

ISSN 0388-3752

平成元年 5 月

May 1989

原生動物学雑誌

第22卷 第1号

*the Japanese Journal
of Protozoology*
Vol. 22 No. 1

日本原生動物学会
Japan Society of Protozoology

原生動物誌

Jpn. J. Protoz.

原生動物学雑誌 第22巻第1号

目 次

総説 石井圭一, 石橋康久 両生アカントアメーバによる角膜炎

第22回日本原生動物学会大会概況

講演目次

特別講演 「当教室における最近のマラリア研究」…………… 中林敏夫

一般講演

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

日本原生動物学会 幹 事

藤田 濤 吉 (会長)

石井 圭 一 尾崎 文 雄 小山 力 重中 義 信 鈴木 直 義
高田 季 久 竹内 勤 中林 敏 夫 野沢 義 則 樋渡 宏 一
盛下 勇 渡辺 良 雄

Committee of the Japan Society of Protozoology

Jinkichi Fujita (President)

Keiichi Ishii, Humio Osaki, Tsutomu Koyama, Yoshinobu Shigenaka, Naoyoshi Suzuki,
Suehisa Takada, Tsutomu Takeuchi, Toshio Nakabayashi, Yoshinori Nozawa, Koichi Hiwatashi,
Isamu Morishita, Yoshio Watanabe

原生動物学雑誌 編集委員

野沢 義 則 (委員長)

鈴木 直 義 高田 季 久 中林 敏 夫 樋渡 宏 一 渡辺 良 雄

Editorial Board

Yoshinori Nozawa (Chief)

Naoyoshi Suzuki, Suehisa Takada, Toshio Nakabayashi, Koichi Hiwatashi, Yoshio Watanabe

日本原生動物学会大会概況

大会長 渡 辺 良 雄

会 場 筑波大学大学会館

つくば市天王台 1 - 1 - 1

会 期 昭和 63 年 12 月 1 日 (木), 2 日 (金)

日 程 第 1 日 12 月 1 日 (木)

13:00 開 会

13:05 ~ 16:05 一 般 講 演 (1 ~ 12)

16:15 ~ 17:15 特 別 講 演

17:30 ~ 19:30 懇 親 会

第 2 日 12 月 2 日 (金)

9:30 ~ 12:00 一 般 講 演 (13 ~ 22)

12:00 ~ 13:00 昼 食

13:00 ~ 15:00 総 会

15:00 ~ 16:45 一 般 講 演 (23 ~ 29)

講演目次

特別講演

当教室における最近のマラリア研究 …………… 中林敏夫 (阪大・微研・原虫)

一般講演

1. テトラヒメナ酸性 α -グルコシダーゼの細胞内プロセッシングと分泌
…………… 坂野喜子, 佐々木昇, 吉野稚佳子, 野沢義則 (岐阜大・医・生化)
2. テトラヒメナのタウロリピド脂肪酸の培養条件による変動 …………… 彼谷邦光 (国立公害研)
3. 淡水赤潮 *Peridinium bipes* の出現及び種移行 …………… 安達六郎 (三重大・生物資源)
4. エビ幼生餌料としての繊毛虫の培養 …………… 前田昌調 (東大・海洋研)
5. ニホンウナギの鰓より得られた *Trichodina* 属繊毛虫のSEM 観察
…………… 今井壮一, 宮崎裕康, 野村清彦 (日獣大・寄生虫)
6. ニッポンヨコエビに寄生する2種のグレガリナについて …………… 星出一巳 (山口大・教育・生物)
7. *Cryptosporidium* オーススト及びスポロゾイドの簡易染色法
…………… 朝日博子, 熊田三由, 加藤桂子, 小山 力 (国立予研・寄生虫)
8. 日本に分布する *Entamoeba histolytica* の zymodeme の解析
…………… Severa Motta¹, 小林正規¹, 関口恒存¹, 野崎智義¹, 竹内 勤¹, Peter G. Sargeant² (¹慶大・医・寄生虫, ¹London School of Hygiene and Tropical Medicine, London University)
9. 病原力の異なる *Trypanosoma cruzi* のDNA 切断パターンの比較
…………… 上村春樹, 福間利英, 中澤秀介, 神原廣二 (長崎大・熱研・原虫)
10. 既成培地を用いた *Trypanosoma b. gambiense* 血流型の培養
…………… 福間利英, P. J. Mhando, 上村春樹, 中澤秀介, 神原廣二 (長崎大・熱研・原虫)
11. *Trichomonas foetus* から得た ribosome 及び surface protein の化学的性状と抗原性
…………… 岡 好万¹, 伊藤義博² (¹徳島大・総合・保健, ²徳島大・医・寄生虫)
12. *Plasmodium yoelii* の Ca^{2+} ・ATPase 遺伝子のクローニング
…………… 村上賢二, 田辺和裕, 高田季久 (大阪市大・医・医動物)
13. 繊毛虫 *Pseudourostyla levis* の無小核体における再生について
…………… 高橋忠夫, 洲濱幹雄 (広島大・理・動物)
14. 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* シンゲン1のオートガミーについて …… 小阪敏和 (広島大・理・動物)

15. テトラヒメナの接合中の核の行動と配置：細胞質分裂突然変異体 (cdaC) の場合
 菅井俊郎, 加藤治夫 (茨城大・理・生)
16. ゴウリムシの接合時における細胞間情報交換と同調受精 見上一幸 (宮城教育大・理研)
17. ミドリゴウリムシの接合概日性リズム —— 位相物質はあるか ——
 三輪五十二, Ruth Gamboa, Gloria L. Enlriquez (茨城大・教養・生物)
18. 繊毛虫プレファリズムの細胞伸長反応に関わる構造的要素
 石田正樹, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
19. 太陽虫軸足の収縮反応 安藤元紀, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
20. 太陽虫の単離軸足とその形態変化 石井いずみ, 重中義信 (広島大・総合科学・細胞生物)
21. 画像処理によるアメーバ運動の定量化 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養・生物)
22. アメーバ遭遇行動のコンピュータ解析
 堀上英紀, 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養・生物)
23. アメーバ・プルテウス系統間の生理学的比較
 月井雄二, 木原 章, 石井圭一 (法政大・教養・生物)
24. *Acanthamoeba* のミトコンドリア DNA の strain 差
 八木田健司, 遠藤卓郎 (国立予研・寄生虫)
25. トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) の補体結合能について
 小俣吉孝, 中林敏夫 (阪大・微研・原虫)
26. トキソプラズマ主要膜抗原に対するモノクロナール抗体の作製と同抗原の血清診断法への応用
 牧岡朝夫, 小林昭夫 (慈恵医大・寄生虫)
27. *Toxoplasma gondii* における pellicle の微細構造の電顕観察
 保田友義¹, 八木田健司², 遠藤卓郎² (¹国立予研・技術, ²国立予研・寄生虫)
28. トキソプラズマ原虫の actin の分布について
 遠藤卓郎¹, 八木田健司¹, 保田友義², 中村 健³ (¹国立予研・
 寄生虫, ²国立予研・技術, ³北里大・医・寄生虫)
29. ディディニウムのシスト形成における陽イオンの効果
 上野貴将, 浅井 博 (早大・理工・物理)

両生アcantアメーバによる角膜炎

石井 圭一^{*}, 石橋 康久^{**}

^{*} 法政大学生物学研究室, ^{**} 筑波大学臨床医学系眼科

Amphizoic Acanthamoeba Keratitis

Keiichi Ishii^{*} and Yasuhisa Ishibashi^{**}

^{*} Laboratory of Biology, Hosei University, ^{**} Department of Ophthalmology, Tsukuba University

元来自由生活アメーバである *Acanthamoeba* 属 (以後ACNTと略記する) の1種が哺乳動物に対して病原性を持つことを Culbertson et al. (1958) は最初に実験的に証明し, このアメーバをすでに発見されていた *A. castellanii* に該当すると考えた. 後に Singh & Das (1972) はACNTの独立性に疑問を持ち, これを *Hartmannella culbertsoni* と命名し, 他に *H. rhysodes* も病原性を有すると発表した, 現在ではこの2種はいずれもACNTとみなされている (Page, 1967). これとほぼ同時代に自由生活性アメーバの人体初感染例が報告され (Fowler & Carter, 1965), 後にこの症例はPAM (原発性アメーバ髄膜脳炎 Primary amoebic meningoencephalitis) と名づけられた. 後日このアメーバは *Naegleria fowleri* と命名され, 以後同様症例が北・中米及びヨーロッパを中心として次々に報告されるようになった.

一方で, ACNTの最初の人体感染例 (角膜潰瘍) も Jones et al. (1975) により報告された. このアメーバは *A. polyphaga* で, 同時に *Acanthamoeba sp.* によるぶどう膜炎, ついで脳炎も併発している. 以後ACNTによるヒトのGAE (アメーバ肉芽腫性脳炎 granulomatous amoebic encephalitis) は多数知られるようになり, 1984年までにPAM, GAE合わせて160例以上が世界各地から報告されている (Martinez, 1985). 日本でも *Naegleria fowleri* によるPAM初例が1979年発表された (中村他, 1979) が, 後に

A. culbertsoni であると訂正された (赤井他, 1980). PAMの患者は健康な若い人に多いが, GAEは皮膚, 呼吸器, 泌尿器系に1次病巣を作り, これより血行性に移行して中枢神経系をおかすと考えられ, PAMとは異なり, 慢性消耗性疾患あるいは免疫不全による日和見感染が多いのが特徴である.

すでに中枢神経系の炎症性疾患の診断にはこれら2属のアメーバが常に考慮されるようになっているが, ACNTによる角膜炎の存在は本邦ではほとんど眼科で注目されず, 臨床・病理・疫学ともに関心が少なく, 多くの本症が診断されることなく見すごされていると思われる. 筆者らがアメーバ角膜炎の本邦初例を経験 (石橋他, 1987) して以来, すでにACNTの分離ができたもの4例があり, 今後診断, 同定の体制が多少でも整い, 臨床家の関心を増すにつれて, 本邦の症例も急速に増加するものと思われる. 以下これらの問題点について具体的に記述する.

ACNT角膜炎の問題点

ACNT角膜炎はコンタクトレンズ (以下CLと略) 装着に伴う合併症として注目されてきた. 欧米では大半がソフトCL装用によるもので, 水道水や井戸水などから作る生理食塩水 (home made saline) の使用や, いわゆるコールド滅菌法との関連が指摘されている. 日本の症例はいずれもCL装用者であり, その保存液からもACNTが分離できた. その他ステロイド剤の使用, へ

ルベスの長期感染、角膜の物理的傷害などとの関連が指摘されているが実証されていない。もともとACNTは広く土壌や淡水に分布する極くありきたりのアメーバで、米国では健康者のCL保存液の2.5%から本属を分離し(Stehr-Green et al., 1987), また不顕性感染と考えられるものも報告されている(Jones, 1986)。石橋ら(1988)も同様に保存液からの検出を試みたが、さらに納豆培地の使用により、かなり高頻度の汚染が現在確認されつつある。

ACNTはマウステストによると同一種でも病原性の有無、強弱、様々の株があり、この病原性が何に由来するか全く不明である。また患者から分離された株でもマウステストにより病原性の認められないものが多い。非常に不思議な点は、PAMは免疫不全に強い関連があるが、本症はほとんど健康者に発症している。このように自由生活性病原体であるが故の疫学上の多数の問題点を抱えており、マウステストに代わる病原性の判定法の開発、感染機構の解明、実用的な殺シスト法の発見、病原性の理論的裏付け、自然界におけるACNTの分布調査などが待たれている。

治療面では第1に適当な治療薬の入手困難、第2に角膜移植の是非の問題があげられるが、これらについては後述する。第3の問題に疼痛がある。本症の痛みは通常の薬剤で抑えることが困難で激しい頭痛も伴うため、失明やアメーバが脳へ拡がったのではないかと疑いが患者や医師を悩ませ、さらに医師への不信感をも伴って角膜移植を急ぐ例が見られる。疼痛に対する対策と同時に患者との意志の疎通が重要であると思われる。

診断の分野では、初期臨床像が特徴に乏しく、この時期での対処法は完全に空白である。この場合、患者の使用している保存容器、保存液、CLからの分離培養が大きな指標となるであろう。また本症の実験動物モデルが可能となれば初期像についても有力な情報が得られるものと期待されている。

アメーバは一生の間に2度と同一形態をとらないと云う言葉の示すとおり原生動物の中で最も分類学の不備な群で、現在アメーバ分類を専門とするものは10指に満たない(石井, 1985)。その上、固定病理標本からの同定はまず望めないため、検査材料の適確な採取、輸送、さらに現場における簡易分離培養の普及が確実な診断にとって不可欠である。

ACNT角膜炎の診断

本症の診断を行なう際には患者の臨床経過および臨床

所見より本症を疑い、直接鏡検と分離培養を行なって診断を確定する。本症の診断に至るうえで最も大事な点は、本症ではないかと臨床経過や臨床所見より疑ってみることである。

臨床経過 角膜真菌症のそれと非常によく似ている。すなわち外傷が先行すること(本症でCL装用に伴う角膜傷害として見られる)、細菌性のもので抗生剤の投与を受けるが治療に抵抗して改善しないこと、ステロイド剤の投与を受けること(本症では実質型角膜ヘルペスと誤診されることがほとんどである)である。したがって以上のような経過をたどる症例については真菌症の他に本症の疑いを持つことが大切である。我々が経験した本邦初例では、当初角膜真菌症を疑って検索をすすめていたが、幸いなことに直接鏡検によりACNTが検出できた。後述のように適切な生鮮材料の塗沫標本さえ作製すれば、ACNTは容易に発見できるので、これを見のがすことはない。

臨床所見 本症の角膜所見として、初期には非特異的な単発あるいは多発する斑状または線状の上皮下混濁として起こってくる。その後軽度の非化膿性の実質の炎症となり虹彩炎も伴ってくる。この虹彩炎は非常に細かい細胞であり、前房蓄膿となってもサラサラしており、体位の変換で容易に移動する特徴がある。以上のような時期には臨床所見に特徴がなく、あまり診断の参考にならないように思われる。やがて病変は実質の浮腫を伴いリング状となってくる。これは免疫の関与した反応であると考えられる。その後実質の混濁は円盤状を呈して増加し、実質型角膜ヘルペスに酷似した病変となる。病変は比較的軟らかそうで盛り上がりしており、その部の上皮は正常ではないが完全に欠損しているわけでもない。患者の訴える痛みは非常に激しく、角膜所見からは説明できない。Mooreら(1986)は角膜輪部から中央へ向かう角膜神経への細胞浸潤(radial keratoneuritis)が臨床上大事であり、本症の患者が非常に強い痛みを訴えることと関連があるのではないかと報告している。その他結節性の強膜炎などを認めたとの報告もある。角膜の炎症がすすめば壊死性の化膿性病変となって穿孔することもある。角膜以外では結膜の充血が強く、特に毛様体充血が認められる。また眼瞼の浮腫が強い例もある。患者は非常に痛がるが角膜の知覚は低下する。眼以外の身体各所には異常のない例がほとんどである。

検査 臨床経過および臨床所見より本症の疑いを持ったら、次に直接鏡検および分離培養などの検査を行なう(後述)。ここでは標本の採取法を中心に述べる。

直接鏡検に供する標本としては角膜擦過標本 (corneal scraping) と角膜生検標本 (corneal biopsy) とがある。ACNT 角膜炎が完成された時期には、病変部に多数のアメーバが寄生しているため、擦過したのみで十分な量の検体が採取できる。また角膜生検を行なってみると、驚くほど多数のアメーバが実質中に寄生していることが判る。擦過標本はスパーテルなどで病変部を強くこすり、これをアメーバ用塩類溶液を1滴おとしたスライドガラスに塗布する。問題は初期の病変に対してどのような標本を採取すべきかということである。初期には潰瘍を形成せず、上皮も比較的健常で、実質混濁もあまり強くない場合が多く、そこを強く擦過したり、角膜生検するのは勇気がいる。この場合、後述の方法でCL保存液や器壁からの培養を行ないACNTが分離されるのであれば、本症を強く疑って検査をすすめるとよい。角膜生検材料は小さく、しかも硬いため、パーカーインクKOH法が特に適している。KOHは角膜の構造を破壊して生検材料を平らにし、中まで見やすくする。

分離培養のために採取する材料としては直接鏡検に用いるものと全く同じでよい。病変部をスパーテルなどで強く擦過したものや、角膜実質の一部を切り採る角膜生検材料を無菌的に採取すればよい。その輸送法や培養の実技については後述する。

ACNTの生物学的特徴

ACNTは元来自由生活性アメーバと考えられ、その自然生息場所から生態学的には土壌 (terrestrial, soil) アメーバに属する1群で、広く地球上に分布し、花壇、畑、芝生、森林はもとより植木鉢の中の土壌からしばしば検出できるとごく普通のアメーバである。この仲間は食細菌性 (bactivorous) のものが多く、*Hartmannella*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba*, *Cashia*, *Hartmannina*, *Glaeseria*, *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Heteramoeba*, *Echinamoeba*, *Filamoeba* などがあり、その体形から、かつては一括してリマックス型アメーバ (limax amoeba) と俗称されてきた。

これらのアメーバは体長60 μ m以下のいわゆる小型アメーバが大多数で、形態も互いに極めて類似していることから、特に *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba* の3属の異同については長年にわたり混乱が続いた。ACNTや *Naegleria* に続いて *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Paramoeba*, *Vexillifera*, *Rosculus* などの自由生活と同時に寄生生活も可能なアメーバが次々と発見されるにつれて、これらのア

メーバに free living, exozoic, endozoic と対比して両生 (amphizoic) アメーバという新しい概念を与えるようになった (Pege, 1974)。現在魚類から哺乳類にいたるまでこれらのアメーバの宿主となり得ることが知られ、欧米ではすでに畜産や水産関係で注目されるようになってきている。両生アメーバは自由生活期、寄生期ともに増殖と被シストが可能で、両期の交代は生活史にともなう必然的なものではなく、偶発的であることが特徴で、自由あるいは寄生アメーバと異なる種々な特性を持っている。これらアメーバの存在は進化学的に寄生生活の出現過程を暗示する好材料と考えられる。

1例をあげると、中・大型の自由生活アメーバに比較して両生アメーバに最適な生理塩類溶液は約10~100倍高濃度である。また他の原生動物と異なり、自由生活アメーバは各種アミノ酸やポリペプチドに対して極めて弱い (Oshima et al., 1985) ことが特徴であるが、両生アメーバは比較的高耐性で、自由生活種と寄生種との中間に位置すると考えられる。

至適温度も増殖率、被シスト率、脱シスト率、運動性等、指標によって異なるが、増殖率を指標とすると一般に好熱性で、ACNTでは種と株の相違により23, 30, 35, 37, 42 $^{\circ}$ C 5群に分かれる。*A. castellanii* では23と30 $^{\circ}$ Cの株が最も普通で、35 $^{\circ}$ Cの株は少なく、37または42 $^{\circ}$ Cのものはごくまれである。一般にPAMやGAEでは低温の株より高温の株の方が病原性が高いが、アメーバ角膜炎ではこの常識は通用しない。患者から分離した株で23 $^{\circ}$ Cのものがかなりあり、また30 $^{\circ}$ C株のマウスによる病原性テストで陰性の結果が得られる場合も多い。このように病原性の定義の困難なことも両生アメーバの特徴である。

属の同定 ACNT角膜炎の診断には最終的に病変部からアメーバを検出すること、そしてそのアメーバがACNTであることを同定することが必要である。幸い通常病変部に多数の栄養体とシストが混在するので、後述の生体鏡検によって比較的容易に属の同定は可能であるが、後日の種の同定のために是非分離培養を心がけるべきとおもわれる。ここで重要なことは、前述したように両生アメーバは埃や手指、汚水、土などより容易にCL保存容器中に混入し、増殖する可能性がある。従ってCL保存容器やCLからの検出はあくまで従で、病変部材料からの検出を欠くことはできない。同定の要点は：

栄養体 (trophozoite)

1 前進時に体前端部に幅広い透明な葉状擬足 (lobopodium) と、体周に比較的少数のアカント

擬足 (acanthopodium) の 2 種の擬足を同時に形成できる。

- 2 アカント擬足の基部はやや太く、先端になるにつれて先細りとなっているが、先端部は尖鋭でなく鈍端であること。擬足が比較的多数で針状、先端がとがっていれば Echinamoebidae 科の疑あり。
- 3 活発な前進時でも体長/体幅比は 2.0~3.0 以下。体長は 20~40 μm のものが多い。
- 4 前進時の速度は *Naegleria* や *Vahlkampfia* に比べてゆっくりで、葉状擬足の前進は *Naegleria* や *Vahlkampfia* あるいは *Entamoeba* のように爆発的 (eruptive) ではない。
- 5 体尾端部または後側部に大きな食碗 (food cup) を形成する。
- 6 単核の胞状核 (vesicular nucleus) で、エンドソーム (endosome) はほぼ中央部に 1 個。
- 7 有糸分裂中にエンドソームは崩壊する。核膜は前期の後半に消失。 *Naegleria* のように Promitosis ではない。

シスト (cyst)

- 1 シストの長径は 10~20 μm のものが多い。
- 2 シスト壁は外壁 (ectocyst) と内壁 (endocyst) の 2 枚よりなる。
- 3 外壁は多くの種で粗大なしわ状突起があり、光学的にその部分が乳頭状にみえることが多い。しかし少数の種でほとんど平滑な球形を呈するものもある。
- 4 内壁はセルロース質を含み、PAS 反応強陽性。丈夫で大多数の種でやや不規則な多角形または星形にみえるが、少数の種で球形に近いものもみられる。
- 5 内外壁の接点に operculum があり、その周囲に ostiole を持つ種 (*A. castellanii*, *A. polyphaga* など) と、それを欠く種 (*A. astronyxis*, *A. culbertsoni* など) とがある。脱シスト時には 1 箇所の operculum が脱落する。
- 6 上記内外壁の形態の相違により本属のシストを 3 型に分類できる。 *A. castellanii* のシストは *astronyxis* 型と *polyphaga* 型の間。
- 7 胞状核の単核で、シスト期に核分裂は起こらない。一般的にはアカント擬足・単核の胞状核・独特の 2 重壁よりなるシストの星状あるいは多角形構造の 3 点が確認できればまず ACNT を疑ってまちがいない。

種の同定 現在までに記載されている ACNT 属のアメーバ 22 種中 *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A.*

culbertsoni, *A. rhysodes*, *A. hatchetti* の 5 種が ACNT 角膜炎の患者から分離されるか、または蛍光抗体法で同定されている (Jones, 1986)。このうち *A. rhysodes* はその性状が極めて *A. castellanii* と類似して分類学上の独立性に疑問があり、23 °C 型の弱または非病原性 *A. castellanii* と考えているものも多い。

また *A. hatchetti* と *A. rhysodes* は従来 GAE からの分離例は皆無で、すべて角膜炎のみ、かつ *A. hatchetti* は 1 例のみである。従ってアメーバ角膜炎の場合、実際の種の同定には *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* の 3 種を対象と考えてよいと思われる。これら 3 種の区別は性状の安定したクローン株をコントロールとして同定用培養した材料の形態学的標徴の比較、蛍光抗体法やゲル分散法などの免疫学的方法、制限酵素による DNA の電気泳動解析などにより行なわれる分野であるためここでは省略する。

ACNT の検出

固定染色 通常の病理切片標本では 10 % フォルマリン固定切片の HE 染色が常用されているが、切片では種の同定はもとより属すらも判断することはまず望めない。上述のようにアメーバは他の原生動物と異なり、主として運動中の形態によって同定が行なわれるが、固定液による変形が甚しく、運動型を保存できないこと、ACNT のシストは特に固定液が侵入しにくく、切片中では固有の形態が失われること等が理由である。しかし何等かの都合で角膜の切片が必要な場合は、4 % 中性フォルマリン固定後 chlorazole black E 染色すればシストはかなり変形するが縁染し、また thionin 染色をすると栄養体の核は赤染され、かつアメーバ特有の胞状核の形態を示すので宿主細胞の核と識別でき、アメーバの存在を知る一助となる。Zenker 固定後ギームザまたは chlorazole black E 染色すれば、通常の 10 % フォルマリン-HE より比較的良好的な病理標本が得られる。また Rossman 固定切片を PAS 反応させれば、ACNT のエンドシストが濃染するので組織中のシストを発見しやすい。

栄養体の永久標本が必要な場合、現在最良の方法は Nissenbaum 固定-chlorazol black E 染色の組合わせによる塗沫標本で、かなり運動型を保存できる。

生体観察 自由生活アメーバの同定は生体観察を除外しては不可能であり、ACNT もまた例外ではない。スライドグラス上にアメーバ塩類溶液 (AS) を 1 滴おき、

角膜擦過物の微小片を加えてカバーグラスをかける。培養材料の観察には、シストの変形を防ぐため最も薄いカバーグラス（高橋技研 #0 など）の小切2枚を枕としてブリッジプレパラートを作る。栄養体の鏡検には位相差が最適で、DICではアメーバの内部構造がほとんど見えない。一方、シストは位相差では無理で、明視野ケラー照明とし、対物レンズの開口度を40~50%にして観察するとエクトシストとエンドシスト、ostioleやoperculum、Ray数のカウント、周辺顆粒などの確認がしやすい。

簡易分離培養 病変部から採取した生鮮材料の直接鏡検によって属の同定は可能であっても、種の同定には分離培養が不可欠である。ACNTの培養は自由生活アメーバの中でも最も容易なもの1つで、目的により分離・増殖・保存・単離（クローンニング）・無菌・同定用培養等各種の培養が可能であるが、ここでは最も簡単で失敗が少なく、病院の検査室などでも充分可能な新分離培養法を述べる。

小管ピンに新鮮な納豆8~10粒（挽割り納豆は不可）を入れAS 10mlを加注、管ピンを静かに倒立、正位をくり返し、納豆の粘液がほぼAS中に溶解したら直ちにその上澄みを別の容器に分注する。この納豆上澄み液をコマゴメピペットで1~2滴、用意したNN寒天平板上に落し、ガラスロッド等で寒天表面を傷付けることなく塗り広げ、室温で約半日~1日放置する。平板中央部に角膜擦過物を置き、その上にASを1滴追加する。CLの場合はレンズ表面を寒天平板にこすりつけるように塗りつける。CL保存液は、先端の尖った遠心分離管に入れ200~600 G/3分間遠心分離し、沈澱をマイクロピペットで1滴平板中央に落とすか、あるいは白金耳で数回塗抹する。いずれの場合も30℃、暗黒で培養すると2~4日で多数増殖し1000~3000 cells/mm²となる。寒天表面では極めて鏡検しにくい、寒天上にASを1滴落とせば×40以上のステミで栄養体がみられる。次第にシャーレ周辺部に移動し、約1週間後には大多数の個体がシスト化するのでステミでも確認できるようになる。株の保存は上記シャーレを室温に放置するのが最良で、寒天が完全に乾燥してもさしつかえない。半年で80%以上、1年後でも50%以上の脱シスト率がある。

培養の可否はシャーレの寒天上でいかに安定したアメーバ+細菌の生態系を作るかにあり、栄養寒天ではなくNN寒天を使用するのも生態系のバランスを保ちやすいからである。ACNTが極めて好気性であるためばかりでなく、寒天表面の環境の一様化を防ぎ、寒天上各区域

に各々異なる生態系を形成しやすくし、アメーバが最適な区域を求めて移動できる余地を与えるために寒天上に水を張らない。餌が少ないとアメーバの増殖は当然減速し、多いと細菌の代謝産物によって簡単に細胞崩壊を起こす。

ACNTの郵送 過去に被検物の郵送方法が不適当であったために同定できなかった事例がいくつかあった。安全な郵送法は次のとおりである。

角膜擦過物：採取した材料を直接濾紙の1箇所にとり、ASをその上から1滴落としてから室温で充分乾燥する。材料の周囲を鉛筆のマーカで囲み、長矩形に切断した濾紙をねじ栓小試中に密封して郵送する。ACNTのシストは乾燥に耐えるので、乾燥によって組織の腐敗を防げば、後日容易に分離培養ができる。

簡易分離培養したシスト：ねじ栓小試のNN寒天斜面培養基を用意する。多数のシストが形成されている培養1週間~10日後の寒天平板上にASを1滴加え、白金耳でシストをこすり取り、小試中の寒天斜面上に塗抹するか、平板の一部(0.5×0.5cm)を切出して斜面にはりつける。CLとCL保存容器はその表面をふきとった硬質濾紙(0.5×0.5cm)を斜面に貼付する。

ACNT角膜炎の治療

本症の治療は困難で、欧米では種々の薬物、角膜搔爬、角膜移植術などが行なわれているが、あまり予後はよくない。薬物ではネオマイシン、パロモマイシン、ネオスポリン、ミコナゾール、プロバミジンイセチオネート、ケトコナゾールなどが有効と報告されているが、特異的効果はないようである。日本ではミコナゾール（フロリードF注、持田製薬）およびピマリシン点眼（千寿製薬）だけが市販されている。我々は抗真菌剤として現在治験中のイトラコナゾールを内服させ、これに0.1%ミコナゾール点眼、病巣部搔爬を併用して本症の3例に良好な結果を得た。イトラコナゾール（ヤンセン社、ベルギー）はトリアゾール系の経口抗真菌剤で抗菌スペクトルが広く、ケトコナゾールにより副作用が少ないとされているが、残念ながら一般的には入手が困難である。角膜移植術については、前述したように良否2様の意見があるが、アメーバが検出できる期間中は行なうべきではないといえる。病原体を完全に除去できなければ、移植された角膜は絶好の寄生場所となるからである。事実、欧米では再発例が多い。したがって、徹底した薬物療法でアメーバを駆逐したあと光学的移植を行なう以外は、角膜移植は行なうべきではないと考える。角膜病巣部の搔爬

(debridement)は大変有効である。掻爬したものを直接鏡検すれば診断や治療効果の判定に役立ち、壊死物質を除くことにより薬物の角膜浸透も助け、しかも病原体そのものを除去してしまうという一石三鳥の効果がある。さらに耐薬剤性の高いシストも掻爬することにより除去可能で、治療にとって重要な意味を持つものと考えている。現状としては、ミコナゾール点滴、点眼、ピマリシン点眼、イトラコナゾール内服、角膜掻爬などを組合わせて治療を行なっていくしかないと思われる。本症に有効で使い易い薬剤が1日も早く入手できることを望んでいる。

処 方

Nissenbaum 固定液 塩化第2水銀飽和水溶液 10ml, 水錯酸 2ml, フォルマリンC P 2ml, 第3ブタノール 5ml. 塗沫標本用. 混液は使用直前に調整する. スライドガラス上にASと共に材料をとり, アメーバが前進し始めたら高さ2cm上からピペットで固定液を滴下しはじめながらスライドガラスに接近させる. 15秒後に固定液を捨て乾燥する. 70%ヨードアルコールに3~4分入れ, 70%エタノールで3~5分洗う.

Rossmann 固定液 ビクリン酸飽和エタノール溶液(約7%) 85ml, フォルマリンC P 10ml, 水錯酸 5ml. シスト固定用. 組織ブロックを12~24時間/0~5℃で固定.

Chlorazol black E染色 切片, 塗沫ともに色素の70%エタノール飽和溶液(約1%)で15~25分染色. 水洗せず70%エタノールで充分洗う. 過染しにくいので弁色は不必要. ポリクロマジー性で, シストは緑染する.

Giemsa染色 ギームザ原液 4ml, M/10クエン酸緩衝液 100ml. Nissenbaum 固定にはpH4.5~5.0, Rossmann にはpH6.5が適当. 使用直前に混合. 染色液中にスライドガラスを垂直に浸し, 10~40分染色. 蒸留水で数秒水洗し, アセトン→第3ブタノール→ベンゼンまたはリグロインで脱水して封埋.

Thionin 染色 組織切片中のアメーバ検出用. 0.25% thionin 水溶液で3~5分染色, 2%シュウ酸水溶液で30秒~1分弁色して水洗する. アメーバの核は赤色, 他の細胞核は青色.

NN-寒天 Bacto agar, Difco 1.5g, AS 100ml. オートクレーブ15ℓb/in²で15分間滅菌. 約60℃に冷えた時6cmプラスチックシャーレに厚さ約5mm

に注入. 4℃で約3ヵ月保存可能.

4 mMアメーバ塩類溶液AS (簡易処方) 人体用生理的塩類溶液1mlに脱イオン蒸留水60mlを加え, オートクレーブをかける.

文 献

赤井契一郎, Martinez, A. J., 中村俊彦 (1980) 神経内科12:75.

Byers, T. (1979) in *International Review of Cytology* (Bourne, G.H. and Danielli, J.F. eds.), 61:283, Academic Press, New York.

Culbertson, C.G., Smith, J.W. and Minner, J.R. (1958) *Science* 127:1506.

Fowler, M. and Carter, R. F. (1965) *Br. Med. J.* 2:740.

Griffin, J. L. (1978) in *Parasitic Protozoa* (Kreier, J. P. ed.), 2:507, Academic Press, New York.

石井圭一 (1985) *La mer* 23:97.

石橋康久他 (1988) *日眼会誌* 92:963.

Jones, D. B. (1986) *Am. J. Ophthalmol.* 102:527.

Jones, D. B., Visvesvara, G. S. and Robinson, N. M. (1975) *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 5:221.

Martinez, A. J. (1985) *Free-living Amebas*, CRC Press, Boca Raton.

Moore, M. B. et al. (1986) *Ophthalmology* 93:1310-1315.

中村俊彦他 (1979) *神経進歩* 23:500.

Oshima, N., Takeda, F. and Ishii, K. (1985) *J. Protozool.* 32:509.

Page, F.C. (1967) *J. Protozool.* 14:709.

Page, F.C. (1974) *Acta Protozool.* 13:143.

Schuster, F.L. (1979) in *Biochemistry and Physiology of Protozoa* (Lewandowsky, M. and Hutner, S.H., eds.), ed. 2, 1:215, Academic Press, New York.

Singh, B. N. and Das, S. R. (1972) *Curr. Sci.* 41:277.

Stehr-Green, J. K. et al. (1987) *JAMA* 258:57.

渡辺亮子他 (1988) *日本コンタクトレンズ学会誌* 30:265.

特 別 講 演

当教室における最近のマラリア研究

中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

Current Progress of Malaria Study in our Laboratory

Toshio Nakabayashi

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

Trager, Jensen が初めて熱帯熱原虫の培養に成功したのは1976年で、以来、ヒトマラリア原虫は研究室における好適な材料として、各種の生物学的研究に用いられてきた。もっとも興味を持たれたのは、ワクチン開発を目指す分子生物学的研究で、すでに100種以上の抗原物質についての報告がみられるが、まだ具体的に使用し得るものはない。当教室においても、数年来、培養熱帯熱原虫を用いて生物学的研究を進めているので、その幾つかの研究成績について報告する。

熱帯熱原虫の培養には宿主細胞として新鮮人赤血球が必須であるほか、培養液中に新鮮人血清が不可欠とされている。先ず、人血清の入手難を克服するために動物血清（馬、牛、仔牛）による置換を試みた。人血清培地より直接動物血清培地に移植した場合は、原虫増殖は全くみられないので、漸増適応法 (gradual adaptation) を考えた。人血清濃度を漸減するとともに動物血清濃度を漸増することにより、1~2ヶ月後には完全に動物血清培地に適応することを観察した。また、一旦ある種動物血清に適応したものは、人を含む他種動物血清培地においても良好な増殖を示すことが判明した。

1) クロロキン作用の検討

培養熱帯熱原虫株、FVO (クロロキン耐性) FUP (同感受性)、を用い *in vitro* における作用を比較したところ、予期に反して最小増殖阻害濃度はFVO、 4×10^{-7} M、FUP、 6×10^{-8} M と大差を認めえなかった。sorbitol 法による同調培養を行い、初期の20時間、次の20時間、その後の20時間にクロロキンを作用させた結果、trophozoite/schizont 期にもっとも強い増殖阻害作用が見出された。Hb 消化に対する阻害効果を検

討するために、原虫溶解液の endoarylamidase, amino peptidase 活性に対するクロロキン阻害を検査した。クロロキン 3×10^{-6} M 以上で阻害が認められ、原虫の trophozoite 期以後の発育期に阻害効果が顕著であることを知った。

2) 生殖母体形成の誘発

培養熱帯熱原虫は生殖母体形成能を消失するものが多い。この研究は、熱帯熱原虫に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の培養上清液とハイブリドーマ細胞融解液の混合液 (reactive medium) が、培養原虫に生殖母体形成を誘発することを見出し、その作用について検討したものである。RPMI 1640 培地における培養第5日目に reactive medium に置換すると、その第3日目頃から生殖母体が見出され、第5~6日目には最高数に達する。reactive medium 培養の第3日目に Waymouth 培地に置換すると、形成された生殖母体が長期にわたり観察されるのみならず、雌雄生殖体形成、鞭毛放出、受精、ookinete 形成までの発育を観察することができた。

reactive medium 中の活性物質は、分子量1000以下で、水に可溶であるがエーテル、クロロホルムには不溶性物質で、200℃の加熱に耐えるものであることが判明したが、さらに解析を続けつつある。

3) 可溶性抗原

培養原虫を多量かつ純粋に集めることは困難なため、培養上清液中の可溶性抗原について検討を加えた。培養上清を濃縮し、affinity chromatography により純化した。モノクローナル抗体および家兔免疫血清により Western blotting 法によって 33 KD の特異抗原を検

出した。同抗原は培養原虫融解液中にも見出されることから、本抗原物質は原虫の生理的代謝産物で、原虫体内から宿主赤血球を経て培養液中に溶出するものと考えられた。この抗原物質は糖蛋白性のもので、65℃の加熱で失活した。

本抗原物質は東南アジアのベトナム、タイ、南米コロンビア、アフリカ各地等の地理的分布の異なる熱帯熱原虫分離株から検出された。また、本抗原が三日熱、四日熱、卵型マラリア患者血清によっても認知されることか

ら、本抗原はマラリア原虫種および分離株間を通じて産生され、培養液中に溶出するものと思われる。さらに、本抗原は軽度ではあるが原虫増殖阻害作用を持つこと、非感染赤血球に吸着すること、抗原抗体複合物が補体C₃成分と結合することなどの諸性質が確認されているが、これらの特性はアラリアの病態を解析するうえに有用な手がかりを与えるものと考えられた。

なお、以上の研究成績は、ここ数年の間に多数の当研究室員によってなされたものであることを付言したい。

一 般 講 演

1. テトラヒメナ酸性 α -グルコシダーゼの細胞内プロセッシングと分泌

坂野 喜子, 佐々木 昇, 吉野 稚佳子, 野沢 義則

岐阜大学医学部生化学教室

Processing and secretion of Tetrahymena acid α -glucosidase

Yosiko Banno, Noboru Sasaki, Chikako Yoshino and Yoshinori Nozawa

Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine

テトラヒメナ細胞が多くのリソゾーム酵素を細胞外に分泌することは知られているが、その機構に関しては明らかではない。私共は従来より、細胞内・外の酵素を単離・精製し、両者の生化学的性状および免疫学的性質を比較検討することにより分泌機構の解明を試みてきました。今回は細胞を [35 S] メチオニンでパルスラベルし、酸性 α -グルコシダーゼについて細胞外への分泌および細胞内プロセッシングを検索することにより、分泌過程を推察した。

Tetrahymena pyriformis W は 2% プロテオースペプトンを含む栄養培地で培養すると、細胞の増殖に伴い細胞外へ多量の酸性 α -グルコシダーゼを分泌する。酸性 α -グルコシダーゼは細胞内と細胞外よりそれぞれ別々に DEAE-cellulose, Ultrogel AcA-44, DEAE-Sephadex, Mono Q HPLC カラムクロマトグラフィーを行うことにより、SDS-PAGE 上均一にまで精製した。両酵素の分子量は SDS-PAGE により 105 kDa と一致していた。両者の酵素化学的性質および免疫学的性質はほとんど区別できなかった。また、本酵素は糖タンパク質であり、両者の糖鎖構造を比較した。酸性 α -グルコシダーゼは 3~5 個のマノースのみからなる高マノース型の糖鎖構造を有していた。細胞の内・外の酵素はマノースの鎖長の割合を異にしており、長鎖マノース型の割合は後者に高かった。高等動物細胞では、リソゾーム酵素の局在化にはマノース-6-リン酸結合が重要な認識を果たすことが知られているが、テトラヒメナの酸性 α -グルコシダーゼは両者とも糖鎖にマノース-6-リン酸結合を含んでいなかった。

酸性 α -グルコシダーゼの生合成過程とプロセッシングの過程を検討するために、細胞を [35 S] メチオニンで標識し、チェイス後の時間経過で酵素の細胞内動態お

よび分泌を検討した。標識された細胞を非放射性的のメチオニンを含む栄養培地と無機培地に移し、チェイス後の各時間で細胞内・外の酸性 α -グルコシダーゼを免疫沈降させ、SDS-PAGE で検討した。オートラジオグラムにより感光された標識酸性 α -グルコシダーゼの動態を観察した。酸性 α -グルコシダーゼは最初 108 kDa のプレ型として検出され、栄養培地では約 1 時間後、無機培地では約 3 時間後にほぼ完全に成熟型の 105 kDa への移行がみられた。チェイス後徐々に培地中の酸性 α -グルコシダーゼが増加したが、両培地中には成熟型 (105 kDa) のみが検出され、プレ型 (108 kDa) は全く検出されなかった。

高等動物では、リソゾーム酵素のプロセッシングは酸性条件下で起こり、塩化アンモニウム等の弱塩基化合物の添加によりリソゾーム内へのプロセッシングが阻害され、その結果プレ型として細胞外へ分泌されることが知られている。そこで、テトラヒメナ細胞の酸性 α -グルコシダーゼのプロセッシングにおける pH の影響を検討した。塩化アンモニウムを添加した無機培地中でインキュベートした際の細胞内・外における酸性 α -グルコシダーゼの変動を検討した。塩化アンモニウム添加により酵素の細胞外分泌が阻害され、相当する量の細胞内蓄積がみられた。この際の酵素のプロセッシングを検討したところ、対照細胞とほぼ同じ速度でプレ型から成熟型への移行がみられ、プレ型の細胞内蓄積あるいは細胞外への分泌はみられなかった。

さらに、糖鎖構造の分泌への影響を調べるために、糖合成阻害剤のツニカマイシン (TM) を添加した細胞における酸性 α -グルコシダーゼのプロセッシングの影響を調べた。TM はテトラヒメナ細胞の増殖を濃度依存的に阻害し、また、酸性 α -グルコシダーゼの細胞外への

分泌も阻害した。TM 処理細胞における本酵素のプロセッシングは対照細胞とほぼ同じ速度で起こり、プレ型の蓄積および分泌はみられなかった。また、糖鎖を持たない酵素タンパク質のバンドも観察されなかった。したがって、テトラヒメナではタンパク質と糖の合成はほぼ同時に起こり、糖の合成阻害剤はタンパク質の合成および細胞の増殖も阻害すると考えられた。

また、リソゾーム酵素の分泌欠損株 *T. thermophila* MS-1 における酸性 α -グルコシダーゼのプロセッシングを野生株 *T. thermophila* CU 399 と比較検討したところ、本酵素の生合成およびプロセッシングの速度は変化なく、また、変異株におけるプレ型の細胞内蓄積も見られなかった。

以上の結果からテトラヒメナ細胞における酸性 α -グルコシダーゼは、ポリゾームでタンパク質の合成が起こると同時に糖が付加されるか、あるいは両者は同時に起こり、速やかにリソゾーム内へ移行して、プレ型から成熟型にプロセッシングされる。この過程は糖鎖のマノース-6-リン酸受容体を介する系とは別の経路により起こり、タンパク質側にシグナルペプチド様の構造の存在が示唆され、今後の課題である。また、細胞外への分泌は、リソゾーム内でプロセッシングされた後に起こるものであり、このプロセッシングの過程には pH の上昇は影響されないが、リソゾーム顆粒が細胞外に分泌される過程が阻害されることを明らかにした。

2. テトラヒメナのタウロリピド脂肪酸の培養条件による変動

彼谷 邦光

国立公害研究所

Differences in fatty acid composition of taurolipid in Tetrahymena cells by various culture conditions

Kunimitsu Kaya

National Institute for Environmental Studies

タウロリピドはテトラヒメナから単離されたタウリン含有脂質である。現在、3種類のタウロリピド (taurolipid A, taurolipid B および diacyltaurolipid A) の化学構造が明らかにされている。最近、タウロリピドの界面活性作用が注目され、タウロリピドをバイオサーファクタントとして利用することが検討されている。そ

質問 彼谷 邦光 (国立公害研)

108 kDa から 105 kDa へ移る時どの部分 (C 末端か N 末端か) が切れるのか。

回答 坂野 喜子 (岐大・医・生化)

前駆体として単離することが困難なためまだ分かっていません。今後、明らかにしたい。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

カルチャーエイジが進むと細胞が死にはじめますが、体外に出るリソゾーム酵素はこの現象に関係しているかどうか教えて下さい。それと関連して、非分泌型の MS-1 はカルチャー寿命が長いというようなことはないでしょうか。

回答 坂野 喜子 (岐大・医・生化)

リソゾーム酵素の細胞外分泌についての生理的意義は明らかでないのではっきり分かりません。

MS-1 はむしろカルチャー寿命は短いと思います。

質問 小林 正規 (慶大・医・寄生虫)

α -グルコシダーゼの役割 (生理的意義) は何か?

α -グルコシダーゼ分泌株と分泌欠損株 (*T. thermophila* MS-1) とで何か違いがみられますか?

回答 坂野 喜子 (岐大・医・生化)

α -グルコシダーゼは多糖体をグルコースにまで分解する酵素ですが、MS-1 でも酵素の合成は変化ないので、生育は同じように起こっている。

こでバイオサーファクタントとしてのタウロリピドの物性を左右する脂肪酸組成を培養条件を変えることによってどの程度制御できるかを検討した。

[方法] テトラヒメナ (*T. mimbres* (旧名, *T. pyriformis* NT-1)) を 2% プロテオースペプトン培地で 15 $^{\circ}$, または 39 $^{\circ}$ で培養した。また、15 $^{\circ}$ ではコレステロー

ルを、39℃ではスクワランのエタノール溶液を培地に加えた。培養は、15℃で4日間、39℃で24時間行った。培養後、テトラヒメナからクロロホルム-メタノールで脂質を抽出し、DEAEセファデックスおよびシリカゲルのカラムで分画してタウロリピド画分を得た。タウロリピドの脂肪酸組成を調べるために、脂肪酸をメチルエステルにした後、ガスクロマトグラフィーを用いてその組成を調べた。

〔結果と考察〕39℃で培養したテトラヒメナのタウロリピドにはパルミチン酸が57%、C18不飽和脂肪酸が9%であったが、15℃培養では、パルミチン酸は19%に減少し、C18不飽和は48%に増加した。パルミトオレイン酸は、39℃で13%、15℃で10%とほとんど変わらなかった。脂肪酸組成を変動させるために、生体膜の流動性を高める作用のあるスクワランを培地に添加し、39℃で培養したところ、スクワラン添加によって、細胞の増殖阻害が見られた。1mMの添加で細胞数が無添加の場合の約30%に、5mMで8%に減少した。一方、脂肪酸組成は、1mMでパルミチン酸が約62%に、5mMで63%に増加し、その分、不飽和脂肪酸の減少が認められたが、その変化は小さかった。

次に、生体膜を堅くする作用のあるコレステロールを培地に添加し、15℃で培養してタウロリピドの脂肪酸組成の変動を調べた。スクワランの場合と同様に、コレ

ステロールによる細胞の増殖阻害が認められた。0.5mMのコレステロールの添加で無添加の場合の45%に、1.25mMの添加で33%に減少した。一方、脂肪酸組成では、コレステロールの添加によるパルミチン酸含量の変動はわずかであった。不飽和脂肪酸では、コレステロール濃度の上昇につれてパルミトオレイン酸の増加が観察された。コレステロール無添加の場合はパルミトオレイン酸の含量が10%であるが、コレステロール1.25mM添加培地では35%にまで増加し、この間、濃度依存的に増加した。しかし、逆に、C18不飽和脂肪酸ではコレステロール濃度の上昇につれて減少し、無添加の場合に48%あったものが1.25mMで19%までになった。

以上の結果から、培養条件を変えることによって、62%がパルミチン酸のパルミチン酸型、48%がC18不飽和脂肪酸のC18不飽和脂肪酸型、35%がパルミトオレイン酸のパルミトオレイン酸型の3タイプのタウロリピドAを調製できることを明らかにした。

質問 樋渡 宏一（東北大）

タウロリピドはテトラヒメナ以外の生物で見出だされているものがありますか

回答 彼谷 邦光（国立公害研）

テトラヒメナ以外調べられていませんので不明ですが、現在の所テトラヒメナだけです。

3. 淡水赤潮 *Peridinium bipes* の出現及び種移行

安達 六郎

三重大学生物資源学部

Appearance and change of dominant species on the fresh water bloom Peridinium bipes

Rokuro Adachi

Faculty of Fisheries, Mie University

淡水赤潮は我国の各地湖沼で出現している。この内で特に上水道など人工湖で起きる現象は生活水の関係上、生物密度から生ずる濾過困難性、臭気対策、有機物の推定予測と処理など上水道管理で多様な問題・課題を残している。このために淡水赤潮の現象の解明と対策が急務となっている。

本研究は神路湖（伊勢神宮森の奥端にあって、伊勢志摩地区の水道用水源・農林用水など多目的ダム湖）を調査地と定め、淡水赤潮の予知対策である一出現種の同定及びその出現発生の相移行一解析を目的とした。神路湖内の観測5定点は湖奥部から湖中央部・湖堤部に区分し、生物採集と同時に環境項目一水温・溶存酸素・pHを測

定した。淡水赤潮の発生期とされる5月から7月に6回の実測値は水温が一般の湖水変化と類似するが、溶存酸素平均9.83 ppm, pHの平均8.70と両者共に高値にあり、5月下旬から7月まで異常増殖を指示する環境にある。

単細胞生物に関しては出現種が33属61種に達するものであった、この内でその生物異常増殖をした優占種は珪藻類 *Merosila granulata* var. *angustissima* f. *spiralis*, 渦鞭毛虫類 *Peridinium bipes* 及びクリプト類 *Cryptomonas crosa* であることが明白となった。この3種を頭文字の略でMとP及びCと称する。

神路湖における優占種移行は湖内の地点による若干の差がみられるものの、一般的には

湖奥 (st 2)	M→P→(M)→C
湖奥 (st 3)	M→P→C
湖中央	
湖中央 (st 4)	M→P→C
全般	M→P→C

上記の通りであり、このことから単細胞生物の異常発生順位が明確となった。これは神路湖特有の移行である。

淡水赤潮は単細胞生物群の内、鞭毛虫類の種類が優占種となった際に云う。そこで神路湖は *Peridinium bi-*

*pipes*及び *Cryptomonas crosa* の2種が淡水赤潮原因種となる。神路湖の淡水赤潮は前者 *P. bipes* が年間を通じて、長期的な出現性のあることから本種の淡水赤潮が重視される。

以上のことから神路湖の *P. bipes* の淡水赤潮は珪藻類 *Merosila* の増殖後に来る順位が明確となり、淡水赤潮の出現発生の予測・予知が得られることに至った。今後は *P. bipes* の淡水赤潮対策には本種の生理・生態的な解明と生物学的な生活史面からの知見と淡水赤潮の生物処理上の実際の対策の開発・研究が課題として残されている。

質問 彼谷 邦光 (国立公害研)

毒素を生産する種類があったらおしえていただきたい。

回答 安達 六郎 (三重大・生資)

Peridinium 属の淡水産種について有毒種は少なく、現在、*Peridinium polonicum* が知られています。それはサガミ湖に20余年前に出現した種ですが、魚毒性があるため注目されています。本種の同定を当時、私が行いました。世界中においてもこの属では本種のみ認められていますが、今後若干の種類に増大すると推定しています。なお、本種は上水道・ダム等に出現するため注意が必要なものです。

4. エビ幼生餌料としての繊毛虫の培養

前田 昌調

東京大学海洋研究所

Cultivation of ciliated protozoa as food for a shrimp larvae

Masachika Maeda

Ocean Research Institute, University of Tokyo

海洋の魚介類資源にたいする需要が年々増大するに従い、水産増養殖生産量も増加しており、特に、タイ、クルマエビ、ハマチ等の魚種では、養殖による生産量が天然の捕獲量を上回るほどにいたっている。これらの養殖過程において、卵よりふ化した直後の幼生は、運動範囲が狭く、また、小さい口は歯を保持していないため、その摂餌能力は大変に低い。従って、これらの幼生の餌としての条件には、サイズが小さく、高い濃度で幼生の周囲に位置しうることがあげられる。

本研究の供試生物ウシエビ (*Penaeus monodon*) の養殖過程では、ふ化後の一週間、主として餌料としてケイ藻を与えるが、ケイ藻のみを餌料とした場合には、生存率が低下するため、粉碎した卵黄も同時に与えている。この卵黄を栄養基質とすることにより、エビ幼生飼育水中の微生物、原生動物が増殖し、幼生はこれらの微小生物をも摂食しているものと考えられている。

ウシエビ飼育水より分離され、エビ餌料となることが判明した原生動物は、ほぼ卵型の形状をした、大きさ50-

60 μm の繊毛虫で、体前端部に小突起を保持し、その周囲に adoral zone of membranelles (AZM) が位置する。他にトリカイト構造、体後部の薄板構造が見られることより、本繊毛虫は *Strombidium sulcatum* Claparede and Lachmann, 1858 と同定された。 *S. sulcatum* は大きさ約 10 μm のケイ藻 *Navicula* を摂餌して増殖したが、渦鞭毛藻や黄色鞭毛藻などを用いた場合には、顕著な増殖は認められなかった。この繊毛虫を、餌料として、エビ幼生 (*Zoea* I 期) に供与した場合、3 日間におけるエビの生残率は 100 % を示し、かつ *Zoea* II 期への脱皮率も 100 % であったが、他の原生動物 (*Strombidium* sp. および *Oxyrrhis marina*) を使用した場合には、生残率および脱皮率ともに低下した。

この繊毛虫の増殖率は、培養系に土壤エキスを *Navicula* sp. とともに加えた場合には、土壤エキスを使用しない場合よりも増大した。この結果は、土壤エキスを栄養源として細菌が増殖し、この細菌を繊毛虫が、ケイ藻とともに、摂食していることを示唆している。事実、この培養系より分離された細菌を純培養株とし、再度ケイ藻とともに *S. sulcatum* に与えた場合には、繊毛虫

の増殖速度は増大した。しかしながら、この細菌は、エビ幼生の生長を阻害することが判明し、この現象は、食物連鎖における被食者の自己防御の一手段とも考えられた。

養殖生産の餌料は、高密度に培養することが、経済効率および省力の点においても重要であり、この餌料原生動物細胞の高い収穫のためには、培養系において細菌を使用することがのぞまれる。このため、現在はエビの生長を増大させる細菌を分離し、この株を用いた原生動物の飼育を試みている。

質問 安達 六郎 (三重大・生資)

繊毛虫の培養の際に餌料として微小プランクトン効果について：*Navicula* が最も良かったという報告は大きさ、運動性、栄養的質性の 3 点があり繊毛虫の口径との相関での検討は如何

回答 前田 昌調 (東大・海洋研)

原生動物の餌料の特徴としてご指摘の 3 点については大変重要なファクターと存じますので、今後の探索においても特に留意し進めてまいります。

5. ニホンウナギの鰓より得られた *Trichodina* 属繊毛虫の SEM 観察

今井 壮一, 宮崎 裕康, 野村 清彦

日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室

SEM observation of Trichodina (Peritrichia, Ciliophora) from the gills of Japanese eel (Anguilla japonica)

Soichi Imai, Hiroyasu Miyazaki and Kiyohiko Nomura

Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College

魚類の体内外には淡水産、海産を問わず、極めて多種多様な寄生虫の寄生が知られている。近年、養殖漁業の隆盛に伴い、これらの寄生虫に対する注目度が高まってきたが、わが国においてはこれらに関する基礎的知見の集積は極めて貧弱で、外国文献等によりある程度の同定は可能であっても、本邦においていかなる寄生虫種が存在しているかについてさえもほとんど知られていない状況にある。魚類の鰓や体表に寄生する *Trichodina* 属繊毛虫についても、海外においてはこれまでに多くの

種が報告されているが、本邦における研究は少ない。今回、演者らは、例年梅雨期になると養鰻場で多数の発生がみられるニホンウナギの *Trichodina* について、その同定および形態を明らかにすることを目的として、光顕および走査電顕的検討を行った。

材料は、1987 年 7 月三重県下の養鰻場で養殖されているニホンウナギの鰓よりスライドガラス上にスタンブすることにより採取した。光顕的観察のためには主として Klein の鍍銀法を用い、走査電顕観察のためには、

オスミウム単独固定を施したのち常法に従って脱水、乾燥処理を行った。

鍍銀法による光顕的観察の結果、ニホンウナギから3種の *Trichodina* 属繊毛虫が確認され、そのうちの2種は、それぞれ、過去にフランスウナギから報告されている *T. jadratica* および淡水産魚類に広い宿主域をもつ *T. acuta* と同定されたが、他の1種は未報告のものであった。これらのうち、未報告の1種の寄生が最も多く、他の2種のほぼ50倍の寄生率を示したことから、本種についてのSEM観察を行った。

観察の結果、本種の外形はチロリアンハット状を呈し、縁毛類に特徴的な反時計回りの口周囲繊毛帯と、それとは独立した下部繊毛帯が明瞭に観察された。口周囲繊毛帯は、体中央部をほぼ390度にわたって周回しており、buccal cavityに終わっていた。下部繊毛帯は、周囲繊毛環、運動繊毛列、基部繊毛環の3つの繊毛帯よりなり、それぞれの繊毛帯は境界によって仕切られていた。これらのうち、運動繊毛列がもっとも顕著であり、多数の長繊毛から構成されていたが、体後方で短く、前方へいくに従って長い繊毛が存在しているのが観察された。一方、基部繊毛環は、運動繊毛列の前方に位置し、長い繊毛を有していたが、配列はまばらで、運動繊毛列の繊毛のおよそ5列あたり1本の割合で生じていた。また、最後部に位置する基部繊毛環は、極めて短い一列の繊毛よりなっていた。これらの所見より、下部繊毛帯にみられた繊毛配列のうち、運動繊毛列を除く、周囲繊毛環および基部繊毛環における繊毛の配列は運動器官としての役割は果たしていないものと思われ、特に、長いまばらな繊毛を有する周囲繊毛環は感覚器官など特別な機能を有してい

る可能性があることが考えられた。

体後端の付着盤の観察では、この類の同定の重要な標徴となる denticle および radial pins が明瞭に観察された。このことは、従来同定のために用いられてきた鍍銀法のほかにSEM観察によっても容易に種の同定が行える可能性のあることを示唆している。また、付着盤中央が虫体内方へ湾入している像が多数見られ、この構造がかなり柔軟性に富んでいることがうかがわれた。辺縁の観察では、付着盤は3層の膜から構成されていた。

なお、*Trichodina* 属繊毛虫は、一般的に半寄生性半自由生活性であると考えられており、宿主に対する病原性については種々の論議があるが、鰓薄板のSEM観察では、本繊毛虫の付着跡が明瞭に観察され、特に付着盤辺縁部の付着痕とみられる部位にかなり深くぼみが認められた。このことから、これらの繊毛虫が宿主の鰓に対してなんらかの機械的障害を与えている可能性が示唆された。

質問 前田 昌調 (東大・海洋研)

トリコディナは寄生した後、さらに他の場所に移動するものでしょうか。また、移動の範囲はどれほどのスケールと考えられるでしょうか。

回答 今井 壮一 (日獣大・寄生虫)

魚類の体表に寄生しているトリコディナは、簡単に魚体から離れ、游泳します。かなり活発に游泳しますので、相当な距離を移動するものと考えられます。例えば、となりの魚といったようなスケールではなく、養殖場全体といったようなスケールで考えてよいと思います。

6. ニッポンヨコエビに寄生する2種のグレガリナについて

星出 一巳

山口大学教育学部生物学教室

Studies on two Gregarines from Rivulogammarus nipponensis UENO

Kazumi Hoshide

Biological Institute, Faculty of Education, Yamaguchi University

中国地方の山間の溪流に広く分布する、ニッポンヨコエビ, *Rivulogammarus nipponensis* UENO の消

化管中に寄生していた2種のグレガリナについて報告する。現在までに甲殻類を宿主とするグレガリナは146種記載されている。その甲殻綱を目別に分類すると、十脚目71種、端脚目54種、蔓脚目17種、アナスピデス目1種、橈脚目1種、貝甲目1種となっている。またグレガリナの属別の内訳は *Ganymedes* 1種、*Porospora* 2種、*Nematopsis* 48種、*Pachyrospora* 4種、*Cephaloidophora* 56種、*Caridohabitans* 4種、*Rotundula* 4種、*Cephalolobus* 3種、*Callynthrochlamys* 1種、*Uradiophora* 6種、*Heliospora* 3種、*Pyxinioides* 10種、*Bitilida* 1種、*Gregarina* 1種、*Cirigregarina* 2種で *Cephaloidophora* 属に属するグレガリナが最も多く報告されている。今回観察されたグレガリナは2種ともにその先端の構造より *Cephaloidophora* 属に属すると考えられるが、本邦においては両種に関する記録はない。ここでは両種に *Cephaloidophora* sp. 1 (Rotundtype)、*Cephaloidophora* sp. 2 (Filiformtype) の仮称を与える。

Cephaloidophora sp. 1 のガモントの形態は卵形または円筒形、前節は半球形、先端部に小さな透明な突起がある。後節は卵形で最広部は中央部、核の位置は中央部または中央よりやや前部にある。サテライトはプリミエテよりやや小型で、前節の形状は円盤状。体の各部分の平均値は次のようになっている。(単位は μm) TL 44.0, LP 11.6, LD 34.0, WP 16.4, WD 23.4, LP: TL 1: 3.9, WP: WD 1: 1.4, tl 38.2, lp 9.3, ld 30.5, wp 15.0, wd 20.6, lp: tl 1: 4.3, wp: wd 1: 1.4 寄生率は春から秋にかけてほぼ同じで約90%。寄生部位は消化管の前半部分。

Cephaloidophora sp. 2 のガモントの形態は細長い糸状、前節は球状で先端中央部に小さな透明なレンズ状突起がある。セプタム部のくびれは明瞭である。後節は細長く、幅はほぼ一様であるが、核のある部分はやや広がっている。後端は鈍円端をなす。核は球状で中に1個の核小体を持ち後節の中央部よりやや後ろの部分にある。サテライトはプリミエテよりやや細長い。体の各部分の平均値は次のようになっている。(単位は μm) TL 122.5, LP 7.9, LD 115.9, WP 15.6, LP: TL 16.9, WP: WD 1.7, tl 135.0, lp 6.4, ld 129.7, wp 8.8, wd 14.7, lp: tl 1: 20.7, wp: wd 1: 1.7

Cephaloidophora 属の特徴をなすガモントの先端の透明なレンズ状の部分の微細構造を透過型電子顕微鏡により調べた。前節の先端にあるこのレンズ状部分と前節の他の部分との間には明瞭な境界はないが、この部分には他の部分にあるような大きな空胞はなく、細胞質の状態は他の部分と全く異なっている。C. sp. 1 と C. sp. 2 ではその内部構造は異なり、C. sp. 1 ではプリミエテの先端部分とセプタムに沿った部分に電子密度の高い大きな顆粒が多数集積していたが、C. sp. 2 にはこのような顆粒は認められなかった。この顆粒がどのような役割を果たしているのかは、今のところわからない。

質問 石井 圭一 (法政大・教養)

グレガリナに大量にみられる細胞質内 vacuoles の役割について御教示下さい。

回答 星出 一巳 (山口大・教育・生物)

はっきりとはわかりませんが、栄養を貯めること及び細胞質内の内圧を高め、体形を保つために役立っているのではないかと思います。

7. *Cryptosporidium* オーシスト及びスポロゾイトの簡易染色法

朝日 博子, 熊田 三由, 加藤 桂子, 小山 力

国立予防衛生研究所寄生虫部

A simple staining method cryptosporidian oocysts and sporozoites

Hiroko Asahi, Mituyoshi Kumada, Keiko Kato and Tsutomu Koyama

Department of Parasitology, National Institute of Health

近年、*Cryptosporidium* 症が、免疫不全者や免疫抑制患者ばかりでなく、免疫機能正常者のあいだにも、

知られるようになった。下痢を主徴とする種々の症状をひきおこす本症の診断は、主に、糞便、喀痰などに排出

されるオーシストを検出することにより行われている。本種の分類に関しては、なお検討の余地が残されているが、一応現在のところ哺乳類に寄生するものとしては、オーシストの小型の *C. parvum* と大型の *C. muris* の二種は valid な種とされている。本原虫のオーシストは排出量が少なく、特に小型種のオーシストは直径約 4.5 μm とサイズが小さいため、直接検鏡では検出が極めて困難である。そのため、いろいろな検出方法が検討され、現在は一般に蔗糖浮遊法による集嚢子や抗酸染色が用いられているが、これらの方法をもってしても内部構造は確認しにくく、他の類似物、例えば酵母類や藻類との区別がしばしば困難である。他の類似物との確実な鑑別のためには、オーシスト内に形成される4個のスポロゾイトや1個の残体の確認がぜひとも必要である。そこで、通常の顕微鏡を用いて *Cryptosporidium* のオーシストを検出するために、オーシスト内部構造を確認するのに有効な染色法を見出す試みを行った。

自然及び実験感染猫より得た小型オーシスト及びラットより得た大型オーシストを集めたのち、スライドガラスに塗布、乾燥し、Kohnの染色液で染色時間を5分～72時間、染色温度を室温及び37℃と変化させて染色し、染色のための好適な条件を検討した。コントロールとしてオーシストとの区別が特に必要とされるものの

1つである *Candida* も同様に染色し、オーシストと比較した。

その結果、Kohnのone-step染色変法(Gleason and Healy, 1965)を、さらに改変して、染色時間を1晩、染色温度を37℃とすることにより、オーシスト内のスポロゾイトが、青～灰青色に、またオーシスト壁が濃緑～黒色に鮮明に染まり、内部構造が識別できた。また夾雑物や *Candida* との区別も容易であった。

したがって、本染色法は、*Cryptosporidium* のオーシストの確認のために有用な方法であると考えられた。なお、本法は、簡便で、安価に実施でき、染色液の能力は2年以上にわたって安定なばかりでなく、作製した標本も長期間にわたって褪色しないなど、多くの優れた利点を有している。

質問 今井 壮一(日獣大・寄生虫)

本題とははずれるかもしれませんが、染色中にオーシストがスライドから落ちてしまうようなことはないでしょうか。

回答 朝日 博子(予研・寄生虫)

いままでの経験ではそのようなことは特に気がつきませんでした。サイズが小さいことが影響しているかもしれません。

8. 日本に分布する *Entamoeba histolytica* の zymodeme の解析

Severa Motta, 小林 正規, 関口 恒存, 野崎 智義, 竹内 勤
慶応大学医学部寄生虫学教室

Peter G. Sargeant
ロンドン大学熱帯衛生医学部

Studies on zymodemes of Entamoeba histolytica isolated in Japan

Severa R. N. Motta, Seiki Kobayashi, Tsuneari Sekiguchi, Tomoyoshi Nozaki and Tsutomu Takeuchi
Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University

Peter G. Sargeant
Department of Medical Protozoology, London School of Hygiene and Tropical Medicine

Qualitative electrophoretic studies on the isoenzyme patterns (zymodeme) have been proved to be useful for characterization of pathogenicity of

Entamoeba histolytica. Thin layer starch gel electrophoresis using the crude extract of amebae demonstrated 22 zymodemes. Among them, 9

have been designated pathogenic.

The incidence of amebiasis has been increasing in Japan since 1978; however, detailed studies on the pathogenicity of amebae have not been attempted. Accordingly, the isoenzyme analysis was conducted on the recent isolates of *E. histolytica* in Japan. This study was also expected to contribute to clarification of pathogenicity of amebae involved in sexually-transmitted amebiasis of homosexual males.

The amebae were grown in the Robinson's medium usually from the stool. In 48 hours, the lysate of amebae was prepared by freeze and thawing. It was subsequently centrifuged, and the supernatant fluid was subject to the thin layer starch gel electrophoresis at 16 V/cm for 5 hours at 4 °C.

According to the previous data, the absence of slow-moving a band of phosphoglucosyltransferase and the presence of two fast-moving bands of hexokinase were recognized as the marker of pathogenic zymodemes. Judging from this, 8 out of the 9 isolates of *E. histolytica* were proved to be pathogenic. Among the 8 isolates, 5 of them turned out to be zymodeme II. Of the remaining three, two were designated zymodeme XIX and one zymodeme XIV. This seemed very interesting, be-

cause zymodeme XIV has been detected only in India, and zymodeme XIX has been rather rare.

Among these 9 isolates, four were derived from Japanese male homosexuals. They were symptomatic and serologically positive. Three of them were also positive on syphilis serology. All of the 4 cases were associated with pathogenic zymodemes.

Our present experiments clearly demonstrated association of pathogenic zymodemes of *E. histolytica* with homosexual males in Japan. This seems to be in accord with our previous data that Japanese homosexual men are highly seropositive against amebic infection, and support the view that pathogenic *E. histolytica* is circulating among such biased populations.

追加 竹内 勤 (慶大・医・寄生虫)

zymodeme 分析は赤痢アメーバの研究の中で特にキャリアーの治療の必要性に関連して問題視されています。我々のデータでは培養条件によっても zymodeme に差が出るので, carrier の治療が必要ないという意見は仲々理解され難いと思われます。又, この starch-gel electrophoresis の方法も非常に細部までコントロールされた方法であって, 比較する際に注意を要する点が多く, この方法での結果に関するトラブルの一因となっていることも考えられます。

9. 病原力の異なる *Trypanosoma cruzi* の DNA 切断パターンの比較

上村 春樹, 福岡 利英, 中澤 秀介, 神原 廣二

長崎大学熱帯医学研究所原虫学部門

Comparison of DNA digest patterns between Trypanosoma cruzi clones of different virulence

Haruki Uemura, Toshihide Fukuma, Shusuke Nakazawa and Hiroji Kanbara

Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

私達はこれまで, 同一株由来で病原力の異なる *Trypanosoma cruzi* について, 各種の比較実験を行ってきた。今回, それらから DNA を単離して比較を行った。

T. cruzi は, 生活環に伴って形態, 機能の変化を示すので, DNA 上にも変化がみられるか否かを, 培養で得た Epimastigote 及び Trypomastigote の DNA を制限酵素で切断の後アガロースゲル電気泳動で比較す

ることによって調べた。両者の間に差は認められず、遺伝子の増幅、組換えの有無等についての知見は得られなかった。しかし、異なるクローン、ストレインの間の切断パターンの比較には、培養が容易で多量の原虫が得られる Epimastigote から DNA を単離して行えばよいことがわかった。

そこで、Tulahuen 株から得た異なる病原性を示す 2 つのクローンの Epimastigote の DNA について比較を行った。EcoRI 切断パターンに顕著な違いが認められたので、特異的なフラグメントを単離してプローブとして用い、ハイブリダイゼーションを行った。それぞれ、プローブを単離したクローンの DNA とは強くハイブリダイズしたが、他方とは弱くしかハイブリダイズしなかった。この結果は、プローブとして用いた DNA フラグメントがそれぞれのクローンに特徴的な塩基配列を有していることを意味し、それは単純な変異によって生じたとは考え難い。すなわち、原株がもともと不均一な集団でいくつかの種類のクローンを含んでいた可能性が高いことを示している。他のストレインにおいても、クローニングすることなく継代している場合は、不均一であったり、条件に適した株を選択している可能性があり、病原性、あるいは生化学的データの比較に際して、注意しなければならないと思われる。

次いで、我々が調べたところではマウスに対する病原力が弱くなった他の 5 種類のストレインについても比較を行ったところ、すべて弱毒と類似のパターンを示した。しかし、そのハイブリダイゼーションの結果は、弱毒クローンから得たプローブとのみ強くハイブリダイズするとは結論し難く、病原性との関連については、さらに研究を進めることが必要である。

質問 竹内 勤 (慶大・医・寄生虫)

クローンをもっと分離されて比べられる方がよいと思います。

回答 上村 春樹 (長崎大・熱研・原虫)

御指摘のとおりです。もう少し多数のクローンについて切断パターンについては比較する予定にしています。

質問 田辺 和祐 (大阪市大・医・医動物)

- ① 1.4kb 付近にみられる電気泳動のバンドがキネトプラスト DNA ですか。
- ② もし、そうだとすればその DNA はどうして各種の制限酵素で切れないのですか。
- ③ EcoRI 処理のみで、強毒と弱毒株 DNA の切断パターンに差が見られる理由についてどうお考えですか。

回答 上村 春樹 (長崎大・熱研・原虫)

- ① 最初、制限酵素で切っていない時、1.4kb 付近にみられるバンドのみがキネトプラストの minicircle DNA と考えていましたが、キネトプラスト DNA はネットワークを形成していて原点に残っている DNA の一部も minicircle DNA のようです。
- ② 一つの前虫がもっている minicircle DNA も均一ではなく heterogeneity があり、その存在様式も、一部は monomer として存在していて 1.4kb 付近にバンドを与えているのですが、ネットワークを形成しているものは原点に残っていると考えられます (未処理の時)。そして、それらに EcoRI site は各 minicircle DNA 当たり 1~4 ヶ所存在するので、ネットワークからはずれて短いバンドを与えたのであるが、他の制限酵素の部位はほとんどなく、ネットワークのままなので大部分が原点に残っていると考えています。
- ③ 最初は、これが病原性を反映していると考えていましたが実際のところはそう単純ではないらしく、わからないというのが現状です。

質問 八木田 健司 (予研・寄生虫)

虫体から DNA はどのように分離・抽出したのでしょうか。

回答 上村 春樹 (長崎大・熱研・原虫)

SDS 存在下 Proteinase K で処理した後 Phenol 抽出、EtOH 沈澱を行って total DNA を単離して用いました。

10. 既製培地を用いた *Trypanosoma b. gambiense* 血流型の培養

福岡 利英, ピーター J. ムハンド, 上村 春樹, 中澤 秀介, 神原 廣二
長崎大学熱帯医学研究所原虫学部門

Cultivation of Trypanosoma b. gambiense bloodstream form with semi-defined medium

Toshihide Fukuma, Peter J. Mhando, Haruki Uemura, Shusuke Nakazawa and
Hiroji Kanbara

Department of Protozoology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

Trypanosoma brucei brucei, *T. b. gambiense* として *T. b. rhodesiense* はアフリカトリパノソマのうちブルセイ種に分類されている。これらの血流型は培養が困難であった。しかしながら過去約10年の間に種々の細胞を待養細胞 (feeder cell layer) に用いて長期の培養が可能になった。にもかかわらずこの培養系はあまり利用されていない。その理由として待養細胞の存在が系を複雑にしており、得られた結果の解釈に難点があること、また原虫が待養細胞の間隙に侵入し巣形成をして増えるので原虫全てを待養細胞から分離して回収する確かな方法がないことがあげられる。そこで待養細胞を用いない血流型の培養が望まれる。

演者らは *T. b. gambiense* Wellcome 株感染マウスから得られた血流型を待養細胞なしで培養することを試みた。イーグルの MEM (アールの塩溶液) とライボピッツの L-15 培地を混合して牛胎仔血清を添加した液を培養液として用いた。培養器は 96 穴のマイクロプレートで、培養開始時に適当な原虫懸濁液 0.1 ml と試すべき組成の培養液 0.1 ml を加えて総量 0.2 ml とし、5% CO₂, 37°C でインキュベートした。毎日一条件につき 3 ウェルより培養液を採取して原虫密度を計算した。

基礎培地について

イーグルの MEM のみに牛胎仔血清 (10%) を加えて利用しても血流型の培養に適さない。MEM にライボピッツの L-15 培地を 1:3, 2:1, 1:1, 2:1, 3:1 の各割合で混合してみたところ等量混合の場合が血流型の増殖維持に最も安定した結果を与えることがわかった。

牛胎仔血清の濃度について

MEM と L-15 培地を等量混合した基礎培地に牛胎仔血清を 2.5, 5, 10, そして 20% の割合で添加してみたところ 10% がもっとも好条件を与えた。5 × 10⁵/ml より開始して培地交換なしで 4 日後に最大密度およそ 5 × 10⁵/ml に達する。牛胎仔血清 20% では 10% の場合より 1 日遅いが、ほぼ同程度の最大密度に達する。5% では増殖速度は更に遅く最大密度も 1 ~ 5 × 10⁵/ml 程度あるけれども 2, 3 日毎に培養液を交換すれば、その程度の原虫密度ながら培養は維持できる。2.5% では原虫の増殖はなく減数し、3 日目には計数できなくなった。

培養液交換

MEM と L-15 の等量混合液に牛胎仔血清 10% を添加した場合最も好条件であったが、隔日に培養上清を交換すると最大密度 10⁶/ml のレベルに達する。血流型を培養して 10 ヶ月維持しているがマウス血中では 10⁹/ml にまで増えるのでそれにははるかにおよびない。何か不足しているのか、血清を多く加えても不利であることから何か害になる物質を除く必要があるのかまだ改良の余地がある。L-15 培地の役割としてシスチンを多く含んでいること他のアミノ酸の種、量が多いことが考えられるが、L-15 の割合が多くても不利である。今後このようなことを考慮して培養液の要不要構成成分について、更に詳細な検討を進める。

質問 高田 季久 (大阪市大・医・医動物)

本培地による昆虫型の培養については如何でしょうか?

回答 福岡 利英 (長崎大・熱研・原虫)

我々の用いた MEM と L-15 の混合液で *T. b. gambiense* の昆虫型の培養は試みておりません。ブルセイトリパノソーマ一般についていえば昆虫型の培養は

培養温度を室温に下げることによって比較的容易に早くから成功しております。

11. *Trichomonas foetus* から得た ribosome 及び surface protein の化学的性状と抗原性

岡 好万

徳島大学総合科学部保健科学

伊藤 義博

徳島大学医学部寄生虫学教室

Chemical properties and antigenicity of ribosome preparation and surface protein obtained from Trichomonas foetus cells

Yoshikazu Oka

Department of Health Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences, The University of Tokushima

Yoshihiro Ito

Department of Parasitology, School of Medicine, The University of Tokushima

10⁷ 個以上の *Trichomonas foetus* を腹腔内接種されたマウスは感染死する。この接種原虫は増殖するがマウス腹腔を出ることなく、宿主側の免疫学的細胞応答も、主として腹腔に見られるので、感染免疫のメカニズムを研究する一つの好適な方法と考え、この実験系による感染防御抗原性の解析を進めている。

我々の過去の成績は、*T. foetus* の致死感染が *T. foetus* homogenate の前処置で抑止され、さらに、細胞分画物の ribosome の画分 + Freund's complete adjuvant (FCA) の vaccination が homogenate の場合と同様に有効であることを示した。以後、ribosome 画分の防御抗原性について追求してきたが、1976 年頃より、一部の研究者により、ribosome vaccine の有効性は、ribosome 画分に混在する細胞表層成分(細菌類では LPS) と強く関係することが示唆された。従って、*T. foetus* ribosome の防御抗原性の解析においても ribosome 画分の精度が重要な鍵になった。

そこで、従来行った遠心分画法の過程を変えて 26,000 ~ 70,000 g の fluffy を 80,000 g の沈渣として集め、これに detergent 処理を施すなどの工夫で、ribosome 画分の精度を高める等の改良に務めた結果、従来より優れた分画物を得ることができ、さらに問題の細胞表層成分の画分である surface 画分の回収にも注意を払った。

今回は、これらの画分が有する抗原性を化学組成と照合しつつ検討したのでその結果を報告する。

T. foetus の表層成分中には、fucose を持つ glycoprotein が存在することをすでに認めている。この糖タンパクは、UEA-1 レクチンと特異的に結合するので、biotin 化 UEA-1 の使用で、分画物中の細胞表層成分の含有程度を追跡することが可能である。そこで、従来の方法と改良法で得られた ribosome および surface 画分を SDS-PEAG で分画し、それぞれにおけるタンパク分子の分布と fucose 含有タンパクの検出を行った。その結果、改良法の ribosome 画分に含まれる fucose 含有タンパクは旧法より遥かに少ないことが観察され、高精度の ribosome 画分が得られたと考えた。

次いで、今回得た ribosome と surface の画分でマウスを免疫し、これら抗血清と両画分を抗原として ELISA で検定した。その結果、抗 ribosome 血清は明らかに、ribosome 画分と反応したが、surface 抗原との反応は微弱であった。一方、抗 surface 血清と surface 抗原とは明らかに反応したが、ribosome 画分との反応は低く、surface 抗原 : 抗 surface 血清の場合より明らかな差がみられた。これらの ELISA の成績は、ribosome 画分中の surface 成分が極く少量であったことを示唆している。次にこれらの抗血清と抗ホルマリン死虫血清

とを用いて、生虫に対する凝集能を試験したその結果、抗 surface 血清は、抗ホルマリン死虫血清とほぼ同程度に生虫を凝集させたが、抗ribosome 血清の凝集能は陰性であった。

以上の分画物にたいする検定から、今回得られた ribosome画分は ribosome 精度の高い画分と考えられた。そこで、この感染防御抗原性を調べるために、マウスによる感染防御実験を行った。この実験には、比較のために surface 画分も抗原として用いた。

免疫方法：マウス (ddY) に、次の抗原を腹腔内に接種した。ribosome 画分抗原 = 初回：200 μ g - protein / mouse + FCA, 2回目：FCA を入れずに同量。surface 画分抗原 = 初回：99 μ g - protein / mouse + FCA, 2回目：FCA を入れずに同量。対照群 = 初回：溶媒 (Tris buffer) + FCA, 2回目：溶媒のみを接種した。

攻撃および感染防御効果の判定：2回目の免疫後、18日目に 4×10^7 生原虫の腹腔内接種で攻撃し、その

後40日間マウスの生死を記録し、対照群との比較で判定した。

感染防御実験の結果：対照群は6日目で全例死亡し (20/20), ribosome 画分免疫群は大半が死亡したが (16/20), surface 画分免疫群の場合は、僅かな死亡数であった (5/20)。この結果は、ribosome 画分免疫の耐過マウスは微量混在の surface 成分によると予測でき、ribosome 画分より surface 画分に感染防御抗原性が高いと示唆され、細胞膜成分の防御付与能力について詳細な検討が必要になった。

質問 神原 廣二 (長崎大・熱研・原虫)

これまで調べてこられた膜成分分画で高い防御能が得られなかったのは何故ですか？

回答 伊藤 義博 (徳島大・医・寄生虫)

従来その抗原性 (防御に関する) が否定的であった膜を主とした分画には膜以外のタンパクが多量含まれていたため、抗原濃度として低く、従って *in vivo* の成績も顕著な防御能を示さなかったと考えています。

12. *Plasmodium yoelii* の Ca^{2+} ・ATPase 遺伝子のクローニング

村上 賢二, 田辺 和祐, 高田 季久,
大阪市立大学医学部医動物学教室

Cloning of a gene for Ca^{2+} ・ATPase of Plasmodium yoelii

Kenji Murakami, Kazuyuki Tanabe and Suehisa Takada

Department of Medical Zoology, Osaka City University Medical School

マラリアはマラリア原虫 (*Plasmodium* 属) が赤血球に寄生することにより引き起こされる。赤血球内は①宿主の免疫系の攻撃を避ける、②ヘモグロビンを摂取してアミノ酸源とする、③還元剤 NADPH を利用して酸化障害を防ぐ、などの点でマラリア原虫の寄生にとり好都合である。しかし一方、赤血球内では細胞増殖にとり必須な各種の物質 (核酸前駆体や Ca^{2+}) が少量しか存在しない。これらの物質的要求を原虫がどのように満たしているのかは興味ある問題であり、原虫の赤血球内寄生適応の生化学的構造を考える上で重要である。動物細胞は多くのエネルギーを消費して細胞内のイオン濃度を一定に保ち、その結果により形成される膜内外の電気化学的ポテンシャルを代謝物の膜輸送に利用している。

例えば形質膜内外の Na^+ の濃度勾配はブドウ糖やアミノ酸の取り込みに、また、ミトコンドリア膜内外の強い電位差は Ca^{2+} の取り込みに利用される。赤血球内では Na^+ レベルが低く、 K^+ レベルが高く保たれ、 Ca^{2+} は極めて低い濃度 (1 μ M 以下) に保たれている。このことはマラリア原虫が通常の動物細胞と異なる細胞外液 (赤血球細胞質) に適した独特の陽イオン膜輸送の系を発達させている可能性を示唆する。一方、マラリア原虫寄生赤血球では Ca^{2+} や Na^+ の膜透過性が変化し、原虫形質膜内外の H^+ の電気化学的ポテンシャルが Ca^{2+} やブドウ糖の原虫内への取り込みに利用されることも知られている。これら陽イオン類の膜透過性の変化には膜 ATPase が関与すると思われるので、その特徴を調べる目的でマラリ

ア原虫の陽イオン輸送性の膜ATPaseの遺伝子のクローニングを試みた。

げっ歯類のマラリア原虫, *P. yoelii* 17XL株を用いた。感染マウス血液のセルロースパウダーカラム濾過, 及びPercoll 密度勾配遠心によって宿主白血球と非感染赤血球を完全に除去し, サポニンにより溶血を施した後, 原虫からゲノムDNAを型通りに調製した。このDNAを制限酵素 EcoRI で処理し, λ ファージを用いて遺伝子ライブラリーを作成した。すでにアミノ酸配列の決定されている他生物種の幾つかの膜ATPase, すなわち, アカパンカビ (*Neurospora crassa*) H^+ ATPase, ヒツジ腎 $Na^+ \cdot K^+$ ATPase, 大腸菌 K^+ 輸送性タンパク, ウサギ筋小胞体 $Ca^{2+} \cdot ATPase$ の間で最も強く保存されているリン酸化部位のアスパラギン酸周辺のアミノ酸配列DKTGTLTと, マラリア原虫の特異なコドン使用頻度, すなわち高ATコドンから, それらに対応する塩基配列を推定して21塩基の合成オリゴマー $5'GATAAAACAGGAACATTAACA3'$ を作成した。

この合成オリゴマーをプローブとして *P. yoelii* のゲノム遺伝子ライブラリーをブランクハイブリダイゼーションによりスクリーニングした。ポジティブシグナルを示すファージのクローンを得たので, 6クローンについてそのインサートをプラスミドにサブクローンした。サザンブロットハイブリダイゼーションによる解析の結果, サブクローンは6.8 kbpあるいは6.0 kbpのインサートをもつものに分かれた。原虫ゲノムDNAのサザンブロットハイブリダイゼーションの結果でもこれらのサイズに対応する位置にシグナルが認められた。プローブに使用した合成オリゴマーに相補的なオリゴヌクレオチドを合成し, それをプライマーとして5'側上流の塩基配列(約280 bp)をサンガーのジデオキシヌクレオチド法により決定した。得られた塩基配列に対応するアミノ酸配列を他生物種(前述の)膜ATPaseと比較したと

ころ, 6.0 kbpのインサートを持つクローン YEL 6 に高い相同性が認められ, もう一方のクローンには認められなかった。YEL 6 は中でもウサギ筋小胞体の $Ca^{2+} \cdot ATPase$ と相同性が高く, 各種 ATPase 群の保存領域外の上流においても共通部分が多かった。この上流部分には $Ca^{2+} \cdot ATPase$ のトランスメンブレン部位と Ca^{2+} 結合部位のアミノ酸配列が含まれているので, YEL 6 は *P. yoelii* の $Ca^{2+} \cdot ATPase$ 遺伝子を含むことが強く示唆される。また, 塩基配列中の塩基組成でも AT比が高く(約74%), これはマラリア原虫遺伝子の高ATの塩基組成と一致するので, 得られたYEL 6 は宿主動物からの遺伝子を含むものではないと考えられる。

質問 渡辺 良雄(筑波大・生物)

Plasmodium の $Ca^{2+} \cdot ATPase$ の役割は虫体の Ca^{2+} が増加することに関連して, どうお考えでしょうか?

回答 田辺 和裕(大阪市大・医・医動物)

① 得られたクローン(YEL 6)は形質膜 $Ca^{2+} \cdot ATPase$ (ラット脳)よりもウサギ筋小胞体 $Ca^{2+} \cdot ATPase$ と高い相同性を示すこと, 及びYEL 6をプローブにした原虫ゲノムDNAのサザンブロットでは一本のバンドしか認められないことから, マラリア原虫(*P. yoelii*)は小胞体のみ $Ca^{2+} \cdot ATPase$ を持ちこれを利用して, Ca^{2+} を小胞体に取り込むと考えております。

② 赤血球内から原虫内への Ca^{2+} の取り込みは形質膜の膜電位が利用されていると考えております。

質問 神原 廣二(長崎大・熱研・原虫)

特定されたDNAクローンは実際に虫体内で発現されているのですか?

回答 田辺 和裕(大阪市大・医・医動物)

その点については, 得られたクローンをを用いてノーザンブロットで確かめてみるつもりです。

13. 繊毛虫 *Pseudourostyla levis* の無小核体における再生について

高橋 忠夫, 洲濱 幹雄

広島大学理学部動物学教室

*Regeneration in amiconucleates of the ciliate
Pseudourostylas levis*

Tadao Takahashi and Mikio Suhama

Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

繊毛虫には、大核と小核という2種類の核があり、大核は栄養期の殆どの代謝と表現型を支配し、小核は有性生殖のときに遺伝子供給源として機能すると一般に考えられている。実際に、生化学的あるいは遺伝学的手法では小核が栄養期に機能しているという証拠は現在まで得られていない。しかし、その一方で小核が何らかの方法で細胞から除去されると、分裂速度や食胞形成能が低下したり、口部を含む表層構造に異常が生じたり、極端な場合には生存できないなど、種や系統によって様々な程度の異常が生じることは古くから知られており (Ng, 1984), 我々の使っている繊毛虫 *Pseudourostyla* でも小核を微小手術法で除去すると、口の構造に異常が生じ、この異常は培養中に頻繁におこる生理再生によって修復されること、さらに、小核を移植すればそれらの異常は生じなくなることを既に報告した (Takahashi, 1988)。これらのことは小核も栄養期に重要な働きをしていることを強く示唆しており、このような小核の機能を明らかにすることを研究の目的としている。今回は、無小核という状態が細胞を切断したときにおこる再生過程にどのような影響を与えるかを調べ、形態形成における小核の役割について検討した。

実験では、対数増殖期にある無小核系から、分裂のための表層原基をもたない細胞を選び出し、1%メチルセルロース液中で運動を制限したのち、ガラス針で口部の少し後方を横切断し、前断片と後断片に分けて培養液の入った凹みスライドに移し、23℃に保った。その後、20分間隔で固定し、プロタルゴール染色して、再生における形態形成過程を調べた。

前断片では、切断約1.5時間後に、断片の後端付近にある3~4本の左腹棘毛の左側に口部膜板帯 (AZM)

の原基である基粒体の小さな領域が現れ、次いで2枚の波動膜の前端部および第1左額棘毛が崩れて基粒体の小領域を生じて stage 1 となる。約30分後には、これらの基粒体の領域が広がった stage 2 になり、次の30分で、第1左額棘毛に由来した領域の前方部分に櫛状の分枝が生じ、AZM 原基内では膜板が分化し始め、周縁棘毛の原基も出現して stage 3 となる。さらに30分後の stage 4 では櫛状分枝および周縁棘毛の原基が大きく発達する。その後、1.5時間以内に stage 5 から8まで経過し、この間に櫛状原基からは、額腹棘毛と肛棘毛が分化し、さらに波動膜、膜板の分化と AZM の形成および周縁棘毛の分化が生じる。stage 8 では多少細胞の形が短小ではあるが、外見上正常な口部をもった細胞となる。一方、後断片でも、stage の進行度は、前断片とほぼ同一に進行して、切断約4.5時間後には同じく外見上正常な細胞となった。ただし、AZM、波動膜および第1左額棘毛を持たないので、これらから生じるはずの原基は全て、本来 AZM の原基となるはずの基粒体領域から生じる点が異なっている。その後、両断片の再生体は、細胞の形が前後方向に次第に伸長する。このとき、それまで正常に見えていた AZM のラベル部に断裂が生じ、さらにそれが広がって無小核体に特有の AZM の欠落部が短時間で形成される。このような口部異常体は、その後、1.5時間以内に生理再生を開始して、口部の修復を行う。有小核体では同様の手術を行って再生させた場合、このような異常は観察されなかった。これは有小核体の再生体の AZM は80~100枚の膜板 (無手術の対照区と有意差なし) で構成されているのに対して、無小核体の再生体では、AZM を構成する膜板が60枚前後しか形成されず、この AZM の基端部と終端部が固定

されたまま細胞が伸長するためにラベル部で断裂が生じるものと推測される。しかし、無小核状態でも前後両断片の再生過程がほぼ正常であることから、小核は形態形成過程そのものには関与していないと言える。ただし、無小核体では形成される膜板の数が少ないことから、小核は膜板の構成要素である基粒体またはその前駆物質の生産速度あるいは細胞の全体的な代謝速度などに関与しているものと考えられるが、この点については今後さらに検討していく予定である。

質問 高木 由臣 (奈良女子大・生物)

無小核の再生欠陥体に小核を移植すると、細胞分裂を伴わずに再生を完了しますか。

回答 高橋 忠夫 (広島大・理・動物)

無小核体に小核を移植した場合、必ず細胞数を増やしてから実験に使っていますので、移植後細胞分裂を伴

わずに再生できるかどうかは分かりません。

質問 重中 義信 (広島大・総科・細胞生物)

この繊毛虫では小核が散在していて、小核除去が困難と思われるのですが、どのようにして除去されたか御教え下さい。

回答 高橋 忠夫 (広島大・理・動物)

細胞をいくつかの切断片に切り分け、それらのなかから無小核体として再生したものを拾い出しております。

質問 見上 一幸 (宮城教育大・理科教育研)

生理再生と再生で、小核のかかわりかたが異なるようですが、細胞周期の観点からはいかがでしょうか。

回答 高橋 忠夫 (広島大・理・動物)

興味ある問題ですが、無小核体は細胞周期をそろえるのが比較的困難なため、この点に関しては知見をもっておりません。

14. 繊毛虫 *Euplotes woodruffi* シンゲン 1 のオートガミーについて

小阪 敏和

広島大学理学部動物学教室

Several features of an autogamous stock in Euplotes woodruffi syngen 1 (Ciliophora)

Toshikazu Kosaka

Zoological Institute, Faculty of Science, Hiroshima University

繊毛虫の有性生殖には、接合と接合が特殊化したと考えられるオートガミー (自殖) がある。私はこれまでに、下毛目繊毛虫の *Euplotes woodruffi* 種群では、自殖は淡水産のオートガミーグループとシンゲン 2 の全ての株で生じ、一方、海水産のシンゲン 1 と淡水産のシンゲン 3 では接合だけが生じ自殖は観察されないことを報告してきた。しかし、最近の研究から、海水産の株 KB-16 が自殖能を有し、しかもシンゲン 1 に属することが判明した。本株の自殖形質の特徴について調べることは、*E. woodruffi* 種群での有性生殖方法の進化、とりわけ自殖能の進化を考察するうえで極めて重要であると考えられる。今回は、この株のいくつかの特徴について報告する。

シンゲン 1 は、塩分 2 ~ 30% の汽水域に生息している。株 KB-16 は佐賀県の有明海に面した塩分 5.5 ~ 10

% の汽水中から採集された 29 株のうちの一つである。性生殖方法について調べたところ、本株のみが自殖と接合の両能力を備え、他の 28 株は接合能のみをもつことがわかった。これらの株はシンゲン 1 と接合し、生存率が高いことから、シンゲン 1 に属すると考えられる。

株 KB-16 の子孫クローンの自殖未熟期間は、12 クローンで調べたところ、33 ~ 51 回細胞分裂回数で、最初に自殖が生じたときの集団中でのその割合は 1 ~ 17% であった。自殖完了体の生存率は 8 クローンで 75 ~ 100%、3 クローンで 50 ~ 60%、1 クローンで 20% であった。加齢に伴う自殖細胞の割合は、オートガミーグループやシンゲン 2 では、最初にクローン内で自殖が生じた後約 40 回分裂で 100% に達し、その後割合は維持されるが、本株では匹敵する期間中に多くの場合 30% 以下で、その割合は増加しない。

株 KB-16 とシンゲン 1 の株を混合した時に、KB-16 はシンゲン 1 のいくつかの株に selfing (自系接合) を誘導する。用いたシンゲン 1 の成熟期の 23 株は、通常の培養条件下では自系接合を行わない。23 株の各々から 50 細胞ずつとり出し、それに KB-16 の成熟期の 1 細胞を加えたところ、混合中に 2 対以上の対が形成されたもの 8、1 対が 1、テスターの KB-16 が自殖を行ったものに、有性生殖がみられなかったもの 2 であった。KB-16 は 1 細胞しか加えられていないので、自系接合が生じなければ 1 対しか対形成が生じないはずである。2 対以上は明らかに自系接合対が生じたことを示している。逆に、シンゲン 1 の株も株 KB-16 に自系接合を誘導する。株 KB-16 の 8 クローンのそれぞれ 50 細胞に、シンゲン 1 の 5 株のそれぞれから 1 細胞ずつを加えたところ、3 クローンで 2 対以上が、1 クローンで 1 対が、4 クローンで自殖のみがみられた。株 IN-3 を加えた場合、4 クローンで 2 対以上が、1 クローンで 1 対が、3 クローンで自殖のみが観察された。他の 3 株、IK-32、AT-8、M-7 を加えたときにも、同様の結果となった。このように、シンゲン 1 の株が KB-16 に、KB-16 が通常自系接合を行わないシンゲン 1 の株にそれぞれ自系接合を誘導することがわかったが、その理由は不明である。

株 KB-16 とシンゲン 1 の株の混合では、両者間の対と、双方のそれぞれの株の自系接合対が形成される可能性が高いため、実験的に双体を作り、接合の生存率を調べた。その結果、KB-16 からの 2 クローンと株 AT-7 の双体の混合では、接合の生存率は 73% と 50% であった。

株 KB-16 の自殖に由来する F_1 クローンのすべては自殖能を備え、さらにそれらの自殖に由来する F_2 クロー

ンもすべて自殖を行った。子孫クローン間で自殖能をもたないものは、これまでに得られていない。このことから、親株とそれの自殖に由来するクローンのすべては自殖形質に関してホモであると考えられる。

株 KB-16 の単体と、自殖能をもたない株 AT-7 の実験的に作られた双体を接合させ、自殖能の遺伝について調べた。その結果、生存した 21 の単体及び 10 の双体の接合完了体クローンのすべては自殖能を示した。このことは、接合を通じて相手に自殖の形質が伝達されること、ヘテロのクローンが自殖能を発現することから自殖形質は優性であることを示す。現在、ヘテロのクローンを用いて、自殖を行わせ、子孫の自殖形質の分離について研究中である。

質問 (高橋 三保子 (筑波大・生物))

autogamy 能が細胞質遺伝する可能性はないか。

F_2 でしないものが分離されますか。

回答 小阪 敏和 (広島大・理・動物)

細胞質遺伝については、調べていませんので、一寸わかりません。

オートガミーのくり返しでは F_3 まで、オートガミーをしないものは分離していません。接合に関しては、現在実験を継続中です。

質問 見上 一幸 (宮城教育大・理科教育研)

オートガミーに細胞どうしのコンタクトや外液の影響について教えてください。

回答 小阪 敏和 (広島大・理・動物)

オートガミーは、1 細胞ずつにしても生じるので、細胞どうしのコンタクトは特に必要ないと思います。外液に関しては、餌生物を含まないことが重要で、exhausted medium を使うと、オートガミーの誘導率が良いようです。

15. テトラヒメナの接合中の核の行動と配置：細胞質分裂突然変異体 (*cda C*) の場合

菅井 俊郎, 加藤 治夫

茨城大学理学部生物学教室

Nuclear behavior and positioning in Tetrahymena cytokinesis deficient mutant (cda C) during conjugation

Toshiro Sugai and Haruo Kato

Department of Biology, Ibaraki University

繊毛虫の接合過程では、減数分裂・核交換・受精・核分化等の重要な現象が起こる。この際核は、時期特異的に特定場所に移動、配置 (nuclear positioning, NP) する。このような細胞内の位置によって発生運命が決まる現象は、繊毛虫に限らず、一般的に重要な意味を持つと思われる。

NPは、従来スライドグラス上に広げた細胞についての観察によって決められて来たが、これでは正確とはいえない。演者等は、テトラヒメナ (*Tetrahymena thermophila*) を材料に、ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いた生細胞の観察、固定細胞の光学切片等により、接合の全過程でNPを定量的に、3次元的に調べることができた。従来知られていた、減数分裂後の4個の核のうち1個が接合対の接着面に付着することによって、残ること等の現象を確認しただけではなく、大核も時期特異的に移動すること等の新しい知見も多く得た。

次の段階として、これらのNPが何によって支配されているのかが問題となる。テトラヒメナでは、細胞表面の位置情報がFrankelによって詳しく調べられている。細胞表面のパターン、位置を決めている何かが、同時に細胞内の核の位置を決定している可能性が考えられる。そこで形態異常を持つ細胞の接合中のNPを観察すると、正常細胞からでは得られない知見が得られると思われる。

Frankelにより分離された *cda* (cell division arrest) 細胞質分裂突然変異体のうち *cda C* は、非許容温度 (34°C以上) では分裂が阻止される際、細胞がくびれず“細胞の鎖”を形成する (実際はソーセージ形)。

cda C 細胞を1回だけ分裂阻止すると、2個分の細胞が縦に連なった“鎖”を多数得ることができた。これ

は、口部装置、大核小核、表面構造はそれぞれ2つつあり、前端、後端はそれぞれ1つしかないものである。異なる交配型の正常細胞と混合すると、正常な細胞は、鎖の2個ある口部装置のうち前方の口部装置の上部にのみ接着する。減数分裂にはいると、後方の大核に付着した小核は、近くの口部装置の方には移動せず、前端の正常細胞との接着面にまで移動する。2個の小核はほぼ並んで伸長しcrescentを形成する。crescentの長さは正常のものと同じであったが、長い“鎖”の中では直線状に伸びた。減数分裂は接着面の近くで行われ、減数分裂後の核の接着面への附着、核交換、受精は正常細胞のもとほぼ同じ位置で行われた。受精核が1回分裂してできた2個の核は、正常細胞でも“鎖”でも後端に移動し、そこで2回目の分裂を行った。“鎖”の長さは正常の2倍あるので、核は2倍の距離を移動したことになる。また旧大核は2個後方に並んでから消失した。

“鎖”は表面構造、核を通常の細胞の2倍持っているにもかかわらず接合では1個分の細胞としてふるまった。このことは、核のNPを支配しているのは、細胞の前端または接着面と後端であろうと思われる。他の多数の形態異常突然変異体について、同様の観察を行い、さらに顕微操作等も適用すれば、よりはっきりと因果関係を明らかにすることができると思われる。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

cda C はタンデム・チェーンホーマーですので大核4~8、小核4~8ケなどのものも生じると思います。それらを使ったとき、お示しになった大核2ケ、小核2ケのときの接合の結果と同じ様になりますか? また、口部装置も4つ以上生じる *cda C* でも前方の口部装

置の上で接合が起きるのでしょうか？

回答 菅井 俊郎（茨城大・理・生物）
長いチェーンは、接合活性が弱く、また飢餓状態にす

ると容易に丸くなってしまい今のところ接合させることができません。細胞2個分のチェーンがやっと接合できます。

16. ゾウリムシの接合時における細胞間情報交換と同調受精

見上 一幸

宮城教育大学理科教育研究施設

Intercellular communication and synchronized fertilization between conjugating cells of Paramecium caudatum

Kazuyuki Mikami

Research Institute for Science Education, Miyagi University of Education

接合中の2細胞において、小核の動きはよく同調している。このことは、2細胞間で相互に配偶核を交換し、受精核を形成するためには重要である。本研究ではゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) の接合において、小核の行動を同調させるために、接合対を形成する2細胞間で遺伝情報の交換が行われているかどうかを、顕微操作により解析した。

接合を始めると小核は膨大し、減数分裂前DNA合成の後、減数分裂に入る。減数分裂前期で小核は三日月形になり、その後球形に戻った後、第一分裂および第二分裂を行う。その結果生じた4核のうち、1核が囀口部に移動し、それ以外の3核は間もなく退化消失する。囀口部の核はさらにもう一度分裂し、移動核と静止核を生じる。移動核は接合面に押し付けられるかたちから相手の細胞に移動し、静止核と融合して受精核となる。

実験1. 株Ydtと株Ydlとを接合させ、接合開始後2時間（DNA合成期）から1時間ごとに、6時間（三日月期）までの時期に、接合対の一方の細胞から大核を除去した。その結果、接合開始後2時間で大核を除去された細胞の小核は、三日月期を経過することなく核分裂を行った。生じた核のいずれも囀口部には移動せず、核の退化も見られなかった。接合開始後3時間（伸び始めた紡錘形の時期）の除去では、小核は三日月形にはなったが、囀口部への移動と核退化は見られなかった。それ以降での除去の場合、三日月期を経過して一部の細胞では囀口部への核の移動と退化が見られた。その頻度は除

去の時期が遅くなるにつれて増加した。しかしそれ以降の変化については、相手の移動核との区別が難しく正確な観察ができなかった。

実験2. そこで株Vdlと無小核株Ydlamとの間に接合を誘導し、有小核細胞から大核を除去した。接合開始後2時間での除去では、実験1の結果と同様、小核は三日月期を経過することなく分裂を行った。しかし、3時間以降での除去実験では、すべて三日月期を経過の後、核分裂を行い、囀口部への移動、それ以外の核の退化、移動核の相手細胞への移入が、通常の接合経過よりも1-2時間遅れて観察された。

実験3. 次に株Ydlと無小核株Ydlamとの接合を誘導し、接合開始後4時間で無小核細胞から大核を除去して無核細胞とした。つづいて接合開始後5時間から10時間までの時期に1時間ごとに、相手の小核と大核を持つ細胞から大核だけを除去した。その結果、5時間（小核は長く伸びた時期）に大核を除くと、小核は三日月形にはなるが分裂せず、それ以降の核変化は全く起こらなかった。6時間（三日月期）に除去した場合も同様に、核分裂以降の現象は起こらなかった。9時間（減数第一分裂中期）で除去した場合、正常（2回）よりも多い3-4回の分裂が観察された。しかし、いずれの核も囀口部へ移動することなく、核の退化も見られなかった。10時間（第二分裂後の2核の時期）で除去した場合、核分裂は正常の2回起こり、囀口部への移動や核の退化も観察された。しかし、相手の細胞への核の移動は見られな

かった。

実験1と2の結果から、大核除去の顕微手術は、同じ細胞の小核の行動に大きな影響を与えないと考えられ、大核の機能を調べるために顕微操作による大核除去が有効であるといえる。

実験3の結果は、接合中の小核の行動が、大核によって支配されており、小核が自律的に行動しているのではないことを示す。しかも、大核からの遺伝情報は、小核のそれぞれの行動の1~1.5時間前に出されると考えられる。さらに実験2の結果は、核分裂、囲口部への1核の移動と他の3核の退化消失、相手細胞への核移動に関する遺伝情報は、接合面を通過してそれぞれ相手の細胞に有効に働くと考えられる。

では実験1および2において、接合開始後2時間で除去した場合、なぜ減数分裂前期を通過することなく核分裂に入るのだろうか。核分裂に関する情報は分子量が小

さく接合面を非常に通過しやすいか、または少量で有効に働くと考えれば、接合の早い時期にたとえ両細胞の接合面での膜の融合が不十分であっても、核分裂だけは起こると考えられる。この核分裂を誘導する物質は、減数分裂前期を通過しない核に分裂を誘導できることから、mitosisにも共通するものであると考えられる。

質問 樋渡 宏一(東北大)

クレスセントを経過しないで分裂だけを行った小核の子孫をとって、交叉率などを調べることができませんか。これができると、クレスセントの機能を調べられると思います。

回答 見上 一幸(宮城教育大・理科教育研)

クレスセントを経過しないで分裂した核を無小核細胞に移植し、有小核クローンを得ることができました。遺伝マーカーを用いて染色体の対合、分離さらに交叉などについて調べることは可能だと思います。

17. ミドリゾウリムシの接合概日性リズム —— 位相物質はあるか

三輪 五十二, *Ruth Gamboa, Gloria L. Enriquez*

茨城大学教養部生物学教室

Circadian mating rhythm in Paramecium bursaria—What is the phase-substance

Isoji Miwa, Ruth Gamboa and Gloria L. Enriquez

Biological Laboratory, College of General Education, Ibaraki University

概日性リズムは単細胞生物から人間まで、すべての真核生物に見られる約24時間周期のリズム現象である。繊毛虫においては接合活性・接合型・行動・分裂・集光性などの概日性リズムが研究されているが、そのリズムの駆動体としての生物時計の実体は依然謎のまま残されている。

ミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) を12時間毎の明暗条件下で培養すると、接合活性は明期に表れ暗期には表れないことが知られている。これを恒明条件下に移すと、そのリズムは約24時間周期で継続していくが、約2週間後にはリズムは消え常時約50%の活性率を示すようになる。しかし、そのような集団の中から細胞を取り出して、各細胞について接合活性の有無を

3時間毎に調べてみると、すべての細胞が約24時間周期のリズムを表していた。このようにミドリゾウリムシは細胞レベルでリズムの測定が可能である。また、ゾウリムシには顕微注射法が応用でき、今までにそれを用いた多くの研究が行われてきた。

本研究は顕微注射法を用いて、位相の異なる細胞間で細胞質移植を行い、その後の相位変化を調べたものである。供与体としては、明暗条件下で培養したクロレラを保持していない Mit-Cw のサーカディアンタイム (CT) 0, 6, 12, 18 の4種類の細胞を用いた。受領体は6時間毎づれた明暗条件下でまず同調させ、次に恒明条件下で24時間以上経過させた4種類のクローンをを用いた。すなわち16通りの組み合わせで

注射を行った。注射後の細胞はコンディション液の中に3時間入れ、その後K-DS液に移し、各細胞の接合活性は注射後6時間目から3時間毎に緑色のテスター細胞を用いて調べられた。リズムの位相変化は9細胞の位相の平均が対照群と比べられた。その結果CT 12の細胞の細胞質をCT 1.5と7.5の細胞に注射した時に約3時間の位相の前進が見られ、CT 19.5の細胞に注射した時は約6時間の位相後退が見られた。次に、恒明条件下で培養した供与体を用いた時は、位相変化の割合は前の実験より小さかったが同様の結果が得られた。すなわち、CT 12の細胞の細胞質を特定の位相の細胞に注射すると、相手の細胞の位相を前進もしくは後退させることがわかった。またCT 12の細胞のブライを105,000gで超遠心分離した上澄にも同様の効果があることもわかった。

さらに、CT 2, 6, 10, 14, 18の細胞と未熟期の細胞のブライの上澄をアフリカツメガエルの卵細胞に注射すると、CT 10, 14の細胞の上澄のみが卵成熟を誘導した。これらは卵成熟促進因子(MPF)と同じ効果なので、逆にMPFをミドリゾウリムシに注射して接合

性リズムの位相変化を調べることは興味ある今後の問題として残されている。

また、CT 0, 6, 12, 18の細胞のブライの超遠心分離の上澄をSDS電気泳動法で分離し、(銀染色法で染めてみたがCT 12のバンドに顕著な差は見られなかった。しかし、別の電気泳動法を用いれば差の出る可能性はある。

以上の実験からCT 12前後の細胞には、生物時計に影響を与え位相変化を引き起こす位相物質の存在が考えられるので、今後はブライの上澄から位相物質を精製し、その性質を明らかにしたい。

質問 高木 由臣(奈良女子大・理・生物)

未熟期細胞の遠心分画上清成分は、ゼノパス卵に対し成熟促進効果をもつとのことですが、この細胞の日周リズムの位相についておたずねします。

回答 三輪 五十二(茨城大・教養・生物)

未熟期細胞のブライの上清についてはサーカディアンタイム6時の時のみゼノパスの卵に注射しましたが、この場合は成熟促進効果はありませんでした。他の位相については今後調べてみるつもりです。

18. 繊毛虫プレファリズムの細胞伸長反応に関わる構造的要素

石田 正樹, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Structural elements concerning with cell elongation in a ciliate, Blepharisma

Msaki Ishida and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

原生動物繊毛虫においては、外界の刺激に対する応答として、細胞の変形を伴う場合がある。多くの場合は、すばやい細胞の収縮反応を示して応答するが、この収縮反応は、直径4-5nmのマイオネームやスパスモネームと呼ばれる収縮性の繊維によって起こることが知られている。これらの繊維による収縮は、エネルギーを必要とせず、カルシウムの濃度に依存することが報告されている。一方、細胞伸長に関係する繊維としては、微小管の束からなるkm繊維が知られており、この微小管の活

滑りによって収縮状態からの回復がなされると考えられている。

本研究に用いたプレファリズムの場合にも、これらのマイオネームやkm繊維は、存在しているが、さらに、伸長に関係すると考えられる微小管の束が知られている。それは、細胞質中で液胞に近接して存在することから、特に液胞近接微小管(vacuole-associated microtubule, VAM)と呼ばれている。

1985年の松岡と重中の報告によれば、代謝系阻害剤

や微小管ダイニン ATPase 阻害剤 EHNA を用いた実験から、細胞伸長が、微小管の滑りによって起こっていると考えている。さらに、1時間の10 mMコルヒチン処理は、VAMを消失させるが、km 繊維は消失させず、このとき、細胞伸長反応は観察されないことを報告しており、VAMが細胞伸長に関与するとゆう可能性を考えている。本研究でも、細胞伸長に及ぼす代謝阻害剤の影響を調べてみたが、1AA (10^{-4} M)、NaN₃ (10^{-4} M)そしてDNP (10^{-4} M)は、それぞれに伸長を阻害し、細胞伸長反応がエネルギー依存性であることを示唆している。また、電子顕微鏡観察をしてみると、km 繊維や、VAMの近傍には、ミトコンドリアが、数多く存在しており、代謝系阻害剤の効果を裏付けるものである。

さらに本研究では、電子顕微鏡観察により、プレファリズマの伸長時と平常時の形態変化を比較した。伸長時と平常時では、細胞表面の液胞の形態が異なり、平常時に比べて伸長時では、扁平で細長くなっているのが分る。その変形した液胞は細胞の比較的前端から後端部に存在し、その周辺には、VAMが配向している。つまり、液胞の変形から推測すると、伸長は細胞のほぼ全体で起こっているようである。しかしながら、伸長反応が後端部で顕著に観察されるのは、前端部が構造的に安定した状態にあるためだと考えられる。実際に、電子顕微鏡で観察してみると、細胞口の周りは、繊毛列がかなり密に存在し、構造的な制限要因となっているようである。

伸長時の細胞は、細胞表面の繊毛溝に従って、長軸方向にねじれるように伸びているようである。VAMやkm 繊維の配向方向もこれに一致すると観察される。細胞表面から細胞の中心部に向かって順にkm 繊維、マイオネーム、そしてVAMは3層の明確な部域差をもって局在している。その配向上の特徴として、VAMはマイオネームにほぼ相当する数で複数の層をなし、km 繊維は、これと比べてやや少なく、繊毛の数に対応している。

単一のkm 繊維を構成する微小管のシートの数は、伸長時細胞の後端部で減少している。また、隣り合う基底小体間の距離を測定し、細胞の前端と後端で比較したところ、伸長時の細胞の基底小体間の距離は、後端部で前端部の約2倍に広がっていた。このような観察結果は、km 繊維の滑りを示唆するものと考えられる。しかしながら、もし、伸長が液胞の変形に反映されているならば、このkm 繊維の細胞後端部に特異的な変化は、二次的な(受動的な)変化の可能性も考えられる。

一方、VAMの束を構成する微小管の数は、伸長時では細胞前端部で多く、中央部では少なくなっていた。V

AMを構成する微小管の数は特に後端部で多く、最大40数本の微小管から構成されていた。また、伸長時の細胞の中心部や前端部にみられるVAMは、平常時のものが規則正しいのに対して、比較的ランダムな構造(恐らく微小管がお互いに滑り合った結果であろう)をしていた。

しかしながら、上述したような変化はkm 繊維とVAMのどちらが主に伸長に関与しているかを決定づけるものではなく、むしろ、両方の滑りが生じていることを示唆しているように考えたほうが妥当であろう。つまり、細胞表面では、マイオネームをはさんで、km 繊維が細胞表面側を伸展させ、VAMが細胞質側を伸展させているものと考えられる。

質問 木原 章 (法政大・教養・生物)

そのファイバーは、伸長力を発生しているとお考えなのでしょうか？

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学・細胞生物)

伸長力を発生していると考えております。理由は

1. エネルギー依存性の反応
2. dynein ATPase inhibitor が inhibit する。
3. 形態的に観察するとすべりが生じているようである。
4. VAM の繊維数は、マイオネームとほぼ同じかそれ以上だから。
5. Vacuole の変形が、VAM の分布と一致してみられるので

以上のようなことから伸長の力を出しているのではないかと考えます。しかしながら、その力がVAMであるかkm であるかは今のところわかりませんし、伸長力を測定したわけではありませんから、推測の域を出ませんが。

御質問ありがとうございました。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

EM像で見られます液胞が、収縮時と伸長時で、形態も数もともに異なっていたように思われました。伸長運動にともない液胞の分裂や融合がおきているのでしょうか。また液胞の機能はわかっているのでしょうかお教え下さい。

回答 石田 正樹 (広島大・総合科学・細胞生物)

数的に云って vacuole に変化はないように思われますが、その点に関しては測定した訳ではないのははっきりしたことは言えません。しかしながら次のように考えております。dark adapt した細胞の cross section でお見せしたように vacuole は比較的球状を呈して大きくみえているのですが、これが伸長すると

(伸長した状態では), 長軸方向に細長く伸びて, 今まで重なりあうことがなかった vacuole も重なって数多く見えてくるものと考えています. それから, vacuole 中には potassium pyroantimonate と deposit を示

す (おそらくは Ca^{2+} ion) ことがわかっていますが, これから考えるとおそらくは伸長する場合に Ca^{2+} の release がこの vacuole から出てくるものと考えます. 御質問ありがとうございました.

19. 太陽虫軸足の収縮反応

安藤 元紀, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Contractility of heliozoan axopodia

Motonori Ando and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

太陽虫 *Echinosphaerium akamae* は軸足の伸長, 短縮によって様々な細胞運動を行っている. その中でも餌虫の捕獲の際に起こる軸足の急速な収縮は軸糸微小管の瞬間的な崩壊を伴うかなり特異的な現象であると言える. これまでに, 電子顕微鏡的検索などからこの収縮反応は軸糸微小管に近接して存在する X 小体の形態変化を伴うことが示唆されていたが, 今回, この X 小体が実際に軸足の急速な収縮に重要な役割を担っていることが判明したのでここに報告したい.

餌虫の接触によって誘起される軸足の急速な収縮は, 餌虫が軸足の比較的先端付近に接触したときに起こり, 中央付近に接触した場合には収縮は起こらず, 軸足内の原形質流動によって餌虫が細胞体表面まで運ばれると言われている. そこで本研究では, まず正に荷電した粒子が軸足の急速な収縮を誘起することを利用して, 軸足の各部位に餌虫の代わりに陰イオン交換樹脂 DEAE-Sephacel CL-6B による直接刺激を与えて軸足の反応を調べた. その結果, 刺激反応部位は軸足のほぼ全域にわたって存在していることが確認された. さらに軸足の基部を 0, 先端を 100% としたときの各部位での急速な収縮の起こる割合を調べたところ, 軸足の先端 70-100% の間では 90% 以上の確率で急速な収縮が誘起されるのに対し, 軸足の中央付近ではその確率はほぼ 60% に下がることがわかった. また急速な収縮が誘起されなかった場合を詳細に観察してみると, 軸足の長さには

変化がないものの, 瞬間的にビーズ形成を起こしていることが認められた. 1980 年に, 洲崎らによって餌虫が軸足に接触する際にビーズ形成を起こすことが示され, さらにビーズ形成を起こしている部位で X 小体の収縮形態と思われる像の電顕的な観察が報告されていることから, ここで観察された現象も恐らくそれに一致するものと思われる. つまり, 軸足の急速な収縮は軸糸微小管の崩壊と X 小体の収縮の同時的な変化であり, ビーズ形成は X 小体のみの収縮であると考えられる.

次に, 外液のイオン環境を変化させたときの陰イオン交換樹脂の接触刺激に対する軸足の反応を調べた. Ca^{2+} が 4 mM のコントロール溶液中では急速な収縮が誘起されるが, Ca^{2+} の濃度を 0.2 mM に落とすと急速な収縮は抑制され, ビーズ形成が誘起された. エネルギー阻害剤であるアジ化ナトリウムやシアン化カリウムを作用させたところ, 急速な収縮が抑制され, ビーズ形成が誘起された. カルシウムチャンネル阻害剤と言われている Co^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+} を作用させたところ, 急速な収縮は抑制され, ビーズ形成が誘起されたが, この場合のビーズ形成は樹脂を接触させた付近の局所的な変化であった. カルモデュリン阻害剤であるトリフルオロペラジンや細胞内カルシウムの放出に関与すると言われているカフェインを作用させたところ, 急速な収縮は抑制され, ビーズ形成が誘起された. これらのことから, ビーズ形成が X 小体のみの収縮によって起こると考えれば, X 小体が収

縮するためには外液のカルシウムイオンは必要であるが、エネルギーに非依存性であることが示唆される。これはラップムシヤツリガネムシ、あるいは海産の太陽虫の収縮運動と基本的に同じメカニズムで起こると考えられる。

さらに、本研究では電顕的な検索を行い、軸足の収縮前後のX小体の形態変化を詳細に調べてみた。コントロールの軸足では、軸糸微小管に近接して存在している小管状構造のX小体が観察された。また軸足の細胞体外質表面ではX小体が観察されたが、内質表面ではその存在は認められなかったことからX小体は軸足の外質の部分で終わっていることが示唆される。これに対して収縮直後の軸足では顆粒状の形態を示すX小体が観察された。さらに軸足の基部のほぼ外質表面で、顆粒状の形態を示したX小体が多数集合しているのが観察された。これらのことから、軸足の急速な収縮は軸足のほぼ全域にわたって存在しているX小体が軸足基部に引き込まれる形で起

ることが示唆される。

今後は、軸糸微小管の崩壊とX小体の収縮が同時に起こるのは何故かと言う問題について、そのメカニズムを探っていきたいと考えている。

質問 木原 章 (法政大・教養・生物)

DEAE・ビーズにはどのような前処理を行いましたか。また、異なるイオン組成の液中で、その刺激効果は一定だとお考えですか？

回答 安藤元紀 (広島大・総科・細胞生物)

DEAE・Sepharose は、まず通常の方法で活性化させたあと、control medium で20回程度洗浄し、実験に用いました。

また、外液のイオン組成を変化させた場合、その反応は、変化することがあります。現在のところ Ca^{2+} 以外に Mg^{2+} と K^+ の影響を検討中です。

20. 太陽虫の単離軸足とその形態変化

石井 いずみ, 重中 義信

広島大学総合科学部細胞生物学研究室

Isolated axopodia and morphological changes in a large heliozoa

Izumi Ishii and Yoshinobu Shigenaka

Laboratories of Cell Biology, Faculty of Integrated Arts and Sciences, Hiroshima University

太陽虫 *Echinospaerium akamae* は、球状の細胞体を持ち、その体表面から放射状の軸足と呼ばれる仮足を出している。この軸足の内部には、二重の渦巻状配列をもつ軸糸と呼ばれる微小管の束とその周辺にミトコンドリア、小胞、電子密度の高い顆粒、X小体などの細胞内小器官が存在している。太陽虫はこの軸足を収縮・短縮したり、伸長したりすることによって様々な真核生物系に共通した細胞運動を行っている。このため、太陽虫の軸足は真核生物における微小管による細胞運動の解析に関して興味深いモデルであると思われる。同様の微小管系を有する繊毛や鞭毛に関しては、完全な形で単離されたモデルを用いて運動の解析が進められている。このことから太陽虫についても同様のモデルを作成することが有効であろう。本研究室では近年 D_2O を用いて軸足を単離することに成功し、その微細構造が観察されてい

る。しかし、この場合の実験は培養液であるクノッブ溶液中で行われている。細胞運動には、様々なイオンが関与しているので、軸足は緩衝液中で単離されることが望ましい。そこで、本研究では様々な緩衝液中での軸足の状態から Mg^{2+} - K^+ HEPES緩衝液中で、 D_2O 処理を行った。

Mg^{2+} - K^+ HEPES 緩衝液中の太陽虫に、最終濃度がそれぞれ 3 mM, 60% になるように EGTA と D_2O を加えた。その結果、2分前後で太陽虫の軸足が一つの極に収束していく様子が観察された。さらに、収束した極の部分では、根元から外れた軸足が溶液中に流出して行くことが観察された。このように細胞体から外れた軸足は長さとしては単離していないものとはほぼ同じ位であるが、位相差顕微鏡下で観察すると、局所的な凝縮すなわちビーズを形成しており、その周辺は、細くなってい

るようであった。

そこでまず、単離溶液処理時に見られる軸足の収束を誘発する要因を明らかにすることにした。その結果 Ca^{2+} -free のクノッブ溶液中で D_2O と低濃度の EGTA 溶液を加えた場合、同様の軸足の収束が生じた。このことから、 Ca^{2+} -free 条件下での D_2O がその要因であろうと推測される。この軸足の収束現象は、太陽虫自身に何らかの極性があることを指摘している。類似の軸足の集合に関してはコンカナバリン A (Con A) 処理について報告されている。(豊原ら, 1977)。 D_2O はチューブリンの重合を促進し、 Ca^{2+} は脱重合を引き起こすことが知られている。さらに Con A は Ca^{2+} の膜透過性に関与していることが知られている。これらの点から、太陽虫の極性が存在するならば、それは恐らく微小管の重合、脱重合に関係しているのであろうと考えている。

次に、軸足を遠心機を用いて単離を行った。単離溶液を加えたあと、まず 600 ~ 700 g の軽い遠心を行い、細胞体を分離したのち、10,000 g で 10 分間遠心操作を行うことによって軸足のみを回収することに成功した。

このようにして単離された軸足を、光学顕微鏡下で観察すると、軸足が細胞体から外れた状態とほぼ同様の形態を保持していることが分かった。さらに、その微細構造を明らかにするために、電子顕微鏡下でネガティブ染色法を用いて観察を行った。その結果、単離軸足は、一本の軸足に関して数個のビーズを形成し、ビーズを形成

していない軸足部分には、微小管の束のみが存在しており、ほかの細胞内小器官は観察されなかった。この微小管の束は、軸足中で真直ぐに伸びていることから、この単離軸足中では微小管はほぼ完全な形を保っているものと推測される。ビーズの部分は、はっきりとした像としては観察することが出来なかったが、周辺部に細胞内小器官が観察されていないことから、この部分に細胞内小器官が凝集しているのではないかと思われる。

このように Mg^{2+} - K^+ HEPES 緩衝液中で軸足の単離を行ったが、今後の課題としては、ネガティブ染色で不鮮明であったビーズの解析を超薄切片法を用いて行い、また軸足の収束と太陽虫の極性についての解析を行っていきたいと思っている。

質問 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

Ca^{2+} 存在下で EGTA などのキレート剤を添加しますと (キレートされる Ca^{2+} の量にもよりますが)、液の pH が変化します。すなわちこの実験系では Ca^{2+} を除くことと同時に pH が変化していると思われます。この点にも御配慮が必要かと思われます。

回答 石井 いずみ (広島大・総科・細胞生物)

その点についてこれから実験していきたいと思います。そのことについては、EGTA を含む試薬を加えた後、苛性ソーダなどを加えることによって確かめることができます。

21. 画像処理によるアメーバ運動の定量化

木原 章, 石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

Quantitative analysis of cell movement in Amoeba proteus

Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ運動については生化学的手法によって分子機構の一部が解明されてきたが、細胞レベルでの運動制御機構については以前不明な点が多い。その理由として、アメーバ運動をする細胞では変形と移動が同時に起こるため細胞運動の定量化が極めて困難であった点が挙げられる。本報では、アメーバの顕微鏡画像 (2次元投影画

像) を、マイクロコンピューターを用い経時的に解析し、アメーバ運動の定量化を行うためのファクターについて検討した。

材料は、*Amoeba proteus* を用いた。アメーバの運動を 20 秒間隔で 7 ~ 10 分間 35 mm フィルムに記録した画像をイメージスキャナーを通じてマイクロコンピュ

ターを入力し、コンピューター上で以下の5つのファクターを算出した。

F1. 面積：アメーバ像の輪郭をトレースし、輪郭及びその内側に含まれる画素数より面積を算出した。

F2. 擬足伸長面積：経時的に記録した2個のアメーバ像を合成し、新生した擬足の部分の面積を測定した。

F3. Complexity (Ueda & Kobatake, 1983) : (輪郭の長さの二乗) ÷ (面積) が示す値。輪郭を構成する画素のうち、斜方向に連なる画素を $\sqrt{2}$ 、縦横方向に連なる画素を1と換算し、長さを算出した。

F4. 移動距離：アメーバ像を構成する総画素の座標平均より重心を求め、その移動距離を用いた。

F5. 方向転換角度：経時的に記録した3個のアメーバ像の重心をそれぞれ結んだ線分の成す角度。

以上のファクターを実際のアメーバの運動と照合した。

単一個体について経時的に観察(20秒間隔)した場合、移動中のアメーバの面積(F1)は他のファクターに比べ安定し、擬足新生面積(F2)の変動の影響を受けない、即ち20秒の範囲内では擬足の新生量と収縮量がほぼ相殺していることが判明した。さらに、Complexity (F3)の減少、移動距離(F4)の増大、方向転換角度(F5)の減少にはそれぞれ正の相関が見られた。またF2は、F3、F4、F5とあまり相関性が見られなかった。

22. アメーバ遭遇行動のコンピューター解析

堀上 英紀, 木原 章, 石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

Computer measurement of social behaviour of Amoeba

Hideki Horikami, Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

通常アメーバ・プロテウス(G株)は1本の主偽足と数本の副偽足を形成しながら行動する。しかし、1日間絶食させた後、暗黒下の塩類液中に移し数10分間にわたって一定の時間間隔(2分)でストロボ撮影すると単一偽足となって行動軌跡は1つの単純な弧を描く。その軌跡を便宜的に右曲型・直進型・左曲型に分けると、実験容器内のアメーバが単独の場合、右曲型が多く(約75

次に、移動パターンの異なる3個体について、それぞれ7分間の平均値で比べた。方向転換角度(F5)については、絶対値を平均した値で比べた。その結果、F4、F5については、負の相関が見られたのに対して、F2は移動パターンの影響をあまり受けず、むしろF1との間で負の相関が見出された。F3は、経時変化に比べ、個体間での変異が大きく見られた。

以上の結果より、面積及び擬足新生面積は、短時間の移動パターンの影響をあまり受けにくかったことから、細胞条件や、活動量を反映するファクターとなりうること、また重心移動距離と方向転換角度については、短期的な移動パターンを反映するファクターとなり得ることが示唆された。

質問 遠藤 卓郎(予研・寄生虫)

移動速度と擬足増大面積を両方兼ね合わせたファクターを考えたらより良く activity を説明できるのでしょうか?

回答 木原 章(法政大・教養・生物)

移動速度は方向転換が大きくなると減少する傾向にあります。これは、おそらく重心移動を伴わない変形が起こるためと考えられます。その点擬足増大面積は、重心移動に関係なく変形量を測定できると考えられることから、むしろ擬足増大面積は移動速度もすでに include した値であると言えます。

%)、アメーバの体軸をY軸に重ね合わせると20分後にはY軸の右側へ分布(79%)する。しかし、比較的低密度の集団(約1個体/mm³)ではその右偏性が解消する。しかも実験容器材料の違いや磁場の変化による影響はみられない。そこで別種における傾向を調べるため、常時単一偽足のトリカメーバ属のアメーバと多偽足で前進方向をしばしば変更するマヨレラ属のものを用いた。草食

性のトリカメーバは単独でも集団条件でも到達点が左右どちらかに偏ることはなかった。雑食性のマヨレラでは単独条件ではアメーバ・プロテウスと逆にY軸の左側に有意に多く分布した。しかし集団時にはその偏りが解消した。また15分間の行動軌跡をみるとトリカメーバではアメーバ・プロテウス(G株)と類似した1つのゆるい弧を描くが、集団条件下ではその弧が一層直線化するとともに移動距離も伸長することがわかった。一方、マヨレラの軌跡は蛇行型であり、体軸や偽足先端の決定が極めて困難である。そこで今回、マヨレラ(クローン)の行動軌跡写真をイメージ・スキャナーでコンピューターにとり込み、個々の細胞の面積重心を求め、各重心間の直線距離(細胞の移動距離)と、重心を結んでいった時の直線の折れ角(方向変換角)を計算し、軌跡の定量化を試みた。まず、軌跡の1番目と2番目を結ぶ直線を前進方向とみなしY軸に重ねて到達点を調べると、単独・集団条件のいずれにも偏りはみられなかった。一方、塩類液を、偽足の前進に促進効果を持つグルタミン酸ナトリウム(1 μ M)溶液に代えて、その中での軌跡を調べると集団条件でのみ到達点の右偏性が生じた。コンピューター測定した塩類液中での15分間の軌跡の全長は単独時平均960ミクロンで、集団条件では約17%伸長した。1.5分間隔毎の方向変換角の平均値は単独の場合約22°

で、集団時には約20%減少した。またグルタミン酸ナトリウム中では軌跡全長は平均1,320ミクロンであり、集団時には8%伸長。方向変換角は単独時平均32°、集団時平均20°であった。

以上の結果から、同種アメーバの個体間には少なくとも化学的情報に基づいた干渉作用の結果、移動距離の増加と方向変換角の減少による行動軌跡の直線化傾向が現れ、一定時間後の到達点の分布を決定することが明らかになった。

質問 八木田 健司(予研・寄生虫)

アメーバの運動方向の変化に対して、個体の密度効果はあるのでしょうか。

回答 堀上 英紀(法政大・教養・生物)

アメーバ・プロテウスでは個体密度を上げると互いに遭遇した後、並進行動を示したり、個々の軌跡が区別できなくなります。

質問 重中 義信(広島大・総科・細胞生物)

暗黒下で一匹のみの行動をみたとき右廻りに歩くということですが、この実験を南半球で行ったとき左廻りとなる可能性があるでしょうか。

回答 堀上 英紀(法政大・教養・生物)

コリオリの力に反応しているか否かはよくわかりません。

23. アメーバ・プロテウス系統間の生理学的比較

月井 雄二, 木原 章, 石井 圭一

法政大学教養部生物学研究室

Physiological comparison among strains of Amoeba proteus

Yuuji Tsukii, Akira Kihara and Keiichi Ishii

Laboratory of Biology, Hosei University

アメーバ・プロテウス、およびその近縁種では有性生殖が知られていないため、遺伝学的に種を判別することができない。一方、形態的特徴に基づく分類は、種内変異と種間変異の境界があいまいで、研究者により分類の仕方が一定していない。

我々は、従来の基準によりアメーバ・プロテウスとされるいくつかの株を用い、これまでに熱抽出タンパク質、核酸などの生化学的特徴に関して株間の比較を行ってき

た。これまでに、調べた6つの株(A, F, G, K, S, T)のうち、F株を除いた他はすべて熱抽出タンパク質、および核酸の成分に株間の違いは見られなかった。F株には他の株と異なるたんぱく質が2~3種認められ、また、細胞質内に2重ラセンRNA(dsRNA)が検出された。

今回は、テトラヒメナを餌としKCM溶液中で培養したA, F, G, H, S, T株を用いて、諸々の生理学

的特徴に関する比較を行った。その結果、薬剤（抗生物質・その他）に対する反応では系統間に違いは見られなかったが、分裂速度、細胞のサイズ、運動形態、運動性などに違いがみられた。

1) 20℃と30℃で分裂速度を比較したところ、F以外では30℃で速度が1.2～3.0倍促進された。Fは20℃での分裂速度は最低であり、また、30℃では分裂が抑制され、熱感受性であることがわかった。

2) 形態観察からは、Fは他の株に比べて細胞の大きさの変異が著しいことが認められた。そこで、給餌後2日目の細胞をコンピューターに画像入力し、画面上に表示された各々の細胞像を構成する画素数（面積）を各株間で比較した。その結果、Aの面積の変異幅が最も少なく、細胞のサイズが均一であることがわかった。一方、Fの面積は平均値が最大で、変異幅は他株の倍以上あった。そこで、F細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、12～13%の細胞が多核だった。これらの結果から、Fは細胞質分裂に異常があることが判明した。

3) つぎに、細胞の外周を構成する画素数を細胞全体を構成する画素数（面積）で割った値（外周/面積）を求め、単位面積あたりの細胞の外形の複雑さを比較した。その結果、あきらかにTが他の株に比べて複雑さの度合いが高いことがわかった。これは、仮足の数の多さなど形態観察の結果と一致した。

4) 最後に、細胞の基質上での運動性について比較した。シャーレに細胞をおき2分間隔で3回撮影した。その軌跡が一細胞の長さより大きい場合は、撮影の間移動していたとし、そうでない場合は動かなかったとして、移動した細胞の割合の経時変化を株間で比較した。

Fは、ガラスシャーレにくらべて疎水性の強いプラス

チックシャーレ（Corning 25020, Falcon 3002）でも変わらずに移動できたが、他の株は、シャーレ上で次第に動かなくなった。Corning 25020上では、F、G、Tは移動したが、A、Sはシャーレに移してから45～50分後、30～50%の細胞が基質上で動かなくなった。また、より疎水性の強いFalcon 3002上では、F以外の株は50～80%の細胞の動きが止まった。細胞の移動が停止するのは、アメーバ細胞の疎水性の接着が強まることによると思われる。したがって、これらの結果から、アメーバ・プロテウス株間には疎水性の接着力に違いがあり、とくにFが最も疎水性の接着力が弱いことが示唆された。

以上のように、比較した6つの株は、増殖速度、細胞のサイズ（面積）、形態の複雑さ（外周/面積）、疎水性基質上での運動性などに各々違いが認められた。特に、細胞質内にdsRNAを保持するF株には、増殖速度が低い、分裂異常である、疎水性の接着が弱いなど、際だった特徴が認められた。

質問 小山 力（予研・寄生虫）

アメーバ・プロテウス系統間の生理学的比較をなさっていますが、種間となるとこの生理学的性状の差異はもっと大きくなるのでしょうか、アメーバ属の中の種の同定は難しいと思われるのでおたずねします。

回答 月井 雄二（法政大・教養・生物）

要旨にもあるように、アメーバは遺伝学的に種を判定することが困難であり、形態的にも種の判定規準が研究者によりまちまちです。そのため、我々は、まず、種内変異がどの程度あるかを調べ、その上で近縁種と考えられるサンプルとの間にどれ程の差があるかを知りたいと考えています。

24. Acanthamoeba のミトコンドリア DNA の strain 差

八木田 健司, 遠藤 卓郎

国立予防衛生研究所寄生虫部

Biochemical characterization of strains of Acanthamoeba isolated from human eye and soil

Kenji Yagita and Takuro Endo

Department of Parasitology, National Institute of Health

Acanthamoeba は従来より分類同定の難しさが指摘されている。一方、Acanthamoeba は自由生活性のア

メーバでありながら、ときとしてヒトに感染し髄膜炎や、最近では特にコンタクトレンズの使用と関連して眼に感染し角膜炎の原因にもなるなど、少なからず病原性のあることが知られている。従って、その病原性の解明、さらには的確かつ迅速な診断を行う上でも、確定的な分類法が必要とされている。

基本的には *Acanthamoeba* の分類同定は形態学的に行われており、重要な特徴が指標として用いられている。しかし我々の予備的実験から明らかになったことであるが、分類上重要な指標である ray の数は培養温度により変化する性質を持っており、形態学的分類のためには培養条件等を厳密にすることが要求される。そこでより恒常的な形質を用いて明確な特徴を調べる方法が望まれるが、我々はその一つとして、ミトコンドリア DNA のフラグメントパターンを利用した分類法を検討している。その利点は、DNA が恒常的形質であること、mtDNA はそのままの形で分離できること、そして mtDNA は核 DNA に比べ変異が大きいことであり、特に近縁関係にある種類を分類するのに有効とされている。方法としては、mtDNA を制限酵素で分解し、生じたフラグメントを電気泳動してそのパターンを調べ比較するというもので、既に多くの生物種で利用されている。*Acanthamoeba* においてもいくつかの分離株については、そのフラグメントパターンが明らかにされており、病原性も含めた同定も可能ではないかといわれている。現在、我々は本邦初例のアメーバ性角膜炎患者の角膜より分離したものを含め、いくつかの分離株についてフラグメントパターンを明らかにし、分離株間の関係を調べるのに利用している。今回は、これまで明らかとなった結果について報告する。

〈方法〉 アメーバは大腸菌塗布寒天プレートを用いてサンプルより分離、クローン化した後、PYGC 液体培地で無菌培養した。mtDNA は細菌のプラスミドを分離する方法として用いられるアルカリ溶解法で抽出した。則ち、アメーバをアルカリ性 SDS 溶液で溶解し、酢酸カリウム溶液を加え核 DNA 及び RNA 等を沈殿させた後、上清を除タンパク処理し、エタノール沈殿法により mtDNA を回収した。mtDNA は常法により制限酵素処理を行い、電気泳動によりフラグメントパターンを調べた。今回調べたクローンは第 1 例患者の患部角膜及びコンタクトレンズ保存液からの 2 クローン、別の人のレンズ保存液から分離した 1 クローン、そして自由生活性のものであり、土壌より分離した 3 クローンの計 6 クローンであった。

〈結果〉 栄養体及びシストの形態的な違いは土壌から

のクローンを除き、ほとんどなかった。各クローンの mtDNA のサイズは、土壌分離のうち形態的に異なるクローンから通常サイズより大きな DNA (約 53 Kbp) が検出されたが、残りの 5 クローンからは約 41 Kbp の mtDNA が分離された。

数種の制限酵素について各クローンのフラグメントパターンを調べた結果では、角膜からのクローンと大きな DNA の分離されたクローンではそれぞれ固有のパターンを示した。これに対し、レンズ保存液由来の 2 クローンと土壌分離の 2 クローンの計 4 クローンの mtDNA では同一のパターンを示すことが明らかとなった。これを既に報告されている他の分離株のパターンと比較したところ、驚いたことに角膜由来 (病原性) のものは非病原性の *castelanii* strain と一致し、一方 4 つのクローンが示したパターンは、海外で角膜より分離された *ma* strain と一致するというまったく入れかわった結果を得た。ただし、*Acanthamoeba* の病原性については不明点が多く、どのアメーバにも潜在的に病原性があるという意見が主流を占めており、今回の結果はこれを示唆するものとして注目している。

質問 小山 力 (予研・寄生虫)

今度得られたミトコンドリア DNA のフラグメントパターンを文献的に調べると、病原性に関して外国の成績との間で、多少の狂いがあるとお話ですが、得られた strain についての病原性について更に検討すれば、無理なく説明し得るものかも知れぬとお考えのようですが、そう理解してよろしいでしょうか。つまり、現在非病原性と考えているものが実は病原性のものであるかも知れぬ、また、その逆かも知れぬというように。

回答 八木田 健司 (予研・寄生虫)

ミトコンドリア DNA のフラグメントパターンは分類の指標としては有効と考えていますが、病原性を同定するための手段では今のところありません。しかし、その可能性を知ることはできると思われ、疑いのある strain については、マウスを用いた実験感染で病原性の有無を確認することで、このアメーバの病原性を明らかにできるのではないかと考えています。

質問 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)

海外で分離された株を比較しておられますが、日本におけると同様角膜から分離されたものでしょうか。

回答 八木田 健司 (予研・寄生虫)

分離 source は、実際にアメーバ性角膜炎をおこした患者の角膜です。

補足 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

本原虫症の診断に際しては病理切片上などで得られたアメーバのシストの形態はかならずしも分類上の特徴を表していない。そこで患者からアメーバを分離する必要があろうと思います。我々は目下ミトコンドリアDNAを分類に用いるよう工夫しているところです。

補足 石井 圭一 (法政大・教養)

Acanthamoebaの病原性の判定は、その株が患者から得られたものであるか否かを問わず、マウスに対する感染実験の結果により判定する……というやや特殊な習慣があるように思われます。

25. トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) の補体結合能について

小俣 吉孝, 中林 敏夫

大阪大学微生物病研究所原虫学部門

Binding capacity to human C_{1q} on the parasite of Toxoplasma gondii

Yoshitaka Omata and Toshio Nakabayashi,

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

細胞内寄生原虫は、寄生するためのひとつの手段として宿主体内成分や、免疫応答を巧妙に利用することが知られている。細胞内寄生原虫のひとつである *Toxoplasma gondii* (Tg) では健康成人血清中の IgM-Class に属する Immunoglobulin (Ig) が、虫体の先端部に付着することが知られているが、その生物学的役割についてはほとんど調べられていない。

補体の一成分である C_{1q} は、抗原抗体複合体に結合し、補体経路を活性化する一方、様々な異物にも結合することが知られている。我々は、Tg 虫体にみられる非特異的 Ig 結合と補体結合性について検討する目的で、ヒト C_{1q} 成分の虫体結合性について間接蛍光抗体法、およびイムノプロットング法にて検討を行った。

RH 株、および S273 株虫体をマウス胎仔細胞にて培養し、培養浮遊液から得られた Endozoite を PBS にて洗浄後、実験に供した。Cyst および Cystozoite は、S 273 株感染マウス脳から percoll を用いて Cyst を分離し、50 mM 酢酸 buffer - saline. 中で 37 °C, 30 分処理後、PBS で洗浄した。Spolozoite は、S 273 株感染ネコから得られた oocyst を 0.5 % タウロコール酸ナトリウム含有 PBS 中で 37 °C, 30 分処理後、percoll を用い、分離を行った。ヒト新鮮血清は、- 70 °C に保存し、蛍光抗体法で抗 Tg・IgG 抗体価が 16 倍以下のものを実験に用いた。ヒト精製 C_{1q} (ヒト C_{1q}) およ

び抗ヒト C_{1q}・ウサギ血清は、奈良医大・細菌学教室・米増國雄氏より提供された。抗ヒト C_{1q} および FITC-標識抗ウサギ IgG・(Fab)₂ 分画は、固定虫体を用いて吸収操作を行い、虫体への非特異的結合の除去を行った。

間接蛍光抗体法には、1 % - paraformaldehyde 含有 PBS (pH 7.2) による固定処理 (4 °C, 15 分) を施した虫体の塗抹標本、および未固定虫体浮遊液を用い、被検血清、および抗体を各々 37 °C, 30 分反応させた。

虫体上のヒト C_{1q} の存在を確認するため、イムノプロットング法による検索を行った。固定処理虫体 (2 × 10⁷) をヒト新鮮血清、あるいはヒト C_{1q} と 37 °C, 30 分 incubate した後、遠心洗浄し、SDS - PAGE 用 sample buffer (4.6 % SDS, 10 % 2 -メルカプトエタノール, 12.5 mM Tris - HCl pH 6.8) にて加熱処理 (100 °C, 3分) 後、10 % gel による SDS-PAGE を行い、次いでニトロセルロース膜に転写後、抗ヒト C_{1q} およびペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG・(Fab)₂ 分画を反応させ、3,3'- Diaminobenzidine・4 HCl にて呈色を行った。

間接蛍光抗体法による観察では、ヒト C_{1q} で incubate した RH 株、および S 273 株 Endozoite の虫体全域に特異蛍光が認められ、未固定虫体においても同様の結果が得られた。また、S 273 株感染マウス脳から得られた

Cyst および Cystozoite, 同株培養浮遊液中の Cyst-like body 中の Cystozoite にも同様の特異蛍光が認められた。特異蛍光の認められるヒト C_{1q} 最終濃度は、60 ng/ml であった。一方、Sporozoite は、Endozoite や Cystozoite に比較し、特異蛍光は乏しく、ヒト C_{1q} 最終濃度は 240ng/ml であった。

イムノブロッティング法による検索では、ヒト新鮮血清、およびヒト C_{1q} と incubate した虫体に分子量 28 ~ 34kD の broad な band が検出され、ヒト C_{1q} の泳動位置と一致していた。一方、虫体のみでは、特異 Tg band は検出されなかった。

実験に用いたヒト C_{1q}, および虫体自身にはヒト Ig 分子が検出されなかった事、虫体上のヒト IgM 結合部

位とヒト C_{1q} 結合部位とは局在部位が異なる事から、ヒト C_{1q} 分子は抗体非依存的に Tg 虫体表面に付着する事が示唆された。虫体膜表面上の C_{1q} 付着物質、および付着した C_{1q} の果たす役割については、今後の検討が必要である。

質問 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)

C_{1q} と虫体とを反応させた後の Western immunoblotting において C_{1q} に相当する位置以外に反応がみられますか。

回答 小俣 吉孝 (大阪大・微研・原虫)

みられませんでした。おそらく SDS 処理により C_{1q} と結合物質とは解離したものと考えております。

26. トキソプラズマ主要膜抗原に対するモノクローナル抗体の作製と 同抗原の血清診断法への応用

牧岡 朝夫, 小林 昭夫

東京慈恵会医科大学寄生虫学教室

Generation of a monoclonal antibody to a major membrane antigen of Toxoplasma gondii and application of the antigen to serodiagnosis

Asao Makioka and Akio Kobayashi

Department of Parasitology, Jikei University School of Medicine

トキソプラズマ (Tp) 増殖型虫体の主要膜抗原として分子量 3 万の蛋白 (P30) が知られている。我々はこの P30 に対するモノクローナル抗体 (mAb) の作製を行うとともに、P30 の色素試験 (DT) 抗原としての性状を検討し、分離した P30 を用い、ラテックス凝集反応 (LA) を試みた。mAb の作製には Tp ゴースト免疫マウスを用い、常法に従い、3 クローン (3 D11, 1 B 5, 2 D11) が得られた。このうち、1 B 5, 2 D11 抗体は LA 陽性、DT 陰性であり、3 D11 抗体のみが DT, LA とも陽性で、IgM 抗体であった。そこで、3 D11 接種マウスの腹水から、硫酸分画、ゲル濾過により、IgM を精製した。この抗体は、蛋白濃度 0.5 mg/ml で DT 4,096 倍、LA 16,000 倍を示した。ビオチン化 3 D11 抗体を用い、アビジン・ビオチン反応により、対応抗原の

局在を検討したところ、虫体表面膜に局在していることが確認された。一方、調製した Tp 粗膜抗原を用い、イムノブロッティングを行ったところ、この抗体は分子量 3 万の蛋白と反応することが明らかになり、これらの結果から、この抗体は P30 を認識していることが確認された。次に、P30 の Tp 抗体との反応性を Tp 粗膜抗原を用いたイムノブロッティングにより検討した。種々の DT 抗体価の血清と反応させたところ、P30 は、他の膜抗原に比し、DT 抗体価の上昇に伴い、その反応性が増加した。また、これに関連して、種々のヒト抗 Tp 血清と P30 との反応性を調べたところ、P30 は DT 陽性血清との反応性がよいことがわかり、これらの結果から、P30 は DT 抗原として重要であると考えられた。そこで、mAb を用いたアフィニティークロマトグラフィー

により P30 を分離し、これを DT よりも簡易である LA の系に応用することを試みた。常法に従い、P30 をラテックス粒子に感作し、LA を行い、これと DT を比較した。被検血清 48 例につき、LA (P30) 及び DT を実施したところ、両者の定性的一致率は 93.8 % と高い値を示した。定量的には LA (P30) の抗体価は DT のそれと同じか、その $\frac{1}{2}$ 程度低く示された。以上の結果から、P30 は単一抗原として LA に応用可能と考えられた。また、特異性の問題として、この P30 は

増殖型虫体にのみ存在し、シスト型虫体には存在しないという報告があり、Tp 感染急性期と慢性期を識別する抗原としてヒト血清を用いて検討することは重要と考えられた。

質問 金田 良雅 (東海大・医・寄生虫)

この P30 は他の原虫との間での cross reactivity があるのでしょうか。

回答 牧岡 朝夫 (慈恵医大・寄生虫)

まだ調べられておりません。

27. *Toxoplasma gondii* における pellicle の微細構造の電顕観察

保田 友義

国立予防衛生研究所技術部

八木田 健司, 遠藤 卓郎

国立予防衛生研究所寄生虫部

Ultrastructural study on the pellicle of Toxoplasma gondii

Tomoyoshi Yasuda

Department of Technology, National Institute of Health

Kenji Yagita and Takuro Endo

Department of Parasitology, National Institute of Health

Toxoplasma を含め胞子虫類の表層は複雑で、外膜 (形質膜) とそれを裏打ちする 2 枚の単位膜からなる内膜構造 (以下内膜) およびその直下の表層微小管等からなることが知られている。しかしながらその機能や性質はほとんど明らかにされていない。一方、前記の構造の他に、ゴースト化した胞子虫類の表層には、網目構造からなるシート状表層骨格が見つかっている (遠藤他, 1985年寄生虫学会)。この構造は内膜とみなされ、細胞の形態保持に寄与しているといわれている。本構造は、無処理の細胞中にシート状表層骨格が見つかからないこと、また内膜は電顕的に二重の単位膜、骨格は網目構造のシートというように両者の微細形態が著しく異なっておりシート状表層骨格を単純に内膜とみなすことには問題があるように思われる。こうした問題を微細形態学的に解析し、内膜構造とシート状表層骨格の関係を明らかにするために超薄切片法を用い *Toxoplasma* の表層を詳細に観察した。

《方法》

A. 無処理細胞の固定: 1) 1% グルタルアルデヒドと 1% オスミウム酸による二重固定, 2) 3% グルタルアルデヒドと 1% パラフォルムアルデヒドの混合液で前固定した後、オスミウム酸で後固定 (カルノフスキー法), 3) 液体窒素による急速凍結および 4% オスミウム・アセトン溶液による凍結置換を行った。各処理後、アセトンで脱水しエポキシ樹脂に包埋した。

B. 界面活性剤処理: 1) 0.02% - 2% NP-40 で、4℃、5 - 15 分間処理, 2) 同濃度の NP-40 と 3% グルタルアルデヒド、1% パラフォルムアルデヒドとの混合液で 5 - 15 分間処理, 3) 上記固定液で 2 時間固定後、2% NP-40 で 15 分間可溶化処理を行った。各処理後、カルノフスキー法で前固定、オスミウム酸で後固定後エポキシ樹脂に包埋した。

《結果》 以下、細胞膜を外膜、そして 2 枚の内膜のうち外膜に近い方を中間膜、遠い方を最内膜と便宜上表現した。

無処理: 急速凍結すると外膜も内膜も比較的起伏の

少ない滑らかな層状構造を呈した。内膜は、2枚の単位膜が密着し、電子密度の高い、従って暗い層と電子密度の低い明るい層からなる5層構造として観察された。2枚の内膜は、どちらもよく保存されていた。しかし、化学固定では、ときどき中間膜に限って小さな人為的な崩壊像が見られた。同じ内膜でも、中間膜と最内膜では化学固定に対する抵抗性が違うことが示され、これにより両者の構造的な違いが示唆された。

界面活性剤処理：0.02 - 0.05 %のNP-40で処理すると、中間膜が最も早く消失し、一方、最内膜は比較的良好に残った。さらに強い可溶化処理では、最内膜の単位膜構造の崩壊が進むにつれて最内膜の表面をそぐように切れた切片上に網目構造からなる表層骨格が観察できるようになった。固定後NP-40で可溶化処理を行った細胞では、外膜の単位膜構造が断片的に残った。最内膜も消失せず残ったが外膜と異なり単位膜構造が完全に失われ一層の電子密度の高い層が出現した。中間膜は著しく崩壊した。

《考察》以上の観察からシート状表層骨格は通常電顕的に識別できず界面活性剤処理によってはじめて顕在化する構造であることが示された。目下我々はこのシート状表層骨格を内膜そのものではなく2枚の内膜のうち

最内膜に存在する膜骨格であると考えてるのが妥当であると思っている。

シート状表層骨格は単に原虫の形態を物理的に補強するだけでなく、宿主細胞へ侵入する際には、原虫の体表に特有のらせん状隆起を形成させ、ちょうどネジの原理で原虫の回転運動を前進運動へ効率的に転換させる役目もしているものと考えている。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

トキソプラズマの内膜・最内膜はテトラヒメナ等でみられる alveolar sac のようなものではないですか？最内膜下のメッシュワークは膜のうらうち構造そのものではないでしょうか？

回答 保田 友義 (予研・寄生虫)

alveolar sac に相同の構造である可能性も考えられるが、その類似性については更に検討が必要と思われます。

膜のうらうち構造か、膜内骨格と考えられますが、無処理の細胞では観察されないこと、最内膜の厚さが7～8 nmであること、NP-40処理で、最内膜と同じ位置に現れることから、膜内骨格であるとの印象を受けます。

28. トキソプラズマ原虫の Actin の分布について

遠藤 卓郎, 八木田 健司

国立予防衛生研究所寄生虫部

保田 友義

国立予防衛生研究所技術部

中村 健

北里大学医学部寄生虫学教室

*Detection and immunocytochemical localization of actin in Toxoplasma gondii**Takuro Endo and Kenji Yagita**Department of Parasitology, National Institute of Health**Tomoyoshi Yasuda**Department of Technology, National Institute of Health**Ken Nakamura**Department of Parasitology, Kitazato University School of Medicine*

トキソプラズマの自動運転はもっぱら宿主細胞から遊出する際にみられ、新たな細胞へ侵入することにより停止する。我々はこの運動が外液のイオン組成により制御されていることを明らかにしてきた (Endo, et al., 1987)。今回は運動に直接関与すると思われる収縮系蛋白の検出と、トキソプラズマ虫体における分布を光学および電子顕微鏡で観察した。トキソプラズマの運動様式に関しては古くから知られており、基本的には原虫の先端部の回転運動が原動力となっていることが分っている。また、細胞へ侵入する際にはコノイドと呼ばれる構造が先端部より突出することが観察されている。我々は収縮系蛋白のうち細胞に広く存在しているとされているアクチンに注目した。すでに共同研究者の中村らは *Ascaris* (回虫) のアクチンを分離し、これを家兔に免疫することで非常に広いスペクトルを持つ抗 *Ascaris* - アクチン抗体を得ている。また、同様にニワトリ砂嚢に対する抗体も得て、本研究に用いた。

アクチン様蛋白の検出： トキソプラズマの虫体蛋白を SDS-PAGE, さらに immuno-blotting によりアクチン様蛋白の検出を試みた。その結果、トキソプラズマの虫体蛋白の中には回虫、ニワトリ骨格筋、および

砂嚢など他の動物のアクチンと同程度の泳動距離をもつ蛋白が存在しており、さらに、これが特異的に抗-アクチン抗体に対して反応することがわかった。

間接蛍光抗体法によるアクチンの分布： 感染マウスの腹水より採集した細胞外のトキソプラズマを対称に抗-アクチン抗体を作用させたところ、虫体の一端にのみ特異蛍光が観察された。しかしながら、この方法では虫体の先端部が染まったのか、それとも後端部が染まったのかは判別できなかった。そこで、マウスの肺の初代培養細胞にトキソプラズマを感染させ、原虫が4-8個にまで分裂した時期に抗-アクチン抗体による反応を行った。この時期のトキソプラズマは宿主細胞のなかで先端部を外側にして奇麗に菊花状に配列するので、虫体の前後を決定することができる。その結果、蛍光は先端部に集中しており、すなわち、アクチンはもっぱら虫体先端部に分布することが明らかとなった。アクチンは体前方 $\frac{1}{3}$ まで分布するようであるが、それ以降では検出できなかった。

プロテイン-A・金コロイド免疫電顕法によるアクチンの分布： プロテイン-A・金コロイド免疫電顕法を用いて詳細な検討を行った。アクチンの存在を示す金コ

ロイド粒子はトキソプラズマ原虫の体前端に位置する細胞器官である Apical complex を中心にして特異的に分布していた。詳細に検討すると、コロイド粒子は conoid や apical ring 自体に集中的に分布していると同時に、conoid と apical ring との接点にも多く観察された。さらに体前端部付近の pellicle に沿っても観察され、pellicle を裏打ちするような形で分布していた。トキソプラズマを含め孢子虫類の特異的構造とでもいうべき pellicular microtubules との関連については興味あるところであるが、目下詳細に検討中である。また、界面活性剤 (NP-40) 処理により得られるトキソプラズマの pellicule 標本においても同様に反応を行った。興味あることに、反応は寧ろ強く起こり、先端部の pellicule 構造には何倍ものコロイド粒子が認められた。その分布様式は無処理の虫体と同様であった。このことから pellicle に局在するアクチンは構造と強く結びついているものと推測される。

基本的には、その他の細胞小器官や核内には金コロイドの分布は認められなかった。例外的に、rhoptry にコロイド粒子が認められた。しかしながら、無処理の対

照においても rhoptry だけには非特異反応が認められており、現段階ではこの構造に関して特異性を判断できないでいる。

いずれにせよ、トキソプラズマの運動の中心が先端部にあることとアクチンの分布がこれに一致するという事実関係は興味深いところである。

質問 渡辺 良雄 (筑波大・生物)

トキソプラズマの虫体の先端部にアクチン抗体で反応するものがあることを示されましたが、NP-40 モデルを用いて ATP で収縮をおこさせるようなことを試みられましたか？

回答 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

今後検討させていただきます。

質問 堀上 英紀 (法政大・教養・生物)

虫体先端部にみられるマイクロチューブスとアクチンと、虫体の行動との関連性はいかがなものでしょうか？

回答 遠藤 卓郎 (予研・寄生虫)

目下、この関係について検討しているところです。アクチンの分布に関しては何か新しい方法を導入して分解能を上げる必要があらうかと考えています。

29. ディディニウムのシスト形成における陽イオンの効果

上野 貴将, 浅井 博

早稲田大学理工学部物理学教室

The effect of potassium ions in encystation of Didinium nasutum

Takamasa Ueno and Hiroshi Asai

Department of Physics, Waseda University

繊毛虫ディディニウムは、ゾウリムシを特異的に捕食することで知られているが、飢えた状態で放置しておくことでシストを形成する。我々はこのシスト形成が、ペニシリンGカリウムによって、著しく促進されるという現象を発見した。そこで研究を進めた結果、その原因がカリウムイオンであるという結果を得たので、ここに報告する。

〈方法〉

まず、あらかじめクローニングしておいたディディニウムを、ワラの浸出液中で培養したゾウリムシに植えつき、30°Cで incubate する。ディディニウムがすべてのゾウリムシを食べ終わった後、培養液を standard buffer

(SB) (1 mM CaCl₂, 10 mM imidazole, pH0.7) を含む試験溶液で十分に洗う。それを 10ml ずつ 2 つのペトリ皿に移し、22 °Cで 24 時間以上 incubate する。そして、72 時間後にシストの数を数える。

〈結果〉

(1) ペニシリンGカリウムの濃度を変化させ、シストの形成率を測定すると、それを全く加えないときには、シストが形成されないが、約 0.2 mM で最高値 (60%) に達した。その半分の値を示す濃度は 30 μM であった。また、同じ実験をナトリウム塩について行った結果、この現象は見られなかった。そこで、この現象の原因はカリウムイオンであると考えた。

(2) KCl 濃度を变化させ、シストの形成率を測定した結果、 K^+ free 溶液 (SB のみ) では、シストは形成されず、KCl 60 μ M で最高値 (70 %) に達した。その半分の値を示す濃度は 30 μ M であった。そして、酢酸カリウム、臭化カリウム、硫酸カリウムを使った場合にも同様の結果が得られた。しかし、カリウムと同族の Li, Na, Rb, Cs およびイオン半径がカリウムと近い NH_4 ではこの現象は見られなかった。このことより、ディディニウムのシスト形成には、外液中にカリウムが存在することが必要であり、陰イオンには関係がないと思われる。

(3) Ca^{2+} 濃度がディディニウムのシスト形成に与える影響を調べた。SB 中の Ca^{2+} 濃度を 10 mM, 0.1 mM にし、それぞれについて(2)と同様の実験を KCl について行った。その結果、 Ca^{2+} 濃度は、シスト形成率には、ほとんど関係がないと考えられる。ただし、外液を Ca^{2+} free または Ca^{2+} を Mg^{2+} に代えると、細胞が lysis してしまうので、ディディニウムの細胞構造の維持には Ca^{2+} が必要であると思われる。

(4) この現象に対し、カリウムの効果を阻害するような物質があるかどうかを調べた。使用した物質は、LiCl, NaCl, RbCl, NH_4 Cl および既知のカリウムチャンネル阻害剤である。塩化テトラエチルアンモニウム (TEA Cl) と 4 - アミノピリジン (4 - Ap) である。この際、すべての試験溶液は、0.5 mM KCl を含む SB で行っている。

その結果、NaCl, LiCl, TEA Cl では、各々 10 mM まで KCl の効果に対する拮抗は見られなかった。CsCl の濃度が 5 mM 以上においては、24 時間以内にほとんどの細胞が死んでしまったため、シストの形成は、ほとんど見られなかった。しかし、RbCl, 4 - AP, NH_4 Cl では 5 mM において、それぞれ control に対し 70 %, 50

%, 20 % の阻害効果が認められた。

(5) K^+ がどの時点で必要なかを調べるため、次のような 2 つの実験を行った。④ 0 時間において、KCl 0.5 mM を含む SB で洗ったものを 4 つ用意し、22 $^{\circ}$ C で incubate する。まず 1 時間後にそのうちの 1 本を取り出し、それを 2 つに分け、片方を control として KCl 0.5 mM を含む SB (0 時間と同じ溶液) で洗い、もう一方は KCl free 溶液で洗う。それをペトリ皿に移し、22 $^{\circ}$ C で incubate する。そして、72 時間後にシストの数を数える。これと同じことを 3, 6, 12 時間後に行う。それぞれについて、control との比較において、シスト形成率の変化を追った。⑤ ④と逆の実験で、0 時間において K^+ free 溶液で洗い、1, 3, 6, 12 時間後にそれぞれ KCl 0.5 mM を含む SB で洗った。

④と⑤の実験結果をを総合すると、buffer で洗浄後、3 時間から 12 時間以降にかけての長い時間にわたって、 K^+ は必要であることがわかった。

以上の結果により、以下の 2 点を推測することができる。① ディディニウムの膜表面には K^+ に対する特異的な結合部位が存在すること。② シスト形成という形態変化を伴う一連の反応において、その部位に K^+ が結合していることが必要であること。

さらに、その結合部位の特徴として、 K^+ に対する特異性が高いことが挙げられる。

質問 堀上 英紀 (法政大・教養・生物)

1. 用いたディディニウムの種名は何ですか。
2. 人工的に encyst させたものと自然の cyst とでは excyst 率に差がみられますか。

回答 上野 貴将 (早大・理工・物理)

1. *Didinium nasutum* を用いた。
2. 観察した結果差は見られない。

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 本会は原生動物に関する研究をすすめる、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(学生の場合は2,000円)を前納するものとし、会の主催する各種の会合に参加し、幹事を互選し、会誌に投稿し、会誌の無料配布をうけることができる。賛助会員は本会の主旨に賛同し、会の維持発展のため1口10,000円以上を納入するものとし、会誌の無料配布をうけることができる。名誉会員は幹事会の推薦により総会において決定する。
- 第5条 本会運営のため、会長1名、幹事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. 本会の事務所は当分の間、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。

原生動物学雑誌 第22巻第1号

The Japanese Journal of Protozoology Vol. 22 No. 1

平成元年5月15日 印刷

平成元年5月25日 発行

編集兼発行人：藤田 潯 吉

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・FAX (075) 712-5432

Office of the Editorial Board

c/o Department of Biochemistry, Gifu University

School of Medicine

Tsukasamachi 40, Gifu, 500 Japan