

# 日本住血吸虫の *in Vitro* における 産卵及び虫卵の発育

——日本株とフィリピン株との比較——

川 中 正 憲

(昭和58年5月27日 受領)

**Key words:** *Schistosoma japonicum*, Japanese and Philippine strain, egg, miracidium, *in vitro* culture

宿主の血管内で生み出される住血吸虫の卵は産卵直後では未成熟であり、宿主組織内に一定期間とどまることによつて成熟し卵内にミラシジウムが形成される。日本住血吸虫症の主要な症状は、これらの虫卵が腸管壁及び肝臓等に蓄積生存することによつて引き起こされると考えられ、本吸虫の産卵、虫卵の発育と寿命、及びそれともなう物質の代謝は本症の研究にとつて基本的に重要な意義を持つ。Moore and Sandground (1956) は、実験動物を宿主として産卵数を調べ、中山 (1910)、宮川 (1910)、Faust and Meloney (1924)、渡辺 (1934)、Vogel (1942)、織田 (1959) は、それぞれ宿主組織内での虫卵の発育について研究した。しかしながら、*in vitro* においてこれらの課題を検討した報告は極めて少なく、わずかに Newsome (1962) と Hsü (1974) を見るのみである。そして両者ともに、その含有成分が複雑で不確定な動物血清を基礎液とした培養液を用いてのみ産卵と成熟卵の培養に成功している。血清などの不確定成分を含まない完全合成培養液による産卵と虫卵培養の試みは、 Manson 住血吸虫において Senft and Senft (1962) と Newport and Weller (1982 a) によつて報告されているが、日本住血吸虫では見当らない。

他方で日本住血吸虫には、日本株、フィリピン株、台湾株、中国株などが知られ、これらは中間宿主貝や終宿主の感受性が異なるとともに、マウスやウサギなどにおける病原性にも差異があることが報告されている (Hsü and Hsü, 1960; Warren and Berry, 1972; Cheever *et al.*, 1980)。これらはいずれも *in vivo* での検討であ

るが、未知の宿主要因を排除した *in vitro* の条件で異なる株の間で如何なる生理的性質の差異が存在するのかは、全く知られていない。

著者等はいくつかの培養液を用いて日本株とフィリピン株の *in vitro* での産卵と虫卵の培養を試みた。その結果、両株ともに産卵と成熟卵への発育が無血清の完全合成培養液でも可能であることを見出した。虫卵発育にともなう栄養要求については別に発表したが (Kawana-ka *et al.*, 1983 a, b)、ここでは日本株とフィリピン株が培養液中で示す産卵能力、虫卵成熟の速度及び率、成熟卵の寿命等について比較検討した。また、培養ミラシジウムの貝への感染性については日本株を用いて試験した。以下、それらの結果について報告する。

## 材料と方法

### 培養液

産卵と虫卵発育の為に本実験で用いた培養液は、1) イーグル改変アールの平衡塩類溶液 (以下アール液と略称)、2) ダルベッコ変法イーグル培地 (日本製薬調製、以下 DEM と略称)、3) RPMI 1640培養液 (日本製薬調製、以下 RPMI と略称)、及びこれら3種に10%の割合でウシ胎児血清 (国立予研調製、以下 FCS と略称) を加えたもの、即ち、4) 10% FCS 添加アール液、5) 10% FCS 添加 DEM、6) 10% FCS 添加 RPMI、の6種類である。

### 虫体及び採集法

日本住血吸虫は日本株とフィリピン株の二つの系統を用いた。前者は、山梨県甲府盆地由来で国立予研研究室に於てマウスとミヤイリガイ *Oncomelania nosophora*

とで継代飼育している系統で、後者はフィリピン、レイテ島で採集した *Oncomelania quadrasi* に自然感染していた系統である。二つの系統のセルカリアは、それぞれに感染貝を破砕して少量の水溶液中に遊出させ、生後5週で雌の NIH マウスへ感染させた。セルカリアの感染量はマウス1匹当り20~30とし、腹腔内注射により投与した。感染8週後、以下の手順でマウスより虫体を無菌的に採取した。まずエーテル麻酔をかけ、一方の眼球を摘出して放血死せしめた。マウス体表に消毒エタノールを噴霧し、クリーンベンチ内で開腹、開胸を行ない、胸大動脈から滅菌生理食塩水を注入するとともに門脈本幹を切開して灌流した。排出された虫体をピンセットで速かにシャーレ内のアール液に集めた後、アール液の交換をくり返して虫体体表から血液成分を除去して産卵実験への準備とした。

#### 産卵実験

成虫の飼育の為に、蓋付のプラスチック製容器で直径16 mm、深さ17 mmの穴がプレート上に縦4横列6列で24個並んでいる「マルチディッシュ」(組織培養用、Nunc社製)を使用した。それぞれの穴に1 mlの培養液を容れ、抱合している雌雄虫体を1対宛収容した。成虫の培養時間は、虫体をマウスから採取、洗浄した後の48時間とし、37Cおよび5% CO<sub>2</sub>を保つ炭酸ガス孵卵器を使用した。産卵数はそれぞれの穴から虫体をピンセットで取り除いた後、倒立顕微鏡下で算定した。この際雌雄いずれかの虫体が欠けているか又は、操作時に傷害を受けている不完全虫体については虫卵数の算定を行なわなかった。

#### 虫卵培養

上記の産卵に用いた培養液と同一の培養液で虫卵の培養を継続するために、虫卵を含む飼養液をその培養液の種類ごとにスピッツ管に集めた。遠心沈澱によりそれぞれの培養液を3度交換した後、各培養液に虫卵が一定の濃度(1,000個/ml)になるように調整し、1.5ml宛レイトン管へ分注した。これらのレイトン管は、キャップを緩めた後炭酸ガス孵卵器(37C, 5% CO<sub>2</sub>)に入れた。培養期間中の液交換は2週間々隔で実施した。

#### 虫卵の観察と発育段階評価の基準

虫卵の詳細な観察は、虫卵培養の開始日を培養1日目として3, 9, 15, 22, 29, 35, 42日目に行つた。6種の培養液中の虫卵をスライドグラスに採つてカバーグラスを乗せ、顕微鏡下でランダムに50個の虫卵を選択し、個々の虫卵について発育段階を評価してそれぞれの条件下の各発育段階の出現率を百分率で表現した。虫卵の発

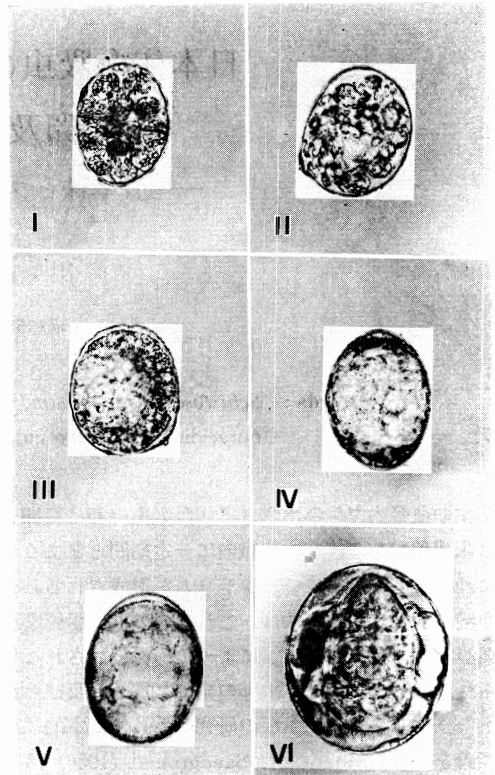


Fig. 1 I-VI Classification of the developing stages of *Schistosoma japonicum* eggs *in vitro*. I. First stage egg; the egg is filled with yolk cells. II. Second stage egg; the small globular embryo has appeared clearly. III. Third stage egg; the embryo has grown to reach approximately half the diameter of the egg. IV. Fourth stage egg; the embryo has become oval and fills the greater part of the egg space. V. Fifth stage egg; the miracidium has nearly matured, however the cilia and the inner organ are not clearly visible. VI. Sixth stage egg; the egg containing mature miracidium.

育段階の評価は、Vogel (1942) が *in vivo* の虫卵について行つたものに基本的には従がひ、次の基準を設定した。段階I:産卵直後の虫卵で、内部に空胞がある卵黄細胞が桑実状に並び胚は未だ確認できない (Fig. 1-I)。段階II:発育が進行すると虫卵の中心付近に小球状、透明な胚が出現する (Fig. 1-II)。段階III:胚はその大きさを増し、卵長径のほぼ半分を占めるようになる (Fig. 1-III)。段階IV:胚は更に増大して卵内容の大部分を占め、卵黄顆粒は周縁に押し集められる (Fig. 1-IV)。段階V:排泄管と焰状細胞が明らかとなり胚はミラシジウムとしての内部構造を整えつつある。繊毛は未だ不明瞭

で卵殻との空隙も狭い (Fig. 1-V). 段階VI: ミラシジウムが完全に成熟し, 原腸, 穿刺腺, 排泄管, 焰状細胞などが明瞭に認められる. ミラシジウムと卵殻との空隙は広くなり繊毛運動と伸縮運動が観察される (Fig. 1-VI). 発育途上の個々の虫卵について正常過程を辿っているか又は変性過程にあるかの判定は必ずしも容易ではない. しかし上に述べた段階 I~IV の形態的特徴を正常発育過程の基準として, これからの形態的逸脱, 例えば顆粒や空胞等が内部に認められるものを変性卵とした. また, ミラシジウム形成後の成熟卵のうち焰状細胞の運動停止を示したものをとも変性卵として記録した.

#### ミラシジウムの感染実験

培養して得られた日本株の成熟卵の一部を水を満たしたシャーレに移して孵化させた. これらのミラシジウムにミヤイリガイを暴露し感染の有無について試験した. ミヤイリガイは甲府盆地由来で, 室内で3代継代した殻長2.5~3.5mmのものをを用いた. 暴露条件は25°Cで12時間とし, 小型シャーレ(径25mm)内で貝1個に対して10匹のミラシジウムを同居させた. 貝は腰高シャーレ(径120mm)に約3cmの深さに水を入れ, エアレーションを継続し, 未同定の珪藻類を餌として飼育した. これらのうち生存貝は6週後又は6ヶ月後に破砕して, スポロシスト又はセルカリアの有無を精査した.

### 実験結果

#### 1. 産卵実験

産卵実験の結果を Table 1 に示す. 日本株の平均産卵数を少数のものから順に挙げると, アール液, FCS 添

加アール液, RPMI, DEM, FCS 添加 RPMI, FCS 添加 DEM であつた. 同じくフィリピン株について見ると, アール液, FCS 添加アール液, DEM, RPMI, FCS 添加 DEM, FCS 添加 RPMI であつた. 得られたこれらのデータについてまず各培養液ごとに両系統間の平均産卵数の差を統計学的に検定した. その結果, RPMI, FCS 添加アール液, FCS 添加 RPMI ではそれぞれ1%, 5%, 2.5%の危険率で両系統間に有意な差が認められ, フィリピン株は日本株よりも産卵数が多い傾向が示された.

次に培養液の違いが産卵数にどのような影響を与えているかを検討した. 即ち, それぞれの株について, 各培養液間の平均産卵数の差を全ての組み合わせについて検定しその結果, 両株ともにアール液中での産卵数は, それ以外の培養液内での産卵数よりも明らかに少ない傾向が示された. 培養液に血清を含むか否かで, アール液対 FCS 添加アール液, DEM 対 FCS 添加 DEM, RPMI 対 FCS 添加 RPMI の三つの組み合わせについて見ると, いずれも血清を含む液で産卵数が多い傾向がある. 他方で, DEM 対 RPMI, FCS 添加 DEM 対 FCS 添加 RPMI について検定すると両株ともに有意な差は認められなかつた.

#### 2. 虫卵の発育と変性

産卵実験に引続き同一の培養液によつて虫卵発育の可否を試験した. その結果, アール液中では虫卵の発育は全く見られず, FCS 添加アール液でも培養3日目に少数の虫卵が段階IIに達したのみで以後の発育は両系統ともに全く認められなかつた.

Table 1 Egg output of *Schistosoma japonicum* during 48 hour culture in various media  
—Comparison between Japanese and Philippine strain—

Medium*	Japanese strain		Philippine strain		Significance level : † comparison between strains
	No. of worm pairs used	Mean No. of eggs/pair ± SEM	No. of worm pairs used	Mean No. of eggs/pair ± SEM ‡	
EBSS	12	104.8 ± 90.9	10	148.8 ± 40.0	N.S.
DEM	12	1393.7 ± 259.5	7	1171.4 ± 511.2	N.S.
RPMI	11	748.6 ± 221.9	10	1978.5 ± 306.2	<0.01
EBSS+FCS	12	365.3 ± 242.9	8	622.6 ± 85.0	<0.05
DEM+FCS	12	2270.8 ± 921.2	9	2080.5 ± 397.3	N.S.
RPMI+FCS	12	1826.7 ± 610.6	12	3147.9 ± 447.5	<0.025

\* EBSS (Earle's balanced salt solution)  
DEM (Dulbecco's modified Eagle medium)  
RPMI (Medium RPMI 1640)  
FCS (Foetal calf serum)

† Student's t-test, with P<0.05 considered significant. N.S., Not significant.  
‡ SEM indicates standard error of the mean.

Table 2 Rate of embryonic development of two strains of *S. japonicum* eggs in various culture media

Medium	Age of eggs (days) Stages	Japanese strain Per cent of eggs in stage							Philippine strain Per cent of eggs in stage						
		3	9	15	22	29	35	42	3	9	15	22	29	35	42
DEM	I	62	12	20	0	0	0	0	60	24	22	6	0	0	0
	II	34	72	30	2	0	0	0	36	46	18	14	0	0	0
	III	0	0	12	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	VI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	degenerated	4	16	38	92	100	100	100	4	30	60	80	100	100	100
DEM+FCS	I	62	0	0	0	0	0	0	80	8	6	0	0	0	0
	II	34	12	0	0	0	0	0	18	10	6	0	0	0	0
	III	0	62	6	0	0	0	0	0	32	12	0	0	0	0
	IV	0	6	4	2	0	0	0	0	0	8	2	0	0	0
	V	0	0	16	4	4	0	0	0	0	0	14	0	0	0
	VI	0	0	10	26	38	24	0	0	0	0	6	24	14	0
	degenerated	4	20	64	68	58	76	100	2	50	68	78	76	86	100
RPMI	I	66	2	2	0	0	0	0	60	0	0	0	0	0	0
	II	20	4	2	0	0	0	0	28	2	0	0	0	0	0
	III	0	12	0	0	0	0	0	0	16	6	0	0	0	0
	IV	0	24	12	0	0	0	0	0	46	10	0	0	0	0
	V	0	2	14	6	0	0	0	0	0	2	10	0	0	0
	VI	0	0	16	12	0	0	0	0	0	20	34	0	0	0
	degenerated	14	56	54	82	100	100	100	12	36	62	56	100	100	100
RPMI+FCS	I	58	0	0	0	0	0	0	64	0	0	0	0	0	0
	II	22	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0
	III	4	18	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0
	IV	0	42	8	0	0	0	0	0	60	2	6	0	0	0
	V	0	4	12	6	8	0	0	0	2	12	4	0	0	0
	VI	0	0	20	40	38	0	0	0	0	32	24	20	0	0
	degenerated	16	36	60	54	54	100	100	8	22	54	66	80	100	100

Table 2 はこの2種以外の培養液による虫卵の發育状態を示したものである。段階VIの成熟卵への培養は、両系統ともに、FCS添加DEM, RPMI, FCS添加RPMIの3種によつてのみ可能であつた(Photos. 1, 2)。系統によつて發育程度又は發育速度に差が現われたのは、DEM及びFCS添加DEMに於てであつた。即ちDEMによる培養15日目、日本株では12%の虫卵が段階IIIに達したにもかかわらず、フィリピン株では段階IIに止まり、その後も段階IIIの虫卵は遂に出現しなかつた。また、FCS添加DEMによる培養15日目、日本株では10%の虫卵がすでに段階VIとなつているのに対し、フィ

リピン株は段階IVに止まり、培養22日目でも成熟卵は6%を見るのみであつた。一方、RPMIによる虫卵の培養では、日本株とフィリピン株とは殆ど同じ發育速度であり、更にFCS添加RPMIでの發育速度とも差を認めず、培養10日以後に成熟卵が出現し培養15日目には20%前後の虫卵が段階VIとなつた。

虫卵の変性はどの發育段階からも起きる。それらは卵内容の顆粒化、萎縮、胞形成等によつて正常卵と區別された。成熟卵の死はミラシジウムの焰状細胞の運動停止によつて判定したが、死後には虫卵が全体として縮小するとともに卵殻が厚くなり、ミラシジウムと卵殻との空

Table 3 The mean and standard error of measurements of 20 eggs in each stage of two strains of *S. japonicum* cultured in RPMI 1640 (measurements in  $\mu$ )

Stages of development	Japanese strain		Philippine strain		Comparison between strains significance level*	
	Length	Width	Length	Width	Length	Width
I	63.7±0.58	50.9±0.58	62.2±1.20	48.7±1.10	<0.005	N.S.
II	70.1±1.56	52.9±0.64	69.1±1.76	52.7±1.30	N.S.	N.S.
III	72.8±1.04	55.6±0.48	69.1±2.04	51.2±1.40	N.S.	<0.005
IV	73.2±1.30	57.8±1.38	69.6±1.68	54.5±1.10	N.S.	N.S.
V	78.3±2.27	63.6±3.09	71.2±1.22	56.1±1.25	<0.025	<0.025
VI	83.6±1.84	68.4±1.30	76.9±0.61	60.1±1.04	N.S.	<0.005

\* Student's t-test, with  $P < 0.05$  considered significant. N.S., Not significant.

隙は不透明物質によって充填された。成熟卵の死滅時期は培養液によって異なっているのみで、系統による差は見られなかった。RPMI では、成熟卵は培養29日目に全て死滅変性するに至った。即ち RPMI での成熟卵の生存期間は14日以内である。FCS 添加 RPMI では全ての成熟卵が死滅していたのは培養35日目で、成熟卵の生存期間は20日以内である。成熟卵の死滅時期が最も遅いのは FCS 添加 DEM 中で培養42日目で全く生存卵が認められなくなった。但しこの培養液中ではフィリピン産の成熟卵出現時期が遅れた為に、成熟卵の生存期間は日本株が27日以内であるのに対しフィリピン株では20日以内であった。その他、培養液中で成熟卵が孵化しミラシジウムが出現する現象が少数ながら見られ、それについては後述する。Table 2 は孵化しない虫卵についてのみ記載してある。

Table 3 は、日本株とフィリピン株との虫卵の大きさを発育段階に従ってそれぞれ20個ずつ計測し、その平均値と標準誤差を示したものである。これらは両株とも RPMI で培養して得た虫卵についての成績である。表に示す通り、日本株では産出時の計測値とミラシジウム形成時の計測値を比べると長径で1.24倍、短径で1.34倍になった。同様にフィリピン株では長径で1.23倍、短径でも同じく1.23倍になっている。両系統について各段階ごとに平均値の差を検定すると、段階 I の長径、段階 III の短径、段階 V の長径及び短径、段階 VI の短径でそれぞれ少くとも2.5%以下の危険率で有意な差がみられ、日本株に比してフィリピン株の虫卵が明らかに小型の傾向がある事が示された。

### 3. 虫卵の孵化とミラシジウムの変化及び貝への感染実験

培養15日以後、前記三種の培養液で発育した成熟卵を

水に移すとそこで孵化し、ミラシジウムは活発な繊毛運動によって水中を泳ぎまわることが確かめられた。他方で、成熟卵の孵化はそれぞれの培養液中でも少数ながら観察された。培養液中で孵化したミラシジウム (Photo. 3) は、水中でのそれとは異なり繊毛運動は弱く、その殆んどは数時間以内に自ら崩壊した (Photo. 4)。しかしながら培養液中に出現したミラシジウムのうちいくつかのものは、母スポロシストへと連続的な転換を始めた。この転換は、孵化後数分にわたる緩慢な繊毛運動の後、繊毛の脱落過程として観察され転換過程には数時間を要した (Photo. 5)。繊毛外被に覆われているミラシジウムが繊毛を脱落させて母スポロシストへの転換をなしとげると、ミラシジウムでは全く見られなかった前後の伸縮運動や蠕動運動が間歇的に認められた。今回の観察で最も長期にわたって生存した母スポロシストは、FCS 添加 DEM 中のフィリピン株で37C、5%CO<sub>2</sub>の虫卵培養と同一条件下で転換後10日間生存した。大きさは収縮時110 $\mu$ 、伸長時180 $\mu$ に達した (Photos. 6, 7)。

培養ミラシジウムの貝への感染能力の有無は、RPMI と FCS 添加 RPMI で培養した日本株について試験した。培養14日後に両方の培養液から成熟卵をピペットで吸い上げ、水を入れたシャーレに移して虫卵を孵化させミラシジウムを得た。そして運動活発なミラシジウムのみに貝に暴露し、貝を最長6ヶ月飼育した。その結果、FCS 添加 RPMI で培養した虫卵よりのミラシジウムは貝への暴露6週後に、貝よりスポロシストとして見出された (貝8個中3個陽性)。また、無血清の RPMI で培養したミラシジウムも同じく、貝への暴露6週後にスポロシストとして見出され (貝3個中1個陽性) 更に、貝への暴露6ヶ月後に、貝よりセルカリアとして見出された (貝5個中2個陽性)。

## 考 察

日本住血吸虫の *in vitro* での産卵は、無機塩類とブドウ糖からなる平衡塩類溶液においてよりもアミノ酸やビタミン類を含む合成培養液において遙かに多数認められた。日本住血吸虫の雌虫が子宮内に持つことのできる虫卵数は一般に50~150個とされている。今回の産卵実験の結果、第1表に見るごとくアールの平衡塩類溶液中では48時間の平均産卵数が150個を越えず、DEM (アミノ酸14種、ビタミン8種含有) や RPMI (アミノ酸20種、グルタチオン、ビタミン11種含有) では750~2,000個の平均産卵数が見られた。この事実は、*in vitro* での虫卵生産が培養液中のアミノ酸やビタミン等の栄養成分に依存している事を示している。

虫卵が DEM 中では成熟せず RPMI 中で成熟するという実験結果は、RPMI に含まれていて DEM に含まれていない栄養成分の中に虫卵成熟に必須なものが存在する事を示唆する。事実、著者らの検討の結果 (Kawanaka *et al.*, 1983, a, b), 日本住血吸虫の虫卵成熟の為に必要で十分な栄養成分を含む培養液の処方は、アールの平衡塩類溶液に次のアミノ酸15種 (アルギニン、シスチン、グリシン、グルタミン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン) と、塩化コリン、ニコチン酸アミドを加えたものである事が明らかとなった。RPMI はこれらの栄養成分を全て含み、DEM はグリシンのみを欠如している。DEM が日本住血吸虫虫卵の培養液として不適当なのは、グリシンを含有していない為であり、DEM に血清を添加した培養液で虫卵の成熟が見られたのは血清によってグリシンが補給された事によると考えられる。

血清成分中の何が効果をもたらすかは不明であるが、合成培養液に血清を添加する事の実験的な効果は、産卵数の増加と成熟虫卵の生存期間の延長にも認められた。最近、Newport and Weller (1982, a) はマンソン住血吸虫の *in vitro* での研究で、動物血清中の脂肪酸 (ステアリン酸) が産卵促進の有効成分であると報告した。また、今回の実験で、成熟虫卵が最も長く生存するのは栄養成分の最も豊富な血清添加 RPMI ではなく、それよりも栄養成分の乏しい血清添加 DEM であった事は興味深い。血清成分をも含めて、どんな成分の添加又は欠如が、日本住血吸虫の産卵促進や虫卵の生存期間の延長に効果を及ぼすのか今後の検討を要する。

成熟虫卵の一部が培養液中で孵化し、同一培養条件の

まま連続的にミラシジウムからスポロシストへと転換するという現象は、マンソン住血吸虫卵でも Newport and Weller (1982, b) によつて観察されている。住血吸虫スポロシストの *in vitro* 培養は Voge and Seidel (1972), Bash and DiConza (1974) などによつて試みられているが、娘スポロシストの産生には成功していない。従来は、ミラシジウムを無菌的に得る事に多少の困難があつた。今後は本実験で用いた手法によつて産卵から出発して大量のミラシジウムを得る事が比較的容易になると考えられ、スポロシストの *in vitro* 培養の研究に応用され得ると思われる。

日本株とフィリピン株との系統間の差異は今回の実験の範囲内でも随所に見られたが、平均産卵数、虫卵の大きさでもそれが認められた。これらは日本住血吸虫の病原性の強さに関与する要因として特に重要であると思われる。成虫による産卵能力の高低は、虫卵の蓄積による組織障害程度に係わり、虫卵の大小は血流を介して体内各臓器への分散程度に関係する可能性が存在するからである。Warren and Berry (1972) は四つの日本住血吸虫系統をマウスに定量的に実験感染させ、それによる肝脾腫を比較した。その結果、肝脾腫の程度はフィリピン株、台湾株が最も顕著で、ついで日本株、中国株の順で軽減すると報告している。今回行なつた *in vitro* での実験は、フィリピン株として野外から分離したものをそのまま用い、他方日本株としては実験室内で長期にわたつて維持されてきたものを用いたものである。長期にわたる実験室内維持が産卵能力や虫卵の大きさ等の諸性質を変化させたのではないならば、今回の実験の結果として、産卵能力はフィリピン株が日本株よりも高く、また虫卵の大きさはフィリピン株が日本株よりも小型の傾向があるという事ができる。これらの結果は、さきに引用した *in vivo* での病原性に関する成績を量的な側面から根拠づけるものと考えられる。

## 要 約

日本住血吸虫の産卵能力、ミラシジウム形成の有無と速度、成熟卵の生存期間などについて異なる培養液を用い *in vitro* での検討を行なつた。使用した培養液は、アールの平衡塩類溶液、ダルベッコ変法イーグル培地、RPMI 1640液及びこれらにそれぞれ10%に牛胎児血清を添加した計6種類である。実験に際しては日本住血吸虫の日本株とフィリピン株について同一条件で実施し、可能な限り両者の比較を試みた。得られた結果は次の通りである。

1) 成虫1対当りの産卵数は用いた培養液によつて異なり、48時間の平均産卵数の範囲は日本株で105-2,271個、フィリピン株で148-3,148個であつた。フィリピン株は日本株よりも産卵能力が高い傾向があり、3種の培養液中で系統間の平均産卵数の差は統計学的にも有意であつた。

2) ミラシジウム形成卵は、無血清のRPMI 1640液による培養によつても得られた。牛胎児血清を添加したのでは、アールの平衡塩類溶液のみ成功しなかつた。成熟にいたる虫卵の発育期間は、培養液及び系統によつて若干の差があるがおおむね産卵後2週間であつた。

3) 無血清RPMI 1640液で培養した虫卵の大きさを発育段階ごとに系統間で比較すると、フィリピン株が日本株よりも小型の傾向がある事が示された。

4) 培養した日本株成熟卵を水中で孵化させて得られたミラシジウムはミヤイリガイに感染し、感染後、スポロシスト、セルカリアへの発育する能力があることを確かめた。

5) 少数の成熟卵は水に移すことなく、培養液保存中に孵化し、その一部はミラシジウムから更にスポロシストに転化して、10日間にわたり生存しある程度の発育を示す事が観察された。

## 謝 辞

本研究の遂行と論文作成にあたり御指導いただいた、国立予防衛生研究所寄生虫部林 滋生部長、岐阜大学医学部寄生虫学教室大友弘士教授に深く感謝致します。本研究の一部分はフィリピン、レイテ島、パロの Schistosomiasis Control and Research Project (S.C.R.P.) で行なわれ、この間 Dr. B. L. Blass 所長はじめ所員の方々に惜しめない援助と協力を載きました。記して心よりのお礼を申し上げます。

## 文 献

- 1) Basch, P. F. and J. J. DiConza (1972): The miracidium-sporocyst transition in *Schistosoma mansoni*; surface changes in vitro with ultrastructural correlation. J. Parasitol., 60, 935-941.
- 2) Cheever, A. W., R. H. Duvall, and R. G. Minker (1980): Quantitative parasitologic findings in rabbits infected with Japanese and Philippine strains of *Schistosoma japonicum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29(6) 1307-1315.
- 3) Faust, E. C. and H. E. Meleney (1924): Studies on schistosomiasis japonica. Am. J. Hyg., Monogr. Ser., 31-339.
- 4) Hsü Shih-E (1974): Culture of *Schistosoma japonicum* in vitro, with special reference to egg production and development (in Chinese with English summary). Acta Zoologica Sinica, 20, 231-242.
- 5) Hsü, S. Y. L. and H. F. Hsü (1960): On the virulence of the geographic strains of *Schistosoma japonicum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 9, 195-198.
- 6) Kawanaka, M., S. Hayashi and H. Ohotomo (1983, a): Nutritional requirements of *Schistosoma japonicum* eggs. J. Parasitol. in press
- 7) Kawanaka, M., S. Hayashi and H. Ohotomo (1983, b): A minimum essential medium for cultivation of *Schistosoma japonicum* eggs. J. Parasitol. in press.
- 8) 宮川次次 (1910): 日本住血吸虫の病原的方面, 最新日本住血吸虫病論. 日新医学社, 東京, p. 21-100.
- 9) Moore, D. V. and J. H. Sandground (1956): The relative egg-producing capacity of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 5, 831-840.
- 10) 中山平次郎 (1910): 宿主の組織内に於ける日本住血吸虫卵子の発育. 東京医誌, 24, 133-160.
- 11) Newport, G. R. and T. H. Weller (1982, a): Deposition and maturation of eggs of *Schistosoma mansoni* in vitro: importance of fatty acids in serum-free medium. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31, 2, 349-357.
- 12) Newport, G. R. and T. H. Weller (1982, b): Miracidia infective for snails derived from eggs laid by adult *Schistosoma mansoni* in vitro. Parasitol., 84, 481-490.
- 13) Newsome, J. (1962): Maturation of Schistosome eggs in vitro. Nature, 195, 722-723.
- 14) 織田卓五郎 (1959): 日本住血吸虫症に於ける組織内虫卵の運命及び組織変化に関する研究. 久留米医誌, 22, 185-216.
- 15) Senft, A. W. and D. G. Senft (1962): A chemically defined medium for maintenance of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol., 48, 551-554.
- 16) Voge, M. and J. S. Seidel (1972): Transformation in vitro of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. J. Parasitol., 58, 699-704.
- 17) Vogel, H. (1942): Über Entwicklung, Lebensdauer und Tod der Eier von *Bilharzia japonica* im Wirtsgewebe. Dtsche Tropen Med. Z., 46, 57-61, 81-91.

18) Warren, K. S. and E. G. Berry (1972) :  
Induction of hepatosplenic disease by single  
pairs of the Philippine, Formosan, Japanese,  
and Chinese strains of *Schistosoma japoni-*

*cum.* J. infect. Disease, 126, 5, 482-491.

19) 渡辺真澄 (1934) : 日本住血吸虫 *Miracidium*  
の發育. 岡山医誌, 46, 615-664.



**Abstract**

DEPOSITION AND MATURATION OF *SCHISTOSOMA JAPONICUM*  
EGGS *IN VITRO*: COMPARISON BETWEEN JAPANESE  
AND PHILIPPINE STRAINS

MASANORI KAWANAKA

(*Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo and Department  
of Parasitology, Gifu University School of Medicine, Gifu*)

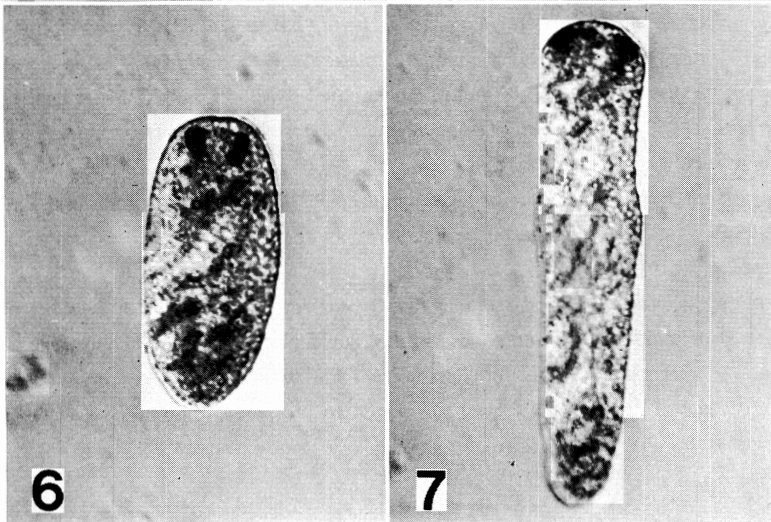
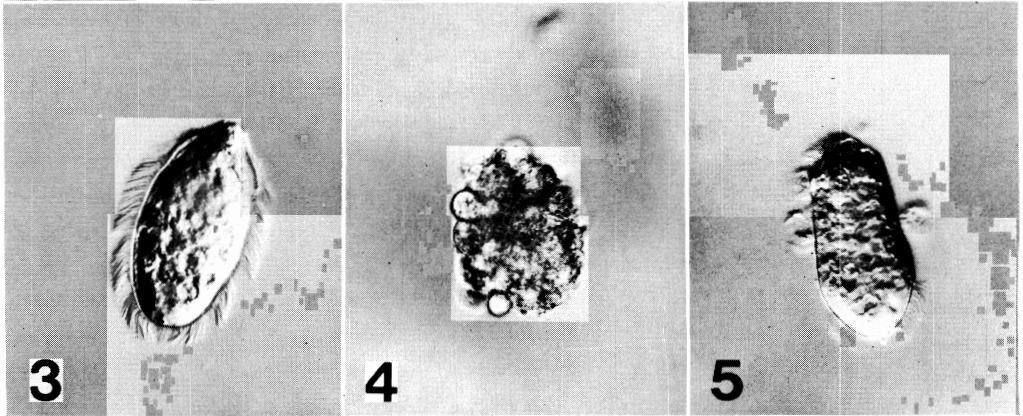
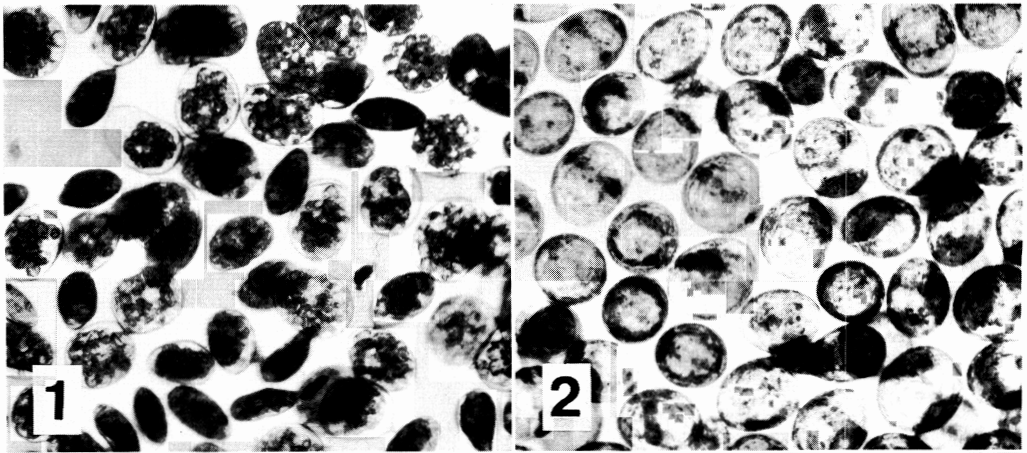
Adult pairs of two geographic strains of *Schistosoma japonicum*, Japanese and Philippine, were maintained in various culture media in order to assess the difference in ability of oviposition between strains. Eggs deposited by adult worms were subsequently cultured in these media. The media used for the study include three chemically defined media [Earle's balanced salt solution (EBSS), Dulbecco's modified Eagle medium (DEM) and Medium RPMI 1640 (RPMI)] with or without foetal calf serum (FCS) at concentration of 10%.

The average numbers of eggs laid per worm pair of the Japanese strain during first 48 hours were 104.8, 1392.7 and 748.6 in EBSS, DEM and RPMI, respectively, and they were 365.3, 2270.8 and 1826.7 in each medium supplemented with FCS. In the case of the Philippine strain, average numbers were 148.8, 1171.4 and 1978.5 without FCS, and 622.6, 2080.5 and 3147.9 with addition of FCS with each strain the addition of FCS resulted more yield of eggs. The higher egg producing capacity of the Philippine strain than the Japanese strain was statistically significant in RPMI with or without FCS and EBSS with FCS (Table 1.).

In the experiments of culturing eggs for growth, EBSS and DEM were found to be lacking in nutritional factor(s) required for complete maturation of embryos, although DEM could support the full maturation when it was supplemented with FCS. RPMI supported miracidial development either with or without FCS supplement. It required about two weeks for the eggs to reach the miracidial stage (Table 2.).

Measurements were made on the eggs cultured in RPMI. It was indicated that the size of eggs of the Philippine strain tended to be smaller than that of the Japanese strain through all the stages of development (Table 3.).

The miracidia which hatched from eggs derived from RPMI with or without FCS cultures possessed normal behavioural characteristics. They could penetrate into the host snails and develop to sporocysts and cercariae. Some miracidia were found to hatch while maintained in the culture medium at 37C, and a few of them even developed to mother sporocysts and survived for 10 days *in vitro* (Photos. 1-7.).



**Explanation of Photographs**

- Photo. 1 *Schistosoma japonicum* eggs in Dulbecco's modified Eagle medium on day 12 of culture (Japanese strain,  $\times 130$ ).
- Photo. 2 *S. japonicum* eggs in RPMI 1640 on day 12 of culture (Japanese strain,  $\times 130$ ).
- Photo. 3 *S. japonicum* miracidium observed in RPMI 1640 on day 14 of culture (Japanese strain, Nomarski's interference micrograph,  $\times 330$ ).
- Photo. 4 Disintegrating miracidium observed in RPMI 1640 on day 15 of culture (Japanese strain,  $\times 330$ ).
- Photo. 5 Miracidium in the process of shedding its epidermal plates in RPMI 1640 on day 15 of culture (Japanese strain, Nomarski's interference micrograph,  $\times 330$ ).
- Photo. 6 Mother sporocyst survived for 10 days in Dulbecco's modified Eagle medium with 10 % foetal calf serum (Philippine strain,  $\times 330$ ).
- Photo. 7 Same specimen as Photo 6. that is in extension ( $\times 330$ ).