

## Trypanosoma の薬剤耐性形質転換におよぼす 発癌性物質の効果 (2)

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

アフリカ睡眠病の病原体 *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline (以下 *p*-ros と略) 耐性に関する形質転換が DAB および MAB の発癌性誘導体によつて阻害される事実を認め、これを第 1 報に報告したが(小野, 1966)この知見は Inoki *et al.* (1960) の抗腫瘍性物質による実験とともに原虫の遺伝現象を利用して物質の抗腫瘍性および発癌性を窺知する 1 つの新しい方法を示唆し得たものとして興味がある。そこで DAB と MAB の発癌性誘導体と非発癌性誘導体についての実験をさらに進め、形質転換が如何なる作用によつて阻害されるのか、また発癌性誘導体と非発癌性誘導体の生物学的活性には本質的な相違があるのか、あるいはただ量的な相違があるにすぎないのか、という諸点を明らかにするために次のような実験を行なつた。実験は 2 部からなつており、先づ最初の実験では発癌性あるいは非発癌性の誘導体に *in vitro* で繰返し接触させて作つた原虫株を recipient にして *p*-ros 耐性の形質転換が起こるかどうかを調べた。その結果発癌性の誘導体に接触させた株では形質転換が起こらなかつたので、あらかじめ発癌性誘導体で処理された原虫は *p*-ros に対し耐性化するのが不可能なのではないかと考え、Inoki & Matsushiro (1959) の術式にしたがつてマウス体内で原虫を順次高濃度の *p*-ros または rosaniline に接触させて耐性株を得る試みを行ない、この点を解明せんとした。

### 実験材料および実験方法

#### 1. 使用した株

WS……………これは Wellcome 株の原株 (*p*-ros 感性

株)であつて、先の実験 (Inoki & Matsushiro, 1960, Inoki *et al.* 1960, 小野, 1966) に用いられた株と同じである。第 1 報(小野, 1966)で報告した如く、この株の原虫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*-ros を用いて AK 型誘発試験 (Inoki & Matsushiro, 1959)を行なうと kinetoplast を失つた原虫すなわち、AK 型原虫が 21%前後出現する。しかしこの実験で用いた Chroma-Gesellschaft Schmid & Co の *p*-ros によつて AK 型誘発試験を行なうと AK 型原虫は 29%前後出現する。

WS 5 および WS 13……………これらの株はいずれも WS を漸次高濃度の発癌性誘導体で処理して作つた株であるが、前者は 3'-Cl-DAB、後者は 4'-OCH<sub>3</sub>-MAB にそれぞれ接触させたものである。すなわち、*in vitro* で最初それぞれの誘導体 1  $\gamma$ /ml に 15 分間接触せしめ、その 0.05 ml をマウスに接種し、2-3 日後、接種されたマウスの末梢血に原虫が出現するのを待つて尾端より原虫をとり、前回と同様 *in vitro* で 5  $\gamma$ /ml の誘導体に 15 分間接触させた後、その 0.05 ml をマウスに接種した。以下、同様にマウス継代毎に 5  $\gamma$ /ml 宛増量し、180  $\gamma$ /ml に至るまで漸次高濃度の誘導体に接触させながらマウス継代を続け WS 5 および WS 13 の両株を作つた。これら 2 株の原虫にそれぞれ AK 型誘発試験を行なうといずれも 28%前後の AK 型原虫が出現した。

WS 7 および WS 9……………これ等はいずれも WS を非発癌性誘導体で処理して作つたが、前者は 3'-BR-DAB 後者は 3'-CF<sub>3</sub>-DAB でそれぞれ処理した株であり、処理の方法および処理した最高濃度は既述の発癌性誘導体の場合と同じである。AK 型誘発試験による AK 型出現率は 28-29%であつて、この値は原株 WS のそれと

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。(猪木正三記)



第1表 形質転換による

形質転換による耐性賦与におよぼす発癌性物質の効果		処理に用いた誘導体	対照 (非処理)	
		原虫株 (Recipient)	WS	
形質転換前	誘発前 <sup>1)</sup>	分裂型原虫 (%) <sup>6)</sup> 亜鈴型 <sup>4)</sup> の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	5.1 <sup>7)</sup> 4.5 ≤ m <sup>8)</sup> ≤ 5.7 0	
	誘発後 <sup>2)</sup>	AK型 (%) <sup>6)</sup> 分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	29.4 28.3 ≤ m ≤ 30.5 5.5 5.0 ≤ m ≤ 6.0 36.0 34.6 ≤ m ≤ 37.3	
形質転換後	誘発前	分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	5.4 4.9 ≤ m ≤ 6.0 0	
	誘発後	AK型 (%) 分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	19.8 18.4 ≤ m ≤ 21.1 5.2 4.6 ≤ m ≤ 5.7 19.5 17.8 ≤ m ≤ 21.2	

- 1) AK 型誘発試験前 2) AK 型誘発試験 240 分後 3) 原虫 1,000 個について  
4) Kinetoplast の分裂が全く阻害され, kinetoplast が 1 個しかないか, または分裂しても 2 個が接触したまま離れていかない kinetoplast

同じである。

このようにして作った 4 つの株は最後に 1 匹釣を行ない、それぞれクローンとしてから実験に供したが、それらの原虫株は実験成績の所で述べるような性質を 1 年以上維持しているから、その性質は遺伝的なものと考えてよいだろう。これらの原虫に感染したマウスの流血中に自然に出現する AK 型原虫の率はいずれも 1% 以下であるが、Chroma-Gesellschaft Schmid & Co の *p*-ros 10 mg/kg マウス量を注射して AK 型誘発試験を行なうと先にも述べたように 28-29% の AK 型原虫が出現する。本研究では上記の 5 株の感性原虫を recipient にし、donor に Wellcome 株の *p*-ros 85 mg/kg 耐性株 (以下 WR と略) を用いて形質転換を行なった。WR は第 1 報 (小野, 1966) で報告した形質転換の実験で donor に用いた株と同じであるが、この原虫株は米国 Eli Lilly 製薬会社附属研究所から恵与された *p*-ros を用い、Inoki & Matsushiro (1959) の術式にしたがい作成したものである。この株の原虫に感染したマウスについて AK 型誘発試験を行なうと 4% 前後しか AK 型原虫が出現しない。なお、WS を処理するのに用いた DAB および MAB の発癌性誘導体と非発癌性誘導体はともに殺 *Trypanosoma* 作用がなく、感染マウスに対して治療効果を全く示さなかった。

2. 実験方法: a) 発癌性誘導体あるいは非発癌性誘導体で処理して作った原虫株を形質転換により *p*-ros 耐性にする試み。

形質転換は猪木らの方法 (Inoki & Matsushiro, 1960, Inoki *et al.* 1961, 猪木, 1961) に準拠して行なったことは第 1 報 (小野, 1966) と同じである。すなわち、耐性原虫 WR に感染させたラッテから得た血液を適当に希釈し、原虫を 10<sup>5</sup> 個/mm<sup>3</sup>\* の割合に含むように調製した原虫懸濁液を凍結融解し、得られた lysate を donor として用いた。recipient には WS, WS5, WS13, WS7 および WS9 を用いたが、それぞれの原虫に感染させたマウスから作った原虫 10<sup>3</sup> 個/mm<sup>3</sup>\* を含む懸濁液 1 ml を前記 lysate 1 ml とよく混和し、室温で 15 分間放置した後、その 0.05 ml をマウスに接種した。接種後 2-3 日を経てマウスの末梢血中に原虫が出現したとき、対照としてそれぞれのマウスから血液塗抹標本を作り、AK 型の自然出現率を求め、ついで同じマウスに AK 型誘発試験を行なつて AK 型原虫の出現率の増加を観察した。これらの標本はいずれも 60°C に加温した 1 N 塩酸中に 2 分間浸して加水分解し、水洗、乾燥後ギムザ染色を施した。ついでこれらの標本につき原虫 400 個を調べ、その AK 型原虫出現率 (%), kinetoplast をもつ原虫 1,000 個中に含まれる分裂型原虫の数、分裂型原虫 50 個中にみられる亜鈴型の kinetoplast をもつた原虫\*\* の数、すな

\* 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。

\*\* 以下亜鈴型の kinetoplast をもつた原虫とは kineto-



## 耐性賦与の試み

発癌性誘導体				非発癌性誘導体			
WS 5		WS 13		WS 7		WS 9	
5.0	4.5 ≤ m ≤ 5.5	5.3	5.0 ≤ m ≤ 5.5	4.8	4.1 ≤ m ≤ 5.4	5.3	4.5 ≤ m ≤ 6.0
0		0		0		0	
28.4	27.7 ≤ m ≤ 29.1	28.3	27.2 ≤ m ≤ 29.4	29.7	28.1 ≤ m ≤ 31.2	28.9	27.7 ≤ m ≤ 30.1
5.0	4.5 ≤ m ≤ 5.4	4.9	4.2 ≤ m ≤ 5.6	5.2	4.5 ≤ m ≤ 5.9	5.5	5.1 ≤ m ≤ 5.9
36.1	34.9 ≤ m ≤ 37.4	34.3	32.8 ≤ m ≤ 35.7	35.2	33.8 ≤ m ≤ 36.7	34.0	32.7 ≤ m ≤ 35.3
<hr/>							
5.6	4.7 ≤ m ≤ 6.5	5.1	4.4 ≤ m ≤ 5.8	5.0	4.3 ≤ m ≤ 5.7	5.8	5.1 ≤ m ≤ 6.5
0		0		0		0	
29.6	28.4 ≤ m ≤ 30.9	29.1	27.9 ≤ m ≤ 30.4	19.0	17.9 ≤ m ≤ 20.1	19.3	17.8 ≤ m ≤ 20.7
5.2	4.3 ≤ m ≤ 6.0	5.3	4.2 ≤ m ≤ 6.4	5.1	4.5 ≤ m ≤ 5.8	5.7	5.0 ≤ m ≤ 6.4
30.4	29.3 ≤ m ≤ 31.5	30.7	29.0 ≤ m ≤ 32.4	20.2	19.1 ≤ m ≤ 21.2	20.1	17.8 ≤ m ≤ 22.5

5) 分裂原虫 50 個中

6) 原虫 400 個について

7) 平均値

8) 1% の危険率でみた平均値の信頼限界。

わち AK 型原虫を誘発すると思われる分裂型原虫\*\*\* の数をそれぞれ調べた。

b) 発癌性誘導体あるいは非発癌性誘導体で処理して作った原虫株を *p*-ros または *rosaniline* に接触させることにより耐性にする試み。

WS, WS 5, WS 13, WS 7 および WS 9 の 5 株の原虫を Inoki & Matsushiro (1959) の方法にしたがってマウス体内で *p*-ros あるいは *rosaniline* (以下 *ros* と略) に接触させた。これは形質転換の実験に donor として用いる耐性株 WR を作る方法であつて、感性株 WS をこの方法で処理すると通常、形質転換によるよりも強い耐性株が得られる。すなわち、末梢血中に原虫が認められる WS 感染マウスの腹腔内に *p*-ros あるいは *ros* 1 mg/kg を注射し、注射 1 時間後、そのマウスの末梢血からとつた原虫を別の健常マウスに接種する。2-3 日後接種マウスの末梢血中に適当な数の原虫が出現したとき、前回より大量すなわち 5 mg/kg の *p*-ros あるいは *ros* を腹腔内に注射する。以下、同様の操作によつてマウス継代毎に 5 mg/kg づつ増量し漸次高濃度の *p*-ros あ

plast の分裂が全く阻害され、1 個の kinetoplast しか持たない原虫及び分裂しても 2 個が接触したまま離れていかない kinetoplast を持った原虫を意味しており、細胞質の分裂が起こると 1 つの娘細胞に kinetoplast が残り、他の娘細胞は所謂 AK 型原虫となる分裂型原虫である。

\*\*\* 以下、分裂型原虫とは核が完全に分裂して 2 核をもつた原虫を意味する。

るいは *ros* と接触させるのである。この実験では WS 5 および WS 7 は Chroma-Gesellschaft schmid & Co の *p*-ros で、WS 13 および WS 9 は米国 Eli Lilly 製薬会社附属研究所から恵与された *ros* でそれぞれ処理し、耐性株を作る試みを行なつたが、用いた最高濃度はマウスに対する毒性から 85 mg/kg マウス量であつた。このようにして処理した原虫はその後、1 匹鈎 (Inoki 1960) を行ないクローンとして用いた。なお、*p*-ros で処理した WS, WS 5 および WS 7, *ros* で処理した WS, WS 13 および WS 9 に対する AK 型誘発試験は実験 a と同様、10 mg/kg マウス量の *p*-ros をマウス腹腔内に注射する方法 (Inoki & Matsushiro, 1959) によつて行なつており、血液塗抹標本の検索方法も実験 a と同じである。なお、*p*-ros と *ros* はともに AK 型原虫の誘発効果があり、それらの耐性の間には交叉がみられる。

## 実験成績

a) 発癌性誘導体あるいは非発癌性誘導体で処理して作った原虫株を形質転換により、*p*-ros 耐性にする試み。

表 1 にみられる如く、形質転換の実験に recipient として用いた 5 株の原虫はいずれも分裂型原虫すなわち 2 核をもつた原虫の出現率が約 5% である。次に AK 型原虫の出現率と分裂型原虫で垂鈴型の kinetoplast をもつた型\*\*の原虫数であるが、AK 型誘発試験を行なわなければ、どの株の原虫でも垂鈴型の kinetoplast をもつた原虫は全く認められず、AK 型原虫も 1% 以下である。AK 型誘発試験を行なうと分裂型原虫で kinetoplast

第2表 薬剤との接触による

		処理に用いた誘導體	対 照 (非処理)			
		原虫株	WS			
薬剤との接触による耐性賦与におよぼす発癌性物質の効果						
薬剤との接触前	誘発前 <sup>1)</sup>	分裂型原虫 (%) <sup>2)</sup> 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数 <sup>5)</sup>	5.1 <sup>7)</sup> 4.5 ≤ m ≤ 5.7 <sup>8)</sup> 0			
	誘発後 <sup>2)</sup>	AK型 (%) <sup>6)</sup> 分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	29.4 5.5 36.0	28.3 ≤ m ≤ 30.5 5.0 ≤ m ≤ 6.0 34.6 ≤ m ≤ 37.3		
		接 触 さ せ た 薬 剤	p-rosaniline		rosaniline	
薬剤との接触後	誘発前	分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	5.2 0	4.4 ≤ m ≤ 6.0 0	5.6 0	4.9 ≤ m ≤ 6.3 0
	誘発後	AK型 (%) 分裂型原虫 (%) 亜鈴型の kinetoplast をもった分裂型原虫の数	15.9 5.5 18.7	14.5 ≤ m ≤ 17.2 4.9 ≤ m ≤ 6.1 17.5 ≤ m ≤ 19.9	14.5 5.2 18.9	12.6 ≤ m ≤ 16.4 4.0 ≤ m ≤ 6.4 17.1 ≤ m ≤ 20.7

- 1) AK 型誘発試験前 2) AK 型誘発試験 240 分後 3) 原虫 1,000 個について  
 4) kinetoplast の分裂が全く阻害され、kinetoplast が 1 個しかないか、または分裂しても 2 個が接触したまま離れていかない kinetoplast

の分裂が阻害された原虫が現われ、また AK 型原虫もみられるようになるが、AK 型原虫の出現率は 28-29 %、亜鈴型の kinetoplast をもった原虫は分裂型原虫 50 個中 34-36 個であり、5 株の原虫の間で著しい差が認められない。しかし形質転換を行なうとあらかじめ原虫を処理するのに用いた誘導體が発癌性か否かによつて 5 株の原虫の間に明瞭な違いがあらわれ、発癌性誘導體で処理して作った WS5 および WS13 を recipient にした場合、AK 型原虫は約 29 % で形質転換が全く起こっていないが、非発癌性誘導體で処理して作った WS7 および WS9 を recipient にした場合や対照すなわち誘導體で処理していない原虫を recipient にした実験では AK 型原虫の出現率が約 19 % で確かに形質転換が起こっていることが認められる。

この場合、それぞれの誘導體で処理して作った原虫の間における相違は AK 型原虫の出現率についてだけではなく、2 個の核をもったいわゆる分裂型原虫で亜鈴型の kinetoplast をもつ原虫の数においても異なり、発癌性誘導體で処理した原虫では分裂型原虫 50 個中約 30 個であるのに反し、非発癌性誘導體で処理した原虫や対照すなわち誘導體で処理していない原虫を recipient にした形質転換では分裂型原虫 50 個中約 20 個であつた。

b) 発癌性誘導體あるいは非発癌性誘導體で処理して作った原虫株を p-ros または ros に接触させることに

より耐性にする試み。

a) の実験で recipient に用いた原虫と同じ株の原虫を *in vitro* で p-ros あるいは ros に接触させ、それらの薬剤に耐性にする試みを行なつた。先づ分裂型原虫の出現率であるが表 2 にみられる如く、AK 型誘発試験の前後において変わらず約 5 % である。次に AK 型誘発試験後出現する AK 型原虫の出現率であるが誘導體で処理していない原株では 14-15 % であり耐性化が認められる。これに反し、発癌性誘導體あるいは非発癌性誘導體で処理した原虫では 27-29 % であり、p-ros あるいは ros に接触させる前と変わらず、耐性獲得が認められない、なお、誘導體で処理していない原株と発癌性あるいは非発癌性の誘導體で処理して作った原虫株との違いは AK 型原虫の出現率だけではなく、分裂型原虫で亜鈴型の kinetoplast をもった原虫\*\* の数でも異なり、誘導體で処理していない原株では分裂型原虫 50 個中約 19 個であつたが、誘導體で処理した原虫では分裂型原虫 50 個中 32-35 個であつた。

考 察

DAB および MAB の発癌性誘導體と非発癌性誘導體が *Trypanosoma* の薬剤耐性形質転換に如何なる効果を見出すかを検討し、興味ある成績を得た。すなわち、先づ形質転換の実験では donor として p-ros 85 mg/kg



## 耐性賦与の試み

発癌性誘導体				非発癌性誘導体			
WS 5		WS 13		WS 7		WS 9	
5.0	4.5 ≤ m ≤ 5.5	5.3	5.0 ≤ m ≤ 5.5	4.8	4.1 ≤ m ≤ 5.4	5.3	4.5 ≤ m ≤ 6.0
0		0		0		0	
28.4	27.7 ≤ m ≤ 29.1	28.3	27.2 ≤ m ≤ 29.4	29.9	28.1 ≤ m ≤ 31.2	28.9	27.7 ≤ m ≤ 30.1
5.0	4.5 ≤ m ≤ 5.4	4.9	4.2 ≤ m ≤ 5.6	5.2	4.5 ≤ m ≤ 5.9	5.5	5.1 ≤ m ≤ 5.9
36.1	34.9 ≤ m ≤ 37.4	34.3	32.8 ≤ m ≤ 35.7	35.2	33.8 ≤ m ≤ 36.7	34.0	32.7 ≤ m ≤ 35.3
<i>p</i> -rospniline		rosaniline		<i>p</i> -rosaniline		rosaniline	
5.6	5.0 ≤ m ≤ 6.2	5.1	4.4 ≤ m ≤ 5.8	5.5	4.7 ≤ m ≤ 6.4	5.7	4.7 ≤ m ≤ 6.6
0		0		0		0	
29.5	27.9 ≤ m ≤ 31.0	28.5	27.1 ≤ m ≤ 29.8	27.0	25.5 ≤ m ≤ 28.5	29.0	27.6 ≤ m ≤ 30.5
5.8	5.3 ≤ m ≤ 6.3	5.8	5.1 ≤ m ≤ 6.6	5.6	4.7 ≤ m ≤ 6.5	5.3	4.5 ≤ m ≤ 6.1
35.6	34.4 ≤ m ≤ 36.8	35.8	35.1 ≤ m ≤ 36.5	33.6	32.1 ≤ m ≤ 35.1	32.5	31.0 ≤ m ≤ 34.0

- 5) 分裂原虫 50 個中      6) 原虫 400 個について      7) 平均値  
8) 1% の危険率でみた平均値の信頼限界

耐性株 WR を用いたのであるが、発癌性誘導体で処理して作った原虫株 WS 5, WS 13 を recipient にすると非発癌性誘導体で処理して作った原虫株 WS 7, WS 9 を recipient として用いた場合と異なり、全く形質転換が起こらない事実を認めた。この実験においては形質転換の操作に際して形質転換阻害物質を用いておらず、しかも recipient として用いた WS 5 と WS 13 は発癌性誘導体である 3'-Cl-DAB と 4'-OCH<sub>3</sub>-MAB によつてそれぞれ処理を受けてから 4 カ月も経過しており、その間マウスに 40 代以上継代を続けている。それにもかかわらず形質転換が起こらなくなっているのである。他方、非発癌性誘導体の 3'-BR-DAB と 3'-CF<sub>3</sub>-DAB でそれぞれ処理して作った WS 7 と WS 9 を recipient にすると感性株 WS を recipient に用いたときと同じように形質転換が起こる。この知見は発癌性誘導体は形質転換を阻害するが非発癌性誘導体はそれを阻害しないという第 1 報 (小野, 1966) の成績を裏付けるとともにその時未解決であった問題すなわち非発癌性誘導体でも使用量を多くすれば形質転換の阻害が起こるのではないかという危惧を否定するものと思われる。さらにこの知見は第 1 報で報告したアゾ色素による形質転換阻害効果の作用機序に対する考察にも 1 つの指針を与えているように思われる。すなわちあらかじめ発癌性誘導体で処理された原虫では形質転換にさいして阻害物質を用いなくても形質転換が起こらなくなっているが、この事実は DAB および MAB

の発癌性誘導体による形質転換の阻害はこれらの物質が *in vitro* で形質転換因子の DNA と反応し、この DNA が原虫内に取込まれる前の段階ですでにその形質転換能を失活させることによつて起こると考えるよりも、むしろ阻害作用は発癌性誘導体によつて recipient 原虫に起こされる遺伝性の変化に関連して起こると考える方が妥当であることを示唆しているように思われる。それならばこの場合、アゾ色素は形質転換 DNA と反応せず、ただ原虫に遺伝性の変化を与えることによつて形質転換を阻害するのか、あるいは形質転換因子の DNA と反応し、その結果生じた DNA の変化が原虫に遺伝性の変化を与え形質転換を阻害するのか、ということが問題となる。現在、アゾ色素の代謝は酸化的脱メチル化、水酸化およびアゾ基の還元分解の 3 つの経路が考えられており、最初の酸化的脱メチル化反応の結果できるホルムアルデヒドと核酸の反応性については以前から知られていた (Staehelin, 1958) が、最近、Roberts & Warwick (1963) はアミノアゾベンゼンの N メチルグループが *in vitro* で N メチロールを形成し、このものが核酸と反応することを見出した。N メチルグループは肝臓で段階的に酸化を受けるが最初の産生物である N メチロール誘導体ヒドロキシルアミノアゾベンゼンが *in vitro* で DNA をアルキル化するのである。したがつて形質転換の阻害もアゾ色素の活性な代謝産物である N メチロールあるいはホルムアルデヒドと形質転換 DNA との反応が関連して起こ



ると考えるのが合理的かも知れない。しかし、ホルムアルデヒドやNメチロールが発癌性誘導体のみならず非発癌性誘導体においても作られるという事実は発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用の一部に共通点が存在する可能性を示し、発癌性誘導体が形質転換を阻害し、非発癌性誘導体が阻害しないという現象をこれらの代謝産物の形成だけで解説することの不可能なことを教えている。またラットの肝臓で知られているアゾ色素を代謝する各種の酵素が果たして *Trypanosoma* 原虫にも存在するかどうか、という点も考慮すると今の段階では形質転換を阻害する因子の本態およびその作用機序について十分な考察を加えることができない。しかし、ここに観察された現象はきわめて興味あるものであり、アゾ色素による発癌機構の研究に将来、何等かの示唆を与えるかも知れない。

なお、実験成績が示すように発癌性誘導体で処理して作った株の原虫では形質転換によってもまたマウス体内で直接、薬剤と接触させる方法によっても耐性株を得ることができなかつた。これに反して、非発癌性誘導体で処理して作った株の原虫では薬剤と接触する方法では耐性化できなかつたが、形質転換では耐性を獲得した。すなわち、非発癌性誘導体で処理して作った原虫は *in vivo* で薬剤と接触しても耐性株になり得ないという点では発癌性誘導体で処理して作った原虫と同じ性質を示したのである。この成績は核酸と反応性をもつNメチロールおよびホルムアルデヒドが発癌性誘導体でも非発癌性誘導体でも同じように作られるという事実と関連して興味があり、非発癌性誘導体は発癌実験に用いても癌を作ることができず、また形質転換阻害効果も持たないが何等かの生物学的活性を示し、少なくともその作用の一部には発癌性誘導体の作用と共通した部分があることを意味しているように思われる。

以上の実験成績から第1報(小野, 1966)で報告したDABおよびMABの発癌性誘導体による形質転換の阻害にはこの誘導体によつて recipient 原虫に起こされる遺伝性の変化が関与しているのではないかとと思われる成績が得られ、また発癌性誘導体と非発癌性誘導体とはその作用において全く異つた点とともに互に共通した点ももつのではないかとと思われる知見が得られたわけであり、非発癌性誘導体は発癌作用を示さないけれども発癌機構の解明にあつて決して無視できない何等かの生物学的活性をもつのではないかと推定される。

## 結 論

先に得られた知見(Inoki *et al.* 1960, 小野, 1966)によつて *Trypanosoma* の遺伝現象と抗腫瘍性物質および発癌性物質の作用との間にある関係が存在することが明らかになつたので、*Trypanosoma* の遺伝現象を利用してDABおよびMABの発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用をさらに明らかにするため実験を行つた。その結果、発癌性誘導体であらかじめ処理して作った原虫株を recipient にすると形質転換が起こらないことがわかつた。すなわちこれは発癌性誘導体と非発癌性誘導体はその作用において違つた点があり、発癌性誘導体は形質転換を阻害するが、非発癌性誘導体は阻害しないという第1報の成績を裏付けるとともに、発癌性誘導体による形質転換の阻害にはこの誘導体によつて recipient 原虫に起こされる遺伝性の変化が関連しているのではないかということ推定させる。そこで、あらかじめ発癌性誘導体で処理された原虫は *in vivo* で *p*-rosaniline と直接、接触してもこの薬剤に対して耐性を獲得することができなくなつていないのではないかと考え、この点を検討したが、発癌性誘導体で処理した原虫だけではなく、非発癌性誘導体で処理した原虫においても、耐性を獲得する能力が失なわれていることがわかつた。今までに得られた実験成績からだけではこの理由について十分な考察を加えることができない。しかし、これらの実験によつて発癌性誘導体と非発癌性誘導体はその作用において、全く異つた点とともに互に共通した点もまたもつのではないと思われる成績が得られたわけであり、非発癌性誘導体は発癌作用をもたないけれども、発癌機構を解明するにあつて、決して無視できない何等かの生物学的活性をもつのではないかと推定される。

擱筆にあたり終始、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およびMABとその誘導体を恵与して頂き種々御助言を頂いた京都大学工学部福井謙一教授に感謝します。又討論を賜わり、御助言を頂いた大阪大学理学部村上英夫氏に感謝致します。

本論文の内容は昭和36年11月日本寄生虫学会西日本支部第17回大会、昭和37年10月日本寄生虫学会西日本支部第18回大会および昭和38年4月第32回日本寄生虫学会総会において発表した成績の一部である。



## 文 献

- 1) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1959) : Relationship between kinetoplast elimination and pararosaniline resistance in *Trypanosoma gambiense*. *Bikens J.*, 2(4), 371-374.
- 2) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1960) : Transformation of drug-resistance in *Trypanosoma*. *Bikens J.*, 3(1), 101-106.
- 3) 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.
- 4) Inoki, S. (1960) : Studies on antigenic variation in the Welcome strain of *Trypanosoma gambiense* I. Improvements in technique. *Bikens J.* 3(3), 215-222.
- 5) Inoki, S., Taniuchi, H., Sakamoto, H., Ono, T., & Kubo, R. (1961) : Interspecific transformation of drug-resistance between *Trypanosoma gambiense* and *Trypanosoma evansi* *Bikens J.*, 4(2), 111-119.
- 6) 猪木正三(1961) : 病原性 *Trypanosoma* の AK 型 (akinetoplastic 型) に関する遺伝学的研究. 核と細胞質, 2, 23-30.
- 7) 小野忠相 (1966) : *Trypanosoma* の薬剤耐性形質転換におよぼす発癌性物質の効果 (1). 寄生虫誌, 15(2), 173-178.
- 8) Roberts, J. J. & Warwick, G. P. (1963) : Azo dye liver cartinogenesis reaction of hydroxymethylaminoazobenzene with nucleic acid *in vitro*. *Nature*, 197(4862), 87-88.
- 9) Staehlin, M. (1958) : Reaction of tobacco mosaic virus nucleic acid with formaldehyde. *B. B. A.*, 29, 410-417.

## Abstract

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

TADASUKE ONO

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

In the works of Inoki *et al.* (1960) and the present author (1966) an inhibitory effect of cartinogenic or anti-tumor substances upon the drug-resistance transformation was observed in trypanosomes. In the present study further effort was made to elucidate the mode of this inhibitory action of DAB, MAB and their derivatives on the transformation.

Experiments in this study showed that no transformation was induced when trypanosomes previously treated with cartinogenic substances were used as a recipient. The fact may support the results in the author's previous work (Ono, 1966) and simultaneously may suggest the possibility that genetic change occurring in the pre-treated trypanosomes may be closely related with the inhibition of the transformation. Hence the question arises whether pre-treated trypanosomes have an ability to acquire resistance against *p*-rosaniline treatment *in vivo*.

Another series of experiments were made to answer this question. The experiments showed that no ability to acquire the resistance was observed in trypanosomes treated with non-cartinogenic substances as well as in those with cartinogenic ones. Although there have been no data to explain above-mentioned results, the present data revealed the occurrence of two characters in the chemicals tested; one is common between two sorts of chemicals, cartinogenic and non-cartinogenic in their nature, and the other uncommon between two sorts of chemicals, carcinogenic and non-carcinogenic derivatives. It is presumed that non-cartinogenic derivatives, though they have no ability to produce tumor, may have some biological activity not to be ignored when the mechanism of cartinogenesis is investigated.