

蛔虫体腔液の酵素作用について (1)

平 岡 義 雄

岐阜県立医科大学寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(昭和 39 年 1 月 24 日受領)

豚蛔虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) の体腔液中の酵素に関しては von Brand(1952), Fairbairn(1957) らによつて総括的に報告されているし、別に多数の研究者による報告が見られる。本邦では小泉ら (1954) によるごく初期の酵素的なしかし広範な研究報告も存在している。森下ら (1963) は蛔虫体腔液中に抗真菌作用を示す物質が存在しこのものが酵素であると考えその追求を行なつて来た。

教室の塩谷 (1964) は体腔液の抗真菌分割中には polysaccharide を分解するらしい酵素は存在しない様であるという結果を得たが、体腔液中での protease の存在の究明は第 2 報に譲りたい。著者は本報告の中で蛔虫体腔液の抗真菌分割と amylase 及び esterase を含む分割の相互関係について若干の知見を得たので記述する次第である。

実験方法

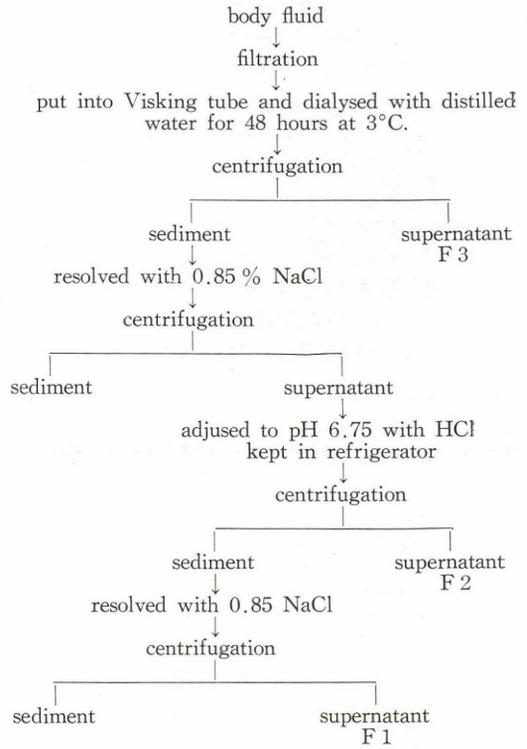
蛔虫体腔液の各分割を求める方法として透析法, Sephadex による法及び超遠心法による法の 3 つを用いた。

第 1 に体腔液採取の方法としては岐阜市屠場で採取した豚の蛔虫の雌成虫を生理的食塩水で数回洗い、蛔虫の尾部の表皮に切創を入れて、ピーカーの上に吊し滴下する体腔液を集めた。1 匹の蛔虫から大体 6~10 滴の体腔液が得られる。これを東洋濾紙 No. 2 で濾過し、この原液を透析法を用いる場合は Table 1 に示す様に分割を求め夫々の分割につき amylase, esterase 及び anti-fungal activity をしらべた。

amylase activity の測定は沃素澱粉反応を用いた比色定量法 (赤堀, 1957) を行なつた。その方法は次の様である。

a) 酵素液: 各分割を原液量に対し 2 倍に稀釈したものを用いた。b) 基質液 (1.2 g/dl 澱粉溶液): 溶性澱粉 (キシダ化学 KK1 級) 1.2 g, 安息香酸 0.1 g に少量の水を加えて糊状とし、これに熱湯 70~80 ml を注ぎ、約 5 分間水浴中で加熱し、室温に放冷した後水を加えて 100 ml とした。c) Lugol 溶液 (0.026 N) : I₂ 1 g, KI 2

Table 1. Analytical method of *Ascarid* body fluid.



g を水に溶解して 300 ml とした。d) 5% H₂SO₄ 溶液 e) M/15 磷酸緩衝液 pH 5.0。

検量線の測定方法は上記の基質液を水で 10 倍に稀釈しそれぞれ 100 ml のメスコルベンに 0 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml 及び 5 ml とり、これに 2 ml の 5% H₂SO₄ を加え、更に Lugol 溶液 1 ml 及び水を加えて総量 100 ml とする。盲検液を対照として 620 mμ で測定する。検量線は Beer の法則に従い直線となつた。

酵素活性の測定は基質液 0.5 ml 及び磷酸緩衝液 0.5 ml を加え、これを予め 37°C に温めておく。これに 2 倍稀釈の体腔液分割を 0.5 ml 加え混和し、37°C 30 分間振盪加温する。加温後直ちに 5% H₂SO₄ 2 ml を加え

pH を2以下として 酵素作用の進行を阻止し、さらに Lugol 溶液 1 ml 及び水を 加えて 100 ml とする。一方 基質の入らないもの (H₂SO₄, Lugol 溶液及び水) を作り、これを比色の対照とし、夫々水を Blank として 620 m μ で比色した。酵素活性は対照の吸光度から試料の吸光度を引いてその差を酵差活性値とした。

esterase activity の測定は p-nitrophenyl acetate を基質とした Huggins 及び Lapedes の法を用いた。基質として使用した p-nitrophenyl acetate の濃度は 0.333 micromole per ml とし、酵素液は生理的食塩水で 5% とした蛔虫体腔液の各分割を用いた。酵素液 1 ml, pH 7.0 の M/15 phosphate buffer 2 ml, 蒸留水 5 ml をこの順序で加え、1 分間 25°C で加温した後 2 ml の基質を加え直ちにその呈色度を 400 m μ で測定し、25°C 20 分後再び吸光度を測定し、標準曲線により遊離した p-nitrophenol の量を求めた。対照として酵素液を加えない場合について同じ条件で測定し、自然分解により遊離した p-nitrophenol の量を求め両者の差が酵素作用によつて遊離した p-nitrophenol の量とした。

抗真菌作用の判定は森下ら (1963) の法に従い *Trichophyton mentagrophytes* 及び *Aspergillus fumigatus* を用い、ペトリー皿の Sabourand 寒天培地に生育させ、培養 8 日目の菌苔上に各体腔液分割を滴下し、37°C で観察して 30 分~8 時間以内に lysis を起すか否かをしらべた。

実験成績

蛔虫体腔液の各分割の amylase, esterase 及び anti-fungal activity 作用の相関々係は Table 2 の如くであつ

Table 2. Relation between anti-fungal, amylase and esterase activities and dialysed fractions (F₁, F₂, F₃)

Activiy	Fraction		
	F ₁	F ₂	F ₃
Amylase activity	-	-	+
Esterase activity	-	-	+
Anti-fungal activity	-	+	-

た。即ちこの結果から 3 者の間に関係のないことが明らかである。

amylase の測定に先立ちその酵素作用の特性について至適 pH 及び至適温度と体腔液中の amylase 単位について求めた結果は Fig. 1 及び 2 に示される様で、至適 pH は 5、至適温度は 37°C で amylase 単位は 45~135 単位 (平均 70 単位) である (Table 3)。

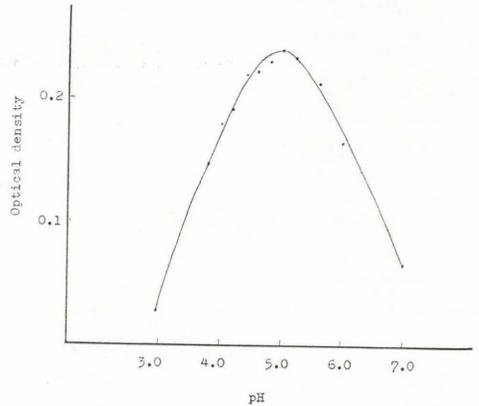


Fig. 1 The effect of pH on the rate of enzymic hydrolysis of the starch

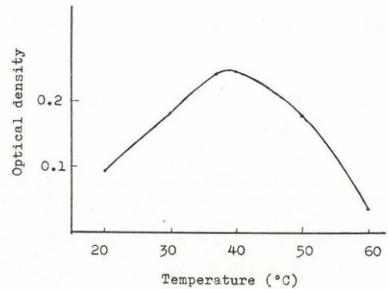


Fig. 2. Amylase action of body fluid of *Ascaris lumbricoides* at varying temperatures

Table 3. Amylase unit of ascarid body fluid

No. 1	20.8 unit
No. 2	79.6
No. 3	66.8
No. 4	72.8
No. 5	56.6
Average	59.9

1 unit of amylase activity is defined that 100 mg of ascarid body fluid hydrolyzes 10 mg of the starch

esterase について amylase の場合と同様に至適 pH 及び至適温度と esterase 単位を求めた結果は Fig. 3 及び 4 の様で、至適 pH 及び至適温度については明瞭な値を得なかつた。このことは Huggins *et al.* (1947) ものべている如く、アルカリ側および高温では p-nitrophenyl acetate の自然分解が非常に高くなる為に、この実験での如く pH 7.0, 温度 25°C を用いる結果となつた。この問題について Huggins *et al.* (1947) の原著には基質として p-nitrophenyl acetate を用いた実験のデータは示されてなく、文章でのみ pH 7.0, 温度 25°C とし

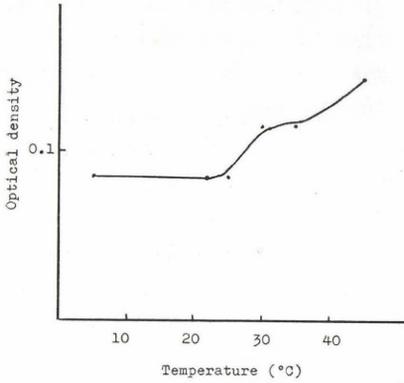


Fig. 3. Esterase action of the body fluid of *Ascaris lumbricoides* on p-nitrophenyl acetate at varying temperatures.

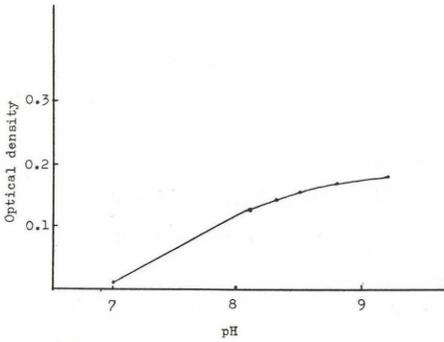


Fig. 4. The effect of pH on the rate of enzymic hydrolysis of the p-nitrophenyl acetate.

て表現されている。体腔液の esterase 測定法としてのこの方法には著者も抵抗を感じている次第である。esterase 単位としては 9~26 単位(平均 15.4 単位)の値が得られた (Table 4)。

Table 4. Esterase unit of ascarid body fluid.

No. 1	26.0 unit
No. 2	9.0
No. 3	9.2
Average	15.4

1 unit of aliesterase activity is defined as that amount of enzyme liberating 1 micro-mole of p-nitrophenol in 20 minutes at 25°C

Sephadex G-75 による体腔液の各分割の amylase, esterase 及び anti-fungal activity についての実験結果は次の様である。森下ら(1963)の報告に従い Sephadex G-75 を担体とした column chromatography により得た各分割の amylase, esterase 活性を求めたのが Fig. 5 及

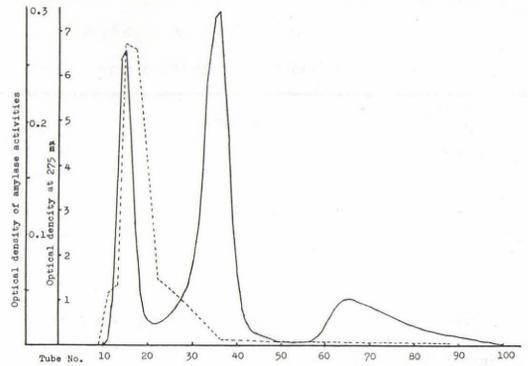


Fig. 5. Relation between amylase activity and the protein fraction of ascarid body fluid with Sephadex G-75

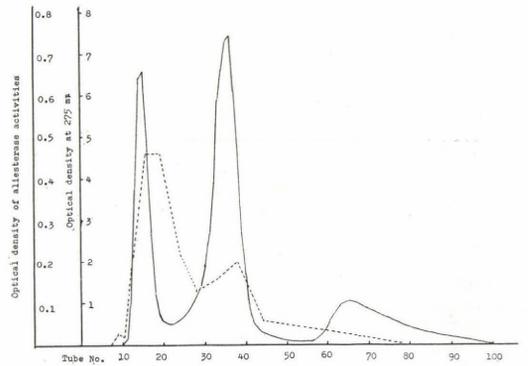


Fig. 6. Relation between aliesterase activity and the protein fraction of ascarid body fluid with Sephadex G-75

び 6 である。anti-fungal activity は 275 mμ 吸収曲線の第 1 峯に存在することからして、この結果は amylase 活性分割と重なり、esterase 活性分割もその一部に混在する結果となった。

次に体腔液の超遠心分割について anti-fungal activity を有する部分を究明した。下(1961)は蛔虫体腔液の超遠心分析を行ない、主として $S_{1.20W}=7.8s$ 及び $S_{2.20W}=1.6s$ の 2 つの分割が得られたことを報告した。著者は前述の Sephadex G-75 による分割から蛋白性成分としては、下の成績と同様の 2 つの分割が得られたので、日立 40-P を用いて体腔液を原液及び 0.85% NaCl 液で 2 倍、4 倍、8 倍に夫々稀釈したものを 10 ml 宛 tube に入れ 40,000 r. p. m で 1 時間超遠心を行ない、上層から 1 ml 宛抜きとり、その各分割について anti-fungal activity を求めた結果は Table 5 (1~4) の如き結果となった。

Table 5. Relation between anti-fungal activity and ultracentrifugational fraction

1. 100 % ascarid body fluid (40,000 r.p.m., 1 hr.)

Time till positive activity	Fraction									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2 hour	-	+	±	±	-	-	±	±	+	±
1 hour	±	±	±	±	+	+	+	±	±	±
1 1/2 hours	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
4 hours	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±

2. 50 % ascarid body fluid (40,000 r.p.m., 1 hr.)

Time till positive activity	Fraction									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3/4 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	+	±
1 1/2 hours	-	-	-	-	-	±	±	+	±	±
2 hours	-	+	+	+	+	+	±	±	±	±
3 hours	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±

3. 25 % ascarid body fluid (40,000 r.p.m., 1 hr.)

Time till positive activity	Fraction									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/4 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 1/2 hours	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
2 hours	-	±	±	±	±	+	+	±	±	±
3 hours	-	±	+	+	+	+	+	+	±	±

4. 12.5 % ascarid body fluid (40,000 r.p.m., 1 hr.)

Time till positive activity	Fraction									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1/2 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/4 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1 hour	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 1/2 hours	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
2 hours	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±
3 hours	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±

そこで分析用超遠心器 (日立 UCA-1 型) を用いて 8 倍稀釈の体腔液について 分光分析を試みた結果 S₁ は赤色, S₂ は黄色の 2 つの分割を得た. Fig. 7 はその間の事情を示し各図の露出間隔は 8 分で湿度は平均 18°C である. 正式な沈降係数を示し難いが下の得た成績と大体一致する結果を得た. そこでこの結果と 40-P による分割の結果とを比較した上で, anti-fungal activity は S₂ のみ存在する. 一方体腔液の可視部における吸収曲線をしらべたのが Fig. 8 である. この結果の示すものは 390~

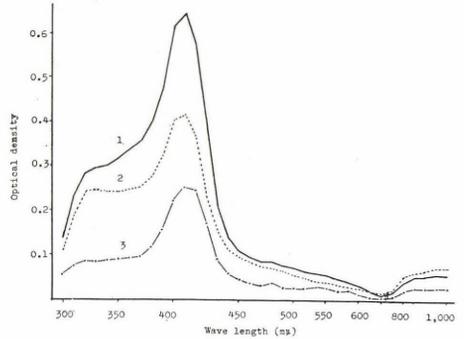


Fig. 8. Absorption spectra of Ascarid body fluid. (1 : fresh, 2 : kept in the refrigerator for 3 days at 8°C, 3 : treated under reducing pressure)

420 mμ (Soret 帯) の間に特異吸収帯が認められ, 更に 540 mμ 及び 578 mμ にも Fig. 9 に示す如き吸収が認められる. このことは Davenport (1949) の報告にある如く蛔虫の体腔液中に hemoglobin の存在することを証明し得たものと考えられる. 更にこの結果と Table 1 に示す分析結果とを比較して見ると F₁ (Fig. 11) 及び F₃ (Fig. 10) には Soret 帯が認められるのに反し, F₂ には全く認められない. 一方 amylase, esterase の活性は F₃ にもみ存在し, anti-fungal activity は F₂ にもみ存在することと考えて, 超遠心法による S₁ の分割即ち下の言う S_{1.20ws=7.8s} に anti-fungal activity がある分割が一致

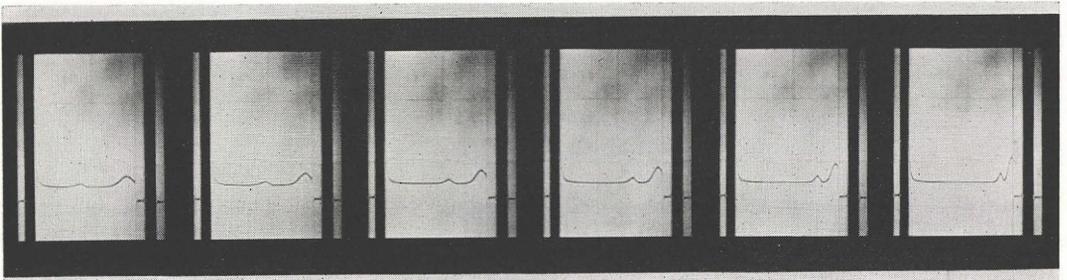
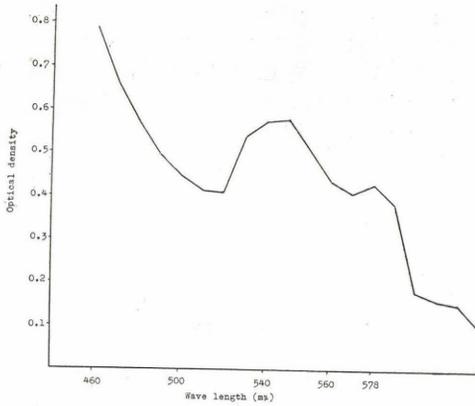
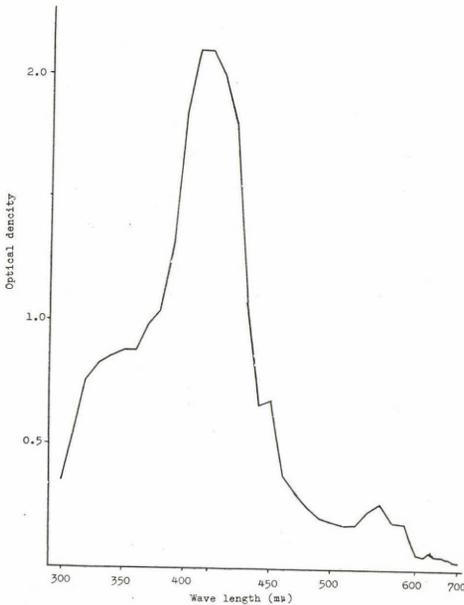


Fig. 7. Ultracentrifugational analysis of ascarid body fluid (12.5 % ascarid body fluid, at 18°C, time between exposures 8 minutes)

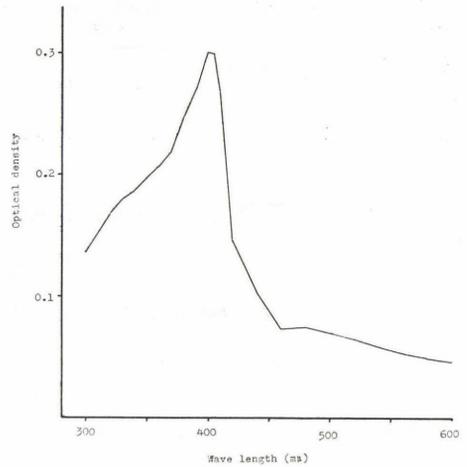
Fig. 9. Absorption spectra of F_3 in Table 1Fig. 10. Absorption spectra of F_3 in Table 1

すると考えられる。

結 語

蛔虫体腔液中の抗真菌 activity を有する分割と、amylase, esterase を含む分割を Visking tube を用いた透析法, Sephadex G-75 を用いた分割法及び超遠心分割法で比較検討し次の様な成績を得た。

1) 抗真菌 activity を有する分割は Visking tube を用いて純水に対して透析すると内液の沈澱分割中に移行し、更に pH 6.75 で 3°C 下で 1 夜保存すると、その上清分割に移行する。amylase, esterase を含む分割は tube の内液中上清分割にあつて、前者を沃素澱粉法で測定し

Fig. 11. Absorption spectra of F_1 in Table 1

た結果、amylase 単位は 45~135 単位(平均 70 単位)であり、後者は Huggins & Lapiques の法で測定した結果 9~26 単位(平均 15.4 単位)であつた。

2) Sephadex G-75 による分割では抗真菌 activity を有する分割には amylase, esterase が混在する。

3) 超遠心器(日立 40-P)を用いて 40,000 rpm, 1 時間遠心沈澱を行ない、三者の分離を試みたが、この場合も前法同様に抗真菌 activity を有する分割には amylase esterase が混在する。本法で蛔虫体腔液蛋白質を 2 つに分層に分離し得た。第 1 分層は黄色で第 2 分層は赤色であり、この 2 分層を分光学的に観察して、更に透析法による分割と比較した結果、抗真菌作用を有する分割には Soret 帯がなく、amylase, esterase 活性を有する分割には Soret 帯がある。超遠心法による S_1 の分割及び透析法による内液の上清中に haemoglobin 様物質が存在するのを確認し得た。

参 考 文 献

- 1) 赤堀四郎(1957): 酵素研究法. 朝倉書店, Vol. 2, 108-127. Vol. 4, 681-685.
- 2) Von Brand, T. (1952): Chemical physiology of endoparasitic animals. Academic Press, New York, 46-57.
- 3) Davenport, H.E. (1948): Cited from the review of Fairbairn, D. "The Biochemistry of Ascaris." Exptl. Parasitol. 6, 57.
- 4) Fairbairn, (1957): The Biochemistry of Ascaris. Exptl. Parasitol., 6, 491-554.
- 5) Huggins, & Lapiques, (1947): Acyl esters of p-nitrophenol as substrates for the colorimetric determination of esterase. J. Biol. Chem., 170, 467-482.

- 6) 一井昭五・杉浦健一・松本克彦(1959) : 蛔虫体外飼育時における代謝像の変動(2)消化酵素について. 寄生虫誌, 8(1), 19-21.
- 7) 小泉丹(1954) : 蛔虫毒の研究. 岩波書店, 210-214.
- 8) 森下哲夫・小林瑞穂(1963) : 蛔虫体腔液の抗白癬作用について. 臨床皮泌, 17(5), 479-484.
- 9) 下康郎(1961) : 豚蛔虫体腔液蛋白の塩析法並びに超遠心法による研究. 日薬理誌, 57(4), 393-398
- 10) 塩谷利淳(1964) : 蛔虫体腔液と chitinase との関係. 寄生虫誌, 13(1), 76-85.

ON THE ENZYMATIC ACTIVITIES IN ASCARIS BODY FLUID I.

YOSHIO HIRAOKA

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

Anti-fungal, amylase, and esterase activities in the fractions of *Ascaris* body fluid prepared by means of dialysis using Visking tube, column chromatography by Sephadex G-75 and ultracentrifugation technique, were comparatively studied in this paper. The results obtained were summarized as follows :

1) Anti-fungal activity was detected in the sediment by centrifugation of dialyzed body fluid in distilled water for 48 hours at 3°C. It was also recognized in the supernatant of 0.85 % NaCl solution containing the sediment which was allowed to stand overnight after adjusting pH to 6.75. On the contrary amylase and esterase activities were found in the supernatant (F3 as shown in Tab. 1 in the text) after centrifugation of dialyzed body fluid. Average activities of both enzymes in this fraction were 70 units with 45 and 135 units as both extremes by the iodometry and 15.4 units with 9 and 26 units by Huggins and Lapides' method respectively.

2) Anti-fungal fraction separated by column chromatography using Sephadex G-75 showed both amylase and esterase activities.

3) Anti-fungal fraction prepared by means of ultracentrifugation at 40,000 r. p. m. for 60 minutes (Hitachi 40-P) also demonstrated the both enzymatic activities. Ultracentrifugal analysis on the body fluid diluted at 1:8 with 0.85 % saline, resulted in two fractions, the one was yellow and the other red in color. Anti-fungal activity was demonstrated in the yellow fraction but not in the red one. Spectroscopic comparison of these with those by dialysis technique indicated the absence of Soret band in the absorption spectra of antifungal fraction (F2) at visible wavelength region and presence of it in those of both enzymatic activity fractions (F1 and F3). The hemoglobin-like substance was spectroscopically recognized in the red fraction and fraction 3.