

## 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究 (2)

榊 原 弘

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1965年6月12日受領)

著者は第1報で、蛔虫体腔液の Visking Co. 製、セロハンチューブによる透析内液の沈澱分割中に溶真菌作用 (fungilytic action) を有する酵素が存在する事を報告した。さらにこの沈澱分割を生物学的な、*Penicillium* sp. E 株菌苔の溶真菌現象と、脂肪蛋白結合体である activated triglycerid を基質とした *in vitro* における lipolytic action の面より併せて追求した結果、加熱処理、至適 pH、稀釈による activity の変化等が fungilysis と lipolysis において平行した関係にあり、諸種の阻害剤として、human serum, heparin, NaCl, NaF, hog bile juice を添加した場合も殆ど同様な平行関係を認めその阻害性より、沈澱分割中に LPL 様酵素が存在し、これが activated triglyceride に対して lipolytic action を有し、fungilysis に深い関係があるのではないかと第1報に報告した。これをさらに確かめるため、阻害剤として、CaCl<sub>2</sub>, protamine, quinine, sodium taurocholate, adrenaline を第1報と同様な方法で添加を行い、その阻害性を fungilysis と lipolysis の両面よりしらべた結果共通の影響を受け、その受け方は lipoprotein lipase (以下 LPL と略す) (lipemia clearing factor) の阻害性と近似の成績を得た。さらに Nikkilä (1958) の方法による蛔虫体腔液沈澱分割の Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着により分離した partially purified fungilytic fraction (elute) に保存、加熱処理、稀釈、透析、trypsin 処理、至適 pH、種々阻害剤添加の実験を行つた結果 fungilysis と lipolysis に対する影響は殆ど同一であり、溶真菌作用と LPL 様酵素が直接、また直接でないにしろ間接的に深い関係がある結果を得たのでここに報告する。

### 実験方法の検討

1) 第1報において、検量線の検討を次の機会に報告すると述べたが、森下ら (1965) が蛔虫体腔液の lipolytic activity について (1) で先に報告した如く 1  $\mu$ Mol  $\sim$  0.05  $\mu$ Mol/ml の glycerol の各濃度が原点を通

る直線となつた。

2) Lipolytic action の実験に、基質として使用する蛋白脂肪結合体である activated triglyceride は、10% ediol 1容 + 7% albumin 4容を 37°C 下に1時間 incubate したものをを用いたが、森下ら (1965) の報告の如く Armour Co. 製 Bovine albumin powder (Fraction V from Bovine plasma) は、Lot No. により本酵素を阻害する物質が存在するものもあり、これは透析により除去出来るので、albumin 溶液を Visking tube にて、純水に対して 3 $\sim$ 4°C 下に24時間透析し、これを7%になる様、調整使用した。

3) 粗酵素液としての蛔虫体腔液沈澱分割は、蛔虫体腔液の lipolytic activity について (1) に報告されている如き関係があるので、透析前と等容になる様、沈澱分割を 0.1 M  $\sim$  0.4 Mol, NaCl 溶液で溶解使用した。Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着による partially purified fungilytic fraction (elute) は、後述実験成績 (2) の方法で分離したものを、その儘粗酵素液として使用した。沈澱分割の activated triglyceride に対する lipolytic action は incubation mixture の NaCl 濃度が 0.4 Mol の場合が、最も高いので1報と同様食塩濃度を調整したが、elute の activated triglyceride に対する lipolytic action は食塩濃度 0 $\sim$ 0.3 M 迄は殆んど同一、それ以上の濃度では activity は減少する為、elute に対する実験は、特別の場合を除き、incubation mixture の食塩濃度は 0 $\sim$ 0.3 Mol に調整した。

4) Buffer solution の lipolytic action に対する影響は、Table 1 の如く、蛔虫体腔液の sediment fraction, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着による partially purified fungilytic fraction とともに、Clark-Lubs buffer sol. が最も発色率が良く、次いで、NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl, Sørensen, Tris aminomethane-HCl buffer sol. の順であり、後者の場合発色率はかなり低下する為、Buffer sol. は第1報の如く、主として Clark-Lubs buffer sol. を使用した。但し、CaCl<sub>2</sub>

Table 1 Influence of buffer solution to lipolytic activity of sediment fraction and partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

Fraction	Activity to activated triglyceride. (O.D at 570 m $\mu$ )			
	Buffer solution at pH 7.8			
	Clark-Lubs	NH <sub>3</sub> -NH <sub>4</sub> Cl	Sörensen	Tris Amino-methane-HCl
Sediment	0.050	0.042	0.023	0.007
Partially purified fungilytic	0.081	0.066	0.035	0.000

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate	1 ml
Fraction (Enzyme)	1 ml
Buffer solution	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

添加実験においては、Clark-Lubs buffer sol. を使用すると白濁を生ずるので、この場合は NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer sol. を用いた。

5) Lipolytic action に対する 37°C 下における incubation の時間は、第1報においては1時間であったが、*Ascaris* 体腔液の lipolytic activity について(1)に報告の如く、2時間 incubate した場合が glycerol の解離が高いので、第2報の実験は総て2時間とした。

6) Glycerol の定量は第1報で報告した方法を、少し改め、Table 2 の如く行つた。4.6% thiourea の量は、Fig. 1, Fig. 2 の如く、沈澱分割および、partially purified fungilytic fraction, 何れに対しても、0.5 ml 添加よりも 1 ml 添加がより良好と考えられるので第2報の実験は1 ml とした。また、Fig. 1, Fig. 2 の如く in-

Table 2 Analytical method of enzymatic glycerol liberation by lipolytic action of sediment and partially purified fungilytic fractions of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination) (revised author's method)

Incubation mixture :	
Substrate	1 ml
Enzyme	1 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml
<b>total</b>	<b>3 ml</b>
incubated for 2 hrs. at 37°C shaking 80/min.	
added 5 ml of 10% trichloroacetic acid to 2ml of incubation mixture and mixed sufficiently.	
stood for 30 min. at room temperature.	
filtrated (by the Toyo filter paper No. 4)	
removed 2 ml from filtrate.	
added 0.5 ml of 0.05 Mol sodium periodate and mixed sufficiently.	
stood exactly for 5 min.	
added 0.5 ml of 10% sodium bisulfite.	
stood for 10 min.	
removed 1 ml from mixture.	
added 8 ml of chromotropic acid. (4 volume of 24 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 1 volume of 1% chromotropic acid.)	
placed in boiling water bath for 30 min.	
cooled in tap water.	
added 1 ml of 4.6% thiourea.	
read the optical density at 570 m $\mu$ .	

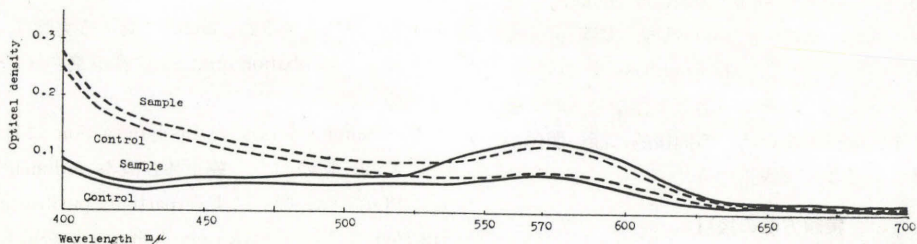


Fig. 1 Absorption spectra of lipolysed solution by sediment of *Ascaris* body fluid (colour reaction with chromotropic acid by author's method.)

--- 0.5 ml of 4.6% thiourea  
— 1.0 ml of 4.6% thiourea

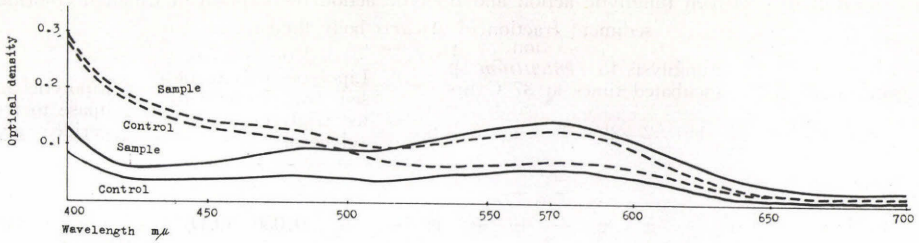


Fig. 2 Absorption spectra of lipotysed solution by partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (colour reaction with chromotropic acid by author's method.)

--- 0.5 ml of 4.6 % thiurea  
 — 1.0 ml of 4.6 % thiurea

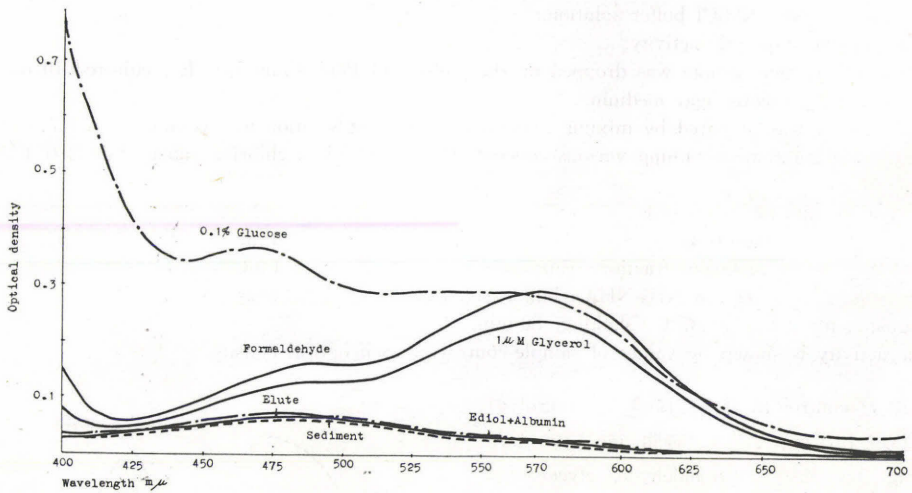


Fig. 3 Absorption spectra of glucose, formaldehyde, glycerol, sediment, elute and activated triglyceride. (colour reaction with chromotropic acid by author's method.)

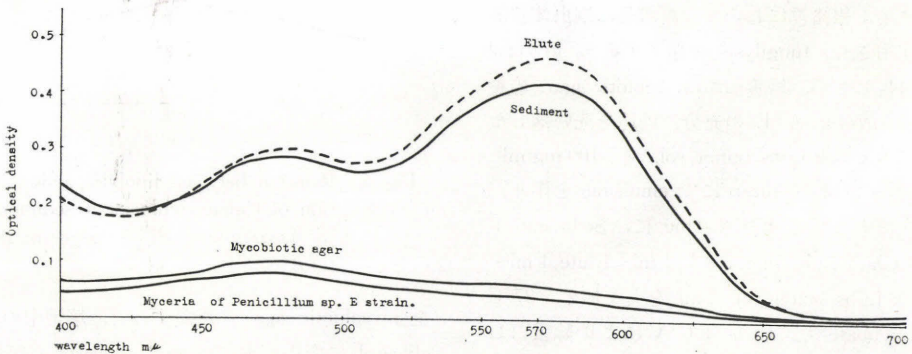


Fig. 4 Absorption spectra of fungilytic solution of *Penicillium myceria* by sediment and partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (colour reaction with chromotropic acid by author's method.)

Table 3 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of Calcium chloride to sediment fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of CaCl <sub>2</sub> (Mol)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity of sed. frac. to activa- ted triglyceride. (glycerol)	Lipolytic activity of lipase to free trigly- ceride. (glycerol)
	1	1 <sup>1</sup> (c	2	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub>	3	4	5	6		
CaCl <sub>2</sub> +Buffer sol. 0.4 Mol	-	-	-	-	-	-	-	-		
Sediment+Buffer sol.	-	-	±	±	+	++	++	+++	0.056 (O.D)	0.346 (O.D)
Sediment+CaCl <sub>2</sub> Buff. sol. 0.4 Mol	-	-	±	±	+	++	++	+++	0.076	0.344
0.2	-	-	±	+	+	++	++	+++	0.080	0.375
0.1	-	-	±	+	+	++	++	+++	0.087	0.386
0.05	-	-	+	+	++	++	++	+++	0.089	0.369
0.025	-	±	+	++	+++	+++	+++	0.094	0.339	
0.0125	-	-	±	+	++	+++	+++	0.089	0.381	
0.00625	-	-	±	±	+	++	++	0.087	0.355	

Buffer solution: NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of sediment solution to 1 volume of pH 7.8 NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer solution containing various concentrations of Calcium chloride and contained 0.4 Mol NaCl.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Sediment fraction (Enzyme)	1 ml
pH 7.8 NH <sub>3</sub> -NH <sub>4</sub> Cl buffer sol.+CaCl <sub>2</sub>	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

incubation しない control に対してに全く glycerol の spectra は認められなかつたが、2時間 incubate した sample は Fig. 3 の如く、formaldehyde, glycerol の spectra と同一であり、これは、sediment, elute 共に lipolytic action があり、これにより glycerol が解離されたものと考えられる。

7) 著者は第1報緒言において、真菌苔に蛔虫体腔液沈澱分割を作用させ、fungilytic を起させると、glycerol を生ずると報告したが、培養前の mycobiotic agar, 培養7日後の *Penicillium* sp. E の充分に培地を洗い落した菌苔に pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol. を 100 mg/ml の割に加え glass homogenizer にて emulsion を作り、別に培地を充分除去した菌苔 200 mg に、Sediment 1 ml+pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol. 1 ml, Elute 1 ml+pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol. 1 ml を夫々加え、37°C 下に2時間 incubate し、10% T.C.A により除蛋白したものに chromotropic acid による glycerol 発色を行い、spectra を求めると Fig. 4 の如くであり、fungilytic により glycerol の検出を認めた。尚 *Penicillium* sp. E

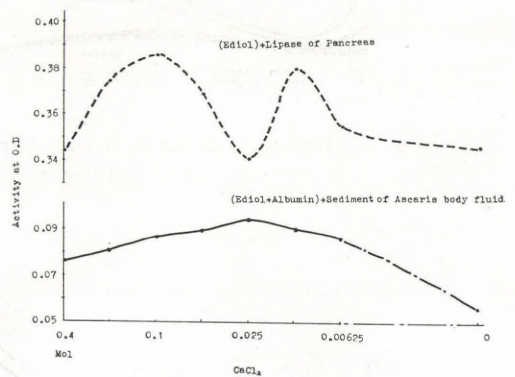


Fig. 5 Relation between lipolytic action and addition of Calcium chloride to sediment fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

を mycobiotic agar に培養すると、培地中の glucose が glycerol に変えられ培地中に glycerol が証明されるので、生菌苔より培地を充分に除去し、水洗した菌苔にて実験を行った。

Table 4 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of protamine sulfate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Protamine (mg/ml)	Fungilytic to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)										Lipolytic activity of sed. frac. to activated triglyceride (glycerol)	Lipolytic activity of lipase to free triglyceride (glycerol)
	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	20			
Protamine+ Buffer sol. 100 mg/4/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Sediment Buffer sol.	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.069 (O.D)	0.218 (O.D)
Sediment+Protamine+Buff sol. 100/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.004	0.217
100/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.004	0.218
100/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006	0.217
100/32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	0.018	0.218
100/64	-	-	-	-	-	-	±	+	+	++	0.036	0.218
100/128	-	-	-	-	±	+	+	+	+	++	0.058	0.219
100/256	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+++	0.062	0.218
100/512	-	-	-	±	+	+	++	++	++	+++	0.064	0.218
100/1,024	-	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.066	0.218
100/2,048	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.066	0.218

Protamine sulfate: Nutritional Biochemicals Corporation (Cleveland Ohio) Lot. 8992

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of sediment solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentrations of protamine sulfate and contained 0.4 Mol NaCl.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Sediment fraction (Enzyme)	2 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml

incubated for hrs. at 37°C (shaking 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

### 実験成績 (1)

第1報に引続き、蛔虫体腔液沈澱分割を粗酵素液と考え、阻害剤として CaCl<sub>2</sub>, protamine sulfate, quinine sulfate, sodium taurocholate, adrenaline 等を添加し、*Penicillium* sp. E 株菌苔に対する fungilytic と、activated triglyceride を基質とした lipolytic activity とへの影響をしらべた。incubate は実験方法の検討で述べた如く総て、37°C 下で、恒温振盪装置を用い 80/min. の割に振盪し、2時間 incubate を行い、glycerol の定量を行い、glycerol の解離の度合を lipolytic activity とした。

1) 種々濃度の calcium chloride 添加における、蛔虫体腔液沈澱分割の fungilytic action と lipolytic action に対する影響は次の様である。

緩衝液は Clark-Lubs buffer sol. では白濁する為、fungilytic action, lipolytic action 何れに対しても pH 7.8 NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer sol. を用いた。Table 3, Fig. 5の如く、fungilytic, lipolysis 共に CaCl<sub>2</sub> の添加により

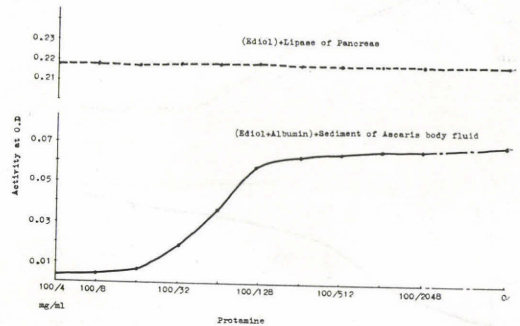


Fig. 6 Relation between lipolytic action and addition of protamine sulfate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

activate された。特に CaCl<sub>2</sub> 濃度 0.025 Mol においては activity は高く認められた。東京化成製 lipase の non activated triglyceride に対する lipolytic action の CaCl<sub>2</sub> の影響は全体に activate するが 0.025 Mol では逆に軽度の inhibit を認めた。

Table 5 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of quinine sulfate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Quinin (mg/ml)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)									Lipolytic activity of sed. fract. to activated triglycerid. (glycerol)	Lipolytic activity of lipase to free triglyceride. (glycerol)
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	3 1/2	5	7		
Quinine Buffer sol. 100 mg/4/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Sediment+Buffer sol.	-	-	-	±	+	++	++	+++	+++	0.073 (O.D)	0.219 (O.D)
Sediment+Quinine+Buff. sol. 100/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.007	0.249
100/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.013	0.271
100/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.021	0.269
100/32	-	-	-	-	-	-	-	±	±	0.033	0.260
100/64	-	-	-	-	-	±	+	+	++	0.047	0.252
100/128	-	-	-	-	-	±	+	++	+++	0.053	0.244
100/256	-	-	-	-	-	±	+	++	+++	0.059	0.230
100/512	-	-	-	-	+	+	++	+++	+++	0.063	0.218
100/1024	-	-	-	±	+	++	++	+++	+++	0.065	0.216

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of sediment solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentrations of Quinine sulfate and contained 0.4 Mol NaCl.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Sediment fraction (Enzyme)	2 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol.	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

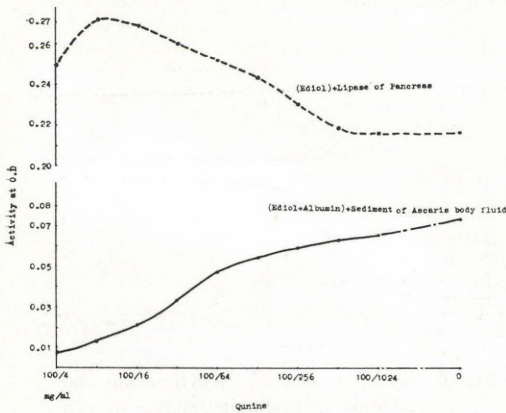


Fig. 7 Relation between lipolytic action and addition of quinine sulfate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

Protamine sulfate の LPL, clearing factor に対する阻害性については Korn (1955), Hollett & Meng (1956) 等によって報告されている. 著者は東京化成製 lipase と沈澱分割に protamine sulfate (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleaveland Ohio, Lot No. 8992) を種々の濃度にて添加し fungilytic と lipolysis をしらべた. Table 4, Fig. 6 の如くで, protamine は全体に何れに対しても inhibit の傾向を認め, 濃度の低下と共に inhibit の率も低下し, fungilytic においては, 100 mg/1,024/ml においては阻害性は殆ど消失する. lipolysis においては, 100 mg/128/ml で急激にその阻害性は減少し 100 mg/1024/ml で殆ど, 阻害性を消失するのは fungilytic, lipolysis 共に相似した傾向を認めた. 尚, 東京化成製, lipase の lipolytic activity に対する影響は 100mg/2,048/ml より 100 mg/4/ml の種々濃度において認められなかつた.

2) 種々濃度の Protamine sulfate 添加における, 蛔虫体腔液沈澱分割の fungilytic action lipolytic action とに対する影響は次の様である.

3) 種々濃度の quinine sulfate 添加における, 蛔虫体腔液沈澱分割の fungilytic action と lipolytic action に対する影響は次の様である,

Table 6 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of Sodium taurocholate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Sodium taurocholate, (Mol)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)							Lipolytic activity of sed. frac. to activated triglyceride (glycerol)	Lipolytic activity of lipase to free triglyceride (glycerol)
	1/6	1/2	1	1 1/2	2	3	4		
Sediment Buffer sol.	-	-	-	±	+	+	++	0.041 (O.D)	0.148 (O.D)
Sediment+Sodium taurocholate +Buff. sol. M/25	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.005	0.191
M/100	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.010	0.203
M/250	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.017	0.201
M/500	±	+	++	+++	+++	+++	+++	0.026	0.185
M/1,000	-	±	+	++	++	++	++	0.032	0.172
M/2,500	-	-	-	±	+	++	++	0.039	0.158
Sodium taurocholate+Buffer sol. M/25	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
M/100	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
M/250	+	++	+++	+++	+++	+++	+++		
M/500	±	+	++	+++	+++	+++	+++		
M/1,000	-	±	+	++	++	++	++		
M/2,500	-	-	-	±	+	++	++		

+ shows positive fungilytic activity.

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate	1 ml
Sediment fraction (Enzyme)	1 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol.	1 ml
Sodium taurocholate sol.	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values sample-control of each optical density.

Table 5, Fig. 7 の如くで、沈澱分割の fungilytic および lipolysis に対して、全体に inhibit の傾向を認め、100 mg/1024/ml では何れもその阻害性は殆ど消失した。東京化成製 lipase に対する影響は 100 mg/8/ml で最も activate され、濃度の低下と共に activate の傾向は減少し、100 mg/1024/ml では殆どその影響は消失する。その結果は、LPL, clearing factor の阻害性、Overbeek & Van der Vies (1955) の報告と同様な結果を得た。

4) 種々濃度の sodium taurocholate 添加における、蛔虫体腔液沈澱分割の fungilytic action と lipolytic action に対する影響は次の様である。

Table 6, Fig. 8 の如くで、fungilytic に対しては、sodium taurocholate の表面活性作用がかなり著明である為、その阻害性を云々出来ないが、lipolytic activity に対しては、添加により阻害性を認め、M/2,500 濃度においても多少の阻害傾向を示めた。尚東京化成製 lipase に対しては M/100~M/250 においてかなり activate し他の濃度においても全体的に、activate を認めた。

5) 種々濃度の adrenaline 添加における、蛔虫体腔液沈澱分割の fungilytic action と lipolytic action 対

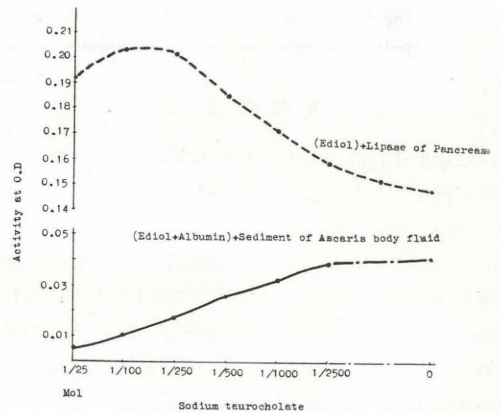


Fig. 8 Relation between lipolytic action and addition of sodium taurocholate to sediment fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

する影響は次の様である。

Table 7 の如く、1,000 倍から 128,000 迄倍数稀釈を行い添加、fungilytic と lipolysis とをしらべたが、何れも添加における activity の変化を認めなかつた。

Table 7 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of Adrenaline to sediment fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Adrenaline	Fungilytic to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)							Lipolytic activity of sed. frac. to activated triglyceride (glycerol)
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	5	
Adrenaline+Buffer sol. × 1,000	—	—	—	—	—	—	—	0.046 (O.D)
Sediment+Buffer sol.	—	—	±	+	+	++	+++	
Sediment+Adrenaline+Buff. sol. × 1,000	—	—	—	+	+	++	+++	0.045
× 2,000	—	—	—	+	+	++	+++	0.046
× 4,000	—	—	±	+	+	++	+++	0.045
× 8,000	—	—	±	+	+	++	+++	0.045
× 16,000	—	—	±	+	+	++	+++	0.045
× 32,000	—	—	±	+	+	++	+++	0.044
× 64,000	—	—	±	+	+	++	+++	0.045
× 128,000	—	—	±	+	+	++	+++	

DL-Adrenaline: Tokyo Kasei Co.

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of sediment solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentrations of Adrenaline and contained 0.4 Mol NaCl.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Sediment fraction (Enzyme)	2 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml
Adrenaline solution	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/m.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

### 実験成績 (2)

次に蛔虫体腔液の沈澱分割を Nikkilä 法によつて部分精製を行なつたものについての酵素学的性状を次の各方法によつて検討した。

#### a) 0.2 M Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着法

蛔虫体腔液沈澱分割中に LPL 様酵素があり、これが fungilysis と深い関係があるのを確認したので、著者は Nikkilä (1958) の Partial purification of clearing factor of postheparin human plasma. の方法に準じて、沈澱分割の 0.2 M Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着による partial purification を行い、これについて各種実験を行った。尚 Gel は、E.D. Korn (1959) が作製後 1~2 カ月位の物が最も良いと報告しているのでこれに準じ作製後 1~2 カ月後の Gel を使用した、吸着、分離方法は、Table 8 の如く行い Supernatant (1), (2), (3), (4) とし、(4) は蛔虫体腔液沈澱分割の partially purified された fungilytic fraction である。Gel 吸着後 Nikkilä に従い種

々の溶液で洗滌したが、0.2 Mol Sodium oxalate 洗滌においては、Supernatant (2) に fungilytic enzyme は移行し、Table 9 (A) の如く、fungilytic action および activated triglyceride に対する lipolytic action は高く認められた。蒸留水洗滌の場合は、(B) の如く沈澱分割に fungilytic, lipolytic action を認めたのに拘らず、Supernatant (1), (2), (3), (4) 何れにも action を認めなかつた。0.9% NaCl 溶液洗滌の場合は (C) の如く、Supernatant (4), elute に fungilytic action および activated triglyceride に対する lipolytic action を著明に認め、Supernatant (1), (2), (3) は 12 時間後も fungilysis を全く認めず、lipolysis も殆ど認めなかつた。尚 purification rate は Biuret 法、U.S. Army 法で定量を行つた結果 1/300~1/400 であつた。家兔の postheparin plasma (5 mg/kg の静注後、15 分に cardiac puncture にて採血) を同様 0.2 Mol Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着後、0.2 Mol Sodium oxalate, 0.9% NaCl 溶液で洗滌した場合 Table 10 の如く fungilytic action は認められなかつた



Table 8 Partial purification method to sediment fraction of *Ascaris* body fluid by 0.2 Mol  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel adsorption

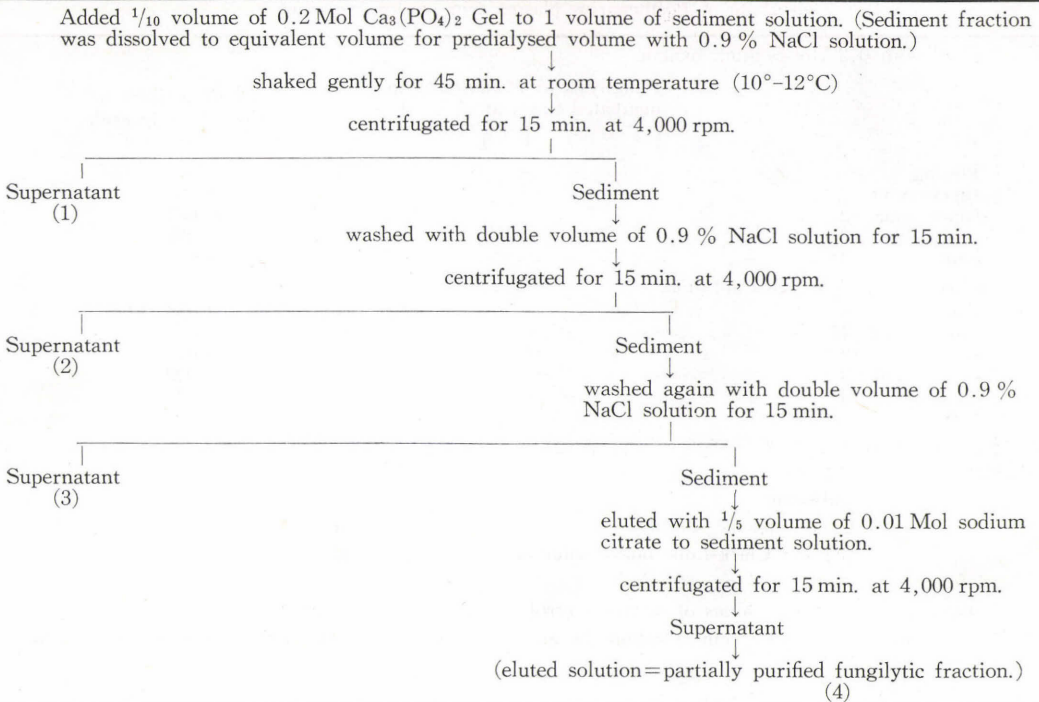


Table 9 Fungilytic and lipolytic actions of (1), (2), (3) and (4) on washing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel adsorbate of *Ascaris* body fluid with various solutions

(A) washed with 0.2 Mol Sodium oxalate.

	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)											Lipolytic activity to activated triglyceride. (glycerol)
	$\frac{1}{2}$	1	1½	2	2½	3	4	5	6	7	12	
sediment	—	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.044 (O.D)
supernatant (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.002
supernatant (2)	—	—	—	±	+	++	++	++	+++	+++	+++	0.026
supernatant (3)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.012
elute (4)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.008

(B) washed with distilled water.

sediment	—	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.044 (O.D)
supernatant (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.003
supernatant (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.004
supernatant (3)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.001
elute (4)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.009

(C) washed with 0.9 % NaCl solution.

sediment	—	±	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.044 (O.D)
supernatant (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.002
supernatant (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.003
supernatant (3)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.001
elute (4)	—	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	0.062

Sediment, supernatant (1), supernatant (2), supernatant (3), and elute (4) were prepared as Table 8.

+ shows positive fungilytic activity.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
crude enzyme solution	1 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values sample-control of each optical density.

Table 10 Fungilytic and lipolytic action of (1), (2), (3) and (4) on washing  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel adsorbate of Postheparins plasma with various solution

(A) washed with 0.2 Mol Sodium oxalate.		Fungilytic to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride. (glycerol)
		1	2	3	4	5	7	12	24	(O.D)
Plasma		—	—	—	—	—	—	—	—	0.054 (O.D)
supernatant (1)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.002
supernatant (2)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.032
supernatant (3)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.009
elute (4)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.026
(B) washed with 0.9 % NaCl solution.										
Plasma		—	—	—	—	—	—	—	—	0.054 (O.D)
supernatant (1)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.003
supernatant (2)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.016
supernatant (3)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.009
elute (4)		—	—	—	—	—	—	—	—	0.021

— shows negative fungilytic activity.

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate	1 ml
Crude enzyme solution	1 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml

incubated for hrs. at 37°C (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

Postheparin plasma was derived from a rabbit by an intravenous administration of 5 mg/kg of sodium heparin after 15 min.

が activated triglyceride に対する lipolytic action は sodium oxalate の場合は Supernatant (2) に, 0.9 % NaCl の場合は Supernatant (4) に比較的高く認められた。以上より, 本実験の partial purification に際しては Gel 吸着後, 0.9 % NaCl 溶液で2回洗滌し, 0.01 Mol sodium citrate で elute を施行した。尚 elute を 0.01 Mol sodium citrate にて5倍稀釈, 沈澱分割を0.9 % NaCl 溶液で25倍稀釈し, 210 m $\mu$ ~700 m $\mu$  の波長で測定した spectra は Fig. 9 の如くであった。

b) 0.2 Mol  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着法による Supernatant (1) の non activated triglyceride に対する lipolytic action

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着後0.9 % NaCl 溶液で2回洗滌, 0.01 Mol Sodium citrate で elute した場合, elute に fungilytic action, activated triglyceride に lipolytic action を認めたが, 他の Supernatant (1), (2), (3) には, それを認めなかつた。non activated triglyceride に対する lipolytic action は Supernatant (2), (3), (4) には殆ど無く, Supernatant (1) に認められたので, 実験を行ったところ, Table 11 の如き結果を得た。その optimum pH は 7.4 (Clark-Lubs buffer solution を使用), incubation 時間と lipolytic activity の関係は  $1/2$ , 1, 2 時間

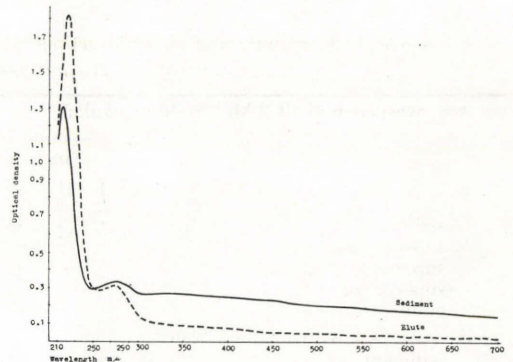


Fig. 9 Absorption spectra of sediment and partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid.

Sediment was diluted with 0.9 % NaCl solution to 25 times. Elute was diluted with 0.01 M sodium citrate to 5 times.

行つた結果殆ど直線的であつた。Trypsin また 56°C, 30 分間の加熱処理において活性は全く消失し, 非透析性であり, 種々阻害剤を添加した場合の lipolytic action の影響は human serum の影響を除き pancreatic lipase の影響と近似であり, これは lipase 様酵素と考えられる。1 報において沈澱分割中に lipoprotein lipase 様酵

Table 11 Lipolytic action of non absorbed fraction (Supernatant (1)) of *Ascaris* body fluid by 0.2 Mol  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel adsorption to non activated triglyceride. (glycerol determination)

1. Optimum pH.

pH	5.7	6.5	6.9	7.4	7.8	8.6	9.4
Activity (O.D)	0.018	0.021	0.026	0.032	0.028	0.019	0.011

2. Relation between incubation times and lipolytic activity.

Times (hrs.)	$\frac{1}{2}$	1	2
Activity (O.D)	0.007	0.026	0.066

3. Inactivation by Trypsin.

Trypsin (mg/ml)	0	10 mg/ml
Activity (O.D)	0.033	0

Supernatant (1)+Trypsin was put for 30 min. at room temperature 15°C)

4. Inactivation by Heating at 56°C.

Heating Times (min.)	0	5	15	30
Activity (O.D)	0.034	0.016	0.006	0

5. Effect of Dialysis.

Dialysis	no dialysed	dialysed
Activity (O.D)	0.017	0.015

dialysed by Visking tube against distilled water for 24 hrs. at 3°~4°C in a low temperature room.

6. Effect of various inhibitors.

Inhibitors	Serum (×12)	Heparin (10mg/ml)	NaCl (2 Mol)	NaF (1 Mol)	Protamine (100 mg/8/ml)	Quinine (100 mg/8/ml)
% of inhibition.	41%	0	0	85%	0	-29%

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

Incubation mixture to lipolytic action:

Substrate (1 volume of 10 % Ediol+4 volume of Buffer sol.) 1 ml

Supernatant (1) (Enzyme) 1 ml

Buffer solution 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

素と lipase 様酵素を認めたと報告したが,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着により, Supernatant (1) に lipase 様酵素が分離出来たと考えられる.

c) Partially purified fungilytic fraction (elute) の fungilysis

*Penicillium* sp. E 株を mycobiotic agar に7日間培養し, その菌苔に対して elute 1容+pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution 1容を混じて 37°C 下に2時間 incubate

を行い fungilysis を起させ, それを glass homogenizer にて emulsion とし, 10 % T. C. A 除蛋白後, chromotropic acid にて発色させた spectra は Fig. 4 の如くであり, fungilysis によつて, 沈澱分割を作用させた時と同様, 菌苔より glycerol の検出を認めた.

d) elute に対する緩衝液, 基質の検討

緩衝液として pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol.,  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ , Sørensen, Tris aminomethane-HCl buffer solu-

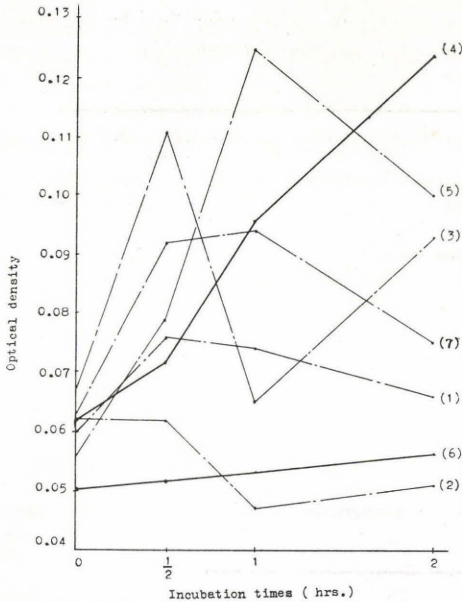


Fig. 10 Lipolytic action of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid against various substrates (glycerol determination)

- |   |     |
|---|-----|
| (1) human plasma  | 1   |
| 0.85% NaCl sol.   | 1   |
| buffer sol.   | 1   |
| 10% Ediol   | 0.1 |
| (2) 10% Ediol.  | 1   |
| buffer sol.   | 4   |
| (3) 10% Bovine albumin                                      | 8   |
| human serum   | 1   |
| 10% Ediol   | 1   |
| (4) 7% Bovine albumin                                       | 4   |
| 10% Ediol   | 1   |
| (5) Chylomicron   |     |
| (6) <i>Ascaris</i> body fluid (heated for 30 min. at 56°C.) | 4   |
| 10% Ediol   | 1   |
| (7) 1% human $\beta$ -Lipoprotein (N.B.C.)                  |     |

Buffer solution was used pH 7.8

Clark-Lubs buffer solution-

Incubation mixture:

Substrate	1 ml
Elute (Enzyme)	1 ml
Buffer solution	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

nomethane-HCl buffer solution の順であり、蛔虫体腔液沈澱分割のそれと同じ傾向を示したので elute に対する実験においても主として Clark-Lubs buffer sol. を使用した。elute を酵素液として、Fig. 10 の如く Cherkes & Gordon, Grossman, Korn, Suehiro 等の方法に準じ、10% Ediol を triglyceride として、第1報の如く、37°C 下に1時間 incubate して、脂肪蛋白結合体を作り基質とした。chylomicron は、E.D. Korn に従い犬にバターを食べさせ1時間30分後採血、その plasma より作製した。蛔虫体腔液+10% Ediol は、体腔液を 56°C 下に30分間加熱処理を行い、酵素活性を inactivation し、Visking tube を用い、純水に対し、3~4°C 下に24時間透析し、たもの4容、10% Ediol 1容を混合し、37°C に1時間 incubate して基質とした。基質1容、Elute 1容、pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol. 1容を混じて incubation mixture とし、37°C 下に 1/2, 1, 2時間 incubate し、glycerol の解離より lipolytic action の傾向を観察した。従来著者が使用してきた7% Albumin 4容+10% Ediol 1容の activated triglyceride は、殆ど直線的な解離傾向を示めし、2時間値ではかなり高い glycerol の解離を認めた。蛔虫体腔液4容+10% Ediol 1容も直線的傾向を認めたが glycerol の解離は activated triglyceride に比して少であった。従つて elute の lipolytic action に対する基質も沈澱分割の時と同様7% Albumin 4容+10% Ediol 1容の activated triglyceride を使用した。

e) elute の fungilytic action と activated triglyceride に対する lipolytic action の至適 pH.

Clark-Lubs buffersol. を用い、incubation mixture の pH を 4.3, 5.2, 6.1, 7.0, 7.8, 8.8, 9.6 の7種にて fungilytic action と lipolytic action をしらべた結果は Table 12, Fig. 11 の如くであり、培養後10日の *Penicillium* sp. E 株菌苔に対して pH 6.1~pH 7.8 に、特に pH 7.8 に著明な fungilytic action を認め、pH 5.2 以下、pH 9.6 では、10日間の観察においても fungilytic action は全く認められなかつた。activated triglyceride に対する lipolytic action も pH 7.8 にて最大の値を示めし、これは沈澱分割の fungilytic action と activated triglyceride に対する lipolytic action と同様の傾向を認めた。

f) Elute の倍数稀釈による fungilytic action と lipolytic action の影響

elute の倍数稀釈を行い、128倍稀釈迄、fungilysis をしらべ、activated triglyceride に対しては16倍稀釈迄

tion を用いた比較検討した結果 Table 1 の如く、Clark-Lubs buffer sol. を使用した場合 glycerol の発色は最も良好であり、次いで NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl, Sørensen, Tris ami-

Table 12 Effects of various pH of fungilytic action and lipolytic action of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

pH of incubation mixture.	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride. (glycerol) (O.D)
	1	1½	2	3	4	5	8	10	
4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	0.019
5.2	-	-	-	-	-	-	-	-	0.023
6.1	-	-	-	+	+	+	+	+	0.030
7.0	±	+	+	+	+	+	+	+	0.038
7.8	+	+	+	+	+	+	+	+	0.049
8.8	-	-	-	-	-	-	-	±	0.031
9.6	-	-	-	-	-	-	-	-	0.018

+ shows positive fungilytic activity.

*Penicillium* sp. (E) cultured 10 days at 30°C.

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate 1 ml  
 Elute (Enzyme) 1 ml  
 Various pH solution (Clark-Lubs buffer sol.) 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

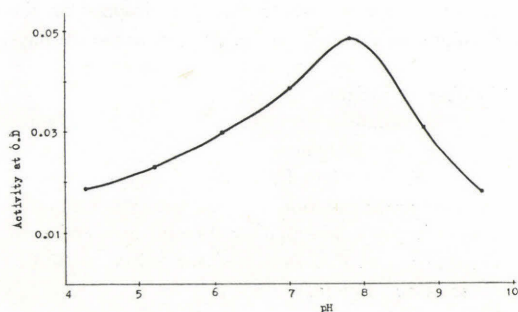


Fig. 11 Optimum pH of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid against activated triglyceride. (glycerol determination)

lipolytic action をしらべた。結果は Table 13, Fig. 12 の如くであり、4 倍稀釈迄は fungilytic action, lipolytic action はかなり存在するが、以上の稀釈では何れも、activity は激減する。

g) Elute の加熱処理の影響

elute を振盪攪拌しつつ 56°C 下に加熱、5 分、15 分 30 分の処理を行い、*Penicillium* sp. E 株菌苔に対する fungilysis と、activated triglyceride に対して lipolytic action をしらべた結果は、Table 14 の如くであり、加

Table 13 Relation between fungilytic action and lipolytic action by various dilution rates of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Dilution rate of Elute	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)										Lipolytic activity to activated triglyceride. (glycerol) (O.D)
	1	1½	2	2½	3	4	5	6	24		
1 : 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0.069
1 : 2	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	0.065
1 : 4	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	0.046
1 : 8	-	-	-	-	-	±	±	+	+	+	0.002
1 : 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.001
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 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of elute dilution to 2 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate 1 ml  
 Diluted solution of elute (Enzyme) 1 ml  
 pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

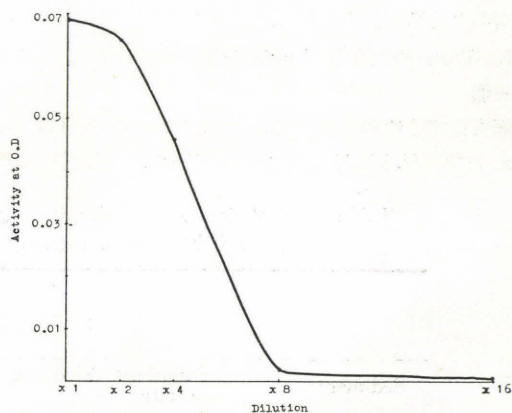


Fig. 12 Relation between lipolytic action and dilution of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid (glycerol determination)

Table 14 Relation between fungilytic action and lipolytic action by heat treatment of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)							% of lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)
	2	2½	3	4	5	6	24	
Elute none heat treatment for 5 min. at 56°C	-	±	+	++	++	+++	+++	100%
for 15 min. at 56°C	-	-	-	-	±	+	++	40
for 30 min. at 56°C	-	-	-	-	-	-	±	22
	-	-	-	-	-	-	-	0

Heat treatment was done shaking at 56°C.  
+ shows positive fungilytic activity.

熱処理 30 分間で fungilytic および lipolysis 共に全く認められなかったが、5 分間の加熱処理では activity は何れも存在した。

h) Elute の trypsin 処理の影響

Trypsin を 100 mg/4ml ~ 100 mg/65,536/ml 迄倍數稀釈を行い、各種濃度の trypsin (Merck Co.) と elute を室温 (15°C) 下に 30 分間放置後 *Penicillium* sp. E 株菌苔に対して drop test および activated triglyceride に対して lipolytic action をしらべた結果は Table 15 の如くであった。何れも 100 mg/16,384/ml 迄の濃度では著明な失活が認められた。

i) Elute の保存と fungilytic action, lipolytic action の影響

蛔虫体腔液沈澱分割, elute および elute を Visking tube により純水に対し, 3°~4°C 下に 24 時間透析した

Table 15 Relation of fungilytic action and lipolytic action by Trypsin treatment against elute of sediment of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Trypsin. (mg/ml)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)
	1	2	3	4	5	6	12	24	
Trypsin + Buffer sol. 100mg/4ml	-	-	-	-	-	-	-	-	(O.D)
Elute Buffer sol.	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.058
Elute + Trypsin + Buff. sol.	-	+	-	-	-	-	-	-	0
100/4	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/8	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/16	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/32	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/64	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/128	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/256	-	-	-	-	-	-	-	-	0
100/512	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002
100/1024	-	-	-	-	-	-	-	-	0.002
100/2048	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005
100/4096	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006
100/8192	-	-	-	-	-	-	-	-	0.010
100/16384	-	-	-	-	-	-	±	+	0.035
100/32768	-	-	±	+	+	+	++	+++	0.050
100/65536	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.056

Trypsin: E. Merck, Darmstadt Co.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Elute (Enzyme)	1 ml
pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution	1 ml
Trypsin solution	1 ml

Elute + Trypsin was put for 30 min. at room temperature (15°C). incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

Table 16 Relation between fungilytic action and lipolytic action to store Sediment of *Ascaris* body fluid, partially purified fraction and its dialysed

	Fungilytic activity (%)	Lipolytic activity (%)	Stored days						
			1	4	7	10	14	17	21
Sediment	+++	++	+	±	-	-	-	0	
Elute	+++	++	+	+	±	-	-	8%	
Dialysed elute	+++	++	++	++	+	±	±	19%	

Each crude enzyme was stored at 3°~4°C in a low temperature room.

+ shows positive fungilytic activity.

Dialysed elute was done with distilled water by Visking tube for 24 hrs. at 3°~4°C.

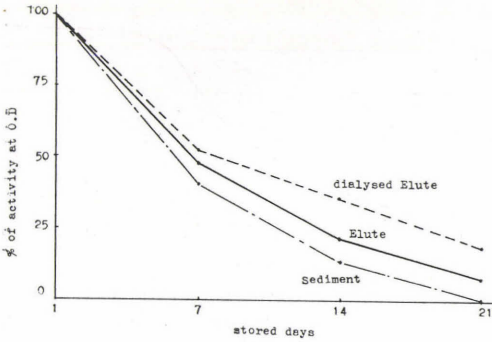


Fig. 13 Relation between lipolytic action and store of Sediment of *Ascaris* body fluid, partially purified fungilytic fraction and its dialysed. (glycerol determination)

ものを、夫々 3°~4°C の低温室に保存し fungilysis と lipolysis をしらべた結果は Table 16, Fig. 13 の如くであつた。尚、elute を透析したものは、fungilysis, lipolysis は共に存在し、非透析性を認めた。保存に対して沈澱分割は 14 日後で fungilytic action は全く消失し lipolytic action はかなりの減少を認め、保存における activity の減少は沈澱分割において早く、elute が次ぎそれを透析したものは 14 日後かなりの fungilysis, lipolysis を認めた。尚著者の実験で、沈澱分割においては、保存と共にその fungilytic action は減少するが lipolytic action において逆に増加する沈澱分割群のある事を知つた。

j) 諸種阻害剤の elute に対する影響

0.2 Mol Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着により elute した partially purified fungilytic fraction に、沈澱分割と同様種々阻害剤 human serum, heparin sodium, sodium chloride, calcium chloride, sodium fluoride, protamine sulfate, quinine sulfate, sodium taurocholate, adrenaline 等を添加して、培養 10 日前後の *Penicillium* sp. E strain の myceria に対する fungilysis と activated triglyceride に対する, lipolysis を追求し、次の如き結果を得た。

i) Human serum 添加における蛔虫体腔液 elute の fungilytic action と lipolytic action に対する影響

森下ら (1964) は human serum が蛔虫体腔液の fungilytic action を inhibit すると報告した。それに準じ第 1 報と同様、elute に空腹時採血し 56°C, 30 分間加熱非働化した human serum を倍数稀釈し、添加し *Peni-*

Table 17 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of human serum to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Dilution of human serum	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)										Lipolytic activity to activated triglyceride. (glyceride)
	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	6	12	24		
Serum+Buffer sol. 1:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(O.D)
Elute+Buffer sol. 1:1	-	±	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	0.049
Elute+Serum 1:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.001
1:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.003
1:4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.005
1:8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.016
1:16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	0.035
1:32	-	-	-	-	-	±	±	±	±	++	0.041
1:64	-	-	-	-	±	+	+	++	+++	+++	0.046
1:128	-	-	±	+	+	++	++	+++	+++	+++	0.048
1:256	-	±	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	0.049
1:512	-	±	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of elute solution to 1 volume of pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various dilution serum.

Human serum was derived intravenously from hunger human, heated for 30 min. at 56°C and dialysed with Visking tube against distilled water for 24 hrs. at 3°~4°C.

Incubation mixture to lipolysis:

- Substrate 1 ml
- Elute (Enzyme) 1 ml
- pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution 1 ml
- Serum of various dilutions 1 ml

incubated for 24 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

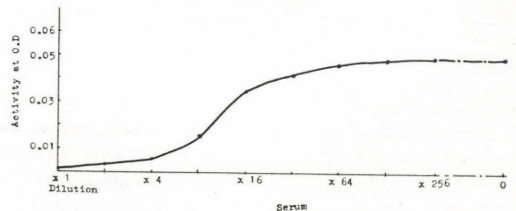


Fig. 14 Relation between lipolytic action and addition of human Serum to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

Table 18 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of Heparin sodium to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Heparin (mg/ml)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride (Glycerol)
	2	2 1/2	3	4	5	6	24	(O.D)	
Heparin+Buffer sol. 10/4mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	(O.D)
Elute+Buffer sol.	±	+	+	++	+++	+++	+++	0.042	
Elute+Heparin + Buff. sol.									
10/4mg/ml	-	-	-	-	-	-	±	0.002	
10/8	-	-	-	-	-	-	±	0.003	
10/16	-	-	-	-	-	-	+	0.006	
10/32	-	-	-	-	-	-	+	0.010	
10/64	-	-	-	-	±	+	++	0.013	
10/128	-	-	-	±	+	+	++	0.023	
10/256	-	-	±	+	++	++	+++	0.037	
10/512	-	±	+	++	+++	+++	+++	0.041	
10/1,024	-	±	+	++	+++	+++	+++	0.041	
10/2,048	±	+	+	++	+++	+++	+++		

Buffer solution : pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.  
+ shows positive fungilytic activity.

*Penicillium* sp. (E) cultured 10 days at 30°C.

Incubation mixture to lipolysis :

- Substrate 1 ml
- Elute (Enzyme) 1 ml
- Buffer solution 1 ml
- Heparin sodium solution 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

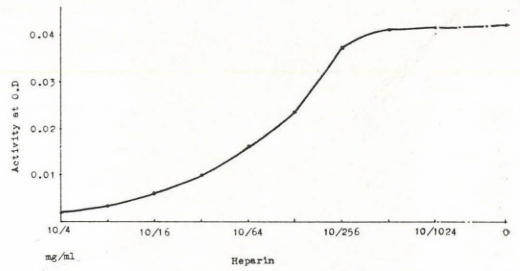


Fig. 15 Relation between lipolytic action and addition of Heparin sodium to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

*cillium* sp. E 株菌苔 に対する fungilytic と activated triglyceride に対する lipolysis をしらべた結果は Table 17, Fig. 14 の如くで, serum 16 倍稀釈迄は fungilytic, lipolytic action とともに著明な inhibit を認め, 128~256 倍以上の稀釈では何れに対しても殆ど inhibit の傾向を認めず, 蛔虫体腔液沈澱分割に対する人血清添加と同様の傾向を認めた.

ii) 種々濃度の heparin 添加における, elute の fungilytic action, lipolytic action に対する影響

第 1 報の沈澱分割に対する heparin sodium 添加実験に順じて, heparin を倍数稀釈し elute に添加, 培養 10 日後の *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する drop test と

Table 19 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of sodium chloride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid.

Final concentration of NaCl (Mol)	Fungilytic action to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)										Lipolytic activity to activated triglycerid (glycerol)	Lipolytic activity of lipase to free triglyceride (glycerol)
	1/2	1	1 1/2	2	2 1/2	3	4	5	7			
Elute+Buffer sol.	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.053 (O.D)	0.141 (O.D)	
Elute+NaCl+Buffer sol.												
0.1	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.052	0.142	
0.2	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.052	0.143	
0.3	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	0.051	0.142	
0.4	-	-	±	+	++	+++	+++	+++	+++	0.045	0.142	
0.5	-	-	-	-	±	+	++	+++	+++	0.034	0.141	
0.6	-	-	-	-	±	+	++	+++	+++	0.022	0.142	
0.7	-	-	-	-	-	±	+	++	+++	0.019	0.141	
0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	±	0.018	0.141	
0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.016	0.142	
1.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.016	0.142	

+ shows positive fungilytic activity.

*Penicillium* sp. (E) cultured 10 days at 30°C.

Incubation mixture to lipolysis :

- Substrate 1 ml
- Elute (Enzyme) 1 ml
- pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentrations of NaCl. 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)



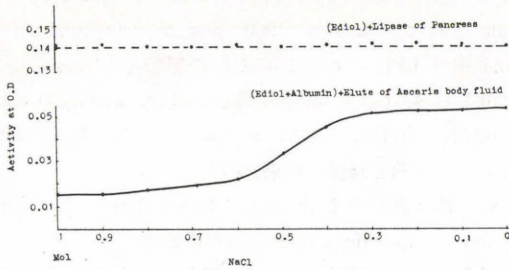


Fig. 16 Relation between lipolytic action and addition of Sodium chloride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

activated triglyceride に対する lipolytic action の影響は Table 18, Fig. 15 の如くであり, 10/4mg/ml より, 10/64 mg/ml~10 mg/128/ml 迄は fungilytic, lipolytic action 何れにもかなり inhibit がみられ, それ以上の稀釈ではその影響は殆ど認められなかった。

iii) 種々濃度の NaCl 添加における, elute の fungilytic action, lipolytic action に対する影響

培養後, 10日の *Penicillium* sp. E 株菌苔と, activated triglyceride に対する lipolytic action を, 種々濃度の食塩を elute に添加, incubation mixture の食塩濃度を 0~1 M に調整, しらべた結果は Table 19, Fig. 16 の如くであり, 0~0.3 Mol 濃度迄は fungilysis, lipolysis に対する影響を認めず, 以上の濃度では何れに対しても inhibit の傾向を認め, 両者に関係を認めた。尚蛔虫体腔液沈澱分割に NaCl を添加した場合, 0.4 Mol 濃度において fungilysis, lipolysis ともに activate を認め, 以上および以下の濃度において activity が減少するのと異なつた傾向を認めた。Suehiro (1960) は Studies of lipoprotein lipase において, postheparin plasma 中の LPL に食塩添加を行い glycerol 定量を行い, NaCl 0 Mol の場合 LPL の activity は 0.043, 0.348 Mol→0.060, 0.696 Mol→0 と報告しており, E.D. Korn (1955) は, NaCl 濃度 0.35 Mol 以上で inhibit すると報告している。食塩濃度と inhibit の関係は報告者により多少の差を認めるが, 著者の実験においては, 沈澱分割と, その partial purification を行つたものとに相違を認めたが何れにせよ高濃度添加にては inhibit の傾向を示した。他方東京化成 lipase に対する食塩添加の影響は Fig. 16 の如く認められなかった。

Table 20 Relation between fungilytic action and lipolytic action at addition of Calcium chloride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of CaCl <sub>2</sub> (Mol)	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)	
	1	2	3	4	5	6	7	8		
NH <sub>3</sub> -NH <sub>4</sub> Cl										
Buffer solution	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(O.D)
Elute+Buffer sol.	-	-	±	+	+	+	+	+	+	0.034
Elute+CaCl <sub>2</sub>										
0.4 Mol	-	-	±	+	+	+	+	+	+	0.037
+Buff. sol.										
0.2	-	-	±	+	+	+	+	+	+	0.041
0.1	-	-	±	+	+	+	+	+	+	0.046
0.05	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.052
0.025	-	±	+	+	+	+	+	+	+	0.056
0.0125	±	+	+	+	+	+	+	+	+	0.061
0.00625	-	±	+	+	+	+	+	+	+	0.057
0.003125	-	-	+	+	+	+	+	+	+	0.048

Buffer solution: NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 30°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing volume of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid to pH 7.8 NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>-Cl buffer sol. containing various concentrations of Calcium chloride.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate 1 ml

Elute (Enzyme) 1 ml

pH 7.8 NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl buffer solution

+ various concentrations of CaCl<sub>2</sub> 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values of sample-control of each optical density.

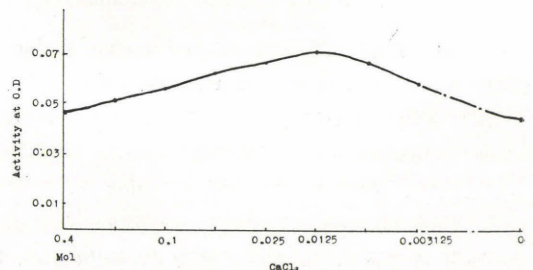


Fig. 17 Relation between lipolytic action and addition of Calcium chloride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

Table 21 Relation between fungilytic action and lipolytic action at addition of Sodium fluoride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of NaF (Mol)	Fungilytic activity to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)					Lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)
	2	2 1/2	3	4	5	
NaF+Buffer sol. 1 Mol	—	—	—	—	—	(O.D)
Elute+Buffer sol.	±	+	+	++	+++	0.048
Elute+NaF+Buff. sol. 1 Mol	±	+	+	++	+++	0.047
1/2	±	+	+	++	+++	0.047
1/4	±	+	+	++	+++	0.048
1/8	±	+	+	++	+++	0.048
1/16	±	+	+	++	+++	0.047
1/32	±	+	+	++	+++	0.048
1/64	±	+	+	++	+++	0.048
1/128	±	+	+	++	+++	0.048

Buffer solution : pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

*Penicillium* sp. (E) cultured 10 days at 30°C.

Incubation mixture to lipolysis :

Substrate 1 ml  
 Elute (Enzyme) 1 ml  
 NaF+Buffer solution 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

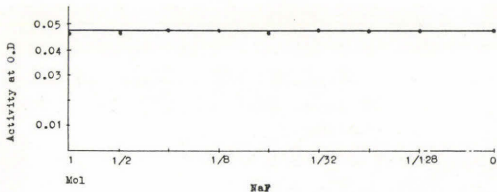


Fig. 18 Relation between lipolytic action and addition of Sodium fluoride to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

iv) 種々濃度の CaCl<sub>2</sub> 添加における elute の fungilytic action と lipolytic action に対する影響

CaCl<sub>2</sub> 溶液を倍数稀釈し elute に添加その fungilytic action と lipolytic action の影響をしらべた。尚緩衝液は前述の如く pH 7.8, NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub> Cl buffer sol を使用した。Table 20, Fig. 17 の如く incubation mixture の CaCl<sub>2</sub> 濃度が 0.0125 Mol の場合 *Penicillium* sp. E 株菌苔に対する fungilytic action および, activated triglyceride に対する lipolytic action は最も activate された。蛔虫体腔液沈澱分割の場合 0.025 Mol 濃度において何れに対しても最も activate され, elute の場合と

多少の位相を認めたと、何れも CaCl<sub>2</sub> 添加により activate された。Suehiro (1960) post heparin human plasma 中の LPL に対する CaCl<sub>2</sub> の影響を glycerol 定量よりしらべ, CaCl<sub>2</sub> 濃度 0 Mol の場合, activity 0.050, 0.02 Mol→0.135, 0.2 M→0 と報告したが、著者の実験においても殆ど同様の結果を得た。

v) 種々濃度の NaF 添加における elute の fungilytic action と lipolytic action に対する影響

NaF を倍数稀釈し, elute に添加, incubation mixture の NaF 濃度を 0 Mol~1 Mol の間において, fungilytic action と activated triglyceride に対する lipolytic action の影響をしらべた結果は Table 21, Fig. 18 の如く、此の範囲の濃度においては、何れに対しても影響は認められず、蛔虫体腔液の沈澱分割のそれと同様傾向を示した。

vi) 種々濃度の protamine, quinine 添加における elute の fungilytic action と lipolytic action に対する影響。

Protamine sulfate および quinine sulfate の倍数稀釈溶液を elute に添加しその fungilytic action と activated triglyceride に対する lipolytic action の影響は Table 22, Fig. 19 に示す如く、protamine, quinine, 100/64 mg/ml, 100/32 mg/ml 迄は fungilytic, lipolytic action 何れもかなり inhibit の傾向を認めたと、100 mg/256/ml 以上の稀釈濃度において inhibit の傾向は減少し、蛔虫体腔液沈澱分割の影響と近い傾向を認めた。

vii) 種々濃度の sodium taurocholate 添加における elute の lipolytic action に対する影響。

実験成績 (2), (4) で述べた如く, sodium taurocholate は表面活性作用による fungilytic action を認める為, elute に添加した場合の fungilytic action の影響は判定し難いので, activated triglyceride に対する lipolytic action の傾向をしらべた。結果は Fig. 20 の如くであり, incubation mixture の sodium taurocholate 濃度 1/1,000 Mol 迄かなりの inhibit が認められ, 1/2,500 Mol では inhibit の傾向はかなり減少した。これは蛔虫体腔液沈澱分割の影響と同一の傾向を示した。

viii) 種々濃度の adrenaline 添加における elute の fungilytic action と lipolytic action に対する影響

elute に adrenaline 溶液倍数稀釈し添加, incubation mixture として, 1,000 倍より 128,000 倍迄の濃度で fungilytic action と, activated triglyceride に対する lipolytic action の影響をしらべたが, Table 23 の如く

Table 22 Relation between fungilytic action and lipolytic action at addition of Protamine sulfate and Quinin sulfate to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Protamine (mg/ml)	Fungilysis to <i>Penicillium</i> sp. incubated times at 37°C (hrs.)								Lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)	
	1½	2	2½	3	4	5	6	24		
Protamine+Buffer sol. 100/4mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-	0.060 (O.D)	
Elute+Buffer sol.	±	+	††	††	††	††	††	††		
Elute+Protamine+Buff. sol. 100/4	-	-	-	-	-	-	-	0		
100/8	-	-	-	-	-	-	-	0.001		
100/16	-	-	-	-	-	±	±	0.003		
100/32	-	-	-	-	±	+	††	0.007		
100/64	-	-	-	-	+	+	††	0.011		
100/128	-	-	±	±	+	+	††	0.042		
100/256	-	-	±	+	+	††	††	0.054		
100/512	-	±	+	+	††	††	††	0.057		
100/1,024	±	+	††	††	††	††	††	0.058		
Final concentration of Quinin (mg/ml)										
Quinin+Buffer sol. 100/4 mg/ml	-	-	-	-	-	-	-	-		0.060 (O.D)
Elute+Buffer sol.	±	+	+	††	††	††	††	††		
Elute+Quinin+Buff. sol. 100/4	-	-	-	-	-	-	-	0		
100/8	-	-	-	-	-	-	-	0.004		
100/16	-	-	-	-	-	-	±	0.013		
100/32	-	-	-	-	-	±	+	0.022		
100/64	-	-	-	-	+	††	††	0.041		
100/128	-	-	-	-	+	††	††	0.049		
100/256	-	-	-	+	††	††	††	0.053		
100/312	-	-	±	††	††	††	††	0.057		
100/1,024	±	±	+	††	††	††	††	0.058		

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.

+ shows positive fungilytic activity.

About 0.1 ml of each sample was dropped on the colony of *Penicillium* sp. (E), cultured 10 days at 37°C on the mycobiotic agar medium.

Dropped solution was prepared by mixing 1 volume of partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid to pH 7.8 Clark-Lubs buffer sol. containing various concentrations of Protamine and Quinine.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate 1 ml

Elute (Enzyme) 1 ml

pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution containing various concentrations of Protamine and Quinine. 1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

Lipolytic activity is shown by values sample-control of each optical density.

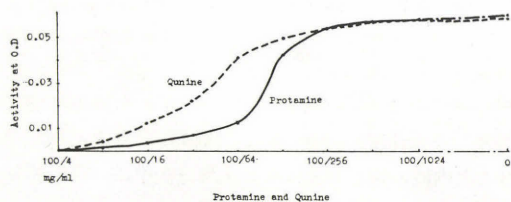


Fig. 19 Relation between lipolytic action and addition of Protamine sulfate and Quinine sulfate to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

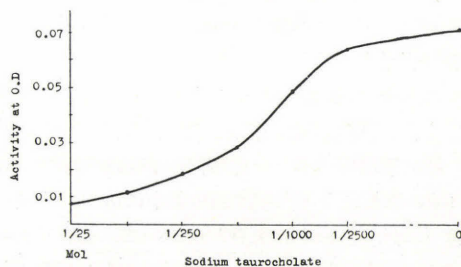


Fig. 20 Relation between lipolytic action and addition of Sodium taurocholate to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid. (glycerol determination)

Table 23 Relation between fungilytic action and lipolytic action by addition of Adrenaline to partially purified fungilytic fraction of *Ascaris* body fluid

Final concentration of Adrenaline	Fungilytic to <i>Penicillium</i> sp. incubated time at 37°C (hrs.)							Lipolytic activity to activated triglyceride (glycerol)
	1	1½	2	3	4	5	7	
Adrenaline + Buffer solution								(O.D)
× 1,000	-	-	-	-	-	-	-	0.042
Elute + Buffer sol.	-	±	+	+	++	++	+++	
Elute + Adrenaline + Buff. sol.								
× 1,000	-	-	+	+	++	++	+++	0.041
× 2,000	-	-	+	+	++	++	+++	0.042
× 4,000	-	-	+	+	++	++	+++	0.042
× 8,000	-	±	+	+	++	++	+++	0.041
× 16,000	-	±	+	+	++	++	+++	0.042
× 32,000	-	±	+	+	++	++	+++	0.042
× 64,000	-	±	+	+	++	++	+++	0.042
× 128,000	-	±	+	+	++	++	+++	0.041

DL-Adrenaline: Tokyo Kasei Co.

Buffer solution: pH 7.8 Clark-Lubs buffer solution.  
+ shows positive fungilytic activity.

*Penicillium* sp. (E) cultured 10 days at 30°C.

Incubation mixture to lipolysis:

Substrate	1 ml
Elute (Enzyme)	1 ml
Buffer solution	1 ml
Adrenaline solution	1 ml

incubated for 2 hrs. at 37°C. (shaking, 80/min.)

殆どその影響を認めなかつた。

### 総括および考察

蛔虫体腔液の酵素については、von Brand *et al.* (1952), 小泉ら (1954) の報告がみられ、平岡 (1964) は蛔虫体腔液を Visking tube を使用、純水に対して 3~4°C 下に 24 時間透析し、その透析内液を遠心分離して得た上清分割に esterase, amylase を証明し、これを報告した。森下ら (1963) は、蛔虫体腔液が fungilytic action を有し、それは酵素的作用に因るのではないかと報告した。古橋 (1964) は真菌、放線菌抗酸菌に drop test を行い、何れに対しても体腔液の溶菌糸作用を認め、特に *Penicillium* sp. E 株に著明であつた。体腔液の溶真菌分割は、Visking tube 透析による内液沈澱分割中にあり、上清分割中には fungilytic action を有しないので、著者は沈澱分割をしらべ、fungilytic action を起す時 glycerol が解離される事を知り fungilytic action と lipolysis の間に深い関連性があるのではないかと考えた *Penicillium* sp. E 株菌苔に drop

test を行い、その fungilytic action と、triglyceride として 10% Ediol を使用し、non activated triglyceride、脂肪蛋白質結合体として、7% Albumin 4 容 (Bovine Albumin powder) と 10% Ediol 1 容を 37°C 下に 1 時間 incubate し activated triglyceride としたものおよび種々なるものを基質として蛔虫体腔液沈澱分割および、Nikkilä (1958) の Partial purification of clearing factor of postheparin human plasma., E. D. Korn (1959) の The assay of lipoprotein lipase *in vivo*. and *in vitro*. に記載されている  $Ca_3(PO_4)_2$  gel 吸着法に準じ、 $1/300 \sim 1/400$  の partially purified fungilytic fraction を作製し、これに対し稀釈、加熱処理、trypsin 処理による失活、非透析性より、それは酵素であり、至適 pH 7.8 にて、各種阻害剤、human serum, heparin, NaCl,  $CaCl_2$ , NaF, protamine, quinine, hog bile juice, sodium taurocholate, adrenaline を添加してその影響を東京化成製 lipase と比較検討した結果をまとめて Table 24 に示した。これは従来報告されている clearing factor としての LPL に極めて近い性質を示し、activated triglyceride に lipolytic action を有する酵素が、沈澱分割中、および、 $Ca_3(PO_4)_2$  Gel 吸着による elute 中に存在し、これが fungilytic action と極めて深い関係があるとの結果を得た。また家兎の postheparin plasma (5 mg/kg 15 分後、cardiac puncture により採血) の partially purified fraction には fungilytic action は全く認められなかつた。高等動物、下等動物の LPL は、その作用において多少の差はあると考えられる。尚実験成績 (2), b) で述べた如く、 $Ca_3(PO_4)_2$  Gel 吸着による Supernatant (1) に LPL 様酵素と異なり、non activated triglyceride に lipolytic action を有する lipase 様酵素を分割し得た。これの至適 pH は 7.4 であり、56°C、30 分の加熱処理、trypsin 10 mg/ml の処理で失活を認め、非透析性であり、諸種阻害剤の影響は、human serum の添加では稍々 inhibit されるが他の阻害剤の影響は一般 lipase と近似であつた。

### 結 語

蛔虫体腔液に fungilytic action を有する酵素的物質が存在し、Visking tube にて、体腔液を純水に対して透析した内液の遠心分離による沈澱分割中に、その物質は存在し、それは、加熱処理、trypsin により失活し、非透析であり、酵素であると考えられる。その酵素は、fungilytic action に深い関係があると同時に、activated triglyceride に対して lipolytic action を有し、諸種阻害

Table 24 Influence of various inhibitors to lipolytic and fungilytic actions of sediment and partially purified fractions of *Ascaris* body fluid.

Inhibitors (Substances added with)	Lipolytic enzyme of mammal	Sediment fraction of <i>Ascaris</i> body fluid. (after dialysis by Visking tube against distilled water.)	Partially purified fungilytic fraction of <i>Ascaris</i> body fluid. Elute by $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ Gel adsorption
	Lipoprotein lipase (clearing factor) (glycerol determination)	Lipolytic activity to activated triglyceride, (glycerol determination)	Fungilytic activity to Myceria of <i>Penicillium</i> sp. E strain
	Pancreatic lipase	Fungilytic activity to Myceria of <i>Penicillium</i> sp. E strain	Lipolytic activity to activated triglyceride, (glycerol determination)
Serum	no effect	inhibited	inhibited
Heparin	inhibited at high concentrations by Brown (1953), Shore (1953), Korn (1955), Hollett and Meng (1956)	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations
NaCl	no effect	inhibited at high concentrations	inhibited at high concentrations
CaCl <sub>2</sub>	by Korn (1955), Hollett and Meng (1956) activated at low concentrations	activated at 0.025 Mol	activated at 0.0125 Mol
NaF	inhibited by Hollett and Meng (1956) no effect	no effect	no effect
Protamine	by Hollett and Meng (1956) Korn (1955) inhibited	inhibited	inhibited
Quinine	activated by Overbeek and van der Vies (1955)	inhibited	inhibited
Hog bile salts	activated by Robinson (1955)	inhibited	inhibited
Sodium taurocholate	activated by Engelberg (1956), Grossman (1955), Katz (1957)	inhibited	inhibited
Adrenaline		no effect	no effect

剤, human serum, heparin, NaCl, NaF, hog bile juice 等の影響より考え, 従来報告されている pancreatic lipase と異なつた性質を有する lipase で, Hahn, Anderson Brown, French, Fawcett, Grossman, Korn, Nikkilä, Robinson, Suehiro 等が報告した, postheparin plasma 中にみられる clearing factor, LPL と非常に近い type の lipase と考えられ, 既に第1報に報告した。さらにこれを確認する為, 第1報と殆ど同様な方法で, *Penicillium* sp. E strain の菌苔に対する ftngilytic action と, 7% Albumin 4容+10% Ediol 1容を 37°C 下, 1時間 incubate して作製した activated triglyceride を基質として, lipolytic action を起させ, glycerol 定量を行いその解離の度を lipolytic activity として, 沈澱分割に CaCl<sub>2</sub>, protamine, quinine, adrenaline を種々の濃度に添加し, その阻害性をしらべた。

(1) 蛔虫体腔液沈澱分割に対する, 阻害性物質添加の影響

1. Human serum, heparin, NaCl, protamine, quinine, hog bile juice, sodium taurocholate の影響

東京化成製 lipase に対する heparin, NaCl, protamine の影響は殆ど認めず, quinine, bile juice, sodium taurocholate の添加に対しては, lipolytic activity は activate の傾向を示したが, 蛔虫体腔液に上記阻害剤を添加した場合, 高濃度においては, fungilytic action, lipolytic action 何れに対しても inhibit の傾向を認めた。NaCl の場合 0.4 Mol 濃度にて, fungilysis, lipolysis 共に activate されるが, 以上の濃度では, inhibit の傾向を認めた。尚, bile juice, sodium taurocholate はその表面活性作用の為 fungilysis の影響は余り確認出来なかつた。

2. CaCl<sub>2</sub> 添加に対しては, 一般に activate の傾向を認め, 特に 0.025 Mol 濃度では fungilytic action, lipolytic action は高い値を示した。

3. NaF, adrenalin 添加の影響

東京化成製 lipase に対して, NaF は inhibit の傾向を示したが, 沈澱分割に対しては, fungilytic action, lipolytic action 何れも殆ど影響を認めなかつた。

さらに Nikkilä (1958) に順じて, 蛔虫体腔液, 沈澱分割の Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着により partially purified fungilytic fraction (elute) を分離し, 諸種の実験を行った。尚 elute は Biuret 法, U.S.-Army 法で  $\frac{1}{300} \sim \frac{1}{400}$  の purification rate を示した。

(2) Elute の一般性質

1. Nonactivated triglyceride に対して lipolytic action は殆ど認めず, 37°C 下に incubate した場合, incubate 時間と glycerol 解離とは直線関係を示さず, activated triglyceride に対して lipolytic action は高く認められ, incubate 時間と glycerol の解離は直線関係を示した。

2. *Penicillium* sp. E, strain 菌苔に対してかなり著明な fungilytic action を認め, fungilysed された菌苔より, glycerol を認めた。

3. 0.2 Mol Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Gel 吸着による, elute 以外の分割, supernatant (1), (2), (3) では, fungilytic action および activated triglyceride に対する lipolytic action は認められなかつた。

4. 56°C, 30 分間の加熱処理, および Trypsin の処理により, fungilytic action および lipolytic action は消失, 失活を認めた。

5. Visking tube にて 3~4°C 下に, 24 時間純水に対して透析しても, 透析内液に, fungilytic action と lipolytic action は存在し, 非透析性を認めた。

6. elute の倍数稀釈により, 8 倍以上の稀釈では fungilytic action および lipolytic action 何れも激減を認めた。

7. elute の activated triglyceride に対する lipolytic action の至適 pH

fungilytic action および lipolytic action に対する至適 pH は何れも 7.8 であつた。尚, incubation mixture に使用する緩衝液は, Clark-Lubs buffer solution が最も発色は良く, 以下, NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub>Cl, Sörensen, Tris-aminomethane-HCl buffer solution の順であつた。

8. 保存における影響

蛔虫体腔液沈澱分割, elute を透析したものを 3°~4°C 下に保存した場合, fungilytic action, lipolytic action の減少は沈澱分割に早く認められ, 次いで elute であり, elute を透析保存したものは比較的長期間その action を認めた。尚, 沈澱分割の保存の場合, fungilytic action は減少しても, lipolytic action が逆に増加する場合もあつた。

(3) Elute の各種阻害剤の影響

1. Human serum, heparin, NaCl, protamine, quinine, sodium taurocholate の添加においては, 一般に濃度の高い場合, *Penicillium* sp. E strain 菌苔に対する fungilytic action および, activated triglyceride に対する lipolytic action は inhibit の傾向があり, NaCl

添加の場合、0~0.3 Mol 濃度迄は殆ど影響を認めず、以上の濃度では、inhibit の傾向を認めた、

2.  $\text{CaCl}_2$  添加に対して、fungilytic action, lipolytic action 何れも activate の傾向を認め、0.0125 Mol 濃度において、高い値を示した。

3. NaF, adrenaline の添加に対しては NaF 0~1M の間、adrenaline 1,000~128,000 倍の添加においては、fungilytic action, lipolytic action 何れも影響を認めなかった。

以上の事より、蛔虫体腔液の溶真菌現象は酵素が深い関係にあり、それは透析内液の沈澱分割に移行し、さらに 0.2 M,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着法により partial purification され、postheparin plasma 中に認められる LPL と至適 pH, serum の影響について差はあるが、高等動物のそれとは異なつた一種の LPL 様酵素と考えられる。尚  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着の遠沈上清分割 Supernatant (1) が activated triglyceride に対して lipolytic action は殆ど無く、non activated triglyceride に lipolytic action を有する事を知り、諸種の実験を行った。

(4)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Gel 吸着、Supernatant (1) の lipolytic action (substrate として Buffersol 4 容+10% Ediol 1 容を用いた)。

1. Trypsin 10 mg/ml, 56°C, 30 分の加熱処理により lipolytic action は全く消失した。

2. Visking tube に対し、非透性であつた。

3. incubate 時間と glycerol の解離は殆ど直線的であつた。

4. Non activated triglyceride に対する lipolytic action の至適 pH は 7.4 であつた。

5. 諸種の inhibitors 添加における影響は蛔虫体腔液中の LPL 様酵素と異なつた傾向を有し、一般の lipase と近似であつた。

これは第 1 報に、沈澱分割中に lipase 様酵素も存在すると述べたが、LPL 様酵素と分離して、Supernatant (1) に存在すると考えられるので、附記する。

#### 引用文献

- 1) 赤堀四郎 (1964) : 酵素研究法. 1 巻, 101-173, 朝倉書店, 東京.
- 2) 赤堀四郎 (1961) : 酵素研究法. 4 巻, 77-81, 朝倉書店, 東京.
- 3) 赤堀四郎・沖中重雄 (1964) : 臨床酵素学. 15-24, 朝倉書店, 東京.
- 4) Bernfeld, P. & T. F. Kelley (1963) : Inhibitory and activating effects of polyanions on lipoprotein lipase. Jour. Biol. Chemistry, 238 (4), 1236-1241.
- 5) 江上不二夫 (1953) : 核酸及核蛋白質上巻. 243-244, 共立出版, 東京.
- 6) 江幡光雄 (1965) : タンパク質の比濁定量法. 生化学領域における光電比色法, 総論. 127-129, 南江堂, 東京.
- 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 (2). 寄生虫学雑誌, 13 (6), 521-534.
- 8) 堀越弘毅 (1964) : 糸状菌の細胞壁の構造. 日本農芸化学会雑誌, 39 (1), 18-21.
- 9) 金井泉 (1964) : 臨床検査法提要 VII. 14-16. 金原出版, 東京.
- 10) 川出由己・曾良忠雄・山本正 (1956) : カバット, マイヤー実験免疫化学訳. 320-332, 361-364, 岩波書店, 東京.
- 11) Korn, E. D. (1961) : The fatty acid and positional specificities of lipoprotein lipase. Jour. Biol. Chemistry, 236 (6), 1638-1642.
- 12) Korn, E. D. (1962) : The kinetics of the inhibition of lipoprotein lipase by polyanions and polycations. Jour. Biol. Chemistry, 237 (11), 3423-3429.
- 13) 森下哲夫・小林瑞穂・塩谷利淳・江口孝・坂田六郎・平岡義雄・五藤基 (1963) : 蛔虫体腔液の投白癬分割の投 Aspergillus 力について. 寄生虫学雑誌, 12 (5), 400-404.
- 14) 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 (1965) : 蛔虫体腔液の lipolytic activity について (1). 寄生虫学雑誌, 14 (1), 98-104.
- 15) Nikkilä, E. A. (1958) : Partial purification of clearing factor of postheparin human plasma. Biochimica et Biophysica Acta. 27, 612-617.
- 16) 岡田吉美 (1963) : 紫外部吸収測定法. 生化学領域における光電比色法, 各論 1. 79-81, 南江堂, 東京.
- 17) Rizack, M. A. (1961) : An epinephrine-sensitive lipolytic activity in adipose tissue. Jour. Biol. Chemistry, 236 (3), 657-662.
- 18) Robell, M. (1964) : Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. Jour. Biol. Chem. 239 (3), 753-755.
- 19) 齊藤正行 (1961) : タンパク質(ビウレット法), 生化学領域における光電比色法, 各論 3. 47-49. 南江堂, 東京.
- 20) 榊原弘 (1965) : 蛔虫体腔液中の溶真菌酵素の研究 (1). 寄生虫学雑誌, 14 (1), 47-67.
- 21) 山田稲好 (1965) : 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. 寄生虫学雑誌, 14 (1), 37-46.

## STUDIES ON FUNGILYTIC ENZYME IN ASCARIS BODY FLUID II.

HIROSHI SAKAKIBARA

*(Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University, Gifu)*

Ascaris body fluid contains a substance with fungilytic action. This substance is not dialyzed through a strip of cellophane tubing (Visking Co.) and migrated into the sediment when the dialyzed inner solution is centrifuged. The fungilytic action of the substance is inactivated by heating and by the addition of trypsin. It is accordingly conceivable that the substance is an enzyme with fungilytic action. On the other hand, this enzyme-like substance reveals a lipolytic action against activated triglyceride consisting of 7% albumin and 10% Ediol in 4:1. Results of experiments with the inhibitory effects of human serum, heparin, NaCl, NaF and hog bile juice upon the fungilysis and lipolysis demonstrate that this enzyme is different from an already-known lipase. It is thus surmised that this enzyme is closely related to lipoprotein lipase (lipemia clearing factor) which has been detected from the post-heparin plasma of vertebrates by Hahn, Anderson, Brown, French, Fawcett, Grossman, Kown, Nikkilä, Robinson and Suehiro. It therefore seemed pertinent to undertake an attempt to clarify the characteristic of the enzyme in ascaris body fluid in further details.

A. Effect of inhibitors on the fungilytic and lipolytic actions of the sediment fraction of ascaris body fluid.

1) Both the lipolytic and fungilytic actions were inhibited by the addition of higher concentrations of human serum, heparin, NaCl, protamine, quinine, hog bile juice and sodium taurocholate.

2) Both the actions were remarkably activated by the addition of  $\text{CaCl}_2$  in a concentration of 0.025 mol.

3) No influence on both the actions was found in the presence of NaF and adrenaline.

A partially purified fungilytic fraction, according to Nikkila's method (1958) with 0.2 mol  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  gel, was isolated from the sediment fraction of ascaris body fluid. Results of calculation of protein in this fraction with biuret technic indicated a purification rate of 1/300 to 1/400. The following tests were carried out with this enzyme solution.

B. A general property of the partially purified fraction (elute) of ascaris body fluid.

1) Lipolytic action of this enzyme solution was seen against activated triglyceride, while almost no lipolytic action was seen against non-activated triglyceride.

2) A marked fungilytic action was observed against *Penicillium* sp. E strain and glycerol was detected from the fungus lysed. In this test care was taken to exclude the interference of media in the fungilysis.

3) Neither fungilytic nor lipolytic actions were found in fractions other than the partially purified fraction, i. e. the supernatants I, II and III.

4) Both the fungilytic and lipolytic actions of the partially purified fraction were inactivated by heating to 56°C for 30 minutes or by trypsin treatment.

5) No substance with fungilytic and lipolytic actions was detected from the dialyzate through a strip of cellophane tubing (Visking Co.).



6) This enzyme has an optimum pH 7.8. Among buffer solutions tested, the degree of the fungilytic and lipolytic actions was found to be high in the following descending order; Clark-Lubs,  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$ , and Sörensen. No activity was observed when tris amino methane-HCl was used.

7) The activity could not be recognized in the sediment fraction kept at  $4^\circ\text{C}$  for 2 weeks but in the dialyzed solution of the partially purified fraction kept at  $4^\circ\text{C}$  for 3 weeks.

C. Effect of inhibitors on the fungilytic and lipolytic actions of the partially purified fraction of ascaris body fluid.

1) The addition of comparatively higher concentrations of human serum, heparin, NaCl, protamine, quinine and sodium taurocholate tends to inhibit the fungilytic and lipolytic actions of the partially purified fraction. In the case of NaCl, the inhibition occurred by the addition of more than 0.3 mol, while no effect was found in concentrations of 0 to 0.3 mol.

2) The fungilytic and lipolytic actions were accelerated by the addition of  $\text{CaCl}_2$ , particularly in a concentration of 0.0125 mol.

3) No effect on the fungilytic and lipolytic actions was recognized in the presence of NaF and adrenaline.

On the basis of these findings, it is evident that this enzyme participates in the fungilytic action of ascaris body fluid, that the enzyme migrates into the sediment fraction by centrifuging the dialyzed solution, that the enzyme can be partially purified by  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  gel absorption technic, and that the enzyme differs from LPL which has been found in postheparin plasma by Nikkilä, in optimum pH and the inhibitory effect of human serum. Since the supernatant I revealed no lipolytic action against activated triglyceride but against non activated triglyceride, the following experiments were carried out, in which a solution consisting of buffer and 10 % Ediol in 4 : 1 was used as a substrate.

D. The lipolytic action of the supernatant I, non-absorption fraction with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  gel treatment, against activated triglyceride.

1) The lipase was inactivated by trypsin treatment or by heating to  $56^\circ\text{C}$  for 30 minutes.

2) The lipase was not dialyzed through a strip of cellophane tubing (Visking Co.).

3) The relation between the length of incubation period (up to 2 hours) and the dissociation of glycerol was able to manifest as the equation of the first degree.

4) The lipase had an optimum pH 7.4 when acted against non activated triglyceride.

5) The lipase differed from LPL-like enzyme of ascaris body fluid in the influence of inhibitors but was similar to pancreas lipase in action. In a previous paper of this series it was shown that the sediment fraction of ascaris body fluid contained a lipase-like enzyme. Putting these results together, the lipase is surmised to be present in the supernatant I, non absorption fraction with  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)$  gel. treatment.