

# 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

坂本 等

大阪大学微生物病研究所寄生虫原虫学部 (部長 猪木正三教授)

(昭和37年9月28日受領)

## 緒言

*Trypanosoma brucei* に感染した動物にある種の有機色素を注射すれば、原虫の細胞質内にある自家増殖性顆粒、すなわち、Kinetoplast を欠除した変異型原虫 (akinetoplastic 型=AK 型) が出現する事実は、Werbitzki (1910) によつてはじめて記載され、その後、本現象は種々の *Trypanosoma* についても観察された。その間の消息は Jirovec (1929) および Hoare (1954) の総説に詳しく記載されている。しかし、色素注射後宿主動物内で増加する AK 型の起源について、遺伝学的な立場から深く掘り下げて解析を試みたものはなかった。

Inoki (1956) は本問題に興味をもち、*Trypanosoma gambiense* (以下 *T.g.* と略す) について、色素による AK 型誘発の過程を遺伝学的に追求し、pararosaniline (以下 *p-rostaniline* と略す)、rosaniline および acriflavine 注射後に増加する AK 型は、色素の直接作用の下に、Kinetoplast をもつた原虫 (以下 K 型と略す) から細胞分裂時造りだされるものであり、色素投与前に混在する自然発生の AK 型が、色素の淘汰作用によつて単に現われたものでないと結論した。この研究はその後、原虫における形質転換 (genetic transformation) 現象の発現という新しい方向に発展した (猪木ら, 1957; 猪木・松代, 1958; Inoki & Matsushiro, 1960; 猪木, 1961; Inoki *et al.*, 1961)。

著者は *T.g.* における猪木らの成績と比較する目的をもつて、色素による *Trypanosoma evansi* (以下 *T.e.* と略す) の AK 型誘発機序の解析を試み、更に新しい AK 型誘発物質 (特に抗毒性物質を中心に) を探求し、興味ある結果をえたのでここに報告する。

## 実験材料および実験方法

### 実験材料

#### 1) 使用マウス

本研究には、阪大微生物病研究所の純系動物飼育場より供給された体重約 20 g の純系 (白色) dd マウスを使用した。

#### 2) 使用原虫

農林省家畜衛生研究所小平分場より分与された台湾系の *T.e.* を使用した。実験には Inoki (1960) の方法にしたがい単個原虫を分離し、それから出発した純な系統 (clone) を用いた。本系統を上記 dd マウスに接種すれば、AK 型が約 5% の出現率をもつて末梢血液に現われる。本原虫の AK 型は、*T.g.* のそれと異なり増殖可能である (Inoki *et al.*, 1960)。

#### 3) 使用薬剤

色素剤として、*p-rostaniline*、acriflavine および ethidium bromide、その他種々の抗毒性物質 (抗生物質を含む) を使用し、種々の量を *T.e.* 感染マウスの腹腔に注射して AK 型誘発の過程を観察した。

## 実験方法

#### 1) 継代感染の方法

ほぼ Inoki *et al.* (1952) の術式にしたがい、感染マウスの尾端よりえた血液を、glucose-citrate-saline solution (glucose 0.5%, sodium citrate 0.5%, NaCl 0.5%) に採取し、これを新しいマウスの腹腔内に注射し継代保存した。かかる系統の原虫では、自然発生の AK 型の出現率がほぼ一定値を示し 5% 前後であった。したがつて、*T.g.* で行なつたようないわゆる AK 型誘発試験 (Inoki, 1956; Inoki & Matsushiro, 1959) が可能となつた。

#### 2) 染色法および AK 型出現率の算出法

中等度 (H) に感染したマウスの尾端より血液塗抹標本を作成し、自然乾燥後これを純メタノール内で固定し、Kinetoplast を明瞭に示すため、更に標本を 60°C に加温

本研究の一部は文部省科学研究費により支弁された。ここに附記して謝意を表する (猪木記)

した1N HCl中に約2分間浸して加水分解を行なった。染色はメルクのギムザ氏液をもって40分間行ない、乾燥後検鏡した。ギムザ氏原液はpH 7.4の磷酸緩衝液 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  18 g/1000 ml +  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.4 g/500ml) をもって適当に稀釈して使用した(緩衝液1 mlにつき、ギムザ原液1滴が適当)。

AK型出現率は、上記のごとく作成した染色標本について、原虫500コ中に含まれるAK型の数を油浸装置の顕微鏡下で算出し、その百分率をもって表現した。

### 3) 分裂型内における2個のKinetoplast間の距離の測定法

各血液塗抹染色標本について、分裂型50コを任意に選び、その個々についてKinetoplast間の距離を微測計をもって測定し、その平均値を表示した。この方法は、AKの出現が薬剤の直接作用によるか否かの判定に用いられる。

### 4) K型およびAK型分裂型の出現率の算出法

薬剤がK型およびAK型の分裂を阻害するか否かを観察するためにこの方法を用いた。すなわち、血液塗抹染色標本について、K型では1,000個、AK型では300個の原虫を数え、各型における分裂型(2核をもつ原虫)を算出した。この成績を更に確かめるため、出現率の値を $\chi^2$ の方法によって統計学的に処理した。

## 実験成績

### 1) *p*-rosanilineによるAK型の誘発実験

中等度に感染せるマウスの腹腔内に、*p*-rosanilineの種々の量、すなわち、1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 50 mg/kgを投与し、注射後30分間隔で4時間にわたり血液塗抹標本を作り、AK型の百分率を求めた。Fig. 1に示したごとく、5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg投与例においては、注射約150分後よりAK型の増加をみ、約240分後ではその値が20%前後に達した。これに反し、1 mg/kg, 50 mg/kg投与例においては、かかる増加はみられなかつた。

この成績は、*T.g.*を感染せしめたマウスに*p*-rosanilineの適量を注射した場合に比してAK型の出現がやや遅延しているように思われた。これは恐らく、原虫の発育速度の差に起因するものと思われる。また、*T.e.*においても*T.g.*におけるがごとく、AK型誘発に有効な*p*-rosanilineの量に一定の範囲があることが知られた。

しかも、AK型誘発に有効な*p*-rosanilineの量は、兩種

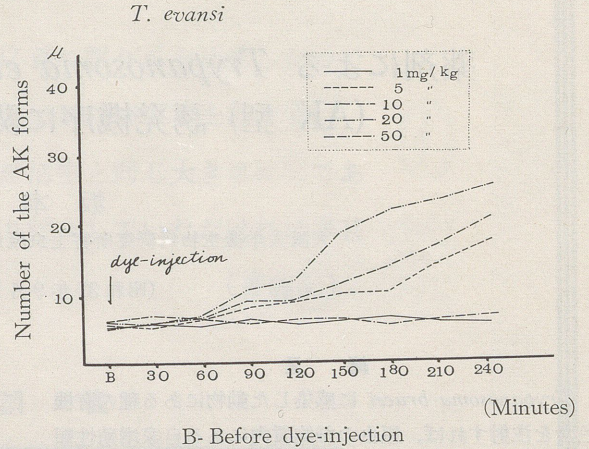


Fig. 1 Effect of *p*-Rosaniline

において全く一致していた点は興味がある。

次に、このようなAK型の増加が、果して*T.g.*の場合にみられたと同じ機序によって起されるか否かを検討した。すなわち、色素による*T.g.*のAK型誘発機序の解析に用いたInoki (1956)の方法に準拠して、色素投与後に出現する*T.e.*の分裂型内の2コのKinetoplast間の距離を測定した。Fig. 2に示すごとく、非投与例ではその距離は2 $\mu$ 内外の値を保持しているのに反し、色素投与例では1 mg/kgを除いて全て時間の経過と共に漸次縮小し、240分では2つのKinetoplastが殆んど接触した状態となつて現われた。したがって、*p*-rosa-

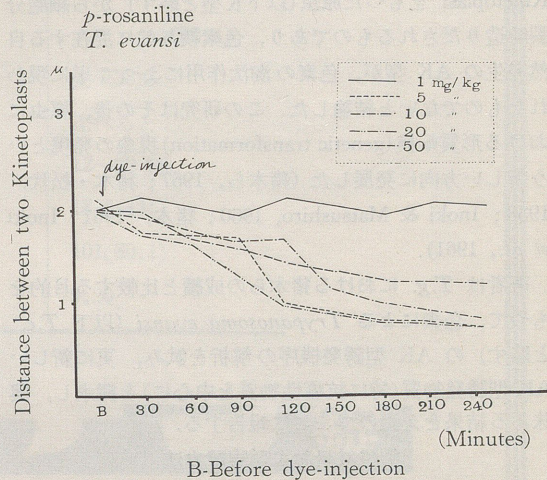
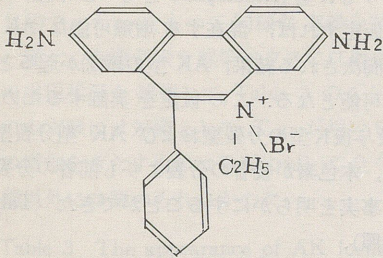


Fig. 2 Distance between two Kinetoplasts in the dividing form

niline 投与後にみられる *T.e.* の AK 型の増加は, *T.g.* におけると同様な機序, すなわち, その直接作用によつてもとの K 型原虫より分裂時に造りだされる AK 型に起因するものと結論された. ただ, 50 mg/kg 投与例において確かに Kinetoplast の分裂が阻害されているにも拘らず, AK 型の増加がみられなかつた点は, *T.g.* と同様かかる大量は原虫そのものの分裂を阻害するためだと解説された. 以上の成績から, *p*-rosaniline による AK 型誘発は, 両種の *Trypanosoma* において全く同様な機序によつて惹起されるものと考えられる.

2) ethidium bromide による AK 型の誘発実験

Newton(1957)が *Strigomonas oncopelti* を使用して, ethidium bromide が DNA 合成を特異的に阻害し,



ethidium bromide の構造式

RNA および蛋白合成を阻害しない事実を明らかにした. DNA 合成の阻害作用および抗 *Trypanosoma* 性をもつ rosaniline との相似性から, 本色素も *T.e.* の Kinetoplast の分裂を阻害し, AK 型誘発に有効な物質ではなからうかと考え次の実験を試みた.

実験には 1 mg/kg, 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg,

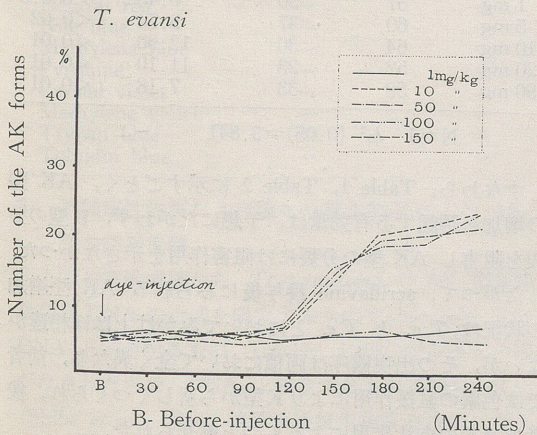


Fig. 3 Effect of ethidium bromide

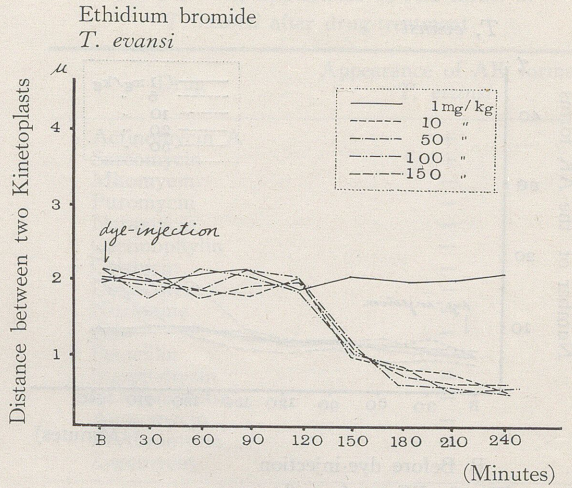


Fig. 4 Distance between two Kinetoplasts in the dividing form

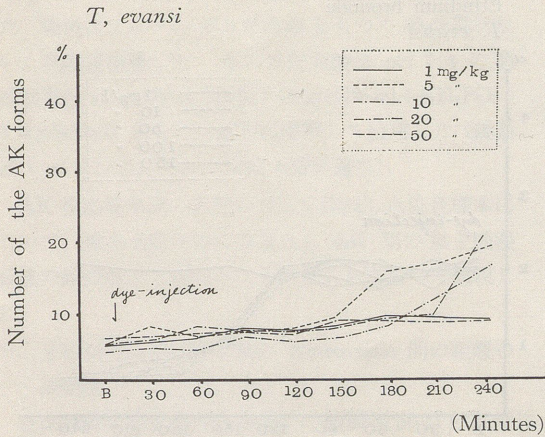
150 mg/kg を *T.e.* 感染マウスに注射し, その AK 型の出現を既述の方法で観察した. その結果, 10 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg 投与例において, 予期したごとく AK 型の増加がみられ, 240 分後ではほぼ 20% の値に達した. ただし, その増加の状態は, *p*-rosaniline 投与例に比して急激な傾きを示しているように思われた. これに反し, 少量の 1 mg/kg および, 大量の 150 mg/kg ではいずれも増加がみられなかつた. このように本剤にも AK 型誘発に有効な量的範囲がある点は *p*-rosaniline と同様である (Fig. 3).

次に, その誘発機序を *p*-rosaniline の場合と同じ方法で解析した処, 全く同様な結論に達した. すなわち, 分裂型内の二つの Kinetoplast 間の距離は, 本色素投与後時間の経過とともに短小することがみられた (Fig. 4 参照). したがって, ethidium bromide による AK 型の誘発は *p*-rosaniline とほぼ同様な機序によつて起されることが明らかにせられた.

3) acriflavine による AK 型誘発実験

Inoki(1956)は, *T.g.* に感染したマウスに acriflavine を注射すれば AK 型が増加し, かつ, その AK 型発現機序は *p*-rosaniline と同様, acriflavine の直接作用によつてもとの K 型原虫から細胞分裂時につくりだされることを明らかにした. したがってここでは, acriflavine が *T.e.* の AK 型誘発にどのように作用するかを検討した.

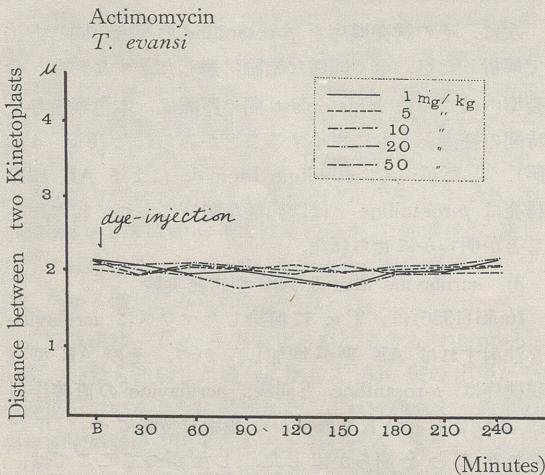
実験には, 1 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg,



B. Before dye-injection  
Fig. 5 Effect of acriflavine

50 mg/kg を各々感染マウスに注射し、AK 型の出現を観察した処、5 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg において AK 型の増加がみられ、1 mg/kg, 50 mg/kg ではその増加が認められなかつた。この成績から *T.e.* の AK 型誘発に有効な色素量にも一定の範囲が存在することが認められた。ただし、*T.g.* の場合に比して、その有効量は約 10 倍となつている。有効量投与後の AK 型増加の状態は Fig. 5 に示したごとく、約 90 分後より増加がみられ、240 分では約 20 %前後の値を示した。

この場合、*p*-rosaniline 投与例に比し、AK 型の増加し始める時期は多少早く、*T.g.* 感染に acriflavine を投



B. Before drug-injection  
Fig. 6 Distance between two Kinetoplasts in the dividing form

与した場合と酷似していた。

次に、AK 型の出現機序を明らかにするため、上記同様分裂型内の二つの Kinetoplast 間の距離を測定した処 *p*-rosaniline, ethidium bromide 投与の場合と異なり、240 分間の観察中その距離が一定に保たれ、短小がみられなかつた (Fig. 6 参照)。

この成績は、acriflavine を *T.g.* に与えた場合の成績と全く相違して特に興味があつた。したがつて、acriflavine による *T.e.* の AK 型誘発は、*p*-rosaniline および、ethidium bromide 投与の場合と異なり、その淘汰作用によるものと推定された。かつて Inoki *et al.* が報告したごとく、*T.e.* の AK 型が *T.g.* のそれとちがつて増殖可能である。そこで、acriflavine が *T.e.* の AK 型よりも K 型 (Kinetoplast をもつ正常型) に強く作用すると仮定すれば、混在する増殖可能な AK 型が薬剤により淘汰される結果、AK 型の増加が起ると合理的な説明が可能となる。この仮定を実証するため、acriflavine 投与後 K 型の分裂型および AK 型分裂型の増減を観察し、本色素が後者の分裂よりも前者の分裂を強く阻害する事実を明らかにすることができた (Table 1 および 2 参照)。

Table 1 The effect of acriflavine on the division of the K type forms

Dye dosage	Number of dividing forms per 1000 K type cells		Statistical analysis	
	Before dye-injection	240minutes after dye-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	59	55	0.14	<0.7
1 mg	57	50	0.46	0.5-0.3
5 mg	60	37	5.74	<0.02
10 mg	64	30	12.90	<0.01
20 mg	52	23	11.10	<0.01
50 mg	58	33	7.18	<0.01

$$N=1 \quad \lambda_0^2 (0.05) = 3.841$$

すなわち、Table 1, Table 2 に示すごとく、AK 型の増加を誘起する有効量は、予想にたがわず、K 型の分裂を阻害し AK 型の分裂には阻害作用を示さなかつた。したがつて、acriflavine 投与後にみられる AK 型増加の状況は、*T.g.* と *T.e.* とにおいてみかけ上ほぼ相違がないが、その出現機序は両種において全く異なり、前者では色素の直接作用により K 型から新しくつくられ、後者ではその淘汰作用によるものと解せられた。

4) その他の有機色素剤による AK 型の誘発実験

Table 2 The effect of acriflavine on the division of the AK type cells

Dye dosage	Number of dividing forms per 300 AK type cells		Statistical analysis	
	Before dye-injection	240minutes after dye-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	15	14	0.138	0.8>0.7
1 mg	17	15	0.130	0.8>0.7
5 mg	16	15	0.032	0.9>0.8
10 mg	17	16	0.028	0.9>0.8
20 mg	15	14	0.034	0.9>0.8
50 mg	18	16	0.122	0.8>0.7

$$N=1 \quad \chi_0^2(0.05)=3.841$$

Inoki (1956) は *T.g.* を用いて新しい AK 型誘発物質を求めて実験を行なっている。著者は、その成績と対比する目的で、*T.e.* をもって同様な実験を試みた。すなわち、種々の有機色素を感染マウスに注射後上記同様 AK 型の出現状況を観察して Table 3 のごとき結果をえた。この実験には対照として *T.g.* が用いられたが、AK 型の増加をきたすものは両種において全く一致し、上記 4 種以外には認められなかった。

Table 3 The appearance of AK forms in *T. gambiense* & *T. evansi* after dye-treatment

Dye	Appearance of AK forms	
	<i>T. gambiense</i>	<i>T. evansi</i>
<i>p</i> -Rosaniline	+	+
Rosaniline	+	+
Ethidium bromide	+	+
Acriflavine	+	+
Methyl green	-	-
Neutral red	-	-
Nile blue	-	-
Methylene blue	-	-
Pyronine	-	-
Crystal violet	-	-
Methylene violet	-	-
Trypan blue	-	-
Toluidin blue	-	-

#### 5) 抗腫瘍性物質および種々の抗生物質による AK 型の誘発実験

上記の実験成績から、*Trypanosoma* の AK 型誘発物質は DNA の合成を阻害するものや (Newton, 1957), DNA と結合するもの (Lawley, 1956) であるとの推定がなされたので、DNA と結合するものが知られている (Shiba *et al.*, 1958) 抗腫瘍性抗生物質の中に、新しい AK 型誘発物質がみ出されるかも知れないとの大きな期

Table 4 The appearance of AK forms in *T. evansi* after drug-treatment

Drug	Appearance of AK forms <i>T. evansi</i>
Actinomycin A	+
Sarcomycin	+
Mitomycin	-
Puromycin	-
Naramycin	-
Cartinophylin	-
Colchicin	-
Demecorcin	-
Nitromine	-
Azan	-
Penicillin	-
Streptomycin	-
Chloromycetin	-
Aureomycin	-
Erythromycin	-
Zygomycin	-

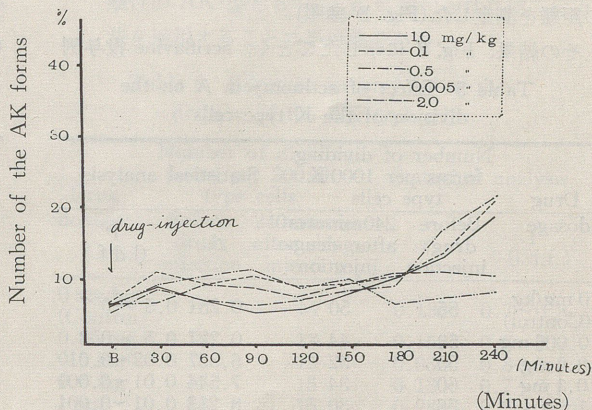
待をもつてこの実験を行なつた。なお、普通の抗生物質についても対照の意味で一応検討した。

実験に用いた抗生物質は Table 4 に示した 16 種であるが、その内、actinomycin A および sarcomycin のみに AK 型誘発の効果が認められた。いま、actinomycin A および sarcomycin の成績について詳しく説明することにする。

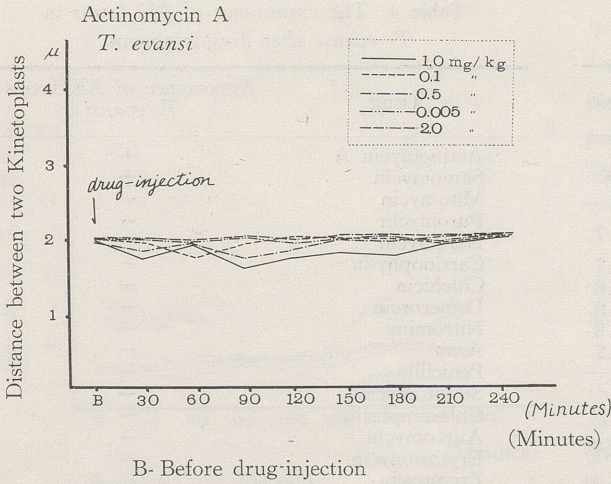
#### a) Actinomycin A

色素剤と同様な方法で、種々の量の actinomycin A を *T.e.* 感染マウスに注射し AK 型誘発効果を検討した。Fig. 7 には、0.005 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg をそれぞれ感染マウスに注射した成績が示されている。すなわち、AK 型の増加が 0.1

#### *T. evansi*



B-Before drug-injection  
Fig. 7 Effect of actinomycin A



B- Before drug-injection

Fig. 8 Distance between two Kinetoplasts in the dividing form

mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg において認められ, その値は 240 分後には約 20% の値を示した. これに反し, 0.005 mg/kg および 2 mg/kg 量ではそれほど著明な変化が認められなかった. したがって, 本抗生物質にも色素と同じように, AK 型誘発に有効な一定の量的範囲があることが明らかにせられた (Fig. 7 参照). いま, AK 型出現曲線を見ると, 他の色素剤の場合とちがって AK 型増加の時期がやや遅れ, 210 分後になって AK 型が増加し始めている. そこで, この AK 型の増加が *p*-rosaniline の場合のごとく, その直接作用によるものかあるいは acriflavine のごとくその淘汰作用の結果として現われるのか, そのいずれかを決定する目的で, まず薬剤注射後にみられる分裂型内の二つの Kinetoplast 間の距離を測定した (Fig. 8 参照).

その結果, Fig. 8 に示したごとく, acriflavine 投与例

Table 5 Effect of actinomycin A on the division of the K type cells

Drug dosage	Number of dividing forms per 1000 K type cells		Statistical analysis	
	Before drug-injection	240minutes after drug-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	55	50	0.251	0.5 ~ 0.7
0.005 mg	53	44	0.277	0.5 ~ 0.3
0.5 mg	55	32	6.357	0.02 ~ 0.01
0.1 mg	60	34	7.546	0.01 ~ 0.001
1 mg	56	30	8.213	0.01 ~ 0.001
2 mg	52	30	6.154	0.02 ~ 0.01

$N=1 \quad \chi_0^2(0.05)=3.841$

と全く同様, その距離の短小がみられなかった. この成績から, 増加した AK 型は, *p*-rosaniline の場合のごとく actinomycin A の直接作用でもとの K 型原虫からつくりだされたものでなく, acriflavine の *T.e.* に対する作用のごとく, actinomycin A が AK 型よりも K 型原虫の分裂を強く阻害するため起る淘汰作用の結果, 自然発生の AK 型が増加して現われたものであろうと推論された. この仮定を実証するため, actinomycin A の各実験量について, K 型および AK 型原虫の分裂に対する阻害作用を統計学的に観察したところ, Table 5, Table 6 に示したごとく, 有効量 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg ではいづれも 予期したごとく K 型の分裂を阻害し, AK 型の分裂には殆んど影響を示さなかった. したがって, この場合も acriflavine 投与の場合と同じ機序で, AK 型が増加するものと解釈された.

#### b) Sarcomycin

sarcomycin の種々の量について AK 型誘発実験を行なった結果, Fig. 9 に示すごとく, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg において AK 型の増加がみられ, 投与後 240 分において約 20% の値に達した.

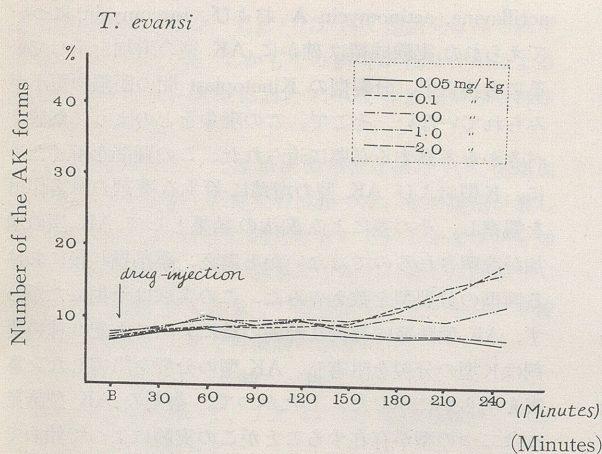
これに反し, 少量の 0.05 mg/kg, 多量の 2 mg/kg 量ではかかる増加はみられなかった. したがって sarcomycin にも AK 型誘発の量的有効域が存在することが知られた.

そこで, actinomycin A 同様の術式をもつて, AK 型誘発機序の解析を行ない, 本剤も *p*-rosaniline と異なり, acriflavine と同じ機作によって最初から混在した AK 型を淘汰する結果, AK 型の増加が現われるものと解せられた (Fig. 10, Table 7, Table 8 参照).

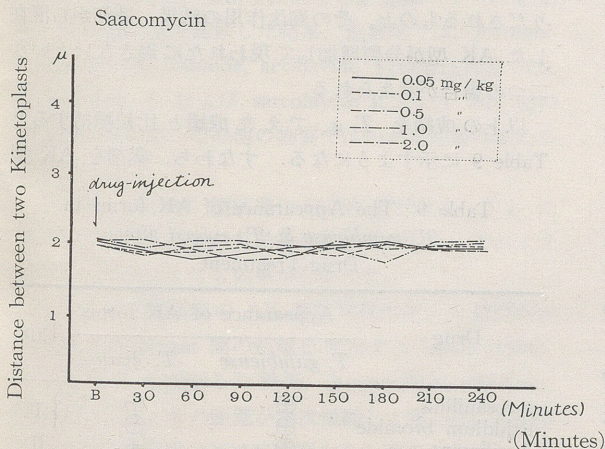
Table 6 Effect of actinomycin A on the division of the AK type cells

Drug dosage	Number of dividing forms per 300 AK type cells		Statistical analysis	
	Before drug-injection	240minutes after drug-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	16	15	0.032	0.8 ~ 0.9
0.005 mg	16	14	0.138	0.7 ~ 0.8
0.5 mg	15	12	0.349	0.5 ~ 0.7
0.1 mg	15	14	0.034	0.8 ~ 0.9
1 mg	16	17	0.032	0.8 ~ 0.9
2 mg	17	15	0.130	0.8 ~ 0.7

$N=1 \quad \chi_0^2(0.05)=3.841$



B- Before drug-injection  
Fig. 9 Effect of sarcomycin



B- Before drug-injection  
Fig. 10 Distance between two Kinetoplasts in the dividing form

Table 7 Effect of sarcomycin on the division of the K Type cells

Drug dosage	Number of dividing forms per 1000 K type cells		Statistical analysis	
	Before drug-injection	240minutes after drug-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	56	54	0.038	0.7 ~ 0.8
0.05 mg	53	46	1.795	0.1 ~ 0.2
0.1 mg	50	30	5.208	0.07 ~ 0.05
0.5 mg	55	33	5.753	0.01 ~ 0.02
1 mg	56	30	8.213	0.01 ~ 0.001
2 mg	60	40	4.211	0.02 ~ 0.05

$$N=1 \quad \chi_0^2(0.05)=3.841$$

### c) その他の物質

発癌および抗癌に関係あると思われる物質，すなわち，20-methylcholanthrene, dimethylaminoazobenzene (D.A.B.) および D.A.B. 系物質 10 種 methylaminoazobenzene (M.A.B.) および M.A.B. 系物質 4 種について AK 型誘発実験を試みたが，いずれも陰性に終った。

### 総括および考察

K型の単個原虫から出発した *T.e.* の純な系統 (clone) を接種したマウスでは，その AK 型出現率は一定な値を示し，*T.g.* で用いたような薬剤による AK 型誘発試験が可能であると記載した Inoki *et al.*, (1960) の報告にしたがい，著者は種々の色素剤ならびに抗生物質その他を感染マウスに注射し，*T.e.* の AK 型誘発試験を試み，更にその出現機序を検討した。その結果，誘発陽性の成績をえたものは，色素剤では *p*-rosaniline, ethidium bromide, acriflavine, 抗腫瘍性物質では actinomycin A, sarcomycin であった。

これら薬剤注射後の AK 型増加は，*T.g.* におけるよりも常に遅く始まるように思われた。なお *T.e.* においても *T.g.* 同様，薬剤にはそれぞれ AK 型誘発に有効な適量が存在することを明らかにした。しかも，有効量は兩種において相違する場合があることも知られた。

次に，薬剤による *T.e.* の AK 型誘発が，*T.g.* と同じ機序で起されるか否かを検討した。しかし，増殖性の AK 型をもつ *T.e.* に対しては，非増殖性の AK 型をもつ *T.g.* に用いられた総ての方法を適用することは不可能である。

Table 8 Effect of sarcomycin on the division of the AK type cells

Drug dosage	Number of dividing forms per 300AK type cells		Statistical analysis	
	Before drug-injection	240minutes after drug-injection	$\chi^2$	P (l.d.f.)
0 mg/kg (Control)	16	14	0.138	0.7 ~ 0.8
0.05 mg	15	13	0.155	0.7 ~ 0.8
0.1 mg	16	15	0.032	0.8 ~ 0.9
0.5 mg	17	15	0.130	0.7 ~ 0.8
1 mg	18	15	0.288	0.5 ~ 0.7
2 mg	20	21	0.026	0.8 ~ 0.9

$$N=1 \quad \chi_0^2(0.05)=3.841$$

ただ、使用可能な方法は、分裂型における2個の Kinetoplast 間の距離を測定し、その変化から AK 型の誘発機序を知る方法であり、これによると AK 型の増殖性の如何と無関係に、AK 型の誘発が薬剤の直接作用によつて起されるのか、あるいは、その薬剤が始めから混在していた AK 型を淘汰するに過ぎないのかを判別することができる (Inoki & Matsushiro, 1959). すなわち、前者では時間の経過とともにその距離が漸次短小するに反し、後者では短小せず一定の値が保たれる。

上記の方法によつて、AK 型誘発陽性と判定された物質5種について誘発機序を解析した結果、*p*-rosaniline, ethidium bromide では、2コの Kinetoplast 間の距離は、投与後時間の経過とともに漸次短小し、*T.g.* におけると同様両色素の直接作用によつてもとの K 型原虫から分裂時に AK 型がつくりだされることが明らかにせられた。これに反し、actinomycin A, sarcomycin および acriflavine では、投与後もその距離の短小はみられなかつた。特に、acriflavine では、*T.g.* と *T.e.* とにおいてその成績は全く異なり、後者では投与後 Kinetoplast 間の距離の短小がみられなかつたことは興味ある事実と思われる。すなわち、この成績から、たとえ同一薬剤によつて AK 型の増加が起るとしても、その誘発機序は使用する原虫の種類によつて全く異なる場合があることが明らかにせられた。したがつて、*T.e.* を用いて薬剤の AK 型誘発効果を観察した従来の報告 (Laveran & Roudsky, 1919; Jirovec, 1929) は、上記の解析方法で再検討する必要がある。したがつて、かかる解析を行なわずただ AK 型の増加のみを観察するだけでは、その薬剤が果して AK 型をつくりだす作用を有しているかどうかを決定することは不可能である。事実、*T.e.* の AK 型誘発物質として記載 (Jirovec, 1929) された pyronine も著者の方法によつて再検討してみると、AK 型誘発が全くみられなかつた。特に、増殖性の AK 型をもつ *T.e.* では、薬剤投与を行なわなくてもマウス継代中に自然に AK 型が増加することを Inoki *et al.*, が経験している (Inoki *et al.*, 1960). したがつて、*T.e.* をもつて薬剤の AK 型誘発試験を施行する場合、Inoki *et al.* (1960) が行なつたように単個原虫より出発した純な系統を使用し、慎重に実験を進めなければならない。

以上のごとく、薬剤のいわゆる直接作用による AK 型誘発であるか否かの決定は、増殖性の AK 型をもつ *T.e.* においては分裂型内の二つの Kinetoplast 間の距離の測定によつてのみ可能であると思われる。然るに、

acriflavine, actinomycin A および, sarcomycin についてえられた実験成績は確かに AK 型の増加を示しているにも拘らず、分裂型の Kinetoplast 間の距離の短小がみられていない。そこで、この現象をどのように解説すべきかを考察する必要に迫られた。この疑問を解くために、K 型および AK 型の増殖に対する薬剤の阻害作用を観察し、その差による淘汰の結果として AK 型の増加が説明されるのではないかと考え、薬剤投与後における両型の分裂型を数えてみた。この実験は予期にたがわず、AK 型誘発に有効な範囲の量において上記3種の薬剤は K 型の分裂を阻害し、AK 型の分裂を阻害しない事実を明らかに示した。したがつて、薬剤の AK 型誘発には二つの型が存在することがこの実験によつて始めて明らかにせられたといえる。すなわち、*p*-rosaniline のごとく、その直接作用によつてもとの K 型原虫からつくりだされるものと、その淘汰作用の結果、最初から混在した AK 型が分裂増加して現われたに過ぎないという二つの場合が考えられる。

以上の成績を *T.g.* でえた成績と比較総括すると Table 9 に示すようになる。すなわち、薬剤を AK 型

Table 9 The Appearance of AK forms in *T. gambiense* & *T. evansi* after Drug-Treatment

Drug	Appearance of AK forms		Type
	<i>T. gambiense</i>	<i>T. evansi</i>	
<i>p</i> -rosaniline	⊕	⊕	I
Ethidium bromide	⊕	⊕	
Acriflavine	⊕	+	II
Sarcomycin	—	+	III
Actinomycin	—	+	
Pyronine	—	—	IV
Methyl green	—	—	
Nile blue	—	—	
Methyl blue	—	—	
Penicillin	—	—	
Streptomycin	—	—	

⊕……Appearance of AK forms interpreted as the result of the direct action of drugs.

+……Appearance of AK forms interpreted as the result of the selective action of drugs.

—……No increase in AK forms.

誘発様式から表記の4型に分類することができる。すなわち、第1型は、*p*-rosaniline のごとく、*T.g.*, *T.e.* の両種においていわゆる直接作用により AK 型を誘発するもの、第2型は、acriflavine のごとく、*T.g.* においてはその直接作用により、*T.e.* においては淘汰作用に



よるもの、第3型は、*T.g.* では AK 型誘発はみられず *T.e.* にのみみられ、しかもその誘発が淘汰作用によるもの。第4型は、両種において AK 型誘発がみられないもの、である。

以上の説明から、ただ単に薬剤投与後の AK 型増加を目安として観察した従来の成績では、その薬剤が果して AK 型をつくりだす効力を有しているかどうかを知ることが不可能なことが容易に了解される。したがってこの問題に関するこれまでの報告は少なくともここで述べたような解析方法で再検討の必要がある。

### 結 論

種々の薬剤を用いて、*T.e.* の AK 型誘発実験を行ない次のような結果をえた。

1. 色素剤 14 種類、抗腫瘍性物質 10 種類、その他、抗菌性物質 および 発癌性物質などを感染マウスに注射し、AK 型出現を観察した結果、色素剤では、*p*-rosaniline, ethidium bromide, acriflavine 抗腫瘍性物質では、actinomycin A および sarcomycin において AK 型の増加を認めたと、その他の物質ではかかる増加は認められなかった。

2. *T.e.* の AK 型誘発に有効な薬剤にも、*T.g.* におけると同様それぞれ有効量の範囲が存在し、それよりも多くても少なくとも効果もなかった。

4. 上記5種薬剤の AK 型誘発機序を、分裂型内の2個の Kinetoplast 間の距離を測定する Inoki (1956) の方法により検討した結果、*p*-rosaniline, ethidium bromide では、その距離が漸次短縮して現われ、AK 型が薬剤の直接作用の下で K 型原虫から造りだされるものと判明した。これに反し、acriflavine, actinomycin A および sarcomycin ではその短縮がみられなかった。

4. 更に acriflavine, actinomycin A および, sarcomycin の AK 型誘発機序を解明する目的で、各薬品について AK 型および K 型の分裂に対する阻害作用を比較観察した処、AK 型誘発に有効な量では総て K 型の分裂を阻害し、AK 型の分裂には何等の影響も認められなかった。したがって、この場合の AK 型の増加は、薬剤の淘汰作用に起因するものと考えられた。

5. *T.e.* における AK 型誘発およびその機序を *T.g.* における成績と比較検討した結果、薬剤を AK 型誘発様式から次の4型に分類することができた。

1型: *T.g.*, *T.e.* 何れにおいても、いわゆる直接作用により、もとの K 型原虫から AK 型を作りだすもの………*p*-rosaniline および ethidium

bromide.

2型: *T.g.* ではいわゆる直接作用により、*T.e.* ではその淘汰作用によるもの………acriflavine.

3型: *T.e.* ではその淘汰作用により、*T.g.* では AK 型の増加が認められないもの………actinomycin A, sarcomycin.

4型: *T.g.* および *T.e.* において何れも、AK 型の増加が認められないもの………pyronine, penicillin その他.

6. 以上のことから、薬剤の AK 型誘発力の判定には、ただ単に、薬剤投与後の AK 型増加を観察する従来の方法では不可能であつて、少なくとも本研究で行なったような解析方法を試みる必要がある。

本論文の要旨は第28回日本寄生虫学会総会(於東京)昭和34年4月6日、第15回日本寄生虫学会西日本支部会(於広島)昭和34年11月8日、第31回日本遺伝学会(於大阪)昭和34年11月3日、第29回日本寄生虫学会総会(於札幌)昭和35年6月26日、第32回日本遺伝学会(於福岡)昭和35年10月30日において発表した。

本稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた猪木正三教授に深甚の謝意を表し、実験に御協力下さつた小野忠相氏に心から感謝いたします。

### 参 考 文 献

- 1) Hoare, C. A. (1954): The loss of the kinetoplast in trypanosomes, with special reference to *Trypanosoma evansi*. J. Protozool., 1, 28-33.
- 2) Inoki, S. (1956): Origin of the akinetoplastic strain of *Trypanosoma gambiense*. Cytologia Suppl. Vol. (Proceedings of the International Genetics Symposium), 550-554.
- 3) 猪木正三・松代愛三・片岡猛(1957): 色素による *Trypanosoma gambiense* の AK 型誘発機序に関する遺伝学的考察(第2報 色素耐性株についての2,3の知見). 日本寄生虫学会西日本支部会(第13回)講演抄録, 104-105.
- 4) 猪木正三・松代愛三(1958): 色素による *Trypanosoma gambiense* の akinetoplastic 型 (AK 型) 誘発機序に関する遺伝学的考察. 寄生虫学雑誌. 7(3), 299-300.
- 5) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1960): Transformation of drug-resistance in *Trypanosoma gambiense*. Biken's J., 3, 101-106.
- 6) 猪木正三(1961): 病原性 *Trypanosoma* の AK 型 (akinetoplastic 型) に関する研究. 核と細胞質, No. 2, 23-30.

- 7) Inoki, S., Y. Taniuchi, H. Sakamoto, T. Ono & R. Kubo (1961) : Interspecific transformation of drug-resistance between *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma evansi*. Biken's J., 4, 111-119.
- 8) Inoki, S. (1960) : Studies on antigenic variation in the welcome strain of *Trypanosoma gambiense*. Improvements in technique. Biken's J., 3, 215-222.
- 9) Inoki, S., Y. Taniuchi, A. Matsushiro & H. Sakamoto (1960) : Multiplication ability of the akinetoplastic form of *Trypanosoma evansi*. Biken's J., 3, 123-129.
- 10) Inoki, S., T. Kitaura, T. Nakabayashi & H. Kuroguchi (1952) : Studies on the immunological variations in *Trypanosoma gambiense*. 1. A new variation system and a new experimental method. Med. J. Osaka Univ., 3, 357-371.
- 11) Inoki, S. & A. Matsushiro (1959) : Relationship between kinetoplast elimination and parosaniline resistance in *Trypanosoma gambiense*. Biken's J., 2, 371-374.
- 12) Jirovec, O. (1929) : Studien über blepharoplastose Trypanosomen. Arch. Protistenkde., 98, 187-208.
- 13) Laveran & Roudsky (1919) : Sur les variétés acentrosomiques artificielles des Trypanosomes. C. R. Acad. Sci., 168, 749-751.
- 14) Newton, A. B. (1957) : The mode of action of phenanthridines. The Effect of ethidium bromide on cell division and nuclei acid synthesis. J. Gen. Microbiol., 17, 718-730.
- 15) Lawley, P. D. (1956) : Interaction studies with DNA. IV. The Binding of 5-aminoacridine studied fluorimetrically and its comparison with the binding of rosaniline. Biochimica et Biophysica Acta, 22, 451-458.
- 16) Shiba, S., A. Terawaki, T. Taguchi & J. Kawamata (1958) : Studies on the effect of mitomycin C on nucleic acid metabolism in *Escherichia coli* strain B. Biken's J., 1, 179-193.
- 17) Werbitzki, F. W. (1910) : Ueber blepharoplastlose Trypanosomen. Zentr. Bakteriol. 1, Abt. Orig., 53, 303-315.

## GENETIC STUDIES ON THE MODE OF AKINETOPLASTIC-FORM INDUCTION IN *TRYPANOSOMA EVANSI* BY MEANS OF INJECTING MOUSE WITH SOME CHEMICAL AGENTS

HITOSHI SAKAMOTO

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

Experimental induction of akinetoplastic form in *Trypanosoma evansi* by injecting mice with 14 dyes, 10 anticarcinogenic substances, antibiotics and carcinogenic substances, was undertaken.

Results obtained were summarized as follows :

1) Of all dyes used in this experiment, *p*-rosaniline, ethidium bromide and acriflavine showed an ability to induce akinetoplastic form in *Trypanosoma evansi*. Actinomycin A and Sarcomycin of 10 anticarcinogenic substances tested, were found to have an ability to increase in the number of akinetoplastic individuals. All chemical agents tested other than substances indicated above, failed to show such an ability.

2) Optimal range of concentration to induce akinetoplastic form of *Trypanosoma evansi* was also recognized in these 5 substances as same as those seen in *T. gambiense*.

3) In an attempt to elucidate the mode of akinetoplastic-form induction, measurements of distance between two kinetoplasts in an individual *Trypanosoma* by means of Inoki's method (Inoki, 1956) were carried out. Measurements revealed the fact that distance between two

kinetoplasts were gradually diminished with the time after injection with dyes, *p*-rosaniline and ethidium bromide. This fact may suggest that akinetoplastic form is originated from kinetoplastic form by direct action of dyes to diminish the distance between two kinetoplasts.

On the other hand no diminution in the distance was observed in the akinetoplastic form of *Trypanosoma* obtained from mice injected with acriflavine, actinomycin A and sarcomycin.

4) The inhibitory action of acriflavine, Actinomycin A and Sarcomycin against division of both kinetoplastic and akinetoplastic form of *Trypanosoma* was comparatively tested to find a clue to the mode of induction by these substances. The concentration sufficient to induce akinetoplastic form was found to inhibit the division of kinetoplastic one and simultaneously to have no effect against that of akinetoplastic form. Increase in number of akinetoplastic form by the treatment with these agents is, therefore, considered due to genetic selection by them.

5) Comparison of akinetoplastic form induction and its mechanism in *Trypanosoma evansi* with those in *T. gambiense*, enable the author to divide agents used into 4 groups: Group 1. substance to induce akinetoplastic form from kinetoplastic one by its direct action as stated above in cases of both *T. gambiense* and *T. evansi*...*p*-rosanilide & ethidium bromide, Group 2. substance to induce akinetoplastic form by its direct action in *T. gambiense* and by its genetic selection in *T. evansi*...acriflavine, Group 3. Substance to induce akinetoplastic form by its genetic selection in *T. evansi* and to fail to induce in *T. gambiense*...Actinomycin A & sarcomycin, Group 4. substance to fail to induce in both *T. gambiense* and *T. evansi*...pyronine, Penicillin etc.

6) The conclusion reached from results obtained can be expressed as follows. Analytical procedure as previously stated in this work, should be performed when an ability of substance to induce akinetoplastic form of *Trypanosoma* is studied. Furthermore, it is impossible to determine the ability only by means of conventional observation technique such as counting the number of akinetoplastic form of *Trypanosoma* in the treated hosts.