

## 蛔虫体腔液の抗真菌物質と Chitinase の関係について

塩 谷 利 淳

岐阜県立医科大学寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(昭和 38 年 12 月 18 日受領)

森下ら(1962)は回虫体腔液中に抗白癩菌力を有する酵素を発見し、同氏ら(1963)はこの酵素が抗 *Aspergillus* 作用を有する事を報告した。著者は本酵素について検討を行ない、併せて真菌の細胞壁に chitin が含まれることから、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) 及び *Aspergillus fumigatus* の exocellular chitinase の採取を試み、このものとの比較を行なったので、この間の事情についてここに報告する。

### 腸炎ビブリオからの chitinase の作製

腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) に chitinase の存在する事は山本(1950)が報告した処である。本菌を使用して次の様な方法で chitinase を採取した。使用した腸炎ビブリオの株は岐阜衛研に保存されていたもので、培地には Reynolds(1954)が *Streptomyces* sp. の培養に使用した mineral salt medium を用い、更に NaCl を 3% の割に加えたものを 500 ml の shaking flask に 250 ml 宛入れ、N源C源として市販キチンから Tracey (1955) の法に従って作成した colloidal chitin を 1% の割に添加し、型の如くに滅菌処理を行なった後に菌体を接種し 30°C 下で振盪培養した。尚この実験に先だち本菌の増殖の条件につき種々の検討を行なった結果、磷を含む培地で振盪を行なうのが Fig. 1 に示す如く最も良好な結果を得た。振盪培養期間はすべて 1 週間である。

培養濾液からの chitinase の採取は、振盪培養終了後 30 分静置して上清をとり、それを約 3500 回転 1 時間遠沈し、更にその上清を Seitz filter No. 85 で濾過し、その濾液を Visking tube に入れて純水に対して 3°C 下で 72 時間透析し、そのまま 3°C 下で風乾濃縮し、用途に応じて原液量に対して適宜濃縮又は稀釈して使用した。

この様にして得た菌体外粗酵素の紫外外部吸光度を求めると、Fig. 2 の如くで最大吸光度が 262.5  $m\mu$  に存在し、

蛋白性物質の存在がうかがわれた。

### chitinase 活性の測定法と腸炎ビブリオ菌体内及び外酵素の諸性状

3 g の市販キチンを Tracey (1955) の方法に従って colloidal chitin とし、最終物を遠心沈澱したものを 1 batch の substrate colloidal chitin とした。反応系は前述の substrate 0.5 ml, pH 7.0 の M/15 phosphate buffer 2.0 ml, 酵素液は原培養濾液 (キチン未分解残渣を除いたもの) に対して等容量に調製したものの 0.5 ml を用い、37°C 1 時間常に振盪を行ないながら incubate した。incubate 後遠心沈澱して substrate を除くことによつて反応を停止させ、その上清 1.0 ml につき ferricyanide ferric iron method で総還元物質の定量によつて酵素活性を比較した。本実験の対照としては酵素液 0.5 ml に buffer 2.0 ml を加えて前述の様に振盪 incubate したものに、その終了直後に 37°C で振盪加温しておいた substrate の colloidal chitin を 0.5 ml 加えて直ちに遠心沈澱し、その上清 1.0 ml を同様に定量してその差を酵素活性値とした。blank は酵素液及び substrate の代りに 1.0 ml の蒸留水を使用し phosphate buffer 2.0 ml を加えた液の 1.0 ml について同様の操作を行なったものを用いた。

次に菌体外 chitinase と菌体内 chitinase の酵素活性の比較をするために次の実験を行なった。同一 flask 内の振盪培養後の全培養液中の chitinase の活性と全菌体中の chitinase の活性を比較するために、Table 1 の如き順序で調製した酵素液を用い、前記の法に従い施行すると、Table 1 の如く濾液中の chitinase の量ははるかに菌体内の chitinase より多かつた。このため以後の実験は菌体外酵素を用いた。

次に chitinase 活性と pH との関係についてしらべた

本研究は文部省科学研究費に負う所大である。

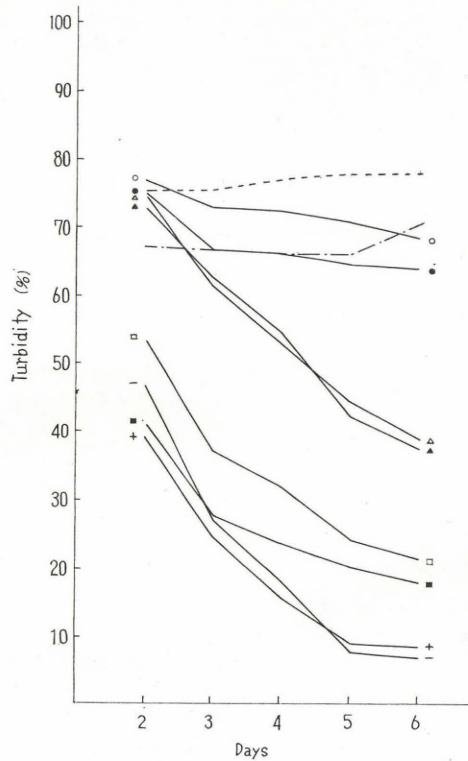


Fig. 1. Influence of shaking culture and supplemented with phosphate to multiplication of *Vibrio parahaemolyticus*

--- media supplemented with phosphate and shaking. no inoculated. (control).

..... media supplemented with no phosphate and shaking. no inoculated. (control).

- 1 ▲ mineral salt media (supplemented with phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus*(o-1) 0.1 ml. no shaking.
- 2 △ mineral salt media (supplemented with phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus*(o-7) 0.1 ml. no shaking.
- 3 — mineral salt media (supplemented with phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-1) 0.1 ml. shaking.
- 4 + mineral salt media (supplemented with phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-7) 0.1 ml. shaking.
- 5 ● mineral salt media(supplemented with no phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. +chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-1) 0.1 ml. no shaking.
- 6 ○ mineral salt media(supplemented with no phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-7) 0.1 ml. no shaking.
- 7 ■ mineral salt media(supplemented with no phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-1) 0.1 ml. shaking.
- 8 □ mineral salt media(supplemented with no phosphate:  $K_2HPO_4$  0.1 %). 15 ml. + chitin powder ca. 0.1 g. inoculated with *Vibrio parahaemolyticus* (o-7) 0.1 ml. shaking.

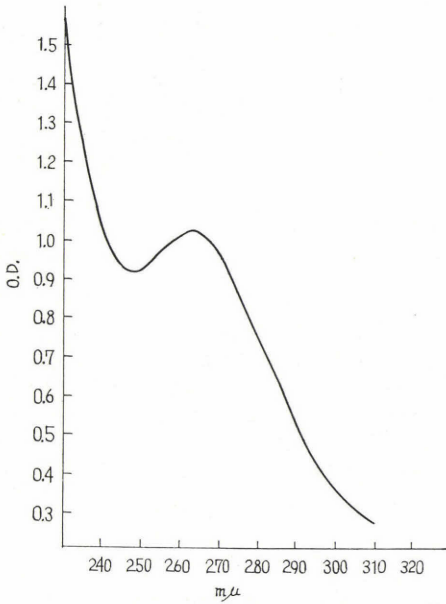


Fig. 2 Ultraviolet absorption spectrum of chitinase fraction from *Vibrio parahaemolyticus*

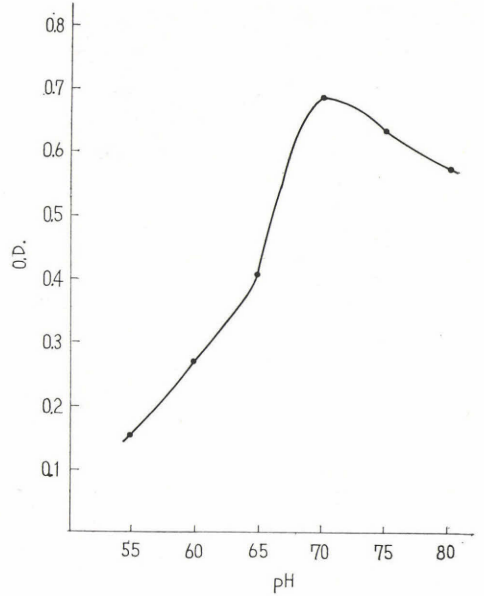
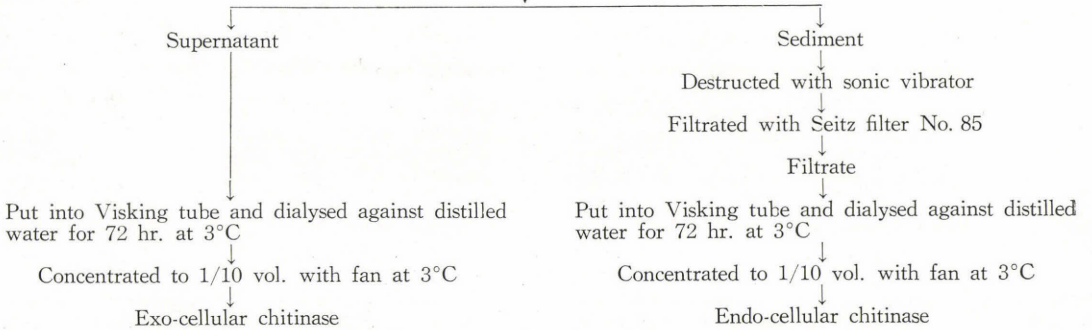


Fig. 3 Relation between pH and chitinase activities

Table 1. Preparation systems of chitin from *Vibrio parahaemolyticus*

Cultured with chitin-mineral salt medium for 7 days at 30°C by shaking machin  
 ↓  
 Centrifuged at 1,000 rpm. for 5 min. and removed undisintegrated chitin  
 ↓  
 Centrifuged at 12,000 rpm. for 30 min.



Exo- and endo-cellular chitinase activities of *Vibrio parahaemolyticus*

Enzyme	Optical density		
	Sample (A)	Control (B)	Activity (A - B)
Exo-cellular chitinase	12.800	0.990	(11.810)
Endo-cellular chitinase	0.495	0.132	( 0.365)

結果は次の様であつた。M/15 phosphate buffer で pH 5.5 から 8.0 まで調製し、各 pH 域における chitinase 活性を求めて見ると、Fig. 3 の如くで至適 pH は 7.0 であつた。

本 chitinase 活性と温度との関係は次の様である。M/15 phosphate buffer を用い、pH 7.0 で温度 13.5°C から 60°C に至る各温度条件で 1 時間 incubate し、各温度における酵素活性を求めたところ Fig. 4 の如くで至適な温度は 37°C である。

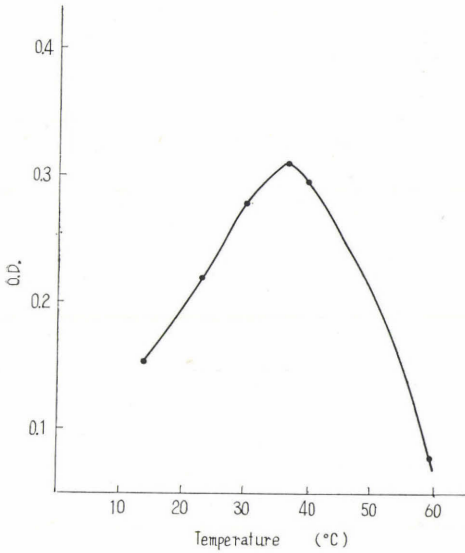


Fig. 4. Relation between temperature and chitinase activities.

本 chitinase 活性と incubate の時期との関係は次の様である。pH 7.0 の phosphate buffer を用いて 37°C で振盪培養し 10 分より 2 時間に至る各時点での酵素活性を求めたところ Fig. 5 に示す如くで、30 分迄は急速な分解が見られるが以後次第に分解速度の低下を見た。

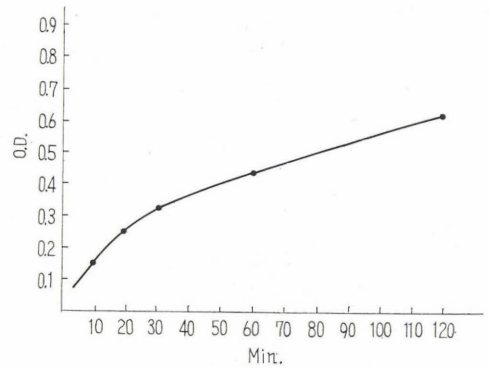


Fig. 5. Relation between incubate time and chitinase activities

以上の結果から本菌の chitinase についての実験は以下すべて pH 7.0 の M/15 phosphate buffer を用い incubate の温度は 37°C で時間は 1 時間を用いた。

#### colloidal chitin に対する腸炎ビブリオ chitinase の作用機序その他

通常の粗 chitinase には chitinase と chitobiase を含むと言われているのでこの問題について paper chromatography を用いて検討してみた。

試料の調製は腸炎ビブリオ菌体外酵素  $1/20$  濃縮液 10.0 ml に、pH 7.0 M/15 phosphate buffer で 2 倍に稀釈した colloidal chitin 10.0 ml を加えたものを 37°C 2 時間 incubate し、遠心沈澱後その上清と同量の  $1/10$  濃縮腸炎ビブリオ菌体外酵素液をそれぞれ Visking tube に入れて、3°C 下で風乾濃縮し  $1/10$  量に調製したものを paper chromatography の試料及び対照とした。

paper chromatography は上昇一次元法で東洋濾紙 No. 85 を用い室温で 12 時間展開した。又 (A) 溶媒として buthanol pyridin 水 (6 : 4 : 3) を用いた場合は silver

Table 2. Rf. values of monosaccharide substrate related to chitin and water-soluble products resulting from the hydrolysis of chitin by *Vibrio parahaemolyticus* chitinase

Solvent & Spray reagent	Substrate			chitinoclastic products
	N-acetyl glucosamin	glucosamin	glucose	
Buthanol : pyridin : water (6 : 4 : 3)	0.47	0.30	0.38	0.08 0.20 0.24
Silver nitrate reagent				
Ammonium : buthanol : ethanol : water (1 : 40 : 10 : 49)	0.24	0.17	0.14	0.07
Aniline hydrogen phthalate reagent				
Ammonium : buthanol : ethanol : water (1 : 40 : 10 : 49)				0.07 0.10
Silver nitrate reagent				0.13

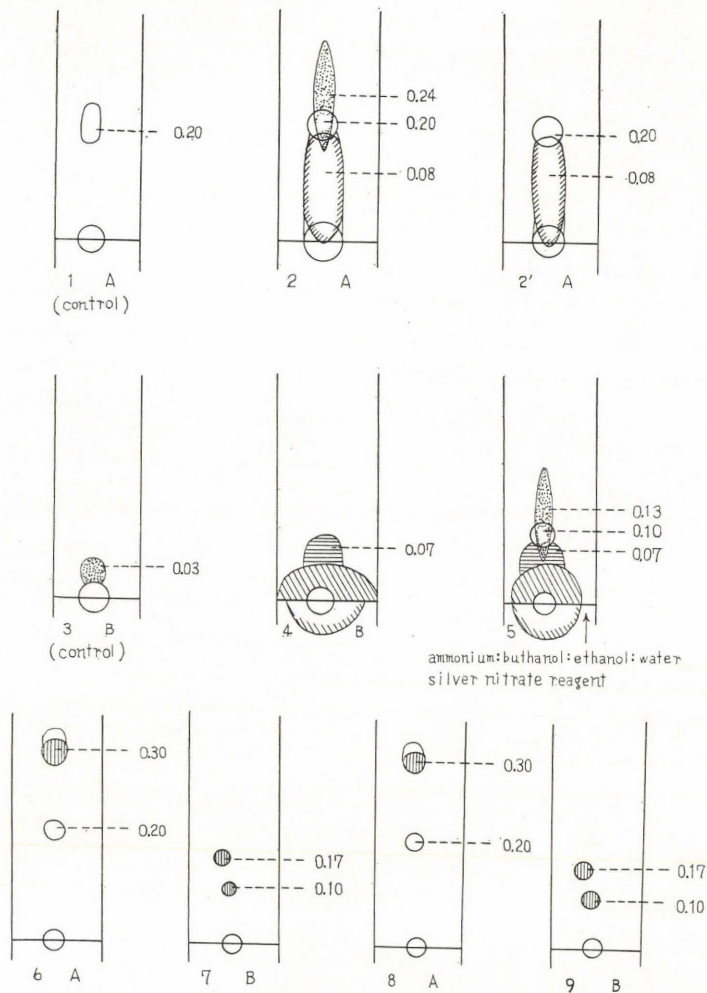
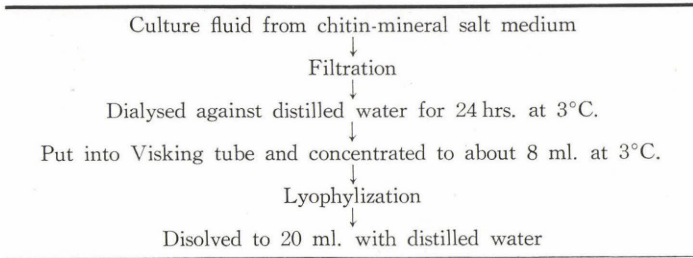


Fig. 6. Paper chromatography

nitrate reagent (5 N アンモニア水, 2 N 苛性ソーダ, 0.1N 硝酸銀等量混和液) を用い (B) ammonium-buthanol-ethanol-水 (1 : 40 : 10 : 49) 系溶媒を用いたときは aniline hydrogen phtharate reagent による呈色反応を用いた。

paper chromatography 所見として同一条件における標準物質及び試料の Rf 値は Table 2 及び Fig. 6 の如くで (1) (2) (3) (4) (5) はそれぞれ酵素分解させた場合の上記試料を原点に 10 回つけて得た対照及び試料であり何れも n-acetylglucosamin, glucosamin に相当する spot を生ぜず, 且つ (2) は Fig. 6 の如く還元物質の著明なる tailing のために spot 自体が不明瞭であつたので該試料の 10 倍稀釈濃度にて同様 paper chromatography を施

行し (2') の所見即ち Rf 0.20 の部位に脱色 spot を生じた。この様に未分解の中間産物と思われる spot しか得られなかつたので, 上記酵素分解試料を 12 枚の東洋濾紙で 6 枚づつを両溶媒系を用いて展開させて, この未分解の中間産物 spot に相当する部分を切斷蒸溜水にて十分抽出し, 7.5, 5.0, 2.5 N HCl を抽出液に等量加え 105°C~110°C, 15 時間加水分解し, 減圧乾燥後可及的少量の溶液に調製し, 再び上記と同一条件にて paper chromatography を施行すると, 上記規定塩酸において (6) (7) の如く溶媒呈色条件 (A) 及び (B) 共に glucosamin に相当する Rf 0.30 及び 0.17 の部に褐色 spot を生じ, 且つ Rf 0.20 の脱色 spot 及び 0.1 の褐色 spot を生じた。猶切斷せず酵素分解液をそのまま同様条件にて加水分

Table 3. Preparation system of *Aspergillus fumigatus* chitinase

解した場合(8)(9)も再抽出の場合と同一結果を得た。以上の結果より腸炎ビブリオ chitinase には, chitobiase を含むことが極めて少いか或いは殆んど含まれないものと考えられる。*Aspergillus fumigatus* の chitinase についても検討を試み次の様な所見を得た。

名大細菌学教室より分与された *Aspergillus fumigatus* を材料として腸炎ビブリオの場合と同様に Reynolds (1954) の法に従い調製した mineral salt medium に colloidal chitin を 1% の割に入れ 30°C 8 日間振盪培養した後、濾過した濾液について Table 3 に示す様な方法でその中に含まれる chitinase の粗分割を取り酵素液とした。この *Aspergillus* の chitinase については腸炎ビブリオ chitinase の様な酵素学的検討を加えないですべて腸炎ビブリオの chitinase の示す様な酵素学的条件に従った。次に腸炎ビブリオ菌体外 chitinase による *Trichophyton mentagrophytes* の発育抑制作用についての検討を試みた。

Sabouraud's liquid medium で 30°C, 7 日間培養した *Trichophyton mentagrophytes* を glass filter を用いて生理学的食塩水で菌苔を良く洗い、前述の方法で分離した粗酵素液 1.0ml 中に約  $\frac{1}{10}$  量の菌苔を入れ密栓を施し、30 分から 24 時間に至る間 37°C で incubate した。その後良く菌苔を生理学的食塩水で洗ってマイコバイオテックアガールの斜面培地に 1 白金耳ずつ接種して、以後の

Table 4. Influence of chitinase on growth of *Trichophyton mentagrophytes*

Time of soaking mycelia in enzyme		Time of cultivation			
		12 hours	36 hours	60 hours	84 hours
30min.	Sample	—	###	###	###
	Control	—	###	###	###
2hours	Sample	—	##	###	###
	Control	—	###	###	###
4hours	Sample	—	##	###	###
	Control	—	###	###	###
8hours	Sample	—	+	###	###
	Control	—	##	###	###
12hours	Sample	—	+	###	###
	Control	—	##	###	###
24hours	Sample	—	—	###	###
	Control	—	+	###	###

— ······ no growth

+ ······ growth

Sample ··· added chitinase

Control ··· added no chitinase

菌苔の発育を酵素液の代りに食塩水を用いた対照例と比較した結果 Table 4 に示す如く三浦ら(1950)の報告に述べる如き著明な抑制は全く見られず、尚森下ら(1963)の報告にある様な回虫体腔液の場合程の著明な発育の抑制も示さなかつた。

#### chitinase と回虫体腔液抗真菌分割の colloidal chitin 等に対する酵素作用

各 chitinase 及び回虫体腔液抗真菌分割を用いてエビ

Table 5. Enzymatic activities of *Vibrio parahaemolyticus* exo-cellular chitinase, *Aspergillus fumigatus* exo-cellular chitinase and anti-fungal fraction of Ascarid body fluid against colloidal chitin prepared from lobster and their anti-*Trichophyton* activities

Enzyme	Optical density			Anti- <i>Trichophyton</i> activity
	Sample (A)	Control (B)	Activity (A - B)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> exo-cellular chitinase	0.065	0.012	(0.053)	—
<i>Aspergillus fumigatus</i> exo-cellular chitinase	0.038	0.008	(0.030)	—
Anti-fungal fraction of ascaris body fluid	0.520	0.520	(0.000)	+

から得た colloidal chitin に対する分解を調べた結果は、Table 5 に示す如くで回虫体腔液中には chitinase 作用を示す物質の存在を認めなかった。又 Sabouraud's agar medium 上に培養した8日目の菌苔上にこれらのものを約0.1 ml 宛滴下し、抗 *Trichophyton* 作用を見たところ前2者の chitinase には体腔液の示すような抗 *Trichophyton* 作用をまったく認めなかった。尚回虫体腔液の製法及び抗白癬分割の採取法は森下ら(1962)に従った。腸炎ビブリオ及び *Aspergillus* からの2種 chitinase と回虫体腔液抗真菌分割の *Trichophyton mentagrophytes* の polysaccharide fraction に対する酵素作用を究明する為、次の実験を行なった。Sabouraud's liquid medium で8日間 30°C で培養した菌体を濾過して集めその湿菌苔約 10 g について McNall(1961)の方法に従ってその polysaccharide fraction をとり、これに対する分解を求めると、Table 6 に示す如くで、この場合は僅かにその polysaccharide fraction に対する分解を示す様にも見受けられるが全体的に見て殆んど測定誤差に近いものと考えたい。以上の結果回虫体腔液は *Trichophyton mentagrophytes* の polysaccharide fraction に対して殆んど酵素分解作用を示さない。回虫体腔液中の抗真菌分割の *Trichophyton mentagrophytes* に対する影響を観察した。Sabouraud's liquid medium で8日間、30°C で振盪培養した *Trichophyton mentagrophytes* の菌体を集め生理的食塩水でよく洗滌した後、ガラス球を入れた肉厚

コルベンに約3倍量の生理的食塩水とともに入れ1時間振盪して菌体の homogenate を作り、このものの0.5 ml を substrate とし、体腔液の抗真菌分割を 0.5 ml, pH 7.0 M/ 15 phosphate buffer 0.5 ml の反応系を作り 37°C, 1時間 incubate し、その後の反応の停止は substrate の遠心沈澱除去により行ない、ferricyanide ferric iron method で総還元物質を、又 Folin の phenol 試薬で総蛋白性物質の定量を行なった。一方菌体の homogenate を 56°C, 30分熱処理したのを作り substrate 側の酵素系を不活性化して同様の測定をした。この結果は Table 7 に示す如くで、還元物質には著変を認めないが Folin 法による定量で著変を認めることが出来た。次に回虫体腔液中の抗真菌分割の *Aspergillus fumigatus* に対する影響を同様に観察した。前述の *Trichophyton mentagrophytes* の場合と同様に処理して、抗真菌分割の *Aspergillus fumigatus* の mycelia に対する影響をしらべた結果は、Table 8 に示される如く、本作用は主としてその蛋白性物質に作用して居るもの如く感ぜられる。

#### chitinase に対する回虫体腔液の影響

Tracey(1955)は *Basidiomycetes* のある種のものの中に chitinase を産生することを見出しこの chitinase に対して血清が activator になることを報告している。この事を腸炎ビブリオ chitinase を用いた場合を追試し、且

Table 6. Enzymatic activities of *Vibrio parahaemolyticus* exo-cellular chitinase, *Aspergillus fumigatus* exo-cellular chitinase and anti-fungal fraction of *Ascarid* body fluid against polysaccharide fraction of *Trichophyton mentagrophytes*

Enzyme	Optical density		
	Sample (A)	Control (B)	Activity (A - B)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> exo-cellular chitinase	0.094	0.048	(0.046)
<i>Aspergillus fumigatus</i> exo-cellular chitinase	0.042	0.000	(0.042)
Anti-fungal fraction of ascaris body fluid	0.420	0.415	(0.005)

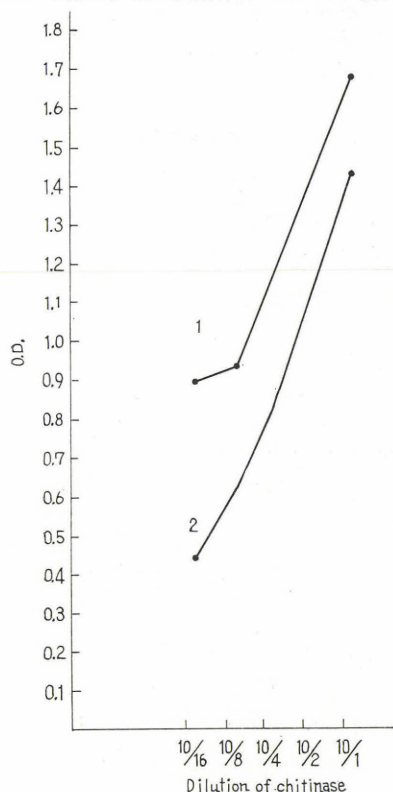
Table 7. Influence of anti-fungal fraction of *Ascarid* body fluid on living mycelia and heat-treated mycelia of *Trichophyton mentagrophytes*

Method for determination	Substrates used	Optical density		
		Sample (A)	Control (B)	Activity (A - B)
Ferricyanide ferric iron method	Living mycelia	0.294	0.302	(-0.008)
	Heated mycelia	0.530	0.426	(0.004)
Folin method	Living mycelia	0.520	0.480	(0.040)
	Heated mycelia	0.293	0.228	(0.085)

Table 8. Influence of anti-fungal fraction of *Ascarid* body fluid on *Aspergillus fumigatus*

Method for determination	Substrates used	Optical density		
		Sample (A)	Control (B)	Activity (A - B)
Ferricyanide ferric iron method	Living mycelia	0.360	0.350	( 0.010)
	Heated mycelia	0.430	0.420	( 0.010)
Folin method	Living mycelia	0.590	0.598	(-0.008)
	Heated mycelia	0.635	0.608	( 0.027)

つ回虫体腔液の chitinase に対する影響を調べるために次の如く実験した。血清蛋白及び回虫体腔液の抗真菌分割を用い、それぞれ 24 時間純水で透析し無機イオンの除去につとめた。酵素分解系としては生理的食塩水濃度を用いた。実験方法として腸炎ビブリオ chitinase  $1/10$  濃縮液を順次数稀釈しその 0.5 ml に、substrate colloidal chitin 6 倍稀釈液 0.5 ml, pH 7.0 M/15 phosphate buffer 1.5 ml を加え、之に反応系は incubate 前に、対照

Fig. 7. Influence of human serum and *Ascarid* body fluid against chitinase activities.

- 1...added human serum. dilution rate...1:10  
2...added *Ascarid* body fluid. dilution rate...1:10

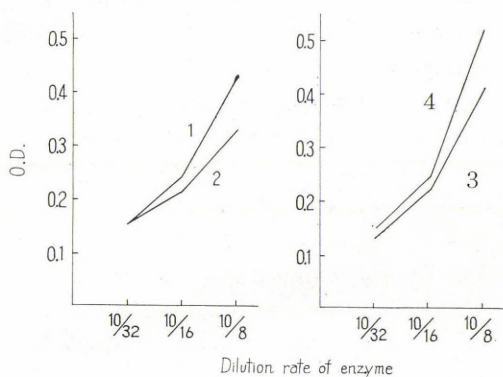


Fig. 8. Influence of ascarid body fluid against chitinase activities.

1. added ascarid body fluid (dilution rate... 100) before incubate.  
2. added ascarid body fluid (dilution rate... 100) after incubate.  
3. added ascarid body fluid (dilution rate... 1000) before incubate.  
4. added ascarid body fluid (dilution rate... 1000) after incubate.

系は incubate 後に、10 倍稀釈前記人血清蛋白及び体腔液 0.5 ml 又は 100 倍及び 1000 倍稀釈体腔液 0.5 ml 加えたものを使用した。結果は Fig. 7 及び 8 に示す如くで Fig. 7 の場合は血清も体腔液も chitinase の活性を著しく増進させない。Tracey の云う様な現象は認められなかった。Fig. 8 の場合は稀釈していくと 100 倍稀釈の場合体腔液で chitinase 作用を増進させる像が得られた。Tracey が血清で行ない濃度の高い程促進的であるとの結果とは些か異なる結果を得た。

#### 考 按

回虫体腔液が抗白癬菌及び *Aspergillus* 作用を有することの原因として体腔液中のある種の酵素の存在が考えられる。真菌の細胞壁が chitin を大量に含んでいるこ



とから、体腔液中に chitinase の存在の有無を知る為、既知の chitinase 産生微生物の研究を行なった。即ち腸炎ビブリオ及び *Aspergillus* からの chitinase 産生条件を先ず検討して見た。chitin 加 mineral salt medium で振盪培養を試みた所、燐酸塩を含む場合に腸炎ビブリオの増殖が盛んであり、ひいては chitinase 産生量の多いことが判明した。この方法で chitinase を得、このものの activity を次の測定法で比較した処、endocellular chitinase は極めて微量で exocellular chitinase に比し問題でない量であったので以後の実験は菌体外 chitinase のみを対照とした。

測定法としては ferricyanate ferric iron 法で総還元物質を発色せしめ、Ito 光電比色計 540°にて測定した。chitinase の至適 pH は 7.0、至適温度は 37°C で時間的に 30 分迄は比較的急激にその後は緩徐に活性値の上昇を認めた。この chitinase の colloidal chitin に対する作用機序を paper chromatography で追跡してみると、n-acetylglucosamin 及び glucosamin の spot を生じない。そして中間産物と考えられるものの spot を得た。それ故にこの chitinase は chitobiase を含むことが少いか或いは殆んど含まないものと考えられる。

次に回虫体腔液抗真菌分割と白癬菌と更に腸炎ビブリオ又は *Aspergillus* からの chitinase との三者の関係をしらべた。Sabouraud's liquid medium に培養した白癬菌の菌苔をその約 10 倍量の chitinase の中に入れ時間を追つて白癬菌の発育を観察したが対照に比し抑制作用は認められなかった。回虫体腔液には colloidal chitin に対する分解能はない。

Sabouraud's agar plate 上に培養した白癬菌の菌苔上に滴下した場合回虫体腔液にのみ溶解作用が認められる。chitinase にはその作用がない。次に白癬菌の polysaccharide fraction に対しては chitinase は分解作用を示すのに回虫体腔液には殆んど認めることが出来なかった。そして生及び 56°C 30 分処理白癬菌に対する回虫体腔液抗真菌分割の影響は還元物質の定量的方法では著変を認められないが、総蛋白質の定量的方法では分解の促進が観察された。抗 *Aspergillus* の場合でも回虫体腔液は主として蛋白様物質に作用している様である。Tracey

が血清が chitinase 作用を促進すると述べているので、回虫体腔液でこれを追試した。しかし 10 倍稀釈の回虫体腔液は 10 倍稀釈血清同様 chitinase 作用を促進するとは考えられず、一方 Tracey は血清は濃度の高い程 chitinase 作用を促進するというが、回虫体腔液では 100 倍稀釈の方が 10 倍稀釈より chitinase 作用を促進する様な結果が得られた。

## 結 語

腸炎ビブリオ及び *Aspergillus fumigatus* から得られた chitinase は chitin を oligosaccharide までに分解する様で n-acetyl-glycosamin を証明することは出来なかつた。

回虫体腔液の抗真菌分割には chitinase は含まれていない。回虫体腔液の抗 *Trichophyton* 及び抗 *Aspergillus* 作用は真菌の多糖体成分には作用せずに、生又は 56°C 30 分処理の白癬菌に体腔液を作用させると Folin 法による定量的結果では蛋白様物質を分解している像を認めた。回虫体腔液の添加で chitinase が作用を著しくは促進されない。しかし 100 倍稀釈した場合には 10 倍稀釈よりも chitinase 作用促進の像を認めた。

## 主なる文献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 森下哲夫・小林瑞穂 (1963): 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.
- 4) 森下哲夫・小林瑞穂 (1963): 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.
- 5) Reynolds, D. M. (1954): Exocellular chitinase from a *Streptomyces* sp., *J. Gen. Microbiol.*, 11 150-159.
- 6) Tracey, M. V. (1955): Chitinase in some Basidiomycetes. *Bioch. J.*, 61, 579-586.
- 7) 山本忠治郎 (1952): 日本産キチン分解菌の研究. *62(6)*, 145-152.

## RELATION BETWEEN ANTI-FUNGAL FRACTION IN ASCARIS BODY FLUID AND CHITINASE

RIJUN ENYA

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

Anti-Trichophyton and anti-Aspergillus activity were initially demonstrated in a fraction of ascaris body fluid by Morisita et al. (1962 & 1963). Present work is an extension of these previous studies in an attempt to clarify these antifungal action mechanism involved in the fraction by comparing them with those of chitinase prepared from *Vibrio parahaemolyticus* and *Aspergillus fumigatus*. The results obtained are as follows:

1) No chitinase activity was demonstrated in anti-fungal fraction in ascaris body fluid while the activity to break down chitin to oligosaccharide not to n-acetyl-glucosamin was proved to occur in the exocellular chitinase prepared from *V. parahaemolyticus* and *A. fumigatus* by means of paperchromatographical analysis on the reaction mixtures.

2) The anti-fungal fraction of the body fluid is not working against polysaccharide fraction in *Trichophyton mentagrophytes* but against living and heat-treated (30 minutes at 56°C) mycelia of this fungus with results to support that this ascaris fraction had an activity to attack protein component of both species of fungi on the basis of the change in total protein determined by Folin method.

3) Enzymatic action of chichinase against colloidal chitin was not accelerated by the addition of ascaris anti-fungal fraction but when diluted fraction (1 : 100) was added, acceleration in the activity was observed to an appreciable extent.