

## *Trichomonas vaginalis* の核酸代謝におよぼす抗トリコモナス剤の影響

身 原 正 一

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任：徳田源市教授)

(昭和 43 年 8 月 2 日受付)

### I. 概 要

核酸の Precursor である  $^{14}\text{C}$ -Adenine, またその構成員である  $^{32}\text{P}$  や  $^{14}\text{C}$ -Glycine を用いて *Trichomonas vaginalis* (以下, *T. V.* と略す) の各細胞分画 (nuclear DNA, nuclear RNA, soluble-RNA (以下, S-RNA と記す), ribosome RNA) におけるとりこみおよび、メチルアルブミンカラムによる分画より *T. V.* の核酸蛋白代謝について検討し、それらにおよぼす抗トリコモナス剤の影響およびその作用機序について考察をこころみた。

1)  $^{14}\text{C}$ -Adenine の *T. V.* 核酸分画へのとりこみのピークは約 3 時間目にみられる。

2) Trichomycin, Metronidazole, Azalomycin F の MIC (Minimal inhibitory concentration) での  $^{14}\text{C}$ -Adenine のとりこみの経時的推移は、Trichomycin, Azalomycin F では阻害傾向はみられなかつたが、Metronidazole では DNA 分画へのとりこみの阻害傾向がみられた。

3) 高速遠心分画法による *T. V.* の各細胞分画への  $^{14}\text{C}$ -Adenine のとりこみは Metronidazole の MIC の量ときだけ DNA 分画で阻害傾向がみられたが、nuclear RNA, ribosome RNA, s-RNA 分画は有意の変化は認められず、また、Azalomycin F, Trichomycin によつては各分画の  $^{14}\text{C}$ -Adenine のとりこみに有意の変化は認められなかつた。

4)  $^{14}\text{C}$ -Glycine の *T. V.* の ribosome RNA 分画へのとりこみは、抗トリコモナス剤作用時に軽度の阻害傾向がみられ、とくに Trichomycin に著明であつた。s-RNA 分画へのとりこみは、Metronidazole, Azalomycin F で MIC の 5 倍量投与時に阻害傾向がみられたが、他の分画には影響がみとめられなかつた。

5) メチルアルブミンカラムクロマトグラフィーによつても MIC の Metronidazole で  $^{32}\text{P}$  の DNA 分画へのとりこみの抑制がみられ、Trichomycin, Azalomycin F では影響が認められなかつた。

### II. 緒 言

産婦人科領域において、*T. V.* による感染症は日常一般によくみられる再発しやすい疾患として知られており抗トリコモナス剤も多数報告されているが、その作用機序については不明の点が多い。本原虫の分裂増殖はひじ

ように活潑で、その核酸蛋白代謝を追求することは興味深い。そこで核酸の Precursor である Purine 塩基の  $^{14}\text{C}$ -Adenine を用いて DNA および RNA 分画への incorporation より、*T. V.* の核酸合成の経時的な推移とそれにおよぼす抗トリコモナス剤の影響を検討し、また  $^{14}\text{C}$ -Adenine および  $^{14}\text{C}$ -Glycine を用い、高速遠心分画法により *T. V.* を各細胞分画に分け、各分画へのとりこみを検索するとともに  $^{32}\text{P}$  を用いてメチルアルブミンカラムより、*T. V.* の核酸蛋白代謝を検討し、またそれにおよぼす抗トリコモナス剤の影響およびその作用機序の考察を試みた。

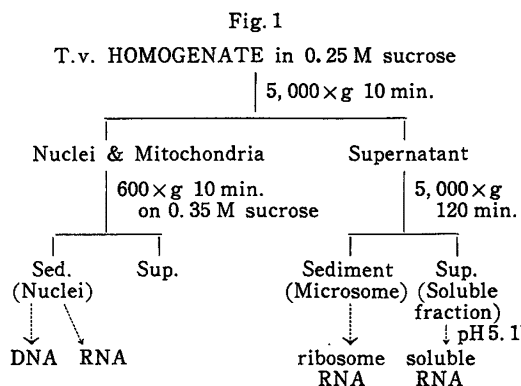
### III. 実験材料および方法

[A]  $^{14}\text{C}$ -Adenine の *T. V.* 核酸分画へのとりこみの経時的推移と、抗トリコモナス剤の影響に関する実験

*T. V.* は教室保存株を用い 10% 人血清添加 SYS 培地 1,000 ml 中で 24 時間 37°C で培養しこれを 1,000 × g, 5 分間後集虫し、それを 10% 人血清添加 SYS 培地 10 ml に植え継ぎ、各抗トリコモナス剤を MIC, すなわち Trichomycin 2.5 u/ml, Azalomycin F 5 mcg/ml, Metronidazole 2 mcg/ml を加え、30 分振とう培養し、これに  $^{14}\text{C}$ -Adenine 0.5 μc/ml を加え振とう培養後おのおの経時的に *T. V.* を 1,000 × g, 5 分間後集虫し、10% Tri-chlor-acetate (TCA) で 2 回洗条後凍結させ、テフロンホモジナイザーで破壊し、凍結→破壊を 3 回くり返してのち、LE PAGE<sup>1)</sup>の方法により核酸分画を抽出した。核酸量は Beckman 分光光度計によつて、260 mμ の吸光度で測定し、放射活性は liquid scintillation counter で測定、incorporation rate を算出した。

[B] 高速遠心分画法による *T. V.* 核酸分画への  $^{14}\text{C}$ -Adenine,  $^{14}\text{C}$ -Glycine のとりこみと抗トリコモナス剤の影響に関する実験

[A] と同様の方法で *T. V.* を集め 10% 人血清添加 SYS 培地に植え継ぎ抗トリコモナス剤の MIC およびその 5 倍量を投与し 30 分間振とう培養後  $^{14}\text{C}$ -Adenine または  $^{14}\text{C}$ -Glycine 0.5 μc/ml を加え、以下すべて振とう培養は 3 時間として、おのおの振とう培養した。これら *T. V.* を 1,000 × g, 5 分間遠心して集め、冷 0.25 M 蔗糖液で 3 回洗条し凍結させて、テフロンホモジナイザーで破壊し、凍結→破壊を 3 回くり返してのち、超音



波で約 10 分間破壊し、冷やした 0.25 M 蔗糖液と 30 % ホモジネートを作り、これを Fig. 1 のように高速遠心分画法で核分画と Microsome 可溶性分画に分けた。核分画は 0.35 M 蔗糖液上に重畳し 600×g で遠心して Mitochondria を除き精製した。Microsome 分画は「高浪の変法<sup>9)</sup>」に従がつて ribosome RNA を調製した。上清分画は pH 5.2 として溶かして S-RNA とした。核酸の抽出は RNA は Phenol 法<sup>9)</sup>により、すなわち等量の 90% Phenol 液を混じ、Duportal を 0.05% になるように加え、65°C、3 分間よく振つて 1,000×g、30 分遠心し水層、中間層、Phenol 層に分け、水層について 2 容の ethanol、1 容の acetone、終濃度 1% の醋酸ソーダを加えてストッカー内で冷却し RNA を澱沈させた。DNA の抽出は前記の中間層、Phenol 層に 1 M-NaCl を等量加え、100°C 30 分 2 回抽出、2 容の ethanol、1 容の acetone、終濃度 1% になるように醋酸ソーダを加え、ストッカーで冷却し澱沈してくる核酸を 1 N NaOH 中に 37°C、18 時間おいた。過クロール酸を終濃度 4% になるように加え、DNA を澱沈させた。RNA、DNA の各澱沈を 4 ml の蒸溜水にとかし (DNA は稀アルカリにする) 核酸量を Beckman 分光光度計で 260 mμ から測定し、放射能は liquid scintillation counter で測定、各分画の比放射能を算出して incorporation rate を求めた。この各分画での incorporation rate について control を 100% として各薬剤および各濃度 (MIC およびその 5 倍量) における incorporation rate を算出した。

#### [C] メチルアルブミンカラムによる <sup>32</sup>P 標識 T.V. の核酸分画分析実験

##### 1) 試料の作製

イ) [A][B] と同様に約 1 g wet weight の T.V. を集め 10% 人血清添加 SYS 培地 100 ml に植え継ぎ MIC 量の各抗トリコモナス剤を投与して、37°C 30 分振とう培養した後 <sup>32</sup>P を 10 μc/ml 加え 150 分 37°C で

振とう培養後、T.V. を 1,000 ×g 5 分後集虫し、SYS 培地で 2 回洗条、0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.7 により 3 回洗条して後凍結させ、テフロンホモジナイザーですりつぶし、凍結→破壊を 3 回くり返した。超音波で 10 分間破壊した後、1 M NaCl を加え、Phenol 法<sup>9)</sup>で 3 層に分け、水層をとり出し、その半量を 0.1 M buffered saline (0.05 M リン酸緩衝液 pH 6.7 に 0.1 M になるように食塩を加えたもの) 25 ml に溶解し試料とした。

ロ) 試料がカラムに吸着されていることを確かめるため、このカラムでの S-RNA の Elution pattern を見るために、精製された S-RNA 2 mg を用い 0.1 M buffered saline 25 ml に溶解して試料とした。この試料を用いて各 50 ml の 0.1 M、0.2 M、0.6 M buffered saline に 1 管 5 ml ずつ溶出した。

ハ) カラムクロマトグラフィーの Elution pattern の同定のため、イ) の方法で調製した control の試料に Ribonuclease 0.2 mg を加え、37°C 10 分間 incubation し、RNA を破壊しそれを試料とした。

##### 2) メチル化アルブミンの作成

アルブミンは市販の bovine serum albumin powder を用い、水野<sup>9)</sup>が示している方法で、methyl ester 化した。

##### 3) ケイソウ土の前処置

市販の "Hyflo Supercel" を用い、100 g を 400 ml 1 N NaOH→蒸溜水→400 ml 1 N HCl→蒸溜水 (アルカリ処理は Büchner ロートで pH 7.0 になるまで蒸溜水で洗った) の順に処理し風乾させた。

##### 4) カラム

内径 2 cm、高さ 40 cm のを用いた。

##### 3) カラムの調製、試料の添加および溶出

SUBOKA, CHENG の方法<sup>6)</sup> によつた。すなわち 25 ml の 0.1 M buffered saline 中で加熱冷却処理をおこなつた 5 g ケイソウ土に 1.3 ml の 1% メチル化アルブミン水溶液を加え、かくはん後さらに 5 ml の 0.1 M buffered saline を加えてカラムにつめた。次第に澄んできて透明層とケイソウ土部分に分離してくる透明層がやがて減少して約 0.5 cm の高さになつたとき、試料を添加し、同様に 0.5 ml の高さになつたとき約 5 ml の 0.1 M buffered saline で管壁を洗い流して段階的食塩濃度こう配溶出装置に接続し約 75 ml の 0.1 M buffered saline を落して非吸着成分を洗い流した後、フラクションコレクターにセットし、0.1~1 M buffered saline 各 50 ml ずつで溶出させ各管 5 ml ずつに分けた。核酸量は Beckman 分光光度計で 260 mμ より測定し、放射活性は各管より 0.5 ml ずつとり liquid scintillation

counter で測定した。

IV. 実験成績

[A] <sup>14</sup>C-Adenine の T. V. 核酸分画へのとりこみの経時的推移と抗トリコモナス剤の影響に関する実験成績

Fig. 2, 3, 4 に示すように、<sup>14</sup>C-Adenine の DNA, RNA 各分画に対する incorporation は約 3 時間でピークに達した。Trichomycin の MIC 量投与時には Fig. 2 のように DNA, RNA 各分画ともに阻害傾向がみられなかったが、Metronidazole の MIC 量投与時には DNA 分画への incorporation の阻害傾向がみられ (Fig. 3), Azalomycin F ではその影響はみられなかった (Fig. 4)。

[B] 高速遠心分画法による T. V. 核酸分画への <sup>14</sup>C-Adenine, <sup>14</sup>C-Glycine のとりこみと抗トリコモナス剤の影響に関する実験成績

Incorporation rate より <sup>14</sup>C-Adenine の nuclear DNA 分画へのとりこみをみると、Fig. 5 のように Metronidazole の MIC 量投与で軽度の阻害傾向がみられ、さらに MIC の 5 倍量において著明なとりこみの抑制がみられた。Trichomycin, Azalomycin F では、ほとん

どその影響は認められなかった。Nuclear RNA 分画への <sup>14</sup>C-Adenine のとりこみに対する抗トリコモナス剤の影響は Fig. 6 のように、有意の変化が認められなかった。Ribosome RNA 分画の <sup>14</sup>C-Adenine とりこみに対する抗トリコモナス剤の影響は Fig. 7 に示すようにほとんどその影響がみられなかった。S-RNA 分画でも <sup>14</sup>C-Adenine の incorporation rate はすべての薬剤にほとんどその影響がみられなかった (Fig. 8)。<sup>14</sup>C-Glycine のとりこみは ribosome RNA 分画ではほとんどの薬剤にその影響がみられ、とくに Trichomycin に著明であった (Fig. 9)。S-RNA 分画への <sup>14</sup>C-Glycine のとりこみは Metronidazole および Azalomycin F におい

Fig.2 Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into DNA and RNA

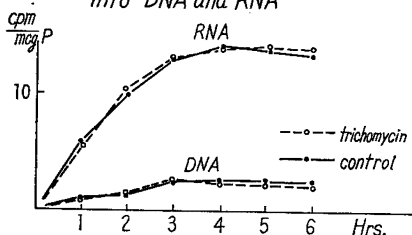


Fig.3 Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into DNA and RNA

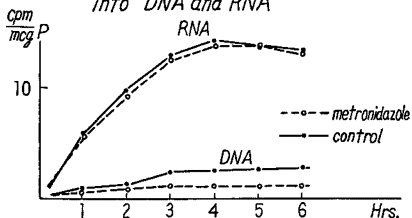


Fig.4 Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into DNA and RNA

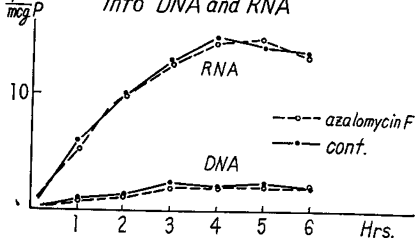


Fig.5 Effects of Anti-Trichomonas Agents on Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into DNA

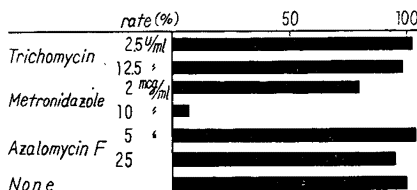


Fig.6 Effects of Anti-Trichomonas Agents on Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into nuclear RNA

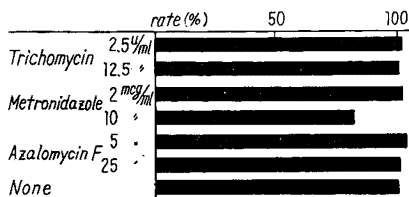


Fig.7 Effects of Incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into ribosome RNA

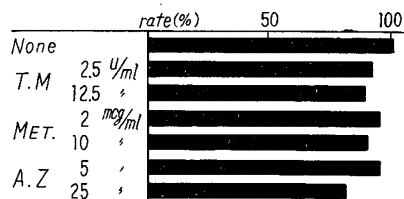


Fig.8 Effects on incorporation of Adenine-<sup>14</sup>C into s-RNA

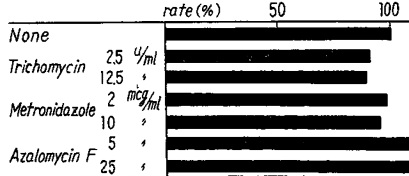


Fig.9 Effects on Incorporation of Glycine-<sup>14</sup>C into ribosome RNA

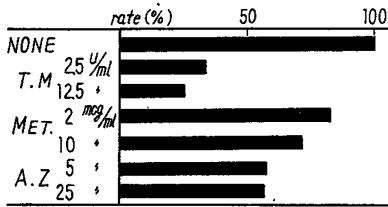


Fig.10 Effects on Incorporation of Glycine-<sup>14</sup>C into s-RNA

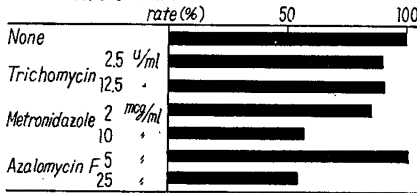
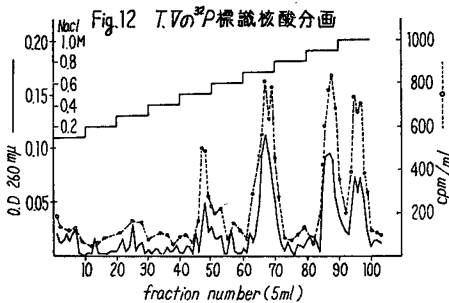
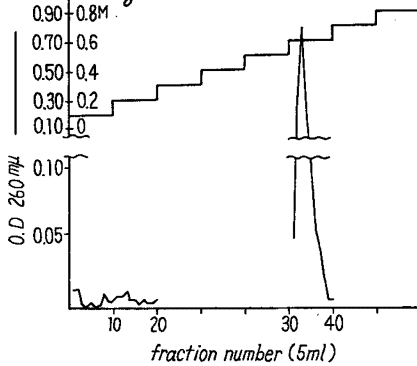


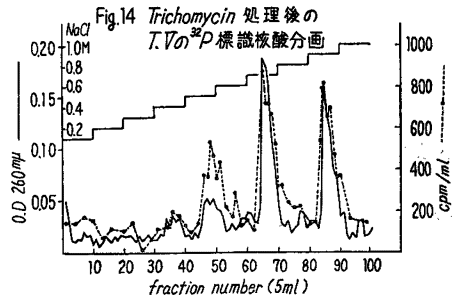
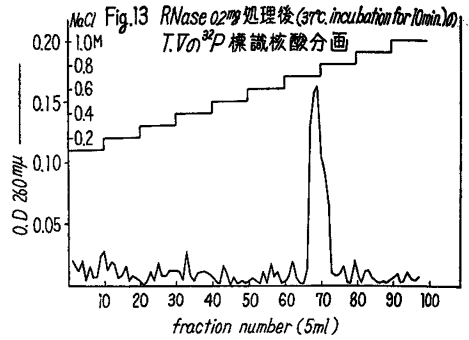
Fig.11 S-RNA 2mgを試料として使用



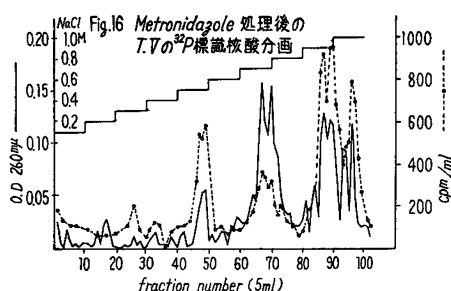
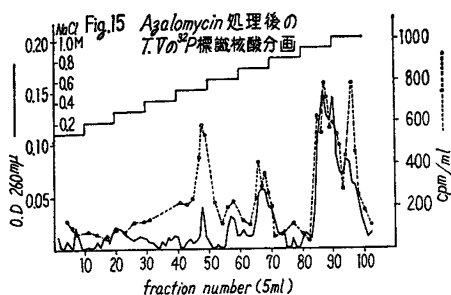
て MIC の5倍量投与時に阻害傾向がみられたが、他には影響が認められなかった (Fig.10)。

[C] メチルアルブミンカラムによる <sup>32</sup>P 標識 T. V. の核酸分画分析実験成績

このカラムがまちがいに試料を吸着し溶出していることを確かめるために、精製された S-RNA 2mg を試料として 0.1 M, 0.2 M, 0.6 M buffered saline 各 50 ml 各管 5 ml ずつで溶出してみたところ、Fig. 11 のように 0.1 M, 0.2 M buffered saline では溶出されず、0.6 M



buffered saline で溶出される pattern がえられ、したがって S-RNA 分画は少なくともこのカラムでも 0.6 M buffered saline 以下の濃度で溶出されることと試料が確実に吸着されていることが確かめられた。そこでコントロールにつきその Elution pattern をみると、Fig. 12 のように 0.5 M buffered saline を落すとき現われる第1番目のピークと 0.7 M buffered saline を落すとき現われる第2番目のピークと、0.9 M buffered saline を落すとき現われる第3番目のピークの計3つのピークが見られ、実線で示した核酸量に平行して、点線で示した放射性活性も、ほぼこれに相当する3つのピークを示し、<sup>32</sup>P が3つの分画によくとりこまれていることを示している。この3つのピークのうち 0.5 M buffered saline を落としたときに現われる第1のピークは Fig. 11 で確かめたことより S-RNA 分画であると考えられる。第2、第3のピークは DNA 分画と ribosome RNA 分画であろうと考えられるが、これを確かめるため、control の試料に Ribonuclease 0.2 mg を加え 37°C で 10 分間 incubation し、試料としてその Elution pattern を調べてみると、Fig. 13 のように 0.7 M buffered saline を落すときに現われるピークがただ1つ存在するだけで、このピークは DNA が溶出されたものであり、これは Fig. 12 の第2のピークに相当する。したがって Fig. 12 の3つのピークのうち第1番目のピークが S-RNA 分画であり、第2番目のピークが DNA 分画であり、第3番目のピークが ribosome RNA 分画であると同定された。そこで Trichomycin の MIC 量投与時における Elution



pattern は Fig. 14 のようで実線で示した核酸量に3つのピークがみられ、これらのピークは左より順に S-RNA 分画, DNA 分画, ribosome RNA 分画が溶出されたものであり、このピークに相応して点線で示す放射活性も3つのピークを示しており、 $^{32}\text{P}$  の S-RNA, DNA, ribosome RNA 各分画へのとりこみに Trichomycin の MIC 量では影響を与えなかつた。Azalomycin F でも Fig. 15 に示すように同様のところで3つのピークが現われ実線の核酸量にほぼ相応して点線で示す放射活性も3つのピークを示しており、S-RNA, DNA, ribosome RNA 各分画への  $^{32}\text{P}$  のとりこみに抑制はみられなかつた。Metronidazole では第1番目のピークの S-RNA 分画にはそのとりこみに影響はみられないが、第2番目のピークの DNA 分画には  $^{32}\text{P}$  のとりこみの抑制がみられた。これは前述の高速遠心分画法によるデータとよく一致している。第3番目のピークの ribosome RNA 分画にはその影響は見られなかつた (Fig. 16)。

## V. 考 按

核酸は 1869 年 FRIEDERICH MIESCHER によつて膿細胞から、ついで鮭の精子からはじめて単離され、1889 年に ALTMANN により核酸と名付けられた。続いて 1910 年には 4 種の塩基が核酸中に含まれていることがわかり、1929 年に至つて 2 種類の核酸の存在が知られた。すなわち Deoxyribose をもつものは DNA, Ribose をもつものは RNA と名付けられ、1940 年初期になつて核酸の化学の基礎が築かれた。

核酸の化学構造は 5 炭糖の Ribose または Deoxyri-

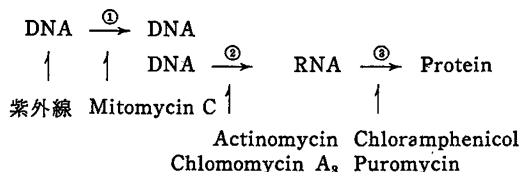
bose の 3' と 5' の位置に diester 結合したリン酸によつて長く続いた主鎖に 1' の位置に Pyrimidine または Purine 塩基からなる側鎖がくつついてできている。Purine 塩基は Adenine, Guanine をもち、Pyrimidine 塩基は Cytosine を共通してもち、DNA では Thymine, RNA では Uracil をもっている。細胞における核酸蛋白代謝は DNA の nucleotide 配列鋳型を messenger RNA (以下、m-RNA と略す) が遺伝情報としてそつくりうけとり細胞質顆粒の Ribosome に結合する。いつぼう、アミノ酸も ATP とアミノ酸活性化酵素によつて活性化されて、それぞれ別個にアミノ酸に対応する S-RNA の末端に結合し Ribosome 上に配列して Polypeptide をつくり蛋白を合成していくのであるが、そのさいに Ribosome に結合した m-RNA が DNA から受けた情報にしたがつて蛋白質の中のアミノ酸を一定の順序に配列するのである。これを略記すると下図<sup>7)</sup>のようになる。

- (1)  $\text{AA} + \text{ATP} + \text{E} \longrightarrow (\text{AAcyl AMP-E}) + \text{PP}$
  - (2)  $(\text{AAcyl AMP-E}) + \text{S-RNA} \longrightarrow (\text{AAcyl S-RNA}) + \text{AMP}$
  - (3)  $(\text{AAcyl S-RNA}) + \text{m-RNA} + \text{Ribosome} \longrightarrow \text{蛋白質} (\text{S-RNA} + \text{m-RNA} + \text{Ribosome})$
- AA=アミノ酸; PP=ピロリン酸  
ATP=Adenosine≡リン酸  
AMP=Adenosine-リン酸; E=酵素  
AAcyl AMP=Aminoacyl AMP  
AAcyl S-RNA=アミノ酸と S-RNA の化合物

今の実験に使用した  $^{14}\text{C}$ -Adenine は Purine 塩基として核酸合成系にとりこまれ、また  $^{32}\text{P}$  は糖を diester 結合で結合するリン酸として核酸にくみこまれるし、 $^{14}\text{C}$ -Glycine は上図のようにアミノ酸として蛋白質合成系に利用されるが、また Purine 塩基の Precursor として核酸にくみこまれるので、これらを示標として核酸代謝の解析を試みたのである。

T.V. のような下等な単細胞動物では高等多細胞動物と形態的にも生化学的にも生化学的にもかなり相異なるものと思われ、このような活潑な分裂増殖をおこなう T.V. の核酸蛋白代謝については非常に興味がある。T.V. の核酸蛋白代謝については松元<sup>9)</sup>や伊従<sup>9,10)</sup>は培地中のアミノ酸の増減から T.V. の核酸蛋白代謝があまりみられないといつており、また浜田<sup>11)</sup>は T.V. の核酸量を測定して、抗トリコモナス剤の影響が見られなかつたとしている。著者の実験では核酸の Precursor である  $^{14}\text{C}$ -Adenine の T.V. の核酸分画への経時的なとりこみや高速遠心分画法による T.V. の核酸分画へのとりこみ、またメチルアルブミンカラムによる  $^{32}\text{P}$  標識 T.V.

核酸分画の分析などから、活潑な *T. V.* の核酸合成がおこなわれていることがうかがえた。また湯浅<sup>12)</sup>の <sup>3</sup>H-Thymidine, <sup>3</sup>H-Uridine を用いた *T. V.* のラジオオートグラフィの報告から、その分裂増殖に応じた核酸の合成が明らかにされている。核酸蛋白合成に影響を与えるおもな抗菌性および抗癌性抗生物質の作用点は下図のように



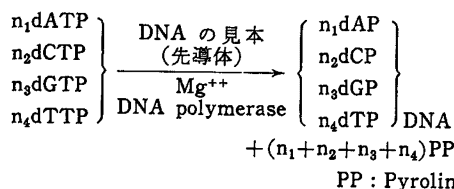
- ① DNA から DNA の合成を阻害するもの
- ② DNA から RNA の合成を阻害するもの
- ③ RNA 系から蛋白合成系を阻害するもの

の3群に大別できる。

まず③の RNA 系から蛋白合成系の阻害剤としては、Puromycin や Chloramphenicol などがある。Puromycin<sup>13)</sup> の作用点はこれが S-RNA の末端と構造が似ているために、ちょうど S-RNA で運ばれてきたアミノ酸とまちがえられて Peptide 鎖の中にはいるために、実際のアミノ酸とは異なるので蛋白質としては完成されず、未完成の Peptide を Ribosome から放出するからである。Chloramphenicol<sup>13)</sup> は Ribosome の大小2種の顆粒のうち、大型の Ribosome に結合するので、S-RNA と Ribosome の結合が阻害される。したがって Ribosome 上で Peptide 結合をつくることができないためと推定されている。

②の DNA から RNA の合成阻害については Actinomycin や Chlomomycin A<sub>3</sub> が知られている。この作用点は Actinomycin<sup>14, 15, 16)</sup> が DNA と結合してしまうために DNA 依存性の RNA polymerase の作用が阻害され、m-RNA の合成が阻止されるためと考えられている。Chlomomycin A<sub>3</sub><sup>13, 17, 18)</sup> は Actinomycin と同様な作用機作をもつと考えられるが、とくに S-RNA の合成を阻害するとされている。

①の DNA から DNA の合成は下図に示すように行なわれ



DNA polymerase によつて 5'-nucleoside-3'リン酸を素材として Mg<sup>+2</sup> の存在下で重合される。その反応の

阻害には template である DNA 自身に damage が起きたときにもおこるし (たとえば紫外線を照射<sup>19, 20)</sup>すると DNA の中に thymine dimer ができ、そのため鋳型にならない)、いろいろの突然変異を起こす化学薬品によつてもおこることがある。たとえば Nitrogen mustard のような Alkylating agents<sup>18, 21)</sup> は guanyl 酸などと結合することによつて正常なら cytidyl 酸と塩基対をつくる部位に異常をおこす。また Pyrimidines analogues の 5-fluoro-2'-deoxyuridine<sup>13)</sup> のように、Thymine にかかわつて DNA 中にはいるために DNA 合成に異常がおこる。Mitomycin C<sup>22, 23)</sup> のように DNA と複合体をつくつて<sup>24)</sup> DNA polymerase による DNA 合成反応を阻害するとともに細胞核を破壊して DNA を低分子化し<sup>25, 26)</sup>、また一部の DNA を細胞質のほうへ放出する<sup>27)</sup>らしい作用をもっているものもある。

上記のように DNA から DNA の合成の抑制をきたす薬剤の作用点は種々であるが、Metronidazole では MIC 量で DNA 分画に特異的な合成阻害をおこし、RNA 系には変化をおよぼさず、一般的にみて Mitomycin C のような働きをしているのではないかと考えられる。しかしこれは核酸の Precursor である Purine 塩基の <sup>14</sup>C-Adenine の *T. V.* 核酸分画へのとりこみ阻害の著者の実験成績からの推定であり、核酸合成段階を酵素レベルにおいて解析検討することによりはじめて確認しうることである。

Trichomycin の作用機序については種々の報告<sup>28-33)</sup>があり、呼吸代謝に影響を与える薬剤のようであるが、今回の実験結果よりみて、Trichomycin および Azalomycin F は核酸代謝には2次的な作用の影響が多少みられるが、1次的な阻害傾向を示さない薬剤であるように考えられる。なお通常作用機序の異なる薬剤の作用量を増加して大量投与した場合、その結果はほとんど同様な阻害傾向が見られるが、MIC およびその5倍程度の投与量での影響はその薬剤の持つ本来の作用として認められるものと思う。

以上、主として核酸の各種 Precursor を用いて核酸代謝の研究をおこない、ここに記述したような結果が得られたが、蛋白合成は核酸代謝に密接な関係があり、蛋白合成の前反応として核酸の代謝がおこるので、*T. V.* においては、とうぜん活潑なタンパク合成がおこつていると推量できる。

## VI. 結 論

*T. V.* の核酸代謝とそれにおよぼす抗トリコモナス剤の影響およびその作用機序に関する考察をおこない、以下の結論を得た。

- 1) *T. V.* は活潑な核酸合成を行なつていると考えら

れる。

2) <sup>14</sup>C-Adenine の T. V. 核酸分画へのとりこみの経時的推移は3時間でピークに達する。

3) Trichomycin, Azalomycin F は核酸代謝には1次的な影響をおよぼさないと考えられる。

4) Metronidazole は DNA 分画に特異的に影響し RNA 系にはほとんど影響をおよぼさず, DNA 系の核酸合成を阻害すると考えられる。

稿を終るに臨み, 終始ご懇篤なご指導とご鞭撻ならびにご校閲を賜わった恩師 徳田源市教授に深甚の謝意を表す。

また本研究の実施にあたり終始ご教示ご指導をいただいた湯浅充雄助手に深く感謝する。最後に種々ご助言ご教示を賜わった京都大学化学研究所 高浪満教授に御礼の言葉をささげたい。

なお本論文の要旨は昭和 41 年 12 月第 14 回中日本化学療法学会総会, 昭和 42 年 3 月第 19 回日本産科婦人科学会総会, 昭和 43 年 5 月第 38 回近畿産科婦人科学会総会で発表した。

#### 文 献

- 1) TYNER, E. P., C. HEIDELBERGER & A. G. LE PAGE: Intracellular distribution of radioactivity in nucleic acid and nucleotides and proteins following simultaneous administration of <sup>32</sup>P and Glycine 2-<sup>14</sup>C. *Cancer Research* 13: 186~202, 1953
- 2) 高浪 満: リボゾームおよび S-RNA の調製法。蛋白質核酸酵素 11(6): 490~499, 1966
- 3) KIRBY, K. S.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem. J. (London)* 64: 405~408, 1956
- 4) COLTER, J. S., R. A. BROWN & K. A. O. ELLEM: Observations on the use of phenol for the isolation of deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 31~39, 1962
- 5) 水野重樹, 高木正道: カラムクロマトグラフィーによる核酸の分離・分画。蛋白質, 核酸, 酵素 11(6): 470~483, 1966
- 6) SUEOKA, N. & T. Y. CHENG: Fractionation of nucleic acids with the methylated albumin column. *J. Mol. Biol.* 4: 161~172, 1962
- 7) PEACOCKE, A. R. & R. B. DRYSDALE, 池田庸之助訳: 分子遺伝学入門, 第 1 刷: 127, 1966 みすず書房
- 8) 松元重達: 腫トリコモナスに関する実験的ならびに臨床的研究。鹿児島医誌 7: 124~157, 1955
- 9) 伊従 茂: 腫トリコモナスのアミノ酸利用について。日新医学 46: 759~764, 1960
- 10) 伊従 茂: 腫トリコモナス増殖に伴う培地内窒素の動きについて。寄生虫学雑誌 5(2): 66, 1956
- 11) 浜田義雄ほか: *Trichomonas* のデソキシリボ核酸の虫体内分布。寄生虫学雑誌 5(2): 66, 1956
- 12) 湯浅充雄: *Trichomonas vaginalis* の分裂と増殖におよぼす 2, 3 の抗原虫剤の影響。日産婦誌 20(11), 1968 掲載予定
- 13) 三浦義彰: 抗菌・抗ガン・抗ウイルス剤の作用。医人 14(6): 255~261, 1965
- 14) 三浦義彰: 抗癌剤の作用機序。最新医学 19(9) 2283~2289, 1964
- 15) REICH, E.: Biochemistry of actinomycins. *Cancer Res.* 23: 1428~1441, 1963
- 16) 山田 毅: アクチノマイシン S による細菌 RNA 合成阻害に関する研究。大阪大学医学雑誌 17(6-7): 343~347, 1965
- 17) YANO, M., T. KUSAKARI & Y. MIURA: Intracellular transfer of nucleic acids. *J. Biochem.* 53: 461~464, 1963
- 18) FUKUI, N. & Y. MIURA: クロモマイシン A<sub>9</sub> の癌細胞核酸代謝阻害。第 37 回日本生化学会総会発表
- 19) 池永満生, ほか: DNA の放射線損傷。文部省研究報告集録, 放射線影響編: 155~156, 1965
- 20) 野津敬一, ほか: 照射された DNA の RNA 合成 Priming 活性。文部省研究報告集録, 放射線影響編: 170~171, 1965
- 21) LAWLEY, P. D. & P. BROOKES: Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem. J.* 89: 127~138, 1963
- 22) SHIBA, S., A. TERAWAKI, T. TAGUCHI & J. KAWAMATA: Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by mitomycin C. *Nature* 183: 1056~1057, 1959
- 23) SEKIGUCHI, M. & Y. TAKAGI: Effect of mitomycin C on the synthesis of bacterial and viral deoxyribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Acta* 41: 434~443, 1960
- 24) IYER, V. N. & W. SZYBALSKI: A molecular mechanism of mitomycin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50: 355~362, 1963
- 25) REICH, E., A. J. SHATKIN & E. L. TATUM: Bacteriocidal action of mitomycin C. *Biochim. Biophys. Acta* 53: 132~149, 1961
- 26) KERNSTEIN, H. & H. M. RAUEN: Degradation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* cells treated with mitomycin C. *Nature* 190: 1195~1196, 1961
- 27) SHATKIN, A. J., E. REICH, R. M. FRANKLIN & E. L. TATUM: Effect of mitomycin C on mammalian cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 55: 277~289, 1962
- 28) 石川矩子: *Candida* の呼吸におよぼす各種薬剤の影響ならびに Trichomycin の作用機序について。日産婦誌 12(5): 617~626, 1960
- 29) 塚原 毅: *Candida albicans* の呼吸におよぼす Trichomycin の影響。J. Antibiotics, Ser. B 10(5): 204~210, 1957
- 30) 塚原 毅: *Candida albicans* の呼吸におよぼす Trichomycin の影響。J. Antibiotics, Ser. B 10(6): 243~249, 1957
- 31) 塚原 毅: *Candida albicans* の呼吸におよぼす

- Trichomycin の影響。J. Antibiotics, Ser. B 10 (4) : 169~176, 1958
- 32) 塚原 毅 : *Candida albicans* の呼吸におよぼす Trichomycin の影響。J. Antibiotics, Ser. B 11 (6) : 287~293, 1958
- 33) 塚原 毅 : *Candida albicans* の呼吸におよぼす Trichomycin の影響。J. Antibiotics, Ser. B 13 (3) : 103~107, 1960

THE EFFECTS OF ANTI-TRICHOMONAS AGENTS UPON  
THE METABOLISM OF NUCLEIC ACIDS IN  
*TRICHOMONAS VAGINALIS*

MASAKAZU MIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine

(Director : Prof. GEN-ICHI TOKUDA, M. D.)

*Trichomonas* infection is one of the most common clinical problems that we encounter in the obstetrical and gynecological fields.

Although a number of anti-*Trichomonas* agents has been reported, their modes of action are not well clarified.

Schizogenesis of this protozoa is known to be very active. Therefore, we felt it worth-while to investigate the synthesis of nucleic acids in *Trichomonas vaginalis* and the possible interference with normal metabolic process by anti-*Trichomonas* agents.

In the present study, the incorporation rate of  $^{14}\text{C}$ -Adenine into DNA and RNA fractions was determined at specific intervals.

Fractionation of *Trichomonas vaginalis* was performed by two different methods, with high-speed centrifugal graduation and with methylated albumin column.

Then the effects of various anti-*Trichomonas* agents upon the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Adenine,  $^{14}\text{C}$ -Glycine and  $^{32}\text{P}$  into individual fractions were studied.

The results are summarized as follows ;

- 1) *Trichomonas vaginalis* appears to have very active synthetic effects of nucleic acids.
- 2) Maximum incorporation of  $^{14}\text{C}$ -Adenine into the nucleic acid fractions of *Trichomonas vaginalis* was noted in 3 hours.
- 3) Trichomycin and azalomycin F did not demonstrate any appreciable effect upon nucleic acid metabolism of *Trichomonas vaginalis*.
- 4) Metronidazole in this study showed marked inhibition effect of DNA synthesis in *Trichomonas vaginalis*, however RNA metabolism was not disturbed.