

Trichomonas の多糖類要求性に関する研究

片 岡 猛

大阪大学微生物病研究所 寄生虫原虫学部 (部長 森下薫教授, 指導 猪木正三教授)

(昭和31年2月20日受領)

緒 言

Trichomonas tenax, (以下 *T.t.*) *Trichomonas vaginalis* (以下 *T.v.*) *Trichomonas foetus* (以下 *T.f.*) の寄生部位及び培養条件から考え, これら原虫が糖成分を必要とすることは容易に想像される。*T.t.* は, 口腔内の食物残渣の多い歯牙歯頸部或は歯肉嚢附近に最も多く見出され *T.v.*, *T.f.*, は共にそれぞれ人, 牛のグリコーゲンの豊富な腔内に寄生している。

更にこれら原虫の培養をみても, 糖類が必要であり。*T.t.* は米粉を *T.v.* *T.f.* に於てはブドウ糖を必須成分としている。

かように寄生部位, 及び培養条件から原虫が, 糖成分を要求し, それをエネルギー源として利用することは, 一応考えられるとしても, 本問題に関する研究は極めて少く, 特に *T.t.* に就ては, 純培養が不可能で常に細菌との混合培養を用いなければならないためか, いまだ糖代謝に関する報告はない。ただ *T.v.* *T.f.* については単糖類の代謝に関する若干の成績が報告されているが, これに反し多糖類についての報告は極めて少い現状である。

たまたま私は, ペニシリン力価検定法としてのカップ法を応用して原虫の澱粉分解能を知ると共に, 細胞化学的方法によつて原虫体内における多糖類, グリコーゲン等の存在及び細胞内の分布を観察し, いささか興味ある所見を得た。

第1章 *Trichomonas* の amylolytic activity について

実験内容

F. A. Hallman 及び J. N. De Lamater が, *Endamoeba histolytica* の澱粉分解能を観察するのに用

Takeshi Kataoka: On the polysaccharides requirement in the trichomonads.

(Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

いたペニシリン力価検定法としてのカップ法を応用して, *Trichomonas* のアミラーゼ作用を実験した。本法は, カップ内の被検物が, その基底の可溶性澱粉加寒天培地に作用して, アミラーゼ作用を起したかどうかをヨード反応によつて判定するのである。従つて被検物すなわち, 原虫の共存細菌, 継代培養に使用した培地成分が本作用を有する場合には, 可及的これをとり除くようにせねばならぬ事と, 原虫の動的な状態に於けるアミラーゼ作用をみるためには, カップ内の原虫浮游液は, 全く本作用なく, しかも原虫が生存せねばならない。以上の条件にするために, 細菌混合培養である *T.t.* の場合, 抗生物質を使用して共存細菌のみの発育増殖を抑制した。使用した抗生物質にはアミラーゼ作用が全然認められなかつた。培地成分の混入は, 数回澄明となるまで遠心沈澱法による洗滌で, ほとんど除去し得た。実験中のカップ内浮游液には, もち論本作用なく, しかも原虫が24~48時間生存し得るものを用いた。

第1節 実験材料及び実験方法

アミラーゼ測定の方法

- | | | |
|----|-------------------------------------|---------------------|
| 1. | <i>T. foetus</i> | } 24時間培養 |
| | <i>T. vaginalis</i> | |
| | <i>T. tenax</i> | |
| 2. | 生理的食塩水又は Tyrode 液 1~2 回遠心 (2500回数分) | |
| 3. | <i>T. foetus</i> | 0.5%ブドウ糖ブイヨン |
| | <i>T. vag.</i> | 0.5%ブドウ糖ブイヨン |
| | | 0.2%塩酸チステインブドウ糖ブイヨン |
| | <i>T. tenax</i> | ブイヨン |
| | | 以上各浮游 |
| 4. | a) Penicillin, Streptomycin 添加 | |
| | b) Formalin 添加 | |
| | c) 添加せず | |
| 5. | 遠心 | |
| 6. | 原虫 (沈澱部) 対照 (上清部) | |

1) 使用原虫株

実験に用いた原虫は、下記の 3 種類でそれぞれ人口腔人腔、牛腔より本研究所で分離したものである。

Trichomonas tenax は吉川、北山株 *Trichomonas vaginalis* は大久保、松本株 *Trichomonas foetus* はトリコ、2600株

2) 実験前処理

各原虫培地は、*T.t.* は米粉加人血清斜面磷酸緩衝液培地、*T.v.* では *V. Bouillon*, *T.f.* では *F. Bouillon* (詳細は文献参照の事) を使用して 37°C 24~48 時間培養後遠心沈澱法によつて上清部の澄明となるまで数回原虫を洗滌し、出来る限り機械的に培地成分、夾雑物を除去するに努めた。また時に (*T.t.* の場合は毎常) 共存細菌の発育増殖を抑制し、操作時の雑菌混入防止の目的で、結晶ペニシリン G (以下 P) 及び結晶硫酸ジヒドロストレプトマイシン (以下 S) をそれぞれ 1000u/cc, 1 mg/cc を添加した。こうして原虫を供試し得るほど集め、各原虫の生物学的性状より最も適していると思われる浮游液に浮游させ実験に供した。使用した各浮游液は、*T.t.* に於ては、*ブイオン T.v.* に於ては、0.5% ブドウ糖 *ブイオン*, 0.2% 塩酸チステインブドウ糖 *ブイオン*, *T.f.* は、0.5% ブドウ糖 *ブイオン* であつた。

3) アミラーゼ測定法

F. A. Hallman, J. N. De Lamater らが *Endamoeba histolytica* の澱粉分解能を観察した方法に従い、内径 8~5 cm のペトリシヤールに 2% 可溶性澱粉 (Merk 製) 加寒天培地 15cc を平板とし、その上にペニシリン力価検定法に使用される銅製カップ (外径 8 mm 容量 0.25cc) を静置し、上記各原虫浮游液及び最後の遠心沈澱上清部 (対照) を滅菌ピペットにて採り、カップ内に無菌的に注入充溢させ、37°C、孵卵器に 24~48 時間放置し、平板上が無菌的であることを確認した後静かにルゴール液を平板全面に流し、被検液を容れてあるカップ周辺部にヨード反応を示さない無色の環状部 (写真) が生ずると、その部が被検液により澱粉が分解されたものと判定し計測した。

その計測値は、カップ外壁より環状部外縁に至る距離を以て表現した、なお本実験は常に、原虫部と、その対照としての上清部を同一シヤール内に併置し、結果の判定は両者の計測を比較検討して判定の誤認を避けた。

第 2 節 実験成績

1) 予備実験

前記実験内容の項で述べた如く、アミラーゼ測定実験

第 1 表 アミラーゼ測定に就ての予備試験

培地	地	アミラーゼ		判定時		
		判定	外径 (mm)			
10% 人血清加	F. Bouillon	+	3.5	24 時		
		+	3.0			
	V. Bouillon (No. 2)	++	5.5			
無血清	F. Bouillon	-	-		24 時間	
		-	-			
	V. Bouillon (No. 2)	-	-			
1% 可溶性澱粉 (Merck)	F. Bouillon	+	2.5	24 時間		
		+	2.0			
	V. Bouillon (No. 1)	+	2.0			
1% フォルマリン水	F. Bouillon	-	-		48 時間	
		-	-			
10% フォルマリン水	F. Bouillon	-	-			24 時間
		-	-			
1% フォルマリン加人唾液	F. Bouillon	++	8.5	24 時間		
		++	7.5			
Penicillin Streptomycin } 加人唾液	F. Bouillon	++	10.0		24 時間	
		++	9.5			

V. B. (No. 1): 肝抽出液を基とする培地

V. B. (No. 2): *ブイオン* を基とする培地

Peni. 2000 u/cc Strept. 2 mg/cc

を行うに先立ち、原虫のみの本作用をみるためには、次の条件を備えていなければならない。

(a) カップ内の浮游液は、澱粉分解能がなくしかも培地の代用として原虫を生かさねばならない。

(b) *T.t.* の場合には共生細菌の作用を除去しなければならないが、そのために用うる P.S. に本作用があつてはならない。

(c) 3 種原虫の培地には、いずれも本作用がある事を証明したので、カップ内に原虫を入れる際培地成分を持込みぬようにしなければならない。

大体以上の観点から予備実験を行つたが、第 1 表の如く (a) に関しては浮游液は、継代培養に用いた各原虫の培地をそのまま使用出来ると最も理想であるが、それらはいずれもアミラーゼ作用を有するので、これらに代わるものとして、人血清及び肝抽出液を除いた単なる *ブイオン* を基にしたものを使用した。これには本作用が認められなかつた。(b) については抗生物質として P.S. を使用したが本作用はなかつた。(c) に関しては、2500

r.p.m. の遠心沈澱法を数回繰返すことによつて本作用を有する培地成分或は夾雑物は除去されることを確めた。(b, c に就ては、各原虫に関する実験成績の項に於て更に詳述する)

2) *Trichomonas tenax* に於けるアミラーゼ測定予備実験

第2表 *T. tenax* に於けるアミラーゼ測定予備試験

添加物	アミラーゼ						判定時間
	原虫 (沈澱部)			対照 (上清部)			
	判定	外径 (mm)	原虫	判定	外径 (mm)	原虫	
—	++	5.0	++	+	4.0	—	24
フォルマリン	±	1.0	—	—	0	—	
〃	+	3.0	—	—	0	—	
〃	+	3.0	—	±	0	—	
〃	+	2.0	—	—	0	—	

〔註〕 フォルマリン加 1 gt/cc

§ 共存細菌のアミラーゼ作用

No. 1 判定 ++ 外径 5.0mm

No. 2 判定 + 外径 3.0mm

(48時間培養共存細菌)

前述の如く *T.t.* が純粹培養不可能のため、共生細菌のアミラーゼ作用を完全に除外した後に於て本原虫の作用を判定せねばならぬ事は明らかであるが、たとえ頻回洗滌して出来得る限り共存細菌を除外してもなお検定材料中に混入することは当然である。そこで共生細菌の有するアミラーゼ作用の程度を知ると共に、フォルマリンによりこれを殺滅してその作用の有無を検討したところ第2表に示す如く、原虫部とその対照である上清部すなわち共生細菌を含んでいる被検液には、37°C、24時間後の判定では明らかにこの作用がみられた。しかしこれにフォルマリン原液 1 gt/cc の割に滴下し、共生細菌及び原虫を完全に殺滅すれば、上清部は全く陰性となつたが原虫部は弱陽性を示した、これにより共生細菌は殺滅されると全く本作用を示さないが、原虫は殺滅されても原虫体成分に本作用が残ることが示された。

3) *Trichomonas tenax* に関する実験

前記 *T.t.* のアミラーゼ測定予備実験に於ては、フォルマリンを使用して共生細菌の殺滅をすると本作用が陰性となる事を明らかにしたが、この際同時に原虫の生存も絶つてしまうので、原虫の生命現象として動的な状態

第3表 *T. tenax* に於けるアミラーゼ測定試験 (P. S. 添加による)

添加物	アミラーゼ						判定時間
	原虫 (沈澱部)			対照 (上清部)			
	判定	外径 (mm)	原虫	判定	外径 (mm)	原虫	
P. S.	++	6.0	+++	±	1.0	—	24 時 間
	+	4.5	++	—	0	—	
	++	6.0	++	+	2.0	—	
	+++	8.0	++	±	1.0	—	
	++	5.0	—	++	4.0	—	
	++	6.0	++	±	1.5	—	
	++	5.0	+++	—	0	—	

〔註〕 P.: 結晶ペニシリンGカリウム (1000u/cc)

S.: 結晶硫酸ジヒドロストربتマイシン (1 mg/cc)

に於て澱粉分解能の有無を観察するために、原虫に対しては非感受性であり、共生細菌に対しては感受性が強くこれの発育増殖を抑制する抗生物質すなわち P.S. をそれぞれ1000u/cc, 1 mg/cc を原虫部及び対照部に添加することにより、原虫部に対しては成績判定時まで原虫の純粹培養の状態を呈せしめると共に、上清部に対しては共生細菌の発育増殖を抑制して本作用を出来るだけ不活性とし、対照としての意義を充分備える様な状態にした。

かかる方法により得た成績は第3表に示す如くいづれも外径 4.5mmから最大 8 mm程度にわたり澱粉分解能は強く示され、しかも24時間後の判定時には原虫が、明らかに発育増殖を示していた。一方対照部に於ては、全く本作用を示さないか或は示しても 1~2 mm程度の僅微な反応を示すにすぎなかつた。ただ1例に於てのみ原虫部と共に対照部にも両者殆ど判別し難い程度の分解能を示したがこれらはたとえ P.S. を添加しても常に共生細菌の増殖が完全に抑制されるとは限らず、従つて抗生物質の感受性の程度に応じて反応を示したものと思ふされるが、原虫部の作用はなお対照反応と比較して常に強く出現していた。

4) *Trichomonas vaginalis* に関する実験

本原虫は純粹培養されているので、前記予備実験に於てアミラーゼ作用には影響なくしかも原虫には24~48時間生存し得る事を確認した 0.5%ブドウ糖ブイヨンあるいは 0.2%塩酸チステインブドウ糖ブイヨンに原虫を浮遊させ実験に供した。

第 4 表 *T. vaginalis* のアミラーゼ測定

No.	培 添 加 地 物	ア ミ ラ ー ゼ				判 定 時 間
		原虫 (沈渣部)		対照 (上清部)		
		判定	外径 (mm) 原虫	判定	外径 (mm) 原虫	
1	G	+	3.5 +	-	-	
2	G P.S.	+	3.5 -	-	-	
3	G ^x	+	4.8 ++	-	-	24
4	St	±	0.5 +	-	-	
5	St P.S.	++	5.5 ++死	+	2.	-
6	St ^x	++	5. ++	-	-	
7	G ^x P.S.	+	4. ++死	-	-	
8	St ^x P.S.	+	4.8 ++死	-	-	48
9	G ^x F	-	-	-	-	48
10	St ^x F	-	-	-	-	

G: ブドウ糖 (1.0%) 加培地
 St: 可溶性澱粉 (1.0%) 加培地
 P: 結晶ペニシリンGカリウム (1000u/cc)
 S: 結晶硫酸ジヒドロストレプトマイシン (1mg/cc)
 F: ホルマリン (1gt/cc)
 X: V. Bouillon No. 2 培地, 他は No. 1 培地

原虫は前述の如く培養中の培地成分を出来得る限り除去するために頻回遠心沈澱して洗滌し、上清部のアミラーゼ作用が陰性になるまで同操作を続けた。

その結果は、第 4 表に示す如く外径 0.5mm しか示さなかつた 1 例を除いてはすべて 3.5~5mm にわたる著明な反応を示した。判定時間は 24 時間と 48 時間としたが、反応の強弱は両者間には認められず、48 時間経過するとカップ内での原虫の生存は、困難と考えられ 24 時間後の判定には原虫はほとんど発育増殖するのがみられたけれども 48 時間後には原虫はすべて死滅して屍体しかみられなかつた。24 時間後の判定の 1 例に於て、対照部にも外径 2mm 程度の反応がみられたが、これは原虫が死滅している事から考え、特にこの 1 例に於ては P.S. が添加してあつたにもかかわらずこの反応が現われたのは、前述の如く P.S. によつても操作時混入した雑菌が抑制されず、従つてその影響によるものと考えられる。

死原虫に本作用があるかどうか、あるいは培養中の培地成分が混入するかどうかをみるためにフォルマリン原液 1gt/cc を添加、48 時間後に観察したが、死原虫にアミラーゼ作用はなく、また培地成分の混入もない事を確認した。

なお各例に於て本原虫が、継代培養中の条件によつて本作用に影響もたらされるかどうかをみるために V B (No. 1) 培地に 1.0% ブドウ糖を加えたものと、1.0% 可溶性澱粉を加えたものとの 2 種の培地で継代培養して実験に供したが、両者間に著明な差異はみられなかつた。

5) *Trichomonas foetus* に関する実験

第 5 表 *T. foetus* のアミラーゼ測定成績

No.	培 添 加 地 物	ア ミ ラ ー ゼ				判 定 時 間
		原虫 (沈渣部)		対照 (上清部)		
		判定	外径 (mm) 原虫	判定	外径 (mm) 原虫	
1	G	-	++	-	-	
2	G P.S.	-	+++	-	-	
3	G P.S.	-	-	-	-	24
4	St	-	++	-	-	
5	St P.S.	-	+	-	-	
6	G P.S.	±	1.	-	-	
7	G	+	2.5 +++死	-	-	
8	G P.S.	+	3.5 +++	±	0.5	-
9	St P.S.	++	5.8 +	±	0.7	-
10	St	++	8.3 ++	-	-	+
11	St	++	5.5 +++	-	-	
12	G F	-	-	-	-	
13	G F	-	-	-	-	
14	G F	+	3.5 -	-	-	48
15	St F	-	-	-	-	
16	St F	-	-	-	-	

G: ブドウ糖 (1.0%) 加培地
 St: 可溶性澱粉 (1.0%) 加培地
 P: 結晶ペニシリンGカリウム (1000u/cc)
 S: 結晶ジヒドロストレプトマイシン (1 mg/cc)
 F: ホルマリン (1gt/cc)

本原虫は *T.v.* 同様純粋培養されているので *T.v.* に準じて実験を行つた。その結果は第 5 表の如く、*T.t.*, *T.v.* と全く異り、24 時間では本作用は全然示されないうが、48 時間後観察したものではいずれも本作用を示し、しかも原虫の発育増殖を認めた。

なお *T.v.* の場合と同様供試原虫の培養条件による本作用の活性度の強弱を検討したが、1.0% ブドウ糖加培地よりも、1.0% 可溶性澱粉加培地で培養した原虫の方が本作用をやや強く現わすようにみられた。

フォルマリン添加例は 1 例を除き全く陰性であつた。

第 3 節 考按

人体ならびに動物に寄生する *Trichomonas* が澱粉あるいは他の糖類を要求し、消費するという事はこれらの寄生部位や培養条件から明らかであり、*T.v.*, *T.f.* に於ては既に単糖類の代謝に関して若干の報告があるが、これらの実験に供せられた *Trichomonas* はいづれも純粋培養し得る種のものに限られ、本実験に用いた *T.t.* の如き純粋培養の得られていない原虫に就ては、それが常に澱粉を必要とし、糖成分を要求することが想像されていても、その分解過程を明確に示すことは困難である。すなわち第 2 節実験成績、予備実験の項に於て述べた如く、原虫のみのアミラーゼ作用を観察するには培地成分に本作用があるかどうかをみて、本作用があればこれを如何にして取り除くか、次に純粋培養されていない原虫種では、原虫には何等影響を及ぼさないう共生細菌のみの発育増殖を如何にして抑制するかという 2 つの問題を解決しておかねばならない。しかも原虫の動的な状態に於ける本作用を観察するには、実験に用いる原虫浮游液に本作用を有する要素があつてはならぬ事はもち論、24~48 時間実験観察中原虫が生息し得るよう培地の代行するものでなければならぬ。

以上の観点を考慮して本実験を行つた。すなわち最も困難視されていた *T.t.* に於ては、P.S. が本原虫に対して非感受性であり、他方共生細菌に対してはこれの発育増殖を抑制し得て、一過的な原虫の純粋培養の様相をもたらすことが出来、その時期を確実に利用することによつて原虫の澱粉分解能をみる事が出来た。

T.t. の場合実験全例に於て 24 時間後には明らかな澱粉分解能のあることを示されたが、他方対照にも微弱な作用のみられた。もち論これは抗生物質によつても共生細菌の発育増殖の完全なる抑制は困難な場合も生じ得るかも知れないし、そのために常に対照を厳にして誤認をさけるように努めた。1 例に於て原虫部と対照部とのほとんど差異のみられない結果を得たが、これは原虫部に於て 24 時間後原虫が全く認められたなかつた点から抗生物質によつても共生細菌が全然抑制されず、従つて原虫はその影響によつて死滅した結果であろうと思われる。かようにただ 1 例抗生物質が共生細菌に対して無効果であつた場合のみられたが、他の全例に於ては判定時に原虫の生存を認めると共に原虫部は 4.5~8 mm に至る著明な反応を示すにもかかわらず、対照部では反応しても最大 2 mm 程度の微弱なものであり容易に判定は出来た。

T.v., *T.f.* の場合は原虫が純粋培養されているので共

生細菌に就ての考慮はしなくてもよいが、培地成分には既述の如く本作用が認められるので、これを取り除く事に努めた。その結果それぞれの場合遠心沈澱最後の上清部と沈澱部にフォルマリン原液 1 gt/cc を添加して実験したところ浮游液には培地成分は全く混入しないことが確認された。

T.v. に関する実験成績は既に述べたように *T.t.* と同様 24 時間で本作用を示したが、48 時間後に於ては 24 時間後のものと大体同程度の作用を示すにすぎず、しかも原虫は、48 時間後には全く死滅してかなりの数の屍原虫を認めた。この事実は第 5 表に示す如く *T.v.* の場合と比較して *T.f.* では 24 時間では全く本作用を表わさず 48 時間に至り、初めて本作用を示し、しかも原虫は全例に於てはなお活潑な運動状態を呈していたことと照し合せて *T.v.* のエネルギー源としての糖類消費の速度が *T.f.* より速く従つてその生命周期も甚だ短いものとなつたものと考えられ興味がある。また継代培養条件が本作用の強弱を左右するかどうかを知るために *T.v.*, *T.f.* を用いてそれぞれの培地に 1% ブドウ糖、及び可溶性澱粉を添加したが、*T.v.* に関しては両培地による影響はほとんど認めらなかつたが、*T.f.* では 1% ブドウ糖加培地よりも、1% 可溶性澱粉加培地の方がやや澱粉分解能を促進する作用が認められた。

三種原虫を通じ、*T.t.* の場合には抗生物質が完全な効果を発現せず細菌によると思われる程度の作用を示すこともあり、*T.f.*, *T.v.* の場合は操作時に細菌を混入するおそれもあるが、それらは対照を常に正確にすることによつてその差異は明瞭に示され結果の判定は容易である。

かように三種原虫にはいづれも程度、時期等に於て多少の差異はあつても澱粉分解能の存することは以上の実験から明らかである。

第 2 章 *Trichomonas tenax*, *Trichomonas vaginalis* の多糖類に関する細胞化学的検査

実験概要

第 1 章に記載した如く *Trichomonas tenax*, *T. vaginalis*, *T. foetus*. の動的な状態に於ける澱粉分解能の実験からそれぞれの様相には多少の相違があるとしても結論的には 3 種共澱粉分解能を有するものといえる。従つて培養原虫体に多糖類が存在するであろう事はもはや疑う余地のないところであり、かかる見地から細胞化学的方法によつてこれを確認しようとした。

原虫の多糖類に関する細胞化学的研究は、我国に於ては *Endamoeba histolytica* についての沢田氏の報告をはじめ、外国に於ては J. N. De Lamater らが同じく *Endamoeba histolytica* についてこれを行つているが *Trichomonas* 特に *T.t.* に関する報告はいまだみられない。ここに於て私は、*T.t.* と同時に *T.v.* についても同様の生活機構を観察すると共に多糖類の証明を行うため細胞化学的多糖類反応を試みた。

第1節 実験材料及び実験方法

1) 使用原虫株

Trichomonas tenax 佐野, 貴田, 北山, 金城株

Trichomonas vaginalis T.U.A 株

以上各株を適時えらび使用

2) 実験前処理

増殖発育の最盛期をえらび原虫の内部構造観察を阻害しないように夾雑物を注意深く遠心沈澱法によりとり除いた。(操作方法は前章に於ける前処理に準じて行つた。)

3) 塗抹乾燥

供試原虫をピペットにて1滴とり厚層標本の場合と同様塗抹 自然乾燥した。

4) 固定

10%フォルマリンアルコール, フォルマリンカルノア氏液等を用いたが、特に相違は認められなかつた。しかしアルコールフォルマリンで24時間固定したものはいずれの染色法にも良好な結果をもたらした。

5) 染色反応法

Hotchkis Mc Manus, Lillie, Bauer, Lhotka, Best 氏の Carmin 染色法 Gomori, 大野氏法により多糖類, グリコーゲン, ムチン, ヒアルロン酸について検討した。

6) 後染色

前記染色反応法を試みた後、原虫体の核の所在及び、内部構造の部分的な観察を容易にする目的で Meyer 或は Delafield の Haematoxylin で30~60秒後染色を適時行つた。

第2節 実験成績

Hotchkis Mc Manus, Lhotka, Lillie, Bauer 氏法等、いわゆる Periodic acid Schiff 反応 (PAS) 及び他の Schiff 氏液による多糖類反応は種々なる酸化剤によつてその反応に影響をもたらすことは既に明らかである。よつて本実験に於ては、PAS及びその他の Schiff 反応と共に Best 氏の Carmin 染色 Gomori

氏法, 大野氏法を併用した。

1) Hotchkis Mc Manus 氏法

多糖類に関する細胞化学的方法としては、代表的なもので過ヨード酸によつて附属水酸基をアルデヒド基に酸化させその多糖類のアルデヒド基と Schiff アルデヒド試薬との間に反応を起させ発色させるのである。

通法により固定は Carnoy 氏液で Schiff 反応後 Meyer の Haematoxylin で1分間後染色を行つた。この後染色は少し時間を過ぎると過染され Schiff の反応がわからなくなる。

(これは後の Delafield の場合でも同様)

本法によると *T.t.*, *T.v.* 共に反応は陽性で、Haematoxylin 後染色された核は淡紫色に染色され、その核周囲部及び軸索と思われる部分に沿つて特に赤紫色の反応が著明に見られる。なお同一標本に於ける原虫でもその発育増殖の過程に応じて異なつた反応を示し、幼若と思われる形態を呈する原虫は、既に変性期にある原虫が網状淡染の反応を示すのに比較して、内部構造のほとんど不明となるほど原虫体全体が濃染する。(これは後記各染色法に於てどれも同結果であつた。)

染色反応と同時に、唾液消化試験も行い反応が陰性となるのを確かめ対照を明らかにした。

2) Lhotka 氏法

1-2 Glycols 基を含む多糖類に関する検出法で、Hotchkis Mc Manus 氏法と同様 Schiff reaction であるが HIO₄ の代わりに酸化剤として20% 磷酸水液に蒼鉛酸ソーダを1%と加したのものを用いた。原虫に対しては非常によく反応し、赤紫色の顆粒となつて現われる。染色所見は前者と略同様の結果を得た。唾液消化試験の陰性となるのを確認しに。

3) Bauer 氏法

アルコールフォルマリン固定後4%クロム酸で1~2時間酸化 Schiff 反応を行い Delafield で後染色をした。前二者に比し酸化作用がやや弱いためか、反応は弱かつたが幼若期の原虫も部分的にかなり明確な反応を示すのが見られた。

4) Lillie 氏法

Lillie 氏酸化剤(過ヨード酸カリ又はソーダ 0.8 gr. 70%硝酸 0.3cc水 100ccの混合液)による酸化法で固定には通法により前記の三法を用いた反応状態は前三者よりも弱く瀰漫性に全体が淡赤色に反応する。なお酸化時間反応時間等の影響がかなり敏感に表われ反応結果が不定でもある。唾液消化試験の結果陰性となるのを認め

た。

5) Best 氏 Carmin 染色法

前記のいわゆる PAS 及びその変法とは全く異り Carmin による Glycogen の染色法である。染色結果は部分的な濃淡にとぼしく、内部構造の明確な検索には若干不十分であつたが、唾液消化試験も同時に行い Glycogen の存在を確認し得た。

6) Gomori 氏法

Glycogen 及び Mucin のための染色法の1つで Bauer 氏法と同様4%クロム酸で酸化させ、メセナミン銀液で反応後0.1%塩化金で調色するのである。その結果 Glycogen, Mucin の褐色或は黒色の反応がみられたが、その反応が操作の結果として非常に不安定なもので同一標本上の原虫でさえ異なつた結果を示すことがある。

7) ヒアルロン酸のための大野氏法

高分子酸性基が塩基性色素と結合してメタクロマシアを表わすことは既に周知の通りである。従つて $-SO_3$ の如き強酸は別として、 $-COOH$ 、 $-PO_4$ の様な弱酸は強い酸性溶液の中では全く酸としての能力を示さない。従つてある pH 以下ではヒアルロン酸は全然塩基性色素との結合能力を失う。そこで0.05%トルイジン青をそれぞれ pH 2.5, 4.1, 7.0 に調製して pH に応じてメタクロマシアの有無を観察した。

その結果 pH 7.0 のものでは核周辺部並に原形質部にも点在して若干メタクロマシアが認められたが、pH 4.1 では非常に反応は微弱となり、2.5 に至つては全く反応は認められなかつた。これらの結果として原形質特に核周辺部にはヒアルロン酸は存在するが、コンドロイチン硫酸の存在は認められなかつた。

第3節 考按並びに総括

第1章の実験結果から原虫体に多糖類の存在すること

はもはや疑問の余地なきところである。そこで細胞化学的方法によつて原虫体に於ける形態学的な面からこれを確認することは、その機構を知り生理的な検索を進める上に必要と考えられる。

細胞化学的方法による多糖類の検出には、誤認をさけるために種々の方法を行い、同時に対照として唾液消化試験を用いる必要がある。かかる見地から PAS 及びその他の染色反応を試みた。固定法はいづれも大同小異で著しい影響が認められなかつたが、酸化剤として使用した過ヨード酸はじめ、蒼鉛酸ソーダ、クロム酸等の間にはかなり異つた影響をもたらすと思つた。すなわち過ヨード酸、蒼鉛酸ソーダを用いた場合にはクロム酸或は過ヨード酸カリ等を用いたものより反応が一定にしかも適確に示された。

反応結果は、いずれも陽性であつたがその間強弱がみられ、Hotchkis Mc Manus, Lhotka 氏の方法が最も強く、次で Bauer, Lillie, Best 氏の Carmin 染色の順となるが、(Gomori 氏の Glycogen, Mucin のための染色法は、結果不安定であつた。) よく反応したものに於てはいずれも多糖類、グリコーゲンに特に核の周囲部あるいは原虫体の軸索に沿つた部分に顆粒状あるいは瀰漫性に濃染して表われた。又原虫の發育増殖の時期的な変化に応じて、反応の状態が変るのも興味あるところと思われる。すなわち同一標本上に於て内部構造が全く不明となるほど強い反応を示し染色される原虫は、全部糖類の要求消費が最大時にあると思つた極めて幼若な形態をした時期のものに限られ、一方逆に変性期にあると思つたものに於ては、反応は弱く内部構造にもかなりの部分が不染で網状を呈するのがみられた。酸性多糖類反応として大野氏法によつてヒアルロン酸の反応を試みたが、原虫核には認められず原形質特に核周辺部に若干存在すると思つた成績を得た。

附 図 説 明

Fig. 1 澱粉分解能実験の1例で、A部は原虫によつて基底部の澱粉が分解されヨード反応を示さず、カップの周辺に透明帯が生じたところ。B部は対照部で、全く透明帯がみられない。

Fig. 2 *T.t.* の Hotchkis McManus 法 Haematoxylin 後染色

Fig. 3 *T.t.* の Lhotka 法, Haematoxylin 後染色

Fig. 4 *T.v.* の “

Fig. 5 *T.v.* の Ohno 法 (pH 7.0 トルイジン青)

片岡論文附圖

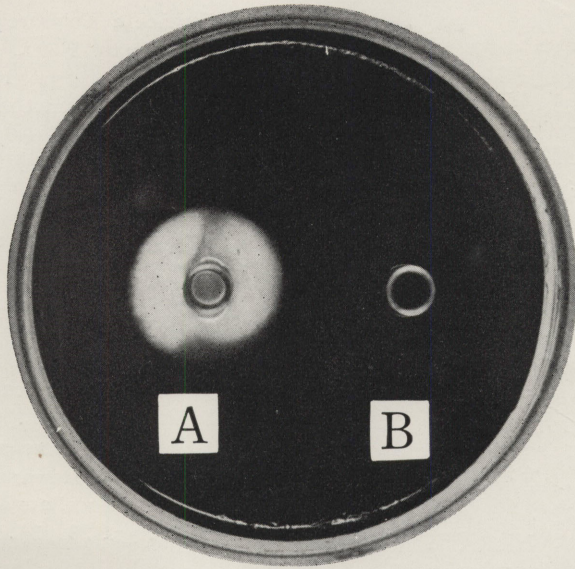


Fig. 1

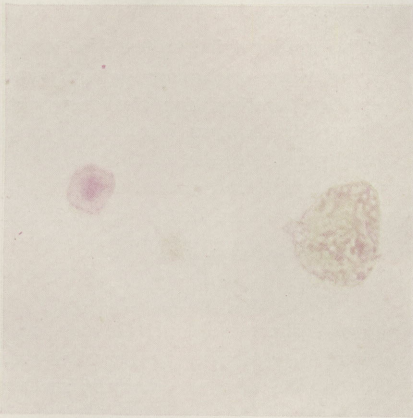


Fig. 2

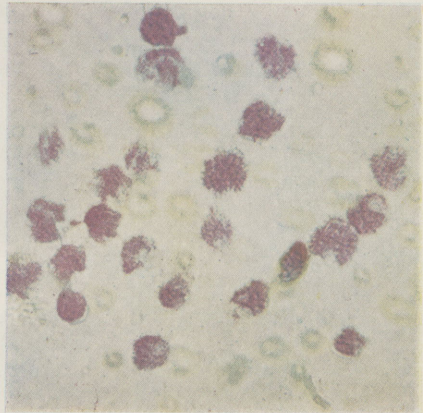


Fig. 4

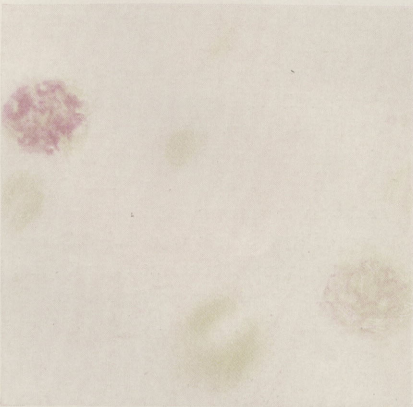


Fig. 3

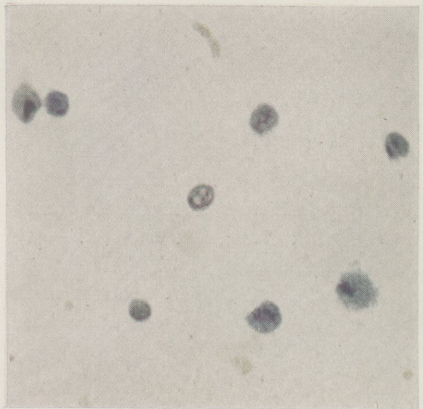


Fig. 5

結 論

Trichomonas 類の澱粉分解能を観察すると共に糖類が原虫体内に如何なる状態で存在するかを細胞化学的方法によつて観察し次の結果を得た。

(1) *Trichomonas tenax*, *T. vaginalis*, *T. foetus* は何れも澱粉分解能を有している。

(2) *T.t.* では24時間でカップ外径最小 4.5 mm から最大 8.0 mm, *T.v.* では24時間で 3.5 mm から 5.5 mm, *T.f.* では24時間では現われず, 48時間に至り最小 2.5 mm から 8.3 mm に至る範囲に澱粉分解能のある事を示した。

(3) 過ヨード酸 Schiff 氏反応及びその他の方法により細胞化学的方法を用いて多糖類反応を試み, 各原虫体に多糖類, グリコーゲン, ムチン, ヒアルロン酸の存在することを確認した。

(4) 多糖類, グリコーゲンは原虫核周辺部並びに軸索と思われる部分に沿つて特に著明に現われ, ヒアルロン酸はトルイジン青H 7.0で細胞核周辺部及び細胞質全般にメタクロマシアを現わすことがみられた。

(5) 以上の実験から, これら各原虫に糖代謝能のあることを証明した。

稿を終るに当り御懇篤な御指導及び御校閲を賜つた森下薫教授, 猪木正三教授及びびに 阪大歯学部川勝賢作教授に深謝し, また終始実験について御援助を賜つた中林敏夫助手に深甚の謝意を表します。

なお本研究は 中林助手に与えられた 文部省科学研究助成補助金によつて支弁されたことを附記しておく。

本論文の要旨は昭和28年12月13日 日本寄生虫学会近畿支部第9回例会, 昭和29年4月3日 日本口腔科学会総会第8回総会, 昭和30年11月3日 日本寄生虫学会西日本支部第11回大会に於て発表したものである。

参 照 文 献

- 1) Andrews, J. and Von Brand, T. (1938): Quantitative studies glucose consumption by *Trichomonas foetus*. *Am. J. Hyg.*, 2841, 138-148.
- 2) Andrews, F. W. J. (1930): Note on the fermentation of starch by certain haemolytic streptococcus. *Path. Bact.*, 33, 145-152.
- 3) Caillean, R. (1934): Sur les caractères culturaux de *Trichomonas columbae* et *Trichomonas foetus*. *Bulletins Société Path. Exot.*, 27, 943-953.
- 4) Hallman, F. A., Michaelson, J. B., Blumenthol, H. and De Lamater, J. N. (1955): Cytochemical studies on *Endamoeba-histolytica*, with Particular

Reference to Polysaccharides, *Exp. Paras.* 45-53—5) Hallman, F. A. and De Lamater, J. N. (1954): Demonstration of Amyolytic Activity in Cultures of *Endamoeba histolytica*. *Exp. Paras.*, 11 (2), 170-173. —6) 浜田義雄 (1953): *Trichomonas vaginalis* の生物学的研究 第1報 純培養について. *阪大医誌*, 5 (5). —7) Hara, K., Oka, S., Sawada, T., Fuse, M. (1954): Cyto-Chemical observation on *Endamoeba histolytica*. *Gumma J.*, 3 (4) 257-265. —8) 市川修 (1955): 細胞化学. —9) Lwoff, A. (1951): *Biochemistry and physiology of Protozoa*. 154. —10) Lillie, R. D. (1950): Further exploration of the HI₁₀-Schiff reaction with remarks on its significances, *Anat. Rec.*, 108, 239. —11) Riedmuller, L. (1936): Beitrag zum Kulturreich von *Trichomonas foetus*. *Zent. Bakt.*, 137, 428-433. —12) Stewart, H. M. (1938): Glycogen content of a flagellate of cattle *Trichomonas foetus*. *Am. J. Hyg.*, 28 (1). 8084.

Summary

Considering from the parasitic site and the culture conditions of the trichomonads, it is easy to suppose that *Trichomonas tenax*, *T. vaginalis* and *T. foetus* need the polysaccharides for their growth.

The author tried to test the amyolytic activities of these trichomonads, by using the Oxford cup-plate method for the assay of antibioticity. That is, the agar base containing 2% solubl. starch was prepared in the Steril Petri dishes and the cultured parasites were inoculated into the cups. These dishes were incubated at 37°C for 24-48 hours. If the parasites have ability to digest starch, the area of hydrolysis appears around the cup, which is clearly shown by the starch-iodine reaction. On the other hand, the polysaccharides in the parasites were examined by the cytochemical staining methods, including Hotchkis Mc Manus, Lillie, Bauer, Lhotoka, Gomori, Best's carmin, Ohno method.

The results obtained are summerized as follows;

- 1) The amyolytic activities of *Trichomonas tenax* and *T. vaginalis* were similarly indicated within 24 hours after inoculation, and the area of hydrolysis were measured as 5-8 mm and 3.5-5.5 mm respectively, while, the activity of *T. foetus* was shown within 24-48 hours and the area of hydrolysis was 2.5-8.3 mm.
- 2) By the cytochemical methods, the polysaccharides were demonstrated in the perinuclear part and along the axostyle of the trichomonads.