

マンソン裂頭条虫 *Plerocercoid* の生体外飼育

高橋 剛 男

昭和医科大学生物学教室

岡本 謙 一 園 江 稔

昭和医科大学医動物学教室

(昭和 34 年 3 月 8 日受領)

寄生蠕虫類を *in vitro* で飼育しようとする試みは、既に多くの人達によつてなされているが、何れも満足すべき結果を得たものはない。然し寄生虫の代謝生理を知るためには、*in vitro* での実験を必要とする。条虫類における体外飼育の実験は、Smyth (1949) が *Ligula intestinalis* で血清を用いてある程度の成功を収めているに過ぎない。

著者らはマンソン裂頭条虫の *Plerocercoid* を各種の medium の中で飼育する実験を行い、それぞれにおける飼育条件を検討したので、ここにその成績を報告する。

材料及び方法

Plerocercoid は実験室において *Cyclops* に感染させて得た *Procercoid* を、マウス腹腔に注射し、30 日から 45 日を経過したものを、出来るだけ無菌的にとり出した。

飼育容器は寒天培地の場合は、雑菌の混入を防止し、観察に好都合のため、直径 3 cm、高さ 1 cm、口径 1 cm、容量約 10 cc のカーレル瓶を用い、開口部は二重ゴム栓又は綿栓(パラフィン紙で包む)を施した。液体培地の場合は、内径 18 mm の硬質試験管に綿栓を施して使用した。これらの器具類はすべて化学的、微生物学的に清浄に保った。

飼育に用いた血清は人及び犬から分離し、脱繊維及び血漿は犬から採った。又総合アミノ酸製剤としての *glucopolytamin* (以下 gp と略す) を用い、各飼育液の稀釈には、0.9% 食塩水を使用した。又観察に好都合なこ

とと、*Plerocercoid* の寄生部位である皮下織又は筋肉に似た環境を与えるために、上記飼育液に夫々、寒天を加えたものを使用した。寒天は 0.9% 食塩水で調製した(以後飼育液に寒天を加えたものを寒天培地と称す)。

液体培地及び寒天培地を、それぞれ各容器に 10 cc 宛分注し、マウスから無菌的にとり出した虫体を、滅菌生理食塩水で 3 回洗滌し、その後、滅菌生理食塩水にペニシリンを、5000 u/cc 加えた液で、1 時間づつ 2 回洗滌して、飼育を開始した。

ペニシリン加生理食塩水における 1 週間後の虫体の状態は、5,000 u/cc 群が虫体を完全に保ち、50, 500, 10,000 u/cc 群は、虫体の一部崩壊又は死の結果を得たので、虫体の洗滌には 5,000 u/cc のペニシリンを使用した。パラフィン紙で包んだ綿栓と、二重ゴム栓の生存期間に及ぼす影響は、両者間に差を認めなかつたので、滅菌操作の点から綿栓が有利でもあるので以後の実験には綿栓を使用した。

観察は *Plerocercoid* 独特の変形伸縮運動を指標とし、低温域実験群の場合、或は運動微弱な場合は、徐々に加温して運動を観察し、なほ不動の場合は死と判定した。

虫体 Glycogen 量の測定は Carroll *et al.* (1956) の Anthrone 法によつて定量し、組織化学的には、Lillie 氏法及び唾液消化試験を用いて検索した。

実験成績

1. 飼育液更新と不換による生存状態

飼育液を 3 日毎に更新する場合と、否の場合における結果は Fig. 1 に示してある。両者間の生存率及び虫体の状態については顕著な差が認められなかつたので、以後の実験は飼育液を更新しないで行った。

2. 生理的塩類溶液内における生存状態

虫体の洗滌、及び飼育液の調製に必要な生理的塩類溶

TAKEO TAKAHASHI*, KENICHI OKAMOTO & MINORU SONOE**: Studies on *Plerocercoid* of *Diphyllobothrium mansonii in vitro* (*Department of Biology, Showa Medical School, Tokyo. **Department of Medical Zoology, Showa Medical School, Tokyo.)

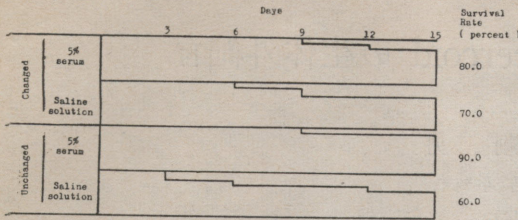


Fig. 1 Comparison of number of worms survived in changed and unchanged media
Temperature: 20°C Worms: 35 days in mice

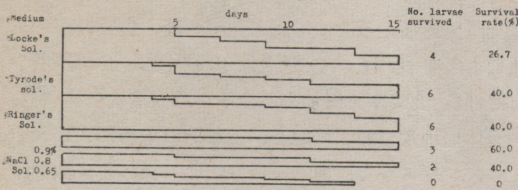


Fig. 2 Comparison of number of worms survived in various kinds of saline solutions
Temperature: 30°C Worms: 45 days in mice

液内における虫体の生存期間を比較した結果は Fig. 2 に示してある。残存虫体数が当初の約 1/3 になる 15 日間の生存率を比較してみると、0.65% 食塩水が最も低く、ついで Locke 液が 26.7% を示し、Tyrode 液、Ringer 液、0.8% 食塩水は 40.0% で差がなく、0.9% 食塩水は 60.0% で最も良好であった。基礎飼育液としては、なるべく単純なものの方が、解析に便なので、以後の実験の基礎飼育液として 0.9% 食塩水を用いることにした。

3. 寒天培地の結果

液体中の Plerocercoid は互にからみ合い、多数の虫体の場合は蝟集し、恰も菊花状を呈するので、観察に不便である。しかるに寒天培地内では寄生部位である皮下織及び筋肉内と同様の、個々自由な行動をとるので観察に好都合である。先づ寒天の 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% 各濃度における生存状態を検討した結果 (Fig. 3), 0.9% 食塩水に 1% 寒天を加えた場合 (以後生食寒天と称す) が、最も生存期間長く、且つ虫体の状態は、伸長するもの、蛇行状のもの、渦巻くもの等宿主体内における状態と非常によく似た行動を示した。2.0% は硬度のためか、行動の束縛が大きく、頭部と体部が離断するもの多く、0.5% は軟か過ぎ、観察に不便であった。この生食寒天

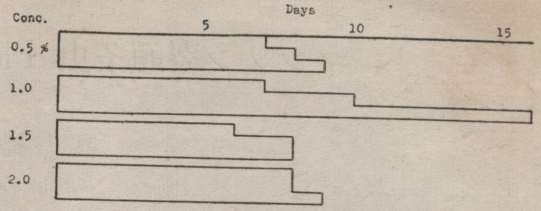


Fig. 3 Effect of the concentration of saline agar medium on number of worms survived
Temperature: 30°C Worms: 42 days in mice

と、生理的食塩水との比較は Fig. 4 にみる如く、両者の生存期間には差が認められなかった。従つて、以後の基礎飼育液は前記の 0.9% 食塩水と、生食寒天とを使用することにした。

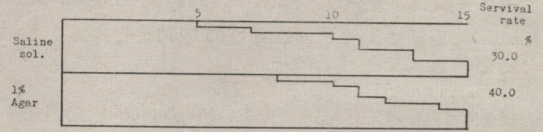


Fig. 4 Comparison of number of worms survived in saline solution and saline agar medium
Temperature: 30°C Worms: 42 days in mice
One group 10 worms

4. 飼育虫体に及ぼす温度の影響

Plerocercoid の宿主は無尾両棲類から哺乳類に及ぶので、0°C から 37°C までの各温度範囲についての影響を、0.9% 食塩水を用いて観察した (Table 1)。各温度における最長生存日数を比較すると、20°C が 31 日で最高を示し、10°C, 30°C, 4°C, 0°C, 37°C の順に低下した。但し 10°C 以下の群では殆ど不動の状態であるので 40°C の温湯内で徐々に加温して観察した。又 20°C 以上でも飼育日数の経過に伴い運動微弱になった場合は、同様に加温して観察した。各温度における虫体の状態は、飼育後 6 日までは、各温度群とも、虫体完全に保たれ、10°C 以下は殆ど動かず、20°C はゆるやかな伸縮運動を続け、30°C, 37°C と上昇するに従い、非常に活潑な伸縮運動を展開する。しかし 7 日に到り 30°C 及び 37°C は虫体末端崩壊し始め、37°C は運動微弱となり、翌日虫体崩壊し死亡した。30°C は 9 日で虫体頭部と体部離断し、体部はその後崩壊するも、頭部は運動を続け、14 日後に運動微弱となった。20°C は 19 日までは虫体完全に保たれ、20 日で虫体末端一部崩壊するも、なほ 28 日まで運動を続け、次第に微弱とな

Table 1. Effect of temperature on worms during incubation

Temp. °C	Incubation in days											
	3	7	8	13	14	17	18	19	20	26	28	31
0	A α	A β		A γ								
4	A α	A α			A α	A β	A γ					
10	A α	A α			A α		A β		A γ			
20	A α	A α		A α						B α	B α	B α B γ
30	A α	B α			C α				D γ			
37	A α	B α	D γ									

Medium : 0.9 % NaCl sol. Worms : 35 dapys in mice

Abbreviations

- A : Normal
- B : Partly collapse of the body
- C : Scolex separated from the body
- D : Collapse of worm
- α : Normal movement
- α : Normal movement under warm condition
- β , Decayed movement under warm condition
- γ : Discontinuation of movement under warm condition

つた。低温域は、虫体の崩壊殆ど示さず、7日までは僅かの加温で鋭敏に反応して運動し、それ以後は次第に反応時間が延長された。高温域は虫体の末端の崩壊、又は頭部と体部の離断がみられ、低温域ではそれがみられなかつたが、この虫体の状態と、生存期間とは、特に関係がみられなかつた。

5. 各種飼育液における生存期間

各種血液成分即ち、人血清、犬血清、犬脱繊維血、犬血漿及び総合アミノ酸製剤のgpにおける比較を、各群の最低と最高の生存期間で Table 2 に示した。飼育液の濃度に関しては、高濃度群が比較的生存期間短く、25%以下の群がやや良好であつた。各種飼育液間には、顕著な差が認められないが、25%人血清、25%犬血清、5%犬脱

繊維血、5%犬血漿、25% gp が各群の最高を示し、犬血漿群を除いた他の群は、対照群を上回っている。又人及び犬の血清間には差が認められない。25%人血清40日、5%犬脱繊維血37日、25% gp 50日の各飼育虫体をそれぞれ終宿主である犬に経口投与した結果感染成立し、成条虫を得た。即ち感染能力は体外飼育によつて失われなかつた。

6. 各種寒天培地における生存期間

1%寒天を加えた各種培地における生存状態を Table 3 及び Fig. 5 に示した。飼育10日後における生存率は、犬血清寒天、犬脱繊維血寒天において44.5%、38.4%を示して大差なく、対照群の生食寒天22.3%の約2倍を示した。肉汁、肝汁は、各濃度とも生存日数短く、良好な環

Table 2. Comparison of survival duration of worms in various kinds of culture solutions

Medium	Concentration (%)				
	5	10	25	50	100
	min	max			
Human serum	17—26	15—33	40*	22—25	18—24
Dog serum	22—26	23—26	27—31	20—22	25—26
Dog defibrinous	29—37*	20—25	8—26	9—21	16—21
Dog plasma	22—24	16—18	12—24	20—22	15—19
Glucopolytamin	12—20	11—16	45—50*	33—36	8—15
Control (0.9 % NaCl sol.)			21—29		

Temperature : 28°C

Worms : 32 days in mice

* Oral administration into dogs

Table 3. Number of worms survived in different agar culture media

Medium	Concentration of medium (%)	Culture in days							
		5				10			
		I*	II	III	Total	I	II	III	Total
Dog serum	10	3	3	2	8	2	1	1	4
	25	3	3	1	7	2	2	0	4
Dog defibrinous	10	3	0	3	6	1	0	2	3
	25	3	3	3	9	2	1	1	4
Meat extract	10	1	1	0	2	0	0	0	0
	25	1	1	0	2	0	0	0	0
Liver extract	10	0	1	1	2	0	0	0	0
	25	1	1	2	4	0	0	0	0
Saline agar	NaCl 0.9	3	1	1	5	1	0	1	2
Saline sol.	NaCl 0.9	3	3	3	9	2	0	1	3

Temperature : 28°C Worms : 35 days in mice One group 3 worms * : group

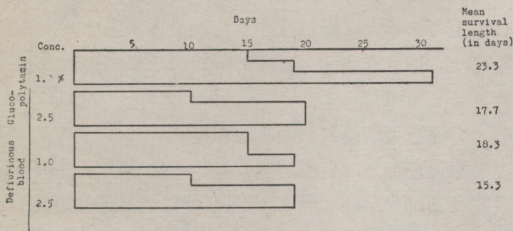


Fig. 5 Days of survival of worms in different kinds of agar culture media

One, group 3 worms. Temperature : 25°C. Worms : 33 days in mice.

境とはいえなかつた。次に 1.0%, 2.5% 各種濃度における脱纖維寒天と gp 寒天における生存日数は Fig. 5 にみる如く, 1% gp 寒天の32日生存の1例を除いて大差なく, 平均17日前後の生存日数を示したが, gp 群がやや良好な成績といえる。

7. glucopolytamin 寒天による生存日数

1%寒天に gp を5%から30%加えた各 gp 寒天における生存日数は Fig. 6 に示す如く, その平均生存日数は20%群が最も長く21.0日の結果を得た。次いで25%, 5%, 10%, 30%の順に短縮を示した。これと同様の培

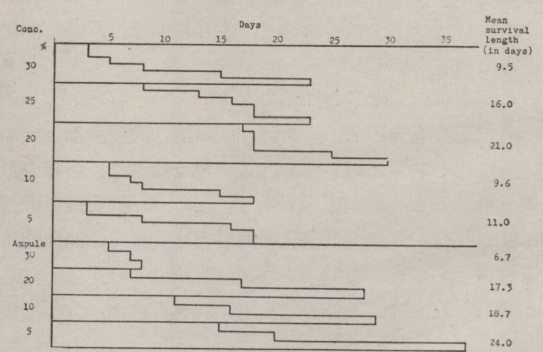


Fig. 6 Days of survival of worms in agar medium in the presence of glucopolytamin

Worms : 30 days in mice. Temperature : 28°C. One group, 5 or 3 worms.

地を注射用アンプルに封入した場合の平均生存日数は30%, 20%群においてはカーレル瓶の場合と差が認められないが, 10%, 5%群は約2倍の生存日数を示した。

8. 血清及びgpを用いての各温度における生存状態

上述の各実験結果から飼育に良好な成績を示した25%血清 (Ss), 25%血清寒天 (Sa), 25% gp (Gps), 20% gp 寒天 (Gpa) における温度別の生存状態は Table 4

Table 4. Effects of temperature and medium on the survival duration of worms

Temp. °C	Medium					
	Sa	Ss	Gpa	Gps	Cont.	
4	max. (in days)	45	50	25	30	18
	mean	38.5	47.5	22.5	26.3	15.8
	relative value	2.4	3.0	1.4	1.6	1.0
10	max.	60*	65*	40	40	20
	mean	47.5	61.3	32.5	35.0	17.8
	relative value	2.6	3.4	1.8	1.9	1.0
20	max.	40	60	40	35	31
	mean	35.0	42.5	30.0	27.5	23.8
	relative value	1.4	1.7	1.2	1.1	1.0
30	max.	35	55	30	30	19
	mean	25.0	52.5	25.0	26.3	15.0
	relative value	1.6	3.5	1.6	1.7	1.0
37	max.	20	30	20	20	8
	mean	15.0	25.0	11.3	12.5	5.4
	relative value	2.7	4.6	2.1	2.3	1.0

Worms: 35 days in mice

Abbreviations

- *: Oral administration into dogs
- Sa: 25% dog serum+1% agar
- Ss: 25% dog serum
- Gpa: 20% glucopolytamin+1% agar
- Gps: 25% glucopolytamin
- Cont: 0.9% saline solution

及び Table 5 に示してある。これら各群の平均生存日数をみるに、10°C Ss 群が最も長く 61.3 日の結果を示した。但しこの場合、65 日目まで飼育を中止して、犬に経口投与したので、実際には平均生存日数は更に延長される筈である。同様に 10°C Sa 群も 60 日目まで中止して犬に投与した。この 2 頭の犬は、14 日後の剖検において体長約 40 cm の成条虫を夫々 5 条づつ得て、感染成立し、発育するのを観察した。各温度域における gp 群と血清群との

比較では、何れの温度域においても血清群がやや良好な成績を示し、検定の結果 $\{F_0 = 24,007 > F'_1(0.05)\}$ 有意差が認められる。又寒天群と液体群では液体群がやや良好で $\{F_0 = 22,16 > F'_1(0.05)\}$ 有意差が認められた。これらを対照の食塩水群に較べると、平均生存日数において 1.1 倍から 4.6 倍の延長を示した。

このときの虫体の状態を三群に分けて観察した結果は Table 5 に示してある。即ち虫体の形態が、飼育開始時と変りないもの (A)、虫体の一部が膨潤又は崩壊を示すもの (B)、虫体の頭部と体部が離断するもの (C)、の 3 種に分けてみると、高温度域は A→C という変化が多く、低温度域では A→B という傾向がみられた。しかしこの虫体の外形的変化と、生存日数との間には、特別な関係は認められなかつた。

9. 飼育虫体内 glycogen 量の変化

25%血清 (Ss)、25%血清寒天 (Sa)、25% gp (Gps)、20% gp 寒天 (Gpa) を培地とし、対照として 0.9% 食塩水 (Cs)、及び生食寒天 (Ca) を使用して、1 週間毎に、虫体内の glycogen 量を測定し、虫体組織 1 g 中に

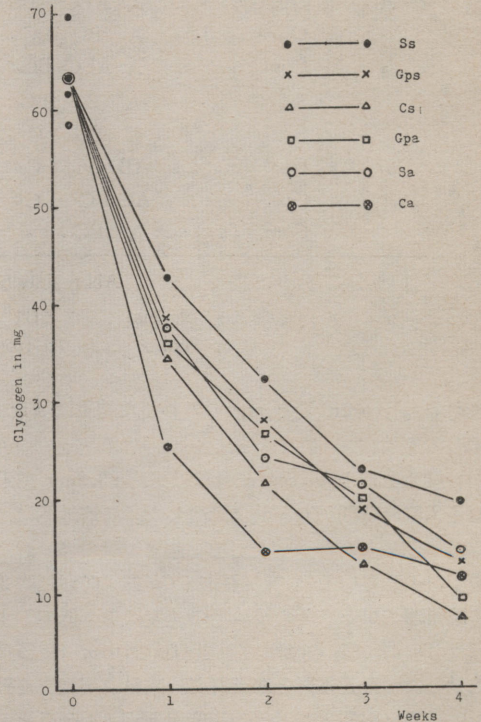


Fig. 7 Glycogen contents of worms
Abbreviations, as same as Table 4. Temperature: 20°C

Table 5. Effects of culture solution and temperature on the behaviour of worms.

Temp. °C	Medium	Culture in days												
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
4	Sa	A	A	A	A	A	AB	AB	AB					
	Ss	A	A	A	A	AB	AB	AB	AB	AB				
	Gpa	A	A	A	A	AB								
	Gps	A	A	A	A	AB	B							
	Cont.	A	A	A	A									
10	Sa	A	A	A	A	A	A	A	A	AB	AB	B	B	
	Ss	A	A	A	A	A	A	A	A	A	AB	AB	AB	AB
	Gpa	A	A	A	A	AB	AB	B	B					
	Gps	A	AB	AB	AB	AB	AB	B	B					
	Cont.	A	A	AB	AB									
20	Sa	AB	AB	AB	BC	BC	BC	BC	BC					
	Ss	A	AB	AB	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC
	Gpa	A	BC	BC	BC	BC	BC	BC	BC					
	Gps	A	AB	B	BC	BC	BC	BC						
	Cont.	A	A	A	AB	BC	BC							
30	Sa	A	A	A	B	B	B	B						
	Ss	A	AB	B	B	B	B	B	B	B	BC	BC		
	Gpa	AC	ABC	ABC	BC	BC	BC							
	Gps	A	BC	BC	BC	BC	BC							
	Cont.	A	ABC	BC										
37	Sa	A	BC	BC	C									
	Ss	A	BC	C	C	C	C							
	Gpa	AB	BC	C	C									
	Gps	AC	C	C	C									
	Cont.	A	BC											

Abbreviations

A: Normal B: Partly swelled or collapsed worm
 C: Scolex separated from the the body

含まれる glycogen 量を mg で表わした結果は Fig. 7 に示してある。

飼育開始直前の glycogen 含量は平均 63.2mg を示し各群とも飼育時間経過と共に漸減した。各培地間には顕著な差は認められなかったが第1週における Ss 群は33%減少を示しているのに、対照の Ca 群は60%と約2倍近く減量している。その後減量の速度はやや低下し4週後には Ss 群, Ca 群それぞれ当初量の70%, 80%の減量を示した。又液体群と寒天群では減量の速度に差異があり、前者は1週まではその速度大きく、1週以後は略等しい速度で減量するのに、後者は2週まで急速な速度で減量し、それ以後は、ゆるやかな速度で減量した。し

かし何れの群も4週後には当初量の約 $\frac{1}{4}$ から $\frac{1}{5}$ 量に減量した。

10. 飼育虫体内 glycogen の組織化学的検索

飼育開始直前の Plerocercoid 体内 glycogen の分布は以下の如く、即ち皮下細胞層には小顆粒状, Parenchyma には顆粒状及び塊状, 筋繊維には微小顆粒の glycogen が存在し、特に Parenchyma には多量の glycogen が分布している (photo. 1, 2)。1週間後の Parenchyma には塊状 glycogen の分布少くなり、顆粒状の分布がみられ、2週間後 (photo. 3, 4) には、更にこの傾向が著明となつて、小顆粒状 glycogen が粗に分布する。この現象は虫体辺縁部から中心部に向つて起る。しかし筋

繊維束内の微小粒状 glycogen には変化がみられなかった。4週間後には (photo. 5, 6, 7, 8), glycogen の大半は消失するもなほ、Parenchyma に小顆粒状の glycogen が、かなり認められる。筋繊維束内の glycogen は飼育開始時と同様で大差を示さなかつた。各培地間における虫体 glycogen の組織化学的分布及び経時的变化は認められなかつた。

又角皮層及び筋繊維には glycogen 以外の多糖類が存在し、これは飼育日数の経過には影響されないうで残存した。

考 按

マンソン裂頭条虫 *Plerocercoid* の体外飼育の条件を検討した結果は以上の如くである。

即ち血清が最も良く、ついで gp, 脱繊維血等であり、温度は 10°C ~ 20°C が好結果であることが明らかになつた。飼育液を更新する場合と不換の場合とでは、虫体の生存状態に差が認められなかつたので、飼育液を更新することなしに飼育を続けた。即ち飼育液は60日余更新しないもなほ、飼育開始時と色調、透明度に変化を認めなかつた。これは体外飼育のため代謝が低下したか、或は虫体の代謝率が小さいかのどちらかが考えられる。本実験に使用した虫令30~45日の虫体は、宿主体内では未だ成長過程にあるので代謝率が極度に小さいとは考えられない。従つて体外環境のための低下と考えられる。この観点からは更に改善の余地があると思われる。

Smyth (1949) は *Ligula intestinalis* の *Plerocercoid* を用い、1日中飼育液を更新し続け、ある例は産卵するに至つた。然しこの *Plerocercoid* は、既に形態学的に生殖器官その他が分化しており、マンソン裂頭条虫の全く未分化の *Plerocercoid* の場合とは、全く条件が異つてゐるが、飼育液の更新が良結果をもたらすことは否定出来ない。伊藤ら (1955) は日本住血吸虫の体外飼育で飼育液更新と不換例で大差ないが、更新例にやや良い成績を認めている。medium の他の条件の改善と共に、medium の更新を行なう積りである。

液体培地では虫体の観察に都合悪く、振動などの機械的刺戟も多い。これを改善するために寒天培地を使用した。その結果、虫体は液体培地のときには全く見られなかつた渦巻き状、或いは蛇行状の行動を示した。これは宿主体内における行動と全く同様であり、皮下又は筋肉がその棲息部位であることと考え合わせると、かなり良好な環境といえる。加うるにこれは、虫体を観察するの

に好都合であつた。又液体培地との比較では、生理食塩水と生食寒天とでは両者の生存状態に差がみられないが、血清, gp 使用例においては寒天群が、生存日数についてはやや劣つた。このことは食塩水群, 生食寒天群では medium から殆ど物質摂取を行わないので両者間に差がなく、血清或は gp の場合は、多少とも摂取がなされ、そのとき寒天培地は行動の自由が多少束縛されるが、液体培地ではそれがなく、且つ一様に分布するために摂取し易いために両者間に差を生じたのではないかと思われる。この観点から寒天培地への添加物を考慮することにより更に良結果が得られることと思われる。

Plerocercoid の宿主は無尾両棲類から哺乳類に亘るので、生存の温度域、及び滲透圧の巾はかなり広範囲が予想された。しかし実験の結果、各種の生理的塩類液においては、顕著な差はみられなかつたがなお生存日数には差があり、食塩水群では 0.9%群が最も良好で、蛙の生理食塩水である0.65%群は最も悪かつた。又温度域は 10°C から 20°C が最も好適域である。これは、生体外においては、酵素系が充分働き得ず、代謝の収支に不均衡を生ずるため、生体内では棲息し得る環境でも、体外では生存し難くなると考えると、低滲透圧域、低温度域、高温度域において、何れも生存日数が短いことは首肯出来る。体外飼育の虫体の状態は崩壊又は膨潤、切断、不変等の外形変化がみられるが、明白に成長を示したものは認められなかつた。かかる外形変化の起る原因は単に温度、飼育液の差のみに限らず、宿主から摘出して飼育容器に入れる過程における外傷などの機械的要因、又は代謝の低下による体細胞の老化などが、影響するものと思われるが、これは更に追求する考へである。然しこのことと虫体の生存期間とは特に明白な関係が認められないことから、外形変化が、致命的因子とはならない。特に終宿主への感染能力については、虫体の外形変化の如何を問はず、又飼育液の種差の影響もなく、犬脱繊維血37日、人血清40日、gp 50日、犬血清寒天60日、犬血清65日飼育の *Plerocercoid* を終宿主である犬に経口投与した結果、何れも感染成立し、投与した *Plerocercoid* の数だけの成条虫を得た。これは、*Plerocercoid* の体外飼育において、2ヶ月余は、感染能力を保持出来ることを立証したもので甚だ興味あることである。

血清は飼育液として最も良い成績を示したが、一方人工合成飼養液調製への最初の手懸りとして gp を使用した結果、血清群と有意差があるとはいへ、Table 2, 4 にみる如く、40~50日の生存を示したことは、血清に代

る飼育液として注目に価する。しかし Fig. 6 にみられるアンプルに封入した場合とカーレル瓶の場合の濃度差による生存期間の差異については、その原因は不明であるが、或いは好気、嫌気と云う観点から更に追求すべきことと考えられる。

飼育虫体の体内 glycogen 量の変化は、液体培地と寒天培地とで減量の速度に差異があり、前者が1週間で急速に減量し、後者が2週間を要していることは、主として運動量の差によるものと思われる。しかし両群とも4週後には、当初の $\frac{1}{4}$ ～ $\frac{1}{5}$ 量に減量している。これは宿主体内におけるよりも、体外飼育の方がより活潑な運動が行われている結果培地からの物質摂取はごく少量か、或は殆どないにも拘らず、運動量は各種の刺戟が増大しているため体内 glycogen の消費が著明となると考えられる。これは組織化学的結果からも裏付けされる。即ち当初 Parenchyma に多量に存在した glycogen は飼育日数の経過と共に漸減し、4週後には Parenchyma の glycogen は大半が消失している。これは Smyth (1949) が *Ligula intestinalis* で、Winona *et al.* (1956) が *Gynaecotyla adunca* を用いて得た結果と一致している。松下ら (1957), Erasmus (1957a) らは条虫類の Phosphatase の研究からそれが栄養の吸収、分解、合成に関与していると考察し、Read (1950), Erasmus (1957b) らによつて条虫類の Embden-Myerhof の解糖径路が指摘されているが、これらのことから飼育虫体の解糖径路についての究明は更に今後に残された問題である。

要 約

マンソン裂頭条虫の Plerocercoid を *in vitro* で飼育した結果、次のことを明かにし得た。

1. 塩類溶液内の生存率は 0.9%食塩水が最も良い成績を示し、Tyrode 液、Ringer 液、0.8%食塩水の間には差がなく、Locke 液が之に次ぎ、0.65%食塩水内では最も低かつた。
2. 飼育温度としては 0°C から 37°C の範囲内では、10～20°C が最良の結果を示した。
3. 飼育液は、血清、脱繊維血、血漿、glucopolytamin を用い、それらのうち血清が最も良く、10°C において最良65日の結果を得た。ついて gp が良好な成績を示した。
4. 飼育液に 1%寒天を加えた寒天培地内では液体培地に較べ生存期間やや短い、虫体は宿主体内と同様な行動を示し、良好な結果を得た。
5. 飼育日数 37, 40, 50, 60, 65 日の虫体を終宿主

(犬) に経口投与した結果、感染成立し、それぞれ成条虫を得た。即ち体外飼育で最長65日間感染能力を保持し得た。

6. 虫体内 glycogen 量は飼育開始と共に漸減し、4週間後には当初の約 $\frac{1}{4}$ ～ $\frac{1}{5}$ 量となつた。

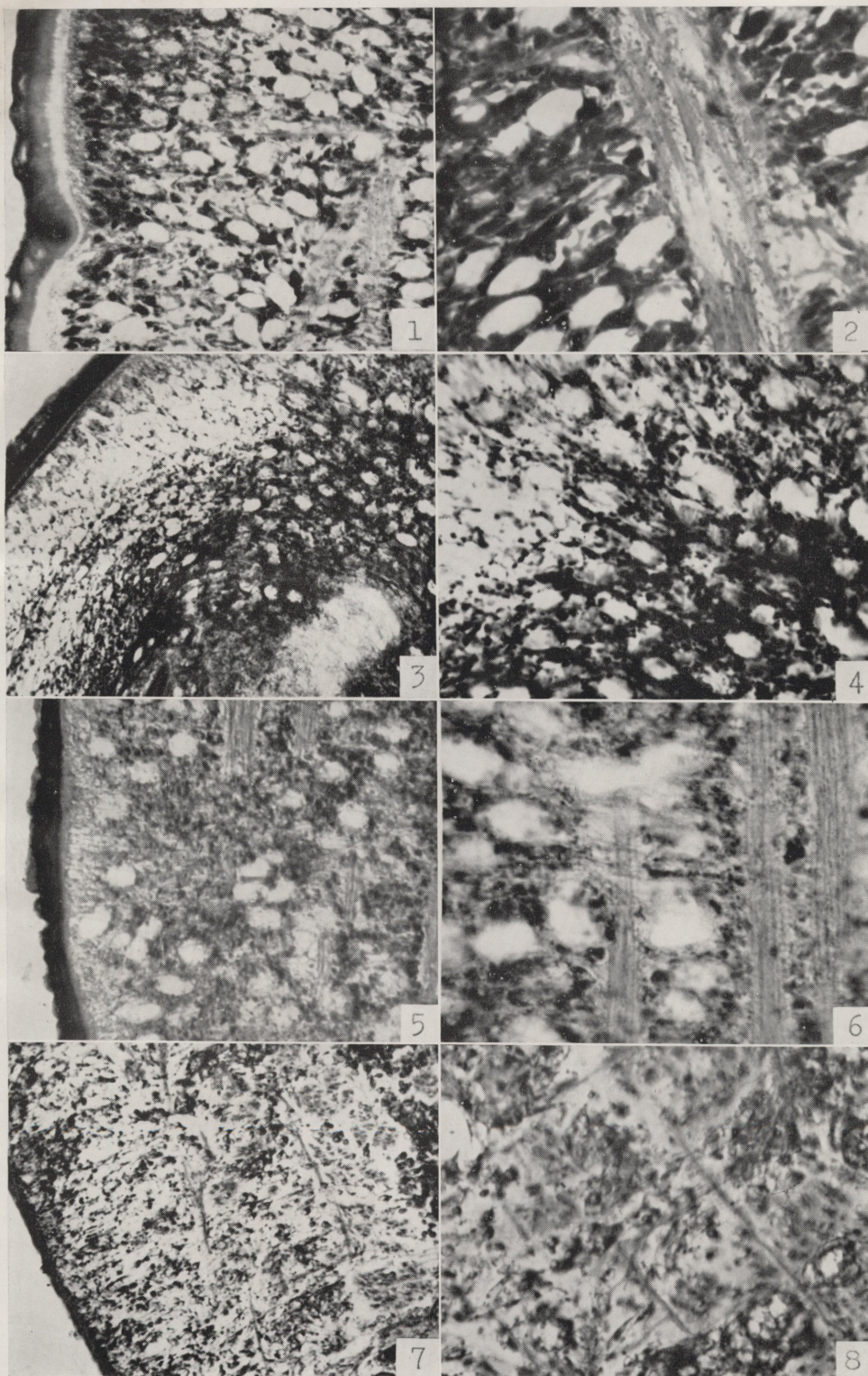
7. 組織化学的には、Parenchyma に多量に存在した Glycogen は飼育日数の経過と共に漸減したが、筋繊維内の glycogen には変化がみられなかつた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜つた昭和医科大学医動物学教室森和雄教授に深く感謝いたします。また御協力を戴いた同教室杉浦健一氏に感謝いたします。なお生物教室桜井稔三君の御助力に御礼申し上げます。

又本論文の要旨は昭和34年4月第28回日本寄生虫学会総会に於いて発表した。

文 献

- 1) Carroll, N.V., Longley, R.W. & Roe, J.H. (1956): The Determination of glycogen in liver and muscle by use of Anthrone reagent, *J. Biol. Chem.*, 220, 583-593. —2) Edwin, M. I. (1956): *In vitro* survival of radiae of *Cyclocoelum microstromum*, *Exp. Parasit.*, 5(2), 231-237. —3) Erasmus, D. A. (1957a): Studies on phosphatase system of cestodes 1. Studies on *Taenia pisiformis* (Cysticercus and Adult). *Parasitol.*, 47(1 & 2), 70-80. —4) Erasmus, D. A. (1957b): Studies on phosphatase system of cestodes 2. Studies on *Cysticercus tenuicollis* and *Moniezia expansa* (Adult). *Parasitol.* 47(1 & 2), 81-91. —5) 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, *寄生虫誌*, 4(1), 12-18. (2) 人工合成飼育液における飼育試験, *寄生虫誌*, 4(3), 14-17. —6) 松下文雄・他(1957): 条虫類における phosphatase の組織化学的研究, *熊本医学会雑誌*, 31(4), 367-369. —7) Read, C. P. (1950): The acquisition of isotopically labelled inorganic phosphate by the tapeworm, *Hymenolepis diminuta* with some remarks on the host-parasite relationship, *J. Parasit.*, 36, 34-41. —8) Smyth, J. D. (1949): Studies on tapeworm physiology. IV. Further observations on the development of *Ligula intestinalis in vitro*. *J. Exp. Biol.*, 26, 1-14. —9) Winona, B.W. & W.S. Hunter (1956): Quantitative determinations of the glycogen content of *Gynaecotyla adunca*, *Exp. Parasit.*, 5(5), 441-448. —10) 横川宗雄・他(1955): 肺吸虫 *Paragonimus westermani* の体外飼育, (1) 脱嚢幼虫 (excysted metacercariae) の *in vitro* における生存期間について, *寄生虫誌*, 4(4), 70-75.



Summary

Plerocercoid larvae of *Diphyllobothrium mansonii* were cultured in various kinds of media *in vitro*.

The results obtained were as follows :

(1) These larvae were cultivated in various kinds of saline solutions : 0.9 per cent NaCl solution, Tyrode's solution, Ringer's solution, 0.8 per cent NaCl solution, Locke's solution, and 0.65 per cent NaCl solution. The worms in 0.9 per cent NaCl solution survived longer than those in any other kinds of saline solutions. Tyrode's solution, Ringer's solution and 0.8 per cent NaCl solution did not differ in their ability to maintain worm survival. The worms in Locke's solution remained alive shorter than did in all the solutions described above, with the exception of 0.65 per cent NaCl solution.

(2) The temperature was maintained between 0°C and 37°C. The temperature from 10°C to 20°C was suitable for their survival *in vitro*.

(3) When culture media containing serum, defibrinous blood, blood plasma or glucopolytamin were used, serum was superior to defibrinous blood, to blood plasma and to glucopolytamin. At a temperature of 10°C, the larvae cultured in medium containing serum lived as long as 65 days, and those

in glucopolytamin survived as long as 50 days.

(4) Worms cultivated in 1 per cent agar medium survived slightly shorter than those in liquid culture. In this case, however, the behaviour of the parasite approximated their behaviour *in vivo*, so it was considered that this *in vitro* system was one of the suitable condition for their survival.

(5) After durations of 37, 40, 50, 60 and 65 days from the beginning of culture *in vitro*, the plerocercoids were infected dogs by the oral administration. These worms were capable of bringing about the normal development and of reaching their adult form as usual. From this fact, it was further considered that worms still possessed the ability to grow in their hosts even after a duration of 65 days *in vitro*.

(6) Glycogen content of worms cultured *in vitro* gradually decreased and attained a level of about 1/4 to 1/5 as compared to the initial level after 4 weeks of cultivation.

(7) Histochemical examinations revealed that great quantities of glycogen in parenchyma region of worms gradually decreased, the quantity being proportional to the duration of cultivation. Glycogen content in muscle region, however, did not decrease.

Explanation of photographs

1. Transverse sections of a non-cultured plerocercoid showing quantities of glycogen localized mainly in the parenchyma region. PAS staining $\times 400$
2. The same as photo. 1. $\times 800$
- 3-4. Cultured in serum for 2 weeks. photo. 3 : $\times 200$, photo. 4 : $\times 400$
- 5-6. Cultured in serum for 4 weeks. photo. 5 : $\times 400$, photo. 6 : $\times 800$
- 7-8. Cultured in saline solution for 4 weeks. photo. 7 : $\times 400$, photo. 8 : $\times 800$