteins in these fractions. This reversible response to the heat-treatment appears to be interpreted as some indications reflecting the thermo-sensitive nature of a factor(s) holding the key to progression of the cell cycle.

The set-back curves in synchronous rounding well coincide with those in synchronous division. The heat-treatment may, therefore, disturb some of the metabolic activities or structural remodelling and consequently causes the various aged cells to synchronize their physiological conditions. It is possible to offer a hypothesis that synchronization may largely be induced by the reversible conformational change of the thermo-sensitive protein(s). Simultaneously, the protein(s) controlling the time of cell cycle is assumed to be accumulated in an inactive form, since the first and second synchronous roundings occur with the time shorter than generation time of the cell.

In fact, from the analysis of electrophoretic patterns of pulse-labeled protein with ^{14}C -amino acid mixture on polyacrylamide gel, it was shown that labeled proteins from log-phase cells were separated into many bands, but during the heat-treatment in synchronous rounding system a single protein fraction moving together with front indicator (Bro-

mophenol Blue) was exclusively labeled. Molecular weight of this "front protein" was estimated to be 8,500 (0.6 S). The synthesis of this protein appeared to be requisite for the induction of synchronous rounding, since addition of 4 mM p-fluorophenylalanine to the culture during the heat-treatment prevented synchronous rounding completely. These evidences appear to further consolidate our hypothesis.

By using concentrated puromycin or cycloheximide, some protein synthesis other than "front protein" is suggested to occur from EHT to synchronous rounding (especially about 45 minutes after EHT) and to be indispensable for synchronous rounding. The molecular weight of the protein may be larger than that of front protein, since it moved more slowly than front protein on polyacrylamide gel electrophoresis. In synchronous division system, the synthesis of division protein is required after EHT to sustain cell division. Need of such a protein synthesis would hold true for synchronous rounding.

2 移植活性汚泥の順応過程における原生動物群集の挙動について

盛 下 勇

荏原インフィルコ株式会社・研究部生物研究室

Studies on the protozoa-population in acclimatization process of transplanting activated sludge.

Isamu Morishita

Biological Laboratory, Research and Development Section, Ebara-Infilco Co., Ltd.

汚水、廃水などを衛生的、生物学的見地から安全かつ無害とするために処理する施設において、その施設を運転開始する場合、他の原水系の活性汚泥を移植する場合があります。

移植の目的は運転開始とともに一定の処理水質を得ようとする場合、あるいは活性汚泥の形成を助けようとする場合の2つがある。

このような移植を行なった場合、被移植系に順応する過程において活性汚泥原生動物群集がどのような挙動を示し、順応して行くかを検討することは生態学的にも、実用面においても重要なことである。

今回は同一系の活性汚泥—原生動物群集—を異なった原水に移植した場合の挙動について検討した結果を報告する。

実験に使用した活性汚泥は脱り液性活性汚泥で、被移植原水はスキムミルク、及びペプトンを主成分とした人工汚水である。実験方法はスキムミルク・ペプトンをそれぞれ BOD=100ppm に相当するように清水中に溶解させたものをポンプを使用して実験装置に注入する方法

をとった。なお曝気槽内の活性汚泥量は、2000ppm とし、BOD 負荷は 0.1-kg-BOD/活性汚泥-kg/日となるよう制御した。

使用した活性汚泥の原生動物群集は *Epistylis* を優占種としたものである。

(1) スキムミルク廃水に移植した場合

群集は移植したのち1日目からその構成上に変化が現われ7日目あたりから安定して来る。活性汚泥の浄化能をあらわす COD 除去率は2日目あたりから徐々に高くなり、群集構成の安定とほぼ同様な挙動を示す。

このような群集構成の挙動は繊毛虫類の緑毛目を中心として追跡すると明瞭となる。すなわち PAP-index (全原生動物に対する緑毛目比率)、TNP-index (全緑毛目単位活性汚泥量中の緑毛目比率)、PC-index (繊毛虫類中の緑毛目占有比率) などである。このような index をもちいて順応完了(構成の安定)までの挙動をみると3段階に分けることができその区々は0~2日、3~9日、10日以降となる。このような過程は浄化能、あるいは活性汚泥の性状においても同様である。脱り液

性活性汚泥原生動物群集がスキムミルク廃水に順応し、安定するのには少なくとも10日間以上を必要とすることがわかる。

(2). ペプトン廃水に移植した場合

移植した群集は *Epistylis* を優占種とし、*Vorticella* を従属種とするものであった。移植後2日目あたりから群集構成上の変動が始まる。

構成上の挙動について PC-index, TNP-index, PAP-index を算出してみると移植後2日目あたりから変動が始まり、4日目～12日目あたりまで変動し、12日目付近から安定状態に入る。また浄化能、活性汚泥の性状の変動もほぼ群集の変動に一致する傾向が認められる。したがって脱り液性活性汚泥を移植し、ペプトン廃水に順応するまでに必要な日数は約12日を必要とする。

以上の如き結果からまったく異なる活性汚泥原生動物群集を移植した場合、移植した群集は構成上の変動を起しながら被移植系の群集構成に移行し、一定の期間をへて安定することが明らかとなった。また安定までの挙動は群集中の縁毛目を基準とした index を使用することによって明確にすることが可能である。群集の順応過程は上記の index を使用してみることに、おおよ

そ3つに分けることが出来る。

I. 順応予備期

II. 順応中間期

III. 順応完了期

本研究によって活性汚泥を移植することは見かけ上の安定した処理水を得るために効果があっても、その汚水、廃水系の個有な群集となって安定するまでにはかなりの日数が必要であることを充分考慮しなければならない。したがって活性汚泥の移植は類縁関係の近い系相互間で行なわれるのが望ましく、そのような状態で移植が行なわれない場合には、移植の意義はきわめて少ない。

なお移植時に起る上記の構成変動のメカニズム、については改めて報告する。

質問 鈴木 守 (東大 医科研)

活性汚泥中の Bacteria と Protozoa との関係はどの様であるか。

回答 盛下 勇 (荏原インフィルコK.K.研究部)

一応定式的なことはわかっております。特に *Peritricha* の場合には完全な Bacteria 摂食性なので Bacteria の挙動と一致します。なお次回または雑誌で報告致します。

3 *Trichomonas vaginalis* のリンゴ酸脱水素酵素の活性と局在について

浅見 敬三, 田中 耕誠, 河村 信夫, 竹内 勤
慶応大学医学部寄生虫学教室

Activity and localization of malate dehydrogenase in Trichomonas vaginalis

Keizo Asami, Kosei Tanaka, Nobuo Kawamura and Tsutomu Takeuchi

Department of Parasitology, Keio University Medical School, Tokyo

Trichomonas vaginalis のエネルギー代謝路として TCA 回路が存在するか否かの点に関しては、研究者によって異った成績が得られている。併し乍ら、同回路上の脱水素酵素活性のうち、リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性については著しく高い活性を持つとする成績が幾つか見られる。我々は MDH 活性を細胞化学、生化学、電気泳動などの方法を用いて検討することを試みた。

細胞化学的方法による他の酵素活性との比較: NBT を水素受容体として用いて、MDH, LDH, SDH 及びアルコール脱水素酵素活性の存在を比較検討した。これらのうち SDH のみは、対照として使用した基質を含めぬ反応液中での虫体と同じく、Formazan の形成による

呈色反応が現われなかった。一方 MDH, LDH 及びアルコール脱水素酵素では明らかに強く反応し、細胞質内に青色の反応物が顆粒状に認められた。

生化学的方法による活性の測定: TTC を用いたツンベルグ法によって生虫体及びガラスホモジナイザー破砕虫体につき、MDH, SDH, LDH の活性を比較した。SDH は基質を含めぬ対照と大差の無い低い活性を示し、虫体の破砕によって活性はむしろ低下したが、MDH 及び LDH の場合は対照に比べて明らかに高い活性を示し、破砕操作によって2.5～3.0倍の活性の上昇が見られた。

次で破砕虫体の遠心分画中の MDH 活性の所在を検

討した。活性測定の方法として malate を基質として TTC の還元を測定する方法と oxaloacetate を基質として加え NAD の変化を測定する方法の両者を用いて比較検討を行った。その結果 malate を基質とした場合には、24000g 遠沈上清に於て強く、沈渣には弱い活性が見られた。一方 oxaloacetate を基質とした場合には 12000g, 24000g 遠沈沈渣に強い活性が現われ、上清には極めて弱い活性が見られた。これらの成績は、細胞質内の可溶性成分中には malate から oxaloacetate への

反応を司る MDH が存在し、顆粒性成分中にはその逆反応に関与する MDH が所在することを思わせ、糸粒体を有する一般好氣的細胞と、糸粒体様構造物を欠く本原虫細胞との MDH 作用の意義の相違を示唆するものと解釈されよう。

電気泳動的方法による検討：培養虫体の凍結融解物についてセルローズアセテート膜電気泳動を行い、NBT の呈色反応から MDH のアイソザイムを検討し、易動度の異なる 2本の帯を証明することが出来た。

4 コクシジウム原虫の宿主特異性

角 田 清
農林省家畜衛生試験場

堤 可 厚
第一製薬株式会社

野 亦 克 弥
日本大学

Host Specificity of Coccidian Parasite.

Kiyoshi Tsunoda
National Institute of Animal Health, Kodaira

Yoshiatsu Tsutsumi
Daich Seiyaku Co.

Katsuya Nomata
Nihon University

鶏の *Coccidia* は鶏 (*Gallus gallus domesticus*) には、その品種、系統を問わず等しく感染するが鶏に極めて近縁の鳥類には全く感染能力を示さず、この逆もまた成立した。このような鶏の *Coccidia* は、現在地球上に生存する 4種の野鶏の *Coccidia* と同一種であった。また、ニワトリとヤマドリなど類種の鳥を人工的に受精させて F_1 を作出したところ、これらの F_1 には、両親の *Coccidia* のうち、数種のものが共通に感染することがみとめられた。

質問 岡 好万 (徳島大 医)

ヤマドリと鶏の F_1 はコクシジウムの cross infection が生ずることは興味があるが、もし孵化直後の鶏の thymus と下嚢を摘出し、その代りに孵化直後のヤマドリの thymus や下嚢を移植した場合、 F_1 と同じ結果がおこるかどうかの可能性はどうか。

回答 角田 清 (家衛試)

胸腺やフアプリウス嚢を取っても、ニワトリの場合は、コクシジウムの感染性、宿主特異性といったものには全く差異がみられませんでした。

5 *Studies of polar filament on Nosema cuniculi*

Hisakichi Matsubayashi and Shinkichi Akao

Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

Lainson et al. (1964) demonstrated the presence of coiled filament in spores by electron microscope observations. The purpose of the present study is to elucidate the ultrastructure of polar filament in the spore. Two strains were used throughout this experiment. One is separated from a mouse and the other is separated from rat sarcoma. Polar filament of these two strains were morphologically compared in detail. For the electron microscope studies, heavily infected peritoneal fluid was centrifuged, the sediment was prefixed with 2.0% glutaraldehyde for 30 minutes, fixed with 1% osmic acid solution for 60 minutes, dehydrated through graded ethanal and embedded in epoxy resin. Polar filament was protruded by the treatment of 1% H₂O₂ solution. Ultrathin sections and total negative stain materials were investigated.

The polar filament was about 15 to 20 μ in length and about 40 to 50 m μ in diameter. The filament has a darker central fibril which is encircled by two walls. The inner wall seems to be composed of a pressed coil and the outer wall looks like a definite membrane. These two walls are separated by a clear area. The polar filament is believed to be a hollow tube through which the sporoplasm emerges. In cross sections, however, it looks like a solid filament rather than a tube as long as it is located in the spore. Authors concluded that the filament is filled with some substance and is not hollow in the spore. When it is extruded the substance will be driven out of the filament and the sporoplasm will follow the substance to escape from the spore. The structure of the polar filament is essentially the same in both strains obtained from mice and rat sarcoma.

質問 柳生 亮三

微細な *Nosema* について、精細な電顕像を紹介していただきましてありがとうございました。

1. Polar filament の中心にある electron dense の部位は、filament 発射の際、protoplasma を通す役をするかと拝聴しましたが、どんな形状変化をとりましますか？ その際 filament の直径は増しでしょうか？

2. *Nosema* は節足動物に限って寄生すると一般に知られますが、マウスにも、ふつうに寄生するものですか？ 種名をお知らせ下さい。

回答 赤尾 信吉 (慶大 医)

1. Polar filament を構成する内層はコイル状になっているものと観察され、これは P.f 突出時に Action するものと考えられる。又中心に見られる electron dense な物質については現在不明であるが、小さな腔として観察される場合もあり、この様な点では恐らく拡大してその

芽体を通し得るものと考えられる。

2. 一般の DD 系マウス、又は純系として用いられるマウスに何れも認め得ます。しかしマウスは本原虫感染により斃死することなく生存し、その病原性は強くないようです。種名は *Nosema cuniculi* です。

cf: S. Akao (1969): *Jap. J. Parasitology*, vol. 13, No 2.

質問 石崎 英夫 (福岡教育大)

1. Polar filament が射出された際において P.f の基部並びに先端の部分はどうなっているか。

2. Polar filament の内部に空胞が生じるのは P.f 発育中のどの時期か。

回答 赤尾 信吉 (慶大 医)

1. Polar filament の突出状態については、撮影枚数が少なく細いことは云えないが、先端部においては L-字状に変化した形態を認める。これは新宿主細胞への侵

入に際し機械的に作用するものと考えられる。胞子内の基部は胞子壁に固定され、胞子内容物を注入する状態が観察されている。

2. 栄養型から胞子型に移行する場合、初めに胞子壁が形成されるが、殆んど同時に完成時の Polar filament

の約1/3~2/5位の若い P.f が認められる様になる。しかしこの時期では P.f 内に腔は観察されない。従ってこの様な腔は胞子移行型の後期において完成していくものと考えられる。

6 血液ならびに組織所見から見たマウスの実験 *toxoplasma* 症の検討

奥木 実, 古谷 正人, 伊藤 義博, 岡 好万, 尾崎 文雄
徳島大学医学部寄生虫学教室

Hematology and histology in experimental toxoplasmosis in mice

Minoru Okugi, Masato Furuya, Yoshihiro Ito, Yoshikazu Oka and Humio Osaki
Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima

Toxoplasma の免疫に関しては、数々の研究成果が見られているが、その致死因子にはいまだ不明の点が多い。そこで、われわれは、実験 *toxoplasma* 症について発症から死に至る機序を明らかにすることを企図し、今回は、RH 株および Beverley 株感染マウスについて、血液性状および各種臓器の解剖・病理組織変化を観察し、両株を比較検討した。まず、RH 株は原虫 10^4 コをマウスに腹腔内投与し、感染死する6~7日目に、Beverley 株は30シストを腹腔内投与し20日目に、それぞれと殺・解剖した。血液性状、剖検所見ならびに肝、脾、腎、脳、脾、胸腺および腸間膜リンパ節の組織像を検索した。その結果、RH 株感染マウスは全身諸臓器に著しい病変を呈し、とくに、肝、脾、腸間膜リンパ節、横隔膜に強度の炎症像を認めたが、Beverley 株感染マウスでは、脾およびリンパ節の著明な腫脹のほかは明らかな変化は見られなかった。赤血球数および白血球数は両株ともわずかに減少し、血液像では RH 株にリンパ球の減少、好中球の増加が著明であった。組織像については株間に著明な相違点が認められた。すなわち、RH 株では肝の著しい壊死、脾の壊死ならびに結合織の増生、Beverley 株は肝のクッペル星細胞増生、グリソン鞘およびジッソイド内細胞浸潤、肝細胞変性、肺胞壁の肥厚増生、リンパ節の濾胞膨大および高度の壊死が特徴的であった。次に、RH 株 10^4 コ、Beverley 株 50~100 シストをそれぞれマウスの腹腔内に投与し、1, 3, 5, 7日目に、Beverley 株投与マウスはさらに10日目に、と殺、解剖した。その成績は、1) 血液性状は、RH 株では赤血球数のわずかな減少、白血球数の一過性増加に

続く減少が見られたが、Beverley 株では白血球数に減少が認められた。血液像は両株ともリンパ球の減少、好中球の増加および単球の一過性の増加の著明で、RH 株のみ好酸球が一過性に増加した。ヘモグロビン量は両株とも一過性に増加した後減少し、とくに RH 株において減少が著明である。2) 血清酵素については、GOT, GPT 値は両株とも著しく増加し、RH 株は GPT, Beverley 株は GOT 活性値の上昇がそれぞれ高度である。3) 臓器重量は、RH 株の場合、早期に脾、腸間膜リンパ節に一過性の増加が見られ、7日目は両株とも肝重量の増加、脾および腸間膜リンパ節重量の顕著な増加、胸腺重量の減少がうかがわれた。

質問 鈴木 守 (東大 医科研)

マウスが RH 株の感染を受けたのち、肝硬変がおこったという事であるが、肝実質細胞を弾性線維がとりかこんでいる像がみえたのか。

回答

小葉中間帯に弾性線維の増生と思われる像がみられました。

質問 浅見 敬三 (慶大 医)

1. *Toxoplasma* を含まぬ接種物を接種した対照マウスでの病変の有無如何?

2. 接種後早期には、果して生体が各臓器に存在し、増殖していたか否か。

回答

1) 接種原虫は汙過および遠心洗浄の操作により大半の宿主由来の細胞を除いています。したがって原虫以外のものによる作用はほとんどないと考えましたので、こ

質問の実験は行なっておりません。

2) 接種後早期の原虫増殖と臓器変化は大変興味ある問題と考えています。感染早期では臓器重量、解剖所見

および病理組織像と検索しましたが、原虫の検出ができませんでした。

7 *Immune adherence test for toxoplasmosis*

Mamoru Suzuki and Yukinori Tsunematsu

Department of Bacterial Infection, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo

Immune adherence was discovered by Nelson in 1953 and was defined as the complement-dependent adherence of certain indicated particles, such as non-sensitized human erythrocytes to antigen-antibody complexes. It has received attention because of its great sensitivity for the detection of antibody, antigen, antigen-antibody complex or complement components. Successful application of this test was reported in various infectious diseases and other conditions of immunological interest.

The application of immune adherence test to the detection of toxoplasma antibody was attempted. The results indicated that the following procedure seemed to be recommendable to obtain clear cut results in the test.

The antigen is the purified toxoplasma suspended in gelatin veronal buffer added with 0.00015M Ca^{++} and 0.0005M Mg^{++} (GVB $^{++}$) at the concentration of 5×10^7 organisms/ml. RH strain toxoplasmas used as the antigen were harvested from mice infected 3 days earlier. The ascite was withdrawn with syringe by injecting 1.5 ml of saline and pumping it out again. The centrifuged sediments without red cell contamination were pooled in a siliconized tube and washed by repeating centrifugation at the speed of 1500 r.p.m. for 5 minutes. The washed parasite suspension was filtered through a glass filter of 25–30 micron pore size to eliminate the peritoneal cells mixed with the free toxoplasma. The filtrate was centrifuged at the speed of 600 r.p.m. for 10 minutes and the supernatant was collected as the source of antigen.

The antibody is the serial dilutions in GVB $^{++}$ of dye test positive pig serum 1:4096 in titer. For the microtitration, dye test positive and negative human, pig and mouse sera were prepared.

The complement is the 1:120–1:150 dilution in GVB $^{++}$ of dye test negative new born guinea pig sera.

The indicator is the human O type red cells suspended in GVB $^{++}$ at the concentration of 2×10^8 /ml.

One tenth ml of antigen, 0.1 ml of each antiserum dilution and 0.1 ml of each antiserum dilution and 0.1 ml of complement were added in this order to 0.6 ml of GVB $^{++}$ in small test tube. The mixture were incubated at 37°C for 30 minutes with constant shaking, added with 0.1 ml of the indicator and incubated further at 37°C with constant shaking, for 10 minutes and was left unagitated at 37°C for 60 minutes. The agglutination of the red cells were dispersed homogenously at the bottom of small test tube, whereas, negative

controls showed no such pattern. Negative controls containing antigen showed very slight agglutination but the spreading of the agglutinated red cells was very limited and the strong ring of the accumulated unagglutinated red cells was formed. The agglutination grades were recorded as +4, +3, +2, +1 and 0 according to the macroscopical observation on the test tube bottom.

The results were clear cut when microtiter system was applied. Microtiter plate (Linbro, IS-MRC-96) was filled with 2 drops (0.05 ml) of GVB⁺⁺ using microdropper (Tominaga). The prepared sera were diluted serially using microdiluter loop (Tominaga). After adding 1 drop of antigen, 1 drop of complement, the test system was incubated at 37°C for 30 minutes with constant vibration on micromixer (Taiyo Bussan). Added with 0.1 ml of indicator red cell, the plate was agitated for 10 minute in the same incubator. The results were observed after leaving the plate unagitated for 60 minutes at the same temperature. It was found that dye test negative sera were completely negative whereas positive ones were higher in titer than that of indirect hemagglutination test or dye test.

It may be worthwhile to mention that the toxoplasmas used as the antigen must be fresh and devoid of particulate contamination such as mouse cells and their debris. The parasites kept in saline for a few days or treated with formalin alcohol and glutaraldehyde lost their reactivity in immune adherence phenomenon. Ruptured parasites by freezing and thawing also showed no reactivity. These findings seems to suggest that certain antigenic components contained in the parasites would be diffuse away easily or modified in situ by the fixation treatment described above.

第3回国際原生動物学会議に出席して

樋 渡 宏 一

東北大学理学部生物学教室

第3回国際原生動物学会議 (Third International Congress on Protozoology) は1969年7月2日から10日までレニングラードで開催されたが、私は日本学術会議から派遣されて出席したので、その様子を簡単にお知らせしたい。学会が行われたのは Taurida Palace とよばれる古い王宮で一時議事堂に使われたこともあるという白壁の立派な建物で、5会場に分れて各 session が行なわれた。日本から出席したのは前からヨーロッパに滞在しておられた法政大学の菅野文和教授と私の2人だけで、日本よりも国力が劣ると考えられる国からも20人以上もの出席者があったのにいささか淋しい感じであった。出席者は閉会式での Poljansky 教授の報告によると、741名でソ連以外で一番多いのが米国の72名、以下多いのは英国51名、フランス30名、ポーランド25名その他であった。

第1日目は午後2時から開会式があり、組織委員会の chairman の Poljansky 教授の挨拶のあと英国の Garnham 教授とソ連の Moshkovski 教授の特別講演があった。翌日から5会場に分れて各 session が行なわれたが、第1会場である Grand theater とよばれるシャンデリアの輝く大ホールでは毎日午前中招待講演が行なわれ、細胞学、微細構造、形態形成、生態学、遺伝学、生化学の各分野について半日ずつ最近の研究の綜説的な紹介が行なわれた。私は遺伝学のときの座長をつとめたが、このときのスピーカーは英国の Beale、米国の Siegel、同じく Preer、イタリアの Crippa-Franceschi 女史の4人で、Beale は繊毛虫を用いての生化学的な研究の紹介を行ない、特にアイソザイムの研究や、繊毛抗原蛋白について詳しい紹介があった。Preer はカップヤラムダなどのような繊毛虫の細胞質内の自己増殖粒子についての最近の研究の発展について話し、とくにカップ内の R-body にみられるウイルス様粒子についての研究は注目をあびた。Siegel は接合型の研究についての綜説を行ない、接合型の遺伝を統一的に説明するための彼独自の説を展開した。Crippa-Franceschi 女史はいわゆる 'Dauermodifikation' の問題に関する最近の研究を紹介し、これが大核ではなく細胞質に原因を求めべきであることを主張した。その他の分野では細胞学はあまりパツとした講演はなく、微細構造では Wohlfarth-Bottermann (西独) が電顕による微細構造の研究からアメーバ運動の機構を論じ、また Pitelka 女史 (米) は繊毛虫の cortex の微細構造とくにキネトソームについての研究を紹介した。生態学の分野では Losina-Losinsky (ソ) が火星上の条件を人工的に作って繊毛虫がそのような条件下でどうなるかをしらべ、低温に適応し生活環の短いものは食物さえあれば火星上でも生存するかも知れないことを暗示した。生化学の分野では Dryl (ポーランド) は原虫の motor response に関する研究を紹介し、日本の木下治雄教授一門の研究を高く評価し、Zeuthen と Rasmussen の同調培養のときの生化学的な変化の研究を Rasmussen が紹介し、形態的なものは synchronize するが生化学的なプロセスは synchronize しないという結論を発表した。

一般講演では法政大学の菅野教授がアメーバ運動についての映画を発表し好評を受け、また私はゾウリムシの接合型遺伝子の調節について発表した。一般講演については私の専門分野である細胞学、遺伝学の講演しかきくことができなかったが、その中で注目したのはスペインの Pérez-Silva らの *Stylonichia* の大核原基の成長のときに現われる polytene chromosome の研究で、スライドをみただけだと *Drosophila* の唾腺染色体とまちがう程で、puffing 様の構造まで現われていた。しかしてこの puff 様構造には H^3 -uridine のとり込みは見られなかったという。同様の研究はこの学会の

あとで行なわれたパリ郊外オルセイでの Ciliate Genetics Conference でも Ammerman (独) によって発表されたが、今後大きく注目される研究であろう。閉会式ではポーランドの Michajlow の特別講演があった。その他の詳しいことはナウカから出版された 'Progress in Protozoology' (Abstracts of papers read at the 3rd International Congress on Protozoology) を見ていただきたい。但しこの abstract は申込んでいたが実際に講演しなかったものも含まれているし、又実際の講演内容とは可成りちがっているものの中にはある。講演は Grand Theater で行なわれた Plenary session のものは英独仏露 4 カ国語の同時通訳が行われ、これは非常に流暢な通訳だったが、普通の session のは露語の講演は英語に、露語以外の講演は露語に通訳されたが、このときの英語は概してききにくいのが多かった。しかしこの通訳は殆んど会議の運営にも当たったソ連の原生動物学者がやっていたようで、一方でいろいろな学会の運営にかけまわりながら通訳の番がくるとボックスに入って通訳の労をとっていたのには敬服した。

学会の期間中、レニングラードシムフォニオーケストラへの招待や、エルミタージュ美術館の見学、市内見物などが学会の世話で行なわれ、また 7 月 6 日には帝政時代の Summer resort で噴水の美しい Petrodvoretz へのエクスカージョンがあった。また遺伝学関係者と生理学関係者が郊外の美しい森にかこまれたレニングラード大学生物学教室に招待され、菅野教授と私も招かれたが研究室での晩餐に出されたウォトカやコニャックが効いて帰りのバスの中は各国の歌の交歓会になり楽しい思い出となった。

会期中に International Commission on Protozoology が組織委員長の Poljansky 教授のオフィスで開かれ、私は猪木会長の代理で出席した。出席したメンバーは Poljansky (ソ), Raikov (ソ), Gahnem (英), Puytorac (仏), Raabe (ポーランド), Chapman-Anderson 女史 (デンマーク), Pitelka 女史 (米), Honigsberg (米), Qadri (印) などで、議題は 1) IUBS との関係、2) 第 4 回国際会議の場所、3) イスラエル問題、の三つであった。先ず IUBS (国際生物科学連合) に対する代表と International Commission on Protozoology とはこれまで別だったが一緒にするという提案が Poljansky 教授から出され、各国代表の意見をきかれ、結局万場一致の賛成をえ、これは閉会式の時総会にかけられ可決された(内容は文末参照)。ついで第 4 回の Congress はフランスで行なうこと、Congress を 4 年毎にやるか 5 年毎にやるかは新しい Commission にまかせることにしたが、今回は 1973 年と決定した。最後にイスラエルからの苦情について、Poljansky 教授から種々努力を重ねた経過について詳しい説明があり、一同了承し且つ Poljansky 教授の努力に対し謝意を表した。(イスラエル問題というのはソ連で開催される国際学会にイスラエル代表の出席が困難なことについてのイスラエルの苦情であるが、今回は Poljansky 教授がウィーンのソ連大使館を通じてイスラエル代表にヴィザが下りるように努力され、これが可能になったが、結局出席者はなかった)。

以上で大体の様子をお知らせしたつもりであるが、さらに詳細をお知りになりたい会員の方は私か法政大学の菅野教授に直接たずねて下さるよう希望します。なお、私はこの会議のあとフランスの Orsay で開かれた国際繊毛虫遺伝学コンフェレンス (Ciliate Genetics Conference) に出席したが、この方の詳細は又別の機会にゆずりたいと思う。

Resolution regarding the composition of the I.U.B.S. commission on protozoology

In keeping with the spirit of the Resolution adopted in Plenary Session by the Second International Conference on Protozoology (London, 1965), the Society of Protozoologists supports the concept of broad international representation in the Commission on Protozoology of the International Union of Biological Sciences.

To implement this Resolution, we propose that:

1. Responsibility for the affairs of the Commission on Protozoology of IUBS shall be vested in a Governing Board.
2. The Governing Board of the Commission shall be composed of representatives named by national groups of protozoologists in the following way:
 - (a) three representatives from each group of 300 or more members,
 - (b) two representatives from each group of 100 to 300 members,
 - (c) one representative from each group of fewer than 100 members.
3. The terms of office of the members of the Governing Board shall coincide with the interval between International Congresses on Protozoology.
4. The Chairman of the Governing Board shall be one of the representative from the country in which the next International Congress is to be held. Additional officers of the Governing Board may be elected by the Board from its membership.
5. New national groups shall be admitted to representation on the Governing Board upon approval by two-thirds of the incumbent members of the board.

The purpose of the Commission on Protozoology of IUBS shall be not only to promote the development of knowledge in the field of protozoology but also to facilitate scientific and personal communication among protozoologists of all nations.

日本原生動物学会会則

- 第1条 本会は日本原生動物学会 (Japan Society of Protozoology) と称する。
- 第2条 本会は原生動物植物に関する研究をすすめ、その知識の普及、向上を図ることを目的とする。
- 第3条 第2条の目的を達成するために、年1回大会を開催し、会誌を発行するほか必要な事業を行なう。
大会においては、本会の運営を議する総会および学術講演を行なう。総会および学術講演会は、それぞれ臨時にまたは別個に開くことができる。これらの会合は会長の委嘱する委員が運営する。
会誌は原則として年1回発行する。このほか、不定期に別刊を発行することがある。但し、別刊は実費をもって会員に配布する。
- 第4条 本会員は正会員、賛助会員および名誉会員とする。正会員は年会費1,000円を前納するものとし、会の主催する各種の会合に参加し、幹事を互選し、会誌に投稿し、会誌の無料配布をうけることができる。賛助会員は本会の主旨に賛同し、会の維持発展のため1口10,000円以上を納入するものとし、会誌の無料配布をうけることができる。名誉会員は幹事会の推薦により総会において決定する。
- 第5条 本会運営のため、会長1名、幹事若干名をおく。幹事は会員の互選により、会長は幹事の選挙によって決定する。
会長及び幹事の任期は3年とし、重任を妨げない。
会長は会を代表して会務を統轄する。幹事は幹事会によって会務を処理し、庶務、会計および編集の業務を分担する。
- 第6条 本会の事務年度は暦年とする。
- 第7条 本会に入会を希望するものは、別に定める手続きによって申し込むものとする。
- 第8条 会則の変更は幹事会の議をへて、総会において行なう。
- 付 則
1. 本会の事務局は当分の間、大阪大学微生物病研究所原虫学部門内におく。
 2. 入会手続きは所定の申し込み用紙を用い、会費1年以上を添えて会長あて事務局に提出するものとする。
 3. 納入した会費は返却しない。会費を2年間滞納した場合は退会とみなす。

編集後記

昨年の総会で、本年度から年2回発行と決まりましたが、原著の投稿がただ1編にとどまりましたので、やむなく原著を大会記事と同一号に載せることにいたしました。学会発展のためにもどんだん原稿(欧文)をお寄せください。

次に幹事改選の投票をもれなく期日までにお願いたします。お忘れなく。

また会費未納の方は至急事務局あてお送りください。

終わりに今年の第3回大会が有意義かつ盛会でありますように。
(尾崎)

原生動物学雑誌 第3巻 第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol. 3 No. 1

昭和45年7月15日 印刷

昭和45年8月1日 発行

編集兼発行人: 猪木正三

発行所: 日本原生動物学会

吹田市山田上(565) 大阪大学微生物病研究所原虫学部門内

電話 (068) 78-5121代 (内線3131)

振替口座: 大阪 7 7 9 6

印刷人: 前田政昭

印刷所: 株式会社 前田進行堂印刷所

京都市中京区西ノ京南上合町81 電話(075)802-0366
