

アメリカ鉤虫被囊幼虫の日齢と感染能 との関係について

長 花 操 田 辺 一 男 吉 田 幸 雄
近 藤 力 王 至 石 川 允 岡 田 清 吾
岡 本 憲 司 福 留 祥 子 松 野 喜 六

京都府立医科大学医動物学教室

(1964年10月10日受領)

緒 言

凡そ鉤虫被囊幼虫の生命の長さ、感染能力の保有期間及びその能力の強弱の消長等の究明は鉤虫研究の基礎として、またその感染予防並びに疫学の面からも非常に大切な問題である。

鉤虫被囊幼虫の生命の長さについては従来いろいろな報告がある。即ち Bruns & Leichtenstern は夫々6カ月あるいは7カ月といひ (Boycott による)、Nicoll (1917) は実験室内で 60°F の水中では 18 カ月間保たれると述べている。また Cort & Payne (1921) は日陰の湿った土壤中では 6~8 週間生きるものは少なく、直射日光下では 5 日以内で死滅すると報告している。この様に鉤虫被囊幼虫の生命の長さはその置かれている環境の如何によつていろいろな様である。

生命の長さに関連して、一方ではその感染能力の保有期間に長短があり、且つその間の感染能力の強弱に消長がある事も想像される。Looss (1911) は鉤虫被囊幼虫の人体への経皮感染に際して、老齢の幼虫は若齢のものよりも侵入能力が大きいと言っている。しかし Payne (1929) は、人体経皮感染実験を行なった結果、老齢のものは若齢のものよりもその感染能力が非常に弱いと述べている。白井 (1926) は 35°C で種々な期間培養した犬鉤虫幼虫を用いて犬に経口感染実験を行なった結果、培養開始後 24 時間目で被囊していない幼虫は犬消化管内で全く成虫となるものはないが同じく被囊していない 60 時間目のものでは被囊幼虫の場合と殆んど変わらない数のものが成虫に達する。また 50~60 日令の被囊幼虫の場合

では若令のものの場合に比べてその数は稍々少ないと報告している。笹田 (1935) はズビニ鉤虫被囊幼虫を白鼠の皮膚に接触させて感染実験を行なうと、7~9 日令のものは最もよく白鼠体内に侵入し、10~14 日令のものはこれに次ぎ、30 日令のものは前 2 者より侵入力弱く、更に 50~70 日令のものはごく少数のものが侵入するのみであると云っている。以上の他、更に数多くの実験者によつてこの種の実験が行なわれているが、夫々の実験に於て用いられた鉤虫の種類、培養後の幼虫の置かれた環境或は実験動物の相違等の為、得られている成績は異なつており厳密に比較する事は出来ない。しかし、大多数のものの見解は次の如くである。即ち、鉤虫被囊幼虫の宿主への侵入或は感染能力は幼若令のものでは未だ充分でなく、その後最強となり、2 カ月以上を経たものでは著しく減弱する。

著者らは先般来、アメリカ鉤虫 (以下 Na と略記する) 被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させて感染実験を行なうと同被囊幼虫は仔犬体内に侵入して發育し成虫に達すること、即ち仔犬は同鉤虫の固有宿主である事を報告してきた。ここに於て同鉤虫の固有宿主を用いての感染実験が可能となり、各種の実験を行なうに先立つて先づ同被囊幼虫の培養開始後の日令と感染能力との関係を究明する必要があると考えた。そこで培養開始後種々な日令の Na 被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させて実験を行ない、仔犬の体内へ侵入した幼虫数を確め、且つ一定日数後、仔犬を剖検して、その体内移行中の幼虫を検索し、検出幼虫数の多寡を知る事によつて、これらの関係を追求した。

本研究は昭和36年度の文部省科学研究、各個研究の援助によつて行われた。記して謝意を表する

実験材料並びに方法

供試した仔犬は生後1カ月ないし3カ月のもので、その体重及び雌雄は不同である。実験に用いた Na 被囊幼虫は1人の Na 単独被寄生者の虫卵陽性便を試験管全濾紙培養法により温度 27~28°C で5~7日間培養して得られたフィラリア型被囊幼虫で、このものをその後、清水を容れたスピッツグラス中に分注し、21~25°C に保つたものである。但しスピッツグラス中の水量は約10ccで、これは1~2週間毎に新鮮なものと容れ替えた。実験に当つては、先づ仔犬をネブタールで麻酔した後、背位に固定しその下腹部及び鼠径部の皮膚上に正確に算定した各培養開始後日令の500隻前後の Na 被囊幼虫を適量の水(皮膚に塗布後1時間で略乾燥する程度)と共に塗布して1時間接触させた。その後直ちに駒込ピペットを用いて幼虫接触部をよく洗い不侵入の幼虫を洗い落してその数を数え、接触幼虫数からそれらを差引いて侵入幼虫数とした。尚実験中の室温は21~26°C に保つた。また用いた被囊幼虫の日令は5~117日令で、各幼虫日令のものにつきそれぞれ2頭の仔犬(一部を除いて)を使用して実験を行なつた。成績の判定は原則として幼虫接触後、6日目に仔犬を屠殺し、体内の幼虫を検索して行なつたが、5日目或は7日目に行なつたものもある。この時期には著者らの従来の実験成績によると(田辺, 1962)、仔犬に経皮侵入した Na 第3期幼虫は大部分が肺に移行してここに留つており、ごく少数のものが例外的に幼虫接触部附近或は消化管に検出されるのみであるので、幼虫の検索を行なつた組織は5日目及び6日目の剖検例では幼虫接触部皮膚(皮下組織を含む)と肺、7日目の例では肺と消化管内容のみである。幼虫の検索に当つては、皮膚及び肺は細切してペールマン氏装置にかけ、消化管は切開して、その粘膜面を手指腹部でこすつて内容を洗い出し、夫々得られた液の沈渣について検鏡した。また肺から回収された幼虫は体長、体幅の計測を行なつた。

実験成績

著者らの行なつた培養条件下では、培養開始後5日目にはかなり多数が被囊幼虫となつた。そこで5日以後のいろいろな日令の被囊幼虫について実験を行なつた。それらの成績は表及び図に示した通りである。但し、第1図(第1表参照)に於てその下段は培養開始後5日から117日に至る種々な日令の被囊幼虫を夫々仔犬の皮膚に

接触させて後5~7日目に屠殺し、それらの体内から回収した幼虫数を示したもので、各日令の幼虫について夫々仔犬2頭宛の平均値である(但し21日令及び60日令のそれは仔犬1頭づつの値)。また同図の上段は幼虫接触後、該部皮膚を水洗した際、その洗滌液中に数えられた不侵入の幼虫即ち、残存幼虫数を示したものである。これも各日令のものについて、夫々仔犬2頭宛の平均値を示した。

1) 経皮侵入能

Na 被囊幼虫の培養開始後日令による仔犬体内への経皮侵入能は回収不能の不侵入幼虫がかなり多数あると思われるので残存或は侵入幼虫数の多寡のみを以つて正確に推し測る事は出来ない。しかし第1表及び第1図上段に示した如き成績から凡その傾向を知る事が出来る。即ち先づ5日令の被囊幼虫を以つて行なつた実験では残存幼虫数は少数で多数のものが仔犬の体内に経皮侵入したこととなる。

即ち、5日令の多くのものは既に経皮侵入能力を保有していると言ひ得る。次ぎに6日令以後の被囊幼虫では更に多くのものが経皮侵入能力を保有する様になり殊に12日令以後55日令頃までのものでは、多くの実験例で残存幼虫数は各々20隻以内のごく少数で大多数のものは経皮侵入能力を保有している。しかし、それ以上の日令の被囊幼虫では日令の増加と共に次第にその能力を持つているものが減少し、105日令以後の被囊幼虫では各実験で夫々100隻以上の経皮侵入し得ないものを認める様になる。即ち、この時期になるとかなり多数の被囊幼虫は経皮侵入能を失なつていていると考える。尚、侵入能力の旺盛な時期のものを皮膚に接触させた場合には、該部を洗つた際の洗滌水中にその脱囊した鞘が多く認められたが、老令または若令のものを以つて行なつた場合には鞘の数は少なかった。併し、2カ月以上を経た老令の幼虫では既に培養中に脱囊しているものも少数ではあるが認められること、鞘の回収数には充分な信頼がおけない事などからして、その数は敢えて数えなかつた。

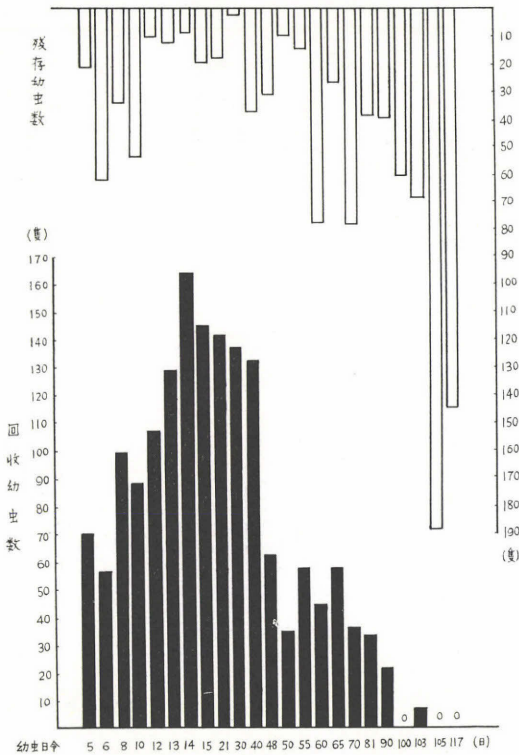
要するに、経皮侵入能を保有する被囊幼虫の数は5日令のものでは既に多数であり、それ以後の日令のものでは更に多いこと、60日令頃以後のものでは日令の経過と共に次第に減少し、105日令以後のものではかなり少くなることが明らかにされた。

2) 肺への移行能力及肺での発育能

Na 被囊幼虫が仔犬の体内に経皮侵入した後の肺への移行能力及肺での発育能力は第1表及び第1図下段に

第1表 培養開始後種々なる日数(5~117日)を経過したアメリカ鉤虫被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させた場合の幼虫の侵入状況及び回収状況

仔 犬				感 染 幼 虫						回 収 幼 虫					
番 号	性	体 重 (kg)	剖 の 見 日 迄 数	培 日 養 齢	接 触 数	残 存 数	侵 入 数	平 侵 入 均 数	平 侵 入 均 率	皮 膚	肺	消 化 管	合 計	平 均	平 回 収 均 率
1	♂	1.9	6	5	506	26	480			0	57	—	57	71	13.8
2	♀	1.3	6	5	514	16	498	489	95.8	0	84	—	84	71	13.8
3	♂	1.3	5	6	519	102	417			1	62	—	63	57	11.2
4	♂	1.1	5	6	501	23	478	448	87.8	1	49	—	50	57	11.2
5	♀	1.1	6	8	511	32	479			0	114	—	114	100	19.6
6	♂	1.2	6	8	509	36	473	476	93.3	1	85	—	86	100	19.6
7	♂	0.9	6	10	521	43	478			1	92	—	93	83	17.0
8	♂	0.7	6	10	524	65	459	469	89.5	3	80	—	83	83	17.0
9	♂	0.9	6	12	500	9	491			2	161	—	163	108	21.5
10	♀	0.8	6	12	501	13	488	490	97.8	1	52	—	53	108	21.5
11	♂	1.3	6	13	500	15	485			0	165	—	165	131	26.0
12	♀	1.1	6	13	504	9	495	490	97.6	1	95	0	96	131	26.0
13	♀	1.5	6	14	507	9	498			0	138	0	138	164	32.3
14	♀	1.3	5	14	509	7	502	500	98.5	2	188	0	190	164	32.3
15	♂	0.9	7	15	550	21	529			—	154	0	154	151	27.9
16	♀	0.8	7	15	509	18	491	510	96.3	—	147	0	147	151	27.9
17	♂	1.5	7	21	532	19	513	513	96.4	—	143	0	143	143	26.9
18	♂	0.8	6	30	510	1	509			1	160	—	161	139	27.6
19	♀	1.5	6	30	501	4	497	503	99.7	1	116	—	117	139	27.6
20	♀	1.5	6	40	544	69	475			2	122	—	124	134	25.2
21	♀	1.1	6	40	593	7	486	481	92.5	4	140	—	144	134	25.2
22	♀	1.5	7	48	512	63	449			—	79	0	79	63	12.0
23	♀	1.2	7	48	540	2	538	494	93.9	—	47	0	47	63	12.0
24	♀	1.5	5	50	495	12	483			3	49	—	52	37	7.4
25	♂	1.4	7	50	497	8	489	486	97.9	—	21	0	21	37	7.4
26	♂	1.5	6	55	521	18	503			0	59	—	59	54	10.3
27	♀	1.2	6	55	520	12	508	506	97.1	0	48	—	48	54	10.3
28	♀	1.3	7	60	502	59	443	443	88.2	—	45	0	45	45	10.1
29	♀	1.7	6	65	500	43	457			0	62	—	62	64	12.6
30	♀	1.0	6	65	509	12	497	477	94.5	1	64	—	65	64	12.6
31	♀	1.3	6	70	517	70	447			0	47	—	47	36	6.9
32	♂	1.7	6	70	516	86	430	434	84.9	0	25	—	25	36	6.9
33	♂	1.7	6	81	502	43	459			0	37	—	37	34	6.7
34	♂	1.1	6	81	501	35	466	463	92.2	0	30	—	30	34	6.7
35	♀	1.9	6	90	507	68	439			2	38	—	40	22	4.2
36	♀	1.5	6	90	504	12	492	466	92.1	0	3	—	3	22	4.2
37	♂	2.9	6	100	512	57	455			0	0	—	0	0	0
38	♂	2.6	6	100	516	65	451	453	88.1	0	0	—	0	0	0
39	♂	0.8	6	103	505	53	452			2	7	—	9	8	1.6
40	♀	0.7	6	103	524	87	437	444	86.3	2	5	—	7	8	1.6
41	♂	3.0	6	105	502	106	396			0	0	—	0	0	0
42	♂	2.5	6	105	504	272	232	314	62.6	0	0	—	0	0	0
43	♀	2.4	6	117	525	171	354			0	0	—	0	0	0
44	♀	1.9	6	117	502	111	391	373	72.5	0	0	—	0	0	0

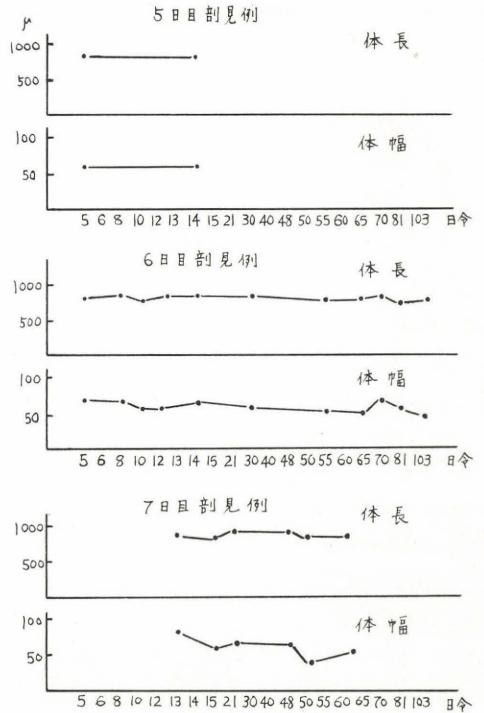


第1図 培養開始後5~117日を経たアメリカ鉤虫被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させた場合の残存幼虫数と仔犬体内から回収された幼虫数

示した如くである。先づ5日令の被囊幼虫では、既にその移行能力及び発育能力を共に保有するものがかなり多数あるのが認められる。6日令以後の被囊幼虫ではその様な幼虫の数は日令の経過と共に増加し、14日令の被囊幼虫で最も多く平均164隻である。そしてその後40日令の被囊幼虫に至るまで平均110隻以上の多数が肺で発育しているのが見出される。しかし、48日令以後になるとその数は日令の増加と共に次第に減少し、多くの例で50隻以下となり、100日令以後になると、その様な幼虫は全く認められないか或いはごく少数となる。

要するに経皮侵入後の肺への移行能力、肺での発育能力を保有する幼虫の数は5日令の被囊幼虫では既にかなり多数であり、その後40日令頃までのものではそれ以上に多いが、中でも14日令頃のもののが最多数であること、48日令頃以降のものでは日令の経過と共に次第に減少し100日令以後のものは、ごく少数であるか全くないことが明らかとなった。

3) 肺での発育状況



第2図 培養開始後各日令の被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させて5, 6, 7日後に仔犬の肺から回収された幼虫の平均体長・体幅

仔犬体内に経皮侵入した Na 幼虫は血流によって肺に達し、ここに5, 6日間留り、この間発育を行なうわけであるが、日令の異なる Na 被囊幼虫が経皮侵入して肺移行をした場合、それらの肺での発育状況が異なるかどうか検討した。即ち、肺に於てある日令のものは発育が速く、ある日令のものは遅いという様な差があるかどうかを観察した。その成績は第2図に示す如くである。但し、図は本実験で仔犬の肺から回収した幼虫の体長、体幅を計測しその平均値を幼虫接触後、屠殺剖検した日数別に示したものである。幼虫接触後5日目に剖検を行なったものは2例のみであるので論議はさけるとして、同6日目に剖検した11例では Na 被囊幼虫の日令の相違によつて、その体長、体幅に差が生ずるとは認めがたい。同7日目に剖検した6例についても同様である。

要するに、Na 被囊幼虫は宿主体外では一定度以上の発育を行わず、且つ一度仔犬体内に侵入して肺に移行する事が出来れば、その培養日令の如何に拘らず、同様な速度で肺内での発育を進めるものと思われる。

考 案

衆知の様に鉤虫被囊幼虫は外界より栄養を摂取しないと思われるので、その生命及び感染能力の保有期間或はその能力の強弱は日令の経過のみならず、被囊前に体内に貯蔵した栄養物質の消費速度によつても大いに左右される。従つて被囊幼虫のおかれた環境の温度の上昇とかその他の色々な刺激等はその貯蔵物質の消失を早め被囊後日数を経ないものでも老令期に入るものと考えられる。そこで著者らは日令の経過以外に実験成績に影響を与えらると思われる様な因子を出来るだけ除く様に努めた。即ち、全実験期間を通じて Na 被囊幼虫を容れた容器は 21~25°C の恒温器中に静置して無用の刺激を与えない様にした。また容器中の水は 1 ないし 2 週間に 1 度の割合で新鮮なものと取替えて環境の汚染されるのを防いだ。被囊幼虫の皮膚への接触時の該部の温度或は環境の温度と幼虫の侵入性についてみると、Looss は幼虫の経皮侵入には該部の温度が 30~38°C であるのが最適で、皮膚がつめた様な場合は幼虫は経皮侵入し難いと云つている。一方、江口 (1922) は鉤虫被囊幼虫は蛙の様な変温動物或は動物屍体でもよく侵入するといひ、これについては余り重要視してない。他方、水野ら (1959) は人鉤虫被囊幼虫をもつて人体経皮感染実験を行なつた際同一人体に於ても幼虫接触時の室温の高低によつてその侵入率は大いに異なると云つている。即ち、その時の室温 25°C と 18°C とでは前者の場合の方が後者の場合よりも幼虫侵入率は相当大きかつたと報告している。著者らは Na 被囊幼虫を仔犬の皮膚に接触させた予備実験でやはり水野らの如き傾向を認めたので本実験では幼虫接触時の室温は 21~26°C に保つて観察を行なつた。

松崎 (1929) は同一条件下でズビニ鉤虫及び Na 虫卵陽性便の培養実験を行なつた結果、孵化した幼虫の大多数が第 3 期被囊幼虫に達するには前者の方が後者よりもその所要時間が短いと述べている。また諸家の鉤虫被囊幼虫の日令の経過による感染能力の問題についての実験成績も、用いた鉤虫の種類によつて可成りの相違がある。従つて 1 鉤虫の種類をもつて他の種のものそれを推し測る事は出来ない。一方、鉤虫感染に対する宿主側の条件として、鈴木 (1923) は天竺ネズミの様な皮膚の軟かい動物では幼弱な日令のものでも経皮侵入する事が出来るといひ、笹田 (1935) は同じ種類の実験動物でも、年齢、栄養状態、個性等によつてその侵入或は感染状況に差があると云つている。

これらの諸問題について、著者らは虫種は Na、宿主は固有宿主である仔犬を用いて実験を行なつた。然し乍ら、生後 1 カ月ないし 3 カ月の仔犬の間にも犬の品種、性別、栄養状態、体重、生後月齢等に相当の違いがあり、必らずしも一致した実験成績が得られていない場合もあるが、本実験の成績を以つてその目的は略々達成せられたものと信ずる。

結 語

Na 虫卵を濾紙培養法によつて 27~28°C の温度下で 5~7 日間培養して得られた被囊幼虫を採集し、以後これを清水中に移して 21~25°C の温度下で保存したものを、培養開始後 5~117 日間の種々な時期に仔犬の皮膚に接触させて感染実験を行なつた。先づそれらの経皮侵入状況を観察し、次いで数日後仔犬を屠殺剖見して仔犬体内の幼虫の検索を行ない、培養後の幼虫日齢と経皮侵入能、肺への移行能及び肺での発育能との関係について観察を試みた。得られた実験成績を要約すると次の如くである。

1) 経皮侵入能力：培養開始後 5 日目の被囊幼虫でも既にこの能力を有している事が認められた。同様 6 日目 8 日目、10 日目のものも有しているが、これら若令の幼虫はそれ以後のものに比較しやや能力が低い様である。12 日ないし 55 日目の間の幼虫は一定した高い侵入能力を保有する事が残存幼虫数の少ないと云う点から推定された。60 日以上を経過した幼虫の侵入能力は不安定となり多数のものが侵入し得ずして皮膚上に残存する様になる。100 日を越えると急激に侵入能力は失なわれてゆく様である。

2) 肺への移行能力及び肺での発育能力：培養開始後 5 日目の幼虫でも既にこの能力を有するものが存在するがその数は多くない。併しその後数日の内に急激に多数のものがこの能力を有する様になり、13 日ないし 40 日間の日齢の幼虫はほぼ一定した高い能力を有する。所が 48 日令以後の幼虫では急に之が低下し、日数の経過と共に著しくなつて 100 日令以後のものでは殆ど幼虫は回収されなくなり、肺への移行能或は発育能を失なつていて考えられる。この間 48, 50, 55 日令等のものは前述の皮膚侵入能力は尚保有すると考へられるのに肺に於て著明に減少しているのは肺への移行能力の減弱を示唆している。

3) 肺での発育状況：培養後日齢の異なる被囊幼虫でも仔犬体内に侵入して一度その肺に移行する事が出来れ

ば、それらの幼虫の發育は殆んど同様に進み、發育の速度に差は認められない。

4) 以上の結果から、Na 被囊幼虫を仔犬に経皮感染させる実験を行なうに際しては培養開始後凡そ12日ないし40日の日令の幼虫を使用する事が、実験結果を一定にする上に好ましいと考える。

文 献

- 1) Boycott, A. & Haldane, J. S. (1904) : Ankylostomiasis. J. Hyg., 4, 73-111.
- 2) 江口季雄(1922) : 十二指腸虫に関する研究 (第1報) 十二指腸虫仔虫の異種動物組織内侵入並に侵入幼虫の運命について, 愛知医誌, 29, 727-746.
- 3) Haley, A. J. & Clifford, C. M. (1960) : Age and infectivity of the filariform larvae of the rat nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. J. Parasit., 46, 579-582.
- 4) Looss, A. (1911) : The anatomy and life history of *Agchylostoma duodenale* Dub. A Monograph, Records of the Egyptian Government, School of Medicine, IV.
- 5) 松崎義周(1929) : 「アンキロストーマ」種及び「ネカトール」種十二指腸虫仔虫の宿主体外に於ける發育速度, 慶応医学, 9, 1781-1805.
- 6) 水野哲夫ら(1959) : 鉤虫の感染経路に関する研究 II. とくにヒト感染実験について, 医学と生物学, 50, 101-104.
- 7) Payne, F. K. (1904) : Investigation on the control of hookworm disease XXXI. The relation of the physiological age of hookworm larvae to their ability to infect the human host. Amer. J. Hyg., 3, 584-597.
- 8) 笹田丁二(1935) : 経皮感染異宿主動物に於ける人十二指腸虫仔虫の移行状態に就て, 並にその移行臓器に於ける病理組織学的研究, 慶応医学, 15, 1843-1892.
- 9) 鈴木憲二(1923) : 十二指腸虫病に関する研究 (仔虫の皮膚侵入に就て), 日本病理学会誌, 12, 71-74.
- 10) 白井光次(1926) : 十二指腸虫の経口感染に関する実験的研究特に仔虫の宿主体内移行に就て, 実験医誌, 10, 1572-1596.
- 11) 田辺一男(1962) : アメリカ鉤虫被囊幼虫を仔犬に経皮侵入せしめた場合に於ける本虫の体内移行経路と發育について, 京府医大誌, 71, 513-537.
- 12) 高林良行(1956) : 実験的鉤虫症の研究, 第一, 感染仔虫の成熟度及び感染方法による鉤虫寄生率及び發育の比較について, 岐医大紀要, 3, 383-390.
- 13) 山口正道・山口操(1928) : 十二指腸虫の感染経路に関する実験的研究補遺, 東京医事新誌, 2563, 503-505, 540-546.
- 14) 吉田幸雄ら(1960) : アメリカ鉤虫の仔犬体内に於ける發育について, 寄生虫誌, 9, 735-743.

ON THE RELATIONSHIP BETWEEN AGE AND INFECTIVITY OF THE ENCYSTED LARVAE OF *NECATOR AMERICANUS*

MISAO NAGAHANA, KAZUO TANABE, YUKIO YOSHIDA, KAORU KONDO,
MAKOTO ISHIKAWA, SEIGO OKADA, KENJI OKAMOTO,
SACHIKO FUKUTOME & KIROKU MATSUNO

(Department of Medical Zoology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto, Japan)

The present work has been carried out to make clear the following questions concerning infectivity of the encysted larvae of *Necator americanus*: (1) When the larvae begin to acquire the ability of infection? (2) When they show the strongest ability of infection? (3) When they lose this ability?

The encysted larvae of *N. americanus* were obtained by culturing the eggs of this hookworm at 27-28°C for 5-7 days. These encysted larvae were then preserved in tap-water at 21-25°C for 1-112 days. During this period, experimental infections of puppies with those larvae were carried out from time to time.

The results obtained are summarized as follows: The larvae which are five days old already showed considerable ability of skin penetration and lung migration. This ability increased rapidly with their age. The larvae of about 2 to 6 weeks old showed constantly high levels in

this ability. Above all, those of 14 and 15 days old seemed to be the highest. After that, the ability dropped down gradually, and no larva was found penetrating the skin after 105 days in their age.

The larvae of young age (e. g. 5 to 10 days old) and old age (e. g. 50 to 90 days old), once they could penetrate the host's skin, did not show any difference in their development from that of moderate age (e. g. 13 to 40 days old).