

日本住血吸虫の生体外飼育に関する研究

2. 人工合成飼育液における飼育試験

伊藤 二郎 小宮 義孝

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和30年3月7日受領)

第1報では血液成分、特に血清をもちいての飼育成績を報告したが、本報では人工合成飼育液をもちいた成績を報告する。かかる試みに関しては、わづかに Ross and Bueding (1950) のたゞ1報を見るのみである。すなわち氏等はマンソン住血吸虫をもちいて血清に酷似せしめるために40種類以上の化学薬品の混合液を調製して生体外飼育を試みたが18時間以上生存せしめえなかつたと報告している。筆者等はリンガー氏液を基本とせる飼養液を考案改良して現在最長12日平均5.3日迄その生存期間を延長せしめることができたので一応此処にとりまとめて報告する。

供試虫体、飼育容器、観察方法等については第1報に詳述したのでここでは省略してたゞちに実験成績をあげ飼養液の調製についてはその都度各項に記述する。

実験結果

1. 各種生理平衡液内における生存期間

人工合成飼養液の基本としての生理平衡液の既存4種について、各々における虫体の生存期間を比較した。平衡液の種類および製法は表1にしめたごとくである。

第1表 供試生理平衡液一覽

| | NaCl | KCl | CaCl ₂ | MgCl ₂ | NaH ₂ PO ₄ | NaHCO ₃ | |
|------------|--------------|--------|-------------------|-------------------|----------------------------------|--------------------|----|
| | (小宗化学 犬印) | (純正化学) | (関東化学) | (純正化学) | (小宗化学 犬印) | (旭硝子) | |
| 0.85% NaCl | 0.85 | | | | | | 若干 |
| Locke's | 0.9 | 0.042 | 0.024 | | | | " |
| Tyrode's | 0.8 | 0.02 | 0.02 | 0.01 | 0.005 | | " |
| Ringer's | 0.85 | 0.02 | 0.02 | | | | " |

Studies on the survival of *Schistosoma japonicum* in vitro.

2. Survival in chemical defined artificial medium.

Jiro Ito and Yoshitaka Komiya

(National Institute of Health, Tokyo, Japan)

CaCl₂ および NaH₂PO₄ は結晶水を含むゆえに換算して秤量した。NaHCO₃ は pH を 7.4 に補正するために各液に添加したが、さらに 50 万分の 1 のフェノール・レッドを滴加して pH の指示薬とした。飼育成績は表 2 にしめせるごとく、0.85% 食塩水内では平均生存時間は 3.6

第2表 各種生理平衡液内における虫体の生存時間
虫体；モルモット 8~10 週目
飼育温度；38°C；PH 7.4 (NaHCO₃)

| 飼養液 | 虫体数 | 生存時間数 | | | | | 平均生存時間数 |
|-----------|------|-------|----|----|----|----|---------|
| | | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | |
| 0.85% 食塩水 | ♂ 6 | 1 | 0 | 0 | | | 3.6時間 |
| | ♀ 7 | 4 | 1 | 0 | | | |
| Locke's | ♂ 20 | 18 | 7 | 0 | | | 6.9時間 |
| | ♀ 20 | 20 | 7 | 0 | | | |
| Tyrode's | ♂ 20 | 19 | 6 | 0 | | | 7.1時間 |
| | ♀ 19 | 19 | 10 | 0 | | | |
| Ringer's | ♂ 20 | 20 | 8 | 2 | 2 | 0 | 9.2時間 |
| | ♀ 19 | 19 | 16 | 4 | 1 | 0 | |

時間であつたが、リンガー氏液内では最短5時間最長20時間平均9.2時間をしめて最優秀であつた。ロック氏液およびタイロード氏液ではたがいにほぼ同様の結果をしめて中位にあつた。すなわち以後の実験ではすべてリンガー氏液をもちいる事が適当と認められた。なお上述リンガー氏液に0.2% 葡萄糖を添加せる成績は平均15時間の生存時間をしめたが、添加葡萄糖の量の影響についてはさらに後述する。

2. 加糖リンガー氏液内における温度の影響

上述の成績はいづれも 38°C の飼育温度であつたが、ここでは 0.2% 加糖リンガー氏液をもちいて 38°C, 28°C, 18°C および 8°C の各温度の影響を観察した(表3)。8°C では虫体が殆んど不動であるために観察時にはやゝ温度を上昇せしめる必要があつたので各観察ごとに新しい材料をもちいた。各温度における平均生存日数を通覧すれば、38°C の 0.6 日に対し 28°C ではたゞ 2 倍の 1.2

第 3 表 飼育温度の生存期間に及ぼす影響

虫体；家兎 11 週目
飼養液；0.2% 加糖 リンガー氏液
pH；7.4~8.0 (NaHCO₃)

| 飼育温度 | 虫体数 | 生存日数 | | | | | | 平均生存日数 |
|------|------|------|---|-----|---|---|---|--------|
| | | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 3 | 4 | |
| 83°C | ♂ 9 | 5 | 0 | 0 | | | | 0.6日 |
| | ♀ 9 | 9 | 2 | 0 | | | | |
| 28°C | ♂ 10 | 10 | 7 | 4 | 0 | 0 | | 1.2日 |
| | ♀ 10 | 10 | 9 | 6 | 2 | 0 | | |
| 18°C | ♂ 9 | 9 | 9 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1.3日 |
| | ♀ 9 | 9 | 9 | 7 | 5 | 1 | 0 | |
| 8°C | ♂ 6 | | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0.9日 |
| | ♀ 6 | | 6 | 3 | 1 | 0 | | |

日をしめし、18°C ではさらに 1.3 日迄延長され、8°C では 0.9 日で稍々低下した。即ち最良の成績は 18°C で認められたけれども、この温度では虫体の運動が緩慢で観察に困難であり、かつ飼養液の改良によつては 28°C との間に顕著な差が認め難くなると思われたので、以後の実験には当分の間 28.0°C をもちいることが適当と認められた。以下の実験は特筆せざる限りその飼育温度は総べて 28°C である。

3. 添加葡萄糖の量と生存期間との関係

リンガー氏液に添加する葡萄糖の最適の量を決定するために表 4 にしめすごとく実験をおこなつた。既述の実験では虫体の生存期間は割合に短かつたので抗菌性物質の添加は敢えておこなわなかつたが、以後の実験では念の為にペニシリン 500 u/cc, ストレプトマイシン 500

第 4 表 葡萄糖添加の濃度の影響

虫体；家兎 6 週目；温度 28°C
対照飼養液；リンガー氏液+抗生物質
pH (NaHCO₃)

| 葡萄糖濃度 | pH 初~終 | 虫体数 | 生存日数 | | | | | 平均生存日数 |
|-------|---------|-----|------|---|---|---|---|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| 対照 | 7.6~7.4 | ♂ 6 | 3 | 0 | 0 | | | 0.8日 |
| | | ♀ 6 | 4 | 1 | 0 | | | |
| 0.01% | 7.6~7.0 | ♂ 6 | 1 | 0 | 0 | 0 | | 1.4日 |
| | | ♀ 6 | 6 | 6 | 1 | 0 | | |
| 0.1% | 7.6~7.0 | ♂ 7 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.7日 |
| | | ♀ 7 | 7 | 6 | 4 | 1 | 0 | |
| 0.5% | 7.6~6.8 | ♂ 7 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.7日 |
| | | ♀ 7 | 7 | 7 | 3 | 1 | 0 | |
| 1.0% | 7.6~6.8 | ♂ 7 | 5 | 0 | 0 | 0 | | 1.6日 |
| | | ♀ 7 | 7 | 7 | 2 | 0 | | |
| 5.0% | 7.3~6.3 | ♂ 7 | | 0 | | | | >1.0日 |
| | | ♀ 7 | | 0 | | | | |

r/cc を添加して雑菌の繁殖を防止した。これらの抗生物質の虫体におよぼす影響は第 1 報と同様にほとんど認められなかつた。

0.01~1.0% の葡萄糖添加例では対照に比しいずれも生存期間の延長が認められ、とくに 0.1~1.0% の 3 例ではいずれも約 1.7 日の平均生存日数をしめして最優秀であつた。しかるに 5.0% 添加例では pH の低下が著しく、虫体はいずれも 24 時間以内に死滅した。なお上述の加糖リンガー氏液にさらに 0.1% アスパラギンを添加するとその生存日数は平均 2.7 日迄延長されたが、アスパラギンの量については後述する。

4. 緩衝液の種類及び pH の影響

表 4 に認められたごとく、添加葡萄糖の量を増加するほど飼養液の pH の低下が見られ、NaHCO₃ 単独ではその pH の補正が困難であつたので、適当な緩衝液の使用を余儀なくされた。もちいた種類は MacIlvaine の枸橼酸・磷酸ソーダ緩衝液、Kolthoff の硼砂・磷酸カリ緩衝液および Michaelis のペロナール醋酸ソーダ・塩酸緩衝液の 3 種で、対照に重曹単独をもちいた。飼養液はリンガー氏液に 0.5% 葡萄糖及び 0.1% アスパラギンを添加し、それに 5% ずつの上述各緩衝液を滴加して pH 7.0~7.5 に補正した。その結果は対照としての重曹単独添加例では平均 2.5 日の生存日数を示し、これと略々同様な成績は Michaelis 緩衝液使用例の 2.4 日に認められた。MacIlvaine 及び Kolthoff の両緩衝液では平均生存期間が何れも 0.8 日であつた。

上述の結果により Michaelis 緩衝液が適当であることが明らかとなつたので、この緩衝液をもちいて 6.0, 6.5,

第 5 表 水素イオン濃度の影響

虫体；モルモット 5 週目；飼育温度 28°C
基本飼養液；リンゲル+0.5% 葡萄糖+0.1% アスパラギン+抗生物質+5% Michaelis 緩衝液

| 補正 pH | 最終 pH | 虫体数 | 生存日数 | | | | | | | 平均生存日数 |
|-------|---------|-----|------|---|---|---|---|---|---|--------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | |
| 6.0 | 6.3~6.5 | ♂ 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0.8日 |
| | | ♀ 6 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | |
| 6.5 | 6.5~6.7 | ♂ 9 | 8 | 3 | 2 | 2 | 0 | | | 1.8日 |
| | | ♀ 6 | 5 | 3 | 2 | 1 | 0 | | | |
| 7.0 | 7.0~7.3 | ♂ 8 | 6 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 2.5日 |
| | | ♀ 8 | 7 | 7 | 6 | 6 | 2 | 0 | | |
| 7.5 | 7.3~7.7 | ♂ 7 | 7 | 6 | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 3.4日 |
| | | ♀ 7 | 7 | 7 | 6 | 5 | 1 | 0 | 0 | |
| 8.0 | 7.8~8.8 | ♂ 7 | 7 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | | 2.4日 |
| | | ♀ 7 | 7 | 6 | 3 | 2 | 1 | 0 | | |

7.0, 7.5 及び 8.0 の各 pH を有する飼養液を調製して比較した (表5)。飼養液は前掲と同様である。その結果は pH 6.0 及び 6.5 はいずれも不適であり、pH 7.0~8.0 の間が良好でとくに pH 7.5 (最終 7.3~7.7) が最も優秀でその平均生存日数は 3.4 日であった。

5. 添加アスパラギンの量と生存期間との関係

予備実験によりアスパラギンの添加が虫体の生存に有利であることが明かであったので、ここではさらにその至適量について実験をおこなった。アスパラギンは Merck, Darmstadt 製である。その添加量は表 6 にしめすごとく 0.01%, 0.1%, 0.5% 及び 1.0% として比較

第6表 アスパラギン添加の濃度の影響

| 虫体; モルモット 9 週目; 飼育温度 28°C 対照飼養液; 0.5% 加糖リンガー氏液 + 抗生物質 pH; 7.2~7.6 (Michaelis 緩衝液) | | 生存日数 | | | | | | | 平均生存日数 |
|---|-----|------|---|---|---|----|----|----|--------|
| アスパラギン濃度 | 虫体数 | 2 | 4 | 6 | 8 | 11 | 12 | 14 | |
| 対 照 | ♂8 | 1 | 0 | | | | | | 1.5日 |
| | ♀8 | 6 | 0 | | | | | | |
| 0.01% | ♂3 | 1 | 0 | | | | | | 1.5日 |
| | ♀3 | 2 | 0 | | | | | | |
| 0.1% | ♂3 | 2 | 0 | 0 | | | | | 2.7日 |
| | ♀3 | 3 | 2 | 0 | | | | | |
| 0.5% | ♂6 | 5 | 1 | 1 | 1 | 0 | | | 4.1日 |
| | ♀5 | 5 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | | |
| 1.0% | ♂3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.3日 |
| | ♀3 | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | |

した。各々の飼養液は既述諸実験における最良の諸条件を満して調製した。即ち 50 万分の 1 のフェノール・レッド添加のリンガー氏液に 0.5% の葡萄糖を加え、これに各濃度のアスパラギンを添加したのち Michaelis 緩衝液で pH を 7.4 に補正し、最後に所定量の抗生物質を加えた。その結果は表 6 に示せる如くアスパラギン量の多いほど生存期間の延長が見られ、1.0% 添加例で最短 2 日最長 12 日平均 5.3 日であった。1.0% 以上の実験は目下おこなっていない。なお葡萄糖を欠除せるリンガー氏液にただちにアスパラギンを添加せる例では 0.01~1.0% の各例共対照と有意の差が認められなかつた。

6. 虫体の生存状態及び雌雄の差

第 I 報の血清内における虫体の生存状態についてはこれを前期、中期、後期にわけたことをすでにのべたが、本報の人工合成飼養液内ではその殆んどが前期の状態を欠いてただちに中期の状態、即ち雄虫吸盤の吸着力を欠き、雌虫の産卵は認められず、抱合虫体は次第に分離の

傾向にあつた。生存期間 1 日以内のものではとくにこの傾向が著しかつた。

雌雄虫体の生存期間の差は概して雄虫のそれが短かく、とくに葡萄糖添加量を示した表 4 とアスパラギン添加量を示した表 6 において顕著であつた。即ち表 4 では 2 日以上生存せる虫体は雌虫 40 匹中 27 匹におよび雄虫は 40 匹中皆無であり、又表 6 では 4 日以上生存せる虫体は雌虫 22 匹中 10 匹であつたが、雄虫 23 匹中では只 1 匹であり、充分有意の差をしめした。

考 察

各種生理平衡液の比較においてリンガー氏液が最良の結果をもたらしたのは住血吸虫が血液内に寄生生存せる事実と考え合せるならこれは当然と思われる。なぜなら 0.85% 食塩水は論外として、ロック氏液は心臟用、タイロード氏液は腸管用であり、リンガー氏液のみが哺乳類の血液代用として考案せられたものであるからである。爾後の飼養液調製の基本として充分もちいるべきものと考えられる。

血清内飼育実験では 28°C が 38°C の 1.3 倍ないし 1.8 倍の生存期間の延長をもたらしたことはすでに第 I 報で述べたところであるが、今回の人工合成飼養液内飼育では丁度 2.0 倍に延長され、18°C ではさらにわづかながら良好な結果を示したことは、すなわち人工合成飼養液は血清に比してより不適当な状態にあつたためと思される。飼養液がさらに改善される場合はこの差は次第に短縮されるものと考えられる。

Ross and Bueding (1950) は磷酸緩衝液は虫体に有害であると報告しているが、筆者などの実験において、MacIvaine 緩衝液と Kolthoff 緩衝液が不良の結果をもたらしたのも恐らくその磷酸塩に基因するものであろう。

住血吸虫の糖代謝に関しては Bueding 一派により種々の知見が報告されており、比較的多くの葡萄糖が消費されて乳酸にまで分解される事などが明かにされている (Bueding and Charms, 1951)。然るにそのアミノ酸代謝についてはいまだ充分な知見が知られていない。筆者等はリンガー氏液に葡萄糖を添加することによる虫体の平均生存期間を 0.8 日から 1.7 日まで延長せしめ、さらにアスパラギンを添加して 5.3 日まで延長せしめることができた。この場合葡萄糖を欠除してアスパラギン単独ではその効果は認められなかつた。これらの事実からすれば、日本住血吸虫は多くの糖を必要とする点においては Bueding らの知見と一致するが、さらに比較的多く

のアミノ酸をも必要とし、かつ後者は前者の存在下において充分利用されうるものと考えられる。

雌雄虫体の生存期間の差は、単独な生理平衡液内ではそれ程顕著ではなかつたが、葡萄糖を添加すると雌虫ではその生存期間が著しく延長され雄虫では顕著でなく、同様の結果はまたアスパラギンを添加せる際にも認められた。Bueding らの糖代謝の報告では雌雄虫体の差に関しては全く言及していないが、上の事実は雌雄虫体の代謝機構の量あるいは質において可成りの差のあることを暗示するものであろう。

要 約

容量約 10 cc のカーレル瓶内に 6 cc の人工合成飼養液を入れ、3 対の成熟抱合せる日本住血吸虫を投入して虫体の生存期間を観察した。その際の人工合成飼養液の種々の条件を吟味してつぎのごとき飼養液を考案した。50 万分の 1 濃度のフェノール・レッドを添加せるリンガー氏液に葡萄糖 0.5%，アスパラギン 1.0% を加え、Michaelis のペロナール 醋酸ソーダ・塩酸緩衝液を用いて pH 7.3~7.7 とし、さらに念のためにペニシリン 500 u/cc、ストレプトマイシン 500 r/cc を添加して雑菌の繁殖を防止した。飼育温度は 28°C である。その結果は、最短 2 日、最長 12 日平均 5.3 日（雄虫 2.7 日、雌虫 8.0 日）の生存期間をしめし、従来の 18 時間という成績に比し約 7 倍の延長を見た。

引 用 文 献

- 1) Bueding, E.: Metabolism of parasitic helminths. *Physiol. Rev.*, **29**, 195~218, 1949. —2) Bueding, E. and Charms, B.: Respiratory metabolism of parasitic helminths without participation of the cytochrome system. *Nature*, **167**, 149,

1951. —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) 伊藤二郎, 安羅阿一男, 小宮義孝: 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. *寄生虫学雑誌*, **4** (1), 12~18, 1955. —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.

Summary

Information about the survival of schistosomes in artificial medium has been limited to the report of Ross and Bueding (1950) who reported that the survival of *Schistosoma mansoni* did not exceed 18 hours in a chemically defined medium. The present paper reported a more favorable artificial medium for the survival of *Schistosoma japonicum*. General procedure was conducted in the same manner as reported in the previous paper. The pH was adjusted to 7.3-7.7 with Michaelis buffer which proved the suitable one for worms.

We have tried 0.85% NaCl-solution, Lock's, Tyrode's, and Ringer's solution as a basal medium. Among of them the Ringer's solution was the most efficient for survival of worms. Addition of 0.5% glucose and 1.0% asparagine to the Ringer's solution resulted in a marked increase in survival time. The female survived in this medium for 8.0 days (5-12) at 28°C, and the male 2.7 days (2-4).