

蛔虫体腔液の lipolytic activity について (1)

森下哲夫 小林瑞穂 榊原弘
山田稲好 五藤基 江口孝
平岡義雄 古橋貞二郎 三島誠也

岐阜県立医科大学寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1964年12月26日受領)

特別掲載

蛔虫体腔液中に esterase の存在する事については一井(1959), 平岡(1964)の報告がある. 前者は基質として tributyrine を使用し, 後者は p-nitrophenylacetate を使用している, いずれも低分子物質に対する分解を主体としたもので lipase に関する研究ではない. 著者らは蛔虫体腔液の有する溶真菌作用の機序の解明の途上, 本作用の主体が lipolytic action に関係する事を知り, 或る種の lipase 特に lipoprotein lipase 様酵素の存在を想定させられるいくつかの事実を得た. そのことについて追究し若干の興味ある成績を得たのでここに報告する次第である.

実験方法

lipolytic activity を有する酵素活性の定量法には現在までに各種の方法が報告されている. 著者らはこれらのうち Korn (1962) が lipoprotein lipase 定量に用いた glycerol 定量法を主体に若干の改変を試み Table 1 に示す様な方法を考案した. 酵素液, 基質液, 緩衝液及び glycerol 定量試薬の調製は次に示す如くである.

酵素液: 使用した豚蛔虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) は屠場で豚の解体時に腸管中から集め, 直ちに 37°C に保温した生理的食塩水中に入れて持参し, 体表を保温した生理的食塩水で良く洗って汚物を完全に除去し, 頭部を吊つて懸垂してのち, 尾端より 1~2 cm 上部に切創を入れ, 滴下する体腔液をあつめた. 一度濾過したものを直ちに Visking tube を用いて, 約 200 倍容の純水に対して, 4°C で 24 時間透析し, その時出来た沈澱を遠心して集め, 原液量の半量の生理的食塩水を加え, 37°C で充分溶解してのち, 不溶物を遠心して除きその上清を粗酵素液とした.

基質: triglyceride として用いた Ediol は次の様な組

Table 1

Identification method of lipolytic action of ascarid body fluid sediment fraction

incubation system	
enzyme	1 ml
substrate	1 ml
buffer solution	1 ml
total	3 ml

incubated at 37° C for 1-3 hrs (shaked at 80/min.)

added 7.5 ml of 10 % trichloroacetic acid

filtrated

removed 2 ml from filtrate

added 0.6 ml of 0.05 mol sodium periodate

stood for 5 min.

added 0.5 ml of 0.5 mol sodium bisulfite

stood for 10 min.

removed 1 ml from mixture

added 8 ml of 1 % chromotropic acid*

boiling water bath for 30 min.

cooled in tap water

added 0.5 ml of 4.6 % thiourea

570 m μ

* chromotropic acid. 1 g of chromotropic acid is dissolved in 100 ml of water and added to 400 ml of sulfuric acid (2 parts of water). The reagents should be cooled throughout the mixing procedures. This reagent should be prepared fresh daily.

成である. G.M.S. (エマルヂー M.T.) 15 g (武田製), ヤシ油 500 g (片山製) 及びニコール T.S.10. 20 g (日光ケ

ミカル Tween 60)を蒸留水で全量を 5 l としたもので、乳剤としての粒子の大きさは高圧ホモジナイザーを用いて 0.1~0.2 μ の略均一なものとした。

1) Triglyceride...Ediol 10% 溶液を用い、溶媒は 0.4 M NaCl 及び Clark-Lubs phosphate buffer を用いた。

2) Activated triglyceride...製造方法は主として Grossman (1954) の法に準拠した。albumin として Armour 社製 bovine plasma fraction V を、pH 7.8 の Clark-Lubs phosphate buffer で 7% 溶液とし、この 4 部に対し 1 部の割に同様 Clark-Lubs phosphate buffer で 10% とした Ediol を加え、37°C 1 時間 incubate したものを activated triglyceride とした。

3) Lipoprotein...N.B.C. 社製 human plasma fraction III (lipoprotein) を Clark-Lubs phosphate buffer M/5, pH 7.8 で 1% の割に乳剤としたものを用いた。

4) Buffer solution...Clark-Lubs M/5 phosphate buffer で主として pH 7.8 のものを用いた。

本実験に用いた粗酵素液は 0.18 Mol 以上の NaCl の存在に於いて溶解可能であり又各種の予備実験から 0.4 Mol NaCl が最も適当であると云う結果が得られたので NaCl の影響に関する実験以外は常に酵素反応の状態では 0.4 Mol の濃度に NaCl が含まれる様にした。以上の様にして得たものをそれぞれ Table 1 に示す様な割合で反応系をつくり、lipolytic activity を求めた。又酵素分解の結果得られた glycerol は Korn (1962), 坂上 (1962), 末広ら (1960) の法を本実験に合う様に若干の改変を試みた。この方法で buffer solution に glycerol を 1 μ mol/ml ~ 0.05 μ mol/ml 含む系をつくり酵素反応の場合と同じ様に酵素液、基質及び前記 glycerol buffer solution を加え、直ちに trichloroacetic acid で除蛋白を行ない、更に glycerol の定量を行なつて標準曲線を求めたのが Fig. 1 である。この表に示す様に 1 μ mol/ml から 0.05 μ mol/ml に至る各種の濃度で原点を通る直線となり、充分本法による glycerol の測定が可能である事が証明された。又 0.025 μ mol/ml 以下の濃度では本法では全く発色不能であり、この事は従来の研究者の結果と一致した。

実験成績

1) lipolytic action に対する pH の影響

Clark-Lubs phosphate buffer (M/5) で pH 6~10 までの系をつくり、各 pH 域に於ける triglyceride 及び acti-

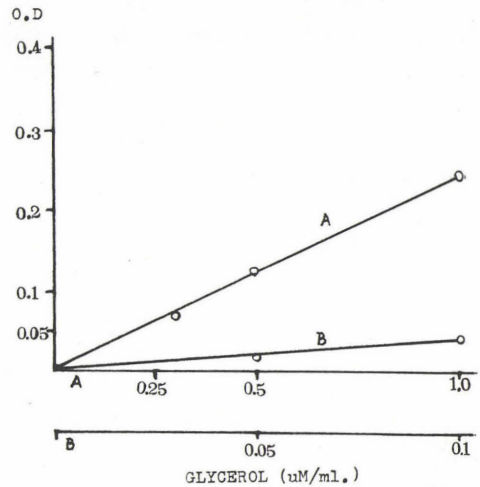


Fig. 1 Determination of glycerol in incubation mixture after deproteinization with trichloroacetic acid

One ml. Clark-Lubs phosphate buffer solution containing various concentration of glycerol, 1 ml. of enzyme solution, and 1 ml. of substrate poured into 7.5 ml. of 10% of trichloroacetic acid. After removing the precipitates, 2 ml. of filtrate was taken for assaying glycerol by author's method.

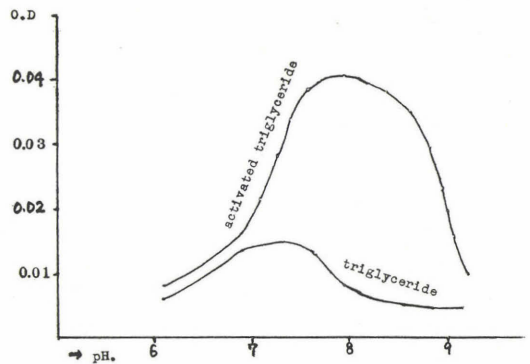


Fig. 2 Relation between pH and lipolytic activity

* used Clark-Lubs M/5 phosphate buffer.

vated triglyceride を基質とした反応系をつくり 37°C 2 時間 incubate による glycerol の解離を求めた。この結果は Fig. 2 に示す様に activated triglyceride を基質とした場合の至適 pH は 7.8 となり、triglyceride を基質としたときには至適 pH は 7.4 となつた。又 pH 7.8 に

於ける triglyceride の分解は極めて僅少であり、この pH 域を使つて activated triglyceride の分解を行なえば殆んど lipase like な酵素活性について考慮する必要のない様に思われる。以上の様な結果から著者等は以後の実験に於いてはすべて Clark-Lubs phosphate buffer M/5 pH 7.8 を使用した。

2) 酵素液の濃度と incubate の時間との関係

粗酵素液を pH 7.8 の 0.4 Mol NaCl で 2 倍 4 倍に稀釈したものを酵素液として、incubate の時間と各種酵素濃度による glycerol の解離の状況を見たのが Fig. 3

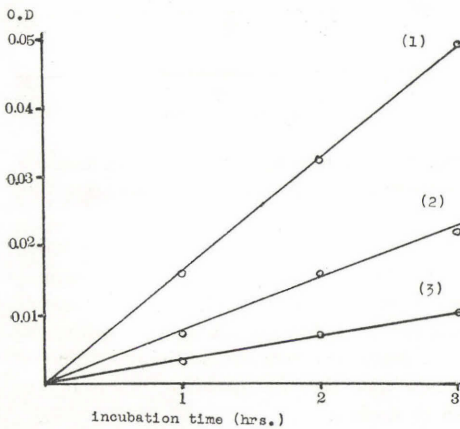


Fig. 3 Relation between lipolytic activity and concentration of enzyme

- (1) Original concentration of enzyme.
- (2) 1/2 concentration of enzyme dilluted with 0.4 M. NaCl.
- (3) 1/4 concentration of enzyme dilluted with 0.4 m. NaCl.

である。いずれも原点を通る直線となり、原液に於いて著明な酵素分解を認めた。

3) 酵素液の lipolytic activity と温度との関係

粗酵素液を 56°C 30 分加温処理をした場合、-20°C に 1 夜保存した場合及び凍結乾燥した場合の酵素活性を無処置のものを 100 とした場合の抑制の%を求めてみた。この結果は Table 2 に示す様に三者ともに殆んど完全な

Table 2 Influence of temperature against enzymatic activities

Treatment	% of inhibition
heated at 56°C for 30 minutes	97.1
lyophilization	100.0
stored at -20°C for over night.	100.0

抑制を認め、酵素標本の保存に従来行なわれている様な方法が用いられない事が判つた。

4) Human lipoprotein に対する lipolytic activity 本酵素の基質としては activated triglyceride が良好である事は前に述べたが、Korn (1962), 末広 (1960) は soluble lipoprotein も lipoprotein lipase の有用な基質となり得る事を報告している。著者らは前に述べた様にして調製した human plasma fraction III (主として β -lipoprotein) を基質として 37°C で 1~2 時間、1 分間 80 回の割で振盪を加えながら incubate し、glycerol の解離を見た。この結果は Fig. 4 に示す様に基質の分散の均一性と云う点で難がある為か、直線的にはならなかったが、経過時間につれて glycerol の解離が増大し、これ等も又有用な基質となり得る事がわかつた。尚同時に同一酵素液を用いて行なつた activated triglyceride に対する分解と比較しても著明な差はなかつた (Fig. 4)

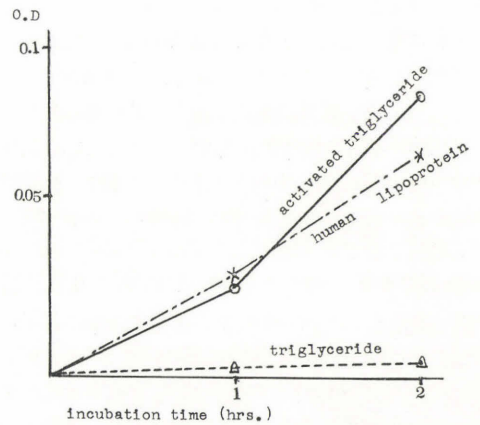


Fig. 4 Relation between various substrates and lipolytic activity of ascarid body fluid

5) activated triglyceride の作製に用いる Armour 社製 bovine plasma fraction V (albumin) についての考察 著者らは Korn (1962), Grossman (1954), Suehiro (1960) の報告の如く activated triglyceride の作製について Armour 社製の bovine plasma fraction V を使用して実験を行なつて来た。しかしこの分割が常に全く均一なものであるとは考えられない。

特に著者らの材料としている蛔虫の体腔液の様なものでは阻害剤の所で述べるが、plasma 中の或る種の成分が極度に酵素作用を抑制するのでこの点に関して特に注意を要するものと思われる。著者らは現在までに Arm-

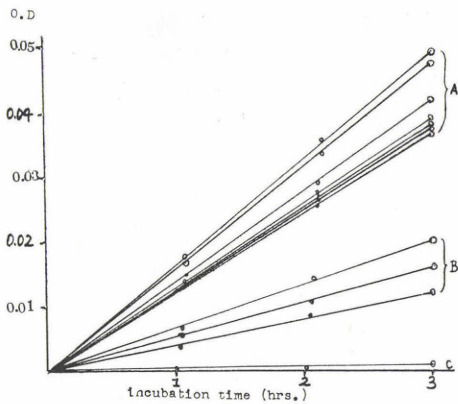


Fig. 5 Relation between various albumins (Rovine fraction V of Armour Co., LTD.) A-C and lipolytic activity of ascarid bodyfluid

our 社製の Bovine fraction V を用いて基質を作製して来たが、それ等を用いて行なつた実験を要約して、incubate の時間と glycerol の解離との関係を図示したのが Fig. 5 である。A 群は最も初期に入手したものをを用いた場合であり、B 群はその後、C 群は最近入手した Armour 社製 bovine fraction V (albumin) microbiological use としたものでこのものを用いて activated triglyceride を作製した場合には全く蛔虫体腔液の lipolytic action を抑制してしまう結果となつた。しかしこの様な albumin を用いて、純水で 7% 溶液とし、これを Visking tube に入れて 4°C で純水に対して 1 夜透析したものを更に 56°C 10 分熱処理し、この液を蛋白量 7% になる様に濃縮したものを今迄と同様な方法で activated triglyceride をつくりこれを基質として酵素分解を行なつた所、著明な分解が見られた。

以上の様な事から蛔虫体腔液の lipolytic activity の力価の不安定性に加えて、基質の極度な不均一性が酵素力価の判定に更に大きな変動を与える結果となり今後如何にしてこの点を克服するかについて充分な研究を重ねなければならない事と思われる。

6) lipolytic activity に及ぼす heparin, 無機塩類, bile juice, 人血清などの影響 以上の様な事から本酵素の lipolytic activity は triglyceride の場合よりも Korn, Grossman らの云う activated triglyceride に高い分解を示し、これに lipoprotein が続く様な感じを受ける。この様な事は既報の lipase などとは異なる性質のものであり、高等動物に於ける lipoprotein lipase 様作用が考

Table 3 Inhibition of lipolytic activities of ascarid body fluid in the presence of higher concentration of heparin, salts, bile juice and human serum

Material	Amounts of inhibitors in final concentration	% of inhibition
heparin	1.66 mg/ml	89.8
	0.83	84.2
	0.41	77.0
	0.27	64.1
	0.13	41.1
	0.05	15.4
NaCl	0.1 m/ml	-13.4 (activated)
	0.2	-47.8 (activated)
	0.4	-186.4 (activated)
	0.6	-143.3 (activated)
	0.8	-43.4 (activated)
NaF	1.0 m/ml	0
	0.5	0
	0.25	0
bile juice	0.166 ml/ml	100.0
	0.055	100.0
	0.0185	100.0
	0.0061	90.0
	0.00205	60.0
	0.00068	50.0
human serum	0.166 ml/ml	99.7
	0.083	87.0
	0.0416	65.2
	0.0208	47.9

えられるので heparin, NaCl, NaF, bile juice, 人血清などの添加による lipolytic action への影響をしらべたのが Table 3 である。この表は対照とした何も添加しないものの glycerol の分解率を 100% としたとき、添加した場合の lipolytic action の阻害性、賦活性を百分率で示したもので、この表に見られる様に高濃度の heparin では lipolytic activity に抑制が見られた。NaCl の添加では 0.4 Mol では活性化され、これを中心に高い濃度でも低い濃度でも抑制が見られた。NaF の添加では殆んど変化を与えなかつたのに対して、表には示していないが、phosphate buffer として用いた磷酸の量的関係に比例して Clark-Lubs の buffer solution の場合よりも Sørensen の phosphate buffer solution の場合の方が抑制的になつた。豚の胆のうから採取した bile juice の添加では 162 倍稀釈まで著明な抑制が見られた。正常人血清の添加では人血清の 1/3 量まで著明な抑制が見られた。

総括及び考案

蛔虫体腔液中の脂質分解酵素に関する研究は先に述べた様に主として esterase 作用であり、純水に対して体

腔液を透析した場合、透析時の上清中に活性物質が存在し、著者らの本実験に用いた透析時に於ける沈澱分劃中には全く esterase 作用を含まない事は平岡(1964)の報告に見られる如くである。しかし榊原(1965)の蛔虫体腔液の溶真菌作用に関する報告に見られる様に真菌を基質とした場合に glycerol の解離が見られ、更に activated triglyceride を基質として、その glycerol の解離と溶真菌作用との関係を pH 阻害剤について求めた結果でも極めて良く両者が一致し、更に lipase 作用と溶真菌作用とは全く異なる現象である事を述べている。又溶真菌作用に関して古橋(1965)は *Mycobacterium smegmatis* を材料とした電顕像で著明な菌体の ghost 化を証明し、cytoplasmic membrane の早期消失がうかがえる像の出現する事を報告している。以上の様な事実から著者らは蛔虫体腔液中には従来の報告にある lipase と異なる或る種の lipase の存在を想定させられる結果を得た。そこで本酵素作用に関しては特に基質特異性を重視する必要があると考え、初めに Tween 60, tributyrin などを用いたがいずれも陰性の成績であつた。更に activated triglyceride, triglyceride, lipoprotein を基質とした結果 activated triglyceride に特に著明な分解が見られた事は Fig. 4 に示す如くでこの事は lipoprotein lipase 様作用を想定させるのでこれについて各種の考察を加えて見た。lipoprotein lipase に於いては Korn(1962) Robinson(1963), 岡庭(1964), 末広(1964)の綜説があり多数の研究報告がなされている。元来このものは脂濁血漿の清澄因子として Hahn(1943)が犬血漿中に偶然に見出したものであり、現在では本態性高血圧症、肝硬変、ネフローゼ、動脈硬化症、糖尿病なども関係し非常に広範な研究がなされて来ている現況である。しかしその酵素的性質が耐熱性に乏しく、60°C 5分で失活し、0°C 以下の低温でも極めて容易に活性を失う等の性状を有し、その取扱いが非常に困難である点は現在でも克服されていない。この事は蛔虫体腔液の場合でも同様であり、60°C 5分で容易に活性を失ない、0°C 以下でも全く完全にその活性を失なう、次に基質特異性については先にのべた如くであるが、lipoprotein lipase の場合は勿論、activated triglyceride が最もその分解性が良いが、単味の triglyceride に対しても前者に対して 10分の1位の分解を示す事が報告されている(末広1964)。しかし著者らの蛔虫体腔液に関する実験では、至適 pH 7.8 で triglyceride に対する分解性を殆んど証明する事が出来なかつた。

この点高等動物の postheparin plasma, adipose tissue に見られるものより更に一層基質特異性に富むものではないかとも考えられる。次に本酵素作用の至適 pH であるが高等動物の場合はいずれも至適 pH は 8.5 と報告されているが、蛔虫体腔液では 7.8 であり、その至適 pH に相違を示した。次に各種阻害剤の蛔虫体腔液の lipolytic action に対する影響を高等動物の膵 lipase, lipoprotein lipase と比較してみた。先づ従来の報告に見られる哺乳動物の lipoprotein lipase の阻害剤に対する態度を Robinson(1963)の表から見ると、高濃度の heparin, 胆汁酸塩、高濃度の NaCl では阻害を示し、NaF では全く影響がないと報告している。又膵 lipase については NaF で阻害を示し、高濃度の NaCl では影響を示さず、胆汁酸塩では活性化されると報告されている。以上の様な事実と蛔虫体腔液の lipolytic action に対する上記阻害剤の示す態度とを比較してみると、これ等の諸点に関しては哺乳動物の lipoprotein lipase に対するそれと全く一致し、膵 lipase 様の作用ではない事がうかがわれる。次に著者らが用いた蛔虫体腔液の lipolytic action に対する人血清の及ぼす影響に関する諸点に於いては少なくとも温血動物の lipoprotein lipase のそれと異なり著明な阻害を示した。この点に関しては血清中のどの部分に阻害性があるのか現在の所全く不明であるが更に今後とも良く検討を加える予定である。以上述べた様に蛔虫体腔液中には高等動物の postheparin plasma や adipose tissue の中に見出されている lipoprotein lipase 様の或る種の lipase が存在する事は明白であり、今後更に各種の基質や、calcium phosphate gel に対する吸着性及び純化、精製、更には各種の阻害剤に対する態度についても究明を行ない、本作用の酵素的な性状を解明する予定である。

結 語

著者らは蛔虫体腔液中に溶真菌作用を有する酵素の存在することをすでに報告している。著者らは更に本溶真菌作用の主体が蛔虫体腔液中の lipolytic action であることを確認した。従来温血動物にのみ lipoprotein lipase の存在が証明されている。著者らは蛔虫体腔液に lipoprotein lipase に極めて近似した酵素的性状を示す lipolytic action を見出したのでここに報告する。

用いた酵素液は豚蛔虫(*Ascaris lumbricoides suum*) 体腔液を純水に対して 4°C で 1夜透析し、その時出来た沈澱を遠心して集め、このものを 0.4 Mol NaCl で

溶解し粗酵素液とした。基質は triglyceride, activated triglyceride, human plasma fraction III (β -lipoprotein) を用い、酵素分解により解離する glycerol を T.C.A. を用いて除蛋白したものについて、Korn, 坂上らの法を改変した方法で定量し、その酵素活性を求めた。この結果は triglyceride に対する分解は殆んど定量が不能な程に僅少であるのに対し、activated triglyceride, β -lipoprotein では良く分解された。至適 pH は 7.8 であり lipoprotein lipase のそれが pH 8.5 であるのに比し、低い値を示した。

又本作用は高濃度の heparin, NaCl, bile juice, 人血清などで阻害され、NaF の添加では対照との間に差を示さなかつた。

以上の様なことから著者らは本酵素作用の主体は温血動物の postheparin plasma や adipose tissue に見出された lipoprotein lipase に極めて良く似た酵素と考えられ、従つて lipoprotein lipase 様のものが蛔虫体腔液中に存在することを想定した。

引用文献

- 1) N. G. Anderson and B. Fawcett (1950) : An antichylomicronemic substrate produced by heparin injection : Pro. Soc. Exp. Med. (74) 768-771.
- 2) A. Cherkes and R. S. Gordon (1959) : The liberation of lipoprotein lipase by heparin from adipose tissue incubated in vitro. Journal of lipid research 1(1), 97-101.
- 3) M. I. Grossman, L. Palm, G. H. Becker and H. C. Moeller (1954) : Effect of lipemia and heparin on free fatty acid content of rat plasma. P.S.E.B.M. 87, 312-315.
- 4) M. I. Grossman (1954) : The quantitative measurement of heparin induced lipemia clearing activity of plasma, Journal laboratory clinical Medicine 43, 445-452.
- 5) 古橋貞二郎 (1964) : 蛔虫体腔液の各種真菌, 放線菌, 細菌に対する lytic action について(II), 寄生虫誌, 13(6).
- 6) 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(1), 143-148.
- 7) 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.
- 8) Hahn (1943) : 文献 10) による.
- 9) J.I. Kessler, M. Finkel, D.A. Dreiling and H. D. Janowitz (1963) : Lipoprotein lipase activity in the dog pancreas and pancreatic juice, P. S. E.B.M. 113, 127-132.
- 10) E. D. Korn (1959) : The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro : O. Glick (1959), Method of biochemical analysis Vol. 7, 145-192, Interscience Publishers, New York による.
- 11) E. D. Korn (1962) : Lipoprotein lipase (Clearing factor) : S.P. Colowick & N. O. Kaplan (1962) Method in enzymology, Vol. 5, 542-545, Academic Press. New York. による.
- 12) 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
- 13) T. Morisita, M. Kobayashi, T. Eguti and R. Sakata (1963) : Anti-Trichophyton activity of the Ascaris body fluid. Jap. J. Med. Mycol., 4(3), 168-173.
- 14) T. Morisita and M. Kobayashi (1963) : Ascaris body cavity fluid as a new anti-Trichophyton agent. Jap. Exp. Med., 33(2), 107-112.
- 15) E. A. Nikkila (1958) : Partial purification of clearing factor of postheparin human plasma. Biochimica et Biochysica Acta 27, 612-617.
- 16) 岡庭弘 (1964) : lipoprotein lipase, 赤堀四郎ら (1964) : 臨床酵素学, 483-488, 朝倉書店, 東京による.
- 17) D. S. Robinson and J. E. French (1956) : The heparin clearing reaction and fat transport. Quart. J. E. Exp. Physiol., 42, 151-163.
- 18) D. S. Robinson (1963) : R. Paoletti, D. Kritchevsky (1963), Advances in lipid research, 1, 133, Academic Press. New York による.
- 19) M. Suehiro (1960) : Studies on lipoprotein lipase, J.B.C. 47(6), 777-780.
- 20) 末広雅也 (1964) : リポプロテインリパーゼ. 醸酵協会誌, 22(9), 431-435.

ON THE LYPOLYTIC ACTION OF ASCARIS BODY FLUID I.

TETUO MORISITA, MIZUHO KOBAYASHI, HIROSHI SAKAKIBARA,
INAYOSHI YAMADA, MOTOSHI GOTO, TAKASHI EGUCHI,
YOSHIO HIRAOKA, TEIGIRO FURUHASHI & SEIYA MISHIMA
(*Department of Parasitology, Gifu Prefectural Medical School, Gifu*)

It has already been pointed out by the present authors that ascaris body fluid contains a kind of enzyme with fungilytic action. Although lipoprotein lipase has been detected in only warm-blooded animals, the present authors found in ascaris body fluid a substance with lipolytic action which closely resemble lipoprotein lipase. The present paper deals with the results of the experiments concerned.

The body fluid of *Ascaris lumbricoides suum* was dialysed for over night at 4°C against distilled water and the dialysed solution was centrifuged. The crude enzyme was thus prepared by dissolving the sediments into 0.4 M NaCl solution. The crude enzyme was examined for lipoproteolytic activity using triglyceride, activated triglyceride and human plasma fraction III (β -lipoprotein) as substrates according to modified Korn's and Sakagami's methods in which T. C. A. was added for deproteinisation. As a result of this it was proved that both activated triglyceride and β -lipoprotein were readily broken down, while triglyceride was so hardly broken down that the volume of glycerol liberated was impossible to calculate. The enzyme has an optimum pH of 7.8, but lipoprotein lipase pH of 8.5. The activity was not inhibited by the addition of NaF but of a high concentration of heparin, NaCl, bile juice and human serum.

It seems likely, on the basis of the present findings, that the substance with lipolytic action found in ascaris body fluid is closely resemble lipoprotein lipase which have detected from the post heparin plasma and the adipose tissue of warm-blooded animals. It is thus surmised that there exists a lipoprotein lipase-like enzyme in ascaris body fluid.