

トキソプラズマに関する研究

(3) 螢光顕微鏡による虫体の観察

小山 力 小林 昭夫 石井 俊雄*
熊田 三由 小宮 義孝

国立予防衛生研究所寄生虫部

小机 弘之

東京慈恵会医科大学衛生学教室

(昭和37年3月26日受領)

緒言

近年、原生動物の研究分野でも、螢光顕微鏡法の導入が試みられつつあり、純生物学的な研究のほかに、生死の判別、虫体および虫卵の検出などの応用面で、寄生虫学上寄与するところ多大である。

また最近では、螢光抗体法の応用も盛んとなり、トキソプラズマの研究分野にも、この兆がみえる。

ところで、トキソプラズマの諸研究にとっては、目下のところ、上述の生死の判別と虫体の検出とは、ともに重要な基礎的課題となつているのかかわらず、満足すべき手掛りはえられていない。

そこで、本研究においては、まず予備的な観察の意味で、細菌学その他の部門で著しい成果を挙げている螢光色素 Acridinorange を用いての螢光顕微鏡的観察を、トキソプラズマの栄養型虫体に試み、比較的自然に近い状態で、いくつかの示唆に富んだ結果をえたので報告するとともに、今後発展を予想される生死の判別、虫体の検出など多方面にわたるその応用面上の可能性を指摘したいと思う。

材料および方法

被検虫体としては、トキソプラズマ RH 株の継代マウス腹水中の遊離虫体を用いた。

ここにいう腹水は、感染マウスの腹腔内貯溜腹水原液であつて、生理食塩水で稀釈された腹水ではない。

螢光顕微鏡装置は、Zeiss-Winkel 製光源装置および NB 式(日本 BCG)装置を用いた。

前者の概要は、光源 (Osram 超高圧水銀灯 HBO 74) 光源フィルター (Schott BG 3 および BG 12) に、更に除熱のため、硫酸銅液槽 (2.5% 硫酸銅水溶液、液層 45

mm) を併用、接眼フィルター(イワキ FY 4)、顕微鏡 (Zeiss 大型 FZE, 集光器 N.A. 1.4)。

同じく後者は、光源 (東芝超高圧水銀灯 SHL-100 UV)、光源フィルター (イワキ BG 12)、接眼フィルター(イワキ FY 4)、顕微鏡 (Zeiss; 集光器 N.A. 1.4)。

供試螢光色素としては、Acridinorange (Grübler), Acridingelb (Merck), Rivanol (Grübler), Coriphosphin O (Grübler), Aurophosphin (Grübler), Euchrysin GNX (Grübler) などを用い、すべて等張の生理食塩水で 10,000 倍溶液を調製、使用した。

一般に螢光色素による螢光像は、色素濃度、色素の作用時間、pH などの諸要素によつて左右されることが知られているが、今回のわれわれの目的は、今後の研究のための予備観察であつたので、観察テクニックは、主に Rothstein *et al.* (1959) のそれに拠つた。

pH も、まず最初は、自然状態での観察を意図し、緩衝液は使用しなかつた。

上記の条件下で、かつ虫体の観察および検出のみを目的とした場合に限れば、色調およびコントラストの点で前述の6種の色素中、Acridinorange が最適と考えられたので、以後の観察には、専らそれを生理食塩水による 10,000 倍稀釈液 (pH 6.0~6.5 位) として用いた。

観察方法としては、採取腹水を室温下に、無菌的に保存しておき、一定時間毎にその一部をとつて、色素液と 1:1 の割合に混合後鏡検した。

すなわち、実際には、腹水と色素の各一滴づつをスライドガラス上で混合し、カバーガラスで蔽つて鏡検した。

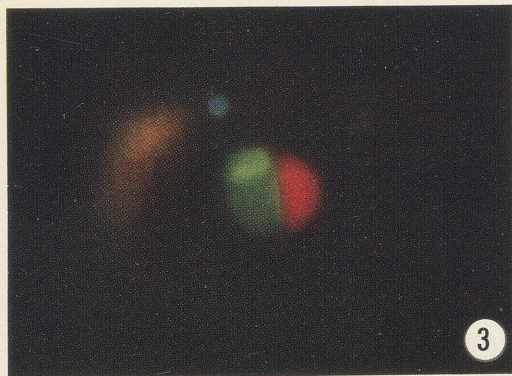
したがつて色素の終末濃度はほぼ 20,000 倍というこ

本研究の一部は、文部省科学研究費トキソプラズマ研究班の補助によつたことを附記して、謝意を表する。
(小宮義孝記)

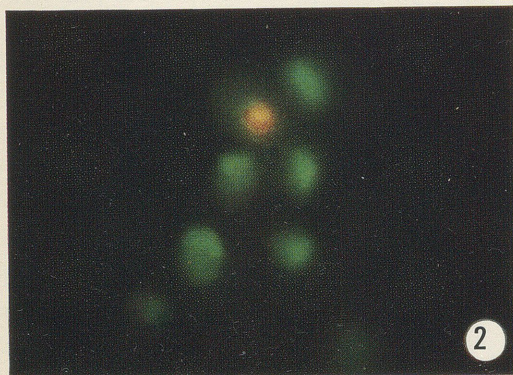
* 現在：日本生物科学研究所



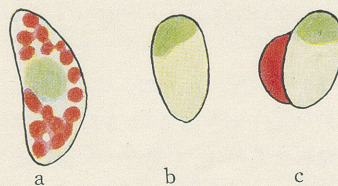
1



3



2



a

b

c

4

第1図および第4a図 採取直後の生虫体
 第2図および第4b図 細胞質内赤色蛍光顆粒の認められなくなった保存虫体
 第3図および第4c図 胞状構造部を示す保存虫体

となる。

なお、混合操作は、蛍光色素の生体に与える影響（毒性）を考慮して、観察直前に行なった。

観察結果

初めに、トキソプラスマの遊離虫体は、生死に拘りなく固有蛍光を示さないことを知つたので、以下に述べる記載は、すべて Acridinorange による二次蛍光の観察結果である。

すなわち、採取直後の生虫体を、低倍率で観察した場合の蛍光色調は、細胞質が赤色、核質が黄緑色であるので、虫体は暗紫色の視野内に、中央部に黄緑色の小点をもつた赤色の三日月形として認められた。

虫体にみられたこの赤色蛍光は、細胞質内の小形赤色蛍光顆粒に基ずくもので、その数およそ10数個で、細胞質内に充満していた(第1図および第4a図)。

この顆粒以外の細胞質部分は、ほとんど蛍光を発しなかつた。

核の構造は、標本作製後時間とともに漸次明瞭となるが、その中央部はほとんど蛍光を発しなかつた。

保存虫体、すなわち感染マウスより採取し、保存した腹水中の虫体では、次第に上記の赤色蛍光顆粒の小形化していくものが、時に出現することもあつたが、一般的な傾向としては、赤色色調の褪色とともに顆粒自体の輪郭の不明瞭な虫体が増加し、保存3日以後は、虫体の蛍光は淡黄色から無色へと色調の変化をたどり、遂には認め難くなつた。

ただし核質の黄色蛍光のみは、以後もかなり長時間にわたつて残存した(第2図および第4b図)。

普通光源による観察時に、時間の経過とともに虫体の外部形態が次第に変化し、三日月形から楕円形ないし卵形となり、時には球形に近いものまで出現するのを認めた。

かかる虫体を蛍光顕微鏡によつて観察すると、採取直後の生虫体に存在した赤色蛍光顆粒とは異なつた、大形の赤色均一に発色する胞状構造部が、虫体周辺部に認められることがあつた(第3図および第4c図)。

この胞状構造部は、蛍光処理法によらずとも、普通光源による鏡検によつて、既に虫体の外部形態からその存

在を察知することができた。

蛍光鏡検時、photo-oxidation によると考えられる褪色現象が顕著にみられ、このために同一虫体の長時間にわたる観察は不可能であるばかりでなく、蛍光像の撮影時にも、長時間の露光が必要なため、同様の困難を感じた。

腹水の保存によつて、虫体の生活力が低下するに伴ない、この現象は一層著しくなるようにみえた。

腹水の pH は、採取直後は約 7.4~7.6、3 日後にはそれが 8.0~8.5 位になるのを知つたが、生虫体を、Holmes の緩衝液にて pH 8.5 に調整した生理食塩水中に浮游後、蛍光処理しても、前述のごとき美しい赤色蛍光顆粒を認めているので、時日の経過に伴つて蛍光色調の褪色する現象は、単に pH だけの問題ではないことは明らかである。

参考迄に記すと、われわれの用いた Acridinorange 生理食塩水溶液の pH は、6.0~6.5 位の弱酸性であつたが、腹水と混じた場合 (1:1 混合) の pH は、腹水のそれとほとんど変わらなかつたことを確かめている。

考 察

蛍光顕微鏡法によつて原虫を観察した報告は、近年増加しつつあり (Strugger, 1949; 小机ら, 1955 a, b, 1957; 鈴木 1955 a, b, 1959; Rothstein, 1958; 長谷ら, 1958; Rothstein *et al.*, 1959; 久井ら, 1960, 1961 a, b, など)、また同法によるトキソプラズマの観察も報ぜられるようになった (Rothstein, 1958; Armstrong *et al.*, 1959; 小山ら, 1960; 牧野ら, 1960, 1961 a, b)。

蛍光顕微鏡法によつて、トキソプラズマ RH 株の、継代マウス腹水中の遊離虫体を観察した結果、われわれは、蛍光色素液の濃度、作用時間、pH などの諸要素が適当であれば、生虫体の蛍光色調の differentiation は顕著であり、Acridinorange を用いた時は、核は黄緑色の、また細胞質は赤色の蛍光を発するのを認めた。

このことは、Armstrong *et al.* (1959)、牧野ら (1961 b) からも同様に述べている。

われわれの実験に用いた蛍光色素は、acridine 系に属する 6 種で、そのうち、トキソプラズマの観察には、Acridinorange が最適であつた。

この結果は、Rothstein *et al.* (1959) のそれと一致している。

したがつて、われわれの観察では、以下常に Acridinorange を、その濃度 10,000 倍で使用し、好結果をえた。

牧野ら (1961 a, b) は、トキソプラズマ生虫体を Acridinorange で染色し、色素濃度 10,000 倍前後、pH は中性ないし弱アルカリ性領域、染色処理時間は 30~60 分間前後などを、最も濃度効果のよい条件としている。

今回のわれわれの目的は、予備試験的な意味の観察であつて、採取直後の腹水内虫体の蛍光色調、および時間に伴う蛍光色調の変化を、できるだけ自然の状態で観察することにあつた。

われわれの結果によれば、採取直後の腹水の pH は、約 7.4~7.6、採取後、腹水を無菌的に保存して 3 日後には、ややアルカリ性 (pH 約 8.0~8.5) になつたが、この範囲の pH では、生虫体は、常に上記のごとき著明な核質と細胞質の differentiation を示したこと、および Acridinorange の生理食塩水溶液の pH は、6.0~6.5 前後の弱酸性を示すが、観察時に、腹水と 1:1 の割合に混合した場合には、その pH は、腹水のそれとほとんど同じであつたことなどから、本観察では、特に pH の調整を行う必要がなく、緩衝液は使用しなかつた。

色素液の作用時間については、前述のごとく、腹水と色素液とをスライドガラス上で混合後、直ちに観察しているが、その時、既に美しい虫体の蛍光像をみており、牧野ら (1961 a) が、色素液処理直後から 30 分間は、原虫の蛍光度が非常に悪いというのと相違している。

これらテクニック上の問題は、更に今後検討を加えたい。

さて、蛍光発色の機構については、不明な点が多く、臆測の域をでないが、De Bruyn *et al.* (1953) が *in vivo* および *in vitro* で、diaminoacridines (acridine 系色素) が、核蛋白に親和力があるとしているほか、生材料または固定材料を用いて、Acridinorange またはそれに構造上近縁の色素によつて観察し、RNA 成分は赤色の DNA 成分は黄色ないし緑色の蛍光を発するとする報告がいくつかある (Armstrong, 1956; Bertalanffy *et al.*, 1956 b; 長谷ら, 1958)。

上に述べた発色の機構に関連して、われわれがトキソプラズマの生虫体を蛍光顕微鏡法によつて観察した際、その細胞質内に認めた赤色蛍光顆粒の本体を追究することも、また興味あるところであると思われるが、そもそも、かかる顆粒の存在は、小机ら (1955 a, 1957) が赤痢アメーバで、鈴木 (1955 a, 1959) が *Trichomonas*, *Balantidium*, *Tetrahymena*, *Paramecium* などで、既に認めているところである。

われわれが、今回、トキソプラズマでも同様な顆粒を

認めたということは、はなはだ興味深い。

そしてわれわれは、更に、これらの顆粒が、トキソプラズマ虫体の activity の低下とともに不鮮明となり、遂には認められなくなることも突きとめており、この現象は、生から死への移行過程を示すものと思われ、これまた、生物学的に興味深いものと考えられる。

鈴木(1959)は、生体内に現われる赤色蛍光顆粒は、固定染色後は認められないとし、上記顆粒は、ある種の構造物というより、むしろ生命に関係の深いある種の物質と考えている。

われわれも固定染色後の虫体で、同様な経験をしているが、同じくトキソプラズマで細胞学的研究を行なっている Cross(1947)および、細胞化学的検索を行なっている阿部(1958)の論文にも、かかる顆粒の記載は見られない。

長谷ら(1958)は、塩を加えた Acridingelb による染色の結果を、柴谷(1948)が、塩基性色素による細胞の染まりが、食塩によつて抑えられ、また飽和食塩水で脱色される場合、これはイオン結合による染まりと判断されてよいとする報告から判断して、イオン結合によるものと考えている。

また山崎(1955)は、acridine 系色素は、蛋白質を沈澱する性質を持つといい、Bertalanffy *et al.* (1956 b)は、commercial RNA に Acridinorange を作用させると、細胞内で認めたものに類似した赤色蛍光沈澱を生じたといっている。

因に、彼らは、例の赤色蛍光顆粒が、各種の新鮮な動物組織細胞内にも出現することを報じている。

Kurnick(1955)も、いくつかの報告を引用して、RNA が、蛍光色素との反応によつて顆粒を形成する場合のあることを述べている。

以上の諸説を総合してみるに、目下のところ、例の赤色蛍光顆粒は、生細胞質内において、RNA と Acridinorange との結合により新たに形成された沈澱物が、顆粒形態をとつたものではないかというのが、妥当な考えのようである。

ただし、組織化学的なテクニックによつて認めた RNA 成分と Acridinorange との結合物が、生体内で認めた顆粒と同一物であると断定するためには、更に多くの研究が必要であろう。

次に、われわれが、activity 低下虫体において認めた胞状構造部は、鈴木(1959)がいう blister と同一のものと考えられるが、このものは、普通鏡検においても認

めうるものであつて、特に蛍光法の影響によつて生じたものではなく、虫体自体の退行変性像であると思われる。

その著明な赤色蛍光は、特異的であつて興味ある現象である。

最後に、蛍光鏡検の応用面を考察してみよう。

まずこの方法によると、極めて低濃度の色素でよいことから、生体観察が比較的に安全に行え、artifacts を少なくすることが可能である。

Bertalanffy *et al.* (1956 b) も指摘するように、通常の生体染色では染まり難い核が、蛍光鏡検によれば容易に認められるということも、この方法の優れた点といえよう。

呈色反応が specific に行われることが、確認されれば、組織化学的な面への展開が予想できるし、Strugger(1949)や Borchert *et al.* (1950) らがいうように、Acridinorange による蛍光処理法で、生細胞と死細胞の間に生ずる色調の差を利用して、生死判別も可能であろう。

生死判別といえ、細胞質内の赤色蛍光顆粒の推移を追うことによつても、その可能性が考えられ、虫体の環境諸要因に対する抵抗性の追究や、殺滅のための効果的な薬剤の検索などに、この方法の導入が期待されるだけでなく、顆粒の消長そのものは、細胞の生命現象に密接な関連をもつものごとく、この本態追究は、生物学的にも大いに意義があると考えられる。

最後に、Bertalanffy *et al.* (1956 a) が、蛍光鏡検で、malignant cell と normal cell とを、蛍光色調の差で区別できたといっているように、特定の虫体もしくは細胞の検出にも応用できる可能性がある。

特に、マウス腹水中のトキソプラズマ遊離虫体の場合には、Acridinorange 蛍光染色によつて、低倍率でも、黄緑色の核を中心にもつた赤色の三日月形態として認めることができ、主として黄緑色の蛍光を発する宿主細胞とは、その色調および形態の点で容易に識別しうる。

したがつて、今後、虫体の検出という分野でも、この観察方法の効果的な利用が期待される。

要 約

Acridinorange 生体蛍光処理法によつて、トキソプラズマ RH 株の、継代マウス腹水中の遊離虫体を観察した結果は、以下のごとくである。

すなわち、採取直後の生虫体の蛍光色調は、細胞質が赤色、核質が黄緑色であつた。

この赤色蛍光は、細胞質内の小形赤色蛍光顆粒にもと

づくもので、採取後、時間の経過とともにこの顆粒は次第に褪色し、遂に認められなくなった。

以上の結果から、この赤色蛍光顆粒の消長は、虫体の生命現象と密接な関連があると思われ、生物学的に興味ある問題であると同時に、上記赤色蛍光顆粒の存否をもとにして、ある程度の生死判別が可能であろうと考えられた。

本研究の要旨は、第20回日本寄生虫学会東日本支部大会において発表した。

引用文献

- 1) 阿部道夫(1958) : *Toxoplasma gondii* の細胞化学的検索並に Sulfa 剤投与後における虫体の細胞化学的变化. 慶応医学, 35(2), 193-208.
- 2) Armstrong, J. A. (1956): Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. Exp. Cell Res., 11, 640-643.
- 3) Armstrong, J. A. & Fulton, J. D. (1959): Observations on the pathology of Toxoplasmosis in the cotton rat. British J. Exp. Pathol., 40(3), 225-231.
- 4) Bertalanffy, L. von, Masin, F. & Masin, M. (1956a): Use of acridinorange fluorescence technique in exfoliative cytology. Science, 124(3230), 1024-1025.
- 5) Bertalanffy, L. von & Bickis, I. (1956b): Identification of cytoplasmic basophilia (RNA) by fluorescence microscopy. J. Histochem. Cytochem., 4(5), 481-493.
- 6) Borchert, R. & Helmcke, J. G. (1950): Bemerkungen zur Fluorochromierung lebender und toter Zellen mit Akridinorange. Naturwiss., 37, 565.
- 7) Cross, J. B. (1947): A cytologic study of *Toxoplasma* with special reference to its effect on the host's cell. J. Inf. Dis., 80, 278-296.
- 8) De Bruyn, P. P. H., Farr, R. S., Banks, H. & Morthland, F. W. (1953): *In vivo* and *in vitro* affinity of diaminoacridines for nucleoproteins. Exp. Cell. Res., 4: 174-180.
- 9) 久井学・木下勝夫・高田季久(1960): 蛍光顕微鏡による *Trichomonas* 類の観察(第1報). 第16回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 12.
- 10) 久井学・高田季久・木下勝夫(1961a): 蛍光顕微鏡による *Trichomonas* 類の観察(第2報). 寄生虫誌, 10(4), 498-499.
- 11) 久井学・高田季久・木下勝夫(1961b): 蛍光法によるトリコモナス類の観察(第3報). 第17回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 19-20.
- 12) 小山路・小林昭夫・石井俊雄・熊田三由・小宮義孝・小机弘之(1960): トキソプラズマに関する研究. (3) 蛍光顕微鏡による虫体の観察. 第20回日本寄生虫学会東日本支部大会記事, 15.
- 13) 小机弘之・鈴木禾甫(1957): Acridinorange 蛍光法によるアメーバ 症治療薬の試験管内効果判定のこころみ. 医学と生物学, 43(4), 134-140.
- 14) 小机弘之・鈴木禾甫・沢田利貞(1955a): Acridinorange 蛍光処理法による赤痢アメーバの生体観察. 第I編 新鮮染色法による観察. 北関東医学, 4(4), 265-269.
- 15) 小机弘之・鈴木禾甫・沢田利貞(1955b): Acridinorange 蛍光処理法による赤痢アメーバの生体観察. 第II編 培養染色法による観察. 北関東医学, 4(4), 270-273.
- 16) Kurnick, N. B. (1955): Histochemistry of nucleic acids. Internat. Rev. Cytol., 4, 221-268.
- 17) 牧野毅・高田季久(1960): 蛍光顕微鏡による *Toxoplasma* の観察(第1報). 第16回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 12-13.
- 18) 牧野毅・高田季久(1961a): 蛍光顕微鏡による *Toxoplasma* の観察(第2報). 寄生虫誌, 10(4), 507-508.
- 19) 牧野毅・高田季久(1961b): 蛍光法によるトキソプラズマの観察(第3報). 第17回日本寄生虫学会西日本支部大会講演抄録, 22.
- 20) 長谷芳美・森原正博(1958): 蛍光顕微鏡によるゾウリムシの皮質構造. 山口理学会誌, 9, 91-99.
- 21) Rothstein, N. (1958): Vital staining of blood parasites with acridine orange. J. Parasit., 44(6), 588-594.
- 22) Rothstein, N. & Diamond, L. S. (1959): Vital staining of parasitic protozoa for dark-field microscopy. J. Protozool., 6 (Suppl.), 8.
- 23) 柴谷篤弘(1948): 核酸の染色機構について. IV. 細胞のリボ核酸が塩基性色素と化学的に結合していることを判定する方法. 医学と生物学, 13(4), 297-300.
- 24) Strugger, S. (1949): Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. Schaper, Hannover, 194 pp.
- 25) 鈴木禾甫(1955a): Acridinorange 蛍光処理法による *Trichomonas vaginalis* の生体観察. 第I編 新鮮染色法による観察. 北関東医学, 6(1), 29-34.
- 26) 鈴木禾甫(1955b): Acridinorange 蛍光処理法による *Trichomonas vaginalis* の生体観察. 第II編 培養染色法による観察. 北関東医学, 6(1), 35-38.
- 27) 鈴木禾甫(1959): 蛍光顕微鏡法による絨毛虫の研究. 慈医大雑誌, 74(11), 2616-2627.
- 28) 山崎和秀(1955): 蛍光色素に関する研究, 蛍光色素の蛋白質沈澱作用について. 医学と生物学, 37(4), 141-145.

STUDIES ON TOXOPLASMA
III. THE FLUORESCENCE-MICROSCOPIC OBSERVATION
OF THE PARASITE

TSUTOMU KOYAMA, AKIO KOBAYASHI, TOSHIO ISHII,
MITSUYOSHI KUMADA, YOSHITAKA KOMIYA,
(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo*)

&

HIROYUKI KOZUKUE
(*Department of Hygiene, Jikei University School of Medicine, Tokyo*)

The living organisms obtained from the peritoneal fluid of mouse infected with *Toxoplasma gondii* (strain RH) were observed by means of the acridine orange vital fluorescent staining.

The results obtained are as follows :

- 1) The nucleus of the proliferative form fluoresced greenish yellow, whilst the cytoplasm red.
- 2) At high magnification, it became apparent that the red fluorescence of cytoplasm was due to many red spherical granules in it.
- 3) When the peritoneal fluid contained organisms was preserved at room temperature, these granules gradually faded in course of time, and finally disappeared.

Judging from the above mentioned results, the existence of these granules seems to be closely related to the activity of the parasites, and it is thought biologically very interesting phenomenon.

This phenomenon might practically be applied to distinguish the living organism from the dead, according to the existence of these granules.