

³H-thymidine ラジオオートグラフィーによる
Trypanosoma gambiense および
Trypanosoma evansi の DNA
 合成の検討

猪木正三 小野忠相

大阪大学微生物病研究所原虫学部

(1969年3月19日 受領)

緒言

Trypanosoma gambiense (以下 Tg と略) はアフリカ睡眠病の病原体であり, *Trypanosoma evansi* (以下 Te と略) は家畜のズルラ病の病原体である. これらはいずれも住血鞭毛虫であつて, 鞭毛起始部に近く2つの細胞器官, すなわち Kinetoplast (以下 K と略) と Blepharoplast をもっている. この実験で問題となる K は約 1 μ 大の自家増殖性顆粒であつて, 電子顕微鏡で観察すると中に「らせん」状に彎曲した紐状構造物が認められる. K は細胞の分裂に際して核よりも先に分裂する.

1953年以來, 猪木らはこの K について遺伝学的な研究を行つており, Tg あるいは Te に感染したマウスに *p*-rosaniline, rosaniline および acriflavine など DNA と結合する性質をもつた薬剤を注射すれば, 薬剤の直接作用で K を失つた原虫即ち AK 型原虫が生ずることを実験的に証明した (Inoki, 1956; 坂本, 1963). このようにして誘発された Tg と Te の AK 型原虫は形態的に全く同じであるが, 前者の AK 型原虫は増殖不可能であり, 後者のそれは増殖可能であるという顕著な差異が認められる (Inoki *et al.*, 1960). AK 型原虫は akinetoplasmic 型としてその名が示す如く, K を欠如した原虫であり, 本来ならば鞭毛起始部に染色される小体が染色されない原虫である. ところが AK 型原虫を電子顕微鏡で観察すると, 鞭毛起始部に内部の構造は崩壊しているが二重膜によつて包まれた K が依然として存在することが見出された (Mühlpfordt, 1963 a, b; 猪木・菅沼, 1964, 1965). また Trager & Rudzinska (1964) は *Leishmania tarentolae* において同じような所見を得て

いる. だから Tg および Te の AK 型原虫において, 上記の K 類似小体が果して DNA 合成を行つているかどうかに興味ある問題となる.

そこで ³H-thymidine ラジオオートグラフィーにより, まず Tg および Te の K 型原虫 (K のある原虫) では K における DNA 合成はどのように行なわれ, これと核における DNA 合成との関係はどうなつているか, 次いで Tg と Te の AK 型原虫においてそれぞれ K 類似小体と核で DNA 合成が起つているかどうかを検討した. 特にこの場合, Te では AK 型原虫が増殖可能で AK 型のクローンが得られているから K 類似小体が DNA 合成を行なうかどうか, また前者即ち Tg では AK 型原虫が増殖不可能であるが, 果して核での DNA 合成は可能かどうかに興味をもたれた.

実験材料および実験方法

1. Tg 株および TeK 株における ³H-thymidine の「とり込み」

この実験には Tg の Welcome 株 (以下 Tg 株と略) および Te 台湾株の K 型原虫株 (以下 TeK 株と略) が用いられたが, いずれも *p*-rosaniline 感性株であつて自然の状態における AK 型原虫の出現率は前者は 1% 以下, 後者は 5% 以下である. この実験に用いた両種の原虫は 1 匹釣 (Inoki, 1960) を行ない, 遺伝的に純なクローンとして実験に使用したが, いずれも *in vitro* で培養が不可能なため, 実験は総て *in vivo* で行なつた. 実験動物は大阪大学純系動物事業場から供与された体重 20 g の ddO 系マウスを用い, 原虫接種 3~4 日後, マウスの末梢血中に $2 \times 10^5/\text{mm}^3 \sim 3 \times 10^5/\text{mm}^3$ の原虫

を認める時、尾静脈内に ^3H -thymidine-6T (Spe. act. 5 c/mM) を注射し、1時間後 11×45mm のカバースリッパに血液塗抹標本を作った。注射した ^3H -thymidine の量は Tg 株の場合は 34 μc /20g マウス量、TeK 株の場合は 40 μc /20g マウス量であった。標本は総てメタノール固定を施し、乾燥後、2%過塩素酸水を用いて4°Cの下で40分間処理し、合成反応にあずからなかつた ^3H -thymidine を除去した。標本を感光乳剤に接触させる手技については従来より多くの方法が考案されているが、この実験では標本を乳剤中に浸す dipping 法を用い、感光乳剤は Kodak NTB3 を蒸留水で2倍に稀釈して使用した。dipping を行なつた標本は Kato *et al.* (1963) の考案による穴あき短試験管におさめ、その後、あらかじめ底にシリカゲルを入れた罐に入れ、4~6°Cの低温室で露出を行なつた。この場合、罐の蓋のすきまは光線を防ぎ、また外部の湿気が侵入するのを防ぐ目的で黒テープをもつて完全にシールした。標本は70日間露出後、とり出して現像した。現像液は Kodak D 19b を用い、18°C で5分間現像した後、定着液に10分間浸し、その後よく水洗した。得られた標本は乾燥後、ギムザ染色を施し検鏡した。トリパノソーマ科の原虫にみられるKは原虫の分裂に際して核に先んじて分裂を始めることは既に述べた通りである。従つて血液塗抹標本中にみられる原虫はKおよび核の数によつて次の3型に分けられる (Inoki, 1956)。すなわち最も幼若なものはKが1つで核も1つの原虫(1K1N, 以下I型と略)、次はKは分裂して2つになつているが核はまだ分裂せず1つの原虫(2K1N, 以下II型と略)。更に分裂した型はKが2つで核も2つの原虫(2K2N, 以下III型と略)である。Tg 株の標本ではI型は77.8%、II型は15.9%、III型は6.3%の割合で見出され、TeK 株では約5%の割合でAK型原虫が認められ、残りの約95%はKのあるいわゆるK型原虫である。後者にはI型は86.5%、II型は8.1%、III型は5.3%含まれていた。なお、TeK 株のAK型原虫における分裂型原虫出現率は5.6%であつた。検鏡に際してはそれぞれの原虫についてKおよび核における銀粒子沈着の有無を検討したが、Tg 株ではI型原虫1,000個、II型原虫400個、III型原虫250個、またTeK 株ではI型原虫1,200個、II型原虫400個、III型原虫250個、AK型原虫500個について観察した。

2. TeAK 株のAK型および色素により誘発されたTg 株のAK型における ^3H -thymidine の「とり込み」

この実験は Te のAK型クローン(以下TeAK株と略)およびTg株のAK型原虫における ^3H -thymidine の「とり込み」を調べることを目的として行なつた。

Tg 株のAK型原虫はTeのそれと違つて増殖出来ず、しかもマウス感染におけるAK型原虫の出現率は1%以下である。従つてTg株のAK型原虫は色素によつて誘発されたものについて実験した。すなわちTg株に感染したマウスの腹腔内に *p*-rosaniline 10 mg/kg マウス量を注射し、24時間後AK型原虫が50%以上誘発された状態で ^3H -thymidine (^3H -thymidine-6T, Spe. act. 5 c/mM) 3.45 μc /g マウス量を20gのマウスの尾静脈に注射し、1時間後、11×45mmのカバースリッパに血液塗抹標本をとつた。他方、TeではTgと異なりAK型原虫が増殖可能である。従つて、Kを欠如したいわゆるAK型原虫のクローンが得られ、これをマウスに継代維持することが出来る。それ故、TeAK株では *p*-rosaniline によつてAK型原虫を誘発する事なく、そのまま実験に供した。 ^3H -thymidine はTgの実験に用いたものと同様であり、4.4 μc /g マウス量を20gのマウスの尾静脈に注射し、1時間後、上記のカバースリッパに血液塗抹標本を作つた。2%過塩素酸水による標本の処理方法、用いた感光乳剤、これによる dipping の方法は、いずれも実験1と同様であるが、感光乳剤はここでは原液を使用した。

標本の露出日数はTeAK株では37日、Tgでは86日であつた。使用したTeAK株は総てAK型原虫であり、その中2核をもつ分裂型原虫は5%の割合に含まれていた。Tgでは *p*-rosaniline によるAK誘発試験を行なつており、AK誘発試験24時間後にはAK型原虫が53.3%に見出された。それ故、Kをもつた原虫は残りの46.7%であるが、その中I型原虫は81.9%、II型は7.3%、III型は7.6%認められた。その他、*p*-rosaniline によつてKの分裂が阻害された原虫、すなわち1つのKと2つの核をもつた原虫(1K2N)が色素誘発24時間後においても3.2%見出された。

なお、Tg株に53.3%認められたAK型原虫のうち、2核すなわち分裂型原虫は6.0%であつた。次に調べた原虫の数であるが、Tg株ではI型原虫1,000個、II型原虫500個、III型原虫500個、AK型原虫1,000個であり、1K2N原虫は150個を調べた。なお、TeAK株はAK型原虫のみであり1,900個を観察した。

表1 分裂過程における核および Kinetoplast の DNA 合成

| 分裂過程 | | I 型** | II 型 | III 型 |
|-----------|-----|--------|------------------|------------------|
| DNA 合成の有無 | | (1K1N) | (2K1N) | (2K2N) |
| K- | N-* | 50.6% | 6.5% | 9.6% |
| K+ | N- | 8.2% | 1.3% (2.0%) | 0.1% |
| K+ | N+ | 19.9% | 12.3% (33.8%) | 2.0% (8.8%) |
| K- | N+ | 21.3% | 57.8% | 79.2% (81.6%) |

* ラジオオートグラフィーによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す.

** I 型 (1K1N) は1つの Kinetoplast (K) と1つの核 (N) をもった原虫を示す.
括弧内の数字は2つの Kinetoplast の中, 1つが+, あるいは2つの核の中1つが+の原虫を加えた場合の百分率.

実験成績

1. Tg 株および TeK 株における ^3H -thymidine の「とり込み」

表1は Tg 株 (写真1参照) の, 表2は TeK 株 (写真2参照) のそれぞれKと核における ^3H -thymidine の「とり込み」を示したものであり, 括弧内の数字はKを2つあるいは核を2つもった原虫で, そのKまたは核の1つに「とり込み」があれば+に含めて算出した百分率を示している. 原虫はKおよび核における ^3H -thymidine の「とり込み」の有無によつて次の4群, すなわち K-N-(Kにも核にもとり込みがない), K+N-(Kにのみとり込みがある), K+N+(Kにも核にもとり込みがある), K-N+(核にのみとり込みがある)に分けることが出来るが, 両種原虫のいずれにおいてもKついで核と分裂する原虫の形態的变化, すなわち I 型 (1K1N) から II 型 (2K1N), ついで III 型 (2K2N) への変化に伴つて ^3H -thymidine の「とり込み」に相違が認められた. それは Tg 株と TeK 株でほぼ同じ傾向を示したが, Tg 株では原虫の分裂経過に伴う ^3H -thymidine の「とり込み」の相違が TeK 株に比べて顕著であった.

また Tg 株ではマウスに注射した ^3H -thymidine の量が TeK 株に比べて少なかったにもかかわらず, Kあるいは核に thymidine をとり込んでいる原虫の数は多かった. まず表1は Tg 株のKおよび核における ^3H -thymidine の「とり込み」が原虫の分裂経過に伴つてどのように変化するかを I ~ III 型の原虫について百分率で示

した. 表において I 型原虫では K にも核にも「とり込み」のない原虫が50.6%あるが, 分裂の進んだ II 型, III 型の原虫では6.5%, 9.6%と極めて少なかった. これは K および核の分裂が開始されようとする時期の原虫に DNA 合成が盛んに行なわれた事を示すものと思われる. 次に K にのみ ^3H -thymidine の「とり込み」が認められる原虫 (K+N-) であるが, これは分裂が進むと共に減少しており, 核分裂が完了して2核になった III 型原虫では殆んど認められない. これに反し, 核にのみ ^3H -thymidine の「とり込み」が認められる原虫 (K-N+) は原虫の分裂経過と共に増加しており, 表1に示す如く, III 型原虫では約80%に達している. なお, I 型原虫でも核にのみ「とり込み」のある原虫が I 型原虫全体の21.3%にみられたが, これは標本の採取がマウスの静脈内に ^3H -thymidine を注射してから1時間後であるため, その間に細胞分裂がおり III 型原虫から I 型原虫になったものが含まれているためであろう. 以上の成績は原虫の分裂に際してまず K, ついで核で DNA 合成がおり, K における DNA 合成がとまった後, 核の DNA 合成がとまることを意味しているものと思われる. なお, K と核の両方に ^3H -thymidine をとり込んでいる原虫 (K+N+) について II 型原虫や III 型原虫では2つのKの1つにのみ ^3H -thymidine をとり込んでいる原虫が多く, これに反して2つの核をもつ III 型原虫ではその殆んどが2つの核に「とり込み」が見られ, 1つの核にのみ「とり込み」が認められるものは殆んど見られなかった.

表2は TeK 株の K と核における ^3H -thymidine の「とり込み」の有無を示したものであり, Tg 株と同様, I ~ III 型の原虫についての百分率で, K と核における ^3H -thymidine の「とり込み」がどのように変化するかを調べたものである. その傾向は表1の Tg 株の場合と大体一致している. 結局, TeK 株においてもまず K, ついで核において DNA 合成がおり, K での合成がとまった後, 核の DNA 合成がとまるものと思われる. 表3は TeK 株に約5%の割合で認められる AK 型原虫500個について「とり込み」の状態を観察した成績であるが, K 類似小体には ^3H -thymidine の「とり込み」が全く認められなかった.

核における ^3H -thymidine の「とり込み」は表に示す如く, 1核すなわち 1N の原虫の37.3%, 2核すなわち 2N 原虫の39.3%に見出され, また 2N 原虫で1核にのみ「とり込み」のあつた原虫が7.1% (46.4% -

表2 分裂過程における核および Kinetoplast の DNA 合成

| | | <i>T. evansi</i> (TeK 株) | | |
|-----------|-----|--------------------------|----------------|------------------|
| 分裂過程 | | I 型** | II 型 | III 型 |
| DNA 合成の有無 | | (1K1N) | (2K1N) | (2K2N) |
| K- | N-* | 68.7% | 48.3% | 48.0% |
| K+ | N- | 8.3% | 3.8% (7.8%) | 2.8% (6.0%) |
| K+ | N+ | 10.3% | 5.8% (8.8%) | 0.8% (4.4%) |
| K- | N+ | 12.8% | 35.3% | 28.8% (41.6%) |

* ラジオオートグラフィによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す。

** I 型 (1K1N) は1つの Kinetoplast (K) と1つの核 (N) をもった原虫を示す。括弧内の数字は2つの Kinetoplast の中1つが+, あるいは2つの核の中1つが+の原虫を加えた場合の百分率。

表3 AK 型原虫の核における DNA 合成
T. evansi (TeK 株中の AK 型原虫)

| DNA 合成の有無 | 1N** | 2N |
|-----------|-------|------------------|
| N-* | 62.7% | 53.6% |
| N+ | 37.3% | 39.3% (46.4%) |

* ラジオオートグラフィによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す。

** 1N は1つの核 (N), 2N は2つの核をもった原虫を示す。括弧内の数字は2つの核の中, 1核のみ+の原虫を加えた場合の百分率。

39.3%=7.1%) 認められた。

2. TeAK 株の AK 型および色素により誘発された Tg 株の AK 型における ³H-thymidine の「とり込み」

TeAK 株では1900個, また *p*-rosaniline によつて AK 誘発試験を行なつた Tg 株では1,000個の AK 型原虫について「とり込み」を調べたが, 電顕で AK 型原虫に認められる K 類似小体には ³H-thymidine の「とり込み」が全く認められなかつた (写真3および4参照)。従つて表4および表5に示した如く, AK 型原虫では核における ³H-thymidine の「とり込み」が観察の対象となる。

表4は TeAK 株の AK 型原虫の核における ³H-thymidine の「とり込み」を表に示したものであり, 1核の原虫 (1N) では33.7%, 2核すなわち分裂型原虫

表4 AK 型原虫の核における DNA 合成
T. evansi (TeAK 株)

| DNA 合成の有無 | 1N** | 2N |
|-----------|-------|------------------|
| N-* | 66.3% | 35.0% |
| N+ | 33.7% | 48.8% (65.0%) |

* ラジオオートグラフィによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す。

** 1N は1つの核 (N), 2N は2つの核をもった原虫を示す。括弧内の数字は2つの核の中, 1核のみ+の原虫を加えた場合の百分率。

表5 AK 型原虫の核における DNA 合成
T. gambiense (*p*-rosaniline により誘発した Tg 株の AK 型原虫)

| DNA 合成の有無 | 1N** | 2N |
|-----------|-------|------------------|
| N-* | 58.0% | 18.3% |
| N+ | 42.0% | 68.3% (81.6%) |

* ラジオオートグラフィによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す。

** 1N は1つの核 (N), 2N は2つの核をもった原虫を示す。括弧内の数字は2つの核の中, 1核のみ+の原虫を加えた場合の百分率。

(2N) では48.8%の原虫に「とり込み」が認められ, やはり分裂の進んだ原虫では ³H-thymidine をとり込んだものが多かつた。また分裂型原虫で2核の中, 1核にのみ ³H-thymidine のとり込みが認められた原虫は16.2% (65.0%-48.8%=16.2%) であつた。表5は *p*-rosaniline による AK 誘発試験後増加した Tg 株の AK 型原虫の核における ³H-thymidine の「とり込み」を示したものである。1N 原虫の42%, 2N 原虫の68.3%に「とり込み」が認められ, また 2N 原虫の13.3% (81.6%-68.3%=13.3%) では2N の中, 1N にのみ ³H-thymidine の「とり込み」があつた。本実験に用いた Tg 株の AK 型原虫は Inoki (1956) が指摘した如く, マウス体内で増殖不可能である。しかしこのように核分裂は行なわれ, また核における ³H-thymidine の「とり込み」も盛んであり, 「とり込み」のみられる原虫は TeK 中に5%含まれる AK 型原虫や TeAK 株よりも多かつた。次に, この実験において Tg 株の原虫における「とり込み」であるが, この実験では AK 型原虫が53.3%を占めているため, Kのある原虫は結局, 残りの46.7%ということになる。表6は AK 誘発試験を行な

表6 分裂過程における核および Kinetoplast の DNA 合成

T. fambiense (*p*-rosaniline による AK 型誘発中の Tg 株の K 型原虫)

| 分裂過程 | | I 型** (1K1N) | II 型 (2K1N) | III 型 (2K2N) |
|-----------|--|-----------------|-----------------|------------------|
| DNA 合成の有無 | | | | |
| K- N-* | | 42.7% | 33.4% | 11.6% |
| K+ N- | | 15.0% | 1.8% (2.8%) | 1.4% (1.6%) |
| K+ N+ | | 26.6% | 8.8% (13.8%) | 4.0% (10.4%) |
| K- N+ | | 15.7% | 50.0% | 68.6% (76.4%) |

* ラジオオートグラフィーによる銀粒子沈着の有無を+, -で示す。

** I 型 (1K1N) は1つの Kinetoplast (K) と1つの核 (N) をもった原虫を示す。

括弧内の数字は2つの Kinetoplast の中1つが+, あるいは2つの核の中1つが+の原虫を加えた場合の百分率。

つた Tg 株の K のある原虫について K および核における ^3H -thymidine の「とり込み」が原虫の分裂経過と共にどのように変るかを示したものであり、その「とり込み」の有無の消長は実験1に示した Tg 株や TeK 株の成績と類似していた。結局、AK 誘発試験を行なった Tg 株においても誘発操作を施さない Tg 株および TeK 株と同様、K における DNA 合成が核における DNA 合成に先行するものと解される。

なお、この実験では1K2N 原虫が標本全体の約1.5%に見出された。この型の原虫は *p*-rosaniline の作用により K の分裂が阻害された結果、K が垂鈴状として認められる原虫であり、このまま核および細胞質の分裂が進むと AK 型原虫が誘発される原虫であるが、この原虫では K-N- は22.7%, K+N- は4.7%, K+N+ は11.4% (2核中1核のみ+の原虫を加算すると21.4%), K-N+ は24.7% (2核中1核のみ+の原虫を加算すると51.3%) であった。

この原虫は2核すなわち分裂型原虫であるにもかかわらずKにも核にも ^3H -thymidine の「とり込み」のない原虫が多いこと、K-N+ では2核中1核にしか「とり込み」のみられない原虫が同じ標本中にみられる2K2N (III型) 原虫に比べて極めて多いこと、また2核すなわち分裂型であるにもかかわらずKにのみ ^3H -thymidine の「とり込み」のある原虫が多いことなどから、1K2N では原虫の分裂が或程度抑制されていることが考えられる。

考 察

トリパノソーマ科に属する原虫の細胞質にみられる K は元来、janus green に染色され、Feulgen 反応陽性の性質を示し、電顕ではミトコンドリアに似た構造が認められる (Steinert, 1960; Clark & Wallace, 1960; Inoki *et al.*, 1962). このように K とミトコンドリアは密接な関係をもつわけであるが、Nass & Nass (1963), Nass & Nass (1963) は chick embryo のミトコンドリア DNA の電顕像を調べ、この DNA はヒストンと結合していないのではないかと推定し、Steinert (1965) は細胞化学的方法で *Trypanosoma mega* の核にはヒストンが存在するが K には存在しないと述べている。また *Tetrahymena pyriformis* のミトコンドリア DNA の合成について、これは核の DNA と無関係に連続的に合成されると報告されている (Parsons, 1965). 従つてもしも K の DNA がヒストンと結合していないのならば K では DNA の合成と制御がどのように行なわれ、これと核における DNA 合成との関連はどうなっているかという事が興味ある問題となる。従来、トリパノソーマ科の原虫の K と核における DNA 合成について、2, 3 の報告がみられるが、用いられた原虫は *Trypanosoma mega* (Steinert & Steinert, 1962; Steinert & Suzanne van Assel, 1967), *Crithidia luciliae* (Steinert & Suzanne van Assel, 1967) および *Trypanosoma lewisi* (Patton & Clark, 1965) であり、Tg および Te についてはこのような実験は未だ行なわれていない。しかも *T. mega* と *C. luciliae* は培養型原虫であり、*T. lewisi* はラッテの流血中の原虫について行なわれているが、この原虫はラッテに致死感染を示さない。従つて核および K における DNA 合成の推移を調べるにはあまり適当な材料ではない。また *T. lewisi* の実験では ^3H -thymidine が腹腔内に注射されている。これに反し、本研究ではマウスに対して病原性が強く致死感染をおこす Tg および Te を用い、 ^3H -thymidine も直接血管内に注射する方法を試みた。まず K をもった原虫における ^3H -thymidine の「とり込み」であるが、実験1の Tg 株および TeK 株、実験2の AK 誘発試験を行なった Tg 株の K をもった原虫における成績が示す如く、これらのいずれにおいても、K にのみ ^3H -thymidine をとり込んだ原虫は原虫の分裂経過と共に減少しており、それに対して核にのみ「とり込み」のみられる原虫は増加している (表1, 表2 および表6 参照)。それ故、両種原虫ともまず K、ついで核が分裂する光学顕微鏡での所見

と同様、原虫の分裂に際してまずKでDNA合成がおり、ついで核で合成が行なわれ、KにおけるDNA合成がとまった後、核でのDNA合成もとまるものと思われる。

上述の如く Parsons (1965) の実験によると *Tetrahymena pyriformis* のミトコンドリアではDNAが連続的に合成されているようであるが、この実験で示された成績から考えるとミトコンドリアとKは密接な関係があるとはいえ、DNAの合成は異なりTgおよびTeのKのDNAの合成は連続ではなく周期的に行なわれていることが推定される。

次にKのないAK型原虫であるが、Mühlpfordt (1963 a, b) はトリパノソーマ科の各種原虫につき、猪木・菅沼 (1964) はTeにつき、Trager & Rudzinska (1964) は *Leishmania tarentolae* につきそれぞれ電顕でAK型原虫を観察し、光学顕微鏡ではAK型原虫としてKが観察されない原虫においても電顕像では二重膜によって包まれたK類似小体が依然として存在することを発表した。また猪木・菅沼 (1965) はAK型原虫が増殖しえないTgにおいて、AK型原虫の鞭毛起始部に近く、内部の「らせん」構造が崩壊したK類似小体を認めている。そこでTgおよびTeのAK型原虫にみられるK類似小体がDNA合成を行なっているかどうかについて実験を行なった。その結果、TeK株に約5%含まれるAK型原虫、TeAK株およびAK誘発試験後出現したTg株のAK型原虫のいずれにおいてもK類似小体には ^3H -thymidineの「とり込み」が全く認められず、DNA合成が行なわれていないことが明らかとなった。TeではAK型原虫が増殖可能であり、単個原虫分離 (Inoki, 1960) によってAK型のクローンも得られるところからK類似小体の自家増殖性が考えられ ^3H -thymidineの「とり込み」が予想されたが、実験の結果は全く「とり込み」が認められなかった。

次にTgのAK型原虫であるが、Tg感染マウスでは通常1%以下の割合で自然発生のAK型原虫が認められ、*p*-rosanilineによるAK誘発試験を行えば24時間後において50%以上のAK型原虫の出現が認められる。いずれにしてもTgのAK型原虫はマウス体内では増殖しないとされており (Inoki, 1956)、従つて核でDNA合成が行なわれるかどうかは興味深い問題である。実験の結果、核では ^3H -thymidineの「とり込み」がみられ、AK型もDNA合成を行なう事が明らかになった。そしてAK誘発試験後24時間を経過したマウ

スの血液中には核分裂によつて2核になつたAK型原虫が6%の割合で見出された。この%は*p*-rosanilineを作用させない時のTgおよびTeのK型原虫やTeのAK型原虫の分裂型%とほぼ同じである。しかし、この場合、TgのAK型原虫で細胞質が分裂している像は全く認められなかった。従つて、TgのAK型原虫は核におけるDNA合成および核分裂は盛んに行なうが原虫の分裂増殖は出来なくなつていているものと考えられる。Kおよび核におけるDNA合成と細胞分裂がどのような関連性をもつて行なわれるかについては未だ明らかでないが、今後、攻究すべき重要な問題であろう。本実験に使用したTgおよびTeではKと核にのみ ^3H -thymidineの「とり込み」があり細胞質には「とり込み」が認められなかった。しかし、他の原虫、すなわち赤痢アメーバ (Albach *et al.*, 1966)、自由生活のアメーバ *Amoeba proteus* (Ravinovitch & Plaut, 1962; Plaut & Sagan, 1958)、*Paramecium* (Kimball & Perdue, 1962) および *Tetrahymena* (Scherbaum & Luderback, 1960) では核と細胞質あるいは細胞質にのみ「とり込み」があることが報告されている。細菌共棲培地で培養した原虫では ^3H -thymidineでラベルされた細菌が原虫の細胞質にとり込まれるという可能性があり、また *Tetrahymena* では細胞質にkinetosomeがあり、時には大核の断片も存在する場合がある。だから、上記の原虫を使用する限り、細胞質への「とり込み」についてはさらに詳細な検討を必要とするものと思われる。

結 論

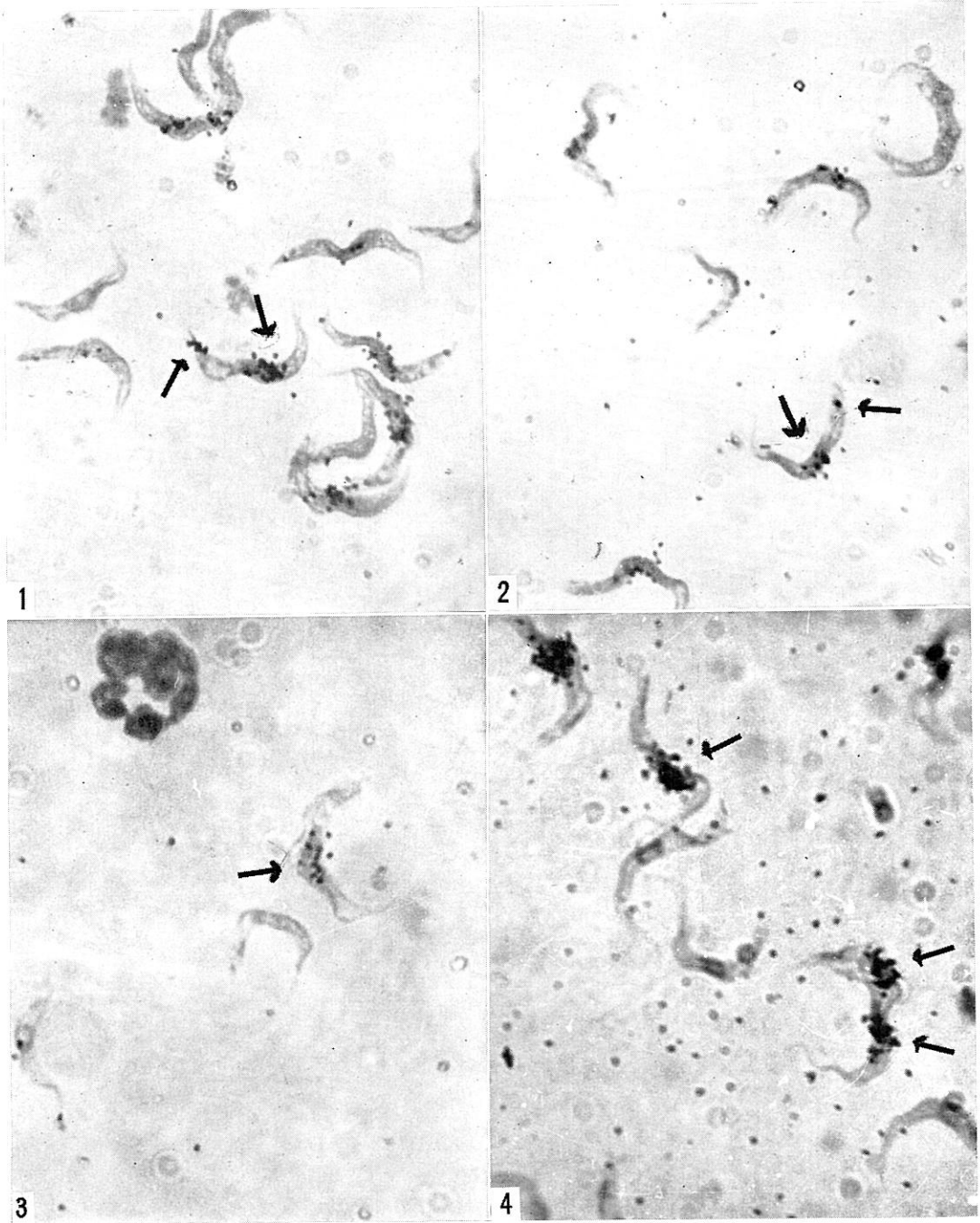
1. ^3H -thymidineによるラジオオートグラフィで実験した結果、TgおよびTeのKのある原虫ではまずK、ついで核にDNA合成がおり、Kでの合成がとまった後、核のDNA合成がとまる事実が明瞭に示された。
2. TgおよびTeのAK型原虫に電顕的に認められるK類似小体には ^3H -thymidineの「とり込み」がなく、内部のらせん構造物が崩壊したこの小体ではDNA合成が行なわれていないものと判定された。
3. *p*-rosanilineによつて誘発したTgのAK型原虫はマウス体内では増殖不可能であるが、核では ^3H -thymidineの「とり込み」が認められ、そこでDNA合成が起こつていることが明らかにされた。そして核が分裂して生じた2核原虫も約6%の割合で見出された。この値は増殖可能なTeのAK型原虫の分裂型%とほぼ

同じである。

従つて、Tg の AK 型原虫では核の分裂は起こるが虫体の分裂がそれに伴わないものと考えられる。

参考文献

- 1) Albach, R. A., Shaffer, J. G. and Watson, R. H. (1966) : Autoradiographic studies of ^3H -thymidine uptake in *Entamoeba histolytica* in GLG medium. J. Protozool., 13, 349-355.
- 2) Clark, T. B. and Wallace, F. G. (1960) : A comparative study of kinetoplast ultrastructure in the Trypanosomatidae. J. Protozool., 7, 115-124.
- 3) Inoki, S. (1956) : Origin of the akinetoplastic strain of *Trypanosoma gambiense*. Cytologia suppl. Vol. (Proceed. Internat. Genetics Symposium) 550-554.
- 4) Inoki, S., Taniuchi, Y., Matsushiro, A. and Sakamoto, H. (1960) : Multiplication ability of the akinetoplastic form of *Trypanosoma evansi*. Biken's J., 3, 123-129.
- 5) Inoki, S. (1960) : Studies on antigenic variation in the Welcome strain of *Trypanosoma gambiense* I. Improvements in technique. Biken's J., 3, 215-222.
- 6) Inoki, S., Sukanuma, Y. and Kubo, R. (1962) : Some observations by electronmicroscope on the fine structure of trypanosoma. The proceeding of the first regional symposium on scientific knowledge of tropical parasites (in Singapore), 130-133.
- 7) 猪木正三・菅沼美子(1964) : AK 型 *Trypanosoma evansi* の電子顕微鏡的観察 (予報). 寄生虫誌, 13, 575-576.
- 8) 猪木正三・菅沼美子(1965) : *Trypanosoma* の細胞質内顆粒 Kinetoplast の微細構造に及ぼす acriflavine および p-rosaniline の作用. 寄生虫誌, 14, 322.
- 9) Kato, S., Aoyama, Y. and Kamahora, J. (1963) : Autoradiography of the tissues of mice infected with Ectromelia virus using ^3H -thymidine. Biken's J., 6, 9-16.
- 10) Kimball, R. F. and Perdue, S. W. (1962) : Quantitative cytochemical studies on *Paramecium*, V. Autoradiographic studies of nucleic acid syntheses. Exp. Cell Res., 27, 405-415.
- 11) Mühlpfordt, H. (1963a) : Über die Bedeutung und Feinstruktur des Blepharoplasten bei parasitischen Flagellaten. I Teil. Z. Tropenmed. Parasitol., 14, 357-398.
- 12) Mühlpfordt, H. (1963b) : Über die Bedeutung und Feinstruktur des Blepharoplasten bei parasitischen Flagellaten. II Teil. Z. Tropenmed. Parasitol., 14, 475-501.
- 13) Nass, M. K. and Nass, S. (1963) : Intramitochondrial fibers with DNA characteristics I. Fixation and electron staining reaction. J. Cell Biol., 19, 593-611.
- 14) Nass, S. and Nass, M. K. (1963) : Intramitochondrial fibers with DNA characteristics II. Enzymic and other hydrolytic treatments. J. Cell Biol., 19, 613-629.
- 15) Parsons, J. A. (1965) : Mitochondrial incorporation of tritiated thymidine in *Tetrahymena pyriformis*. J. Cell Biol., 25, 641-646.
- 16) Patton, C. L. and Clark D. T. (1965) : Incorporation of tritiated thymidine into the nucleus and kinetoplast of *Trypanosoma lewisi* as demonstrated by autoradiography. Amer. Society. Parasitologist 40th Meeting. J. Parasitol., 51, 29.
- 17) Plaut, W. and Sagan, L. A. (1958) : ^3H -thymidine incorporation into the cytoplasm of Amoeba. J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 843-847.
- 18) Rabinovitch, M. and Plaut, W. (1962) : Cytoplasmic DNA synthesis in *Amoeba proteus* I. On the particulate nature of the DNA-containing elements. J. Cell Biol., 15, 525-534.
- 19) 坂本等 (1963) : 薬剤による *Trypanosoma evansi* の akinetoplastic 型 (AK 型) 誘発機序に関する遺伝学的研究. 寄生虫誌, 12, 1-11.
- 20) Scherbaum, H. O. and Louderback, L. A. (1960) : Incorporation of tritiated thymidine into heat-treated *Tetrahymena*. J. Protozool., 7 (Supl.), 25.
- 21) Steinert, M. (1960) : Mitochondria associated with the kinetoplast of *Trypanosoma mega*. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8, 542-546.
- 22) Steinert, M. and Steinert, G. (1962) : La synthèse de l'acide désoxyribonucléique au cours du cycle de division de *Trypanosoma mega*. J. Protozool., 9, 203-211.
- 23) Steinert, M. (1965) : L'absence d'histone dans le kinétonucleus des trypanosomes. Exptl. Cell Res., 39, 69-73.
- 24) Steinert, M. and Suzanne van Assel (1967) : The loss of kinetoplastic DNA in two species of trypanosomatidae treated with acriflavine. J. Cell Biol., 34, 489-503.
- 25) Trager, W. and Rudzinska, M. A. (1964) : The riboflavin requirement and the effects of acriflavin on the fine structure of the kinetoplast of *Leishmania tarentolae*. J. Protozool., 11, 133-145.



写真説明

- 写真 1 Tg 株の Kinetoplast と核における ^3H -thymidine の「とり込み」. 矢印は「とり込み」を示す.
 写真 2 TeK 株の kinetoplast と核における ^3H -thymidine の「とり込み」. 矢印は「とり込み」を示す.
 写真 3 TeAK 株の核における ^3H -thymidine の「とり込み」. 矢印は「とり込み」を示す.
 写真 4 *p*-rosaniline によって AK 誘発試験を行なった Tg 株の核における ^3H -thymidine の「とり込み」.
 矢印は核における「とり込み」を示す.

AbstractSTUDIES ON THE DNA SYNTHESIS IN *TRYPANOSOMA GAMBIENSE* AND
TRYPANOSOMA EVANSI BY MEANS OF ³H-THYMIDINE RADIOAUTOGRAPHY

SHOZO INOKI AND TADASUKE ONO

*(Department of Protozoology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Suita, Osaka, Japan)*

³H-thymidine radioautography were employed for investigating the DNA synthesis of *Trypanosoma gambiense* and *T. evansi* in mice.

From the results obtained, we may conclude as follows ;

1. The DNA synthesis in *T. gambiense* and *T. evansi* having kinetoplast began at first in the kinetoplast and then in the nucleus. DNA synthesis stopped in kinetoplast before in nucleus.
2. Kinetoplast-like body in the AK form of *T. gambiense* and *T. evansi* can not incorporate tritium thymidine. It was found that this body devoid of the internal structure is incapable of DNA synthesis.
3. AK form of *T. gambiense* can not multiply in mice. But the localization of silver grain in the nucleus indicated that DNA synthesis occurred in the nucleus. The appearance rate of the segmenting form was about six percent. The rate of percentage was identical to the rate obtained in the AK form of *T. evansi* that are multiplicable in mice.