

# Toxoplasma gondii의 組織培養에 관한 研究

## I 돼지의 Buffy Coat Cell Culture에서의 增殖所見

金 鍾 晁

全北大學校 農科大學 獸醫學科

### 緒 論

*Toxoplasma gondii* (以下Tp虫)의 組織培養에 관해서는 1929년에 Levaditi 및 Sanchis<sup>12)</sup> 등에 의해서 鷄胎兒, 닭 및 비둘기의 여러 組織들을 사용한 것을 비롯하여 근래에는 Chernin 및 Weller<sup>2),3)</sup> 등의 생쥐 胎兒組織을 이용한 廻轉培養法에 이어 原虫증식을 더욱 好條件下에서 이루어지게 하기 위한 組織培養法등 20여편의 연구성과가 발표되었다. 이들에 의하면 Tp虫은 鷄胎兒를 위시하여 사람, 생쥐, 의 胎兒組織<sup>3),9)</sup>, 사람의 包皮 및 子宮筋, 猿, 쥐, guinea pig의 腎, 그리고 各種 動物 由來의 Macrophage 및 骨髓등 여러가지 細胞로부터 실험실내에서 사용되는 Hela 細胞나 L 細胞에 이르기 까지<sup>2),3),5),11),18),22)</sup> 어느 것이거나 잘 발육증식함이 밝혀졌으나 循環血液의 白血球 細胞에서의 발육증식에 관한 연구는 1963년에 Yanagawa<sup>21)</sup>가 正常血清과 免疫血清을 培養液에 혼합하여 그 변동의 차이를 관찰한 것 외에는 이에 관한 연구가 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

근래 組織培養은 原虫의 生物學的 諸生狀을 연구하는 수단으로서 뿐만이 아니라 各種 治療劑의 효력판정에 또는 血清反應用 抗原製造用으로서 널리 이용되고 있는 실정에 비추어 본다면 간편하고 경제적인 循環血液 buffy coat 細胞를 이용하는 방법의 연구가 더욱 절실하게 요구된다.

循環血液의 buffy coat 細胞를 이용한 바이러스에 관한 연구로는 돼지 Cholera<sup>6-8),10)</sup>를 위시하여 Rinder Pest<sup>20)</sup> Equine infectious anemia<sup>16)</sup> 그리고 Marek's disease<sup>4)</sup> 등이 있었으나 本原虫에 관한 구체적인 연구는 드문 실정에 있다.

循環血液中 白血球는 培養시간에 따라 培養前과는 상당히 相異한 형태를 갖게되며 培養후에 있어서는 細胞도 변화를 가져오게 되므로<sup>15-17)</sup> 細胞의 변화에 따르는 Tp虫의 發育增殖에 좋은 결과를 얻기 위해서는 細

胞의 培養狀態와 Tp虫의 증식조건들이 면밀히 검토되어야 할 것으로 생각된다.

### 材料 및 方法

**原虫株:** Tp虫의 代表株로서 널리 사용되고 있는 "RH株"를 안양 가축위 생연구소에서 분양받아 4~5일 간격으로 생쥐의 복강내에 접종하여 繼代 保存중인 것을 사용하였다.

**供試豚:** 離乳 1개월된 것으로서 dye-test에 음성인 건강한 잡종 암돼지를 격리사양 하면서 실험에 이용하였다.

**Media:** Medium-199 (Gibco) 10g을 1l의 triple distilled water에 용해시켜 여과한 후 4°C의 냉장소에 보관하였다.

autologous-plasma의 혼합비율은 buffy coat 細胞만의 배양을 위해서는 50%로 하였고 Tp虫 접종시에는 20%로 하였다.

항생제의 첨가는 penicilline 150 unit/ml와 streptomycine 150 µg/ml로 하였으며 medium의 pH는 사용시에 7.3~7.4로 교정하였다.

**Heparin:** Heparin (Ricker Lab.)은 1ml에 2000 U.S.P. unit가 함유된 것 0.1ml를 혈액 10ml의 채취에 사용하였다.

**Bacto-phytohemagglutinin M(PHA) (Difco Lab.):** 한 vial에 5.0 ml의 triple distilled water를 주입 용해하여 4°C에 보관하였으며 혈액 10ml 채취시에 0.2 ml (20 µg)를 사용하였다.

**白血球 細胞培養:** buffy coat 細胞는 Cho<sup>4)</sup>, Merchant<sup>14)</sup> 방법 및 Moore<sup>17)</sup>와 Tarnvik<sup>19)</sup>의 방법을 보완하여 培養하였다. 즉 供試된 돼지의 頸靜脈에서 2000 unit/ml의 heparin 0.1 ml와 PHA M 0.2 ml (20 µg)를 멸균된 주사기에 넣어 10 ml를 採血한 다음 충분히 혼합한 후 screw capped tube에 서서히 분주, incubator에 30分間 靜置하였다가 毛細피펫으로 buffy coat를 吸引 採取하였다. 이때 침전이 잘 되지 못할 경우에는

1000 rpm 에서 5분간 원심침전하여 採取하였다. 이와같이 하여 얻어진 plasma 에는 많은 白血球와 少量의 赤血球가 함유되어 있는데 이를 균등하게 혼합시킨후 血球計算盤으로 細胞의 數를 계산하여 1ml에  $5 \times 10^7$  이 되도록 autologous plasma 로 희석한 다음 同量的 medium-199 를 가하여 시험관 (200×16)에 分注하고 다음 cover slip 를 넣어 고무마개로 밀봉하여 37°C incubator 에서 배양하였다. 이때의 pH는 7.3~7.4 가 되도록 sodium bicarbonate 용액으로 조정하였다.

**Toxoplasma gondii 의 接種** : Tp 虫 接種후 3~4 일 된 생쥐의 腹腔內에 pH7.2의 phosphate buffered saline (PBS) 2 ml 를 주사기로 주입하여 腹水와 충분히 혼합한후 採取하여 2倍量的 PBS 를 다시 加한 다음 2000 rpm 에서 10분간 원심침전하여 上清液을 버리고 沈渣를 3회 遠心洗滌한 후 medium 에 부유시켰다. 原虫數의 算定은 血球計算盤으로 실시하였으며 0.5~1 ml 의 medium 에 所要數가 함유되도록 희석하였다.

Tp 虫을 接種할때는 시험관내의 medium 을 버린후 脱落細胞를 제거할 목적으로 새로운 medium 이 가볍게 cover slip 위를 흐르게 한 다음 接種材料를 注加하여 細胞層 全面에 균등하게 分布되도록 하고 잔여 medium 을 注加한 후 밀봉시킨 다음 37°C 의 incubator 에 넣었다. 原虫 接種時의 medium 은 plasma 濃度を 20%로 하였으며 pH는 7.3~7.4 로 조정하였다. 接種材料 採取로 부터 接種終了時까지의 시간은 특별히 注意를 기울여 1시간 이내에 完了토록 하였다.

**虫體 觀察** : 各種 組織 細胞內에서 Tp 虫의 발육 증식을 관찰하는 방법으로서는 細胞의 變性과 Tp 虫의 증식상태를 形態學的으로 관찰하는 방법과<sup>2, 3, 5, 8, 9, 10, 23)</sup> 증식된 Tp 虫을 計算된 數로서 관찰하는 방법<sup>18, 22, 21)</sup> 등이 있으나 組織細胞와는 多少 樣像을 달리하는 白血球의 특수성 때문에 著者는 形態學的 所見만을 관찰하기로 하였다. 白血球의 分裂增殖의 정도에 따라 接種된 Tp 虫의 發育增殖을 經時的으로 관찰하기 위하여 細胞의 培養時에 삽입했던 cover slip 을 꺼내어 37°C incubator 에 넣어 충분히 건조시킨후 methyl alcohol 로 固定하고 giemsa 染色을 하여 鏡檢하였다.

## 結 果

Buffy coat 細胞의 培養日齡에 따르는 Tp 虫의 細胞內侵入과 增殖

培養細胞에 Tp 虫이 침입하는 樣像과 程度는 Tp 虫의 接種量에 따라서 그리고 培養된 細胞의 日齡에 따

라 다르나 細胞數가 일정했을 경우에는 培養 3~5 日 齡된 細胞에 細胞 1個當 4~5 個의 비율로 接種하면 5 시간만에 細胞內로 침입된 Tp 虫을 發見할 수 있었으나 대부분 7~8 시간에서 부터 관찰이 가능하였다. 接種 初期 30 分에서는 Tp 虫이 아직도 細胞內에 침입되지 않고 있기 때문에 細胞外에서 부유하고 있는 것을 볼 수 있었으며 시간의 경과에 따라 점차 찾아보기 어렵게 되었다. 細胞에 侵入한 Tp 虫은 細胞質內에 存在하게 되는데 giemsa stain 으로써는 침입 直後의 形態를 보기가 어려웠으며 대부분의 경우 증식하기 시작하여 虫體 주변에 形成되는 透明帶(vacuola)에 의해서만이 그 존재를 알 수 있었다(Fig. 3, 5). 그리고 간혹 짙게 염색되어 細胞에 중첩된 것처럼 보이는 경우도 있었다(Fig. 1, 2).

細胞內의 Tp 虫은 第3圖와 第4圖에서 보여주는 바와 같이 처음에는 둥글게 팽대되면서 뚜렷한 空胞를 형성하게 되며 2個로 분열하는 모양을 침입초기에도 관찰할 수 있었으나 대부분 7~8 시간후에 볼 수 있었다. 상술한 結果는 같은 試驗群이라 할지라도 細胞의 分裂增殖의 정도에 따라 나소의 차이를 볼 수 있었다.

細胞內에 虫體를 多量 接種하였을 경우 第2圖, 第3圖, 第4圖, 第5圖에서처럼 重複感染이 빈번히 이루어져 마치 短時間內에 發育增殖된 것처럼 보이지만 하나의 個體가 增殖되어 集團을 이루고 있는 것과는 第7圖 및 第8圖에서 보는 바와 같이 구별이 용이하였다.

細胞內 侵入을 끝낸 Tp 虫은 2個·4個·8個로 증식하여 20個 전후로 分裂增殖(endodyogeny)하는데 이 같은 조건은 接種 12~15 시간에서 보여주기 시작했으며 18 시간에는 현저하였다. 이렇게 하여 細胞內에 침입된 Tp 虫은 몇번의 分裂을 反復한 끝에 細胞外로 탈출하게 되는데 脫出하는 시기는 24 시간 전후이었다. 發育增殖의 이와같은 反復의 지속은 細胞의 培養日數, 培養狀態 그리고 Tp 虫의 接種量에 따라 다르지만 細胞培養日齡이 3~5 日 된 것에서 Tp 虫과 細胞와의 比率가 1:1 이었을 경우 接種 48 시간까지 지속되었다. 接種 Tp 의 量이 적을 경우에는 더욱 연장됨을 알 수 있었다.

發育增殖된 Tp 虫이 細胞內에 充滿되어 細胞를 파괴시키고 脫出하는 像은 第7圖, 第8圖, 第9圖 및 第10圖에서 보여주고 있으며 第8圖에서처럼 소위 rosette form 을 볼 수도 있었다. 第10圖, 및 第11圖는 細胞에서 脫出하여 第8圖에서 보다 시간적으로 오래된 것으로 보이며 第12圖는 脫出된 시간도 길었을 뿐만 아니라 細胞는 破壞되어 다시 새로운 細胞에의 침

입이 不可能한 상태로 單在 혹은 連鎖狀으로 부유되어 있음을 알 수 있었다. 부유된 상태의 Tp 虫에는 뚜렷한 Tp 虫 原來의 染色性を 띠고 있는 것이 대부분이었지만 methylene blue 에 染色되지 않은 채 엷은 eosin 색으로만 보이는 소위 染色性を 상실한 Tp 虫도 많이 볼 수 있었다. 이같은 現象은 寄生性的의 Tp 虫이 生細胞內에 다시 侵入하여 寄生할 수 없었기 때문이라고 생각되며 대개 接種後 72 시간의 소견에서 많이 나타났다. 이 實驗에 있어서 增殖의 終末 단계인 72 시간에는 第2圖에서와 같은 細胞의 崩壞로 마치 Tp 虫과 混同하기 쉬운 核의 잔해들을 많이 볼 수 있었다.

以上과 같은 發育增殖 過程의 時間的 長短은 여러가지 條件이 關與한다고 보겠으나 本實驗에서 보여준 바로는 培養 3~5 일제의 細胞에 있어서 가장 우수한 增殖狀을 보였고 培養 6 日 이후 부터는 不良하였다. buffy coat 細胞와 虫體의 同時 接種이나 培養 1~2 日제의 細胞에서는 거의 증식상을 찾아보기 힘들었으며 집중 72 시간 만에 細胞內에서 겨우 增殖이 始作되는 像을 볼 수 있었을 뿐이다.

## 考 察

Tp 虫이 白血球內에서 發育增殖하기 위해서 여러가지 條件이 苛要한다고 생각되며 Tp 虫, 細胞 및 培養의 三者間에 복잡한 관계가 있는 것은 물론 培養溫度, 酸素壓 등 기타 많은 因子에 의해 左右된 것으로 생각된다.

buffy coat 細胞 즉 白血球 培養에는 상술한 바와 같이 目的에 따라 그리고 研究者에 따라 方法을 달리하고 있으나 本實驗에서는 무엇보다도 發育이 均衡히 잘되어야 할 것이 요구되고 있다.

近來 白血球 培養에는 赤血球의 凝集을 일으키는 phytohemagglutinin (PHA)의 사용이 권장되고 있는데 이 PHA 는 白血球中の 淋巴球에 작용하여 分裂增殖을 促進하는 作用을 하는 것으로 되어있다. Tarnvik<sup>19)</sup>에 의하면 淋巴球의 分裂增殖을 促進하는 PHA 의 淋巴球에 대한 作用은 赤血球의 存在下에서 더욱 그 効力を 증가하는 것으로 되어 있으나 종전에는 赤血球 混入이 白血球 培養에 絶對的인 障礙物로 간주되어 왔다.

本實驗에서는 Cho<sup>4)</sup>와 Merchant<sup>14)</sup>의 方法을 改良하여 buffy coat 細胞를 採取할 때 약간 混入되는 赤血球는 그대로 培養에 사용하였으며 medium 에 plasma 量을 細胞培養에 50%, Tp 接種을 위하여 20%로 하여 사용한 것은 Moore<sup>17)</sup>와 Tarnvik<sup>19)</sup>의 方法을 이용한 것인데 종전과는 현저히 다른 性적을 나타내 주었다.

원래 buffy coat 에는 여러종류의 細胞가 含有되어 있다. 이중에서도 培養되는 細胞는 eosinophile 을 除外하고는 多核白血球는 分裂增殖이 不可能하여 硝子壁에서 脫落되기 때문에<sup>16)</sup> 實際로 mitosis 를 일으키는 細胞는 當初 培養한 量의 半정도로 밖에 볼 수 없었다. 이는 白血球 百分率로 본 概算이지만 淋巴球의 全部가 分裂增殖에 입한다고는 볼 수 없으며 따라서 cell:Tp 虫의 比率이 1:1 이라 할지라도 事實上的 比率은 0.5:1 以下라고 볼 수 밖에 없다. 細胞培養시 DNA 合成을 하는 細胞의 급격한 증가는 24 시간에서 시작되어 72 시간 까지는 40~50%의 細胞가 DNA 合成에 임하고 있으며 이에 關하여는 細胞種類는 대부분이 淋巴球로 되어 있는데<sup>13)</sup> Tp 虫의 接種時期는 細胞培養 3~5 日 사이에서 좋은 結果를 보여주고 있으며 이 事實은 Tp 虫이 細胞에 容易하게 侵入하여 發育增殖하기 위해서는 循環血液中的 成熟細胞는 상당히 어려우며 풍부한 原形質을 갖게 되는 어느 狀態에서 만이 容易한 增殖을 한다고 생각된다. 즉 循環血液의 성숙한 細胞와 Tp 虫과의 同時 接種은 좋은 성과를 거두지 못할 뿐만 아니라 細胞가 分裂增殖할 사이에 Tp 虫은 死滅하는 結果를 招來하였다고 보며 이것은 崩壞된 Tp 虫이 허다하게 관찰되었다는 점에서도 추측될 수 있었다. 3~5 日間 培養된 細胞에 接種하였을때의 Tp 虫은 집중 7~8 시간에서 처음 발견되는 경우가 대부분이었으며 이때 透明帶(vacuola)를 虫體 주변부에 形成하기 때문에 더욱 뚜렷하게 볼 수가 있었다. 이같은 소견은 Visher와 Suter<sup>23)</sup>가 macrophage 에서 Tp 虫을 발육증식시킨 것과 시간적으로나 形態에서 同一하였음을 알 수 있었다. 6 日 이후에 있어서의 不良한 成績을 보이고 있는 것은 分裂增殖한 細胞의 脫落現象에 기인됨이 當然하다고 생각되지만 발육이 良好하다고 볼 수 있는 空胞가 있는 細胞에 있어서나 巨大細胞에 있어서 Tp 虫의 發育增殖이 不良했다는 점에서 본다면 細胞가 分裂增殖하고 있는 어느 시기에서 만이 Tp 虫이 發育할 수 있는 好條件이 形成되는 것으로 생각된다.

培養細胞의 日齡에 따라 Tp 虫의 發育增殖이 左右되었음을 本實驗에서 보여주고 있지만 세포를 供與한 動物의 個體에 따라서 세포의 분열·증식도가 다를 뿐만 아니라<sup>1)</sup>, 同一 個體에 있어서도 시험관에 따라서 多少의 差異가 있어 斷定을 내리기는 어려운 일이다.

## 結 論

다른 동물에 비해서 Toxoplasmosis 에 감수성이 높은 폐지의 循環血液으로부터의 buffy coat 細胞를 시험

관내에 培養한 후 이에 *Toxoplasma gondii* 를 접종하여 細胞內에서의 증식상을 經時的으로 관찰하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. *Toxoplasma gondii* 는 3~5日間 배양된 豚循環血液의 buffy coat 細胞에서 우수한 증식상을 보였다.
2. 3~4日間 培養된 豚循環血液의 buffy coat 細胞에

*Toxoplasma gondii* 를 接種한후 虫體의 發育増殖狀을 經時的으로 관찰한 結果 虫體의 早期發見은 힘들었으나 7~8시간이 經過한후 부터 나타나기 시작하여 24~48시간 사이에서 가장 뚜렷하였고 이후부터는 虫體의 붕괴가 시작되었다.

### Legends for Figures

**Fig. 1-2.** Organisms in the cytoplasm, 5 hours post inoculation, x 1000.

**Fig. 3-5.** Early phase of organisms, 7-8 hours post inoculation, beginning the budding (Endodyogeng), forming a vacuola around them, x 1000.

**Fig. 6-7.** Organisms multiplied in the cytoplasm of cells, 24 hours post inoculation, x 1000

**Fig. 8-11.** Organisms liberated from the cell cytoplasm, 24-48 hours post inoculation, x 1000.

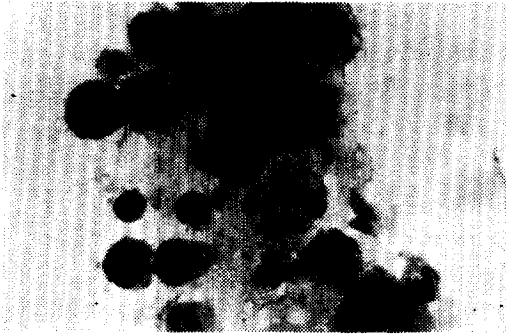


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

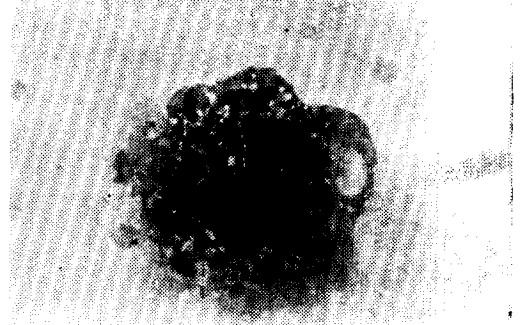


Fig. 4

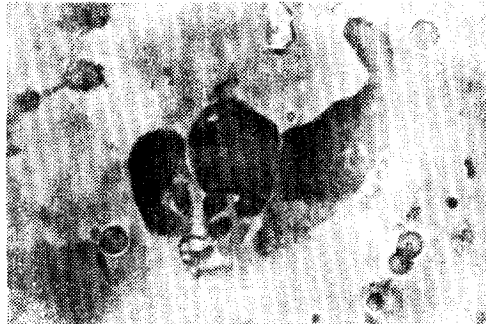


Fig. 5

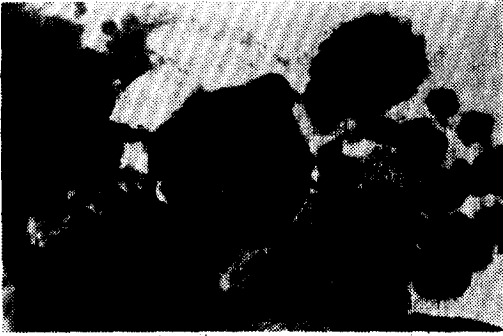


Fig. 6



Fig. 7

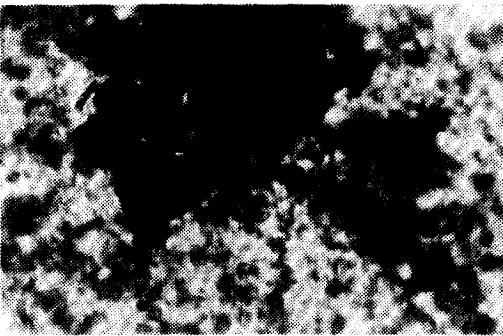


Fig. 8



Fig. 9



Fig. 10

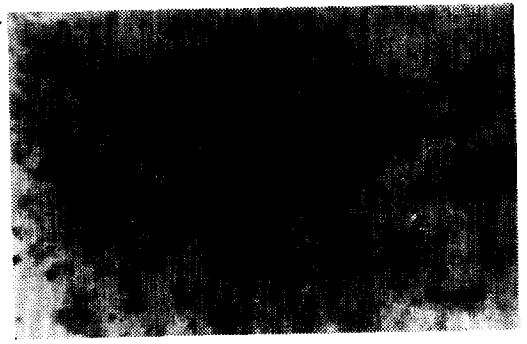


Fig. 11

## 参 考 文 献

1. Buckton, K. and Nettesheim P.: *in vitro* and *in vivo* culture of mouse peripheral blood for chromosome preparations. P.S.E.B.M., 1968. 128 : 1106.
2. Chernin, E. and Weller, T.H.: Serial propagation of *Toxoplasma gondii* in roller tube cultures of mouse and human tissues. P.S.E.B.M., 1953, 85 : 68.
3. Chernin, E. and Weller, T.H.: Further observation on the growth of *Toxoplasma gondii* in roller tube cultures of mouse and human and primate Tissue. J. Parasit., 1957, 43 : 33.
4. Cho, B.R., Kenzy, S.G. and Kim, U.H.: Typical Cell in the peripheral blood of chickens exposed to Marek's disease agent. Canadian J. Comp. Med., 1968. 32 : 562.
5. Cook, M.K. and Jacobs, L.: Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture of various derivations. J. Parasit., 1958. 44 : 172.
6. Dunne, H.W., Luedke, A.J., Hokanson, J.F.: The growth of animal leukocytes and their use in cultivation of animal viruses. Am. J. Vet. Res., 1958. 119 : 706.
7. Dunne, H.W., Luedke, A.J., Reiche, V. and Hokanson, J.F.: The *in vitro* growth of hog cholera virus in cells of peripheral blood. Am. J. Vet. Res., 1957, 18 : 502.
8. Goldman, M., Carver, R.K. and Sulzer, A.J.: Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. J. Parasit., 1957. 43 : 161.
9. Guimares, F.N., Meyer, H.: Cultivo de "Toxoplasma" Nicolle and Manceaux, 1909, Em cultulas de Tecidoo, Brasil, Biol., 1942, 2(1) : 123 Marco, Riodejaneiro, D.F.
10. Loan, R.W., Gustafson, D.F.: Cultivation of hog cholera virus in subculturable swine buffy coat cells. Am. J. Vet. Res., 1961. 22 : 741.
11. Lund, E. Lycke, E. and Sourander, P.: A cinematographic study of *Toxoplasma gondii* in cell cultures. Br. J. Exp. Path., 1961. 13 : 357.
12. Levaditi, S., Sanchis-Bayarri, V., Lepine, P. and Schoen, R.: Etude sur l'encephalomyelite provoquee par le *Toxoplasma cuniculi*, 11, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1958. 61 : 754. (cited by Cook and Jacobs, J. Parasit., 44 : 172)
13. Mackinney, A.A. Jr., Stohlman, F. Jr. & Brecher, G.: The kinetics of cell proliferation in cultures of human Peripheral blood. Blood., 1962. 19 : 349. (cited by Nakai: 組織培養—基礎と應用, 朝倉書店 1970. p.278)
14. Merchant, D.I., Kahn, R.H., Murphy, W. H.: Handbook of cell and organ culture. Ann. Arbor, Michigan., 1964. p.23.
15. Malmquist, W.A., Hay, D.: Hemadsorption and cytopathic effect produced by african swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. Am. J. Vet. Res., 1960. 21 : 104.
16. Moore, R.W.: The immunologic properties associated with equine infectious anemia, recent findings. J.A.V.M.A., 1969. 155 : 331.
17. Moore, R.W., Katada, M., Redmond, H.E.: A method for the continuous culture of peripheral horse leukocytes. Am. J. Vet. Res., 1970. 31 : 463.
18. Shimizu, K.: Studies on toxoplasmosis V. Complementary observations on the tissue of the nutrient fluid upon the invasion and multiplication of the organisms. Jap. Vet. Res., 1963. 2 : 1.
19. Tarnvik, A.: A role for red cell in phytohemagglutinin induced lymphocyte stimulation. Acta. Path. Microbiol. Scand. Section B., 1970. 78 : 733.
20. Tokuda, G., Fukusho, K., Morimoto, T.: Studies on rinderpest virus in bovine leukocyte culture I. Cultivation of leukocytes and appearance of inclusions infected cells. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 1962. 2 : 189.
21. Yanagawa, R. and Hirato, K.: Antitoxoplasmic effect of immune swine serum revealed in the culture of swine leukocytes. Jap. J. Vet. Res., 1963. 2 : 135.
22. Shimizu, K.: Studies on Toxoplasmosis III. Observations on the tissue culture method of *Toxoplasma gondii*. Jap. J. Vet. Sci., 1961. 23 : 33.
23. Vischer, W.A. and Suter, E.: Intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* in adult mammalian macrophages cultivated *in vitro*. P.S.E.B.M., 1954. 86 : 413.

## Studeis on the *Toxoplasma gondii* in Buffy Coat Cell Culture

### I. Multiplication of *Toxoplasma gondii* in Swine Origin Buffy Coat Cells

Jeong Myeon Kim, D.V.M., M.S.

*Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture*

*Jeon Bug National University*

#### Abstract

*Toxoplasma gondii* (Tp), RH strain, was inoculated into cultured buffy coat cells obtained from the swine blood. The main reason for adopting swine lies in the animal's unusual susceptibility to Tp. As for the culture method used in the experiment, those well proved methods practised by Cho, Merchant, Moore and Tarnvik were mainly referred to as a starting point: hence, the author's method has been turned out to be the modified or supplementary form of those methods. Observations were made on the phase of multiplication of Tp in the cytoplasm.

The results obtained were as follows:

1. Better growth and multiplication of *Toxoplasma gondii* were noticeably observed in the swine buffy coat cell, inoculated after three-to-five day cultivation of the cell.
2. In the lapse of the observation period, there appeared *Toxoplasma gondii* rarely available in the earlier stage, which had been inoculated into the cell after three-to-five day cultivation. In other words, *Toxoplasma gondii* started to show itself in seven or eight hours after inoculation, most outstandingly noticeable between twenty four hours and forty eight hours. Thereafter the disintegration stage of *Toxoplasma gondii* was observed.