

犬鉤虫の各発生段階に於ける物質代謝に関する研究

(1) 感染仔虫期の組織化学的研究

佐藤 温重

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和33年1月18日受領)

内部寄生性蠕虫は、その生活環上で自由生活から寄生生活へと、その外的生活環境を著しく変換する。このような生物について発生にともなう物質代謝系の変化の様式を明らかにすること、換言すれば自由生活期の物質代謝系と寄生生活期のそれとを比較研究することは、寄生現象のもつ生理学的特性を明らかにする上での一つの重要な基礎となるものと考えられる。

発生にともなう物質代謝系の変化の機構を明らかにするためには、生化学的、及び組織化学的な面からの広汎な研究が必要である。従来、内部寄生性蠕虫類の物質代謝変化については von Brand (1952) の呼吸代謝に関する研究や Erasmus (1957) の解磷酸酵素に関する研究等があるが、犬鉤虫に関しては、個々の発生段階について呼吸代謝の研究 (von Brand ら 1938) や組織化学的研究 (Giovannola, 1926 ; 山口, 1958) が散見されるのみである。

筆者は、犬鉤虫の発生にともなう物質代謝系研究の一環として各発生段階の虫体につき、いくつかの組織化学的研究を試みた。ここでは、まづ感染仔虫期につき、グリコーゲン、脂質及び解磷酸酵素の分布と消長並びに Rogers (1939) が排泄物質と考えた黒色顆粒の組織化学的性状につき報告する。

材料及び方法

1. 虫体：犬鉤虫感染仔虫は、犬鉤虫卵含有糞便の通常の瓦培養法 (28°C) によりえた。培養開始後4日目に水中に遊出した仔虫を集め、蒸留水で洗滌後、深さ4 mm 程に蒸留水を充したシャーレに移し、そのまま28°C の恒温器内に置いた。遊出仔虫は遊出直後の仔虫を1日仔虫、以後日を経るに従つて7日、15日、30日、

60日、90日、各仔虫と名づけた。

2. 固定包埋及び組織化学的反応

A. 炭水化物：凍結乾燥 (中島ら, 1950 ; Glick ら, 1956) 或は Gendre 液 4°C 2時間固定のものをパラフィン切片とし、Hotchkiss (1948) の PAS 反応による多糖類染色と、唾液消化試験 (37°C 30分) によるグリコーゲンの検出を行つた。

B. 脂質：無固定或は Baker の4% formalin-Ca 4時間固定の材料を冷凍ナイフ (Adamstone ら 1948 の方法を筆者が改変したもの) で凍結切片にしたものにつき以下の操作を施した。脂質は Lillie の Oil Red 4 B (OR) 60% isopropanol 液 10分染色か或は Chiffelle らの0.7% Sudan Black B (SB) propylene glycol 液 5分染色によつた。対照としては Baker の pyridine 抽出試験を行つた。特に全体標本をうるためには、虫体を10% Antiformin の新鮮溶液で20分処理し、3回遠心水洗後、固定し、組織化学的反応を施した。Antiformin 処理により虫体の被嚢は溶解したが、虫体の運動性には異常は認められない。この処理により虫体の染虫性は高まり OR 染色では若干のすぐれた標本をえた。しかし物質の微量検出には応用しなかつた。

C. 酸性解磷酸酵素：冷4%中性 formalin 2時間固定材料を充分水洗後、凍結切片とし Coupling Azo dye 法 (Grogg & Pearse, 1952) によりこの酵素の検出を行つた。sodium α -naphthyl phosphate を基質とし coupler は *o*-dianisidine の diazotate を用いた。阻害実験については110°C 60分乾熱処理の切片につき正常基質による反応、或は正常切片について NaF を1/100 M ふくむ基質混液による反応を試みた。基質混液処理は20°C で60分間行つた。

D. アルカリ性解磷酸酵素：酸性酵素と同様にしてつくつた切片を用い Coupling Azo dye 法により検出した。sodium α -naphthyl phosphate を基質と 4-benzoyl

ATUSHIGE SATO: Studies on the metabolism of *Ancylostoma caninum* in its each developmental stage (1). Histochemical studies on the infective larva (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

amino-2 : 5-dimethoxyaniline の diazotate で couple した。阻害実験は 110°C 60 分乾熱処理切片につき正常基質処理を行つた。尙基質混液処理は 20°C で 30~120 分間行つた。

E. Rogers のいう黒色顆粒の組織化学的性状を決定するために、無固定氷結切片に次の諸方法を適用した。

- i) Scott 原法を筆者が簡素化した方法による灰化 (Glick, 1949)
- ii) Policard 法による Ca の検出 (Lison, 1952)
- iii) von Kóssa 法による不溶性カルシウム塩の検出 (Pearse, 1954)
- iv) lithium carbonate 水溶液による尿素、尿酸溶出試験 (Gomori, 1952)

3. 一般形態 : Mayer の Hemalum-Eosin Y 染色及び Mann の Methyl blue-Eosin Y 染色を用いた。

実験結果

炭水化物 : 仔虫体内に存在する PAS 陽性物質の大部分はグリコーゲンである。グリコーゲンは腸管、体筋肉排泄管壁 (excretory column wall) 等の細胞質中に主に顆粒状 (一部は拡散状) に存在する。グリコーゲンの含量は仔虫の令と共に減少する (Fig. 7~11)。この減少の様子を典型的に示すと考えられる虫体中央部の体筋肉細胞質中のグリコーゲン顆粒の消長は Table I の如くである。即ち、仔虫体からグリコーゲンが消失するのは 60~90 日の間である。この日数が恐らく仔虫の寿命を示すものであろう。

グリコーゲン以外の PAS 陽性物質は口腔内壁、腸管内壁、排泄管、分泌腺中に存在する。

脂質 : OR 及び SB で可染し Nile Blue sulfate で赤染する中性脂質は、腸管、体筋肉、排泄管壁の細胞質中に

Table 1 Reduction in the amounts of glycogen and neutral lipid in correlation with aging (28°C)

| Age of larva (day old) | The average number of glycogen and lipid granules in the somatic muscle cell | | | |
|------------------------|--|-------|-------|-------|
| | glycogen | | lipid | |
| | large | small | large | small |
| 1 | 8 | 15 | 14 | 58 |
| 7 | — | — | 9 | 68 |
| 15 | 4 | 15 | — | — |
| 30 | — | — | 2 | 27 |
| 60 | 1 | 12 | 0 | 0 |
| 90 | 0 | 0 | 0 | 0 |

large : over 1.5 μ in diam.
small : under 1.5 μ in diam.

主に顆粒状に一部拡散状に豊富に存在する。この外 SB にのみ可染する脂質—Pearse によると ester phosphatid であるが—が神経環、筋組織等に拡散状に存在する。中性脂質は仔虫の令に従つて徐々に減少する (Table I)。60 日仔虫では、すべての仔虫が中性脂肪を欠く。しかし SB にのみ可染の脂質は変動が認められない。

酸性解磷酸酵素 : 切片を基質混液で処理する時間を長くすると、多くの組織が染色する。即ち最初体筋肉細胞質、次に食道腸管に染色し、処理 120 時間分に及ぶと排泄管壁も染色している。比較的強い染色を示すのは排泄管壁 体筋肉、腸管の細胞質である (Fig. 13 & 14)。

アルカリ性解磷酸酵素 : 酸性酵素に比し反応がおそく 100 分処理切片で腸管、排泄管、食道分泌腺等に検出された (Fig. 15 & 16)。酵素の活性度の定量は行なかつたが、酸性酵素がアルカリ性酵素に比し優越しているようである。アルカリ性及び酸性酵素活性の仔虫の令に従う変動は認められなかつた。

Rogers の黒色顆粒 : 固定前の虫体では、その腸管細胞質内に球型の輝く顆粒として認められる (Fig. 17)。この顆粒は燃焼に安定で、灰化像の中に強く白く輝く灰として残る (Fig. 18)。灰像にマイクロピペットで 3% 硫酸の微滴を滴下すると、この顆粒附近に硫酸カルシウムの針状或はバラの花状の結晶が形成される (Fig. 20)。von Kóssa 法では、この顆粒は黒色にメッキされ、炭酸リチウム液処理切片でも、その染色性は変わらない (Fig. 19)。これらの組織化学反応はいずれもこの顆粒が少くとも不溶性カルシウム塩を含むものであることを示している。この顆粒は 15 日以後の仔虫に検出され、顕微灰化像の観察からみて、仔虫の令に従い集積する傾向がある。

以上の結果を表示すると Table 2 のようになる。

論議

グリコーゲン、脂質 : 感染仔虫は被囊していて所謂食物を摂取しないのにかかわらず、長期間生存するためには多量の貯蔵食物を持つていなければならない。事実、感染仔虫はいわゆる栄養顆粒とよばれるものを多量に持っている。Rogers ら (1938) はこの栄養顆粒が脂質でありその含有量が、仔虫の令に従つて減少することを観察している。しかし氏は仔虫を切片にすることなしに染色したので組織化学的意味での局在性染色性は厳密でない。筆者は冷凍ナイフ凍結切片による SB 染色をほどこして検鏡した結果、栄養顆粒といわれたもののなかには脂質だけではなく SB に染まらないグリコーゲンと思

Table 2 Results of histochemical reactions to the infective larva of *Ancylostoma caninum*.

| Tissue | carbohydrate | | lipid | | | phosphatases | |
|-----------------------------|--------------|----------|-------|---------|---------------|--------------|----------|
| | PAS | glycogen | Oil | Red 4 B | Sudan Black B | acid | alkaline |
| esophagus | + | + | | + | + | + | - |
| esophageal excretory gland | + | + | | - | + | - | + |
| esophageal bulb | - | - | | + | + | + | - |
| esophageal intestinal valve | + | + | | + | + | + | ? |
| intestine | ++ | ++ | | ++ | ++ | ++ | + |
| somatic muscle | ++ | ++ | | ++ | ++ | ++ | ? |
| excretory columns | + | + | | + | + | ++ | + |

++ : Excellent positive.

われる顆粒を見出した (Fig. 12)。即ち SB 染色標本と、凍結乾燥—アルコール切片に PAS 反応をほどこした標本とを対比すると SB 不染顆粒はその分布及び大きさからグリコーゲン顆粒に相当すると考えられる。もとよりグリコーゲンは用いられた固定法によりその検出される状態が異なるのであるから、両切片標本を直ちに対比するのは危険ではあるが、物質の分布状態をよく保存する凍結乾燥法の切片標本からこの様に考えることは許されるであろう。

グリコーゲンの分布については、最近山口 (1958) が、仔虫体内に組織構造が明らかでないほど全体的に濃染すると報告しているが、恐らく固定液の選択及び Schiff 処理が不適当であつたものと考えられる。

若い仔虫に多量に存在するグリコーゲン及び脂質は仔虫の令に従い減少するが、脂質の消失はグリコーゲンのそれより急速である。このことは貯蔵脂肪は、一度グリコーゲンに代つて異化されることを示すものであろう。この点については目下更に検討中である。仔虫体内にこの様に多量のグリコーゲン及び脂質が存在することは、仔虫が第2期で嫌気優越型の呼吸を行つていたことを示すものと解される。

解磷酸酵素：上述したように、仔虫体内にグリコーゲン及び脂質が濃密に存し、かつ消長があることは、この酵素の活性度と密接な関係があると考えられるのであるが、成虫に比しその活性は低いようである (佐藤, 1957)。このことは感染仔虫が食物摂取を行わず、専ら貯蔵物質の消費によつて生活していることと関連しているのかも知れない。しかし仔虫に於いては酵素の絶対量が少いために組織化学的検出法では低活性を示すが、相対的活性

度で考えてみれば、この時期の仔虫の解磷酸酵素活性を直ちに低活性と考えることは出来ない。又その分布はグリコーゲン及び脂質の分布とよく一致しており、その部所で糖、脂質の代謝に関与しているのであろう。最近 Erasmus (1958) が条虫で解磷酸酵素の研究を行い、成虫と囊虫では、その至適 pH が異なり、老囊虫にその中間型が存在すると報告しているが、鉤虫仔虫の場合では酸性酵素が優越しているという点で成虫と一致することは興味深い。この点については、更に各 pH に於ける活性及び基質を代えての活性の定量的研究を行わねばならない。

黒色顆粒：Giovannola (1926), Rogers (1939) らは老仔虫体内に黒色顆粒が存在することを報告しているが、その本態を明らかにしなかつた。筆者は組織化学的にこの顆粒が、Ca の不溶性塩を含むものであることを明らかにした。こゝで問題になるのは Ca の組織化学的検出法に於ける特異性であるが、こゝに用いられた Policard 法は Ca に対し極めて特異的なものである (Lison, 1952)。しかし、この方法は局在性を細胞学的微細な点まで精確にしえない欠点がある。この点を補うため、顕微灰化像の検鏡、及び銀メッキ法等を併用した。そしていずれも Ca の存在を示した。よつて腸管細胞質内のいわゆる黒色顆粒は少くも Ca 塩を含むものであると考えてよい。この顆粒の生理的機能は不明であるが、細胞内に蓄積される傾向があることから、老排物質と思われる。この顆粒の生理的機能及びその化学構造を明らかにすることは、この顆粒に類似した所のものが多くの内部寄生虫に見出される (Chitwood ら, 1952) ことからしても代謝研究にとつて重要なことと思われるので、更に検討を試みようと考えている。

要 約

犬鉤虫の発生にともなう物質代謝系の変化を研究する一環として、各時期の虫体につき組織化学的研究を行った。ここでは感染仔虫期につき、グリコーゲン、脂質及び解磷酸酵素の体内分布と仔虫の令に従う、これら物質及び酵素の消長、並びにいわゆる黒色顆粒の性状を組織化学的に研究した。

1. PAS 法で検出されるグリコーゲン及び Oil Red 4 B 可染の中性脂質は、初期仔虫の体筋、腸管、排泄管壁の細胞質中に顆粒状及び拡散状に豊富に存在する。これらは仔虫の令に従い徐々に減少し、グリコーゲンは 90 日仔虫で又中性脂質は 60 日仔虫で全く消失している。

2. Coupling Azo dye 法で検出されるアルカリ性解磷酸酵素は、腸管、排泄管、食道分泌腺に存在する。酸性解磷酸酵素は体筋肉、食道腸管、排泄管の細胞中に存在する。その活性は成虫期と同様酸性酵素がアルカリ性酵素に比し優越していると思われる。仔虫の令による活性の変動は認められない。

3. いわゆる黒色顆粒は、不溶性カルシウム塩を含むものである。この顆粒は 15 日以後の仔虫の腸管細胞質中に存在し、仔虫の令の増加に従って集積する傾向がある。

4. いわゆる栄養顆粒といわれたものは脂質の外、グリコーゲン及び不溶性カルシウム塩の顆粒からなつていた。

5. 検出した物質及び酵素の機能につき考察を加えた。

稿を終るに際し、御指導と御校閲の労を賜つた寄生虫部長小宮義孝博士並びに種々御教示いただいた東京教育大学理学部動物学教室中島雅男博士に対して深く感謝の意を表します。

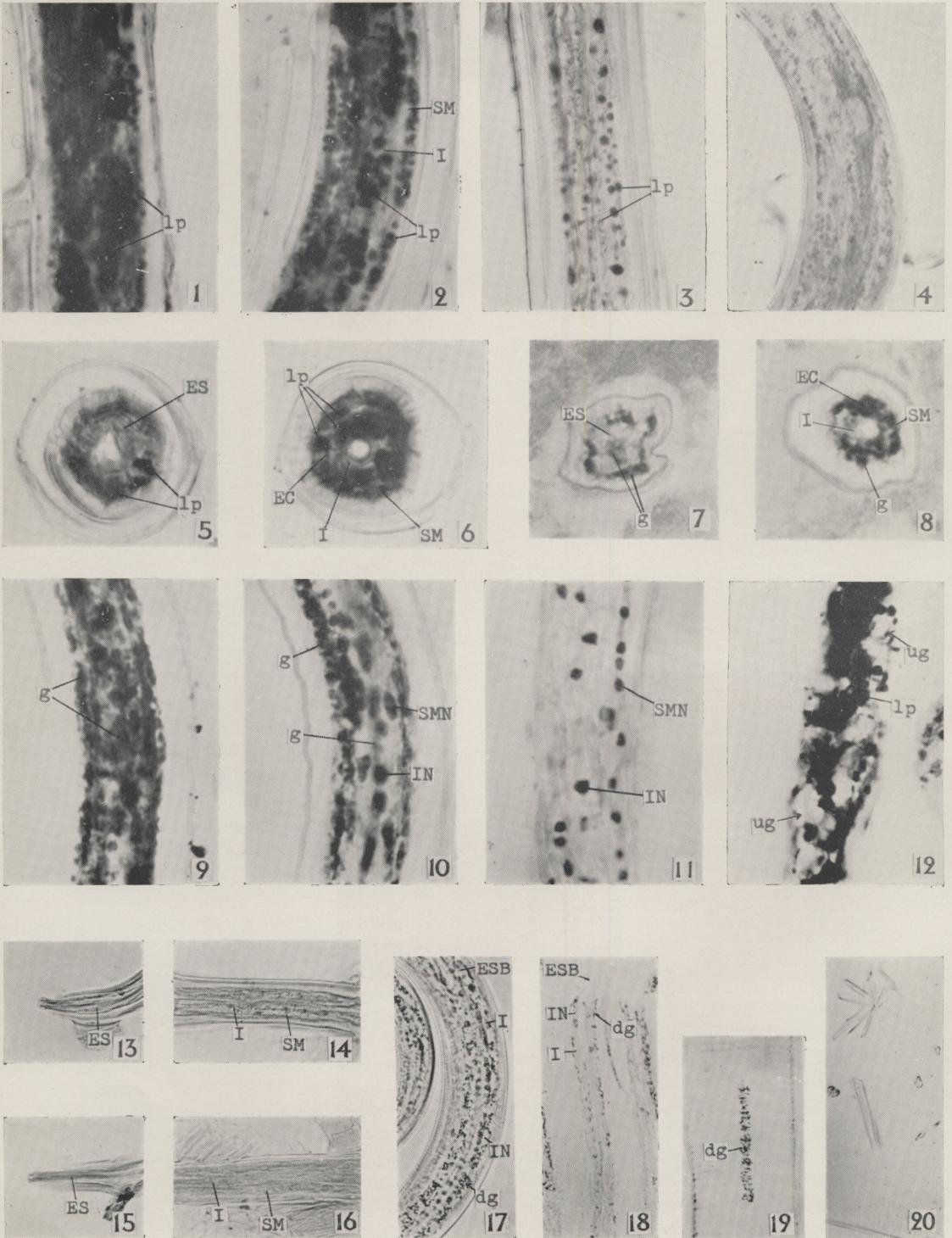
本研究要旨は第 15 回日本寄生虫学会東日本支部大会において発表した

文 献

1) Adamstone, F.B. & Taylor, A.B. (1948) : The rapid preparation of frozen tissue sections. *Stain Technol.*, 23, 109-116. —2) von Brand, Th. & Otto, G. (1938) : Some aspects of carbohydrate metabolism of the hookworm, *Ancylostoma caninum*, and its host. *Am. J. Hyg.*, 27, 683-689. —3) von Brand, Th. : Chemical physiology of endoparasitic animals, Academic Press, New York, N. Y. —4) Chitwood, B. G. & Chitwood, M. B. (1952) : An introduction to nematology. Section Monumental Printing Company, Baltimore, Md. —

5) Danielli, J. F. (1947) : Phosphatase and other enzymes considered in relation to active transport and functions of fibrous protein structure. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, 142. —6) Danielli, J. F. (1953) : Cytochemistry and a critical approach. John Wiley and Sons, New York, N. Y. —7) Erasmus, D. A. (1957) : Studies on phosphatase system of cestodes. 1. Studies on *Taenia pisiformis* (Cysticercus and adult) *Parasitol.*, 47 (1 & 2), 70-80. —8) Giovannola, A. (1926) : Energy and food reserves in the development of Nematodes. *J. Parasitol.*, XXII (2), 207-218. —9) Glick, D. & Bloom, D. (1956) : Studies in histochemistry. XXXIX. The performance of freezing-drying apparatus for the preparation of embedded tissue and an improved design. *Exptl. Cell Research*, 10, 687-696. —10) Gomori, G. (1952) : Microscopic histochemistry, principles and practice. The University of Chicago Press, Chicago, Ill. —11) Grogg, E. & Pearse, A. G. E. (1952) : A critical studies of the histochemical techniques for acid phosphatase with a description of Azo dye method. *J. Path. Bact.*, 64, 627-637. —12) Hotchkiss, R. D. (1948) : A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue. *Arch. Biochem.*, 16, 131-141. —13) Lison, L. (1953) : Histochemie et cytochemie animales. Principes et Méthodes. Gauthier-Villars, Éditeur. Paris. —14) 松崎義周 (1931) : 「アンキロストーマ」及び「ネカトル」種十二指腸虫仔虫の宿主体外に於ける形態学的發育の研究, 慶応医学, 11 (6), 1-49. —15) 中島雅男 辻井禎・直良博人 (1950) : 凍結乾燥による顕微鏡切片標本の製作法, 科学, 20 (5), 12-19. —16) Nichols R. L. (1956) : The etiology of visceral larva migrans. II. Comparative larval morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum*. *J. Parasitol.*, 42 (4), 363-399. —17) Novikoff, A. B. (1951) : The validity of histochemical phosphatase methods on the intracellular level. *Science*, 113, 320-325. —18) Pearse, A. G. E. (1954) : Histochemistry. Theoretical and Applied. J. & A. Churchill Ltd. London. —19) Rogers, W. P. (1939) : The physiological ageing of *Ancylostoma* larvae. *J. Helminthol.*, 17 (4), 195-202. —20) 佐藤温重 (1957) : 犬鉤虫の組織化学的研究, II 成虫の腸管の構造と機能について, 第 17 回日本寄生虫学会東日本支部大会記事, 12-13. —21) Sumner, J. B. & Myrbäck, K. (1950) : The enzymes, chemistry and mechanism of action. vol. 1. Academic Press Inc., Publishers New York. —22) 山口正 (1958) : 寄生性蠕虫類の組織化学的研究, III. 鉤虫仔虫及び *Strongyloides ratti* 仔虫体の組織化学的研究, 寄生虫誌, 7 (1), 29-37.

Plate



Summary

In order to elucidate the metabolic changes during its development were carried out histochemical studies on the egg, larva, and adult of *Ancylostoma caninum*.

The present paper reported the studies on the localization of glycogen, lipid, and phosphatases, and on the histochemical properties of the so called "dark granule" in the infective larva.

In young larva, the intestine cell, somatic cell, and excretory column wall contained a large amounts of both glycogen and neutral lipid chiefly in the form of granules. These substances were located in the other tissue in a small amount.

As the larva aged, contents of glycogen and neutral lipid were reduced, in 60 day old larva no neutral lipid remained, but some amounts of glycogen remained. In 90 day old larva the glycogen was completely exhausted.

Acid phosphatase occurred in the somatic cell,

intestine cell, excretory columns wall etc.

Alkaline phosphatase was revealed in the esophageal excretory glands, intestine cell etc.

In the infective larva the acid phosphatase activity seemed to be similarly predominant to that of the alkaline enzyme as the case of adult.

The nature of "dark granule" were investigated with several histochemical methods. From the following histochemical tests the granule was considered to consist of Ca salts:

1) persistancy of the granule to the treatment of the microincineration as a white refractive granular body in the ash.

2) positive reaction in Policard's method and von Kóssa's method.

3) the insolubility in Li_2CO_3 solution.

The granule appeared in the intestine cell of 15-day-old larva and progressively accumulated with increase of age.

A discussion of these findings was given.

Explanation of plate

Fig. 1-4. Distribution of lipid in longitudinal sections of the mid-intestine level of the infective larvae. Baker's formalin-Ca-fixed frozen section, Sudan Black B, X 1350.

Fig. 1. 1-day-old larva

Fig. 2. 7-day-old larva

Fig. 3. 30-day-old larva

Fig. 4. 60-day-old larva

Fig. 5-6. Distribution of lipid in transverse sections of 7-day-old larva. Baker's formalin-Ca-fixed frozen section, Sudan Black B, X 1350.

Fig. 5. At a level of the esophagus.

Fig. 6. At a level of the intestine.

Fig. 7-8. Distribution of glycogen in transverse sections of 7-day-old larva. Cold Gendre's fluid-fixed paraffin section, PAS, Haemalum, X 1350.

Fig. 7. At a level of the esophagus.

Fig. 8. At a level of the intestine.

Fig. 9-11. Distribution of glycogen in longitudinal sections of the mid-intestine level of the infective larvae. Freeze-dried & alcohol-fixed section, PAS, Haemalum, X 1350.

Fig. 9. 1-day-old larva.

Fig. 10. 30-day-old larva.

Fig. 11. 90-day-old larva.

Fig. 12. Location of the unstainable granule, possibly glycogen granule, in a longitudinal section of the mid intestine level. Baker's formalin-Ca-fixed frozen section, Sudan Black B, X 1350.

Fig. 13-14. Alkaline phosphatase activity in longitudinal sections of 7-day-old larva. Cold neutral formalin-fixed frozen section. Coupling Azo Dye technique, 100 min. at 17°C. X 400.

Fig. 15-16. Acid phosphatase activity in longitudinal sections of 7-day-old larva. Cold neutral formalin-fixed frozen section. Coupling Azo Dye technique, 30 min. at 17°C. X 400.

Fig. 17. Distribution of "Dark granule" in the intestine cell of a unfixed 30-day-old larva. X 600.

Fig. 18. Distribution of "Dark granule" in the microincinerated section. X 400.

Fig. 19. Distribution of "Dark granule" impregnated with silver. von Kóssa method. X 800.

Fig. 20. Formation of the need-shaped crystals of calcium sulfate. Policard's method. X 400.

The following abbreviations are used; dg., dark granule; g., glycogen; Ip., lipid; ug., unstainable granule; EC., excretory column; ES., esphagus; ESB., esophageal bulb; I., intestine; IN., intestine cell nucleus; SM., somatic muscle cell; SMN., somatic muscle cell nucleus.