

ウエステルマン肺吸虫のカワニナへの感染実験

(1) 経皮感染について

小宮 義孝 鈴木 了司 伊藤 洋一

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和35年9月15日受領)

まえがき

カワニナ (*Semisulcospira libertina*) へのウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermani*) の感染実験は中川(1915), 小林(1918), 横川(定)(1919), 宮入(1918, 1934)等によつて報告されているが, いずれもその cercaria を得るまでには至っていない。

すなわち, 中川(1915)は水中で孵化した miracidium がカワニナに好んで侵入すると報じ, 中川及び横川は実験池内にカワニナとウエステルマン肺吸虫卵とを混在させ, その実験感染を試みたが, いずれも数週にして貝が死滅し, 何らの結果をみるに至らなかった。同様の方法で, 宮入はカワニナ体内に redia の形成までは認めたが, cercaria の形成を見るまでには至らず, 小林もカワニナとウエステルマン肺吸虫 miracidium を接触させた後, 40日目のカワニナ体内に mother redia を検出し, その中に daughter redia の形成を認めたが, cercaria の形成までには至らなかったと報じている。

その後現在に至るまで, 多くの人が同様の実験を試みているが, いまだに成功の例をみていない。したがつてカワニナ体内でのウエステルマン肺吸虫の発育については不明の点が多量に存在する。

筆者らは第一中間宿主体内で未だ不明であるウエステルマン肺吸虫の発育過程の観察を試みつつあるが, まずその前段階として, ウエステルマン肺吸虫のカワニナへの感染実験を行い, 一応の結果を得たので, ここに報告する。

材料および感染方法

1. miracidium

静岡県函南地方より採集したモクズガニ (*Eriocheir japonicus* de Hann) から得たウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Braun, 1899) の metacercaria を犬に摂食せしめ, その尿より

得た虫卵を洗滌分離し, 腰高シャーレに約 250 cc の水と共に入れ, 30°C 恒温槽で 12~20 日間培養した。使用時には卵内で miracidium にまでの発育が完了したことを確認したのち, 5~8°C の冷蔵庫に約 15 分間入れ再び室温に戻すという温度刺激を与えて, 一斉に孵化させたものを用いた。

2. カワニナ

静岡県田方郡函南村の肺吸虫症流行地の溝より採集したカワニナ (*Semisulcospira libertina* Gould) のうち, 殻長 5~10 mm 位の幼若貝を実験室内にて室温で水槽中に飼育しておき, 必要に応じてそれを使用した。幼若のものを使用したのは, 自然界での生存期間が未だ短かく, したがつてウエステルマン肺吸虫の自然感染の可能性およびその感染に対する感受性が低いと思われること, および表皮が柔かく, かつ貝体が小さいので検査に都合が良いと考えられたからである。また流行地の貝を使用したのは, 流行地以外の貝にはあるいはウエステルマン肺吸虫に感染しにくいという可能性がありはしまいかと懸念したためである。

miracidium 被曝後のカワニナは大型の角形水槽 (60 cm × 30 cm × 30 cm) 内を 4 つに網で仕切り, その中に貝を実験群ごとにまとめて入れ, 餌料としては主として固形餌料 (船橋農場製のものでウサギ, モルモット用の飼料) およびフサモ, カナダモなどの淡水藻類を用い, 水槽中の水は週 2 回, 1/3 づつ水道水のくみ置き水で換水した。また常時エア・ポンプで空気を送り, 冬期 (11 月~5 月) はヒーターを入れ, 水温を約 25°C に保つて飼育した。

3. 感染方法

口径 15 cm の腰高シャーレ中に上記の方法で孵化させた miracidium の懸濁液 200 cc を入れ, その中にカワニナを通常 50 個体, 実験群によつては 25 個体または 75 個体を入れ, 室温で 20 時間放置し, その侵入を図つ

本研究は文部省科学研究費の補助によつて行われた。記して謝す。

第1表 各実験群におけるカワナ1個体当りの被曝 miracidium 数(室温)

実験群番号	実験開始日	被曝 miracidium 数	使用貝数
7	1959-10-19	2,940	50
8	-11-20	268	20
9	-12-24	200	50
10	1960-1-20	384	25
11	-2-18	360	50
13	-3-16	288	50
14	-5-6	140	50
15	-5-17	311	20

た. カワナ1個体当りの miracidium 数は懸濁液 0.1cc 中の数より推定した. 各実験群における実験開始日, 被曝 miracidium 数, 使用カワナ数については第1表に示したとおりである. 20時間放置したカワナは水道水でよく洗い, 前記の大型水槽中で飼育した.

4. 感染虫体の検出

感染後, 各実験群について24時間後および1週間ごとに miracidium 被曝貝を原則として3個体とり, その軟体部をいくつかの小片に切り, カバーガラス上より圧を加え, 生標本のまま検鏡し, カワナ体内でのウェステルマン肺吸虫幼虫の存在の有無およびその發育状態を観察した.

また対照として同じ時期に採集し, 実験室内で飼育した貝を各実験群について, 実験終了時に各50個体検査し, その自然感染の有無を調べた.

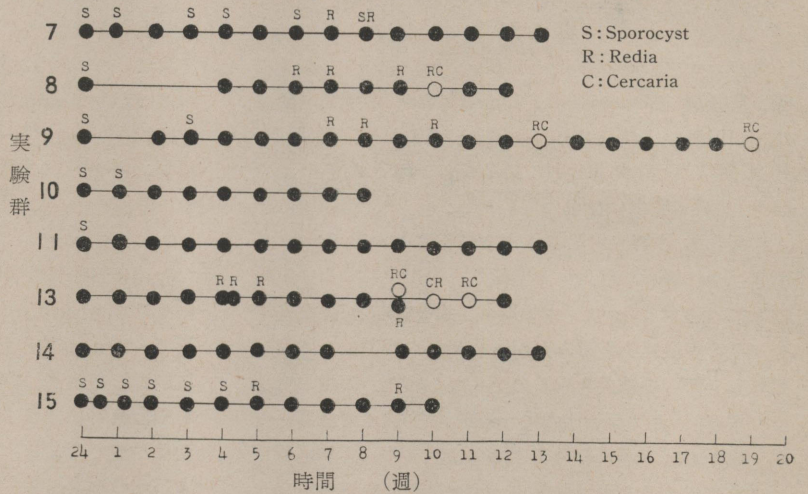
貝組織内のウェステルマン肺吸虫 sporocyst はその焰状細胞の存在その他により, 簡単に識別できた. またその若い redia は他の吸虫類の redia との識別は困難であったが, 実験に使用した貝は相当期間実験室内で飼育したものであり, 自然界で感染した吸虫類があるとするれば, 観察時には既に相当發育した redia, あるいは cercaria になっているものと思われる. したがって本実験の結果得られた redia であるか, 自然界の感染によつて得られた redia であるかは, その観察時期と發育状態によつても充分に区別し得た.

実験成績

現在までに行つた8実験群, 計248個体(実験中の死

亡は除く)の miracidium 被曝カワナについて, 前記の方法で感染成立の有無, 發育状況を検し, その結果を図示したものが第1図である.

この図は縦軸に実験番号を, 横軸には観察した時を週単位で示している. 図の符号中 S は sporocyst, R は redia, C は cercaria の検出を意味し, 符号の位置は検出された週を示している. 実験群の番号が7から始まり, 途中12がぬけているのは, 方法的に確立しなかつた初期の実験群, または別の実験群を除いたためである.



第1図 ウェステルマン肺吸虫幼生の検出状況

以下これらの実験群について, その観察結果の概要を示す.

- A) 実験群7 (Oct., 14, 1959~Jan., 13, 1960)
- 実験群15 (May, 24~Aug., 1, 1960)

実験群7では使用した貝50個体, このうち検査した貝は33個体で他は死亡している. 被曝させた miracidium 数は貝1個体当り約2,940匹で, 被曝後24時間に検査した貝では, 1個体の貝に sporocyst 196匹が主に足部および頭部に侵入していた. この傾向は4週目迄続き, 個体によつて多少の差はあるが, 貝1個体当り100~200匹の sporocyst の存在がみられた. しかし5週目に調べた3個体の貝からは1匹の sporocyst も検出できなかった. 6週目の検査では3個体の貝のうち, 2個体に sporocyst が検出されているが, その数は少なく, それぞれ9匹, 11匹の sporocyst が検出されたにすぎず, 4週目迄の sporocyst 数に比べれば, その数の著しい減少の傾向がみられた. 7週目には中腸腺の部分に初めて多数の redia を検出, その redia の一部にはかなり發育した10

数匹の redia が内蔵されているのがみられたので, mother redia と同定した. 8週目にもやはり多数の redia を1個体の貝から検出, 発育段階は7週目のものに比べれば, 若干幼若であった. また頭部には相当発育した1匹の redia を内蔵している sporocyst も同一個体の貝から検出することができた. その後13週目迄ひきつづき検査したが, 自然感染と思われる多数の *Pseudexorchis major* の redia および cercaria を1個体の貝から検出した以外は, 吸虫類の幼生は何ら検出できなかった.

実験群15も大体これと同じ傾向を示した. ただ実験群15では実験群7ほど多くの sporocyst の存在はみられず, 24時間後に4個体の貝を検査して, 各3, 10, 20, 91匹の sporocyst の存在がみられたが, それ以後の観察では検出 sporocyst 数が少ない. そして4週目には3個体の貝のうち1個体に sporocyst の存在が見出されたにすぎず, その数も1匹であった. 以後の傾向は実験群7とほぼ同じであった.

- B) 実験群8 (Nov., 26, 1959~Feb., 18, 1960)
 実験群9 (Dec., 24, 1959~May, 4, 1960)
 実験群13 (Mar., 16~June 8, 1960)

この3つの実験群はほぼ同じ傾向を示したので, 実験群9を代表例としてとりあげ, 詳述することにする.

実験群9では使用した貝数は50個体, そのうち検査した貝数は44個体であった. 被曝した miracidium 数は貝1個体当たり約200匹であり, 24時間後の検査では1個体の貝を検査して, 44匹の sporocyst の存在が認められた. しかし2週目には2個体の貝を検査して, 全然 sporocyst を検出できず, 3週目には2個体の貝のうち1個体から22匹の sporocyst を検出できたが, その後4, 5, 6週目と各週3個体ずつの貝を検査して, 何も検出することができなかった. しかし7週目には3個体の貝のうち1個体から多数の redia を検出, 形態, 時期からみて, ウェステルマン肺吸虫の mother redia と決定することができた. 同様の redia は8, 10週目にも多数検出できた. さらに13週目には1個体の貝より多数の redia および cercaria を検出, redia の発育段階は不揃いであったが, 大部分の redia は内部にはつきりウェステルマン肺吸虫と識別のできる20匹内外の cercaria を内蔵していた. さらに19週目にも1個体の貝から同様多数のウェステルマン肺吸虫 redia および cercaria を検出することができた. 他の吸虫類としては, 17週目に自然感染と思われる *Pseudexorchis major* の cercaria を

1例検出している.

実験群8, 実験群13も上とほぼ同じ傾向を示したが, 実験群8では使用した貝の数が少なく(20個体), 後期の観察を行うため, 被曝後1~3週目迄検査しなかつた. したがつてこの間 sporocyst の存在がどのような状態であったか不明である. また実験群13では3週目迄14個体の貝を検査したにもかかわらず, 1匹の sporocyst も検出できなかった. しかしこの実験群からは, その後図に示されているごとく, 9週目に2個体の貝から各多数の redia を検出, そのうち1個体の貝から得られた redia

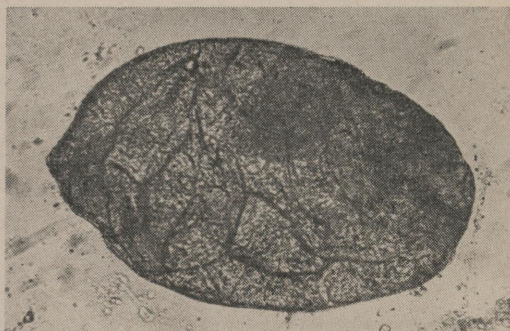


写真1 cercaria を内蔵する daughter redia
 実験8, 70日目



写真2 感染実験で得られた cercaria
 実験13, 77日目

の大部分はやはり20匹内外の cercaria を内蔵しており, ごく一部の cercaria は redia より脱出していた(ただし検査の際のカバーガラスの圧力によつたものかどうかは断定できない). また10週目, 11週目にも同様各1個体ずつの貝より多数の redia および cercaria を検出できた.

このようにひきつづき3回にわたつて cercaria が実

験貝より検出されたということは、本実験のように毎週3個体づつしか検査していない場合には確率的に非常に高い検出率を示しているものと思われる。

C) 実験群 10 (Jan., 20~Mar., 16, 1960)

実験群 11 (Feb., 19~May, 12, 1960)

実験群 14 (May, 16~Aug., 5, 1960)

この3つの実験群もやはり互いに同じような傾向を示しているので、代表例として実験群 10 をとりあげる。

実験群 10 では使用した貝数は 25 個体、そのうち検査した貝数は 23 個体であった。カワナナ 1 個体当りの被曝 miracidium 数は 384 匹であり、24 時間後の検査では貝 1 個体を調べて 7 匹の sporocyst を頭部、足部の組織中より検出し得た。しかし 1 週間後の検査では 2 個体の貝から 1 匹の sporocyst しか検出できず、その後 8 週目迄検査したが、それ以後は吸虫類の幼生を全然検出することができなかつた。実験群 11, 実験群 14 も同様で、ほとんど吸虫類の幼生は検出されなかつた。

上記実験群は便宜的に観察結果により同じ傾向を示した 3 群に分けて記載したが、これら各実験群はいずれも独立に行なつたものであり、各群間で相互に關係のないことはいうまでもない。

考 察

カワナナへウェステルマン肺吸虫の miracidium を侵入させ、cercaria を実験的に得ようとする試みは多くの先人達のかかわらず、現在まで成功していながつたが、筆者らは 1959 年から 1960 年に至る 8 回の実験において、ウェステルマン肺吸虫の cercaria を 6 個体のカワナナから認めることができた。しかしこれら 6 個体のカワナナから得られた cercaria は静岡県函南地方という肺吸虫症流行地内より採集した貝を実験に供したため、本吸虫の自然感染の可能性を考慮する必要が当然生じてくるが、これは次のごとき理由によつてその可能性を否定しうるものと考えてよい。

すなわち、

1) 実験に使用した貝は採集してきてから 1~3 カ月間実験室内で飼育した貝を用いており、本実験で検出されたウェステルマン肺吸虫 cercaria が自然感染の結果であるとすれば、時間的な cercaria の出現状態に、より大きなばらつきが生じてこなければならぬ。すなわち本実験の結果見られるように、実験の終期にのみ cercaria が検出されることなく、さらに早期にも出現して

良い筈である。しかるに図に示されているごとく、本実験によつてえられた cercaria はすべて 9 週以後にしか出現していない。同様のことは redia の出現状態についてもいえることであり、従つてこれらのことによりえられた redia, cercaria は本実験の結果によつてえられたものと考えざるをえない。

2) 図に示されているごとく、実験群 13 において 9 週目から 11 週目迄ひきつづき 3 週間にわたつて cercaria が検出されている。無作意的に毎週 3 個体のカワナナをつぶして検査している本実験において、このように 3 週間連続して cercaria が検出されたことは、確率的に考えて、低感染率を示す自然界で感染した貝がたまたま 3 週にわたつて見出されたということは理解し難く、実験によつて感染せしめた cercaria であると考えざるを得ない。

3) 既記対照を検査したところ、いずれの実験群の対照においてもウェステルマン肺吸虫幼生は全く見られなかつた。

以上の諸点より、本実験によつて観察された cercaria は実験感染の結果カワナナ体内で發育した cercaria であると考えざるをえない。

かくして、本実験において、ウェステルマン肺吸虫 miracidium の実験感染により、カワナナ体内でその cercaria までの成生に一応は成功したわけである。

しかし、考えてみると、実験感染せしめた miracidium の数に比して被検貝の cercaria の成生率はいかにも少ない、との感なきを得ない。他種肺吸虫では *P. kelli-cotti* (Ameel, 1934) にせよ、*P. ohirai* (横川, 1958; 吉田, 1958) にせよそれらの miracidium は第一中間宿主体内で容易に cercaria にまで發育するのに比較して、その間かなり著しい差異が見出される。

一方、sporocyst のカワナナ体内での存在状態は、著者らの試験では、一時に相当多数の miracidium をこれに侵入せしめたにもかかわらず、その侵入より時日を経るにしたがつて、これらは著しくその数を減じている。この点に関しては、宮入 (1934) は最初の実験で 24 日目に、第 2 回、第 3 回の実験ではそれぞれ 10 日および 14 日目にすべての sporocyst が消失したと報じ、その所見もほぼ著者らのそれと同じ傾向を示している。

以上の事柄を考えてみると、本実験のような単なる経皮感染という方法が、果して実際自然界で行われている感染の常道なのかどうかという疑問が生じてくる。しかしその当否については今後の実験結果をまたねばならぬ

い.

要 約

ウェステルマン肺吸虫の miracidium を第一中間宿主であるカワニナに実験的に侵入させ、cercaria にまで発育させる実験を試みた。

幼カワニナ(殻長 5~10 mm) 25~50 個体の各実験群に本虫 miracidium を経皮的に大量侵入せしめ、以後毎週原則として3個体のカワニナをつぶして生標本のまま組織中の幼生の存在を観察した。

その結果、現在までにウェステルマン肺吸虫 redia 14 例、cercaria 6 例を被検貝より見出すことができた。これら cercaria は種々の理由により自然感染のそれではなく、実験によつて得られたものと考えることができた。しかしかかる感染方法が果して自然界におこなわれている本虫のカワニナへの感染の常道であるかという点には疑問の余地が存する。

稿を終るにあたり本研究について種々の御批判を戴いた研究室各位に厚く御礼申し上げる。

また貝の採集に便宜を与えていただいた函南病院長・勝呂毅博士に深謝の意を表す。

本研究の一部は第20回寄生虫学会東日本支部大会において発表した。

主要文献

- 1) Ameel, D. J. (1934): *Paragonimus*, its life history and distribution in North America and its taxonomy (Trematoda: Troglotrematidae), *Amer. Jour. Hyg.*, 19(2), 279-317.
- 2) Ameel, D. J., Cort, W. W. & Van der Woude, Anne (1951): Development of the mother sporocyst and rediae of *Paragonimus kellicotti* Ward 1908. *J. Parasitol.*, 37, 395-404.
- 3) 安藤亮(1915a): 肺ヂストマの研究(第二回報告), 中外医事新報, 847, 827-840.
- 4) 安藤亮(1915b): 肺ヂストマの研究(第三回報告), 中外医事新報, 851, 1109-1127.
- 5) 安藤亮(1920): 肺ヂストマの第一中間宿主決定に関する研究(第一報), 東京医事新誌, 2175, 861-865; 2178, 987-991.
- 6) 安藤亮(1921): 肺ヂストマ「チェルカリア」の形態並に生物学的研究, 中外医事新報, 983, 286-297.
- 7) 伊藤二郎・望月久・野口政輝(1959): 静岡県下のカワニナに寄生する吸虫類幼虫の研究, 寄生虫学雑誌, 8(6), 913-922.
- 8) 小林晴治郎(1918): 肺ヂストマの第一中間宿主, 朝鮮医学会雑誌, 21, 1-18.
- 9) 小林晴治郎(1924): 肺ヂストマ発育研究補遺, 朝鮮医学会雑誌, 50, 80.
- 10) 宮入慶之助(1918): 肺ヂストマの発育に関する追加, 朝鮮医学会雑誌, 22, 1-16.
- 11) 宮入慶之助(1919): 肺ヂストマの発育に関する知見補遺, 細菌学雑誌, 181, 83-90.
- 12) 宮入慶之助(1934): パラゴニムス・ウェステルマニイの発育に関する知見追加, 東京医事新誌, 2877, 1-6.
- 13) 中川幸庵(1915a): 肺ヂストマの第一中間宿主について, 東京医事新誌, 1942, 8-14.
- 14) 中川幸庵(1915b): 肺ヂストマの発育に関する研究(第一報), 肺ヂストマの中間宿主について, 中外医事新報, 843, 551-557.
- 15) 中川幸庵(1918): 肺ヂストマのチェルカリアに就て, 東京医事新誌, 2062, 349-353.
- 16) 横川宗雄(1951): 肺吸虫幼虫の生態・特に第二中間宿主への移行に関する研究, 臨床医学, 36(1), 43-53; 36(3), 253-262; 36(8), 413-424.
- 17) 横川宗雄(1955): 肺吸虫, 自然, 10(5), 22-30.
- 18) 横川宗雄・吉村裕之・小山千万樹・佐野基人・津田守道・鈴木重一・辻守康(1958): 大平肺吸虫(*Paragonimus ohirai* Miyazaki 1939)の新第一中間宿主ウスイロオカチゲサ *Paludinella devilis* (Gould 1861) Habe 1942) について, 東京医事新誌, 75(2), 67-72.
- 19) 横川定(1919): 肺ヂストマの研究拾遺(其二), 肺ヂストマの発育史に関する研究, 台湾医学会雑誌, 202, 844-854.
- 20) 吉田幸雄・宮本正美(1959): 大平肺吸虫 *Paragonimus ohirai* Miyazaki, 1939) の第一中間宿主ムシヤドリカワザンショウ *Assiminea parasitologica* Kuroda, 1958(横川, 小山等によるウスイロオカチゲサ)に関する研究, 寄生虫学雑誌, 8(1), 122-129.
- 21) 吉田幸雄(1959): *Paragonimus iloktsuenensis* Chen, 1940(小型大平肺吸虫)の我国に於ける第一中間宿主の研究, 寄生虫学雑誌, 8(5), 822-828.

THE EXPERIMENTAL INFECTION OF PARAGONIMUS WESTERMANI
TO THE FIRST INTERMEDIATE HOST, SEMISULCOSPIRA
LIBERTINA

I. EXPERIMENTAL INFECTION THROUGH THE SKIN
PENETRATION OF THE SNAIL BODY

YOSHITAKA KOMIYA, NORIJI SUZUKI & YOICHI ITO

(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

Semisulcospira libertina has been known as the first intermediate host of *Paragonimus westermani*, but hitherto no cercaria could be obtained from experimentally infected *S. libertina* with its miracidia.

Here experiments was carried out to gain its cercaria from *S. libertina* experimentally infected with its miracidia.

The young *S. libertina* were exposed to large number of newly hatched miracidia (140-2,940 miracidia per snail) for 20 hours in Petri dishes. These infected snails were breded in the aquaria under the conditions of 25°C in temperature, and 3 snails were dissected every one week.

In 6 out of these snails, cercariae were found as early as 9 weeks after the exposure of snails. These were identified with that of *P. westermani* morphologically.

It is thought that these cercariae were as those from the infected miracidia since no evidence of the presence of natural infection of *P. westermani* was confirmed in the controller ones.