

蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究 (1)

榊 原 弘

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)

蛔虫体腔液の酵素については von Brand et al. (1952) や本邦では小泉ら (1954) の報告がみられる。森下ら (1963) は蛔虫体腔液中に溶白癬菌作用のある物質を発見し、更に同年それが *Aspergillus fumigatus* に対しても lysis 作用を認め、その物質が酵素である事を報告した。これに基き教室の古橋 (1964) は真菌類 (*Trypophyton*, *Aspergillus*, *Penicillium*), 放線菌類 (*Streptomyces*, *Nocardia*) 及び抗酸菌 (*Mycobacterium*), 各種の菌苔に対し蛔虫体腔液の drop test を行い、何れにも lysis 作用を認めた事を報告した。尚この作用は酵素的であると考えられるのでその面より教室の平岡 (1964) は、蛔虫体腔液中の酵素をしらべた。即ち体腔液を Visking tube 法で透析し、透析内液の上清分割中に esterase activity, amylase activity を見出し沈澱分割中に存在する溶真菌現象とは関係のない事を証明した。尚真菌の表面構造である細胞壁が chitin を多量に含んでいるので、これに対して坂田 (1963) は電子顕微鏡的に白癬菌細胞壁に chitin が多量に存在し、蛔虫体腔液の作用によつて白癬菌の細胞壁中層に電子密度の高い顆粒の出現する事を報告した。この点について塩谷 (1963) は chitin 分解酵素である chitinase の面より追求したが、蛔虫体腔液中には chitinase を認めず、体腔液の溶真菌現象には chitinase が、全く関係のない事を報告した。著者は真菌苔に蛔虫体腔液沈澱分割を作用させ lysis を起させると、glycerol 及び脂肪酸が生ずることを知り溶菌現象 (fungilysis) と脂肪分解現象 (lipolysis) との間に深い関係があるのではないかと考えこれを追求した。Streptomyces lipase, Pancreas lipase は lipolytic action を有するが真菌苔に対する fungilysis 作用を認めないので lipase と異なる lipolytic action を有する酵素が fungilysis 作用に関係すると考え、真菌苔、遊離の triglyceride 及び triglyceride に albumin を conjugate した基質 (substrate) に蛔虫体腔液を種々の条件下に作用させその lipolysis と、他方 *Penicillium* 菌苔に蛔虫体腔液を

同様種々の条件下にて滴下して生じた fungilysis の間における関聯性を検討したところ、溶真菌現象を起す物質が酵素であることを知った。更に、Hahn (1943) の所謂食餌性脂濁血漿状態の犬に、heparin を静注した他の犬の血液を静注した場合、脂濁血漿の清澄化が起るとの報告を始として、Anderson & Fawcett (1950), Brown et al. により *in vitro* においても、heparin 静注後血漿即ち heparin-activated plasma (E.D. Korn), heparin-injected plasma (Grossman), heparinized plasma (French, Grossman, Robinson), postheparin plasma (E.D. Korn) を食餌性脂濁血漿に作用させる時も同様の清澄化が起り、heparin 静注後血漿中に脂濁血漿清澄因子 (lipemia clearing factor) の存在が考えられている。更に E. D. Korn (1955) はニワトリの心、脂肪組織からリポ蛋白質と結合した triglyceride を lipolysis させる酵素を抽出し、lipoprotein lipase (以下 LPL と略す) と命名し更にこれが postheparin plasma 中に存在する lipemia clearing factor と殆ど同じであると考えられている。その様な酵素、即ち LPL、或いはこれに近似した酵素が蛔虫体腔液中にも存在し、真菌苔に対する fungilysis 作用に極めて深い関係があると考えられる成績を得たのでここに報告する次第である。

実験方法

1) Glycerol 定量, LPL の activity を測定する方法として、濁度の変化を濁度測定により比較する比濁法、lipolysis によつて解離した遊離脂肪酸を測定するアルカリ滴定法等があるが、著者は本実験に於いては、比濁法が温度、含有される salt により濁度値が屢々変動する事を知り、また Dole の法 (1956) によるアルカリ滴定も試料中に含まれる受容体の質、量によつて尚問題があると考え lipolysis によつて生ずる glycerol の定量を主体として行ない、これを lipolytic activity の指標とし更に森下ら (1963) が溶白癬菌現象を検べる為白癬菌

Table 1 Analytical method of enzymatic glycerol liberation.

Incubation mixture.

Substrate: it was prepared by incubating a commercial triglyceride emulsion (10% Ediol) with four parts Albumin (Armor Co. Bovine plasma fraction V) 1 ml.

Enzyme: fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid 1~2 ml.

Buffer solution: Clark-Lubs and Sørensen buffer solution
pH 7.4~7.8, 1~2 ml

incubated for 1 hr. at 37°C.

added 5 ml of 10 % trichloroacetic acid to 2 ml of incubation mixture.

stood for 30 minutes at room temperature.

filtration (by the Toyo filter paper No. 4.)

added 0.1 ml. of 10 N H₂SO₄ to 3 ml. of filtrated sample.

added 0.5 ml. of 0.05 Mol. Sodium periodate and shaked.

stood exactly for 5 minutes.

added 0.5 ml. of 10 % Sodium bisulfite.

stood for 10 minutes.

added 5 ml. of 1 % chromotropic acid with 24 N H₂SO₄.

placed boiling water bath for 30 minutes.

cooled in tap water.

added 0.5 ml. of 4.6 % thiourea.

read the optical density at 570 milimicrons of wavelength using Beckmann Spectrophotometer.

に対して行なつた手技により *Penicillium* sp. E 株に drop test を施行しその fungilysis 作用とを比較する方法を採つた. glycerol の定量は E. D. Korn(1958)の方法を加味し, Hanahan(1958), 坂上(1962)の方法に基き Table 1 の如く chromotropic acid による発色前に 10 % trichloroacetic acid にて除蛋白, 濾過(東洋濾紙, No. 4 硬性を使用)を行ない, 後発色せしめ, 流水中に冷却後多少のコロイド様懸濁液が生ずるので再び上記濾紙にて濾過, 発色した検液を Beckmann 型 Spectrophotometer 及び Hitachi recording spectrophotometer を使用波長 570 m μ にて optical density を測定した. 本法では検量曲線は原点を通る直線的関係を示したが Hanahan (1958)によるよりも低い吸光度を示し, その検討の結果は次の機会に報告する.

2) 基質 (Substrate). triglyceride を含有するものとして, 稀釈牛乳, 乳び, 脂濁血漿, 人工脂肪乳剤等があり, 著者は食餌性脂濁血漿及び人工脂肪乳剤を静注後

採血して得た脂濁血漿を使用してみたが, 人工脂肪乳剤を Plasma と混合し, 37°C, 1 時間 incubate しても或る程度のトリグリセリッド, リポ蛋白質結合体が作られると考えられ, 一方, E. D. Korn は 37°C, 30 分間の incubate で十分であると報告しているのを考え併せ, トリグリセリッド, リポ蛋白質結合体基質は主として incubate によつて得た. 尚人工脂肪乳剤として Fatgen(大日本製薬 K.K.), Ediol(Schenley Labo. Inc.). Lipomul (Upjohn Co.) 等があるが, 著者は入手の都合もあり主として Ediol, Fatgen を使用した. Ediol はヤシ油 500 g, Tween-60, 20 g, グリセリンモノステアレート 15 g 及び蔗糖 125 g を乳化して後, 蒸溜水にて全量を 5,000 ml とした 10 % ヤシ油乳剤であり, Fatgen は, その 100 ml 乳剤中に, 精製ゴマ油 20 g, 精製大豆レシチン 0.2 g d-1 メチオニン 0.4 g, ブドウ糖 0.8 g を含有する 20 % ゴマ油乳剤であり, 使用前に, 実験により蒸溜水, 緩衝液, 生理的食塩水等で稀釈 triglyceride 濃度を 1 % とし

た (10% Ediol 溶液及び5% Fatgen 溶液). glycerol の発色定量では glucose が発色に影響するので, Ediol は庶糖の含有していない物を興和化学より分与していただき, Fatgen 中の glucose は5~10°C の温度下にて12時間, Visking tube により純水中に透析したものをを用いた. 脂肪蛋白結合体基質は, Bovine Albumin Powder (Fraction V from Bovine Plasma, Armor Pharmaceut. Co.) を用い, 実験の種類により Clark-Lubs の pH 7.4~pH 7.8 buffer solution, pH 7.4~pH 7.8 の Sørensen の phosphate buffer solution にて7% Albumin 溶液を作り前述の1% triglyceride 液と7% Albumin 溶液の容積比を1:4の割に混合し, 37°C, 1時間 incubate して結合基質を作製した. 対照的基質として Albumin の入らない, そして triglyceride の含有率は同じである基質, 即ち1% triglyceride と, 実験に応じ, buffer solution, 蒸溜水又は生理的食塩水の容積比を1:4の割に混じたものを作製した. substrate に対しての基礎的実験として既知酵素である東京化成 lipase を10 mg/ml の割に生理的食塩水に溶解, この酵素液を10% Ediol + 7% Albumin (pH 7.5 の Clark-Lubs buffer solution にて稀釈, 溶解), 10% Ediol + buffer solution, 5% Fatgen + 7% Albumin (上記と同じ buffer solution にて稀釈, 溶解), 5% Fatgen + buffer solution の4種の基質夫々1 ml に, 酵素液2 ml, pH 7.5 の Clark-Lubs buffer solution 2 ml の割に混合した. incubate 前の混合液を control (以下Cと略す) とし, 37°C, 1時間 incubate した試料 sample (以下Sと略す) の glycerol 発色定量の結果は Table 2, Fig. 1 の如くであり, 著者の実験では glycerol の発色は Ediol に高く認められた. 脂肪蛋白結合体形成の割合は, この実験においては至適 pH の差, 結合されない albumin の影響等

Table 2 Relation between lipolytic activity and substrates. (Glycerol-determination)

Substrate	control(A)	sample(B)	activity(B-A)
Ediol + Albumin	0.038	0.096	0.058
Ediol	0.032	0.129	0.097
Fatgen + Albumin	0.036	0.065	0.029
Fatgen	0.020	0.068	0.048

Enzyme: Pancreas lipase, 10 mg/ml
 Incubation mixture: Substrate: 1 ml
 Enzyme: 2 ml
 Buffer solution: 2 ml
 (pH 7.5 Clark-Lubs)

incubated at 37°C for 1 hr.

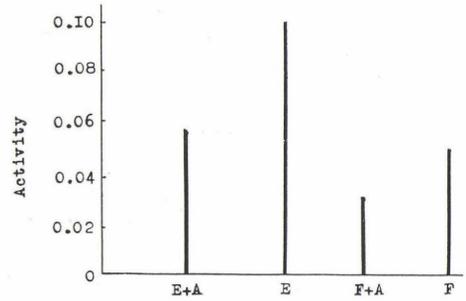


Fig. 1 Relation between lipolytic activity and substrates. (Ediol and Fatgen). (Glycerol-determination)

A: Albumin. E: Ediol.
F: Fatgen.

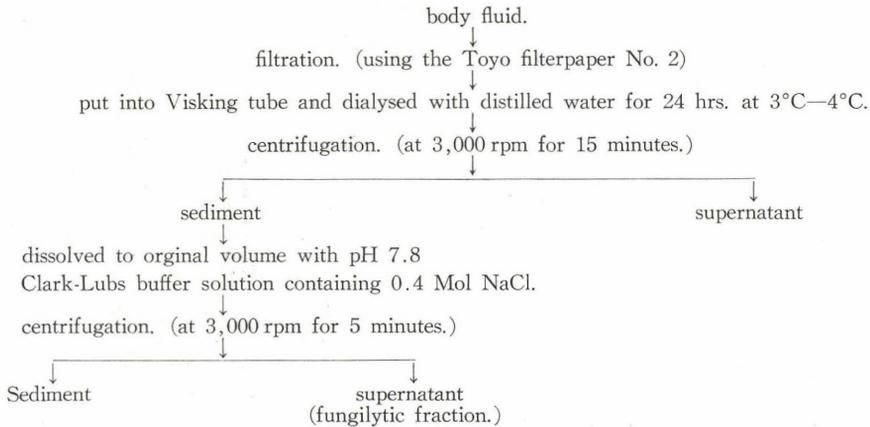
Enzyme: Pancreas lipase.

Activity shows difference at optical density of control and sample, incubated at 37°C for 1 hr.

も考えられ, この成績より形成比を論ずる事は勿論出来ないが, 大体 Ediol, Fatgen 共に殆ど同じ比率に作られると考えられる. 以後実験は特別の場合を除き, triglyceride として人工乳剤は庶糖の含有していない Ediol を使用した. 尚以後10% Ediol をE, 7% Albumin 溶液をA, その脂肪蛋白結合体 (37°C 下に1時間 incubate したものを) をE+Aと略す.

Penicillium sp. E 株菌苔乳濁液, Sabouraud 液体培養の菌苔を蒸溜水で充分洗い, 培地の成分を完全に除去した菌苔を P₂O₅ 上で減圧乾燥したものを10 mg/ml の割に0.4 Mol 食塩水を溶媒とし, グラスホモジナイザーにかけて emulsion とし, 更に56°C, 30分間加熱処理した後, 3°C 低温室で24時間, Visking tube を使用純水に透析したものを基質として使用した.

3) 酵素液 蛔虫体腔液は岐阜市屠場で採取した豚蛔虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) の雌成虫を生理的食塩水にて数回良く洗い, 尾部の表皮に切創を作りビーガー上に吊し滴下する体腔液を採集, これを濾過 (東洋濾紙 No. 2 を使用) 後, Table 3 の如く3°C~4°C の低温室に24時間, Visking Co. 製セロハン・チューブにて純水中にミックス・スターラーを使用し透析, 内液の上清及び沈澱分割を実験の種類により0.1 Mol~0.4 Mol の食塩水に, 透析前と等容, 又は透析後液と等容に溶解使用した. 尚 LPL の鑑別の指標, 対照として東京化成 lipase 及び大阪細菌製細菌 lipase を10 mg/ml の割に実験の目的により, 0.1 Mol~0.4 Mol の食塩水に溶解し酵素液として使用した.

Table 3 Analytical method of *Ascaris* body fluid.

4) 操作法 前述の substrate を氷水中に試験管を冷却しながら1容, 実験の種類により酵素液を1~2容, buffer solution (実験の種類により pH は変えた)を1~2容の割に入れ充分混合し, 直後酵素反応の起っていない混合液を control として glycerol の定量を行ない, 後1時間 (実験の目的によつては16時間), 37°C 下に振盪攪拌を行ない incubate した試料を sample として glycerol の定量を行い, その値の差を lipolytic activity と考えた. 基質が *Penicillium* 菌苔乳濁液の場合は, 静止の状態では試験管の下層に菌苔成分が沈澱し易く均一の状態でないので, 振盪恒温装置を使用 incubate した. Table 1 の如く incubation mixture の2 ml を採り glycerol 定量を行なった.

Penicillium sp. E 株菌苔 古橋 (1964) が各種真菌類, 放線菌類, 抗酸菌の溶菌現象をしらべ, 溶菌現象は mycobiotic agar に 30°C 下に均一に培養した *Penicillium* sp. E 株菌苔に, 早い時間に, しかも著明にみられると報告しているので, 著者は *Penicillium* sp. E 株の培養後7日~14日の菌苔上に酵素液 (蛔虫体腔液の各分割及び東京化成 lipase) や酵素液を処理したもの及び酵素液に各種阻害性物質を添加して drop test を行ない, 37°C の恒温下において時間を追つて観察しその fungilysis 作用と, 脂肪蛋白結合体である E+A を substrate として, これに同様の条件にある酵素液を加え, 37°C 下に一定時間 incubate して, それによつて解離生産された glycerol を lipolysis の指標として両者を比較した.

実験成績

a) 新しい蛔虫体腔液と4°C 下7日間保存した蛔虫

体腔液の比較

新しい体腔液は, 実験方法の項で述べた如く, 豚蛔虫より採集した体腔液を直ちに東洋濾紙 No. 2 で濾過, Visking tube 法により 3°C~4°C 低温室で純水を使用24時間透析したもので, 保存体腔液は蛔虫より体腔液を採取後4°C 下に7日間保存し, 同様に透析したもので, 各々透析内液を 3,000 rpm, 15分間遠沈により上清, 沈澱, 全液と分割し, 夫々粗酵素液とした. 基質に, 脂肪蛋白結合体として E+A, 遊離 triglyceride として E を用い, E+A 及び E の夫々の substrate 1容に対して, 酵素液2容, pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution 2容を充分に混じり 37°C, 1時間 incubate した. 結果は Fig. 2, Fig. 3 の如く, 新しい蛔虫体腔液の沈澱分割に E+A の基質に対する activity は高く, E のみの基質に対

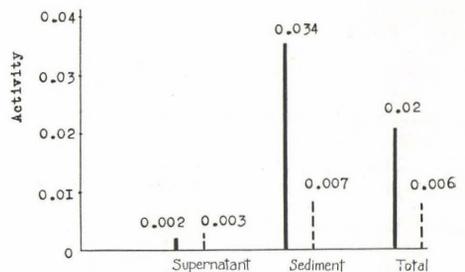


Fig. 2 Lipolytic activity of fresh *Ascaris* body fluid fractions. (Glycerol-determination)

Ediol + Albumin —

Ediol

Activity shows difference at optical density of control and sample, incubated shaking for 1 hr. at 37°C.

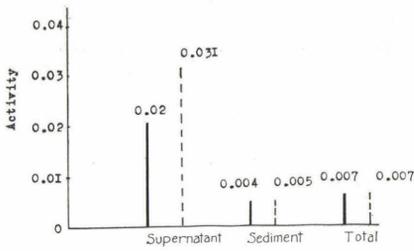


Fig. 3 Lipolytic activity of stored *Ascaris* body fluid fractions. (Glycerol-determination)
 Ediol + Albumin —
 Ediol
 Activity shows difference at optical density of control and sample, incubated shaking for 1 hr. at 37°C

Table 4 Comparison with lipolytic action of fresh and stored *Ascaris* body fluid fractions

Substrate	Fraction					
	Fresh			Stored		
	Sup.	Sed.	Total	Sup.	Sed.	Total
Ediol + Albumin	±	卅	卅	+	±	±
Ediol	±	+	+	卅	±	±

するそれは低い. 保存体腔液においては上清分割のEに対する場合が activity が高い. これらを総括すると Table 4 の如く, 新しい蛔虫体腔液の沈澱分割に脂肪蛋白結合体に対して, glycerol の解離が大であり, トリグリセリッド・リポ蛋白結合体に対して lipolytic action を有する酵素が含有されていると思われる.

b) *Penicillium* sp. E 株菌苔乳濁液に対する蛔虫体腔液分割の lipolytic action

Penicillium sp. E 株菌苔を十分に蒸留水で洗い培地成分を除去し乾燥し, これを Anderson 氏法 (1937) により脱脂質したものと, 脱脂質しないものを夫々, 56°C 30 分間, 加熱処理 (時々振盪攪拌しつつ) を行ない, 後 3°C の低温室にて 24 時間, Visking tube 法にて純水中にミックス, スターラーを使用して透析し, これらを基質として, 体腔液透析内液の上清分割と沈澱分割を夫々粗酵素液とし, 37°C, 1 時間, 振盪恒温装置を使用, 常時振盪せしめて incubate した. 結果は Table 5 の如くで上清分割 (supernatant) を作用せしめた場合, 脱脂質菌苔乳濁液及び非脱脂質菌苔乳濁液何れに対しても殆んど lipolysis の結果解離される glycerol を認めなかつたが, 沈澱分割 (sediment) を作用せしめた場合 非脱脂質菌苔乳濁液に対しては glycerol の解離を認めた. 即ち蛔虫体腔液沈澱分割中に脂肪蛋白結合体を分解し, glycerol を解離すると同様, *Penicillium* 菌苔乳濁液に対しても glycerol を解離する酵素が存在すると思われる.

c) 蛔虫体腔液沈澱分割の加熱処理の影響

Visking tube 法により透析した新しい蛔虫体腔液の沈澱分割を, 56°C, 30 分間時々振盪攪拌しつつ加熱処理を加えた分割溶液と, 加熱処理を加えない分割溶液を夫々粗酵素液として, E+A, E 及び *Penicillium* sp. E 株菌苔乳濁液を基質とし, 基質 1 容, 酵素液 2 容, pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution 2 容を充分混合し, 振盪恒温装置を使用, 37°C, 1 時間 incubate し, C と S の glycerol の解離の差より lipolytic activity をしらべ, 並行して蛔虫体腔液沈澱分割の上記 2 種の酵素液を *Penicillium* sp. E 株菌苔に対して droptest を施行した結果は, E+A 及び E を基質とした場合 Table 6, Fig. 4 の如く, E+A に対して, 末処理沈澱分割を

Table 5 Lipolytic activity of *Ascaris* body fluid fractions to *Penicillium* mycerial emulsion (Glycerol determination)

Substrate	Fraction					
	Supernatant			Sediment		
	Control (A)	Sample (B)	Activits (B-A)	Control (A)	Sample (B)	Activity (B-A)
<i>Penicillium</i> (none delipid)	0.018	0.019	0.001	0.018	0.024	0.006
<i>Penicillium</i> (delipid)	0.012	0.012	0	0.012	0.014	0.002

Substrate: *Penicillium* mycerial emulsion was prepared from dry none delipid and delipid myceria, dissolved to 10 mg/ml with 0.4 MNaCl solution, heated for 30 minutes at 56°C and dialysed with Visking tube for 24 hrs. at 37°C against distilled water.

Enzyme: *Ascaris* body fluid fractions were prepared by dialysis method with Visking tube against distilled water for 24 hrs. at 3°C.

Incubation: at 37° C for 1 hr. with shaking incubator.

Table 6 Relation between lipolytic activity and heat treatment of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid (Glycerol-determination)

Substrate	none heat treatment			heat treatment		
	Control(A)	Sample(B)	Activity(B-A)	Control(A)	Sample(B)	Activity(B-A)
Ediol + Albumin	0.038	0.072	0.034	0.039	0.040	0.001
Ediol	0.038	0.045	0.007	0.040	0.041	0.001

Heat treatment: incubated at 56°C for 30 minutes.

Incubation mixture: Enzyme 2 ml

Substrate 1 ml

Buffer solution 2 ml

(Clark-Lubs, pH 7.8)

shaked and incubated at 37°C for 1 hr.

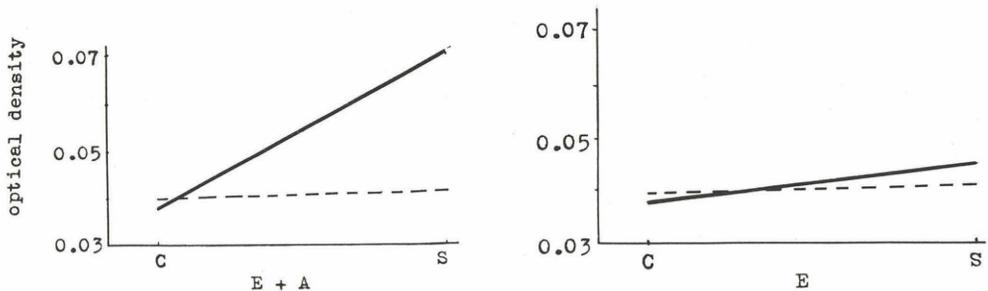


Fig. 4 Relation between lipolytic activity and heat treatment of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid: (Glycerol-determination)
heat treatment none heat treatment —

作用させた場合は高い lipolysis がみられ、56°C、30 分間加熱した沈澱分割を作用させた場合は殆ど glycerol の解離を認めなかった。E に対しては加熱処理を加えなかった沈澱分割を作用させた場合は少量の解離が認められ、加熱処理した沈澱分割を作用させた場合は殆ど解離を認めなかった。又同様蛔虫体腔液の沈澱分割を 56°C、30 分間加熱処理したものと、しないものを同一培養基上の *Penicillium* sp. E 株菌苔に、drop test を施行した結果は Table 7 の如く、非熱処理沈澱分割においては 1 時間後に菌苔の fungilysis を認めたが、熱処理したものは 20 時間後にも fungilysis は認めなかった。体腔液を加熱処理することにより、脂肪蛋白結合体に対する lipolysis 作用と菌苔の fungilysis 作用は共に激減、消失を認めた。*Penicillium* sp. E 株菌苔乳濁液に対しては、菌苔中に glycerol の発色を妨害する様な因子があると考え基質である乳濁液を、56°C、30 分間加熱非働化し、Visking tube 法にて、24 時間純水中に透析した Group 1、加熱非働化を行わず透析した Group 2、加熱非働化を行ない、透析を行わない Group 3、加熱非働化も

透析も行わない Group 4 の 4 種に分け、これに、56°C 30 分間加熱処理した蛔虫体腔液沈澱分割と熱処理を加えなかった沈澱分割を夫々作用させ、37°C、1 時間 incubate して glycerol の定量を行つた結果は Table 8、Fig. 5 の如くであり、Group 2 の場合は基質が未非働化の状態であるためか、沈澱分割の熱処理をした場合も、又しない場合も定量値では変化は殆ど認められなかった。Group 3 においては incubate する事により、C が S より高い発色を示す逆な現象がみられ、*Penicillium* 菌苔乳濁液を基質として、その変化を glycerol の発色でしらべる場合、乳濁液の 56°C、30 分間の加熱処理及び透析を必要とすると考えられる。Group 1 に於ては、沈澱分割を加熱処理した場合 glycerol の解離は殆ど認められないが、分割を加熱処理しない場合は高い解離を認め、E + A、E に対する沈澱分割の熱処理の影響と同様であつた。即ち沈澱分割中には、遊離の triglyceride である E に対して lipolysis をおこす酵素及び、脂肪蛋白結合体である E + A に対して lipolysis を起す酵素が存在し、その活性は共に、56°C、30 分間の加熱処理にお

Table 7 Relation between fungilytic action and heat treatment of sediment fraction of *Ascaris* body fluid.

dropped solution	Incubation time (hr.)								
	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	20
0.4 Mol NaCl solution.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sediment of heat treatment.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sediment of none heat treatment.	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 7 days at 30°C on the mycobiologic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of sediment solution of heat treatment or none heat treatment to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing 0.4 Mol NaCl.

Sediment of heat treatment was incubated at 56°C for 30 minutes.

Table 8 Lipolytic activity of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid to *Penicillium* mycerial emulsion. (Glycerol-determination)

Substrate	Sediment	Control (A)	Sample (B)	Activity (B-A)		
dialysed	treated for 30 min. at 56°C	heattreated	0.074	0.075	0.001	Group 1
		none	0.091	0.114	0.023	
	none treated	heattreated	0.076	0.089	0.013	Group 2
		none	0.080	0.094	0.014	
none dialysed	treated for 30 min. at 56°C	heattreated	0.084	0.082	-0.002	Group 3
		none	0.099	0.090	-0.009	
	none treated	heattreated	0.084	0.086	0.002	Group 4
		none	0.086	0.104	0.018	

Substrate: *Penicillium* mycerial emulsion was prepared from myceria sufficiently washed down medium and dried enough, dissolved to 10 mg/ml with 0.4 Mol NaCl solution using Homogeniser, heated for 30 minutes at 56°C and dialysed with Visking tube for 24 hrs at 3°C against distilled water.

Enzyme: Sediment fraction of *Ascaris* body fluid was prepared by dialysis method with Visking tube as Table 3.

Incubation: at 37°C for 1 hr. with shaking incubator.

いて殆ど消失すると考えられる。

d) 蛔虫体腔液各分割の稀釈時における, lipolysis と fungilysis 作用の関係

新しい蛔虫体腔液を, Visking tube により, 3°C 下に 24 時間純水中に透析, 遠沈して得た上清, 沈澱分割及び全液を夫々倍数稀釈しこれを粗酵素液とし, 32 倍稀釈迄 (実際は基質, 緩衝液が混合する為, 80 倍迄) 稀釈し, これに対して E+A を基質として 1 容, 粗酵素液 2 容, 緩衝液 2 容を充分混合し, 37°C 下, 1 時間 incubate した結果は Fig. 6 の如くで, 沈澱分割に glycerol 解離の activity がかなり認められ約 20 倍稀釈迄は比較的急激に optical density は下降し, 以後は緩徐に下降した。又上

清分割を作用させた場合は, glycerol の解離は沈澱分割のそれに比して, 極めて少であつた。更に沈澱分割の稀釈と, *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する fungilysis の関係を drop test によりしらべた結果は, Table 9 の如く, 2 倍稀釈では, 1 時間 30 分で, 4 倍稀釈では 2 時間後に, 8 倍稀釈では 5 時間後に, 16 倍稀釈では長時間で fungilysis が認められたが, 32 倍以上の稀釈では, 21 時間の観察では全く fungilysis は認められなかつた。この事は E+A を基質として, 稀釈沈澱分割を作用させてしらべた glycerol の解離状態と関係がある様に考えられる。

e) Incubate の時間と lipolysis の関係

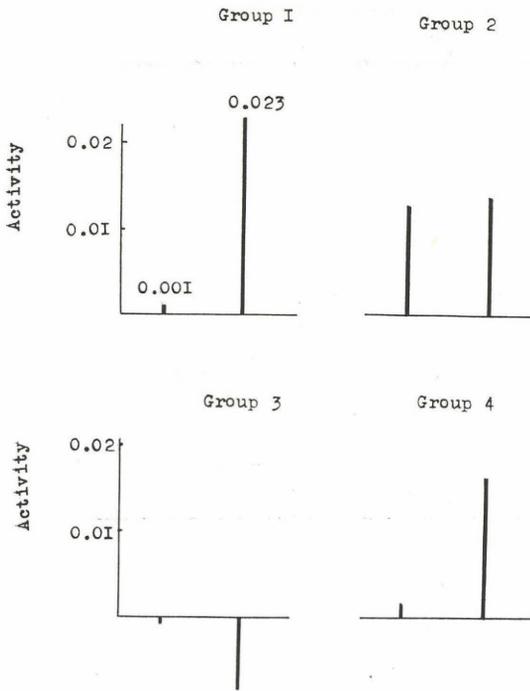


Fig. 5 Figures of Table 8
Activity shows difference at optical density of control and sample, incubated shakily at 37°C for 1 hr.

substrate として、10% Ediol 液 (原液を pH 7.4 の Clark-Lubs buffer solution で希釈) を用い、酵素液として、東京化成 lipase を 10 mg/ml の割に pH 7.4 の Clark-Lubs buffer solution に溶解したもの及び、新し

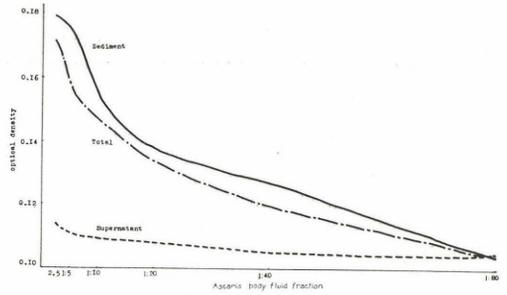


Fig. 6 Relation between lipolytic action and dilution of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (Glycerol-determination)

Incubation mixture:

Substrat 1 ml
Enzyme 2 ml
Buffer solution 2 ml
(pH 7.8 Clark-Lubs)

and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

い蛔虫体腔液沈澱分割を、透析前原液と等容になるように、生理的食塩水で溶解したものとを使用し、37°C 下に、2時間~16時間 incubate して glycerol の解離状態を観察した。結果は Fig. 7 の如く、東京化成 lipase は2時間後に glycerol の解離が高くなり、後8時間~12時後の解離は少となり、以後再び解離状態は増加した。Eに蛔虫体腔液沈澱分割作用をさせた場合(沈澱分割中の lipase 作用と考えられる)、4時間後が最高となり以後 glycerol 解離の変化は殆ど認められなかつた。前述の如く、新しい蛔虫体腔液の沈澱分割中に遊離の

Table 9 Relation between fungilytic action and dilution of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid.

Dilution rate	Incubation time (hr)												
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2	4	4 1/2	5	5 1/2	6	21
1:2	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:4	-	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
1:32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:256	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 8 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

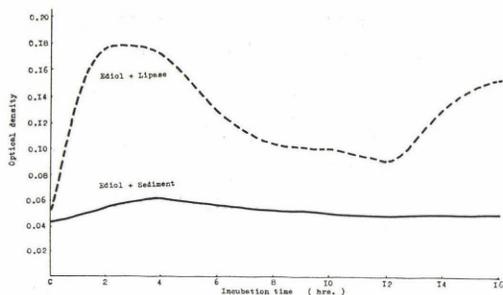


Fig. 7 Relation between lipolytic action and incubation time in the cases of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid and pancreas lipase. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate	1 ml
Enzyme	2 ml
Buffer solution	2 ml
(pH 7.4 Clark buffer)	

incubated at 37°C.

triglyceride を lipolysis する lipase activity を認めたがこれは東京化成 lipase とは時間的に glycerol の解離現象に差を認めた。

f) 蛔虫体腔液沈澱分割の lipolysis と fungilysis に対する optimum pH

基質に脂肪蛋白結合体として E + A 及び遊離 triglyceride として E を使用、酵素液は新しい蛔虫体腔液透析内液沈澱分割を 0.4 Mol 食塩水にて透析前原液等容になるよう溶解作製した。緩衝液は Sørensen の phosphate buffer solution と Clark-Lubs buffer solution の 2 種を使用し、前者は pH 5.5, 6.1, 6.9, 7.4, 7.8, 8.7, 後者は pH 6.1, 6.9, 7.4, 7.8, 8.2, 9.3 の各々 6 種の pH とした。基質、酵素液、緩衝液の容積比は 1 : 2 : 2 の割合であり混合液の食塩濃度は 0.4 Mol になるよう調整し充分混和し、37°C, 1 時間 incubate して glycerol の定量を行なった。E は Ediol 原液を使用する buffer solution の測定しようとする夫々の pH 液で 10% に稀釈し、7% Albumin 溶液は、同様に使用する buffer solution にて、測定しようとする pH 液で 7% となし、脂肪蛋白結合体 E + A は 37°C, 1 時間 incubate した。実験の結果は Fig. 8, Fig. 9 の如く、E + A が E に比して全体に高い glycerol の解離を認め、その解離の最も高いのは Clark-Lubs, Sørensen 何れの buffer solution を使用しても pH 7.8 附近であり、E に対して最も高い解離を認めたのは pH 7.4 附近であつた。尚

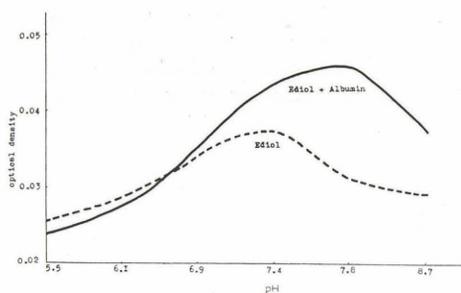


Fig. 8 Optimum pH of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (using Sørensen buffer solution) (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate	1 ml
Enzyme solution	2 ml
Buffer solution	2 ml

and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

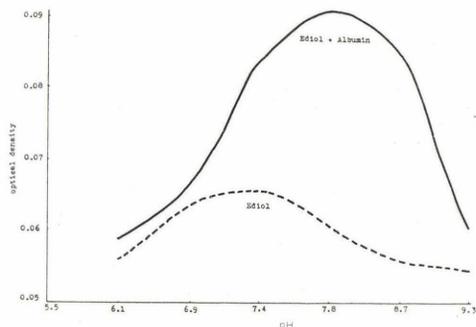


Fig. 9 Optimum pH of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (using Clark-Lubs buffer solution) (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate	1 ml
Enzyme solution	2 ml
Buffer solution	2 ml

and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

glycerol の発色は、著者の実験では Clark-Lubs buffer solution 使用の方が Fig. 9 の如く Sørensen の buffer solution を使用した場合よりも高い optical density を示した。更に *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する蛔虫体腔液の各種 pH 沈澱分割溶液の droptest による fungilysis は Table 10 の如く、pH 7~pH 9 において lysis 作用は著明であり、E + A に対する *in vitro* の lipolysis の結果として解離されたと考えられる glycerol の optical density においても、生物学的な fungilysis 作用と

Table 10 Relation between fungilytic action and pH of fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

pH	Incubation time (hr)									
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2	4	4 1/2	
5.8	-	-	-	+	###	###	###	###	###	###
6.3	-	-	+	###	###	###	###	###	###	###
7.0	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
7.7	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
8.0	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
8.2	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
8.7	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
9.1	-	-	###	###	###	###	###	###	###	###
11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ shows positive fungilytic activity.
 About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 8 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.
 Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of enzyme solution to 1 volume of pH 5.8-11.1 Clark-Lubs buffer solution.

云う現象においても類似した関係があると考えられる。

g) *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する, Protease (trypsin) 処理後の体腔液沈澱分割の fungilytic action mycobiotic agar に 30°C 下, 7日間培養した菌苔に対し, 蛔虫体腔液沈澱分割溶液 (0.4 Mol 食塩水にて透析前原液と等容に溶解) に各種濃度の trypsin (E. Merck, Darmstadt 製) を加え, 37°C, 30分間作用させた

もの, 及び全く作用させなかつた沈澱分割の droptest の結果は Table 11 の如く, trypsin の処理をしなかつた場合は1時間後に fungilytic action を認めたが trypsin 処理された場合は, trypsin 濃度 100 mg/16/ml 迄は 20 時間の観察にても fungilytic action は認めず, 以下の濃度では 20 時間後 fungilytic action を認めた. これは trypsin により蛔虫体腔液の fungilytic action の活性が消失されると考えられる.

h) 各種阻害剤添加による蛔虫体腔液の lipolytic 及び fungilytic action の影響

(1) serum の蛔虫体腔液沈澱分割の lipolytic action と fungilytic action に対する影響, 森下ら (1964) は人血清は溶真菌作用はなく, 豚蛔虫体腔液に人血清を加えるとその溶真菌作用を失い, 人血清中に inhibitor があるらしいと報告したが, 著者は triglyceride として Ediol を使用し, E+A及びEを基質として, fungilytic action を有する分割, 即ち蛔虫体腔液沈澱分割に人血清 (空腹時採血. 脂濁性の無い事を確かめ, 56°C, 30分間時々振盪攪拌して incubate を行ない非働化, 後 3°C 低温室にて 24 時間 Visking tube にて, 純水に透析した血清を使用した. 尚血清は透析により容積は透析前の 2 倍になつた) を倍数稀釈法により生理食塩水にて稀釈し, 基質 1 容, 酵素液 (体腔液沈澱分割溶液) 2 容, 緩衝液 1 容, 血清 (倍数稀釈を施行したもの) 2 容を充分

Table 11 Relation between fungilytic action and trypsin treatment of sediment fraction of *Ascaris* body fluid.

Trypsin	mg/ml	100	100/2	100/4	100/8	100/16	100/32	100/64	100/128	100/256	0	100
		ml	0.25 ml									0
Sediment fraction	ml	0.5 ml									0.5 ml	0
pH 7.8 Clark Lubs buffer solution	ml	0.25 ml									0.5 ml	0.75 ml
Incubation time (hr)	1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	1 1/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	##	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	###	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	###	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	###	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	###	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	###	-
	20	-	-	-	-	-	+	+	++	++	###	-

+ shows positive fungilytic activity.
 About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 7 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.
 Enzyme solution was prepared by mixing as above described. Sediment of trypsin treatment was incubated at 37°C for minutes.

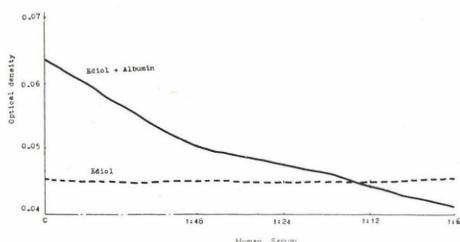


Fig. 10 Relation between lipolytic action and fungilic fraction of *Ascaris* body fluid added with human serum. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate	1 ml
Enzyme	2 ml
Buffer solution	1 ml
(pH 7.8 Clark-Lubs)	
Serum	2 ml

Serum was heated for 30 minutes at 56°C and dialysed with Visking tube for 24 hrs. at 3°C and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

に混和し、37°C 下に振盪恒温装置を使用、1時間 incubate を行ない glycerol の定量を行なった。結果は Fig. 10 の如くであった。他方倍数稀釈をした人血清を蛔虫体腔液に添加、*Penicillium* sp. E 株菌苔に対して droptest を行ない、fungilysis 作用は Table 12 の如くであり、*in vitro* における lipolysis による glycerol の optical density は、E+A を基質とした場合 Fig. 10 に示す如く血清を全く添加せず 1 時間 incubate した C の値に比し、実験を施行した 48 倍血清添加迄は inhibit がみら

れ、特に 6 倍稀釈の場合は殆ど完全に inhibit された。しかし基質を E のみとし、稀釈血清添加、蛔虫体腔沈澱分割の lipolytic action は、添加血清が高濃度でも inhibit の傾向は全く認められなかつた。即ち体腔沈澱分割中の脂肪蛋白体である E+A に対して作用する酵素は、血清により inhibit され、遊離の triglyceride に作用する沈澱分割中の酵素 (lipase と考えられる) は人血清添加を行つても、全くその影響は認められなかつた。*Penicillium* sp. E 株菌苔に対する人血清添加、droptest の結果は、約 64 倍稀釈迄は inhibit され、2 倍稀釈の場合は、48 時間後の観察にても全く、fungilysis 作用は認められなかつた。森下ら (1964) が溶真菌現象の立場から人血清は沈澱分割の溶真菌性を inhibit するらしいと報告したが、glycerol の解離を指標として眺めた脂肪蛋白結合体の lipolysis の点からも同じ事が考えられる。

(2) 各種濃度の食塩添加における。蛔虫体腔液沈澱分割の lipolysis と fungilysis 作用の影響。

lipase 及び LPL は何れも lipolytic action を有するが、その鑑別は、基質を変えて反応をみる事、種々の阻害性物質の添加により、lipolytic action の影響を、lipase のそれと比較する事等が行われている。特に完全理想的な基質が殆ど得られない現在では、後者の方法が主として行われている。Robinson & French (1957) は、各種阻害剤を添加し、と lipase と LPL のこれら物質による影響を総括的に報告した。著者も大体これにならない実験を行なった。lipolysis に関しては、脂肪蛋白結合体として E+A、遊離の triglyceride として E を基質とし、酵

Table 12 Relation between fungilic action and addition of human serum to fungilic fraction of *Ascaris* body fluid.

Serum	dil. rat. (2 ⁿ)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	phosph. buffer, pH 7.5 0.5 ml	
	ml	0.5 ml											
Fungilic fraction	ml	0.5 ml										0.5 ml	
Incubation time (hr)	1/2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1	—	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±
	2	—	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±
	4	—	—	—	—	—	—	±	+	+	+	+	+
	5	—	—	—	—	—	—	±	±	±	±	±	±
	24	—	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
48	—	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	

+ shows positive fungilic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 14 days at 30°C on the mycobiologic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing serum.

素液としては、蛔虫体腔液透析内液の沈澱分割を、透析前原液と等容になるように、0.1 Mol の食塩を含む pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution にて溶解した。(対照として、食塩の入らぬ沈澱分割酵素液が望ましいが、食塩の入った溶媒でないとして沈澱分割は溶解し難い為此これを使用した) 緩衝液は pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution を用いた。尚、pH 値が、基質、酵素液、緩衝液の混合液とした場合も変化しないように、基質、酵素液の稀酵及び溶解も同様 pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution を使用した。操作は、基質 1 容、酵素液 2 容、緩衝液 1 容とし、食塩濃度を夫々 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 Mol になる様調整し、充分混和して、37°C, 1 時間 incubate し glycerol の定量を行なつた。結果は Fig. 11 の如くで、図中の C は前述の混合比である為、食塩濃度は 0.05 Mol である。glycerol は E + A に対しては 0.4 Mol 食塩濃度において最高の解離を認め、それ以上の濃度では急激に下降し高濃度食塩添加では inhibit する傾向を認めた。E に対しては 0.2 Mol 食塩濃度で稍々高い glycerol の解離を認めたが、E + A に対する如き著明な変化を認めなかつた。尚、同じ蛔虫より同日採取同様に透析した蛔虫体腔液の各分割を 0.05 Mol ~ 1 Mol の各食塩濃度とし *Penicillium* sp. E 株菌苔上に対して droptest を施行した結果は Table 13 の如く、沈澱分割では 0.3 Mol ~ 0.4 Mol の食塩濃度にて fungilysis は最も強く、0.7 Mol 以上の食塩濃度では、48 時間観察するも fungilysis 作用は全く認めなかつた。これは、in

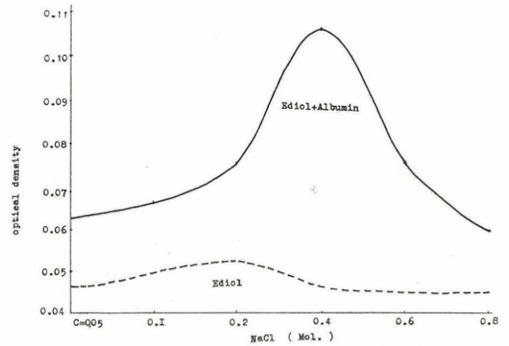


Fig. 11 Relation between lipolytic action and fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid added with sodium chloride. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :
 Substrate 1 ml
 Enzyme 2 ml
 Buffer solution 1 ml
 (pH 7.8 Clark-Lubs)
 incubated for 1 hr. at 37°C.

vitro における glycerol の解離を指標として眺めた脂肪蛋白結合体の lipolysis の結果と近似していた。尚上清分割においては、0.05 Mol ~ 1 Mol の食塩濃度では 48 時間観察を行なつたが、菌苔に対する fungilysis 作用は認められなかつた。

(3) 各種濃度の heparin sodium 添加における、蛔虫体腔液沈澱分割と lipase (東京化成) の lipolytic action と fungilytic action の影響

Table 13 Relation between fungilytic action and addition of sodium chloride to *Ascaris* body fluid fractions

NaCl (Mol)	Supernatant									Sediment								
	1 hr	4	5	15	18	20	24	40	48	1	4	5	15	18	20	24	40	48
0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	+
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+
0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+
0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	+	+
0.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-
0.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 14 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various mol of NaCl.

heparin と LPL の間に、かなりの関係がある事は、食餌性脂濁血漿の状態にある犬に対して、heparin を静注した他の犬の血液を静注することにより脂濁血漿が澄清化することを発見した Hahn(1943)以後、Anderson, Fawcett, Brown 等によつて研究、報告されているが尚不明な点が多いようである。著者は蛔虫体腔液の lipolytic 及び真菌に fungilytic action を有する fraction である沈澱分割に、heparin sodium を 10 mg/6/ml~10mg/24576/ml (倍数稀釈施行の為端数が生じた) の間で、種々濃度にて基質、酵素液、緩衝液の混合液に添加し、glycerol の解離を指標に lipolysis の影響をしらべた。他方同一蛔虫より得、同様に透析した体腔液沈澱分割に種々の濃度の heparin sodium を添加し、*Penicillium* sp. E 株菌苔に drop test を行ない、*in vitro* における lipolysis の影響と菌苔の fungilysis 作用と云う生物学皆な反応とを比較した。操作は、基質として、E+A 及び E の 2 種を使用、これを 1 容、酵素液として、沈澱分割溶液 (0.4 Mol 食塩水に溶解) 及び東京化成 lipase (10 mg/ml の割に、0.4 Mol 食塩水に溶解) を 2 容、緩衝液 (pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution) 2 容、倍数稀釈を行なつた heparin 1 容を混じ、食塩濃度を 0.4 Mol に調整 37°C 下に 1 時間、振盪恒温装置にて incubate した。

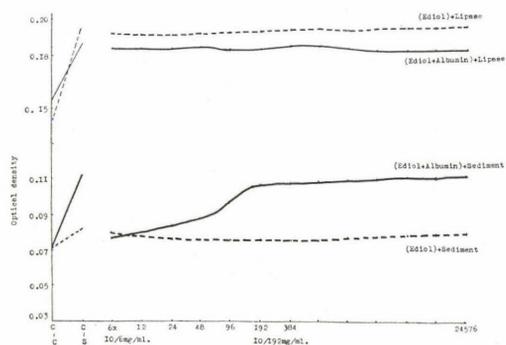


Fig. 12 Relation between lipolytic action and fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid added with heparin sodium. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate	1 ml
Enzyme	2 ml
Buffer solution	2 ml
(pH 7.8 Clark-Lubs)	
Heparin solution	1 ml

and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

結果は Fig. 12 の如くであり、C は heparin を含有していない対照であり、C-C はこれの incubate 前の定量値、C-S は 37°C、1 時間 incubate した値を示す。東京化成 lipase の作用は (Ediol)+Lipase, (Ediol+Albumin)+Lipase に示す如く、比較的高濃度の heparin sodium の添加においても、heparin sodium を添加しない場合と殆ど同じ glycerol の optical density であり、東京化成 lipase に対して heparin は殆ど影響がないと考えられる。(Ediol+Albumin)+Lipase が (Ediol)+Lipase に比して全体に optical density が低いのは、10% Ediol に 7% Albumin 溶液を 1:4 に混じ、37°C 下、1 時間の incubate により脂肪蛋白結合体が出来、E に比して、遊離の triglyceride が減少しているからと考えられる。蛔虫体腔液沈澱分割の作用は、(Ediol + Albumin) + Sediment, (Ediol)+Sediment で示す。後者は各濃度 heparin 添加において殆ど差を認めなかつた (沈澱分割中の lipase 作用と考えられる)。(Ediol + Albumin) + Sediment の場合、10 mg/6/ml ではかなり lipolysis は inhibit を認めた。ただし、実験成績において、C-C より glycerol の解離がみられるのは、E+A が全部脂肪合体となつていゝのではなく、遊離の triglyceride が多少含まれ、沈澱分割中の阻害されない lipase 様酵素が lipolysis を起している結果と考えられるが、それは明確ではない。何れにしても 10 mg/192/ml 迄は阻害傾向を認め、heparin 濃度の稀釈に比例して、比較的急激に阻害性は減少し、10 mg/192/ml 以下の濃度では、その阻害性は殆ど消失する結果を得た。これは、同一蛔虫より採取、同様に透析して作つた沈澱分割溶液に各種濃度の heparin を添加し、*Penicillium* sp. E 株菌苔に drop test を行ない観察した Table 14 に示す fungilysis 作用と近似の結果を得た。即ち 8 時間後では、10 mg/1536/ml 以下の濃度では heparin を添加しない沈澱分割の fungilysis と同程度の fungilysis を認め、24 時間後では 10 mg/192/ml 以下で対照と殆ど同じ fungilysis を認めた。生物学皆な反応である fungilysis と云う現象においても、*in vitro* における脂肪蛋白結合体に対する lipolysis と云う現象においても、heparin の阻害性は極めて近似皆関係が認められた。尚比較的純粋に抽出された pancreas lipase (東京化成) においては heparin sodium 添加、非添加何れの場合も、24 時間の観察では fungilysis を認めなかつた。

(4) 各種濃度の sodium fluoride 添加における、蛔虫体腔液沈澱分いと東京化成 lipase の lipolytic action と

Table 14 Relation between fungilytic action and addition of heparin sodium to fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Heparin (mg)	Enzyme									
	Pancreas lipase					Fungilytic fraction				
	1 hr	2	5	8	24	1	2	5	8	24
0	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+
10/3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/12	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/48	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/96	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±
10/192	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
10/384	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
10/768	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
10/1536	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+
10/3072	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+
10/6144	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+
10/12288	—	—	—	—	—	—	—	—	±	+

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 14 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentration of heparin sodium.

fungilytic action の影響

lipase 及び LPL に対する 弗化ソーダの阻害性については、Hollett & Menge(1956)らが報告し、Robinson & French (1957)らが、他の阻害性物質と併わせて総括的に報告した。著者は、弗化ソーダ濃度を $1/64$ Mol - 1 Mol 迄、倍数稀釈により、7種類の濃度とし、基質として、E+A及びEの2種類を用い、酵素液は、新しい蛔虫体腔液の沈澱分割溶液と、既知の lipase として、東京化成製 lipase を 10 mg/ml の割合に生理的食塩水で溶解した2種を使用、操作法は、基質1容、酵素液2容、緩衝液1容 (pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution、弗化ソーダ倍数稀釈液1容を混和し、混合液食塩濃度は夫々0.4 Mol となる様調整し、37°C 1時間 incubate を行ない、弗化ソーダの含有されていない対照Cと比較した。結果は、Fig. 13 の如く、E+A 及びEに東京化成製 lipase を作用させた場合、何れも、1 Mol 濃度では完全に inhibit され、 $1/8$ Mol 迄、濃度の低下と共に急激に glycerol が解離は増量し、以下の濃度では徐々に解離は増加し、 $1/32$ Mol では、弗化ソーダを添加しない場合の glycerol の解離とほぼ同一になった。全体的に、E+A を基質とした場合は E を基質とした場合より glycerol の解離が少なかったのは、E+Aが脂肪蛋白結合体を作り、遊離の triglyceride がEに比して少なくなっている

と考えられるが、それは明確ではない、粗酵素液として蛔虫体腔液の沈澱分割溶液を作用させた、(Ediol+Albumin)+Sediment 及び(Ediol)+Sediment において、後者の弗化ソーダ添加による glycerol 解離曲線は、東京化成 lipase を酵素液として作用させた解離曲線と非常に良く似て、弗化ソーダ濃度 M/4-M/8 では inhibit が見られ、以下の濃度では変化は余りなく徐々に解離が増加し、約 M/32 濃度で、弗化ソーダが添加されていない場合と、殆ど同じ位の glycerol の解離が認められた。基質をE+Aとした場合はEの如き著変は認められなかった。*Penicillium* sp. E 株菌苔に対する、同一蛔虫より得、同様に透析した沈澱分割溶液に、種々濃度の弗化ソーダ添加、droptest を行なった結果は Table 15 の如く、6時間後に弗化ソーダが添加されていない場合と同じ様に弗化ソーダ濃度に影響なく fungilysis を認めた。即ち弗化ソーダを添加しても、少なくとも亦弗化ソーダの濃度が高い場合も低い場合も、沈澱分割中の fungilysis 作用には影響を認めなかった。尚、東京化成製 lipase を滴下した場合、弗化ソーダ添加、亦添加しない場合何れも、8時間の観察では全く fungilysis は認められなかった。著者の実験において、既知の lipase と思われる。東京化成製 lipase を、一つの道標として、弗化ソーダ添加の影響をしらべたところ、弗化ソーダ高濃度の添加

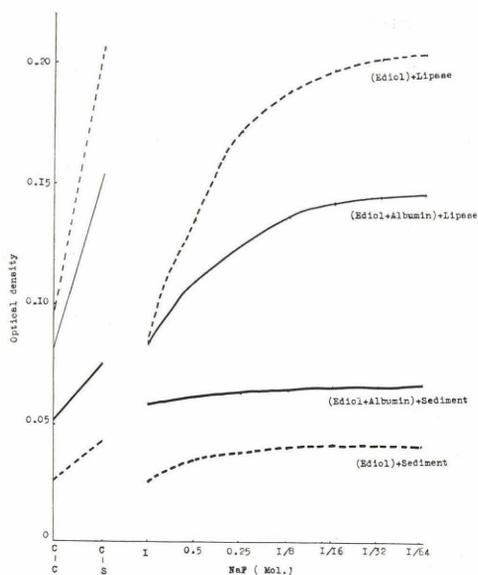


Fig. 13 Relation between lipolytic action and fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid added with Sodium fluoride. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate 1 ml
Enzyme 2 ml
Buffer solution 1 ml
(pH 7.8 Clark-Lubs)
NaF solution 2 ml

and containing 0.4 Mol. NaCl, incubated for 1 hr. at 37°C.

においては東京化成 lipase 及び蛔虫体腔液沈澱分割中に存在すると考えられる lipase も同様に inhibit されるが、同分割中に存在されると考えられる LPL 様の酵素の lipolytic activity は殆ど影響がない様に思われ、更に生物学的な反応としての *Penicillium* 菌苔の lysis にも全く影響は見られず、互いに近似の関係がある様に考えられた。

(5) 各種濃度の胆汁添加による、蛔虫体腔液沈澱分割と、東京化成 lipase の lipolysis と fungilysis 作用の影響

Robinson(1955) は bile salts が pancreas lipase に対し activate し、LPL に対しては inhibit する事を clearing factor の面より報告した。著者は、岐阜屠場で屠殺直後の豚胆嚢より胆汁を採取、これが胆嚢炎等により細菌感染をしていない事を確かめ、遠沈 (3,000 rpm, 15分間)、上清を濾過(東洋濾紙 No. 4を使用)し、これを実験に用いた。基質としては、E+A及びEの2種、酵

Table 15 Relation between fungilytic action and addition of Sodium fluoride to fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

NaF (Mol)	Enzyme							
	Pancreas lipase				Fungilytic fraction			
	1 hr	2	5	8	1	2	5	8
0	-	-	-	-	-	-	+	+
1	-	-	-	-	-	-	+	+
1/2	-	-	-	-	-	-	+	+
1/4	-	-	-	-	-	-	+	+
1/8	-	-	-	-	-	-	+	+
1/16	-	-	-	-	-	-	+	+
1/32	-	-	-	-	-	-	+	+
1/64	-	-	-	-	-	-	+	+
1/128	-	-	-	-	-	-	+	+

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 14 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various Mol of NaF.

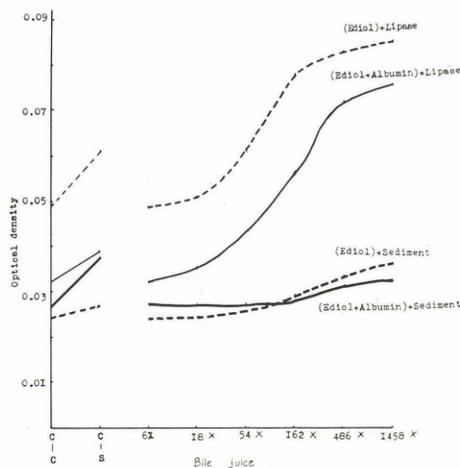


Fig. 14 Relation between lipolytic action and fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid added with Bile juice. (Glycerol-determination)

Incubation mixture :

Substrate 1 ml
Euzyyme 2 ml
Buffer solution 2 ml
(pH 7.8 Clark-Lubs)
Bile juice 1 ml

Bile juice was filtered with Toyo filter paper No. 4, centrifuged at 3,000 r.p.m. for 15 minutes and diluted.

素液として、新しい豚蛔虫体腔液の沈澱分割を透析前の原液と等容に生理的食塩水溶液としたもの、及び胆汁添加による変化を既知の lipase と比較する為、東京化成製 lipase を 10 mg/ml の割に、生理皆食塩水で溶解した 2 種を使用し、胆汁は生理的食塩水にて 3 倍稀釈を行ない、実際稀釈としては、6 倍稀釈より、1458 倍稀釈濃度迄実験を行なつた。混合液は、基質 1 容、酵素液 2 容、緩衝液 2 容 (pH 7.8 の Clark-Lubs buffer solution を使用)。3 倍稀釈の胆汁 1 容を混合し、食塩濃度は 0.4 Mol に調整、37°C、1 時間、振盪恒温装置を使用し、常時振盪 incubate を行ない glycerol の定量を行なつた。その結果は、Fig. 14 の如く、基質 E+A 及び E に対する東京化成 lipase の作用は (Ediol + Albumin) + Lipase 及び (Ediol) + Lipase で示し、これ等は高濃度胆汁の添加では lipolysis は inhibit される傾向が認められたが、54 倍稀釈及びそれ以上の稀釈では何れも、胆汁を添加しなかつた C より Activate さに、162 倍迄は急激に glycerol の解離が増加し、以上の稀釈では、glycerol の増加は緩徐であつた。尚 (Ediol + Albumin) + Lipase が (Ediol) + Lipase の曲線と殆ど平行はしているが、発色は低く見られた。これは脂肪蛋白結合体形成による、遊離 triglyceride の減少の為と思われる。基質、E+A 及び E に対する蛔虫体腔液沈澱分割の lipolysis は (Ediol + Albumin) + Sediment 及び (Ediol) + Sediment で示し、前者では、胆汁、162 倍稀釈迄、殆ど完全に inhibit され、それ以上の稀釈濃度では、glycerol の解離

は徐々に増加を見たが、1458 倍稀釈でも、尚多少 inhibit された状態であつた。(Ediol) + Sediment は、東京化成 lipase の如く、濃度稀釈による急激な増加を認めなかつたが、54 倍稀釈以上の稀釈濃度では、activate する傾向を認めた。此の実験に於いて、東京化成 lipase 及び蛔虫体腔液沈澱分割中の lipase は共に、高濃度胆汁添加では、inhibit されるが、一定の稀釈された胆汁の添加には activate される傾向があり、亦沈澱分割中の脂肪蛋白結合体に lipolysis を起す酵素は高濃度胆汁では勿論、かなり低濃度においても inhibit された。lipolysis の実験時に使用した同一の酵素液、東京化成 lipase、体腔液沈澱分割溶液に胆汁を添加して、*Penicillium* sp. E 株菌苔に対して行なつた droptest の結果は Table 16 の如く、lipase のみで、胆汁を添加しない場合 En (+), J (-) は 48 時間の観察でも fungilysis 作用を認めず、lipase の入らない胆汁のみの場合、En(-), J(+)では 1 時間後に fungilysis 作用を認めた。この現象は、他の droptest の結果をも考へて、菌苔に対する fungilysis 作用は lipase によるものでなく、胆汁の作用であり、特に胆汁の界面活性作用によるものと考えられる。沈澱分割を使用した場合、En(+), J(-) では 24 時間で fungilysis 作用が認められ、En(-), J(+)では 1 時間後に fungilysis 作用がみられ胆汁濃度 243 倍稀釈迄、fungilysis 作用を認めた。これは沈澱分割中の酵素性物質の作用によるものでなく、胆汁中の界面活性作用によるものと考えられる。但し胆汁の 2187 倍稀釈より、48 時間後みられ

Table 16 Relation between fungilytic action and addition of bile juice to fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Dilution of bile juice	Pancreas lipase						Fungilytic fraction					
	1/2hr	1	1 1/2	2	24	48	1/2	1	1 1/2	2	24	48
E (+) J (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	+
E (-) J (+)	-	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++
1 : 3	-	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++
1 : 9	-	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++
1 : 27	-	+	++	+++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++
1 : 81	-	±	+	+	++	++	-	+	+	+	++	++
1 : 243	-	-	±	±	+	++	-	-	±	+	+	++
1 : 729	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
1 : 2,187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 : 6,561	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 : 19,683	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1 : 59,049	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 14 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Enzyme solution was prepared by mixing 1 volume of Enzyme solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentration of Bile juice.

る fungilysis 作用は沈澱分割中の fungilytic action によるものと考えられる。

考案及び総括

森下ら (1963) が、蛔虫体腔液中に溶白黴菌作用を有する物質が存在し、それが酵素性であると報告し、それについて、生物学的、形態学的、酵素学的に追求されて来た。生物学的には、白黴菌から始まり、種々の真菌類放線菌類、抗酸菌に対する古橋 (1964) の詳細な報告があり、形態学的には、坂田 (1963) の真菌細胞壁の電子顕微鏡的な報告が見られ、酵素学的には、平岡 (1964) 塩谷 (1964) らが報告した。即ち、蛔虫体腔液を Visking tube 法により、純水にて、 $3^{\circ}\sim 4^{\circ}\text{C}$ 、24 時間透析、その内液を遠沈分割し、その上清分割中に amylase, esterase を証明し、これ等は溶真菌性を認めず、透析内液沈澱分割中に溶真菌性酵素の存在する事が解明され、真菌細胞壁に存在する chitin を分解する酵素、chitinase は蛔虫体腔液中には存在しない事が解かった。著者は、沈澱分割中に存在する溶真菌性酵素が、真菌苔を溶かす時、glycerol を解離する事を知り、glycerol の定量を Hana-han 法 (1958)、坂上 (1962) の法に基き施行した。別に既知の酵素、lipase を道標として lipolytic action を有する酵素を比較追求し、又種々阻害物質の添加を行いその lipolytic action の影響をしらべ、併せて、*Penicillium* sp. E 株菌苔に対する同様阻害性物質添加、droptest を行ない蛔虫体腔液沈澱分割中の fungilytic action と lipolytic action の本態及びその関連性を追求した。

1) 新鮮な蛔虫体腔液沈澱分割、(Visking tube 法により、 3°C 、24 時間、純水に透析後、3,000 rpm、15 分間遠沈したもの) 中には、脂肪蛋白結合体を lipolysis する酵素と、遊離の triglyceride を分解する lipase 様酵素があり、上清分割中に此等の酵素は殆ど認められなかった。採取後、 4°C 下に 7 日間保存した蛔虫体腔液では沈澱分割中のこれ等酵素活性は激減し、上清中の lipase 活性は高くなった。

2) *Penicillium* sp. E 株、菌苔乳濁液を、 56°C 、30 分間、加熱非働化し、その儘のもの、Anderson 法によつて脱脂質したものとの 2 種を substrate として、体腔液の沈澱分割と上清分割を夫々酵素液として作用せしめた場合、非脱脂質菌苔乳濁液を基質とし、沈澱分割を粗酵素液として作用させた場合の lipolysis は、上清分割を粗酵素液として作用させた場合に比して高い activity を認めた。

3) 基質を脂肪蛋白結合体として、Ediol + Albumin 及び遊離の triglyceride として Ediol を用い、lipolytic action を有する沈澱分割溶液を粗酵素液として、これを 56°C 30 分間加熱処理した場合と、しない場合の lipolytic action と fungilytic action を検討した結果、沈澱分割中の lipase 作用、及び脂肪蛋白結合体に対する lipolytic action は共に熱処理で、その活性を激減し、*Penicillium* sp. E 株菌苔に、対する droptest にても熱処理した沈澱分割では全く fungilysis は消失、その酵素性と、lipolysis 作用と菌苔に対する fungilysis 作用に深い関係のある事を知った。

4) 新鮮な蛔虫体腔液各分割を倍数稀釈により稀釈、基質として、脂肪蛋白結合体である Ediol+Albumin に作用させた結果は、沈澱分割では約 20 倍迄急激に lipolytic action は減少し、以後は緩徐の減少がみられた。尚上清分割は lipolysis を起す活性は非常に少であつた。*Penicillium* sp. E 株に倍数稀釈を行なつた沈澱分割溶液の droptest の 21 時間の観察では、16 倍稀釈迄 lysis 作用を認め、稀釈による活性の低下は、脂肪蛋白結合体に対する lipolysis と、菌苔に対する fungilysis とは傾向的には非常に近似であつた。

5) 基質に遊離の triglyceride として Ediol を用い、体腔液沈澱分割溶液と既知の lipase (東京化成) の夫々酵素液を作用させた場合、沈澱分割中の lipase と、東京化成製 lipase は、時間的に glycerol の解離に差を認めた。

6) 基質を Ediol + Albumin 及び Ediol とし、沈澱分割溶液を酵素液として緩衝液に、Clark-Lubs buffer sol. と Sørensen phosphate buffer sol. を用い、種々の pH 値をもつて、optimum pH を測定した結果、遊離の triglyceride に作用する沈澱分割中の lipase の optimum pH は 7.4 附近、脂肪蛋白結合体に作用する optimum pH は 7.8 附近であり、何れの buffer sol. を使用しても同じであつたが、全体の発色は Clark-Lubs buffer sol. を使用した場合が、Sørensen buffer sol. に比して高かつた。glycerol を定量する場合、緩衝液は、Clark-Lubs buffer sol. を使用した方が良いと考えられる。蛔虫体腔液、沈澱分割の各種 pH 溶液の *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する droptest の結果は、pH 11.1 では 4 時間 30 分の観察でも fungilysis は認めず、pH 5.8 では lysis 開始は遅延を認め、pH 7.0~pH 9.1 迄は、強い fungilysis 作用を認め、lipolysis の至適 pH と近似であつた。

7) 基質として、Ediol + Albumin 及び Ediol を使

用, 人血清の蛔虫体腔液沈澱分割の lipolytic action に対する影響をしらべた結果は沈澱分割中の lipase と考えられる酵素に対しては, 血清は何等の影響を認めなかったが, 脂肪蛋白結合体に lipolytic action を有する酵素は血清により inhibit され, *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する血清添加, 沈澱分割溶液の droptest による fungilysis 作用の inhibit と殆ど近似の関係がみられた.

8) 食塩添加による体腔液沈澱分割の lipolytic action に対する影響を, 基質 Ediol + Albumin 及び Ediol を用い, しらべた結果, 沈澱分割中の lipase は 0.2 Mol NaCl 濃度において, その活性は稍々増加するが, NaCl による影響は余り認められなかった. 脂肪蛋白結合体に対する酵素作用は 0.4 Mol. NaCl 濃度でかなり activate されるが, 以上の濃度では inhibit される傾向があり, 食塩添加体腔液各分割の *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する droptest では, 沈澱分割において 0.4 Mol 0.3 Mol の食塩濃度で fungilysis 作用が最も強くみられるのと全く一致した. 尚上清分割は食塩濃度に関係なく, 24 時間の観察でも fungilysis は認めなかった.

9) Heparin sodium 添加による体腔液沈澱分割の影響を同様基質にて, 既知の lipase (東京化成) を道標としてしらべた結果, 東京化成 lipase の lipolytic action は Heparin sodium によつて全く影響を受けなかった. 又蛔虫体腔液沈澱分割中 lipase も殆ど影響されないが, 脂肪蛋白結合体に作用する酵素は, 高濃度 heparin 添加においては inhibit された. *Penicillium* 菌苔に対する heparin 添加, 沈澱分割の droptest では高濃度 heparin においては, fungilysis は inhibit された. 高濃度 heparin 添加は, 脂肪蛋白結合体に対する lipolysis, 菌苔に対する fungilysis 共に inhibit すると考えられる. heparin と LPL の間に深い関係がある事は Hahn (1943) の食餌性脂濁血漿の状態にある犬に, heparin を静注した他の犬の血液を静注すると脂濁血漿が清澄化すると報告以来, 脂濁血漿状態の犬に heparin を静注しても同様清澄化が生ずるが, *in vitro* において, 脂濁血漿に heparin を加え, 作用させても清澄化は生じない等の Anderson & Fawcett 等の報告があるが, 不明な点が多い, Brown et al., Shore et al., Korn, Hollett & Menge 等は高濃度の heparin を LPL に添加した場合, *in vitro* におけるその活性は inhibit されると報告しているが著者の実験においても蛔虫体腔液沈澱分割の脂肪蛋白結合体も同様の傾向を認めた.

10) 弗化ソーダ添加による体腔液沈澱分割の影響を同

様基質にて, 東京化成 lipase を, 道標としてしらべた結果, 弗化ソーダは, 東京化成 lipase, 及び沈澱分割中の lipase を, inhibit し, 沈澱分割中に存在する, 脂肪蛋白結合体を分解する酵素に対しては余り影響がないと考えられる. 弗化ソーダ添加, 沈澱分割の *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する droptest においても同様に fungilysis 作用に対する弗化ソーダの影響は認めなかった.

11) 胆汁添加による体腔液沈澱分割の lipolytic action の影響を, 同様基質を用い, 東京化成 lipase を道標としてしらべた結果, 東京化成 lipase 及び沈澱分割中の lipase は胆汁, 高濃度の場合は lipolytic action は inhibit されるが, 胆汁約 54 倍稀釈より稀釈が高い場合は activate された. しかし, 沈澱分割中の脂肪蛋白結合体に作用, lipolytic action を起す酵素は胆汁添加により inhibit される傾向を認めた. *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する胆汁添加, 沈澱分割の droptest における fungilysis は, 胆汁のもつ界面活性作用を除き考えれば, lysis 作用は胆汁添加により inhibit する傾向は認められる. 以上を文献的, 実験的結果より考察するに, 蛔虫体腔液沈澱分割中に存在する溶真菌作用物質は, 56°C, 30分の加熱処理により殆どその活性を失う事, Visking tube を用い純水にて透析した場合, 溶真菌作用物質は, 透析内液中に存在する事. Protease (Trypsin) を作用させると, その溶真菌性が消失する事. 若し, 蛔虫体腔液の溶真菌性が界面活性によるものとするならば, 上清分割にも fungilysis がみられる可きであるが, それが全く認められない事等より, 溶真菌作用物質は酵素であると考えられる. 沈澱分割中には遊離の triglyceride を分解する lipase 様酵素と, triglyceride と albumin を conjugate して得た脂肪蛋白結合体に作用する酵素があり, Serum, NaCl, Heparin, NaF, Bile juice 等の阻害剤を加え, その影響を東京化成製 lipase の lipolytic action と比較総括すれば, Table 17 の如くであり, Serum を除き, 蛔虫体腔液沈澱分割中の脂肪蛋白結合体に lipolytic action を示す酵素は, D. S. Robinson & J. E. French (1957) が, The heparin clearing reaction and fat transport で発表した. 諸種阻害剤による pancreatic lipase と, 脂濁血漿清澄因子 (lipemia clearing factor) としての lipoprotein lipase の影響と全く同様の結果を認めた. 又 *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する蛔虫体腔液沈澱分割の諸種阻害剤添加, droptest による fungilysis は, lipoprotein lipase と同様, 近似の阻害性を認めた. 即ち Serum の添加においては, 脂肪蛋白結合体を基質

Table 17 Influence of various inhibitors to lipolytic action of enzymes and fungilytic action of sediment fraction of *Ascaris* body fluid by dialysis method

Inhibitors	Enzyme		Sediment fraction of <i>Ascaris</i> body fluid	
	Pancreatic lipase (by Robinson)	Lipoprotein lipase (by Robinson)	Glycerol (Lipolysis)	Droptest (Fungilytic)
Serum			inhibited	inhibited
Sodium chloride	no effect	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations
Heparin	no effect	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations
Sodium fluoride	inhibited	no effect	no effect	no effect
Bile salts	activated	inhibited	inhibited	inhibited

として作用させた lipolysis と、菌苔に対する fungilytic action は共に inhibit され、NaCl の添加では 0.4 Mol 濃度では lipolysis fungilytic action 共に activate されるが、高濃度では共に inhibit の傾向を認め、Heparin 添加においては、高濃度で共に inhibit され、NaF の添加では lipolysis 作用、fungilytic action 作用は共に影響は認められなかつた。Bile juice は共に inhibit の傾向があり、これらより蛔虫体腔液沈澱分割中の溶真菌作用は、同分割中に存在する。Hahn (1943), Anderson & Fawcett (1950), Brown (1953), Korn (1955), Robinson & French (1957) らが報告した Lipoprotein lipase 様、或はこれに類似した酵素が fungilytic action 作用の主体をなすか、或は重要な役割をなしていると考えられる。

結 語

蛔虫体腔液中に溶真菌作用を有する酵索性物質が存在する事は既に報告されている如くであるが、本作用の主体は lipolytic なものであらうと考えられるいくつかの事実を知つたので、これについて追求し、併せて溶真菌作用 (fungilytic action) の機序についてしらべた。蛔虫体腔液の溶真菌分割のとり方は Visking Co. 製セロハン・チューブを用い、純水に対し 3°~4°C, 24 時間透析し、その透析内液を遠心分離し、出来た沈澱分割を目的により 0.1 Mol~0.4 Mol の食塩水に溶解し、これを、溶真菌分割 (fungilytic fraction) の粗酵素液とし、Korn (1962) の法に従つて triglyceride として Ediol (10% ヤシ油剤) 及び、脂肪蛋白結合体として、Ediol に bovine albumin (Fraction V from bovine plasma, Armor Co. 製) を conjugate した 2 種の基質に作用せしめ、37°C, 1 時間 incubate し、Hanahan (1958), 坂上 (1962) の glycerol 定量法を主体にして、10% trichloroacetic acid

にて除蛋白を加えた方法で lipolytic action によつて分離された glycerol の量を測定し、又同様によつて得た蛔虫体腔液沈澱分割を *Penicillium* sp. E 株の mycotic agar 平板培養菌苔に対して droptest を行ない、その生物学的な fungilytic action 現象を比較した。尚対照として東京化成製 lipase を併せて用い、蛔虫体腔液沈澱分割中の lipolytic action を有する酵素の作用と比較した。その結果は、Ediol に Albumin を conjugate した脂肪蛋白結合基質に対する lipolysis と生物学的な反応である fungilytic action の傾向は殆ど一致した。即ち沈澱分割溶液を 56°C 30 分間、加熱処理したものと、しないものを粗酵素液として、脂肪蛋白結合体に作用させた場合、及び *Penicillium* sp. E 株菌苔に droptest を行なつた場合、その lipolysis 作用 fungilytic action 作用共に加熱処理をしたものは、その活性は消失同様の傾向を示し、又脂肪蛋白結合体の lipolysis 作用における optimum pH と fungilytic action 作用の optimum pH とは、同様の傾向を認め、夫々 pH 7.8 及び pH 7~pH 9 であつた。沈澱分割の稀釈における lipolysis と fungilytic action の場合も同様の傾向を認めた。又 inhibitor として、serum, NaCl, heparin, NaF, bile juice を種々の濃度で添加した場合、lipolysis と fungilytic action 作用の影響は次の如く全く両者が一致した結果を得た。serum の添加に対しては、lipolytic action と菌苔に対する fungilytic action は何れも、inhibit され、NaCl の添加では、0.4 Mol 濃度では何れも activate されたが、更に高濃度では lipolytic action, fungilytic action は何れも inhibit の傾向を認めた。heparin 添加では、高濃度では両者共に inhibit された。NaF 添加では、対照として使用した lipase (東京化成製) に対しては inhibit を認めたが、Ediol に albumin を conjugate した脂肪蛋白結合体基質に対する蛔虫体腔液沈澱分割粗

酵素液の lipolytic action 又菌苔に対する体腔液、沈澱分割の fungilytic action は何れも影響を認めなかつた。Bile juice の添加では東京化成製 lipase は activate される傾向を認めたが、Ediol に albumin を conjugate した substrate に対して体腔液沈澱分割を作用させた場合は、inhibit の傾向がみられ、菌苔に対する。その fungilytic action は胆汁の持つ界面活性作用の為比較するのは困難であるが、実験結果を検討するに高濃度では inhibit されると考えられる。以上よりみて、脂肪蛋白結合体に対する、体腔液沈澱分割の liyolysis 作用と菌苔に対する fungilytic 作用は全く同じ傾向があり、inhibitor の影響より、postheparin plasma 中にみられる、lipoprotein lipase (LPL) とは serum の阻害性においては尚検討の余地はあるが、他の場合は全く合致し、沈澱分割中に存在する。溶真菌作用は、この LPL、或いはこれに近似した酵素によるか、或いは重要な役割をなす様に思われる。この酵素の optimum pH は 7.8 附近であり、56°C、30 分間の加熱処理により、又、trypsin の作用によりその活性は殆ど消失し、Visking tube に対して非透析であり、新鮮な蛔虫体腔液沈澱分割にはその活性を認めたが、4°C 下に 7 日間、保存した体腔液の沈澱分割にはその活性を殆ど認めなかつた。尚、glycerol 定量については、検量曲線は原点を通る直線の関係を示したが、Hanahan, Korn らの法による場合よりも吸光度が低値を示し、その検討の結果は、次の機会に報告する。

引用文献

- 1) 赤堀四郎(1957)：酵素研究法。2巻, 1-18, 4巻 685-687, 朝倉書店。
- 2) 赤堀四郎・沖中重雄(1964)：臨床酵素学。483-497 朝倉書店。
- 3) Anderson, N.G. & B. Fawcett(1950)：An antichylomicronemic substance produced by heparin injection. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 74, 768-771.
- 4) Baker, S. P.(1957)：Heparinactivated clearing factor. Circulation, 15, 889-896.
- 5) Cherkes, A. & R. S. Gordon(1959)：J. Lipid. Res., 1, 97-101.
- 6) 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。寄生虫学雑誌, 13 (1), 76-85.
- 7) 古橋貞二郎(1964)：蛔虫体腔液の各種真菌、放線菌及び細菌に対する lytic action について(1)。寄生虫学雑誌, 13(3), 256-265.
- 8) Grossman, M. I.(1954)：The quantitative measurement of heparin induced lipemia clearing activity of plasma. J. Lab. Clinic Med., 43, 445-451.
- 9) 平岡義雄(1964)：蛔虫体腔液の酵素作用について(1)。寄生虫学雑誌, 13(2), 143-148.
- 10) Korn, E.D.(1955)：Clearing factor, A heparin-activated Lipoprotein lipase. I. Isolation and characterization of the enzyme from normal rat heart. J. Biol. Chem. 215, 1-14. II. Substrate specificity and activation of Coconut oil. J. Biol. Chem., 215, 15-25.
- 11) Korn, E. D.(1959)：The assay of lipoprotein lipase *in vivo* and *in vitro*. Methods of Biochemical Analysis, VII, edited David Glick, 145-192.
- 12) Korn, E. D.(1962)：Lipoprotein lipase. (clearing factor). Methods of enzymology V, edited by S. P. Golwick and N. O. Kaplan, 542-545 Academic Press.
- 13) 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
- 14) 森下哲夫・小林瑞穂(1963)：蛔虫体腔液の抗白癬作用について。臨床皮膚泌尿器科, 17(5), 479-484.
- 15) 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。寄生虫学雑誌, 12(5), 412-414.
- 16) 森下哲夫・小林瑞穂・坂田六郎・五藤基・古橋貞二郎・平岡義雄・榊原弘・山田稲好・関谷竜吉・大久保守正(1964)：豚膵臓抽出液の抗真菌作用について。寄生虫学雑誌, 13(2), 158-161.
- 17) Robinson, D. S. & J. E. French(1957)：The heparin clearing reaction and fat transport. Quart. J. Exp. Physiol., 42, 151-163.
- 18) 坂田六郎(1963)：Chitin の研究。寄生虫学雑誌, 12(6), 471-473.
- 19) 坂上利夫(1962)：脂質成分-グリセリン。生化学領域における光電比色法, 各論, 4, 32-35. 南江堂。東京。
- 20) Suehiro, M.(1960)：Studies of Lipoprotein lipase. I. Determination of Lipoprotein lipase. The Journal of Biochemistry, 47 (6), 777-780.
- 21) Seligman, A.M. & M. Nachlas(1963)：Lipase: Methods of enzymatic analysis edited by Hans-Ulrich Bergmeyer, 776-778.
- 22) Shore, B., A. V. Nichols & N. K. Freeman (1953)：Evidence for Lipolytic action by Human Plasma Obtained after Intravenous Administration of Heparin. Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 83, 216-220.

STUDIES ON FUNGILYTIC ENZYME IN ASCARIS BODY FLUID (I)

HIROSHI SAKAKIBARA

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

It has already been pointed out that *ascaris* body fluid contains an enzyme-like substance of fungilytic action. The present author has accordingly examined the fungilytic action and has found that it would be ascribed mainly to the lipolytic action. The present paper describes the results of the experiments concerned.

For obtaining the fraction with fungilytic action, *ascaris* body fluid was dialyzed for 24 hours at 3° to 4°C through a strip of cellophane tubing (Visking Co.) against distilled water. For preparing the crude enzyme solution, the dialyzed solution was then centrifuged and the sediments were, depending on the kind of experiments, dissolved into 0.1 M to 0.4 M NaCl solutions. The crude enzyme according to Korn's method (1962), was incubated at 37°C for 1 hour with triglycerides such as Ediol (10 % emulsion of coconut oil) alone or conjugated with bovine albumin (Fraction V from bovine plasma, Armor Co.). Thus glycerol dissociated by the lipolytic action was calculated according to Hanahan's method (1958) supplemented with a deproteinisation technic using 10 % trichloro-acetic acid. The results were compared with the biological action of *Penicillium* sp. E strain against fungus body which was cultivated on mycobiotic agar plate. Commercially available lipase (Tokyo Kasei Co.) served as controls was compared with an enzyme-like substance of the lipolytic action in the sediment fraction of *ascaris* body fluid.

Both of the lipolytic and fungilytic actions were inhibited by the addition of serum or higher concentrations of heparin. The addition of higher concentration of NaCl inhibited both the reactions, whereas 0.4 M NaCl activated the actions. NaF acted as an inhibitory factor against lipase (Tokyo Kasei Co.) action but not against Ediol conjugated with albumin. It seems that the addition of bile juice activated the lipase action and inhibited the lytic action against fungus body, though it was hard to determine because of the surface activity of bile juice.

Results of experiments with the inhibitory effects of serum, NaCl, heparin, NaF and bile juice upon the fungilysis and the lipolysis demonstrated that the fungilysis and the lipolysis belong to one, though it is more or less different in the inhibitory effect of serum from LPL of postheparin plasma. It would seem, therefore, that an enzyme-like substance of fungilytic action in *ascaris* body fluid is lipoprotein lipase or LPL-like enzyme nearly lied to it.

This enzyme has an optimum pH 7.8 and is inactivated by heating to 56°C. for 30 minutes. No active fraction of the enzyme is dialyzed through a strip of cellophane tubing. The activity can not be recognized in the fraction kept at 4°C for 1 week but in freshly obtained fraction.

As to the calculation of glycerol, the degree of light absorption was lower than those obtained by Hanahan's and Korn's methods. This problem will be taken up in detail in the next paper of this series.