

Trypaosoma gambiense の薬剤耐性形質転換におよぼす 抗腫瘍性物質ならびに発癌性物質の効果に関する知見補遺

猪 木 正 三 小 野 忠 相 佐 野 恵

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3月23日受領)

緒 言

Werbitzki(1910)は *Trypanosoma brucei* 感染マウスにある種の色素を注射すれば細胞質内自家増殖性顆粒, kinetoplast が失われた変異型, すなわち akinetoplastic form (AK 型) が出現する現象を発見した。しかし, 色素注射後に出現する AK 型原虫の発生機序についての解析は行なわれていなかった。

猪木は 1956 年, アフリカ睡眠病の病原体 *Trypanosoma gambiense* の kinetoplast が p-rosaniline および acriflavine により消失する現象に興味を持ち, この過程を遺伝学的な立場から解析することを企て, 色素注射後マウス体内で増加する AK 型原虫は kinetoplast の分裂障害によつて造られることを実証し, AK 型原虫の出現機序に対して明快な解答を与えた (Inoki, 1956)。この研究はその後さらに発展し種々の重要な知見が加えられたが, その中でも上記の現象を利用して *Trypanosoma gambiense* の p-rosaniline 耐性形質転換に成功した Inoki and Matsushiro (1960) の報告は注目すべきものである。

形質転換という遺伝現象は Griffith(1928)が肺炎双球菌について見出したものであるが, donor から抽出した DNA によつて donor の遺伝形質が recipient に伝えられる現象である。猪木らは *Trypanosoma* で認めたこの形質転換に各種の物質を作用させその影響を観察した結果, 抗腫瘍性が認められている 10 種類の物質の中, a-zane, colchicine および demecolchine を除く総ての物質は形質転換阻害作用を持ち, 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 (Inoki et al., 1960)。ついで小野 (1966 a) は発癌性物質として DAB および MAB とその誘導体 14 種類を用い, これらの物質が形

質転換におよぼす効果を調べ, その結果, 発癌性が認められる誘導体のみが形質転換を阻害することを見出した。しかし, これらの実験において一応問題となることは, 形質転換の阻害, あるいは非阻害の判定がいわゆる AK 型誘発試験 (Inoki and Matsushiro, 1959) によつて行なわれている点である。すなわち, AK 型誘発試験は 10 mg/kg マウス体重の p-rosaniline を感染マウスに注射し 4 時間後に出現する AK 型原虫数を算出して感染原虫の p-rosaniline 耐性度を測定する方法であるが, この実験のように形質転換に際して各種の物質を作用させる実験においても, やはり AK 型原虫の数が原虫の p-rosaniline 耐性度を正確に反映しているかどうかということである。もしも, 抗腫瘍性物質や発癌性物質が直接 AK 型原虫を誘発したり, 原虫の増殖に影響をおよぼしたりするならば AK 型原虫の数によつて原虫の p-rosaniline 耐性度を判定することは困難となる。したがつて上記の実験が形質転換阻害実験であることを明確にするためには抗腫瘍性物質や発癌性物質が原虫の増殖に影響をおよぼしていなかったかどうか, また AK 型原虫の出現が kinetoplast の分裂障害だけに起因するのかどうかという諸点を明らかにしておく必要がある。

そこで, 形質転換に各種の物質を作用させた実験において, AK 型誘発試験の前後における分裂型原虫の出現率および細胞分裂に際しての kinetoplast の動向について観察を行なつてみた。

実験方法

形質転換に用いた原虫はいずれも先の実験 (Inoki and Matsushiro, 1960; Inoki et al., 1960; 小野, 1966a) に用いた株と同じであつて, recipient には *Trypanosoma gambiense* の p-rosaniline 感性株 (以下 WS と略) を,

本研究の一部は文部省科学研究費の補助を得て行なわれた。ここに記して謝意を表する。猪木記

donor には p-rosaniline 85 mg/kg 耐種株(以下 WR と略)をそれぞれ使用した。実験操作も先の論文に示した方法と同様である。すなわち WR に感染させたラッテから 10^5 個/mm³(註1)の原虫を含む懸濁液を作つてこれを凍結融解し、得られた原虫 lysate 1ml, 10^3 個/mm³(註1)の割合に WS を含む原虫懸濁液 1ml, および形質転換におよぼす効果をみるために用いた各種の物質を含む液 0.5ml の3者、計 2.5 ml をよく混和し、室温で15分間放置した後、その 0.05 ml 宛を各マウスに接種した。なお、この実験において形質転換に及ぼす効果を調べた物質は抗腫瘍性物質として actinomycin S, DAB 誘導体の中で発癌性が認められている 3'-Cl-DAB, と発癌性が認められていない 3'-Br-DAB, 核酸分解酵素として DNase および RNase, 蛋白合成阻害剤として chloramphenicol, 蛋白分解酵素として trypsin の計7種類であり、先の実験(Inoki and Matsushiro, 1960; Inoki et al., 1960, 小野, 1966 a)において actinomycin S, 3'-Cl-DAB, および DNase はいずれも形質転換を阻害し、一方、3'-Br-DAB, chloramphenicol, trypsin および RNase はそのような阻害作用を示さなかつた。実験に用いた量は最終濃度が chloramphenicol は 200 γ /ml, actinomycin S は 1 γ /ml であるが、それら以外はいずれも 100 γ /ml である。

マウスに原虫を接種すれば2~3日後、その末梢血に原虫が出現する。その時期にまず血液塗抹標本を作り、さらに同じマウスに AK 型誘発試験を行なつて4時間後の血液塗抹標本をとつた。標本はいずれも 60°C に加温した 1N 塩酸内に2分間放置して加水分解を行なわしめた後、ギムザ染色を行なつた。ついで、これとの標本につき kinetoplast をもつた原虫 1,000 個中に含まれる分裂型原虫(註2)の数、分裂型原虫 50 個中に含まれる亜鈴型(註3)の kinetoplast をもつた原虫、すなわち、kinetoplast の分

註1 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(日本寄生虫学会総会報告)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。

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

註3 以下、亜鈴型の kinetoplast をもつた原虫とは亜鈴状の kinetoplast をもつた原虫および kinetoplast の分裂が阻害されて1個の kinetoplast しかもたない原虫を意味しており、細胞分裂が起こると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。

裂が阻害されていて細胞の分裂が起これば AK 型原虫が誘発される態勢にある分裂型原虫の数を調べた。また対照として WR の代わりに WS を donor に用い、これに上記の物質を作用させる実験を行なつた。

実験成績

第1表は recipient に WS, donor に WR および WS の lysate を用い、それらの系に各種の物質を作用させた実験の結果であるが、分裂型原虫の出現率は表に示すように約5%であり、AK 型誘発試験の前後でほとんど変わらない。次に核が完全に分裂しているにもかかわらず、kinetoplast の分裂が阻害されていて、いわゆる亜鈴型を呈する kinetoplast をもつた原虫の数であるが、形質転換に上記の供試物質を作用させても AK 型誘発試験を行なわなければこのような型の原虫は認められずまた、この場合、AK 型原虫の出現もない。しかし、AK 型誘発試験を行なうと kinetoplast の分裂が阻害された原虫が出現し、recipient に WS, donor に WR を用いた形質転換で各種の形質転換阻害物質を作用させた実験では表に示すように分裂型原虫 50 個中に亜鈴型の kinetoplast をもつた原虫が約30個認められる。この値は阻害物質の種類が違つても同じである。しかし、形質転換を阻害しない物質を作用させた時にはこのような原虫が分裂型原虫 50 個中に20個前後認められ、対照すなわち、各種の物質を用いない場合とほぼ同じ値であつた。次に対照として WS を recipient および donor に用いた形質転換の実験では、表に示したように形質転換阻害物質あるいは非阻害物質の使用に関係なく、kinetoplast の分裂が阻害された原虫は分裂型原虫 50 個中に34個見出された。

考察

1956年に Inoki が行なつた実験によつて薬剤投与後に出現する *Trypanosoma gambiense* の AK 型の発生機序が明らかにせられ、さらにこの知見を基にして考案されたいわゆる AK 型誘発試験(Inoki and Matsushiro, 1959)によつて *Trypanosoma* の p-rosaniline 耐性度が容易に、しかも正確に測定されるようになり、猪木等の研究は急速に発展した。この AK 型誘発試験は kinetoplast が p-rosaniline に対して核よりも強い感受性を示す点を利用したものであり、核や細胞の分裂に影響がなく kinetoplast の分裂のみを阻害する比較的低い濃度の p-rosaniline を原虫感染マウスに注射し細胞分裂を起

第1表 形質転換におよぼす各種薬剤の効果

実				験								
形質転換の系	供試薬剤	使用量 ($\mu\text{g}/2.5\text{ml}$)	形質転換	AK型誘発試験前				AK型誘発試験後				
				分裂型原虫 (%)		亜鈴型 ⁽¹⁾ の kinetoplast を持った分裂原虫の数 ⁽²⁾	分裂型原虫 (%)		亜鈴型 ⁽¹⁾ の kinetoplast を持った分裂原虫の数 ⁽²⁾			
				(3)	(4)							
WS ⁽⁵⁾ +	—	—	+	5.4	4.9 ≤ m ≤ 6.0	0	5.2	4.6 ≤ m ≤ 5.7	19.5	17.8 ≤ m ≤ 21.2		
	DNase	250	—	4.9	4.4 ≤ m ≤ 5.4	0	5.1	4.5 ≤ m ≤ 5.8	30.4	28.1 ≤ m ≤ 32.8		
	actinomycin S	2.5		4.8	4.1 ≤ m ≤ 5.5	0	4.8	3.8 ≤ m ≤ 5.7	30.7	28.6 ≤ m ≤ 32.8		
	3'-Cl-DAB	250		4.9	4.3 ≤ m ≤ 5.6	0	5.7	4.8 ≤ m ≤ 6.5	31.6	29.2 ≤ m ≤ 34.0		
WR-L ⁽⁶⁾	RNase	250	+	5.1	4.3 ≤ m ≤ 5.8	0	5.3	4.3 ≤ m ≤ 6.2	20.8	18.5 ≤ m ≤ 23.0		
	3'-Br-DAB	250		5.3	4.2 ≤ m ≤ 6.4	0	5.2	4.2 ≤ m ≤ 6.2	20.7	19.2 ≤ m ≤ 22.9		
	chloramphenicol	500		5.5	4.5 ≤ m ≤ 6.5	0	5.1	4.3 ≤ m ≤ 5.9	20.1	18.3 ≤ m ≤ 21.9		
	trypsin	250		5.1	4.3 ≤ m ≤ 5.9	0	5.1	4.4 ≤ m ≤ 5.7	21.0	17.7 ≤ m ≤ 23.3		
	—	—		—	5.4	4.6 ≤ m ≤ 6.2	0	5.2	4.3 ≤ m ≤ 6.0	35.0	33.2 ≤ m ≤ 36.8	
WS +	DNase	250	—	5.2	4.2 ≤ m ≤ 6.1	0	5.2	4.0 ≤ m ≤ 6.3	34.0	32.3 ≤ m ≤ 35.7		
	actinomycin S	2.5		5.0	4.1 ≤ m ≤ 5.9	0	5.2	4.0 ≤ m ≤ 6.4	35.1	34.0 ≤ m ≤ 36.3		
	3'-cl-DAB	250		5.2	4.3 ≤ m ≤ 6.2	0	5.7	4.6 ≤ m ≤ 6.9	34.3	32.4 ≤ m ≤ 36.2		
	RNase	250		5.3	4.2 ≤ m ≤ 6.4	0	4.8	4.1 ≤ m ≤ 5.4	33.3	31.8 ≤ m ≤ 34.7		
	3'-Br-DAB	250		5.7	4.7 ≤ m ≤ 6.8	0	5.0	4.0 ≤ m ≤ 6.0	33.6	32.1 ≤ m ≤ 35.2		
	chloramphenicol	500		5.1	4.2 ≤ m ≤ 6.0	0	5.0	4.0 ≤ m ≤ 5.9	34.1	32.7 ≤ m ≤ 35.6		
	trypsin	250		5.1	4.3 ≤ m ≤ 6.0	0	5.7	4.7 ≤ m ≤ 6.7	34.8	33.0 ≤ m ≤ 36.7		

(1) kinetoplast が 1 個のものも含む, (2) 分裂型原虫 50 個について, (3) 平均値, (4) 1 % の危険率でみた平均値の信頼限界, (5) 感性原虫, (6) 耐性原虫の lysate, (7) 感性原虫の lysate

こさしめると, kinetoplast を持たない原虫(AK型原虫)が出現する。この場合, 原虫が p-rosoaniline に対して耐性を持つておれば kinetoplast の分裂があまり阻害されず, そのため AK 型原虫の出現が起こらない。しかし感性の原虫であれば分裂が阻害されるので AK 型原虫が多く出現する。したがって, 上記色素の投与後に現われる AK 型原虫の数を調べることによって感染原虫の耐性獲得の程度を知ることが出来るのである。そこでこの AK 型誘発試験を利用して *Trypanosoma* の形質転換に及ぼす抗腫瘍性物質ならびに発癌性物質の効果を調べ, その結果, これらの物質がいずれも形質転換を阻害する事を見出した (Inoki et al., 1960; 小野, 1966 a) しかし, この実験で問題となる事は形質転換の阻害, あるいは非阻害の判定が AK 型誘発試験, すなわち, 色素注射 4 時間後に出現する AK 型原虫を数える事によって行なわれているという点である。p-rosoaniline, rosoaniline および acriflavine による AK 型原虫の誘発機序についてはすでに Inoki(1956) により詳しく解析され一応明らかにされているか, 抗腫瘍性物質や発癌性物質を使用する実験においても AK 型原虫はやはり kinetoplast の分裂障害によってのみ作り出されるのかどうか,

もしこれらの物質が原虫の増殖速度を変え, その結果, AK 型原虫の誘発に影響を与えるとすれば, AK 型原虫の数によって原虫の p-rosoaniline 耐性を判定する事は困難となり, したがって AK 型原虫の出現率から形質転換の阻害度を知る事は不可能となる。そこでこの点を明らかにする目的で先ず, AK 型誘発前後における分裂型原虫の出現率を観察したが, その結果は表に示すようにいずれも 5 % 前後で, この値は donor が耐性あるいは感性, 各種の物質の使用および使用した物質の形質転換阻害性あるいは非阻害性等によつて全く影響を受けなかつた, したがって, これらの供試物質は原虫の分裂速度に影響を及ぼす事によつて AK 型原虫の出現数を変えるのではない事が明らかになった。次に分裂型原虫で亜鈴型^(註3)の kinetoplast を持った原虫, すなわち, kinetoplast の分裂のみが阻害された原虫でそのまま核および細胞質の分裂が進行すれば AK 型原虫が誘発される状態にある原虫の数であるが, 各種の物質を作用させた実験においても AK 型誘発試験を行なわなければこのような原虫は出現しない。この事はこの場合, AK 型原虫の出現がないという事実と共に形質転換を阻害しない物質は勿論, 阻害する物質であつてもこれらの物質自身, AK

型原虫を誘発する作用を持たない事を意味しているものと考えてよからう。しかし、p-rosaniline を注射して AK 型誘発試験を行なうとこのような亜鈴型の kinetoplast を持った分裂型原虫が出現する。recipient が WS, donor が WR で形質転換非阻害物質を作用させた実験では、分裂型原虫 50 個中に亜鈴型の kinetoplast を持ったものが 20~21 個見出された。この値は各種の物質を作用させない対照と変わらない。一方、形質転換阻害物質、すなわち、抗腫瘍性物質、DAB の発癌性誘導体等を作用させた実験では亜鈴型の kinetoplast を持った分裂型原虫が分裂型原虫 50 個中に 30~31 個認められた。以上の成績から形質転換に各種の物質を作用させた実験においても AK 型原虫は kinetoplast の分裂阻害によつて生じるものであり、形質転換に抗腫瘍性物質や発癌性物質を用いると AK 型誘発試験に際して AK 型原虫が多く誘発されるのはこれらの物質が形質転換を阻害した結果である事が明らかになった。次に donor として WR の代わりに WS を用いた対照実験であるが、AK 型誘発試験を行なうと分裂型原虫で亜鈴型の kinetoplast を持った原虫は形質転換阻害物質あるいは非阻害物質のいずれを作用させた場合でも分裂型原虫 50 個中に約 34 個認められている。この値はこれらの物質を作用させない対照実験の場合と大体同じであり、この事は、形質転換を阻害する DNase, 抗腫瘍性物質および発癌性物質は対照すなわち、これらの物質を用いない場合以上に多く AK 型原虫を誘発する作用を持っていない事を意味しておりこの点を AK 型原虫の出現率によつて調べた先の実験結果 (Inoki and Matsushiro 1960; Inoki et al., 1960; 小野, 1966 a) を裏付けている。

なお、この実験に用いた DNase, actinomycin S および 3'-Cl-DAB は先の報告 (Inoki and Matsushiro, 1960; Inoki et al., 1960; 小野, 1966 a) に示したように形質転換を阻害する物質であり、WR を donor にした形質転換を完全に阻害して AK 型原虫の出現率は WS を donor に用いて行なつた形質転換実験の場合とほぼ同じ値を示した。しかし、今回行なつた実験によると分裂が阻害された kinetoplast を持った分裂型原虫の数は第 1 表に示したように異なっており、後者すなわち WS を donor にした形質転換の場合は、前者、すなわち、WR を donor にして形質転換阻害物質を用いた場合に比べて kinetoplast の分裂が阻害された分裂型原虫が多く出現した。換言すれば、WR を donor にし形質転換阻害物質を用いた実験では kinetoplast の分裂が阻害さ

れている原虫、すなわち、亜鈴型の kinetoplast をもつた原虫数に対して誘発される AK 型原虫数が多い事を意味している。しかしこれは WR を donor にした形質転換であれば阻害物質を使わない場合にも同じ傾向がみられ、先に報告 (小野, 1966 b) したように p-rosaniline に接触せしめて作つた p-rosaniline 耐性株の原虫に AK 型誘発試験を行なつた場合と形質転換によつて作つた p-rosaniline 耐性の原虫に AK 型誘発試験を行なつた場合と比べると後者では、亜鈴型の kinetoplast をもつた分裂型原虫数に対して誘発される AK 型原虫の数が多し。これらの事は WR を donor にした形質転換について AK 型誘発試験を行なつた場合、分裂型原虫内の kinetoplast が亜鈴状を示さず、AK 型原虫が誘発されないと思われる分裂型原虫であつても、AK 型原虫が誘発される可能性があることを示唆しているのかも知れない。

以上の成績から形質転換に DNase, 抗腫瘍性物質および発癌性物質を用いると AK 型誘発試験に際して AK 型原虫が多く誘発されるのは、形質転換が阻害された結果、kinetoplast に分裂障害が起こつたためである事がわかる。

結 論

Trypanosoma gambiense の p-rosaniline 耐性の形質転換に対する薬剤の阻害あるいは非阻害作用の判定はいわゆる AK 型誘発試験によつて行なわれている。したがつて AK 型原虫は kinetoplast の分裂障害によつてのみ生じるのか、各種の物質は原虫の増殖速度に変化を与えないか、等を明らかにしておく必要がある。そこでこれ等の諸点を検討したが形質転換非阻害物質は勿論、阻害物質であつてもそれ等自体には AK 型原虫を誘発する作用がない事、AK 型原虫は kinetoplast の分裂障害によつてのみ生じるものであり、各種の物質は原虫の増殖速度を変える事により AK 型原虫の誘発を増減させるのではない事が明らかとなつた。したがつて形質転換に際して抗腫瘍性物質や発癌性物質を用いると AK 型誘発試験によつて AK 型原虫が多く誘発されるのはこれらの物質が形質転換を阻害したためである事がわかる。

拙筆にあたり、DAB 及び MAB とその誘導体を恵与して頂き、種々有益な御助言を頂いた京都大学工学部福井謙一教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Griffith, F. (1928) : The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.*, 27 (2), 113-159.
- 2) Inoki, S. (1956) : Origin of the akinetoplastic strain of *Trypanosoma gambiense*. *Cytologia, Suppl.*, Vol. (Proceedings of international symposia, Tokyo, Japan) 550-554.
- 3) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1959) : Relationship between kinetoplast elimination and pararosaniline resistance in *Trypanosoma gambiense*. *Bikens J.* 2(4), 371-374.
- 4) Inoki, S. & Matsushiro, A. (1960) : Transformation of drug-resistance in *Trypanosoma*. *Bikens J.*, 3(1), 101-106.
- 5) 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.
- 6) 小野忠相(1966 a) : *Trypanosoma gambiense* の薬剤耐性形質転換に及ぼす発癌性物質の効果(I), *寄生虫誌* 15(2), 175-180.
- 7) 小野忠相(1966 b) : *Trypanosoma gambiense* の薬剤耐性形質転換に及ぼす発癌性物質の効果(II), *寄生虫誌* 15(2), 181-187.
- 8) Werbitzki, F. W. (1910) : Ueber blepharoplastlose Trypanosomen. *Centralbl. f. Bakt. u. Infektionskrank. Abt. Orig.* 53(3), 303-315.

Abstract

EFFECT OF CARTINOGENIC AND ANTI-TUMOR SUBSTANCES ON THE
DRUG-RESISTANCE TRANSFORMATION IN *TRYPANOSOMA GAMBIENSE*

SHOZO INOKI, TADASUKE ONO & MEGUMI SANO

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

In order to determine an inhibitory action of anti-tumor or cartinogenic substances against the p-roaniline resistance transformation in *Trypanosoma gambiense*, the akinetoplastic form induction test (Inoki *et al.*, 1959) has been applied by Inoki *et al.* (1960) and Ono (1966 a, b). But the use of the test casts some doubts upon the following points: Whether these substances tested have the direct action on the kinetoplastic division to induce akinetoplastic form or on the multiplication of the protozoa. The present work was carried out to clear up these doubts using substances such as actinomycin S, 3'-Cl-DAB, 3'-Br-DAB, DN-ase, RN-ase, chloramphenicol and trypsin.

As shown in Table 1, experiments conclusively proved that none of them had any action to induce akinetoplastic form. This fact may, therefore, suggest that the increase in number of akinetoplastic trypanosomes is caused by the inhibitory action of anti-tumor or cartinogenic substances upon the drug-resistance transformation.

訂 正

寄生虫学雑誌第15巻第2号の175頁及181頁の表題中、又180頁及187頁の第2表題中、単に *Trypanosoma* とある所を著者の希望により *Trypanosoma gambiense* と訂正する。