

## 培養小形条虫幼若成虫の發育 に及ぼす胆汁の効果

中村文規 松沢和世 浅野和仁  
安倍正史 萩原輝喜 岡本謙一

(昭和57年12月10日 受領)

**Key words:** *Hymenolepis nana*, juvenile, *in vitro* growth, bile

### はじめに

腸管腔内發育期 (luminal phase) にある条虫虫体の發育に及ぼす宿主胆汁の影響を調べたものに、*Hymenolepis diminuta* 寄生ラットを用いての報告があり (Goodchild, 1958), また、草食獣の胆汁を加えた培地中に浸漬した *Echinococcus granulosus* の原頭節は、数日以内に死に至るという報告もある (Smyth, 1962). しかし、*Hymenolepis diminuta* (Berntzen, 1961; Schiller, 1965), *Hymenolepis nana* (Berntzen, 1962) の虫体を宿主体外で成熟可能とする条件が順次示されると、宿主腸管内での条虫虫体發育に果たす胆汁の役割は積極的な意味をもつものではないと考えられるようになった (Clegg and Smyth, 1968). 著者らは、Sinha and Hopkins (1967) の培地を用い、小形条虫幼若成虫を宿主体外で成熟させることを試みた。この場合、同培地成分に加えた馬血清のみは、彼らの用いたものと同一の製品を入手できなかったため、GIBCO 社製の馬血清を用いた。このような培地中で脱囊直後の小形条虫幼若虫体を培養したところ、Sinha and Hopkins (1967) の報告と同様の成績を得ることができなかった。この差異は、培地中に含まれる Biological fluid の製品差によって生ずる可能性が充分考えられるといわれる (Sinha, 1976; Evans, 1980). しかし、更に、同様の組成の培地を用いたにもかかわらず、培養成績に差ができるという事実は、好適な培地の成分として加えるべき未確認の要因が存在することによる、とも考えることができる。その要

本研究は、昭和57年度文部省科学研究補助金の補助を受けて行なったものの一部である。

昭和大学医学部医動物学教室

因として、著者らは腸管腔内の条虫虫体の生息環境中に継続的に供給され、且つ量的にも無視できない宿主胆汁に着目し、前述の培地に稀釈胆汁を加えた培養液を用いて小形条虫虫体の發育を検討した。その結果、少なくとも条虫虫体の初期の發育が胆汁添加によって著しく促進されることを認めた。以下に、その結果について報告する。

### 材料と方法

宿主：日本チャールス・リバーより購入した ICR マウスを当教室で繁殖飼育し、7 週令以上に達したものを宿主として使用した。

寄生虫：当教室にてマウスを宿主として維持してきた小形条虫 (*Hymenolepis nana*) を用いた。

基礎培地：培地は、Sinha and Hopkins (1967) の報告したものである。すなわち、Hanks' BSS 4 容に、6% glucose 水溶液 0.5 容、10% yeast extract (Oxoid 社製) 水溶液 1 容、ラット肝抽出液 1 容及び馬血清 (GIBCO 社製) 3 容を無菌的に混合したものである (以後この混合培地を「基礎培地」とする)。なお、上記成分のうち、馬血清のみは、Sinha and Hopkins (1967) が用いた製品と異なるものである。また肝抽出液は、日本チャールス・リバーより購入した体重 230g 以上の雄ラット肝臓より、Sinha and Hopkins (1967) の方法で抽出したものである。

さらに、上記培地成分のうち、Hanks' BSS を、他の合成培地、NCTC 135 (GIBCO 社製)、RPMI 1640 (GIBCO 社製)、Glasgow-MEM (GIBCO 社製; BHK-21 培地) のいずれかと置き換える実験も試みた。以下これらを、「Hanks' BSS-基礎培地」、「NCTC135-基礎

培地], 「Glasgow-MEM-基礎培地」と, 基本となる塩類溶液または合成培地を冠して示すこととする。

胆汁: 添加に用いた胆汁は, ICRマウス, ニューゼーランドホワイトラビット, 捕獲野犬より採取凍結保存した3種の動物由来の胆汁である。これらを使用時に融解し, NCTC135培地にて希釈した後に濾過滅菌したものを, 基礎培地9容に対して1容の割合で加え, 目的濃度の胆汁を含むように調製した。

培養方法: 脱殻虫卵50,000~70,000個/匹を経口投与後120~125時間通常飼育したICRマウス小腸内より採取した脱囊直後片節形成前の虫体を, 中村ら(1981)の方法で洗浄した。この洗浄された虫体30~100隻を, 上記培地1.5mlと共に直径35mmのCarrell型培養びん(池本理化製)に入れ, 数十秒間混合ガス(95%N:5%CO<sub>2</sub>)を通気後ただちに密栓し, 37C孵卵器内に静置した。3日毎に培地のほぼ全量を新しいものと交換した。

測定方法: Carrell型培養びんの中の虫体を倒立顕微

鏡下に観察し, 形成されてきた片節数を経日的に算定し, 虫体発育の指標とした。実際には, 全虫体を, その片節数によって, 30節未満のもの, 30乃至60節のもの, 60節を越えるものの3群に分け, それぞれの群に属する虫体数を計数した。上記各群毎に, 同一培養びん中の全虫体数(死虫体をも含む)に対する割合(百分率)をもつて結果を示すこととした。

## 実験結果

### 胆汁提供動物種と培養虫体の発育

Fig. 1のa, b, cは, それぞれ, マウス胆汁, イヌ胆汁, ウサギ胆汁を, 同一組成のHanks' BSS-基礎培地中に加えた際の培養結果を示したものである。結果は, それぞれの培地における全培養虫体数に対する30節以上の片節を形成した虫体数の割合を百分率で示したものである。図の横軸には, 培地中の胆汁濃度(v/v)を, 縦軸には上述の百分率を示した。マウス胆汁を含む培地

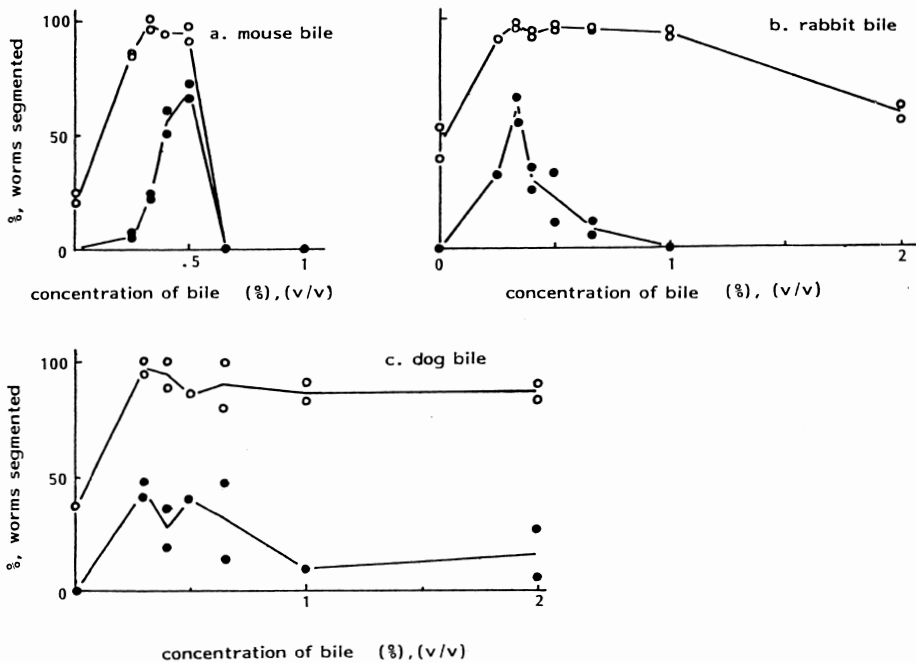


Fig. 1 Concentration of bile in the medium and strobilization of *Hymenolepis nana* cultivated *in vitro*. Values are shown as percentages of the numbers of worms with segments (○) and of worms with segments of more than 30 (●), respectively, per total number of worms in a bottle, observed after cultivation for 7 days for mouse bile (a) and rabbit bile (b), and for 10 days for dog bile (c). One volume of diluted (with NCTC 135 medium) bile was mixed with nine volumes of the basal medium (Sinha and Hopkins, 1967).

及びウサギ胆汁を含む培地で培養開始7日後に算定を行なった理由は、その時期を過ぎると、胆汁濃度0.5%(v/v)を超える培地中の虫体の内部構造が崩壊し、一度形成された片節の境界が判別不能となる傾向がみられたからである。Fig. 1 に示されているように、3種の動物由来の胆汁のいずれを加えた場合にも、胆汁濃度0.3~0.5%(v/v)で、片節形成虫体数の占める割合が最も高かった。Plate 1 の a, bには、それぞれ0.5%マウス胆汁添加培地及び胆汁無添加培地中で4日間培養した虫体を同一拡大率で示した。胆汁濃度が0.5%を超えると、片節形成促進効果は低下し、逆に虫体の内部構造が変形する傾向を示した。特にマウス胆汁を用いた場合、

胆汁濃度の高い(1%(v/v)以上)培地中の培養虫体に、培養開始後3日後には不透明な顆粒状物が充満するようになることが認められた(Plate 1, c)。類似の傾向は、ウサギ胆汁を添加した培地中で培養した虫体にも認められた。しかし、イヌ胆汁を添加した培地中の培養虫体では、胆汁濃度2%(v/v)、培養10日後のものでも、若干の顆粒状物出現が認められるものの、片節境界の識別が不能になることはなかった。培養虫体内部の器管形成は、胆汁濃度0.33~0.5%(v/v)の培地中の虫体では、培養5~7日後より明瞭に認められるようになり、10~13日間培養後には、培養びん1個あたり1~2隻の虫体が、外見上成熟形と認め得る虫卵を形成する傾向を示し

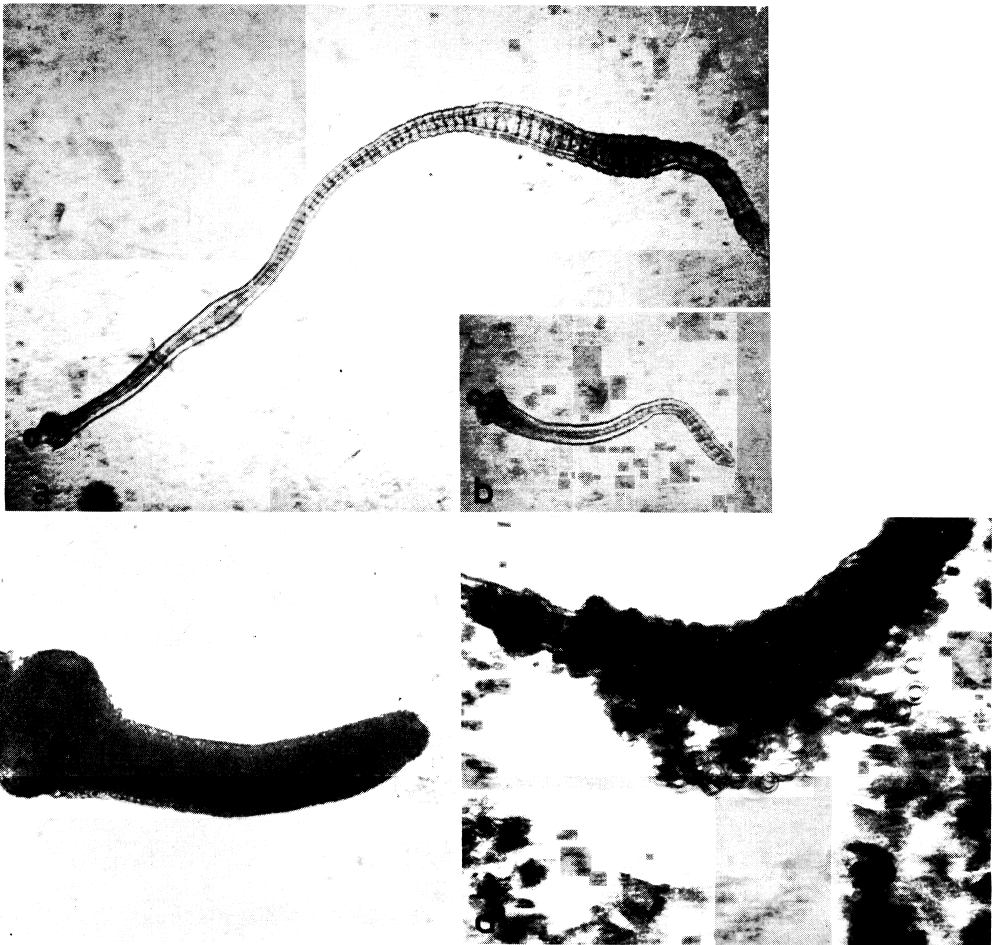


Plate 1 Growth promoting and inhibiting effect of the bile on *Hymenolepis nana* juveniles *in vitro*. photo a, worms after 4 days in the medium containing 0.4% (v/v) of mouse-bile; photo b, worms after 4 days in the medium without bile; photo c, worms after 3 days in the medium containing 2% (v/v) of mouse bile; photo d, worms after 11 days in the medium containing 0.4% (v/v) of mouse-bile.

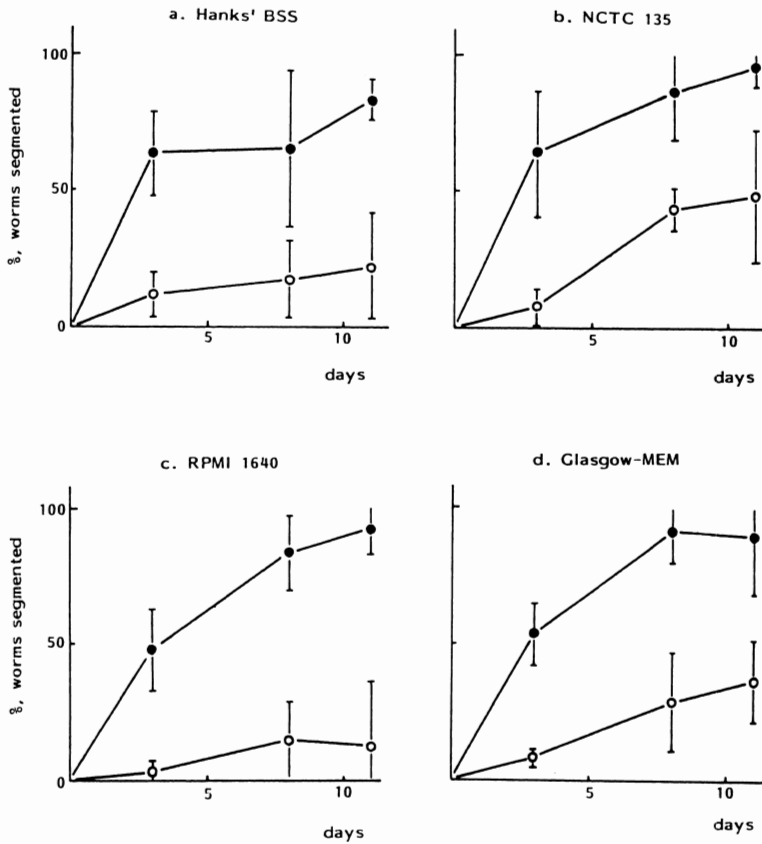


Fig. 2 Effect of addition of bile on segmentation of *Hymenolepis nana* in four types of partially modified medium. Hank's BSS in the medium described by Sinha and Hopkins (1967) was exchanged by 3 sorts of synthetic medium: a, Hanks' BSS (control); b, NCTC 135; c, RPMI 1640; d, Glasgow-MEM. Data are shown as mean percentages of the number of worms segmented per total worms in a culture: ●, medium containing mouse bile; ○, no additive (control). Vertical line shows standard error ( $p < .01$ ) in five culture bottles on days 3, 8 and 11.

た (Plate 1-d).

基礎培地組成の変化及び胆汁添加の有無と培養虫体の発育

Sinha and Hopkins (1967) は、培地中の塩類溶液として Hanks' BSS を用いたが、本研究では、この Hanks' BSS を他の合成培地 (NCTC 135, RPMI 1640, もしくは Glasgow-MEM) に置き換え、マウス胆汁を 0.4% の割合で混合した培地中で虫体を培養した際の片節形成虫体数の割合を経日的に調べた。それらの結果を Fig. 2 の a, b, c, d に示した。対照として、胆汁を全く加えないそれぞれの培地を用いた際の結果をも示した。4

種類の培地には、各合成培地の製品を除き、同一 Lot の製品を加え、虫体も同一マウスより得たものを用いた。また全培養びんは同一条件で同時に incubate した。図の各点は、それぞれ 5 個の培養びんを用いたものの平均値 ± 標準誤差 ( $p < 0.01$ ) を示したものである。結果は、どの組成の培地を用いても、胆汁添加によって片節形成虫体数の割合が著しく増大することを示している。しかし、培地成分中の塩類溶液を合成培地に置き換える操作によって片節形成虫体数の増加時期及びその程度には著しい変化が認められなかった。そこで、11 日間培養後の各虫体を、形成片節数によって 3 群 ( $< 30$ ,  $30 \sim 60$ ,  $>$

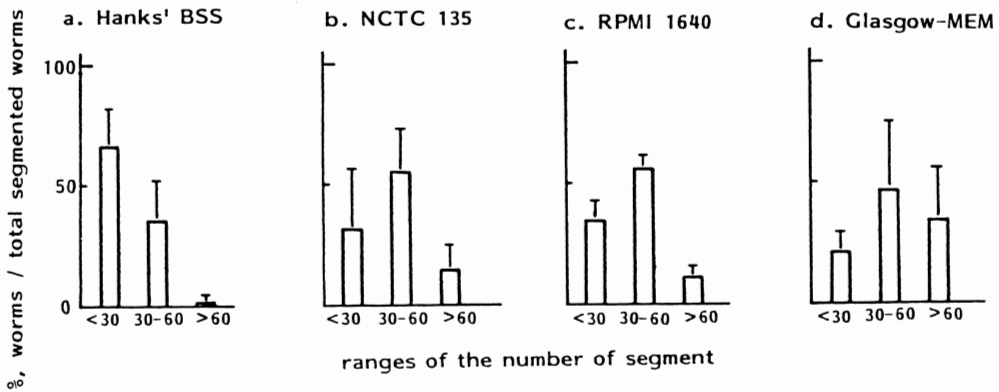


Fig. 3 Percentage distribution of the number of segmented *Hymenolepis nana* between three ranges of the number of segment after cultivation for 11 days in four sorts of partially modified medium. Hanks' BSS in the medium described by Sinha & Hopkins (1967) was exchanged by 3 sorts of synthetic medium: a, Hanks' BSS (control); b, NCTC 135; c, RPMI 1640; d, Glasgow-MEM. Vertical line shows standard error ( $p < 0.05$ ) in five culture bottles on days 3, 8, and 11.

60)に分け、それぞれ片節形成虫体全数に対する割合(百分率)を比較した。Fig. 3は、各組成の胆汁添加培地を用いて培養した結果を示したものである。標準誤差( $p < 0.05$ )範囲を考慮に入れた結果は以下のとおりである。Hanks' BSS-基礎培地では、片節形成虫体の約50%以上が30片節未満の虫体であり、一方、60を超える片節をもつに至った虫体は約5%未満の割合にとどまった。これに対し、Glasgow-MEM-基礎培地では、30片節未満の虫体が30%にとどまり、残りは30片節以上の群に分布する傾向がみられた。NCTC-135-基礎培地及びRPMI 1640-基礎培地を用いた場合は、培養虫体の片節形成程度は、Glasgow-MEM-基礎培地での結果とHanks' BSS-基礎培地での結果とのほぼ中間の値の範囲を示した。すなわち、用いた3種の合成培地のうち、Glasgow-MEMは他のものに比べ、やや虫体の発育を促進する傾向を示した。

### 考 察

Goodchild (1958)は、胆管カニューレを装着して胆汁の腸管内への流入を妨げるような手術を施したラット腸管内に、縮小条虫の幼若成虫を移植する実験をおこない、宿主胆汁の条虫虫体発育に対する有効性を示した。一方、Clegg and Smyth (1968)は、Berntzen (1961)の縮小条虫培養系には胆汁が含まれていないにもかかわらず、虫体を成熟に導くことができたことから、胆汁が条虫虫体に直接作用を及ぼすことによる発育促進作用はないという考えを示した。しかし、人工的な培養条件下

で、虫体の発育に胆汁を必要としないということから、ただちに宿主体内での虫体発育に対する胆汁の作用を否定する結論には至らないと考えられる。Roberts(1980)も、縮小条虫発育に対する胆汁の発育促進効果は否定できないとしている。縮小条虫成虫体内に脂肪酸がとり込まれる際、胆汁酸と脂肪酸との間でmicelleを形成する必要があるという報告も知られており(Bailey and Fairbairn, 1968)、胆汁の役割を一概に否定することはできないのが現状である。これまでに小形条虫成虫体の発育に関して胆汁の生理的作用を調べた報告はないが、小形条虫成虫も、縮小条虫成虫と同様に小腸管腔内に生息していることから、類似の発育要因を必要とすることが推察できる。一方、小形条虫成虫虫体の*in vitro*での発育要因に関しては、Berntzen (1962)が初めて脱囊直後の幼若虫体から培養し、成熟虫体を得たことを報告している。そこで、Sinha and Hopkins (1967)は、Berntzen (1962)の方法を追試したが、彼の成績を裏付けることができず、独自の培地を開発した。しかし、彼らの用いた培地成分も、その製品差によつて虫体発育程度にばらつきをもたらす(Sinha, 1976; Evans, 1980)といわれ、未だその原因も明らかにされていない。本研究の結果は、小形条虫幼若成虫虫体の僅かの成育しか保障し得ない培地が、比較的低濃度の胆汁添加によつて片節形成を促す程に改良されたことを示している。また、Sinha and Hopkins (1967)の培養系では、回転培養装置が用いられているが、著者らが同様の条件で回転培養装置を用いて培養したところ、虫体の発育には、静置培養法と

の間に著しい相違を認めなかつた(中村ら, 未発表). このことは, 著者らの用いた培地の組成あるいは培養技術に, 回転培養法の効果を覆うような欠陥があることを示している可能性も考えられる. Sinha (1978) は, 単包条虫の片節形成には *diphasic medium* が必要であること (Smyth, 1967) から, 小形条虫の回転培養時にみられる培養管内壁への沈澱物の不規則な被覆に, 条虫虫体の発育を促す作用がある可能性を推論している. しかし, 著者らは, その被覆に条虫虫体が付着するような現象を認めず, 静置培養時, 沈澱物が浮遊する状態でも, 胆汁添加によつて十分に片節形成に至ることを観察した. 以上のことから著者らは, 静置培養法を用いた場合でも, 培地組成の検討を更に進めることにより, *in vitro* で小形条虫虫体を維持し, 虫卵形成にまで至らしめることは可能であろうと考えている.

単包条虫原頭節は, 好適宿主といわれる犬の胆汁を含む培地中では著しい変化を示さないが, 草食獣の胆汁を含む培地中では, 虫体内に脂質滴を充満させ, 追つて死に至るという反応を示す (Smyth, 1962). これと類似の反応が小形条虫頭節 (片節未形成の虫体) にも認められた (Plate 1c). しかし, 小形条虫の場合, 頭節に対するこのような作用は, 本条虫の好適宿主と見做し得るマウスの胆汁を添加した培地中で最も著しいという傾向を示した. このことは, 小形条虫では, 胆汁成分が必ずしも宿主特異性を決定する要因とはならないという可能性を示唆するものである.

胆汁内特有の成分である胆汁酸が片節形成促進に関与する可能性は, その多様な生物学的活性からも推察できる. 本研究で実験に用いた胆嚢胆汁内に含まれる胆汁酸は, ほとんどが抱合体であると考えられる. また, *in vivo* 腸管内に分泌された抱合胆汁酸は, 小腸内を下行するに従つて腸内の細菌による脱抱合を受けつつ腸壁を経て再吸収されると考えられている (Hayakawa, 1973). 一方, 本研究では, 虫体発育を促進すると認められる至適胆汁濃度は, 胆嚢胆汁の 4/1,000 という低濃度 (Hargreaves, 1968) であり, また, その濃度が 1/100 より高値に設定された培地中の虫体は発育を抑制されるという結果を得た. 更に, 小形条虫成虫の通常寄生部位は小腸下部 (回腸) であることから, 本条虫成虫体は, 抱合胆汁酸濃度が低い状態に維持された環境内に生息することになる. このように, 抱合胆汁酸が腸管内細菌によつて脱抱合を受け, 再吸収される部位に小形条虫成虫体が寄生するという事実は, 本研究の *in vitro* の結果と共に, 本条虫の発育促進には抱合胆汁酸が関与する可能性を予

想させ得るものである. しかし, 小腸内の胆汁酸は極めて多様な状態で存在していると考えられる上に, 胆汁中には胆汁酸以外の成分も含まれている. 更に, 現段階での培養成績は, 受胎節を形成するに至る虫体数の割合及び受胎節内虫卵数の面から, 宿主体内での虫体の発育と同程度の発育を *in vitro* で行なわしめるというものには至っていない. 従つて, 今後更に胆汁以外の発育要因についても検討を進める必要がある.

## 要 約

Sinha and Hopkins (1967) の方法に従つて調製した培地中で, 小形条虫の腸管腔内発育期の幼若虫体を培養したところ, 分節を促すような著しい発育を認めなかつた. そこで, 同培地中に宿主胆嚢胆汁を加えて静置培養法により虫体を培養したところ, 以下の知見を得た.

- 1, 培地中に 0.33~0.5% (v/v) の濃度でマウス胆汁を加えると, 虫体の発育は著しく促進され, 受胎節形成に至る虫体も認められた.
- 2, 培地中に加える胆汁の提供動物は, 必ずしもマウスである必要はなく, イヌまたはウサギの胆汁を用いた場合でも, 上記濃度範囲でほぼ同様の効果を認めた.
- 3, マウス胆汁を 1~2% (v/v) の濃度で含む培地中では, 培養 3~5 日後には虫体内部が顆粒状物で充たされ, 以後虫体の片節は形成されなかつた.
- 4, 培地中に混合して用いた Hanks' BSS の代わりに, 市販の各種合成培地を使用した場合, マウス胆汁添加による発育促進効果の程度には著しい影響を認めなかつた. 但し, Glasgow-MEM 培地を用いた場合, Hanks's BSS を用いた場合に比較して, 多くの片節を形成する虫体数がやや増加する傾向を示した.

## 文 献

- 1) Bailey, H. H. and Fairbairn, D. (1968): Lipid metabolism in helminth parasites. V. Absorption of fatty acids and monoglycerides from micellar solution by *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Comp. Biochem. physiol.*, 26, 819-836.
- 2) Berntzen, A. K. (1961): The *in vitro* cultivation of tapeworms. I. Growth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *J. Parasitol.*, 47, 351-355.
- 3) Berntzen, A. K. (1962): In vitro cultivation of tapeworms. II. Growth and maintenance of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidea). *J. Parasitol.*, 48, 785-797.

- 4) Clegg, J. A. and Smyth, J. D. (1968) : Growth, Development, and culture Methods; Parasitic Platyhelminths. In Chemical Zoology, vol. II, ed. by M. Florkin and B. T. Scheer, Academic Press, New York, 395-466.
- 5) Evance, W. S. (1980) : The cultivation of *Hymenolepis in vitro*. In Biology of of the Tapeworm *Hymenolepis diminuta*, ed. by H. P. Arai, Academic Press, New York, 425-448.
- 6) Goodchild, C. G. (1958) : Growth and maturation of the Cestode *Hymenolepis diminuta* in bileless hosts, J. Parasitol., 44, 352-362.
- 7) Hargreaves, T. (1968) : The Liver and Bile Metabolism, North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- 8) Hayakawa, S. (1973) : Microbiological Transformation of Bile Acids. In Advances in Lipid Research, 11, Academic Press, New York, 143-192.
- 9) 中村文規・松沢和世・浅野和仁・鈴木博子・村越里江・岡本謙一(1981) : 小形条虫 (*Hymenolepis nana*) 幼若成虫の感染マウス血清中における沈降物形成. 寄生虫誌, 30, 373-379.
- 10) Roberts, L. S. (1980) : Development of *Hymenolepis diminuta* in its definitive host. In Biology of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*, ed. by Arai, H. P., Academic Press, New York, and London, 357-423.
- 11) Schiller, E. L. (1965) : A simplified method for the *in vitro* cultivation of the rat tapeworm, *Hymenolepis diminuta*. J. Parasitol., 51, 516-518.
- 12) Sinha, D. P. (1976) : Yeast extract in media for *in vitro* cultivation of Cestodes. Indian J. Exptl. Biol., 14, 46-50.
- 13) Sinha, D. P. (1978) : Effect of sheep liver extract, serially filtered in combination with Hanks' BSS of reconstituted after Sephadex column fractionation, on the growth & maturation of *Hymenolepis nana in vitro*. Indian J. Exptl. Biol., 16, 1085-1088.
- 14) Sinha, D. P. and Hopkins, C. A. (1967) : *In vitro* cultivation of the tapeworm *Hymenolepis nana* from larva to adult. Nature, 215, 1275-1276.
- 15) Smyth, J. D. (1962) : Lysis of *Echinococcus granulosus* by surface-active agents in bile and role of this phenomenon in determining host specificity in helminths. Royal Soc. Lond., 156, 553-572.
- 16) Smyth, J. D. (1967) : Studies on tapeworm physiology XI. *In vitro* cultivation of *Echinococcus granulosus* from the protoscolex to the strobilate stage. Parasitol., 57, 111-133

**Abstract**

EFFECT OF BILE ON THE GROWTH OF JUVENILES  
OF *HYMENOLEPIS NANA* IN VITRO

FUMINORI NAKAMURA, KAZUYO MATSUZAWA, KAZUHITO ASANO,  
MASAFUMI ABE, TERUKI HAGIWARA AND KENICHI OKAMOTO

(Department of Medical Biology, School of Medicine,  
Showa University, Tokyo, 142, Japan)

Excysted juveniles of *Hymenolepis nana*, collected from mouse intestine just after killing by cervical dislocation were cultured *in vitro* under static culture condition. Except for horse serum, the culture medium used was the same as that used by Sinha and Hopkins(1967), but we obtained somewhat different results from did they with *H. nana*. The difference suggested that differentiation of *H. nana* required some stimulating factors which were not present in the culture medium provided. In this study as bile is a normal constituent of intestinal contents, it was speculated that its presence may act as stimulus for strobilization. Bladder bile from mice, dogs or rabbits markedly proceeded to grow the worms when used at concentration of 0.33 to 0.5% (v/v). But, in the medium containing more than 0.5% of mouse bile, morphological structure of the worm became indistinguishable under light microscope within 3 days of cultivation. Either dog bile or rabbit bile had similar effect on the worms at concentration of more than 0.5%. Hanks' BSS in the medium was substituted for NCTC 135, RPMI 1640 or Glasgow MEM. No remarkable effect by these enrichments was observed. However, with Glasgow-MEM medium, some effects to promote growth of the worms were observed when mouse bile (0.4%) was added to the medium. These results suggest that host bile has some effects on growth of the juvenile of *Hymenolepis nana*, and that the roller tube method which some other studies adopted is not essential for strobilization of the worm *in vitro*.