

## フィラリア仔虫の脱鞘現象について(I)

青 木 克 己

長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学部 (主任 : 片峰大助教授)

(Received for Publication August 13, 1971)

## Exsheathing Phenomenon of Microfilaria in vitro (I)

Yoshiki AOKI

Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University

(Director : Prof. Daisuke KATAMINE)

## Abstract

Previous investigators have discussed the relationship between microfilarial periodicity and presence of microfilaria sheath. The author in making microscopic observations during the study of this relationship observed an interesting phenomenon : the kinds of ensheathed microfilaria such as *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *B. pahangi* actively cast off their sheath in vitro, if some certain environmental conditions were given.

Microfilariae were observed to swarm together in boundary area between the blood cell sediment and the blood plasma in a test tube. The microfilariae were taken out by a pipette, put on the agar plate and the behavior was observed at room temperature of about 20°C.

Under a phase contrast microscope, the intact microfilariae were clearly found to have a delicate sheath membrane fitting over the cuticle. After a certain time, the microfilariae began to take a peculiar pendular movement going back and forth inside the sheath. Under the repeated strong attacks of the larva, the top of the sheath was torn and microfilaria body escaped slowly through the resulting opening. The naked microfilaria moved around lively in snake like movement dragging the sheath. Some of them moved more vigorously on the agar plate and naturally migrated into the agar in violent spiral movement if the concentration of agar was 0.5 per cent. The author has counted the number of the naked microfilariae every two hours. In bancroftian micro-

filaria, 41.3 per cent of them already casted off their sheath in the first two hours, 65.9 per cent at 4 hours and 80.4 per cent within 8 hours respectively after placed on the agar plate. In pahangi microfilaria, incidence of the naked larva reached to 83.8 per cent within two hours.

The author found that this exsheathing phenomenon also occurred on the thick blood smears which were prevented from drying.

The blood smears containing microfilariae were kept in a moist chamber without delay after taking them from patients or animals, and they were taken out of there at two hour intervals to dry and to stain. The smears of *W. bancrofti* microfilariae were stained with silver deposition technique and again with hematoxyline. The sheath was distinguishably visible as a silver blue stained membrane. The sheath of *B. malayi* and *B. pahangi* microfilaria could be stained better with Giemsa solution. It was observed that the exsheathing occurred progressively during incubation according to increase of the period.

In the specimens of bancroftian microfilaria, naked larvae appeared in 50.9% of the population at 4th hour, in 75.6% at 10th hour and finally in 93.7% at 20th hour showing that microfilariae cast off their sheath actively on the thick blood drops placed on the slide glass.

In malayan microfilaria, similar process was also found, the rate reaching to 80.2% within 20 hours.

On the other hand, in pahangi microfilaria, the rate was less than 10% even in the specimens which were incubated for 16 hours or more.

## 結 言

末梢血中に出現するフィラリア仔虫には *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *B. pahangi* のように被鞘を有すものと, *Dipetalonema*, *Mansonella*, *Diriofilaria* のように被鞘を有しないものがある。被鞘の有無が又所謂仔虫の周期性の発現と何かの関係があることが論ぜられている。

一般に仔虫の被鞘は中間宿主の蚊に摂取されてから数時間以内に蚊の消化管内で脱鞘して胃壁を貫通、胸筋内に侵入して发育をはじめる。このように有鞘仔虫の脱鞘は仔虫の发育の一つの過程として蚊体内でおこるものとされている。

普通血液の染色標本の上で脱鞘した仔虫を認めることは *W. bancrofti* の場合はほとんどないが、1958年 Edeson 等はマレー半島の *B. malayi* の流行地で採血した厚層標本でしばしば被鞘のない仔虫と、空鞘をみとめ、その出現は採血後直ちに乾燥した標本上では少く、湿度の高い環境ではその出現率が高いことを認め、報告している。Wilson 等(1958) は空鞘の出現率

は仔虫の種類により異り、periodic *B. malayi* では sub-periodic のそれに比べてはるかに高く、これは periodic form の一つの特長と思われると述べている。事実著者等も沖繩の流行地でわずかではあるが時に脱鞘した *W. bancrofti* 仔虫を染色標本の上で発見する経験をもっている。他方仔虫の生体外での寿命をみた文献(竹下1962, Taylor 1960)の中でも特殊な飼育液の中で仔虫が被鞘を脱し、或は肝、肺臓などの組織片のなかに侵入する事実があることが述べられている。

以上のように仔虫はある特殊な条件のもとでは、蚊体内と同様脱鞘を起しうることが考えられるが、これを実証し、顕微鏡下で脱鞘の経過や運動を記録したものはない。又脱鞘をひきおこす要因や、脱鞘現象のもつ生物学的意義などについても全く不明と言わねばならない。

著者は有鞘仔虫の生体外で色々の条件のもとでの動態をくわしく観察し、一定の条件のもとでは容易に脱鞘をおこす事実を確認したのでその知見を報告する。

## 実験材料と方法

観察に用いた糸状虫仔虫は沖縄や長崎県の流行地で得られた *W. bancrofti*, 韓国済州島の *B. malayi* 及び実験的に犬に感染させた *B. pahangi* の3種である。

1) すり合せガラス容器の底に脱脂綿を敷き、これに充分水を浸した後、濾紙をその上に敷き、ふたをかぶせて容器内の湿度を一定に保つことの出来る湿室を作製した。スライドグラスに60cmmの患者血液厚層標本を作り、採血後直ちに上記湿室に入れ、2時間から20時間保存、其の間2時間毎に次々と取り出して室温にて乾燥、溶血後染色して被鞘の有無を観察した。染色は *W. bancrofti* では過ヨウ素酸メテナミン銀染色とヘマトキシリン重染色を行い、*B. malayi*, *B. pahangi* には *Giemsa* 染色を行った。同時に湿室に2～3時間保存したものにカバーグラスをかけ、軽く圧

迫しながら、位相差顕微鏡にて仔虫の態度、運動を観察した。尚採血後直ちに室温にて乾燥した標本を対照として観察した。仔虫は総て24時間後に採血したものをを用いた。

2) 生理食塩水に寒天粉末を0.5及至1.0%の割合で溶解して寒天平板を作製し、その上に仔虫を滴下して仔虫の運動や脱鞘の経過を観察した。この場合仔虫を血液から分離する方法としては、先ずヘパリン加血液を1～2時間放置すると血球成分と血漿の境界にある buffy coat に仔虫が集まるのでこの部をメランジュールにて吸上げ活発な仔虫を分離した。尚仔虫の特有な運動と脱鞘の様子は芝電製ビデオ・テープレコーダーにて記録した。以上の観察はすべて室温約20°Cの下で行われた。

## 実験成績

第一表に示すように患者から採血直後に室温で乾燥した標本では脱鞘仔虫や空鞘はほとんど認められない。上記の湿室中に入れて乾燥を防ぎ、一定時間の後取出して乾燥した標本では時間と共に完全に脱鞘した仔虫やその過程にある脱鞘中の仔虫があらわれて来る。

脱鞘率(脱鞘仔虫数/検査仔虫数)は *W. bancrofti* では湿室に2時間保存したもので10.1% (139隻中14隻), 4時間で50.9% (169隻中86隻), 8時間で76.7% (146隻中112隻), 12時間で82.7% (150隻中124隻)に達し、20時間のものでは全仔虫の実に93.7% (126隻中118隻)が完全に脱鞘を完了するのが確認される。*B. malayi* (Cheju strain)でも同様、脱鞘仔虫があらわれ、その率は時間と共に上昇する。即ち2時間で16.5% (688隻中104隻), 4時間で26.3% (692隻中182隻), 10時間で44.1% (794隻中350隻), 16時間で71.0% (569隻中404隻), 20時間で80.2% (653隻中523隻)に達している。

*B. pahangi* の仔虫では前者に比べて濃滴血液の上では脱鞘をおこす率はるかに低く、それはわずかに6時間で0.8% (372隻中3隻), 8時間のものでは6.8% (441隻中30隻), 16時間で9.7% (298隻中29隻)にすぎない。その後湿室中保存の時間を延ばしてもその数は増加しない。

以上のように *W. bancrofti* 仔虫をはじめ有鞘のフィラリア仔虫は採血後、乾燥を防いだ患者血液の中で高率に被鞘を脱することが確認される。その数は時間と共に増加する。

このような仔虫の脱鞘をおこす経過を顕微鏡下で観察するために、仔虫を含む約10cmmの患者血液濃滴標本を2～3時間湿室中に蓄えた後取り出し、カバーグラスを被って仔虫の運動を追究した。

位相差顕微鏡下の仔虫は被鞘と虫体とは明かに区別され、その間に空隙があつて相対的に自由に移動し得る。虫体内部の構造は染色標本より明瞭で、G細胞、排泄細胞、排泄腔なども観察出来る。カバーグラスをかけた直後からゼリー様の基質の上におかれた仔虫は広い範囲を移動することなく、ほとんど同じ場所のみみずのようになうちまわる運動を示すが、一方血清や血液の中ではみられない特異な運動があらわれる。それは被鞘の中での活発な虫体の前進後退運動である。被鞘の中の虫体は壁にそつて被鞘の末端まで強く後退し、つづいて勢いよく前進して頭部を被鞘の前端に強く打ちつける動作をくりかえす。この場合虫体頭部はその度に強い伸縮運動を行つて被鞘前端を攻撃する動作がみられる。この様な動作を数十回、数百回と反覆しているうちに被鞘の頭端が裂け、内部の虫体が脱出する。脱出孔となる被鞘の裂け目は一般に虫体の巾よりせまいようで、しばしば脱出をはじめた虫体が被鞘をひきずり、移動しながら抜けてゆく姿が見られる。標本が湿室から取出され、カバーグラスでおゝわれた後、早いものでは2分以内に脱鞘がおこる。このような特異な仔虫の行動と脱鞘現象は患者血液のみならず、健康者人血液、家兎血液の濃滴標本の上でも容易に惹起

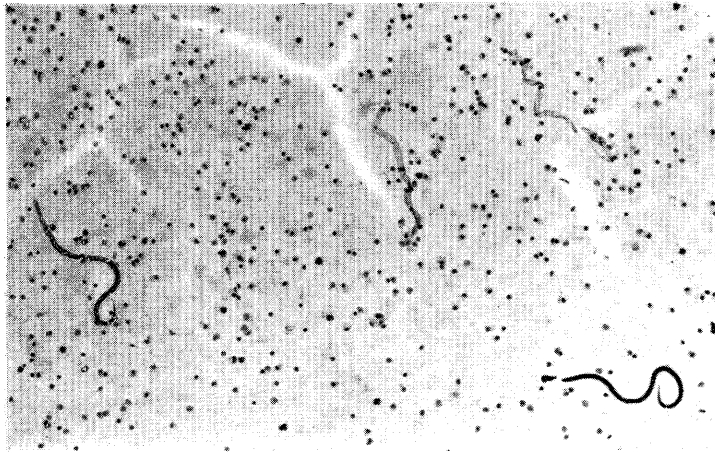


Fig. 1 *W. bancrofti* microfilaria

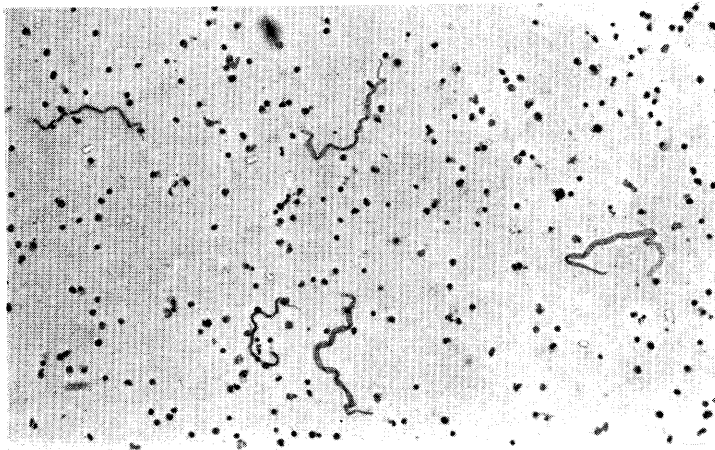


Fig. 2 *B. malayi* microfilaria



Fig. 3 *B. malayi* microfilaria

Fig. 1, 2 Naked microfilaria and empty sheath on thick blood film.  
Fig. 3 Microfilaria going to escape through top of the sheath.

**Table 1** Occurrence of exsheathing of microfilaria on thick blood films.

Incubation hours	W. bancrofti microfilariae			B. malayi microfilariae			B. pahangi microfilariae		
	No. of mf.	Exsheathed mf.	Exsheathing rate	No. of mf.	Exsheathed mf.	Exsheathing rate	No. of mf.	Exsheathed mf.	Exsheathing rate
0	173	1	0.6	592	3	0.5	356	0	0.0
2	139	14	10.1	688	104	16.5	403	0	0.0
4	169	86	50.9	692	182	26.3	321	0	0.0
6	171	80	46.8	876	346	39.5	372	3	0.8
8	146	112	76.7	714	198	27.7	441	30	6.8
10	168	127	75.6	794	350	44.1	404	18	4.5
12	150	124	82.7	721	481	66.6	403	30	7.4
14	188	155	82.5	644	317	47.7	443	17	3.8
16	168	140	83.3	569	404	71.0	298	29	9.7
18	137	127	92.7	732	569	76.3	480	34	7.1
20	126	118	93.7	653	523	80.2	393	33	8.4

される。

完全に被鞘を脱出した虫体は被鞘時には見られないようなきわめて活発な振巾の大きな蛇行運動を行って直線的に前進、標本上をはいまわる。

寒天平板上に滴下された *W. bancrofti* 仔虫はカバーガラスの有無にかかわらず、血液濃滴標本上と同様の脱鞘とそれに先駆する特有の被鞘内での前後運動が

認められるが、滴下の直後から多くの仔虫にこの前後運動がはじまる。その脱鞘運動の過程に於いて時に虫体が被鞘内で反転し、虫体の頭部が被鞘尾部に陥入するものがあらわれるが、このような仔虫では脱鞘するものが少く、時間が経過すると、動かなくなるものが多い。被鞘と寒天板との間には癒着による固定は認められない。被鞘からの脱出は原則として前端近くでお

**Table 2** Frequency of exsheathment of microfilaria on agar plate— *W. bancrofti* microfilaria —

No. of exp.	No. of mf.	No. of exsheathed microfilaria		
		2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.
1	25	8	15	17
2	32	9	22	26
3	7	3	5	6
4	13	4	10	12
5	10	4	4	7
6	14	7	8	12
7	8	7	7	7
8	29	15	20	24
Total	138	57 (41.3)	91 (65.9)	111 (80.4)

— *B. pahangi* microfilaria —

No. of exp.	No. of mf.	No. of exsheathed microfilaria	
		1 hr	2 hrs.
1	98	76	80
2	74	58	63
3	48	45	45
4	32	23	27
5	29	23	23
6	10	8	8
7	13	11	11
8	42	41	42
10	61	45	51
11	45	29	33
12	19	13	13
13	35	23	25
Total	531	419 (78.9)	445 (83.8)

( ) Exsheathing rate

このものと想像される。寒天板上では仔虫が脱鞘をはじめると、被鞘を引きずって移行するものが多い。完全に脱鞘した仔虫は前述の蛇行運動を行って直線的に前進するが、基質の寒天の濃度が 0.5% の場合には移行中にしばしば頭部を立て、侵入の部位をさがすような行動を示しながら進行し、遂に頭端を寒天板中に突入し頭部からおこる強いラセン状運動を示しながら積極的に寒天層内に侵入し、層内を移動する。

各種の仔虫が寒天板上で脱鞘を起す頻度をみると、

## 考

著者は *W. bancrofti*, *B. malayi* 及び *B. pahangi* など有鞘仔虫が、乾燥を防いだ濃滴血液標本や、寒天板の上に置かれると、仔虫は被鞘の中できわめて活発な前進後退運動を行い、積極的に被鞘の先端を破壊して脱鞘を行い、又完全に脱鞘した仔虫は被鞘時には見られない活発な蛇行運動を行って一定方向にむかって前進し、寒天板上では遂には層内に穿入する事実を確認、はじめに記載した。フィラリア仔虫のスライドグラス上の、或は血清中での運動については既にいくつかの観察がある。例えば Hawking (1967) は仔虫がスライドグラス上におかれると仔虫の動きは同じところをぐるぐるまわる運動、所謂 wriggling で一定方向への前進はみられないが、毛細血管内では行動に支点が生じ、血管内を前進することが出来ると述べている。Drinker (1935) もまた、スライドグラス上で観察し、*D. immitis*, *Loa loa* の仔虫が一分間に前者は 0.14~0.19mm、後者では 0.37mm 前進したと記載しているが、いずれも頭部から起る波状運動で脱鞘はおこっていない。

仔虫の構造をみると、被鞘と角皮層との間を結合する組織はなく、被鞘内での仔虫体の移動は容易に行われる状態にあるが、著者が記載した様な前後運動は認められないのが普通である。

Yoeli (1957), McQuay (1966) も記載しているが、著者等の経験によってもスライドグラス上で、析出した線維素塊に附着した虫体や、凝集した虫体がそれから離れようとして強い運動をつづけても虫体が被鞘から脱することはない。従って著者等が見て来た脱鞘現象は被鞘が基質に癒着し、移動の障害をおこしたための単なる機械的現象とは考えられない。

蚊の唾液中には caogulin か又は red cell agglutinin のいずれかが含まれるとされているが、蚊の消化管内に吸入された血液は完全には凝固せずゼリー様の

## 察

第 2 表に示すように *W. bancrofti* 仔虫の場合、滴下後 2 時間で 138 隻中 57 隻 (41.3%)、4 時間で 91 隻 (65.9%)、8 時間で 111 隻 (80.4%) に脱鞘がみられる。*B. malayi*, *B. pahangi* 仔虫も *W. bancrofti* 仔虫と同様寒天上ですみやかに脱鞘する。特に *B. pahangi* の場合 1% 寒天上で脱鞘する仔虫数は 1 時間で 531 隻中 419 隻 (78.9%)、2 時間で 445 隻 (83.8%) に達し、濃滴血液標本上とは異り、高い脱鞘率がみられる。

半流動体となると考えられている。湿室内で保存された濃滴標本は表面に血清が浸出しその下にゼリー様になった血餅の形成がはじまっている。0.5% 及 1.0% の寒天や、濃滴標本は蚊消化管内で仔虫が脱鞘をおこす環境ときわめてよく類似することが窺われる。この様な基質の条件下では仔虫の運動に支点を与えられ、血清などの中ではみられない特有の被鞘内の運動を呈し、脱鞘にいたるものとも考えられるが、その誘因がこのように単なる機械的のものほかにこれを促進する因子がある様にも思われ、その検討は今後の問題である。

母虫から分娩された仔虫は必ず肺臓に蓄積されるものと思われるが、末梢血内にあられる有鞘仔虫は少くとも伝搬蚊に吸血されればその消化管内で脱鞘し、以後の発育をなし得る資格をもつ成熟仔虫と考えられる。しかし蚊に摂取される機会を失った仔虫は宿主体内でどのような運命をたどるか実証がない。

しかし近年 Schardein (1968) は *L. carinii* に感染した宿主に diethylcarbamazine を与えると、投薬前には見られなかった無鞘の仔虫が肝洞静脈内に出現し、又肝間質細胞内に無鞘の仔虫が貪食されている像を電顕的に観察している。

宿主生体内で仔虫が脱鞘をおこすか否か不明であるが、Schardein の記載した所見は仔虫が破壊される前処置として宿主体内でも脱鞘がおこる可能性を示唆するものと考えられる。

又実験的に体外でみられる脱鞘後の仔虫が活発な前進蛇行運動を行い、寒天層に穿入する現象など、合目的意義が感ぜられる。

著者が観察した脱鞘は恐らく自然の生物学的現象で、フィラリア仔虫の感染、宿主体内での処理、更には定期出現性の機序を解明する上にも重要な意義を有するものと推測される。

## 摘 要

著者は *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. pahangi* などの有鞘仔虫を乾燥を防いだ濃厚血液標本や、寒天板上におくと被鞘内で虫体は特有の前後運動をおこし、大部分の仔虫が被鞘の先端から積極的に高率に脱出し、脱鞘した仔虫は活発な前進蛇行運動を行い寒天層に穿入

する習性を有することを確認し、その経過を記載した。宿主体内で脱鞘がおこるか否かわからないが、仔虫の感染、宿主体内での処理、更には仔虫出現の周期性の機序を考える上に重要な現象と考えられる。

稿を終るに当り終始熱心な御指導、御校閲を載いた恩師片峰大助教授に深甚の謝意を表します。

## Reference

- 1) 阿部 衷男他：糸状虫並びに糸状虫症に関する研究 (F-1) バンクロフト糸状虫の形態学的並びに組織学的研究. 鹿児島大学医学雑誌, 12 (3): 82-98, 1960.
- 2) Annual Report of the Institute for Medical Research, for 1967 p. 63., Kuala Lumpur, Malaysia
- 3) Augustine, D. L. et al: Observations on living microfilariae immitis in the capillary circulation of bats. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 30 (2) : 231-232, 1936.
- 4) Drinker, C. K. et al : On filtration of microfilariae by lymphnodes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 29 (1) : 51-58, 1935.
- 5) Ewert, A. : Exsheathment of the microfilariae of *Brugia pahangi* in susceptible and refractory mosquitoes. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 14 (2) : 260-261, 1965.
- 6) Gray, J. and Lissmann, H. W. : The locomotion of nematodes. J. Exp. Biol., 41 : 135-154, 1964.
- 7) Hawking, F. and Truston, J. P. : The periodicity of microfilariae. 1. The distribution of microfilariae in the body. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 45 (3) : 307-328, 1951.
- 8) Hawking, F. and Clark, J. B. : The periodicity of microfilariae. 8. Movements of *Dipetalonema witei* microfilariae in the lungs. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 61 (6) : 817-836, 1967.
- 9) Laurence, B. R. and Simpson, M. G. : Staining microfilariae for structures other than nuclei. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 63 (6) : 801-810, 1969.
- 10) McQuay, R. M. and Schmutzer, D. E. : Observations on the agglutination of microfilariae of *Loa loa* in citrated blood. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 15 (5) : 730-734, 1966.
- 11) Nelson, G. S. : The pathology of filarial infections. Helminthological Abstracts., 35 (4) : 311-336, 1966.
- 12) Sawyer, T. K. : Molting and exsheathment: in vitro of third stage *Dirofilaria immitis*. J. Parasit., 51 (6) : 1016-1017, 1965.
- 13) Schardein, J. L. : Ultrastructural changes in *Litomosoides carinii* microfilariae in gerbils treated with diethylcarbamazine. J. Parasit., 54 (2) : 351-358, 1968.
- 14) Somme oile, R. I. : The exsheathing mechanism of nematode infective larvae. Exp. Parasit., 6 (1) : 18-30, 1957.
- 15) 竹下尚治, 奥田琉穂 : Bancroft ふいらりあ仔虫ノ培養並ニ動物體移植試験ニ就テ. 医学中央雑誌, 23 (2) : 175-186, 1926.
- 16) Taylor, A. E. R. : Maintenance of filarial worms in vitro. Exp. Parasit., 9 (2) : 113-120, 1960.
- 17) Wilson, T. : Differences between the microfilariae of *Wuchereria malayi* and *Wuchereria bancrofti* in giemsa-stained thick blood films. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 50 (1) : 54-57, 1956.
- 18) Wilson, T. : The occurrence of two forms of *Wuchereria malayi* in man (correspondence). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 52 (5) : 480-481, 1958.
- 19) Yoeli, M. : Observations on agglutination and thigmotaxis of microfilariae in Bancroftian filariasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 51 (2) : 132-136, 1957.