

肺虫駆虫薬 Copper DL-methionine の作用機序 ブタ肺虫の電子伝達系の解明とそれに 及ぼす Cu^{++} の影響

小 澤 光 福 島 英 明

東北大学医学部薬品作用学教室

(昭和 37 年 12 月 5 日受領)

緒 言

ブタ肺虫 *Metastrongylus apri* は、ブタの肺および気管支内に寄生する線虫で、わが国でも患害が少なくない。この肺虫駆虫薬として、小沢ら(1957)により創製された Copper DL-methionine は、ブタ肺虫に対し選択的に有害であることが見出されている。しかし、その作用機序に関しては、わずかに石関(1961)により Cu^{++} が肺虫の酸素消費を著明に抑制することが観察され、また Ozawa *et al.* (1962) および石関(1962)により、肺虫のホモジネートが強いコハク酸脱水素酵素の活性を示し、それを Cu^{++} が抑制することが報告されているのみである。

一方、肺虫は酸素の豊富な条件下に寄生しているが、その代謝様式に関しては、近年石関(1961)によつて肺虫の Qo_2 は回虫や肝蛭に比べて大きく、生存には比較的大量の酸素を必要とすること、および小沢ら(1961)により含窒素化合物の最終産物がアンモニアであることが見出されている程度である。したがつて、肺虫に如何なる電子伝達系が存在するかは、いまだ全然研究されていない。一方、嫌気的条件下に寄生している回虫の電子伝達系に関しては Bueding (1949) によつてシアン不感受性(KCN insensitive)であるため、通常の形式でのコハク酸酸化酵素系は存在しないと報告されたが、Kikuchi *et al.* (1959) はシアン不感受性であるが、コハク酸酸化酵素系は存在すると報告している。しかるに、好気的条件下に寄生する肺虫には如何なる電子伝達系が存在するかは、比較生化学的な意味からも興味があり、また Cu^{++} の作用機序解明の一助としても重要であるので、以下の実験をおこなつた。

実験材料および方法

I. 実験材料

ブタ肺虫は、仙台市立中田屠場で入手し、屠殺直後肺虫の寄生している肺臓とともに実験室に運び、臓器より虫体を採集した。

試薬はすべて市販のものを用いた。チトクローム *c*, phenazine methosulfate, DPNH (NADH) は Sigma 化学のを用い、Antimycin A は協和醸酵のものを 100% アルコールに溶解して用いた。

II. 酵素標本

肺臓より採集した虫体を生理食塩液で数回洗い、水分をろ紙で吸い取り秤量してから、ガラス製ホモジナイザーを用いて、氷冷した 10 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズする。そのホモジネートを 0°C で 600×g, 30 分間遠心し、その沈澱物に対し同じ操作をくり返す。両方の上澄液を 7,000×g, 10 分間遠心し、その沈澱物を 2 倍量の 0.1 M リン酸緩衝液でホモジナイズしたものを、ミトコンドリア分画として用いた。なお、チトクローム “*b*” の確認の場合には、7,000×g, 10 分間遠心で沈澱したものを、 $\frac{1}{2}$ 倍量の 1% コール酸ナトリウム溶液でホモジナイズし、さらに 7,000×g, 10 分間遠心し、その上澄液を用いて行なつた。

III. 各種酵素活性の測定

1) コハク酸酸化酵素：通常の Warburg 検圧計を用い、 37°C , 10 分間の温度平衡後、側室より基質を加え、60 分間酸素吸収を測定した (気相：空気)。反応液の組成：主室—ミトコンドリア (500 mg 新鮮虫体相当量), 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4, 阻害液, 蒸留水を加え測定中主室に 2.8 ml あるようにする。側室—コハク酸ナトリウム 10 mM. 副室—20% KOH 水溶液 0.2 ml.

本研究は文部省科学試験研究費 (昭和 37 年度) の補助によつたものである。感謝の意を表す。

2) コハク酸脱水素酵素: Bonner(1955)の方法にしたがい, Warburg 検圧計を用いて, 電子受容体として methylene blue (Mb) または phenazine methosulfate (PMS) を加えて, 37°C で酸素吸収を測定した(気相: 空気).

一方, 分光光度計を用い, 電子受容体として 2,6-dichlorophenolindophenol (2,6-dye.) またはチトクローム *c* を加えて室温 (20~25°C) で, 600 $\mu\mu$ または 550 $\mu\mu$ の吸光度の変化を測定した. 反応液の組成: ミトコンドリア, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), コハク酸ナトリウム 100 μM , 2,6-dye., 130 mM またはチトクローム *c*, 1 μM (チトクローム *c* の場合には KCN (HCl にて中和) 1 mM), 全量 3.0 ml. 対照セルとして上記反応液よりコハク酸ナトリウムをのぞいたものを用いた.

3) チトクローム酸化酵素: Potter(1957)の方法にしたがい, アスコルビン酸を基質とし, 空气中 37°C で酸素消費を測定した.

4) DPNH (NADH) 酸化酵素: 反応液の組成: ミトコンドリア, リン酸緩衝液 (pH 7.4), DPNH 1 μM , 全量 3.0 ml. 室温で 340 $\mu\mu$ の吸光度の変化を測定. 対照セルとして, 上記反応液より DPNH を除いたものを用いた.

5) DPNH ジアホラーゼ: 2,6-dye. を電子受容体とし, 分光光度計で測定. 反応液: ミトコンドリア (100 mg 新鮮虫体相当量), 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), DPNH 1 μM , 2,6-dye. 130 $\mu\mu\text{M}$, 全量 3.0 ml. 対照セルには 2,6-dye. をのぞく.

6) DPNH チトクローム *c* 還元酵素: 反応液の組成: ミトコンドリア (100 mg 新鮮虫体相当量), 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4 適量, DPNH 1 μM , チトクローム *c* 1 μM , KCN (HCl にて中和) 1 mM, 全量 3.0 ml. 室温で 550 $\mu\mu$ の吸光度の変化を測定, 対照セルとして, 上記反応液よりチトクローム *c* をのぞいたものを用いた.

7) チトクローム "b" の確認: Kikuchi *et al.* (1959)の方法にしたがい, 1% コール酸ナトリウム溶液でミトコンドリア分画を抽出し, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を還元剤として difference spectrum を測定した. 反応液: コール酸ナトリウム抽出液 (2.0 g 新鮮虫体相当量), 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4), Antimycin A 40 μg および $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 少量, 全量 3.0 ml. 対照セルとして, 上記反応液より $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を除いたものを用いた.

実験結果

1) コハク酸酸化酵素

コハク酸を基質として, 肺虫ミトコンドリアの O_2 吸収を測定すると, 60分以上にわたって, 時間に対してほぼ直線的な増加がみられる. このとき反応液に KCN, Antimycin A, を加えると O_2 消費の阻害がみられる. 同様な阻害作用は, Cu^{2+} においてもみられる (第1表). しかし, 10^{-3}M Cu^{2+} ではほぼ100%の阻害をうけるが, 10^{-3}M KCN, 40 μg Antimycin A では70~80%ぐらいしか阻害されない.

第1表 コハク酸酸化酵素の活性

添加物	酵素活性*	阻害率**
なし	78	
10^{-3}M KCN	18	76.9%
40 μg Antimycin A	24	69.2%
10^{-3}M Cu^{2+}	4	95.8%

* μl O_2 /500 mg 新鮮虫体相当量/60分

** 阻害率 = $\frac{\text{対照} - \text{薬物添加}}{\text{対照}} \times 100$

2) コハク酸脱水素酵素

コハク酸脱水素酵素の活性は, 電子受容体を Mb, PMS, 2,6-dye., チトクローム *c* のいずれにしても, Cu^{2+} によつて完全に阻害される (第2表, 第3表).

また, Cu^{2+} の濃度による阻害率を示すと第1図のようになる.

第2表 コハク酸脱水素酵素の活性と Cu^{2+} の阻害作用 (その1—Warburg 検圧計による)

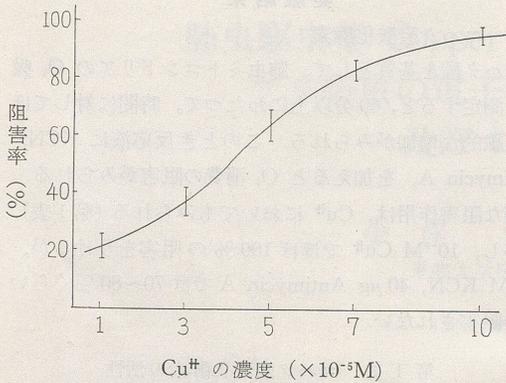
電子受容体	酵素活性*		阻害率
	対照	+ 10^{-3}M Cu^{2+}	
Methylene blue	112	3	97.3%
Phenazine methosulfate	117	2	98.3%

* μl O_2 /500 mg 新鮮虫体相当量/60分

第3表 コハク酸脱水素酵素の活性 (その2—光電光度計による)

電子受容体	添加物	酵素*	阻害率
		活性	
2,6-dichlorophenol-indophenol	なし	0.10	
	10^{-3}M KCN	0.12	-10%
	40 μg Antimycin A	0.10	0%
	10^{-3}M Cu^{2+}	0.00	100%
チトクローム <i>c</i>	なし	0.14	
	40 μg Antimycin A	0.01	93%
	10^{-3}M Cu^{2+}	0.00	100%

* μ mole 電子受容体の還元/500 mg 新鮮虫体相当量/分



第1図 コハク酸脱水素酵素に対する Cu^{2+} の効果 (電子受容体 Methylene blue), 縦線は標準誤差を示す

3) チトクローム酸化酵素

アスコルビン酸を基質とし, チトクローム *c* を加えて酵素吸収を測定した結果は, 第4表に示した通りで, 40 μg の Antimycin A ではほとんど阻害されず, 10^{-3}M の KCN によって完全に阻害されたので, チトクローム酸化酵素が存在すると考えられる。

第4表 チトクローム酸化酵素の活性

添 加 物	酵素活性*	阻 害 率
な し	98	
10^{-3}M KCN	2	98.0%
40 μg Antimycin A	92	6.1%

* μl O_2 /500 mg 新鮮虫体相当量/60 分

4) DPNH 酸化酵素

DPNH を基質として, 340 μm での吸光度の変化を測定した結果は, 第5表に示した通りで, DPNH 酸化酵素の存在が認められる。この酵素は, KCN, Antimycin A, Cu^{2+} のいずれによっても阻害されない。

5) DPNH ジアホラーゼ

DPNH を基質として, 2,6-dye. を電子受容体として 600 μm の吸光度の変化を測定した結果は第6表に示した通りで, この酵素も KCN, Antimycin A, Cu^{2+} のいずれによっても阻害されない。

6) DPNH チトクローム *c* 還元酵素

KCN 存在下でチトクローム *c* の還元を分光光度計で測定した。この酵素は, Antimycin A では阻害を受けないが, Cu^{2+} によつては完全に阻害される(第7表)。

7) チトクローム “*b*”

第5表 DPNH 酸化酵素の活性

添 加 物	酵素活性*	阻 害 率
な し	0.067	
10^{-3}M KCN	0.067	0.0%
40 μg Antimycin A	0.064	4.5%
10^{-3}M Cu^{2+}	0.073	-9.0%

* μ mole 基質の酸化/500 mg 新鮮虫体相当量/分

第6表 DPNH ジアホラーゼの活性

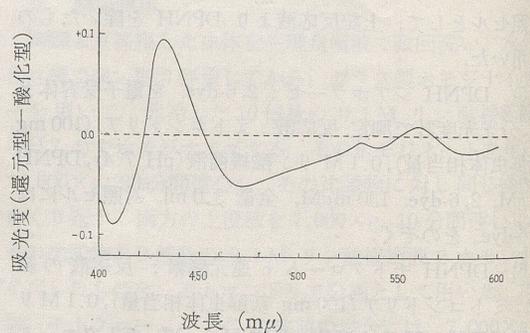
添 加 物	酵素活性*	阻 害 率
な し	0.52	
10^{-3}M KCN	0.51	1.9%
40 μg Antimycin A	0.51	1.9%
10^{-3}M Cu^{2+}	0.50	3.9%

* μ mole 基質の還元/500 mg 新鮮虫体相当量/分

第7表 DPNH チトクローム *c* 還元酵素の活性

添 加 物	酵素活性*	阻 害 率
な し	1.73	
40 μg Antimycin A	1.71	1.2%
10^{-3}M Cu^{2+}	0.00	100.0%

* μ mole 基質の還元/500 mg 新鮮虫体相当量/分



第2図 1%コール酸ナトリウム抽出液の difference spectrum (還元剤— $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

1%コール酸ナトリウム溶液でミトコンドリア分画を抽出したものに, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を還元剤として用い, 分光光度計でその difference spectrum を測定すると, 431, 531, 560 μm にそれぞれ吸収帯が示された(第2図)。心筋のチトクローム *b* の吸収帯が 430, 530, 564 μm であるので, *b* 型のチトクロームが肺虫に存在していると思われる。

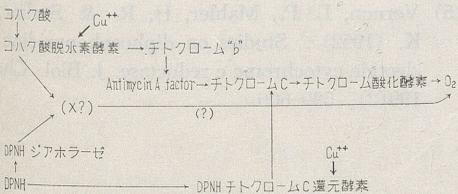
考 察

ブタ肺虫のミトコンドリアにコハク酸脱水素酵素, チトクローム酸化酵素, DPNH 酸化酵素, DPNH ジアホ

ラーゼ, DPNH チトクローム *c* 還元酵素の活性が存在することにより, チトクローム酵素系がその電子伝達系を形成しているものと考えられる. さらに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の還元によりチトクローム “*b*” も存在すると見なされるので, この系列に含まれているものと思われる. しかし, チトクローム “*b*” はコハク酸または DPNH による酵素的還元がはつきり証明されず, また還元吸収帯の現われ方もわずかなので, 活性はかなり弱いものと考えられる.

一方, コハク酸酸化酵素系に対し, KCN および Antimycin A がおよそ 70~80% しか阻害しないことより, これらの阻害部位以前の段階で, 電子の一部がある未知の物質 (X) を通つて酸素まで移行しているものと考えられる. 同様に DPNH 酸化酵素系に対し, KCN, Antimycin A および Cu^{2+} がほとんど作用を示さないことより, チトクローム系以外の経路より電子が移行する過程が存在しているものと考えられる. この際, コハク酸酸化酵素系と DPNH 酸化酵素系との間に相互関連があると考えると, DPNH 酸化酵素系も, ある物質 (X) を通つて酸素まで移行するものと思われる. ここで (X) が如何なるものかは全然未検討であるが, Kikuchi *et al.* (1959) により, ブタの蛔虫においてチトクローム “*b*” より自働酸化により酸素まで電子が移行することが見出しされているので, 肺虫においてもそのような過程が存在するものと仮定すれば, (X) はチトクローム “*b*” と同じであることも予想されるが, 今後検討すべき問題であると思われる.

以上の結果から考えて, 肺虫には第 3 図に示したような過程が存在するものと考えられる.



第 3 図 肺虫の電子伝達系の推定経路

一方, 肺虫に対して特異的な殺虫作用を有する Copper DL-methionine が, この電子伝達系に対しいかなる部位を阻害するかを検討した. この場合, Copper DL-methionine は水に不溶性であり, またブタに投与した場合, Cu^{2+} の形となつて肺虫に対し効力を発揮するものと考えられており, かつ, 10^{-3}M の FeSO_4 がコハク酸酸化

酵素を全然阻害しなかつたことより, 硫酸イオンには阻害作用がないものと見なされるので, Cu^{2+} は全て CuSO_4 の形で用いた. その結果, Cu^{2+} はコハク酸脱水素酵素に対し, 電子受容体として, Mb, PMS, 2,6-dye., チトクローム *c* のいずれの場合にもほぼ 100% 阻害した. この際, Mb, 2,6-dye., チトクローム *c* はコハク酸脱水素酵素より電子を受けとる場合, その間に種々の要素が入るものと考えられているが, PMS に対しては, Singer *et al.* (1954) により, コハク酸脱水素酵素より直接電子を受け取ることが報告されているので, Cu^{2+} はコハク酸脱水素酵素を直接阻害すると思われる. さらに Cu^{2+} は DPNH チトクローム *c* 還元酵素に対しても 100% の阻害作用を示す. なお, チトクローム酸化酵素に対して Cu^{2+} の阻害作用を調べていないのは, アスコルビン酸を基質とした場合, アスコルビン酸と Cu^{2+} の間で自働酸化が起り, 測定不能だつたことによる. しかし, 小沢 (1960) により, 肺虫のホモジネートのチトクローム酸化酵素は, Cu^{2+} によつて阻害されないことが報告されている.

しかし, コハク酸脱水素酵素が -SH 酵素であることが Hopkins *et al.* (1938a) により報告されており, Cu^{2+} により阻害されることは当然考えられることであり, Hopkins *et al.* (1938b) によりウサギの後肢筋肉のコハク酸脱水素酵素に対し, また Slater (1949) によりブタの心臓ミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素に対して Cu^{2+} が阻害することが報告されている. 一方, Vernon (1952) により, Cu^{2+} がブタの心臓の DPNH チトクローム還元酵素も阻害することが報告されている. したがつて, Cu^{2+} がコハク酸脱水素酵素および DPNH チトクローム *c* 還元酵素を阻害することは, 肺虫に対してのみ特異的ではなく, 肺臓その他の臓器に対しても同様な阻害作用を及ぼすことは当然考えられることであるが, 肺虫が好気的条件下で代謝をいとなみ比較的大量の酸素を必要とすること, およびブタに Copper DL-methionine を投与した場合, 2~3 日たつて徐々に肺虫に効力を現わすことから考えて, 肺虫の電子伝達系を Cu^{2+} が阻害することが, その殺虫作用に対して相当の役割をはたしているものと考えられる.

総 括

1) 肺虫のミトコンドリアを取り出しその電子伝達系の組成を調べたところ, コハク酸脱水素酵素, チトクローム酸化酵素, DPNH 酸化酵素, DPNH ジアホラーゼ, DPNH チトクローム *c* 還元酵素の活性が存在し

た。また、弱いチトクローム“b”も存在しているものと思われる。したがって、チトクローム系が、電子伝達系を形成しているものと思われる。

2) コハク酸酸化酵素系が $10^{-3}M$ KCN および $40\mu g$ Antimycin A で完全に阻害されないことより、Antimycin A sensitive factor より前の段階で、別の経路を通過して電子の一部が移行するものと考えられる。

3) 肺虫に対し特異的阻害作用を有する Cu^{2+} の電子伝達系に対する作用を調べたところ、コハク酸脱水素酵素と DPNH チトクローム c 還元酵素を強く阻害した。このことが、Copper DL-methionine 特に Cu^{2+} の肺虫殺虫作用の主要な部分を形成しているものと考えられる。

終りにのぞみ、御助言をたまわつた本学医化学教室菊地吾郎教授、当教室浅見行一助手及び、虫体採集に御便宜を戴いた仙台市立中田屠場阿部克己技師に感謝の意を表します。

本論文要旨は、日本薬理学会第13回北部会（昭和37年、新潟）において発表した。

文 献

- 1) Bonner, W. D. (1955): Succinic dehydrogenase. Methods in Enzymology, I, Academic Press Inc., New York, 722 pp.
- 2) Bueding, E. (1949): Metabolism of parasitic helminths. Physiol. Reviews, 29(3), 195-218.
- 3) Hopkins, F. G. & Morgan, E. T. (1938a): The influence of thiol-groups in the activity of dehydrogenases. Biochem. J., 32(1), 611-620.
- 4) Hopkins, F. G., Morgan & E. J., Lutwak-Mann, C. (1938b): The influence of thiol-groups in the activity of dehydrogenases. II. With an addendum on the location of dehydrogenases in muscle. Biochem. J., 32(2), 1829-1848.
- 5) 石関忠一 (1961): 豚肺虫駆虫薬 DL-Copper methionate に関する研究, 特に豚肺虫の呼吸におよぼす銅化合物の影響. 日獣医誌, 23(6), 341-346.
- 6) 石関忠一(1962): 豚肺虫駆虫薬 DL-Copper methionate に関する研究, 特に豚肺虫の Homogeneous Succinic dehydrogenase に対する DL-Copper methionate の阻害作用. 日獣医誌, 24(1), 13-17.
- 7) Kikuchi, G., Ramirez, J., Barron, E. S. G. (1959): Electron transport system in *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 36(2), 335-342.
- 8) 小沢光・石関忠一・新村宗敏・高仲正・鈴木康雄・玉崎幸二(1957): 豚肺虫症化学療法剤研究, DL-メチオニン銅の基礎実験. 獣医畜産新報, 208, 619-622.
- 9) 小沢光(1960): 肺虫駆虫薬の研究, DL-メチオニン銅の創製とその作用機序. 日本大学創立70年記念論文集, 4, 585-603.
- 10) 小沢光・村越善衛・新村宗敏(1961): ブタ肺虫 (*Metastrongylus elongatus*) の物質代謝に関する研究 (第1報), 含窒素化合物の代謝経路について. 薬学雑誌, 81(12), 1774-1782.
- 11) Ozawa, H., Ishizeki, C. & Niimura, M. (1962): Copper DL-methionine, a new anthelmintic for swine lung worm. The action of Copper DL-methionine on lung worms. Chem. Pharm. Bull., 10(10), 975-978.
- 12) Potter, V. R. (1957): Manometric Techniques (Respiratory enzymes), 3rd ed., Burgess Publishing Co., Wisconsin 173 pp.
- 13) Singer, T. P. and Kearney, E. B. (1954): Solubilization assay, and purification of succinic dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, 15(1), 151-153.
- 14) Slater, E. C. (1949): Effect of sulphhydryl compounds on the activity of the succinic oxidase system. Biochem. J., 45(2), 130-142.
- 15) Vernon, L. P., Mahler, H. R. & Sarkar, N. K. (1952): Studies on diphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase. J. Biol. Chem., 199(2), 599-606.

STUDIES ON THE ACTION MECHANISM OF COPPER DL-METHIONINE
AS THE ANTHELMINTIC FOR SWINE LUNG WORMS
ELECTRON TRANSPORT SYSTEM OF SWINE LUNG WORMS
AND THE EFFECTS OF Cu^{++} ON IT

HIKARU OZAWA & HIDEAKI FUKUSHIMA

(Department of Chemical Pharmacology, Tohoku University School of
Medicine, Sendai, Japan)

Mitochondria of swine lung worms, *Metastrongylus apri*, were obtained and components of their electron transport system were examined.

1) Activities of following enzymes were demonstrated; succinic dehydrogenase, cytochrome oxidase, DPNH oxidase, DPNH diaphorase and DPNH cytochrome *c* reductase. Although the absorption spectrum of cholate extract using $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ as the reductant suggested the presence of cytochrome "b" component, its reduction by DPNH or succinic acid was very weak. This would support the presence of an electron transport system through the cytochrome system.

2) Succinoxidase system was inhibited only about 70-80% by 10^{-3}M KCN or $40\ \mu\text{g}$ Antimycin A. This would suggest the presence of an alternate pathway for the oxidation of succinic acid by molecular oxygen.

3) The action of copper DL-methionine, a specific anthelmintic for swine lung worms, on electron transport system was examined. Consequently, succinic dehydrogenase and DPNH cytochrome *c* reductase were inhibited completely. This would be the main part of anthelmintic action of copper compound on lung worms.