

鉤仔虫の鑑別及び分離に関する二・三の方法に就て

西 村 猛

大阪大学微生物病研究所 寄生虫原虫学部 (主任 森下教授)

(昭和31年1月30日受領)

鉤虫の感染経路については近来その研究が急速に進み種々な知見が報告されつつあるが、その感染予防上の基礎となる感染形態としての鉤仔虫の生態についての研究は技術的な面で幾多の困難をともなうため余り進んでいない様である。私は鉤虫症の疫学的な研究をはげめるに当つて之等の困難を少なくする必要にせまられ先ず仔虫の生態観察上に必要な二、三の方法を考案し試みた。

1. 鉤仔虫と自由生活性線虫との鑑別及び被鞘の染色

Baermann (1917) が土壌内の仔虫を分離する装置 (Isolation apparatus) を考案して以来之れを使用する研究は著しい進展をなし、其後之れに種々な改良が加えられてきたが、Baermann 装置で仔虫を集めた場合屢々自由生活性線虫 (Free living Nematoda) が多数に混じり鉤仔虫との鑑別に多大の労力を要することはよく経験する処である。

この点に関し Baermann (1917) は 7.5% 苛性ソーダ Cort (1925) は 5% フォルマリンを夫々使用して鉤仔虫と自由生活性線虫 (以下 FN と略称) の薬剤に対する抵抗性の差によつて之れを鑑別し得るといつた。即ち Baermann 装置を以て集めた鉤仔虫 と FN の混合する水中へ之等の薬剤を作用せしめると、一定時間内に於ては抵抗性の強い鉤仔虫のみが生じ FN は斃死するから鑑別が容易となるとするものである。其後この方法を Van Thiel & Wolff (1931) が追試し両者の鑑別法を比較しているが何等の新しい方法を考案するに至っていない。

Behrenz (1955) は螢光色素 Acridinorange を用いて犬鉤虫の一種 *Uncinaria stencephala* の仔虫の被鞘を染め、之れにより FN との鑑別を容易にすることが出来ると述べた。即ち *Uncinaria* と FN の混合する水中に $1/1000$ 乃至 $1/5000$ の割合で溶解する様に Acridinorange を入れ螢光顕微鏡によつて観察すると、*Uncinaria* 仔虫の被鞘は第一乃至第二期仔虫では綠色に第三期仔虫

は赤銅色に染り、一方 FN は斃死すれば体細胞が染り生存する場合には染らないから鑑別が容易だと述べている。

私は1953年外用殺菌剤として広く用いられているマーゾニン (エチルメルクリチオサルチル酸ナトリウム 100 倍等張水溶液) を使用し、抵抗性の差により鉤仔虫と FN との鑑別を試みた際に之れに色素を併用するか又は色素性消毒剤の単独使用によつて鑑別をより容易とすることが出来ることを知つた。尚此の際使用する色素によつては仔虫の被鞘のみを染色して何等生体に障害を与えないものがあることを知り併せて之れを追究した。

実験方法

Baermann 装置によつて土壌内より集めた FN 又は尿槽から採取した尿尿より換水法によつて集めた FN を、糞便の濾紙培養によつて得た均等に発育した鉤仔虫と混じり尖底試験管に集めた後ホールスライドグラスに移して濾紙により可及的に水を吸い取り、素め作成しておいた各種濃度の薬剤を作用せしめた。此の他色素を使用した場合には之れを水洗すると一層判定が容易となるので一定時間接触後尖底試験管に移し水を加えて色素を薄め遠心して上水を捨てる方法で水洗を行った。

尚観察が数時間に及ぶ場合にはホールスライドグラスにカバーグラスをかけ周囲をパラフィンで封じて蒸発を防ぎ 28°C — 30°C 孵卵器内に保つた。

実験に使用した人鉤虫は全てツビ=鉤虫 (*Ancylostoma duodenale*) (以下 Ad と略称) で同一人の糞便内卵を培養して得たものであり他に犬鉤虫 *Ancylostoma caninum* (以下 Ac と略称) を使用した。

成 績

先ずマーゾニンに対する Ad と FN の抵抗性の差についてみると第1表に示す通りであつて、 $1/1000$ — $1/3000$ 濃度では30分の接触で FN は不動となり Ad も又不動となるか活動不活潑となるが、 $1/5000$ — $1/8000$ 濃度では30分後に FN が不動となるに反し Ad は2時間後まで殆ど変化なく $1/10000$ — $1/20000$ 濃度では逆に FN に於いて2乃至4時間後まで不動とならぬものが認められる。即ち之等のことか

Takeshi Nishimura: On some methods for differentiation and isolation of hookworm larvae. (Department of Parasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University.)

ら考えて両者の鑑別の目的には 1/5000 乃至 1/8000 濃度の液を30分間作用せしめることが有効であることが判る。

次に之れにピクリン酸、赤インク、デラフィロドヘマトキシリン、メチレン青、マーキロクローム、ギムザ氏液を併せ用いた処、前2者の色素では Ad, Ac, FNを問わず不動となつたものは被鞘を除いた体細胞が着色し動くものは着色しなかつたが、後の4者では不動のものは前2者同様に体細胞が着色するが、動くものも Ad, Ac では被鞘のみが瞬間的に着色することを知つた。即ち第2表に示す様に 1/5000 マーゾニンと 1/100 マーキロクロ

ームの併用では接触30分後に、Ad, Ac は被鞘が着色したままで運動能には変化がなく、60分乃至5時間の接触では運動不活潑又は不動となるものが漸次増加し不動となつたものは被鞘と同様に体細胞も着色するに至るものである。

1/100 マーキロクロームの単独使用では30分乃至3時間の接触では被鞘の着色のみで運動能は変化がなく5時間以上の接触で運動不活潑又は不動となるものが漸次増加する。赤インクでは最小限接触5時間までは運動能に変化がなく被鞘も着色しないが21時間以上では

第1表 各種濃度のマーゾニンに対する抵抗性

濃度	30分		1時間		2時間		4時間		24時間	
	Ad	FN	Ad	FN	Ad	FN	Ad	FN	Ad	FN
1/1000	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
1/3000	△	●	△	●	△	●	●	●	●	●
1/5000	○	●	○	●	○	●	●	●	●	●
1/8000	○	●	○	●	○	●	△	●	●	●
1/10000	○	●	○	●	○	●	△	●	△	●
1/20000	○	△	○	△	○	△	△	●	△	●
Control (水)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

●……不動 ●……一部不動 大部分が微動 △……殆どが不活潑な運動 ○……運動活潑

第2表 色素による着色状態

接触時間	1/100 マーキロクローム		1/100 マーキロクローム		赤インク		1/100 ピクリン酸		1/100 ピクリン酸	
	1/5000 マーゾニン	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態	着色状態
30分	○	S+	○	S+	○	-	△	-	△	-
1時間	△	S+	○	S+	○	-	△	-	△	-
2時間	△	S+	○	S+	○	-	△	-	△	-
3時間	●	S++	○	S+	○	-	●	±又は+	●	±又は+
5時間	●	S++ +	△	S+ ±	○	-	●	±又は+	●	±又は+
21時間	●	S++ +	●	S++ ±又は+	●	±又は+	●	++	●	++
24時間	●	S++ +	●	S++ ±又は+	●	±又は+	●	++	●	++

S+……被鞘のみ着色 +……体細胞着色 ±……口腔、肛門の一部が着色
++……濃厚に着色 -……着色せず

活動不活潑又は不動となるものがみられる。

$1/5000$ マーゾニンと $1/100$ ピクリン酸の併用では30分後に Ad, Ac 共に運動不活潑なものがみられ 3乃至5時間では不動となるものが漸次増加し, 21時間以上では全てが不動となる。尚此のことはマーゾニンを併用しない場合でも略々同様であつた。

以上の様に色素によつては被鞘を着色せしめるものとそうでないものがあるが, 虫体が不動(斃死と見做し得るが明らかではない)となつた場合には, Ad, Ac, FN の例外なく体細胞が速かに着色するもので, 之等の点を利用して Ad, Ac, FN の鑑別には大別して第3表に示す二つの方法が考えられる。

第3表 色素による着色の差異

色素	種別		Ad		Ac		FN	
	虫体の状態		動	不動	動	不動	動	不動
マーキクロローム					S+	S+		
デラフィロド					S+	S+	-	+
ヘマトキシリン								
メチレン青					+	+		
ギムザ								
ピクリン酸			-	+	-	+	-	+
赤インク								

即ち第1の方法はマーキクロローム, メチレン青, デラフィロドヘマトキシリン等の被鞘の着色する色素を用いるもので, 之れに短時間接触せしめる場合にはFNは生存に影響がなく着色しないが Ad, Ac は被鞘が桃色又は緑色に着色し明らかに区別し得ることとなる。此の結果は Behrenz が Acridinorange を用いて行つた鑑別法と極めて近似して居り, 本方法では $1/100$ マーキクロロームが色調其他の点から最も有効であると思われた。

第2の方法は Ad, Ac 仔虫の被鞘を染めないピクリン酸, 赤インクを用いるもので, ピクリン酸はマーゾニンを併用しなくても単独で相当の毒性を有する点からこの $1/100$ 溶液を30分間作用せしめるとFNは不動となり従つて体細胞が黄色に着色するに至るが, Ad, Ac は染らないうで運動しているので鑑別することが出来る。尚赤インクは $1/5000$ 乃至 $1/6000$ マーゾニンを併用すれば目的を達することが出来るがピクリン酸の方が鑑別にはより簡単だといえる。

以上何れの方法に於いてもその鑑別は極めて容易となり短時間で目的を達することが出来ることとなつたが, 本方法は Baermann, Cort 等が用いた様な仔虫の薬剤に対する抵抗性の差のみに依存するのではないから Ad, Ac

が不動となる様な低温下に於いても充分之れを鑑別し得るものである。併し乍一方 Ad と Ac との間には薬剤に対する抵抗性の差が認められず鑑別が不可能であり, 又被鞘しない仔虫は抵抗性が弱く且つ着色もしないから之等についての鑑別が不可能である点は本法の欠点である。尚此の他FNの種類は極めて多いため本実験に供した以外に之等の薬剤に特別に強い抵抗性を有する種類が無いとは言えない不安もないではない。

以上は Ad, Ac とFNの鑑別について述べたが Ad, Ac は共にマーキクロローム, メチレン青, デラフィロドヘマトキシリンによつて被鞘を容易に着色することが出来, しかもその仔虫の運動能に外見的に何等の障害を与えないことを知つたので, 着色仔虫の生存日数と感染能力について知るため実験を行つた。即ち先ず仔虫の生存日数を $1/100$ マーキクロローム並びに $1/10$ デラフィロドヘマトキシリンによつて着色した仔虫について観察した処第4表に示す通りであつて, 30分乃至1時間の接触では正常な仔虫と比較して生存力に何等の差異もないことを知つた。

第4表 着色仔虫の生存日数

色	素	接触時間	着色までの仔虫の経過時間		生存日数	
			着色仔虫	正常仔虫		
$1/100$	マーキクロローム	30分	15日	12~16日	16日以上	
	〃	1時間	15日	10日以上	10日以上	
	デラフィロドヘマトキシリン	30分	5日	15日以上	15日以上	
	〃	1時間	6日	15日以上	15日以上	

孵卵器内温度 28~30°C

次に感染能力については $1/100$ マーキクロローム及び $1/10$ デラフィロドヘマトキシリンで夫々着色した Ad 仔虫をマウスに経口的経膈的に与え, 一定期間後肺臓内の仔虫の有無を検索した処第5表に示す通りであつて, 経口, 経膈を問わず他の正常仔虫による感染実験と同様に全例に於て5乃至6日後肺臓内に仔虫を認め感染能力にも変化のないことを知つた。

この様に被鞘を着色した仔虫は正常の仔虫と生存力, 感染能力に於いて何等変る処がないことを知つたが, マーキクロロームでは桃色にメチレン青, デラフィロドヘマトキシリンでは緑色に夫々着色することが可能であることは此後種々な方面に利用価値を有するものと思つて

第5表 着色仔虫の感染能力

培養後の仔虫の経過日数	投与より斃殺までの日数	仔虫を認めた臓器	経口感染	経膚感染
11 日	6 日	肺 臓	+	+
10 日	6 日	〃	+	+
17 日	5 日	〃	+	+
20 日	6 日	〃	+	+
9 日	6 日	〃	+	+

いる。尚これに関連して之等着色仔虫をシャーレ内に盛った土壤内に放ち 4 時間後 Baermann 装置によつて集めたが、此の実験に於いては集まった仔虫は脱皮したものが多く着色仔虫は少数を認めたのみであつたから此の様な方面への利用は一考を要するのではないかと思つている。

2. 水中又は土壤内の鉤仔虫の生態観察についての家兎膀胱膜の利用

鉤仔虫の水中又は土壤内に於ける経膚感染に関連した生態は今だ詳らかではなく、ただ経膚的に侵入する場合に組織又は血清に対して陽性の向化性 (Chemo-Tropism) を発現することが分島 (1933) 北山 (1935) 等の詳細な研究によつて知られている。私は之等の向化性を利用して経膚感染時の状態に最も近似した条件に於いて仔虫の経膚的侵入の態度を観察する目的を以て家兎膀胱膜の使用を試みた。即ち膀胱膜では分島が使用した寒天よりも一層感染時の実体を捉えることが出来るものと考えられ、これに血清を入れることにより仔虫の侵入を確認することが出来た。鉤仔虫が血清又は組織に対して陽性の向化性を有するとはいえ経膚的に侵入するには先ず仔虫の運動を可能とする環境条件が必要であることは当然で、例えば土壤内に於いては適当な温度と湿度が保たれば侵入可能であるが水中の仔虫はどのような接触によつて組織内に侵入するものであろうか。私は之等の点について観察するために膀胱膜を利用したものであるが、ここでは此の使用によつて観察された仔虫の向化性についての検討は行わずにおく。

実験方法

血清入家兎膀胱膜とは斃死した家兎を直ちに解剖して膀胱膜を摘出しマーゾン液で洗滌した後之れに血清 (人, 馬, 家兎) を入れ口を縫糸で縛つたものである。

水中に於ける観察は表面積 56.71 cm² 高さ 12cm のピーカー又は表面積 59.41cm² 高さ 2.5cm のシャーレ内に一定温度の水道水を入れ水深 0.4cm 乃至 3.8cm として之

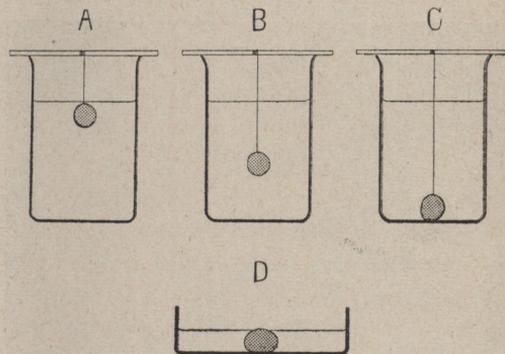
れに予め算定した感染型鉤仔虫を入れ、此の水中に夫々の位置に家兎膀胱膜を吊して仔虫の侵入の有無を検した。実験は全てツビ=鉤仔虫を用い孵卵器内で行い 29°C—37°C の水温下で 2—5 時間又は 24 時間接触せしめた。

使用したツビ=鉤仔虫は糞便を濾紙培養して得たもので、実験に際して之等仔虫を尖底試験管に集めた後、水量を一定としてその 0.1cc を採り数を正しく算えることを数回繰返しその総和を平均して一定量の水中に於ける仔虫推定数を出し使用した。血清内侵入の仔虫は実数を算えたが組織内の仔虫は実数を算えることが不可能であつたので、実験後水中に残存した仔虫を前述と同様方法で算え血清内侵入の仔虫数を之れから除したものを組織内仔虫推定数とした。

成 績

水中に於ける実験は第 1 図に示す様な A, B, C, D の方法で行つた。即ち A は膀胱膜を水表面に、B は水中の中間部に、C は管底部に膀胱膜が触れる程度に、D は水深を浅くして管底部に充分接触する様に夫々位置せしめたもので、水中に於ける仔虫は通常静置すれば水底に数個乃至は十数個の集塊をなしているものである。

第 1 図 膀胱膜の位置



之等の実験結果は第 6 表に示す通りであつて、A, B の場合には血清入膀胱膜への仔虫の侵入は認められず C, D の場合即ち膀胱膜が水底に接触した位置にある場合のみ仔虫の侵入が認められた。仔虫の侵入を認めなかつた A, B の場合には仔虫は水底に塊をなすのみで何等の反応も示さず、又水を攪拌して仔虫が水中に游泳する状態としても侵入は全然認められなかつた。実験は概ね水温 30°C と 37°C で行つたが仔虫の侵入は両者の場合共認められ、水温 30°C で D の状態に置いたものが比較的侵入率が高い様であつた。仔虫との接触時間は 2—24 時間

第6表 各位置に於ける仔虫の家兎膀胱膜侵入数

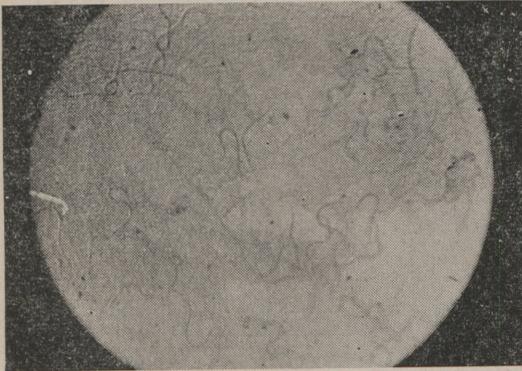
膀胱膜 内容	血清 量 (cc)	接触 温度	接触 時間	位置	培養後 の仔虫 の経過 時間	水深 (cm)	実験仔 虫数 (推定 数)	血清内		膀胱膜組織内		水中残存	
								実数	%	推定数	%	推定数	%
人血清	7	29	24	A	120	3.8	11625	0		0		11625	100
〃	5	〃	2	B	120	3.8	11625	0		0		11625	100
* 〃	7	30	24	B	264	3.8	9500	0		0		9500	100
〃	8	〃	2	C	116	1.9	4000	0		0		4000	100
〃	7	37	5	C	115	1.3	2250	2	0.008	648	28.8	1600	71.1
〃	4	〃	2	C	116	1.9	18400	3600	19.6	10640	57.8	4160	22.6
〃	7	30	5	D	115	0.7	2750	787	28.6	1363	49.6	600	26.8
〃	〃	〃	3	D	145	0.7	5100	50	0.9	3450	67.6	1600	31.4
〃	〃	〃	24	D	145	0.7	5100	0		3380	66.3	1820	33.7
**透折 人血清	7	30	5	D	114	0.4	25000	31	0.1	8569	34.3	16400	65.6
〃	〃	37	5	D	114	0.4	25000	12	0.04	488	19.6	24500	98.0
馬血清	7	37	5	D	120	0.4	20600	40	0.19	6760	32.8	13800	67.0

* 攪拌して仔虫を水中に浮遊せしめて接触させる

** セロファン紙で24時間透折

あるが接触30分後には盛んに膀胱膜組織内に頭部を挿入している状態が観察される。尚長時間の接触では血清の腐敗が起ることもあり、2時間の接触で充分の侵入を認

第2図 膀胱膜組織内の仔虫の塊集(接触2時間)



めることが出来た。侵入率の最高は77.4%でCの状態に保つた水温37°Cで接触2時間の場合であつた。血清は人血清を主として使用したが馬、家兎の血清に於いても同様の侵入が認められることを知つた。尚ここで重要な処見は膀胱膜に侵入した仔虫が組織を穿通して内部の血清内へ侵入したものよりも膀胱膜組織内に止まっているものが多く認められた事実で、之等の仔虫は組織内に個々に見られることもあるが多くは数カ所に多数が塊集(第2図)していることが観察された。尚之等の膀胱膜内に侵入した仔虫を集め之れをマウスに経口的に投与し48時間後剖検した処、肺臓内から仔虫を検出し得たので感染能力をもつ仔虫が膀胱膜に侵入したものであることを確め得た。

以上の様にツビニ鉤仔虫は血清入家兎膀胱膜に侵入することを知つたが膀胱膜に血清を入れず水又は生理的食

第7表 膀胱膜内容による仔虫侵入数の差異

膀胱膜 内容	量 (cc)	接触 温度	接触 時間	位 置	培養後 の仔虫 の経過 時間	水深 (cm)	実験仔 虫数 (推定数)	血清内		膀胱膜組 織内		水中残存	
								実数	%	推定 数	%	推定 数	%
血清	7	30°C	5時間	D	145	0.7	6800	50	0.7	3450	50.7	3287	48.3
水								0	0	13	0.2		
血清	7	37°C	5時間	C	115	1.3	2250	2	0.09	648	28.8	1600	71.1
生理的食塩水								0	0	0	0		

塩水を入れた場合には殆どの実験例に於いて仔虫の侵入を認めなかつた。即ち第 7 表に示す様に同一のビーカー内に血清を入れたものと相接して位置せしめても仔虫の侵入は殆ど認められず、血清入膀胱膜内のみ多数の仔虫の侵入が認められたことは興味を深かつた。

尚家兎膀胱膜は之れを適時に得ることが困難なのでセロファン紙、Fish skin 等で代用可能ではないかと考え試みたが、実験の全例に於いて仔虫の侵入を認めなかつた。

水中に於ける之等の実験と共に土壤内に血清入膀胱膜を埋め仔虫の侵入を観察したが水中に於けると同様に多数の仔虫の侵入することを認めた。

考按及び総括

鉤虫症の疫学的な研究は感染形態としての鉤仔虫の生態を追及することがその基礎をなすものと信ぜられる。

私は之等の研究を行うに当り先ず鉤仔虫の生態を観察する上に便宜なる方法を考案する必要にせまられたので種々の試みをなした処、此の内の二・三が之れに役立つものと思われた。即ち (1) Baermann 装置によつて土壤内より集められた鉤仔虫と自由生活性線虫との鑑別方法 (2) 鉤仔虫の被鞘の染色 (3) 血清入家兎膀胱膜による水中又は土壤内の鉤仔虫の経膚感染時の態度の観察がそれである。

(1) に就いてはその鑑別は従来より形態的な差によつてなされるか、又は薬剤に対する両者の抵抗性の差によつてなされて来たが前者に於いては多大の時間と労力を要し後者に於いては低温下ではその鑑別が困難となるものであつた。私は此の点について Picrin 酸を使用することが極めて有効であり、又 (2) に於いて述べる色素とマーズニンを併用しても鑑別には同様に有効であることを知つた。

Behrenz は Acridinorange を用いて略々同様の効果があると述べているが螢光顕微鏡を使用して居り、本法は之れを必要としない。併し乍本方法によつてもツビニ鉤仔虫と犬鉤仔虫との鑑別は不可能であり、被鞘せざる之等仔虫も抵抗性が弱いため鑑別不可能であることが欠点とされる。

(2) に就いてはマーキロクローム、メチレン青等の色素を使用し仔虫に一定時間接触せしめると、仔虫は運動能、感染能力に何等の変化がなく被鞘のみが着色するもので前者では桃色に後者では青色に着色する。大浜信賢 (1941) はツビニ鉤虫、アメリカ鉤虫の感染仔虫の化学薬品に対する抵抗性の実験に於いて、之等の色素には

抵抗性が強いとは述べているが被鞘が着色することは言及していない。

又小西政雄 (1952) も感光色素の鉤虫に及ぼす影響をシアニン系感光色素 Pos IV7 によつて調べているが、被鞘が黄色に染着するものがみられると述べているのみである。以上要するに仔虫の運動能に変化を与えず被鞘のみが着色出来ることは之等着色仔虫によつて自然界に於ける仔虫の行動を調べる等種々の利用価値があるものと思われる。

(3) に就いては鉤仔虫の血清に対する陽性の向化性を利用して家兎膀胱膜を以て経膚感染時の状態に近い条件に於いて仔虫の侵入の態度の観察を行った。即ち家兎膀胱膜内に血清を入れて水中に存在するツビニ鉤仔虫と接触せしめると接触の方法によつては仔虫は膀胱膜内に侵入するものであることを知つた。此の方法による水中の仔虫の侵入に就いての観察では、仔虫は水中を游泳して侵入することではなく管底を匍行してのみ侵入が可能なるものであらうと推定することが出来た。勿論本法は血清又は組織の温度を人体に於けると同様としないから此の点に於いて不備なることは免れ得ないが、山口 (1930) 其他の諸氏によつて討議された水中に於ける鉤虫の経膚感染の有無に関する問題について些かの示唆を与えるものと思う。

以上本報告はただ鉤仔虫の生態を調べる上に役立つ方法の二・三を述べたに過ぎないが、此後之等の方法を利用して種々な方面の研究を進めたいと思つている。

終りに臨み種々御懇篤な御指導と御校閲を賜つた主任森下教授に深甚な感謝の意を表します。

文 献

- 1) Behrenz, W. (1955): Die Scheidenfärbung, ein einfaches diagnostisches Hilfsmittel zur Unterscheidung infektiöser Hakenwurmlarven von unbescheideten freilebenden Nematoden und ihren Larven. Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie, 6, (1) 111-114. —2) Baermann, G. (1917): Eine einfache Method zur Auffindung von Ankylostomum. (Nematoden) Larven in Erproben Mededeel. Geneesk. Lab. Weltevreden, Feelsbundel, Batavia. 41-47. —3) Cort, W. W. (1925): Investigations on the Control of Hookworm disease. XXXIV: General summary of results. Am. J. Hyg. 5, 49-89. —4) 小西政雄 (1952): 感光色素の寄生虫卵に及ぼす影響 (第 1 報, 鉤虫仔虫に及ぼす影響) 日本寄生虫学会記事, 124-125. —5) 北山 博 (1935): 十二指腸虫(鉤虫)の向

性に関する実験的研究, 第一編, 鉤虫の向性一般, 就中向化性並に夫れと固有宿主血清との關係に就て, 大阪高等医学専門学校雑誌, 3, (2) 5-32. —6) 大浜信賢 (1941): *Necator americanum* 並に *Ancylostoma duodenale* の成熟仔虫の諸種化学薬品に対する抵抗試験, 台湾医学会雑誌, 40, (11) 30-43. —7) Van Thiel, P. H. & Wolff, A. E. (1931): A comparison of the chemical methods used to separate larvae of the hookworm of man and animals from the larvae of free living nematodes. *Am. J. Hyg.* 14, 726-732. —8) 分島 整 (1933): 鉤虫科 *Ancylostomidae* 成熟仔虫の趨向性 *Tropism* に関する実験的研究, 第三報, 鉤虫科 *Ancylostomidae* 成熟仔虫の向化性 *Chemotropism* に就て, 台湾医学会雑誌, 32, (10) 43-69. —9) 山口 操 (1930): 十二指腸虫症に関する実験的研究, 新潟大学病理学教室研究報告, 12, 74-75.

Summary

For differentiating and isolating the hookworm larvae from free-living nematodes, the author has attempted several methods and come to the conclusions that the following ones are practically useful.

1) By adding 1/100 solution of picric acid to the mixture of larval nematodes put in the hole glass, free-living nematodes may die out within

30 minutes, while the hookworm larvae (*Ancylostoma duodenale*) may persist. Yellowish colouring may occur in the former with the death, while the latter remained unstained and alive still after 5 hours.

2) A 1/100 solution of mercury chrome will stain the sheath of hookworm larvae pinkish from the moment of contact to it, while solutions of Delafield hematoxylin and methylene blue will stain it greenish. Within 30-60 minutes these solutions did not cause any change of motility, infectivity and longevity of life. Thus by staining the sheath of hookworm larvae with these dyes it is possible to distinguish them from free-living nematodes which are unstained.

3) When the fresh rabbit bladder filled with serum (human or horse or rabbit) is put in the water or earth containing hookworm larvae, the latter penetrate into the bladder in which the larvae remained mostly in the tissue and were found to agglomerate in some groups, while the rest were found free in the serum. Without serum, however, the bladder was not penetrated by the larvae. This method is thought quite useful for isolating hookworm larvae in certain conditions.