

鉤虫に関する実験的研究

(1) 犬鉤虫の生体外飼養について

林 栄 一 高 村 省 三

静岡薬科大学薬物学教室

(昭和 38 年 10 月 14 日受領)

鉤虫の代謝産物に関する研究は、適当な飼養液がないため、未だほとんど窺知し得ない分野に属している。著者らは、基礎的には鉤虫の生理、代謝などに関する生理化学的事項、応用的には鉤虫症の病態生理、診断、免疫などに関する事項の究明を意図し、先ず最初にそれらの研究の基礎となる鉤虫飼養の検討から始めることとし、便宜的に人鉤虫に代りうるに、それに最近似で、しかも入手しやすい犬鉤虫を対象とすることにした。

犬鉤虫の飼養については、その固有血清をメジウムとした場合、長期間にわたり正常状態で飼養しうる事が小宮ら(1958 a)により既に明らかにされている。しかし著者らの意図する研究においては相当多量の血清が必要であり、常時犬血清を確保することは容易でない。それ故、犬血清に代りうる飼養液をもつてする飼養法の開発に第 1 の目標を置き、基礎的メジウムの検討に着手した。

今回は現在迄に得られた基礎飼養液についての飼養成績の一部について報告する。

実験方法

1) 犬鉤虫

孵化後 10~13 日目の感染仔虫 400~1,400 匹を仔犬に経皮的(背部皮下)に感染させ、約 1 カ月後エーテル・クロロホルム麻酔下に開腹、摘出腸管を加温生理食塩水

中で切開、成虫を採取した(感染率 5~34%)。

2) 虫体の無菌化処置

以下述べる処置を講ずることにより、可及的虫体の無菌化につとめた。即ち採取成虫を滅菌生理食塩水で 3 回洗滌後、一旦同食塩水 200 cc を入れたシャーレに移し、フラン器内(28°C)に孵置する。次いで実験開始直前、抗生物質(ペニシリン 250 単位/cc + ストレプトマイシン 2,500 γ /cc) 含有滅菌生理食塩水を入れたシャーレに成虫を移し、30 分ごと(この間 37°C フラン器内に孵置)に 4 回シャーレ内液を更新して虫体の洗滌を計り、最後に再び滅菌生理食塩水のみで更に 1 回虫体の洗滌を行なった。

3) 飼養法

径 4 cm カレルフラスコに 6 cc のメジウムを入れ、ペニシリン 400 単位及びストレプトマイシン 800 γ を添加した後、♀♂ 3 対宛の成虫を納入、37°C 下で飼養、倒立顕微鏡下で毎日虫体の運動、交尾状況等を観察した。メジウムは第 1 日目、第 2 日目と連続的に、次いで隔日に更新、又フラスコはメジウム 1 種類につき 2 組宛作製して実験に供した。

実験成績

1) 塩類溶液(リンゲル液)のみをメジウムとした場合、鉤虫の生存期間は 1~3 日(平均 1.5 日)と極めて

Table 1. Survival of *Ancylostoma caninum* in various media (1)

Medium No.	Medium	Longevity (days)		Mean period of survival (days)
		Min.	Max.	
1	Ringer	♀	1-2	1.5
		♂	1-3	1.5
2	Ringer + Glucose: 0.1 %	♀	2-3	2.2
		♂	2-3	2.2
3	Ringer + Glucose: 0.1 % + Sodium Glutamate: 0.5 %	♀	2-3	2.5
		♂	2-3	2.3
4	Ringer + Glucose: 0.1 % + Peptone: 0.5 %	♀	3	3.0
		♂	5-8	5.7

短かい。しかし、これに糖（グルコース）ないし窒素源としてのアミノ酸（グルタミン酸）又はペプトンを添加したメジウムにあつては、生存期間にやや延長の傾向がみられた（Table 1）。

2) 1%グルコースブイヨン及び牛血清をメジウムとした場合、先ず1%グルコースブイヨンでの生存期間はリングル液の場合に較べさほど延長しなかつた。しかし牛血清即ち非働化牛血清をメジウムとした場合の生存期間はかなり延長（リングル液の場合の4倍程度）した。一方、ゼイツ濾過血清によつた場合には、リングル液の場合と同程度の生存を示したに過ぎなかつた。又非働化牛血清をリングル液により75%に稀釈したものをメジウムとした場合には、鉤虫の生存期間は血清単独の場合に較べやや劣るかのごとくであつた（Table 2）。

3) 他方、75%リングル液稀釈非働化牛血清にそれぞれの濃度が0.1%、0.5%、1%の割合になるようにグルコースを添加した3種のメジウム（No. 9, 11, 12）による飼養では、これらのいずれもが同血清単独の場合（メジウム No. 8）に較べよりすぐれた成績を示し、就中、0.5%添加メジウム（No. 11）において最良の成績〔平均生存期間♀10.8日（最長23日）、♂7.0日（最長14日）〕が

得られた（Table 2 & 3）。

4) Table 4は75%リングル液稀釈非働化牛血清にグルコース及びペプトンを種々の割合に添加したメジウムでの成績を示したものである。即ちグルコース及びペプトンを0.1~1%の濃度の範囲で種々組合せた5つのメジウム（No.13~17）のうち、グルコース0.5%、ペプトン1%添加の場合（メジウム No.17）が最も良好な成績を示した。即ちこのメジウムにあつては平均生存期間♀36.0日（最長37日）、♂24.0日（最長38日）とかなり長期間にわたる生存がみられた（Table 4）。

5) グルコース及びペプトンに加えて、更にいくつかの生物学的活性物質をも同時に包含している物質としてT.G.C.「ニッサン」(チオグリコレート培地)註に着眼し、これを血清メジウム添加物質として使用してみることにした。即ち3% T.G.C. 溶液をもつて50~75%の非働化牛血清を作製して実験を行なつた（メジウム No.20, 21）。その結果、3% T.G.C. 等量添加メジウム（メジウム No.21）が最良であつた。即ち該液中における鉤虫の生存期間は♀最長68日、♂最長46日とかなり長期に

註：無菌試験用培地（日水製薬製）

Table 2. Survival of *Ancylostoma caninum* in various media (2)

Medium No.	Medium	Longevity (days)		Mean period of survival (days)
		Min.	Max.	
5	1% Glucose-Bouillon (Peptone: 1%)	♀	2-4	3.3
		♂	3-4	3.7
6	Bovine serum (Seitz filt.)	♀	1-3	1.7
		♂	1-2	1.7
7	Bovine serum (Inactivated)	♀	4-11	6.3
		♂	5-8	6.2
8	Bovine serum + Ringer (Inactivated)	♀	2-6	3.7
		♂	2-8	4.8
	3 : 1			

Table 3. Survival of *Ancylostoma caninum* in various media (3)

Medium No.	Medium	Longevity (days)		Mean period of survival (days)
		Min.	Max.	
9	Bovine serum + 0.4% Glucose-Ringer (Inactivated)	♀	3-11	6.0
		♂	6-11	7.0
10	Bovine serum + 0.4% Glucose-Ringer (Seitz filt.)	♀	2-4	2.8
		♂	2-3	2.2
11	Bovine serum + 2% Glucose-Ringer (Inactivated)	♀	5-23	10.8
		♂	3-14	7.0
12	Bovine serum + 4% Glucose-Ringer (Inactivated)	♀	4-25	9.0
		♂	4-8	5.7
	3 : 1			

Table 4. Survival of *Ancylostoma caninum* in various media (4)

Medium No.	Medium	Ringer	Longevity (days)		Mean period of survival (days)
			Min.	Max.	
13	Bovine serum + { 0.4 % Glucose } (Inactivated) { 2 % Peptone } 3 : 1	Ringer	♀	15—25	20.2
			♂	7—20	13.7
14	Bovine serum + { 2 % Glucose } (Inactivated) { 2 % Peptone } 3 : 1	Ringer	♀	18—45	32.6
			♂	7—42	16.8
15	Bovine serum + { 4 % Glucose } (Inactivated) { 2 % Peptone } 3 : 1	Ringer	♀	21—35	29.3
			♂	9—21	13.8
16	Bovine serum + { 2 % Glucose } (Inactivated) { 0.4 % Peptone } 3 : 1	Ringer	♀	8—34	22.7
			♂	12—36	19.7
17	Bovine serum + { 2 % Glucose } (Inactivated) { 4 % Peptone } 3 : 1	Ringer	♀	34—37	36.0
			♂	13—38	24.0

Table 5. Survival of *Ancylostoma caninum* in various media (5)

Medium No.	Medium	Ringer	Longevity (days)		Mean period of survival (days)
			Min.	Max.	
18	1 % T.G.C.*		♀	11—15	12.7
			♂	10—14	11.7
19	3 % T.G.C.		♀	7—14	10.3
			♂	9—11	9.7
20	Bovine serum + 3 % T.G.C. (Inactivated) 3 : 1		♀	52—68	59.0
			♂	5—44	17.7
21	Bovine serum + 3 % T.G.C.* (Inactivated) 1 : 1		♀	35—68	51.8
			♂	15—46	28.3

* Thioglycollate Medium “Nissan”

わたり、しかも飼養開始後44日目迄虫卵(飼養の初期を除き異常卵)の産出が認められた(Plate 1)他、飼養初期(3日目)に交尾1対も認められた。なお飼養メジウムを1~3% T.G.C. 単独とした場合では、先の血清混合との場合に較べ生存期間は著しく短縮された(Table 5)。

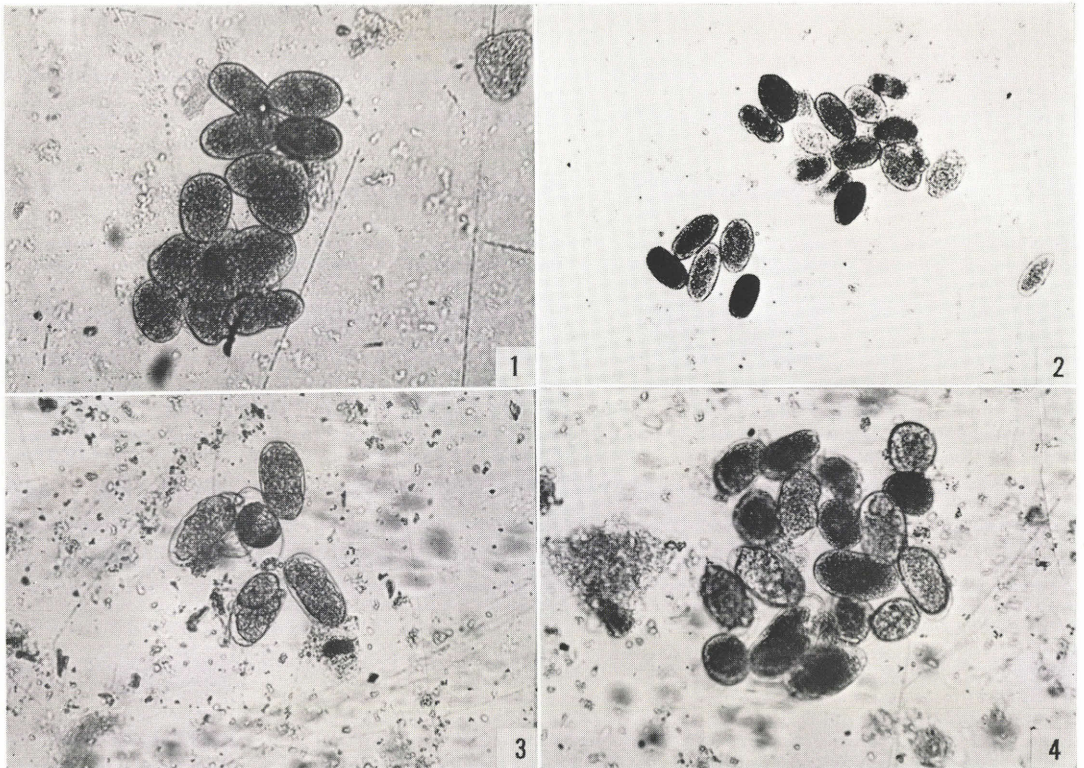
考 察

松本(1955)は各種メジウムによる犬鉤虫の生体外飼養実験において、犬の溶解赤血球加血清に等量の混合アミノ酸液を加えた飼養液が最良のものであり、且つ該液中での生存期間は鉤虫の成長過程と関係があること、即ち仔虫感染後17日目の鉤虫では30個体中3個体が1カ月以上生存した(排卵、交尾、体長増加等は認められなかった)のに対し、感染後1カ月のものでは30個体全部が6日目に斃死したなどのこととともに、犬鉤虫が生体

外で生存するためには、犬の血清及び血球のいずれもが必要であると報告している。

ついで小宮ら(1958 a)は犬鉤虫を Krebs-Ringer bicarbonate 液で75%に稀釈した犬血清中で飼養すると、最長 ♂ 6週間、♀ 12週間の生存を示し、その期間中、交尾、受精卵の産出が認められ、且つ血清単独及び血球加血清の両メジウム間における生存期間、交尾、産卵状況等に差異が認められないということなどを報告している。そして小宮らは「これらの成績と松本の上述の実験結果とを比較した場合、その間に著しい差異が認められるが、これは松本の実験に何等かの不備が介在していたのではないかということを示唆している。」と述べている。

その後、安羅岡ら(1961)は人血清をメジウムとして、ヅビニ鉤虫の♀♂ともに100日以上にわたる生体外での飼養に成功している。



Explanation of Plate

Figs. 1-4 represent eggs laid in the medium No. 21, the most effective one of 21 media tested to maintain *Ancylostoma caninum* *in vitro*.

Fig. 1. Eggs laid between 17-18 days after maintenance of worms *in vitro*.

Fig. 2. Eggs laid between 25-26 days.

Figs. 3-4. Eggs laid between 31-32 days. The degenerated figures are observed in these eggs.

以上の諸研究から、固有宿主血清を用いた場合、犬及び人の鉤虫のいずれにおいても、かなり長期間にわたる生体外飼養の可能性が実証された。

しかし、単に生態的な観察等を主目的としてなされる少数個体の飼養の場合にはともかく鉤虫の生理代謝等を目的とする研究にあつては、飼養液のかんりの量が必要とされるであろう。この場合、固有宿主血清をメジウムとして使用する限り、飼養液の多量を常時保持することは凡そ困難なことである。それ故、この固有宿主血清に代りうる血清、即ち常時多量入手可能な大動物血清による飼養が当然考慮される。このような可能性に対する試みの一つとして、今回は牛血清を基本メジウムとして飼養を行なつてみた。

先に小宮ら(1958 b) は犬血清を牛及び馬血清で置換し

たメジウムによつて犬鉤虫の生体外飼養を行なつたところ、その平均生存期間は牛血清では♂ 3.5日、♀ 4.4日、また馬血清では♂ 9.5日、♀ 11.2日で対照の犬血清中での平均生存期間に較べはるかに劣ること、ひいては犬鉤虫は血清に対して種特異性を示すということなどの結果を報告している。ところで、著者らの今回の実験成績ではメジウムを牛血清単独とした場合には小宮らの成績とほとんど変りなかつた。しかし、血清を非働化し、これにブドウ糖を添加(メジウム No. 11, 12)すると、血清単独の場合に較べ平均生存期間はやや延長した。このブドウ糖添加については、前記小宮ら(1958 a) が Krebs-Ringer bicarbonate 液による犬鉤虫の飼養の際、メジウムへのブドウ糖の添加が生存期間を延長せしめたことを報告し、他方、柳沢(1958)が飼養液中へのブドウ糖の添

加が鉤虫の酸素消費量を増大させたことを報告している。これらの事実は鉤虫の代謝形式が aerobic であり、鉤虫が生体内での養資の1つとしてブドウ糖を常時利用していることの可能性を示唆しているものと考えられ、本実験からも又このことに左祖するような結果が得られた。又牛血清にブドウ糖、更にペプトンを添加したメジウム (No. 13~17) にあつては先のブドウ糖添加メジウムの場合より一層の延命効果がみられた (平均生存期間はブドウ糖添加メジウムに較べ2~3倍、血清単独メジウムに較べ2~6倍)。ついで糖、ペプトンの他、酵母抽出物などの生物学的活性物質を含有している T.G.C. をメジウム (牛血清単独メジウム) へ添加 (メジウム No. 20, 21) したところ、平均生存期間は No. 13~17 のメジウムによる場合に較べ更に延長された (血清単独メジウムに較べ平均生存期間は5~8倍)。これらの事実より、糖及びペプトンは鉤虫の生命維持に必須物質に近いものであろうことが示唆されるとともに、更には T.G.C. 中の生物学的活性因子の付加の重要性が理解されるのである。しかしながら、T.G.C. 添加メジウムのうち最良の成績を示した No. 21 でも、飼養の初期を除き、交尾、受精卵の産出はみられなかつた。この点が犬血清をメジウムとした場合に比較してやや劣るところであつた。それ故、T.G.C. 添加牛血清メジウムのみでは未だ鉤虫の正常状態の生命活動を維持できない。結局、牛血清+T.G.C. に交尾、受精卵の産出現象などを誘起せしめる X-Factor が存在してはじめて飼養液の栄養条件は一層完全性を加えるものであろう。従つて、今後の課題はこの X-Factor の究明であり、この Factor の解明は単に鉤虫の正常飼育への足掛りを与えるばかりでなく、それは同時に宿主特異性解明への糸口になりうるものとも考えられる。いづれにせよ、本実験から T.G.C. 添加牛血清中でも、犬血清メジウム中におけると同様かなり長期間にわたり、犬鉤虫を生存させることが明らかとなつた。

次にザイツ濾過牛血清の場合 (メジウム No. 6, 10) には非働化牛血清をメジウムとした場合 (メジウム No. 7, 9) と比較して飼養成績は劣つた ($1/2 \sim 1/3$)。今メジウムのザイツ濾過効果についての文献を按ずるに、Dougherty et al. (1950) は「ザイツ濾過肝抽出液では *Rhabditis briggsae* に対する成長促進能力が消失したこと」、又 Weinstein (1953) は「ザイツ濾過組織抽出液では *Ancylostoma caninum* larvae に対する成長促進能力が完全に消失したこと」などをそれぞれ報告している。従つて、

本実験において示されたザイツ濾過血清と非働化血清との間の飼養効果の差異も上記報告に一致するものであり、その差異の成因についてみれば、濾過による serum components の消失などの他、非働化処置による血清の変化が関係しているかもしれない。しかし、この点に關しての詳細は無処置血清との比較実験成績がないので、ここでは推測の域を出ないことは勿論である。

次に鉤虫の生体外飼養に際し、虫体の無菌化が必要とされる。そして安羅岡ら (1960) も述べているごとく、この虫体の無菌化はこの種の研究において最初に直面する重要な問題でもある。既に Epps, W. et al. (1950), Fairbairn & Reesal (1950), 門多 (1954) らは抗生物質を使用し、回虫を完全に無菌化し得たことを報告している。一方、石崎ら (1957) は回虫の生体外飼養の研究と題した報告中に「Wachsmann (1949), 梅沢 (1950), Wolf (1950) によると Penicillin (P) 及び Streptomycin (SM) 感性菌に対する最少有効濃度は $P=10 \text{ u/cc}$, $SM=50 \text{ } \gamma/\text{cc}$ である。」ということを用い、回虫の無菌化のため P 又は SM を上記の10倍量の濃度に添加した飼養液で飼養したところ、対照とした Lock 改變液の場合に較べ平均生存日数に変化がなかつたと述べている。著者らの今回の実験でも、飼養に先立ち、P 及び SM 含有滅菌生理食塩水で数回虫体の洗滌を行なうとともに、一方ではメジウムに約 $P60 \sim 70 \text{ u/cc}$, $SM 130 \text{ } \gamma/\text{cc}$ を添加することによつて鉤虫体にさしたる影響を及ぼすことなく無菌の状態下 (厳密には制菌の状態下) にて飼養を続け得た。しかし、この条件下での無菌化に失敗した実験例もあつたので、より完全な無菌化法については現在なお検討を行なつている。

一方、鉤虫飼養に際してのメジウムの交換の是非に關して、Weinstein (1953) は「メジウムの交換が鉤虫仔虫の發育を促進させたこと」、又 Taylor (1960) は「フィラリヤの生体外飼養実験でメジウムをしばしば交換することが虫体にとつて好都合であつたということ」を述べている。本実験では隔日にメジウムの交換を行なつたが、この操作はかなり過重の労力を伴つた。それ故、最も適切なメジウム交換の頻度について今後とも検討する予定である。

結 語

固有宿主血清を含有しない21種のメジウムによる犬鉤虫の生体外飼養実験を行なつた。

- 1) 基本メジウムとしては塩類溶液より牛血清による

飼養がより有効的であつた。

2) 牛血清ではザイツ濾過血清より非働化血清によるのがより効果的であり、更にこの非働化血清にブドウ糖及びペプトンを添加することにより、生存期間の一層の延長が認められた。

3) 非働化牛血清に T.G.C.「ニッサン」(無菌試験用培地)を添加した場合は更に飼養環境は良好となり、その平均生存期間は ♀ 51.8 日(35~68 日)、♂ 28.3 日(15~46 日)であつて、しかも飼養開始 44 日後迄虫卵(飼養の初期を除き異常卵)の産出が認められた。

稿を終るにあたり、御懇切なる御助言を戴いた国立予防衛生研究所寄生虫部小宮義孝博士及び安羅岡一男博士並びに同研究室の諸先生に感謝の意を表します。

本論文の要旨は第 31 回日本寄生虫学会総会において発表した。

文 献

- 1) Dougherty, E. C., Raphael, Jr. J. C. & Alton, C. H. (1950): The axenic cultivation of *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae) I. Experiments with chick embryo juice and chemically defined media. Proc. Helminthol. Soc. Wash., 17, 1-10.
- 2) Epps, W., Weiner, M. & Bueding, E. (1950): Production of steam volatile acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides*. J. Infect. Dis., 87(2), 149.
- 3) Fairbairn, D. & Reesal, M. R. (1950): Complete elimination of microorganisms from an intestinal parasites (*Ascaris lumbricoides*). Science, 112, 792-793.
- 4) 石崎達・板東丈夫(1957): 蛔虫の生体外飼養の研究. 寄生虫誌, 6(1), 47-56.
- 5) 小宮義孝・安羅岡一男・佐藤温重(1958a): 犬鉤虫の生体外飼育(1). 寄生虫誌, 7(2), 103-107.
- 6) 小宮義孝・安羅岡一男・佐藤温重・保阪幸男(1958b): 犬鉤虫の生体外飼育(2). 寄生虫誌, 7(3), 228.
- 7) 松本季彦(1955): 犬鉤虫の生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. 大阪市大医雑, 4, 389-399.
- 8) 門多魁(1954): 蛔虫の無菌飼育について. 寄生虫誌, 3(4), 235-239.
- 9) Taylor, A. E. R. (1960): Maintenance of Filarial worms *in vitro*. Exptl. Parasitol., 9, 113-120.
- 10) Weinstein, P.P. (1953): The cultivation of the free living stages of hookworms in the absence of living bacteria. Am. J. Hyg., 58, 352-376.
- 11) 安羅岡一男・柳沢十四男(1960): 寄生蠕虫類の生理. 医学生物学最近の展望, 1, 528, 539.
- 12) Yasuraoka, K., Hosaka, Y. & Ogawa, K. (1961): Survival of *Ancylostoma duodenale in vitro*. Japanese J. Med. Sci. & Biol., 13(4-6), 207-212.

EXPERIMENTAL STUDIES ON HOOKWORM
I. ON THE MAINTENANCE OF ANCYLOSTOMA
CANINUM IN VITRO

EIICHI HAYASHI & SHOZO TAKAMURA

(Department of Pharmacology, Shizuoka College of Pharmacy, Shizuoka, Japan)

Several attempts have been made in the past to maintain *Ancylostoma caninum in vitro*; for example, Komiya *et al.* (1956) were able to keep the worms alive for 6 weeks (male) or 12 weeks (female) in dog serum at 37°C.

The present study was designed to substitute the dog serum with more easily available materials for the medium. Thus, adult *Ancylostoma caninum* was maintained in 21 different kinds of culture media at 37°C renewing every other day. The results are summarized as follows:

- (1) Bovine serum was better than saline solution as the basal medium.
- (2) Furthermore, Seitz-filtrated bovine serum did not support the survival of the worms, whereas inactivated one possessed the ability to survive the worms for several days.
- (3) Addition of glucose and peptone to the inactivated bovine serum resulted in a marked increase in their survival time.
- (4) The longest time of survival was obtained on both male and female worms when 50 per cent inactivated bovine serum diluted with 3 per cent solution of Thioglycollate Medium "Nissan" was used as the medium, that is, in this medium the female worms remained alive for 35 to 68 days and the male worms for 15 to 46 days. However, neither copulation nor laying fertilized eggs into the medium took place until the end of the culture with the exception of their occurrence in early days.