

豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養

II. 血清中の発育促進物質の検討

畑 英 一†

日本獣医畜産大学寄生虫学教室

(昭和53年1月25日 受領)

緒 言

In vitro 培養において血清は種々の点ですぐれた発育効果を有することが知られているが同時に未知の要素を多く含んでいるため種々の点で不安定であり多くの問題をかかえている。*In vitro* 培養は培養条件の再現性とその基準化および既知の合成培養液を用いる方向にあり、その見地から組織培養の分野では合成培養液の研究は多く、いくつかのすぐれた合成培養液が作製されているが無血清による完全合成培養液の完成にはまだ多くの問題が残されているのが現状で、また近年血清の化学物質等による汚染の問題も加味され現在のこの方面の研究の大きな課題となつている。

一方寄生虫の分野特に寄生原虫類の培養における血清中の発育物質についての研究はいくつか知られている。たとえば *Plasmodium knowlesi* の *in vitro* 培養に Cohn の血漿分画IV-4が血漿と置換えることができ (Geiman *et al.*, 1966), さらにこれをクロロホルムにて抽出しこの分画を用いて培養を行なつた結果、血漿添加の場合と同様の効果を認め、さらにはこれをステアリン酸によって置換えることに成功している (Siddiqui *et al.*, 1967), また Boñe and Parent (1963) は *Trypanosoma cruzi* の培養で血清中の必須発育因子としてステアリン酸を認めている。さらに Wyss *et al.* (1960) は *Trychomonas foetus* の培養において脂肪酸とコレステロールが *T. foetus* の *in vitro* 培養における重要な成分であるとのべているなどいくつかのこ

ろみ報じられており、その多くは脂肪酸、コレステロールの重要性をのべている。

一方哺乳動物寄生性の蠕虫類においては、*in vitro* 培養上の血清の重要性について以前から良く知られているが (Tayler and Baker, 1968), 血清中の発育物質についての研究は非常に少ない。しかし近年 Heath and Elsdm-Dew (1972) は *T. saginata* の培養において血清を硫酸による塩析で分画をこころみアルブミンと pseudoglobulin 分画に高い発育促進活性を認めている。豚肺虫 *Metastrongylus apri* の培養に関しては前報による結果から虫体の5期への発育にL細胞の無血清培地として開発された化学的に既知な合成培養液 NCTC 109の単独下では $18.7 \pm 7.3\%$ の虫体が5期に発育するにすぎないが、これに20%の割で仔牛血清を添加したものでは非常に良好な発育を示しその $85.7 \pm 6.7\%$ の虫体が5期に発育し、さらには性成熟にまで達する (畑ら, 1973; 1975 a; 1975 b; 1976)。この様に NCTC 109への血清の添加は豚肺虫の培養にとつて非常に大きな効果を有すると言ふ知見から血清中の発育促進物質の検討をこころみ若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1) 培養方法

前報 (畑ら, 1973; 1975 a; 1975 b; 1976) において行なつた培養方法の検討の結果良好とされた方法にしたがつた (Table 1)。また感染ミミズより分離した第3期虫体から培養を行ない、5期への発育を評価の指標とした。

分画後得られた血清の各分画はもとの血清量に換算

† 現所属, 千葉大学医学部寄生虫学教室

Table 1 Methods used for the culture of *M. apri in vitro*

| | | |
|------------------------------|---------------------------|------------------|
| Medium | NCTC 109 | 80% |
| | Calf serum (GIBCO) | 20% |
| | Antibiotics | |
| | Penicillin | 200 i. u/ml |
| | Streptomycin | 100 γ /ml |
| Days in culture | 14 days | |
| Frequency of medium changing | Twice a week | |
| Total worms cultured | 100-200 worms/tube | |
| Gas phase | 5% CO ₂ in air | |
| Culture method | Standing culture | |

し、NCTC 109に20%の割で加え培養を行なった、また1回の実験に対しそれぞれ3本の培養管を用し、培養の準備、培養後の虫体の処理に関しては前報の方法にしたがった。

2) 血清の加熱処理

血清の対する熱の影響を見るため、血清をウォーターパス中にて56~75C まで種々の温度下にて30分間加熱処理を行なった。その後血清は-20C 下に保存した。

3) 飽和硫酸による塩析

仔牛血清に飽和硫酸を加え $1/3$, $1/3 \sim 1/2$, $1/2 \sim 3/4$ 飽和によつて沈澱する分画と $3/4$ 飽和によるその上清分画の計4種の分画に分けた。これらの分画はその後生理食塩水中にて4C 下で十分に透析を行なった後、コロジオンバック (エムエス機器) にて濃縮し、その後生理食塩水を加えもとの血清量にもどした後、全て0.45 μ のミリポアフィルターにて濾過滅菌後使用に供した。

4) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画

硫酸アルブミン分画を DEAE セルロースを用いさらに分画を行なった。その条件は硫酸アルブミン分画 (OD: 83) を3ml, DEAEセルロース30g, カラムの大きさ2.5 \times 30cm, 流速21ml/時間, フラクションコレクター (ISCO Model 1200 PUP) にて試験管当り3.5ml 採取, 緩衝液0.01 M Tris-HCl pH 8.0を用い, 0.1 M NaCl より出発し段階的に塩濃度を0.5M NaCl まで上げて行つた。分画後280nm の紫外外部吸収を UV モニター (ISCO Model UA-5) にて測定し、得られた分画はコロジオンバックを用いて4C 下で濃縮し、さらに生理食塩水にて4C 下で十分に透析を行なった。透析後各分画はそれぞれもとの硫酸アルブミン量に調整後、濾過滅菌し使用した。

5) 免疫電気泳動

DEAE セルロースによる分画およびいくつかの市販アルブミンについて免疫電気泳動を実施した。すなわちチメロサルを0.01%の割に加えた Veronal 緩衝液 (pH 8.6) を用いて0.9%の割に寒天 (アガロース) を溶かし、この寒天液10ml を8 \times 10cm のスライドガラスに流し泳動板を作製した。泳動は24 mA で80分行なつた。泳動後、抗仔牛ウサギ血清 (生化学工業) を加え、室温下にて反応を行なわせ沈降線の出現を見た。なお染色はアミドブラックにて行なつた。

6) 市販アルブミン

Cohn アルブミン V (Armour), 結晶アルブミン (Pentex) は市販のものを用いた。これらは生理食塩水にて透析後、硫酸アルブミンの OD 値に合わせ濃度の調節を行なった後、濾過滅菌し使用した。

結 果

1) 血清の加熱処理

血清中の発育因子の熱に対する影響を見るため血清を56C から75C まで各30分の加熱処理を行ない、その影響について検討した。その結果、Table 2 に示した様に

Table 2 Effect of the heat treatment of sera on the development of *M. apri in vitro*

| Medium* sera heat treated at | % 5th stage worms | % mortality |
|---------------------------------|----------------------|-------------|
| Untreated serum | 75.2 | 10.5 |
| 56 C 30 min. | 72.2 | 8.8 |
| 65 C min. | 83.4 | 8.4 |
| 70 C min. | 73.5 | 6.7 |
| 75 C min. | 79.7 | 8.7 |
| NCTC 109 | 9.3 | 32.0 |

* NCTC 109+20% calf serum

Table 3 Effects of the ultrafiltrated calf serum on the development of *M. apri* to the 5th stage larvae

| Medium | % 5th stage worms | % mortality | Total No. of worms |
|-------------------------------------|-------------------|-------------|--------------------|
| NCTC 109+20% calf serum | 62.1 | 23.9 | 611 |
| NCTC 109+20% ultra-filtrated serum | 4.1 | 71.9 | 1,095 |
| NCTC 109+20% serum protein fraction | 73.1 | 13.5 | 950 |
| NCTC 109 alone | 6.4 | 53.9 | 815 |

虫体の5期への発育には56~75°C 30分の加熱処理まで影響は認められず、血清中の発育因子はある程度耐熱性であることが示唆された。

2) 血清の限外濾過

血清をコロジオンバックを用いて限外濾過を行ない、その濾液と濾過されなかつた蛋白液とに分け比較培養をこころみた。その結果血清の限外濾液中での虫体の5期への発育と NCTC 109単独中でのそれとの間に差が認められなかつた。また濾過されなかつた血清中の高分子部分を加えた場合には血清添加の場合とほとんど変わらぬ好発育を示し、血清中の比較的高分子の分画に活性のあることが推察された (Table 3)。

3) 硫酸塩析法による分画

飽和硫酸を用いて血清を $1/3$ 飽和、 $1/3 \sim 1/2$ 飽和、 $1/2 \sim 3/4$ 飽和および $3/4$ 飽和で沈澱しなかつた上清の計4種の分画に分け検討をこころみた。その結果、Table 4に示した様に $1/2 \sim 3/4$ 飽和のアルブミン分画に最も発育促進活性が高く見られ、血清添加の場合とほとんど変わらなかつた。また $1/3 \sim 1/2$ 飽和の pseudoglobulin 分画にも高い活性が認められた。しかし $1/3$ 飽和の euglobulin 分画では活性が落ち死亡率も上昇の傾向がみられた。さらに $3/4$ 飽和の上清分画ではその活性はほとんど認められなかつた。

4) DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画

硫酸塩析によって得たアルブミン分画に高い活性を認めたことから、このアルブミンを DEAE セルロースカラムクロマトによって分画し、Fig. 1に示した様な5つのピークを得、それを6つの分画に分けた。これらの分画を用いて培養をこころみた結果、F3のアルブミン分画およびF2の $\alpha\beta$ -グロブリン分画に活性を認め、またF1とF4分画ではわずかに活性が認められたもののF5、F6分画ではほとんど活性が認められなかつた (Table 5)。これらの分画を用いて免疫電気泳動を実施した結果、 $\alpha\beta$ -グロブリン分画にはほとんどアルブ

Table 4 Comparison of the development of *M. apri* to the 5th stage larvae in the serum proteins fractionated by ammonium sulphat

| Medium | % 5th stage worms | % mortality |
|-------------------|-------------------|-------------|
| Euglobulin F. | 53.5 | 35.4 |
| Pseudoglobulin F. | 69.1 | 7.1 |
| Albumin F. | 74.4 | 1.9 |
| Albumin sp. F. | 20.4 | 19.8 |
| Calf serum | 82.1 | 2.5 |
| NCTC 109 | 18.3 | 23.0 |

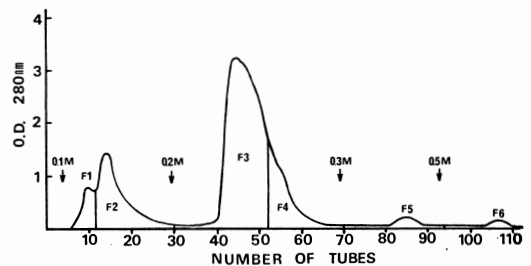


Fig. 1 Elution patterns of albumin fraction by DEAE-cellulose ion exchange chromatography.

ミンの混入は認められなかつた。これらのことからグロブリン分画にも発育活性の存在が示唆された。また同時に行なつた硫酸アルブミン分画を DEAE 処理し各分画を集めたものでは対照の仔牛血清の添加に比べ虫体の5期への発育が劣り、死亡率も上昇する傾向がみられた。

5) 各種アルブミン分画の検討

アルブミン分画に高い活性が認められたことから、いくつかのアルブミンを用いその発育促進活性について検討をこころみた。その結果、Table 6に示した様に免疫学的にかなり純度の高い結晶アルブミンの添加によっても発育活性を得ることができた。しかし一方、市販アルブミンにおいてはその活性に lot 差を認めた。また免疫

Table 5 Comparison of the development of *M. apri* to the 5th stage larvae in the serum proteins fractionated by DEAE-cellulose

| Medium | % 5th stage worms | % mortality |
|----------------|-------------------|-------------|
| F 1 | 31.9 | 62.0 |
| F 2 | 54.7 | 48.5 |
| F 3 | 56.7 | 51.5 |
| F 4 | 39.8 | 56.5 |
| F 5 | 23.5 | 80.0 |
| F 6 | 21.3 | 81.0 |
| Total fraction | 60.6 | 22.0 |
| Calf serum | 90.1 | 4.1 |
| NCTC 109 | 20.1 | 49.0 |

Table 6 Effects of the various commercial albumin on the development of *M. apri* to the 5th stage worms

| Albumin | % 5th stage worms | % mortality |
|--------------------------|-------------------|-------------|
| Cohn F. V (Armour) | 45.4 | 38.4 |
| (Armour) | 37.5 | 49.2 |
| Crystal albumin (Pentex) | 59.4 | 57.0 |
| (Pentex) | 58.0 | 6.5 |

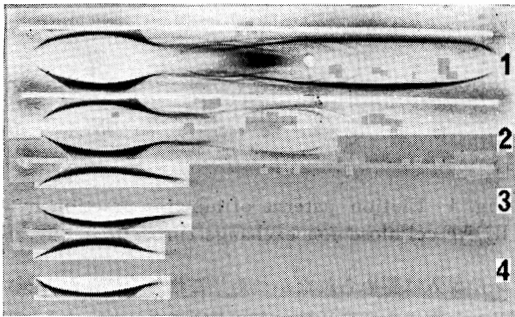


Fig. 2 Immunoelectrophoretic patterns of various albumin fractions. 1. calf serum; 2. albumin fraction precipitated by ammonium sulphate; 3. Cohn albumin V; 4. crystal albumin; X. anti-calf rabbit serum.

電気泳動により確かめた結果、結晶アルブミンには α -グロブリンの混在を認めなかつた (Fig. 2).

考 察

豚肺虫の培養において NCTC 109への血清を添加することにより非常に大きな発育促進効果が得られたこと

から、その発育促進物質の追求をこころみた。その結果、免疫電気泳動的に純度の高い結晶アルブミンを血清の代わりに加えることにより、ある程度の lot 差があるにせよ、かなりの部分の虫体を5期に発育させることができた。このことから結晶アルブミンは血清の発育促進効果の大きな部分をしめしていることが示唆された。なお結晶アルブミンは *Schistosoma mansoni* の schistosomule の培養においてこれを用い、その生存期間は延長したが発育は認められなかつたと言う否定的結果も知られている (Cheever and Weller, 1958)。一方アルブミンは多くの親水性物質および一部の脂溶性物質と結合しやすいと言われていることが知られており (赤堀・水島, 1955; Saifer and Goldman, 1961)、これらの市販アルブミンは Cohn 処理によつて分画するため、その過程に高濃度のエタノール処理がなされていることからアルブミンに付着していると考えられる活性物質の一部がエタノールに溶出したのではないかと仮定にもとづき、補足的に硫酸アルブミン分画を Cohn の方法にしたがい低温エタノール処理を行なつたところ活性の低下が認められた。このことから lot 差に影響をもたらしている活性物質は、その一部がエタノールに溶出することに原因しているのではないとも推察される。このことに関連した知見はいくつかの寄生原虫類 (Bonè and Parent, 1963; Geinman *et al.*, 1963; Cunningham *et al.*, 1972 など) や、組織培養における実験 (Ham, 1963; Yamane *et al.*, 1975 など) においても得られており、アルブミン付着性物質として脂肪酸の重要性が指摘されている。また最近では組織培養の同種の研究でホルモンの重要性が指摘されており (林・Sato, 1978)、本実験に関してもそれらの可能性を否定できない。

Hansen and Berntzen (1969) は *Hymenolepis nana* と *Caenohabditis briggsae* の培養において血清中の発育促進物質は β -グロブリンであることを報告しており、また Heath and Elsdm-Dew (1972) も *Taenia saginata* の培養において飽和硫酸による血清蛋白の分画からアルブミンと pseudoglobulin に高い活性を得ている。さらに、細胞培養における血清中の発育物質として α -酸性グロブリン、酸性グリコプロテインなどグロブリン分画に活性物質を認めた報告もある (黒田, 1974)。一方、本実験においては比較的发育効果の高かつた lot の結晶アルブミンを添加した培地における発育も、血清を添加した場合のそれに比べると十分であるとは言えず、また DEAE セルロースによつて分離した $\alpha\beta$ -グロブリン分画にはほとんどアルブミンの混在を認めていない。

これらのことからアルブミン分画の活性にはわずかに劣るがグロブリン分画中にも活性物質の存在することが示唆された。

Ross and Bueding (1950) は *S. mansoni* の維持に際し、血清中の蛋白質や他の透析不能な成分は虫体の生存にあまり影響しないとのべている。しかし、*S. mansoni* の場合と異なり、本実験では発育促進物質が血清中の蛋白質部に存在しており、この点では Heath and Elsdm-Dew (1972) の *T. saginata* における知見とほぼ一致していた。

硫酸アルブミン分画を DEAE セルロースで処理したものは、処理しないものに比べ活性がやや落ちる傾向を認めた。このことはあるいは発育促進物質の一部がゲルに吸着された可能性も考えられ、今後の検討すべき問題として残されよう。

要 約

豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養を進めている過程で血清が第3期虫体の5期への発育に非常に大きな効果をもたらしていることがわかり、このことから豚肺虫の *in vitro* 培養における血清中の発育促進物質の検討をこころみた。その結果、

1) 血清中の発育促進物質は75C 30分の加熱処理に対しほとんど影響を受けることなくある程度耐熱性であった。

2) 血清の限外濾過による検討から発育促進活性は濾液中にはほとんど認められず、濾過されなかつた高分子分画中に認められた。またこの発育促進物質は非透析性であった。

3) 血清の硫酸による塩析および DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによる分画から、その活性はアルブミン分画中に最も高く見られ、また、グロブリン分画にも高い活性が見られた。

4) 免疫電気泳動によりほとんどグロブリンの混在を認めなかつた結晶アルブミンの添加により、高い発育促進活性を得ることができた。

謝 辞

本研究の御指導と御校閲を賜わつた藤田濤吉教授ならびに元農林省家畜衛生試験場大木与志雄博士に深く感謝致します。また筑波大学安羅岡一男教授、石井俊雄教授ならびに日本獣医畜産大学寄生虫学教室員諸氏に心からお礼申し上げます。

文 献

- 1) 赤堀四郎・水島三一郎(1955)：蛋白質化学3巻，343頁，共立出版，東京。
- 2) Boñe, G. J. and Parent, G. (1963) : Stearic acid, an essential growth factor for *Trypanosoma cruzi*. J. Gen. Microbiol., 31, 261-266.
- 3) Cheever, A. W. and Weller, T. H. (1958) : Observations on the growth and nutritional requirement of *Schistosoma mansoni in vitro*. Am. J. Hyg. 68, 322-339.
- 4) Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L. Jr., Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M. and Taylor, H. L. (1946) : Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV., J. Am. Chem. Soc., 68, 459-475.
- 5) Cunningham, L. V., Kazan, B. H. and Kawahara, S. S. (1972) : Effect of long-chain fatty acids on some trypanosomatid flagellates. J. Gen. Microbiol., 70, 491-496.
- 6) Geinman, Q. M., Siddiqui, W. A., and Schell, J. V. (1966) : Plasma replacement for *in vitro* culture of *Plasmodium knowlesi*. Science, 153, 1129-1130.
- 7) Ham, G. R. (1963) : An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Exp. Cell Res. 29, 515.
- 8) 畑英一・藤田濤吉・安羅岡一男(1973)：豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養(第一報)。寄生虫誌，22(増)，83。
- 9) 畑英一・藤田濤吉・安羅岡一男(1975)：豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養(2)。寄生虫誌，24(増)，12。
- 10) 畑英一・藤田濤吉・安羅岡一男(1975)：豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養(3)。各種培養条件の検討。寄生虫誌，24(増)，54。
- 11) 畑英一・藤田濤吉・安羅岡一男(1976)：豚肺虫 *Metastrongylus apri* の *in vitro* 培養(5)。第3期虫体から preadult への培養。寄生虫誌，25(増)，65。
- 12) 林泉・Sato, G. H. (1978)：細胞培養液における血清の役割。科学，48，33-40。
- 13) Heath, D. D. and Elsdon-Dew, R. (1972) : The *in vitro* culture of *Taenia saginata* and *Taenia taeniaeformis* larvae from the oncosphere., with observations on the role of serum for *in vitro* culture of larval cestodes. Internat. J. Parasit., 2, 119-130.
- 14) 黒田行昭(1974)：動物組織培養法。第1版，409頁，共立出版，東京。
- 15) Miller, C. A. and Johnson, W. H. (1960) : Nutrition of *Paramecium*: A fatty acid requirement. J. Protozool., 7, 297-301.

- 16) 中井準之助・山根績・山田正篤・井上幸重・堀川正克 (1976) : 組織培養, 608頁, 朝倉書店, 東京.
- 17) Ross, O. A. and Bueding, E. (1950) : Survival of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 179-182.
- 18) Saifer, A. and Goldman, L. (1961) : The free fatty acids bound to human serum album. J. Lipid Res., 2, 268-270.
- 19) Siddiqui, W. A., Schnell, T. V. and Geinman, Q. M. (1967) : Stearic acid as plasma replacement for intracellular *in vitro* culture of *Plasmodium knowlesi*. Science, 156, 1623-1625.
- 20) Tayler, A. E. R. and Baker, J. R. (1968) : The cultivation of parasites *in vitro*. Blackwell scient. publ., Oxford, p 377.
- 21) Wyss, W., Krodolfer, F. and Meier, R. (1960) : Lipophilic growth factor for *Trichomonas*. Exp. Parasit., 10, 66-71.
- 22) Yamane, I., Murakami, O. and Kato, M. (1975) : Role of bovine albumin in a serum-free suspension cell culture medium (38823). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 149, 439-442.

Abstract

IN VITRO CULTIVATION OF *METASTRONGYLUS APRI* II. GROWTH PROMOTING SUBSTANCES IN SERUM

HIDEKAZU HATA

(Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical College,
Musashino City, Tokyo, Japan)

In the course of the studies on *in vitro* cultivation of *Metastrongylus apri*, serum was found to be an essential ingredient of the culture medium for the development to the 5th stage worms. The present study was performed in attempts to obtain growth promoting substances in serum for *M. apri* *in vitro*. The investigations recorded in this paper may be summarized as follows :

- 1) The growth promoting substances in serum were heat-stable (75C for 30 min.).
- 2) The growth promoting activity was not recognized in serum ultrafiltered, but in the protein fraction. It was found that the substances were non-dialysable.
- 3) When serum was fractionated by ammonium sulphate, the growth promoting activity existed mainly in the albumin fraction, some in the pseudoglobulin fraction and few in the euglobulin fraction. No activity was seen in the supernatant fraction of albumin.
- 4) The albumin fraction was furthermore fractionated by DEAE-cellulose ion exchange chromatography, and 5 peaks were obtained. Growth promoting activity seemed to be present mainly in the albumin and $\alpha\beta$ -globulin fraction.
- 5) A great number of the 5th stage worms could be obtained in the medium supplemented with a purified crystal albumin which was not found to contain other proteins by the immuno-electrophoretic examination.