

^1H , ^{13}C 及び ^{31}P -NMR 分光法による旋毛虫 *Trichinella spiralis* (U.S.A.株) 筋肉内幼虫の glucose 代謝とその代謝産物の宿主 (マウス) への影響に関する研究

仁科正実 (埼玉医科大学寄生虫学教室)

キーワード

Trichinella spiralis, NMR spectroscopy, glucose metabolism, intracellular pH, ATP

1. はじめに

組織内寄生の寄生虫による宿主組織の病態生理を考える上で、寄生虫の代謝産物の影響は重要な要素であり、その病態生理の解析には、寄生虫の種々の代謝経路の解析および代謝産物の測定は不可欠なことである。

核磁気共鳴 (NMR) イメージングや NMR 分光法は、画像診断や生体系研究に利用されている。特に *In vivo* における研究において NMR 分光法は、生体に対して無侵襲的な手段として有用な方法である。

最近 Nishina et al.¹⁾ は ^{13}C -NMR 分光法を用いて、組織内寄生の寄生虫で好酸球性髄膜脳炎の原因線虫である広東住血線虫 (*Angiostrongylus cantonensis*) 幼若成虫の glucose 代謝経路が Embden-Meyerhof pathway と同様な glycolysis の経路に依存し、その最終代謝産物は lactate, acetate, alanine であることを証明し、さらに ^1H -NMR 分光法を用いて、その代謝産物の定量も行った。Blackburn et al. (1986)²⁾ も同様な方法で、腸管内寄生条虫の縮小条虫

(*Hymenolepis diminuta*) の glucose 代謝経路が, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)-succinate pathway に依存し、その最終代謝産物は, lactate, succinate, acetate, alanine であることを証明している。

今回著者は、組織内寄生線虫、特に人畜共通寄生虫症の原因線虫による病態生理や、化学療法の基礎的研究の一環として、ヒト及び多くの哺乳動物の骨格筋に被嚢して寄生し、全身的な筋炎等をひきおこす旋毛虫症の原因線虫である旋毛虫 (*Trichinella spiralis*) 筋肉内幼虫 (ML) の glucose 代謝の代謝産物の同定と定量、さらにその代謝経路を、*in vitro* 条件下で安定同位体の $\text{D-} (^{13}\text{C}_6)$ glucose と (1, 1'- $^{13}\text{C}_2$) succinate を用いて ^1H -, ^{13}C -NMR 分光法で観察した。また、宿主 (マウス) への glucose 代謝産物の影響を *in vivo* 条件下で ^{31}P -NMR 分光法を用いて観察した。

2. 材料及び方法

①旋毛虫幼虫の分離：千葉大学医学部寄生虫学教室より分与された旋毛虫 (U.S.A.株) を使用

した。感染幼虫を経口的にマウスに感染させ、感染後 60 日目に骨格筋より, Castro et al. (1969)³⁾の方法に従い, 旋毛虫 ML (体長: 約 1 mm) を回収した。操作は無菌的に行い, 回収した ML を 1% の antibiotic/antimycotic solution (Gibco 製) を含む生理食塩水で数回洗浄した。

② in vitro 飼育実験: 代謝産物の同定と定量のために, 旋毛虫 ML 7000 匹を 10% の牛胎児血清 (Gibco 製) を含む NCTC-109 (Difco 製) 培養液 1 ml 中で, 37°C 好氣的条件下 (5% CO₂ in air) にて 3 日間飼育した。この実験は 3 度行い, またコントロールとして培養液のみについても同様に行った。飼育後, 培養液を回収し, ¹H-NMR の測定まで -20°C で保存した。

glucose 由来の代謝産物と, その代謝経路を, また succinate からの代謝経路を知るために, 上記と同様に調整したサンプルに D-(¹³C₆) glucose (98 atom %) 2.5 mg を加えたサンプルと (1, 1'-¹³C₂) succinate (99 atom %) 0.25 mg を加えたサンプルをそれぞれ作成し, 同様な条件下で飼育実験を行い, 回収した培養液を ¹H-, ¹³C-NMR の測定まで -20°C で保存した。

③ ¹H-, ¹³C-NMR 分光法: 外径 5 mm の NMR 試料管にサンプル 0.45 ml と重水 0.05 ml を入れ, さらに ¹H シグナルの強度とケミカルシフトの内部基準として 3-(trimethylsilyl) propionate (TSP) を最終濃度 1 mM になるように加えた。また ¹³C シグナルのケミカルシフトの外部基準として Tetramethylsilane (TMS) を使用した。分光器は, JNM GSX-270 FT Spectrometer (日本電子) を使用し, ¹H-NMR の測定は室温下で, 観測周波数 270 MHz, 45° パルス, 7 秒間隔, 64 回積算を行い, さらにサンプル中の水 (¹H₂O) の ¹H シグナルを抑制するために homogated decoupling 法を用い測定し

た。¹³C-NMR の測定は室温下で, 観測周波数 67.7 MHz, 45° パルス, 3 秒間隔, 35000 回積算を行った。¹H-, ¹³C-NMR 分光法により得られた代謝産物のシグナルの帰属は, 純品のサンプルより得たシグナルとの比較や, すでに報告されているデータとの比較により決定した^{1,2,4,5)}。¹H-¹³C カップリングによって分離した ¹H シグナル及び ¹³C-¹³C カップリングによって分離した ¹³C シグナルの帰属は, London et al. (1975)⁶⁾, Mackenzie et al. (1982)⁷⁾, Blackburn et al. (1986)²⁾ の解析に従った。代謝産物の定量は, Ohsaka et al. (1981)⁸⁾, Matsushita et al. (1982)⁹⁾ の方法に従い, 既知濃度の TSP の ¹H シグナル強度との比較により算出した。

④ 旋毛虫 ML の宿主 (マウス) への影響の観察: 旋毛虫感染後 60 日目のマウスを sodium pentobarbital で麻酔後 (ip. 60 mg/kg) NMR プロローブに固定した。マウスの左大腿部より半径 5 mm の surface coil で ³¹P-NMR を測定した。コントロールとして健康なマウスについても同様に測定した。³¹P のシグナルの測定には, 上記の分光器を使用し, 観測周波数 109.14 MHz, 45° パルス, 1 秒間隔, 300 回積算を行った。

細胞内 pH (pHi) は, creatine phosphate (PCr) のシグナルを基準として無機燐 (Pi) のシグナルのケミカルシフト (δ ppm) より次式 (I)¹¹⁾ を用いて算出し, 比較した。

$$pHi = 6.90 - \log \left[\frac{(\delta - 5.805)}{(3.290 - \delta)} \right] \quad (I)$$

また adenosine triphosphate (ATP) のシグナルの変化は, ³¹P-NMR で観察された各成分のシグナルの面積強度による相対比 [ATP(β)/Pi + PCr + ATP(β)] で比較した。

3. 結 果

① 代謝産物の同定と定量: Fig. 1 は, 牛胎児血清

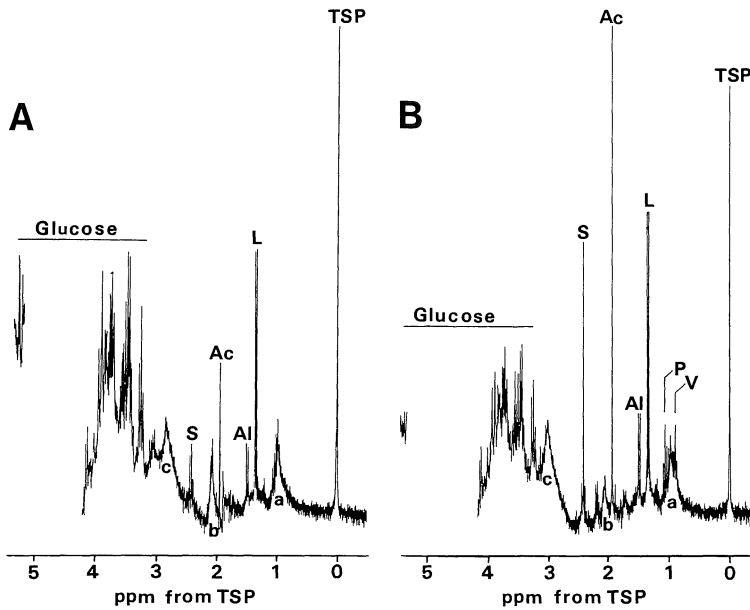


Fig. 1 270MHz ^1H -NMR spectra of spent media collected after maintenance without (A) and with muscle larva *T. spiralis* (B) at 37°C for three days. Chemical shift is given in ppm from internal TSP.

L : lactate; Al : alanine; Ac : acetate ;
S : succinate; P : propionate ;
V : n-valerate; a, b and c : methyl and methylene protons of lipid and/or protein.

10%. 含む NCTC-109 培養液で旋毛虫 ML を 3 日間飼育後の培養液(B)と、そのコントロールの培養液(A)の ^1H -NMR のスペクトルである。4-5 ppm 間の抑制された水のプロトンシグナルは、図より省いた。

コントロールのスペクトルには、内部基準の TSP のシグナルの他、3.2 ppm-5.3 ppm の間に glucose のプロトンに帰属されるシグナル、1.32 ppm と 1.48 ppm にダブルットのそれぞれ lactate と alanine のメチルプロトンに帰属されるシグナル、1.93 ppm と 2.41 ppm にシングレットのそれぞれ acetate のメチルプロトン及び succinate のメチレンプロトンに帰属されるシグナルが観察された。さらに 0.98 ppm, 2.1 ppm, 3.0 ppm に脂質やタンパク質のプロトンに帰属される比較的、幅の広いシグナルも観察された。

旋毛虫 ML の飼育後の培養液のスペクトルでは、コントロールと比較して、シグナル強度の減少した glucose のプロトンシグナルと、わずかに強度が増加した lactate と alanine のメチルプロトンのシグナル、著しく強度が増加した acetate のメチルと succinate のメチレンのプロトンシグナルが観察され、さらに新たに 0.89 ppm と 1.06 ppm に、それぞれトリプレットの n-valerate と propionate のメチルプロトンのシグナルが観察された。

上記の ^1H -NMR 分光法で観察された代謝産物の定量結果を、Table 1 に示した。定量の結果、lactate, acetate, succinate, propionate, n-valerate, alanine が、旋毛虫 ML の最終代謝産物であることを認め、さらにその代謝産物全体のモル比 (lactate : acetate : succinate :

Table 1 End-products of glucose metabolism in muscle larva of *Tricinella spiralis* as measured by ¹H-NMR

Samples	End-products					
	Lactate	Acetate	Succinate	Propionate	n-Valerate	Alanine
Control medium(mM) ^a	3.3±0.3	1.0±0.1	0.3±0.0	ND.	ND.	0.7±0.1
Spent medium(mM) ^a	4.9±0.2	4.3±0.5	2.0±0.2	1.0±0.2	0.8±0.0	1.6±0.1
Increment(mM)	1.6	3.3	1.7	1.0	0.8	0.9
Relative increase ^b	1	2	1	0.6	0.5	0.6

Values are the mean±standard error of the triplicate assays for both samples.

ND.: not detected

a: As determined with TSP as internal standard.

b: Increment of lactate was taken as unity.

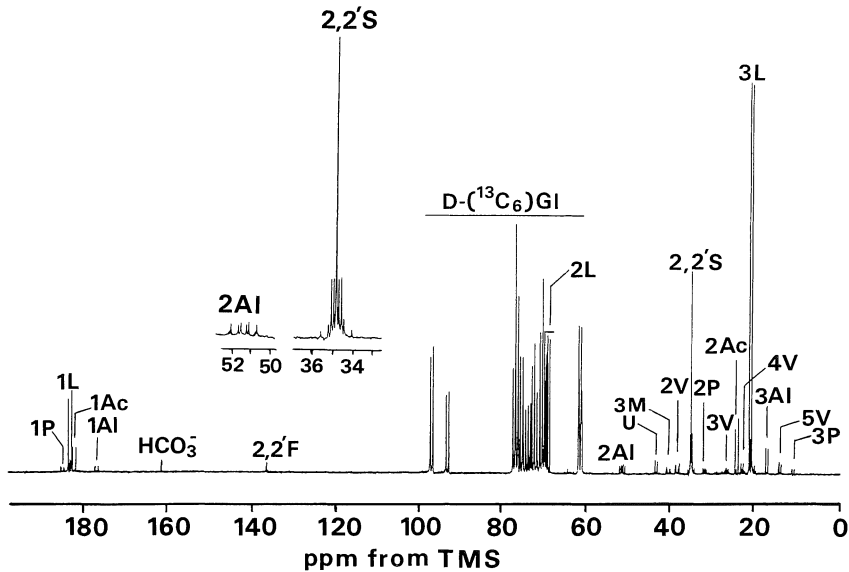


Fig. 2 67.7MHz ¹³C-NMR spectrum of the spent medium collected after maintenance with muscle larva *T. spiralis* at 37 °C for three days in the medium enriched with D-(¹³C₆)glucose. Chemical shift is given in ppm from external TMS.

1L, 2L, 3L: lactate 1-C, 2-C, 3-C; 1Al, 2Al,

3Al: alanine 1-C, 2-C, 3-C; 1Ac, 2Ac: acetate 1-C, 2-C; 2, 2'S: succinate 2-C, 2'-C; 1P, 2P, 3P: propionate 1-C, 2-C, 3-C; V2, 3V, 4V, 5V: n-valerate 2-C, 3-C, 4-C, 5-C; 2, 2'F: fumarate 2-C, 2'-C; 3M: malate 3-C; Gl: glucose; U: unknown

propionate: n-valerate: alanine) は、1:2:1:0.6:0.5:0.6であり、主要代謝産物は、lactate, acetate, succinateであった。

②代謝経路: 旋毛虫 ML の飼育後の培養液につ

いて、¹H-NMR を用いて代謝産物を観察した結果、glucose のプロトンシグナルの減少と代謝産物として、lactate, acetate, succinate, propionate, n-valerate, alanine のプロトンシ

グナルの増加が確認された。これら代謝産物の代謝経路を観察するために、安定同位体の D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose と (1, 1'- $^{13}\text{C}_2$) succinate を用い代謝産物の代謝経路を観察した。

[D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose による観察] glucose 由来の代謝産物を確認するため、D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose を加えた培養液で旋毛虫 ML 飼育後の培養液の ^{13}C -NMR と ^1H -NMR のスペクトルを、それぞれ Fig. 2 と Fig. 3 に示した。Fig. 2 の ^{13}C -NMR のスペクトルには、培養液に加えた D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose のカーボンシグナルの他、D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose 由来代謝産物の lactate, acetate, propionate, n-valerate, alanine のメチル、

succinate, propionate, n-valerate のメチレン、lactate, alanine のメチン、及び lactate, acetate, propionate, alanine のカルボキシルのカーボンシグナルが観察された。さらに fumarate のエチレンと malate のメチンのカーボンシグナルと $\text{H}^{13}\text{CO}_3^-$ のカーボンシグナルも観察された。以上の結果から、 ^1H -NMR (Fig. 1) で同定された代謝産物は培養液中の glucose に由来することがわかった。

Fig. 3 の ^1H -NMR のスペクトルでは、D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose 由来の pyruvate, n-valerate, alanine のプロトンシグナルは、確認できなかった。しかし、主要代謝産物の lactate, acetate,

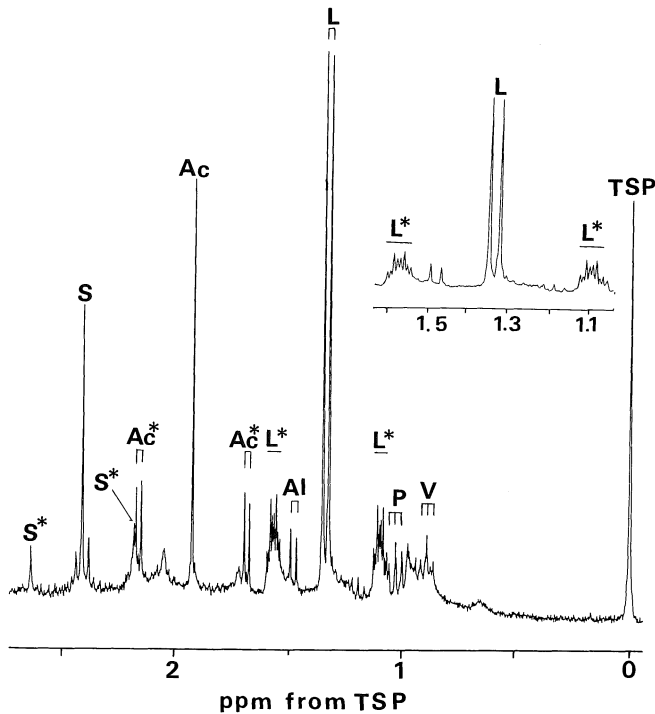


Fig. 3 270MHz ^1H -NMR spectrum of spent medium collected after maintenance with muscle larva *T. spiralis* at 37°C for three days in the medium enriched with D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose. Chemical shift is given in ppm from internal TSP.

L : unlabeled lactate; L* : ^{13}C -labeled lactate; Al : unlabeled alanine; Ac : unlabeled acetate; Ac* : ^{13}C -labeled acetate; S : unlabeled succinate; S* : ^{13}C -labeled succinate

succinate のプロトンシグナルは、確認された。これら主要代謝産物のシグナルを London et al. (1975)⁶⁾, Mackenzie et al. (1982)⁷⁾, Blackburn et al. (1986)²⁾ のシグナルの解析に従い解析した結果、1.32 ppm のダブルットのシグナルは、¹³C で標識されていない lactate のメチルプロトンシグナルで、そのシグナルの両サイドの 127.8 Hz 離れた 8 本のシグナルから成るダブルットのシグナルは、D- (¹³C₆) glucose 由来の ¹³C で標識されている lactate のメチルプロトンシグナルであり、(¹³C₃) lactate と (2, 3-¹³C₂) lactate の混合物であった。またその濃度比は 2 : 1 であった。1.93 ppm のシングレットのシグナルは、¹³C で標識されていない acetate のメチルカーボンシグナルで、そのシグナルの両サイドの 127.1 Hz 離れた 2 本のシグナルから成るダブルットは、D- (¹³C₆) glucose 由来の ¹³C で標識されている acetate のメチルプロトンシグナルであり、(¹³C₂) acetate であった。また (¹³C₂) acetate は、Fig. 2 の acetate のダブルットのメチルおよびカルボキシルのカーボンシグナルからも確認された。2.41 ppm のシングレットのシグナルは、¹³C で標識されていない succinate のメチレンプロトンシグナルで、そのシグナルの両サイドの 126.6 Hz 離れているダブルットは、D- (¹³C₆) glucose 由来の ¹³C で標識されている succinate のメチレンプロトンシグナルであった。succinate については、そのメチレンのカーボンシグナル (Fig. 2) より (2, 2'-¹³C₂) succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃) succinate, (1, 2-¹³C₂) succinate の混合物で、その比率は 25 : 20 : 1 であることが確認できた。特にメチレンカーボンの中央のシグナルは、(2-¹³C₁) succinate からのシグナルではなく、(2, 2'-¹³C₂) succinate からのシグナルであることが、メチレンプロトンのシグナル (Fig. 3) より確認された。

また Fig. 3 では、¹³C で標識されていない n-varerate, propionate のトリプレットのメチル

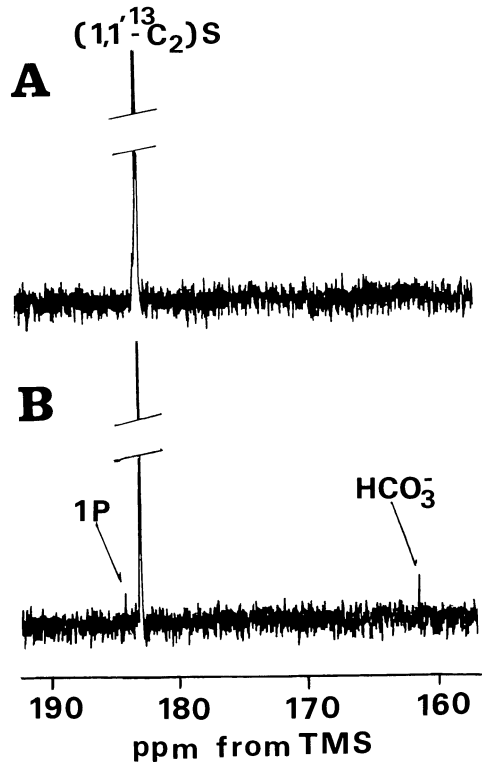


Fig. 4 67.7MHz ¹³C-NMR spectra of the spent media collected after maintenance without (A) and with muscle larva *T. spiralis* (B) at 37°C for three days in the medium enriched with (1, 1'-¹³C₂) succinate. Chemical shift is given in ppm from external TMS.
S : succinate; 1P : propionate 1-C

プロトンシグナルもそれぞれ 0.89 ppm と 1.06 ppm に観察された。

[(1, 1'-¹³C₂) succinate による観察] succinate からの volatile acid の代謝を確認するために、(1, 1'-¹³C₂) succinate を加えた培養液で、旋毛虫 ML 飼育後の培養液の ¹³C-NMR スペクトルを Fig. 4 に示した。コントロールのスペクトル (A) では、succinate の 1, 1' のカルボキシルカーボンシグナルのみ観察され、飼育後の培養

液のスペクトル(B)では,新たに HCO_3^- のカーボンシグナルと propionate のカルボキシルカーボンシグナルが観察された.代謝産物の proionate は, succinate に由来し,脱炭酸反応で生産されることを認めた.

③旋毛虫感染マウス大腿部の ^{31}P -NMR : in vitro での旋毛虫 ML の代謝産物の測定の結果,多くの有機酸が生産されており,これら有機酸の生体への影響として,生体組織の pH の低下が推測される.それを確認するために,旋毛虫感染部位のマウス大腿部筋肉の pH の変化を ^{31}P -NMR 分光法で測定した.

マウス大腿部筋肉の ^{31}P -NMR のスペクトルは, Fig. 5 に示した.スペクトルは期待された, Pi, PCr, ATP の α , β , γ それぞれの ^{31}P シグナルが観察された.コントロールマウスのスペクトル(A)と旋毛虫感染マウスのスペクトル(B)との比較では,後者の Pi のシグナルの方がわずかに高磁場側にシフトしており, pH の低下が推測された. I 式により算出された pH の値と ATP の面積強度による相対比 $[\text{ATP}(\beta)/\text{Pi} + \text{CrP} + \text{ATP}(\beta)]$ を Table 2 に示した.コントロールマウスと感染マウスの pH の値は,それぞれ 6.8 と 6.2 であり,また ATP の相対比はそれぞれ 0.33 と 0.27 であった.感染マウスの大腿部筋肉の pH は,コントロールに比べ低下しており, ATP の相対比も低下していた.

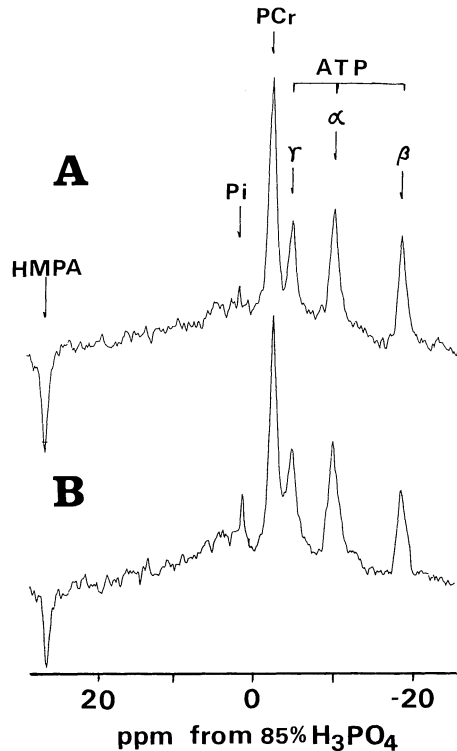


Fig. 5 In vivo ^{31}P -NMR (109MHz) spectra of the leg muscle of mice uninfected (A) and infected with *T. spiralis* (B) as measured by surface coil method. Chemical shift is given in ppm from external 85% H_3PO_4 .

ATP : adenosine triphosphate; PCr : creatine phosphate; Pi : inorganic phosphate; HMPA : hexamethyl phosphoramide (external standard)

Table 2 Characteristics of the leg muscle of mouse infected with *Trichinella spiralis* as measured by ^{31}P -NMR

Animal	Intracellular pH mean \pm SE (n=3)	ATP(β)/Pi+PCr+ATP(β) mean \pm SE (n=3)
Uninfected mouse	6.8 \pm 0.1	0.33 \pm 0.01
Infected mouse	6.2 \pm 0.1	0.27 \pm 0.01

Values are the mean \pm standard error of the triplicate assays for each animal. Pi: inorganic phosphate, PCr: creatine phosphate, ATP: adenosine triphosphate

4. 考 察

旋毛虫 ML の代謝産物の同定, 定量とその代謝経路

NMR は分光法を用いて, *in vitro* 培養条件下での旋毛虫 ML の最終代謝産物の同定および定量を行った. その結果, lactate, acetate, succinate, propionate, n-valerate, alanine が, モル比 1 : 2 : 1 : 0.6 : 0.5 : 0.6 の割合で生産されており, これら代謝産物は glucose 由来であることを確認した. さらに主要代謝産物は lactate, acetate, succinate であった.

寄生蠕虫類の glucose 代謝経路は, Embden-Meyerhof pathway と同様な glycolysis の経路と PEPCK-succinate pathway の経路が知られており, 前者の経路は主に lactate を生産し, 後者は主に succinate を生産する (Fig. 6). 蠕虫がどちらの経路に主に依存するかは, 両経路の分岐点である phosphoenolpyruvate (PEP) の位置での酵素で PEP から oxaloacetate を生産させる PEPCK と PEP から pyruvate を生産させる pyruvate kinase (PK) 両酵素の活性化

(PK/PEPCK) により推測される¹¹⁾. 旋毛虫 ML の PK/PEPCK 比は 0.34¹²⁾ であり, 本実験においても succinate を生産していることにより, 主に PEPCK-succinate pathway に依存していることが推測された.

Blackburn et al. (1986)²⁾ は, D- (¹³C₆) glucose を用いた縮小条虫 (腸管内寄生条虫) の飼育実験において, glucose 代謝産物が, (¹³C₃) lactate, (2, 3-¹³C₂) lactate の混合物, (¹³C₂) acetate のみ, (¹³C₄) succinate, (2, 2'-¹³C₂) succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃) succinate, (1, 2-¹³C₂) succinate の混合物であることを¹H, ¹³C-NMR によって示し, これら代謝産物のうち (¹³C₃) lactate, (2, 3-¹³C₂) lactate, (¹³C₂) acetate, (2, 2'-¹³C₂) succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃) succinate は, PEPCK-succinate pathway により, (1, 2-¹³C₂) succinate は, tricarboxylic acid (TCA) cycle, (1, 2-¹³C₂) succinate, (¹³C₄) succinate は, glyoxylate cycle により, 生産されることを述べている.

本実験においても D- (¹³C₆) glucose を用いた飼育実験で, 主要代謝産物の lactate, acetate,

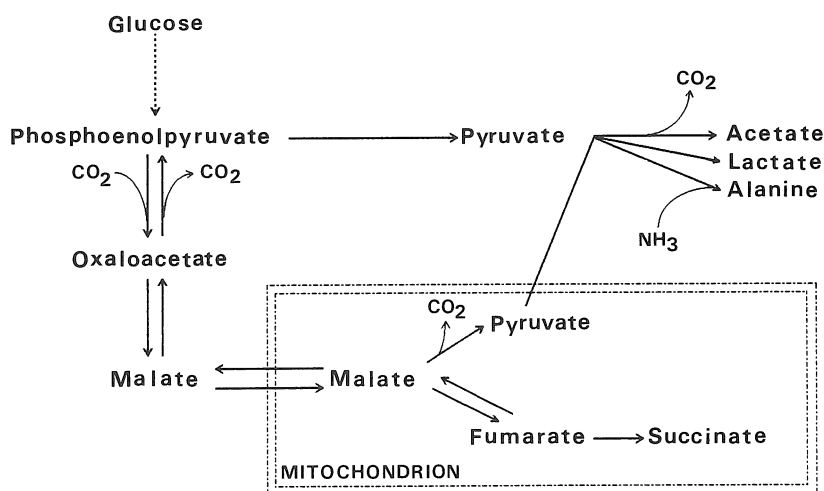


Fig. 6 The pathway of glucose metabolism for a parasitic helminth.

succinate は、それぞれ (¹³C₃) lactate, (2, 3, -¹³C₂) lactate の混合物, (¹³C₂) acetate のみ, (2, 2'-¹³C₂)succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃)succinate, (1, 2 -¹³C₂)succinate の混合物であった。また旋毛虫 ML の TCA cycle に関与する酵素は、すべて確認されていることより¹³⁾, これら代謝産物の生産経路は、Blackburn et al. (1986)²⁾ と同様に、PEPCK-succinate pathway と TCA cycle によって説明できる。すなわち、PEPCK-succinate pathway において、D-(¹³C₆) glucose は (¹³C₃) PEP, (1, 2, 3 -¹³C₃) oxaloacetate を通り (1, 2, 3 -¹³C₃) malate を形成する。さらに malate はミトコンドリアへ入り (1, 2, 2'-¹³C₃) fumarate になる。fumarate, malate 間は水の存在下において可逆的に反応し、(1, 2, 3 -¹³C₃) malate と (2, 3, 4 -¹³C₃) malate の混合物を形成する、この malate の混合物が可逆的に PEP へと進むと、PEP は (¹³C₃) PEP と (2, 3 -¹³C₂) PEP の混合物になり、再び PEP の混合物が malate へと進み、最終的に malate は (1, 2, 3 -¹³C₃) malate, (2, 3, 4 -¹³C₃) malate, (2, 3 -¹³C₂)malate の混合物を形成する。この malate の混合物が、脱炭酸され (¹³C₃) pyruvate, (2, 3 -¹³C₂) pyruvate の混合物を形成し、さらに代謝産物の (¹³C₃) lactate, (2, 3 -¹³C₂) lactate と (¹³C₂) acetate を生産する。また malate の混合物は、(1, 2, 2'-¹³C₃) fumarate, (2, 2'-¹³C₃) fumarate の混合物を形成し、さらに代謝産物の (1, 2, 2'-¹³C₃)succinate, (2, 2'-¹³C₂)succinate を生産する。(1, 2 -¹³C₂)succinate の生産では、D-(¹³C₆) glucose から形成された (¹³C₃) PEP は、(1, 2, 3 -¹³C₃) oxaloacetate へ進み、さらに citrate, isocitrate, 2-oxoglutarate 及び succinyl-CoA をへて最終的に (1, 2 -¹³C₂)succinate を生産することができる。しかし本飼育実験の結果、(2, 2'-¹³C₂)succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃)succinate, (1,

2 -¹³C₂) succinate の濃度比は 25 : 20 : 1 であり、succinate の生産における TCA cycle の関与はごくわずかであると考える。

旋毛虫 ML の glucose 代謝の主要代謝産物の代謝経路は、安定同位体 D-(¹³C₆) glucose を用いた in vitro の実験の結果より、主に PEPCK-succinate pathway に依存していることが示唆された。

また他の代謝産物について、alanine はそのメチンカーボンのシグナル (Fig. 3) より (¹³C₆) alanine と (2, 3 -¹³C₂) alanine で、濃度比が 2 : 1 の混合物であり主要代謝産物の lactate と同じ比率であることが確認された。おそらく lactate, acetate と同様に PEPCK-succinate pathway の中間代謝産物である malate の脱炭酸反応によって生じた pyruvate より生産されたと推測される。また alanine の生産に関して、aspartate-pyruvate transaminase system が、種々の寄生蠕虫類で証明されている¹⁴⁾。本実験では直接の証明はできなかったがおそらく pyruvate から alanine への反応は、アミノ基転移反応によるものと考えられる。

また propionate については、(1, 1'-¹³C₂)succinate を用いた飼育実験の結果から succinate の脱炭酸反応により生産されることが示唆された。

n-valerate の生産経路については、glucose 由来であるという以外、本実験では的確な推測ができなかった。また Castro et al. (1969)³⁾ は、旋毛虫 ML の glucose 代謝の主要代謝産物は n-valerate であると報告し、本実験の結果と異なっていたが、代謝産物として succinate を検出していない。glucose 代謝経路が PEPCK-succinate pathway に依存している回虫 (*Ascaris lumbricoides*) の glucose 代謝産物には、2-methylvalerate, 2-methylbutyrate, n-valerate 及び propionate 等の volatil acid が知られており¹⁵⁾、特に 2-methylvalerate は、succinate の脱

炭酸によって生じた propionate 二分子から生産される。また 2-methylbutyrate は、同様に succinate から生じた propionate と pyruvate から生じた acetate から生産される^{16,17}。n-valerate については、詳細な報告はないが、上記の volatile acid 同様 succinate より生産されるなら、本実験結果と Castro et al.の報告との違いは、使用した旋毛虫の系統または飼育実験条件の違いによると推測される。

旋毛虫 ML の代謝産物の生体への影響

in vivo³¹P-NMR の測定で、旋毛虫感染マウスの感染部位の大腿部筋肉への影響は、pHi の低下と ATP の相対比の低下が認められた。

Ross et al. (1981)¹⁸、Hagberg (1985)¹⁹ は、ヒトおよびウサギの骨格筋の虚血時の運動において、lactate 増加が pHi を低下させることを報告している。また虚血時における骨格筋の pHi の影響として細胞膜電位や ATP の低下についての報告もある^{10,19,20,21}。今回の in vivo 実験の結果において感染マウス骨格筋の pHi の低下は、in vitro の実験で観察された旋毛虫 ML の glucose 代謝産物の多くの有機酸が、寄生状態においても生産された結果によるものと推測される。また宿主 ATP の相対比の低下は、寄生虫感染による代謝障害の一部とも考えられるので、宿主-寄生虫相互関係の点からさらに詳細な研究が必要と考える。

今回の研究を通して NMR 分光法は、病態生理の解析においてその基礎的研究や、生体の自然状態での無侵襲的観察に対して有用な方法と考える。さらに、in vivo における人畜共通寄生虫症の病態生理の解析への NMR 分光法の応用は、今までに報告がなく初めての試みであり、さらに発展が期待できると考えられた。

従来、数ミリメートルの小形の寄生線虫に対する in vitro での薬物効果は、その線虫の動きの阻止によって判定されていたが、代謝産物の定量や、代謝経路が容易に観察できれば、更に客観的な薬物効果の判定や作用機序の解明の研

究に、有用になる。今回行った¹H-NMR 分光法は、サンプル測定時間 3-5 分で前処理なしに一回の操作で代謝産物の同定、定量ができ、寄生線虫の薬物効果のスクリーニングには有用な手段になると考えられた。

4. ま と め

in vitro 培養条件下で旋毛虫症の原因線虫である旋毛虫 ML の代謝産物を、¹H-NMR 分光法を用いて調べた。その結果 lactate, acetate, succinate, propionate, n-valerate 及び alanine が 1 : 2 : 1 : 0.6 : 0.5 : 0.6 のモル比で生産されていた。さらに D- (¹³C₆) glucose を用い、¹³C-NMR 分光法で測定した結果、これら代謝産物は、全て glucose 由来であり、また主要代謝産物の lactate, acetate, succinate は、(¹³C₃) lactate, (2, 3-¹³C₂) lactate の混合物、(¹³C₂) acetate のみ、(2, 2'-¹³C₂) succinate, (1, 2, 2'-¹³C₃) succinate, (1, 2-¹³C₂) succinate の混合物であり、その代謝経路は主に PEPCK-succinate pathway に依存していることが推測された。

³¹P-NMR 分光法での旋毛虫感染部位のマウス大腿部筋肉の観察では、pHi の低下と ATP の相対比の低下が認められた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、御指導、御校閲下さいました埼玉医科大学教授堀桑太郎博士、国立予防衛生研究所前部長逢坂昭博士、ならびに主任研究官加藤賢三博士、主任研究官高橋正和博士に深謝し、また NMR 測定と御指導下さいました日本電子松下和弘氏に感謝致します。旋毛虫人手に際して御援助いただいた千葉大学医学部教授小島荘明博士、助教授新村宗敏博士に御礼申し上げます。

文 献

- 1) M. Nishina, E. Hori, K. Matsushita, et al.: ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic study of the metabolites in young adult Angiostrongylus cantonensis maintained in vitro, Mol. Biochem. Parasitol., 28: 249-256, 1988.
- 2) B.J.Blackburn, H.M.Hutton, M.Novak, et al.: Hymenolepis diminuta: Nuclear magnetic resonance analysis of the excretory products resulting from metabolism D- (¹³C₆) glucose, Exp. Parasitol., 62: 381-388, 1986.
- 3) G.A.Castro, D.Fairbairn: Carbohydrates and lipids in Trichinella spiralis larvae and their utilization in vitro, J. Parasitol., 55: 51-58, 1969.
- 4) C.A.Behm, C.Bryant, A.J.Jhones: Studies of glucose metabolism in Hymenolepis diminuta using ¹³C nuclear magnetic resonance, Int. J. Parasitol., 17: 1333-1341, 1987.
- 5) E. Bengsch, B.Perly, C.Deleuze, et al.: A general rule for the assignment of the carbon-13NMR peaks in fatty acid chains, J. Magn. Reson., 68: 1-13, 1986.
- 6) R. E. London, V.H.Kollman, N.A.Matwiyoff: The quantitative analysis of carbon-carbon coupling in the ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of molecules biosynthesized from ¹³C enriched precursors, J. Am. Chem. Soci., 97: 3565-3573, 1975.
- 7) N. E. Mackenzie, R. L. Baxter, A. I. Scott, et al.: Uniformly ¹³C-enriched substrates as N.M.R. probes for metabolic events in vivo. Application of double quantum coherence to a biochemical problem, J. Chem. Soci. Chem. Comm., 3: 145-147, 1982.
- 8) A. Ohsaka, K. Yoshikawa, S. Vamaya, et al.: ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic study of glucose metabolism in Treponema phagedenis (Reiter strain), Physiol. Chem. Phys., 13: 159-164. 1981.
- 9) K. Matsushita, K. Yoshikawa, A. Ohsaka: ¹H-NMR of human urine. An application of NMR spectroscopy in clinical pathology, JEOL news anal. instru. 18A: 54-56, 1982.
- 10) 津保雅彦, 高井宏明, 井形高明, 他: 骨格筋の温阻血に対する耐容性の研究—³¹P-MRS を用いて—, 日本核磁気共鳴医学誌, 7: 258-265, 1988.
- 11) C. Bryant: Carbon dioxide utilisation, and the regulation of respiratory metabolic pathway in parasitic helminths, Adv. Parasitol., 13: 35-69, 1975.
- 12) C.W.Ward, G.A.Castro, D. Fairbairn, : Carbon dioxide fixation and phosphoenolpyruvate metabolism in Trichinella spiralis larvae, J. Parasitol., 55: 67-71, 1969.
- 13) E.Goldberg: Studies on the intermediary metabolism of Trichinella spiralis, Exp. Parasitol., 6: 367-382, 1957.
- 14) J. Barrett: Biochemistry of parasitic helminths, Macmillan, London, 1981, P73-148.
- 15) T. von Brand: Biochemistry of Parasites, 2nd edit., Academic Press, New York, 1973, P89-170.
- 16) H.J.Saz, A.Weil: The mechanism of the formation of α -methylbutyrate from carbohydrate by Ascaris lumbricoides muscle, J. Biol. Chem., 235: 914-918, 1960.
- 17) H.J.Saz, A. Weil: Pathway of formation of α -methylvalerate by Ascaris lumbricoides, J. Biol. Chem., 237: 2053-2056, 1962.
- 18) D.B.Ross, G.K.Radda, D.G.Gadian, et al.: Examination of a case of suspected McArdle's syndrome by ³¹P nuclear magnetic resonance, New Eng. J. Med., 304: 1338-1342, 1981.
- 19) H. Hagberg: Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP, Pflugers Arch. 404: 342-347, 1985.
- 20) K.R.Thulborn: ³¹P n.m.r. studies of energy metabolism and tissue pH in the ischaemic rat leg, Biochem. Soc. Transact., 9: 237-238, 1981.
- 21) R.J.Newman: Metabolic effects of tourniquet ischaemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy, J.Bone Joint Surg., 66B: 434-440. 1984.

^1H , ^{13}C and ^{31}P -NMR spectroscopic study of glucose metabolism of muscle larva *Trichinella spiralis* (U.S.A. Strain), and the effects of the end-products on the host (mouse).

Masami Nishina

(Department of Parasitology, Saitama Medical School)

^1H - and ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy was used to identify and quantitate metabolites excreted by muscle larva *Trichinella spiralis* maintained aerobically in the presence of D- ($^{13}\text{C}_6$) glucose and (1, 1'- $^{13}\text{C}_2$) succinate. End-products of glucose metabolism studied by ^1H -NMR were lactate, acetate, succinate, propionate, n-valerate and alanine, at the molar ratio of 1 : 2 : 1 : 0.6 : 0.5 : 0.6. ^{13}C -NMR measurement proved that all the products originated from the glucose in the medium via the phosphoenolpyruvate carboxykinase-succinate pathway and the tricarboxylic acid cycle.

In vivo ^{31}P -NMR spectra were also taken by the surface coil method from the leg muscle of mice which had been infected with *T. spiralis*. Intracellular pH and relative amount of ATP in the leg muscle of the infected mice were found to decrease significantly as compared with that of control mice.