

強制投与方法と自然吸血法により摂取された フィラリア幼虫の蚊体内における発育の比較

神 田 錬 蔵

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部 (主任 佐々学教授)

(昭和 38 年 7 月 1 日受領)

はじめに

フィラリアの中間宿主の伝搬の機構の定量的な追及については、従来数多く報告されているが、Lavoipiere (1958)はこれに関する 1878 年から 1957 年に至る間の知見をまとめており、それ以後の主なものでは、Jordan (1961)、Beye *et al.* (1960)はバンクロフトおよびマレー糸状虫について、Kershow (1953)は犬糸状虫についての報告がある。すべてこれらの報告は、自然吸血法によつて推測的に定量を論じたものばかりである。

実測的に定量投与を確認して、このフィラリア伝搬の機構を追及するために、バンクロフト糸状虫とその中間宿主である広義のアカイエカ *Culex pipiens* Linnaeus, s.l. について、つぎにのべるような方法で実験を試みた。末梢血にマイクロフィラリア (以下 mf とする) を認める宿主血液を採つて、mf を分離し、定量的に投与して、蚊体内で発育したフィラリア幼虫を認め、第 III 期幼虫の感染型に達していたものをえたので報告する。

実験方法

a) 実験材料

奄美大島古仁屋の自然界に繁殖中のアカイエカ幼虫および蛹を採集して飼育し、羽化後 1~2 日の雌に対して、バンクロフト糸状虫保持者の血液から分離して投与した。

ここに用いた mf の材料は、夜間末梢血 30 mm³ につき 50 匹以上の mf をみとめるものを選び、静脈血 10 cc を採取して mf を分離するために次の溶血方法をそれぞれ行なつた。

b) 溶血方法

1) 水による溶血法 滅菌蒸溜水約 100 cc に採血液

を上記量混入攪拌して凝固するのを防いで溶血した。ただちに毎分 1,500 回転 2 分間遠心、上清を分離してその沈渣に 5% リンゲル糖液を加えて、再び同様の遠心を行なつて、上清をのぞいて、mf を含む沈渣を投与した。

2) ヘモリジン溶血法 体重 2 kg の家兎 3 匹に血液型をことにする数人の人血球浮遊液を耳静脈より注入して溶血素を作成し、これとはべつに、モルモットの血清から補体を作製して、溶血力価を定めてそれに応じて mf 含有宿主脱線維素血に、それぞれ必要量の溶血素と補体とを加えて、37°C に 30 分間保つて溶血して遠心して、mf を含む沈渣に 5% リンゲル糖液を加えて、同様遠心後 mf をふくむ液を蚊に与えた。

c) 投与方法

蚊を固定し、毛細管に mf 含有液を入れて強制的に摂取させる方法を考案した。蚊がその液を摂取する時、mf が蚊の吻からとりこまれるが、このさい mf の数と摂取される状態とを立体拡大鏡下で確認することができる。

1) 蚊固定方法 蚊をエーテルで麻酔し、先端に小孔を有する直径約 5 mm のガラス管に、小孔から吻をだすように頭を先にして入れて、少量の綿花で後退するのを防ぎ、この蚊の入つたガラス管をスライドガラスの上にセロファンテープで固定する。

2) 毛細管の作製 径約 2 mm のガラス管を加熱して延ばし、吻が入る程度の太さの毛細管を作り、これに mf を含む上記液を毛細管現象によつて吸い上げる。

3) 投与方法 こうして用意したのを立体双眼拡大鏡下で、毛細管を指でささえながら、mf をふくむ液を蚊が摂取できるように、吻の先を毛細管口に入れ、蚊にの

This study was supported by a Public Health Service Research Grant E-3328 from National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health (Report No. 30)

第1表 強制投与方法と自然吸血法によりアカイエカ体内に摂取されて10日間飼育後のフィラリア幼虫の發育状況の比較

(1) 強制投与方法

実験番号	投与 mf 数 (対蚊1匹) (A)	供試蚊 数(B)	剖検(生 存)蚊数 (C)	生存率 (C/B) (%)	フィラリア幼虫保有蚊			中間宿主体内各期 フィラリア幼虫数				發育率% (F/AC)
					数 (D)	保有率(%) (D/C)	感染型保 有蚊(E)	I	II及び III(未 完熟)	III感染 型	総数 (F)	
1	10	102	92	90.2	22	23.9	0	10	18	0	38	4.13
	20	17	6	35.6	3	50.0	0	1	3	0	4	3.33
	30	19	15	78.9	6	40.0	4	4	5	6	15	3.33
	50	50	31	58.3	12	38.7	2	7	8	3	18	1.61
2	2	24	5	20.8	2	40.0	0	1	2	0	3	30.0
	3	5	4	80.0	1	25.0	0	0	2	0	2	16.67
	5	63	33	52.3	11	33.3	0	12	6	0	18	10.91
	10	81	25	30.8	5	20.0	1	3	2	1	6	2.40
	20	26	10	38.4	4	40.0	0	2	5	0	5	2.50
3	10	57	18	31.6	4	22.2	0	3	4	0	7	3.89
	20	2	2	100	1	50.0	1	0	0	1	4	1.0
	50	25	23	92.0	9	39.0	0	3	12	0	15	1.30
4	20	8	4	50.0	3	75.0	2	1	0	3	4	5.0

(2) 自然吸血法

実験番号	宿主末梢血 内 mf 数 130mm ³	供試蚊 数(B)	剖検(生 存)蚊数 (C)	生存率 (C/B) (%)	フィラリア保有蚊			中間宿主体内各期 フィラリア幼虫数				対蚊1匹 發育率 (F/C)
					数 (D)	保有率(%) (D/C)	感染型保 有蚊(E)	I	II及び III(未 完熟)	III感染 型	総数 (F)	
1'	1	93	82	97.8	9	14.4	0	3	7	0	10	0.12
2'	2	20	20	100	6	30.0	0	2	5	0	7	0.35
3'	11	37	30	81.1	7	23.3	1	2	13	1	16	0.53
4'	75	30	25	83.3	10	40.0	2	3	11	3	17	0.60
5'	200	80	54	67.5	43	79.6	5	243	140	29	409	7.51

実験番号1はヘモリジン溶血法, 2: 同法溶血後蚊中腸エマルジョン処置, 3: 水溶血法,

4: サポニン溶血法を行った

ませる。この場合に、mf が蚊の吻から摂取されるのを1匹づつ数えて、所要数のmf を蚊にのみさせることができる。

d) 蚊の飼育

一定数のmf を投与した蚊は、すぐさまガラス管から取り出して飼育ケージに放ち、3%蔗糖液を与えて、30~20°Cの室温78~85%の湿度に保つて飼育した。死亡した蚊は12時間以内に全部剖検し、一定期間飼育後すべて剖検に供した。

実験結果

1) アカイエカ体内に摂取されたフィラリア幼虫の發育状況

このように蚊にmf を投与して、10日間飼育後に剖検して、蚊の体内でのフィラリア幼虫の發育状況をしらべた結果は、第1表に示す通りである。

各実験mf の分離の方法をそれぞれ、実験1はヘモリジン溶血法、同2は同法溶血後蚊中腸エマルジョン処置、同3は水溶血法、同4はサポニン溶血法を行なった。どの実験も投与mf 数とは関係なく、發育状況は多様であるが、蚊の体内でフィラリア幼虫第三期の感染型である完熟状態にまで發育が進んでいたものを、合計14匹をえた。

發育途中のもの各実験多数をえており、感染型の場合と同じように、mf 分離溶血の方法による差異を認めることができ難い。実験2は投与数の割合に發育したの多く、フィラリア幼虫の發育率を蚊体内で發育した数(F)の投与したmf 数(A)と剖検した蚊の数(C)との積に対する比率として、その發育状況を比較するに、各実験とも、mf を少数投与した場合は、多数投与した場合に比して、溶血方法に関係なく高値を示し、実験2に

明らかであつた。

フィラリア幼虫保有蚊の数について各実験各群を比較するに、結果は、多様で一定の傾向を示さなかつた。感染型フィラリア幼虫保有蚊数は、実験1ではmf 30匹投与群の4匹とmf 50匹投与群の2匹で、実験2ではmf 10匹投与群に1匹、実験3ではmf 20匹投与群1匹、実験4では2匹であつた。

供試蚊の10日間飼育後の生存率あるいは死亡率は、投与したmf数に関係のない値を示した。

また溶血方法による差異も認めたいが、蚊の中腸エマルジョンで処置した場合は蚊の死亡率が他に比し高値を示した。

自然吸血法によつて摂取した蚊を対照にとると、蚊の死亡率は、宿主末梢血内mfの密度の高い程高く、蚊1匹に対するフィラリア幼虫の發育比も同様高値を示し、多数の感染型幼虫をえ、強制投与法の及ばない結果を示した。

実験では、ヘモリジン溶血をしてmfを分離した後蚊の中腸エマルジョンに1時間処置して蚊に投与した。これは多数のフィラリアが、強制投与後に排泄されてしまうのを防ぐために試みたものである。結果は先にのべた通りであるがなお検討を要するものと思う。

2) mf 摂取についての観察

mf 保有液を蚊がとりこむ時、mf は液の流れとともに蛇様運動をしながら毛細管内に入れた吻口に向つて移動する。その移動速度は、血液沈渣の固形小片などの速度と変らない。

多数のmf が毛細管内吻口の先に集つてからみあつた

場合、mf がとりのこされて液だけ摂られることもある。これはmfの密度の高い場合に多く認められた。

これとは別にmfを血液有形成分から分離する操作がmfに如何に影響するかを知るために、犬糸状虫およびコトナラットフィラリアmfの運動を観察した結果を第2表に示す。

この観察には、分離操作の内、水による溶血法とサポニンによる溶血法をして遠心分離をバンクロフトの場合と同様の方法をやり、対照に遠心操作をぬいた5%リンゲル糖液内に脱線維素血を等量、全血 $1/10$ 量をまぜた場合をとつた。mfの運動回数はmfの長軸に関し1側えの頭部の振れの回数をとつて比較した。

犬糸状虫の場合は時間経過しても運動回数がとくに変わる傾向はなく、各種処置法による差異を認めなかつた。1分間最高80回最低54回で平均して個体差および同一個体でもその時により変異があるが70~60回が普通であつた。

コトナラットフィラリアの場合も同様の観察をしたところ犬糸状虫の場合と同様に、各種処置法による差異を認めなかつた。時間的経過をみると24時間後は直後30分後に比して、1分間の運動回数は明らかに少なくなつていた。実験1および2共に採血後は、無菌的に上記操作をして、綿栓をしたスピッツグラスに入れて、室温(15~20°C)下においた。用に臨んでホールスライドグラスにとりだして、直ちにmfの運動をしらべた。

このような観察を行なつて、同一のmfについてもその運動回数に変動がありまた個体によつても差異を認めたい傾向

第2表 犬糸状虫及びコトナラットフィラリアのmfの運動に及ぼす各種処置法の影響の比較

実験番号	時間	A						B						C						D					
		*	1	2	3	4	5	\bar{x}	1	2	3	4	5	\bar{x}	1	2	3	4	5	\bar{x}	1	2	3	4	5
1	0	67	68	66	75	71	70	72	70	65	69	80	71.2	71	69	68	78	73	71.8	68	74	69	74	73	71.6
	30'	68	67	76	68	66	69	65	80	71	67	68	70.5	67	63	75	71	70	69.2	71	63	65	69	72	68
	90'	57	73	62	74	56	64.4	64	68	62	59	78	66.2	63	61	67	66	75	66.4	58	64	67	74	61	64.8
	24°	66	73	69	67	64	67.8	63	68	65	66	66	65.6	71	67	65	63	66	66.4	75	54	66	68	65	65.8
2	0	143	137	105	125	130	148	122	138	121	137	121	127.8	134	127	127	129	136	130.6	129	111	145	125	136	129.2
	30'	121	109	119	116	128	114.6	141	128	120	118	132	127.8	143	128	130	117	125	128.6	109	130	139	126	137	128.2
	90'	69	71	68	98	105	82.2	88	90	63	67	73	76.2	74	80	54	106	91	61	98	61	103	60	85	81.4
	24°	69	71	68	98	105	82.2	88	90	63	67	73	76.2	74	80	54	106	91	61	98	61	103	60	85	81.4

実験番号1：犬糸状虫のマイクロフィラリア (mf) 同2：上コトナラットフィラリアのmfを使用

A：水による溶血法，B：サポニンによる溶血法，C：mfを含む脱線維素血1容+5%リンゲル糖液1容

D：全血1容+5%リンゲル糖液9容

*：mfの番号， \bar{x} ：平均値

数値は毎分のmfの長軸に関して1側に振れる頭部の運動回数

を示した。このことは行つた分離溶血などの操作によつて mf が弱められるとは思われない。

自然吸血法に比し、強制投与法では蚊体内でのフィラリア幼虫の発育率が低いことを更に検討するために、次の実験的観察を行なつた。

3) 摂取された液および mf の行方

第3表 強制投与法により摂取された液の蚊消化器系内の分布の比較(+)：多量，(+)少量，(-)：認めない

投 与 液	供試蚊数	投与液の消化器内分布状況					
		腹側	食道	嚢	腸	管	
5%糖液(エオジン着色)	43	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
5%糖液(墨汁添加)	50	34	9	0	0	3	40
血液(全血)	4	38	12	0	0	8	32
溶血液上清(5%加糖)	6	2	1	1	3	1	0
溶血液沈渣(5%加糖)	10	6	0	0	1	1	4
		3	3	4	0	3	5

第4表 強制投与法により摂取されたフィラリアの蚊体内時間的消長

時間	供試蚊数	投与 mf 総数 (A)	腹側食道嚢内フィラリア			中腸内フィラリア			腹腔内フィラリア	
			保有蚊数	フィラリア数(B)	B/A (%)	保有蚊数	フィラリア数(C)	C/A (%)	保有蚊数	フィラリア数
0	10	60	10	53	88.3	5	7	11.6	0	0
4	6	45	1	1	2.2	5	20	44.4	0	0
8	9	90	2	6	6.6	7	23	25.5	5	6

第5表 強制投与法により摂取されたフィラリアの24時間後の行方の比較

溶血方法	投与 mf 数 (A)	供試蚊数 (B)	投与 mf 総数 (AB)	フィラリア保有蚊数 (C/B) 率 (%)		蚊体内フィラリア数				蚊1匹平均保有率 (D/C)	排泄物中検出フィラリア		蚊1匹平均排泄率
				数 (C)	率 (%)	頭部	胸部	腹部	計 (D)		数 (E)	排泄率 (E/AB%)	
水	10	21	210	8	33.3	0	4	33	37	4.62	162	77.0	7.7
ヘモリジン	10	21	210	13	62.0	1	29	7	37	2.84	171	81.4	8.1
サポニン	10	10	100	6	60.0	4	3	4	11	1.66	89	89.0	8.9
対照 (自然吸血)	宿主末梢血中 200/30 mm ³	10	—	10	100	1	103	157	261	26.1	27	—	2.7

について追及した結果を第3表および第4表に示す。

着色した5%糖液を与えると、投与直後の蚊を剖検して、着色液は全例ともおもに腹側食道嚢に入っており、中腸内には3例少量の色素液を認めたにすぎない。人血液自然吸血満腹蚊は、すべて主に中腸に入り、一部の蚊に腹側食道嚢にも血液をみとめた。ヘモリジンで溶血した血液を5%糖液にして、遠心した上清を投与すると全例とも腹側食道嚢に入っており、2例では1部分中腸内に入っていた。沈渣では、腹側食道嚢に認めないもの40%、中腸内に認めたもの50%であった。

次に mf がこの沈渣と共にとりこまれたのちの蚊体内の分布状況は、直後では腹側食道嚢にあるもの88.3%を示したが、4時間後では2.2%、8時間後では6.6%に減少し、逆に中腸には直後11.6%、4時間後44.4%、8時間後25.5%を示した。腹腔内に検出した mf は8時間後に5例の蚊に6匹を認めた。かくて、mf は蚊に摂取されて、はじめ腹側食道嚢に大部分が入り、時

間と共にこれが減少し、中腸の方は増加してから減少し、数時間後には少くも一部は腹腔内に侵入することが分つた。

4) フィラリア幼虫の行方を更に追及するため排泄と蚊体内分布を検べた結果を第5表に示す。

蚊に mf を10匹づつ投与して密閉したビニールの小袋内に個別に飼育して、24時間後まで生存した蚊を剖検し、ビニール小袋内面に排泄された mf を検索した。蚊のフィラリア保有率は強制投与法では、ヘモリジン溶血分離法では62.0%で最高、サポニン溶血分離法60%、水溶血分離法33.3%であったが、対照に自然吸血させた群では100%であった。蚊1匹の平均幼虫保有数は、水溶血分離法の4.62が最高で他はこれよりも低値で、自然吸血群は26.1を示した。

ビニール小袋に排泄された虫体には脱皮しないままのもの、脱皮したものとが認められ、水溶血分離法で供試蚊21匹で162匹のフィラリア幼虫の排泄を、ヘモリ

ジン法では29匹の蚊で171匹の幼虫排泄を、サポニン法では蚊10匹について89匹を排泄し、自然吸血法では蚊10匹で27匹を排泄し、蚊1匹の平均排泄率は、強制投与法の7.7~8.9に対し、自然吸血法の2.7を示した。一方フィラリア幼虫の蚊1匹平均保有率は、水溶血法4.62、ヘモリジン法2.48、サポニン法1.66にたいし、自然吸血法26.1であつた。このように強制投与法では大部分が排泄されてしまつて、蚊の体内に保存されるものは少い。

ビニールの小袋に排泄された虫体には、脱皮しないままのものと、脱皮したものとが認められた。

考 察

この実験的観察に、中間宿主のフィラリア伝搬について定量的に追及するにあつて、mfを可視的にする方法として溶血法を試みた。Tsunematsu (1960) は血中トキソプラズマの分離にトリプシンなどを使用している。Sawyer *et al.* (1963) は *Dirofilaria immitis* について、宿主血液からの分離に、サポニン、トリプシン、プロナーゼ、コラゲナーゼ、ストレプトリジンOなどを使用し、更に *in vitro* での培養を行なつて、第1期ソーセージ型幼虫をえ、生存フィラリア幼虫数、発育数が、実験に供した数よりもはるかに少いことから分離方法の検討を要するのべている。

筆者はこれらの方法とは別に、可視的で生理的なメディアウムにmfを分離して、蚊に摂取されてからも自然吸血法の場合と変わらない発育をするように各種の溶血分離法を試みた。

強制投与をしたmfで、蚊体内に侵入して発育するものが少い原因を追及したところ、投与したmfが、一旦腹側食道嚢に入つてから、中腸に行き、一部分は蚊体内に侵入して発育するが、他の大部分は排泄されてしまうことは、投与方法を再検討する必要があると思われる。

この実験で知ることができた事実のうち、投与mfが一旦腹側食道嚢に入つてのちに、中腸にすすみ、その一部が蚊体内に侵入し、他は排泄されることについて、蚊が血液あるいは糖液を摂取したのちの蚊消化器内分布をしらべた報告は、Christophers (1959) は綜説に *Aedes aegypti* についての多数の人達の報告をのべている。しかし、腹側食道嚢に入つた内容が中腸に移動したことを確認した報告はない。Trembley (1952) は糖液および血液を蚊に吸わせてその分布について追及している。これによると、中腸および腹側食道嚢内の摂取物は、直後、2時間後、24時間後の剖検で、時間の経過と共に減少し

ていると述べ、このことから食道嚢内に入つたものの中腸への移行の確認はない。

摂取されたmfが、蚊体内から排泄されることについての観察は、Jordan *et al.* (1961) のバンクロフト糸状虫、Reid *et al.* (1953) のマレー糸状虫、Kartman (1953) の犬糸状虫についての報告がある。筆者の行なつた自然吸血法の場合もこれらと同様の値であつた。

発育したフィラリア幼虫を定量的に観察して、溶血分離法に関係なく、少数mf投与群程多数投与群に比して、発育率が高値を示したことは、自然吸血法による推測的な観測の結果について、山本ら(1963)、Jordan *et al.* (1961)、Beye *et al.* (1960)の報じているものと同じ傾向といえよう。

バンクロフト糸状虫の他に、東京都八丈小島において、マレー糸状虫のmfをトウゴウヤブカに与えた実験と、犬の糸状虫のmfをトウゴウヤブカ、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカ、アカイエカに与えた実験も行なつた。

マレー糸状虫では、流行地での気温 $17^{\circ}\text{C}\pm 2.0^{\circ}\text{C}$ という条件下で行なつたため、感染型幼虫をえなかつた。犬糸状虫では、投与後の蚊の飼育が困難であつたこと、アカイエカの場合はフィラリア幼虫の発育したものをうるることができなかつた。

む す び

1. 蚊に一定数のマイクロフィラリア (mf) を人工的に与えて、その後の蚊体内発育を観察する方法を考案した。この結果摂取されたバンクロフト糸状虫のmfの1部がアカイエカ体内で感染型幼虫になり、他に多数の発育したフィラリア幼虫をえた。

2. 方法は、バンクロフト糸状虫mf保持者の血液を採つて、サポニン溶液あるいは蒸留水あるいはヘモリジンによつて溶血して、mfを遠心により分離し、5%リングル糖液を加えて投与した。ガラス管の先端の小孔から蚊の吻をださせるように蚊を管に入れて固定し、mfを含む5%リングル糖液を毛細管につめて、蚊の吻を毛細管口に入れて投与した。

3. mfは投与する液と共にとりこまれるが、その速度は、虫以外の液および有形物のとりこまれるのと同じであつた。

4. 強制投与方法によつて、発育したフィラリア幼虫を蚊体内に多数見出し、第Ⅲ期感染型幼虫を14匹えた。しかしその発育率は自然吸血法に比してはるかに少かつた。

5. この原因を追及するのに、先づmfの運動性をしらべて、溶血分離の操作をしたものとししないものと差がない結果を示した。次に摂りこまれたmfの行方を追及して、mfははじめ大部分が腹側食道嚢に入り、その後中腸の方へ移り、1部分は蚊体内に侵入するが、大部分は排泄されて了う。これに対し自然吸血法では、排泄されたものは僅かであつた。この点投与方法について更に検討を要するものと思う。

終りにのぞみ、この研究指導を賜つた佐々学教授、林滋生助教授、協力を得た三浦昭子、川井潤子、元井悦郎、東大学生小宮義璋、中野春雄、吉倉広の諸氏に深甚の謝意を表す。尙へモリジン作成に当つて、当研究所試験製造田所助教授、安達秀雄氏に協力をあおいだことを深謝する。

文 献

- 1) Beye, H. K. & Gurian, J. (1960) : The epidemiology and dynamics of transmission of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. Ind. J. Mal., 14, 415-440.
- 2) 伝染病研究所学友会(1958) : 細菌学実習提要, 全訂改版第1版, 丸善, 東京.
- 3) Christophers, S. R. (1959) : The life history bionomics and structure of *Aedes aegypti*(L.) the yellow fever mosquito. Cambridge Univ. Press. 484-498.
- 4) Jordan, P. & Goatly, K. D. (1962) : Bancroftian filariasis in Tanganyika : A quantitative study of the uptake, fate and development of microfilariae of *Wuchereria bancrofti* in *Culex fatigans*. Ann. Trop. Med. & Parasit., 56(2), 173-187.
- 5) Kartman, L. (1953) : An observation on the loss of microfilariae from the mosquito host during its infective meal. J. Parasit., 39(5), 571-572.
- 6) Kershaw, W. E., Lavoipierre, M. M. J. & Chalmers, T. A. (1953) : Studies on the intake of microfilariae by their insect vectors, their survival and their effect on the survival of their vectors. I: *Dirofilaria immitis* and *Aedes aegypti*. Ann. Trop. Med. Parasit., 47, 207-224.
- 7) Lavoipierre, M. M. J. (1959) : Studies on the host-parasite relationships of filarial nematodes and their arthropod hosts. II. The arthropod as a host to the nematode : A brief appraisal of our present knowledge, based on a study of the more important literature from 1878 to 1957. Ann. Trop. Med. Parasit., 52, 326-345.
- 8) 大森南三郎(1957) : バンクロフト糸状虫症の伝搬に関するアカイエカの役割に関する実験的研究, 第1報(1), 27°C及び25°Cで飼育した感染蚊の体内におけるフィラリア幼虫の発育分布及び生存数について, 長医学会誌, 32, 1434-1445.
- 9) 大森南三郎(1958) : バンクロフト糸状虫症の伝搬に関するアカイエカの役割に関する実験的研究, 第2報(2), 人末梢血流中のマイクロフィラリアの分布様式について, 長医学会誌, 33, 1045-1053.
- 10) Sawyer, T. K. & Weinstein, P. P. (1963) : Studies on the microfilariae of the dog heart-worm *Dirofilaria immitis*: Separation of parasites from whole blood. J. Parasit., 49, 39-45.
- 11) Sawyer, T. K. & Weinstein, P. P. (1962) : Development *in vitro* to the sausage stage of microfilariae of the dog heart worm, *Dirofilaria immitis*. J. Parasit., 48 (Suppl.), 35-36.
- 12) Sawyer, T. K. & Weinstein, P. P. (1961) : Viability survival of *Dirofilaria immitis* microfilariae in modified physiological saline solutions. J. Parasit., 47 (Suppl.), 24.
- 13) Taylor, A. E. R. (1960) : Maintenance of filarial worms *in vitro*. Exp. Parasit., 9, 113-120.
- 14) Trembley, H. L. (1952) : The distribution of certain liquids in the esophageal diverticula and stomach of mosquitoes. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1, 693-710.
- 15) Tsunematsu, K. (1960) : Purification of toxoplasma by means of some vibration and tryptic digestion. Am. J. Trop. Med. Hyg., 9, 556-561.
- 16) 若杉幹太郎・林滋生・佐々学(1956) : 流血中のマイクロフィラリアの凍結集虫法について, 第16回日本寄生虫学会東日本支部大会記事, 20頁.
- 17) 山本久(1963) : フィラリア症の疫学的研究 (未発表).
- 18) Waterhouse, D. F. (1957) : Digestion in insects. Ann. Rev. Ent., 2, 1-8.

COMPARATIVE STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF FILARIAL
LARVAE AS INGESTED BY THE MOSQUITOES BY
THE COMPULSORY FEEDING METHOD
AND BY THE NATURAL BITES

TOZO KANDA

(*Department of Parasitology, The Institute for Infectious
Diseases, University of Tokyo, Tokyo*)

1) A method was devised to feed individual mosquitoes with known numbers of microfilariae and to observe their further development in the intermediate hosts. A part of the microfilariae of *Wuchereria bancrofti* was found to develop to infective larvae in *Culex pipiens* s. l. under this system.

2) In the present method, the blood taken from microfilarial carriers was first hemolysed with saponine solution or distilled water and the microfilariae were collected by centrifuging and washing with saline. The mosquito to be fed with microfilariae was slightly anesthetized and was fixed in a glass tube with a small hole at the end, from which its proboscis was extruded. A fluid containing microfilariae was taken in a capillary tube, and was put in contact with the tip of proboscis under a microscope. The microfilariae could readily be ingested by the mosquito by this method, and the glass tube and the capillary was separated when certain numbers of microfilariae were picked up through the proboscis.

3) The microfilariae thus ingested were mostly found in the oesophageal diverticula at dissections made soon after they were fed, but in a few hours they seem to move to the midgut and then penetrated into the body cavity or were discharged in feces. The rates of developments of microfilariae to further stages in the body of the intermediate hosts under such artificial feeding method were estimated to be considerably lower than those obtained at the natural bites on microfilarial carriers.