

ブタ回虫及びアニサキスのアミノ酸について

II. 薄層クロマトグラフィー法及びアミノ酸自動分析器による同定

奥野 嘉也

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (主任: 森下哲夫教授)

(1968年12月10日 受領)

著者は第1報において、薄層クロマトグラフィーを用い、アジの腹腔より取り出した *Anisakis* I型幼虫の全虫体ならびにブタ回虫 *Ascaris lumbricoides suum* の体腔液及び各組織のアミノ酸構成について報告した。

今回の実験では前回の方法では検出できなかった methionine に対して、試料を過ギ酸にて酸化し、更に第1報で述べたと同様の方法で加水分解し薄層クロマトにかけた結果とブタ回虫各組織及びアニサキス幼虫体の加水分解産物と遊離アミノ酸をアミノ酸自動分析器を用いてアミノ酸構成を調べたのでここに報告する。

材料および方法

アニサキス幼虫及び回虫各組織の採取方法は第1報で述べた如く、新鮮なもののみを用いた。ブタ回虫各組織及びアニサキスの過ギ酸酸化法は各組織に生理食塩水 (0.9% NaCl) を2倍量加え、Teflon のホモジナイザーないしガラスホモジナイザーにて磨砕する。体腔液はそのまま使用した。ホモジネートは凍結乾燥しその約300mg の試料に過ギ酸 (88%のギ酸9容に対し30% H₂O₂ 水を加え0°C に冷却して1時間室温に放置) を加え0°C に16時間放置しておき低温で濃縮し大部分の試薬を除いた後、第1報で述べた様に6 N-HCl で110°C, 22時間加水分解し、分解終了後薄層クロマトグラフィーにかけた。即ち第1報の様に試料はプレートの下端より1.5cm の所に1mm² 以内にスポットし展開溶媒には一次展開には n-propanol-28% ammonia (67:33w/w) を使用し、二次展開には phenol-water (75:25) を用いた。更に発色試薬として ninhydrin 試薬 (I. 0.2% ninhydrin-ethanol 溶液 50ml, acetic acid 10ml 及び 2.4.6 collidine 2 ml を混ぜる。II. 硝酸銅 Cu(NO₃)₂ · H₂O の ethanol 溶液。I と II を使用前 50:3v/v の比に混合して使用。) を用い、上昇法で10cm 展開し、spot の検出確認には第1報の Table 1, 2 及び Fig. 1 を参考

とした。

アミノ酸自動分析器による分析においては試料の調整法は Table 1 に示す様な操作を行なった。即ち体腔液、角皮、卵巣、腸管、筋肉などのブタ回虫各組織及びアニサキス幼虫 I 型の全虫体をホモジナイザーにて磨砕し、遊離アミノ酸を求める方法として、ホモジネートに1% ピクリン酸5倍容を加え、よく振盪し、20分間15000回転で遠心沈殿し、その上清に等量のエーテルを加え、よく振盪し、エーテル層を除き、試料を Dowex 2×8Cl⁻ に通し、更に沸騰水浴上に完全に蒸発乾固し、これをアミノ酸自動分析器にかけた。構成アミノ酸分析に当っては上記ホモジネートに等量の14% トリクロル酢酸を加え3000回転20分間遠心沈殿し、上清を除去し、沈渣を脂質を除く為に acetone で洗浄し、更に残りの脂質を除く為にエーテルで洗った。その後7% トリクロル酢酸で洗浄し乾固した。蛋白量にして5mg 相当を6 N-HCl で110°C 22時間加水分解しアミノ酸自動分析用の試薬とした。アミノ酸自動分析には日立アミノ酸自動分析計 KLA-3型を使用した。塩基性アミノ酸の分析には15cm カラムで pH 5.28, 0.35 N のクエン酸ソーダ緩衝液を使用し、酸性及び中性アミノ酸に対しては150cm カラムで始め pH 3.25, 0.2 N のクエン酸ソーダ緩衝液を使用し、次いで pH 4.25, 0.2 N のクエン酸ソーダ緩衝液に切り換え、カラム温度は共に50°C だった。全分析時間は8時間を要した。

実験成績

ブタ回虫各組織とアニサキス幼虫 I 型を過ギ酸で酸化し、薄層クロマトグラフィーにかけた結果、Fig. 1 及び 2 のようなクロマトグラムの模式図 (この模式図はアルカリ加水分解、過ギ酸酸化後の酸加水分解との合成図で示されている。) この模式図にみる methionine の spot は histidine の spot の少し上方に現われ、体腔液、角

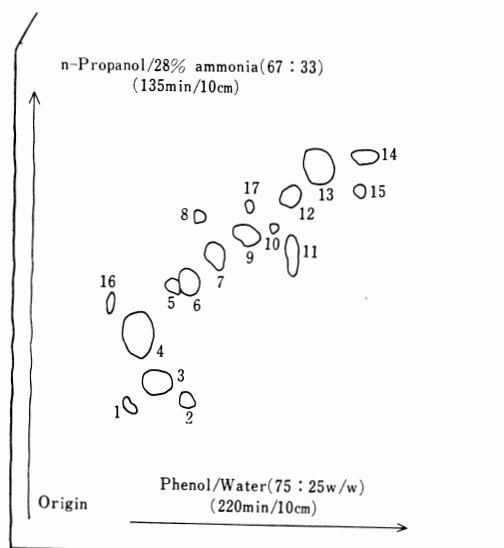
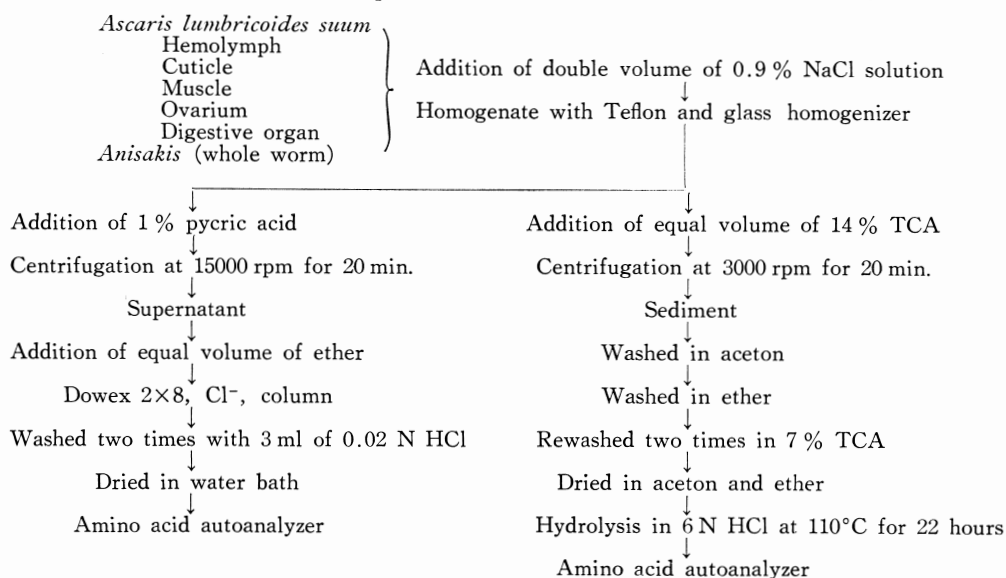
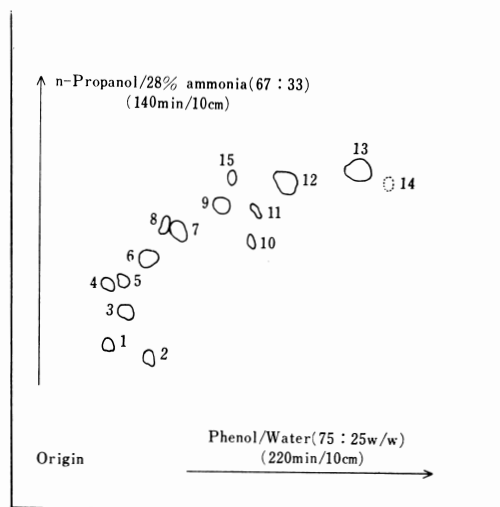
Table 1 Preparation of free and protein amino acid of *Ascaris* tissue and *Anisakis* larva

Fig. 1 Diagram of two-dimentional T.L.C. of amino acids identified from the acid hydrolysed acids hemolymph which was oxidized with performic acid.

- | | | |
|-------------------|---------------|--------------------|
| 1 : Lysine | 7 : Alanine | 13 : Isoleucine |
| 2 : Arginine | 8 : Threonine | and Leucine |
| 3 : Glutamic acid | 9 : Histidine | 14 : Phenylalanine |
| 4 : Serine | 10 : Tyrosine | 15 : Tryptophane |
| 5 : Aspartic acid | 11 : Proline | 16 : Cystine |
| 6 : Glycine | 12 : Valine | 17 : Methionine |

Fig. 2 Diagram of two-dimentional T.L.C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Anisakis* sp. larvae which was oxidized with performic acid.

- | | | |
|-------------------|----------------------------|--------------------|
| 1 : Lysine | 7 : Alanine | 13 : Phenylalanine |
| 2 : Arginine | 8 : Threonine | 14 : Tryptophane |
| 3 : Glutamic acid | 9 : Histidine | 15 : Methionine |
| 4 : Serine | 10 : Proline | |
| 5 : Glycine | 11 : Tyrosine | |
| | 12 : Leucine or Isoleucine | |

Table 2 Distribution of amino acid in *Ascaris* and *Anisakis* (with thin layer chromatography)

Amino acid	<i>Ascaris lumbricoides suum</i>					<i>Anisakis</i> (larvae) whole worm
	homolymph	cuticle	muscle	female sexual organ	digestive organ	
Alanine	+	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+	+
Aspartic acid	+	+	+	+	+	+
Cystine	+	+			+	
Glycine	+	+	+	+	+	+
Glutamic acid	+	+	+	+	+	+
Histidine	+	+	+		+	+
Isoleucine	+	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+
Methionine	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	+	+	+	+	+	+
Proline	+	+	+	+	+	+
Threonine	+	+	+	+	+	+
Tryptophane	+		+	+	+	+
Tyrosine	+	+		+	+	+
Serine	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	

Table 3 Concentration (μ mole) of protein amino acid in *Ascaris* and *Anisakis*

Amino acid	<i>Ascaris lumbricoides suum</i>					<i>Anisakis</i> larvae whole worm
	hemolymph	digestive organ	cuticle	muscle	ovaries	
Tryptophane	0.65	0.78	1.28	3.12	0.43	trace
Lysine	0.83	0.55	0.29	0.52	0.71	3.42
Histidine	0.64	0.31	0.34	0.34	trace	1.92
Arginine	0.68	0.64	0.25	0.51	0.86	2.10
Aspartic acid	2.12	2.40	2.42	3.96	2.71	1.04
Threonine	1.51	1.06	1.04	1.74	1.34	0.93
Serine	0.93	0.95	0.88	1.69	1.38	0.82
Glutamic acid	2.46	1.83	2.31	4.24	2.29	0.63
Proline	2.64	3.61	16.31	2.94	5.14	2.96
Glycine	2.72	2.54	1.74	3.01	2.84	3.51
Alanine	4.81	2.57	5.12	3.98	3.29	4.23
Cystine	0.14	0.95	0.12	0.81	0.81	0.14
Valine	2.63	2.04	1.83	2.14	2.96	1.83
Methionine	0.82	0.78	0.89	0.88	0.67	0.93
Isoleucine	2.06	1.56	1.83	1.51	1.56	1.33
Leucine	2.49	1.67	2.51	2.12	2.51	1.87
Tyrosine	1.93	1.06	0.96	0.96	1.22	1.14
Phenylalanine	1.21	1.21	1.21	1.31	1.31	1.04

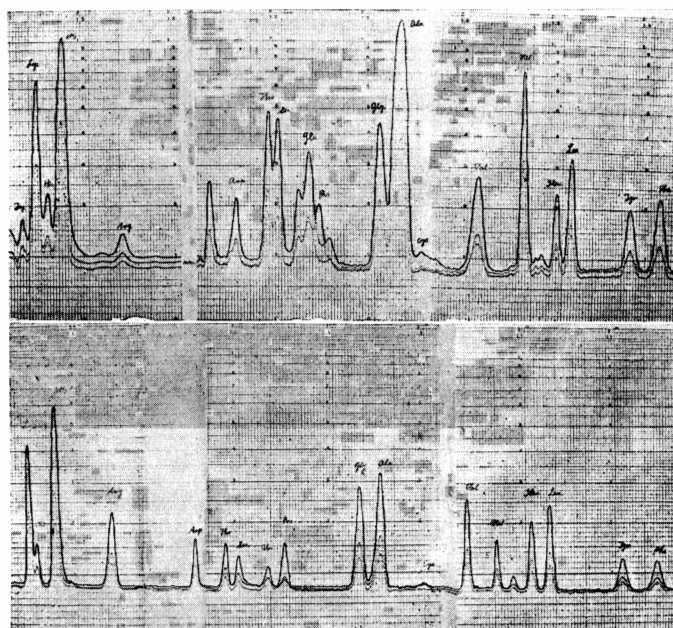
皮, 筋肉, 生殖器, 消化管ないしアニサキスの全虫体に methionin が存在する事が認められた. cystine は体腔液, 角皮, 消化管に検出されたが, 筋肉, 生殖器, アニサキス 幼虫体には認められなかった. クロマトグラムの各 spot の濃度は過ギ酸酸化後では tyrosine,

aspartic acid, proline, glutamic acid は第1報に示した結果より淡くなった. 他の spot の濃淡は第1報の結果と大体同様の結果が得られた. 尚 methionine の spot の濃度はブタ回虫各組織及びアニサキス幼虫体共に中等度で+~++として現わされた. cystine は非常に

淡い spot として検出された。第1報のアミノ酸分析結果と今回の実験の成績を合わせて見ると Table 2 の様な結果となった。この表を通覧してみるとアミノ酸は体腔液からは18種、角皮よりは17~18種で tryptophane は検出されず、筋肉より16種で cystine と tyrosine は認められなかつた。消化管よりは17種のアミノ酸を、雌生殖器よりは16種で cystine と histidine が検出されず、アニサキスからは15種のアミノ酸を認め、cystine と valine は検出されなかつた。次いで加水分解したブタ回虫各組織とアニサキス幼虫体のアミノ酸自動分析器による分析表は Table 3 に示す様で、共に μ mole で表わされている。回虫各組織、アニサキス共検出されたアミノ酸の数は18種で各アミノ酸の分析値の割合をみると、体腔液に於ては Table 3, Fig. 3 の様に alanine が最も多く次いで leucine, proline, glycine, glutamic acid, valine が共に 2.5μ mole 前後の分析値を示し、最も少ないものは cystine でこれに塩基性アミノ酸の arginine, histidine, tryptophane が次いでいる。角皮では proline がずばぬけて多く 16.31μ mole と全体の約4割を占めている。次いで alanine, aspartic acid の順であつた。薄層クロマトグラフィーで検出されなかつた tryptophane がアミノ酸分析計では 1.28μ mole を示した。glycine は 1.73μ mole で他の組織に比べると少ない分析値を示した。更に少ない方のアミノ酸は cystine, lysine, arginine の順に少なく共に 0.3μ mole 以下だつた。筋肉に関しては glutamic acid, alanine, aspartic acid の順に多く 4.0μ mole 前後で、他の組織で最も少ない方のアミノ酸である tryptophane が 3.12μ mole もあり、glycine がこれに次ぎ、cystine が最も少量で、histidine, arginine, lysine がこれに次いでいる。卵巣では proline が最も多く 5.14μ mole を占め、alanine, valine, glycine の順で、histidine が最も少なくアミノ酸分析器で定量出来なく trace だつた。次いで cystine, lysine の順である。消化器に於ても proline が最も多く、alanine, glycine, aspartic acid が共に 2.5μ mole 前後の分析値を示し valine, glutamic acid がこれに次いでいる。又筋肉以外の組織と同様にやはり塩基性アミノ酸が最も少量の方のアミノ酸に属した。アニサキス全虫体の加水分解によると、Fig. 3, Table 3 の様に alanine が最も多く約 4.0μ mole で glycine, lysine がこれに次ぎ、特に lysine がブタ回虫と比較して多く、 3.42μ mole と高値を示した。cystine が最も少なく glutamic acid がこれに次いでいる。又 tryptophane を除

き回虫では一般に非常に少ないアミノ酸に属した塩基性アミノ酸が中等度の分析値を示している事は一つの特徴と見なされる。Table 4 に表わされている遊離アミノ酸の分析値をみると、体腔液では18種のアミノ酸が検出され、alanine が最も多く検出されたアミノ酸量の約3割を占め、lysine, proline, methionine がこれに次ぎ cystine が最も少なく 0.01μ mole で histidine, arginine, isoleucine, aspartic acid は共に 0.34μ mole 前後であつた。角皮に関しては15種のアミノ酸が検出された。このうち glutamic acid が最も多く約全体の3割を占め valine, lysine がこれに次ぎ、tryptophane, histidine は trace で threonine が最も少なく 0.08μ mole であり、arginine, aspartic acid, cystine は検出されなかつた。筋肉では17種のアミノ酸が検出されたがこのうち体腔液と同様 alanine が最も多く glycine, glutamic acid, proline がこれに次ぎ、cystine, histidine は trace で tryptophane, serine が最も少なく共に 0.1μ mole であり methionine は検出されなかつた。卵巣に於ては Fig. 4, Table 4 に見られる様に18種のアミノ酸を検出したが、やはり alanine, glutamic acid の順に多く、これが全体の約6割を占め、glycine, lysine がこれにつぎ、tryptophane は trace で serine, cystine が少なくとも 0.02μ mole 以下を示した。

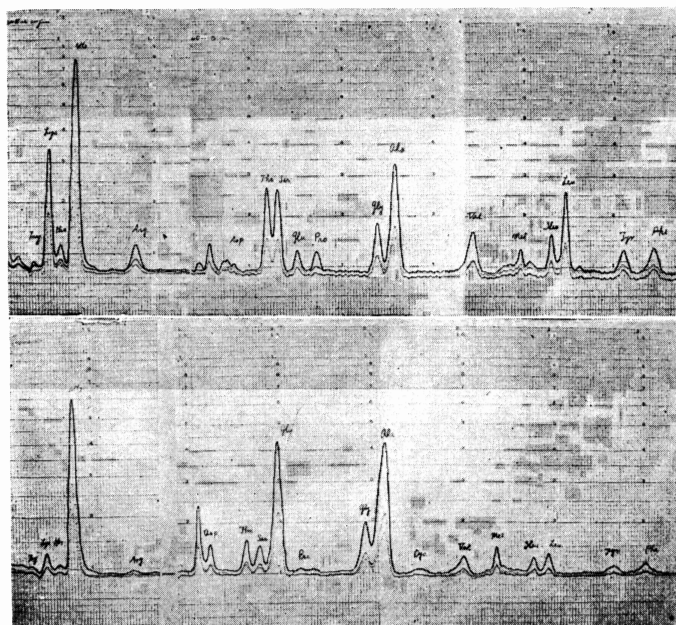
Fig. 4 の様に消化管では17種で、lysine が最も多く alanine がこれに次ぎ tryptophane は trace で methionine が 0.06μ mole と最も少なく、glutamic acid, aspartic acid がこれにつぎ共に 0.08μ mole 以下の分析値を示し、cystine は検出されなかつた。アニサキスに於ては、glutamic acid が最も多く alanine, lysine, glycine がこれにつぎ、他のアミノ酸は回虫各組織の抽出法と同様の方法では充分分析され得なかつた。遊離及び加水分解物のアミノ酸分析値を通覧して見ると、加水分解物に於ては alanine がブタ回虫各組織ならびにアニサキスとも多い方のアミノ酸に属し、腸管の 2.57μ mole を除き、全て 4μ mole 以上だつた。proline は角皮で最も多く、卵巣、消化管、アニサキスに於て豊富だつた。更に glycine は角皮では 1.74μ mole を示したが他の回虫各組織、アニサキスでは共に 2.7μ mole 以上の分析値を示し、leucine, isoleucine, tyrosine, phenylalanine, methionine は回虫、アニサキス共殆ど同様の分析値を示した。共通に最も少ないアミノ酸は cystine で共に 0.1μ mole 以下であつた。塩基性アミノ酸も最も少ないが、筋肉以外の回虫各組織及びアニサキスで



Ascaris hemolymph

Anisakis

Fig. 3 Amino acid analysis of *Ascaris* hemolymph and *Anisakis larva* (whole worm).
(Hydrolysis : 6N-HCl, 110 C, 22 hrs.)



Digestive organ

Ovary

Fig. 4 Free acid in *Ascaris* digestive organ and ovary.

The acidic and neutral amino acids were separated on column 150 (150 cm column) which was operated at 50°C. The elution of column 150 started with the pH 3.25, 0.2N sodium citrate buffer with a change to the pH 4.25, 0.2N sodium citrate buffer. The basic amino acids and ammonia were separated on column 15 operated at 50°C and with the pH 5.28, 0.35 N sodium citrate buffer.

Table 4 Concentration (μ mole) of free amino acid in *Ascaris lumbricoides*

Amino acid	<i>Ascaris lumbricoides suum</i>				
	hemolymph	digestive organ	cuticle	muscle	ovaries
Tryptophane	0.44	trace	trace	0.11	trace
Lysine	2.40	0.24	1.27	0.84	0.24
Histidine	0.34	0.13	trace	trace	0.07
Arginine	0.36	0.38	none	0.24	0.07
Aspartic acid	0.37	0.08	none	0.13	0.08
Threonine	1.18	0.45	0.09	0.23	0.14
Serine	1.14	0.45	0.14	0.10	0.02
Glutamic acid	0.88	0.09	1.66	0.71	0.90
Proline	1.43	0.46	0.13	0.56	0.19
Glycine	1.35	0.27	0.22	1.31	0.32
Alanine	7.03	0.85	0.42	3.10	1.24
Cystine	0.01	none	none	trace	0.02
Valine	0.96	0.34	7.70	0.31	0.12
Methionine	1.37	0.07	0.06	none	0.08
Isoleucine	0.36	0.13	0.04	0.19	0.07
Leucine	0.64	0.40	0.07	0.23	0.08
Tyrosine	0.47	0.16	0.08	0.17	0.05
Phenylalanine	0.65	0.19	0.08	0.14	0.06

tryptophane は共に少なく、更に arginine, histidine, lysine は回虫各組織に於て共に 0.6μ mole 内外であつたが、アニサキスでこれらの塩基性アミノ酸 (tryptophane を除く) は多い方のアミノ酸に属した。次いで遊離アミノ酸についてみると角皮を除くブタ回虫各組織で alanine が最も多く、加水分解物で少ない方のアミノ酸に属した lysine は共に豊富に認められた。加水分解物で豊富だつた proline, aspartic acid は分析された遊離アミノ酸全体の割合と比べてみると中等度で、glutamic acid については角皮で最も多く消化管では非常に少なくなり 0.09μ mole しか分析されなかつた。isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine の割合は一様に加水分解物と余り変化がなかつた。少量のものは各組織共に tryptophane, histidine, aspartic acid と消化管を除く組織に於て arginine も少ない方のアミノ酸に属した。

考 察

回虫体およびその飼育液中のアミノ酸についてはいくつかの実験がある。飼育液については若林(1941), 吉沢(1954) によつてなされ、吉沢は飼育液中より10種のアミノ酸を検出し、アミノ酸代謝と回虫毒とが何等かの関係があるものと考えた。更に Rogers (1955) はブタ回虫やその他の寄生線虫から排泄される遊離アミノ酸について調べ線虫から排泄される遊離アミノ酸として、

leucine, phenylalanine, alanine, valine, proline, aspartic acid, glutamic acid を検出し、更に飼育液を加水分解すると glycine, serine, cystine が検出され時に lysine, tyrosine も検出できたと報告している。回虫体に関しては虫体全体を加水分解し Flury (1912) が glycine, lysine, valine, leucine, aspartic acid, arginine, histidine, tyrosine 等8種のアミノ酸を検出して以来、ブタ回虫各組織について種々の報告がある。Savel (1955) は回虫体を加水分解して13種のアミノ酸を検出し、次の様なアミノ酸即ち arginine, cystine, glutamic acid, lysine, tyrosine が豊富に認められたと述べている。全虫体についてはこの他松岡 (1960) が虫体の蛋白分画を材料として、leucine, valine, tyrosine, proline, histidine, threonine, alanine, glycine, arginine, serine, glutamic acid, aspartic acid, cystine, tryptophane, taurine を証明した。体腔液に関しては梶原・橋本(1952) がペーパークロマトグラフィーにて、次の様な8種の遊離アミノ酸即ち aspartic acid, glycine, lysine, alanine, tyrosine, tryptophane, leucine, histidine を検出し、tyrosine, alanine, lysine の着色斑が濃くつぎに tryptophane, leucine, aspartic acid, glycine は同様の濃度と報告しているが、著者は上記のアミノ酸に加えて更に arginine, threonine, serine, proline, glutamic acid, cystine, valine, methionine, isoleucine, phenylalanine

Table 5 Comparison of the values obtained by the author on the free and protein amino acid compositions of *Ascaris* ovaries with those by Pollak and Fairbairn(1955).

Amino acid	free amino acid protein amino acid			
	Pollak and Fairbairn (1955)	The Author (1968)	Pollak and Fairbairn (1955)	The Author (1968)
Leucine	1.5%	2.1%	12.7%	6.6%
Glutamic acid	33	23.9	10.8	6.7
Serine + Glycine	15	8.7	10.4	7.2
Proline	0.5	4.9	8.2	11.8
Aspartic acid	2.5	2.0	8.0	7.2
Lysine	10	6.4	8.0	2.1
Valine	1.5	3.1	7.8	6.9
Alanine	17	32.6	7.1	5.9
Histidine	8.2	1.9	5.8	trace
Phenylalanine	0.5	1.6	3.4	4.4
Threonine	0.5	3.6	3.1	3.1
Tyrosine	0.5	1.3	4.1	4.4
Cystine	0.5	0.5	trace	0.4
Arginine	none	1.8	none	2.4
Methionine	none	2.2	none	1.9
Tryptophane	trace	trace	trace	1.8

を検出し、特に alanine 4.81 μ mole と豊富な含有量を示し lysine 0.83 μ mole と少なかった。一方 tyrosine は1.93 μ mole と中等度の分析値を示した。又 Savel (1955) は体腔液を加水分解して得られたアミノ酸は人血清アルブミンのアミノ酸と良く似ていて、体腔液には proline と tyrosine が常に高く cystine は少ないと報告している。又遊離アミノ酸も加水分解物と良く似た傾向を示すと述べている。今回の実験で加水分解された体腔液又は遊離の体腔液に於て多い分析値を示した alanine は Moore & Stein (1951) による人血清アルブミンのアミノ酸分析値では殆ど存在しないと述べられている。更に proline, tyrosine は今回の実験及び Moore & Stein (1951) の文献に於ても中等度ないしそれ以下で Savel (1955) が報告している結果と異なっている。加水分解された体腔液と体腔液中の遊離アミノ酸を比較した場合、定性的には殆ど同様だが、定量的にはいくらか異なった結果が出ている。更に Salmenkova(1962) は体腔液中の遊離アミノ酸をペーパークロマトグラフィーを用いて検出し、17種のアミノ酸を検出している。著者は leucine, cystine を更に検出したが glutamine は検出できなかった。角皮のアミノ酸構成に関しては Hackman (1953), Bird (1957), Watson & Silvester (1958) によつて研究され報告された。一般にコラーゲンは他の蛋白質といちぢるしく異なつたアミノ酸構成を

示し, cystine, cystein, tryptophane を含まず methionine は少量で glycine, proline, oxyproline を極めて多量に含み全体の約 2/3 を占めると云われている。Hackman (1953) は角皮より aspartic acid, alanine, lysine, glutamic acid, serine, glycine, threonine, tyrosine, valine, proline, phenylalanine, leucine and isoleucine, hydroxyproline, tryptophane を検出し、Bird (1957) 及び Watson & Silvester (1958) は Moore & Stein (1951) の方法によつて Hackman が検出したアミノ酸に加えて更に methionine, arginine, histidine を検出し、このうち proline が最も多く次いで glycine, arginine の順でこの三者で分析されたアミノ酸の約 6 割を占めている。著者の実験では proline 16.31 μ mole と極めて豊富で glycine は1.74 μ mole を示し、arginine は 0.25 μ mole と最も少ない方のアミノ酸分析値を示した。Watson & Silvester の実験では alanine 6.39% に比べ 9.1% と少し高い結果が出た。これらの変化は加水分解時間の差、回虫の採取ないし飼育状態、試料の調整方法によつても相違が出るものと考えられる。興味ある事として、高等動物において営まれている arginine \rightarrow ornithine \rightarrow proline \rightleftharpoons glutamic acid の様な代謝があるが、回虫角皮においても上記反応の proline 合成が何らかの機序で多くなつていゝものと考えられる。卵巣については Pollak and Fairbairn (1955) により実験され、

次の様に報告されている。即ち遊離及び蛋白質のアミノ酸構成は定量的には似ていないが、定性的にはよく似ていると述べている。著者の実験でも同様の傾向を示した。Table 5 の様に Pollak & Fairbairn と今回の実験を比べてみると Pollak らには遊離、蛋白質アミノ酸共に検出されていない arginine, methionine は量的には少ないが著者に於ては加水分解物の arginine 2.4% 遊離では 1.8%, methionine は加水分解で 1.9% 遊離で 2.2% を示した。更に Pollak らは遊離アミノ酸では glutamic acid と alanine が全体の 50% を占めると報告しているが、今回の実験でも大体同様の結果が得られた。更に両者における大きな相異は著者の実験で proline が遊離、加水分解物ともに多いこと、histidine が少なかつた事である。他のアミノ酸については著変はなかつた。更に Jaskoski (1962) は幼虫包蔵卵を加水分解してペーパークロマトグラフィーを用い展開溶媒に n-butanol: acetic acid: water (4:1:5), n-cresol: phenol (1:1) の 2 つの溶媒を使用して 18 種のアミノ酸を検出している。筋肉、腸管に関してはあまり報告されていない。筋肉は myosin, actin, myogen 等いろいろの成分に分画されているが、おのおのの純度はまだ完全なものではなく、従つたアミノ酸分析値は必ずしも信をおけるものではないと云われているが、一般に平滑筋、横紋筋による差もほとんどなく、又動物の種類による違いも少ないと云われている。その中で myosin のアミノ酸分布をみると、大体次の様だとされている、即ち glutamic acid が一番多く 22% 位、次いで leucine+isoleucine が 15% 前後、lysine は 10% 前後で aspartic acid, arginine の順になり、tryptophane, cystine, glycine, proline 等が少ないアミノ酸に属する。ここで今回の実験をみてみると、alanine, glutamic acid, aspartic acid が豊富で約 12% 前後、leucine+isoleucine は約 11% だつた。一方 tryptophane が 9.5% と高く arginine は少量で、cystine, lysine, histidine が 1% 以下という分析結果が出た。腸管については体腔液とよく似た分析値を示している。異なつた点をあげると alanine については体腔液 4.81μ mole に対し腸管では 2.57μ mole と少なく proline, glycine が腸管の方に豊富だつた事が目立つ相違であつた。次いでアニサキス全虫体については加水分解された虫体より 18 種のアミノ酸が検出されたが、このうち proline, lysine, alanine, glycine が多く、更に回虫に比して tryptophane は trace だつたが、arginine, histidine は回虫体腔液の 3 倍の分析値を示した事は興

味深い点である。更にアニサキス幼虫体ならびにブタ回虫体と *Hymenolepis diminuta* 及び *larval tapeworm* (*Taenia crassiceps*) とにおけるアミノ酸構成を比較してみる。

Hymenolepis diminuta のアミノ酸は Goodchild & wells (1957) によると全虫体を 48 時間加水分解して次の様なアミノ酸を検出している。lysine, glycine, alanine, histidine, phenylalanine, aspartic acid, serine, cystine, cystein, tyrosine, valine, leucine-isoleucine, tryptophane, proline, hydroxyproline を証明し、glutamic acid, methionine, arginine, threonine は認められなかつたと報告している。次いで *Taenia crassiceps* に関しては Tayler (1962) が遊離と加水分解された虫体のアミノ酸について実験したが、それによると alanine, arginine, aspartic acid, cystein, glycine, glutamic acid, lysine, leucine, isoleucine, phenylalanine, threonine, proline, serine, valine, methionine, tyrosine (?), ornithine (?), taurine (?) 等を証明し、遊離には上記アミノ酸のうち arginine, tryptophane, threonine, tyrosine, ornithine, taurine は認められなかつたと報告している。アニサキス幼虫体ならびにブタ回虫体のアミノ酸構成は *Hymenolepis diminuta*, *Taenia crassiceps* と同定性的には大体同様の結果が得られた。ただし今回の実験では ornithine, taurine 等は証明されなかつた。又アニサキス幼虫体の遊離アミノ酸は今回の方法では充分証明出来なく、恐らくもう少し多くの虫体を使用したら充分の結果が得られると思う。回虫体の遊離アミノ酸についての文献はあるが、完全に遊離のアミノ酸を抽出する事は非常に困難である。この様な状態での定量値の比較には疑問があるので、参考の程度にとどめるべきである。又加水分解されたブタ回虫各組織アニサキス幼虫体のアミノ酸分析に於ても加水分解速度ないし時間により若干の相違は出て来る。加水分解時間とともに増加するものと減少するものがあり、今回の実験に於ては、一連に 22 時間加水分解を行なつて比較検討した。第 1 報で述べた様に人の必須アミノ酸である leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, threonine, tryptophane, valine と前回検出できなかつた methionine がブタ回虫各組織及びアニサキスに認められたが、これらの線虫においては更に多くのアミノ酸が生体内で合成されず、不可欠アミノ酸とされると思われる。

結 語

著者はブタ回虫体腔液と各組織及びアニサキス幼虫体のアミノ酸構成を薄層クロマトグラフィー及びアミノ酸自動分析器を用い調べた。

1. ブタ回虫各組織及びアニサキスの加水分解物より共に18種のアミノ酸即ち alanine, arginine, aspartic acid, cystine, glycine, glutamic acid, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophane, tyrosine, serine, valine を検出した。このうち卵巣の histidine とアニサキス幼虫体の tryptophane は trace だった。

2. 遊離アミノ酸は体腔液より18種, 角皮よりは arginine, aspartic acid, cystine を除く15種を, 卵巣からは18種, 筋肉からは methionine を除く17種, 消化管より cystine を除く17種のアミノ酸が検出された。アニサキス幼虫体からは十分な分析が出来なかつた。

3. 加水分解物において proline, alanine, glutamic acid, glycine はブタ回虫各組織及びアニサキスに共に豊富で, 塩基性アミノ酸即ち tryptophane (筋肉を除く) lysine, histidine, arginine と cystine は最も少ない方のアミノ酸だった。valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine 等はブタ回虫各組織ならびにアニサキスに於て大体同様の分析値を示した。

4. 遊離アミノ酸について, lysine がどの組織に於ても豊富で, この他 alanine が多く, tryptophane, histidine, arginine, cystine が最も少なかつた。

引用文献

- Bird, A. F. (1957) : Chemical composition of the Nematode cuticle. Observation individual layers and extracts from these layers in *Ascaris lumbricoides* cuticle. Exptl. Parasitol., 6, 383-403.
- Flury, F. (1912) : Zur Chemie und Toxikologie der Ascariden. Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., 67, 275-392.
- Goodchild, C. G. and Wells, O. C. (1957) : Amino acids in larval and adult Tapeworms (*Hymenolepis diminuta*) and in the tissues of their rat and beetle hosts. Exptl. Parasitol., 6, 575-585.
- Hackman, R. H. (1953) : Chemistry of insect cuticle. The water soluble proteins. J. Biochem., 54, 362-367.
- Jaskoski, B. J. (1962) : Paper chromatography of some fraction of *Ascaris suum* eggs. Exptl. Parasitol., 12, 168-175.
- 梶原誠一・橋本典秋 (1952) : 回虫体腔液の paper chromatography. Medicine and Biology, 25, 108-110.
- 松岡弘 (1960) : 回虫虫体の蛋白分画に関する研究, 熊本医会誌,
- Moore, S. and Stein, W. H. (1951) : Chromatography of amino acids on starch columns. Solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. J. Biol. Chem. 192, 53-77.
- 奥野嘉也 (1968) : ブタ回虫及びアニサキスのアミノ酸について, I. 薄層クロマトグラフィー法による同定. 寄生虫誌, 17, 199-207.
- Pollak, J. K. and Fairbairn, D. (1955) : The metabolism of *Ascaris lumbricoides* ovaries. Can. J. Biochem. Physiol., 33, 297-306.
- Rogers, W. R. (1955) : Amino acid and peptides excreted by Nematode parasites. Exptl. Parasitol., 4, 21-28.
- Savel, J. (1955) : Etudes sur la constitution et le métabolisme protéiques d'*Ascaris lumbricoides* Linné, 1758. Partl. Rev. Pathol. comparée et hyg. gén. 55, 52-121.
- Salmenkova, E. A. (1962) : Free amino acid in cavity fluid of *Ascaris suum* and changes in their composition under conditions of artificial culture in protein-free synthetic medium. Med. Parazitol, Parazitarn., 31, 664-668.
- Taylor, A. E. R. (1964) : Studies on the in vitro culture and biochemistry of larval tapeworms (*Taenia crassiceps*), in First International Congress of Parasitology, Rome. [Abstract,] in press.
- 若林一夫 (1941) : 回虫並に其の飼育液のアミノ酸に就て. 慶応医学, 21, 559-566.
- Watson, M. R. and Silvester, N. R. (1958) : Studies of invertebrate collagen preparations. J. Biochem., 71, 578-584.
- 吉沢利雄 (1954) : 回虫飼育液のペーパークロマトグラフィー. 寄生虫誌, 3, 228-232.

AbstractAMINO ACIDS IN *ASCARIS SUUM* AND *ANISAKIS* SP. LARVA. ANALYSIS
BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY AND
AMINO ACID AUTOANALYZER

YOSHIYA OKUNO

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

Protein hydrolyzate and free amino acid from various tissues of *Ascaris lumbricoides suum* and *Anisakis* sp. larva were analyzed by the thin layer chromatography and amino acid autoanalyzer.

1. Eighteen amino acids found in *Ascaris* tissues and *Anisakis* after hydrolysis were as follows; alanine, arginine, aspartic acid, cystine, glycine, glutamic acid, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, threonine, tyrosine, tryptophane, serine and valine.

Histidine in *Ascaris* ovary and tryptophane in *Ascaris* were present in amounts representing less than 0.1μ mole.

2. Eighteen free amino acids were found in *Ascaris* hemolymph and ovary; 15 in cuticle (except for arginine, aspartic acid, and cystine), 17 in muscle (except for methionine), and 17 in digestive organ (except for cystine), respectively. In addition, free amino acid in *Anisakis* could not be sufficiently analyzed by the similar method.

3. Hydrolyzates of *Ascaris suum* and *Anisakis larva* contained proline, alanine, glycine, and glutamic acid abundantly. Tryptophane (except in muscle), lysine, histidine, arginine and cystine were extremely small amounts.

Quantatively, the following 6 amino acids, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine and phenylalanine in *Ascaris suum* and *Anisakis* were accounted middle analytical amount.

4. Among the free amino acids, lysine was found most abundant in each tissues of *Ascaris* and alanine was also large amount. On the other hand, tryptophane, histidine, arginine and cystine were exceedingly small amount.