

*Trypanosoma gambiense* の音波破壊液による

## 低血糖作用について

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉登教授)

本 村 一 郎  
もと ひら いら ちう

The Hypoglycemic Action of Extract from *Trypanosoma gambiense* Bodies Destroyed by Sonic Wave.  
 Ichiro MOTOMURA Pathological Department, Research Institute of Endemics, Nagasaki University  
 (Director: Prof. Noboru TOKURA)

本論文の要旨は、第5回熱帯風土病研究会(昭和38年11月、長崎)に於いて口演発表した。

## 緒 言

睡眠病 trypanosome 感染症の死因に就いては、本世紀の初頭より現在に至る迄、多数の研究成果が報告せられているが、これらの報告を分類すると、次の5学説に区分することができよう。すなわち、

- (1) 毒素説 (LEBER 1908, et al.)
- (2) アンドーグス説 (KLIGLER, GEIGER and COMAROFF 1929)
- (3) 機能障礙説 (ANDREWS, JOHNSON and DORMAL 1930)
- (4) 加里毒説 (ZWEMER & CULBERTSON 1939)
- (5) 低血糖説 (SCHERN 1928, et al.)

である。

1908年、LEBERは、*Trypanosoma brucei* (以下*T. brucei* と略す) 感染マウスの血液を熱及び薬物処理によって殺菌した後、家兎前眼房内に注射して角膜炎の発現を認め、“Trypanotoxin”を証明して、trypanosome の毒素産生説を最初に樹立した。これに続いて、BECK (1910) は *T. gambiense* 感染動物の血液濾液を用い、LAVERAN & PETTIT (1911) らは *T. evansi*, *T. brucei* の乾燥死菌を用いて、発熱、痙攣、衰弱、嗜眠状態から遂に死に致らしめ、毒素説を支持する見解を発表した。その後も相次いで多数の研究者 (LAVERAN & PETTIT 1911; SCHILLING & RONDONI 1913; LAVERAN 1913; ROSKIN & ROMANOVA 1938; REICHENOW 1921; REGENDANZ & TROPP 1927; LEDENTU 1928; ZOTTA & RADACOVICI 1929;

LOCATELLI 1930; VON BRAND & REGENDANZ 1931; KRIJGSMAN 1933; FRENCH 1938) によって、毒素説を支持する研究報告がなされている。

本邦に於いては、登倉 (1935) は、*T. gambiense* と *T. equiperdum* の磨砕抽出液を家兎の角膜内に注射して、潰瘍、白斑の出現を確認し、併せてこの現象が免疫家兎及び免疫血清では阻止される事実から、この毒素の特異性を指摘した。この注目すべき報告と相前後して、新見 (1935)、中村 (1941)、森住 (1949) らは、*T. gambiense* による貧血は、虫体の産生する毒素が造血臓器を侵し、ついで白血球簇のそれをも侵すこと、虫体自己の崩壊物質にはかかる作用は極めて軽度であることを明らかにした。1958年、川満は、登倉教授の指導の下に、*T. gambiense* の内毒素 (trypanotoxin) による低血糖を証明し、Trypanosomiasis に於ける低血糖は、Trypanosome 生体の糖消費によるばかりでなく、trypanotoxin による糖原の生産貯蔵の破綻に帰すると考え、かくして、trypanosomiasis の毒素死因説は一層強固な地盤を形成するに至った。

しかしながら他面において、これまでに発表された報告の中には、この毒素説を真向から否定する実験成績 (BRAUN & TEICHMAN 1912) もあり、また、アンドーグスを致死因子と見做した報告 (KLIGLER, GEIGER and COMAROFF 1929) や、虫体による機能障礙説を主張する研究 (ANDREWS, JOHNSON and DORMAL 1930) もあり、加里毒を死因と考えた報告 (ZWEMER & CULBERTSON 1939) も見られた。一部の研究者は上述の三学説を全面的に否定する見解を発表し、虫体

によるアシドーシス、加里毒及び機能障害等は、直接死の原因とはなり得ず、寧ろ瀕死期の二次的産物に他ならないことを指摘している (HOPPE & CHAPMAN 1947; IKEJANI 1946; SCHEFF & THATCHER 1949)。また、他方においては、睡眠病 trypanosome 感染末期に動物の血糖値が著しく低下する事実に着眼した SCHERN (1928)一派 (VON FENYVESSY 1926; CORDIER 1927; FRENCH 1938; HOPPE & CHAPMAN 1947等)は、Trypanosomiasis の死因は毒素のためではなくして、虫体の糖消費に帰因するといひ、脳下垂体副出動物でも低血糖を惹起するが (MOLEMUT 1947)、これらの低血糖はアドレナリン投与によって正常に復帰するし (REGANDANZ & TROPP 1927; KRIJGSMAN 1933)、また、薬物によって虫体を除去すると低血糖が正常に戻る (SCHEFF 1932)、というような観察も行なわれ、Trypanosome の低血糖作用はインシュリンと同作用であるとも云われた (HOPPE & CHAPMAN 1927)。

然るに、これらの実験報告とは逆に、BROWNING (1927) は血糖の低下は稀であるといひ、CORDIER (1927) や SAVINS (1927); WALRAVENS (1931); WORMALL (1932) 等は血糖値に格別の変動はないと報じ、否、寧ろ高血糖を示すという ANDREWS & SANDERS (1928); SCHEFF (1932) 及び BELL & JONES (1947) 等の報告もあるなど、まさに、諸説紛紛として方向を見失うの感があつた。

最近、川満 (1958) は *T. gambiense* の内毒素 (Trypanotoxin) と血糖との関係を追及し、この毒素はインシュリンと大差のない著明な低血糖作用を有し、それは ACTH 及び コーチゾン によって拮抗されるが、アドレナリンによっては抑制されず、また、オバホルモン及びオオホルミンによって幾分抑制されると報告した。氏が実験に使用した Trypanotoxin 液は、*T. gambiense* の 10% 加熱原虫死体浮游液であったが、今回、著者は *T. gambiense* 生体を強力音波発生装置を用いて音波破壊液を調製し、それによって川満の報告と同様の低血糖作用がみとめられるか否かを実験的に証明しようと企図した。

血糖測定法としては現在最も新しく、且つ操作が簡単で、定量精度も高く、個人誤差の少ないといわれる百瀬法 (1962) を採用し、比色には光電分光光度計を使用した。その他、Trypanosomiasis における原虫数と血糖値の関係、並びに臨床所見について補遺する成績を得たので、茲に報告する。

## 実験材料並びに実験方法

### A. 供試資料

実験に供用した *Trypanosoma gambiense* は、大阪大学微生物病研究所より分譲された 1 株であったが、実験に使用するまでは当教室においてマウス継代接種によって保存していたものである。

### B. 実験方法

1. **Trypanosome 原虫 (T 原虫と略す) の採集法**  
マウス継代接種によって保存されていた *T. gambiense* の生理的食塩水浮游液を体重  $120 \pm 20$  g の健康ラットの腹腔内に注射すると、接種後 2 日目から末梢血液中に原虫が出現し始めるが、逐日、尾端を缺で切断して得られる 1 滴の血液を鏡検して、大半のラットが、所謂、Parasitemia の最高潮に達している時期を選び、全ラットを心臓穿刺によって可及的多量に血液を採集して、目的の T 原虫を蒐集した。

血中から原虫を分離する方法は、まづ、採取した血液を防凝固のために、4% クエン酸ナトリウム加 0.85% 生理的食塩水を血液の約 5 量添加し、その後、800~1000 rpm 10~12 分間遠心沈澱を行ない、血球と原虫との僅かの比重差を利用して、赤色層、白色層、白濁層の 3 つの層に分離された。赤色層は大部分が赤血球より成り最下部を占め、赤色層のすぐ上面には白血球よりなる白色層が位置し、最上部の白濁層はほぼ原虫のみによって占められている。然し乍ら、1 回の操作だけでは完全に赤血球は除去し得ないので、白濁層を再三 1000 rpm 10 分間遠心操作を繰返して血球を除く。次いで、この上清に 3000 rpm 15 分間遠心沈澱を施して原虫を集めた後、生理的食塩水で 2~3 回洗滌した。かかる操作を経て蒐集せられた T 原虫は生理的食塩水に再浮游させ、WINTOROB 遠心沈降管を用いて 10% 濃度に調整した (3000 rpm/30 分遠心沈澱する)。以上の術式はすべて無菌操作のもとに行なわれた。

### 2. 音波曝射条件

原虫浮游液は、久保田式 (KMS-200) 強力音波発生装置 (振動数 10 kc/s, 想定出力 200 W, 流水冷却式) を用いて処理せられ虫体が破壊せられた。曝射の条件は、100 V, 50 W, 20°C と要約される。KMS 各計器目盛を附記すれば、電圧計目盛 102 volt, 陽極電流計 85 mA 陽極電圧計 2.3 KW, 出力調整器 3 Tap, 同調調整器 40 micro であった。曝射後 5 分間隔で処理槽から資料のごく少量を採り、虫体破壊の過程追求はギムザ染色鏡検によって形態学的観察を行ない、虫体崩壊を

確認して、曝射15分後に総ての操作は閉止された。

### 3. 虫体数の算定法

ラットの尾端を鉋で切断し、湧出する血液を Sahli ピペットで正確に0.02ml採取し、予め用意しておいた小試験管に GOWERS の稀釈液を2.00ml入れ、この液の中に血液0.02mlを加えてよく振り混ぜた後、THOMA 血球計算盤上に伸展させて280倍率の顕微鏡下で原虫数を計算した。GOWERS の稀釈液は次の組成より成っている：無水硫酸ナトリウム12.5g + 氷醋酸33.3ml + 蒸留水200.0ml。

### 4. 血糖測定の術式

血糖の測定は、百瀬ら(1962)の創案した3,6ジニトロフタル酸法(百瀬法)のうち、超微量法の術式に従い、小動物及び低血糖測定法を利用した。測定手技の詳細は原著に譲って、ここでは要点だけを記述するにとどめておく。

#### (1) 器具及び器械

普形水浴、リングバーナー、加熱用金網籠、鹿皮片、2連ゴム球、遠心分離器(4000rpm密閉式)、分光光度計(EPU-2A Type 日立製)、迅速自動ピペット(0.50ml; 0.58ml), SAHLI ピペット(0.02ml), メスピペット(5.0ml), 2.0ml目盛自動ビュレット, ストップウォッチ, 時計皿。

#### (2) 試薬

2%硫酸亜鉛液, 2%水酸化バリウム液, 25%塩化カリウム加0.3%3,6ジニトロフタル酸液, 25%炭酸カリウム加5%チオ硫酸ナトリウム液(アルカリ液と呼ぶ)。各試薬は2.0mlの自動ビュレットを装備した褐色瓶に貯え、ソーダ石灰管をつけて炭酸を吸わないように保存した。

#### (3) 検量線の作成

ブドウ糖を100°C/2時間乾燥後、その100mgを精密に計り、蒸留水に溶かして1000mlとする(ブドウ糖100µg/ml)。この液を5, 10, 20, 30及び40mlをとり、それぞれ蒸留水でうすめて100mlとし、5~40µg/mlの液をつくる。発色用試験管に上記糖液0.50mlづつを各濃度について3本宛とり、3.6ジニトロフタル酸液0.40ml及びアルカリ液0.40mlを加えて混和し、別の試験管に、蒸留水0.50mlづつ3本とり、同様に試薬を加えて、ブランク用とする。各試験管を後述の方法と同様に発色及び冷却を行なった後、蒸留水を加えて全量5.0mlとし、3回転倒してよく混ぜたのち、ブランク3本を混ぜたものを対照として、分光光度計の450mµで吸光度を測定した。この操作を3回繰返してもっとも確かと思われる点を結んで、検量線を作成した。

#### (4) 採血並びに血糖測定法

体重120±20gの、外観上健康なラット(♀)を使用し、実験室内に於いて約1週間飼育して、一定の環境下に馴致せしめた。実験中、気温は平均24°Cであった。これらのラットの飼料は、オリエンタル酵母製品(固型飼料)と水とを与え、時々青野菜を投与した。

食餌後、約15時間を経過したラットを、巾着袋の中に入れて、尾だけを外に出して、40~45°Cの湯槽に漬けて、十分に摩擦して血管を拡張せしめた後、湯槽より取出して、乾布でよく拭ってから尾端を鉋で切断し、湧出する尾静脈血を時計皿に滴下して、直ちにSAHLI ピペットで0.02ml正確に採取して、予め蒸留水0.58mlを入れた遠心沈降管に注加してよく混ぜる。振りまぜて溶血した後、2%水酸化バリウム0.2mlを加えてふりませ、液が赤色から黒褐色に変わったら、2%硫酸亜鉛液0.2mlを加えてよくふりませた後、3000rpm 15分遠心分離して、上澄液0.5mlを発色用試験管にとり、3.6ジニトロフタル酸液0.4mlとアルカリ液0.4mlを加えてよく混ぜる。加熱用籠に並べて沸騰水中に漬ける。この際籠を水浴中に漬けると、一時沸騰が止むが、再沸騰までの時間(単式リングバーナーで1分)をいつも一定にしておく。煮沸水の中に正確に10分間漬けた後、取出して冷水で急冷する(3分間)。次いで、各管に蒸留水を加えて全量5.0mlとし、3回転倒混和する。同様に処理したブランク2本を混ぜたものを対照とした。以上の発色操作を終了してから、所定の術式に従って、分光光度計で吸光度を測定した。このようにして求められた吸光度は、検量線から糖量に換算した。

## 実験成績

### 実験1 *Trypanosoma gambiense* 感染ラットの血糖値と虫体数との関係

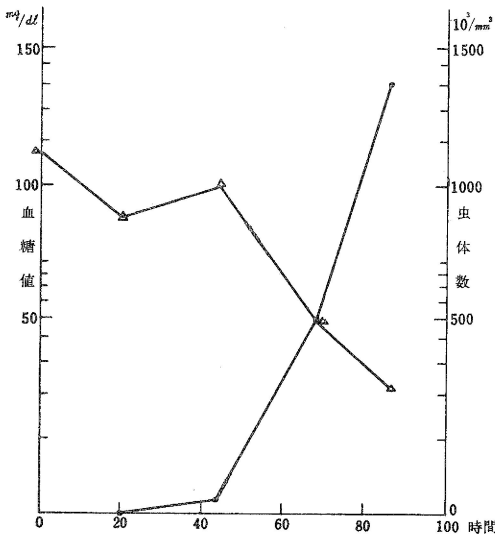
*T. gambiense* 感染ラットの血糖値及び虫体数は、感染末期に近づくに伴って、相当著明な血糖の低下現象とT原虫の急激な増殖とが認められるが、これらの成績を表1に示す。

体重110±20gの健康ラット30匹の食餌後、約15時間を経過した時期の血糖値は、最高121~最低87、平均100.7mg/dlを示したが、1mm<sup>3</sup>当たり1200個の濃度に調製されたT原虫を腹腔内接種感染せしめたラットの血糖値は、接種後、20時間乃至44時間では、生理的動揺範囲内と見做されたが、その後、低下の一途を辿り、68時間後の血糖値は平均49.3mg/dl、標準偏差10.7

表 1 *Trypanosoma gambiense* 感染ラットの血糖値と虫体数

時 間		感染前	感染後 20時間	44時間	68時間	斃死時
ラ ッ テ 数		30	30	21	25	16
血 糖 値 mg/dl	平 均	100.7	94.8	99.9	49.3	21.0
	標 準 偏 差	4.0	4.7	3.2	10.7	2.4
ラ ッ テ 数		30	30	21	25	14
虫 体 数 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	平 均	0	0	16.9	491.6	1330.0
	標 準 偏 差	0	0	2.2	7.3	3.6

であり、死の瞬間には平均21.0mg/dl偏差2.4mg/dlを示した。虫体数は血糖値の低下と逆行して増大し、注射後20時間までは末梢血液中に虫体は出現せず、44時間後に各mm<sup>3</sup>毎に5000~40,000個、平均16,900個、68時間後には10,000~1,285,000個平均491,600個、斃死の瞬間には975,000~1,560,000個、平均1,330,000個を算定するに至った。



図・1 *Trypanosoma gambiense* 感染ラットの血糖値と虫体数との相反関係 (片対数度標による)

●—● 虫体数    △—△ 血糖値

原虫の増殖の状況を片対数度標で示すと図1に図示したように、接種後20時間は誘導期 (lag phase) であって、虫体数の増加は見られず、20時間から44時間の範囲では漸増期に移行し、44時間から斃死までは

原虫数は等比級数的に急上昇して略々直線となっているのでこの時期は対数期 (logarithmic phase) と思われる。T原虫の場合、一般細菌にみられるような静止期(stationary phase)及び下降期(phase of decline)はみとめられず、原虫は対数期のまま増殖を積重ねていき、遂には、宿主を斃すものと考えられる。

これを要するに、T原虫感染ラットの血糖値と虫体数との間には、時間の経過と共に相反関係がみられ、血糖値は、接種後68時間以降漸減して、斃死時には平均21.0mg/dlにまで低下し、接種前の血糖値と比較すると79.1%の減少がみられた。この成績は、HOPPE & CHAPMAN (1947) によって *T.equiperdum* 感染ラットの血糖が死亡直前には77.4%に低下したという実験成績と略々同様であり、また、教室の川満 (1958) が *T.gambiense* 感染ラッテで同様に平均60%の低下が見られたという成績よりも著明である。

実験2 *T.gambiense* 感染ラッテの臨床所見補遺

病原性トリパノソーマの急性感染を受けたラッテに見られる特徴的な症状については、VOEGLIN, DYER & MILLER (1924) らを初めとして、多数の研究者によって報告せられているが、一般に斃死前、約6時間より眼の色が桃色を帯びるようになり、全身の立毛、後肢の運動麻痺からやがて前肢に波及し、呼吸困難となり、死亡数分前には大半は鋭い奇声を発して、全身性痙攣発作を起こし、飼育籠の中を跳躍し、遂に呼吸の停止を来たして斃死するといわれている。今回実施せられたT原虫感染実験においても、上述の症状と同様の所見が見られたが、細かに観察すると、ラッテの人工的 Trypanosomiasis には、急性と慢性の二つの経過を辿って発症し、急性症の場合、運動麻痺型と痙攣発作型とに区分せられる。すなわち、急性感染症の場合、T原虫を腹腔内接種されたラッテは、勿論、接種量の多寡にもよるが、一般に接種後2日を経て、T原虫が末梢血流中に出現し始め、爾後、時の経過と共に分裂増殖し、宿主動物は死期に向かって漸進して行く。この時期から、動物は元気なく、一箇所小さく体を丸めていたり、被毛の立毛、食慾不振が見られる他には著明な徴候もなく、斃死前1~2時間頃より後肢の脱力がみられ、肢を左右に開き腹部を地につけて、運動麻痺に陥入り、やがて、前肢にも波及して、恰かも蛙の腹這った姿とよく似ている。紅彩の色も紅色からピンク色に変わっている。死の5分以内に激しい痙攣発作を惹起して、動物は全身の筋肉を振盪させ、鋭い奇声を挙げて、遂に呼吸が停止し、やがて搏動も停止する。この間に血液の混じた泡沫を鼻から出すもの



も見られる。仮りに、これを運動麻痺型と呼称する。

もう一つの型は、斃死数分前までは健常時期と余り変わりなく、元気に運動していたものが、突如として、激しい痙攣発作に見舞われ、飼育籠の中を跳躍し奇声を発し、首を背後に上反し、間もなく、呼吸停止を起こして斃死する。このような症状を痙攣発作型と呼んでおく。

以上は急性感染症の所見であるが、動物の中には接種後40~48時間内の検査では、末梢血液中に虫体の出現を確認したにもかかわらず、その後は1箇の虫体も見ずに、動物は慢性経過を辿って2週間後頃より斃死し始める。急性感染症の斃死時間は、 $82.2 \pm 20$ 時間であった。

### 実験3 *T.gambiense* 音波破壊液の血糖低下現象

10%の濃度に調製した *T.gambiense* 生理食塩水浮游液は、既述の音波破壊術が施された後、3,000rpm 30分遠心分離されて、上澄液と沈渣とに分けられ、沈渣はさらに生理的食塩水をもって5回洗滌された。一方、同一条件下で調製せられた10%虫体浮游液は、川満(1958)の実験報告に従い、60°C/30分加熱滅菌して加熱原虫死体浮游液を作成して対照実験に供した。

体重 $120 \pm 20$ gの健康な雌ラット40匹を5群に区分して、それぞれのグループには、次の被検資料を1.0ml 腹腔内注射して、その後、5時間まで毎時間尾静脈より採血して、血糖値を測定した。注射前の血糖値はmg/dlで示し、各資料注射後の血糖値は、前者に対する百分率をもって記載したが、小数以下は四捨五入し、平均値は小数点第1位まで求めた。

1) 60°/30分加熱原虫死体浮游液注射群：一加熱原虫死体浮游液注射群の血糖値を注射前のそれと比較すると、表2に示すように、注射後4時間で最低82.5%、標準偏差7.5%であった。注射後5時間から血糖値は回復の傾向がみられ、3日後の再検査で3匹の平均105.4mg/dlの恒常値に復帰していた。

2) 60°/30分加熱生理食塩水注射群：-1)のコントロールとして加熱生理食塩水を注射したラットの血糖は、各時間毎の平均が95.3%~102.8%であって、生理的動揺の範囲内と見做された(表3)。

3) 原虫音波破壊液上清注射群：一既述の音波破壊術が施されて得られた10%原虫破壊液は、3,000rpm30分遠心分離を行なって、上清と沈渣とに分けた。この上清をラットに注射すると、表4に見られるように、血糖値は注射後4時間で最低に達し、平均80.6%、標準偏差4.9%であった。注射後5時間から血糖値は注射前の正常値へ回復の傾向がみられ、この

表2 10%加熱原虫死体浮游液1.0mlを腹腔内注射されたラットの血糖値

ラット番号	時間					
	注射前	注射後	2	3	4	5
	mg/dl	%	%	%	%	%
101	119	86	72	70	74	81
102	104	101	101	99	80	95
103	106	108	102	100	103	102
104	106	126	101	98	88	99
105	95	102	100	89	78	81
106	117	96	85	74	72	85
107	106	109	104	99	89	98
108	105	110	109	100	76	90
平均	107.2	104.7	96.7	91.1	82.5	91.3
標準偏差	1.4	5.5	4.6	6.0	7.5	3.8

表3 (対照) 加熱生理的食塩水1.0mlを腹腔内注射されたラットの血糖値

ラット番号	時間					
	注射前	注射後	2	3	4	5
	mg/dl	%	%	%	%	%
111	61	110	118	114	111	128
112	84	112	113	118	121	108
113	83	100	87	79	94	95
114	76	112	100	92	101	105
115	72	115	90	94	100	102
116	85	90	80	93	81	101
117	86	91	85	85	72	85
118	72	93	90	97	97	94
平均	77.3	102.8	95.3	96.5	97.1	102.2
標準偏差	4.4	4.6	6.5	6.1	7.4	6.0

ことは3日目の再検査によって、3匹平均102.6mg/dlに復帰していたことから窺われる。

表4 10%原虫音波破壊液上清1.0mlを腹腔内注射されたラツテの血糖値

ラツテ 番号	時間		2	3	4	5
	注射前 1	注射後 1				
201	mg/dl 85	% 117	% 99	% 95	% 94	% 96
202	101	102	102	84	76	81
203	93	121	102	100	72	76
204	92	114	105	94	79	92
205	85	126	110	101	93	107
206	88	118	104	96	85	88
207	95	94	89	74	64	66
208	100	98	93	90	82	96
平均	92.3	112.5	100.5	92.2	80.6	87.7
標準偏差	2.9	5.6	3.3	4.1	4.9	6.1

4) 原虫音波破壊液沈渣注射群：一上記3)で分離された沈渣は、生理的食塩水で5回洗滌後、10%濃度に生理的食塩水に浮遊せしめた。この液を注射すると、表5に見るように、最低95.8%最高123.1%が記録され、次の5)の対照群と大差のない値が示された。

表5 10%原虫音波破壊液沈渣1.0mlを腹腔内注射されたラツテの血糖値

ラツテ 番号	時間		2	3	4	5
	注射前 1	注射後 1				
211	mg/dl 90	% 130	% 141	% 108	% 98	% 110
212	84	148	129	100	93	101
213	105	116	110	72	82	95
214	70	128	128	102	100	97
215	85	100	98	105	115	123
216	91	139	137	102	90	104
217	102	112	129	85	75	78
218	86	110	122	104	114	119
平均	91.6	122.8	123.1	97.2	95.8	103.4
標準偏差	5.3	7.6	6.7	6.0	7.4	6.6

5) 生理的食塩水音波破壊液注射群：一生理的食塩水を音波処理し、この液を注射すると、ラツテの血糖値は、98.1~92.1%の範囲内に止どまり、何等の影響は認められなかった(表6)。

表6 (対照) 音波処置した生理的食塩水1.0mlを腹腔内注射されたラツテの血糖値

ラツテ 番号	時間		2	3	4	5
	注射前 1	注射後 1				
221	mg/dl 94	% 101	% 94	% 100	% 94	% 94
222	100	103	100	101	87	90
223	96	93	95	94	89	98
224	78	93	91	101	98	98
225	75	98	96	99	101	101
226	98	100	98	89	87	85
227	90	95	94	94	89	94
228	95	102	94	94	92	90
平均	90.7	98.1	96.5	96.5	92.1	93.7
標準偏差	4.3	1.8	1.1	2.0	2.5	2.6

これらの成績を要約すれば、60°C/30分加熱原虫死体浮遊液及び原虫の音波破壊液上清を注射すると、4時間後に最低(82.5%, 80.6%)値が得られ、対照群の血糖値の動揺を生理的動揺範囲と見做すならば、明らかに軽度の血糖低下現象が認められた。また、血糖低下を誘起する因子は、T原虫体内に内蔵せられているものと考えられる。

## 考 察

血糖の測定法は極めて多くの方法(数十種)が発表されてきたが、いずれの方法にも一長一短があって、実用に供しうるものは、数種の方法に過ぎない。現在、わが国で最も広く用いられているのは、HAGEDORN-JENSEN法で、これは1923年にはじめて発表された相当に歴史的な方法であるが、今日尚よく用いられているのは、精度が高く逆反応の少ない良法であるからに他ならない。もう一つよく用いられている方法は、SOMOGYI-NELSON法で近年光電分光光度計、または光電比色計の普及発達につれて広く用いられるようになった。いずれの方法も、相当な精度で血糖を測定する

ことができるが、その反面、欠点として挙げられるものとしては、前者においては、フェリシアンカリウムのブドウ糖による還元を利用しているため、糖以外の還元物質の影響を多少うけることと、試薬の調製および操作が複雑であること等であり、後者においては、試薬を20°C以下で保存すると、結晶が析出してくるので、冬季の使用に不便があり、銅塩の還元作用を利用したものであって、反応のコントロールには前者以上の注意を要する。最近、百瀬等の創案した3,6ジニトロフタル酸法(百瀬法とも呼ばれる)は、精度においては前の2種の方法と比較して余り遜色なく、試薬の調製、保存も容易で、操作が簡単であり、予備実験の結果から、小動物、特に低血糖測定法としては、前2者より誤差が少なかったため、今回の実験には百瀬法を採用した。実験には、終始、百瀬法の超微量法のうち、小動物及び低血糖用の術式に従って実施された。この方法のブドウ糖液についての標準偏差は、百瀬等によれば、血糖値に換算して100mg/dlで2.8mg、60mg/dlで3.1mgであったという。

LEBER (1908), SCHILLING and RONDONI (1913), MARTIN and DARRÉ (1914), REICHENOW (1921), REGANDANZ and TROPP (1927)らの研究者は、Trypanosomiasisの死因が病原性トリパノゾーマの虫体崩壊によって放出される毒性物質によって奔らされるものであると確信していた。REICHENOWは、流血中からtrypanosomeが消失した後、高熱を発するという事実を人の感染症に見出したが、彼の報告は毒業死因説をさらに強める結果となった。

他方において、SCHERN (1926), VON FENYVÉSSY (1926), HOPPE & CHAPMAN (1947)らはTrypanosomiasis感染末期に著明な血糖の低下現象に着目して、血糖消耗説を発表した。然しながら、KLIGLER, GEIGER and COMAROFF (1929)らは、これらの説を否定して、trypanosomeの物質代謝産物と考えられる乳酸の急激な増量が死の直接原因であるとするacidosis theoryを樹立した。また、ANDREWS, JOHNSON and DORMAL (1930)らのtrypanosomeのagglutinationによる器官の機能障害が致死因子であるというmechanical asphyxia theoryも出現し、さらには、ZWEMER & CULBERTSON (1939)によって、trypanosome感染動物の瀕死期に見られる痙攣は、血清カリウムの著しい増量に由るとの見解を基として、potassium poisoning theoryが提唱された。このように、同種原虫を使用した実験にも拘わらず、各自の成績が乱麻の如く渾沌としているのは、川満

(1958)も述べているよう供試原虫の種は同一であっても、strainの相異、実験動物の個体差または種族特異性によるためであろうと思われるけれども、他面、Trypanosomiasisの致死因子の究明が如何に困難かつ複雑であるかを物語っている。

翻って、今回実施した実験成績を考察すると、*T.gambiense*感染ラットの血糖値は、接種後44時間までは異常がなく、68時間には正常時の51%減少が見られ、斃死の瞬間には平均21.0mg%で、健康時のそれと比較すると、79%も血糖の低下を起していることが知られた。百瀬法の検量線は原点及び400mg/dl附近で彎曲するため、極めて低血糖、使えば、15mg/dl以下では測定誤差が大きく、今回の成績でも、死の瞬間には恐らく15mg/dl以下であろうと推測されるほどの低下を来たしたラット数匹を見たが、誤差を考慮に入れて最低値を15mg/dlにとどめた。百瀬等によれば、本法によるブドウ糖液についての標準偏差は、血糖値に換算して、100mg/dlで2.8mg、60mg/dlで3.1mgであるというから、60mg/dl以下の標準偏差はさらに大きくなるものと予想される。これはブドウ糖液についてであって、実際の実験には、血液の採取、除蛋白操作、還元比色及び機械的操作等による誤差が含まれるので、偏差は更に大きくなる可能性がある。現今の血糖測定法では、明確に真糖値を得ることは極めて困難であって、今後の進歩が期待されている。

今回の実験dataから、真糖値をうることは困難であるが、統計学的考察を加えるならば、真糖値に近似した値の推定は、さして困難なことではない。すなわち、各測定値( $\bar{x}$ )のうち、 $\bar{x} \pm 3\sigma$ (標準偏差)の範囲内に含まれるものの数は、全体の99.7%であるから、実測値から99.7%の確率で真糖値を推定すると、それは、実測値 $\pm 3\sigma$ の範囲にあると考えてよい訳である。そこで、今回の実験dataから、99.7%の確率で真の血糖値を推定するには、得られた標準偏差の3倍を実測値に加減する必要がある。

今回の成績から、T原虫の虫体数が平均1mm<sup>3</sup>当たり1,330,000個以上に増加すると、動物は死を避け得ないという事実が認められた。以上のことから考えるならば、*T.gambiense*感染動物の死因の一部分をなすものとして、次の結論が導かれよう。すなわち、T原虫の急激な増殖の結果、虫体数が平均1,330,000/mm<sup>3</sup>以上に達すると、宿主であるラットの血中ブドウ糖量は、殆んどすべてが虫体によって消費され、ために、宿主は著しい低血糖を惹起して斃れるものと推測せられた。この実験成績は、HOPPE & CHAPMAN (1947)

ら、*T. equiperdum* を供試原虫とした成績と略々一致している。

従来、菌体破壊の方法としては、(1)自己消化法(2)リゾチーム、または化学物質による菌体の融解(3)凍結融解法があり、機械的な方式によるものとしては、(4)研磨剤(ガラス又はアルミナの粉末)を加える方法、(5)スリガラス面のスリ合わせて磨砕する方法、(6)強力音波照射法と(7)超音波照射法とが知られている。

最近、9~10K Cの音波による破壊術式が、超音波法と共に注目されてきたが、両者共、原理、操作法には共通点も多く、その根本原理は、菌懸濁液に対する局所的な激しい圧変化という形で、エネルギーを細胞に加えて、これを破壊するものである。この音波法の利点として挙げられるものは、操作が器械的であるため自動的に手軽に行えること、無菌的条件下の操作も可能であり、低周波を利用するため、発振時に酵素作用を酸化失活せしめることあがると云われている発生機の酸素原子が生じ難いという諸点である。今回の実験に音波発生装置を供試した所以は此処に在る。

また、肉眼による測定はどうしても主観的であるため、個人誤差は避けられない。測定に時間がかかり、精度が充分高いというわけに行かない。多くの測定を行なうと、疲労が重なり、微妙な色調の差を区別し難いことなどが欠点として挙げられよう。肉眼による測定を、光電現象による電流の強弱によって測定しようとしたものが光電比色法であるが、この方法は戦後著しく進歩して定量が迅速正確且つ純客観的に行なうことができるようになり、今日では専らこれによって測定が行なわれるようになってきた。今回の実験には、この光電比色法によって、被検資料を客観的に測定しようと考えて光電分光光度計を使用した。

次に実験2に見られる如く、従来、多くの文献(VOEGTLIN, DYER & MILLER 1924; ANDREWS, JOHNSON & DORMAL 1930; ZWEMER & CULBERTSONS 1939; HOPPE & CHAPMAN 1947; 川満1958)や成書に記載せられている臨床症状を若干補遺する見解が得られた。先に、川満(1958)の実験による成績から、*T. gambiense* の60°C/30分加熱死体浮遊液上清に低血糖作用が証明されているので、今回、著者は *T. gambiense* の音波破壊液上清を供試資料として実験を行なった結果、軽度の血糖低下現象を確認した。川満と同様の術式に従って調製した、60°C/30分加熱10%原虫死体浮遊液接種ラットの血糖値は、最低82.5%で、正常時血糖値と比較すると、17.5%低下しているが、川満の成績では最低73%、健康時のそれよりも27%の低下が見

られており、著者の成績よりも顕著であった。然しながら、その後、補足実験を行なった結果では、この供試資料の接種量を2倍に増しても、その成績に大差がないことがわかり、このような成績の不一致を招来した主な原因として、①供試資料作成の温度差が低血糖作用に微妙な影響を及ぼした、②原虫の種は同一であっても、Strainの相異、または、病原性の変異(variation)による、③供試動物の個体差及び年令の差等が指摘されよう。

また、10%原虫音波破壊液の遠心上清をラッテに注射すると、血糖値は最低80.6%まで下降し、健康時のそれと比較して、19.4%の低下が認められた。しかるに、破壊液沈渣を生理的食塩水で5回洗滌した後、10%濃度に生理的食塩水で薄めた液を注射しても、ほぼ生理的動揺の範囲に停滞していた事実から導かれる推定は、ラッテの血糖値を降下させる或る種の物質が、trypanosomeの虫体細胞質内に内蔵せられており、細胞膜、鞭毛、波動膜等には含有されていないということである。この血糖降下物質が、複雑多岐な生体の血糖調節機構に、どのような機作を与えるものかは未検であるが、この物質の究明は、今後、化学的純化または病理学的研究の対象として、将来に残された課題であると考ええる。

以上の成績を総括し考按すれば、*T. gambiense* 感染動物の死因の1つとして、対数期に入った原虫の急激な増殖の結果、宿主の血糖は、殆んどすべて原虫によって消費せられ、このために、動物は著しい低血糖障害を招き、所謂奪糖中毒を誘発して、遂に宿主は斃れるものと推測せられ、原虫自身、軽度の低血糖作用を有する或る種の物質を虫体内成分として内蔵して、これも死因の間接的補助の役割を演じているものように考えられる。

## 結 語

1) *Trypanosoma gambiense* 感染ラッテの血糖値は、原虫接種後44時間では生理的動揺範囲内にあり、68時間では正常時の血糖値(100.7±12mg/dl)の約半分(49.3±32.1mg/dl)に減少し、死の瞬間時に於いては、21.0±7.2mg/dlにまで低下した。これと逆行して、虫体数は接種後20時間では全く虫体を認めず44時間後には16,900±6,600/mm<sup>3</sup>を算え、68時間後には491,600±21,900/mm<sup>3</sup>に達し、斃死の瞬間時には1,330,000±10,800/mm<sup>3</sup>であった。虫体数が平均130万/mm<sup>3</sup>以上に達すると、虫体によってラッテの血中ブドウ糖量は殆んど消費されてしまうものと考えられる。

2) 急性 Trypanosomiasis の臨床症状として、痙攣発作型と運動麻痺型の2型のあることを知り、従来の知見に若干補遺するを得た。

3) 10% *Trypanosoma gambiense* 音波破壊液上清 1.0ml を腹腔内注射されたラットの血糖値は、注射後4時間で、最低80.6%、健康時期の血糖値と比較して19.4%の減少が認められた。しかるに、同破壊液沈渣浮遊液 1.0ml を注射したラットの血糖値は、各時間とも、生理的動揺の範囲内にとどまり、これらのことから、血糖降下因子は虫体の細胞質内に存在していて、細胞膜、鞭毛、波動膜等には存在しないものと推定せられた。

4) 急性 Trypanosomiasis の致死因子の一つは、対数期に入った原虫の急激な増殖の結果、宿主の血糖は殆んど消費せられ、ために、著しい低血糖障害を誘発し、

所謂奪糖中毒を惹起して宿主は斃れるものと思われるが、原虫の虫体内成分にも血糖降下作用を有する因子が存在しているものと考えられ、“Trypanotoxin”の作用の一つとして低血糖作用を挙げることができよう。

なお念のため附記すれば、本論文は trypanosomiasis の死因如何を追求するものではなく、trypanosome が Toxin を産生するか否かを論ずるのが目的であって、その Toxin の証明法として、生きた虫体のために低血糖が起こるばかりでなく、崩壊した虫体(すなわち毒素)によっても低血糖が起こるということを実証するのが主旨である。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師登倉教授並びに高橋助教に謹んで深謝すると共に、種々御援助を戴いた九州大学医学部薬学科百瀬教授に感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

1) **Andrews, J., Johnson, C. M. and Dormal, V. J.:** Lethal factors in experimental infections with *Trypanosoma equiperdum* in rats. Am. J. Hyg., 12 : 381-400, 1930.

2) **Andrews, J. & Sanders, E. P.:** Changes in blood of cats infected with *Trypanosoma equiperdum*, Am. J. Hyg. 8 : 947-962, 1928.

3) **Beck, M.:** Arh. Keiserl. Gesundh. 34 : 318, 1910. Cited by K. Kawamitsu.

4) **Bell, F. R. & Jones, E. R.:** Carbohydrate metabolism bovine trypanosomiasis. Ann. Trop. Med., 40: 199-208, 1946.

5) **Braun, H. & Teichmann, E.:** Über Trypanosomen-Immunisierung, Deutsch. Med. Wochenschr., 107, 1912.

6) **Cordier, G.:** Étude de la glycémie et action du sérum glucosé et de l'insuline dans quelques cas de Trypanosomiase expérimental. Compt. rend. Soc. de biol. 96 : 971-973, 1927.

7) **French, M. H.:** Studies in animal trypanosomiasis. The effect of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* on some inorganic blood constituents. J. Compt. Path. & therap., 51 : 119-127, 1938.

8) **Hagedorn, H. C. & Jensen, B. N.:** Zur

Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferricyanid. Biochem. Ztschr., 135 : 46, 1923.

9) **Hoppe, J. O. & Chapman, C. W.:** Role of glucose in acute parasitemic death of the rat infected with (*Trypanosoma equiperdum*). J. Parasitol., 33 : 509-519, 1947.

10) **Ikejani, O.:** Studies in trypanosomiasis. The plasma whole blood and erythrocyte potassium of rats during the course of infection with *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma equiperdum*. J. Parasitol., 32 : 379-382, 1946.

11) a 川満恵光：*Trypanosoma gambiense* の毒素産生に関する知見補遺。長崎医学会雑誌。33 : 22-39, 1958.

11) b 川満恵光：*Trypanosoma gambiense* の産生する毒素 (*Trypanotoxin*) による低血糖と諸種ホルモンの関係について。長崎医学会雑誌。33 : 115-123, 1958.

12) **Kligler, I. J., Geiger, A. and Comaroff, R.:** Susceptibility and resistance to trypanosome infection. Cause of injury and death in trypanosome infected rats. Ann. Trop. Med. Parasit., 23 : 325-335, 1929.

13) **Krijgsman, B. J.:** Biologische Untersuchungen ueber das System. WirtstierParasit. Teil : Das Verhalten der Blutproteine und Teil Das Verhalten des Blutzuckers während der

Entwicklung von *Trypanosoma evansi* in der Ratte., Ztschr. f. Parasitenk. 6 : 1-22, 1933.

Cited by Trop. Dis. Bull. Vol131, 214, 1934.

14) **Laveran, C. L. A.** : Bull. Soc. Path. Exot., 6:693, 1913. Cited by K. Kawamitsu.

15) **Leber, A.** : Über Trypanosomentoxine und trypanotoxische Keratitis parenchymatosa. Deutsch. med. Wochenschr., Nr. 43, 1908. Cited by K. Kawamitsu.

16) **Ledentu, G.** : Bull. Soc. Path. Exot., 21 : 544, 1928. Cited by K. Kawamitsu.

17) **Locattelli, p.** : C. R. Soc. Biol, 105 : 449, 1930. Cited by K. Kawamitsu.

18) **Molomut, N.** : Mechanism responsible for lowered resistance of hypophysectomized rats to *T. lewisi*. J. Immun., 56 : 139-141, 1947.

19) a **Momose, T., Inada, A., Mukai, Y., Watanabe, M.** : Talanta, 5, 275, 1960.

19) b 百瀬 勉, 向井良子, 佐々木宏子 : 血糖測定法, 総合臨床, 11 : 120-127, 1962.

20) 森住久光 : *Trypanosoma gambiense* による貧血の発生機転に関する研究 医学と生物学, 14 : 216-218, 1949.

21) 中村敬司 : 実験的に *Trypanosoma evansi* を感染せる動物に於ける貧血に関する研究, (1)成熟家兎に於ける所見, 実験医学雑誌, 25 : 1201-1220, 1941.

22) **Nelson, N.** : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. chem., 153 : 375-380, 1944.

23) **Regendanz, P. & Tropp, C.** : Das Verhalten des Blutzuckers und des Leberglykogens bei mit Trypanosomen-infizierten Ratten. Arch. f. Schiffs. Tropen-Hyg., 31 : 376-385, 1927.

24) **Reichenow, E.** : Untersuchungen über das Verhalten von *Trypanosoma gambiense* im menschlichen Körper., Zeit. Hyg. Infektionsk. 94 : 266-395, 1921.

25) **Roskin, G. & Romanova, K.** : Traitement du cancer expérimental par les endotoxins des protozoaires., Arch. internat. demed. expèr. 13 : 379-384, 1938.

26) **Savino, E.** : Relations entre le nombre des trypanosomes et les variations glycemiques dans l'infection expérimentale par *Trypanosoma*

*equiperdum.*, Compt. rend Soc. dei biol. 96 : 220, 1927.

27) **Scheff, G.** : Über die Bedeutung des Stoffwechsels der Parasiten für das Wirtstier bei der Trypanosomen-Infektion. Biochem. Zeit., 200 : 309-330, 1928.

28) **Scheff, G. J. & Thatcher, J. S.** : Potassium in relation to death in rats injected with *Trypanosoma equiperdum*. J. Parasitol. 33 : Sec. 2 (supplement), 8, 1947.

29) **Schern, K.** : Über die Störung des Zuckerstoffwechsels bei Trypanosomiasen und Spirochätosen., Biochem. Zeit., 193 : 264-268, 1928

30) **Schilling, C. & Rondoni, P.** : Über Trypanosomentoxine und Immunität., Zeitschr. f. Immunitäts forsch., Orig. Bd. 18, 1913.

31) 新見正喜 : 実験的 chagas 病に関する研究 : 第2編 *Trypanosoma cruzi* の培養濾液によって惹起せらるる貧血に就て (其の1), (其の2). 実験医学雑誌, 19 : 819, 1935

32) a **Somogyi, M.** : Notes on sugar determination., J. Biol. Chem., 195 : 19-23, 1952.

32) b **Somogyi, M.** : Reducing non-sugars and true sugar in human blood., J. Biol. Chem. 75 : 33-43, 1927.

33) **Tokura, N.** : Ueber Trypanotoxin von *Trypanosoma gambiense* und *equiperdum.*, Igaku Kenkyu. 9 : 14, 1935.

34) **Voegtlin, C., Dyer, H. A. & Miller, D. W.** : Drug-resistance of trypanosomes with particular reference to arsenic., J. Pharm. & Exper. Therap. 23 : 55-86, 1924.

35) **von Brand, T., Tobie, E. J., Kissling, R. E. & Adams, G.** : Physiological observation on four strains of (*Trypanosoma cruzi*), J. Parasitol. 85 : 5-16, 1949.

36) **von Fenyvessy, B. V.** : Über die Bedeutung des Stoffwechsels der Parasiten für das Wirtstier bei der Trypanosomen-Infektion., Biochem. Zeit., 173 : 280-296, 1926.

37) **Wormall, A.** : Carbohydrate metabolism in human trypanosomiasis. Biochem. J., 24 : 777, 1932.

38) **Zotta, G. & Radacovici, E.** : C. R. Soc. Biol., 102 : 129, 1935. Cited by K. Kawamitsu.

- 39) Zwemer, R. L. & Culbertson, J. T. : potassium in death from this infection, Am. J. Hyg., Sec. C 29 : 7-12, 1939.  
The serum potassium level in *Trypanosoma equiperdum* infection in rats. : The role of

---

### Summary

The present study was attempted to demonstrate hypoglycemia in the rat due to a toxic activity of *Trypanosoma gambiense* destroyed by sonic wave. The blood sugar determination was made by means of the 3,6-dinitrophthalic acid method as described by MOMOSE et al. (1960), with the aid of a photo-electric spectrophotometer. Flagellates separated from the blood-corpuses by centrifugation were suspended by 10% concentration in physiological saline solution, and subjected to sonic wave of 10 K C and 200 W for the purpose of destroying them.

The results obtained by the experiments were as follows:

- 1) The blood sugar of rats infected with *Trypanosoma gambiense* decreased from a normal level,  $100.7 \pm 12$  mg/dl on the average, to  $21.0 \pm 7.2$  mg/dl on the verge of death.
- 2) In the course of infection with *Trypanosoma gambiense* it was found that there were clinically two characteristic patterns in rats: the convulsion type and paralysis type. In the former they had no obvious symptoms until 5 minutes before sudden death, and in the latter a progressive paralysis occurred from hind legs to fore legs about 2 hours before death, following characteristic symptoms as known.
- 3) When rats intraperitoneally injected with 1.0 ml of the supernatant fluid of 10% emulsion of *Trypanosoma gambiense* destroyed by sonic wave, a lowering of the blood sugar rate to 80.6% on the average of the normal level was observed at the 4th hour after injection. However, the sediment of the centrifuged emulsion proved not effective.

On the basis of these data, it is seemed reasonable to deduce that the cause of death of rats infected with *Trypanosoma gambiense* may be ascribed to consumption of the blood sugar by trypanosomes and glycoprival intoxication of hosts, which ought to depend on the heaped logarithmic multiplication of flagellates.

Furthermore, it is important to notice that a toxic substance capable of causing a hypoglycemia is contained in the cell of *Trypanosoma gambiense*, as it has been reported by KAWAMITSU(1958) in our Institute.

(Author)