

肺虫駆虫薬 Copper DL-methionine の作用機序

—ブタ肺虫雌雄の呼吸ならびに N 代謝の比較と
それにおよぼす Cu[#] の影響—

小澤 光 佐藤 正 早坂 弘子

東北大学医学部薬品作用学教室

(昭和 39 年 6 月 15 日受領)

緒 論

ブタ肺虫 *Metastrongylus elongatus* の駆虫薬として、小沢ら(1957)は copper-DL-methionine を創製したが、以来、石関(1961, 1962)、小沢ら(1961, 1962, 1963)及び Ozawa *et al.* (1962) によつてブタ肺虫の生理作用ならびに駆虫薬の作用機序の解明がなされて来た。その結果、ブタ肺虫は蛔虫や肝蛭に比べて Q_{O_2} が高く、電子伝達系はチトクローム系で形成され、又含 N 化合物の最終産物はアンモニアである事、ならびに copper-DL-methionine の駆虫効果は主に Cu^{++} によるコハク酸脱水素酵素の活性の阻害や NADH チトクローム c 還元酵素の阻害にある事が判つた。かくして、肺虫の生理作用ならびに copper-DL-methionine の駆虫効果の機序に関する知見は漸次豊富になつて来ている。

しかし、従来肺虫に関する報告は、肺虫の性別に対するの顧慮がなされておらず、性別による生理作用の比較に関する知見は皆無と云つてもよい。従つて、今回著者らは肺虫駆虫薬の作用機序解明の一環として、特に性別個体を用いて、 Cu^{++} の殺虫効果の比較および、主な生理作用としての呼吸ならびにアンモニア形成とそれに対する Cu^{++} の影響を比較検討し、若干の知見を得たのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

ブタ肺虫は、仙台市立中田屠場で入手し、屠殺直後肺虫の寄生している豚の肺から、特に肺気腫と無気肺部を切除して実験室に運び臓器より虫体を採集した。虫体を傷つけないように注意して Ringer 液で 3 回洗浄の後、雌雄のべん別をし、ほぼ同大のものを選んで実験に供した。ブタ肺虫の雌雄別個体は特にその大きさに著しい相異があり、肉眼でも容易に識別可能である。すなわち、

雌個体は体長約 4.5 cm 体重約 5 mg の白色木綿糸状であるのに対し、雄個体は体長約 2.0 cm、体重約 0.5 mg と雌個体の $\frac{1}{10}$ であり、やや透明な糸状の様相を呈している。

2. 実験方法

1) 容器内殺虫試験

ブタ肺虫飼養液として、小沢ら(1962)は Peptone-Ringer 液がよい事を報告しているが、今回の著者らの実験に於ては、Peptone-Ringer 液は腐敗しやすく適当でないので、Ringer 液を飼養液として用いた。又 copper-DL-methionine は水にとけ難く、その駆虫効果は $Cu^{#}$ に負う事が知られている事より、薬物は $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ を用いた。

内径約 4.5 cm の小型シャーレに 10 ml の Ringer 液又は $Cu^{#}$ Ringer 液をとり、10 個体づつ虫体を入れ $37 \pm 1^\circ C$ の恒温器に保つた。実験溶液の種類は、Ringer 液および 1:5,000, 1:50,000, 1:500,000 の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ を含む $Cu^{#}$ Ringer 液の 4 種類を用いた。各実験に 20~30 個体の虫体を用い、1 時間毎に観察を行ない、虫体の 60% が外部からのピンセットによる接触刺激に対して反応しなくなるまでに要する時間をもつて、その虫体の生存時間とした。なお、Ringer 液のみの対照においては、24 時間毎に飼養液を更新した。

2) 吸呼および R.Q. の測定

Warburg の検圧計を用いて行なつた。R.Q. 測定の際は 3 本の検圧計を用いる Warburg の直接法を用いた。飼養液としては Krebs Ringer phosphate 液 pH 7.4 を使い、15 分間振とうし温度平衡の後、 $37.5^\circ C$ 、120 回/min. 振とうで 30 分間の測定結果より O_2 消費量および CO_2 排出量を算出した。虫体数は各容器 3 ml の飼養液中に雌では 10 個体、雄では 50 個体づつを用いた。呼吸に対

する Cu[#] の影響を測定する際には、主室に 2.7 ml の Krebs Ringer phosphate 液と虫体を入れ、中央室には 10 % KOH 0.2 ml 側室には Ringer 液又は 1 : 500, 1 : 5,000, 1 : 50,000 の CuSO₄·5H₂O を含む Cu[#]Ringer 0.3 ml をそれぞれ入れた。予め 30 分間の O₂ 消費を測定した後、側室より Cu[#] を加え、その後の O₂ 消費を 1 時間毎に 3 時間まで 30 分間づつ測定を行なった。なおこの際は、雌個体は用いる 虫体数を 各実験に 15 個体とした。

3) NH₃ の測定

直径 3 cm の共栓付試験管に Ringer 液又は、1 : 5,000, 1 : 500,000 の CuSO₄·5H₂O を含む Cu[#] Ringer 液をそれぞれ 1 ml とり、予めよく Ringer 液で洗浄した虫体を、雌では 5 又は 20 個体、雄では 50 又は 200 個体を試験管に加え栓をし、38°C の恒温器中に 2~3 時間保つ、その後、この試験管中の液を 0.5 ml とり遊離 NH₃ を、Conway の方法を用いて (NH₄)₂SO₄ に変え、indophenol 法を用いて NH₃ の呈色を行ない、光電比色計 (610 mμ) を用いて測定を行なった。

実験結果

1) 容器内殺虫効果

Table 1 に 4~5 回にわたる実験結果が示されている。Cu[#] を含まぬ Ringer 液のみを飼養液として 2~3 日間虫体が生存可能である。これに対して、Cu[#] の殺虫効果はいちじるしく、その濃度に応じて著明に生存時間の短縮が認められる。性別による差異は顕著でなく、対照においてやや雄の生存時間が短く、また、高濃度の Cu[#] による影響がやや大きい傾向が見られる程度に過ぎない。

2) 肺虫の呼吸および R.Q.

肺と云うきわめて O₂ 分圧の大きな部位に寄生虫する寄

Table 1. Anthelmintic activity of various concentration of Cu²⁺ on swine lung worms in culture solution (37±1°C)

	Ringer solution	Concentration of CuSO ₄ ·5H ₂ O		
		1 : 500,000	1 : 50,000	1 : 5,000
No. of Exp.	5	4	4	4
		Survival time* (hrs)		
Male	48~63	11~13	5~7	3~4
Female	48~89	11~12	5~9	4~5

* Time to require 60% of worms to become immobile

生虫として、O₂ 呼吸の盛んな事は注目されていたところであるが、雌雄別個体についての測定結果は Table 2 に見る通りで、特に雄個体の呼吸が雌個体の約 2 倍を示し、きわめて高い酸素呼吸を有する事が分つた。

Table 2. Respiration of *M. elongatus*
Medium : KRP (pH 7.4)
Temp. : 37.5°C (p=0.05)

Sex	No. of experiments	Q _{O₂} (O ₂ ul/mg/hr)	Q _{CO₂} (CO ₂ ul/mg/hr)	R.Q.
Male	6	14.9±2.1	12.7±1.8	0.8~0.9
Female	6	6.8±1.0	5.8±1.1	0.8~0.9

3) Cu[#] の肺虫の呼吸に対する影響

Fig. 1 に、酸素呼吸に対する Cu[#] の影響が示されている。呼吸の割合は、側室より Cu[#] を加える前の O₂ 消費に対する Cu[#] を加えて後の O₂ 消費の割合をもつて表わしてある。図に見られるように、対照の Cu[#] を加えぬ場合も時間とともにやや呼吸の低下が見られるが、Cu[#] を加えた場合は更に著しく呼吸が低下する。最初の 15~30 分間は、Cu[#] によつて幾分呼吸が促進さ

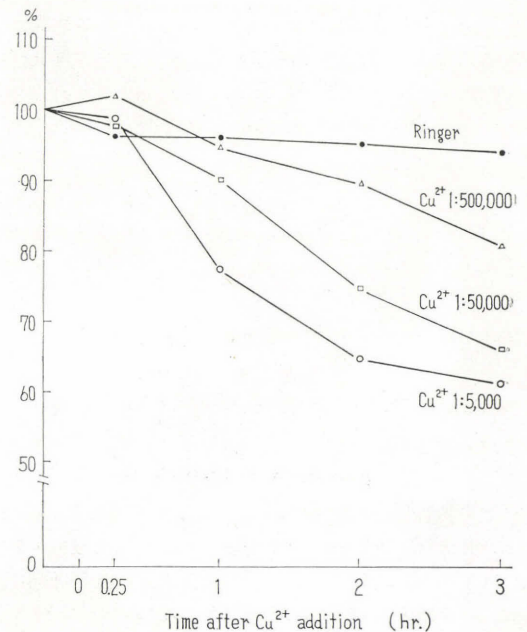


Fig. 1-A Effect of various concentrations of Cu[#] on O₂ uptake of male lung worms

$$\text{Rate of O}_2 \text{ uptake} = \frac{\text{O}_2 \text{ uptake after Cu}^{\#} \text{ addition}}{\text{O}_2 \text{ uptake before Cu}^{\#} \text{ addition}}$$

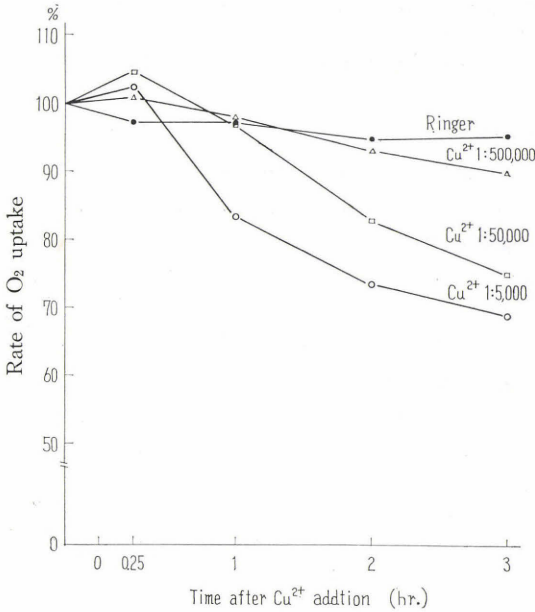


Fig. 1-B Effect of various concentrations of Cu^{2+} on O_2 uptake of female lung worms

れる場合もあるが、その後は徐々に Cu^{2+} の濃度に応じてその阻害効果が顕著になっている。雌雄の差による阻害の程度は、やや雄の方が阻害の割合が大となっているが、あまりその差は著しくない。この結果は 1) に見られた殺虫効果と平行しており、酸素呼吸への Cu^{2+} の阻害効果がその殺虫効果に相当な役割をなしている事を示唆している。

4) NH_3 産生

先に小沢ら(1963)は、ブタ肺虫のN代謝の最終産物は主に NH_3 である事を報告している。測定に先立つて混入微生物の影響を見るために、雌個体のみを用い、0.005%ストレプトマイシン、0.002%デハイドロ酢酸を加えたものと加えぬものについて比較検討を行なった。その結果、この実験条件下では明らかに微生物の影響を無視して差し支えないことが分った。そこで以後は、ストレプトマイシンやデハイドロ酢酸処理をせず実験を行なっている。

雌雄別個体についての測定結果は Table 3 に見られる通りである。ここで注目すべきことは、その NH_3 産生が虫体の密度によつていちじるしく異なる事で、特に雄個体においてそれが明白である。雌雄別による NH_3

Table 3. NH_3 formation of *M. elongatus* in Ringer solution (38°C) (p=0.05)

	A		B	
	Male	Female	Male	Female
Lungworms/ml	50	5	200	20
Incubation time (hrs)	3	3	2	2
No. of experiments	4	4	18	26
Ammonia-N ($\gamma/g^*/hr$)	106.1 \pm 34.8	44.1 \pm 9.4	54.0 \pm 5.8	42.1 \pm 3.7

* Wet weight

Table 4. Effect of Cu^{2+} on NH_3 formation of *M. elongatus* (38°C, 2hrs) (P=0.05)

Culture solution	Male*		Female*	
	No. of exp.	Ammonia-N	No. of exp.	($\gamma/g/hr$)
A { Ringer solution Cu^{2+}	10	45.8 \pm 3.4	10	37.3 \pm 5.8
	4	34.4 \pm 16.4	10	24.7 \pm 6.2
B { Ringer solution I: Cu^{2+}	10	47.8 \pm 4.0	10	35.9 \pm 5.2
	5	27.6 \pm 7.4	5	21.9 \pm 6.1

* Male: 200/ml; * Female: 20/ml

産生量は呼吸における場合と同様に、雄では雌のその約2倍の値が得られている。しかし、高密度では、雄の NH_3 産生はいちじるしく減じるのに反し、雌ではそれ程差がなく、その結果、性別による NH_3 産生量の差はあまり顕著ではなくなる。

5) NH_3 産生に対する Cu^{2+} の影響

NH_3 産生に対する Cu^{2+} の影響は Table 4 に見られる通りである。測定の都合上高密度の虫体についての結果のみが示されている。密度の影響の少ない雌個体について見れば、 Cu^{2+} の濃度に関わりなく一様に約40%の阻害効果が見られ、呼吸や殺虫効果の場合とはやや趣を異にしている。雄個体においてはこれに反して、低濃度ではあまり阻害が認められず高濃度において阻害が見られるが、この場合は 4) に見られた密度の影響が大であり、結果は複雑になっているため、雌雄による比較は困難である。

考 察

先に小沢ら(1960)は、 Cu^{2+} による肺虫の殺虫効果は Cu^{2+} の濃度によつてあまり相異がなく、1:5,000 から 1:500,000 の $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ の濃度におたり生存時間は対照の72時間に対し18~20時間にと一様に短縮する

ことを報告している。これは 27°C という比較的低い温度条件下での実験結果であり、今回行なわれた 37°C での実験では、Cu⁺ の濃度によつて殺虫効果はある程度異なり、対照が 2~3 日間の生存に対し、1:500,000 の CuSO₄ · 5H₂O で約 1/5 に、1:5,000 では約 1/15 にその生存時間は短縮している。このような相異は、温度によつて虫体の生理的条件が相当異なることによるものと考えられる。雌雄別の差は、生存時間としてはあまり顕著ではないが、虫体自身の動きはやや相異が認められた。虫体は Cu⁺ 中では 1) 活発な自働運動 2) 弱い自働運動 3) 自働運動を消失するが外部からの刺激で動く 4) 外部からの刺激でも動かぬ、の 4 つの段階を経過して死に至るが、2) の段階から雄個体では食道部附近からねじれて来、全体として虫体が縮れる傾向にあるのに反し、雌個体ではむしろ虫体が水を吸い、伸び切つた形を呈しやすい。なお、虫体の水分については、1:5,000 の CuSO₄ · 5H₂O を含む Ringer 液中で 1 時間で 8~10 % の体重増加が雌個体を用いて観察された。これは Cu⁺ により明らかに水分代謝が影響される事を示している。Demis *et al.* (1955) はラット横隔膜において、Cu⁺ が横隔膜の表面に作用してグルコースのとりこみを阻害することを報告しているが、上の結果をこの報告と関連させて考えるなら Cu⁺ の作用機序を考える上に興味ある事実である。すなわち、Cu⁺ は主に腸管の表面に附着し徐々に体内に浸透し、その間腸管の表面を通じての物質の移動が影響され、その結果体内水分にも変化を生じ、これが更に雌雄差に応じて形態の相異をもたらしたものと考えられる。

ブタ肺虫が酸素呼吸の盛んなことは、先に石関(1961)により報告されているところであるが、今回の雌雄別個体について測定した結果でも、特に雄個体の酸素呼吸が雌個体のそれに比べていちじるしく盛んである事が判つた。このような差を生じる原因としては、1) 虫体の大きさ 2) 運動性 3) 組織での呼吸能の相異、などがあげられるが、雄個体は体が小さく表面積の割合が大であり、又運動性も活発で、1), 2) とも雄個体が呼吸を盛んにする傾向をもつている。3) については、Sacktor *et al.* (1952) は昆虫のゴキブリの筋肉において、雄の方が雌に比べて高い Q_{o2} を示すのに応じてチトクローム c 酸化酵素の活性が大であることを報告しているが、肺虫におけるこのような事実の存否は今後の研究にまたなければならぬ。R.Q. の値は雌雄とも 0.8~0.9 であり石関(1961)の報告よりも大きな値を得たが、これは測定方

法や測定温度の相異にもとづくと考えられる。今回の実験は、特に寄生部位のブタ肺の温度に近い 37.5°C で実験が行なわれた。

呼吸に対する Cu⁺ の影響は、最初の 15~30 分間は、むしろ阻害作用よりも促進作用の認められる場合もあつたが、その後徐々に、その濃度に応じて Cu⁺ の阻害効果が顕著となる。最初の 15~30 分は lag period と考えられる。実際、Demis *et al.* (1955) はラット横隔膜に対する Cu⁺ の影響を観察し、呼吸への Cu⁺ の阻害効果は lag period をもち、他の物質の透過性への阻害が十分行なわれたのち表われることを報告している。一方 Cu⁺ のとりこみは主に腸管から行なわれることを小沢(1960)は報告しているが、このとりこみの間に Cu⁺ が異物として虫体に刺激的に作用することから、最初の 15 分頃に呼吸に対して促進的に働く場合が観察されたりするのであり、Cu⁺ そのものの作用は、先に石関(1961)や小沢ら(1963)の報告の如く、呼吸に対して阻害的に働くことにあると考えられる。容器内殺虫効果の結果と呼吸に対する阻害の結果は平行的な関係にあり、殺虫効果は主に Cu⁺ の呼吸に対する阻害作用に起因することと考えられる。

NH₃ 産生は虫体の密度によつて影響されやすいことが判つたが、特に雄個体においてこの影響が大である点から考えて、密度による影響は主に O₂ 分圧の影響によるものと考えられる。実際肺虫は、N₂ 気相中で飼養すると 2~3 時間で自働運動を示さなくなるが、再び空気を通じると運動を再開し、O₂ 分圧に対する依存度はきわめて大きな寄生虫であることが判る。NH₃ 産生量は、Rogers (1962) の著書に見られる若干の他の寄生虫の値と大体類似の値を示し、特にブタ肺虫のみに特徴的な点はない。雌雄別による NH₃ 産生量の相異については報告が見当らず、ブタ肺虫特有の現象か否か不明である。

Cu⁺ の NH₃ 産生に対する影響を密度の影響の少ない雌個体の場合について見ると、Cu⁺ の濃度に関わらず約 40 % の一様な阻害が認められるが、この点は上述の容器内殺虫効果や呼吸に対する影響とはいちじるしく異なるところである。Rogers (1962) は回虫において、水分の供給状態に応じて NH₃ 産生から尿素産生へ移行する Fairbairn による報告例を述べているが、このようにその環境条件によつて NH₃ 産生がいちじるしく変動する可能性も考えられる、しかし、肺虫においては条件の変化によつて尿素生成がおこると云う事は不明である。Cu⁺ による影響もその機構は相当複雑なものと考えられ

る。現在の得られた結果よりは、 Cu^{2+} がその濃度に関わらず一様に NH_3 産生を阻害するしくみの解釈は困難であり、さらにこの点に関しては詳細な検討が必要である。

総括

ブタ肺虫 *Metastrongylus elongatus* の雌雄別個体を用いて、 Cu^{2+} の殺虫効果の比較及び呼吸ならびにアンモニア形成とそれに対する Cu^{2+} の影響を比較検討し、下記のような結果を得た。

1) ブタ肺虫は酸素呼吸が盛んであるが、特に雄個体は雌個体の約2倍の Q_{O_2} を示し、酸素呼吸が大である。しかし R.Q. は雌雄ともに 0.8~0.9 である。

2) アンモニア形成は虫体の密度によつて影響されるが、低い密度では雄個体のアンモニア形成は雌個体のその約2倍大である。

3) Cu^{2+} は雌雄肺虫に対してともにその濃度に応じて強い殺虫効果を示す。

4) Cu^{2+} の殺虫効果と呼吸に対する阻害効果とは平行的な関係を有する。

5) アンモニア形成に対する Cu^{2+} の阻害効果は Cu^{2+} の濃度に必ずしも比例しない。

終りにのぞみ、虫体採集に御便宜を戴いた仙台市立中田屠場阿部克己技師をはじめ職員の方々に感謝の意を表します。

文献

- 1) Demis, D. J. & Rothstein, A. (1955): Relationship of the cell surface to metabolism. 12. Effect of mercury and copper on glucose uptake and respiration of rat diaphragm. *Am. J. Physiol.*, 180, 566-574.
- 2) 波多野博行・桐田智子(1962): 生化学領域における光電比色法, 各論 (2), アンモニア. (化学の

領域増刊 34), 南江堂, 41-43, 46-49.

- 3) 石関忠一(1961): 豚肺虫駆虫薬 DL-copper methionine に関する研究, 特に豚肺虫の呼吸におよぼす銅化合物の影響. *日獣医誌*, 23(6), 341-346.
- 4) 石関忠一(1962): 豚肺虫駆虫薬 DL-copper methionine に関する研究, 特に豚肺虫の Homogenate の Succinic dehydrogenase に対する DL-copper methionine の阻害作用. *日獣医誌*, 24(1), 13-17.
- 5) 小沢光・石関忠一・新村宗敏・高仲正・鈴木康雄・玉崎幸二(1957): 豚肺虫症化学療法剤研究, DL-メチオニン銅の基礎実験. *獣医畜産新報*, 208, 619-622.
- 6) 小沢光(1960): 豚肺虫駆虫薬の研究, DL-メチオニン銅の創製とその作用機序. *日本大学創立70年記念論文集* 4, 585-603.
- 7) 小沢光・村越善衛・新村宗敏(1961): ブタ肺虫 (*Metastrongylus elongatus*) の物質代謝に関する研究(第1報), 含窒素化合物の代謝経路について. *薬学雑誌*, 81(12), 1774-1782.
- 8) Ozawa, H., Ishizeki, C. & Niimura, M. (1962): Copper-DL-methionine, a new anthelmintic for swine lung worms. The action of Copper-DL-methionine on lung worms. *Chem. Pharm. Bull.*, 10(10), 975-978.
- 9) 小沢光・福島英明(1963): 肺虫駆虫薬 copper DL-methionine の作用機序, ブタ肺虫の電子伝達系の解明とそれに及ぼす Cu^{2+} の影響. *寄生虫誌*, 12(2), 136-141.
- 10) Rogers, W. P. (1962): The nature of parasitism. Academic Press, New York and London, 287 pp.
- 11) Sacktor, B. & Bodenstein, D. (1952): Cytochrom c oxidase activity of various tissues of American cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 42, 157-160.
- 12) 吉川春寿編(1954): ワールブルク検圧法, (化学の領域増刊 13). 南江堂, pp. 180.

STUDIES ON THE ACTION MECHANISM OF COPPER DL-METHIONINE
AS THE ANTHELMINTIC FOR SWINE LUNG WORMS
COMPARATIVE STUDIES ON THE RESPIRATION AND THE AMMONIA
FORMATION BETWEEN MALE AND FEMALE SWINE LUNG
WORMS, *METASTRONGYLUS ELONGATUS*, IN THE
PRESENCE AND ABSENCE OF Cu^{++}

HIKARU OZAWAM, ASASHI SATO & HIROKO HAYASAKA

*(Department of Chemical Pharmacology, Tohoku University, School
of Medicine, Sendai, Japan)*

Comparative studies on the respiration and the ammonia formation, the effects of Cu^{++} on them, and the anthelmintic activity of Cu^{++} between male and female lung worms were resulted in the following conclusions.

1. Q_{O_2} of lung worms is high, and moreover O_2 uptake of male lung worms is about twice as much higher than that of the female.
2. Effect of the population density on the ammonia formation of the lung worms is observed. At the low population density, the ammonia formation of the male lung worms is about twice as much larger than that of the female.
3. Cu^{++} has high anthelmintic activity equally on both male and female lung worms according to its concentration.
4. Inhibitory effect of Cu^{++} on the respiration of the lung worms has the parallelism with its anthelmintic activity.
5. Inhibitory effect of C^{++} on the ammonia formation of the lung worms does not always accord with its concentration.