

犬 鉤 虫 成 虫 の 生 体 外 飼 育

(1) 各種生理平衡溶液および犬血清を用いての飼育*

小 宮 義 孝 安 羅 岡 一 男 佐 藤 温 重

(国立予防衛生研究所寄生虫部)

(昭和 32 年 7 月 12 日受領)

寄生虫の生体外飼育はその生理、代謝等の基礎的研究の前提条件であり、それは更に駆虫剤の作用機転や病理の解明等に進展する可能性をはらんでいる。そしてこの方面の研究は von Brand (1957) も言っているように、最近の寄生虫生理学の分野で最も活潑に行われているもの一つである。最近 Weinstein および Janes (1956) は *Nippostrongylus muris* をカゼインおよびその分解産物、粉末酵母および肝抽出液、鶏胚抽出液、および哺乳類血清をメディウムとし、廻転培養法によつて幼虫から成虫にまで発育させることに成功した。鉤虫の生体外飼育に関しては既に松本 (1955) の報告があるが、いまだ充分の成績を得たとは言えない。筆者らは犬鉤虫成虫を用いてその生体外飼育を試み、その維持にある程度の成功をおさめることが出来たのでここに報告する。

材料および方法

本実験で用いた犬鉤虫成虫は、感染仔虫約 100 個体を犬に経口感染させてから 3~4 週後に小腸を剖出して得たものである。虫体は高濃度の抗生物質を入れた滅菌生理食塩水で 5 回洗つてその無菌化につとめた。実験はすべて厳密な無菌操作の下で行つた。飼育容器として径 3.5cm のカレルフラスコを用い、飼育液は 4.8cc を入れた。飼育液 1 cc 当り Penicilline G potassium 50 単位 Dehydrostreptomycin sulphate 100 μ g, Dehydroacetic acid 50 μ g を加えた。1 個のカレルフラスコに♂♀3 対の虫体を入れ、1 種の飼育液について 3 個のカレルフラスコを用いた。

低倍率の倒立顕微鏡下で毎日虫体の運動交尾状況等を観察し、機械的あるいは熱刺激を加えてもなお不動の個体を死と判別した。飼育液は 2 日毎に更新し、その際旧液中に産卵された卵を観察し、数を算定した。

実験成績

1. 種々の生理平衡溶液中での生存期間

Ringer, Locke, Tyrode (葡萄糖を含まない), Krebs-Ringer phosphate および bicarbonate の 5 種の生理平衡溶液を用いて、各液における成虫の生存期間を比較観察した。Krebs-Ringer (以下 K-Ringer と略す) 液の調製は Umbreit ら (1951) の方法により、又各液の pH は 7.4 とし、実験は 28°C の孵卵器内で行つた。

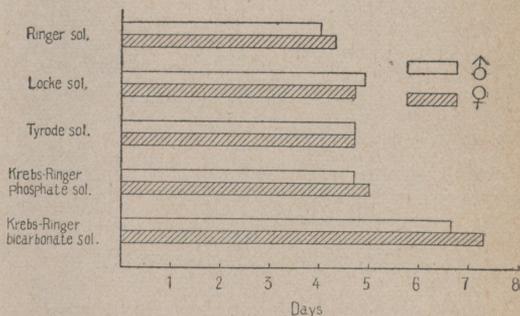


Fig. 1. Comparison of average length of life of *Ancylostoma caninum* in various physiological saline solutions. (28°C)

その結果は Fig. 1 に示すように、K-Ringer bicarbonate 液において最も生存期間が長く、♂平均 6.6 日 (4.5日~10.5日)、♀ 7.3 日 (4.5日~11.5日) を示した。この結果から後述の実験における血清の稀釈には K-Ringer bicarbonate 液を用いることとした。

2. 種々の濃度に葡萄糖を添加した K-Ringer bicar-

YOSHITAKA KOMIYA, KAZUO YASURAOKA & ATSUSHIGE SATO: Survival of *Ancylostoma caninum* in vitro. (1) Survival in various physiological saline solutions and dog serum with and without blood cells. (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

* この研究の一部は文部省科学研究費交附金によつてなされた。

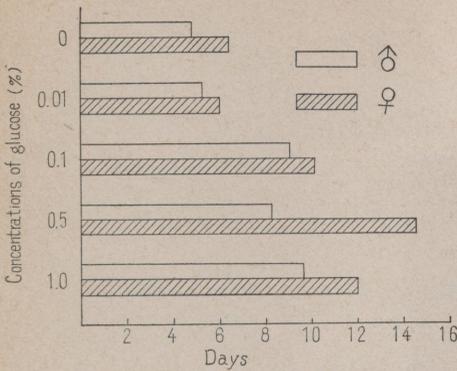


Fig. 2. Comparison of average length of life of *Ancylostoma caninum* in Krebs-Ringer's bicarbonate solution using various concentrations of glucose. (28°C)

bonate 液中での生存期間

K-Ringer bicarbonate 液に 0.01, 0.1, 0.5 および 1.0 %になるよう葡萄糖を添加し、やはり28°Cで実験を行った。Fig. 2 に示すように葡萄糖の添加によって生存期間はいちじるしく延長され、0.5%葡萄糖添加液中で♀最長21.5日、♂のそれは11.5日を示した。又♀の生存期間が♂にくらべて長くなる傾向が認められた。

3. K-Ringer bicarbonate 液で種々の濃度に稀釈された犬血清中での生存期間

Hoeppli ら (1938) は肝チストマの生体外飼育にさいして血清を用いる場合、全血清よりも Tyrode 液で1/2 に稀釈された血清中で最良の成績を得たと述べ、又横川ら (1955) も肺チストマについてこれと同様の結果を報告している。しかし伊藤ら (1955) は日本住血吸虫は稀釈血清より全血清中で長く生存すると述べている。そこ

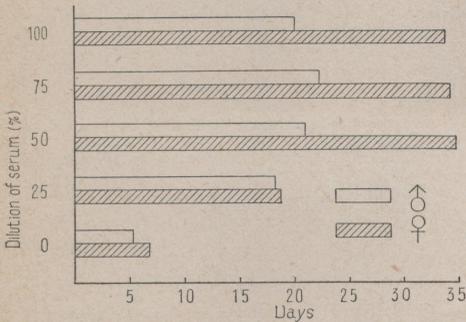


Fig. 3. Average length of life of *Ancylostoma caninum* in various dilutions of the dog serum with Krebs-Ringer's bicarbonate solution. (28°C)

で筆者らは犬血清を25%, 50% および 75%になるよう K-Ringer bicarbonate 液で稀釈し、28°Cにおける生存期間を比較した。その結果は Fig. 3 に示すように、25%血清では他に比較してその生存期間が短いけれども、50%, 75%および全血清の3者ではほとんど同様の結果で♂平均約3週間、♀約5週間を示した。そこで次の実験で飼育液として血清を用いる場合には75%血清を用いることとした。

4. 75%血清および血球加血清中での生存期間、交尾産卵状況

1 ccのヘパリン加血液を K-Ringer bicarbonate 液で3回遠沈水洗し、その沈渣に K-Ringer bicarbonate 液 1 ccを加えて血球浮游液を作る。これを1 cc当りの血球数が約 500万になるよう75%血清に添加して“血球加血清”を作り、血清のみのものと比較を行った。飼育温度は28°C および 37°C とした。

生存期間: Fig. 4 に示すように血球加血清と血清の間で、生存期間にいちじるしい差は認められなかった。一方37°Cにおける生存期間は28°Cのそれにくらべてはるかに長く、最長生存期間は♂で6週間、♀で12週間を示した。

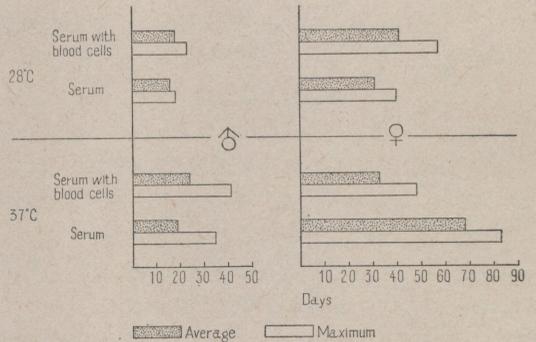


Fig. 4. Comparison of the length of life of *Ancylostoma caninum* in the dog serum with and without blood cells.

交尾: 飼育開始後3週までは♂♀の交尾が数回観察されたが、常に観察しているわけではないので、あるいはもつと多く行われていたかも知れない。血球加による影響は交尾発現状況にも認められなかった。

産卵: 28°Cの飼育液中では産卵は最初の数日間のみで停止するが、37°Cでは長期間にわたる産卵が認められた。(Table 1, Plate) 飼育開始後3週まではかなり

Table 1. Egg laying of *Ancylostoma caninum* living in the dog serum with and without blood cells (37°C)

| Days | Medium | No. of eggs | No. of embryonated eggs | No. of hatched larvae | No. of eggs per female per day |
|-------|--------|-------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 11-12 | A | 23,000* | 4,000 | 1,000 | 4,600 |
| | B | 35,000* | 6,000 | 5,500 | 7,600 |
| 17-18 | A | 20,000* | 3,000 | 1,200 | 6,000 |
| | B | 23,000* | 5,000 | 4,500 | 5,400 |
| 21-22 | A | 3,500* | 350 | 680 | 1,100 |
| | B | 8,700* | 1,250 | 2,000 | 1,900 |
| 23-24 | A | 7,800* | 350 | 600 | 2,100 |
| | B | 8,000* | 80 | 300 | 1,300 |
| 25-26 | A | 3,000* | 730 | 420 | 1,000 |
| | B | 3,300* | 60 | 420 | 600 |
| 27-28 | A | 3,100* | 320 | 510 | 900 |
| | B | 3,000 | 0 | 0 | 500 |
| 29-30 | A | 2,600* | 0 | 40 | 600 |
| | B | 5,500 | 0 | 0 | 900 |
| 31-32 | A | 400 | 0 | 0 | 100 |
| | B | 2,500 | 0 | 0 | 400 |
| 33-34 | A | 350 | 0 | 0 | 80 |
| | B | 1,500 | 0 | 0 | 200 |
| 35-36 | A | 480 | 0 | 0 | 120 |
| | B | 4,000 | 0 | 0 | 600 |
| 37-38 | A | 380 | 0 | 0 | 190 |
| | B | 4,200 | 0 | 0 | 800 |
| 39-40 | A | 150 | 0 | 0 | 80 |
| | B | 2,100 | 0 | 0 | 500 |
| 41-42 | A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 5,400 | 0 | 1 | 1,350 |
| 43-44 | A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 9,900* | 3 | 6 | 2,400 |
| 45-46 | A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 6,700* | 22 | 33 | 1,600 |
| 47-48 | A | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | B | 5,600* | 11 | 20 | 1,400 |
| 49-50 | B | 10,900* | 23 | 95 | 2,700 |
| 51-52 | B | 6,100* | 38 | 32 | 1,500 |
| 53-54 | B | 6,900* | 7 | 10 | 1,700 |
| 55-56 | B | 11,900 | 0 | 0 | 2,900 |
| 57-58 | B | 4,800 | 0 | 0 | 1,200 |
| 59-60 | B | 3,800 | 0 | 0 | 900 |
| 61-62 | B | 1,100 | 0 | 0 | 250 |
| 63-64 | B | 6,000 | 0 | 0 | 1,500 |
| 65-66 | B | 6,800 | 0 | 0 | 1,700 |
| 67-68 | B | 10,500 | 0 | 0 | 2,500 |
| 69-70 | B | 1,200 | 0 | 0 | 300 |
| 71-72 | B | 1,600 | 0 | 0 | 400 |
| 73-74 | B | 3,000 | 0 | 0 | 700 |
| 75-76 | B | 1,900 | 0 | 0 | 500 |
| 77-78 | B | 1,300 | 0 | 0 | 300 |
| 79-80 | B | 2,300 | 0 | 0 | 600 |
| 81-82 | B | 1,580 | 0 | 0 | 400 |
| 83-84 | B | 0 | 0 | 0 | 0 |

A....Serum with blood cells

B....Serum only.

*....No. of eggs including normal ones.

多数の受精卵を産出し、飼育液中で既に孵化している仔虫も多く、又♀1匹当りの産卵数も多い。そして以後産卵数の減少にともない、30日以後には正常卵は消失したが、再び43日~54日に受精卵、孵化仔虫が認められた。異常卵は飼育日数の経過にともなつて多くなり、それは最長期間生存した虫の死滅2日前まで認められた。産卵数や卵の状況にも血球加の影響は見られなかつた。

論 議

松本(1955)は犬鉤虫成虫の生体外飼育を試み、犬の溶解赤血球含有血清に等量の混合アミノ酸液を加えた飼育液中において最も長期間生存せしめることが出来、生存期間は仔虫感染後の剖出までの日数、いゝかえれば虫体の大きさと関連があると報告している。すなわち感染後10日目に剖出した虫体では飼育6日後に全部死亡し、17日目のものは少数(3/30)が1ヶ月後も生存し、1ヵ月目のものは6日後に全部死滅したと述べている。又血清と溶血血清とでは、後者においてその生存期間は長く感染後17日目の虫は血清中で最長♀が6日であるが、溶血血清中では10日以上生存し、感染後1ヵ月目の虫では血清中で1日しか生存せず、溶血血清中でも5日間生存するのみと述べている。そして飼育液として最適という溶血血清+混合アミノ酸液中でも排卵、交接、体長増加は全く認められなかつたと言っている。

しかし筆者らは感染後28日目の虫体が、75%犬血清中で最長生存期間♂35.5日、♀84.5日、平均生存期間♂17.8日、♀68.2日を示し、しかも飼育開始後3週までしばしば交尾しているのを認め、そして53~54日後にいたつても受精卵、仔虫包蔵卵等の産出を認めた。すなわち松本の上述のような実験結果と比較して、その間にいちじるしい差異が認められるが、これはおそらく彼の実験に何らかの不備が介在していたのではないかということを示唆する。

温血動物の内部寄生虫はほゞ一定の宿主体温下に棲息しており、当然この温度下で正常の物質代謝が営まれていると考えられる。したがつてこれらの生体外飼育にあたり従来のだどの研究者は37°C附近を飼育温度として居り、Weinsteinら(1956)も *Nippostrongylus muris* を37.5°Cで飼育し、幼虫から成虫にまで發育させることに成功した。しかし寄生虫が栄養物質を含まない、又は添加栄養物が必ずしも適当でないという条件下で飼育され

外界からのエネルギー源の吸収、利用が満足に行われな
いときは、既存の体内貯蔵物質が消費される一方となり
したがって間もなく死に至る。その消費速度は37°Cより
低温において緩慢であつて、したがって虫を低温下に飼
育すれば生存期間も延長されるものと想像される。この
ような見地から筆者らは最初の生理平衡溶液から血清稀
釈飼育まで28°Cを飼育温度としたのであり、これは又単
に生存期間の延長のみを期待したのではなく、このよう
な飼育メEDIUMを用いて37°Cで飼育した場合生存期間
がいちじるしく短縮され、その結果種々のメEDIUMに
よる生存期間の差が、虫体の個体差、観察時間および
実験誤差等の範囲内に相殺されてしまうのをおそれた
からである。そして最後に75%血清および血球加血清中
ではその生存期間、交尾、産卵状況等について28°Cより
37°Cにおいてはるかによい結果を得たが、これは環境
条件としてのメEDIUMがより好適条件に接近し、ほぼ
正常に近い物質代謝の遂行が可能になつた結果と考えら
れる。伊藤ら(1955)は日本住血吸虫が馬血清で37°Cより
も28°Cでより長い生存期間を示したと述べているが、
これも更に他の飼育環境条件が好適なものになればむしろ
前者温度下の方が生存期間がより長くなるのではある
まいか。

又筆者らは血球加血清と血清のみの両者を用いてその
生存期間、交尾、産卵状況等に差異を認めなかつたが、
勿論これだけの実験で血球の意義について云々すること
は出来ない。更に違った角度からの検討が必要と思われる。

要 約

犬鉤虫成虫の無菌の生体外飼育を試み、次のような結
果を得た。

(1) 飼育液として種々の生理平衡溶液を用いたが、
Krebs-Ringer bicarbonate 液において最も生存期間が長
く、♂平均 6.6日(4.5日~10.5日)、♀は 7.3日(4.5
日~11.5日)を示した。

(2) Krebs-Ringer bicarbonate 液に葡萄糖を添加
することによって生存期間が延長され、0.5%葡萄糖添
加液中で♀最長21.5日、♂のそれは11.5日を示した。

(3) Krebs-Ringer bicarbonate 液で犬血清を25%、
50%、および75%に稀釈して生存期間を比較したが、全
血清、50%および75%血清のいずれでも♂平均約3週間
♀5週間で大きな差異は認められなかつた。

(4) 以上は飼育温度28°Cで行われたが、37°Cの75%
犬血清中で最長♂6週間、♀は12週間の生存期間を示し

最初の3週間にはしばしば交尾するのを認め、受精卵を
54日まで産出し、異常卵(おそらく不受精卵と思われ
る)は82日後まで認めた。又血球加血清でもほとんど同
様の結果を得た。

文 献

- 1) Hoeppli, R., Feng, L. C. & Chu, H. J. (1938) Attempt to culture helminths of vertebrates in artificial media. Chinese Med. J., Suppl. 2, 343~374. —2) 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, 寄雑, 4, 12~18. —3) 伊藤二郎, 小宮義孝(1955): 日本住血吸虫の生体外飼育に関する研究, 2. 人工合成飼育液における飼育実験, 寄雑, 4, 258~261. —4) 石崎達, 板東丈夫(1957): 蛔虫の生体外飼養の研究(蛔虫飼育液 pHの研究及び抗生物質並びに抗酸剤, 特に D.H.A. 添加による生存日数及び正規前進運動期間の延長について) 寄雑 6, 47~56. —5) 松本季彦(1955): 犬鉤虫成虫の生体外飼育法による各種駆虫剤の殺虫効果判定に関する研究, 大阪市大医雑, 4, 389~399. —6) Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer, J. F. (1951): Manometric techniques and tissue metabolism, 6th Ed. Burgess pub. Co., Mineapolis —7) von Brand, T. (1957): Recent trends in parasite physiology, Exp. Parasit., 6, 233~244. —8) Weinstein, P. P. & Jones, M. F. (1956): The *in vitro* cultivation of *Nippostrongylus muris* to the adult stage, J. Parasit., 42, 215~236. —9) 横川宗雄, 大島智夫, 木畑美知江(1955): 肺吸虫 *Paragonimus westermani* の体外飼育, (1) 脱囊幼虫 (excysted metacercariae) の *in vitro* における生存期間について, 寄雑, 4, 388~393.

Summary

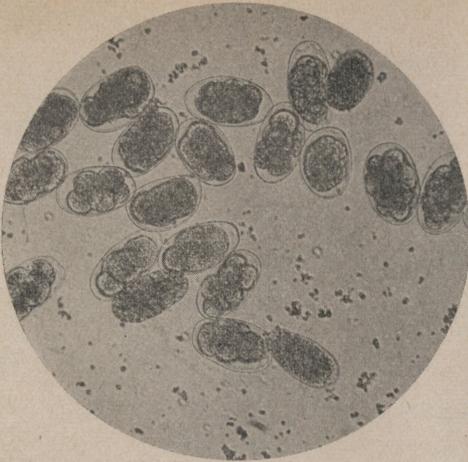
1. Among various physiological saline solutions, Krebs-Ringer's bicarbonate solution was most efficient for the survival of *A. caninum* worms. Addition of glucose to the solution resulted in a marked increase in their survival time.

2. The survival time of worms maintained in whole serum did not differ significantly from that of worms maintained in 50% or 75% diluted serum.

3. In dog serum at 37°C the longest time of survival was 6 weeks in the male and 12 weeks in the female. Addition of blood cells to the serum gave no effect on survival time.

4. Copulation *in vitro* took place in dog serum at 37°C, and fertilized eggs were found until the 54 day.

Explanation of Plate



a. Eggs laid between 1~2 day after the maintenance of the worm *in vitro*.



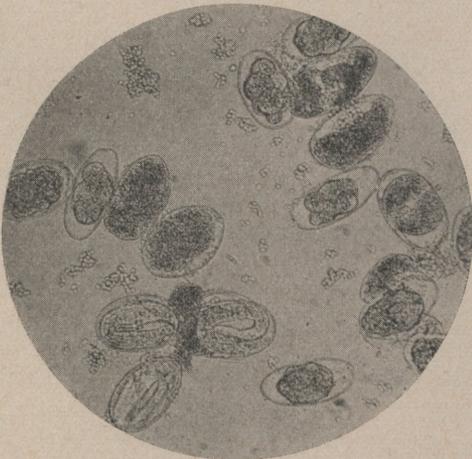
d. Eggs laid between 47~48 day. Some eggs have hatched already.



b. Eggs laid between 7~18 day. Some eggs have hatched already.



e. Eggs laid between 49~50 day.



c. Eggs laid between 27~28 day.



Eggs laid between 79~80 day.