

# *Trichomonas foetus* の cell homogenate (石英磨砕による)からの遠心分画物の電子顕微鏡的観察と防御抗原性の分析

山 川 敬 止

徳島大学医学部寄生虫学教室 (指導 尾崎文雄教授)

(1968年2月9日 受領)

## 緒 言

著者 (1968) はさきに *Trichomonas foetus* の石英砂による細胞ホモジネートを differential centrifugation 法により 3,600×G-sediment, Seds 1, 2, 3 (それぞれ 12,000×G-, 44,000×G-, 115,000×G-sediment) 及び final sup 1 (115,000×G-supernatant) に分画し、各分画物について理化学的性状の一部を検討した。岡・尾崎 (1963 a) が“防御抗原”として有益であると公表した分画は Sed 2 及び 3 に相当する部位であり、又彼らは final sup 1 は宿主に液性抗体を導く能力は存在するが、防御能力の付与に欠けていることにも触れた。しかし、これら分画の詳細な組成の分析と、Sed 1 の免疫学的動態については十分な観察を加えていない。

遠心分析を主軸とする前報 (1968) の結果から Sed 2 及び 3 はマイクロソームとライボソームが濃縮された部位であるという幾つかの証拠が得られた。しかし、これら細胞分画物に対して抗原分析を試みるさい、その結果の解釈の上いくつかの支障がある。すなわち 1) ライボソームは一定の機能構造に与えられた名称であるが、マイクロソームは分画の精度により幅広い解釈がされている (田代・小倉, 1957; Palade & Siekevitz, 1956) こと。2) この分画に含まれる主要組成は分泌あるいは細胞タンパクの合成に密接に関与するものであり (Risborough *et al.*, 1962; Tsugita *et al.*, 1962), これが宿主細胞内の同様の機能組成とどのような生化学的反応により防御機構をつくり出すのか明らかでなく、又マイクロソーム構造の膜質部 (リボプロテイン) に局在する H-抗原 (岡田, 1964) が自己、非自己の識別に重要な役割を

果たすというが、“防御免疫”でいかなる態度を示すかも確かでない。

次に“防御免疫”を分析する上で抗原側と抗体側のふたつの方向があるがここに述べた著者の成績は、すべて抗原側から“防御免疫”の分析を試みたものである。最初に遠心分画法により得た各分画物の形態を電子顕微鏡では握し、次にこれら分画物で動物を前処置したさい、どの分画が再感染に対し強い抵抗性を与えるか、そのさい攻撃原虫が宿主体内でどのような消長を示すかを観察した。

## 実験材料及び実験方法

供試株と培養法: *T. foetus* (乾株) を用い、すべて前報 (1968) に準じた。

細胞分画物の調製: 前報 (1968) に準じ 900×G-sediment (900×G-sed), 12,000×G-sediment (12,000×G-sed), 44,000×G-sediment (44,000×G-sed), 115,000×G-sediment (115,000×G-sed) 及び 115,000×G supernatant (final sup) に分画した。ただし免疫抗原として用いる際の分画法は 44,000×G-sed を分画するステップを省略し、12,000×G-supernatant を直接 115,000×G で遠心しマイクロソーム (遊離ライボソームを含む) と final sup に分画した。

電子顕微鏡観察: 1) 塗抹法…各分画物はすみやかに 0.0066M リン酸緩衝液 pH 7.0 (pH 7.0-PBS) で適当な浮遊液となし、これに 0.1% 四酸化オスミウム液を等量に添加処理し、数分後に純水により希釈した (Takami, 1957)。希釈はかすかにタンパク色が残るのを示標とした。希釈液を白金耳にとり、規定の銅メッシュにのせ乾燥後、日立 HU-6 型電子顕微鏡で観察した。

2) ネガティブ染色法…各分画物に所定量の pH7.0-PBS を添加, 均一浮遊液となし, 同量の 6% グルタルアルデヒド固定液 (pH 7.2, 0.05M-PBS) で 30 分冷室内で固定し, 上記同様に適当な希釈液として銅メッシュの上ののせ半乾燥して 2% リンタングステン酸 (pH 7.2) に試料を下方にして浮かし, 約 1 分染色, 次いで室温乾燥し, カーボン蒸着して観察に供した.

実験動物: 北里研究所より分与を受けた CF<sub>1</sub> 系マウスを自家繁殖し, 体重 20 g 前後の健康なものを用いた. 飼育はオリエンタル固型飼料と水道水により恒温で管理した.

免疫方法: 免疫に用いた分画は 12,000×G-sed, マイクロソーム及び final sup の 3 分画である. 接種量の基準は元の湿潤虫体重量 1 g 当たりから得られた各分画物を 1 g 該当と定めた. 接種ルートはすべて尾静脈を選び, 所定量の抗原を含む 0.3 ml を注射した. 注射後 3 時間から約 1 日間は立毛し, 運動性が弱まり一ヶ所に集合する状態を示すが, その後すみやかに回復し, 免疫処置により死亡する動物は見なかった.

### 実験成績

#### 電子顕微鏡的観察

3,600×G-sed: Photo 1 に示したごとく 0.1% オスミウム固定標本においては 150~500 m $\mu$  にわたる不均一な構造と, 長さ 130 m $\mu$  幅 30 m $\mu$  の比較的均一性のある構造物が見られ, これらとはともに電子密度が高い. 更にこれらの構造をとりまくように密度の低い網状不規則構造が存在した. 3,600×G-sed の組成はおそらく細胞表面の複雑な膜質及び外部構造(波動膜及び鞭毛など)の破片と思われる.

12,000×G-sed: 0.1% オスミウム固定標本 (Photo 2a) では約 200~400 m $\mu$  の比較的密度の不規則な構造と, 3,600×G-sed に見られたと同様に長さ 130 m $\mu$ , 幅 30 m $\mu$  の均一構造物が観察された.

ネガティブ染色標本 (Photo 2b) に示した膜構造のなかには, おそらく大形顆粒(おそらく嚢状で酸化還元酵素をそのなかを含むと考えられる)の破片の集合が推定される.

44,000×G-sed: Photo 3a (0.1% オスミウム固定) では電子密度の高い部と, やや低い部の両者からなる大小さまざまな集合体が観察された. 前者をよく観察するとライボソームの凝集したものであり, その凝集度によ

り様々の大きさを示している. 後者はおそらく膜構造であろうと推定した.

この推定の確認の意味からネガティブ標本の検討をしたのが Photo 3b である. ここに示されるほとんどは膜構造であり, ライボソームはわずかに散在した. 膜構造はかなり破壊を伴っているが明らかに 70~80 Å の厚さを保った二重膜構造であることが示された.

115,000×G-sed: 細胞組成のうち 115,000×G-sed に濃縮される主なものは遊離のライボソームである. Photo 4a に見られる約 25 m $\mu$  の均一性に富む, 電子密度のかなり高い小形粒子は明らかにライボソームである. これらの粒子は円形あるいは楕円形を示した.

Photo 4b のネガティブ標本では 6~10 コからなるライボソーム集合像が現われたが, これが自然のポリライボソームか人工的凝集産物かは明らかでない. 又これらのライボソームをよく注意すると, それらのサブパーティクルの存在が認められた.

Final sup: 密度は低く, 一様に無構造である. この分画の組成は可溶性酵素, 可溶性 RNA, 遊離アミノ酸及び核膜の破壊に由来する核タンパク (DNA-タンパク) からなるものと推定される.

#### 動物実験

前述のごとく各分画の基準濃度は, 湿潤虫体 1 g から得た各々の分画を 1 g 該当とし, これを所定の浮遊液とした. ゆえに浮遊液 1 ml 中の分画濃度は常にその作製に要した湿潤虫体重量の所定量を示すことになる. たとえば 1 g : 1 ml の標示は 1 g 虫体重量から得た分画物を 1 ml に浮遊してあることを表示している. かかる条件をもった各分画浮遊液の 0.3 ml を静脈内に免疫接種し, 3 週間後に 10<sup>7</sup> コの原虫を腹腔内に攻撃, それより 1 カ月にわたり防御能力について判定を続けた.

12,000×G-sed: Fig. 1 に示すごとく, 12 匹の無処置

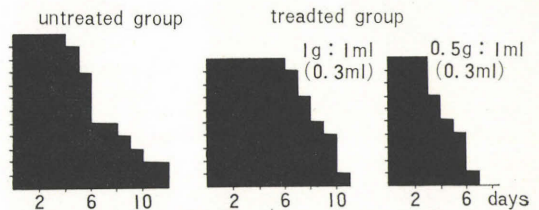


Fig. 1 Protective effect of intravenous immunization with large granules (12,000×G-sediment) on reinfection.

Mice attacked with 10<sup>7</sup> parasites after three weeks of immunization.

対照群と、接種実量の異なる 12,000×G-sed 免疫2群 (各群とも10匹からなる) で試験した。

無処置対照群は攻撃後12日までに、1g : 1ml 免疫群では11日までに、又 0.5g : 1ml 免疫群では7日までに100%の致死率を示した。感染後の生存日数において、3群の個々のマウスは多少の変動はあったが、12,000×G-sed が防御抗原性を欠除していることを示唆したものと考える。

実験各群とも死亡マウスは腹部膨満し、白濁粘りような腹水は、おびただしい数の活動原虫を含んだ。しかし腹腔内滲出細胞の著明な増加は認められなかった。

マイクロソーム : Fig. 2 に示したごとく無処置対照群は12匹他の3群は10匹ずつかからなり、マイクロソームの 1g : 1ml, 0.5g : 1ml 及び 1g : 5ml の濃度で、その 0.3ml で免疫した。

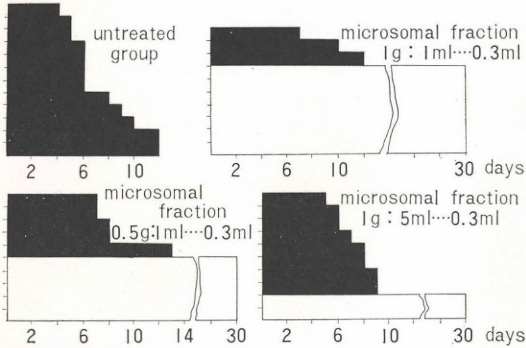


Fig. 2 Protective effect of intravenous immunization with soluble fraction (115,000 × G-sediment) on reinfection.

Mice attacked with  $10^7$  parasites after three weeks of immunization.

1g : 1ml 免疫群は3匹の感染死をみたにすぎず、耐過率はきわめて高く70%であった。30日の観察後、耐過マウス7匹の腹水の肉眼的所見では異状は認められず、もちろん活動原虫は培養においても証明されなかった。ただ腹腔内のリンパ細胞が未処置マウスよりも幾分増加の傾向を示した。0.5g : 1ml 免疫群では1g : 1ml 免疫群よりも耐過率がやや低下し、その値は50%であった。更に1g : 5ml 免疫群ではわずかに20%が耐過したにすぎなかった。後二者免疫群からの耐過動物の腹腔内所見も1g : 1ml 免疫群のそれに著しく類似した。

マイクロソームに高い防御抗原性が局在することは以上の結果から明らかである。しかしマイクロソームの濃度の低下に伴って抗原性が急速に減弱することも事実で

ある。

Final sup : 12匹の無処置対照群の外に final sup 1g : 5ml 及び 1g : 1ml の両免疫群を加えて試験した。

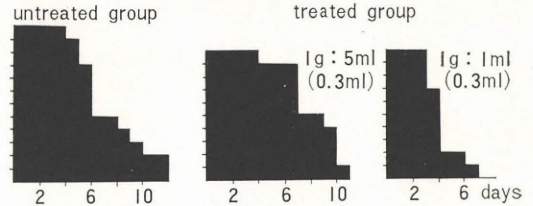


Fig. 3 Protective effect of intravenous immunization with soluble fraction (115,000 × G-supernatant) on reinfection.

Mice attacked with  $10^7$  parasites after three weeks of immunization.

Fig. 3 に示したごとく各実験群を通じて耐過した動物は存在しなかった。もともと final sup はタンパク含量が高く、血清学的には液性抗体産生に最適の抗原であると思われる (1967)。しかし“防御抗原”としては全く無効である結果を得た。更に興味あることは免疫濃度の高い群 (1g : 1ml) が、低い免疫群及び対照群よりも生存日数がかなり短縮された結果を表わした。このことは他の意味一たとえば負荷効果一で重要と思われる。

母親から次代への防御伝達試験 : マイクロソーム 1g : 1ml 免疫群 (Fig. 3) の耐過マウス7匹のうち2匹は、攻撃後に合計13匹のマウスを出産した。防御能力が母親から次代に伝達されたものであれば、これらの次代マウスにはその証拠が認められるべきである。

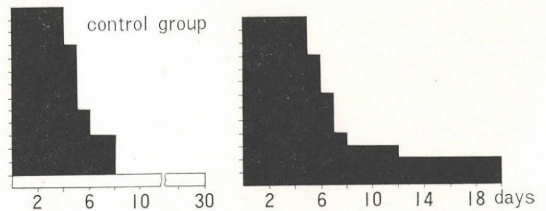
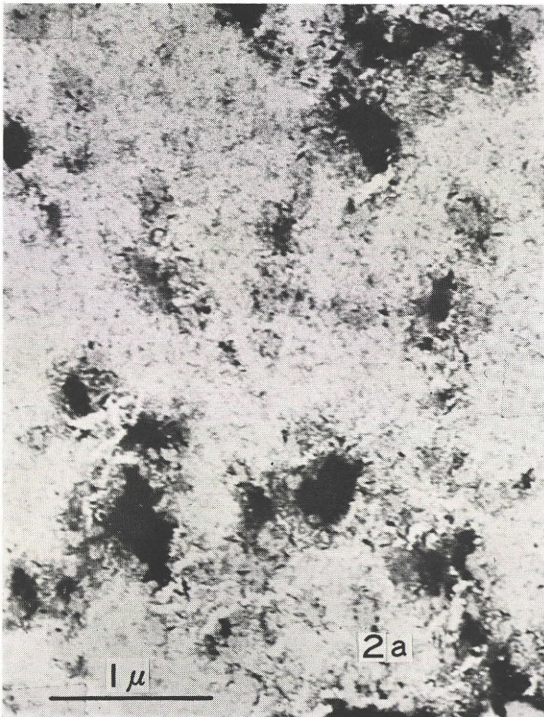
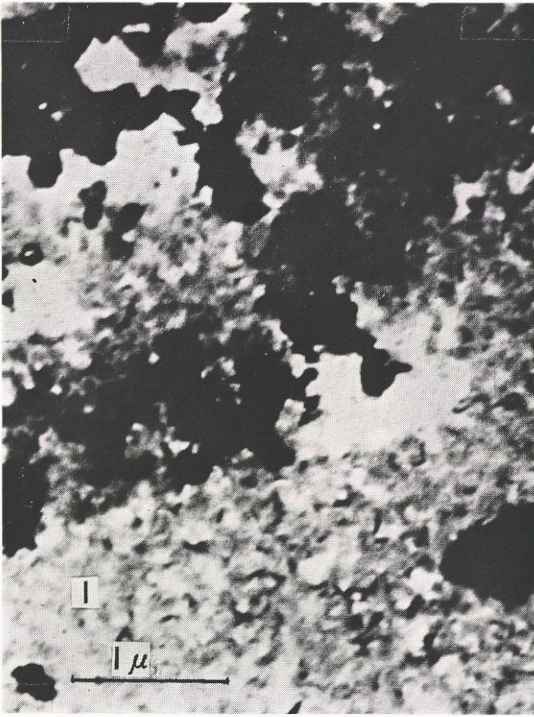


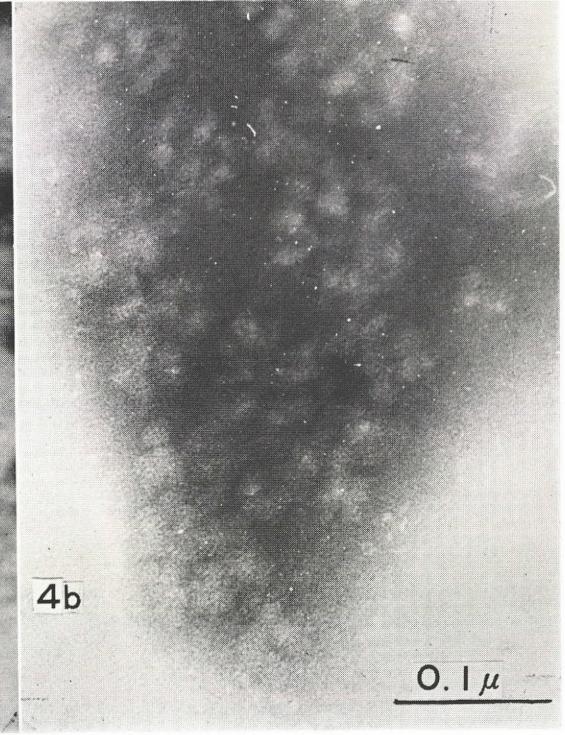
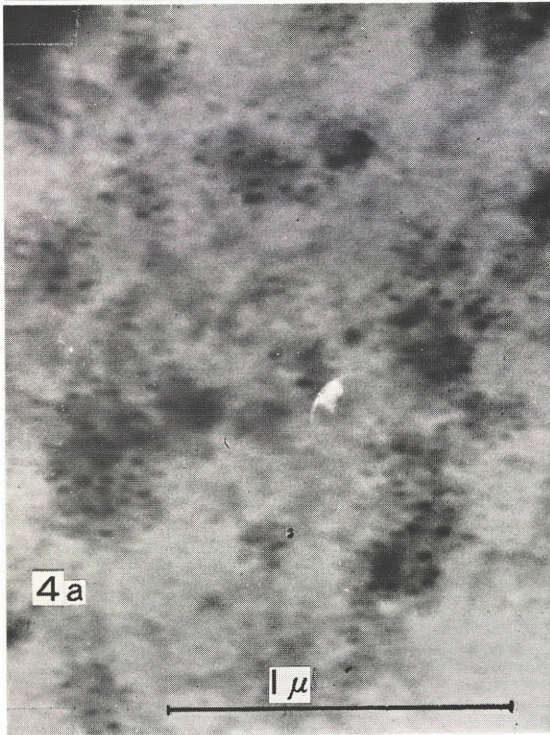
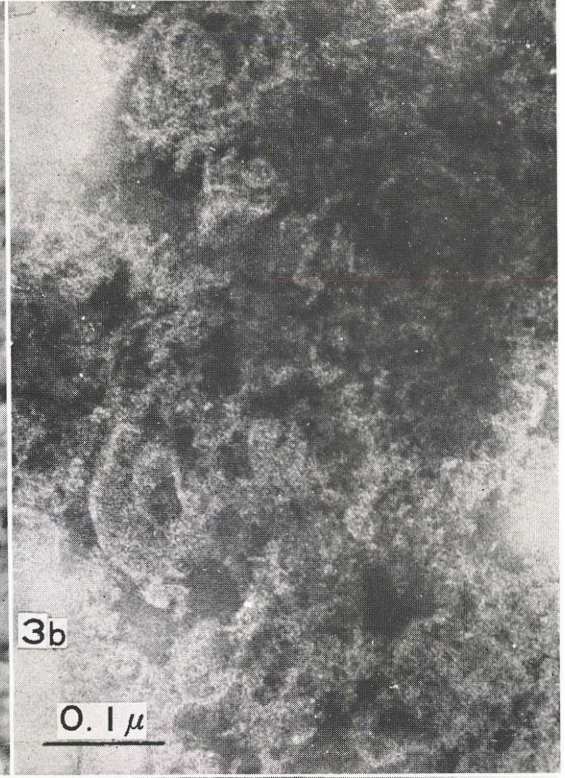
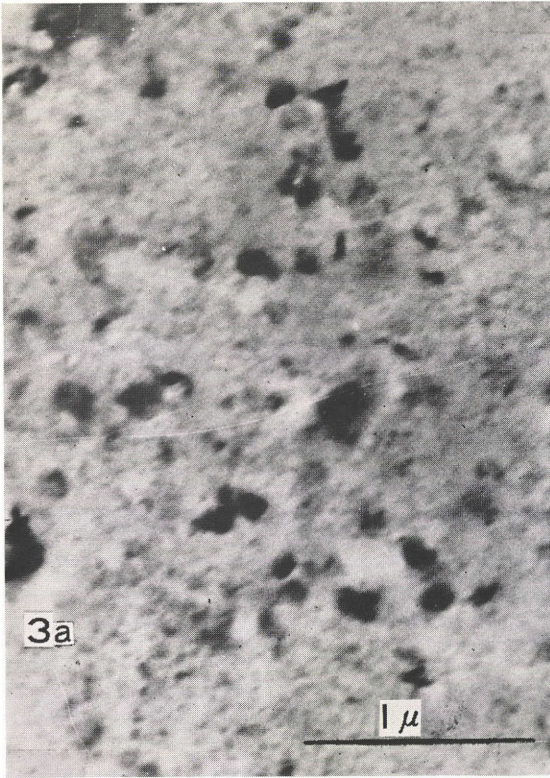
Fig. 4 Protective response of litters from immunized mice to infection 24 to 27 days after the birth.

Fig. 4 の結果は、出産後24~27日を経過した上記13匹の次代マウスの腹腔内に  $6 \times 10^6$  コの原虫を攻撃した際の成績である。対照群 (生後28日のもの) は攻撃後8日以内に12匹死亡し、1匹だけ耐過した。実験群では20日以内に100%の死亡率を示した。このことから防御能力の次代への伝達は考え難い。

### Explanation of Photos

- Photo 1 Electronmicrograph of the 3,600 $\times$  G-sediment  
fixed with 0.1% osmium tetroxide
- Photo 2 Electronmicrograph of the 12,000 $\times$  G-sediment  
fixed with 0.1% osmium tetroxide  
negative stained with 2% phosphotungstic acid after fixed with 4% glutaraldehyde
- Photo 3 Electronmicrograph of the 44,000 $\times$  G-sediment  
fixed with 0.1% osmium tetroxide  
negative stained with 2% phosphotungstic acid after fixed with 4% glutaraldehyde
- Photo 4 Electronmicrograph of the 115,000 $\times$  G-sediment  
fixed with 0.1% osmium tetroxide  
negative stained with 2% phosphotungstic acid after fixed with 4% glutaraldehyde





## 総括及び考察

感染病予防ワクチンとして強毒死菌よりも弱毒生菌がはるかにすぐれていることを立証した数多くの成果は、Ehrlich 以来免疫の通念であった体液性抗体に大きな動揺を与えた。小林六造教授門下の羽生 (1929) は *Salmonella murium* (ファージ抵抗株) ので、Li (1929) は *Salmonella cholerae* で弱毒生菌の優位性を立証した。その後この課題は実験チフス症を場とする Ushiba (1965), 三橋 (1959) の液性及び細胞性免疫の解析に直接の関連をもった。すなわち、強毒死菌免疫はS-型のO-抗原に対応する体液性抗体の上昇を重視しているが、弱毒生菌免疫では感染という宿主と病原体の相互反応によって生ずる“細胞性抗体”に主体をおいている。細胞性免疫の現象論的な説得力は Chase (1945), 天野 (1961, 1962) のリンパ細胞によるツベルクリン抗体の伝達、三橋 (1959) の *Salmonella enteritidis* 弱毒生菌免疫マウスの腹腔腔細胞の *in vitro* での毒力菌増殖阻止効果などから与えられるが、その本態についての理論的分析証拠にはまだ完全なものが得られていない。又、細胞性免疫のすべてが“防御抗体”に通ずると断定できない証拠は岡ら (1962), Fong *et al.* (1963) の結核免疫とツベルクリンアレルギーの関係が暗示している。

Murakami *et al.* (1959a, 1959b), 岡ら (1961), Youmans *et al.* (1955), Kanai & Youmans (1960), 尾崎・岡 (1963), 岡・尾崎 (1963a) は宿主の“防御抗体”よりも、むしろそれを誘発する“防御抗原”の解析を実験チフス症、結核症及びトリコモナス症から追求している。これらの実験の主軸となるものは、病原細胞のある特定の subcellular component が“防御抗原”としての資格をもち、その情報が宿主細胞により解読された場合のみに“防御抗体”が作られるだろうという仮定に基づいているようである。

石英砂による *T. foetus* の細胞ホモジネートを differential centrifugation 法により 3,600×G-, 12,000×G-, 44,000×G-, 115,000×G-seds及び final sup に分画し、それらの組成について電子顕微鏡の構造分析に努めるとともに、各分画の“防御抗原”としての能力を、マウス尾静脈免疫、腹腔内攻撃の組合せで検討した。

3,600×G-sed は約 150~500 m $\mu$  にわたる幅広い不均一な構造であった。このことはあらゆる段階の細胞残屑を含むことを示すものと推定された。かかる解釈から

“防御抗原”分析の目的には不適當と考え免疫学的評価から除外した。

12,000×G-sed は主に膜構造の集合体であるが、種々の程度に破壊を受けていることは電子顕微鏡観察から明らかである。岡ら (1966) はテフロン磨砕器処理による場合、この分画に 200 m $\mu$  程度の顆粒を認め、又、白方・岡 (1965) は岡ら (1966) と同一処理法でリンゴ酸脱水素酵素活性が 12,000×G-sed に濃縮されることを述べた。しかし石英砂法のさいはリンゴ酸脱水素酵素系は final sup に移動することも岡・尾崎 (1963) は述べている。以上のことから予測できることはリンゴ酸脱水素酵素系は可溶性であり、膜構造に包まれて存在するらしい。その点、分化の進んだ生物のミトコンドリアとはかなり異った構造と考えられる。かかる構造が石英砂で破壊を受け、その破片のみがこの分画に残留したのであろう。

12,000×G-sed を静脈から免疫処置したマウス群には、致命的感染に対して評価しうる抵抗性は生じなかった。すなわち、この分画には防御抗原性は欠除されている。

44,000×G-sed は Hogeboom *et al.* (1948), Schneider & Hogeboom (1950) が記録したマイクロソーム分画に該当する。マイクロソームの定義はかなり operational なものであるが一応 endoplasmic reticulum が破壊され小胞化してできた破片であるという Palade & Siekevitz (1956) の意見に従った。厚さ 70~80Å からなる二重膜構造が明らかに認められた。これはリポタンパクを主成分とする膜質部である。それらの間に 20~25 m $\mu$  のライボソームが散在した。

115,000×G-sed は遊離ライボソーム及びそのサブパーティクルの濃縮分画である。Huxley & Zubay (1960), Tissieres *et al.* (1959), 前田 (1961) はライボソームを大腸菌型とイースト型に分類し、前者は、30s+50s  $\rightleftharpoons$  70s, 2(70s)  $\rightleftharpoons$  100s, 後者は 40s+60s  $\rightleftharpoons$  80s, 2(80s)  $\rightleftharpoons$  120s のシステムをマグネシウム濃度により変動することを記録した。著者のネガティブ染色でもサブパーティクルからなるモノマー及びダイマーのライボソームが認められた。しかし *T. foetus* のサブパーティクルが上記のいずれの型に該当するかは明らかにできなかった。

著者がマイクロソームと称した分画は 44,000×G-sed と 115,000×G-sed の混合体である。抗原として用いた分画のうち、致命的感染に対して有効な特異抵抗性をマウスに与えたのはこの分画のみであった。すなわち、マイクロソームの 1g : 1ml 免疫群では 70% の生存率を

得た。しかし、この能力も免疫処置量の低下に伴って急速に下降した。

マイクロソームの主要組成であるリボタンパクとリボ核タンパクのどちらが“防御抗原”として有能であるかという課題が残されているが、これについては近い機会に明らかにされると思う。

次に妊娠中にマイクロソーム免疫、続いて  $10^7$  コの原虫の攻撃を受け、それに耐過した強力な免疫獲得マウスが、出産仔に抵抗性を伝達しうるかについて追求した結果はすべて陰性の成績に終わった。

石英砂による細胞ホモジネートから得た final sup を、より温和な法で得たそれと比較して異なる点は、石英砂法の場合にはデソキシリボ核タンパクとリンゴ酸脱水素酵素系が高濃度に存在したことである。いずれにしても各分画のなかで最高のタンパク量を示しながら防御抗原性を表わさなかったことはマウスによる免疫実験から明らかである。

## 結 論

*Trichomonas foetus* 石英砂ホモジネートを differential centrifugation 法により  $3,600 \times G$ -,  $12,000 \times G$ -,  $44,000 \times G$ -,  $115,000 \times G$ -sediments 及び final supernatant に分画し、それらの電子顕微鏡的な形態構造を観察するとともに、 $12,000 \times G$ -sediment, マイクロソーム ( $12,000 \times G$ -supernatant の  $115,000 \times G$ -sediment) 及び final supernatant について防御抗原性を、マウス尾静脈免疫、腹腔より攻撃の組合せから検討し下記の結果を得た。

1.  $3,600 \times G$ -sediment は  $150 \sim 500 m\mu$  にわたる細胞の残屑で不均一構造を示した。
2.  $12,000 \times G$ -sediment は膜構造の破片が主要組成であり、防御抗原性に欠けた。
3.  $44,000 \times G$ -sediment は  $70 \sim 80 \text{ \AA}$  の厚さをもつ二重膜構造を主要組成とし、他に  $20 \sim 25 m\mu$  のライボソームもわずかに散在した。 $115,000 \times G$ -sediment はライボソーム及びそのサブパーティクルを主要構成成分とした。分画物のうち防御抗原性を表わしたのは  $44,000 \times G$ -sediment と  $115,000 \times G$ -sediment の両者を含むマイクロソーム分画のみであった。しかしマイクロソームの免疫量の減少に伴って抗原性も著しく低下した。又、マイクロソーム免疫は次代マウスに抵抗性を伝達しなかった。
4. Final supernatant は電子顕微鏡的には一様に無

構造を呈し、免疫学的には防御抗原性を欠除した。

稿を終るに臨み御指導と御校閲を賜った尾崎文雄教授、終始実験を御指導下さった岡 好万助教授、電子顕微鏡観察に御援助を頂いた伊藤義博助手に深甚の感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 天野重安 (1961) : 抗体と免疫細胞とに関する総合的考察. 日血液誌, 24, 1-15.
- 2) 天野重安 (1962) : 抗体産生細胞系と抗体性蛋白. 日血液誌, 25, 840~854.
- 3) Chase, M. W. (1945) : The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 59, 134-135.
- 4) Fong, J., Chin, D. and Elberg, S. S. (1963) : Studies of tubercle bacillus-histiocytes relationship (VI). Induction of cellular resistance by ribosomes and ribosomal RNA. J. exp. Med., 118, 371-386.
- 5) 羽生秀吉 (1929) : 鼠チフス菌のエレメンタル パクテリオファーゼと本菌の免疫原性並に病原性との関係について. 慶応医学, 9, 1173-1206.
- 6) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. & Palade, G. E. (1948) : Cytochemical studies of mammalian tissues (1). Isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. J. biol. Chem., 172, 619~635.
- 7) Huxley, H. E. and Zubay, G. (1960) : Electron microscope observation on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*. J. mol. Biol., 2, 10-18.
- 8) Kanai, K. and Youmans, G. P. (1960) : Immunogenicity of intracellular particles and cell walls from *M. tuberculosis*. J. Bact., 80, 607~614.
- 9) Li, C. P. (1929) : Studies on the dissociation of the hog cholera bacillus (III). Active immunization with R forms. J. exp. Med., 50, 767-775.
- 10) 前田章夫 (1961) : 核酸の構造と機能. リボソーム——マグネシウムの役割を中心に. 蛋白質 核酸 酵素, 6, 713-723.
- 11) 三橋 進 (1959) : 実験チフス症の研究. 特にマウス対ゲルトネル菌との関係において. 感染のシンポジウム, 1, 70-98.
- 12) Murakami, S., Oka, Y., Matsuura, Y. and Yoshioka, T. (1959a) : Studies on prevention of infection (I). Antigenic activity of enzymati-

- cally active fractions isolated from tubercle bacilli against tuberculosis of mouse. Acta med. Okayama, 13, 1-14.
- 13) Murakami, S., Yoshioka, T., Oka, Y. and Matsuura, Y. (1959b): Studies on prevention of infection (II). The enzymologic traits and protective ability of the fractions obtained from *Salmonella typhi* by high speed centrifugation. Acta med. Okayama, 13, 15-26.
  - 14) 岡 好万・松浦慶之・吉岡達治 (1961): 細菌細胞より得た超遠心分画物の酵素活性と防御抗原性の研究. 総合医学, 18, 769-782.
  - 15) 岡 好万・松浦慶之・吉岡達治 (1962): 感染防御に関する研究 (13). 結核菌細胞構造とツベルクリンアレルギー, 血球凝集反応との関係. 日細菌誌, 17, 61-64.
  - 16) 岡 好万・尾崎文雄 (1963a): 原虫細胞の生理機能に関する研究 IV *Trichomonas* 無細胞液の超遠心分画物の酵素活性. 医学と生物学, 66, 199-201.
  - 17) 岡 好万・尾崎文雄 (1963b): 原虫細胞の生理機能に関する研究 VII *Trichomonas foetus* 細胞の微細構造物の防御抗原性. 医学と生物学, 66, 331-334.
  - 18) 岡 好万・伊藤義博・尾崎文雄 (1966): 原虫細胞の免疫原性の解析 16 *Trichomonas foetus* の intracellular components の電子顕微鏡観察. 医学と生物学, 72, 325-329.
  - 19) 岡田節人 (1964): 生物学における個の問題. 科学, 34, 191-196.
  - 20) 尾崎文雄・岡 好万 (1963): 原虫細胞の生理機能に関する研究 VIII 超遠心分画法により *Trichomonas foetus* 生細胞から得た不溶性顆粒部の防御抗原性の解析. 医学と生物学, 67, 61-64.
  - 21) Palade, G. E. and Siekevitz, P. (1956): Liver microsomes. An integrated morphological and biochemical study. J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 171-200.
  - 22) Risebrough, R. W., Tissieres, A. and Watson, J. D. (1962): Messenger-RNA attachment to active ribosomes. Proc. nat. Acad. Sci., 48, 430-436.
  - 23) Schneider, W. C. & Hogeboom, C. H. (1950): Intracellular distribution of enzymes (V). Further studies on the distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. J. biol. Chem., 183, 123-128.
  - 24) 白方隆晴・岡 好万 (1965): *Trichomonas foetus* のリンゴ酸脱水素酵素系. 寄生虫誌, 14, 636.
  - 25) Takanami, M. (1957): Ultracentrifugal studies on the cytoplasmic components. J. Histochem. Cytochem., 5, 503-514.
  - 26) 田代 裕・小倉光夫 (1957): Microsome の高分子子構造. 細胞化学シンポジウム, 6, 89-108.
  - 27) Tissieres, A., Watson, J. D., Schneider, D. and Hollingworth, B. R. (1959): Ribonucleoprotein particle from *E. coli*. J. mol. Biol., 1, 221-233.
  - 28) Tsugita, A., Conrat, H. F., Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H. (1962): Demonstration of the messenger role of viral RNA. Proc. nat. Acad. Sci., 48, 846-853.
  - 29) Ushiba, D. (1965): Two types of immunity in experimental typhoid: "cellular immunity" and "humoral immunity". Keio J. Med., 14, 45-61.
  - 30) 山川敬止 (1968): *Trichomonas foetus* の石英砂 cell homogenate からの遠心分画物の理化学的性状. 寄生虫誌, 17, 19-26.
  - 31) Youmans, G. P., Millman, I. and Youmans, A. S. (1955): The immunizing activity against tuberculous infection in mice enzymatically active particles isolated from extracts of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bact., 70, 557-562.



**Abstract**

ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION AND ANALYSIS OF PROTECTIVE  
ANTIGENICITY OF FRACTIONATED CELL HOMOGENATE OF  
*TRICHOMONAS FOETUS* GROUND WITH GLASS POWDER

KEISHI YAMAKAWA

(Department of Parasitology, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima, Japan)

The cell homogenate of *Trichomonas foetus* was prepared from forty hour cultures of the organisms in F-bouillon by centrifugation after washing with saline four times or five. Crude supernatant was obtained by centrifuging the homogenate at  $900\times G$ . From this the  $3,600\times G$ -,  $12,000\times G$ -,  $44,000\times G$ - and  $115,000\times G$ -sediments and final supernatant were fractionated by differential centrifugation.

For electron microscopic observations the fractions were fixed with osmium tetroxide or fixed with glutaraldehyde and negative stained with phosphotungstic acid. Mice were immunized with different concentrations of the  $12,000\times G$ -sediment (large granules),  $115,000\times G$ -sediment of the  $12,000\times G$ -supernatant (microsomes) and final supernatant through their tail veins to study the protective antigenicity of the fractions prepared.

The results obtained are as follows ;

1. The  $3,600\times G$ -sediment was composed almost completely of inhomogenous cell debris of 150 to  $500\text{ m}\mu$  in size.
2. The principal constituent of the  $12,000\times G$ -sediment was the membrane structure and this possessed no protection activity.
3. The main part of the  $44,000\times G$ -sediment was the membrane structure of 70 to  $80\text{ \AA}$  in thickness, and also ribosomes of 20 to  $25\text{ m}\mu$  in size were included. The  $115,000\times G$ -sediment was mostly of ribosomes and their subunits with a small amount of the membrane structure. Remarkable protective antigenicity was observed in the combination of the  $44,000\times G$ - and  $115,000\times G$ -sediments ; microsome. With decrease in the amount of microsome fraction given, a rapid decrease was seen in the protection ability.
4. No protective antigenicity was confirmed in the final supernatant.