

短 報

旋毛虫新生幼虫の調製法

高田伸弘 多田 高

(昭和63年2月5日受領)

Key words: *Trichinella spiralis*, *in vitro* larviposition, newborn larva, preparation

旋毛虫 *Trichinella spiralis* の成熟幼虫は、経口的に取り込まれた数日後に小腸粘膜で成虫まで発育し体長100 μ m 程度の微小な新生幼虫 newborn larva (以下NBL) を産出し始める。これが循環系を経て全身に移行する故に、NBLこそが旋毛虫感染の主たる症状発現を導く引き金役といえる。そこで我々は、NBLを *in vitro* 実験の対象として設定し、その形態形成や発育期別の抗原性の変化など検討しつつあり、順次報告の予定である。ところが、この種の研究は近年の欧米で多くみられるとはいえ (Campbell, 1983), NBLの取扱い手技についてはこれから研究者の間でも評価の確立したものがあるとはいえず、もちろんわが国では著者ら (1987) が産仔能観察の方法を簡単に述べた以外は報告をみない。したがって、手はじめに大量のNBLをより純粋に能率よく調製する方法の検討が必要であった。

日本産岩崎株の成熟幼虫を適宜経口投与 (10~30/頭) した雄ddYマウスにつき前日より断食させた6日目に小腸全長を摘出し、当初は、これを縦開して Despommier (1973) 考案の thermal migration apparatus により成虫の遊出を図った。しかし本装置は、円筒ガラス器内の生理食塩水を下から電球で加温するもので温度条件に客観性がなく、広い平底に沈下した成虫の回収も手間がかかるものであった。さらに、6 mm 金属メッシュを抜ける腸内容物も多く、これら虫体にまとり付き夾雑物除去のために試みた細メッシュの併用や蔗糖ないしは percoll 密度勾配遠心法も奏功しなかった。当然、得られた虫体の維持培養には通常量に数倍する抗菌剤添加を要した。そこで、生理食塩水を満たしたガラス製沈殿コップ (径15cm) の口に Marti *et al.* (1987) によるチーズクロス1枚を張って浸し (底部に環を置き平坦にする)、下部を37℃恒温水槽内に設置した一種の Baermann 装置を考案した (Fig. 1)。すなわち、縦開した小腸をこの布地の上に1.5~2時間置くと、布地は親水性なので夾雑物やコロイド物質を吸着する一方で運動性の成虫は貫通できると思われ、虫体が下部水中を対流しつつ尖底部に

集った。布地 (森永乳業株式会社提供) は、織目の類似した市販のブロード布で代用可能で数回は反復使用できた。成虫の回収率は、前記の thermal migration apparatus と著差はなく30~50%で必ずしも投与幼虫数に比例はしなかったが、優れた点は極めて清浄な成虫を容易に集め得ることであった。これら成虫は、滅菌生食水で3回遠心洗浄し (100xg, 5 min.), 少量の後述する組成の培養液に移して37℃, 5%炭酸ガス培養器にて産仔を待った。虫体が清浄な故に Penicillin (100-200 U/ml), Streptomycin (100-200 μ g/ml) および Fungizone (0.3 μ g/ml) の添加量で1週を越える維持培養が可能となった。産出されたNBLと成虫の混液は10ml 遠沈管の滅菌生食水に投入、10~15分間静置して沈下の遅いNBLの大半が浮遊状態にある上清を分取するという方

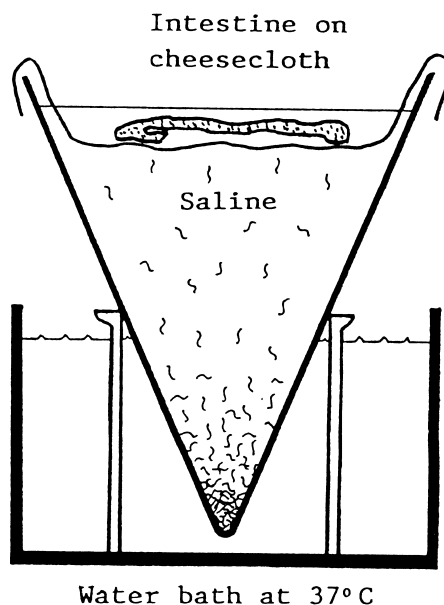


Fig. 1. Apparatus for collection of *T. spiralis* adult worms

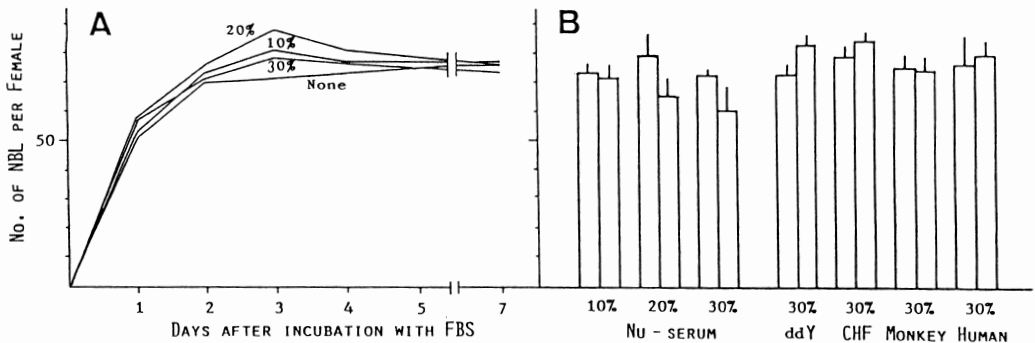


Fig. 2. Larviposition of adult females of Iwasaki strain *T. spiralis* in each medium 199 with various kinds and concentrations of serum. A: Daily changes in mean numbers (n=30) of NBL. Percentages indicating concentrations of FBS supplemented. B: Mean numbers (n=30) with S.E. of live NBL on days 2 (left) and 7 (right) postincubation. Adult females from ddY mice on day 6 postinfection. Nu-serum: artificial fetal bovine serum; CHF: Chinese hamster Fukui colony.

法 (Jungery *et al.*, 1983) を 3 回反復, これをまとめて遠沈 (200xg, 5 min.) して清浄な NBL を分離収集できた。別に試みたコーヒーフィルター濾過では, 収量が約 50% に低下した。

上記の培養液は Dennis *et al.* (1970) に準じて Medium 199 (Difco) とし, 10~30% 濃度に各種血清 (ウシ胎児, 人工ウシ胎児, ddY マウス, チャイニーズハムスター, サルおよびヒト血清) を添加したものの中で雌 1 個体当りの NBL 産出数を調べた。FBS 添加の 7 日連続培養では 1 日目ですでに 7 日目の算定数の 6 割を越えたが (Fig. 2-A), FBS 無添加の対照と大きな差はなく, その他の血清でも全般に 2 日目で 7 日目と余り遜色ない産出数が示された (Fig. 2-B)。しかし, 人工ウシ血清 Nu-serum (コスモバイオケミカル) では 2 日目からすでに死滅 NBL が増加するほか, FBS 無添加では産出後の成長が充分でないことが知られたので (別報で詳述), 生存率の高い NBL を調製するにはロットの安定した動物血清として FBS または CS を当初より 10~20% 添加しておくのが適当と思われた。そして, NBL の成長は 2 日目までは緩徐なことも分ったので, この間に収集すればほぼ同じ発育期の虫体を調製し得るものと思われた。なお, 今回の程度の培養条件では, 旋毛虫の株ごとの雌個体とその時点で包蔵する uterolarva の数, 例えば ddY マウス感染で 6 日後回収の岩崎株で約 80, 同様にタイ国株

で約 140, またポーランド株で約 110, さらに類縁種 *T. pseudospiralis* では 30 弱を, それぞれ産出させるに過ぎないと思われたが, ここでは, 必要とされる各株の NBL 数を調製する場合の目安として付記する。

文 献

- 1) Campbell, W. C. (1983): *Trichinella* and Trichinosis, Plenum Press, New York and London, 581pp.
- 2) Dennis, D. T., Despommier, D. D. and Davis N. (1970): Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *J. Parasitol.*, 56, 974-977.
- 3) Despommier, D. D. (1973): A circular thermal migration device for the rapid collection of large number of intestinal helminths. *J. Parasitol.*, 59, 933-935.
- 4) Jungery, M., Clark, N. W. T. and Parkhouse, R. M. (1983): A major change in surface antigens during the maturation of newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 7, 101-109.
- 5) Marti, H. P., Murrell, K. D. and Gamble, H. R. (1987): *Trichinella spiralis*: Immunization of pigs with newborn larval antigens. *Exp. Parasitol.*, 63, 68-73.
- 6) 高田伸弘・多田 高 (1987): 旋毛虫感染に対するチャイニーズハムスターの自然抵抗性 II. 排虫時期と関連した成虫の腸管内分布と産仔能. *寄生虫誌*, 36, 322-327.

Abstract

COLLECTION OF NEWBORN LARVAE OF *TRICHINELLA SPIRALIS* IN VITRO

NOBUHIRO TAKADA AND TAKASHI TADA

(Department of Immunology and Parasitology, Fukui Medical School, Fukui 910-11, Japan)

This study was designed to seek an improved technique for obtaining newborn larvae (NBL) of *Trichinella spiralis* in vitro.

Small intestines of mice were slit lengthwise 6 days after oral infection of 10–30 muscle larvae of *Trichinella spiralis* per gram body weight. They were placed on a single layer of cheesecloth dipped in a sedimentation cup filled with clean physiological saline. The tapering part of cup was kept at 37°C in a water bath. After 1.5–2 hr's incubation, adult worms were collected from the bottom cone and washed three times in sterilized physiological saline containing penicillin (100–200 U/ml), streptomycin (100–200 µg/ml) and fungizone (0.3 µg/ml) by centrifugation at 100 × g for 5 minutes. For *in vitro* larviposition, they were incubated in medium 199 with various kinds and concentrations of sera and the anti-bacterial mixture for consecutive 7 days at 37°C in an incubator with 5% CO₂ gas phase. This culture medium contained both adult worms and NBL deposited. It was then settled for 10–15 minutes in 10 ml sterilized physiological saline. The supernatants containing NBL alone was removed and the same procedure was performed three times using the remained sediments. NBL were consequently collected by centrifugation of the whole supernatants obtained at 200 × g for 5 minutes.

Although larviposition took place successfully in medium 199 with or without sera, it was indicated that live NBL at almost the same developmental stage were obtained within 2 days after incubating adult worms in medium 199 with 10–20% FBS.