



Title	Trypanosoma gambiense及びTrypanosoma lewisiの核酸分布の細胞化学的観察
Author(s)	川満, 恵光
Citation	長崎大学風土病研究所業績 6. p.1398-1403, 1957
Issue Date	1957-11-25
URL	http://hdl.handle.net/10069/4899
Right	

This document is downloaded at: 2020-10-22T09:14:00Z

Trypanosoma gambiense 及び Trypanosoma lewisi の核酸分布の細胞化学的観察

長崎大学風土病研究所病理部 (主任：登倉教授)

川 満 恵 光
かわ みつ けい こう

緒 言

Trypanosoma の核酸に関しては, Pizzi P. (1948), Pizzi P. & Diaz A. (1954) の Trypanosoma cruzi の Feulgen 反応 (F-反応と略記) と, Gerzeli (1955) の Trypanosoma gambiense, Trypanosoma Brucei, Leishmania tropica 等の生物化学的研究の報告がある。Pizzi P. 等によれば, cruzi の leishmanial form と crithidial form に於いては, F-反応陽性物質は核周縁に環状を呈し, 核室中央部は陰性であるが, trypanosoma form に於いては, このような核酸の分布が見られないことが多くて, F-反応陽性物質は, 新月形を示すか, 乃至, 不規則な団塊として核膜の諸所に沈着して不緊密な配列を示す。Gerzeli (1955) によれば, gambiense に於いては, F-反応陽性物質は, 核周辺に環状をなして存在するが, kinetoplast は F-反応陰性であり, gallocyanin-pyronin 染色では, 原形質内に塩基性顆粒が明瞭に見え, kinetoplast も同様に染色されたが, 酸加水分解及びリボヌクレアーゼを以つて処置すると, kinetoplast 以外のものは消失した。Trypanosoma lewisi の核酸についての報告は今日まで見られない。

核酸に対する各種薬物の影響については, 若干の研究業績があるが, 就中, Martin & Fischer (1942) はスルフォアミドが細菌のアデニン代謝を妨げると云い, Houswright & Koser (1944) はスルフォアミドは細胞質の RNA に影響してリボヌクレアー

ゼが作用し易いような形に変化させると述べ, Boyvin (1947) 等はペニシリンは微生物の核酸代謝を障碍するが作用点は明確でないと記述した。Tilane (1948) 等は, しかし, ストレプトマイシンは核酸に直接作用し, ペニシリンとは作用機序が若干異ると報告した。阿部 (1955) は, Toxoplasma gondii の動物実験に於いて, サルファー剤を投与後, RNA の染色性が3~4日後に減少したと報告した。Pizzi P. & Diaz A. (1954) は, Trypanosoma cruzi 感染マウスを primaquine によつて治療を行い, 実験動物の血液塗抹標本の虫体について F-反応を観察し, F-反応陽性物質の配列に特別な変化は見られなかつたが, 免疫動物の標本に見える虫体の F-反応陽性物質は緻密となつて拡散性の輪郭を示したと述べている。しかし, 一般に言つて, 薬物等による外的影響はなくても, 核酸の自然の消長は見られるのであつて, 小川 (1952) は, pyronin-methyl-green 染色の腹水癌の所見として, 癌細胞の細胞質には生活力の盛衰に応じて RNA 顆粒が現われ, 成熟期以後に於いては顆粒の減少, 染色性の減退, 空胞形成及び結節形成等の退行変化に陥るものが多くなると述べている。

Trypanosoma 感染に砒素剤が効果があることは以前より記述されているが, Cantrell (1953) は Trypanosoma equiperdum 感染ラツテに対して Mapharsen の 0.516mg/kg を静脈注射して, Trypano-

soma の10%は45分間に血中から消失し、90%は108分間に消失したことを見、Mapharsen は Hexokinase には作用しないが、それ以後の解糖作用に影響するか、又は他の代謝系に作用を及ぼす可能性があるとして述べている。最近発見された抗生物質は、細菌性疾患の治療を主眼とし、原虫性疾患に対しては治療効果は餘り認められないのであるが、TOBIE(1954), PIZI P. et al (1953), SONNTAG et al (1954), TRINCAO et al (1955)等によつて Achromycin が動物及び人類のトリパノソーマ症に治療効果を示すことが報告されている。また、HEWITT et al (1955), 並びに、TOBIE & H. GHMAN (1956)は、Trypanosoma equiperdum の感染マウスの治療実験によつて、Achromycin は恐らく虫体の代謝過程殊に核酸又は核蛋白合成を障碍するのであろうと記載している。Trichomycin

は、細谷等(1952)が八丈島の土壌から分離した放射線状菌の1新種 = Streptomyces hachijoensis の菌枝から抽出、精製、黄色の粉末としたもので、Trichomonas, 糸状菌、酵母菌に対する殺滅作用は知られているが、Trypanosoma に対する効果は今日まで試みられていない。

著者は、Trypanosoma gambiense 感染マウス、並びに、Trypanosoma lewisi 感染ラットの血液塗抹標本について、Giemsa 染色、Wright 染色、Hansen's Haematoxylin 染色、Feulgen 反応 (F-反応)、pyronin-methylgreen 染色 (PMG 染色)、Brachet's test 等を行つて、感染経過に伴う核酸の分布、形態、微細構造の変化を追求し、また、二・三の薬物の治療効果と核酸に及ぼす影響を観察した。

実験材料並びに方法

実験動物：-Gambiense に対してはマウスを、lewisi に対してはラットを用い、いずれも感染血液を腹腔内に接種した。

供試原虫：- Gambienseは、山口大学農学部畜産微生物教室の石黒秀雄助教授から分譲され、昭和30年3月以来当教室に於いてマウスの継代接種によつて保存している株、Lewisiiは野鼠から分離してラットの継代接種によつて保存している株である。

染色法及び染色液の調製：- 血液塗抹標本の自然乾燥を待つて、Carnoy 液或は昇汞醋酸液を1時間作用させて固定した後、10~30分間水洗して染色に供した。DNA の染色は F-反応の術式に従つて行い、氷室に保存した pH 3.0~4.0 の leucofuchsin に24時間浸漬して、0.5% lightgreen で後染色を施した。RNA は PMG-染色液 (pH 4.4 の Walpole 氏酢酸緩衝液 100cc に methylgreen 0.5g を溶解し、夾雑物をクロロホルムで3回抽出除去、pyronin 0.2gを加える) で室温で24時間染色した。両反応によつて得られた物質が核酸であることを確認するために、DNA については、塩酸加水分解を行わない標本を同時に染色して対照とし、RNA については、Brachet's test に従つて、5000倍リボヌクレアーゼを 60°C に於いて1時間作用せしめた標本に就いて PMG-染色が陰性になることを確めた。

供試薬剤：- Mapharsemin (第一製薬)、Achromycin (武田薬品)、Trichomycin (藤沢薬品、2250 u/mg) の3種類の薬剤を用い、Mapharsemin は蒸溜水、他は生理的食塩水に溶かして、実験動物の腹腔内に注射した。これら薬剤のマウスに対する毒性試験の結果は表1に示すようであつたので、Mapharsemin は 0.01mg、Achromycin は 1.0mg、Trichomycin は 0.01mg を実験注射量とした。

Trypanosoma 接種感染マウスの血中に原虫が多数見られる時期 (接種後3~4日目) に、上記薬剤を腹腔内に1回又は連日数回注射して、原虫の消長を観察し、逐次血液の塗抹標本を作つて核酸染色を施し、その変動を追求した。

第1表 マウスに対する毒性

薬品	量	○生, ●死
Mapharsemin	1.0mg	● ● ●
	0.1	○ ○ ●
	0.01	○ ○ ○
Achromycin	10.0mg	● ● ●
	5.0	○ ● ●
	1.0	○ ○ ○
Trichomycin (2250U/mg)	1.0mg	● ● ●
	0.1	○ ● ●
	0.01	○ ○ ○

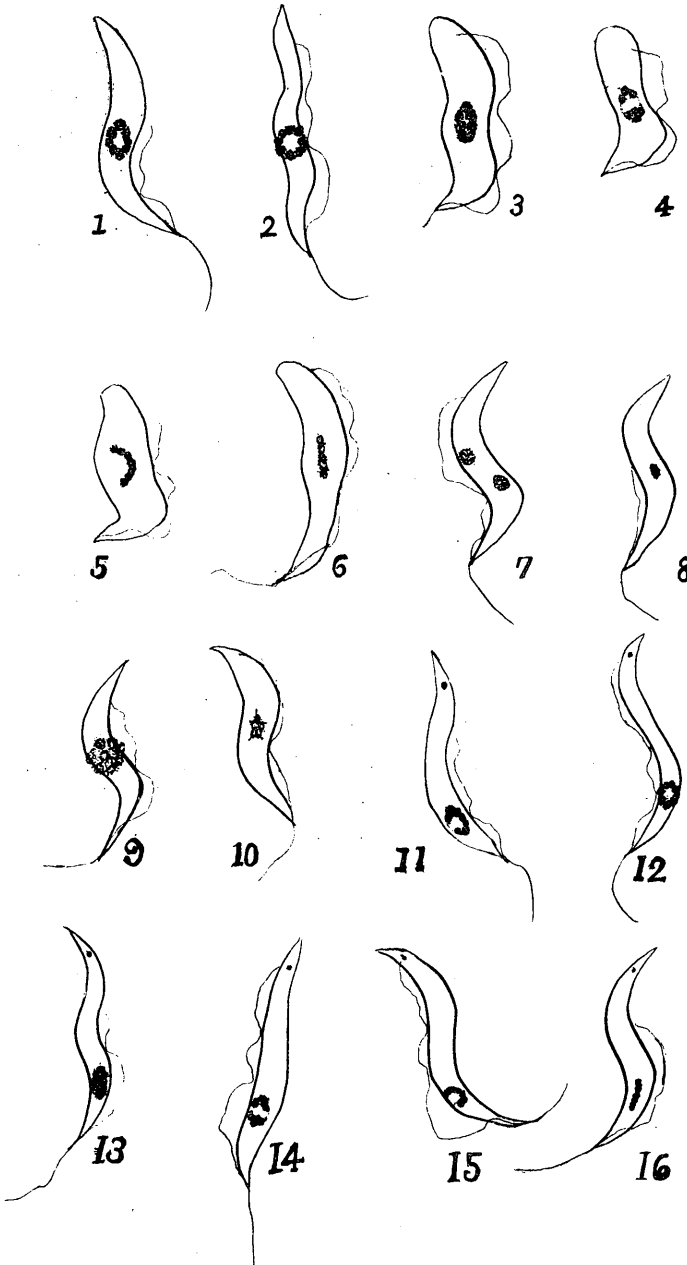
実験成績

1) F-反応による所見

T. gambiense : F-反応の所見を Giemsa 染色, Wright 染色, Haematoxylin 染色の所見と比較参照しつつ観察すると, 細胞質は lightgreen によって淡緑色に平等に染まり, 波動膜は一層淡染され

るが, 全然染まらないこともあつた。核は卵形又は円形を呈し, 細胞質から逸脱しそうに見えるほどに大きなこともあり, 虫体の略々中央に位置して, F-反応陽性の赤紫色の顆粒を表わしている。それは略々同大の球状の顆粒であつて, およそ6~10個

第1図



の集団をなし, 比較的大きな核に於いては染色が弱くて, 比較的小きな核に於いては染色が強いように思われた。核膜及び仁と思われる箇所は反応しない。F-反応陽性の顆粒は, 図1(1~6)に示すように, 諸種の形の配列をなすが, それは核自体の形状の変化によつて左右されるためであらう。模式図に就いて説明すると,

1) 最頻繁に見られる形で, 核室中央部は DNA 陰性で透明に見え, 周辺部に DNA 陽性の顆粒が環状に配列して楕円形を呈する。

2) 大体, 前者と同じであるが, 顆粒の配列が円形を呈する。

3) DNA 陽性顆粒が核室全面に亘つて充塞している。

4) 顆粒群が核室両極に分かれて対向する。

5) 弓状配列を呈する。

6) 棒状配列を呈する。

第1型及び第2型が最も多くて全体の略々90%を占めた。同一虫体の顆粒は, 比較的一様の染色度を示すことが多いが, 濃淡の差の見られることもあつた。普通大の顆粒の間には微細な淡染する顆粒が散在している場合も時には認められた。

Gambiense に於いては F-反応陽性顆粒は比較的容易に鮮明に染まるのであるが, 一般に言つて, F-反応, PMG-染色の染色効果は, 白血球及び淋巴球

のその染色度と並行すると思つてよいのであつて、白血球及び淋巴球の染色が良好であるに拘らず、原虫核の染色が劣るとすれば、それは原虫核の核酸の減弱に由来すると判断される筈である。

感染マウスの死亡するまでの経過に従い、F-反応によつて DNA の変動を観察したが、核の形態、顆粒の大きさと数、配列状態、染色性等に著明な変動は認められなかつた。死後の時間を追つて観察した例では、死後5時間にして既に DNA 顆粒の変形又は破壊の像を認め、第1型及び第2型は減少し、第3型及び第6型の増加するような傾向が見られた。

T. lewisi : 細胞質は lightgreen により淡緑色に平等に染まり、核は虫体の中央より幾分か前方に位置し、F-反応陽性顆粒は gambiense と略々同様な形態と配列を示す (図1:11~16)。Lewisi 感染ラツテの経過に伴う特別な変動は確認されなかつた。Lewisi に特異な点は、kinetoplast の部位に1個のF-反応陽性顆粒が存在して赤紫色に濃染されていることであつて、対照標本、Brachet's test と比較観察して、この物質は DNA であるように思われる。

2) Pyronin-methylgreen 染色所見

PMG-染色を施すと、核全体が淡緑色に染色されて、そこに DNA の存在することを示しているが、F-反応のように個々の DNA 顆粒を識別することは困難であつた。RNA は原形質内に認められ、一

様に淡紅色を呈することが多いが、核周辺の染色性が特に強く、核より遠ざかるに従つて染色性が衰えているように感じられる場合も認められた。原形質内に RNA の顆粒、空胞形成、結節形成等を認められる虫体には遭遇しなかつた。

Lewisi では kinetoplast は淡緑色に染色され、それはリボヌクレアーゼの作用によつて消化されないもので、やはり DNA らしく考えられる。

3) 薬剤の影響

Mapharsemin :- Gambiense の中等度の感染を示すマウスの腹腔内に0.01mgを1回注射すると、1~3時間後に血中の原虫は減少し始め、2~5時間後には殆ど消失し、少くとも数日間の観察に於いては、再発を見ることなく治癒に赴く。薬剤の注射後、血中の原虫が減少し始める時期から逐次血液塗抹標本を作り、核酸染色を行い、その変動を見た。Mapharsemin 注射後の原虫に於いては、図1(7~10)に示すように、二核に分裂した形体が異常に増加して特異な所見を呈する他、核が著明に膨大し、顆粒は淡染して鬆粗な団塊を形成することもあり、非常に萎縮して濃染する顆粒を示す形も見られた。RNA には特に変化は認められなかつた。

Achromycin 及び Trichomycin :- 前記同様に実験を行つたが、罹患マウスの生命を延長させる効果もなく、血中の原虫に対して、形態学的に影響も与えず、核酸所見にも変化を見なかつた。

総括及び考察

F-反応が DNA だけに特異的な反応であるかどうかということについては、従来議論が重ねられて来たが、通常、それによつて赤紫色に反応する物質は DNA に他ならないと考えられている。また、一般に言つて、塩基性色素は RNA のための特殊染色法としての意義は少いのであるが、PMG-染色は特別な意義を有し、これによつて、DNA は緑色に染まり、RNA は紅赤色に反応し、その染色の強さは、DNA 及び RNA の活性度と平行するものとされている。BRACHET (1947)によれば、細胞質顆粒は各種の酵素を含んで蛋白質の合成に参与するのであるが、CASPERSON (1941)は、RNA が核膜の周辺に於いて濃度が高いのを見て、それは仁との関

連に於いて核膜のすぐ外側で合成されるのであろうと想定した。CLAUDE (1941)は、しかし、細胞質顆粒で蛋白質がつくられるので、RNA が核周辺に多いのは、細胞質含有の物質のために核酸が此処に追いやられた結果に過ぎないと述べている。

Trypanosoma の F-反応についてなされた報告は多くはないが、GERZELI (1955)によれば、gambiense の DNA は核内の周縁に環状をなして配列し、kinetoplast はF-反応陰性であつたと述べ、PIZZI P. & DIAZ A. (1954)は cruzi の DNA 顆粒は楕円形、二核様、棒状、弓状等の配列を示し、比較的濃染する顆粒6~10個が見られるが、核室中央部は F-反応陰性で空虚を呈することが多

いと述べており、gambiense 並びに lewisi に於いて著者が得た結果も Pizzi P. 等の cruzi の核所見と一致している。Gambiense に於いても、lewisi group に属する cruzi に於いても、kinetoplast は F-反応陰性であると報告されているのに、lewisi では陽性であることは著者によつて初めて知られた所見であろう。

GERZELI (1955) は gallocyanin-pyronin 染色によつて gambiense の原形質内に塩基性顆粒が明確に認められたと述べているが、PMG-染色によつては同様な顆粒を識別することは困難であつた。しかし、屢々核周辺が濃染されて、RNA の活性度が其処で高いように見受けられた。

Trypanosoma に対して、各種の治療薬剤が核 (DNA) に作用するか、または、原形質 (RNA) に作用するか、その作用点を究明することは興味のあることであるので、gambiense 感染マウスに二・三の薬剤を注射して、核酸に及ぼす影響を観察した。その結果、Mapharsemin 注射後に於いては、二核に分裂した原虫が増加しているのを見た他、核が縮小して、DNA 顆粒が濃染されて核室に充実している像、核が著明に膨大して、DNA 顆粒の不整形の団塊を呈する像を生じ、Mapharsemin の DNA に対して影響を与えていることが知られたが、PMG-染色に於いて RNA に特記するような変化は認められなかつた。CANTRELL (1953) は Mapharsen が Trypanosoma の解糖能又は他の代謝系に影響を及ぼす可能性のあることを記載しているが、著者の実験によれば、Mapharsemin は蛋白合成と関連のある細胞質の RNA に対しては著明な影響を及ぼすものではなくて、むしろ、原虫の DNA に作用して殺虫効果を発揮するのではなからうかとの示唆を受ける結果を得た。

Achromycin は人類及び動物のトリパノソーマ症に対して治療効果を有するという報告があるが、著者の実験に於いては、Trichomycin と同様に Achromycin の抗トリパノソーマ性は認められなかつた。

実験成績を概括すれば次の如くである。

(1) Trypanosoma gambiense 並びに Trypanosoma lewisi の Feulgen 反応及び pyronin-methylgreen 染色に於いて、殆ど全部の虫体に核酸を証明したが、感染経過に伴なつて格別の変動は認められなかつた。しかし、感染動物の死後 5 時間に於いては、既に DNA 顆粒の変形又は破壊の像が認められた。

(2) DNA 顆粒は、通常、6~10 個を算え、核膜内縁に沿うて楕円形又は円形の環状に配列し、核室中央部は反応陰性で透明に見える像が定型的な像であつて、全虫体の 90% を占めた。

(3) Trypanosoma lewisi に於いては、Trypanosoma gambiense と異なり、kinetoplast の部位に F-反応陽性顆粒 1 個が認められた。

(4) RNA は、顆粒としては識別されず、原形質内に拡散性に一樣に淡染されているが、概して、核周辺に近づくに従つて比較的濃染する傾向が見られた。

(5) Mapharsemin の 0.01mg を gambiense 感染マウスの腹腔内に注射して、核分裂を示す虫体の増加を見た他、DNA 顆粒の退行変形と思われる像を多数に認めたが、RNA に対しては特記するような変化を及ぼさないとされた。

(6) Achromycin 及び Trichomycin は、gambiense 感染マウスに対しては治療効果を示さず、DNA 及び RNA にも何等の影響を与えないらしく思われた。

欄筆するにあたり、御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師登倉教授に対して、衷心感謝の意を表す。本編の概要に就いては、昭和 32 年 10 月 22 日 (別府)、日本寄生虫学会第 10 回南日本支部大会に於いて口演発表した。

参 考 文 献

- 1) 阿部道夫 : *Toxoplasma gondii* の細胞化学的検索並に薬剤 (サルファ剤) 投与による変化について. 寄生虫学雑誌 4 (2) : 104, 1955.
- 2) Cantrell, W. : The Effect of Mapharsen on Glucose Metabolism of *Trypanosoma equiperdum*. J. Inf. Dis. 92 (2) : 191-194, 1953.
- 3) 江上不二夫 編 : 核酸及核蛋白質, 下巻. 共立出版, 東京, 1951.
- 4) Gerzeli, G. : Cytochemical and Morphological Researches on Trypanosomidae (Phase-Contrast and Interference Microscopy). Trop. Dis. Bull. 53 (6) : 723-724, 1956. (Riv. di Parassit. Rome. 16 (4) : 209-215, 1955.)
- 5) Hewitt, R. T., Gumble, A. R., Wallace, W. S. & Williams, T. H. : Experimental Chemotherapy of Trypanosomiasis. V. Effect of Puromycin Analogues against *Trypanosoma equiperdum* in Mice. Trop. Dis. Bull. 52 (10) : 960, 1955.
- 6) 市川 收 : 細胞化学. 本田書店, 東京, 1953.
- 7) Lison, L. (今泉正訳) : 組織化学および細胞化学. 白水社, 東京, 1954.
- 8) 三枝重信 : 培養 2 核アメーバの核分裂に於ける核酸の消長. 日新医学 48 (7) : 401-405, 1956.
- 9) 小川勝士 : 滝沢系マウス腹水癌の Pyronin-Methylgrün 染色所見, 殊に吉田腫瘍との比較研究に就て. 岡山医学会雑誌 673 : 121-125, 1951.
- 10) 岡本耕造, 上田政雄, 前田隆英 : 顕微鏡的組織化学. 医学書院, 東京, 1955.
- 11) Pizzi, P. T. : Cytological Studies on *Trypanosoma cruzi*. 1. Observations in Culture : (a) Morphology, (b) Nucleus, (c) Chondriome. Trop. Dis. Bull. 48 (6) : 531, 1951. (Biológica, Santiago, 8-11 : 93-104, 1948/49.)
- 12) Pizzi, P. T., Prager, S. R. & Knierim, T. F. : The Chemotherapy of Experimental Infection with *T. cruzi*. XII. The Action of Puromycin alone and in Combination with Primaquine. Trop. Dis. Bull. 51 (9) : 897-898, 1954. (Bol. Informaciones parasitarias Chilenas 8 (4) : 77-79, 1953.)
- 13) Pizzi, P. T. & Diaz, A. M. : Feulgen Reaction in *Trypanosoma cruzi*. Trop. Dis. Bull. 53 (5) : 555, 1956. (Biologica, Santiago, 20 : 69-87, 1954.)
- 14) Sonntag, R. & Kloetzel, J. : Achromycin in the Treatment of Camundongas experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Trop. Dis. Bull. 51 (9) : 898, 1954. (Folia Clin. Biol. 20 (2) : 133-138, 1953.)
- 15) Tobie, E. J. : The Effect of Puromycin on six Species of *Trypanosoma* in Mice. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 3 (5) : 852-859, 1954.
- 16) Tobie, E. J. & Highman, B. : Influence of the Aminonucleotide of Puromycin on the Course and Pathology of Trypanosome Infections in Rabbits and Mice. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 5 (3) : 504-515, 1956.
- 17) Tobie, E. J. : The Trypanocidal Effect of Nucleocidin in Vivo. J. Parasitol. 43 (3) : 291-293, 1957.
- 18) Trincão, C., Franco, A., Nogueira, A., Pinto, A. R. & Mühlfordth, H. : First Report on the Treatment of Sleeping Sickness with Puromycin. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 4(1) : 13-17, 1955.