

鉤虫幼虫の産生する Hyaluronidase について (1)

多満城 智行

群馬大学医学部衛生学教室

(昭和36年9月4日受領)

緒言

鉤虫幼虫の経皮感染機序については、幼虫が損傷をおこした皮膚面、あるいは毛根部を通つて皮膚を穿通するのではなく、健康皮膚面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。すなわち幼虫は表皮および真皮の基質を形成する keratin, hyaluronic acid (以下 HA と略), collagen および elastin などを溶解する物質を、その分泌液中に有しているのではないかということが考えられる。Kuntz (1953) は、*Schistosoma mansoni* の cercariae を用い spreading factor を証明し、Bruni, A. (1939) は *Ancylostoma duodenale* の extracts について Spreading power の存在を、Bradin (1953) は *Endamoeba histolytica* につき hyaluronidase (以下 HD と略) の存在をそれぞれ認めている。また Lewart (1954) は蠕虫幼虫の侵入機序について、幼虫が分泌液中の酵素を用いて侵入すると推定し、山崎(1959)は *Ancylostoma caninum* 幼虫を用いて、collagenase 様物質を認め、また細菌において Crowley (1951), Mc Clean (1936) らが *Streptococcus hemolyticus*, *Cl. welchii*, *Cl. septicum* について HD を認め、本酵素が組織侵入に寄与していると報告している。

著者等は鉤虫幼虫の経皮感染機序の1つとして HA を溶解し経皮感染に重要な意義をもつと見られる HD を鉤虫の幼虫が分泌するのであろうと考えて研究をおこない知見を得たのでここに報告する。

実験材料および実験方法

犬鉤虫幼虫虫体：鉤虫人工感染犬より得た鉤虫卵含有便を瓦培養(28°C, 8日培養)して孵化した幼虫を集めて数を計測し、この幼虫50,000隻に生理食塩水1mlを加えさらに37.5°C, 24時間培養した後、遠心洗滌(1,000 rpm, 5分)を3回おこない、得た沈殿を幼虫虫体として以下の実験に使用した。

培養上清：培養8日目の *filaria* 型幼虫50,000隻をとり、生理食塩水1mlを加えて37.5°C, 24時間培養後

遠心(1,000 r.p.m, 5分)をおこない、得た上清を培養上清として使用した。この上清の乾燥重量は100 γ /mlであつた。またこの培養上清を100°C, 10分間加熱処理したものを加熱培養上清として実験に供した。

音波破壊抽出液：培養8日目の *filaria* 型幼虫500,000隻を乳鉢にて磨砕し、0.2M Borate buffer (pH 6.4) 20mlを加えて、Sonic disintegrator (3.1 mA, 10 kc) にて30分曝射後遠心(2,500 rpm, 10分)をおこない、得た上清を幼虫の音波破壊抽出液として使用した。またこの音波破壊抽出液を100°C, 10分間加熱処理したものを加熱音波破壊抽出液として実験に供した。

反応術式

(1) 濁度法：基質として HA (N.B.C. 製品) を用いた。0.4 mg/ml の HA 溶液 1ml に pH 6.4 Borate buffer 1ml を加え 37.5°C において、幼虫虫体あるいは培養上清 1ml を加えて後 0, 1, 2, 4 各反応時間に、この 1ml 宛に Bovine Albumine (第1化学薬品) の 4% 溶液 (0.2 M acetate buffer pH 4.2) 5ml を加え、生じた濁度を室温放置 5分後 Coleman Spectrophotometer general (600 m μ) を用いて計測した。

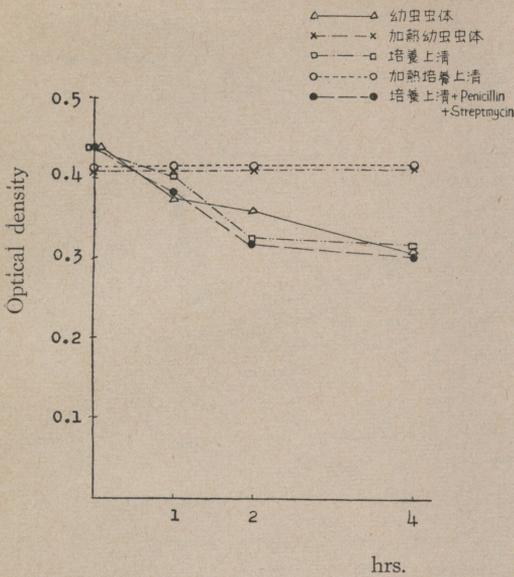
(2) 粘度法：上記の HA 溶液 (0.4 mg/ml) 1ml に pH 6.4 の Borate buffer 1ml を加え、これに培養上清 1ml を加えて 37.5°C にて作用させた後 0, 1, 2, 4 各時間における粘度の低下を Ostwald 粘度計を用いて降下速度の変化を計測した。

実験成績

(1) 幼虫虫体の活性

8日培養の *filaria* 型幼虫虫体につき濁度法を用いて酵素活性を検討したところ、対照の加熱虫体の場合は0時間値より4時間値迄0.410と変化しないのに反し、幼虫虫体の場合は0時間値0.430, 1時間値0.375, 2時間値0.360, 4時間値0.309と反応時間の経過と共に濁度の減少を示し酵素活性が認められた(第1表)。

(2) 培養上清の活性

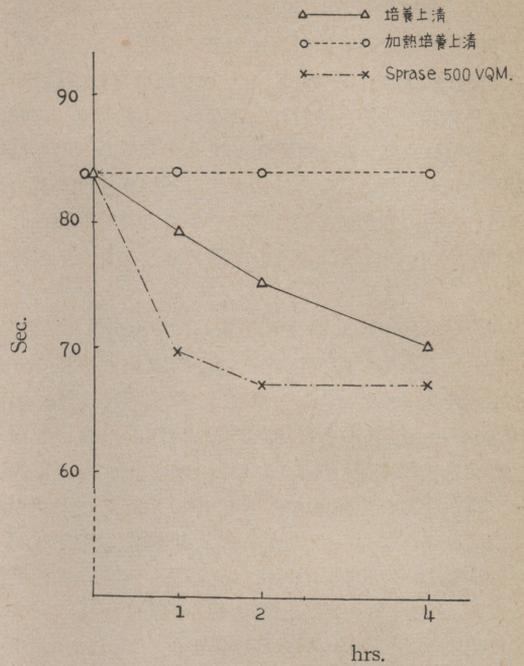


第 1 図 幼虫体および培養上清の活性 (濁度法)

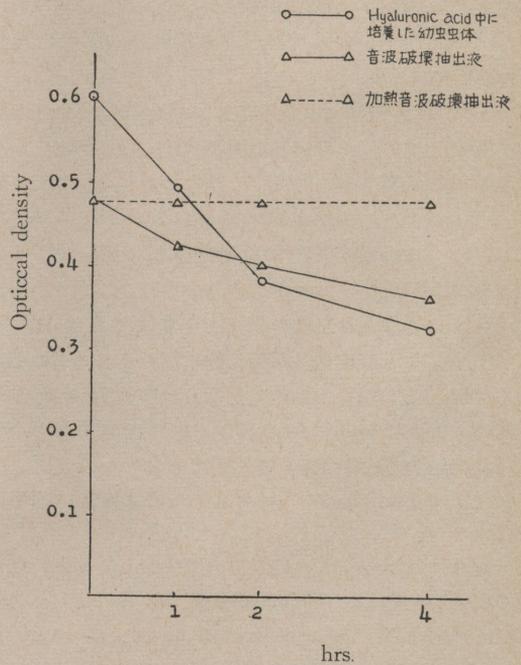
(a) 濁度法による検討: 8日目の filaria 型幼虫の培養上清につきまず濁度法を用いて検討をおこなった. 対照として加熱培養上清については0時間値より4時間値迄0.410と濁度変化を全く示さないのに反し, 培養上清の場合は0時間値0.430, 1時間値0.400, 2時間値0.320, 4時間値0.310と反応時間の経過と共に濁度の減少を示して酵素活性が認められた(第1表).

次に雑菌の影響を考慮して8日培養の filaria 型幼虫浮遊液に penicillin を500単位/mlおよび streptomycin を0.4 mg/mlに加えて, 24時間培養をおこない, その上清について検討をおこなったが, この場合も0時間値0.430, 1時間値0.385, 2時間値0.318, 4時間値0.303と濁度の減少を示し, 抗生物質の有無に拘らず酵素活性の認められることが明らかになった(第1表).

(b) 粘度法による検討: 培養上清の酵素活性を粘度法を用いて検討したところ, 対照の加熱培養上清については0時間値から4時間値迄84.0秒と全く変化が認められないが, 培養上清の場合は0時間値84.0秒, 1時間値79.0秒, 2時間値75.0秒, 4時間値69.0秒と反応時間の経過と共に粘度の低下を示して酵素活性が認められた. なおこの酵素活性を検討する為に HD として市販されている sprase (500 VQM) を用いて検討をおこなったところ0時間値84.0秒, 1時間値69.0秒, 2時間値67.0秒, 4時間値67.0と培養上清の場合と同様の粘



第 2 図 培養上清および sprase の活性 (粘度法)



第 3 図 音波破壊抽出液および hyaluronic acid 中に培養した幼虫虫体の活性 (濁度法)

度の低下曲線を示した(第2表)。

(3) 鉤虫幼虫の音波破壊抽出液の活性

濁度法により HA 溶液 1 ml に音波破壊抽出液 2 ml を加えて酵素活性を検討したところ、0時間値 0.480, 1時間値 0.420, 2時間値 0.400, 4時間値 0.360 と反応時間の経過と共に濁度の減少を示し、酵素活性が認められた。対照の加熱音波抽出液については0時間値から4時間値迄 0.475 と全く変化が認められなかった(第3表)。

(4) hyaluronic acid 中に培養した幼虫虫体の活性

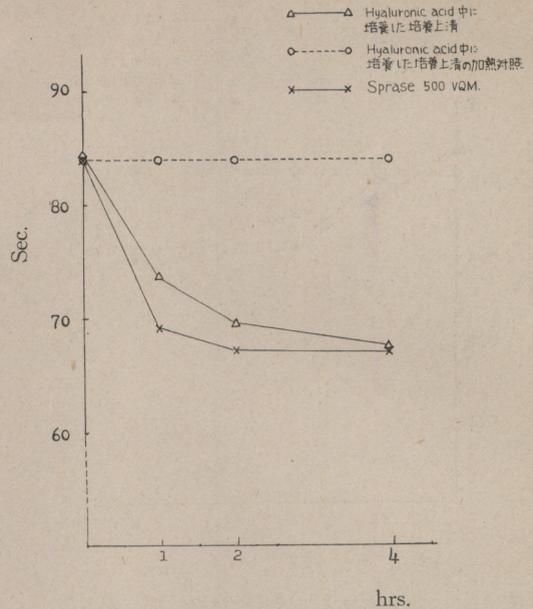
鉤虫幼虫虫体の酵素活性を適応的に高める為に、幼虫虫体を Harris *et al.* の方法に準じ得た HA 溶液 (0.4 mg/ml) 1 ml 中に 37.5°C, 24時間培養した後、生理食塩水にて遠心洗滌(2,500 r.p.m, 5分)を3回繰返し、得た沈澱の洗滌虫体を HA 中に培養した幼虫虫体として、これについて濁度法により酵素活性を検討した。濁度は0時間値 0.600, 1時間値 0.495, 2時間値 0.385, 4時間値 0.325 と反応時間の経過と共に減少を示して、前述の HA 中での培養を行っていない幼虫虫体の場合に比し、より急激な濁度の低下を示し、これは HA 中での培養により幼虫の酵素活性が適応的に高められたものと考えられる(第3表)。

(5) hyaluronic acid 中に幼虫を培養した場合の培養上清の活性

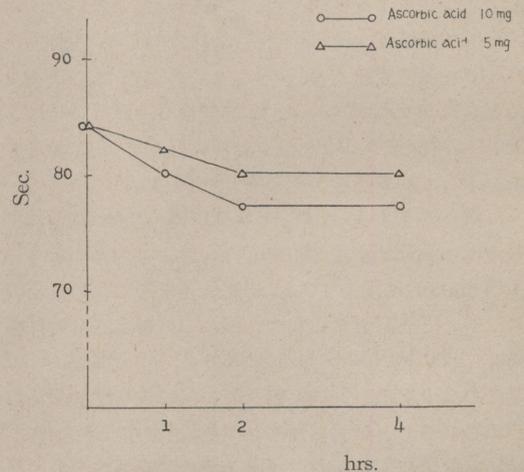
前述の HA 中に幼虫を培養した場合の幼虫虫体と同様の操作を行い、この培養上清を、HA 中に幼虫を培養した場合の培養上清として、これにつき粘度法により酵素活性を検討した。粘度は0時間値 85.0 秒, 1時間値 73.5 秒, 2時間値 69.5 秒, 4時間値 67.0 秒と低下を示し、前述((2)-b)の HA 中での培養を行っていない場合に比し、より急激な粘度の低下を示し、これは HA 中での培養により酵素活性が適応的に高められたものと考えられる。この場合の加熱対照は0時間値 84.0 秒, 1時間値 84.0 秒, 2時間値 84.0 秒, 4時間値 84.0 秒と全く変化を示さなかつた(第4表)。

(6) hyaluronic acid に対する ascarbic acid の作用の検討

ascorbic acid が HA の粘度を減少せしめるということが、知られている(Madinaveita *et al.*, 1941)ので、この点を検討する為、ascorbic acid 5 mg および 10 mg を各々 Borate Buffer 2 ml に溶解したものについて、粘度法により検討をおこなつたところ、5 mg の場合は0時間値 84.0 秒, 1時間値 82.0 秒, 2時間値 79.5 秒を示し、



第4図 hyaluronic acid 中に培養した培養上清および sprase の活性)粘度法)



第5図 hyaluronic acid に対する ascorbic acid の作用の検討(粘度法)

10 mg の場合は0時間値 84.0 秒, 1時間値 80.7 秒, 2時間値 77.0 秒と何れの場合も、共に粘度の低下を認めしたが、4時間値は 5 mg が 79.5 秒, 10 mg が 77.0 秒と2時間値と同値を示しており、この成績を培養上清での結果と比較した場合、実験に使用した培養上清は、その 1 ml の乾燥重量が 100% であつて、ascorbic acid の以上の場合に比べ極めて微量で、遙かに強い活性を示して

おり、犬鉤虫幼虫の示す活性は、ascorbic acid による作用としては証明され得ない(第5表)。

総括ならびに考察

鉤虫幼虫の経皮感染機序の1つとして、HA を溶解し経皮感染に重要な意義をもつと見られる HD を、鉤虫幼虫が分泌することを想定し、濁度法および粘度法により犬鉤虫の8日培養幼虫について HD の検討をおこなったところ幼虫虫体および培養上清に酵素活性を認めることができた。

(Madinaveita *et al.*, 1941) は ascorbic acid が HA の粘稠度を減ずるとの報告をおこなっているので、この点を検討したところ、ascorbic acid の作用は培養上清の示す活性に比較して極めて弱く、犬鉤虫幼虫の示す酵素活性は ascorbic acid による作用としては証明されない。なお HD として市販されている sprase につき検討し、培養上清はこれと同様の酵素活性を示すことを認めた。また幼虫虫体を音波破壊した抽出液にも HD 活性を認めることができた。さらに培養上清および幼虫虫体を HA 中に培養することにより酵素活性が適応的に高められることを認めることができた。以上の活性は何れも 100°C 10 分の加熱により失活する。

以上により鉤虫幼虫の経皮感染機構の1つとして幼虫が経皮侵入に際して HD を分泌し、皮膚の HA を溶解し経皮感染をおこなふことが推論された。以上の成績は Kuntz がおこなった *Schistosoma mansoni* の cercariae についての spreading factor の報告と関連しさらに追究を要する興味ある問題と考えられる。

結 論

(1) 犬鉤虫の8日培養 *filaria* 型幼虫について、虫体および培養上清につき濁度法および粘度法を用いて HD 活性を認めることができた。

(2) 犬鉤虫の8日培養 *filaria* 型幼虫の音波破壊抽出液につき濁度法を用いて HD 活性を認めることができた。

(3) 幼虫虫体および培養上清の HD 活性は、幼虫を HA 中に培養することにより適応的に高められる。

(4) 幼虫虫体および培養上清の HD 活性は 100°C、10 分間加熱により失活する。

擲筆に当り、終始御懇切な御指導にあづかつた沢田利貞教授、今村晋助教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Bradin, J. L. Jr. (1953): Studies on the production of hyaluronidase by *Endamoeba histolytica*. Exp. Parasit., 2(3), 230-235.
- 2) Bruni, A. (1939): Il fattore die diffusione nell ankylostoma duodenale. Sett Med., 27, 1-7.
(Duran-Reynals, F. (1942): Bacteriol. Revs, 6, 232. より引用).
- 3) Crowley, N. (1951): The effect of amino acids and other substances on the activity of streptococcal hyaluronidase. J. gen. Microbiol., 5(5), 906-918.
- 4) Dorfman, A. (1948): The kinetics of the enzymatic hyaluronidase of hyaluronic acid. J. Biol. Chem., 172, 377-387.
- 5) Harris, S. & Harris, T. N. (1949): The measurement of neutralizing antibiotics to streptococcal hyaluronidase by turbidimetric method. J. Immunol., 63, 233-248.
- 6) Kuntz, R. E. (1953): Demonstration of the "Spreading factor" in the cercariae of *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasit., 2(4), 397-402.
- 7) Lewart, R. M. & Lee, C-L (1954): Studies on the passage of Helminth larvae Host tissues. J. Infect. Dis., 95, 13-51.
- 8) Madinaveita, J. & Quibbel, T. H. H. (1941): Studies on diffusing factor. Bioch. J., 35, 457-460.
- 9) Mc Clen, D. (1936): Factor in culture filtrates of certain pathogenic bacteria which increase the permeability tissue. J. Path. Bact., 42, 477-512.
- 10) 山崎茂(1959): 鉤虫幼虫の Collagenase 様物質について。日本衛生学雑誌, 13, 6-10.

STUDIES ON HYALURONIDASE OF ANCYLOSTOMA CANINUM LARVAE I.

TOMOYUKI TAMAKI

(Department of Hygiene, School of Medicine, Gunma University, Japan)

Studies on hyaluronidase of *Ancylostoma caninum* larvae by turbidimetric and viscosimetric method using hyaluronic acid as substrate were carried out and the following results were obtained.

- 1) Hyaluronidase activities were observed in the larval worm, the culture fluid and the extracts obtained from the larvae by sonic vibration.
 - 2) With the addition of hyaluronic acid to the culture fluid the activity of hyaluronidase was accelerated.
 - 3) The activity of hyaluronidase was destroyed by heating (at 100°C for 10 minutes).
-

会 記

“*Deutsche Gesellschaft für parasitologie*” が下記
にありますので会員各位に連絡して欲しい
由通知がありましたので御知らせいた
します

*Institute für Parasitologie der Tierärztlichen
Hochschule Hannover West-Deutschland*

Hannover-Kirchrode Büntweg 17 (Westfalenhof)