

## 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

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 5月 13日 受領)

ブタ回虫及びその飼育液の含窒素物質ことにアミノ酸について, Flury (1912) は虫体を加水分解したものから 8 種のアミノ酸を検出した. Baldwin (1937) は蛋白代謝の終産物として無脊椎動物ではアンモニアが主体であり, より下等な動物ではアミノ酸が変化しないままで排泄される傾向が強いという. 梶原ら (1952) はブタ回虫体腔液の遊離アミノ酸をペーパー・クロマトグラフィーで検出し, Rogers (1955) はブタ回虫体について遊離と加水分解したアミノ酸をしらべた. Bird (1957) は角皮を 80% formic acid : 11.7 N HCl (1:1) で加水分解して, 16 種のアミノ酸を検出し, Watson (1958) にも角皮を 6N HCl で加水分解し Bird と同様に 16 種のアミノ酸を検出した. 松岡 (1960) は回虫全体の蛋白分画のペーパー・クロマトグラフィーにより 15 種, Salmenkova (1962) も体腔液中に 17 種, Jaskoski (1962) は卵巣を加水分解して 18 種のアミノ酸を検出した. 著者は 1958 年以来標準化されて, しかもアミノ酸の分析ではペーパー・クロマトグラフィーにくらべて検体の量が微量で充分な分離検出能をもっているといわれる薄層クロマトグラフィーによって, ブタ回虫 *Ascaris lumbricoides suum* の各組織即ち体腔液, 角皮, 筋肉, 雌生殖器, 消化管とアニサキス幼虫 I 型虫体について, アミノ酸構成をしらべたのでここに報告する.

#### 材料及び実験方法

岐阜市営の屠殺場で屠殺直後のブタの小腸から回虫を採取し, 37°C に保った生食水に入れ教室に持ちかえり, 外部に附着している雑物を除去した. 回虫体を生食水, 次に蒸溜水でよく洗い, 濾紙で虫体についている水分を吸着して除いた. 体腔液の採取のし方はビーカーの上に回虫体を吊し, 尾部の角皮に切創を作り, 滴下する体腔

液を集めた. 回虫の各組織については, 生食水中で各組織別にとり出し, 生食水でよく洗いこれを数回くり返した. アニサキス幼虫体は静岡県焼津市の海産物商で塩サバを作る時に, サバの腹腔に寄生しているのを採取し, 生食水に入れて教室に持ち帰り, 外部に附着している雑物を除去した. 被囊しているものはその中から幼虫体を取り出し, 生食水で数回洗って検体として使用した. ブタ回虫各組織は 5g を生食水 10 ml 中で Teflon の homogenizer で homogenize し, これをアミノ酸分析の試料とした. 体腔液はそのまま使用した. アニサキス I 型幼虫の場合は wet weight 1g に対し 2 ml の生食水を用い, ブタ回虫組織と同様に Teflon の homogenizer で homogenize した. 薄層クロマトグラフィーを実施する方法は次の様である. 先ずブタ回虫の体腔液や各組織, アニサキス幼虫体の homogenate を試料とし, 各 homogenate を Kjeldahl-Nessler の変法を用いて, 各試料の大体の N 量を測定した. その結果角皮は 630  $\gamma$ /ml, 筋肉は 460  $\gamma$ /ml, 消化管は 820  $\gamma$ /ml, 生殖器は 1050  $\gamma$ /ml, 体腔液は 1880  $\gamma$ /ml で, アニサキス幼虫体は 1240  $\gamma$ /ml であった. 酸加水分解の条件として, 蛋白量 5mg に相当する量を上記 N 量から概算して, アンプル中に入れた. このアンプルはあらかじめクロム硫酸であらい, 蒸溜水と 1N-HCl で洗滌し, 100°C の乾燥器で乾燥しておいたものである. アンプル中で試料と 6N-HCl 2.5 ml をまぜ, ドライ・アイス, アセトン中で凍結させながら, 真空ポンプで減圧し, 充分減圧した後アンプルを真空ポンプにつないだまま, 先端をバーナーで封管する. これを恒温器中に移し 110°C 22 時間加水分解する. 加水分解終了後アンプルを切り内容を 10 ml の小ビーカーに移し, 1ml の蒸溜水でアンプルの管壁についたものをとって小ビーカーに入れ, 沸騰した油浴上で HCl を

本研究は文部省総合科学研究費に負う所大である.

迅速に除き完全に乾固する。薄層クロマトグラフィーにかけるまで  $\text{CaCl}_2$  デンケーター中に保存する。使用時少量の蒸溜水でとがして試料とした。薄層の作り方は adsorbent と binder を共に含む Wako Gel B-10 (pure chemical industries) 30 g を乳鉢に入れ、かきまぜ乍ら約 40ml の蒸溜水を加えず早くねり合せ、次いで約 15 ml の蒸溜水を加えて混ぜ合せ。直ちに懸濁液を automatic applicator (Mitamura RI Ken) に入れ、プレートの大きき  $20 \times 20$  cm, 厚さ  $250 \mu$  の薄層を作る。暫時室温に静置したのち、硫酸デンケーター中で完全に水分を除く為 1 週間保存して展開に使用した。薄層は使用時  $110^\circ\text{C}$  で 15 分間加熱して活性化し、30 分間室温に放冷したのち使用した。試料は template (spotting guide) を使用して、上記の様子に作製した薄層上に micro-pipette でプレートの下端より 1.5cm の所に  $1 \text{ mm}^2$  以内にスポットした。著者は一次溶媒として n-propanol: 28% ammonia 水 (67: 33w/w) を solvent とし、二次溶媒として phenol: water (75: 25w/w) を用いた。この溶媒を volume 5200 ml の薄層クロマトグラフィー用展開槽に 100-70(Yamazaki, scientific apparatus MFG, GO) に 1 cm の高さに入れ、タンクの中を充分飽和させるために濾紙片をタンクの壁にはりつけ、試料を spot した薄層を静かに展開わくに立てて、展開槽のふちに wax をぬり、glass plate を密封した。展開は二次元法で共に上昇法によった。展開距離は solvent front が原点から 10 cm の所に達した時に展開を中止した。再現性を確実にする為に二次展開の前の処理の乾燥は一定の条件によった。即ち一次展開終了後約 20 分間空気中で乾かした。

検出方法としては展開終了後プレートを恒温器中で  $110^\circ\text{C}$ , 10 分間乾燥した。発色剤は次のものを用いた。ninhydrin 試薬 (1. 0.2% ninhydrin-ethanol 溶液 50 ml, acetic acid 10 ml 及び 2, 4, 6 collidine 2 ml を混ぜる。II. 1% 硝酸銅  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  の ethanol 溶液 I と II を使用直前 50: 3 の比に混ぜて用いる)。をスプレーし、 $110^\circ\text{C}$  5 分間加温発色させた。この場合発色の時間的ずれを注意して接近した位置を占める 2 つのクロマトグラムを識別した。なおこの一連の操作中に Rf 値が再現性をもつために薄層の厚さを均一にすること、プレートの熱処理や保存の条件、展開容器が気密で温度及び展開距離が一定である事などに、出来るだけ注意を払った。各クロマトグラムの固定には標準物質の二次元の薄層クロマトグラムと比較すると共に各 spot の Rf

値、相対的位置、呈色調などを検討してアミノ酸を固定した。確定困難又は相異なった spot はその spot をけずりとり蒸溜水中にとがし、更に polyethylene glycol 1500 で濃縮して、更に異なった展開溶媒即ち n-propanol-water (64: 36w/w) ないし n-butanol-acetic acid-water (60: 20: 20 w/w) で一次展開してくわしく鑑別した。数種のアミノ酸については、その存在を確かめる意味で展開後の spot に特種試薬による呈色反応を行った即ち坂口反応で arginine を、Ehrlich 試薬で tryptophane を、Millon 反応で tyrosine を、Knoop 反応で histidine の検出を行った。酸加水分解では加水分解中に tryptophane は完全に近い程度に破壊されるので、アルカリ加水分解によって分離同定した。

### 実験成績

第 1 表は既知のアミノ酸各 1 mg を用いて、一次展開

Table 1 Rf values\* of known amino acids (one-dimension)

Amino acid	Solvent	
	PrA	PhW
Alanine	70	32
Arginine	25	22
Aspartic acid	29	11
Cystine-cysteine	52	6
Glutamic acid	36	18
Glycine	55	27
Isoleucine	74	55
Leucine	73	56
Lysine	30	10
Hydroxyproline	50	41
Proline	59	52
Phenylalanine	75	58
Histidine	60	39
Serine	49	22
Threonine	64	29
Tryptophane	69	62
Tyrosine	58	49
Valine	64	47
Methionine	71	51

PrA: n-propanol/28% ammonia (67: 33 w/w)

PhW: phenol/water (75: 25w/w)

\*—Values represent an average of three developments.

によって著者の求めた Rf 値である。この Rf 値は両溶媒の場合とも文献に記載されている Rf 値と比べて多少異なっている。この原因として考えられるのは装置、温度、溶媒、薄層の質などによるらしい。第 2 表と第 1 図は各アミノ酸の 1 mg mixture を二次展開して求めた Rf 値の標準物質の薄層クロマトグラフィーである。第 1 及び第 2 表の Rf 値は当然異なった結果が出るわけである。これらの標準物質を用いてブタ回虫及びアニサキス幼虫



Table 2 Average Rf values of homologous spots from two dimensional thin layer chromatography of *Ascaris* tissues and *Anisakis* larvae as compared with Rf values of known amino acids

	Known amino acid.		<i>Ascaris lumbricoides suum</i>												Solvent
			hemolymph		cuticle		muscle		female sexual organ		alimentary canal		<i>Anisakis</i> larvae		
	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	Spot No.	R <sub>f</sub>	
Alanine	8	53/29	8	55/31	8	50/28	7	56/26	7	47/28	7	51/30	7	53/28	PrA PhW
Arginine	2	22/21	2	19/23	2	21/20	2	25/22	2	21/18	2	23/21	2	20/17	PrA PhW
Aspartic acid	6	40/17	6	44/41	6	40/19	5	44/16	5	35/16	5	41/18	5	40/8	PrA PhW
Cystine-Cysteine	5	39/5	5	36/5	5	37/6									PrA PhW
Glycine	7	42/22	7	44/24	7	42/22	6	44/21	6	43/17	6	40/23	6	47/18	PrA PhW
Glutamic acid	3	27/15	3	24/16	3	25/14	3	28/14	3	28/13	3	28/16	3	32/14	PrA PhW
Histidine	11	56/83	10	58/40	10	53/36	9	58/50			9	52/40	9	61/36	PrA PhW
Hydroxyproline	10	38/36			16	?									PrA PhW
Isoleucine	16	66/57	14	70/60	14	72/65	12	70/55	12	71/56	13	68/58	12	69/55	PrA PhW
Leucine		65/53													
Lysine	1	20/10	1	17/11	1	17/9	1	20/10	1	19/9	1	21/11	1	24/9	PrA PhW
Phenylalanine	17	67/64	15	71/66	15	75/80	13	70/65	13	72/70	14	70/69	13	73/71	PrA PhW
Proline	13	52/50	11	55/53	11	49/48	10	56/52	9	49/48	10	48/48	10	52/46	PrA PhW
Threonine	9	55/25	9	62/26	9	52/53	8	61/28	8	54/23	8	53/25	8	57/26	PrA PhW
Tryptophane	18	64/79	16	66/75			14	67/81	14	70/74	15	70/69	14	65/78	PrA PhW
Tyrosine	14	57/48	12	60/48	12	58/51			11	59/49	11	54/45	11	61/45	PrA PhW
Serine	4	33/8	4	35/9	4	30/10	4	40/7	4	33/7	4	33/9	4	41/6	PrA PhW
Valine	15	62/45	13	65/48	13	64/50	11	64/44	10	66/44	12	60/47			PrA PhW
Methionine	12	64/39													PrA PhW
Unknown			×	4/2	×	10/1									PrA PhW

体のアミノ酸の同定を行なった。ブタ回虫体腔液のアミノ酸の展開は第2図に示した様である。ここに示された図はアルカリ及び酸加水分解における薄層クロマトグラフィーを合した模式図で示されている。体腔液から検出されたアミノ酸は次の様である。cystine-cysteine, arginine, glutamic acid, lysine, serine, glycine, alanine, threonine, histidine, proline, tyrosine, valine, phenylalanine, tryptophane, aspartic acid が認められた。その他に Spot No. 14 は spot をけずり取って蒸留水

で抽出して, polyethylene glycol で濃縮して, solvent として n-propanol-water (64 : 36w/w) を用い一次展開したところ, leucine と isoleucine の二つに分離出来た。Spot No. 4.5 は cystine と glycine に分離され、原点近くの Spot X は同定出来なかったが恐らく peptide と思われる。ブタ回虫の角皮は第3図および第2表に示される様で tryptophane が検出されなかった他は、体腔液と殆ど同様のアミノ酸構成を示した。Spot No. 13 は体腔液の場合の様に操作して leucine と isoleucine

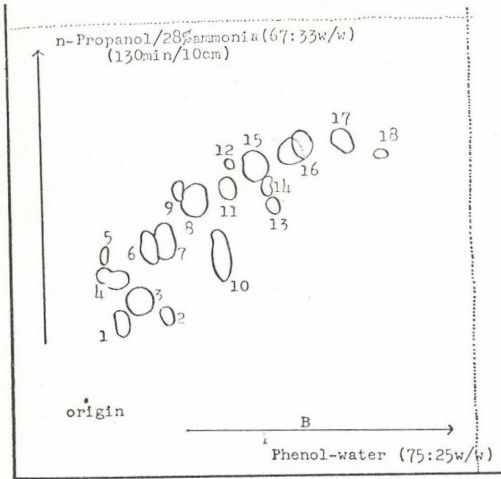


Fig. 1 Two-dimensional thin-layer chromatogram of amino acids mixture. The plate was first developed in direction A, dried, and developed in direction B

- |                   |                            |
|-------------------|----------------------------|
| 1 : Lysine        | 10 : Hydroxyproline        |
| 2 : Arginine      | 11 : Histidine             |
| 3 : Glutamic acid | 12 : Methionine            |
| 4 : Serine        | 13 : Proline               |
| 5 : Cystine       | 14 : Tyrosine              |
| 6 : Aspartic acid | 15 : Valine                |
| 7 : Glycine       | 16 : Leucine or Isoleucine |
| 8 : Alanine       | 17 : Phenylalanine         |
| 9 : Threonine     | 18 : Tryptophane           |

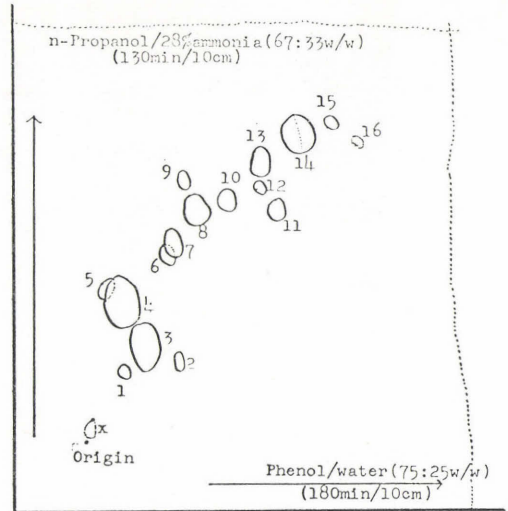


Fig. 2 Diagram of two-dimensional TLC of amino acids identified from the acid hydrolysed *Ascaris* hemolymph

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

に、Spot No. 5, 6 は solvent として n-butanol-acetic-acid-water 60 : 20 : 20w/w) を用いて glycine と alanine に分離する事が出来た。Spot No. 16 は二次展開終了後に、ninhydrine を spray して 110°C 恒温器の中で加温した時に橙黄色の spot が出現した事があった。角皮の薄層クロマトグラフィーの Spot No. 15 の Rf 値は標準物質より大きい、けずりとして一次展開して一次の標準物質と比べた結果 phenylalanine であると同定出来た。Spot No. X は未知の spot であった。

筋肉からは第 4 図および第 2 表の様に 15 種のアミノ酸が検出された。Spot No. 12 は leucine と isoleucine に分離されたが、tyrosine は認められなかった。

雌生殖器については第 5 図および第 2 表に示される様である。Spot No. 12 は leucine と isoleucine にはっきり分離出来なかった。同定出来たアミノ酸の数は 15 種である。この場合には体腔液および角皮と異なり cystine-cysteine と histidine が検出出来なかった。

消化管では第 6 図及び第 2 表に示される様に 16 種のアミノ酸が分離出来た。Spot No. 13 は isoleucine と

leucine に分離出来た。しかし cystine は認められなかった。一方 histidine の spot が検出された。以上の様にブタ回虫の各組織別に分析されたアミノ酸の構成は大体似かよっている。アニサキス幼虫体からのアミノ酸については第 7 図及び第 2 表に示される様である。即ち 14 種のアミノ酸があり、arginine, alanine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, histidine, leucine-isoleucine, proline, phenylalanine, tryptophane, tyrosine, threonine, serine の spot が認められた。Spot No. 5 は solvent として 96% ethanol-water (63 : 37w/w) を用いて aspartic acid と glycine に separate 出来た。Spot No. 7 は上記の solvent で alanine と threonine に分離された。Spot No. 11 は n-propanol-water を使用した一次の薄層クロマトグラフィーでも leucine と isoleucine に分離出来ず一つの spot として検出された。次に定量的な意味で第 3 表に示される様に二次元の薄層クロマトグラフィーの標準物質の各 spot の濃度を # とし、ブタ回虫各組織及びアニサキス幼虫体の薄層クロマトグラフィーの spot の濃度と比較し、# ± 土の 4 段



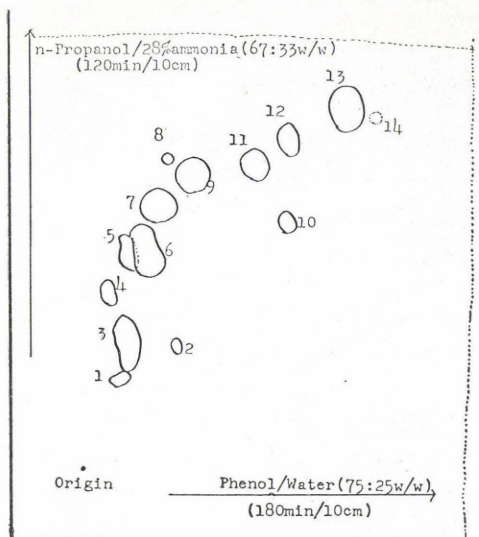


Fig. 3 Diagram of two-dimensional T. L. C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Ascaris* cuticle

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

階に分けてみた。(第3表)体腔液では glutamic acid, serine, alanine, leucine, isoleucine の spot が最も濃厚で、次に valine, proline, phenylalanine の spot がやや低い程度を示した。角皮では proline, glycine, alanine が濃厚 aspartic acid, glutamic acid, serine, phenylalanine がこれに次いだ、筋肉では aspartic acid, alanine, glutamic acid, proline, glycine, valine, leucine, leucine, isoleucine が濃厚で arginine, serine がこれに次いでいる。雌生殖器では alanine, proline, valine, glycine が濃厚で glutamic acid, threonine, phenylalanine がこれに次いでいる。消化管では alanine, aspartic acid, glycine, proline が濃厚で valine, leucine, isoleucine, arginine, serine, phenylalanine, glutamic acid がこれに次いでいる。アニサキス幼虫体では glycine, proline, alanine が濃厚で glutamic acid, serine がこれに次ぎ、その他のアミノ酸はごく薄い spot としてのみ認められた。これを通覧するとブタ回虫の各組織及びアニサキス幼虫体を通じて alanine,

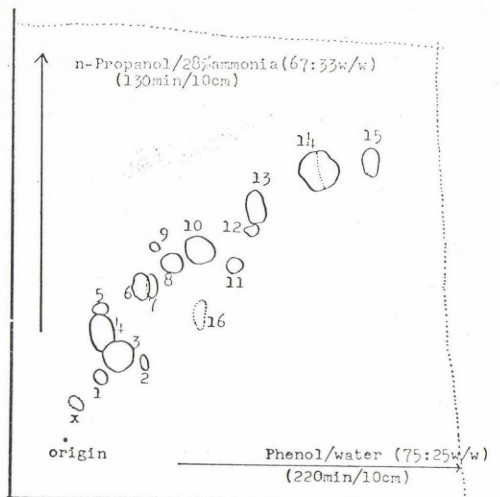


Fig. 4 Diagram of two-dimensional T. L. C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Ascaris* muscle

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

glycine, leucine, isoleucine, proline が濃厚な spot として認められた。一方 threonine, tyrosine, tryptophane は一様に非常に薄い spot として検出された。著者の今回の実験では methionine の spot が検出出来なかった。

#### 考 按

今回の実験で展開溶媒の選択に際し、従来 solvent として種々なものが報告されている。Mutschler (1959) は 70% ethanol : 25% ammonia (4 : 1v/v) を用いて良好な分離が得られたと報告している。一方 Brenner et al (1960) は methanol, ethanol, acetone などを含む溶媒系が spot の分散をおこし易い欠点があるのに反し、n-butanol : acetic acid : water (60 : 20 : 20w/w) 及び 100 g の溶媒に対して約 20 mg の NaCN を加えた n-phenol : water (75 : 25w/w) の solvent がよりすぐれていると報告したが、著者の実験では n-propanol : 28% ammonia (67 : 33w/w) が良い結果が得られた。

所謂回虫毒の研究は回虫の代謝の本質の問題を追求し

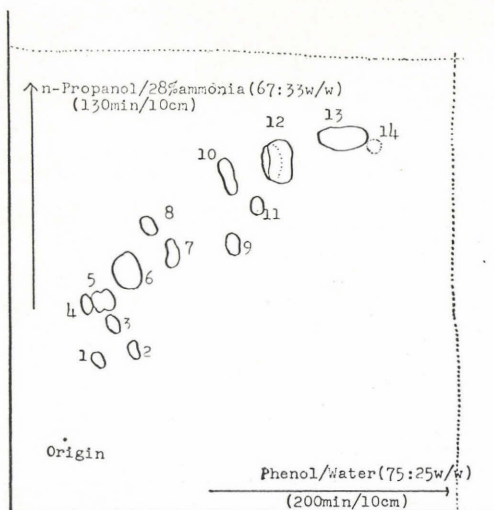


Fig. 5 Diagram of two-dimensional T. L. C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Ascaris* female sexual organ

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

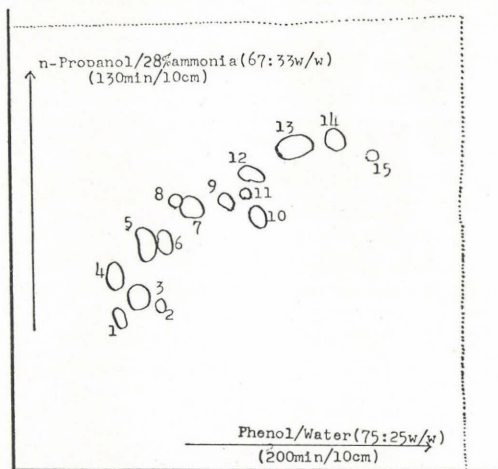


Fig. 6 Diagram of two-dimensional T. L. C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Ascaris* alimentary canal

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

たものである。回虫体とその飼育液中のアミノ酸についていくつかの実験がある。Flury (1912) は虫体全部を加水分解して glycine, valine, leucine, aspartic acid, arginine, lysine, histidine, tyrosine などのアミノ酸を検出した。美馬はブタ回虫体腔液及び飼育液 histamine のを定量し、これが回虫毒の一因子とも考えられると報告している。若林 (1941) は回虫飼育液中にアミノ酸として tryptophane, tyrosine を証明した。ペーパークロマトグラフィーが開発されて回虫毒の本態の化学的追求ことにアミノ酸、脂肪酸の分析がこの方法で追求された。橋本ら (1952) は回虫体腔液のペーパークロマトグラフィーによって aspartic acid, alanine, leucine, glycine, lysine, tyrosine, tryptophane さらに不確定ではあるが histidine を遊離アミノ酸として検出し、これらのアミノ酸は回虫の栄養素としての役割を果たすと共に、腸内に排泄され腸内細菌の作用でアミン類あるいは脂肪誘導体に変化して、回虫毒の一因となるのではないかと推定している。吉沢 (1954) は回虫飼育液のペーパークロマトグラフィーによって cystine, alanine, serine, histidine, tyrosine, tryptophane, leucine, glycine, valine, taurine 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。Savel (1955) は回虫体の加水分解により13種のアミノ酸を検出し、arginine, cystine, glutamic acid, lysine, tyrosine が豊富に認められると報告しているが、著者は tyrosine, cystine がブタ回虫各組織及びアニサキスを通じて、その量の少ないアミノ酸に属する結果を得た。Rogers (1955) はブタ回虫やその他の寄生性線虫から排泄されるアミノ酸を調べた。随伴細菌を防ぐ為ペニシリンやストレプトマイシンを加えた生食水中で飼養すると、線虫から出される遊離アミノ酸として、leucine, phenylalanine, alanine, valine, proline, aspartic acid, glutamic acid が検出され、更に加水分解すると glycine, serine, cystine が検出され時に lysine, tyrosine も検出されたと報告している。この際アミノ酸の排泄は角皮を通して出されると考えていなくて、生殖器や消化管から出されたものと想像している。松岡 (1960) はブタ回虫の全虫体の蛋白分画を材料として、紫外線吸収スペクトログラム及びペーパークロマトグラフィーによるアミノ酸分析を行なった。その結果 leucine, valine, tyrosine, proline, histidine, alanine, threonine, glycine, taurine, arginine, serine,



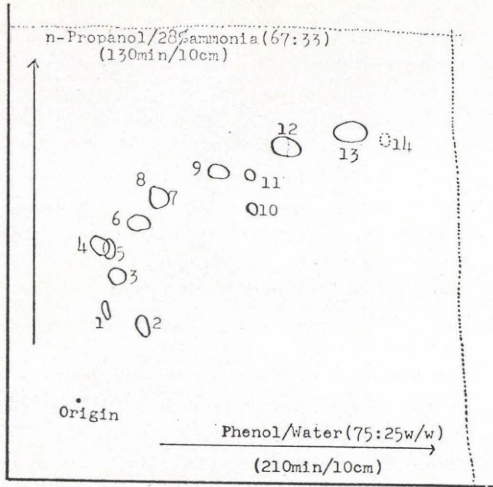


Fig. 7 Diagram of two-dimensional T. L. C. of amino acids identified from the acid hydrolysed *Anisakis* sp.larvae.

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

Table 3 The degree of colour reaction by ninhydrin reagent, compared with thin layer chromatography of standard amino acid.

	hemo-lymph	cuticle	muscle	femal sexual organ	alimentary canal	<i>Anisakis</i> larva
Alanine	##	##	##	##	##	##
Arginine	+	##	+	±	+	±
Aspartic acid	##	+	##	±	##	±
Cystine-cysteine	±	±	##	##	##	##
Glycine	±	##	##	##	##	##
Glutamic acid	##	+	##	+	+	+
Histidine	+	##	+	+	+	±
Ileucine and Leucine	##	##	##	##	+	+
Lysin	+	+	±	±	±	±
Phenylalanine	+	+	+	+	+	±
Proline	+	##	##	##	##	##
Threonine	±	±	+	+	±	±
Tryptophane	±	±	±	±	±	±
Tyrosine	±	±	+	±	±	±
Serine	+	+	+	±	±	±
Valine	+	±	##	##	+	±
Hydroxyproline		+(?)				

standard is shown as #

glutamic acid, aspartic acid, cystic acid, tryptophane を証明した. Pollak & Fairbain (1955) によ

るとアメリカのブタ回虫の卵巣には arginine は含まれていないが、オーストラリアのブタ回虫のものには含まれているという. 著者の実験成績では日本のブタ回虫の雌生殖器官からは arginine が検出された.

Bird (1957) や Watson and Silwester (1958) は Moore & Stein (1951) の分析方法によって、角皮のアミノ酸を分析した. その結果量の多いものとして proline, glycine, arginine の順になると報告した. 著者が薄層クロマトグラフィー法で角皮のアミノ酸をしらべた結果この3つのアミノ酸の量は他に比して多かった. この際 Watson and Silwester は角皮から hydroxyproline を検出したが著者もこのアミノ酸は存在するものと考えている. Jaskoski (1962) は幼虫包膜卵から18種のアミノ酸即ち alanine, arginine, aspartic acid, cystine, glycine, glutamic acid, histidine, isoleucine, leucine, metnionine, phenylalanine, proline, tryptophane, tyrosine, serine valine を検出した. Salmenkova (1962) はペーパークロマトグラフィーで体液液の遊離アミノ酸を調べ Jaskoski の幼虫卵の場合と殆ど同様な結果を得た. ただ cystine と isoleucine が検出されていない. 著者は体液液の薄層クロマトグラフィーによって cystine と isoleucine を検出出来た. 著者の実験を通覧して methionine が検出されていない点を除いては、不可欠アミノ酸とされている leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, threonine, tryptophane, valine がブタ回虫各組織から検出されている. typtophane が角皮からだけ検出されていないが、この事は角皮が生活反応の活発でない組織であるからとも考えられる. アニサキス幼虫体からは valine が検出されていない. ブタ回虫, アニサキス幼虫体を通じて proline が濃い spot として認められるが, arginine→ornithine⇄proline⇄glutamic acid の反応が相互に移行される中で proline の合成の方の反応が促進されていること考えとれる. methionine の検出されない事の検討は過酸で酸化して薄層クロマトグラフィーないしアミノ酸自動分析器にかけ次の機会に報告したい.

結 語

1) ブタ回虫各組織につき薄層クロマトグラフィーによってアミノ酸分析を行なった. その結果体液液から17種, 角皮から16~17種, 筋肉から15種, 雌生殖器官から15種, 消化管から16種を検出した. 各々に共通に認められたアミノ酸は aspartic acid, alanine, arginine, gly-

ine, glutamic acid, lysine, phenylalanine, proline, threonine, serine, valine であった。

さらに cystine-cysteine は体腔液, 角皮にだけ認められた。角皮には hydroxyproline の存在が考えられる。tryptophanane は角皮にだけ, tyrosine は筋肉にだけ, histidine は雌生殖器官にだけそれぞれ検出されなかった。methionine はこの方法では証明され難かった。

2) alanine, proline, glycine, glutamic acid は各組織を通じて濃い spot として検出された。一方 threonine, tryptophane, tyrosine は薄い spot であった。

3) アニサキス幼虫体からは14種のアミノ酸が検出された。即ち alanine, arginine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, histidine, leucine isoleucine, lysine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophane, tyrosine, serine である。このうち alanine, glycine, proline の spot は濃厚で他の spot は非常に薄かった。

#### 文 献

- 1) Baldwin, E. (1937): 6 より引用。
- 2) 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.
- 3) Bnnerer, M. and Niederweiser, A. (1960): Dünn-schicht-Chromatographie von Aminosäuren. Experientia, 16, 378.
- 4) Flury, F. (1912): Zur Chemie und Toxikologie der Ascariden. Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol., 67, 275-392.
- 5) Jaskoski, B. J. (1962): Paper chromatography of some fraction of *Ascaris suum* eggs. Exptl. Parasitol., 12, 168-175.
- 6) 梶原誠一, 橋本典秋 (1952): 回虫体腔液の paper-chromatography. Medicine and Biology, 25 (3) 108-110.
- 7) 松岡弘 (1960): 回虫虫体の蛋白分画に関する研究。熊本医学会誌, 4(9), 1803-1808.
- 8) Moffat, E. D. and Lytle, R. I. (1959): Polychromatic technique for the identification of amino acids on paperchromatograms. Anal. Chem., 31, 926-938.
- 9) Moore, S. and Steine, W. H. (1951): 15 より引用。
- 10) Mutschler, E. and Rochelmeyer, H. (1959): Über die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Dünn-schicht-Chromatographie. Arch. Pharmacol., 292, 449.
- 11) Pollak, J. K. and Fairbairn, D. (1955): The metabolism of *Ascaris lumbricoides* ovaries. Can. J. Biochem. Physiol., 33, 297-306.
- 12) Rogers, W. R. (1955): Amino acid and peptides excreted by Nematode parasites. Exptl. Parasitol., 4(1), 21-28.
- 13) Salmenkova, E. A. (1962): Free amino acid in the cavity fluid of *Ascaris suum* and changes in the their composition under conditions of artical culture in protein-free synthetic medium. Med. Parazitol, i Parazitarn., 31, 664-668.
- 14) 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.
- 15) Watson, M. R. and Silvester, N. R. (1958): Studies of invertebrate collagen preparations. J. Biochem., 71, 578-584.
- 16) 吉沢利雄 (1954): 回虫飼育液のペーパークロマトグラフィ。寄生虫誌, 3, 228-232.



**Abstract**

AMINO ACIDS OF HYDROLYSED TISSUES OF HOG *ASCARIS* AND  
*ANISAKIS* SP. LARVA.

I. ANALYSIS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY

YOSHIYA OKUNO

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

Amino acid analyses of hydrolysed tissues of *Ascaris lumbricoides suum* and *Anisakis* sp. larva were carried out by thin layer chromatography.

1) By the method of thin layer chromatography, it became clearly that *Ascaris lumbricoides suum* contains many amino acids: 17 in hemolymph, 16-17 in cuticle, 15 in muscle, 18 in female sexual organ and 16 in digestive organ. The common amino acids which were determined in each tissue were as follows; alanine, arginine, aspartic acid, glycine, glutamic acid, lysine, phenylalanine, proline, threonine, serine and valine.

Cystine was identified only in hemolymph and cuticle. However, hydroxyproline in cuticle was determined only in one case among three.

Tryptophane could not be identified in cuticle and similarly tyrosine in muscle and histidine in female sexual organ. By this method, it was impossible to prove the presence of methionine in *Ascaris* tissues.

2) Alanine, proline, glycine and glutamic acid spots were recognized at high concentration, on the other hand, threonine, tryptophane and tyrosine showed low concentration.

3) From the hydrolyzate of *Anisakis* larvae, 14 amino acids were determined; alanine, arginine, aspartic acid, glutamic acid, histidine, leucine-isoleucine, lysine, phenylalanine, proline, threonine, tryptophane, tyrosine and serine.

The densities of alanine, glycine and proline spots were at higher concentration and the others were low.