

犬糸状虫仔虫の走査電子顕微鏡的観察

青木 克己, 片峰 大助

長崎大学熱帯医学研究所寄生虫学部門 (主任: 片峰 大助 教授)

Scanning Electron Microscopic Observations on *Dirofilaria immitis*Yoshiki AOKI and Daisuke KATAMINE (*Department of Parasitology, Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University*)

ABSTRACT: The microfilariae separated from the blood were washed three times in phosphate buffer solution adjusted to pH 7.2, fixed in 5% glutaraldehyde, dehydrated in a graded series of acetone. Under scanning electron microscope, one can clearly observe the striated annular appearance running across transversely with regular intervals on the surface of cuticle all over the body. In high power micrograph, the body surface is almost smooth and pits, tubercles and any other attachments are not recognizable. The number of the annulation is approximately 310. The anterior tip of microfilaria forms a cap-like cephalic disk which is provided with a single wedge-shaped hook and two small pores. The hook measures about 0.4–0.6 μ in length by 0.3 μ in width at the base. The pores are round in shape measuring about 0.1 μ in diameter, one of which opens at the center of cephalic disk and another one at the lateral side opposite to the hook. These two pores may be the orifices of buccal capsule and cephalic ciliary channels. The excretory pore is a small round opening, which is situated at nearly the 83rd annulus ranked from the anterior tip. The oval-shaped anal pore is usually demonstrated at around the 93rd annulus ranked from the posterior end. The size is generally larger than the excretory pore, measuring 0.4–0.5 μ in diameter. The posterior extremity gradually tapers and is finally connected to the club-shaped tail. The tail is about 4–5 μ long lacking the transverse striations on the surface.

Tropical Medicine, 17(1), 27–34, March, 1975

緒 言

近年走査型電子顕微鏡 (以下 SEM と略す) は寄生虫学領域においても, 光学顕微鏡下で区別しにくい蠕虫の比較形態学的研究や, 蠕虫体表面の微小器官の形態の観察に主として用いられる様になり, 更に透過型電子顕微鏡 (以下 TEM と略す) を用いての内部微細構造の観察の補助的手段としても応用されている。蠕虫の SEM 観察の為に試料調整についても, Green

(1967), Hockley(1968), Hammond(1969), Madden *et al.*(1970), Allison *et al.*(1972), Miller *et al.*(1972), Weise(1973), Morris(1973), Ubelaker *et al.*(1973) 等により種々の方法が報告されている。

犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* 仔虫の TEM による微細構造の観察は Sonoda *et al.*(1965), Johnson *et al.*(1969), Kozek(1968, 1971), McLaren(1969, 1972) により記載されている。しかし TEM 所見のみから仔虫の立体微細構造を正確に知ることは容易ではない。著者は犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の微細構造に関

する研究の一つとして、SEM を用いて仔虫の体表構造を観察した。

材料と方法

観察に用いた犬糸状虫仔虫は長崎市で捕獲した自然感染犬の足静脈より得た。ヘパリン加試験管に採血した犬血液に1%サポニン溶液を等量加え溶血をおこした後、遠沈した。多くの仔虫を含む沈渣に0.1M磷酸緩衝液(pH7.2)を加え仔虫を洗浄した。さらに遠沈、洗浄を3回くり返した後、仔虫を5%グルタルアルデヒドで1時間固定し、上昇アセトン系列で脱水、小ガラス板に滴下し、自然乾燥した。金蒸着を行なった試料をJSM-U3にて、加速電圧15kv~25kv、倍率1,000~20,000で観察した。

形態の記載

仔虫体表の概形

犬糸状虫仔虫の体表には Fig. 1 に示すごとく、頭端より尾部まで虫体長軸に直角に走る多くの輪状溝が存在し、1,000倍の弱拡大でも明かに認められる。倍率をあげて観察すると、この輪状溝はほぼ等間隔に規則正しく走り、仔虫体表面を多くの体環に分けていることがわかる。頭端部及び排泄孔、肛門孔の存在する体環を除いて、各体環の表面は全く平滑で小突起や小孔は存在しない (Fig. 2)。頭端より尾端まで存在する体環の数はほぼ一定で、Table 1 に示すごとく、犬糸状虫仔虫は 296~321 (平均306) 個の体環を有す。しかし SEM で観察された仔虫の体長は 177.3~

Table 1 Body length and number of annulations of *D. immitis* microfilariae

Specimens	Length (μ)	No. of annulations
1	184.6	306
2	184.7	308
3	184.7	301
4	189.5	306
5	199.3	301
6	177.3	296
7	186.7	321
8	200.4	310
9	211.0	314
10	217.6	297
11	178.9	304
12	199.4	296
13	188.7	315
14	189.7	319
15	187.3	307

217.6 μ (平均192.0 μ)と先人の報告値(Fülleborn, 1912; 板垣, 1938; Taylor, 1960) に比し 50~60 μ 短い。脱水及び金蒸着の為に試料を真空中に置くことにより仔虫に収縮がおこった為であろう。時折り虫体中3分の1の体表面に Fig. 3 に示す様な輪状溝の分岐がみられ、その前後に変形した体環がみられることがある。

頭部

犬糸状虫仔虫の頭端部は帽子状あるいは半球状を呈している。その表面は平滑で、一端より楔様鉤が後方に向ってのびている。鉤は長さ0.4~0.6 μ 、起始部での幅約0.3 μ で一般に鉤の先端は第一体環のほぼ中央までのびている (Fig. 4)。しばしば鉤の先端の一部、あるいは鉤のすべてが第一体環に被れた仔虫が観察される (Figs. 5 & 6)。半球状の頭端部には、その先

Table 2 Location of excretory pore and anal pore

Specimens	No. of whole annulations	Excretory pore*	Anal pore**
1	296	81	86
2	302	83	95
3	315	85	89
4	314	90	97
5	297	83	88
6	316	88	
7	306		98
8	281		88
9	301		93
10	315		89
11	296		92
12	307		92
13	319		99
14		84	
15		85	
16		79	
17		82	
18		83	
19		83	
20		78	
21		85	
22		84	
23		79	
24			98
25			92
26			96
27			91
28			94

* Showing the annulus ranked from the anterior tip.

** Showing the annulus ranked from the posterior tip.

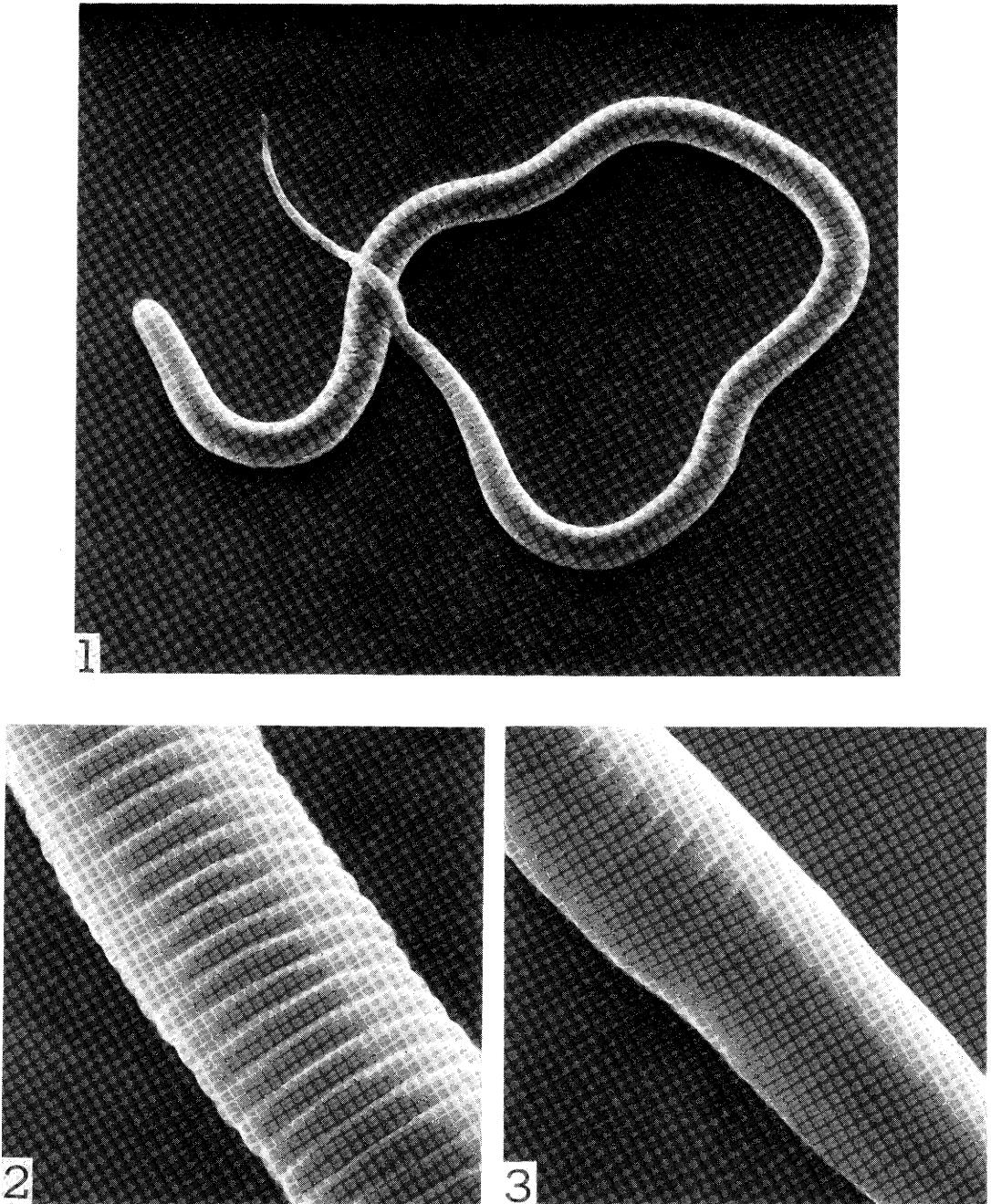
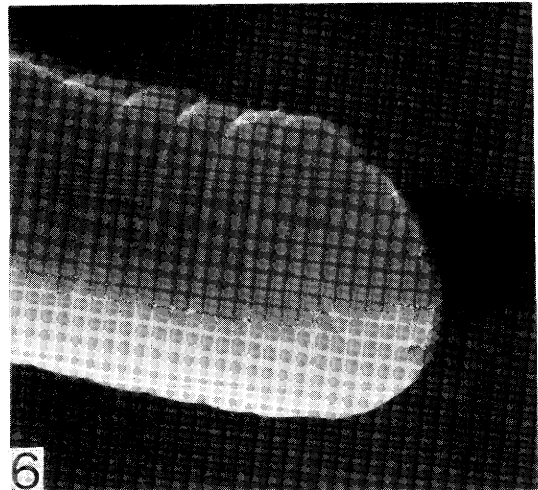
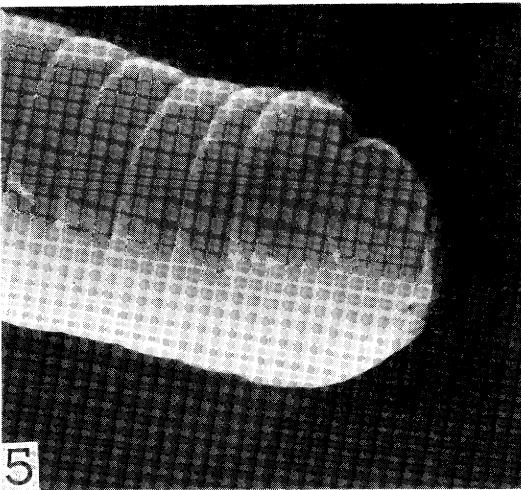
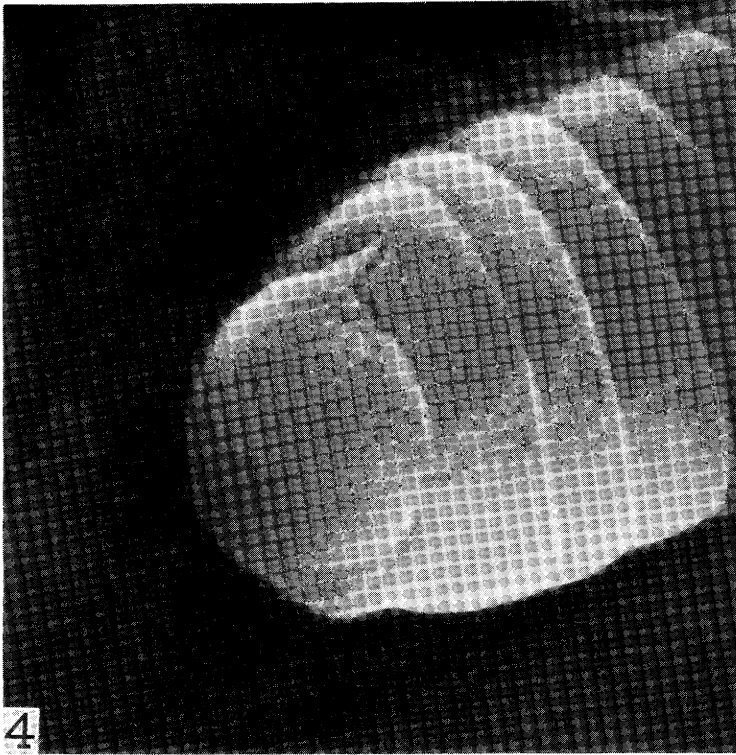
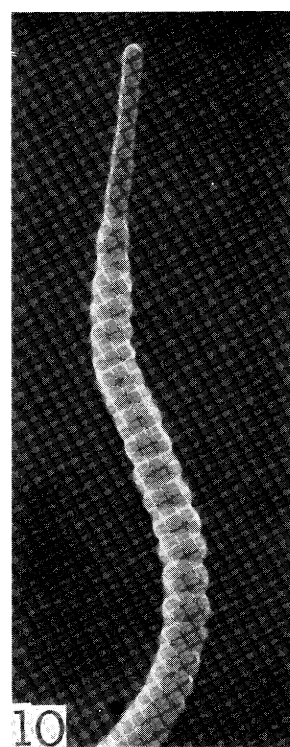
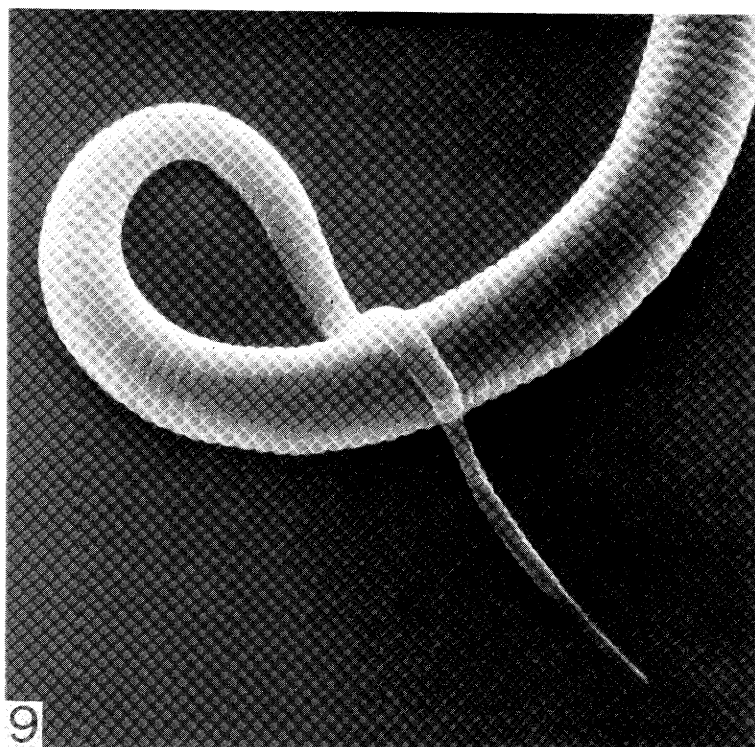
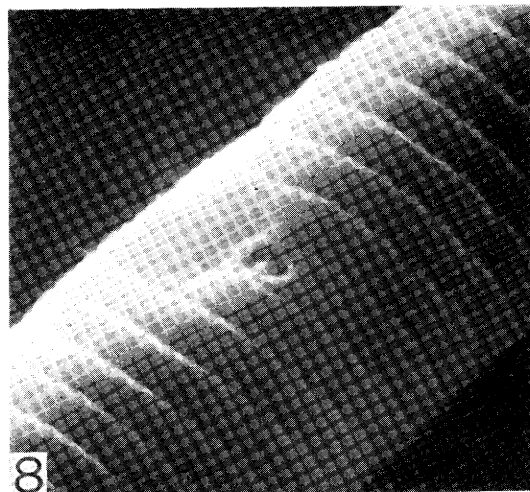
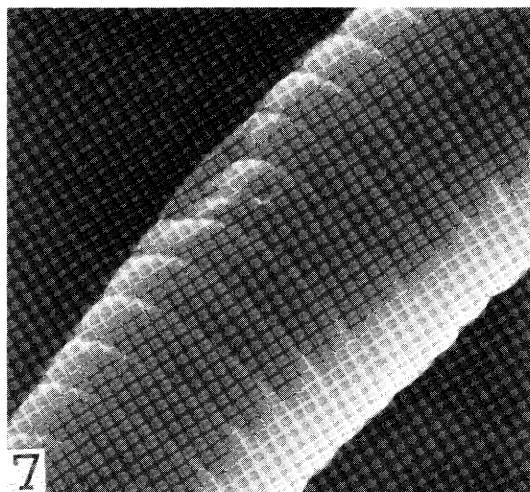


Fig. 1. Scanning electron micrograph of whole body ($\times 1,440$).

Figs. 2 & 3. Transversely striated grooves at mid-portion of the body. Abnormal bifurcation of the striation rarely present ($\times 8,000$, $\times 7,000$).



Figs. 4, 5 & 6. A hook and two small openings on cephalic disk
($\times 20,000$, $\times 12,000$, $\times 12,000$).



- Fig. 7. Excretory pore. 83rd annulus ranked from the anterior tip ($\times 10,000$).
- Fig. 8. Anal pore. 89th annulus ranked from the posterior tip ($\times 10,000$).
- Fig. 9. Caudal portion tapering to club-shaped tail ($\times 4,000$).
- Fig. 10. High power magnification of tail. Transverse striations absent ($\times 7,000$).

端中央部と鉤の対称部位に直径約 0.1μ の2つの小さな円形の小孔が存在する (Figs. 5 & 6). 頭端部に続く第一体環は短円柱状の他のすべての体環と異り, 鉤に面した体環長 (輪状溝間の長さ) は対側に比べ, かなり短い (Fig. 4).

排泄孔と肛門孔

排泄孔は虫体のほぼ前3分の1, 頭端より数えて78~90番目 (平均83番目) の体環の中央に存在する (Table 2). その形は約 0.2μ の径を有する小円形, あるいは同大の紡錘形を呈している. その形のちがいは体環の収縮の程度によるものと考えられる (Fig. 7).

肛門孔は尾端より数えて86~99番目 (平均93番目) の体環中央に位置し (Table 2), 排泄孔より明かに大きく, 長径約 0.5μ , 短径約 0.3μ の楕円形を呈し, 常にその長径は虫体長軸と直角の位置にある (Fig. 8).

尾部

Fig. 9 に示すごとく, 尾端に近づくとつれ, 各体環は徐々に体環長, 体環幅を減じ, 尾端近くでは各体環は球状に変化し, 一見連珠様を呈す. 尾端より4~ 5μ の部分は棍棒状で, その表面は滑かで輪状溝は存在せず, 尾端は鈍に終る (Fig. 10).

考 察

すでに Taylor (1960) は光学顕微鏡下に各種糸状虫仔虫の体表には多くの輪状溝が存在することを報告しているが, SEM を用いることにより更に詳しい仔虫の体表微細構造の観察が可能である. SEM による観察により, はじめて犬糸状虫仔虫の体表に約310の輪状溝が存在すること, 虫体中央部に時折り輪状溝の分岐がおこる事が明かとなった. SEM 所見のみからは輪状溝の分岐が角皮の奇形によるものか, 仔虫の発育にともなう角皮の変化によるものか不明であるが, 今後 TEM やその他の方法により追求されるべき興味ある所見である. Sonoda (1965) は TEM を用いて犬糸状虫仔虫の部位による輪状溝間の長さのちがいを観察し, 虫体前半部で $1.0\sim 1.3\mu$, 後半部で $1.0\sim 0.4\mu$ と報じている. SEM 下で観察した仔虫の計測値は撮影時の傾斜角度や試料の収縮等によって正確さを欠く為 (徳永等, 1971), 本報では部位による体環長の比較は行わなかった. しかし, Sonoda (1965) の報告したごとく尾端部に近づくとつれて体環長と幅は徐々に減じ, 輪状溝がより著明となることは明かである.

光学顕微鏡で糸状虫仔虫を観察する場合, 尾部の形態は重要な種の鑑別点の1つである. 著者は犬糸状虫仔虫の尾端より4~ 5μ の部分は棍棒状で輪状溝がない事を本報で明かにした. 今後各種糸状虫の尾端部の体表構造の観察は体環数の観察とともに, *Brugia malayi* と *B. pahangi* 仔虫, あるいは *D. immitis* と *Dipetalonema reconditum* 仔虫のごとく形態が類似する仔虫の比較研究に興味ある所見を与えるであろう.

Kozek (1968, 1971), McLaren (1969, 1972), Tongu (1974) は糸状虫仔虫の超薄切片の観察により仔虫の頭端に Amphids の前階物と考えられる2つの Cephalic ciliary channels と1つの Buccal capsule が開口することを記載している. SEM で観察された犬糸状虫仔虫の半球状頭端部には径約 0.1μ の2つの小孔が見られる. SEM 所見のみでは小孔がいかなる器官の開口部であるか不明であるが, Tongu (1974) 等の記載より中央に存する小孔は Buccal capsule, 鉤の対側に存する小孔は Cephalic ciliary channels の1つの開口部と考えられる. 他の Cephalic ciliary channel の開口部は鉤の内側に開くとされており, 鉤が外転した仔虫では SEM 下に観察されるであろう.

以前より犬糸状虫仔虫の頭端に鉤が存在することは知られている. 最近 Kozek (1971), McLaren (1972) は TEM 下に鉤の存在を確認しているが, SEM 観察より鉤の形, 存在部位について更に詳しい知見が得られた. 鉤は頭端部より後方にのび, 通常第一体環表面より外側に存在するが, 時に鉤が第一体環に被れていることもある. Esslinger (1962) は生きた *B. pahangi* 仔虫の鉤が前方に反転することを報告しているが, 上記 SEM の所見からも鉤は筋の収縮により外転, 内転をくり返し, 何等かの生物学的働きをもつものと考えられる. 本研究では Kozek (1968), McLaren (1972) により鉤の近くに存在すると記載されている Lip 様構造は全く観察されなかった. おそらく彼等は第一体環と第一輪状溝をあやまって Lip と記載したのでであろう. Laurence (1968) は *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *B. pahangi* 等の仔虫の頭端には鉤以外に数本の棘突起があることを特殊染色を行い認めている. *B. pahangi* 仔虫の SEM 像には明かに鉤の対側の第一体環に3本の棘突起が見られるが (未発表), 犬糸状虫仔虫にはこの棘突起は存在しない. 更に Laurence (1968) は各種糸状虫仔虫の鉤の周囲に鉤の支持組織や Oral ring があると記載している. 犬糸状虫仔虫の頭端体表にはこの様な構造はなく, Mc-

Laren(1972)が記載した8個のCephalic papillaeとともに半球状頭端部の内側に存在する器官であろう。Phasmidの前階物と考えられているCaudal ciliary channelsの開口部が犬糸状虫仔虫の肛門孔の後方にあることがKozek(1968)によって報告されているが、SEMでは観察されない。この開口部は極めて小さく、又粘液様物質で開口部が塞がれ観察されないのであろう。

摘 要

走査型電子顕微鏡を用いて犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* 仔虫の体表微細構造を観察した。仔虫の体表

には頭端より尾部まで虫体長軸に直角に、ほぼ等間隔に走る約310個の輪状溝が存在する。各体環表面は全く平滑である。時に輪状溝の分岐が見られる。頭端は半球状を呈し、その一端より長さ0.4~0.6 μ の鉤が後方にのびる。又頭端にはCephalic ciliary channelとBuccal capsuleの開口部と考えられる2つの小孔が、頭端中央部と鉤の対側に存在する。排泄孔は頭端より約83番目の体環中央部に開き、一般に円形を呈す。肛門孔は尾端よりほぼ93番目の体環中央部に存し排泄孔より大きく楕円形を呈している。尾端に近づくにつれ、各体環は小さくなり、尾端近くでは一見連珠様を示す。尾端より4~5 μ の部分は棍棒状でその表面には輪状溝は認められない。

文 献

- 1) Allison, V. F., Ubelaker, J. E., Webster, R. W. Jr. & Riddle, J. M. (1972): Preparation of helminths for scanning electron microscopy. *J. Parasit.*, 58, 414-416.
- 2) Esslinger, J. H. (1962): Behavior of microfilariae of *Brugia pahangi* in *Anopheles quadrimaculatus*. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 11, 749-758.
- 3) Fülleborn, F. (1912): Zur morphologie der *Dirofilaria immitis* Leydi 1856. *Centralbl. f. Bakt. etc.* I. Abt. Originale., 65, 341-348.
- 4) Green, C. D. (1967): Preparation of nematodes for examination under the stereoscan electron microscope. *Nematologica*, 13, 279-282.
- 5) Hammond, R. A. (1969): The preparation of nematode material for scanning electron microscope. *J. Microscopy*, 90, 273-274.
- 6) Hockley, D. J. (1968): Scanning electron microscopy of *Schistosoma mansoni* cercariae. *J. Parasit.*, 54, 1241-1243.
- 7) 板垣四郎, 久米清治 (1938): 犬糸状虫 *Dirofilaria immitis* の研究. 中央獣医学雑誌, 51, 1059-1263.
- 8) Johnson, K. H. & Bemrick, W. J. (1969): *Dirofilaria immitis* microfilariae: Electron microscopic examination of cuticle and muscle cells. *Amer. J. Vet. Res.*, 30, 1443-1450.
- 9) Kozek, W. J. (1968): Unusual cilia in the microfilaria of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasit.*, 54, 838-844.
- 10) Kozek, W. J. (1971): Ultrastructure of the microfilaria of *Dirofilaria immitis*. *J. Parasit.*, 57, 1052-1067.
- 11) Laurence, B. R. & Simpson, M. G. (1968): Cephalic and pharyngeal structures in microfilariae revealed by staining. *J. Helminth.*, 42, 309-330.
- 12) Madden, P. A., Tromba, F. G. & Vetterling, J. M. (1970): En face views of *Ascaris suum* with the scanning electron microscope. *J. Parasit.*, 56, 202-203.
- 13) McLaren, D. J. (1969): Ciliary structures in the microfilaria of *Loa loa*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 63, 290-291.
- 14) McLaren, D. J. (1972): Ultrastructural studies on microfilariae (Nematoda: Filarioidea). *Parasit.*, 65, 317-332.
- 15) Miller, F. H. Jr., Tulloch, G. S. & Kuntz, R. E. (1972): Scanning electron microscopy of integumental surface of *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.*, 58, 693-698.

- 16) Morris, G. P. (1973): Scanning electron microscopy of trematodes embedded for transmission electron microscopy. *J. Parasit.*, 59, 806-809.
- 17) Sonoda, M. & Kobayashi, K. (1965): Electron microscopic studies on the morphology of microfilaria of *Dirofilaria immitis*. I. Observations of the whole body. *Jap. J. Vet. Res.*, 13, 67-71.
- 18) Taylor, A. E. R. (1960): Studies on the microfilariae of *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis*, *D. repens* and *D. aethiops*. *J. Helminth.*, 34, 13-26.
- 19) 徳永純一, 幡場良明 (1971): 生物試料の調製と二次電子像の形態学的分析の問題点. *細胞*, 3, 17-31.
- 20) Tongu, Y. (1974): Ultrastructural studies on the microfilaria of *Brugia malayi*. *Acta Medica Okayama*, 28, 219-242.
- 21) Ubelaker, J. E., Allison, V. F. & Specian, R. D. (1973): Surface topography of *Hymenolepis diminuta* by scanning electron microscopy. *J. Parasit.*, 59, 667-671.
- 22) Weise, R. W. (1973): *Ascaris suum*: A scanning electron microscope study. *J. Parasit.*, 59, 141-146.