

犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* 成虫の *in vitro* での行動に関する研究

安 羅 岡 一 男

(国立予防衛生研究所寄生虫部)

(昭和 31 年 5 月 12 日受領)

まえがき

鉤虫成虫の行動に関しては、西 (1933) ⁴⁾ の *in vivo* での観察があるが、以来生体外飼育がなされなかつたために、*in vitro* での行動についての記載は全くない。筆者はさきに佐藤、小宮らと共に犬鉤虫成虫の生体外飼育を試み、37°Cの犬血清中で雄虫の最長生存期間35.5日、平均24.2日、雌虫の最長84.5日、平均68.2日で、しかも飼育初期には交尾が行われ、雌虫は飼育開始後8週まで受精卵を産出することを報告した。⁶⁾ 又、一方人工合成飼育液として Krebs Ringer bicarbonate sol. に 0.5%葡萄糖を添加した medium 中で、28°Cでは雄虫は最長 9.5日、平均 8.2日、雌虫は最長21.5日、平均12.0日まで生存させ得ることを見出した。このように鉤虫成虫を *in vitro* で、ある期間生存させることに成功したので、筆者は犬鉤虫成虫の *in vitro* での行動について種々の実験的研究を行った。

材料および方法

犬鉤虫感染仔虫 100~150個体を生後2カ月の犬に経口感染させ、4週間後小腸を剖出し、37°Cの Krebs Ringer bicarbonate sol. (pH 7.4) 中で切開して得た成虫を用いた。

飼育 medium として Krebs Ringer bicarbonate sol. に 0.5%となるよう葡萄糖を添加し、更に Penicilline 500 u/cc, Streptomycine 100 r/cc および Dehydro acetic acid 50 μ/cc を加え、pH は 7.4 に調整した。その他の方法の細部にわたつては、各章において述べることにする。

Kazuo Yasuraoka: Behavior of *Ancylostoma caninum* *in vitro*.

(Department of Parasitology, National Institute of Health)

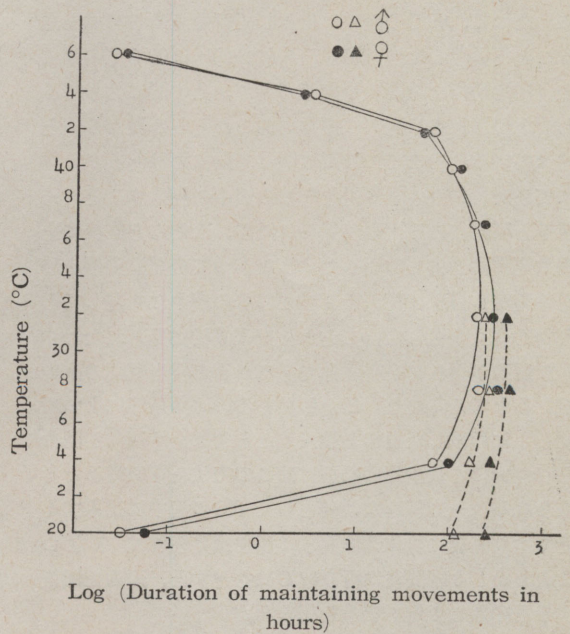
種々の温度における自発運動停止時間

飼育容器としてD 3.5カレルフラスコを用い、種々の温度下で自発運動がなくなるまでの時間を測定した。鉤虫は1回の実験にそれぞれ10個体を用い、運動の状態は弱拡大の倒立顕微鏡を用いて観察した。

自発運動が消失するまでの時間は、46°Cでは♂ 1.3分、♀ 3分、44°Cでは♂ 3.5時間、♀ 3.0時間と 2°Cの温度差でいちじるしい差を示し、42°C以下でも温度の下降と共にその自発運動時間は延長され、28°Cでは♂ 181時間、

Fig. 1 The time-interval from the beginning of the test until the worm showed no spontaneous movement at various temperatures of the solution.

*Survival time



♀ 310時間と最大値を示した。そしてそれ以下の温度では再び自発運動時間は短縮し、20°Cでは♂ 1分50秒、♀ 2分40秒、そして19°Cではほとんど投入直後に運動は消失した。温度と自発運動停止時間の対数値との関係は図1に示す通りである。Krebs Ringer bicarbonate sol. + 0.5%葡萄糖液の37°C中では、24時間以内に鉤虫の運動は剖出直後とほとんど変わらないから、比較的短時間に認められる運動の停止は温度の影響によるものと考えられる。そしてこのように成虫の運動の温度範囲が、自由生活期仔虫のそれに比べてせまく、そして6°C~7°C高温部にずれているのは、成虫が恒温動物の腸管内という環境に生存、適応していることに基因すると考えられる。

低温の場合は自発運動が停止しても、それをたぐちに死と判定することは出来ないのであつて、たとえば19°Cの飼育液中に投入するとほとんど直後に運動は見られなくなるが、数時間後に再び37°Cにもどすと活潑な運動を恢復するのを認めた。自発運動停止時間と生存時間の相異を各温度で比較したのが図1の点線で示した部分で、32°C以上では両者の差は小さく、すなわち自発運動が停止してから短時間のうちに死滅する。したがつて数値の対数をとると両者はほとんど一致した。そして32°C以下ではその差は次第に大きくなり、対数値を比較しても差が認められるようになった。

Lamson および Brown (1936)⁹⁾ は、蛔虫生死判別にあつて、60°Cの液中に投入して自発運動の有無を見ることを提唱したが、板東、石崎(1952)¹⁾ は60°Cでの蛔虫の自発運動停止時間は平均 5.3秒で、その間に見られるわずかの運動も自発的な運動であるかどうか疑わしいと述べている。そこでこの点に関して鉤虫ではどうかを調べてみた。鉤虫♂♀ 6対を60°Cの液中に投入すると、一瞬体を収縮させる運動が見られたが、ほとんど直後に全例共運動は消失し伸展した。したがつて自発運動停止時間は測定し得ず、投入後5秒で37°Cの液中にもどしても運動は全く恢復しないことから投入直後に見られたわずかな運動が果して自発運動であるか否か相当疑問の余地があると考えられる。しかし熱あるいは薬剤等によつて明らかに死滅した虫体を投入したときは全く運動が認められないので、生死の判別にはこの方法を用い得ると考えられる。一方極端な低温として0°Cの液中に投入するとやはり直後に虫体は伸展し、運動は見られなくなつた。しかし3時間後に再び37°Cにもどすと、運動を恢復するものなお1例あるのを認めた。

運動量におよぼす温度の影響

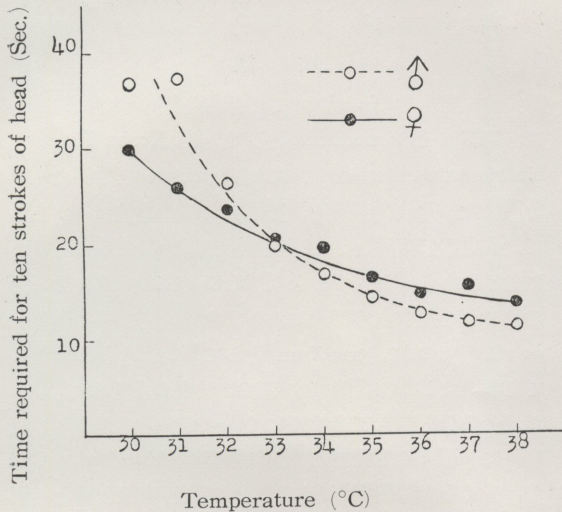
筆者はさきに鉤仔虫の運動量を頭端の搏動数であらわすことを提唱したが⁹⁾、成虫についても同様に、頭端の搏動10回に要する時間を測定し、これを運動量としてあらわすことにした。成虫♂♀ 5対を1°C間隔の所定の温度を示す液中に投入し、搏動10回の所要時間をストップウォッチで測定し、その平均値および標準偏差を算出した。(第1表)。成虫の実験前の適応温度はすべて28°C、1回実験に用いられた材料はすべて、各温度において常に新しい材料が用いられた。

Table 1. The time required for ten strokes of head of *Ancylostoma caninum* in several temperatures.

Temperature (°C)	Time required for ten strokes of head			
	♂		♀	
	Average (Sec.)	Standard deviation	Average (Sec.)	Standard deviation
29	—	—	—	—
30	37.4	15.37	30.5	10.04
31	37.5	14.10	26.4	7.62
32	26.2	4.72	24.1	3.54
33	19.9	2.83	20.7	2.10
34	17.2	2.42	20.3	2.05
35	14.5	2.72	16.7	1.99
36	13.1	1.30	15.3	1.08
37	12.0	1.41	16.1	1.22
38	11.9	1.18	14.4	0.90
39	—	—	—	—

前述したように成虫は20°C以下では全く運動せず、21°C~23°C附近からかすかな頭端の摸索運動を見せるが、体位置の移動は全く認められない。25°C~29°Cでは体位置はわずかに移動するが、不規則なノタクリ運動で、虫体はγ状あるいはα状を呈する。30°C附近からやゝ規則的な運動となるが、頭端の搏動10回に要する時間は30°Cで、♂ 37.4秒、♀ 30.5秒、31°Cで♂ 37.5秒、♀ 26.4秒を示し、したがつて相当緩徐な運動であり、しかも標準偏差はそれぞれ 15.37、14.10を示して相当にばらつきの多いことが分る。しかし温度の上昇と共にその運動も活潑となつて、標準偏差も小さく、いゝかえれば規則的、律動的な運動となり、36°C~38°Cはおいてほゞ安定した最も活潑な運動を示す。(図2)。そして39°C以上になると再び虫体はγ状あるいはα状を呈し、体方向の変換の度合がはげしく、41°C附近ではさらにけいれん的なし

Fig. 2 Correlation between the time required for ten strokes of head and temperature.

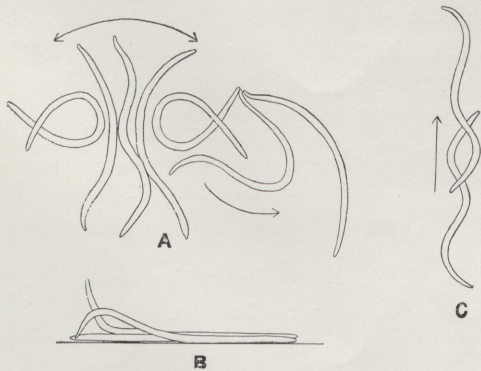


んがく運動が加わってくる。したがって運動量の測定は全く行うことが出来なかつた。

37°C の medium 中における行動

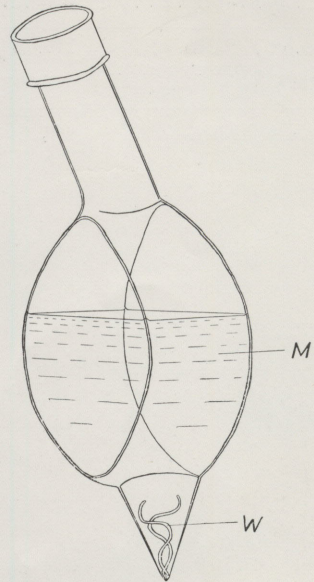
上に述べたように、成虫は36°C~38°Cにおいて最も活潑な、ほゞ安定した運動を見せるので、特に 37°C の medium 中でその行動を観察したのが図3である。図中 A は俯瞰図で、体を左右に屈曲させる運動が主となり、しばしば尾部を基点として頭部を 180° 廻転させる。これは虫が腸壁からはなれて、新しい咬着箇所につつかる

Fig. 3 Locomotion of *Ancylostoma caninum* in a Carrel flask filled with Krebs-Ringer bicarbonate solution.



- A: Bird's-eye view.
- B: Side-view.
- C: Progressive movement.

Fig. 4



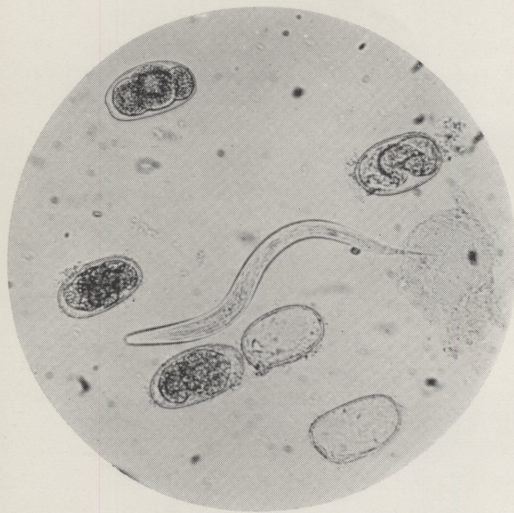
ために好都合な運動と考えられる。図Bは容器の側面から見たときよく見られる行動で、頭部を上方にあげたり、又口器を底面に接触させるのであるが、これもやはり咬着→吸血という過程のために興味ある行動と思われる。鉤成虫はこれらの行動と共に、図Cのように体を蛇行させて medium 中をわずかに前進する。又 medium 中に犬の内臓組織片、血餅あるいは条虫体片節等を投入すると、しばしばこれに咬着する虫があるのを認めた。

筆者は犬鉤虫が犬血清を入れた37°Cのカレルフラスコ内で交尾することを観察したが、Krebs Ringer sol. のカレルフラスコ内では、交尾は全く認められなかつた。そこで雄虫と雌虫を出来るだけ接触させるように、Chu (1938)²⁾ が日本住血吸虫で用いたのと同様に、図4に示すような改変カレルフラスコを用いて観察した。すなわちこの容器内に剖出直後の鉤虫♂♀3対を入れて突起部が下になるよう支持すると、虫は下の突起部に入って、♂♀の虫体がよく接触するようになるのであるが、数回実験をくり返してもやはり交尾は認められなかつた。

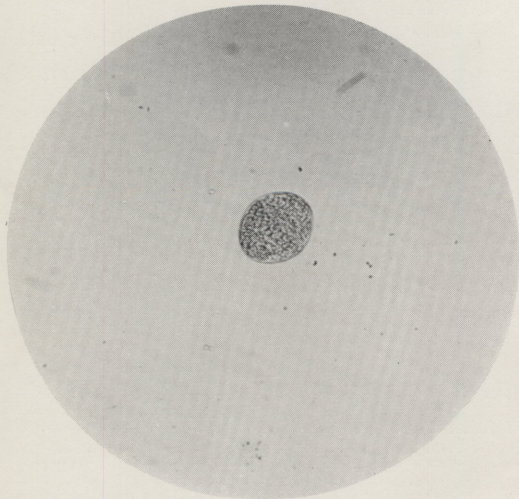
又、カレルフラスコ内で♂♀1対の鉤虫を飼育して毎日飼育液を更新し、その度に液中に産卵された虫卵を調べたのが第2表である。飼育後1日では写真1に示すようないろいろな発育段階の受精卵を産出し、しかも既に孵化して活潑に運動する仔虫も認められた。しかし第2

Table 2. Egg laying of *A. caninum* living in Krebs-Ringer bicarbonate solution.

Days	No. of eggs	No. of embryonated eggs	No. of larvae	Total
1	459 (117)		41	500
2	38 (0)		0	38
3	0		0	0
4	0		0	0
5	0		0	0



Microphoto. 1



Microphoto. 2

日になると、写真2のような不受精卵と考えられる卵を少数産出するのみとなつて、3日以後では産卵は全く認められなくなった。

論 議

犬鉤虫成虫の *in vitro* での行動を観察するにあつて、筆者はその *medium* として終始 Krebs Ringer bicarbonate solution に 0.5% glucose を加えたものを用いた。その生存期間、交尾および産卵状態等からして、鉤虫の飼育液としては犬血清を用いるよりもはるかに劣るにもかかわらず、なお Krebs Ringer を用いたのはこれを鉤虫の行動におよぼす各種駆虫剤の影響の *in vitro* test に、*medium* として用いようとしたからである。たしかに血清はすぐれた鉤虫の飼育液であるが、その採取は人工合成液にくらべて手数がかり、又成分には種々の変動をまぬがれない。 *in vitro* で虫体が、少くとも24時間以上にわたつて剖出直後とほとんど変らない運動を維持することが出来れば、それとの比較において薬剤作用の影響を知ることが出来ると考えられる。これらの見地からして、Krebs Ringer bicarbonate sol. + 0.5% glucose は、*medium* として十分にその目的に合致するものと思われる。そして種々の薬剤がどのような機構で虫体に作用し、影響を与えるかを知るには、先づ虫の正常の状態がよく把握されなければならない。

動物の行動を規定する外界の要因は、数多く存在するが、その物理的要因の中で、温度は特に大きな位置を占めている。特に鉤虫の仔虫は温血動物皮膚への侵入感染ということから、そして又成虫はほとんど温度一定の温血動物体内に寄生し、したがつて適応温度範囲もせまいということから、特に温度の影響は大きいと考えられる。筆者は既に仔虫の Thermo-kinesis について観察し、又こゝに成虫の *in vitro* での行動に対する温度の影響について種々の実験的研究を行つた。これらの結果を *control* として、次に鉤仔、成虫の行動に及ぼす各種駆虫剤の影響について実験を行う予定である。

要 約

犬鉤虫成虫を Krebs-Ringer bicarbonate 液に 0.5% glucose を加えた *medium* 中で飼育し、*in vitro* での行動、およびそれに及ぼす温度の影響等について観察した。

1) 種々の温度における鉤虫の自発運動を停止するまでの時間を測定すると、それは28°Cで最長を示した。温

度と自発運動停止時間の対数値の關係は図 1 に示すとおりである。

2) 温度と運動量の關係は図 2 に示すように、温度の上昇とともに運動量は増加して、36°C~38°C で最も活潑な安定した律動的運動を示した。

3) 特に 37°C における行動の形態を詳細に記述し、さらに交尾の有無、産卵状態等について観察した。

稿を終るにあたり、終始御指導をたまわり、御校閲の労をとられた部長小宮義孝博士に深く感謝の意を表す。又種々援助を与えられた研究室員佐藤温重氏に感謝する。

(本研究の要旨は第 25 回日本寄生虫学会総会において発表した)

文 献

- 1) 板東丈夫, 石崎達 (1952): 蛔虫の前進運動に及ぼす温度の影響. 東京医雜, 60, 187. —2) Chu, H. J. (1938): Certain behavior reactions of *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis* in vitro. Chinese Med. J., Sup. 2, 411. —3) Lamson, P. D. and Brown, H. W., (1936): Methods of testing the anthelmintic properties of ascaricides. Amer. J. Hyg., 23, 85. —4) 西雅憲 (1933): 鉤虫症 *Ancylostomiasis* に見る貧血の成因に関する実験的研究, 第一報 鉤虫類 *Ancylostomidae* の吸血状態に就て, 特に犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* に就ての実験的観察. 台湾医雜, 32, 677. —5) 安羅岡一男 (1955):

鉤虫仔虫の行動に関する研究, 1. 犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* 感染仔虫の温度に対する動性 Kinesis について, 寄雜, 4, 74. —6) Yasuraoka, K., Sato, A. & Komiya, Y. (1956): Survival test of *Ancylostoma caninum* in vitro. Jap. J. Med. Sci. Biol., in press,

Summary

The author studied on the behavior of the adult of *Ancylostoma caninum* living in Krebs-Ringer bicarbonate solution containing 0.5 % glucose in Carrel flask. The results obtained were as follows:

1) The highest and lowest temperatures of the solution in which few worms could hardly move were 46°C and 20°C respectively. The time-interval from the beginning of the test until the worm ceased completely its movements, was measured in the solution of various temperatures. It was longest at 28°C, and became shorter in living at any other temperature higher or lower.

2) The quantity of the movement of the worm was markedly influenced by changes in the temperature of the solution in which it was tested. Most rhythmic and active movement of the worm was observed between 36°C and 38°C.

3) The pattern of behavior, copulation and egg-laying of the worm was observed, especially at 37°C.