

## 寄生線虫類感染幼虫の生態に関する研究

## (3) 検便材料の保存条件が培養成績に及ぼす影響について

白坂 竜 曠

東京大学伝染病研究所寄生虫研究部  
(部長 長谷川秀治教授 指導 佐々学助教授)

(昭和 33 年 8 月 28 日 受領)

特別 掲載

## まえがき

寄生虫の集団検診にあたっては、これまで直接塗抹法や浮游集卵法などが主として実施されていたが、近年は試験管培養法がとくに鉤虫類の検出に鋭敏で、しかもツビ=鉤虫、アメリカ鉤虫、毛様線虫、糞線虫などの判別が確実に行い得るので一部において、重要視されるに到った。とくに当研究室においては、その技術面に改良を加え、これまで約 7 万人に達する集団検診に応用して好成績を取めた(佐々ら: 1957, '58)。

試験管培養法の原理は前報にのべたように、一定量の便を細長い濾紙片の凡そ  $\frac{2}{3}$  の面にぬつてこれを試験管中に挿入し、水を少量加えて濾紙面を湿し、適温におくとこれら線虫の卵がかえつて *rhabditis* 型幼虫となり、さらに *filaria* 型幼虫にまで発育して後、水中に游出するので、これを検出しようとするものである。従つて、従来の検便法と異つて卵が生きていなければならず、その為には採便後の保存条件が重要な意義をもつものである。

他面において、我々は九州、北海道などの炭鉱従業員の検便にあつて、便を東京の研究室に輸送する方法を採用し、能率を上げた。このように長距離輸送を行うさいには、少くも 3 日後、長いときは 1 週間後に検便を行うことになる。この様な際に、鉤虫卵などの死滅を防ぐためにどの様な容器、温度、湿度に保つたらよいかも知る必要がある。この研究は培養法の基礎となるべきこれらの諸問題を解明し、併せて鉤虫類などの幼虫の生態の一面を明らかにしようとして試みたものである。

RYUKOH SHIRASAKA: Studies on the bionomics of infective larvae of parasitic nematodes (3) The relationship between the storage conditions of fecal samples and the larval developments in test-tube cultivation (Department of Parasitology, Institute for Infectious Disease, University of Tokyo)

なお、鉤虫類の卵又は幼虫の各温度ないし湿度に対する抵抗性を生物学的な見地から研究した報告には近年にも、富士田 (1951)、小林 (1951)、福本 (1955)、飯島 (1953)、浜田 (1953) などの研究があるが、一定の規格のもとに集団検診を行うにあつて、とくにこれら条件の培養成績に及ぼす影響についてツビ=鉤虫、アメリカ鉤虫、東洋毛様線虫の 3 種を同じ環境において比較し、その至適条件を究明した研究はこれまで発表されていない。

## 実験成績

材料は採便直後の新鮮便で、ツビ=鉤虫 *A.d.*、アメリカ鉤虫 *N.a.*、東洋毛様線虫 *T.o.*、それぞれ単独に含むものをえらんで使用した。培養法の技術は前報(第 2 報)にのべた通りである。保存実験の容器としては、従来からしばしば検便に用いられているマッチ箱(3.5×5.5×1.8 cm)と当研究室の検便に使用している 30 g 入り軟膏缶(直径 4.5、高さ 1.5 cm、円形フタつき)とを使用して比較した。

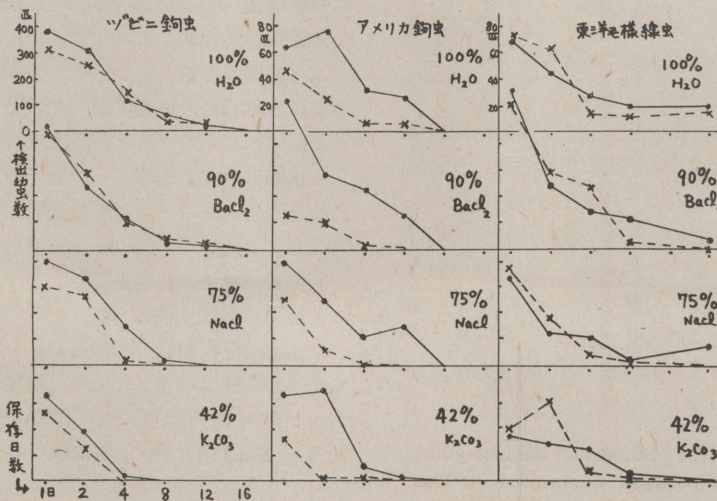
1. 乾燥の影響 便が色々な条件下で乾燥にあつた場合に、各種線虫の培養成績にどのような影響がみられるかをしらべたものである。便は割箸で 20 分間充分に攪拌して虫卵の分布を均等にした上で約 10 g づつ軟膏缶に入れたものと、便の 0.3 g を濾紙片にぬり、これを 4 つ折りにして 3 枚分を 1 個のマッチ箱に取めたものを作つた。後者は従来の検便上においてマッチ箱を使用した際に普通にみられる状態を模したものであり、直接にマッチ箱にとると、乾燥して濾紙にぬれなくなるので予めぬつたものを作つたわけである。湿度の調節にはガラス製のデシケーターの底に水(約 100%)、及び  $\text{BaCl}_2$ (約 90%)、 $\text{NaCl}$ (約 75%)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (約 42%) の飽和溶液をそれぞれ入れたものを作り、この各々に 6 個づつ缶及びマッチ箱を入れ、25°C の恒温室に保存した。

これらの材料は 1 日、2 日、4 日、8 日、12 日、16 日後にそれぞれ一部をとり出して同一条件で 3 本づつの試

第1表 採便容器の差による各湿度に於ける保存日数培養後の検出幼虫数

保存日数	金属缶				マッチ箱				
	H <sub>2</sub> O	BaCl <sub>2</sub>	NaCl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> O	BaCl <sub>2</sub>	NaCl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	
	100%	90%	75%	42%	100%	90%	75%	42%	
アメリカ鉤虫	1日	63	112	79	66	45	24	45	32
	2	75	55	49	70	27	19	11	2
	4	30	43	21	10	5	2	1	2
	8	26	24	28	19	5	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0
ツビニ鉤虫	1	382	457	397	325	304	434	297	262
	2	307	285	334	192	248	278	263	126
	4	158	107	148	4	196	105	136	0
	8	53	20	11	0	30	29	4	0
	12	15	2	0	0	17	9	0	0
	16	3	0	0	0	5	0	0	0
毛様線虫	1	67	148	68	35	71	120	74	40
	2	43	48	22	29	52	58	36	60
	4	25	27	20	25	12	43	7	7
	8	18	24	4	5	10	5	2	4
	16	17	7	13	0	13	0	0	0

註. 便量各0.3g×3本, 培養の合計数, 25°Cの保存及び培養



第1図 各湿度に保存せる便を培養した時の保存日数と検出幼虫数 (実線: 金属缶, 点線: マッチ箱) 25°C 保存

験管に入れて25°Cで培養し、10日後に游出した幼虫の数及び種類を判定した(第1表, 第1図)。図表中の数字は3本の幼虫数を合計したものである。

これをみると、金属缶及びマッチ箱とも、各種類について保存日数が長くなるほど游出幼虫数が減少して来る。これには、温度と湿度の両要因が影響し、乾燥の著しいほど減少が早い、たとえ湿度を飽和させても、25°Cにおいては保存中に卵ないしこれから孵化した幼虫が死滅することを示している。この成績を容器の差、湿度の差、線虫の種類との差の3つの面から解析してみると次のようになる。

a. 容器による差 金属缶はふたがほぼ密閉されているので、マッチ箱に比し乾燥をうけ難く、低湿の影響がそれ程著明でないがマッチ箱では低湿度におくと次第にカラカラに乾燥し、虫卵の一部も死滅して来る。第1図についてこれを見ると、たとえば *N.a.* では第1日目からどの段階の湿度でもマッチ箱の方が游出数が少く、とくに低湿の場合にはその差が著しい。4日後にはマッチ箱ではごく少数が生存するのみであり、8日後になるとマッチ箱では湿度がほとんど100%でない限り陰性となつて居るが、金属缶では8日後でもどの湿度においてもかなり多数が生存している。しかし12日以後になると、たとえ乾燥を防いだ条件においても幼虫の発現は認められなくなった。

ツビ=鉤虫においては、湿度約100%と約90%の場合には缶とマッチ箱の差はほとんどみられなかつたが、約75%と約42%の場合にはマッチ箱のものは缶に保存した場合に比べて初日から>幼虫数が少く、やはり金属缶の方が保存によいことが示された。しかし東洋毛様線虫の場合は乾燥に抵抗が強く、容器による差、及び低湿の影響は前2者に比して軽微であつた。

即ち、便の保存容器としてはマッチ箱より金属缶の方がとくに低湿の場合にすぐれており、その影響はアメリカ鉤虫の場合に最も著しく、東洋毛様線虫では比較的少ないことが認められた。

b. 湿度による差 前述した成績によつて、マッチ箱を用いた場合には、保存日数の長くなる程高湿の方が低湿より幼虫游出数が多いことが示されている。とくにアメリカ鉤虫の2日後の成績、ツビ=鉤虫の4日以後の成績にはその差が著しい。しかし、毛様線虫では比較的その差が少なかつた。3種のうち、アメリカ鉤虫は25°Cにおいても高湿ならばかなり長く生存するものが多いので、湿度の幼虫游出数に及ぼす影響が最も著明にみられ

たのは興味深い。また、アメリカ鉤虫については同じ湿度条件においても、金属缶の方がマッチ箱よりも総じて好成绩が得られたことは、乾燥の程度の差によるものと推定される。

要するに、便の保存にはなるべく高湿におき、乾燥を防ぐ条件に保つことが望ましい事が示された。

c. 線虫の種類による差 上に供試した3種のうち、*T.o.* は容器の差及び湿度の差が幼虫游出数に及ぼす影響が最も少く、乾燥に強い抵抗をもつ事を示している。また、金属缶に取めた場合、或はマッチ箱に入れても湿度を飽和に近くした場合には16日たつてもなお幼虫の游出がみられた。これに反し、*A.d.* ではとくに外界湿度の影響が大きく、また *N.a.* では容器の差による影響が著明で、共に乾燥に弱いことが認められる。*A.d.* は高湿におき、乾燥を防ぐと16日後でも少数は生存したが、*N.a.* は低湿で4日後には全滅し、高湿においても25°Cにおいては12日後に全滅することが示された。

即ち、25°Cの環境においては、*N.a.* は最も乾燥及び保存時間の影響を受け易く、*A.d.* も乾燥に弱い、*T.o.* になると両条件に対し最も抵抗が強いことを見出した。

2. 温度の影響 便を保存する場合、どのような温度においたらこれら3種の線虫の培養成績に最良の結果が得られるかを知るためにこの実験を行った。材料は *A.d.*, *N.a.*, *T.o.* の虫卵をそれぞれ単独に保存する排便後一日以内の新鮮便を用い、これを約20gづつ30g入り軟膏缶に入れ、底に水を入れて湿度を飽和に近くしたデシケーター用ガラス器内にこれを格納し、25°C(恒温室)、室温(最高18°C, 最低8°C, 平均13°C)、0°C及び-10°C(冷蔵庫)にそれぞれ所要日数を保存した後に0.5gづつをぬつた3本の培養試験管を作つて、25°Cにおいて表示した日数ごとに16日後まで出現幼虫数をかぞえた。なお、このさいに塗抹法10mgを計量し(18mmカバーガラス6枚にぬつて全視野検鏡)と飽和食塩水浮游法(便量を0.5g計量し小試験管内に入れたものを2本、30分後に浮游した材料を採取)を併用し、培養成績と比較した。又各々3種の材料につきストール法による1g中の虫卵数を計測した。なお材料の量が充分でなかつたので、保存温度は上述の4階段に止めた。

第2表は3種の虫卵を単独にふくむ材料のそれぞれを25°C、室温(8°C~18°C)、0°C、及び-10°Cに1, 2, 4, 8, 16日間保存したものを培養に仕込み、25°Cに16日間おいた後の游出幼虫数と、各日数に保存直後に浮游法及び塗抹法で検出した虫卵数を表示したものである。な

第2表 便材料を各温度に各日数保存したときの検出数

保存温度	保存日数	ゾビニ鉤虫					アメリカ鉤虫				毛様線虫				
		1日	2日	4日	8日	16日	2日	4日	8日	16日	1日	2日	4日	8日	16日
25°C	培養	130	169	707	231	83	473	112	171	0	88	171	83	17	0
	浮游	51	48	70	82	29	110	512	298	98	7	6	18	13	3
	塗抹	2	4	0	5	0	9	7	4	3	1	2	1	3	0
8~18° 室温	培養	429	40	558	373	447	614	151	124	143	119	162	140	165	50
	浮游	83	22	39	51	85	163	385	144	180	7	9	14	5	8
	塗抹	2	2	3	7	6	15	5	13	9	1	2	1	1	1
0°	培養	309	68	244	34	21	30	2	5	0	145	150	78	167	118
	浮游	59	31	57	28	23	58	226	135	153	14	12	10	7	5
	塗抹	2	16	3	8	0	10	11	21	3	1	3	1	2	2
-10°	培養	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	浮游	2	4	1	0	0	8	5	4	5					
	塗抹	0	0	0	0	0	2	5	3	3					

培養：便量1本につき0.3g, 3本分, 浮遊：便量0.5g, 2本分, 塗抹：便量10mg, 保存：葉青缶(18mm×18mm×4)

お、実験に供する便はあらかじめ均等になる様に攪拌し、採取にあつてはなるべく精密に便を計量したが、この種の検査にはなお実験上の誤差がかなり介入して来た。しかし、全般的な趨勢は充分に推定し得たものとする。

#### a. 各保存温度における培養成績について

第2表の培養成績だけについてみると、25°Cの保存においてA.d. は第1日130、第16日83とあまり差がないが、N.a. では第2日473に比し第16日0、T.o. も第1日88、第16日0となり、保存日数が長くなると出現幼虫数は著明に減少する。しかし、室温(8~18°C)においては初日と最終日との差がどの種類もあまり著明でなく、どの種類も16日たつてもなおかなりの幼虫游出がみられる。さらに0°Cに下げると保存経過の長くなるにつれN.a. で最も著しい減少がみられ、2日ですでに約10分の1となり8日目には全滅している。A.d. は0°Cで4日後までは大した影響がないが、8日以後には著しく減少をみた。しかし、T.o. は0°Cに16日おいても全く出現幼虫数の減少は認められなかった。-10°Cにおいたものは3種とも卵が死滅して幼虫に發育するものがなく、浮游法で見出された虫卵も悉く変性していた。即ちこの3種を通じて最も長期に保存しうる温度は25°Cより10°C前後が適当であるが、T.o. だけについてはこれより0°C近くの方が成績が良く、凍結温度は3種とも不適であることが示された。

#### b. 培養成績と浮游及び塗抹検査成績の比較

便の材料は培養と浮游には各0.5g, 塗抹には10mg

を用いた。室温第1日の成績と比較すると、A.d. については培養検出数429は浮游の83に比べて約5.2倍、塗抹の2に比べて約200倍にも達し、培養法のすぐれていることがよく示されている。N.a. についても614:163:15、T.o. も119:7:1でこの検出数の差は著しい。

しかし、保存条件が各検査法に及ぼす影響はその意義が異なる。培養法にあつては卵またはこれからかえつた幼虫が生存していることが必要であり、浮游法にあつては卵がたとえ死んでも卵の浮游性さえ保存されていればよいが、卵がかえつて幼虫となつてしまえば検出し得なくなる。塗抹法は卵または幼虫の形骸さえ残つていれば良いので、最も影響を受け難い。

第2表の浮游法の欄をみると、室温では3種とも保存日数による影響はみられない。25°Cにおいてもほとんど影響なく、16日後、N.a. とT.o. の培養が陰性となつてもなお卵が検出されている。これは、かなり高温でも大部分の卵が便中では孵化せず、死滅後も浮游能はかなりよく保たれていることを示す。0°Cにおいても、保存日数が長くなるとN.a. やA.d. では培養の成績はおち、虫卵の死滅を来すことは明らかであるが、浮游の成績は16日たつても実質的には変化しないことが示された。しかし-10°Cになるとおそらく凍結によつて卵殻も破壊されるものが多く、浮游成績は著しく低下するが、なお完全には0にならなかつたことは培養と異なる。即ち浮游法では若干の変性卵が見られた。塗抹法についてもほぼ近似の

第 3 表 便材料を各温度に各日数(縦軸)保存せる時の培養日数別(横軸)の幼虫検出数と百分率

培養日数	ツビニ鉤虫						アメリカ鉤虫						毛様線虫							
	日数	2日	4日	8日	12日	16日	計	2日	4日	8日	12日	16日	計	2日	4日	8日	12日	16日	計	
25°C	1日	1%	0.7	75.5	19.3	4.5	130匹						0	0	55.5	23.9	21.6	88		
	2	1.2	0	89.3	8.3	1.2	199	0	44.2	53.9	1.9	0	473	0	0	26.0	44.1	29.4	171	
	4	0.6	76.1	22.6	0.7	0	701	0.9	16.2	81.8	1.8	0	112	0	0	9.7	67.5	22.8	83	
	8	0.9	90.4	8.7	0	0	231	0.6	7.2	90.4	1.8	0	171	0	35.3	23.5	29.4	11.8	17	
	16	1.2	51.7	4.1	0	0	83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13°C (8°~18°C)	1	0	0.5	91.8	6.3	1.4	428						0	0	34.5	31.9	33.6	119		
	2	0	0	77.0	17.5	5.5	240	0	32.7	65.8	1.5	0	513	0	0	27.8	51.8	21.0	162	
	平均室温	4	0	83.5	13.5	2.4	0.6	578	0	19.6	64.5	15.9	0	151	0	0	48.5	36.4	15.1	140
	8	0	81.6	11.8	5.3	1.3	373	0	50.9	45.9	1.6	1.6	124	0	60.0	12.2	14.8	13.0	115	
	16	0	84.9	15.1	0	0	447	0	51.8	42.6	5.6	0	143	12.0	14.0	30.0	28.0	16.0	50	
0°C	1	0	0.3	81.5	14.2	4.0	303						0	0	45.5	25.5	29.0	145		
	2	0	0	60.3	32.3	7.4	168	0	23.3	70.0	6.7	0	30	0	0	22.7	62.6	14.7	150	
	4	0	75.8	22.6	1.6	0	244	0	50.0	50.0	0	0	2	0	0	17.9	70.6	11.5	78	
	8	0	8.8	61.9	29.3	0	34	0	0	100.0	0	0	5	0	42.6	11.9	21.6	23.6	167	
	16	0	14.1	85.9	0	0	21	0	0	0	0	0	0	0	0	27.9	45.3	22.8	118	

傾向が見られ、保存による影響はほとんど認められなかった。卵は変性の他、卵殻の破れたものが認められた。

要するに浮游法や塗抹法は 0°~25°C の範囲の保存には培養法に比して成績に影響をうける程度がずっと少ない事が示された。

c. 線虫の種類による差 保存温度に対する抵抗性の面でも 3 種の線虫はそれぞれ特異性がある。N.a. は最も弱くて、0°C に冷すと短時日のうちに死滅するし、25°C においても 16 日後には 0 となっている。A.d. は 25°C においても、また 0°C においても N.a. より抵抗性が強い。T.o. は 25°C では A.d. と同程度(第 1 表の成績)、又はこれより弱い(第 2 表)が、0°C では 16 日においても全く幼虫游出数に変化がなく、その卵も低温には 3 種のうちで最も強いことが示された。第 1 報で述べたようにフィラリア型幼虫も T.o., A.d. N.a. の順に低温に対する抵抗が強く、また本種の地理的分布が東北、北海道の住民に高率で九州に少ないという事実に一連の関係があるように推定される。

d. 各温度における保存日数と幼虫出現期日との関係(第 3 表) へで保存日数というのは、あらかじめ便を缶に入れて各温度に放置した日数のことであり、幼虫出現期日とはこの便を培養に仕込んでから試験管底に幼虫が游出して来るまでの日数である。第 3 表は縦軸に各温度における保存日数をとり、横軸には培養に仕込んでから何日目に何匹の幼虫が游出したかをしらべて、各条

件ごとに 16 日後の総游出数に対する比率(%) で示したものである。

25°C においては、各種類とも保存日数が長くなるほど幼虫の出現数が減少することは前述した通りであるが、その出現期日は次第に早くなる傾向がみられた。これは、すでに保存中にある程度卵又は幼虫の発育がみられるために、培養に仕込むとすぐに filaria 型にまで発育するためであろう。又、N.a. と A.d. については、その幼虫の出現が速くて、12 日以後に游出する幼虫はほとんどないが、T.o. はその游出がおそく、12 日と 16 日の間にもなほかなりの類が検出されている。

室温(平均 13°C) の場合には 25°C より発育がおそいので、それ程顕著ではないが、やはり各種とも保存日数の長いほど出現期日が短い傾向がみられた。とくに T.o. にこの傾向が著しく、本種が比較的低温でよく発育する事を示している。

0°C の場合には保存日数の影響が全く認められないのは予期通りであった。

### まとめ

寄生虫の集団検便、とくに試験管培養法を実施するにあたって、便を採取してから検査を行うまでの期間、どの様な条件に保存したら最良の成績がえられるか、また、最も長期間保存出来るかを知るために ツビニ鉤虫(A.d.)、アメリカ鉤虫(N.a.)、東洋毛様線虫(T.o.) を各単独に保有せる便を材料として実験を行い、次のよう

な成績を得た。

1. 乾燥は培養成績を次第に低下させる。従つて容器はマッチ箱より金属缶がよく、しかも当研究室で採用しているようななるべく大形の容器(30g入軟膏缶)に多量とつた方がよい。保存湿度はほぼ100%, 90%, 75%, 42%の4段階にかえて比較してみると高湿ほど好成績が得られた。

こゝに検討した3種のうち、*T.o.* は最も乾燥に強く、*A.d.* と *N.a.* は乾燥による死滅がこれより早く、とくに *N.a.* は保存がきかない(第1表)。

2. 便を金属缶に入れ湿度を飽和に近くして25°C、室温(8~18°C, 平均13°C)、0°C、-10°Cの4段階に所定日数を保存した後の培養成績をみると、*A.a.*、*N.a.*、*T.o.* の3種を通じて最も生存が長いのは室温群であった。25°Cにおくとこれより幼虫出現数の減少が著明であり、0°Cでは *N.a.* と *A.d.* は室温に比し減少が早かつたが、*T.o.* のみは16日後になつても初めとほぼ同じ成績であった。-10°Cの群は3種とも1日で全滅した。即ち、一般的にいつて、便の保存は13°C前後が至適であるが、*T.o.* だけを保存する目的なら0°C近くが良い(第2表)。

3. 浮游法及び塗抹法による検出虫卵数は培養法の成績にくらべて保存日数の長短による差はずつと少い。とくに室温及び0°C近くの保存では16日を経過してもほとんど変化をみなかった。また25°Cに16日保存したものの3種類とも多数の虫卵浮游がみられ便のまゝ保存すればその大部分が孵化せずにいることが認められた。とくに、25°C又は、0°C近くに長期日において培養陰性となつてもなお一部の虫卵の浮游能は保たれていることが分つた。しかし、-10°Cのような凍結温度になると、虫卵の破壊変性が著明で、浮游成績も著しく低下した。

4. この3種のうち *A.d.* は最も広汎圏の温度に保存し得て、25°C16日でも0°C16日でもなお少数は生存した。しかし、低温には *T.o.* が強く、0°Cでは16日後でも出現幼虫数の減少を認めなかつた。*N.a.* は低温でも高温でもその死滅が最も早かつた。

5. 便をある程度高い温度に保存すると、これを培養に仕込んだ後に幼虫が早く出現するようになる。この傾向は25°Cの方が13°C前後より著明である。0°Cに保存した場合には保有日数の長短による出現期日の差は認められない。*T.o.* は *A.d.* や *N.a.* にくらべて出現期日が長期にわたり、またその發育の至適温度が低いようである。

6. 以上の実験を通じ、便を長距離輸送するさい、ま

たは採便後直ちに検査することが出来ないような事情の場合には、容器を金属缶にして湿気をあたえ、乾燥を防ぐこと、気温が13°C前後であるような春秋の季節をえらぶことなどの点に注意をほらえば、かなりの日数を保存し得ることが示された。また、*T.o.*、*A.d.*、*N.a.* の3種の温度及び湿度に対する抵抗性の差が著明で、*T.o.* は乾燥と低温に強く、*N.a.* は最も保存がきかないことを認めた。この3種について、ある温度及び湿度で便をある日数保存した場合、培養及び浮游検査法でどのくらい検出数の減少が起るかの具体的な指標も示すことが出来た。

この研究を指導された当科研究室の佐々学主任、林滋生博士、実験に御協力をえた三浦昭子、前田繁氏に深謝する次第である。

#### 参考文献

- 1) 富士田猛(1951): 各種温度の鉤虫卵及び感染仔虫に及ぼす影響。日本寄生虫学会記事, 70(26), 78-79.
- 2) 浜田彪(1953): ツビニ鉤虫感染仔虫の温度に対する抵抗力。寄生虫学雑誌, 3(1), 76-77.
- 3) 原田義道(1953): 培養法並びに皮内反応による鉤虫症の診断。臨床医学, 37(3), 1-5.
- 4) 飯島利彦(1953): 鉤虫卵の低温に対する抵抗。寄生虫学雑誌, 2(1), 120.
- 5) 小宮義孝(1956): 集団検便, 集団駆虫指針。金原堂出版社, 1-117.
- 6) 小宮義孝(1958): 鉤虫と鉤虫症。積文堂出版株式会社.
- 7) 松崎義周(1956): 便の培養検査時における各種仔虫の鑑別。臨床病理, 4(3), 119-205.
- 8) 佐々学・他(1957): 人体病害動物学, 医学書院.
- 9) 佐々学・他(1957): 九州, 北海道等の炭鉱従業員寄生虫相の比較研究, 第1報 長距離輸送材料による塗抹浮游培養検便の併用法について, 第2報, 地域別の寄生虫相の差異について, 公衆衛生, 21(11), 19-27.
- 10) 佐々学・他(1958): 九州北海道等の炭鉱従業員寄生虫相の比較研究, 第1報 試験管培養法による集団検便で見出された糞線虫保有者について, 公衆衛生, 22(7), 395-8.
- 11) 佐々学・他(1958): 新しい寄生虫集団検便法の実際, 別刷.
- 12) 杉山博・福田正道(1953): 糞便内寄生虫卵検査について(第2報) 寄生虫学雑誌, 3(1), 36.

#### Summary

The present study was designed to see the effects of the storage of fecal samples under various conditions on the developments of infective larvae of the three main nematode parasites of humans in test-tube cultivations.

1. Humidity and desiccation. Fecal samples containing eggs of *Ancylostoma*, *Necator* or *Trichostrongylus* were divided into two kinds of contain-

ners, metal ointment cans and match boxes, and were preserved in chambers with relative humidities of 100%, 90%, 75%, and 42%, respectively. After 1 to 16 days of the preservation, a part of the samples was put into the cultivation tubes and the number of larvae appeared into the bottom water was counted. Feces preserved on the metal containers gave better results than those in match boxes, especially when the humidity was low and the period of preservation was long. Desiccation of feces under lower humidities resulted in the developments of less numbers of larvae. Among the three nematode species, the resistance against desiccation was the highest in *Trichostrongylus*. Best results were seen in samples preserved in metal cans under saturated humidity.

2. Temperature. Fecal samples were taken into metal cans and were preserved for different days under various temperatures in saturated humidity, and then put into the cultivation tubes. The days of survival of the nematodes were the longest under the temperature range of 8°C to 18°C; the decrease of the number of cultivated larvae by day of preservation was faster under 25°C; under 0°C, only *Trichostrongylus* could well be preserved; exposure to 10°C resulted in the destruction of the parasites' eggs.

3. Less influences of preservation were seen in the direct smear or egg-floatation methods than in the cultivation, since the former two procedures did not require the survival of eggs. Preservations of feces under saturated humidity for the periods

to 16 days under the temperature range of 0°C to 25°C affected little influences on the egg counts, though exposure to 10°C caused the destruction of eggs:

4. Among the three nematode species tested here, *Necator* was found to be the most sensitive to both high and low temperatures; *Ancylostoma* survived for longer days under wider range of temperature from 0°C to 25°C; in lower range near 0°C, *Trichostrongylus* could best be preserved without causing deaths of eggs.

5. Preservation of feces under higher temperatures before cultivation resulted in the shortenings of the days for developments of infective larvae in the tubes. No such effects were seen when the samples were kept at 0°C. In general, the developments of infective larvae of *Trichostrongylus* are slower, take longer periods, and are adapted to lower temperatures than in *Ancylostoma* and *Necator*.

6. In cases of large scale parasitological surveys by test-tube cultivation together with the routine methods, as have often been carried on in this laboratory, it has often been required to preserve or to ship the fecal samples for a long distance, taking several days before tested. Through observations discussed above, it is recommended that the samples are taken in metal cans as much as possible, and the care is taken to prevent them from desiccation by adding humidity. As for the seasons, spring and autumn with the temperature range of 8° to 18°C are the choice.