

蛔虫卵試験管内脱殻に関する観察

(その1) 細菌及び黴の影響

谷口富士雄

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和30年1月31日受領)

蛔虫の感染方法は一定の発育を遂げた仔虫包蔵卵の経口的摂取によるものであり、虫卵が腸に至り、仔虫が孵化脱出し、宿主に感染するものであることは今更言を要しない事である。そしてその孵化脱殻に関与する諸種条件は大別して、仔虫自体の持つ内的なもの、周囲からの影響即ち外的なものに分けられる。仔虫自体が十分な生活力を有し、諸刺激に反応する力を具備することは無論であるが、蛔虫仔虫の脱殻には外的な影響が大きな要因であり、これを実験的に解明せんとする試みとして動物の消化管に於ける研究は勿論、動物体外での人工的孵化脱殻が旺に行われた。それは吉田(1923)の過マンガン酸カリ水によるものを始めとして、大場(1923)、井田(1929)、豊田(1931, 1932)、McRae(1935)、坂元(1939)、中井(1940)、Pitts(1948)、O'Connor(1951)、沢田、高橋(1952)等の研究である。

井田は唾液、人工胃液、人工腸液、動物の腭液、胆汁等の影響並に試験管の振盪等による機械的刺激の影響について実験し、腭液を作用させたものでは高率に脱殻するのを見た報告している。

最近高橋(1953)は動物の小腸上部及び大腸下部を結紮したものに直接虫卵を注入し、その成績より腸液との接触或はその消化酵素の直接作用が脱殻を起す要因であろうと推測している。

亦大場、坂元等は腸の蠕動或は試験管の振盪等による機械的なものゝ影響を重要視している。

一方豊田は蛋白質、含水炭素、脂肪等の栄養素の分解物質による人工孵化を行い、この分解物質の存在が蛔虫仔虫の脱殻には重大な役目を演ずるとし、人工孵化に際しては稀薄ペプトン水及び葡萄糖水を用うることを推奨

した。併し坂元、中井、Pitts等は略々同様の方法による人工孵化を行い、僅かの脱出仔虫を認めているに過ぎない。亦O'Connorは適当な温度、pH、電離度等という条件を具備すれば Ringer-Tyrode 氏液のみでも相当の脱殻を見らるとして、分解物質が存在することの必要を否定している。

これら人工孵化の報告を通覧するに、実験に使用する虫卵を 25~28°C で培養中或は孵化脱殻液中に混入繁殖する雑菌の脱殻に及ぼす影響については詳細なものは見当らず、唯単に雑菌による腐敗が仔虫に悪影響を与えるのではないかと考えている様である。

私は無菌的に蛔虫仔虫を得る目的で、豚蛔虫卵の試験管内脱殻を種々の方法で試みたが、その際操作中に混入した雑菌が虫卵に影響を及ぼし、蛔虫仔虫の脱殻を誘起したのではないかと思われる如き所見に相遇したので、それについて 2, 3 の実験的観察を行った。

実験材料及び方法

(1) 虫卵の採集

豚蛔虫の雌で採取後間もないよく発育した虫体を Ringer-Dale 氏液でよく洗滌し、体壁に附着した肉眼的不潔物を除去し、更に数回滅菌 Ringer-Dale 氏液で洗滌し、細菌の除去に努めた。この虫体を 5% Antiformin 液、1% Formalin 水或は 0.5% 昇汞水等の中で開体し、子宮腔部 1~1.5 cm で切断し、同種液を満した滅菌シャーレに移し、虫卵を取出した。受精卵であることを確認した後、遠心沈澱管に移し、約 20~30 分後に 1,500 回転 5 分間遠心沈澱し、滅菌水で 4~5 回洗滌した。雑菌の混入を可及的防ぐ目的で用いた Antiformin, Formalin 昇汞水等は後の脱殻に何等かの影響を及ぼすのではないかと考えたが、豊田は防腐剤として 2% Formalin 水を使用して居り、亦 Antiformin についても鏡検した結果は形態的に蛋白膜が除去された以外、卵殻には大した変化を認めなかつた。尚 Formalin 或は昇汞水を使用した虫卵は操作時ピペット或は試験管壁に附

Fujio Taniguchi: Observations on the hatching of ascaris larvae in vitro. I. Effect of associated bacteria and molds. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan.)

着し、亦培養時虫卵を均一に扱われぬ不便があつたので実験に用いた大部分の虫卵は 5% Antiformin 液を最初防腐剤として使用してある。

(2) 虫卵の培養

虫卵の培養には以下の 3 方法を用いた。

1) 瓦培養。以前から当教室で使用していたのと略々同様で、よく清拭したものを中型 (3 寸) シャーレに入れ、乾熱で 170°C 30 分間滅菌し、放冷後、処置した虫卵を撒布し、適当量の滅菌水をシャーレに満して 28°C の孵卵器で培養した。亦仔虫形成後虫卵を採取するのに便利にするため瓦の上に濾紙を敷いたものも用いた。

2) 石膏斜面濾紙培養。シャーレ内瓦上に培養した虫卵は仔虫形成後実験に数回使用すると、雑菌で汚染され易いため試験管内で瓦のものと類似の培養をする目的で作製した。歯科用石膏で円柱を作り、一定程度硬化後、全長の約半分を削除して斜面を作り、その上に濾紙を貼布した。24 時間放置し、完全に硬化後、大試験管に挿入し、乾熱滅菌し、虫卵を培養した。

3) 試験管内滅菌水中培養。中試験管に滅菌水 3 ml を分注し、処置した虫卵を入れ、攪拌し、孵卵器内に約 15 度の傾斜にして静置した。虫卵は大概傾斜した管壁に洗滌した。水の深さは最も深い所で 1 cm を越さぬ程度であり、野村等(1931)の報告にも見られる通り、虫卵の發育には差して影響はないと思われる。10 日目毎に振盪攪拌し、虫卵發育の均一化をはかつた。

これら 3 方法による虫卵の發育は瓦上のものが最も早く、石膏斜面濾紙上、試験管内滅菌水中の順であつた。虫卵の發育は虫体を異にすることで、亦同一虫体からの虫卵でも個々に多少の差はあるが、大部分の虫卵が仔虫形成を完了するのは瓦上のものでは 13~15 日、石膏斜面濾紙上の上ものは 15~18 日であり、試験管内滅菌水中の上ものは稀に相当数の虫卵が 30 日後にも發育しなかつたり、或は發育の途中である様な試験管もあつたが、大概發育程度には余り差はなく、18 日には殆んど仔虫を形成していた。

(3) 脱殻液

虫卵の孵化脱殻には次の如き組成の各溶液を用いた。各液を夫々滅菌試験管に 4 ml づゝ分注し、3)~7) のものについては 120°C 15 pound 20 分間 Autoclave で滅菌した。

1) 人工胃液及び強塩酸ペプシン液

(1)	{	10% 塩酸	5 ml	(ロ)	{	純塩酸	10 ml
		Pepsin	0.5 gr			Pepsin	0.5 gr
		蒸留水	100 ml			蒸留水	100 ml

2) 人工腸液

{	塩化ナトリウム	0.6 gr
{	炭酸ナトリウム	0.2 gr
{	Trypsin	0.5 gr
{	蒸留水	100 ml

3) Ringer-Dale 氏液

Glucose を除いたもので、10% 炭酸ソーダ液により pH を 7.4~7.6 に調製した。

4) Pepton-Ringer 氏液

Pepton を 0.05%, 0.1% 及び 0.5% の割に Ringer-Dale 氏液に加えたものである。

5) Glucose-Ringer 氏液

Glucose を 0.05%, 0.1% 及び 0.5% の割に Ringer-Dale 氏液に加えたものである。

6) Pepton-Glucose-Ringer 氏液

Pepton 及び Glucose を 0.05%, 0.1% 及び 0.5% の割に Ringer-Dale 氏液に加えたものである。4), 5) 及び 6) のものは実験の前半は pH を 7.4~7.6 に、後半の齧を使用する様になつてからは pH を 7.2 に調製した。

7) Yeast extract-Ringer 氏液

0.1% 及び 0.5% の Yeast extract に Ringer-Dale 氏液と同量の塩類を加えたものであり、pH は 7.2 に調製した。

尚実験中の無菌試験は Thioglycollete 培地により行い、pH の測定は東洋濾紙の試験紙によつた。

実験成績

1) 人工胃液及び人工腸液による脱殻並に振盪の脱殻に及ぼす影響。

実験に用いた虫卵は瓦上或は試験管内滅菌水中に培養したもので、培養後 35~55 日を経過したものである。蛔虫 1 匹からの虫卵を 1 個の瓦又は 1 本の試験管内に培養し、その各 4 例についてこの実験を行つた。瓦上の虫卵は白金耳により数回採取し、試験管内のものはピペットで遠心洗滌管に入れ、1,500 回転 5 分間で集卵し、上清を除去し、人工胃液を 38°C 3 時間作用させて、再び遠心洗滌し、滅菌水で 4 回洗滌したものを、人工腸液 4 ml を入れた試験管に移し、38°C に 7 日間保存し、1 日、2 日、3 日、5 日、7 日の 5 回に亘つて鏡検した。鏡検の際は可及的均一の虫卵浮游液とし、ピペットで静

かに約0.3~0.5 mlを吸引し、スライド上に拡散させ、カバーガラスで覆うことなく、それを観察し、仔虫の有無及びその率を検べた。

卵内仔虫は活潑に運動しているが、脱出仔虫を認めたのは8例中2例であり、且つその2例は5回の鏡検中、各1度づゝ運動する仔虫1~2匹が見られたのみであり、未脱殻の虫卵は数百個であつた。

同一培養虫卵を用いて、人工胃液の代りに強塩酸ペプシン液を38°C 3時間作用させる実験も試みた。その他の操作は総て前実験と同様である。この場合も1例で未脱殻仔虫数に対し4%にあたる脱殻仔虫を認めたが、1回のみであり、強塩酸ペプシン液にも特別の作用は認められなかつた。全体として従来の大場、井田等の成績と略々同様の結果であつた。次に振盪の脱殻に及ぼす影響であるが、培養日数38~52日の虫卵で、瓦上或は試験管内滅菌水中に培養したものを、前同様にして集卵し、強塩酸ペプシン液を作用させ、洗滌後、0.05% Pepton-Ringer 氏液 (pH 7.4~7.6) に入れ、毎日3時間30分間隔毎回50回振盪し、7日間続けた。鏡検は前同様である。対照は前処置を同様にし、Pepton-Ringer 氏液に移してからは鏡検時以外は38°C の孵卵器内に静置した。成績は第1表に示した通りで、対照でも脱殻しないものでは振盪してもそれによつて脱殻が助長されると云うことは見られない。瓦上の虫卵で例 VII, VIII, IX 及び試験管内の例 IV では振盪した場合は脱殻したものが16~39%であり、静置した場合ではそれが12~22%を示した。この様な比較的好く脱殻した例では振盪したものが多少高率に脱殻して居り、振盪が脱殻を助長した様に思われる。これらの例では第1日より10%前後の脱出仔虫が認められ、漸時増加し、5日或は7日が最高になつた。亦これらは何れも培地の濁濁を来していたが、それは細菌の増殖を来したためと思われる。その他の例では9%或は6%等という脱殻率を示すことがあつたが、それは連続的に鏡検時仔虫を認めたものではない。

亦同一培養虫卵で集卵後の強塩酸ペプシン液を5% Antiformin 液30分間作用と換えた場合も結果は略々類似のものであつた。

2) Pepton-Ringer 氏液, Glucose-Ringer 氏液, Ringer-Dale 氏液での脱殻

人工胃液及び人工腸液を用いても殆んど脱出した仔虫は見られず、亦強塩酸ペプシン液を作用後、Pepton-Ringer 氏液に入れ、これを振盪した場合にも、静置しても脱殻する様な少数例に於て多少よく脱出仔虫を認め

第1表 振盪の脱殻に及ぼす影響

番号	瓦上培養虫卵		試験管内培養虫卵	
	振盪	対照	振盪	対照
I	0	3	0	0
II	1	6	0	2
III	0	0	0	0
IV	3	1	16(+)	12(+)
V	0	0	1	0
VI	0	1	1	1
VII	27(+)	18(+)	3	2
VIII	17(+)	12(+)	4	5
IX	39(+)	22(+)	9	5
X	—	—	1	0

表中(+)は脱殻液の濁濁。数字は脱殻仔虫数の全虫卵数に対する%

た程度である。そこで瓦上、石膏斜面濾紙上及び試験管内滅菌水中に培養した虫卵について何の処置もせず、それらを0.05%及び0.1%のPepton-Ringer 氏液及びGlucose-Ringer 氏液並にRinger-Dale 氏液(何れもpH 7.4~7.6)に入れて脱殻を試みた。

方法は瓦上或は石膏斜面濾紙上の虫卵は1白金耳を、亦試験管内滅菌水中のものはピペットで虫卵浮游液少量(0.1 ml 以下で虫卵数は約500~1000個)を上記の液に移し、38°C に5日間保ち、その間、1日、2日、5日に鏡検した。同時に培養虫卵について無菌試験をした。この脱殻試験を虫卵培養後35~80日の間に5日間隔で大略10回行つた。

第2表及び第3表に示したのは各脱殻液での最高脱殻率である。全体を通じて、特に注目されるのは先づ無菌的に培養出来、脱殻試験の行われた虫卵では殆んど脱殻しないで、最高が2~4%程度であり、毎回脱出仔虫を見たものは稀であつた。次によく脱殻したものでは最高が65%、35%、45%等と比較的高率を示していた。この様なものでは各脱殻液とも全部脱出仔虫の存在を認め、Pepton 或は Glucose を加えたものが Ringer-Dale 氏液のみのものより多少よく脱殻しているかに見えるが、大差はなく(又 Pepton 或は Glucose の液でその濃度が0.05%と0.1%の間には差異を認められず、何れが優れているとは云えない)、且つ各回の試験で脱殻率に高低はあつたものゝ毎回連続的に脱殻しているのが見られた。1回の脱殻試験について見ると、大概第1日は8~15%程度を示すものが多く、時に35%以上の

第2表 Pepton-R., Glucose-R. 及び Ringer-Dale 氏液での脱殻(その1)

虫卵	番号	最高脱殻率			細菌混入
		Pepton	Glucose	Ringer	
瓦上培養虫卵	I	2(+)	0(+)	0	+
	II	65(+)	52(+)	56	+
	III	25	35	26	+
	IV	0(+)	0(+)	0	+
	V	8(+)	20(+)	25(+)	+
	VI	3	2	1	-
	VII	45(+)	42(+)	29(+)	+
	VIII	40(+)	24(+)	46(+)	+
	IX	0(+)	0(+)	0(+)	+
	X	2	0	0	-
石膏斜面濾紙上培養虫卵	I	0	0	0	-
	II	2	0	0	-
	III	4	3	2	-
	IV	26(+)	30(+)	11(+)	+
	V	2	0	0	-
	VI	34(+)	32(+)	26	+
	VII	0	0	0	-
	VIII	0	0	0	-
	XI	16(+)	20(+)	14	+
	X	0	0	0	-

表中(+)は脱殻液の濁濁を示す

ものがある。これは大体日を増すに従い順次高くなり、5日目が高くなるが多かった。この時までは最も早く脱出したと思われる仔虫が形態的には変化を来していても、まだ相当に運動していた。2日目が高くなった様な例ではそれ以後卵内仔虫も脱出した仔虫も変性するのが早い様であつた。これらのものは表に見られる通り、総て雑菌の混入したものであつて、脱殻液の著しい濁濁を示すものと、殆んど濁濁を見ないものがある。

混入した雑菌は桿菌、球菌及び微等種々のものが混在し、従つて脱殻液には必ず同一の菌種が繁殖するというものではなかつた。瓦上或は石膏斜面濾紙上等では雑菌が培養虫卵と共に在した場合に虫卵の發育が阻害されたと思われる例はそれ程多くなく、仔虫を形成した後に卵内仔虫が変性し或は死することも殆んど起らなかつた。だが時に脱殻液中で雑菌増殖が極度に害作用を与えたのではないと思われる様な場合にも遭遇した。即ち球菌の或種のもの亦は微の一種と思われるもの等が繁殖した液

第3表 Pepton-R., Glucose-R. 及び Ringer-Dale 氏液での脱殻(その2)

虫卵	番号	最高脱殻率			細菌混入
		Pepton	Glucose	Ringer	
試験管内滅菌水中培養虫卵	I	0	0	0	-
	II	10(+)	10(+)	9	+
	III	0	1	0	-
	IV	0	0	0	-
	V	0	0	0	-
	VI	0	0	0	-
	VII	63	40	34	+
	VIII	0	0	0	-
	IX	0	0	0	-
	X	0	4	0	-
	XI	12	6	4	+
	XII	0	0	0	-
	XIII	0	0	0	-
	XIV	0	4	0	-
	XV	36(+)	38(+)	34(+)	+
	XVI	0	0	0	-
	XVII	0	0	0	-
	XVIII	0	0	0	-
	XIX	0	0	0	-
	XX	0	0	0	-

表中(+)は脱殻液の濁濁を示す

で、脱殻開始2日目位で脱出した仔虫も卵内の仔虫も変性したものがあつた。然しながら雑菌が脱殻液中に繁殖し、その濁濁を来しても卵内仔虫は相当活潑に運動を繰返し、脱出した仔虫もその液中で5日間は生存している様に思われる。そしてこの様な脱殻液の変化が何にか脱殻を誘起している如く見えた。

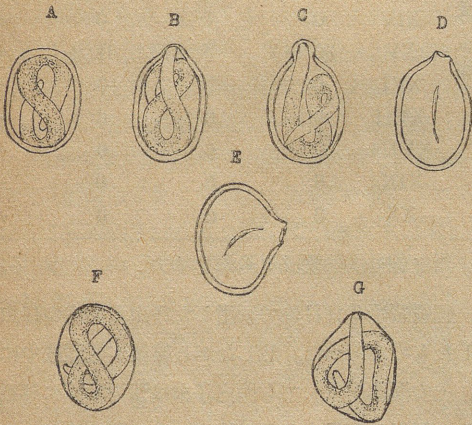
次に雑菌が脱殻液中に繁殖しても全然脱殻を見ない例があつたのは無論のことであるが、この場合にも卵内仔虫が変化しているものは案外少く、鏡檢上無菌の脱殻液中の虫卵と殆んど同様のものが多かつた。

3) 蛔虫仔虫の脱殻方法

前述の様なよく脱殻した虫卵について観察すると、仔虫が卵殻から脱出する方法は大場、豊田、稲留(1930)、栗栖(1932)、O'Connor等の記載したところと大抵同様であり、仔虫は2通りの方法で脱殻する様に思われる。第1の方法は卵殻の一部が消失して、最内層がそこより突出膨隆するもので、この一層は柔軟膜様の感じで、仔

虫は盛に運動し、これを破つて脱出する。仔虫脱出後の卵殻を見ると、その脱出口は次第に消化されて出来るが如き感じを受けるものであつて、ピペット或はカバーグラス等の機械的刺戟で卵殻にさけめを生じ、脱出した場合とは明に異なる。この様な脱出口は大部分卵殻の極に近い部位に出来るが(第1図の A, B, C, D), 井田の報告に見られる小孔との関係は明に出来なかつた。時には極の中間の側方の一部分に同様のことが起り、仔虫の脱出するのが見られた(第1図の E)。第2の方法では卵殻全体が一層の菲薄なものになる。それは極めて柔軟で仔虫の体制に略々一致して、長卵円形或は不正円形等種々の卵形になり、その一部が裂開して仔虫が脱出するものである。この方法のものは Pitts の報告した Antiformin と苛性ソーダの混合液で卵殻を溶解したものの脱殻と似ている(第1図の F, G)。

第1図 蛔虫仔虫の脱殻方法



これら2方法による脱殻は虫卵の培養を異にするものに別々に起ることもあり、同一培養虫卵で同時に見られることもあつた。亦同一培養虫卵を用い、数回の脱殻試験を行う間に最初は第1の方法のものが多く、回を増す毎に第2の方法で脱殻するものが増加した場合があり、更に1回の脱殻試験中でも最初の1日、2日は第1の方法によるものが高率であり、5日には第2の方法のものが著明になつて、その間に移行が見られ、これら2方法が全然別々のものではなく、一連のものである様に感じられた例もあつた。綜括的に云えば、第1の方法は脱殻液の濁濁を殆んど見ない場合に、亦第2の方法は脱殻液が著しく濁濁して来た場合に主として見られた現象である。尙数匹のラッテ及びマウスに同一虫卵を与えた場合

に、それらの腸管で同時に両方法で脱殻が起つているのが観察された。

4) Penicillin 及び Streptomycin による雑菌の増殖抑制と脱殻。

雑菌が培養虫卵と混在し、脱殻液中に増殖した場合に前述の如く相当高率に脱出仔虫が存在したものがあつたが、この雑菌増殖を Penicillin, Streptomycin 等の抗生物質で抑制した場合は脱殻に影響を及ぼすか否かを観察するために、0.1% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に種々の濃度に此等を注入し、脱殻を行つた。使用虫卵は石膏斜面濾紙上或は試験管内のもので培養日数30~84日のものである。Penicillin は1.0 ml 中200, 500, 1000単位とし、Streptomycin は1.0 ml 中0.2, 0.5, 1.0 mg とし、両者を併用した。脱殻試験、鏡検等は前述のものと同様である。Penicillin 及び Streptomycin をこの程度の量用いたのでは蛔虫に附着している可能性のある菌にすら充分でなく、且つ実験室で操作中に混入する雑菌を総て発育阻止出来るとは思わないが、これらを高単位用いることは雑菌の増殖を抑制すると同時に、その毒性が卵内仔虫に作用し、稲留の実験に於ける Santonin 或は Macnin の如く、脱殻を抑制することが起るかもしれぬと考え、可及的少量のものにより暫時の間、雑菌の増殖が抑制されることを期待した。

その脱殻成績は第4表に示した通りである。表中の数字は各5日間に於ける最高脱殻率であり、()内は雑菌

第4表 Penicillin, Streptomycin により雑菌の増殖を抑制した場合の脱殻

番号	培養日数	最高脱殻率				対照
		P. 1000u. S. 1 mg	P. 500u. S. 0.5mg	P. 200u. S. 0.2mg		
I	30	10 (-)	12 (±)	27 (+)	13 (+)	
II	36	14 (-)	31 (±)	28 (+)	23 (+)	
III	41	8 (±)	9 (+)	11 (+)	16 (+)	
IV	60	15 (+)	11 (+)	15 (+)	10 (+)	
V	62	37 (-)	34 (+)	25 (+)	24 (+)	
VI	66	12 (-)	7 (-)	5 (-)	9 (+)	
VII	70	2 (-)	2 (-)	5 (+)	3 (+)	
VIII	70	15 (-)	17 (-)	43 (±)	12 (+)	
IX	75	15 (±)	17 (±)	15 (+)	11 (+)	
X	84	25 (±)	14 (+)	15 (+)	10 (+)	

表中 P. は Penicillin, S. は Streptomycin ()は雑菌の状態

の状態を示すもので、(+)は24時間で雑菌が増殖し、脱殻液が溷濁したもの、(±)は5日までに多少の溷濁の現われたもの、(-)は全然肉眼的に変化を見ないものである。この様な状態に於ける虫卵の脱殻を比較しても明瞭な差は認められない。雑菌の増殖が抑制されても仔虫の脱出は同程度に起り、培地が全然溷濁しないもので37%、多少溷濁を来したもので43%の仔虫が見られることもあつた。

亦 Penicillin 1000 u/ml, Streptomycin 1.0 mg/ml 程度の併用では雑菌の増殖を抑制出来なかつたものに Penicillin 2000 u/ml, Streptomycin 2.0 mg/ml を併用し、雑菌の増殖を阻止したが、脱殻率には同様大した差異は現われなかつた。然して、この程度の濃度では卵内仔虫も活潑に運動して居り、脱出した仔虫も5日~1週間は生存している様に思われた。

5) 無菌培養虫卵に雑菌を移植した場合の脱殻。

無菌的に培養出来た虫卵では脱殻試験をしても殆んど脱出仔虫を認めず、反つて培養中或は脱殻試験管内に雑菌が存在したものに高い脱殻率を示すものがあり、且つ Penicillin 及び Streptomycin で脱殻液中に増殖する雑菌を抑制した場合にも相当の脱出仔虫が見られたこと等から、虫卵を28°Cで培養している間に、それら雑菌が及ぼす影響が大きいのではないかと考え、よく脱殻した材料に繁殖した雑菌を培養日数16~65日のものに移植し、一定時日を経過した後、脱殻試験を行つた。これら雑菌には前にも述べた通り、種々のものが混在していたが、それを唯盲目的に移植した。方法は石膏斜面濾紙上の虫卵を数白金耳とり、新しい石膏斜面濾紙上に貼布し、亦試験管内滅菌水中のものは虫卵浮游液0.5mlを他試験管に移し、滅菌水を追加して、対照とし、元の濾紙上或は滅菌水中のものに雑菌を移植し、これらを更に30日間28°Cに保存し、その間に5日間隔で6回の脱殻試験を行つた。但し、石膏斜面濾紙上例I及び試験管内滅菌水中例Iは移植後15日より試験した。脱殻液は0.1% Pepton-Glucose-Ringer 氏液であり、鏡検等は前同様である。第5表の成績は4~6回の試験の最高脱殻率である。試験管内例Iは最高25%を示したが、これは雑菌移植後30日に行つた成績である。この例では15日、20日、25日の試験も15%前後の脱出仔虫が見られ、連続的に脱殻した。対照では4%の仔虫を認めたのが最高であり、この例では明らかに雑菌の影響があつた様に思われる。尙本例で見られた脱殻は全部第1の方法によるものであつた。この他、石膏濾紙上例II及び試験管内

例III, VIでも6~15%程度の脱出仔虫を移植後10~15日より連続的に認めたが、それら以外のものでは時に脱殻しても各回連続的なものではなかつた。

第5表 無菌虫卵に雑菌を移植した場合の脱殻

培養	虫卵 番号	培養 日数	最高脱殻率	
			雑菌移植	対 照
石濾 上 膏紙	I	16	1	0
	II	30	14	0
	III	65	9	7
試 験 管 内	I	16	25	4
	II	25	0	0
	III	25	11	0
	IV	36	15	3
	V	42	0	0
	VI	48	5	0
	VII	56	10	0
	VIII	65	0	2

全体を通じ、雑菌を移植しても、結果はそれ程顕著なものでもなく、前に述べた雑菌の増殖したもので高率の脱殻を見た場合に比すると、ほど遠い感じがする。これは移植した雑菌が数種類の混合したものであり、それらが増殖する割合も、環境の異なるに従つて異なるのは当然であり、そのために結果も亦異つて来るものと考えられる。

6) 単一細菌及び黴の影響

無菌培養虫卵に雑菌を接種し、脱殻を見る様になつた例もあるが、大部分は余り良好な成績ではなかつた。そこで操作中に混入を予想される *Escherichia coli* (3株, E₁, E₂, E₃), *Bacillus subtilis* (B. s.), *Pseudomonas cyanogenes* (P. c.) 並に前述試験管内雑菌から分離した Gram 陽性の大桿菌 (B. p.), Gram 陰性の短桿菌 (B. n.) 及び *Mucor* (毛黴, M.) 等を単一で用い、略々前同様の実験をした。虫卵は培養日数47~60日までの試験管内滅菌水中のもので、これらを各10本の試験管に分け、滅菌水を夫々約2mlになる如く追加し、それに各菌を接種し(1本は対照で無菌)、更に28°Cに20日間保ち、その間に5日間隔で4回の脱殻試験をした。各菌は虫卵と滅菌水のみで栄養に乏しいものに接種されたのであるが、5日目には *Mucor* では白色の雲状浮游物として、亦その他の菌では極めて僅に溷濁が認められた。脱殻液は0.05%及び0.1% Pepton-Glucose-Ringer 氏液で、脱殻方法、鏡検等は前同様である。脱殻液に移して24

第6表 単一の細菌及び黴を移植した場合の脱殻

番号	培養日数	最 高 脱 殻 率								
		E ₁	E ₂	E ₃	B _s	P _C	B _P	B _N	M.	C.
I	47	0	2 (3)	0	0	0	0 (4)	2	15	0
II	47	0	0	0	0	0	0	0	32	0
III	55	0	0	0	0	0	0	0	5	0
IV	55	0	1 (23)	0	0	0	0	0	7 (38)	0
V	60	0	0	0	0	1	0	2 (6)	2 (42)	0

表中()は脱殻寸前のものゝ率

時間後に *Mucor* 以外は液の濁濁を来した。*Mucor* は24時間では白色毛状のものが浮遊しているのが判る程度であり、48時間で雲状のものとして明瞭になり、管底に沈澱していた。仔虫の脱殻率について見ると、*Escherichia coli* 2及びGram陰性の短桿菌では時に2%程度の脱出仔虫を見たが、*Mucor* の他は脱殻に影響したとは思われない。*Mucor* では最高32%を示したものがあり、且つ殆んど各回脱出仔虫を認めたが、脱殻率は各回毎に高低があり、漸次増加するものではなかつた。そして脱殻液に移した時の *Mucor* の繁殖と何にか関係がある様に見えた。対照では仔虫の脱出したものはない。第6表に示した成績は4回の試験の最高脱殻率を示すものであり、亦()内の数字は薄い柔軟な一層のみで囲まれ、脱殻する寸前と思われるものゝ率である。

次にこれら細菌及び黴等の増殖が卵内仔虫に及ぼす害作用であるが、0.05%及び0.1% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に繁殖して、5日間位では仔虫は卵殻内で活潑に運動し、死せるもの或は変性したもの等は見当らなかつた。尙前記以外に *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus haemolyticus* 等については0.1%及び0.5% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に繁殖した程度では全然害作用は見られなかつた。*Staphylococcus aureus* 及び *Staphylococcus citreus* では0.1%の液では多少、0.5%液で卵内仔虫は相当運動不活潑になり、変性したものも見受けられた。但し、*Proteus vulgaris* 以下の菌では脱殻を試みたのが2回であるためその影響は明確でない。

7) *Mucor* を繁殖させた脱殻液での脱殻。

蛔虫卵に対し *Mucor* は何等かの影響を与え、仔虫の脱殻を容易にすることが明かになつたので、更に *Mucor* を繁殖させた脱殻液で無菌培養虫卵の脱殻を試みた。0.1% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に *Mucor* を移植

し、28°C 2日間培養したものに培養日数65日の虫卵を入れ、脱殻試験をした。この際 *Mucor* は前にも述べた如く、白色雲状の浮遊物として、液中或は管底にある。脱殻成績は第7表の通りで、1日後には5~13%程度の仔虫が認められ、略々5日目が最高となり、35%の脱出仔虫を見たものがある。対照は *Mucor* を接種しない脱殻液のものであり、脱殻したものを全然認めなかつた。5日目の鏡検後脱殻液のpHを測定したが、*Mucor* を繁殖させたものでは7.2のものが6.4~6.6程度に変動していた。

第7表 *Mucor* を繁殖させた脱殻液での脱殻(その1)

鏡検日	I	対照	II	対照	III	対照	IV	対照	V	対照
1	13	0	0	0	12	0	5	0	0	0
2	15	0	5	0	18	0	10	0	0	0
5	35	0	10	0	29	0	12	0	5	0
pH	6.4	7.2	6.4	7.0	6.6	7.2	6.4	7.2	6.4	6.6

次に0.1%及び0.5%の Pepton-Ringer 氏液、Glucose-Ringer 氏液、Pepton-Glucose-Ringer 氏液及び Yeastextract-Ringer 氏液の脱殻液に28°C 2日間 *Mucor* を繁殖させ、それらに培養日数55~85日までの虫卵浮遊液約0.2mlを注入し、各液に於ける脱殻状態を観察した。第8表に示したのは0.5%溶液に於ける最高脱殻率であるが、Pepton-Glucose-Ringer 氏液及び Yeast extract-Ringer 氏液では *Mucor* の繁殖も Pepton 或は Glucose 単味のものより良好であり、その溶液内に於ける仔虫の脱出率も亦最高52%或は48%と高率を示した。pHは表に見られる通り7.2のものが6.0~6.4と可成りの変動を示している。

この *Mucor* の繁殖した液中での脱殻方法は各液とも

第 8 表 Mucor を繁殖させた脱殻液での脱殻 (その 2)

番 号	培 養 日 数	最 高 脱 殻 率									
		Pepton		Glucose		Pepton-Glucose		Yeast extract		P.-G.-M. 上 澄	
			pH		pH		pH		pH		pH
I	55	0(20)	6.8	0(3)	6.8	0(52)	6.4	3(65)	6.4	2	6.8
II	56	0(3)	"	0	"	2(80)	"	8(40)	"	4	"
III	56	0(15)	"	0	"	0(10)	"	0(47)	"	0(20)	"
IV	56	5(20)	"	0(4)	"	35	"	48(30)	6.2	0(8)	"
V	65	18(6)	"	0(8)	"	10(66)	6.0	35(60)	"	0	"
VI	65	0(57)	"	2	"	32(9)	6.4	8(32)	6.4	0(25)	7.0
VII	65	0(7)	7.0	0	"	52	6.0	4(43)	"	2	"
VIII	75	0(35)	6.8	12	"	24(38)	"	5(27)	"	0	6.8
IX	85	6(3)	"	8	"	11(35)	"	—		8	"
X	85	10(2)	7.0	0(7)	"	7(42)	7.0	—		10(2)	"

表中 P.-G.-M. 上澄は Pepton-Glucose-Ringer 氏液に Mucor を繁殖させた上澄である ()は脱殻寸前のものゝ率

略と同様で、1日或2日目に見られるのは殆んど第1の方法によるものであり、5日になると第2の方法即ち卵殻全体が菲薄になつて脱殻する虫卵が増加する様であつた。亦この実験では脱出仔虫を殆んど或は全然認めないものでも、卵殻の一部或は全体が菲薄になり、卵内仔虫も活潑に運動し、脱出するのではないかと思われる虫卵が多数に存在した。併しそれらの材料を5日後に續けて観察しても余り脱出した仔虫を認めることが出来なかつた。そして遂には変性した。早期に脱出した仔虫は5日位は形態は多少変化しても、生存し、運動していた。

更に Mucor を増殖せしめた液の上澄の脱殻に対する作用を検討した。即ち 0.5% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に Mucor を接種し、28°C 2日間培養したものを可及的菌糸等を入れぬ様に遠心沈澱管に移し、2,000回転5分間の後、静かにその上澄を他試験管に移し、そのもので虫卵の脱殻を行つた。時に 8~10%の脱出仔虫を見ることがあつても、全体を通じ前述のものに比すると余り良い結果ではなかつた(第8表)。

以上の成績に見られる様に、Mucor を繁殖させた溶液中で最高 52% という高率の脱出仔虫を認め、又その上澄を用いた場合でも、10% 程度程の脱殻率を示す場合がある一方、全然脱殻しないもの或は相当の率のものが脱殻途中のまま経過するという事は、虫卵が虫体から産出されたものではなく、人為的に採取されたものであり、又虫体個体の差がその大きな要因であると思ふ

が、同時に本実験の如く、試験管内で虫卵が培養されている間、引續いて滅菌水中にあるという不自然さも多少影響があるのではないかと思われる。それを改変することにより幾らかでも脱殻率を昂めることが出来るのでは

第 9 表 Mucor を繁殖させた脱殻液での脱殻(その 3)

番 号	培 養 日 数	最 高 脱 殻 率			
		10°C 濾紙上	28°C 濾紙上	28°C 寒天斜面上	対 照
I	53	0	0	0(6)	0
II	53	6(12)	0	0	0
III	53	0(5)	17(2)	14(3)	12(25)
IV	60	10(7)	0	0(3)	0
V	60	0(12)	0	16(15)	0
VI	75	1(6)	2(4)	5(4)	5(8)
VII	75	0(7)	0	0	0
VIII	85	0	0	15(1)	8

表中 () は脱殻寸前のものゝ率

ないかと考え、滅菌水中の培養日数 53~85 日の虫卵を試験管内濾紙上或は寒天斜面上に散布し、5日間 10°C の氷室或は 28°C の孵卵器内に放置した。対照は滅菌水中に 28°C でそのまま保存した。これらに前同様 0.5% Pepton-Glucose-Ringer 氏液に Mucor を繁殖させた上澄を注入し、脱殻を試みた。成績は第9表に示した如

く、寒天斜面上 28°C 5 日間のもので 14~16 % 程度に脱殻しているものがあり、多少よいかと思われるが、滅菌水中にあつたものでも 12 % の脱出仔虫を認めて居り、大差はなかつた。

実験に使用した *Mucor* は通常の如く、酵母エキスを寒天に繁殖させたものでなく、脱殻液と同じものに移植継代してあつたもので、毎回菌叢の一部をとつて移植した。亦 *Mucor* を接種した後 28°C で繁殖させ、虫卵の脱殻に用うるまでの時日についても調べたが、5 日位まで 2 日の場合と繁殖状態も大差なく、脱殻に及ぼした影響も余り違はなかつた。この菌が *Mucor* に属するものであることは東大応用微生物研究所飯塚助教の御教示によつたが、その種については未だ決定を見ていない。

尙本実験中、昭和 29 年 8 月中旬より 9 月下旬までの間に、何の処置も施さなかつた滅菌水中に、無菌的に培養していた試験管 76 本の内 7 本の試験管に 10~30 % 程度の脱出仔虫が存在していた。これについては現在検討中である。

考按及び綜括

蛔虫仔虫の脱殻機転に関する研究報告は多く、種々な方法による人工的孵化脱殻が行われている。豚蛔虫卵ではその人工的な自然(生物学的)脱殻の容易でないことが坂元、中井、Pitts 等のみでなく、豊田の論文の一端からも探知出来るが、仔虫を得る目的でその試験管内脱殻を行い、それが如何に困難なものであるかを痛感した。即ち人工胃液及び腸液等によつては殆んど脱殻するものを認めず、亦強塩酸ペプシン液或は 5 % Antiformin 液を作用させた後、振盪刺戟を与えてもその結果は他の方法によつても比較的好く脱殻する様な虫卵 (12~22 %) の場合に、多少効果があつたと思われる程度であつた (16~39 %)。亦豊田が推賞する稀薄な Pepton 或は Glucose の溶液中に入れて脱殻を試みたが、無菌的に培養出来た虫卵では殆んど脱殻せず、稀に脱出仔虫を認めても最高が 2~4 % であつた。この場合でも時によく脱殻するものを見ることがあり、最高 10~65 % を示した。この如き虫卵では Ringer-Dale 氏液のみでも略々同様な成績が得られ、同一虫卵で 10 回の脱殻を行つたが、各回多少の高低はあつても連続的に脱出殻虫を認めることが出来た。これらのものは脱殻液の著しき濁濁を示すものと、殆んど濁濁を見ないものとがあつたが、無菌試験の結果は何れも雑菌の混入が明かにされた。尙仔虫が卵殻より脱出する方法を観察すると、それは 2 通りの方法で行われているが、従来報告されたもの及び動物の腸

管で見られるものと同様のものであり、所謂生物学的な脱殻であると思われる。雑菌が混在繁殖しても全然脱殻しなかつた虫卵があつたのは無論のことである。

細菌の繁殖による腐敗が蛔虫卵の發育を抑制することは土橋(1932)により報告されているが、その混在する雑菌の種類或はその増殖程度によつては卵殻の諸性状に何等かの変化を与え、亦卵内仔虫に対しその代謝物が刺戟となり、脱殻に好結果を来す様なことも起るのではあるまいか。事実、培養中に雑菌が混在した時でも差して虫卵の發育には影響が見られず、亦よく脱殻する虫卵で、脱殻液中の雑菌増殖を Penicillin 及び Streptomycin で抑制した場合にも略々同程度に脱出仔虫を認め、脱殻液が軽度に濁濁したものは他に比して多少よく脱殻する様な傾向があつた。そしてそれら雑菌を無菌培養虫卵に盲目的に移植した実験では、移植後 10~15 日より余り高率ではないが (6~25 %), 連続的に脱殻した例もある。

そこで操作中混入を予想される *Escherichia coli* (3 株), *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas cyanogenes* 並に前述雑菌中より分離した 2 種の桿菌及び *Mucor* 等を用い、その単一のものが脱殻に及ぼす影響を検べたが、明かに脱殻に好結果を与えたのは *Mucor* のみであつた。*Mucor* を移植した例では各回連続的に脱殻する様になり、最高は 32 % であつた。これら単一細菌或は菌の繁殖による害作用は 0.05~0.1 % Pepton-Glucose-Ringer 氏液に繁殖して 5 日間位では全然認められず、この他 *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus haemolyticus* 等も 0.5 % Pepton-Glucose-Ringer 氏液に繁殖した場合には同様害作用を現わさなかつたが、*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus* では虫卵に相当の変化が見られた。

然して *Mucor* の脱殻に及ぼす影響は、それが虫卵の培養中に及ぼすものよりも脱殻液に於ける繁殖の状態と関係がある様で、実験の結果は 0.5 % Pepton-Glucose-Ringer 氏液或は Yeast extract-Ringer 氏液に繁殖して 2~5 日を経過した状態のものが蛔虫仔虫の脱殻には適していた様であり、その時のこれら脱殻液の pH は 7.2 から 6.0~6.4 に変動していた。*Mucor* の代謝物質は各種について明にされているが、宮路(1953)によれば菌は培養基、培養条件等により著しく形態を変化すると云われ、その形態的变化と同時に諸種代謝も変化するのではないかと考えられ、且つ本 *Mucor* はその種も不明であるので *Mucor* の繁殖が蛔虫仔虫の脱殻に影響を与

えたのは如何なるものであるかを推測するのは早計であると思うが、それは *Mucor* の産出する酵素の卵殻に対する作用によるよりは寧ろ Pepton 或は Glucose 等脱殻液中の成分の分解産物の蓄積或は酸素の欠乏、又は pH の変動等の理化学的刺戟が卵殻を通して適度に仔虫に働き (脱殻途中のまま経過するものでやがて変性するものが多い場合もある)、脱殻を起さしめるのではないかと想像する。

以上より私は蛔虫仔虫の脱殻には仔虫自体が旺盛な生活力を有するものである事と、同時に仔虫の発育が完了するまでに卵殻が受ける変化及び卵殻を透過して作用する諸種の理化学的刺戟の度合が大きな要因であると考えらる。

稿を終るに臨み松林教授の御指導、御校閲、浅見講師の御助言並に東大応用微生物研究所飯塚助教の御助力に深く感謝致します。本論文の要旨は昭和二十九年第二十三回日本寄生虫学会総会及び同年秋の第十四回日本寄生虫学会東日本支部大会に於て発表した。

文 献

- 1) 吉田貞雄(1923): 蛔虫の研究二三, 大阪医学会雑誌, 22: 244. — 2) 大場辰之允(1923): 蛔虫卵子の孵化要約並に感染能力に就て, 台湾医学会雑誌, 228: 176. — 3) 井田正二(1929): 蛔虫の成熟仔虫の脱殻機転に就て, 慶応医学, 9: 89. — 4) 豊田一長(1931): 寄生虫卵(特に蛔虫卵)の人工孵化に関する研究, 東京医事新誌, 2748: 1. — 5) 豊田一長(1932): 寄生虫卵(特に蛔虫卵)の人工孵化に関する研究, (第2回報告), 蛔虫幼虫の経口的並に経皮的感染に就て, 大阪医学会雑誌, 31: 2823. — 6) McRae, A.(1935): The extra-corporal hatching of ascaris eggs. J. Parasit., 21: 222. — 7) 坂元祐実(1939): 蛔仔虫の人工的孵化脱殻に就て, 慶応医学, 19: 1051. — 8) 中井貫一(1940): 蛔虫成熟仔虫の脱殻機転に就て, 日本寄生虫学会記事, 12: 29. — 9) Pitts, T. D.(1948): Experimental hatching of the eggs of *Ascaris suum*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 69: 348. — 10) O'Connor, G. R.(1951): Morphological and environmental studies on the hatching of ascarid eggs in vitro. J. Parasit. 37: 179. — 11) 沢田利貞, 高橋泰二(1952): 蛔虫卵の脱殻について, 日本寄生虫学会記事, 21: 35. — 12) 高橋泰二(1953): 蛔虫卵の実験的孵化について, 寄生虫学雑誌, 2: 102. — 13) 野村舜治, 土橋静佳(1931): 諸種瓦斯体の蛔虫卵発育に及ぼす影響, 慶応医学, 11: 1737. — 14) 稻

留藤次郎(1930): 蛔虫成熟卵の感染機転に及ぼす二三駆虫薬の影響に就て, 慶応医学, 10: 729. — 15) 栗栖莊太郎(1932): 蛔虫卵殻内仔虫の外界に於ける自然脱殻現象及び動物体内特に消化管以外の脱殻に就て, 日本医事週報, 1872: 547. — 16) 土橋静佳(1932): 蛔虫卵発育の抑制現象に関する研究, 慶応医学, 12: 1271. — 17) 宮路憲二(1953): 微の培養法及研究法, 応用微生物学, 下巻: 423.

Summary

Bacteria-free cultivation of ascaris eggs was tried on the purpose of obtaining bacteria-free larvae. The larvae, however, did not hatch out in a sterile media. Effect of the bacterial and fungus contamination upon the hatching was investigated. Seven different solutions were used as media to induce the hatching: 1) artificial gastric juice, 2) artificial intestinal juice, 3) Ringer-Dale solution, 4) pepton-Ringer solution, 5) glucose-Ringer solution, 6) pepton-glucose-Ringer solution, 7) yeast-extract-Ringer solution. Embryonated eggs were put into these solution and kept in a 38°C incubator for 5-8 days in most cases. Examinations for the presence of hatched out larvae were carried out from time to time during the incubation.

Larvae hatched out rather in a few cases in any of the media cited above, and in almost all cases in which fairly a large number of hatched out larvae were detected, bacterial contamination was recognized. One each of pure cultures of several bacterial species together with 2 species of bacillus and 1 species of *Mucor* (molds) isolated from the contaminated media was added to the sterile media with which the embryonated eggs were incubated. None of the bacterial species seemed to promote the hatching of larvae. When incubated with *Mucor*, however, hatching occurred frequently. This effect of *Mucor* upon the hatching is likely to be due to the accumulation of decomposed substance, low oxygen tension and change of pH in the media, all of which were brought about by the growth of the molds.