

鉤虫飼育液中の酸素量の消長について

野 田 昇 加 藤 宗 男 沢 田 順

大阪市立大学医学部塩田内科 (主任 塩田憲三教授)

後 藤 英 二

大阪市立大学医学部生理学教室 (主任 木村栄一教授)

(昭和 38 年 9 月 2 日受領)

緒 言

鉤虫を体外において長期間飼育し得るようにはなつたが、2 期仔虫以上は次の期の体制迄は脱皮させ得る程度であり、卵より成虫に迄連続して外界で発育させる迄には至っていない現状である。すなわち形態は変え得るが体制の増大を計ることは非常に困難な現状で、これは鉤虫のみならず他の寄生虫についても同様であろう。1939 年 Ferguson はマンボウの肝および腎より得た *Post-diplastomum minimum* の metacercaria を 39°C の下で成虫の状態に迄発育させたが体長の増加の無かつたことを報じている。体外で鉤虫をこれらの段階よりさらに発育の促進を計るには飼育液の改善はもちろん重要ではあるが、飼育環境の検討も必要なことは論を待たない。

先に Perroncito (1931) は鉤虫卵の培養には O₂ の不可欠なことを発表し、皆川 (1917) も O₂ を遮断した状態に置いた場合は発育を停止し、その条件を除した場合急速に発育することを発表した。その後、柳沢 (1959)、大津 (1959)、福本 (1959) 等は卵および 1 期、2 期仔虫共に Warburg 装置で測定したり、嫌気性状態に置いた場合の脱殻、発育数などより、O₂ の必要なことを述べている。野田 (1953 a) も卵を水中、pepton 水中および滅菌尿液中に置いた場合 1 期仔虫の状態 で発育が停止するが、これらの液中に海綿を添加するか、または卵を含んだ上記各液を炭末と混じて培養した場合 2 期仔虫に迄発育することを見出した。すなわち空気に曝すことにより発育が促進されることを認めた。また鉤虫卵の発育状況を映画に撮影中、飼育液の蒸発を防ぐために密閉した場合、卵の発育は途中で停止するが、空気の泡沫を同時に封入すれば、発育停止が見られない事を知つた。

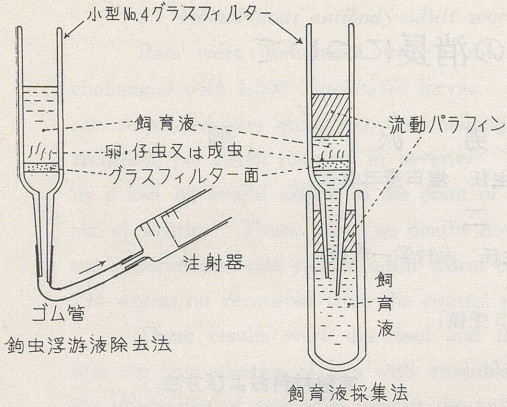
いまなお鉤虫の呼吸を直接測定した文献は見当らない。そこで卵より 5 期成虫迄の各期の飼育液中の O₂ 量を時間を追つて測定した。

実験材料および方法

鉤虫卵、各期の仔虫および成虫は入手し易い犬鉤虫を用いた。卵は重症感染犬より浣腸により得た尿から既報 (野田, 1953 a) の方法で集卵し、寸時フォルマリン滅菌を行つた。実験に供する迄に約 1 時間を要したが、なお未分化の卵であつた。1 期仔虫は集卵後水中で 24 時間、38°C の下で放置し、孵化させたものである。2 期仔虫は上記 1 期仔虫を 37°C の下で瓦培養し 4 日目に得たものである。3 期仔虫は生後 2~3 カ月位の仔犬に 2 期仔虫を経膚感染させ、感染後 48 時間でその肺および筋肉を摘出し、細切して温湯中に浸して遊出を計り採集した。4 期仔虫は経膚感染後 6~7 日目の犬を屠殺し、その小腸を切り取り切開して 40°C 前後の温湯中で遊出を計り、その仔虫の中より顕微鏡下に 4 期のみを選び出したものである。5 期成虫は経膚感染後 1 カ月の犬の小腸より得たものである。

飼育液は犬血清を用いた。犬血清は溶血を避けるため、また可及的速く採血するため股動脈より採血し、直ちに流動パラフィンを加えた 50 cc 容量の大型スピググラスに入れ遠心して血清を分離した。分離した血清は流動パラフィン中に貯えたが O₂ が非常に少いため予め人工的に O₂ を注入した。注入法は泡沫をできるだけ速く除去するためにシリコンを微量に加えた後、酸素ポンペより導いた 1/4 注射針を通して少量宛 10 分間通気して行つた。注入後の血清内の O₂ 量は日を変えての各実験群間では多少の差異を生じたことは止むを得ない。なお腐敗を防ぐため上記通気血清に 1 刀尖宛のペニシリンおよびストレプトマイシン末を加えた。

別に用意した数本の化学実験用の小型 No. 4 グラスフィルターにそれぞれ各期の被検鉤虫を入れグラスフィルターの下端より第 1 図のごとく吸引することにより充分水分を除去した後、上記 O₂ を注入した血清 2.5 cc 宛



第1図 鉤虫浮游液除去法及び飼育液採集法

を入れ、ガラスフィルター器の下端迄血清を吸引により引き降した後、ゴム栓で下端を密栓し、次で上部に流動パラフィン2ccを加えた。この操作のさい注意すべきことはフィルターの裏面に小気泡の残ることで、これはできるだけ速く血清を吸引して引き降すことにより除き得た。上記操作により鉤虫を入れた飼育液は外界のO₂との交流を遮断し得た。

なお各ガラスフィルター内に虫卵および1期より4期迄の仔虫数をできるだけ均等に入れるために、予め、これら虫卵あるいは各期の仔虫の入った液を振盪攪拌してできるだけ均等に浮游させ、その一定量をガラスフィルター内に注入するように注意した。3, 4期仔虫数はO₂測定後隻数を数えた。

飼育液を入れたガラスフィルターは37°Cに置き一定時間後、一定数のフィルターを取出して下端のゴム栓を除き速に予め用意した試験管内の流動パラフィン中に第1図のごとくガラスフィルター器の下端を浸し、飼育液のみの流出を計った。

かくすることにより外界のO₂と遮断された状態で鉤虫卵および各期の仔虫、成虫と飼育液を完全に分離することができた。

この液についてO₂含有量(vol%)をvan Slyke法で測定した。

実験成績および考按

1) 虫卵、各期の仔虫および成虫飼育液中のO₂量について

血清および通気した血清を実験方法の項で述べた操作で小型No.4ガラスフィルターに分注し、すなわち外界のO₂との交流を遮断した状態で、37°Cの下に放置し、

第1表 37°Cに於ける血清及びO₂通気血清内のO₂量の時間的変動(vol%)

No.		時 間		
		前	1時間後	2時間後
a	血 清	0.372	0.369	0.372
	O ₂ 通気血清	0.558	0.620	0.620
b	血 清	0.369	0.369	0.369
	O ₂ 通気血清	0.615	0.615	0.615

一定時間後それぞれ1本宛ガラスフィルターを取出し、それら血清および通気血清内のO₂量を測定したのが第1表であるが、2時間後もほとんど変化を示さなかつた(a, bは日を変えての同一実験例を示す)。

卵培養液中のO₂量

無数の卵を一定量宛血清内で培養したのが第2表であるが、対照血清のものと比較して、少しO₂量の減少し

第2表 卵培養液中のO₂時間的変動(vol%)

No.		時 間			
		前	1時間後	2時間後	3時間後
a	対 照 血 清	0.738	0.615	0.615	0.617
	1 卵培養液	0.738	0.615	0.492	0.492
	2		0.615	0.369	0.492
b	対 照 血 清	0.615	0.615	0.615	
	卵 培 養 液	0.615	0.492	0.492	
c	対 照 血 清	0.697	0.494	0.494	0.615
	1 卵培養液	0.697	0.617	0.617	0.617
	2		0.617	0.617	0.369

たものを認めた(a, b, cは日を変えての同一実験例を示す。以下同じ)。なお培養前より培養3時間後迄の測定値は全部別々のガラスフィルター器内の飼育液中のO₂量であるため、卵の数も各ガラスフィルターにより多少差を生じ、成績も幾分不均いになることは止むを得ない。

1期仔虫飼育液中のO₂量

1期仔虫は1つのガラスフィルター内に約10,000隻を投入したものであるが、対照血清と比較してかなりのO₂量の減少が認められた(第3表)。

2期仔虫飼育液中のO₂量

2期仔虫は各ガラスフィルター内に約200隻を投入したが、第2例(b)のごとく2時間後にO₂が完全に消失したのも認めた。2期仔虫は37°Cの下で血清を加え

第3表 1期仔虫飼育液中の O₂ 量の時間的変動 (vol %)

No.		時 間			
		前	1 時 間後	2 時 間後	3 時 間後
a	対 照 血 清	0.867	0.867	0.867	0.867
	飼 育 液 1 2	0.867	0.620	0.620	0.372
b	対 照 血 清	0.615	0.615	0.615	
	飼 育 液	0.615	0.369	0.369	
c	対 照 血 清	0.743	0.620	0.620	
	飼 育 液	0.743	0.620	0.372	

第4表 2期仔虫飼育液中の O₂ 量の変動 (vol %)

No.		時 間			
		前	1 時 間後	2 時 間後	3 時 間後
a	対 照 血 清	0.991	0.991	0.991	
	飼 育 液	0.991	0.991	0.494	
c	対 照 血 清	0.617	0.617	0.617	
	飼 育 液	0.617	0.370	0	
b	対 照 血 清	0.49	0.62	0.49	0.37
	飼 育 液	0.62	0.62	0.25	0.12

ると急激に活発な運動を始め、約半時間内にほとんどの仔虫が脱皮して3期仔虫に移行するものであり(野田, 1953 b), 第4表の成績は3期仔虫の初期の O₂ 量の消費も示すものと考えられる。

3期仔虫飼育液中の O₂ 量

3期仔虫は肺より採集したものと、筋肉内より採集したものと別々に飼育した。飼育仔虫数が少数で、かつ数

も不均いのため判然とはいえないが肺より採集したものについては、100 隻以上飼育したものの中、3 時間後のものにわずかながら O₂ 量の減少を認める。これに反し筋肉内よりのものは100 隻以上のものにおいてもほとんど減少を示さなかつた(第5表)。

沢田(1961)の報告でも肺内より採集した仔虫の体制が、筋肉内より得たものより大きく、かつ体外飼育により肺内よりの仔虫のみ脱皮して4期仔虫に迄發育し、かつ肺内よりの仔虫の方が酸素消費の多いことを認めている。本実験においても肺内より蒐集して仔虫の3時間飼育により4期仔虫に迄脱皮したのも認められた。

固有宿主の体内の腸管以外の場所で4期仔虫は今迄発見されていないが、体内成分である固有宿主の血清で飼育することにより体外で、腸管以外の体内より採集した3期仔虫が4期に脱皮發育し得ることは O₂ が、より一層補給された結果によるものと考えられる。

4期仔虫飼育液中の O₂ 量

4期仔虫は第6表に示すように仔虫数の100 隻以上のものにわずかながら O₂ 量の減少するものを認めた。鳥居の報告にも示すようにこの飼育液中に5期に脱皮した幼若成虫が混じていることはもちろんである。

5期成虫飼育液中の O₂ 量

5期成虫は体制上♀の方が♂に比して遙かに大きく、同一数で比較することはできないが、共に5隻宛飼育したのが第7表であるが♀の方が遙かに多く O₂ を消費することを認めた。♀成虫飼育液中には産卵された卵も含まれており、その影響も幾分考慮に入れなければならないものと考えられる。成虫がこのように大量の O₂ を消費することは、飼育に当つてかなり考慮を払わねばならぬことはもちろんではあるが、腸管内に寄生している場合

第5表 3期仔虫飼育液中の O₂ 量の時間的変動 (vol %) (括弧内は鉤虫数)

No.		時 間			
		前	1 時 間後	2 時 間後	2 時 間後
a	対 照 血 清	1.191		1.076	0.969
	肺 内 仔 虫			0.834 (108)	0.598 (160)
	筋 肉 内 仔 虫			0.834 (105)	0.834 (85)
	b	対 照 血 清	0.987		0.987
肺 内 仔 虫			0.987 (18)	0.987 (32)	0.987 (28)
	筋 肉 内 仔 虫		0.987 (111)	0.987 (111)	0.987 (146)
	c	対 照 血 清	0.987		0.987
肺 内 仔 虫			0.617 (156)	0.496 (138)	0.370 (121)
	筋 肉 内 仔 虫			0.864 (98)	0.864 (149)

第6表 4期仔虫飼育液中の O₂ 量の時間的変動 (vol%) (括弧内は鉤虫数)

No.		時 間			
		前	1 時間後	2 時間後	3 時間後
a	対 照 血 清	0.966	0.845	0.965	0.845
	飼 育 液 1		0.797 (約100)	0.604 (約110)	0.483 (約100)
	飼 育 液 2		0.724 (約120)	0.604 (約120)	0.845 (約50)
b	対 照 血 清	0.743	0.743	0.740	0.743
	飼 育 液		0.743 (約50)	0.740 (約50)	0.496 (約100)
c	対 照 血 清	0.908	0.845	0.966	0.980
	飼 育 液 1		0.580 (約50)	0.580 (約60)	0.535 (約50)
	飼 育 液 2		0.580 (約50)		0.608 (約50)

第7表 5期成虫飼育液中の O₂ 量の変動 (vol %)

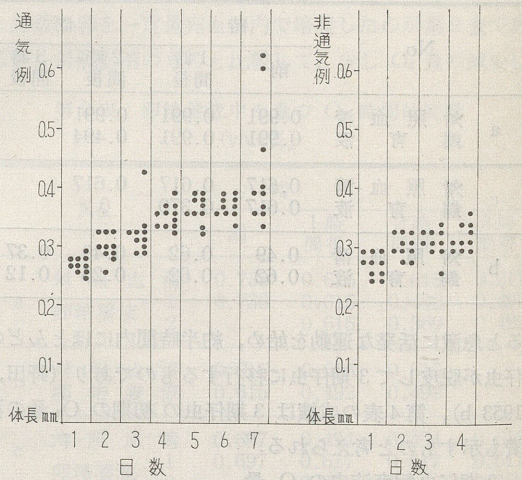
No.		時 間			
		前	1 時間後	2 時間後	3 時間後
a	対 照 血 清 ♂	0.727	0.606	0.364	0.727
	飼 育 液 ♀	0.727	0.364	0.242	0.364
b	対 照 血 清 ♂	0.918	0.962	0.875	0.903
	飼 育 液 ♀	0.962	0.457 0.612	0.483 0.362	0.362 0.298
c	対 照 血 清 ♂	0.857	0.857	0.857	
	飼 育 液 ♀		0.619 0.496	0.248 0	

宿主よりかなりの O₂ を奪取することが考えられる。

2) 卵から2期仔虫迄の発育に及ぼす O₂ の影響について

以上の実験により鉤虫卵、仔虫および成虫の飼育には O₂ が不可欠の要素であることが判明したので、人工的に O₂ を負荷した卵と、負荷しない卵との孵化、発育に及ぼす影響を検索した。

2個の大型 No. 4 グラスフィルター内に無数の卵を入れ、水分を除去した後、尿を餾水で稀釈後濾過し煮沸滅菌した液を加え、一方のグラスフィルター器のみに酸素ポンベより導いた O₂ を注射針を通して少量宛連続送入し、37°C の下で、両方のグラスフィルター内の卵および仔虫の発育状態を日を追って観察した。通気翌日より毎日一定数の仔虫を取出して体長を計測した。第2図に示すように飼育翌日には両フィルター内共ほとんど全部が1期に脱殻していたが、O₂ を送入しないグラスフィルター内では1期の儘で4日後全部死滅した。しかし



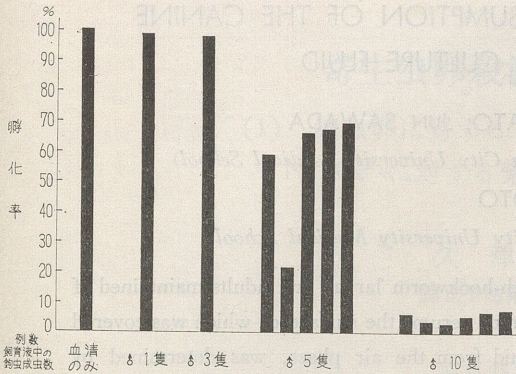
第2図 酸素通気有無に依る鉤虫卵よりの孵化、発育の比較

O₂ を送入したグラスフィルター内では日を経るにつれて漸次体長の増大を示し7日後2期の仔虫を認めるに至った。以上の実験より卵より2期への培養には O₂ の補給が絶対必要なことを確認した。

3) 鉤虫成虫飼育液中の虫卵の孵化率について

前実験において鉤虫成虫を飼育した場合 O₂ を大量に消費することを認めたので、成虫を含む飼育液中で、成虫の存在が鉤虫卵の発育脱殻にどれだけ影響を及ぼすかを検索した。

このさい産卵による影響を避けるため、成虫としては♂成虫のみを用い、種々の隻数を投入し、これに別に用意した鉤虫卵も同時に併せ入れ、前述の方法で通気していない血清を入れ、37°C の下で1昼夜飼育した。成績



第3図 鉤虫成虫飼育液内に於ける虫卵 孵化率の比較

は第3図に示す通りであるが、成虫の隻数の多い程卵の孵化率が低下することを知った。

孵化しない原因は鉤虫による飼育血清の変性、血清と鉤虫分泌物との凝集反応による沈降物の出現による影響等にもあることも考えられるが、O₂の不足することもまた一つの大きな原因と思われる。

以上の実験により、鉤虫の体外飼育をなお一層促進させる為には、O₂をさらに補給する必要があるものと思われる。

結 語

化学実験用小型 No. 4 グラスフィルター内に鉤虫卵、各期の仔虫および成虫を入れ、人工的に O₂を加えた血清を加え、流動パラフィンを重量して外界の O₂と遮断した条件下で鉤虫を飼育し、その飼育液のみをグラスフィルターを通して分離し、飼育液中の O₂量を時間を追って van Slyke 法で測定した。

未分化の卵は余り O₂を消費しなかつた。1期仔虫、2期仔虫はかなり O₂を消費した。3期仔虫は肺より採集した仔虫のみ100隻以上のものでわずかの O₂消費を認めた。4期仔虫も100隻以上のものにわずかの O₂消費を認めた。5期成虫はとくに♀虫が大量に O₂を消費した。卵を滅菌した稀釈尿液中で培養した場合、その

ままの状態では 37°C の下で4日後1期仔虫まで發育して死滅するが、尿液に O₂を負荷した場合2期に迄發育した。

♂成虫と虫卵を 37°C の下に血清で飼育した場合成虫数の多い程虫卵の孵化率が低下する。

摺筆に当り本研究に終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師塩田憲三教授に深謝の意を表する。

本論文要旨は昭和36年第30回日本寄生虫学会総会(久留米)で発表した。

文 献

- 1) Ferguson, M. S. (1939): Development of trematode metacercariae into adult worms in sterile cultures. J. Parasitology, 25, Abst. 13.
- 2) 福本圭士(1959): 各種薬剤の鉤虫仔虫に及ぼす影響に関する研究. 南大阪病院医学雑誌, 7 (1-3), 55-93.
- 3) 皆川弘毅(1917): 十二指腸虫卵含有便の本邦固有の便所に排泄せられたる場合に於ける虫卵の運命に就いて (第1回報告). 医事新聞, 988, 1235-1246.
- 4) 野田昇 (1953 a): 鉤虫の培養に関する研究, 第1編. 犬鉤虫 *Anchylostoma caninum* Ercolani 仔虫の無菌的培養法に就て. 日本消化機病学会雑誌, 50(12), 補遺(1), 1-7.
- 5) 野田昇(1953 b): 鉤虫の培養に関する研究, 第2編. 無菌的に培養せられた犬鉤虫 (*Anchylostoma caninum* Ercolani) 完熟被嚢仔虫の發育に就て. 日本消化機病学会雑誌, 50(12), 補遺(2), 1-9.
- 6) 大津肇(1950): 鉤虫卵並びに仔虫の發育に及ぼす酸素の影響について. 千葉医学会雑誌, 35 (1), 281-300.
- 7) Perroncito(1931): 中島勝美(1931): 実験医学雑誌, 15, 844に依る.
- 8) 沢田順 (1961): 第三期鉤虫仔虫の生物学的研究. 寄生虫学雑誌, 10(3), 70-81.
- 9) 鳥居達生(1960): 鉤虫IV期仔虫の發育に関する実験的研究. 大阪市立大学医学雑誌, 9 (9), 235-246.
- 10) 柳沢利喜雄・水野哲夫・大津肇(1959): 鉤虫卵の發育に及ぼす酸素の影響について (2). 寄生虫学雑誌, 8(3), 393-394.

STUDIES ON THE OXYGEN CONSUMPTION OF THE CANINE HOOKWORM IN THE CULTURE FLUID

NOBORU NODA, MUNEO KATO, JUN SAWADA

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

& EIJI GOTO

(Department of Physiology, Osaka City University Medical School)

Oxygen uptake of the eggs, the first- to fourth-hookworm larvae and adults maintained of 37°C in a funnel with glass filter No. 4, containing canine serum, the surface of which was covered with a layer of liquid paraffine for separate the fluid from the air phase, was determined by means vessel of van Slyke method conducted on the sample fluid withdrawn into a clean tube at a certain interval. Results obtained were as follows :

1) Numerous number of segmented hookworm eggs at early stage showed less oxygen consumption while about 10,000 of the 1st-stage and 200 2nd-stage larvae showed a considerable amount of the oxygen uptake. The 3rd-stage larvae removed from the canine lung consumed a small quantity of oxygen when more than a hundred of the larvae were used, while a hundred of those from the dog muscle showed no oxygen uptake after 3-hour maintenance.

2) The 4th stage larvae consumed a little oxygen only when more than a hundred of larvae were used in the determination. Remarkable amount of oxygen was consumed by the young adults just after 4th moulting in both sexes especially by the female.

3) The canine hookworm eggs developed up to the 1st stage and then died when maintained in the sterilized diluted fecal solution for 4 days at 37°C. But when the fecal solution used was aerated with oxygen gas, some of the reached up to 2nd stage after 7-day culture.

4) Lower hatching rates of eggs were observed when the larger number of male adults were kept together with eggs than when the less number were used in the canine serum at 37°C.