

## トリコモナスの2~3の脱水素酵素に 関する細胞化学的研究

田 中 耕 誠

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和45年9月24日 受領)

### 緒 言

*Trichomonas vaginalis* (以下 T.v. と略す) の純粋培養が可能になつてからその生理・生化学に関する研究も活発に行なわれて来たが未だなお多くの未解決の問題が残されている。T.v. 虫体のもつ代謝系に関連する各種酵素の存否についても多くの研究者により明かにされつつあるが、中でも Krebs cycle の有無に対して関連の脱水素酵素については生化学的に Seama (1953), Wirtschafter (1956), Asami (1956), Read (1957), 河原 (1959), Baernstein (1961), Kunitake *et al.* (1962), 岡等 (1963 a, b) が、又細胞化学的には Sharma and Bourne (1963) の研究がある。又 Suzuoki and Nino-miya (1952) は生化学的に T.v. 虫体内の LDH の存在を証明し、Wellerson and Kupferberg (1962) は malic enzyme の存在を証明している。併しながら、これらの成績は必ずしも一致したものではなく、いまだに T.v. に於いて Krebs cycle が生理的に作動しているか否かは不明である (浅見, 1967)。

著者は TCA cycle に属する脱水素酵素について T.v. 虫体内での存在の有無を究明し、更にミトコンドリアを有しないとされている (Inoki *et al.*, 1959, 1961) T.v. 虫体内に於ける TCA cycle に属する脱水素酵素の局在性並びに代謝機構を追求することを企て、その初段階として細胞化学的手技により、光学顕微鏡のレベルで Malate dehydrogenase (MDH), Succinate dehydrogenase (SDH), Isocitrate dehydrogenase (IDH), 及び Lactate dehydrogenase (LDH) の T.v. 虫体内に於ける存在並びに局在を検討した。

### 実験材料ならびに実験方法

当教室で所謂浅見培地 (Asami, 1952) で250代余り無菌的に継代培養した *Trichomonas vaginalis* 株を用い

た。寒天を除いた浅見培地で48時間培養後の運動活発な虫体を低温下で生理食塩水により3,000r.p.m. で10分間ずつ3回遠沈洗滌し、ついで0.85% NaCl 1/15M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) にて最終洗滌を行なつたものを実験材料とした。

1) Succinate dehydrogenase (SDH) 活性の証明方法

水素受容体に Nitro-Blue tetrazorium (NBT) を用い、この tetrazorium 塩が還元されて Diformazan を形成して呈色する反応を利用して観察することが出来た。

Nachlas *et al.* (1952) の方法に準じ、0.2M. Sodium Succinate 5 ml 0.2M. Phosphate buffer (pH 7.6) 5 ml, Nitro-BT (1mg/1ml) 10ml を含む基質反応液中に上述の洗滌した未固定の生虫体を浮遊せしめ、37°C 恒温水槽中で8時間 incubate し、10%中性ホルマリン固定を行い光学顕微鏡にて観察した。尚本実験に際して基質を加えぬ反応液中で同様に incubate したものを対照とした。

2) Malate dehydrogenase (MDH) 活性の証明方法

Nachlas, Walker-Seligman (1958 a, b,) の方法の变法により、0.5M. Sodium Malate 4 ml, 0.1M. Phosphate buffer (pH 7.6) 11ml, 0.25% NAD 2.5ml, Nitro-BT 5 mg, 蒸留水 3 ml の溶液を基質反応液とし、対照には基質を含まぬ反応液を用い、ともに洗滌した未固定の虫体を浮遊せしめて37°C で8時間 incubate した。

3) Lactate dehydrogenase (LDH) 活性の証明方法

Barka and Anderson (1963) の方法に準じ、0.1M. Sodium lactate 1.0ml, 0.06M. Phosphate buffer (pH 7.4) 2.5ml, 0.05M. MgCl<sub>2</sub> 1.0ml, NAD (4 mg/ml) 1.0ml, Nitro-BT (4 mg/ml) 2.5ml, 蒸留水1.0ml を含む溶液を基質反応液とし、前記の未固定の生虫体を浮

遊せしめ、37°C で8時間 incubate し、その後10%中性ホルマリンで固定と同時に反応を停止せしめ観察した。尚対照のとり方は SDH, MDH の場合と同様に行なつた。

4) Isocitrate dehydrogenase (IDH) 活性の証明方法  
Barka and Anderson (1963) の方法により NAD 依存性の IDH を染色した。即ち1.0M. DL-Sodium isocitrate 0.1ml を基質として加えた以外 Lactate dehydrogenase の場合と同様にした。又対照のとり方も前記の他の酵素の場合と同様とした。

### 実験結果

1) SDH 活性について；写真1-a に示す様に大小種々の陽性顆粒が少数ではあるが細胞質内に散在して認められた。これに比較して細胞膜及び核質内には反応は認められず陰性であつた。又対照群にも極めて少数ではあるが反応顆粒の認められる虫体もあつた(写真1-b)。

併しながら実験例虫体の中にも陽性顆粒は全く認められず対照との差が殆んどない虫体もあつた。以上によつて T.v. 虫体内には SDH 反応陽性顆粒成分もあることが認められたが強い反応を呈するものではないことが分つた。

2) MDH 活性について；写真2-a に示す様にリンゴ酸脱水素酵素反応による生成物が、比較的大きい大小不同の濃い青紫色の顆粒状に細胞質全体に認められた。MDH の場合は SDH のそれに比較して陽性顆粒の数もはるかに多く、発色の度合も著しく濃かつた。しかし細胞膜、核膜及び核質内、並びに鞭毛、波動膜等には反応は全く認められなかつた。対照例では反応顆粒は全く認められず陰性であり実験例との間に著明な差異があつた(写真2-b)。

3) LDH 活性について；写真3-a に示す様に LDH 活性による反応生成物が赤紫色の顆粒状或いはびまん性に細胞質全体に認められ、時には細胞膜にも陽性反応が認められた。併し核膜及び核質内には反応は認められなかつた。陽性顆粒の大きさは大小不規則であり、時には顆粒状をなさず細胞質全体が赤紫色に染まる時もあった。又虫体により発色の度合に差異があり、時には殆んど発色を呈さない虫体もあつた。これは虫体の発育期或いは活動状態により活性の強さに変化が起る為であろうと思われる。尚対照例の中にも極めて弱い LDH 活性陽性反応によると思われる発色を認めたが、これらは虫体内に存在すると考えられている内部基質によるものと思われた(写真3-b)。しかしこれら対照例はいずれも実

験例に比較すれば極めて弱いものであり、両者の間に明らかな差違があつた。又 LDH 活性による発色は SDH 活性のそれよりも可成強いが MDH 活性による発色より弱く、いくぶん赤みをおびた赤紫色であつた。

4) Isocitrate DH について；本酵素による反応陽性顆粒は殆んど認められず、対照例との間にも明らかな差異は認められなかつた(写真4-a, 4-b)。実験例の中の虫体によつて細胞質全体がびまん性に青紫色に染まっているものもあつたが濃度は余り濃くなかつた(写真4-a)。以上より細胞化学的手技による染色実験では NAD 依存性の isocitrate DH の存在は明らかでなく、むしろ否定的所見と思われた。

### 考按ならびと総括

Trichomonas の酵素学的研究は Suzuoki and Ninomiya (1952) 以来発展を見たが、中でも T.v. 虫体の脱水素酵素に関する研究は Seama (1953) が生化学的に *Trichomonas vaginalis* や *Entamoeba histolytica* 等の原虫に SDH が少量に存在することを報告し、Wirtschaft (1956) は T.v. では TCA cycle 上の基質の中で malate, pyruvate のみが酸化基質となり得ることを記録している。又 Read (1957), 河原 (1959) は T.v. の完全細胞中には malate dehydrogenase 活性を認めないが、homogenate には強い活性有りと報告している。Baernstein (1961) は T.v. 虫体内の MDH の存在を生化学的に証明し、Wellarson and Kupferberg (1962) は malic enzyme の活性が非常に強いことを報告している。

一方 Sharma and Bourne (1963) は細胞化学的に Nachlas *et al.* (1957) の方法を用いて T.v. 虫体内の SDH を追求し、Burnston (1959) の方法で Cytochrome-Oxidase の活性を追求した結果、T.v. 虫体内にこれらの酵素の弱い活性を認めたと報告している。又 Junus-Green, Regard fixation, iron-alumhematoxylin stain によるミトコンドリア染色を行い、これによつて染色される物質を“mitochondria like granules”と名づけ、SDH 及び Cytochrom-C Oxidase 活性の部位はこの mitochondria 様顆粒と一致していたと報告している。更に又、これらの脱水素酵素活性の細胞内局在と T.v. の有する organella との関連性を究明しようと試みているが光学顕微鏡のレベルでの観察のみでは明かな所見を見出ししていない。

著者の実験によれば T.v. 虫体内にコハク酸脱水素酵素の存在を証明することを否定出来ぬ成績が得られた

が、活性は弱く、細胞質中の陽性顆粒は大小様々でその数も MDH, LDH に比較して可成少なかった。しかしこれらの顆粒が Sharma and Bourne (1963) の指摘する mitochondria 様顆粒であるかどうかは全く同定出来なかつた。リンゴ酸脱水素酵素活性は SDH, LDH, isocitrate DH に比べてはるかに強く、その反応生成物は極めて濃い青紫色の顆粒状を呈し、細胞質全体に認められたが、核膜及び核質内には全く認められず、細胞膜や鞭毛も反応陰性であつた。しかし光学顕微鏡のレベルでは、これ以上虫体内微細構造物とこれら脱水素酵素の局在との関連性を明らかにすることは出来なかつた。

乳酸脱水素酵素では反応生成物が細胞質中に顆粒状に散在している虫体と、細胞質全体にびまん性に陽性反応を認められる虫体とがあつた。LDH 活性による反応生成物は MDH 活性によるそれよりも可成赤みを帯びたむしろ赤紫色を呈していた。それは顆粒状をなさず細胞質全体がびまん性に呈色している虫体にその傾向が強かつた。これは脱水素酵素の活性が弱い場合は濃い青紫色の Diformazan が形成されず、赤色で溶解性の Monoformazan が形成される為であると考えられ (Lison, 1953)。

Isocitrate dehydrogenase は NAD を助酵素とするものと NADP を助酵素とするものの2種類ありとされているが、今回は NAD を助酵素とする反応についてのみ実験を行った。その限りでは反応系に於いても極くうすい発色を示すのみで対照との差は明瞭でなく本酵素の存在は不明確であつた。河村 (1969) は NADH の酸化を指標とした生化学的方法で、T.v. 虫体内には非常に弱い isocitrate DH が存在すると述べているが、NADP 依存性の isocitrate Dehydrogenase に関しては今回実験を行なわなかつたので細胞内の局在性を示し得なかつた。

各酵素とも虫体によつて活性の強い虫体と弱い虫体との差がみとめられたが、これは虫体の發育の時期によるものではないかと推測される。しかしながらこの問題の解決は同調培養を得て始めて可能となるであろう。

以上より T.v. 虫体内に MDH, LDH の存在が証明されたが、その他の SDH, isocitrate DH 活性については極めて弱い活性を思わせる所見であつた。これらの所見からは生化学的な方法によつた他の成績と同様 T.v. 虫体内に於いて TCA cycle が生理的に作動しているか否かの点についての何等の決め手も得られなかつたが、実験成績の示すものは少なくとも Sharma and Bourne (1963) の言う如く細胞化学的にも TCA cycle

の存在を思わせる様な成績とはむしろ反対であると言えよう。

これらの脱水素酵素活性の T.v. 虫体内に於ける局在と虫体内微細構造物との関連性を究明することは光学顕微鏡のレベルでは殆んど不可能であつたので、更に、一歩進めて電子顕微鏡的細胞化学の手技を応用してこれを追求したがその結果については続報で報告する。

## 結 語

T.v. 虫体に於ける脱水素酵素 (SDH, MDH, LDH, isocitrate DH) について細胞化学的手技を用いて各酵素の存在と虫体内局在を検討し、以下の結論を得た。

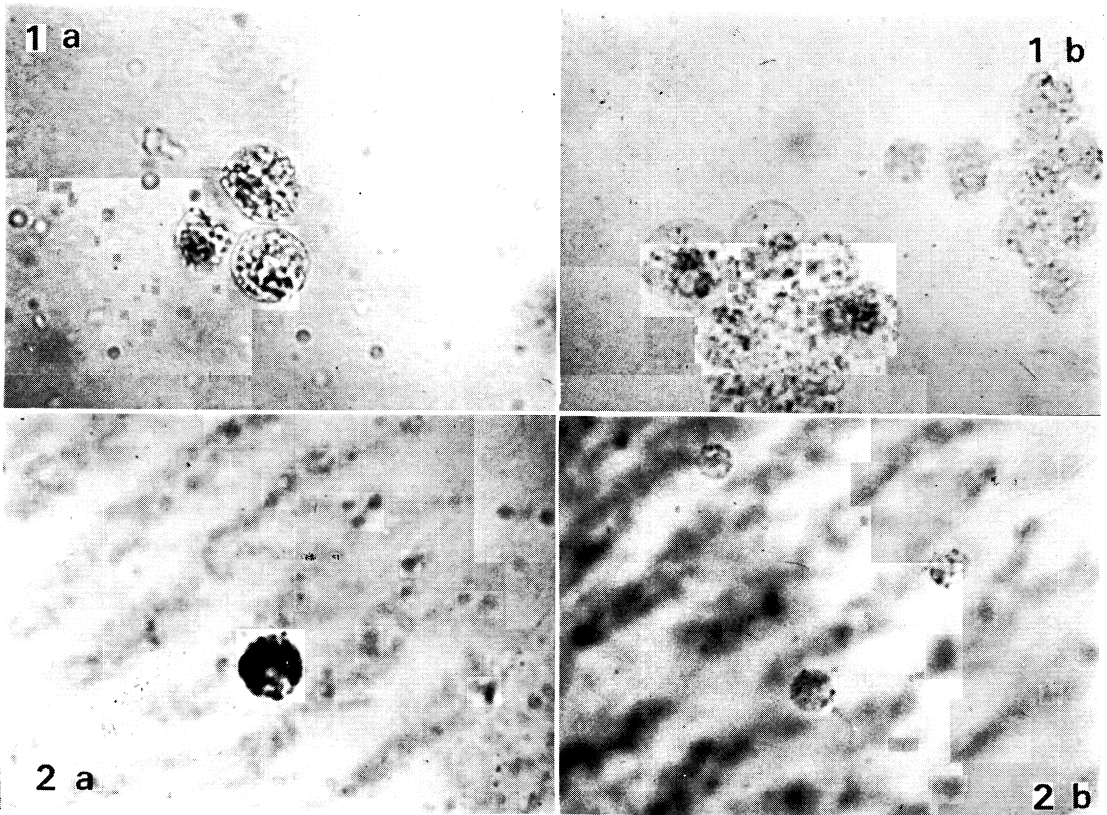
1. 細胞化学的手技によつて T.v. 虫体内に malate dehydrogenase, の存在が強く証明され、Lactate dehydrogenase 活性もその存在を思わせるに足る所見を得た。
2. Succinate dehydrogenase 活性については極めて微弱な反応しか得られなかつた。
3. T.v. 虫体内に NAD 依存性の isocitrate dehydrogenase 活性が存在するかどうかは本実験に於ける細胞化学的方法では断定出来なかつた。したがつてもしあつても極めて弱いものであらうと思われる。
4. 以上の所見は過去のこれらの酵素に関する生化学的所見とほぼ一致するものである。

擧筆に当り、御指導御校閲を賜つた松林久吉教授並びに浅見敬三助教授に深甚の謝意を表します。(本論文の要旨は第28回日本寄生虫学会東日本支部大会で発表した。)

## 文 献

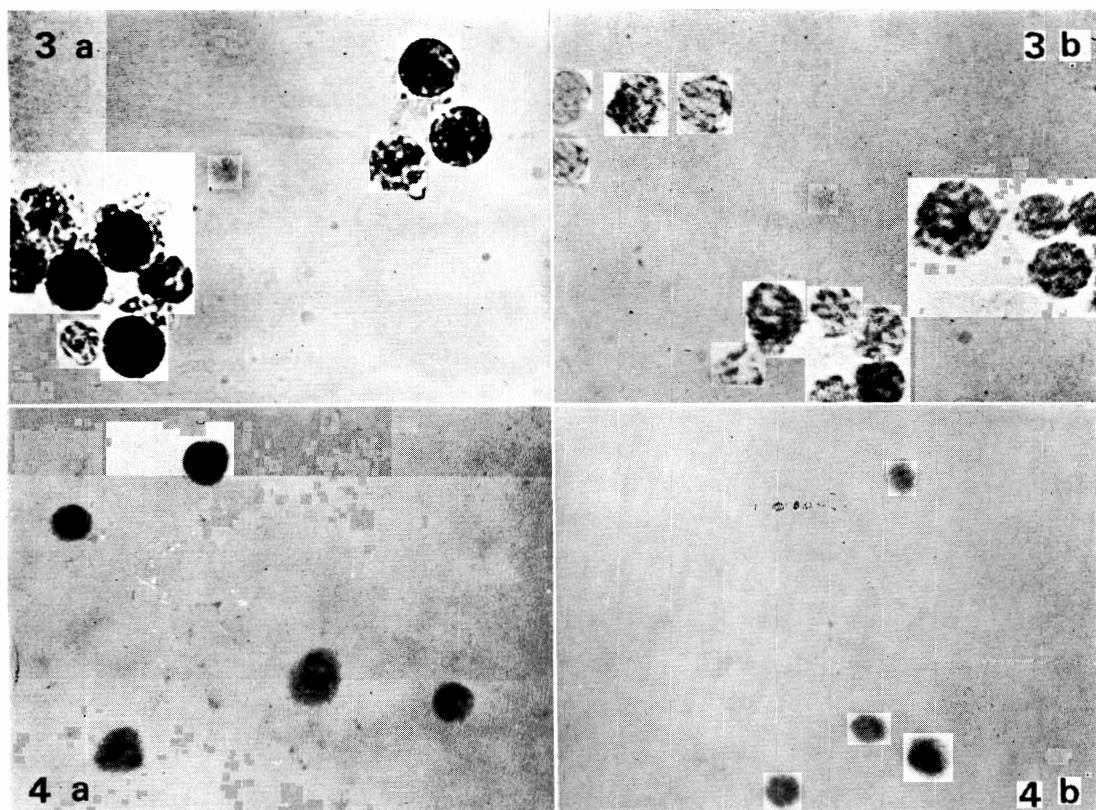
- 1) 浅見敬三 (1952) : 腫トリコモナスの細菌を伴わない培養。臨床婦人科産科, 6, 36-37.
- 2) Asami, K. (1952) : Bacteria free cultivation of *Trichomonas vaginalis*. Kitasato Arch. of Exp. Med., 25, 149-156.
- 3) Asami, K. (1956) : Physiological studies on *Trichomonas vaginalis*. Keio J. Med., 5, 169-190.
- 4) 浅見敬三 (1967) : わが国に於ける寄生虫の問題点・トリコモナス類—生理・生化学及び構造機能の関連性から—。医学のあゆみ, 61, 302-304.
- 5) Baernstein, H. D. (1961) : Malic dehydrogenase in *Trichomonas vaginalis*. J. Parasitology, 47, 279-284.
- 6) Barka, T. and Anderson, P. J. (1963) : Histochemistry: Theory, Practice, and Biology. New York, Eraston, and London.

- 7) Burnston, M. S. (1959) : New histochemical technique for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.*, 7, 112-122.
- 8) Inoki, S., Nakanishi, K. and Nakabayashi, T. (1959) : Observation on *Trichomonas vaginalis* by electron microscopy. *Biken J.*, 2, 21-25.
- 9) Inoki, S., Ohno, M., Kondo, K. and Sakamoto, H. (1961) : Electron microscopic observation on the "costa" as one of the organelles in *Trichomonas foetus*. *Biken J.*, 4, 63-65.
- 10) 河原勉(1959) : トリコモナスのカタラーゼ活性と培養条件についての比較研究. 大阪大学医学誌, 11, 3643-3650.
- 11) 河村信夫(1969) : *Trichomonas vaginalis* の iso citrate dehydrogenase について(未発表).
- 12) Kunitake, G., Stitt, C. and Saltman, P. (1962) : Termal respiration in *Trichomonas vaginalis*. *J. Protozool.*, 9, 371-375.
- 13) Lison, L. (今泉正訳) (1953) : 組織化学及び細胞化学, 白水社, 東京.
- 14) Nachlas, M.M., Tsou, K.C., and Souza, D.E. (1957) : Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenil substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 5, 420-436.
- 15) Nachlas, M. D., Walker, O. G. and Seligman, A. M. (1958-a) : A histochemical method for the demonstration of D P N Diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 29-43.
- 16) Nachlas, M. M., Walker, O. G. and Seligman, A. M. (1958-b) : The Histochemical localization of Triphosphopyridin Nucleotide Diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4, 467-474.
- 17) 岡好万・尾崎文雄(1963-a) ; 原虫細胞の生理機能に関する研究Ⅲ : *Trichomonas* 無細胞液と細胞残渣の終末呼吸. 医学と生物学, 66, 127.
- 18) 岡好万・尾崎文雄(1963-b) ; 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の酵素活性. 医学と生物学, 66, 199.
- 19) Read, C. P. (1957) : Comparative studies on the physiology of trichomonad protozoa. *J. Parasitology*, 43, 385-394.
- 20) Seama, G. R. (1953) : Inhibition of succinic dehydrogenase of parasitic protozoa by an arseno and phosphoro analog of succinic acid. *Exp. Parasit.*, 2, 366-373.
- 21) Sharma, N. N. and Bourne, G. H. (1963) : Studies on the histochemical distribution of oxidative enzyme in *Trichomonas vaginalis*. *J. Histochem. Cytochem.*, 11, 628-634.
- 22) Suzuoki, Z. and Ninomiya, H. (1952) : The metabolism of *Trichomonas vaginalis*, with comparative aspects of trichomonads. *J. Biochem. Jap.*, 39, 321-331.
- 23) Wellerson, R. and Kupferberg, A. B. (1962) : On glycolysis in *Trichomonas vaginalis* *J. Protozool.*, 9, 418-424.
- 24) Wirtschafter, S. K. (1956) : The metabolism of *Trichomonas vaginalis*: The Oxidative pathway. *J. Protozool.*, 3, 86-88.



#### Explanation of the Figures

- Fig. 1 a. Succinate dehydrogenase (SDH) activity  
A few granules showing weakly positive reaction are seen in the cytoplasm.
- Fig. 1 b. Controls of SDH reaction  
Almost all of the organisms show negative reaction excepting small number of granules stained weakly. Difference between the experimentals and controls are very little.
- Fig. 2 a. Malate dehydrogenase (MDH) activity  
Positive granules stained in dark purple are seen throughout the cytoplasm. No reaction is recognized in plasma membrane, nuclear membrane and nucleus.
- Fig. 2 b. Controls of MDH reaction  
No reaction product is demonstrated in any part of the cell.



#### Explanation of the Figures

Fig. 3 a. Lactate dehydrogenase (LDH) activity

Besides the positive granules in the cytoplasm, some cells show the reaction products stained difusely in reddish purple.

Fig. 3 b. Controls of LDH reaction

No stained cells.

Fig. 4 a. Isocitrate dehydrogenase (IDH) activity

The cells have no granules stained.

Fig. 4 b. Controls of IDH reaction

No reaction appears in the cells indicating no difference between the experimentals and controls.

**Abstract**CYTOCHEMICAL STUDIES ON DEHYDROGENASES IN *TRICHOMONAS*  
*VAGINALIS*

KOHSEI TANAKA

*(Department of Odontology and Department of Parasitology  
Keio University Medical School)*

Although many investigations have been performed on energy metabolism of *T. vaginalis*, it remains still unsolved whether tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) operates as a physiological metabolic pathway of the organism or not. In the present studies, cytochemical demonstration of some dehydrogenases relating to TCA cycle was undertaken by the author using tetrazolium salt methods. The cultivated organism was washed repeatedly by cold phosphate buffer saline and incubated in the reaction medium composed of substrate, phosphate buffer, nitro-blue tetrazolium, and NAD when necessary. The same incubation medium excluding substrate was used as a control medium. Activity of malate dehydrogenase (MDH) was clearly demonstrated as many darkpurple granules scattered throughout the cytoplasm, whereas no stained granule was found in the controls. No staining was seen in the organelles other than the cytoplasmic granules. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was shown as red-purple granules in the cytoplasm or, sometimes, reaction appeared diffusely in the cytoplasm being stained in reddish purple. The reaction appeared to be less intense than that of MDH. Faint staining was seen in some cells of controls. Activities of succinate dehydrogenase (SDH) was recognized very weakly in the cytoplasm as a small number of positive granules, while a few cells of the controls also showed similar finding indicating no or very little difference between the experimentals and controls. Isocitrate dehydrogenase (IDH) of NAD dependent nature was not recognized to be active in *T. vaginalis* showing almost no staining reaction in the cytoplasm.