

低温におけるネオヂクロンおよび二硫化炭素の 蛔虫卵殺滅試験とその効果判定について

久津見晴彦

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和 30 年 8 月 19 日受領)

化学薬品による蛔虫卵殺滅試験は、二硫化炭素や芥子油などによつて行われているが、今までの殺卵試験報告を見ると、効果効定の方法についての記載は柳沢・熊田(1954)以外に見当たらない。筆者はネオヂクロン及び二硫化炭素による蛔・鉤虫卵殺滅試験(久津見・大手1955)を行つたのであるが、その際、「従来正常単細胞卵とすでに死滅した虫卵とを形態的に区別することは困難とされ、染色その他の方法が考案されているが未だ確定的な方法は見当たらない」旨をのべ、その野外試験に際してはすべての虫卵が仔虫包蔵卵と脂肪球変性卵の2種に分れるまで、即ち生死不明の変性卵が変性最終過程の脂肪球変性卵に退化するに至るまでの70~90日間の培養を行い、かゝる退化卵の百分率を以て殺卵率とした。

本報は前報に引続きネオヂクロンと二硫化炭素を用い、実験室的に低温における蛔虫卵の殺滅試験を行い、培養期間中に現れる変性卵数と、その見出されなくなる日数を追求し、併せて其他の虫卵のそれとの関係を調べた結果である。なお、この判定方法に基くところの殺卵試験成績をも併記した。

試験材料と方法

1) 供試薬品

ネオヂクロン(明治薬品工業製)は前報と同じ1ポンド塊入を用い、二硫化炭素は日本曹達株式会社供試品(乳化剤75%含有)を使つた。但し後述試験成績の項での二硫化炭素の倍率は、純粋二硫化炭素のそれに換算表示した。

2) 試験材料

数日間に別々に集められた人尿尿を1:4にまぜ、この中に豚蛔虫子宮下部2cm内の成熟豚蛔虫受精卵を入れ

て充分攪拌し、蛔虫卵含有尿尿を作つた。これを直径17cm、深さ26cmのガラスシリンダーに2lづゝ入れ、前記の薬剤を $1/250$ 、 $1/500$ 、 $1/10000$ 、 $1/2000$ 、容量加え、2例は水を加えた対照とし、各例とも内容を充分まぜ合わせ、全部で10コを氷室に置いた。作用期間は各1、2、3、4週間で、取出す尿尿は1回50ccで合計200ccとし、その量は全体の $1/10$ とした、作用温度は自記温度計で記録し、最低1°C、最高10°Cで24時間のうち1°C~3°Cに8時間、3°Cから10°Cへ上昇するのに13時間、10°Cから3°Cへ下降するのに3時間で、全期間中この形を続けた。

3) 虫卵の培養と観察

薬剤の接触が済んだあと尿尿を攪拌しながら取出し、多量の水道で数回自然沈澱して出来るだけ薬液を除き、最後に遠沈して沈渣を素焼皿にのせ27°C~28°Cで培養した。培養虫卵の形態的観察は3~10日間隔で80日間に11~12回行い、各例100コの虫卵について発育と退化を調べた。

虫卵の分類は正常卵として、(1)単細胞卵、(2)分裂卵、(3)仔虫期卵、異常卵としては、(4)顆粒変性卵以外変性卵、(5)顆粒変性卵、とに分けた。

(5)の顆粒変性卵とは、卵細胞が粗大な油滴状物になつたもの、或いは油滴状物が卵内部に満たされたものであつて、前報の「脂肪球変性卵」と同一物である。(4)の変性卵は、単細胞のままで、細胞外に胞形成、細胞転位、細胞の一部透明化、細胞収縮、細胞崩壊などの異常卵を含有している。しかして以上の各種虫卵のうち、生卵たることが明らかに判定しうるのは、自発運動を行う仔虫期卵、次いでかゝ低い程度で上記(1)(2)(3)の正常卵であり、確実に死卵と判定しうるのは目下の段階では(5)の顆粒変性卵のみである。以上と異つて(4)の変性卵は、恐らくその大部分は時日の経過により(5)となるものの如くであるが、死滅に至ることなく正常の発育をつづけるものも少くともその一部には

Haruhiko Kutsumi: Ovocidal effects of Neo-Gikuron and carbon disulfide on the ascaris egg at low immersed temperature, (Division of parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

存在するものようである。そこで本報では生卵を(3) 仔虫期卵に、死卵を(5) 顆粒変性卵に一応限定して、長期培養によりすべての虫卵がこの何れかに到達した場合の死滅卵数をもつて殺卵率として表した。

試験成績

1. 凡ての虫卵が仔虫期卵と顆粒変性卵とのみになる

日数

(4) の変性卵には各種の変性像があることを前に述べたが、これをひとまとめにして各例に現れる変性卵とし、その数を培養日数毎に求め、最後にそれが消失する日を調べた。

表1に示す如く、全例を殺卵率の高低順にならべ、

第1表 培養日数別(4)群変性卵数の変化(%)と消失日

変性卵数	培養日数							消失日			最終結果 殺卵率%	
	20日	30日	40日	50日	60日	70日	80日	1%及び以下	平均	5%及び以下		
A	34	23	1	0	0			40		40		100
	42	24	11	0	0	0		50		50		100
	59	26	5	0	0			50	46日	40	42日	100
	36	20	0	0				40		40		100
	51	36	3	0	0			50		40		100
B	60	26	12	0	0	0		50		50		98
	33	27	16	0	0			50		50		94
	14	20	9	0	0			50	53日	50	52日	93
	16	15	1	0			40			40		
	26	31	32		4	0	0	70		60		83
	19	13	6	10	0	0		60		60		82
C	44	38	44	41	3	0		70		60		75
	37	23	5	0	0			50		40		75
	26	31	25	35	20	0	0	70	58日	70	52日	67
	22	27	19	2	0			60				50
	22	12	1	1	0			40		40		61
D	41	22	27	23	18	7	0	80		80		48
	15	11	18	9	14	2	0	80		70		29
	10	5	5	0	0	0		50		30		22
	2	1	3	0	1	0	0	50	58日	20	36日	16
	4	3	2	6	1	0		60				20
	7	6	4	1	0			50		40		10
E	3	0	2	2	0	0	0	60		20		4
	1	0	0	0	0	0	0	20		20		3
	0	2	1	0	0	0		40		20		2
	0	22	0	0	0	0	0	40		40		1
	16	0	0	0	0	0	0	30	30日	30	24日	1
	0	0	0	0	0	0		20				20
	7	0	0	0	0	0	0	30		30		1
	1	0	0	0	0	0		20		20		0
	1	0	0	0	0			20		20		0
	0	0	1	0				20		20		0

100%殺卵群と4%以下殺卵群を別にし、その間を20%間隔に区切った。全例とは二硫化炭素とネオデクロンの各稀釈、各作用日数の試験例のすべてであるが、変性卵の出現数と変性像は各殺卵率別にも、以下述べる事項に関しても、二種の薬品では概ね似た傾向を示したので、両者を一樣にして取扱った。

各例に現れる変性卵数は、培養20~30日ではABC群では全虫卵数の20~80%が最も多く、10~50%に互つて現れ、D群の半数とE群では概ね10%以下であり、培養日数とともに減少する。その消失日を調べると、A群(殺卵率100%)では各例とも50日に至つて消失し、B群(同99~82%)では大部分50日、全く消失するには70日、C群(同79~61%)は40~70日、D群も略々同様で、これらの平均数はA群46日、B群53日、C群58日、D群58日、E群80日であった。但し48%殺卵率1例は概当する階級がなく省略した。

以上の変性卵消失日数は、変性卵数が全卵数の1%及びそれ以下の時消失と見做したときの日数で、使宜上5%及びそれ以下になつたときこれを無視すると、31例中13例は上記の日数より10~20日早く消失したことになる。平均値でA群42日、B群52日、C群52日、D群36日、E群24日となる。

次に(1)単細胞卵と(2)分裂卵の消失日を見ると、分裂卵はB~D群40~50日、E群30~40日、単細胞卵はA群50日、B~E群60日である。以上と変性卵の消失日を比較すると、表2に示す如く分裂卵が最も早く消失し、単細胞卵がこれに次ぎ、最後に変性卵が消失する。分裂卵の消失のあと単細胞卵が消失する例は、B~D群15例中11例(73%)、平行して消失するもの4例(27%)、更に単細胞卵より変性卵がおくれて消失する例は、A~D群21例中9例(43%)、平行するもの9例(43%)となつている。E群ではこの関係は明かでない。

以上により(4)の変性卵の消失と同時に、凡ての虫卵は仔虫期卵と顆粒変性卵とのみになることが明らかとなつた。

2. 培養日数20~70日間における仮定殺卵率の誤差範囲

虫卵の生死判定に當つて明らかに死滅と認めたものは顆粒変性卵のみであることは、前述の通りであるが、こゝでは培養20~70日に至つても分裂しない単細胞卵と、変性卵、それに顆粒変性卵をすべて死滅と仮定して、その合計を各時期における仮定殺卵率とした。いまこれを確定した最終結果殺卵率と比較し、仮定殺卵率が上廻つ

表2 判定に不必要な虫卵の消失日比較

	(2) 分裂卵	(1) 単細胞卵	(4) 変性卵
A		50	40
		50	50
		40	50
		40	40
		40	50
B	40	50	50
	50	50	50
	40	50	50
	30	40	40
	50	60	70
C	40	50	60
	40	60	70
	50	60	70
	60	50	60
	40	50	40
D	60	70	80
	40	50	80
	50	50	50
	50	60	50
	50	50	60
E	50	50	50
	60	60	60
	40	60	20
	30	20	40
	40	40	40
E	40	30	30
	30	20	20
	30	30	30
	40	30	20
	30	20	20

卵数1%それ以下を消失と見做す

B~D:	(1)が(2)と同時消失4例	27%
	(2)より遅延消失11例	73%
A~D:	(4)が(1)と同時消失9例	43%
	(1)より遅延消失9例	43%

た殺卵率を示したときに(+)の誤差とし、下廻つたとき(-)の誤差として、各時期における誤差をまとめて表3に示した。表によるとC群(殺卵率61~75%)が培

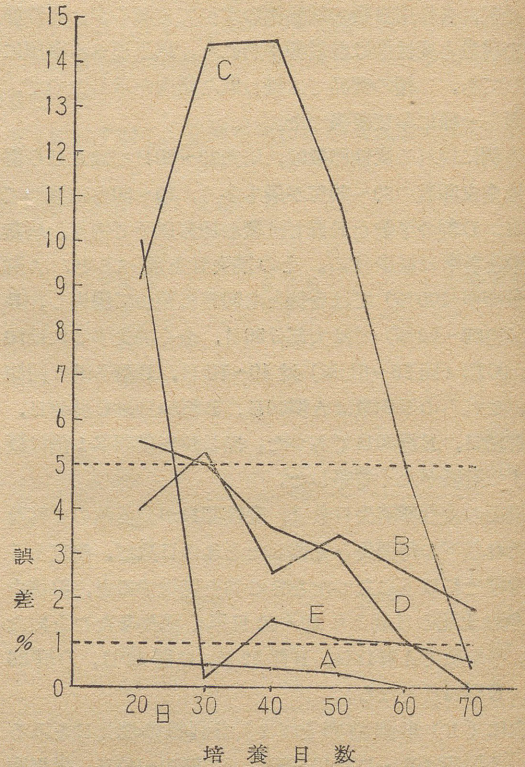
養各期を通じて最も誤差が大きく、B、D群がこれより稍少く、A、E群の誤差はかなり小さいことを示している。これをまとめて図1に示し、培養日数(横軸)と誤差(%、縦軸)との関係を見ると、最終結果殺卵率が100%(A群)、4%以下(E群)の場合には、仮定殺卵

図1 最終結果殺卵率に対する仮定殺卵率の誤差
A~Eは殺卵率による群別を示す

表3 最終結果殺卵率に対する仮定殺卵率の誤差

最終結果 殺卵率	培養日数					
	20日	30日	40日	50日	60日	70日
A	100	0	-1	-1	-1	0
	100	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0
	100	-3	-1	-1	0	0
B	98	-3	-7	-4	-2	-1
	94	+6			+5	0
	93	-9	+3	+4	+1	0
	88	+6	+4	0	0	
	83	+9	+8	+4		+2
	82	0	-3	-6	-7	-2
C	75	+17	+23	+14	-12	-12
	75	+1	-9	-11	-2	0
	67	-19	-8	-15	-10	-13
	67	+8	-14	-12	-19	0
	61	-1	-18	-21	-11	0
D	48		+7	+2	-8	-6
	29	+1	-5	-3	-5	-2
	22	+8	+5	-2	+3	0
	16	+1	+8	-1	+2	-7
	11	-1	-2	-5	-4	-1
	10	+9	+6	-2	-3	0
E	4	+26	0	0	+5	0
	3	+13	0	-3	-1	-2
	2	-2	+1	-4	-2	+1
	1	-1		0	-1	+2
	1		0	-1	0	0
	1	-1	0	-1	+1	0
	1	+21	0	0	0	
	0	+18	0	+2	+1	+2
0	+8	+1	0	0	0	
0	+1	0	+4	0		

仮定殺卵率が最終結果より高いとき(+), 低い場合(-)を示す。



率は培養30日以降70日まで概ね平均1%前後の誤差範囲をもっている。B群、D群においては、同じく培養30日以降、概ね平均5%以下の誤差があり、日数が増すにつれて誤差は小さくなる。

C群(殺卵率61~75%)のみは、培養50日まで平均11~15%の誤差があり、60日5%、70日1%と低下する。これは培養初期において仮定殺卵率を設定しても、それが最終結果と平均1%以下の誤差において使い得るのは、完全な殺卵作用のあつた群か、或いは全く効果のなかつた群にのみ限られることを示している。その他の場合には5%前後、或は10%以上に及ぶ誤差が伴い、培養20~30日の仮定殺卵率の適用は危険率が高いことを考慮する必要がある。

3. 殺卵効果

ネオデクロン及び二硫化炭素の低温(1~10°C)における殺卵成績は表4に示した。ネオデクロンは、250倍1週間で48%、2~4週間で83%から92%と増加したが完全には殺卵しなかつた。500倍では1~4週間で29%、67%、75%、61%の殺卵率であり、1000倍になると

表 4 最終結果殺卵率 (培養 70~80 日目) %

作用日数	薬剤 稀釈	ネ オ ギ ク ロ ソ ン				二 硫 化 炭 素				対 照	
		250×	500×	1000×	2000×	250×	500×	1000×	2000×	A	B
1	週 間	48	29	16	3	100	82	2	0	3	4
2	"	83	67	4	1	100	98	22	1	0	0
3	"	94	75	11	1	100	100	75	0	3	0
4	"	93	61	10	1	100	88	67	0	6	1

註 尿: 尿=1: 4 作用温度 1~10°C

効果はずつと落ちて10~16%となり、対照に比べてやゝ効果が認められるが、2000倍では対照と全く差がない。

二硫化炭素では 250倍で 1~4 週間とも 100%の殺卵率で、500倍では 1~3 週で82% 100%であり、4 週で88%を示した。1000倍では 2~4 週間で22%, 75%, 67%と稍々増加するが完全に殺卵し得ない。対照の各例は 1~6%が死滅したが、作用日数とは関係がない。

考 察

殺卵剤作用後の培養日数が短い場合、そこに現れる単細胞卵、分裂卵、変性卵は必ずしも生死が明かでない。分裂卵は一応仔虫期に達するとしても、単細胞卵と変性卵の生死は長期培養によらねば予測し得ない。著者は前報でその生死の定め方と、殺卵率決定に要する培養日数を報告したが、本報では、その日数が殺卵剤の効果の強弱によつて異なることを明かにした。完全殺卵群(100%)と無効群(4%以下)では平均46日、30日で変性卵が消失し、直ちに判定が可能になる。一方薬剤の作用が有効か無効か判定の下し難い場合(61~75%殺卵率)では、平均58日(大約60日)の培養が必要であることを認めた。今のところ変性卵の生死は、それが顆粒変性卵に至つて確認されねばならず、そのために長期間培養が必要なことは、柳沢(1954)が培養16週でも変性卵が残るという報告や、児玉(1954)の化学薬剤処理後の効果判定に60日の培養を行つた報告からも明かである。本報の結果からも、顆粒変性卵のみを死卵とする判定方法に従うならば、60日以上長期培養が確実な方法であることが確められた。

しかし本報の結果から、判定に要する培養日数は殺卵効果の強弱によつて異なり、かつ完全殺卵群と無効群のそれは他に比べてかなり短いことが分つたので、一定の培養日における殺卵効果の判定を次の如く試みた。即ち或程度培養してなお単細胞卵なるものと、変性卵とは、ともに明記されず死滅と見做して扱われてきたので、今回この二者と顆粒変性卵をまとめて死滅卵と仮定し、

仮定殺卵率を設定し培養20~70日間にわたつて、最終結果とどの程度の誤差があるかを調べた。その結果、仮定殺卵率は完全殺卵群と無効群のみにおいて全期間平均1%前後の誤差で有効なことが認められ、培養30日以降ならば長期培養法に代つて効果判定に役立つことが分つた。但し、様々な殺卵率が得られると推定されるような試験例のすべてに互つて、詳細な結果を求める場合には、本報の結果にも明らかな如く誤差が大きいので長期培養法によらねばならないことも、同時に認められた。この事実は変性卵の取扱いは慎重を要し、将来さらにその詳細な分類を行つて生死が明かにされなければならないことを示している。

最後に殺卵効果についてみると、ネオヂクロソンの 250倍、500 倍では作用日数と共に或程度効果が上つてゆくが、今までの高温下の試験成績より劣り、1000倍以下では急に効果が落ち 4 週間作用でも殺卵作用は見られない。一般に殺卵剤の効力は作用温度の高低により動揺することは既に認められ、予研の柳沢(1954)は最近の試験で、実験的に温度を10°C上下するとによつて有効限界濃度は倍数稀釈の一段階、或いはそれ以上ずれると報告している。この報告と著者の前報(平均気温15°C)の試験成績から考え、上述結果は低温という作用条件に基づくものではないかと推定される。二硫化炭素は前報と異り乳化剤を含む製品を使つたが、これは同条件で行われた試験(児玉, 1954, 柳沢1955)と概ね一致していた。

但し前報の野外試験は約1ヶ月貯溜された人尿中人蛔虫卵について行われ(今回は豚蛔虫卵である)、対照が4週間後20%近く死滅していたとを考慮する必要があり、更に乳化剤、温度差についての分析は今後の問題として残されている。

要 約

ネオヂクロソ及び二硫化炭素により蛔虫卵殺卵試験を行い、作用後生死判定のため培養を行つた。培養日数と共に、分裂卵、単細胞卵、変性卵の順に消失し、最終的

には仔虫期卵と顆粒変性卵とのみが残し、前者を生卵、後者を死卵として効果判定をした。最終結果殺卵率は変性卵の消失と同時に求められ、それに要する日数は殺卵効果の大小によつて差があり、完全殺卵群及び無効群が最も短く平均46日、30日で、他の最も長い場合は80日を要した。

次に単細胞卵、変性卵、顆粒変性卵を死滅卵と仮定して仮定殺卵率を設定すると、完全殺卵群と無効群のそのみは、培養30日以降なれば概ね平均1%前後の誤差で最終結果に等しく、長期培養法に代つて効果判定に役立つ。殺卵効果が不完全な例(殺卵率10~98%)では、仮定殺卵率の誤差は5%前後、或は10%以上にも及ぶので、その適用は考慮を要する。

低温(1°~10°C)におけるネオヂクロンの殺卵効果は、250倍4週間で90%前後、500倍では4週間で60~70%、1000倍では1~4週とも10~16%で、2000倍では対照と差がない。二硫化炭素は75%の乳化剤含有品を使い、純粋二硫化炭素を基準にして、250倍1~4週とも100%、500倍では1~4週でほぼ100%に近くなり、1000倍では4週で70%前後、2000倍では対照と差がない。

稿を終るに臨み御指導と御校閲下さつた部長小宮義孝博士、及び石崎博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) 藤田敏子等(1955): 二硫化炭素と其の拡散剤による糞池内蛔虫卵の死滅試験. 寄生虫学雑誌, 4, (2) 154. — 2) 国井喜章等(1955): 芥子油の殺卵機構. 寄生虫学雑誌, 4, (2) 216. — 3) 児玉威等(1954): 尿酸分離処理の研究7. 神奈川県衛生研究所年報, 21, 231. — 4) 久津見晴彦等(1955): ネオヂクロン及び二硫化炭素による蛔虫卵殺滅試験. 寄生虫学雑誌,

- 4, (1) 5-11. — 5) 松村竜雄等(1955): 殺卵剤の研究, 寄生虫学雑誌, 4, (2) 119. — 6) 佐渡正四郎(1954): 寄生性殺卵剤の研究(1)文献の追試及び市販殺虫、殺菌剤の殺卵力について. 衛生試験所報告, 72, 257-267. — 7) 柳沢十四男等(1954): 化学薬品による蛔虫卵殺滅試験方法の検討, 第14回寄生虫学会 東日本支部大会記事, 20.

Summary

Ovocidal effects of carbon disulfide and Neo-Gikuron on the ascaris ova were studied at the low immersion temperature (1-10°C).

Eggs immersed in reagents, were cultured for 70-80 days and classified as follows: mono cell, division, larvae, slight degeneration and degeneration stages. After the cultivation for the above mentioned days eggs observed were either developed up to the larvae (alive) or turned to the vacuolation (dead) stages. In order to judge the final ovocidal effects of the reagents the period required for culture was 30-40 days in A-group (ovocidal ratio 100%) and E-group (less than 4%), 60 days in other groups. Provided that mono cell, slight degeneration and vacuolation eggs were presumed to be dead, the ovocidal ratio above mentioned in A- and E-group were same to that obtained after culture for 30 days within the error of 1%. On the contrary, no such coincidence were recognized in B-D group (98-10%) from the results obtained from these procedure.

The ovocidal effects were as follows: with 1:250 diluted Neo-Gikuron for 4 weeks a few larvae were recognized, with carbon disulfide in 1:250 dilution for a week ova were completely killed, and a few larvae were recognized in 1:500 dilution for 4 weeks.