

ウエステルマン肺吸虫被囊幼虫の脱囊機轉の検討

大 島 智 夫

国立公衆衛生院衛生微生物学部寄生虫室

(昭和31年2月9日受領)

まえがき

ウエステルマン肺吸虫は現在知られている6種類の肺吸虫^{註1)}の中で人体に寄生する唯一のもので、我国では各地に分布し、多数の感染者を出して風土病の重要なものとなつている。本吸虫はその名の示す通り、通常肺に寄生し、咯血、血痰、レ線上の陰影等肺結核症に酷似した症状を呈する事が多く、時には肺以外の臓器に寄生したり、又は流血中に虫卵が運ばれて他の臓器の毛細血管を栓塞して思はぬ重大な障害を与える事がある。本吸虫の發育史、生態、病理等に関しては我国の多くの研究者により重要な知見がつかまれて今日に到つているが、なほ本吸虫に関し未知のまま残された重要な問題も少くない。

その一つに再発率の少い良い治療別に関する問題がある。現在最良のエメチンサルファ剤併用療法も再発率は高率であり、治療を受けながらも20年以上にわたり苦しむ人も少くない。本虫を *in vitro* で飼育する事が出来なかつた事が治療剤の研究の溢路であり、多数の薬剤について短時間に効果判定を行う事は不可能であつた。著者はこの *in vitro* の飼育を試み、先ず幼虫を飼育する事に成功した。(横川、大島1955)

そしてこの幼虫飼育の第一段階は被囊幼虫を最も自然に近い状態で能率良く脱囊せしめる事である。従来諸大家の報告を吟味しながらこの脱囊試験を試みるうちに、脱囊に関して新たな知見を得、従来報告されたものには再検討を要するのでここに報告する次第である。この結果は既に応用されて長期にわたる飼育(發育を伴つた)と薬剤のスクリーニングテストに成功している。(横川、大島、1955、1956)又単に応用を目的とする立場からのみでなく、本症の疫学上の立場からも、又生物学上の問題として *Host-Parasite-Relationship* の立場

Tomo-o Oshima: Studies on excystation of the metacercariae of Paragonimus westermani in vitro. (Division of Parasitology, Institute of Public Health.)

からも被囊幼虫が終宿内で如何にして脱囊し体内に侵入するかは甚だ興味ある問題である。

ここで先人の業跡の概略に触れておくと、まず安藤亮(1915)は被囊幼虫は成熟して或る時期がくると外界で自ら包囊を喰ひ破つて出ると報告し、松井氏(1914)は温度と滲透圧の変化が脱囊を促すと云つている。横川、定氏(1918)は詳細な実験を試み消化酵素が促進的に働く事を述べられている。

ウエステルマン肺吸虫の最も近縁種である大平肺吸虫に関しては米良(1951)の成績があるが、大平肺吸虫の被囊幼虫は固有膜の構造が著く異なるので同日に論ずる事は出来ない。

実験材料及び実験方法

1) 被囊幼虫の採取

現在ウエステルマン肺吸虫の第二中間宿主として我国で認められているのは、*Potamon dehaani* White サワガニ、*Eriocheir japonicus* de Haan モクズガニ及び最近追加された(横川、1951、横川、大島1953) *Procambarus clarkii* (Girad)^{註2)} アメリカザナガニの3種であるが、被囊幼虫の採取の点からは流行地の河川で捕獲したモクズガニが最良であつた。モクズガニは静岡県狩野川、愛媛県吉野川、高知県吉野川及び新潟県直江津市附近で採取されたもので、送附を受けて後野外の飼育槽又は実験室内で大型ガラスシリンダー中に飼育して^{註3)} おき被囊

註1)

Paragonimus westermanii Kerbert, 1877.

Paragonimus kellicotti Ward, 1908.

Paragonimus ohirai Miyazaki, 1939.

Paragonimus iloktsuenensis Chen, 1940.

Paragonimus compactus Cobbold, 1858.

Paragonimus rudis Diesing, 1850.

註2) 学名は上野益三教授の御指示に従つた。旧学名 *Cambaroides clarkii* (Girad)

註3) 水を交換し、適当な餌(鯉のようなもの)を与え、管理をよくすれば6カ月位は充分生きる。

幼虫は生きた蟹より分離するように勉めた。

被囊幼虫は主に鰓の血管中より採集したが、鰓の寄生数の多い場合は大型肉ひき器で全体を粉砕し、水を加え、細目の金網でふるった沈渣より更に採集した。被囊幼虫は解剖顕鏡下に附着物を取り、固有膜の不完全なもの、内容の未成熟なもの等を除き、完全な成熟した形態を呈するもののみ実験に使用した。

2) 脱囊の観察法

被囊幼虫は約 2 cc の液と小試験管中にいれ、反射鏡と低倍率の解剖顕微鏡を用いて底部より観察した。ブロックシャーレは液の蒸発、其の他の点で不適當であつた。周囲の条件が適當であると、先ず包囊内で幼虫の運動が活発となり、ついて激しい回転運動を試みるうちに固有膜の一部が穿孔されて幼虫の頭部が突出し、激しい蠕動様伸縮運動を繰り返しながらその小孔より外部に脱出して、遂に完全に離脱する。幼虫体の一部が包囊外に出るから完全に離脱する迄 30 分乃至 1 時間位である。一定時間毎に観察する際は、多くの被囊幼虫の種々な脱囊状態を同時に見るわけだが、脱囊を開始したものから完全に脱囊したものまでその状態を区分する事なく、集計して脱囊せぬものとの区別を重視した。

3) 脱囊に用いた基礎的溶液

種々の比較実験をするには先ず Control として用う可き最も基礎的な溶液が必要である。それには種々の後述の実験結果 pH 8.0~8.5 の Tyrode 氏液が最も適當であつた。滲透圧の低いものは脱囊途次又は脱囊後ただちに幼虫が死亡するので不適當である。

Tyrode 氏液の作り方は Perker. 註1) に準じ pH の指示薬として Phenol red. を 0.002% の割に加え、注 2) pH は重曹によつて調節し、変動を防ぐためにゴム栓

註 1) Tyrode 氏液 (約 1l) の製法
 NaCl, 8.00gr. KCl 0.20gr CaI₂·2H₂O 0.25gr MgCl₂ 0.1gr. NaH₂PO₄·2H₂O, 0.05gr Glucose 1.0gr. を順次 950cc の蒸溜水に溶かし Phenol red を加え、別に NaHCO₃ 0.70gr. を 150cc の蒸溜水に溶かし、両者を別々に滅菌 (15 lbs. 30分)、冷却後重曹を加えながら適當な pH に調製する。脱囊用には重曹 1.0gr にする、Glucose を 4gr とする場合は食塩を 7.70gr とする。総量は必しも 1l とならなくて良い。
 註 2) Phenol red 0.4gr を N/10 NaOH 11.4cc に溶かし一昼夜孵卵器中に放置、蒸溜水を加えて 100cc とし 0.4% の Stock solution とする。これを 1000cc に対し 5 cc 加えれば 0.002% 溶液になる。

をもつて密栓した。pH の影響を見る場合はペロナル、醋酸曹達、塩酸による等滲透圧緩衝液を用いた。

4) 恒温装置

とりたてて云々する事もないが、原則として小試験管は恒温水槽中に浸した。等者の用いたものは温度の動揺範囲 ±0.05°C 以内である。孵卵器は正確な温度条件を検討するには不適當であるが、単に脱囊幼虫を得るためだけであるなら差支えない。

5) 一実験の標本数並びに結果の検定法。

脱囊現象は時系列であるから全体で n 個の測定を行えば n 次元のベクトルを作つて各系列間の比較を行えば差の判定についても誤る危険は少いが、便宜的には適當な時間断面で比較しても大過はなく、経験的に脱囊の最も盛んとなる 4 時間前後をもつて一応の判定を行つた。甚しく不規則な経過をとるものは一応全経過を見た。一実験の標本数は、材料の入手、実験の死亡率、結果の精度等を見合せて 1 シリーズに 20 個づつ、若しくはそれ以上を用いた。これ以下の場合には著しく精度が落ちて使ひものにならない。

差の有意性の検定は第二種の過誤には触れずに行つた。これは本実験の性質上余り必要がない。

実験成績

1) 脱囊に及ぼす温度の影響 (予備実験)

温度として 10°C, 20°C, 32°C 及び 40°C (32°C は 30°C の調節の誤り) の 4 段階を選び、溶液としてとりあえず蒸留水、生食水及び 0.5% 重曹水を用い、67 時間迄観察した。0°C, 20°C の場合は全く脱囊が見られなかつた。(第一表参照) 32°C で 20 時間前後で漸く若干の脱囊が見られる。40°C では 1 時間目から盛んな脱囊が認められた。カッコ内は脱囊したが死亡した幼虫数で、蒸留水は甚だ死亡しやすく、前節に述べたように脱囊液は等滲透圧であるのが望ましい。

生食水のみであらためて 37°C, 40°C, 43°C 及び 50°C について再検討して見ると第 1 図の如くになつた。これにより 37°C から 40°C に温度が上昇すると飛躍的に脱囊が促進される事が分つた。50°C では脱囊も早いのが直ちに死亡した。43°C では 40°C よりかなり脱囊率が良いが、後述の実験で判明したもら一つの重要な因子である pH についてはまだ考慮されていないので、これだけで連断は出来ない。これ等一連の予備実験により、脱囊には 40°C 前後が最も適當であり、32°C 以下では殆ど脱囊しない事が判明した。

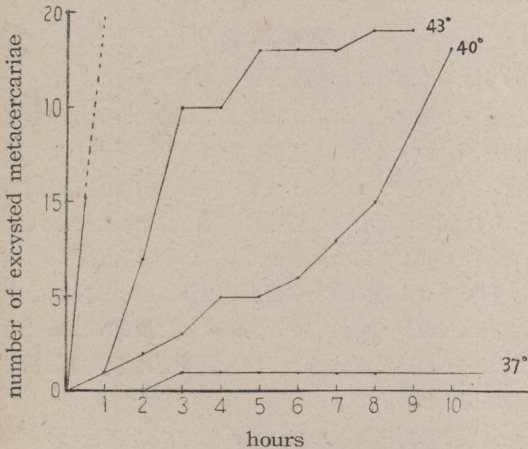
Tab. 1 Thermal points of excystation of fresh metacercariae in dist. water, saline and 0.5% NaHCO₃ solution

		Number of excysted metacercariae														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	17	20	24	42	67 (hour)
10°C.	Aqua dest.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5% NaHCO ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20°C.	Aqua dest.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Salin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.5% NaHCO ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32°C.	Aqua dest.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	(2)	(10)
	Salin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	5	5(3)	(7)
	0.5% NaHCO ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40°C.	Aqua dest.	1	2	8	(11)	(12)	14	(13)	18	(17)	(20)					
	Salin	6	8	9	9	9	9	9	9	9	10		(10)			
	0.5% NaHCO ₃	1	1	2	3	3	3	3(1)			(4)					

Number examined: 20 metacercariae by each experiment Number in (): dead larvae

Fig. 1.

Effect of temperature on excystation of fresh metacercariae in saline. Number examined: 20 metacercariae for each experiment

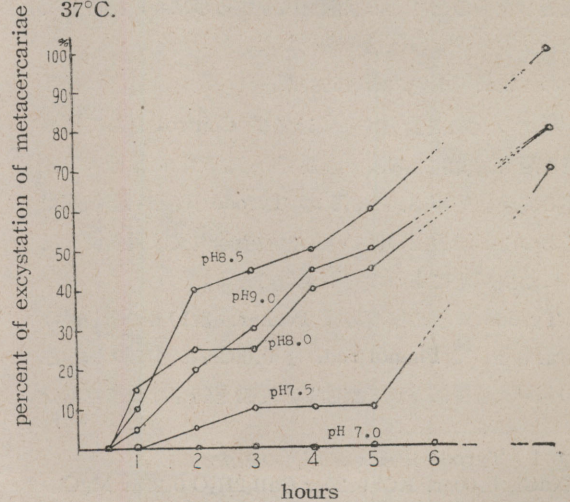


上記の実験より検討す可き温度として37°C, 40°C及び43°Cの3つを選び、pHとして7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0の5つを組合せてその総合的影響を見た。溶液はpHの広い範囲にわたって緩衝能力があり生物学的実験に慣用されるペロナル、醋酸曹達、塩酸による等滲透圧緩衝液を使用した。観察は6時間迄である。時間による累積脱囊率を温度別に示すと第2, 3, 4図の如くなる。

この3つのグラフを通じて先ずpH 7.5以下がいつれの

Fig. 2.

Effect of pH. on excystation of fresh metacercariae in veronal-isotonic buffer solution at 37°C.



温度でも極めて脱囊率の低い事が目立っている。pH 8.0以上になると著しく脱囊し易くなり、殊に37°Cの場合に比べて40°C, 及び43°Cの場合に著明に脱囊率の上昇が見られる。これによって溶液のpHを考慮に入れぬ脱囊実験は結果が不定となって意味をなさぬ事が多い事が分る。これ等をpH 8.0からpH 9.0の間で相互に差があるかどうか、pH 8.0とpH 7.5の間に差があるかどうか、又pH 8.0の場合に各温度で差があるかどうかを χ^2 検定法で検討して見た。

Fig. 3.

Effect of pH. on excystation of fresh metacercariae in veronal-isotonic buffer solution at 40°C.

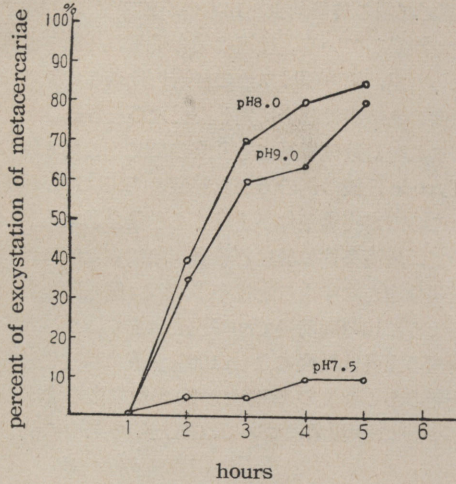
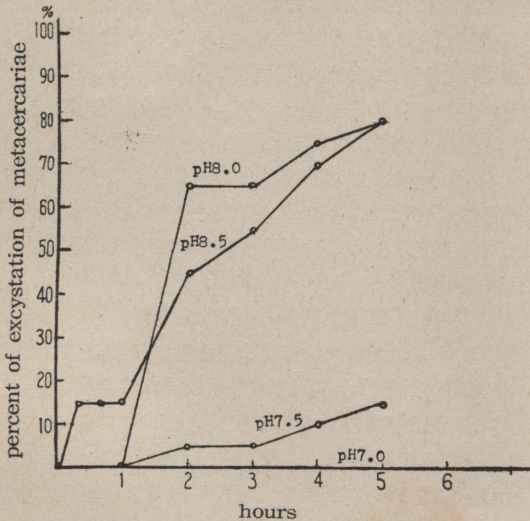


Fig. 4.

Effect of pH. on excystation of fresh metacercariae in veronal-isotonic buffer solution at 43°C.



結果は第二表に示してある。観察法で述べたように時間は4時間の断面をとつてある。pH 8.0~9.0間は37°C 40°C, 43°C各々 pは0.79, 0.47, 0.72で差があるとは云えぬようである。それに較べpH 7.5とpH 8.0の場合はp各々0.07, 0.01, 0.001であるから、本質的に著しい差があるものと見て差しつかえない。但し温度の低い場合はその差も著明に現はれず、37°Cの場合より40°C

Tabl. 2 Comparison of excystation rate of fresh metacercariae in media of different pH at different temperatures for 4 hour observation

Medium ; Veronal-isotonic-buffer solution
pH : 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 and 9.0
Temperatures : 37°C., 40°C. and 43°C.

37°C.	pH	Number of examined	Number of excysted	Number of not excysted
	9.0	20	9	11
	8.5	20	10	10
	8.0	20	8	12
	7.5	20	2	18
	7.0	20	0	20

pH 9.0-pH 8.5-pH 8.0 : $\chi^2=0.07$ p=0.79

pH 8.0-pH 7.5 : $\chi^2=3.3$ p=0.07

40°C.	pH	Number of examined	Number of excysted	Number of not excysted
	9.0	20	13	7
	8.0	20	16	4
	7.5	20	2	18
	7.0	20	10	20

pH 9.0-8.0 : $\chi^2=0.50$ p=0.47

pH 8.0-pH 7.5 : $\chi^2=17.2$ p=0.001

43°C.	pH	Number of examin.	Number of excysted	Number of not excysted
	8.5	20	14	6
	8.0	20	15	5
	7.5	20	2	18
	7.0	20	0	20

pH 8.5-pH 8.0 : $\chi^2=0.13$ p=0.72

pH 8.0-pH 7.5 : $\chi^2=11.0$ p=0.001

pH	Tempe- rature	Number of examin.	Number of excysted	Number of not excysted
8.0	40°C	20	16	4
	43°C	20	15	5

$\chi^2=0.03$ p=0.86

43°Cの場合に著しい。pH 8.0の脱嚢率を比較して見ても37°Cに比べ40°C, 43°Cの場合が遙かに高く、又後二者は相互に差が認められない。以上を要約すると脱嚢にはpHが支配的な影響を持ちpH 7.5以下では温度の上昇による促進作用も認められず、pH 8.0以上になり始めて温度の脱嚢促進作用も著明に現れ、最も脱嚢の盛んなのは

pH 8.0~ 9.0, 温度40°C~43°C, である。但しこの範囲内では大差はなく, 高温, 高アルカリは脱囊幼虫死亡しやすいので, 至適条件としてはpH 8.0~ 8.5, 温度40°Cを選んだ。

以上はベロナール緩衝液に於ける所見であるがこれが一般的な条件として妥当であらうか。この事を検討する為アルカリ性の Tyrode 氏液を用いて比較した。又更に標本数を 100個近くの大標本として詳しく両者の結果を

Fig. 5.

Excystation of fresh metacercariae in the media of optimum pH and optimum temperature (40°C)

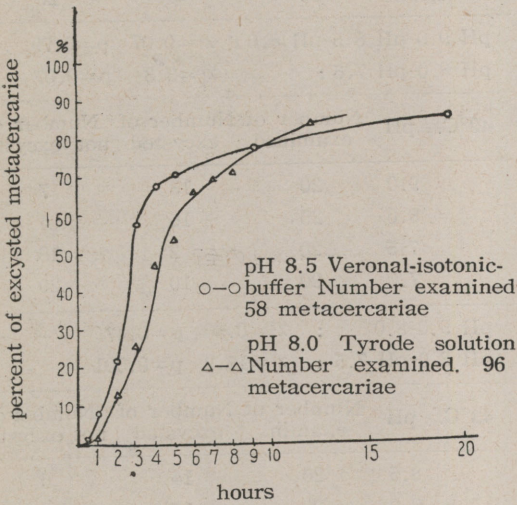
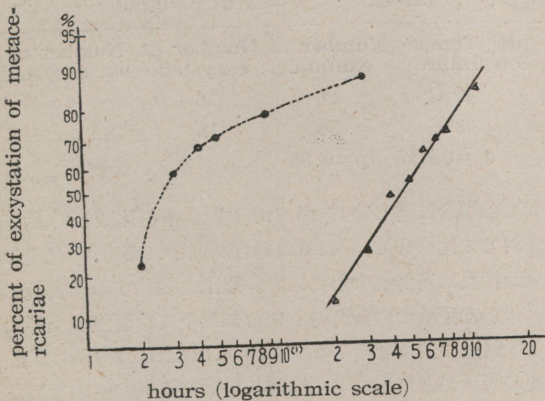


Fig. 6.

Statistical analysis of excystation curve of Fig. 5. (Plotted on probability paper in log. scale)



追つて見た。結果は第5図並びに第6図に示した。実験条件は必しも同一でなく, 片方はpH 8.5のベロナール緩衝液で58個の被囊幼虫を2分し, 片方はpH 8.1の Tyrode 氏液で96個の被囊幼虫を10本の小試験管に約10個づつ分けて観察している。後述の集合効果の問題も考慮せねばならぬが, 第5図に二つの経過を比較して見てほぼ同じ傾向のある事は認めて差し支えなからう。

但しこれを対数確率紙にとり直して見ると第6図の如くに Tyrode 氏液の例の方が直線性のあてはめが可能であり, この方が実験条件が正確であり集合効果も著しくないので, 最適条件に於ける脱囊現象は本質的には時間対数正規分布をなすものと推察される。然し図を見て判明するように10時間前後で80%脱囊に達するが, それ以後脱囊率の上昇は緩慢になり 100%脱囊には遂に達しない。上記のある程度の規則性も 80%脱囊迄の部分的現象である。この現象については後述の考察中に再述する。

実際問題としては至適条件の Tyrode 氏液中に被囊幼虫を侵漬しておけば10時間後に約8割を最も自然条態に近く脱囊せしめ得る事になる。横川(1918)は種々な塩類溶液で肺吸虫被囊幼虫の脱囊を試みた結果, 0.5%重曹水が最適であつたと報じているが, これは恐らく今回の実験で明かになつたアルカリ側に偏つた脱囊の至適pHから説明される現象であらう。但し単なる 0.5%重曹水は容器の条態(密栓してあるか否か), 温度条件等により極めて変動し易く, 17°C, 及び45°Cで測定すると同じ 0.5%重曹水でpHは 8.1より 9.3迄変化するので, 重曹の濃度だけを指定したのでは脱囊状態も一定でなく再現性に乏しい結果になる。

1) 及び2) に得た結果の小括

新鮮なウェステルマン肺吸虫被囊幼虫の脱囊に及ぼすメチウムの滲透圧, 温度及びpHを検討し次の結果を得た。

- i) 溶液は等滲透圧である事が望ましい。
- ii) pH 7.5温度37°C以下では殆ど脱囊しない
- iii) pHが 7.5より 8.0に, 温度が37°Cより40°Cに上昇すると飛躍的に脱囊が促進される。
- iv) 脱囊至適pH及び温度はpH 8.0— 8.5 温度 40°Cである。
- v) pH 8.0— 8.5, 温度40°Cに於て被囊幼虫の50%は3時間内至4時間で, 80%は約10時間で脱囊するが 100%脱囊には達し難い。
- vi) この条件で80%脱囊迄は時間を対数にとつて確率紙にとればほぼ直線をなし脱囊傾過に規則性のあるも

のと思はれる。

vii) 以前に脱囊に好適であると称せられた 0.5% 重曹水は、その脱囊促進作用は pH がたまたま脱囊至適 pH 附近にあつたためと思はれる。

3) 脱囊に及ぼす抗生物質の影響

肺吸虫被囊幼虫の脱囊現象に、使用するメヂウムに抗生物質を加え細菌の増殖を抑制した場合に何等かの影響があるかどうかを検討してみた。即ち蒸留水、生食水、Ringer 氏液、及び 0.5% 重曹水にそれぞれ 1 cc に対しペニシリン 100U. とストレプトマイシン 50 γ を加え、これを加えないものと対照として 34°C, 37°C, 40°C 及び 43°C の 4 段階についてその脱囊状況を比較してみた。各々 20 個づつ用ひ、10 時間迄観察をした。その各々の差を検討するため、10 時間の観察中最も差を生じた 5 時間断面をとつて検討した。結果は第 3 表の如くである。二元

Tab. 3 Effect of antibiotics on excystation of metacercariae in several types of medium at various temperatures

	Numb. of metacercariae	37°C		37°C		40°C		43°C	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Aq. dist.	20	0	1	1	1	3	4	16	18
Saline	20	0	0	1	2	5	13	10	14
Ringer	20	0	1	1	3	4	7	1	3
0.5% NaHCO ₂	20	4	4	1	6	5	13	13	15

*...added Penicillin 700 U. & Streptomycin 50 γ per ml.

配置法に従つて計算すれば全体を通じて 1% 以下の危険率で両者には差が認められない。又別に数の大小関係だけに着目して集計すると、抗生物質を加えた方がやや脱囊数が少くなる傾向すら認められる。これが抗生物質そのものの影響が、二次的に細菌増殖が抑制されたために起つたのが明かではないが、ともかく脱囊を促進させる意味では抗生物質を加える必要は無く、又雑菌が混在しても脱囊は影響されないように思はれる。これは本吸虫の被囊幼虫は終宿主の腸管内で腸内細菌数の中で脱囊すると云う事実を考慮すれば当然の事であらう。

4) 脱囊に及ぼす消化酵素の影響

被囊幼虫は終宿主に経口的に摂取せられて後胃を経て小腸に至つて始めて脱囊する。従つて本被囊機軽には胃液及び腸液の消化作用が重要な役割をなしていると考えられる人が多い。然しこの点に関しても詳しい納得するに足る実験がなされているわけではないので、果してそうで

あるか否かを改めて検討してみた。消化酵素としては Pepsin 及び Trypsin を用い、それぞれの至適 pH に於いて脱囊に及ぼすそれぞれの単独の作用及び両者の綜合作用について観察した。

i) Pepsin 単独の影響

先づ人工胃液 (蒸留水 100cc, Pepsin 0.5gr. HCl 0.3cc pH 3.6) 中での脱囊状況を、10°C, 20°C, 30°C, 35°C 及び 40°C の各温度について観察した。この結果は何れの温度でも脱囊したものは一つも認められず、3 時間以上に及ぶと多くの被囊幼虫のなかには内容潤濁して変性死滅するものが現れてくる。

40°C の場合 10 時間後になると全被囊幼虫が変性死亡するが、35°C 以下では死亡する率はやや少い。以上の実験成績から Pepsin には例え被囊幼虫の固有膜を或る程度消化する作用があるとしても、その至適 pH が低いために脱囊を促進するにいたらず、むしろこれを抑制し、3 時間以上に及べばかえつて被囊幼虫に有害であつた。

ii) Trypsin 単独の影響

前項の実験で Pepsin は脱囊にむしろ有害なものであるが、これは一応 Pepsin の至適 pH が著しく低く脱囊の至適 pH 8.0~8.5 からかけ離れているためとも思はれる。これに反して Trypsin はその至適 pH が 8.0 前後であり、pH のみによる脱囊抑制作用は考えられない。この点から Pepsin の場合と異り Trypsin には脱囊を促進する作用があるかも知れぬと期待して実験を行つた。

Trypsin は製品により著しく活性を異にするので、持田製薬製品の結晶性 Trypsin (商品名 Trypsilin MO-CHIDA), Merk 社製品の Trypsin 及び Difco 製品の Trypsin (1:250) の 3 種を用いた。持田の結晶性 Trypsin は 10,000 Haemoglobin Unit, を 20~30cc に溶解し、pH は指定の至適 pH 7.1 のものと、別に pH 8.0 のものを作つた。Merk 及び Difco の Trypsin は いづれも 0.2%, pH 8.0 とした。溶解した液はすべて Tyrode 氏液である。被囊幼虫は大量に入手出来たので各々 100 個近く宛用いて 40°C で 6 時間観察した。その結果は第 4 表に示した。結晶性 Trypsin のみが Control と差がなかつたほか他の Trypsin は Pepsin の場合と同様にむしろ脱囊を抑制する傾向が見られる。

その中でも Merk 製のものが最も脱囊率が少なかつた。

iii) Pepsin 及び Trypsin の綜合作用

Pepsin によりポリペプチド様に迄分解された蛋白は Trypsin によつて消化され易くなる事実から、それぞれ

Tab. 4 Comparison of the effect of trypsins on excystation of metacercariae in Tyrode's solution at 40°C.

	pH	Number of metacercariae (specimens)	Number of excysted metacercariae					
			1	2	3	4	5	6 hour
Crystalline Trypsin (MOCHIDA Co. Japan)	8.0	100	4	4	17	31	40	44
" "	7.0	97	5	7	8	15	23	23
Trypsin (Merk)	8.0	96	1	1	2	9	9	14
Trypsin (Difco)	8.0	95	0	5	10	16	19	19
Control (pH 8.0 Tyrode's solution)	8.0	85	0	6	16	30	38	40

単独に作用した場合脱嚢促進作用が認められなくとも両者が遂次に作用すれば共同して脱嚢促進作用が現れるかも知れない。この事を確かめる為に次の4通りの実験を行った。いずれも最初のA液に3時間浸漬後、B液に浸漬した。海為は40°C、一列に用いた被嚢幼虫は20個である。

A B

- ① 塩酸性 pH 3.6 の液 → pH 8.0 Tyrode 氏液
- ② " " → " " + 結晶性 Trypsin.
- ③ 人工胃液 (pH 3.6) → " " pH 8.0 Tyrode 氏液
- ④ " " → " " + 結晶性 Trypsin

結晶性 Trypsin の濃度は実験 ii) に同じ。結果は第5表に示した。

少 Trypsin を加えると良いようであるが $p=0.157$ となく有意差にはならない。

結局前処置に Pepsin を加えようが加えまいが、後に Trypsin を加えても加えなくてもこの4通りの観測値は余り差が無いようである。いずれの場合も液を交換して直後に脱嚢が急に行はれるのはこれ等の実験経過の共通因子たる pH 3.6 の液から pH 8.0 の液に交換する際の pH の変動によると解するよりほかは無からう。

5) 脱嚢に及ぼす機械的振盪の影響

之までは主として pH, 温度又は消化酵素等の脱嚢に及ぼす影響について被嚢幼虫を溶液中に静置した場合につき検討を加えてきた。ところが肺吸虫卵内のミラシデウムの孵化機転には機械的振盪の影響が極めて大きい事

Tab. 5 Comprison of effect of crystalline trypsin on excystation Combined with pretreatment by pepsin for 3 hours

Pretreatment (3 hours)	Number of mutacercariae	Number of excysted metacercariae			
		0.1	1.0	2.0	3.0 (hours)
① pH 3.6* → pH 8.0**	19	8	8	8	8
② pH 3.6 → Trypsin (pH 8.0)	20	12	13	13	13
③ Pepsin (pH 3.6) → pH 8.0	19	14	16	16	16
④ Pepsin (pH 3.6) → Trypsin (pH 8.0)	20	12	14	14	14

Control* ... 0.3% HCl solution

Control** ... Tyrode's solution

先ず③及び④を比較して見よう。これは前処置は同じく人工胃液でB液の Trypsin の有無のみの差がある。いずれの時間をとつても危険率を5%にとつて差は証明されない。つまり例え Pepsin 前処置がしてあつても Trypsin の脱嚢促進作用は認められない事になる。次に①及び②について比較すればこれは前処置に Pepsin の加えてない場合で、19個中8個と20個中13個で多

が明かにされてある。そこで被嚢幼虫の脱嚢機転にも機械的振盪の影響で関与しているかどうかを検討してみた。

機械的振盪は Monod 氏振盪培養装置を用ひ、1分間40回5ccの液とともに長さ25cmのガラス管中を往復せしめた。温度は40°C、第6表を見ると静置した対照よりも振盪した方が良く脱嚢するようである。(50%以下の危

Tab. 6 Shaking effect on excystation of fresh metacercariae at 40°C.

Treatment...40 times shaking per min. by Monod's shaking apparatus.
Medium...Veronal-isotonic-buffer of pH 8.0

	Number of excysted metacercariae							
	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	14.5
shaked	1	3	8	10	10	15*	15*	18 (all dead) †
not shake	0	2	2	7	8*	9*	9	9 (ali alive)

*...significant difference ($p < 0.05$) Numb. examined...20 metacercariae

除率率で有意) 但しこの機械的刺戟は幼虫に有害であり、14時間後には全部死亡した。

6) 脱嚢に及ぼす被嚢幼虫の集合効果

100個の被嚢幼虫を10本の試験管に10個づつ分けた場合と、50個の被嚢幼虫を5個づつ10本に分けた場合と20個の被嚢幼虫を1個づつ20本に分けた場合とで脱嚢状況に差があるかどうかを検討してみた。実験の都合で標本数が揃えられなかつたので、母 100分率に換算して棄却限界を考慮して比較した。第7図がその結果である。8) に述べるようにこの実験だけ新鮮な材料が入手出来ずに死後3日冷蔵したモクスガ=より被嚢幼虫を分離したので全体として従来の新鮮な被嚢幼虫の脱嚢状況と多少異

場合、10個の場合と小試験管に収容した個数が多くなるにつれて、脱嚢率が上昇する現象が見られる。

これは終宿主中に摂取されて脱嚢する場合にはこのような現象はないとも云えるが *in vitro* に実験的に脱嚢を試みる時には充分考慮して然る可き現象であらう。仮りにこれを被嚢幼虫の集合効果と呼んでおく。脱嚢の比較実験を行う時に片方は5個づつ小試験管に入れ、片方は10個づつ試験管に入れたのでは結果の判定は困難となる。今迄の実験は20個づつ小試験管に投入してあるから上記の意味の集合効果を含んだ成績であるが、一試験管内に収容した個体数は同じであるから結果の判定に誤る事はないと思はれる。この集合効果は被嚢幼虫が小試験管の底のように相互に密集するような場合に見られる現象で、底の平な小型シャーレのようなものに投入しても被嚢幼虫が集合出来ずにこのような現象は起らない。これは恐らく脱嚢を開始した幼虫は極めて活発に屈伸運動を行い隣接の被嚢幼虫に強い機械的刺戟を与えて更に脱嚢を促進せしめるためと推察される。

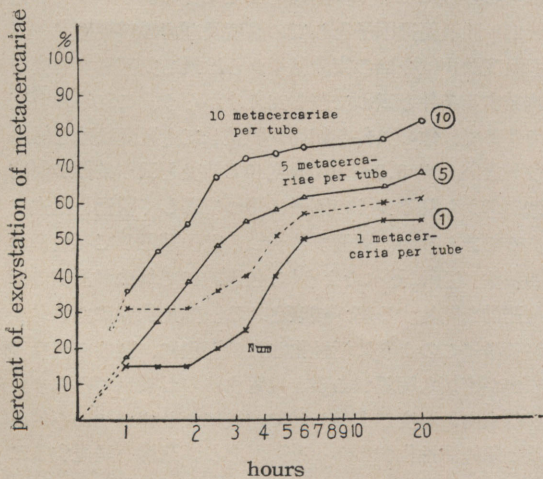
被嚢幼虫の乳剤渗出液中にも特に脱嚢を促進する物質は証明されれないから、註1) 被嚢幼虫が嚢包内に脱嚢促進物質を排出するとは考えにくい。又このような物質が脱嚢とともにメチウム中に出て他の未脱嚢の被嚢幼虫に影響を与える事も想像の域を脱しない。

7) 脱嚢に及ぼすモクスガ=体液の影響

モクスガ=の脚を切断すると一匹につき約2ccの体液を採取出来る。23匹分の体液を集め充分凝固させた後 clot を除く(遠心沈澱を繰返しても比重によっては分離し難いので毛細管ピペットにて液状部だけ棄める。)と

Fig. 7.

Compon of crowding effect on excystation of metacercariae at 40°C.



Notice: Metacercariae were collected from dead crabs and stored for 2 days in refrigerator (2°C-4°C).

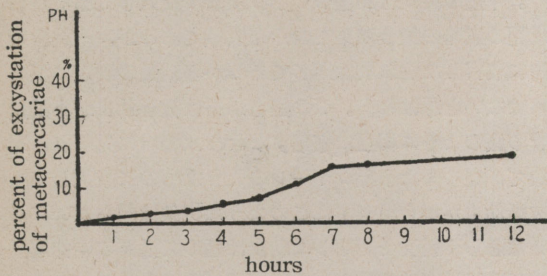
つているが、相互の比較には差し支えなからう。図を見れば一個づつ投入したものの脱嚢率が最も低く、5個の

註1) 新鮮被嚢幼虫30個を pH8.0 の Tyrode 氏液 6cc とともに Tissue grinder で磨碎して乳剤となし遠心して上清をとる。これを被嚢幼虫を1個づつ投入した試験管に加え、同じく1個づつの同数の対照と比較して脱嚢状況を観察した。全く差を認められなかつた。(危険率5%)

Haemocyanin を含んだ淡青色の粘稠な液を得る。これのpHは7.9である。これはほぼ被囊幼虫の脱囊最適pHに近い。この液中に被囊幼虫を浸漬し、40°Cに加温し脱囊状態を観察した。用いた被囊幼虫は48ヶ之を5本の小試験管に分けて入れた。温度及びpHは最適条件に近いが第8図に見られるように極めて脱囊は低率で6時間後の漸く10%に達し、12時間観察するも19%を越えなかつた同じく40°CでpH 8.0のTyrode氏液の場合に比較して著しい差が認められ、モクスガニ液体中では脱囊が抑制される傾向があるように考えられる。これは第二中間宿主体内で被囊幼虫の状態で発育が留り、第二中間宿主体外に出て始めて次の発育段階に達する事が出来る事の一つの説明資料となり、極めて興味深い現象と思はれた。

Fig. 8.

Inhibition effect of the serum of *Eriocheir japonicus* pH 7.9 upon excystation of fresh metacercariae at (a temperature) 40°C.



numb. examined: 48 metacercariae.

8) 被囊幼虫の鮮度の脱囊に及ぼす影響

上記の実験は、集合効果の検討(実験6)に用いたもの以外すべて新鮮な被囊幼虫を使用した。実験によっては既に死亡したモクスガニより分離せねばならぬ場合や、冷蔵した被囊幼虫を使用せねばならぬ場合もあるので、鮮度の脱囊に及ぼす影響を終りに記しておく。横川(1912)は被囊幼虫を蟹体内より分離して時日の経過した場合、或いは死亡後時日の経過した蟹より分離した場合には、脱囊が容易になる事を既に報告している。

6)の集合効果の検討に使用した材料が死後3日間冷蔵された蟹より分離し、更に2日冷蔵された被囊幼虫であるのでこの脱囊曲線と新鮮被囊幼虫の脱囊曲線とを比較して見よう。

Fig. 3のTyrode氏液群とFig. 6の3本の曲線の一番上の曲線の群がメヂウムは同じくTyrode氏液でpH 8.0、温度も40°Cで更に小試験管に10個づつ約100個の被囊幼虫を用いてあり、被囊幼虫の鮮度以外は同じ条件

の実験であるのでここに再び引用して比較して見た。一見して陳旧な被囊幼虫の方が遙かに脱囊の早い事がわかる。50%脱囊時間を見ても、新鮮なものは4時間50分であるのに陳旧なものは1時間40分である。これによつても生きた蟹より分離した直後の被囊幼虫に比べて、分離後時日を経過したもの、或いは死亡後時日を経過した蟹より分離した被囊幼虫は著しく脱囊が促進され、脱囊現象は又被囊幼虫の鮮度とも深い関係ある事が判る。但し陳旧な被囊幼虫より脱囊した幼虫は生活力が弱く、短時間の間に死亡するものが多い。たとえば4日間冷蔵された被囊幼虫を使用した場合、最適条件で4時間以内に殆ど脱囊しても、14時間後に全部死亡した。この現象は横川(1912)も述べているように、恐らく被囊壁が変化を受けて弱くなり僅かな内部よりの力で脱囊出来るようになるためと思はれるが、脱囊促進因子とは少々性質の異なるものでないかと思はれる。

考 察

1) 実験結果の要約

以上 *in vitro* でウェステルマン肺吸虫被囊幼虫の脱囊を誘発する条件をpH、温度、抗生物質、消化酵素、機械的刺戟為にわたり検討したのであるが、結局pH及び温度が最も重要な因子であり、機械的刺戟がそれを助長せしめると云う簡単な事しか捕える事は出来なかつた。以下この点につき多少論議を加えて見る。

2) 脱囊促進因子としての温度及びpHの重要性。

温度及びpHは今回の実験結果からは最も支配的な脱囊を誘発する条件と云つて差し支えなからう。これ等の最適条件外では他の条件を如何に調整しても脱囊は殆ど促進されない。pH 8.0~9.0温度40°C前後と云う条件が何故他の考えられる多くの因子に勝つて著しく脱囊を促進するのであらうか。脱囊する一つの前段階として「脱囊の観察法」の頂に述べたように、包囊内にて幼虫が活発の回転運動を開始する事が観察される。静止状態にある幼虫が急激にこのように活性化される過程に、周囲の温度及びpHが密接な関係があると推定するのが妥当であらう。

幼虫内に温度が上昇し40°C前後になりpHが8.0を越えると急に活性化するある系列があり、運動を誘発するに至るものと想像される。これ以上は全く想像の域を脱しないが、pH 8.0、温度40°Cで活性化されるある酵素系が引金のような作用をなし、次々に連鎖反応を誘発して最後に活発な筋肉運動を引き起すと思はれる。内部からTrypsinのような同じ条件で活性化する蛋白触解酵素の作用で、固有膜が内層から消化されて脱囊し易くなる

も考えられるが、これには更に多くの無理な仮説を必要とし索強附会となる。

脱嚢は決して幼虫が静止の状態て起るものでなく、その直接の主な誘因は幼虫の活発な運動にあるものと著者は考えている。若し固有膜が内部から消化されるとしてもそれは副次的な促進因子にすぎない。pH及び温度の他に脱嚢を促進する因子として認められたものは外部からの機械的刺戟のみであつた。

3) 従来の消化酵素脱嚢促進説の検討。今回の実験によつては Trypsin 及び Pepsin には全く脱嚢促進作用はなく却つて対照よりも脱嚢率は低かつた。横川氏 (1918) の詳細な実験によつても、人工液に処置した後に人工腸液に浸漬すれば容易に脱嚢する事を報告されてあり、この結果は甚だ意外であつた。そこでもう一度その判断されたものとの成績を検討して見たところ、一実験に使用された標本が 5 個内外であつた。今仮りに一部に 10 個の標本を用い、実験郡が 9 個脱嚢し、対照郡が 4 個脱嚢したと云う成績を得たとする。直観的判断ではこの実験郡は脱嚢が促進されたものと取り易いが、今かく判断する危険率を計算すれば 5.7% 差があるとは簡単に断定出来ない。

従来行はれて来た実験が 5 個前後の標本数である点から、その対照郡と比べての結果の判定には、本来差の証明出来ぬものを差ありと誤る危険が充分にある。よつて上記の結論も消化酵素は脱嚢促進作用があると云う一つの先入感が大きな危険率のある判断を敢て下さしめた結果である様に解釈出来る。上記の実験は又結果を判定した時間が 2 時間であるので、逆に本来差があるものも未だ充分な開きが現れず差がないと判定される所謂第二種の過誤を犯す懼れも充分にある。この点標本数、判定時間と云うような実験の基準の設定法が如何に重要なものであるかがよく判る。なほこれ等の統計学的智識はごく近年に発達したもので、当時としては病むを得ざる方法論上の誤謬であつた。消化管内で脱嚢するから恐らく消化液がそれを助長するであらうと考えるのは自然であるが、事実はそれ程合目的では無いようである。

4) 自然界に於ける脱嚢機転の考察

以上は *in vitro* の問題として脱嚢現象を観察して来たが、これ等をもとにして実際の自然現象中の宿主内脱嚢について考察して見よう。

先ず第二中間宿主体内では如何に長期に亘つて存在しても脱嚢しない事は、温度が 20°C 以下である事と、第二中間宿主自身の体液中に存在する脱嚢を抑制する作用の

ある事で一つの説明とする事が出来よう。これが終宿主に摂食されると、体内温度が 38°C~39°C の場合、温度は至適範囲であつても胃中では塩酸性のため折制されて幼虫は賦活化せず、2~3 時間後に小腸に送られると pH がアルカリ側に傾き至適範囲となるので幼虫は固有膜中にて賦活化されて活発に運動を始め、同時に腸の蠕動による機械的刺戟が外から加はつて、容易に脱嚢をするものと思はれる。

脱嚢幼虫は直ちに腸壁に穿孔侵入するので腸内容が異なる浸透圧であつてもその影響を免れると考えられる。この消化酵素の関与しないと云う見解は被嚢幼虫のままマウスの腹腔内に注入しても充分脱嚢せしめ得る事から間接にも証明出来るが詳細は別報にゆづる。今回の実験に於て最良の条件下にも 100% 脱嚢せしめる事は困難であり、脱嚢せずに終る被嚢幼虫が若干残つていた、これは更に脱嚢条件を検討改良すれば解決出来る性質のものかも知れぬが、或は自然界に於ても実際の感染が成立する場合に摂取された被嚢幼虫がすべて宿主の腸管内で脱嚢するものでなく、未脱嚢のまま排出される場合のある事の一つの説明になるかも知れぬ。従来の実験的に被嚢幼虫を犬、猫に投与して成虫を得る率が平均 8 割前後である事はこの事を裏書きするように思はれる。

5) 実験的応用について

本論文のまがきに記したように、飼育に必要な最も自然状態に近い幼虫を得る方法を見出すのがこの実験の一つの目的であるから、以上の結果からその最も態率的方法を考えて見れば次の如くである。①材料は新鮮な被嚢幼虫を用いる。②密集させた方が脱嚢率が良いから多くの被嚢幼虫を小試験管に入れる。(10~20 個位が適当)。③脱嚢液として pH 8.0~8.5 の Tyrode 氏液を用い温度 40°C に存在する。以上により 10 時間後にその 8 割を飼育に適する状態で脱嚢せしめ得る。著者等に既に 200 日以上にこの方法により被嚢幼虫を脱嚢せしめわたり飼育し、發育させる事に成巧した。又脱嚢幼虫を用いて *in vitro* の抗肺吸虫性の薬剤のスクリーニングテストも簡単に出来るようになった。

又至適条件に於ける脱嚢状況を観察して被嚢幼虫の生死の判別に資する事も可能である。従来試験動物に投与して長時間後に感染の有無を調べていたがこの脱嚢試験を行えば短時間内に簡単に生死、感染力の有無を判定出来るであらう。

6) 他種寄生虫幼虫の脱嚢又は脱嚢現象との比較。

ウエステルマン肺吸虫の近縁種である大肺吸虫の被

囊幼虫の脱囊について米良(1951)が報告している。これはウェステルマン肺吸虫と異り容易に脱囊するようである。大平肺吸虫被囊幼虫の固有膜が甚だ菲薄で、カバーグラスを上のにのせただけでも容易に脱囊する程であることから当然と思はれる。

肝吸虫被囊幼虫は小宮(1940)によれば人工胃液処理後に精製した Trypsin (Grüber) と使用すれば直ちに脱囊するが、これも恐らく被囊幼虫の構造の差によるものと思はれるので尚検討して見たい。蛔虫卵の脱殻について古来種々討議されているが、最近谷口(1955) O'Connor (1951) 等は外部環境の理化学的刺戟が卵殻を通じて仔虫を活性化して脱殻を促すものらしいとしている。この場合従来考えられた消化液の作用が重要な要因でない事が判明し、本実験の成績と照らして興味深いものがある。

原虫類の囊胞の脱囊機転については赤痢アメーバ、コクシジウム等について多くの考察が為されているが本実験に於いては特に論及しない。

謝 辞

拙筆するに当りこの小論文をまとめるに至る迄に種々御援助下さった多くの方々へ心よりの謝意を表します。終始熱心に怠り勝ちな筆者を御指導、御鞭撻下さった、元研究室主任(現千葉大学教授)横川宗雄博士には稿を終るに当つて最も深い感謝を捧げます。

拙文を御校閲下さった予研寄生虫部長、小宮義孝博士研究材料を御送附下さった愛媛県衛生研究所技師、山岡邦夫氏、高知県衛生研究所技師武内兵四郎氏、函南病院院長勝呂毅氏、新潟県直江津保健所長平野多聞氏、同所予防課長中川晃子氏にも併せ感謝の意を表します。終りに本論文の実験成績は千葉大学医学部学生、福本泰彦、小川道一、森宏、遠藤光夫、松丸信太郎の諸氏の御協力による所大であつた事を記しておきます。

文 献

- 1) 松井芳雄(1914): 肺デストマ幼虫の生物学的研究 北越医学雑誌, 202, 161-173. —2) 安藤 亮(1915): 肺デストマの発育に関する研究(第三報) 中外医事新報, 851, 1109-1127. —3) 横川 定(1917-18): 二口虫類の生物学的研究, 特に被囊「チェルカリア」の縮終宿主内消化管内に於ける遊離機転に就て, 台湾医学会雑誌, 181, 703-778; 184, 301-354, 401-427, 岡山医学会雑誌, 336, 1-106; 337, 1-41. —4) 横川宗雄(1951): 静岡県肺吸虫流行地におけるアメリカ

ザリガニの感染状況, I, 医学と生物学, 25(6), 305-307. —5) 横川宗雄, 大島智夫(1953): 静岡県肺吸虫流行地におけるアメリカザリガニの感染状況, II, 医学と生物学, 27(2), 65-68. —6) 横川宗雄, 大島智夫, 木畑美知江(1955): 肺吸虫 *Paragonimus westermani* の体外飼育 I, 脱囊幼虫の *in vitro* に於ける生存期間について, 寄生虫学雑誌, 4(4), 70-75. —7) 米良利己(1951): 大平肺吸虫の生物学的研究, 医学研究, 21(4), 509-516. —8) 谷口富士雄(1955): 蛔虫卵試験管内膀胱殻に関する観察, その1) 細菌及び微の影響, 寄生虫学雑誌, 4(1), 34-43. —9) O'Connor, G. R. (1951): Morphological and environmental studies on the hatching of ascarid egg *in vitro*. J. Parasit. 37, 179. —10) Parker, R. C. (1950): Method of tissue culture 2nd Ed., Paul. B. Hoeber Inc.

Summary

The promoting factors of excystment of the metacercariae *Paragonimus westermani* were studied.

The metacercariae were removed from alive crabs, *Eriocheir japonicus*, collected from endemic areas of paragonimiasis in Japan. Tyrode's solution or buffered saline was used as the basic medium for excystment. In the hypotonic medium the excysted metacercariae died soon after excystation. Metacercariae were suspended in the medium in small test tube with rubber stopper and observed from the bottom of the test tube by microscope. Test tubes were immersed in water-bath controlled to maintain the fixed temperature with the accuracy of $\pm 0.05^{\circ}\text{C}$. The minimum number of metacercariae used in each experiment was 20 and the results of experiments were examined statistically.

Favorable temperature and pH degree of the medium for excystment: No excystment was observed below the temperature of 32°C . Most of the metacercariae excysted at $40-43^{\circ}\text{C}$. Higher the temperature over 43°C . was harmful to excysted larvae. Effect of pH of the medium at the temperature of 37°C , 40°C , and 43°C . were shown in Fig. 2, 3 and 4 respectively. In the medium of pH 7.0 no excystation occurred at any degree of temperature. Excystation occurred mostly in the medium of pH 8.0-9.0 at the temperature of 40°C and 43°C . Statistical comparisons of excystation rate in these various condition studied in Tab. 2. The temperature of 40°C . and pH degree of 8.0-8.5 were the most suitable condition for excystation. More than

80% of the metacercariae excysted within 10 hours in these optimum environments. (Fig. 5)

Effect of antibiotics for excystment: No special advantage was found by using antibiotics such as Penicillin and Streptomycin in order to suppress the bacterial contamination. It would not necessarily to use aseptic technique in the experiments of encystation. (Tab. 3)

Effect of digestive enzymes for excystment: Trypsin was not effective for encystation *in vitro* even though combined with the pretreatment by pepsin, but rather harmful to metacercariae. Pepsin was also unable to induce excystment because of the active pH of pepsin was much lower than the pH of the medium for excystment. The writer would like to reject the old theory that the digestive enzymes of the host are responsible for the excystment of metacercariae. (Tab. 4 and 5)

Effect of the mechanical stimulates for excyst-

ment: Mechanical shaking of the test tubes by shaking apparatus was rather advantageous for excystment, but harmful to excysted larvae. (Tab. 6) The writer also has observed that the crowded metacercariae in the test tube excysted easier than the isolated metacercariae kept singly in each test tube. This curious promoting effect was also probably due to the mechanical stimulus by the active movement of excysted larvae to encysted metacercariae. (Fig. 7)

Effect of the juice of emulsified metacercariae for excystment: The writer could not find any advantage to use the emulsified juice of fresh metacercariae for excystment.

Excystment in infected crab: Excystment never happens in infected crabs which are alive or dead. Body fluids of crabs, *Eriocheir japonicus*, has a strong tendency to suppress the excystment. (Fig. 8)