鉤虫幼虫の Collagenase 様物質について

Studies on the Collagenase-like Enzymes of Larvae of *Ancylostoma caninum*

群馬大学医学部衛生学教室 (主任 沢田利貞教授)

山 崎 茂

Shigeru Yamazaki

Department of Hygiene & Parasitology, School of Medicine, Gunma University

(Director · Prof. T. Sawada)

緒 言

鉤虫幼虫が経皮感染によつて最終宿主に感染することは周知の事実である。しかも幼虫が損傷を起した皮膚面あるいは毛根部位を通つて皮膚を穿通するのではなく、健康皮膚を短時間に通過することはきわめて興味深い問題である。すなわち、幼虫は角質層・透明層・中間層・真皮を通過するのであるから、これらの層の基質を形成する Keratin, Eleidin, Keratohyalin, Collagen および Elastinなどを溶解する酵素を分泌液中に有しているのではないかと考えられる。Oakleyら(1946)はガス壊疽菌培養濾液から得た k-toxin が Collagenase 作用を有することを証明した。Lewartら(1954, 1956)は経皮感染をおこなう種々の蠕虫幼虫の皮膚侵入機序を研究した結果、幼虫侵入時における Basement membrane および Ground substance の組織学的変化はこれら幼虫の分泌する酵素、特に Collagenase 様物質の作用によつて起るものであらうと述べている。さらに氏らは *Bilharzia mansoni* の Cercaria および *Strongyloides ratti* の幼虫の分泌する Collagenase 様物質について報告をした。

著者は鉤虫幼虫の健康皮膚侵入は皮膚の主成分である Collagen および Keratin を溶解する Collagenase および Keratinase を幼虫が分泌するために起るのであらうと考え、まず Collagenase についての研究をおこなつたところ知見を得たのでここに報告する。

実験材料および方法

実験に使用した幼虫および基質は次のようにして調製した。

鉤虫幼虫は、鉤虫感染犬よりとつた鉤虫卵含有便を瓦培養して孵化した幼虫を集めた。瓦培養は鉤虫卵含有便を瓦に塗抹し孵卵器 (28°C) に 6~40 日間飼育した。

基質は新鮮な犬の皮を鉋および肉挽器で細挫し、ついで少量の水を加えて mixer でさらに細挫し、水洗濾過したのち約 5 倍の Aceton をもつて 2~3 回洗い脱脂後乾燥し、これに水を加えさらに塩酸を加え酸性 (pH 2.0) にし、Pepsin を加え 37°C において消化し、ガーゼで濾過した。この濾液に苛性ソーダを加え中和し、さらに Aceton を等量加えて濾紙で濾過し、濾紙上の沈渣を 2~3 回水洗後さらに Aceton で洗つて基質 (Collagen) を得た (Diagram 1)。この Collagen に Oakley¹⁾の方法によつて Azo-coupling をおこなつて紫色の Azo-collagen [Azo-dye-coupled (hide powder) collagen] を得た (Diagram 2)。

まず 2~5 mg の Azo-coll. を小試験管に入れ Phosphate buffer (M/20, pH 7.0) 0.5 ml を加え、これに鉤虫幼虫を 2,000~40,000 隻加え、37°C に 1~8 時間 incubate したのち試験管を取出し、これらの試験管内液の総量が 3 ml になるように水を加え、次に遠心して上清をとり、これを Microcuvette に移し、遊離した Azo 色素について Coleman Spectrophotometer (General) をもつて 520 m μ の波長で Optical density を観察した。波長 520 m μ はあらかじめ Azo 色素の吸収スペクトルを検したところ 520 m μ において最大の peak を認めたのでこの波長で計測をおこなつた。なお被検液の着色が強すぎる場合は適当に溜水で稀釈し、また常に Buffer のみの対照をおきその計測した値を実験値より減じて数値を計算した (Fig. 1)。

Fig. 1 Absorption curve of Azo-dye

Fig. 2 The effect of pH on dye release from Azo-coll.

5 mg Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer incubated 4 hours at 37°C

Fig. 3 Activity of living larvae of *A. caninum* on Azo-coll. with increasing time

2 mg (1) and 5 mg (2) Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer at pH 7.0 incubated at 37°C

Fig. 4 Activity of living larvae of *A. caninum* on Azo-coll. with various numbers of larvae

5 mg Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer at pH 7.0 incubated 4 hours at 37°C

Fig. 5 Activity of living larvae of *A. caninum* and trypsin on Azo-coll. with or without ovomucoid

T: Trypsin 5×10^{-3} mg

L: Living larvae 10,000

O.M.: Ovomucoid 10^{-3} mg

5 mg Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer at pH 7.0 incubated 3 hours at 37°C

実験成績

1) pH と酵素活性について

Buffer の pH と酵素活性の強弱の関係をj知るために, Phosphate buffer の pH をそれぞれ 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0とし, これら各種 Phosphate buffer に培養9日目の幼虫5,000 隻および基質 2 mg を加え 37°C に4時間 incubate したのち Optical density を測定したところ酵素活性は pH 7.0 においてもつとも高いことがわかつた。しかし至適 pH の範囲は比較的広いことがわかつた (Fig. 2)。

2) 酵素活性について

鉤虫卵を培養して12日目の *filaria* 型幼虫2,000 隻および8日目の *filaria* 型幼虫5,000 隻をそれぞれ 5 mg, 2 mg の基質と4~8時間作用させ Azo 色素の遊離状態を測定したところいずれも反応時間の経過に伴ない酵

Fig. 6 Activity of various living larvae on Azo-coll.

5 mg Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer at pH 7.0 incubated 3 hours at 37°C

— (1) Prepared from the same lot

---- (2) Prepared from the various lot

Fig. 7 Effect of various metal ions on dye release from Azo-coll.

2 mg Azo-coll. in 0.5 ml of M/20 phosphate buffer containing various metal ion (0.001 M) incubated 4 hours at 37°C

素の活性値は8時間までの観察ではほとんど直線的に増加することがわかつた (Fig. 3)。

3) 幼虫数と酵素活性について

幼虫の数による酵素活性の変化を知るために培養12日

Diagram 1. Preparation of Collagen **Diagram 2. Preparation of Azo-collagen**

目の鉤虫 *filaria* 型幼虫を 5,000, 10,000, 20,000, 30,000, 40,000 隻ずつとり、前と同様に Azo-coll. に入れ 37°C, 4 時間 incubate したのち各々の Optical density を観測したところ幼虫の数の増大とともに酵素活性も増大することがわかった (Fig. 4)。

4) 熱による影響について

60°C 10 分, 60°C 20 分, 60°C 30 分, および 100°C 10 分加熱した約 5,000 隻の幼虫をそれぞれ基質に加えて各

々の色素の遊離状況を観察したところ、無処置の幼虫の色素の遊離量を 100% としたとき 60°C 10 分加熱した幼虫の Azo 色素の遊離量は 17%, 60°C 20 分加熱の幼虫は 12%, 60°C 30 分加熱の幼虫は 11%, 100°C 10 分加熱の幼虫は 1% であった。すなわち加熱の強さに比例して Azo 色素の遊離は減少することがわかった (Fig. 2)。

5) Trypsin 阻害剤 (Ovomucoid) との関係

犬鉤虫幼虫の Azo-collagen 分解酵素中に Trypsin 作用があるかどうかを検査するために本実験をおこなった。

Azo-collagen (5 mg) に Trypsin (5×10^{-3} mg) を 3 時間 (37°C, pH 7.0) 作用させたものの Optical density は 3.4 であった (Fig. 5 (1))。同様に同量の Trypsin に Ovomucoid (10^{-3} mg) を加えて作用させたものの Optical density (1)(2) は 0.88 であつて Ovomucoid による Azo-coll. 分解作用の阻害が認められた。次に鉤虫幼虫 10,000 隻を Azo-collagen (5 mg) に同様に作用させたときの Optical density (3) は 2.55 であつて同数の鉤虫幼虫に Ovomucoid (10^{-3} mg) を加えて Azo-collagen (5 mg) に同様に作用させたときの Optical density (4) は 2.14 であった。これらを総合すると Trypsin の Azo-collagen 分解作用は Ovomucoid の添加によつて著明に阻害されるが鉤虫幼虫の Azo-collagen 分解作用は Ovomucoid の添加によつて僅少の阻害が認められたが大した影響を受けなかつた。すなわち鉤虫幼虫の Azo-collagen 分解酵素中には Trypsin 作用を有する物質は僅少であつて Azo-collagen の幼虫による分解は主として Collagenase 様酵素によることがわかった。

6) 幼虫の培養日数による酵素活性の差異

鉤虫の感染は *filaria* 型幼虫によつて起るものであるが、*filaria* 型幼虫はその新旧を問わず常に同様な経皮感染能を有するものであるかどうかを確認するために本実験をおこなった。すなわち鉤虫感染犬より得た虫卵を 37°C において培養し、培養 1 週後の幼虫、2 週後の幼虫および 6 週後まで各週の幼虫を各々 10,000 隻ずつをとつて基質 5 mg, 反応時間 3 時間における Azo-coll. よりの色素の遊離状況を検したところ、培養 1 週後の幼虫において最高の Azo 色素の遊離を認め、2 週後および 3 週後の幼虫においてはそれらの酵素作用は急激に減弱するのを認めた。また培養 4 週、5 週および 6 週後の幼虫の酵素作用は徐々に減弱することを認めた (Fig. 6)。

なお種々の lot から培養 6 日～6 週目の幼虫について同様の実験をおこなったところ培養 6 日後の幼虫には既に強い酵素作用を認め、培養 1 週後の幼虫には前と同様

最強の酵素作用を認め、培養12日後および2週後の幼虫は日数の経過とともに酵素作用は急激に減弱し、その後6週後までは2週後の幼虫の酵素作用と大差のない結果が認められた。すなわち *filaria* 型幼虫の酵素作用は培養1週後に最強となり、次の1週間の間に急激に減弱し、その後はその作用に増減なく一定度の活性を保持しているものと考えられる。

7) 各種金属イオンの影響

鉤虫感染予防の見地より各種金属の該酵素に及ぼす影響を検討した。すなわち $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 計9種の金属を基質2mg, 幼虫5,000 隻に M/ 10,000 濃度になるように添加し、4時間後の結果を観察したところ、 Hg^{2+} はきわめて著明に酵素作用を阻害すること、次に Mg^{2+} Cu^{2+} Pb^{2+} Zn^{2+} の順に酵素作用を阻害することを認めた (Fig. 7)。

考 察

鉤虫の経皮感染については卵から孵化した *Rhabditis* 型幼虫はさらに発育して *filaria* 型幼虫となり5~7日のうち被囊(感染)幼虫となつて感染能力をそなえ、この感染幼虫が固有宿主の健康皮膚に接触すると迅速に皮膚を穿通することは周知の事実である。本実験によつてこの経皮感染の機構の1つが幼虫の *Collagenase* によるだろうということが定量的に証明されたことは興味あることと考える。また *filaria* 幼虫の自然界における生存期間については長期にわたり生存するものであるが、これらの生存期間中の幼虫の経皮感染能力に関しては諸研究者の報告がある。すなわち孵化直後の仔虫は感染能力をほとんどもたないが(明石)、培養3~5日の幼若仔虫は弱い感染能を有し(鈴木)、感染して成虫になる能力を有しその率は被囊幼虫と同じである(浅田)。培養7~14日の成熟仔虫は高い感染能力を有する(鈴木・熊谷・稻田・笹田)が、特に7~9日の仔虫の侵入力をもつとも旺盛であり、10~14日のものこれに準じ(笹田)、15日以後の仔虫の感染能力は低下し(山口)、30日以後のものは感染能の強いものもあるが一般に感染力は低下し、50~

70日の仔虫は感染力衰え皮下に侵入するもその後の進行は一層困難である(笹田・山口・白井・Payne)。

本実験において培養6日より42日にわたる感染仔虫の酵素活性の消長をみると、7日の仔虫の酵素活性は最高を示し、その後7日の間に酵素活性は急激に減弱し、その後は42日まで著しい増減のないという実験成績は諸研究者の報告と興味深い関係を有するものと考えられる。

結 論

- 1) 犬鉤虫幼虫は *Collagenase* 様酵素を有し、このに適 pH は 7.0 であり、60°C30分でその大部分、100°C10分で完全に酵素作用は失活される。
- 2) 該酵素は *Trypsin* 阻害剤である *Ovomucoid* の添加によつてもほとんど影響を受けない。
- 3) 該酵素は Hg^{2+} によつて強い阻害を受けるが、 Ca^{2+} Mg^{2+} によつてはかえつて賦活される。
- 4) 該酵素は培養7日目、すなわち *filaria* 型幼虫の初期において特に強く、14日目の幼虫には著しく減弱し、その後は顕著な増減はなかつた。

文 献

- 1) Oakley, C. L., Warrack, G. H. & van Heymingen, W. E.: J. Pathol. Bact. 58, 229~235, 1946.
- 2) Lewert, R. M. & Lee, C. L.: J. Infect. Dis. 95, 13~51, 1954.
- 3) Lewert, R. M. & Lee, C. L.: J. Infect. Dis. 97, 177~186, 1955.
- 4) Lewert, R. M. & Lee, C. L.: J. Infect. Dis. 99, 1~14, 1956.
- 5) Fredericq, E. & Deutsch, H. F.: J. Biol. Chem. 181, 499~510, 1949.
- 6) 明石真隆: 東京医事新誌, 1848, 2621~2630, 大2.
- 7) 鈴木憲二: 日本微生物学雑誌, 19, 2131~2180, 大14.
- 8) 白井光次: 日本病理学会会誌, 第16年, 223~233, 大15.
- 9) 山口正道・山口操: 東京医事新誌, 2563, 540~546, 昭3.
- 10) 稲留藤次郎: 慶応医学, 12, 419~452, 昭7.
- 11) 笹田丁二: 慶応医学, 15, 1843, 昭10.

(受付: 1958年11月20日, 特別掲載)