

肺吸虫 *Paragonimus westermani* の体外飼育

(I) 脱囊幼虫 (excysted metacercariae) の in vitro に おける生存期間について

横川 宗雄 大島 智夫 木畑 美知江

国立公衆衛生院

(昭和30年11月3日受領)

はしがき

人体寄生蠕虫の幼虫或いは成虫を in vitro で飼育しようとする試みは既に多くの人達によつてなされて来ているが何れも充分満足すべき結果を得たものはない。即ち幼虫では Hoepli (1937)³⁾ 等が肝吸虫の脱囊幼虫を Tyrode 液で稀釈した血清中で最長2週間生存させ得たが、發育の徴候は殆ど認められなかつたと報告している。又 McCoy (1936)⁴⁾ は *Trichinella spiralis* の幼虫を鶏卵胎児内或いは妊娠白鼠の子宮内等に入れて完全な發育を認めたと、Larvae を産出する迄には至らなかつたと報告している。成虫の例では、Hoepli 及び Chu (1937)⁵⁾ が日本住血吸虫及び肝吸虫の成虫を血清に赤血球その他のものを加えた Medium 中で最長5ヶ月生存させ得たと云う報告があり、恐らくこれが成虫の in vitro での最長の生存期間と思われるが、この場合も産卵その他の固有宿主体内におけると同様な生活現象は認められず、辛じて生存期間を延長させ得たに過ぎない。従つて幼虫から成虫にまで宿主体外で發育させ得た例としては、McCoy (1936) の例一之は in vitro とは云えないが唯一のものである。このことから寄生蠕虫の幼虫或いは成虫を in vitro で飼育することが如何に困難であるかが想像される。

それにもかゝらず、多くの人々が之を試みるのは、寄生虫の新陳代謝機能等の生理を知るためばかりでなく治療の面で薬剤の効果を見る上からも in vitro での実験を必要としているからである。

著者等は肺吸虫のメタセルカリアを人工的に脱囊させたものを種々の Medium の中で飼育する実験を行つて

Munoo Yokogawa, Tomoo Oshima and Michie Kihata: Studies to maintain excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* in vitro. (Division of Parasitology, Institute of Public Health, Tokyo, Japan.)

いたが、これ等の中のあるものは(昭和30年5月28日飼育開始)、Hoepli 及び Chu (1937) 等の吸虫類の in vitro における生存期間の最長記録である5ヶ月を既に超えているにもかゝらず尚生存中で、然かも最初の脱囊当時の体長が0.6mm前後であつたのに比較すると現在(202日目、昭和30年12月13日)では静止時でも体長3~4mm、伸長時には6~7mmに達し最初の大きさの10数倍に迄成長することに成功した。然かも尚本実験は継続中で、今後どれ位の期間生存させ得るか又どこまで發育成長させ得るかは明かでないが、兎に角吸虫類の幼虫の生存期間としては既にこれまでの最長記録を突破しており、然も著明な發育を示したと云うのは恐らく最初の例であると思われるので、とり敢えずその経過についてのみこゝに報告する。

実験材料及び実験方法

肺吸虫メタセルカリア:

肺吸虫症流行地である新潟県直江津地方及び静岡県狩野川流域で集したモクツガ = *Eriocheir japonicus* の鰓及び筋肉より分離した。

脱囊幼虫:

モクツガより分離したメタセルカリアを Penicillin 及び Streptomycin 含有 Tyrode 液で洗滌した後約20ヶ宛内径8mm高さ100mmの小試験管に3ccの Tyrode 液 (pH 8.0) と共に入れて密栓をし、39°C~40°Cの恒温水槽に(10~12時間)放置しておく、翌朝は凡そ、その80%以上が脱囊し、活発に運動している。

飼育容器:

小試験管: 最初の3週間迄は内径8~10mm高さ100mmの小試験管に5匹乃至10匹の幼虫と共に2ccの Medium を入れた。

カレルフラスコ:

飼育開始後約3週間以上になると幼虫もかなり大きく

なるので、直徑 4 cm のカレルプラスチックを用いその中に 2 匹宛の幼虫を 3 cc の Medium と共に入れた。

飼育温度:

飼育容器はすべて 37°C の孵卵器内に納めた。

Medium:

血清は犬、猫、馬、牛及び兎で、Tyrode 液で稀釈したものを用いた。Tyrode 液は pH 7.4 とし Penicillin 100 μ/cc 及び Streptomycin 100 r/cc を加えた。

血球浮游液:

猫の拘縁酸加血液 1 cc を生理食塩水で 3 回遠心沈澱して洗滌した後、沈渣に 1 cc の Tyrode 液を加えて血球浮游液とし、Tyrode 稀釈血清 1 cc に対し血球浮游液を 1 滴 (1/40 cc) 宛加えた。

Chick Embryo Extract:

口立予防衛生研究所病理部より分与を受けたが、之を飼育液 1 cc に対し 0.1 cc の割に加えた。

Medium の交換:

飼育用開始から 3 週迄の幼虫の未だ小さい時期には、4 日乃至 5 日おきに交換したが、カレルプラスチックに入れてからは 3 日乃至 4 日おきとした。交換に際して虫体は一度容器より出して、Tyrode 液でよく洗滌した後新しい容器に移した。虫体を傷つけないように、先端のやゝ太いピペットで扱い上げて移動させた。時に Medium にカビを生ずるが、虫体には致命的影響なく、頻回の洗滌と頻回の液の交換で消失させ得た。

生死の判別は主として虫体の運動の有無により決定したが、この観察には容器の底部を透して観察出来るように装置した双眼解剖顕微鏡によつた。

実験成績

(I) Tyrode 液による血清の稀釈度と生存期間との関係:

日本住血吸虫或いは肝吸虫の飼育の Medium としては動物の血清が最もよく、それも Tyrode 液で 2 倍に稀釈した方が血清のみより好いと云われている。そこで馬血清を Tyrode 液によつて種々の割に稀釈した Medium 中での生存期間を検討してみた。その結果は Fig. 1 に示すごとく、血清原液よりも、血清 4、Tyrode 液 6 の割に稀釈したものが最長の生存期間を示している。その後血清と Tyrode 液を等量に加えたものでは生存期間は更に延長しているので、以下の実験ではすべて血清と Tyrode 液を

等量に加えたものを用いた。

(II) 各動物の正常血清中における生存期間:

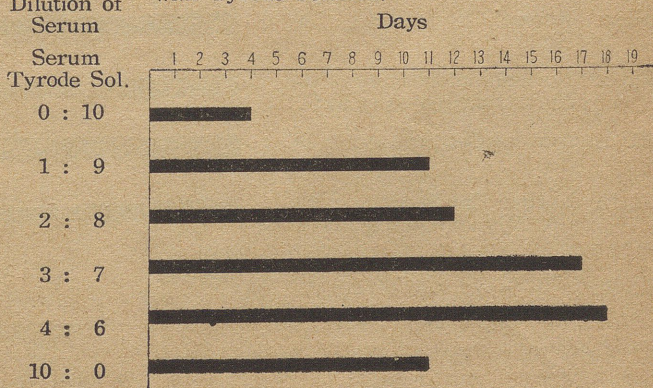
犬猫は実験的にも肺吸虫に感染し易いが、兎、白鼠などでは例えメタセルカリアを与えても成虫にまでは發育し難い。又牛、馬などの草食動物では未だ感染していたと云う記録は見当らない。従つて好適終末宿主と、そうでない宿主とはこれら動物の血清間に差があるかどうかをみた。すべて血清は等量の Tyrode 液で稀釈したものを用いた。その結果は Fig. 2 に示してある如く 3 週間までの飼育成績では、何れの血清中에서도殆ど途中で死滅するものはなかつた。即ち飼育開始後最初の 2 週間迄は何れの血清中에서도脱囊幼虫の運動は極めて活発で、然も成長も速くて最初の大きさの約 2~3 倍大(体長約 1~2 mm)にはなるが、2 週目をすぎる頃から運動は鈍くなり成長も停止し、23 日を経過する頃から急激に虫体は死滅し始め、28 日目には何れの血清中にも生存するものは 1 匹もなかつた。従つて 3 週以後では一各種動物の血清を問わず一血清のみでは虫体の飼育には不適當と思われる。

(III) 正常血清と免疫血清中における生存期間:

日本住血吸虫の虫卵或はミランジウムを感染動物の血清中に入れた場合に見られる Precipitation¹⁹⁾ 或いは Immobilization²⁰⁾ 或いはセルカリアの Agglutination¹⁹⁾ とか Precipitation^{13) 14) 15)} の現象は既によく知られている。著者等は等量の Tyrode 液で稀釈した猫の正常血清及び肺吸虫に感染させてから約 10 ヶ月以上を経過した猫の血清を用いて脱囊幼虫を飼育し、両者の血清中で脱囊

Fig. 1

Average Length of Life of excysted Metacercariae in various Dilution of the Horse Serum with Tyrode Solution.



幼虫の生存期間に差異が見られるかどうか、又或いは脱囊幼虫が免疫血清中で何等かの変化を起すかどうかを観察しようと試みた。その結果は Fig. 3 の如くて、何れ

の血清中でも生存期間には差はないのは勿論、脱囊幼虫の運動その他にも何等変化は認められなかつた。尚56°C 30分て非動化したものと、しないものとても何等差異は

Fig. 2

Comparison of Length of Life of the Larvae in the Media using sera of various Animals, Rabbit, Horse, Cattle, Dog and Cat.

Serum: diluted with the same amount of Tyrode Solution.
Temperature: 37 C.

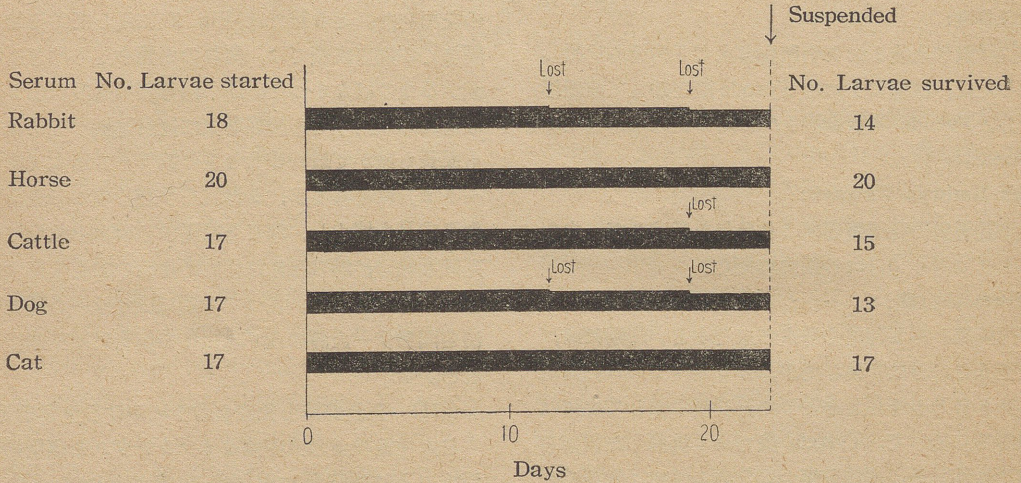


Fig. 3

Comparison of Length of Life of the Larvae in the Cultures using Serum from Cat infected with *Paragonimus westermani* and in the Cultures using Normal Cat Serum.

Temperature: 37 C

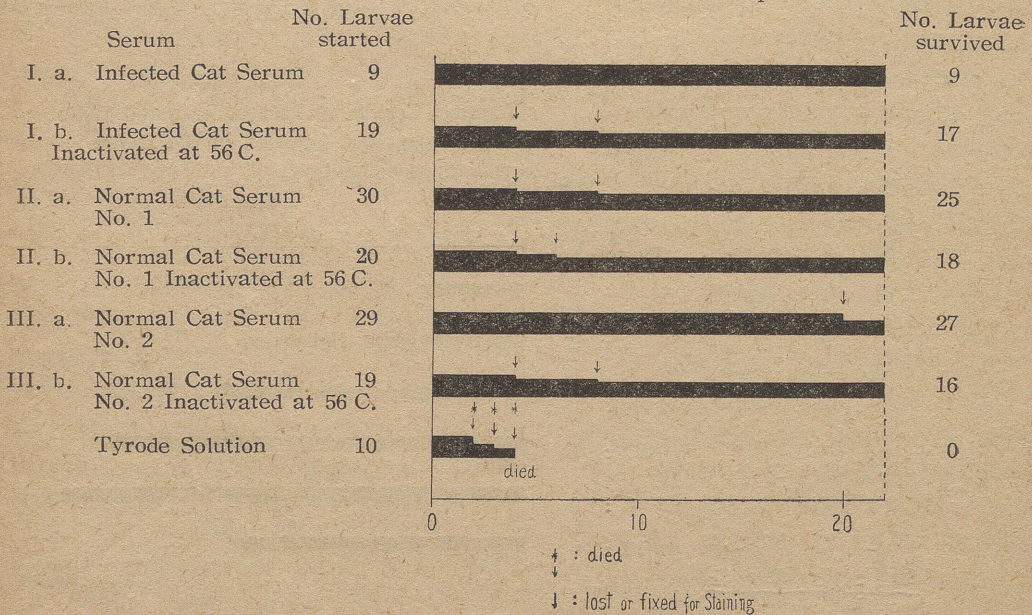
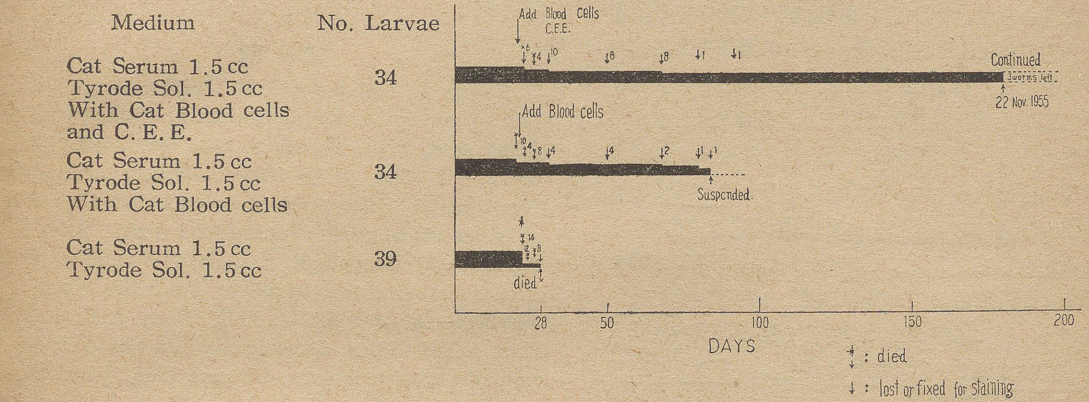


Fig. 4
Comparison of the Length of Life of the excysted Metacercariae
in the Media with Blood Cells and Chick Embryo Extract,
with Blood cells only and without the both.



認められなかった。

(IV) 血清に赤血球及び Chick embryo extract を加えた場合の生存期間：

血清を Tyrode 液で稀釈した Medium 中だけでも 3 週間間は容易に生存させ得ることは既に述べた通りであるが、2 週をすぎる頃から虫体の運動も不活発になり、成長の速度もおそくなるようであつた。そこで 3 週迄猫の Tyrode 稀釈血清で飼育したものをそれ以後はカレル瓶に移して、これに猫の赤血球浮游液と Chick embryo extract を加えてみた。対照としては猫の赤血球のみを加えたものと、何も加えないものとを略ぼ同数ずつ用いた。最初は総計 107 匹を用いたが、III 群の Tyrode 液稀釈血清のみのもでは 23 日目から急激に死滅し始め 28 日目には 1 匹も生存するものはなかつた。之に反して I 群の赤血球及び C. E. E. を加えたもの及び II 群の赤血球のみを加えたものでは、矢張り 23 日から 26 日目迄の間には約 1/3 以上が死滅してしまつたが、それ以後は死滅するものはなかつた。最初の中はどの位の期間生存するのか見当がつかなかつたため、10 日目乃至 20 日目毎に 5 乃至 10 匹の虫体を生存中にとり出して、ホルマリン或いはブアン固定を行つて、ヘマトキシリン染色を施したので II 群では 83 日目に 1 匹もなくなつた。I 群でも 26 日以後は自然死を来したものは 1 匹もなかつたが、現在は 3 匹のみになつた。従つて最初の実験開始の時の使用虫体数と現在生存虫体数との比較から各群の優劣を論ずることは出来ないが Fig. 4 に示す如くに、I 及 II 群の赤血球及び C. E. E. を加えたものと、赤血球のみを

加えた群と、両者とも加えない III 群の間には著しい差が認められる。然し第 I 群の赤血球と C. E. E. を加えた群と第 II 群の赤血球のみを加えた群の間には生存期間に関して、この実験のみからは差があるかどうかは云えない。その後の実験から両者の中では赤血球の方が、より重要な栄養源と思われたがこの点に関しては、尚検討したい。赤血球浮游液を加えた場合、Medium 中の虫体は直ちに之を摂取するものゝ如く、10 数分後には今迄明かに見えなかつた腸管は赤褐色に強く着色してくる。又恐らく赤血球の消化物と思われる黒褐色の物質が口吸盤の部から間歇的に排出されて来るのも認める事が出来た。未だ赤血球の 1 日の消費量或いは、赤血球の如何なる成分が虫体の成長發育に最も必要とするかについては明かにし得ないが、肺吸虫が宿主体内で宿主の赤血球を主要な栄養源としていることは間違いないと思われる。

考 察

著者等は肺吸虫脱囊幼虫を猫の血清を Tyrode 液で等量に稀釈した Medium に、猫の赤血球及び C. E. E. を加え 37°C で飼育を試みた所、現在 220 (12 月 13 日現在) 日に至るもその中の 3 匹は生存し、然かも最初の大きさの体長 0.6mm 前後に比べると、静止時の体長 3 ~ 4mm、巾 1.5mm、伸長時には 6 ~ 7mm に達する程に成長發育している。尚未だ内部臓器の發育状況については検討中であるが、82 日目迄飼育した虫体では飼育当初に比べると卵黄細胞及び辜丸の細胞の増殖が明かに認められた。純粹に invitro で人体寄生吸虫類の幼虫をかくも長期に亘

つて飼育し得、然かも最初の大きさに比べてかくも著しく成長させたと云う例は未だ報告をみない。

実験的に肺吸虫メタセルリアを犬或いは猫に与えた場合、10数時間後から24時間後の間には脱囊幼虫は既に腹腔内に認められ、2乃至3週後に至つて始めて本脱囊幼虫は胸腔内にあらわれる。然かしこの期間内に腹腔内或いは胸腔内より検出した幼虫は、未だ發育も著明でなく、その腸管も着色は著明ではない。感染3週を過ぎて4週間に至る頃になつて始めて幼虫は、肺表面より肺實質内へ侵入を始めるものゝ如くであるが、2匹宛或いはそれ以上が一諸になる迄は一ヶ所に落つかないで、侵入したり出たりしているようである。然しこの頃には腸管は赤褐色に強く着色しているのが認められる。4週或いはそれ以上、時には数ヶ月に達するも肺の實質内へ侵入せず胸腔内に1匹のみ残つている場合は、發育が非常に遅れていることも観察されている。以上の事実は今回の著者等の実験でも、2週乃至3週までは血清のみで充分に發育するが、これ以後には赤血球を加えてやる必要があることゝよく一致している。又發育成長が甚しく遅延しているのは、狭い囊内に2匹以上が同棲することが必要なか或いは、赤血球以外に尚肺の Extract その他のものを必要とするのか非常に興味ある問題である。これ迄は幼虫にしろ *in vitro* では辛じてその生存期間を延長し得たにすぎなかつたが、この実験で少くとも飼育虫体の發育増大がみられたと云うことは、今後の研究に大きな進歩を持たらずものと思われる。今後は Medium の検討を行うと共に肺吸虫の Metabolism に関する研究及びこれらの虫体を用いて肺吸虫に対する薬剤の効力のスクリーニングテストを行いたいと考えている。

結 論

著者等は人工的に脱囊させた肺吸虫メタセルリアを *in vitro* で飼育した結果次のことを明かにし得た。

- 1) 牛、馬、犬、猫及び兎の血清を Tyrode 液で倍に稀釈した Medium 中では、3週間の飼育期間では何れの血清中でも同じ様に生存し、差は認められなかつた。
- 2) 猫の正常血清と肺吸虫に感染した猫の血清とを用いて生存期間を比較したが何れも差は認められなかつた。
- 3) 猫の血清に赤血球浮激液と C. E. E. を加えた場合は、生存期間は極めて長く、發育成長も著しいことを認めた。
- 4) 肺吸虫の發育成長には、最初の2週乃至3週迄は

血清のみでよいが、それ以後は赤血球を栄養源として必要とすると思われる。

5) 肺吸虫脱囊幼虫は血清中で容易に生存させ得るので、之を薬剤の効力判定に応用出来るのではないかと考えられる。

文 献

- 1) Chi'en, L. and Bang, F. B. (1950): Agglutination of cercariae of *Schistosoma mansoni* by immune sera. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 74, 68-72. — 2) Chu, H. J. (1938): Certain behavior reactions of *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis* in vitro. Chinese Med. Jour., Suppl., 2, 411. — 3) Hoespli, R. J. C. (1937): Studies on *Clonorchis sinensis* in vitro. Festschr. Nocht. 199-203. — 4) Hoespli, R. J. C., Feng, L. C. and Chu, H. J. (1937): Experiments on the cultivation of parasitic worms. Chinese Med. Jour., 51 (5), 734. — 5) Hoespli, R. J. C., Feng, L. C. and Chu, H. J. (1938): Attempts to culture helminths of vertebrates in artificial media. Chinese Med. Jour., Suppl., 2, 343-374. — 6) 伊藤二郎、安羅岡一男、小宮義孝 (1955): 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. — 7) McCoy, O. R. (1935): The physiology of the helminth parasites. Phil. Rev., 15, 221. — 8) McCoy, O. R. (1936): The development of Trichinae in abnormal environments. Jour. Parasit., 22(1), 54-59. — 9) Newsome, J. and Robinson, D. L. H. (1954): Investigation of methods of maintaining *Schistosoma mansoni* in vitro. Annals of Trop. Med. and Parasit., 48(2), 194-200. — 10) Oliver-Gonzalez, J., Bauman, P. M. and Bennensen, A. S. (1955): Species specificity of the Anti-egg precipitin in Schistosoma serums. Jour. Infect. Dis., 99(1), 95-100. — 11) Papiermeister, B. and Bang, F. B. (1948): In vitro action of immune serum on cercariae of *Schistosoma mansoni*. Amer. Jour. Hyg., 48, 74-80. — 12) Ross, O. A. and Bueding, E. (1950): Survival of *Schistosoma mansoni* in vitro. Proc. Soc. Biol. and Med., 73, 179-182. — 13) Senterfit, L. B. (1953): Immobilization of *Schistosoma mansoni* miracidia by immune serum. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 84, 5-7. — 14) Standen, O. D. (1952): The in vitro effect of normal and immune serum upon cercariae of *Schistosoma mansoni*. Jour. Helminthology, 24(1), 25-42. — 15) Vogel, H. and Minning, W. (1948): Hullenbildung bei *Bilharzia-Cercariae* in Serum *Bilharzia* infizierten Tiere und Menschen. Zentralbl. F. Bakt. 1. Orig., 153, 99-105.

Summary

Three excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* have been maintained in vitro for 202 days thus far (as of 13, Dec. 1955). From an average length of about 0.6 mm and width of 0.26 mm at rest immediately after excystation, these forms have grown to 2.5-3.0 mm in length and 1.5 to 2.0 mm in width at rest; stretched, they reach up to 6-7 mm long. Signs of beginning development of the male reproductive system, especially of the testes, are being observed.

107 excysted metacercariae were used to start the cultures. Carrel flasks closed by rubber caps were employed, the cultures incubated at 37°C and kept as sterile as possible including the use of antibiotics. The medium used for the first three weeks after excystation consisted of equal parts of cat serum and Tyrode solution. Chick Embryo Extract and cat blood cells were added to the medium of one third of the cultures and cat blood cells only was added to another third of the cultures after that time. The comparison of Length of Life of the larvae in the cultures is shown in Fig. 4. All of the larvae in the media

without both blood cells and C. E. E. died within 4 weeks; None of the worms in the media with both cat blood cells and C. E. E. and in the media with blood cells only was died. The red blood cells and C. E. E. seem to be the important requirements for maintaining the larvae; It was observed that the red blood cells were ingested and also the digested red blood cells were excreted.

It is felt that many more than the three worms presently surviving would have lived up to this time; however, five to ten worms were fixed and stained with hematoxylin for checking the development of the internal organs every ten or twenty days; thus reducing the number of survivors greatly.

The survival period of the larvae in cultures using serum from cat infected with *P. westermani* did not differ significantly from the survival period of those cultures in normal cat serum as shown Fig. 3.

The comparison of the survival period of the larvae in cultures using sera from various animals, Cat, Dog, Horse, Cattle and Rabbit, is shown in Fig. 2.