

電子顕微鏡による *Trypanosoma* の形態学的研究

金沢大学医学部微生物学教室(主任：谷教授)

専攻生 渡 慶 次 賀 学

(昭和30年12月13日受附)

Electron-Microscope Studies on Trypanosome

Gagaku Tokeshi

*Department of Microbiology, School of Medicine,
Kanazawa University.*

(Director : Prof. Tomoji Tani)

第1章 緒 言

電子顕微鏡による *Trypanosoma* の形態学的研究は比較的少なく、本邦における福見等(昭, 24)¹⁾、後藤等(昭, 22)²⁾、木村及び堀井(昭, 28)³⁾、朝倉及び小野(昭, 29)⁴⁾等の報告を認めるのみのものである。

Trypanosoma は被膜、原形質、原形質内顆粒、主核、副核或いは Blepharoplast. 鞭毛及び波動膜等の明らかに分化した構造を有する単細胞生物で、各種構成要素の同定が容易である。かか

る微細構造を細胞としての配置において把握するために、或いは一般の鞭毛を有する細菌や線維束を備えているスピロヘータとの対比研究において興味深い問題があると考えられる。そこで著者は電顕試料として余りに massthetic であり過ぎると考えられる *Trypanosoma* に種々の物理化学的処理を施して、電子鏡検及び撮影し、一般外形、微細構造及び原虫体構成要素の localization について検討したので報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

供試原虫は当教室においてマウス及び家兎接種により保存せる *Trypanosoma gambiense* 及び *Trypanosoma evansi* の2株である。

Trypanosoma (以下 T. と略す) の両株の感染マウス血液を生理食塩水にて適当濃度に希釈し、マウス腹腔内に接種し、2~3日経過して原虫の無数に出現するを待つて、1%クエン酸ナトリウム加生理食塩水にて凝固を防止しつつ腋窩動脈を切断採血し、これに生理食塩水を加えて希釈し、分割遠沈によつて赤血球を分離、その上清について次の如く試料を調製した。

1. 生理食塩水により遠沈洗滌を繰返して精製したもの。
2. 上述の精製された料試について、原虫体を electron non dense とし、或いは解体し、又構成要素の

物理化学的処理に対する態度を検討する目的で蒸留水及び低張食塩水(0.6%)、5%塩酸及び硫酸、エーテル(50%)、pH.7.2 緩衝オスミウム酸溶液固定後リボヌクレアーゼ(20mg/cc, 37°C 12時間)及びトリプシン(0.3mg/cc, 37°C 30分)作用等の処理を施したもの。

3. Mirshy & Pollister 法⁵⁾によつて核を集め、その儘又は核の破壊に伴う内容流出の途中の像を得るため蒸留水処理或いに軽い磨潰法を施したもの。

これらの試料はコロジオン膜面に載せ適当に乾燥し、蒸留水で靜かに膜面を洗滌して異物を除去し、低圧にて充分の乾燥、その儘又は Cr shadowing を施して日立製 II-U 9 型電子顕微鏡で、加速電圧 50KV 直接倍率 2000—5000 倍を使用し、鏡検及び撮影した。

第3章 実験成績及び考察

第1節 一般形態

福見等(1947)¹⁾は *T. gambiense* について得られた電顕像のスケッチを示し、次の如く記載している。この微生物の body と波動膜が明瞭に写し出されている。波動膜の境界が甚だ濃く撮影されているのはこの部分の massthick が大きいことを物語ると察せられる。後藤等(1947)²⁾が波動膜以外の運動器官として鞭毛様のものを認めたといつているが、われわれはこれを認めない。*Trypanosoma* の body の内部構造については今のところ電子光学像を得ていないと。木村及び堀井(1953)³⁾は感染マウス血液より分離した *T. gambiense* についてオスミウム酸固定、n-butyl metacrylate monmer に包埋、菲薄切片とし、非切標本及び特殊写真技術を応用研究し、菲薄切片標本の断面より窺えば本原虫は鱗の如く扁平でなく或る程度の厚さを有していると報告し、朝倉及び小野(1954)⁴⁾は本原虫は概して電子透過性がよくないが、蒸留水で処理すると透過性がよくなり細部に亘り構造が認められたと発表している。

生理食塩水による分割遠沈洗滌によつて精製した試料からの *Trypanosoma* の両株は平面形態 (Fig.1, Fig.2) として観察される場合が多く、その名の示すが如き廻転体を推測せしめる構造は認め難い。又一般的に electron dense の body, 波動膜及び円味を帯びている後端より嘴状に狭く尖つている前端に波状形を描いて遊離する鞭毛が確認されるが、原虫体の内部構造は明らかでない。しかし時に変性を思わせる原虫に原形質の内部構造を示すものがあつた。發育或いは分裂の時期的相違によつてか、特に *T. gambiense* の形態は極めて多形的で細長形のもの、短厚形のものが混存して認められた。従つて多形的両 *Trypanosoma* の電顕像には相互に類似するものがある。しかし *T. evansi* は一般的に体幅、波動膜が細長で体型は一群として揃つており、*T. gambiense* は体幅及び波動

膜の幅が比較的大きく短厚形で、又極めて多形的であることから集団として或いは個々の電顕像を注意深く観察すれば区別することが可能である。

この他原虫体周囲に Fig.2, Fig.3 に示したような特異の線維形態を認めることがあつたが、これは所謂鞭毛様物質の膠質溶解過程において見られる一種の状態構造を示すものと判断される。

次に蒸留水処理により原虫体は瞬時にして膨大し Zysta を思ひしめ或いは崩壊を推定させる像が得られた。低張食塩水による低温処理、1%緩衝オスミウム酸溶液固定後の ribonuclease non 処理により原虫体は原形を保つたまま electron dense となり、被膜、主核、Blepharoplast、原形質内顆粒 (ribonuclease 処理の場合は確認し難い) が著明に認められ、一般外形及び各種構成要素の localization を確認することが出来た (Fi.4, Fig.5)。

後述する両 *Trypanosoma* の微細構造についての知見は種々の物理化学的処理を施して得られたものである。

第2節 被膜 (細胞膜)

電顕的に *T. gambiense* における被膜 (細胞膜) の存在は木村及び堀井(1953)³⁾により初めて確認されたようであり、朝倉及び小野(1954)⁴⁾は細胞体の表層には可成り丈夫な被膜があり、このものの基幹をなすものは約 20μ の経を有する細線維で、60-80本が原虫体の前端と後端を両極とし虫体長軸に平行して紡錘状の囊を形成していると述べている。

著者の実験においても被膜は electron non dense の無構造の包体として認められたもの (Fig.2, Fig.4)。小粒子状体又は原虫体長軸の方向に縦走する経約 20μ の細線維の接着により構成されたが如き像 (Fig.6, Fig.7, Fig.8)。或いは網状構造 (Fig.9) を思わせる像があつた。

かかる電顕像の知見は本原虫が一種の膠質系

の被膜を有し、その構成要素が極めて緻密に結合し、一定の状態ではコントラストが得られないが種々の物理化学的条件、発育時期及び破壊様式の差によつて異なつた状態構造を示すものと判断される。

しかし乍らこれらの状態構造は本原虫の被膜が小粒子状体又はその連鎖結合により形成された原虫体長軸の方向に縦走する細線維及び膠着或いは被覆物質を構成原基としていることを暗示しているのではないかと推考される。

第3節 鞭毛及び波動膜

電顕的研究による *Trypanosoma* の鞭毛の記載は後藤等(1947)²⁾に始まり、木村及び堀井(1953)³⁾は鞭毛は縦に配列する数多くの線維から成立つておりなお鞭毛鞘を有している。以上の他なお細菌の場合の如き細小鞭毛を認めたと発表している。朝倉及び小野(1954)⁴⁾は鞭毛は約8本の細線維(経約60 μ)の束状の集まりより出来ていると報告している。

Trypanosoma の両株における鞭毛は極めてよく発達しており、原虫体部に巻き付き或いは周囲に波状形を描いて前端に遊離する巨大鞭毛は常に明瞭に電顕像で確認される。鞭毛は原形質内に存在する Blepharoplast を起始部として発生しており(Fig.4, Fig.5)。その微細構造は両株共に経約50-60 μ の週期的に配列した粒子状体の連鎖結合により構成された縦走する細線維により集成されている(Fig.11)。この細線維の数は両株において相違する如く *T. gambiense* では8本、*T. evansi* では約6本が確認される。又時には鞭毛鞘を推定させる像が得られた。次いで鞭毛が螺旋状に菌体に巻き附いて遊離鞭毛として終る外観や他の原形質成分に比較して抗トリピン性を認めること(Fig.12)はスピロヘータの線維束に類似し、鞭毛を構成する細線維の電顕像におけるコントラスト及び解離の状態(並立的)等は被膜に由来する線維の性格に一致するものがあつた。

Trypanosoma の巨大鞭毛を構成している細線維の数によつて *T. gambiense* 及び *T. evansi*

を鑑別することは不全線維のため困難のようである。又 Fig.6 は Mayer (1912)⁷⁾が鞭毛は二重の Periplastlamelle であり、多少強固に形成されていると記載している光顕的知見を想起せしめる。細小鞭毛様像については前述した。

第4節 副核 (Blepharoplast)

朝倉及び小野(1954)⁴⁾は Blepharoplast を認め、副核は確認出来なかつたと発表しているが、従来 micronucleus, kinetonucleus, Geisselwurzel, Basalkorn, parabasal body 等の名称で呼ばれた副核は谷⁶⁾ Mayer (1912)⁷⁾, Prowazek & Hartmann (1907)⁸⁾, Rosenbach (1906)⁹⁾等は副核或いは Blepharoplast と形容し記載しており、副核と Blepharoplast を別種のものとして区別してないようである。

副核は鞭毛の起始部として原形質内に存在し、electron dense の球状小体或いは楕円形の球状体(Fig.10. B)として確認され、一定恒常の像は得られなかつた。これは分裂及び発育時期の相違によるものであろう。又 ribonuclease 処理に対して抵抗性を有する。副核と Blepharoplast は区別し難い。

上述の如き電顕像における多形性、electron dense の外観、ribonuclease 処理に対する抵抗性等は Blepharoplast の核様の性質を物語るものと思われる。

第5節 主 核

光学顕微鏡による染色標本における知見を顧みるに Mayer (1917)⁷⁾は主核の中央部に核小体があり、これは一部は chromatin から一部は Plastion から成つており、この核小体を Eine achromatische, alveolare structur が囲繞している。この部分に Linin の支柱があり、kernchromatin は Linin の支柱の相合点に存在し、時に桿状に、時には顆粒状体として分布し、その外側を核膜が被包していると記載しており、Doflein & Reichenow (1929)¹⁰⁾は *Trypanosomidae* の主核は泡状核 (bläschenförmiger kern) であり、外側に核膜があり、中央部に大形の一箇の核小体 (Binnenkörper) を包含しており、その周囲を

僅かの微細な Chromatin が分布した Zone が圍繞している。又可成り Chromatin に富んだ核も存在すると述べている。

上述の如き Trypanosoma における核染色質含有の核小体の存在は Prowazek & Hartmann (1907)⁸⁾, Rosenbach (1909)⁹⁾, Schaudinn (1904)¹⁰⁾ 等も記載しており、これを Caryosom と呼んでいる。

従つて Trypanosoma は Caryosom 核を有することが推定され、核の中央に一箇の大形の核小体(核仁)が存在し、これは仁物質(酸嗜好性物質)以外に核染色質を含んでおり、その周囲は蜂巢状構造(Wabenwerk)或いは Eine achromatische, alveolare structur と記載されている Linin の支柱、僅かの Chromatin 及び核液より成る層があり、その外側を核膜が包んでいるであろうと推考される。

電顕的には木村及び堀井(1953)³⁾が核膜及び核仁(核小体)を明瞭に認め、核質は無数の小顆粒で充満すると発表し、朝倉及び小野(1954)⁴⁾は核及び核と関係あると思われる部位に核仁その他の所見が得られたが、分裂の時期により呈する像が異なるようであると述べている。

扱て本原虫を低張食塩水或いは蒸留水又は緩衝オスミウム酸溶液固定後 ribonuclease で処理することにより確認出来る主核は一般に原虫体部の中央に位し、他の細胞構成要素に比し electron dense であり、その微細構造は明らかでない。外形は静止形と考えられている円形から楕円形に至る種々の像が得られ、大きさも一定していないようである。

分離された主核の電顕像 Fig. 13 では可成り電子透過性のよい無構造の外核に圍繞されて中央部に一箇の electron dense の球状体が存在し、その中央部は明るい像を映じている。主核内の球状体の更に大きいものでは外核は稍々 electron dense で狹隘となり、中央部の electron non dense の構造は認められない(Fig. 14)。この球状体(核小体)の中にクロマチン顆粒類似の小体が存在することは Fig. 15, Fig. 16 から、

球状体を包んでいる被膜が多孔性であることは Fig. 16 から推定出来る。又主核には球状体(核小体)を包む被膜及び核本来の外膜の2枚の膜を認める(Fig. 14, Fig. 17)。

核小体を圍繞している外核は光顕的知見によれば Linin の支柱が存在し、微細な Chromatin 顆粒が分布している場合があることが上述の如く記載されているが、未固定の超切片法によらない試料においては核小体に比較して稍々 electron non dense で無構造の像を示している(Fig. 13)。しかし固定した試料においては蜂巢状構造を示すことがあつた。かかる主核内の微細構造の相異は固定液の pH と關聯していることが近年明らかにされている。即ち核は pH. 5.5 附近においては蜂巢状或いは網状構造を示すが pH. 7.0 附近では一様無構造の像として確認されるようである¹¹⁾。従つて本電顕像の外観は比較的正常形態に近い構造を示しているものと思われる。又外核の比較的 electron dense の充実した外観(Fig. 13)及び Fig. 18 に認める electron dense の Linin 類似の紐状体の像が核の崩壊像において得られることはその存在を暗示していると考えられる。外核における Chromatin 顆粒の存在は直視的に確認出来なかつたが、各種染色像及び木村及び堀井(1953)³⁾の知見から明らかである。又核小体の発達に伴い外核は次第にその容積を縮小されていくが如く、時には核の大部分が核小体によつて占められている外観を呈している(Fig. 14)。

かくの如く Trypanosoma の主核は中央部に一箇の大形の核小体が存在し、これは仁物質以外に Chromatin 顆粒様小体が多孔性の被膜に包まれている。核小体を圍繞している外核には Linin の支柱と極めて疎に分布した微細な染色質が分布していることが推定されるが、直視的には確認し難い。その外側には連続した外膜が存在し、原形質との境界をなしている。

第6節 原形質内顆粒

電子顕微鏡による原形質内顆粒については木村及び堀井(1953)³⁾が原形質は無数の小顆粒で

充満し、ミトコンドリアと覚しき円形顆粒を認めたと報告したのを初めとし、朝倉及び小野(1954)⁴⁾は細胞体内部に多数(30-60箇)の円盤状乃至橢円形の顆粒があり、その大きさは200-250 μ ×300-350 μ から100-130 μ ×150-180 μ 程度であると発表している。

Trypanosomaの両株は原形質内に顆粒形成の傾向を有するようで、多くの原虫の原形質内に顆粒が認められる。

原形質内に存在する粗大顆粒はFig.4に示したように経約200-300 μ の正円形Uniformの形態を有し、その位置は一定せず核の前後に認められ、激しく電子線を散乱する。時に境界膜(Fig.10. A)が確認出来る場合がある。この顆粒はNeisser染色により青黒色に鮮明に染色され、5%塩酸及び硫酸10分作用、1N HCl水解、ribonuclease処理により染色性が失われ、電顕的にも確認し難い。

扱て原形質内顆粒は光顕的にSalvin et al (1907)¹¹⁾が鉄ヘマトキシリン染色により確認す

ることが出来なかつたと報告し、Swelengrebel (1908)¹⁴⁾が詳細な研究によつてTrypanosomaの原形質内粗大顆粒のすべてがGuillermonds & mayerのボルチン反応を与えたと記載している。

著者の実験結果も従来記載されているVolutin顆粒の性質¹²⁾に類似している。

しかし近年電子顕微鏡及び位相差顕微鏡で見ることが出来、境界膜を持ち、酸化還元酵素系の整つた組織をもっているような細胞質内顆粒をミトコンドリアと考える傾向にあるようである¹³⁾。

著者の電顕的知見としての激しい電子線の散乱及び境界膜の存在、特有の大きさはMudd et al (1951)^{14) 15)}のmycobacterium及び種々の細菌のミトコンドリアの知見と共通するものがあるが、現在原虫のミトコンドリアについては検討さるべき多くの問題を残しており、形態学的に検索の規準を求めるには更に今後の発展に待たなければならないと考えられる。

第3章 要

感染マウス血液から分割遠沈及び生理食塩水による遠沈洗滌により精製したT. gambiense及びT. evansiについて、その儘又は種々の物理化学的処理を施し、電子鏡検及び撮影し、次の所見を得た。

1. Trypanosomaの電顕像は一般的に平面形態を示す場合が多く、立体的廻転体としては認め難い。両Trypanosomaは一般形態的に多形性の程度、原虫体及び波動膜の幅の広狭によつて区別することが出来る。

2. Trypanosomaの原虫体は一様に濃映され微細構造は明らかでないが、種々の処理によつて被膜、主核、Blepharoplast、巨大鞭毛及び原形質内顆粒が確認される。

3. 被膜は繊細な粒子状態(幅約20 μ)が長軸の方向に連鎖結合して形成された細線維と膠着或いは被覆物質により構成されているよう

約

る。

4. 鞭毛は両株共に原形質内のBlepharoplastから発生し、T. gambienseにおいては約8本、T. evansiでは約6本の細線維により構成されており、時に鞭毛鞘を有する像が得られる。

5. 主核の微細構造として核膜、Linin及び疎に分布したChromatin顆粒の存在が推定される外核、多孔性の被膜に包まれたChromatin顆粒様粒子状体を包含している核小体が確認される。

6. 原形質内にVolutin顆粒と推定される正円形顆粒が認められる。

稿を終えるに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りし恩師谷教授に謹みて謝意を捧げ、電顕撮影に助力の労をとられた野田・西村の両氏に感謝致します。

文 献

1) 福見・鈴木等：日新医学，36：410，(昭. 22). 2) 後藤・富樫等：超電子顕微鏡講演要旨，p. 87. (昭. 22). 3) 木村・堀井：日本細菌学雑誌，8:566—567，(昭. 28). 4) 朝倉・小野：日本細菌学雑誌，6：638，(昭. 29). 5) **Mirsky and Pollister**：Cited from *Electron microscopy*, p. 338 (1951), by k. Sasagawa. 6) 谷友次：医学微生物学(大改訂4版)，頁237—243，南山堂，東京，(昭. 29). 7) **M. Mayer**：Zitiert nach “Prowazek Handbuch der Pathogenen Protozoen, Erster Band：249—323，(1912). 8) **Hartmann, M. u. V. Prowazek, S**：Arch. f. Protistenk. X：306—333，(1907). 9) **Rosenbach, F.**：Arch. f. Protistenk, XV：261—293，(1909). 10) **Schaudinn, F.**：Arbeiten aus dem kaiser Gesundheitsamte. XX：378—429，(1904). 11) a) **Salvinetal**：Ann. of trop. med. and Parasitol. 1：p. 441，

(1907). b) **Swellengrabel**：C. r. soc. biol. 64, 38, (1908) zitiert nach “Prowazek Handbuch der pathogenen” Erster Band.：353—354，(1912). 12) **Jordan, E. O. and Folk, I. S.**：The newer knowledge of Bacteriology and Immunology capter II. p. 16. (1928). 13) 医学のあゆみ，20：71—81，(昭. 30). 14) **Mudd, S., Wintersheid, L. C., De La-meter, E. D & Henderson, H. J.**：J. Bact. 62：459—475，(1951). 15) **Mudd, S., Brodie, A. F., Wintersheid, L. C., Hartmann, P. E., Beutner, E. H. & Mc lean, R. A.**：J. Bact., 62：729—759，(1951). 16) **Doflein & Reichenow**：Lehrbuch der Protozoenkunde, Fünft Auflage, 14—528，(1929). 17) 電子顕微鏡学会関東支部編：電子顕微鏡のための超薄切片技術，11頁，東京，本田書店，(昭. 28).

附 図 説 明

Fig. 1. *T. gambiense*, 7000X, Unshadowing 像. electron dense の body, 鞭毛, 波動膜を認める.
 Fig. 2. *T. gambiense*, 4500X, 緩衝オスミウム酸固定, Cr-shadowing 像. 一様無構造の被膜, 鞭毛及び細小鞭毛様像を認めるが原形質の内部構造は明らかでない.
 Fig. 3. *T. ambiense*, 6000X, Cr-shadowing 像. 所謂鞭毛様像を認む.
 Fig. 4. *T. gambiense*, 9000X, 低張食塩水処理後緩衝オスミウム酸固定, Cr-shadowing 像. 被膜, Blepharoplast, 鞭毛, 原形質内顆粒が確認される.
 Fig. 5. *T. gambiense*, 9000X, 緩衝オスミウム酸固定後 ribonuclease 処理, Cr-shadowing 像. 原形質は不定な微細顆粒状を示しているが原形質内の正円形顆粒は確認されない.
 Fig. 6. *T. evansi* 15000X, 21000X, 低張食塩水処理, Cr-shadowing 像. 被膜と鞭毛の線維形態は極めて類似している.

Fig. 7. *T. evansi*, 8000X, 21000X. 緩衝オスミウム酸固定後蒸溜水処理, Cr-shadowing 像. 被膜は小粒子状態の接着により形成されている.
 Fig. 8. *T. gambiense*, 15000X, 緩衝オスミウム酸固定後蒸溜水処理, Cr-shadowing 像. 被膜は繊細な線維が基本構成要素をなしている.
 Fig. 9. *T. gambiense*, 25000X, 蒸溜水処理, 中性ホルマリン固定, Cr-shadowing 像. 被膜は小粒子状態の接着により形成されており, 一部は網状構造を示している.
 Fig. 10. *T. gambiense*, 17000X, 蒸溜水処理, Cr-shadowing 像. Blepharoplast(B), 境界膜を持つている原形質内顆粒(A)を示す.
 Fig. 11. *T. evansi* 14000X, 蒸溜水処理, 鞭毛は経約 50m μ の小粒子状態の連鎖結合よりなる凡そ6本の細線維より形成されている.
 Fig. 12. *T. gambiense*, 7000X, Trypsin 処理, Cr-shadowing 像. 主核及び鞭毛は抗トリプシ

ン性を認める。

Fig. 13. T. gambiense, 20000X, Cr-shadowing 像, 主核は稍々 electron non dense の外核に囲繞されて中央部に1個の大形の electron dense の球状体が存在し, 内部は electron non dense である。

Fig. 14. T. gambiense, 20000X, Cr-shadowing 像. 主核内の球状体内部の electron non dense の構造は確認されない。

Fig. 15. T. gambiense, 20000X, Cr-shadowing 像. 主核内の球状体の内部には electron

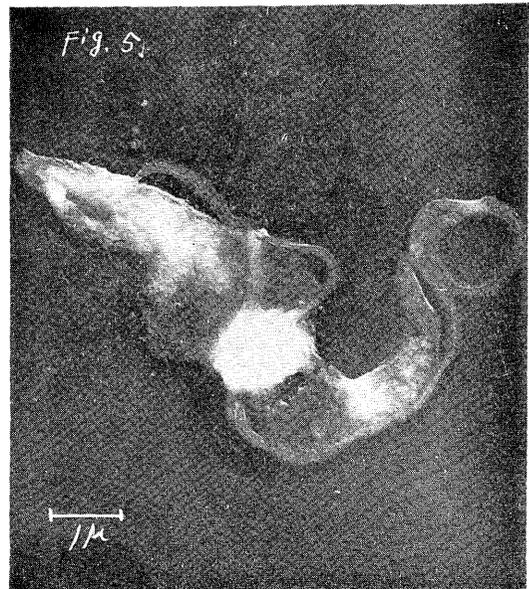
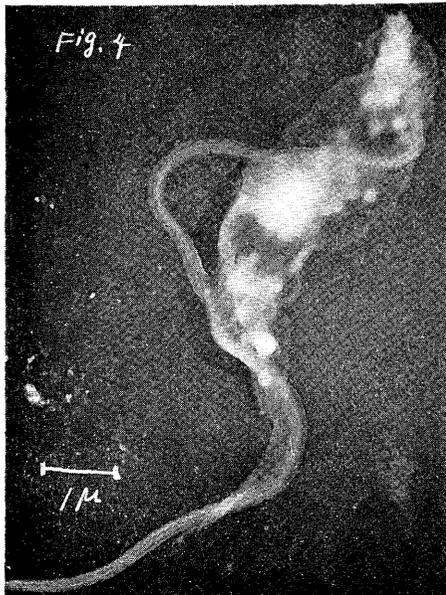
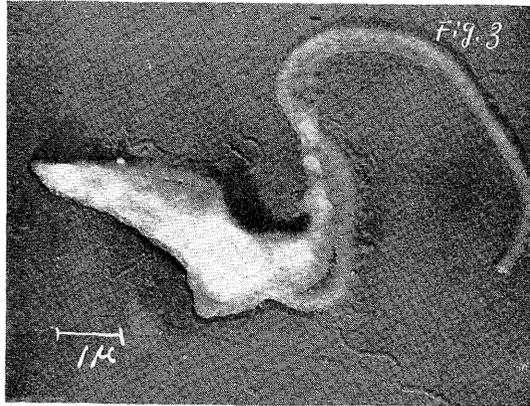
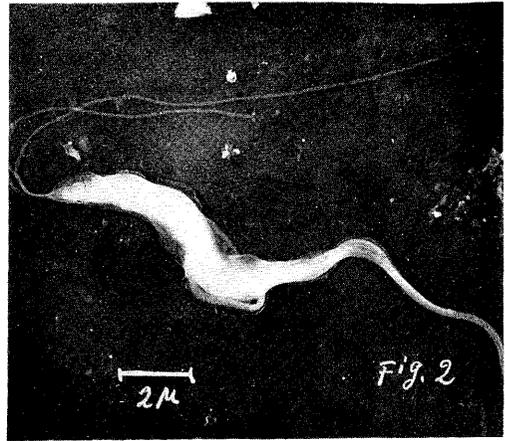
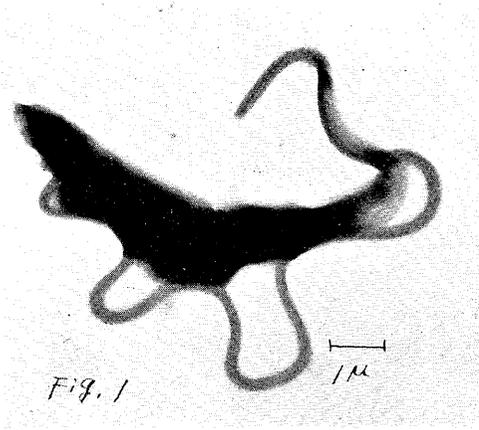
dense の小粒子状体が存在し, 一部は流出している。

Fig. 16. T. gambiense, 40000X Cr-shadowing 像. 主核内の球状態の被膜は多孔性である。

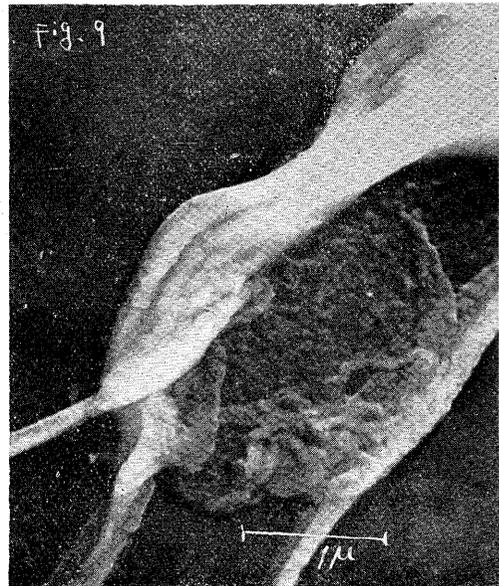
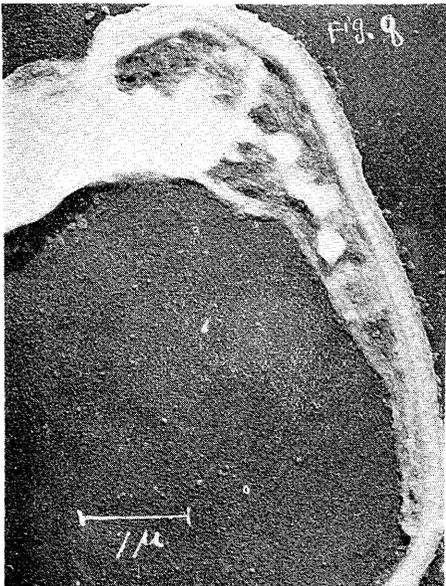
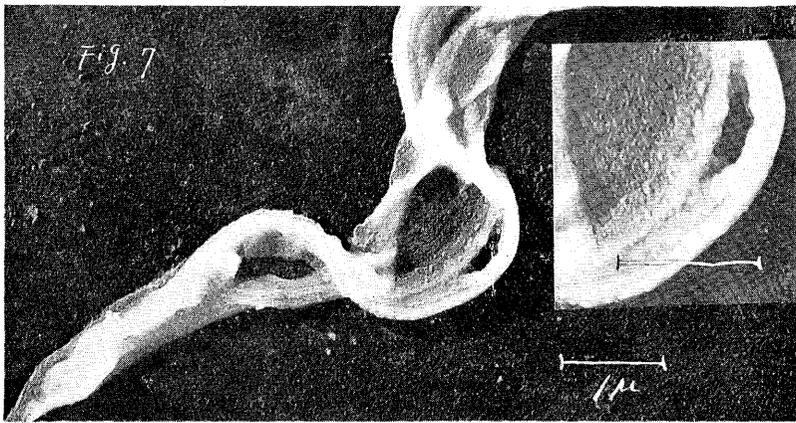
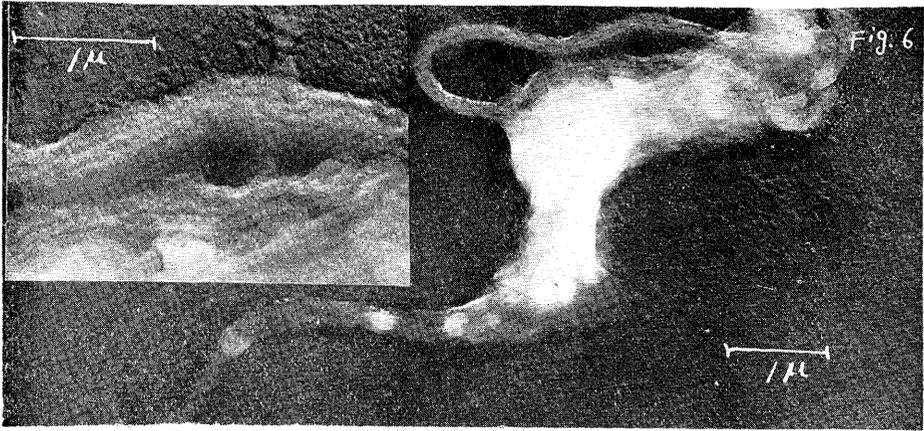
Fig. 17. T. gambiense, 30000X, Cr-shadowing 像. 核本来の被膜, 球状体の被膜の2板の膜を認める。

Fig. 18. T. gambiense, 40000, Cr-shadowing 像. 主核内の外核より流出したと思われる electron non dense の紐状体を認める。

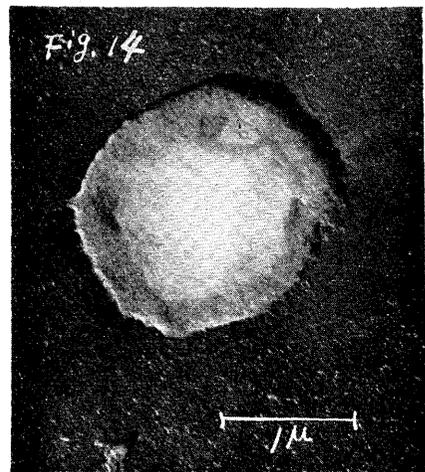
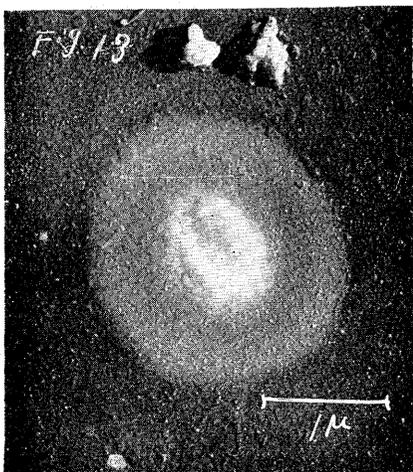
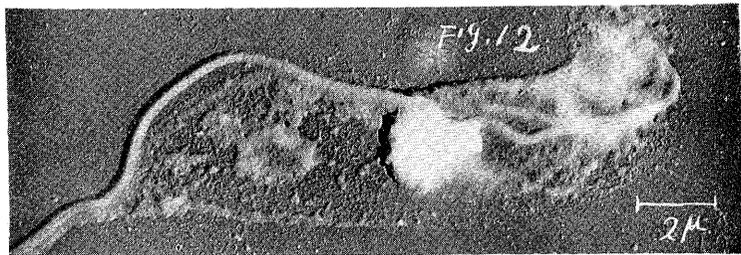
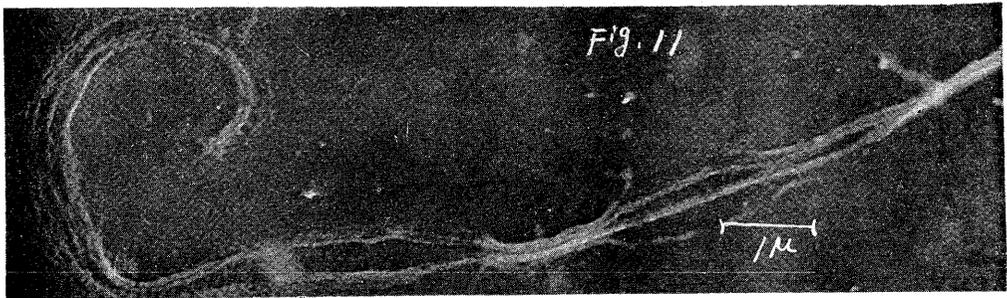
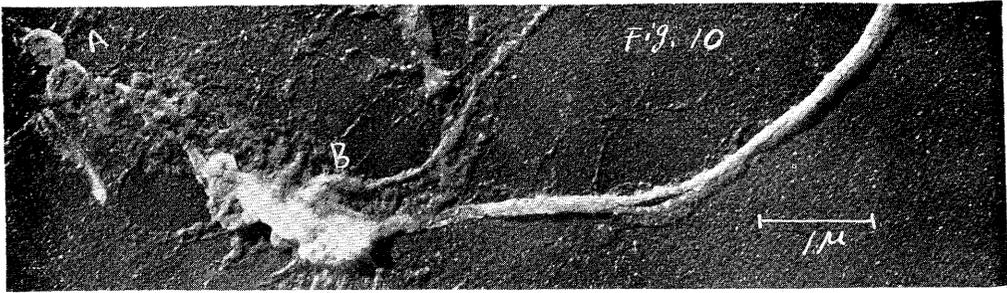
渡慶次論文附圖(1)



渡慶次論文附圖(2)



渡慶次論文附圖(3)



渡慶次論文附圖(4)

