

蛍光染色によるマラリア原虫の研究

—迅速診断のための形態と核 DNA 量の変化に関して—

奈良県立医科大学寄生虫学教室

天野 博之

FLUORESCENCE STAINING FOR MALARIAL DIAGNOSIS —RELATIONS BETWEEN THE SHAPE AND NUCLEAR DNA CONTENTS OF PARASITES IN *PLASMODIUM VIVAX* AND *P. FALCIPARUM*—

HIROYUKI AMANO

Department of Parasitology, Nara Medical University

Received November 29, 1991

Summary: The relationship between the shape and nuclear DNA contents of malarial parasites of *P. vivax* (Pv) and *P. falciparum* (Pf) by microfluorometry on fluoro-stained thin blood films was studied in order to establish the usefulness of the method for simple and rapid diagnosis of malaria. In brief, thin blood films were prepared from 5 cases with Pv malaria and 3 cases with Pf malaria, fixed with methyl alcohol and stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). DNA contents were expressed in arbitrary fluorescence units (FU). When the average nuclear DNA contents of human mature granulocytes were 100.6 FU, those of ring form malarial parasites (R) were 1.1 FU and there was no significant difference of these value between Pf and Pv. As the FU of R was haploid (1 C) value, DNA contents of trophozoites of Pv were increasing in proportion to development, but up to 2 C. Referring to DNA contents, the observation of the shape of Pv parasites revealed that some of the so-called mature trophozoites had more times DNA contents than haploid value. Therefore, these parasites were newly named "immature schizonts". Schizonts with 2 nuclei showed 2 C DNA contents, while the number of nuclei was directly proportional to the DNA contents in the schizonts with 3 nuclei or more. Macrogametocytes (MG) and microgametocytes (mG) of Pv and Pf had more DNA contents than those of R value and mG of Pv had 1-6 times as much DNA value as R, probably reflecting various stages of DNA synthesis up to octoploid (8 C). Nearly all young gametocytes of Pv and Pf had the diploid (2 C) value of DNA. Exflagellating microgametes of Pv showed the haploid value. The observation of periodically-sampled blood smears from a case with Pv malaria revealed that the number of gametocytes increased with decrease of counts of asexual forms, and decreased with increase of counts of asexual forms before and after the treatment. Additionally, DAPI staining revealed a decrease in DNA contents in the Pf parasites of crisis form in the patients with high IFA titer. Thus, for the better understanding of malarial parasites, critically needed is not only pure morphological information but also cytochemical data such as nuclear DNA contents in the parasites.

Index Terms

malaria (*Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*), 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihy-

drochloride(DAPI), fluorescence dye staining, DNA contents, microfluorometry, crisis form

緒 言

マラリアはマラリア原虫の赤血球内寄生増殖に起因する急性熱性疾患である。ヒトのマラリアの原因となるマラリア原虫としては、熱帯熱マラリア原虫(*Plasmodium falciparum*, Pf), 三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*, Pv), 卵形マラリア原虫(*Plasmodium ovale*, Po) および四日熱マラリア原虫(*Plasmodium malariae*, Pm)の4種が知られている。このうちPo, Pmによるマラリアは稀で、ほとんどはPfおよびPvによる。Pvによる三日熱マラリアは再発を繰り返す危険性があるものの、重症化することは少なく良性マラリアと呼ばれる。一方、Pfによる熱帯熱マラリアは悪性マラリアと呼ばれ、脳障害、腎障害、DICなどによる多臓器障害を合併し、適切な治療が遅延すると死の転帰を取る。本邦におけるマラリア例では非常に稀な例を除いて、ほとんど全て海外からの輸入例である。世界的には、今なお、最も重要な感染症のひとつで年間100万にものぼる死亡者が経験されている¹⁻⁴⁾。加えて本邦例にも死亡例が経験されている現状⁵⁻¹²⁾では、国際協力の立場のみならず、本邦での臨床の立場からもマラリアの診断を疎かにすることは出来ない。マラリアの確実な診断は血液塗抹標本上でマラリア原虫を証明することであり、この目的にはギムザ染色法が一般化されている¹³⁻¹⁵⁾。当法はマラリア診断法として、疫学、臨床両者にとって今後とも標準法とされるが、マラリア原虫検索には、ある程度の時間と熟練を必要とする。疫学の場合は、より迅速簡便かつ確実なマラリア診断法が真剣に求められている¹⁶⁻¹⁸⁾。臨床の場合にあっては、時間的要素はさほど重要とはされないが、迅速簡便に越したことはない。最近の本邦医療従事者中にはマラリア診断の経験者が少ないので、診断にあたって熟練者を求めることが難しい現状では手技の簡便さが重要である。特に寄生赤血球数(parasitemia)の著しく少ない場合や、臨床では治療後の治癒判定にあたって、簡便な方法が歓迎される。筆者はこの観点から迅速簡便なマラリア診断法としてDAPI染色法を先に紹介報告し¹⁹⁾、臨床的に応用してきた。4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)²⁰⁾は二重鎖DNAと特異的に結合する蛍光色素である²¹⁾。従って当法では染色された原虫核からマラリアを診断することになる。本研究では、まずDAPI染色により sulfamonomethoxine 投与時のPvの

経時的形態変化を観察したが、この過程でマラリア診断を容易にする原虫核形態のアトラスの必要性と核DNA量の変化に注目検討した。そこで、臨床材料にて当法によるPvおよびPfの環状体(ring form)とその生殖母体(gametocyte), Pvの栄養体(trophozoite), 分裂体(schizont), および生殖体(gamete)の形態を詳細に観察し、その形態と核相対DNA量の関係を個々のマラリア原虫について検討した。またPfにおいて、何等かの宿主免疫機序により生じるとされる変性環状体(crisis form)の形態とDNA量との関係をも検討したので、その結果を報告する。

材料と方法

(検体)

1) 三日熱マラリア患者5名(日本人2名, インド人1名, タイ人2名)および熱帯熱マラリア患者3名(日本人2名, タイ人1名)より得た末梢血塗抹標本を検体として使用した。タイ人例は現地で経験した土着急性マラリア例で、他は輸入例であった。Pvの経時的形態観察にはインドよりの輸入三日熱マラリア症例(症例1)の血液標本を用いた。Pfのcrisis formの研究では、タンザニアよりの輸入熱帯熱マラリア症例(症例2および症例3)の血液塗抹標本を使用した。

2) 実験材料採取に用いた主な症例の概略

症例1: 28才, 男性, 宗教家。インドから帰国後発熱, 発症3日目に三日熱マラリアと診断され入院。入院時三日熱型の悪寒戦慄を伴う高熱発作(40.9℃)を認め、肝1横指, 脾0.5横指触知。検査結果(Table 1)で、血小板著明に減少。parasitemia 2,592/μlでPvの各期の原虫を認め、CRP強陽性。LDH高値, ハプトグロビン低値。入院後30時間にわたり無治療にて、さらに sulfamonomethoxine(M錠)を単独投与し、血液塗抹標本上のマラリア原虫の形態学的変化を経時的に観察。M錠投与後も連日発熱発作を繰り返し、SP合剤(sulfadoxine 500 mg + pyrimethamine 25 mg)投与により解熱し完治。

症例2: 29才, 女性, 研究者の妻。

主 訴: 発熱発作

家族歴・既往歴: 特記事項なし

現病歴: 1982年10月—1984年9月の2年間チンパンジー研究の夫に同行してタンザニア国カソゲ(タンガニカ湖畔)に滞在した。この間、マラリア予防内服として

MP 合剤(sulfamonomethoxine 250 mg + pyrimethamine 12.5 mg) 2 錠/週または chloroquine(150 mg base) 2 錠/週を規則正しく服用していたが、蚊に刺されることが多く、都合 5 回発熱発作を来し、その都度 MP 合剤に chloroquine を併用し軽快していた。帰国後マラリア予防内服を打ち切ったところ、1984 年 10 月 20 日、11 月 1 日に発熱(37.8°C)した。自己加療後、受診したがマラリア原虫陰性で放置観察された。同年 11 月 24 日より再び悪寒を伴う微熱を来し、26 日に至りマラリア原虫が発見され、翌日入院となった。

入院時現症：体温 36.8°C，頭痛，倦怠感あるも，貧血，黄直なく，下痢を認めない。意識清明で神経学的異常なし。心肺正常。肝脾腫を認めず，表在リンパ節腫脹なし。下肢に痒疹を認めるも出血傾向なし。

入院時検査結果：Table 1 に示すごとく，血液学的に著変を認めない。末梢血にマラリア原虫を認めるもののその数は多くない。CRP は陰性で，出血傾向を認めない。肝機能・腎機能など著変なく，溶血を示唆する所見も無かった。また便潜血陰性，寄生虫卵を認めず，尿異常所見なく，胸部レ線像，ECG とも正常範囲で，エコー上，肝，脾，膵に異常を認めなかった。

入院後経過：熱型は午後 37°C 台に体温上昇するも，発作感を自覚せず，軽い頭痛以外の訴えもなく経過した。ring form の形態のみからは種の同定困難であったが，入院後 3 日目に Pf の gametocyte が発見され，診断が確定した。同日，再燃から 7 日目より sulfamonomethoxine 2 g を 60 時間内に 6 回投与，さらに QT 療法(quinine 1.5 g/日 x 4 日間と doxycycline, DOXY 200 mg/日 x 8 日間)を加え，引き続き primaquine(15 mg/日 x 14 日間)を投与して治療を終了した。解熱時間は 84 時間(QT 療法後では 12 時間)，原虫消失時間は 120 時間(QT 療法後では 36 時間)と，有意な parasitemia の減少を認め，症状改善し軽快退院した。その後外来にて同様の治療を 1 クール行い，再燃を見ず完治したと判断している。間接蛍光抗体法(IFA)にて，入院時血清は Pv 抗体陰性，Pf 抗体 1,024 倍と高値で，その後 1985 年 3 月まで同値は 256 倍の高値を持続し，6 月に至り 16 倍に低下した(Fig. 1)。またクロロキシン感受性テストで，本例 Pf は耐性を示さなかった。

症例 3：35 才，男性，人類学者。予防内服として chloroquine(150 mg base) 2 錠/週を定期的に服用。タンザニアにて発熱発作を来し chloroquine を服用後解熱して帰国。帰国後再度 39.8°C の発熱を来し来院。受診時体温 38.1°C，咳嗽，倦怠感，食欲不振，下痢を認める。検査結果(Table 1)で，血小板著明に減少。CRP 強陽性，総

コレステロール値低下。LDH 高値，ハプトグロビン低値，総ビリルビン高値。parasitemia 39,000/ μ l で Pf の ring form，幼若生殖母体(immature gametocyte)を認めた。外来加療にて，SP 合剤(2 錠 x 3 日間)に DOXY (200 mg/日 x 10 日間)を併用，primaquine(15 mg/日 x 14 日間)を追加し根治。IFA 値は Pv 抗体陰性，Pf 抗体陽性(治療前，2 カ月目 256 倍，3，4 カ月目 64 倍)。

(方法)

1) 薄層血液塗抹標本の作製

全ての標本は，採血後直ちに通常の方法に従い薄層血液塗抹標本として，メタノールで 5 分固定後，デンシケータ内で 4°C の冷暗所に保存し，要に臨み室温に戻し使用した。準備実験にて差異を認めなかったため標本作成に当たり無蛍光ガラスは使用しなかった。

2) DAPI 染色法

a) 試薬として以下の 2 種を用意した。

①蛍光分析用特製試薬 DAPI(NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan)を蒸留水で溶解し，1 μ g/ml DAPI 液を作成して冷暗所に保存した。

Table 1. Summaries of case 1, 2 and 3

Case		1	2	3
Age, Sex		28y. o. M	29y. o. F	35y. o. M
Nationality		Japanese	Japanese	Japanese
Malaria		Pv	Pf	Pf
Parasitemia	(/ μ l)	2,592	461	39,000
	(%)	0.048	0.012	0.77
IFA titer		nd*	1,024	256
RBC	($\times 10^4$ / μ l)	540	384	504
Hb	(g/dl)	16.2	11.6	15.1
PLT	($\times 10^4$ / μ l)	7.4	16.4	3.2
WBC	(/ μ l)	4,000	4,500	4,300
Eos.	(%)	0	1	1
Neutro.	(%)	79.5	77	67
CRP	(mg/dl)	6.3	(-)	20.1
Glucose	(mg/dl)	108	94	106
T. Chol.	(mg/dl)	153	148	108
T. P.	(g/dl)	6.9	7.2	5.9
Alb	(g/dl)	3.8	3.9	3.4
LDH	(IU)	734	330	1,501
Hpt	(mg/dl)	4.0	127.5	nd
TB	(mg/dl)	0.9	0.7	2.8
GOT	(IU)	40	17	61
GPT	(IU)	32	19	54
Al-P	(BU)	1.7	0.8	2.3
BUN	(mg/dl)	17.6	8.4	15.6
Cr	(mg/dl)	0.9	0.7	1.2
Fbg	(mg/dl)	430	300	450
FDP	(\pm)	(\pm)	(-)	(-)

*nd; not done

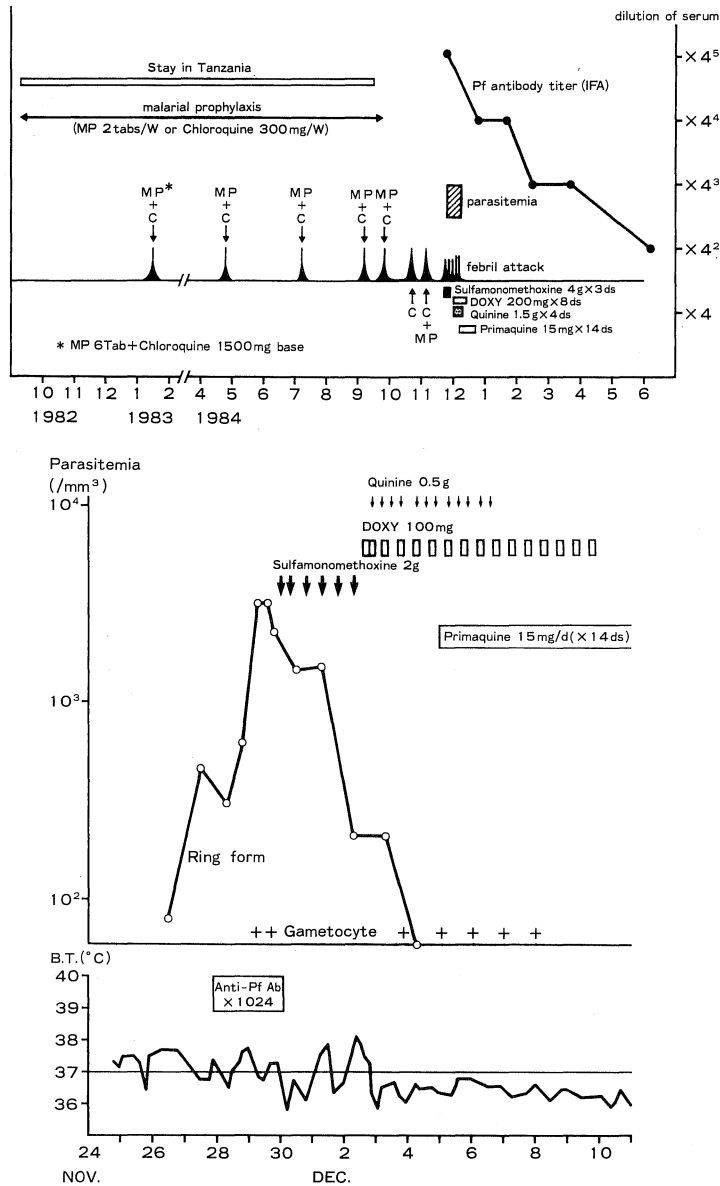


Fig. 1. Clinical course of Case 2.

This was a case with *P. falciparum* malaria in a 29 year-old Japanese female who was thought not to get seriously ill because of her high malarial antibody level. She was admitted to the hospital in November 1984, suffering from low grade fever. For two years before admission she had been in Tanzania. And she had gotten malarial febrile attack five times (cf. upper graph). On admission, her body temperature was 36.8°C and anemia, jaundice, bleeding tendency, neurological abnormality and hepatosplenomegaly were not found. Malarial parasitemia was 461/mm³ and it was too difficult to make a differential diagnosis from morphological findings of the intraerythrocytic parasites as many of these ring forms were degenerated (crisis form). Pf gametocytes were discovered 3 days after admission, and remained without progression of symptoms (cf. middle and lower graphs). The high Pf malarial antibody titers (IFA, 1024-256) were continued for about 3 months, although she was cured by administration of sulfamonomethoxine, quinine, doxycycline and primaquine (cf. upper graph).

② 1% 2-メルカプトエタノール(2-ME)液を蒸留水またはリン酸緩衝液(PBS, pH 7.2)で調整した。

b) DAPI 染色

メタノール固定した血液塗抹標本を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI 液にて 15 分間染色し、水洗風乾後、蛍光減弱防止液²²⁾として 2-ME 1 滴を滴下し、カバーガラスをかけ、直ちに蛍光観察を開始した。

3) 蛍光観察および核 DNA 量の測定

ニコン落射型蛍光顕微鏡にて、UV 励起し 420 nm の吸収フィルターを用いて観察し、写真撮影した。要に臨み可視光を併用した。

原虫形態を観察するにあたっては、その核相対 DNA 量を参考にした。標本中の原虫核相対 DNA 量は、ニコン顕微測光装置 P-1 にて測定し、蛍光強度(FU)として表記した。バックグラウンドの影響を避けるために、核の大きさに合わせてその都度、径 0.1 mm および 0.2 mm の測光絞りを選択した。FU は任意の値であるが、ヒト好中球の核 DNA 測定値より補正し、マラリア原虫 ring form の核 DNA 値(1 C)を 10 FU に近似させる様に調整した。なお Pf の crisis form の研究にあたっては同値を 40 FU に調整した。この過程で、ヒト好中球とマラリア原虫 DNA 比が理論値を大きく外れる測定値は、標本作製上の変性などの何等かの付加的因子を考慮して、実験に適さないものとして除外した。

4) ギムザ染色法

同一症例同一時期の標本の 1 枚、および DAPI 染色後の標本の一部をギムザ染色して同時に観察し DAPI 染色に際する形態分類の参考にした。

染色手技は通常法に従い、PBS(pH 7.2)にてギムザ染色液(メルグ)を 10 倍希釈したものを使用して 20 分染色した。DAPI 染色後の標本ではカバーガラスを除いて、PBS(pH 7.2)にて洗浄後染色に供した。

5) Pv 赤内型原虫の経時的形態観察

症例 1 では入院後、治療前後に都合 22 回の経時的採血を行い、血液塗抹標本上のマラリア原虫の形態学的変化をギムザ染色および DAPI 染色で観察したが、初期の実験のため原虫核相対 DNA 量は測定出来ていない。

6) 統計処理

統計処理には MEDICAL PLAN II, Ver. 2.00(MEDICAL. I. F. Co., Ltd.)を用い、T 検定を実施した。

結 果

DAPI 染色像ではマラリア原虫核が青白色に輝き、従来法のギムザ染色では見落とす危険性のある倍率での観察でも容易に識別可能であった。蛍光観察時に可視光観

察を併用して、原虫の赤血球内寄生を確認すると共にその細胞質の形態を観察した。臨床材料には Pv の各発育期の赤内型原虫が出現するが、Pf では通常 ring form と gametocyte しか認めないので、その範囲での観察となった。実験は以下の 5 シリーズに分けて検討した。原虫の発育段階の鑑別には、核形と細胞質の形態のみならず、核相対 DNA 量を参考にして総合的に判定したが、初期の実験であるシリーズ 1) では核 DNA 量測定は行っていない。

1) Pv の経時的形態変化の観察

Pv の経時的形態観察(症例 1)では、parasitemia は 2,592/ μl から発熱発作後 12,595/ μl に増加し、次回発熱時まで波状の増減を繰り返したが、ほぼ一定の値を維持した。治療前で無性原虫は、まず ring form が増加し、その減少と共に栄養体(trophozoite)が発育し、次回発熱発作直前に分裂体(schizont)が出現した。サルファ剤投与後の parasitemia は連続的な減少傾向を認め、特に無性原虫の減少が著明であった。生殖母体(gametocyte)は、治療前後とも、無性原虫の減少時に増加、増加時に減少するという興味ある像を示し、サルファ剤投与後では、258/ μl から 5,256/ μl と著増した(Fig. 2)。この間の ring form, trophozoite, schizont, 娘原虫(merozoite)および gametocyte の核 DNA の DAPI 染色態度は興味ある DNA 量の変化を示唆するもので、以下の実験への端緒となった。

2) ヒト成熟好中球とマラリア原虫との核 DNA の関係

ヒト成熟好中球の核 DNA 実測値を 100 FU に近似させた場合、その核相対 DNA 量は 100.6 ± 10.5 FU(120.7-62.9) (n=59)であり、この時のマラリア原虫 ring form (R)の核相対 DNA 量は 1.1 ± 0.3 FU(0.5-1.9) (n=110)であった。また Pv では 1.2 ± 0.2 FU(1.0-1.9) (n=54)、Pf では 1.0 ± 0.3 FU(0.5-1.8) (n=56)の値を示した。すなわち基本となる 1 マラリア原虫あたりの核 DNA 量はヒト成熟好中球のその 1.1/100 で、マラリア原虫の種間に差を認めない結果であった。

3) Pv の環状体、栄養体および分裂体の観察

原虫形態と核相対 DNA 量測定結果は一括して表に示した(Table 2)。

Pf, Pv とも、その ring form(R)は円形ないし類円形の核を有す。時に馬蹄型を呈することもあった(Plate 1-a, b, c, 2-a, b, c)。Pv で、R より細胞質が変形しかつマラリア色素を持たないものを幼若栄養体(imature trophozoite, iT)、細胞質がアメーバ状に変形し、マラリア色素(hemazoin)を持ち、核がやや大型化し、いびつ化し

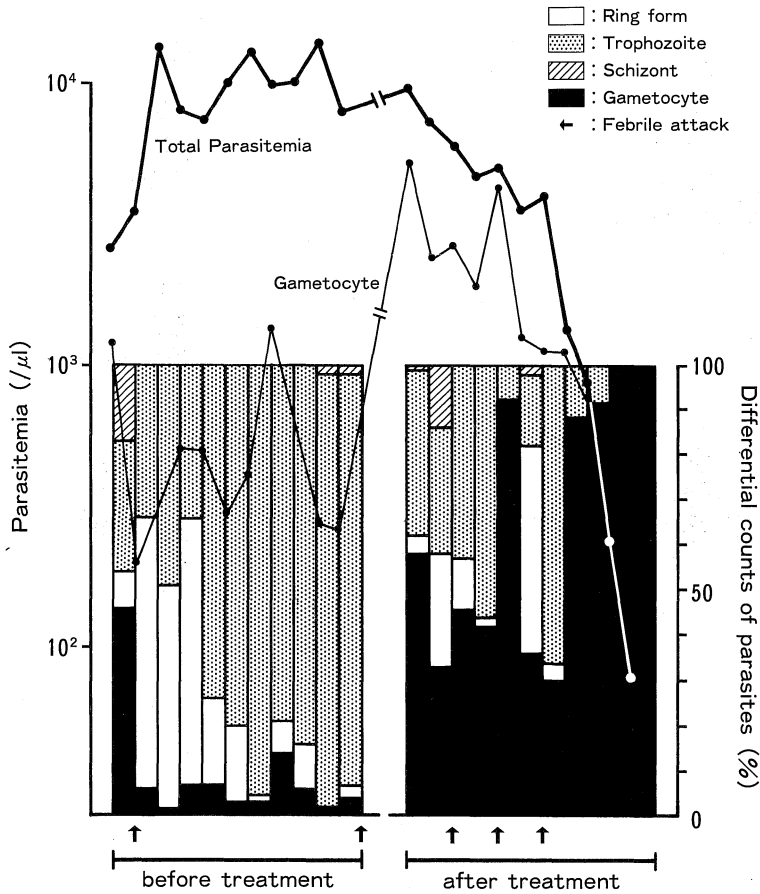


Fig. 2. Parasitemia and differential counts of parasites observed in periodically sampled blood smears from a case with *P. vivax* malaria.

Table 2. The shape and nuclear DNA contents of *P. vivax*

Ring form	10.3 ± 2.0* (8.0 - 16.0) n=39
immature Trophozoite	11.2 ± 2.3 (8.1 - 22.0) n=80
Trophozoite	15.8 ± 2.4 (10.2 - 21.5) n=76
Schizont (2 nuclei)	28.7 ± 5.5 (18.9 - 37.5) n=19
Schizont (3 nuclei or more)	101.6 ± 51.1 (45.5 - 225.0) n=19
immature Schizont	77.9 ± 31.7 (26.0 - 160.8) n=42

*mean ± SD fluoro unit (FU)

たものを栄養体(trophozoite, T)とした。栄養体は空胞を持ち変形の著しいものから大型で生殖母体に似た形態のものまで形状変化に富むが、核はほぼ同一の大きさと同様の形態を持つことを特徴とした(Plate 1-d, e, 2-d, e, g)。その核相対DNA量を、RのFU(10.3 ± 2.0)(n=39)を基準に検討するに(Fig. 3), Tで15.8 ± 2.4 FU(n=76), iTでは11.2 ± 2.3 FU(n=80)とその変化は少量であったが、成熟に従いDNA量は増加していた。2核以上およ

び核形態の著しく変形したものを分裂体(schizont, S)としたが、この内著しい核形態変化を伴うものを、核DNA測光の結果を考慮し未熟分裂体(immature schizont, iS)とした。いわゆる成熟分裂体(mature schizont, S)では娘原虫(merozoite)がロゼット状に配列し美しく輝いた(Plate 1-f, h-j, 2-f, g, j)。その核相対DNA量は2核の分裂体で28.7 ± 5.5 FU(n=19)と、ほぼ理論通りのdiploid(2C)の値を示し、3核以上の分裂体では総平均

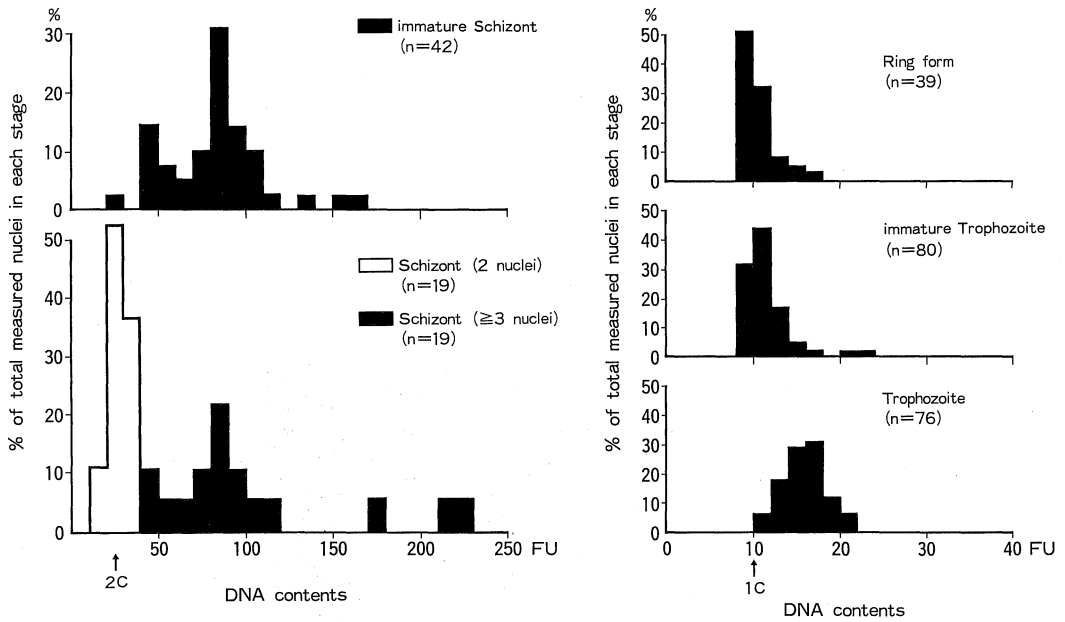


Fig. 3. Frequency distribution of DNA contents of *P. vivax* in each asexual developing stage. DNA contents were expressed in arbitrary fluorescence unit (FU).

値が 101.6 ± 51.1 FU ($n=19$) となり、核数に比例する DNA 量の増加を示した (Fig. 4)。しかし未熟分裂体 (iS) のそれは 77.9 ± 31.7 FU ($n=42$) とばらつきが大きく、複雑な様相を呈し、形態と DNA 量の間に関連を見いだし得なかった。未熟分裂体は従来のギムザ染色による分類上栄養体に属する形態の原虫を含むが、DNA 量からは数回の分裂を示唆するもので、これまでとは異なる基準により未熟分裂体とした。

4) Pv および Pf の生殖母体 (gametocyte) と Pv の生殖体 (gamete) の観察

原虫形態と核相対 DNA 量測定結果は一括して Table 3 および Fig. 5 に示した。

Pv の雌性生殖母体 (macrogametocyte, macroG) と雄性生殖母体 (microgametocyte, microG) とは原虫の大きさおよび核の位置により区別可能で、macroG は大型で類楕円形、核は辺縁に濃縮して類円形に輝き、microG は少型類円形、核は中央に分散して種々の形態に染まる。両者とも hemazoin が細胞全体に黒色の影として明瞭に散見される (Plate 1-k, 1, 2-k, 1)。その DNA 量は R のそれ (10.1 ± 1.4 FU, $n=77$) より大で、macroG では 15.8 ± 6.2 FU ($n=40$)、microG は 29.0 ± 16.8 FU ($n=30$) であった。microG の核 DNA 量は $11.6-67.8$ FU で、1 C-6 C に広く分布することを示唆する結果で

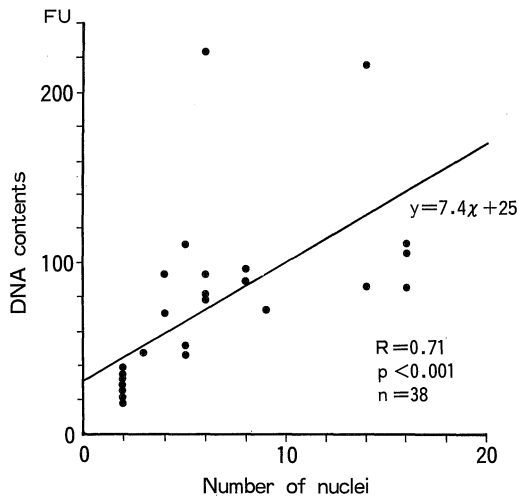


Fig. 4. Correlation between number of nuclei and DNA contents in *P. vivax* schizonts.

あった。幼若生殖母体 (immature gametocyte, iG) は、小型で比較的円形の細胞質と十分量の hemazoin の存在、および核が 1 核であることにより認識されるが、Pv では雌雄を判別することが困難であった (Plate 1-m, 2-m)。その DNA 量は 20.9 ± 4.2 FU ($n=11$) で、2 C が主体と考えられた。

Table 3. The shape and nuclear DNA contents of malaria parasites

	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>
Ring form	10.1±1.4* (6.2-13.3) n=77	10.1±2.6 (5.6-15.8) n=19
macro Gametocyte	15.8±6.2 (7.7-35.0) n=40	16.6±4.2 (9.5-22.1) n=10
micro Gametocyte	29.0±16.8 (11.6-67.8) n=30	15.3±4.7 (10.6-25.7) n=16
immature Gametocyte	20.9±4.2 (16.2-28.1) n=11	
macroG		19.0±2.9 (15.9-23.3) n=8
microG		20.6±8.1 (10.8-38.5) n=11
micro Gamete	11.2±2.7 (7.3-16.2) n=29	

*mean±SD fluoro unit (FU)

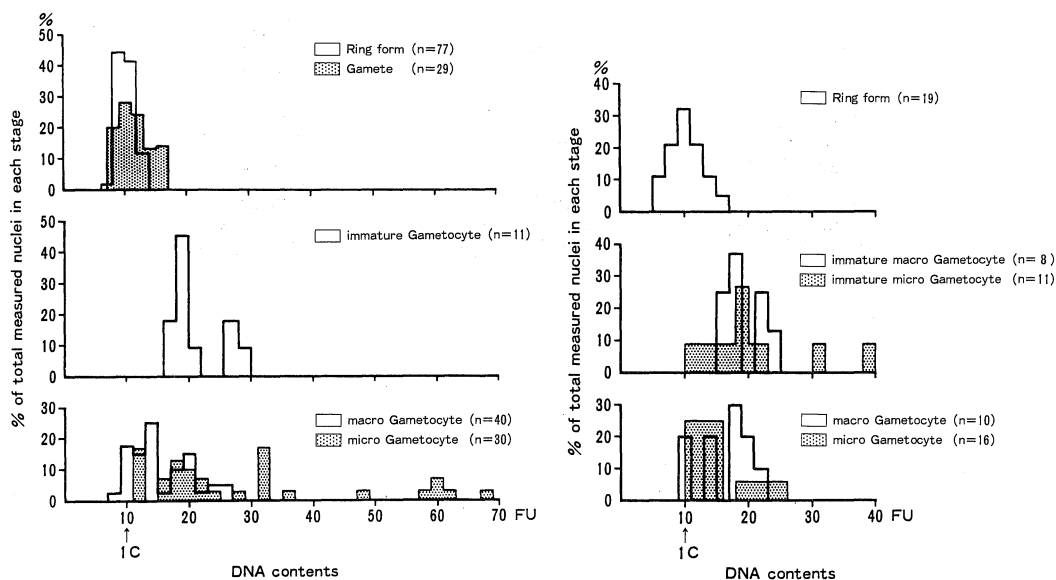


Fig. 5. Frequency distribution of DNA contents of *P. vivax* (left) and *P. falciparum* (right) in each sexual form. DNA contents were expressed in arbitrary fluorescence unit (FU).

Pf では、macroG と microG とをその核 DNA の濃縮状態により区別した。すなわち両者とも半月体の細胞質を持ち、核はその中央に位置するが、その核は macroG では濃縮して類円形の形態を、microG では散在して不整の形態を示した(Plate 1-n, o, 2-n, o)。その DNA 量は、R のそれ(10.1±2.6 FU, n=19)より大であるが、macroG で 16.6±4.2 FU(n=10)、microG では 15.3±4.7.FU(n=16)と、雌雄間でほとんど差を認めなかった。

Pf の iG は比較的小型の類円形の細胞質で hemazoin が散在する特徴を有し、核 DNA の状態は成熟生殖母体と同様で、雌性幼若生殖母体(macro-iG)と雄性幼若生殖母体(micro-iG)との区別可能であった(Plate 1-p, q, 2-p, q)。その DNA 量は macro-iG で 19.0±2.9 FU(n=8)、micro-iG では 20.6±8.1 FU(n=11)と、両者とも Pv 同様 2 C を主体とするグループと考えられた。

exflagellating microgamete は Pv で観察され、紐様

でその中央に類円形の核を有した(Plate 1-r, 2-r). その核 DNA 量の測定では, 11.2 ± 2.7 FU($n=29$)と haploid (1 C)であることを示す結果であった.

5) Pf の変性環状体(crisis form)の観察

crisis form は赤血球内寄生原虫中, 症例 2 (HT 株) で, 38.8%に, 症例 3 (MO 株)で 51.7%に認められ, 1 方, コントロールとしたタイ例(T 6-1 株)の標本上のそれは 1.2%であった. その核は, 時に核内空胞を持ち, 環状, V 字型, 棒状など種々に変性していた(Plate 1-s-u, 2-s-u). 期待に反して, crisis form の変性した核の各

形態と, その DNA 量との間には有意の差を認めなかった. 標準型 ring form の核 DNA 量は, コントロールの T 6-1 株で 40.5 ± 5.1 FU($n=85$), HT 株で 40.7 ± 6.2 FU($n=63$), MO 株で 39.9 ± 3.7 FU($n=72$)と, 3 者とも, ほぼ近似した値を示した. 一方 crisis form の核 DNA 量は, MO 株では 39.4 ± 5.2 FU($n=77$)で, 標準型とはほぼ同レベルであったが, HT 株では, crisis form のそれが 33.5 ± 6.9 FU($n=40$)と, 標準型のそれ(上記 40.7 ± 6.2 FU)よりも有意に低かった($P < 0.001$)(Fig. 6).

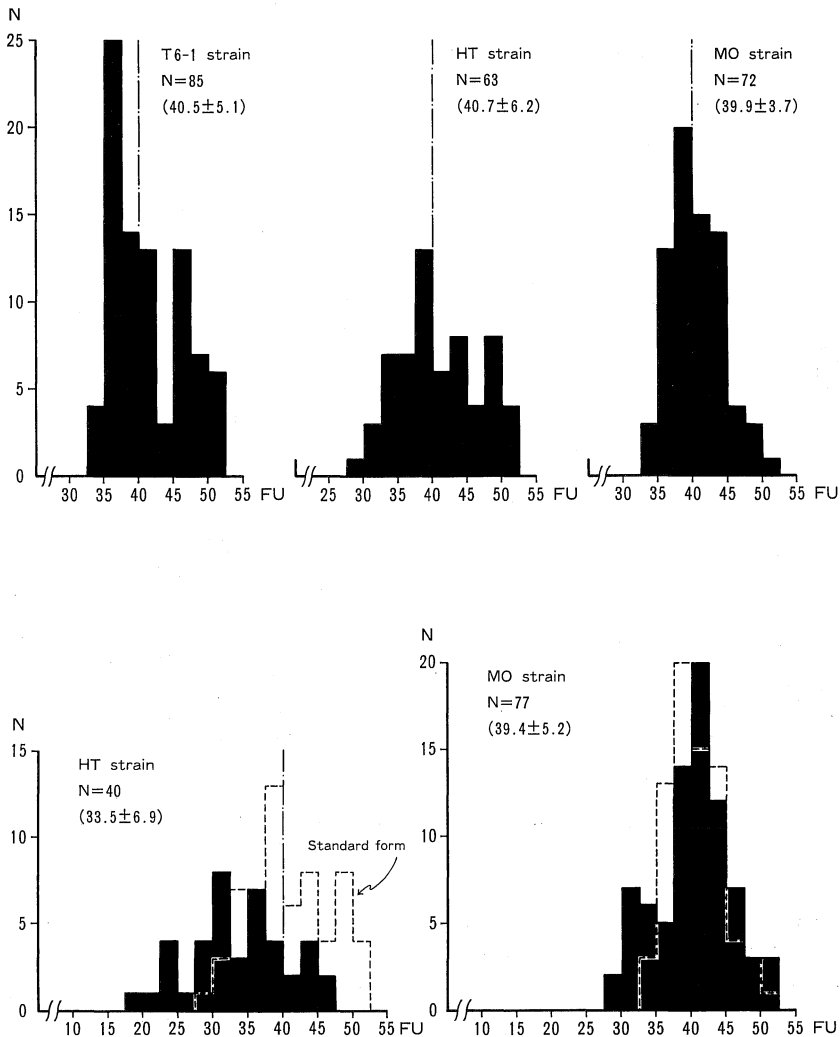


Fig. 6. Nuclear DNA contents of crisis form. Upper graphs show the distribution of DNA contents of standard ring form, and lower of crisis form. Strains of T6-1, HT and MO are *P. falciparum* parasites seen in the smears of control case, Case 2 and Case 3, respectively. FU is arbitrary fluorescence unit indicating nuclear DNA contents of each parasites.

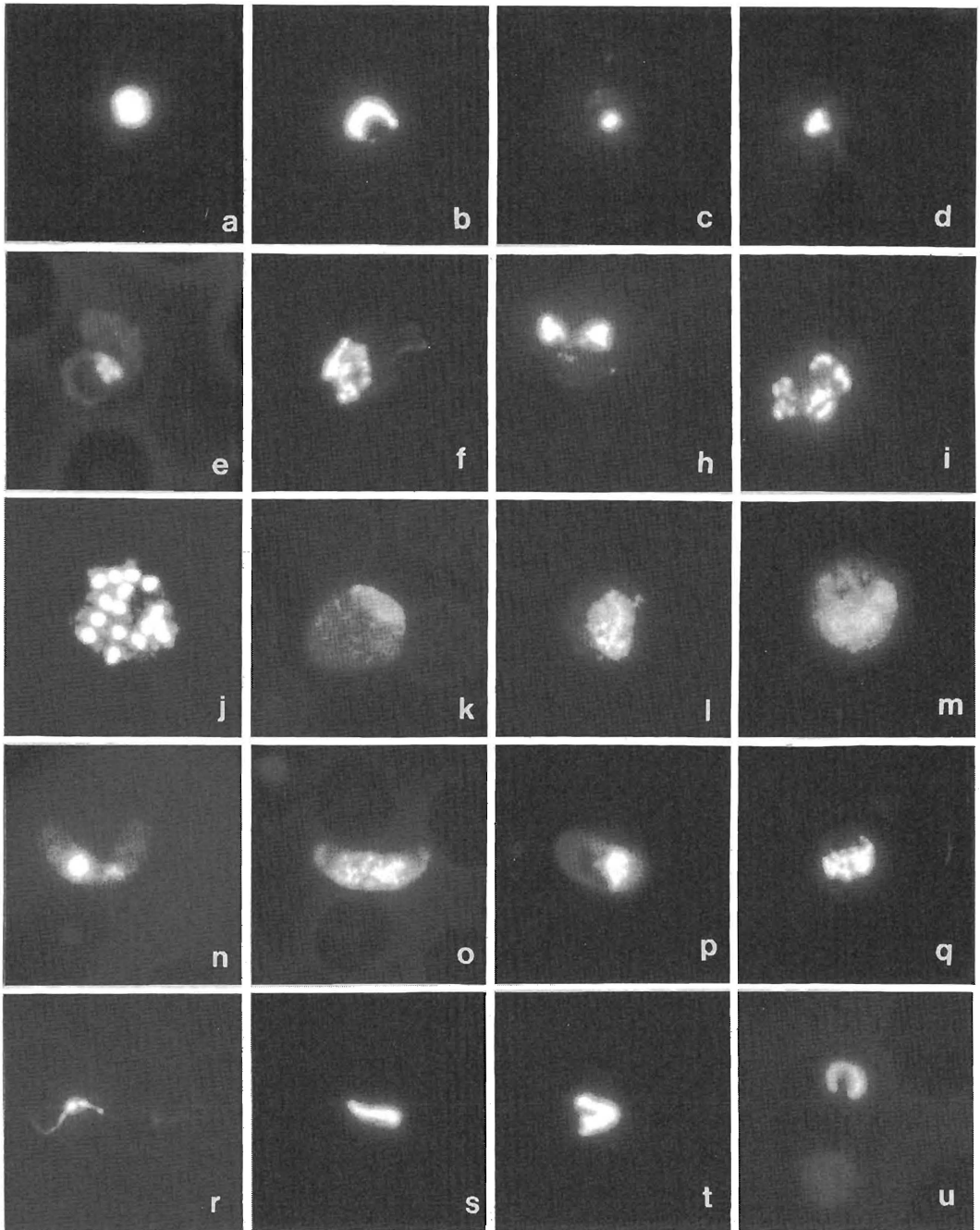


Plate 1. Various shapes of *P. falciparum* and *P. vivax* stained by DAPI fluorescent method.
 a, b, n-q, s-u; *P. falciparum*. c-f, h-m, r; *P. vivax*. a-c; Ring form. d; Immature trophozoite.
 e; Trophozoite. f; Immature schizont. h; Schizont (2 nuclei). i, j; Schizont. k, n; Macrogametocyte.
 l, o; Microgametocyte. m; Immature gametocyte. p; Immature macrogametocyte.
 q; Immature microgametocyte. r; Exflagellating microgamete. s-u; Crisis form.

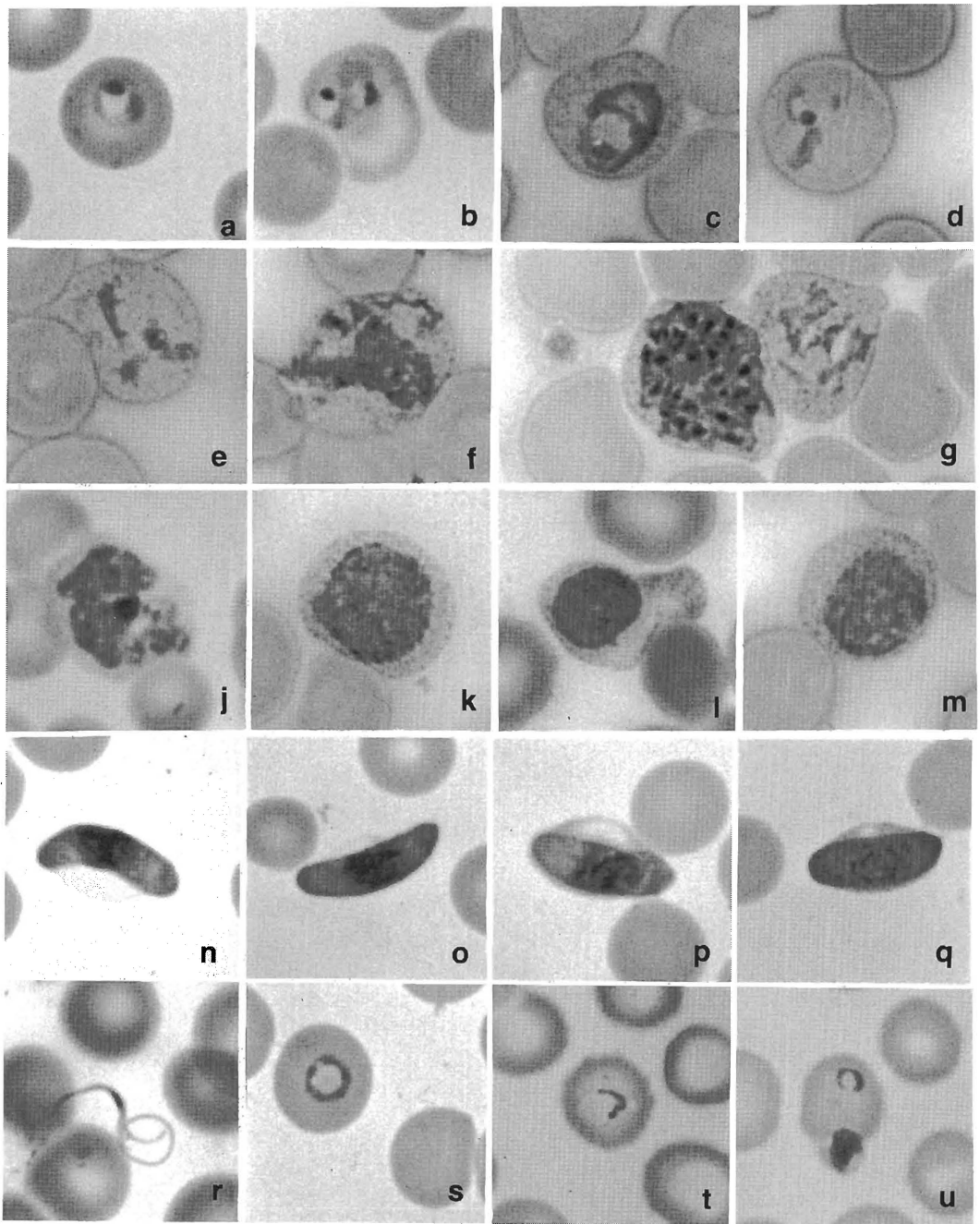


Plate 2. Various shapes of *P. falciparum* and *P. vivax* stained by Giemsa method.
 a, n-q, s-u; *P. falciparum*. b-g, j-m, r; *P. vivax*. a-c; Ring form. d; Immature trophozoite.
 e; Trophozoite. f; Immature schizont. g; Schizont and trophozoite. j; Schizont.
 k, n; Macrogametocyte. l, o; Microgametocyte. m; Immature gametocyte.
 p; Immature macrogametocyte. q; Immature microgametocyte. r; Exflagellating microgamete.
 s-u; Crisis form.

考 察

細胞核 DNA 染色は個々の細胞の形態と同時に核 DNA 量の変化を知り得るため、ヒト血液細胞の研究などにも応用されている²³⁻³⁰⁾。原虫核 DNA 染色の目的では、フォイルゲン染色³¹⁾、アクリジンオレンジ³²⁻³⁴⁾、Hoechst 33258³⁵⁾および 33342³⁶⁾、そして DAPI^{37,38)}等が使われている。いずれも室温で実施できるし、フォイルゲン染色以外は、その手順も簡単かつ短時間で終了する。蛍光顕微鏡を必要とするが、その蛍光ゆえに観察が容易で、慣れればマラリア原虫の鑑別も可能であり、十分臨床およびフィールドで応用できる。最近ではキット化された方法もあり¹⁷⁾、その有用性が報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。コスト面でも DAPI 染色は従来法のギムザ染色と比較して 2分の1と廉価であることが判かった³⁹⁾。DAPI 染色の原法³⁷⁾では固定にエタノールを使用しているが、メタノールで十分²²⁾であり、無蛍光ガラスを使用する必要もなかった。

DAPI 染色による原虫形態を観察するにあたり、その核相対 DNA 量を参考にすることは非常に有意義であった。DAPI 染色像ではマラリア原虫核が青白色に輝き従来法のギムザ染色では見落とす危険性のある倍率での観察でも容易に識別可能である¹⁹⁾。蛍光観察時に可視光観察を併用することにより、赤血球内寄生を確認すると共に細胞質の形態もある程度観察可能であり、原虫の発育段階を鑑別し得る。この鑑別に当たり、核相対 DNA 量の知見が必要となる。

ヒトのゲノムサイズ、C 値(C value)は成書によれば 3.2×10^9 basepairs(bp)とされる⁴⁰⁾。一方、Cornelissenら(1984)⁴¹⁾はフォイルゲン染色と microfluorometry により、ヒト 21 番染色体を内部対象として *P. berghei*(Pb)の sporozoite の核 DNA 量を $27.4 \pm 1.5 \times 10^{-15}$ g とした。Janse ら(1984)⁴²⁾は、この値を 2.5×10^7 bp と計算し、Hoechst 33258 または 33342 染色と flow cytometry 法による観察で Pb, Pf, Pv の haploid(1 C)期の核 DNA 量に差がないことから、Pf, Pv のゲノムサイズも 2.5×10^7 bp であるとした。また Janse & Mons(1987)の総説⁴³⁾によればマラリア原虫のゲノムサイズは Pf で $1-3 \times 10^7$ bp, Pv で 2.5×10^7 bp, *P. knowlesi* で 1.9×10^7 bp, *P. yoelii* で 1.5×10^7 bp, Pb で $2.5-4.8 \times 10^7$ bp と記載されている。仮にマラリア原虫のゲノムサイズを 2.5×10^7 bp とするならば、diploid(2 C)のヒト好中球の FU を 100 に近似させた時、マラリア原虫の FU が 0.4 と成るはずであるが、実際の測定値は 1.1 ± 0.3 FU とそれよりも高値であった。我々の測定値より換算すると、

マラリア原虫の C 値は 7.0×10^7 となる。ring form の核相対 DNA 量が Pv および Pf で同一の値を示した点は、基本的にマラリア原虫の種間に DNA 量の差がないことを示している^{42,43)}。

DAPI 染色による Pv および Pf の形態を詳細に記載したものはなく、その意味で本研究は、今後の活用が期待され、意義あるものと考えられる。ring form を基準にして、細胞質の変形、マラリア色素の有無により幼若栄養体、栄養体を区別した。ギムザ染色像での分類が基本になるが、栄養体を、核がほぼ同一の大きさで形態を持つものに限定し得たのは、分裂体への連続した核形変化とその DNA 量を観察出来た結果によるものである。すなわち、従来のギムザ染色による分類上、栄養体に属する形態のものでも、著しい核形態変化を伴うものは複雑な様相を呈し、この形態と DNA 量の間には、何ら相関を見いだし得ず、DNA 量からは数回の分裂を示唆する結果であった。したがって、これまでとは異なった基準による未熟分裂体なるカテゴリーを設けることにした。2 核の分裂体が、ほぼ理論通りの diploid(2 C)の値を示し、3 核以上の分裂体は核数に比例する DNA 量の増加を示した点は他の報告を裏づけるものである⁴⁴⁾。

Pv, Pf とも、その雌性生殖母体と雄性生殖母体とは原虫の大きさ、核の位置および染色性により区別可能であった。幼若生殖母体は比較的小型で分量のマラリア色素の存在、および核が 1 核であることにより認識され、Pf の雌性幼若生殖母体と雄性幼若生殖母体は核の染色性から区別可能であるが、Pv では雌雄を判別することが困難であった。Ponnudurai ら(1986)⁴⁵⁾は、培養マラリアの観察で Pf の生殖母体を 5 期に分類した。1 期は R 類似でかつマラリア色素陽性のものとしているが、我々の観察でははっきり分類されるものを認めなかった。2-4 期は我々の幼若生殖母体に相当する。生殖母体の DNA 量は R のそれより大であるが、Pf では雌雄間でほとんど差を認めず、Pv の雄性生殖母体では 1 C-6 C に広く分布した。雌性生殖母体は 8 体の microgamete を内包するに至るから、Pv では 8 C へのさまざまな過程を観察したことになる。Pf ではこのような変化を見ることはできなかったが、これは種間の違い、または同期化したある時期を見ている可能性がある。あるいは Pf ではヒト血液中で microgamete の発育を行わないのかも知れない。これらに関する結論づけは今回の実験結果からはしえなかった。幼若生殖母体の DNA 量は、Pv, Pf とも、2 C が主体と考えられた。Sinden(1983)⁴⁶⁾によれば Pf の生殖母体は 2 C の時期があり、Janse ら(1988)⁴⁷⁾の観察でも生殖母体は 1-5 期への成熟する過程で 2 C

からやや3 C よりにDNAが増量する結果を得ている。また Pf の生殖母体は宿主内では1 C-2 C で、雄性生殖母体を pH 8 で活性化すると速やかに数回分裂すると記載しているが、今回の我々の観察と一致するものと言えよう。exflagellating microgamete は Pv 例で観察されたものだが、非常に印象的な形態で、その核 DNA 量は理論通り haploid (1 C) であった。

成書によれば、マラリア原虫が1サイクルの赤血球内発育に要する時間は種によりほぼ一定しており、Pf, Pv では48時間とされる。発熱発作時に血流に放出された娘原虫は新たに赤血球内に侵入し環状体となる。その後栄養体を経て分裂体となり娘原虫を内包するに至るか、または環状体の一部は生殖母体に発育するとされる。Pf では一般臨床の血液標本には環状体および生殖母体しか出現しないので経時的観察には適さないが、Pv に限らずマラリア原虫の経時的形態変化、発熱発作と無性原虫の発育との関係は、確立されたものごとく成書には記載されている。しかし、この間の原虫の経時的形態変化、生殖母体の態度に関する記載は意外に乏しく未だ問題が多い様である。今回の Pv の経時的形態観察で認めた parasitemia が発熱発作後に増加し、次回発熱時まで波状の小さな増減を繰り返すも、ほぼ一定値を維持し、無性原虫は、まず環状体が増加し、その減少と共に栄養体が発育し、次回発熱発作前に分裂体が出現すると言う変化は Coatney ら(1971)⁴⁶⁾および Inoki ら(1951)⁴⁹⁾も確認している。

生殖母体は、治療前後とも、無性原虫の減少時に増加、増加時に減少するという興味ある態度を示し、治療後では明らかに著増していた。Sinden(1983)⁴⁶⁾は、Pf では無性原虫の減少時に生殖母体が増加するが、*P. galinaceum* および Pv では両者が同時に増減すると言う我々の結果とは異なる観察を示している。gametocytogenesis に関して興味のあるところであるが、DAPI 染色では、治療前後の態度に明らかな差を認め得なかった。生殖母体の誘導には種々の研究がある⁵⁰⁾。最近の報告によると、Pf では分裂体中の娘原虫は無性原虫になるか、生殖母体になるかの方向づけがなされている⁵¹⁾。したがって、Pv でも同様の方向づけがあれば、何等かの誘導により一方が増加する時に他方が減少するという今回の Pv の観察結果となるといえよう。治療後の生殖母体の増加は使用薬剤が誘導的に作用した可能性を示唆するが、サルファ剤のマラリアに対する作用は薬酸代謝経路を介して核酸代謝を阻害し分裂増殖を阻止することにあるとされる点⁵²⁾に多少の変更を迫るかも知れない。

症例2は、本邦では興味の持たれる重症化しなかった熱帯熱マラリア例で、その非定型的な症状と、非定型的環状体の出現、および罹患地の点から猿マラリア⁵³⁾をも疑ったが、これらの非定型性には、マラリア流行地における感染の反復と、本邦人としては稀な獲得免疫の成立⁵⁴⁾が関与したと考えられる。また、治療後のマラリア抗体価を長期にわたり観察した症例として貴重な一例である。このような非定型的な変性環状体(crisis form)は治療後の標本や培養環境の悪くなった時にも認められることが知られているが、症例2の熱帯熱マラリア原虫を群馬大学寄生虫学教室で、環境を整えて継代培養したところ、典型的な円形の核を持つ環状体が出現した。すなわち、本例の血清がマラリア原虫に影響を与えていることを示唆する結果であった。症例3も高マラリア抗体価を示し、末梢赤血球内原虫中に crisis form を認めた点は症例2と同様である。抗体価は症例2ほど高値ではないが、3カ月にわたり陽性値を持続した。症例2よりも crisis form の割合は多かったが、parasitemia が十分量であった点からは増殖抑制とは言い難い。症例2とは異なる発育抑制機序を想定しなければならないかもしれない。クロロキン耐性と考えるものの、受診前に服用した同薬が、殺原虫的ではないまでも発育抑制的に影響していた可能性を完全には否定できない。Tariaferro & Tariaferro (1944)⁵⁵⁾は猿マラリアにおいて parasitemia の増加が自然経過中に抑制されることを観察し、分裂体中の娘原虫数が減じ、かつ形態的に変形した娘原虫の出現を認めた。彼らはこの変性娘原虫を crisis form と名付け、獲得免疫の関与を想定したが、以後、この名称は、広く何等かの免疫機序による変性赤血球内寄生マラリア原虫にも使用されるようになった^{56,57)}。確かに赤血球内マラリア原虫には変性したものがあり、その誘発に、特に humoral な immune mechanisms が関与している証拠が整ってきた⁵⁶⁾。Jensen ら(1982)⁵⁷⁾の観察では、免疫血清を加えた熱帯熱マラリア原虫の培養で crisis form が出現し、かつ分裂体への発育が抑制されている。彼らはその機序として、マラリア抗原に対する抗体反応により娘原虫の赤血球内侵入を妨げるのみならず必須栄養素の取り込みをブロックするためにマラリア原虫の発育に支障を来すことを推定している。症例2の原虫が継代培養中に標準型の環状体に戻った点も、crisis form 形成に宿主の血清中の humoral factor の影響があったことの証拠といえよう。最近の研究によると、これら humoral factor には crisis form factor (CFF) なる名称が与えられ、特に重要なものとして tumor necrosing factor (TNF) の関与が決定的と成っている^{54,55)}。我々の例では残念ながら2例とも

TNF の測定は行えなかった。DAPI は二重鎖 DNA のみに結合するので、DNA が解離すれば染色されないことになり、症例 2 に見られた crisis form の DNA 量の変化は変性 DNA の存在を示唆し、赤血球内寄生原虫発育抑制効果が DNA にまで及んでいることを物語るものとして興味を持たれる。

以上、本研究の結果は、マラリア原虫をその核 DNA 量の態度を加味して観察することの重要性を示すもので、今後の基礎および臨床研究におきマラリア原虫の理解に寄与するものとする。

結 語

4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) による核 DNA 染色法 (DAPI 染色法) を用いて、臨床例の熱帯熱マラリア原虫 (Pf), 三日熱マラリア原虫 (Pv) を観察検討し、以下の結論を得た。

1) DAPI 染色法は簡便で、従来法に比し低倍率でもマラリア原虫の識別が容易であり、迅速診断に適している。

2) Pv の経時的形態観察では、

a) parasitemia は発熱発作後に増加し、環状体から栄養体、分裂体への経時的発育をみるが、次回発熱発作までほぼ一定値を維持した。

b) サルファ剤投与後の parasitemia は、無性原虫の減少により持続的に減少した。

c) 生殖母体は、治療前後とも、無性原虫の減少時に増加、増加時に減少し、投薬後に著増した。

3) DAPI 染色法による Pf および Pv の形態観察とその核相対 DNA 量測定では、

a) Pf および Pv の環状体 (R) は円形ないし類円形、時に馬蹄型の核を有し、その核 DNA 量はほぼ同値で、ヒトの 1/100 であった。これを基本のハプロイド (1 C) 値とした。

b) Pv の栄養体は形状変化に豊むが、核は比較的同一の大きさ形態を持つ。マラリア色素を持たない幼若栄養体 (iT) とマラリア色素を持ち、核がややいびつ化し、大型化した栄養体 (T) とに分けることが出来た。両者の核 DNA 量は成熟に従い増加したが、その変化は少量 (2 C 以下) であった。

c) Pv の 2 核以上および核形態の著しく変形したものを分裂体 (S) としたが、この内著しい核形態変化を伴うものを未熟分裂体 (iS) とした。2 核の S は diploid (2 C) の値を示し、3 核以上の S は核数に比例する DNA 量の増加を示した。iS は 2 C 以上の DNA 量を持ち、形態と DNA 量の間に関連はなかった。

d) Pf, Pv とも、雌性生殖母体 (macroG) と雄性生殖母

体 (microG) とをその細胞形態、マラリア色素、核 DNA の濃縮状態により判別可能であった。幼若生殖母体 (iG) は比較的小型でマラリア色素が散在する特徴を有し、Pf では核 DNA の状態から雌雄に区別出来たが、Pv では雌雄判別は困難であった。Pf, Pv とも G の核 DNA 量は R のそれより大で、Pf では雌雄間でほとんど差を認めなかったが、Pv の microG では 1 C から 6 C に広く分布した。Pf, Pv とも iG は 2 C を主体とするグループと考えられた。

e) Pv の exflagellating microgamete は紐様で、その類円形の核の DNA 量は haploid (1 C) であることを示す結果であった。

4) Pf の crisis form の検討では、

a) crisis form は赤血球内寄生原虫中、38.8% - 51.7% に認められた。

b) その核は、環状、V 字型、棒状など種々に変形していた。crisis form の平均核 DNA 量は標準型のそれよりも低かったが、変形した各形態間には核 DNA 量に有意の差を認めなかった。

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜った恩師 荒木恒治教授ならびにご助言、ご校閲を賜った細菌学教室 榎葉周三教授、病態検査学教室 中野 博教授に深甚なる謝意を表しますとともに、ご助言を賜った教室の諸兄に感謝の意を表します。また IFA テスト、クロロキン感受性テストをお願いした群馬大学寄生虫学教室 鈴木 守教授に感謝致します。

この論文の要旨は、第 26 回、第 27 回、第 29 回、第 30 回日本熱帯医学会総会、第 59 回日本寄生虫学会大会において発表した。

文 献

- 1) 天野博之：マラリア；その世界分布状況と熱帯マラリアにおける血小板減少症について。病理と臨床 2：1062-1067, 1984.
- 2) 天野博之：サハラ以南のマラリアと旅行者のマラリア対策。Topics in Infectious Diseases 1：16-19, 1990.
- 3) WHO：World Malaria Situation in 1989-Part 1 and 2. Wkly Epidem. Rec. 66：157-163, 167-170, 1991.
- 4) WHO：International travel and health, vaccination requirements and health advice 1991. p 61-77, WHO, Geneva, 1991.
- 5) 天野富貴子, 加藤孝治, 中村千衣, 三宅 薫, 戸谷

- 徹造：熱帯熱マラリアの1例。感染症学誌。61：1180-1185, 1987.
- 6) 恒成茂行, 米満孝聖, 神戸 威：熱帯熱マラリアの一部検例。日法医誌。36：550-552, 1982.
 - 7) 駒ヶ嶺正純, 松岡健平, 出口修宏, 小出 紀, 細田泰弘, 渡辺陽之輔：熱帯熱マラリア。日臨。38：3422-3423, 3772-3775, 1980.
 - 8) 瀬古 敬, 平岡篤信, 澤見春康, 小林祥男, 狭間章忠：脳マラリアの1剖検例。神経内科8：125-131, 1978.
 - 9) 天野博之, 山本利雄, 左野 明, 高橋泰生, 蔵田駿一郎, 市島国雄, 山辺博彦：国内二次感染と思われる脳性熱帯熱マラリアの一部検例。日熱医学会誌。4：195-205, 1976.
 - 10) 清水幹子, 滝川道子, 新井裕子, 坂口潤子, 小山千代, 三神美和, 梶田 昭, 白坂竜曠, 脇 誠治：激症熱帯熱マラリアの1剖検例。熱帯7：105-110, 1972.
 - 11) 大平一郎, 荻原正雄, 松崎修二, 中谷 恒：激症性熱帯熱脳型マラリアの1剖検例。熱帯6：112-116, 1972.
 - 12) 滝上 正：輸入マラリアの3例について。診断と治療56：516-520, 1968.
 - 13) Abadie, S. H. : Some laboratory diagnostic methods. Tropical medicine (Hunter, G. W. et al., ed.). 5th ed, Saunders, Philadelphia, p 807-810, 1976.
 - 14) Pammenter, M. D. : Techniques for the diagnosis of malaria. S. Afr. Med. J. 74 : 55-77, 1988.
 - 15) WHO : Malaria diagnosis : memorandum from a WHO meeting. Bull. WHO 66 : 575-594, 1988.
 - 16) Makler, M. T., Ries, L. K., Ries, J., Horton, R. J. and Hinrichis, D. J. : Detection of *Plasmodium falciparum* infection with the fluorescent dye, benzothiooxycarboxypurine. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44 : 11-16, 1991.
 - 17) Rickman, L. S., Long, G. W., Oberst, R., Cabanban, A., Sangalang, R., Smith, J. I., Chulay, J. D. and Hoffman, S. L. : Rapid diagnosis of malaria by acridin orange staining of centrifuged parasites. Lancet 1 : 68-71, 1989.
 - 18) Wongsrichanalai, C., Pornsilapatip, J., Namsiripongpun, V., Webster, H. K., Luccini, A., Pansamdang, P., Wilde, H. and Prasittisuk, M. : Acridine orange fluorescent microscopy and the detection of malaria in population with low-density parasitemia. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44 : 17-20, 1991.
 - 19) 天野博之：マラリアの診断法-特にDAPI染色の応用。臨床と微生物14：409-414, 1987.
 - 20) Dann, O., Bergen, G., Demant, E. and Volz, G. : Trypanocide Diamidine des 2 - Phenylbenzofurans, 2 - Phenylindens und 2 - Phenylindols. Liebigs Ann. Chem. 749 : 68-89, 1971.
 - 21) Kapuscinski, J. and Skoczylas, B. : Fluorescent complexes of DNA with DAPI 4'6 Diamidine-2-phenylindole • 2 HCl or DCI 4'6 Dicarboxyamide-2-phenylindole. Nucleic Acids Res. 5 : 3775-3799, 1978.
 - 22) Hamada, S. and Fujita, S. : DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. Histochemistry 79 : 219-226, 1983.
 - 23) Rabkin, M. S., Kjeldsberg, C. R., Hammond, M. E., Wittwer, C.T. and Nathwani, B. : Clinical, ultrastructural immunohistochemical and DNA content analysis of lymphomas having features of interdigitating reticulum cells. Cancer 61 : 1594-1601, 1988.
 - 24) Shimazaki, C., Nishio, A., Haruyama, H., Isemura, T., Nakagawa, M. and Ijichi, H. : Cell kinetics and prognosis in acute leukemia studied by DNA cytofluorometry. Acta Haematol. Jap. 49 : 70-79, 1986.
 - 25) 佐々木功典：消化器癌のDNA解析。最新医学40：85-87, 1985.
 - 26) Look, A. T., Roberson, P. K., Williams, D. L., Rivera, G., Bowman, W.P., Pui, C., Ochs, J., Abromowitch, M., Kalwinky, D., Dahl, G. V., George, S. and Murphy, S. B. : Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 65 : 1079-1086, 1985.
 - 27) 諸富直文, 蒲池正浩, 香川恵造, 楠崎克之, 出口武司, 芦原 司：パラフィン組織を用いた細胞核DNA顕微蛍光測光法-新しい方法の試み。医学のあゆみ133：191-193, 1985.
 - 28) 高橋勝美, 橋本良子, 橋本仙一郎：DAPI法によるリンパ球幼若化の測定。医学のあゆみ131：236-240, 1984.
 - 29) 小林 裕, 小沢 勝, 堀内博彦, 丸尾直幸, 近藤元

- 治: Wrigth-Giemsa 染色脱色後 DAPI 染色を用いた顕微蛍光測光法によるヒト骨髓巨核球の核 DNA 定量-ITP について. 日血会誌. 51 : 1147-1151, 1988.
- 30) **Fujita, S.** : DNA cytofluorometry on large and small cell nuclei stained with pararosaniline Feulgen. *Histochemia* 36 : 193-199, 1973.
- 31) **Cornelissen, A. W. C. A., Overdulve, J. P. and van der Ploeg, M.** : Cytochemical studies on nuclear DNA of four eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Eimeria tenella*, *Sarcocystis cruzi* and *Plasmodium berghei*. *Parasitology* 88 : 13-25, 1984.
- 32) **Whaum, J. M., Rittershaus, C. and Ip, S. H. C.** : Rapid identification and detection of parasitized human red cells by automated flow cytometry. *Cytometry* 4 : 117-122, 1983.
- 33) **Hare, J. D. and Bahler, D. W.** : Analysis of *Plasmodium falciparum* growth in culture using acridine orange and flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 215-220, 1986.
- 34) **Kawamoto, F.** : Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *Lancet* 337 : 200-202, 1991.
- 35) **Brown, G. V., Battye, F. and Howard, R. J.** : Separation of stages of *Plasmodium falciparum* infected cells by means of a fluorescence-activated cell sorter. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 : 1147-1149, 1980.
- 36) **Franklin, R. M., Brum, R. and Grieder, A.** : Microscopic and flow cytophotometric analysis of parasitemia in cultures of *Plasmodium falciparum* vitally stained with Hoechst 33342-application to studies of antimalarial agents. *Z. Parasitenkd* 72 : 201-212, 1986.
- 37) **Hyman, B. C. and MacInnis, A.J.** : Rapid detection of malaria and other bloodstream parasites by fluorescence microscopy with 4', 6 -diamidino-2 -phenylindole (DAPI). *J. Parasitol.* 65 : 421-425, 1979.
- 38) **Kawamoto, F., Mizuno, S., Fujioka, H., Kumada, N., Sugiyama, E., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Iseki, M., Yamada, M., Matsumoto, Y., Tegoshi, T. and Yoshida, Y.** : Simple and rapid staining for detection of *Entamoeba* cysts and other protozoans with fluorochromes. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 40 : 35-46, 1987.
- 39) **吉岡 豊, 森岡 章, 坂江一久, 山口 勝, 楠 武** : 4', 6 -diamidino-2 -phenylindole (DAPI)による原虫, とくに小型ピロプラズマの検出. *日獣会誌.* 40 : 33-38, 1987.
- 40) **榎 佳之** : 情報の担い手としての DNA, 真核生物. 岩波講座—分子生物学 1, 遺伝子と遺伝の情報 I (松原謙一編). 岩波書店, 東京, p114, 1989.
- 41) **Cornelissen, A. W. C. A., Overdulve, J. P. and van der Ploeg, M.** : Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma) gondii*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gamontogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology* 88 : 531-553, 1984.
- 42) **Janse, C. J., van Vianen, P. H., Tanke, H. J., Mons, B., Ponnudurai, T. and Overdulve, J.P.** : *Plasmodium* species : Flow cytometry and microfluorometry assessments of DNA content and synthesis. *Experimental Parasitology* 64 : 88-94, 1987.
- 43) **Janse, C. J. and Mons, B.** : DNA synthesis and genome structure of *Plasmodium* : A review. *Acta Leidensia* 56 : 1-13, 1987.
- 44) **Inselburg, J. and Banyal, H. S.** : Synthesis of DNA during the asexual cycle of *Plasmodium falciparum* in culture. *Molecul. Biochem. Parasitol.* 10 : 79-87, 1984.
- 45) **Ponnudurai, T., Lensen, A. H. W., Meis, J. F. G. M. and Meuwisses, J. H. E. Th.** : Synchronization of *Plasmodium falciparum* gametocytes using an automated suspension culture system. *Parasitology* 93 : 263-274, 1986.
- 46) **Sinden, R. E.** : Sexual development of malarial parasites. *Advances in Parasitology* 22 : 153-216, 1983.
- 47) **Janse, C. J., Ponnudurai, T., Lensen, A. H. W., Meuwissen, J. H. E. Th., Ramesar, J., van d. Plodg, M. and Overdulve, J. P.** : DNA synthesis in gametocytes of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology* 96 : 1-7, 1988.
- 48) **Coatney, G. R., Collins, W. E., Warren, McW.**

- and Contagos, P. G. : *Plasmodium vivax*. The primate malarias, U. S. Government Printing Office, Washington p 43-67, 1971.
- 49) Inoki, S., Okuno, Y. and Aoyama, A. : On the length of the asexual life cycle of *Plasmodium inui* var. *cyclopis*. Med. J. Osaka Univ. 2 : 37-43, 1951.
- 50) Dearsly, A. L., Sinden, R. E. and Self, I/A. : Sexual development in malaria parasites : gametocyte production, fertility and infectivity to the mosquito vector. Parasitology 100 : 359-368, 1989.
- 51) Bruce, M. C., Alone, P., Duthie, S. and Carter, R. : Commitment of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* to sexual and asexual development. Parasitology 100 : 191-200, 1990.
- 52) 大友弘士, 田辺清勝, 日置敦巳, 田中 寛, 小田切脩, 鶴藤雅裕, 車 勇 : 日本人健常者における抗マラリア薬ファンシダールの薬物動態に関する考察. 新薬と臨床 34(3) : 415-423, 1985.
- 53) Tsukamoto, M. : An imported human malaria case characterized by severe multiple infections of the red blood cells. Trop. Med. 19(2) : 95-104, 1977.
- 54) Jensen, J. B. : Malaria crisis forms : intraerythrocytic development derangement. Malaria : host responses to infection (Stevenson, M. M., ed.). CRC Press, Florida, p 109-126, 1989.
- 55) Taliaferro, W. and Tariaferro, L. G. : The effect of immunity on the asexual reproduction of *Plasmodium brasilianum*. J. Inf. Dis. 75 : 1-32, 1944.
- 56) Ockenhouse, C. F., Schulman, S. and Shear, H. L. : Induction of crisis forms in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by γ -interferon-activated monocyte derived macrophages. J. Immun. 133 : 1601-1608, 1984.
- 57) Jensen, J. B., Boland, M. T. and Akood, M. : Induction of crisis forms in cultured *Plasmodium falciparum* with human immune serum from Sudan. Science 216 : 1230-1233, 1982.
- 58) Clark, I. A. and Chaudhri, G. : Relationships between inflammation and immunopathology of malaria. Malaria : host responses to infection (Stevenson, M. M., ed.). CRC Press, Florida, p 127-146, 1989.