

ミヤイリガイ殺貝剤の実験室内効果判定法の検討 (1)

保 阪 幸 男

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和33年9月21日受領)

ミヤイリガイがその殺貝剤 PCP-Na に対して抵抗性を示しつつあることが、最近岡部ら (1956) その他、二のものにより報告されている。

しかしこの問題を検討するためには、ある程度正確かつ鋭敏な殺貝剤効果判定法を用いてこれを行う必要がある。

Oncomelania 殺貝剤の Screening test の方法としては McMullen (1949) により報告された、いわゆるシャーレ法 (Plate method) がある。この Plate method は Screening test ばかりでなく、従来効果比較試験及び貝の薬剤に対する抵抗性試験等にまで応用されている (秋山ら : 1958, 小宮ら : 1957, 岡部ら : 1952, '56)。この方法はその操作が簡単であるから、これがそのまま殺貝剤の効果判定に応用出来れば便利であるが、この方法にはなおいくつかの検討を要する点があると考えられる。すなわちこの方法においては、薬剤は必ずしも個々の貝体に平等に接触するとは考えられず、又しばしば貝が薬剤よりガラス面上に離脱して薬剤との接触を免れる事態が生ずる。又濾紙に浸漬する薬剤量、前者の湿潤状態を確保するための方法、薬剤の作用時間等においても尚検討を要するところがあると考えられる。一方従来本邦において広く殺貝効果試験に用いられている直接浸漬法 I (岡部ら : 1952, '56, 小宮ら : 1957) は貝体に対する薬剤の接触はほぼ全面的に行われ、この点においては前者の方法よりも上記の目的に沿うものの如くであるが、この方法自体にもなほ問題なしとは云いえない。

そこで私は上記の McMullen の方法にきさかの改良を加えた Plate method 変法 I および II を考案し、これと直接浸漬法 I およびこれに改良を加えた直接浸漬法 II の4つの方法について、PCP-Na を用いてミヤイリガイ殺貝効果の比較試験を行ってみた。

YUKIO HOSAKA : Study on standardized technics for testing the susceptibility of *Oncomelania* snail to molluscicides, (Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo.)

材料と方法

1. 材料

1) 使用薬品 : 水溶性殺貝剤である PCP-Na (Sodium pentachlorophenate) を用いた。これはミヤイリガイ殺貝剤用、旭電化工業株式会社製のものである。

2) 使用貝 : 山梨県の棲息地より採取した殻長 7 mm 以上のミヤイリガイ *Oncomelania nosophora* で、使用にさきだち乾燥状態のまま 3~5 日間室内に保存されたものである。使用に際しては予めこれを清水中に漬し、活動を始めたものを実験に供した。ここに清水と云うのは水道水を数日間室内に放置することにより游離塩素を除去せしめたものである。

2. 方法

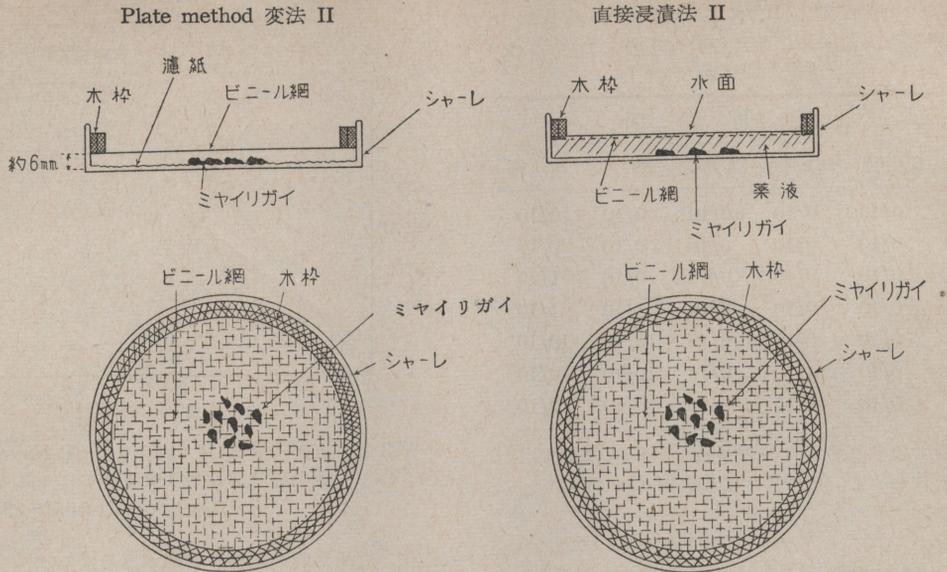
1) 供試殺貝方法

a) Plate method 変法 I : ペトリシャーレ (直径約 12cm) の底に丁度入る様な濾紙一枚をしき、これに各種濃度の PCP-Na 溶液を 5 cc づつ漬し、被検貝をその中央に 10 コづつ放置して薬剤に接触せしめた。

この変法 I は McMullen の Plate method (McMullen : 1949) の場合の薬剤の作用時間の 96 時間を 48 時間とした点、および薬液量を後者の濾紙直径約 15cm の使用薬液 2~3 cc を夫々直径 12cm および定量 5 cc とした点が異つている。

b) Plate method 変法 II : Plate method 変法 I においては上述の様にその薬剤作用中に被検貝が薬剤を漬した濾紙より自動的に離れ、薬剤に接触しない処に移動するものがあり、したがって薬効の安定性が期しがたい点が考えられる。Plate method 変法 II はこの不利を除去せんとして考案されたものである。改変の要点は、貝を浸漬した濾紙上に低くビニール網をかぶせ、以て貝が薬剤を漬した濾紙より離れることを防止した点にある (第 1 図参照)。

c) 直接浸漬法 I : ペトリシャーレ (直径約 12cm) に各種濃度の PCP-Na 溶液各 100cc を入れ、その中央



第 1 図 Plate method 変法 II, 直接浸漬法 II の方法模式図

に被検貝10コづつ放置して薬剤に接触せしめた。

d) 直接浸漬法 II : 上記 I 法との差は、貝体と薬液とを常時接触せしめるためシャーレ内の薬液表面すれすれにビニール網をかぶせたことである。この装置により貝は薬液中を自由に匍動しうが、薬液より離脱不能となり、薬効はそれだけ安定することが考えられる (第 1 図参照)

2) 使用薬剤の調製

まず PCP-Na 0.256 g を蒸留水 1 l に溶解し原液を調製した。次にこの原液を倍々稀釈法により 128 ppm より 0.0625 ppm までの各種濃度の液を使用にさきだつて作成し、試験に際してはこれ等を所定量所定の方法に用いた。

3) 作用時間

薬剤と貝との接触時間を何時間にすべきかについては、未だ問題が残っている。そこで私はこの点を検討すべく Plate method 変法 I と直接浸漬法 II とを用いて、各種濃度の PCP-Na を貝に作用せしめその効果の時間的発現を検した。第 1, 2 表および第 2, 3 図がその結果である。即ちこれによれば、何れの方法の場合においても、薬液の各濃度の場合とも、貝の死亡率は 24 時間作用あたりで急激に高くなり、48 時間作用で最高に達するもの多く、ここでほぼ安定を示す。かように上のいずれの方法にあつても薬剤の効果は 48 時間作用で最高に達し、

第 1 表 Plate method 変法 I, により PCP-Na の各種濃度を各時間作用させた際のミヤイリガイの死亡状況

薬剤作用濃度 (PPM)	作用時間				
	6 時間	12 時間	24 時間	48 時間	96 時間
0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
8	0/10	0/10	2/10	6/10	2/10
16	0/10	0/10	5/10	9/10	8/10
32	0/10	0/10	7/10	8/10	10/10
64	1/10	2/10	8/10	10/10	9/10
128	1/10	1/10	9/10	9/10	10/10
256	0/10	3/10	9/10	10/10	10/10
512	3/10	4/10	8/10	9/10	9/10

表中の数字の分母は使用貝数を示し、分子は死貝数を示す、実験中の室温は 21°C ~ 24°C

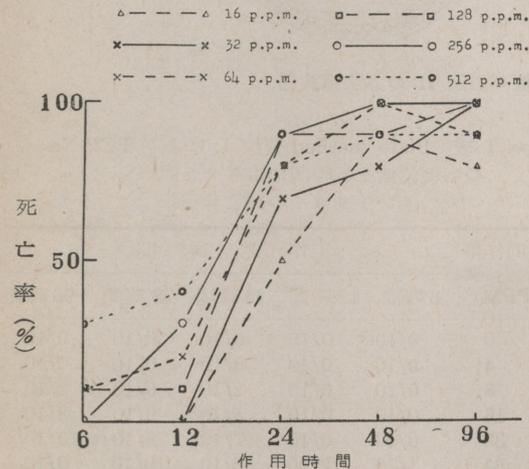
かつこの作用時間で薬効は安定するとみられるので以下薬剤の作用時間は何れの方法においても 48 時間とすることとした (註)。

(註) この作用時間中において Plate method 変法 I 及び直接浸漬法 I にあつては、接触開始後 1, 2, 6, 24 時間毎に、貝の運動状況を観察し、同時にシャーレの中央部より移動したところの貝をそれぞれ再び中央部に集め、もつて貝の薬剤への接触を確保することに努めた。Plate method 変法 II 及び直接浸漬法 II にあつては 1, 2, 6, 24 時間毎に運動状態の観察のみを行った。

第2表 直接浸漬法 II. により PCP-Na の各種濃度を各時間作用させた際のミヤイリガイの死亡状況

薬剤作用濃度 (PPM)	作用時間				
	6時間	12時間	24時間	48時間	96時間
0	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
0.0625	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
0.125	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
0.25	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10
0.5	0/10	0/10	8/10	10/10	10/10
1	0/10	4/10	9/10	10/10	10/10
2	0/10	6/10	10/10	10/10	10/10

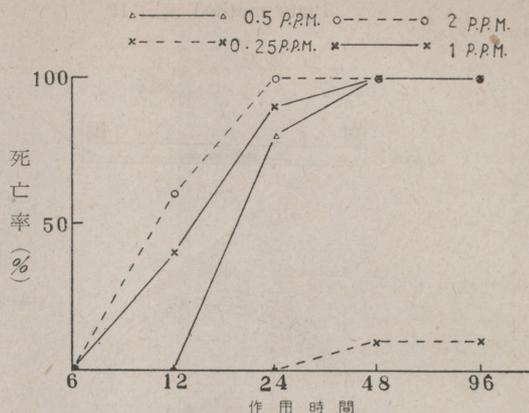
表中の数字の分母は使用貝数を示し、分子は死貝数を示す、実験中の室温は24°C~29°C



第2図 Plate method 変法 I により PCP-Na の各種濃度を作用させた際のミヤイリガイの死亡状況 (実験中の室温 21°~24°C)

4) 薬剤作用後の貝の生死判定

いずれの場合においても所定の作用時間終了後たまたちに貝を清水でよく洗い、これを清水中に入れて96時間放置し、生死の状態を観察した。ここで96時間放置した理由は、筆者の試験した室温下においては、浸漬貝は未だ仮死状態にあり、充分に生死の判定を下しえないものが存する事が観察されていたからである。この間メediumの水は数回これを交換した。生死の判定はまづ清水より自動的にはい出したものは生とし、残余はこれを分離針で貝体を刺激して、これに反応したものを生と判定した。反応を示さないものはさらにこれを押しつぶしてそ



第3図 直接浸漬法 II. により PCP-Na の各種濃度を各時間作用させた際のミヤイリガイの死亡状況 (実験中の室温 24°C~29°C)

の際の軟体の収縮運動が著明であるならば、又はたとえ緩慢な収縮運動でもそれが貝の体の半ば以上に及ぶならば、それを生と判定し、かかる反応の欠如せるものを死と判定した。

尚実験中の室温は10°C~29°Cであつた。

実験成績

1. Plate method 変法 I による PCP-Na の殺貝効果
Plate method 変法 I により PCP-Na の各種濃度を作用させた貝の死亡状況は第3表の如くである。この各死亡率を縦軸にとり、横軸に薬量に対数目盛にとつて図で示すと第4図実線の様になる。

PCP-Na の殺貝効果は4~8 ppm より現れ始め、さらに作用濃度が高くなるのに縦い貝の死亡率は高くなり128 ppm を作用させたものでそれは 100% に達した。

Fisher の中央致死量 (MLD) 計算法 によつて MLD を計算すると、それは11.3ppm (10.1~12.5ppm) を示した。

2. Plate method 変法 II による PCP-Na の殺貝効果

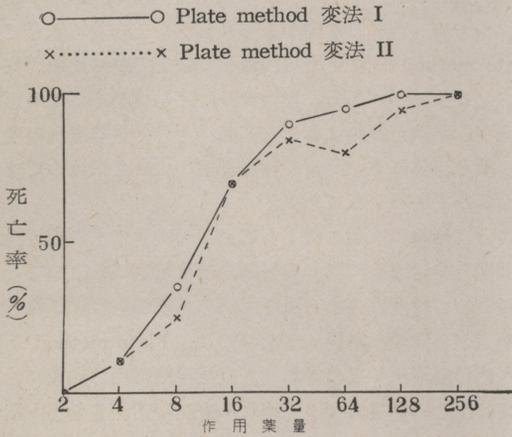
Plate method 変法 II により PCP-Na の各種濃度を作用させた貝の死亡状況は第3表の如くである。これを前項の場合と同様に図で示すと第4図点線の様になる。

PCP-Na の殺貝効果は4~8 ppm の濃度から現われ、その作用濃度が高くなるのに従いその貝の死亡率は高くなることは 前法の場合と同様であるが死亡率 100% は256 ppm 作用において始めて認められた。

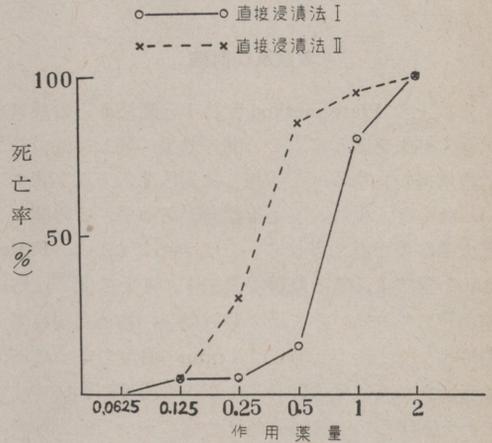
第 3 表 Plate method 変法 I. 及び Plate method 変法 II により PCP-Na の各濃度を 48 時間作用させたミヤイリガイの死亡状況

濃 度 (PPM)	Plate method 変法 I.				Plate method 変法 II.			
	使用貝数	生貝数	死貝数	死亡率	使用貝数	生貝数	死貝数	死亡率
0	20	20	0	0	20	20	0	0
2	10	10	0	0	10	10	0	0
4	10	9	1	10	10	9	1	10
8	20	13	7	35	20	15	5	25
16	20	6	14	70	20	6	14	70
32	20	2	18	90	20	3	17	85
64	20	1	19	95	20	4	16	80
128	20	0	20	100	20	1	19	95
256	20	0	20	100	20	0	20	100

ミヤイリガイは山梨県北巨摩郡双葉町より採取したものを使用，実験中の室温は 10°~22°C



第 4 図 Plate method 変法 I, Plate method 変法 II により PCP-Na の各種濃度を 48 時間作用させた際のミヤイリガイの死亡状況



第 5 図 直接浸漬法 I, 直接浸漬法 II により PCP-Na の各種濃度を 48 時間作用させた際のミヤイリガイの死亡状況

この場合の MLD は 14.2ppm (13.0~15.4ppm) で変法 I に比較してむしろその値は大きく現れている傾向がある。

3. 直接浸漬法 I による PCP-Na の殺貝効果

直接浸漬法 I により PCP-Na の各濃度を作用させた貝の死亡状況は第 4 表の如くである。この死亡率を縦軸にとり、横軸に薬量を対数目盛にとつて図で示すと第 5 図実線の様になる。

この方法による PCP-Na の殺貝濃度は前記 2 方法に比して極めて低いところの 0.125~0.25ppm から現れ、その作用薬剤の濃度が高くなるのに比例して前同様貝の

死亡率も高くなるが、すでに 2 ppm を作用させたものにおいてその死亡率は 100% に達した。

この場合の MLD は 0.67ppm (0.66~0.68ppm) であった。

4. 直接浸漬法 II による PCP-Na の殺貝効果

直接浸漬法 II により PCP-Na の各濃度を作用させた貝の死亡状況は第 4 表の如くである。これを前項の場合と同様図で示すと第 5 図点線の様になる。

この方法においても PCP-Na の殺貝効果は、すでに 0.125~0.25ppm から現れはじめ、やはり 2 ppm とゆう低濃度を作用させたときすでに 100% に達している。

第4表 直接浸漬法 I. 及び直接浸漬法 II. により PCP-Na の各濃度を 48 時間作用させたミヤイリガイの死亡状況

濃 度 (PPM)	直接浸漬法 I.				直接浸漬法 II.			
	使用貝数	生貝数	死貝数	死亡率	使用貝数	生貝数	死貝数	死亡率
0	20	20	0	0	20	20	0	0
0.0625	10	10	0	0	10	10	0	0
0.125	20	19	1	5	20	19	1	5
0.25	20	19	1	5	20	14	6	30
0.5	20	17	3	15	20	3	17	85
1	20	4	16	80	20	1	19	95
2	20	0	20	100	20	0	20	100
4	20	0	20	100	20	0	20	100

ミヤイリガイは山梨県北巨摩郡双葉町より採取したものを使用、実験中の室温は 10°~22°C

この場合の MLD は 0.32ppm (0.31~0.33ppm) であった。

考察及び討論

いま以上の Plate method 変法 I と変法 II との殺貝効果試験の結果をみるに、その間の効果に関しては、むしろその効果の大なるべく予想した変法 II の方がかえつて MLD は大きく現われている傾向があるが、その間それほど大きな差が認められない。しかるにかかる Plate method 変法 I, II と直接浸漬法 I, II との間には格段の差が認められる。即ちその殺貝効果の初めて現れてくる濃度は、前 2 者では等しく 4 ppm の濃度であるのに、後 2 者にあつてはその 20 分の 1 以上の濃度においてすでにこれを顕現し、その 100% 死亡率に至つては、前者の 50~100 分の 1 の濃度においてすでにこれに到達している。

既に述べたる如く、これらの実験は同一地点から得られた貝について、しかも同一の日時および場所において行われたものである。したがつていま以上の如き著しい差異の生じ来る所以を考察するに、第一に直接浸漬法にあつては、貝の全体部がほとんど常に薬剤に接触しているのに反し、Plate method においては貝の一部(主として足部)のみしか常に薬剤に接触していないという違いに基づくものであろう。また一つには Moon *et al.* (1958) も指摘しているように、Plate method にあつてはその接触期間中において貝が濾紙を摂食するものもあり、或はかようなことの影響のあることも考え得られる。

又直接浸漬法の中にあつては、Plate method 変法の

場合におけるとむしろ反対に、その I 法に比しさらにそれに改良を加えた II 法による殺貝効果は第 5 図に示す如く、やや高く現れる傾向がみられるが、その差は総じて Plate method 両法と直接浸漬法両法との差に比較すれば、はるかに小である。換言すれば、一度薬剤に接触した貝が、薬剤を離脱することに基くその効果の攪乱程度は、薬剤自体に対する貝の接触面の大きさに比してはるかに小であるようである。

さきに緒論にも述べたように、ミヤイリガイの抵抗性の問題を検討するには、殺貝剤の効果判定にあつてより正確かつ精度の高い方法を用いる必要がある。これらの観点から向後の実験にあつては、Plate method よりも直接浸漬法が妥当であり、直接浸漬両法の比較においては、その効果の大きく現れる直接浸漬法 II を用いるのが現在では最も妥当な効果判定の方法であろうことが示唆された。

要 約

ミヤイリガイの薬剤に対する抵抗性に関する研究を行う準備段階として、殺貝剤の効果判定の方法を決定すべく、諸種の方法について PCP-Na を用いて、実験的にその効果に関して吟味した。その結果によれば、私のいわゆる直接浸漬法 II がこれにもつとも適すると考えられる。Plate method およびその変法は Screening test の方法としては便利であるが以上の目的のためには不利である。

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義孝博士に深く感謝の意を表するとともに種々御教示をたまわつた安羅岡一男博士及び同部の諸兄

姉, 衛生昆虫部安富和男技官に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 秋山澄雄・飯島利彦 (1958) : 宮入貝殺貝に関する研究. I, 二, 三の phenol 誘導体の殺貝効果について, 寄生虫学雑誌 7 (4), 354-356. —2) Hunter, G. W, III, *et al.* (1952) : Potential molluscicides screened in the laboratory and the results of preliminary field plot test. *J. parasit.*, 38 (6), 509-516. —3) 小宮義孝・蕭榮煒・徐国清・姚土春・孫慶祺 (1957) : PCP-Na と酸性硫酸石灰の殺貝効果について, 臨床消化器病学, 5 (3), 43-46. —4) McMullen, D. B., *et al.* (1948) : Results of screening tests on chemicals as molluscicides. *J. parasit.*, 34, 33 (suppl.). —5) McMullen, D. B. (1949) : A plate method of screening chemicals as molluscicides. *J. parasit.*, 35, 28 (suppl.). —6) McMullen, D. B. (1952) : Schistosomiasis and molluscicides. *Am. J. Trop. Med. & Hyg.* 1 (4), 671-679. —7) Moon, A. P., Frick, L. P., & Asakawa, S. (1958) : Laboratory screening of compounds for molluscicidal activity against *Oncomelania nosophora* with an immersion test and a modified plate test. *Am. J. Trop. Med Hyg.*, 7(3), 295-297. —8) Nolan, M. O., Bond,

H. W., & Mann, E. R. (1953) : Results of laboratory screening test of chemical compounds for molluscicidal activity. I. Phenol and related compounds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 716-752. —9) 岡部浩洋・波江浩 (1952) : 宮入貝に対する PCP-Na の殺貝効果, 久留米医学雑誌, 15, 436-440. —10) 岡部浩洋・岡原哲爾・小野典雄 (1956) : 宮入貝の PCP-Na に対する耐性, 日本住血吸虫症の予防に関する研究, 第 XII 報, 久留米医学雑誌, 19 (10), 1609-1613. —11) 太田秀浄・佐藤重房 (1956) : 宮入貝の薬剤に対する耐性について, 北関東医学雑誌 6 (4), 287-291. —12) 津田栄造 (1952) : 日本住血吸虫中間宿主宮入貝の撲滅に関する研究 (三) 宮入貝の薬剤に対する抵抗性と季節との関係. 東京医誌, 69 (1), 48-49.

Summary

Four methods (modified plate method I., modified plate method II., direct immersion method I., and direct immersion method II.) testing the susceptibility of *Oncomelania nosophora* to PCP-Na were examined experimentally in the laboratory and as a results of this the conclusion was induced that the direct immersion method II. was to be recommendable.