

ツボガタ吸虫 *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850)

のメタセルカリアの走査電子顕微鏡による観察

中 元 緑

(昭和61年2月5日 受領)

Key words: SEM observations, *Pharyngostomum cordatum* metacercariae

ツボガタ吸虫 *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) はわが国において, Kifune *et al.* (1967) によって初めて発見されて以来, 数多くの報告(木船・藤, 1976; 近藤ら, 1974; 井関ら, 1974; 梶山ら, 1977; 齊藤ら, 1983; 宇賀ら, 1984; 岡田ら, 1984)があるが, 主に成虫に関するもので, 第二中間宿主およびメタセルカリアに関する報告は少ない。

本吸虫のメタセルカリアについて, 両生類では, Wallace (1939), 栗本 (1976), 内田ら (1977) および梶山ら (1980a, b) が, それぞれ各種のカエルからの, また爬虫類では, 内田ら (1977) のほか塩飽ら (1984) が, 数種の蛇からの寄生を報告している。

また, 梶山ら (1980a) は, 実験的にツチガエル *Rana rugosa* のオタマジャクシから遊離メタセルカリアおよび被囊メタセルカリアを得ている。さらに Ooi *et al.* (1984) が, 待機宿主 Paratenic host として, 日本産タヌキの横隔膜からメタセルカリアを検出したと報告している。

成虫および成虫の寄生状態に関する走査電子顕微鏡(以下SEM)による観察はあるが, メタセルカリアについてのSEM観察はされていない。

本研究は, ツボガタ吸虫のメタセルカリアを, その成長過程にしたがい, SEMで観察を行い, セルカリア(中元, 1985)および成虫(近藤ら, 1974; 梶山, 1979; 岡田ら, 1984)のSEM像と比較検討し, 新しい知見を得たのでその結果を報告する。

材料と方法

1. 実験的感染で得たオタマジャクシよりの遊離メタセルカリア

1985年8月, ツボガタ吸虫に濃厚感染した山口市平川

で飼育されている日本在来種2歳雄ネコから得た虫卵を梶山ら (1979) の方法で孵化後得たミランジュウムを, ツボガタ吸虫の非汚染地域で採集したヒラマキモドキ71個に, 11ピーカーの水中(室温)で感染させ, その貝をピーカーごと171の水槽内に放置し, エアレーションを行ないながら飼育し, 14日後, 自然界で採取した孵化後5日目のツチガエルのオタマジャクシ15匹を水槽に入れ感染させた。

オタマジャクシ投入後, 14日, 16日, 21日および27日目にオタマジャクシを順次剖検し, ガラス板で圧平してメタセルカリアの寄生の有無およびその寄生数を調べた。また, これらのメタセルカリアを分離摘出し, 2.1% グルタルアルデヒドで4°C, 2時間固定後, 0.1M コジール酸緩衝液(pH 7.2)で2回洗浄し, さらに1% 四酸化オスミウム酸溶液で30分固定し, 25%, 50%, 70%, 90%, 無水エタノールおよび100%アセトンで脱水操作を行なった。さらに, 臨界点乾燥(日立HCP-2)後, 金属イオン蒸着装置(Eiko IB-3)を用いて金を蒸着し, SEM(日立S-430S)を用いて加速電圧15KVで観察した。

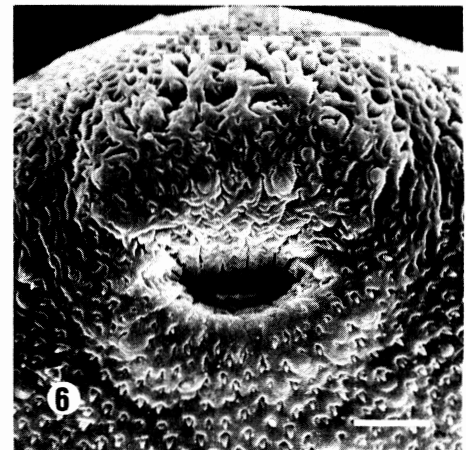
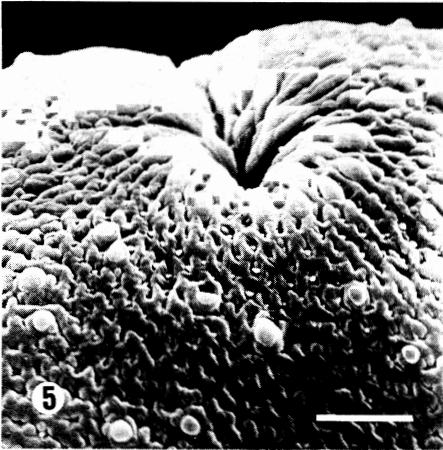
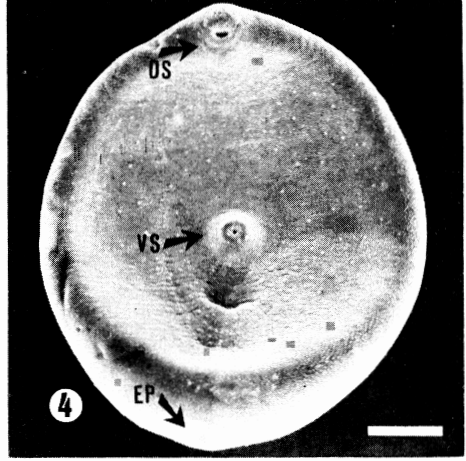
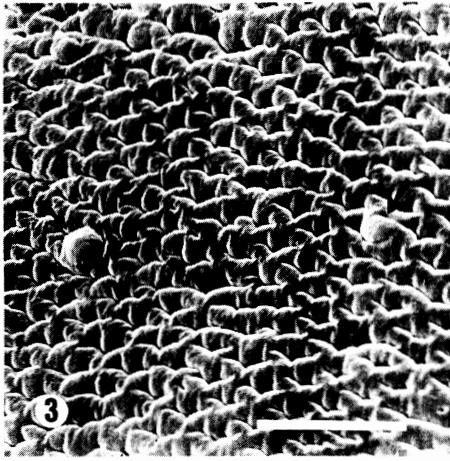
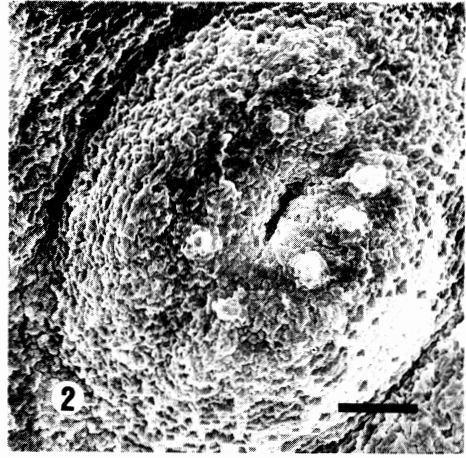
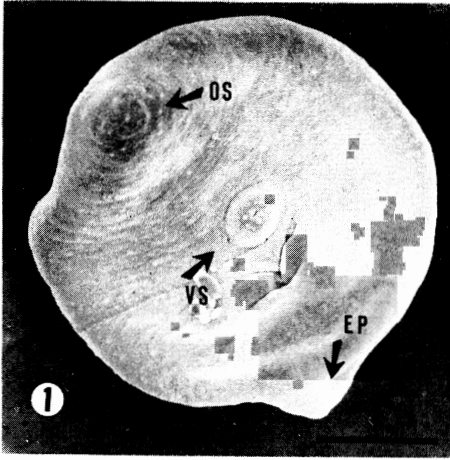
2. 自然感染カエルよりの被囊メタセルカリア

上記ネコの棲息地付近から採集した今年生れの幼若トノサマガエル16匹のうち11匹を剖検, 両後肢の筋肉を取り出し, ガラス板で圧平してメタセルカリアの寄生数を検索した。

また, 他の5匹は, そのまま飼育し2ヶ月後に剖検し, 同じく寄生数を調べた。

これらのカエルのメタセルカリア寄生部の筋肉を, 人工胃液(1:10000 ペプシン 1g, HCl 7ml, 0.9%食塩水 1000ml)中で, 35°C, 4時間適時攪拌しながら消化を行なった。

さらに, その沈渣を35°C, 30分間人工腸液(トリプシン 0.5g, 重曹 0.2g, 0.9%食塩水 50cc)で処理し



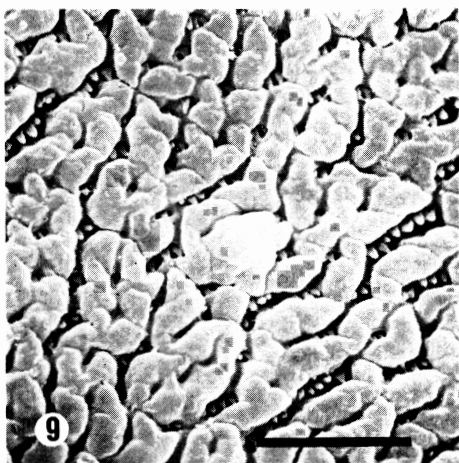
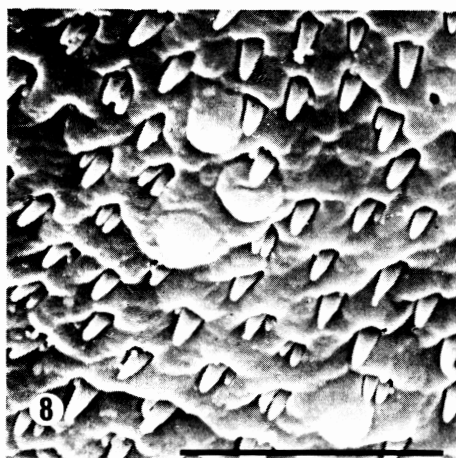
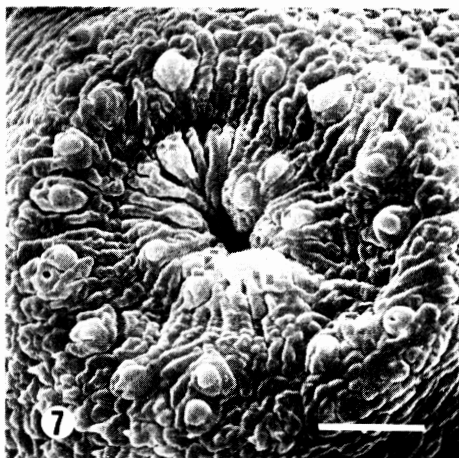


Table 1. Number of *Pharyngostomum cordatum* metacercariae in *Rana rugosa* tadpole in experimental infections (3 tadpoles died)

Tadpole No.	Days after infection	No. of metacercariae
1	14	3
2	14	8
3	14	1
4	16	3
5	16	4
6	16	1
7	16	4
8	21	4
9	21	10
10	27	5
11	27	1
12	27	7
Total		51 (Average 4)

Figures 1-9. Scanning electron micrographs of *Pharyngostomum cordatum*.

Fig. 1. Freely moving metacercaria, showing the oral sucker (OS), the ventral sucker (VS), the excretory pore (EP), and a irregular fissure behind the ventral sucker. Bar=50 μ m.

Fig. 2. Ventral sucker of freely moving metacercaria, showing rounded swollen papillae around the ventral sucker. Bar=5 μ m.

Fig. 3. Enlarged view of the tegument of freely moving metacercaria, showing dome-shaped papillae (arrow). Bar=5 μ m.

Fig. 4. Encysted metacercaria, showing the oral sucker (OS), the ventral sucker (VS), the excretory pore (EP), and a irregular fissure behind the ventral sucker. Bar=50 μ m.

Fig. 5. Oral sucker of a young encysted metacercaria. Dome-shaped papillae are scattered and small tips of the spines are observed. Bar=5 μ m.

Fig. 6. Oral sucker of an encysted metacercaria. Conical spines are observed. Bar=5 μ m.

Fig. 7. Ventral sucker of an encysted metacercaria. Rounded swollen papillae are situated in two circles. Bar=5 μ m.

Fig. 8. Enlarged view of the surface of encysted metacercariae, showing four dome-shaped papillae, single-pointed spines and double-pointed spines. Bar=5 μ m.

Fig. 9. Enlarged view of an encysted metacercaria, showing triple-pointed spines, four-pointed spines, and a dome-shaped papilla. Bar=5 μ m.

た後、シャーレ内で、被囊から脱出運動中のメタセルカリアを摘出して1.と同様に処理し、SEM観察を行なった。

結 果

1. メタセルカリアの感染状態

感染実験によるオタマジャクシのうち、飼育中死亡した3匹を除いた12匹につきメタセルカリアの感染状態を調べたところ、全個体にメタセルカリアが認められ、感染率は100%であった。また、メタセルカリアの寄生数は、各個体において1個から10個で、計51個、平均4個であった (Table 1)。

さらにその stage については、No. 11 のオタマジャクシのメタセルカリアにのみ被囊の形成が認められ、それ以外の個体においては、すべて遊離メタセルカリアであった。

自然界より採集された幼若トノサマガエル11匹の両後肢筋肉内におけるメタセルカリアの寄生率は82%であり、その寄生数は、計65個、平均7個であった。その後さらに2ヶ月間飼育した5匹については、その寄生率は60%であり、寄生メタセルカリア数は計107個、平均38個であった。

メタセルカリアの体形については、オタマジャクシの体内で運動中のものでは、平均体長 204 μm 、平均体幅 170 μm で、やや小形であり、幼若トノサマガエルでは平均体長 263 μm 、平均体幅 234 μm 、さらに2ヶ月間飼育係のトノサマガエルでは、平均体長 302 μm 、平均体幅 224 μm であり、漸次大きくなっていった。

2. メタセルカリアの SEM による観察

a. オタマジャクシから得られた遊離メタセルカリアの SEM 像

オタマジャクシ体内の遊離メタセルカリアの形態は、Fig. 1 にみられるように不整形を呈していた (体長 193-223 μm 、体幅 152-195 μm)。体前端に口吸盤 (6.3-9.7 μm) がみられ、中央に楕円形で丘状に隆起した腹吸盤 (短径 10.7-22.1 μm 、長径 12.6-30.4 μm) があり、腹吸盤の裂孔の周囲には、径 1-2 μm の papillae が、円周状に 5-8 個配列していた (Fig. 2)。

腹吸盤の後方に、体内部に巻き込むような不整形の亀裂がみられ、これは holdfast organ (支持体) の初期像と推測された。後端に、円筒形の排泄孔 (1.9-2.6 μm) がみられた。

遊離メタセルカリアの体表は、腹面背面ともに索状襞が密集し平坦にみえ、皮棘は全くみられなかったが、体

表全面に半球形の papillae (径約 1 μm) が散在していた (Fig. 3)。

b. 自然感染カエルにみられた被囊メタセルカリアの SEM 像

被囊中のメタセルカリアの形態は、類円形 (幼若カエル体長 229-322 μm 、体幅 210-250 μm ; 2ヶ月飼育カエル体長 285-320 μm 、体幅 214-237 μm) であり、holdfast organ の亀裂孔を中心にして、メタセルカリアの後方は半円形に辺縁から包み込むように堤防状の盛りあがりが見られた (Fig. 4)。体前端に口吸盤、腹面中央に腹吸盤、その後方に不整形の亀裂がみられ、背面後端に排泄孔がみられた。

口吸盤の大きさは、幼若カエルのメタセルカリアでは 7.7-10.9 μm であり、2ヶ月飼育後のカエルのメタセルカリアでは、8.4-12.2 μm であった。口吸盤周辺の索状の襞の間には、オタマジャクシ寄生の遊離メタセルカリアではみられなかった皮棘が認められた。この皮棘は、幼若カエルのメタセルカリアでは、先端を襞間にわずかに可視できるだけで、襞から突出してはいなかった (Fig. 5)。2ヶ月飼育後のカエルのメタセルカリアでは、円錐状の皮棘が同心円状に配列しているのがみられた (Fig. 6)。

腹吸盤は、幼若カエルのメタセルカリアでは、短径 12.5 μm 長径 16.5 μm で楕円形を呈していたが、2ヶ月飼育後のカエルのメタセルカリアでは、短径 18.7-36.4 μm 、長径 20.0-36.4 μm で、やや大きくなり円形を呈したものが多くみられた。腹吸盤の開口部を中心にして球形の papillae が内側 5-7 個、外側 10-13 個と二重の円周状に配列していた (Fig. 7)。

排泄孔は、幼若カエルのメタセルカリアでは、5.6-8.3 μm 、2ヶ月飼育後のカエルのメタセルカリアで 5.8-9.8 μm であった。排泄孔周辺には、いずれのメタセルカリアにも皮棘はみられなかった。

幼若カエルのメタセルカリアの体表は、口吸盤周囲をのぞいて、オタマジャクシの遊離メタセルカリアの体表とほとんどかわりなかったが、体表全体に散在する papillae が、オタマジャクシの papillae (半球形) より球状に近い形態をしていた (Fig. 5)。2ヶ月飼育後のカエルのメタセルカリアの体表には、腹面背面いずれにも円錐形の皮棘に混じり、2指状の皮棘がみられた (Fig. 8)。体後方辺縁の肥厚し、成長のすすんだメタセルカリアでは、虫体前部および後部 (排泄孔周辺をのぞく) で、円錐形および2指状の皮棘がみられるが、体中央部では、腹面背面ともに襞間から3指状あるいは4指状

の皮棘が、不規則に発生しているのがみられた(Fig. 9).

考 察

ツチガエルのオタマジャクシへの本吸虫のセルカリアの感染実験で、感染率が100%であったのは、梶山ら(1980a)の97%と一致し、極めて高率に感染することを再度立証したことになる。また、幼若カエルの感染率が82%と高率であったのは、採集地域が本吸虫の濃厚汚染地域であったためであろう。

今回得られた幼若カエルよりのメタセルカリアは、すべて被囊しており、オタマジャクシへの感染実験でみられたような遊離メタセルカリアは全くみられなかった。Wallace (1939), 栗本 (1976) および 梶山ら (1980a) は、幼若なメタセルカリアは活発に結合織内を移動するものがあると述べ、内田ら (1977) は、カエルから遊離メタセルカリアを認めていない。

今回の幼若トノサマガエルは、その大きさから生後4ヶ月前後と推定され、自然感染後かなりの日数を経過しており、感染後の期間とメタセルカリアの被囊形成と密接な関係があると考えられる。

今回のメタセルカリアの SEM 標本における計測値では、標本作製時の収縮が推定され、光顕標本での栗本 (1976), 内田ら (1977) および 梶山ら (1980b) の計測値のおよそ55%と大幅に小さくなっている。

オタマジャクシよりのメタセルカリアの SEM 像は、セルカリアが第二中間宿主に侵入した際に、その尾幹部と尾岐部がとれたセルカリア体部と、ほぼ類似した全体像を呈している。セルカリアの口吸盤周辺から、体部中央近くまでみられた円錐形の鋭い皮棘および感覚毛をともなった papillae は、オタマジャクシよりのメタセルカリアでは全く観察できず、侵入と同時に消失したものと考えられる。

メタセルカリアの体表全体に散在する半球状の papillae については、セルカリアおよび成虫の体表にはみられない。肺吸虫類のメタセルカリアの体表でも、類似した papillae を認めている (Aji *et al.*, 1984; Higo and Ishii 1984; Tongu *et al.*, 1985) が、その機能についてはふれられていない。

ツボガタ吸虫のセルカリアにみられた unciliated type および pit type の papillae に似た構造が、肝蛭 (Bennett, 1975) および肝吸虫 (Fujino *et al.*, 1979) のメタセルカリアの観察でみられているが、本吸虫のメタセルカリアには、半球状の papillae と皮棘の他の構造は観察されていない。

セルカリアが第二中間宿主に侵入後、時間を経過した被囊中のメタセルカリアは、円形となり、辺縁部が肥厚している。体表においても成長とともに、鬚間にある皮棘が、徐々に成虫にみられる皮棘の形態に変化していくことが、今回の観察で明らかになった。Wallace (1939) および内田ら (1977) は、体表全体が小棘で被われていることを、さらに内田ら (1977) は成虫にみられるような突起はメタセルカリアの段階ではみられないと報告している。しかし、鬚間の皮棘は、光顕レベルでは判明しにくく、あるいは観察に供されたメタセルカリアの成長の差異によるものと思われる。

成虫の SEM 像 (近藤ら, 1974; 梶山, 1979; 岡田ら, 1984) では、メタセルカリアと大きく形態を異にしており、成虫の全体像は、ツボガタを呈し、holdfast organ が体上半を占め、腹吸盤はその下にかくれ、外からはみられない。

セルカリアの腹吸盤は、開口部の内側に牙状の長く鋭い円錐形の大きな突起が2-3層に配列していたが、メタセルカリアでは、裂孔を中心に papillae が円周状に規則正しく配列している。近藤ら (1974) は、SEM で観察できない成虫の腹吸盤を光顕で透過して観察し、菊花状を呈していると報告しているが、今回観察されたメタセルカリアの腹吸盤に似ている。

成虫の体表では、口吸盤周辺、holdfast organ 表面および虫体後部 $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ に皮棘はみられないが、そのほかの部分には、円錐状、2-3指状あるいは5-6指状の皮棘がみられている。岡田ら (1984) は、皮棘の機能は不明であるが、分布部位から、虫体の固定を介助するものではないかと推測している。

結 論

ツボガタ吸虫のセルカリアが第二中間宿主に感染した後のメタセルカリアの成長について、SEMによる観察を行なった結果、

1. 感染初期の遊離メタセルカリアの全体像はセルカリアの体部に類似しているが、腹吸盤には、セルカリアの歯牙状の突起はみられず、周囲に papillae の配列がみられた。被囊メタセルカリアの全体像は類円形を呈し、腹吸盤には半球形の papillae が2重の円周状に配列し、成虫の腹吸盤に類似していた。

2. 遊離メタセルカリアおよび被囊メタセルカリアの体表には、セルカリアにも成虫にもみられない半球形の papillae が散在していたが、その機能については不明である。

3. 皮棘は、遊離メタセルカリアではみられず、被囊メタセルカリアでは成長とともに円錐状から2指状さらに多指に分岐した皮棘がみられ、成虫の皮棘と同形であった。

謝 辞

本研究にあたり終始御指導ならびに御校閲をいただいた山口大学医学部病理学第一講座・内野文弥教授に深甚の敬意を表し、御助言を賜った高知医科大学環境保健医学講座寄生虫学教室・鈴木了司教授に深謝の意を表します。多大な御援助をいただいた山口大学医学部病理学第一講座・石原得博助教授、山下吉美博士、山口大学医療短期大学部・梶山松生博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Aji, T., Oh, H., Tongu, Y., Inatomi, S., Hata, H., Kobayashi, M., Miranda, H. and Ibanez, N. (1984): Ultrastructure of tegumental surface of the metacercaria of *Paragonimus peruvianus*. Jpn. J. Parasitol., 33, 15-21.
- 2) Bennett, C.E. (1975): Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Faciola hepatica* L. J. Parasitol., 61, 886-891.
- 3) Fujino, T., Ishii, Y. and Choi, D.W. (1979): Surface ultrastructure of the tegument of *Clonorchis sinensis* newly excysted juveniles and adult worms. J. Parasitol., 65, 579-590.
- 4) Higo, H. and Ishii, Y. (1984): Scanning electron microscopy of the newly excysted juveniles *Paragonimus westermani* (Kerbert, 1878) Brauer, 1899 (Parthenogenetic type) and *P. miyazakii* Kamo, Nishida, Hatushika and Tomimura, 1961. Jpn. J. Parasitol., 33, 421-427.
- 5) 井関基弘・田辺和祐・宇仁茂彦・佐野竜蔵・高田季久(1974): 大阪地区における猫のトキソプラズマ感染状況ならびに心臓および腸管内寄生虫調査成績, 寄生虫誌, 23, 317-322.
- 6) 梶山松生・梶山 緑・原 行雄・佐藤昭夫(1977): 山口県で発見されたツボガタ吸虫症について. 山口獣医誌, 4, 1-4.
- 7) 梶山松生(1979): わが国におけるツボガタ吸虫について. 山口獣医誌, 6, 1-12.
- 8) 梶山松生・梶山 緑・鈴木了司(1980a): *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) に関する研究(2)第二中間宿主および終宿主における感染実験. 寄生虫誌, 29, 313-318.
- 9) 梶山松生・中元 緑・鈴木了司(1980b): *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) に関する研究(3)山口市周辺における感染状況. 山口獣医誌, 7, 1-6.
- 10) Kifune, T., Shiraishi, S. and Takao, Y. (1967): Discovery of *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) in cats from Kyushu, Japan. (Trematoda, Strigeoidea, Diplostomidae). 寄生虫誌, 16, 403-409.
- 11) 木船倂嗣・藤 幸治(1976): ツボガタキュウチュウに関する新知見. 福大医紀, 3, 133-136.
- 12) 近藤力王至・栗本 浩・織田 清・嶋田義治(1974): 滋賀県の野猫から見出された *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) について. 寄生虫誌, 23, 8-13.
- 13) 栗本 浩(1976): *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) の生活史に関する研究 1. わが国における第二中間宿主の探索と終宿主への感染実験. 寄生虫誌, 25, 241-246.
- 14) 中元 緑(1985): *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) のセルカリアの走査電子顕微鏡的観察. 寄生虫誌, 34, 403-409.
- 15) 岡田亮次・今井壮一・石井俊雄(1984): ツボガタキュウチュウ *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) Ciurea, 1922 の寄生状態に関する走査電子顕微鏡的観察. 寄生虫誌, 33, 333-339.
- 16) Ooi, H., Kamiya, M., Kudo, T., Hashimoto, A. and Kitazawa, K. (1984): Diplostomulum of *Pharyngostomum cordatum* in the muscle of a Raccoon Dog *Nyctereutes procyonoides*. Jpn. J. Vet. Sci., 46, 409-412.
- 17) 斉藤利和・川上生三郎・本山信雄・武井伸一・高岡正敏・影井 昇(1983): 埼玉県における猫の寄生蠕虫類感染状況. 寄生虫誌, 32(1・補), 10.
- 18) 塩飽邦憲・角坂照貴・金子清俊・近藤繁生(1984): *Pharyngostomum cordatum* の走査電子顕微鏡による観察. 寄生虫誌, 33(2・補), 7.
- 19) Tongu, Y., Aji, T., Oh, H., Ishii, A., Yokogawa, M., Hata, H., Ito, J. and Lamothe-Argumedo, R. (1985): Surface ultrastructure of *Paragonimus mexicanus* Miyasaki et Ishii, 1968. Jpn. J. Parasitol., 34, 441-447.
- 20) 内田明彦・井上英幸・板垣 博(1977): 日本産両生類の寄生虫相(第5報)香川県の両生類・爬虫類に寄生する壺形吸虫 *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) のメタセルカリア. 寄生虫誌, 26, 384-387.
- 21) 宇賀昭二・松村武男・山田都佐雄・大西富男・五藤政義(1984): 兵庫県下におけるネコの寄生蠕虫類について. 寄生虫誌, 32, 91-98.
- 22) Wallace, F.G. (1939): The life cycle of *Pharyngostomum cordatum* (Diesing) Ciurea (Trematoda; Alariidae). Trans. Amer. Micro. Soc., 58, 49-61.

Abstract

SCANNING ELECTRON MICROSCOPE OBSERVATIONS ON METACERCARIAE
OF *PHARYNGOSTOMUM CORDATUM* (DIESING, 1850)

MIDORI NAKAMOTO

(First Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan)

Metacercariae of *Pharyngostomum cordatum* (Diesing, 1850) obtained from wild *Rana nigromaculata* and the experimentally infected second intermediate host (*Rana rugosa* tadpole) were observed under a scanning electron microscope.

The body of metacercariae was round in shape. The body surface of freely moving metacercariae at early stage was similar to that of cercariae, but sharp spines were not seen around the ventral sucker. Rounded swollen papillae were present circularly around the ventral sucker. The ventral sucker appeared similar to that of adult worms.

Dome-shaped papillae were observed scatteringly on the surface of metacercariae but not on the surface of cercariae and adult worms.

No spines were noticed on the body surface of freely moving metacercariae. However, as the encysted metacercariae grew up, the spines were seen to be single-, double-, triple-, or quadruple. These spines were also observed on the body surface of adult worms.