

蛔虫の体外飼育時における代謝像の変動

(2) 消化酵素について

一井 昭 五 松本 克彦 杉浦 健一

昭和医科大学医動物学教室

(昭和 33 年 7 月 17 日受領)

寄生の意義を追求する一つの手懸りとして、体外飼育中の蛔虫の代謝像の変動を経時的に追求する一連の実験を行つている。食塩水飼育中豚蛔虫の体壁、体腔液並びに腸管の ATP, Glycogen, Ascorbic acid 量の消長については既に報告した(一井・杉浦・松本:1957)。今回は腸管並びに体腔液中の消化酵素(Amylase, Esterase 並びに Protease) 活性度について報告する。

材料及び方法

東京都品川屠殺場において採集した豚♀蛔虫を用いた。材料の選択及び食塩水飼育法は第一報と同様である。蛔虫の尾端を切除して滴下する体腔液を採集した後、蛔虫の全腸管を注意深く分離し、10倍量の蒸留水と共にホモゲナイズする。これの一定量を採り、各酵素活性を測定した。体腔液は採集したものを遠心し(3000 rpm) その上澄液の一定量を酵素液として用いた。

Amylase 活性度の測定: 0.154M NaCl 溶液と 0.1 M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を 1 : 1 に混合した溶液に 0.5% の可溶性澱粉 (Merck 製) を溶解したものを基質とし、酵素液と共に 37°C, 2 時間インキュベートした後、遊離した Glucose を Dinitrosalicylic acid 法で定量することにより活性度を測定した。

Esterase 活性度の測定: 5% Tributyrine (Merck 製) 溶液 (0.02 N NaOH で pH 7.0 に調整) を基質とし、酵素液と共に 37°C, 2 時間インキュベート後、遊離した Butyric acid を 0.01N NaOH で滴定することによつて行つた。

Protease 活性度の測定: 0.5% Hammarsten Casein

SHOGO ICHII, KATSUHIKO MATSUMOTO & KENICHI SUGIURA: Metabolic changes in *Ascaris lumbricoides* var. *suum* during the culture *in vitro* (2) Digestive enzymes (Laboratory of Medical Zoology, Showa Medical School, Tokyo)

(Merck 製) 溶液を 0.1M 磷酸一クエン酸緩衝液で pH を 5.0 に保ち、酵素液と 37°C, 24 時間インキュベートした後、遊離したアミノ酸を Formol 法により 0.01N NaOH で滴定することによつて測定した。

結果

1) Amylase: 食塩水飼育中蛔虫の腸管並びに体腔液の Amylase 活性度を第 1 表及び第 1 図に示す。数値は新鮮重量 1 g の腸, 或は 1 ml の体腔液の 37°C, 2 時間の活性度を遊離した Glucose 量 (mg) で表わしてある。

Amylase の活性度は飼育 1 日で採集直後の約 70% に

第 1 表 蛔虫腸並びに体腔液の Amylase 活性度

飼育日数	0	1	2	3	5	7	9
腸	123.8	84.3	92.7	91.6	67.3	77.2	68.8
体腔液	19.50	6.90	7.72	4.80	7.16	4.46	3.44

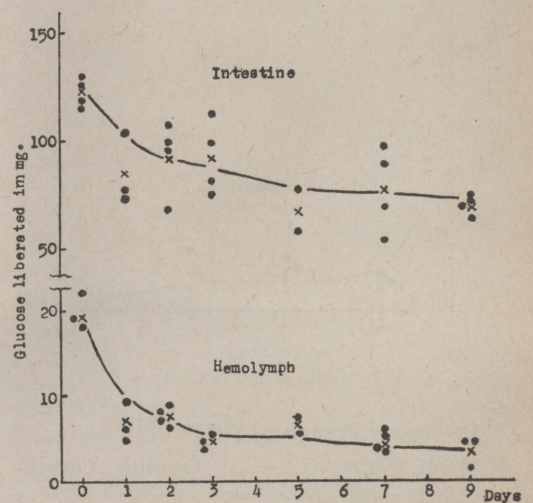


Fig. 1 Amylase activity

減少し、3日目迄大体この活性度を保ち、以後漸減して9日目では60%に達した。一方体腔液の場合は第1日目で約1/3の活性度に減少し、以後わずかに減少する傾向を示した。

2) Esterase: Esterase 活性の変動を第2表及び第2図に示す。数値は腸新鮮重量1g或は体腔液1mlあたり37°C、2時間で遊離する Butyric acid を中和するに要した0.01N NaOH 量 (ml) で表わしてある。

腸管 Esterase 活性度は飼育3日迄は採集直後のものと比べてほとんど変化を示さなかつた。4日以後は漸次減少し7日目で初期の約66%に達した。体腔液 Esterase も第1日目では初期の活性度を保つが、2日目から急減して、7日目では25%の活性度を示すに過ぎなかつた。3日以後の活性度にはほとんど変化は見られなかつた。

第2表 蛔虫腸並びに体腔液の Esterase 活性度

飼育日数	0	1	2	3	4	5	7
腸	115	112	123	115	95	86	76
体腔液	3.7	3.9	2.0	1.3	1.1	1.0	0.9

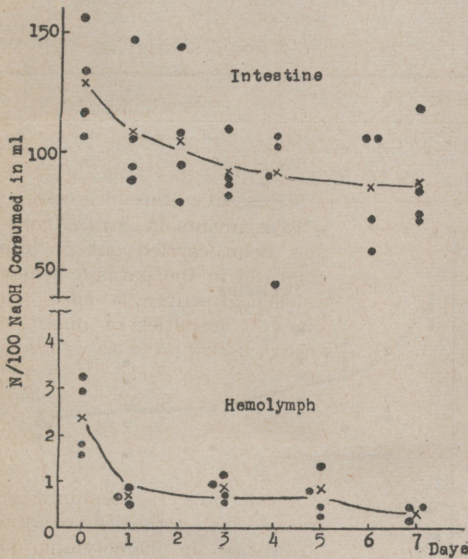


Fig. 2 Esterase activity

3) Protease: Protease 活性度を測定するに先立ちその至適 pH を検討するために、Trypsine, Cathepsine, Pepsine の至適 pH である 8.0, 5.0, 2.2 の pH で腸ホモチネエトを Casein に作用させて見た。結果

第3表 蛔虫腸 Protease の至適 pH

pH	8.0	5.0	2.2
活性度	53.0	145.4	28.2

第4表 蛔虫腸各部位に於ける Protease 活性度

腸部位	前部	中部	後部
活性度 pH (5.0)	135.0	134.0	167.0

を第3表に示す。又その酵素の活性の分布を見る為に全腸管を大体前、中、後部と3等分してそのホモチネエトについてそれぞれ活性度を測定した。その結果を第4表に示す。数値は腸新鮮重量1gたり37°C、24時間で遊離するアミノ酸の滴定値を 0.01N NaOH の ml, で示したものである。表より見られる様に蛔虫腸 Protease は 5.0附近にその至適 pH を持ち、これは Cathepsine

第5表 蛔虫腸並びに体腔液の Protease 活性度

飼育日数	0	1	2	3	4	5	6	7
腸	129	109	106	92	90	—	86	89
体腔液	4.8	1.3	—	1.7	—	1.6	—	0.7

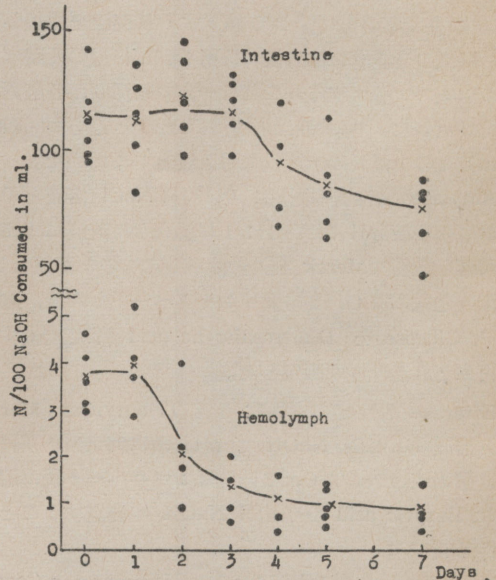


Fig. 3 Protease activity

のそれに相当する。Carpenter(1957)も蛔虫腸 Protease の至適 pH は 6.0附近にあり Cathepsin 系の Protease であろうと述べているが、我々の結果もこれによく一致している。

体外飼育時の腸並びに体腔液の Protease 活性度の変化を第 5 表及び第 3 図に掲げた。腸 protease の活性度は 1 日で 85%, 3 日で 70% に減少するが以後はほとんど減少せず, 7 日を経ても 67% を保っていた。体腔液 Protease は体外飼育と共に急激に減少し第 1 日で 27% になるが以後は大體一定の活性度を保っていた。

考 按

蛔虫の体外飼育液中に種々の栄養物を添加しても, その飼育期間を延長せしめることに失敗したという多くの報告がなされている。これらの事実から体外飼育中の蛔虫の生理状態—消化吸收能力—が正常に保たれているかどうかということは考慮しなければならない一つの要因と思われる。

蛔虫の消化酵素については Rogers (1940, 1941a, b) Carpenter (1957), Savel (1955) らにより種々の酵素の存在並びに性状が報告されている。我々は体外飼育蛔虫腸の生理状態を知る一つの目安として Amylase, Esterase, 並びに Protease 活性度を測定してみた。

一般に腸の消化酵素活性は単なる食塩水という培養条件にも拘らずその変動は極めて少い様に思われた。三酵素とも体外飼育 7 日を経過しても初期の大體 70% の活性度を保っていた。この事実より考えると, 腸の生理状態は比較的变化をうけにくいものと思われる。Amylase, Protease において 3 日目まで活性の漸減が見られたが, それ以後はほぼ一定の活性度を示す様になるが, この事は蛔虫腸内の残存内容物との関連があるものと思われる。

他方体腔液の酵素活性は体外飼育とともに急激に減少している。体腔液量が体外飼育と共に増加する事が Rogers (1945) により見出されているが, この減少量は単なる稀釈によつては説明出来ない。前報で報告した様に体腔液の Ascorbic acid も体外飼育と共に急激に減少している。これらの事実を考え合せると体腔液の生理状態は体外飼育と共に急激に変化し, これが蛔虫の体外飼育を, 極めて困難なものにしているものと推測される。

要 旨

体外飼育中蛔虫の腸及び体腔液の Amylase, Esterase, Protease 活性度を経時的に測定した。

1) 腸 Amylase 及び Protease は 3 日目迄漸減し以後は活性度に変化は見られない。9 日目と 7 日目で初期のそれぞれ 70%, 及び 67% を示した。

2) 腸 Esterase は 3 日目迄初期の活性度を保ち, 以後漸減し 7 日を経ても 67% に減少した。

3) 体腔液のこれら酵素活性は体外飼育と共に急激な減少を示した。

4) 以上の結果より, 体外飼育中腸の生理状態は良好に保たれるが, 体腔液の変化は極めて大きいものと思われる。

稿を終るにあたり御指導, 御校閲をたまわつた森和雄教授に対し深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Carpenter, M. F. P. (1952) : Cited from the Review of Fairbairn, D. "The Biochemistry of Ascaris." Exptl. Parasitol. 6, 491-544 (1957).
- 2) 一井昭五・杉浦健・松本克彦 (1958) : 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, 寄生虫誌, 7 (6), 661-665. —3) Rogers, W. P. (1940) : Digestion in parasitic nematodes. 1. The digestion of carbohydrates. J. Helminthol., 18, 143-144.
- 4) Rogers, W. P. (1941 a) : Digestion in parasitic nematodes. 2. The digestion of fats. J. Helminthol., 19, 35-46. —5) Rogers, W. P. (1941 b) : Digestion in parasitic nematodes. 3. The digestion of proteins. J. Helminthol., 19, 47-58. —6) Rogers, W. P. (1945) : Studies on the nature and properties of the perienteric fluid of *Ascaris lumbricoides*. Parasit., 36, 211-218. —7) Savel, J. (1955) : Etudes sur la constitution et le métabolisme protéiques d'*Ascaris lumbricoides* Linné, 1758. Part 2. Rev pathol. comparée et hyg. gén., 55, 213-285.

Summary

As an approach to successful culture of intestinal parasites, a series of experiments in *Ascaris lumbricoides* var. *suum* has been carried out on the metabolic changes occurred in the parasite which maintained in physiological saline *in vitro*. In this paper the changes in activities of digestive enzymes (amylase, esterase and protease) in intestine and hemolymph of ascaris being maintained in physiological saline, were observed.

Activities of all enzymes in the intestine of ascaris decreased very gradually by the time elapsed, and reached to a level of 2/3 of the initial value at 5th day or later the beginning of the experiment. While the activities of the amylase and the protease in hemolymph of ascaris decreased rapidly in the early period of incubation, but the activity in esterase of hemolymph remained at the high degree in the early period of the observation and then reduced gradually.

From the result obtained, it is suggested that the digestive function in the intestine of ascaris was retained throughout the experimental period.