

## *Rhabditis elongata* に関する研究 (3)

関 谷 竜 吉

岐阜大学医学部寄生虫学教室 (森下哲夫教授)

(1966 年 8 月 31 日 受領)

著者は第 2 報 (1966) に於いて人体に長期に亘つて寄生していた *R. elongata* (南株) の各種薬物に対する抵抗力及び母虫体が産下する諸条件について検討を行なつた。

今回は人体感染との関連を究明するため、炭酸ガス及び窒素ガスに対する本虫の抵抗性と温度の本虫に与える影響について比較検討を行ない、さらに、超低温に対する抵抗の実験を行なつて、いささかの知見を得たので報告する。

### ガスに対する *Rhabditis elongata* (南株) の抵抗性について

#### 1) 減圧下に於ける抵抗

K 20 培地培養 (室温 25±1°C) 5 日の虫体をデシケーターの中に取めロータリーポンプでデシケーター内の空

第 1 表 減圧下に於ける抵抗 室温 26±2°C

虫体区分	死までの所要時間 (分)											
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
成虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
卵幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

気を排除し、常時デシケーター内の気圧は水銀柱 10~15 mm を示し真空に近い条件下で、成虫、幼虫及び卵殻内幼虫の抵抗性を観察した。この結果第 1 表に示す如く、成虫と幼虫との間に於ては殆んど抵抗の差は認められなかったが、卵殻内幼虫は成虫及び幼虫に比して稍々抵抗性が強かつた。この実験では成虫、幼虫及び卵殻内幼虫何れもが 120 分を経過すると乾燥し原形を保つものを認めることが出来なかつた。

#### 2) 窒素ガスに対する抵抗

K 20 培地培養 (室温 25±1°C) 5 日の虫体をアトランダムに約 1,000 隻集め、純水 20 ml 中に浮遊させ、デシケーターに取めてロータリーポンプで空気を排除し真空

第 2 表 窒素ガスに対する抵抗 室温 26±2°C

例数	虫体区分	死までの所要時間 (時)											
		2	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66
1	成虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	卵幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
2	成虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	卵幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
3	成虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	卵幼虫	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

に近い状態とし、窒素ガス (N<sub>2</sub> 純度 99.70, 圧力 150 kg/cm<sup>2</sup> 35°C) に置き換えてこれを 3 回反覆し、デシケーター内には常時窒素ガスが充満するように放流する。窒素ガス中での本虫の抵抗は第 2 表に示すように、成虫は 12 時間、幼虫は 24 時間、卵殻内幼虫は 42 時間生存していることが認められた。さらに、120 時間窒素ガス中に静置した検体 (成虫、幼虫及び卵殻内幼虫は死亡している) を空気にさらして放置すると第 4 表のように 48 時間後には第 1 期幼虫の出現を見、未成熟卵は窒素ガス内に於いても強い抵抗性を有することが認められた。この実験は 3 回行なつたが 3 回何れも同様な結果を得た。

#### 3) 炭酸ガスに対する抵抗

炭酸ガスに対する実験は液体炭酸ガスを用い、前述窒素ガス実験の要領に従つて行なつた。第 3 表に示すように、成虫と幼虫との間に於ては抵抗の差は認められず、18 時間経過すると死亡した。卵殻内幼虫は 24 時間で極く僅か動いているのが認められたが、30 時間を経ると死滅した。48 時間から 120 時間炭酸ガス内に静置した検体を室温 26±2°C 内に移して空気と置換えて観察を行なつたが第 4 表の如く第 1 期幼虫の出現は 8 日を経ても認めることが出来なかつた。炭酸ガスは前述窒素ガスに比較すると成虫、幼虫及び卵殻内幼虫共に僅か

第3表 炭酸ガスに対する抵抗 室温 26±2°C

例	虫区	虫体分	死までの所要時間(時)									
			2	6	12	18	24	30	36	42	48	
1	成虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	卵	虫	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-
2	成虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	卵	虫	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-	-	-
3	成虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	卵	虫	卅	卅	卅	卅	±	±	-	-	-	-
	幼虫	虫	卅	卅	卅	卅	±	±	-	-	-	-

第4表 各ガス処理による幼虫出現成績 室温 26±2°C

ガス	処理時間	虫体出現所要日数								
		1	2	3	4	5	6	7	8	
窒素ガス	48			+	+	+	+	+	+	+
	72		+	+	+	+	+	+	+	+
	96			+	+	+	+	+	+	+
	120			+	+	+	+	+	+	+
炭酸ガス	48		出現を見ず							
	72		"							
	96		"							
	120		"							

＋は幼虫の出現を表わす

第5表 加温度別による虫体培養成績

加温度	°C												
	20	25	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	
5日毎に5°C宛加温	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
5日毎に3°C宛加温	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
5日毎に1°C宛加温					+	+	+	+	+	+	+	-	

＋は継代培養可能 - は継代培養不能を示す

第6表 温度別培養虫体の高温度に対する抵抗

虫体培養温度	加温時間												
	2時間					10分間				1分間			
	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48°C
5°C放置	卅	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
15°C培養	卅	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
25°C "	卅	卅	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
35°C "	卅	卅	卅	卅	-	+	+	-	-	±	-	-	-

卅は成虫、幼虫及卵幼虫の70%以上の生存  
 卅は " 30%~70%生存  
 十は " 1%~30%生存  
 ±は顕微鏡検査によつて頭部尾部のみを僅かに動かすもの1%以下の場合を示す

あるが抵抗性が弱く、第4表の空気置き換え実験では窒素ガスに於ては何れも幼虫の出現を見ているが、本ガスでは出現を認めることが出来なかつた。以上から炭酸ガスは窒素ガスよりも有毒性が高いと考えられた。

温度に対する *R. elongata* (南株) の抵抗性について

1) 加温に対する抵抗

著者は第1報(1964)で本虫の至適温度は20±5°C

であると述べたが、人体温度との関連を究明するため、温度に対する抵抗性の実験を試みた。第5表の如く、室温15±2°C下でK20培地で培養5日の虫体を36°Cの恒温室に移し培養を試みたが、温度衝撃によるものか12時間で死滅した。ついで、前記虫体を5日毎に5°C宛加温しK20培地で継代培養を試みると、31°Cでは長期日培養が可能であつたが、36°Cでは24時間経ると死滅した。さらに、5日毎に3°C宛加温しK20培地で継代培養を行なうと35°Cまではよく増殖し継代培養は可

能であつたが、36°Cでは48時間で死滅した。35°C恒温室内で培養した虫体を5日毎に1°C宛加温し継代培養すると38°Cの恒温室内で7日間生存している虫体が認められた。39°Cでは48時間で死滅した。この実験から本虫は加温が急激な場合は温度衝撃を受けるものと考えられ、健康な人体温(36°C±1°C)中では長時間に亘つて生存が可能であることが認められた。野々田(1958)は *Rhabditis* 属線虫の人体感染に関して、気温の高い夏期に罹患の例が多く、気温の低い冬期は殆んど罹患の例を見受けないと報告しているが、この実験から検討を加えると、冬期自然界に生活する *Rhabditis* 属線虫は人体にとりこまれた場合、急激な温度衝撃によつて死亡し、罹患例が少なく、夏期には自然界に於て温度に対する抵抗力も強くなつており、人体温度との差も少なく感染が容易となり、彼が言つているように罹患例が多いのではないかと考えられる。

冬期に於ても虫体の生活環境の条件によつては感染が可能である。著者は第1報(1964)で本虫の家兎への感染実験で室温30°C±2°C下で培養した虫体を家兎へ与えて感染した例を報告している。

## 2) 生存上限温度

本虫の生存上限温度を究明するために室温5°C、15°C、25°C、35°C、と各々一定温度下で培養した虫体を用いて、恒温槽内で熱に対する抵抗力を観察した。第6表に示すように、5°Cに7日間放置した虫体は、30°Cまで急激に加温しても活発な運動を行なつて殆んど温度衝撃を受けないが、32°Cに至ると約70%が数分内に死亡し、生存する虫体にあつても緩慢な動きとなり、1時間後には動かなくなり死滅する。40°Cに加温すると5分以内に、45°Cでは1分以内、46°Cでは瞬時に死滅する。15°C下で培養した虫体は急激に32°Cに加温しても活発な運動を行ない、144時間生存している虫体が認められ、前述5°Cの培養虫体に比して強い抵抗力を有することが判明した。15°C培養虫体を急激に35°Cに加温すると、6時間内に死滅した。40°Cでは5分以内、45°Cでは1分以内、46°Cでは瞬時に死滅した。ついで、25°Cで培養した虫体は32°Cに急激に加温しても殆んど温度衝撃を受けず144時間経ても生存している虫体が多数認められ、35°Cでは24時間で死滅した。40°Cでは5分以内に、45°Cでは1分以内に46°Cでは瞬時に死滅した。さらに、35°Cで培養した虫体は40°C下では20分以内に、45°Cでは1分以内に、46°Cでは瞬時に死滅した。

上記の実験から本虫の加温度に対する抵抗力は生活環境温度によつて異なつてはいるが、45°C以上になると何れの温度下に生活している虫体も1分以内に死滅し、46°Cでは瞬時に近く死亡をする。46°Cが本虫の生存上限温度ではないかと推定した。

## 3) 低温に対する抵抗

著者は1963年9月から1965年3月に亘る531日間、本教室の冷蔵庫(恒温度4°C±1°C)の中に本虫を放置して、生存している虫体を認めた。本虫は低温度(1~6°C)に対しては抵抗力強く、仮死状態で長期日生存するのではないかと考えられるので、本虫の低温に対する抵抗及び生態の観察を行なつた。この実験で虫体の運動能力を室温15°C下で活発な運動を行うものを基準(以下運動能力Aで表わす)とし、全身運動緩慢な虫体(以下運動能力Bで表わす)、頭部及び尾部のみ僅かに動かす虫体(以下運動能力Cで表わす)、顕微鏡(×100)下で観察しても全く動かなく、仮死状態となつてはいる虫体(以下運動能力Dで表わす)、の4つに区分した。ただし、B、C及びD共に15°Cに加温すると何れも運動能力がAに恢復することを条件とする。15°C±2°C下で培養した虫体を8°Cの恒温室内に移すと第7表の如く、2時間後には運動能力はBとなり、24時間後には運動能力Cとなる。15°C±2°C下で培養した虫体を6°Cの恒温室

第7表 低温に対する抵抗力

温度	区分	所 要 時 間 (時)										
		2	4	6	12	24	48	72	96	120	144	
8°C	虫体活力生存率	B	B	B	B	C	C	C	C	C	C	
6°C	虫体活力生存率	B	B	B	C	C	C	C	C	C	C	
4°C	虫体活力生存率	C	C	C	C	D	D	D	D	D	D	
2°C	虫体活力生存率	C	C	C	C	D	D	D	D	D	D	
-2°C	虫体活力生存率	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
-4°C	虫体活力生存率	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
-20°C	虫体活力生存率	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	

活力A = 全身運動活潑な虫体

B = 全身運動を行なうが緩慢な虫体

C = 頭部尾部のみをわずかに動かす虫体

D = 仮死状態の虫体

に移すと2時間後には運動能力B, 8時間後には運動能力Cとなる。前記培養虫体を4°Cの恒温室に移すと1時間後には運動能力B, 2時間後では運動能力C, 24時間を経ると運動能力Dとなって顕微鏡(×100)下で観察を行なっても全く動かなく仮死状態となっている。これらの虫体は, 144時間恒温室に放置した後, 室温15°Cに移すと, 何れも運動能力はAに恢復した。4°Cの恒温室に60日間放置した虫体を室温15°Cに移して観察を行うと10分後には運動能力はAに恢復し, K20培地で継代培養を行ったが, よく増殖した。氷点下に対する抵抗は-3°Cでは10分以内に運動能力Dとなり30分で凍結した。-4°Cで2時間凍結させた虫体を毎分1°Cずつ加温すると, 8°Cで運動能力C, 10°Cで運動能力B, 13°Cでは運動能力Aに恢復し, 虫体生存率は全虫体の約90%が生存していた。-4°Cで6時間凍結させた虫体は, 8°Cでは運動能力C, 10°Cでは運動能力B, 13°Cでは運動能力Aに恢復し生存率は約70%であった。12時間経過した虫体は13°Cに加温すると運動能力Aに恢復したものが全虫体の約40%, 24時間-4°C中に放置した虫体は13°Cに加温すると約30%, 38時間経過した虫体は約10%生存しており, 48時間では13°Cに加温し6時間放置しても運動能力Cにも恢復せず死滅したものと認められた。

グリセリン7%溶液に虫体を浸漬して, -4°Cの恒温

第8表 グリセリン溶液に対する抵抗  
室温13±2°C

濃度	虫体区分	所要日数									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1%	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3%	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
5%	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7%	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
10%	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
対照 (蒸溜水)	成虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	卵幼虫	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

室に放置すると, 48時間経過した虫体は, 15°Cに移すと運動能力がAに恢復し, 生存している虫体が全虫体の約40%認められ, 60時間経過した虫体に於いても運動能力がBに恢復した虫体が約2%認められ, 72時間では全く運動を行うものがなく死滅した。溜水に浮遊させた前記虫体とグリセリン添加液浸漬虫体と-4°Cに於ける抵抗の差は, グリセリン添加によるものが強いことが認められた。-20°Cに凍結した虫体は2時間で13°Cに移すと全虫体の約70%が生存しているが, 6時間経過すると急速に生存率は低下して全虫体の約30%が生存していた。12時間では約10%で, 24時間経ると死滅した。

この実験中死滅したと認められた検体は, すべてK20培地に植えて室温15±2°C中で7日間培養を試みたが幼虫の出現が見られず死滅したものと認められた。本虫は低温度(1~6°C)に対しては強い抵抗性を有し, 仮死状態で長期日生存し得ることが判明し, 氷点下で凍結しても本虫は長時間に亘って生存していることが可能であり, グリセリン添加した液中の冷凍した虫体は純水中のものよりも抵抗性が強いことが認められた。

4) 温度差による発育比較

室温15±2°C下でK20培地で培養した虫体をSörensen citrate-HCl buffer, pH 1.0に30分浸漬し, 溜水で数回洗滌し, 虫体浮游液をpH 6.8に調整し, 沈渣中の虫体を任意に約500隻(成虫及び幼虫は死亡してい

第9表 4°C14日静置濾紙培養の幼虫出現成績

例	15°Cに移したの ちの所要日数					25°Cに移したの ちの所要日数							
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	
1					+	+				+	+	+	+
2				+	+	+			+	+	+	+	+
3				+	+	+			+	+	+	+	+
4						+				+	+	+	+
5					+	+				+	+	+	+
6					+	+				+	+	+	+
7						+				+	+	+	+
8					+	+				+	+	+	+
9					+	+			+	+	+	+	+
10					+	+				+	+	+	+

註 +は幼虫の出現を示す

るが, 母虫子宮内幼虫, 母虫子宮内卵殻内幼虫及び母虫から産下した卵殻内幼虫は活発な運動をして生存している)を集めて新鮮なK20培地2g, 木炭末1gとよく混じ, 濾紙に塗布し, 試験管濾紙培養法を用いて第1期幼虫の出現とその発育について温度別に観察を行った。

第9表に示す如く, 4°Cの恒温室に静置した検体は

14日経ても第1期幼虫の出現をみなかつたが、これを室温 25°C 中に移すとその時点より24時間後に10例中3例に第1期幼虫の出現が認められ、48時間後には10例中全例に幼虫の出現が認められた。

同様に4°C 恒温室に14日静置した検体を室温 15°C に移した場合は96時間で10例中2例、120時間で6例、144時間後には全例に幼虫の出現を見るに至つた。

4°C では卵の発育は休止し、比較的低い室温下 (15°C) では卵及び卵殻内幼虫は緩かな発育を示し、高い室温下 (25°C) 下では短期日のうちに発育することが認められた。

さらに、前述試験管濾紙培養法 (この方法を用いたのは、死亡成虫及び死亡幼虫の混入を防ぎ、出現した第1期幼虫の発育度の観察を適確にした) によつて出現した第1期幼虫を純水に浮遊させて、5°C、15°C、25°C、35°C の各温度下で発育度の観察を行なつた。発育度の区分は、さきに大橋 (1959) が報告した *Rhabditis* 属線虫の発育区別を用いた (成長期を第1期幼虫は仮性食道球及び食道球不明で、生殖器は原基性で著明でないもの、第2期幼虫は仮性食道球の膨大部が認められ、食道球は明らかであるが弁は原基性で著名でなく、生殖器は原基性であり著名でないもの、第3期幼虫は頭腺が明らかとなり、食道腺は食道弁が判明し、肛門の開口が認められる。第4期幼虫は口唇が明らかとなり、口腔も形態的に見て成虫に近くなり、食道腺、頸腺の形成を完了し、生殖器原基もいくらか雌雄の区別がつけられるようになり、雌に於いては膈の部分の形成が判明し、雄にあつては交接翼の形成が進んだもの、成虫は雄成虫にあつては交接刺の判然としているもの、雌成虫では膈の開口が認められるもの)。第10表に示す如く、5°C では144時間経ても第1期幼虫は仮死状態で成長が認められなかつた。15°C 下では48時間経ると第2期幼虫、72時間では第3期幼虫、120時間で第4期幼虫を認め、成虫を認めるには144時間要した。25°C 下では24時間で第2期幼虫、48時間で第3期幼虫、72時間では成虫を認めることができた。

このように本虫の発育度は温度によつて大きく左右されることが判明した。この実験で本虫の発育は同一温度内でも一様に揃わないので全虫体中約60%が最上段階の形態を整えている場合はその段階に成長したものと判定した。

5) 超低温に対する抵抗

第10表 温度別虫体の発育表

温度別	区分	所要日数						
		1	2	3	4	5	6	7
5°C	体長 (mm)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
	形態	I	I	I	I	I	I	I
15°C	体長	0.10	0.25	0.50	0.50	0.80	1.00	1.30
	形態	I	II	III	III	IV	IV	V
25°C	体長	0.25	0.50	0.80	1.30	1.50	1.50	1.50
	形態	II	III	IV	V	V	V	V
35°C	体長	0.50	0.80	1.30	1.50	1.50	1.50	1.50
	形態	III	IV	V	V	V	V	V

- I は第1期幼虫と認められるもの
- II は第2期幼虫と認められるもの
- III は第3期幼虫と認められるもの
- IV は第4期幼虫の形態を整えているもの
- V は成虫

精液を超低温 (-79°C) に凍結して長期日保存する、いわゆる“凍結精液保存法”は、英国で Polge et al. (1949) によつて発見されたものであるが、以来今日まで世界各国において盛んな追試が行われ、特に家畜人工授精には、凍結精液の応用は極めて広く普及されるにいたつている。著者は、“凍結精液保存法”を応用し本虫の超低温保存 (-79°C) を試みた。精虫の保存には最近卵黄を混合した卵黄緩衝液 (組成及び調整法は、卵黄20g、クエン酸ソーダ3gに純水を加えて100mlとし、K塩か2塩基性のNa塩でpHを6.75に補正する) が極めて有効とされている。

本虫を15±2°Cの室温下で該卵黄緩衝液に浸漬して抵抗性を観察すると第11表のように対照の純水に浮遊

第11表 卵黄及び卵黄クエン酸液に対する抵抗 室温15±2°C

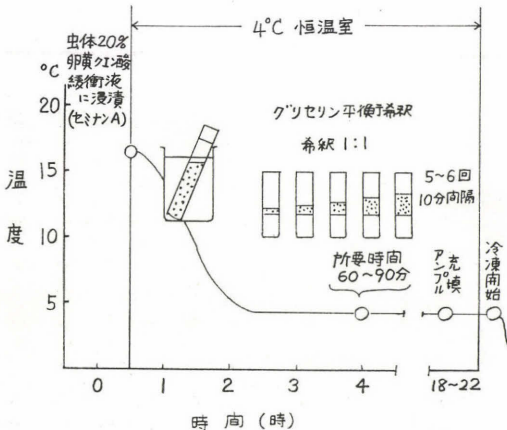
浸漬液	虫体区分	所要日数					
		2	5	10	15	20	25
10% 卵黄液	成虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	幼虫 卵幼虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
20% 卵黄液	成虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	幼虫 卵幼虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
卵黄クエン酸液	成虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	幼虫 卵幼虫	+++	+++	+++	+++	+++	+++
対照 (蒸溜水)	成虫	+++	+++	+++	++	+	+
	幼虫 卵幼虫	+++	+++	+++	++	+	+

第12表 精液凍結用セミナン「シミズ」成分表

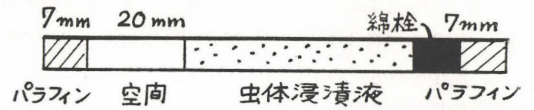
A液 (pH6.8)		
クロルプロマジン	0.00292 W/V %	
クエン酸ナトリウム	1.91667 W/V %	
グリシン	0.16667 W/V %	
卵黄	20.0 V/V %	
クエン酸	0.00383 W/V %	
第二磷酸ナトリウム	0.08333 W/V %	
ブドウ糖	1.16667 W/V %	
B液 (pH6.8-7.0)		
クロルプロマジン	0.00243 W/V %	
クエン酸ナトリウム	1.73245 W/V %	
ブドウ糖	0.41579 W/V %	
卵黄	20.0 V/V %	
クエン酸	0.00319 W/V %	
グリシン	0.0693 W/V %	
グリセリン	16.0 W/V %	

した虫体よりも抵抗性は強く、よく発育、繁殖し本虫の培養液としても有効なもの一種であることが判明した。この実験中卵黄緩衝液は48時間15±2°Cの室温下に放置すると悪臭ある白色濁液となり、7日を経ると表面一帯に青靨が生じる。一方本虫を浸漬した卵黄緩衝液は48時間を経ると前者と同様悪臭ある白色濁液となるが、その後時間を経るに従って臭気は薄らぎ、黄褐色半透明の飴状液と化して乾燥するまで(約40日)はよく増殖する。

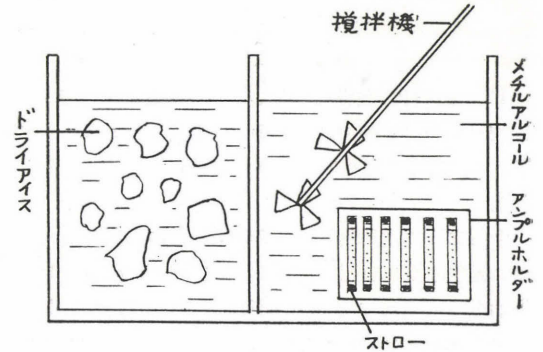
牛の精液の超低温保存には卵黄緩衝液にグリセリン7%を加えた液を用いて保存によい成果を得ている。著者は牛の精液保存液として国内で広く用いられている市販のセミナン「シミズ」(清水製薬 K.K. 調製, 組成成分第12表の通り)を使用した。室温15±2°C下でK20培地培養5日の虫体を任意に集め、セミナンA液20mlに約2,000隻を投じ、4°Cの恒温室で2時間冷却し、



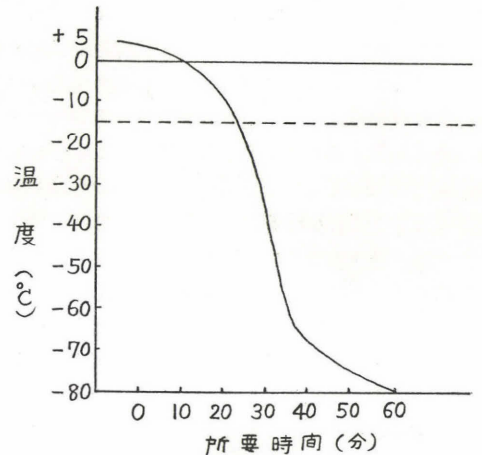
第1図 R. elongata 冷凍のための処理要領図



第2図 ビニールストロー封入側面図



第3図 ドライアイスを用いる冷凍器略図



第4図 冷凍速度(ボルゲ原法)

同時にセミナンB液も冷却する。冷却2時間後セミナンA液(虫体浸漬)にB液を4mlづつ5回に分けて10分間隔で注加混入し、セミナンA液とセミナンB液の平衡希釈を行なう(この操作は4°Cの恒温室で行なう)。平衡希釈後は再び4°C下に15時間静置冷却する。虫体の運動能力は全くなく、仮死状態となるが、15°Cに移すと活発な運動を行ない、全虫体の約90%が生存している。冷却後はプラスチック製ストロー(長さ150mm. 直径5mm. 下端綿栓パラフィン封)へ本液を1mlづつ(虫体約50隻)を静かに注射器で注入し、パラフィンで封ずる。この温度が下るに従って容積が大きくなり、ス

第 13 表 超低温に対する虫体の抵抗 (-79°C)

例	虫体区分	所 要 日 数										
		7	14	21	28	35	42	49	56	63	70	120
1	成虫	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B
	幼虫	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B
2	成虫	+/B	+/B	+/B		+/B		+/B	+/B		+/B	
	幼虫	+/B	+/B	+/B		+/B		+/B	+/B		+/B	
3	成虫		+/B		+/B	+/B				+/B	+/B	+/B
	幼虫		+/B		+/B	+/B				+/B	+/B	+/B
4	成虫	+/B		+/B		+/B		+/B		+/B	+/B	
	幼虫	+/B		+/B		+/B		+/B		+/B	+/B	
5	成虫	+/C		+/C		+/C		+/C		+/C	+/C	+/C
	幼虫	+/C		+/C		+/C		+/C		+/C	+/C	+/C

B = 虫体緩慢な全身運動を行なう

C = 頭部尾部のみを動かす虫体の活力

+/B = 全虫体中約 60% 以上が生存している

+/C = " 約 30% 以下の生存を示す

- = 虫体の死滅

トローの破裂又は抜栓がしばしば生ずるので上端 20~30 mm の空間を設ける。封入後は再び 4°C に 2 時間静置し、ドライアイスとアルコールを使用し凍結に入る。50 cm 立方の恒温槽の中にメチルアルコールを入れ、これに少量のドライアイスを入れて 4°C に調整し、虫体封入ストローを漬ける。ついでドライアイス徐徐に加えて -79°C まで下げる。この下降の速度は、0°C までは毎分 0.5°C ずつ、約 8 分間要し、0°C から -10°C までは毎分 1°C ずつ、-10°C から -15°C の間は毎分 2°C ずつ、-15°C から -30°C までは出来るだけ速かに下げ、-30°C から -79°C は毎分 5°C ずつ下げる。一般に細胞学上温度は -65°C から -250°C の間を超低温と称し、原形質の硝子化をなし、生存上に安全温度とされており、0°C から -64°C の間は低温と称し氷晶成長し臨界温度域とされている。精液保存の場合は、0°C から -60°C を有害温度とみなされており、この区間は出来るだけ速く過るよう取扱われている。-79°C まで下げた虫体は、これを電気超低温保存器(常時 -79°C 恒温)で保管する。凍結保存した虫体の融解は一挙に -79°C から 15°C にひきあげる。この方法に基づいて行った例は 5 例で、1 例には 20 アンプルを組として凍結し、7 日毎に 1 アンプルを融解し虫体の生存

第 14 表 浸漬液別の虫体超低温抵抗比較

浸 漬 液	所 要 日 数						
	1	2	3	4	5	6	7
セ ミ ナン 液	-	-	-	-	-	-	-
セ ミ ナン A + B 液	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B	+/B
グ リ セ リン 7 % 液	-	-	-	-	-	-	-
卵 黄 20 % 液	-	-	-	-	-	-	-
蒸 溜 水	-	-	-	-	-	-	-

及び運動能力について観察を行なった。

この結果第 13 表に示すように、5 例全例成虫及び幼虫が長期間に亘って生存していることが認められ、凍結第 1 日と 120 日経た検体と比較すると虫体の生存率は殆んど変りなく全虫体の 60% が生存し、運動能力は稍緩慢な全身運動を行なっている。アンプルを融解し、15°C 下に放置すると虫体は 72 時間で死滅する。融解時虫体を純水で洗滌すると 10 分以内に死滅した。K 20 培地で培養を試みたが増殖能が認められなかつた。

第 14 表に示す如く保存液を換えて、純水浮游、グリセリン 7% 溶液浸漬、セミナン A 液浸漬等を用いて凍結を試みたが何れも 24 時間内に死滅した。セミナン A. B

の平衡希釈を行つて毎分1°C ずつ-79°C まで下げた実験でも24時間以内に虫体は死滅した。さらに基準に従つて-79°C に凍結した虫体を毎分1°C ずつ徐々に加温、融解し観察を行つたが融解死滅していた。

以上から本虫は超低温(-79°C)中に於いて仮死状態で長期間生存していることが認められたが、このものには増殖能が認められず1代限りであつた。

### 結 語

1) *R. elongata* (南株) は減圧下においても120分生存し、窒素ガス中では成虫は12時間、幼虫は24時間、卵殻内幼虫は42時間生存しているものが認められ、120時間窒素ガス中に静置した雌成虫を空気にさらすと、48時間後には幼虫の出現を見るに至つた。未成熟卵は無酸素に近い条件下においても強い抵抗性を有していることが認められた。炭酸ガスは窒素ガスに比して有毒性が高かつた。

2) 本虫は何れの温度下で培養した虫体も46°C に加温すると瞬時に近く死滅した。46°C が本虫の生存上限温度でないかと推察した。

3) 本虫を徐々に加温すると38°C に於いても長期日生存し継代培養も可能であつたが、30°C 以上は急激に加温すると温度衝撃を受けて死滅し、継代培養が出来ない。

夏期に罹患例が多く、冬期に少ないのは、*Rhabditis* 属線虫の生息環境温度と人体温度の影響によるものと考えられた。

4) 本虫は室温8°C 以下になると次第に運動能力が低下し、4°C に至ると運動を休止して仮死状態となり長期日この状態で生存するが10°C 以上に加温すると再び活発な運動を行う。

5) 本虫は温度によつて発育度が著しく異つている。5°C 以下では仮死状態で殆んど発育をしない。温度の高い程発育度が高い。

6) 低温に対しては抵抗性が強く、凍結しても相当長時間にわたつて生存している。グリセリンを添加するとさらに生存時間が延長される。

7) 超低温(-79°C)に対する抵抗は卵黄緩衝液を用いると、120日に亘つても生存している虫体が認められ、生存率及び運動能力は凍結第1日と120日経るものと比較して全く差はなく、さらに長期間に亘つて生存するものと推察された。超低温保存の虫体は増殖能が認められず1代限りであつた。

### 文 献

- 1) 岩田節夫(1957): *Rhabditia* 属線虫に関する生物学的研究. 岐阜医大紀要, 7(2), 638-656.
- 2) 葛西米市(1958): 土壤線虫に関する研究. 岐阜医大紀要, 6(3), 451-641.
- 3) 小島輝三(1959): *Rhabditis* 属線虫に関する生物学的研究. 岐阜医大紀要, 7(3), 159-165.
- 4) 国井洋一(1959): 糞線虫に関する研究, 岐阜医大紀要, 7(1), 141-158.
- 5) 西川義正(1956): 家畜人工授精法. 養賢堂, 東京 509-559.
- 6) 野々田照一(1958): 糞杆虫に関する研究. 岐阜医大紀要, 6(4), 589-595.
- 7) 大橋政彦(1957): *Rhabditis hominis* に関する研究. 岐阜医大紀要, 5(4), 403-419.
- 8) 関谷竜吉(1964): *Rhabditis elongata* に関する研究(1). 寄生虫学雑誌, 14(1), 83-90.
- 9) 関谷竜吉(1966): *Rhabditis elongata* に関する研究(2). 寄生虫学雑誌, 15(1), 30-43.
- 10) 横尾多美男(1959): 土壤線虫生態と防除. 明文堂東京, 77-88.



**Abstract**STUDIES ON *RHABDITIS ELONGATA* III.

RYUKICHI SEKIYA

*(Department of Parasitology, School of Medicine, Gifu University, Gifu)*

The present paper, the third in the series of *Rhabditis* study, deals with effects of environmental factors such as atmospheric pressure, gases (nitrogen and carbon dioxide), and temperatures upon the viability of *R. elongata*. Results obtained were summarized as follows:

1) All stages of the parasite (adults, free larvae & larvae in eggshell) were found alive after 2-hour exposure to an air pressure as low as 10–15 mmHg at 26°C.

2) When maintained in nitrogen gas (99.70 in purity) at 26°C adults could survive for 12 hours, free larvae for 24 hours, and those in eggshell for 42 hours. When adult females previously kept in nitrogen gas for 120 hours were exposed to air, the 1st-stage larvae emerged 48 hours after exposure. The survival period of the parasite in carbon dioxide at 26°C was considerably short as compared with that in nitrogen gas at the same temperature.

3) Exposure to 46°C resulted in rapid death of the parasite. The movement of adult worms became inactive at 8°C or lower temperatures. All stages tested were, in general, resistant to lower temperatures. When the medium containing the worms was frozen for 2 hours at -4°C and then slowly warmed up to 13°C, 90% of the treated worms were found alive. Addition of glycerin to the medium to give a final concentration of 7.0%, resulted in longer survival period at -4°C. The adult worms were found alive even after 120-day exposure to a super-low temperature of -79°C when maintained in yolk-buffered solution commonly used for sperm storage.