

ブラジル鉤虫 *Ancylostoma braziliense*

とセイロン鉤虫

A. ceylanicum の比較研究

IV. 成虫体構成蛋白の DISC 電気泳動像について

吉田 幸雄 近藤 力王至* 岡田 清 吾
栗本 浩 織田 清 嶋田 義治
塩田 恒三 猪飼 剛 木崎 恭子

京都府立医科大学医動物学教室

(昭和52年5月16日 受領)

緒言

ブラジル鉤虫は1910年 de Faria によつて、セイロン鉤虫は1911年 Looss によつて、それぞれ新種の記載が行われたが、1922年 Gordon が両種の間に差なしと述べてからセイロン鉤虫はブラジル鉤虫のシノニムとして取扱われ近年に至つた。ところが Biocca は世界各地の標本を検討し、1951年に両種は別種であるという見解を発表した。

著者の1人吉田は1965年以来、両種の異同問題を研究し、成虫の形態において従来知られていなかった差異を認め、かつ感染幼虫の形態にも著明な差異のあることを報告し、さらに両種鉤虫の生活史を明らかにした (Yoshida, 1965, 1971 a, b; Yoshida *et al.*, 1974)。

今回は DISC 電気泳動法を用いて両種鉤虫の体構成蛋白の間に何らかの差異が存在するか否かを検討した。この DISC 電気泳動法を用いて寄生虫あるいは他の生物の可溶性蛋白部分を分析したり、またその所見を分類に利用しようとした研究はかなり多い (Sodeman and Meuwissen, 1966; Davis and Lindsay, 1967; Yoshimura, 1968, 1969a, 1969b; Yoshimura *et al.*, 1970; Ruff *et al.*, 1971; 近藤ら, 1974; 栗本, 1974; 織田, 1976)。

材料ならびに方法

実験に供したブラジル鉤虫は1968年にブラジルのイヌから分離し、以後当教室で仔犬に継代感染させて保存してきたものである。一方、セイロン鉤虫は1966年に台湾

のネコから分離し、以後、上と同様にして保存してきた系統である。

実験に用いた両種鉤虫の成虫は、まず各々の感染幼虫を仔犬に経口投与し3-4週後、十分に成熟した時に仔犬を屠殺して採取した。これら生きている成虫は雌雄に分け、38°C の生理的食塩水を交換しながら数時間飼育し、虫がとり込んだ血液などを出来るだけ排除し、さらに蒸留水で数回洗滌したのち凍結保存 (-20°C) した。

DISC 電気泳動法により得られるパターンは同じ種の寄生虫であつても報告者によつてかなり異なる。それは主として蛋白の抽出法の違いによるもので、特に種の間の差異を論ずる様な場合は同一の方法で実施したものでなければならぬ。

当教室では辻 (1968, 1974) が報告した抽出法に統一して行つている。すなわち上記の如き凍結乾燥虫体を磨砕し、0.1%食塩水中に懸濁させ、48時間、凍結融解をくり返して抽出し、ついでこの抽出液を 15,000 rpm (約 28,000G) 1時間遠沈した後その上清を 4°C で約15時間透析し、直ちに凍結乾燥することによつて粉末とした。

作製した両鉤虫の虫体成分抽出凍結乾燥末は、永井 (1966)、荻田・中村 (1967) らの方法に従つて、polyacrylamide gel を支持体として DISC 電気泳動を行つた。泳動緩衝液は Tris-glycine buffer を用い、泳動電流はカラム1本当たり 4 mA である。泳動試料は乾燥重量で 2 mg を 0.02 ml の蒸留水中に溶かし、さらに試料 gel 1.0 ml 中に溶解させ、次にこれの 0.15 ml をとつて濾過 gel の上に重層し重合させた。泳動は 4 mA の場合ほぼ1時間20分で終了した。泳動の終つた gel は amidoblack 10B で1時間染色し、7%酢酸中で自然脱色を行つた。染色

* 現所属 金沢大学医学部寄生虫学教室

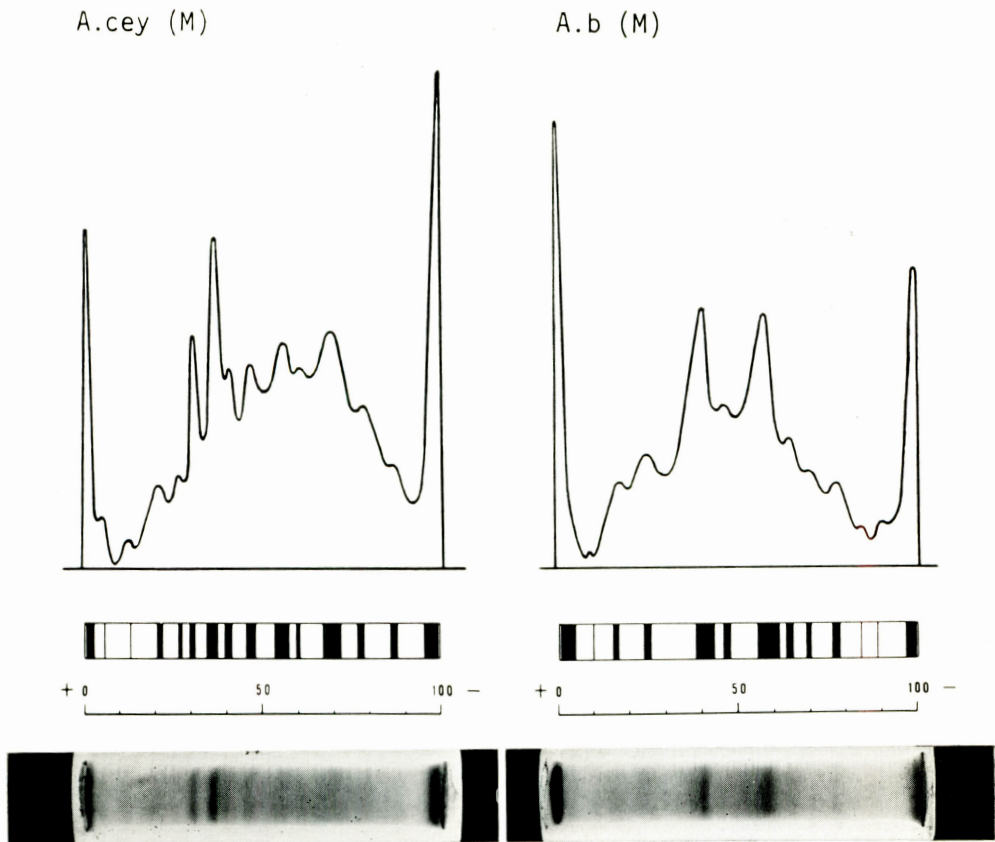


Fig. 1 Comparison of DISC electrophoretic patterns of proteins extracted from whole body of adult males of *Ancylostoma ceylanicum* and *A. braziliense*. upper: densitometric tracings, middle: diagrammatic drawings, bottom: photographs of the column.

し終わった泳動 gel は 7% 酢酸中に保存し、写真撮影を行うとともに、densitometer によつて吸光度 (OD 値) を連続 pattern として記録し、band の積分値も併せ記録した。densitometer (東洋科学製) のスリット幅は 4.0×0.2 mm, 感応波長は $577 m\mu$ を用いた。また band の位置は陽極側の BPB band を除き、陰極側に向つて未泳動蛋白を除いた位置までを全長とし、全長に対し陽極側から band までの距離を百分率で示した (relative position)。

成 績

セイロン鉤虫とブラジル鉤虫の成虫から、その虫体成分を抽出し、これを試料として DISC 電気泳動を行い、泳動 gel 中に分画された蛋白を染色し、その泳動像を観察した。

Fig. 1 はセイロン鉤虫とブラジル鉤虫の雄成虫 (A. cey M, A. b M と略す)、Fig. 2 はセイロン鉤虫とブラジル鉤虫の雌成虫 (A. cey F, A. b F と略す) について、それぞれの DISC 電気泳動像を示したものである。図の上段は染色 gel を densitometer により、その吸光度 (OD 値) を測定した連続曲線である。下段は染色 gel を直接写真撮影したもので中段はこれらを模式化したものである。

Table 1 は A. cey M, A. cey F, A. b M, A. b F の 4 試料について、泳動蛋白の band の位置を relative position で示し、かつこれら band の積分値を並記したものである。これら 4 試料の band についてそれぞれ相同するものと、相同しないものとを総合して番号を付してみると 31 となった。すなわち 31 個所の位置のいずれかに存在していた。

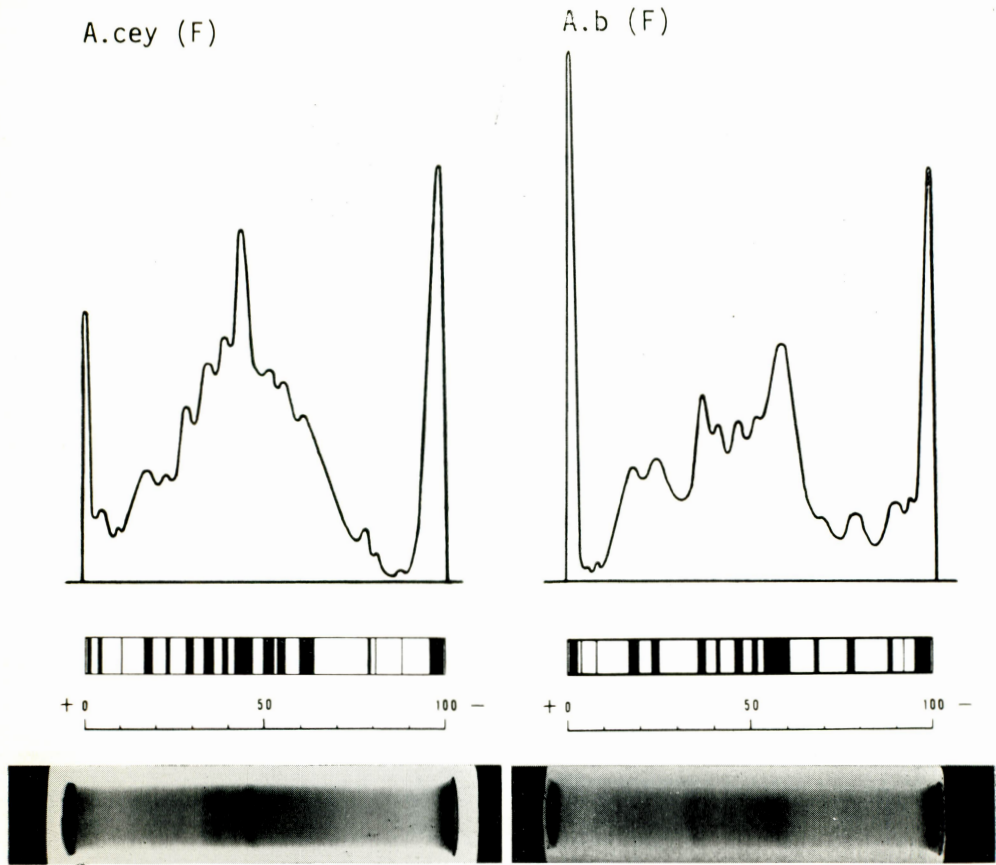


Fig. 2 Comparison of DISC electrophoretic patterns of proteins extracted from whole body of adult females of *Ancylostoma ceylanicum* and *A. braziliense*. upper: densitometric tracings, middle: diagrammatic drawings, bottom: photographs of the column.

まず、この4試料のそれぞれについて、その数を比較してみると、*A. cey* Mでは15本、*A. b* Mでは13本で2本の差がみられ、また *A. cey* Fでは16本、*A. b* Fでは15本と1本の差がみられた。この band の中には4組 (No. 1, 26, 29, 31) の相同する band がみられた。さらに雌雄を通じセイロン鉤虫には存在してブラジル鉤虫には存在しない band は3本 (No. 13, 21, 23)、逆にブラジル鉤虫の雌雄にはあつてセイロン鉤虫にはみられない band は2本 (No. 11, 22) であつた。

次に、吸光度 (OD 値) の連続記録像から、それぞれ4試料の pattern の特徴をさがしてみると、セイロン鉤虫では *A. cey* M に No. 13, 15 (RP=30.6, 36.1%) の band がかなり高い OD 値を示し、*A. cey* Fでは No. 18 (RP=43.9%) の band が高い OD 値を示し、1峰性の pattern を示した。これに対してブラジル鉤虫

では *A. b* M には No. 17, 22 (RP=40.4, 57.9%) の2つの band と、*A. b* F には No. 15, 22 (RP=36.6, 57.1%) の2つの band に高い OD 値を持つ2峰性の pattern が認められた。中でも *A. b* M と *A. b* F に見られた No. 22 の band はブラジル鉤虫にはあつて、セイロン鉤虫には認められないブラジル鉤虫固有の band と考えられた。

また両種鉤虫を通じ性に関係のある band について観察してみた。相同する band について比較してみると、両種の雌にあつて雄にない band が2本 (No. 8, 20) 確認された。一方両種の雄にあつて雌にないという band は認められなかった。

考 察

セイロン鉤虫は1922年から約40年の間、ブラジル鉤虫

Table 1 Relative position and integrated value of DISC electrophoretic band of whole body proteins from adults of *A. ceylanicum* and *A. braziliense*

Band No.	<i>A. ceylanicum</i>				<i>A. braziliense</i>			
	M		F		M		F	
	RP	IV	RP	IV	RP	IV	RP	IV
1	0.9	31.9	0.7	11.9	0.9	66.8	0.8	33.0
2	—	—	4.0	10.4	—	—	3.8	4.2
3	5.6	5.4	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	8.0	3.0
5	—	—	10.2	2.3	9.6	1.2	—	—
6	13.0	4.2	—	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	15.8	20.0	—	—
8	—	—	17.6	28.4	—	—	17.9	30.7
9	21.3	16.1	—	—	—	—	—	—
10	—	—	23.1	11.5	—	—	—	—
11	—	—	—	—	24.6	30.0	24.1	32.6
12	26.9	10.8	—	—	—	—	—	—
13	30.6	16.9	28.9	23.0	—	—	—	—
14	—	—	34.3	33.4	—	—	—	—
15	36.1	34.2	—	—	—	—	36.6	30.7
16	—	—	38.9	27.6	—	—	—	—
17	40.7	18.8	—	—	40.4	54.9	41.1	15.7
18	—	—	43.9	56.5	—	—	—	—
19	46.3	31.5	—	—	46.5	30.7	46.4	21.5
20	—	—	50.9	38.4	—	—	51.0	18.0
21	55.6	46.8	54.6	30.0	—	—	—	—
22	—	—	—	—	57.9	73.0	57.1	82.9
23	60.2	14.2	61.3	51.1	—	—	—	—
24	—	—	—	—	64.0	28.0	—	—
25	69.4	73.0	—	—	69.3	20.0	67.9	16.5
26	77.8	21.9	78.8	7.7	77.2	23.4	77.3	20.7
27	—	—	80.6	2.3	—	—	—	—
28	—	—	—	—	84.2	6.1	—	—
29	87.0	22.7	88.0	1.2	88.6	5.4	88.7	23.0
30	—	—	—	—	—	—	92.4	4.6
31	98.2	47.2	98.7	49.5	98.2	34.6	98.6	58.4

RP: Relative Position

IV: Integrated Value

のシノニムとして取扱われてきたが、Biocca (1951), Yoshida (1965, 1971a, 1971b)らの形態学研究, Yoshida *et al.* (1974)の生活史の研究, さらに Rep *et al.* (1968), 吉田 (1970)の交配実験の結果, それぞれの種は独立した種であることが承認され, 最近の世界各地からの分布調査の報告はすべて別種説に立脚している。著者らは今回

さらに別種説を裏づける目的で生化学的な面から両種鉤虫の体構成蛋白を DISC 電気泳動法を利用して比較してみた。

DISC 電気泳動法は Ornstein and Davis (1962) によって開発され, 臨床的にも血清, 脳脊髄液, 胸水, 腹水, 尿などの蛋白の分析に利用されているが, 生物学的

にも貝類や寄生虫の体構成蛋白の分析にも用いられている。例えば Sodeman and Meuwissen (1966) は *Plasmodium berghei* について本法により分析し、寄生虫に由来すると思われる蛋白が少くとも15種、宿主に由来すると思われるものが6種同定されたと報告した。Davis and Lindsay (1967) は貝類の haemolymph および foot muscle を材料として精細な研究を行い、本法の貝の分類への貢献度について検討した。一方 Yoshimura (1968) はまず本法により得られた泳動像により日本住血吸虫とマンソン住血吸虫を容易に区別出来ることを報告し、ついで佐渡肺吸虫の泳動像が、ウェステルマン肺吸虫と宮崎吸虫とは異なるが大平肺吸虫と類似していることを認め (Yoshimura, 1969a), さらにウェステルマン, 大平, 宮崎の3種肺吸虫の泳動像について比較検討した (Yoshimura, 1969b)。その後 Yoshimura et al. (1970) はケリコット肺吸虫についても研究を行い、上記4種肺吸虫と異なる泳動像を得たことを報告した。

その他 Ruff et al. (1970) は日本住血吸虫を用いて蛋白抽出法の比較検討を行い、かつ雌雄において泳動像に差のあることを示した。著者らの教室においても近藤ら (1974), 織田 (1976) は犬蛔虫と猫蛔虫について、栗本 (1974) は蛔虫と豚蛔虫について、それぞれ泳動像上の差を認め報告した。

既に述べた如く、この DISC 電気泳動法によって得られた泳動像は各研究者によってそれぞれ特徴があり、それは主として研究者の行う可溶性蛋白の抽出法の差異によるものと思われる。従つて複数生物間の差異を論ずる様な場合は同じ抽出法によらねばならぬことは当然である。著者らは過去において種々の抽出法を検討し、最近 は辻 (1968, 1974) の方法に統一して行っている。

今回報告したブラジル鉤虫とセイロン鉤虫の成虫全虫体抽出材料についての所見は、まず得られた band の数の点からみると、前者の雄で13本、雌で15本、後者の雄で15本、雌で16本と差異を認めた。次にそれらの吸光度連続曲線を見ると、雄においては両種の全体像は似通っているが雌においてはブラジル鉤虫では曲線は2峰性の pattern を示すがセイロン鉤虫では1峰性を示した。

その他、個々の band の比較において、雌雄を通じ相同する band (No. 1, 26, 29, 31), セイロン鉤虫には存在し、ブラジル鉤虫には存在しない band (No. 13, 21, 23), 逆にブラジル鉤虫には存在し、セイロン鉤虫には存在しない band (No. 11, 22) など、両種間に差異を認めた。問題はこれらの band が如何なる蛋白であるかが現在ほとんどわかっていない点であり、かつ種差等

についてはさらに免疫電気泳動法などの手技をも加味することが必要であろうと考える。

結 語

セイロン鉤虫と、ブラジル鉤虫の成虫虫体を、0.1%食塩水で抽出し、凍結乾燥末としたものを試料とし、DISC 電気泳動法を用い、その泳動像を比較検討した。

1. 確認できた band の数は、セイロン鉤虫の雄では15本、雌では16本、ブラジル鉤虫の雄では13本、雌では15本であつた。

2. セイロン鉤虫の雌雄には存在し、ブラジル鉤虫の雌雄には存在しない band は3本、逆にブラジル鉤虫の雌雄には存在し、セイロン鉤虫の雌雄には存在しない band は2本であつた。

3. 吸光度 (OD 値) の連続記録曲線も両種鉤虫の雌雄においてそれぞれ異つた pattern を示した。

以上の結果から、セイロン鉤虫とブラジル鉤虫は DISC 電気泳動像の上からも異つた所見を示すことが明らかとなつた。

稿を終るに当たり、本実験に始終御協力下さつた教室の福田時男氏に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Biocca, E. (1951) : On *Ancylostoma braziliense* (de Faria, 1910) and its morphological differentiation from *A. ceylanicum* (Looss, 1911). J. Helminth., 25, 1-10.
- 2) Davis, G. M. and Lindsay, G. K. (1967) : Disc electrophoretic analysis of molluscan individuals and populations. Malacologia, 5, 311-334.
- 3) de Faria, G. (1910) : Contribution towards the classification of Brazilian Entozoa. III. *Ancylostoma braziliense* n. sp., parasite of cats and dogs. Mem. Inst. Osw. Cruz, 8, 71-73.
- 4) Gordon, R. M. (1922) : Ancylostomes recorded from sixty-seven post-mortems performed in Amazonas. Ann. Trop. Med. Parasit., 16, 223-228.
- 5) 近藤力王至・織田 清・栗本 浩・嶋田義治 (1974) : 犬蛔虫と猫蛔虫との DISC 電気泳動像。寄生虫誌, 23 (増), 51.
- 6) 栗本 浩 (1974) : 人蛔虫と豚蛔虫の異同に関する形態学的、生化学的ならびに免疫学的研究。寄生虫誌, 23, 251-267.
- 7) Looss, A. (1911) : The anatomy and life history of *Agchylostoma duodenale* Dub. A monograph. Rec. Egypt. Govt. Sch. Med.,

- 4, 159-613.
- 8) 永井 裕(1966) : デイスク電気泳動法. 蛋白質核酸 酵素, 11, 744-749.
- 9) 織田 清(1976) : 移行性幼線虫症の研究, 特に猫蛔虫と犬蛔虫について. 京府医大誌, 85, 517-532.
- 10) 萩田善一・中村正二郎(1967) : ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 電気泳動実験法, 241-274, 文光堂, 東京.
- 11) Ornstein, L. and Davis, B. J. (1962) : Disc electrophoresis. Distillation Products Industries, Division Eastman Kodak Company, Rochester, N. Y.
- 12) Rep. B. H., Vetter, J. C. M. and Eijsker, M. (1968) : Cross breeding experiments in *Ancylostoma braziliense* de Faria, 1910 and *A. ceylanicum* Looss, 1911. Trop. Geogr. Med., 20, 367-378.
- 13) Ruff, M. D., Werner, J. K. and Davis, G. M. (1971) : Effect of extraction procedures on Disc electrophoretic patterns of *Schistosoma japonicum*. Jap. J. Parasit., 20, 341-358.
- 14) Sodeman, W. A. Jr. and Meuwissen, J. H. E. T. (1966) : Disc electrophoresis of *Plasmodium berghei*. J. Parasit., 52, 23-25.
- 15) 辻 守康(1968) : 免疫電気泳動法による寄生虫学領域の研究. 医学のあゆみ, 67, 531-536.
- 16) 辻 守康(1974) : 寄生蠕虫類の免疫電気泳動法について. 寄生虫誌, 23, 335-345.
- 17) 吉田幸雄(1970) : ブラジル鉤虫とセイロン鉤虫の差異に関する研究. 寄生虫誌, 19, 324-325.
- 18) Yoshida, Y. (1965) : *Ancylostoma kusimaense* from a dog in Japan and comparative morphology of related ancylostomes. J. Parasit., 51, 631-635.
- 19) Yoshida, Y. (1971a) : Comparative studies on *Ancylostoma braziliense* and *Ancylostoma ceylanicum* I. The adult stage. J. Parasit., 57, 983-989.
- 20) Yoshida, Y. (1971b) : Comparative studies on *Ancylostoma braziliense* and *Ancylostoma ceylanicum* II. The infective larval stage. J. Parasit., 37, 990-992.
- 21) Yoshida, Y., Kondo, K., Kurimoto, H., Fukutome, S. and Shirasaka, S. (1974) : Comparative studies on *Ancylostoma braziliense* and *Ancylostoma ceylanicum* III. Life history in the definitive host. J. Parasit., 60, 636-641.
- 22) Yoshimura, K. (1968) : Disc electrophoretic comparison between *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* adult worms. Jap. J. Parasit., 17, 382-394.
- 23) Yoshimura, K. (1969a) : *Paragonimus* : Electrophoretic fractionation of whole body proteins as an aid in specific identification of a species from Sado Island, Japan. Exp. Parasit., 25, 107-117.
- 24) Yoshimura, K. (1969b) : *Paragonimus westermani*, *P. ohirai* and *P. miyazakii* : Electrophoretic comparison of whole body proteins. Exp. Parasit., 25, 118-130.
- 25) Yoshimura, K., Hishinuma, Y. and Sato, M. (1970) : A preliminary study on the DISC electrophoretic patterns of *Paragonimus kellyi* Ward, 1908 adult worms. Res. Bull. Meguro Parasit. Mus., 3, 12-17.

AbstractCOMPARATIVE STUDIES ON *ANCYLOSTOMA BRAZILIENSE* AND
ANCYLOSTOMA CEYLANICUM. IV. DISC ELECTROPHORETIC
COMPARISON OF WHOLE BODY PROTEINS

YUKIO YOSHIDA, KAORU KONDO, SEIGO OKADA, HIROSHI KURIMOTO,
KIYOSHI ODA, YOSHIHARU SHIMADA, TSUNEZO SHIOTA,
TSUYOSHI IKAI AND KYOKO KIZAKI
(*Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto, Japan*)

The differences of *Ancylostoma ceylanicum* from *A. braziliense* were morphologically redescribed by Biocca (1951) and Yoshida (1956, 1971a, 1971b). In the present study, the whole body proteins of both ancylostomes were compared with an aid of DISC electrophoretic techniques. The number of bands obtained were unlike between the two ancylostomes as 15 in *A. ceylanicum* male, 16 in the female, 13 in *A. braziliense* male and 15 in the later female (Table 1). The three bands which were not found in *A. braziliense* male and female but found in *A. ceylanicum* male and female, were noticed. On the other hand, two bands which were not present in *A. ceylanicum* but present in *A. braziliense* were also noticed (Table 1). The densitometric tracings of four kinds of DISC column showed specific pattern in each material (Fig. 1 and 2).