

ガンビアトリパノソーマ原虫
(*Trypanosoma brucei gambiense*)
の細胞骨格の電子顕微鏡的研究

奈良県立医科大学寄生虫学教室

古 木 純 子

ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY OF CYTOSKELETON IN
TRYPANOSOMA BRUCEI GAMBIENSE

JUNKO FURUKI

The Department of Parasitology, Nara Medical University

Received September 28, 1990

The cytoskeleton of *Trypanosoma brucei gambiense* trypomastigote was investigated electron microscopically with emphasis on structural relationships between each component. The parasite has two prominent microtubular systems, namely axonemal complex in the flagellum and pellicular microtubules underneath the plasma membrane. The two systems are physically connected by a linear array of rivet structures that runs from the anterior end of the parasite towards a ring-shaped structure around the flagellar pocket. The rivet structure is composed of a pair of macula-like dots, which are shared by flagellum and cell body membranes. The binding between flagellum and cell body is resistant against saponin treatment but labile to Triton X treatment. The flagellum is equipped with an axonemal complex commonly seen in other organisms. Extraction of the parasite with saponin or Triton X results in clear visualization of the cytoskeleton, preserving the peculiar spacial relationships among the cytoplasmic organelles. A network of filaments with a diameter of about 4 nm is present between kinetoplast and centriole/basal body, where cytoplasmic ribosomes are excluded. And filaments with the same morphology are also found in the vicinity of microtubules, suggesting that the filaments are playing a major role in maintaining cell integrity. Ribosome-like granules are closely associated with pellicular microtubules. Whole mount preparation after parasite-extraction with Triton X discloses a general structural profile of the parasite's cytoskeleton including pellicular microtubules, rivet structures and flagellum. The anterior end of the parasite is tapering and the posterior end terminates abruptly without any particular device. Centriole is always associated with basal body. This investigation seems to be the first comprehensive description of the cytoskeleton of *T. b. gambiense* which would make a base to understand all aspects of the parasite.

Index Terms

Trypanosoma brucei gambiense, cytoskeleton, electron microscopy

緒 言

トリパノソーマ原虫は、吸血昆虫によって伝播され、人など脊椎動物に感染し、アフリカ睡眠病、シャーガス病などの疾患を引き起こす。このトリパノソーマは、単細胞の flagellate で、キネトプラストという特殊な器官を有し、生活上において、その種により差異を有するが、その形態を種々変換する事が知られている。すなわち発育各期における原虫は、鞭毛の状態、核とキネトプラストとの位置関係により、錘鞭毛期 (trypomastigote stage)、後鞭毛期 (opisthomastigote stage)、上鞭毛期 (epimastigote stage)、前鞭毛期 (promastigote stage)、襟鞭毛期 (choanomastigote stage) および無鞭毛期 (amastigote stage) と区別され、それぞれ光顕で弁別可能の特徴的な形態を示す¹⁾。 *Trypanosoma brucei gambiense* は、アフリカ睡眠病の病原寄生体で、ツェツェバエ (tsetse fly) の媒介により人に感染し²⁾、毎年約 20,000 例の感染がみられる³⁾。感染すると、2~3 週間の潜伏期を経て、発熱、皮膚の輪状発疹に始まり、リンパ節腫脹、特に頸部リンパ節腫脹が特徴で Winterbottom 徴候といわれ、さらに肝脾腫、頭痛、不眠、脱力感などをきたし、次第に意識混濁、嗜眠性となり、多くは全身衰弱で死亡する。感染した宿主主流血中では、錘鞭毛期 (trypomastigote) であり、鞭毛が活発に運動するのが特徴的で、激しく分裂増殖する。

最近、細胞の外形の維持、細胞内小器官の位置決定、細胞の移動、運動、分裂など細胞の生理作用発現に細胞骨格と呼ばれる細胞質内線維の関与が注目されつつある⁴⁾。細胞骨格は細胞を内部から機能的および構造的に支える線維の総称であり、その主な構成要素は、微小管 (microtubule)、微小線維 (microfilament)、中間径線維 (intermediate filament) と呼ばれる 3 種の蛋白質線維構造で⁵⁾⁶⁾、その他に microtrabecula、形質膜裏打ち (plasmalemmal undercoat) と呼ばれる成分なども含まれる場合もある⁷⁾⁸⁾。

トリパノソーマは単細胞生物であるため、宿主内で生存および増殖する事に必要なすべての機能をその一つの細胞の中にそなえている。その特徴的な外形を種々に変化させ、またそれを維持し、鞭毛の運動、分裂増殖をはじめ、種々の酵素反応、代謝、さらに endocytosis、exocytosis など細胞内のすべての機能が能率的に秩序正しくおこなわれていくためにこの細胞骨格が重要な役割を果たしているものと考えられるため、単細胞生物における細胞骨格を *Trypanosoma brucei gambiense* をモデルに超微形態的に検索した。

材料と方法

材料

Trypanosoma brucei gambiense (Welcome strain) (以下、*T. b. gambiense* と略す) は、兵庫医科大学免疫医動物学教室新家莊平教授より分与された。系の維持は、マウスに継代するか、または、10% dimethylsulfoxid 添加後、超低温槽 (REVCO, INC. West Columbia, S. C. 29169) 内で凍結 (-70°C) 保存し用に臨み解凍蘇生させた。実験に供する *T. b. gambiense* は、マウスまたはラット内で大量に発育増殖させて回収した。すなわち、燐酸緩衝生食液 (PBS) 中に浮遊させた *T. b. gambiense* をマウス一匹当たり約 10,000 個、腹腔内に投与して感染させ、3~4 日後、宿主動物にヘパリンを投与し、エーテル麻酔下にて心採血をおこない、採取した血液を DEAE-cellulose (Brown company, U. S. A) カラムに通し、1% グルコース加燐酸緩衝液 (pH7.8) で洗浄し、*T. b. gambiense* (血流量型) を宿主血球成分より分離した⁹⁾。

方法

[A] 通常の *T. b. gambiense* (血流量型) の超微形態：
上記に従い回収した *T. b. gambiense* を直ちに 1/2 Karnovsky 固定液¹⁰⁾ を用い、4°C において 30 分間固定した。2000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を捨て、0.25 M 蔗糖溶液を加え、4°C において 30 分毎に同様の遠心分離操作を 3 回くり返して洗浄した。1% OsO₄ を含む 0.25 M 蔗糖加燐酸緩衝液 (pH7.4) を用いて、4°C において後固定を 1 時間おこなった。50%、70%、80%、90%、95% アルコールを用いて順次脱水し、最後に 100% アルコールを用いて 3 回脱水した。propyleneoxide を経た後、電顕用樹脂 (応研商事 Epok812 162g, DDSA 100g, MNA 89g, DMP-30 5.3g の混合物) に包埋した。35°C、45°C、60°C にて各々 24 時間ずつ加熱し重合させた。樹脂包埋したブロックを ultrome 8800 (LKB, Sweden) でサファイアナイフを用いて薄切し、超薄切片をホルムバル膜をはったグリッドの上のせ、50% アルコールに飽和した酢酸ウラニールとレイノルド氏液で型の如く電子染色した。染色した切片を日立 H-100 または日本電子 1200EX を用いて観察した。

[B] トライトン X-100 処理 *T. b. gambiense* :

細胞骨格をより明確に観察するため、Capco¹¹⁾ の方法にしたがい、細胞質内可溶性成分を除去した後、超薄切片法による電顕観察をおこなった。すなわち、回収した *T. b. gambiense* (血流量型) を 3 群に分け、0.5% トライトン X-100 を含む cytoskeletal buffer (100mM

NaCl, 10mM PIPES buffer (pH7.8), 3mM MgCl₂, 300mM sucrose, 1.2mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 0.5% トライトンX-100) で4℃において各々3, 6, 12分間抽出した後, 2% glutaraldehyde を含む cytoskeletal buffer を用いて4℃において, 1時間以上固定した。2000rpm で10分間遠心分離し, 上清を捨て, 0.1M sodium cacodylate buffer (pH7.2)を用いて30分毎に同様の遠心分離操作をくり返し, 3回洗浄した後, 1% OsO₄を含む0.1M sodium cacodylate buffer で1時間4℃において後固定をした。0.1M sodium cacodylate buffer で1回洗浄した後, 上記と同様の方法で, 脱水, 包埋し, 超薄切片を二重染色し, 電顕観察をした。

[C] サポニン処理 *T. b. gambiense* :

同様の目的で, さらに, 膜系と細胞骨格との関連を見るために, *T. b. gambiense* をサポニンで処理し, 電顕観察を行った。すなわち, 回収した *T. b. gambiense* を4群に分け, 0.1% サポニンを含む cytoskeletal buffer 中で37℃において, 各々, 3, 6, 12, 15分間抽出し, 2% glutaraldehyde を含む cytoskeletal buffer を用いて4℃において1時間以上固定した後, トライトンX-100 処理の時と同様の方法で電顕観察した。

[D] *T. b. gambiense* の全載標本 :

T. b. gambiense の細胞骨格の全体像を把握するため, 虫体の全載標本を作成し, 電顕観察を行った。従来, 原虫の細胞骨格観察のための全載標本に関する報告はきわめてすくなく, 細胞質内可溶性成分の除去方法, グリッドへの搭載方法などの至適条件が不明であるため, 下記の如く, 種々の条件下で全載標本作成をおこなった。

Fig. 1 に試料作製過程のフローチャートが描かれているが, 各図の意味するところは下記の如くである。

血中より DEAE セルロースを用いて分離した直後の原虫 (step 1) は, 実線で細胞膜を示し, ハーフトーンで細胞質が示されている。破線の細胞膜は, サポニンまたは トライトンX-100 処理で抽出された原虫である事を示す。細胞質中の無数の小点は, 化学固定剤処理された原虫である事を示す。白地の細胞質は, 脱水された原虫を示す。グリッド上の原虫は, 電顕用グリッド上に搭載されたことを示す。各実験過程の後に酢酸ウラニールで positive 染色をし, 電顕観察をおこなった。

1) 実験 [S] サポニン処理 *T. b. gambiense* の全載標本 :

回収した *T. b. gambiense* (step 1) を0.1% サポニンを含む PBS 中で室温において5分間抽出した後 (step 2), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理し

たグリッドに載せ (step 3), 1/2 Karnovsky 固定液で室温において1時間固定した (step 4)。蒸留水で洗浄し, 乾燥後, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕観察した。

2) トライトンX-100 処理 *T. b. gambiense* の全載標本 :

a) 実験 [T-1]

回収した *T. b. gambiense* (step 1) を0.5% トライトンX-100 を含む PBS 中で4℃において10分間抽出した後 (step 2), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理したグリッドに載せ (step 3), 1/2 Karnovsky 固定液で室温において3時間固定した (step 4)。蒸留水にて洗浄し, 乾燥後, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕観察した。

b) 実験 [T-2]

回収した *T. b. gambiense* (step 1) を0.5% トライトンX-100 を含む PBS 中で4℃において10分間抽出した後 (step 2), 2.5% glutaraldehyde で固定し (step 3), 50%, 70%, 80%, 90%, 95% アルコールで30分毎に順次脱水し, 100% アルコールで3回脱水した後 (step 4), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理したグリッドに載せ (step 5), 乾燥後, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕観察した。

c) 実験 [T-3]

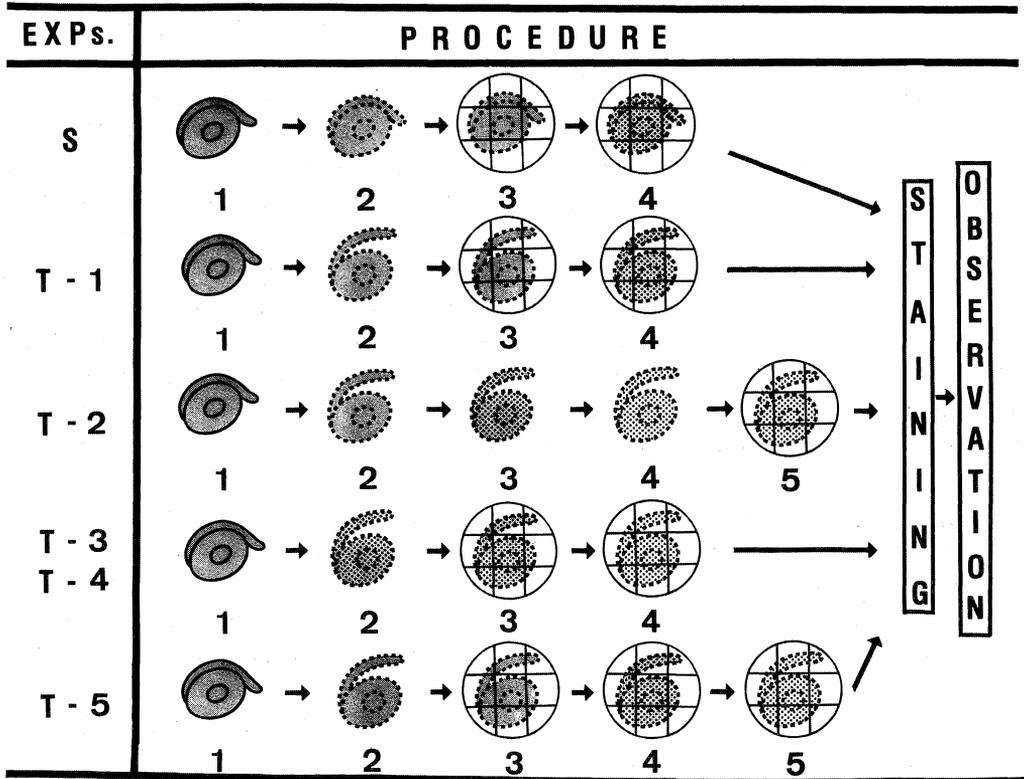
回収した *T. b. gambiense* (step 1) を1% トライトンX-100 と0.05% glutaraldehyde を含む PBS 中で4℃において20分間抽出, 固定した後 (step 2), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理したグリッドに載せた (step 3)。室温で10分間放置した後, PBS で洗浄し, 1/2 Karnovsky 固定液で固定した。前述の如く脱水し (step 4), 乾燥後, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕観察した。

d) 実験 [T-4]

回収した *T. b. gambiense* (step 1) を0.5% トライトンX-100 と0.5% glutaraldehyde を含む PBS 中で4℃において20分間抽出, 固定した後 (step 2), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理したグリッドに載せた (step 3)。室温で10分間放置した後, PBS で洗浄し, 1/2 Karnovsky 固定液で再度固定した。前述の如く脱水し (step 4), 乾燥後, 酢酸ウラニールで染色し, 電顕観察した。

e) 実験 [T-5]

回収した *T. b. gambiense* (step 1) を0.5% トライトンX-100 を含む PBS 中で4℃において20分間抽出した後 (step 2), ホルムパール膜をはり0.1% poly-L-lysine で処理したグリッドに載せた (step 3)。室温で10分間放



Exp. S: Parasites (step 1) were extracted with 0.1% saponin (step 2) , mounted (step 3) and fixed with a half-strength Karnovsky (step 4) .

Exp. T-1: Parasites (step 1) were extracted with 0.5% Triton X (step 2) , mounted (step 3) and fixed (step 4) .

Exp. T-2: Parasites (step 1) were extracted with 0.5% Triton X (step 2) ,fixed (step 3) , dehydrated (step 4) and mounted (step 5) .

Exps. T-3 & T-4: Parasites (step 1) were simultaneously fixed and extracted (step 2) with 1% Triton X (in T-3) or 0.5% Triton X (in T-4) , mounted (step 3) and dehydrated (step 4) .

Exp. T-5: Parasites (step 1) were extracted with 0.5% Triton X (step 2) , mounted (step 3) , fixed (step 4) and dehydrated (step 5) .

Fig. 1. A flow chart of the procedures for whole mount preparation of *T. b. gambiense*. Six types of experiments (S, T-1, T-2, T-3, T-4 and T-5) were performed as illustrated in the right column. Freshly recovered parasites (step 1) were subjected to several treatments including cell extraction (an intermittent line indicates extraction effect) , chemical fixation (small dots indicate fixative), dehydration (indicated by an open cell) and mounting on grids, which were performed in different order. All specimens were positively stained with uranylacetate and observed under an electron microscope.

置した後、PBS で洗浄し、1/2 Karnovsky 固定液で固定した (step 4)。前述の如く脱水し (step 5)、乾燥後、酢酸ウラニールで染色し、電顕観察した。

[E] *T. b. gambiense* のステレオ観察：

上記実験 T-5 の操作で得られた全載標本をゴニオメーターを用いて水平位置より±7度ずつ角度を変化させて電顕写真を撮影し、鞭毛ポケット部の立体像を観察した。

結 果

[A] *T. b. gambiense* (血流量型) の透過電顕像：

T. b. gambiense の形質膜は、鞭毛 (flagellum) (Plate 1 の F)、鞭毛ポケット (flagellar pocket)、虫体本体 (cell body) の3つの部分より成るが、この細胞膜 (Plate 1 の M) は、通常の細胞膜と同様、暗帯、明帯、暗帯の3層構造を示した他、最外層に厚さ約10nm の variant surface glycoprotein (VSG) に相当する層 (Plate 1 の VSG) が見られた。細胞膜より filopodia と呼ばれる膜構造¹²⁾ (Plate 2 の F1) が伸張しているのが時折観察されるが (Plate 2)、これは通常鞭毛の細胞膜より生じていた。filopodia は、先端部より丸くくびれて次々と球状の膜構造となり、宿主血流中に放出される。Plate 2 と3にその過程の連続写真を示す。流血中に放出された後、いわゆる exoantigen として血漿中に遊離して存在する¹³⁾¹⁴⁾が、虫体本体に付着しているものもあると思われる (Plate 1 と4の V)。鞭毛ポケット (Plate 4 の FP) の膜より coated pit (Plate 4 の CP) が形成され、coated vesicle (Plate 4 と5の CV) となって細胞質中に移動するのが観察された。トリパノソーマの栄養摂取は、鞭毛ポケットにおける endocytosis によるものと考えられている¹⁵⁾。

虫体本体の細胞膜直下には、虫体の前端から後端へ、平行に等間隔に走る微小管 (pellicular microtubules) が観察された (Plate 1, 4, 6, 7)。細胞膜と膜直下微小管との距離は、約10nmであった。両者の間を結ぶ構造物は観察されなかった。虫体の太さにしたがって、膜直下微小管の数は増減し、隣合う微小管間の距離は約15nm で一定に保たれていた。また、隣合う微小管の間を結合する線維状構造物が観察された (Plate 6 の矢印)。鞭毛ポケットの部分には上記のような微小管は見られず3~4本の微小管が一列に連なり flagellar pocket を取り巻いているのが観察された (Plate 7 の矢印)。これら膜直下の微小管と鞭毛ポケットの微小管の結合関係は明かではない。この3~4本の微小管のまわりには、電子密度中等度の不定形の物質が存在する。

鞭毛には典型的な axonemal complex が見られた。すなわち9対の doublet 微小管が周囲を取り囲み、中心を2本の微小管が縦走していた (Plate 1)。さらに9対の doublet 微小管は intraflagellar structure¹⁶⁾ と呼ばれる類結晶構造物 (Plate 1 と6の1F) と線維状構造物によって結合しているのが観察された (Plate 1 の*印)。この類結晶構造物は *Trypanosoma lewisi* で報告されているのと同様¹⁶⁾鞭毛ポケット内の鞭毛には存在しなかった。軸索近傍にみられる構造物は、精子の場合、outer dense fiber, peripheral tubules があるが¹⁷⁾、これらは doublet 微小管に付随するものであり、今回観察された類結晶構造とはその数が異なる。また、軸索近傍の結晶構造としてミトコンドリア内の結晶が報告されているが¹⁸⁾、今回観察された類結晶構造は二重膜を欠如するゆえ、類同性があるとは言えない。

分裂途上の *T. b. gambiense* においては1本の鞭毛中に1対の axonemal complex が見られることがあった。dynein arm (Plate 1 の D) の方向より判断すると2つの axonemal complex の回転方向は線対称をなしていた。鞭毛の基底小体 (basal body) (Plate 8 の BB) の近傍には中心体 (centriole) が観察された (Plate 8 の C)。鞭毛の膜と虫体本体の膜とは直接癒合せず各々の VSG をはさんで接着していた。接点の部分には各々の膜の細胞質側に小斑点がみられた (Plate 9, 10, 11)。鞭毛側の小斑点は虫体側の小斑点より小さく、両者は対になって存在していた。虫体本体側の小斑点を含む接線方向の切片では pellicular microtubules (Plate 11 の MT) の1本分が欠如し、飛石状に連なる小斑点に置き替わっているのが観察された (Plate 11)。小斑点間の距離は約70nmであった。同様の構造は諸家により報告され、desmosome-like attachment¹⁶⁾、macula adherens¹⁹⁾、rivets²⁰⁾などの名称が与えられている。本論文ではリベット構造 (rivet structure) の名称を使用する。基底小体の近辺に典型的な形態を示すキネトプラスト (kinetoplast) (Plate 8 の K) が観察された。一般に *T. b. gambiense* の細胞質内には多量のリボゾームが含まれているが、キネトプラストと基底小体の間およびキネトプラストと中心体の間にはリボゾームが観察されない部分があった (Plate 8 の矢印)。核はリボゾームの付着した核膜に囲まれ特記すべき特徴的な形態は示さなかった。細胞内膜系としては他に Golgi 装置、粗面小胞体 (rough endoplasmic reticulum)、細胞質内小胞 (vesicle) などが見られた。

[B] 細胞質内可溶性成分抽出後の *T. b. gambiense* の透過電顕像：

1) トライトンX-100 処理

トライトンX-100 は界面活性剤であるが、形質膜や膜性オルガネラをよく溶かすにもかかわらず、細胞骨格構造に与える影響が小さい。トライトンX-100 処理後、実験に用いたあらゆる条件において細胞膜および細胞内膜系小器官はすべて消失した。核は核膜が消失したが、その相対的位置は保たれていた (Plate 12)。細胞質内可溶性成分が除去された事により細胞骨格がより明確に観察された (Plate 13)。細胞内小器官および鞭毛の axonemal complex などには無数の細線維の結合がみられた。このような細線維は通常の超薄切片法では認識が困難である。膜直下微小管はその特徴的形態をとどめており、また、多数のリボゾーム様顆粒が付着しているのが観察された (Plate 14)。鞭毛はその特徴的形態をとどめていたが、多くの場合リベット構造部分の結合が離れ、起始部を除き虫体本体より遊離していた。虫体本体の鞭毛の付着していた部分に飛石状の小斑点が残存しているのが観察された。基底小体の近傍にはやはり膜構造の消失したキネトプラストが存在していた。基底小体とキネトプラストおよび中心体とキネトプラストの間には両者を結合する細い線維束が観察された。細線維は直径約 4nm で、枝分かれに富み、網目状の外観を呈していた。細線維の一端は傍中心体物質と思われる部分で中心体と結合し、他端はキネトプラスト核と結合していた。

2) サポニン処理

サポニンは細胞膜中のコレステロールに作用して細胞膜に小さな穴を多数あけるものであるが、サポニン処理後も、核、ミトコンドリア、鞭毛、中心体、膜直下微小管などはその相対的位置関係を保ち、その特徴的形態をとどめていた (Plate 15, 16)。虫体の外層を形成する細胞膜は実験に用いたあらゆる条件において消失したが、細胞内小器管の膜は残存していた。この差は細胞膜中に含有されるコレステロールの差によるものと思われる。細胞質内可溶性成分が除去されたためトライトンX-100 処理の場合と同様細胞骨格が明確に観察された (Plate 15, 16, 17, 18)。膜直下微小管には多数のリボゾーム様顆粒が付着していた (Plate 18)。中心体とキネトプラストの間および鞭毛の基底小体とキネトプラストの間には両者を結合する網目状の細い線維が観察された (Plate 19, 20)。この細線維はキネトプラストの外膜と内膜が癒合しているかのように接着している部分でキネトプラストと結合していた。キネトプラストが膨大するなど損傷の激しい場合にもキネトプラスト核は基底小体の近位に観察された。鞭毛および虫体本体の細胞膜は消失したが両者の位置関係は保たれており、飛石状に連なるリベット構

造の小斑点は残存していた (Plate 21)。

[C] *T. b. gambiense* の全載標本

著者は *T. b. gambiense* の細胞骨格の全体像の可視化に最適な方法の確立に努めた。その結果、サポニン処理の場合、グリッドに張ったホルムバル膜上に個々の *T. b. gambiense* が適度に散在し、観察に耐えうる虫体の数は多かったが、抽出が不充分であったために細胞骨格の微細な観察は不可能であった。トライトンX-100 処理の場合、*T. b. gambiense* の膜がすべて消失し、細胞質内可溶性成分の十分な抽出ができ、細胞内の微細な線維の観察が可能であったが、虫が凝集するために形態観察に適する *T. b. gambiense* は大変すくなかった。細胞質内可溶性成分を抽出する方法として種々の濃度のサポニンやトライトンX-100 を選び、さらに試料をグリッド上に搭載する時期と固定の時期についても考慮した。

脱水を行う時期については、グリッドに搭載する前に脱水を行った群では度重なる遠心、再浮遊操作のため試料の損傷が激しく、形態観察に耐えうる *T. b. gambiense* の数はごく限られたものとなった。グリッド搭載後に脱水した群では、比較的虫全体の形態をよく保ち、細胞骨格の全体像を可視化するのに適していた。

細胞質内可溶性成分抽出の程度は抽出液の種類と濃度に大きく左右されるが、固定の時期によっても大きな差が生じる。Claviez²¹⁾らは抽出液の中に固定液を混在させ抽出と固定を同時に行うことにより試料の激しい損傷を避けている。著者も同様の方法を試みたが有意な画質向上は認められなかった。トライトンX-100 で処理した場合、虫体本体と鞭毛との結合がはずれ、虫体本体にはリベット構造が虫の前端から後端へ一列に縦走しているのが認められたが、サポニン処理の場合には、虫体本体と鞭毛との結合が保たれており、リベット構造は観察できなかった。

以上の結果を総合すると、*T. b. gambiense* 全体の細胞骨格を観察するための全載標本を作成する方法はそれぞれに一長一短があるので、目的に応じて使い分ける必要があると判明した。

Plate 22, 23 は、実験 [T-5] の処理にしたがい、トライトンX-100 処理後グリッドに搭載し、グルタル固定、脱水、染色をおこなったトリパノソーマの全載標本である。鞭毛の起始部近傍には中心体が点状に観察される (Plate 23 の C)。鞭毛は点状に連なるリベット構造より離れて観察される (Plate 22, 23 の F)。Plate 23 は分裂途中の *T. b. gambiense* であり、2本の鞭毛が見られ、リベット構造が虫体本体の前端部より鞭毛ポケットの部分まで2本点状に縦走しているのが観察される (Plate

23のR). 虫体の前端はテーパ状に細くなり、虫体本体の後端部には何ら特別な構造は観察されず、膜直下微小管の終末端のみが観察される。鞭毛ポケットの開口部に相当する部分を立体観察すると、輪状構造が鞭毛を取り囲むように存在し(Plate 24)、その部分に縦走するリベット構造の一端が付着しているのが観察された。

考 察

本論文により錘鞭毛期の *T. b. gambiense* (血流型)の細胞骨格の形態の全体像が明らかにされた。*T. b. gambiense*の最も顕著な細胞骨格は、鞭毛を形成する軸索と細胞膜直下を平行に縦走する微小管である。前者を形成する微小管は、その形態的特徴より、鞭毛の運動をになうものと考えられる。後者の微小管は、明かに細胞の外形を保持する役をになうものと考えられるが、*T. b. gambiense*の運動への関与を直接示唆する形態的所見は得られなかった。

微小管は通常の超薄切片法で比較的簡単に観察されることから、従来よく研究されてきた。*T. b. gambiense*の鞭毛の軸索も、他の細胞系の軸索と同様²²⁾²³⁾、9対のdoublet微小管と中心の2本のsinglet微小管より成る事が示された。分裂途上の*T. b. gambiense*の鞭毛には線対称のaxonemal complexが存在する。従来、分裂途上にあるトリパノソーマの形態的研究は、核とキネトプラストについてなされてきたが²⁴⁾²⁵⁾、鞭毛に関しての報告は皆無であった。軸索と膜直下の二つの微小管系はリベット構造を介して結合されている。すなわち軸索のdoublet微小管は軸索内の類結晶構造に結合し¹⁶⁾、さらにこの類結晶構造より伸びた線維成分がリベット構造の小斑点に結合する。この小斑点に対応する虫体本体側の小斑点は、隣接する微小管列に固定されている。さらに、膜直下の微小管束は橋構造により互いに結合され虫体全体の形を構築している。膜直下の微小管は虫体の前端より後端まで縦走している事が全載標本法により示されたが、虫体の前後両端において、虫体の直径が減少するのに合わせて存在する微小管も減少する。コクシジウムのスポロゾイトは同様の膜直下微小管を持つが、虫体の前後両端部において微小管を束ねる輪状構造(polar ring)が存在する²⁶⁾。*T. b. gambiense*においては、かような特別な輪状構造が全載法および超薄切片法によっても観察されず、隣接する微小管は前述の橋構造により互いに結合されているものと思われる。この橋構造は鞭毛の微小管にみられるdynein arm(ATPase自身であり、鞭毛の運動に直接関与する²²⁾²⁷⁾²⁸⁾)とは形態的に異なる。

軸索と虫体本体は前述のごとくりベット構造を介した

多段階にわたる複雑な細胞骨格系をもって固く結合するが、この結合はサポニン処理に耐性であるが、トライトンX-100処理には不耐性である。従来の報告によると二つの細胞膜を接着する装置として、gap junction, tight junction, zonular adherense, desmosomeなどが知られているが²⁹⁾、いずれも隣接する二つの細胞間を接着するものであり、*T. b. gambiense*のリベット構造は単一の細胞内における二つの膜接着をになうという意味で極めて異色である。このような異色の膜接着の様式を詳細に検索し他の膜接着系と比較検討することは、膜接着の細胞生物学の発展に寄与できるものと思われる。すでにYoshikawa³⁰⁾らは凍結切断法により、この膜接着部における膜内粒子の分布を検索し、膜内蛋白質の凝集がリベット構造に沿って一条に走行し、しかも凝集粒子の間隔がリベット構造の間隔に一致していることを観察し、この膜内粒子が膜接着をになうものであると推測している。*T. b. gambiense*におけるもう一つの膜接着の様式は鞭毛ポケットの開口部にみられる。この開口部では虫体本体の膜が軸索の膜を輪状に取り囲む。超薄切片法ではこの開口部は常に閉じているかのように観察されるが¹⁹⁾³¹⁾⁻³⁸⁾、外界の栄養物を取り込む入口であるので¹⁵⁾必要に応じて開口するはずである。このような高度に機能化した膜結合部に観察される細胞骨格は開口部の膜直下を裏打ちする輪状の細胞膜裏打ち構造(plasmalemmal undercoat)である。一般に細胞膜裏打ち構造はアクチンと密接な機能的関係にあり、細胞膜の内から外へ、外から内への物質及び情報の移動に関与すると共に細胞接着を直接になう。超薄切片法で明確に示される細胞接着装置は、デスモゾーム、ヘミデスモゾームなどであるが、いずれも物質の出入を制御するほど動的な機能を付与されていない。この点において、鞭毛ポケット部の輪状構造は特異的なものであるといえよう。Yoshikawa³⁰⁾らは凍結切断法により、鞭毛ポケット部の膜蛋白質の分布を検索し、この部に首飾り状の膜内粒子の配列が数条存在する事を報告している。さらに彼³⁹⁾らはフィリピン処理により細胞膜ステロールの可視化をおこない、鞭毛ポケット部における膜接着の様式を観察し、この接着部では膜を構成するステロールが著明に少ないことを見出している。この鞭毛ポケット開口部に位置する輪状構造は軸索と虫体本体との結合部に沿って虫体の前端より後方へ一条に縦走するリベット構造と結合する事が全載標本法により示されたが、この二者の結合も*T. b. gambiense*の形態保持の重要な要になっているものと思われる。この輪状構造物はサポニン、トライトンX-100などの処理に耐えて観察される事より、鞭毛ポケットを取り囲む三

重連または四重連微小管と考えられる。この微小管の形態保持以外の機能への関与は現在全く不明であるが、微小管周囲に電子密度中等度の不定形の物質の集積が見られたことは、中心体における傍中心体物質と同様に何らかの重要な微小管関連の機能をになっているものと思われる。

血流型の *T. b. gambiense* を通常の超薄切片法により観察すると種々の細胞内小器官がみられるが、細胞質の大部分を占めるのはリボゾームである。リボゾームは、核膜、粗面小胞体と結合している他、ポリゾームの形でも存在している。このリボゾームと形態的にまったく同一の物質が細胞質抽出後の膜直下微小管に結合しているのが観察される。サポニン、あるいはトライトンX-100 いずれの処理によっても同じ結果が得られたので、微小管とリボゾーム様物質の結合は化学的に安定したものである。軸索の微小管にはリボゾーム様物質の付着はみられなかったので、膜直下微小管とリボゾーム様物質の結合は細胞質抽出操作にともなう非特異的な吸着によるものとは考え難く、何らかの機能的意義を持つものと思われる。リボゾームと細胞骨格との結合は、Fulton らによって報告されている⁴⁰⁾⁴¹⁾。これによると細胞質中のリボゾームは、蛋白質合成に関与する時にポリゾームの形となり、さらに、細胞骨格と結合するとされている。現在までのところリボゾームと結合する細胞骨格を同定している文献はない。今後リボゾームと *T. b. gambiense* の微小管の結合について、蛋白質合成への関与の点から、さらに詳細な研究が必要と思われる。

錘鞭毛期において *T. b. gambiense* は鞭毛を持ち、基底小体およびキネトプラストは細胞核の後方に位置するが、この特徴的な細胞内小器官の配置は、サポニン処理、トライトンX-100 処理などによる細胞質可溶性成分抽出後も保たれており、この位置決めをになう細胞骨格は細胞質内可溶性成分抽出後に超薄切片法で観察される無数の線維であると思われる。この線維は直径約4nmであり比較的枝分かれに富む。この線維は微小管近傍にみられ、*T. b. gambiense* の細胞内小器官の位置決めに関与するものと思われるが、本研究において得られた極めて重要な所見は、同様の線維が鞭毛の基底小体とキネトプラスト間にも見られた事である。さらに、まったく同様の線維が、中心体とキネトプラスト間にも見られた。基底小体は中心体の特殊型であり⁴²⁾、両者ともに中心体としての機能は傍中心体物質がになうものと考えられている。直径約4nmの線維の片一端は、この傍中心体物質に接着し、他端は、キネトプラストの二重膜が癒合した部分に接着する。さらに、基底小体と中心体は太い一本の線維

によって結合し、キネトプラストとの間に安定した空間的位置関係を保っている。従来基底小体とミトコンドリアの近接をになう構造は電顕的には不明であるとされていた⁴³⁾。通常の超薄切片法で *T. b. gambiense* の中心体とキネトプラスト間を観察してみると、リボゾームが選択的に排除されており、それに替わって細線維の束が見られる部分がある。この細線維が細胞質抽出後に観察される直径約4nmの線維に相当するものと思われる。キネトプラストと基底小体との結合は、古くは猪木⁴⁴⁾らの報告があるが、本論文に記載された線維とは形態的にまったく異なるものである。

ミトコンドリアは5.5 μ mの長さの環状のDNAをもち⁴⁵⁾、蛋白質合成を営むが、必要な蛋白質のかなりの部分は細胞質で合成され、ミトコンドリア内に運搬されることが最近実証されつつある⁴⁶⁾⁻⁴⁹⁾。ミトコンドリアは二重の膜により覆われているので、巨大分子である蛋白質が膜を二回通過するのはエネルギー的に不経済であり、むしろミトコンドリアの内膜と外膜が癒合している部分から一回の膜通過で蛋白質輸送がなされるものと考えられつつある⁴⁶⁾⁻⁴⁸⁾⁵⁰⁾。キネトプラストは巨大ミトコンドリアであるので⁵¹⁾⁵²⁾、内膜と外膜の癒合部分に直径約4nmの線維が接着していることは、この線維が、細胞質内合成蛋白質がキネトプラスト内へ輸送されるにあたり神経軸索内におけるのと相同の機序を介して関与していることが示唆される⁵³⁾⁻⁵⁹⁾。Souto-Padron⁶⁰⁾らも同様の線維を観察しているが、彼らはこの線維が膜通過後キネトプラストDNAに結合している事を示唆している。この両者の結合は、膨化したキネトプラストにおいてもDNA線維束が基底小体の近傍に存在する事実によっても裏付けられる。

トリパノソーマ感染症の治療は大変難しく、しばしば死に致す重篤な疾患である。現在ワクチン開発も試みられているが、特徴的な抗原変異のために有効なものの開発が遅れている。薬物療法としては、ペンタミジン、スラミンなどが用いられているが、著効は示さず、新薬の開発が待たれている。著者の教室の山田⁶¹⁾は、*Trypanosoma cruzi* を用いて Lampit[®]、Radani[®] の治療効果を電顕的に観察している。両薬剤ともキネトプラストに影響をおよぼすが、細胞骨格への直接の障害は観察されていない。現在、微小線維に対しては、ファロイジン、サイトカラシン、微小管に対しては、コルヒチン、タキソール、ポドヒヨロトキシンなどをはじめとして種々の細胞骨格障害物質が知られている⁶²⁾が、トリパノソーマ症に対するこれらの薬剤効果も検討されるべきであろう。すでにトリパノソーマを monensin で処理を

し、ゴルジ装置レベルで新合成ペプタイトの移行を阻止することが実験的に示されている⁶¹⁾。また小野⁶⁴⁾らは、Berenil をトリパノソーマ感染マウスに投与し、キネトプラストの位置異常、および鞭毛の新生阻害など、細胞骨格の直接障害の結果と思われる観察結果を報告している。この様にトリパノソーマにおける細胞骨格の知見が必要であるにもかかわらず、現在までのところ文献はきわめてすくない。Vickerman¹⁶⁾⁶⁵⁾⁶⁶⁾らが通常の超薄切片法にもとづきトリパノソーマの超微形態を明かにし、その中で細胞骨格に関する知見を述べているが、細胞骨格だけを可視化する試みは、わずかに Souto-Padron⁶⁰⁾らが、急速凍結後、ロータリーシャドウイングをほどこし、トリパノソーマの細胞骨格を部分的に報告しているにすぎない。また、それぞれが特有の形態を示す原生動物においては、細胞骨格は極めて重要な役割を果たしており、さらに、高等動物における相同の細胞骨格線維とは生化学的組成が異なるという多様性が示されている⁶⁷⁾事から、原生動物の細胞骨格の知見は細胞骨格の生物学的意義研究にとっても不可欠である。本研究により得られた *T. b. gambiense* の細胞骨格の総合的所見は、細胞骨格一般の理解のみならず、トリパノソーマ原虫の生理学、生化学の理解及び治療薬の開発の基礎を形成するものと期待される。

結 語

ガンビアトリパノソーマ原虫 (*Trypanosoma brucei gambiense*) の細胞骨格の超微形態的研究を行い下記の観察結果を得た。

- 1) *T. b. gambiense* における微小管は、鞭毛、細胞膜直下、および鞭毛ポケット部に存在する。
- 2) 鞭毛は他の動物種と類似の形態を示す。二分裂途上にある原虫では軸索の微小管は線対称形を成して合成される。
- 3) 膜直下の微小管は長軸方向に一定の間隔に並んで縦走する。隣接する微小管は互いに橋構造により結合される。
- 4) 鞭毛と虫体との結合部は膜直下の微小管が一本分欠如する。その部分はリベット構造で置き代わり、両方の微小管系の結合を介在する。
- 5) 膜直下の微小管には形態的にリボゾームと思われる顆粒が付着している。
- 6) 鞭毛ポケット部の膜直下では三重連または四重連の微小管束が輪状に取り囲む。この微小管とリベット構造とはポケット開口部付近で結合している。
- 7) キネトプラストと中心体および基底小体とは、直径

約 4nm の線維を介して互いに結合している。

以上の如く *T. b. gambiense* を用いてトリパノソーマの形態を保持するのに必要な細胞骨格が初めて総合的に記載された。

(本研究の一部は第 43 回日本寄生虫学会西日本支部大会(1987年、岡山市)および第 57 回日本寄生虫学会大会(1988年、名古屋市)で報告した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師奈良県立医科大学寄生虫学教室荒木恒治教授に深甚の謝意を捧げますとともに、御校閲賜った第 2 解剖学教室山本浩司教授、細菌学教室榎葉周三教授に深謝いたします。さらに御助言、御指導いただいた本学寄生虫学教室高橋優三助教授並びに同教室諸兄姉に感謝致します。)

文 献

- 1) Hoare, C. A. : Nature 212 : 1385-1386, 1966.
- 2) Hawking, F. : Protozool. Abstr. 3 : 199-206, 1979.
- 3) Kolata, G. : Science 226 : 956-959, 1984.
- 4) Darnell, J. E., Lodish, H. F. and Baltimore, D. : Molecular Cell Biology. Scientific American Books, New York, p771-814, 1986.
- 5) Porter, K. R., Byers, H. R. and Ellisman, M. H. : in The Neuroscience (Schmitt, F. O. and Worden, F. G., eds.). The MIT Press, Cambridge, Mass., p703-722, 1979.
- 6) 石川春律 : 蛋白質核酸酵素 28 (臨時増刊) 細胞運動と細胞骨格. 624-635, 1983.
- 7) 石川春律 : 図説細胞骨格(石川春律編). 講談社, 東京, p1-9, 1985.
- 8) Porter, K. R. and Tucker, J. B. : Scientific American, March : 40, 1981.
- 9) Lanham, S. M. : Nature 218 : 1273-1274, 1968.
- 10) Karnovsky, M. J. : J. Cell Biol. 27 : 137A-138A, 1965.
- 11) Capco, D. G., Krochmalnic, G. and Penman, S. : J. Cell Biol. 98 : 1878-1885, 1984.
- 12) Wright, K. A., Lumsden, W. H. R. and Hales, H. : J. Cell Sci. 6 : 285-297, 1970.
- 13) Thillet, C. J. and Chandler, A. C. : Science 125 : 346-347, 1957.
- 14) Weitz, B. : J. gen. Microbiol. 23 : 589-600, 1960.
- 15) Langreth, S. G. and Balber, A. E. : J. Protozool. 22 : 40-53, 1975.
- 16) Anderson, W. A. and Ellis, R. A. : J. Protozool.

- 12: 483-499, 1965.
- 17) **Fawcett, D. W.** : The Cell. 2nd. ed., W. B. Saunders Company, U. S. A., p604-639, 1981.
- 18) **Phillips, D. M.** : J. Cell Biol. 44: 243-277, 1970.
- 19) **Vickerman, K.** : J. Cell Sci. 5: 163-193, 1969.
- 20) **Boisson, C., Mattei, X. and Boisson, M. E.** : C. r. Séanc. Soc. Biol. 159: 228-230, 1965.
- 21) **Claviez, M., Brink, M. and Gerich, G.** : J. Cell Sci. 86: 69-82, 1986.
- 22) **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.** : in Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Inc., New York, p550-610, 1983.
- 23) **Fawcett, D. W.** : The Cell. 2nd. ed., W. B. Saunders Company, U. S. A., p575-603, 1981.
- 24) **Burton, P. R. and Dusanic, D. G.** : J. Cell Biol. 39: 318-331, 1968.
- 25) **Inoki, S. and Ozeki, Y.** : Biken J. 12: 31-41, 1969.
- 26) **Russell, D. G. and Burns, R. G.** : J. Cell Sci. 65: 193-207, 1984.
- 27) 真行寺千佳子・高橋景一: 蛋白質核酸酵素 28 (臨時増刊) 細胞運動と細胞骨格: 585-598, 1983.
- 28) 毛利秀雄・小川和男: 蛋白質核酸酵素 28 (臨時増刊) 細胞運動と細胞骨格: 599-612, 1983.
- 29) **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.** : in Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Inc., New York, p674-717, 1983.
- 30) **Yoshikawa, H., Furuki, J., Takahashi, Y., Morioka, H. and Yoshida, Y.** : J. P. protozool. 37: 27-32, 1990.
- 31) **Armstrong, J. A., Brown, K. N. and Valentine, R. C.** : Trans. roy. soc. trop. Med. Hyg. 58: 291-292, 1964.
- 32) **Brooker, B. E. and Vickerman, K.** : Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg. 58: 293, 1964.
- 33) **Brown, K. N., Armstrong, J. A. and Valentine, R. C.** : Exp. Cell Res. 39: 129-135, 1965.
- 34) **Brooker, B. E. and Preston, T. M.** : J. Protozool. 14: 41-42, 1967.
- 35) **Seed, J. R., Byram, J. and Gam, A. A.** : J. Protozool. 14: 117-125, 1967.
- 36) **Jadin, J. M. and Greemers, J.** : Acta trop. 25: 363-366, 1968.
- 37) **Vickerman, K.** : J. Protozool. 16: 54-69, 1969.
- 38) **Geigy, R., Steiger, R. and Hecker, H.** : Acta trop. 27: 271-277, 1970.
- 39) **Yoshikawa, H., Furuki, J., Takahashi, Y. and Morioka, H.** : J. Electron Microscopy 39: 328A, 1990.
- 40) **Fulton, A. B., Wan, K. M. and Penman, S.** : Cell 20: 849-857, 1980.
- 41) **Howe, J. G. and Hershey, J. W. B.** : Cell 37: 85-93, 1984.
- 42) **Fawcett, D. W.** : The Cell. 2nd. ed., W. B. Saunders Company, U. S. A., p551-574, 1981.
- 43) **Simpson, L.** : J. Protozool. 15: 132-136, 1968.
- 44) **Inoki, S., Ozeki, Y. and Kambara, H.** : Biken J. 14: 37-50, 1971.
- 45) **Krstic, R. V.** : Illustrated Encyclopedia of Human Histology, Springer-Verlag, Germany, p266, 1984.
- 46) **Schleyer, M. and Neupert, W.** : Cell 43: 339-350, 1985.
- 47) **Schwaiger, M., Herzog, V. and Neupert, W.** : J. Cell Biol. 105: 235-246, 1987.
- 48) **Hay, B., Bohni, P. and Gasser, S.** : Biochim. Biophys. Acta 779: 65-87, 1984.
- 49) **Harmey, M. A. and Neupert, W.** : in The Enzymes of Biological Membranes (Martonosi, A. ed.). Vol. 4, Plenum Publ., New York, p431-464, 1985.
- 50) **Kellems, R. E., Allison, V. F. and Butow, R. A.** : J. Cell Biol. 65: 1-14, 1975.
- 51) **Muehlpfordt, H.** : Z. Tropenmed. Parasit. 14: 357-398, 1963.
- 52) **Muehlpfordt, H.** : Z. Tropenmed. Parasit. 15: 289-323, 1964.
- 53) 黒川正則: 蛋白質核酸酵素 28 (臨時増刊) 細胞運動と細胞骨格: 450-468, 1983.
- 54) **Tsukita, S. and Ishikawa, H.** : J. Cell Biol. 84: 513-530, 1980.
- 55) **Brady, S. T., Lasek, R. J. and Allen, R. D.** : Cell Motil. 5: 81-101, 1985.
- 56) **Lasek, R. J. and Hoffman, P. N.** : in Cell Motility (Goldman, R., Pollard, T. and Rosenbaum, J., eds.). p1021-1049, 1976.
- 57) **Mori, H., Komiyama, Y. and Kurokawa, M.** : J. Cell Biol. 82: 174-184, 1979.

- 58) Willard, M. B. and Hulebak, K. C. : Brain Res. 136 : 289-306, 1977.
- 59) Black, M. M. and Lasek, R. J. : J. Cell Biol. 86 : 616-623, 1980.
- 60) Souto-Padron, T., de Souza, W. and Heuser, J. E. : J. Cell Sci. 69 : 167-178, 1984.
- 61) 山田祥次 : 奈医誌. 35 : 229-254, 1984.
- 62) 小林良二 : 阻害剤研究法(日高弘義編). 共立出版株式会社, 東京, p 76-85, 1985.
- 63) Orci, L., Halban, P., Amherdt, M., Ravazzola, M., Vassalli, J. D. and Perrelet, A. : Cell 39 : 39-47, 1984.
- 64) 小野忠相・山本美由紀・高見一利・大西義博・チタンボハリソン・荒川 皓 : 第 46 回日本寄生虫学会西日本支部会抄録集. p-22, 1990.
- 65) Steiger, R. F. : Acta Tropica 30 : 64-168, 1973.
- 66) Vickerman, K. : J. Protozool. 16 : 54-69, 1969.
- 67) 広野雅文・渡邊良雄 : 蛋白質核酸酵素 34 (臨時増刊) 細胞骨格の機能 : 1533-1541, 1989.

Explanation of plates

- Plate 1. A transverse section through the intracellular junction between the flagellum (F) and cell body. Pellicular microtubules are lined with periodical intervals just underneath the plasma membrane (M) of cell body. Two adjacent microtubules are sometimes connected by a bridge-structure. The exterior surface of membranes (M) of cell body, flagellum and vesicles (V) are thick lined by a layer of variant surface glycoprotein (VSG, a kind of glycocalyx). This trypanosome is likely under the process of cell division since the parasite has a pair of axonemal complex and intraflagellar structure (IF). The two axonemal complex are in symmetrical position with regards to the direction of dynein arm (D) and rivet structures (R). There is a filament (*) that connects doublet microtubule and intraflagellar structure (IF).
- Plate 2. A longitudinal section of filopodia (FI) extending from flagellum (F). The exterior surface of filopodia is thick lined by variant surface glycoprotein. The filopodia has bullous termination which will grow to vesicles.
- Plate 3. A series of ovoid-shaped vesicles under the final process of vesicle formation.
- Plates 4. and 5. Sections through the flagellar pocket (FP). Coated pits (CP) and coated vesicles (CV) are often observed in the vicinity of flagellar pocket.
- Plate 6. Adjacent microtubules are sometimes connected by bridge-structures (arrows) which probably ensure periodical arrangement of pellicular microtubules.
- Plate 7. An oblique section through the flagellar pocket. A bundle of microtubules (arrow), triplet or quadriplet, is sometimes circumbending the flagellar pocket underneath the plasma membrane. Unlike pellicular microtubules they are directly attaching each other and accompanying an amorphous material around them.
- Plate 8. A longitudinal section through the basal body (BB), its counter part centriole (C), and kinetoplast (K). The area between those structures are filled with fibrillar materials, though the rest of area is occupied by abundant ribosomes.
- Plate 9. A longitudinal section through the junction between the flagellum and cell body. A pair of dense maculae of rivet structure are located at the junction.
- Plate 10. A longitudinal section through the flagellar pocket where the array of rivet structures terminates. The opening of the flagellar pocket is circumvented by dense substance underneath the plasma membrane (arrow).
- Plate 11. A tangential section through rivet structures (R) which are sandwiched between two pellicular microtubules (MT). Dense maculae are locating with regular intervals.
- Plate 12. A general view of a trypanosome extracted by Triton X 100 treatment. Despite the vigorous

treatment the parasite is still remaining its structural integrity. N : nucleus.

- Plate 13. A higher power view of pellicular microtubules. Although cell membrane is dissolved away, interconnection of pellicular microtubules is preserved.
- Plate 14. A tangential section through pellicular microtubules, which depicts a close association of microtubules and ribosome like granules.
- Plate 15. Anterior portion of the trypanosome extracted by saponin treatment. Peculiar profile of the parasite is preserved. N : nucleus, F : flagellum.
- Plate 16. Posterior portion of the trypanosome extracted by saponin treatment. K : kinetoplast, N : nucleus, F : flagellum.
- Plate 17. A high power view of transverse section of axonemal complex ; 9+2 arrangement of microtubules.
- Plate 18. A tangential section through pellicular microtubules which depicts a close association of microtubules and ribosome like granules.
- Plate 19. Vicinity of basal body (BB) and kinetoplast (K) in saponin-treated parasites.
- Plate 20. A high power view of a network of fine fibers that connect basal body and kinetoplast.
- Plate 21. Saponin treatment does not destroy physical connection between flagellum and rivet structures. Numerous fine filaments are extending from microtubules.
- Plate 22. Whole mount preparation of a trypanosome after Triton X treatment. A flagellum appears as a dense line.
- Plate 23. Whole mount preparation of a trypanosome after Triton X treatment. The parasite is currently under cell division, it is equipped with two flagellum and two lines of rivet structures. Triton X 100 destroy physical connection between the flagellum and cell body. The centriole appears as a dense round spot which is always close association with the root of flagellum.
- Plate 24. Whole mount preparation of trypanosome extracted with Triton X according to the method, T-5, described in Fig. 1. For the three dimensional view, a pair of electron micrographs were taken changing angle of the grid by $\pm 7^\circ$. The posterior end of the parasite is devoid of any particular device such as polar ring. A round dense dot in the vicinity of basal body is centriole. Flagellum is surrounded by a ring-shaped structure where a row of rivet structure terminates.

