

Research Note

A Method to Determine the Number and Arrangement of Flame Cells in Cercariae

MASAKAZU HARADA AND SETSUO SUGURI

(Accepted for publication; July 14, 1989)

Key words: flame cell, cercaria, cystogenous gland

The flame cell formula is important for identifying and classifying trematode cercariae. However, the formula is difficult to determine in species which have a lot of secretory substances in the body (Cable, 1963; Ogata, 1943). The main causes of difficulty are that flame cells are only visible when living cercariae are immobilized by pressure from a cover glass and that numerous granules in secretory cells such as those of cystogenous glands obstruct the observation of fine excretory tubules. Moreover it is impossible to re-examine the position of the flame cells after the cercaria dies. Watanabe (1983) has reported a method for finding the distribution and number of flame cells using serial paraffin sections under a light microscope (LM). It is well known, however, that tissue structure is retained better by fixation for electron microscope (EM) than for LM. Therefore we will describe an improved method using EM techniques.

In *Cercaria shikokuensis* obtained from snails, *Cerithidea rhizophorarum* (Harada, 1989), it is difficult to observe the exact number of flame cells because the cercaria body contains many cystogenous materials and other kinds of secretory granules. We used this type of cercariae in the present study.

The cercariae were fixed in Karnovsky's fixative (Karnovsky, 1965). After several washings with 0.1M cacodylate buffer solution

(pH 7.2), they were postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol series and embedded in epoxy resin (Spurr, 1969). The whole body of cercariae was successively sectioned longitudinally, into 1.4 or 1.5 μm strips with an ultramicrotome (Reichert, Ultracut) and two or three successive sections were picked up by a wire loop and transferred to a drop of water on a glass slide. The glass slide was then warmed on a hot plate to evaporate water and leave the sections attached to it. These specimens were stained with 0.5% toluidine blue solution (pH 7.0—7.2) for 6 min at 58—60°C, washed in tap water for 2 min, and dried. A cover glass was mounted on the sections and fixed on a slide glass with a small amount of transparent nail coating at the four corners. After a drop of xylene was immersed between the slide and cover glass, the sections were observed under an LM. After xylene evaporates, the dried slides can be preserved for a long time without color change.

Flame cells appeared as peculiar triangular shapes in typical longitudinal sections (Fig. 1, arrow head) and were identified as circles with densely stained cores (cilia bundles) in typical cross sections (Fig. 2, arrow head). In oblique sections, they were also recognizable as variations of the two types mentioned above. As the flame cell is about 10 μm long and 5—6 μm wide in this species, one flame cell can be observed in at least three sections even if longitudinally cut. All sections were photographed under an LM, and each flame cell's position was marked on the photographs. The outline of the cercaria and the positions of flame cells on each photograph were

Division of Medical Zoology, Department of Pathology,
Kagawa Medical School, 1750-1, Ikenobe, Miki-cho,
Kita-gun, Kagawa 761-07, Japan

原田正和 村主節雄 (香川医科大学病理学講座医
動物学)

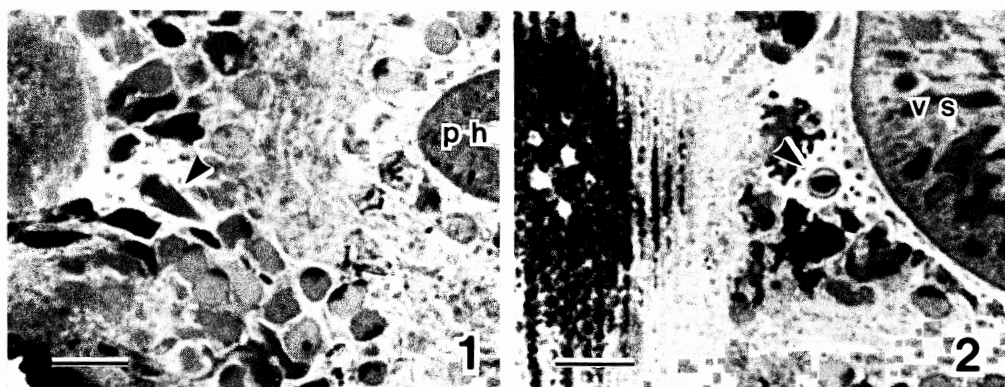


Fig. 1. Photograph showing a longitudinally-sectioned flame cell (arrow head). bar = 10 μ m. ph: pharynx.

Fig. 2. Photograph showing a cross-sectioned flame cell (arrow head). Bar = 10 μ m. vs: ventral sucker.

transcribed on a transparent sheet. The sheets were then three-dimensionally reconstructed and the number and distribution of flame cells were examined. We determined the number of flame cells for this species to be 36. The same results were obtained by a three-dimensional image analyzing system (Cosmozone-2S).

The major advantage of this method is that those who are acquainted with EM techniques can easily determine the distribution and the number of flame cells. However, since this method does not reveal the flame cell pattern (connection of excretory tubes) necessary for the description and identification of cercariae, an easier and more accurate method for determining the flame cell pattern must be devised.

References

- 1) Cable, R. M. (1963): Marine cercariae from Curaçao and Jamaica. *Z. Parasitkd.*, 23, 429—469.
- 2) Harada, M. (1989): A new cercaria, *Cercaria shikokuensis* n. sp. (Trematoda), from littoral gastropods in Kagawa Prefecture, Shikoku, Japan. *Jpn. J. Parasit.* (in press)
- 3) Karnovsky, M. J. (1965): A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 27, 137A.
- 4) Ogata, T. (1943): Studies on Japanese cercariae 1. A new echinostome cercaria from brackish water snail, *Cercaria granifera* n. sp. *Zool. Mag.*, 55(8), 265—284 (in Japanese).
- 5) Spurr, A. P. (1969): A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastructure Res.*, 26, 31—43.
- 6) Watanabe, T. (1983): Observation on the excretory system of *Echinostoma hortense*. *Jpn. J. Parasit.*, 32(2), Suppl., 85 (in Japanese).

投稿規定

1. 著者は原則として会員に限る。
2. 原稿は寄生虫学およびそれと関連を有する和文および欧文の原著、総説、短報とする。
3. 原稿の採否、掲載の順序、体裁などの決定は、一定の審査を経て編集委員会が行う。
4. 原稿は1編につき投稿料2,000円とする。
 - 1) 原著および総説は印刷ページ4ページまで本会で負担する。ただし図版および超過ページ分は著者負担とする。
 - 2) 学会よりの依頼原稿の掲載料および印刷費用は無料とする。
 - 3) 短報はOriginalな研究工夫、仮説などの速報的なものとする。印刷ページ2ページ以内とし、1ページまでを著者負担とする。
 - 4) 同一号に同一著者が2編以上を掲載する場合は1編を除いて他は超過ページとみなす。
5. 別冊を必要とする場合は実費を申し受ける。申し込みは50部単位とする。
6. 印刷費等全額著者負担の原稿は掲載順序を優先する。
7. 原稿についての照会、送付は〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1、筑波大学基礎医学系 日本寄生虫学会編集幹事あてとする。

投稿上の注意

1. 和文原稿は400字詰原稿用紙(A4版)に横書きし、現代仮名づかいによる平仮名および当用漢字を用いることを原則とする。

欧文原稿は、タイプ用紙にダブルスペースでタイプする。

なお、原稿は正副3部作製して編集部へ送付する。副は写真を除いてはコピーでよい。
2. 和文原稿は次の順序で記載する：題名、著者名、所属機関名、本文、文献および欧文抄録。なお欧文抄録も題名、著者名、所属機関名および抄録(印刷ページ1ページ以内)の順に記載する。

短報も上記に準じる。
3. 欧文原稿の構成は和文原稿のそれに準じ、これに和文抄録をつける。その形式も2.に準じ和文で記載する。
4. 原稿作成上の注意事項
 - 1) 本文の形式は、要約、緒言、材料および方法、成績、考察の順序またはそれに準じた形式をとることが望ましい。このほか、6語以内のKey words(英語)を表紙に付記する。
 - 2) 学名の属・種小名はイタリックとして印刷されるため、当該部位にはアンダーラインをつける。

例：*Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758
 - 3) 各種単位の略号は次のように表わし、ピリオドを用いない：centimeter-cm, micrometer- μ m, nanometer-nm, kilogram-kg, gram-g, milligram-mg, microgram- μ g, nanogram-ng, liter-l, milliliter-ml, hour-hr, minute-min, degree Celsius- $^{\circ}$ C, molar-M, normal-N, millicurie-mCi, microcurie- μ Ci, gravity-

\times g, revolutions per minute-rpm, per cent-%, standard deviation-SD, standard error-SE, optical density-OD, 50% lethal dose-LD₅₀, また、寄生虫感染後の日数・週を示す場合は at 60 days PI, by 18 wk PI のように表記する。

4) 本文中の人名は次のように記載し、必ず年号を括弧内に入れる。

1人の場合；山田(1964), Thomas(1964), Faust(1961 a, b),

2人の場合；山田・竹内(1965), Faust and Khaw(1927),

3人以上の場合；山田ら(1965), Faust et al.(1927 a, b),

()内に入れる場合；(佐藤, 1970; Boray et al., 1976; 齊藤ら, 1973),

5) 数を表わすにはすべて算用数字を用いるが成語はそのままとする。例；一般, 同一。

6) 図, 写真, 表等は本文とは別にまとめる。それらと番号は, 図1, 表1(英文では Fig. 1, Table 1 など)とし, 本文中に挿入箇所を明記する。図表の脚注の順序を示す記号は次の順に用いる：*, †, ‡, §, ||, #, ¶, **, ††, ‡‡, §§ ……。

7) 表には縦線は原則として入れない。

8) 引用文献は著者名のアルファベット順に配列し, 下記の順序に記載する(特に句読点に注意する)。

和文の場合

原著文献；宮崎一郎・石井洋一・菊池 正(1954)：大平肺吸虫の新しい終宿主。寄生虫誌, 2, 177-179。

単行本；宮川米次(1957)：最新臨床寄生虫病学。蠕虫性疾患II。第1版, 300頁, 中外医薬社, 東京。

欧文の場合

原著文献；Weinbach, E. C. and Nolan, M. O. (1956)：The effect of pentachlorophenol on the metabolism of the snail *Australorbis glabratus*. Exp. Parasitol., 5, 276-284。

単行本；Faust, E. C. (1949)：Human Helminthology, 3rd ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 744 pp.

Yokogawa, M. (1969)：Paragonimus and Paragonimiasis. In Advances in Parasitology, Vol. 7, Dawes B., ed., Academic Press, London and New York, 375-387。

9) 原著の表紙にKey words, 論文の枚数, 図, 表, 写真の枚数, アート紙使用希望, 別刷希望部数(表紙の有無)および連絡先(住所, 電話番号)を朱書する。

10) 文部省科学研究費等の研究費の出所を明記する場合には, 原稿第1ページの脚注に記載する。

11) 謝辞またはこれに準ずるものは本文末尾に記載する。

12) 校正は初校ならびに再校を著者が行うが, 文章の削除, 挿入等は許されない。

平成元年4月改正