

肺吸虫の生理 (II)

組織化学的にみた肺吸虫卵殻の性状と
その形成機轉に関する考察

横川宗雄 吉村裕之

千葉大学医学部寄生虫学教室

(昭和32年5月8日受領)

まえがき

吸虫類虫卵の卵殻形成機轉に関しては、Leuckart (1863) の肝蛭虫卵の卵殻形成機轉の研究を始めとし、Heneguy (1906), Goldschmidt (1902~9), 中山 (1912), 小林 (1915), 氏家 (1936), 中山 (1911, '12) 等の研究があるが何れも細胞形態学的観察をもとにしたものであつた。然るに Vialli (1933, '34, '50) に至つて始めてこの分野にも組織化学的な新しい研究方法が適用され種々の興味ある事実が見出された。即ち肝蛭の卵黄腺 (Vitelline gland, Vitellaria) の腺細胞内にチロチン酸化に由来するポリフェノールを組織化学的に証明する事に依つて、従来指摘された本細胞内の卵殻滴 (Shell granules, Schallen-Tröpfchen) はチロチン代謝に由来するキノン体に関連した蛋白体であろうという事が明かにされた。Pryor (1940~55), Nurse (1950), Stephenson (1947) 等も相次いで同様の見解を明らかにしたが、最近 Gönnert (1955)¹⁰⁾ はマンソン住血吸虫 (*Schistosoma mansoni*) の虫卵殻の化学的性格並にその形成機轉に関する研究においても亦、卵殻を構成する主成分は蛋白体 (tanning-protein) であつて、これは卵黄腺細胞内の L-チロチン蛋白顆粒に由来するものであるとした。Smyth (1956, '51, '54, '56), Yosufzai (1955) も亦吸虫類 (肝蛭, 肝吸虫等) 及び条虫類の或る種のものについて同じく本腺細胞が塩基性蛋白反応, チアゾ反応, 並にポリフェノール-オキシダーゼ反応を示す事

から之等の虫卵殻を構成する蛋白体の由来を卵黄腺細胞内の塩基性蛋白に求めている。

著者等は大平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai* Miyazaki, 1939) の虫体並に虫嚢部の細胞学的並に組織化学的検索を行う事によつて本種虫卵の卵殻の化学的性格とその形成機轉に関与すると考えられる卵黄腺の役割について2-3の知見を得ると共に、更に卵殻の形成過程についても生殖器系の解剖学的位置とその部における組織化学的反應成績から明確な所見を得ることが出来た。こゝにその諸成績の概要を述べ聊か考察を加えたいと思う。

実験材料

大平肺吸虫のメタセルカリアは著者等が新に発見した南伊豆地方のベンケイガハの肝臓より採取し、横川等 (1955) これを白鼠に与え、3ヶ月後に剖検して肺臓より成虫をとり出し、直ちに次に示す各種の固定液を用いて固定した。(大平肺吸虫の白鼠体内における成熟期間は凡そ80日前後である)

実験方法

主としてパラフィン切片によつたが、脂肪染色には氷結切片によつた。虫体は悉く連続切片とし、次の如き各種の染色を実施し相互に比較観察した。

〔A〕：糖質反応。(Carnoy 液固定)

(1) P.A.S. 染色 (過沃度酸-Schiff 反応) による多糖類染色

(2) 唾液消化試験によるグリコゲンの決定

〔B〕：蛋白質反応 (Carnoy 液固定)

(1) キサントプロテイン反応

(2) 塩基性蛋白 (Basic protein) 反応

—Tropaeolin O 染色

(3) チロチン反応. *α*-Nitroso- β -Naphthol 染色

MUNEO YOKOGAWA and HIROYUKI YOSHIMURA: Studies on lung fluke physiology. II. On the chemical nature of egg-shell and its formation in *Paragonimus ohirai* as demonstrated by the histochemical techniques. (Department of Parasitology, School of Medicine, Chiba University, Chiba, Japan)

(4) ニンヒドリン反応 (α -アミノ酸反応)

(5) ワン・ギーンソン染色

[C]: 核蛋白(核酸RNA, DNAの証明) (Carnoy液固定)

(1) メチル緑—パイロニン染色

(2) 塩基性色素(トルイジン青)による核酸のメタクロマジー(柴谷)

(3) RNA除去実験(リボヌクレアーゼ, その他による)

(4) フォイルゲン核酸反応

[D]: 脂質反応. (フォルマリン液固定)

(1) 所謂リポイド染色。(川村—矢崎の Sudan III 染色)

(2) Sudan 黒 (Sudan black) 染色

[E]: 酸性多糖類証明としてのメタクロマジー法及びヒアロニダーゼ消化実験

[F]: 解磷酵素(フォスファターゼ)

(1) フォスフォモノエステラーゼ(グリセロフォスファターゼ)

a) アルカリ性フォスファターゼ

b) 酸性フォスファターゼ

(2) 核酸フォスファターゼ(基質=RNA)

a) アルカリ性RNA—フォスファターゼ

b) 酸性RNA—フォスファターゼ

[G]: オスミウム酸—ズダン黒染色 (Osmic acid-Sudan black technique) による 卵黄腺 細胞のミトコンドリア (Mitochondria) 染色

[H]: 鍍銀染色 (Gomori 法)

[I]: ヘマトキシリン—エオジン染色及びデイルフェールドヘマトキシリン染色

実験成績

肺吸虫卵卵殻と卵黄腺における各種組織化学的反應の諸成績は次の如くである。

(1) 糖質反応としての P.A.S. 染色及び唾液消化実験によるグリコゲンの決定:

本反応に依つて陽性を示すものは一般に多糖類のすべてであるが、就中グリコゲン、ムチン、キチン質、糖蛋白体、ヒアロン酸等で核酸は反応しない。こゝで問題となるのはグリコゲン及びグリコゲン以外の糖質及び酸性多糖類等であるが後者については別に吟味した。

所見:

卵殻は陰性である。之に反し卵黄腺の腺細胞の胞体内には粗大及び微細顆粒が充満して見とめられた。特に強陽性を示す微細顆粒は腺腔に面した基底部の反対側の胞体内及び腺腔内に多数群集し、量的にも個々に可成りの

差異がみとめられる。これは恐らく細胞の機能相に關係するものと思われる。胞体の基底部には極めて微細な陽性顆粒が充満しているものも存在する。尚唾液反応を行うと之等の殆んど陽性顆粒は最早や染色されないか、又は減弱する事からこれら陽性顆粒はグリコゲンに外ならないと考えられる。然し乍ら唾液試験後に胞体内に弱陽性を示す瀰慢性もしくは一部顆粒状を呈した反応物質の存在を確認出来るが、これは恐らくグリコゲン以外の糖質の存在によるものと考えられる。

(2) 蛋白質反応:

a) キサントプロテイン反応:

本反応は蛋白質の礎石であるフェニールアラニン、チロチン、トリプトファン等の芳香族の存在による反応である。

所見:

卵殻並に卵黄腺の腺細胞は共に強陽性を示した。

b) 塩基性蛋白質反応:

Tropaeolin O による本反応は Chapman 及び Cohn (1924~27) 等の染色理論にもとづき大原 (1949) が創案した方法で塩基性蛋白であるアルギニン、リチン、ヒスチチン等が染色される。

所見:

卵殻並に卵黄腺細胞は共に強陽性を示した。

c) チロチン反応:

チロチン反応には数種があるが著者等は 大原—倉田 (1949) (石川 1955) による α -nitroso- β -naphthol 法を適用した。

所見:

卵殻並に卵黄腺細胞は共に強陽性を示した。

d) ニンヒドリン反応 (赤堀 1946・市川 1953):

本反応はニンヒドリンが α -アミノ酸に酸化的に作用して生ずる NH_3 がニンヒドリン及びその還元物と結合し Diketo-hydrindyliden-diketohydroindamine を生じ紫色に発色する。

所見:

卵殻は中等度、卵黄腺の腺細胞は弱或は中等度陽性を示した。

e) ワン・ギーンソン染色:

本染色は蛋白ピクラートの形成に関連した反応と考えられている。

所見:

卵殻は中等度陽性に卵黄腺細胞は強陽性を示した。

(3) 核酸 (RNA, DNA) の証明:

a) メチル緑—パイロニン染色

所見：

卵殻は均等瀰漫性にパイロニンに可染し、一方卵黄腺の腺細胞内にはパイロニンに強陽性を示す粗大な顆粒が胞体内に充満してみとめられた。本染色をRNA除去操作後に実施すると卵殻の染色性は変わらないが、卵黄腺の腺細胞内のパイロニン可染性は全く消失する。

b) トルイジン青による核酸のメタクロマジー (柴谷 1949, '53, 横川等 1957)

所見：

卵殻は均等にトルイジン青に正染色性に染め出され、一方卵黄腺の腺細胞内には青緑色の粗大な先に染め出されたパイロニン嗜好性顆粒と同様な顆粒群が胞体内に充満して認められた。因みにRNA除去操作後の本染色ではその染色性は消失した。

c) フォイルゲン核酸反応：

卵黄腺の腺細胞の胞体にはみとめられず核質内に限つてDNAが証明された。卵殻では全く陰性である。

(4) 酸性多糖類染色 (大野1951) 及びヒアロナーゼ消化実験 (市川 1953)：

所見

各種 pH の下に於ける卵殻及び卵黄腺の腺細胞の染色成績は先述した (3) の b) の所見に類似する。醋酸緩衝液 pH 5.5 のスプラクター消化実験、及び加熱処理操作の両者に対する腺細胞内の染色性は減弱若くは消失が認められなかつた。

(5) 脂質反応 (ズダン III 及びズダン黒染色)：川村—矢崎²⁵⁾によるズダン III 染色及びズダン黒染色 (高良 1956, Lison 1953) を用いた。

所見

両者染色法によつて卵黄腺の腺細胞内には類円形粗大顆粒がよく染め出された。

(6) 解磷酵素：

a) アルカリ性並に酸性フォスファターゼ (グリセロフォスファターゼ)：

両者共に卵黄腺細胞内に瀰漫性若くは顆粒状に強陽性に反応がみとめられた。

卵殻では弱陽性である。

b) アルカリ性並に酸性RNA—フォスファターゼ：

武内等 (1952) (吉村 1952, '53) による核酸フォスファターゼ証明法を改変した吉村 (1952~53) の方法を用いた。

所見

アルカリ性RNA及び酸性RNAフォスファターゼ両者ともに (6) の a) の所見に類似して極めて鮮明に陽性に出現した。卵殻に於いては共に弱陽性もしくは陰性である。

(7) ミトコンドリアの染色 (ズダン黒による)：

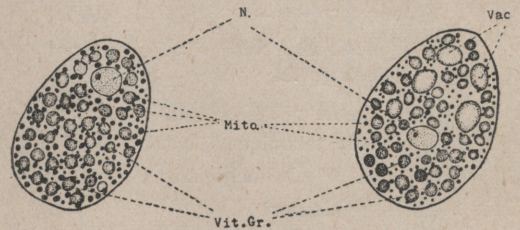
腺細胞内のズダン可染性顆粒の本態を追究するためオスミウム酸固定による本法を試みた。卵黄腺の腺細胞を解剖顕微鏡下に未乾燥操作に於いてすみやかに固定し高良 (1956) によるズダン黒染色法を用いた。更に古典的なハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色によるミトコンドリア染色をも併用した。

所見

卵黄腺の腺細胞内には大小不同の略々円形を呈する多数のミトコンドリアが極めて鮮明にみとめられた。之等の顆粒は所謂卵殻滴の顆粒間胞体内に充満している事がわかつた (plate 1)。

Plate. I Mitochondria in the cell of vitelline gland.

Figures of Mitochondria by means of osmic acid-Sudan black technique.



Mito. = Mitochondria
Vit. Cr. = Vitelline Granules
Vac. = Vacuoles
N. = Nucleus

総括

上述の諸成績から卵殻では蛋白質反応のみが何れも陽性を示したが卵黄腺の腺細胞に於ては蛋白質反応、糖質 (主としてグリコゲン) 及び核酸 (特にRNA) が豊富に存在することが推定された。脂質反応では特にズダン黒可染性顆粒の存在を重視し、ミトコンドリアとの関係に及んだ。今之等の諸成績を表示すれば Table 1. の如くである。

考察

上述の如き諸実験の成績から肺吸虫卵の卵殻の化学的組成は主として蛋白体からなることを明かにし、これが形成の化学的メカニズムには卵黄腺の腺細胞が重要な役割を演ずるとした諸家の説を再確認すると共に、更に核

Table I. Results of the histochemical reactions of the vitelline glands and of the egg-shell.

Histochemical reactions	Vitelline glands	Egg-shell	
Carbohydrate-reaction	a) P.A.S. stain.	Excellent	None
	b) Glycogen (Saliva-test)	Positive	Negative
Protein-reaction	a) Xanthoprotein-reaction	Excellent	Excellent
	b) Basic protein-reaction (Tropaeolin-O)	Excellent	Excellent
	c) Tyrosin-reaction (α -nitroso- β -naphthol)	Excellent	Excellent
	d) Ninhydrin-reaction	Fair	Excellent
	e) Picrate build in Van-Gieson stain.	Excellent	Excellent
Lipid-reaction	a) Lipoid-reaction	Excellent	None or weak positive
	b) Sudan black stain	Excellent	None or weak positive
RNA-proof	a) Pyronin-methylgreen stain	Excellent (Pyronin affinity)	Weak
	b) RNA-metachromasy (Shibatani)	Positive	Negative
	c) RNA-stain. after RNA-removal,	Disappeared	Unchanged
DNA-proof	Feulgen nuclear reaction	Positive (in nucleus)	None
Mucopolysaccharide	Toluidinblue-metachromasy	None	None
Phosphatases	(I) Phosphomonoesterase		
	a) Alkaline glycerophosphatase	Positive	Weak positive
	b) Acid glycerophosphatase	Positive	Weak positive
	(II) RNA-phosphatase		
	a) Alkaline RNA-phosphatase	Positive	Weak positive
b) Acid RNA-phosphatase	Positive	Weak positive	

酸 RNA, スタン可染性顆粒及び蛋白合成の代謝過程に最も関連性の深い解磷酸素を始めて証明し得た。こゝに今一度考察を試みてみる。

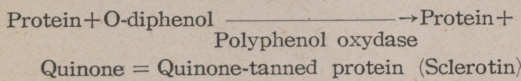
(1) 糖質反応について:

卵黄腺の腺細胞には極めて豊富にグリコゲンが証明されたがこのことはグリコゲンの生機的意義を考へるとき興味あることと思われる。尚本腺細胞内にはグリコゲン以外の糖質の存在することにも注目した。Glick (1949) によれば之が陽性物質は主としてグリコゲン、ムチン、ムコプロテイン等であるが、更にキチン、ヒアロン酸、セロブロンシッドも之に反応し、更らに Pearce (1949) は多糖類、粘液多糖類等の外に糖蛋白体、糖脂質、磷脂質、脂蛋白体等も陽性を示す事を記載してい

る。McManus (1946~1948) (市川 19) はアミノ酸としてセリン、ヒドロオキシリヂンも染まるという。唾液反応で消失しない P. A. S. 可染性物質の本態については未だ十分に解明されていないが恐らくは或る種蛋白体と複合した Polymer の形で存在している様である。理論的には $-\text{CHOH}-\text{CHOH}-$ の反応基をもつた高分子の含水炭素 (Polymer carbohydrate) 及び $-\text{CHOH}-\text{CHNH}_2-$ 基のあるヒドロオキシアミノ酸も本反応に陽性に出現する筈であつて、卵黄腺の腺細胞内にかゝる物質の存在が推定されたことは興味深い。最近 Smyth (1956) は肝蛭のメーリス腺内にかゝる物質の存在を指摘しホルモンの関連性を示唆している。

(2) 蛋白質反応について:

卵黄腺細胞及び卵殻共に各種の蛋白質反応が強陽性に出現することは上述の如くである。Smyth 等 (1954, 1956) の注目した塩基性蛋白については著者等も亦 Tro-paeolin O 染色によつて再確認した。チロチン反応では従来のミロン反応に代るに α -nitroso- β -naphthol 反応によつて成功した。このことは既に Stephenson 等 (1947) が肝蛭の卵殻はチロチン由来の “tanning-protein” であるとする説や、Brown (1950, '52) (Hackman 1953) の蛔虫の Cuticula に同様の物質がみられるとする説等と関連して興味深い。Sealock 及び Silberstein (1939) (Gonnert 1956, Rienits 1950) は動物体内の L-チロチン代謝にビタミン C が関与するという説、更らに最近に至つてビタミン C が卵殻の形成に重要な関連性を有することが Gonnert (1955) 等によつて明らかにされて来ている。Gonnert は細胞形態学的にも卵黄腺細胞内の顆粒が卵黄導管上皮の機能的制御の下に胞体外に放出され氏の所謂 “leer Dotterzellen” になるという事を証明しているが著者等も亦これらの過程を組織化学的にみて所見を得ている。猶亦 Smyth (1954~1956) 等は Catechol (DL-O-diphenol) によるポリフェノール-オキシダーゼを腺細胞に証明し塩基性蛋白から卵殻蛋白の形成過程を次の様に説明している。



(3) 核酸の存在について :

核酸特に RNA の生機的意義については今更ら述べるまでもないが著者等は卵黄腺の腺細胞内に極めて豊富に RNA がみとめられたという事は重視すべき事と考えている。即ち Brachet (1950), 江上 (1953, '55), 市川 (1953) 等もこのべている様に蛋白合成の旺盛な細胞には一般に RNA の濃度が高い筈であつて、これは著者等が同時に証明した腺細胞内のフォスファターゼの存在及び

ミトコンドリアの所見と共に重要である。

(4) 脂質特にスダン黒可溶性顆粒とミトコンドリアとの関係について :

スダン黒が従来の脂質染料と異なつて細胞質内の化学的構成要素の一つである非顕性脂質 (Masked lipids) を容易に染め出しうる事が明らかにされて以来、Casper-son (1940~1950), Claude (1945~1948), Bourne (1951), Buchner. Roulet (1955), 高良 (1956) 等の研究が示している様にミトコンドリアの化学的成分としての脂質が RNA と共に重要な構成成分であることがスダン黒による染色成績等から重視されて来ている。従つて著者等も本腺細胞について検索した様に各種の組織化学的の反応に対して陽性を示す部位と極めて密接な関係を有する部位に多数のミトコンドリアが認められた事は興味深い。

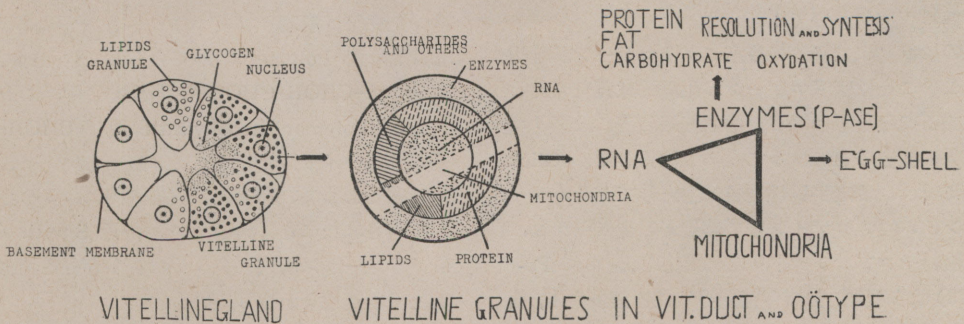
(5) フォスファターゼの存在とその意義について :

卵黄腺の腺細胞内にはアルカリ性並に酸性のグリセロフォスファターゼ及び RNA-フォスファターゼが共に特異的に陽性に出現したが、本酵素が生体内蛋白合成や磷酸代謝に重要な意義がある点から注目すべき所見と思われる。

(6) 卵黄腺の腺細胞内顆粒の本態並に卵殻蛋白形成機転に関する考察 :

以上述べて来た諸成績と考察から著者等は従来卵殻形成に関与するとされていた卵黄腺の役割はその胞体内に有する RNA を主体とする蛋白体を始め糖質、脂質等も之れに関与し、同時に存在するフォスファターゼの介在によつて磷酸代謝より蛋白合成 (卵殻蛋白の合成) へと目まぐるしい動きが行われているものと考えたい。即ち顆粒自体は RNA-ミトコンドリア-酵素 (こゝでは主としてフォスファターゼ) という最も重要な細胞胞体内顆粒を反応の場として卵殻の蛋白を合成するものであらうと思われる。今著者等の考察を図示すれば図 II の如くである。

Plate. II Shema of chemical mechanism of egg-shell formation.



結 論

著者等は太平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai* Miyazaki 1939) を材料として肺吸虫の虫卵卵殻並に卵黄腺について各種の組織化学的反應を実施し概略次の如き事実を明らかにし得た。

① 卵黄腺の腺細胞にはグリコーゲンを含めた多糖類が豊富に存在するが、卵殻自体には糖質は全く認められなかった。

② 卵黄腺の腺細胞内には蛋白質反応としてキサントプロテイン反応、チロヂン反応、塩基性蛋白反応、並にニンヒドリン反応が何れも陽性に認められたが、更に卵殻自体にも亦共通して陽性に出現した。

③ 卵黄腺の腺細胞内にはRNAが極めて豊富に認められ核質内にはDNAも亦証明された。一方卵殻自体には何れの核酸もみとめられなかった。

④ 卵黄腺の腺細胞内及び卵殻には酸性多糖類は証明されなかった。

⑤ 卵黄腺の腺細胞内にはスタンⅢ及びスタン黒に可染する脂質がみとめられたが卵殻には証明されなかった。

⑥ 卵黄腺の腺細胞内には特有の形態を有するミトコンドリアが多数存在することが解つた。

⑦ 卵黄腺の腺細胞内にはグリセロフォスファターゼ及びRNA—フォスファターゼがアルカリ性並に酸性共に夫々特異的に陽性に出現することが解つた。

⑧ 卵黄腺の腺細胞内のミトコンドリアと上述の各種の組織化学的反應によつて陽性にみとめられた部位とは極めて密接な関連性があることが明らかとなつた。

⑨ 以上の諸成績から肺吸虫卵殻の化学的組成の主体は蛋白体であろうと考えられる。

⑩ 卵殻の形成には卵黄腺が関与し、その胞体内に豊富に存在するRNAを主体とする蛋白質が卵殻蛋白の形成の礎石を供給すると思われるが、之等の生化学的過程には同時に本腺細胞内に存在する糖質、脂質、及びフォスファターゼが相互に関連し磷酸代謝より蛋白合成へと複雑な動きを示すものと推定される。

参考文献

- 1) 赤堀四郎 (1946): アミノ酸及び蛋白質 (共立出版社).
- 2) 天野重安 (1948): 血液学の基礎, 上巻, (丸善).
- 3) Bracht, J. (1950): The localization and the role of ribonucleic acid in the cell. *Ann. New York Acad. Sci.*, 50, 816-869.
- 4) Brown, C. H. (1950): Quinone tanning in the animal kingdom. *Nature*, 165, 275.
- 5) Brown, C. H. (1952): Some structural proteins of *Mytilus*

- edulis*. *Quart. J. Microscop. Sci.*, 93, 407-503.
- 6) Büchner, E. Letterer, E. und Roulet, F. (1955): *Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Das Cytoplasm.* Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg.
- 7) Bullock, W. L. (1949): Histochemical studies on the Acanthocephala. *J. Morphology*, 84, 185-199, 201-225.
- 8) Dennell, R. C. (1946): A study of an insect cuticle; the larval cuticle of *Sarcophaga falcata* Pand (Diptera). *Proc. Roy. Soc. London*, B, 133, 348-373.
- 9) Dennell, R. & Malek S. R. A. (1955): The cuticle of the cockroach *Pariplanata americana*. II. The epicuticle. *Proc. Roy. Soc. London*, B, 143, 239-257.
- 10) 江上不二夫 (1951): 核酸及び核蛋白質, 上, 下巻, (共立出版社).
- 11) 江上不二夫, 柴谷篤弘 (1955): 核酸, (共立出版社).
- 12) Feulgen, R. & Rassenbeck, H. (1924): Mikroskopisch-Chemischer Nachweis einer Nucleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zell-Kernen in mikroskopischen Präparaten. *Ztsch. Physiol. Chem.*, 135, 203-248.
- 13) Glick, D. (1945): Techniques of histo- and cytochemistry. *New York Interscience Publ. Inc.*
- 14) Gomori, G. (1949): Histochemical specificity of phosphatase. *Proc. Exp. Biol. and Med.*, 70, 7-11.
- 15) Gomori, G. (1939): Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 42, 23-26.
- 16) Gönnert, V. R. (1955): Schistosomiasis Studien. II. Über die Eibildung bei *Schistosoma mansoni* and das Schicksal der Eier im Wirtsorganismus. *Zeitsch. Trop. Med. u. Parasit.*, 6(1), 33-55.
- 17) Hackmann, R. H. (1953): Chemistry of insect cuticle. 3. Hardening and darkening of the cuticle. *Biochem. J.*, 54, 371-377.
- 18) Hackman, R. H. & Todd, A. R. (1953): Some observation on the reaction of catechol derivatives with amines and amino acids in presence of Oxidising agents. *Biochem. J.*, 55, 631-637.
- 19) Hale, C. W. (1946): Histochemical demonstration of acid Polysaccharides in animal tissues. 157, *Nature*, 802.
- 20) Hopkins, C. A. (1952): Studies on Cestoda metabolism II. The utilization of glycogen by *Schistocephalus solidus* in vitro. *Exptl. Parasitol.*, 1, 196-213.
- 21) Hotchkiss, R. D. (1948): A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16, 131-141.
- 22) 市川收 (1953): 細胞化学—その理論と術式 (本田書店).
- 23) 石川太刀雄丸 (1955): 動物組織化学実験法, 生物学実験法講座, 5分冊の4-8, 中山書店.
- 24) Johri, L. N. and Smyth, J. D.

- (1956): Histochemical approach to the study of helminth morphology. *Parasit.*, 46 (1-2), 107-116. —25) 川村麟也, 矢崎俊明 (1933): 脂肪の一新染色法, 東京医事新誌, 2823, 875-878. —26) 高良武明 (1956): 中性オスミウム酸-Sudan black 法による皮下結合組織諸細胞の形態学的研究, 十全医学会雑誌, 58 (11), 1047-1084. —27) Krügelis, E. J. (1946): Distribution and properties of intracellular alkaline phosphatases. *Biol. Bull.*, 90, 220-233. —28) 久保久雄 (1951): 解磷酵素 (Phosphatase) の組織化学的研究, 日本病理学会誌, 40 (総会号), 特別講演 (1-12). —29) 久保久雄, 高松英雄 (1942): 組織化学的研究に基づいてフォスファターゼの生物学的意義を論述す, 日本医学及び健康保険, 3303, 14-15. —30) Lison, L. (1953): *Histochimie et Cytochimie animales, Principes et Méthodes.* (今泉訳: 組織化学および細胞化学, 理論と方法, (白水社). —31) Mason, H. S. (1955): Reactions between quinone and proteins. *Nature*, 175, 771-772. —32) Mason, H. S. (1956): Structure and functions of the phenolase complex. *Nature*, 177, 79-81. —33) Mazia, D. Brewer, P. and Alfert, M. (1953): Cytochemical staining and measurement of protein with bromophenol blue. *Biol. Bull.*, 104, 104, 57-67. —34) 那須茂 (1953): 核酸フォスファターゼの組織化学的研究, 医学研究, 23 (9), 21-34. —35) 中山平次郎 (1911): 筧形二口虫卵子の発育, 東京医学会雑誌, 24 (12), 1-51. —36) 中山平次郎 (1911): 二口虫及び条虫の卵殻質造生機管について. 日本病理学雑誌, 1, 265. —37) 中山平次郎 (1912): 肺二口虫及び筧形二口虫の卵殻腺及び子宮の構造並びに同虫に於ける子宮卵子の形成に就て, 東京医学会雑誌, 2 (1-3), 3 (18-65), 4 (10-48). —38) Nurse, F. R. (1950): Quinone tanning in cocoon-shell of *Dendrocelun lacteum*. *Nature.*, 165, 570. —39) Pearse, A. G. E. (1953): *Histochemistry. Theoretical and Applied.* Little, Brown and Company. Boston. —40) Pryor, M. G. M. (1940): On the hardening of the ootheca of *Blatta*. *Proc. Roy. Soc. London*, 128, 378-393. —41) Rienits, K. G. (1950): Metabolism of l-ascorbic acid and l-tyrosine in guinea pig liver *J. Biol. Chem.*, 182, 11-16. —42) Serra, T. A. (1946): Histochemical tests for proteins and amino acid; the characterization of basic proteins. *Stain Technol.*, 21, 5-18. —43) Smyth, J. D. (1951): Specific staining of egg-shell material in Trematodes and Cestodes. *Stain Technol.*, 26, 255-256. —44) Smyth, J. D. (1954): A technique for the histochemical demonstration of polyphenol oxidase and its application to egg-shell formation in helminths and byssus formation in *Mytilus*. *Quart J. Microscop. Sci.*, 95, 139-152. —45) Smyth, J. D. (1954): Studies on tapeworm Physiology VII. Fertilisation of *Schistoceyalus solidus* in vitro. *Exptl. Parasit.*, 3, 64-71. —46) Smyth, J. D. (1956): Studies on tapeworm physiology. IX. A Histochemical study of egg-shell formation in *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea). *Exptl. Parasit.*, 5 (6), 519-540. —47) Stephenson, W. (1947): Physiological and histochemical observations on the adult liver fluke. *Fasciola hepatica*. L. III. Egg-shell formation. *Parasit.*, 38, 128-139. —48) 清水信夫, 有蘭初夫 (1949): フォスファターゼの組織化学的検査法に就て, 生体の科学, 1 (4), 23-28. —49) 柴谷篤弘 (1948): 核酸の染色機構について. I. 核酸のメタクロマジー, 動物学雑誌, 58 (1-2), 3-7. —50) 柴谷篤弘 (1949): 核酸の染色機構について, 医学と生物学, 14 (6), 357-360. —51) 柴谷篤弘 (1953): Ninhydrin 組織反応による低分子蛋白の検出特に細胞質のRNAの関係について, 生理生観, (1-2), 24-26. —52) 沢田卓 (1925): 吸虫類発育各階梯における糖原質及び脂肪の顕微化学的研究, 愛知医学会雑誌, 32, 801-856 及び 1088-1133. —53) Shibatani, A., Naora, H. (1952): Enhancement of colour intensity in the histochemical Feulgen reaction, method and quantitative estimation. *Experientia*, 8 (7), 268-275. —54) Takamatsu, H. (1939): Histochemische und biochemische Studien über die Phosphatase (I Mitteilung), Histochemische Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. *Tranc. Societ. Path. Japan*, 39, 492-498. —55) 武内忠男, 那須茂 (1952): RNA および DNA フォスファターゼの組織化学的証明についての知見補遺. 医学と生物学, 25 (2), 74-76. —56) Vialli, M. (1933): Ricerche istochimiche sui vitellogeni dei platelminti. *Boll. Zool. Pub. ital. (Naples)*, 4, 135-138. —57) Vialli, M. (1934): Ricerche istochimiche sui granuli vitelloni dei policladi. *Boll. Zool. Pub. ital. (Naples)*, 5, 21-23. —58) Vialli, M. (1950): Fenoli e tannazione chinonica delle proteine. *Monit. Zool. ital.*, 58, 83-87. —59) 横川宗雄, 吉村裕之, 鈴木重一 (1957): 大平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai* Miyazaki 1939) の自然終宿主の追加, 東京医事新誌, 74 (1), 13-16. —60) 横川宗雄, 吉村裕之, 佐野基人, 鈴木重一 (1957): 南伊豆地方に於ける太平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai* Miyazaki 1939) の分布, ベンケイガニにおけるメタセルカリアの寄生状況, 東京医事新誌, 74 (1), 17-20. —61) 吉村裕之 (1952-1953): 血液細胞 (特にエオジン嗜好細胞を中心とする) の組織化学的研究, 日本病理学会誌, 41 (総会号), 74, 及び地方会号, 42, 57-58. —62) Yosufzai, H. K. (1955): Shell gland and egg-shell formation in *Fasciola hepatica*. *Parasit.*, 43, 88-93.

Summary

Histochemical studies on the *Paragonimus ohirai* were conducted in order to make clear the chemical nature of the egg-shell and the role of vitelline gland on the egg-shell formation and the process. The adult worms (*Paragonimus ohirai* Miyazaki 1939) removed from the lungs of the weasels which were naturally infected in the province of the South Izu of Shizuoka Prefecture and from the lungs of the white rats experimentally infected with *P. ohirai* were used for this experiments.

The results obtained were as follows.

(1) Polysaccharides containing glycogen was positive in the vitelline gland cells, but negative in the egg-shell.

(2) Protein test reactions, such as xanthoprotein reaction, basic protein reaction (Tropaeoline-O-Stain). Tyrosin reaction (*a*-nitroso- β -naphthol test) and ninhydrin reaction were all specifically shown positive in the both of the vitelline gland cells and in the egg-shell.

(3) Ribonucleic acid (RNA) was strong positive in the protoplasm of the gland cell. On the other hand desoxyribonucleic acid (DNA) was

proved only in the nucleus of the all. The both nucleic acid was not proved in the egg-shell.

(4) Sudanophile granules which show the affinity to Sudan black were proved in the vitelline gland cells only, but not in the egg-shell.

(5) Mitochondria in the gland cells were stained out as the round granules by the osmic acid Sudan black technique. It seems probable that the granules in the vitelline gland cells and mitochondriae may have very close relation in the process of the egg-shell formation.

(6) Alkaline and acid phosphomonoestrerase (glycerophosphatase) and RNA-phosphatase were specifically proved in the gland cells.

(7) Histochemical nature of the egg-shell of *Paragonimus* will be considered as the polymer protein.

(8) It would be concluded that the vitelline gland may be related very closely to the process of the egg-shell formation from the following reasons. Vitelline gland is rich in RNA, many other proteins (especially basic protein), polysaccharides, lipids, and phosphatases, and very complicated biochemical mechanism will be carried out in the vitelline gland to synthesize egg-shell protein from phosphor-metabolism.

Explanation of Photographs

1. Periodic-acid-Schiff (P. A. S.) reaction.
2. Glycogen granules in vitelline gland.
3. Xanthoprotein reaction.
4. Basic protein reaction (Tropaeolin O-stain.).
5. Methylgreen-pyronin stain.
6. Pyroninophile granules (RNA) in vitelline gland.
7. Lipid reaction (Sudan black B stain.).
8. Alkaline glycerophosphatase.
9. Acid RNA-phosphatase.
10. Mitochondria in the cells of vitelline gland.
11. Stage of discharging of vitelline granules in vitelline reservoir.
12. Stage of polymerization of vitelline granules in the beginning part of the canal of uterus.

Abbreviation :

Vit. g.	— Vitelline gland
E.	— Egg of <i>Paragonimus ohirai</i>
Gly.	— Glycogen granules
Ut.	— Uterus
Py.	— Proninophile granules (RNA)
Int.	— Intestine
Os.	— Ossification (Phosphatase positive)
Vit. d.	— Vitelline duct
Vit. c.	— Vitelline cell (Yolk cell)
E. s.	— Stage of egg-shell formation
b. Ut.	— Beginning of the canal of uterus
Mit.	— Mitochondria

Photo. I Histochemical reactions of the vitelline glands and egg-shell.

