

蛔虫飼養液のペーパークロマトグラフ (アミノ酸及び脂酸の検出)

吉 沢 利 雄

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和29年7月13日受領)

蛔虫代謝産物中の窒素化合物及び脂酸は、つとに宿主との関連に於て注目されて来たが、所謂蛔虫毒は唯蛔虫体中に存在する物質というだけのものでなく、排泄乃至は分泌されて虫体外に出される物質でなければならない。この見地から代謝産物が問題となるのであるが、窒素化合物としては、Weinland(1904)は含窒素物質の主体はアンモニアであるとなし、Flury(1912)はアンモニア、アミン、更にピウレット反応陽性物質としてライム、ペプトン、アミノ酸を検出し、尿素尿酸は検出されなかつたと報じ、Bueding(1951)も尿素、尿酸は産生されないと云っている。関・関根・鈴木(1940)三氏は蛔虫飼養液中にアンモニア及び尿素を認め、尙お他の含窒素物質を渺からず排泄していると報じている。諸家の報告になるアンモニア量は実際宿主の腸管内に於けるアンモニア量よりも遙かに少くして之は蛔虫毒としては可能性は少いものと小泉教授(1944)は述べている。Baldwin(1937)によれば、蛋白質代謝の終産物としては、無脊椎動物ではアンモニアが主体をなし尿酸は最も少く、下等動物ではアミノ酸が不変化のままで排泄される傾向が多いという。之に依つても、アミノ酸が排泄されることが想像されるが、小泉教授は排泄されたアミノ酸が、細菌の作用を受けて、或はカルボキシル基を失つてアミンとなり、又アミノ基を失つて脂酸若くはその誘導体に変ずる可能性があり、之等が何等かの機転で多量に蓄積するときは種々の障害を起し得ると想定されている。若林(1941)は実際にアミノ酸としてトリプトファン、チロシンを飼養液中に証明し、之れはインドエチラミン、チラミン等のアミンとなり、又はスカトール、インドール、フェノール等

の脂肪誘導体となる変化が宿主腸管内に於て行われるものとみて居り、飼養液中からインドール、フェノールは証明し得たとしている。斯くの如く蛔虫に於てアミノ酸が問題となるので、私は飼養液中のアミノ酸を更に追究しようと考えたものである。

次に蛔虫代謝物中の脂酸に就いては、Weinland(1904)はヴァレリアン酸、カブロン酸、Flury(1912)は不揮発性脂酸としてはオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸を、揮発性脂酸として蟻酸、プロピオン酸、酪酸、ヴァレリアン酸を、Harnisch(1935)はイソヴァレリアン酸生成の可能性を、Oesterlin(1938)は蟻酸、ヴァレリアン酸を報じている。小泉教授は蛔虫毒研究の立場に於て脂酸にも着目して居られ、若林(1942)はオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、揮発性脂酸として、蟻酸、酪酸、イソヴァレリアン酸を証明している。私は先に蕁心臓洞房標本を以て飼養液の生物に対する薬理的作用を実験中、脂酸と思われる作用を認めたが、今回は脂酸の中でも意義の最も深いと思われる揮発性低級脂酸を検出しようとして実験に取り掛かつた。脂酸及びアミノ酸共に実験方法としてペーパーパーティションクロマトグラフィー(以下 P.C. と略記す)を応用した。

1. 実験材料

蛔虫の代謝終産物或は分泌物が蛔虫毒として問題になるので、蛔虫を人工飼育しその飼養液を材料とした。屠場より保温リングル氏液に入れ速かに運搬した豚蛔虫を10隻に対し0.95%食塩水200ccの割合にて、37°Cの孵卵器中で飼育し、48時間の飼養液100隻分即ち2000ccを1回の材料として処理した。この飼養液を減圧の下に60°Cで沸騰せしめて、約1/100に濃縮したものをアミノ酸の検出の目的に向つて処理し、又殆んど乾く程度にまで濃縮したものと及びその場合の蒸溜液については脂酸の目的に沿うべく処理した。

Toshio Yoshizawa: Detection of aminoacids and fatty acids by paper-chromatography in the medium in which *Ascaris lumbricoides* were kept alive (Dept. of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

2. 飼養液中のアミノ酸
(P. C. による検出)

一般にアミノ酸の P.C. は容易とされているが、飼養液の類は各種の塩類、有機物に汚染されているので初め展開が定型的に出なかつた。佐竹(1949)も微生物の培養液等は無機塩類が種々の障碍を来し、之にはイオン交換樹脂を用いると完全に除去出来るがアミノ酸の損失が意外に多かつたりすると述べている。

私の実験では、次の方法に従つてアミノ酸を採収した実験が最も良い結果をもたらした。材料の項で述べたところの減圧濃縮の結果得られた約 $1/100$ に濃縮した 20 cc の被検液に、10% Na_2CO_3 水溶液を滴下することによつて常にアルカリ性に保ちつゝ、一方に備えたビュレットより 10% 醋酸水銀水溶液を滴下し、遂に永久に黄色の炭酸水銀の化合物が残るまで両試薬を加えてゆく。斯くすると略々全アミノ酸をカルバミノ酸醋酸水銀化合物として沈澱せしめ得るといふ (Neuberg u. Kerb 1912)。次でアルコールで処理し、 H_2S で分解して濾液より水を蒸散せしめ濃縮して之を検体とした。この方法によると塩類や糖類を一度に分離除去することが出来る。この検体約 1 mg をペーパーの一隅に型の如くに附し下記の様に展開した。

(1) 展開

ペーパーは東洋濾紙 No. 50, 40×40 を使用し、室温で 24 時間宛二次元展開を行つた。溶媒は第 1 次元はフェノールとアンモニア水 (0.1% に NH_3 を含む) の 9:1 の混合液上層部を用い、第 2 次展開はブタノール、醋酸水 (4:1:2) 混合液の上澄部を用いた。ブタノール、エタノール、水の混合溶媒は Rf 値が小さくて余りよい成績が得られない。

(2) 検出

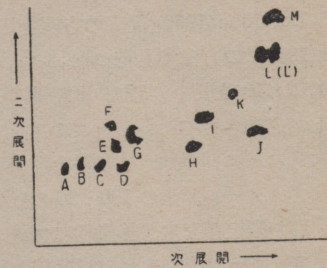
2% Ninhydrin Butanol 溶液を噴霧し 90°C の恒温器中に 10 分間おいて呈色せしめた。Rf 値は温度、湿度、装置等を完全に一致せしめることは難いので、多くのアミノ酸試薬を蒐め反覆展開して略々一定せる値を得て、その平均値に基いて被検体の Spot 同定の資料とした。

(3) 成績

同定出来たものはチスチン、セリン、タウリン、バリン、ロイチン、グリシン、アラニン、チロシン、ヒスチジンである。この中でバリン、アラニン、ロイチン等は常に濃厚に出て来る。尙お、トリプトファンが検出されたこともある。同定出来ない Spot が 3 個所許り見られ

た。之等のアミノ酸のクロマトグラムの模型は第 1 図に、平均 Rf は第 1 表に通す通りである。

第 1 図 アミノ酸の展開



[註]

- { 第一次展開 : フェノール、水 (含アンモニア) 9:1
- { 第二次展開 : ブタノール、醋酸、水... 4:1:2
- B: cystine I: alanine L: tryptophane
- E: serine J: histidine M: leucine
- G: taurine K: tyrosine A, C, D, F: 不明
- H: glycine L: valine

第 1 表 飼養液展開成績 (アミノ酸の Rf)

アミノ酸	展開剤 第一次展開フェノール: 0.1%アンモニア水 (90:10)	第二次展開ブタノール: 醋酸: 水 (4:1:2)
cystine	0.21	0.24
serine	0.28	0.31
taurine	0.35	0.34
glycine	0.51	0.31
alanine	0.57	0.38
tyrosine	0.63	0.48
histidine	0.71	0.34
valine	0.77	0.56
tryptophane	0.80	0.62
leucine	0.81	0.70

3. 飼養液中の脂肪酸
(P. C. に依る検出)

既に述べた様に前処理した材料である飼養液の減圧蒸溜液及び濃縮物について各々を次の様に扱つた。即ち先ずエーテルにて抽出し、之に 20% の炭酸ソーダ水溶液を加えて脂肪酸をソーダ塩として水中に溶かし、次で分液漏斗で水層を分離してエーレンマイエルコルベンに採収し、濃硫酸を滴下してよく混和し、炭酸ガスの気泡が出なくなり且つ弱酸性になる様にして脂肪酸を再び遊離させ、再度エーテルで抽出し、分液漏斗でよく水洗して硫酸を

除く。水洗の際は食塩水を用いる方がよい。この抽出液よりエーテルを追放して脂酸を得ることが出来る。これを試料として展開した。

(1) 展開

Hiscox & Berridge(1950) 発表の方法を用いた。Reid, Lederer(1951) の方法でも行つた。ペーパーは東洋濾紙 No. 50, 2×40 を使い、予め48時間アンモニア蒸気中にさらして飽和させておいた。このアンモニア蒸気の飽和したペーパーに型の如くに試料を附着して展開した。展開剤はブタノール、水の100:20の混合液の上層部を用いた。即ち固定相を水、移動相にブタノール、更に展開器中にアンモニア水を入れた試験管を装置して絶えずアンモニア蒸気を蒸散せしめることにより蒸気相としてアンモニアを使用したものである。室温で凡そ24時間展開した。

(2) 検出

展開容器中から取出したペーパーは速に溶媒上昇終末点に鉛筆でマークを附す。乾燥後に Brom-cresol-green の2%のアルコール溶液を噴霧した。然る時は忽ちにして黄色の地に青色の極めて鮮明な Spot が得られる。この場合も又速に Spot の輪廓にマークをする。尙お、成績判定については C₁~C₁₀ のカルボン酸及び乳酸、オレイン酸、硫酸等を反覆展開して Rf 平均値を得て、之を以て判定の資料とした。

(3) 成績

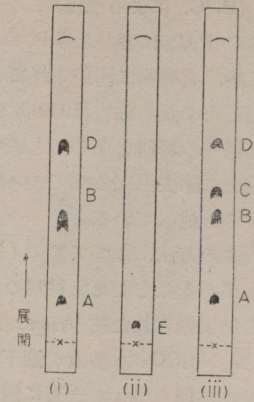
乾固物及び蒸溜液中の脂酸のクロマトグラムは第2図に示す通りであり、同定されたものは前者に於ては醋酸(C₂)、酪酸(C₄)、ヴァレリアン酸(C₅)、カブロン酸(C₆)で、後者には醋酸、酪酸、カブロン酸及びオキシカルボン酸たる乳酸である。酪酸は最も濃厚に Spot を作った。之等の Rf は第2表に示す通りである。

4. 総括並に考按

1) アミノ酸に就て

私は飼育液中のアミノ酸を一望のもとに検出する方法としてペーパークロマトグラフィーを応用したものである。アミノ酸の P.C. は最も広く行われているものであるが、飼養液は細菌培地と共に塩類、糖類に甚しく汚染されているので美しく展開され難いとされている。そこで之等の物質の除去を確実に行うことが必要と考えられた。それでカルバミノ酸醋酸水銀化合物として落す方法は効果的であつたと思われる。又、ブタノールに醋酸を含ませた展開剤は非常に良い。成績は前表の通りで、ヴ

第2図 脂酸の展開



[註]

- i, ii: 蒸溜分 A: acetic acid
- (ii はその中最下層) B: butylic acid
- iii: 残渣 C: valeric acid
- D: caproic acid
- E: lactic acid

第2表 蛔虫飼養液展開成績 (脂酸の Rf)

種 類	Rf
Carboic acid	
acetic acid	0.15
butylic acid	0.44
valeric acid	0.50
caproic acid	0.66
Oxycarboic acid	
lactic acid	0.04

Solvent system :

- { stationary phase : water
- { mobile phase : n-Butanol
- { vapour phase : ammonia

ァーリンが毎常濃厚に検出された。ロイチン、アラニン、チスチン、セリンも常に比較的濃厚な Spot を現わした。第1図の通り数種の Spot は同定出来ないが、之は Peptid かと思われる。

之等のアミノ酸は分泌又は排泄されるものであるか、或は混在細菌の為に分解されて発生したのか、恐らくは両者であろう。

Flury(1912) は蛔虫体成分としてはグリコロール、バーリン、ロイチン、アスパラギン酸、アルギニン、リヂン、ヒスチヂンを含むと報告して居り、梶原・橋本(1952) は著者同様に P.C. によつて蛔虫体腔液中にアスパラギ

昭和 29 年 11 月 (1954)]

ン酸, グリシン, リヂン, アラニン, チロシン, トリプトファン, ロイチン, ヒスチヂンを検出して居り, 即ち虫体からは多くのアミノ酸の証明が行われているのに, 代謝産物中のアミノ酸については具体的には既述の若林氏の報告の様にチロシン, トリプトファンあるのみで, 最近 Bueding (1951) もアミノ酸代謝については余り知られていないが蛋白分解酵素の存在は確実であると報じて居るだけである。今こゝに飼養液中に約 10 種のアミノ酸が検出得られたことは蛔虫の生理作用研究上, 又ヒスタミンその他のアミンや脂酸誘導体との関聯よりして蛔虫毒の基体の一つとして意味あるものと思考する。

2) 脂酸について

Weinland, Flury, Harnisch, Toryu, Oesterlin, 若林等の報告を綜合すると蛔虫排泄物中には揮発性低級脂酸としては蟻酸, 醋酸, プロピオン酸, 酪酸, ヴァレリアン酸, カブロン酸等が検出されている。蟻酸, プロピオン酸, ヴァレリアン酸は夫々炭素数は 1, 3, 5 であつて, 元来天然には動植物体構成成分として炭素数奇数のカルボン酸は存在せぬと言われていたものである。殊に代謝物中に ヴァレリアン酸の存在の問題については諸家の議論が集中し, Fischer (1923) 等は無菌的に蛔虫を飼育してヴァレリアン酸を否定した。ところが最近 Epps, Weiner, Bueding (1950) 等は同様に無菌的に飼育して代謝物中に細菌等の影響によらずしてヴァレリアン酸及びその異性体又はその何れかが存在すると報告した。私の P.C. によれば, 醋酸, 酪酸, ヴァレリアン酸, カブロン酸及び乳酸が検出出来た。この中で酪酸は最も濃厚に Spot を作った。

脂酸が毒物としての作用を有ち, 蛔虫毒の一つではないかと注目した学者には Flury, 小泉教授等がある。著者の臺心臓洞房標本実験に於ても飼養液中の有害作用物質の一つとして遊離脂酸と目される物が検出されて居るのである。然し一方では, 同じく私の実験で蛔虫寄生者と非寄生者についての糞便中の脂酸の定量を行つたものでは両者に差異は認められなかつた。然し乍ら之も, 極めて症状顯著なる蛔虫症患者について, 更に遊離脂酸の箇々のものについて検討を加えるならば異なる成績を得るかとも思うものである。

5. 結 論

蛔虫の代謝終産物, 分泌物並にそれらが微生物や酵素の作用を受けて分解して出来る物質中に, 所謂蛔虫毒の一基体であると思はれるアミノ酸, 低級揮発性脂酸の証明を行うべく, 蛔虫飼養液をペーパークロマトグラ

フィーにより分析し次の成績を得た。

1) アミノ酸

チスチン, セリン, タウリン, ヴァーリン, ロイチン, グリシン, アラニン, チロシン, ヒスチヂンが検出され, 殊にヴァーリンは常に最も濃厚で, アラニン, ロイチン, チスチン, セリンも毎常比較的濃厚に検出された。尙お, 決定し難い 3 種程の含窒素化合物, 恐らくはペプチドが存在する。

2) 脂 肪 酸

揮発性低級脂酸として, 醋酸, 酪酸, ヴァレリアン酸, カブロン酸及びオキシカルボン酸として乳酸が検出された。この中酪酸は最も濃厚な Spot を表わした。

終りに松林教授の御指導, 御校閲に深甚の謝意を表する。

主 要 文 献

- 1) Baldwin, E. (1937): An introduction to comparative biochemistry (小泉丹: 蛔虫の研究 p. 431 による)。
- 2) Bueding, E. (1951): Metabolism of helminths, Parasitic infections in man, No. 4: 150.
- 3) Epps, W., Weiner, M. & Bueding, E. (1950): Production of steam volatile acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*, Journal of infectious diseases 87: 149.
- 4) Fischer, A. (1923): Über den Kohlenhydratstoffwechsel von *Ascaris megaloccephala*, Bioch. Z. 144: 224.
- 5) Flury, F. (1912): Zur Chemie und Toxikologie der Ascariden, Archiv f. exp. Path. u. Pharm. 67: 275.
- 6) Harnisch, O. (1935): Daten zur Beurteilung des Sauerstoffverbrauchs von *Ascaris lumbricoides* (nach messungen an isolierten Organen), Z. f. vgl. Phys. 22: 50.
- 7) Hiscox, E. R. & Berridge, N. J. (1950): Use of paper-partition chromatography in the volatile fatty acid, Nature 166: 522.
- 8) 小泉丹 (1944): 蛔虫の研究, 初版, p. 434.
- 9) Neuberg, C. u. Kerb, J. (1912): Über ein Fällungsmittel für Aminosäuren, Bioch. Z. 40: 498.
- 10) Oesterlin, M. (1938): Die von oxybiotisch gehaltenen Ascariden ausgescheidenen Fettsäuren, Z. f. vgl. Phys. 25: 88.
- 11) Reid, R. L. u. Lederer, M. (1951): Separation and estimation of saturated C₂~C₇ fatty acids by paperpartition chromatography, Bioch. J. 50: 60.
- 12) 佐竹一夫 (1949): アミノ酸及び蛋白質, 有機化学の進歩 8: 363.
- 13) 若林一夫 (1941): 蛔虫並に其の飼育液のアミノ酸に就て, 慶応医学 21: 559.
- 14) 若林一夫 (1942): 蛔虫及びその飼育液に於ける総脂酸と蛔虫毒としての夫れに関する一考察, 慶応医学 22: 489.
- 15) Weinland, E. (1904)

: Über die Zersetzung stickstoffhaltiger Substanz bei Ascaris, Z. f. Biol. 45 : 517.16)do (1904):
Über die von Ascaris lumbricoides angeschei-

dene Fettsäure, Z. f. Biol. 45 : 113. 17) 吉沢利雄 (1954) : 蛔虫寄生者と非寄生者に於ける糞便中脂肪量の比較, 第23回日本寄生虫学会総会記事.

寄生虫学雑誌 第3巻・第2号 正誤表

蛔虫毒に関する研究

P.	誤	正
148	如	始
151	F)	(Li)
151	⊗V	⊗IV
151		⊗IV の次に⊗V を入れる。 ⊗V 蛔虫毒感作モルモット腸管に対し CA, Be, Pr, Li が腸管を収縮するかについて行つた実験で Li を除いて他の CA, Be, Pr, は腸管を収縮しアレルギー性が認められた。
152 ⊗IX …蛋白割分 Benadryl 陽性割分…		…を如何に Benadryl が阻止するか…
152 5) 粗蛔虫分割精製分層		粗蛔虫毒分割精製分層。

会 記

会記 1. —此の度編集委員会の申合せにより寄生虫学に関する各位の業績目録を逐次速報する事になりました。就きましては各位の原著報文等1部当学会事務所宛御寄進戴きましてその目録を到着順に作成し、本誌各号に掲載したいと存じます。又戴きました原著報文は永く学会事務所に保管して各位の縦覧の便に供したいと存じます。昭和28年(1953)の分から始めておりますが、上記の主旨をお汲取りの上御協力下さる様願います。尚その際掲載誌名、巻号頁発行年月等が別刷に明記なきものは、目録作成の関係上特に明記さる様願います。

会記 2. —学会事務所に於て下記のバックナンバーを販売致しますので希望者はお申込下さい。

日本寄生虫学会記事 1年~21年

但し1~9年は各冊100円、10~21年は各冊200円。2, 4, 6, 8, 15年は欠本、13, 14の各年は残僅少、16, 17, 18は合本で目録だけになつて居ります。

寄生虫学雑誌第1巻・第1号(昭和26年10月発行)
1部 150円。

寄生虫学雑誌2巻以降各号200円

日本寄生虫学文献集吸虫篇(山口左伸博士編、昭和15年1月発行)1部200円。