

# フォルマリン固定魚体よりの肝吸虫(*Clonorchis sinensis*) メタセルカリアの検出法に関する研究

小宮 義孝 清水 澄子

国立予防衛生研究所寄生虫部

(1965年8月5日受領)

魚体からの肝吸虫メタセルカリアの検出は、従来魚の生体標本より検出するのが通則となつている。けだし魚体を固定してしまうと、メタセルカリアの変貌がいちじるしく、同定が困難であると考えられていたからである。

しかし魚体の生鮮標本からでないこれが検出できない、ということは如何にも不便である。もし魚体を固定液で固定し、これからの検出が可能となれば、標本の操作取扱上、またその保存上、いくたの便宜がある。

しかし同じく固定するといつても、種々なる固定法があるが、魚体保存に従来もつともよく用いられており、しかも固定法が簡単なものはフォルマリン固定である。通常8~10%のフォルマリンが用いられているので、ここでは、かかる濃度の魚体固定標本からのメタセルカリアの採取法と、取り出したメタセルカリアの同定につき研究を行い、このフォルマリン固定の魚体からの肝吸虫メタセルカリアを同定しうることが明らかとなつた。以下はその報告である。

## 実験材料およびその方法

実験手づきは大別して2つに分けられた。

第1には自然感染をうけた魚体から肝吸虫メタセルカリアを探針で器械的に取り出し、これを8~10%のフォルマリン水に浸漬し、時間を追つて、その変貌の過程を追跡し、変貌したメタセルカリアについて、その同定のためのキイを検索した。

第2には、予め固定した魚体標本から、固定後一定時間後毎にメタセルカリアを一定の方法で蒐集し、その蒐集された各種メタセルカリアからの肝吸虫メタセルカリアの鑑別同定の検索を行い、その鑑別の基準および同定のためのキイの発見を検討した。

魚体は肝吸虫メタセルカリアの自然寄生を受けている

モツゴ (*Pseudorasbora parva*) を用い、その1部を生そのままこれから各種メタセルカリア、特に肝吸虫メタセルカリアを器械的に採取し、その1部を比較のための生標本観察用とし、他のものを上記フォルマリン固定を行い、これを3°Cの永室に保存し、時を追つての変貌の検査に供した。また類似メタセルカリア、とりわけ横川吸虫メタセルカリア(生標本用および固定標本用)の採取には市販のアユ (*Plecoglossus altivelis*) の筋肉内のそのメタセルカリアを用いた。けだし筋肉内寄生のものの方が、その相互鑑別上重要だからである。

## 実験成績と考察

### 1. 肝吸虫 *Metacercaria* 生標本の鑑別

肝吸虫メタセルカリアの生標本の鑑別には、概括的にはまづその形、大きさ、包壁の厚さ、弱拡大で検鏡した場合(20~100倍)のその黄褐色の色調およびO-字状をなし、強屈光性排泄顆粒の存在のため暗黒色にみえる排泄のうの存在が、その大体のキイとなる。そしてさらに確実な鑑別のためには、1) 体内に散在する黄褐色の粒子状をなせる色素顆粒の存在、2) 腹吸盤は口吸盤とほぼ同大またはこれよりやや大きく(感染後約14日以後のもの)。体正中線両腸脚分岐点の直下にあること、および3) 排泄のうの形がO状で、内部の大きい方の排泄顆粒(排泄は大体大小2種に分たれる)はほぼ同大かつその形が球形で、他のメタセルカリアのそれよりもいちじるしく大きく、しかも排泄のう内に一杯にぎつしり充満し、その大きいものの数は平面分布として概ね110コを算すること、などが、第2のキイとなる。

しかるに、こうしたメタセルカリアをフォルマリンで固定するときは、第1に固定のため虫体はその透明度を失い勝ちであり、第2にその排泄顆粒は次第に溶解して形が小さく、かつ数が少くなり、遂には全く消滅してし

本研究の一部は文部省科学研究費の補助を受けたここに付記して謝意を表する

まうことを、筆者らは経験的に知っている。

## 2. フォルマリン固定肝吸虫 *metacercaria* の時間的検査

そこで、第1に、摘出した肝吸虫メタセルカリアを8~10%のフォルマリン水に固定し、固定魚類を保存すると同様にこれを氷室内に格納し、一定の時間の経過毎に、固定肝吸虫メタセルカリアの変貌状態を検してみた。その結果は次のとおりである。

### (1) 固定4日後の肝吸虫 *metacercaria* :

固定した *metacercaria* はその直後において運動を全く停止するが、透過光線による検鏡においては、その透明度は生のものとは比べて、ほとんど失なわれていない。また *cyst* および虫体の弾力性も生のものに比べてほとんど変りないものの如く、圧平の程度により固定 *metacercaria* の方が大きくみえることもある。但し *cyst* の壁の厚さは生のものに比して変りはない。

肝吸虫の *metacercaria* の特長である体内に散在する黄褐色の顆粒、排泄顆粒の大きさおよび数、その排泄のうの充満状態も生標本の場合と変りはない、また、口腹吸盤の状態も、生標本の場合と全く変りなく、むしろより明らかに看取できる。これを要するに、氷室(3°C)保存4日後の *metacercaria* は、生の標本に比較し、その運動が失はれているだけで、その本来の特徴は悉くほぼ完全に保たれている。

### (2) 固定後8日目および14日のもの :

固定後8日目および14日目のものにおいても、*cyst* の厚さ、体内における黄褐色の色素の散在状態、口腹吸盤の状態なども、固定後4日目のものと同様である。ただ固定後8日目および14日目のものにおいては、生のそれと比べて、排泄顆粒の大きさが、やや小さくなっており、また14日目のものにおいては、顆粒の暗黒色にみえる度合がやや稀薄に半透明に近くなつてみられる。

### (3) 固定後3週目および4週目のもの :

この時期にあつても *cyst* の壁の厚さ、体内色素顆粒、口・腹吸盤の状態および排泄顆粒の状態は、固定後4週目のものとはほぼ変りがない、ただ固定後4週目のものにおいては、排泄顆粒の、のうの週辺に位置するもの大きさが、中心部に位するものよりも小さくなつてきている感じがある。また、この時期のものにおいては、*cyst* はその弾力性が生のものに比べて失われるに到つたと考えられ、多少強く圧平すると破壊されることがある。一方生のものでは、かかることは認められない。

### (4) 固定後7週目のもの :

*cyst* の壁、体内の色素顆粒、口・腹吸盤の状態は、固定後1~4週目のものと全く同様であるが、ただ排泄のう内の排泄顆粒はその大きさが、全体的に小さくなり、とりわけ外側の顆粒がその暗黒色の色彩が薄く半透明にみえる。また顆粒の一つ一つに同心円状の構造が明らかに認められ、大方の顆粒は一見厚い同心円の二重層にみえる。

### (5) 固定10週以降のもの。

固定後10週目のものにあつては、*cyst* の厚さ、体内色素顆粒の分布状況、口腹吸盤の状態等は、それ以前のものとは全く変りはない。ただ排泄顆粒だけは、総じて認められなくなるが、時として、きわめて薄くその輪廓が認められる程度の顆粒が少数なお存在している場合が、固定15週目のものにおいても、なお認めうる場合がある。

さて、以上の実験の結果を通覧するに、フォルマリン固定後4週目位までは、その排泄顆粒の大きさがやや小さくなること以外には、その顆粒の特長をも含めて、生の標本とほとんど変りなく、その鑑別のキイを保持することができる。

固定後6~7週間以後になるとこの排泄顆粒は消失し初めるが、完全に排泄顆粒を消失したのものにあつても、

1) *cyst* の壁の厚さ、2) 体内色素顆粒の分布状況、3) 口・腹吸盤の状況、4) 排泄のうの形状、等の特長は、依然として保持されているので、これらにより肝吸虫の *metacercaria* たることは、同定しうる。

### 3. 固定魚体標本中よりの肝吸虫 *metacercaria* の採取と同定

生のとき魚体から取出してフォルマリンで固定した肝吸虫 *metacercaria* の時間的な形態的検索は、上のとおりであるが、*metacercaria* が魚体内に寄生しているまま、この魚体をフォルマリンで同様に固定し、同時に魚体内に固定されたその *metacercaria* について、肝吸虫のそれとして同定可能なりや否やについて、次に検してみた。

#### (1) フォルマリン固定魚体よりの *metacercaria* の採取

フォルマリン固定魚体よりの *metacercaria* の採取は、まず魚体の脱フォルマリンを行つた後、その人工胃液消化法によつた。この方法で、筋肉内寄生 *metacercaria* はかなりよく採取できるようである。その手技は次のごとくである。

まづ固定魚体を、5~6mm<sup>3</sup> に細切し、これを24時間水洗、フォルマリンを除く。次に適量量の人工胃液を

これに加え、約5分間ホモゲナイザー(2,500 r/min)にかける。これにさらに人工胃液を加え、蓋をしたビーカーに移し、37°C、30~40分間解卵器内に攪納する。攪納後その上清を捨て、残渣に0.6%の食塩水を適宜加え、約3~4回くり返して洗滌、胃液を除去した後、沈渣を約2ccぐらいずつ取り、これを実体顕微鏡の下におき(約20倍)、沈澱せる metacercaria をピペットを用いて分離採取する。

## (2) 固定魚体中の肝吸虫 metacercaria の同定

肝吸虫流行地より採取したモツゴ (*Pseudorasbora parva*) の1部を予め検して肝吸虫 metacercaria の存在を確認し、その残りを10%ホルマリンで固定しこれについて、固定後4週目、6週目、8週目および10週目に、上記の方法でその metacercaria を分離採取、これについて肝吸虫 metacercaria の状態を検した。

結果は、大体において、前章に述べた固定 metacercaria の所見と同様であつたが、その排泄顆粒の変化は、この場合においては、5~6週目ぐらいから認められ、8~10週ごろに到ると、ほぼ完全に消滅する。

しかし、前章において述べたように、その排泄顆粒の消滅以後においても、1) cyst の壁の厚さ、2) 体内色素顆粒の分布状態、3) 口・腹吸盤の状況、4) 排泄のうの形状などの特徴は依然として保持されているので、これらによりその肝吸虫 metacercaria たることは、同定しうる。

筆者らの手許に、約15年前に捕獲、10%ホルマリンに固定しておいたモツゴ(愛知県肝吸虫流行地より採取のもの)が幸い保存してあつたので、これについて、上記の方法でその寄生 metacercaria を採取し、肝吸虫のその検査を行つてみた。この場合における肝吸虫 metacercaria は、当然ながらその排泄顆粒は、ことごとく消失していたが、上記の4項目の肝吸虫 metacercaria の特長の残存により、比較的容易にその同定を行うことができた。

## ま と め

肝吸虫 metacercaria の同定は、従来は魚体より採取した生鮮 metacercaria によつてのみ可能であると考えられていた。しかし、この方法は場合によつて魚体保存の困難さなどの不便が存在する。

そこで筆者らは、保存された魚体から分離された肝吸虫 metacercaria のホルマリン固定標本について、その同定の可能性に関して実験を行つた。

結果は、固定標本においても、その透明度は、生の標本に比してほとんど低下することはない、かつ固定後3~4週目位までは、肝吸虫 metacercaria の有力な特長の1つである排泄顆粒の状態も、生の標本に比してほとんど変りなく保存されることを知つた。

また、右の排泄顆粒の完全に消滅した以後にあつても、肝吸虫 metacercaria の他の特長たる、1) cyst の壁の厚さ、2) 体内色素顆粒の分布状態、3) 口・腹吸盤の状態および4) 排泄のうの形状など、特長は依然として保持されているので、これらによりその肝吸虫 metacercaria たることは、比較的容易に同定しうる。

また、ホルマリン固定保存魚体よりの肝吸虫 metacercaria の分離採取の方法についても述べた。

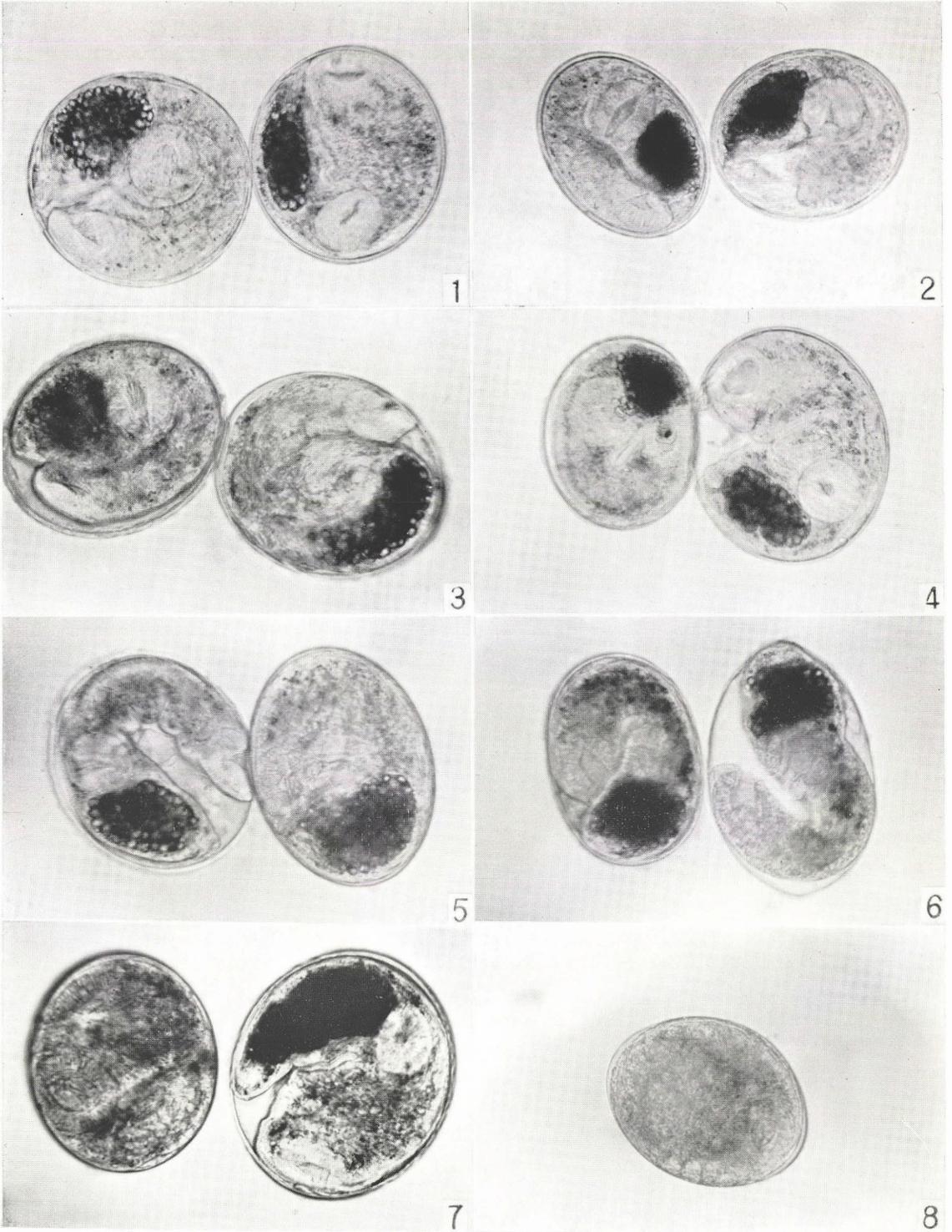
本論文の内容は日本寄生虫学会第34回総会(昭和40年4月)において述べた。

## 文 献

- 1) 小宮義孝・村瀬かつ子(1944 a): 人工胃液消化法による各種 metacercaria の魚体よりの収納度に就て、上海自然科学研究所彙報, 14(5), 351-355.
- 2) 小宮義孝・村瀬かつ子(1944 b): 魚体内における各種 metacercaria の分布に就て、上海自然科学研究所作業報, 14(6), 419-434.
- 3) Nagano, K (1927): A collecting method of metacercariae. Okayama Igakkai Zasshi, (452), 1313-1314.

## 写 真 説 明

- |  |        |                |
|--|--------|----------------|
| 1. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 4 日 目  | } 左一固定標本, 右一対照 |
| 2. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 8 日 目  |                |
| 3. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 2 週 目  |                |
| 4. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 3 週 目  |                |
| 5. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 4 週 目  |                |
| 6. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 7 週 目  |                |
| 7. <i>Clonorchis metacercaria</i> フォルマリン固定                 | 10 週 目 |                |
| 8. フォルマリン固定魚体(固定後15年)より採取した <i>Clonorchis metacercaria</i> |        |                |



THE IDENTIFICATION OF *CLONORCHIS* METACERCARIA FROM  
THE FISH BODY FIXED WITH FORMALIN

YOSHITAKA KOMIYA & SUMIKO SHIMIZU

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

Hitherto it is considered that the identification of *Clonorchis* metacercaria should be made on fresh fish material. Here the possibility of the identification of it from the fish body preserved in formalin was studied. The result proved that it was possible. Along with it the technic of the isolation and collection of the encysted metacercariae from the preserved fish muscle was studied.

The technic of isolating and collecting metacercariae from preserved fish body. The fish body is cut to 5-6 mm<sup>3</sup> in size, which are washed with tap water for 24 hours to remove the formalin. Add some amount of artificial gastric juice to them and put them in the homogenizer (2,500 r/min.). Add to them a sufficient amount of gastric juice further and put them in an incubator in a flask for 30-40 minutes under the temperature of 37°C. After that wash them with physiological saline water several times and the sediment is examined under the dissecting microscope. Metacercariae can be found at the bottom between the muscle debris. Then isolate and collect them using the micro pipette under the dissecting microscope.

The identification of *Clonorchis* metacercaria. The characteristics of the living specimen of *Clonorchis* metacercaria are the followings: 1) the thickness of the cyst wall, 2) the distribution of yellowish-brown pigment granules in the body, 3) the ratio of the diameter of both suckers and 4) the characteristic shape of the excretory vesicle as well as the characteristic size, shape and arrangement of the excretory granules.

In the fixed specimen its transparency is scarcely affected and up to 3 weeks after the fixing procedure all the 4 characteristics can be retained as clearly as those of the fresh specimen; after four weeks the excretory granules became gradually smaller in size and after 8-10 weeks they disappear completely. But the identification can be made even at that time because the other 3 characteristics can clearly be observed.