

膵臓抽出液及び膵液の溶真菌酵素の研究

(1) 蛔虫体腔液のそれとの比較

山 田 稲 好

岐阜県立医科大学寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1964 年 11 月 30 日 受領)

豚蛔虫体腔液の溶真菌現象 (lysis) については森下ら (1963) によつて屢々報告された所であるが, 平岡 (1964) は蛔虫体腔液中の各種既知酵素群を追求し, 更に *Protease*, *amylase*, *cellulase*, *pectinase* 等の酵素が真菌に対して溶真菌作用 (lytic action) を示さない事を報告した. 塩谷 (1964) は *chitinase* が, 更に森下ら (1963) は *hyarulonidase lysozyme* も lytic action を示さない事を報告した. この一連の実験の途上で東京化成工業製の膵 lipase の一標本 (ロット番号 040938) に蛔虫体腔液の場合と同様の lytic action を見出したので, この事実にもとづいてこの作用を示す物質が動物の膵臓その他の臓器にも存在するのではないかと, 又, この物質が lipase と関係があるのではないかと想定して次の様な実験を行なった.

溶真菌作用を有する各種動物の臓器及び組織から抽出された酵素について

実験に用いた動物は犬, 兎, ラット, マウス, 豚等でこれら動物を屠殺し脱血後直ちに脳, 心臓, 肺臓, 膵臓, 胃, 腸, 肝臓, 筋肉等の組織及び臓器を取り出し, 吸取紙にて附着血液を拭い去り脂肪組織を出来るだけ取り除いてから細かく切り一定量秤量してそれに 3 倍量の冷い生理的食塩水を加えて *waring blender homogeneizer* で 2,000~3,000 回転, 5~10 分間 (組織及び臓器の磨砕の

難易に応じて回転数及び時間を調節する) 氷冷しながら磨砕しこの磨砕液を冷凍遠心分離機を用いて (roter No. 3) 温度 0°C 前後, 10,000 回転 (rpm), 30 分間遠心し, 得た上清をマイコパイオティックアガール平板培養 8 日目の *Penicillium* sp. (E) 株の菌苔上に約 0.3ml 滴下し 37°C 下で菌苔に対する lytic action を観察した. 結果は Table 1 に示す如く lytic action は各動物の膵臓抽出液にのみ見出され他の臓器及び組織には見られなかった.

1. 広義膵 lipase の lytic action

新鮮な豚膵臓から出来るだけ繊維及び脂肪組織を除き肉挽器で細かくする. このものを数回アセトン冷浸出しアセトン可溶の脂肪を除去する.

次に 1 回アセトン・エーテル (1 : 1) 混液を用いて冷浸出を行ない, さらにエーテルのみを用いて同様回数冷浸出を繰返して脂肪を除去する. この操作によつて組織磨砕物から脂肪及び水分を除去する事が出来, エーテル臭がなくなるまで風乾すると白色の粉末として粗酵素標本が残る. このものを粉碎篩別し (膵臓 lipase の粗分画法) 之に 0.025 M アムモニウム溶液を 100 mg/ml の割合に加えて溶解するとこの溶解液は菌苔に対する lytic action を示す. このものはセロファン膜に対して非透析性であり, 純水に対して透析した場合にはその遠心沈澱分面に主として移行するが活性を急速に減ずる. 又このものは熱に対して不安定で 60°C, 5 分で容易にその活性

Table 1 Fungilytic activity of animal organs

Animals	Pancreas	Liver	Spleen	Brain	Lung	Heart	Stomach	Intestine	Muscle
Dog	+++	—	—	—	—	—	—	—	—
Rabbit	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Rat	±	—	—	—	—	—	—	—	—
Mouse	±	—	—	—	—	—	—	—	—
Hog	+++	—	—	—	—	—	—	—	—

* About 0.3 ml of each extracted solution were dropped on the colony *Penicillium* sp. E, cultured at 28°C on the mycobiologic agar medium

* + Shows positive fungilytic activity

Table 2 Relation between pH and fungilytic action of pancreas extract

pH	Incubation time (hr.)							
	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6
9.7	-	-	-	-	-	±	+	+
9.1	-	-	±	±	±	+	+	+
8.0	-	-	±	±	+	+	+	+
7.2	-	-	±	±	+	+	+	+
7.0	-	-	±	±	+	+	+	+
6.7	-	-	-	-	±	+	+	+
6.2	-	-	-	-	-	±	+	+
5.8	-	-	-	-	-	±	+	+

+ shows positive fungilytic action

を失う。

膵臓抽出液の lytic action の好適 pH 域は Table 2 に示す如く 6.7~9.1 で, Sørensen の phosphate buffer を用いて pH 5.0~9.1 までの系をつくりこのものに 1:1 の割合に抽出液を加え各 pH を測定しその時の pH 値を lytic action の pH 値として滴下試験を行なった。

2. 膵液の溶真菌作用

犬に静脈麻酔剤を腹腔に入れて麻酔し開腹して十二指腸部で胆管と合流しない肛門側の膵管を遊離し生理的食塩水に浸した細いガラス管を膵管開口部に挿入して膵液を採取した。これを *Penicillium* sp. (E) 株の菌苔上に滴下しその lytic action を観察した結果滴下後 1 時間で lysis が始まり 28 時間で終了した。このように膵液にも lytic action を示す物質が存在する。

3. 豚膵臓の細胞分画法

lytic action を示す物質が膵臓に存在することを知られた著者はそこで比較的入手し易い豚の膵臓を用いて van Lancker & Holtzer (1959) の行なった法に従って細胞分画 (cytoplasmic fractionation) を行ない lytic action を示す物質の細胞中の局在性について調べた。屠場で豚の解体直後の膵臓を貰い受け直ちに冷凍して教室に持ち帰り凍結状態のまま臓器に附着している脂肪, 被膜, 繊維を取り除いた。これを細かく切り秤量してそれに 0.25 M の冷蔗糖液を加えて Teflon 乳棒つきの Potter-Elvehjem homogenizer で 0°C 下 3 分間磨砕した。磨砕液全量は組織 1 g に対して蔗糖液 5 ml の割合とした。之を冷凍遠心分離機にて 4°C 下 600×g の速度で 10 分間遠心し, 次いで Spinco model L 超遠心分離機 (roter No. 40) で Table 3 に示すような速度と時間で遠心した。各沈渣は冷蔗糖液で 2 度洗滌しその洗滌液をより強く遠心する前にその上清に加えた。各沈渣は冷蔗糖液にて組織 1 g に対して溶液が 2.5 ml の割合になるよう懸濁した。

Table 3 Fractionation procedure (by Lancker and Holtzer)

Cytoplasmic fraction	In 0.25 M sucrose	
	Centrifugal force (g×10 ⁻³)	Duration of centrifugation (Min.)
Zymogen granules (a)	1.68	5
Large and small mitochondria (b)	1.68	10
(c)	11.4	8
(d)	11.4	16
(e)	26.3	10
Microsomes (f)	105.4	15
(g)	105.4	30
Postmicrosomes (h)	105.4	60

以上の操作は 4°C~6°C の低温室で行なつた。得た分画 (fraction) は van Lancker & Holtzer の云う zymogen granules (a), large and small mitochondria (b), (c), (d), (e), microsome (f) (g), postmicrosome (h) 及び上清である。この各 fraction を *Penicillium* sp. (E) 株の平板培養の菌苔上に滴し 37°C 下で観察し Table 4 に

Table 4 Cell fractionation of hog pancreas and fungilytic action

Cell fractions	Incubation time (hr.)						
	1/4	1/3	1/2	1	1 1/2	2	3
Nuclei	+	+	++	+++	+++	+++	+++
Cytoplasmic fraction (a)	-	-	-	-	-	-	-
(b)	-	-	-	-	-	-	-
(c)	±	±	±	±	±	±	±
(d)	±	+	+	+	+	+	+
(e)	±	+	+	++	++	++	++
(f)	+	+	++	+++	+++	+++	+++
(g)	+	+	+	++	++	++	++
(h)	-	±	±	±	±	±	±
Supernatant	+	+	++	++	++	++	+++
0.25 M Sucrose	-	-	-	-	-	-	-

+ shows positive fungilytic action

示す如き lytic action の成績を得た。この表でわかるように lytic action は nuclei に最も強く, ついで (f), 上清, (e) の fraction の順である。これらの fraction は凍結融解を 2~3 回繰返すと急速にその活性を減ずる性質があり, 又臓器そのものに於いても同様に凍結融解を繰

返すとそれから得た fraction は lytic action を示さなくなる。この事から lytic action を示す物質は非常に不安定なものであることがわかる。又著者はこれらの実験の経過中に次のような現象に気附いた。それは新鮮な豚膵では lytic action を示す物質が microsome (f) fraction に多く上清のそれには少ない。臓器をたとえ -20°C に冷凍保存しても貯蔵が長くなる程 lytic action を示す物質が上清に増加し microsome (f) fraction に減少すると云うことである。この事から lytic action を示す物質は microsome (f) fraction から何らかの原因で遊離して来るものと考え microsome (f) fraction 作製の後、0.25 M 蔗糖液で懸濁し 25°C 下 2 時間放置しそれを再び $105,000\times g$ の速度で 15 分間超遠心してその上清と沈渣で菌苔に対する lytic action を見るとその上清にも強い lytic action が見られた。この事は Palade 顆粒が lytic action と関係があるのではないかと云う事を疑わしめる。

microsome (f) fraction に RNase 及び trypsin を作用させた場合における lytic action への影響

pH 7.0 の phosphate buffer (Sørensen) に 10 mg/ml の割に R. Nase (牛膵臓より抽出片山化学製) を溶解し microsome (f) fraction に等量に加えたものと、単に phosphate buffer を等量に加えたものとを 25°C 下に放置し時間をおつて滴下試験を行ない 37°C 下で菌苔に対する lytic action を観察した。結果は Table 5 に示す。

Table 5 Influence of RNase to lytic action of hog pancreas (f) fraction

Addition to (f) Fraction	Incubation time (hr.)				
	0	1/4	1/2	1	1 1/2
RNase + phosphate buffer	20 sec*	5 sec	5 sec	10 sec	20 sec
phosphate buffer	20 sec	30 sec	30 sec	2 min	5 min

* shows start in lysis

うに単に pH 7.0 の phosphate buffer を等量に加えた microsome (f) fraction の溶液は放置時間の経過と共に lysis 開始時間が遅延するが、R. Nase を加えた方は放置時間 15~30 分の所で lysis 開始時間が早くなりその後徐々に開始時間の延長を見た。尚対称としての R Nase 溶液は lytic action を示さなかつた。この事は上清に R Nase を作用させてもその対称との差異が見出されなかつた事から R. Nase は lytic action に対して賦活剤と

して作用するのではなくて lytic action を示す物質をより多く分離させて来るものではないかと考えられる。

つぎに pH 8.0 の phosphate buffer に 100 mg/ml の割に市販の trypsin (Merk 社製) を溶解し microsome (f) fraction に等量に加えたものと、対称として buffer のみを等量に加えたものとを 25°C 下に放置し時間を追つてそれらの菌苔に対する lytic action を比較した。結果は Table 6 に示す様に trypsin 溶液を加えた方は混和

Table 6 Influence of trypsin to fungilytic action of hog pancreas (f) fraction

(f) fraction	Incubation time (hr.)			
	0	1/4	1/2	1
trypsin + phosphate buffer	+	-	-	-
phosphate buffer	+	+	±	±
	15 sec.	15 sec.	2 min.	15 min.

* shows start in lysis

+ shows positive fungilytic activity

直後には lytic action を見るが放置時間 15 分以上には全く見られず、対称は放置時間 15 分、30 分でも lytic action を示した。この事から豚膵臓の microsome (f) fraction の lytic action を示す物質は酵素様のものではないかと推定される。

豚膵臓の microsome (f) fraction の lytic action と lipase 活性及び protease 活性の関係

豚膵臓の microsome (f) fraction の lipase 活性及び protease の活性と lytic action との関係について実験した。lipase 活性は 3% Fatgen (大日本製薬製) を substrate として之に microsome (f) fraction を作用せしめ脂肪分解により生ずる free fatty acid (F.F.A) を N/100 alcohol-KOH で滴定し鹼化数より力価を求めた。先づ microsome (f) fraction を 2 ml, McIlvain buffer (pH 7.0) 2 ml, 蒸留水 5.0 ml 及び賦活剤として M/8 CaCl_2 2 ml, 3% Fatgen 1 ml を加えて恒温振盪槽 37°C に入れ時間を追つて 1% phenol phthalen を指示薬として F.F.A を滴定した。又 protease 活性は substrate casein (Merk 社製) を使用し、除蛋白試薬として 10% trichloroacetic acid (T.C.A) を用いて、lipase 活性測定と同様に恒温振盪槽 37°C に放置し時間を追つて 280 μg の optical density で測定した。先づ microsome (f) fraction (pH 7.0) を 37°C 下に放置してその時間的経過と lytic action の関係を求めると Table 7 に示すごとく、菌苔

Table 7 Relation between fungilytic action of hog pancreas (f) fraction and its incubated time at 37°C

Incubated time (hr)	Observation time (min.)			
	1	2	3	4
0	±	+	++	+++
1/2	-	±	++	+++
1	-	±	+	++
1 1/2	-	±	+	++
2	-	-	±	++
2 1/2	-	-	±	++
3	-	-	±	++
4	-	-	±	++

+ shows positive lytic action

に対する lytic action は殆んどその活性を減ずる事なく 4時間放置後でも直後と比較して lysis 開始時間が僅かに約6分の遅延を見たのみであった。この実験と併行して同一時間に同一材料で lipase 活性及び protease の活性を求めて見ると lipase 活性は殆んど変化がなく僅かに低下するのみで菌苔に対する lytic action と全く平行するが、protease 活性は時間経過と共に急速にその活性が増大し菌苔に対する lytic action と全く逆の関係となった。Table 8, Table 9.そこでこの事を更に確める為に *Penicillium* sp.(E)株の菌苔の emulsion を substrate として nuclei (各 fraction の total に相当する), a 及

Table 8 Lipolytic activity of hog pancreas (f) fraction by alkali titration method (incubated at 37°C)

Incubated time (hr.)	control	0	1/2	1	1 1/2	2
activity	2.90	3.90	3.60	3.60	3.60	3.70

Incubation mixture

Substrate... 3 % Fatgen (Dainihon seiyaku Co. Ltd) ... 1 ml
 Emzyme... hog pancreas (f) fraction ... 2 ml
 Buffer... Sørensen phosphate buffer (pH 8.0) ... 2 ml
 Distilled water ... 5 ml

Table 9 Proteolytic activity of hog pancreas (f) fraction determined at 280μ in wave length (incubated at 37°C)

Incubated time (hr.)	control	0	1/2	1	1 1/2	2
activity	0.450	0.401×10	0.460×10	0.465×10	0.478×10	0.480×10

Substrate... Casein (Merck Co.)
 Buffer ... Sørensen buffer (pH 7.2)
 Deproteinated with 10 % trichloroacetic acid

び b (lytic action を殆んど或は全く示さない fraction), microsome (f) の fraction を 37°C 下にて 1時間作用させその lipase 活性を求めると, lytic action の最も強い nuclei と次に microsome (f) の fraction に高い lipase 活性が見られ, lytic action を殆んど示さない, (a, b) fraction は変化を示さなかつた。Table 10 これ

Table 10 Lipolytic activity of hog pancreas fractions to *Penicillium* sp. (E) emulsion

Fraction	Control	Sample
Nuclei	3.70	5.00
Cytoplasmic fraction (a b)	2.50	2.50
(f)	2.70	3.50

は *Penicillium* sp. (E)株の平板培養菌苔の lytic action と全く一致し, lipase 様の作用が lytic action の主体をなすものではないかと考えられる。しかしながら市販の豚 lipase は前に述べた東京化成工業製の標本(ロット番号 040938) 以外は, pH 8.0 及び pH 8.5 の phosphate buffer に市販 lipase を 10 mg/ml の割に溶解し Ca⁺ を加えてその菌苔に対する lytic action を見ても全くその作用を示さなかつた。植物性 lipase や NBC 製 elastase (2 mg/ml の割に溶解) も同様その作用を示さなかつた。

以上の事から lipoprotein lipase 様作用を想定し, また同じ時期に蛔虫体腔液の lytic action を示す物質を究明していた教室の榊原(1964)が蛔虫体腔液中に lipoprotein lipase 様の酵素の存在する事を出したので主として lipoprotein lipase 様の作用について実験した。

豚膵臓の各 fraction の clearing factor (C.A) 及び Glycerol 定量と菌苔に対す lytic action との関係

Grossman (1954) の法による clearing activity の測定法を用いて各 fraction の活性を測定した。先づ substrate として Ediol 10 倍稀釈液 (Ediol 原液 1 ml 中ヤ

シ油 100 mg 含有をよく振り混ぜ均一としてから pH 7.2 の Clark-Lubs buffer を用いて 10 倍に稀釈) と Ediol 10 倍稀釈液に, Amour 社製 bovine-albumin (bovine plasma fraction V) を Clark-Lubs buffer で 7% に溶解した Albumin を 1 : 4 にて混和し 37°C 下で 1 時間 incubate して conjugate したものをを用い, このものを 2 ml, fraction を 1 ml, pH 7.2 の Clark-Lubs buffer 2 ml を混和し 25°C で直ちに波長 660 m μ で吸光度を測定し, 同温度で 30 分放置後再び吸光度を測定しこの値から初回の測定値を差引いた値が活性値である。

尚盲検として純水を用い substrate は実験の都度作製した。この様にして各 fraction の clearing factor を両者の substrate について求めた。この結果 Table 11 は

Table 11 Determination of clearing activity (by Grossmann method)

Fraction	Substrate			
	Ediol		Ediol + Albumin	
	Control	Sample	Control	Sample
(Nuclei)	1.240	0.595	1.000	0.450
Cytoplasmic fraction				
(a)	0.839	0.730	0.760	0.450
(b)	0.790	0.676	0.760	0.430
(c)	0.810	0.329	0.780	0.307
(d)	0.820	0.599	0.820	0.399
(e)	1.030	0.509	0.970	0.292
(f)	0.980	0.387	0.930	0.235
(g)	0.840	0.253	0.810	0.246
(h)	0.859	0.229	0.799	0.192
(Supernatant)	0.770	0.109	0.755	0.058

Ediol を substrate とした場合には菌苔に対する lytic action と平行しないが, Ediol と Albumin を conjugate したものをを用いた場合は nuclei, (e), (f), (h) 及び上清の各 fraction に高い活性を見出し lytic action とほぼ平行する。

また Korn(1962)の報告による lipoprotein lipase 測定法としての glycerol 定量と lytic action の関係を求めて見た。substrate として clearing factor の場合と同じく 10 倍稀釈 Ediol 及び 10 倍稀釈 Ediol と 7% Albumin を conjugate したものをを用いた。この定量の際 succharose が混じると発色に影響する為 cell fraction を行なった後各沈渣を 0.4 M の食塩水で洗滌しその洗液を捨て, 次いで洗った沈渣を食塩水で懸濁し, その fraction を得た同一回転数, 同一時間で超遠心し得た沈渣に同様の操作を 2 度繰返して succharose を除去し使用し

た。

この方法を採用したのは純水に対して低温下で 12 時間透析して succharose を除去するのと比較して活性が低下せず, また試料作製の時間が短縮される為である。著者の行なった定量法は Hanahn(1958)法にもとずきこれに T.C.A を加えた小林・榊原(1964)の法に従った。すなわち substrate 2 ml, emzyme 1 ml, clark buffer 2 ml を混和 37°C で 1 時間 incubate しその 2 ml に 10% T.C.A 5 ml 加え 10 分間以上放置後濾過, その濾液 3 ml に 10 N H₂SO₄ 0.1 ml 加えて攪拌, それに 0.05 M 過沃素酸ソーダ 0.5 ml 加え振盪 5 分間放置, 次に 10% 亜硫酸水素ナトリウム 0.5 ml 添加 10 分間以上放置, 1% chromotropic acid と濃硫酸の混和液を 5 ml 追加 30 分間沸騰水にて加熱, 次にこれを冷却 4.6% の Thiourea 0.5 ml 加えて濾過し, 之を 570 m μ で Beckmann Spectrophotometer を用いて optical density を測定する。尚 glycerol 定量については検量曲線は原点を通る直線的関係を示したが Hanahan, Korn らの法による場合よりも低吸光度を示し, 尚検討の結果は次の機会に報告する。この結果は Table 12 に示す様に Ediol を substrate とし

Table 12 Glycerol determination of hog pancreas fractions

Fractions	Substrate			
	Ediol		Ediol + Albumin	
	Control	Sample	Control	Sample
Nuclei	0.071	0.089	0.072	0.106
Cytoplasmic fraction				
(a)	0.038	0.075	0.048	0.064
(b)	0.043	0.074	0.040	0.066
(c)	0.043	0.064	0.043	0.068
(d)	0.042	0.107	0.045	0.080
(e)	0.058	0.075	0.070	0.113
(f)	0.072	0.073	0.076	0.124
(g)	0.047	0.074	0.045	0.079
(h)	0.048	0.071	0.046	0.081
Supernatant	0.083	0.058	0.068	0.107

た場合には clearing factor の場合と同様に lytic action とは平行関係が見出せず, Ediol と Albumin を conjugate したものをを用いた場合には nuclei (e), (f) 及び上清の各 fraction に高い活性を見出し, これは全く菌苔に対する lytic action と平行した。

(1) 豚臓 microsome (f) fraction の lipolytic activity と pH との関係

さきに述べた菌苔に対する lytic action と pH との関

係を glycerol の定量で求めて見た. microsome (f) fraction を pH それぞれ 6.1, 6.8, 7.4, 7.8, 8.7 の Clark-Lubss phosphate buffer に等量に加え, substrate として前回と同様に Ediol 及び Ediol と Albumin を conjugate したものをを用いた. この結果は Fig. 1 に示す様に

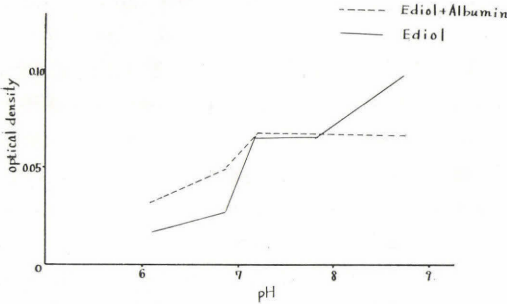


Fig. 1 Relation between pH and lipolytic activity of pancreas (f) fraction

Ediol と Albumin を conjugate した substrate を用いた場合, pH 7.0 以下の酸性側に低い値が, pH 7.2 以上アルカリ側に高い値を示し前に述べた菌苔に対する lytic action の pH とほぼ平行した.

(2) 阻害剤に対する lipolytic action 及び lytic action の態度

以上の事から膵臓 microsome (f) fraction の示す作用が lipoprotein lipase 様であるので lipoprotein lipase の阻害剤についての lipolytic action 及び lytic action の関係について調べて見た. 阻害剤として先づ NaCl を用い microsome (f) fraction の lipolytic activity に対する影響を glycerol 定量及び Dole (1955) の F.F.A 測定法を用いて測定した. 同時に *Penicillium* sp. (E) 株の平板培養菌苔に対する lytic action を調べた (Fig. 2, Fig. 3, Table 13). NaCl の濃度はそれぞれ 0.2, 0.4,

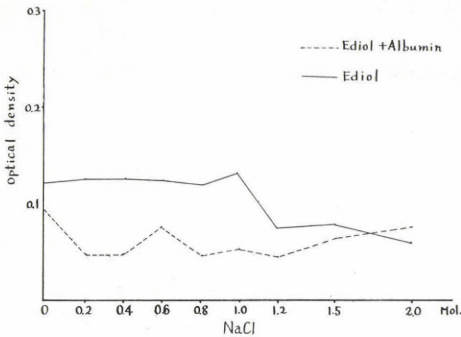


Fig. 2 Relation between lipolytic activity of hog pancrease and NaCl (glycerol-determination)

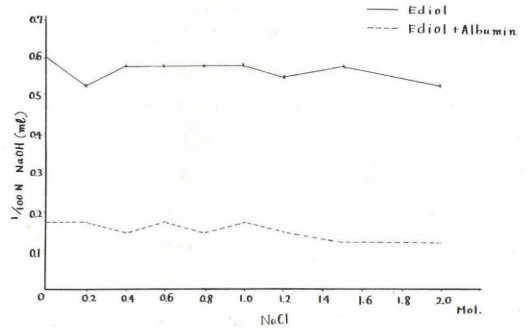


Fig. 3 Relation between lipolytic activity and NaCl by Dole's method (F.F.A. deteymination)

Table 13 Relation between fungilytic action and NaCl

NaCl (Mol.)	Incubation time (hr.)							
	1	2	3	4	5	6	10	12
0.4	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
0.6	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
0.8	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
1.0	-	-	±	+	++	+++	+++	+++
1.5	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
2.0	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
Control	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++

0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 である. その結果は NaCl の各濃度における glycerol 定量, F.F.A 測定とも substrate に関係なく阻害剤の影響を受けず, 菌苔に対する lytic action にも変化がなかつた. 次に NaF では glycerol 定量は Ediol 及び Ediol + Albumin の両者共抑制され (Fig. 4), 菌苔に対する lytic action (Table 14) の開

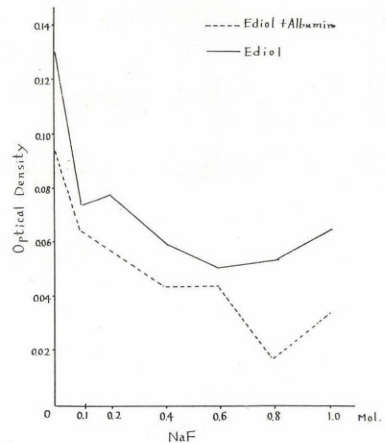


Fig. 4 Relation between lipolytic activity of hog pancreas and NaF (glycerol-determination)

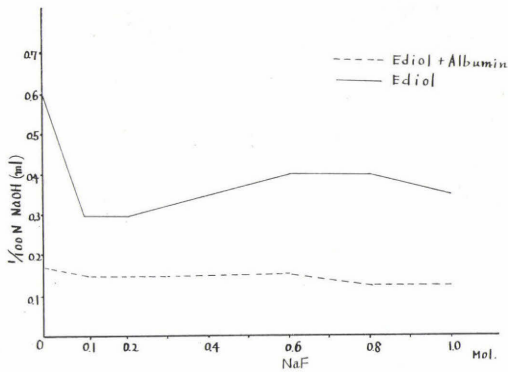


Fig. 5 Relation between lipolytic activity and NaF by Dole's method (F.F.A determination)

Table 14 Relation between fungilytic action and NaF

NaF (Mol.)	Incubation time (hr.)							
	1	2	3	4	5	6	10	12
0.0	—	—	±	±	+	+	+	+
0.4	—	—	—	±	+	+	+	+
0.6	—	—	—	—	+	+	+	+
0.8	—	—	—	—	+	+	+	+
1.0	—	—	—	—	+	+	+	+
Control	—	±	+	+	+	+	+	+

始時間の著明な延長と平行した。F.F.A 測定 (Fig. 5) では NaF の抑制作用がそれ程著明ではない。又一定濃度の heparin (1 mg/ml), NH_4 (0.025 M) では lytic action は高まり, glycerol 定量, F.F.A 測定も高い値を示し lipolytic activity は賦活された。この事は lipoprotein lipase 様作用及び lipase 様作用の両者をもつ事を示している。

(3) 蛔虫臓器の lytic action

蛔虫の各臓器についてその lytic action を見ると, homogenate するとどの臓器にも lytic action は見られないが, 各臓器を生理的食塩水にて充分洗滌しそのまま *Penicillium* sp. (E) 株の菌苔上に置くと腸管の前部 $\frac{2}{3}$ 迄の所にこの lytic action が見られ, 花房状器管, 体壁その他には全く見られなかった。食道部にはこの作用はない。

(4) 蛔虫体腔液の溶真菌分画に R. Nase を作用させた際の lytic action の態度

蛔虫体腔液に lytic action のある事を確認し pH 7.0 の Sørensen buffer に 10 mg/ml の割合に R. Nase を溶解し之を蛔虫体腔液沈渣 (蛔虫体腔液を Visking tube で

純水に対して低温下で透析し 12 時間後 3,000 rpm で 10 分間遠心したもの) の 0.4 M 食塩水溶液に等量に加えて膵臓の microsome (f) fraction と同様の実験をし Table 15 に示す如き成績を得た。この様に蛔虫腔液沈渣の食塩

Table 15 Influence of RNase to fungilytic action of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Addition to <i>Ascaris</i> body fluid	Incubation time (hr.)				
	$\frac{1}{2}$	1	2	24	48
RNase					
+ phosphate buffer 10 mg/ml	—	—	—	+	+
phosphate buffer	—	—	—	±	±

* + shows positive fungilytic activity

水溶液の lytic action も膵臓の (f) fraction の場合と同様に R. Nase に影響される事がわかった。

総 括

著者は膵臓 (f) fraction の真菌苔に対し lytic action を示す物質の本体を追求して次の事を知った。即ち蛔虫体腔液と同様の lytic action を示す物質が各動物の膵臓中に存在し, 膵 lipase の粗分画法に従ってアセトン処理した場合にはその沈渣に移行し, セロファン膜に対して非透析性で純水に対して透析した場合にはその沈澱分画に移行するが活性を急速に減ずる。又このものは熱に対して不安定で 60°C 5 分で容易にその活性を失なう。犬の膵液中にも lytic action を示す物質が存在する。膵臓抽出液の lytic action の好適 pH 域は 6.7~9.1 である。膵臓の細胞分画を行なうと lytic action を示す物質は microsome (f) fraction に最も多い。これは上清に移行し易く, R. Nase によつてその作用が増強されるが, いわゆる賦活剤として働くのではなくて作用物質を増加させるような働きをしているらしいがその機序は明瞭でない。また蛔虫体腔液沈渣にも R. Nase は同様に作用する。protease を作用させると急速に活性を失い膵臓器或は microsome (f) fraction に凍結融解と云う物理的作用を加えるとその lytic action は見られなくなる。又 lytic action は膵臓の各 fraction の lipase 活性と平行し, protease 活性とは平行しない。然し市販膵 lipase はその作用を示さない。Hanahn 法の glycerol 定量, grossman の clearing factor 測定の際 substrate に 10 倍稀釈 Ediol と 7% Albumin を conjugate したものを用いると *Penicillium* sp. (E) 株の平板培養菌苔に対する lytic action と平行する。実験結果から lipoprotein lipa-

se 様作用が想定されるが、阻害剤について実験して見ると特に NaF, NaCl ではこれを否定する結果を示した。

結 語

著者は豚 lipase の 1 標本が *Penicillium* sp. (E) 株の平板培養菌苔に対する lytic action を示したことに基いて動物の膵臓にも蛔虫体腔液と同様の lytic action を示す物質が存在する事を想定し、またその物質が lipase 様のものではないかと考えこのものが蛔虫体腔液の溶真菌酵素と同じものか或は作用は似ても異なつたものであるかを形態学的現象と併せてこの物質の化学的性質をしらべた。

先づ犬, 兎, ラッテ, マウス, 豚等の膵臓を用いて生理的食塩水で抽出し菌苔に対する lytic action を見た。また膵液中にこの物質の存在する事を知つた。van Lancker 及び Holtzer の法で豚膵臓の cell fraction を行ない各 fraction の *Penicillium* sp. (E) 株の菌苔に対する lytic action を見ると microsome (f) fraction 及び上清に強く見られる。この lytic action を示す物質は凍結融解と云う物理的的操作で容易にその作用を失う。組織の新鮮なもの程 microsome (f) の fraction に lytic action が強く、古くなると上清に強くなる。この (f) fraction に R. Nase を作用させると一時的に lytic action が強く起り, trypsin を作用させると lytic action を示さなくなる。蛔虫体腔液に対しても同様である。又各 fraction の lipase 活性を 3% Fatgen を substrate として N/100 alcohol-KOH を用いた alkali 滴定法で、又 protease 活性は casein を substrate として 280 m μ 吸光度法で測定し菌苔に対する lytic action との関係を見ると lipase 作用は lytic action と平行し protease 作用はそれに平行しない。市販 lipase にはこの作用のない事から lipoprotein lipase 様作用を想定し、Korn の報告による glycerol 定量と grossman の法による clearing factor を用いて各 fraction の活性を測定した。結果 Ediol と Albumin を conjugate した substrate を用いた場合に lytic action と lipolytic activity は略々平行した。次に阻害剤 NaCl, NaF を添加して glycerol の定量, Dole の F.F.A 測定法と菌苔に対す lytic action とを平行して行ないこの結果から lytic action は lipase 様作用によるものとわかつた。

以上の実験から蛔虫体腔液に見られるのと同様な *Penicillium* sp. (E) 株の平板培養菌苔に対する lytic action を示す物質が膵臓抽出液に存在する。然しその性質

は蛔虫体腔液は lipoprotein lipase 様の作用を示すのに対し膵臓抽出液は lipase 様作用を示す。この事からこの lytic action を示す酵素は従来の lipase とは異なつた type の lipase と考えられる。

引用文献

- 1) 赤堀四郎・柴谷篤弘・木原弘二 (1962): 酵素研究法 II. p. 181-190. 朝倉書店. 東京.
- 2) 赤堀四郎 (1962): 酵素研究法 II. p. 237-292. 朝倉書店. 東京.
- 3) 赤堀四郎 (1961): 酵素研究法 IV. p. 1-33. 朝倉書店. 東京.
- 4) 赤堀四郎・沖中重雄 (1963): 臨床酵素学. p. 483-501. 朝倉書店. 東京.
- 5) Cherkes A. & R.S. Gordon (1959): The liberation of lipoprotein lipase by heparine from adipose tissue incubated in vitro. Journal of lipid research, 1(1), 97-101.
- 6) Colowick, S. P. & N. O. Kaplan (1962): Method in Enzymology. V. 542-545. Academic Press, N. Y.
- 7) Daly, M. M. & A. E. Mirsky (1952): Formation of protein in the pancreas. J. Gen. Physiol., 36, 243-253.
- 8) Dole, V. P. (1955): A relation between non-esterified fatty acid in plasma and the metabolism of glucose. Journal of Clinical Investigation, 35, 150-154.
- 9) 塩谷利淳 (1964): 蛔虫体腔液の抗真菌物質と Chitinase の関係について. 寄生虫誌, 13 (1), 76-85.
- 10) Grossmann, M. I. (1954): The quantitative measurement of heparin induced lipemia clearing activity of plasma. Journal laboratory clinical Medicine, 43, 445-451.
- 11) 古橋貞二郎・五藤基 (1964): 蛔虫体腔液の各種細菌, 真菌に対する作用. 寄生虫誌, 13(4), 342-343.
- 12) 平岡義雄 (1964): 蛔虫体腔液の酵素作用について (1), 寄生虫誌, 13(2), 143-148.
- 13) 舟橋三郎ら (1958): 脂質化学, II. p. 32. 共立出版. 東京.
- 14) 小林瑞穂・榊原弘 (1964): 蛔虫体腔液の溶真菌酵素の究明, 特に L. P. L. との比較, 第20回日本寄生虫学会西日本支部会抄録, (印刷中).
- 15) Korn, E. D. (1956): The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro in Methods of Biochemical Analysis Vol. 7. edited D. Glick, 145-192.
- 16) Kessler, J. I., M. Finkel, D. A. Dreiling & H. D. Janowitz (1963): Lipoprotein lipase activity

- in the dog pancreas and pancreatic juice. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 113 (1), 127-132.
- 17) Lewis, U. J., D. E. Williams & N. G. Brink (1956) : Pancreatic elastase : Purification, properties and function. J. B. C., 234(9), 2304-2307.
 - 18) Lancker, J.L.V. & R.L. Holtzer(1959) : Tissue Fractionation Studies of Mouse Pancreas. J. B. C., 234(9), 2359-2363.
 - 19) 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.
 - 20) 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.
 - 21) Morisita, T. & M. Kobayashi(1963) : Ascaris body cavity fluid as a new anti-Trichophyton agent. Jap. J. Exp. Med., 33(2), 107-112.
 - 22) Morisita, T., M. Kobayashi, T. Eguti & R. Sakata (1963) : Anti-Trichophyton activity of the Ascaris body fluid. Jap. J. Med. Mycol., 4(3), 168-173.
 - 23) 森下哲夫・小林瑞穂・平岡義雄・坂田六郎・塩谷利淳 (1963) : 蛔虫体腔液の抗白癬菌作用の機転, 寄生虫誌, 12(5), 412-414.
 - 24) 榊原弘 (1964) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素 (I), 寄生虫誌, 14(1), - .
 - 25) Suehiro, M. (1960) : Studies on lipoprotein lipase. J. B. C., 47(6), 777-780.
 - 26) Nikkila, E. A. (1958) : Partial purification of clearing factor of post heparin human plasma. Biochemia et Biophysica Acta, 2(7), 612.
 - 27) 末広雅也 (1964) : リポプロテインリパーゼ酵解協会誌, 22(9), 431-435.
 - 28) 関根隆光・笹川泰治・森田茂弘・林徳次・倉富一興 (1962) : 化学の領域, 増刊 48, 光電比色法各論 4, p. 32-35, 南江堂, 東京.
 - 29) Tietz, N. W., T. Borden, & J. D. Stepleton (1959) : An improved method for the determination lipase in serum. American Journal of Clinical Pathology, 31(2), 148-154.

STUDIES ON FUNGILYTIC ENZYME IN PANCREAS EXTRACT
AND PANCREATIC JUICE WITH SPECIAL REFERENCE
TO A COMPARISON WITH THAT OF
ASCARIS BODY FLUID

INAYOSHI YAMADA

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

On the basis of findings that a specimen of pancreas lipase revealed the lytic action against *Penicillium* sp. E strain which was cultivated on agar plate, the present author examined the presence of such a lipase-like activity in the pancreas of animals. In addition, experiments to ascertain whether a fungilytic enzyme of *Ascaris* body fluid and a lipase-like enzyme of the pancreas belong to one or not were carried out.

The lytic action of physiological saline extracts of the pancreas of mammals such as dog, rabbit, rat, mouse and pig against fungus body was examined and it was proved that the pancreatic juice contains a substance with lytic action against fungus body. Among the cellular fractions of the pancreas which was obtained by Van Lancker and Holtzer's method, the lysis against *Penicillium* sp. E strain was recognized to be strong in the fraction of the microsome and the supernatants. This substance with lytic action was inactivated by such physical procedure as freeze-melting. In the freshly prepared tissue the lysis was found mainly in the fraction of the microsome, but the action shifted into the supernatants as time goes by. A passing increase of the lytic action was observed when R. N. ase was put into the fraction, while the action disappeared when trypsin was put. This phenomenon was found not only in the fraction of the pancreas but in *Ascaris* body fluid. The lipase activity of each fraction was examined against fatgen by alkali titration with N/100 KOH. On the other hand, the protease activity of each fraction was measured against casein by light absorption at 280 m μ . The results obtained showed that the lytic action kept pace with lipase. Because no lysis could be found in commercially available lipase specimens, it was surmised that the lytic action would be due to a lipoprotein lipase-like enzyme. The activity was, therefore, examined according to Korn's and Grossman's methods and the lysis was found in pace of lipase when Ediol conjugated with albumin was applied as a substrate. It was also proved by experiments with inhibitors such as NaCl and NaF that the lysis against fungus body is due to a kind of lipase.

The experiments described above show that (1) the pancreas extract as well as *Ascaris* body fluid possesses a substance with lytic action against *Penicillium* sp. E strain and that (2) the pancreas extract shows a lipase-like action, though *Ascaris* body fluid revealed a lipoprotein lipase-like action. It therefore appears that the substance with a fungilytic action is a kind of lipase but not identical to lipase which has already known.