

## ブタ回虫及びアニサキス幼虫の遊離 脂肪酸について

### II) ブタ回虫の遊離低級脂肪酸について

川 合 幸 夫

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1968 年 8 月 30 日 受領)

ブタ回虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) の総脂肪酸は最初 Weinland (1901) によってその存在が推定され、Flury (1912) によって確認された。回虫毒との関係を追求するため、諸研究者によって回虫飼養液中の低級脂肪酸の分析がなされている。一方回虫の臓器についても Bueding (1951) により体腔液中の、Fairbairn (1955) により体腔液及び生殖器の、Saz (1960) により筋肉の低級脂肪酸が報告されている。本邦でも若林 (1942) 及び Ueno (1960) は体腔液の低級脂肪酸を報告している。著者はブタ回虫の各臓器 (体腔液を含む) の低級脂肪酸をガスクロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーを応用して分析したのでここに報告する。

#### 材料及び実験方法

岐阜市営の屠場で屠殺直後のブタの腸管から採取した新鮮なブタ回虫を 37°C に保った生理食塩水に入れて教室に持ち帰り、外部に附着している脂肪、線維などを除去した。その後、虫体を生理食塩水でよく洗い、虫体の表面の生理食塩水を濾紙で充分にふき取った。

体腔液の採取の仕方はピーカーの上に回虫体を吊し、尾部の角皮に切創を入れ、滴下する体腔液を集めた。一方回虫の各組織についてもこれを生理食塩水で数回洗滌した後に検体として使用した。

ガスクロマトグラフィーの場合は回虫の各組織 10g を ice bath 中で生理食塩水 40 ml とガラスホモジナイザーを使用して磨砕し、15,000 r. p. m. で 10 分間遠心沈澱を行い上清を試料とした。遊離脂肪酸は上清を 1/10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で酸性としてから、3 倍容のエーテルで 7 回抽出した。総脂肪酸は上清を 1/10 NaOH でケン化後 1/10N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で酸性としてのち、前者と同様エーテル抽出を行い、それぞれを約 0.3 ml に減圧濃縮しガスクロマトグ

ラフィーに移した。(高取, 1967)

ガスクロマトグラフィーの装置は日立製作所製 F6 型昇温ガスクロマトグラフィーを使用した。カラムは長さ 2m の充填カラムを用いた。担体は 60~80 メッシュのクロモソルブ W を、酸・アルカリで処理した後、1% 磷酸と 5% ジエチレングリコールサクシネイトを加えシラン処理を行い、これを使用した。F. I. D. の温度は 350°C で、注入口の温度は 300°C で O. V. N. の温度は 60°C から 1.25°C/min の割合で上昇させた。感度は 1/10 で、キャリアガスは N<sub>2</sub> ガスを使用した。検出器は水素炎イオン化検出器を使用した。圧力は窒素圧が 0.5kg/cm<sup>2</sup> で空気圧は 1.0kg/cm<sup>2</sup> で、水素圧は試料側、対照側共に 0.7kg/cm<sup>2</sup> で使用した。チャートスピードは 40 mm/min で使用した。

ペーパークロマトグラフィーの場合は前記の様に各臓器別に磨砕した検体を 5% メタ磷酸で除蛋白し、上清を 5,000 r. p. m. 10 分間遠心沈澱を行い、上清を 5N KOH で pH 8.5 にした後、40°C で約 3 ml に濃縮し、磷酸、磷酸ナトリウム緩衝液で pH 3 にし、さらに水蒸気蒸溜を行い dry-ice-acetone bath 中に蒸溜物 150 ml を集め、0.1N アンモニア水で中和してから約 0.5 ml に減圧濃縮を行い、これをストリップの原点に附着させた。ストリップとしては東洋濾紙 NO. 50 (2×40) を使用した。

展開剤は tert-ブタノールと 28% アンモニア水及び蒸溜水を 80 : 4 : 16 の容量比に、又 n-ブタノールとエタノールと 28% アンモニア水及び蒸溜水を 75 : 5 : 4 : 16 の容量比に、又ジメチルエチルカルピノールとエタノールと 28% アンモニア水及び蒸溜水を 75 : 5 : 4 : 16 の容量比に、分液漏斗でよく振って混ぜ合せたものを使用した。展開は室温で大体、24 時間行った。検出には 0.1N NaOH で pH 6 にしたブロームチモールブルーを用いた。

本研究は文部省総合科学研究費に負う所大である。

第1表 ガスクロマトグラフィーによるブタ回虫の各臓器の低級脂肪酸の百分率(%)

酸	体腔 遊離	液 総	筋肉 遊離	角皮 遊離	消化器 遊離	睾丸 遊離	睾丸以外の 雄性生殖器 遊離	卵巣 遊離	子宮 遊離
酢酸	4.3	4.2	3.3	7.0	5.1	6.9	5.5	7.1	6.2
プロピオン酸	10.4	10.3	6.9	5.7	8.5	10.8	9.2	9.7	9.5
n-酪酸	4.7	4.7	2.9	4.6	5.2	5.2	6.6	6.6	10.0
α-メチル酪酸	58.3	58.2	53.5	55.0	51.1	41.0	44.3	38.7	38.3
n-ヴァレリアン酸	15.0	15.1	26.9	11.9	20.0	11.7	13.4	14.3	17.6
n-カブロン酸	1.9	2.0	3.3	3.9	2.2	7.9	6.1	7.7	6.1
n-カプリール酸	5.4	5.5	3.2	11.9	7.9	16.5	14.9	15.9	12.3

遊離：遊離低級脂肪酸                      総：総低級脂肪酸

第2表 ブタ回虫の各臓器の遊離低級脂肪酸のペーパークロマトグラフィー

酸	Rf 値	体腔液	筋肉	角皮	消化器	睾丸	睾丸以外の 雄性生殖器	卵巣	子宮
蟻酸	0.40	+	+	+	+	+	+	+	+
酢酸	0.36	+	+	+	+	+	+	+	+
プロピオン酸	0.44	+	+	+	+	+	+	+	+
n-酪酸	0.53	+	+	+	+	+	+	+	+
α-メチル酪酸	0.59	+	+	+	+	+	+	+	+
n-ヴァレリアン酸	0.64	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カブロン酸	0.75	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カプリール酸	0.94	+	+	+	+	+	+	+	+

(展開剤：tert-ブタノール，28%アンモニア水及び蒸溜水)

第3表 ブタ回虫の各臓器の遊離低級脂肪酸のペーパークロマトグラフィー

酸	Rf 値	体腔液	筋肉	角皮	消化器	睾丸	睾丸以外の 雄性生殖器	卵巣	子宮
蟻酸	0.14	+	+	+	+	+	+	+	+
酢酸	0.10	+	+	+	+	+	+	+	+
プロピオン酸	0.21	+	+	+	+	+	+	+	+
n-酪酸	0.33	+	+	+	+	+	+	+	+
α-メチル酪酸	0.42	+	+	+	+	+	+	+	+
n-ヴァレリアン酸	0.52	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カブロン酸	0.69	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カプリール酸	0.79	+	+	+	+	+	+	+	+

(展開剤：ジメチルエチルカルビノール，エタノール，28%アンモニア水及び蒸溜水)

## 実験成績

ブタ回虫の体腔液，筋肉，角皮，消化器，睾丸，睾丸以外の雄性生殖器，卵巣及び子宮の低級脂肪酸のガスクロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーの成

績を第1表，第4表及び第1図に示した。即ちガスクロマトグラフィーでは全ての場合に7個のピークが検出され，比較相体保持容量から，これらのピークは酢酸，プロピオン酸，n-酪酸，α-メチル酪酸，n-ヴァレリアン酸，n-カブロン酸，n-カプリール酸と同定した。

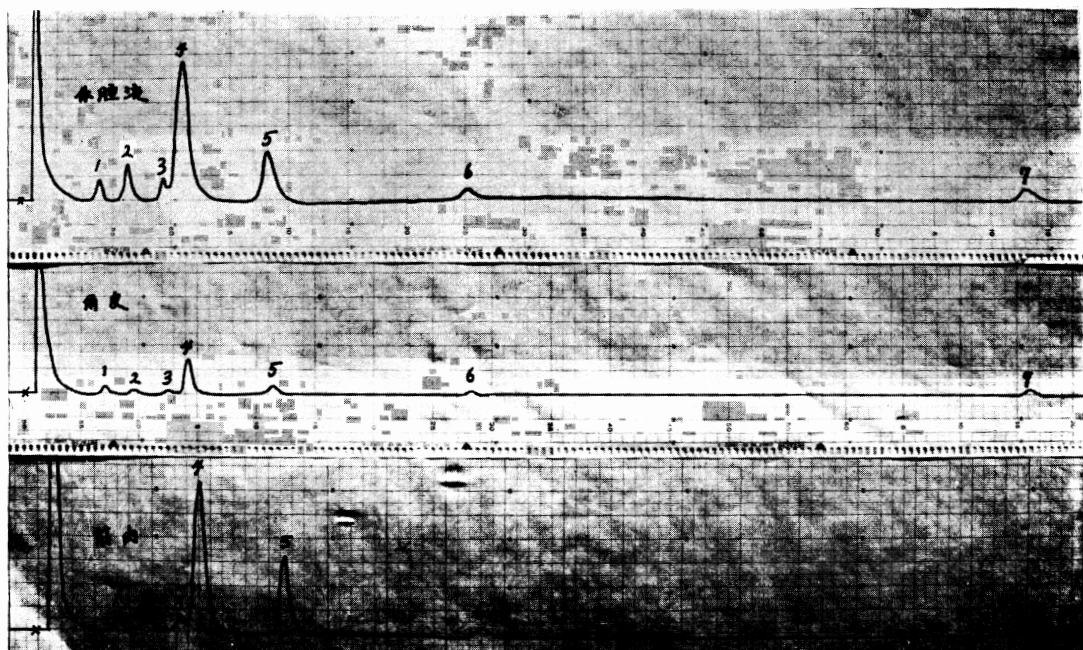
第4表 プタ回虫の各臓器の遊離低級脂肪酸のペーパークロマトグラフィー

酸	Rf 値	体腔液	筋肉	角皮	消化器	辜丸	辜丸以外の 雄性生殖器	卵巢	子宮
蟻酸	0.13	+	+	+	+	+	+	+	+
酢酸	0.18	+	+	+	+	+	+	+	+
プロピオン酸	0.27	+	+	+	+	+	+	+	+
n-酪酸	0.38	+	+	+	+	+	+	+	+
$\alpha$ -メチル酪酸	0.48	+	+	+	+	+	+	+	+
n-ヴァレリアン酸	0.53	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カブロン酸	0.64	+	+	+	+	+	+	+	+
n-カプリール酸	0.75	+	+	+	+	+	+	+	+

(展開剤：n-ブタノール，エタノール，28%アンモニア水及び蒸溜水)

第5表 プタ回虫の各臓器の C<sub>5</sub> 百分率 (%)

酸	体腔液	筋肉	角皮	消化器	辜丸	辜丸以外の 雄性生殖器	卵巢	子宮
$\alpha$ -メチル酪酸	79.8	66.6	82.4	71.9	76.9	75.2	73.2	68.4
n-ヴァレリアン酸	20.2	33.3	17.1	28.1	23.1	24.8	26.8	31.6



第1図 プタ回虫の体腔液，角皮，筋肉，のガスクロマトグラフィー

1: 酢酸, 2: プロピオン酸, 3: n-酪酸, 4:  $\alpha$ -メチル酪酸, 5: n-ヴァレリアン酸,  
6: n-カブロン酸, 7: n-カプリール酸.

体腔液における総低級脂肪酸の割合はガスクロマトグラフィーによれば酢酸4.2%, プロピオン酸10.3%, n-酪酸4.7%,  $\alpha$ -メチル酪酸58.2%, n-ヴァレリアン酸15.1%, n-カブロン酸2.0%, n-カプリール酸5.5%であった。

遊離低級脂肪酸の割合は酢酸4.3%, プロピオン酸10.4%, n-酪酸4.7%,  $\alpha$ -メチル酪酸58.3%, n-ヴァレリアン酸15.0%, n-カブロン酸1.9%, n-カプリール酸5.4%であった。

その他の臓器における遊離低級脂肪酸の割合は筋肉では酢酸3.3%, プロピオン酸6.9%, n-酪酸2.9%,  $\alpha$ -メチル酪酸53.5%, n-ヴァレリアン酸26.9%, n-カブロン酸3.3%, n-カプリール酸3.2%, 角皮では酢酸7.0%, プロピオン酸5.7%, n-酪酸4.6%,  $\alpha$ -メチル酪酸55.0% n-ヴァレリアン酸11.9%, n-カブロン酸3.9%, n-カプリール酸11.9%, 消化器では酢酸5.1%, プロピオン酸8.5%, n-酪酸5.2%,  $\alpha$ -メチル酪酸51.1%, n-ヴァレリアン酸20.0%, n-カブロン酸2.2%, n-カプリール酸7.9%, 辜丸では酢酸6.9%, プロピオン酸10.8%, n-酪酸5.2%,  $\alpha$ -メチル酪酸41.0%, n-ヴァレリアン酸11.7%, n-カブロン酸7.9%, n-カプリール酸16.5%, 辜丸以外の雄性生殖器では酢酸5.5%, プロピオン酸9.2%, n-酪酸6.6%,  $\alpha$ -メチル酪酸44.3%, n-ヴァレリアン酸13.4%, n-カブロン酸6.1%, n-カプリール酸14.9%, 卵巣では酢酸7.1%, プロピオン酸9.7%, n-酪酸6.6%,  $\alpha$ -メチル酪酸38.7%, n-ヴァレリアン酸14.3%, n-カブロン酸7.7%, n-カプリール酸15.9%, 子宮では酢酸6.2%, プロピオン酸9.5%, n-酪酸10.0%,  $\alpha$ -メチル酪酸38.3%, n-ヴァレリアン酸17.6%, n-カブロン酸6.1%, n-カプリール酸12.3%, であった。

ペーパークロマトグラフィーでは展開剤に tert-ブタノールと28%アンモニア水及び蒸留水を使用した場合もエタノールと28%アンモニア水及び蒸留水を使用した場合も、又ジメチルエチルカルピノールとエタノールと28%アンモニア水及び蒸留水を使用した場合も、いずれの場合も8個のスポットを認めた。

Rf 値より、これらは蟻酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、 $\alpha$ -メチル酪酸、n-ヴァレリアン酸、n-カブロン酸、n-カプリール酸と同定した。蟻酸と酢酸のスポット濃度は同じ程度であった。又  $\alpha$ -メチル酪酸のスポットが一番濃く現われた。

## 考 察

若林 (1942) はブタ回虫の体腔液から、蟻酸、酪酸及

び iso-ヴァレリアン酸を検出したが、著者の実験では iso-ヴァレリアン酸は検出できなかった。Moyle & Baldwin (1952) はブタ回虫の体腔液から C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 及び C<sub>6</sub> の脂肪酸を検出し、C<sub>1</sub> は蟻酸、C<sub>2</sub> は酢酸、C<sub>3</sub> はプロピオン酸、C<sub>4</sub> は n-酪酸、C<sub>5</sub> は  $\alpha$ -メチル酪酸と同定したが、n-ヴァレリアン酸の存在を認めなかった。そして C<sub>6</sub> は同定出来なかった。全脂肪酸の46%が C<sub>5</sub> で、その90%が  $\alpha$ -メチル酪酸であったとしている。著者の実験では C<sub>6</sub> は n-カブロン酸と同定した。C<sub>5</sub> の79.8%が  $\alpha$ -メチル酪酸であった。その結果を第5表に示した。Bueding (1951) はブタ回虫の体腔液内の低

第6表 体腔液の遊離低級脂肪酸の割合 (%)

	Baldwin (1952)	上野 (1960)	著者
C <sub>2</sub>	11.1	22.7	4.5
C <sub>3</sub>	4.4	32.0	11.0
C <sub>4</sub>	1.9	18.6	5.0
C <sub>5</sub>	46.0	16.1	77.5
C <sub>6</sub>	35.7 (C <sub>6+8</sub> )	10.6	2.0

級脂肪酸の40%が C<sub>5</sub> で、その大体20%が  $\alpha$ -メチル酪酸で、蟻酸は検出できなかったと報告し、上野 (1960) はブタ回虫の体腔液中の脂肪酸の炭素数の割合を報告した。即ち C<sub>1</sub> は49.0%, C<sub>2</sub> は11.6%, C<sub>3</sub> は16.3%, C<sub>4</sub> 95%, C<sub>5</sub> は8.2%, C<sub>6</sub> は5.4%であるとし、大量の C<sub>1</sub> を認めている。著者の今回の実験の結果は、ガスクロマトグラフィーでは C<sub>1</sub> を認められなかった。水素炎イオン化検出器では荒木(1966)によると蟻酸は検出困難であると指摘している。著者の実験で C<sub>1</sub> の認められなかった理由はその為かと思われる。ペーパークロマトグラフィーでは蟻酸が認められた。スポットの濃度から推定すると、上野 (1960) の場合ほど多いとは思われないが、酢酸と同じ程度の濃度に観察出来た。

Fairbairn (1955) は雌ブタ回虫の生殖器及び体腔液から酢酸、プロピオン酸、n-酪酸及び n-ヴァレリアン酸を検出した。著者は体腔液及び生殖器から、その他に  $\alpha$ -メチル酪酸、n-カブロン酸、n-カプリール酸を検出した。

Saz & Weil (1960) はブタ回虫の筋肉から蟻酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、 $\alpha$ -メチル酪酸及び n-ヴァレリアン酸を検出した。著者はその他にさらに C<sub>6</sub> として n-カブロン酸、C<sub>8</sub> として n-カプリール酸を検出した。

体腔液に関しては総脂肪酸と遊離脂肪酸の構成上の割合の差はほとんどなく、上野 (1960), Moyle & Baldwin (1952) 及び著者の成績を C<sub>1</sub> を除いて、C<sub>2</sub>~C<sub>6</sub> の範囲

で比較すると第6表のようである。即ち上野の場合は  $C_3$  が 32.0%と多いが、Baldwin 及び著者の場合は  $C_5$  が46.0%及び77.5%と多い。

消化器、角皮、辜丸、辜丸以外の雄性生殖器、卵巣及び子宮でも、体腔液の場合と同様に蟻酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、 $\alpha$ -メチル酪酸、n-ヴァレリアン酸、n-カブロン酸及び n-カプリール酸と8個の脂肪酸が検出された。総ての臓器において、 $\alpha$ -メチル酪酸が全体の1/2近くを占めた。

### 総 括

ブタ回虫 (*Ascaris lumbricoides suum*) の低級脂肪酸の分析方法として、ガスクロマトグラフィー及びペーパークロマトグラフィーを応用した。

ガスクロマトグラフィーには各臓器を生理食塩水で磨碎し、エーテルで抽出し、その後減圧濃縮したものを用いた。

ペーパークロマトグラフィーにはガスクロマトグラフィーの場合と同様に磨碎した検体を KOH で pH 8.5 にし、磷酸・磷酸ナトリウム緩衝液で pH 3 にし、さらに水蒸気蒸溜を行った後アンモニアで中和し、その後減圧濃縮したものをストリップに附着させた。ガスクロマトグラフィーでは7個のピークが検出され、それらは比較相対保持容量から酢酸、プロピオン酸、n-酪酸、n-ヴァレリアン酸、 $\alpha$ -メチル酪酸、n-カブロン酸及び n-カプリール酸と同定された。

ペーパークロマトグラフィーでは前記の脂肪酸の他に蟻酸を検出できた。総ての臓器で  $\alpha$ -メチル酪酸が大部分を占めた。

### 文 献

- 1) 荒木峻 (1966): ガスクロマトグラフィー. 東京化学同人, 107.
- 2) Bueding, E. and Yale, H. W. (1951): Production of  $\alpha$ -methylbutyric acids by bacteria free *Ascaris lumbricoides*. J. Biol., 93, 411-423.
- 3) Fairbairn, D. (1955): Lipids of the female reproductive organs, in *Ascaris lumbricoides*. Can. J. Biochem., 33, 31-37.
- 4) Flury, F. (1912): Zur Chemie und Toxikologie der Ascariden. Arch. Exptl. Pathol. Pharmkol., 67, 275-392.
- 5) Hamajima, F. (1967): Studies on metabolism of lung flukes genus *Paragonimus*. III. Occurrence of organic acids in uterine eggs, larvae and adults. Jap. J. Parasit., 16, 1-7.
- 6) Moyle, V. and Boldwin, E. (1952): Volatile fatty acids of *Ascaris lumbricoides* from the pig. Biochem. J., 51, 504-510.
- 7) Saz, H. J. and Weil, A. (1960): The mechanism of the formation of  $\alpha$ -methylbutyrate from carbohydrate by *Ascaris lumbricoides* muscle. J. Biol. Chem., 235, 914-918.
- 8) 高取健彦・今井陽 (1967): 標識低級脂肪酸の自動分析. 生化学, 39, 619.
- 9) 上野芳夫 (1960): ブタ回虫に於ける中間代謝物の定性ならびに定量的研究. (1) 低級脂肪酸, アンモニア, およびアミノ酸について. 生化学, 32, 54-59.
- 10) Ueno, Y. (1960): A method for the microdetermination of lower aliphatic fatty acids by paper chromatography and its application to study of the metabolism of *Ascaris lumbricoides* var. *suis*. Biochem. J., 48, 161-168.
- 11) Weiland, E. (1901): Uber Kohlenhydratzersetzung ohne Sauerstoffaufnahme bei *Ascaris*, einen tierischen Gärungsprozess. Z. Biol., 42, 55-90.
- 12) 若林一夫 (1942): 蛔虫及び其の飼育液に於ける総脂肪酸と蛔虫毒としての其に関する考察. 慶応医, 22, 489-503.

**Abstract**FREE FATTY ACIDS OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM* AND *ANISAKIS* SP. LARVAE2) VOLATILE FREE FATTY ACIDS OF *ASCARIS LUMBRICOIDES SUUM*

YUKIO KAWAI

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

The volatile fatty acids of various organs *Ascaris lumbricoides suum* were analyzed by gas chromatography and paper chromatography.

By gas chromatographic analysis, seven fatty acids were found.

They were identified as acetic, propionic, n-butyric,  $\alpha$ -methylbutyric, n-valeric, n-caproic and n-caprylic acids. Formic acid was not appeared by this method. In this analysis, large quantity of  $\alpha$ -methylbutyric acid was appeared in the all organs.

By paper chromatographic behavior, eight fatty acids were found.

They were identified as formic, acetic, propionic,  $\alpha$ -methylbutyric, n-valeric, n-caproic and n-caprylic acids.

In these results, volatile fatty acids of *Ascaris lumbricoides suum* were identified as formic, acetic, propionic, n-butyric,  $\alpha$ -methylbutyric, n-valeric, n-caproic and n-caprylic acid.