

豚蛔虫角皮等の抗菌性物質の研究(2)

五 藤 基

岐阜大学医学部寄生虫学教室(森下哲夫教授)

(1967年1月5日受領)

森下ら(1965)は豚蛔虫体腔液中に真菌の菌糸をとかず物質があり、このものが、lipoprotein lipase 活性と密接な関係があることを報告した。一方三浦(1955)は豚蛔虫角皮の抽出液中に抗菌作用を示す物質があり、ブドウ球菌、結核菌に有効に作用するが、大腸菌の発育は阻止しないことを報告した。三浦はその際この蛔虫角皮中の抗菌作用物質は lysozyme 様のものと考えたが、lysozyme が結核菌には作用しないことから cuticulin と名付けた広い抗菌 spectrum を有する物質であると報告した。しかし三浦の記載の中にはなお色々議論の余地が多い様である。

著者(1965)は第1報で三浦の報告に従い追試を行なつて、三浦の記載の様にブドウ球菌に特異的に作用する物質の存在することを証明した。しかし三浦の報告の様にブドウ球菌から結核菌迄に阻止的に働く物質が単一のものであるかどうかには疑問の余地があると考えている。更に極論をすればブドウ球菌の発育に阻止的に作用する物質にしても単一のものでなくてもよい訳である。著者は今回の報告では以上の様な考えの下に、蛔虫体各組織中のブドウ球菌に対する抗菌性物質の化学的解明を試みたので以下に報告する。

実験材料

豚蛔虫体は屠殺場で採取し、運動活発な豚雌蛔虫を用いた。実験室に生きたまま持ち帰り、滅菌生理的食塩水でよく洗い、滅菌濾紙で体表面をよく拭い、頭端より約5cmの部をしぼり、吊し下げて尾部に傷をつけて滴下する体腔液を滅菌シャーレに集め、滅菌東洋濾紙 No. 2 でこして使用した。豚蛔虫角皮や各種臓器の抽出液を作る方法は第1報でのべた方法によつた。ブドウ球菌(寺島株)をはやす平板寒天の作製法は第1報と同様である。ディスク法の場合は東洋濾紙 No. 2 を5枚重ねて直径5mmに打抜き、120°30分乾熱滅菌して用いた。

体腔液の抗菌性

体腔液に三浦の角皮の場合にのべた様なブドウ球菌に対する抗菌性があるかどうかをしらべた。ディスクを体腔液原液に浸し、ブドウ球菌含有寒天平板上に置き、37°C 下で24時間培養した。その結果直径9mmの発育阻止円が出来た。体腔液をpH 7.0のSørensen 磷酸緩衝液を用いて倍数希釈を行ない、発育阻止力をしらべたのが Table 1 であるが、8倍希釈まで有効であった。

Table 1 Bacteriocidal activity of *Ascaris* body fluid

Dilution	Bacteriocidal activity*
1: 2	+
1: 4	+
1: 8	+
1: 16	-

*In this and the following tables the plus and minus signs indicate the presence and absence of inhibition zone around paper disc (Tokyo filter paper No. 2, 5-fold, 5.0 mm in diameter) on cultures of staphylococci.

更に体腔液の抗菌性と pH との関係をしらべてみた。即ち pH 5~9 迄 Sørensen 緩衝液で pH をかえて見ると、pH 5では体腔液が濁濁する。そこで pH 6~9 の範囲でディスク法でブドウ球菌寺島株に対する影響をしらべたのが Table 2 である。その結果 pH 7で最大

Table 2 Effect of pH on the bacteriocidal activity of *Ascaris* body fluid

pH	Diameter of inhibition zone
6	7mm
7	9
8	7
9	7

の発育阻止円直径が見られた。

体腔液の透析および保存と抗菌性

豚蛔虫体腔液を Visking tube に入れ、24 時間の間 3~4 °C 下で純水に対して、透析を行なった。その内液をその後 3,000 rpm 15 分間遠心沈澱した。有効成分は Table 3 に示す様に上清に移行している。

体腔液を 4 °C 下で保存して 3 日後でも抗菌性は証明される。しかしこの頃から体腔液に濁濁が生ずる様にな

Table 3 Partial purification of *Ascaris* body fluid in relation to bacteriocidal activity

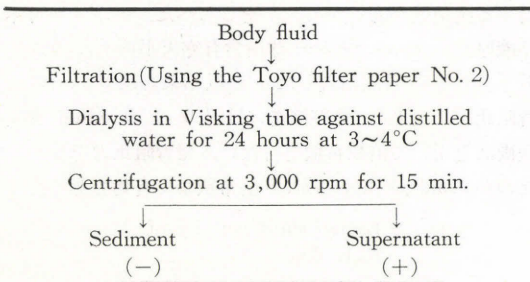


Table 4 Effect of samples at 4°C on their bacteriocidal activity

Sample tested	Storage in days						
	1	2	3	4	5	6	7
Cuticle extract	+	+	+	+	+	±	-
Body fluid	+	+	+	-	-	-	-

る。一方豚蛔虫角皮を生理的食塩水で抽出した液を 4°C 下で保存しておくとも 5 日間は効力の減退は認められず 6 日後から明らかな効力の減退が見られる様になった。このことはディスク法でブドウ球菌寺島株に対し実施してはつきり観察可能である。

豚蛔虫各臓器抽出物の抗菌性

新鮮な豚蛔虫を滅菌生理的食塩水でよく洗い、筋層、生殖器、消化管に分別し、各臓器をさらに滅菌生理的食塩水でよく洗った。その後各臓器 1 g 当り 10 ml の滅菌生理的食塩水を加え、ガラスホモゲナイザーを用いて 37°C、30 分抽出する。この様にして得た抽出液について、ディスク法でブドウ球菌寺島株に対する抗菌性をしらべた。Table 5 に示す様に筋層、消化管の抽出液では僅かに効力を認めたが、生殖器の抽出液には全く効力後

Table 5 Bacteriocidal activities of various tissue extracts

Extract used	Bacteriocidal activity
Muscle extract	±
Digestive organ extract	±
Genital organ extract	-

見られなかった。

角皮抽出液の抗菌性の分析

豚蛔虫角皮を生理的食塩水で抽出した液について各種真菌に対する溶真菌作用の実態をしらべたのが Table 6 である。マイコバイオチックアガールに培養 8 日目の

Table 6 Fungilytic activity of cuticle extract

Species used	Hour				
	1	2	3	4	24
<i>Penicillium</i> sp. E strain	-	-	-	-	-
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-

Penicillium sp. E 株、培養 3 日目の *Trichophyton mentagrophytes* 及び培養 5 日目の *Aspergillus fumigatus* がほぼ一様に菌苔が生えそろうつ所に、角皮抽出液を滴下して、溶真菌作用をしらべたが 24 時間後でも効力は認められなかった。このことから角皮抽出液はブドウ球菌に特異的に発育阻止作用を有することがわかった。更に角皮の抽出液について partial purification を試みた。即ち蛔虫角皮抽出液の有効成分を精製する目的で column chromatography を行なった。充填剤には Sephadex G-50 及び CM-Sephadex を用いて liquid chromatography で分別した。

Sephadex G-50 は架橋した不溶性デキストラン粒子で水溶性混合物を粒子の大きさにより分別可能である。一方 CM-Sephadex は lysozyme の分別に都合がよいので使用した。まづ Sephadex G-50 を蒸留水に懸濁し、膨潤平衡に達した所でクロマトカラムに充填し、緩衝液 1 l を流して洗滌し、ゲル層の最上部に濾紙をおき、これより上部の緩衝液を除き、静かに試料を 5 ml 重層させた。その後カラム底部の流出口を開き試料をゲル層に移動させ、更に少量の緩衝液を加えてゲル層に移動させたが、約 10 ml の緩衝液を加え、緩衝液槽を接続し、auto-

fraction collector を用いて溶出液を分離採取した。カラム内径 1.8 cm, 高さ 45 cm, 流速 40 ml/hr, 1 分画量 5 ml, pH 6.2 の Sørensen 燐酸緩衝液を用いた。実験は 4 ~ 6 °C の低温度室で行なった。この様にして得られた各分画の蛋白量は紫外外部吸収測定法に従い、Beckman 型 spectro-photometer で slit 0.1, 波長 280 m μ で石英吸収セルを用いて測定した。同時に各分画について lysozyme 活性を測定した。M. lysodeikticus ATCC 4698 の粉末を基質とし上記緩衝液で懸濁し、電光比色計で専用試験管を用い、波長 640 m μ の透過率を 10% に合せた。恒温槽を 35°C \pm 0.5°C に保ち、専用試験管に調整した基質液を 3 ml 入れる。別に試験管に検液約 5 ml を入れておく。この 2 本の試験管を同時に 35°C \pm 0.5°C に保った恒温槽につける。正確に 3 分後検液 3 ml をホールピペットでとり基質液の中に入れて混和する。振盪し乍ら 10 分間 incubate し、直ちに比色計にかける。この値を T (%) とし、検液の代りに燐酸緩衝液を用いて同様な操作を行ない、これを Tbl とする、T と Tbl を吸光度 E 及び Ebl に換算し Ebl-E を真の値とした。

これと同時に平行して各分画についてディスク法によりブドー球菌寺島株に対する抗菌性をしらべた。その結果 3 本目の分画に紫外外部吸収のピークが見られたが、どの分画も lysozyme 活性を示さなかつた。一方ブドー球菌に対する抗菌性は 4 本目及び 5 本目の分画に認められた。CM-Sephadex による分画は Sephadex G-50 の場合と同様の操作を行なったが、溶媒には pH 6.2 の生理的食塩水を使用しカラムの高さ 45 cm, 試料 10 ml, 1 分画 10 ml で行なった。蛋白量はニンヒドリン反応で呈色させてしらべた。その結果は lysozyme 活性は見られず、9, 10, 11, 18 及び 19 番の分画にブドー球菌に

Table 7 Fractions separated by column chromatography of CM-Sephadex

	Bacteriocidal activity	Lysozyme activity	Ninhydrine reaction
90 ml	+	-	+
100	+	-	+
110	+	-	-
180	+	-	-
190	+	-	-

Solvent, physiological saline; Flow rate, 40ml/hr. Column diameter, 1.8 cm; Column length, 45cm.

に対する抗菌性を認めた。そして 9 と 10 番の分画はニンヒドリン反応陽性であつた。このことを Fig. 1 及び Table 7 が示している。

蛔虫体腔液の partial purification

蛔虫角皮抽出液では以上の様に lysozyme 活性は証明されず、ブドー球菌に対する抗菌性が蛋白反応の証明される分画とそうでない分画にも認められた。このことを体腔液について検討して見た。即ち体腔液を上記の如く Sephadex G-50 による column chromatography にかけると 4 ~ 6 本目の elute に lysozyme 活性が見られる。又紫外外部吸収の曲線では 3 本目と 9 本目にピークを示し

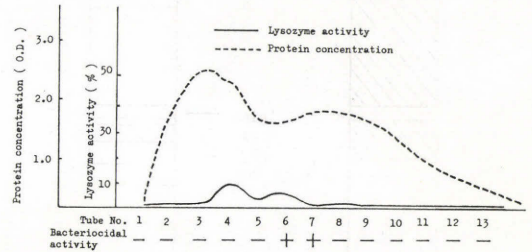


Fig. 2 Curves of protein concentration and lysozyme activity of body fluid elutions using Sephadex G-50

た。ブドー球菌に対する抗菌性は 6 本目と 7 本目に効力のあることが証明される。豚蛔虫体腔液に lysozyme 活性のあることは興味がある。このことは Fig. 2 に示される様である。

蛔虫角皮抽出液および体腔液の濾紙電気泳動および薄層クロマトグラフィ

蛔虫角皮抽出液を pH 8.6 のペロナル緩衝液を用い、長さ 45 cm, 巾 2 cm の東洋濾紙 No. 51 で、電圧

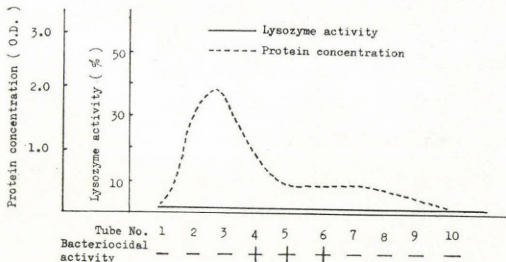


Fig. 1 Curves of protein concentrations and lysozyme activity of cuticle extract elutions using Sephadex G-50

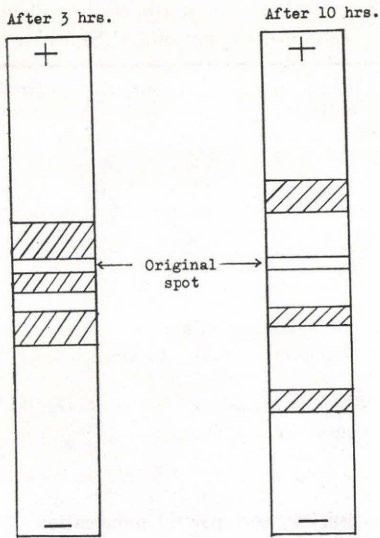


Fig. 3 Paper electrophoresis of cuticle extract (200 V, Veronal buffer pH 8.6, stained by B.P.B.)

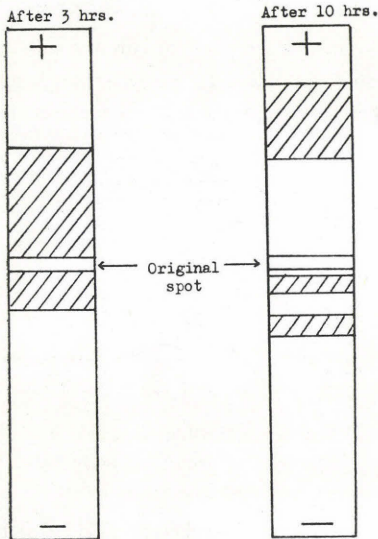


Fig. 4 Paper electrophoresis of body fluid (200 V, Veronal buffer pH 8.6, stained by B.P.B.)

200 V の下で泳動すると3時間では不明瞭であるが、10時間泳動すると陽極側に1、陰極側に2個のスポットを生ずる、同じ条件で蛔虫体腔液を泳動すると3時間では分離が不明瞭であるが、10時間後にはやはり陽極側に1、陰極側に2個のスポットを認めることが出来る。こ

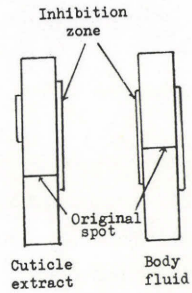
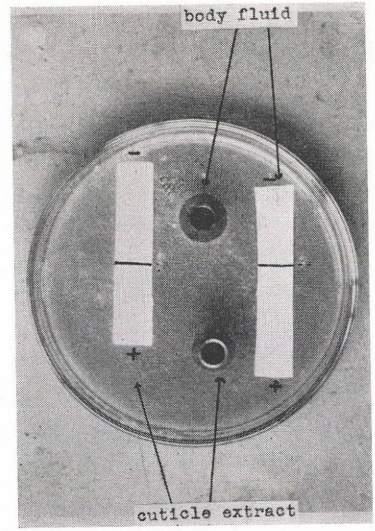


Fig. 5 Bacteriocidal activities of body fluid and cuticle extract in the cases of paper electrophoresis

の様なスポットは brom phenol blue によつて明らかに呈色する、この様にして泳動させた濾紙を切つてブドウ球菌含有普通寒天培地上におくと、蛔虫角皮抽出液では頂点から陽極側に 0.5 cm と陰極側に約 2 cm の範囲に抗菌力が見られる。蛔虫体腔液では原点から陽極側に 1.5 cm と陰極側に 1.5 cm の範囲に亘つて抗菌力が認められる。このことからさきに述べた brom phenol blue による発色部とは完全な一致が見られない。このことを Fig. 3~5 が示している。

次に蛔虫角皮抽出液について薄層クロマトグラフィを試みた。シリカゲルで 250 m μ の薄層プレートを作製し 110°C、30分加熱して、n-ブタノール4 : 醋酸1 : 蒸溜水5の割合に混じた溶媒の上層を用いた。ドライヤーで乾燥させながら試料を下端から5 cm の点に 10 μ ml, 20 μ ml 及び 30 μ ml とつて溶媒の深さを約1 cm として原

Table 8 Bacteriocidal activity of fractions separated from cuticle extract by thin-layer chromatography

Distance from original point	Bacteriocidal activity
1 cm	—
2	—
3	—
4	—
5	—
6	—
7	—
8	—
9	—
10	±

点から 10 cm の高さまで展開すると ニンドリン 反応陽性部は原点に止っている。アンモニア性硝酸銀による糖の反応は原点から 1 cm の範囲に見られた。ローダミン B により反応は認められない。展開部のシリカゲルを 1 cm づつに区切ってかき取り、ブドー球菌含有普通寒天培地にのせておいたディスク上においた。毛細管ピペットで 1 滴づつ生理的食塩水をディスクの上におとして、抗菌作用を観察すると Table 8 の様に、30 μ ml の試料をつけた所で最上端に僅かではあるが、発育阻止が見られた。

蛔虫角皮からの抗菌物質の抽出と有機溶媒の関係

蛔虫角皮の細片を直接アセトンを加えてホモゲナイズしてもブドー球菌に対する抗菌性物質は抽出出来ない。しかし蛔虫角皮片を 1 g 当り 10 ml の生理的食塩水で 37°C 下で 30 分抽出したものを、冷却しながらアセトンを 2 倍量加えて 4000 rpm 10 分間遠心沈澱すると抗菌物質が上清に移行する。一方生理的食塩水で抽出したものを減圧濃縮して、等量のエタノールを加え、4°C 下で 12 時間放置すると有効成分は沈澱している部分に移行する。

考 按

蛔虫角皮の中にブドー球菌の発育を阻止する物質が存在している。このものは普通ブイオン及び生理的食塩水で抽出される。そして角皮をそのまま 100°C で 30 分加熱すると効力を失うのに、普通ブイオンで角皮を抽出した液は 100°C 60 分加熱されても抗菌力は保持してい

る。作用時の pH も 6~9 迄有効性は保持出来る。これらのことから考えられるのはこの物質が蛋白性のものであつたとしてもごく低分子のものらしいことである。原報告者三浦は lysozyme 様であるが、抗菌 spectrum の点で結核菌にも有効なので異なると結論で述べている。しかし森下らが報告した蛔虫体腔液中の溶真菌物質は結核菌にも抗菌的に作用するが、明らかに lipoprotein lipase 活性と密接な関係がある。著者は *M. lysodeikticus* ATCC 4698 を基質とした場合蛔虫体腔液中には lysozyme 活性を有する物質があるが、角皮抽出物中には明らかに存在しないことを明らかにした。一方体腔液を溜水に対して透析した場合抗菌活性は減少はするが、なおかつ透析内液に抗菌物質は残る。しかしその上清に存在する。

体腔液中には lysozyme の他に角皮抽出液に存在すると同様な抗菌性物質が存在している。そこで column chromatography を用いて、紫外部吸収曲線と抗菌作用を有する部をしらべるとかなり離れた部分にポツポツと抗菌作用を有する部分の存在することがわかつた。更に濾紙電気泳動及び薄層クロマトで展開した部分部分の抗菌力をしらべたが、必ずしも蛋白の存在と一致しないことが分つた。一体何が蛔虫角皮中に存在する抗菌物質であるかは詳かに出来ないが、有機溶媒と水とのある分配係数下では角皮から抗菌性物質が抽出可能である点から、著者はある種の脂肪酸を疑っている。このものが時に蛋白質と共存し時にあらわになつて、複雑な態度をとるのではあるまいか。

結 語

- 1) 蛔虫体腔液中に lysozyme 活性が認められるが、別に角皮抽出液中にある様な抗菌性物質も存在する。
- 2) 角皮抽出液には溶真菌作用はない。
- 3) 角皮抽出液中の抗菌作用を有する物質は有機溶媒に対する態度、column chromatography 及び濾紙電気泳動、薄層クロマトグラフィによつて少くとも蛋白ではないらしいことを知つた。想像ではあるがある種の脂肪酸を疑っている。

引用文献

- 1) 五藤基(1966): 豚蛔虫角皮等の抗菌性物質の研究(1). 寄生虫誌, 15(5), 454-457.
- 2) 三浦孝次(1955): 豚蛔虫角皮の抗菌性物質について. 十全医学会誌, 57(6), 1068.
- 3) 森下哲夫ら(1965): 蛔虫体腔液の lipoprotein lipase について. 寄生虫誌, 14(1), 98-104.

Abstract

STUDIES ON BACTERIOCIDAL ACTIVITY IN *ASCARIS* TISSUE
II. ON THE ACTIVITY IN VARIOUS TISSUE EXTRACTS
AND ITS CHEMICAL NATURE

MOTOI GOTO

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

The presence of a substance responsible for bacteriocidal activity against staphylococci in *Ascaris* cuticle was re-confirmed by the present author (GOTO, 1965). Further effort was made in this work to demonstrate the activity in various tissue extracts and to investigate the chemical nature of the active substance in the extracts. Results obtained are summarized as follows:

- 1) The activity is observed in body fluid and extracts of muscle and alimentary tract as well as of cuticle but not in reproductive organs.
- 2) In body fluid a lysozyme activity is also observed. No fungilytic action is demonstrated in the cuticle extract.
- 3) Application of thin-layer and column chromatography and paper electrophoresis techniques on active samples failed to show any exact parallelism between the activity and protein fractions. The possibility of being fatty acids cannot be, at present, excluded because of the fact that the active substance is extracted from the mixture (organic solvent and water) with a partition coefficient.