

蛔虫体外飼育時に於ける代謝像の変化

(1) -Adenosine triphosphate, Glycogen, Ascorbic acid 量の変化

一 井 昭 五 杉 浦 健 一 松 本 克 彦

昭和医科大学医動物学教室

(昭和 33 年 6 月 17 日 受領)

豚蛔虫はその体制の大きい事と採集しやすい事から多くの人々によつて研究されて来ている。特にその生理並びに生化学的研究は Fairbairn, Bueding, Cavier, 小泉らによつて広範な研究がなされており、その化学的組成と代謝経路に関しては多くのデータが蓄積されている。併し寄生虫学の基本的な命題一体内寄生の意義、と宿主種特異性一の解決を示唆する様なデータは極めて少い。寄生の意義即ち寄生虫は何故特定宿主体内でのみ生棲可能であるかという問題の解決は自由生活線虫と寄生線虫との間の正確な比較生化学的検討によつてのみ与えられるものと思われる。併し蛔虫の場合これに対応すべき自由生活線虫は実験に使用することが不可能である。

この問題に接近するもう一つの手掛りとして体外飼育によつてその栄養条件を決定しようとする試みが行われて来ている。通常等調食塩水中では蛔虫は10—14日間しか生存していない。(森下, 1953: Cavier *et al.*, 1950) この食塩水に種々の物質を添加してもその生存期間の延長はほとんど見られていない。併しアミノ酸を添加した場合に体外飼育中の蛔虫の蛋白質の減少が対照の食塩水飼育のものに比べて少ないという結果 (Cavier *et al.*, 1950), Ascorbic acid 添加により多少の延命効果が見られたという結果など示唆深い、二三の報告がされている。これら体外飼育中の蛔虫は多く腸内細菌によつて汚染されている為はその栄養条件の決定が増々困難にされている。近年 Epps *et al.* (1950), Bueding & Most (1953) らによつて蛔虫を無菌的にする方法が考察されたが無菌蛔虫 (Axenic *Ascaris*) は多少生存期間が長い様である。

我々は寄生の意義を追求する一つの手掛りとして体外飼育中の代謝像の変動を経時的に測定し宿主体内より取

り出した直後のものと比較してみた。これらの定量的測定が直ちに宿主体内での代謝との質的並びに量的な相異を示すものとは考えにくい、少くとも我々の与えた体外飼育の条件が蛔虫の如何なる代謝経路に一番大きく致死的作用しているかは解明されるものと思われる。そしてその一連の代謝像の変化から蛔虫の体外培養のより良い条件を見出そうとするのがこの実験の究極の目的とするものである。

この報告はこれらの試みの第一報として高エネルギー磷酸化合物 Adenosine triphosphate (ATP), Glycogen, Ascorbic acid 量の変化について報告する。

材料及び方法

材料は東京都品川屠殺場にて採集した雌豚蛔虫の 4.5 ~ 5 g のものを用いた。虫体は 37°C 生理的食塩水を入れた魔法びん中に採集して可及的速やかに持ち帰る第一回の分析を行った。体外飼育法としては 0.95% 食塩水を虫体一匹あたり 50 ~ 60 cc を入れた大型シャーレを用い 30 ~ 37°C の孵卵器中に保存した。飼育液は毎日更新した。又これらの物質の変動に対する細菌の繁殖作用を検討するために特定のものは 1 cc あたりペニシリン 200 単位、ストレプトマイシン 500 γ を含む生理的食塩水を飼育液として用いた。通常各シャーレより数匹づつを任意により出して濾紙で軽く拭い実験に供した。

本実験に用いた飼育条件での蛔虫の生存率は第一表に示す通りである。

第 1 表

30°C, 0.95 % 食塩水中に於ける蛔虫の生存率

飼育日数	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
生存率 (%)	100	100	100	97	87	80	57	40	32	27	13

過半数の虫体が一週間前後で死亡するので定量もこの時期で打切った。

ATP の測定は Barth, L. G. & L. Jaeger 法 (1947)

SHOGO ICHII, KENICHI SUGIURA & KATSUHIKO MATSUMOTO: Metabolic changes in *Ascaris lumbricoides* var. *suum* during the culture *in vitro* (1) (Department of Medical Zoology, Showa Medical School, Tokyo)

により IN HCl 中 100°C 7分で加水分解されるエステル磷酸を Allen 法 (1940) により定量した。

Glycogen は Carroll *et al.* (1956) の Anthrone 法により, Ascorbic acid は Evelyn *et al.* (1938) の 2・6-Dichlorophenolindophenol 法によつて定量した。総て操作は可及的速かに氷冷下で行い上記物質の分解を極力避ける様に努めた。

結果

1) 虫体体壁の ATP 測定の結果を第一図に示す。数値は体壁 1 g 中に含まれる ATP の 7 分 P 量 (γ) で表

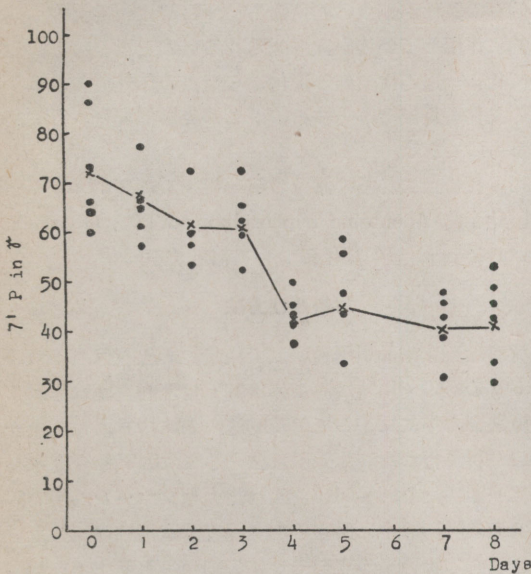


Fig. 1 ATP contents in body wall

わしてある。採集直後の 7 分 P 量は平均 73.0γ/g であり、これを ATP 量に換算すると 1.06mg になり、これは哺乳動物骨格筋の 1/3 ~ 1/2 の含有量に相当するものである。

体外飼育第一日で 64γ, 2日 56γ, 3日 60γ, とやや減少を示しこれ以後は 4日 42γ, 5日 44γ, 7日 40γ, 8日 44γ と約半量に減少する。図より見られる様に ATP は 2 段階の変化をたどつて減少して行く。即ち最初の 3 日目迄はほとんど採集直後の値——恐らくは宿主体内中のものとあまり違はないものと思はれる——と同程度のレベルを保つが 4 日以後になると急激に減少を示して以後は又大体一定のレベルを保つ様になる。

酸化的磷酸化を抑制する 2-4 Dinitrophenol の M/5000 0.95 % 食塩水溶液中で採集直後の 蛔虫 を 3 時間, 24 時

間処理してみた。ATP 量はそれぞれ 60.2γ, 53.8γ を示した。この結果は飼育液中に添加された抑制剤 DNP によつて ATP の形成が或程度抑制された事を示している。併し駆虫剤であるサントゾール 0.6mg/cc の食塩水で 24 時間処理したものは 4 隻の平均値で 62.4γ を示して何等の変化を示さなかつた。

2) Glycogen の定量は体壁と腸管について行つた。結果は組織 1 g 中に含まれる Glycogen 量を mg で表わしたものである (第二図 a, b)。

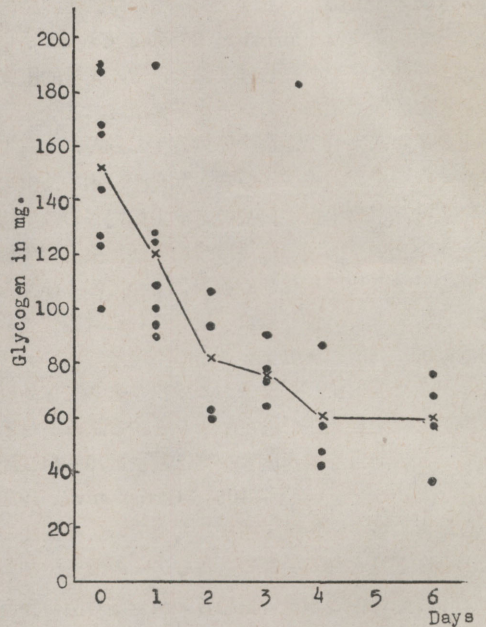


Fig. 2a. Glycogen contents in body wall

採集直後の体壁腸管の Glycogen 含量はそれぞれ平均 150.93mg, 7.24mg を示して Fairbairn & Passey (1957) のデータと非常に良く一致するが鈴木 (1940) のものよりは大幅高い。本研究では陰門前 1 cm 位の筋肉層の厚い部分 100 mg をとり、これについて定量を行つたが虫体の後部になると筋肉層がうすくなり Glycogen 含量の少い Cuticle 層の割合が多くなるために新鮮重量に対する Glycogen 値が低くなるものと思はれる。この様に体壁でもその部分によつて含量の異なる可能性が考えられるので本研究では常に陰門前 1 cm の所より測定材料を採取した。体外飼育中に於ける Glycogen 量の変化については先に von Brand (1937), 鈴木 (1940) により報告されているが本研究で得た結果も大体それらと一致する様

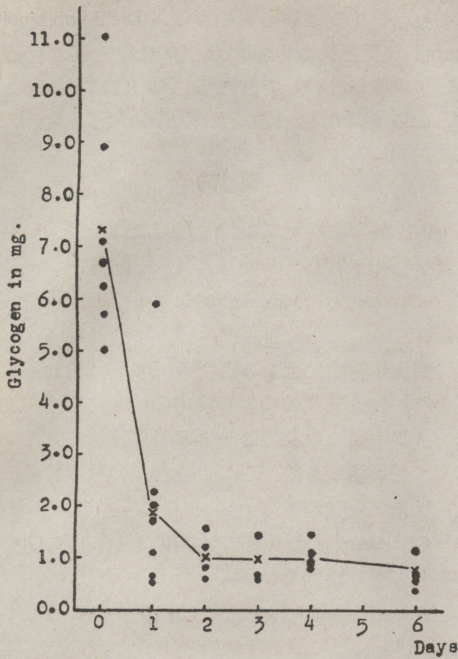


Fig. 2b. Glycogen contents in intestine

である。併し体壁中の Glycogen が時間の経過と共に漸減するのに対して腸管の Glycogen は 1 日目ですでに $\frac{1}{3}$ に減少し以後はほとんど減少を示さない。又ペニシリン、ストレプトマイシン食塩水中で 5 日間飼育した蛔虫体の Glycogen 量は 4 隻の平均で体壁 55.5mg 腸管 0.69 mg、で普通食塩水で飼育したものとほとんど変わらない。

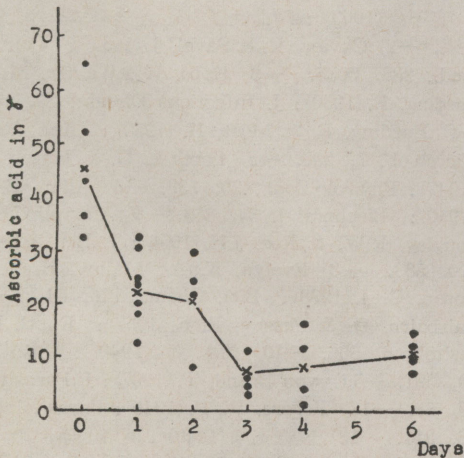


Fig. 3 Ascorbic acid in hemolymph

3) 体腔液中の Ascorbic acid の消長を第三図に掲げる。体壁、腸管の Ascorbic acid は測定し得る程度には存在していなかった。4 隻—8 隻の平均値は体腔液 1 cc あたり採集直後 44.3%, 1 日目 23.1%, 2 日目 21.1%, 3 日目 5.9%, 4 日目 8.0%, 6 日目 11.2% であった。先づ第一日で半減して 3 日以後になると $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{5}$ 量を示すに過ぎない。体外飼育中の体腔液の増量とその比重の減少は等調溶液をその飼育液として使用した場合にも認められている (Rogers, 1954 : 関根, 1940)。

我々も体腔液採取の際には常にこの事に気付いた。即ち、本研究では尾端を切除して滴下する体腔液を集めたが採集直後の虫体のものは全体腔液の採集に約 5~10 分位を要し非常に除々に体腔液が滴下するに反して 4~5 日以後のものは 1 分以内に滴下し終ってしまう。それ故に、この体腔液中の物質の含量の表現に体腔液 1 cc あたりの存在量で表すことは必ずしも妥当であるとは思われない。併し全体腔液を正確に採取することは不可能であり、体腔液の増量と共にその体重も増加する為 (von Brand, 1941) 虫体の体重 g あたり表現するのも不適當と思われる。これらの理由で本研究では敢て 1 cc あたりの含量で表現した。それ故に虫体一匹あたりの Ascorbic acid 量の減少は本研究で示されたデータよりも少い様に思われる。大体体腔液の増量は 4 日以後の虫体で採集直後のものより 1.3~1.6 倍位である。

又ペニシリン—ストレプトマイシン含有食塩水中で 5 日間飼育した虫体の体腔液 Ascorbic acid 量は 4 隻平均して 25.0% の結果であった。この値は対照の食塩水中で飼育したものに比べて約 2 倍高いものである。無菌蛔虫が体外で或程度長期にわたって飼育出来ると云う原因はこういう所に存在するのかも知れない。

考 按

体外飼育中の蛔虫ははじめの 2~3 日間は活潑に運動を続けるがそれ以後になると非常に緩慢になる。一方 ATP 量も 3 日目までは高いレベルを保つが 4 日目以後には減少している。又宿主体内に於けるよりも体外飼育液中の方がより活潑な運動が行われているものと思われる。蛔虫体に於ける高エネルギー磷酸のエステル化は多くの研究者によつて指摘されている様に Glycogen が Embden-Meyerhof の経路を経て分解される間の醗酵段階及び酸化的磷酸化によつて形成されるものと思われる (Rogers et al., 1949 : Bueding, et al., 1951 : Chin et al., 1954 : Rothbone et al., 1954)。体外での蛔虫の

活潑な運動は実験結果に示される様な急激な Glycogen の減少となつて現われ次に ATP 量の減少を惹起せしめて、その運動能力を低下せしめるものと思われる。Embden-Myerhof 経路によつて ADP の磷酸化が行われる以外に Phosphagen からの高エネルギー磷酸の転位による形成経路が存在する。併し Rogers and Lazarus, (1949) 及び Savel (1955) によると蛔虫体は Phospho-creatine, Phosphoarginine などの phosphagen はほとんど含まれていない。これ等の事実より考え合せると体外飼育中でも蛔虫体の Embden Myerhof の解糖経路は健全な状態に保たれているものと考えられる。本実験では 2,4-Dinitrophenol によつて体壁の ATP 量には著しい減少が見られなかつた。このことは本実験に用いた M/5000 の濃度が 蛔虫体の 酸化的磷酸化の完全な抑制を起すには低濃度であつたのか或はこの抑制剤の体内への取入れと筋肉中への拡散が行われなかつたかによるものと思われる。

P^{32} 磷酸ソーダを用いた Rogers and Lazarus の実験によるとこの塩は体壁より吸収されるよりも腸管より多く吸収されると報告されている (Bueding, 1953)。この結果からみれば 2,4-Dinitrophenol も又体壁よりの吸収がわずかであつた為と考える方がより妥当であろう。

Ascorbic acid は生体内の酸化還元及び解糖作用に關係しているものと考えられているが、この物質の蛔虫体内の存在量は極めて少い。又蛔虫組織中に Ascorbic acid 酸化酵素も未だ見出されていない。又体外飼育によつてそれが急激に減少する点より見れば蛔虫は体内でこれを合成すると考えるよりも外部よりの摂取によつているものと思われる。Bueding and Charms (1953) と Rathbone (1955) によつて蛔虫には Cytochrome C-Cytochrome oxidase 系がほとんど存在していないと報告されている。それ故に蛔虫体ではこの系の代りに Ascorbic acid の酸化系が重要な酸化還元の役割を演じているという可能性は充分にある様に思われる。ブドウ糖を飼育液に加えても生存期間の延長は見られないが Ascorbic acid を加えたものは延命効果があるという知見はこの見解を支持するものである。この点に関しては現在実験が進行中である。

4～5日間の体外飼育した蛔虫の ATP, Glycogen, Ascorbic acid 量は或一定値を保ち その後はほとんど減少を示さない。この事は蛔虫体内ではこの量が生存可能な最低濃度である事を示唆するものと思われる。即ち採集直後のものの ATP $1/2$, glycogen $1/10$, Ascorbic acid

$1/5 \sim 1/10$ 量以下の濃度になると蛔虫は生存不能の状態になるものと思われる。事実我々が 2,6-Dichlorophenol indophenol は褪色せしめるが刺戟に対して何等反応を示さない。虫体を分析したところ ATP 12%, 15%, Ascorbic acid 量は 0,0, 1,0, 及び 3,8% であつた。

要約

1) 体外飼育中の蛔虫の代謝像の変動を調べる第一の試みとして 30～37°C, 0.95% 食塩水で飼育中の蛔虫の ATP, Glycogen 並びに Ascorbic acid 量を経時的に定量した。

2) 蛔虫体壁中には 1 g あたり 100～130 mg の ATP を含みこれは哺乳動物骨格筋中の $1/5$ 量に相当する。

3) ATP 量は最初の 2～3 日目迄は採集直後のものよりやや低い濃度を維持しているが、以後は急激に減少して約 $1/2$ 量になつた。

4) Glycogen 量は漸減した。特に腸管中の Glycogen 量の変化が著しかつた。

5) Ascorbic acid は主として体腔液中に存在し腸管 Glycogen と同様に急激な減少を示した。

6) ペニシリン、ストレプトマイシンを添加した飼育液中で飼育した蛔虫では Glycogen は食塩水で飼育したものと変らないが Ascorbic acid 量はやや高い濃度を維持していた。

稿を終るに臨み御指導御校閲を戴いた昭和医大医動物教室森和雄教授に厚く感謝致します。

文献

- 1) 森下薫 (1953) : 蛔虫及蛔虫症 増補第二版, p. 27, 大阪。
- 2) Cavier, R. & Savel, J. (1954) : *Compt. rend.*, 238, 2035.
- 3) Epps, W., Weiner, M. & Bueding, E. (1950) : *J. Infectious Disease*, 87, 149.
- 4) Bueding, E. & Most, H. (1953) : *Ann. Rev. Microbiol.*, 7, 295.
- 5) Barth, L. G. & Jaeger, L. (1947) : *Physiol. Zool.*, 20, 133.
- 6) Allen, B. I. (1940) : *Biochem. J.* 34, 858.
- 7) Carroll, N. V., Longley, R. W. & Roe, J. H. (1956) : *J. Biol. Chem.* 220, 583.
- 8) Evelyn, K. A., Malloy, H. T. & Rosen, C. J. (1938) : *Biol. Chem.*, 126, 645.
- 9) Fairbairn, D. & Passey, R. F. (1957) : *Exptl. Parasitol.*, 6, 566.
- 10) 鈴木嘉六 (1940) : 慶応医学, 20, 591.
- 11) von Brand, T. (1937) : *J. Parasitol.*, 23, 68.
- 12) Rogers, W. P. (1946) : *Parasitology*, 36, 211.
- 13) 関根正雄 (1940) : 慶応医学, 20, 33.
- 14) Von Brand, T. (1941) : *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 46, 417.
- 15) Rogers, W. P. & Lazarus,

M. (1949) : Parasitology., 39, 302. —16) Bueding, E. & Yale, H.W. (1951) : J. Biol. Chem., 193, 411 —17) Chin, C. H. & Bueding, E. (1954) : Biochim. et Biophys. acta., 13, 331. —18) Rothbone, L. & Rees, K. R. (1954) : Biochim. et Biophys. acta., 15, 126. —19) Savel, J. (1955) : Rev. Pathol. comparée, et Hyg. gén., 55, 52. —20) Rogers, W. P. & Lazarus, M. (1949) : Parasitology., 39, 245. —21) Bueding, E. & Charms, B. (1953) : J. Biol. Chem., 202, 505. —22) Rathbone L. (1955) : Biochem. J., 61, 574

Summary

As an approach to successful culture of intestinal parasites, a series of experiments in *Ascaris lumbricoides* var. *suum* have been carried out on the metabolic changes occurred in the parasites which maintained in normal saline or the saline containing penicillin and streptomycin *in vitro*.

First attempt was made on the analyses of Adenosine triphosphate, Glycogen and Ascorbic acid contents in the *Ascaris* body wall, intestine and hemolymph. The results obtained was as follows.

1) Adenosine triphosphate presents in the body wall of *Ascaris* to the extent of 100 to 130 mg per cent. It may be comparable to one third or one half of the amount found in the mammalian skeletal muscles.

The amount of Adenosine triphosphate contained in the body wall of the parasites was exhibited the biphasic changes during the cultivation *in vitro*. In the first phase, within 3 days after the beginning, the level of Adenosine triphosphate remained at a relatively high degree, and in the second phase, it decreased to a half of the initial level after 4 days or more.

Between the activity of the movement of the parasite *in vitro* and the content of Adenosine triphosphate in the body wall, a correlation was observed.

2) Glycogen contents in the body wall decreased gradually along the time elapsed *in vitro*. While the remarkable reduction was found in the glycogen contents in the intestine. The result obtained is good agree with that of von Brand and Suzuki.

3) Ascorbic acid in hemolymph was also decreased markedly within first day *in vitro*. And then it decreased gradually.

4) There was no difference in amounts of glycogen in the body wall between the parasites maintained in normal saline and the parasites in penicillin-streptomycin containing saline. But significantly higher level of ascorbic acid was found in the hemolymph of the axenic parasites than in the parasites contaminated with microorganisms.