

# コトナラット糸状虫 *Litomosoides carinii* の生体外飼育 とこれによる抗フィラリア剤の検定

松 田 肇 小 林 準 三 酒 井 健 夫

東京大学医科学研究所寄生虫研究部 (主任 佐々 学教授)

(1968年 5 月 30 日 受領)

## 緒 論

*Litomosoides carinii* の成虫を *in vitro* で維持し、産生されるマイクロフィラリアを観察したものに Hawking (1954) の記載があり、一方種々な培養液にて同一観察を行ったものに Taylor (1962) がある。しかし、培養する際の基礎的な諸条件について検討を加えたものを見るべきものがない。今回著者等は *L. carinii* の成虫及びマイクロフィラリアでの抗フィラリア剤の検定を行う際の基礎的研究として、Rose *et al.* (1944) が用いた簡単な組成の培養液を用い、培養条件を種々な角度から検討するとともに、従来使用されてきた oxphenarsine hydrochloride (Mapharsol), trimelarsan (Mel W), suramin (Germanin), diethylcarbazine の 4 種の薬剤での検定を試みたので報告する。

## 材料及び方法

### 1. 培養方法

培養液としては、Simms' solution に馬血清を加えたものを使用し、pH は重炭酸ソーダ水をもって調製した。*Litomosoides carinii* 感染後、約14週目のコトナラットの胸腔内より無菌的に成虫を摘出し、約37°Cの滅菌生理的食塩水中で数回洗滌し、白金線で培養液中に投入し観察を行った。成虫の培養はカレル瓶で、マイクロフィラリア (以下 mf と略す) は、TD-15型培養瓶 (池本理化学工業製) で培養した。培養期間中の温度は全て 37°C とした。尚雑菌混入の有無の確認するために、普通寒天培地を斜面として用い、培養のつど検査した。Simms' solution の組成を次に示す。

Simms' solution (Rose, H. M., *et al.* 1944)

Solution A	Grams per liter.
------------	------------------

NaCl	160.0
KCl	4.0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.88
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	4.06
Solution B	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18.4
NaHCO <sub>3</sub>	1.3
Dextrose	20.0
Phenol red	0.2

1 容の A 液を 18 容の蒸溜水で稀釈し高圧滅菌する。B 液は Seitz 型濾過器で滅菌し、最終的に稀釈した 19 容の A 液に 1 容の B 液を加え、馬血清を規定量加える。

### a. 成虫

上記の方法により摘出した成虫の運動性を確認後、実験に使用した。虫体の運動性は、培養時重要な指針となるので以下の如く記載した。すなわち最も強い運動性を示したもの(≡)、やゝ強い運動性を示したもの(≡), 弱い運動性を示したもの(+), 僅かに動く程度(±), 全く運動性を示さないものを(-)と判定した。雌虫の mf 産生数の算定は 0.05 ml 中の mf を数え、同一操作を 3 回繰り返す、その平均から全量中の mf 数を算定した。

### b. mf

上記の如く摘出した雌虫を、30%の割合に馬血清を加えた Simms' solution (pH 8.0) 中で 37°C 24 時間培養した。成虫を除去し、産生された mf を遠心沈澱 (1000 r.p.m. 5') 後、その運動性を確認し、実験に使用した。運動性の判定は、成虫の場合とほぼ同一方法で観察した。死亡率はスライドグラス上で 100 匹の mf を観察し、同一操作を 3 回繰り返す、それを平均した。

### 2. 使用薬剤

This study was supported by WH O Medical Research Grant.

oxophenarsine hydrochloride (Mapharsol), trime-larsan (Mel W), suramin (Germanin, Bayer 205), diethylcarbamazine (Supatonin, Hetrazan) の4種の薬剤を使用し、前2者の金属化合物はAsの量で薬剤濃度を決定し、後2者の非金属化合物は原末の量で稀釈した。

3. 薬剤の効果判定

成虫に対する効果は、薬剤1稀釈に対し、雌3、雄3の割合に入れ、1時間及び24時間の虫体の運動性から判定し、尚24時間後に産生されたmf数をも併せて検討した。

mfに対する効果は、1稀釈中に約5,000匹のmfを含むように調製し、1時間及び24時間後に無菌的に少量のサンプルを取り、顕微鏡下でその運動性を検討した。

実験成績

1. 培養方法の検討：

pHの変化が成熟雌虫の運動性にどのような変化を及ぼすかをみる為に、30%の割合に馬血清を加えた Simms' solution 10 ml 中に雌3匹を投入し、毎日培養液を交換し、その運動性を観察した。第1表に示すように、pH 7.4 及び8.0の範囲において最も長期間生存し、14日間であった。又両者の運動性においてもほとんど差がみられなかった。次いで pH 8.6 において12日間の生存が認められた。

上記 pH 7.4, 8.0 及び8.6の3例につき、mf, 胎虫, 卵及び雌1匹あたりに産生されるmf数につき検討を加え、良い条件を見いだそうとした。第2表に示すように、pH 8.6 では培養1日目ですでに2%の卵を排出し、2日目はmf 45%, 5日目ではmf 0%であった。pH 7.4 及び8.0においては、両者とも5日目頃迄は、ほぼ変化

Table 1 Mobility of female adult worms in Simms' solution of various kind of pH

Days /pH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
6.2	##	##	##	##	##	##	##	##	-						
6.8	##	##	##	##	##	##	##	##	-						
7.4	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
8.0	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
8.6	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##

30% horse serum in Simms' solution: 10 ml

は認められないが、6日目では pH 7.4 において胎虫12%, 卵4%の産出に比べ、pH 8.0 では両者とも0%であった。又雌虫1匹あたり産出されるmf数についても、6日目では pH 8.0 が3,700に比べ、pH 7.4 では800と少い傾向を示した。以上雌虫の運動性、産生mf数等により、同培養液中での成虫の至適pHは、8.0附近であろうと判定した。

血清濃度を変えた場合に、雌成虫の運動性並びにmf産生数にどのような変化が起るかをみるために以下の実験を行った。馬血清を規定量加え、pH 8.0 に調製した培養液 10 ml 中に雌虫3匹を投入し、毎日培養液を交換し観察した。第3表に示すように、各濃度とも5~6日目迄はmfの産生を認めたが、それ以後は全く産生が認められなかった。又、mf数については、血清量が多くなるに従い増加する傾向を示している。一方雌虫の運動性については、血清濃度10%に比べ、20及び30%の方が良好で、ほぼ同一経過をとるが、生存日数は30%の濃度の方が長期間生存し、16日間であり、20%では13日間、10%では9日間であった。以上の結果から血清濃度30%, pH 8.0 と固定した。

実際に薬剤の効果判定する際の基準ともなるべき。

Table 2 Number of producted microfilariae by female adult worms in the solution of various pH

pH/Days	1	2	3	4	5	6	7	
7.4	Mf (%)	100	100	100	99	65	84	0
	Embryo (%)	0	0	0	0	35	12	0
	Ovum (%)	0	0	0	1	0	4	0
	No. of mf/♀	32,500	23,600	40,000	16,000	7,600	800	0
8.0	Mf (%)	100	100	100	98	78	100	0
	Embryo (%)	0	0	0	0	18	0	0
	Ovum (%)	0	0	0	2	4	0	0
	No. of mf/♀	29,400	28,200	32,700	19,000	14,500	3,700	0
8.6	Mf (%)	98	45	18	11	0	0	0
	Embryo (%)	0	26	18	58	57	45	0
	Ovum (%)	2	29	64	31	43	55	0
	No. of mf/♀	44,500	19,900	14,200	20,900	32,000	500	0

30% horse serum in Simms' solution: 10 ml

Table 3 Relationship between mobility and microfilaria productivity of female adult worms on various serum density

Serum density	Days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
10%	Mobility	##	##	+	+	+	+	+	+	±	-							
	No. of mf/♀	16,500	11,200	8,200	1,400	3,000	0	0	0	0	0							
20%	Mobility	##	##	##	##	+	+	+	+	±	±	±	-					
	No. of mf/♀	16,100	14,500	11,700	13,400	5,900	0	0	0	0	0	0	0	0				
30%	Mobility	##	##	##	##	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	-	
	No. of mf/♀	24,500	15,000	13,000	18,600	9,900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Horse serum in Simms' solution: 10 ml pH 8.0

Table 4 Number of produced mf by adult female worms after culture 24 hours

NO	No. of produced mf/♀
1	30,200
2	27,300
3	31,900
4	28,900
5	17,600
6	35,300
7	22,400
8	25,700
9	43,500
10	43,200
Average	28,600

30% horse serum in Simms' solution: 10 ml pH 8.0

成熟雌虫 1 匹が 24 時間の培養の間で産生される mf 数及びその変動を知る目的で以下の実験を行った。培養液 10 ml 中に雌 3 匹を投入し、10 検体観察した。第 4 表に示

すように、24 時間後に雌虫 1 匹が産生した mf 数は、最高 43,500、最低 17,600。平均 28,600 でありかなりの変動が認められた。

雌：雄の比による mf 産生数について、毎日培養液を交換し観察した。第 5 表に示すように、成虫の運動性及び生存日数についてはほとんど変化が認められなかった。又、産生 mf 数についても、培養 5 日目では雄虫の比が多くなるに従い数も多くなる傾向を示したが全体的には著しい変化はみられず、mf 産生期間の延長も認められなかった。

成熟雌虫 24 時間培養後に産生された mf を使用し、血清濃度を規定量とした pH 8.0、10 ml の培養液中に約 5000 匹の mf を投入し、その運動性及び死亡率について培養液を交換せずに無菌的に少量のサンプルを取り出し観

Table 5 Number of produced microfilariae by various combination female of and male worms

♀ : ♂ / Days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 : 0	Mobility	##	##	##	+	+							
	No. of mf/♀	29,300	16,300	16,900	1,200	0	0	0	0	0	±	±	-
1 : 2	Mobility	##	##	##	+	+							
	No. of mf/♀	31,500	15,700	23,900	52,600	1,500	0	0	0	0	±	±	±
1 : 4	Mobility	##	##	##	+	+							
	No. of mf/♀	28,100	14,200	24,700	16,600	4,400	0	0	0	0	±	±	±

30% horse serum in Simms' solution: 10 ml pH 8.0

Table 6 Mobility and mortality of microfilariae in the serum of various density

Serum density	Days	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
10%	Mobility	##	##	+	+	+	+	-							
	Mortality (%)	0	0	0	0	0	10	100							
20%	Mobility	##	##	##	##	+	+								
	Mortality (%)	0	0	0	0	0	0	10	45	50	82	100			
30%	Mobility	##	##	##	##	##	##	##							
	Mortality (%)	0	0	0	0	0	0	0	5	9	12	29	53	86	100

Horse serum in Simms' solution: 10 ml pH 8.0

Table 7 Effects of compounds on adult of *Litomosoides carinii* in vitro

Compounds	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Mobility (Hours)		No. of produced mf/♀
		1	24	
oxophenarsin hydrochloride (Mapharsol)	200	—	—	0
	20	+	—	0
	2	+	—	0
	0.2	+	±	1,800
	0.02	±	+	40,500
Control	—	±	±	36,000
trimelarsan (Mel W)	170	±	±	290
	57	±	+	240
	17	±	+	400
	5.7	±	+	1,760
	1.7	±	+	8,800
	0.57	±	±	12,800
	0.17	±	±	22,400
Control	—	±	±	28,800
suramin (Germanin)	200	±	±	22,300
	20	±	±	21,700
	2	±	±	31,000
	0.2	±	±	28,300
	0.02	±	±	29,700
Control	—	±	±	27,300

Table 8 Effect of diethylcarbamazine on adult of *Litomosoides carinii* in vitro

Compound	Concentration $\mu\text{g/ml}$	Mobility (Hours)								No. of produced mf/♀ after 24hrs
		1	24	48	72	96	120	144	168	
diethylcarbamazine	1,500	±	±	±	±	±	±	+	+	42,000
	150	±	±	±	±	±	±	+	+	10,700
	15	±	±	±	±	±	±	+	+	13,000
	1.5	±	±	±	±	±	±	+	+	11,700
Control	—	±	±	±	±	±	±	+	+	20,700

察した。第6表に示したように10%の血清濃度では培養早期に既に運動性は弱まり、7日目まで死亡した。20%及び30%の濃度においては4日目迄は両者の運動性は全く変化を認めないが、20%の濃度では5日目から多少運動性が弱くなり、9日目では50%の死亡率を認め、11日目まで死亡した。これに比し30%の濃度では、6日目迄運動性に少しの変化もみられず7日目から多少弱くなり、12日目まで53%の死亡率が認められ、14日目まで死亡した。以上の結果からmfの培養にとっても血清を30%の割合に加えた培養液が最も良い成績を示した。

## 2. 薬剤検定

### 1) 各種薬剤の成虫に対する効果

培養液10ml中にoxophenarsine hydrochloride, trimelarsan, suraminの3者をそれぞれ溶解し、雌3、雄3匹を投入した。第7表に示すようにoxophenarsine hydrochlorideにおいては、1時間後に200 $\mu\text{g/ml}$ の

濃度で運動性(—)、24時間後に2 $\mu\text{g/ml}$ まで薬剤の致死作用が認められ、0.2 $\mu\text{g/ml}$ の濃度までmfの産生が減少した。trimelarsanにおいては、170 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度でも1時間後では運動性に何らの変化も認められず、24時間後でも致死に到らしめたものはみられなかった。しかし、産生されたmf数からは明らかに5.7 $\mu\text{g/ml}$ の濃度までは効果が認められた。suraminについては、200 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度でさえ、24時間後の運動性に何らの変化もみられず、産生mf数についても対照とほとんど変らなかった。

Diethylcarbamazineのみにつき、24時間後に培養液を交換し、産生されたmf数を検討し、次いで経時的に168時間後まで培養液を交換せずに成虫の運動性を観察した。第8表に示すように、24時間後に産生されたmf数の検査では、1,500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でさえその効果が認められず却ってmf数の増加が認められた。又そのmfは活発な運動性を示していた。168時間後までの観察では、

Table 9 Effects of compounds on microfilariae of *Litomosoides carinii* in vitro

Compounds	Concentration μg/ml	Mobility (Hours)	
		1	24
oxophenarsin hydrochloride (Mapharsol)	200	—	—
	20	—	—
	2	±	—
	0.2	+	—
	0.02	+	+
trimelarsan (Mel W)	170	+	—
	57	+	—
	17	+	—
	5.7	+	—
	1.7	+	±
	0.57	+	+
	0.17	+	+
suramin (Germanin)	200	+	+
	20	+	+
	2	+	+
	0.2	+	+
	0.02	+	+
diethylcarbamazine	1,500	+	+
	150	+	+
	15	+	+
	1.5	+	+
Control	—	+	+

全ての薬剤濃度において、対照と全く変らぬ運動性を示していた。以上の結果から、本剤は *in vitro* においては成虫の運動性並びにその mf 産生にはほとんど影響を及ぼさないものであろうと思われる。

#### 2) 各種薬剤の mf に対する効果

培養液 4ml の mf 浮遊液を作り、別に 4 ml 中に定規濃度の 2 倍量の薬剤を溶解させ、両者を混合し計 8 ml としたものが第 9 表に示した薬剤濃度である。尚別に 4 ml の mf 浮遊液に薬剤を含まない 4 ml 培養液を加え、計 8 ml としたものを対照とした。oxophenarsine hydrochloride では、1 時間後で 20 μg/ml の濃度で運動性(—)、24 時間後で 0.2 μg/ml まで致死作用を認めた。trimelarsan は 170 μg/ml の濃度でも著変は認められず、24 時間後に 5.7 μg/ml まで致死作用が認められた。suramin では、200 μg/ml でも 24 時間後には mf の運動性に变化は認められなかった。又 diethylcarbamazine においても 1,500 μg/ml の高濃度にかかわらずその運動性は対照と同様に活発な運動を示していた。

#### 考 察

*Litomosoides carinii* を用いたこれまでの *in vitro* における研究報告をみると、Hawking (1954) は雌成虫

を 35°C で維持し、20 時間後に 4,000~43,000 (平均 18,000) の mf の産生を見、最高 14 日間の生存を認めた。Taylor (1960) は各種培養液を用い、成虫の生存日数及び mf 産生期間を比較し、特に Parker 199 の中に新鮮なラット血清を加えたもので 23 日間生存し、18 日間 mf を産生したと記載している。また培養液を頻繁に交換することが虫体にとって有効であるとしている。しかしこのことは、いまだ栄養条件等完成されていない培地にとっては当然のことと思われる。一方、新鮮血清を加えるたびに mf 産生数の上昇が見られることは、血清中のある成分が雌成虫に刺激的に作用するものと推測している。Weinstein & Sawyer (1961) は *Dirofilaria uniformis* の雌雄成虫の組合せを変え、10% の家免血清を加えた NCTC 109 培養液中で維持したが、mf 産生数の著しい変化は認められなかった。また mf の産生は血清量が高濃度となるに従い多い傾向を示したことなどは著者等の成績と一致している。その他の研究報告として主なもの、成虫では Earl (1959) 及び Taylor (1960) は *Dirofilaria immitis* を用い、mf では Earl (1959), Taylor (1960), Sawyer & Weinstein (1961, 1962, 1963) は *D. immitis* で、Taylor (1960) は *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti* を用いてそれぞれ報告している。著者等は *in vitro* での抗フィラリア剤の薬剤検定を行う際の基礎的培養条件として、Rose *et al.* (1944) が用いた簡単な組成の培養液 Simms solution で pH 及び血清濃度の検討を行った。pH は 8.0 付近で良い成績が得られ、特に血清の添加は高濃度となるに従い成虫及び mf の生存期間の延長を来し、mf 産生数も増加する傾向を示した。従って *L. carinii* の培養条件として両者を考慮することは重要な因子となるものと思われる。一方実際に *in vitro* で薬剤の生物検定を試みたものに、Rose *et al.* (1944) があり、同時に Culbertson & Rose (1944) は *L. carinii* の成虫に対する Neostam 及び Neostibosan の効果を見、両薬剤は 1~5 mg% 以上の濃度で約 4 日後に殺虫効果を示すとした。Hawking (1940) は *W. bancrofti* の mf を用い、35 種に及ぶ種々な薬剤での試験では、砒素剤が有効であると認めたが、*in vivo* において得られる濃度では 1 例も抗フィラリア作用を示さないと記載した。Otto & Maren (1949) は主として *D. immitis* の mf を用い有機剤と有機金属剤の抗フィラリア作用のスクリーニングを行い、phenyl arsenoxides のみが mf に対し有効であり、その作用は antimon 剤に比し、より急速であるとした。更に *D. immitis* の

mf が異った薬剤に対しその作用が本質的に平行していたのにくらべ、試験を行った全ての薬剤に対して *L. carinii* の成虫は僅かに抵抗性があり、mf はさらに著しく抵抗を示す成績を得た。Peters et al. (1949) は *L. carinii* の成虫の酸素消費量に対する薬剤の影響を観察し、シアニン系色素は酸素代謝に関連し、1乃至それ以上の酸素系の阻害を通してその化学療法的効果を発揮すると推測している。Hawking et al. (1952) は *L. carinii* の mf で methylene violet 及び他の色素剤の検定を行い、Kulangara & Subramaniam (1960) は数種の fluoride, 砒素剤, antimon 剤, 抗生物質, *Emiccostemma littorale* (インド産薬草の一種) の水製エキスで *Conisporium guidiensis* (トカゲの一種 *Calotes versicolor* の糸状虫) の mf に対しその効果を検討し、特に antimony trifluoride と ammonium hydrogen fluoride が有効であり、Penicillin 及び Streptomycin は無効であると示した。しかし、sodium fluoride と *Emiccostemma* の水製エキスが同程度の効果を示した点は興味ある結果である。Ahluwalia & Dalip Singh (1961) は potassium permanganate は *L. carinii* の mf に対するよりむしろ成虫に対して効果が認められ、又 Dalip Singh & Ahluwalia (1961) は上記薬剤を *D. immitis* の成虫に使用して致死作用を認めたが *D. immitis* 及び *D. repens* の mf に対しては無効であった。*L. carinii* 及び *D. immitis*, *D. repens* の mf に対する同薬剤の作用の差は、mf の生理学的な相違によるものであろうと考察している。概して Hawking (1963) は *in vitro* テストの価値は、*in vitro* で有効であった化合物の作用機構の解明と、化学的に類似したタイプをもった多数の化合物の比較にあると指適している。著者等の今回の実験では *L. carinii* の雌成虫に対する4種薬剤の作用を特に mf 産生数の面まで検討を加えた。*L. carinii* を用いる利点は、小林等 (1967) による感染仔虫の定量的感染方法により、ほぼ一定数の同一周令の成虫が大量にコトナットの胸腔内より摘出出来る点にある。また *in vitro* においては、種々な薬剤に対する虫体の影響を直接的に、しかも短期間に確認出来ることである。一方、*in vitro* において雌成虫を維持し、産生された mf を使用することにより、ほとんど血液成分を含まない mf を純粋に分離することが出来る。また大量培養も可能で、虫体及び虫体の代謝産物等を用いての免疫学的な応用価値も広いものと思われる。

## 総 括

1. *Litomosoides carinii* 感染後、約 14 週目のコトナットの胸腔内より無菌的に白金線で成熟雌虫を摘出し、約 37°C の滅菌生理的食塩水中で数回洗滌した後、Simms' solution で培養した。その結果、pH 8.0 附近、馬血清濃度 30% で最も長期間生存し、16日間であった。mf の産生は培養開始後 6 日目迄認められた。
2. 雌虫 24 時間培養後に産生された mf 数は、1 匹あたり最高 43,500、最低 17,600、平均 28,600 であり、かなりの変動がみられた。
3. 雌：雄の比を 1:0, 1:2, 1:4 の割合で培養した結果からは、雄を入れておいても mf 産生期間の著明な延長は認められなかった。
4. 観察に用いた mf は、成熟雌虫 24 時間培養後に産生されたものを使用した。mf の培養においても 30% の血清濃度が最も長期間生存し、13日間であった。
5. 成虫に対する薬剤効果は、oxophenarsine hydrochloride 及び trimelarsan がその運動性及び mf 産生数に影響を与え、特に oxophenarsine hydrochloride が 0.2 µg/ml の濃度まで著明な効果を認めた。suramin 及び diethylcarbamazine の 2 者は、運動性のみならず mf 産生数に対しても全くその効果が認められなかった。
6. mf に対する薬剤効果もほぼ同様な傾向を示し、oxophenarsine hydrochloride では 0.2 µg/ml、trimelarsan では 5.7 µg/ml の濃度まで完全に運動性の停止が認められた。一方 suramin では 200 µg/ml、diethylcarbamazine では 1,500 µg/ml の高濃度でもその運動性に変化は認められなかった。

本研究に際し、御指導及び御校閲を賜った当研究部長佐々学教授、田中寛助教授に深く謝意を表す。又、種々の御協力をいただいた寄生虫研究部の諸氏に深く感謝する。

## 参 考 文 献

- 1) Ahluwalia, G. S. and Dalip Singh (1961): Preliminary studies on the *in vitro* action of potassium permanganate on the adult worms and microfilariae of *Litomosoides carinii*. Ind. J. Malariol., 15, 4, 301-305.
- 2) Culbertson, J. T. and Rose, H. M. (1944): Chemotherapy of filariasis in the cotton rat by administration of Neostam and Neostibosan. J. Pharm. Exptl. Therap., 81, 189-196.

- 3) Dalip Singh and Ahluwalia, G. S. (1961): Studies on the *in vitro* action of potassium permanganate on the adult worms of *Dirofilaria immitis*, microfilariae of *Dirofilaria repens* and of *Dirofilaria immitis* and of hydrogen peroxide on the adult worms of *Litomosoides carinii*. Ind. J. Malariol., 15, 4, 307-311.
- 4) Earl, P. R. (1959): Filariæ from the dog *in vitro*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 77, 163-175.
- 5) Hawking, F. (1940): Chemotherapy of filariasis *in vivo* and *in vitro*. J. Trop. Med and Hyg., 204-207.
- 6) Hawking, F. (1950): Some recent work on filariasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med & Hyg., 44, 153-186.
- 7) Hawking, F., Ormerod, W. E., Thurston, J. P. and Webber, W. A. F. (1952): The antifilarial action and toxicity of methylene violet and other compounds of the phenosafranine series. Brit. J. Pharmacol., 7, 494-508.
- 8) Hawking, F. (1954): The reproductive system of *Litomosoides carinii*, a filarial parasite of the cotton rat. III. The number of microfilariae produced. Ann. Trop. Med. & Parasitol., 48, 382-385.
- 9) Hawking, F. (1963): Chemotherapy of filariasis. II. General technique for measuring chemotherapeutic activity. Exptl. Chemotherap., Vol. I. Acad. Press. N. Y. London. 1008 pp.
- 10) Kulangara, A. C., and Subramaniam, R. (1960): Preliminary studies on the effect of certain compounds on the filarial worms of the lizard, including an estimate on the toxicity of sodium fluoride. Ind. J. Med. Research., 48, 698-704.
- 11) Otto, G. F. and Maren, T. H. (1949): Studies on the chemotherapy of filariasis. Am. J. Hyg., 50, 92-141.
- 12) Peters, L., Bueding, E., Valk, A. D. Jr., Higashi, A. and Welch, A. D. (1949): The antifilarial action of cyanine dyes. (1) The relative antifilarial activity of a series of cyanine dyes against *Litomosoides carinii*, *in vitro* and in the cotton rat. J. pharm. Exptl. Therap., 95, 212-239.
- 13) Rose, H. M., Culbertson, J. T., and Molloy, E. (1944): An *in vitro* method for the bio-assay of chemotherapeutic agents in filariasis. J. Parasit., 30, (Suppl.), 16-17.
- 14) Sawyer, T. K. and Weinstein, P. P. (1961): Survival of *Dirofilaria immitis* microfilariae in modified physiological saline solution. J. Parasit., 47 (Suppl.), 24.
- 15) Sawyer, T. K., and Weinstein, P. P. (1962): Development *in vitro* to the sawsage of microfilariae of the dog heart worm, *Dirofilaria immitis*. J. Parasit., 48, 35-36.
- 16) Sawyer, T. K. and Weinstein, P. P. (1963): The *in vitro* development of microfilariae of the dog heart worm *Dirofilaria immitis* to the "Sawsage-form". J. Parasit., 49, 218-224.
- 17) Taylor, A. E. R. (1960): Maintenance of filarial worms *in vitro*. Exptl. Parasit., 9, 113-120.
- 18) Weinstein, P. P. and Sawyer T. K. (1961): Survival of adult of *Dirofilaria uniformis in vitro* and their production of microfilariae. J. Parasit., 47 (Suppl.), 23-24.
- 19) 小林準三, 松田肇, 酒井健夫(1967): ネズミ類を用いた抗フィラリア剤スクリーニングテストについて. 寄生虫誌, 16, 277-278.

**Abstract***IN VITRO* MAINTENANCE AND FILARICIDES TEST OF *LITOMOSOIDES CARINII*, THE COTTON RAT FILARIA.

HAJIME MATSUDA, JUNZO KOBAYASHI AND TAKEO SAKAI

*(Department of Parasitology, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo)*

The adult worms of *Litomosoides carinii* were collected aseptically from pleural cavity of cotton rats 14 weeks after the infection, and were transferred to culture media for the purpose of comparing the length of survival and the production of microfilariae under various conditions. The culture media used were Simms' solution containing horse sera at various concentrations and adjusted at various pH. Best results were obtained with the solution at pH 8 containing 30% serum, where adult worms survived for 16 days and the microfilarial production lasted 6 days. The number of microfilarial production per day per female varied from 17,000 to 43,000, with the average of 28,000. No significant differences were seen in the period and amount of microfilaria production among the groups with different combinations of female and male numbers, such as 1:0, 1:2 and 1:4. Microfilariae survived in the media up to 13 days.

Tests were made on the effects of four compounds against adults and microfilariae in the culture media. The organoarsenic compounds, oxophenarsine hydrochloride (Mapharsol) and trimelarsan (Mel W), showed the filaricidal activity on both adults and microfilariae as well as the effects of reducing the production of microfilariae by the females at concentrations up to about 0.2 and 5.7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively, at exposures for about 24 hours. On the other hand, suramine (Germanin) at concentrations 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or lower as well as diethylcarbamazine (Supationin) at 1,500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  or lower showed no effect on both adults and microfilariae *in vitro*.