

アニサキスに関する研究 (I) LDH isozyme について

長 瀬 啓 三

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (主任 森下哲夫教授)

(1968年1月29日 受領)

最近臨床酵素化学的にも、免疫遺伝学的にもその重要性をまして来た lactic dehydrogenase (LDH) は glycolysis に関する酵素として注目を集めて来た。Markert & Moller (1959) により初めて isozyme の概念が提唱されて以来この方面の仕事も沢山報告されている。寄生虫学の分野では Dunagan & Orlando de Luque (1966) が *Macracanthorhynchus hirudinaceus* の LDH isozyme について starch gel 電気泳動法で isozyme pattern を求めたのが最初である。そして1本の LDH band を認めたことを報告し、更にマウス骨骼筋のそれと比較して LD₄ に相当することを報告した。Dusanic (1966) は *Trichinella spiralis* の LDH isozyme を研究した。その報告によるとラットの筋肉中の幼虫を筋肉のペプシン処理でとり出し、幼虫の生食水抽出液と幼虫の代謝産物について polyacrylamide gel electrophoresis により LDH を求めた。その結果幼虫抽出液に2本、代謝産物 (secretion and excretion products) に1本の LDH band を認めたという。著者はセルローズ・アセテート膜電気泳動法でブタ回虫の体腔液や各組織とアニサキス幼虫の体成分について LDH isozyme pattern を追及した。これらとヒト血清の LDH isozyme pattern とを比較検討して興味ある知見を得たのでここに報告する。

実験材料及び方法

ブタ回虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) は屠殺直後のブタの小腸から取出した新鮮な雌回虫 (体長 20~25 cm) を用いた。体腔液は回虫の尾端を切る事により採取し、更に筋層、生殖器を分別して使用した。アニサキス幼虫については静岡県焼津市の市場に赴き、ホンサバの

腹腔から大量、5 g (wet weight) の幼虫を生きたまま生食水中に入れて岐阜の研究室に持ち帰った。対照としてヒト血清とマウス骨骼筋を用いた。実験方法としてはブタ回虫体腔液はそのまま使用した。筋層や生殖器は生食水中で充分洗浄して pH 8.6 tris veronal buffer (0.06 μ) を用いて冷却しながら homogenize (20%) し更に冷凍遠心機で 12,000rpm, 10 分間遠沈し、その上清部を試料とした。アニサキス幼虫については全虫体を homogenize (20%) しブタ回虫と同じ様に操作して試料とした。次に泳動方法であるが支持体にセルローズ・アセテート膜 (millipore) を用い pH 8.6 tris veronal buffer イオン強度 0.06 μ , 170 volt, 0.4~0.6 mA/cm 45 分間の泳動条件のもとに 0.002~0.004 ml の試料を支持体中央部に塗布し、泳動を行った。LDH isozyme の染色法は泳動後直ちに宮本ら (1964) の方法に準じて INT (p-iodo nitro tetrazolium violet), 2-(p-iodophenyl)-3-p-nitrophenyl-5 phenyl tetrazolium chloride), PMS (phenazine metho sulfate), NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), にて染色し、そして 10% 酢酸で固定した。同時に蛋白分画の染色を Ponceau-3 R で行ない比較検討した。

実験成績

アニサキス幼虫の homogenize したものと、ブタ回虫体腔液及び筋層、生殖器 (卵巣) の homogenize したもののについて、セルローズ・アセテート膜泳動法で LDH isozyme pattern を求めた。その結果アニサキス幼虫及びブタ回虫体腔液には各々2本の isozyme bands を認めた。しかしブタ回虫の筋層と生殖器には各々1本の band を認めたにすぎなかった。これらの LDH iso-

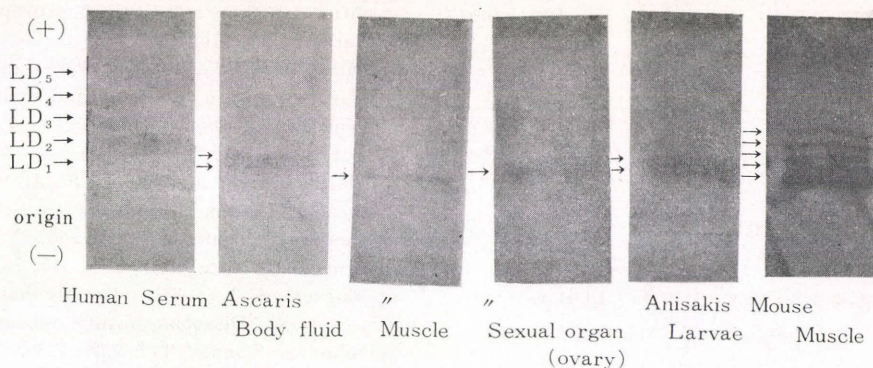


Photo 1 LDH isozyme pattern

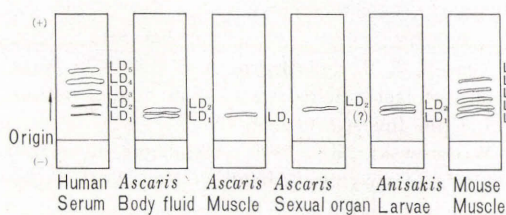


Fig. 1 LDH isozyme pattern

zyme pattern をヒト血清のもの及びマウス骨骼筋のものと比較した。ヒト血清とマウス骨骼筋のものは共に5本の pattern からなっていて、この isozyme pattern を Wroblewski (1961) に準じて命名すると陰極側より LD₁, LD₂, LD₃, LD₄, LD₅ となり、アニサキス幼虫体及びブタ回虫体腔液のものは LD₁ と LD₂ に一致し、ブタ回虫の筋層のものは LD₁ に、生殖器のものは LD₂ に相当する。(Photo 1, Fig. 1). 又これらの LDH isozyme pattern について更にヒト血清蛋白泳動像と比較すると、アニサキス幼虫及びブタ回虫のものも共に血清蛋白分画の β-グロブリン帯にほぼ位置すると考えられた。

考 察

前述の Dunagan & Orlando de Luque (1966) は *Macracanthorhynchus hirudinaceus* の LDH isozyme を1本の LDH band として認めると同時にマウス骨骼筋の LD₂ と一致する位置にあると報告した。しかし LDH isozyme pattern の命名法は、その命名の順序が研究者によって一定していない。即ち Wroblewski (1961) らは易動度の小さいものから順に LD₁, LD₂……

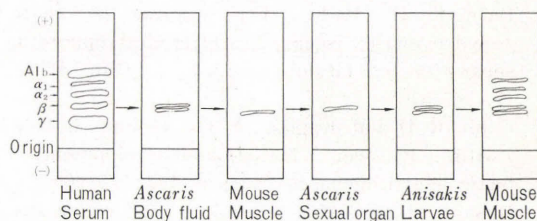


Fig. 2 Relation between protein fraction and LDH isozyme pattern

と符号し、易動度の大きい陽極側を LD₅ としている。しかしこれとは逆に陽極側より陰極側にむかって LD₁, LD₂……と符号する報告もかなり多く、著者は Wroblewski (1961) の陰極側からの命名に従った。その結果 Dunagan (1966) らの LD₄ は著者の LD₂ に相当するものと思われる。Cahn (1962) らによると LDH isozyme の構成についてはM型、H型の2種の全く異った type の subunit からなるとされている。即ち M 型 (muscle type) と H 型 (heart type) の2種の subunit は遺伝子によって支配され、恐らくこの組合せによりヒト血清は5本の LDH isozyme pattern が形成されるものと考えられる。本実験で認めたアニサキス幼虫体及びブタ回虫の LDH isozyme pattern は1本及び2本であった。又高等動物にはM型、H型の2種の type が認められるのに対し、これらの寄生線虫類はM型のみであった。これは寄生線虫類の anaerobic な生活環境と一致するものと考えられる。

結 論

1. ブタ回虫体腔液及びアニサキス幼虫体の homo-

genate の LDH isozyme pattern として2本の band が認められ、これらはヒト血清の LD₁, LD₂ に相当するものである。

2. ブタ回虫の筋層及び生殖器(卵巣)には1本の LDH band しか認められず、前者は LD₁, 後者は LD₂ に相当するものである。

3. これらの band (pattern) はそれぞれヒト血清蛋白分画のはぼ β -グロブリン帯に位置している。

4. ブタ回虫及びアニサキス幼虫体の LDH isozyme pattern はいずれも骨格筋型、即ちM型に属するものと思われる。

文 献

- 1) Barnett, H (1964): The staining of lactic dehydrogenases isoenzymes after electrophoretic separation on cellulose acetate. J. Clin. Path. 17, 567-570.
- 2) Cahn, R. D and Kaplan, N. O., Levine, L, and Zwilling E. (1962): Nature and development of lactic dehydrogenases. Science, 136, 962-969.
- 3) Dusanic, D. G (1966): Serologic and enzymatic investigations of *Trichinella spiralis*. 1 Preci-

pitation reactions and lactic dehydrogenase. Exp. Parasit., 19, 310-319.

- 4) Dunagan, T. T. and Orland de Luque (1966): Isozyme pattern for lactic and malic dehydrogenases in *Macracanthorynchus hirudinaceus*. J. Parasit. 52., 727-729.
- 5) Markert, C. L. and Moller, F. (1959): Multiple forms of enzymes tissue, ontogenetic, and species specific patterns. Proceed. National Academy of Science of U. S. A., 45, 753-763.
- 6) Markert; C. L. (1963): Lactate dehydrogenases isozymes: Dissociation and recombination of subunits. Science, 140, 1329-1330.
- 7) 宮本 忍・大畑正昭・佐々木昌・阿部貞義(1964): LDH isozyme の分離測定法——特にその臨床的応用. 日本臨床, 22, (4), 68-74.
- 8) 小川怒人 (1963): セルローズ・アセテート膜による電気泳動法. 医学のあゆみ, 45, 128-131.
- 9) Vessell, E. S. and Bearn, A. G. (1961): Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissues. J. Clin. Invest., 40, 586-591.
- 10) Wroblewski, F. (1961): Multiple molecular forms of enzymes. Annal. of New York Acad. of Science. 94, 655-1030.

AbstractSTUDIES ON *ANISAKIS* (I) ON LDH ISOZYMES

KEIZO NAGASE

(Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University, Gifu, Japan)

Isozymes of lactate dehydrogenase (LDH) in emulsions of *Anisakis* larvae, the body fluid, muscle and ovary of *Ascaris suum* were examined by cellulose acetate electrophoretic technic. The results obtained were summarized as follows:

1. Emulsified *Anisakis* larvae and the body fluid of *Ascaris* showed two bands of LDH, whereas the muscle and the ovary of *Ascaris* showed only single band.
2. According to nonimination of LDH isozymes by Wroblewsky (1961), the bands obtained from *Anisakis* and the body fluid of *Ascaris* were identified to be corresponded to LD₁ and LD₂ isozymes of human serum.
3. The bands obtained from the muscle and the ovary of *Ascaris* were identified to be LD₁ and LD₂ of human serum, respectively.
4. It was substantiated that mobilities of the isozymes obtained were almost the same as those of β -globulin of human serum.
5. The LDH isozymes in the nematodes seemed to belong to the skeletal muscle type of mammals.