

# 琉球大学学術リポジトリ

[原著] フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する研究  
(FN-2)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学保健学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 与都嶺, 毅, Yonamine, Tsuyoshi メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016375">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016375</a>

## フィラリア仔虫定期出現性の機序に関する 研究 (FN - 2)

与那嶺 毅

鹿児島大学医学部第一内科学教室部外研究生

(主任 金久卓也教授)

琉球大学保健学部附属病院内科

(主任 三村悟郎教授 指導 榎屋富一前教授)

### はじめに

本年(1979)はSir Patrick Mansonが華南厦門の地で一中国人の血中*Mf. bancrofti*(当時は*Filaria sanguinis hominis*)が夜間にのみ末梢血に出現することを見出し清帝国海港税関医報(Medical Reports, China Imperial Maritime Customs, Shanghai No.18, 31-51, 1879)に報告し本現象の存在を確立してより正に100年目に当る。

Manson 卿自身は本虫が夜間吸血性の蚊によって伝播されることをみとめ、蚊に吸血されて伝播される為媒介者の習性に合わせて末梢血に出現すると主張した。そして「自然界において常に遭遇する適応の多くの驚く可き例の一つに過ぎない」とした。

固よりこれは目的論であってなんら本現象の機序に触れたものではない。

以後、今日に至るまでに内外多数の学者によって数々の観察あるいは考察が加えられた。(表1)

Lane (1926, 1933) O'Conner (1931)の母虫が一斉に仔虫を分娩し毎日仔虫が死滅するとの学説は久米、大石(1957)の*Dirofilaria immitis* 感染犬において成虫を除去した後も仔虫の定期出現性が持続するとの画期的業績によって完全に否定された。

菅沼(1921)は*Wuchereria bancrofti*感染の人で、また村田(1933)は*Dirofilaria immitis* 感染犬で日光または紫外線照射下に定期出現性の

乱れを見出し両仔虫の日光あるいは紫外線忌避の学説を提唱したが、この極めて重大と思われる研究はその後の研究者の追試確認を受けることなく、これを無視した研究が行われて来た。

菅沼は*Mf. bancrofti* 保有者を暗室において *in vivo* の *negative heliotropism* をみとめた後 *in vitro* でもその観察を行っている。すなわち、連結した2本の注射器の一方には*Mf. ⊖*の血液を入れて光を遮断し、他方には*Mf. ⊕*の血液を入れてこれを日光を直射したところ、時間の経過と共に*Mf.* が遮光注射器の方に侵入するのを見とめて

Hawking 一門(1956-1967)のOxygen barrier theoryが広く喧伝されたが、彼の分類(1967)の第二群には昼間出現性の*Loa loa*と共に夜間出現性の種も含まれ、本現象の機序の説明に大きな矛盾を露呈している。中国の王中芳ら(1958)は華南福州において昼間にも出現する仔虫(*Bancrofti*)を見出しその大きさを比較し昼間に出現しているものは夜間に出現するものより小形であるとした。

吉田朝啓は長崎大学において研究中、1962年5月より沖縄より南米ボリビアに移民する沖縄県民に同行し、その中の*Mf. bancrofti* 保有者につき航路途上の各地点において時間的に末梢血中仔虫を算定し、各検索地点毎に、仔虫は日没後に出現し、日出前後に消失し、地球の裏側に至る間に*Mf. bancrofti* のTurnus が逆転することを人体において証明した。

Table 1 Theories on the mechanism of the filarial periodicity

Manson (1879, 1891) Lane (1929, 1933)	Teleological theory Synchronized, expulsive emptying parturition, impending larvicidal mechanism.
O'Connor (1931)	Simultaneous cyclical parturition and daily destruction of the previous night's brood of microfilariae
Manson (1883)	Microfilariae survive 100 hrs.
Taniguchi (1905)	Yes, including many other workers.
Hawking (1940)	14 days
Kume and Ohishi (1957)	Turnus continues, after the removal of adult canine heart worms.
MacKenzie (1881)	Inversion of the turnus, by inversion of activity and sleep.
Linstow (1892)	Sleep causes capillary dilatation, awakening causes constriction.
Scheube (1896)	Sleep, rest in horizontal position, activate lymph flow.
Ishiguro (1905)	No
Taniguchi (1905)	No
Rodenwaldt (1909)	Blood pressure theory
Yamada and Yamamoto (1916)	Tropism for CO <sub>2</sub>
Lancereaux (1888)	Negative heliotropism, without evidence.
Suganuma (1921)	Negative heliotropism in <i>Mf. bancrofti</i> .
Murata (1939)	Negative tropism against UV-light, in <i>Mf. immitis</i> .
Masuya <i>et al.</i> (1958)	Site of diurnal concentration of <i>Mf. bancrofti</i> to be the lungs.
Katamine (1959)	Electroshock, forced labor disturb turnus, <i>Mf. immitis</i> .
Yoshida (1966)	Complete inversion of the turnus, ( <i>Mf. bancrofti</i> ) in the emigrants from Okinawa to Bolivia, in 116 days.
Hawking (1967)	Oxygen barrier theory
Masuya (1970)	Photodynamic substance theory

(Reprinted from Masuya)

梶屋 (1952-58) は鹿児島大学第一内科の共同研究者と共に始め宿主側の *Mf. bancrofti* 保有者の血液学的、生化学的所見、自律神経機能の昼夜の変動を検出することに努めたが、画然たる成績を得ることが出来ず、浜田、内園、川崎らと共に肝生検、肺生検、開腹手術時の腹部内臓諸組織、切除肺、さらに静脈カテーテル法を用いて、検索した限りでは仔虫は昼間は肺にのみ集中している事を見出した。

もっとも鶴見、武田 (1940) が既に戦時中沖縄において皮下用長針を用いて昼間肺穿刺を行って仔虫を発見し診断的価値の高いことを報告しているが、あくまで診断率の向上を目的としたもので本現象の機序についてなんらの考察も加えていない。

然らば夜間いかにして肺より末梢血に遊出する

かについて梶屋は鹿児島大学第一内科在勤中多数の共同研究者の熱心な協力の下にさらに種々の観察を行ったが、少なくとも宿主側には昼夜において決定的な要因を見出すことが出来なかった。

1958年梶屋が鹿児島大学を去ると同時に本研究を断念せざるを得なかったが、予ねてポルフィリン症の臨床研究中、夜間出現仔虫の体内に何らかの光力学物質の存在を想定していたが、1970年4月15日 *Mf. bancrofti* を蛍光顕微鏡下に検索し無数の自家蛍光顆粒を発見した。

以後、低度夜間性のイヌの *Dirofilaria immitis* 仔虫には少数の自家蛍光顆粒をみとめ、また非周期性の cotton rat の *Litomosoides carinii* 仔虫には何らの蛍光も存在しない事を見出し、同年9月 Washington D. C. での第2回国際寄生虫学会において蛍光顕微鏡映画を供覧すると共に光

力学物質説を提唱した。

著者は榊屋が琉球大学在学中より本研究の一部を分担し

① 仔虫内光力学物質の本態解析の一例として凍結破断—走査電子顕微鏡的検索

② *Mf. immitis* の in vitro における negative phototaxis について検索を行い  
若干の知見を得たので報告する。

## 材料及び方法

### I 凍結破断—走査電子顕微鏡的観察

本研究は仔虫の自家蛍光顆粒を若し仔虫の凍結破断面に捕捉し得るならば、さらに電子ビームを用いて物質の解析を行う目的で開始したものであるが、後述の如く若干の知見を得ることは出来たが、それ以上の解析用器材入手には巨額の費用を要する事が判明し、単に形態学的知見を記述したに止まらざるを得なかった。

材料はイヌ末梢血中 *Dirofilaria immitis* 仔虫、イヌ右心室内雌成虫の子宮より圧出した最幼弱仔虫（蛍光顕微鏡下にて蛍光顆粒を検出し得ない）、および米国由来のイヌ（沖縄）寄生の *Dipetalonema reconditum* 仔虫（Newton & Wright 1956, によれば仔虫の末梢出現は正午と午後6時以後の二峰性）を用いた。この場合毎回イヌを屠殺し右心室内および肺動脈に成虫の存在しない事をたしかめた。

さらに長崎大学熱研においてイヌに感染せしめた *Brugia pahangi* の仔虫をも検索した。本仔虫はロンドン熱帯医学校のネコについて Dr. Denham と共に榊屋が検索した末梢血中夜昼比は3.0、青木が長崎大学熱研のイヌで検索したものは2.8で近似していた。蛍光顕微鏡的には全く蛍光顆粒を認めない仔虫が多く、一部仔虫に少数の微細蛍光顆粒を示すものがあつた。

ヘパリン血を冷水、または0.5%サポニン生食水溶液にて溶血、遠沈後、沈査を0.1M, pH 7.3の phosphate buffer にて2回以上洗い、度毎に遠沈した。

固定は2.5% glutaraldehyde phosphate buffer にて30分間行った。

脱水は50~90%エタノール系で行い各濃度毎に

遠沈を繰返し最後に100%エタノール中に保存した。

沈査を isoamyl acetate 中に分散させその数滴を液体窒素中で凍結した。凍結破断した数片を isoamyl acetate に移し室温空气中に放置した。一滴をとって臨界点乾燥し、乾燥標品を銅ブロックに貼布し、電気伝導性 dotite を以て接着し、イオン化真空ゲージ (Model JVG-N<sub>1</sub>) 中にて炭素および金を15分間蒸着鍍金した。走査電子顕微鏡は JSM-50A を用いた。

### II 仔虫の negative phototaxis 観察

材料はイヌの末梢血中仔虫 (*Dirofilaria immitis*)—沖縄のイヌには *Dirofilaria immitis* 寄生少なく、材料はすべて福岡、関東のイヌより採取した。

(i) 仔虫含有イヌよりヘパリン採血したものをそのまま用いた。

(ii) ヘパリン血を遠沈して血清を分離し、沈査に0.5%サポニン生食水溶液を加えて溶血し遠沈し、生食水で2~3回洗浄遠沈を繰り返す、最後の沈査を宿主血清に懸濁した。

#### 観 察 法

① ペトリ皿の $\frac{1}{2}$ をアルミホイルでおおったプラスチックの蓋でおおいヘパリン血、後には宿主血清懸濁仔虫をペトリ皿に容れ、蓋の上方10cmより紫外線照射を行い、10-15分おきに照射部、暗部の双方より同時にザーリピベットを用いて0.02 ml ずつ採血した。暗部よりの採血時以外は遮光出来る第2の蓋をした小孔より行った。仔虫算定は型の如く行った。(図1)

② 二枚の蛍光顕微鏡用スライドガラスの $\frac{1}{2}$ を片面ずつ黒、その他赤、橙、黄、緑、青のマジックインキを塗布、二枚のガラス間に仔虫懸濁血清を置き下方より照明を当て同一視野に着色部と明部を鏡検、5-10分毎に写真撮影を行った。(図2)

③ ②の実験で始めアルミホイルで $\frac{1}{2}$ をおおって観察中仔虫が明部より暗部に逃げ込むのがみとめられたが、アルミホイルの厚さが写真撮影、映画撮影を困難にした。1979年夏にいたり Bolex 16mm, camera を用いて映画撮影を行った。二枚のスライドガラスの $\frac{1}{2}$ を片面ずつ各種色マジックインキを塗布、または各種色セロファン紙で遮光し、色による反応の相異も観察した。フィルムは

Fuji color Reversal film RT125を用いた。

Hemolyzed blood or serum-suspended *Mf. immitis*, put in Petri dish, partially covered with plastic lid, covered with aluminum foil.

UV-illumination (Wood's lamp), 10cm distant over the lid. Pipeting the sample, 0.02ml, every 15-20 minutes from bright and dark parts.

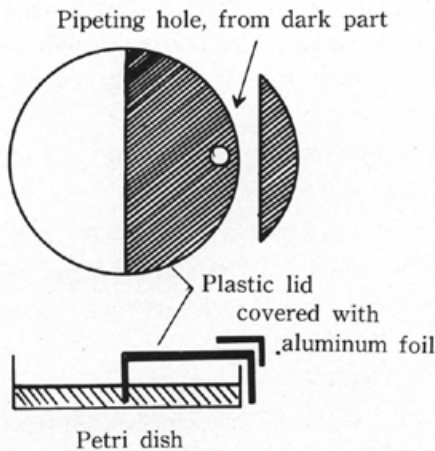


Fig. 1

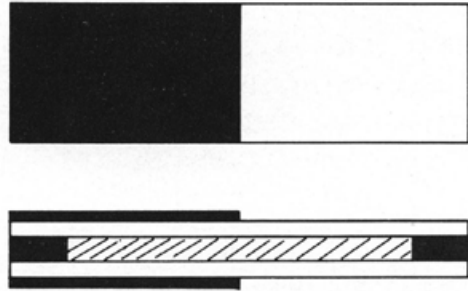
## 成 績

### I 凍結破断—走査電子顕微鏡所見

1. 末梢血中 *Dirofilaria immitis* 仔虫は写真1~6の如く各破断面に5~10個の直径0.1~0.35 $\mu$ におよぶ大小の球状体が検索したすべての仔虫についてみとめられた。ある球状体は仔虫体表面に、また一部は仔虫に近い背景にみとめられた。仔虫凍結破断時に脱落したものと解せられた。

2. 子宮内 *Mf. immitis* イヌ右心室内雌成虫の子宮より圧出した乳白液中には卵のみ（孵化の各段階が認められる）の場合もあるが運よく運動する仔虫を検出し得ることがある。これら仔虫は乾燥固定後あるものは屈曲しあるものは伸展している。すべて蛍光顕微鏡下で蛍光顆粒は検出できな

Experimental method of examination of negative phototaxis of *Mf. immitis*, in vitro.



Heparinized canine blood was centrifuged, serum being separated. The sediment was hemolyzed with 0.5% saponin-saline solution. Washed twice or thrice, with saline, repeating centrifugation. The last sediment was suspended in the host's serum. Two or three drops of such suspension were put between two pieces of thin slide glass, half of the length of each piece being painted with black or colored ink, or covered with colored cellophane, as shown in this figure. Illumination was done from the bottom.

Photomicrography or cinemicrography was done.

Fig. 2

い。

その走査電顕像は写真7~11の如く末梢血中仔虫の破断面にみとめられた球状体を何れの仔虫、何れの破断面にも検出できなかった。なお写真12は偶然に雌成虫の子宮の断端が子宮内仔虫採取時に混入したものであるが多数の胎内仔虫が蜂巢状の胞内にみとめられる。

3. 沖縄犬の末梢血中 *Dipetalonema reconditum* 仔虫には蛍光顕微鏡下で全く蛍光顆粒をみとめないものと、少数の細小顆粒をみとめる二種類を検出するが走査電顕像でも写真13~14の如く少数の小球状体を示すものと、どの破断面にも全くこれを見とめないものとがあった。

4. 長崎大学の保存のイヌより採血した *Brugia pahangi* 仔虫にも前述の如く蛍光顆粒を全くみと

めないものと少数の微細蛍光顆粒をみとめる二種類が混在するが、凍結破断一走査電顕像上でも球状体を全くみとめないものと仔虫周辺に微細球状体を検出するものがあった。(写真15~18)

## II *Mf. immitis* の negative phototaxis の観察

### ① ペトリ皿—紫外線照射下の所見

- (i) ヘパリン血そのままを用いた場合は表2(1)及(2)に示す如く照射部と暗部との仔虫分布に明らかな差異を見出すことが出来なかった。この場合ミキサーないしスターを使用しなかった為かヘパリン血といえども観察中に粘稠となり、恐らく仔虫の運動が阻害された可能性が考えられた。
- (ii) よって溶血、遠沈、洗浄、宿主血清にて懸濁した仔虫を用いて観察したところ表2(3)の如く特に照射120分後に暗部には明部(照射部)の仔虫数の実に10倍以上が検出された。次の実験シリーズでも表2(4)の如く15分ですでに暗部には2倍の仔虫がみとめられ、また別の観察時には30分で明らかに暗部に多く検出された。

Table 2. Negative phototaxis of *Mf. immitis* in vitro (Petri dish) under UV-illumination

(1) Heparinized blood				
Time	0	30	60	120minutes
Dark	872	1,076	1,243	
Bright	1,004	1,080	1,492	
(2) Heparinized blood				
Dark	984	1,112	1,419	1,166
Bright	1,029	1,109	1,381	1,515
(3) Hemolyzed and serum-suspended mf.				
Dark	1,183		1,221	3,532
Bright	1,187		1,079	295
(4) Hemolyzed and serum-suspended mf.				
Time	Bright	Dark		
15minutes	1,632	3,453		
30	1,945	3,177		

### ② スライドガラス上の観察

宿主血清懸濁仔虫を2枚のガラスの間におき下方よりの照射を強くすると、観察の始めには明暗部の双方に均等に分布していた仔虫が(写真撮影

は観察開始5分後で明部に5匹、暗部に5匹)、ゴミの存在から同一視野であることが明らかであるが、30分後には明部に2匹、暗部に9匹を数えた。(写真19~20)

色別には赤色インキでも赤色部に移動したが、青、緑色では明らかな差異を検出出来なかった。

### ③ 映画撮影による観察

①及び②の観察で *Mf. immitis* の negative phototaxis を観察し得たと考えるが更に逃避の運動を映像化する為仔虫の宿主懸濁液を2枚のガラスの間におき下方より強照明を行いつつ Bolex 16mm映画を24コマ撮影した。*Immitis* 仔虫が明らかに暗部に逃げ込む所が捕えられた。

ある仔虫は比較的速やかに10秒以内に逃げ込むが、ある仔虫は緩慢に逃げ込むのが見られた。

色別に黒、赤、橙、黄色までは逃げ込むのが見られたが、緑、青色では著明な変化をみとめなかった。

## 総括並びに考按

以上、著者はManson 卿の発見以来100年間の謎とされるフィラリア仔虫定期出現性の機序に関する樹屋の光力学物質説の作業仮説に基き2, 3の実験的観察を試みて次の如き知見を得た。

1. イヌ末梢血中 *Mf. immitis*, イヌ右心室内雌成虫子宮より圧出した幼弱仔虫、および沖縄イヌ末梢血中 *Dipetalonema reconditum* の仔虫の凍結破断一走査電子顕微鏡観察を行って、末梢血 *Mf. immitis* ではすべての破断面に5-10個の直径0.1~0.35 $\mu$ の大小の球状体をみとめたが、蛍光顕微鏡下に蛍光顆粒を検出出来ない子宮内幼弱仔虫の破断面にはこれを全く検出出来なかった。蛍光顕微鏡下少数の小蛍光顆粒を示すものとこれを全く欠く2種類の仔虫の混在する *Dipetalonema reconditum* 仔虫の破断面には少数の小球状体を示すものと、これを全くみとめない2種類があった。

イヌ、ネコの *Brugia pahangi* 仔虫は末梢血中夜昼比が2.8~3.0で蛍光顆粒を全く検出出来ないものと、少数の微細蛍光顆粒を見るものがあるが、走査電顕上も各破断面に全く球状体を検出せず、ただ虫体周辺の背景に微細球状体が散在するものがみられるものがあった。この場合、仔虫体

の破断面には全く球状体を検出し得なかったので、背景の散在する小球状体が破断面より脱落したものと否かは俄かには断じ難い。

2. *Mf. immitis* の宿主血清懸濁液を用いて紫外線照射または顕微鏡用照明を行って、その negative phototaxis を in vitro で証明し得、かつ映画撮影にも成功した。黒、赤、黄色までには本反応がみられたが、緑、青色では明らかに見られなかった。

榎屋 (1970 ~ 1976) は世界各地のヒト、動物のマイクロフィラリア 13 種 21 株について仔虫体 (横断面では体表に近い) の自家蛍光顆粒存否、およびその密度と末梢血中仔虫数の夜昼比との間に近似的平行関係を見とめ、骨髄性ポルフィリン症における皮膚の日光過敏症とポルフィリン体の皮膚沈着、溶血性貧血の合併、日光溶血とポルフィリンに富む赤色蛍光赤血球の存在とを参照して、フィラリア仔虫定期出現性の機序として光物理学物質説を提唱した。

すなわち、自家蛍光顆粒 (光物理学物質) を多量に有する仔虫は皮下毛細血管内において日光により刺激を受けるであろう。この刺激の強さは仔虫の光物理学物質の含有量と皮下毛細血管中仔虫に到達する励起光の積に比例するであろう。

かくして、これらの仔虫は昼間皮下毛細血管に出現することを忌避するであろう。大循環系において皮下毛細管を退いた仔虫を滞留せしめる如き装置はない。かかる仔虫は昼間よりも夜間に末梢血に出現し夜間吸血性の昆虫により媒介されるにいたった。

*Mf. loa loa* の如く全く光物理学物質を有しない仔虫は、昼間なんらの刺激を受けることなく、末梢血に出現し、昼間吸血性の昆虫により媒介されることとなったであろう。

その光物理学物質の本態については始め flavin 体の存在を見とめたが、flavin 体は蛍光顆粒を有しない子宮内仔虫にも見とめられること、他方蛍光スペクトル解析で夜間性仔虫は 365nm, 410nm 両方の励起で蛍光を発するが、flavin 体は Riboflavin, FMN, FAD, とともに、410nm 励起で発光せぬ事から flavin 体以外の物質が存在すべきことを指摘している。(1976)

著者はその本態追求の為、まず凍結破断一走査

電顕検索を自家蛍光顆粒を有する末梢血中 *Mf. immitis*, 顆粒を有しない子宮内仔虫、また少数の顆粒を有するものと全く有しないものの混在する *Dipetaloneme reconditum* 仔虫について行った。蛍光顆粒を有する仔虫の凍結破断面には電顕上球状体を検出し、蛍光顆粒のない仔虫の破断面にはこの球状体を全く検出し得ない事から、蛍光顆粒がこの球状体と一致する可能性を考えた。(イヌの *Brugia pahangi* 仔虫では少なくとも各破断面には球状体を検出し得ず、背景のみ小球状体が散在した。)

固より固定、プレイティング等の操作に用いた各種物質、又は人工産物の可能性についても専門家の御教示を受けたが、その可能性は否定された。

そのうえでこの球状体について精密な物質の解析を試みんとしたが、解析用器機の入手困難の為此れ以上の追求を断念せざるを得なかった。

しかし形態学的観察からは蛍光顆粒がこの球状体と一致する可能性があり、又子宮内仔虫を電顕的に捕え得たことは新知見と考えられる。(物質本態の追求は別に榎屋、渡久地によって行われ、ミズノの表皮、脊椎動物の網膜の蛍光物質と同様 Vitamin-A 関連の物質であるとの知見が加えられつつある。)

本現象の機序に関する今一つの問題はフィラリア仔虫に光線忌避反応があるか否かの問題である。

上述の如く菅沼 (1921) はヒトの *Mf. bancrofti* につき、村田 (1933) はイヌの *Mf. immitis* について in vivo で negative phototaxis を観察していることになる。菅沼は negative heliotropism と呼んでいるが Strassburger (1878) 以来 "tropism" なる語は生体の一部が示す刺激に向っての運動を、"taxis" なる語は生体全体の刺激に向う運動を示すと定義されている。従って菅沼の negative heliotropism は negative heliotaxis と訂正すべきである。

Boughton, Byrd and Lund は (1938) アメリカカラス (*Corvus brachyrhynchos*) に寄生するマイクロフィラリアは夜間出現性であるが、感染カラスを明暗所を変えることにより定期出現性を逆転出来たとし菅沼、村田に次いで in vivo の negative phototaxis を観察した事になる。但し彼等はこの事実を以て宿主の行動が定期出現性

を変えると解したに止まっている。氏はカラスのマイクロフィラリアを同定していないが、1979年7月29日～8月3日米国ミネアポリスで開かれた米国寄生虫学会の年次総会でカナダのCherryl M. Bartlett 女史とRoy C. Anderson は同国のオンタリオ地方のカラス (*Corvus brachyrhynchos*) に6種の filarioid nematodes の寄生を報告している。

*Chandlerella chitwoodae* 64 %

*Splendidofilaria caperata* 21 %

*Eufilaria* sp. 16 %

*Chandlerella quiscali* 2 %

*Cardiofilaria pawlowskyi* 0.4 %

*Splendidofilaria wehri* 0.4 %

Bartlett らはこのうち *Eufilaria* sp., *Chandlerella quiscali* および *Chandlerella pawlowskyi* に血中仔虫をみとめているがその定期出現性には触れていない。

Boughton ら (1938) が観察したマイクロフィラリアが上記の6種の中いずれか、または全く別なものかは明らかでない。併しカラス寄生のマイクロフィラリアが定期出現性を示し而も明暗によりその逆転を見たとの所見は重要であり、その他の鳥類にも多数のマイクロフィラリアが記述されているので、日本各地の鳥類の血液の調査研究から periodicity の更に詳細な研究が展開されることを待望したい。1979年11月3～4日の日本寄生虫学会南日本支部大会には鹿児島大学農学部の坂本司氏らはカラスのマイクロフィラリアを報告する。

著者は *Mf. immitis* の in vitro における negative phototaxis を証明し得たと考える。

## 結 論

1. イヌ末梢血中 *Mf. immitis*, 雌成虫子宮内仔虫, 沖縄犬の *Dipetalonema reconditum*, およびイヌの *Brugia pahangi* 仔虫の凍結破断—走査電子顕微鏡検索において蛍光顕微鏡下自家蛍光顆粒を有する仔虫破断面には小球状体のみとめ、蛍光顆粒を有しない仔虫の破断面にはこれらの小球状体を全くみとめず、この球状体が蛍光顆粒である可能性が考えられた。これを用いた物質の解

析は必要器機入手不能の為行う事が出来なかった。

2. *Mf. immitis* についてその negative phototaxis を in vitro で証明し得、かつ映画撮影に成功した。

謝辞：部外研究生として本研究遂行の機会をお与え下さり御指導御校閲を頂いた鹿児島大学第一内科金久卓也教授並びに同教室員各位に深甚の謝意を捧げます。

又直接に御指導を賜った琉球大学保健学部附属病院内科三村悟郎教授・榎屋富一前教授に深く感謝いたします。

*Dipetalonema reconditum* 仔虫採取に御協力頂いた沖縄県犬管理所国吉真栄博士, *Dirofilaria immitis* 仔虫, 子宮内仔虫採取に御協力頂いた福岡市武石徳五郎先生, 浦和市三阪力先生, 東京農工大学大石教授, *Brugia pahangi* 仔虫の採取をお許し頂いた長崎大学片峰教授, 青木講師, 走査電顕検索に御援助頂いた昭島市日本電子幡場良明氏, 長沢嬢, 映画撮影に技術的御指導を頂いた東京オリンパス販売株式会社林武彦技師, 九大医療短大田中新一講師に深く感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Boughton, D. C., E. E. Byrd and H. O. Lund: Microfilarial periodicity in the crow. The J. Parasitol. 24, 161-165, 1938.
- 2) Burtlett, C. M. and R. C. Anderson: Filarioid nematodes of the crow in Ontario, Canada: Program and abstracts. The 54th Annual Meeting. The American society of Parasitology. Jul. 29-Aug. 3 in Mineapolis, USA. p.48. 1979.
- 3) 浜田康治：フィラリア症の病態生理に関する研究 (F-9), 肝及び2, 3の腹部臓器におけるマイクロフィラリアの分布について, 鹿大医誌, 9, 1453-1485, 1958.
- 4) Hawking, F.: The periodicity of microfilariae. IV. Stimuli affecting the migration of the microfilariae of *Dirofilaria aethiops*, *D. repens*, *D. immitis*, *Dipetalonema blanci* and *Litomosoides carinii*.



- Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 50, 397-417, 1956.
- 5) Hawking, F., Worms, M. J. and Walker, P. J. : The periodicity of microfilariae. IX. Transfusion of microfilariae into monkeys at a different phase of circadian rhythm. *Ibid*, 59, 26-41, 1965.
  - 6) Hawking, F., Moore P., Gamage, K. and Worms, M. J. : Periodicity of microfilariae. XII. The effect of variation in host body temperature on the cycle of *Loa loa*, *Monongilofilaris setariosa*, *Dirofilaria immitis*, and other filariae. *Ibid*, 61, 674-683, 1966.
  - 7) Hawking, F., Pattanyak, S. and Sharma, H. L. : The effect of body temperature and other stimuli upon the cycle of *W. bancrofti*, *B. malayi*, *B. ceylonensis* and *Dirofilaria repens*. *Ibid*, 60, 497-513, 1966.
  - 8) Hawking, F. and Gamage, K. : The action of serotonin in vivo upon the microfilariae of *Dirofilaria*, *Loa loa* and other five species. *Parasitol.*, 58, 393-402, 1968
  - 9) 川崎兼陽：フィラリア症の病態生理に関する研究(F-10)，フィラリア仔虫の定期出現性機序について，鹿大医誌，8，1486-1512，1958.
  - 10) Lane, C. : The mechanism of the filarial periodicity. *Lancet*, 216, 1291-1296, 1929.
  - 11) Lane, C. : The mechanical basis of periodicity in *Wuchereria bancrofti* infection. *Lancet*. 225, 339-404, 1933.
  - 12) Lane, C. : The periodicity of *Microfilaria bancrofti*. *Lancet*, 29, 1437, 1934.
  - 13) 榎屋富一，浜田康治，内園洋三：フィラリア症の病態生理に関する研究日内会誌，47，478，1958.
  - 14) Masuya, T. : Pathophysiological observations on porphyrias. *Acta Haematol. Jap.*, 32, 519, 568, 1969.
  - 15) Masuya, T. : The autofluorescence in microfilariae and their periodicity. II. Internal Congr. Parasitol. Washington D. C. Sept., 1970.
  - 16) Masuya, T. : Photodynamic substance the theory in the mechanism of the filarial periodicity. Abstract, Ninth International Congr. Trop. Med. Malaria. Athens October, 14-12, 2, 122, 1973.
  - 17) Masuya, T. Studies on the mechanism of the filarial periodicity. - The autofluorescence in the microfilariae and their periodicity *Jap. J. of parasitol.* 25, 283-313, 1976.
  - 18) 村田一：犬糸状虫仔虫の末梢定期出現性に関する実験的研究(1)，福岡医大誌，32，690，1939.
  - 19) 村田一：犬糸状虫仔虫の末梢血管内定期出現性に関する実験的研究(2)，医学研究，13，985～1022，1939.
  - 20) Newton, W. L. and W. H. : The occurrence of a dog filarid other than *Dirofilaria immitis* in the United States. *J. Parasit.*, 42, 246-258, 1956.
  - 21) O'Connor, F. W. O. : Filarial periodicity with observations on the mechanism of migration of the microfilariae from the parent worm to the blood stream. *Puerto Rico J. Publ. Health Trop. Med.*, 6, 263-272, 1931.
  - 22) 大石勇：糸状虫仔虫の定期出現性と成虫との関係について，寄生虫学誌，6，264，1957.
  - 23) 菅沼清次郎：Filaria bancrofti の定期出現性問題に関する研究補随，東医誌，35，381～430，544～583，613～673，1921
  - 24) Strassburger, E. : Wirkung des Lichts und der Waerme auf Schwaersporen. *Jena Z. Naturw.* 12,551, cited by Fraenkel, G.S. and Gunn, D. in 'The orientation of animals, Kineses, Taxes and Compass Reactions'. Dover Publications Inc. New York, 5,1878. 1961.
  - 25) 鶴見三三，武田光磨：人体肺臓器内フィラリア仔虫の昼間検出について，肺穿刺による一診断法，東京医事新誌，3178：631，1940.
  - 26) 内園洋三：フィラリア症の病態生理に関する研究(F-23)肺生検及び腎生検を中心とし

- たマイクロフィラリアの定期出現性機序に関する実験的考察, 福岡医誌, 52, 89-110, 1961.
- 27) Wan C. F., Lin, C. L. and Ch'en, W. H.: The mechanism of microfilarial periodicity. Chinese J. Med. (Peking), 77, 129-135, 1958.
- 28) 吉田朝啓: 琉球におけるフィラリア症の研究, 沖縄よりボリビア移民のマイクロフィラリア定期出現性の変移, 長大熱研誌, 8, 127-135, 1966.

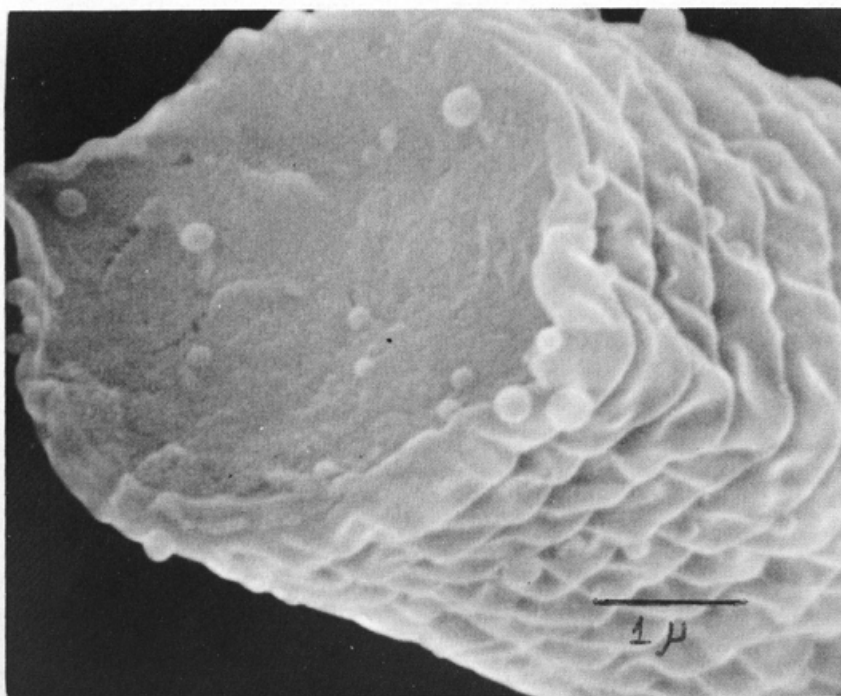


Photo. 1

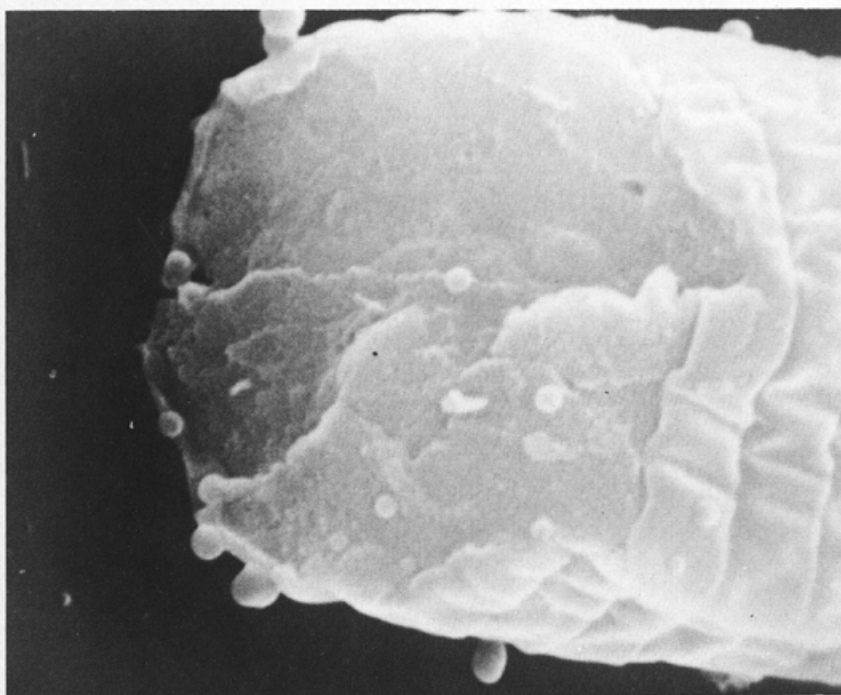


Photo. 2

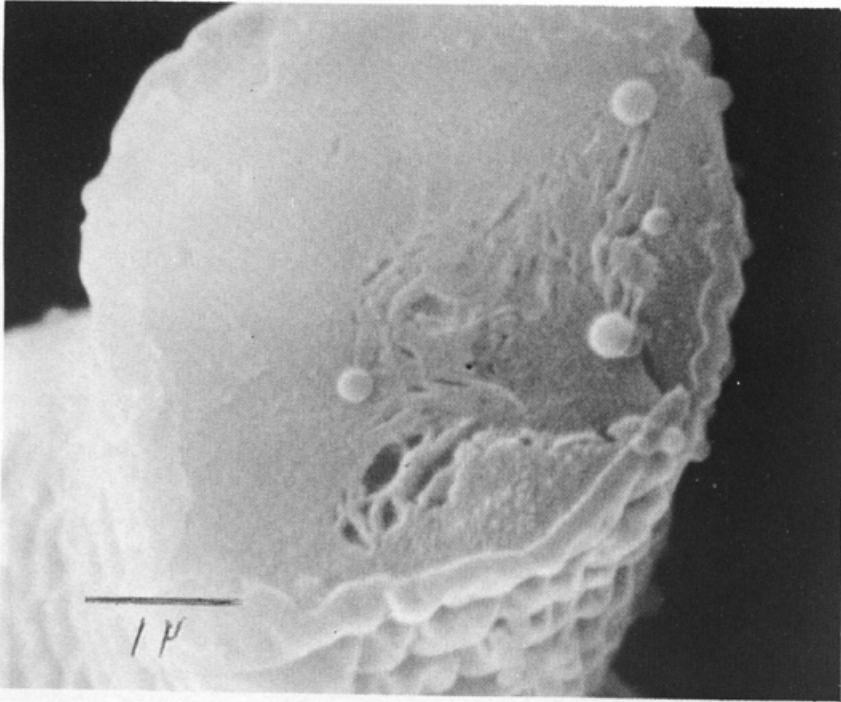


Photo. 3

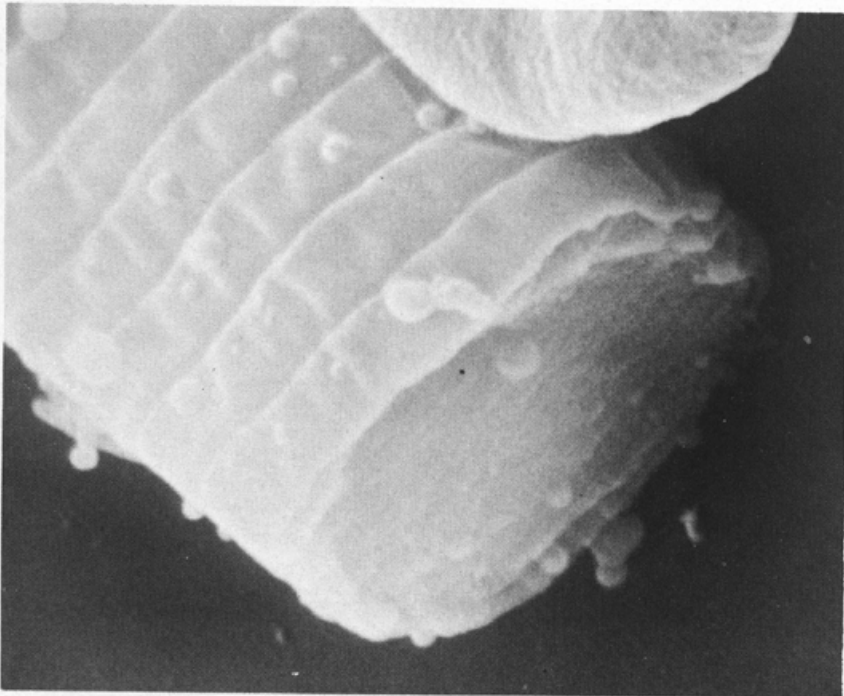


Photo. 4

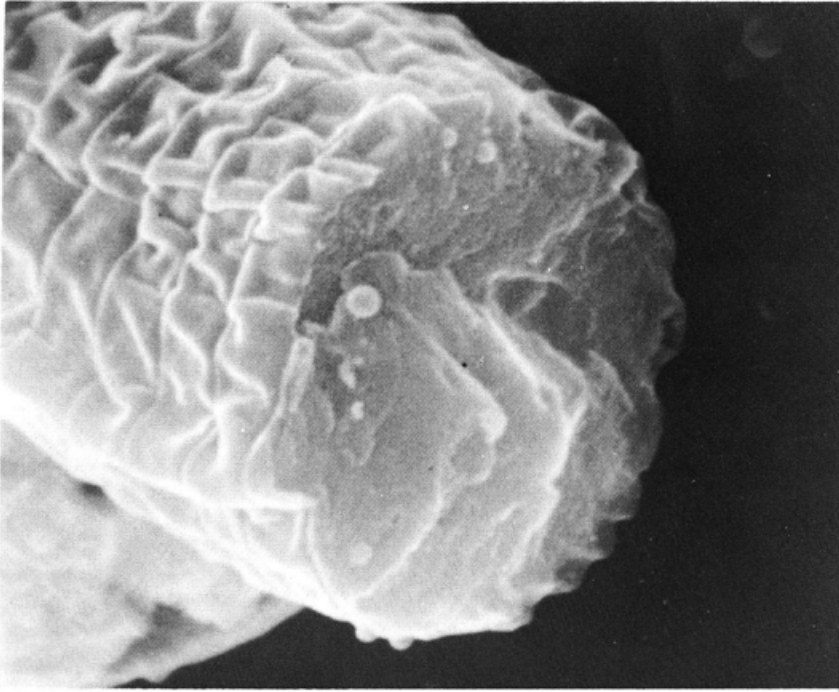


Photo. 5

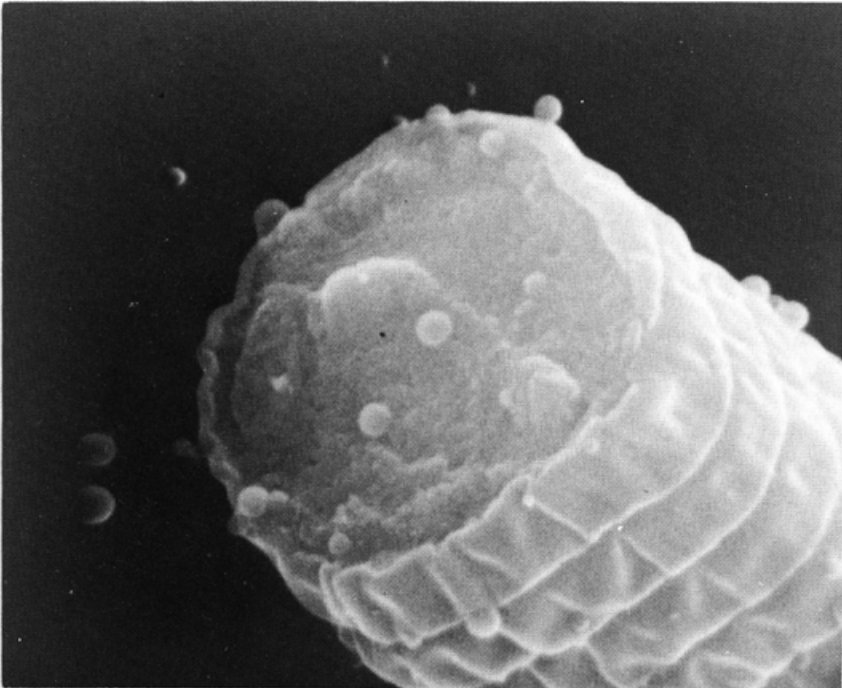


Photo. 6

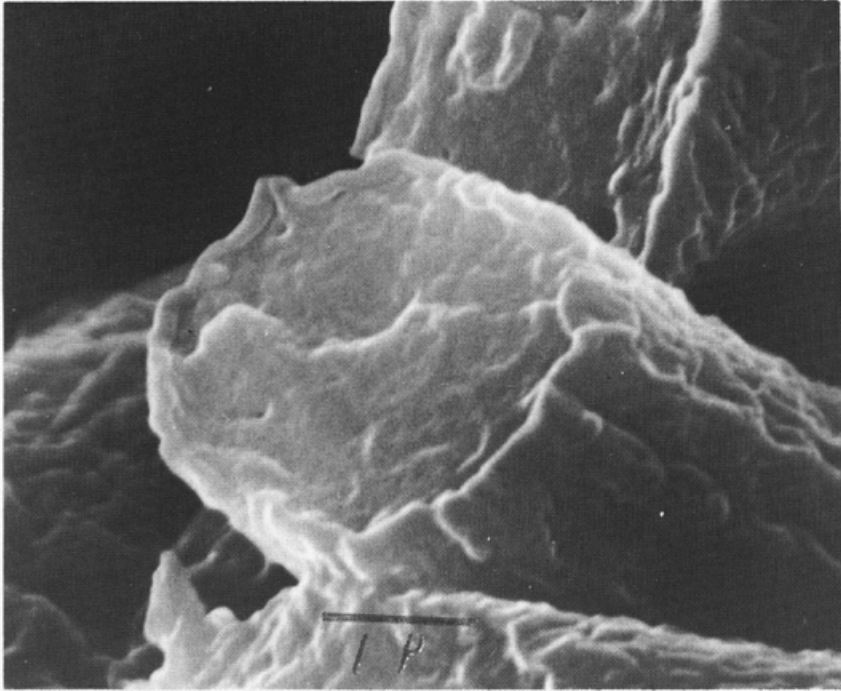


Photo. 7



Photo. 8

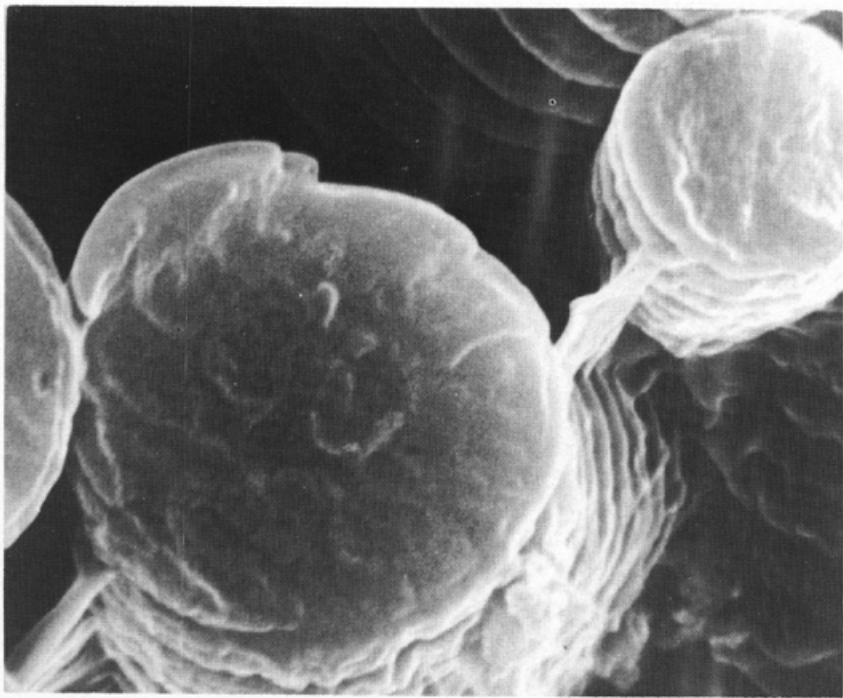


Photo. 9

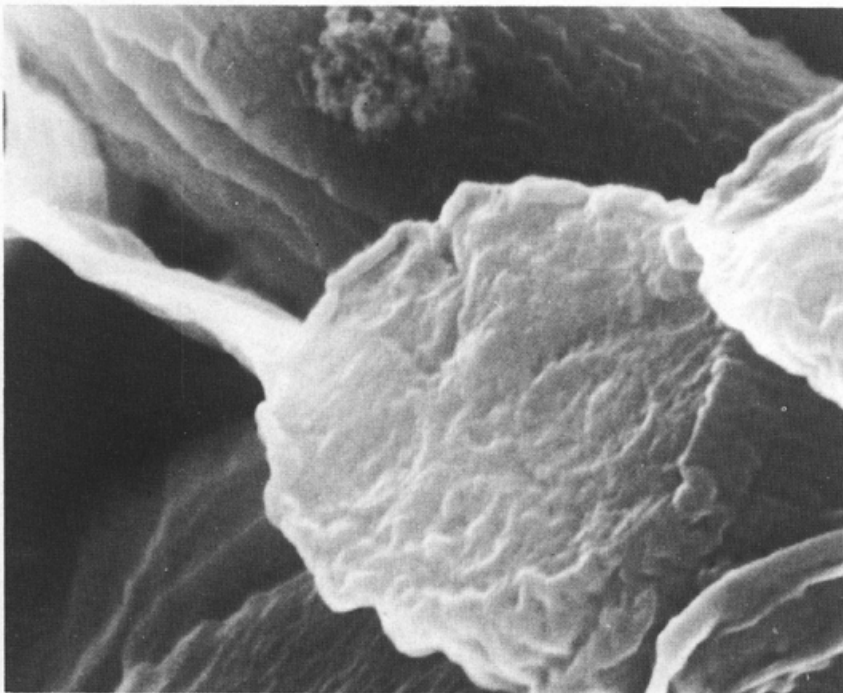


Photo. 10

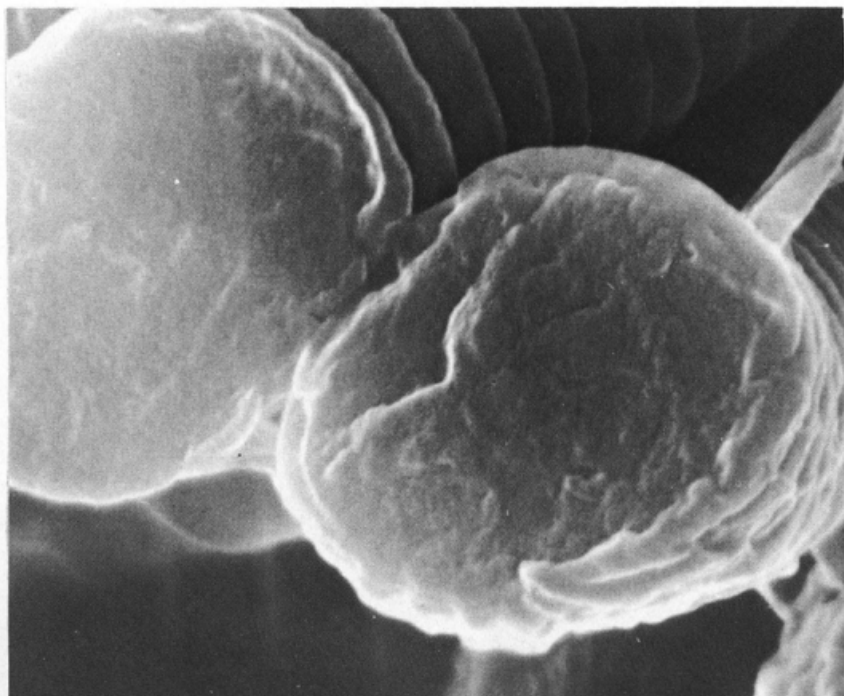


Photo. 11

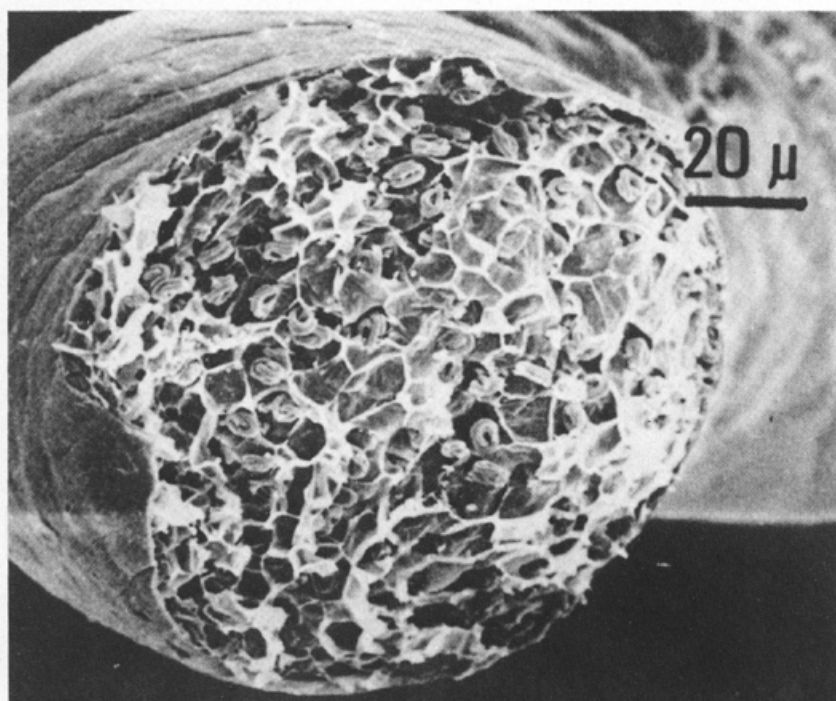


Photo. 12



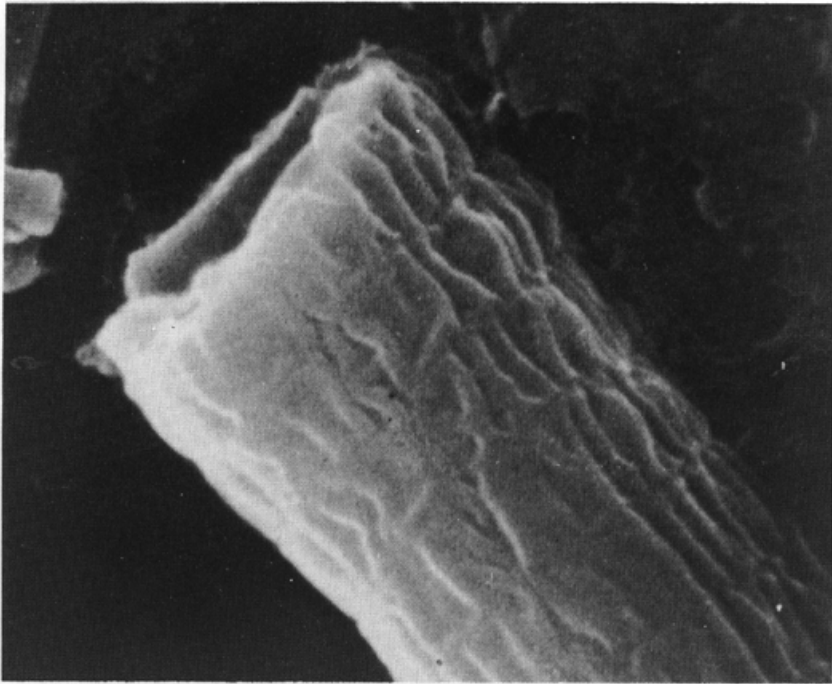


Photo. 13

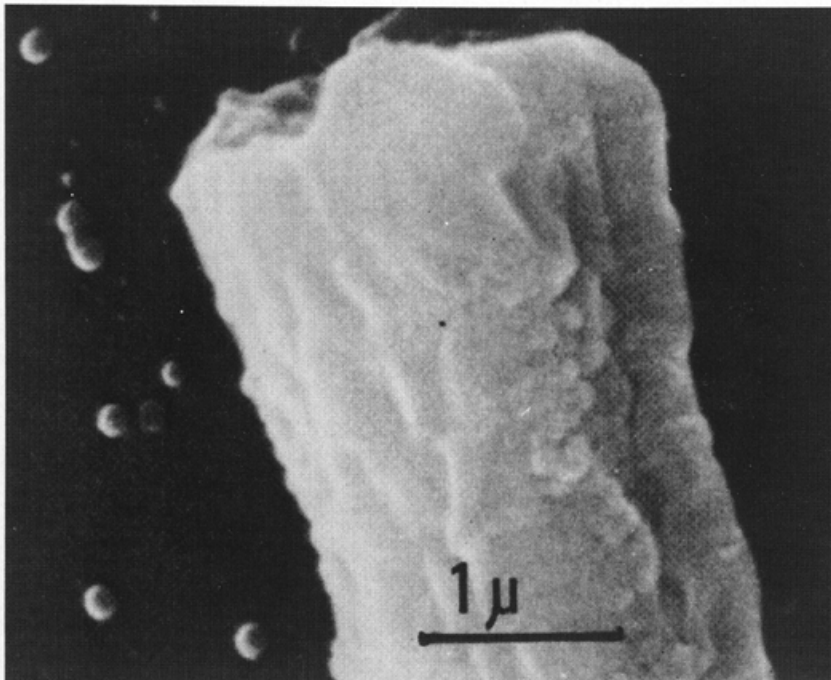


Photo. 14

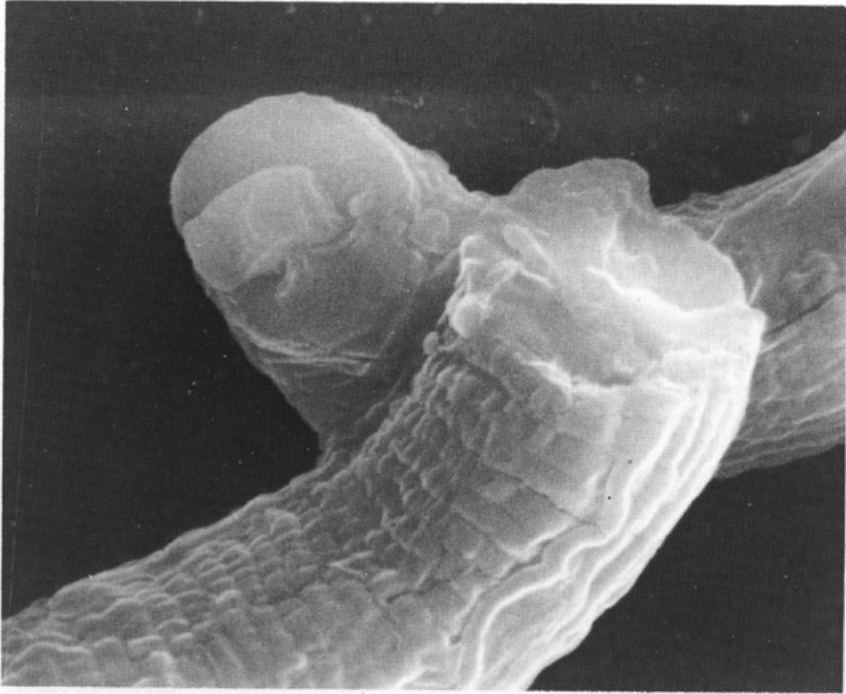


Photo. 15

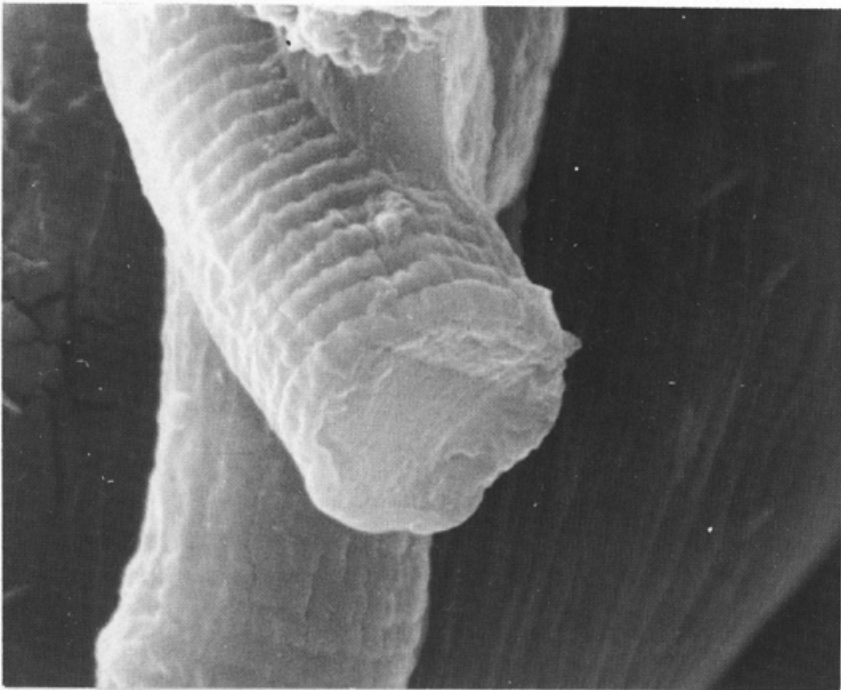


Photo. 16

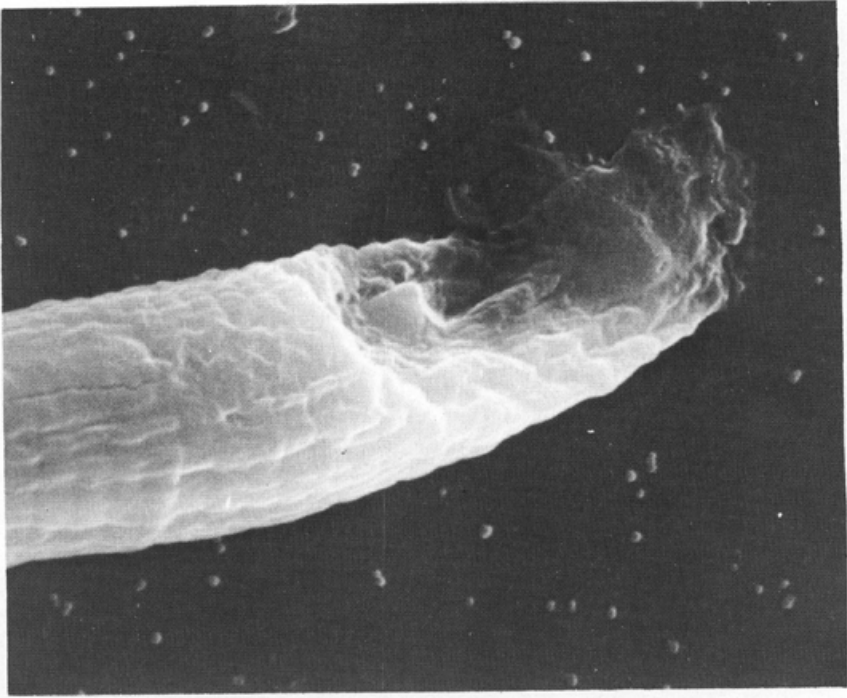


Photo. 17

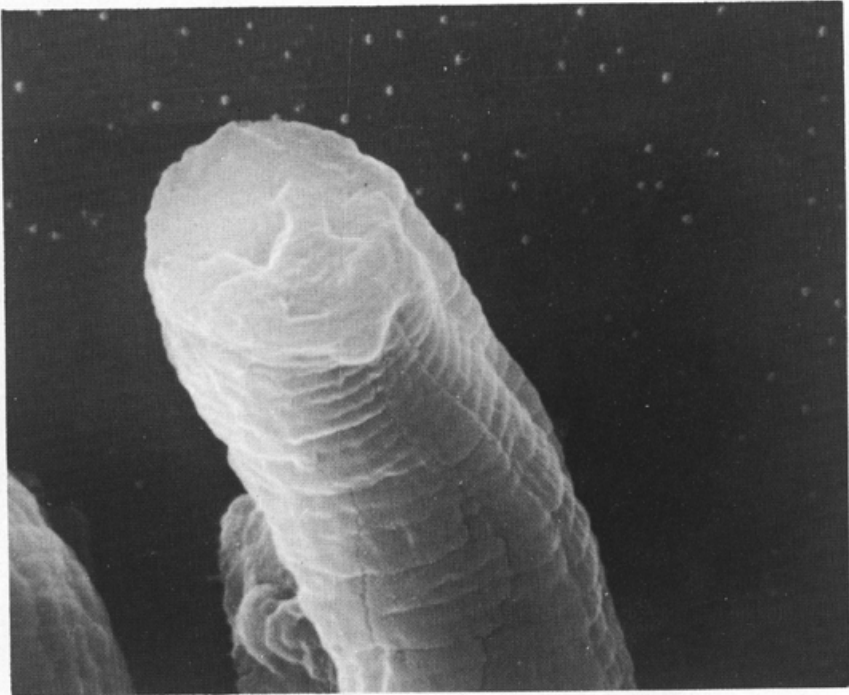
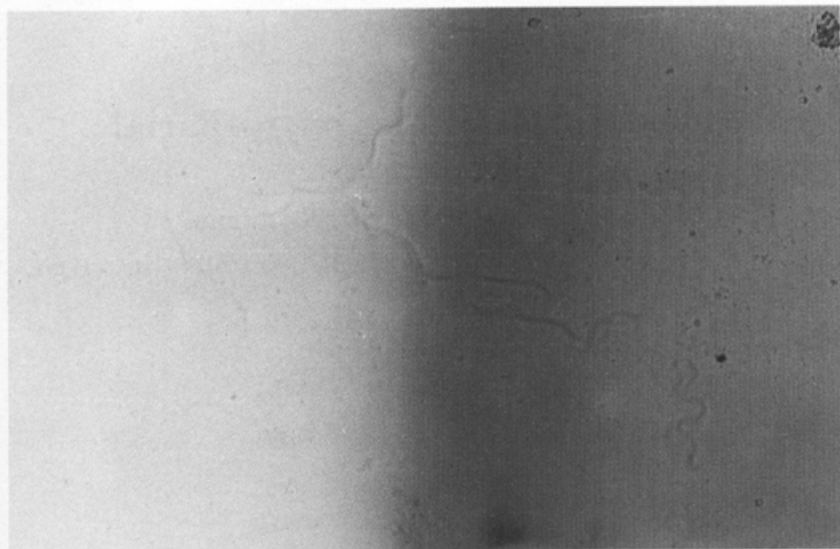


Photo. 18

## フィラリア仔虫定期出現性の機序 (FN-2)



◀ Photo. 19

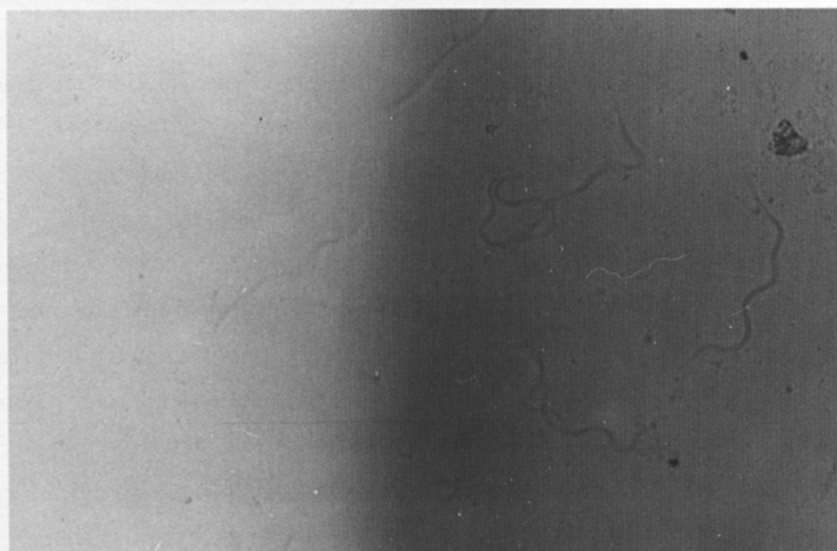


Photo. 20 ▶

## Explanation of Photographs

Monochromatic Photo. 1 to 18. Scanning electronmicroscopic pictures

- Photo. 1-6 Fractured surface of *Mf. immitis*, in the peripheral blood. Magnification 20,000 ×
- Photo. 7-11 Fractured surface of the intrauterine larvae of *D. immitis* 20,000 ×
- Photo. 12 Fractured surfaced surface of the uterus of the *D. immitis*, showing many larvae in the honey comb like structure. 600 ×
- Photo. 13-14 Fractured surfaces of *Mf. Dipetalonema reconditum*. 20,000 ×
- Photo. 15-18 Fractured surfaces of *Mf. Brugia pahangi*. 20,000 ×

Photo. 19 and 20. Photomicrography on examination of negative phototaxis of *Mf. immitis* in vitro. (Fig. -2)

- Photo. 19 At the begining of examination *Mf.* are counted, 5 in the dark area, 5 in the bright area.
- Photo. 20 30 minutes later, on illumination, *Mf.* are counted, 9 in the dark area, 2 in the bright area.

## Abstract

## Studies on the mechanism of the microfilarial periodicity (FN-2)

— Scanning electronmicroscopic study on some microfilariae and demonstration of the negative phototaxis of *Mf. immitis* in vitro.

Tsuyoshi YONAMINE

First Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kagoshima University Outside Student  
Outside student.

Department of Internal Medicine, College of Health Sciences, University of the Ryukyus  
(Director: Prof. G. Mimura)

Scanning electronmicroscopic studies were done using frozen fracture method on *Mf immitis* in the peripheral blood, intrauterine embryos and *Mf.* in the dogs, infected with *Dipetalonema reconditum* and with *Brugia pahangi*. *Mf immitis* in the peripheral blood and some larvae of *Dipetalonema reconditum* showed several globules of variable sizes (0.1 to 0.35  $\mu$  in each fractured surface. Those larvae had shown autofluorescent granules under fluorescence microscope. The intrauterine *Mf immitis* and the other *Mf. reconditum*, those had not shown any fluorescent granule, showed no such globule in any fractured surface of any larva. Some larvae of *Brugia pahangi* showed no such globule, and on the background near the other mf. were found minute globules.

It is very likely that those globules correspond to the autofluorescent granules. Further analysis could not be done, because of the difficulty to use extremely expensive apparatus.

The negative phototaxis of *Mf. immitis* was demonstrated in vitro. Heparinized and hemolyzed canine blood was washed twice or thrice with saline and the sediment was suspended in the host's serum. Such suspension was put in Petri dish, half of which, covered with plastic lid, which again covered with aluminum foil. UV-illumination was done from 10 cm over the lid. Pipeting the sample, 0.02 ml, was done every 10~15 minutes, from both the bright and dark parts, for mf-counting. After 15 minutes of illumination, two times more mf. and after 120 minutes, ten times more mf. were detected in the dark parts than in the bright parts.

In another series of observation, suspension was put between two pieces of thin slide glass, half of the length of each piece, painted with black or colored ink or covered with colored cellophane. Strong illumination was done from the bottom. At the beginning of

observation, mf. were distributed evenly in both the bright and dark parts, while more mf. were seen in the dark parts after 15~30 minutes (in some cases within 10 seconds) of illumination. Such evasion of mf. toward the dark parts could be demonstrated by means of photomicrography and cinemicrography. Such evasion of mf. from the bright parts was seen toward black, red, orange and yellow parts, while no evasion was seen toward green and blue parts.

(Ryukyu Univ. J. Health Sci. Med. 2 (4))