

Nosema cuniculi の発芽に関する電子顕微鏡的研究

赤 尾 信 吉

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室

(昭和47年2月12日 受領)

序論: *Nosema cuniculi* は Wright and Craighead (1922) により兎から発見された *Microsporidia* に属する原虫で, $2.5 \times 1.5 \mu$ の大きさを有し, 宿主細胞内で増殖する栄養型と孢子型の2発育型がある. *Nosema* の多くは昆虫類に寄生するが, 本種は哺乳類に寄生し, 最近まで *Encephalitozoon* と呼ばれていたものである. また, 脳炎様症状を呈したヒトの中樞神経系から発見された報告 (Matsubayashi *et al.*, 1959) もあるが, 一般にその病原性は弱いとされている.

Microsporidia の電顕による形態学的研究は Huger (1960), Lom and Vavra (1961) 等により行なわれ, その微細構造が明らかにされた. その後も de Puytorac (1961, 1962), Vavra *et al.* (1966), Lom and Corlis (1967), Ishihara (1968), Akao (1969) 等の電顕による報告がある. しかしながら, その孢子型の発芽機転については未だ不明な点が少なくない. そこで, 本報では, 孢子からの極糸突出の条件を検討し, さらに, 極糸 (Polar filament) の構造を電顕で観察することにした. Polar filament の微細構造については, 特に孢子より突出した像について報告する.

実験材料および方法

実験に用いた *Nosema* は, 当教室で使用している市販マウス (dd 系雑種) に自然感染していた原虫を, 金田 (1969) による方法で増殖させたものと, ラット腹腔に継代培養された吉田肉腫に自然感染していた原虫の2株である.

感染マウスおよびラットの腹水を注射器で吸引し, 各々生理食塩水にて3回遠心洗滌 (3,000r.p.m. 15分間) を行なった. 遠心洗滌後の細胞を超音波発生装置 (久保田 K.K. 製) KMS-100型で100 γ , 100mA. 3~5分間破壊し, 感染細胞より *Nosema* を遊離した. 次に, 虫体と細胞成分を分離するために, メスシリンダーに原虫浮遊液を集め, 15~30分間静置後その上清を集めて再び

遠心洗滌 (3,000r.p.m. 20分間) を3回繰り返した. その結果, 最終沈渣にはかなり多くの虫体が分離された (写真1). 得られた虫体を試料として以下の実験を試みた. Polar filament 突出の観察は暗視野顕微鏡を使用した.

A) 孢子の発芽条件について

Polar filament の突出に影響する因子をしらべるため, 次の化学物質—1% H_2O_2 , K^+ (0.1M KOH) Mg^{++} (0.1M $MgCl_2$) Na^+ (0.1M NaOH) 人工胃液, NaCl (1, 5, 10%) 溶液, および純水について検討した.

各化学物質と孢子との接触は次の方法で行なった. まず, 集めた孢子をスライドガラス上に塗抹し, これに上述の化学物質溶液を1滴加えた後, 直ちに光顕, または暗視野顕微鏡で観察した. 作用後15分経過しても発芽しない場合には発芽しないものと取り扱った.

B) Polar filament および突出孢子の形態について これらの観察には, リンタングステン酸による Negative staining および超薄切片の2方法を用い, 電子顕微鏡を使用した.

結果:

A) 孢子の発芽因子について

0.1M KOH. 0.1M $MgCl_2$. 0.1M NaOH 人工胃液, 純水, および各食塩水溶液を加えた場合には Polar filament の発芽は観察されなかつた. 一方, 1% H_2O_2 液を用いた場合には, 50%以上の孢子が Polar filament の突出を起こした (表1). この外, カバーガラス上で指による圧力を加えた場合にも Polar filament の突出が観察された.

B) Polar filament の構造について

1. 出芽孢子の Negative staining 像

1% H_2O_2 により発芽を促進された孢子の前端から突出した Polar filament は約30 μ 長で孢子の縦径の約10~12倍におよび, 突出した filament の先端はL字状を呈している (写真2). そして, そこには芽体の残体

表 1 Examinations on factors influencing extrusion of the filament and the sporoplasm in *Nosema cuniculi*.

Reagents tested	after	
	5 min.	15 min.
1 % H ₂ O ₂	+	+
K ⁺	—	—
Mg ⁺	—	—
Na ⁺	—	—
H ₂ O	—	—
NaCl	15 min.	30 min.
1 %	—	—
5 %	—	—
10 %	—	—
Artificial gastric juice	—	—
Pressure under a cover slip	+	+

(+ : Extrusion was observed.)

様物質が残っている。filament 突出後の胞子を観察すると、内容物は少なくなっている。

2. 超薄切片による観察

胞子の形態を観察すると、壁は3層から成り、内層は厚く、最内層は芽体 (Sporoplasm) に接している。胞子の前半部の壁に附着している Polar cap から発した Polar filament はラメラ構造部中を斜めに後方に走り、胞子中央部に至って内壁に接しつつ数回彎曲する。その彎曲した Polar filament の作る環の中央に核 Sporoplasm が納められている (写真3, 4)。Polar filament の先端にある Polar cap は胞子壁に接着し、10数層からラメラ状構造体がこれを取り巻いている (写真6)。胞子内に納まっている Polar filament の断面像を観察すると、中心には細い管状構造があり、この中心管を取り巻くラセン状の構造が認められる (写真7, 8)。中心にある細管内径は Polar filament 断面の約 1/5 の大きさである。

胞子より突出した Polar filament は1層の薄い膜に包まれ、中には電子密度の濃い均質物が充満し、その先端には顆粒状の Sporoplasm の附着しているのが観察される (写真5)。しかしながら、Polar filament 突出前に観察されたラセン構造は観察されなかった。胞子壁に接着していた Polar cap は内側に外れて観察された。一方、Polar filament 突出後の胞子内にはラメラ状構造物が胞子前部に拡がって、その附近には空胞が形成されている。この胞子後端には1個の残された核が観察される (写真5)。

考 察

光学顕微鏡による *Nosema* の filament および芽体の研究は Gibbs (1953, 1956), Ohshima (1966) 等により行なわれ、Gibbs (1956) の観察では filament の先端に芽体があり、filament は胞子より突出後もそれから離脱することなく宿主細胞に貫通、侵入することを報告している。芽体の宿主細胞への侵入について Kamera (1960) は、芽体の核が突出した filament の上部、または内部を通過する像および核が細長に変形することを報告している。

一方、filament の突出過程については、Lom and Vavra (1961, 1963) によると、filament を突出すべく活性化された胞子は、その前端が黒ずみ、やがて胞状となり、次第にラメラ状構造物は胞子後端にある空胞に達し、filament の突出が始まる。そして、コイル状に巻いていた filament は緩み、後部空胞の内壁が消失し、filament は自由になる。胞子の内容物は filament の外部突出前に filament 内に吸いこまれる。さらに、filament の構造は壁と内腔から成る管状構造で、内容物の通過時に太くなる。

これに対して Kreig (1955) は、filament を電顕で観察し、それが中空でないことを述べている。このことは本実験の結果と一致している。また、Huger (1960) は filament が2つの部分からなることを報告している。すなわち、filament は直行部とコイル状の部分に分かれ、直行部は胞子前端より発し、内腔を横切り、ラメラ状構造部に続き、胞子壁の内壁に達してコイル状となる。そして、filament は次第に細くなりながら胞子後端にある核の近くで終わるといのである。その後、Vavra (1966) は filament が管状で、内腔は電子密度の高い物質が充満し、filament が中空であることを報告している。

著者の観察では、filament 壁はごく薄い1層の膜であり、その内側に Huger (1960) の報告した Spiral 構造物が、中心の細管を取り巻いている形で filament を形成していることがわかった。

Microsporidia の filament が胞子より突出する要因については、種々の *Nosema* を試料として実験されてきたが、*N. cuniculi* に関しての報告はほとんどない。Petri (1966) は指による軽い圧力で出芽が認められることを報告したが、その因子が何かという確たるものは不明である。本実験においては、K⁺ Mg⁺⁺ Na⁺ による胞子への影響をしらべてみたが、出芽を促し得なかつた。その他 NaCl 各濃度液の影響を検討したが、なん

ら胞子出芽は認められず、人工胃液による消化試験においても観察されなかった。ただ、スライドガラス上の試料をカバーガラスの上から指圧で胞子を潰した場合、1% H₂O₂ を接触させた時だけ出芽が観察された。

胞子の発芽について、Lainson *et al.* (1964) が指圧、マウス腹水との接触、人工胃液による長期培養等の方法で実験したが、全て不成功に終わっている。しかしながら、H₂O₂ を胞子に作用させた場合には、Polar filament の突出があつたことを観察している。この H₂O₂ による胞子の発芽については、Lom and Vavra (1963) により行なわれた方法で、*Nosema* 以外の *Microsporida* の胞子においても Polar filament の突出が観察されている。Petri (1969) によると、この状態で Polar filament が突出した場合には、胞子中の芽体はそのまま残存するものとしている。本実験においても、Polar filament 突出後の胞子を電顕写真上で観察すると、胞子後部に空胞があるが、芽体は残存している。しかし、球状に巻いたラメラ状構造部は Polar filament 突出前とかわつて、その突出により緩くなつている。このことは、このラメラ状構造部が Polar filament の突出に際し、有効に働くものと考えられる。一方、胞子に圧力が加えられた場合には、Polar filament 先端にある Polar cap か内圧により外れ、Polar filament の突出が起こるものと考えられる。Polar filament の突出は、次の宿主細胞への侵入に際して起こると考えられるが、本実験ではその作動因子を決定することはできなかった。

稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた琉球大学保健学部長松林久吉教授並びに慶応大学医学部浅見敬三助教授に深甚の謝意を表し、併せて御協力下さいました慶大電子顕微鏡研究室藤原達司氏に感謝の意を表します。

尚本研究の要旨は第3回日本原生動物学会(昭44年度)に於て発表した。

References

- 1) Akao, S. (1969) : Studies on the ultrastructure of *Nosema cuniculi*, a microsporidian parasite of rodents. Jap. J. Parasit., 18, 8-20.
- 2) Huger, A. (1960) : Electronmicroscope study on the cytology of a microsporidian spore by means of ultrathin sectioning. J. Insect. Path., 2, 84-105.
- 3) Ishihara, R. (1968) : Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombysis*. J. Invertebrate Pathol., 12, 245-258.
- 4) Kaneda, Y. (1969) : Studies on the effect of endoxan, an antitumor substance, to promote the growth of *Nosema cuniculi* in vivo and in vitro. Jap. J. Parasit., 18, 294-303.
- 5) Kramer J. P. (1960) : Observations on the emergence of the microsporidian sporoplasm. J. Insect. Path., 10, 81-90.
- 6) Lainson, R., Garnham, C. C., Killick-Kendrick, R. and Bird, R. G. (1964) : Nosematosis, a microsporidian infection of rodents and other animals, including man. British Med. Journal., 2, 470-472.
- 7) Lom, J. and Corlis, J. O. (1963) : The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian apores. Acta Protozool., 14, 141-152.
- 8) Lom, J. and Corlis, J. O. (1967) : Ultrastructural observations on the development of the microsporidian protozoon *Plistrophora hyphe-sobryconis* Schäperclaus. J. Protozool., 14, 141-152.
- 9) Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S. (1959) : A case of encephalitozoon-like body infection in man. A. M. A. Archives of Pathology. 67, 181-187.
- 10) Ohshima, K. (1966) : On morphological and physical nature of the filament and spore membrane of *Nosema bombysis*. Jap. J. Zool. 15, 183-202.
- 11) Petri, M. and Schiødt, T. (1966) : On the structure of *Nosema cuniculi* in the cells of the Yoshida rat ascites sarcoma. Acta. Path. microbiol. Scandinav., 66, 437-446.
- 12) Puytorac, P. de, (1961) : Lultrastructure du filament polaire invagine de la microsporidie *Mrezekia lumbriculi* Jirovec, 1936. Compt. Rend. Acad. Sci., 253, 2600-2602.
- 13) Puytorac, P. de, (1962) : Observations sur l'ultrastructure de la microsporidie *Mrezekia lumbriculi* Jirovec., J. Microscop., 1, 39-46.
- 14) Vavra, J., Jayon, L. and Puytorac, P. de., (1966) : Observation sur l'ultrastructure du filament polaire des microsporides. Protistologia. 11, 109-112.
- 15) Wright, J. H. and Craighead, E. M. (1922) : Infectious motor paralysis in young rabbits, J. Exp. Med., 36, 135-140.

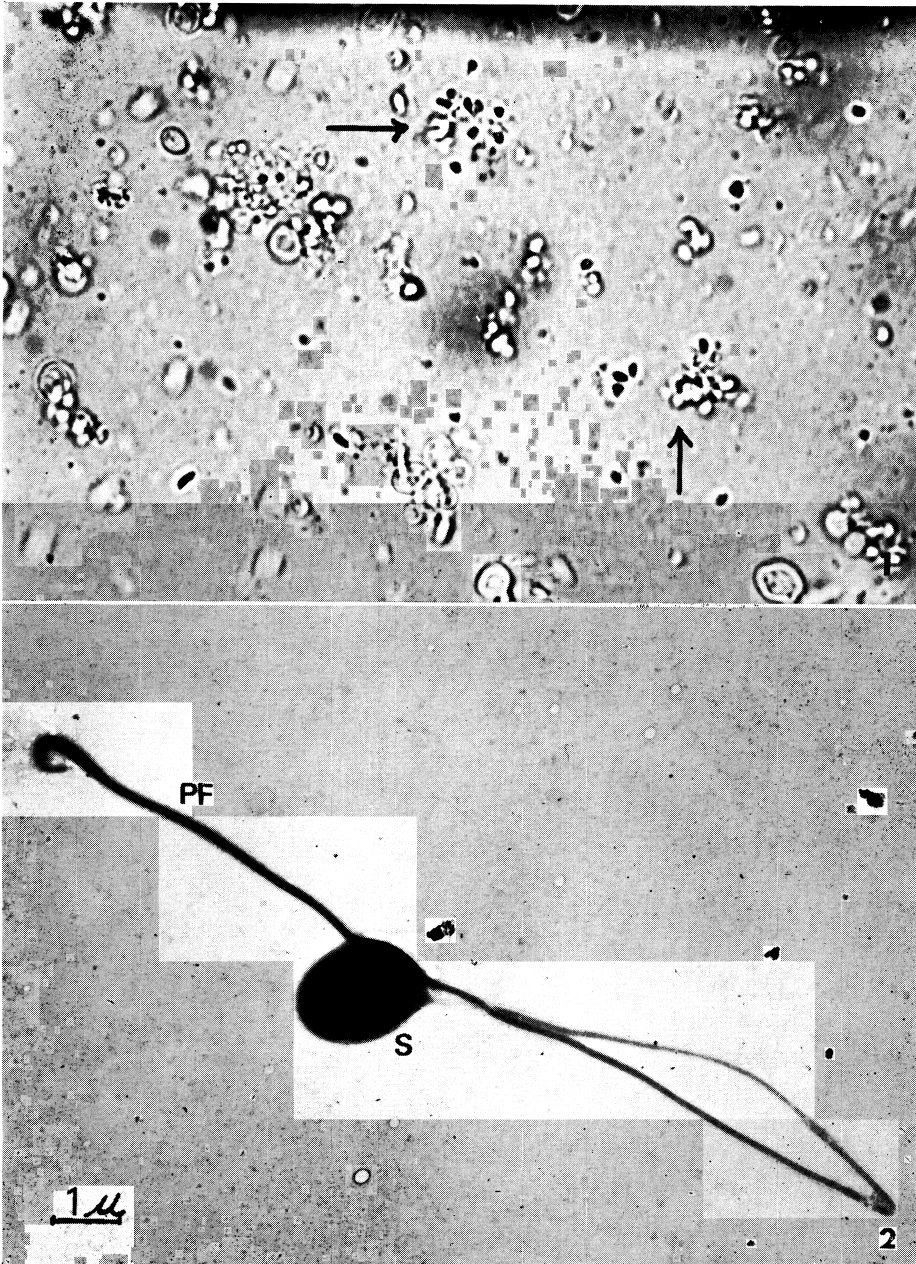


Fig. 1 The purified organisms (arrow).

Fig. 2 Electron microscopical observations of spore and polar filament by negative staining method.
 PF: Polar filament, S: Spore

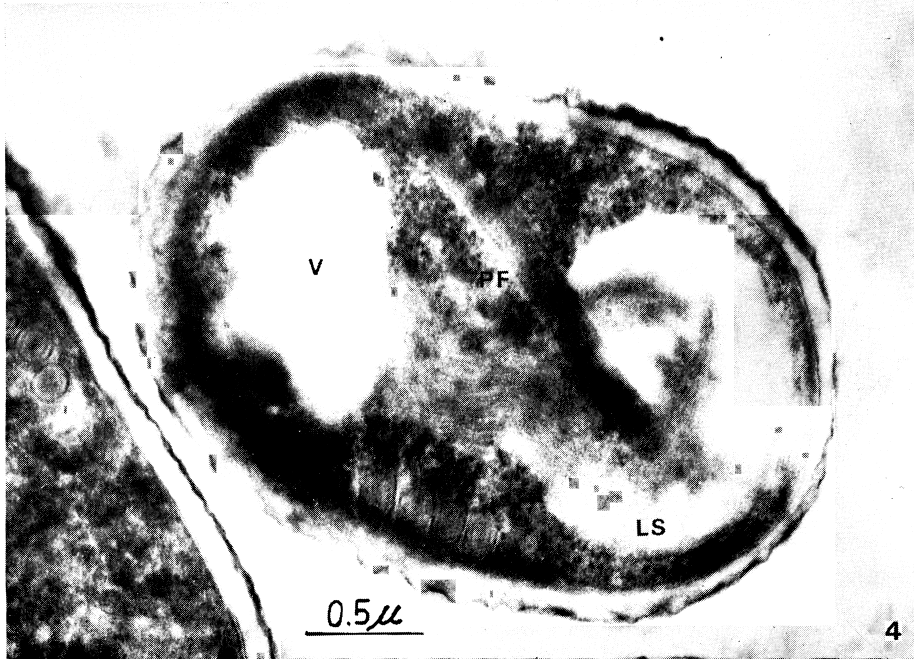
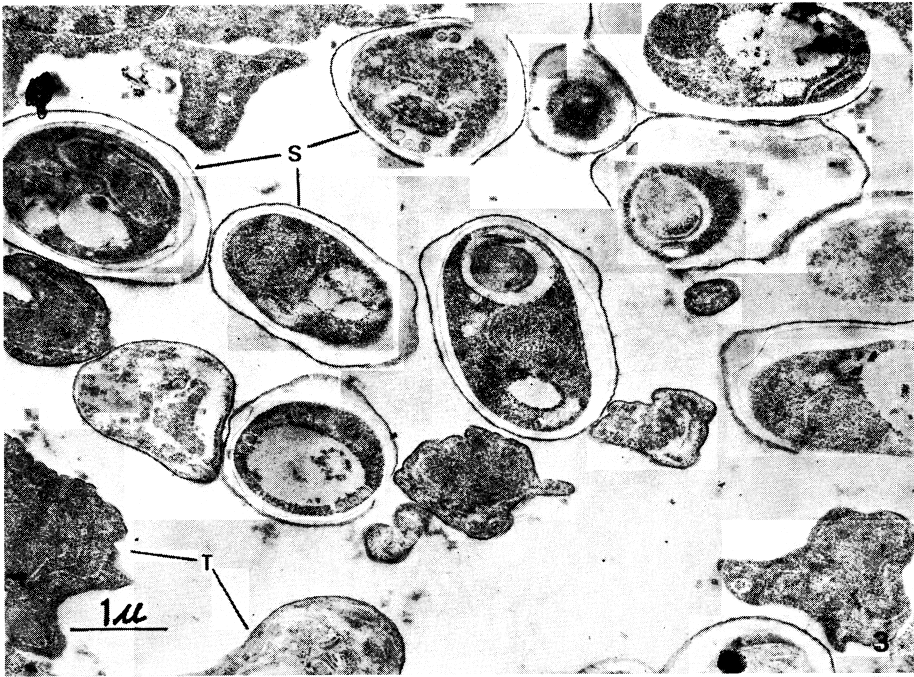


Fig. 3 Proliferating *N. cuniculi* in host cell.

S: Spore, T: Trophozoite

Fig. 4 Longitudinal section of the spore. Polar filament extends to the vacuole forming coil-like structure.

LS: Lamellar structure, PF: Polar filament, V: Vacuole

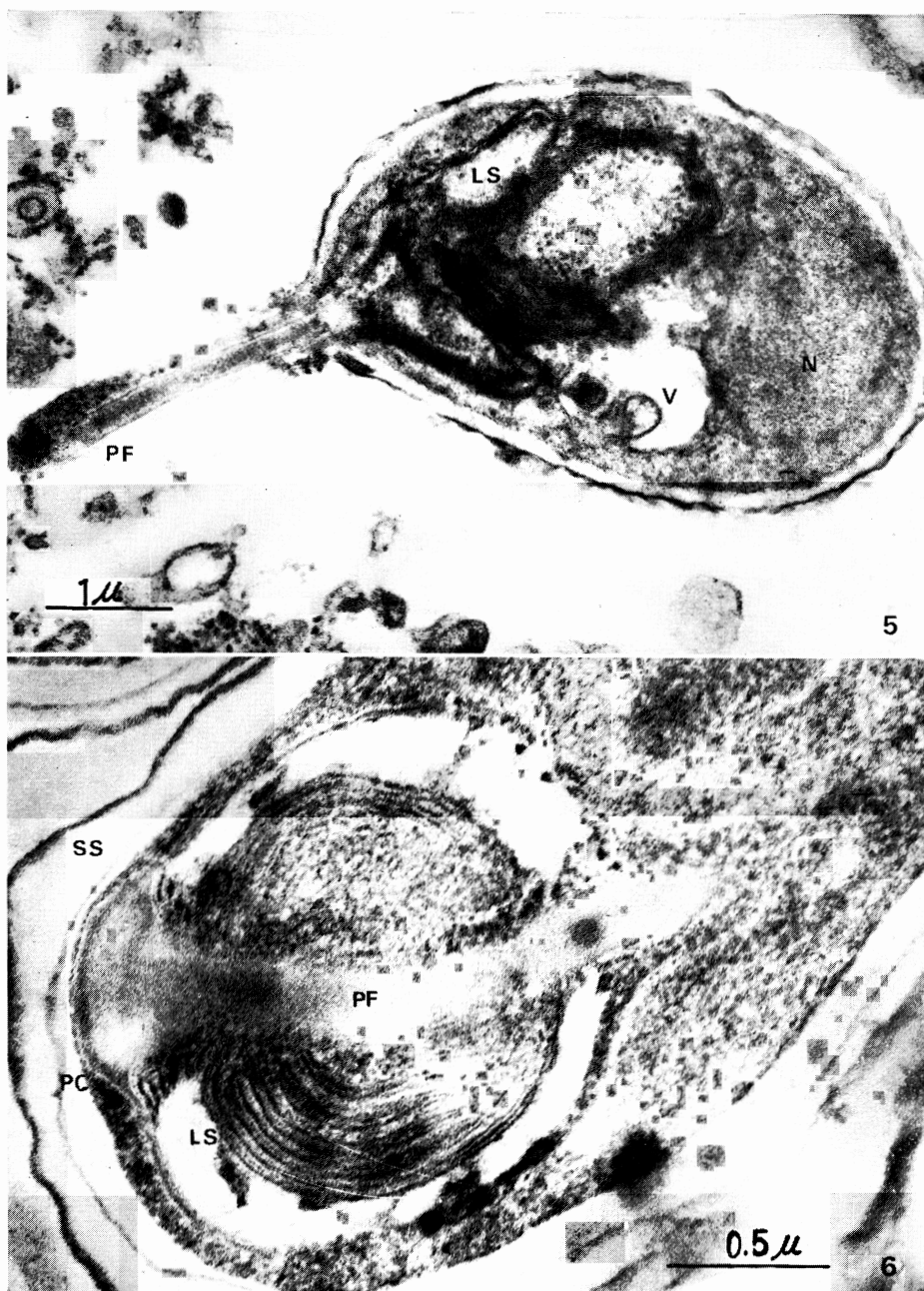


Fig. 5 Extrusion of the filament. Note the loosened lamellar structure and vacuole still containing inclusions.

LS: Lamellar structure, N: Nucleus, PF: Polar filament V: Vacuole

Fig. 6 Polar cap and polar filament surrounded by lamellar structure.

LS: Lamellar structure, PC: Polar cap, PF: Polar filament, SS: Spore shell



Fig. 7 Transverse section of spore. Central tubule of the filament is observable.

LS: Lamellar structure, PF: Polar filament, V: Vacuole

Fig. 8 Obliquely section of spore. Note the spiral structure surrounding the central tubules of the filament.

PF: Polar filament, V: Vacuole

AbstractELECTRON MICROSCOPICAL OBSERVATIONS ON EXTRUSION
OF POLAR FILAMENT IN *NOSEMA CUNICULI*

SHINKICHI AKAO

(Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

The purpose of the present study is to elucidate the ultrastructure of polar filament in *Nosema cuniculi* and to discuss mechanism of extrusion of the filament.

The polar filament has its base at the anterior tip of the spore and runs backwards, obliquely to the long axis of the spore, to the posterior vacuole. The posterior portion of the filament forms a coil of 4-5 turns inside the vacuole. The filament in the spore consists of a thin outer membrane and a central tubule which is surrounded by electron dense substance (Fig. 3, 7). The inner layer of the wall of the tubule looks like a pressed coil of a minute fibril (Fig. 8). The tubule is filled with some substance.

The experiment was tried to elucidate the factors influencing extrusion of the filament. Various methods were tried to extrude a polar filament from the spores. Hydrogen peroxide in 1%, 1/10 M solution of potassium hydroxide, magnesium chloride, sodium hydroxide, sodium chloride solution (1, 5, 10%), artificial gastric juice and deionized water were applied to extrude a polar filament. The extrusion of polar filament, however, was achieved only by addition of the solution of hydrogen peroxide to the materials. Besides H₂O₂, pressing the material under a cover slip stimulated the extrusion of the filament.

The electron microscopical observations of extruded polar filament clarified the detail of its structure. The thin filament extruded from one end of the spore was about 20-30 μ long and the diameter was about 100 m μ . The filament consists of a tubule. In the filament extruded, the substance which filled the central tubule before extrusion seems to be driven out of the tubule of filament and the sporoplasm enters into the tubule following the substance (Fig. 5).