

ISSN 0388-3752

昭和60年3月
March 1985

原生動物学雑誌

第18巻 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 18 No.1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌
Jap. J. Protoz.

原生動物学雑誌 第18巻第1号

目 次

第18回日本原生動物学会大会概況

講演目次

一般講演

シンポジウム「住血原虫類の研究における最近の動向」

本会記事

ニュース

会員名簿

原稿作製上の注意

投稿規定

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)

浅 見 敬 三 石 井 圭 一 尾 崎 文 雄 小 山 力 重 中 義 信
高 田 季 久 中 林 敏 夫 野 沢 義 則 樋 渡 宏 一 藤 田 壽 吉
盛 下 勇 渡 辺 良 雄

Committee of the Japan Society of Protozoology

Shozo Inoki (President)

Keizo Asami, Keiichi Ishii, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Suehisa Takada, Yoshinobu Shigenaka,
Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi, Jinkichi Fujita, Isamu Morishita,
Yoshio Watanabe

原生動物学雑誌 編集委員

猪 木 正 三 (委員長)

高 田 季 久 中 林 敏 夫 野 沢 義 則 渡 辺 良 雄

Editorial Board

Shozo Inoki (Chief)

Suehisa Takada, Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Yoshio Watanabe



ありし日の猪木正三博士

故猪木正三博士略歴

明治44年5月11日生

本籍 三重県上野市岡波935番地

現住所 兵庫県尼崎市武庫之荘3丁目9の13

- 昭和14年3月 大阪帝国大学医学部卒業
- 14年5月 微生物病研究所助手
- 18年10月 大阪帝国大学大学院特別研究生
- 23年2月 大阪大学助教授（微生物病研究所 寄生虫病学部門）
- 24年1月 奈良県立医科大学講師嘱託
- 24年5月 医学博士
- 24年7月 医学部賞受賞
- 30年8月 大阪大学教授（微生物病研究所）
- 31年4月 大阪大学大学院医学研究科 社会系専攻担当
- 31年4月 日本寄生虫学会評議員
- 34年11月 大阪寄生虫病予防協会評議員
- 37年3月 理学博士
- 37年4月 大阪大学東南アジア医学研究会会長
- 38年1月 大阪大学大学院医学研究科病理系専攻担当
- 38年10月 日本熱帯医学会評議員
- 39年3月 WHO専門委員嘱託
- 40年6月 日本熱帯医学協会参与
- 41年5月 小泉賞受賞（日本寄生虫学会）
- 42年12月 日本原生動物学会会長
国際原生動物学会日本代表委員
- 45年4月 日本寄生虫学会幹事
- 46年11月 日本熱帯医学会幹事
- 48年4月 日本寄生虫学会会長
- 50年4月 大阪大学名誉教授
- 55年10月 第3回日独原虫病シンポジウム会長
- 59年4月 勲三等旭日中綬章受章
- 60年3月 逝去

猪木正三博士追悼

本学会会長、大阪大学名誉教授、猪木正三先生は去る3月27日、急性腎不全のために逝去されました。思いもよらぬ急逝のため、その訃報を聞いてわが耳を疑ったのは私1人ではなかったと思います。日頃、健康を誇りにされ御活躍中であっただけに私共の驚きと悲みは言辞に尽し難いものがあります。

先生は昭和14年大阪帝大医学部を卒業後ただちに微生物病研究所に入り、当初はウイルス学、リケッチア学の研究に励まれました。第二次大戦中、戦時研究の要請に応じてマラリア研究に着手されたのが原虫学研究の端緒であったと存じます。以後、寄生虫・原虫学部門助教授、昭和30年からは教授として教室を主催され、多くの研究成果を挙げるとともに後進の指導に当られました。この間に昭和28年より2年間、米国インディアナ大学、米海軍医学研究所に留学されています。昭和50年、停年退官され名誉教授となられた後も、ひきつづき病原性原虫学の研究に没頭されました。

昭和42年、日本原生動物学会創設と同時に幹事、学会運営と研究発展に尽力されてきました。また国際原生動物学会日本代表として何回も国際的集会にも参画されましたが、とくに本年8月、ケニアで開催される第7回国際原生動物学会では次回の会議を日本に誘致することを念願しておられました。その学会を目前にして急逝されたことは御本人はもとより私ども会員にとってもまことに残念なことと言うほかありません。

猪木先生は本学会の他に、日本寄生虫学会、日本熱帯医学会、日独原虫病シンポジウムなどの諸学会で幹事あるいは会長として御活躍になりました。WHO寄生虫学専門委員とし、また各種の国際学会に何回も参加され、国際的活躍の場は欧米諸国のみならず、東南アジア、アフリカ、中南米と広範囲に及んだのであります。JICA、SEAMICの計画に参与され発展途上国との学術交流、親善に努力されたことは衆知のことです。昭和55年日独原虫病シンポジウム会長として会を成功に導かれました。

先生の御研究は一貫して病原性原虫類およびその疾患に関する疫学、治療、原虫の生態免疫などの領域に終始しています。ガンビアトリパノソーマの免疫学的研究は細胞質遺伝学の創始的研究として注目され、またAK型出現に関する形質転換の研究は本原虫の分子レベルの研究成果として高い評価を与えられています。これらの研究に対し昭和41年小泉賞（日本寄生虫学会）が授賞され、昭和59年には長年に渡る研究業績、教育、国際協力等の御功績に対し勲三等旭日中綬章受章の栄に輝かれたのであります。

御退官後も奈良医科大学（荒木恒治教授）、徳島大学医学部（尾崎文雄教授、山田正興教授）

において研究を続行されてきました。本年3月30日より始まる第54回日本寄生虫学会に共同研究者とともに「Bleomycin で障害された *Trypanosoma gambiense* の DNA の修復現象に関する顕微蛍光測光学的研究」の演題を提出されておりました。おそらくその発表準備や資料整理の最中に突如として蒙られた御不幸であったと存じます。もっともっと長生きしていただき、私ども原生動物学会員の中心となって御活躍願いたかったと今さらながら先生の急逝が惜しまれてなりません。

先生御生前の御功績を称え、つつしんで御冥福をお祈り申し上げます。

昭和60年4月8日

中 林 敏 夫

日本原生動物学会大会概況

大会長 浅見敬三

会場 慶応義塾大学医学部
東京都新宿区信濃町35

会期 昭和59年10月28日(日)

日程	9:00	開	会
	9:00~12:20	一般講演	(1~18)
	12:20~13:20	昼食	
	13:20~13:50	総会	
	13:50~14:30	一般講演	(19~22)
	14:40~16:40	シンポジウム	
	16:50~17:40	一般講演	(23~27)
	18:00~	懇親会	

講演目次

一般講演

1. タマリンの寄生原虫について……………熊田 三由, 小山 力, 荒木 潤 (予研・寄生虫)
藤原 徹 (予研・獣疫), 町田 昌昭 (科博・動物)
2. 動物に寄生するクリプトスポリジウムについて
……………扇元 敬司, 稲本 民夫, 大津 伸昭 (東北大・農)
3. トキソプラズマ原虫の細胞内 pH のイオン依存性
……………遠藤 卓郎, 熊田 三由, 小山 力 (予研・寄生虫)
4. *Trichomonas foetus* 免疫マウスの腹腔 macrophage 及び lymphocyte の
in vitro 及び *in vivo* 免疫学的性状 ……岡 好万, 林 弘三 (徳大・教育・保健科学)
5. 熱帯熱マラリア原虫における生殖母体形成の誘発
……………小野 忠相, 中井 丈夫, 中林 敏夫 (阪大・微研・原虫)
6. *Trypanosoma evansi* の超微形態学的研究
I. Mastigont system 及び accessory structures ……比留木武雄 (島根医大・微生物・免疫)
7. *Trypanosoma cruzi* の強毒 trypomastigotes と弱毒 trypomastigotes の比較研究
……………Ma. Editha Hermosura, 神原 廣二, 中林 敏夫 (阪大・微研・原虫)
8. 抗原型変異トリパノゾーマ原虫ホモジネート処置マウスにおける異種抗原に対する免疫応答
……………古谷 正人 (高知医大・動物実験施設), 岡 三希生, 伊藤 義博 (徳大・医・寄生虫)
9. 蛍光色素 Hoechst 23258 を使用した *Trypanosoma gambiense* の K-DNA および
N-DNA の *in situ* microfluorometry 一両核酸に及ぼす Bleomycin の影響
……………猪木 正三 (奈良医大・寄生虫), 伊藤 義博, 岡 三希生 (徳大・医・寄生虫)
尾崎 文雄, 古谷 正人 (高知医大)
10. アメーバ性肝膿瘍発生機序に関する基礎的実験
……………建野 正毅, 竹内 勤, 小林 正規, 田辺 将信, 三浦左千夫, 浅見 敬三
(慶大・医・寄生虫)
11. *Amoeba proteus* における新しい核の単離法 ……月井 雄二 (法政大・教養・生物)
12. アメーバの放射型出現頻度に対する外液イオンの影響
……………木原 章, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
13. 定着性縁毛類幼生の付着行動……………堀上 英紀, 石井 圭一 (法政大・教養・生物)
14. 石手川ダム湖で冬季に赤潮を形成する *Peridinium* sp. の培養液の検討
……………川端善一郎, 寺戸 勅雄, 内藤新司郎 (愛媛大・農・環境保全)
15. 海浜における原生動物の動態 XI. タスマニア産殻アメーバ類…鈴木 実 (日大・法・生物)
16. 繊毛虫類の分類および生態に関する研究
I. 水圏に出現する優先種繊毛虫 *Strombidium* 属の分類……………前田 昌調 (東大・海洋研)
17. 繊毛虫 *Euplotes patella* の栄養期細胞及び接合完了体における小核の役割
……………佐藤 勝幸 (広島大・理・動物)

18. 纖毛虫類の接合型物質と疎水性接着物質との関係……………北村 昭夫 (東北大・理・生物)
19. *Paramecium bursaria* の双体の光顕及び電顕観察
……………渡辺 彊, 佐藤 美香, 遠藤 浩 (東北大・理・生物)
20. ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) の
増殖と小核の役割……………見上 一幸 (宮城教育大・理教研)
21. *Paramecium caudatum* の膜性突然変異体に於ける接合の化学的誘導
……………高橋三保子, 白倉 伸一 (筑波大・生物科学)
22. 纖毛虫における微小管タンパクの三次元構築……………重中 義信 (広島大・総科・情報)
23. テトラヒメ・ミクロソームのカルモデュリン結合タンパク質
……………長尾 清治, 工藤 修三, 武藤 吉徳, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
24. テトラヒメナ・ミクロソームの $(Ca^{2+}+Mg^{2+})-ATPase$
……………武藤 吉徳, 工藤 修三, 長尾 清治, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
25. テトラヒメナ・リソゾーム酵素, α -グルコシダーゼの精製と生化学的性状
……………坂野 喜子, 佐々木 昇, 野沢 義則 (岐阜大・医・生化)
26. *Tetrahymena thermophila* の接合過程におけるチューブリンおよび
14 nm-繊維形成蛋白質 (49 k 蛋白質) の細胞内局在性について
……………作田 寿子, 沼田 治, 渡辺 良雄 (予研・技術部), 保田 友義 (筑波大・生物科学)
27. テトラヒメナの Heat shock proteins
……………大場 浩美, 沼田 治, 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

シンポジウム 住血原虫類の研究における最近の動向

- 原虫免疫と癌免疫の接点 ……………鈴木 守 (群大・医・寄生虫)
- 住血原虫類の研究におけるモノクローナル抗体の利用について
—*Trypanosoma cruzi* を中心として—……………金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)
- マラリア原虫の赤血球環境への適応 ……………田辺 和祐 (大阪市大・医・医動物)

一 般 講 演

1. タマリンの寄生原虫について

小山 力, 熊田 三由, 荒木 潤
国立予防衛生研究所寄生虫部

藤原 徹
国立予防衛生研究所獣疫部

町田 昌昭
国立科学博物館動物研究部

Parasitic protozoa found in tamarins

Tsutomu Koyama, Mitsuyoshi Kumada and Jun Araki
Department of Parasitology, National Institute of Health

Tohru Fujiwara
Department of Veterinary Sciences, National Institute of Health

Masaaki Machida
Department of Zoology, National Science Museum

予研におけるA型肝炎ウイルスの感染実験のために、1983年7月7日に輸入したボリビア産野生アカハラタマリン (*Saguinus labiatus*) 15頭、および同年8月25日に輸入したペルー産野生クチヒゲタマリン (*S. mystax*) 10頭の寄生原虫検査をおこない、以下の原虫を検出した。すなわち、アカハラタマリンからは、糞便内から *Giardia* sp. の cyst, 血液中から *Trypanosoma* sp. の trypomastigote form, また、クチヒゲタマリンからは、糞便内からは何も検出できず、血液中からは、*Trypanosoma* sp. の trypomastigote form および *Plasmodium* sp. の amoeboid, schizont, gametocyte などを検出した。

検出法は、血液および糞便塗抹の Giemsa 染色標本と、糞便塗抹の Heidenhain's Iron Haematoxylin 染色標本による鏡検である。

1) *Giardia* sp. について

感染率は33.3% (感染頭数5/検査頭数15) で cyst の大きさは平均長径13.0 μ m, 短径7.3 μ mであった。

霊長類からの *Giardia* 属原虫の記載はすくなく、人

や猿類からの *G. lamblia*, ホソロリス (*Loris tardigradus*) からの *G. wenyoni*, 南米産猿 *Ateles geoffroyi* からの *G. sp.* などが知られている (Kulda and Nohýnková, 1978; 宮田, 1979)。今回検出した *Giardia* は、形態、大きさともに *G. lamblia* に類似するが、cyst だけの検出のため *Giardia* sp. としておく。

2) *Trypanosoma* sp. について

感染率はアカハラタマリンで73.3% (11/15), 原虫体全長 (遊離鞭毛を含む) は36~48 μ mであった。またクチヒゲタマリンではそれぞれ30.0% (3/10), 37~39 μ mであった。

両宿主からえられた *Trypanosoma* は、形態、大きさなどともに極めて類似し、同一種と思われる。即ち、全形は細長で大形であり、体前端、後端はともに尖っている。核は虫体中央よりやや前方に位置する、kinetoplast はやや小形で、核に接近して存在し、そのため虫体後端からはかなり離れ、かつ体側に辺在している。遊離鞭毛は原虫本体の1/4程度の長さを有する。

以上の形態的特徴に加えて、宿主の健康状態から察し

て、本原虫は非病原性のもと思われること、さらに、産地、宿主なども考慮して総合判断すると、*Trypanosoma minasense* の可能性が高い。本種の近似種である *T. rangeli* との関連については、Dunn and Lambrecht (1962) や Dunn *et al.* (1963) は、*T. rangeli* を *T. minasense* の synonym としている一方、Sousa and Dawson (1976) は、両者をそれぞれ独立種として扱うなど混乱がある。この整理については今後の検討にまちたい。

3) *Plasmodium* sp. について

感染率は10.0% (1/10) で、血液中の形態は被寄生赤血球の膨大がほとんど認められないこと、band form が存在することなどを含めて *P. malariae* のものに類似する。

新大陸の霊長類からの *Plasmodium* 属原虫による自然感染例としては、オマキザル科の猿から四日熱型である *P. brasilianum* のものが報告されている (Garnham, 1966; Levine, 1973; Ayala, 1978)。

本調査でえられたマラリア原虫は、以上の特徴に加えて、宿主や産地などを考慮すると *P. brasilianum* である可能性が高い。

4) 検出原虫種と実験動物としての猿の管理について

Giardia sp. は、人体に病原性を有する *G. lamblia* に類似するから後者と同一種の可能性があり、猿にも病害を与えるかも知れないこと、また *Plasmodium* sp. についても、同一種の可能性の高い *P. brasilianum* が猿に対して病原性のある (Ayala, 1978) ことなどから、実験動物としての猿の管理上、猿の間に発症、伝播などの危険性のあることを考慮すべきである。

また、*P. brasilianum* が、実験的に人への伝播が可能である (Contacos *et al.*, 1963) とされていることや *G. lamblia* 類似の原虫の検出されたことなどは、猿を

実験動物として扱う人の側にも感染の危険性があるわけで、zoonoses や biohazard の面からも特別の配慮がなされねばならぬだろう。さらに、南米産の猿には、*Trypanosoma minasense* や *T. rangeli* に伴って、人にも猿にも極めて病原性の強い *T. cruzi* の重複感染が、しばしば認められる事実も重視する必要がある (Dunn *et al.*, 1963; Sousa and Dawson, 1976)。それは、*T. minasense* や *T. rangeli* の寄生を認めるような猿には、*T. cruzi* 感染の潜在する可能性もまた考えられるからである。

質問 猪木 正三 (奈良医大)

写真を拝見しますと *Crythidia* 属の原虫に見えますが、もう一度スライドを見せて下さい。

回答

核, Kinetoplast, 波動膜などの位置関係から *Trypanosoma* 属の Trypomastigote form と考えます。

質問 岡 好万 (徳島大・教育・保健科学)

病原性がない (証明された *Trypanosoma*) と述べられました。日和見感染の可能性はありますか。また、免疫応答は十分起こし得る可能性はあると思いますか。

回答

日和見感染の可能性は充分あると思います。今後検討してみたいと思っています。

質問 中林 敏夫 (阪大・微研)

P. brasilianum と思われるものを検出されたことは大変興味深い。発育周期が四日熱タイプであるかどうかを検討されるとよいと思う。原虫株の維持に努めていただきたい。

回答

検出したばかりで、詳しい性状についてはまだ不明です。今後検討してみたいと思っています。

2. 動物に寄生するクリプトスポリジウムについて

扇元 敬司, 稲元 民夫, 大津 伸昭
東北大学農学部畜産学科家畜衛生学教室

Cryptosporidium in animals

Keiji Ogimoto, Tamio Inamoto and Nobuaki Otsu
Department of Animalscience, Tohoku University

コクシジウム類, アイメリア亜目, クリプトスポリジウム (*Cryptosporidium*) はヒト, ウシ, ヒツジ, ニワトリなど広い宿主域をもつ原生動物として知られている。また, さらに最近では下痢症の仔牛, 呼吸器病のニワトリ, ヒトの後天性免疫不全症 (AIDS) などと関係しているのではないかという報告もある。

私共はニワトリを用いて感染実験をおこない, その感染性について検索した。

材料と方法

ニワトリ糞便から分離した *Cryptosporidium* のオーシスト 10^5 を1日齢ヒナ(ローランド系, オス)に接種した。すなわち経口感染, 経鼻感染, 直腸感染, 同居感染の各感染実験区および無感染区を設定し, 飼育したヒナは感染14日間, 連日剖検し, 採材し *Cryptosporidium* 感染の有無を検索した。

また, 一方, 本実験と共にイヌ, ネコ, ブタ, ニワトリ, ハムスターなど野外材料の糞便中の *Cryptosporidium* オーシストについても検索をおこなった。

結果および考察

無感染区をのぞく各実験区のヒナは, いずれも本原虫の感染がみとめられ, 本原虫のニワトリに対する感染実験の可能なことが示された。なおいずれの感染ヒナも約1週間後には粘膜上皮に虫体がみとめられたが, とくにフアブリシウスのうに虫体の寄生が多数みとめられたことは特徴的であった。本器官は鳥類の免疫担当器官であることから, 本原虫の寄生は, ニワトリの免疫能に対し

て, なんらかの作用を及ぼしているのかも知れないことが考えられた。一方, 各種動物の野外例では, 検索した動物種の多くから本原虫が検出され, 我国においても, すでに本原虫の寄生が多いことが推定された。

質問 小山 力(予研・寄生虫)

自家感染があるのではないかと考えられていますが, これについて何か御経験がありましたらお教え下さい。

回答

私共の実験成績から考えると, たびたび自家感染が行われているものと思われます。

質問 高田 季久(阪市大・医・医動物)

1) ニワトリでフアブリシウス嚢に集まる理由について何かお考えがありますか。

2) その場合, 栄養摂取の役割を果すと考えられている Attachment organ が存在していますか。

回答

1) 機械的に唯, 集まったのかも知れませんが私としては, トリのフアブリシウスのうは, 免疫担当器官であることと関連づけて考察したいのですが。

2) この Attachment organ については, 目下全く不明です。

質問 石原 忠雄(科学飼料研究所)

トリでの死亡率はどの位ですか。

回答

私共の 10^5 オーシスト接種の感染実験では致死はありませんでした。しかし, なお諸外国の例では野外の死亡例があることが知られています。

3. トキソプラズマ原虫の細胞内 pH のイオン依存性

遠藤 卓郎, 熊田 三由, 小山 力
国立予防衛生研究所寄生虫部

External-ion dependence of the internal pH of Toxoplasma gondii

Takuro Endo, Mitsuyoshi Kumada and Tsutomu Koyama
Department of Parasitology, National Institute of Health

トキソプラズマ原虫の自動運動は受動的にプロトン駆動力が付加された際に誘導されるものと思われる。この時形成される膜電位 ($\Delta\varphi$) はイオン拡散電位に依存しているものと考えられた。そこで今回はプロトン駆動力のもう一つの構成成分である水素イオンの化学的濃度勾配 (ΔpH) について検討を試みた。

マウス腹腔より分離したトキソプラズマを K_2SO_4 -生食水 (K_2SO_4 45mM, MgSO_4 10mM, glycylglycin buffer 20mM, glucose 5mM, BSA 7 mg/ml pH 8.3) 中に保存し, この原虫を glucose 非存在下で, K^+ もしくは Na^+ をベースとした生理的塩類溶液 (以下 K^+ -, Na^+ - 生食水) に分散させて g-aminoacridin (g-AA) の取込みにより ΔpH を測定した。その結果, K^+ - 生食水中では g-AA の取込みの増加はみられなかったが, Na^+ - 生食水中では g-AA の取込みの増加がみられた。この取込みは nigericin により解消した。

次にエネルギー依存性の反応として, グルコース添加実験を行なった。その結果, トキソプラズマは K^+ - 生食水中でもグルコース添加により g-AA の取込みの増加がみられた。またこれと平行して行なった 3,3'-dipropyl-2,2'-thiadicyanocyanine iodide (dis- $\text{C}_9(5)$: $\Delta\varphi$ 測定試薬) の取込み実験により $\Delta\varphi$ 形成が確認された。また Na^+ - 生食水中でのグルコース添加実験では, g-AA の著しい取込増加が観察された。同時にトキソプラ

ズマは dis- $\text{C}_9(5)$ の著しい取込み増加を行なうことが明らかとなった。

g-AA は細胞外の pH に比べ細胞内 pH (pH_{in}) が低い場合に取込まれるもので, 取込みの増加は pH_{in} の酸性化が起きていることを示している。酸性化の程度は外部のイオン環境に影響されていることも明らかとなった。しかし細胞内酸性化によって形成された ΔpH はプロトン駆動力にとってマイナスの要因であることから, 今回のいずれの実験条件下でも形成された $\Delta\varphi$ と ΔpH が互いに消し合う関係となっていた。今後, トキソプラズマ原虫の自動運動の誘導とのかかわりあいにおいて検討する予定である。

質問 金田 良雄 (東海大・医・寄生虫)

膜電位測定のための試薬などを加えた実験で虫体は死亡しないのですか。

回答

dis- $\text{C}_9(5)$ (膜電位測定試薬) は原虫の運動を不可逆的にはぼ完全に止めてしまいます。しかし得られた値は他の測定試薬 (^3H -TPP) の結果と大きな差がありません。このことから少なくともこの方法で正しい膜電位が測定されているものと思われます。

ちなみに TPP もしくは pH 試薬である g-aminoacridine (g-AA) は用いた薬量では原虫の運動に何ら影響を与えません。

4. *Trichomonas foetus* ribosome 免疫マウス 腹腔 macrophage 及び lymphocyte の in vitro 及び in vivo 免疫学的性状

岡 好万, 林 弘三
徳島大学教育学部保健科学

In vitro and in vivo immunological properties of peritoneal macrophages and lymphocytes in mice immunized with Trichomonas foetus ribosomes

Yoshikazu Oka and Hiromi Hayashi

Department of Health Science, Faculty of Education, University of Tokushima

$7 \cdot 10 \times 10^8$ *Trichomonas foetus* 感染を経過したマウスの lethal dose の再感染に対する強い防御能力は、*T. foetus* から遠心分画法により得られる ribosomal antigen (RAG) 単独の抗原刺激では得られないが、Freund's complete adjuvant (FCA) と共に刺激することにより再現できる。この結果から 1) RAG は抗原性が弱いか、2) 貪食 macrophage (M ϕ) により速かに消化され抗原性を失うことが推測された。そこで、RAG 単独の処女刺激前後に dextran sulfate 500(DS) で宿主を処置すると抗体応答も防御能力も表現されなかったが、更に RAG 単独二次刺激を与えると顕著な抗体誘導を生じた。しかし、防御能力は再現しなかった。多分、DS 処置は RAG に対する抗体誘導の memory を作り、memory から抗体産生に進むための二次刺激には貪食 M ϕ を要求しなかったように思う。DS は貪食 M ϕ による RAG の抗原性の消失を防ぐが、RAG を防御抗原として認識するためには FCA が必要であった。ここでは、FCA と共に RAG あるいは RAG 単独で免疫した宿主に lethal dose の腹腔内攻撃を実施し、経時的に腹水を採取し、腹腔浸出細胞と *T. foetus* の数的変動を測定した。他方、これら免疫宿主の腹腔細胞を in vitro で adherent 及び non-adherent 細胞に分別し、これら分画細胞に生虫を接触させた場合、どのような interaction を起こすか非免疫宿主から得た分画細胞と比較観察した。

[方法]: 30日齢 ddY 雌マウスを使用した。RAG は F-bouillon で24時間発育の洗浄虫体から凍結融解により得た homogenate より遠心分画法により得た。RAG は phosphate buffered saline (PBS) 0.1ml 毎 300

μg 濃度とし、この 0.25ml を 0.15ml の FCA と共に免疫、また、RAG 単独免疫の場合は PBS 0.4ml (注射量) に 700 μg 濃度含ませた。腹腔内免疫18日後 F-bouillon 24時間増殖原虫 4×10^7 を腹腔内に攻撃した。in vivo で腹腔浸出細胞と生虫の数的測定は攻撃後 3, 5 及び 18日に実施した。マウスは頸部切断直後に saline 5ml を注入し完全に洗浄腹水を回収し hemocytometer で計測した。in vitro 反応は上記免疫18日後の宿主を頸部切断 10% NBCS 加 RPMI 1640 (EDTA を含む) 5ml を腹腔内に注入洗浄により腹腔細胞を回収し、規定の法により adherent 及び non-adherent 細胞に分画した。前者は M ϕ 、後者はリンパ球が90%以上を占めた。M ϕ の一部は生虫 (4×10^7) を、他の M ϕ にはリンパ球培養上清 (生虫と1時間 incubation 後のもの) と生虫の2者を加え1時間 incubation した後ライト染色を行った。また、リンパ球と生虫の混合 incubation の、上清を除いた沈渣もライト染色を行った。非免疫宿主は対照として全く同一の操作を進めた。

[成績]: In vivo test. . . . RAG 単独免疫宿主は攻撃3日後生虫数は約 3.8×10^8 に達し、腹腔浸出細胞も著しく増加したが原虫数に比較すると約 $\frac{1}{3}$ にすぎない。その多くは生虫により破壊された好中球である。RAG + FCA 免疫群は同時期に生虫数 10^8 以下に減少し、宿主細胞は正常マウスよりやや増加の程度で、その多くはリンパ球と M ϕ であった。攻撃後5日で対照群は100%死し、RAG 単独群も少数生存を見るのみで、生存宿主の腹腔細胞と生虫数は3日値とほぼ同一であった。しかるに、RAG + FCA 群では生虫はほぼ清掃され宿主細胞

胞数は3日値と著差を見なかった。攻撃18後の測定に耐えたのは RAG + FCA 群のみで、原虫は全く証明されず宿主細胞も一貫して3日値に類似するかやや低下した ($4 \sim 1 \times 10^7$)。ただ、この免疫群で慢性経過を示す数例は腹腔細胞が 10^8 レベルに増加し肥胖細胞が顕著に出現した。しかるに、原虫数は攻撃数 (4×10^7) 以下であった。In vitro test..... 前述のように対照、RAG 単独及び RAG + FCA 群は、それぞれ Mφ + 原虫、Mφ + リンパ球上清 + 原虫及びリンパ球 + 原虫の3セットをテストした。対照及び RAG 免疫群の Mφ の貪食活性は低く、貪食 Mφ 数は 4.5~7% 程度で 1 Mφ の貪食数も常に1個にすぎなかった。リンパ球と原虫の混在においても両者の形態に異常を認めなかった。しかるに、RAG + FCA 群は貪食活性が著しく増強 (23~28%) し、2~5 原虫を貪食した Mφ がしば

しば見られた。また、リンパ球と原虫の混合により前者の変性と原虫の swelling が顕著に現れたが、果たして生物的本質反応か、あるいは人工的条件に基づくものか問題が残されている。

質問 中林 敏夫 (阪大・微研)

(ribosome + FCA) 免疫マウス Mφ の貪食能が増強していますが FCA 単独使用で貪食能の亢進がみられることはありませんか。

回答

FCA は、非特異的に Mφ の貪食能力を活性化します。たとえば FCA を 0.25~0.3ml 注入しますと *T. foetus* に対する非特異的防御能が発現します。従って私たちは、この作用を抑制する目的から 0.15ml 以上は使用しないことにしています。

5. 熱帯熱マラリア原虫における生殖母体形成の誘発

小野 忠相, 中井 丈夫, 中林 敏夫
大阪大学微生物病研究所原虫学部門

Induction of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum in vitro

Tadasuke Ono, Takeo Nakai and Toshio Nakabayashi

Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases Osaka University

熱帯熱マラリア原虫の生物学的性質は *in vitro* 培養の成功により、しだいに明らかになってきている。しかし、生殖母体形成はその機序がまだ不明である。無性生殖期原虫の増加、それに対する抗体の増強、薬剤による原虫増殖の不完全な抑制などが関与するといわれているが、明らかではない。Kaushal *et al.* (1980) が発表した C-AMP の効果も多くの研究室での追試は不成功に終わっており、最近では逆に C-AMP が生殖母体形成を阻止するという報告すらみられる。私達は熱帯熱マラリア原虫に対するモノクローナル抗体産生 hybridoma 細胞の培養上清中に生殖母体形成を誘導する物質があることを見出した。生殖母体形成誘発効果はミエローマ細胞の培養上清中にはみられず、抗赤血球抗体を産生する hybridoma 細胞の培養上清液中や MEM 液で培養したマ

ウスL細胞上清液中にもみられなかった。私達が行っているマラリア原虫の培養では、培養液が 10ml 以上になると原虫の増殖が阻害されるので、実験に際しては hybridoma 細胞の培養上清の添加によるマラリア培養液の増加を防ぐため、RPMI 1640 の粉末を hybridoma 細胞培養上清に溶解して使用した。この液による生殖母体形成の誘発は原虫継代の時すなわち、赤血球の 0.5ml に 15~20% の Parasitemia を示す感染赤血球 0.1ml を加えた時、用いても、また培養 4~5 日後、原虫の Parasitemia が 5~10% になった時、用いてもみられ、形成される生殖母体の数は、Concanavalin A 5~20γ/ml の添加により増加した。次にこの生殖母体形成誘発物質の性状を調べ、透析に際して孔径 24Å のセルロースチューブを通過し、分子量が 10,000 以下であること、この

12 一般講演

透析液に含まれる物質は80℃, 10分の加熱によっても損なわれず, 耐熱性であることを認めた. このような生殖母体形成を誘発する物質はミエローマ細胞P3-X63-Ag8およびSP-2のいずれの細胞を用いた hybridoma 細胞であっても, それが熱帯熱マラリア原虫抗体を産生するものであれば培養上清液中に存在した. 次により成熟した生殖母体を多数得るための試みを行い, その結果, hybridoma 細胞を超音波によって破壊し, これを hybridoma 細胞培養上清液と共に用いると, 第4期, 第5期に成熟した生殖母体がかかなり出現すること, そしてこれが Caffeine 最終濃度 1mM~5mM あるいは Calmodulin 2.5~10.0 μ g の添加により増強されることなどを見出した.

質問 猪木 正三 (奈良医大)

- 1) *in vitro* で flagella formation の実験をやられましたか.
- 2) 生殖母体であるというには (生きていますか否かを証

明するには) 蚊に対する感染性をしらべる必要があるのではないか.

回答

- 1) 現在試みています.
- 2) 形態的な観察で, 明らかに生殖母体です. 生死については stage が進むこと, 明瞭に染色されることなどから, 生きていますと思いますが, 1)の観察を含め, 種々試みてみたいと思います.

質問 田辺 和裕 (大阪市立大・医・医動物)

Gametocyte 誘導に myeloma (SP-2) の supernatant が時により効く原因について何か, お考えがありますでしょうか.

回答

SP-2 は時期を異にして2回, 恵与されたものを使用しましたが, それぞれのものについては繰り返した実験で同じ結果を得ています. 別のクローン (?) のものについて, 更に詳しく調べたいと思います.

6. *Trypanosoma evansi* の超微形態学的研究

I. 鞭毛形および附属装置

比留木 武雄

島根医科大学微生物・免疫学教室

Ultrastructure of Trypanosoma evansi (Taiwan strain)

I. Mastigont system and its accessory structures

Takeo Hiruki

Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

The all pathway of quartet microtubules has not amply clarified and the relationship between the quartet microtubules and the other accessory structures such as macula adherens, second barren body and mitochondrion has also not been elucidated.

With Taiwan strain of *Trypanosoma evansi* isolated from the infected mice by Lanham's method, the pathway of the quartet microtubules and the relationship among the quartet microtubules, basal body, second barren body and mitochondri-

on was observed under a transmission electron microscope.

The following findings were obtained:

- 1) The ultrastructure of the mastigont system of this parasite was similar to those of which have been reported already. (Sleigh, M. A., Cilia and Flagella, Academic Press, 1974 Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A., Biology of Kinetoplastida, Academic Press, 1976)
- 2) In the outside of the parasite body, macula adherens, desmosome-like structure, ranged from

the opening of the reservoir (flagellar pocket) to the anterior end of the parasite body, which existed at the site where the flagellum and the cell body adhered each other. This macula adherens was observed on the inside of the flagellar and the cellular membrane; the macula adherens intervened between the subpellicular microtubules in the cytoplasm of the parasite.

Inside of the reservoir, macula adherens appeared at the site near by the terminal plate. In this site, quartet microtubules coexisted with the macula adherens.

Of the pathway of quartet microtubules examined in this study, this site was the most adjacent to the wall of reservoir. Quartet microtubules lied between the macula adherens and the electron dense linear structure. This linear structure occupied the opposite site of the macula adherens and this site was closer to the cell surface and the subpellicular microtubules than the latter.

The alignment, consisted of macula adherens, quartet microtubules and the linear structure, was thought to run toward the cell surface, gradually changing the tilt of the alignment to take parallel position to the base of the flagellum. When this alignment reached to cell surface, it was thought to disappear because the

images of quartet microtubules and the linear structure were no longer obtained in the cross sections of the site where the flagellum ran along the parasite.

- 3) In the more proximal part of the flagellum than the site where the alignment described above, quartet microtubules was thought to run behind the flagellum, because the tilting direction of the flagellum is toward the anterior end of the parasite; in the longitudinal section of the flagellum, quartet microtubules was observed at the opposite site against tilting direction of the flagellum.
- 4) In the basal body part, the extended part of basal body connected partially to the quartet microtubules.

Quartet microtubules ran toward the second barren body but disappeared on the way. However, in other profile, bridging existed between the basal body and second barren body. Connection via the amorphous substance also existed between second barren body and mitochondrion.

Therefore, it was thought that there would be a connecting system among quartet microtubules, basal body, second barren body and mitochondrion. However, whether or not this connecting system may play a role in transportation of the metabolites remains unknown.

7. *Trypanosoma cruzi* の強毒 trypomastigote と弱毒 trypomastigote の比較研究

Ma. Editha Hermosura, 中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

神原 廣二

長崎大学熱帯医学研究所原虫学部門

Comparative studies on trypomastigote of Trypanosoma cruzi from virulent and avirulent strains

Ma. Editha Hermosura and Toshio Nakabayashi

Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Hiroji Kanbar

Department of Protozoology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

Trypanosoma cruzi の Tulahuén 株から長期試験管内培養により弱毒株を得た。*T. cruzi* の感染には Trypomastigote が重要な役割を果たすことより、強毒 Trypomastigote の病原力にかかわる因子を明確にする目的で、マクロファージ、L-cell、新しくマウス心臓より分離した細胞に対する弱毒、強毒 Trypomastigote の作用を比較した。マクロファージは DDY マウスにチオグリコレート培養液の腹腔内に注射後、3日目に採取した腹水を培養容器に移し、1時間後に底面に付着した細胞とした。心臓由来細胞は生後3日目の DDY マウスより心臓を摘出しそれを細切して培養した。これらの培養細胞に対し弱毒および強毒 Trypomastigote を一定量加えて、時間を追って残存原虫数を調べて侵入原虫数を推定した。24時間後に残存原虫は培養器を数回培養液に

て洗うことにより除去、その後に培養上清々新たに出現する Trypomastigote の数により細胞内の発育状況を推測した。結果マクロファージに対して弱毒 Trypomastigote は強毒のものに比し早い侵入（または取り込まれ）を示すが、その後の発育は障害されるため原虫の出現は強毒株に比し遅れる。L-cell に対しては弱毒株は強毒に比しより早い侵入、その結果としてより早い増殖を示す。一方新しく心臓より分離した細胞に対しては逆に強毒 Trypomastigote がより早い侵入と増殖を示す。このことは強毒 Trypomastigote が当然予想されたマクロファージ内での増殖能の強さの他に細胞選択性の点でも、弱毒 Trypomastigote では失われたと思われる能力を保持していることを示している。

8. 抗原型変異トリパノソーマ原虫ホモジネート処置マウスにおける異種抗原に対する免疫応答

古谷 正人

高知医科大学附属動物実験施設

岡 三希生, 伊藤 義博

徳島大学医学部寄生虫学教室

Immune responses to heterologous antigens in mice pretreated with cell homogenate of Trypanosoma gambiense variants

Masato Furuya

Institute for Laboratory Animals, Kochi Medical School

Mikio Oka and Yoshihiro Ito

Department of Parasitology, School of Medicine, University of Tokushima

アフリカ睡眠病においては、他の熱帯住血原虫感染症におけると同様、異種抗原に対する宿主の免疫応答能が著しく低下することが報告されている。しかしながら、その引金となる原虫側の物質及び抗体応答能低下の機序に関してはまだ不明の点が多い。今回は、抗体応答能低下に関与する物質の追究と抗原型変異再発原虫を含めた異種抗原に対する宿主の抗体応答能の解析を目的とした。

<材料及び方法>

原虫は *Trypanosoma gambiense* (T.g.) Wellcome 株を用い、2度のクローン化によって抗原型V₀を得た。抗原型変異株 V₁ 原虫は V₀ 感染マウスをヒト血清で治療した時に出現するものをクローン化して得た。

抗体応答能低下に関与する物質の検索のため、原虫から以下の物質を調製した。1) 細胞ホモジネート (CH) とその遠心分画物、2) 原虫をトリプシン処理後、1,000 ×g 遠心で得られた上清 (T-sup), 及びその沈渣の生原虫からの細胞ホモジネート (TCH)。

宿主の免疫応答能は、これらの物質で刺激された5～7週令 ddY 系雌マウスでのB細胞の非特異的活性化と特異抗体産生能の両面から検討した。測定は Jerner の直接法により、羊赤血球 (SRBC) に対するプラーク形成で行った。前者に関しては、各物質を腹腔 (i. p.) 内に接種後、4日目の脾細胞を用いて行った。後者は、各物質の最終接種直後から7日目にかけて、i. p. 又は静

脈 (i. v.) から SRBC (4～5×10⁷) を接種し、その4日後に抗体産生細胞数を測定した。更に、抗原型変異株原虫に対する抗体産生能は感作5日目の血清を用いて凝集反応で調べた。

<成績及び考察>

1) CH, その 144,000 ×g 遠心沈渣, TCH 及び T-sup 等で前処置された宿主では、SRBC に対するB細胞の非特異的活性化が顕著に現われるが、CH の 144,000 ×g の上清ではこの現象は認められなかった。B細胞の非特異的活性化に関与した物質を protease, pronase, periodate 及び熱 (60°C, 10分) 等で処理、並びに T-sup を透析処理した場合には、これらの物質はB細胞を非特異的に活性化しなくなった。

2) 各物質で前処置されたマウスでの SRBC i. p. 接種時の特異抗体産生能を調べた結果、CH, その 144,000 ×g 沈渣, TCH 及び T-sup 処置群での抗体産生能は正常マウスのその約 1/2 ～ 1/6 に抑制されていた。しかし、SRBC i. v. 接種マウスでは、正常マウスのそれと同程度か、逆に促進される傾向にあった。

3) 一度抗原変異を経験したマウスでの抗体産生能を調べる目的で、V₀, V₁CH を1週間隔で接種したマウスに SRBC を時期及びルートを変えて投与した。その結果、V₀, V₁CH の接種ルートは SRBC の抗体応答に影響を及ぼさなかったが、SRBC の接種時期及びルートは宿主の抗体産生能に影響した。すなわち、V₁CH 接種

直後に SRBC を i. p. 投与したマウスでは抗体応答能は SRBC 単独投与のそれに比べて約 1.5 ~ 2 倍に促進された。しかし、V₁CH 接種 2 日目以降に SRBC を投与したマウスでは SRBC 単独のその約 1/6 ~ 1/10 に抑制された。一方、SRBC を i. v. から接種した場合には、全ての時期において、抗体応答能は SRBC 単独投与のそれと変わらなかった。

4) T. g. 感染症においては、再発原虫の surface coat 構成成分は SRBC 同様に異種抗原に相当する。そこで、V₀CH 処置マウスに V₁CH 接種した 5 日後の凝集抗体価を調べた。その結果、i. p. 接種で抗体応答抑制が認められたが、i. v. 接種では対照と同程度の抗体価を示した。

5) SRBC 投与後の腹腔 Mφ を調べた結果、V₀CH 処置群の Mφ 数は対照群のその約 2 倍であった。

以上の結果から、T. g. 感染宿主での異種抗原に対する抗体応答抑制と B 細胞の非特異的活性化には原虫表層の糖タンパク質が関与していることが示唆された。T-sup 透析処理実験の結果から、B 細胞の非特異的活性化に関与する物質は比較的低分子のもので推察される。しかしながら、この物質と抗体応答抑制に関与する物質が同一のものか否かは今後の課題として残された。

T. g. 感染初期を想定して行った今回の研究から、この時期での異種抗原に対する抗体応答抑制は抑制下細胞に起因するよりも、Mφ の貪食能の高揚と関係しており、それ故に、局所への抗原接種で抗体応答抑制が生じたものと考えられる。更に、この時期の宿主は血中に出現する一種の異種抗原である再発原虫に対して抗体を速やかに産生でき、これによって原虫を処理していける可能性も示唆された。

9. 螢光色素 Hoechst 33258 を使用した *Trypanosoma gambiense* の kinetoplast DNA (K-DNA) および nuclear DNA (N-DNA) の *in situ* microfluorometry — 両核酸に及ぼす Bleomycin の影響

猪木 正三

奈良県立医科大学寄生虫学教室

伊藤 義博, 岡 三希生

徳島大学医学部寄生虫学教室

尾崎 文雄, 古谷 正人

高知医科大学

In situ microfluorometry of kinetoplast DNA (K-DNA) and nuclear DNA (N-DNA) in Trypanosoma gambiense using Hoechst 33258 fluorescent dye

Shozo Inoki

Department of Parasitology, Nara Medical University

Yoshihiro Ito and Mikio Oka

Department of Parasitology, Faculty of Medicine, University of Tokushima

Humio Osaki and Masato Furuya

Kochi Medical School

Hoechst 33258 は DNA の A-T (アデニン-チミン) base pair に特異的に結合する螢光色素である。今回は、われわれの *in situ* microfluorometry の研究に本色素を利用する目的で、先ず Hilwing and Gropp (Exp. Cell Res. Vol. 75, p. 122, 1972) の報告に従って実験を始めたが、測定値は動揺し一定の数値が得られず、この予備実験は失敗に終わった。そこで、本色素使用上の諸条件を慎重に検討したところ、色素の濃度や励起光の強さによりいわゆる濃度消光 (concentration quenching) が起こることが明らかになり、この濃度消光を防止するためには、色素 1 μg を 1 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) (Na と本色素は反応して沈澱を生ずるため、Na を含まないものを使用する) 1 ml に溶解したものを使用し、励起光の強さを ethidium bromide の場合の $\frac{1}{10}$ に減弱する必要があることも判明した。

続いて、この確立された新測光法に準拠し、DNA に strand break を起させる抗腫瘍性物質 Bleomycin (1 mg/kg) を *Trypanosoma gambiense* (Wellcome

strain) 感染マウスの腹腔内に注射して、各原虫細胞内の K-DNA および N-DNA に対する影響を観察した。原虫細胞はその発育段階によって 1K 1N (1個の kinetoplast と 1個の nucleus をもつ原虫)、2K 1N (2個の kinetoplast と 1個の nucleus をもつ原虫)、2K 2N (2個の kinetoplast と 2個の nucleus をもつ原虫) の 3群に分類し、各群の細胞について螢光測光を行った。その結果、分裂中の 2K 1N および 2K 2N 細胞においては、いずれも Bleomycin 投与30分後に著明な螢光強度 (fluorescence intensity=FI) の上昇が認められ、投与60分後には下降を示し、その後再び上昇に向うことが明かになった。これに反し、静止期にある 1K 1N 細胞においては、投与30分後の FI の上昇はみられなかったが、その後は上昇せず下降を示した。

最後に、上記の 2K 1N および 2K 2N 細胞に起った第2番目の FI の上昇は、その時期からみて Bleomycin による DNA 障害の修復 (repair) に帰因するものと推定し、これを確証するため修復酵素阻害剤の1つ

18 一般講演

である ABA (aminobenzamide) の 400 mg/kg を Bleomycin 投与90分前に感染マウスの腹腔に注射したところ、第2番目の FI の上昇は起こらなくなった。従って、Bleomycin 投与例の 2K 1N および 2K 2N 細胞に観察された第2番目の FI の上昇は、薬剤によって障害された DNA の修復の結果であることがほぼ明らかになった。なお、静止期の 1K 1N 細胞において、Bleomycin 投与後に第2番目の FI の上昇がみられなかったことは、DNA 障害の修復に原虫の分裂増殖が必要であることを示唆していると思われる。

質問 前田 昌調 (東大・海洋研)

1) Na⁺ が Hoechst と反応し、DNA 測定上の障害となるとのことですが、Na⁺ はサンプルよりどのように除くのですか。

2) Ethidium bromide と比較し、Hoechst 33258 を

使用した利点は何ですか。

回答

1) サンプルからは除いておりません。Hoechst の色素を稀釈する液に Na⁺ が含まれていると測定値が動揺して一定の成績が得られないので、稀釈液には Na⁺ を含まないものを用いています。

2) もちろん Ethidium bromide と Hoechst 33258 は DNA との結合のしかたに相異がありますが(前者は intercalate し、後者は A-T base pair に特異的に結合します)それぞれ特長があり、どちらが利点があるかは、その使用目的によってちがってくるでしょう。ただ強いて言えば、Hoechst 33258 の方は DNA に結合しないから、RNase 処理が要らないという利点があります。

10. アメーバ性肝膿瘍発生機序に関する基礎的実験

建野 正毅, 竹内 勤, 小林 正規, 田辺 将信, 三浦左千夫, 浅見 敬三
慶応大学医学部寄生虫学教室

Basic study on the mechanism responsible for formation of amoebic liver abscess

Seiki Tateno, Tsutomu Takeuchi, Seiki Kobayashi,
Masanobu Tanabe, Sachio Miura and Keizo Asami
Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University

無菌株アメーバを用いた感染実験は最近ハムスター等において成功しているが、アメーバを直接肝に接種する方法をとるため、アメーバ感染の初期病変像を知ることが困難であった。我々はこの問題を解決するために、アメーバを直接門脈に接種し、感染させる方法を開発した。この方法は病態生理学的によりアメーバ性肝膿瘍形成の実態に近いものと思われるので病理組織学的検討を加え報告する。感受性の高い砂ネズミ (Mongolian gerbil) の門脈に無菌株 (HM-1: IMSS), 3×10^5 ケを one shot にて注入し、病巣の経時変化を観察した。対照としては glutaraldehyde にて固定後洗浄したアメーバを用いた。3時間後では肝細胞の巣状の変性が広くみられ、グ

リソン鞘内にアメーバが存在した。6時間後では巣状壊死が肝全体に分布し、周囲に好中球の浸潤がみられた。12時間後では巣状壊死は進行し、壁死巣に隣接して血栓、フィブリン、アメーバ等が確認された。24時間後には多数の細胞浸潤を伴った壊死巣の中心部にアメーバの存在を認めた。2日後にはアメーバ虫体を内在する microabscess がより鮮明となり、3日後には壊死細胞が消失し、abscess の周囲に類上皮細胞や線維芽細胞がみられるようになった。4日後には多数のアメーバ、及び浸潤細胞を内在する病巣は強く類上皮細胞で被覆されるに至った。対照では6時間までは肝細胞の巣状変性、壊死は同様に出現したが、それ以上の変化はみられな

った。

以上より、アメーバ性肝膿瘍はアメーバによる門脈枝の栓塞、肝細胞の巣状壊死、壊死巣内でのアメーバの増殖、宿主の肉芽腫反応等の段階を経て形成されると推測されたが、不明な点も多いため今後より詳細な検討を加える予定である。

質問 中林 敏夫(阪大・微研)

激症肝膿瘍像と思いますが、砂ネズミは何日位生存するのですか。

回答

4週過ぎても生存しています。Abscess は限局する傾向があります。

11. *Amoeba proteus* における新しい核の単離法

月井 雄二

法政大学教養部生物学研究室

A new method for the isolation of nuclei in Amoeba proteus

Yuuji Tsukii

Laboratory of Biology, Hosei University

Amoeba proteus では、顕微操作による核の移植実験はよく知られているが、細胞集団から大量に核を単離した例は少ない。また、既知の方法 (Tautvydas, 1971) は、 Ca^{++} 、 Mg^{++} を用いているので、単離操作の過程で DNA が切断される危険性がある。そこで、DNA の切断を防ぎつつ核を単離するための新しい方法を開発した。

細胞の培養は Prescott & James (1955) の方法に従い、KCM 溶液 (KCl 0.1 mM, CaCl_2 0.09mM, MgSO_4 0.1 mM) で洗った *Tetrahymena thermophila* を毎日、あるいは1日おきに餌として与えた。核の単離には、最後の給餌から2~4日たって十分な飢餓状態にある細胞を用いた。これらの細胞を手廻し遠心機で集めたのち、10%エタノール、1% Nonidet P-40, 0.25M ショ糖を加え十分に攪拌すると、核および細胞内の結晶成分のみが溶けずに残った。そこで、これらを遠心によ

って集め核分画とした。10%エタノールには、難溶性の細胞膜の溶解を促進するだけでなく、細胞由来の DNase の働きを抑える作用がある。したがって、この方法では、DNA の抽出を目的とした核の単離を室温で行なうことができる。また、核分画に混在する結晶成分は、DNA を抽出するために核を溶解する条件 (1% SDS, 0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 9.0) でも、大部分は溶けずに残るので、その際に遠心によって除去することができる。

単離した核より抽出された核酸は、DNase I により分解され、RNase A によっては分解されなかった。また、細胞全体から SDS-フェノール法で抽出された核酸成分との比較を、0.5~1% アガロースゲル電気泳動法により行なったところ、核由来 DNA の移動度 (>30 Kbp) に差はみられず、したがって核単離の過程で DNase I の切断は起きていないことが示唆された。

12. アメーバの放射型出現頻度に対する外液イオンの影響

木原 章, 石井 圭一
法政大学教養部生物学教室

Ionic effects on the radiate formation of Amoeba proteus

Akira Kihara and Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

KCl, CaCl₂, MgCl₂ 各 0.1 mM より成る塩類溶液中で培養した *Amoeba proteus* は, 外液を低濃度の同溶液で置換すると, 放射型に変形することは既に報告した。

KCl または NaCl 溶液で置換した場合にも放射型が誘引でき, いずれも 10⁻⁴ M で放射型出現頻度は最高となる。また, CaCl₂, MgCl₂ 各溶液では, 10⁻⁵ M で出現頻度は最高 (それぞれ約100%, 約85%) となる。さらに, 低濃度域のみではなく, それぞれ 2×10⁻² M においても, 約20%放射型が出現することが新たに判明した。

陽イオンどうしの相互作用をみるために一定濃度の CaCl₂ 存在下で KCl 濃度のみを変化させる実験を行った。10⁻⁵ M CaCl₂ 存在下では, KCl 濃度の上昇に伴って放射型出現頻度は低下し, いずれも 10⁻⁵ M CaCl₂ 単液中よりも低い頻度を示した。10⁻⁸ M CaCl₂ 存在下では, どの KCl 濃度においても放射型は出現しなかった。更に, CaCl₂ 濃度を 10⁻² Mとした場合, KCl 濃度の上昇に伴って放射型出現頻度は逆に上昇し, 10⁻² M KCl 添加で最高 (約50%) であった。

同様に, 2×10⁻² M MgCl₂ と KCl 各濃度との組合わせ実験では, KCl 濃度の上昇に伴って放射型出現の頻度は低下した。

2×10⁻² M の CaCl₂ あるいは MgCl₂ と NaCl とを

組合わせた場合には, いずれも NaCl 濃度の上昇に伴って, 放射型出現がやや高まる傾向が観察された。

以上の結果より, 低濃度塩類溶液中での放射型出現頻度は, イオン組成そのものにはあまり左右されず, むしろ溶液のイオン強度によって決る傾向が強いが, 高濃度塩類溶液中では全く逆に, 溶液のイオン組成に大きく影響される事がわかった。低濃度域のみではなく高濃度側でも放射型が形成されること, 両域でイオンの関与様式に相違がみられたことは, 放射型形成機構を解明する鍵の一つになるものと思われる。

質問 丸山 正 (都立大・理)

1) 放射型になる事の適応的な意味は何かあるのでしょうか?

2) 放射型になる事とアメーバ運動との関連はいかがでしょうか。

回答

1) 放射型になるとアメーバは, 基質への接着性を消失するので, 浮遊状態での水流に伴う移動が可能になると思われます。

2) 仮足の伸長によって放射型が形成されることから, 原形質流動が, 放射型形成には必順であります。おそらく通常のアメーバ運動と比べて, 原形質流動の調節機構に相当にちがいがあると考えております。

13. 定着性縁毛類幼生の付着行動

堀上 英紀, 石井 圭一
法政大学教養部生物学研究室

Settlement-behavior of telotrochs in sessile peritricha Carchesium

Hideki Horikami and Keiichi Ishii
Laboratory of Biology, Hosei University

定着性の縁毛類のうち、ツリガネムシ属で親の付着パターンから集団型(G型)の種と単独型(S型)の種に大別できることを見出し、その差は幼生時の付着行動の違いによることをすでに報告した。ほかの属の幼生の付着行動および付着パターンについては全く知られていない。今回群体を形成するカルケシウム属の1つの種(未同定, *C. polypinum* に類似)について調べた。ツリガネムシ属では、外形のプロポーシオンを比較するとG型種の成体では最大体幅(bw)や体長(bl)に対する周口部幅(pw)の比がS型よりも小さく(G型 $bw/pw = 0.7 \sim 0.9$, $bl/pw = 0.9 \sim 1.2$; S型 $bw/pw = 0.9 \sim 1.5$, $bl/pw = 1.8 \sim 2.4$)、また幼生の後部繊毛環部の体幅(pcw)に対する体長の比も小さい(G型 $bl/pcw = 1.3 \sim 2.3$, S型 $3.2 \sim 3.9$)ことが特徴であった。本種の成体(n=15)では $bw/pw = 0.65$, $bl/pw = 1.39$, 幼生では $bl/pcw = 1.63$ である。これらのことはツリガネムシのG型種の特徴に一致する。

好培養下で遊出した幼生(野生株)を集め、その行動をストロボ光を用い暗視野照明下で写真撮影した。遊泳軌跡は、S型ツリガネムシ幼生や単独遊泳中のG型幼生のものと類似していた。しかし同調分裂で生じたG型幼生に特有の密集した群泳はみられなかった。付着時期が近づくと幼生は、ツリガネムシの場合と同様に体軸を器面に垂直にして移動しながら前端部で接触を繰り返し、まもなく1カ所にとどまり後部繊毛環の運動が止まって付着を開始する。その軌跡はツリガネムシのものに類似し、からみあった曲線となる。一方、付着後まもない幼生があると、その近くに泳いできた幼生の直進性が突然悪くなり軌跡が曲線となる。時には付着個体をとりまく軌跡がしばしばみられた。しかしその個体そのまま隣接付着して集団を形成することは、G型ツリガネムシに比較して少なかった。このような行動が繰り返されて、

徐々に付着集団が大きくなるとがわかった。1時間にわたって幼生を追加して集団への参加を調べると、1時間後に追加した幼生でも、依然として先着集団に密着して付着することもわかった。このような長時間にわたる集団形成はツリガネムシではみられない。その原因を探るため、幼生の付着後の変態時間を調べた。①付着後10分で周口部が全開し、②約15分で細胞体は成体形となり、柄も認められる。③約60分で柄の長さが細胞体とはほぼ等長になる。これらの時間経過は、G型ツリガネムシと比較するとかなり遅い(*V. convallaria* では約40分で③となる)。

以上のことから、本種は外形上G型ツリガネムシと共通の特徴を持ち、G型種の幼生に特有の群泳は見られないが、長時間にわたって逐次隣接して付着する集団形成様式をとることが明らかになった。

質問 楠岡 泰(都立大・理・生物)

同じグループを作るツリガネムシでも培養条件によって集中的に分布したり、ランダムに分布することが見られましたが、どう思われますか?

回答

今回の実験では、すべて好培養下(細胞分裂率などからみて)でのものを用いています。

ツリガネムシの場合、培養条件が悪くなると集団型のものでも分散分布するようになります。

質問 福井 啓二(早大・理工・物理)

幼生の形状で、付着の仕方によって集団型と単独型があるようですが、付着の仕方と生活様式、生息環境等の間に特徴的な相関がありますか。

回答

今回用いたカルケシウムは1種だけです。他種についても今後調べてみようと思います。

14. 石手川ダム湖で冬季に赤潮を形成する *Peridinium* sp. の培養液の検討

川端善一郎, 寺戸 勅雄, 内藤新司朗
愛媛大学農学部環境保全学科

*Evaluation and utilization of media for the cultivation of *Peridinium* sp. isolated from a winter bloom in Ishitegawa Reservoir, Ehime Prefecture*

Zen'ichiro Kawabata, Akio Terado and Shinjiro Naito
Department of Environmental Conservation, Ehime University

最近, 日本各地のダム湖において淡水赤潮が発生している。その原因種の多くは渦鞭毛藻の *Peridinium* 属に属し, 10数種類がすでに報告されている。愛媛県松山市の山間部にある石手川ダム湖においても湛水後2年目の1975年以来, 毎年冬季に河川水流入部で *Peridinium* sp. の淡水赤潮が発生している。この *Peridinium* 赤潮の発生, 持続, 崩壊機構の解析には室内培養実験による種の増殖特性の研究も有効な手段である。淡水 *Peridinium* の培養については現在まで数例が報告されているのみであるが, これらにおいては種ごとに異なった培地が使用されている。また, *P. penardii* は *P. volzii* 用培地 (畑・西島, 1980), *P. cinctum* 用培地 (Carefoot, 1968) では全く生育しなかったことも報告されている (渡辺, 1982) ことから, 淡水 *Peridinium* は種ごとの栄養要求の特異性が強いことが示唆される。このことは石手川ダム湖の *Peridinium* にみられるような未同定種の適正既存培地の選択を困難にしている。そこで既存培地と新たな人工合成培地を使用して, 1983年12月に石手川ダム湖の淡水赤潮から採取した *Peridinium* sp. の適正培地の選択を行った。更に, 本種の増殖に対するマンガンと役割, 増殖に対するアミノ酸の効果および inoculum の質的差異による増殖の差異の検討も併せて行った。以下それらについて概略を述べる。

既存培地9種類, リン濃度が 0.3 mg/l, および窒素濃度が 0.5 mg/l になるようにそれぞれ Na_2HPO_4 と NaNO_3 を流入河川水に添加した培地, および既存培地を改変した新たな人工合成培地の計11種類の培地を使用して, 本種を 10°C 5000 lux, 10~14時間明暗周期, 初期個体数約 50個体/ml の条件で試験管内において静止培養を行った所, いづれの培地でも良好な増殖がみられ

た。本実験に使用した培地ではダム湖水または流入河川水で調整した培地と脱塩水で調整した成分既知の培地とがあるが, 前者に属する保坂 (1982) の培地では最大個体数が 5.7×10^4 個体/ml, 比増殖率が $0.41 \cdot \text{day}^{-1}$ となり, またこの培地組成を改変し脱塩水で調整した成分既知培地でも最大個体数が 4.6×10^4 個体/ml, 比増殖率が $0.08 \cdot \text{day}^{-1}$ となった。

最大個体数と各培地の全窒素濃度との間に二つの異なった関係が存在した。すなわち, 全窒素濃度の増加に伴って個体数が増加したグループAと増加しなかった培地グループBとが存在した。そこで両グループの培地組成の違いを調べた所, グループBはグループAに比べてマンガン濃度が低いことがわかった。このことからマンガンがグループBでは増殖制限要因になっていることが示唆されたが, 他成分との最適比や現場におけるマンガンの赤潮形成における役割については今後の課題である。

アミノ酸 Ala, Gly, His, および Glu を単独またはこれらの組み合わせで濃度が 0.1 mg/l となるように成分既知人工合成培地に添加した培地を使用して, 本種の増殖に対する各種アミノ酸またはそれらの複合効果を調べた。なおアミノ酸による窒素の量は人工合成培地に含まれる窒素量の数百分の一で, アミノ酸添加による窒素増加量は無視できる。その結果これらすべてのアミノ酸は単独, 複合によらず, 最大個体数には影響を与えないが比増殖率を2~3倍増加させることが判明した。赤潮発生の現場においてもアミノ酸が増殖率促進効果物質になりうるかどうかを今後検討する必要がある。

三種類の inoculum, すなわちフラスコ内でダム湖底泥から発生させた生物群集, 現場で本種が増殖期にある

生物群集および本種が定常期にある生物群集のそれぞれからなるべく本種だけを集めた inoculum を使って、各培養液で本種の増殖を検討した所、底泥から発生させた生物群集から調整した inoculum では最大個体数が極端に低く、どの培地においても 10^2 オーダ/ml 以下

であった。この主な原因は inoculum に含まれていた *Pandorina morum* などの増殖が本種の増殖を抑えたことによると考えられた。この結果は単一種の赤潮形成過程における selection の重要性を示唆している。

15. 海浜における原生動物の動態 XI. タスマニア産殻アメーバ類

鈴木 實

日本大学法学部大宮校舎生物研究室

Protozoans in the marine beach interstices. *XI. Psammophilous testacea from Tasmania*

Minoru Suzuki

Biology Laboratory, Nihon Daigaku-University

On 14. Aug., during my participation in the Antarctic Symposium held in Hobart, Tas., some collections were made on microbiota at two sites with the greatest help from Prof. Dr. Bayly of Monash University, Melbourne. The sites where samplings were made are: 1) high-tidal zone (=HTZ) and mid-tidal zone (=MTZ) of Kingston beach (KGS) near the Antarctic Division, Kingston and HTZ, M₁TZ & M₂TZ of Margate boat ramp (MRG).

The size distributions of sand grains at HTZ, MTZ of KGS are 140-200×200-340 μm and 130-220×190-290 μm, while, those of MGR are of mixture of two types of sand, one 250-330×330-580, the other 440-640×750-780 at HTZ, 130-190×250-290 & 300-450×580-680 μm at M₁TZ and 100-160×160-260 & 150-290×470-580 at M₂TZ respectively. Remarks of the species found are as follows: *Centropyxiella golemanskyi*. Most common at HTZ & MTZ of KGS, HTZ of MRG. Length (=L) =18-26 μm, widest part (=W)=19-22 μm, height (=H)=15 μm, pseudostome elongation (PE)=15-20×15-20 μm; *Psammonobiotus golemanskyi*. Common at HTZs of KGS & MRG. L=19-23, W=

11-17, H=12, PE=20×20; *Micramphora pontica*. Common at HTZs of KGS & MRG, M₁TZ of MRG. L=16-20, W=14-15, PE=14-19×14-19; *Pseudocorythion acutum*. Common at HTZ of KGS. L=23, W=17, H=12, PE=20×20; *Cryptodifflugia lanceolata*. Most Common at HTZs of KGS & MRG. L=17-21, W=9-12, aperture=5-9; *Campascus vulgaris*. HTZ of KGS. L=40-41, W=20, H=14, PE=11×11; *Paralieberkuehnia* sp. 20×20. MTZ of MRG, pseudopodia over 90 μm. Besides are found *Psammonobiotus minutus*, *Difflugiella psammophila* both from HTZ, *Psammonobiotus linearis* & *Trinema lineare* again both from MTZ, all of KGS further *Euglypha loevis* from HTZ of MGR. *Cryptodifflugia* sp. 1 cf. *brevicola* and C. sp. 2 with a round test are also discovered. The latter ca. 17 μm in length, 18 μm in diameter, neck = 3 μm in length, 5 μm in diameter. No specimens were detected from M₂TZ of MRG (Eutrophicated). The characteristics of Tasmanian fauna seem to be put on a point that the dominant taxa are *Cryptodifflugia*. In addition, not a single specimen has hitherto been discovered in the samples collected by Yusa and Nakaya from sandy beach.

hes of such lakes as Eryxell, Bonny & Vanda, Antarctica, where belongs to the same FAO Sea Area i. e. Polar Southwest.

16. 繊毛虫類の分類および生態に関する研究

I. 水圏に出現する優先種繊毛虫 *Strombidium* 属の分類

前田 昌 調

東京大学海洋研究所

Studies on the taxonomy and ecology of ciliates

I. Taxonomic study on the genus Strombidium, free swimming protozoa common in the aquatic environment

Masachika Maeda

Oshan Research Institute, Tokyo University

自然界の生物はその機能によって生産者、消費者、分解者にわけることができる。従来、細菌を中心とした微生物は有機物の分解を通して第一次生産者に栄養塩を供給する分解者として位置づけられてきた。しかし微生物は有機物の分解過程で増殖し、新たな細胞を形成する有機物生産者としての機能もあわせもっている。筆者らは外洋、沿岸水域において細菌現存量を測定したところ、その値は全懸濁態炭素量の数十パーセントを占める場合もあり、また細菌の分布の様相は動物プランクトン（大きさ 330 μm 以上）分布と並行的関係にあった。動物プランクトンによる細菌の摂食に関しては多くの報告があり、また細菌のみを餌料とした飼育事例もみられるが、細菌、動物プランクトンが数多く分布する水域には、繊毛虫も高頻度で出現するため、細菌—ciliates—動物プランクトン、食物連鎖の存在が重要視されている。海水中に優先的に出現する繊毛虫は Suborder Oligotrichina に属する種類であるが、その分類に関しては混乱している点が多く、細菌および原生動物を中心とした微生物生態研究上の問題点の一つとなっている。筆者は oligotrichine ciliates の全種（synonyms を含めて約 200 種類）の原著論文を検討し、その分類の再整理を行なったので、今回の発表では *Strombidium* 属の種に関する検討の結果についてのべる。

Suborder Oligotrichina には 3 families, Halteriidae, Strombidiidae, Strobilidiidae が含まれている。Family Strombidiidae は、apical membranellae 列の輪が開いている点で Family Strobilidiidae とは異なり、また somatic ciliature の代わりに多くの種類が polygonal cortical platelets を保有する点で Family Halteriidae と異なる。Corliss (1979) によると Family Strombidiidae には Genera *Buehringa*, *Laboea*, *Strombidium*, *Tontonia* が属しているが、今回の oligotrichine ciliates の分類検討作業において Genus *Metastrombidium* を Family Strombidiidae に加え *Buehringa*, *Laboea* の種は Genus *Strombidium* に移行した。その結果、Genus *Strombidium* に属す ciliates は 70 種、その synonyms 41 種となった。

質問 鈴木 實（日大・法・生物）

別属として扱われている種を今回 *Strombidium* に含めたという根拠は、演者が飼育実験を行った結果、問題の種の属として形態が *Strombidium* の属としてのカテゴリーに含めうる形態を示したから、ということなのでしょうか？

回答

今回の仕事は原著論文をもとにして *Strombidium* 属

の全種類を整理したもので培養実験は行なっておりません。oeigoerichine ciliates の polysaccharide platelets は非常に変化しやすくとまたその存在も定常的ではありません。このような不安定な体構成要素は分類上の

特徴として扱うには無理があるため、*Laboea* と *Buehringa* 属の種は *Strombidium* 属に移すべきであると判断しました。

17. 織毛虫 *Euplotes patella* の栄養期細胞及び接合完了体における小核の役割

佐藤 勝 幸

広島大学理学部動物学教室

Role of micronuclei in vegetative cells and exconjugants of Euplotes patella

Katsuyuki Sato

Zoological Institute, Faculty, of Science, Hiroshima University

織毛虫は一般に大核と小核、2種類の核を有する。前者は細胞の活動に必要な情報を提供し、後者は殖核ともいわれ遺伝的な情報を次世代に伝える役割をする。しかし人為的に小核を除くと細胞の分裂比の減少や死滅が起こる。この事から小核には前記以外の役割があると考えられるが、その役割は不明である。本研究では *Euplotes* からマイクロピペットを用い小核を除き、細胞の増殖の有無、大核の変化および細胞分裂等に伴う口部再編成について調べ、小核の役割を検討した。除核後、細胞を exhausted solution に移し1日後活発に動いている細胞だけを実験に使用した。

大核が G1 期や S 期初期の栄養期細胞を除核した場合は、63例中49例が1分裂し、残りは分裂なしに除核後それぞれ5~7日で死滅した。この傾向は若齢の株を使用した場合でも同様であった。対照実験として小核周辺の細胞質 (200 μm^3) を除いた場合は、29例がクロンに成長し、1例が1分裂後死滅した。さらに小核が大核や細胞膜の一部に結合している可能性もあるので、小核の喪失ではなく、除核時のその結合の破損が無小核細胞の死滅をもたらすことも考えられる。そこで小核をマイクロピペットに一度吸引し再び同じ細胞へ注入した。24例がクロンに成長し、10例が分裂なしに、16例が1分裂後、5例が2~3回分裂後にそれぞれ死滅した。クロンに成長した株は小核を有した。また同様な実験で、再注入後の細胞における小核の存在を調べると、15例中5例

が小核を有した。除核後、細胞を経時的に調べると、大核においては、DNA 合成 (複製帯の存在から)、分裂時の凝縮や伸長は正常に起ったが、分裂後変化が生じた。大核の幅が通常値 5.9 μm から 10 μm と増加し、それに伴ないC字形が崩れ除核後6日目では退化している場合が多い。同様な大核の解体は分裂しなかった無小核細胞でも見られた。一方細胞分裂時の口部再編成は正常に起ったが、カーミン粒子の細胞への取り込みは大核の解体が始まるのとほぼ同時に低下した。この低下は大核の解体によるものと思われるが、詳細な研究が必要である。

次に、この大核の解体は大核原基でも起きるのか。また起きるとすれば、発達過程のどの時期か。これらの疑問に答えるため、原基が少し膨張している6時間齢の接合完了体から小核を除去した。64例は接合後第1回分裂なしに、1例は数回分裂後に死滅した。なお通常の接合完了体の生存率は90%であった。大核原基は発達し伸長するが、DNA 合成を示す複製帯を形成した例は見られず、さらに一部崩壊している原基を持つ例も観察された。また接合完了体に特有な口部再編成は正常に起った。

以上の結果から、いくつかの織毛虫と同様に *Euplotes* の増殖においても小核は必要である。特に本種では大核と小核にある種の関係があり、小核を失なうと大核は正常な活動ができず解体すると考えられる。大核原基

では、その様な解体は栄養期細胞の大核と形態的に似ている伸長している原基に起こるが、その理由は不明である。

18. 繊毛虫類の接合型物質と疎水性接着物質との関係

北村 昭夫

東北大学理学部生物学科

Relation between mating type substance and adhesion molecules to polystyrene surfaces in ciliates

Akio Kitamura

Biological Institute, Tohoku University

細胞と細胞あるいは細胞と基質との接着に関与する細胞表面の高分子物質の存在が、多数の生物種で知られている。繊毛虫細胞では、細胞間接着の代表例は接合であり、接合に関与する細胞表面膜蛋白質の化学的性質を、ゾウリムシや *Tetrahymena* 等で、これまで明らかにしてきた。他方、繊毛虫の示すガラスあるいはポリスチレン基質への接着機構に関する研究は極めて少なく、この接着に係わる細胞表面物質の性質は全く不明である。本研究は、8種類の繊毛虫における接合活性とポリスチレンへの接着能との関係を明らかにし、後者の接着を担う物質の化学的性質を知る目的で行なわれた。

Paramecium caudatum が接合活性(細胞凝集活性)に依存してポリスチレンのペトリ皿(Falcon 1007)に接着することはすでに報告したが(J. Cell Sci. 58, p. 185, 1982)、同様の接着性が、*P. trichium*、*P. multimicronucleatum* syngen 2、*P. tetraurelia* にも認められた。これら3種のゾウリムシでは、実験に使用したすべての株において、細胞凝集活性を示す細胞が、ペトリ皿に移入後、約1~2分で最大の接着率(40~65%)を示した。細胞凝集活性の無い細胞での接着率は、5%以下であった。

一方、*P. bursaria*, syngen 1 では、16の野外採集株を含む20の株を調べたところ、強い細胞凝集活性を示す細胞でもポリスチレンへの接着率は極めて低く、5分以内では5%以下であった。(これらの細胞は、30分以上放置するとペトリ皿表面に高率に接着するが、本研究で

は比較的早い接着反応のみ問題とし、遅い接着反応とは区別した。) *P. bursaria* は、より疎水性の強い Nissui-P 皿に対しても接着せず、外液の KCl 濃度を 15 mM に増加し、遊泳速度が 0.82 mm/s に低下しても、接着率の増加は見られなかった。更に、*P. caudatum* において、ポリスチレンへの接着に温度依存性(高温程よく接着する)が見られたので、30°C での *P. bursaria* の接着性を調べたが、接着の誘導は見られなかった。他方 Benzylamine や Phenethylamine 等の疎水性試薬で前処理した場合、約90%の細胞に接着が誘導された。接着の誘導は、トリプシン処理(50 µg/ml, 25°C, 30分)した細胞にも見られ、約30%の接着率を示した。

P. duboscqui では、細胞凝集活性の有無に係わらず、ポリスチレンによく接着し、1分で90%の細胞、2分ではほぼ100%の細胞がペトリ皿に接着した。ポリスチレンに対する強い親和性は実験に用いた15の株すべてに見られ、より疎水性の弱いペトリ皿(Falcon 1001 や Falcon 3002 の上蓋)に対しても同様の接着性を示した。

Tetrahymena thermophila も *P. duboscqui* と似た接着性を示し、標準液(1 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM Tris-HCl, pH 7.1)あるいは initiation 用塩類溶液(34 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM CaCl₂)のどちらを用いても、接合活性と無関係にペトリ皿へ高率に接着した。対数増殖期の細胞は、定常期の細胞よりもポリスチレンへの親和性が強く、疎水性の弱い Falcon 3002 やガラス皿にも高率に接着した。対数増殖期の細胞のみ

示す疎水性の弱い基質に対する接着は、starvation の進行と共に失なわれることから、接合活性の出現に伴ない、細胞表面の高分子の存在（分布の状態や電荷等）に変化が生じたものと思われる。接合活性を示す細胞では、接合対を機械的に分離して得た細胞でポリスチレンに対する最も強い親和性を示し、initiated cell あるいは co-stimulated cell が接着しない Corning 25010 皿に対して約60%の接着を示した。P. caudatum において、接合型物質とは異なる疎水性接着物質の接合過程での増加をすでに報告したが (Cell Struct. Funct. 9, p. 91, 1984), 同様の変化が T. thermophila の接合過程にも起きているらしい。しかし、種々の酵素等での処理実験からは、この物質の化学的性質を知るには至らなかった。Blepharisma japonicum は、接合活性とは無関係に、Nissui-P 皿には70~80% 接着し、Falcon 1007 皿には接着しなかった。接合型 I の細胞にガモン II を加えると、selfing pair 出現に先行し、多数の細胞が水面に接着した。ガモン受容により細胞表面が疎水的になったものと思われる。

以上の結果から、繊毛虫細胞でのポリスチレンに対す

る多様な接着性が明らかになった。接合型物質とポリスチレンへの接着物質（疎水性接着物質）との関係は、P. caudatum, P. trichium, P. multimicronucleatum, P. tetraurelia で、両物質間の見掛けの機能的カップリングが示されたが、トリプシン処理され細胞凝集活性を失なった細胞にも、ポリスチレンに対する強い接着能が保持されること及び免疫学的実験 (J. Cell Sci. 62, p. 209, 1983) から、疎水性接着物質が接合型物質の活性基とは異なることが明らかになった。他の4種の繊毛虫では、両物質は全く独立に存在あるいは機能するものと考えられる。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫部)

原虫を疎水性試薬で処理した後、水にもどすと、どのような状態になるのでしょうか。また、接合活性にはどんな影響を与えますか。

回答

0.5~1 mM の疎水性試薬で前処理し、接着を誘導しましたが、処理細胞には遊泳速度のわずかな低下がみられただけです。接合活性にも影響はみられません。

19. *Paramecium bursaria* の双体の光顕及び電顕観察

渡辺 彊, 佐藤 美香, 遠藤 浩
東北大学理学部生物学教室

Light and electron microscopic observation of the homopolar doublets in Paramecium bursaria

Tsuyoshi Watanabe, Mika Sato and Hiroshi Endoh
Biological Institute, Tohoku University

繊毛虫は、細胞表面に配置された各種のオルガネラにより、独特の表面パターンを示す。このパターンは分裂の後にも娘細胞に伝えられていくが、形態形成の位置情報に於ける一つの基準点として、口部域が重要な役割を果たすと考えられている。一方、二つの細胞が融合して出来る双体 (doublet) は、二つの基準点を有するため、形態形成のしくみを解明する上で有利な実験系を提供する。本研究では、ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) で得られた doublet の形態学的な特徴を調べると

共に、doublet が singlet を派生するに至る過程を光顕及び電顕レベルで観察した。

Doublet は、接合対の中から自然に得られたものと、接合対が離れる2~3時間前に3%マンニト溶液で15分処理を行なって得られたものを用いたが、両者の間には形態的な差は認められない。接合対が分離せずに doublet が出来る際には、先ず細胞口の後方部の広い範囲で融合が起り、cytoplasmic bridge が出る。この状態の融合細胞が細胞分裂すると、前方からは2個の singlets,

後方からは1個の doublet が出る。この doublet は、まだ完全なものでない場合が多く、この後の1~2回の細胞分裂に於ても singlet を出す。完成した doublet は、以後の分裂では doublet のみを生み出すようになる。通常 doublet は、2つの互いに180度離れた口部装置(口)を持ち、これらにほぼ90度の位置に1本ずつ、収縮細胞開口部(CVP)を有する繊毛列がくる。この時、口のレベルで細胞の横断面をみると、CVPを有する繊毛列を結ぶ線を長軸に、口を結ぶ線を短軸にした長隋円形をしている。

Doubletの核は、doublet が出来た後に性的未熟期があることから、大、小核とも受精核に由来すると思われるが、大、小核の数には分裂をくり返すうちに変異を生ずるようになる。大核については80%以上が2核となり、残りの多くは1核である。一方小核では、1小核が50%以上となり、無小核が約25%、2小核又はそれ以上のものが約20%であった。殆んどの小核は、元の親株のものに較べて細長く、フォイルゲンによる染色性が弱い。電顕観察では、doublet の小核クロマチンは全体的に電子密度が低く、小核内によく分散している。これに対して大核内クロマチンの様子は親株のものとの差が認められない。これらのことから doublet では、核の数を2大核1小核にし、また小核クロマチンの減少をひき起すような調節がなされているように思われる。

P. bursaria の doublet は、株によって形態維持の安定な期間は異なるが、遅かれ早かれ singlet を生み出すようになる。どの株においても共通しているのは、singlet を出す細胞分裂の数回前から体の前端部から切れ込み(ノッチ)が入り始め、それが分裂を経る度に深くなり、口の位置より後方までノッチが入ると次の細胞分裂で、ノッチの部分から2個の singlets を出すことである。このような singlet の出し方は、従来 *P. aurelia* で報告されてきた doublet の繊毛列の減少に

より singlet が出る(即ち、180度離れていた口が次第に近づき、ついには1つになってしまう)というしくみとは異なっている。ノッチの部分の深まり、singlet を出す際、切れ込みの部分が singlet の背側となり、CVPをもつ。また、この時に口のレベルで横断面を見ると、口を結ぶ線が長隋円形の長軸になっており、元の doublet の場合とは90度の体軸の回転(ズレ)があることが分る。銀染色標本及び走査電顕の観察でも横断面の長軸、短軸及び口とCVPの位置で測られる体軸のズレが観察された。この体軸のズレと、ノッチが深くなることは、同時平行的に起っているが、いずれも細胞分裂を経て進行することから、キネトソームを中心とした表層単位(cortical units)の増殖が必要と考えられる。だが、増殖した表層単位がどのように配置すればノッチが深まり、体軸がズレるのか、その配置を調節しているのは何かという、いわゆる位置情報の本質については現在のところ不明である。

質問 勝部(慶応大・医)

motch の切れこみは環境要因があるのですか。

回答

特に環境条件を変えなくても自然に切れ込みが入ってきます。最初に何らかのヒズミがあって、徐々にそれが大きくなり、ある域値をこえると、ノッチが入り、やがて singlet を出すようになると考えています。

質問 福井 啓二(早大・理工・物理)

1) doublet になった cell は single cell と行動や生理で差異がありますか。

2) *P. bursaria* の green の cell と white な cell で doublet はできますか。

回答

1) まだ調べてはおりませんが、通常の観察で泳ぎ方には、さほど大きな違いはないようです。

2) 試みたことはありませんが、出来ると思います。

20. ゴウリムシ (*Paramecium caudatum*) の増殖と小核の役割

見上一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Role of the micronucleus in asexual reproduction of Paramecium caudatum

Kazuyuki Mikami

Research Institute for Science Education, Miyagi College of Education

Paramecium では小核を除くと分裂率の低下のおこることが古くから知られており、一つには口部形態の異常に基づくものであることも知られている。これら無小核株は、分裂率は低下するものの死滅することは少ない。これに対し、*Euplotes* のように小核を除去すると1分裂した後、死滅する繊毛虫もある。演者達 (Mikami, Kuhlmann and Heckmann, 1981) は、*E. octocarinatus* の約500個の細胞から小核を取り除いたところ、多くは1分裂後に死滅し、無小核株となったものはわずかに3細胞(株)であった。小核除去に伴う異常は、その細胞周期では現われず、1分裂後であった。しかも小核の除去を細胞周期のどの時期に行っても、1分裂を経て大核G1期で停止、S期には入らなかった。この他に食胞形成の低下およびその後の完全停止、大核の変形などの変化が認められた。食胞形成能の低下する時期および小核再移植後の回復を調べた結果、大核G1期停止と食胞形成能低下とは独立した現象であることも明らかになった。食胞形成能の低下は *Paramecium* と同じであるが、口部形態に異常を見つけることはできなかった。口部形態については、*P. tetraurelia* の無小核細胞で比較的詳しく調べられている (Ng and Mikami, 1981)。この無小核細胞で観察された口部形態異常が、*P. tetraurelia* に限られた現象なのかを知るため、今回は *P. caudatum* について調べた。小核除去の後、分裂率の低下がいつから始まるかについても検討し、*Euplotes* における小核除去の効果と比較検討してみた。

細胞内には大核と小核がそれぞれ1個ずつある。この小核を顕微操作によりぬき取り、その後、分裂率低下期にある細胞を渡銀染色して口部の形態を調べた。無小核細胞にも口腔内に繊毛帯 (peniculus と quadrules) が観察された。しかし有小核細胞の繊毛帯が口腔内底部へ

直線的に伸びているのに対し、無小核細胞のそれは並ぶ方が不規則で乱れていた。口腔が浅く、著しい場合には繊毛帯が細胞外に露出していた。これらの結果は、*P. tetraurelia* の場合にはほぼ一致する。*P. caudatum* においても、除小核後の分裂率低下、食胞形成能の低下の原因の一つは、この口部形態の異常と考えられる。

次に、小核除去の影響がいつから現われるかについて調べた。細胞分裂後2~3時間に姉妹細胞の一方から小核を除き、他方からは細胞質の一部を取り除いて対照とした。5例について調べたところ、1例では小核除去後の最初の分裂が約2時間遅れ、1例では1時間遅れ、そして他の3例では遅れは認められなかった。有小核細胞の細胞周期が約8時間であることを考慮すると、小核の除去は最初の分裂にほとんど影響しないものと考えられる。対照の分裂時期と差が出はじめたのは、第2~3分裂からであった。無小核株の培養を続けると1日あたりの平均分裂回数が増加することが知られている。上記5例(クローン)のうち、1クローンは小核除去後10週間現在で回復傾向を示し、1クローンは絶え、他の3クローンは低分裂率(1日1分裂以下)のままであった。この他の株についても調べたところ、多くは小核除去後15~20週で回復傾向を示したが、回復せず分裂異常をおこすものもあった。

Euplotes と *Paramecium* で共通する点は、小核除去後に食胞形成能の低下がおこること、除小核の第1分裂は正常におこり、影響は細胞分裂後に現われることの二点である。*Euplotes* では小核除去後1分裂した細胞に、再び小核移植すると食胞形成が再開され、大核はG1期からS期へと進む。この結果は分裂間期の小核が機能を持っていることを示している。*Paramecium* においても同じことが言えるかどうか、目下検討中である。

21. *Paramecium caudatum* の膜性突然変異体に於ける接合の化学的誘導

高橋三保子, 白倉 伸一
筑波大学生物科学系

Chemical induction of conjugation of the various membrane mutants in Paramecium caudatum

Mihoko Takahashi and Shin-ichi Shirakura
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

ゾウリムシの接合対は、通常、相補的な2つの接合型を混ぜ合わせた時、お互いの繊毛を介して凝集する交配反応を経て形成される。ところが、単一の接合型だけでも、低 Ca^{2+} 条件下で、 K^+ や Mn^{2+} 等の溶液で処理することにより、交配反応を経ずに接合対形成を誘導出来る(接合の化学的誘導: 三宅, 1958)。この誘導の為のイオン条件は、繊毛膜上の Ca チャンネルを活性化し繊毛逆転反応を引き起こす条件とよく類似しており、また、誘導溶液中では遊泳行動に変化がみられることから、接合対の形成を導く引きがね反応には、 Ca チャンネルの活性化が含まれているのではないかと注目されていた。Cronkite は、*P. tetraurelia* の Ca チャンネル機能欠陥突然変異体 Pawn では接合を化学的処理で誘導しえないことから、 Ca チャンネルの寄与を強く示唆している(1976)。ところが、Pawn と同じような突然変異体である *P. caudatum* の CNR では、定性的には誘導出来る(高橋, 1979)。そこで、再度、 Ca チャンネル機能発現に関与する *cnrA*, *cnrB*, *cnrC*, *cnrD* の4つの遺伝子座に属する6種類の突然変異体で、接合の化学的誘導を比較検討した。*cnrB* には Kag (K^+ agitated), *cnrC* には Kr (K^+ resistant) という CNR とは全く表現型を異にする突然変異体を含んでいる。

貧 Ca 培養液で培養した接合活性の高いゾウリムシを、洗滌液 (0.01 mM CaCl_2 , 2 mM MKCl , 2 mM Mes buffer pH6.0) で洗った後、誘導溶液(上記溶液の CaCl_2 と KCl の濃度のみを変えた溶液)に懸濁し、処理開始から2時間後、ピクリン酸で固定し接合率を計測した。 CaCl_2 は 0.01, 0.06, 0.6 mM の3段階、 KCl は各々の Ca 濃度において、2~4 mM の濃度きざみで行った。再現性のある結果として得られた結論を、以下に例記する。

1. いづれの遺伝子座に属する Ca チャンネル欠陥突然

変異体 CNR も、野生型と同等程度かそれ以上に、よく接合誘導される。従って、接合の誘導に Ca チャンネルは直接的には寄与していない、と考えられる。

2. 三宅の報告にあるように、接合の化学誘導は、 Ca^{2+} によって阻害を受ける。また、低い Ca 濃度 (0.01 や 0.06 mM) では、 KCl 濃度が sublethal などところで、よく誘導される。しかし、0.6 mM では、lethal な濃度からは大分離れている。接合の化学誘導に有効な K^+ 濃度範囲が存在する、と示唆される。

3. 遺伝子座に依存した誘導パターンがみられた。

a. *cnrB* 遺伝子座の突然変異体は、表現型の著しい違いにもかかわらず、0.6 mM の CaCl_2 濃度において、比較的良好に接合誘導される、という共通した特徴をもっている。この Ca 濃度において、*cnrB* は 40 mM の KCl 濃度で死ぬが、逆に Kag は 70 mM でも死細胞はほとんどみられない。

b. *cnrC* 遺伝子座の突然変異体 *cnrC* と Kr は、いづれも 0.01, 0.06 mM CaCl_2 を含む溶液では、野生型より極めてよく接合誘導されるにもかかわらず、0.6 mM Ca^{2+} では、ほとんど接合対の形成はみられない。この時、*cnrC* は死ににくく、Kr は死にやすい。

c. *cnrA* と *cnrD* はいづれの Ca 濃度でも、野生型より広い KCl 濃度範囲でよく誘導される。

4. 3で述べたように、遺伝子座に依存した誘導パターンがみられることは、 Ca チャンネル機能を支配する遺伝子作用の中に、間接的にはあるが、接合誘導と関連をもつ部分があることを示唆している。接合対形成は処理後約1時間後にみられる現象であり、 Ca チャンネルが活性化され繊毛逆転反応が引き起こされるような、一過性の反応ではなく、定常状態における遊泳速度に影響を与えるような、たとえば最近注目されているサイクリック AMP 濃度を変化させるような機構、と関連して

いるのではないだろうか。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫部)

K⁺ による接合誘導のメカニズムをお教え下さい。

回答

膜表面の結合 Ca²⁺ が、イオン交換反応により K⁺ と置

き換わること、すなわち結合 Ca²⁺ の除去が、接合誘導を引き起こすのだらうと、EDTA でも接合誘導できることから推定されていますが、よくわかってはおりません。

22. 繊毛虫における微小管タンパクの三次元構築

重 中 義 信

広島大学総合科学部情報行動科学教室

Three-dimensional construction of microtubular proteins in protozoan ciliates

Yoshinobu Shigenaka

Department of Information and Behavioral Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

原生動物繊毛虫類は、細胞質内に多量の微小管を内蔵し、それらが様々な配列とそれに伴う多種多様の機能を発揮していることはよく知られた事実である。従って、その意味からも繊毛虫類は古くから微小管研究の絶好のモデル試料となっている。しかしながら、微小管自体の三次元構築に関しては未だ不明点が多く、試料作製法も含めて多くの問題点が残されたままであることも忘れてはならない。そこで、筆者は繊毛虫における微小管単離法の開発と単離された微小管への光回折・光回過法の応用を試み、今回、ある程度の成果を得ることができたので報告する次第である。

本研究に供された材料は、筆者の研究室で継代培養された収縮性繊毛虫 *Spirostomum ambiguum* である。超薄切片作製にあたっては、繊毛虫を先ず弛緩溶液 (20 mM EDTA, 5% DMSO) で処理した後、固定・脱水並びに包理を行なった。また、繊毛・微小管シート複合体の単離にあたっては、単離溶液 (1mM MgSO₄, 40mM EGTA, 2.5% DMSO, 0.1% Triton X-100, 0.5M HEPES, pH 6.9) で数分間処理した繊毛虫を、フォルムバル膜で被覆した電顕用グリッド上に載せ、ピペットで軽くブローイングして虫体破壊を行ない、1%グルタル・アルデヒドによる固定 (1分間) と水洗 (1分間) を施した後、1%酢酸ウラン水溶液でネガティブ

染色を行なった。さらに、単離されたこの複合体の立体構造解析には、ネガティブ染色しなかった試料にエタノール系列による脱水、ドライアイスによる臨界点乾燥並びに白金パラジウムによるシャドウイングを施し、電顕内で試料傾斜によるステレオ写真撮影を行なった。

電顕観察の結果としては、まず、超薄切片において、虫体の収縮時と弛緩時で互いに重なり合う微小管シートの数は変化するものの、微小管自体の構造には変化が認められないこと、及び微小管の外径が 24nm であり、微小管相互を連結する架橋構造の周期が 18nm であることが判明した。次に、単離された繊毛・微小管シート複合体の全載標本の観察では、ネガティブ染色法と臨界点乾燥したシャドウイング法との間において、微小管の構造的な差異が検出されなかった。さらに、両者において微小管自体の扁平化や部分的破壊も認められなかった。従って、本研究で開発された単離法は微小管自体を安定化させ、特にネガティブ染色法でみられるような過激な乾燥にも耐え得ることが証明された。

そこで、微小管の三次元構築をより詳細に解析するために、ネガティブ染色を施した試料の電顕写真を撮影し、ネガフィルム上にレーザー・ビームを照射するいわゆる光回折・光回過法の応用を試みた。その結果、微小管壁を構成する球状タンパク質 (チューブリン分子) の

立体的な配列を見事に再現することに成功した。そして、チューブリン分子が縦向きに配列して形成されたプロトフィラメント相互の中心間距離が 4.4~5.0nm, プロトフィラメント軸に沿って並ぶチューブリン分子の間隔距離が 3.5~4.0nm, チューブリン分子の横方向の配列とプロトフィラメント軸に対する垂線とのなす角が約 18度であることが判明した。

今後は、さらにマイクロドントメーターの応用と大型計

算機による処理を行ない、正常時における微小管の三次元モデルを作製し、さらに引き続いて、微小管の細胞内における重合・脱重合のメカニズムを追究していきたいと考えている。

最後に、本研究の中でも光回折・光干渉法に関して多大な技術的援助を頂いた日本電子株式会社応用技術部の細井純博士に対して、深謝の意を表するものである。

23. テトラヒメナ・ミクロソームのカルモデュリン結合タンパク質

長尾 清治, 工藤 修三, 武藤 吉徳, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

Calmodulin-binding proteins in Tetrahymena microsomes

Seiji Nagao, Shuzo Kudo, Yoshinori Muto and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

カルモデュリンは細胞内カルシウム・レセプターとして、種々の細胞機能の調節に重要な役割をはたしていると考えられている。テトラヒメナ細胞においても、カルモデュリンは繊毛のダイニン ATPase, 表面膜のグアニル酸シクラーゼ, ミクロソームのドリコールキナーゼなどの酵素を活性化することがすでに報告されている。一方、このカルモデュリンの機能と関連して、最近、カルシウム依存性にカルモデュリンと結合する膜タンパク質の存在が注目されつつある。そこで、我々はテトラヒメナのカルモデュリンおよびカルモデュリン結合タンパク質について検討をおこなった。

テトラヒメナのカルモデュリンは、Nozawa and Thompson の細胞分画法によると、繊毛、形質膜、ミトコンドリア、ミクロソームの各膜画分にも認められるが、繊毛上清およびミクロソーム上清の両可溶性画分に多く存在する（両者で全体の約93%を占める）。一方、カルモデュリン結合活性はすべての膜画分に認められるが、比活性ではミクロソームと繊毛に高く、量的にはミクロソーム（全体の80%近く存在）、ついで形質膜の順に多い。ミクロソームに存在するカルモデュリン結合タンパク質の性状を検索するため、テトラヒメナのカルモデ

リンを放射性ヨードで標識した。この [¹²⁵I]-カルモデュリンは本細胞のグアニル酸シクラーゼを未標識のカルモデュリンと同様に活性化することから、生物活性を保持していると考えられる。ミクロソームと [¹²⁵I]-カルモデュリンとの結合はカルシウム依存的で、結合に必要なカルシウムイオン濃度は 0.1μM 以上であり最大の結合は 1μM 付近で得られた。 [¹²⁵I]-カルモデュリンの最大結合量は mg タンパク質あたり 250ng であった。カルシウム依存性のカルモデュリン結合活性はトリフルオロパラジンや未標識のカルモデュリンにより抑制されカルモデュリンに特異的であり、トリプシン感受性を示した。ミクロソームを低イオン強度、8M 尿素、あるいは 1% トリトン X-100 でそれぞれ処理し 105,000×g の遠心を行うと、その沈殿画分内のカルモデュリン結合活性はトリトン X-100 処理した場合のみ 70% の喪失が認められ、他の場合はすべての活性が回収された。ミクロソームのカルモデュリン結合タンパク質をさらに gel overlay 法を用いて検討した。すなわち、ミクロソームタンパク質を SDS 存在下で電気泳動しその gel を [¹²⁵I]-カルモデュリンと EGTA 或いはカルシウム存在下でインキュベートし、結合しないフリーの [¹²⁵I]-カルモ

デュリンを洗滌後、オートラジオグラフィーを行った。その結果、分子量30万以上の位置にカルシウムに依存して [^{125}I]-カルモデュリンの結合がみれた。この位置のカルモデュリン結合タンパク質はミクロソームを1%トリトンX-100処理後105,000 × gの遠心を行うと、上清画分に回収されることから可溶性となることが示唆された。なお、ミクロソーム画分には上記のタンパク質以外にも、カルシウムに依存しない多くのカルモデュリン結合タンパク質の存在が示された。

テトラヒメナ・ミクロソームの酵素系に対するカルモデュリンの活性化の有無を調べた報告は少く、現在までにドリコールキナーゼと $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ のみが検討されている。上記2つの酵素のうち、前者のみがカルシウムに依存してカルモデュリンにより活性化される。本日の実験から得られたカルシウム依存性カルモデ

ュリン結合タンパク質が上述した酵素であるのか、或いは他の機能をもつタンパク質なのかを、今後、さらに検討を行いたい。

質問 永倉 貢一(東海大・寄生虫)

繊毛上清の Calmodulin はどんな作用をしているのですか？

回答

その存在部位から推察すると、繊毛ないし、形質膜に存在するカルモデュリン結合タンパク質と結合し、機能を発揮すると考えられます。繊毛では dynein ATPase 形質膜では Guanylate cyclase がカルモデュリン依存性酵素であることがすでに報告されており、少なくとも繊毛上清のカルモデュリンの一部はそのような酵素系の調節をしていると思われる。

24. テトラヒメナ・ミクロソームの $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \text{ATPase}$

武藤 吉徳, 工藤 修三, 長尾 清治, 野沢 義則
岐阜大学医学部生化学教室

$(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \text{ATPase}$ of *Tetrahymena* microsomes

Yoshinori Muto, Shuzo Kudo, Seiji Nagao and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

繊毛虫テトラヒメナには、ゾウリムシと同様に膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルが存在し、このチャネルを通じた Ca^{2+} の細胞内への流入が繊毛逆転反応に関与していることが知られている。一方、我々は今までに、テトラヒメナのサイクリックヌクレオチド、カルモデュリン、 Ca^{2+} などの細胞内情報伝達物質と細胞機能の関連について報告してきており、 Ca^{2+} やサイクリックヌクレオチド濃度の変化が繊毛運動を含めた多くの細胞現象に重要な役割を果たしていることが示唆されている。しかしながら、細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の調節機構に関しては、テトラヒメナ及びゾウリムシにおいて、その生化学的解析はほとんど行われていない。そこで、今回、テトラヒメナの細胞内 Ca^{2+} の調節機構を明らかにする第一歩として、ミクロソームの $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}) - \text{ATPase}$ の性質と、本酵素が関与すると思われる Ca^{2+} 輸送活性につ

いて検討した。

実験には、*Tetrahymena Pyriformis* NT-1 株を 39.5°C で培養したものを用いた。ミクロソームは、Nozawa and Thompson の方法で分離し、ATPase 活性は、遊離した無機リン酸の定量により測定した。また、 Ca^{2+} 輸送は、 Ca^{2+} 指示薬である Arsenazo III が Ca^{2+} 濃度の変化に応じて示す吸光度変化を二波長分光光度計で測定した ($\lambda_1 = 675\text{nm}$, $\lambda_2 = 685\text{nm}$)。

テトラヒメナのミクロソームの ATPase 活性を 1mM Mg^{2+} 存在下で、 Ca^{2+} 濃度を $\text{Ca}^{2+} - \text{EGTA}$ buffer で変化させて測定すると、 Mg^{2+} 存在下の ATPase ($\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$) が活性化され、約 $4\mu\text{M}$ Ca^{2+} で最大の活性化が見られ、 V_{max} は $74\text{nmol/mg protein/min}$ を示した。また、逆数プロットから Ca^{2+} に対する見かけの K_d は、約 $0.17\mu\text{M}$ を示し、 Ca^{2+} 依存性の ATPase

((Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase) は、生理的濃度の細胞内 Ca²⁺ に十分反応できることが解った。至適 pH 及び基質特異性について調べると、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase は、pH 7.2 付近に至適 pH があり、基質としては ATP を最も効率よく分解した。一方、Mg²⁺-ATPase は、pH による活性変化は少なく、至適 pH も酸性側の pH 6.8 を示した。また、ATP に対する特異性が低く GTP は ATP と同程度にまで分解された。さらに、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase は、ATP に対する Km が約 66 μM を示し、Mg²⁺-ATPase の 140 μM とくらべ、より ATP に対して親和性が強いことが示唆された。これらの結果は、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase 活性と Mg²⁺-ATPase 活性が別の酵素による可能性を示唆する。次に、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase に対する種々の阻害剤の効果について検討すると、ミトコンドリア ATPase の阻害剤 (DC-CD, oligomycin, NaN₃) や、(Na⁺+K⁺)-ATPase の阻害剤 (ouabain) は効果を示さなかった。一方、カルモデュリン阻害剤として知られるトリフルオペラジン (TFP) は、100 μM で約 50% の阻害を示したが、カルモデュリン添加による本酵素の活性化が見られないことや、阻害には比較的高濃度を要することから、カルモデュリンを介さない阻害と考えられる。

一般に、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase は、細胞質の Ca²⁺ をくみだす Ca²⁺ ポンプとして機能していると考えられており、ミクロソームが細胞内 Ca²⁺ の調節に重要な位置を占めることが知られている。そこで、次にテトラヒメナ・ミクロソームの Ca²⁺ 輸送を Arsenazo III を用いて調べた。10 μM Ca²⁺ 存在下のミクロソーム懸濁液に ATP を加えると、ミクロソーム小胞外液の Ca²⁺ 濃度の減少を示す Arsenazo III の吸光度減少が見られ、ミクロソームが ATP 依存性の Ca²⁺ とりこみ能を有することが解った。この Ca²⁺ とりこみ活性の ATP に

対する Km は、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase のそれと近い値 (約 57 μM) を示した。また、Ca²⁺ に対する見かけの Kd は、0.41 μM で、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase と類似の Ca²⁺ 親和性を示した。次に、トリフルオペラジンの効果を調べると、(Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase を阻害した濃度と同様の濃度で、ATP 依存性の Ca²⁺ とりこみが、トリフルオペラジンを加えることにより阻害された。また、トリフルオペラジンは、ミクロソームに既にとりこまれた Ca²⁺ を流出させる効果も有することが示された。このことは、トリフルオペラジンがテトラヒメナに繊毛逆転反応を誘発する (Suzuki *et al.*, 1982) 機構について一つの説明を与えるものであり、ミクロソームからの Ca²⁺ release が繊毛逆転反応に関与する可能性が示唆される。

以上の結果は、テトラヒメナのミクロソームに (Ca²⁺+Mg²⁺)-ATPase が存在し Ca²⁺ ポンプとして機能している可能性を示している。また、テトラヒメナのミクロソームが筋小胞体などと同様に Ca²⁺ uptake や Ca²⁺ release を通じて、繊毛逆転反応などの Ca²⁺ の関与した細胞機能の調節に積極的に関与していることが考えられる。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

調製されたミクロソーム分画にはアルベオラサックなどは含まれまじょうか。

回答

Nozawa and Thompson の方法では、アルベオラサックが付着した表層膜系 (pellicle) は、あらかじめ別の画分として除外されており、ミクロソーム画分には、含まれておりません。また、マーカーエンザイムの測定の結果からミクロソーム画分は、主に小胞体より構成されていると考えられます。

25. テトラヒメナ・リソゾーム酵素, α -グルコシダーゼの精製と生化学的性状

坂野 喜子, 佐々木 昇, 野沢 義則
岐阜大学医学部生化学教室

Purification and characterization of lysosomal α -glucosidase from *Tetrahymena pyriformis*

Yoshiko Banno, Noboru Sasaki and Yoshinori Nozawa
Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

Tetrahymena は細胞外に多くのリソゾーム酵素を分泌することが Muller (1972) や Blum (1976) らにより明らかにされているが, 分泌の機構と生理的意義に関しては明らかにされていない。我々は, *Tetrahymena* が細胞の増殖に伴い細胞外に種々のリソゾーム酵素を分泌することを見出し, その機構を明らかにするために細胞外に分泌されたいくつかの酵素を単一に精製し, それらの生化学的性状を明らかにした。今回は, α -グルコシダーゼに焦点を当て細胞外酵素を単一に精製し, その生化学的性状を細胞内のものと比較検討することにより分泌の機構を考察した。

Tetrahymena 細胞は28°C, 2%プロテオースペプトン栄養培地で培養すると28時間で静止期に達する。増殖に伴い細胞外に多種類のリソゾーム酵素活性が検出された。細胞外への酵素の分泌速度は静止期が最も高く, 酸性ホスファターゼ, プロテアーゼ, α -グルコシダーゼ, N-アセチルヘキサミンダーゼはほぼ同じ速度で細胞外へ分泌されたが, β -ガラクトシダーゼは他と異なり遅かった。 α -グルコシダーゼの細胞内と外の total 活性は細胞数の増加に伴い変動し, 静止期に達すると細胞外分泌が著しく増加し, 一方細胞内活性は減少した。細胞外への分泌は KCN により濃度依存的に阻害され, エネルギー依存性であることがわかった。

酵素の細胞外への分泌の過程で修飾を受けるかどうかを知るために, まず細胞外分泌型酵素を単一に精製し, 細胞内のものと生化学的性状を比較検討した。分泌型 α -グルコシダーゼは培養28時間の培養上清を硫酸濃縮後, DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー, ゲルろ過, DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにより41%の高収率で精製された。精製標品は電気泳動上単一のタンパクバンドを示し, PAS 染色法で同一バンドが染色される糖タンパク質であった。分子量はゲル

濾過法で110,000であり SDS-電気泳動法でもほぼ同じ値が得られた。アミノ酸組成はアスパラギン酸を多く含むことが特徴的であった。高等動物では酵素のリソゾーム内への移行や細胞外への分泌に特異的糖鎖構造が重要な識別を果していることが知られており, テトラヒメナのリソゾーム酵素の糖鎖構造に興味をもたれる。細胞外分泌型 α -グルコシダーゼはタンパク重量当り2.8%の糖を含有し, その糖鎖構造は高マンノース型糖鎖構造であることが木幡研(東大医私研)との共同研究により明らかにされた。アスパラギン結合高マンノース型糖鎖構造は高等動物のリソゾーム酵素に共通にみられる構造であるが, テトラヒメナの高マンノース型糖鎖構造の一部は, Alternate Pathway で生合成された変則構造であることが明らかにされた。

分泌型 α -グルコシダーゼは至適 pH 4.0 でマルトースとインマルトースを良く分解する。したがって α -1, 4 結合ばかりでなく α -1, 6 結合も分解し, グリコーゲンをグルコースにまで分解することができる。この基質特異性は, *Aspergillus* の α -グルコシダーゼよりヒトの酵素に高い類似性を示した。分泌垂酵素と細胞内酵素の酵素化学的性質を比較したところ, 両酵素のマンノースとグリコーゲンに対する K_m は完全に一致しており, 1.4mM と 11.8mg/ml の値が得られた。また, 単一精製された分泌型 α -グルコシダーゼで作った抗体に対して両酵素とも一本の沈降線を示し, しかも完全に fuse していた。これらの結果より, 細胞外分泌型 α -グルコシダーゼは細胞内酵素と酵素化学的性質や免疫化学的性質においてほとんど区別できないことがわかった。したがってリソゾーム酵素の細胞外分泌の過程で酵素の修飾は起らないことが推測された。

テトラヒメナは細胞外から栄養物を口から摂取し -Food vacuole- を形成し一次リソゾームと融合して二

次リソゾームを形成し消化する。未消化物は Cytoproct から排泄する経路が明らかにされており、リソゾーム酵素もこの経路を通して細胞外に排泄されると思われる。しかしファゴゾームを形成しない変異株が見い出されており、この株も野生株と同様にリソゾーム酵素を多量に細胞外に分泌することが明らかにされ、ファゴサイトーシス経路によるリソゾーム酵素の排泄は主な経路ではないと思われる。我々は細胞内、外のリソゾーム酵素の生化学的性状がほとんど同じであることより、一次リソゾームが何らかの経路で直接細胞外に分泌されていることを示唆する。今後、分泌の生理機能についても検討したい。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

- 1) α -グルコシダーゼの分泌は貧食活性と関連があるのでしょうか。
- 2) マクロファージなどの場合にも同様な enzyme の release があると思いますが、その場合ラテックスのよ

うな消化下可能な物質を取り込ませた時では enzyme の release がなかったと思います。

回答

- 1) 貧食活性を活発にする系においても release の増加は認められないことが報告されています。
- 2) テトラヒメナの場合はラテックスとかカーミンを用いても release は起こります。ただ用いない場合と比較して release の速度に変化がないことが知られています。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物科学)

細胞外に分泌された酵素には前示のような糖の修飾がありますが、細胞内のもはどうなっていますか。分泌と糖の修飾との関係が重要と思いますが。

回答

そのとおり大変興味あることですので今後細胞内についても糖構造をしらべたいと思います。

26. *Tetrahymena thermophila* の接合過程におけるチューブリンおよび 14nm-繊維形成蛋白質 (49K蛋白質) の細胞内局在性について

作田 寿子, 沼田 治, 渡辺 良雄

筑波大学生物科学

保田 友義

国立予研技術部

Intracellular localization of tubulin and 14nm-filament forming protein (49K protein) during conjugation of Tetrahymena thermophila

Toshiko Sakuda, Osamu Numata and Yoshio Watanabe

Institute of Biological Sciences, The University of Tsukuba

Tomoyoshi Yasuda

Laboratory of Technology, National Institute of Health of Japan

Tetrahymena thermophila の接合は、小核の減数分裂、核交換、受精核の形成、新しい小核・大核原基の分化等の諸過程から成り立っている。これらの過程には複雑な核の形態変化や行動が見られ、細胞運動系の繊維性構造蛋白質の関与が考えられた。今回は構造蛋白質の

うちチューブリンと49K蛋白質に注目し、接合時におけるそれらの挙動を間接蛍光抗体法および電子顕微鏡観察により明らかにしようと考えた。

蛍光抗体法で用いた抗チューブリン抗体は *Tetrahymena thermophila* の繊毛チューブリンをウサギに注

射して得た抗血清を更に抗原親和精製したものである。抗49K蛋白質抗体も同様に抗原親和精製したものをを用いた。これら2種の抗体は immunoblotting 法で検討した結果、特異性が高いことが示された。染色標本の材料には細胞骨格がよく保たれている Goodenough によって開発された細胞モデル (J. Cell Biol., 96, p. 1610, 1983) を用いた。繊毛が抗チューブリンの蛍光抗体法では強く染まり、細胞内観察が行いにくかったので、dibucaine で脱繊毛した細胞モデルについても、微小管の局在を検討した。

小核の crescent 形成期に抗チューブリン抗体の局在を間接蛍光抗体法、DAPI による核の染色像と共に観察すると、蛍光抗体は小核が繊維状に伸長した crescent の位置に存在していることがわかった。また、減数分裂の第1分裂、第2分裂、核交換の時期についても抗チューブリン抗体の局在を間接蛍光抗体法で調べたところ、分裂時には紡錘糸が、分裂後は核と核の間を結ぶ繊維状構造が蛍光を発していることが観察された。核交換時には、特記すべき蛍光構造は観察されなかった。一方、49K蛋白質の局在を蛍光抗体法で検討したところ、減数分裂初期の小核が伸長する crescent 形成期には、49K蛋白質の蛍光は特別な細胞内局在性を示さなかった。しかし、減数分裂の第2分裂に入ると、分裂して生じた2核の間を結ぶ繊維状構造として蛍光が見え、そのうち、生じた4つの核の中から将来移動核と静止核とに分裂する1つの機能的な核の周りに蛍光が発した。次に、この核が分裂して移動核と静止核となる時の両核の間の繊維状構造、核交換時には交換核(移動核)の周り、受精核形成時には移動核、静止核の周りに蛍光が見えた。

一方、電子顕微鏡観察によると、第2分裂後将来移動核、静止核に分裂する機能核の周りには微小管は見えないが、核交換を行っている移動核の周りには微小管が観

察された。がれは Orias ら (Science, 222, p. 181, 1983) が、1983年に発表したものと同様な微小管のバスケット状構造と思われた。

このように *Tetrahymena* の接合過程においては、初期の段階、つまり小核の減数分裂のうちの crescent 形成期、第1分裂期、第2分裂期中頃までは抗チューブリン抗体の間接蛍光抗体法で、核の形態変化や分裂に関連した微小管の位置を知ることができる。また電子顕微鏡観察により、微小管が核交換時に現れることもわかった。一方、49K蛋白質に関しては、それが構造として移動核・静止核の選択、移動核の交換、静止核との融合に関わっているようなことを示す結果を得た。核交換時に微小管の局在が間接蛍光抗体法で観察できないのは、この時点で49K蛋白質が微小管の周りを覆ってしまっていることによる可能性が高い。これは微小管の周りに付着物が存在するという電子顕微鏡観察からも示唆される。

従って、チューブリン、微小管、49K蛋白質(14nm-繊維形成蛋白質)は接合中の様々な時期において独立のあるいは協調的に働いていることが考えられ、このような両構造蛋白質の相互作用は細胞運動系の構造の機能調節に関わっている可能性が考えられ、興味深い。

質問 遠藤 浩(筑波大・生物科学)

減数分裂初期には、49Kタンパクは細胞内に存在しますか?

回答

今回は観察する細胞をすべて cell model 化し、細胞骨格性の構造のみをみたため、たとえ、可溶性の49Kタンパク質が細胞内に存在していても、蛍光として観察できません。おそらく、可溶性のタンパク質として存在すると思われます。

27. テトラヒメナの Heat Shock Proteins

大場 浩美, 沼田 治, 渡辺 良雄
筑波大学生物科学系

Heat shock proteins of Tetrahymena pyriformis W.

Hiroyoshi Ohba, Osamu Numata and Yoshio Watanabe
Institute of Biological Sciences, University of Tsukuba

現在, 多くの動物細胞で様々な Heat Shock Protein が発見されているが, その機能, 役割については解析があまり進んでいない. 今回我々は *Tetrahymena Pyriformis* W 株に於いて, 数種の Heat Shock Protein を確認し, これに対する抗体を用いて若干の知見を得たので報告する.

至適温度の26°Cで培養された *Tetrahymena* の細胞と sublethal な高温度の34°Cで培養された細胞について, その構造蛋白質の比較を行ったところ, 特定の蛋白質の蓄積が速やかに起こることが判った. 比較は, 細胞の全蛋白質を二次元電気泳動 (Hirabayashi *et al.*, *J. Biochem.*, 93, p. 461, 1983) し, クーマジー染色したゲルを用いて行った. ここで Heat Shock によって顕著な増加を示す主要な3つのスポットに着目した. 即ち, MW=26k, pI=5.8 (hsp26); Mw=33k, pI=5.1 (hsp33); Mw=71k, pI=5.3 (hsp71) の3つの蛋白質である. これらについて, 34°Cの培養の開始から時間を追って定量を行ったところ, いずれも30分以内に速やかな増加が観察された. このうち hsp26 は, Heat Shock を施さない細胞にも存在して居り, 3つのうちで最も急激な増加を示した. また, hsp33, hsp71 は Heat Shock を施さない細胞の蛋白質を展開したゲル上では確認できなかった.

Guttman ら (*Cell*, 22, p.299, 1980) は, 飢餓状態の *Tetrahymena Pyriformis* に対し, 脱繊毛と Heat Shock, 各々の処理が同一の蛋白質の合成を誘導することをオートラジオグラフにより確認しているため, 我々が注目した3つの Heat Shock Protein についても, 脱繊毛と飢餓による影響を調べてみた. 26°Cでの培養のうち, シブカインによる脱繊毛を行った細胞, 及び無機塩類溶液中での飢餓の処理を行った細胞の両者を二次元電気泳動したが, hsp26, hsp33, hsp71 の量的変化は確認できなかった. このことから, これら3つの蛋白質の

蓄積は, Guttman らとは異なり温度に特異性を示すものであることが判った.

一方, *Tetrahymena Pyriformis* W. 株では, 温度処理 (26°C \rightarrow 34°C) を行うことで細胞の同調化が可能である (Watanabe, *Exp. Cell Res.*, 68, p. 431, 1971). 今回, この同調過程中の hsp26, hsp33, hsp71 の量的変化についても調べた. 同調化のための温度処理によっても, この3つの蛋白質が速やかに増加することが確認できたが, 温度処理75分経過した時の同調分裂期には, hsp26, hsp33, hsp71 や他の蛋白質にも特に大きな変化はなく, 分裂の同調化と, Heat Shock Protein 量との間に直接の関連は認められなかった.

次に, この Heat Shock Protein の機能を調べるため抗体を調製した. 抗原は, 二次元電気泳動したゲルから, 各 Heat Shock Protein のスポットを切り出したもので, これをウサギに注射して抗血清を得た. この抗血清を Talian (*J. Cell Biol.*, 97, p. 1277, 1983) らの方法により, 抗原に対してアフィニティー精製し抗体を得た. そして26°Cと34°Cで培養された細胞各々の蛋白質を Towbin (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, p. 4350, 1979) らの immunoreplica 法により, これらの抗体で処理したところ, この方法でも hsp33, hsp71 は Heat Shock を施さない細胞では確認できないことが判った. また, Heat Shock を施した細胞を, -20°Cでエタノールとアセトンで固定し, 抗 hsp33 抗体を用いて間接蛍光抗体法により観察したところ, 細胞全体が蛍光を発することが判った. 更に, この蛍光が細胞骨格に由来するものであるかを検討するため, Heat Shock を施した細胞を Goodenough (*J. Cell Biol.*, 96, p. 1610, 1983) の方法に従い, 0.1%の NP-40 でモデル化し, 細胞モデルと可溶化された分画について, 抗 hsp33 抗体を用いて immunoreplica 法を行った. この結果, 細胞モデルの分画に hsp33 の存在が確認され,

hsp33 は細胞全体に分布する 細胞骨格性の 成分である
ことが示唆された。

質問 北村 昭夫 (東北大・理・生物)

Heat Shock は transcriptional あるいは post-
transcriptional のどちらのレベルに作用しているの
ですか？

回答

我々が注目した蛋白質については、現在のところまだ
検討しておりません。

シンポジウム

原虫免疫と癌免疫との接点

鈴木 守

群馬大学医学部寄生虫学教室

Joint interest between protozoan immunology and cancer immunology

Mamoru Suzuki

Department of Parasitology, Gunma University School of Medicine

1984年現在地球上の総人口は、47億をこえ、1983年より8,000万人弱の人口増加があったことが、国連によって発表されている。こうした人口増加問題の特に深刻な熱帯諸国においては、当然、農産物の増産が計画されることになる。熱帯という動植物の生態構成が、人類集団を圧倒している地域において、無計画に農業を拡大させる事は、日本において考え及ばない困難な問題を発生させる事もありうる。あらゆる農業企画にとって欠く事のできない農業用水網を開削発展させ、農地を拡大していく事は、地域によっては、マラリアや住血吸虫を蔓延させることにつながる。このした矛盾は食糧問題が特に深刻なアフリカ諸国においては、共通した問題となっている。こうした実情を、直視し、その解決を、まず医学の面から考えようとする動きが、以前よりWHOなどにおいて推進されてきたが、わが国におけるこの方面の理解は、驚くほど不足している。原生動物学会会員諸賢に、まずこの点を訴えたいと考える。

話をマラリアに限ると、現在20億人が流行地域に居住し、内16億人にたいしては、常時対策を講じていかなければならない実情にある。残留性殺虫剤に対し抵抗性をもったハマダラカや、薬剤耐性マラリアの発生と拡散は、従来の対策推進がこのままでは危うい事を警告する事実といえよう。

マラリアワクチン開発計画はこうした背景をふまえて、寄生虫学者、免疫学者、生化学者、分子遺伝学者などの協力と連携のもとに、推進されていく気運が生じ、マラリアの無い先進国においても活発な研究活動が展開されている。ハマダラカより人体に侵入したマラリア原

虫は、スポロゾイトとよばれ、短時間で肝細胞内にはいる。スポロゾイトが、まだ血流中にいるときに免疫学的攻勢によって不活化してしまうためのワクチンをスポロゾイトワクチンと呼び、ニューヨーク大学の Dr. Nussenzweig, R を中心としたグループがこの研究をもっとも強力におしすすめている。このグループの研究のあらまは以下の通りである。マラリア原虫スポロゾイトの表面抗原にたいしてモノクローナル抗体を作りその作用をしらべたところ、抗体の作用をうけたスポロゾイトの感染力がうしなわれている事実がみいだされた。この知見を出発点として、ニューヨーク大学グループは、得られたモノクローナル抗体に対応するマラリア原虫抗原を純化し、さらに、純化された抗原をコードしているcDNAをプラスミッドpBR322に組み入れて、宿主である *E. coli* に問題のマラリア抗原を生産させる事に成功した。この方法は、抗原分子を純粋な物質として、大量にとるという意味において注目される。一方オーストラリアの The Welter and Eliza Hall Institute of Medical Research の Dr. Anders らのチームは、赤血球型原虫が生産しているS抗原をコードしているcDNAをラムダーファージに組入れて *E. coli* 内に入れる方法をとって、目的の純化抗原を遺伝子工学的的方法により大量生産する事に成功した。

以上の二つの研究成果は、マラリア原虫抗原を純化した形で、大量にとるために、遺伝子工学的技法を応用した点が、共通している。したがって得られた抗原は、いづれも原虫のつくりだすポリペプチドである。またこの様な抗原をワクチンとして注射した場合、それに対応し

て生体内に誘発される免疫の実体は、抗体である筈であり、なんらかの免疫担当細胞が特異的に増殖する事は、すくなくとも今の実験事実からはうらづけられてはいない。

われわれは、以上のような批判的視点から、現在放射線照射により恒久的に弱毒化し、逆もどり現象のおこらないマラリア原虫を人工的に作りあげ、この原虫を中心に研究をすすめている。われわれがつくりだした弱毒マラリア原虫株を生ワクチンにみだてて、マウスを免疫してみると、きわめて長期にわたる、しかも強力な防御免疫が成立している事実がみいだされた。この弱毒マラリア原虫は幼若赤血球に選択的に感染する特有な性質がある。マラリア原虫が特に幼若赤血球に感染をおこすと、その表面に H-2K, H-2D 遺伝子の支配によって作られる糖蛋白とマラリア原虫抗原とが複合体となって表現されるとする考察がある。もしそれが事実なら、その複合体は、キラーT細胞を誘導するものと考えられる。誘導されたキラーT細胞は、おなじ複合体を膜表面に表現しているマラリア原虫感染赤血球を中の原虫もろとも破壊することだろう。

この様なキラーT細胞による感染細胞破壊のメカニズムは、ある種のウイルスの感染をうけている細胞の免疫学的破壊においてもみられる。さらに、ある種の癌細胞においても同様の免疫学的細胞破壊機作が観察されている。いずれにおいても細胞表面の特有な糖蛋白の構造が

抗原と一体となって、キラーT細胞が誘発される点が共通項となっている。

いささか考察が先行したきらいは、否めないが、この考察がかならずしも見当違いではないことを最近のわれわれの実験はしめしている。マラリア感染赤血球およびその中の原虫に対する免疫学的攻撃には以上の様に癌細胞にたいする免疫学的攻撃とあい通じるものがあるらしい。

現在われわれは、先にのべた弱毒マラリア原虫感染赤血球および弱毒原虫の元となった強毒原虫感染赤血球それぞれに対してモノクローナル抗体を多数用意し、それぞれの感染赤血球表面の抗原分子を比較し、以上の考えのうらづけ作業を試みている。もし、われわれの考えが、正しいとすれば、先に紹介した遺伝子工学的技法によって作られたポリペプチド抗原はマラリアワクチンとして決定的なものとは、かならずしもいえない事になるう。

質問 神原 広二 (長崎大・熱研・原虫)

マウスの系では弱毒化は簡単に検出できるが、人の場合の弱毒化はいかにして検出し得るか。

回答

in vitro growth curve が横にぬるかどうか。また、ヨゲルの幼若赤血球に対する親和性など、*in vitro* の system を検討してます。

住血原虫類の研究におけるモノクローナル抗体の利用について —*Trypanosoma cruzi* を中心として—

金 田 良 雅

東海大学医学部寄生虫学教室

Monoclonal antibodies in hemoflagellate research: Trypanosoma cruzi

Yoshimasa Kaneda

Department of Parasitology, School of Medicine, Tokai University

細胞融合という技術が最も良く利用され、効果をあげているのはモノクローナル抗体の産生である。生体内で抗体産生を行うBリンパ球細胞は多数のクローン集団で

構成されている。この集団から単一抗原決定基に反応する抗体を産生しているクローンを分離して作り出されたものがモノクローナル抗体である。ところがBリンパ球

は増殖ができないという性質のため単一クローンの培養が不可能であった。このようなBリンパ球細胞と限りなく増殖する骨髄由来のガン細胞であるミエローマと細胞融合を行わせることによって両者の特性を兼ね備えた細胞が得られるようになった。すなわち、特異的抗体を産生し、拡大増殖能力をもつハイブリドーマが得られた。このハイブリドーマのうちから目的とする抗体を産生する細胞を選択すると特異性が高く、安定した抗原との親和力をもち、多量に均一な抗体が得られる。そのため抗体の研究ばかりでなく、抗体の認識する抗原の機能解析にもこのモノクローナル抗体は利用されている。

こうした特性をもったモノクローナル抗体を使って住血原虫類の *Trypanosoma cruzi* の life cycle 中の抗原変異、株間の特異抗原の同定、虫体特異抗原の動態及びそれによる宿主への影響などの研究が行われている。*Trypanosoma cruzi* は中南米に流行する Chagas 病の病原虫体である。この病気に対する有効な治療薬はなく、その病態とくに慢性期における発症の要因が明らかではない。形態変化をする虫体の特異抗原を解析することによりこの病態を明らかにし、予防及び治療手段への手懸りを得るべく研究が行われている。

抗原として培養型の epimastigote を用いて作成したモノクローナル抗体による抗原解析では、*Trypanosoma cruzi* の各型虫体及び *trypanosoma* 属に共通した抗原が存在する一方、epimastigote 特異的抗原の存在も認められた。この特異抗原は虫体膜に局在する分子量32, 36, 45, 50, 56K の glycoprotein であることが、虫体抗原の pronase 及び periodate 処理法や、電気泳動像をニトロセルロース膜へ転写し酵素抗体法などを用いて観察された。さらに、血液型の trypomastigote や細胞内型の amastigote においてもそれぞれに特異的な抗原が認められた。このように *Trypanosoma cruzi* の life cycle における各形態別の特異抗原が認識されるようになったのはモノクローナル抗体を用いて初めて行いえたことである。これらの特異抗原は量的にも少く、十分な精製も不可能であり、従来のポリクローナル抗体による同定では困難なことであった。とくに、trypomastigote や amastigote を虫体分離する際には宿主の血液成分や細胞断片などの混入が避けられない。ところがモノクローナル抗体作成の段階では抗原の十分な精製が必要でないという利点があり、特異抗体の作成が可能となった結果である。

これらの特異抗体のうち *Trypanosoma cruzi* の各形態と各株間に共通して存在する抗原を認識し、他の

trypanosoma 属の抗原とは反応しない抗体は Chagas 病と他の *trypanosoma* 属虫体感染による疾患との鑑別診断にとっては重要なものと考えられる。amastigote 特異的抗原の動態もそれに対するモノクローナル抗体を用いて観察された。この抗原は、trypomastigote には認められないが、amastigote と trypomastigote との移行型には認められた。またこの抗原は感染細胞の培養上清と、感染動物ではこの抗原を認識する抗体が血清中に認められた。さらに培養されている感染細胞表面にも認められた。これらの事実から推察すると、形態変化に伴ってこの抗原は虫体表面から放出され、宿主細胞表面に移行している可能性がある。

trypomastigote に特異的に反応するモノクローナル抗体も作成された。この型の虫体によって新しい細胞または新しい宿主への感染が成立することから考えるとこの抗体の虫体への生理作用が注目を集める。病状の悪化をくいとめたり、予防手段としてこの抗体の利用が検討されている。

質問 猪木 正三 (奈良医大)

T. gambiense の抗原型は100種ほどあるといわれていますので、一つの抗原型の *T. gambiense* 原虫と反応しないといって *T. gambiense* と *T. cruzi* に共通抗原がないといえるでしょうか。

回答

厳密には全ての抗原との反応性を調べなければならない点はお説の通りです。

しかし他の虫体との反応と関連性を求めると *T. cruzi* に特異的抗体が作成できたと考えます。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

Cell coat の glycoproteins (GP) をある程度分画してから monoclonal antibody を分離した方が、specific GP が得られ易いのではないのでしょうか。なぜなら、示された数種の monoclonal 抗体は複雑の GP と coss-reaction していますので。

回答

目的とする monoclonal 抗体を選択する段階で特異性の高いものを選ぶことで specific GP の精製が行えると思います。

specific GP を得やすいという点では先生のおっしゃる通りですが、十分量の抗原が得られないものがこの *T. cruzi* では多いので選択法がいまはよい方法となっています。

マラリア原虫の赤血球内環境への適応

田 辺 和 裕

大阪市立大学医学部医動物学教室

Adaptation of Plasmodium to an intraerythrocytic environment

Kazuyuki Tanabe

Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School

Plasmodium (マラリア原虫) は赤血球を宿主細胞とする寄生性原生動物である。赤血球内は恒常的な生理的環境が得られる点や、宿主の免疫系の認識・攻撃が及び難い点で、原虫にとり好都合な寄生環境である。しかし、赤血球内では K^+ レベルが高く、 $Na^+ \cdot Ca^{2+}$ レベルは低く保たれており、このようなイオン環境で増殖するためにマラリア原虫は多様な適応機構を発達させていると思える。鎌形赤血球症の人はマラリアに抵抗性があるが、それは赤血球の鎌形化に伴い血球内 K^+ レベルが低下し、そのようなイオン環境ではマラリア原虫は成育できない。このことは、高い K^+ レベルが原虫にとり必須であることを示している。一方、赤血球内の Ca^{2+} レベルは非常に低く ($1 \mu M$ 以下)、血漿中の Ca^{2+} 濃度の $1/1,000$ 以下に保たれている。赤血球内のこの低 Ca^{2+} レベルはマラリア原虫の成育にとり重要なのであろうか。あるいは、原虫の寄生を受けた赤血球は膜の Ca^{2+} 透過性を変え、血球内に Ca^{2+} を蓄積するのであろうか。しかし、血球内での Ca^{2+} の蓄積は膜に多くの障害を与え、原虫の寄生にとり不都合となるはずである。様々な細胞活動の調節因子として重要な働きをする Ca^{2+} のトランスポートを *Plasmodium* がどのような機構で行っているか興味深い問題である。*P. chabaudi* 及び *P. yoelii* を用いて得られた結果を要約すると以下のようになる。

まず、原虫寄生赤血球ではカルシウム含量が増加することが原子吸光測定により明らかになった。 $^{45}Ca^{2+}$ を用いた流速実験では、寄生赤血球で Ca^{2+} の流入が増加し、また Ca^{2+} の流出は正常赤血球よりも著しく減少することがわかった。恐らく、この両方の過程により寄生赤血球でのカルシウム含量の増加に関わるものと思える。赤血球内 Ca^{2+} を濃度勾配に抗して血球外に汲み出す働きをする赤血球膜 $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ -ATPase の活性を、寄生赤血球及び正常赤血球から得られた単離血球膜

と比較したところ、至適条件において Ca^{2+} 濃度 $1 \mu M$ 以下においては差が見られなかった。マラリア原虫の寄生により寄生赤血球膜のマトリックスは pH の弱酸化、ATP レベルの低下が誘導されたが、低 ATP 濃度 ($0.2 mM$) の条件下で、 $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ -ATPase は著しく活性が低下した。このことは、寄生赤血球膜の $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ -ATPase が ATP レベルの低下により活性を低下させ、膜の Ca^{2+} 輸送に変化が生じることを示唆する。

血球内に流入した Ca^{2+} は、原虫に移行し、赤血球マトリックスには蓄積していないことがわかった。すなわち、 $^{45}Ca^{2+}$ を取り込ませた寄生赤血球を $Tris \cdot NH_4Cl$ により特異的に溶血させると、 $^{45}Ca^{2+}$ は原虫内に存在していたのである。寄生赤血球内での Ca^{2+} のトランスポートに原虫の膜電位が関与するかどうかを見る目的で、寄生赤血球の膜電位を調べてみた。脂溶性陽イオン (TPMP) 及び陰イオン (SCN) の赤血球内外での分布を指標として計算したところ、寄生赤血球が強い負電位を持つことを示した。陽イオン蛍光色素である Rhodamine 123 を用いた蛍光顕微鏡観察結果は寄生赤血球で見られた強い負電位が赤血球のマトリックスでなく、原虫に局在していること、及び原虫の細胞質がほぼ一様に負電位を持つことを示すものであった。対照として中性化合物の Rhodamine 110 を用いたが、原虫内には取り込みはなかった。この *Plasmodium* の膜電位は H^+ イオノフォアである carbonylcyamide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP)、及び H^+ -ATPase の阻害剤である dicyclohexyl carbodimide (DCCD) の存在によって消失するが、ミトコンドリア電子伝達系の阻害剤である KCN, NaN_3 , Antimycin A ではあまり影響を受けなかった。一方、*Plasmodium* 寄生赤血球の Ca^{2+} トランスポートは、CCCP や DCCD により著しい影響を受けるが、KCN, NaN_3 , Antimycin A では著明で

なかった。以上の事実から *Plasmodium* の形質膜には起電性の H^+ ポンプがあり、その作用によって形質膜内外で H^+ 濃度勾配、及び膜電位が形成され、それらが Ca^{2+} の原虫内への輸送に利用されることを示唆している。

マラリア原虫は長い進化の過程で赤血球を宿主細胞にすることができたと思われる。これまでの研究から、原虫が赤血球内で Ca^{2+} 代謝を調節するために、①寄生赤血球膜の Ca^{2+} トランスポートを修飾していること、そして②原虫の形質膜に H^+ ポンプを持ち、それを Ca^{2+} の膜輸送に使うこと、及び赤血球内に Ca^{2+} の蓄積を抑え溶血を防いでいることなど、原虫が赤血球内で成育・増殖できるための寄生適応の機構があることが浮び上がってきた。

参考文献

1. Tanabe, K. *et al.*, (1982). An increase in Sendai virus-induced cell fusion of erythrocytes infected with *Plasmodium chabaudi*. *Experientia*, **38**, 342-344.
2. Tanabe, K., R. B. Mikkelsen and D. F. H. Wallach (1982). Calcium transport of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.*, **93**, 680-684.
3. Mikkelsen, R. B., K. Tanabe and D. F. H. Wallach (1982). Membrane potential of *Plasmodium*-infected erythrocytes. *J. Cell Biol.*, **93**, 685-689.
4. 田辺和裕 (1983). マラリア感染赤血球の膜病理生物学, 蛋白質・核酸・酵素, **28**, 103-117.
5. Tanabe, K., R. B. Mikkelsen and D. F. H. Wallach (1983). Transport of ions in erythrocytes infected by plasmodia. In "Malaria and the red cell", Pitman, London, (Ciba Foundation Symposium, vol. 94), pp. 64-73.
6. Tanabe, K. (1983). Staining of *Plasmodium yoelii* infected mouse erythrocytes with the fluorescent dye rhodamine 123. *J. Protozool.* **30**, 707-710.

質問 鈴木 守 (群馬大・医・寄生虫)

モノクローナル抗体を使い、赤血球表面にマラリア原虫抗原がみつめられた実験に関して

(1) Aikawa らのしめした原虫の surface coat がぬぎすてられるプロセス

(2) NIH の Haword が示した RBC 内原虫の抗原が表面にでるプロセス

とどうい関係にあるか、RBC 表面の抗原のうごきはありますか。

回答

私の知見と、(1)(2)とは一応無関係と考えます。赤血球表面抗原の動きは現在のところみとめていません。

質問 野沢 義則 (岐大・医・生化)

Ca^{2+} ATPase をはじめとした膜機能変化は膜脂質を中心とした膜物性変化の結果として考えてはいけなんでしょうか。

回答

一つの可能性としては、御指摘される通りだと思います。しかし、寄生赤血球膜のリン脂質構成の変化は、マラリア感染が著しく進行して血中原虫数が80~90%という死亡寸前の状態に起こることなので、普通感染時における膜物質変化の影響が Ca^{2+} トランスポートに出てくるかどうかはわかりません。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

原虫内に Ca^{2+} が蓄積されることが明らかになったと思われます。一般的に細胞内が高 Ca^{2+} となることは原虫にとっても好ましい状態ではないと思われますが、 Ca^{2+} の function についてのお考えをお聞かせ下さい。

回答

Ca^{2+} の細胞内蓄積は一般的に細胞にとり toxic ですが、 Ca^{2+} がミトコンドリアのような細胞内小器官に蓄積されると toxic とはなりません。恐らく、局在化された場所から、必要に応じて Ca^{2+} が細胞質に取り出され、細胞の諸活動に利用されているものと考えております。

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4,500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、会誌の無料配布を受けることができる。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、会誌の無料配布を受けることができる。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、幹事及び監事それぞれ若干名をおく。幹事は会員の互選により、監事は幹事会の議を経て幹事以外の会員から会長が依嘱し、会長は幹事の選挙によって決定する。

会長、幹事及び監事の任期は3年とし、会長及び幹事は重任を妨げない。

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。監事は会計を監査する。

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、岐阜大学医学部生化学教室におく。

2. 入会手続きは所定の申し込み用紙を用い、会費1年分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

第18巻第1号をお届けします。演者の諸先生方、および第18回大会事務局の方々の御協力により、編集が円滑に進み、早々と雑誌を発行することができました。今回より、会員名簿欄に電話番号を掲載しましたが、訂正などございましたら事務局までご連絡下さいますようお願い致します。

事務局移転より2年となりましたが、まだまだ不慣れた点が多く御迷惑をおかけ致しておりますが、今後とも会員の皆様方の御指導、御協力を賜われますよう宜しくお願い申し上げます。

なお、本年は国際原生動物学会がナイロビで開催されますが、次回(1989年)は我が国での開催が期待されておりますので、多くの先生方がアフリカへ飛んで下さることを希望致します。

(野沢・加藤)

原生動物学雑誌 第18巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol.18 No. 1

昭和60年3月20日 印刷

昭和60年3月31日 発行

編集兼発行人：猪木正三

発行所：日本原生動物学会

岐阜市司町40 (☎500) 岐阜大学医学部生化学教室

電話 (0582) 65-1241 (内 2230)

振替口座：名古屋 1-46123

印刷所：前田進行堂印刷

（株）前田グラフィック・アーツ

京都市左京区松ヶ崎修理式町3-7

電話 (075) 722-0234・561-6108

Office of the Editorial Board

c/o Department of Biochemistry, Gifu University

School of Medicine

Tsukasamachi 40, Gifu, 500 Japan