

# 蛔虫体腔液中の抗白癩菌分割の抗 *Aspergillus* 力について

森 下 哲 夫 小 林 瑞 穂 塩 谷 利 淳  
江 口 孝 坂 田 六 郎 平 岡 義 雄  
五 藤 基

岐阜県立医科大学寄生虫学教室

(昭和 38 年 7 月 16 日受領)

著者ら(1963 a, b, c, d) は豚蛔虫体腔液中に抗白癩菌物質を見出し、このものは酵素であるらしく殊に白癩菌の細胞壁の中層にある chitin をとかなすらしいことを報告した。三浦(1953)は chitin 分解菌からの chitinase によつて白癩菌に対する為害作用を認めたが、著者ら(1936 b)の好塩菌 chitinase による追試では蛔虫体腔液程の強い作用は認められなかつた。同時に著者らは hyaluronidase も抗白癩菌作用がないと報告した。岩田ら(1963)はカタツムリの嚙嚢に含まれる帯黄色の消化液中には種々の酵素が含まれているが、とくに hemice-llulase が主体であつて、真菌である *Candida albicans* の細胞壁がこの酵素によつてこわれることを報告している。著者らはカタツムリの嚙嚢液を採取し、C. M. C. (carboxymethyl cellulose) を基質として充分 hemice-llulase を含むことを証明できたカタツムリ enzyme を白癩菌に滴下し、30°C 下で長時間観察したが、蛔虫体腔液の様な作用は見出せなかつた。著者ら(1963 b)が体腔液が *Candida* に無効であると報告したことと何等かの関係があるらしい。

人体に対する病害真菌である *Aspergillus* が chitinase を産生することは Grassmann *et al.* (1931)の報告にも見られる処であるが、著者らは *A. fumigatus* に対して蛔虫体腔液が白癩菌に対するのと同様な作用を呈することを知つたのでここに報告する。

## 体腔液処理 *Aspergillus fumigatus*

### の形態学的変化

蛔虫体腔液中の抗白癩菌分割の採取については前報(森下ら, 1963 b)に詳述した通りである。実験に用いた

*A. fumigatus* は名古屋大学医学部細菌学教室阿多助教授より分与していただいた天野株および久保山株である。培養は Petri 皿の Sabouraud 寒天培地に均一に生育させ、培養 8 日目の菌苔上に体腔液有効成分を含む分割を滴下し、37°C 下で観察した。その結果は写真 1 および第 1 表に示される様で対照として白菌癩 *Trichophyton mentagrophytes* 菌苔を用いた。

第 1 表 体腔液を真菌苔に滴下した場合

観察時間 (37°C)	種 名	
	<i>Aspergillus fumigatus</i> 天野株 久保山株	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
1 時間	—	±
2 時間	—	+
4 時間	±	+
6 時間	+	+

±はケバ立つた菌苔のベタベタになつたことを示す

37°C, 6 時間後には対照の白癩菌同様にケバダチは消失しベタベタした観を呈する。しかし白癩菌の 2 時間後に比し約 3 倍の時間を要する。一方孢子に対しては充分に作用しないので、ベタベタした局所から Sabouraud 寒天培地に移植するとやがて菌糸の発育がみられる。

犯された菌糸の模様を観察するために slide culture を行なつた。30°C 下で寒天ブロックを用いた slide culture 8 日目の菌苔に、有効分割をかぶせ、37°C 下で、1, 2, 4, 6, 8 時間の各時間経過後、生理的食塩水で作用物質を除去し、lactophenol 処理 cotton-blue 染色を行なつた。

無処置の対照では菌糸の細胞質は写真 2 の様に全体に

本研究は文部省科学研究費に負う所大である。

染色性少く、染色物質は顆粒状に細胞質中に充満分散している。核様物は染色されないが明瞭に確認され、細胞壁は染色されず滑らかである。処置1時間後のものでは変化はない(写真3)。2時間後のものでは細胞質が菌糸の先端部でよく染まる。この頃に細胞質の中央部に小空胞の認められるものもある。細胞壁に変化はない。4時間後のものでは細胞質の先端部のみならず基部にまで cotton-blue によく染まる部分が増す。細胞質の中央に空胞形成が認められる。細胞壁には著しい変化はない(写真4)。6時間後のものでは細胞質の大部分が cotton-blue に染まるようになり、しかもその殆んどに空胞形成がある。核様物は不明瞭になり、細胞壁はやや膨化しているように見え、その表面は平滑でなく不規則なデコボコができる。所によると細胞壁が cotton-blue に染まり、しかも metachromatic な紫色になつている所がかなり見られる。cotton-blue に染まらない菌糸には内部に屈光性のある顆粒および青色に染まる小顆粒の存在が認められる。

胞子は何時の場合でも無処置のものとの差が認められなかった(写真5, 6)。

8時間後のものでは細胞質のあると思われる部分が大体染まらなくなり、完全に ghost 化してくる。しかし cotton-blue に染まる部位では細胞質は断裂状を呈しているものが多い。細胞壁は6時間後と殆んど変わらないが、metachromatic に染まる部分は殆んどない。胞子も cotton-blue 染色性が無処置のものに比べてやや劣るようである(写真7)。

### Aspergillus 細胞壁の chitin の赤外

#### 分光吸収曲線

Sabouraud 液体培地約 200 cc を shaking flask にとり *Aspergillus* を 30°C 下で 8 日振盪培養する。十分に発育した菌液を 100°C, 30 分処理し、濾過して菌体を集め、更に数回洗つてから外部に附着した水分を充分に除去し、約 4 倍容の 10% 苛性カリ液を加え 100°C, 1 時間処理する。その後洗滌液が中性になるまで遠沈洗滌した沈渣に約 14°C 下で濃塩酸を加え可溶性物質のなくなる迄くり返し抽出を行ない、全抽出液を合してその 20 倍容の冷 50% アルコール中で攪拌する。1 夜氷室中で保存した後、沈澱物を集め Visking tube に入れ 1 夜流水透析を行なう。更に遠沈した沈渣を凍結乾燥しその内の 3 mg を KBr の錠剤として赤外分光光度計で吸収曲線を測定した。同様に処理した *Candida albicans* と市販の chitin を酸処理したものとを赤外分光光度計にかけ

3 者の比較を行なつたのが第 1 図である。

標準物質の chitin に対して *Aspergillus* の吸収曲線は 1,100~1,000 m $\mu$  の附近の吸収が少いが大体一致した像を示す。これに対して *Candida* の吸収曲線はこの領域に特異的な吸収を示さない。この附近以外の吸収曲線は 3 者一致している。このことから *Aspergillus* の細胞壁には chitin が存在すると考えられる。

### Aspergillus の chitinase 産生

Grassmann *et al.* (1931) は *Aspergillus niger* の水抽出液から luizym と名付けた物質をえ、これが chitin を性状未決定な還元性物質に分解することを報告した。著者らは Reynolds (1954) の *Streptomyces* sp. から exocellular chitinase の採取法にならつて、mineral salt medium (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, ZnSO<sub>4</sub> 0.001 g に水 1 l を加えたもので pH 6.6) 200 cc にエビから精製した colloidal chitin 0.5 g を 500 cc 入りの shaking flask に入れ型のごとく滅菌を行ない、30°C で *A. fumigatus* を振盪培養した。対照として Sabouraud 液体培地で同量の菌体を同様の培養条件で培養した。その結果両者に殆んど差をみない程度に良好な発育が認められた(第 2 表)。このことから *Aspergillus* は chitin のみを N 源、

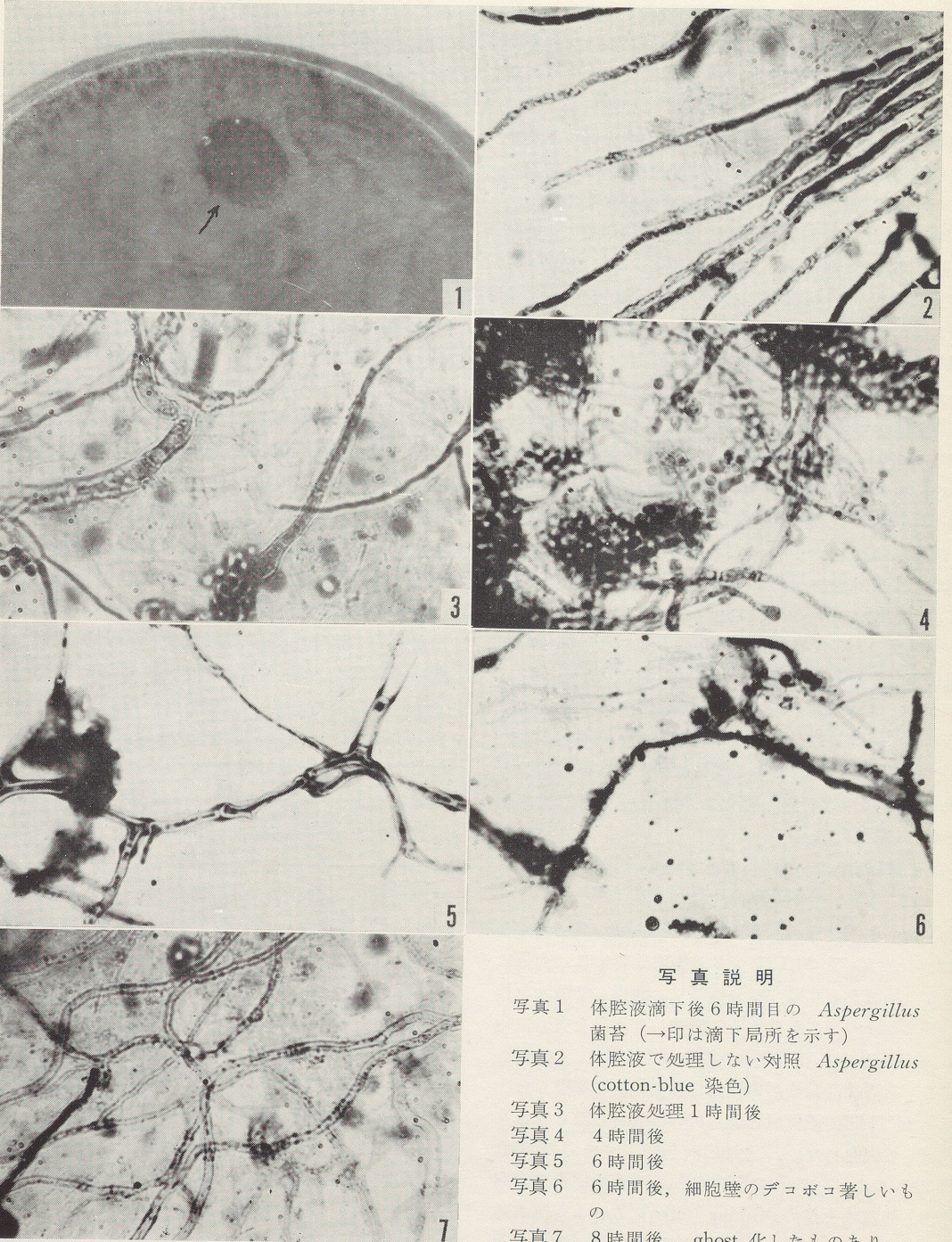
第 2 表 Chitin に N 源 C 源を求めた  
*Aspergillus* 培養成績

培養時間 (30°C)	培 地 と 株			
	Mineral salt medium 加 colloidal chitin		Sabouraud's liquid medium	
	天 野 株	久 保 山 株	天 野 株	久 保 山 株
24時間	+	+	+	+
48 "	≡	≡	≡	≡
72 "	≡	≡	≡	≡

第 3 表 Lysozyme の真菌体への作用

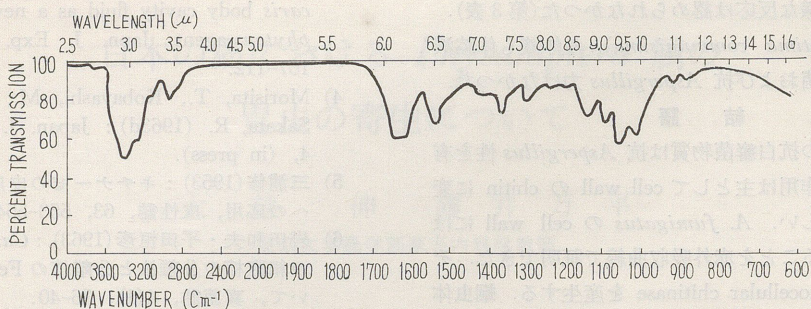
観察時間 (37°C)	真菌名と lysozyme の量			
	<i>A. fumigatus</i>		<i>T. metagrophytes</i>	
	0.02 mg/cc	0.2mg/cc	0.02 mg/cc	0.2 mg/cc
30分	—	—	—	—
1時間	—	—	—	—
2 "	—	—	—	—
4 "	—	—	—	—
6 "	—	—	—	—
8 "	—	—	—	—
24 "	—	—	—	—

C 源として充分に利用しうることを示すもので菌体外に chitinase をだしている結果と思われる。mineral salt chitin 培地で継代培養可能である。なお *A. fumigatus*

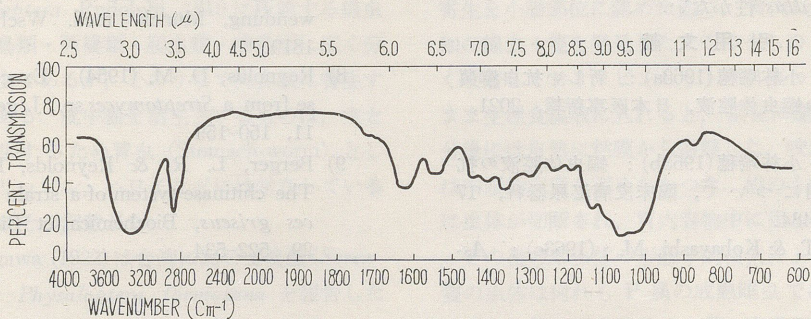
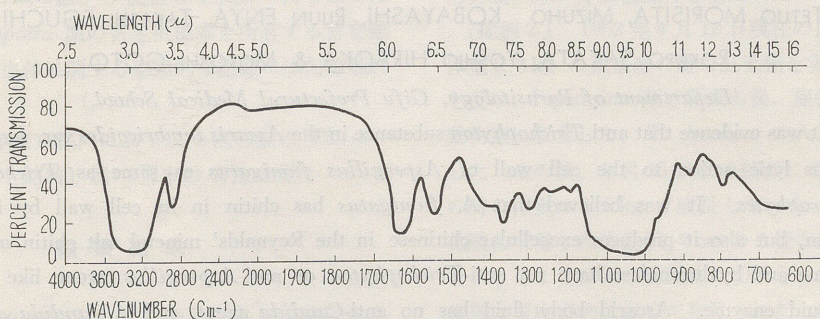


## 写真説明

- 写真1 体腔液滴下後6時間目の *Aspergillus* 菌苔 (→印は滴下局所を示す)
- 写真2 体腔液で処理しない対照 *Aspergillus* (cotton-blue 染色)
- 写真3 体腔液処理1時間後
- 写真4 4時間後
- 写真5 6時間後
- 写真6 6時間後、細胞壁のデコボコ著しいもの
- 写真7 8時間後、ghost化したものあり



a. エビ chitin の赤外吸収曲線

b. *Aspergillus fumigatus* の chitin 分割の赤外吸収曲線c. *Candida albicans* の chitin 分割の赤外吸収曲線

第1図 *Aspergillus*, *Candida* の細胞壁から chitin を得る目的で抽出した物質の赤外分光吸収曲線とエビ chitin のそれとの比較

の chitinase に関する詳細は近く著者らの一人塩谷が別に報告する予定である。

#### 体液の抗白癬菌酵素と lysozyme との比較

lysozyme は Fleming (1922) が唾液中から見出し、Abraham (1937) が卵白中から分離した結晶化した酵素である。稀食塩水に溶けアセトン、アルコールで沈澱する。分子量は 13,900 である。広く細菌をとかし細菌細

胞膜の mucoid の糖の結合を加水分解するという。著者らの蛔虫体液中の酵素と lysozyme との比較を行なつてみた。用いた lysozyme は東京化成製で Sprensen phosphate buffer pH 6.2 を用いて 0.02 mg/cc および 0.2 mg/cc の割に溶解し、培養 8 日目の *Trichophyton mentagrophytes* および *A. fumigatus* の菌苔上に滴下し、37°C 下で時間を追つて変化を観察したが体液を

滴下した場合の様な反応は認められなかつた(第3表).

ミミズ (*Pheretima communisima*) の体液も体腔液のような抗白癬菌および抗 *Aspergillus* 力はなかつた.

### 結 語

蛔虫体腔液中の抗白癬菌物質は抗 *Aspergillus* 性を有している. その作用は主として cell wall の chitin に変化を起させるらしい. *A. fumigatus* の cell wall には chitin が存在することを赤外吸収曲線で証明できた. そして本真菌は exocellular chitinase を産生する. 蛔虫体腔液が有効に作用しない *Candida albicans* の cell wall には chitin の存在を判然と認め難い. lysozyme は抗白癬菌, 抗 *Aspergillus* 性がない.

### 引用文献

- 1) 森下哲夫・小林瑞穂(1963a) : 新しい抗白癬菌剤としての蛔虫体腔液, 日本医事新報, 2021, 24-26.
- 2) 森下哲夫・小林瑞穂(1963b) : 蛔虫体腔液の抗白癬菌作用について, 臨床皮膚泌尿器科, 17 (5), 479-484.
- 3) Morisita, T. & Kobayashi, M. : (1963c) : *Ascaris* body cavity fluid as a new anti-*Trichophyton* agent, Jpn. J. Exp. Med. 33(2), 107-112.
- 4) Morisita, T., Kobayashi, M., Eguti, T. & Sakata, R. (1963d) : Japan. J. Med. Mycol., 4, (in press).
- 5) 三浦修(1953) : キチナーゼの皮膚糸状菌病治療への応用, 皮性誌, 63, 553-554.
- 6) 岩田和夫・平田恒彦(1963) : *Candida albicans* の細胞核の分離法と分離核の Feulgen 反応について, 真菌誌, 4(1), 36-40.
- 7) Grassmann, W. & Rubenbauer, H. (1931) : Über Zellulase und Hemizellulase mit besonderer Berücksichtigung ihrer therapeutischen Anwendung, Münch. med. Wschr. 78, 1817-1819.
- 8) Reynolds, D. M. (1954) : Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp., J. gen. Microbiol., 11, 150-159.
- 9) Berger, L. R. & Reynolds, D. M. (1958) : The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*, Biochemica et Biophysica Acta, 29, 522-534.

## ANTI-ASPERGILLUS ACTIVITY OF THE ASCARID BODY FLUID

TETUO MORISITA, MIZUHO KOBAYASHI, RIJUN ENYA, TAKASHI EGUCHI,

ROKURO SAKATA, YOSHIO HIRAOKA & MOTOSHI GOTO

(Department of Parasitology, Gifu Prefectural Medical School.)

It was evidence that anti-*Trichophyton* substance in the *Ascaris lumbricoides* var. *suum* body fluid has lytic action to the cell wall of *Aspergillus fumigatus* as same as *Trichophyton mentagrophytes*. It was believed that *A. fumigatus* has chitin in its cell wall by infrared spectrum, but also it produces exocellular chitinase in the Reynolds' mineral salt chitin medium. Lysozyme and hyaluronidase have no anti-*Trichophyton* or anti-*Aspergillus* agent like ascarid body fluid enzyme. Ascarid body fluid has no anti-*Candida* agent, and in *Candida albicans* there seems to exist no chitin substance by infrared spectrum.