

蛔虫の生物学的研究

(II) 脱殻蛔虫の無菌的飼育実験並に幼虫の臓器内移行に就いて

問 川 迪 典

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和32年5月1日受領)

緒 言

蛔虫幼虫を卵殻から脱出せしめて飼育するのに比較的良好な液を得たことを第1報に述べた。今回はこの液に更にマウスの各種臓器の薄片を投入し、その中に無菌的に脱殻せしめた蛔虫幼虫を入れ、蛔虫がどの程度生存し、発育し得るか、又投入した臓器内に侵入し得るものか否かを検討した。

実験材料及び実験方法

第1報で詳細に述べたのでこゝでは略記して、飼育液及び臓器内幼虫の検査法は実験成績の項で述べる。

(1) 虫卵の採集。虫卵は無菌的操作のもとに、豚蛔虫の子宮腔部1~1.5 cmより受精卵であることを確認して取り出し、5%アンチホルミン液で処理した。アンチホルミンは虫卵をばらばらにほぐし、蛋白質膜を除去して虫卵相互の凝集癒合を避け、培養及び脱殻の操作を便ならしめる為に用いた。

(2) 虫卵の培養。28°Cの孵卵器内で試験管内滅菌水中培養を行い、1日に1回試験管を振盪、撈拌して虫卵発育の均一化をはかった。

(3) 脱殻方法。大型の試験管に直径5 mm内外の硝子玉を15~20ヶ位入れて綿栓を施し滅菌し、滅菌水中で培養後30~50日経過した仔虫包蔵卵を入れて、硝子玉の動く程度に5~7分間振盪する。硝子玉の摩擦により卵殻に機械的損傷が与えられるので、仔虫は70~80%位脱殻孵化した。

(4) 飼育方法。この孵化幼虫の懸濁液1 ccを予め飼

MICHISUKE TOIKAWA: Biological studies on *Ascaris lumbricoides*. II. Experiments on the survival of hatched out ascaris larvae in the sterilized medium and their migration into animal tissues added in the medium. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan).

育液を3 cc宛分注せる試験管内に注ぎ、37°Cの孵卵器内に静置した。飼育容器は無菌的操作及び観察に便なるために、直径2 cm、長さ約18 cmの試験管を用い、開口部には綿栓をした。使用したピペット、試験管、シャーレ、其の他の器具類はすべて滅菌し、無菌的に操作した。飼育液はすべて蒸気滅菌を行い、人血清は Seitz's filter で無菌にしたものを用いた。飼育温度はすべて37°Cで行い、操作はすべて厳重な無菌的のものに行つたが、念のためにペニシリン10.000 u/cc、ストレプトマイシン10 mg/ccを添加した。尚、実験中の無菌試験は Thioglycollate 培地により行つた。

(5) 幼虫の生死判別。幼虫の生死判別は専ら運動の有無によつた。判定困難の際は5分以上観察して振盪、加温などの刺激を加え、尚、不動の際には死とした。同一条件に於ける虫体の生存期間には個体によりかなりの長短の差はあつたが、算術平均によつて各々の平均生存日数を算出した。

(6) 幼虫虫体の計測。幼虫の発育の有無を検査するために虫体の体長を Zeichenapparat で、体幅を接眼測微計で計測した。

実験成績

1). マウスの各種臓器を添加した人工合成飼育液R液内に於ける幼虫の生存期間並に発育。

使用した飼育液は第1報で述べた人工合成飼育液R液で組成は yeast extract 0.3 g, ペプトン 0.375 g, ブドウ糖 0.375 g, 人血清25cc, Ringer 液75cc (NaCl 0.5 g, KCl 0.02 g, CaCl₂ 0.02 g, NaHCO₃ 0.01 g) である。これにマウスを麻醉死させて心臓、肺臓、脾臓、肝臓の各臓器を無菌的に取り出して別々にR液に入れた。成績は第1表に示す通り幼虫の最長生存日数は心臓を添加したR液で38日、以下脾臓添加で38日、肺臓添加で34日、肝臓添加で31日、対照のR液のみでは37日である。

第 1 表 マウスの各種臓器を添加した人工合成飼育液 R 液内に於ける幼虫の生存期間並びに発育。
(表中の幼虫数は虫体 100 個中の生幼虫数を示す)。飼育温度 37°C

飼育液	飼育開始日	生 存 日 数 (日)														平均 生存日数 (日)		
		2	5	8	12	16	19	22	26	30	32	34	35	37	38		39	
R 液 + 心臓	幼虫数	37	29	25	23	19	16	14	15	10	4	2	2	2	1	0	38	
	平均体長 (μ)	235	236	243	248	252	254	256	257	257	258	258	259	259				
	平均体幅 (μ)	10.6	10.8	13.5	13.5	13.5	13.5	14	14	14	14.1		14.2					
R 液 + 脾臓	幼虫数	42	34	31	26	21	18	15	12	9	5	2	3	2	2	1	0	38
	平均体長 (μ)	241	242	245	248	258	257	257	258	258	259		259	259				
	平均体幅 (μ)	10.5	10.7	11.5	13.5	13.5	13.5	14	14	14.1	14		14.3					
R 液 + 肺臓	幼虫数	41	27	23	30	20	16	15	16	12	6	2	1	0	0	0	0	34
	平均体長 (μ)	235	238	246	253	256	258	258	259	258	260							
	平均体幅 (μ)	10.3	10.6	12	13.5	14	13.5	14	14	14.1	14.6							
R 液 + 肝臓	幼虫数	38	24	20	18	15	12	10	9	6	2	0	0	0	0	0	0	31
	平均体長 (μ)	241	242	243	254	255	255	257	258	258	259							
	平均体幅 (μ)	10.8	10.9	11.5	12	13	13	13.5	13.5	13.5	14							
対 照 (R 液 のみ)	幼虫数	39	32	30	27	25	21	19	16	10	5	4	3	3	1	0	0	37
	平均体長 (μ)	235	238	243	252	261	261	262	261	262	263		265					
	平均体幅 (μ)	10.6	10.7	12	13.5	13.5	14	14	14.3	14	14		14.8					

つた。又、幼虫の発育も最長の生存を見た心臓添加では平均体長 235 μ が 259 μ に、平均体幅 10.6 μ が 14.2 μ になり、脾臓添加で平均体長 241 μ が 259 μ に、平均体幅 10.5 μ が 14.3 μ になり、肺臓添加で平均体長 235 μ が 260 μ に、平均体幅 10.3 μ が 14.6 μ に、肝臓添加では平均体長 241 μ が 259 μ に平均体幅 10.8 μ が 14 μ に夫々成長し、明らかに発育したと考えられる計測値が得られた。又、対照の R 液のみでは平均体長 235 μ が 265 μ に平均体幅 10.6 μ が 14.8 μ になっていた。

2) マウスの各種臓器を別々に添加した人工合成飼育液 R 液内に於ける幼虫の臓器片内侵入の有無。

幼虫の生存期間並びに発育は上述の成績の通りであるが、幼虫の臓器片内侵入の有無について経過日数別に R 液より各臓器を取り出して鏡検した。

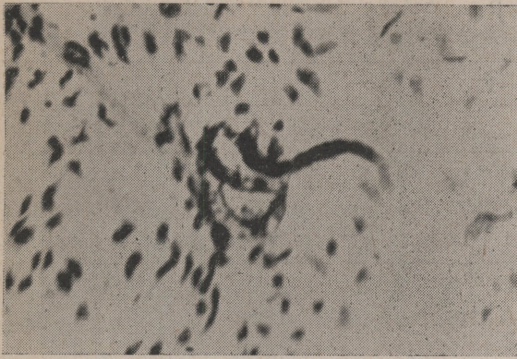
臓器片内侵入豚蛔幼虫の検査法。マウスを麻酔死させて心臓、肺臓、脾臓、肝臓の各臓器を別々に取り出して無菌的に飼育液 R 液に入れた。経過日数別に R 液より各臓器を取り出して、生理的食塩水で 4 ~ 5 回繰返して良く洗った後に乳鉢に入れて圧砕し粥状として鏡検した。又、各臓器を 10% のホルマリンで 48 時間以上固定し、次いで 48 時間以上水洗し、順次アルコールで脱水し、ツェーデル油に入れ脱アルコールし、透明になってからパ

ラフィンに包埋した。6 ~ 8 μ の連続切片を作製し通法の如くキシロールで脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色法を行い幼虫の有無を鏡検した。

経過日数別に R 液より各臓器を取り出して鏡検した結果は第 2 表に示す通りで心臓よりは 6 日目以降、脾臓よりは全部、肺臓よりは 4 日目以降に幼虫が検出されたが、肝臓よりは検出されなかつた。次に 6 日目、13 日目に各臓器を取り出して夫々、連続組織切片標本に作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し幼虫の有無について調べた結果、13 日目に R 液より取り出した心臓の切片標本より 1 例検出した (附図 1)。それ以外の臓器からは切片標本では見出されなかつた。

第 2 表 マウスの各種臓器を別々に添加した人工合成飼育液 R 液内に於ける幼虫の臓器移行の有無 (臓器を圧砕して鏡検)

臓器名	日数					
	2	4	6	8	13	16
心 臓	-	-	+	+	+	+
脾 臓	+	+	+	+	+	+
肺 臓	-	+	+	+	+	+
肝 臓	-	-	-	-	-	-



附図1 人工合成飼育液R液より13日目に取り出した心臓の切片標本から検出した蛔虫。(ヘマトキシリン・エオジン染色)

総括並に考按

蛔虫の飼育実験には主として犬蛔虫を用いた研究発表が多いが、蛔虫の生存期間に就いては自然孵化脱殻せる幼虫を用いて近藤(1920)、浅田(1923)、田村(1932)等の報告があり、人工孵化幼虫(犬蛔虫)を用いて豊田(1932)の詳細なる報告がある。Pitts and Ball (1953)は人工孵化幼虫(豚蛔虫)を用いて飼育し良好なる成績を得ている。人工脱殻により孵化した豚蛔虫の幼虫を無菌的に宿主体外で種々なる組成の人工合成飼育液を考案して飼育実験を行った著者の成績は第1報の通りで最長32日の生存日数並にこれに伴う發育を示した。その際に最も良好な成績を示したR液に添加物を加えて幼虫の生存日数及び發育の延長を計ることとし、マウスの各種臓器を添加したが、それによる著しい影響は見られなかった。即ち心臓及び脾臓の添加で共に幼虫は38日生存し、対照のR液のみの場合(37日)と差はなかった。肺臓及び肝臓の添加では34日、31日で対照のR液のみの場合よりむしろ短縮する傾向にあつた。各臓器をその儘入れたのでは飼育液としての効力が増すことにはならない。

蛔虫の發育は外界で成熟した卵が経口的に直接摂取され、腸内で孵化した幼虫は一度肺臓を通過する体内移行を営んで再び腸に達するという経路を経なければ成虫になり得ない。即ち、蛔虫は幼虫期に宿主体内を移行しなければ爾後の成長を遂げ得ない。蛔虫の宿主体外の培養液内に於ける發育増大に就いては吉田(1917)、小懸(1922)、平沢(1927)、豊田(1923)等の報告が古くからあり、平沢氏は人蛔虫では永く体外培地に置いても大きさ及び体制に変化を認め得ないが、犬蛔虫では多少体の増大を認めると云い、豊田氏も亦人蛔虫及び豚蛔虫では1ヶ月を経ても何らの変化を認めないが、犬蛔虫では一

定の成長を示し、孵化直後平均体長0.3695 mm のものが、1ヶ月後平均0.3935 mm となると述べている。發育に就いての著者の実験では体長、体幅のみの計測を行い、R液に心臓添加のものは38日間生存し、平均体長は初め235 μ のものが35日目に259 μ に平均体幅は10.6 μ から14.2 μ になり、脾臓添加でも38日間生存し、平均体長は初め241 μ のものが35日目に259 μ に平均体幅は10.5 μ から14.3 μ になり、肺臓、肝臓の添加でも夫々明瞭に發育の跡が認められ、統計学的にも明らかに發育した計測値が得られた。対照では37日間の生存で平均体長は初め235 μ が265 μ となり、平均体幅は初め10.6 μ が14.8 μ となつた。これで見ると以上の臓器を添加しても、そのために特に發育が促進されると云う所見は得られなかつた。

蛔虫の孵化幼虫を以てする経口感染は近藤(1920)、浅田(1922)、平沢(1927)、豊田(1932)等の諸氏に依り試みられ何れもその可能なことを実証している。又、経皮的感染は近藤(1920)、浅田(1921)、栗柄(1930)、豊田(1932)等の諸氏により実験され可能であることが明らかであるが、只、これらの実験で組織内に見出される幼虫数は経口的感染の場合に比して著しく少ない傾向のあるのはこの経路が必ずしも適当なものではないのではないかと想像される。犬蛔虫人工脱殻仔虫を用いて戸張(1938)は白鼠皮下感染実験を行い、福岡(1939)は同様仔虫を用いて白鼠の経口的及び皮下的重複感染試験を行い、福岡、坂元(1939)も同様仔虫を用いて白鼠経口的感染試験を行い何れも可能であると述べている。

以上の如く蛔虫の自然孵化幼虫、人工脱殻孵化幼虫を用いて動物に経口的或は経皮的に感染せしめ得る事は可能であるとされているので、著者は宿主体外即ち飼育液中でもなお臓器に侵入する習性を示すか否かを検討した。マウスより無菌的に取り出した各臓器を飼育液中に入れて検索した所によると心臓、脾臓、肺臓よりは検出され、肝臓よりは検出されなかつた。更に幼虫の臓器への侵入を確認するために組織切片標本を作製したが、心臓より1例認められたのみであつた。かくして検出された幼虫数は少くこれらは云わば偶然に侵入したもので *in vitro* に於ける臓器への侵入は幼虫の本質的なものではないと思われる。併し組織片に接着した幼虫が、その組織に侵入するのは、宿主体内で組織内を移動すると云う幼虫本来の習性もある程度関与していることも認める可きであろう。

結 論

マウスから心臓、脾臓、肺臓、肝臓の各臓器を無菌的

に取り出し、これを前報に述べたR液に入れ、その中に人工的に脱殻させた蛔幼虫を入れて、その発育と臓器片内侵入の有無を検した。

1) 幼虫の生存日数は心臓で38日、脾臓で38日、肺臓で34日、肝臓で31日であり、この間幼虫はある程度発育増大した。併し組織片を入れても、そのために特に発育が促進されると言うことはなかつた。

2) 臓器の圧平標本の検査では心臓、肺臓、脾臓からは幼虫が検出されたが、肝臓からは見出されなかつた。

3) 上記各臓器の切片標本を検したが、幼虫の侵入の見出されたものは心臓だけであつた。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた松林久吉教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 浅田順一(1923): 蛔虫の異常感染経路に関する研究(第1回報告)(幼虫の経口的感染に就て), 東京医事新誌, 2335号, 1252-1258. —2) 浅田順一(1923): 蛔虫の異常感染経路に関する研究(第1回報告)(幼虫の経口的感染に就て), (承前), 東京医事新誌, 2336号, 1301-1308. —3) 浅田順一(1925): 蛔仔虫の経口的感染に関する研究(第一), 蛔仔虫の経口的感染に於ける宿主体内移行経路の道程に就て, 東京医事新誌, 2441号, 2125-2133. —4) 福岡俊一(1939): 脱殻仔虫を以て行なへる犬蛔虫重複感染試験, 慶応医学, 19(8), 961-974. —5) 福岡俊一, 坂元祐実(1939): 犬蛔虫脱殻仔虫白鼠経口的感染試験, 慶応医学, 19(10), 1105-1113. —6) 平沢一三(1927): 蛔虫の外界脱殻仔虫の経口的感染に関する実験的研究, 特に固有宿主及び非固有宿主体内に於ける発育経路に就て, 東京医事新誌, 2532号, 1350-1356. —7) 近藤喜一(1920): 蛔虫の経皮的感染に関する研究, 東京医事新誌, 2181号, 1123-1125. —8) 近藤喜一(1920): 蛔幼虫の経口的感染に関する研究, 東京医事新誌, 2187号, 1407-1411. —9) 近藤喜一(1920): 蛔虫の経皮的感染に関する研究, 台湾医学会雑誌, 211号, 630-633. —10) 栗栖吉夫(1930): 蛔虫成熟卵の自然的外界脱殻現象並びに脱殻仔虫の感染経路に関する実験的研究, 熊本医学会雑誌, 6(6), 721-734. —11) 小泉誠治(1922): 蛔虫の発育に関する研究(第1回報告), 東京医事新誌, 2293号, 1689-1696. —12) Pitts, T. D.(1948): Experimental hatching of the eggs of *Ascaris suum*, Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 69, 348-351. —13) Pitts, T. D. and G. H. Ball(1953): In vitro culture of the larvae of *Ascaris lumbricoides suum*, J. Parasitol., 39(4), Section 2 (Suppl.), p. 42. —14) 戸張寅之助(1938): 犬蛔虫脱殻仔虫の白鼠皮下感染試験, 慶応医学, 18(10), 1145-1152. —15) 田村治(1932): 蛔虫の体外培養(第1報~第

- 6報), 日本医事新報, 524-526号, 530-531号. —16) 豊田一長(1931): 寄生虫卵(特に蛔虫卵)の人工孵化に関する研究, 東京医事新誌, 2748号, 2337-2364. —17) 豊田一長(1932): 寄生虫卵(特に蛔虫卵)の人工孵化に関する研究(第二回及び第三回報告), 大阪医学会雑誌, 31, 2823-2880, 3077-3122. —18) 豊田一長(1932): 蛔虫, 鞭虫, 「ヘバチコーラ・ヘバチカ」虫卵の人工孵化に就て, 附, 蛔幼虫の生存期間並びに経口的経皮的感染, 日本寄生虫学会記事, 4, 38-45. —19) 問川迪典(1957): 蛔虫の生物学的研究(I), 脱殻蛔幼虫の無菌的飼育実験, 寄生虫学雑誌, 6(2), 145-154. —20) 吉田貞雄(1917): 蛔虫の発育試験, 東京医事新誌, 2043-2044号, 2019-2024, 2074-2082. —21) 吉田貞雄(1917): 蛔虫の発育に就て, 動物学雑誌, 29(348), 301-317. —22) 吉田貞雄(1917): 蛔虫の研究二・三, 大阪医学会雑誌, 22, 244-270. —23) 吉田貞雄(1918): 蛔幼虫の宿主体内移行経路に就て, 東京医事新誌, 2081号, 1311-1320.

Summary

Eggs were taken from uterus of pig ascaris aseptically and kept in steril water and incubated in 28°C until embryonation completed. The embryonated eggs were shaken with glass beads to make the larvae hatch out. The larvae were put into the nutrient medium which was the most efficient in keeping larvae alive among many kinds of media tested (Report I). The medium consisted of Ringer's solution containing yeast extract, peptone, glucose and human serum.

Heart, lung, spleen and liver were obtained from narcotised mice and a block of these tissues was added to the medium to investigate their effect upon the longevity of ascaris larvae. In every experiments, regardless of what tissue was added, almost a half of larvae died within 2 weeks and the longest survival ranged from 30 to 38 days. Larvae became larger in length and breadth in this period. Control experiments without tissue gave also the similar results.

In another experiment, the tissue was taken out of the medium after a certain lapses of time ranging from 2 to 16 days, and was examined whether the larvae penetrated into it. A number of larvae was always found from heart, spleen and lung, but never from liver. The number of the penetrated larvae was rather small and the penetration was likely to have happened only by chance. That is to say, the larvae seem to have no active tendency to penetrate into tissue in the artificial medium.