

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-3) : 仔虫自家蛍光顆粒の本態に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学保健学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡口, 正和, Toguchi, Masakazu メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016438

フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究 (FN-3)

—仔虫自家蛍光顆粒の本態に関する研究—

渡久地 正 和

鹿児島大学医学部第一内科学教室部外研究生

(主任: 金久卓也教授)

琉球大学保健学部附属病院内科

(主任: 三村悟郎教授)

(指導: 榎屋富一前教授)

緒 言

フィラリア症における仔虫定期出現性は、*Wuchereria bancrofti* 仔虫(当時は、*Filaria sanguinis hominis*)についてPatrick Manson (1879)により発見されて100年になるが、本現象の機序については未だ明確な理解に達していない。

等しく熱帯医学あるいは寄生虫学上の難問とされていたマラリア再発の機序がRaffaele (1936)のカナリア・マラリア原虫の研究に端を発した本原虫赤外形の研究、横川定 (1942)のサル(*Plasmodium knowlesi* var. *arimai*)についての研究、Short and Garnham (1948)のサル(*P. cynomolgi*)、ヒトの*P. vivax*の赤外形の肝組織内の確認、さらにPlasmochin, Atebrin, 8-Aminoquinoline 等についての臨床的知見に基づいて晩期再発がこの赤外形の宿主体内残存によることが明らかにされて久しい。

これに反しフィラリア仔虫定期出現性の機序に関しては、2, 3の重要な研究報告が、特に日本人学者によってなされているにもかかわらず、未だ万人の理解を得るには至っていない。今日までの諸家の研究の概要を榎屋 (1976)は表(1)の如く表示している。Mansonがかって主張した夜間吸血性の蚊によって媒介されるためとの適応説は単なる目的論にすぎない。Lane (1929, 1933), O'Connor (1931)の母虫による一斉分娩、仔虫の毎日の死滅によるとの説は、Hawking (1940)

のこれらの仔虫が14日間も生存し得るとの所見、特に久米・大石 (1957)による犬心室内成虫除去後にも仔虫の定期出現性が持続するとの所見によって完全に否定された。菅沼 (1921)はヒトの*Mf. bancrofti*について、村田 (1939)はイヌの*Dirofilaria immitis*の仔虫について太陽光線あるいは紫外線忌避の現象を示す重要な研究を報告し、また吉田朝啓 (1966)は沖縄より南米に移住する沖縄県民に同行してその中の*Mf. bancrofti*保有者につき航海上の各地点において時間的に末梢血仔虫を算定し経度緯度に関係なく検血現地の日没後に仔虫は末梢血に出現し日出後に消失することを認め地球の裏側に至る間にTurnusが全く逆転することを報告した。これらの重要な、特に吉田の如き説得力ある研究報告があるにもかかわらずHawkingとその一門は(1956-1968)ヒトおよび各種動物寄生の仔虫についての所見に基づいて1967年“Oxygen barrier theory”を提唱したが、彼らの学説による仔虫分類の第2群には昼間出現性の*Loa loa*と夜間出現性の*Edesofilaria malayensis*および*Monningofilaria setariosa*が含まれており本現象の機序を彼らの学説で説明することの矛盾を自ら露呈している。

榎屋および鹿児島大学第一内科の共同研究者達は(1956-1958)従来の仔虫の昼間存在部位に関する研究が屍体またはイヌの所見に基づいていることにその適正でないことを主張した。

即ち寄生虫の死滅は宿主の死亡より多少ともおくれることを強調し、屍体における仔虫分布をも

Table 1 Theories on the mechanism of the filarial periodicity

Manson (1879, 1891)	Teleological theory
Lane (1929, 1933)	Synchronized, expulsive emptying parturition, impending larvicidal mechanism.
O'Connor (1931)	Simultaneous cyclical parturition and daily destruction of the previous night's brood of microfilariae
Manson (1883)	Microfilariae survive 100 hrs.
Taniguchi (1905)	Yes, including many other workers.
Hawking (1940)	14 days
Kume and Ohishi (1957)	Turnus continues, after the removal of adult canine heart worms.
MacKenzie (1881)	Inversion of the turnus, by inversion of activity and sleep.
Linstow (1892)	Sleep causes capillary dilatation, awakening causes constriction.
Scheube (1896)	Sleep, rest in horizontal position, activate lymph flow.
Ishiguro (1905)	No
Taniguchi (1905)	No
Rodenwaldt (1909)	Blood pressure theory
Yamada and Yamamoto (1916)	Tropism for CO ₂
Lancereaux (1888)	Negative heliotropism, without evidence.
Suganuma (1921)	Negative heliotropism in <i>Mf. bancrofti</i> .
Murata (1939)	Negative tropism against UV-light, in <i>Mf. immitis</i> .
Masuya <i>et al.</i> (1958)	Site of diurnal concentration of <i>Mf. bancrofti</i> to be the lungs.
Katamine (1959)	Electroshock, forced labor disturb turnus, <i>Mf. immitis</i> .
Yoshida (1966)	Complete inversion of the turnus, (<i>Mf. bancrofti</i>) in the emigrants from Okinawa to Bolivia, in 116 days.
Hawking (1967)	Oxygen barrier theory
Masuya (1970)	Photodynamic substance theory

(Reprinted from Masuya 1976)

って直ちに生時の分布とすることを不当とした。
 柵屋はかって死亡した兵隊の鼻孔から蛔虫が這い出す光景を頻りに実見したという。もっとも仔虫の運動は蛔虫のそれに比較すれば弱いにはちがないと思われるが *Mf. bancrofti* そのものについても Manson 自身 (1899) 朝 8:30 に青酸自殺をした一青年を同日の午後剖検した結果、肺、大血管等に仔虫を発見しているが、少数とはいえ肺内の仔虫が生きて動いていたことを報告している。宿主が青酸自殺しかも服毒直後に死亡したというので更に数時間も仔虫が動いていた事は重要な所見であろう。

他方イヌの *Dirofilaria immitis* 成虫は右心室に寄生し、しばしば肺動脈内にも集中しており、右心室で分娩する故にイヌの肺組織内仔虫の検出は単に上流より流れきたったにすぎないとも考えられるのでヒトの屍体およびイヌの肺所見をもってそのまゝ *Mf. bancrofti* が昼間肺内に存在す

る事を示すとは解し難い。

たゞ戦時中鶴見・武田 (1940) は沖縄において、皮下用長針を用いて、昼間でも肺穿刺を行なう時は仔虫発見率が高く診断率を向上せしめたと報告したが本現象の機序に関する考察は行なわれていない。共同研究者浜田は (1958) 肝生検、開腹時腹部諸臓器組織の検索、内菌 (1958) は肺生検、腎生検さらに川崎 (1958) は静脈カテーテル法を用いて肺毛細血管中仔虫を昼間多量に検出し、3氏が検索した限りでは *Mf. bancrofti* は昼間肺内に集中していることを明らかにした。

線虫の少なくとも一部がその幼若期を肺において過す (たとえば鉤虫症における若菜病、濃野兄弟の蛔虫性肺炎) ことから *Mf.* が肺において成熟するであろうことは理解するに難くない。

さらに鹿児島大学医学部第一内科の多数の先輩は血液学的・生化学的所見・自律神経機能等の日内変動を仔虫保有者と健康人について比較検討し

宿主側における昼夜の諸因子の変動から本現象を解明せんとして執拗に追求したが仔虫の昼間肺集中、夜間末梢血遊出の機序を説明するに足る事実を把握することはできなかった。かつ樹屋の福岡転出によって本研究は中断した。

樹屋はかねてポルフィリン症の臨床的研究の過程において夜間出現性仔虫になんらかの光力学物質の存在を想定していたが、1970年4月教室の先輩指宿市肥後正典博士恵与の *Mf. bancrofti* 薄層塗抹標本を蛍光顕微鏡下に検索して無数の自家蛍光顆粒を発見した。

引き続き夜昼仔虫比約6/1のイヌの *D. immitis* 仔虫にはより小数の自家蛍光顆粒を認めさらに東大医科研保存の Cottonrat の *Litomosoides carinii* 仔虫は非周期性であるがこの仔虫にはなんらの蛍光をも検出できなかった。

同年8月 London 熱帯医学校において、高度夜間性(30/1)のネコの *Brugia patei*, 低度夜間性(8/1)の *Brugia malayi*, 亜周期性(3/1)の *Brugia pahangi* 仔虫を検索し、同年9月の Washington における第2回国際寄生虫学会において蛍光顕微鏡映画を供覧して「光力学物質説」を提唱した。

以後樹屋は世界各地の学者の協力を得て13種21株のヒトおよび各種動物の *Mf.* を検索して仔虫自家蛍光顆粒の密度と末梢血仔虫夜昼比の間に近似的平行関係の存在することを報告した。(1976) その際本物質の本態に関し共同研究者児玉光威氏の生化学的所見をも参照し flavin 体の存在を考慮したのであるが蛍光分光分析法で夜間出現性仔虫はすべてが365 nm, 410 nm 励起で蛍光を発するのに対し riboflavin, FMN および FAD 共に410 nm 励起では発光しないこと、また児玉の所見で蛍光顕微鏡下なんらの顆粒をも示さないイヌ心室内成虫子宮より圧出した幼若仔虫にも生化学的に flavin 体が検出される事実から仔虫の自家蛍光顆粒はかりに flavin 体を含むとしてもそれ以外にも何物かを含有しているにちがいないことを、指摘している。

著者は樹屋が琉球大学在任中より本研究の一部を分担し、特に動物の Photobehavior と最も関係の深い Vitamin A-Carotenoids について研究を行ない若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

本研究開始当時は鹿児島県はもとより沖縄県においてもフィラリア撲滅対策がほとんど完了に近づき、著者は樹屋・与那嶺と共に沖縄本島各地、西表島各部落住民のご協力を得て深夜仔虫の検出につとめたが、1972年11月より1976年3月の間に *Mf. bancrofti* 保有者は僅か3名を検出し得たのみで、しかも仔虫は遠沈法で辛うじて検出し得るのみで、本研究の材料とすることは不可能であった。

以後1979年の今日まで1例も検出されていない。

沖縄のイヌの *Dirofilaria immitis* 感染はきわめて低率(1%)であったので、福岡、東京、浦和市の獣医師各位のご協力を得て *Mf. immitis* の薄層塗抹標本を採取した。沖縄のイヌには *Dipetalonema reconditum* 感染をみるものが多く共同研究者与那嶺はその仔虫の查走電顕的検索を行なったが仔虫数が少ないため著者の研究材料としては好適ではなかった。

既に樹屋(1976)も引用している様にミミズの日光忌避は Charles Darwin (1881) がこれを観察しており樹屋はこの凍結切片を検索して頭部表皮に密に配列する粗大蛍光顆粒をみとめ、さらに脊椎動物網膜の杆体外節にも類似の蛍光顆粒を認めている。

そこで著者は沖縄産のミミズ (*Pheretima communissima*) の頭部、ヒキガエル (*Bufo bufu garigarizans*) トノサマガエル (*Rana esculenta*) マウス (*Mus sp*) の眼球の凍結無染色切片を用いた。

authentic の Vitamin A としては Vitamin A palmitate を Carotene としてはニンジン (*Daucus sp*) を用いて比較検討した。

1. 顕微蛍光分光分析 (Microfluorospectrophotometry)

研究の初期には徳島大学医学部解剖学教室の山田正興教授のご好意により同教室の Nikon SURFtype (高圧水銀灯 HBO Osram 200W Toshiba) を用いた。1974年以後は琉球大学附属病院に同装置が購入され、空調室を設置し日本光学の技師を2回にわたり来島願い調整に努めたが仔虫の蛍光

分析は成功せず、ミミズ頭部表皮、ヒキガエル網膜の蛍光描記に成功したのみである。

仔虫は薄層塗抹（蛍光顕微鏡用 Slide glass Matsunami 社製）標本を空気乾燥、時には乾燥後メタノール固定を施した。

ミミズ頭部、および2, 3の動物眼球を摘出し凍結切片を蛍光顕微鏡用スライドグラスに貼布し乾燥固定、無染色の状態で蛍光顕微鏡写真撮影を行なった。かつ異なる仔虫、異なる切片を用いて蛍光測光描記を行なった。

BV 透過波長 400 nm 附近で狙撃照射を行ない透過光は特殊フィルターを用いて除去した。選択した蛍光を対物レンズ40×の同一拡大の Viewer の $0.25 \times 0.25 \text{ mm}^2$ 、または $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ の Slit より Photomultiplier を通過せしめて測光した。本蛍光は短命であるのでまず普通光で虫体または切片の蛍光部に相当する部位を Slit 内に（仔虫の場合は対角線上に）おき励起光に切り換え直ちに描記した。走査速度は多くの場合 $1.1 \text{ sec}/100 \text{ nm}$ 、時に $3.3 \text{ sec}/100 \text{ nm}$ または $1.0 \text{ sec}/135 \text{ nm}$ とした。

本研究の目的は相対蛍光光度の測定よりも仔虫の自家蛍光物質、ミミズ頭部表皮の自家蛍光物質が他動物の Photobehaviour と関係の深い Vitamin A - Carotenoid, Rhodopsin 等関連物質を含有するか否かを知るにあるので 365 nm, 410 nm 励起により生ずる蛍光を描記して flavin 体および Vitamin A, Carotene, Rhodopsin のそれと比較検討した。

II. 超顕微分光分析 (Ultramicrospectrophotometry) および超顕微蛍光分光分析 (Ultramicrofluorespectrophotometry)

徳島大学設置の Zeiss UMSP-I を用いて仔虫、ミミズ頭部表皮およびカエル網膜杆体外節の蛍光部の吸収スペクトル描記を試みたが、同研究室庄野枝君のご協力にもかかわらず仔虫の吸収スペクトル描記には逐に成功しなかった。

そこで特に Zeiss UMSP-1 蛍光記録装置 (Farrand Optical Co. UVIS) を附設し grating monochromator による monochrom 波長によって励起し検体（蛍光部）を 20μ の spot に捉え三者の超顕微蛍光スペクトルを描記した。

なお両研究法を通じて pH はそれぞれの生体の

ままとし、室温かつ完全暗室でない部屋での描記であるため露光による bleaching の程度が必ずしも一定でなかったことを附記せねばならない。

III. Vitamin A の組織化学的検索

これまで Vitamin A の組織化学的検索は、Hans Popper (1941) によって肝組織内において蛍光顕微鏡的に行われてきた。著者の研究の目的は仔虫、ミミズ頭部表皮等の自家蛍光顆粒が Vitamin A を含有するか否かを知ることにある。

東京医科歯科大学解剖学教室の和気健二郎教授 (1964-1979) は Kupffer の鍍金法を改良してヒトおよび動物の肝について詳細に検討し肝内の Vitamin A 蛍光を発する細胞を従来貧喰性 Kupffer 細胞としていたのは誤りで Kupffer 細胞と類洞周囲の星細胞とは別物でありこの細胞が Vitamin A を貯蔵する細胞であるとの画期的研究を行なっている。

著者は同教室に短期留学し同教授に直接ご教示を乞い持参した仔虫および凍結切片について鍍金法和気氏変法を用いて染色し Vitamin A の組織化学的検索を行なった。

著者の材料は仔虫の薄層塗抹標本またはミミズ、眼球の切片を用いたので以下の如く処理した。

すなわち仔虫塗抹標本または凍結切片を 10% ホルマリンに約 10 分、ついで鍍金液 (1% 塩化金水溶液 1 ml, 1% HCl 1 ml, 蒸留水を加え 100 ml とする。) 中に 20°C, 暗所で一夜反応させ、標本が赤紫色に着色されているのを確認して脱水・封入を行なって検鏡した。

成 績

I. 顕微蛍光分光分析

1) : *Mf. immitis* は図 1 上段の如く 365 nm および 410 nm の励起の両方とも蛍光を発した。通常の蛍光顕微鏡では検鏡時にも写真撮影でも Barrier filter の特性によって蛍光色調が異なり、金茶色、帯緑黄色または青白色を呈したが、本分析装置では常に仔虫の自家蛍光顆粒は帯黄緑色を呈し F_{max} は 540 nm 附近を示した。 *Mf. immitis* のみならず *Mf. bancrofti*, *Mf. patei*, *Mf. malayi* (韓国済州島株, London 熱帯医学

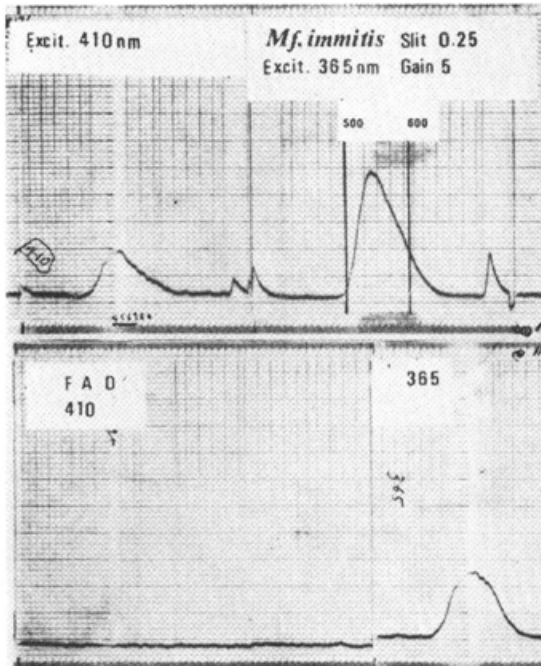


Fig. 1. Microfluorophotometric recordings of *Mf. immitis* and FAD.

校, 東京医科研保存株) 共に Fmax は 540nm 附近にあり同様の蛍光スペクトルを示した。

2) : Authentic の riboflavin, FMN, FAD は図 2 上下, 図 1 下段の如く 365nm では 530 - 550nm 附近を Peak とする蛍光スペクトルを示

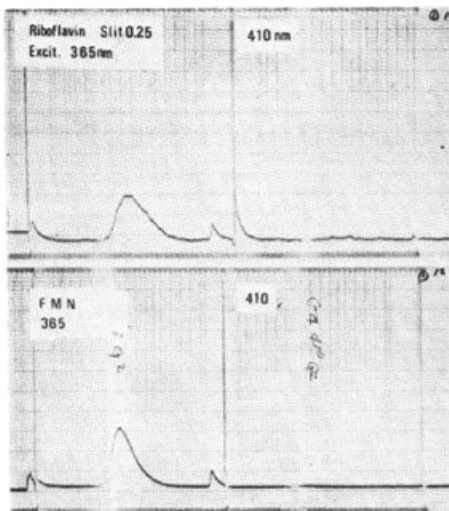


Fig. 2. Microfluorophotometric recording of Riboflavin and FMN

したが, 410nm 励起では発光せず Gain を 5 にしてもならぬ蛍光を描記し得なかった。

日本薬学会編衛生試験法 (1965) Page 145 には 425~475nm 励起で測定すると規定しているが本研究の目的は *Mf.* の自家蛍光物質との異同を知るのが目的であるので 365nm, 410nm 励起を用いて観察した。

要するに蛍光顆粒を有する *Mf. immitis* には flavin 体以外に 410nm で励起される物質が混在することを示した。

3) : ミミズ頭部表皮

既に榊屋 (1976) が記載している如くミミズの凍結無染色切片には体内にみられる強い赤色蛍光 (ポルフィリン体) のほかに頭部の表皮には黄金色の蛍光を示す (Barrier filter Tiyoda No. 4) 粗大顆粒が密に体表に平行に配列しているが, この表皮蛍光部について蛍光分光分析を行なうと図 3 の如く 365nm 励起で 540nm 附近に Fmax を示し一方 410nm 励起では 560nm 附近に Fmax を有し 580-590nm に Shoulder を示す蛍光スペクトルが得られた。

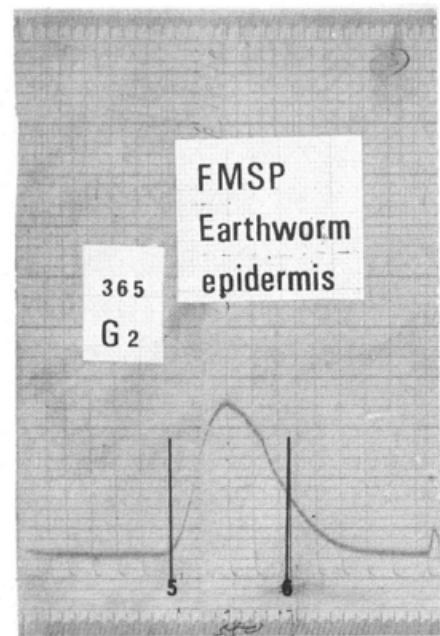


Fig. 3. Microfluorophotometric recording of earthworm epidermis (head segment).

4) : マウス網膜 マウス眼球の無染色凍結切片を蛍光顕微鏡でみると最外層に鞏膜の強い帯緑黄色の蛍光を認め、網膜の色素層の直ぐ内側・杆体外節 (Outer rod segment) に蛍光観察中若干の色調の変化があるがわずかに褐色調を帯びた黄色蛍光の細顆粒が線条に配列するのが認められた。すなわち Rhodopsin (視紅) である。(写真1)

この杆体外節の蛍光部について蛍光分光分析を行なうと図4の如く 365nm 励起では F_{max} 525nm を示し、410nm 励起では描記できなかった。これは光源の減衰によるものと解せられた。

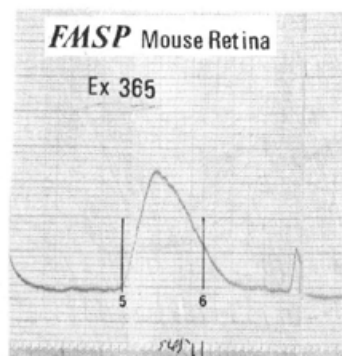


Fig. 4. Microfluorophotometric recording of outer rod segment of mouse retina.

5) : Vitamin A Palmitate は同様に蛍光顕微鏡下 (Barrier filter Tiyoda No. 4) 黄色の蛍光を発するが 365nm, 410nm 励起で共に F_{max} 550nm の蛍光スペクトルを示し、410nm

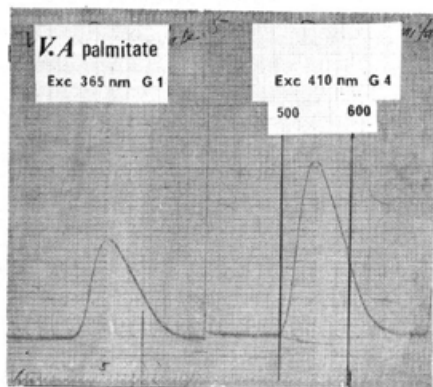


Fig. 5. Microfluorophotometric recording of Vitamin A palmitate.

励起の場合は蛍光光度が弱く Gain 4 にして描記した。

すなわち flavin 体と著しく異なる所見を示した図。(図5)

6) : ニンジンの無染色切片も蛍光顕微鏡下 V. A と同様の蛍光を示すがその蛍光部の蛍光分光分析でも F_{max} 540nm (365, 410nm 励起で) の蛍光スペクトルを示した。β-carotene を主とする Carotenoid の蛍光と解せられる。(図6)

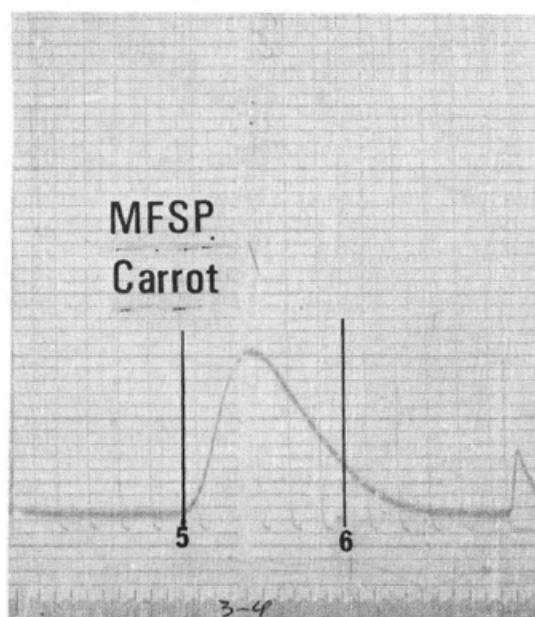


Fig. 6. Microfluorophotometric recording of carrot.

7) : 1974年琉大附属病院に購入した Nikon SUR-Ftype は空調室に設置したにもかかわらず調整に難渋し仔虫の蛍光分析は成功せず那覇市在住猪原氏の献身的な努力によってミミズ頭部表皮の蛍光部、アジアヒキガエルの網膜杆体外節蛍光部の蛍光スペクトルを描記し得るにとどまった。図7に示す如く、400nm 附近の励起で両者とも 510nm, 550nm の2個の F_{max} を示しミミズ頭部表皮の蛍光部がヒキガエル網膜 Rhodopsin部と全く同様の蛍光スペクトルを示したことはきわめて興味ある所見である。

以上の所見は *Mf. immitis* の自家蛍光顆粒は Vitamin A ないし carotene を含有し、他動物

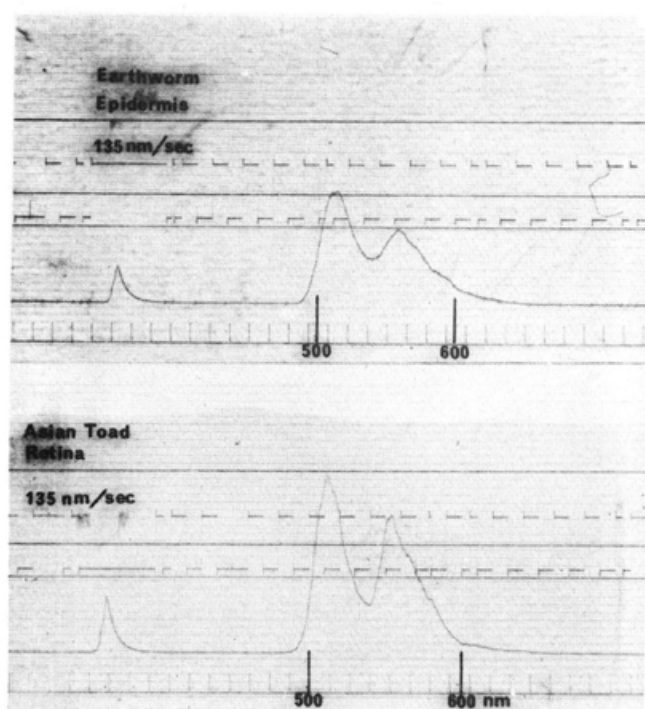


Fig. 7. Microfluorophotometric recordings of earthworm epidermis and retina of Asian toad.

の Rhodopsin 近縁の物質であることを強く示唆している。*Mf. immitis* のみならず *Mf. bancrofti*, *Brugia patei*, *Brugia malayi* (ヒト, ネコ) の仔虫の蛍光顆粒も透過光を除去して見た場合すべて帯黄緑色の蛍光を発生し *Mf. immitis* 同様 Vitamin A-Carotene-Rhodopsin 近縁の物質を含有するものと解せられた。

昼間出現性の *Loa loa* 仔虫, また非周期性仔虫のうちで *Litomosoides carinii* 仔虫には共にならぬ蛍光を検出し得ず, これら仔虫が光力学物質を有しないことを示している。

さらに眼を有しないミミズの頭部表皮に仔虫の蛍光顆粒, 特にヒキガエル網膜杆体外節 Rhodopsin と全く同様の蛍光スペクトルを描記し得たことは重要な所見と思われる。

II. 超顕微分光分析

1) : 徳島大学医学部総合研究室形態学部 (山田正興教授) 設置の UMSP-I Zeiss を用い同室

庄野技官のご協力を得 *Mf. immitis* の蛍光顆粒部の超顕微鏡的吸収スペクトルの描記に努めたが遂に仔虫の吸収スペクトルの描記には成功しなかった。そこでミミズ頭部表皮の蛍光顆粒部およびトノサマガエル網膜の杆体外節の蛍光顆粒部を 10~20 μ の Spot に入れて吸収スペクトルを描記した。図 8 の如くミミズ頭部表皮の蛍光顆粒は 410-420 nm の間に, またカエル網膜 Rhodopsin 蛍光部は 420-430 nm の間に λ_{max} を示した。

2) : 超顕微蛍光分光分析

上述の如く *Mf. immitis* の吸収スペクトル描記に成功し得なかつたので UMSP-I Zeiss に特に Farrand Optical Co. UVIS を附設し grating monochromator を用いて monochrom 波長で励起し, 3 者の超顕微蛍光スペクトルを描記した。図 9 に示す如くミミズ頭部表皮蛍光部は 365nm 励起で Fmax 530nm と 570nm に Shoulder を有し 410nm 励起では 535nm に Fmax と 580nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示

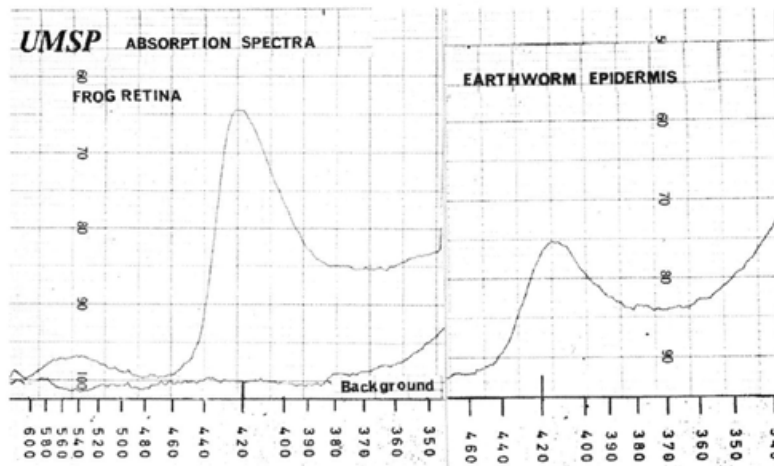


Fig. 8. Ultramicroscopic absorption spectra of the autofluorescent granules in the outer rod segment of frog retina and in the earthworm epidermis.

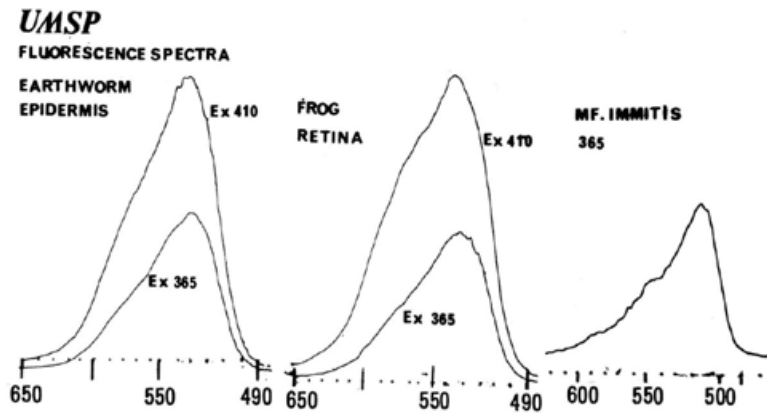


Fig. 9. Ultramicroscopic fluorescence spectra of earthworm epidermis, frog retina and of *Mf. immitis*.

した。トノサマガエル網膜杆体外節の Rhodopsin 蛍光部は 365 nm 励起で 530 nm に Fmax と 580 nm に Shoulder を示し 410 nm 励起では 540 nm に Fmax と 580 nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。

Mf. immitis の蛍光顆粒部は 365 nm 励起で 525 nm に Fmax を 550 nm に Shoulder を示した。

前述の如く琉球大学における Nikon の SUR - Ftype の FMSP で描記したミミズ頭部表皮の蛍

光部とヒキガエル網膜杆体外節の蛍光部の蛍光スペクトルが 510, 550 nm の 2 個の Fmax を示しており UMSP - I Zeiss 附設の蛍光記録装置による *Mf. immitis* の超顕微蛍光分光分析の Fmax と Shoulder が前 2 者の 2 個の Fmax に近似していることは興味ある所見と思われる。

Authentic の V. A paltimate は 365 nm 励起で 530 nm に Fmax を示し (図 10), β - Carotene を含むニンジンの蛍光部は 365 nm 励起で 520

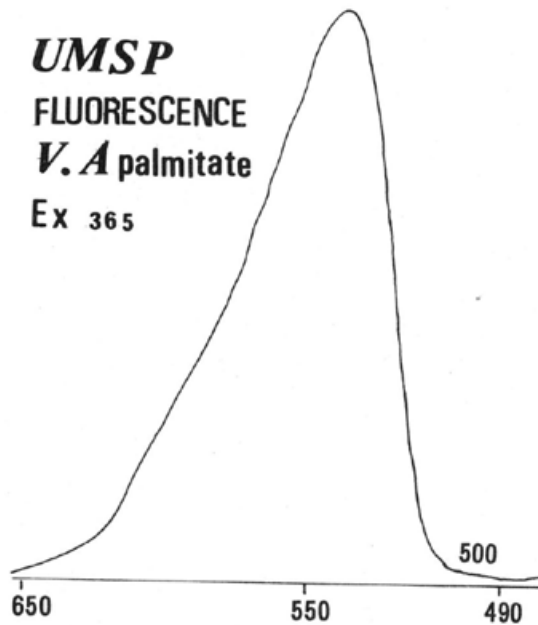


Fig. 10. Ultramicroscopic fluorescence spectrum of Vitamin A palmitate.

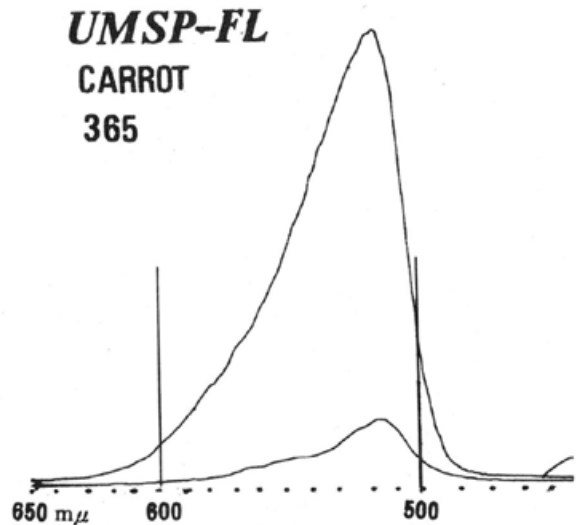


Fig. 11. Ultramicroscopic fluorescence spectrum of carrot.

nmにFmaxを示した。(図11)

Ⅲ. Vitamin Aの組織化学的検出

1) : Kupfferの鍍金法の和気氏変法を*Mf. immitis*の薄層塗抹空気乾燥固定標本に施したところ黒色ないし黒赤色の顆粒が認められた。(写真2-3), 本反応は前述の如く和気教授により肝の星細胞内のVitamin Aの貯蔵を示すものであることが広汎な実験で確認されている。ただし肝の切片にSlitより紫外線を照射した部位では, 鍍金反応が抑制されるという。

従って同一仔虫について蛍光顆粒そのものとV. A反応陽性顆粒との同一性を直接証明することは技術的に困難であると思われた。

2枚の薄層塗抹標本の一部の仔虫を蛍光顕微鏡撮影した後, 鍍金法を行なって比較検討した。同一標本の未照射部の仔虫は明らかに陽性反応(写真2, 3)を示したにかゝらず蛍光撮影した仔

虫の多くはV. A反応陰性を示した。(写真4, 5) しながら写真6, 7の如く写真2, 3ほど明瞭ではないが蛍光写真と照応すると同一仔虫の一部の蛍光顆粒に相当する部位にV. Aの赤い弱い反応がみられた。この所見は仔虫の自家蛍光顆粒とV. A反応顆粒の同一性を示すものと解せられた。

2) : ミミズ頭部表皮の凍結切片にホルマリン固定ののち鍍金法を施した。表皮に沿って陽性顆粒が全表皮の約1/3程度にみられた。

3) : カエル網膜杆体外節に一致して密に配列した陽性顆粒が無書にみられた。

総括および考按

以上著者は、*Mf. immitis* の自家蛍光顆粒物質の本態に関する研究を行なって次の知見を得た。

1. *Mf. immitis* の顕微蛍光分析 (Microspectrophotometry) を行ない 365, 410nm 両波長励起により 540nm 付近に Fmax を有する蛍光スペクトルを得た。Flavin 体は riboflavin, FMN, FAD とともに 365nm 励起では蛍光を発したが 410nm 励起では発行しなかった。Vitamin A palmitate は 365, 410nm 両波長励起で共に 550nm 付近に Fmax を有する蛍光スペクトルを示し、*Mf. immitis* のそれに類似した。

ニンジンの切片も Fmax 540nm を示した。ミミズ頭部表皮の蛍光部は 365nm 励起で 540nm 付近に Fmax を有し 410nm 励起では 560nm 付近に Fmax を有し 580~590nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。マウス網膜杆体外節の蛍光部は 365nm では 525nm に 410nm 励起共では 545nm に Fmax を有し 580nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。なお琉球大学に新たに設置した Nikon SUR-F type で描記したミミズ頭部表皮蛍光部およびアジアヒキガエル網膜杆体外節蛍光部の蛍光スペクトルは 400nm 附近励起で 510nm と 550nm に 2 個の Fmax を示した。

2. 超顕微分光分析 (Ultramicrospectrophotometry) による *Mf. immitis* 蛍光顆粒部の吸収スペクトルの描記には成功しなかったが、ミミズの頭部表皮およびトノサマガエル網膜杆体外節の蛍光顆粒部の吸収スペクトルは、前者は 410~420nm の間に、後者は 420~430nm の間に λ_{max} を有する類似した吸収スペクトルを示した。この UMSP-I zeiss に Farrand Optical Co. UVIS 蛍光記録装置を附設し grating monochromator で monochrom 波長で励起して 3 者の蛍光顆粒の超顕微分光スペクトルを描記した。ミミズ頭部表皮の蛍光顆粒部は 365nm 励起で Fmax 530nm と 570nm に Shoulder を有し、410nm 励起では 535nm に Fmax 580nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。トノサマガエル網膜杆体外節の蛍光顆粒部は 365nm 励起で 530nm

に Fmax 580nm に Shoulder を有し 410nm 励起では 540nm に Fmax 580nm に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。*Mf. immitis* の蛍光顆粒は 365nm 励起で 525nm に Fmax 550nm 付近に Shoulder を有する蛍光スペクトルを示した。

3. *Mf. immitis* は Kupffer 鍍金法 和気氏変法により Vitamin A に基くとされている黒色ないし黒赤色反応を示した。

ミミズ頭部表皮、カエル網膜杆体外節にも同様の陽性顆粒がみとめられた。

梶屋は (1975) "ポルフィリン症の臨床" の講演の中で Shemin & Rittenberg (1946) が酢酸と glycine を用いて Porphyrin 体の生合成に成功したことは地球上生命誕生の生化学的機序と深くかかわっていることを指摘した。すなわち Urey (1952) は原始地球上では CO₂ は存在し得ず過剰の H₂, CH₄, NH₃, H₂O (水蒸気) が存在し最初の炭素源は CH₄ にちがいないとした。S. L. Miller (1953) は Urey の説得に基いて上述の混合気体に沸騰水上で火花放電を行ない多数の脂肪酸とアミノ酸を得たがとくに酢酸と glycine が大量にえられた。この酢酸と glycine から porphyrin 体が出来ることはそれより 7 年前に Shemin と Rittenberg が明らかにしている。一度酢酸が出来るとアセト酢酸-酪酸を経て脂肪が、また dioxycetone を経て糖を生ずる。Glycine からはもちろん蛋白を生じ核酸もまた Glycine から生成され得る。かくして生物に必要な物質が未だ冷めやらぬ原始地球上の次々の雷雨によってつくられた状況を容易に理解することができる。

固より生物の進化に伴なってむしろ進化を遂げることが出来たのは少しずつ変異した生化学反応が新たに出現したためにちがいないが、ほとんどすべての生物が意外に数少ない同一の反応によって生命を維持している。天然のアミノ酸はすべて L 型であり、核酸のラセン構造はすべて右巻きである。DNA 鎖に含まれる 4 種の塩基 (Adenine, Guanine, Thymine, Cytosine) の中の 3 個ずつの塩基の順列組合せ (triplet = codone) はすべて 1 個のアミノ酸合成と対応している。これはすべての生物に共通しており現代遺伝学はこの事実に立脚している。このように考えてくる

と *Mf.* やミミズに光に感じる物質があるとするならば既知の visual pigments から著しく相隔った物質ではあるまいと考えられる。榎屋がはじめ flavin 体に固執したのは生化学的に flavin 体が検出され、しかも原生動物たとえば *Euglena gracilis* では flavin 体が少くとも accessory photoreceptor として作用するとの知見があったからである。

著者は上記の如く *Mf. immitis* およびミミズの頭部表皮に Vitamin A-carotenoid, Rhodopsin と近縁の物質の存在を強く示唆する所見を得た。

顕微並びに超顕微蛍光分析の F max を比較すると次の如くなる。(表2)

研究方法の項で断わった様に著者の吸収スペクトル、蛍光スペクトルの描記が pH は生体のままとした事、室温で、しかも完全暗室で行われたものでない事は遺憾であるが、実際に凍結切片を完全暗室で作製することは困難でもあった。

未露光のカエルの Rhodopsin の吸収スペクトルの λ max は 498nm であるが露光によってその主 peak は Prelumirhodopsin の 497nm ($> -40^{\circ}\text{C}$), Metarhodopsin I の 478nm ($> -15^{\circ}\text{C}$), Metarhodopsin II の 380nm ($> 0^{\circ}\text{C}$), all-trans retinal の 387nm と λ max が shift することが知られている。

他方下等動物の Rhodopsin ないし Porphyrin の λ max は 462~536nm と広く

Table 2. Comparison of Fmax among the materials, examined.

FMSP	Exc.	365nm	410nm
<i>Mf. immitis</i>		540nm	540nm
Earthworm epidermis		540nm	560nm
Mouse retina		525nm	
V.A palmitate		550nm	550nm
Carrot		540nm	
UMSP-FL			
<i>Mf. immitis</i>		525nm	
Earthworm epidermis		530nm	535nm
Frog retina		530nm	540nm
V.A paltimate		530nm	
Carrot		520nm	

(Reference; FMSP -in Ryukyu, Excitation by about 400nm)

	Fmax I	Fmax 2
Earthworm epidermis	510nm	550nm
Asian toad retina	510nm	550nm

分布することが知られている。節足動物、軟体動物以下の下等動物の photobehaviour に関連する色素については未だ知られていないが Wald (1946) は 30 年以上も前から“光覚過程に関与する物質はほとんどすべて Carotenoids である”とのテーゼを提出しているが下等動物については明確な報告は参照出来ない。

Wolken (1971) は節足動物、軟体動物以上においては既知の視色素はことごとく Vitamin A₁ ないし Vitamin A₂ を含むことを総括している。著者の顕微蛍光分析、超顕微蛍光分析および組織化学的所見は *Microfilaria immitis* の自家蛍光顆粒がミミズ頭部表皮の蛍光顆粒と共に Vitamin A-carotene-Rhodopsin と近縁の物質を含有していることを強く示唆している。

他方一般に動物界において photoreceptor の分布は眼のみに限局しているものではない。皮膚光覚 (Dermal light sense DLS) は広く動物界に知られており特定の眼を有しない線形動物 (*Nematoda*) や環形動物 (*Annelida*) では特に重要である。樹屋はかつて *Mf. immitis* の横断面を蛍光顕微鏡で観察し自家蛍光顆粒は多くのものが体表近くに存在することを認めた。Croll (1970) は多くの動物で DLS の活動スペクトルは 500nm 附近に鋭い peak を示すことを記載している。縮瞳筋の光による収縮反応は瞳孔対光反射として Brown-Sequard (1847) 以来、日常の臨床に応用されているが Seliger (1962) は完全に摘除したウナギの虹彩 (網膜・視神経と離断) で光の直接刺激による縮瞳筋の収縮をみとめその活動スペクトルを描記したがその peak は前年 Wald (1961) が得たウナギの Rhodopsin の吸収スペクトルの λ_{max} に一致することを報告している。

以上の著者の所見と先人諸家のヒトおよび動物の視覚、光覚、光による行動に関する業績を参照すると夜間出現性仔虫の自家蛍光顆粒およびミミズ頭部表皮の蛍光顆粒は photoreceptor として機能し、他動物の Rhodopsin と近縁の物質を含有すると解せざるを得ない。樹屋 (1978) は Warszawa における第 4 回国際寄生虫学会の workshop で著者らの知見を報告すると共に医

学的にみるとミミズはすべてポルフィリン症であり頭部表皮の自家蛍光顆粒はミミズの眼に相当し日光曝露による致命的傷害から身を保護するための光検知器であると附言した。これら photoreceptor の本態の研究には Seliger らが行なっている様にその活動スペクトルを描記して既知の Photoreceptor - Carotenoids - Visual Pigments との異同を比較検討することも極めて重要であり、著者は樹屋と共にその機会を得ることに努力して来たが、今日まで果し得ていない。

共同研究者与那嶺は樹屋と共に *Mf. immitis* の negative phototaxis を in vitro で証明し映画撮影にも成功し、しかも黒、赤、橙、黄色で遮光した部には明部より仔虫が逃避したが緑-青色でおおった部への逃避は著明でないことを認めた。しかしマジックインキ、着色セロファンを用いた観察であり monochrom の波長を用いたものではないので単に励起光を遮断したためと考えざるを得ない。

上記の国際学会で発表の夜ある外人学者が“自然は単純である”と樹屋に語った由である。あらためてここに引用しておきたい。

結 論

Mf. immitis の自家蛍光顆粒はミミズ頭部表皮の自家蛍光顆粒と共に、マウス、カエル等の網膜杆体外節の蛍光顆粒 (Rhodopsin) と類似した顕微蛍光スペクトルおよび超顕微蛍光スペクトルを示した。*Mf. immitis* の仔虫体内に鍍金法による V.A 陽性顆粒を検出した。蛍光撮影後、V.A 反応は弱く又は陰転するが、たまたま短時間露光の同一仔虫の蛍光写真と比較し、V.A 反応顆粒は蛍光顆粒と一致する所見を得た。これらの光力学物質は仔虫およびミミズの photoreceptor として機能し、仔虫、ミミズの Negative phototaxis の原因物質であると解せられた。

謝辞、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金久卓也教授のご好意、同教室各位のご好意に感謝致します。御校閲を賜った琉球大学内科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山田正興教授、技術のご協力をいた

だいた同大学庄野技官, Vitamin A の組織化学的研究のご指導をいただいた東京医科歯科大学第一解剖学教室の和気健二郎教授および同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武石徳五郎先生(福岡), 東京農工大学大石勇教授, 三阪力先生(浦和市)に感謝致します。本研究のご指導を賜った琉球大学第一内科前教授榎屋富一教授に感謝致します。

文 献

- 1) Croll, N.A. : The behaviour of nematodes, their activity, senses and responses. Edward Arnold (Publishers) Ltd, London 1970.
- 2) Gruzzo, A. V., G. L. Pool Fluorescence spectra of the intermediates of rhodopsin bleaching Photochem. Photobiol. 9 565-570, 1969.
- 3) Hawking, F: The periodicity of microfilariae. IV. stimuli affecting the migration of the microfilariae of *Dirofilaria aethiops*, *D. repens*, *D. immitis*, *Dipetalonema blanci* and *Litomosoides carinii*. Trans. Roy. Soc. Trop Med. Hyg. 50, 397-417, 1956.
- 4) Hawking, F and Gamage, K: The action of serotonin in vivo upon the microfilariae of *Dirofilaria*, *Loa loa*, and other five species. Parasitol. 48, 393-402, 1968.
- 5) 川崎兼陽: フィラリア症の病態出現に関する研究 (F-10), フィラリア仔虫の定期出現性機序について, 鹿大医誌 9 (6); 1486-1512, 1958.
- 6) Kupffer, K, W: Ueber Sternzellen der Leber Arch. Mikr. Anat. 12, 353-358, 1876.
- 7) Lane, C.: The mechanism of the filarial periodicity. 216, 1291-1296, 1929.
- 8) Lane, C.: The mechanical basis of periodicity in *Wuchereria bancrofti* infection. Lancet. 225, 339-404, 1933.
- 9) Manson, P.: On filarial periodicity. British Medical J. 2: 644-646. 1899.
- 10) Masuya, T : Studies on the Mechanism of the Filarial Periodicity. ---The Autofluorescence in the Microfilariae and Their Periodicity. Jap. Journal of Parasitology. Vol. 25, No.4, 283-313, August, 1976.
- 11) Masuya, T: Photodynamic substance theory in the mechanism of the filarial periodicity. Abstract, Ninth, International Congr, P Trop. Med. Malaria, Athens October, 14-12, 2, 122, 1973.
- 12) Masuya, T : The autofluorescence in the microfilariae and their periodicity. 2-th. Internal. Congr. Parasitol. Washington. D. C. Sept. 1970.
- 13) Masuya, T.: Further studies on the mechanism of the microfilarial periodicity. 4th Internl congr parasit warszawa, 1978.
- 14) 榎屋富一: ポルフィリン症の臨床——西日本皮膚科 37:331~338, 1975.
- 15) 榎屋富一, 浜田康治, 内園洋三: フィラリア症の症態生理に関する研究——日内会誌(抄) 47, 478, 1958.
- 16) 村田 一: 糸状虫仔虫の末梢血管内定期出現性に関する研究 (I) 医学研究 13, 985-1022, 1939.
- 17) O'connor, F. W. O.: Filarial periodicity with observations on the mechanism of migration of the microfilariae from the parent worm to the blood stream. Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med. 6, 263-272, 1931.
- 18) 大石 勇: 糸状虫仔虫の定期出現性と成虫の関係について, 寄生虫誌, 6: 264, 1957.
- 19) Popper, H: Histologic distribution of vitamin A in human organs under normal and under pathological conditions. Arch. Pathol 31, 766-802. 1941.
- 20) Seliger, H.H. and W. D. McElroy: Light, Physical and biological action. Academic Press, New York and London 1965.

- 21) 菅沼清次郎: *Filaria bancrofti* の定期出現問題に関する研究補随 東医誌 35, 381~430, 544~583, 613~673, 1921.
- 22) 鶴見三三, 武田光磨: 人体肺内フィラリア仔虫の昼間検出について—肺穿刺による— 診断法 東京医事新誌, 3178, 631, 1940.
- 23) Wake, K: Distribution of vitamin A in the liver. Proc. Fifth Ann. Gen. Meeting of Japanese Histochemical Association 103-106, 1964
- 24) 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.
- 25) 和気健二郎: ビタミンA貯蔵, コラゲン産生細胞系—肝臓の星細胞をめぐる— 肝臓学の進歩, 第5巻別冊, 肝臓研究会 41~63, 1979.
- 26) Wolken, J, J: Invertebrate photoreceptors Academic press, New York and London 1971.
- 27) Yamada, M: Microfluorophotometry and its application Sogo Rinsho 19, 1399-1410, 1970.
- 28) 吉田朝啓: 琉球におけるフィラリアの研究, 沖繩よりポリビア移民のマイクロフィラリア定期出現性の変移—長崎熱研誌 8, 127-135, 1966.

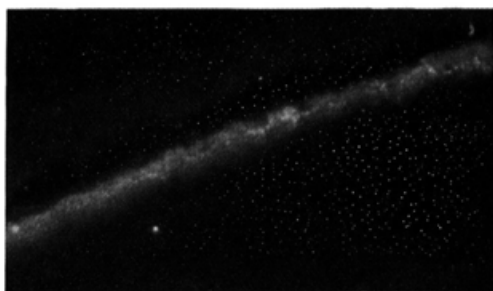


Photo. 1. Fluorescence micrograph of the outer rod segment of mouse retina.

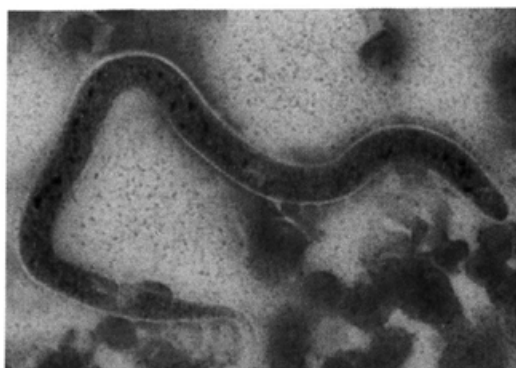


Photo. 2. Black granules (positive) in *Mf. immitis*, impregnated with *chlorauric acid*.

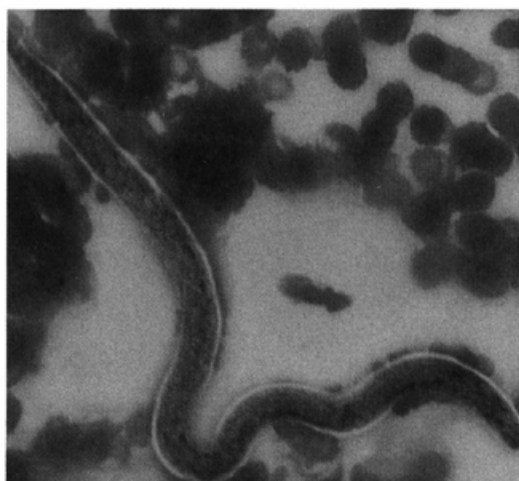


Photo. 3. Black red granules (weak) in *Mf. immitis*.



Photo. 4. Negative reaction of Vitamin A staining of *Mf. immitis* previously irradiated with BV.

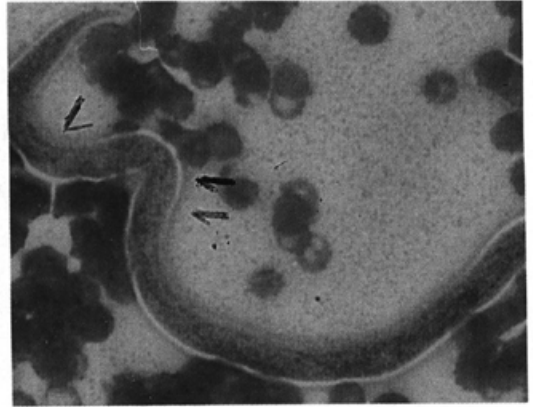


Photo. 6. Residual red granules in *Mf. immitis*, previously irradiated.

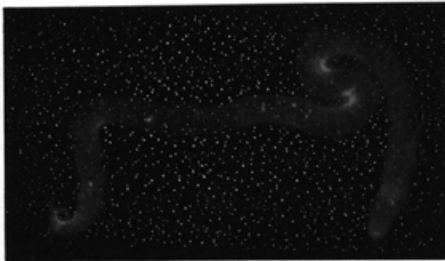


Photo. 5. Fluorescence micrograph of the same *Mf. immitis* with that of photo. 4.

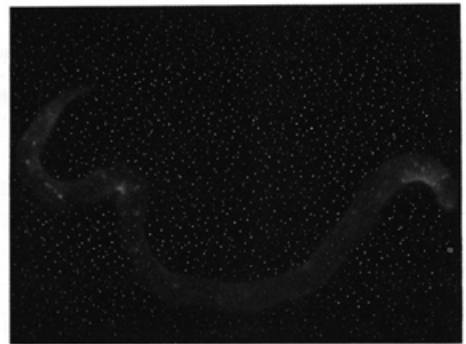


Photo. 7. Fluorescence micrograph of the same *Mf. immitis* with that of photo. 6.

Studies on the mechanism of the microfilarial periodicity (FN-3)

— Studies on the essential feature of the fluorescent substance (s) in the nocturnal microfilariae.

Masakazu Toguchi

First Department of Internal Medicine, Kagoshima University
(Director; Prof. Takuya Kanehisa) outside student

Department of Internal Medicine, University Hospital, University of the Ryukyus
(Director: Prof. Goro Mimura and Former Prof. Tomiichi Masuya)

1. Micro fluorospectrophotometry, using Nikon SUR -F type, equipped with high pressure mercury lamp, (HBO Osram 200W Toshiba) was done on *Mf. immitis*, earthworm epidermis, mouse retina, carrot, authentic Vitamin A palmitate and authentic flavins.

Mf. immitis showed microscopic fluorescence-spectra with Fmax at 540 nm, excited both by 365 and 410nm.

Authentic flavins, riboflavin, FMN and FAD, gave fluorescence spectra with F max between 530 and 540 nm, excited by 365 nm, while they did not fluoresce when excited by 410 nm. Similar autofluorescent granules were seen in the earthworm epidermis (head segments) besides strong red fluorescence of porphyrins in the deeper parts of the body.

Microscopic fluorescence-spectra were obtained in the fluorescent parts in the epidermis (head segment), with F max near 540 nm, excited by 365 nm, and with F max near 560 nm with shoulder between 580 and 590 nm, excited by 410 nm.

Similar autofluorescent granules were observed in the outer rod segment of mouse retina and fluorescent parts showed fluorescence spectra with F max 525 nm excited by 365 nm. Vitamin A palmitate showed fluorescence-spectra with F max at 550 nm, excited both by 365 and 410 nm. Sections of carrot, containing betacarotene, gave similar spectra with F max at 540 nm, excited both by 365 and 410 nm.

Very similar fluorescence-spectra were obtained, using newly introduced microfluoroscpectrophotometer, in our University Hospital, with two F max at 510 and 550 nm excited about 400 nm, in the earthworm epidermis and in the outer rod segment of retina of Asian toad.

2. Ultramicrospectrophotometry, using UMSP-1 Zeiss, was done in the earthworm epider-

mis and frog retina.

Ultramicroscopic absorption spectra were obtained in the fluorescent granules in the earthworm epidermis, with λ max between 410 and 420 nm.

In the fluorescent granules in the outer rod segment of frog retina, λ max was between 420 and 430 nm. Absorption spectrum could not be obtained in case of microfilariae.

Fluorescence recorder (Farrand Optical Co. UVIS) was attached to UMSP-1 Zeiss and excitation was done by monochromatic light, using grating monochromator.

Ultramicroscopic-fluorescence spectra were compared among the autofluorescent granules in *Mf. immitis*, earthworm epidermis and in the outer rod segment of frog retina.

The spectra showed F max at 525 nm with a shoulder at 550 nm in case of *Mf. immitis*, excited by 365 nm.

Those of the earthworm epidermis gave F max at 530 nm with a shoulder at 570 nm, excited by 365 nm and at 535 nm with a shoulder at 580 nm, excited by 410 nm.

F max were seen at 530 nm with shoulder at 580 nm excited by 365 nm, and at 540 nm with shoulder at 580 nm excited by 410 nm, in the fluorescent granules in the segment of frog retina.

Vitamin A palmitate gave F max at 530 and carrot gave F max at 520 nm.

3. Histochemical demonstration of Vitamin A was done using Wake's modified method of Kupffer's gilding with chloroauric acid ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

Black positive granules were detected in all microfilariae, examined without previous irradiation. The inhibitory effect of UV-irradiation against this reaction made it difficult to prove the identity of such black granules (Vitamin A) with the autofluorescent granules in the microfilariae.

However, in the *Mf.* irradiated comparatively shorter time, were detected red granules (weak Vitamin A reaction) in the same locality with autofluorescent granules.

Black granules were also detected in the fluorescent parts of the earthworm epidermis in the head segment and in the outer rod segment of frog retina.

Conclusion; All the results, obtained, strongly suggest that the autofluorescent granules in the nocturnal microfilariae and in the earthworm epidermis (in the head segment) may act as photoreceptors and may be responsible for their negative phototaxis, which has been demonstrated by cinemicrography by Masuya and Yonamine, and further, they may contain Vitamin A-carotene and very similar to the visual pigments in the other animals.

(Ryukyu Univ. J. Health Sci. Med. 2 (4))