

フィラリア仔虫の脱鞘現象について (II)

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 November 22, 1971)

Exsheathing Phenomenon of Microfilaria in vitro (II)

Yoshiki AOKI

*Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine,
Nagasaki University*

(Director: Prof. Daisuke KATAMINE)

Abstract

The author reported previously an interesting evidence that some kinds of microfilaria provided with sheath actively cast off the sheath on agar plates or thick blood films which were prevented from dryness. As the next step, a series of the study was attempt to research the biological meanings of this phenomenon and factors stimulating the ex-sheathing process. Present paper describes the findings concerning the effect of temperature and some other environmental conditions on this phenomenon. For the experiment, *Wuchereria bancrofti* and *Brugia pahangi* microfilariae were used.

As described before, the thick blood films containing microfilariae were stained with silver deposition technique or Giemsa solution after keeping them in a moist chamber for various periods. On the other hand, living microfilariae were observed on agar plates using a phase contrast microscope.

First of all, in order to see the influence of temperature to the ex-sheathing, the thick blood drops and agar plates containing microfilariae were kept at various temperature of 5°C, 10°C, 15°C, 20°C, 27°C, 32°C, and 37°C, and numbers of sheathless microfilariae appearing during incubation at the respective temperature were counted every two hours or four hours. On the thick blood specimens incubated

in 15°C or 20°C, more than 50 per cent of bancroftian larvae already cast off the sheath within 4 hours, 80 per cent in 8 hours and about 90 per cent in 12 hours. Similar results were obtained by the observation of living larvae on the agar plates, for example, 90 per cent of bancroftian larvae ex-sheathed within 8 hours and also 98.2 per cent of pahangian larvae within 1 hour. At higher or lower temperature the rate generally declined. At 5°C and 37°C, none or only less than 10 per cent of larvae came out of the sheath, indicating an extreme inhibition of the process. If the agar plates were exposed to 20°C after keeping them for 8 hours at 5°C, ex-sheathing was found to be accelerated, the rate reaching up to 65.5 per cent of bancroftian larvae and 85 per cent of pahangian larvae within 4 hours. On the contrary, the microfilariae which were incubated in 37°C for 4 hours could not recover their activity casting off the sheath. It is obvious, therefore, that the process of ex-sheathing in vitro is influenced significantly by the temperature of the environment, and that the most suitable temperature ranges from 15°C to 20°C.

The ideal conditions of agar plate for the living larva were tested. Concerning the saline concentration in agar plate, it can be said that the presence of saline is indispensable for living microfilaria. Lack of saline or its high concentration over 2 per cent brought a strong osmotic effect to kill microfilaria. The best concentration of saline was found in the proximity of 0.9 per cent corresponding to that of physiological saline solution, on which bancroftian microfilariae ex-sheathed in 83.2 per cent of them within 8 hours.

Hydrogen ion concentration of agar plate is also an important factor influencing the activity of microfilaria. On an observation of pahangian microfilariae, the naked larvae appeared in the highest rate as many as about 80 per cent of the population on the agar plates adjusted to neutral ranging from pH 5.8 to 6.8. Acid and alkaline media seemed to be undesirable for keeping the activity of microfilaria.

When the most ideal conditions of agar plate and environmental temperature were given, fresh microfilariae were found to begin immediately a characteristic movement to and fro inside the sheath and the ex-sheathing occurred progressively according to increase of the incubation hours.

緒

著者は第一報に於いて乾燥を防いだ患者濃滴血液標本や寒天板上で、*Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* 或は *Brugia pahangi* など被鞘を有す種類のフィラリア仔虫が特有の被鞘内での虫体の運動の後に、積極的に脱鞘する事実を観察記載した。前報にて述べたようにフィラリア仔虫は媒介蚊に血液と共に摂取されると、蚊の消化管内で被鞘を脱し管壁を通過して移動し、感染幼虫まで発育するものとされている。この蚊消化管内での仔虫の脱鞘の現象や、その機序につ

言

いても不明な点が少くない。

一方 Edeson (1958) は高温多湿の地域で採血された *B. malayi* の濃滴標本でしばしば脱鞘仔虫が発見されることを報じている。著者はこのフィラリア仔虫の脱鞘現象の機構やその生物学的意義、脱鞘をひきおこす要因、条件を追求する目的で研究を行っている。本報では上記の有鞘仔虫の寒天板上での脱鞘に及ぼす環境気温の影響、寒天濃度、食塩濃度、pH などの関係について観察を行った成績を述べる。

実 験 材 料 と 方 法

本実験に用いた仔虫は長崎県五島の患者より得たる *W. bancrofti* 及び実験的に犬に感染させて得た *B. pahangi* の 2 種である。

I) 食塩濃度 0.9%, pH 5.8 に調整した 1.0% の寒天板を 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 27℃, 32℃, 37℃ の各温度下におき仔虫を滴下, その温度下で経時的に脱鞘経過を観察した。この場合同時に, 患者より直接採血作製した濃滴標本を上記各温度下におかれた湿室内に置き, 前報に於けると同様 2 時間毎に 20 時間まで保存した各群を夫々の温度にて乾燥, 染色したものについて同様の観察を行った。

II) 適正寒天濃度を観察する為に, 和光製寒天粉末を用い, 夫々 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0% の寒天平板を作製, 20℃, 食塩濃度 0.5%, pH 5.8 の条件で

その上に仔虫を滴下, 観察を行った。次に食塩を全く含まぬものから, 0.2, 0.5, 0.9, 1.2, 2.0% の割合に食塩を含む 1% 寒天板 (pH 5.8) を作製, 20℃ のもとで同様の実験を行った。

III) 0.1M クエン酸緩衝液, 磷酸緩衝液, バルビタール緩衝液を生理食塩水に $\frac{1}{10}$ 量加え, 夫々, pH 4.2, 4.8, 5.2, 5.8, 6.4, 6.8, 7.4, 8.2 に調整した 1% 寒天板を作製, 20℃ の下で観察を行った。

IV) *B. pahangi* 仔虫を含む感染犬血液を採血, これにヘパリンを適量加えて試験管内に無菌的に室温 (20℃) に保存し, 採血直後から逐次的にその仔虫を寒天板上に滴下し, 脱鞘能力の消長を観察した。

実 験 成 績

I) 環境温度が仔虫の脱鞘経過に及ぼす影響:

著者はまず前報に述べたと同じ方法で厚層血液標本上での *W. bancrofti* 仔虫の脱鞘に環境温度がどのような影響を及ぼすかを観察した。5℃ の湿室に 4 時間保存された後, 染色した血液標本中には 64 隻中わずかに 4 隻の脱鞘した仔虫が認められる。8 時間でその数は 73 隻中 6 隻, 12 時間においても 96 隻中 5 隻でその率は低い。10℃ では標本が湿室中に保存される時間が長くなるにしたがって標本中の脱鞘した仔虫の率は増加する。しかしその率は 2 時間で 93 隻中 3 隻 (3.2%), 4 時間で 87 隻中 8 隻 (9.2%), 6 時間で 98 隻中 19 隻 (19.4%), 8 時間で 110 隻中 22 隻 (20.0%), 10 時間で 109 隻中 47 隻 (43.1%) で低い。さらに 12 時間以上湿室保存の時間を延ばした標本でも, 14 時間で 89 隻中 19 隻 (21.3%), 18 時間で 95 隻中 20 隻 (21.1%) でその率の伸びはみられない。15℃ では 2 時間で 110 隻中 15 隻 (13.6%), 4 時間で 103 隻中 43 隻 (41.7%), 6 時間で 56 隻中 32 隻 (57.1%), 8 時間で 115 隻中 93 隻 (80.9%), 12 時間で 92 隻中 87 隻 (94.6%) が脱鞘し, 時間と共にその過程が進行することがわかる。この温度ではほとんどの仔虫が 12 時間内に脱鞘を完了することが窺われる。20℃ においてもその経過は 15℃ の場合とほぼ同様で 2 時間で 69 隻中 6 隻 (8.7%), 6 時間で 69 隻中 53 隻 (76.8%), 10 時間で 80 隻中 74 隻 (92.5%) の仔虫が脱鞘をおこす。27℃ になると 4 時間で 82 隻中 21 隻 (25.6%),

10 時間で 105 隻中 59 隻 (56.2%), 14 時間で 90 隻中 69 隻 (76.7%) で脱鞘のおこる率は 15℃, 20℃ にくらべて逆に低くなっている。32℃ においてはさらにその率が悪く, 6 時間では 124 隻中 29 隻 (23.4%) に脱鞘仔虫が見られるが, 8 時間以上湿室に保存されたものでも最高 26% で増加がみられない。37℃ では 20 時間までの全標本にみられる脱鞘仔虫の率は最高 5.7% で強い抑制がみられる。(第 1 表)

尚上記各温度のもとで採血直後乾燥した厚層血液標本では, 全く脱鞘した仔虫はみられなかった。

次に食塩濃度 0.9%, pH 5.8 に調整された 1% 寒天板を 5℃, 10℃, 15℃, 20℃, 27℃, 37℃ の各温度のもとに置き, 室温に保存された新鮮な *W. bancrofti* 仔虫を滴下, 脱鞘に至る経過を観察した。

5℃ では仔虫は滴下後数分間は被鞘内での特有な前後運動がみられるが, 2 時間を経過すると運動がみられなくなる。その間に脱鞘した仔虫数は 146 隻中 2 隻 (1.4%) で, その後も脱鞘は進行しない。15℃, 20℃ では仔虫の前後運動はきわめて活発で 8 時間たっても衰えない。脱鞘の経過も速かで, 脱鞘を完了した仔虫の数も時間と共に増加する。15℃ の条件下では, 2 時間で 117 隻中 45 隻 (38.5%), 4 時間で 101 隻 (86.3%), 8 時間目にはその大部分の 108 隻 (92.3%) が脱鞘を完了している。20℃ でも略々同様で夫々 2 時間で 104 隻中 46 隻 (44.2%), 4 時間で 81 隻 (77.9%), 8 時間で 89 隻 (85.6%) が脱鞘をおこし

Table 1. Influence of temperature upon exsheathing of *W. bancrofti* microfilariae on thick blood films.

Temperature	5°C		10°C		15°C		20°C		27°C		32°C		37°C	
	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed	No. of mf examined	No. of mf sheathed
0	161	0	57	0	123	0	111	0	73	0	98	0	87	0
2	—	—	93	3(3.2)	110	15(13.6)	69	6(8.7)	85	11(12.9)	99	20(20.2)	—	—
4	64	4(6.3)	87	8(9.2)	103	43(41.7)	88	56(63.6)	82	21(25.6)	95	26(27.4)	89	1(1.1)
6	86	6(7.0)	98	19(19.4)	56	32(57.1)	69	53(76.8)	68	21(30.9)	124	29(23.4)	99	0
8	73	6(8.2)	110	22(20.0)	115	93(80.9)	57	49(86.0)	85	42(49.4)	86	23(26.7)	99	2(2.0)
10	103	6(5.8)	109	47(43.1)	121	94(77.7)	80	74(92.5)	105	59(56.2)	76	8(10.5)	56	1(1.8)
12	96	5(5.2)	100	20(20.0)	92	87(94.6)	103	87(84.5)	78	30(38.5)	82	17(20.7)	84	0
14	94	6(6.4)	89	19(21.3)	132	125(94.7)	90	84(93.3)	90	69(76.7)	105	13(12.4)	72	3(4.2)
16	69	6(8.7)	120	22(18.3)	82	80(97.6)	103	92(89.3)	61	47(77.0)	77	17(22.1)	76	3(3.9)
18	136	6(4.4)	95	23(21.1)	118	112(94.9)	110	102(92.7)	100	71(71.0)	108	20(18.5)	75	4(5.3)
20	104	1(1.0)	87	17(19.5)	105	95(90.6)	81	76(93.8)	90	53(58.9)	103	15(14.6)	88	5(5.7)

た。27°C のもとでは仔虫の運動性は4時間まで20°C に比して変わらないが、脱鞘をおこす率は2時間で120隻中17隻(14.2%)、4時間でも23隻(19.2%)で低く、以後次第に運動が减弱して脱鞘は進行せず、8時間でもその数は26隻(21.7%) であり増加がみられない。37°Cでも滴下後1時間は活発に前進後退運動を行うが2時間で135隻中2隻(1.5%)が脱鞘したのみで、4時間もすると運動は弱まりやがて動かなくなる。その後脱鞘して来る仔虫はほとんどない。

(第2表)

次に予め各温度下に1時間保存された *B. pahangi* 仔虫について同様の観察を行った。5°Cにおいては滴下直後より観察した228隻の全仔虫が運動せず、4時間までの観察でも脱鞘はおこらない。10°Cでは運動は弱い1時間で415隻中28隻(6.7%)、2時間で55隻(13.3%)、4時間で85隻(20.5%)の仔虫が脱鞘した。15°Cのもとでは仔虫は最もすみやかに高率に脱鞘し、1時間で660隻中641隻(97.1%)、2時間で648隻(98.2%)の仔虫が脱鞘した。20°Cにおいてもほぼ同様1時間で531隻中419隻(78.9%)、2時間で445隻(83.8%)の脱鞘した仔虫が見られた。27°C、37°Cでは最初の1時間までは仔虫は活発であるが、その後運動性が减弱してくる。27°Cで脱鞘したものは1時間で349隻中34隻(9.7%)、2時間で36隻(10.3%)、4時間で37隻(10.6%)で、37°Cでは1時間で417隻中9隻(2.2%)が脱鞘したのみで、2時間で運動はほとんど停止し、4時間になってもその数は増加しない。(第3表)

以上のように濃滴血液標本や寒天板の上で仔虫が脱鞘をおこすためには、*W. bancrofti*、*B. pahangi* のいずれの種でも環境温度によって大きな影響を受ける。最も適当な温度は15°Cから20°C附近にあることが明かにされ、5°Cや37°Cのような低温や高温は仔虫の運動及び脱鞘にとって不適当であることが明らかになった。

次の実験として、不適と思われる5°C及び37°Cに夫々8時間湿室中に保存した後、20°Cに移しその後の運動と脱鞘の様相を観察した。その成績は第4表に示してあるが、まず *W. bancrofti* の濃滴標本についてみると、5°Cに保存した8時間までの標本では脱鞘仔虫は88隻中1隻(1.1%)認められたのみであるが、これを20°Cに移すとそれから2時間目70隻中32隻(45.7%)、4時間で102隻中66隻(64.7%)、6時間で82隻中73隻(89.0%)、8時間目になると102隻中その大部分の92隻、実に90.2%が脱鞘している

Table 2. Influence of temperature upon exsheathing of *W. bancrofti* microfilariae on agar plates.

Temperature		5°C	15°C	20°C	27°C	37°C
No. of mf examined		146	117	104	120	135
No. of mf exsheathed (%)	2 hrs.	2(1.4)	45(38.5)	46(44.2)	17(14.2)	2(1.5)
	4 hrs.	2(1.4)	101(86.3)	81(77.9)	23(19.2)	2(1.5)
	8 hrs.	2(1.4)	108(92.3)	89(85.6)	26(21.7)	
	16 hrs.	2(1.4)				

Table 3. Influence of temperature upon exsheathing of *B. pahangi* microfilariae on agar plates.

Temperature		5°C	10°C	15°C	20°C	27°C	37°C
No. of mf examined		228	415	660	531	349	417
No. of mf exsheathed (%)	1 hr.	0	28(6.7)	641(97.1)	419(78.9)	34(9.7)	9(2.2)
	2 hrs.	0	55(13.3)	648(98.2)	445(83.8)	36(10.3)	9(2.2)
	4 hrs.	0	85(20.5)			37(10.6)	9(2.2)
	5 hrs.	187(82.0)	287(69.2)				9(2.2)

Table 4. Acceleration of exsheathing process of *W. bancrofti* microfilariae by changing the temperature to 20°C after 8 hours incubation at 5°C or 37°C.

D) on thick blood films

Incubation hours	5°C→20°C		37°C→20°C	
	No. of mf examined	No. of mf exsheathed(%)	No. of mf examined	No. of mf exsheathed(%)
0	88	1(1.1)	109	2(1.8)
2	70	32(45.7)	79	8(10.1)
4	102	66(64.7)	94	4(4.3)
6	82	73(89.0)	92	9(9.8)
8	102	92(90.2)	107	6(5.6)
10	111	98(88.3)	95	36(37.9)
12	109	101(92.7)	89	35(39.3)
14	80	75(93.8)	103	36(35.0)
16	92	87(94.6)	62	28(45.2)
18	106	88(83.0)	73	35(47.9)
20	115	102(88.7)	78	49(62.8)

D) on agar plates

No. of mf examined		5°C→20°C	37°C→20°C
		139	169
No. of mf exsheathed (%)	0	0	2(1.2)
	2 hrs.	60(43.2)	2(1.2)
	4 hrs.	91(65.5)	2(1.2)

のが確証された。これに反し 37℃に 8時間おいたものはその間に 1.8%(109隻中 2隻)に脱鞘がみとめられたが、20℃に移しても 2時間目 79隻中 8隻 (10.1%)、6時間目 92隻中 9隻 (9.8%)、10時間目 95隻中 36隻 (37.9%)とその伸び率は悪く、20時間でやっと 78隻中 49隻 (62.8%)を示すにすぎない。

寒天上での実験でも同様であって *W. bancrofti* 仔虫では 5℃、8時間保存の後 20℃に移されると数十分で仔虫の運動が回復し、全仔虫が活発に鞘内前後運動をはじめ、2時間後には全仔虫の 43.2% (139隻中 60隻)、4時間で 65.5% (91隻)が脱鞘を完了した。これに反し、37℃保存の寒天板では 20℃に移しても仔虫の運動性は回復せず、8時間観察しても脱鞘はおこってこない。*B. pahangi* 仔虫を用いた実験では 4時間 5℃処理の後 20℃に移したものでは 1時間で 82.0% (228隻中 187隻)、2時間で 85.1% (194隻)が脱鞘したが、予め 4時間 37℃に置いたものでは運動性が回復せず脱鞘も全くみられない。(第 3表)

このように仔虫は 37℃の高温にさらされることによって速かにその生きる力、運動性を失い死滅に向うものと思われる。

II) 寒天板の性状が仔虫の脱鞘経過に及ぼす影響:

1) 寒天の硬度

0.5%の割に食塩を含む 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0%の寒天板 (pH 5.8) 上に *W. bancrofti* 仔虫を滴下し、20℃の恒温のもとに仔虫の脱鞘経過を 2, 4, 8, 16時間目に観察した。

0.5%寒天板上におかれた仔虫は活発に前後運動を行うが、滴下後 4時間で脱鞘した仔虫は 109隻中 1隻にすぎず、8時間でも 13隻 (11.9%)にすぎない。8時間でも仔虫は被鞘内で活発な前後運動を行い、16時間目に 57隻 (52.3%)の仔虫が脱鞘をおこした。しかし 16時間を経過すると仔虫の運動は漸次弱くなる。1%寒天板上では時間と共に脱鞘した裸の仔虫が増加し、2時間で 90隻中 5隻 (5.6%)、4時間で 22

Table 5. Influence of concentration of agar on exsheathing of *W. bancrofti* microfilariae (concentration of NaCl : 0.5%)

Concentration of agar	No. of mf examined	No. of microfilariae exsheathed (%)			
		2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.	16 hrs.
0.5	109	1(0.9)	1(0.9)	13(11.9)	57(52.3)
1.0	90	5(5.6)	22(24.4)	58(64.4)	68(75.6)
1.5	179	29(16.2)	64(35.8)	97(54.2)	106(59.2)
2.0	137			16(11.7)	23(16.8)
3.0	80	3(3.8)	4(5.0)		

Table 6. Influence of concentration of NaCl on exsheathing of *W. bancrofti* microfilariae (concentration of agar : 1%)

Concentration of NaCl	No. of mf examined	No. of microfilariae exsheathed (%)			
		2 hrs.	4 hrs.	8 hrs.	16 hrs.
0	176	0	0		
0.2	57	0	0	0	
0.5	131	7(5.3)	31(23.7)	74(56.5)	100(76.3)
0.9	113	49(43.4)	76(67.3)	94(83.2)	94(83.2)
1.2	210	95(45.2)	129(61.4)	145(69.0)	168(80.0)
2.0	42	1(2.4)			

隻 (24.4%), 8時間で 58隻 (64.4%), 16時間で 68隻 (75.6%) の仔虫が脱鞘を起す。1.5%寒天板上では 1%寒天板上の経過とほぼ同様 2時間で 179隻中 29隻 (16.2%), 4時間で 64隻 (35.8%), 8時間で 97隻 (54.2%), 16時間で 106隻 (59.2%) の仔虫が脱鞘する。しかし 1%に比し運動の減弱がより早くおこり 8時間以後は活発な前後運動は示さず、脱鞘する仔虫もその後あまり増加しない。2%寒天板上においては 16時間で 137隻中わずかに 23隻 (16.8%) が脱鞘するにすぎず運動は弱い。3%になると仔虫は 2時間でほとんど運動を停止し、それまでに脱鞘したものは 80隻中 3隻 (3.8%) にすぎない。

この様に寒天濃度が低いと仔虫は長く活発に前進後退運動を行うが、脱鞘までは長時間要し、又寒天濃度が高く硬い寒天板になると仔虫の運動が抑制され脱鞘がおこりにくい。至適な寒天濃度は概ね 1%附近にあるものと考えられる。(第 5 表)

2) 食塩濃度

食塩を全く含まないものから、夫々 0.2, 0.5, 0.9, 1.2, 2.0%の食塩濃度を示す 1%寒天板 (pH 5.8) 上での仔虫の脱鞘経過を観察した。食塩を含まぬ寒天板上に仔虫を滴下すると、虫体は弓状に伸び、前端及び尾端でわずかの細動がみられるがまもなく運動は停止し、脱鞘をおこすことなく数分内に死滅する。0.2%寒天板上においては仔虫はわずかに前進後退運動を呈するが、8時間までの観察でも脱鞘をおこすものではなく死滅する。食塩濃度が 0.5%になると仔虫の運動もやや活発になり、4時間での脱鞘率は 131隻中 31隻 (23.7%) で低く、16時間目には 100隻 (76.3%) に達するが脱鞘の進行がややおくれる傾向がある。0.9%食塩含有の寒天板上では仔虫は活発に特有の前後運動を行い、2時間で 113隻中 49隻 (43.4%), 4時間で 76隻 (67.3%), 8時間で 94隻 (83.2%) の仔虫が被鞘を脱する。裸になった仔虫は寒天板上を大きな蛇行運動を示しながらはいまわり末脱鞘仔虫も前後運動を行うも以後脱鞘する仔虫は見られなかった。1.2%寒天板上でも 2時間で 210隻中 95隻 (45.2%), 4時間で 129隻 (61.4%), 8時間で 145隻 (69.0%), 16時間で 168隻 (80.0%) の仔虫が脱鞘する。しかしその後 16時間以上を経過すると仔虫は被鞘の有無にかかわらず虫体の縮小がおこり運動しなくなる。2%食塩を含む寒天板上では仔虫は滴下直後は前後運動を行い 42隻中 1隻が脱鞘したが、しばらくすると被鞘内の虫体は $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ ぐらい縮小し運動を停止し死滅する。食塩濃度が 2.0%以上になると、食塩は仔虫に致死

に働くものと思われる。(第 6 表)

以上の結果より寒天層内の食塩の存在は仔虫の生存に不可欠の条件と考えられるが、その濃度が生理的範囲を越えて高くなると仔虫は強い浸透圧の影響を受け死滅する。寒天板上で仔虫が活発に運動し、脱鞘を起すのに最も良い食塩濃度は概ね 0.9%附近にあり、これは生理的食塩水のそれに相当する。

3) pH の影響

pH 4.2 から pH 8.2 まで種々の水素イオン濃度に調整された寒天板上に *B. pahangi* 仔虫を滴下し脱鞘の経過を観察した。その成績は第 7 表に示してあるが、pH 4.2 の寒天板上では仔虫は滴下後数分間は前後運動するもすみやかにその運動は弱まり、30分後にはほとんどの仔虫は前後運動を呈せずただわずかに頭端及び尾端に弱い動きがみられる。1時間後にその運動は全く停止する。それまでに脱鞘した仔虫の数は 223隻中 8隻 (3.6%) で極めて低率である。pH を 4.8 に上げて pH 4.2 の場合とほぼ同じすがたが見られ、1時間内に脱鞘した仔虫数は 347隻中 7隻 (2.0%) で大差なく 2時間を過ぎると運動がとまり以後脱鞘するものはない。pH 5.2 においては 1時間で 176隻中 75隻 (42.6%) の仔虫が脱鞘をおこす。しかしそれ以後は運動が弱まり 4時間以後の観察でも脱鞘仔虫の増加は見られない。pH 5.8 になると仔虫の運動は活発で 249隻中 189隻 (75.9%) が 1時間内に脱鞘し、2時間でそれは 200隻 (80.3%) に達す。4時間の観察でもまだ被鞘を有す仔虫はさかんに前後運動を続けるが、その後あらたに脱鞘をおこすものは少い。pH 6.4, pH 6.8 でも pH 5.8 の場合と同様仔虫は強い前後運動を行って脱鞘する。1時間で夫々 323隻中 247隻 (76.5%), 131隻中 98隻 (74.8%), 2時間で

Table 7. Influence of pH of agar plates on exsheathing of *B. pahangi* microfilariae.

pH	No. of mf examined	No. of microfilariae exsheathed (%)		
		1 hr.	2 hrs.	4 hrs.
4.2	223	8(3.6)		
4.8	347	7(2.0)	7(2.0)	
5.2	176	75(42.6)	75(42.6)	
5.8	249	189(75.9)	200(80.3)	200(80.3)
6.4	323	247(76.5)	253(78.3)	256(79.3)
6.8	131	98(74.8)	102(77.9)	102(77.9)
7.4	143	82(57.3)	88(61.5)	88(61.5)
8.2	274	31(11.3)	39(14.2)	40(14.6)

253隻 (78.3%), 102隻 (77.9%) の高い脱鞘率を示した。pH が 5.8, 6.4, 6.8 の各群ではこのように速かに脱鞘がおこるが、2時間までに脱鞘しない仔虫でも長時間にわたり活発に運動をつづけ、これらの脱鞘しない虫体をよく観察すると被鞘の内部で虫体が反転し、頭部を被鞘の末端にむけたものが大部分で脱鞘の機会を失ったものと考えられる。pH 7.4 では1時間で143隻中82隻 (57.3%), 2時間で88隻 (61.5%) が脱鞘し4時間目頃から次第に運動が減弱し以後脱鞘はほとんどおこっていない。pH 8.2 において脱鞘したものは1時間で274隻中31隻 (11.3%), 2時間で39隻 (14.2%) でその率はきわめて低い。4時間までは弱い運動のみみられるが、それ以上に脱鞘はおこらない。

この様に *B. pahangi* 仔虫が寒天板上で生存し、活発な運動を行い脱鞘をおこすためには適当な水素イオン濃度が必要で、その条件は概ね pH 5.8~6.8 の間にあるものと思われる。この上におかれると仔虫はすみやかに脱鞘をおこし、その率は1時間でほぼ80%に達する。裸になった仔虫は活発に寒天板上をはいまわり、まだ被鞘を残す仔虫も長時間活発な前後運動をくりかえす。しかし pH がこれより酸性又はアルカリ性に傾くと、仔虫に敏感に影響し、仔虫の運動が弱まり、脱鞘の率も著明に低下する。

III) 仔虫の保存期間と脱鞘能力:

B. pahangi 仔虫を血液中に保存する時間と脱鞘能力との関係を見る為、20℃に仔虫をヘパリン加犬血液に保存し、3, 24, 48, 72, 96, 144, 192時間目に仔虫を0.9%食塩を含む1%寒天板 (pH 5.8) に滴下し、1時間内の仔虫の脱鞘率を20℃のもとで観察した。滴下時すでに死せる仔虫は対象から除外し、運動する仔虫についての脱鞘率を算定した。第8表に示す

ごとく3時間保存された仔虫はすべての仔虫が活発に運動し、1時間後の脱鞘率は281隻中225隻で実に80.1%にも達する。24時間以上保存された仔虫の内には全く運動しない仔虫の数が徐々に増して来るが、24時間保存された仔虫は273隻中192隻 (70.3%), 48時間のものでは425隻中341隻 (80.2%) に脱鞘が認められた。以後保存時間が延びるとともに脱鞘率は徐々に低下し、72時間保存された仔虫の脱鞘率は274隻中90隻 (32.9%), 96時間で95隻中22隻 (23.2%), 144時間で216隻中14隻 (6.5%) で仔虫の脱鞘力は極度に低下する。192時間もすると仔虫はわずかに動くも全く脱鞘はおこらない。

以上のごとくヘパリン加血液中に保存された仔虫は48時間までは寒天板上で脱鞘を起す能力を十分に維持しているが、それを過ぎると急激に脱鞘する仔虫の数は減少することがわかる。

Table 8. Exsheathing of *B. pahangi* microfilariae stored in heparinized blood for various periods

Storage hours	No. of mf examined	No. of mf exsheathed within 1 hour (%)
3	281	225(80.1)
24	273	192(70.3)
48	425	341(80.2)
72	274	90(32.9)
96	95	22(23.2)
144	216	14(6.5)
192	163	0

(at 20°C, on agar plates)

総 括 と 考 察

著者は先に有鞘のフィラリア仔虫が体外で脱鞘をおこす現象を観察報告したが、本報では *W. bancrofti*, *B. pahangi* 仔虫を用いて、これら脱鞘をおこす機構とその要因を追求する目的で二三の実験を行った。その結果の総括を行い、考察を加えてみたい。

W. bancrofti 及び *B. pahangi* の仔虫が寒天板又は濃滴血液標本の上で、運動性を保ち、脱鞘をおこすために最適の温度条件は概ね15℃から20℃附近にあり、温度がこれより高くても、低くても脱鞘をおこす

速度とその率が低下する。ことに5℃, 37℃といった低高温では運動が障碍され脱鞘はおこらない。5℃に保たれた仔虫は20℃に移すことにより運動が促進され、大部分が脱鞘する。しかし37℃に4~8時間おくと脱鞘能力を失い死滅する。体外では37℃より高い温度にはきわめて弱いことが窺われる。

寒天上で仔虫が生存するためには食塩の存在が必要であるが、その濃度が1.2%をこえると浸透圧の違いによる障碍を受け、脱鞘率が低下する。ことに2.0

%に達するとその影響は強く、速かに死滅する。最適の食塩濃度は 0.9%で、概ね生理的食塩水のそれに該当する。又寒天板の水素イオン濃度も仔虫の運動性と脱鞘惹起に大きな影響をもっている。pH 5.8 及至 6.8 の中性寒天板が最適で、これより酸性、或はアルカリに傾くと運動が弱くなり、脱鞘もおこり難くなる。ことに pH が 4.2, 8.2 になると仔虫に致命的に作用する。

用いる寒天の硬度即ち寒天濃度は 1.0%が最適で、3%になると脱鞘が強く障碍される。

これら温度、寒天板の性状に最適の条件を与えると、寒天上に滴下された仔虫はその直後からきわめて活発な被鞘内の前後運動をはじめ、時間と共に脱鞘した仔虫数が増加して行くが、一般に寒天上では *W. bancrofti* に比べ、*B. pahangi* 仔虫がその進行が早く、新鮮な仔虫では 1 時間以内に大部分が脱鞘する。

フィラリア仔虫の生体外での生存時間については岩本 (1969) 他多くの報告があり、その寿命はきわめて長く数日から十数日以上生きのびるものとされているが、ヘパリン加血中に蓄えられた仔虫の脱鞘能力は早期に失われ 72 時間を越えると急速に低下する。

蚊の体温は外界気温とほぼ等しきものと考えられるが、大森 (1958)、中村 (1964) は *Culex pipiens pallens*, *Aedes togoi* 体内でのフィラリア幼虫の発育に最も都合のよい環境温度は 24℃~27℃で、発育零点は概ね 14.5℃ 附近にあることを実験的に証明している。仔虫の脱鞘のおこり方は仔虫の運動活性と深い関係があり、蚊体内と外界とを同一に論ずることは出来ないが、寒天上での仔虫の脱鞘至適温度が概ね 15℃~20℃ 附近にあり、27℃ を超えると脱鞘率が低下することは注目される。

又 Ewert (1965) は *B. pahangi* 仔虫は感受性の高い *Anopheles quadrimaculatus* では摂取後 1 時間以内に 98% が脱鞘をおこすが、好適でない *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* では 45~68%, 感受性のない *Culex quinquefasciatus* では脱鞘がほとんどお

こらず、その率は 3% に過ぎないことを報告している。Schacher (1962) も *B. pahangi* 仔虫は吸血後 30 分以内に胃の外面、hemocele などに入り、8 時間もすると胃腔内に仔虫を見ないと記載している。

W. bancrofti 仔虫については具体的な報告はないが、山田 (1927) は *Anopheles*, *Aedes* の胃内で 2~6 時間で脱鞘することを報じ、中村 (1964) も概ね 24 時間内に腹腔に脱出することを認めている。

著者の濃滴標本や寒天板上の実験をみても、*B. pahangi* 仔虫は至適条件のもとで 1 時間内に 80~90% が、*W. bancrofti* 仔虫では 8 時間内に 80% が脱鞘して、これは夫々好適な蚊消化管内での脱鞘時間と略々一致している。一般にその経過は *B. pahangi* において速かである。

仔虫の発育に適当でない蚊族の中では脱鞘をおこす必要な条件が満されないことが想像されるが、それが何であるかの解明は今後の問題である。Sommerville (1957) は羊に寄生する *Haemonchus contortus* の脱皮は消化管内の dialyzable factor により虫体が活性化され、排泄細胞附近から分泌される exsheathing fluid が角皮の特定の部位に作用して、そこが破れ、脱皮がおこることを推論している。フィラリア仔虫の場合にも適当な条件のもとにおかれると、血液や血清中では全く見られない特有の被鞘内での前後運動が激発され、積極的に脱鞘する。その生物化学的の機構はわからないが、寒天上での脱鞘現象は決して偶然のものではなく、蚊体内でのそれと同様、以後の発育の一段階として生物学的にも合目的な意義があるものと考えられる。又新鮮仔虫で脱鞘経過をくわしくみようと、虫体が被鞘を脱する部位は必ず頭端又はそれに近い部位であって、被鞘内で反転した仔虫はいかに運動が活発であっても脱鞘しない。これらの事実は被鞘が破れる部位は予め決まっている様に思われる。仔虫の代謝、微細構造と合せ今後追究されるべき問題点の一つであろう。

稿を終るに当り終始熱心な御指導、御鞭撻を戴いた恩師片峰大助教授に深甚の謝意を表します。尚本研究の一部は日米医学協力計画の資金によるもので併せて謝意を表します。

Reference

- 1) 青木克己 : フィラリア仔虫の脱鞘現象について (I). 熱帯医学, 13 (3) : 134-140, 1971.
- 2) Annual Report of the Institute for Medical

Research for 1967. Kuala Lumpur, Malaysia.

- 3) Clements, A. N. : International series of monographs on pure and applied biology.

Volume 17. The physiology of mosquitoes. 1967.

4) **Ewert, A.** : Exsheathment of the microfilariae of *Brugia pahangi* in susceptible and refractory mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.*, 14 : 260-261, 1965.

5) **岩本 功** : バンクロフト糸状虫仔虫の体外生存時間について. *寄生虫学雑誌*, 18 (6) : 701-702, 1969.

6) **中村義清** : バンクロフト糸状虫症の伝搬に関わるトウゴウヤブカの役割に関する実験的研究. 第一報 トウゴウヤブカの摂取する仔虫数及び仔虫の蚊体内に於ける移動. *長崎大学風土病紀要*, 6(1) : 25-33, 1964.

7) **中村義清** : バンクロフト糸状虫症の伝搬に関わるトウゴウヤブカの役割に関する実験的研究. 第二報 トウゴウヤブカ体内に於けるフィラリア幼虫の発育及び幼虫の寄生が蚊に及ぼす影響について. *長崎大学風土病紀要*, 6 (2) : 113-124, 1964.

8) **Omori, N.** : Experimental studies on the role of the house mosquito, *Culex pipiens*

pallens in the transmission of Bancroftian filariasis. 4. Development and longevity in days of filariae in mosquitoes kept at a series of constant temperatures. *Nagasaki M.J.*, 3(11) : 61-70, 1958.

9) **Sawyer, T. K.** : Molting and exsheathment in vitro of third-stage *Dirofilaria immitis*. *J. Parasit.*, 51 (6) : 1016, 1965.

10) **Schacher, J. F.** : Morphology of the microfilaria of *Brugia pahangi* and of the larval stages in the mosquito. *J. Parasit.*, 48 (5) : 679-692, 1962.

11) **Sommerville, R. I.** : The exsheathing mechanism of nematode infective larvae. *Exp. Parasit.*, 6 : 18-30, 1957.

12) **Yamada, S.** : An experimental study on twenty-four species of Japanese mosquitoes regarding their suitability as intermediate hosts for *Filaria bancrofti* Cobbold. *Sci. Rep. Gov. Inst. Ing. Dis.*, 6 : 559-622, 1927.