

ネズミマラリア原虫に関する研究

II. メロゾイトの赤血球内侵入過程に及ぼす 細胞骨格蛋白質阻害剤の影響について

藤 岡 寿 川 本 文 彦 水 野 さ ほ 子
熊 田 信 夫

(昭和59年1月4日 受領)

Key words: murine malaria, *Plasmodium berghei*, merozoite invasion, cytoskeletal inhibitor, cytochalasin B

緒 言

現在のマラリア研究の動向をみると、感染予防を目的とするマラリアワクチンの開発と、薬剤耐性マラリアに対しても有効な抗マラリア剤の開発に関する研究が主流となっているが (Wernsdorfer, 1977), これらの研究を推進するための基礎的立脚点として、マラリア原虫の赤血球内侵入機構および代謝機構を解明することは重要な研究課題である。

マラリア原虫の赤血球内侵入過程については、*Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulligan, 1932 のメロゾイトを用いた超微形態学的研究 (Bannister *et al.*, 1975; Aikawa *et al.*, 1978) に基づいて、詳細な観察結果が報告されている。すなわち、(1)メロゾイトの先端部 (apical end) と赤血球表面の付着に続いて、(2)付着部の赤血球膜が肥厚し、メロゾイトの plasmalemma との間に接合部 (junction) を形成する。ついで、(3)メロゾイト付着部の赤血球膜が内方へ陥入するとともに、接合部もメロゾイトの周縁部を開んで移動し、メロゾイトは赤血球内に侵入し始める。メロゾイトが赤血球内に完全に侵入したのち、(4)赤血球膜の融合がみられ、接合部も消失して侵入過程が完了する。

最近、Miller *et al.* (1979) と Aikawa *et al.* (1981) は、*P. knowlesi* のメロゾイトとアカゲザル (*Macaca mulatta*) の赤血球の混合液を cytochalasin B (以下 CB) で処理後、電子顕微鏡で観察した結果、メロゾイトと赤血球膜との間には接合部が形成されるが、その移動が阻止されることを認め、そのために赤血球内に侵入

できないものと推察した。しかし、いずれもメロゾイトと赤血球との混合液に CB を作用させているため、CB による侵入阻害がメロゾイトに作用したのか、あるいは赤血球に作用したのかについては不明のままである。

ネズミマラリア原虫はヒトのマラリア原虫と同様に無核赤血球内で増殖し、肝細胞を組織型原虫形成の場とする性質があり、マラリア研究における実験モデルとしての役割を果たしてきた。しかし、*Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948 のメロゾイトの感染性に影響を与えずに、これを分離精製することは最近まで困難であったが、3種のネズミマラリア原虫 (*P. yoelii*, *P. vinckeii*, *P. chabaudi*) の感染赤血球の分離 (Eugui and Allison, 1979) に用いられたメトリゾ酸ナトリウムの塩組成を変えたメトリゾ酸カルシウム・メグルミン塩溶液の不連続密度勾配遠心法の開発 (藤岡ら, 1983) によつて可能となった。そこで、本方法によつて分離精製された *P. berghei* のメロゾイトを用いて、メロゾイトの赤血球内侵入におよぼす CB の影響について調査し、*P. berghei* メロゾイトの赤血球内侵入機構の解明を試みた。

また、ネズミマラリア原虫のメロゾイトにも微小管 (MT) の存在が報告されているため (Sinden, 1978), 細胞骨格系の MT に直接作用すると言われていた colchicine, vinblastine および vanadate の処理によつて、メロゾイトの赤血球内侵入機構にどのような影響が認められるかについても、合わせて検討した。

材料および方法

1) マラリア原虫と実験供試マウス

名古屋大学医学部医動物学教室

実験に用いたネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei*, NK 65株) は, 1979年2月に岐阜大学医学部の大友弘士教授から分与を受け, その後当教室で継代中のものである。継代は1週間隔で行い, ACD (acid-citrate-dextrose) 溶液で希釈した感染赤血球約 1×10^6 個/0.1ml を標準接種量とし, 5~7週齢の ICR 系マウス (雌) の腹腔内に接種した。感染実験には, 5週齢の ICR 系マウス (雌) を用いた。

2) 分離精製メロゾイトの赤血球に対する付着・侵入実験および実験温度条件

メロゾイトの分離精製は藤岡ら (1983) の方法により行つたが, 約10%の成熟栄養型 (trophozoite)・分裂期原虫 (schizont) の混入があるため, トリス-塩化アンモニウム溶液による溶血操作 (Eisen *et al.*, 1977) を加え, 遊離メロゾイト以外の混入感染赤血球から新たにメロゾイトが放出されることを防止した。分離精製メロゾイトは, ウシ胎児血清 (FCS, GIBCO) を10%添加した RPMI 1640培地 (GIBCO) によつて約 1×10^6 個/0.9ml に調整し, メロゾイト浮遊液とした。また, glass beads column と cellulose powder column を通して正常マウス血液から白血球と血小板を取り除き, 得られた正常マウス赤血球約 10^6 個/0.1ml を, ただちにメロゾイト浮遊液に加えた。上記の混合液を 5°C , 20°C および 37°C の温度条件下で30分間培養し, 培養後各試験管を氷水中で 0°C に冷却し, ただちに650g 5分間遠心した。沈渣の塗抹ギムザ染色標本を作成し, 顕微鏡 (10×100) によつて10,000個の赤血球を数えメロゾイトの赤血球への付着・侵入を観察し, その割合を調べた。感染マウス赤血球から遊離メロゾイト浮遊液を調整してから, 正常マウス赤血球と混合するまでの操作時間は70分以内であった。

3) 分離精製メロゾイトのマウスに対する感染性実験

分離精製したメロゾイトを10% FCS 添加 RPMI 1640培地浮遊液として約 1×10^7 個/ml に調整したのち, 5°C , 20°C および 37°C で30分間培養後, 5週齢の ICR 系マウス (雌) の腹腔内に0.1ml 宛接種した。接種後2日ごとに尾部から採血して, 塗抹ギムザ染色標本を作成し, 1,000個の赤血球を数え, 感染赤血球の割合を調査した。メロゾイトを分離精製後, ただちに腹腔内に接種したマウスを対照区とし, 各実験区毎に5匹のマウスを用いて実施した。

4) 細胞骨格蛋白質に作用する阻害剤

MT 阻害剤である colchicine (Sigma, 以下 CC), vinblastine (杏林製薬, 以下 VB) と vanadate (片山

化学, 以下 VN) を10% FCS 添加 RPMI 1640培地で溶解し, 分離精製メロゾイト浮遊液に添加した。この処理液に正常マウス赤血球を加え, メロゾイトの赤血球侵入に対する影響について検討した。微小線維 (以下 MF) 阻害剤である CB (Sigma) の場合は, メロゾイトあるいは赤血球のいずれか一方を前処理した場合の影響についても検討した。最終処理濃度は, CC が 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M , VB が 10^{-4}M , 10^{-5}M , 10^{-6}M , VN が 10^{-3}M , 10^{-4}M , 10^{-5}M となるように調整した。CB は, ジメチルスルホキシド (米山薬品, 以下 DMSO) で溶解したのち, 10% FCS 添加 RPMI 1640培地で希釈し, 最終処理濃度を $100\mu\text{g/ml}$ (約 $2.09 \times 10^{-4}\text{M}$), $10\mu\text{g/ml}$ (約 $2.09 \times 10^{-5}\text{M}$), $1\mu\text{g/ml}$ (約 $2.09 \times 10^{-6}\text{M}$) とし, DMSO 濃度は0.1%とした。

5) 各阻害剤の処理方法

各阻害剤の処理方法を Fig. 1 に示した。

A区 (メロゾイトと赤血球混合液への各阻害剤長時間処理)

約 1×10^6 個/0.8ml の分離精製メロゾイトに前記の各阻害剤溶液0.1ml を加え, 37°C 5分間作用させたのち, この処理液に約 10^6 個/0.1ml の正常マウス赤血球を加え 37°C 5分間, さらに 20°C 60分間反応させた (結

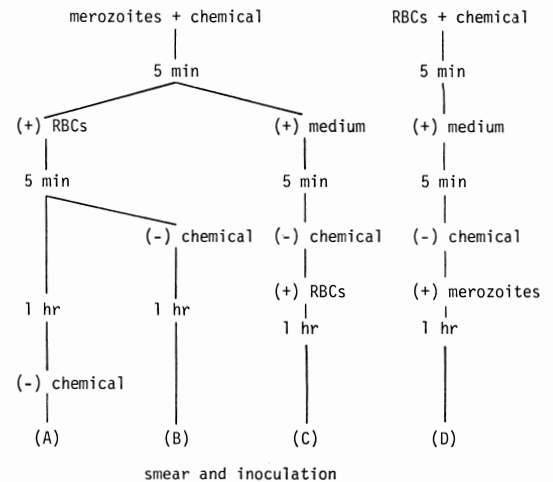


Fig. 1 Experimental procedure of chemical treatments of merozoites and/or RBCs.

A : Treatment of the mixture for long time

B : Treatment of the mixture for short time

C : Treatment of merozoites

D : Treatment of RBCs

(+) : Addition to the mixture

(-) : Removal from the mixture by centrifugation

果および考察を参照)。反応後ただちに650g 5分間遠心した沈渣から塗抹ギムザ染色標本を作製し、赤血球10,000個を数え、メロゾイトが付着・侵入した赤血球の割合を調べた。また、各実験区毎に5匹の5週齢 ICR系マウス(雌)の腹腔内に接種し、各阻害剤処理後の感染性を調査した。

B区(メロゾイトと赤血球混合液へのCB短時間処理)

正常マウス赤血球を加え37°C 5分間反応させるところまではA区と同じ操作を行い、反応後ただちに、1,000g 20秒間の遠心操作を数回繰り返してCBを除去した。沈渣を10% FCS 添加 RPMI 1640 培地 1ml に浮遊させ、20°C 60分間培養後、メロゾイトが侵入した赤血球の割合と、マウスに対する感染性を調べた。

C区(メロゾイトのCB処理)

約 1×10^6 個/0.8ml の分離精製メロゾイトにCB溶液を0.1ml 加え37°C 5分間作用させたのち、10% FCS 添加 RPMI 1640 培地0.1ml を加えさらに37°C 5分間反応させた。反応後CBを遠心洗浄法により除去し、これに正常マウス赤血球約 10^6 個/1.0ml を加えて20°C 60分間培養後、メロゾイトが侵入した赤血球の割合と、マウスに対する感染性を調べた。

D区(赤血球のCB処理)

正常マウス赤血球約 10^6 個/0.8ml にCB溶液を0.1ml 加え、37°C 5分間作用させたのち、これに10% FCS 添加 RPMI 1640 培地を0.1ml 添加しさらに5分間反応させた。反応後CBを遠心操作で洗浄除去し、約 1×10^6 個/1.0ml の分離精製メロゾイトを加えて37°C 10分間、さらに20°C 50分間培養した。

対照区

各阻害剤液添加量と等量の RPMI 1640 培地あるいは最終濃度が0.1%のDMSOを加えたものを対照区とした。

6) 電子顕微鏡観察

CB ($10 \mu\text{g/ml}$) によつて処理したメロゾイトの赤血球に対する付着状態を調べるため、電子顕微鏡観察をおこなつた。約 1×10^6 個/0.8ml の分離精製メロゾイトにCB溶液0.1ml を加え、37°C 5分間作用させたのち、この処理液に約 10^6 個/0.1ml の正常マウス赤血球を加え37°C 15分間反応させた。反応後グルタルアルデヒド固定液とオスミウム酸固定液で二重固定し、超薄切片を作製して、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色した。観察は日立製 HS-11-DS 型電子顕微鏡(加速電圧75KV)により行つた。

結果

1) 分離精製メロゾイトの赤血球に対する付着・侵入に及ぼす温度の影響

分離精製メロゾイトと正常マウス赤血球を混合したのち、*in vitro* で5°C、20°C および37°C 30分間培養し、メロゾイトの付着または侵入を受けた赤血球数の百分率を算出した結果を Table 1 に示した。5°C で培養した場合にメロゾイトの付着・侵入率が最も低く、37°C で培養した場合に最も高率となつた。従つて、材料と方法の5) 各阻害剤の処理方法で記したように、各阻害剤で処理した分離精製メロゾイトに正常マウス赤血球を添加した場合、付着・侵入率の最も高い温度条件である37°C を処理温度とした。

2) 分離精製メロゾイトのマウスに対する感染性に及ぼす温度の影響

分離精製メロゾイトを5°C、20°C あるいは37°C で30分間培養後、5週齢のICR系マウス(雌)の腹腔内に接種し、感染性に及ぼす影響について調査した(Fig. 2)。メロゾイトの接種量は約 1×10^6 個/0.1ml である。メロゾイトを分離精製後、ただちに接種した対照区と比較すると、20°C 処理区では感染性の低下がわずかに認められたのみであつたが、5°C と37°C 処理区においては感染性が著しく低下した(Fig. 2)。従つて、メロゾイトの感染性低下が最も少なかつた20°Cを、各阻害剤処理後の培養温度とした。

3) MT・MF 阻害剤処理による影響

A区の方法により、CB、CC、VB および VN で処理し、メロゾイトの赤血球に対する付着・侵入性に与える影響およびメロゾイトのマウスに対する感染性に及ぼす影響について調査した。メロゾイトの赤血球に対する付着または侵入性を阻害剤処理30分後に調べたところ(Table 2)、無処理対照区とCC、VB および VN 処理区との間に赤血球に対する付着率・侵入率ともに差が

Table 1 Percent attachment or invasion of merozoites after incubation with mouse erythrocytes at various temperatures for 30 min

	5°C	20°C	37°C
Exp. 1	1.6*	4.2	19.8
Exp. 2	0.2	1.8	5.7

* Percent of RBCs attached or invaded by merozoites

認められなかった。

CB (1 $\mu\text{g/ml}$) 処理区においては、メロゾイトの赤血球内への侵入率が DMSO 処理の対照区と比較して低下しており、高濃度 (100 $\mu\text{g/ml}$) 処理区ではメロゾイトの侵入がまったく認められなかった (Table 2)。

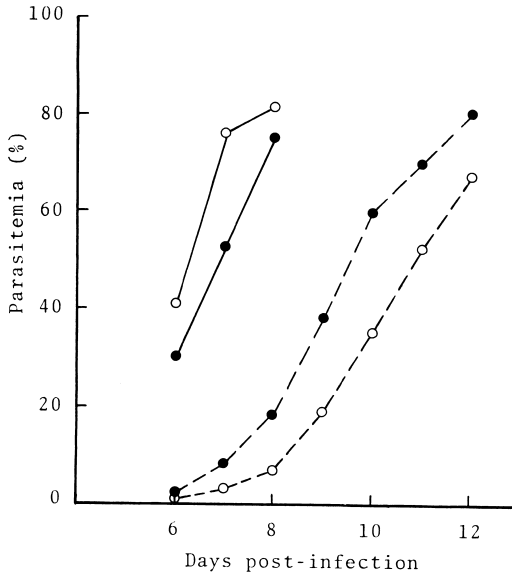


Fig. 2 Infectivity of merozoites incubated *in vitro* at various temperatures for 30 min. ○—○: control mice inoculated intraperitoneally with fresh merozoites. ●---●: 5°C, ●—●: 20°C, ○---○: 37°C

しかし、赤血球に対する付着率は、DMSO 処理対照区より CB 処理区の方が各濃度とも高率であった。メロゾイトに CB 添加後70分間処理したのと同様の調査を行った場合にも (Table 3), CB 処理区において侵入率の低下が認められたが、付着率は DMSO 処理対照区よりも高率であった。また CB の30分間処理 (Table 2) と70分間処理におけるメロゾイトの赤血球付着率を比較すると、いずれの処理濃度においても70分間処理した場合に、付着率は低い値を示した。しかし、侵入率には差を認めなかった。

さらに、70分処理後650g 5分間遠心操作を加えてその沈渣をマウスに接種し感染性を調べたところ、CB 処理区のみ感染性の低下または消失が認められた。

4) メロゾイトの侵入に対する CB 処理の影響

CC, VB および VN 処理メロゾイトに正常赤血球を添加した場合には、メロゾイトの赤血球に対する付着率・侵入率に影響がなく、CB 処理の場合にのみ影響が認められた。従って、B, C および D の方法 (Fig. 1) によつて CB による処理実験を行った。

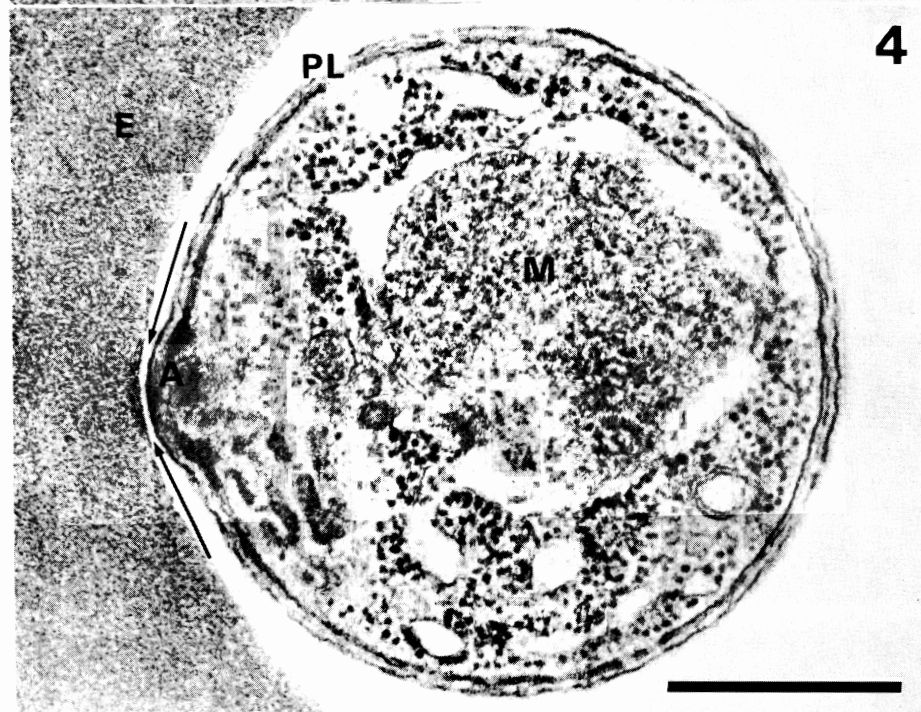
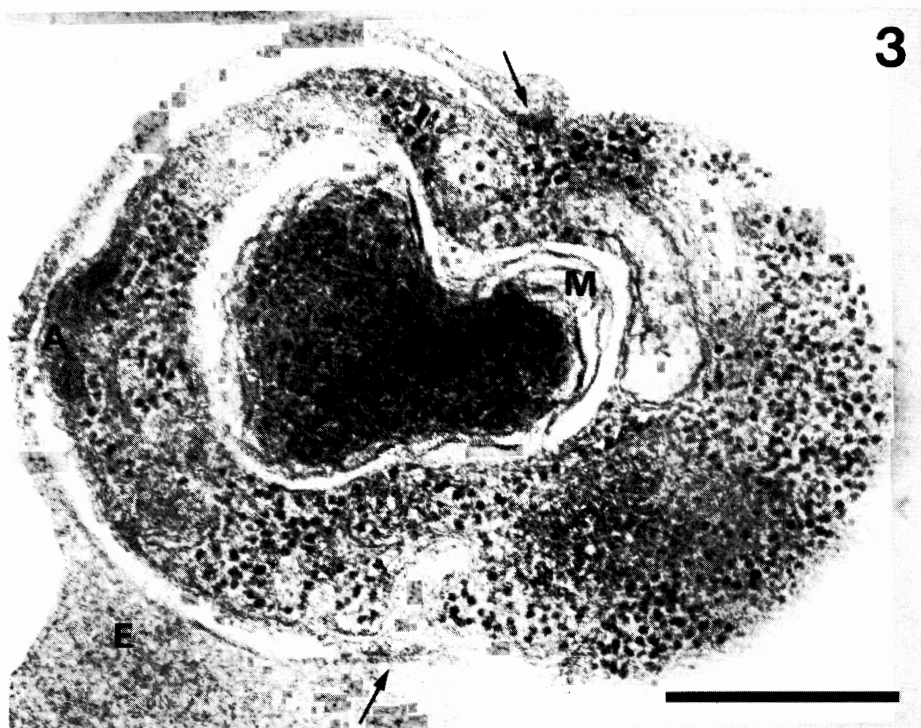
C 実験区の CB (100 $\mu\text{g/ml}$) 処理の場合、メロゾイトの赤血球内侵入率は DMSO 処理対照区の侵入率より27%~86%低下していた。処理後650g 5分間遠心操作を加えた沈渣をマウスに接種したところ、感染性のわずかな低下が認められた。しかし、B と D の処理区においては、DMSO 処理対照区と比較すると、侵入率にはほとんど差が認められなかった (Table 4)。

Table 2 Effects of chemicals on the reaction mixture of merozoites and mouse erythrocytes incubated for 30 min

Treatment (30 min incubation)	Attachment rate (%)			Invasion rate (%)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Untreated	0.5	1.2	0.8	11.2	6.8	17.4
DMSO (0.1%)	0.2	0.5	0.3	6.1	3.7	10.0
Cyto. B (1 $\mu\text{g/ml}$, $2.09 \times 10^{-6}\text{M}$)	3.7	2.8	4.4	0.4	0	0.2
(10 $\mu\text{g/ml}$, $2.09 \times 10^{-5}\text{M}$)	4.2	4.1	3.2	0	0	0.1
(100 $\mu\text{g/ml}$, $2.09 \times 10^{-4}\text{M}$)	3.8	3.1	2.3	0	0	0
Colchicine (10^{-3}M)	0.7	0.5	1.2	8.8	7.4	18.9
Vinblastine (10^{-4}M)	0.3	1.6	0.5	10.3	4.6	14.7
Vanadate (10^{-3}M)	0.5	0.9	1.0	10.5	5.5	8.8

Fig. 3 Electron micrograph showing a mouse erythrocyte (E) invaded by a normal *Plasmodium berghei* merozoite (M). A junction (arrows) is formed between the thickened membrane of the erythrocyte and merozoite plasmalemma. Bar=0.5 μ .

Fig. 4 Electron micrograph showing the attachment of the apical end (A) of a merozoite (M)



to a mouse erythrocyte (E). The mixture of merozoites and RBCs was treated by cytochalasin B ($10\mu\text{g/ml}$). The erythrocyte membrane becomes thickened and forms a junction (arrows) with the merozoite plasmalemma (PL) at the site of attachment. Bar= 0.5μ .

Table 3 Effects of chemicals on the reaction mixture of merozoites and mouse erythrocytes incubated for 70 min

Treatment (70 min incubation)	Attachment rate (%)			Invasion rate (%)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
Untreated	0.3	0.5	0.1	11.0	8.2	20.9
DMSO (0.1%)	0.2	0.1	0.4	5.6	4.9	9.9
Cyto. B (1 μ g/ml, 2.09 \times 10 ⁻⁶ M)	2.1	1.6	1.3	0.3	0.1	0.2
(10 μ g/ml, 2.09 \times 10 ⁻⁵ M)	1.5	0.9	1.1	0	0	0.2
(100 μ g/ml, 2.09 \times 10 ⁻⁴ M)	0.5	0.3	0.8	0	0	0
Colchicine (10 ⁻³ M)	0.4	0.8	0.7	9.4	6.9	15.7
Vinblastine (10 ⁻⁴ M)	0.1	0.4	0.2	12.0	5.5	19.3
Vanadate (10 ⁻³ M)	0.2	0	0.6	10.5	8.7	21.0

Table 4 Effects of cytochalasin B treatment on merozoites invasion to mouse erythrocytes

Treatment	Invasion rate (%)		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
(A) Untreated	11.0	8.2	20.9
DMSO (0.1%)	5.6	4.9	9.9
Cyto. B (10 μ g/ml)	0	0	0.2
(100 μ g/ml)	0	0	0
(B) Untreated	7.3	5.4	10.2
DMSO (0.1%)	6.8	5.2	8.7
Cyto. B (10 μ g/ml)	6.7	5.5	8.3
(100 μ g/ml)	5.3	4.6	7.8
(C) Untreated	15.3	16.8	13.6
DMSO (0.1%)	11.0	8.9	11.3
Cyto. B (10 μ g/ml)	10.3	9.7	11.8
(100 μ g/ml)	8.9	4.3	3.2
(D) Untreated	5.6	10.8	14.0
DMSO (0.1%)	6.3	9.9	12.1
Cyto. B (10 μ g/ml)	7.3	12.8	9.2
(100 μ g/ml)	4.9	11.2	13.3

(A), (B), (C) and (D) indicate experimental procedures shown in Fig. 1

5) 電子顕微鏡観察

DMSO 処理対照区では、接合部の移動を伴った正常な侵入過程の像 (Fig. 3) や、完全に侵入した像が観察されたが、メロゾイトを CB (10 μ g/ml) で処理し、正常マウス赤血球を添加した場合には、Fig. 3 で示したような接合部の移動ともなう侵入過程の像は全く観

察されず、メロゾイトの先端部と赤血球膜との付着した像 (Fig. 4) のみが観察された。しかし、メロゾイトの先端部が付着した赤血球膜部位には肥厚がみられ (Fig. 4, 矢印)、超微形態学的には正常の侵入過程で観察されている付着像 (Aikawa *et al.*, 1978) と同様な接合部を形成していた。また DMSO 処理対照区と CB 処理区のメロゾイトにおいて、超微形態学的差異は認められなかった。

考 察

マラリア原虫は宿主の赤血球内に寄生し栄養的に依存する寄生原虫であり、赤血球内に侵入することはマラリア原虫の生存にとって必要不可欠である。一方、宿主の赤血球、特に成熟赤血球には食食作用がなく、このためにメロゾイトが赤血球内に侵入寄生するには巧妙な機構が働いていることが最近の研究で明らかにされつつある。マラリア原虫の赤血球内侵入過程については、超微形態学的な研究が行なわれているが (Bannister *et al.*, 1975; Bannister *et al.*, 1977; Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1979; Aikawa *et al.*, 1981; Aikawa and Miller, 1983)、その機構については現在まで十分に解明されているとは言えない。マラリア原虫の赤血球内侵入機構の全貌を解明することは、マラリア感染症の治療法を確立するための基礎的研究としても、不可欠のものと思われる。

メロゾイトが付着した赤血球は急激な deformation を起こし (Dvorak *et al.*, 1975)、また、roptry から侵入に関与する物質が放出されることが推察されているので (Miller, 1977; Aikawa *et al.*, 1978)、我々は、メロゾイトの赤血球内侵入に細胞骨格蛋白質が関与する

可能性を推察し、CB, CC, VB および VN を用いてメロゾイトと赤血球を処理し、メロゾイトの赤血球内侵入に及ぼす影響について検討することにより、*P. berghei* メロゾイトの赤血球内侵入機構についての解明を試みた。

MT 阻害剤・MF 阻害剤処理によるメロゾイトの赤血球内侵入性への影響について実験する前に、メロゾイトの赤血球内侵入に及ぼす温度の影響と、メロゾイトを短時間培養した場合にその感染性の低下に及ぼす温度の影響について調査した。

分離精製したメロゾイトと正常マウス赤血球とを混合し、5°C, 20°C および37°C で30分間 *in vitro* 培養した結果、メロゾイトの赤血球に対する付着および侵入率は37°C が最も高く、20°C, 5°C の順に低下した。この結果は、*P. knowlesi* メロゾイトのアカゲザル赤血球に対する付着率 (Miller *et al.*, 1979) と同様の傾向を示した。一方、分離精製したメロゾイトのみを5°C, 20°C および37°C で30分間の *in vitro* 培養後、感染性を調査すると、感染性の低下が最も少ない処理温度は20°C であり、5°C, 37°C の順に低下した。Polycarbonate membrane 法により分離された *P. knowlesi* のメロゾイトの *in vitro* における侵入実験においても、23°C に保つた場合に感染性を長時間維持することが報告されている (Johnson *et al.*, 1980)。したがって、短時間培養におけるメロゾイトの感染性維持には20°C 前後に保つことが最良と考えられた。

また、マラリア原虫感染マウスの感染赤血球の増加率やマウスの死亡日数は、接種する原虫数に逆相関し、接種原虫数が10倍希釈されるごとに死亡日数が約1日延びることが報告されている (塚本, 1981)。分離精製メロゾイトを短時間培養した場合にみられる感染性の低下 (Fig. 2) を、感染力のある原虫数の低下とみなして換算すると、対照区と比較して20°C 30分間培養した場合には約 10^{-1} に、5°C の場合には約 10^{-4} に、37°C の場合には約 10^{-5} に低下したものと推察された。

CC と VB は細胞の MT 阻害剤であり (Wallach, 1979)、VN は微小管の関与する運動系におけるエネルギー転換要素であるダイニンの阻害剤として知られている (毛利・小川, 1983)。CC, VB および VN は *P. berghei* メロゾイトの赤血球内侵入に対して阻害効果を示さなかつた (Tables 2, 3)。このことから、メロゾイトの赤血球内への侵入には MT が関与していない可能性が推察された。しかし、CC は 10^{-8} M の濃度で *P. berghei* の栄養型原虫の発育を阻害し、 10^{-4} M の

濃度で分裂期原虫に異常型を形成することが報告されているので (McColm and Trigg, 1980)、MT 阻害剤処理区における、メロゾイトの赤血球内侵入後の発育に対する影響の有無についてはさらに検討を加える必要があると思われる。

分離精製したメロゾイトに CB を前もって添加し、これに正常マウス赤血球を加えて培養した場合には、顕著な侵入阻害効果が認められた (Tables 2, 3, 4)。CC, VB および VN 処理区では付着率・侵入率ともに対照区と差がなく、メロゾイトが赤血球に付着後すみやかに赤血球内に侵入すると考えられる。CB 処理区の場合は付着率が高く、侵入率が低値であり、CB の作用により付着後の侵入過程が阻害されることが推察された。CB 処理によるメロゾイトの赤血球内侵入阻害について電子顕微鏡で観察した結果、メロゾイト先端部と付着した赤血球膜が肥厚した接合部形成像 (Fig. 4) までは認められたものの、接合部の移動にともなう正常な侵入過程 (Fig. 3) は観察されなかつた。Miller *et al.* (1979) が、*P. knowlesi* のメロゾイトとアカゲザルの赤血球との混合液を CB で処理した場合にも、同様の結果を報告している。従つて、*P. berghei* メロゾイトの赤血球内侵入過程においても、CB が接合部の移動を阻害するために赤血球内に侵入できないものと推察された。また、赤血球内に侵入の際に、rhoptry と赤血球膜間に connection が形成され、rhoptry 内の電子密度が低下することから、侵入に関与する物質が放出され (Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1979)、その放出作用は CB 処理で阻害されないことが報告されている (Miller *et al.*, 1979)。従つて、*P. berghei* メロゾイトと赤血球の混合液を CB 処理した場合に認められた感染性の低下や消失 (Table 4 A) は、メロゾイトが赤血球に付着した状態で侵入物質が放出され、70分後に CB を除去しても、すでに侵入能が消失して感染性が低下したものと推察された。メロゾイトを CB の高濃度 (100 μ g/ml) 10分間前処理した場合にも、感染性の低下が認められた (Table 4 C) が、高濃度 CB のメロゾイトに対する直接作用の有無については今後検討すべき課題と思われる。

Pasvol and Wilson (1982) は、マラリア原虫の赤血球内への侵入について、まず、メロゾイトとレセプターが結合後、rhoptry から侵入物質が放出されることにより、膜の流動性が局部的に変化を受け、膜脂質の局所的な組成変化が惹起され、その結果として、膜蛋白質と脂質との相互作用に変化を及ぼし、その部位における形質

膜の選択的な陥凹が起り、マラリア原虫が“エンドサイトーシス”を受け、赤血球内に入ると推察している。今回の実験結果 (Fig. 4) および Miller *et al.* (1979) の報告にも見られるように、マラリア原虫の赤血球内侵入過程で CB 処理を行うと、原虫が赤血球に付着する部位に接合部の形成は認められたものの、赤血球膜の陥凹形成が阻害されており、この結果、マラリア原虫の侵入が起り得なかつたと考えられた。したがって、形質膜の突出よりも陥凹によるエンドサイトーシス (門田・門田, 1983) に類似した機構により、原虫が赤血球内に入るものと推察された。

Aikawa *et al.* (1981), Ailawa and Miller (1983) は、接合部の凍結割断標本の電子顕微鏡観察結果から、メロゾイトの侵入時に赤血球の膜内粒子 (IMP) に再配列が起こることが必要であり、膜脂質の変化あるいは収縮蛋白と考えられているスペクトリンおよびアクチンが密接に関与することを推察している。CB はアクチン繊維に作用するばかりか、細胞質のグルコース輸送やヘキソース輸送も阻害するが (Wallach, 1979), アクチン脱重合剤である cytochalasin D 処理においても、メロゾイトの赤血球への侵入阻害が認められた (藤岡ら, 未発表)。従つて、今回の実験結果と合わせ、メロゾイトの赤血球内侵入機構に MF が関与していることが強く示唆されたが、CB が赤血球あるいはメロゾイトのどちらに直接作用して、侵入を阻害したかを明確にすることはできなかつた。今後、rhoptry 内の物質について検討を加えるとともに、侵入機構についてさらに詳細に解明する予定である。

要 約

メトリゾ酸カルシウム・メグルミン塩溶液を用いて分離精製したネズミマラリア原虫 *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948 (NK 65) のメロゾイトを、cytochalasin B (CB), colchicine (CC), vinblastine (VB) および vanadate (VN) で処理し、メロゾイトの赤血球内侵入性に対する影響について検討し、赤血球内侵入機構の解明を試みた。

分離精製したメロゾイトに微小管 (MT) 阻害剤である CC (10^{-8} M- 10^{-5} M), VB (10^{-4} M- 10^{-6} M) または VN (10^{-8} M- 10^{-5} M) を添加し、これにマウス赤血球を加えて短時間培養した場合には、赤血球内にメロゾイト侵入像が高率に観察され、赤血球内侵入性に対する阻害作用は認められなかつた。

精製メロゾイトを微小線維 (MF) 阻害剤として知ら

れる CB ($10\mu\text{g/ml}$) で10分間処理したのち、CB を遠心操作で除去後、メロゾイトに赤血球を添加した場合と、赤血球を CB で10分間前処理し、CB 除去後メロゾイトを加えて培養した場合には、DMSO 処理対照区とほぼ同数の赤血球内原虫が観察された。しかし、メロゾイトと CB 混合液に正常マウス赤血球を加えると、 $10\mu\text{g/ml}$, $1\mu\text{g/ml}$ の処理濃度で、赤血球にメロゾイトが付着した像は多数観察されたものの、赤血球内侵入像は非常に少なく、 $100\mu\text{g/ml}$ の処理濃度では赤血球内侵入像はまったく認められなかつた。また、メロゾイトを CB ($100\mu\text{g/ml}$) で10分間前処理した場合、赤血球内原虫数が僅かに低下した。

CB 処理メロゾイトの赤血球への付着状態を電子顕微鏡で観察すると、メロゾイトの先端部 (apical end) と付着した部位の赤血球膜が肥厚し、接合部形成が認められたが、この接合部の移動に伴う正常な侵入像は全く認められなかつた。

従つて、Miller *et al.* (1979) や Aikawa *et al.* (1981) が *Plasmodium knowlesi* Sinton and Mulligan, 1932 のメロゾイトの赤血球内侵入性に対する CB の影響について報告したのと同様に、*P. berghei* のメロゾイトにおいても、赤血球膜とメロゾイト間の接合部の移動が CB により阻害され、このために赤血球内に侵入できないものと考えられ、メロゾイトの赤血球内侵入機構に MF が関与する可能性が推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、有益な御助言を頂いた予防衛生研究所麻疹部の伊藤康彦博士、名古屋大学医学部附属病態制御研究施設ウイルス感染研究部門の西山幸廣博士および同大学医学部医動物学教室の須藤千春博士に深謝します。

文 献

- 1) Aikawa, M. and Miller, L. H. (1983): Structural alteration of the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion and intraerythrocytic development. In *Malaria and the red cell*, ed. by David Evered and Julie Whelan, Pitman, London, 45-63.
- 2) Aikawa, M., Miller, L. H., Johnson, J. G. and Rabbege, J. R. (1978): Erythrocyte entry by malarial parasites: a moving junction between erythrocyte and parasite. *J. Cell Biol.*, 77, 72-81.

- 3) Aikawa, M., Miller, L. H., Rabbege, J. R. and Epstein, N. (1981): Freeze-fracture study on the erythrocyte membrane during malarial parasite invasion. *J. Cell Biol.*, 91, 55-62.
- 4) Bannister, L. H., Butcher, G. A., Dennis, E. D. and Mitchell, G. H. (1975): Structure and invasive behaviour of *Plasmodium knowlesi* merozoites *in vitro*. *Parasitology*, 71, 483-491.
- 5) Bannister, L. H., Butcher, G. A. and Mitchell, G. H. (1977): Recent advances in understanding the invasion of erythrocytes by merozoites of *Plasmodium knowlesi*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 55, 163-169.
- 6) Dvorak, J. A., Miller, L. H., Whitehouse, W. C. and Shiroishi, T. (1975): Invasion of erythrocytes by malaria merozoite. *Science*, 187, 748-750.
- 7) Eisen, H., Furusawa, M., Tanabe, K., Takada, S. and Ostertag, W. (1977): Interactions of rodent malarial parasites with Friend erythroleukemia cells *in vitro*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 55, 367-372.
- 8) Eugui, E. M. and Allison, A. C. (1979): Separation of erythrocytes infected with murine malaria parasites in metrizamide gradients. *Parasitology*, 79, 267-275.
- 9) 藤岡 寿・川本文彦・熊田信夫 (1983): ネズミマラリア原虫に関する研究 I, 不連続密度勾配遠心法による原虫感染赤血球とメロゾイトの分離精製法. *寄生虫誌*, 32, 99-108.
- 10) Johnson, J. G., Epstein, N., Shiroishi, T. and Miller, L. H. (1980): Factors affecting the ability of isolated *Plasmodium knowlesi* merozoites to attach to and invade erythrocytes. *Parasitology*, 80, 539-550.
- 11) 門田朋子・門田 健 (1983): エキソサイトーシスとエンドサイトーシス. *蛋白質・核酸・酵素*, 28, 488-499.
- 12) McColm, A. A. and Trigg, P. I. (1980): The effect of colchicine on the development of *Plasmodium knowlesi in vitro*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 74, 479-483.
- 13) Miller, L. H. (1977): Hypothesis on the mechanisms of erythrocyte invasion by malaria parasite. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 55, 157-162.
- 14) Miller, L. H., Aikawa, M., Johnson, J. G. and Shiroishi, T. (1979): Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes: attachment and junction formation. *J. Exp. Med.*, 149, 172-184.
- 15) 毛利秀雄・小川和男 (1983): 細胞運動とダイニン, *蛋白質・核酸・酵素*, 28, 599-612.
- 16) Pasvol, G. and Wilson, R. J. M. (1982): The interaction of malaria parasites with red blood cells. *Br. Med. Bull.*, 38, 133-140.
- 17) Sinden, R. E. (1978): Cell biology. In *Rodent Malaria*, ed. by R. Killick-Kendrick and W. Peters, Academic Press, London, New York and San Francisco, 85-168.
- 18) 塚本増久 (1981): 実験マラリア最近の進歩と話題—病原体発見100年を記念して—。 *感染・炎症・免疫*, 11, 112-121.
- 19) Wallach, D.F.H. (1979): *Plasma Membranes and Disease*. Academic Press, London, New York and San Francisco, 356p.
- 20) Wernsdorfer, W. H. (1977): The relevance of research to the global antimalaria programme. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 55, 133-135.

Abstract

STUDIES ON MURINE PLASMODIUM
II. EFFECTS OF CYTOSKELETAL
INHIBITORS ON PENETRATION OF *PLASMODIUM BERGHEI*
MEROZOITES INTO ERYTHROCYTES

HISASHI FUJIOKA, FUMIHIKO KAWAMOTO, SAHOKO MIZUNO
AND NOBUO KUMADA

(Department of Medical Zoology, Nagoya University School of
Medicine, Nagoya 466, Japan)

The effects of cytoskeletal inhibitors on penetration of *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948 (NK65) into erythrocytes (RBCs) were investigated using merozoites collected by the metrizoic acid discontinuous density gradient centrifugation method. The results obtained are as follows:

Addition of colchicine (10^{-8} M- 10^{-5} M), vinblastine (10^{-4} M- 10^{-6} M) and vanadate (10^{-3} M- 10^{-5} M) to a mixture of merozoites and RBCs did not affect merozoite invasion into RBCs, whereas the treatment of the mixture with cytochalasin B (CB) greatly reduced the invasion rate of merozoites at the concentrations of 1 μ g/ml and 10 μ g/ml and abolishment of infectivity was observed at 100 μ g/ml. However, pretreatment of either merozoites or RBCs with CB (1 μ g/ml, 10 μ g/ml) did not affect invasion process, and pretreatment of merozoites with CB (100 μ g/ml) for 10 min slightly reduced the invasion rate. Electron microscopic observation of the mixture added with CB (10 μ g/ml) revealed that the merozoites underwent a normal attachment process to form a junction between the apical region of merozoite and RBC's membrane.

From these results, it was apparent that CB blocked the later steps after junction formation in the sequence of merozoite invasion. It is highly probable that CB affects the merozoite invasion into RBC by blocking the movement of the junction, as estimated in *P. knowlesi* by Miller *et al.* (1979) and Aikawa *et al.* (1981). From their data and our results, microfilaments seem to be involved in the process of merozoite invasion into RBCs.