

## 第III期鉤虫仔虫の生物学的研究

沢田 順

大阪市立大学医学部内科教室 (主任 小田俊郎教授)

(昭和36年1月6日受領)

### 緒言

鉤虫の発育に関する業績は現在まで多数報告されているが鉤虫を体外において飼育させる事に成功した報告は我が教室における鉤虫の体外飼育をはじめとする。即ち野田(1953)は犬鉤虫のいわゆる第II期被囊仔虫を犬血液の赤血球を機械的に融解せしめた血色素を含む血清(以下融血血清と言う)内で飼育し第III期仔虫にまで発育させた。鳥居(1960)は同様の条件下において第IV期仔虫を第V期幼若成虫にまで脱皮発育させ得た事を報告し、松本季彦(1955)は第V期成虫を融血血清、松本恒男(1959)は各種アミノ酸液を用いて長期間飼育させる事に成功した。しかし鉤虫第III期仔虫の体外飼育に就いては未だ試みられていなかった。私は鉤虫の体外飼育の一環として特に第III期仔虫の飼育を試み第IV期仔虫にまで脱皮発育させる事に成功し、さらに第III期仔虫の生物学的な性質、即ち趨向性およびO<sub>2</sub>消費量に就いて観察し新知見を得たので報告する。

### 実験材料および方法

#### A) 感染に用いた第II期完熟仔虫の培養法

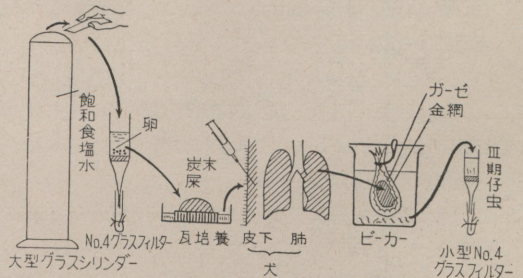
第II期仔虫を大量且純粹に得る為に次の方法を用いた。鉤虫感染犬より得た鉤虫卵含有糞の全部をビーカーに入れ、これに飽和食塩水を加えてよく攪拌混和し、これを金網、次いでガーゼで濾過し糞中の粗大物を除き、直径約7cm、高さ48cmの大型ガラスシリンダーに注ぎ込み、その上に飽和食塩水を注ぎ足して口径一杯に満載し、約1時間放置する。その後オブジェクトグラスをその表面に密着させるとガラス面に多数の虫卵が附着してくる。これを下端にゴム栓を施し充分に水を入れた化学実験用No.4大型ガラスフィルターの中で洗い落とし、これを数回繰返えず事に依りフィルター内に無数の卵が採集出来る。この含卵水を下端のゴム栓を抜き溶液のみを除去した後蒸留水を加える。この操作を数回繰返えずことにより卵より塩分を完全に洗滌除去する事が出来る。こ

の卵に適量の蒸留水を加えて塩分を含まない卵浮遊液とし、下端にゴム栓を施した後37°Cの孵卵器内に24時間放置すると卵はほとんど全部孵化して第I期仔虫となる。

直径約6cm、高さ約2cmの円板状の素焼を少量の水を入れた直径約9cm、深さ約4cmのシャーレ内に入れ、その素焼の上に水を少量加えて作った糞炭末等量混合培地を乗せ、これに虫卵を混じて培養した場合、第II期完熟仔虫が少数しか得られない事が多い。種々検討の結果、培地に細菌および原虫の繁殖盛な場合、又は虫卵が大部分培地内に深く埋没されている場合にみられる事が判明した。そこで糞炭末培地を煮沸滅菌し、その表面に上記の第I期仔虫浮遊液を滴下塗布し、37°C孵卵器内で培養した。この方法によつて第II期完熟仔虫が極めて簡便な取扱によつて大量にしかも純粹に得る事が出来た。

#### B) 第III期犬鉤虫仔虫の採集法

大量の第II期仔虫を含有した浮遊液を生後2乃至3カ月の幼犬の皮下に注射し、一定時間後心穿刺により出来るだけ瀉血した後屠殺しその肺を取り出し、細切してガーゼおよび金網で包み、40°C恒温槽内に用意した水を張ったビーカーに入れると仔虫が組織より遊離してビーカーの底に沈む。これ等の仔虫をガラスフィルターを用いて採集した。



第1図 第III期仔虫の採集法

#### C) 飼育液

- 1) 心穿刺により得た犬血清(S)。
- 2) 心穿刺により得た犬血液をガラス棒で攪拌し機械

的に融解させた血色素を含む血清（融血血清）（H+S）。

3) 小腸内容物と小腸粘膜面を削り取つて得たものを少量の溜水を加えて混和した後濾過しそれに等量の融血血清を加えたもの（D+S）。

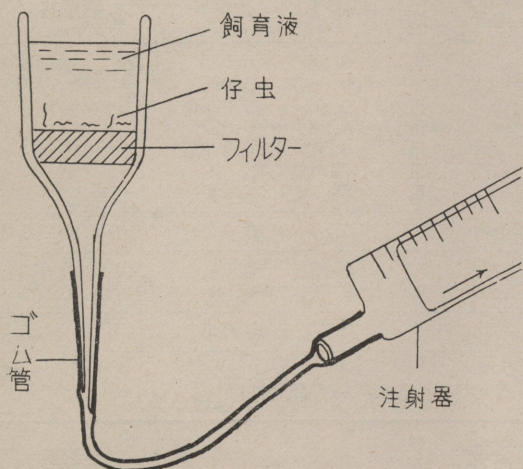
4) 口腔粘膜面を削り取りそれに少量の蒸留水を加えた後濾過した液と融血血清との等量混合液（Sp+S）。

5) 肝磨挫物に蒸留水を加え濾過したものと融血血清との等量混合液（L+S）。

6) 人血液を機械的に融解させた血色素を含む人血清。

7) 家兎血液を機械的に融解させた血色素を含む家兎血清。

用いた飼育液は上記1)～7)迄で各液にはペニシリン、ストレプトマイシンおよび0.005%マーズン液の少量を加え腐敗を防いだ。



第2図 小型 No. 4 グラスフィルター内飼育の飼育液交換法

#### D) 飼育用具および方法

第2図の様に第Ⅲ期仔虫を No. 4 小型グラスフィルター内に入れ水分を除去し下端にゴム栓を施した後、上記各種飼育液を入れ、37°Cの孵卵器内で飼育した。

#### 実験成績

##### I. 第Ⅲ期仔虫の鉤育

##### 1) 肺より採集した仔虫を用いた場合

A) 経皮感染後第4日目の犬の肺より採集したいわゆる第Ⅲ期仔虫約80隻を小腸液、融血血清等量混合液を入れた小型グラスフィルターに入れ、これを37°C孵卵器内に24時間放置した所、仔虫の中、口嚢原基を明らかに

そなえた第Ⅳ期仔虫1隻を発見し、更に72時間後には脱皮中の仔虫をも認めた（写真1, 2, 3参照）。

##### B) 肺よりの第Ⅲ期仔虫の採集率および脱皮率

幼犬に経皮感染させた後、肺からの第Ⅲ期仔虫採集率は第1表の様に48時間目が最も高率であり、24時間目および72時間目のものと比較して体長、体巾に大差を認めなかった。

第1表 肺より採集した第Ⅲ期仔虫

感染後採集時間	体長(mm)	体幅(mm)	口嚢原基	採集率(%)
24時間	0.624	0.0253	なし	0.7~1.3
48時間	0.696	0.0267	なし	2.0~5.0
72時間	0.654	0.0263	なし	1.1~1.5

(体長、体幅は10隻の平均値)

##### C) 各種飼育液中の脱皮率の比較

第Ⅲ期仔虫を脱皮發育させ得る飼育液を検討する為に経皮感染後48時間目の仔虫を実験材料の項で述べた1)～5)迄の各飼育液および水道水を用い飼育した。その結果24時間後には各飼育液中のものはいずれも生存していたが融血血清単独のものおよび口腔液と融血血清等量混合液中のものに口嚢原基を有する第Ⅳ期仔虫を認めた。さらに第Ⅳ期仔虫を別々にし飼育液を交換して引続き飼育し48時間後には肝抽出液融血血清等量混合液中にも第Ⅳ期仔虫を認め、72時間後には融血血清内に認めた。以上より各種飼育液のうち、融血血清のみを用いた場合が最も脱皮率が良く、これに反し腸内容物融血血清等量混合液中では全く認められなかった。水道水中においても同様に認められなかった。

第2表 各種飼育液中の脱皮状況

飼育時間		24時間	48時間	72時間			
仔虫期別		III	IV	III	IV	III	IV
使	D+S	1	7	0	—	5	0
		2	5	0	—	4	0
用	Sp+S	1	9	1	—	2	0
		2	5	1	—	2	0
飼	L+S	1	1	0	—	—	—
		2	6	0	—	—	—
育	H S	1	5	1	5	1	4
		2	2	1			
液	水道水	1	10	0	—	—	—
		2	3	0	—	—	—

##### D) 各種血清内の仔虫の發育度の比較

i) 上記飼育液の中、血清が脱皮發育に対して最適であると推定し得たので融血血清と非融血血清に就いて夫

々の脱皮数 および体長体巾の測定を次の様にして行つた。融血血清および非融血血清夫々5本宛の小型 No. 4 グラスフィルターによる飼育装置を用意し毎日夫々一つずつフィルター内の仔虫を検索した。第3表の様に融血血清の方が脱皮率が高かつたが両者共飼育5日後も余り体長、体巾の増大を認めなかつた。

第3表 融血、非融血血清内飼育の比較

日 数	期 別	融 血 血 清			非融血血清		
		仔虫数	体長	体幅	仔虫数	体長	体幅
2 日	III	6	0.56	0.022	—	—	—
	IV	4	0.60	0.031	—	—	—
3 日	III	5	0.55	0.026	3	0.65	0.026
	IV	3	0.69	0.035	1	0.77	0.035
4 日	III	5	0.56	0.025	5	0.67	0.025
	IV	3	0.70	0.028	1	0.67	0.035
5 日	III	7	0.63	0.024	2	0.68	0.029
	IV	5	0.71	0.029	2	0.80	0.030

(数値は平均値)

ii) 次に犬、人および家兎血清に就いて融血血清と非融血血清内で夫々に24時間および48時間飼育を行い、その脱皮数と体長、体巾の測定を行つた。犬の融血、非融血血清内での脱皮は24時間後、前者は10隻中3隻、後者では8隻中2隻の第IV期仔虫を認め、48時間後、前者は9隻中2隻、後者では同様11隻中2隻のIV期仔虫を認めた。人融血血清内では24時間後8隻中2隻、48時間後のものでは9隻中3隻の第IV期仔虫を認め、又家兎の融血血清においては24時間後には脱皮したものを認めなかつたが48時間後に9隻中3隻に脱皮發育している仔虫を認めた。

第4表

1) 犬融血血清内飼育24時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 7 \\ \text{IV} : 3 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.54	0.025	な	し
2	III	0.61	0.025	〃	〃
3	III	0.56	0.020	〃	〃
4	III	0.58	0.025	〃	〃
5	III	0.55	0.028	〃	〃
6	III	0.59	0.025	〃	〃
7	III	測定不能	〃	〃	〃
平均		0.572	0.0252		
8	IV	0.53	0.032	0.014×0.013	
9	IV	0.67	0.035	0.018×0.015	
10	IV	0.74	0.030	0.017×0.014	
平均		0.647	0.0317	0.0163×0.014	

2) 犬非融血血清内飼育24時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 6 \\ \text{IV} : 2 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.62	0.025	な	し
2	III	0.53	0.025	〃	〃
3	III	0.48	0.024	〃	〃
4	III	測定不能	〃	〃	〃
5	III	測定不能	〃	〃	〃
6	III	測定不能	〃	〃	〃
平均		0.543	0.0246		
7	IV	0.58	0.03	0.015×0.014	
8	IV	測定不能	〃	あ	り

第5表

1) 犬融血血清内飼育48時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 7 \\ \text{IV} : 2 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.58	0.025	な	し
2	III	0.58	0.025	〃	〃
3	III	0.56	0.025	〃	〃
4	III	0.58	0.025	〃	〃
5	III	0.57	0.028	〃	〃
6	III	測定不能	〃	〃	〃
7	III	測定不能	〃	〃	〃
平均		0.57	0.0258	0.0175×0.0145	
8	IV	0.72	0.04	0.017×0.013	
9	IV	0.71	0.03	0.018×0.016	
平均		0.715	0.035		

2) 犬非融血血清飼育48時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 8 \\ \text{IV} : 2 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.65	0.030	な	し
2	III	0.58	0.025	〃	〃
3	III	0.69	0.025	〃	〃
4	III	0.68	0.025	〃	〃
5	III	0.58	0.028	〃	〃
6	III	0.62	0.028	〃	〃
7	III	測定不能	〃	〃	〃
8	III	測定不能	〃	〃	〃
平均		0.633	0.0267		
9	IV	0.75	0.038	0.017×0.015	
10	IV	0.63	0.028	0.018×0.015	
平均		0.69	0.033	0.0175×0.015	

E) 第III期仔虫飼育時における光および飼育器の影響  
第III期仔虫が融血血清内で脱皮發育する事を確認したがこれに対し光線が影響するか否かを検討する為、飼育

器としてホールグラスとグラスフィルターの2つを用い、夫々60W電燈直下と暗箱内た置いて24時間および48時間飼育を行った。ホールグラス内飼育では48時間目に

第 6 表

1) 人融血血清内飼育24時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 6 \\ \text{IV} : 2 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.56	0.024	な	し
2	III	0.49	0.025	〃	〃
3	III	0.48	0.025	〃	〃
4	III	0.68	0.023	〃	〃
5	III	0.59	0.025	〃	〃
6	III	0.52	0.023	〃	〃
平均		0.553	0.0242		
7	IV	0.67	0.032	0.018×0.012	
8	IV	測定不能		あ	り

2) 家兎融血血清内飼育24時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 11 \\ \text{IV} : 0 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.73	0.025	な	し
2	III	0.67	0.025	〃	〃
3	III	0.59	0.025	〃	〃
4	III	0.58	0.025	〃	〃
5	III	0.56	0.020	〃	〃
6	III	0.56	0.025	〃	〃
7	III	0.59	0.025	〃	〃
8	III	0.73	0.025	〃	〃
9	III	測定不能		〃	〃
10	III	測定不能		〃	〃
11	III	測定不能		〃	〃
平均		0.626	0.0244		

第 7 表

1) 人融血血清内飼育48時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 6 \\ \text{IV} : 3 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.69	0.025	な	し
2	III	0.62	0.025	〃	〃
3	III	0.77	0.025	〃	〃
4	III	0.62	0.025	〃	〃
5	III	0.69	0.025	〃	〃
6	III	0.72	0.030	〃	〃
平均		0.682	0.0263		
7	IV	0.95	0.038	0.018×0.015	
8	IV	0.84	0.030	0.017×0.015	
9	IV	0.50	0.030	あ	り
平均		0.77	0.327	0.0175×0.015	

2) 家兎融血血清内飼育48時間後 $\left[ \begin{matrix} \text{III} : 6 \\ \text{IV} : 3 \end{matrix} \right]$

虫番号	期別	体長	体幅	口囊原基	
1	III	0.64	0.025	な	し
2	III	0.63	0.025	〃	〃
3	III	0.21	0.025	〃	〃
4	III	0.61	0.025	〃	〃
5	III	測定不能		〃	〃
6	III	測定不能		〃	〃
平均		0.622	0.025		
7	IV	0.89	0.038	0.022×0.020	
8	IV	0.78	0.032	0.015×0.015	
9	IV	測定不能		0.015×0.018	
平均		0.838	0.035	0.0173×0.0176	

13隻中1隻に明らかに口囊原基を有する仔虫を暗箱内で認め、またフィルター内飼育では24時間目に明暗各々に1隻づつ第IV期仔虫を認めた。第III期仔虫より第IV期仔虫に移行する際には光線はほとんど影響を与えないものと思われる。

第 8 表

飼育器	番号	虫体数	24時間		48時間	
ホールグラス内飼育	1	17隻	暗	III 14	III 12	
			明	IV 0	IV 1	
	2	10隻	暗	III 9	III 9	
			明	IV 0	IV 0	
フィルター内飼育	1	—	暗	III 8	III 8	
			明	IV 1	IV 1	
	2	—	暗	III 7	III 7	
			明	IV 1	IV 1	

第9表 明暗に対する第III期仔虫の脱皮数の時間的観察

仔虫部位採位	光条件	フタ番号	仔虫数	時 間						
				1.5	3	4	5	6	7	
肺	暗	1	12		1				2	
						1			2	1
							1			
					3				1	
										2
	明	2	15						2	
										1
筋肉	暗	1	5							
	明	2	6							

又電燈下のものと暗箱内のものとの脱皮数を時間的に観察したが特に差は見られなかつた。

2) 筋肉より採集した仔虫を用いた場合

筋肉より採集した第Ⅲ期仔虫を小型 No. 4 グラスフィルター内で同様に犬融血血清を用いて飼育したが第Ⅳ期への脱皮発育は全く認められなかつた。

第10表 筋肉より採集した仔虫の飼育

番 号	仔 虫 数	24 時 間			48 時 間		
		第 Ⅲ 期	第 Ⅳ 期	殻	第 Ⅲ 期	第 Ⅳ 期	殻
1	33	18	0	0	—	—	—
2	34	34	0	0	—	—	—
3	33	21	0	0	21	0	0

II. 第Ⅲ期仔虫より第Ⅳ期への脱皮状況

観察方法

オブジェクトガラスの中央に約 2 × 2 cm の丁度カバーガラスの辺縁が着着する様に高さ約 2 mm 程度のパラフィン堤を作り、その中に第Ⅲ期仔虫を犬融血血清数滴と共に入れ、カバーガラスで覆つた後、蒸発により血清の濃縮を防ぐ為、間隙をパラフィンで密封した。又この際血清を空気に接触した状態に保たせる為、気泡を同時に封入した。顕微鏡は約 60 × 50 × 30 cm 大の 37°C の恒温箱に納め、採光は強力な Köhler 照明を用い、恒温箱の一方のガラス壁を通して行つた。顕微鏡の対眼鏡筒は 2 又のものをを用い、その一方に 16mm 映画撮影機を取りつけ必要に応じて撮影した。

脱皮状況

第Ⅲ期仔虫は観察装置に入れた直後より活潑な運動を続け数時間の後やや緩慢となる。それ等仔虫の中には頭部に Y 字型或は φ 字型の線様構造もつたものも認められる。その後頭部に円形様構造が現われはじめ、漸次円形構造が明瞭になつて来、一見第Ⅳ期仔虫の口囊原基を思わせる。然しその口囊原基に相当する構造は不明瞭で、その中央には縦に走る中隔様の陰影が認められる。次に虫体側側に間隙が認められる様になり、虫体が収縮して尾端の間隙が時間の経過と共に拡大し、仔虫が頭部から脱皮を始める。脱皮は運動の活潑なものでは数分間で完了するが半ば脱皮した状態で数時間静止しているものも見られた。又一部には尾端と頭端両方に間隙をもつたものがあつた。脱皮した仔虫は第Ⅳ期の特徴である口囊原基を持ち、その輪廓は明瞭となり中隔様構造は消失す

る。写真 4, 5, 6, 7, 8 及び 9 は頭部の形態の推移を示したものである。

III. 非固有宿主体内より得られた第Ⅲ期鉤虫仔虫の飼育に就いて

固有宿主である犬の肺より採集した第Ⅲ期仔虫を犬血清、人血清および家兎血清を用い、フィルター内で第Ⅳ期にさせ得たのでⅣ期仔虫に脱皮発育するに要する条件を更に検討する為に非固有宿主体内にて発育した第Ⅲ期仔虫の飼育を試みた。

実験方法および成績

上記新瓦培養法に依り得た第Ⅱ期鉤虫仔虫の浮遊液を前章と同様にして約 1,000 隻を約 50 瓦のラットの腹部皮下に注入し、一定時間後ラットを屠殺し夫々筋肉および肺を別々に取り出しこれを細切して温水中に浸し、遊出する第Ⅲ期仔虫を採集した。第Ⅱ期仔虫をラットに注入後 24 時間目の肺および筋肉よりの第Ⅲ期仔虫採集率は第 9 表の如く 2 時間に亘つて観察した結果、温水中に浸した後 30 分で 2 時間の遊出仔虫数の約 50 ~ 70%、1 時間で約 80% の遊出率をみた為以後第Ⅲ期仔虫の採集は温水中に浸漬後 1 時間で行つた。

第11表 ラットの肺及び筋肉よりの第Ⅲ期仔虫採集率

時 間	筋 肉			肺		
	仔虫数	合計数	%	仔虫数	合計数	%
1	15'	259	259	16	16	
	35'	38	297	6	22	47.8
	45'	23	320	1	23	
	1°00'	80	400	11	33	70.8
	1°30'	16	416	6	34	
2	2°00'	64	480	8	40	
	15'	396	396	4	4	
	30'	46	452	1	5	50.0
	45'	18	470	1	6	
	1°00'	25	495	1	7	70.0
3	1°30'	49	544	2	9	
	2°00'	39	583	1	10	
	15'	274	274	8	8	
	30'	40	314	2	10	62.5
	45'	33	347	1	11	
3	1°00'	23	370	1	12	75.0
	1°30'	27	397	3	15	
	2°00'	20	417	1	16	

又第Ⅱ期仔虫をラットに注射した後、第 1 日目 (48 時間) より第 7 日目まで 40°C 温水中約 1 時間後において夫々の第Ⅲ期仔虫の採集率を見ると筋肉からは日数の経過と共にやや採集率の低下する傾向がみられるが著しい差

は認められず、少くとも7日以内では適時に第Ⅲ期仔虫の採集を行うことが出来る事を知った。但し肺からの採集率は最初の24時間目が最も多く48時間では激減する事が知られ、この場合少くとも48時間以内に採集すべきである事を知った。

第12表 第Ⅱ期仔虫注入後第1日目より第7日目までの第Ⅲ期仔虫採集率(40℃温水中1時間)

仔採部 虫集位	ラット内の期間(日)							
	1	2	3	4	5	6	7	
筋肉	1	400	256	193	478	154	449	129
	2	485	291	307	261	129	144	167
	3	370	136	113	201	291	207	202
肺	1	32	5	0	0	1	0	0
	2	7	6	1	0	0	0	0
	3	12	6	1	0	0	0	0

a) 以上の結果よりラットより採集した第Ⅲ期仔虫の夫々肺からの24時間目のものおよび48時間目のもの、又筋肉からの第1日目のものから第7日目のものまで各々別々に犬融血血清内で飼育を試みた。

第13表 ラット体内より取出した第Ⅲ期仔虫の犬融血血清内飼育

採集部 位	飼育 時間	ラット体内日数							
		1	2	3	4	5	6	7	
筋肉	24時間	A { III	598	163	391	112	323	—	—
		IV	0	0	0	0	0	—	—
		殻	6	0	1	0	0	—	—
	48時間	B { III	208	225	402	291	566	—	—
		IV	0	0	0	0	0	—	—
		殻	2	0	2	0	0	—	—
肺	C { III	590	243	225	354	213	827	661	
	IV	0	0	0	0	0	0	0	
	殻	2	0	5	0	0	0	0	
肺	24時間	A { III	10	2	—	—	—	—	—
		IV	0	0	—	—	—	—	—
		殻	0	0	—	—	—	—	—
	48時間	B { III	5	5	—	—	—	—	—
		IV	0	0	—	—	—	—	—
		殻	0	0	—	—	—	—	—

以上ラット体内で发育した第Ⅲ期仔虫は犬血清内においてその肺および筋肉夫々の採集部位に関係なく、又血清内24時間および48時間後のもの何れも第Ⅳ期仔虫に脱皮发育する事なく亦虫体の形態にも何等変化を認める事が出来なかつた。

筋肉より取出したもので1時間目および3時間目のものに脱皮殻が見られたが第Ⅳ期仔虫は全く認められなかつた。

つた。

b) 第Ⅲ期仔虫がⅣ期仔虫に脱皮发育する為には固有宿主又はそれに極く類似の血清成分が必要であると思われたので第Ⅱ期仔虫をラットに感染させると同時に犬血清を0.5cc宛毎日注射し、日を追つてラットを屠殺してその腹筋より採集した第Ⅲ期仔虫をも犬血清を用いて飼育したが第14表の如く肺および筋肉より採集した第Ⅲ期仔虫は96時間後のものも、また48時間飼育したものにおいても第Ⅳ期仔虫に移行させる事が出来なかつた。

第14表 日を追つて犬血清を注射したラットの肺及び筋肉より採集した第Ⅲ期仔虫の犬融血血清内飼育

犬血清	24時間飼育				48時間飼育	
	0.5cc	0.5cc	0.5cc	0.5cc	24時間飼育	
					48"	72"
1 { III	767	0	—	—	—	—
2 { III	420	0	—	—	—	—
3 { III	—	—	473	—	—	—
4 { III	—	—	713	—	—	—
5 { III	—	—	—	478	60	704
6 { III	—	—	—	719	—	—
7 { III	—	—	—	—	644	—
8 { III	—	—	—	—	284	—

以上の成績より第Ⅳ期仔虫への脱皮发育は固有宿主体内で且肺より採集した第Ⅲ期仔虫のみにその条件を備えているものと考えられる。

IV. 第Ⅲ期鉤虫仔虫の趨向性に就いて

第Ⅲ期仔虫が固有宿主である犬血清および非固有宿主である人血清および家兎血清内において一部第Ⅳ期仔虫に脱皮发育する。従つてこれ等の血清に対しても同じ様に趨向性を示すか否かを検討した。

実験材料および方法

第Ⅲ期仔虫は前章と同じ方法により採集し顕微鏡観察を行い、同様に底の浅いシャーレに1%の寒天水を流しその中央とその周囲の等距離の所に写真10の様な真チュー管により凹部を作つた。凹面の内径は0.8 cm、深さ

0.5cmで中央より各凹面までの距離は 0.5 cm である。次に中央に第Ⅲ期仔虫を入れ、その周囲の凹部に夫々水道水、5%糖液、腸内容物の濾過液、ラット血清、家兎血清、人血清および犬血清等各種のメジウムを入れた。以上の操作の後中央池と周囲池の間を安全カミソリを用い、出来る限り同じ深さに溝を切り37°Cの孵卵器内に移し適時その移行状況を観察した。

1) 固有宿主の体内成分に対する趨向性

最初固有宿主である犬の体内成分に対する趨向性を見る為、周囲の凹部に水道水、5%糖液、腸管内容物濾過液、犬血清を入れた。

第Ⅲ期仔虫は水道水、5%糖液、腸管内容物濾過液等にはほとんど趨向性を示さず大多数の仔虫は数時間の後に血清に集まり圧倒的な趨向性を示す事を認めた。

第15表 予備試験

試液		14時間後 仔虫数
中 央	水 道	7
水 道	5%糖液	0
5%糖液	犬 血 清	2
犬 血 清	腸 液	23
腸 液	人 血 清	1

第16表 体内成分に対する趨向性

仔虫採集部位	筋 肉		肺			
	1°	12°	1°	12°		
経過時間	1°	12°	1°	12°		
A 中 央	8	4	4	1		
水 道	0	0	0	2		
5%糖液	0	0	0	0		
犬 血 清	5	7	1	1		
腸 液	0	0	0	0		
人 血 清	1	9	0	0		
経過時間	2°	24°	2°	24°		
B 中 央	11	4	4	3		
水 道	0	1	1	2		
5%糖液	1	2	1	3		
犬 血 清	93	12	8	3		
腸 液	2	4	1	2		
人 血 清	23	12	8	5		
経過時間	1°	2°	3°	1°	2°	3°
C 中 央	11	10	7	41	29	19
水 道	0	1	4	0	2	5
5%糖液	1	2	1	0	1	5
犬 血 清	43	60	22	7	13	15
腸 液	1	2	3	1	1	7
人 血 清	45	44	18	7	11	17

2) 各種血清に対する趨向性

次いで各種動物の血清を用い如何なる血清に趨向性を示すかを検討した。

第17表 各種血清に対する趨向性

仔虫採集部位	筋 肉			肺		
	1°	2°	3°	1°	2°	3°
経過時間	1°	2°	3°	1°	2°	3°
A 中 央	69	60	30	21	15	10
水 道	11	11	7	0	0	1
白鼠血清	18	12	14	12	7	2
犬 血 清	115	148	105	33	27	25
家兎血清	14	17	12	5	5	5
人 血 清	41	48	44	38	24	26
経過時間	1°	3°	24°	1°	3°	24°
B 中 央	46	38	29	19	12	6
水 道	5	6	4	6	6	6
白鼠血清	3	3	3	2	1	0
犬 血 清	9	15	17	10	10	10
家兎血清	6	9	15	4	2	3
人 血 清	14	13	15	7	8	5
経過時間	1°	3°	24°	1°	3°	24°
C 中 央	15	8	2	20	13	0
水 道	2	2	4	2	1	4
白鼠血清	10	7	2	2	3	5
犬 血 清	13	11	3	7	5	4
家兎血清	5	7	0	1	3	2
人 血 清	14	5	2	23	23	3

ラットおよび家兎血清に対しては大抵の場合数隻の仔虫が見られるのみでほとんど趨向性を示さず、固有宿主である犬血清に対してはやはり常に圧倒的な趨向性を示し、操作方法を考慮する余地はない様に思われた。人血清に対してはそれが非固有宿主であるにも拘らず犬血清に劣らぬ趨向性を示し、場合によつては犬血清以上にその趨向性の強さを思わせるものがあつた。この事から人血清は第Ⅲ期仔虫の生存或いは発育に必要な要素を犬血清と同程度に具備しているものと推察される。

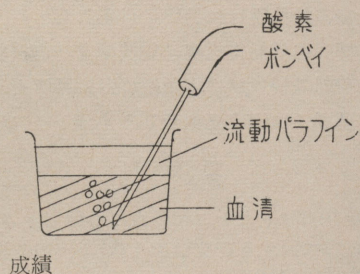
V. 第Ⅲ期鉤虫仔虫の酸素消費に就いて

固有宿主である犬より採集した第Ⅲ期仔虫の中、肺より取出したものののみ血清飼育によつて第Ⅳ期への脱皮を起し、筋肉より取出したものでは全く脱皮発育を認める事が出来なかつた。そこで肺および筋肉より取出した第Ⅲ期仔虫の飼育液中の酸素量の測定を試みた。

測定方法

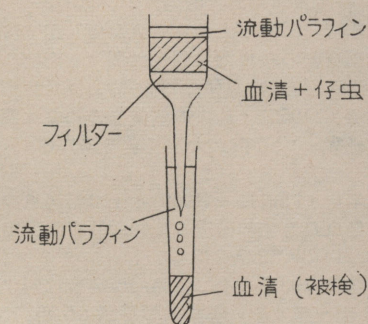
犬より股動脈、心穿刺にて溶血しない様に採血した血液を直ちに流動パラフィン管壁に塗布した大型スピッツグラスに入れ血清を遠心分離しこれにペニシリン、ストレプトマイシン末および0.005%のマーゾニン液数滴

を加え腐敗を防ぎ、且気泡をすぐ消滅させる目的でシリコンを少量加えた後、流動パラフィンによつて空気との接触を断つた。次いで酸素ポンベに1/2注射針を付けたゴム管を連結し上記血清内に10分間通気を行い酸素を混入させた。予め用意した No. 4 グラスフィルターに仔虫を入れ水を除いた後、上記血清を 2.5cc づつ分注し直ちに流動パラフィンで覆い、次いで注射器で吸引してグラスフィルターの下端まで血清を充たした後ゴム栓を施し、37°C の孵卵器内に入れた。1 時間、2 時間および 3 時間後流動パラフィンを張つた小試験管にフィルターを通じて飼育液を流入させた。これより仔虫と被検飼育血清とが完全に分離し得た。そしてその血清内の酸素量を van-Slyke 法により測定した。



成績

第3図 血清内酸素混入法



第4図 飼育液採取法

第Ⅲ期鉤虫仔虫飼育液中の酸素消費は筋肉より採集した仔虫群では最高仔虫数 149 隻、飼育後 3 時間においても認められず、肺より採集した仔虫群において仔虫が 100 隻以上のものに僅かに酸素量の減少を認めた (第15表)。

### 考 按

従来第Ⅱ期完熟仔虫を得る為に鉤虫感染犬の糞を等量の炭末と混じり瓦上で培養していた為に大型の器物と広い場所を必要とした。私の培養法により小型の器具で純粋

第18表 第Ⅲ期仔虫の飼育液—血清の酸素量の消長

実験番号	時 間	筋肉より採集した仔虫		肺より採集した仔虫		対 照
		酸素量 (vol%)	仔虫 数	酸素量 (vol%)	仔虫 数	
No. 1	1°	—	—	0.617	156	0.987
	2°	0.864	98	0.496	138	—
	3°	0.864	149	0.370	—	—
No. 2	1°	0.987	120	0.987	18	0.987
	2°	0.987	111	0.987	32	—
	3°	0.987	146	0.987	28	0.987
No. 3	1°	—	—	0.858	59	0.861
	2°	0.738	88	0.738	73	0.861
	3°	0.738	141	0.738	64	0.861
No. 4	1°	0.650	73	0.602	21	0.722
	2°	0.602	57	0.602	20	0.722
	3°	0.602	23	0.602	6	0.722
No. 5	2°	0.834	105	0.834	108	1.076
	3°	0.834	85	0.598	160	0.969

に多数の仔虫を得る事が出来た。但し糞炭末培地と卵を混和した場合もグラスフィルター内で第Ⅰ期仔虫に孵化させた後そのまま培地に混じた場合には細菌、原虫等が培地に多数繁殖する事が多く仔虫が少数しか得られなかつた。多分、酸素の不足等の発育阻害要素が加つた為と考えられたのでグラスフィルター内で第Ⅰ期に孵化させた後、煮沸滅菌した糞炭末培地の表層に上記仔虫を塗布し空気との接触を良くする様に改良した。この方法により常に多数の仔虫が略々純粋に採集する事が出来た。

鉤虫第Ⅲ期仔虫を体外で飼育し発育させた文献は見当たらない。私はいわゆる第Ⅲ期仔虫を体外飼育し第Ⅳ期に脱皮発育させる事が出来た。第Ⅳ期仔虫へは自然界では皮下、筋肉、肺内等の腸管以外の体内では発育していたのを認めた文献は見当たらないが、体外において体内成分の1つである血清内で第Ⅳ期に脱皮発育させ得た事は興味深い事と思われる。

体外飼育より体内における発育過程および移行経路等を考える事は飛躍であるが、実験的に経路感染後其の肺より採集した仔虫のみが体外飼育により第Ⅳ期に脱皮発育し同一の宿主の筋肉内より採集したものおよび非固有宿主の筋肉内は勿論肺より採集した仔虫も同上の飼育条件下において第Ⅳ期とはならなかつた事は固有宿主の筋肉および非固有宿主の腸管以外の体内では発育をうながす要素の欠けている事が考えられた。酸素消費量も固有宿主の筋肉内より採集した仔虫は肺よりの仔虫と比較して少なかつた事からも発育程度の悪い事が想像された。



中島はラットの筋肉内において経膚感染210日後においても生きた仔虫を認め発育していない事を記載しており、以上の事と考え合せて第Ⅲ期仔虫は他の仔虫の期と異つた蟄居し得る性質をもっている事が想像された。蟄居し得る第Ⅲ期仔虫が筋肉内では発育し得る条件を満たされず肺に入った仔虫のみが発育の軌道を進む事が考えられた。肺より採集した仔虫も犬、人血清でよく第Ⅳ期に脱皮発育するが水中では長く生存はするが脱皮しない事より固有宿主および類似の血清成分が脱皮発育には是非必要な事が想像される。この事は趨向性においても犬、人血清に圧倒的で血清以外のものではほとんど認めなかつた事より脱皮発育には血清成分が重要な役割をもっているものと思われる。然し乍ら自然界では肺内で第Ⅳ期仔虫を認めた文献を見ない事は体内では発育条件が尚不十分な為と考えられる。

私は上記実験中に肺より採集した仔虫の中で第Ⅳ期仔虫は1隻も発見出来なかつた。先に神子および岡田は血清に浸漬した第Ⅱ期仔虫をラットに経膚感染させた場合および家兎に経膚感染後固有宿主の犬および人血清を投与した場合においてその肺内に第Ⅳ期仔虫を少数発見しているが第Ⅳ期への脱皮前の口囊原基様形態を持った仔虫か又は肺より仔虫を採集する過程において脱皮したものかも知れない。

この実験において腸管内の第Ⅲ期仔虫を用いなかつたのは腸管内において第Ⅲ期仔虫のみを撰び出す事は極めて困難であつた為である。腸管内での第Ⅲ期仔虫の発育過程等も今後追求すべき問題と考えている。

以上の実験により鉤虫の卵より第Ⅴ期成虫迄の体外飼育を可能ならしめる基礎を作つたものと考えらる。

### 結 語

1) 固有宿主である犬の肺より採集した第Ⅲ期鉤虫仔虫を体外において犬の融血血清を用いる事により第Ⅳ期へ脱皮発育させる事が出来た。

2) 固有宿主である犬の肺以外の組織(筋肉)および非固有宿主であるラットの体内より採集した第Ⅲ期鉤虫仔虫は犬融血血清を用い2日間飼育したが脱皮発育せず、又ラットに経膚感染後犬血清を連続注射し24時間目より24時間毎に96時間後迄の肺および筋肉内より採集した仔虫はすべて融血血清飼育によつても第Ⅳ期へ移行させる

事が出来なかつた。

3) 第Ⅲ期鉤虫仔虫の趨向性は犬血清に圧倒的であるが人血清に対しても略同程度の成績を示した。

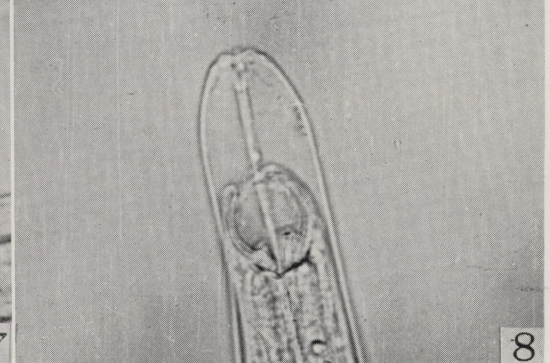
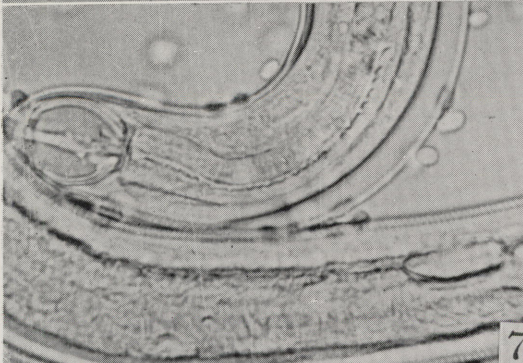
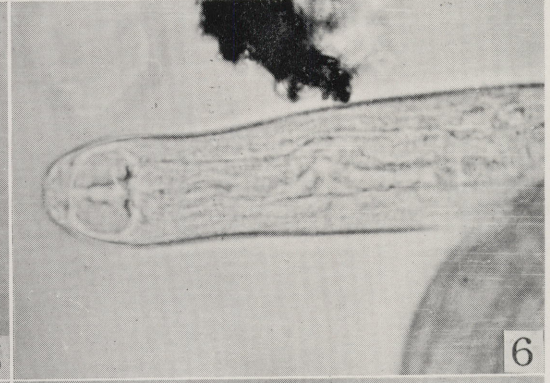
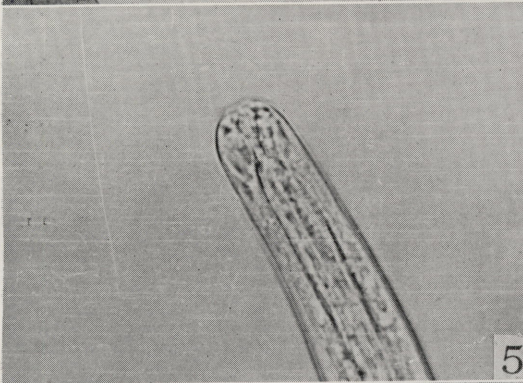
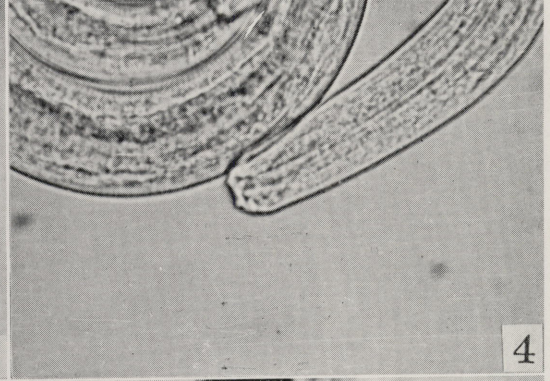
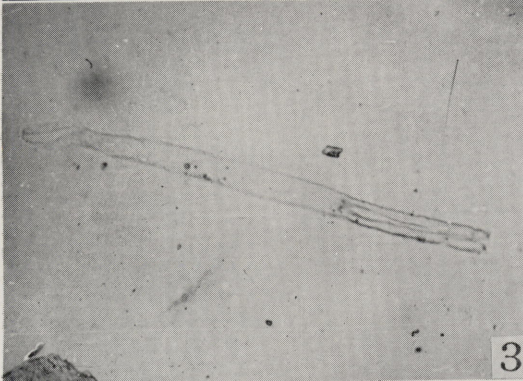
4) 第Ⅲ期鉤虫仔虫の飼育液中の酸素量測定により筋肉より採集したものより、肺より採集したものに僅かの酸素量の減少を認めた。従つて感染後同時期における筋肉内の仔虫と肺内の仔虫ではその発育段階に差異あるものと思われた。

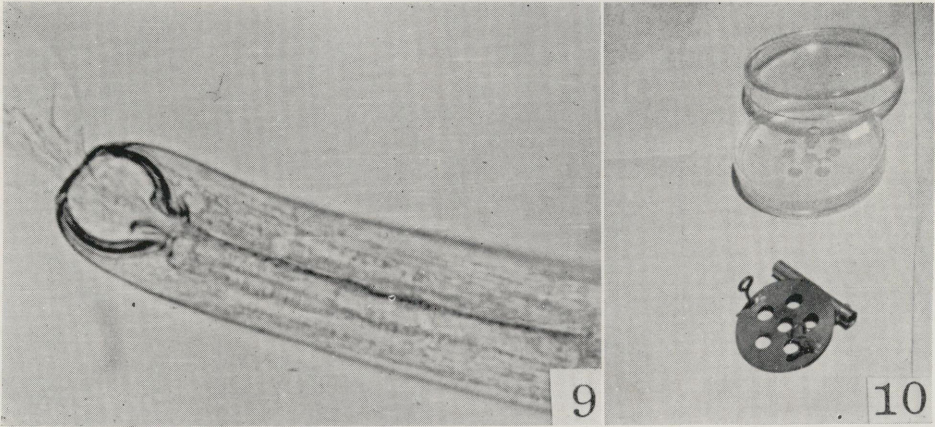
本論文要旨は昭和34年第34回日本寄生虫学会総会(於東京)及び昭和35年6月第29回日本寄生虫学会総会(於札幌)に於いて発表した。尙第Ⅲ期仔虫より第Ⅳ期仔虫への脱皮状況は映画“鉤虫の発育”の一部として昭和34年第15回寄生虫学会近畿地方会(於広島)及び第29回寄生虫学会総会(於札幌)に於いて供覧した。

終りに本研究に終始御指導、御校閲及び御援助を戴いた恩師小田俊郎教授並びに本教室の野田昇博士、楠正知博士及び加藤学士に深く感謝致します。

### 文 献

- 1) 神子謙(1957): 犬十二指腸虫の異種宿主体内に於ける発育に関する研究(第1報), 実験医学雑誌, 23(11), 1667-1680.
- 2) 楠正知(1957): 鉤虫の腸管外寄生に関する実験的研究, 寄生虫学雑誌, 6(2), 215-224.
- 3) 松本季彦(1955): 犬鉤虫成虫の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, 大阪市立大学医学雑誌, 4(4), 389-399.
- 4) 松本恒男(1959): 鉤虫の催貧血性物質に関する実験的研究, 大阪市立大学医学雑誌, 8(5), 618-645.
- 5) 宮川米次・岡田良一(1930): 十二指腸虫の感染に際し仔虫の為す肺循環の生物学的意義, 実験医学雑誌, 14(3), 227-242.
- 6) 中島勝美(1931): 十二指腸虫の発育に関する研究(第1編~第4編), 実験医学雑誌, 15(8), 755-781, 15(9), 843-878, 15(10), 1054-1102, 16(1), 65-78.
- 7) 野田昇(1953): 鉤虫の培養に関する研究(第2編) 日本消化器病学会雑誌, 50(12), 補遺(2).
- 8) 岡田良一(1930): 犬十二指腸虫の経口的並に経皮的感染に関する実験的研究, 実験医学雑誌, (第2, 第3及び第4編), 14(6), 696-708, 15(2), 135-172.
- 9) 鳥居達生(1960): 第Ⅳ期鉤虫の発育に関する研究, 大阪市立大学医学雑誌, 9(9), 235-245.





### 写真説明

1. 経皮感染後4日目の犬の肺より採集した第Ⅲ期仔虫
2. 小腸液・融血血清等量混和液内飼育24時間後の第Ⅳ期仔虫
3. 飼育液内に見られた脱皮殻
- 4~9. 第Ⅲ期仔虫の犬融血血清内飼育中に見られた頸部の形態
10. 第Ⅲ期鉤虫仔虫の趨向性の実験に用いた装置

## BIOLOGICAL STUDIES ON THE THIRD STAGE LARVAE OF CANINE HOOKWORM

JUN SAWADA

(*Department of Internal Medicine, Medical School, Osaka City  
University, Osaka, Japan*)

The present study was designed to maintain the canine hookworm *in vitro*, especially to develop from its 3rd stage larvae to the 4th one. Furthermore, biological characters of them were also investigated. The 3rd stage canine hookworm larvae were obtained from lungs and muscle of the experimentally infected dog with a large amount of the 2nd stage larvae collected by means of newly devised culture method. The 3rd stage larvae thus obtained were maintained in the glass filter funnel No. 4 (commonly used in the chemical experiment), the end of which was fitted with rubber cap, containing haemolized canine sera, filtrate of host intestinal contents, and of host liver homogenate and human haemolized sera as a culture medium at 37°C.

1) These experiments indicated that some of the larvae thus treated developed to the 4th stage after 24- and 48-hour incubation. The development of the larvae from the 3rd to 4th stage, especially morphological change in the larval head part, the formation of primordial buccal cavity and exsheathment (molting) could be observed under the microscope and recorded in the movie film of 16 mm.

2) The 3rd stage larvae taken from the canine muscle and from the rats which have been regarded as non-proper host to this parasite showed no development to the 4th stage in any culture medium used.

3) The 3rd stage larvae showed bairly positive taxis to the canine sera as compared with tap-water, 5% succharose, the filtrate of the host intestinal contents. Such a positive taxis of them to the human sera was also observed.

4) The oxygen uptake by the 3rd stage larvae collected from the host lungs was higher than those from the host muscle.