

画像処理による肝吸虫脱囊幼虫の運動性の記録法

大山文男 初鹿 了

(昭和62年4月20日受領)

Key words : *Clonorchis sinensis*, excysted metacercaria, in vitro motility, quantitative recording, real-time image processing

要 約

暗視野顕微鏡と自作の画像処理装置(画面分解能:垂直117,水平64ドット,階調:6段階,画像取り込み頻度:16/60Hz)を用いて,肝吸虫脱囊幼虫の運動性を実時間で記録した。

Tyrode氏液中の脱囊幼虫の運動は,主に間欠低活動型または間欠突発高活動型を示すが,ときどき連続低活動型や連続高活動型,および自己吸着非活動型を示した。

本法は,微弱な顕微鏡の小型虫体の運動性記録法として有用であると思われる。

寄生虫の運動性記録法としては,従来から1)肉眼的観察法,2)力学的記録法,3)光学的記録法,4)超音波記録法等が工夫されているが,体構造の微弱な虫体に適用するには種々の問題がある。すなわち,1)は特別の装置がいらぬが,データの客観性に乏しく(Tomosky *et al.* 1974;佐野ら,1981 a, b),2)は記録は容易であるが,観察虫体が拘束され,かつ力学的負荷が加わり(Fetterer *et al.*, 1977, 1978; de Moura and Rozental, 1983;佐野ら,1981 a, b),3)は入力部に光ファイバー(直径約0.5mm)を用いるため適用虫種に制限があり(Hillman and Senft, 1973; Senft and Hillman, 1973),4)はノイズレベルが高く虫体の微小運動記録に不適(Brown *et al.*, 1978)等である。

著者らは肝吸虫の終宿主体内での脱囊と体内移行現象を行動生理学的に究明する課程で, *in vitro*における脱囊幼虫の運動性記録法を考案した。この方法は他の微弱な顕微鏡の小型虫体にも適用可能と思われるので,その記録法の概要を報告する。

材料と方法

肝吸虫の被囊幼虫は岡山県産モツゴまたはタモロコから分離した。供試幼虫は実験直前に被囊幼虫をtrypsin処理($4 \times 10^{-4}\%$ trypsin Tyrode氏液, 37°C)で脱囊させたもの,あるいはtrypsin処理により被囊を薄くした後,毛髪針を用いて脱囊させたもので,いずれも顕微鏡下で虫体に損傷がないことを確認した後,1個体宛をTyrode氏液を満たした小型シャーレに入れ, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ で約1時間虫体の運動を連続記録した。Trypsinはシグマ社Type IIIを

用いた。

装置の概要

虫体運動定量化の基本原理は,渡辺ら(1984)の方法と同じである。すなわち,虫体撮像画面を多数の画素に分解し,時刻 t と $t + \alpha$ 秒後における各画素の明暗変化を求め,一定レベル以上変化した画素数を運動性の指標とする方法である。装置はFig. 1に示した。これは暗視野顕微鏡(DM),ビデオカメラ(VC)およびデータ処理回路から成る。DMは,虫体像を明るいコントラストのある映像とするために用いた。データ処理回路は画像入力部,各種クロック発振部,処理部,出力部で構成されている。クロック発振部では,発振器(0)の信号をもとに,同期信号発生器(SG)で水平同期信号(HSYNC)と垂直同期信号(VSYNC)が,画像取り込み信号発生器(SCG)で1.5MHzの信号がそれぞれ形成された。画像入力部ではビデオ信号が増幅器(A)に送られ,A-D変換器で3ビット(6階調)に変換された。画像取り込み頻度は16回/60Hz,画面分解能は垂直117,水平64ドットで,1画素の面積は $165 \mu\text{m}^2$ であった。デジタル化された映像信号は同時に画像記録部(M)から読み出された1画面前の同一画素信号と共に数値差計算器(DC)に送られ,両信号の差が取られ,次のパルス発生器(PG)で2階調以上の数値差がある時,1画素分の虫体の動きとして1個のパルスが出力された。パルス計算器(PC)で運動部位の画素数が計数され,次のD-A変換器でアナログ量に変えられ,128/60秒間隔(8画面分の合計)でレコーダー(R)に記録された。データ処理回路には汎用ICを使用した。

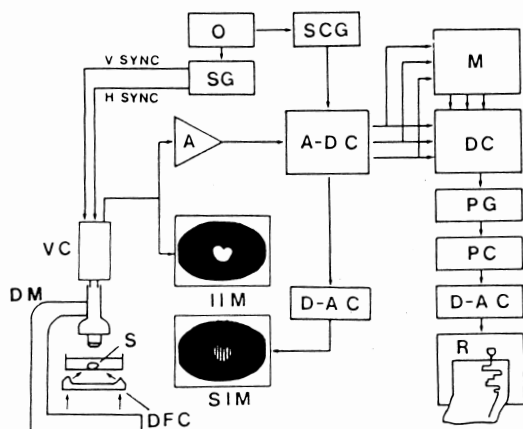


Fig. 1 A schematic diagram of the system for recording *in vitro* motility of *C. sinensis* larvae. A : Amplifier, A-D C : A-D converter, D-A C : D-A converter, DC : Difference calculator, DFC : Dark-field condenser, DM : Dark-field microscope, IIM : Input image monitor, M : Memory (RAM 8Kbit \times 3), O : Oscillator, PC : Pulse counter, PG : Pulse generator, R : Recorder, S : Specimen, SCG : Sampling clock generator, SIM : Sampling image monitor, SG : Sync generator, VC : Video camera.

データの処理

得られた数値は画素数であり物理量としては面積に相当するが、記録は静止時虫体の占有面積に対する運動面積の割合で表示し、これを虫体運動指数 (WMI) と仮称した。静止虫体の占有面積は10% ethanol 麻酔 (Kaplan, 1969) した顕微鏡下の10個虫体の写真撮影像から平均実測値 ($15,900 \mu\text{m}^2$) を求めた。従って、例えば8画面で1000画素分の運動を示す虫体の1秒当たりの運動指数 (MWI/sec) は、 $1000 \times 165 \div 15,900 \div (128/60) \approx 4.9$ となり、静止虫体の約4.9倍の面積分を1秒間に運動したことになる。

結果

肝吸虫脱囊幼虫の運動性は時間的にも個体によっても若干差異を示したが、典型的な運動例は Fig 2 に要約した。A は連続低活動型で、虫体は体の一部を絶えず屈曲・伸縮させるが体全体に及ぶ大きな運動を示さない。この型の虫体運動指数は約0.5以下の小刻み変動で、稀に1.0以上が記録された。B は連続高活動型で虫体は大きな屈曲・伸縮を繰り返し、ときどき移動運動を行う。運動指数は最高値1.5~5.0、変動幅1.0~2.0といずれも大きく、最低値は約0.5を保つことが多かった。C および D はほとんどの個体で観察された間欠低活動型および間欠突発高活動型である。このうち、C では短時間の運動

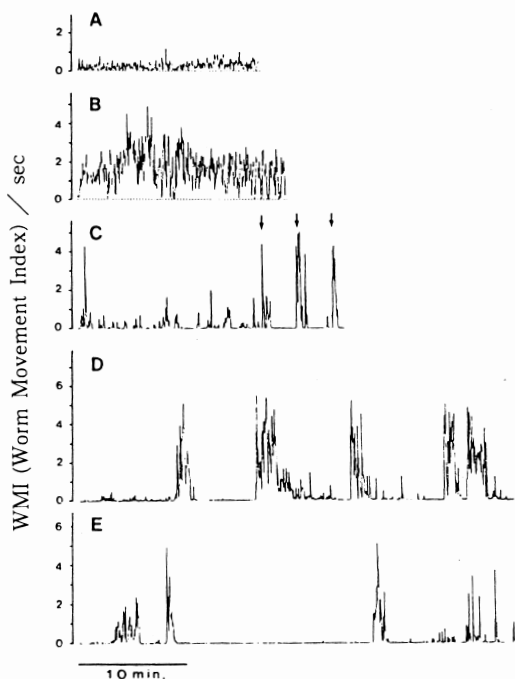


Fig. 2 Records of movement patterns observed in *C. sinensis* larvae. A : Continuous low activity type, B : Continuous high activity type, C : Intermittent low activity type (Arrows indicate the transfer phase to intermittent sudden high activity type), D : Intermittent sudden high activity type, E : Self sucking non-active type.

と休止 (各30秒~2分間) が交互に起こり、運動指数は最大値が0.5~2.0と比較的低かった。この活動型は後述Dの活動型と頻回に交錯した (Fig. 2C, 矢印)。Dは休止期から高活動期への移行が急激に起こり (周期は15~20分、高活動期間は1~2分)、運動指数は1.0~5.0を示した。高活動期から休止期への移行は比較的緩慢であった。Eは稀に見られる自己吸着非活動型で、虫体は吸盤で自身の体表に吸着し、十数分間ほとんど動かない例である (Fig. 2E)。

考察

前述したように *in vitro* での寄生虫の運動性記録法は従来から種々工夫されているが、微弱な小型寄生虫の運動性の記録は困難であった。今回著者らは肝吸虫脱囊幼虫の *in vitro* の運動性を暗視野顕微鏡と画像処理装置を使用して記録することができた。

この方法では記録値が面積量を表わすので、画面拡大率に影響されずデータの相互比較が可能である。垂直方向の動きは原理的には記録できないが、虫体が垂直方向に動くときには、虫体像のコントラスト低下による明暗

変化が生じ、垂直方向の運動もある程度検出できた。虫体が稀に画面の枠外に出る時は、メカニカルステージを操作して虫体像を視野の中心に戻したが、この時の人為記録は容易に識別できた。

過去における小型寄生虫の運動性については、主として駆虫薬の作用面から Tomosky *et al.* (1974), Hillman and Senft (1973), Senft and Hillman (1973), Fetterer *et al.* (1977, 1978), de Moura and Rozental (1983) および Brown *et al.* (1978) が Manson 住血吸虫について肉眼的観察法、光学的記録法、力学的記録法や超音波記録法で、佐野ら (1981a, b) が、各種線虫類、裂頭条虫擬充尾虫、日本住血吸虫、横川吸虫、肺吸虫などについて肉眼的観察法と力学的記録法で、それぞれ記録している。

肉眼的観察法は肝吸虫脱囊幼虫のような微弱小型虫体にも適用できるが、佐野ら (1981a) が述べているように感度やデータの客観性の面で力学的記録法に劣った。また、力学的方法では虫体に負荷が加わり、それによる虫体損傷によって長時間の記録が困難で (佐野ら, 1981a, b), 小さい負荷条件にすると長時間の安定した記録が得難い (Fetterer *et al.*, 1977) などの難点がある。さらに、虫体が小型になるほど固定操作が煩雑と思われる。光学的記録法は、虫体固定操作が不要で力学的負荷も加わらず微弱な虫体に適用できるが、Hillman and Senft (1973), Senft and Hillman (1973) らの光ファイバー法は感度が力学的方法よりも劣り (Fetterer *et al.* 1977), ファイバーの直径 (510 μm) よりも小型の虫体には適用できない。また、超音波記録法はノイズレベルが高く微少な運動の記録に不適と思われる。

著者らの記録法は、入力部に顕微鏡とビデオカメラを使用したので、画面分解能が高く精度面でも著しく改善され、顕微鏡下で観察可能な虫体であれば虫種を問わず適用可能と思われる。また、顕微鏡の視野よりも大きな虫体の場合はビデオカメラによる直接撮影も可能と思われる。この装置では、画像データはハードウェアのみによる高速実時間処理ができ、また、データ処理回路に汎用 IC を使うので制作費用も安価である等の利点がある。

肝吸虫脱囊幼虫の運動性には個体差があり、同一個体でも時間経過によって活動型が変化したが、典型的な活動型は前述の 5 型であった。これらの記録には供試虫体の脱囊操作による差異は見られなかった。

稿を終るに当たり、計測機器類を貸与下さった川崎医科大学の薬理学教室齊藤泰一教授、同生理学教室山根正信講師に感謝致します。

また、種々御助言を頂いた同教材教具センター中田隆男室長、同生理学教室成田和彦助手に謝意を表します。

本論文の要旨は第40回日本寄生虫学会西日本支部大会

において発表した。

文 献

- 1) Brown, M. C., Norman, D. F., Bell, D. R. and Chavasse, C. J. (1978) : A multichannel ultrasonic activity monitor for *in-vitro* screening of antischistosomal drugs. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 16, 408-418.
- 2) de Moura, R. S. and Rozental, R. (1983) : *Schistosoma mansoni* : New method for recording motor activity *in vitro*. *Exp. Parasitol.*, 56, 314-317.
- 3) Fetterer, R. H., Pax, R. A. and Bennett, J. L. (1977) : *Schistosoma mansoni* : Direct method for simultaneous recording of electrical and motor activity. *Exp. Parasitol.*, 43, 286-294.
- 4) Fetterer, R. H., Pax, R. A., Strand, S. and Bennett, J. L. (1978) : *Schistosoma mansoni* : Physical and chemical factors affecting the mechanical properties of the adult male musculature. *Exp. Parasitol.*, 46, 59-71.
- 5) Hillman, G. R. and Senft, A. W. (1973) : Schistosome motility measurements : Response to drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 185, 177-184.
- 6) Kaplan, H. M. (1969) : Anesthesia in invertebrates. *Fed. Proc.*, 28, 1557-1569.
- 7) 佐野基人・寺田 護・石井 明・記野秀人・林道明 (1981a) : 寄生虫症の化学療法に関する研究 I. *In vitro* 実験法の検討ならびに広東住血線虫に対する Avermectin B_{1a} の弛緩性麻痺作用について. *寄生虫誌*, 30, 305-314.
- 8) 佐野基人・寺田 護・石井 明・記野秀人・藤生好則 (1981b) : 寄生虫症の化学療法に関する研究 (II) 各種寄生蠕虫および宿主臓器の自動運動に及ぼす Avermectin B_{1a} の影響. *寄生虫誌*, 30, 447-456.
- 9) Senft, A. W. and Hillman, G. R. (1973) : Effect of hycanthone, niridazole, and antimony tartrate on schistosome motility. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 22, 734-742.
- 10) Tomosky, T. K., Bennett, J. L. and Bueding, E. (1974) : Tryptaminergic and dopaminergic responses of *Schistosoma mansoni*. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 190, 260-271.
- 11) 渡辺富夫, 石井威望, 小林 登 (1984) : コミュニケーションにおけるエントレインメント (音声一体動同期現象) のコンピュータ自動分析法 - 母子 (新生児) をモデルとして - . *医用電子と生体工学*, 22, 19-25.

Abstract

A METHOD FOR RECORDING *IN VITRO* MOTILITY OF THE EXCYSTED METACERCARIAE OF *CLONORCHIS SINENSIS* BY IMAGE DIGITAL PROCESSING

FUMIO OHYAMA AND RYO HATSUSHIKA

(Department of Parasitology, Kawasaki Medical School, Kurashiki City 701-01, Japan)

An image digital processing method for the real-time and quantitative recording *in vitro* motility of excysted metacercariae of *Clonorchis sinensis* is developed. The system consists of three main components; dark-field microscope, video camera and inexpensive self made image processing circuits.

Five types of distinctive patterns were recorded on the free moving larvae. These were continuous low activity type, continuous high activity type, intermittent low activity type, intermittent sudden high activity type, and self sucking non-active type. Two intermittent types occurred most frequently, and the self sucking type rarely occurred with relatively long period of unmovement. The present method can especially be applied to the study for recording *in vitro* motility of microscopic small size parasites.