

## アガロースゲルを用いたミクロフィラリア の分離集虫法

野上 貞雄\* 田中 寛\* 富里 政秀†

(昭和56年12月21日 受領)

**Key words:** isolation of microfilariae, *Litomosoides carinii*, *Dirofilaria immitis*,  
*Dipetalonema viteae*, *Brugia pahangi*

### 緒言

ミクロフィラリア (以下 mf) を血球などの宿主細胞から分離する試みは、古くから行なわれてきた (Franks and Stoll, 1945; Sawyer and Weinstein, 1963). しかし組織片から遊出した *Onchocerca volvulus* の mf を回収して、宿主細胞の混入のない抗原として用いた報告 (Hashiguchi *et al.*, 1979) など一部の特別な例を除き、mf の完全な分離法として精度が高く実用的なものは少ない。

一方ゲル内に雑物と寄生虫を封じ込め、寄生虫の運動性を利用して遊出分離するゲル内封入法は、古くは糞線虫幼虫の糞便からの分離に用いられた事がある。近年では、Jorgensen (1975) が牛肺虫幼虫を寒天を用いて糞便から分離し、Greene and Schiller (1979) は、アガロースゲルを用いて *O. volvulus* の mf を組織破片から分離することに成功した。

本研究では、特に困難であるとされている血液材料から mf を分離する目的で、初めてゲル内封入法を検討し、改良を加え、各種の mf に応用できる実用的で精度の高い方法を完成させた。

### 材料および方法

本研究では、mf のいる血液材料を、溶血や濾過などの前処理を行なった後にゲル内に封入し、そこから遊出してくる mf を回収した。

#### 1. Mf の種類

用いた mf は、*Dirofilaria immitis* (犬: 血液),

*Litomosoides carinii* (コットンラット: 血液), *Dipetalonema viteae* (スナネズミ: 血液) および *Brugia pahangi* (スナネズミ: 腹腔滲出液) の4種類である。血液材料は、ヘパリンによる凝固防止処理を行なった。

#### 2. 前処理法

前処理法としては、mf の種と目的に応じて下記の4種類を用いた。

A. 溶血法: リン酸緩衝液に0.83%の割合で溶解させた  $\text{NH}_4\text{Cl}$  液を、血液沈渣に1対4の割合で混じり、室温下で溶血させた。この方法は各種の血液材料に利用できた。

B. 濾過膜法: Nucleopore 濾過膜 (孔径  $3 \mu\text{m}$ ) を用いて血液の濾過を行なった。濾過膜からの mf の分離には、逆濾過と機械的振動を用いた (Zielke, 1980)。この方法は濾過膜の孔を通り抜けない大きさの mf に有効で、最も簡便であった。

C. 比重分離法: 比重分離液として Ficoll 混合液 (Lymphoprep) を用い、400g で30分間、遠心を行なった (Kimming and Braun, 1980)。この方法は、mf と宿主細胞との比重の差が大きい時に有効であり、最適な比重を mf と宿主の種に応じて検討する必要があった。

D. 付着細胞除去法: 腹腔内の *B. pahangi* など体腔から mf を回収する時に用い、滲出細胞のうち粘着性を有する細胞を、37C、30分間の保温によってシャーレ底面に付着させて除去した (Ah *et al.*, 1974)。

前処理後は、1,500回転10分間の冷却遠心による洗滌を繰り返し、Hanks 塩類緩衝液 (ペニシリン100U/ml, ストレプトマイシン100 $\mu\text{g}$ /ml 含有, 以下 HBSS と略) に浮遊させた。

#### 3. ゲル内封入法

\* 東京大学医科学研究所寄生虫研究部

† 東京医科歯科大学医学部医動物学教室

A. ゲル：ゲルは、アガロース（ヘキストアガロース, Behring Institut）と寒天（Bacto agar, DIFCO）を検討した。各ゲルの1%液を0.9%食塩水を用いて湯煎により作製した。

B. 封入方法：封入方法は、次の3種類（Fig. 1）を検討した。

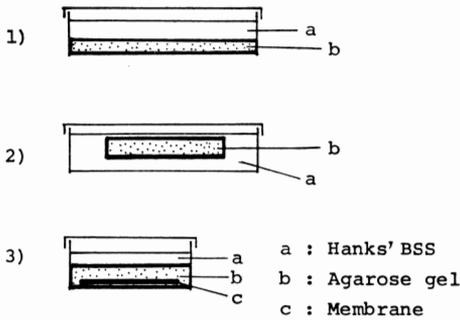


Fig. 1 Three methods of placing agarose gel for isolation of microfilaria.

1) Gel plate method, 2) Floating gel method, 3) Gel plate enclosing Nuclepore membrane.

i) ゲル平板法：30Cの恒温水槽内に保温しているmf浮遊液に、50Cの1%ゲル液をすばやく混じ、シャーレ全面に広げて凝固させた。

ii) 浮遊ゲル板法：アガロースゲル板をHBSS中に浮遊させる方法で、シャーレ（径55mm）の中の輪型（径35mm）の中でゲルを凝固させ、後に輪型を取り除いた。

iii) ゲル重層法：シャーレの中でNuclepore濾過膜

を封入する時に用い、濾過膜の上に0.4%ゲルを直接重層して凝固させた。

C. Mf 遊出方法：室温で15分間放置してゲルが凝固した後に、適当量のHBSSをシャーレに注ぎ、炭酸ガス培養器を用いて、37C、5%CO<sub>2</sub>気相下で保温した。

#### 4. 観察方法

A. 宿主細胞の混入：宿主細胞の混入は、遠心後あるいは濾過膜（孔径0.4 $\mu$ m）上の試料を、Azur II染色あるいはエリスロシン染色を行ない観察した。

B. Mf 数：Mf 数の算定には、メランジュールで定量的にとつたmf浮遊液を、湿らせた濾過膜（孔径0.4 $\mu$ m）の上において水分をしみこませ、0.1% Azur II染色液を滴下し染色して鏡検した。この方法では、mfの損失はほとんどなかった。

#### 成績

##### 1. ゲルの種類と濃度

最適なゲルとその濃度を検討するために、*D. immitis*と*L. carinii*のmfを用い、前処理には溶血法を用いてゲル平板法と比較した。ゲル内封入は、mf浮遊液1mlに、総量が2mlで最終ゲル濃度が0.3, 0.4, 0.5%になるように1%ゲル液と加温HBSSをすばやく混じ、2ml全量をプラスチックシャーレ（径55mm）に流し込み凝固させた。観察は保温2時間後に行ない、その成績はTable 1に示した。

ゲルの種類は、寒天では各濃度において若干ではあるが血球の混入が認められるため、アガロースが適当であった。アガロースの濃度は、低濃度ほど良いmf回収成

Table 1 Recovery of microfilariae from heparinized blood in different gel plates at various concentrations following 2-hour incubation

Kind of gel	Concentration of gel (%)	<i>Dirofilaria immitis</i>			<i>Litomosoides carinii</i>		
		Recovery of mf (%)	No. of mf recovered	No. of host cells contaminated per 1 ml of blood	Recovery of mf (%)	No. of mf recovered	No. of host cells contaminated per 1 ml of blood
Agarose	0.3*	93.4	22,600	<20	95.7	432,000	<20
	0.4	55.3	13,000	<20	69.6	252,000	<20
	0.5	47.2	11,500	<20	20.6	48,000	<20
Agar	0.3*	96.7	23,400	210	83.4	(161,000)†	NE
	0.4	57.5	13,900	150	42.3	(84,600)†	NE
	0.5	28.2	6,800	80	11.1	(52,800)†	80

\*: gel fragile. NE: not examined. Incubation at 37 C with 5% CO<sub>2</sub>.

No. of host cells were observed in 1/50 of the total material.

Results are arithmetic means of triple examinations except the mark †, where only duplicate examinations were made.

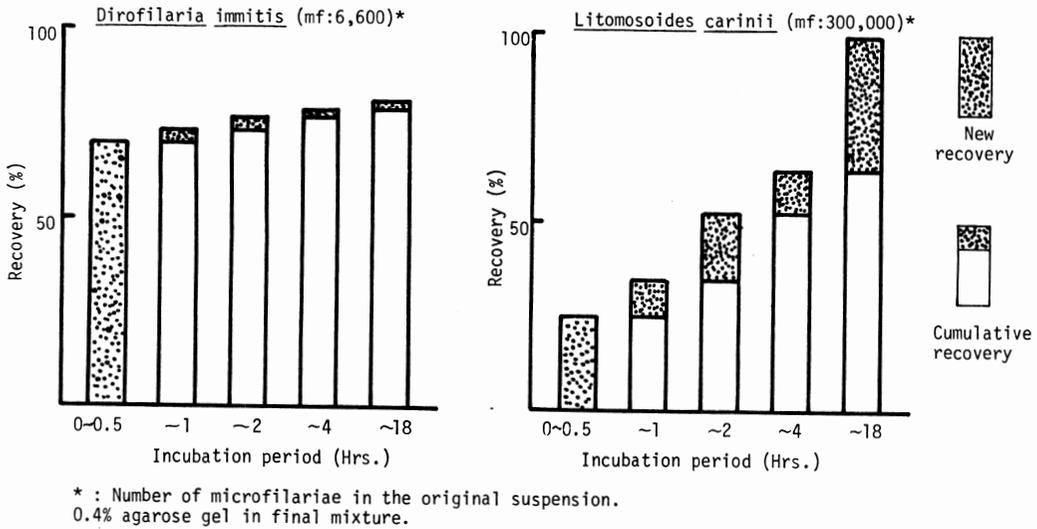


Fig. 2 Recovery of microfilariae from gel plate at various incubation periods.

績が示されたが、0.3%ではゲルが崩れやすく、0.4%が最適であった。また濃度の比較では、*L. carinii* の場合に0.4%と0.5%の間で回収率の大きな差がみられた。

以下の各実験では、ゲルはアガロースを終濃度0.4%として用いた。

## 2. Mf の遊出時間

*D. immitis* と *L. carinii* について、mf の遊出時間経過を観察した。溶血処理後の mf 浮遊液1.2mlに、1%アガロースの0.8mlを加えたゲル平板法で実験した。保温した状態で0.5、1、2、4および18時間後に遊出した mf の回収成績を Fig. 2 に示した。

経時的な観察の結果、*D. immitis* では比較的短時間で mf がゲルから遊出し、0.5時間後ですでに供試 mf 数の約70%、総回収数に対しては90%近くが回収された。それに対して *L. carinii* の遊出は比較的緩慢で、種によつて遊出速度の差が認められた。18時間後に倒立顕微鏡を用いてゲル内の mf の残留を観察した結果、残留した mf はほとんどなく、ゲルの底部側に遊出した mf がシャーレとの間に多数観察され、これが見かけ上の未回収数となっていた。

## 3. Mf 種類別の分離法と回収成績

以下に mf の種類別に分離を試み、その回収成績を Table 2 に総括した。

A. *L. carinii* : Mf に対する溶血操作の影響を考慮し、また濾過膜法を用いるには mf が小型すぎるので、前処理に比重分離法を用いた。前処理後の試料は二分し

てゲル平板法と浮遊ゲル板法に供し、遊出回収率の比較をした。Mf の回収は、保温4時間と16時間後に行なつた。

比重分離法では mf の回収率は98.1%であり、赤血球層への mf の混入は認められなかつた。血中の mf 数に対する浮遊ゲル板法とゲル平板法の最終的な回収率は各々93.4%、58.9%であり、浮遊ゲル板法が著しく優れていた。

分離前後の状況を Photos. 1, 2 に示した。

B. *D. immitis* : 前処理法として濾過膜法を行ない、濾過膜から逆濾過と機械的振動による洗滌で得られた mf は、浮遊ゲル板法に供した。また洗滌後の濾過膜はゲル重層法による検討を行なつた。

まず濾過膜の洗滌によつて回収された mf は、処理前血中総 mf 数の90.5%であつた。その mf を用いて浮遊ゲル板法を行なつた結果、供試 mf 数の93.7%が回収された。一方 mf を捕捉している濾過膜からの回収率は、推定残存 mf 数の24.8%であり、遊出速度も緩慢であつた。

この時の倒立顕微鏡による観察では、残存 mf はゲル内には認められず、濾過膜面と濾過膜とシャーレの間に認められた。濾過膜法を前処理とし浮遊ゲル板法とゲル重層法を併用した総回収率は、血中 mf 数の85.8%であつた。

前処理後と分離後の状況を Photos. 3, 4 に示した。

C. *D. viteac* : スナネズミ血中の *D. viteac* の mf

Table 2 Recovery of microfilariae following selected isolation methods

Filaria spp. examined [Mf count in original material]	Isolation procedure	No. recovered (%)			Final recovery (%)	
		~4 hours	~16 hours	Total		
<i>L. carinii</i> [2,438,000]	Centrifugal flotation on Lymphoprep 2,391,000 (98.1%)	Floating gel (1,104,000)* 100%	818,000 (74.1%)	233,000 (21.1%)	1,051,000 (95.2%)	93.4
		Gel plate (1,104,000)* 100%	499,000 (45.2%)	164,000 (14.9%)	663,000 (60.1%)	
<i>D. immitis</i> [727,000]	Filtration	Suspension.....Floating gel (527,000)* 658,000[90.5%] 100%	488,000 (92.6%)	6,000 (1.1%)	494,000 (93.7%)	85.8
		Membrane.....Gel plate	4,500	12,600	17,100	
<i>D. viteae</i> [79,200]	Hemolysing 78,600[99.2%]	Floating gel (78,600)* 100%	78,000 (99.2%)	400 (0.5%)	78,400 (99.7%)	99.0
		Filtration	Suspension.....Floating gel (72,000)* 72,000[90.9%] 100%	71,000 (98.6%)	700 (1.0%)	
		Membrane.....Gel plate	1,900	1,700	3,600	
<i>B. pahangi</i> [885,000]	Pre-incubation	Floating gel (885,000)* 100%	696,000 (78.6%)	136,000 (15.4%)	832,000 (94.0%)	94.0

\*: Number of mf used for the gel method.

に対する前処理法の子備実験で、比重分離法は不適であったので、溶血法と濾過膜法の比較を行なった。

前処理として溶血法を用いた後の回収率は、供試血中 mf 数の99.2%であり、溶血操作中の損失はほとんど認められなかった。本法による最終回収率は、供試 mf 数の99.7%であり、そのほとんど全てが保温4時間後に回収された。前処理として濾過膜法を用いた場合の全過程における総合回収率は、95.1%であった。*D. viteae* の mf では濾過時に若干の通り抜けが認められるが、濾過膜法は前処理としてかなり有効であった。

*D. B. pahangi*: スナネズミの腹腔から得られた mf 浮遊液は、滲出細胞を多量に含むので、前処理として付着細胞除去法を行なった。前処理後の mf 浮遊液は虫卵や宿主細胞を含んでおり、浮遊ゲル板法によつて分離を行なった。

浮遊ゲル板法の結果、mf だけを分離でき、その回収率は94.0%であった。遊出速度の観察では、やや緩慢な傾向にあり、*L. carinii* のそれに近かった。回収された mf をエリスロシン染色で観察した結果、ほとんどが有鞘であった。

前処理後と分離後の状況を Photos. 5, 6 に示した。

### 考 察

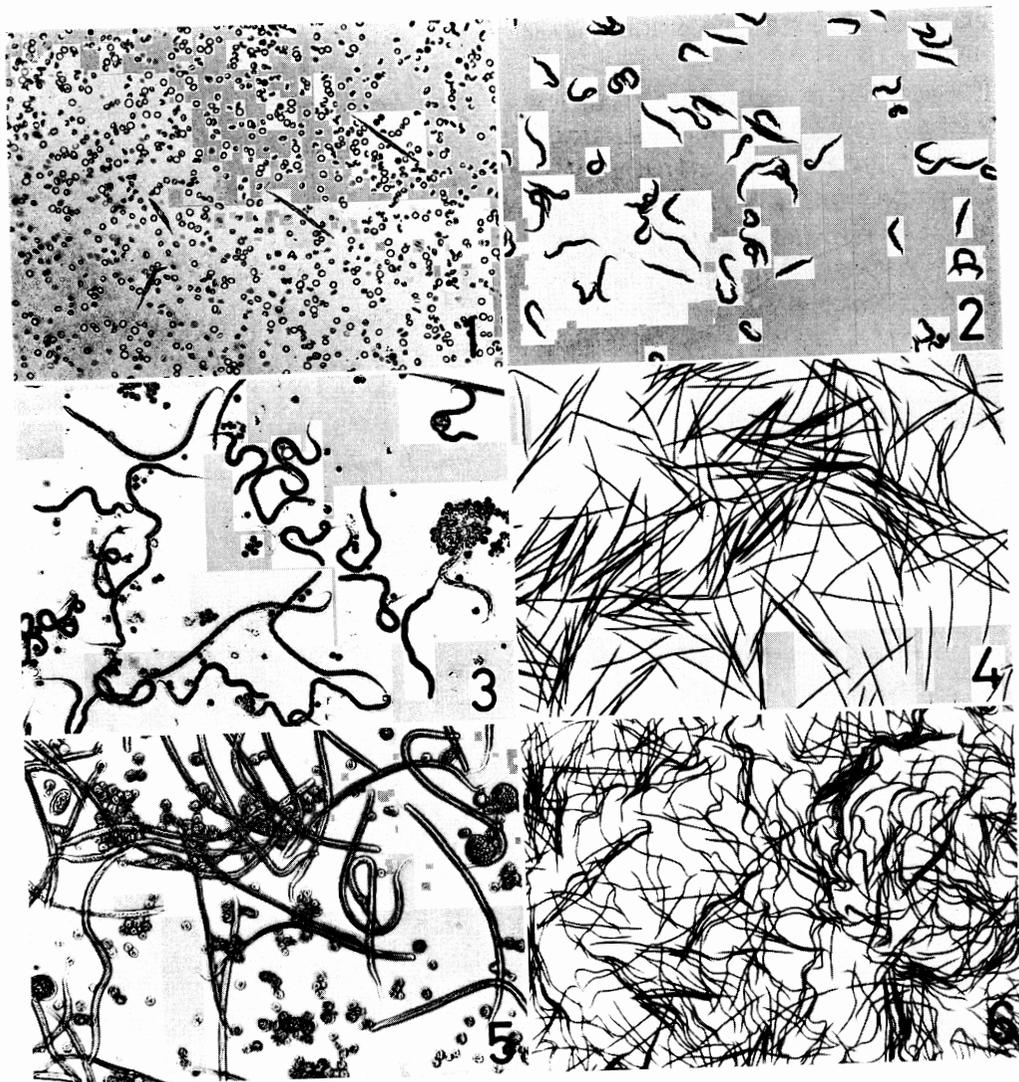
フィラリア症の研究において、mf は免疫学あるいは

生化学の材料として重要であるが、宿主細胞との分離が困難なために十分に活用されていない。本研究では、現在までに発表された分離集虫法を前処理法として利用し、新たに浮遊アガロース板法や重層法を併用し、簡単な分離法を完成させた。

Mf の分離に溶血法は最も古くから利用されており、saponin (Franks and Stoll, 1945)、酵素 (Sawyer and Weinstein, 1963)、凍結融解 (若杉, 1957; Mantovani and Sulzer, 1967) などが用いられている。本研究では0.83% NH<sub>4</sub>Cl 液の溶血で mf の活動性の低下はみられなかった。凍結融解法では、mf の運動性が著しく低下し、ゲルによる分離の前処理としては利用できなかった。

一方血球を凝集沈澱して上清中の原虫を分離する Yaeger (1960) の方法を応用して phytohemagglutinin (Wong, 1964; Wegerhof and Wenk, 1979) や dextran (Subrahmanyam *et al.*, 1976) を利用したり、より簡便法として Obeck (1973) の報告もあるが、回収の効率が低いという批判もある (Ponnudurai *et al.*, 1975)。

Nuclepore 濾過膜法 (Dennis and Kean, 1971) は、開発以来血中 mf の分離に広く用いられており、また濾過膜からの効果的な mf の分離も報告されている (Zielke, 1980)。しかし広く用いられている孔径 5 μm



### Explanation of Photographs

- Photo. 1 Microfilariae of *Litomosoides carinii* in the blood from the cotton rat.  
 Photo. 2 Microfilariae of *L. carinii* after isolation by floating gel method. Microfilariae are active, all having sheath.  
 Photo. 3 Microfilariae of *Dirofilaria immitis* from the dog after pre-treatment of blood by Nucleopore membrane filtration. Leucocytes and ghost cells are still remaining.  
 Photo. 4 Microfilariae of *D. immitis* after isolation by floating gel method.  
 Photo. 5 Microfilariae of *Brugia pahangi* from the peritoneal cavity of the jird after removing exudate cells by adhesion. Eggs of *B. pahangi* and non-adherent exudate cells are still remaining.  
 Photo. 6 Microfilariae of *B. pahangi* after isolation by floating gel method.

の膜では、*D. immitis* の mf の多数が通過するので、孔径  $3\mu\text{m}$  が最適であった (野上ら, 1979)。また *L. carinii* のように小型の mf には応用できなかった。

Mf の比重分離法として、Ficoll あるいはその混合液を用いて良い成績が報告されているが (Subrahmanyam *et al.*, 1978 ; Piessens *et al.*, 1980), mf の種類ごと

に最適な比重を求めることが必要である (Kimming and Braun, 1980).

腹腔中の mf の分離には、滲出細胞をガラス面に付着させて除去する方法などもあるが (Ah *et al.*, 1974), 単独に用いただけでは満足する結果は得られなかった。

本研究では、これらの報告にある分離法を前処理として用い、さらにゲル内封入法を用いて mf の分離を行った。このゲル内封入法について、Jorgensen (1975) は、ゲルの濃度は遊出に影響なく、保温温度が重要であるとしているが、*L. carinii* ではゲルの濃度が回収率に大きな影響を与えていた。

また本研究で、遊出速度は有鞘の mf が緩慢な傾向にあった。Mf の鞘は mf の抗原性の性状を規定する上で重要と思われるが、回収された *B. pahangi* と *L. carinii* の mf のほとんどが鞘を有していた。

Mf の単離には成虫の培養により産出させる方法もある (Neilson, 1978)。しかしこの方法では種類によつては成虫の入手が困難であること、また流血中と培養により産出された mf の抗原性の差違の可能性を考慮すると (Wegerhof and Wenk, 1979)、流血中からの mf の分離は重要な意義をもつ。

本法はどの mf の分離にも応用できるが、良い回収率と宿主細胞の除去のためには、mf の種や目的に応じた前処理法の選択や、保温時間の調節が重要であろう。

## 要 約

血液材料などから mf を分離する方法としてゲル内封入法を検討し、無傷の活動的な mf を効率よく回収することができた。

分離法の基礎条件と 4 種類の mf の分離法は、以下の通りであった。

1. 前処理法として、赤血球除去には溶血法、濾過膜法および比重分離法が、腹腔滲出液中の細胞除去には付着細胞除去法が適し、mf の種類や目的に応じて方法を選択した。

2. ゲルはアガロースの終濃度 0.4% が最適であり、宿主細胞の混入がなく、高い回収率が得られた。

3. ゲル板から mf を効率よく遊出させる方法は、Hanks 塩類緩衝液中にゲル板を浮遊させる形状が良く、37C、5% CO<sub>2</sub> 気相下で 16 時間保温した際の mf の回収率は 90% 以上であった。

4. 最適な保温時間はフィラリアの種によつて若干異なり、用いた 4 種の中では有鞘の mf が緩慢な遊出傾向にあった。

5. *L. carinii* の場合、前処理は Ficoll 混合液による比重分離法を用い、浮遊ゲル板法で分離した結果、回収率は供試血中 mf 数の 93.4% であった。

6. *D. immitis* の場合、前処理は Nuclepore 濾過膜法を用い、その mf 浮遊液を浮遊ゲル板法に供した結果、回収率は 93.7% であった。また濾過膜から回収した mf を加えた血中 mf 数に対する総合回収率は 85.8% であった。

7. *D. viteae* の場合、前処理は溶血法を用い、浮遊ゲル板法で分離した結果、回収率は供試血中 mf 数の 99.0% であった。また前処理として濾過膜法を用いた場合の総合回収率は 95.1% であった。

8. *B. pahangi* の場合、腹腔滲出液中の mf に対する前処理は付着細胞除去法を用い、浮遊ゲル板法で分離した結果、回収率は供試 mf 数の 94.0% であり、宿主細胞だけでなく、*B. pahangi* の虫卵の除去もできた。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、貴重な実験犬の血液材料の提供を賜った、国立公衆衛生院寄生虫室長、荒木国興博士、日本獣医畜産大学第 1 外科学教室、多川政弘講師ならびに東大医科学研究所臓器移植生理学研究部、渡辺俊氏に厚く感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) Ah, H. -S., McCall, J. W. and Thompson, P. E. (1974): A simple method for isolation of *Brugia pahangi* and *Brugia malayi* microfilariae. Internat. J. Parasitol., 4, 677-679.
- 2) Dennis, D. T. and Kean, B. H. (1971): Isolation of microfilariae: Report of a new method. J. Parasitol., 57, 1146-1147.
- 3) Franks, M. B. and Stoll, N. R. (1945): The isolation of microfilariae from blood for use as antigen. J. Parasitol., 31, 158-162.
- 4) Greene, B. M. and Schiller, E. L. (1979): A technique for purification of microfilariae of *O. volvulus*. J. Parasitol., 65, 861.
- 5) Hashiguchi, Y., Kawabata, M., Zea F. G., Recinos C, M. M. and Flores C, O. (1979): The use of an *Onchocerca volvulus* microfilarial antigen skin test in an epidemiological survey of onchocerciasis in Guatemala. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 73, 543-548.
- 6) Jorgensen, R. J. (1975): *In vitro* migration of *Dictyocaulus viviparus* larvae: Mig-

- ration of the infective stage in agar gel. Internat. J. Parasitol., 5, 199-202.
- 7) Kimming, P. and Braun, U. (1980): Die Isolierung von Mikrofilarien von *Litomosoides carinii* im Ficoll-Dichtegradienten. Z. Parasitenkd., 63, 171-175.
  - 8) Mantovani, A. and Sulzer, A. J. (1967): Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis. Am. J. Vet. Res., 28, 351-354.
  - 9) Neilson, J. T. M. (1978): *Dipetalonema viteae*: Isoelectric focusing and immunochemical studies on somatic extracts of adults worms and microfilariae. Exp. Parasitol., 44, 225-232.
  - 10) 野上貞雄・渋谷敏朗・田中 寛 (1979): ミクロフィラリア検出のための濾過膜濃縮法の改良に関する研究. 寄生虫誌, 28, 125-132.
  - 11) Obeck, D. K. (1973): Blood microfilariae: New and existing techniques for isolation. J. Parasitol., 59, 220-222.
  - 12) Piessens, W. F., McGreevy, P. B., Ratiwayanto, S., McGreevy, M., Piessens, P. W., Koiman, I., Saroso, J. S. and Dennis, D. T. (1980): Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: Correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29, 563-570.
  - 13) Ponnudurai, T., Denham, D. A. and Rogers, R. (1975): Studies on *Brugia pahangi* 9. The longevity of microfilariae transfused from cat to cat. J. Helminthol., 49, 25-30.
  - 14) Sawyer, T. K. and Weinstein, P. P. (1963): Studies on the microfilariae of the dog heartworm *Dirofilaria immitis*: Separation of parasites from whole blood. J. Parasitol., 49, 39-45.
  - 15) Subrahmanyam, D., Rao, Y. V. B. G., Mehta, K. and Nelson, D. S. (1976): Serum-dependent adhesion and cytotoxicity of cells to *Litomosoides carinii* microfilariae. Nature, 260, 529-530.
  - 16) Subrahmanyam, D., Mehta, K., Nelson, D. S., Rao, Y. V. B. G. and Rao, C. K. (1978): Immune reactions in human filariasis. J. Clin. Microbiol., 228-232.
  - 17) 若杉幹太郎 (1957): ミクロフィラリアの集虫診断法の研究 (1) ミクロフィラリアの凍結集虫法について. 寄生虫誌, 6, 211-214.
  - 18) Wegerhof, P. H. and Wenk, P. (1979): Studies on acquired resistance of the cotton rat against microfilariae of *Litomosoides carinii*. Z. Parasitenkd., 60, 55-64.
  - 19) Wong, M. M. (1964): Studies on microfilaremia in dogs 11. Levels of microfilaremia in relation to immunologic responses of the host. Am. J. Trop. Med. Hyg., 13, 66-77.
  - 20) Yaeger, R. G. (1960): A method of isolating trypanosomes from blood. J. Parasitol., 46, 288.
  - 21) Zielke, E. (1980): On the longevity and behaviour of microfilariae of *Wuchereria bancrofti*, *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* transfused to laboratory rodents. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 74, 456-458.

**Abstract**

ISOLATION OF MICROFILARIAE USING AGAROSE GEL

SADAO NOGAMI, HIROSHI TANAKA

(Department of Parasitology, Institute of Medical Science, The  
University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108)

AND

MASAHIDE TOMISATO

(Department of Medical Zoology, Tokyo Medical and  
Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

The present paper deals with the gel-enclosing method for isolating various microfilariae (mf) from the blood and the exudate of the peritoneal cavity. The method enabled collection of intact and vivid mf effectively without contamination of host cells. In this method, mf suspension was mixed with agarose gel and the mf emerged were recovered. The procedures of method for isolation and the results of collection of four species of mf were as follows:

1. The microfilariae in the blood sample was processed by hemolysis, Nuclepore filtration or density gradient centrifugation for eliminating red blood cells. The peritoneal exudate was processed by the cell adhesion method in a Petri dish.

2. The mf suspension thus prepared and kept at 30 C was mixed with 1% agarose gel dissolved in saline solution kept at 50 C in a water bath. After solidification of the gel, mf moved out of the gel into Hanks' balanced salt solution (HBSS) placed on the gel. The final agarose concentration of 0.4 % was the optimum for effective recovery of mf without contamination of host cells.

3. In order to obtain much more mf in HBSS, the solidified gel disc was floated in HBSS. With this procedure, the mf recovery was raised more than 90% when incubated at 37 C in a 5% CO<sub>2</sub> gas phase for 16 hours.

4. Adequate periods of incubation varied much depending on the species of filariae. Sheathed mf tended to emerge comparatively slowly among four species of filariae examined.

5. *Litomosoides carinii*: After the pre-treatment with Ficoll gradient centrifugation which was suitable for *L. carinii* the yield of mf by the floating gel procedure was 93.4% from blood samples.

6. *Dirofilaria immitis*: After Nuclepore filtration of blood samples for pre-treatment, the recovery was 93.7% by the floating gel procedure. The total recovery was 85.8% since some mf remained on the membrane.

7. *Dipetalonema viteae*: After hemolysis, the floating gel procedure resulted in 99.0% mf recovery from blood samples. After Nuclepore filtration instead of hemolysis, the floating gel procedure resulted in 95.1% recovery.

8. *Brugia pahangi*: For pre-treatment, the mf suspension obtained from the peritoneal cavity of the jird was poured into a Petri dish, a large number of macrophages adhered to the bottom of the dish, and the supernatant containing mf was transferred. By the floating gel procedure, the recovery ratio was 94.0%. Embryonated eggs of *B. pahangi* could also be eliminated together with host cells by this method.