

蛔 虫 毒 に 関 す る 研 究 I

粗蛔虫毒の生物化学的性状並に純化と

その生物化学的性状に就て

中 島 三 夫

日本化薬株式会社

(東京大学伝染病研究所 第1研究部長 細谷省吾教授指導)

(昭和 29 年 3 月 6 日受領)

緒 言

蛔虫毒による病害作用について Leroy, A.¹⁾ Simonin.²⁾ Schimmel Pfening, G.³⁾ Flury, F.⁴⁾ 島村, 藤井⁵⁾, 北山⁶⁾, 平野⁷⁾, 田中⁸⁾, 野村⁹⁾, 八木¹⁰⁾, 大曾根¹²⁾, 青木¹¹⁾, 池内¹³⁾, 松岡¹⁴⁾, 山田¹⁵⁾ 等極めて多種多様な報告がある。この病害作を惹起する毒物の本態は脂肪系物質²³⁾ 或はアルデヒドであろうという説更にペプトン様物質¹⁹⁾, ポリペプチド¹⁸⁾, ヒスタミン或はヒスタミン様物質¹⁹⁾であろうと推論されているが, 結論を得るにいたらない。

そこで著者は蛔虫毒の本態を追究する目的で蛔虫毒を分割精製し電気泳動的に単一な毒物を得たので報告する。

I. 粗蛔虫毒の生物, 理化学的性状

実験資料

芝浦屠殺場で採取した蛔虫を2~3回生理的食塩水で洗滌し乾燥ガーゼで体壁の水分を去り内臓にふれない様に缺で蛔虫尾端に切開後滴下する褐色透明の体腔液を捕集する。体腔液は1匹から平均0.8cc 前後採取出来る。遠心上清を -20°C で凍結 -15°C で低温乾燥すると褐色粉末が得られる。この粉末を豚の場合は粗豚蛔虫毒と仮称する。1ccの体腔液は乾燥重量として63~64mg得られる。粗蛔虫毒は, 蒸溜水, 生理的食塩水, ロック氏液, タイロート液等に透明に溶解し, 蒸溜水10mg/cc溶解した時のpHは6.2~7.4を示した。

1) 粗蛔虫毒の毒性

Mitsuo Nakajima: Nippon Kayaku Co. Ltd. Biochemical studies on the nature of ascaristoxin. (Under the Guidance of Prof. S. Hosoya of the Institute for Infectious Diseases, Tokyo University.)

粗蛔虫毒のモルモット(200~300g)静注による致死量は30mg/kgで粗蛔虫毒注射後1~2分頃より換毛次で排尿排糞し鼻口を開き頸を延ばし呼吸困難状を呈し四肢で口, 鼻の周囲をなぞまわし, 咳嗽を盛に行い2~3回飛躍して横臥し, 四肢をもがき, シャイネストーク呼吸を行う。その頃から心音は微弱となり呼吸停止後1~2分は心搏動を感ずる。斃死は5~10分以内で斃死する。

皮下注射の場合は相当感受性に差異がある為か斃死が注射重量と平行せず斃死及び中毒症状は静注と同様であった。

2) 粗蛔虫毒の熱に対する安定性。

粗蛔虫毒溶液を $60\sim 65^{\circ}\text{C}$, $80\sim 85^{\circ}\text{C}$, $90\sim 95^{\circ}\text{C}$ の重湯煎中で30分間加熱すると $60\sim 65^{\circ}\text{C}$ はinactivateで $80\sim 85^{\circ}\text{C}$ は白色沈澱物を生じinactivateで $90\sim 95^{\circ}\text{C}$ では上清液と沈澱物が明瞭に分かれて多少減毒した。

3) 粗蛔虫毒の透析性

粗蛔虫毒溶液を牛腸膜で流水透析及び加圧透析の場合48時間まで透析認められず72時間目15.6%透析した。

加圧透析の場合には24時間で外液中に毒性が認められた。

4) 粗蛔虫毒の0.5%ホルマリンによる減毒

粗蛔虫毒溶液pH7.6に於て0.5%ホルマリン添加処理後 37°C に放置すれば3時間目 $1/2$, 24時間目は前者同様で48時間目 $1/3$ に減毒し72時間目は前者同様で粗蛔虫毒は0.5%ホルマリン処理で減毒することが認められた。

5) 粗蛔虫毒に対する0.1%トリブシンによる減毒

粗蛔虫毒溶液に0.1%トリブシンを添加pH8.5に於て 37°C に放置すると24時間目inactivateで48時間

第1表 粗豚蛔虫毒及び処理蛔虫毒の溶血性

資料名	資料稀釈	資料	1.00	0.75	0.5	0.25	0.1	0.075	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	対照
			生理的食塩水	0	0.25	0.5	0.75	0.9	0.925	0.95	0.975	0.99	0.995	0.999
血液の種類		血球5%	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.05	1.00	1.00	1.00	1.00
豚蛔虫体腔液	モルモット	6時間	2 ¹	2	2	2	1 ¹	1	1	1	1	1	0	0
		24 "	2 ¹	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0
	家兎	6 "	2	2	2	1 ¹	1	1	1	1	1	1	0	0
		24 "	2 ¹	2	2	1 ¹	1 ¹	1	1	1	1	1	0	0
	山羊	6 "	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
		24 "	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
粗豚蛔虫毒	モルモット	6 "	2 ¹	2	2	2	1 ¹	1	1	1	1	1	0	0
		24 "	2 ¹	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	0
	家兎	6 "	2	2	2	1 ¹	1	1	1	1	1	1	0	0
		24 "	2 ¹	2	2	1 ¹	1 ¹	1	1	1	1	1	0	0
	山羊	6 "	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
		24 "	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
粗豚蛔虫毒24時間牛腸膜加圧	モルモット	6 "	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
		24 "	2	2	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
	家兎	6 "	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
		24 "	2	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
	山羊	6 "	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
		24 "	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
粗豚蛔虫毒80度C30分加熱処理	モルモット	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	家兎	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	山羊	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
粗豚蛔虫毒0.5%ホルマリン72時間処理37°C	モルモット	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	家兎	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	山羊	6 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		24 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

註 溶血判定 3: 完全溶血 2¹: 溶血するが稍々管底に血球が認められる3と2この中間
 2: 溶血するが稍々管底に血球が認められる 1¹: 2と1の中間
 1: 溶血するが稍々大量に血球が管底に認められる 0: 不溶血

目 1/2 に減毒した。

6) 粗蛔虫毒の各種動物血球に対する溶血性

新鮮蛔虫体腔液, 粗蛔虫毒及びその処理蛔虫毒生理的食塩水溶液を用い, モルモット, 山羊, 家兎に対する溶血性を試験したその結果は第 1 表に示す通りである。

新鮮蛔虫体腔液のモルモット, 家兎, 山羊 5% 血球に対し溶血性が認められ, 粗蛔虫毒の溶血性も前者とまったく同程度の溶血力であり -20°C で凍結し -15°C 乾燥では溶血性に変化はないものと考えられた。透析性について実施した結果, 透析する溶血毒と透析しない溶血毒の存在が観察され 80°C 30 分の加熱で溶血性を失い, 0.5% ホルマリンの処理で溶血性は減弱する。

7) 粗蛔虫毒の呈色反応

粗蛔虫毒溶液 10 mg/cc を調製その 0.5 cc について呈色反応を実施した Biuret 反応, Abderhalden Schmidt 反応, Millon 反応, Xanthoprotein 反応, Ehrlich 氏 diazo 反応, 坂口反応, Molisch 反応, Hopkins-Coles 反応, Disch Cystein 硫酸反応, Diphenyl Amine 反応, Benedikt 反応陽性で Bial Orcine 反応陰性であった。

II. 蛔虫毒の精製

1. 粗蛔虫毒に対する各種薬劑の沈澱性

実験方法

粗蛔虫毒溶液に 10% -k-alum, 50% -ZnCl₂, 50% CCl₃COOH, 1/2 飽和硫酸, 98% Ethyl-alcohol をそれぞれ添加処理し蛔虫毒の沈澱性について実験し毒性は 200~300 g モルモット静注による致死量によつて判定した。

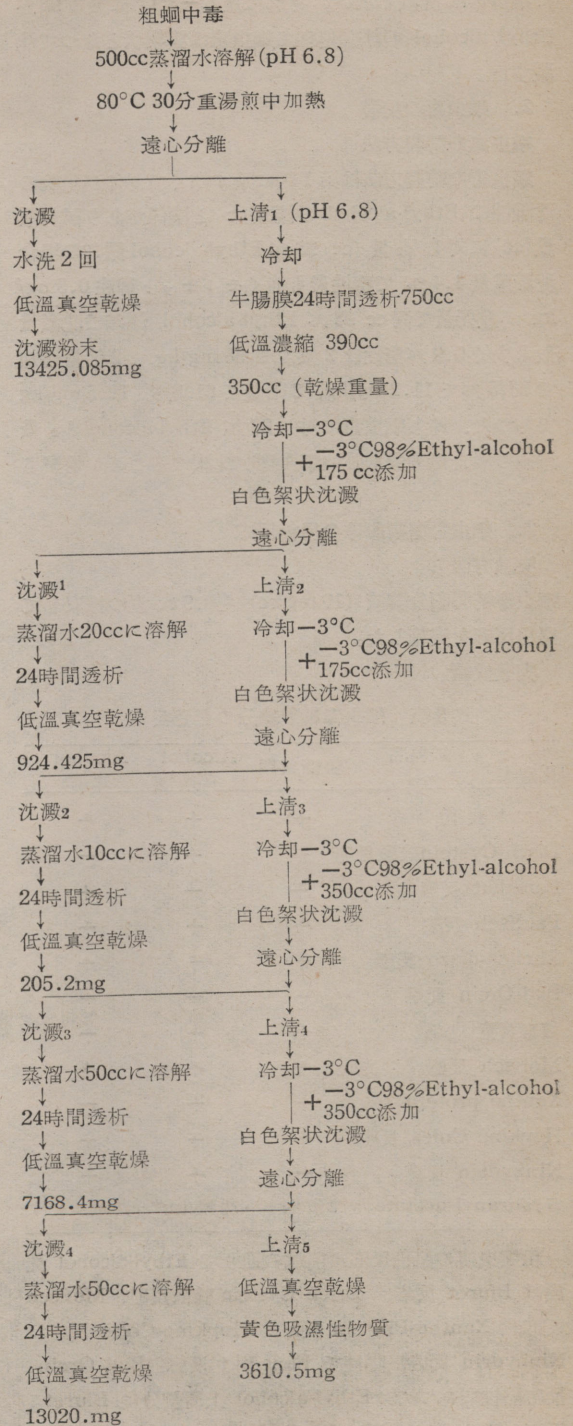
実験成績

第 2 表 粗蛔虫毒溶液に対する各種薬物の対度

No.	分割区分 試薬名	処理前 粗蛔虫毒 致死量 mg/kg	上清 割合	沈澱 割合	備 考
A	K-Alum	30.0	25.0	89.0	
B	ZnCl ₂	"	24.5	65.0	
C	CCl ₃ COOH	"	12.6	45.0	
D	飽和硫酸	"	24.3	256.0	沈澱 ₁ +沈澱 ₂
E	98%Ethyl-alcohol	150.0	2.5		

10% k-alum 処理では上清に毒性が存在し沈澱割合に多少毒性が認められる程度で, 50% ZnCl₂ では毒性が上清に存在し 1/10 程沈澱割合中に毒性を認め, 50% CCl₃COOH の場合も上清にほとんど毒性が存在し 10%

第 1 図 蛔虫毒の精製方法



k-alum, 50% ZnCl₂, 50% CCl₃COOH 1/2 飽和硫酸安で蛔虫毒は沈澱したい。それに反し-3°C に於て 98% Ethyl alcohol の添加処理で蛔虫毒は雲絮状となつて沈澱する。

2. 蛔虫毒の精製

蛔虫毒の精製方法

蛔虫毒の精製方法は第1図に示す如くであるが毒物の沈澱性は Ethyl-alcohol の添加 cc と関係があり試料液量(cc)に対し 1/2 量(cc) 98% Ethyl-alcohol 添加の場合沈澱重量 4.4% で毒性最も強くモルモット静注 0.5mg/kg が致死量で同 cc 98% Ethyl-alcohol 添加で沈澱量最も少く 0.9% 毒性は 2 位で 9.58 mg/kg, 2 倍量添加で 33.5% で 11.2mg/kg, 3 倍量で 61.3%, 12.5 mg/kg であつた。即ち蛔虫毒に対し 98% Ethyl-alcohol 1/2 量添加の場合毒力最も強い蛔虫毒が沈澱することが観察された。

2. 蛔虫毒精製割分の呈色反応

実験方法

蛔虫毒精製割分溶液 (10 mg/cc) を 0.5 cc ずつ採取して呈色反応を実施した。

実験成績

第3表 蛔虫毒精製割分の呈色反応

試料名 反應名	粗蛔虫毒	Alcohol 沈澱 ¹	Alcohol 上清 ⁵
Biuret 反應	+	+	+
Disch-Cystein 硫酸反應	+	+	-
Benedikt 反應	+	-	+
Paulisch 反應	+	+	+
Ehrlich-diazo 反應	+	+	+
Bial-Orcin 反應	-	-	-
坂口反應	+	+	-
Molisch 反應	+	+	+
Xantho protein	+	+	-
Hopkins Coles 反應	+	+	+
Ninhydrin 反應	+	+	+
5% uranyl acetate	沈澱生ず	沈澱生ず	沈澱生ぜず

粗蛔虫毒の呈色反応は前述の通りで Ethyl-alcohol 沈澱は Biuret 反應, Disch Cystein 硫酸反應, Molisch 反應, Xantho-Protein 反應, Hopkino-Coles 反應, Ninhydrin 反應, 陽性で Benedikt 反應, Bial Orcin 反應陰性であつた。Ethyl-alcohol 上清割分は Biuret 反應, Benedikt 反應, Paulisch 反應, Ehrlich-diazo

反應, Molisch 反應, HopkinsColes 反應, Ninhydrin 反應陽性で Disch-Cystein 硫酸反應, Bial-Orcin 反應坂口反應, Xanthoprotein 反應陰性であつた。

3. Ethyl-alcohol 沈澱の均一性及び定量分析

実験方法

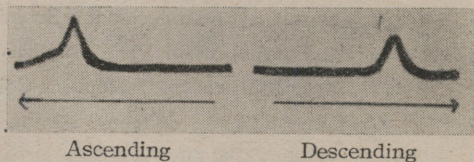
Ethyl-alcohol 沈澱を電気透析後低温真空乾燥物 30mg 精秤し 3 cc の磷酸緩衝液 (Na₂HPO₄ 22.9 g/l, NaH₂PO₄ 1.1 g/l) pH 7.7 に溶解し同磷酸緩衝液で一晝夜透析後 Tiselius 電気泳動装置²³⁾ で試料の均一性を試験した。

実験成績

第2図 Ethylalcohol 沈澱₁ の電気泳動図 (1.0%)

(pH 7.7, イオン強度 0.2 磷酸緩衝液,

温度 15°C, 5 mA.)

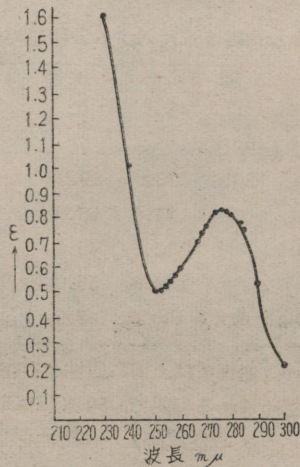


Ethyl-alcohol 沈澱は均一性であることが認められた定量分析の結果 N 12.0%, P 1.7% であつた。

4) Ethyl-alcohol 沈澱₁ の紫外線吸収スペクトル

Ethyl-alcohol 沈澱₁ を電気透析後 1 mg/cc の蒸溜水溶液について Beckman Model Du photoelectric quartz spectro photometer²⁴⁾ で紫外線吸収スペクトルの測定を実施した。

第3図 [Ethylalcohol 沈澱₁ の紫外線吸収スペクトル (0.1% 蒸溜水溶液)



紫外線吸収は 276 m μ が最大吸収であつた。

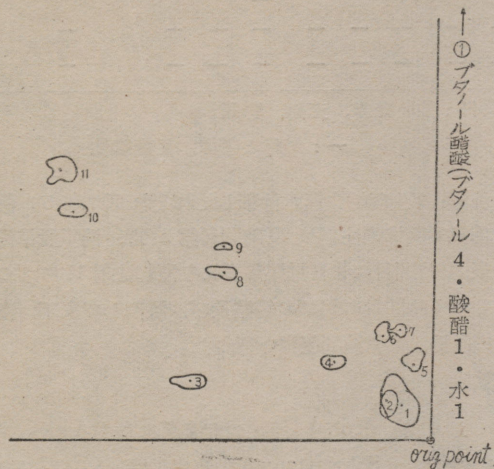
6. Ethyl-alcohol 沈澱₁ 劃分の paper Chromatography²⁵⁾

実験方法

Ethyl-alcohol 沈澱₁ を 15 mg 秤量し 20% HCl 20 倍量 (0.3 cc) を加え 42 時間煮沸し完全アミノ酸まで到つた時真空にて過剰の HCl を溜去後、東洋濾紙 No. 50 (40×40 cm) を用いブタノール醋酸 (ブタノール 4 醋酸 1, 水 1) 及びフェノールブタノール水 (フェノール 4, ブタノール 1, 水 2) を溶媒として上昇法により 23°C にて 24 時間及び 20 時間展開し Ninhydrin 溶液を吹きつけて発色させ R_b を測定した。

実験成績

第 4 図 Alcohol 沈澱₁ の塩酸加水分解物の Paperchromatography



- ← ② フェノールブタノール (フェノール 4, ブタノール 1 水 2)
- 1. Cystin, 2. Cystin 酸, 3. Arginin,
 - 4. Asparagin, 5. Threonin,
 - 6. Histidin, 7. Taurin, 8. β -alanin
 - 9. Alanin, 10. Methionin, 11. phenylalanin

第 4 図に示す通り 11 種のアミノ酸 Cystin, Cystin 酸, Arginin, Asparagin, Threonin, Histidin, Taurin, β -Alanin, Alanin, Methionin, Phenylalanin, を分離した。

7. Ethyl-alcohol 沈澱₁ の Tryptar による減毒試験

Ethyl-alcohol 沈澱₁ を滅菌蒸溜水 1 cc に 100 mg 含有する如く 20 cc 作製し、これに Tryptar (25000 Ar. mor units) 0.1% の割合に添加しトルオールを重層し

て 37°C に放置し 24 時間, 48 時間, 72 時間目をそれぞれ試料を採取してモルモットへ静注して処理前の Ethyl-alcohol 沈澱₁ と毒性の比較を行つた。溶液の pH は Tryptar が pH 7.0 に於て最も作用が強い為に 7.0 とした
実験成績

第 4 表 Ethylalcohol 沈澱₁ の Tryptar による減毒 (37°C, pH 7.0)

観察	実験区分 モルモット 対 照	静注致死量 mg/kg Tryptar 処理
24 時間	0.5 mg	0.5 mg
48 時間	"	2.0 mg
72 時間	"	10.0 mg

以上の実験に示す通り 24 時間では inactivate で 48 時間目 1/4 に減毒し 72 時間目 1/20 に減毒した。

8. 蛔虫毒精劑劃分の Schwartzman 型皮膚反応

蛔虫体腔液が Schwartzman 現象を示すことについて佐藤¹⁹⁾ が報告し、池田²¹⁾ は蛔虫抽出物質の内で含水炭素劃分に Schwartzman 反応を惹起する因子の存在を報じている。

実験方法

体重 2.5 kg 前後の家兎 6 羽に粗蛔虫毒, alcohol 沈澱₁, alcohol 沈澱₂, alcohol 沈澱₃, alcohol 沈澱₄, alcohol 上清₅ をそれぞれ生理的食塩水 1 mg/cc 含有する如く試料を調製, 更に生理的食塩水で 0.1 mg/cc, 0.01 mg/cc に稀釈して各試料を家兎腹部皮内へ 0.05 cc づつ注射し 20 時間後に同一皮内へ更に 0.05 cc 注射を行い 20 時間後, 家兎静脈へ kg 当り 1 mg/cc 惹起注射を行つた。注射後 30 分, 1, 2, 3, 4, 5, 12, 24 時間目にそれぞれ観察した。対称には準備注射に 0.05 cc の生理的食塩水を注射した。

実験成績

Ethyl-alcohol 沈澱₁ が最も強力に反応を示し準備注射 1.0 mg/cc, 0.05 cc 注射 2 回後惹起注射 1.0 mg/cc を kg 当り 1 mg の割合で家兎耳静脈より注射を行い惹起注射後 30 分より発赤, 充血し 3 時間目から局期に達して中心部は緑赤色 Nekrose 様に変化する。この症状は 5 時間目頃より次第に充血は消退の形を取るが 24 時間にいたるも更にその症状は存在する。準備注射 0.1 mg/cc の場合は 2~3 時間目が局期で準備注射 0.01 mg/cc の場合は 1~2 時間目が局期であつた。

alcohol 上清₅ は alcohol 沈澱₁ より発赤, 腫脹ははるかに弱く 30 分~1 時間が最も症状の出現が強く 5 時

第5表 蛔虫毒精製分割の Schwartzman 型皮膚反應

試料	粗蛔虫毒			Alcohol 沈澱 ₁			Alcohol 沈澱 ₂			Alcohol 沈澱 ₃			Alcohol 沈澱 ₄			Alcohol 上清 ₅			対照
家兎番号	1♂			2♂			3♀			4♀			5♀			6♂			7♂
家兎体重	2.5kg			2.3kg			3.0kg			3.0kg			3.4kg			2.8kg			3.0kg
皮内注射番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
準備注射 I r	50.0	5.0	0.5	50.0	5.0	0.5	50.0	5.0	0.5	50.0	5.0	0.5	50.0	5.0	0.5	50.0	5.0	0.5	生理的食塩水 0.05 cc
準備注射 II r	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
惹起注射	1 mg/kg			1 mg/kg			1 mg/kg			1 mg/kg			1 mg/kg			1 mg/kg			1 mg/kg
惹起注射後30分+	+	+	+	+++	++	+	+	+	+	+	+	±	+	±	-	++	+	+	-
1 時間	++	++	+	+++	++	++	++	++	+	++	+	+	++	+	±	++	++	+	-
2 〃	+	+	+	+++	++	++	+	+	±	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
3 〃	+	±	-	+++	++	+	+	+	-	+	-	±	+	+	-	±	±	±	-
4 〃	±	-	-	+++	++	+	±	+	-	±	-	±	+	+	-	±	-	±	-
5 〃	±	-	-	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	±	-	-	±	-	-	-
12 〃	-	-	-	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 〃	-	-	-	+++	++	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ : 強い中心部壊死, 発赤, 充血, 腫脹

++ : 強い発赤, 充血, 腫脹

++ : 発赤, 充血

± : 弱い発赤, 充血

- : 対称と同様, 反應陰性

間目には症状が消退した。

alcohol 沈澱₂ は準備注射 1 mg/cc が alcohol 上清₅ と同程度の出現であった。

粗蛔虫毒は準備注射 1.0 mg/cc, 0.05 cc 注射の場合 1 時間目局期で発赤, 腫脹が見られ 5 時間目以後症状消退した。

alcohol 沈澱₃, alcohol 沈澱₄ は反応出現が alcohol 沈澱₂ によく近示するが症状の消退が早くあつた。

即ち Schwartzman 型皮膚反応に於て粗蛔虫毒, alcohol 沈澱₂ 分割, alcohol 上清₅ 分割に於て反応陽性であることが判明した。Schwartzman 反応の強力の順に列記すれば次の通りであつた。

alcohol 沈澱₁ > alcohol 沈澱₂ = alcohol 上清₅ > 粗蛔虫毒 = alcohol 沈澱₃ > alcohol 沈澱₄。

9. Ethyl-alcohol 沈澱₁ の廿日鼠に起した Schwartzman 型皮膚反応

本間²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾ が初めて緑膿菌の体内毒素を用いて廿日鼠を使用し Schwartzman 型皮膚反応を起すことに成功し, その後宮崎, 翁, 長村²⁹⁾ により更に緒方, 村上³⁰⁾ により組織学的に再検討されて確認された。

実験方法

健康なる体重 15~18 g の廿日鼠の腹部に Ethyl-alco-

hol 沈澱₁ を生理的食塩水稀釈しそれぞれ 50 r, 5 r 腹部皮内第 1 回準備注射後 20 時間目第 2 回, 同重量準備注射後 20 時間目に廿日鼠尾静脈より惹起注射 100 r ずつ行い 3~4 時間目に腹部の観察及び, 解剖して皮下, 内臓の肉眼的, 顕微鏡的観察を行つた。

実験成績

第6表 alcohol 沈澱₁ の廿日鼠に対する Schwartzman 型皮膚反應

廿日鼠号	観察	I r 準備注射量	II r 準備注射量	惹起注射量	皮膚反應		肺出血
					外観	皮下観	
1		50.0	50.0	100.0	++	++	斑点状出血++
2		50.0	50.0	100.0	+	++	斑点状出血++
3		50.0	50.0	100.0	+	++	斑点状出血+
4		5.0	5.0	100.0	-	+	斑点状出血+
5		5.0	5.0	100.0	-	+	斑点状出血++
6		5.0	5.0	100.0	-	-	斑点状出血++

準備注射を皮内へ 2 回行い更に惹起注射後 3~4 時間頃反応局期で発赤, 腫脹が認められ剥皮して皮下より観察すると粟粒大の出血斑が散在し, 漿液浸潤の強力なも

のもあつた。内臓は肺臓の出血斑が極めて顕著であり肝臓に小出血斑の認められる場合もある。

肺臓は気管枝の周囲に強力なる細胞浸潤があり肺胞内は血球で充満し出血が著明である。即ち廿日鼠に対する Alcohol 沈澱₁ の Schwartzman 型皮膚反応は陽性であつた。

10 Ethyl-alcohol 沈澱₁ の粗蛔虫毒免疫家兎血清との沈降性

実験方法

粗蛔虫毒及び alcohol 沈澱₁ それぞれ重層法による。

実験成績

第 7 表 粗蛔虫毒免疫家兎血清と Alcohol 沈澱₁ の沈降反応

試料名	抗原 稀釈 観察	原液	×	×	×	×	×	対 照
		1mg/cc	十	百	千	万	億	
粗 蛔 虫 毒	15分	3	3	3	1	1	0	0
	30分	3	3	3	1	1	0	0
	1時間	3	3	3	1	1	0	0
	2 "	3	3	3	1	1	0	0
	3 "	3	3	3	2	1	0	0
ア ル コ ー ル 沈 澱	15分	3	3	3	1	1	0	0
	30分	3	3	3	1	1	0	0
	1時間	3	3	3	1	1	0	0
	2 "	3	3	3	1	1	0	0
	3 "	3	3	3	2	1	0	0
	4 "	3	3	3	2	1	0	0
	5 "	3	3	3	2	1	0	0

3: 厚い円板状 2: 稍々厚い円板状
1: 円板状 0: 対照と同様

Ethyl-alcohol 沈澱₁ は蛔虫毒と同様沈降性を有する。

考 案・総 括

1) 粗豚蛔虫毒のモルモット静脈内注射に於ける致死量を実験した結果 30 mg/kg が致死量で皮下注射の場合致死量は斃死範囲がまちまちで確実な結果が得られなかつた。斃死する場合は前述の如く注射 1 分前後より中毒症状を示し 5 分前後で斃死する。ヒスタミンを斃死量モルモットに静注した場合は 30 秒以内に中毒症状が出現し蛔虫毒の場合はヒスタミンより中毒症状の出現が遅れて出現する又斃死したモルモット肺臓の解剖処見でヒスタ

ミンの場合に比較して気腫が強力であり肺出血も顕著である。

2) 粗蛔虫毒の熱に対する安定性は 80~85°C の加熱で inactivate であり 90~95°C 30 分の加熱で稍減毒が認められる。

3) 粗蛔虫毒は流水透析で、24 時間では透析性が認められず 72 時間で 15.6% の減毒が認められた。加圧透析に於て 24 時間で透析性を有する蛔虫毒と透析性のない蛔虫毒の存在が認められた。

4) 粗蛔虫毒は pH 7.5 に於て 0.5% ホルマリン処理 37°C で 3 時間 1/2, 24 時間 1/2, 48 時間 1/3 に減毒し。加熱、透析した場合には蛔虫毒はホルマリンによつて減毒が強力となり、24 時間 1/10, 48 時間 1/18 に減毒することが認められた。

5) 粗蛔虫毒 pH 8.5 に於て 0.1% トリプシンを添加すると 37°C に於て 24 時間 inactivate で 48 時間 1/2 に減毒した。

6) 蛔虫毒はモルモット、山羊、家兎血球を溶血する溶血毒を有し、-20°C の凍結で -15°C の乾燥では溶血性に変化が認められず透析性のある溶血毒と透析性のない溶血毒の存在が認められ、80°C 30 分の加熱で溶血性を失い 0.5% ホルマリンで溶血力の減弱が認められた

7) 呈色反応に於て Biuret 反応, Abderhalden schmit 反応, Millon 反応, Xanthoprotein 反応, Ehrlich-diazo 反応, 坂口反応, Molisch 反応, Hopkins Coleo 反応, Disch Cystein-硫酸反応, Disch diphenylamine 反応, Benedikt 反応陽性で Orein 反応陽性である。

8) 蛔虫毒の沈澱剤とし k-alum, ZnCl₂, CCl₃COOH 1/2 飽和硫酸, Ethyl-alcohol それぞれ用いて実施した結果 10% k-alum, 50% ZnCl₂, 50% CCl₃COOH, 1/2 飽和硫酸は蛔虫毒を沈澱せしめないが -3°C に於て 98% Ethyl-alcohol で蛔虫毒が白色雲絮状に析出することが判明した。

9) 蛔虫毒の精製方法として次の如き順序で毒性の強力な単一物質を得ることが出来た即ち粗蛔虫毒を蒸留水に溶解し 80°C 30 分重湯煎で加熱し遠心分離器で沈澱と上清₁ とに分け上清₁ を牛腸膜で 24 時間流水透析後原液 cc まで濃縮して -3°C に冷却し -3°C 98% Ethyl-alcohol 原液 cc の 1/2 量添加で雲絮状沈澱物として沈澱₁ が得られ沈澱物は牛腸膜で透析後低温真空乾燥する同様に沈澱₂, 沈澱₃, 沈澱₄, 上清₅ を得た。毒力は沈澱₁ 最も強くあつたことは前述した通りである。

10) 精製分割の呈色反応は沈澱₁に於て Biuret 反応、Disch-Cystein 反応、Paulisch 反応、Ehrlich-diazo 反応、坂口反応、Molisch 反応、Xanthoprotein 反応、Hopking Coles 反応、陽性で Benedikt 反応、Bial Orcin 反応陰性であり、Ethyl-alcohol 上清₅は Biuret 反応、Paulisch 反応、Ehrlich 反応、diazo 反応、Molisch 反応、Hopkins Coles 反応陽性、Disch-Cystein 硫酸反応、Bial Orcin 反応、坂口反応、Xanthoprotein 反応、陰性であつた。

11) Ethyl-alcohol 沈澱₁を電気透析後 Tiselius 電気泳動装置を用いて試験した結果均一で、Beckman Model Du photoelectric quartz spectrophotometer によつて紫外線吸収スペクトルの測定により 276 mg が最大の吸収を示した。Ethyl-alcohol 沈澱₁の定量の結果 N 12.2%, P 1.7% で Ethyl-alcohol 沈澱₁の HCl 加水分解による paper Chromatography によるアミノ酸の測定で Cystin, Cystin 酸, Arginin, Asparagin, Threonin, Histidin, Taurin, β -alanin, Alanin, Methionin, phenyl alanin, の 11 種を分離した。

12) 蛔虫毒精製分割のいずれの分割が Schwartzman 反応を強力に起すかについて行つた結果 いずれの分割も陽性であつたが、次に反応の強力であつた順に列記すれば Ethyl-alcohol 沈澱₁>Ethyl-alcohol 沈澱₃>Ethyl-alcohol 上清₅>粗蛔虫毒 = Ethyl-alcohol 沈澱₃>Ethyl-alcohol 沈澱₄ の順であつた。更に廿日鼠に対する Ethyl-alcohol 沈澱₁の Schwartzman 型皮膚反応の実験の結果 15g の廿日鼠に 50 r 2 回の準備注射で完全に準備され 100 r の惹起注射で反応陽性に出現することが観察された。

13) Ethyl-alcohol 沈澱₁は粗蛔虫毒と同様粗蛔虫毒免疫家兎血清との間に沈降性を有する。

結 論

1) 粗豚蛔虫のモルモット静注による致死量は 30 mg/kg であり更に、80~85°C 30 分の加熱で inactivate で透析性を有する毒物と透析しない毒物とが認められた。

2) 粗蛔虫毒は 0.5% ホルマリン及び 0.1% トリプシンで減毒する。

3) 粗蛔虫毒はモルモット、山羊、家兎血球を溶血し 80°C 30 分の加熱で溶血性を失い、透析性のある溶血毒と透析性のない溶血毒が存在する。

4) 蛔虫毒は 10% k-alum, 50% ZnCl₂, 50% CCl₃-COOH, 1/2% 飽和硫酸で沈澱せず 98% Ethyl-alcohol で沈澱する。

5) 蛔虫毒の精製方法として蛔虫毒溶液を 80°C 加熱 Ethyl-alcohol によつて均一性の毒物を得た。この均一性物質は呈色反応、紫外線吸収スペクトル、等の測定の結果蛋白質と思考される。この均一性物質は家兎及び廿日鼠を用いた。Schwartzman 型皮膚反応陽性で、粗蛔虫毒免疫家兎血清との間に沈降性を有する。

本研究実施に際し終御指導、御校閲を賜つた東京大学伝染病研究所、第1研究部長細谷吾吾教授に深謝すると共に御指導賜つた伝染病研究所第1研究部本間先生に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Leroy, A.: Arch. intern. Physiol. 9, 1910.
- 2) Simonin: Teése, Nancy. 1919~1920.
- 3) S chimmel Phening, G.: Arch. Wiss. Prak. Thierheilk. 29, 1903.
- 4) Flury, F.: Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 97, 1912.
- 5) 島村, 藤井: 細菌学雑誌, 8, 1928.
- 6) 北山加一郎: 日本内科学会雑誌, 41, 5, 319, 昭和27.
- 7) 平野多賀治: 慶應医学, 8, 1928.
- 8) 田中昌記: 実験薬学雑誌 14, 11, 1934.
- 9) 野村舜治: 慶應医学, 8, 8, 1933
- 10) 八木胤孝: 慶應医学, 12, 12, 1934.
- 11) 青木忠博: 慶應医学, 16, 5, 1932.
- 12) 大曾根幾次郎: 慶應医学, 12, 11, 1932.
- 13) 池内進: 慶應医学, 9, 12, 1935.
- 14) 松岡貞絵: 慶應医学, 9, 12, 1915.
- 15) 山田菊雄: 慶應医学, 15, 1935.
- 16) 毛受八郎: 慶應医学, 12, 7, 1932.
- 17) J. F. A. Sprent.: J. Infect. Dise. 84, 221~229, 1949
- 18) H. Bruce Collier.: Can. J. Research. 19, 90~98, 1941.
- 19) 佐藤真武: 名古屋医学雑誌, 54, 441, 1941.
- 20) 島田光夫: 日本薬理学雑誌, 47, 36, 1951, 46, 98, 1950.
- 21) 池田稔正: 医学研究, 22, 66, 1952, 22, 82, 1952.
- 22) 岡部直巳: 慶應医学, 9, 1849, 1931, 11, 2525, 1931.
- 23) Tiselius, A.: Trans. Faraday. Soc. 33, 524 1937.
- 24) Loopbourow, J. R.: Mod. Phys. 12 267, 1940.
- 25) 佐竹一夫: クロマトグラフ, 共立全書, 12.
- 26) Y. Homma.: The Jap. Jour. Exp. Med. Vol. 22, 17~22, 1952.
- 27) Y. Homma, K. Sagehashi, and S. Hosoya: The Jap. Jour. Exp. Med. Vol. 21, 361~373, 1951.
- 28) Y. Homma, T. Katsura and S. Hosoya.: The Jap. Jour. Exp. Med. 21, 381~393, 1951.
- 29) 宮崎吉夫, 翁振徳, 長村真: 日本病理学会々誌, 41巻, 総会号 248. 昭 27.