

蛔虫卵の発生にともなう炭水化物の変動について

福 島 健

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和 38 年 9 月 26 日受領)

緒 言

蛔虫卵の炭水化物について、Fairbairn & Passey (1957) は、そのほとんど全部がグリコーゲンとトレハロースよりなっていると報告しており、また Passey & Fairbairn (1957) は、蛔虫卵の発生に伴なう脂肪、炭水化物等の炭素出納を測定し、これより蛔虫卵の発生において、脂肪より炭水化物への転換が起つていると報告している。これらの報告の一部を追試する一方、蛔虫子宮内卵の炭水化物および脂肪の測定を行った。

材料および方法

材料：実験に供した虫卵は屠場より得た豚蛔虫 (*Ascaris swis*) の子宮より採集したものである。子宮下部 2~3 cm の部分より得られた受精卵を 10% アンチフォルミンにて蛋白膜を除去して用いた。子宮内卵について子宮部位による炭水化物および脂肪の変動を測定する際には、体長 25~30 cm の雌蛔虫の子宮全体を取り出し、子宮上部および下部の虫卵について、受精卵であることを確認した後、全部の虫卵に外側の卵殻形成が見られる部分受精囊下端より 3~5 cm より下を 6 等分し、各部より得られた虫卵をそれぞれ 1% 苛性カリ溶液にて蛋白膜を除去して測定に供した。不受精卵については、不受精卵のみを有する子宮を上下二分し、受精卵について行ったと同じ処理を行った。子宮内卵の測定のさいには、蛔虫採集後の操作は氷冷下で行なわれた。蛋白膜を除去した虫卵は、これとほぼ等比重 (比重 1.080~1.090) のグリセリン溶液または食塩水溶液に懸濁せしめ (以下に虫卵懸濁液と呼ぶ)、その一定量をとり、種々の定量および培養に供した。

胚子発生 (*embryonation*)：前記の虫卵懸濁液の一定量を 50 ml 三角フラスコにとり、水洗後カビ等の発生を防ぐため 1% 炭酸ソーダ溶液を数 ml 加え (Passey & Fairbairn, 1957)、30°C 孵卵器中に入れて発生を開始させ

た胚子発生期間中はなるべく均一に発育するよう時々手で振盪した。採集後およびある時期まで発生した虫卵を測定に供するまで保存するには、氷室を使用した。3°C では数週間保存しても、蛔虫卵の化学物質および発育能力にはほとんど影響を及ぼさないとされている (Passey & Fairbairn, 1957)。

乾燥重量の測定：虫卵懸濁液の一定量をとり、ガラスフィルター (No. 3) にて、静かに吸引しながら濾別、蒸溜水にて数回洗滌後、105°C で 3 時間乾燥し、デシケーター中で室温まで冷却後秤量した。

炭水化物の定性：虫卵を 90~95°C の 80% エタノールで 1 時間抽出、上清を 60~65°C で減圧下に乾固し、さらに真空中で乾燥した後、無水ピリジンで抽出、東洋濾紙 No. 25 を用いて展開した。また 5% トリクロール酢酸 (以下 TCA と略) を加えてホモジナイズし、得られた抽出液に 5 倍量のエタノール (95%) を加え、攪拌後放置、得られた沈澱を 80% エタノールで洗い、一規定硫酸にて 100°C、30 分間加水分解し、炭酸バリウムを加えて中和し、上清を濾紙で展開した。展開溶媒としてはブタノール・エタノール・水 (52:32:16) またはブタノール・ピリジン・水・ベンゼン (5:3:3:1) を用いた (McMahon *et al.*, 1957)、発色はアルカリ性硝酸銀法 (アセトン硝酸銀—苛性ソーダアルコール) によつた。

炭水化物の定量：虫卵に 5% TCA を加えてホモジナイズし、遠沈して上清を取る操作を 3 回繰返し、全部の上清を合せ良く混和した後、その一定量を取つて全炭水化物およびグリコーゲンの定量に供した。全炭水化物量は TCA 抽出液を蒸溜水で適当に稀釈した後、グリコーゲンは抽出液に 5 倍量のエタノールを加えて攪拌後 1 晩放置、遠心して得られた沈澱を適量の蒸溜水にとかし、アンスロン法 (Carrol *et al.*, 1956) にて定量した。定量には日立 EPO-B 型光電比色計を用い、610 m μ の波長で測定した。

脂肪の定量：資料にクロロホルム・メタノール溶液(2:1)を加えてホモジナイズし、濾過後濾液を蒸留水中にて洗い、減圧下で乾燥し、熱クロロホルム・メタノール溶液で再抽出し、まず減圧下で乾燥し、さらに 105°C 3時間乾燥し秤量した(Folch *et al.*, 1957).

結果

まず胚子発生開始後における炭水化物の変動を調べるため、成熟雌虫の子宮下部より取り出した受精卵の懸濁液を 30°C の孵卵器に入れ、数日毎にその一定量をとって炭水化物の定量を行った。第1表はその結果である。この表においては Passey & Fairbairn(1957) にしたがって、全炭水化物とグリコーゲンの差をトレハロースとしたが、卵を 5% TCA 中でホモジナイズして得られる抽出液からトレハロースを分離定量した結果も、全炭水化物とグリコーゲンとの差にはほぼ一致した。なお TCA 抽出液からトレハロースを分離するには、抽出液にエチルエーテルを加えて TCA を除去した後、濃縮して濾紙上に展開し、トレハロースと同じ Rf 値の部分を取り取り、水で溶出して定量に供した。

第1表 胚子発生の各時期に於ける炭水化物量

定量物質	発 生 日 数											
	0	1	3	6	9	12	16	18	21	24	27	32
炭 水 化 物	14.5	14.1	13.1	11.2	9.4	8.0	7.8	8.1	9.3	12.2	12.2	14.0
グ リ コ ー ゲ ン	3.0	7.0	8.0	6.1	3.5	1.8	1.0	1.2	1.9	3.8	3.9	5.1
ト レ ハ ロ ー ズ	11.5	7.1	5.1	4.9	5.9	6.2	6.8	6.9	7.4	8.4	8.3	8.9

全炭水化物と、グリコーゲンの差をトレハロースとした。

数字は、蛋白膜を除去した未発生卵の乾燥重量に対する百分率

第1表の数値は Passey & Fairbairn(1957) のそれとほぼ同様であるが、発生開始前におけるグリコーゲン含量が低くトレハロース含量が高い点が相違する。この相違が何によるかは後に論ずる。

次に子宮を下降中の受精卵について炭水化物の変動を調べた。それには成熟雌虫の子宮を切り出し、これを6等分して各区分における受精卵について炭水化物および脂肪の定量を行った。結果を第2表に掲げる。この表においても、全炭水化物とグリコーゲンとの差をトレハロースとしたが、子宮下部の受精卵を 80%熱エタノールで抽出し、ペーパークロマトグラフィにより炭水化物を検出すると、第1図(I)に示すごとくトレハロースの存在が認められるのみであつた。第1図(II)(III)は、子宮上部から採取した受精卵および未受精卵を用いて、5%

第2表 子宮内各部位に於ける炭水化物及脂肪

定量物質	子 宮 部 位						
	1	2	3	4	5	6	
受 精 卵	全炭水化物(%)	15.3	15.6	15.4	16.3	17.3	23.
	グリコーゲン(%)	3.5	3.9	5.5	8.8	14.0	22.
	トレハロース(%)	11.8	11.7	9.9	7.5	3.3	10
	脂 肪(%)	30.9	31.8	31.4	79.6	31.0	32.
未 受 精 卵	全炭水化物(%)		41.3				43.2
	グリコーゲン(%)		39.5				41.9

子宮部位は子宮を6等分し、下部より番号を付した。全炭水化物とグリコーゲンの差をトレハロースとし、数字は、リコースとして計算したものである。

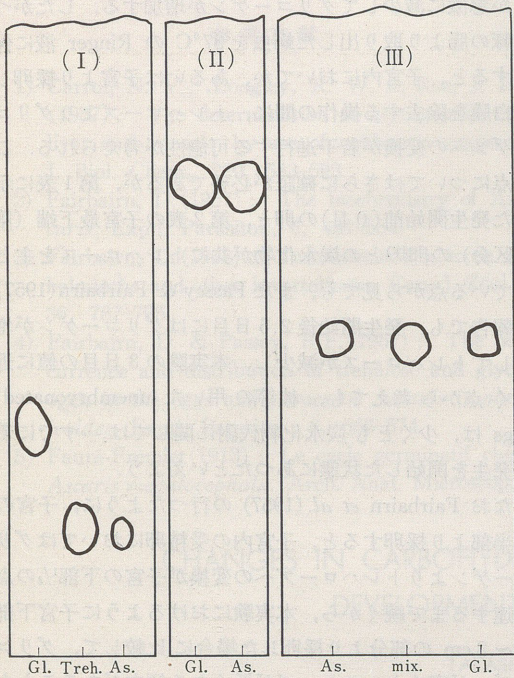
受精卵については3回の測定の結果の平均値、未受精卵については子宮を上下2分して測定した値である。数字は蛋白膜除去卵の乾燥重量に対する百分率

で抽出、エタノールを加えて得た沈澱を加水分解したもののクロマトグラムであり、この沈澱がブドウ糖のみよりなる多糖類、すなわちグリコーゲンと見なし得ることを示す。

第2表は、受精卵が子宮を下降するにつれてグリコー

ゲンが著しく減少し、それに代つてトレハロースが増加することを示している。脂肪含量は子宮内の位置に係らず、ほぼ一定に保たれているから、上記の変化はグリコーゲンよりトレハロースへの変換が起るためと考えてよい。ただし、子宮上半部におけるグリコーゲンの減少はトレハロースの増加を上廻り、全炭水化物含量は 23.3%より 15.4%まで減少する。この減少はグリコーゲンの一部がエネルギー源として、またキチン合成などの原料として消費されるためであろう。

なお、第2表には子宮内の未受精卵について定量した結果を併わせ示したが、未受精卵では子宮内の位置に関せず全炭水化物のほとんど全部がグリコーゲンであり、しかもその含量は子宮最上部における受精卵の含量の2倍に近い、この事実は、輸卵管中で受精した卵が子宮最



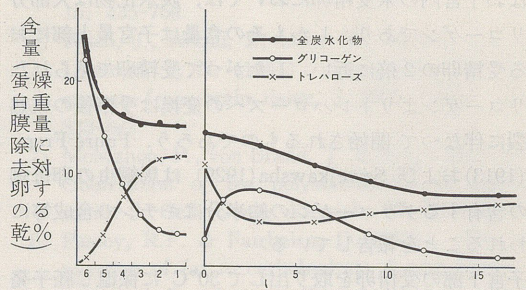
第1図 ペーパークロマトグラフィーによる炭水化物の検出

- (I) 子宮下部(2~3cm) 受精卵の80%エタノールで抽出したもの、展開溶媒、ブタノール・エタノール・水(52:32:16)
- (II) 子宮上部受精卵のTCA抽出液に、エタノールを加えて得た沈澱を加水分解したもの、展開溶媒 ブタノール・ピリジン・水・ベンゼン(5:3:3:1)3回展開、
- (III) 不受精卵について(II)と同じ操作を行ったもの、Gl: グルコース Treh: トレハロース
As: 資料 mix: 資料とグルコースとの混合物

上部に達するまでにグリコーゲンの約1/2が消費または変換されることを物語る。

上述のように、受精卵が子宮を下降する間にその炭水化物は著しい変動を示すが、この変動がどの位の期間に行なわれるかを知るため、受精卵が子宮を下降するに要する日数を次のようにして推定した。

雌蛔虫1匹の子宮内に含まれる全受精卵について、蛋白膜除去後の乾燥重量を測定すると約50mgであつたが、Fairbairn & Passey(1957)によれば、子宮下部卵は蛋白膜除去後の乾燥重量100gにつき 3.6×10^9 個であるから、この数値を用い、かつ受精卵の乾燥重量が子宮の上下下部で相違しないものと仮定して計算すると、子宮



上部←子宮区分→下部 胚子発生開始後の日数

第2図 子宮下降及び胚子発生に伴う炭水化物の変動, 子宮区分を子宮を6等分し, 最下部を1, 最上部を6とした

内の受精卵の総数は約180万個と推定される。蛔虫の産卵数については、文献によりかなりまちまちの値が報告されているが、仮に1日当たり平均30万個とすると、子宮最上部の受精卵が子宮を下降して産卵されるまでに約6日を要することになり、上記のごとく子宮を6等分した場合には、各區別を通過するのに平均約1日を要すると推定される。

第2図は第1表および第2表のデータに基づき、子宮を下降中の受精卵および胚子発生初期における炭水化物の変動を示したものである。

論議

Passey & Fairbairn(1957)は豚蛔虫の胚子発生(embryonation)に伴つて炭水化物の著しい変動が見られることを報告したが、本実験は彼等の結果を追試する一方受精卵が子宮を下降するさいにも、炭水化物が胚子発生の初期に類似した変動を示すことを明らかにした。すなわち、子宮最上部にある受精卵の炭水化物は、その大部分がグリコーゲンであるが、子宮を下降する間にグリコーゲンの約1/2は消失し、残りの大部分はトレハロースに変換する。

古く Fauré-Fremiet(1913)は馬蛔虫の子宮内卵のグリコーゲンを定量して、子宮上半部のものは卵の4.7%、下半部のものは1.7%という結果を得、これは卵が子宮の下部に至るさい、グリコーゲンから他の糖類への転換が起きていることを示唆するとしている。

本実験はグリコーゲンの約1/2はトレハロースに変換することを明らかにしたが、このような変換がどのような機作で起きるのかは、将来研究さるべき興味ある問題であらう。

なお子宮内の未受精卵においては、炭水化物は大部分グリコーゲンであり、しかもその含量は子宮最上部における受精卵の2倍に近い。したがって受精卵で見られたグリコーゲンよりトレハロースへの変換は受精後の成熟分裂に伴なつて開始されるものであろう。Fauré-Fremiet (1913) および Szwejkawsha (1929) は馬蛔虫の卵母細胞の含有するグリコーゲンの約半分はキチンの合成等に使用されることを報告している。

子宮下部の受精卵を取り出して 30°C に保温し胚子発生を開始させると、まず子宮内で増加したトレハロースが減少して、グリコーゲンが増加する。このとき全炭水化物の減少は僅かであり、また Passey & Fairbairn (1957) によればこの期間には脂肪もほとんど減少しないから、発生初期においては子宮内とは反対にトレハロースからグリコーゲンへの変換が起こるものと考えられる。しかし発生開始3日後には、グリコーゲンが減少し始め、やや遅れてトレハロースが増加する。すなわち再び子宮内で見られたのと同様な変化が見られるが、このときにもグリコーゲンの減少は、トレハロースの増加を上廻り、全炭水化物は幾分減少する。しかし発生開始後16日頃より、グリコーゲンは再び増加し始め、トレハロースも増加して全炭水化物が増量する。この増加は、Passey & Fairbairn (1957) の明らかにした脂肪から炭水化物への変換によるものと考えられる。

なお Fairbairn *et al.* (1957) によると、子宮下部より取り出した unembryonated eggs はグリコーゲンとトレハロースをほぼ等量に含み、その全量は蛋白膜除去後の乾燥重量当り約8%である。この値は第2表に示した数値とはかなり相違するが、これは次のような事情によるものと考えられる。本実験で子宮内卵の虫卵について定量する場合には、豚の腸より取り出した蛔虫を直ちに氷冷して実験室に持ち帰り、氷冷下で解剖して採卵し、Fairbairn *et al.* (1957) はブタの腸より採集した蛔虫を modified Ringer 液中で 39°C に保ち、48時間以内に解剖して採卵している。なお本実験においても、胚子発生に伴なう変化を見る場合には、屠殺場で採集した蛔虫を常温で持ち帰つたが、5~8時間以内に解剖して採卵し、直ちに低温に保存した。またこの場合には子宮の下部2~3cm に含まれる虫卵を用いたが、Fairbairn *et al.* (1957) は子宮の下半部から採卵している。

衆知のごとくブタ蛔虫卵の胚子発生には酸素の供給が必要であり、またその最適温度は 31°C とされているが胚子発生が開始されると第2図に示すようにトレハロ-

ースが急激に減少してグリコーゲンが増加する。したがって豚の腸より取り出した蛔虫を 37°C の Ringer 液に保存すると、子宮内においてか、あるいは子宮より採卵し蛋白膜を除去する操作の間に、トレハロースよりグリコーゲンへの変換が若干進行する可能性が考えられる。この点についてはさらに確証が必要であるが、第1表に示した発生開始前(0日)の卵と、第2表の子宮最下端(第1区分)の卵^註との炭水化物が共にトレハロースを主としている点から見ても、また Passey & Fairbairn (1957) の報告でも、発生開始後2.5日目にはグリコーゲンが増加してトレハロースが減少し、本実験の3日目の値に近づく点から考えても、彼等の用いた unembryonated eggs は、少くとも炭水化物代謝に関しては、すでに若干発生を開始した状態にあつたといえよう。

なお Fairbairn *et al.* (1957) の行つたように、子宮の下半部より採卵すると、子宮内の受精卵においてはグリコーゲンよりトレハロースへの変換が子宮の下部 $\frac{1}{3}$ の点に達するまで続くから、本実験におけるように子宮下部2~3cmの部分より採卵した場合に比較して、グリコーゲンが高くトレハロースが低くなる傾向があることも指摘しておく要があらう。

それはさておき、蛔虫卵の初期発生においては、受精卵が成熟分裂を行ないながら子宮を下降している間に、また胚子発生に伴なつて、トレハロースおよびグリコーゲンが変化に富んだ行動を取ることは、発生生理学的にも、比較生化学的にも、きわめて興味深く思われる。

要 約

蛔虫卵の発生にともなう炭水化物の定量を行ない、培養初期以外はほぼ Passey & Fairbairn (1957) と等しい結果が得られた。さらに子宮内卵について、子宮部位による炭水化物および脂肪の変動を測定し、子宮を下降するにつれて、グリコーゲンよりトレハロースの転換が起ることを明らかにした。

稿を終るに当り、御指導御校閲戴きました予研寄生虫部長小宮義孝博士、東京大学教授秋田康一博士、予研寄生虫部柳沢十四男博士に心から感謝致します。

註) 前者では屠殺場より実験室に常温で持参した蛔虫より採血したのに対し、後者では氷冷して持参した蛔虫から氷冷下で採卵した。

参考文献

- 1) Carrol, N. V., Longley, R. W. & Roe, J. H. (1957) : The determination of glycogen in the liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 220, 583-593.
- 2) Fairbairn, D. (1957) : The biochemistry of *Ascaris*. *Exptl. Parasitol.*, 6, 491-554.
- 3) Fairbairn, D. (1958) : Trehalose and glucose in helminths and other invertebrates. *Can. J. Zool.*, 36, 787-795.
- 4) Fairbairn, D. & Passey, R.F. (1957) : The occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. *Exptl. Parasitol.*, 6, 566-574.
- 5) Fauré-Fremiet (1913) : Le cycle germinatif chez *Ascaris megalcephala*. *Arch. Anat. Microscop.*, 15, 435-758.
- 6) Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A. & Lebaron, F. N. (1951) : Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.*, 191, 833-841.
- 7) McMahon, P., von Brand, T. & Roe, J.H. (1956) : Observation of the polysaccharides of aquatic snails. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 50, 219-240.
- 8) Passey, R.F. & Fairbairn, D. (1957) : The conversion of fat to carbohydrate during embryonation of *Ascaris* eggs. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35, 511-525.
- 9) Szejkwowska, G. (1929) : Recherches sur la physiologie de la maturation de l'oeuf d'*Ascaris*. *Bull. intern. acad. polon. sci. Classe sci. math. nat.*, Ser. B., 489-519.

CHANGES IN CARBOHYDRATE CONTENTS DURING EARLY DEVELOPMENT OF ASCARIS EGGS

TAKASHI FUKUSHIMA

(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo, Japan)

1) Carbohydrate metabolism of *Ascaris* eggs in the uterus and in the process of embryonation was studied.

2) The changes in carbohydrate contents during embryonation were found to be essentially similar to those observed by Passey & Fairbairn (1957), although somewhat different results were obtained as regards the initial content of glycogen and trehalose.

3) As fertilized eggs proceeded down the uterus, the carbohydrate contents markedly changed, while the fat content remained almost unchanged.

Glycogen was found to be a predominant carbohydrate in the eggs while they were in the uppermost part of the uterus. By the time the eggs had transversed two-third the length of the uterus, about the half the amount of glycogen disappeared, and the rest was converted into trehalose, although a small amount of glycogen appeared to remain within the eggs.

4) The glycogen content of unfertilized eggs within the uterus was found much higher than that of fertilized eggs, the content of unfertilized eggs differing little whether the eggs were in the upper half of the uterus or in the lower half.