

Title	Trypanosoma gambienseの薬剤耐性形質転換におよぼす発癌性物質の効果
Author(s)	小野, 忠相
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29137
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【 4 】

氏名・(本籍)	小 野 忠 相 お の ただ すけ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 999 号
学位授与の日付	昭 和 41 年 7 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	Trypanosoma gambiense の薬剤耐性形質転換におよぼす発癌性物質の効果
論文審査委員	(主査) 教 授 猪 木 正 三 (副査) 教 授 藤 野 恒 三 郎 教 授 奥 野 良 臣

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

1953年以来、猪木らは *Trypanosoma gambiense* の AK 型 (細胞質内自家増殖性顆粒の kinetoplast を欠陥した原虫、即ち akinetoplastic 型原虫) に関する遺伝学的研究を行なっているが、1960年にはこの原虫の *p*-rosaniline 耐性に関する形質転換を発表した。これは原虫における形質転換の最初の報告であるが、更にこの形質転換が各種の抗腫瘍性物質によって阻害されることを見出した。そこで発癌性物質によってもこの形質転換が阻害されるかどうかを検討する目的で DAB および MAB の発癌性誘導体と非発癌性誘導体16種類を用い、実験を行なった。その結果、発癌性誘導体は形質転換を阻害するが、非発癌性誘導体は阻害しないという成績が得られた。しかし、形質転換の阻害あるいは非阻害は発癌性誘導体と非発癌性誘導体の生物学的活性の量的な違いによって起こるのか、あるいは質的な違いによって起こるのかということが問題となる。そこで、発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用を更に詳しく解析するため、1, 2の実験を行なった。

〔方法ならびに成績〕

この実験には感染マウス体内の原虫の *p*-rosaniline 耐性を測定する方法として猪木らの所謂 AK 型誘発試験を用いた。即ち、感性株(原株)に感染したマウスに *p*-rosaniline 10 mg/Kg マウス体重量を注射すると4時間後には AK 型原虫が約21%出現するが、*p*-rosaniline 85 mg/Kg 耐性株(以下、耐性株と略)に感染したマウスでは同量を注射しても約4%の AK 型原虫が出現するに過ぎない。従って AK 型原虫の誘発により原虫の薬剤耐性度が測定される。形質転換の実験には Donor として *p*-rosaniline 耐性株の原虫を用いたが、まず耐性株の原虫に感染したマウスから Citrate-glucose-saline 中に全血を取り、遠心沈澱により可及的純粋に原虫を集め、 10^5 個/mm³ の原虫懸濁液を作り、ついで acetone, dry-ice による凍結融解を10回繰返してその中に含まれる原虫を完全に融解した。実験はこの原虫

lysate 1 ml, 10^3 個/mm³ の感性株原虫を含む原虫懸濁液 1 ml および 500 γ ~1,000 γ /ml の供試物質 0.5 ml の 3 者を in vitro で 15 分間混合する方法によって行なった。15 分後、その一部を健常マウスに接種し、約 3 日後、末梢血中に原虫が中等度に出現した時、上記の AK 型誘発試験を行なって AK 型原虫の出現率を調べ、原虫の *p*-rosaniline 耐性を測定した。この場合、感性株原虫が形質転換を受け、耐性化しておれば本来の AK 型原虫出現率 ($21.47 \pm 2.06\%$) よりも低い値 ($12.10 \pm 1.06\%$) が出るが、もし供試物質が形質転換を阻害すれば、このような低い値は出ないわけである。

その結果、発癌性誘導体 11 種類は形質転換を完全に阻害し、それに対して非発癌性誘導体 5 種類は形質転換を阻害しないことがわかった。そこで、形質転換が発癌性誘導体によって阻害される機作を調べると共に発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用の相違を更に詳しく解析する目的で次の実験を行なった。実験は 1 γ /ml から始め、マウス継代毎に 5 γ /ml の間隔で最高 180 γ /ml まで漸次高濃度の発癌性誘導体 (3'-CL-DAB, 4'-OCH₃-MAB) あるいは非発癌性誘導体 (3'-Br-DAB, 3'-CF₃-DAB) を感性株原虫に in vitro で接触させ、それぞれの薬剤処理株を作り、それらを Recipient にして *p*-rosaniline 耐性の形質転換が起こるかどうかを観察した。その結果、非発癌性誘導体を接触せしめて作った原虫株を Recipient にすると形質転換が起こるが、発癌性誘導体に接触せしめて作った原虫株を Recipient にすると形質転換が起こらないことがわかった。この場合、形質転換は感性株原虫に発癌性誘導体を接触せしめてから 4 ケ月 (マウス継代 40 代) 以上もたってから試みており、形質転換に際しては発癌性誘導体を使っていない。それにもかかわらず形質転換が起こらなくなっているのである。この成績は発癌性誘導体は形質転換を阻害するが、非発癌性誘導体は阻害しないという上記の知見を裏付けると共に形質転換の阻害あるいは非阻害は発癌性誘導体と非発癌性誘導体の生物学的活性の量的な差異によるのではなく、質的な差異によるのではないかということを示唆し、また、発癌性誘導体による形質転換の阻害にはこの誘導体によって Recipient 原虫に起こされる遺伝性の変化が関与しているのではないかということ推定させる。

次に、発癌性誘導体に接触せしめて作った原虫株を Recipient にした時は形質転換が起こらなかった所から、あらかじめ発癌性誘導体で処理された原虫は *p*-rosaniline に対して耐性を獲得する能力が失われているのではないかと考え、その点を検討する目的で次の実験を行なった。即ち、末梢血中に原虫が認められる感染マウスの腹腔内に *p*-rosaniline 1 mg/Kg を注射し、1 時間後、そのマウスの末梢血からとった原虫を別の健常マウスに接種する。3 日後、接種マウスの末梢血に原虫が出現した時、前回より多量、即ち、5 mg/Kg の *p*-rosaniline を腹腔内に注射する。以下、同様の操作によってマウス継代毎に 5 mg/Kg ずつ増量し、最高 85 mg/Kg の *p*-rosaniline を注射した。これは形質転換の実験に Donor として用いる耐性株を作る時に用いた方法であって、感性株をこの方法で処理すれば通常、形質転換によるよりも強い耐性株が得られる。しかし、実験の結果、発癌性誘導体と非発癌性誘導体のいずれで処理して作った原虫においても *p*-rosaniline 耐性株を得ることが出来なかった。

〔総括〕

DAB および MAB とその誘導体の示す発癌性の有無と *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 耐性の形質転換に対する阻害作用の有無との間に関係が認められた。この知見は Inoki et al (1960) の抗腫瘍性物質による実験と共に原虫の遺伝現象を利用して物質の抗腫瘍性および発癌性を窺知する一つ

の新しい方法を示唆するものと思われる。次に発癌性誘導体と非発癌性誘導体の作用の相違を詳しく調べるために実験を行ない、その結果、発癌性誘導体による形質転換の阻害にはこの誘導体によって Recipient 原虫に起こされる遺伝性の変化が関与していると思われる成績が得られ、また発癌性誘導体と非発癌性誘導体はその作用において全く異なった点と共に互いに共通した点ももつのではないかと推定される知見が得られた。

論文の審査結果の要旨

猪木ら (1960) は、*Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 耐性株から作った lysate を用いることにより *p*-rosaniline 耐性が形質転換されることを実証した。これは原虫に形質転換を認めた最初の報告であり、更にこれが各種の抗腫瘍性物質によって阻害されることも明らかにされた。

そこで著者は発癌性物質によってこの形質転換が阻害されるかどうかを検討する目的で実験を行った。使用した発癌性物質は DAB (4-Dimethyl amino azobenzene), MAB (4-Methyl amino azobenzene) とそれらの発癌性誘導体、計11種類と非発癌性誘導体5種類である。

これらは核置換基のわずかな違いで発癌性を示したり、示さなかったりするところから、形質転換阻害作用と発癌性物質の作用との関連を調べるには絶好の材料と著者は考えた。

実験の結果、DAB, MAB とそれらの誘導体の示す発癌性の有無と *Trypanosoma gambiense* の *p*-rosaniline 耐性の形質転換に対する阻害作用の有無とが全く一致することが認められた。この成績は猪木らの抗腫瘍性物質による実験と共に、原虫の形質転換を利用して物質の抗腫瘍性および発癌性を知る一つの新しい方法の可能性を示すものではないかと考えられ、重要な知見である。

次に、発癌性誘導体であらかじめ処理した原虫株を recipient にし、*p*-rosaniline 耐性株を donor にすると、形質転換をおこさせるとき、阻害物質を用いなくても形質転換が起こらないことを認めた。この場合、対照として非発癌性誘導体で処理した原虫を recipient にした実験では、形質転換が起こった。この成績は、発癌性誘導体は形質転換を阻害するが非発癌性誘導体はそれを阻害しないという上記の実験成績と一致しており、発癌性誘導体による形質転換の阻害には、この物質によって recipient に起こされる遺伝性の変化が関与していると著者は考えている。

次に、発癌性誘導体で処理した原虫のみならず、非発癌性誘導体で処理した原虫も、マウス体内で *p*-rosaniline と接触させる方法では *p*-rosaniline 耐性株にならないことが証明出来た。即ち、DAB, MAB の発癌性誘導体と非発癌性誘導体はその作用において全く異なった点と共に互いに共通した点もまた持つのではないかと考えられる知見が得られたわけである。

以上、この研究は *Trypanosoma gambiense* の形質転換におよぼす発癌性物質の効果を調べ、病原性原虫の遺伝学領域に新知見を加えたものとして価値あるものと認められる。