

蛔虫卵変性に関する研究

(3) 芥子油及び二硫化炭素による各種処理条件に於ける変性蛔虫卵の出現様式

柳 沢 十 四 男

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和32年11月5日受領)

筆者(柳沢, 1955)は既に各種薬剤処理蛔虫卵に出現する変性卵の分類及び変性程度と変性形態との関連について報告し、更に之等変性卵の分類が他の薬剤処理による虫卵変性の表現にも使用しうることを述べた(柳沢, 1958)。今回は薬剤処理の種々の条件に於ける変性虫卵の出現様式を量的に観察し、併せて従来行われて来た仔虫形成率による薬剤効果の表現方法と比較検討したので、ここに報告する。

材料及び実験方法

用いた虫卵は豚蛔虫子宮内受精卵で、子宮末端部より採卵後蒸溜水にて遠心水洗し実験に供した。使用せる薬剤は芥子油(東京化成製品以下 M. oil と略す)及び二硫化炭素(日本曹達製品 CS₂)である。

薬剤は使用に当り4倍量の花王エマルゲン #408と混和し、蒸溜水にて適宜稀釈して薬剤の均一な懸濁液を調製した。稀釈液の濃度は薬剤自身の稀釈倍率を以て示し、M. oil では1,250×より2倍間隔にて40,000×迄、CS₂では62.5×より同様2倍間隔にて4,000×迄の各種稀釈液を使用した。又対照実験に用いた虫卵処理液は、実験群の最高濃度に於けるエマルゲン単独稀釈液を使用した。

虫卵処理の方法は2種薬剤の各種稀釈液40ccを管瓶にとり、之に虫卵を加えて攪拌混和し、処理時間6日、14日、処理温度10°、20°、30°Cの条件のもとで処理を行った。処理後虫卵を蒸溜水にて4回遠心水洗し、瓦培養法にて30°Cで培養した。培養開始後12、20、30日の各時期に100コ以上の虫卵を筆者の分類法(柳沢, 1955)に従って分類観察し、その百分比を以て出現率とした。

TOSHIO YANAGISAWA: Studies on denaturated ascaris eggs (3) Modes of occurrence of denaturated ascaris eggs exposed to oil of mustard and carbon disulphite *in vitro*. (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo)

今回は細分類せる変性卵を下記の如く A, B, C の三種変性卵に大別した。即ち単細胞変性卵を A, B 2種に分類し、A種変性卵に顆粒化、転位、胞形成、強度萎縮及び崩壊を、B種変性卵に上記A種卵以外の単細胞変性卵を含むものとした。C種変性卵は多細胞変性卵で不等分割球卵、及び分割球及び胚の変性を示す虫卵全部を包括した。

変性卵の出現様式を仔虫形成率による従来の表現法と比較する為に仔虫形成率(30日培養)より次の三種の濃度を仮設し表現に便ならしめた。即ち無効濃度(仔虫期卵>80%)、有効濃度(仔虫期卵<10%)、中間濃度(10% ≤ 仔虫期卵 ≤ 80%)の三種濃度である。

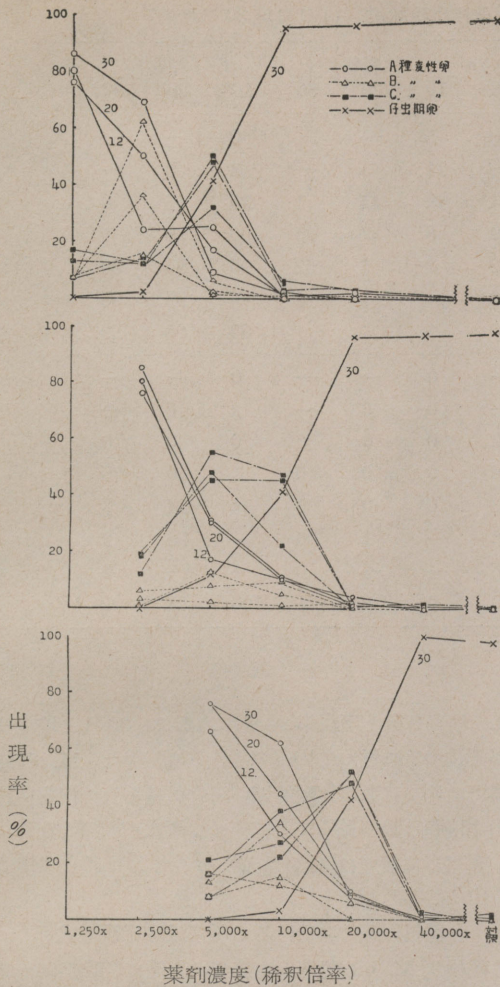
実験結果

三種変性卵及び仔虫期卵の各種処理条件に於ける出現様式は第1図(M. oil)及び第2図(CS₂)、第一表に示す如くである。各種虫卵の出現率は特に記さない限り30日培養結果に於て表現、比較した。

1. 各種処理条件に於けるA種変性卵出現様式

a. 薬剤濃度と出現率: 一般に高濃度程その出現率は高く、濃度の減少に伴い出現率も減少する。M. oil 処理群では最少有効濃度で60%以上の出現を示し、中間濃度で何れも40%以下に減少した。CS₂ 処理群では最少有効濃度で既に著しく減少する場合(処理時間6日、処理温度10°Cの場合、以下6日—10°Cと略記)もあつた。しかし最高無効濃度では両薬剤共、総ての処理条件のもとにA種卵の出現率は5%以下であつた。従つてA種変性卵の出現様式を薬剤濃度と関連して見た時、高濃度に高い出現率を示すシグモイド曲線に類似する出現様式と思われた。

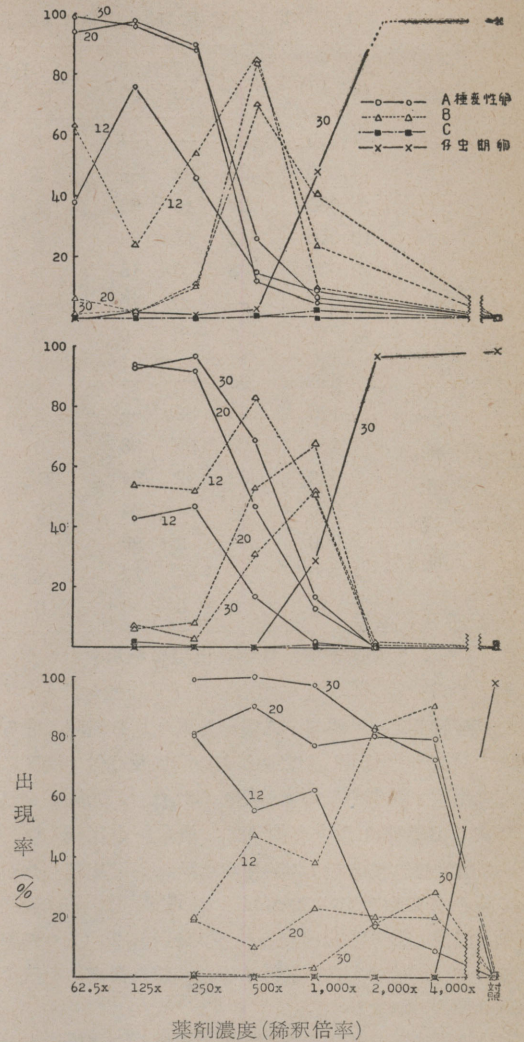
b. 処理温度と出現率: A種卵のシグモイド類似曲線は処理温度の上昇と共に右方即ち稀薄溶液側に移行して出現する。処理温度10°Cと20°Cとの間のA種卵出現率の差は20°Cと30°Cのそれと比較して後者間の差は



第1図 各種処理条件に於ける芥子油処理変性卵, 仔虫卵の出現状況 (6日処理上より処理温度 10°, 20°, 30°C, 曲線上の数字は培養日数)

前者間の差よりも著しかった。即ち M. oil-6日-10°C, 同-20°C, 同-30°C の出現率を 10,000×液で比較すると -10°C, -20°C では殆ど 10% 以下の A 種卵出現率であるが, 30°C に於ては 62% の高率を示した。同様の現象は M. oil-14日 の 10,000×液, CS₂ の 1,000×液 に於ける各処理温度の A 種卵出現率を比較することによつても示された。

c. 処理時間と出現率: M. oil 処理群に於ては処理時間の延長は A 種卵の出現率を高めるが前記処理温度の様な著しい影響は認められなかつた(第1表)。しかし CS₂-6日-10°C, 同-14日-10°C, の二者及び CS₂-6日-20°C,



第2図 各種処理条件に於ける二硫化炭素処理変性卵, 仔虫卵の出現状況 (6日処理上図より処理温度 10°, 20°, 30°C)

同-14日-20°C の二者を夫々 500×で比較すると明らかに 6日, 14日の処理時間の差を示す傾向が認められる。しかし仔虫形成率よりは 6日及び 14日の差は全く観察する事は出来なかつた。

d. 培養日数と出現率: A 種卵は培養日数の延長に伴つてその出現率は漸次増加し, 且つシグモイド曲線への類似性が強く示された。この現象は同時に観察した仔虫卵出現様式と, 濃度に於て逆の出現率を以て全く類似した。

2. 各種処理条件に於ける B 種変性卵出現様式

第1表 芥子油及び二硫化炭素による変性卵，仔虫卵出現状況（14日処理30日培養）

薬剤	稀積率	A種変性卵			B種変性卵			C種変性卵			仔虫期卵		
		*10°	20°	30°C	10°	20°	30°	10°	20°	30°	10°	20°	30°
芥子油	1,250	89	—	—	6	—	—	5	—	—	0	—	—
	2,500	79	92	—	5	3	—	11	5	—	3	0	—
	5,000	24	40	95	2	1	4	49	44	1	25	15	0
	10,000	2	13	65	0	2	9	8	47	25	90	38	1
	20,000	3	0	16	0	0	2	2	5	52	95	95	30
	40,000	—	0	0	—	0	0	—	1	2	—	99	98
	対照	0	0	0	0	0	0	1	1	1	99	98	99
二硫化炭素	625	96	—	—	4	—	—	0	—	—	0	—	—
	125	95	89	—	3	11	—	0	0	—	2	0	—
	250	100	95	98	0	5	2	0	0	0	0	0	0
	500	63	97	94	31	3	6	0	0	0	1	0	0
	1,000	21	95	94	16	21	3	0	0	0	54	14	3
	2,000	—	2	90	—	1	8	—	1	0	—	96	2
	4,000	—	—	72	—	—	26	—	—	0	—	—	2
	対照	0	0	0	0	0	0	0	2	1	100	98	99

* 処理温度，数字は出現%を示す

a. 薬剤濃度と出現率：A種卵と異り，B種卵は或る濃度で最も多く出現し，之より高い濃度及び低い濃度に於ては出現率減少する傾向が認められた。即ち両薬剤処理群共にB種卵は最少有効濃度に最も多く出現した。CS₂-20°Cの処理群では中間濃度に最も多く出現したが此の時の仔虫形成率は30%以下で中間濃度でも比較的有効な濃度と云う事が出来る。又M. oil-20°Cの処理群に於ては，他の条件に於ける様な明瞭な最高値を示す濃度は認められなかつた。

次にA種卵とB種卵の薬剤濃度に対応した出現様式を2薬剤について比較すると，M. oilではB種卵の出現曲線の山はA種卵の出現曲線下降部の左方に低く出現するが，CS₂では右方に比較的高率に出現した。

b. 処理温度と出現率：出現曲線の山は処理温度の上昇に伴つて右方，即ちより稀薄液に出現した。CS₂処理群では処理時間6日，14日共にB種卵出現の山は処理温度10°，20°，30°Cの夫々に於て500×，1,000×，4,000×（又はより稀薄液）に出現した。M. oil処理群に於てもCS₂の場合と同様の傾向が認められる様であるが，M. oil-20°CのB種卵出現曲線の山が不明瞭な為にCS₂の場合の如く明確には示されなかつた。

c. 処理時間と出現率：6日及び14日の処理時間の差によるB種卵出現率の差は殆ど認められなかつた。

d. 培養日数と出現率：一般に12，20，30日と培養日数が延長するに従つて出現率は低下し行つた。M. oil処理群では培養日数の比較的短い場合に見られた出現曲線の山は培養日数の長くなるに伴つて漸次不明瞭となるがCS₂処理群に於ては30日培養に至るも猶明瞭に出現曲線の山は残存した。

3. 各種処理条件に於けるC種変性卵出現様式

C種卵はM. oil処理卵に於ては著明に（最高50~60%）出現し，CS₂処理群に於ては各種濃度に亙り殆ど（4~5%以下）出現しなかつた。従つて此の種変性卵に関してはM. oil処理虫卵に対してのみ述べる事にする。

a. 薬剤濃度と出現率：C種変性卵は中間濃度に於いて最高の出現率を示す山型の出現曲線を示した。従つてA，B両変性卵の出現の山より右方に最高値の山が出現する。又中間濃度が二つの濃度に亙る場合（M. oil-20°C）には此の二つの中間濃度に高い出現率を示した。

b. 処理温度と出現率：処理温度による中間濃度の右方移動と全く相伴つてC種卵出現曲線の山の移動が行われた。

c. 処理時間と出現率：6日，14日の処理時間による影響は全く認められなかつた。

d. 培養日数と出現率：前記A，B両種卵の如き培養日数による出現率の増減率は殆ど認められなかつた。

検 討

A種変性卵の出現様式は薬剤の高濃度液に高率に出現するシグモイド類似曲線をなすものと思われる。又此の曲線は培養日数の延長に伴つてよりシグモイド曲線に近似する傾向が観察された。A種変性卵のかゝる出現様式と、之に含まれる変性形態より推察して、此の変性卵群は変性過程に於ける極相的な一群であり且つ非可逆的な変性卵として取り扱われうるものと想像される。

B種変性卵は培養の延長と共に減少する事は既に述べた通りであるが、薬剤の有効濃度範囲に於いてはA種変性卵の減少に伴つてB種変性卵は増加した。更にM. oil の場合にはC種変性卵の培養日数による出現率の変動は比較的少なく有効濃度に於けるB種変性卵の大部分はA種変性卵に移行するものと思われる。

C種変性卵即ち異常分裂卵の出現は既に和泉(1954)及び筆者ら(1956)が特に芥子油及びNaNO₂処理の蛔虫卵に於て多数出現する事を報告している。今回の実験結果により此の変性卵の量的な出現様式が明瞭に示された。C種変性卵は其の出現様式より考えてB種変性卵と密接な関係を有する事が推察される。即ちB種変性卵はM. oil, CS₂の両薬剤に於て共に最少有効濃度に最も多く出現するが、中間濃度に於ては、M. oil 処理の場合に約10%以下の出現率しか示さなかつた。之に対しCS₂処理の場合には中間濃度に於てB種変性卵は猶相当の高率(最高70%, 最低10%)の出現を示して居た。斯る事実とC種変性卵のM. oil 処理卵に於ける出現、CS₂処理卵に於ける非出現の事象とを考察し、CS₂に於けるB種変性卵はM. oil に於けるB種変性卵とC種変性卵との和に相当するものと推察されよう。かゝる推測よりM. oil に於けるC種変性卵はCS₂に於けるB種変性卵となるべき卵の一部が其の薬剤(芥子油)の特異的な変性機構により異常分裂卵を出現せしめたものであらうと思われる。C種変性卵が培養日数によつて其の出現率に大きな変動の認められなかつた事は、A, B両変性卵と異なる所である。C種変性卵のかかる現象はC種変性卵の規定が多細胞変性卵全部を包括した為、発育時期の異なる多細胞変性卵や同一発育時期でも変性程度の異なる卵も又含まれて居る為であると思われる。従つて此の種変性卵を更に変性程度より分類すれば培養日数による出現率の変動が認められる様になると思われる。

A, B両変性卵の出現曲線相互の位置はM. oil 処理とCS₂処理とで夫々異つて居る事が観察された。即ちM. oil 処理に於てはB種卵の最高値を示す山はA種卵

出現曲線の左方に低く出現し、一方CS₂処理群に於てはB種卵の山はA種卵出現曲線の右方に比較的高く示された。斯る現象はM. oil 処理群に出現するC種卵の出現に影響を受けてB種卵出現曲線の山がA種卵のその左方に出現したかの様にも解釈される。しかしB種卵出現曲線の山は両薬剤共に最少有効濃度又は之に近い濃度に出現し仔虫形成率と比較的一定の関係を有して居るが、A種卵の出現曲線の激減する濃度は、M. oil 処理群では中間濃度にあり、CS₂処理群(CS₂-6日-10°C, 同-20°C, CS₂-14日-10°C)では最少有効濃度であると言ふ激減濃度の差に帰せしめられると思われる。

CS₂処理群に於いて今回使用した濃度の最高稀釈液は4,000×であり濃度範囲の不足により30°C処理温度に於ては最少有効濃度及び中間濃度、最高無効濃度を決定する事が出来なかつた。しかしA種卵の出現曲線の下降傾向及びB種卵の上昇傾向より判断して最少有効濃度が4,000×に存在する事は充分推定される。更に10°CのA, B両変性卵の出現様式より中間及び最高無効濃度が夫々8,000×及び16,000×にある事も或る程度推定されよう。又“1”のa項で述べた如くCS₂の処理時間の差は10°C, 20°C両処理温度に於いて仔虫形成率よりは認められなかつた。しかしA種卵出現率を500×液に於て比較する時は明瞭に処理時間による変性効果の差を認める事が出来た。

従来寄生虫卵の殺卵効果を検討する場合には薬剤処理後に虫卵の培養を行い、仔虫形成率(蛔虫卵)或は游出仔虫率(鉤虫卵)より効果の判定を行つて来た。かゝる効果の判定方法は観察する仔虫の形態の明確さ、或は人体への感染源としての重要性等の観点に立つ妥当な一つの判定方法と思われる。しかしこの様な方法によつては殺卵剤の殺卵機構の特性或は仔虫形成率に差の認められない場合の比較等は不可能である。之は従来の方が殺卵剤の消極的效果即ち発育阻害効果の一面より検討されたのに過ぎない為と云えよう。殺卵剤の効果表現のもう一つの立場は変性を受けた虫卵そのものに依つて表現する立場であつて、仔虫形成率或は其の游出率に着目する表現法を消極的表現とすれば変性卵に依る表現法は積極的表現法と云う事が出来る。従つて殺卵効果の判定には此の二者に着目観察する事が望ましい。筆者は此の様な立場より変性卵の再分類を行いこれを殺卵効果の云はゞ積極的な判定に利用する事を試み、その試みが充分利用可能である事を知つた。斯くして殺卵効果の判定は一方に於

て仔虫形成率をその指標とするとともに、同時に上記三種変性卵の分類を併記する事によりその効果判定をより明瞭かつ正確に行う事が出来る事を確信する。

摘 要

芥子油及び二硫化炭素の各種処理条件（処理温度 10°, 20°, 30°C 処理時間 6 日, 14 日, 薬剤濃度 CS₂: 62.5 × ~4,000 ×, M. oil: 1,250 × ~40,000 × 培養日数 12 日, 20 日, 30 日）に於ける豚蛔虫変性卵を分類観察し、其の出現様式を検討すると共に、30 日培養後に於ける仔虫形成率と比較した。

1. A 種変性卵（単細胞変性卵の顆粒化・転位・胞形成・強度萎縮・崩壊の像を示す卵）は薬剤の高濃度域に高率に出現し、最少有効濃度又は中間濃度に於て著しく減少し、無効濃度に於ては 5% 以下の出現を見るに過ぎなかつた。各種処理条件の A 種変性卵出現様式への影響より考察し、A 種変性卵の出現曲線は薬剤濃度との関連に於てシグモイド曲線に類似する。従つて A 種変性卵は変性過程の極相的変性卵群と思われる。

2. B 種変性卵（A 種変性卵以外の単細胞変性卵）は最少有効濃度に最高の出現率を示す山型の出現曲線として出現し、培養日数の延長と共に減少し、大部分は A 種変性卵に移行するものと推測される。

3. C 種変性卵（総ての多細胞変性卵）は M. oil 処理虫卵に出現し、CS₂ 処理虫卵には殆ど出現しない。此の変性虫卵は M. oil の中間濃度に最高値を有する山型の出現曲線を示し培養日数による変動は小さい。

4. 殺卵効果の判定には変性卵及び仔虫期卵の出現様式を共に検討することにより、その効果をより明確に判定する事が出来る。

5. 殺卵剤の *in vitro* 試験に於ける殺卵効果を左右する処理条件即ち処理温度及び処理時間につき検討し、処理温度の影響は処理時間のそれよりも大なることを認めた。高温部 10°C の差は低温部 10°C の差より効果増減率が大きい。処理時間の 6 日及び 14 日の差は殺卵効果に大きな影響を与えなかつた。

稿を終るにあたり御指導、御校閲をたまわつた予研寄生虫部長小宮博士に対し深甚なる感謝の意を表します。

文 献

- 1) 和泉精一(1954): 数種市販消毒薬の蛔虫卵殺滅効果に就て, 東京医誌, 71(1), 29-33.
- 2) 小宮義孝, ら(1956): 所謂殺卵剤の各種作用条件に於ける尿中蛔虫卵殺滅試験に就て, 日本公衆衛生雑誌, 3(11), 532-538.
- 3) 柳沢十四男(1955): 蛔虫卵変性に関する研究(1), 寄生虫学雑誌, 4(4), 348-354.
- 4) 柳沢十四男(1958): 蛔虫卵変性に関する研究(2), 寄生虫学雑誌, 7(2), 160-166.

Summary

The modes of occurrence of denaturated ascaris eggs exposed to Mustard oil (C₃H₆:CS) and carbon disulphite (CS₂) under various conditions were investigated. Denaturated eggs were divided into three groups: Group A comprised granulated, bubbled, severe-shrunked, abnormal-localized, and cytolized egg cell at one-cell stage. Group B did all eggs at the same stage other than those in group A. All denaturated cleavage eggs were comprised in group C. Frequency of these eggs appearing in each concentration of reagents was expressed in percentage of them after the culture period at 30°C and compared with that of larval egg in the same concentration.

(1) Eggs in group A appeared in an effective concentration (10% < larval egg %) with high frequency which was followed by rapid decrease in minimum effective or median effective (10% ≤ larval egg % ≤ 80%) ones. In ineffective concentrations (80% < larval egg %) they fall to only 5% or less. Frequency curves of group A obtained in plotting percentages appearing as the function of concentration, approximated a sigmoid one. Judging from the effects of exposure temperature and culture period upon the curve of group A, eggs in this group were seemed to be irreversibly denaturated ones.

(2) The most frequent occurrence of group B appeared in minimum effective concentration, at both sides of which it decreased. The frequency of eggs in this group at each concentration decreased as the culture period was long. This decrease in the curve of group B would be due to converting most of these eggs to those in group A.

(3) Eggs in group C were not recognized in those exposed to carbon disulphite but in those exposed to Mustard oil. The most frequent occurrence of this group was seen in media effective concentrations, at both sides of which decreases were found. Frequency curve of group C was hardly affected by difference in culture periods.

(4) Ovocidal activity in chemicals were clearly demonstrated by means of comparing larval egg formation with mode of occurrence in denaturated eggs under a given condition.

(5) Factors influencing ovocidal activity when eggs were exposed to chemicals *in vitro*, viz. temperature and period of exposure, were studied. The former had greater effect on the activity than the latter.