

Trypanosoma の薬剤耐性形質転換におよぼす 発癌性物質の効果 (1)

小 野 忠 相

大阪大学微生物病研究所原虫学部 (部長 猪木正三教授)

(1966 年 2 月 17 日受領)

特 別 掲 載

緒 言

猪木およびその協力者らは 1953 年以来 アフリカ 睡眠病の病原体である *Trypanosoma gambiense* の細胞質内自家増殖性顆粒すなわち, kinetoplast が薬剤の作用を受けて消失する現象について遺伝学的な解析を試み, 1960 年にはこの原虫の *p*-rosaniline 耐性に関する形質転換を発表した (Inoki & Matsushiro, 1960). この成績は原虫においても細菌におけると同様, 形質転換現象が存在することを初めて実証し得たものとして重要な知見である. さらに Inoki *et al.* (1960) はこの形質転換に対する抗腫瘍性物質および抗菌性物質の効果を調べ, 抗腫瘍性が認められている 10 種類の物質の中 azane, colchicine, demecolchine を除くすべての物質は形質転換阻害作用をもち, 単なる抗菌性物質にはこのような作用がないことを認めた. この事実は抗腫瘍性物質の作用と *Trypanosoma* の遺伝現象との間に, ある関係が成立することを意味するものであり, 同時にこの実験方法が非腫瘍生物系スクリーニング法として抗腫瘍性物質のスクリーニングに使用し得る可能性を示唆するものと思われる.

発癌機構がわからない現在, 発癌と制癌という 2 つの現象の間にはその根本の機序においてどのような関連を持つかという事については勿論明らかでない. しかし, Haddow (1937) が指摘しているように制癌性を持つ物質は同時に発癌性をもつ事が多く, 先の実験 (Inoki *et al.*, 1960) で使用した nitromin (Heston 1949), actinomycin (Kawamata *et al.*, 1959) 等でも抗腫瘍性とともにもその発癌性が証明されている. そこで抗腫瘍性物質の作用と

形質転換阻害作用との間にみられた関係が発癌性物質との間においても認められるかどうかを知るため DAB および MAB とその誘導体を用いて上記の形質転換におよぼす効果を調べた. これらの物質は発癌実験に最もよく用いられてきたこと, 核置換基の違いによつて発癌性を示したり, 示さなかつたりすること (Miller & Miller 1953) などから上述の関係を追究するには絶好の材料であると思われる. 実験の結果, 誘導体の示す発癌性の有無と形質転換阻害作用の有無との間に完全な一致が認められた.

実験材料および実験方法

1) 使用した原虫株

この実験には *Trypanosoma gambiense* Wellcome 株の *p*-rosaniline 感性株 (原株, 以下 WS と略) と耐性株 (以下 WR と略) が用いられた. WS に感染しているマウスに米国 Eli Lilly 製薬会社附属研究所から恵与された *p*-rosaniline を注射して AK 型誘発試験 (Inoki & Matsushiro, 1959) を行なうと AK 型原虫, すなわち kinetoplast を欠除した原虫が約 21% 出現する, 色素を注射しない自然の状態における AK 型原虫の出現率は 1% 以下であり, この値は DAB および MAB とその誘導体を作用させても変わらない. lysate として用いた Donor の WR は Inoki & Matsushiro (1959) の方法に準じて WS を薄い濃度から始め漸次高濃度の *p*-rosaniline (以下 *p*-ros と略) にマウス体内で接触させて作ったものである. 用いた最高濃度は *p*-ros 85 mg/kg マウス量であつた. これはマウスに対する毒性からみて, 使用できる最大限の濃度である. このようにして得られた

本研究は文部省科学研究費の補助を得て行なわれた. 記して謝意を表する. (猪木正三記)

第1表 形質転換におよぼす DAB および MAB とその誘導体の阻害効果

供試物質	濃度 μg/2.5ml	AK 型 誘 発 試 験							相対的 発癌活 性 ⁶⁾	
		実 験 例			形質転換 の阻害	対 照 例				
		WS ¹⁾ +WR-L ²⁾ +C ³⁾				WS+WR-L+W ⁴⁾	WS+CGS ⁵⁾ +W			
DAB	250	21.4 ⁷⁾	19.6≤m ⁸⁾ ≤23.3	+	12.1	11.0≤m≤13.2	21.5	19.4≤m≤23.5	6	
4'-OCH ₃ -DAB	500	22.2	19.5≤m≤25.0	+	〃	〃	〃	〃	3	
4'-CH ₃ -DAB	〃	21.3	19.2≤m≤23.5	+	〃	〃	〃	〃	<1	
4'-F-DAB	〃	21.6	19.7≤m≤23.5	+	〃	〃	〃	〃	10-12	
3'-CL-DAB	〃	19.2	17.9≤m≤20.5	+	〃	〃	〃	〃	5-6	
4'-CL-DAB	〃	22.4	20.1≤m≤24.7	+	〃	〃	〃	〃	1-2	
3'BR-DAB	〃	12.0	10.8≤m≤13.1	-	〃	〃	〃	〃	0	
3'CF ₃ -DAB	〃	12.0	9.6≤m≤14.5	-	〃	〃	〃	〃	0	
3'-NO ₂ -DAB	〃	20.5	18.4≤m≤22.5	+	〃	〃	〃	〃	5	
4'-NO ₂ -DAB	〃	12.3	10.8≤m≤13.7	-	〃	〃	〃	〃	0	
MAB	〃	19.9	18.2≤m≤21.6	+	〃	〃	〃	〃	6	
4'-OCH ₃ -MAB	250	20.5	18.7≤m≤22.3	+	〃	〃	〃	〃	3	
3'-F-MAB	500	20.6	19.0≤m≤22.1	+	〃	〃	〃	〃	10-12	
4'-CL-MAB	〃	21.3	19.4≤m≤23.3	+	〃	〃	〃	〃	1-2	
3'-CF ₃ -MAB	〃	12.3	11.3≤m≤13.3	-	〃	〃	〃	〃	0	
4'-NO ₂ -MAB	〃	12.9	10.9≤m≤14.9	-	〃	〃	〃	〃	0	

- 1) WS; *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 感性株
- 2) WR-L; *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 耐性株の lysate
- 3) C; 供試物質 (DAB および MAB とその誘導体)
- 4) W; 水
- 5) CGS; citrate-glucose-saline
- 6) 相対的発癌活性 = $\frac{6 \times \text{DAB 投与月数} \times \text{被検体の発癌率}}{\text{被検体の投与月数} \times \text{DAB 発癌率}}$ (J. A. Miller *et al.* 1953, 1957)
- 7) AK 型出現率 (%) の平均値
- 8) 1% の危険率でみた AK 型出現率 (%) の平均値の信頼限界。

WR はその後現在に至る迄8年以上もその性質を不変に保持している。WR に対していわゆる AK 型誘発試験を行なうと約4%の AK 型原虫が出現する。

2) 形質転換の操作

形質転換は大体猪木らの報告 (Inoki & Matsushiro, 1960, Inoki *et al.* 1960, Inoki *et al.* 1961, 猪木, 1961) に準拠して行なつたが, Donor として感染ラッテから採取した WR 原虫を用いた。すなわち WR 感染の極期におけるラッテから0.5%クエン酸ナトリウムブドウ糖一塩化ナトリウム水溶液(以下 CGS 液と略)に全血をとり, 3,500 rpm 5分間遠心沈澱し上清を捨て, 沈渣に新しい CGS 液を加えて10⁸個/mm³* の WR を含む原虫懸濁液を調製した。この Donor 原虫はアセトン・ドライアイスによる凍結融解を10回繰返して完全に破壊された。実験はこのようにして作製した lysate 1 ml と

10⁸個/mm³* の割合で WS を含む原虫懸濁液 1 ml とを試験管内にて混じ, 直ちにこれに供試発癌性物質 0.5 ml を加えた。なお発癌性物質として用いた DAB および MAB とその誘導体はいずれも水に難溶のため, 先ず少量のエチルアルコールを加え(アルコールの最終濃度は0.2%以下), ついでこれを軽く加温する事によつて溶解し, その後, 直ちに誘導体が 500 γ/ml あるいは 1,000 γ/ml になるように水を加え, コロイド状様の懸濁液を作製して実験に使用した。

上記の混液 2.5 ml はこれをよく混和し, 室温で15分間放置後, その 0.05 ml 宛を各マウスに接種した。

3) 原虫における *p*-ros 耐性度の測定

マウス体内における本原虫の *p*-ros 耐性度は AK 型誘発試験 (Inoki & Matsushiro, 1959) により測定する事ができる。これは *Trypanosoma* の *p*-ros 耐性の研究に猪木らが常に用いている方法である, すなわちマウスの末梢血に適当な数の原虫が出現したときをみて *p*-ros 10 mg/kg をマウスの腹腔内に注射し4時間後の血液塗抹標本をとつてその中に含まれる AK 型原虫の数を調べるのである。この実験では原虫 400 個について

* lysate として用いた Donor の原虫数および Recipient の原虫数はいずれも *Trypanosoma* の AK 型に関する遺伝学的研究第17報 (日本寄生虫学会報告) に基づいたものであり, その詳細は別に報告する予定である。

AK 型原虫の数を調べた。この場合、もし感染原虫が *p*-ros 感性株であれば AK 型原虫が多く出現し、耐性株であれば少ししか現われない。したがって AK 型原虫の出現率を調べることによって原虫の薬剤耐性を測定することが出来る。この試験は動物体内の原虫の耐性を宿主を殺さず、きわめて短時間に測定し得る点において、従来の薬剤耐性の測定法とは全く異なるものであり、しかもきわめて感度の高い測定法である。

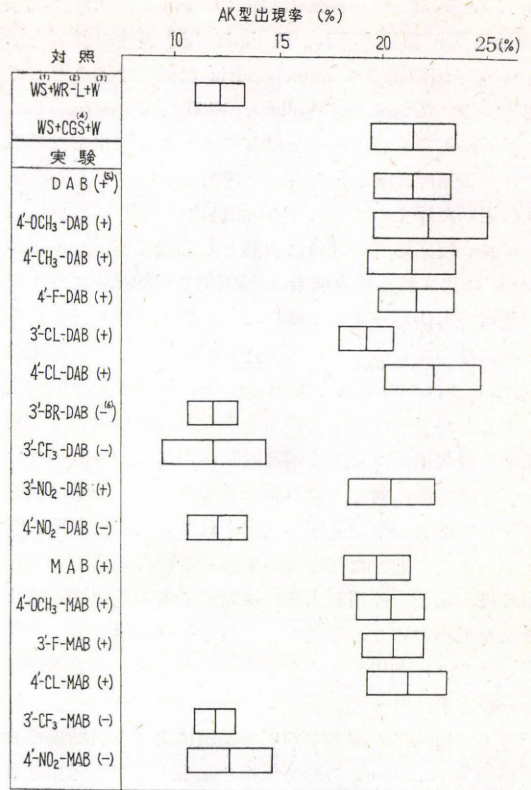
実験成績

第1表対照欄の WS+CGS+W は耐性株の lysate や発癌性物質を用いず、感性原虫 WS と原虫の懸濁液に使用した CGS 液のみを用いた場合であり、AK 型原虫の出現率が約 21% を示している。この値は WS+CGS+C (供試した発癌性物質), WS+WS-L (WS の lysate) +W (水), WS+WS-L+C の実験でもほとんど変わらない。

WS+WR-L+W は発癌性物質を用いず、WR の lysate を作用させた実験であつて AK 型原虫の出現率が約 12% を示し、Inoki & Matsushiro (1960) が報告した形質転換が起こっている事を意味している。WS+WR-L+C は Donor に WR を用い、これに DAB および MAB とその誘導体 16 種類を作用させた実験であるが、第1表および第1図にみられる如く、発癌性が少しでも認められている誘導体は総て形質転換を阻害し、これに反して発癌性が認められていない誘導体ではこのような作用が全くみられなかつた。すなわち、この成績から供試物質の発癌性の有無と形質転換阻害作用の有無との間に一定の関係が存在する事が明らかになつた。なお、この実験で用いた DAB および MAB とその誘導体には AK 型原虫を誘発する作用がなく、*p*-ros を使わなければこれらの誘導体を作用させても AK 型原虫の出現率は常に 1% 以下であり、また殺 *Trypanosoma* 作用もない所から *Trypanosoma* 感染マウスに治療効果を示さなかつた。

考 察

供試物質の発癌性の有無と *Trypanosoma* の形質転換に対する阻害作用の有無という一見無関係と思われる両作用の間に何故このように見事な一致が認められるのであろうか、癌細胞と *Trypanosoma* という 2 つの動物細胞の間には無制限の増殖という事以外に何か類似点があるのであろうか、Gause (1958, a) は「もし癌細胞が遺伝的に損なわれた呼吸活性を持つものならば微生物の



第1図 形質転換におよぼす DAB および MAB とその誘導体の阻害効果

- (1) WS; *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 感性株
- (2) WR-L; *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 耐性株の lysate
- (3) W; 水
- (4) CGS; citrate-glucose-saline
- (5) +; 形質転換阻害
- (6) -; 形質転換非阻害

図において は AK 型出現率 (%) の平均値および 1% の危険率でみた AK 型出現率 (%) の平均値の信頼限界を示す。

中に癌細胞と同じようなものを得ることができないだろうかと述べている。こういう見解から酵母の Pétit 集落、ブドウ球菌の mutant、嫌気性菌等 (Gause 1958 b, Dipaola & Rosenfield 1958, 1959) が抗腫瘍性物質のスクリーニングに用いられたが Dipaola (1960) が利用価値のない実験であるとして甚だ悲観的な見解を示していることから明らかな如く、癌細胞を用いるスクリーニング法にまさる成績は得られていない。さてこの実験で問

題になる Trypanosomatidae の kinetoplast は元來 janus green に染色され、Feulgen 反応陽性の性質を示し、電子顕微鏡では mitochondria に似た小器官として認められ (Clark & Wallace, 1960), *Trypanosoma gambiense* でも患者から分離してまもない原虫ではチトクローム系呼吸酵素が存在し、呼吸商も高い。しかし実験に用いた原虫のように長い間動物に継代した株では Feulgen 反応陽性の性質は依然として続くが、mitochondria に含まれる呼吸酵素はその活性を失い、エネルギー獲得の方法が一変して解糖によってエネルギーを得るようになってい。さて、上述の酵母やブドウ球菌の mutant ではこの実験で見出されたような現象を何故見出すことができなかつたのであろうか、彼等は薬剤の効果を呼吸欠損菌に対する増殖阻止作用によって調べているが、癌細胞に対してのみ強い効果を示し、正常な細胞に対して影響のない薬剤が見出されていない癌研究の現状から考えても、ただ呼吸が傷害を受けているという点で呼吸欠損菌を使用し、それに対する選択的な増殖阻止効果を期待することにより、これを抗腫瘍性物質のスクリーニングに利用しようと試みることは無理な要求ではないかと思われる。

さて、Inoki *et al.* (1960) の業績によつて抗腫瘍性物質が *Trypanosoma* の形質転換を阻害する事が見出されたが、従来 1 つの化合物に抗腫瘍性と発癌性が証明される例が多い所から、この実験では DAB および MAB とその誘導体の形質転換におよぼす効果が調べられた。

その結果、誘導体の発癌性の有無が形質転換阻害効果の有無と一致する事が明らかとなり、この実験方法が抗腫瘍性物質および発癌性物質のスクリーニングに利用し得る可能性が示された。それならばこの実験において、どのような事が発癌性物質の効果を調べるのに適しているのであろうか、1) この実験は *p*-ros 耐性を遺伝的指標とした形質転換であるが、これにおよぼす発癌性物質の効果を調べるために用いた DAB および MAB とその誘導体は原虫の増殖を阻止する効果がなく、また AK 型原虫を誘発する作用もない。それ故形質転換の実験にこれらの物質を用いても *p*-ros による AK 型誘発試験を行なわなければその効果を調べる事はできない。このように *p*-ros は実験方法の点で大きな役割を演じているが、さらにこの実験のために重要な意味をもっているのではないかと想定されるものとして *p*-ros の発癌性の問題がある。すなわち *p*-ros は *p*-magenta として知られる染料として利用されているが、これを取扱う人々

に膀胱癌を発生させる。この場合、染料製造の中間段階で作られる 2-ナフチルアミンが重要視されており、これが N-ヒドロキシル化を受けて発癌性を示すものと思われる。従つてこの点で *p*-ros は N-ヒドロキシ体を重要代謝産物とする発癌性物質である DAB および MAB と似ており、この *p*-ros 耐性に関する形質転換に DAB および MAB とその誘導体を作用させているから、このような事が実験成立の上で大きな要因になつているかも知れない。2) 形質転換という遺伝現象では recipient 原虫による DNA の取込み、取込まれた DNA の複製さらに形質発現という段階があり、DAB および MAB がどの時期にその効果を発揮するかは明らかでないが、いずれの時期に作用するにしても薬剤は直接、原虫に作用させるより形質転換に際して用いた方がその影響は強くあらわれ、これらの薬剤の作用も調べやすくなるのではないかと思われる。しかもこの実験において遺伝的指標としている *p*-ros 耐性という形質は *p*-ros 存在下でもこれに抵抗して分裂を続けることができる kinetoplast の特殊な分裂機構に関係しており、このような形質に関する形質転換に対しては元來、何等かの形で細胞の分裂と関係をもつと思われる発癌物質がその作用をより強く発揮するのではないかと考えられる。以上のようなことがこの実験の成立に関係しているものと思われる。なお先に述べた酵母、嫌気性菌等を用いて抗腫瘍性物質や発癌性物質をスクリーニングする方法以外に、溶原菌を用いて発癌性物質をスクリーニングする試みがあり、この方法の可能性は Lwoff (1953) によつて最初示されたが、Endo *et al.* (1963) は 4-nitroquinoline 1-oxide とその類似体の発癌性の有無と溶原菌に対するフェージ誘発効果の有無とが一致することを見出した。しかし、同じ水溶性発癌物質でも例外があり、また代表的な発癌物質であるアゾ色素や炭化水素系発癌物質については無効である。

さて、この実験では用いた発癌性誘導体の発癌活性の強弱が形質転換阻害作用の強弱に反映されず、発癌活性の弱い誘導体でも強い誘導体と同様、形質転換を完全に阻害した。実験方法の所で述べた如く、DAB および MAB は懸濁液として用いており、原虫に対する作用が全くなく、しかも誘導体を完全に溶解する溶媒がもし存在し、それを使つて実験を行なつたならば同じ発癌性誘導体でもその活性の強弱によつて形質転換を阻害する最少有効濃度に差を生じるかも知れない。しかし、発癌活性の強弱というのはあくまでもラットの肝癌形成を指標としたものであり、ラットの肝細胞と *Trypanosoma* 原

虫が DAB および MAB に対して同じ膜透過性をもつとは考えられないし、細胞内へ入つても同じ強さの代謝活性があらわれるとは思われない。したがつて誘導体を完全に溶解して実験に使用しても発癌活性の強弱が形質転換阻害作用の強弱に反映するかどうかは疑問である。むしろ膜透過性の違いを考えた場合、この実験において特記されるべきことは *Trypanosoma* 原虫という肝細胞とは全く異なる動物細胞でしかも DAB および MAB を懸濁液として用いた形質転換において少しでも発癌性のある誘導体は総て形質転換を完全に阻害したという事実である。このことは形質転換の阻害あるいは非阻害という発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用の違いがこれらの誘導体の本来の性質によるものであつて誘導体の溶解度などの問題が関与したものではないことを示唆しており、発癌性誘導体はそれが弱い活性の誘導体であつても非発癌性誘導体とは違つた作用をもち、その作用と形質転換阻害作用との間にある関係が成立することを示している。

結 論

Trypanosoma gambiense の p-ros 耐性に関する形質転換におよぼす発癌性物質の効果を調べるために実験を行なつた。その結果、発癌性物質として用いた DAB および MAB とその誘導体 16 種類の中、発癌性が認められている誘導体 11 種類はいずれも形質転換を阻害することが認められた。これに反し発癌性が認められない誘導体 5 種類は形質転換の阻害効果を全くもたなかつた。

擧筆にあたり終始、御指導を賜わり、御校閲を得た猪木正三教授に深甚なる謝意を表します。なお、DAB 及び MAB とその誘導体を恵与して頂き、数々の有益な御助言を頂いた京都大学工学部福井謙一教授に感謝致します。又討論を賜わ、御助言を頂いた大阪大学理学部村上英夫氏に深く感謝致します。

本論文の要旨は昭和 35 年 6 月第 29 回日本寄生虫学会総会において発表した。

文 献

- 1) Clark, T. B. & Wallace, F. G. (1960) : A comparative study of kinetoplast ultrastructure in the Trypanosomatidae. *J. Protozol.*, 7 (2), 115-124.
- 2) Dipaola, J. A. & Rosenfield, R. (1958) : The use of anaerobes and respiratory deficient yeast mutant as a screening procedure for potential tumor-inhibiting agents. *Cancer Research*, 18 (10), 1214-1220.
- 3) Dipaola, J. A. & Rosenfield, R. (1959) : Inhibition of yeast respiratory mutants as a technic for selecting compound for cancer chemotherapy study. *Cancer Research*, 19(10), 467-487.
- 4) Dipaola, J. A. (1960) : Evaluation of respiratory mutants for selecting compound for cancer. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 105(3), 665-667.
- 5) Endo, H., Ischizawa, T. & Kamiya, T. (1963) : Induction of bacteriophage formation in lysogenic bacteria by a potent cartinogen, 4-Nitroquinoline I oxide and its derivatives. *Nature*, 198, 195-196.
- 6) Gause, G. F. (1958 a) : Some biochemical foundation in the research for antibiotics. *Proc. of the IV th International Congress of Biochemistry, Symposium V*, 1958, 171-182.
- 7) Gause, G. F. (1958 b) : The search for antibiotics some theoretical problems. *Science*, 127 (3297), 506-508.
- 8) Haddow, A. & Robinson, A. M. (1937) : The influence of various polycyclic hydrocarbons on the growth rate of transplantable tumours. *Proc. Roy. Soc., B* 122(829), 442-446.
- 9) Heston, W. E. (1949) : Induction of pulmonary tumors in strain a mice with methyl-bis (β -chloroethyl) amine hydrochlorid. *J. Nat. Cancer Inst.*, 10(1), 125-130.
- 10) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1959) : Relationship between kinetoplast elimination and parosaniline resistance in *Trypanosoma gambiense*. *Bikens J.*, 2(4), 371-374.
- 11) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1960) : Transformation of drug-resistance in *Trypanosoma*. *Bikens J.*, 3(1), 101-106.
- 12) Inoki, S., Ono, T. & Sakamoto, H. (1960) : Effect of anti-tumor substances on the drug-resistance transformation in *Trypanosoma gambiense*. *Bikens J.*, 3(2), 205-207.
- 13) Inoki, S., Taniuchi, Y., Sakamoto, H., Ono, T. & Kubo, R. (1961) : Interspecific transformation of drug-resistance between *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma evansi*. *Bikens J.*, 4(2), 111-119.
- 14) 猪木正三 (1961) : 病原性 *Trypanosoma* の AK 型 (akinetoplasic 型) に関する遺伝学的研究. 核と細胞質, No. 2, 23-30.
- 15) Kawamata, J., Nakabayashi, N., Kawai, A., Fujita, H., Imanishi, M. & Ikegami, R. (1959) : Studies on the cartinogenic effect of Actinomycin. *Bikens J.*, 2(3), 105-112.
- 16) Lwoff, A. (1953) : Lysogeny. *Bacteriological Review*, 17, 269-337.
- 17) Miller, J. A. & Miller, E. C. (1953) : The cartinogenic aminoazo dyes. *Adv. Cancer Res.*, 1, 339-396.

- 18) Miller, J. A., Miller, E. C. & Finger, G. C. (1957): Further studies on the cartinogenicity of dyes related to 4-Dimethylaminoazobenzene.

The requirement for an unsubstituted 2-position. *Cancer Research*, 17(5), 387-398.

Abstract

EFFECTS OF CARTINOGENIC SUBSTANCES ON THE DRUG-RESISTANCE TRANSFORMATION IN *TRYPANOSOMA* I

TADASUKE ONO

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

The occurrence of *p*-rosaniline resistance transformation in *Trypanosoma gambiense* was reported by Inoki and Matsushiro (1960) and an inhibitory action of some anti-tumor substances upon the transformation in the protozoa was observed by Inoki, Ono and Sakamoto (1960). In the present paper the effect of cartinogenic substances such as DAB, MAB, and 16 their derivatives upon the transformation in trypanosomes was investigated.

Experiments indicated that DAB, MAB, and 11 derivatives with more or less cartinogenic activity were provided with an inhibitory action on the transformation, while no inhibition was observed in the other 5 non-cartinogenic derivatives. The results obtained is, therefore, indicative of a close relation between the cartinogenicity and inhibitory action in these drugs tested. On the basis of the results reported by the present author and by Inoki *et al.* (1960) it may be possible to estimate the anti-tumor or cartinogenic actions of given chemicals.

In addition, neither trypanocidal nor akinetoplastic form inducing activities were observed in drugs used in this study.

会 記

日本学術振興会日米科学協力係より本学会宛連絡あり、同会では日米科学協力事業についてのしおりを製作したので、本学会会員各位のうちで御希望の方に配布したいそうです。下記宛お申込み下さい。

東京都千代田区神田一ツ橋1の1

日本学術振興会 日米科学協力係