

蛔虫卵の低温に対する抵抗力に関する研究

山 崎 繁 富 田 俊 雄 山 下 六 郎

日本冷蔵研究所

(昭和29年6月20日受領)

我国で人及び豚の寄生虫病中最も広範囲に浸淫しているものに蛔虫症がある事は今更述べる迄も無く万人の認める所であつて、現今では之等蛔虫の駆虫並に予防対策に就いては数多の研究者によつて多大の努力が払われ、輝かしい業績が発表されている。

我々が今回実施した此の種の研究は一部既に本邦及び諸外国に於て実施されている、その主な業績は Wharton (1915), Wigdor (1918), 吉田 (1920) 等によつて発表され、Wharton は低温は蛔虫卵の發育を遅延させるが死滅せしめる事は出来ない、Wigdor は犬蛔虫卵を使用し10°Cにて發育は遅れるが究極は活動性の仔虫を形成すると報告し、我国の吉田が行つた試験は蛔虫卵の越冬問題を具に研究している。同様な試験は Martin (1922) によつても行われ同じ結果を齎している。其後比較的精細な試験が Cram (1924) によつて行われており蛔虫卵は甚だしい低温に対して高度の抵抗力を有する事を報告したのであるが、之等諸研究者の報告を見るに低温に対して蛔虫卵が強い抵抗力を示す事は一致した実験の結果である事が視られる。

著者等は之等の研究を補遺する意味から、昭和27年10月から翌28年6月に亘つて当社に於ける一般的な凍結温度を利用し冷凍苳、其他の処理過程で熱処理を施さない冷凍食品に附着した蛔虫卵の低温に対する死滅状況を明かにし、蛔虫の感染予防に資する目的で若干の試験を試みた。(本要旨の一部は昭和28年10月、第13回日本寄生虫学会関東部会に於て発表した。)

実験材料及び方法

供試の蛔虫卵は成熟豚蛔虫の子宮末端より得、各実験毎に夫々10個体以上のものを充分混和して用いた。凍結温度としては当社にて各種冷凍食品の一般的な凍結温

度である -21°C を選んで実験を行つた。試験区分は摘出直後の新鮮な単細胞期卵、摘出後時24時間培養した単細胞期卵、發育中期卵と仔虫形成卵の4期に大別した。試験各区の虫卵は小形シャーレに分割し、予め定めた凍結日数を経過した虫卵群は逐次凍結より解放し、徐々に解凍した。培養に當つては1%フォルマリン水と1/20000 フラスキン溶液にて發育の比較をも試み 27°C の恒温器に移した。観察は培養開始後一定の間隔を置いて6回、即ち培養後3, 6, 9, 12, 15及び30日目に夫々100個の虫卵について發育状態を観察した。發育中期卵迄の死滅虫卵の判定方法は後続培養による仔虫形成の如何による事は勿論であるが、仔虫形成卵の場合判定は観察所見のみで決定する事は甚だ危険と考えられるが一応仔虫の運動性に重点を置き、併せて細胞の変性像を考慮し判定を試みた。

実験成績

-21°C に一定期間凍結後、フォルマリン溶液中で培養した群とフラスキン溶液中で培養したものは何れも顕著な發育の差は認められなかつたのでその平均値で表す事にした。

(1) 単細胞期卵(摘出直後)の抵抗力

凍結虫卵は培養後卵細胞の分裂が遅れ凍結期間の短いものでは培養後6~9日目より發育状態が稍々恢復した。凍結40日以上ものは發育状況は極めて悪く凍結期間が延長するに随い培養30日間のものでも僅か数%しか仔虫となり得ず、120日のものでは全く發育を見なかつた。第1表は単細胞期卵の虫卵100個中に於ける凍結期間と發育の状態を示すもので培養3, 6, 9日目の成績は割愛する事にした。

(2) 単細胞期卵(24時間培養卵)の抵抗力

摘出直後の虫卵に比較して稍々強い抵抗力を示し發育の恢復は凍結期間の短い程速かであるが、凍結10日及び20日の卵群では培養9日目に、凍結25日及び30日の卵群では培養12日目にほぼ正常に近い發育を示し、

Shigeru Yamazaki, Toshio Tomita and Rokuro Yamashita: Experimental studies on the resistance of ascaris eggs against low temperature. (Research Institute, Nippon Reizo K. K.)

第 1 表 単細胞卵(摘出直後)の低温に対する抵抗力

培 養	發育状態	凍 結 期 間															
		対照	10日	16日	20日	23日	30日	35日	40日	45日	50日	55日	60日	75日	80日	90日	120日
12日	単細胞卵		17		26	1	74		71	84	80	89	75	91	49	72	75
	分裂初期卵		35	6	40	7	14	41	7	16	11	2	7	2	21	9	
	桑実期卵	39	36	79	33	70	11	59	3		7		1	4	26	3	
	蝌蚪期卵	9	10	10	1	15	1							2			
	仔虫形成卵	50	1	3		4								1			
	変性卵	2	1	2		3			19		2	9	17		4	16	25
15日	単細胞卵		8	2	45	1	37		52	74	68	93	65	76	84	83	49
	分裂初期卵		18	7	32	1	12	2	7	9	15	2	5	11	8	10	
	桑実期卵		47	53	14	54	17	92	17	17	8	3	3	6	6	1	
	蝌蚪期卵	1	18	32	8	22	13	6	3		6		1	1	2		
	仔虫形成卵	99	9	5		20	4		1		2		1	2			
	変性卵			1	1	2	17		20		1	2	25	4		6	51
30日	単細胞卵		5	1	49	1	20		45	55	68	85	74	87	56	71	49
	分裂初期卵		3	2	6	1	3		3	3	5		3	3	6		
	桑実期卵		3	3	3	1	8	2	9	6	6		1		8	2	
	蝌蚪期卵			4	2	3	6	6	6	8	1	13	1		14	7	
	仔虫形成卵	99	85	87	38	86	51	91	25	23	10	1	5	8	4	3	
	変性卵	1	4	3	2	8	12	1	12	5	10	1	16	2	12	17	51

第 2 表 単細胞卵(24時間培養卵)の低温に対する抵抗力

培 養	發育状態	凍 結 期 間																
		対照	10日	15日	20日	25日	30日	35日	40日	45日	50日	55日	60日	77日	80日	90日	120日	150日
12日	単細胞卵	2		1	3		1	7	16	43	57	78	64	86	88	90	34	51
	分裂初期卵	1		1	2		1	12	11	18	14	3	9		1	4		2
	桑実期卵	5	27	43	49	78	89	68	70	30	15	1	15	9	3	1		
	蝌蚪期卵	13	26	22	39	22	9	11	2					4				
	仔虫形成卵	79	47	32	7													
	変性卵			1				2	1	9	14	18	12	1	8	5	66	47
15日	単細胞卵	1	1	1	2	5	3	3	31	26	44	17	66	97	76	93	52	17
	分裂初期卵	1				2			9	9	13	10	5		4	1		3
	桑実期卵	10	4	5	13	15	34	38	28	38	30	37	12		7			
	蝌蚪期卵	3	2	4	3	13	25	14	20	13	4	9	6	2	4			
	仔虫形成卵	85	93	90	82	65	37	45	9	11			3	1	1			
	変性卵						1		3	3	9	27	8		8	6	48	80
30日	単細胞卵			1	1	1	2	17	40	33	33	8	58	88	51	93	25	44
	分裂初期卵			1		1	2	9	1	1	1	7	2		2		1	2
	桑実期卵	1	2	3	6	3	11	7		1	7	22	3		12			1
	蝌蚪期卵		1		5	4	2	3		1	3	4	2		3	1		
	仔虫形成卵	98	96	94	87	86	80	58	53	53	49	35	25	7	18	3		
	変性卵	1	1	1	1	5		6	6	11	7	24	10	5	14	3	74	53

第3表 发育中期卵の低温に対する抵抗力

培養	发育状態	凍 結 期 間											
		対照	5日	10日	15日	20日	25日	30日	35日	40日	45日	50日	
12日	単細胞卵	1	1		1	2	1	1					
	分裂初期卵				15	33	51	69	74	67	52	55	
	桑実期卵	2	17	34	48	42	43	21	19	24	9	45	
	蝌蚪期卵	8	8	25	12	10	3						
	仔虫形成卵	89	74	41	24	13							
15日	変性卵						2	9	7	9	39		
	単細胞卵										1	2	
	分裂初期卵				10	33	51	59	49	67	57	64	
	桑実期卵	4	4	26	54	44	35	30	43	12	34	32	
	蝌蚪期卵	3	12	35	10	6	5						
30日	仔虫形成卵	93	84	39	26	17	7						
	変性卵						2	11	8	21	8	2	
	単細胞卵	1		1									
	分裂初期卵			1	17	33	45	56	68	60	65	28	
	桑実期卵	1	6	29	34	22	24	33	22	13	31	14	
30日	蝌蚪期卵	2	5	24	16	24	9						
	仔虫形成卵	96	85	35	24	13	18						
	変性卵		4	10	9	8	4	11	10	27	4	58	

凍結30日未滿の卵群では既に培養3日目に分裂開始が見られた。凍結35日から80日迄の卵群に分裂初期卵が観察されたのは培養後6日目で、150日の卵群では著しく遅延し培養12日目であつて、120日及び150日の両群では観察期間中に仔虫形成卵を見なかつた。然し乍ら培養30日間を経過した後凍結150日の卵群を恒温器から取出し室温(約20°C)に移してから15日目に发育状態を更に観察した結果、仔虫形成卵を1個及び分裂初期卵3個を認めた。第2表は24時間培養卵の凍結期間と发育を示し培養3, 6, 9日目の成績は割愛した。

(3) 发育中期卵の低温に対する抵抗力

凍結5日後の卵群は若干の发育遅延を認めるが10日及び15日の卵群では急激に仔虫形成化を妨げられ20日25日の凍結では仔虫への发育は拾数%であつた。30日以降の凍結では仔虫形成卵を全く認めず過半数は分裂初期卵並びに桑実期に止る。第3表は发育中期卵の凍結期間と发育の状態を示す。

尙お低温によつて发育を著しく阻害された虫卵の多くは、培養中に種々な形態的变化を来し所謂変性卵と呼ばれるものとなる。即ち卵細胞が極端に偏在するとか、不定型な分裂像、空胞形成、細胞の萎縮、崩壊、陥没及び

脂肪顆粒の融解等を示したが、之等の変性卵は Sudan III によつて染色を試みたが本方法で生死を鑑定する事は困難であつた。

(4) 仔虫形成卵の低温に対する抵抗力

仔虫形成卵の胚虫は解冻直後には運動性を全く認めないが培養後3日以降より運動を開始する。即ち第4表の如く凍結15日以降25日間の凍結虫卵は一部の運動性仔虫を認めるが30日、35日以降の凍結虫卵は多数の仔虫に運動性を認めなかつた。凍結致死の胚虫は培養日数を経過するに従い細胞顆粒は漸次膨大となり数個の顆粒の融合によつて、節状に空胞を形成する。斯様な変性卵の卵殻は正常虫卵の蛋白膜、卵殻と鏡檢上の差異を殆んど認めなかつた。

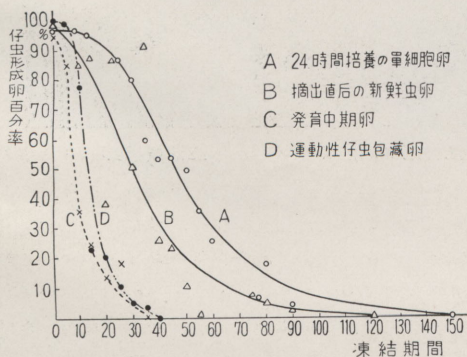
総括並に考察

豚蛔虫子宮内から採集した虫卵の低温に対する抵抗力を知る為に-21°C(±1°C)の低温に曝した虫卵の发育を4期に分け観察した。その結果を総括すると第5表の様に低温の作用によつて細胞分裂は遅延するが、24時間培養卵が最も抵抗力が強く150日の凍結でも一部生存虫卵がある。摘出直後の虫卵はこれに次ぎ、发育中期卵と仔虫形成卵は抵抗力が弱く約40日の凍結で殆んど虫卵は

第 4 表 凍結成熟虫卵の観察表

培 養 区 分	対 照	凍 結 期 間								
		5 日	10 日	15 日	20 日	25 日	30 日	35 日	40 日	
3 日	活動性仔虫	54	18	22	1	1	1	9	5	
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	46	82	78	92	81	80	51	44	41
	変性卵				7	18	19	40	51	58
6 日	活動性仔虫	34	12	23		6	1	7		
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	66	88	41	77	58	40	42	6	1
	変性卵				9		26		2	99
9 日	活動性仔虫	33	27	18	21	7	6	8		
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	67	69	39	54	63	37	40	6	1
	変性卵		4	43	25	30	30	52	94	99
12 日	活動性仔虫	33	47	24	13	9	7			
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	67	43	31	59	45	30	3	4	4
	変性卵		10	45	23	38	34	97	96	96
15 日	活動性仔虫	43	18	22	14	17	8			
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	56	66	30	55	41	4			
	変性卵	1	16	48	31	38	64	100	100	100
30 日	活動性仔虫	44	33	11	13	3				
	非活動性仔虫 (未成熟卵)	56	55	41	35	15	7	22		1
	変性卵		12	48	51	74	72	74	100	99

第 5 表 -20°C に於ける豚蛔虫卵の抵抗力
(培養 27°C ., 30 日目)



死滅する。

以上の実験成績から豚蛔虫卵が予想外に低温に対して強い抵抗力を有する事を知り得たのであるが、実際に野外で附着した虫卵はより強い抵抗力を示すものと考えられる。単細胞期卵及び分裂進行中のいわゆる多細胞期卵の両者に於ける顕著な差は未だ先人の指摘せざる所であつて、今回の試験で清浄な冷凍食品の製造に大きな示唆を得た。今後は更に研究を重ね、短期間内に蛔虫卵を死滅せしむる様目下実施中である。

稿を終るに臨み本実験に際し御援助を頂いた農林省家畜衛生試験場、上野技官、国立予防衛生研究所、和泉博士に深甚なる謝意を表し、御校閲の労を賜つた農林省家畜衛生試験場、尾形博士並に日本獣医畜産大学、清水重矢教授の貴重な御助言を謹謝する。

文 献

- 1) Wharton, Lawrence D.: Phil. Jour. Sci. B. V. 10, p. 19~23, 1915.
- 2) Wigdor, M.: New Orleans Med. and Surg. Jour., V. 71, p. 264~281, 1918.
- 3) Yoshida, Sadao: Jour. Parasitology, V. 6. p. 132~139, 1920.
- 4) Martin, H.M.: Nebr. Agr. Exp. Sta. Circ. 37, 11 p., 3 fig. References, p. 11, 1922.
- 5) 浅田順一: 東京医事新誌, 2339, 大12.
- 6) Kobayashi, H.: Mitt. Med. Hochsch. z. Keijo, Vol. 4, p. 21~31, 1921.
- 7) E. B. Cram: Jour. Agr. Research, Vol. XX VII, No. 3, 1924.
- 8) Bakker, C. R.: Tijds. Chr. V. Vergelijkende Geneek, Enk. Leyden. X (4), 1924.
- 9) 松崎義周: 慶応医学, Vol. 8, No. 6, 1035~1048, 1928.

Summary

This paper reports the results of investigation in the resisting power of the eggs of *Ascaris suilla* against to low temperature ($-21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). The eggs at four different stages of development were used for the investigations. They were placed in petri dishes with 1% formalin solution and were kept in refrigeration room ($-21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for a certain period of time. Samples were then taken out at given intervals and restored in an incubator at 27°C . After the incubation, such considerations as the reduction in growth, the ability to form motile embryos and the changes in appearance due to the degeneration were observed on the respective samples taken at the given intervals. 100 eggs constituted a sample.

The results are summarized as follows:

- 1) When fresh eggs, obtained from the uteri of *Ascaris suilla*, were held at low temperature for 40

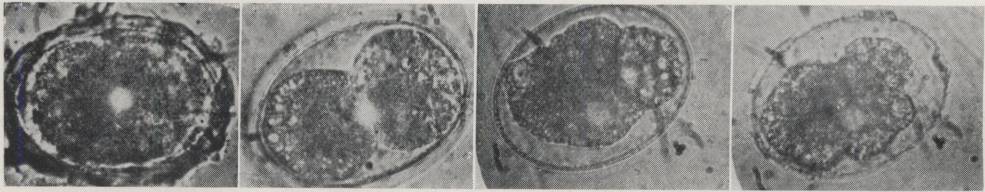
days, the cell division was retarded and their ability to develop into embryos were restrained, when as held for over 120 days storage, the development was prevented completely.

2) The eggs at one cell stage, which had been incubated at 27°C for 24 hrs, were affected by low temperature slightly less than fresh eggs. The growth of the eggs which had been refrigerated for 15 days was similar to that of the control. However, when the period of storage exceeds 15 days, the ability to form active embryos was reduced. The development was restrained gradually up to 50 days of storage and only a few eggs developed after 150 days.

3) The eggs at intermediate stage showed less

resistance as compared to the eggs at one cell and the fresh stages. When those eggs were refrigerated for 25 days, the formation of active embryos was reduced as low as 18. After 30 days storage the eggs showed no indication of development.

4) It seemed that there was no pronounced difference in the resistance between the partially and fully developed eggs, i. e., eggs containing embryos. A few embryos showed development after 35 days storage but none showed development after 40 days storage. The embryos, which had been inactivated by refrigeration, however, degenerated during the subsequent incubation period, first becoming enlarged with granules and later the formation of vacuoles in their bodies.

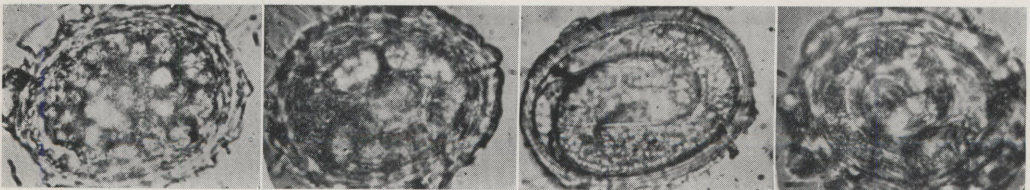


变性单細胞期卵

变性初期分裂卵

变性初期分裂卵

变性初期分裂卵



变性桑実期卵

变性成熟卵

变性初期の成熟卵

生活成熟卵