

## 寄生蠕虫類の染色体に関する研究 (II)

マンソン裂頭条虫における染色体の三倍性  
および単為生殖の細胞学的機構

佐々田 勝義

久留米大学医学部寄生虫学教室

(昭和53年10月31日 受領)

### 緒言

条虫類における染色体および配偶子形成過程に関する細胞学的研究は比較的少なく、なかでも *Diphyllobothriidae* の染色体に関しては、わずかに Wolcott (1959) と Wikgren and Gustafsson (1965) の報告が見られるに過ぎない。

条虫類における細胞学的研究が少ない理由としては、主に技術面でのむずかしさがあげられている。すなわち、虫体は弾力性のある角皮で被われ、強力な筋肉層、体肉組織の融合細胞形成などの特徴があるほか、細胞および染色体が非常に小さく、また plerocercoid の体細胞分裂時間は非常に短い。したがって、切片法や押しつぶし法によつても、正確に染色体を観察することは困難であると言われていた (Smyth, 1956; Wikgren, 1966)。

最近、長 (1978) は吸虫類の肝吸虫 (*Clonorchis sinensis*) について、染色体、配偶子形成過程および受精過程の観察を Snow (1963) の押しつぶし法を応用して行ない、多大な成果をあげている。そこで筆者は、上記の方法を条虫類に応用し、マンソン裂頭条虫 (*Diphyllobothrium erinacei*, 以下 *D. erinacei* と略す) について細胞学的研究を行なつた。

*D. erinacei* は、イヌおよびネコには通常かなり高率に自然感染が見られる。またヒトにおいては、もつぱら幼虫の寄生による sparganosis が主であるが、時折成虫の寄生が見られるなど、臨床面においても重要視されている人体寄生条虫の1つである。

今回筆者は、*D. erinacei* の plerocercoid および成熟虫体を用いて細胞学的観察を行ない、本条虫が染色体

数において三倍性であること、精子形成が不規則で完成精子ができないこと、また第一卵母細胞には精子の侵入がないまま『体細胞的』に分裂し、単為生殖により三倍性の卵が形成されることをつきとめたので報告する。

### 実験材料および方法

Plerocercoid は、久留米市周辺で捕獲したヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) の筋肉より採集し、直ちに固定したグループ、培養後固定したグループおよび頭端より10~20mmの長さに切り子イヌに経口感染させたグループの3つに大別した。なお、培養グループはさらに8グループに分け、各々0.01%のホルミンを含む TC-199 組織培養液 (37C) 中で、1……6, 9, 12時間の短期培養を行なつた後固定した。

成熟虫体は、同地域で捕獲したイヌ・ネコに自然感染していたもの、および人工感染させた子イヌより採集し、直ちに固定した。固定はいずれも酢酸アルコール (1:3) で24時間行ない、その後アルコール塩酸カルミン (alcoholic hydrochloric acid-carmin, Snow, 1963) で24時間染色し、70%エタノール中に保存し実験に供した。

体細胞染色体の観察には plerocercoid を使用した。この場合、plerocercoid は45%酢酸中で20~30分脱色・膨化後、マイクロペンで3~5mmの長さに切断し、各々その1片をスライドガラス上に取り、押しつぶし標本とした。上述の種々な培養時間におけるホルミン処理群および非処理群の plerocercoid のうち、体細胞分裂中期像が最も多く観察されたのは、5時間処理の場合であった。したがって後述の体細胞染色体についての記述

は、コルヒチン処理5時間のものについてである。

成熟虫体は45%酢酸中で30~60分脱色・膨化後、体節ごとに切断し、精子形成および卵子形成の観察に用いた。精子形成については、実体顕微鏡下で注意深く精巢を取り出し、押しつぶし法により観察した。また卵子形成の場合には、マイクロピンで卵巣・輸卵管・メーリス腺および子宮の一部を一塊としてスライドグラス上に取り出し、周囲の不要組織は除去し、同様に押しつぶし法により観察した。なお、いずれの場合も染色が薄くて観察が困難な時には、3%アルコール・フクシン、5%石炭酸、氷酢酸およびフォルマリンの混合液(1:9:1:1)で重染して観察した。

### 観察結果

#### 1. 体細胞染色体

染色体の広がり良好な240細胞の中期核板において $2n=27$ であることが確認された(Fig. 1)。染色体の長さは最大のもので約 $2.0\mu\text{m}$ 、最小のもので約 $0.5\mu\text{m}$ であった。27個の染色体は、形態の類似したものを3個ずつの組に分類することができるので、これらを大きさの順にNo. 1, No. 2, No. 3...No. 9とする(Fig. 2)。Fig. 2により核型の特徴は、次中部着糸型が3個(No. 5)、次端着糸型が12個(No. 1, No. 2, No. 7, No. 8)、および端着糸型あるいはアクロセントリック型が12個(No. 3, No. 4, No. 6, No. 9)であった。以上のような特徴から、*D. erinacci*は9を基本数とする三倍体であることが示唆される。

#### 2. 精子形成と染色体

精巢全域にわたり、精子形成過程および精子完成過程において次のような種々さまざまな異常が観察された(Fig. 3)。すなわち、条虫類の正常な精子形成過程と考えられる16個の第一精母細胞のグループ(Rybicka, 1967; Kazacos and Mackiewicz, 1972)はまったく観察されず、それに近いものとして同調的に中期に達した14個の第一精母細胞グループが、ただ1例観察されたのみであった(Fig. 4)。また、第一精母細胞における中期染色体はすべて一価染色体であり、広がり良好な第一中期における一価染色体の数は27個であった(Fig. 4)。第二精母細胞に相当する32個の細胞群や、成熟分裂直後の64個の精細胞のグループはまったく観察されなかった。精巢中には、精子完成過程の異常と考えられる変形した精子様の核が少数観察されたに過ぎなかった(Fig. 5)。Fig. 5はその1例であり、32個の変形した精子様の核の集団である。しかしこれらの核は、第二精

母細胞が直接変形したものか、あるいは精原細胞の分裂異常により第一精母細胞のときにすでに32個の細胞群が形成され、退行現象として核が変形したものなのかは明らかでない。時折、多数の一価染色体が大型細胞内に観察され、染色体数が300~500個にも達するような場合があった。このような細胞は、内部倍数性(endopolyploidy)細胞かあるいは融合細胞(syncytium)と考えられる。また精巢内に完成精子が認められない理由としては、精原細胞における内部倍数化、融合細胞化、成熟分裂における一価染色体の形成、および種々な細胞退行現象などのためではないかと考えられる。

#### 3. 卵子形成と染色体

卵巣の周辺部には、多数の卵原細胞があり、中心部には大型の核を有する第一卵母細胞が見られた。卵原細胞の中期像はほとんど観察されず、また卵巣内の第一卵母細胞はすべて前期の状態であった。卵巣を出た第一卵母細胞は輸卵管を通過した後、メーリス腺から子宮起始部へ達する間に、卵黄細胞と合して卵殻に包みこまれる。卵殻内には1個の第一卵母細胞と13~15個の卵黄細胞が観察された(Fig. 6)。卵殻内の第一卵母細胞の核は、はじめ前期の状態であるが、子宮を移動しながらしだいに中期へと進んでゆく(Figs. 6, 7)。第一卵母細胞の中期では、明らかに27個の一価染色体が確認された(Figs. 7, 9)。第一後期では、それら27個の一価染色体は、『体細胞的』に両極へ二分するのが観察され、遅滞染色体は見られなかった(Figs. 8, 10)。正確に二分された第一卵母細胞の核の一方は、第一極体を形成し、他方は第二卵母細胞の核となる(Fig. 6)。第一極体が放出された後、卵殻形成はさらに進行してゆくが、その後も第二卵母細胞の核の分裂は観察されず、第二極体の放出も確認されなかった。またいずれの時期の卵殻内・卵母細胞内にも、精子は確認されなかった。

なお、感染動物より取り出した虫体を生塩水で洗滌して得られた虫卵は、室温水中で2週間後には鉤球仔(cocercidium)の形成が見られ、またこれをケンミジンコに摂食させてproceroidに発育することを確認した。

### 考 察

近年、吸虫類の1つであるウェステルマン肺吸虫(*Paragonimus westermani*)についてSakaguchi and Tada (1976), Terasaki (1977)が、また同じく日本産肝絛虫(*Fasciola* sp.)についてSakaguchi and Nakagawa (1975), 森山・辻 (1977), 坂口ら (1977), 森山ら (1977)が三倍体の存在を報告している。細胞遺伝学

的見地からは、両性生殖によつて三倍性を維持することは不可能であるから、三倍体が繁殖するためには単為生殖という特殊な機構が必要である。Terasaki (1977) は、*P. westermani* について、その精巣には正常な成熟分裂像がまったく認められず、精子完成過程がほとんど観察されないことから、単為生殖の可能性を推察している。一方、Jones and Mackiewicz (1969) は条虫類の *Atractolytocestus huronensis* が三倍体であり、三倍性を維持している機構は、精子形成過程での“break-down of meiosis”により機能的な精子ができず、卵は未受精のまま単為生殖により発生するのであると推察している。しかし、いずれの報告にも卵子形成過程の詳細は記載されていない。そのことは Cable (1971) も指摘しているが、長 (1978) も単為生殖を立証するためには、卵子形成過程の観察が必要であることを力説している。以上のような観点から、Cho *et al.* (1977) は *P. westermani* の卵子形成過程を観察し、卵殻内・第一卵母細胞内には精子が存在しないこと、および第一卵母細胞では染色体不対合により33個の一価染色体が出現し、『体細胞的』に分裂して三倍性の卵が形成されることから、単為生殖を裏付けている。

今回、筆者は *D. erinacei* の plerocercoid および成熟虫体について染色体を観察し、本条虫が9を基本数とした三倍体であることを明らかにし、さらに配偶子形成過程を観察することにより、単為生殖を裏付けた。

Diphyllobothriidae の染色体に関しては、Wolcott (1959) が *D. ursi* の卵母細胞の観察から  $n=9$  を報告し、また Wikgren and Gustafsson (1965) は *D. latum*, *D. osmeri* および *D. dendriticum* の plerocercoid を用いて体細胞分裂像を観察し、各々染色体数には非常なばらつきが認められるが、3種とも  $2n=18$  でありほぼ同じ構成であろうと述べている。

条虫類の精子形成過程については、今までにいくつか報告が見られる。すなわち、Pseudophyllidea では *Triaenophorus lucii* について Rybicka (1962a) が、Cyclophyllidea では *Baerietta diana* および *Distoichometra kozloffii* について Douglas (1963) が、*Dipylidium caninum* については Rybicka (1962b, 1964) が、また *Taeniarhynchus saginatus* については Pashchenko (1961) が報告しており、これらを Rybicka (1967) が集大成している。さらに、Caryophyllidea では Kazacos and Mackiewicz (1972) が、*Hunterella nodulosa* について報告している。以上の報告を総括すれば、条虫類はどの種においても精子形成過

程はほぼ同一で、1個の精原細胞から4回の分裂により16個の第一精母細胞が生じ、その後2回の成熟分裂を経て、最終的に64個の精子が形成されるということである。しかし、筆者が観察した *D. erinacei* の精巣においては、これまでの報告に見られるような規則正しい精子形成過程や精子完成過程は観察されず、また Douglas (1963) が報告しているような完成精子は、まったく存在しなかつた。

条虫類の卵子形成過程および受精過程に関しても、いくつか報告が見られる。Pseudophyllidea では *Archigetes appendiculatus* について Motomura (1929) が、Cyclophyllidea では *Dipylidium caninum* について Rybicka (1964) が、また *Baerietta diana* および *Distoichometra kozloffii* については Douglas (1963) が報告している。彼らの報告を総括すると、以下のである。卵巣原基より生じた卵原細胞は何回かの分裂の後、第一卵母細胞を生じ、第一成熟分裂の前に卵巣より離れてゆく。卵巣より離れた第一卵母細胞は輸卵管に入り、そこで多数の精子にとりまかれる。Pseudophyllidea では、第一卵母細胞が輸卵管内を通過している間に精子がその卵母細胞質内に入り込み、卵形成腔を通過し子宮管へと運ばれる。その後子宮へ入り、卵母細胞質内の精子はしだいに収縮してゆく。また、子宮管内には糸状、螺旋状の精子が多数観察されている (Motomura, 1929)。Cyclophyllidea においても、精子と第一卵母細胞は輸卵管中で出会うことが確認されている。*Dipylidium caninum* では精子の侵入は確認されていないが、たぶん輸卵管中で起るのであると推察している (Rybicka, 1964)。*Baerietta diana* では、子宮内で受精が起る (Douglas, 1963)。その後第一卵母細胞の成熟分裂は、子宮に入った直後より始まり、2回の成熟分裂の結果2個の極体が放出され、卵細胞となる (Motomura, 1929; Rybicka, 1964)。また、成熟分裂の間精子核はしだいに増大し、成熟分裂が終了すると卵細胞には2個の前核が見られるようになり、第一卵割が開始されてゆくと述べている (Douglas, 1962, 1963)。

今回、筆者が観察した *D. erinacei* においては、これまでに報告されているような配偶子形成過程・受精過程は、まったく観察されず、輸卵管および子宮内には精子は存在しなかつた。また、いずれの時期の卵殻内・卵母細胞内にも精子は観察されなかつた。第一卵母細胞には二価染色体の形成は認められず、真の成熟分裂過程は起らなかつた。すなわち、第一卵母細胞における27個の一価染色体は、遅滞することなく『体細胞的』に二分し、

1個の極体と卵細胞を生ずることが確認された。もし、一価染色体がランダムに両極へ配分されるならば、遅滞した一価染色体が見られるはずであり、染色体の両極への配分は不規則になるであろう。したがってこのような単為生殖は、Suomalainen (1950), White (1973) のいう“apomictic parthenogenesis”に属するものと思われる。

### 結 語

筆者は、長(1978)の行なつた押しつぶし法を応用し、*D. erinacei* の染色体および配偶子形成過程について観察し、以下のような結果を得た。

1) 染色体数は、9を基本数とした三倍体 ( $2n=3x=27$ )であることを確認し、また3個の次中部着糸型、12個の次端部着糸型、および12個の端部着糸型かあるいはアクロセントリック型より構成されていることを明らかにした。

2) 精巣においては、正常な精子形成過程および精子完成過程はまったく観察されず、核の変形した精子様細胞が少数観察されたのみであつた。また、第一精母細胞では27個の一価染色体が観察された。

3) 輸卵管および子宮内に精子は発見されず、卵殻内・卵母細胞内にも精子は認められなかつた。

4) 第一卵母細胞における染色体は対合せず、中期では27個の一価染色体が観察された。また、その分裂様式は『体細胞的』であり、1個の極体と卵細胞を生ずることが確認された。このようにしてできた卵細胞は体細胞と同じ27個の染色体を持つので、単為生殖により三倍体の繁殖が可能であると考えられた。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、染色体研究の機会を与え、御校閲を賜りました久留米大学医学部寄生虫学教室・塘普教授に深謝するとともに、本研究の機会を与えて下さいました同第二内科学教室・谷川久一教授に感謝の意を表します。また、直接御指導、御校閲を賜りました長崎大学教養部生物学教室・茅野博教授に心から感謝いたします。また、種々協力していただいた教室員各位に感謝いたします。

### 文 献

- 1) Cable, R. M. (1971) : Parthenogenesis in parasitic helminths. *Am. Zoologist*, 11, 267-272.
- 2) Cho, H., Sasada, K. and Takao, Y. (1977) :

Gametogenesis of *Paragonimus westermani*. *Chromosome Inf. Serv.*, 23, 29-30.

- 3) 長博雪(1978) : 寄生蠕虫類の染色体に関する研究(I) 肝吸虫の成熟分裂における染色体、精子完成過程および受精過程—押しつぶし法による観察—。寄生虫誌, 27, 399-410.
- 4) Douglas, L. T. (1962) : Experimental studies on morphological variation in the cestode genus *Hymenolepis*. VI. Somatic pairing of chromosomes in normal and mutant strains of *H. diminuta*. *Exp. Parasit.*, 12, 134-154.
- 5) Douglas, L. T. (1963) : The development of organ systems in nematotaeniid cestodes. III. Gametogenesis and embryonic development in *Baerietta diana* and *Distoichometra kozloffii*. *J. Parasit.*, 49, 530-558.
- 6) Jones, A. W. and Mackiewicz, J. S. (1969) : Naturally occurring triploidy and parthenogenesis in *Atractolytocestus huronensis* Anthony (Cestoidea: Caryophyllidea) from *Cyprinus carpio* L. in North America. *J. Parasit.*, 55, 1105-1118.
- 7) Kazacos, K. and Mackiewicz, J. S. (1972) : Spermatogenesis in *Hunterella nodulosa* Mackiewicz and McCrae, 1962 (Cestoidea: Caryophyllidea). *Z. Parasitenk.*, 38, 21-31.
- 8) 森山信子・辻守康(1977) : 日本産肝蛭の染色体構成と表現型にみられる差異。寄生虫誌, 26(増), 54.
- 9) 森山信子・辻守康・瀬戸武司(1977) : 日本産肝蛭 *Fasciola* sp. の核型3型とその表現型。染色体, II-7-8, 222.
- 10) Motomura, I. (1929) : On the early development of monozoic cestode, *Archigetes appendiculatus*, including oogenesis and fertilization. *Annotnes Zool. Jap.*, 12, 104-129.
- 11) Pashchenko, L. F. (1961) : Rannie standii spermatogeneza u *Taeniarrhynchus saginatus* Goeze, 1782. *Probl. Parasit.*, Kiev 1, 112-122.
- 12) Rybicka, K. (1962a) : Observations sur la spermatogenèse d'un cestode Pseudophyllidien *Triaenophorus lucii* (Müll., 1776). *Bull. Soc. Neuchâtel. Sci. Nat.*, 85, 177-181.
- 13) Rybicka, K. (1962b) : La spermatogenèse du cestode *Dipylidium caninum* (L.). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, 87, 225-228.
- 14) Rybicka, K. (1964) : Gametogenesis and embryonic development in *Dipylidium caninum*. *Exp. Parasit.*, 15, 293-313.
- 15) Rybicka, K. (1967) : Embryogenesis in cestodes. *Adv. Parasit.*, 4, 107-186.
- 16) Sakaguchi, Y. and Nakagawa, C. (1975) : A note on the chromosomes of the common

- liver fluke (*Fasciola* sp.) from Japan. Chromosome Inf. Serv., 19, 20-21.
- 17) Sakaguchi, Y. and Tada, I. (1976) : Chromosomes of a lung fluke, *Paragonimus westermani*. Chromosome Inf. Serv., 20, 23-24.
  - 18) 坂口祐二・鍋岡明子・上野 計 (1977) : 寄生蠕虫の染色体に関する研究 (8). 日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) とオーストラリア産 *F. hepatica* の核型比較. 寄生虫誌, 26(増), 54.
  - 19) Smyth, J. D. (1956) : Studies on tapeworm physiology. VIII. Occurrence of somatic mitosis in *Diphyllobothrium* spp. and its use as a criterion for assessing growth *in vitro*. Exp. Parasit., 5, 260-270.
  - 20) Snow, R. (1963) : Alcoholic hydrochloric acid-carmines as a stain for chromosomes in squash preparations. Stain Technol., 38, 9-13.
  - 21) Suomalainen, E. (1950) : Parthenogenesis in animals. Adv. Genet., 3, 193-253.
  - 22) Terasaki, K. (1977) : Studies on chromosomes of the lung flukes in Japan. Jap. J. Parasit., 26, 222-229.
  - 23) White, M. J. D. (1973) : Animal Cytology and Evolution, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 961pp.
  - 24) Wikgren, B.-J. P. and Gustafsson, M. K. S. (1965) : The chromosomes of somatic cells of three *Diphyllobothrium* species, with notes on the mode of cell division. Acta Acad. Aboensis. Ser. B, 25, 1-12.
  - 25) Wikgren, B.-J. P. (1966) : The effect of temperature on the cell division cycle in diphyllobothrid plerocercoids. Acta Zool. Fenn., 144, 1-27.
  - 26) Wolcott, G. B. (1959) : The chromosomes of *Diphyllobothrium ursi*. J. Parasit., 45, 378.

**Abstract**

STUDIES ON THE CHROMOSOMES OF PARASITIC HELMINTHS (II)  
TRIPLOIDY AND CYTOLOGICAL MECHANISM OF PARTHENOGENESIS  
IN *DIPHYLLOBOTHRIUM ERINACEI*  
(Cestoda: Diphyllbothriidae)

KATSUYOSHI SASADA

(Department of Parasitology, Kurume University School of Medicine,  
Kurume 830, Japan)

The chromosomes and gametogenesis of *Diphyllbothrium erinacei* were observed by a squash method using Snow's (1963) alcoholic hydrochloric acid-carmin. The results were as follows:

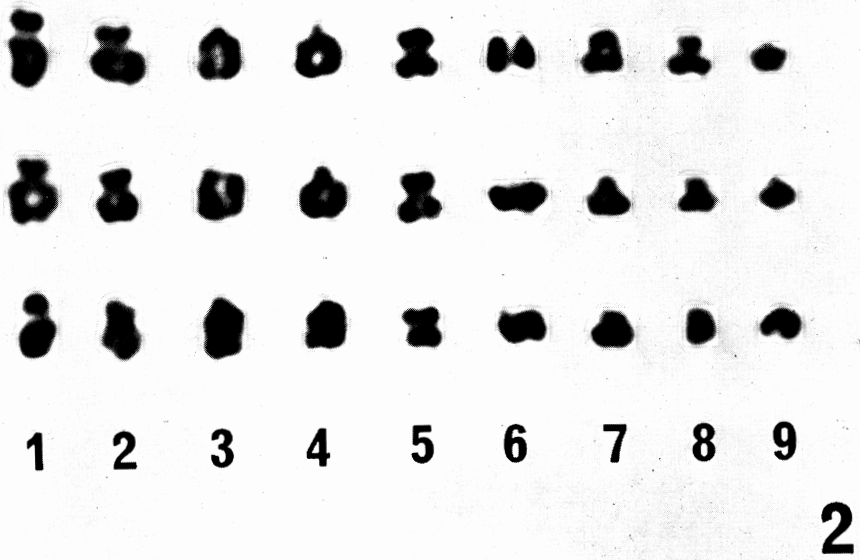
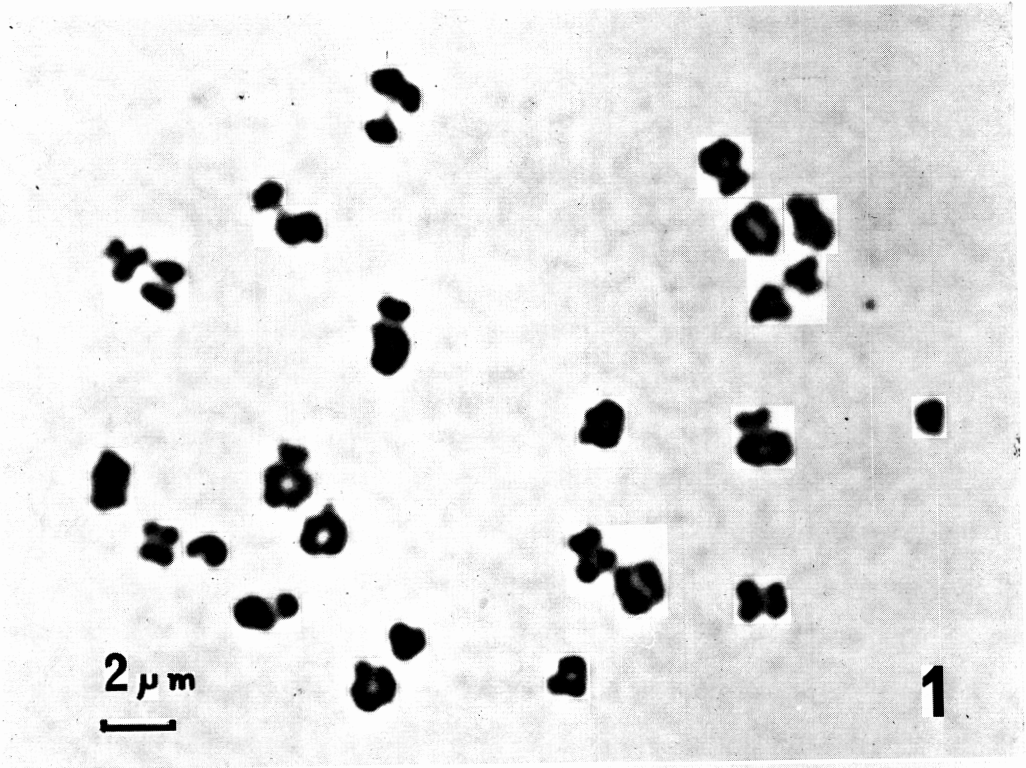
1) The chromosome number of this tapeworm was found to be  $2n=27$  as confirmed in somatic cells of plerocercoid (Fig. 1), in primary spermatocytes (Fig. 4), and in primary oocytes (Figs. 7, 9). Karyotype analysis suggested that the tapeworm was triploid ( $3x=27$ ) with basic chromosome number  $x=9$ . The karyotype consisted of 3 submetacentrics, 12 subtelocentrics, and 12 telo- or acrocentrics (Fig. 2).

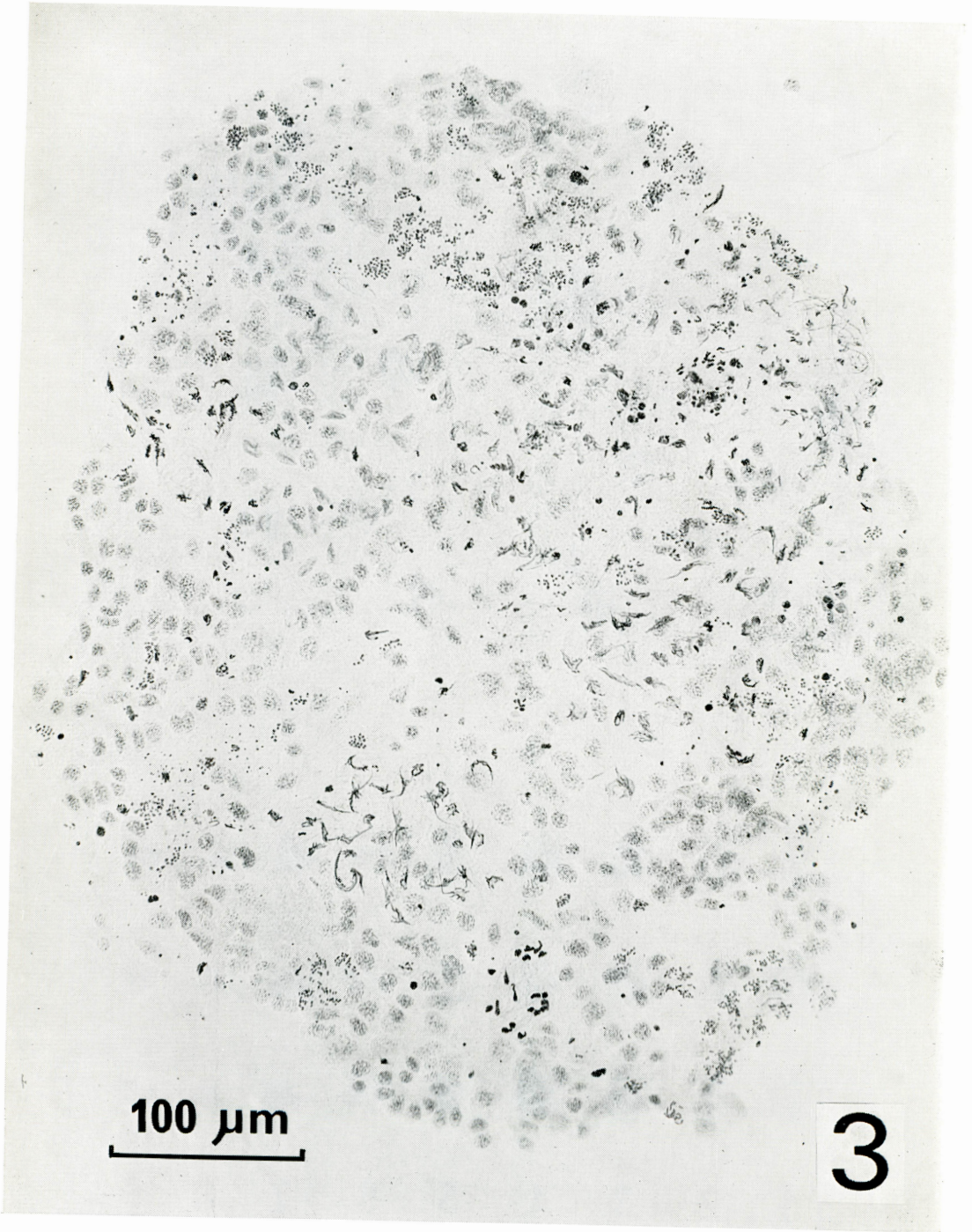
2) In the testis, spermatogenesis and spermiogenesis were so aberrant that no spermatozoa was found except for some spermatoid nuclei (Fig. 3). The aberrations included endopolyploidy, syncytium formation, asynapsis in primary spermatocytes and degeneration of the cells (Figs. 3, 4, 5).

3) No spermatozoon (sperm head) was found either in any part of the oviduct and uterus, or in the cytoplasm of the oocytes at any stage of oogenesis and in early egg capsules (Figs. 6, 7, 8).

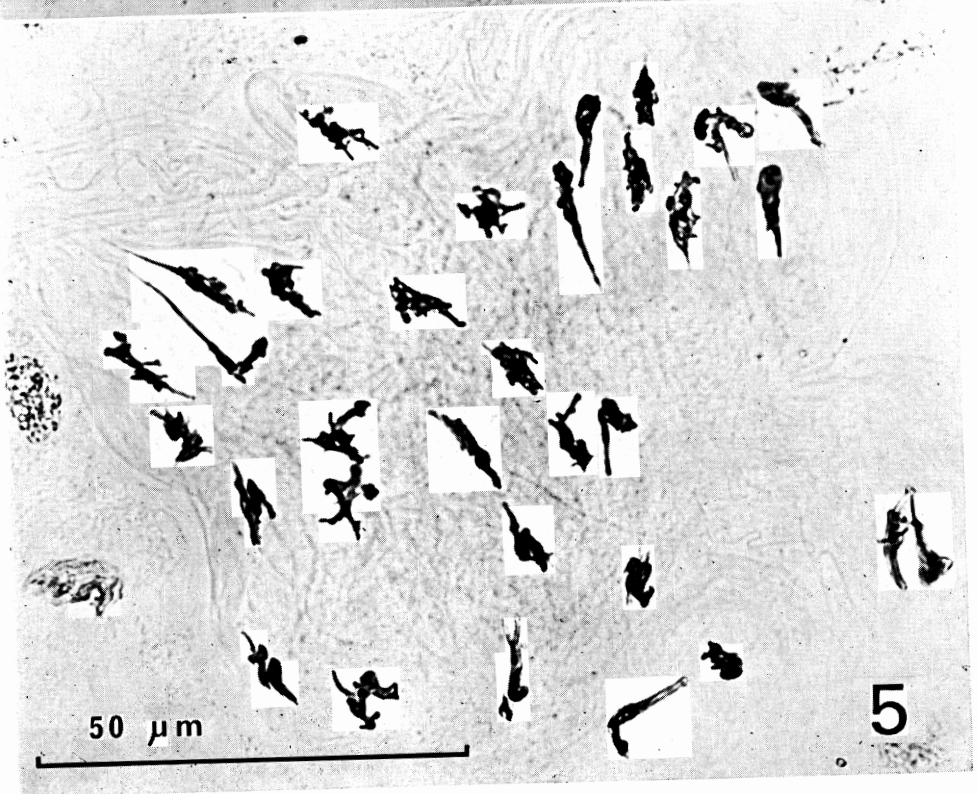
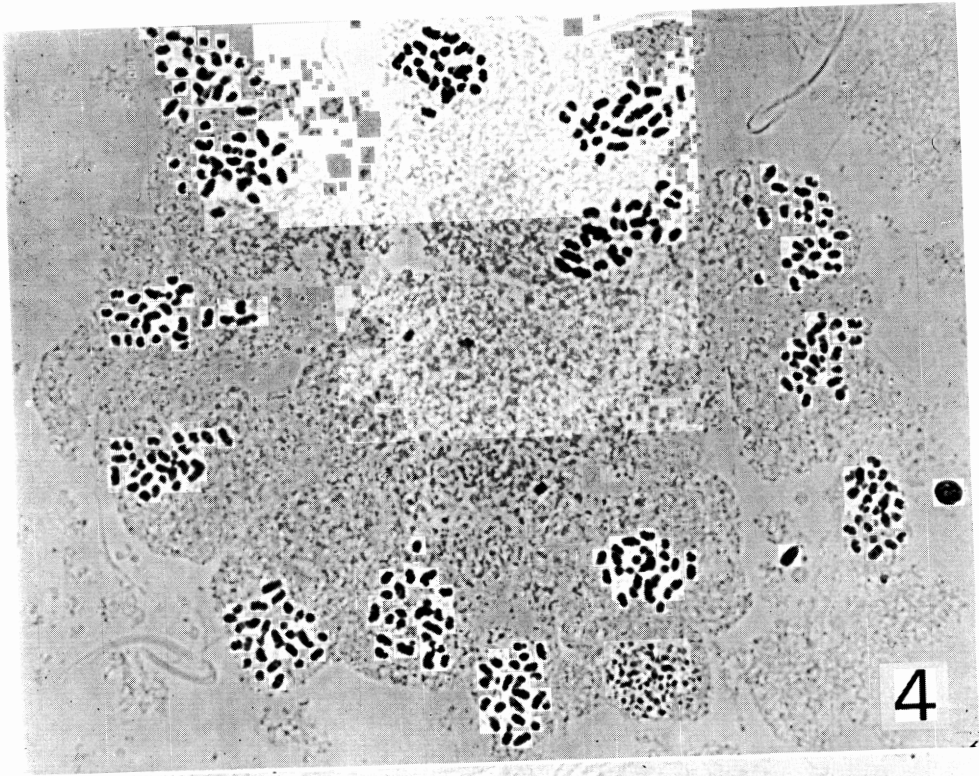
4) In the primary oocytes, the chromosomes were completely asynaptic (Figs. 7, 9). The univalents divided "somaticly" at anaphase to form a triploid polar body and a triploid egg nucleus (Figs. 8, 10).

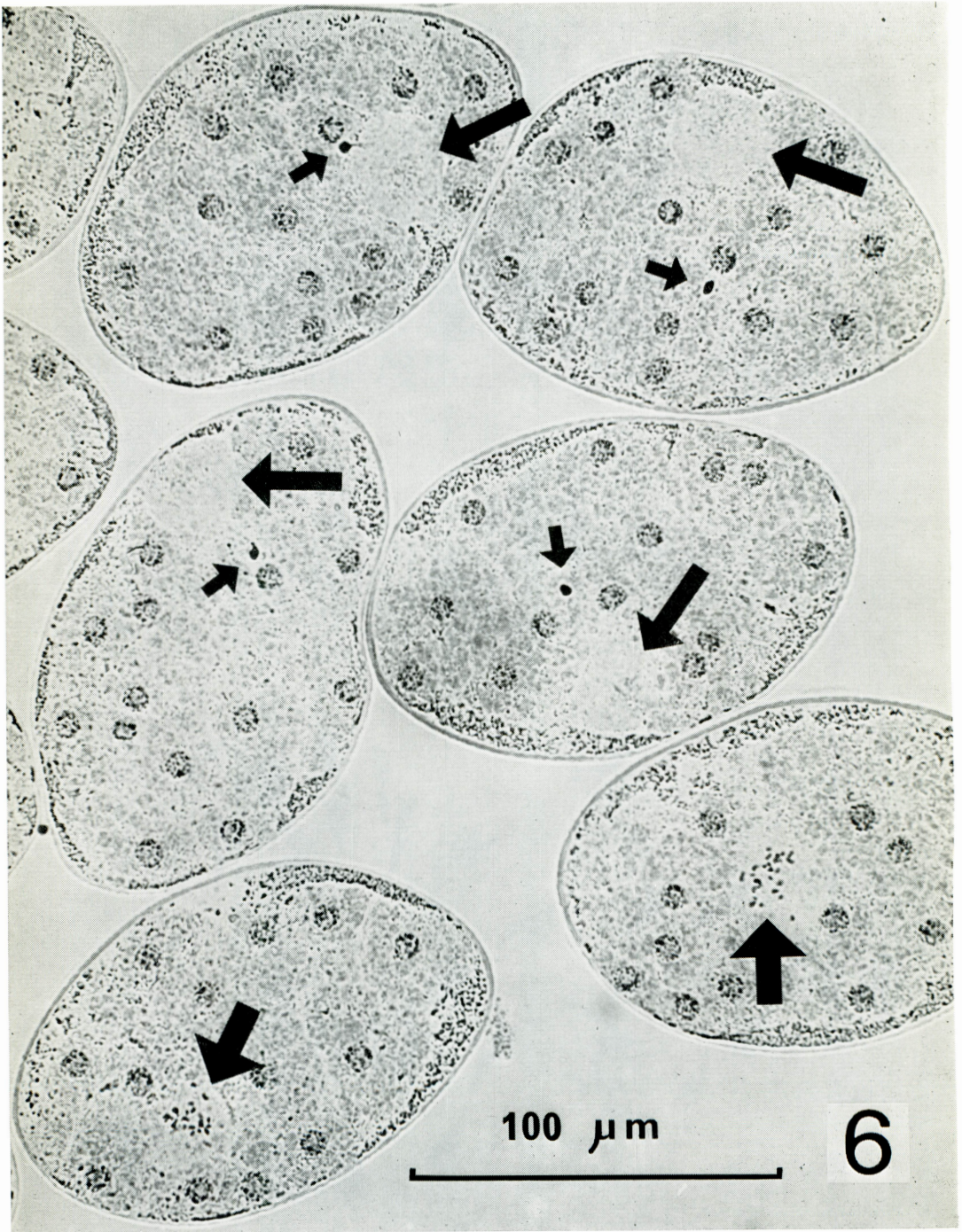
From the above findings, it is unequivocal that *D. erinacei* reproduces by means of "apomictic parthenogenesis".

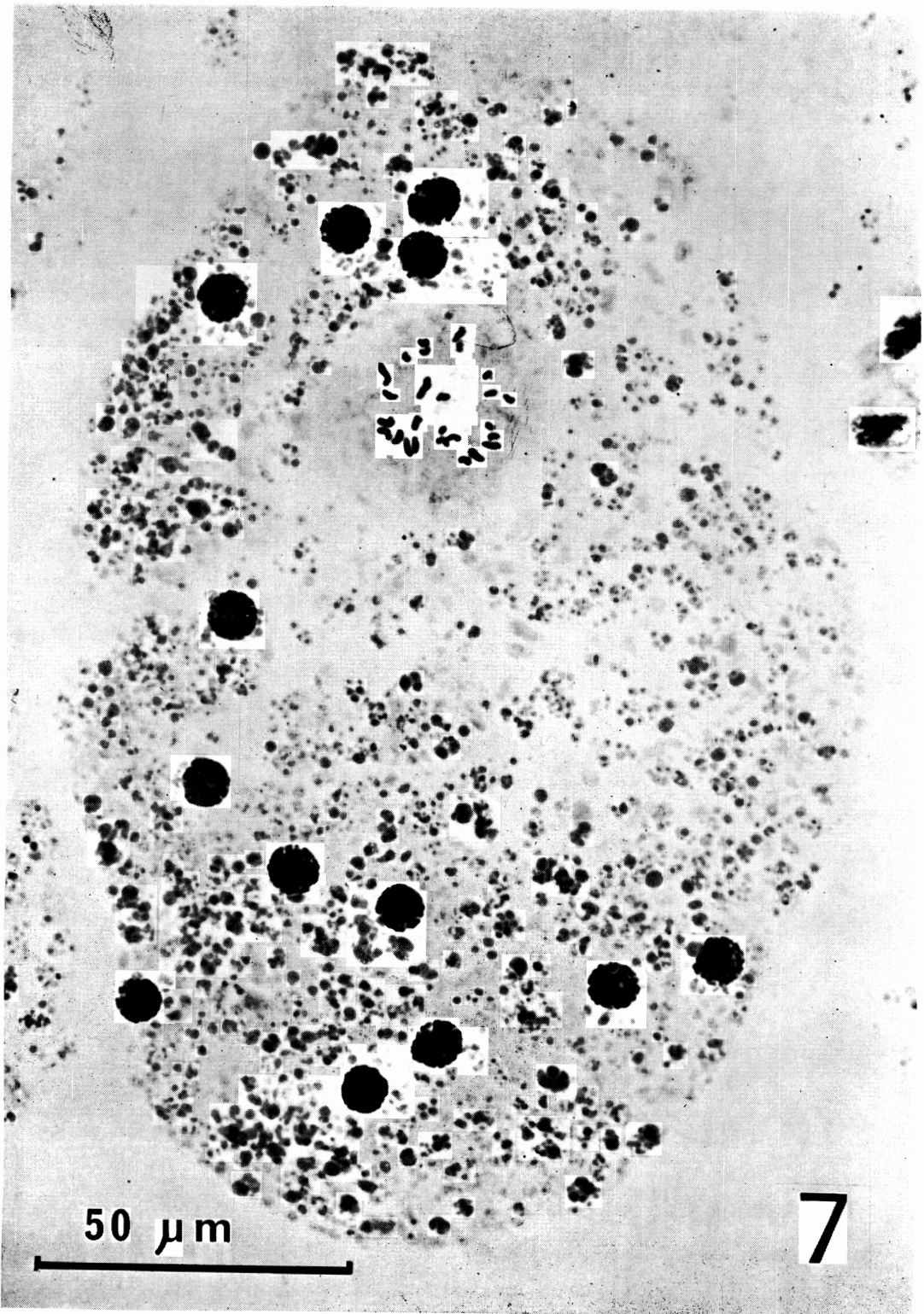


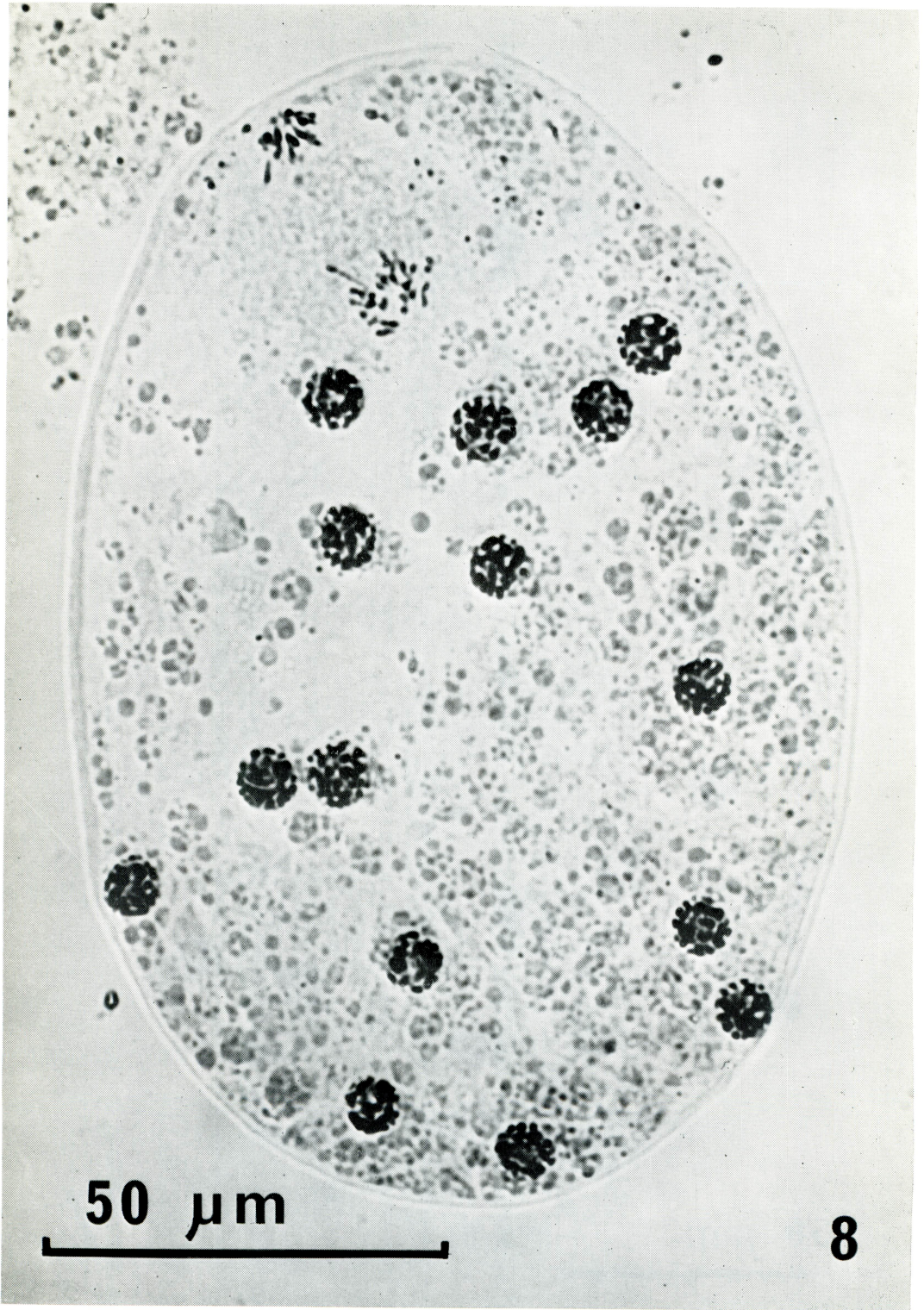


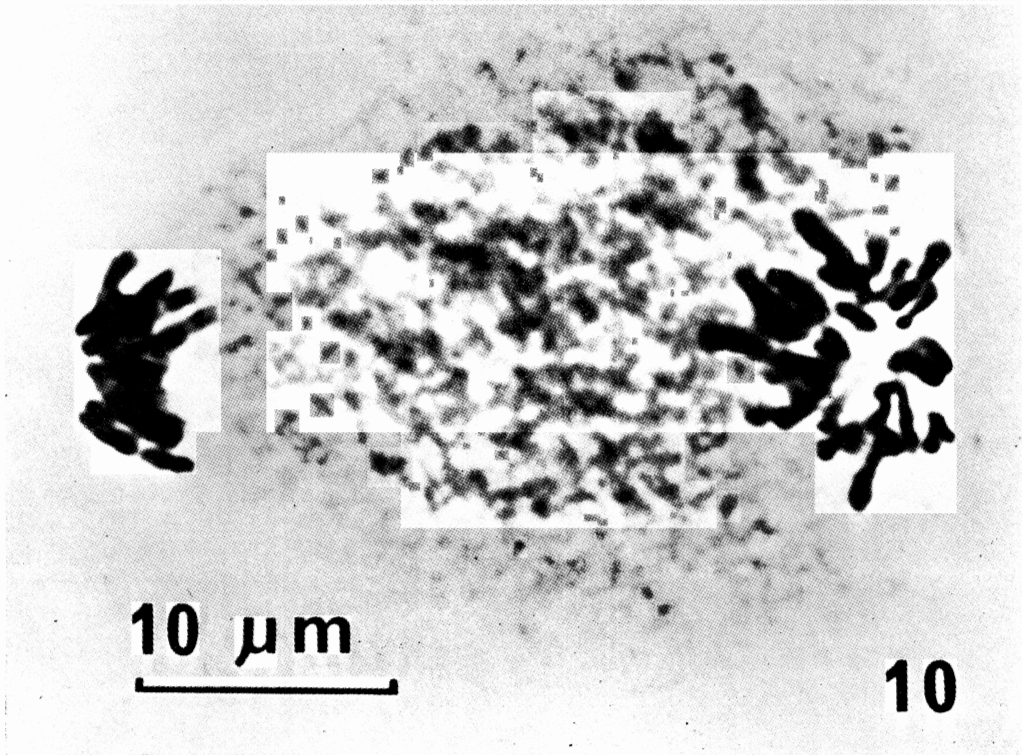
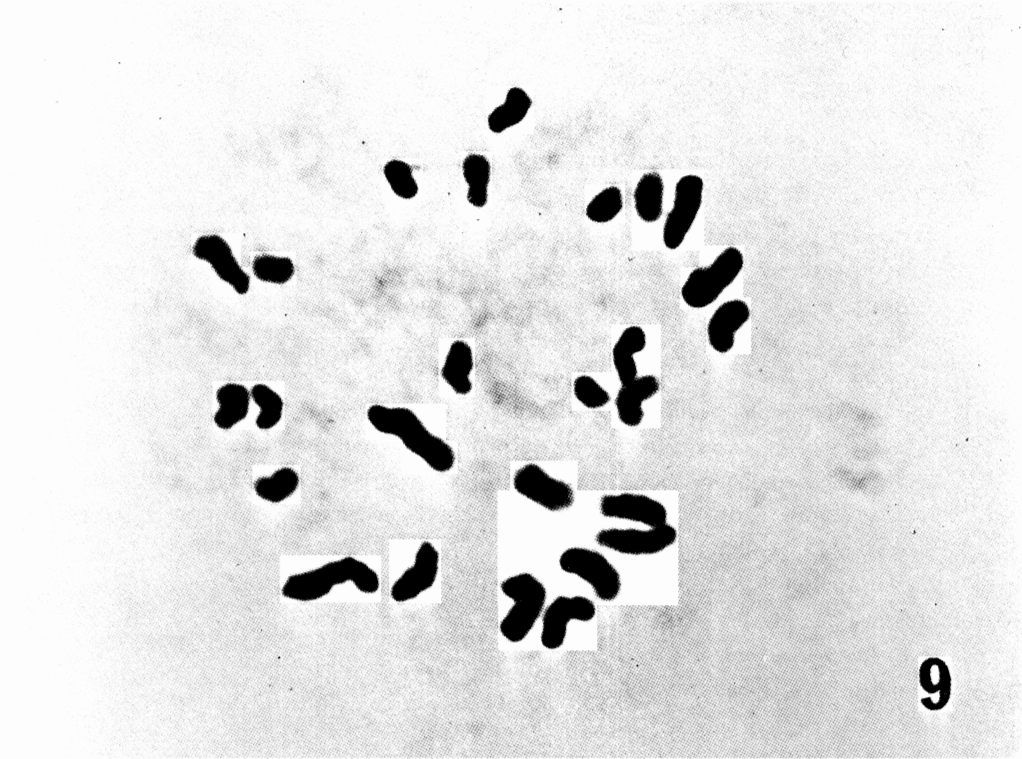












### Explanation of Figures

- Fig. 1 Chromosomes in somatic cells of plerocercoid of *Diphyllbothrium erinacei* ( $2n=27$ ).
- Fig. 2 Alignment of somatic chromosome of *D. erinacei*.
- Fig. 3 Testis in a squash preparation to show aberrations of spermatogenesis and spermiogenesis.
- Fig. 4 A group of 14 primary spermatocytes in which univalents are seen.
- Fig. 5 A group of 32 spermatoid nuclei showing abnormal spermiogenesis.
- Fig. 6 Egg capsules in the beginning of uterus. In two capsules at the bottom the primary oocyte is at metaphase (arrow). In four capsules at the top and the middle a polar body (short arrow) and a secondary oocyte (long arrow) to give rise to a parthenogenetic egg are seen.
- Fig. 7 An egg capsule with a primary oocyte and 13 yolk cell nuclei. The primary oocyte is at metaphase showing 27 univalents.
- Fig. 8 An egg capsule with a primary oocyte at anaphase and 15 yolk cell nuclei.
- Fig. 9 Enlarged 27 univalents in a primary oocyte shown in Fig. 7. Two univalents are overlapped near to the center.
- Fig. 10 Anaphase of a primary oocyte.