

# 日本住血吸虫の生体外飼育に関する研究

## 1. 血液成分、特に血清を用いた飼育

伊藤二郎 安羅岡一男 小宮義孝

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和29年11月20日受領)

住血吸虫の代謝生理に関しては Bueding 一派其他により最近著しい進歩が認められ、呼吸代謝、糖代謝、蛋白代謝等の知見が加えられているが、その宿主外飼育の試みは Lee and Chu(1935)および Ross and Bueding (1950)等の報告を見るのみであり、現在は辛うじてその生存期間を延長せしめる事に留まつているにすぎない。且つその飼養液は血清を用いてのみ或程度の成功を収めているものの、人工合成飼養液については殆んど成功していない。

筆者等は血清飼養液を用い、他方人工合成飼養液を考案改良しつゝ、日本住血吸虫の生体外飼育に関し種々の実験を試みたのであるが、ここでは前二者の報告の追試の意義も含めて、主として健康馬血清を用い、馬の個体差、血清濃度、飼育温度、虫体の雌雄差等の結果を述べ、飼養液更新の有無における夫々の虫体の生存期間を明かにした。以下その成績を報告する。

### 材料及び方法

飼育容器は飼養液の蒸発、雑菌の混入を可及的防止し且つ装束観察に便なるため、直径4cm、高さ2cm、口径1cm、容量約10ccの硬質硝子製カーレル瓶を用い、その開口部には二重ゴム栓を施した。之等の器具類は総べて厳重な化学的微生物学的清浄を必要とするために、使用に際しては次の処理を行つた。硝子器材は硫酸液洗、水洗、石鹼液(Ivory soap)煮沸、湯洗、蒸溜水洗、乾燥、乾熱滅菌を行い、ゴム製品は苛性ソーダ液煮沸、水洗、塩酸液煮沸、水洗、蒸溜水洗、蒸気滅菌を施した。

飼養液に用いた血液は総べて健康馬の頸動脈より無菌採血し、ヘパリン加全血液、脱纖血、血球浮游液、血清

の4種を調製し、その各々を上述カーレル瓶に6cc宛分注した。ヘパリンはリンガー氏液に1,000倍にとかしその1ccを血液20ccの割合に添加して凝血防止の目的に用いた。脱纖血は硝子球の振盪により調製し、血球浮游液はリンガー氏液を用いて1cc当りの血球数約500万に調製した。これらの各液を各々0.2%加糖リンガー氏液をもつて原液、75%、50%、25%の稀釈液となして実験に供した。その他米国 Armour 社製牛血清アルブミンの50%リンガー氏溶液、豚胚抽出液添加の血清50%稀釈液等を飼養液とせる実験をも試みた。

上述各飼養液には雑菌繁殖防止の目的のため、1cc当りペニシリン500単位、ストレプトマイシン500rづゝ添加した。予備実験ではこれらの抗生物質は虫体に対し認めうべき有害作用を示さなかつた。また飼育期間の前後には Beckmann の pH 測定器で pH を測定して記録した。日本住血吸虫の飼養液の至適 pH については第2報で記述する。また稀釈液の調製にリンガー氏液を用いた理由も第2報にゆづる。

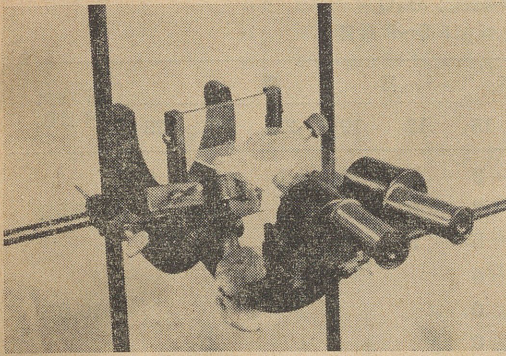
供試虫体は抱合成熟せる雌雄虫体を用いた。山梨県産宮入貝よりえたセルカリアを家兎及びモルモットに注射感染せしめ、感染後6~11週目に解剖して虫体を採取した。採取に際しては室内を可及的無菌状態にし、且つ解剖局所を38°Cに保つために赤外ランプの照射下で解剖を行つた。家兎は空気栓塞死、モルモットはエーテル麻酔死を施し、台上に固定開腹後門脈本幹を切開し、血液と共に流出する虫体をピンセットで速かに取り上げ、一旦38°C加温滅菌リンガー氏液中で附着せる余分の血液を洗つた後、上述カーレル瓶に3対宛收容した。即ち虫体1匹当りの飼養液は1ccである。このカーレル瓶を速かにゴム栓をなし、所定温度の恒温器内に入れてその生存状況を観察した。

飼育虫体の生死判別は専らその運動の有無によつた。飼養液中の虫体をそのまま観察するために、カーレル瓶の下面から拡大透視できる様に双眼解剖顕微鏡を装置

Studies on the survival of *Schistosoma japonicum* in vitro. Survival in blood or serum media. Jiro Ito, Kazuo Yasuraoka and Yoshitaka Komiya: (Parasitology Division, National Institute of Health, Tokyo, Japan)



附 図



し、20~50 倍に拡大して運動状況を観察した (附図参照)。その運動状態乃至生活状態については後述するが、生存期間の末期において運動有無判定の困難な場合は、5 分間以上連続観察、45°C 前後迄徐々に加温、液の振盪などの刺激を与え、なお不動の際にこれを死と認めた。死と確認された虫体はカーレル瓶よりとりだして石井氏法 (1954) の苛性カリ・中性赤の反応によつて更に生死の判別を行ったが、すべて死としての反成を呈した。同一条件下における虫体の生存期間には個体差により

かなりの長短の差は免がれなかつたが、算術平均によつて各々の平均生存日数を算出した。

実験結果

1. 各種血液成分内における生存期間

上述のごとく馬全血液、脱繊維血、血球浮游液および血清の4種を調製し、38°C において飼育比較したが、血清については後述にゆづり、ここでは前3者について記述する (表1参照)。

ヘパリン加全血液では原液と75%稀釈液の両者間に顕著な差が認められず、虫体の生存日数は最低1日最高3日平均1.7日であつた。同じく50%及び25%稀釈液では両者間に有意差は認められなかつたけれども、高濃度の場合と比較すると予想に反して長期間の生存が認められ、最低2日最高10日平均6.0日であつた。然し一般に単なる加糖リンガー氏液よりはすぐれているけれども、後述の血清単独の飼養液と比較すると遙かに劣る成績を示した。即ち当面の飼育の目的のためには全血液そのまゝでは不適當であつた。脱繊維血を使用せる成績は、各濃度共全血液の場合と殆んど同様の成績を得た。即ち血中の纖維素は虫体の生存に対して積極的な意味を

第1表 馬血液成分内における虫体の生存数  
虫体；モルモット6週目；飼育温度；38°C

飼養液	pH 初~終	虫体数	生 存 日 数								平均生 存日数	備 考	
			1	2	3	4	6	8	10	12			
全血液 100~75%	7.4~7.7	♂ 3	3	1	0	0						1.7 日	ヘパリン加
		♀ 3	3	2	1	0							
		計 6	6	3	1	0							
全血液 50~25%	7.5~6.6	♂ 6	6	6	5	4	4	3	0	0	6.0 日	ヘパリン加	
		♀ 6	6	6	5	4	4	3	1	0			
		計 12	12	12	10	8	8	6	1	0			
脱繊維血 100~75%	7.5~7.8	♂ 6	6	3	0	0					1.6 日		
		♀ 6	6	3	1	0							
		計 12	12	6	1	0							
脱繊維血 50~25%	7.5~6.5	♂ 6	6	6	6	3	3	2	1	0	5.5 日		
		♀ 6	6	6	6	3	3	2	1	0			
		計 12	12	12	12	6	6	4	2	0			
血球液 500~125万 per. cc	7.4~6.8	♂ 16	7	1	1	0					0.8 日		
		♀ 16	7	1	0	0							
		計 32	14	2	1	0							
Ringe 0.2% 加糖	7.4~8.0	♂ 9	0	0							0.6 日	対 照	
		♀ 9	2	0									
		計 18	2	0									



第2表 3頭の馬血清の比較  
血清稀釈濃度；50%；飼育温度；38°C  
虫体；家兎11週目及びモルモット5~9週目

馬の 番号	pH 初~終	虫体数	生 存 日 数										平均生 存日数	
			7	9	11	13	15	17	19	21	23	25		
I	7.6~7.2	♂	4	4	4	4	2	2	2	2	1	0	0	16.5日
		♀	4	4	4	4	3	3	3	2	1	1	0	
		計	8	8	8	8	5	5	5	4	2	1	0	
II	7.0~7.3	♂	5	5	4	1	0	0						10.0日
		♀	5	5	5	3	2	0						
		計	10	10	9	4	2	0						
III	7.5~7.1	♂	12	12	11	11	7	2	1	1	0			12.1日
		♀	12	12	11	9	4	2	1	1	0			
		計	24	24	22	20	11	4	2	2	0			

第3表 馬血清濃度の比較  
虫体；モルモット5週目；飼育温度；38°C  
pH；7.2~7.8；稀釈液；0.2%加糖リンゲル

稀釈濃度	虫体数	生 存 日 数						平均生 存日数
		9	13	17	21	25	29	
100%	♂	3	3	3	3	2	0	25.0日
	♀	3	3	3	3	2	0	
	計	6	6	6	6	4	0	
75%	♂	3	3	3	2	2	0	23.3日
	♀	3	3	3	2	1	0	
	計	6	6	6	4	3	0	
50%	♂	4	4	2	2	1	0	17.5日
	♀	4	4	3	3	1	0	
	計	8	8	5	5	2	0	
25%	♂	3	3	0	0			11.1日
	♀	3	3	1	0			
	計	6	6	1	0			

第4表 飼育温度の比較  
飼養液；50%稀釈馬血清 pH 7.2~7.8  
虫体；家兎11週目

飼育温度	虫体数	生 存 日 数						平均生 存日数	
		5	9	13	17	21	25		
38°C	♂	5	5	4	0	0		10.0日	
	♀	5	5	5	2	0			
	計	10	10	9	2	0			
28°C	♂	9	9	9	7	3	1	0	14.5日
	♀	9	9	9	7	3	0	0	
	計	18	18	18	14	6	1	0	
18°C	♂	9	9	9	1	0		9.9日	
	♀	9	9	9	1	0			
	計	18	18	18	2	0			
8°C	♂	9	4	0	0			4.6日	
	♀	9	5	4	0				
	計	18	9	4	0				

見出し難いものと認められた。血球のリンゲル浮游液は正常馬血液中の血球数とほぼ一致させて原液を500万perccに調製し、これを最低125万percc迄4段階に稀釈して実験に供したが、その何れにおいても虫体の生存期間は甚だしく短かく、最高3日平均0.8日であつた。対照としての加糖リンゲル氏液における0.6日とほぼ同様の成績であつた。

2. 液不換馬血清内における生存期間

Standen (1952)の cercaricidal factor の研究において、住血吸虫セルカリアに対する馬血清の影響は、馬の

個体により相当の差のある事が知られている。成虫に対してもその様な差のある事が当然予想されたので、50%稀釈38°Cの同一条件下で3頭の馬血清の比較を行つた。その結果は表2に示した如く、平均生存日数において16.5日、10.0日、12.1日のごとき差を示した。この問題はそれ自体興味のある問題ではあるが、ここでは単にこの事実を指摘するに留める。

同一馬血清の濃度の差による生存日数の影響は、表3に示した如く、濃度の高い程好結果をもたらした。即ちその平均生存日数は100%で25.0日、75%で23.3日、



第 5 表 各種条件下の 38°C と 28°C の飼育温度の比較

A; 100%馬血清, 虫体家兎 7 週目  
 B; 他個体の 50%馬血清, 虫体モルモット 9 週目  
 C; 他個体の 50%馬血清, 虫体家兎 11 週目(再掲) pH 7.2~7.8

飼育条件	虫体数	生存日数						平均生存日数	比率		
		9	17	25	33	41	49				
A	38°C	♂	6	6	3	2	1	0	24.6日	1.3倍	
		♀	5	5	2	0	0	0			
		計	11	11	5	2	1	0			
	28°C	♂	3	3	3	3	2	0	33.0日※		
		♀	3	3	2	0	0	0			
		計	6	6	5	3	2	0			
B	38°C	♂	12	11	1	0			12.1日	1.8倍	
		♀	12	11	1	0					
		計	24	22	2	0					
	28°C	♂	13	13	11	9	4	2	0		21.9日
		♀	10	10	4	0	0	0	0		
		計	23	23	15	9	4	2	0		
C	38°C	♂	5	4	0				10.0日	1.4倍	
		♀	5	5	0						
		計	10	9	0						
	28°C	♂	9	9	3	0			14.5日		
		♀	9	9	3	0					
		計	18	18	6	0					

※液不換馬血清の最良の成績を示し, 最短 22 日, 最長 45 日であつた

50%で 17.5 日, 25%で 11.0 日であつた。これと関聯して飼養液量と虫体数の関係について実験を行つたが, その結果は 50%稀釈 38°C 同一馬血清 6cc 6 匹で平均 13.1 日の場合に, 6cc 中 18 匹で平均 7.8 日に短縮された。次に飼育温度と生存日数の関係を知るために, 同一馬血清 50%稀釈液を用いて 38°C, 28°C, 18°C 及び 8°C の各温度下で飼育した。8°C では虫体が殆んど不動であるために, 観察時には稍々温度を上昇せしめる必要があつたので, 各観察毎に新しい材料を用いた。以上の結果を表 4 に示したが, 38°C で 10.0 日, 28°C で 14.5 日, 18°C で 9.9 日, 8°C で 4.6 日となり, 28°C の飼育が最良の条件である事が明かとなつた。38°C と 28°C の関係を更に他の馬血清及び 100%の原血清等で追試せる結果は, 表 5 に見るごとく常に 28°C において生存期間の延長が認められ, 38°C に比して 1.3 倍乃至 1.8 倍となつた。

上述の諸結果により, 日本住血吸虫の生体外飼育の最

良の条件は, 馬血清の原液を用いて 28°C で飼育する時に得られ, その生存日数は最短 22 日, 最長 45 日, 平均 33.0 日であつた。

### 3. 液更新馬血清内における生存期間

実験例数が少いために充分な結論を得ることはできなかったが, 前後 2 回にわたる結果を示せば表 6 のごとくである。液は 4~7 日毎に更新した。第 1 例は血清濃度 50%, 飼育温度 38°C, 第 2 例は血清濃度 100%, 飼育温度 28°C として条件をかなり変更しているにも拘らず両者間には殆んど差が認められず, 最短 17 日, 最長 64~62 日, 平均 31.7~34.2 日であつた。なおここで雌雄虫体の差による生存期間に就いて述べると, 表 6 に見る如く雄虫が最長 60 日以上迄生存したが, 雌虫は 30 日前後で悉く死滅した。雌雄別にその平均生存日数を算出すると雄虫 42 日, 雌虫 27 日であつた。この様な性別の差は, 既述表 5 の 100%血清 38°C, 28°C, 及び 50%血清 28°C の 3 例にも認められたが, これらの例はどれも



第6表 馬血清飼養液更新の場合の虫体の生存日数  
 A; 50%稀釈馬血清 38°C,  
 虫体モルモット 5週目 pH 7.5~8.6  
 B; 100%馬血清 28°C,  
 虫体家兎 7週目 pH 7.5~8.3

飼育 条件	虫体数	生存日数							平均生 存日数	最長生 存日数	
		17	25	33	41	49	57	65			
A	♂	15	15	12	9	6	5	4	0	31.7日	64日
	♀	15	15	9	5	0	0	0	0		
	計	30	30	21	14	6	5	4	0		
B	♂	9	9	9	8	5	3	2	0	34.2日	62日
	♀	8	8	5	0	0	0	0	0		
	計	17	17	14	8	5	3	2	0		

雄虫の生存期間が1ヵ月以上に及んだ場合であつた。その他の例では性別の差は顕著でなかつた。

#### 4. その他の飼養液を用いた飼育試験

血清成分の一つとして米国 Armour 社製の牛血清アルブミン粉末を加糖リンガー氏液に50%に溶解して飼養液とした例では最高10日、平均4.0日の生存期間であつた。この例では雄虫の生存期間が著しく短かつたが、その理由は目下不明である。次に組織培養液と同様にハンクス氏液45%に血馬清45%及び豚胚抽出液10%の混合溶液を用いた例と、ハンクス氏液の代りに加糖リンガー氏液を用いた例では、その平均生存日数は各々17.0日及び20.6日であつたが、対照としての50%血清における18.0日と比較して見ると、何れも有意の差を認め得なかつた。

#### 5. カーレル瓶内における虫体の生存状態

個々の虫体によつてかなり差はあるが、一般に全生存期間を三等分して前期、中期、後期と名付ける事が出来る。門脈より取出してカーレル瓶に入れた当座は、虫体は抱合したまま雄虫の強大な吸盤によつて器壁に吸着し、且つ両吸盤を交互に用いて可成りの移動を行う。体の伸縮は専ら口吸盤と腹吸盤との間に見られ、腹吸盤以後の体部は伸縮は殆んど見られず、たゞ屈曲するのみである。雌虫はその間抱合されたまま頭部のみ出して摸索運動を行い、随時産門から数個づゝ連続して産卵するのが認められた。たゞし卵形成腔で新たに卵が形成されているかどうかは不明であつた。雌虫の両吸盤は甚だ繊弱で、吸着、移動等は専ら雄虫に依存している如くであつた。この様な状態は血清内では全生存期間のはゞ1/3の間続き、前期と名付け得る。中期1/3においては虫体は

次第に吸着力を失ひ、血清中に洗んで体を伸縮屈曲するにとゞまり、雌虫の産卵はすでに停止して遂に抱合虫体が分離してしまう。後期においてはこれらの分離した虫体は血清中で僅かに体を屈曲し、間けつ的な吸盤の収縮伸張あるいは腸管の蠕動に伴う内容の移動等が認められるに過ぎず、最後にはそれらの総べての徴候を失うにいたる。後期における雌虫の卵黄巣は一般に著しく黒変且つ崩壊の觀を呈し、雄虫の場合は長期間生存せる例において、るい瘦の觀を呈していた。

#### 考 察

以上の諸結果により日本住血吸虫の生体外飼育に際しては血清が最も優秀であり、全血液、脱纖血が中位で、血球浮游液が最低の成績である事が明かとなつた。然しながら血球が虫体の生存に重要でないということは、これからだけでは明言出来ない。むしろ反対に、虫体腸内容にはヘモグロビンが存在し、腸末端ではヘマチンとなり、明かに血球成分が虫体に摂取消化されていることがBueding and Charms (1951)等により報告されている。即ち血球は宿主血管内では虫体の重要な栄養源であるとしても、生体外では充分利用されず、そのままでは器底への沈滞、崩壊、pHの低下等の原因で却つて有害になつているものと考えられる。それ故にまた、血球成分を生体外で利用しうる様に形を変えて血清に添加できるならば、更に良好な結果が得られるかとも考えられる。

虫体の雌雄による生存期間の差は、Lee and Chu (1935)の表にもその傾向が認められたが、筆者等の結果では更に明瞭であつた。すなわち血清内で本虫を飼育する際、悉くの虫体が1ヵ月以内で死滅する例では雌雄の差は顕著でないが、1ヵ月以上に及ぶ例ではその殆んどが雄虫であり、換言すれば雌虫は血清内では1ヵ月以上生存せしめることが困難であつたが、雄虫は2ヵ月以上も生存せしめ得た。感染動物解剖所見では相当末期に及んでもほゞ同数の雌雄虫体が得られ、この様な差は認められない事実からすれば、これは明らかに血清単独の不自然な環境による影響と考えられ、ひいては雌虫と雄虫ではその代謝機構に差のある事を暗示するものとも考えられる。第2報の人工合成飼養液では最長12日間の生存成績を得ているが、その範囲内では殆んど常に雄虫の生存期間の短かつた事実と関聯して、将来の興味ある問題と考えられる。

血清濃度の高い程虫体の生存日数が延長される事實は、虫体の生存にはある一定量以上の血清成分が必要であることを意味するものと考えられる。血清飼養液を一



定期間毎に更新することは、虫体の生存によつて消費された血清成分を補給するとの考えに立てば、液更新飼育例では血清濃度はそれほど大きな影響がないと思われる。飼育温度 28°C が最良の結果をもたらした事実は、組織培養や原虫飼育その他の例と一致しているが、この様な温度の影響は饑餓などの不良条件下で顕著であり、次第に好条件となるに従つて、不明瞭になるものと考えられる。表 6のごとく液更新の実験 2 例では、血清濃度飼育温度共に異なる条件下にも拘らず、ほぼ同様の結果が得られたのは、上述の様な理由に基くものと思考される。

Ross and Bueding (1950) はマウス感染後 6~8 週目のマンソン住血吸虫を用い、馬全血清 37°C の条件下で 14~18 日間生存せしめ、Lee and Chu (1935) は家兔感染後 8~10 週目の日本住血吸虫を用いて、馬全血清 37°C で平均 13.4 日生存せしめ、更に液更新により最高 82 日迄生存せしめているが、その平均生存日数は示していない。筆者等の結果によれば、液不換例において、前者等と略同一条件下にて既にその生存日数は 2 倍に延長され、さらに全血清 28°C の好条件では最短 22 日最長 45 日平均 33.0 日の生存日数であつた。ペニシリン及びストレプトマイシンを添加せる以外はほぼ同様の飼育方法であるにも拘らず、筆者らの成績が良好である理由は目下のところ不明である。

住血吸虫の飼育実験は、(1) 無菌的環境に棲息、(2) 無菌的採取の比較的容易、(3) 門脈血という略一定の環境に棲息などの理由からすれば、他の腸管寄生蠕虫類に比してその生体外飼育は比較的容易なものとも考えられる。既述の実験成績は馬の頸動脈血を用いたものであるが、門脈血の特性を活かしてその飼養液を改良するならば、さらに良好な成績をあげうるものと思考される。

#### 要 約

1. 日本住血吸虫の生体外飼育にさいして、その飼養液に馬全血液、脱繊維血、血球浮游液および血清の 4 種を比較し、血清が最良の成績を示すことを明かにした。

2. 血清は馬の個体差の影響が大きく、液不換の際は濃度の高い程生存期間が延長され、飼育温度は 28°C が最良であつた。

3. 液不換馬血清原液 28°C の条件下では、その生存日数は最短 22 日最長 45 日平均 33.0 日を示し、液更新例では最短 17 日最長 64 日平均約 34 日を示した。

4. 血清飼養液内では雄虫が 1 ヶ月以上生存する場合でも雌虫は最長 1 ヶ月以内で死滅した。

5. 牛血清アルブミン溶液内では平均 4.0 日の生存日数を示した。血清に豚胚抽出液を添加せる例では血清と比較して有意の差は認められなかつた。

謝辞—宮入貝の郵送を戴いた山梨県医学研究所地方病部、抗生物質を分与された予研抗生物質部、豚胚抽出液及びヘパリンを分与された予研リケッチアビールス部、牛血清アルブミンを分与された予研血清部の各位に厚く御礼を申上げる。

#### 引用文献

- 1) Bueding, E., and Charms, B.: Respiratory metabolism of parasitic helminths without participation of the cytochrome system. *Nature*, **167**, 149, 1951. — 2) Hanks, J. H.: The longevity of chick cultures without renewal of medium. *Jour. Cell Comp. Physiol.*, **31**, 256, 1948. — 3) Hoeppli, R., Feng, L. C. and Chu, H. J.: Attempts to culture helminths of vertebrates in artificial media. *Chinese Med. Jour. Suppl.*, **2**, 343-374, 1938. — 4) Ishii, K.: A differential staining for living and dead larval trematodes. *Jap. Jour. Med. Sci. and Biol.*, **6**(5), 481-485, 1953. — 5) Lee, C. U., and Chu, H. J.: Simple technique for studying schistosome worms in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **32**(9), 1397-1400, 1935. — 6) Ross, O. A., and Bueding, E.: Survival of *Schistosoma mansoni* in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **73**(1, 2), 179-182, 1950. — 7) Standen, O. D.: The in vitro effect of normal and immune serum upon the cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Jour. Helminth.*, **26**(1), 24-42, 1952.

#### Summary

Information about the survival of adult schistosomes in vitro has been limited to the reports of Lee and Chu (1935) and Ross and Bueding (1950). Similarly we have studied on the survival of them in Carrel flasks. Each 3 pairs of schistosomes were removed from rabbits and guinea pigs to each Carrel flask containing 6 ml of medium. In order to secure the rigid axenic condition, antibiotics were added to the medium. Mortality of worms was used as the criterion of survival.

Whole blood, defibrinous blood, corpuscle suspension and serum of horse were applied as the medium. Among them the serum was the most efficient for the survival of worms. The survived period of worms became longer as the serum



was more concentrated. The most effective temperature for maintaining the life of worms was 28°C. The worms were found survived in serum for 33 days (22-45) under the best condition without changing the medium. With changes of fresh medium at intervals the life of worms pro-

longed for 64 days at the maximum. The male survived for over a month, whereas the female died within a month. Addition of pig embryo extract to the serum had no effect for survival of this worm.