

蛔虫体腔液の抗白癬菌作用の機転

森 下 哲 夫 小 林 瑞 穂 平 岡 義 雄

坂 田 六 郎 塩 谷 利 淳

岐阜県立医科大学寄生虫学教室

(昭和 38 年 8 月 2 日 受領)

白癬菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) の充分に発育した菌苔上に蛔虫体腔液を滴下すると 37°C 下で 2 時間後に主として菌糸に変化が起こり, ghost 化がみられる. 著者ら (1963 a, b) はこのことを発見して報告したが, その機転として体腔液中の酵素によって惹起されるものであることは確かである. しかし菌糸の細胞壁の chitin 質に変化があるので一応 chitinase を疑った(森下ら, 1963a). ただし腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) からの chitinase では白癬菌に同様な作用がみられないことも著者ら (1936 b) の報告した処で, 酵素の分子量の点からも Jeuniaux (1957) の *Streptomyces* からの chitinase より大であることも同時に指摘しておいた(森下ら, 1963 b). 著者らの一人塩谷は腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* の exocellular chitinase を検討し, 平岡は体腔液中の酵素群の究明に努めて別の機会に報告するが, 腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* の exocellular chitinase による colloidal chitin の分解能を実証することができ, 蛔虫体腔液の抗白癬菌分割に殆んど colloidal chitin 分解能のないことを知ったので, 従来著者らが体腔液に chitinase の存在を考えていたことに対して, 疑問を生ずることになり抗白癬菌作用の主体について改めて検討を要するので, その間の考え方の変化をここに報告する次第である.

白癬菌苔に対する腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* の exocellular chitinase の作用

Trichophyton mentagrophytes の Sabouraud 平板培養 8 日目の菌苔上に次のごとく調製した粗酵素液を滴下した.

腸炎ビブリオの exocellular chitinase の採取法はエビ chitin powder を 200 cc の mineral medium (Reynolds, 1954) に 1% の割に加え, 滅菌処理したものに約 2 白金耳の菌体を加え 30°C で 8 日間振盪培養する.

Seitz 濾過器でこし濾液を 3°C 下で純水で 24 時間透析し, 更に同温度下で cellophane tube 中で風乾して 1/10 量になるまで濃縮したものを粗酵素液とした. *Aspergillus fumigatus* の exocellular chitinase の採取も同様の処置をしたものを用いた. 第 1 表に示すように蛔虫体腔液を対照とした場合抗白癬菌作用は対照にのみ認められた.

第 1 表 *Trichophyton mentagrophytes* の平板培養菌苔に対する腸炎ビブリオ及び *Aspergillus* の exocellular chitinase と蛔虫体腔液の作用

作用時間	酵 素 種 類		
	腸炎ビブリオ chitinase	<i>A. fumigatus</i> chitinase	蛔虫体腔液
30 分	—	—	—
1 時間	—	—	±
1 時間 30 分	—	—	+
2 時間	—	—	+

培養 8 日目の菌苔上に滴下, 温度 37°C

Colloidal chitin に対する腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* の exocellular chitinase と蛔虫体腔液の作用

colloidal chitin の製法はエビの chitin を Berger *et al.* (1958) の方法にならつてコロイド状にし, これを 1 batch として第 2 表に示すような割合で試料を調製し 37°C 下 2 時間 incubate したものを ferricyanide ferric iron method のマクロ法を用い, 分光光度計による吸光度で各種酵素の分解能を測定した.

その結果は第 2 表に示すごとく腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* からの exocellular chitinase にのみ著明な chitinase 活性が認められ, 蛔虫体腔液では殆んどその測定誤差範囲内にとどまつた.

本研究は文部省科学研究費に負う所大である.

第2表 Colloidal chitin に対する腸炎ビブリオ及び *A. fumigatus* の培養濾液と蛔虫体腔液の chitinase 作用 (37°C, 2時間 incubate)

腸炎ビブリオ chitinase	Colloidal chitin (エビ)	生理的食塩水	-log T.
0.5 cc	0.5 cc	1.0 cc	0.063
/	0.5	1.5	0.003
0.5	/	1.5	0.009
/	/	2.0	blank

<i>A. fumigatus</i> chitinase	colloidal chitin (エビ)	生理的食塩水	-log T.
0.5	0.5	1.0	0.038
/	0.5	1.5	0.002
0.5	/	1.5	0.006
/	/	2.0	blank

蛔虫体腔液	colloidal chitin (エビ)	生理的食塩水	-log T.
0.5	0.5	1.0	0.002
/	0.5	1.5	0.001
0.5	/	1.5	0.001
/	/	2.0	blank

***T. mentagrophytes* および *A. fumigatus* の培養菌体よりえた colloidal chitin に対する作用**

Sabouraud 培地で培養した *T. mentagrophytes* の菌苔を 100°C 30分処理し遠沈して菌体を集め、これに5倍量の 10% KOH を加え、100°C 1時間処理後純水で中性になる迄洗い、これに 15°C 以下で濃塩酸を加え、可及的に可溶性成分を溶出させ、glass filter で濾過した濾液を 20倍量の 50% アルコール中に攪拌しながら注加し、-15°C に一夜保つた後できた沈澱を捕集し数回純水で洗つた後、2,000 廻転 5分遠沈し、できた沈澱を純水に対して 24時間透析し、その内容を 1 batch として colloidal chitin とした。

A. fumigatus からの colloidal chitin の調製も白癬菌の場合と同様に行い、その最終産物を凍結乾燥してえた粉末を秤量し 2 mg/cc になるように生理的食塩水に懸濁して基質とした。使用酵素および定量法は前回の記載と同様である。ただし第4表の場合は *Aspergillus* からの chitinase の *Aspergillus* の chitin に対する作用のみを観察した。その結果第3, 4表にみるごとく蛔虫体腔液ではその測定値が誤差範囲内にとどまるのに、腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* からの exocellular chitinase は著明な分解能を示した。

第3表 *Trichophyton mentagrophytes* の培養菌苔より得た colloidal chitin に対する腸炎ビブリオ及び *A. fumigatus* の培養濾液と蛔虫体腔液の chitinase 作用 (37°C, 2時間 incubate)

腸炎ビブリオ chitinase	colloidal chitin	生理的食塩水	-log T.
0.5 cc	0.5 cc	1.0 cc	0.032
/	0.5	1.5	0.002
0.5	/	1.5	0.009
/	/	2.0	blank

<i>A. fumigatus</i> chitinase	colloidal chitin	生理的食塩水	-log T.
0.5	0.5	1.0	0.045
/	0.5	1.5	0.000
0.5	/	1.5	0.005
/	/	2.0	blank

蛔虫体腔液	colloidal chitin	生理的食塩水	-log T.
0.5	0.5	1.0	0.002
/	0.5	1.5	0.001
0.5	/	1.5	0.001
/	/	2.0	blank

第4表 *Aspergillus fumigatus* の培養菌苔より得た colloidal chitin に対する *Aspergillus fumigatus* の exocellular chitinase の作用 (37°C, 2時間 incubate)

<i>A. fumigatus</i> chitinase	colloidal chitin	生理的食塩水	-log T.
0.5 cc	0.5 cc	1.0 cc	0.068
/	0.5	1.5	0.001
0.5	/	1.5	0.006
/	/	2.0	blank

***T. mentagrophytes* の cell-wall に対する作用**

McNall *et al.* (1961) の方法にしたがい白癬菌の細胞壁を採取した。すなわち Sabouraud 培地上の菌苔を 100°C 30分処理し、遠沈して沈澱を純水で数回洗滌する。10g の湿菌体に対し 1N の NaOH を 200 cc 加え、20 pounds 20分 autoclave にかけた後数回純水で洗滌した沈澱を cellophane tube に入れ、流水で一夜透析してからアルコール、アセトンを通して脱水乾燥したものを生理的食塩水で 200 mg/cc になるように調製して基質とした。これに対し蛔虫体腔液、腸炎ビブリオ chitinase および *Aspergillus* の chitinase の作用をみるに、第5表のごとく三者とも著明な分解はみられず僅かに蛔虫体腔液に分解がみられるようであるが、いづれも測定誤差範

第5表 *Trichophyton mentagrophytes* の cell wall に対する腸炎ビブリオ及び *A. fumigatus*- の培養濾液と蛔虫体腔液の chitinase 作用 (37°C, 2時間 incubate)

腸炎ビブリオ chitinase	cell-wall	生理的食塩水	-log T.
0.5 cc /	0.5 cc 0.5	1.0 cc 1.5	0.006 0.004
0.5 /	/	1.5 2.0	0.006 blank
<i>A. fumigatus</i> chitinase	cell-wall	生理的食塩水	-log T.
0.5 /	0.5 0.5	1.0 1.5	0.010 0.007
0.5 /	/	1.5 2.0	0.007 blank
蛔虫体腔液	cell-wall	生理的食塩水	-log T.
0.5 /	0.5 0.5	1.0 1.5	0.004 0.000
0.5 /	/	1.5 2.0	0.002 blank

圈内にとどまつた。

結 語

蛔虫体腔液中の抗白癬菌, 抗 *Aspergillus* 分割はエビ, *Trichophyton* および *Aspergillus* からえられた colloidal chitin に対する分解能は著しくない。これに反

して腸炎ビブリオおよび *Aspergillus* の exocellular chitinase は上記各種 colloidal chitin を分解するが, 抗白癬菌作用はない。このことから蛔虫体腔液の抗白癬菌作用の主体酵素は chitinase ではないらしい。

文 献

- Berger, L. R. and D. M. Reynolds (1958) : The chitinase system of a strain of *Streptomyces griseus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 29, 522-534.
- Jeuniaux, C. (1957) : *Arch. Intern. Physiol. Biochem.*, 65, 135.
- McNall, E. G., T. H. Sternberg, V. D. Newcomer and L. J. Sorensen (1961) : Chemical and immunological studies on dermatophyte cell wall polysaccharides. *J. Investigative Dermatology*, 36, 55-57.
- 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.
- 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.
- Reynolds, D. M. (1954) : Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp. *J. Gen. Microbiol.*, 11, 150-159.

ON THE MECHANISM OF ANTI-TRICHOPHYTON ACTIVITY OF THE ASCARID BODY FLUID

TETUO MORISITA, MIZUHO KOBAYASHI, YOSHIO HIRAOKA,

ROKURO SAKATA & RIJUN ENYA

(Department of Parasitology, Gifu Prefectural Medical School, Gifu, Japan)

The authors (1963) reported a new anti-*Trichophyton* or anti-*Aspergillus* agent in the ascarid body fluid, and supposed that this agent is caused by chitinase, because the attacked hyphae turned to ghost and the middle layer of the hyphae cell wall became hollow. But at the same time, we reported that active fraction of the body fluid has mollecular weight higher than 50,000 and differs from *Streptomyces* chitinase which has 30,000 mollecular weight.

Against colloidal chitins from lobster, *Trichophyton* and *Aspergillus*, the exocellular chitinases of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aspergillus fumigatus* act distinctly lyticly but the ascarid body fluid does not react against any kind of colloidal chitin. Exocellular chitinases of *Vibrio* and *Aspergillus* does not act lyticly against *Trichophyton* and *Aspergillus* hyphae. According to the above mentioned reasons, the authors suppose that anti-*Trichophyton* agent in the ascarid body fluid is different enzymes from chitinase.