琉球大学学術リポジトリ

[原著]フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究(FN-4)：仔虫自家蛍光顆粒の本態に関する研究(B)

メタデータ	言語: Japanese
	出版者: 琉球大学医学部
	公開日: 2014-07-18
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 真喜志, 金造, Makaishi, Kinzo
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016369

琉大保医誌 4 (3)：219～237，1981.

フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究（FN－4）

― 仔虫自家螢光顆粒の本態に関する研究(B)―

琉球大学医学部第一内科学教室
（主任：小張一峰教授）
（指導：桝屋富一　前琉球大学保健学部附属病院第一内科教授）
真喜志　金　造

緒　　言

Sir Patrick Manson[1]（1879）が始めて記載した*Mf. bancrofti* の夜間定期出現性の機序に関しては内外多数の学者による数々の観察と考察がある．その概要については，共同研究者桝屋[2]与那嶺[3]および渡久地[4]が記述しているので本稿では重複を避けたい．桝屋（1970）は多少とも夜間出現性を示す*Mf. bancrofti, Mf. patei, Mf. immitis*の虫体には無数ないし少数の自家螢光顆粒をみとめ，非周期性の*Litomosoides carinii*仔虫（その後昼間出現性の*Mf. loa*）にはなんら螢光をもみとめず，Washington DCでの第２回国際寄生虫学会（1970）において螢光顕微鏡映画を供覧して光力学物質説を提唱し[5]，以後世界各地の学者の協力を得てヒトおよび各種動物の*Mf.* 13種21株を検索し，末梢血中仔虫数の夜昼比と仔虫自家螢光顆粒の密度との間に近似的平行関係の存在を指摘して，上記作業仮説の妥当性を主張した．[2]（1976）．

与那嶺[3]は桝屋と共に*Mf. immitis*のin vitro negative phototaxis を証明し，渡久地[2]は桝屋と共に*Mf. immitis*の顕微螢光分析を行ない，本顆粒が365，410nm 双方の励起によってauthenticのVA palmitate と同様の螢光発赤を示すこと，またその日光忌避がCharles Darwin（1881）によって記述されているミミズ頭部表皮およびカエル，マウスの網膜杆体体節にも同様の螢光顆粒の存在することを報告した．特に渡久地，桝屋[2]はKupffer 鍍金法和気氏変法[6]を用いて*Mf. immitis*にVA 反応陽性顆粒を検出した．さらに紫外線照射によって本反応が陰転するという困難を克服して，仔虫の自家螢光に一致してVA 陽性反応が残存することを証明した．ミミズ表皮，マウス網膜の螢光顆粒にも陽性反応を検出した．

以上の観察は夜間出現性仔虫およびミミズ頭部表皮の自家螢光顆粒が網膜のRhodopsin と近縁の物質である可能性を強く示唆している．

著者は桝屋が琉球大学在職中（1973～1979年）より本問題の研究に着手したが研究機材の欠乏により徒らに時日のみ経過し新知見を得ることが出来なかったが，徳島大学医学部解剖学山田正興教授，同総合研究室庄野正行技官，および同大学薬学部山下伸典助教授のご指導および同大学のUMSP-Ⅰ Zeiss,JASCO R-800 等の使用を許可され，２，３の知見を加えることが出来たので報告する．

研　究　材　料

1．*Mf. bancrofti*：1972秋以後、共同研究者と共に沖縄本島，離島各地の住民を深夜までのご協力を得て本仔虫の発見に努力したが本研究の使用に耐える材料を遂に入手することが出来なかった．幸いにして桝屋と親交あるSri Lanka, Clomboの医学研究所寄生虫部長Dr. M. M. Ismail のご協力により前後３回にわたり同地の*Mf. bancrofti* 含有の夜間採血，薄層塗抹―Matsunami 社螢光顕微鏡用スライドグラス―空気乾燥 methanol 固定標本を入手し得た．

本実験には自家螢光顆粒の特に多い仔虫を選

んで用い，無顆粒の仔虫は対比とすることにとどめた．

2．*Mf. immitis*：沖縄の犬の本虫寄生は極めて低率（1％）であるので福岡市武石徳五郎獣医師のご協力により福岡の飼犬より採血し，一部徳島市の犬より採血したものを用いた．

3．ミミズ：沖縄産の未固定のミミズの頭部の凍結切片を用いた．

4．網膜：マウス（*Mus sp.*）の眼球の凍結切片を用いた．

研究方法

1．Photon 計測．螢光発光は励起光によって励起された分子が基底状態（分子内運動エネルギー最低の状態）に戻るに際してPhoton（光子）が放出されて起る．桝屋[2]は先に顕微螢光分析で螢光顆粒の最も多い*Mf. bancrofti*, より少ない*Mf. immitis*および顆粒の全くない*Mf. loa loa* について相対螢光々度を比較測定し，顆粒数の多いもの程相対螢光々度は大きく，かつ各種間の差は推計学的に有意であることを報告した．著者はたまたまSri Lanka の*Mf. bancrofti* 無顆粒の*Litomosoides carinii* 仔虫等の螢光分析を行なった際，比較として用いた徳島（昼間採血）*Mf. immitis*と福岡で夜間採血した材料とでは螢光々度が異なることに気づき，同一犬で昼夜の採血標本についてphoton放出数に相異があるか否かを観察した．

山田正興教授[7]と庄野正行技官[8]は核酸を螢光染色した細胞螢光のphoton計測を行なう為にphoton counterを組立てている．Nikon 落射型螢光顕微鏡，Osram 50Watt の高圧水銀灯，光電子増倍管（Hamamatsu R649，－20℃冷却）およびdigital computorより成る．

*Mf. immitis*含有血液薄層塗抹空気乾燥methanol固定標本を無螢光glycerin で封じTungsten灯照明下に10μの spot に虫体を捕え，400nm 附近の励起光に切り換えcut filter 515 nm を用い，Gain20で5秒間のphoton発生をdigital computorで読み取った．

照射の影響を可及的0とする為1虫体につき離れた2点のみを計測し，かつ虫体のsegmentのうち赤，白血球と可及的離れているものを選択的に計測したので夜間採血標本では30匹60点を計測し得たが昼間採血標本では29匹58点を計測し得るにとどまった．

2．Laser-Raman 分光分析

インドの有名な物理学者C. V Raman (1928) は物質にmonochromの光を照射した場合，照射光波長のほかに異なる波長の光を散乱すること，その散乱光の波長は物質内分子の振動回転等によって異なることを発見した．このRaman効果は当然化学分析に応用されて来たが，特に光源としてLaser の強力な単色光を用いることによって本分析法は飛躍的な進歩を遂げるにいたった．

著者は徳島大学薬学部山下伸典助教授のご指導により同学部設置の日本分光社製JASCO R-800を用いてArgon ion Laser488Åを照射，スペクトルバンド幅5 cm^{-1}，計測時間0.2秒，λ-Expansion（cm^{-1}/div）5 を用い，顕微鏡標本の場合は反覆32回，集中凍結してガラス毛細管に入れた場合は反覆8回で本分析を行なった．

3．顕微螢光分析

本研究は*Mf. bancrofti* 入手に先立ち*Mf. immitis*のUMSP-1 Zeissによる顕微吸収スペクトルの描記に成功せず，桝屋，渡久地らの行なったFMSP-Nikon SUR-F typeより詳細な観察を行なう為，UMSP-1 Zeiss に附置した螢光記録装置（Farrand Optical CO. UVIS）を用いた．

検体（*Mf. immitis*, 後には*Mf. bancrofti*, ミミズ頭部表皮，マウス網膜杆体外節の螢光顆粒部）をまず落射型螢光顕微鏡下にスケッチし，（特にミミズでは表皮黄金色螢光の内側にポルフィリンの強い赤色螢光があり，また網膜の場合は色素上皮と多くの場合離断して離れてはいるが，結合繊維の強い黄緑色螢光部があるのでこれらを除外せねばならぬので）さらにTungsten 灯照明下に螢光顆粒部を詳細にスケッチし，UMSP-1 Zeiss の視野8μのspot の中心点に計測部の中心部を捕えた．

grating monochromator より取り出したmonochrom波長（以下に記す理由で365nm励起に

よらざるを得なかった）で励起Farrand Fluorescence recorderにて顕微螢光スペクトルを描記した．

実験方法の詳細は本装置の試作者，徳島大学庄野正行，顕微螢光測光測装置の試作とその応用：徳島県臨床衛生検査技師会会誌[8]の記載にゆずるが，特に螢光スペクトルをrecorder上に連続的に記録するには螢光を捕促するmonochromator の波長送りとrecorder送りとを同期させる為に，螢光波長送り回転軸にpotentiometerを取り付け波長送りに比例した電圧を与える様にしている。これをX-Y recorder のX軸に，検知管よりの出力をY軸に接続することにより，この目的を達する様に組立てられている．この連動記録装置を加えることにより測定能率を大幅に向上せしめるのみならず，詳細かつ正確な顕微螢光スペクトルが記録出来る様になったのである．

理論的には物質の螢光の励起スペクトルはその吸収スペクトルと（機器上の誤差は別として）同一とされており，本実験においても*Mf. bancrofti* ミミズ頭部表皮螢光部のλmaxがおおよそ406－412nm（後述の如く）附近に見られたので400－410nm 附近で励起するのが望ましい．桝屋の初期の実験（1970～76）でFMSP(Nikon SUR-F type)を用いた場合，*Mf. immitis, Mf. bancrofti* 共に365，410 nm 双方の励起で螢光を発し，flavin 体は365nm励起でのみ発光するに反し，VA palmitate は双方の波長励起で発光したことは未だ*Mf.* の自家螢光物質のλmaxを求め得ていない時期の観察であったが誠に興味深いことである。唯UMSP-1 Zeiss に附置したFarrand Fluorescence記録装置で励起する際，種々のfilterを併用したがエネルギーが強すぎたりして410nm，またRhodopsinの入max500nm附近で励起することが円滑に出来なかったので止むなく365nm励起を主として観察した．

桝屋[2]も指摘している通り夜間出現性のMf.の自家螢光顆粒の螢光色調は同一波長励起でもbarrier filter の特性によってblue white (Tiyoda No 2), yellow green (Tiyoda No 3) またはgold brown(Tiyoda No 4)と変化する．桝屋，渡久地は[4] UMSP 1-Farrand 螢光装置でbarrier filter Y52 を用いていたが，より短波長域の螢光を逸する恐れがあるのでY42を用いた。本実験の目的はあくまで3者の螢光物質の比較観察にあるからである．

又従来のRhodopsin 関連物質の螢光に関する報告(Guzzo and Pool, 1969)[9] では pH の影響に関しての記載はないが，ウシやイカのMetarhodopsin →N-Retinylidene opsin のλmaxが酸性，アルカリ性で変化することが知られているので，後述の如くλmaxのpHによる変化を追求する場合に用いたbuffer 液で封じてpHによる螢光スペクトルの変化の有無をも観察した．

4．顕微分光分析(UMSP)

物質の螢光分析に当ってはF maxを求めると共に励起スペクトルを記録してE maxを求めることが常道である．著者も Nikon SPMRFL systemを用いて*Mf. immitis, Mf. bancrofti*の励起スペクトルの記録を試みたが著者の材料の螢光が弱いこともあり，また装置も自家螢光用でなく螢光染色標本の測定用である為かついに成功しなかった．

前述の如く理論的には励起スペクトルはその物質の吸収スペクトルに一致するとされている．よって徳島大学医学部総合研究室形態班設置のUniversal Microspectrophotometer（UMSP-1 Zeiss）を用いて*Mf. bancrofti*(Sri Lanka)ミミズ頭部表皮，マウス網膜色素上皮の自家螢光顆粒部の顕微吸収スペクトルを描記した．

先に桝屋，渡久地[4]は*Mf. immitis*を用いて顕微吸収スペクトルの描記に努力したが，遂に成功せず止むなく顕微螢光スペクトルを観察するにとどまった．

Sri Lanka よりの*Mf. bancrofti* の螢光顆粒の特に多い虫体を螢光顕微鏡下に選び，かつHb，白血球（特に好酸球の顆粒は強い螢光を発する）の影響を避ける為にTungsten灯照明下に赤，白血球と可及的離れた仔虫のsegment をスケッチしておき、螢光顆粒の多いsegment と螢光顆粒をほとんどみとめないsegment とを区別して各部の顕微吸収スペクトルを描記した．また螢光顆粒のほとんど全くみとめられない別の虫体を

も比較の為に観察した．

ミミズ頭部の凍結切片では表皮の螢光には比較的弱く多少ともビマン性に見える部分と，所々に強い顕微鏡的小塊として見える部がありこの部にKupffer 鍍金反応によるV.Aの黒色顆粒が特に強く見られたので，この部が Hesse (1896)[10] が記載したLicht Zellen（光覚細胞）に相当するものと考えられたので螢光顕微鏡下にこの部をスケッチして置き，UMSP の計測spotの中心点をこの部の中心に捕える様にした．

網膜の凍結切片では，杆体外節部に線状にRhodopsin（実は露光と室温の影響によりそのbleached intermediatesの何れかになっているはず）の螢光顆粒が配列する好適な標本を選び，外側結合織の強い黄緑螢光部との位置関係を正しくスケッチしておき計測spotの中心に目的部を捕える様にした．

UMSP-Zeiss の仕様書に従い，対物レンズ100/1.25投影レンズ10：1を用いて照明spot20μ,計測spot10μ にした場合と，投影レンズ100：1を用いて照明spot 8.0μ, 計測spot1.0μの2方法を用いた．何れの場合も緑色filter，波長域340～600nm，または350～600nm，計測速度②②，感度①または②damp(nois euffing)③，光源Xenon Lamp 24Amp.を用いた．

native の検体を無螢光 glycerin で封じて観察するほかpHによるλmax の変化を見る為にpH 5.7のphthalate buffer, 7.7の phosphate buffer および8.6のborate buffer を用意し，上記の如くTungsten灯および励起光照明下に計測好適部を探し，これを中心に各buffer 液を滴下し無螢光cover glass にておおい，無螢光glycerin immersionの下に顕微吸収スペクトルを描記した．

実 験 成 績

1. Photon計測 Table1.; 同一犬より夜22：00に採血した標本では30匹，60ヶ所の計測で（background は毎回読んで差引いた）平均655.47±212.75に対し昼間11.00採血したものでは29匹，58ヶ所平均462.77± 125.29を示し，t-test p=0.01で夜昼の平均値の差は有意であった。推計学的計算は福岡市中村学園大学津田信夫教授のご指導により同教授室のcomputorを用いて行なわれた．

Table 1. PHOTON COUNTING(Tokushima University)UV Ex. 515nm Cut filter, Gain 20, Time 5 sec.

Mf. immitis	No.	Mean ±SD
Night specimen at 22：00	60	655.47± 212.75
Day specimen at 11：00	58	462.77± 125.29

t-test significant p=0.01

2. Laser-Raman 分光分析

Fig. 1.; *Mf. immitis* 含有血液を溶血，遠沈して生仔虫を集め（凍結保存）ガラス毛細管に入れ，図内に明示した条件でLaser-Raman分光分析を行なったところ1600cm^{-1}附近に著明なRaman線をみとめた．

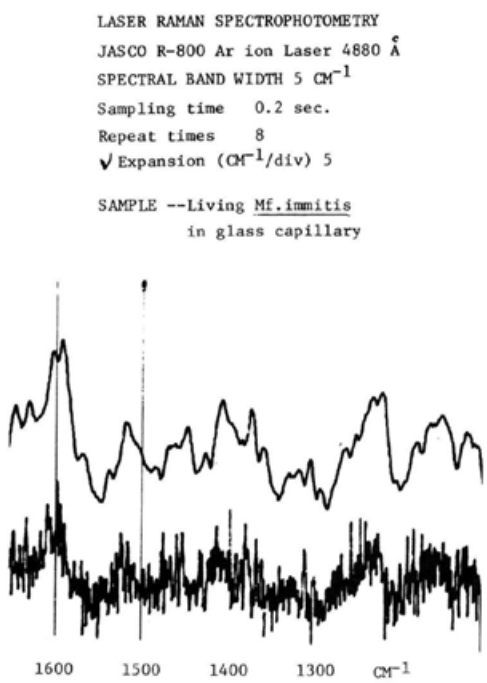

Fig. 1. Laser Raman spectrophotometry of living *Mf. immitis* in glass capillary.

Fig. 2.; *Mf. immitis* の薄層螢光顕微鏡用スライドグラス塗抹，methanol　固定標本で鏡下に仔虫をマークしスライドグラスを装置に固定Argon ion Laser beam を当てて図内に明示した条件下で分析を行なっても1600cm^{-1}附近に著明なRaman線をみとめた．

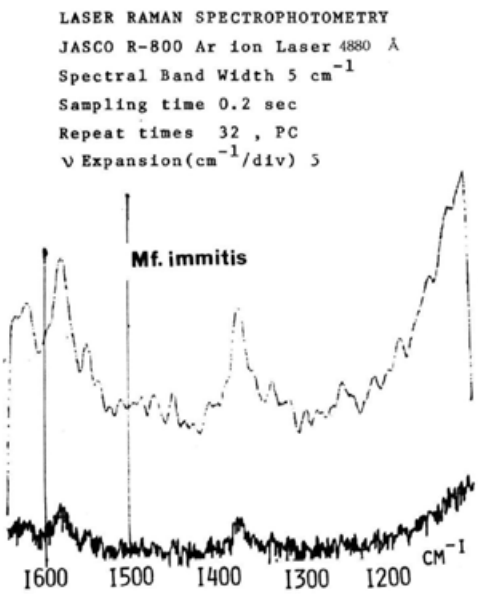

Fig. 2.　Laser Raman spectrophotometry of *Mf. immitis.*

Fig. 3.; 比較のためauthenticのV. A palmitateにつき同一条件で分析を行なったところ，*Mf. immitis*にみとめたと同様1600cm^{-1}　附近に著明なRaman 線をみとめた。渡久地，桝屋が Kupfer　鍍金法和気氏変法で螢光顆粒に一致してV. Aの残存陽性反応をみとめたことを強力に支持する所見である．

3.　顕微螢光分析

A）　上述Sri Lanka　よりの*Mf. bancrofti, Mf. immitis*は365nm励起，barrier filter Y52 を用いた場合は何れも540　m附近にFmax を示したが，Fig. 4. Y42を用いた場合は両者とも 450 nm　附近にF maxを示した．かつ自家螢光を全く示さない非周期性のLitomosoides carinii仔虫は本検索法でbackgroundと同様，わずかに0.75mVの数値を示したにとどまるが，螢光顆粒多数の

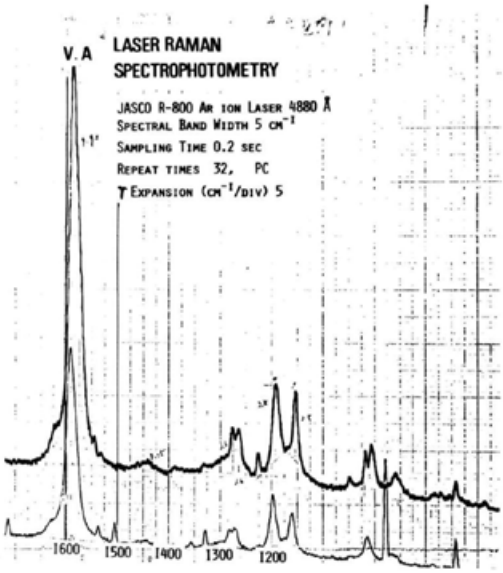

Fig. 3.　Laser Raman spectrophotometry of Vitamin A　Palmitate.

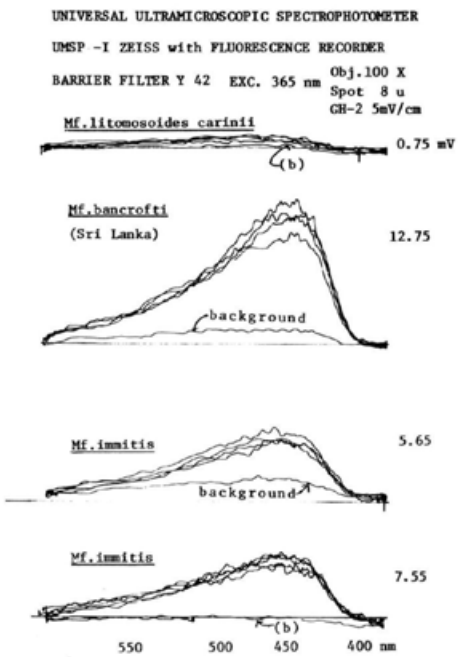

Fig. 4.　Ultramicroscopi fluorescence spectra of *Mf. litomosoides carinii, Mf. bancrofti* (Sri Lanka), and *Mf. immitis* (daytime specimen) and *Mf. immitis*(night time specimen).

Mf. bancrofti は本図で最高の相対螢光光度12.75 mV を示し，昼間採血の徳島の犬の*Mf. immitis* は5.65mV，夜間採血の福岡の犬のそれは 7.55 mVを示した．(Fig. 4.)

B) すでに渡久地[4]が報告した様に barrier filter Y52を用いた場合，ミミズ頭部表皮，カエル網模杆体外部の螢光顆粒部は*Mf. immitis*のそれと同様540 nm附近にF maxを有する顕微螢光スペクトルを示した．

C) Barrier filter Y42を用いた場合365nm励起，対物レンズ100：1，spot 8 μ, Gain GH-2, 5 μV/cmの同一条件下で，*Mf. ancrofti* (Fig. 5) ミミズ頭部表皮 (Fig. 6) およびマウス網膜杆体外節 (Fig. 7) の螢光顆粒部は450nm を中心として*Mf.* 460～440nm，ミミズ450～430nm マウス網膜 460～430nm に凹凸はあるがやや幅広いF maxを有する顕微螢光スペクトルを描いた．これら三者の顕微螢光スペクトルを重ね合わせると区別困難であり三者の螢光が極めて類似していることを示した．(Fig. 8) ただしauthenticのV. A palmitateはF max 450nm 附近を示しスペクトルはF max を中心として600～400nmの間でやや対称的に近いスペクトルを描き，上述三者の螢光スペクトルはV. Aそのもののそれではないことを示した．

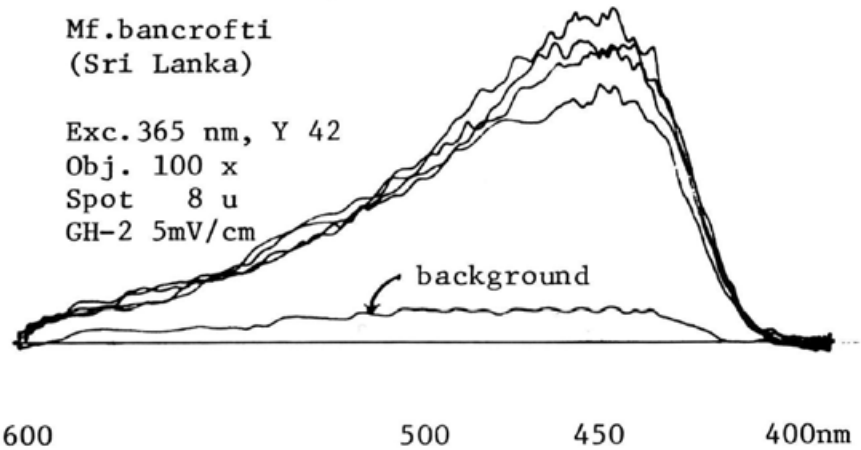

Fig. 5. Ultramicroscopic fluorescence spectra of *Mf. bancrofti* (Sri Lanka).

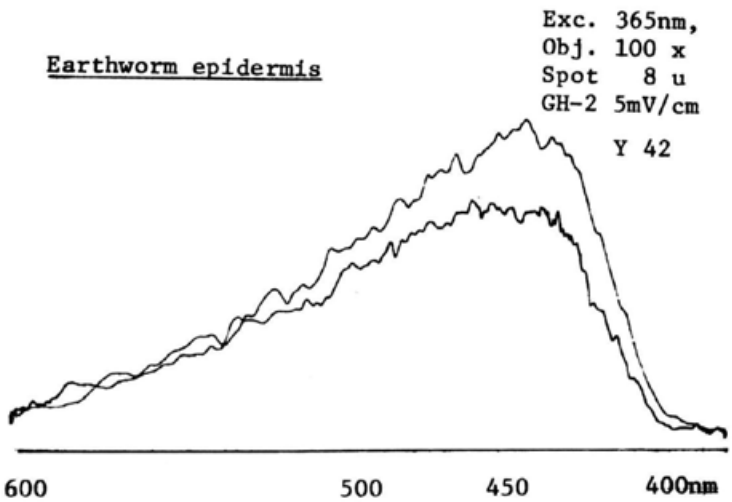

Fig. 6. Ultramicroscopic fluorescence spectra of Earthworm epidermis.

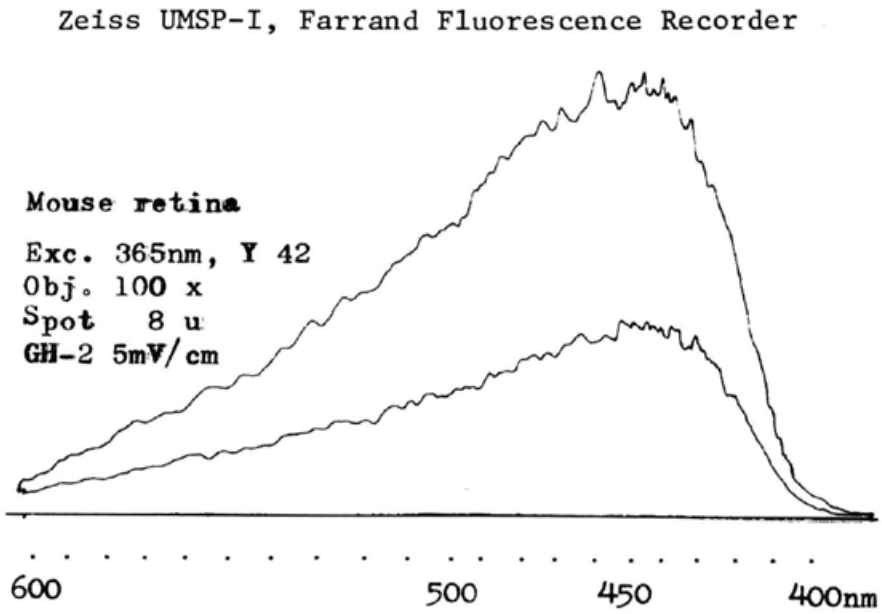

Fig.7. Ultramicroscopic fluorescence spectra in the outer rod segment of mouse retina.

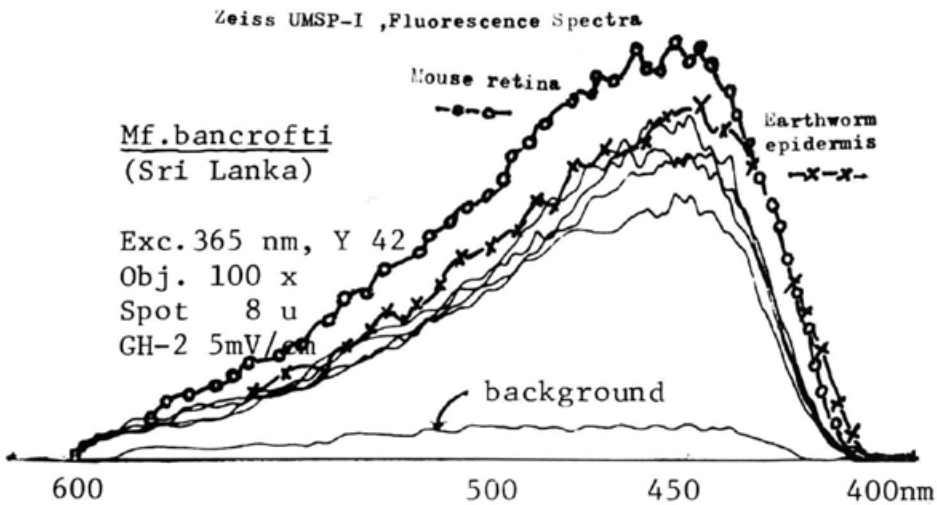

Fig. 8. Ultramicroscopic fluoresce spectra of *Mf. bancrofti*(Sri Lanka). Earthworm epidermis and mouse retina.

もとより生体内には365nm励起で450nm附近にF maxを示す物質がほかにも存在し，例えば小暮[11]は液体窒素下に凍結したラット脳の切片で365nm励起でF max 450nm附近にmitochondria の内膜にあって蛋白質と結合しているNADH の螢光を記載している．

NADHがV. Aを含有しないことは勿論である．いずれにしても螢光スペクトル（しかもnativeの材料で）のみで物質の同定は不可能である．

D）pHによる変化，桝屋，渡久地[4]らによる *Mf.* 自家螢光顆粒部の螢光スペクトルの記録は，比較として用いたミミズ表皮，カエル，マウス

網膜のいずれもすべて生体のまま(native) 行なっており，pHの補整は特に行なわれなかった．Guzzo and Pool[12]はウシの網膜の凍結乾燥杆体外節標本を－196℃，490～500nm 励起でF max600nmを得，露光により620，625nmとわずかながら長波長側に移動するのを見ている．この折もpHおよびbarrier filterについての記載はない．Rhodopsin の露光および温度によるλmaxの変化，F maxの変化については後述するが，同氏らはウシRhodopsinのDigitonin 抽出液を用いてpH6.7，＋3℃で490nm 励起で F max 575nmを得ている．

著者らの実験は桝屋以来，室温でしかも暗室ないし赤色灯下の標本作製ならびに実験ではないのでマウス網膜のRhodopsin はすでに露光かつ温度変化を受けており，従来のこの種の実験が暗調動物の網膜材料を用い，しかも低温下で行なわれているのと著しく異なっている。マウス網膜杆体外節の螢光顆粒が後述の如きλ max（500nm と著しく異なる）を示し，またF max も600nm とは遠く離れているのは当然であろう．*Mf.* ミミズの螢光顆粒についても露光，温度の影響があると考えねばならない．

Morton and Pitt[13]はウシ Rhodopsin のまたHubbard and St. George[14]はイカのRhodopsin のbleached intermediate について酸性，アルカリ性でそのλmax が異なることを報告している．後述の如くpH によるλmax の変動の可能性を追求すると同時にF maxの変化を検索した．

Fig. 9.; *Mf. bancrofti* の螢光顆粒部は365nm 励起，barrier filter Y42 を用いた場合 pH5.7 7.7で共に470nm 附近にF max を示し450～500 nmの間にやや幅広い山を示し，580nm 附近に shoulder を示した．相対螢光光度はpH5.7で約8mV，pH7.7では6.8mVとやや低下し，pH8.6では螢光減弱し background と区別困難なスペクトルを画いた．ただし捕えた螢光顆粒が少な過ぎた可能性を否定できない．（Noiseが多いのは高エネルギーを用いた為であろう．）

Fig.10.; 同一条件下でミミズ頭部表皮（凍結乾燥切片）の螢光顆粒部は pH5.7で F max490 nm，相対螢光光度8.4mV 7.7ではF max470nm

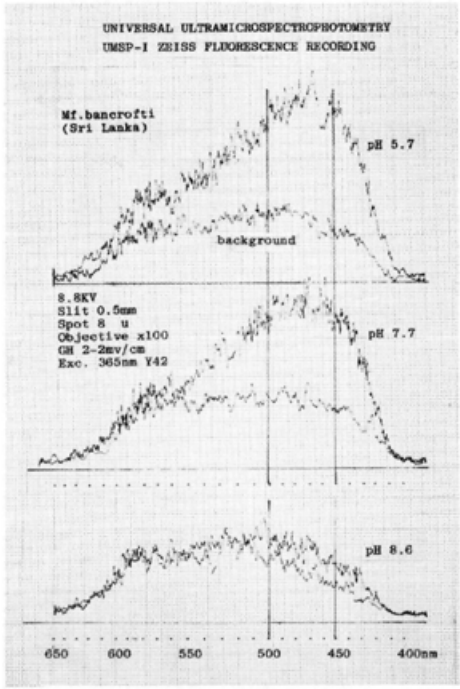

Fig. 9. Ultramicroscopic fluorescence spectra of *Mf. bancrofti* (Sri lanka) by pH.

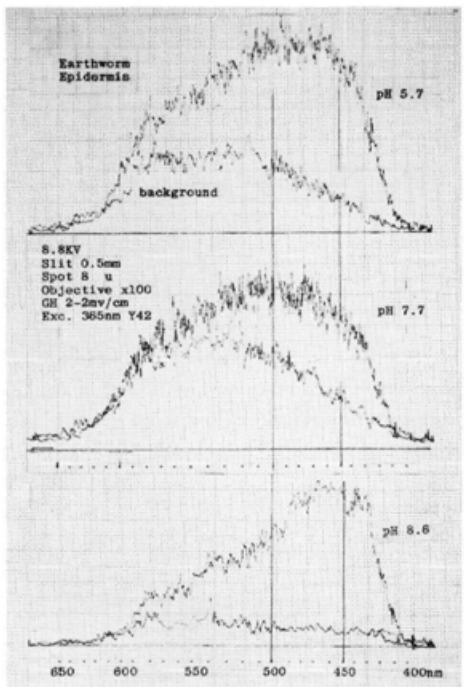

Fig. 10. Ultramicroscopic fluoresce spectra of Earthworm epidermis by pH.

5.8mVと相対光度の低下とF maxの短波長側への移動を示し，580～590nmにshoulderを示した．

Mf. bancrofti のそれとの著しい相異はpH8.6でF max460nm と更に短波長に移動し480nmより長波長側ではやや急峻に低下し，先に記述したnative の標本の（pH 未補整）それに類似した．相対光度も 9 mV を示したが，この場合のみbackground が甚だ低かったので螢光分析法にしばしば避け難いinstrumental artifacts の介入を否定し得ない．マウス網膜についてもpHの影響を見るべく再三努力したが明確なスペクトルを描くことが出来なかった．

4．顕微分光分析

UMSP-I Zeiss を用いて顕微吸収スペクトルを記録した成績は次の如くである．

A）pH 未補正材料(native materials)

Fig. 11.; *Mf. bancrofti* の螢光顆粒部を10μ 径内に捕え得たものでは406nmにλmax を示す顕微吸収スペクトルを描き，螢光顆粒のほとんどない仔虫ではbackgroundと異ならなかった．

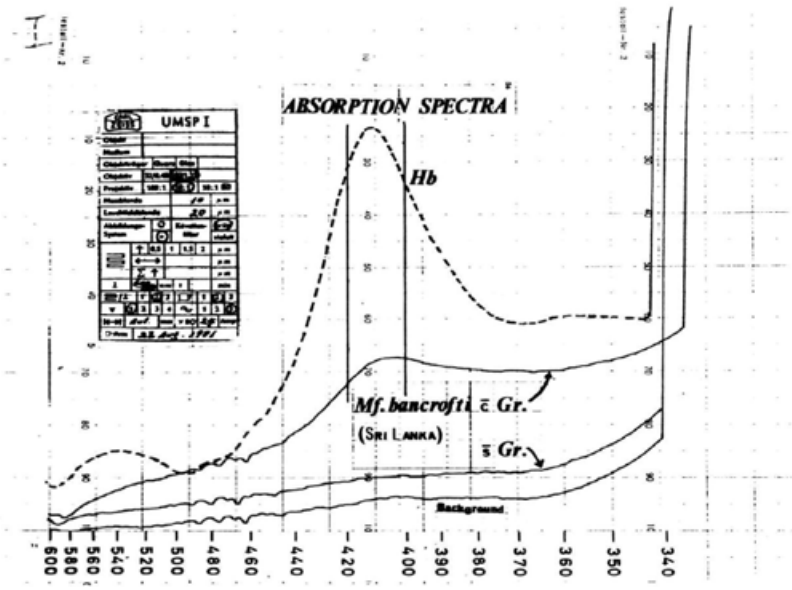

Fig. 11. Ultramicroscopic absorption spectra of *Mf. bancrofti* and homoglobin.

Fig. 12に示す如く，螢光顆粒の多少とも多い虫体ではこのスペクトルは再現性を示した．対照としてHb（赤血球）の吸収スペクトルは412nmにλmax を示す急峻な曲線を描き，540 nmにshoulder を示し，*Mf.* のそれと明らかに区別された．(注：波長のScaleは UMSP-I Zeiss の仕様書に従い計測速度②②の時は附図の如くなるが上記のλ maxの読みはいずれも400－420nmの間を仮に20等分して表示した．)

Fig. 13.;　ミミズ頭部表皮の凍結乾燥切片における螢光部（赤色の強い螢光を示すPorphyrin 部と離れた部）は同一条件下（但し螢光が強いので計測spot を 1 μ 径とした．)で414nmにλmax を示す比較的急峻な曲線を描き540nmにshoulderを示した．

Fig. 14.; マウス網膜（凍結乾燥切片）の杆体外節の螢光顆粒部（Rhodopsin の bleached intermediates のあるstep）は414nmにλmax を示す急峻な曲線を描き，Hb，ミミズ表皮同様 540 nm附近にshoulderを示した．

B）pHによるλmaxの変化

本実験は上述の如く*Mf.* およびミミズ表皮の自家螢光顆粒をRhodopsin 露光，温度の影響によりbleach した分解産物の一連の変化のいずれかのstep のものであろうとの想定の下に行なったものである．

Morton & Pitt[13]はウシ網膜からのいわゆるIndicator yellow (N-retinylidene opsin) についてpH によるλmax の変化を，またHubbard & St. George[14]はイカのMetarhodopsinがpHによってλmax が変化することを見ているので，著者の材料についてpHの変化を比較する事は有意義であると考えた．

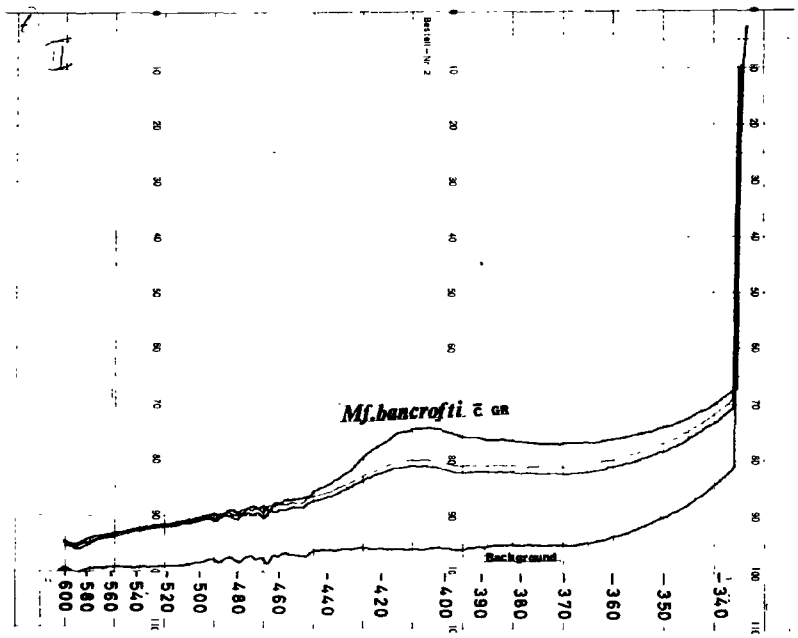

Fig. 12. Ultramicroscopic absorption spectrum of *Mf. bancrofti* with fluorescent granules.

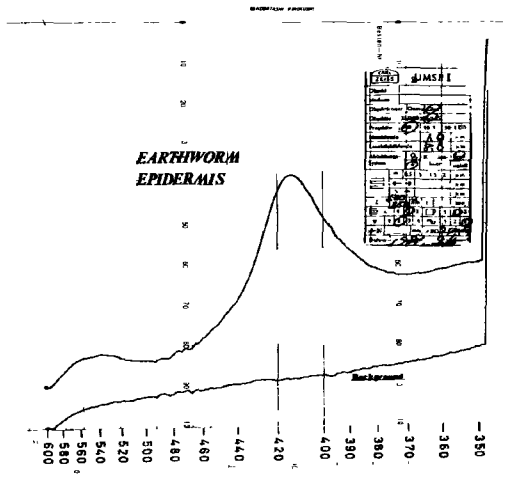

Fig. 13. Ultramicroscopic absorption spectrum of earthworm epidermmis.

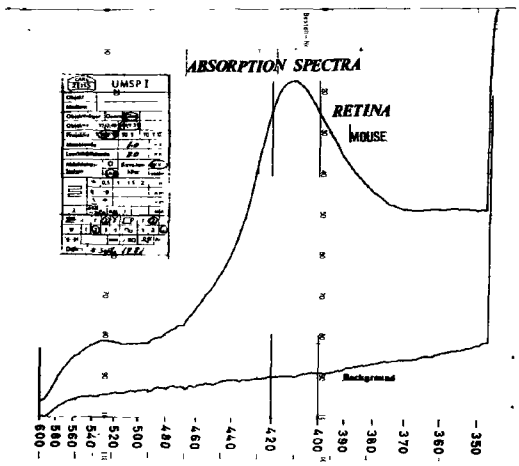

Fig. 14. Ultramicroscopic absorption spectrum of in the outer rod segment of mouse retina.

Fig. 15.; *Mf. bancrofti* の螢光顆粒部を特に本項の実験では1.0μの計側spotに捕え，表示の条件で顕微吸収スペクトルを記録した．Tungsten灯下に赤，白血球と可及的離れ，かつ螢光顕微鏡下に螢光顆粒の多い部を探してスケッチしておき，該当部を中心に各pHの緩衝液を滴下し，無螢光cover glassをのせ無螢光glycerin immersionの下に検鏡，目的部の中央と計測spotの中心点とを合わせた．図の如くpH5.7および7.7ではλmax413（412.8）nm（注：上述）を示したがpH 8.6では406（506.4）nmとわずかながらλmaxの shift をみとめた．

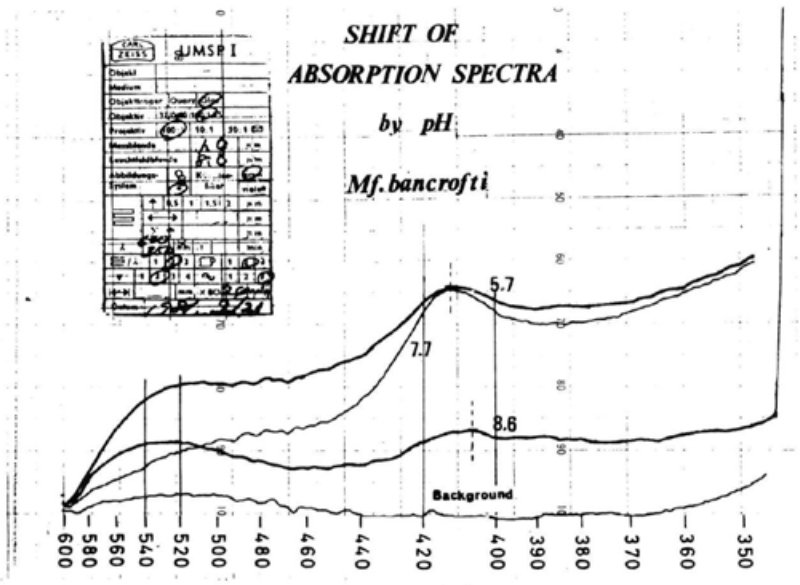

Fig. 15. Ultramicroscopic absortion spectra of *Mf. bancrofti* by pH.

Fig. 16.; ミミズ頭部表皮の螢光顆粒部は同一条件，(計測spot1.0μ）でpH 5.7でλmax 413（412.8）nm，7.7では良好なスペクトルを描かなかったがpH8.6ではλmax406（405.6）nmにshiftし少なくともpH 5.7と8.6によるλmaxのshiftに関する限り，*Mf. bancrofti* の螢光顆粒部とミミズ頭部表皮のそれとが極めて近似する，ほとんど同一の態度を示した．

Fig. 17.; マウス網膜杆体外節の螢光顆粒部は同一条件下pH5.7，8.6共にλmax411(411.2) nm，7.7では少しnoiseを示したが，λmaxのpHによる変化はないものと考えられた．同一条件で同一標本のnative の材料を無螢光 glycerin で封じて描記したスペクトルではλmax412(412.4) nmでFig. 14に示した同一条件下のλmax 414nmと比較する時 pH による変化は，native のそれと事実上は差がないものと考えられた．

なお本項の実験では前項の実験と異なり，*Mf.* とミミズの吸収スペクトルに540nm附近のshoulder をみとめ，かえって網膜のそれではshoulder をみとめなかった．またnative の材料で網膜杆体外節のスペクトルがFig. 14のそれほど急峻でないことは，螢光顆粒の捕えた量の多少に関係するものと思われた．Hbのλmax の変化を比較したがpH5.7,7.7では共に413(412.8) nmを示しpH8.6では411（411.2）nmを示しpH 8.6では411（411.2）nmとこの範囲では事実上pHによるλmaxのshift はないものと考えられた．

考　　按

1．夜間末梢血に出現している*Mf. immitis*の400nm附近励起による5秒間のphoton放出数の平均値は，同一犬より昼間採血した*Mf. immitis*より同一条件下で放出するphotonの平均値より有意に高値を示した．

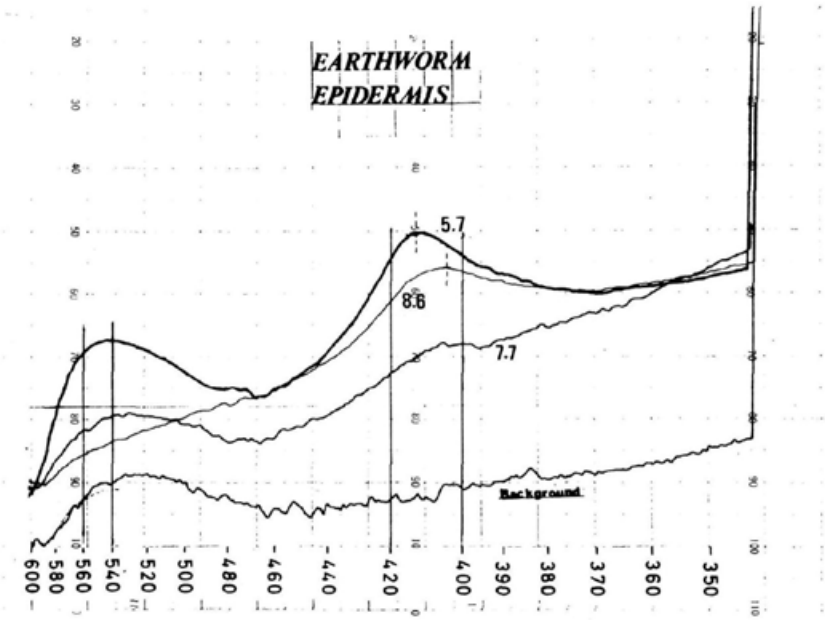

Fig. 16. Ultramicroscopic absorption spectra of earthworm epidermis by pH.

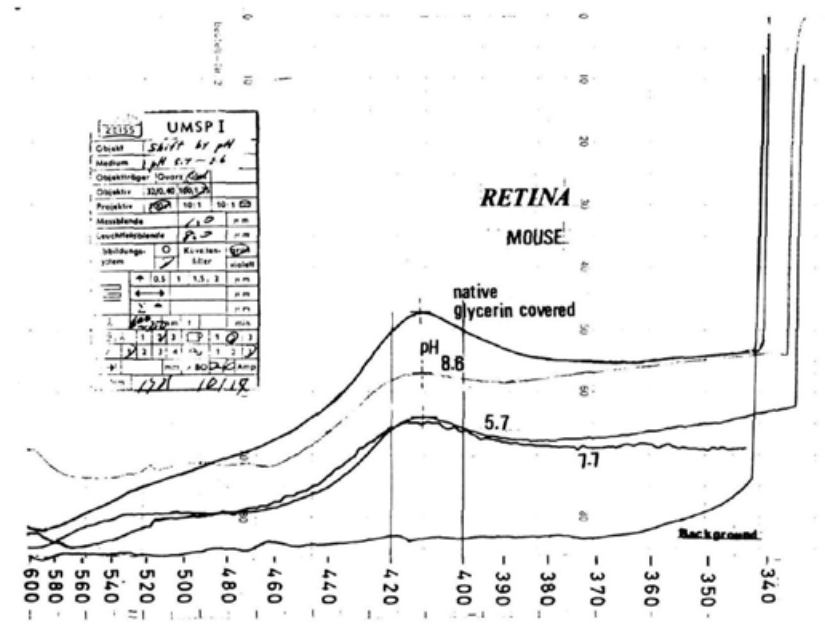

Fig17. Ultramicroscopic absorption spectra of mouse retina by pH.

顕微螢光分析で夜間採血のSri Lanka の螢光顆粒の多い*Mf. bancrofti* は同一条件下で最高の相対光度を示し，犬は異なったが夜間採血の*Mf. immitis*,昼間採血の*Mf. immitis*の順に相対螢光光度が低値を示し，非周期性で螢光顆粒の全くないLitomosoides carinii仔虫の螢光スペクトルは background のそれと差を示さなかった．

これらの所見は桝屋（1970～76）の13種21株のヒトおよび動物の*Mf.* の末梢血中仔虫数の夜昼比が，仔虫の自家螢光顆粒の密度と近似的平

行関係を示した所見，また与那嶺，桝屋，[3] の *Mf. immitis* の invitro negative phototaxis の所見と共に，これら自家螢光顆粒の存否および密度がmicrofilarial periodicityの機序と深くかかわっている事を確信せしめる．

2．仔虫自家螢光顆粒の本態

A）V.Aの存在；著者は*Mf. immitis* とauthenticのV.A palmitateのLaser-Raman分析を行なって，両者が共に1600cm^{-1}のRaman線を示すことを認めた．先に桝屋[2]は児玉と共に生化学的に*Mf. immitis*のmassがflavin 体を含むことをみとめたが，*Mf. immitis, Mf. bancrofti* 等多少とも夜間出現性を示す仔虫は365.410nm双方の励起によって螢光を発するのに対し，flavin 体は365nm励起では発光するが410nm励起では発光しない故をしてflavin 体以外に何物かを含有すべしとし，後日authenticのV.A palmitateは365 410nm双方の励起で発光することをみとめた．

桝屋，渡久地[4]は組織化学的にKupffer 鍍金法和気氏変法を用いて*Mf. immitis*にV.Aの黒色～赤色陽性顆粒を証明し，かつ紫外線照射により肝切片のV.A鍍金反応が陰転するという実験的困難を克服して，螢光顕微鏡撮影後の標本に本鍍金法を施し，残存赤色陽性顆粒が螢光顆粒に一致することを証明した．

著者のLaser-Raman 分析の成績は両氏の所見を物理学的に再確認したものである．

B）顕微吸収—および螢光スペクトル所見；著者の顕微分光分析および顕微螢光分光分析の所見を一括するとTable 2の如くなる．

Table 2. Microscopic absorption and fluorescence spectroscopic findings.（Makishi & Masuya）

	λmax	Exc.	Y	F max nm
mf. bancrofti native	406	365	42	450（460－440）
pH 5.7	413			470
7.7	413			470
8.6	406			
Earthworm epidermis native	414	365	42	440（450－430）
pH 5.7	413			490
7.7				470
8.6	406			460
Mouse retina native	414－412	365	42	450（460－430）
pH 5.7	411			
7.7				
8.6	411			

Masuya's FMSP findings（Nikon SUR-F type, 1976）
Exc. near 400nm, Y52.

	F max（major）	F max（minor）
Earthworm epidermis native	510	550
Asian toad retina native	510	550

C）Rhodopsin およびその分解産物との比較；Fig. 18.；一般にRhodopsinは露光と温度によってFig. 18のsequenceを追ってbleached intermediatesを生じ，最後にはall trans RetinalとOpsinに分解され，生体内ではこの両分解産は暗調により11－Gis 型のRhodopsin に再生される．

実験方法の項で断わった様に著者らの実験はすべて室温かつ非暗室で行なわれたので，Rhodopsinはもとよりミミズ表皮あるいはMf. の螢光顆粒が仮にRhodopsin 関連物質であるとしても，すでに露光と温度変化により分解されているに違いない．

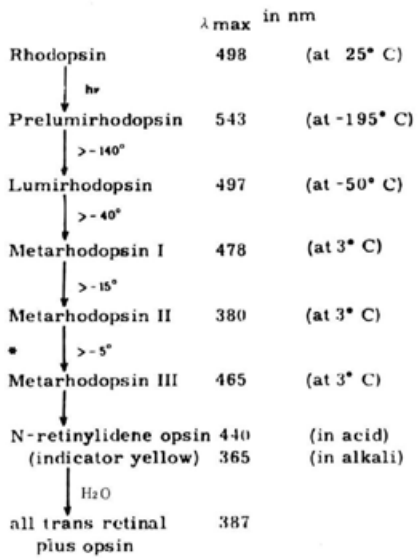

Fig. 18. The chemistry of the visual pigments. in"Photochemistry of vision". (Morton. R. A. 1972.)

Guzzo & Pool [9] によるウシRhodopsin およびその分解産物の螢光に関する励起波長およびF maxをTable 3に引用する.

この二つの図, 表を比較すると, 螢光を発しないprelumirhodopsinを除いてbleachingの進行と共にλmax はおおむね短波長側に移動する. Guzz & Pool [9] の螢光分析は−196℃の超低温の観察であるが, 励起波長もF maxもbleachingの進行と共に短波長側に移動している.

著者のマウス網膜杆体外節の螢光顆粒のλmaxが500nm附近でなくまたF maxが600nm でないのはむしろ当然であろう.

Guzzo & Poolは励起波長について別にE maxとは断わっていず, それぞれこの波長で励起したとしているが, Fig. 18のλmax と比較する時, この場合の励起波長が各stepのλ max に多少とも近いことは注目に値する. 前述の如く理論的には励起スペクトルはその物質の吸収スペクトルと同一であると考えられているからである.

著者および桝屋[2]の励起波長が365または400nm 附近, あるいは410nm であったことは, 未だλmax に関する所見を得ていない時の実験であったが, おおむね妥当の励起波長であったと思われる.

Table 2に掲げた*Mf. bancrofti* の螢光顆粒部のλmax はnative の場合406nmミミズ表皮のそれ, 及びマウス網膜杆体外節の螢光顆粒部のλmax がnative のものでは共に414nmであるが, Fig. 18, Table 3と照応する時Metarhodopsin IIないしN-retinylidene Opsin に近い物質を著者らは検索していたものと解せられる. *Mf. bancrofti*, ミミズ表皮の螢光顆粒をもし他動物のvisual pigments の分解産物の中にこれを求めるとすれば上記2物質に近いものと考えられる.

Rhodopsinおよびそのbleached intermediatesの螢光の pH による変化に関する報告は参照出来ないが, Hubbard & St. George(1958)[14] はイカのRhodopsinのλmax493nmに光を当てた場合, 酸性環境ではλmax500nmのacid Metarhodopsin をアルカリ性にするとλma380nmのalkaline metarhodopsin を生ずることを報告した. (暗室で).

またMorton[15]が引用している所ではFig. 18. に見る如くウシのMetarhodopsinがN-retinylidene opsinに分解する場合, 酸性ではλmax440nm アルカリ性では365nmに変化している.

著者が観察した*Mf. bancrofti* の螢光顆粒部のλmaxはpH5.7, 7.7で共に413nm 8.6では406nmと僅かながら短波長側に移動した. ミミズ表皮の螢光顆粒部はnative の場合はマウス網膜杆体外部のそれと同様にλmax 414nm を示したが, ミミズ表皮の場合pH5.7で413nm, 8.6では406nm と僅かながら短波長側に移動したが, マウス網膜のそれはpH5.7とpH8.6で同様411nm を示した.

F maxの pH による変動については文献とも参照し得ず, 網膜杆体外節のそれも観察を終了していないので論じないこととする. 著者らの研究はもっぱらin situの観察であり, 螢光物質のみを純粋に抽出して生化学的物化学的に観察する方法に比し, ある限界の存在することを指摘せざるを得ない.

しかし今日まで著者および共同研究者の得た

Table 3. Fluorescence of rhodopsin and its bleaced intermediates. (Guzzo & Pool: Photochem. & Photobiol. 9 : 565-570, 1969)

	Exc.	F max nm	temperature
Rhodopsin	490－500	600	－196℃
Prelumirhodopsin No fluorescence			
Lumirhodopsin	440	600 (ROS) * 580 (sol) **	－196℃
Metarhodopsin I	440	580 (ROS) 550－560 (sol)	－196℃
Metarhodopsin II	400	535 (ROS) 510－515 (sol)	－196℃
N-retinylidene opsin (Indicator yellow)	360	505－510 (ROS)	－196℃

* Rod outer segment; ** digitonin extract

*** Barrier filter and pH not given.

所見の限りでは，*Mf.* およびミミズ頭部表皮の螢光顆粒部はV. Aを含有し，λmax, 励起波長，F maxが網膜杆体外節の螢光顆粒部のそれに比較的近似しており，これらとRhodopsin の分解産物の間に類似を求めるとすればMetarhodopsin IIないしN-retinylidene opsinに近いと考えられる．

この場合，Wolken [16] が総括しているところによると下等動物，昆虫，蜘蛛類（カブトガニ）のvisual pigmentsのλmax は520～437nmと脊椎動物のそれよりも広く分布していることも考慮に入れるべきであろう．

3. Rhodopsin と光線過敏について

露光，室温の観察で Metarhodopsin ないしN-retinylidene opsinに近似の物質と考えられることは*Mf.* およびミミズ表皮の螢光顆粒がRhodopsin ないし他動物のvisual pigments に近い物質を含有すると考えられる．

ミミズは桝屋[17]が指摘している様にPorphyrin 症であるから頭部表皮の螢光顆粒，特にその濃密集団はHesseが記載したLicht Zellenに相当し，日光曝露による致死的傷害から身を護るためのphotodetectorとして機能していると考えられる．

Mf. の場合はどうであろうか．

一般に光線過敏反応はBlumen et al [18] Rimington et al [19]らの所論では酸素と光と光力学物質の三者の作用によって起こりperoxy type の free radicals がその中心的反応とされている．これによって脂質の過酸化を来たし，脂質に富む細胞小器管の膜の傷害が起こり，たとえばlysosomeの膜の破壊によって逸脱した水解酵素が細胞傷害，光線過敏症を起こすというのであった．

近年free radicals に関する研究が進歩し，例えば未熟児網膜症の発生病理と関連して（光とは無関係に）過剰の酸素によって網膜内に過酸化脂質が増量するが，八木[20]によるとこの過酸化脂質は肺で生じたものであるという．多くの未熟児網膜症の研究者も酸素中毒としている．

Rhodopsin は従来単にphotoreceptor またはphotodetector としての作用が重視され，光または酸素によって有害な光力学作用を起こす可能性についての論議は余りされていない．しかし，桝屋が著者らにかねて強調していたことは，未熟児の生命，あるいはその脳細胞の生存に必要不可欠の血中酸素分圧が，網膜を最初に犯すことは不思議である．この折の肺病変は血中よりはるかに高い酸素分圧に直面するものとして別個に論ぜらるべきであろうということであった．日蝕性網膜炎についても，網膜以外への太陽光線の作用は皮膚癌や，日光皮膚炎の発生と関連して論ぜられているに過ぎない．

すでにNoel et al [21]は光曝露によって網膜に重

篤な傷害を起こすことを報告したが，特にKuwabara & Gorn[22]の電子顕微鏡的研究は特に興味深い．白色ラットで光凝固法に用いる光よりはるかに弱い40Wattの螢光灯（750ft. c）の露光によって最初の病変がphotoreceptorの最外端に始まり，24時間後その杆体外節の屈曲，腫脹，ミエリン膜の相互分離，胞状，管状変形等を来たすというのである．酸素自体を三重項の基底状態から一重項状態に励起 $\{O_2\ (^3O_2) \rightarrow {}^1O_2\}$ する場合，光の吸収体として第3の物質（増感剤）が存在することより容易に励起されることが知られている．未熟児網膜症や日蝕性網膜炎の発生病理においてRhodopsin またはそのintermediatesの何物かがこの増感剤の作用を示さないであろうか．Kuwabara らの所見はこの意味で重要な意義を持つと著者は桝屋と共に考えた．

光による網膜損傷はNoell et al（1966）[21] 以来いくつもの報告があるが，Hayasaka [23] らは弱い光の持続的照射によってラット網膜色素上皮および脈絡膜のCathepsin D が特に増加することをみとめた．Hayasaka [24] らはすでにlysosomal enzymesの中でも特にCathepsin D が杆体外節蛋白の分解に重要な意義を有することをみとめており，これらの生化学的所見はKuwabara[22]らの電顕所見を裏づけるものであり，著者および桝屋のRhodopsin の光，酵素の存在下，組織傷害作用の可能性についての見解を支持するものであろう．*Mf.*の体内の螢光顆粒がRhodopsin類縁の物質としても，生体内に広く分布し，Mf. にもその存在が確認されている flavin 体と共にこの光増感作用を発揮し，螢光顆粒を全く有しない*Mf.* よりも多くの刺激を受けることは容易に理解されるであろう．

結　　語

1．同一犬で夜間採血の*Mf. immitis*は同一波長励起で5秒間に昼間採血のそれより有意に多数のPhoton を放出した．

2．*Mf. immitis*のLaser-Raman 分析により体内にV. A の存在を再確認した．

3．*Mf. bancrofti*，ミミズ頭部表皮の螢光顆粒部の顕微螢光分析，顕微分光分析所見の限りでは，マウス網膜杆体外節の螢光顆粒部のそれと近似し，そのλmax，励起波長，F max を先人のRhodopsin 分解産物についての所見と照応する時，visual pigments の分解産物との間に類似を求めるとすれば，Metarhodopsin IIないしN-retinylidene opsinに近いものと考えられた．

4．ミミズはPorphyrin 症であり，頭部表皮の螢光物質は日光曝露による致死的傷害を防止するためのphotodetectorであると考えられる．

5．Rhodopsin は光の作用の下に網膜の傷害を起す（日蝕性網膜炎，光による杆体外節の最初の病変）所見があり，未熟児網膜症の発生病理とも関連し，夜間出現性の*Mf.* の螢光物質は光によって*Mf.* に刺激を与えるものと考えられる．

稿を終るに臨み，部外研究生として本研究の機会を与えられた鹿児島大学医学部第一内科教室田中弘允教授，ならびに金久卓也前教授の御好意，同教室各位の御好意に感謝致します．御校閲を賜わった琉球大学医学部第一内科教室小張一峰教授ならびに第二内科教室三村悟郎教授に感謝致します．研究機材の使用をお許しいただいた徳島大学医学部第一解剖教室山田正興教授，同薬学部山下伸典助教授，技術的ご協力をいただいた同大学総合研究室庄野正行技官，第一解剖学教室の各位に感謝致します．また*Dirofilaria immitis* 仔虫採取にご協力いただいた福岡市武石徳五郎先生に感謝致します．終始御指導御校閲を賜わった前琉球大学保健学部第一内科桝屋富一教授に感謝致します．

参 考 文 献

1）Manson, P.：Additional notes on Filaria sanguinis hominis and filaria disease. China Imperial Maritime Customs Medical Reports. No 18, 31－51　1879.

2）Masuya, T.: Studies on the mechanism of

the filarial periodicity--The autofluorescence in the microfilariae and their periodicity. Jap. J. Parasitol., 25, 288-313, 1976.

3）与那嶺毅：フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究（FN-2），琉大保医誌2：335－355，1979.

4）渡久地正和：フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究（FN-3）－仔虫自家螢光顆粒の本態に関する研究－，琉大保医誌2，356－373，1979.

5）Masuya, T.: The autoflunrescence in the microfilariae and their periodicity. Second International Congr. Parasitol. Washington DC, September, 1970.（Abstract）

6）和気健二郎：Kupffer 鍍金法によるヒト肝臓の観察．解剖誌 53; 474－475，1978.

7）山田正興：顕微螢光測光とその応用．総合臨床．19，1399－1410，1970.

8）庄野正行：顕微螢光測光装置の試作とその応用，徳島県臨床衛生検査技師会会誌，18，6－8，1980.

9）Guzzo, A, V. and Pool, G. L.: Fluorescence spectra of the intermediates of rhodopsin bleaching. Photochem. and Photobiol., 9, 565－570，1969.

10）Hesse, R.: Untersuchungen ueber die Organe der Lich-tempfindung bei niedere Thieren. I. Die Organe der Lichtempfindung bei den Lumbriciden. Z. wiss. Zool., 61, 393-419, 1896.

11）小暮久也：虚血と脳代謝－フリーラジカル反応にふれて「虚血と細胞障害－活性酵素，フリーラジカル」医歯薬出版，東京，1980.

12）Guzzo, A.V. and Pool, G.L.: Visual Pigment fluorescence. Science, 159, 312-314, 1968.

13）Morton, R. A. and Pitt, G. A. J. Studies on rhodopsin. 9. pH and the hydrolysis of indicator yellow. Biochem. J., 59, 128-134, 1955.

14）Hubbard, R. and St. George, R. C. C.: The rhodopsin of the squid. J. Gen. Physiol., 41. 501-508, 1958.

15）Morton, R. A.: The chemistry of the visual pigments. in "Photochemistry of vision". ed. by H. J. A. Dartnall, Springer-Verlag, Berlin, 33-68, 1972.

16）Wolken, J. J.: "Invertebrate photoreceptors". Academic Press, New York and London. 1971.

17）Masuya, T.: Further studies on the mechanism of the microfilarial periodicity. Fourth International Congr. Parasitol. Warsawa August. 1978.（Abstract）

18）Blum, H. F., Watroud, W. G. and West, R. J: On the photosensitization in man. Amer. J. Physiol., 113, 350-353, 1935.

19）Rimington, C., Magnus, I., Ryan, E. A. and Cripps, S. J.: Porphyria and photosensitivity. Quart. J. Med., 36, 29-57, 1967.

20）八木国夫：過酸化物質とフリーラジカルについて，「未熟児新生児の酸素障害」馬場，坂元，美濃監修3－14．医歯薬出版．東京．1981.

21）Noell, W.K., Walker, V. F., Kang, B.F.: Retinal damage by light in rats. Investi. Ophthal. 5, 450-472, 1966.

22）Kuwabara, T. and Gorn, R. A.: Retinal damage by visible light.--An electron microscopic study. Arch. Ophthalmol., 79, 69-78, 1968.

23）Hayasaka, S. and Lai, Y-L.: Effect of continuous lowintensity light on the lysosomal enzymes in the retina of albino rats. Exp. Eye Res., 29, 123-129, 1979.

24）Hayasaka, S., Hara, S. and Mizuno, K.: Degradation of rod outer segment proteins by cathepsin D. J. Biochem., 78, 1365-1367, 1975.

Studies on The Mechanism of The Microfilarial Periodicity (FN-4)

——Studies on the essential feature of the autofluorescent substance(s) in the nocturnal microfilariae (B) ——

Kinzo MAKISHI

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of the Ryukyus

(Director Prof. Kazumine, KOBARI)

(Former Prof. Tomiichi MASUYA. First Department of Internal Medicine, University of Ryukyus, College of Health Sciences)

1. The night specimens of Mf. immitis emitted significantly more photons in 5 seconds, excited by near 400nm, than those emitted from the daytime specimens.
2. Laser-Raman analysis detected in Mf. immitis the presence of Vitamin A, showing prominent Raman line near 1600 cm^{-1}, just samely with that of authentic V. A palmitate.
3. The similarity to rhodopsin and its intermediates was pursued.

Microscopic fluorescence spectra, taken using UMSP-I Zeiss, equipped with a Farrand-fluorescence recorder, (exited by 365nm and using barrier filter Y42) were very similar among those granules in Mf. bancrofti (Sri Lanka), earthworm epidermis (head segment) and in the outer rod segments of mouse retina.

Masuya (1976), one of the coworkers, has obtained the same microscopic fluorescence spectra, using Nikon SUR-F type, between the earthworm epidermis and in the outer rod segments of Asian toad retina, F max at 510nm and minor F max at 550nm.

According to Guzzo & Pool (1969), cattle metarhodopsin II showed F max at 535 (ROS) and 510-515nm(sol), excited by 400nm, and N-retinyline opsin at 506-510nm(ROS), excited by 360nm. Absorption max of metarhodopsin II is known to be 380nm and that of RNO to be 440nm in acid and 365nm in alkali.

Absorption spectra of those granules in Mf. bancrofti (UMSP-I Zeiss) showed λmax at 406nm, apart from that of Hb. Under the same conditions, those granules both in the earthworm epidermis and in the outer rod segments of mouse retina showed λmax near 414nm and shoulder near 540nm The granules both in Mf. bancrofti and in the earthworm epidermis showed λmax near 413nm at pH 5.7 and near 406nm at 8.6, thus showing a little shift toward shorter wave length. However, the granules in the outer rod segments of mouse retina gave the same λmax at pH 5.7, 7.7 and 8.6 (411.6nm); although those in native retina at 412.4nm, in the same specimens, on the same day, thus showing no shift of λmax, by pH.

Those findings were compared with the known characteristics of rhodopsin and its intermediates (λmax, excitation wave length and F max.)

So far as concerned with findings, obtained, of microscopic fluorescence spectra and absorption spectra, after light exposure and at room temperature, the autofluorescent granules in the nocturn-

al microfilariae and in the earthworm epidermis, both negative phototactic, were considered to be similar to metarhodopsin II or N-retinylidene opsin, among the bleached intermediates of the visual pigments. Further, it must be taken into consideration that λmax of the visual pigments distribute from 520nm to 437nm in the insects and arachnid, examined, shown in the literature.

It was discussed on the possible harmful effects of rhodopsin, its photodynamic activity at least as photosensitizer, in the presence of light and oxygen, recalling retrolental fibroplasia in the prematurity and ecliptic retinitis.