

豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響 (1)

林 栄一 寺田 護 高村 省三

静岡薬科大学薬理学教室

(1968年7月31日 受領)

緒 論

回虫と宿主との生存環境は種々の点——酸素圧、炭酸ガス圧、温度、湿度、pH など——で著しく相違している。しかし回虫はそのような環境に巧妙に適応し、それに依存して生存している。ところで宿主の哺乳動物は外的環境の変動に極めて鋭敏な反応を示すのに、回虫では生存環境と異なる *in vitro* においてもかなり長期間の生存が可能である。哺乳動物と回虫では動物分類学上同一にみることはできぬが、回虫のこの生態は興味深いものが感じられる。

著者らは外的環境と回虫との関係に興味を抱き、外的環境の回虫の生態に及ぼす影響、すなわち種々なる環境因子のうち最も重要因子と考えられる酸素圧をとりあげ、これと回虫の生命ひいては代謝機構との関係について追究検討を加えることにした。この場合液中に回虫を保って行う方法では酸素圧の直接的な影響を観察できぬので、著者らは生回虫そのものを気相中に露出して、酸素圧の影響が直接回虫に及ぶという実験法をとった。

この結果、外的酸素圧の変動により回虫の生命は著しい影響を被むるという知見を得た。

実験材料ならびに実験方法

豚回虫(以下回虫)は Tyrode 液で 3 回洗滌、ついで抗生物質 (penicillin 10 万単位+streptomycin 75 mg/l) 添加 Tyrode 液中に浸漬後、活発に運動をしている回虫のみを選び実験に供した。

液相実験体法:「メヂウム」に回虫を浸漬しておき、気相の変化が回虫の生存に及ぼす影響を観察する実験である。「メヂウム」としては前掲抗生物質添加 0.95% 生食水および Tyrode 液 (1% glucose) を用いた。実験にあたってはこの 100 ml に 1 虫の割りに回虫を浸漬させ、通常 7 虫をもって 1 群とし、次の各気相条件下における回虫の生死を観察した。セミ嫌气的環境とは液相面が単に大気と接触している状態、好气的環境とは液中に通気

(aeration) する状態を指す。通気の際の空気は滅菌した水、グラスウールおよび綿球を通し雑菌の除去を行った。また嫌气的環境とは空気をミニバックで 3 分間吸引、減圧により除去後、 $N_2 95\% + CO_2 5\%$ のガスを充填した状態を指す。本実験は $37^\circ C$ フラン器中で行い、「メヂウム」は毎日更新した。

気相実験法:直接回虫を気相中に露出させて各気相の回虫の生存に及ぼす影響を観察する実験である。一定量の 0.95% 生食水で湿潤状態にした汚紙上に、抗生物質添加 Tyrode 液中に 24 時間浸漬した回虫を静置、ミニバックで 1 分 30 秒間吸引、減圧して空気を除去後、以下に示す組成のガスを充填した。

充填ガスの組成

1) 酸素圧 $pO_2 20\% : O_2 20\% + N_2 75\% + CO_2 5\%$, $pO_2 15\% : O_2 15\% + N_2 80\% + CO_2 5\%$, $pO_2 10\% : O_2 10\% + N_2 85\% + CO_2 5\%$, $pO_2 5\% : O_2 5\% + N_2 90\% + CO_2 5\%$, $pO_2 2.5\% : O_2 2.5\% + N_2 92.5\% + CO_2 5\%$, $pO_2 0\% : N_2 95\% + CO_2 5\%$, $pO_2 20\%$ の場合には大気のみを充填した実験をも行った。

2) 炭酸ガス圧 $pCO_2 20\% : CO_2 20\% + N_2 70\% + O_2 10\%$, $pCO_2 10\% : CO_2 10\% + N_2 80\% + O_2 10\%$, $pCO_2 5\% : CO_2 5\% + N_2 85\% + O_2 10\%$ (前出の $pO_2 10\%$ と同条件) $pCO_2 0\% : N_2 90\% + O_2 10\%$ 。

ガス充填後 $37^\circ C$ フラン器中に静置する。ガス、汚紙およびコルベンなどは毎日更新し、また回虫も毎日 $37^\circ C$ 抗生物質添加 0.95% 生食水中に浸漬してよく洗滌した。本実験においても回虫は 7 虫をもって 1 群とした。

以上の液相および気相の両実験とも、効果の判定は、1 群の回虫の半数生存日数を指標とした。また回虫の生死は回虫を $42^\circ C$ の微温湯中に移し、自発運動の有無により判定した。なおこの時、同時に回虫の体色および体腔液色の変化をも観察した。

実験成績

1) 「メヂウム」中の回虫の生存に及ぼす気相の影響

回虫の半数生存期間は 0.95% 生食水中で、気相がセミ嫌氣的（大気）の場合 9 日、嫌氣的（ $N_2 95\% + CO_2 5\%$ ）の場合 10 日であった。また Tyrode 液中で気相がセミ嫌氣の場合 19 日、嫌氣の場合 20 日であった（Fig. 1）。以上の結果は Toru (1935) および Weinland (1901) らの報告、すなわち回虫が「メヂウム」中に浸漬されている場合、その気相が好氣的（著者らのセミ嫌氣的）であっても、また嫌氣的であっても気相に関係なく等しく生存するという結果に一致した。しかるに Tyrode 液中に通気（好氣的）した場合の回虫の半数生存期間は僅かに 4 日であった（Fig. 1）。

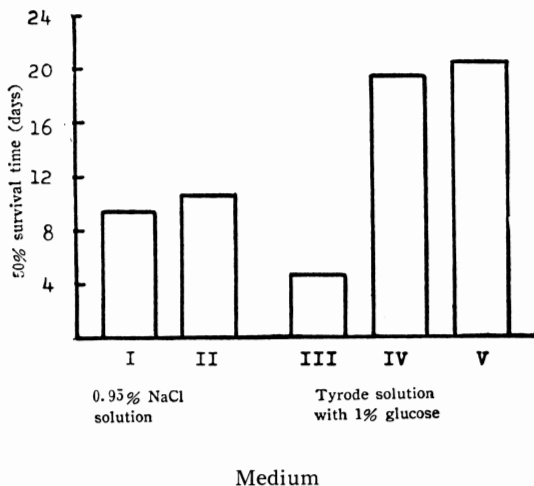


Fig. 1 The effect of O_2 pressure on the survival of *Ascaris* kept in liquid medium.

I and IV: semianaerobic (air)
 II and V: anaerobic ($N_2 95\% + CO_2 5\% v/v$)
 III : aerobic (aeration)

2) 気相中の回虫の生存に及ぼす炭酸ガス圧と酸素圧の影響

a) 炭酸ガス圧の影響

気相中の酸素圧を $pO_2 10\%$ と一定にしておき、炭酸ガス圧を 20, 10, 5, 0% と 4 段階に分け、回虫の生存に及ぼす影響を観察した。成績は Fig. 2 に示されている如く $pCO_2 5\% > 10\% > 0 = 20\%$ の順で、 $pCO_2 5\%$ の条件が回虫の生存にとり好適のようであった。しかし炭酸ガス圧の変動はそれ程大きな影響を回虫に与えぬようである。この結果にもとづき以後の酸素圧の実験には炭酸ガス圧を 5% とした気相を用いることにした。

b) 酸素圧の影響

$pO_2 20, 15, 10, 5, 2.5, 0\%$ ($pCO_2 5\%$) の 6 段階の気相中における回虫の半数生存期間は $pO_2 2.5\%$ および 5% の場合最も長かった。すなわち $2.5 = 5\% > 10\% > 15\% > 0\% \geq 20\%$ のごとくであった（Fig. 2）。但し大気の場合は $pO_2 20\%$ ($pCO_2 5\%$) の場合より僅かに早く死亡した。以上の結果から試験管内における好適な酸素圧は宿主の小腸内圧に近似したものであることがわかった。

c) 酸素圧と回虫体色およびその体腔液色との関係

各種の酸素圧気相中に回虫を保った場合、酸素圧の変化に応じて、回虫体壁およびその体腔液の色調が変化した。 $pO_2 5\%$ では正常体色が僅かに褪せる程度であるが、酸素圧が高くなるにしたがって、最初は尾端の黄色化のみであったのが、漸次虫体の半分にも及び、甚だしい場合には全体に波及した。

体腔液色（正常では淡赤色）も酸素圧の上昇とともに淡黄褐色へと変色した。

その他著明な所見として酸素圧が高くなると、口腔部に潰瘍状の変化が認められた。

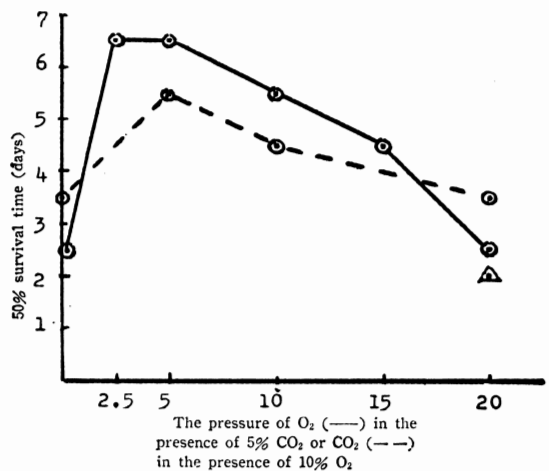


Fig. 2 The effect of O_2 and CO_2 pressure on the survival of *Ascaris* exposed to gas phase.

考 察

回虫と O_2 との関係については多くの報告がある。古くは Bunge (1890), Slater (1925) らが、回虫が生存するために適量の O_2 の必要性を指摘しており、ついで近年になって Laser (1944) が回虫の好氣的代謝につい

て詳細な研究を行った結果、 O_2 の回虫における役割が一応明らかにされた。すなわち回虫は小腸内環境とほぼ等しい pO_2 5% の如き低酸素圧下でも O_2 消費を行なうこと且つ O_2 負借も認められることより、回虫は O_2 を必要とすることを示唆し、ついで回虫における O_2 消費量は酸素圧に依存し、酸素圧が上昇するにしたがい O_2 消費量も増大する。そして pO_2 100% のような高分圧の場合、一層 O_2 消費量は増大して H_2O_2 が形成されるとしている。そしてこの O_2 を利用する経路として flavoprotein を介する succinic oxidase system を推定した。一方 Bueding & Charms (1952) および Rathbone (1955) 以後の研究から回虫のエネルギー獲得が嫌氣的代謝によるという説が提唱された。すなわち O_2 の利用できる環境下では O_2 を electron acceptor として H_2O_2 を生成する succinic oxidase activity を示し、一方低酸素圧下 (pO_2 5%) では fumarate を electron acceptor とする NADH oxidase activity を示す flavoprotein の electron transport system が提唱された (Bueding, 1963; Saz & Bueding, 1966)。

かくして生理的環境下では O_2 はなんらの意義を示さないという嫌氣説が支配的となった。

以上の諸家の研究を通覧して、生理的環境下において O_2 の果す役割については未だ明らかでないという印象を受ける。しかし回虫の生存は完全嫌氣下で著しく阻害されるという事実から、生理的な正常代謝機構に何らかの形で関与しているのではなからうかと疑念をもつのである。そこで O_2 が回虫の代謝において果す役割を再検討しようと考えた。第一段階の実験として、生きている回虫そのものの生命が O_2 によって如何なる影響を被むるものであるかという極めて素朴な基本的問題に本研究の出発点を置いた。

1) 回虫は好氣的であれ、嫌氣的であれ「メヂウム」中では等しく生存するという Toru (1935) らの実験成績を追試確認する意味で第一の実験を行った。すなわち回虫を「メヂウム」(Tyrode 液または 0.95% 生食水)中に保ち、気相をセミ嫌氣(大気)および嫌氣(N_2 95% + CO_2 5%)として生存期間の長短を検討した。

この結果「メヂウム」の条件としては、Tyrode 液の方が生食水よりもより好適であり、且つ環境気相の相違は回虫の生存にはほとんど影響を与えぬことがわかった。一方「メヂウム」中に空気を導通するという条件(好氣的)では著しくその生存期間は短縮された。

Tyrode 液が生食水よりも好適な結果の得られた理由

として栄養成分の差と pH との 2 つの要因が考えられる。石崎・板東(1957)の実験——McIlvain および Menzel の緩衝液で緩衝化された各種の pH を示す 0.95% 生食水中における回虫の生存を観察——によると、その最適 pH は 6~10 であった(「メヂウム」は 48 時間ごとに更新)という知見を参考にして著者らの今回の実験を吟味すると、Tyrode 液 (pH 8.0) 中で 24 時間回虫を飼養後の pH は 6.5、生食水 (pH 5.5) 中での 24 時間後の pH は 4.5 であった。この結果を石崎らの成績から判断するならば生食水の pH は明らかに不適 pH であるから生食水は栄養組成および pH の点で Tyrode 液より劣る「メヂウム」と考えられる。pH が酸性域に傾くと回虫にとり何故不適当な環境となるかについての理由は明らかではないが、著者らは catalase 活性に関連させて考えてみることにした。回虫における catalase 活性は哺乳動物のそれに較べると約 1/500 という極めて弱い活性しか示さぬという報告 (Magath, 1918) があるが、一応定量可能な catalase は含有されている。回虫の catalase 活性の最適 pH は 5~9 の間で、pH が 5 以下ではその活性は低下する(未発表データ)。したがって回虫における H_2O_2 の生成量がたとえ微量であっても、漸次 H_2O_2 の蓄積をきたし、これが回虫に有毒に作用して、その死を早めるのでなからうかと推定している。

次に気相が嫌氣的であっても、またセミ嫌氣的であっても等しく生存するという点についてであるが、現在のところこれに対する理由を明らかにするような報告は見当たらない。ここで回虫の呼吸形式をみるに、回虫には呼吸器はなく、体表面や口腔から透過吸収される微量の O_2 が呼吸代謝に関与するのではないかと考えられる。ところで気相を完全嫌氣にした場合「メヂウム」中における当初の残存溶存酸素はほぼセミ嫌氣下の場合と同じく 0.5 v/v% である。嫌氣的気相下では回虫の存在により溶存酸素は漸次減少を辿る。しかし液中から完全には消失せず、回虫の必要とする程度の O_2 はほぼ充足できるのでないかと思われる。したがって本実験におけるような条件下では環境気相の影響をほとんど被むらないのでなからうか。

次に「メヂウム」中に通気(好氣的)した場合であるが、この場合、 O_2 が絶えず回虫体に接触するから、回虫の O_2 消費量が増加し、 O_2 過剰状態に陥りその死が早まるのでなからうかと考えられる。過剰 O_2 が有毒的に作用するという事は先の Laser らの報告に照して、多分 H_2O_2 の過剰生成に基づくと考えられる。

2) 次に回虫を気相中に露出させておいて炭酸ガス圧ないし酸素圧の影響が直接回虫に及ぶという方法によって CO_2 ないし O_2 の回虫に対する影響を求めた。

a) CO_2 は回虫の代謝過程において極めて重要な役割を果しており (Saz & Hubbard, 1957; 大家, 1959; Harpur, 1962; Saz & Bueding, 1966) また小腸内の炭酸ガス圧はかなり高くその変動も大きいのであるが、回虫が生存するための重要な因子でなかろうかと思われる。それで炭酸ガス圧の回虫の生存に及ぼす影響を各種の炭酸ガス圧のもとで検討した。結局 pCO_2 5% が回虫の生存にとって最も好適なガス圧であること、しかも炭酸ガス圧が 20% に上昇しても、これに相当する酸素圧の変動よりも、その生存に大きな影響を与えぬようであった。

b) 一方酸素圧の方の結果では生理的環境 (小腸内) の酸素圧に近い pO_2 2.5~5% 下で最も長く生存し、酸素圧が上昇するにしたがい生存期間の一層の短縮がみられた。

酸素圧と O_2 消費量との関係についての Laser の報告を参考にして考えるならば、高酸素圧下では O_2 消費量が大きくなり H_2O_2 の生成が促進され、これが回虫に有毒に作用してその死を早めるものと思われる。

また本実験では pO_2 0% においても生存期間の著しい短縮がみられた。無酸素環境下においては回虫の体内保有酸素 (O_2 親和性の強いヘモグロビンと結合) が欠乏することが死を早める原因ではなかろうかと思われる。

3) pO_2 5% においてはほとんど変化がみられなかった回虫の体色および体腔液色が、酸素圧の上昇に応じて変色を示すという現象も結局は O_2 消費の増加による H_2O_2 の過形成に基くと推定している (未発表)。

結 論

「メヂウム」ならびに気相下において酸素圧の変化と回虫の生存期間との関係についての実験を行った。その結果得られた知見は次の如くである。

1) 液相実験において

a) 「メヂウム」を Tyrode 液とした場合、回虫の半数生存期間は気相がセミ嫌気 (大気) では 19 日、嫌気 (N_2 95% + CO_2 5%) では 20 日であった。また「メヂウム」を 0.95% 生食水とした場合、セミ嫌気下では 9 日、嫌気下では 10 日であって気相酸素圧の相違は液中の回虫の生存に特に影響をもたらさなかった。

b) Tyrode 液中に通気した好気的環境下では半数生存期間はわずかに 4 日であった。

2) 気相実験において

a) 炭酸ガス圧と回虫の半数生存期間との関係では、 pCO_2 5% の場合に最も長く生存し pCO_2 0% および 20% では生存期間は短縮された。

b) 酸素圧と回虫半数生存期間との関係では pO_2 2.5 および 5% の場合に最も長く生存し、酸素圧が上昇するにしたがい生存期間は短縮された。また pO_2 0% でも生存期間は著しく短縮された。

c) 酸素圧の上昇にしたがい回虫の体色および体腔液色に変化が生ずるのが認められた。

本論文の要旨は第37回日本寄生虫学会総会において発表した。

文 献

- 1) Bueding, E. and Charms, B. (1952): Cytochrome c, cytochrome oxidase and succinoxidase activities of Helminths. *J. Biol. Chem.*, 196, 615-627.
- 2) Bueding, E. (1963): Electron transport and fermentations in *Ascaris lumbricoides*. Control mechanisms in Respiration and Fermentation, the Rondon Press Company, New York, 167-177.
- 3) Bunge, G. (1890): *Hoppe-Seyl. Z.* 14, 318.
- 4) Harpur, R. P. (1962): Maintenance of *Ascaris lumbricoides in vitro*: A biochemical and statistical approach. *Can. J. Zool.*, 40, 991-1011.
- 5) 石崎 達・板東丈夫 (1957): 蛔虫飼養液 pH の研究及び抗生物質並びに抗黴剤とくに D H A 添加による生存日数及び正規前進運動期間の延長について。寄生虫誌, 6, 47-56.
- 6) Laser, H. (1944): Oxidative metabolism of *Ascaris suis*. *Biochem. J.*, 38, 333-338.
- 7) Magath, T. B. (1918): The catalase content of *Ascaris* serum, with a suggestion as to its role in protecting parasites against the digestive enzymes of their hosts. *J. Biol. Chem.*, 33, 395-400.
- 8) 大家 裕 (1959): *Ascaris lumbricoides var suis* の筋肉による malic acid の酸化的脱炭酸およびその他の T C A cycle 中間代謝基質の酸化について。寄生虫誌, 8, 29-43.
- 9) Saz, H. J. and Hubbard, J. A. (1957): The oxidative decarboxylation of malate by *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 225, 921-932.
- 10) Saz, H. J. and Bueding, E. (1966): Relationship between anthelmintic effects and biochemical and physiological mechanisms. *Pharmacological review*, 18, 871-894.

- 11) Slater, W. K. (1925): *Biochem. J.*, 19, 604.
 12) Toru, Y. (1935): Contribution to the physiology of the *Ascaris* 3. Survival and glycogen content of the *Ascaris*, *Ascaris megalocephala*. *Cloq. Sci. Recpts. Tohoku Univ.*, 4, 361-375.
 13) Weinland, E. (1901): Über kohlenhydratzersezung ohne Sauerstoffaufnahme bei *Ascaris*, einen tierischen Gärungsprozess. *Z. Biol.*, 42, 55-90.

Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF *ASCARIS LUMBRICOIDES* VAR. *SUUM* (1)

EIICHI HAYASHI, MAMORU TERADA AND SHOZO TAKAMURA
 (Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical
 Sciences, Shizuoka, Japan)

The influence of oxygen pressure, a supposedly most important factor among the environmental conditions, on the survival time of *Ascaris lumbricoides* var. *suum* was investigated *in vitro* with or without liquid media. The results obtained are summerized as follows,

1. The experiment in liquid phase

When the worms were kept at 37° in Tyrode solution, 50% of them survived 19 days under semianaerobic condition (gas phase: atomosphere, pO₂ 20%, static incubation) and 20 days under anaerobic condition (gas phase: N₂ 95%+CO₂ 5%). If the Tyrode solution was aerated (aerobic condition), however, the 50% survival time was found only 4 days.

The use of 0.95% NaCl as medium instead of Tyrode solution reduced the time by about 50% in semi- or anaerobic incubation.

It is clear from these results that the survival time of *Ascaris* is not so affected by the variation of oxygen pressure of gas phase unless the culture medium is not aerated.

2. The experiment in gas phase

The worms were kept at 37° in flasks free of liquid medium under varied gas phases with various combinations of CO₂ and O₂, each of them ranging from 0 to 20%. The longest survival time was observed when they were kept under 5% CO₂ (in the presence of 10% O₂), or 2.5 and 5% O₂ pressures (in the presence of 5% CO₂) comparable to the oxygen pressure in the host's intestine. As the O₂ pressure increased the changes in the color of the body surface and body fluid of the worm have appeared.

These results are tempting us to think that pressure of excess oxygen may exert an toxic effect on the worms.