

# 蛔虫卵の呼吸代謝

## (1) 蛔虫卵の發育とメチレン青脱色能の關係

齊藤 昭三 川副 泰時

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和34年12月16日受領)

### 緒言

1909年 Thunberg, 更に翌年 Batteli & Stern によつて, コハク酸脱水素酵素ははじめて見出され, その後 Szent-Györgyi(1937)はC<sub>4</sub>ジカルボン酸学説を提唱して, コハク酸脱水素酵素の生体内酸化における重要性をはじめて示唆し, 現在に於いては, コハク酸脱水素酵素は, tricarboxylic acid cycle(TCA cycle)を回転させる酵素の一つとして, 生体内終末呼吸系に必須の役割を演じていると考えられている(Krebo 1943, Green et al. 1948).

蛔虫卵に関する研究は古くからその形態・發育・抵抗力並びに感染等数多くなされているが, 上述のような呼吸代謝に関する生化学的・生理学的研究は殆んど行われていないようである。そこで私たちは最初に Thunberg のメチレン青脱色反応法を用いて, 蛔虫卵の呼吸代謝に關係ある二, 三の実験を行つた。

本実験に於いては純粋にコハク酸脱水素酵素を抽出して行つたものではなく, 蛔虫卵の破碎液を使用し, 基質としてはコハク酸を使用し, そのメチレン青脱色能に及ぼす pH, 温度及び基質濃度の影響を追求し, 更に蛔虫卵の發育時期によるメチレン青脱色能の差を比較検討した。

### 材料及び実験方法

虫卵材料は屠殺場より得た新鮮豚蛔虫の子宮内(下部1.5cm)卵で, 5%アンチホルミン液に40~50分間浸漬し, 蛋白質膜を除去して後, 蒸留水洗滌を3回行つた。pH, 温度及び基質濃度の影響に関する実験では, 採取直後の単細胞期卵を使用した。尚虫卵の培養は0.5%ホルマリン加2%寒天平板を使用し, 27~28°C 孵卵器に収めて行つた。

各実験共, 上記虫卵材料をトーマ氏血球計算盤により約20万個を算定し, その破碎液0.5mlを実験に供した。緩衝液としては主として KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>を用

い, 一部は Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>—NaOH を使用したが, それらの pH 及び基質(コハク酸ソーダ)濃度等は各実験に於いて異なるので, 夫々の項に記述する。尚メチレン青は予め 1/5,000 のものを作製しておき, 実験直前に 1/50,000 に希釈して使用した。

Thunberg 管中に収めた組成及び量は下記の通りである。

|    |                |        |
|----|----------------|--------|
| 主室 | 蛔虫卵(約20万個)破碎液  | 0.5 ml |
|    | 緩衝液            | 2.5 ml |
| 側室 | 1/50,000 メチレン青 | 1.0 ml |
|    | コハク酸ソーダ        | 1.0 ml |
|    | (或いは対照として蒸留水)  | 1.0 ml |

排気は真空ポンプで3分間行い, ついで恒温槽(温度に関する実験を除いて30°C)に10分間放置して温度を平衡させた。

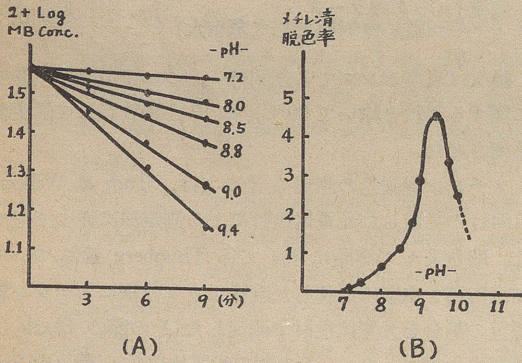
メチレン青脱色の測定に當つては, Tam & Wilson (1941)の記載した光電比色計による測定法に従つて行つた。即ち夫々の実験に於いて各 Thunberg 管について側室内容を主室に混和した直後より3分毎にメチレン青脱色の割合を光電比色計で測定した(その際の Blank は蒸留水を使用した)。その時の光電比色計の読みを I とする。更に各 Thunberg 管共少量のヒドロ亜硫酸ソーダを加え, メチレン青を完全に脱色させ, 虫卵材料による濁りを比色計で測定した。その時の比色計の読みを I<sub>0</sub> とすると, 各時間に於けるメチレン青の濃度は log(I<sub>0</sub>/I) に比例する。かくしてメチレン青の濃度の対数をもう一度とつて, メチレン青の還元脱色と時間との関係を直線的にせしめ, 各実験に於ける夫々のメチレン青脱色能の差を追求した。

### 実験成績

#### 1. メチレン青脱色能に及ぼす pH の影響

虫卵材料は上記の通り, 採取直後の単細胞期卵約20万個の破碎液を使用した。基質として M/20 コハク酸ソ

ーダ 1.0 ml を使用し、反応溶液全体としては M/100 になるようにし、恒温槽の温度は 30°C に保ち実験を行った。緩衝液としては M/10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —M/20  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  及び M/5  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ —N/10 NaOH を使用し、pH を 7.2, 7.5, 8.0, 8.5, 8.8, 9.0, 9.4, 9.7, 10.0 の 9 段階に分ち、各 pH による蛔虫単細胞期卵のメチレン青脱色能の差を比較検討した。第 1 図にその実験成績を示した。第 1 図(A)はメチレン青濃度と時間との関係を示したものであり、これによると  $2 + \text{Log MB Conc.}$  と時間とは略々直線関係を示している。このように酵素反応と時間との関係が直線となる場合には、その傾斜より反応速度は容易に求められ、酵素活性値の測定に便利である。第 1 図(B)はメチレン青脱色率—pH 曲線である。こゝにメチレン青脱色率は第 1 図(A)の直線の傾斜を以て表わしたものである。第 1 図(A), (B)両図に見られるように、pH が 7.2, 7.5, 8.0, 8.5……と増加すると共にメチレン青脱色率は急速に増加を示し、pH 9.4 に於いてその脱色率は最高に達し、その後 pH 9.7, 10.0 に於いては再び減少した。

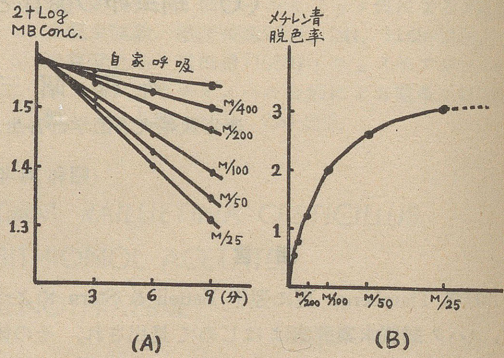


第 1 図 メチレン青脱色能に及ぼす pH の影響

2. メチレン青脱色能に及ぼす基質濃度の影響

本実験に於ける虫卵材料は前実験と同様、採取直後の単細胞期卵である。緩衝液は M/10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —M/20  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  を使用し、その pH を 9.0 となし、温度は 30°C に保ち、pH 及び温度の一定条件下に於いてコハク酸ソーダ濃度を反応溶液全体として M/25, M/50, M/100, M/200, M/400, M/800 の 6 段階に分ち、各基質濃度によるメチレン青脱色能の差を比較した。第 2 図にその実験成績を示した。第 2 図(A)はメチレン青濃度と時間との関係を示したものであり、第 2 図(B)はメチレン青脱色率—基質濃度曲線である。第 2 図(A)・(B)両図より

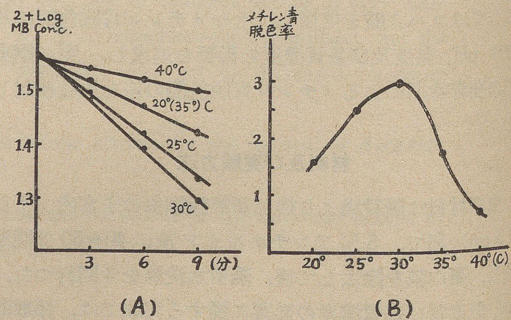
分るように、コハク酸ソーダ濃度が M/800, M/400, M/200……と増加すると共に蛔虫卵のメチレン青脱色率も亦増加を示した。



第 2 図 メチレン青脱色能に及ぼす基質濃度の影響

3. メチレン青脱色能に及ぼす温度の影響

虫卵材料及び緩衝液は前者の基質濃度の実験と同様である。本実験に於いては、pH (9.0)、コハク酸ソーダ濃度 (M/100) を一定にして、温度を 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C の 5 段階に分ち、各温度による蛔虫単細胞期卵のメチレン青脱色能の差を追求した。その実験成績は第 3 図に示す通りである。第 3 図(A)はメチレン青濃度と時間との関係を示したものであり、第 3 図(B)はメチレン青脱色率—温度曲線である。第 3 図(A)・(B)によると蛔虫卵のメチレン青脱色率は温度 30°C に於いて最高を示し、その前後に於いては減少した。



第 3 図 メチレン青脱色能に及ぼす温度の影響

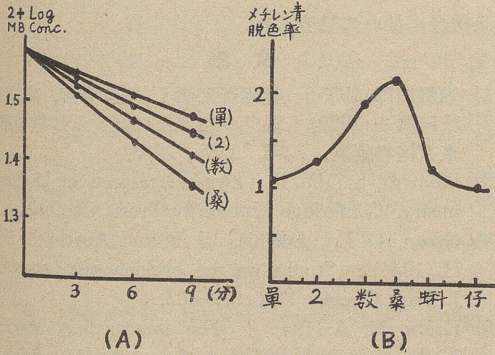
4. 発育時期によるメチレン青脱色能の差

本実験に於いては、前記豚蛔虫卵を培養して、その発育各時期によつてメチレン青脱色能に如何なる差があるかを検討した。虫卵の培養は前述のように 0.5%ホルマ

リン加2%寒天平板を使用して、27~28°C 孵卵器に収めて培養した。

個々の虫卵の發育速度は必ずしも一様ではないが、一応実験区分を次の6期に分けて行つた。

- (1) 単細胞期卵 (採取直後の100%単細胞期のもの)
- (2) 2細胞期卵 (培養第3日の2細胞期卵60%, 単細胞期卵40%含有のもの)
- (3) 数細胞期卵 (培養第6日の数細胞期卵98%, 4細胞期卵1%, 2細胞期卵1%含有のもの)
- (4) 桑実期卵 (培養第8日の桑実期卵87%, 数細胞期卵7%, 早期蛸蚪期卵6%含有のもの)
- (5) 蛸蚪期卵 (培養第10日の蛸蚪期卵94%, 仔虫期卵6%含有のもの)
- (6) 仔虫期卵 (培養第13日の仔虫期卵98%, 蛸蚪期卵1%, 数細胞期卵1%含有のもの)



第4図 發育時期によるメチレン青脱色能の差

以上6つの發育時期の各実験共、緩衝液はM/10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —M/20  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  を使用し、pHは8.6、コハク酸ソーダ濃度は反応溶液全体としてM/100になるようにし、温度は30°Cに保つて実験を行つた。第4図にその実験成績を示した。第4図(A)はメチレン青濃度と時間との関係を示したものであり、第4図(B)はメチレン青脱色率—發育時期曲線である。第4図(A)・(B)によると単細胞期、2細胞期、数細胞期と蛸虫卵の發育が進むと共に、メチレン青脱色率も亦増加を示し、桑実期に於いてその脱色率は最高に達し、蛸蚪期、仔虫期には再び脱色率は減少を示した。

#### 総括並びに考按

私たちは Thunberg のメチレン青脱色反応法により、更に Tam & Wilson の考案した光電比色計による脱酸素酵素活性の測定法に従つて、蛸虫単細胞期卵のメチレ

ン青脱色能に及ぼす pH, 温度並びに基質濃度の影響を検討し、更に蛸虫卵各發育時期によるメチレン青脱色能の差を比較検討した。

#### 1. pH の影響

酵素反応は一般に pH の可成りせまい限られた範囲においてのみあらわれる。この範囲内で活性度は至適 pH といわれているある特定の pH で極大に達し、そこを通過すると再び減ずる。コハク酸脱水素酵素の至適 pH については、Haldane の表によると、筋肉の場合は pH 9 大腸菌の場合は pH 8~10 である (Baldwin, 1952)。又 Tam & Wilson (1941) によると *Rhizobium trifolii* の場合は至適 pH は 8.2 であるという。このようにコハク酸脱水素酵素の至適 pH は一般にアルカリ側にあるようである。

第1図(B)に示す如く、蛸虫卵のメチレン青脱色率—pH 曲線は尖つた、幅のせまい山型の曲線となり、このことはメチレン青脱色能に及ぼす pH の影響は非常に大であることを示して居り、上述のような酵素反応の一般的性質を示したものと考えられる。又メチレン青脱色率の最高を示したのは pH 9.4 であり、これより蛸虫卵のコハク酸脱水素酵素の至適 pH も 9.4 前後のアルカリ側にあると考えられる。

#### 2. 基質濃度の影響

一般に酵素反応の速度は他の条件が一定であれば酵素と基質の濃度によつて定り、酵素が一定量の場合には、反応の初速度は基質の増加と共に増加しついに一定値に達することが極めて多くの場合に見られる。これらのことは Michaelis の提案した理論によつて説明出来る (Baldwin 1952)。私たちの実験は pH, 温度等の条件を一定にし、且つ又、酵素源である蛸虫卵も一定量にして行つたもので、その実験成績は前記した如く、コハク酸ソーダ濃度の増加と共にメチレン青脱色率も増加して居り、上述の酵素反応の一般的性質を示したものと思われる。かくして第2図(B)のメチレン青脱色率—基質濃度曲線は Michaelis 式の理論曲線とよく一致したものであろう。

#### 3. 温度の影響

一般に酵素反応の速度と温度との関係は山型の曲線であらわれ、速度ははじめ温度とともに増大するが、ある極大を越した後は多くは急激に低下する (赤堀 1955)。

第3図(B)に示す如く蛸虫卵のメチレン青脱色率も同様にはじめ温度(20°C, 25°C)と共に増大し、30°C に於いて最高に達し、その後 35°C, 40°C と減少し、メチレ

ン青脱色率——温度曲線は山型となり、その下降の割合は上昇よりも急速であつた。このことから蛔虫卵のコハク酸脱水素酵素の至適温度は 30°C 内外にあるだろうと推定される。このことは蛔虫卵の發育の好適温度が 30°C 内外であるのと一致している。

即ち蛔虫卵の發育の好適温度については、吉田(1917) 浅田(1922)、小泉(1922)、横川(1923)、大場(1923)等の研究があり、何れも 30°C 内外が好適であることを報告している。

以上の如く蛔虫卵の發育の好適温度とコハク酸脱水素酵素の至適温度とが共に 30°C 内外に一致したことは、蛔虫卵のコハク酸脱水素酵素——呼吸代謝——發育という生理的な関連に由来するものと考えられ、興味深く思われる。

#### 4. 發育時期によるメチレン青脱色能の差

メチレン青脱色能の最高を示した時期は培養第 8 日の桑実期であり、この時期は細胞分裂の最盛期に相当する。その細胞分裂の最盛期には虫卵の發育過程に於いて最高のエネルギーが必要であり、従つてこの時期に最も旺盛な呼吸代謝が要求され、メチレン青脱色能は最高を示したものであらうと考えられる。

更に發育が進み蝸蚪期(培養第 10 日)、仔虫期(培養第 13 日)となるに従つてメチレン青脱色能は低下を示したが、このことは蝸蚪期に入ると、今迄の細胞分裂は完了し、この時期には細胞分裂の最盛期である桑実期に要した程の高エネルギーを必要とせず、虫卵の呼吸代謝もより低下し、メチレン青脱色能の低下を来したものと思われ、一応發育の完了した仔虫期には、蝸蚪期よりも更に低下を来したものと推察される。

かくして単細胞期、2細胞期、数細胞期と發育が進むと共にメチレン青脱色能も増加を示し、桑実期に於いて最高に達し、蝸蚪期、仔虫期と再び低下を示したのであらう。

#### 結 論

Thunberg のメチレン青脱色反応法により、基質としてコハク酸を使用し、蛔虫卵のメチレン青脱色能を検討し、下記の結果を得た。

尚此の実験に用いた虫卵は豚蛔虫子宮内より取出した受精卵約 20 万個である。

1. メチレン青脱色能に及ぼす pH の影響は非常に大きく、至適 pH は 9.4 であり、その前後では急速にメチレン青脱色率は減少した。

2. 基質濃度による影響については、コハク酸ソーダ濃度の増加と共にメチレン青脱色率も亦増加し、試みた範囲では基質を M/25 添加した際に最大の活性を示した。

3. メチレン青脱色反応の至適温度は 30°C であり、その前後に於いては脱色率は減少した。

4. 發育時期による差については、培養第 8 日の桑実期に於いてメチレン青脱色能は最高を示し、その前後には減少した。

終りにのぞみ、御指導、御校閲を賜つた松林久吉教授 浅見敬三助教授に深甚なる謝意を表します。

尚本論文の要旨は昭和 31 年 10 月第 16 回 日本寄生虫学会東日本支部大会 及び 昭和 31 年 11 月第 36 回 慶応医学学会総会に於いて発表した。

#### 文 献

- 1) 赤堀四郎(1955) : 酵素研究法 I. 朝倉書店、東京。
- 2) 浅田順一(1922) : 蛔虫の發育史に関する知識増補 東京医事新誌, 2278, 2280, 2283.
- 3) Baldwin, E. (1952) : Dynamic aspects of biochemistry. Cambridge University Press, Cambridge.
- 4) Green, D. E., Loomis, W. F. and Auerbach, V. H. (1948) : Studies on the cyclophorase system. J. Biol. Chem., 172, 389-403.
- 5) Krebs, H. A. (1943) : The intermediary stages in the biological oxidation of carbohydrate. Advances in Enzymology, 3, 191-252.
- 6) 小泉誠治(1922) : 蛔虫の發育に関する研究(第 1 回報告). 東京医事新誌, 2293, 1689-1696.
- 7) 大場辰之允(1923) : 蛔虫卵子の發育に就て, 台湾医学会雑誌, 228, 161-175.
- 8) Szent-Györgyi, A. (1937) : Studies on biological oxidation and some of its catalysts. Eggenberger u. Barth, Budapest u. Lpz.
- 9) Tam, R. K. and Wilson, P. W. (1941) : Respiratory enzyme systems in symbiotic nitrogen fixation. J. Bact. 41, 529-546.
- 10) 横川定(1923) : 蛔虫の發育史及蛔虫病の研究, 台湾医学会雑誌, 229, 241-301.
- 11) 吉田貞雄(1917) : 蛔虫の發育試験, 東京医事新誌 2043, 2044, 2045.

## STUDIES ON THE RESPIRATORY METABOLISM OF ASCARIS EGGS

(1) Relation between the developmental stages of the eggs  
and the methylene blue decolorization activity

SHOZO SAITO and YASUTOKI KAWAZOE

*(Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo)*

The methylene blue decolorization activity of *Ascaris lumbricoides* eggs in various developmental stages was evaluated by Thunberg's method. The eggs used were taken from the lower part of uteri of pig ascaris. The eggs of which albuminous coats were removed by antiformin solution were kept in 27°C to permit development. The developmental stages of eggs were classified as follows: one cell, two cells, several cells, morular, tadpole and larval stage.

In the experiment by Thunberg's method, 0.5 ml of homogenized eggs (about 200,000 of the eggs) and 2.5 ml of buffer solution were put into the tube, and 1.0 ml of 1/50,000 methylene blue solution and 1.0 ml of succinate into the side arm. The reduction of methylene blue was measured by electro-photometer according to Tam and Wilson.

The effects of the medium on the decolorization activity of the ascaris eggs were estimated using the eggs of one cell stage. At the pH of 9.4, the rate of decolorization showed maximum value and at the lower and the higher pH the activity decreased. The optimum concentration of succinate was M/25, so far as the present experiments were concerned. To find out the optimum temperature for the decolorization, experiments were carried out at 20°, 25°, 30° 35° and 40°C, and the activity showed maximum at 30°C. The changes of decolorization activity in developmental stages of ascaris eggs were evaluated under the conditions of pH 8.6, temperature 30°C and M/100 of succinate. The highest activity was recognized in the eggs of morular stage, showing the gradual decrease in the younger and older stages.