

## 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(3)

### 豚回虫の体色および体腔液色ならびに

### ヘモグロビンに及ぼす酸素圧の影響

林 栄 一 寺 田 護

(静岡薬科大学薬理学教室)

(昭和45年5月15日 受領)

#### 緒 論

豚回虫(以下回虫)の生態と外的環境,特に酸素分圧(以下酸素圧,  $pO_2$ )との関係についての一連の研究において,回虫の生存には低酸素圧(微量  $O_2$  の存在)下での環境が高酸素圧下ないし無酸素下での環境よりもより有利であることを明らかにした(林ら, 1968; 林・寺田, 1969).

これらの知見から,回虫は低酸素圧下では吸収される微量  $O_2$  を利用して  $H_2O_2$  を生成し,この  $H_2O_2$  を cytochrome c peroxidase を含む cytochrome 系および catalase により適宜利用,処理することにより,長期間にわたり生命を維持しうること,

高酸素圧下では,これらの酵素活性を凌駕する  $H_2O_2$  が生成されるため,一方 KCN および  $NaN_3$  作用下では,これらの酵素活性が阻害されるため,  $H_2O_2$  が過剰に蓄積し,この  $H_2O_2$  が一方では細胞毒となつて回虫の生存を脅かし,他方では回虫ヘモグロビン(以下回虫ヘモ)を酸化分解して,体色および体腔液色に変化を惹起させること,

また,無酸素下では,呼吸系の機能が作動しなくなるために生存が阻害されることなどの諸推察がなされた。

結局,回虫の生存は環境酸素圧に依存するのであるが,環境酸素圧が回虫の生存を左右するのは,吸収  $O_2$  量と生成  $H_2O_2$  量およびその利用と処理量との量的関係に基因すると思われる。

ところで高酸素圧下ないし KCN および  $NaN_3$  作用下で回虫を飼育した際,回虫の体色および体腔液色に注目すべき変化が惹起されることを先に報告した(林ら, 1968; 林・寺田, 1969)。この変化は蓄積された  $H_2O_2$  による回虫ヘモの酸化分解に関連して惹起されるもの

ではなかろうかと考えられた。

そこで,体色などの変化と回虫ヘモの性状の変化との関係について検討を加えるならば回虫体内で生成されるであろう  $H_2O_2$  量の推定が可能になり,  $H_2O_2$  と関連した回虫の生死の関係を一層明確化できると考えられる。

本論文では,各種の条件下での回虫の体色および体腔液色の変化と回虫ヘモとの関係について検討を加えたので報告する。

#### 実験方法

##### 1) 豚回虫 (*Ascaris lumbricoides suum*)

前報(林ら, 1968)に準拠して入手,処理した回虫を使用した。

##### 2) 豚回虫体腔液ヘモグロビン標本

回虫の尾端を切開し,滴下する体腔液を集めた。正常の回虫の体腔液は淡赤褐色澄明であつた。黄濁化した体腔液は遠心操作により澄明化した。なお体腔液は目的に応じ,原液,終濃度2倍ないし1.33倍希釈液を用いた。希釈にはM/15リン酸緩衝液(pH 7.0)を用いた。

##### 3) 家兎溶血液ヘモグロビン標本

採血した家兎血液を先ず精製水で溶血させ, M/15リン酸緩衝液(pH 7.0)で終濃度が200倍ないし250倍になるように希釈した。

##### 4) 豚回虫筋束標本

回虫を側線に沿って切開し,腸管,生殖器などを除去後,カミソリ刃で表皮層から筋肉層を分取し,実験には子宮孔から尾部数 cm (1g 相当)のものを生食水で数回洗浄後用いた。

##### 5) 液相実験法および気相実験法

前報(林ら, 1968, 林・寺田, 1969)に準拠した方法で行つた。

- 6) 体腔液ヘモグロビンの分光学的測定法  
日立 EPS-2 U 型自記分光光度計によって行った。
- 7) 豚回虫筋束による  $H_2O_2$  生成量の測定法  
Thunberg 法によつた (実験成績の項参照)。
- 8) 実験に用いた試薬は市販特級品を使用した。

### 実験成績

#### 1. 回虫の体色, 体腔液色および体腔液ヘモグロビンに及ぼす酸素圧の影響

##### A. 回虫体色

セミ嫌気 (気相:  $N_2$  95% +  $CO_2$  5%) 下, Tyrode 液中で飼育した回虫は24時間後に全体が黄色化し, 20.5日後 (50%斃死日) でも同様であつた。この黄色化は新鮮空気と接触することにより正常体色 (淡紅色) に復した。セミ好気 (気相: 大気) 下の場合では, 24時間後の体色には変化が生じなかつたが, 19.5日後 (50%斃死日) では尾端部が稍黄白色化した。飼養液中に通気した場合 (好気) では24時間後の体色に変化は生じなかつたが, 4.5日後 (50%斃死日) では全虫体が黄白色化した。

次に気相中に保つた回虫は,  $pO_2$  0% 下では24時間後に全体が黄色化し, 2.5日後 (50%斃死日) でも同様であつた。この黄色化は新鮮空気との接触により正常体色に復した。 $pO_2$  2.5~5%, 10%および15%下では24時間後の体色には変化が生じなかつたが, 50%斃死日 ( $pO_2$  2.5~5% : 6.5日,  $pO_2$  10% : 5.5日,  $pO_2$  15% : 4.5日) では尾端部ないし体後半部にかけて黄白色化が生じた。 $pO_2$  20%下では24時間後の体色には変化が生じなかつたが, 50%斃死日 (2.5日) では全虫体に黄白色化が生じた。なお本実験で酸素圧が高い条件下に2~3日置かれた回虫の口腔部に潰瘍の発生が認められた。

##### B. 回虫体腔液色

A.の実験で回虫体色に黄白色が生じた場合, ほとんど時期を同じくして体腔液色 (正常では淡赤褐色澄明) は淡黄褐色ないし淡黄色に変化した。この変化は酸素圧が高い程著明となつた。また体色の黄白色化に先行して体腔液は黄濁化した。体色の黄色化の場合には, この黄濁化は認められず, また体腔液色にも変化が生じなかつた。

##### C. 回虫体腔液ヘモグロビン

A.およびB.の実験で認められた回虫の体色および体腔液色の変化は恐らく回虫体ヘモグロビン (回虫ヘモ) の酸化分解に基因した変化であろうと考え, 各種実験条件下における回虫体腔液ヘモグロビン (以下体腔液ヘモ) の変化を分光学的に観察した。

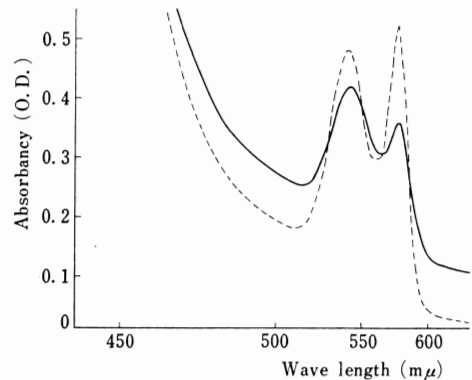


Fig. 1 Absorption spectra of oxyhemoglobin.  
— *Ascaris* perienteric fluid hemoglobin (2-fold perienteric fluid)  
..... rabbit blood hemoglobin (250-fold hemolysate)

正常体腔液ヘモ (屠場で入手後37°CのTyrode液中に数時間保つた回虫より採取) は578 $m\mu$  ( $\alpha$ 帯), 541~3 $m\mu$  ( $\beta$ 帯) および412~3 $m\mu$  ( $\gamma$ 帯またはSoret帯) に吸収極大を示し,  $\alpha$ 帯よりも $\beta$ 帯の吸収極大のピークが大であつた (Fig. 1)。対照の家兎溶血液ヘモグロビン (以下家兎溶血液ヘモ) は577 $m\mu$  ( $\alpha$ 帯), 541 $m\mu$  ( $\beta$ 帯) および414 $m\mu$  ( $\gamma$ 帯) に吸収極大を示し,  $\alpha$ 帯が $\beta$ 帯よりも大であつた (Fig. 1)。

セミ嫌気 (気相:  $N_2$  95% +  $CO_2$  5%) 下およびセミ好気 (気相: 大気) 下, Tyrode 液中で4日間飼養した回虫の体腔液ヘモの吸収曲線には異常は生じなかつた (体腔液色は正常, Fig. 2)。しかし好気 (通気) 下で4.5日後 (50%斃死日) の体腔液ヘモでは $\alpha$ および $\beta$ 帯ともに痕跡をとどめる程度であつた (体腔液色は淡黄色, Fig. 2)。

次に回虫を気相中に保ち  $pO_2$  0% ( $N_2$  95% +  $CO_2$  5%) 下60時間後 (50%斃死時間) の体腔液ヘモの吸収曲線には異常は生じなかつた (体腔液色は正常, Fig. 2)。 $pO_2$  10% ( $N_2$  85% +  $O_2$  10% +  $CO_2$  5%) 下36時間後 (100%生存) では,  $\alpha$ および $\beta$ 帯に異常は生じなかつたが630 $m\mu$ にmethemoglobin (以下Met Hb) の生成を示す肩が認められた (体腔液色は正常, Fig. 2)。ついで130時間後 (50%斃死時間) では体色が黄白色化しているので,  $\alpha$ および $\beta$ 帯はほとんど消失していると考えられる。 $pO_2$  20% (大気) 下60時間後 (50%斃死時間) では,  $\alpha$ および $\beta$ 帯はほとんど消失し, Soret帯を残すのみであつた (体腔液色は淡黄色, Fig. 2)。

2. KCN および  $NaN_3$  作用下の回虫の体色, 体腔

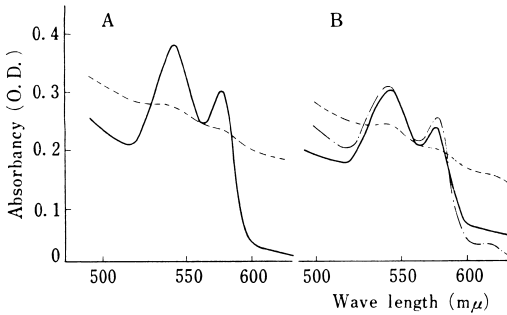


Fig. 2 Absorption spectra of perienteric fluid hemoglobin of *Ascaris* kept in liquid medium or exposed to gas phase.

- A The worms were kept in Tyrode solution  
 — : under semianaerobic or semiaerobic condition for 4 days  
 ···· : under aerobic condition for 4.5 days  
 B The worms were exposed to the following gas phases.  
 — : pO<sub>2</sub> 0% for 60 hrs.  
 - - - : pO<sub>2</sub> 10% for 36 hrs.  
 ···· : pO<sub>2</sub> 20% for 60 hrs.

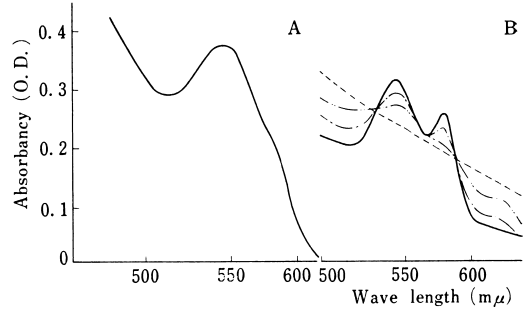


Fig. 3 Absorption spectra of perienteric fluid hemoglobin of *Ascaris* treated with KCN or NaN<sub>3</sub> under various oxygen pressures without medium.

- A The worms were treated with KCN  
 — : incubated under pO<sub>2</sub> 15 and 20%, at death and 6 hrs. after death  
 - - - : incubated under pO<sub>2</sub> 5%, at death  
 B The worms were treated with NaN<sub>3</sub>  
 — : incubated under pO<sub>2</sub> 5%, at death  
 - - - : incubated under pO<sub>2</sub> 10%, at death  
 ···· : incubated under pO<sub>2</sub> 20%, at death  
 ···· : incubated under pO<sub>2</sub> 20%, 6 hrs. after death

#### 体色および体腔液ヘモグロビンに及ぼす酸素圧の影響

##### A. 回虫体色

1 mM KCN 含有生食水中および 1 mM KCN 含有生食水中に 12 時間浸漬後各種の酸素圧下の気相中に移した回虫の体色は斃死時においても、また斃死数時間後においても、肉眼的に認めうる変化は生じなかった。

次に NaN<sub>3</sub> は KCN と異なり、その濃度、pH、酸素圧などの相異で体色の変化の現われかたがさまざまであった。たとえば、0.085 mM NaN<sub>3</sub> 含有生食水中に 6 時間浸漬後各種の酸素圧下の気相中に移し斃死時の体色の変化をみると、pO<sub>2</sub> 5% 下 (50% 斃死: 28 時間) ではほとんど変化なく、pO<sub>2</sub> 10% 下 (50% 斃死: 22.5 時間) で尾端部が黄白色化、pO<sub>2</sub> 20% 下 (50% 斃死: 11.5 時間) で体後半部に黄白色化が認められた。斃死数時間後では pO<sub>2</sub> 5% 下で尾端部に黄白色化、pO<sub>2</sub> 10~20% 下では斃死時の黄白色化は一層拡大した。

##### B. 回虫体腔液

KCN 作用下の場合、斃死時でも斃死数時間後でも体腔液色は淡赤橙色で、正常の淡赤褐色に類似した色調であった。この場合も斃死に先行して体腔液には黄濁化がみられた。

NaN<sub>3</sub> 作用下の場合、体色が部分的に黄白色化した時点の体腔液色は淡黄褐色、虫体全体が黄白色化した時点ではほぼ淡黄色であった。

この場合も体色の黄白色化ないし斃死に先行して、体腔液には黄濁化がみられた。

##### C. 回虫体腔液ヘモグロビン

KCN 作用下で斃死直後の体腔液ヘモは 445 mμ に吸収帯を示した (Fig. 3)。これは家兔溶血液ヘモに赤血塩と KCN を作用させて生ずる cyanmethemoglobin (以下 CN-Met Hb) の吸収帯と同一であった。斃死数時間後においても同様な吸収帯がみられた。

一方 NaN<sub>3</sub> 作用下で、体色に未だ変化がみられない時点の体腔液ヘモの吸収曲線は正常とほぼ同じであった (Fig. 3)。体色が部分的に黄白色化した時点では、543 mμ および 579 mμ の吸収極大はかなり低下し、635 mμ に肩がみられた (Fig. 3)。全虫体が黄白色化した時点では、Soret 帯のみが認められた (Fig. 3)。この変化は、NaN<sub>3</sub> で catalase 活性を阻害した家兔溶血液ヘモに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (終濃度 1 mM) を作用させた場合に生ずる吸収曲線に類似していた。

#### 3. 回虫体腔液ヘモグロビンに対する KCN および NaN<sub>3</sub> の作用

1. および 2. の実験において、回虫の体色および体腔液色は酸素圧とか KCN ないし NaN<sub>3</sub> により著明な変化を受け、しかもその際体腔液ヘモの分光学的性状も変化を受けることを明らかにした。

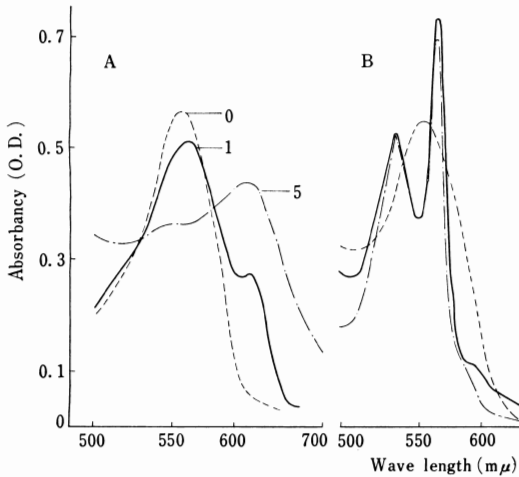


Fig. 4 Effect of KCN on the deoxygenated hemoglobin.

A rabbit deoxygenated hemoglobin 200-fold hemolysate was treated with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  and 50 mM KCN. The numbers in the figure indicate the incubation time in hours.

B *Ascaris* perienteric fluid deoxygenated hemoglobin

..... : treated with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  (deoxygenated hemoglobin)

--- : treated with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  and KCN (CN-hemoglobin)

— : CN-hemochromogen

ここでは体腔液へモに直接 KCN および  $\text{NaN}_3$  を加えても生体の場合におけると同様な変化が生ずるか否かについて検討を加えた。

#### A. 家兎溶血液ヘモグロビン (鮮紅色)

回虫体腔液へモとの比較対照のため、家兎溶血液へモに対する KCN および  $\text{NaN}_3$  の影響を先ず検討した。

$\text{NaN}_3$  ( $5 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 作用下の家兎溶血液へモは酸素化型 ( $\text{HbO}_2$ ) および還元型 ( $\text{Hb}$ ,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  で還元) のいずれでも分光学的な性状の変化はみられなかった。

KCN ( $5 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 作用下では、 $\text{HbO}_2$  は変化を受けなかったが、 $\text{Hb}$  は変化を受けた。すなわち作用1時間後では  $\text{Hb}$  の  $556\text{m}\mu$  の吸収帯は  $563\text{m}\mu$  に移動し、同時に  $620\text{m}\mu$  に小さな吸収帯が生じた。時間の経過とともに血液の色調は徐々に青緑色 (安定) となり、5時間後では  $620\text{m}\mu$  の吸収帯は一層大きくなり、 $550\sim 560\text{m}\mu$  の吸収帯は肩を示すのみとなった (Fig. 4)。

#### B. 回虫体腔液ヘモグロビン (淡赤褐色)

$\text{NaN}_3$  ( $5 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 作用下では、家兎の場合と同様に  $\text{HbO}_2$  および  $\text{Hb}$  ともに変化を受けなかった。KCN

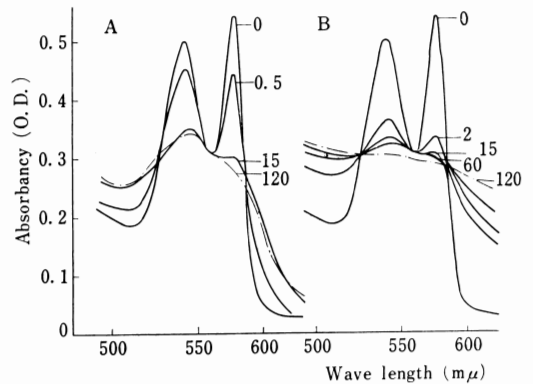


Fig. 5 Effect of  $\text{H}_2\text{O}_2$  on rabbit hemoglobin treated with KCN or  $\text{NaN}_3$ .

A 250-fold hemolysate was treated with 2 mM KCN and 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

B 250-fold hemolysate was treated with 2 mM  $\text{NaN}_3$  and 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

The numbers in the figure indicate the incubation time in minutes.

( $5 \times 10^{-2}\text{M}$ ) 作用下でも  $\text{Hb}$  のみが変化を受けた。 $\text{Hb}$  の  $553\text{m}\mu$  の吸収帯は KCN 添加直後に  $534\text{m}\mu$  および  $564\text{m}\mu$  に移動し、体腔液の色調は淡赤色 (安定) となった (Fig. 4)。この  $\text{Hb}$  の変化は家兎溶血液の場合と少々相異していた。この KCN による反応生成物は黒田(1960)の報告している CN-hemoglobin (CN-Hb) と同一と考えられる。CN-Hb は回虫体腔液の CN-hemochromogen の吸収帯の位置と類似しているが、後者には更に  $590\text{m}\mu$  にも吸収帯の肩が認められることから、CN-hemochromogen と異っている (Fig. 4)。

#### 4. KCN および $\text{NaN}_3$ 処理体腔液ヘモグロビンに対する $\text{H}_2\text{O}_2$ の作用

##### A. 家兎溶血液ヘモグロビン

$\text{NaN}_3$  (2 mM) で catalase 活性を阻害した家兎溶血液へモに  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) を滴加すると、 $\alpha$  および  $\beta$  帯のピークは直ちに低下し、 $\alpha$  帯のピークは  $\beta$  帯よりも低下した。時間の経過とともに両帯は消失し、Soret 帯を残すのみとなった (Fig. 5)。この間の血液の色調は鮮紅色→淡赤褐色→淡黄褐色→淡黄色と変化した。

一方 KCN (2 mM) 作用下の家兎溶血液へモに  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) を滴加すると、最初は  $\text{NaN}_3$  の場合と同様の変化を生じた。しかし時間の経過とともに  $545\text{m}\mu$  に CN-Met Hb の吸収帯が生じ安定した (Fig. 5)。この間の血液の色調は鮮紅色→淡赤褐色→(淡黄褐色)→淡赤褐色と変化した。ここで生じた CN-Met Hb の吸収帯

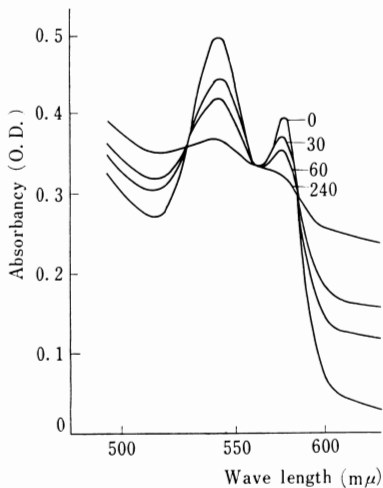


Fig. 6 Effect of  $H_2O_2$  on *Ascaris* perienteric fluid hemoglobin treated with  $NaN_3$ .

1.33-fold perienteric fluid was treated with 2.5 mM  $NaN_3$  and 125 mM  $H_2O_2$ .

The numbers in the figure indicate the incubation time in minutes.

のピークは、同一濃度の家兎溶血液ヘモに赤血塩と KCN とを加えて得られる CN-Met Hb のピークよりかなり低いので、恐らくは、家兎溶血液ヘモの一部分のみが CN-Met Hb に変化した結果によるものと考えられる。

#### B. 回虫体腔液ヘモグロビン

$NaN_3$  (2.5mM) で catalase 活性を阻害した体腔液ヘモに高濃度の  $H_2O_2$  (125mM) を加えても数分以内ではほとんど変化が生じない。しかし時間が経過するにしたがい  $\alpha$  および  $\beta$  帯の低下が漸次進行し、4時間後には全く消失した (Fig. 6)。この間の体腔液の色調は淡赤褐色→淡黄褐色→淡黄色に変化した。一方低濃度の  $H_2O_2$  (12.5mM) の滴加では、この間の変化はより一層緩慢であった。以上のことは体腔液ヘモは家兎溶血液ヘモよりも  $H_2O_2$  に対する抵抗性が極めて強いこと、ひいては回虫ヘモの  $O_2$  親和性が極めて強いことを示している。

KCN (10mM) 作用下の体腔液ヘモに  $H_2O_2$  (125mM) を加えても、 $NaN_3$  の場合と同様に変化は生じ難いが、時間の経過とともにその色調に変化が生じ、12時間後 545 $m\mu$  に CN-Met Hb の吸収像が認められた。

#### 5. 回虫体腔液メトヘモグロビンに対する KCN お

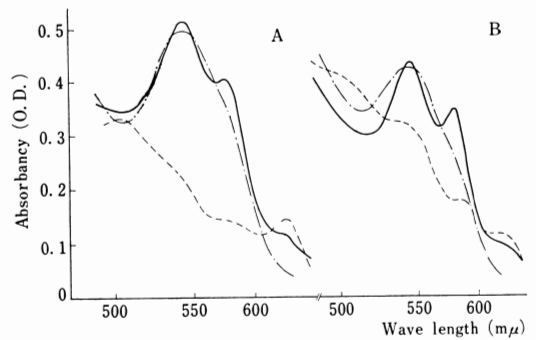


Fig. 7 Absorption spectra of methemoglobin derivatives.

A rabbit blood methemoglobin derivatives

B *Ascaris* perienteric fluid methemoglobin derivatives

..... : methemoglobin

----- : CN-methemoglobin

———— :  $N_3$ -methemoglobin

#### および $NaN_3$ の作用

##### A. 家兎溶血液メトヘモグロビン

家兎溶血液ヘモ (250倍希釈) 5 ml に 5% 赤血塩 0.05 ml を加えると、500 $m\mu$  および 635 $m\mu$  に吸収帯を示す Met Hb が容易に生じた (Fig. 7)。これに少量の KCN を加えると、545 $m\mu$  に吸収帯を示す CN-Met Hb (淡赤橙色) 一方少量の  $NaN_3$  を加えると、545 $m\mu$  および 580 $m\mu$  の吸収帯と 635 $m\mu$  に肩を示す  $N_3$ -Met Hb (淡赤褐色) の形成がみられ、これらの生成物は安定であった (Fig. 7)。

##### B. 回虫体腔液メトヘモグロビン

回虫体腔液ヘモ (1.33倍希釈) 5 ml に 5% 赤血塩 0.2 ml を加えると、数分以内に何らの変化も生じないが、30分～2時間後に  $HbO_2$  の一部が Met Hb に酸化されたことを示す吸収像が生じた。しかし10時間を経ても完全に Met Hb に酸化された吸収像は得られなかった (Fig. 7)。このことから体腔液ヘモは家兎溶血液ヘモよりも赤血塩に対し抵抗性が強いといえる。ここで生じた Met Hb に少量の KCN ないし  $NaN_3$  を加えると、容易に家兎溶血液ヘモにおいて認められたと全く同様な吸収像が得られ、しかも生成物は安定であった (Fig. 7)。

#### 6. 回虫体腔液 CN-Met Hb および $N_3$ -Met Hb に対する $H_2O_2$ の作用

##### A. 家兎溶血液 CN-Met Hb および $N_3$ -Met Hb

CN-Met Hb は  $H_2O_2$  (2 mM) に極めて安定で、24時間を経ても吸収像および血液の色調になんらの変化も

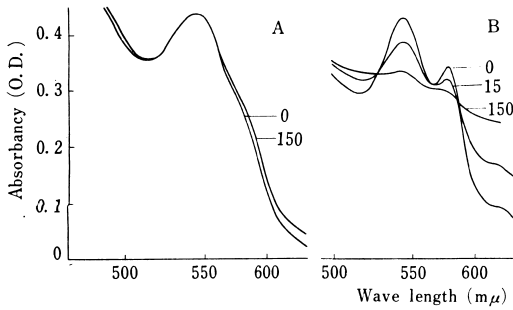


Fig. 8 Effect of  $H_2O_2$  on *Ascaris* periteric fluid CN-methemoglobin and  $N_3$ -methemoglobin.

1.33-fold CN-methemoglobin (A) or  $N_3$ -methemoglobin (B) was incubated with 125 mM  $H_2O_2$ .

The numbers in the figure indicate the incubation time in minutes.

生じなかった。一方  $N_3$ -Met Hb は  $H_2O_2$  (2 mM) に徐々に不安定で、4時間後では545 $m\mu$  の吸収帯が著しく低下し、580 $m\mu$  の吸収帯は肩のみとなり、血液の色調も淡赤褐色から淡黄色となった。

#### B. 回虫体腔液 CN-Met Hb および $N_3$ -Met Hb

CN-Met Hb は  $H_2O_2$  (125mM) に極めて安定で、吸収像および体腔液の色調になんらの変化も生じなかった。一方  $N_3$ -Met Hb は  $H_2O_2$  (125mM) に稍不安定で、2時間30分後では545 $m\mu$  および580 $m\mu$  の吸収帯はほとんど消失し、体腔液の色調も淡黄色となった (Fig. 8)。

#### 7. 回虫筋の $H_2O_2$ 生成量とその分解能

3. から 4. の実験では、KCN ないし  $NaN_3$  で catalase 活性を阻害した体腔液へモに  $H_2O_2$  を加えた場合に生ずる体腔液へモの変化が、高酸素圧下に保つた回虫の体腔液へモに生じた変化と同様であることを明らかにした。これらの結果から、高酸素圧下での回虫は  $O_2$  吸収量の増大により内在  $H_2O_2$  分解酵素活性を凌駕する  $H_2O_2$  の過形成を生じ、体色および体腔液色などに変化が生ずるとともに生存期間が短縮されるであろうことがほぼ明らかとなった。

ここで回虫筋の内部で実際に  $H_2O_2$  が生成されるものか否かを実証する目的で以下の実験を行った。先ず本実験の理論的背景となる知見として、(a)  $NaN_3$  で catalase 活性を阻害した家兎溶血液に微量の  $H_2O_2$  を加えるとへモは容易に酸化分解を受けること、(b) 回虫は酸素圧に比例して  $O_2$  吸収量を増加するとともに、吸収した  $O_2$  から  $H_2O_2$  を生成することなどがあり、この知見にもとづき catalase 活性を阻害した家兎溶血

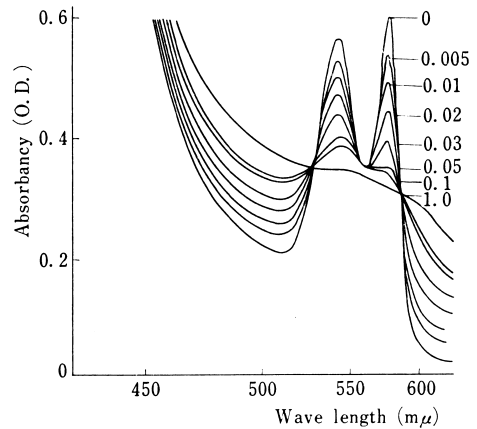


Fig. 9 Effect of  $H_2O_2$  on hemoglobin of rabbit blood with inactivated catalase. 250-fold hemolysate was treated with 1 mM  $NaN_3$  for inactivation of catalase in rabbit blood and with various concentration of  $H_2O_2$ . The numbers in the figure show the concentration of  $H_2O_2$  in mM.

液と回虫筋を incubate するならば、回虫筋が生成する  $H_2O_2$  により家兎溶血液へモは酸化分解を受けること、そしてこの酸化分解の程度を分光学的に測定することにより回虫筋が生成する  $H_2O_2$  量を間接的に知ることが可能となるはずである。

#### A. 家兎溶血液へモに対する $H_2O_2$ の作用

家兎溶血液へモに及ぼす  $H_2O_2$  の酸化分解力の程度を知るため、先ず  $NaN_3$  (1 mM) で catalase 活性を阻害した家兎溶血液に各種濃度の  $H_2O_2$  を加えた。すなわち家兎溶血液と  $H_2O_2$  を混合し、37°C 15分 incubate 後、冷却しながら15分放置し、家兎溶血液へモの性状を分光学的に測定した。0.005mM の如き低濃度の  $H_2O_2$  によつても  $\alpha$  および  $\beta$  帯のピークは己に低下し、以下  $H_2O_2$  の濃度が漸次高くなるにしたがいその酸化分解の割合はより一層顕著となり、 $H_2O_2$  の 1 mM で  $\alpha$  および  $\beta$  帯は完全に消失した (Fig. 9)。

#### B. 家兎溶血液へモに対する骨格筋の作用

ラットの骨格筋は回虫筋と異り末端電子伝達系に cytochrome oxidase をもち、最終産物として  $H_2O$  を生成する。したがつて家兎溶血液へモに変化を与えぬはずなので、回虫筋の対照として本実験を行った。Thunberg 管の主室に家兎溶血液 (最終濃度250倍希釈, catalase 含有), 1 mM Succinate, 1 g の骨格筋束, 副室に 1 mM の  $NaN_3$  を入れ、管中の気相を大気とし、37°C 5分間 preincubate する (この間筋束中にたとえ

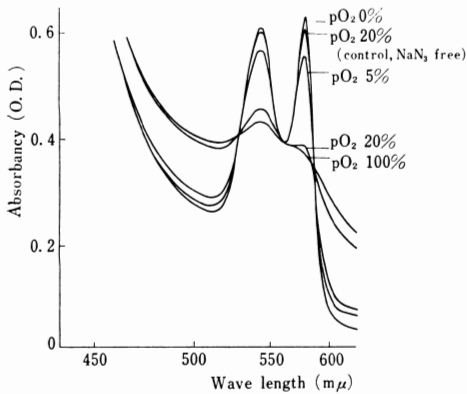


Fig. 10 In vitro formation of  $H_2O_2$  by *Ascaris* muscle under various oxygen pressures.

#### Incubation system

1.0g of *Ascaris* muscle slice was preincubated with succinate (as substrate) and 250-fold hemolysate of rabbit blood in 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) for 5 minutes and after an addition of 1 mM  $NaN_3$  to inactivate the hydroperoxidase in the system, further incubated for 15 minutes under various oxygen pressures.

The formed  $H_2O_2$  by *Ascaris* muscle was qualitatively measured by decrease in absorbancy of rabbit hemoglobin.

$H_2O_2$  が蓄積していたとしても、家兎溶血液の catalase により処理されてしまう。次いで両者を混合（ここで家兎血液および骨格筋の  $H_2O_2$  分解酵素は  $NaN_3$  で阻害される）、15分間 incubate 後筋束を除去し、冷却下で15分間放置後家兎溶血液ヘモの性状の変化を分光学的に測定した。

この結果は家兎溶血液ヘモになんらの変化をも示さず、したがって骨格筋から内因性の  $H_2O_2$  が生成されないことが明らかとなった。

#### C. 家兎溶血液ヘモに対する回虫筋の作用

実験B.と同様にして家兎溶血液ヘモと回虫筋束を用いて実験を行ったが、この場合管中の気相酸素圧を  $pO_2$  100%, 20%, 5%および0%の4段階とした。

$pO_2$  0%下では家兎溶血液ヘモになんらの変化も生じなかった。酸素圧を5%, 20%および100%と上昇させるにしたがい家兎溶血液ヘモの性状は次第に顕著な変化を示した (Fig. 10)。

ここでみられた家兎溶血液ヘモの変化の状態は、実験A.においてみられた変化と極めて類似し、回虫筋か

ら  $H_2O_2$  が生成されていることを明らかに示している。たとえば  $pO_2$  20%下で回虫が生成した  $H_2O_2$  量を実験A.の場合における添加  $H_2O_2$  量から換算すると、約  $22.4\mu l O_2/g$  wet wt./h であった。Laser (1944) らは回虫の大気下における  $O_2$  吸収量を  $80\mu l O_2/g$  wet wt./h と報告している。著者らの数値と Laser らの数値との差は、著者らが測定した  $H_2O_2$  は回虫筋内で生成されたものが液中に溶出されたものである点などを考慮すれば大差ないものと思う。

#### D. 回虫筋の $H_2O_2$ 生成量とその分解能

実験C. では家兎溶血液および回虫筋の  $H_2O_2$  分解酵素を阻害した条件下で回虫筋が生成した  $H_2O_2$  量を測定した。ここでは家兎溶血液の catalase のみを阻害した条件下で回虫筋の生成した  $H_2O_2$  量を測定し、回虫筋の  $H_2O_2$  生成量とその分解能との関係について検討した。

a) Thunberg 管の主室に家兎溶血液, Succinate, 回虫筋束, 副室に  $NaN_3$  を入れ、管中の気相を大気とする。

b) Thunberg 管の主室に家兎溶血液,  $NaN_3$ , 副室に回虫筋束, Succinate を入れ、管中の気相を大気とする。

a) および b) とも  $37^\circ C$  15分間 incubate 後、両室の内容物を混合 ( $H_2O_2$  分解酵素はすべて阻害された)、30秒後筋束を除去、冷却下15分間放置後家兎溶血液ヘモの性状を分光学的に測定した。

a) の場合家兎溶血液のヘモの吸収像に変化は生じなかった。このことは回虫筋から生成される  $H_2O_2$  は家兎溶血液および回虫筋中の  $H_2O_2$  分解酵素により完全に分解処理されたことを示している。b) の場合家兎溶血液ヘモの  $\alpha$  および  $\beta$  帯のピークはともに著しく低下した。このことは大気下では、回虫筋から回虫筋自身のもつ  $H_2O_2$  分解酵素の処理能力を凌駕する多量の  $H_2O_2$  が生成されたことを示している。

#### 考 察

実験1. において、環境酸素圧の変化と回虫の体色、体腔液色および体腔液ヘモの変化との関係について検討したが、これらの結果を一括表示したものが Table 1 である。

先ず回虫を Tyrode 液中ないし気体中に保ち環境から  $O_2$  を除去した場合には、体色は黄色化する。しかしこれを新鮮な空気と接触させることにより正常色に復元した。また無酸素下における生存期間は微量  $O_2$  存在

Table 1 The influence of oxygen pressure on the color of body surface and perienteric fluid, and the spectrum of hemoglobin

Environment	The color of body surface		The color of perienteric fluid		The spectrum of perienteric fluid hemoglobin At death
	At 24 hrs.	At death	At 24 hrs.	At death	
Liquid medium	Anaerobic (N <sub>2</sub> bubbling)	Yellow (Whole body, reversible to pink by aeration)	Light red-dish brown (Normal)	Light red-dish brown	$\alpha$ , $\beta$ and $\gamma$ peaks (Normal)
	Semianaerobic (N <sub>2</sub> 95%+CO <sub>2</sub> 5%)				
	Semiaerobic (Atmosphere)	Pink (Normal)	Yellowish white (Posterior end)	Light yellowish brown	$\alpha$ and $\beta$ peaks diminished
	Aerobic (Aeration)		Yellowish white (Whole body)	Light yellow	$\alpha$ and $\beta$ peaks disappeared
Gas phase	pO <sub>2</sub> 0%	Yellow (Whole body, reversible to pink by aeration)		Light red-dish brown	$\alpha$ , $\beta$ and peaks (Normal)
	pO <sub>2</sub> 5%		Yellowish white (Posterior end)	Light yellowish brown	$\alpha$ and $\beta$ peaks diminished
	pO <sub>2</sub> 10%	Pink (Normal)	↓	↓	↓
	pO <sub>2</sub> 20%		Yellowish white (Whole body)	Light yellow	$\alpha$ and $\beta$ peaks disappeared

下(液体飼養下ではセミ嫌気およびセミ好気, 気体飼養下では pO<sub>2</sub> 2.5~5%) にくらべ著しく短縮した。この体色の黄色化は、O<sub>2</sub> 欠乏状態で回虫へモの O<sub>2</sub> が筋肉中で消費され (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成)、脱酸素へモが生ずるためであろう。また新鮮空気と接触すると、O<sub>2</sub> が回虫へモに再び結合することにより体色は正常に復元するものと考えられる。このことは回虫へモ(体壁筋中のへモ)は O<sub>2</sub> 貯蔵体として O<sub>2</sub> 過少環境(小腸内の低酸素圧環境)下で O<sub>2</sub> を供給する機能を保持すること。そして微量 O<sub>2</sub> 存在下にくらべ無 O<sub>2</sub> 下での場合の生存期間が短縮されることから、回虫筋中には極く微量の O<sub>2</sub> を利用する呼吸系(セミ嫌気呼吸系)の存在を推定させる(回虫筋に cytochrome c peroxidase を含む cytochrome 系の存在を確認した。林ら, 1969)。以上の結果は回虫の生存に O<sub>2</sub> を必要としないという Bueding らの嫌気説(Bueding, 1963; Saz & Bueding, 1966; Saz, 1969)と矛盾する。

また無 O<sub>2</sub> 下の場合体腔液色に変化が生じないのは、生成される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素により充分処理され、回虫へモは脱酸素化という生理的变化しか受けなかったためであろう。

次に液体メヂウムで気相を大気(pO<sub>2</sub> 20%, セミ好気)または液中に通気(好気)した場合、一方気体中では pO<sub>2</sub> を 5~20%とした場合、O<sub>2</sub> 量が多くなるにしたがい、体色、体腔液色および体腔液へモの3者の変化が著明となり、同時に生存期間もより一層短縮された。これ

は環境の O<sub>2</sub> 量が増加すると、回虫の O<sub>2</sub> 吸収量したがって H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量が増加し、蓄積された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量に応じて、一方では回虫へモが酸化分解されて体色および体腔液色に変化を受け、他方では細胞毒として作用を受け回虫の生存が阻害されるものであることを裏付けるものである。

またこれら3者の変化に先行して常に体腔液の黄濁化がみられた。回虫体内の蓄積 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量が未だ微量の場合には、回虫へモは O<sub>2</sub> 親和性が強いので容易に影響を受けない。しかるに体細胞は微量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> でも影響を受け、細胞分解産物が体腔液中に移行し黄濁化を生ずるものと考えられる。

この黄濁化に関連して、回虫を生食水および Tyrode 液中で飼養した場合興味ある知見が認められた。本研究の第一報(林ら, 1968)で回虫の生存期間を観察した際、セミ好気下(大気)生食水中での回虫の50%生存期間は9.5日、Tyrode 液中でのそれは19.5日であり、この相異は飼養液の組成と pH の差に基因するのではなからうかと指摘した。ところで Tyrode 液中では飼養10日を経ても体腔液の黄濁化は生じないのに、生食水中では3日目に著明となった。この原因としてメヂウムの pH の差にもとづく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素活性の差が考えられる。すなわち生食水の pH は 5.5→4.5、Tyrode 液は 8.0→6.5 に変動する。ところが生食水の pH は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素活性の至適 pH 外になるので H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の蓄積がより一層増加する。そのため早期に細胞毒作用が生じ、



Table 2 The influence of KCN and  $\text{NaN}_3$  on the color of body surface and perienteric fluid, and the spectrum of hemoglobin

Environment	The color of body surface	The color of perienteric fluid	The spectrum of perienteric fluid hemoglobin
Gas phase $\text{pO}_2$ 5 % (At death)	Pink(Normal)	Light reddish brown (Normal)	$\alpha$ , $\beta$ and $\gamma$ peaks (Normal)
$\text{pO}_2$ 10 % (At death)	Yellowish white (Posterior end)	Light yellowish brown	$\alpha$ and $\beta$ peaks diminished
$\text{pO}_2$ 20 % (At death)	Yellowish white (Lower half)	↓	↓
$\text{pO}_2$ 20 % (6 hrs. after death)	Yellowish white (Whole body)	Light yellow	$\alpha$ and $\beta$ peaks disappeared
Liquid medium	Changes above described were dependent on the environmental $\text{pO}_2$ and pH, and the concentration of $\text{NaN}_3$ .		
Gas phase KCN $\text{pO}_2$ 5 % ~ 20 %	Pink	Light reddish orange	Cyanmethemoglobin
Liquid medium			

体腔液の黄濁化，早期の死が生ずると考えられる。この事実から回虫を *in vitro* で飼養する際，pH を調整することの重要性を指摘することができる。

以上の実験を通じて，液体中に回虫を飼養した場合の環境酸素圧と生存の関係は，

セミ嫌気  $\rightleftharpoons$  セミ好気  $\gg$  嫌気  $\rightleftharpoons$  好気

(気相:  $\text{N}_2 + \text{CO}_2$ ) (気相: 大気) (液中に  $\text{N}_2$ ) (液中に大)  
(溶存  $\text{O}_2$  漸減) (溶存  $\text{O}_2$  常) (気泡を通ず) (気を通ず)  
(在) (在) (溶存  $\text{O}_2$  な) (過剰  $\text{O}_2$ )  
(存在)

で，微量  $\text{O}_2$  の存在が回虫の生存に有利であることを示し，また気相中の場合でも同様で， $\text{pO}_2$  2.5~5% > 10% > 15% > 20%  $\rightleftharpoons$  0% の如く微量  $\text{O}_2$  の存在が生存に有利であることは明らかである。

実験 2. において，KCN および  $\text{NaN}_3$  で回虫の  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酵素を阻害した状況下で環境酸素圧の変化と体色，体腔液色および体腔液ヘモの変化との関係を検討したのであるが，これらの結果を一括表示したものが Table 2 である。

KCN 作用下の場合，液体メヂウム中であろうとまた各種の酸素圧下の気体中であろうと，体色および体腔液色にはほとんど変化が生じなかつたが，体腔液ヘモには CN-Met Hb の形成がみられた。この CN-Met Hb の色調は淡赤橙色であつて，正常の体腔液色に類似しているため，肉眼的に体色の変化として認めることができなかつた。また CN-Met Hb は KCN により  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酵素が阻害された結果，過剰  $\text{H}_2\text{O}_2$  により形成され

たと考えられる。

$\text{NaN}_3$  作用下の場合，回虫ヘモの  $\alpha$  および  $\beta$  帯の低下ないし消失により，体腔液は淡黄褐色ないし淡黄色となり，体色に変化が生じたと考えられる。

以上の実験 1. および 2. から，回虫の生存期間の短縮，体色，体腔液色および体腔液ヘモの変化は，酸素圧とか  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解酵素の変化により体内に生じた蓄積  $\text{H}_2\text{O}_2$  に密接な関連を有するのではなからうかと考えられる。

ついで実験 3. から 7. で *in vitro* においても体腔液ヘモが  $\text{H}_2\text{O}_2$  によつて回虫体内でみられるような変化を実際に蒙るものであるか否かの検討を加えた。先ず回虫体腔液ヘモの分光学的性状を家兎溶血液ヘモとの対比のもとで検討した。両ヘモの分光学的性状はほぼ同一であつたが，体腔液ヘモの  $\alpha$  および  $\beta$  帯の吸収極大のピークの高さは家兎と逆の関係にあつた。回虫と家兎との性状の相異については種特異性の差にもとづくものであらうと黒田 (1960) が報告している。しかし回虫は家兎と異なり  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成し，多分  $\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を利用して生存する生物であるから回虫ヘモは  $\text{H}_2\text{O}_2$  の影響をたえず受けるため，家兎と異なる性状を示すことも考えられる。そこで  $\text{NaN}_3$  添加家兎溶血液ヘモに微量の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を加えたところ，容易に酸化分解され， $\alpha$  および  $\beta$  帯の吸収極大のピークは低下し，且つ両ピークの高さは回虫の場合と同様な結果となつた。しかし体腔液ヘモに  $\text{H}_2\text{O}_2$  を作用させたところ，抵抗性が極め

て強く容易に酸化分解されなかつた。このように家兎と回虫のヘモの間には  $H_2O_2$  に対する感受性に大きな差がみられた。この感受性の相異は両ヘモの  $O_2$  親和性の相異にもとづくものと考えられ、したがって体腔液ヘモの分光学的性状は回虫体内で生成される  $H_2O_2$  の影響により生じた結果とは考えがたい。回虫ヘモと同じような性状を示す寄生虫については他にも報告 (Fernando, 1968) されており、結局低酸素圧下で生存する回虫のもつ属性と考えた方が妥当ではなかろうかと思う。

次に体腔液ヘモに対する KCN および  $NaN_3$  の影響を検討した。 $NaN_3$  は体腔液ヘモおよび家兎溶血液ヘモ ( $HbO_2$  および Hb) のいずれにも分光学的な性状に変化を与えなかつた。一方 KCN は両動物の  $HbO_2$  には変化を与えなかつたが、Hb に対しては興味ある変化を与えた。すなわち体腔液ヘモの Hb は KCN 作用直後淡赤色に変化した。ここで生じた変化物は吸収像からみると黒田 (1960) の報告した cyanhemoglobin (CN-Hb) と同一であつた。一方家兎溶血液ヘモの Hb は徐々に青緑色に変化した。結局回虫および家兎の 2 価鉄の Hb に対する KCN の反応生成物は全く異なるものであると考えられる。以上の知見から *in vitro* においても体腔液ヘモに KCN や  $NaN_3$  を作用させても、回虫そのものにこれらを作用させた場合に体腔液にみられるような変化が生じなかつた。それ故回虫自体に  $H_2O_2$  分解酵素の阻害剤を作用させた場合には、生体内の  $H_2O_2$  の作用が加わることが当然予想される。

そこで KCN ないし  $NaN_3$  を加えた体腔液ヘモに更に  $H_2O_2$  を加えた場合の変化を観察した。すなわち  $NaN_3$  添加体腔液ヘモ ( $HbO_2$ ) に 125mM  $H_2O_2$  を加えると緩徐に、12.5mM  $H_2O_2$  を加えるとなお一層徐々に、 $\alpha$  および  $\beta$  帯の消失が生じた。この場合の体腔液の色調は回虫に  $NaN_3$  を作用させた場合に生じた淡黄 (褐) 色に類似していた。一方  $NaN_3$  添加家兎溶血液ヘモに 1mM  $H_2O_2$  を加えると、急速に  $\alpha$  および  $\beta$  帯は消失した。また KCN 添加体腔液ヘモ ( $HbO_2$ ) に 125mM  $H_2O_2$  を加えると緩徐に、125mM  $H_2O_2$  を加えるとなお一層徐々に、 $\alpha$  および  $\beta$  帯の低下が生じ、CN-Met Hb が生じた。一方家兎血液ヘモは 1mM  $H_2O_2$  により急速に酸化され CN-Met Hb が生じた。ここで生じた CN-Met Hb の吸収帯の高さは同一濃度のヘモに赤血塩と KCN を加えて生じた CN-Met Hb のそれよりもかなり低くあらわれた。このことは  $H_2O_2$  の作用で生じた CN-Met Hb の一部分のみが KCN と反応

して CN-Met Hb を形成し、他の部分は更に  $H_2O_2$  の作用を受けて分解されてしまう結果であろうと考えられる。

以上の KCN ないし  $NaN_3$  添加の体腔液ヘモに  $H_2O_2$  を加えて生じた変化は、回虫に直接 KCN および  $NaN_3$  を作用させた場合に生ずる体腔液ヘモの変化と極めて類似しており、回虫体内で生ずるこれらの変化に  $H_2O_2$  が関与しているであろうことを充分推定させる。

しかし *in vitro* において体腔液ヘモを変化させる  $H_2O_2$  の濃度はかなり高く、回虫体内でこのような高濃度の  $H_2O_2$  の存在はあり得ない。 $H_2O_2$  が関与するとしても低濃度であるはずである。ここで  $H_2O_2$  がヘモに作用する場合 *in vitro* および *in vivo* における作用形式について考えてみたい。 $H_2O_2$  はヘモの酸素化型 ( $HbO_2$ ) には還元型 (脱酸素化型, Hb) に作用する。*in vitro* においての体腔液ヘモは  $O_2$  親和性が強いいため  $HbO_2$  から Hb になりがたい。したがって高濃度の  $H_2O_2$  でのみ酸化分解を受ける。しかるに *in vivo* においては  $HbO_2$  の  $O_2$  が  $H_2O_2$  生成系に利用されるため、局部的且つ瞬間的に  $HbO_2$  から  $O_2$  が遊離して Hb になるため、低濃度の  $H_2O_2$  により変化を蒙るものと考えられる。

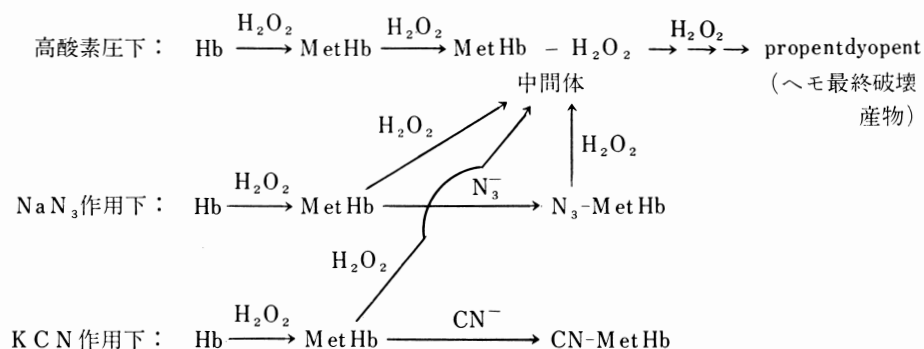
また本研究の第 2 報 (林・寺田, 1969) において已に報告した現象からも、*in vivo* において低濃度の  $H_2O_2$  が作用にあずかっていることを説明することができる。すなわちセミ嫌気 ( $N_2$  95% +  $CO_2$  5%) およびセミ好気 (大気) 下、 $NaN_3$  添加生食水中の回虫にみられる体色の黄白色化は前者の条件下が早いのに、生存期間は逆に後者の方が短かつた。セミ好気下での回虫の生存期間が短いのは、吸収  $O_2$  量が多いためしたがって  $H_2O_2$  の蓄積量も多くなるためであろう。一方セミ嫌気下では「メヂウム」中の  $O_2$  量が乏しいため、回虫ヘモの  $HbO_2$  から  $O_2$  が遊離し Hb の状態で存在する割合が時間とともに増加し、微量の  $H_2O_2$  によつても容易に Hb が酸化分解を受けるためであろうと考えられる。

また以上の実験において回虫に KCN を作用させた場合および KCN 添加体腔液ヘモに  $H_2O_2$  を加えた場合に CN-Met Hb の形成を認めたが、 $NaN_3$  を作用させた場合は  $N_3$ -Met Hb は認められずヘモの最終破壊産物のみが認められた。果して  $N_3$ -Met Hb は形成されないのだろうか。ここで Keilin & Hartree (1951) の報告——哺乳動物 (馬) のヘモを赤血塩で Met Hb に酸化し、これに  $CN^\ominus$ ,  $N_3^\ominus$  および  $F^\ominus$  を加えると

CN-MetHb,  $N_3$ -Met Hb および F-Met Hb を形成する——に着目し, 回虫体腔液へモに同様な操作を施した. 体腔液へモの Met Hb への酸化は家兎溶血液へモにくらべ緩慢であつたが, 容易に安定な CN-MetHb,  $N_3$ -MetHb および F-MetHb を形成した.

では  $NaN_3$  作用下の回虫体腔液へモになぜ  $N_3$ -MetHb の吸収像が確認できなかつたのであろうか. これは体腔液へモの  $N_3$ -MetHb の吸収像が, 正常の体腔液へモ (HbO<sub>2</sub>) の吸収像と極めて類似していることおよび CN-MetHb は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対し安定であるのに,  $N_3$ -Met Hb は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に不安定で分解されやすいためであつた.

ここで実験 1. から 6. ままでに得られた体腔液へモに対する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の作用の結果を総括模式化すると次の如くに考えられる.



結局以上の条件下で内因性に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が蓄積し, 一方では回虫へモが酸化分解を受け体色および体腔液色に変化を生ずるとともに, 他方では細胞毒として作用し回虫を死に導くものであろうと考えられる.

また以上の実験は体腔液へモの変化から, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の生成, 蓄積を明らかにしたのであるが, 回虫筋は実際に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成しているのであろうか. これを明らかにするために実験 7. では  $NaN_3$  で catalase を阻害した家兎溶血液へモが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で酸化分解を受けやすいという性質を利用し, 家兎溶血液と回虫筋束を incubate (両者とも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解酵素は阻害する) し, 家兎溶血液へモが回虫筋から生成される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により酸化分解を受ける程度から回虫筋より生成される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を測定した. 対照として用いたラットの骨格筋 (cytochrome oxidase を有し, H<sub>2</sub>O を生ずる) は家兎溶血液へモに何らの変化も与えなかつた. しかしに回虫筋は著明な酸化分解を示し, この作用の程度は酸素圧が高い程顕著であつた. すなわち pO<sub>2</sub> 0% 下ではほとんど酸化分解を示

さないが, pO<sub>2</sub> 5% 下では pO<sub>2</sub> 20% 下の約 1/4~1/5 程度, pO<sub>2</sub> 100% 以下では pO<sub>2</sub> 20% 下の約 3 倍程度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成を示す酸化分解を惹起した. そして生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量から吸収された O<sub>2</sub> 量を計測すると, Laser (1944) らの算出した O<sub>2</sub> 吸収量とほぼ等しい結果であつた.

これらの結果は回虫筋から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が生成されること, そして回虫では単に O<sub>2</sub> 吸収量のみならず H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成量も酸素圧に密接に関連していることを明快に実証した.

次に家兎溶血液のみの catalase 活性を阻害した条件下で回虫筋が生成する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量を家兎溶血液へモの酸化分解の程度から測定し, 筋自身の持つ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解処理能の程度を検討した. この結果から pO<sub>2</sub> 20% 下では

回虫筋は自己の所有する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解処理能力を凌駕する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成することが明らかになつた.

これら 2 つの実験から, 回虫は酸素圧が高い場合には自己の所有する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解能を凌駕する H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を生成すること, したがって回虫には生存に適した酸素圧が存在すること, この至適酸素圧は極めて低いものであることなどを明らかにした.

## 結 論

環境酸素圧の変化が回虫の体色, 体腔液色および体腔液へモに及ぼす影響についての検討を行つた. その結果明らかにされたことは次の如くである.

環境が無酸素の場合, 回虫の生存は著しく阻害された. その際体腔液色および体腔液へモには変化が認められなかつたが, 体色には回虫へモの脱酸素化によると考えられる変化が認められた.

一方環境酸素圧が上昇するにしたがい回虫の生存期間は短縮された. その際体色, 体腔液色および体腔液へモ

に回虫ヘモの  $H_2O_2$  による酸化分解にもとづくと考えられる変化を生じた。

以上の結果は、無酸素下での生存期間の短縮はセミ嫌気呼吸系の機能停止にもとづくものであること、また高酸素圧下では  $H_2O_2$  の過形成により生じた蓄積  $H_2O_2$  が一方では回虫ヘモの酸化分解をひきおこし、体色などに変化を生じ、他方では細胞毒として回虫の生存期間を短縮させるのであろうとの推定を如実に裏書きするものである。

結局回虫には生存に適した酸素圧が存在しその至適酸素圧は微量  $O_2$  の存在する低酸素圧であることが明らかになった。

本論文の要旨は昭和44年4月の第38回日本寄生虫学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) Bueding, E. (1963) : Electron transport and fermentations in *Ascaris lumbricoides*. Control Mechanisms in Respiration and Fermentation, the Rondon Press Company, New York, 167-177.
- 2) Fernando, M. A. (1968) : Hemoglobins of Parasitic Nematodes(1) Spectra of the perienteric fluid hemoglobins of *Obeliscoides cuniculi* and the distribution of hematin compounds within its tissues. *J. Parasit.*, 54, 863-868.
- 3) 林栄一・寺田護・高村省三(1968) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(1). *寄生虫誌*, 17, 424-428.
- 4) 林栄一・寺田護(1969) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(2). *寄生虫誌*, 18, 508-514.
- 5) 林栄一・寺田護・村松郁延(1969) : 豚回虫の生存に及ぼす酸素圧の影響(4). 豚回虫筋ミトコンドリア分画のヘム蛋白について. *寄生虫誌*, 18, 655-656.
- 6) Keilin, D. and Hartree, E. F. (1951) : Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methemoglobin. *Biochem. J.*, 49, 88-104.
- 7) 黒田清(1960) : 回虫 (*Ascaris lumbricoides*) のヘモグロビンの精製とその分光学的性質について. *生化学*, 32, 729-735.
- 8) Saz, H. J. and Bueding, E. (1966) : Relationship between anthelmintic effects and biochemical and physiological mechanisms. *Pharmacological review*, 18, 871-894.
- 9) Saz, H. J. (1969) : Carbohydrate and energy metabolism of Nematodes and Acanthocephala. *Chemical Zoology*, Vol. III, Academic Press, New York and London, 329-360.

## Abstract

THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE SURVIVAL TIME OF  
*ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* (3)  
THE INFLUENCE OF OXYGEN PRESSURE ON THE COLOR OF BODY SURFACE  
AND PERIENTERIC FLUID, AND ON THE SPECTRUM OF HEMOGLOBIN

EIICHI HAYASHI AND MAMORU TERADA

(Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmaceutical  
Sciences, Shizuoka, Japan)

In the previous papers we observed that the survival time of *Ascaris lumbricoides suum* was dependent on oxygen pressure and was shortened with KCN or  $NaN_3$ , and we assumed that these might be closely related both with the magnitude of  $O_2$  uptake dependent on oxygen pressure and with the hydroperoxidase activity of *Ascaris*.

The present report is concerned with the influence of oxygen pressure on the color of body surface and perienteric fluid, and on the spectrum of hemoglobin of *Ascaris* in the pre-

sence or absence of KCN or  $\text{NaN}_3$ . The results obtained are summarized as follows.

1. In the absence of  $\text{O}_2$  the survival time of *Ascaris* was significantly shortened, and the change, which is reversible by aeration, in the color of body surface probably caused by deoxygenation of hemoglobin was observed, whereas no changes were observed in the color of perienteric fluid and in the spectrum of perienteric fluid hemoglobin.

2. With the increase of oxygen pressure over the physiological condition ( $\text{pO}_2$  2.5~5.0%) the survival time was proportionally shortened. The color of body surface and perienteric fluid, and the spectrum of perienteric fluid hemoglobin were both changed, probably due to the oxidative degradation of hemoglobin by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

3. In the presence of  $\text{NaN}_3$  the similar change mentioned in 2. was also observed.

4. In the presence of KCN appeared the shift of the spectrum resulting from the change of perienteric fluid hemoglobin to cyanmethemoglobin, whereas apparent changes in the color of body surface and of perienteric fluid were not observed.

5. The spectral changes of perienteric fluid by in vitro treatment of KCN or  $\text{NaN}_3$ , followed with an addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  were respectively coincident with the changes by in vivo treatment of KCN or  $\text{NaN}_3$ .

6. The formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by *Ascaris* muscle slice was dependent on oxygen pressure, and  $\text{H}_2\text{O}_2$  was abnormally accumulated in *Ascaris* muscle under aerobic condition. From these facts together with the results obtained before, we can draw the following conclusions:

: that in the absence of  $\text{O}_2$  the repression of the semiaerobic respiration (the cytochrome system containing cytochrome c peroxidase) may occur and cause the shortening of the survival time.

: that in the presence of excessive  $\text{O}_2$  the formation of  $\text{H}_2\text{O}_2$  will surpass the hydroperoxidase activity and then the abnormally accumulated  $\text{H}_2\text{O}_2$  in *Ascaris* may result in the shortening of the survival time and in the color changes of body surface and perienteric fluid.

: that under the physiological environment (low oxygen pressure) the formed  $\text{H}_2\text{O}_2$  will be immediately consumed by hydroperoxidase and this balanced process of  $\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) consumption may account for the longest survival time in this condition.