



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	蛔虫卵の耐寒性に関する実験的研究：特に凍結による影響について
Author(s)	飛澤, 實; TOBISAWA, Minoru
Citation	低温科学. 生物篇, 11, 101-121
Issue Date	1954-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17566
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_p101-121.pdf



Minoru TOBISAWA 1954 Experimental Studies on the Resistance of Ascaris Eggs to Low Temperatures, with Special Reference to the Effect of Freezing on the Eggs. *Low Temperature Science, Ser. B, II.*
(With English résumé p. 121)

蛔虫卵の耐寒性に關する實驗的研究

特に凍結による影響に就て*

飛 澤 實

(低溫科學研究所 醫學部門)

(昭和 28 年 2 月 受理)

I. 緒 言

体外に排出された寄生虫卵が、自然の環境にあつては外界の條件によつて種々の影響を受けることは當然であるが、特に北海道のような寒冷地に於て冬期間の低い氣温が虫卵の發育過程に對してどのように影響するかということについて未だ充分の検討が下されていない¹⁾。

更に自然環境ばかりでなく、最近利用度の増してきた各種冷凍食品、例えば肉、魚、野菜、果實等に、もし虫卵が附着している場合、通常用いられる冷凍温度範囲で、果して虫卵が死滅するものであるか否かが問題になつている。

これらの意味からも、虫卵の耐寒性の有無或いは程度を究明することは、寄生虫の感染豫防上重要なことがらであると考えられる。

従來蛔虫卵の種々の温度に對する抵抗性のうち、高温に對する耐熱性についての實驗は多數みられるが^{2), 3)}、低温に對する抵抗性に關しては報告が比較的少ない^{4)~10)}。しかもその報告はいずれも冬期間の自然氣温や或いは氷室内に相當期間放置した場合の虫卵生死の成績をあげているにすぎず、被験材料自身の温度の變化、凍結の有無を明らかにしたものがないのは勿論、低温によつて虫卵が障害をうけることの機序については全然究明されていないので、著者は、各種人体寄生虫卵のうち、吾國に於て最も淫浸度の高い蛔虫卵を研究の對象にとりあげ、實驗的に上記の諸點を検討したいと考えて本實驗に着手した。

II. 實驗方法

1. 材 料 實驗材料としては豚の蛔虫卵を用いた。この豚の蛔虫卵を用いた理由は、その種々の性状が人の蛔虫卵とよく似ていて研究用として人の蛔虫卵と同一視してよく¹⁾、しかも

* 北海道大學低溫科學研究所業績 第 243 號

本論文の要旨は昭和 28 年 4 月、第 111 回低溫科學研究所談話會及び昭和 29 年 1 月第 2 回北海道寄生虫、衛生動物集談會に於て發表した。

なお、本研究の費用の一部は文部省科學研究助成金の補助によつた。

入手が容易だからである。即ち屠場に於て屠殺した豚の腸内容から蛔虫の雌成虫を得、腹部を切開して子宮を剔出し、排卵管側から約1 cmの所を切斷して虫卵をしぼりだす。この虫卵を集めて、水道水(本研究所ではポンプにて揚水している地下水である)1 ccに1/2白金耳ぐらいの割合に加えて浮游液とした。この際個体差を少なくするため、數匹の成虫から虫卵を集めまた卵塊を白金耳で軽く壓しつぶして、できるだけ平等な浮游液を作るようにした。

また成熟仔虫卵を得るためには、この未熟卵浮游液1 ccに水道水を9 ccの割合に加えて、有蓋シャーレに容れ、28°Cの孵卵器内におくと、未熟卵は發育して凡そ14日で殆んど仔虫卵となる。著者は特に培養40日前後の最も抵抗力の強いといわれる時期のもの¹⁾1白金耳に水道水を1 ccの割合に加えて浮游液とした。子宮からしぼりだした未熟卵1/2白金耳と、沈澱しても水分を含んでいる仔虫卵1白金耳とは略々同数である。

2. 凍結方法 前記の虫卵浮游液1 ccを内徑15 mmの試験管にいれ、種々の速度で冷却し、それぞれ所要の最終凍結温度まで到達させた。即ち冷却速度を大きくする時には、この試験管を直接液体空氣(凡そ-190°C)、ドライアイス・アルコール(凡そ-70°C)、又は鹽化カルシウムブライン(凡そ-40°C)中に浸し、冷却速度を小さくする場合は、この試験管を更に内徑30 mmの外套管にいれ2重にして、これらの寒劑中に浸した。別に低温室(約-35°C及び-20°C)或いは冬期間の外氣温に放置した場合もある。

試料自身の温度變化を測定するためには、試験管内の虫卵浮游液の中心部に銅コンスタンタンで作つた熱電對を挿入し、凍結過程を仔細に記録して冷却曲線を得た。

そして所定の温度或いは所定の時間に達したならば、寒劑または低温室等より+30°Cの温湯に移して融解した。

3. 成績の判定

1) 未熟卵

前記のような種々の條件で凍結融解させた後、虫卵液を徑4 cmの蓋附シャーレにいれ、水道水を9 cc加え、28°Cの孵卵器中で培養し、凡そ3日間の間隔で4週間に亘る期間鏡檢觀察し、その發育過程を詳細に記録した。發育の時期は一般に記載されているように單細胞期(I型)、2胞期(II型)、4胞期(III型)、多胞期(IV型)、桑實期(V型)、蝌蚪期(VI型)、仔虫期(VII型)の7期に分類した。鏡檢にあつては、數視野に亘り總數100個の虫卵を數えて、それらの發育時期を記載した。その實例をあげれば第1表の通りである。ここで破損卵というのは、卵殻が破損されて内容が逸脱しているものであるが、これは虫卵浮游液を作る時または檢鏡のため標本を作る時などに機械的に傷害されたと考えられるもので、凍結操作によつて生じた變化ではない。成績の項で記載したすべての表中の生殘率として表示した數値は、破損卵を除いた對照卵數に對するII期以後まで分割發育した虫卵數の百分率を示し、括弧内にあげた數値はその中の仔虫卵にまで達したものの百分率を示す。なお成績は最終檢査日即ち28日目のそれを探つた。

第 1 表 未熟卵を培養した場合の各時期に於ける發育卵數

處置	培養日數	破損卵	發 育 段 階							生 殘 卵		仔 虫 卵		
			I	II	III	IV	V	VI	VII	數	率	數	率	
無處置 對 照	1	2	98											
	4	1	1	3	59	38								
	8	1					24	75						
	12	2						4	94					
	17	4						2	94					
	25	2						2	96	98	100%	96	100%	
-40°C (低溫室) 40分放置	1	1	99											
	4	3	80	15	2									
	8	4	66			10	20							
	12	3	63				2	19	8					
	17	1	64					22	13					
	25	1	66					14	19	33	33.6%	19	19.8%	

凍結融解卵には、培養後全く分割發育しないもの（即時死亡卵）と發育途上で死亡して成熟仔虫卵にまでならないもの（後發死亡卵，遲延死亡卵）とがあるが、遲延死亡卵の大部分も VI 型までは發育する。

2) 成熟仔虫卵

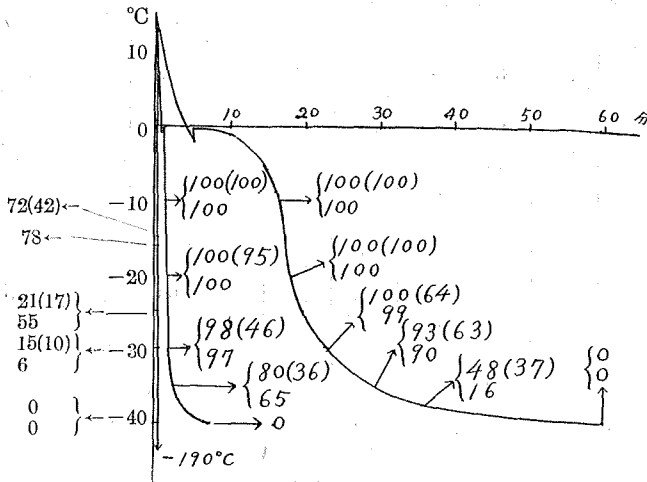
低溫處理後數時間 28°C の孵卵器中に放置してから檢鏡し、次のような基準で生死の判定を行つた。これは、處置直後に觀察すると仔虫の運動が不活潑であるから暫時放置して常態に復するのを待つためである。

(1) 形態的變化： 虫体内に明らかに空泡の認められたものは、これを死亡卵とみなした。

(2) 蠢動の有無： 仔虫の蠢動は確實に生存の證であるが、蠢動は少しく間歇的であり、殊に觀察時の溫度が適當でないとき蠢動しなくなるから、静止が必ずしも死の徴とは云えない。そこで生死の判定として、生存卵のすべてが必ず且つ一齊に蠢動するような方法が要求されるが、それには適當な溫度と熱刺激が必要である。著者は +35°C の恒溫箱中に顯微鏡を裝置し、この中で載物硝子上にとつた試料を觀察した。熱刺激としては、+15°C から急に +35°C の恒溫箱にいれたり、または 45~50°C の銅板上で約 30 秒熱するのである。しかしかかる高溫の熱刺激を與えても仔虫の活潑な運動は 2 分ぐらいでやみ、しかも數回繰返すともはや仔虫は死滅して全く動かなくなるから注意を要する。

また蠢動はみとめられないけれども空泡も明らかでない場合がある。かかる仔虫は -20°C 前後に長期間凍結保存した場合や屋外の自然氣溫に長期間放置した場合に多くみられるが、このような時には數日間 28°C の孵卵器に置いておくとき空泡が明らかに認められるようになる。故に處理後數時間と數日後の 2 回の檢査が必要である。

なお正常仔虫卵は +28°C に6ヶ月ぐらい保存した時に始めて數%に空泡を認めるにすぎないから、以上のような變化は明らかに低温處理によるものであることがわかる。



第1圖 蠶虫卵浮游液の冷却曲線及び各温度で融解した場合の虫卵の生残率 (内徑 15 mm の試験管, 浮游液量 1 cc) 数字の上段は未熟卵生残率, 下段は仔虫卵生残率, 括弧内数字は成熟仔虫卵率。

III. 實驗成績

1. 凍結融解の虫卵に及ぼす影響 (即時死)

冷却の方法をいろいろ變えることにより、試料を種々の冷却速度で凍結させ、所定の温度に達した時に融解して、その結果を前述したような基準によつて判定した。まず 1cc の試料を液体窒素中で直接冷却すると凡そ 45 秒

第2表 凍結融解した未熟卵の發育狀態

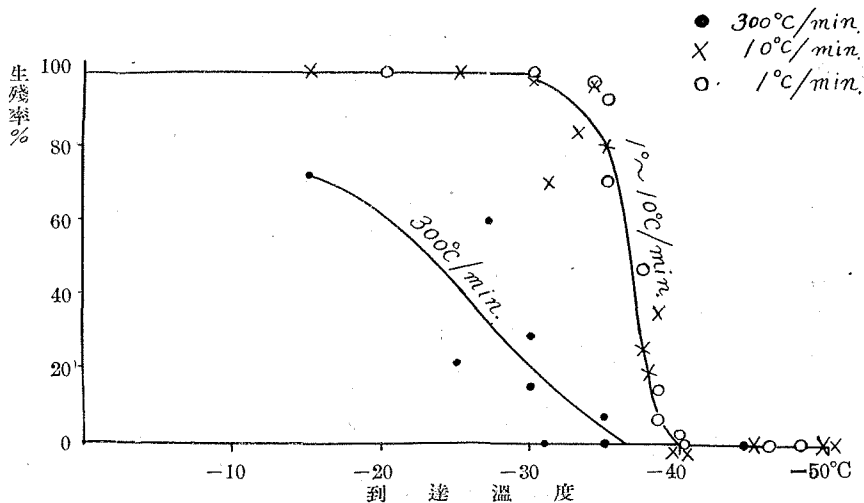
到達温度	日数	發育段階						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
對照	5	3	1	7	89			
	9					83	17	
	14							100
-6°C	5	3	1	5	91			
	9					75	25	
	14							100
-15°C	5	4	2	5	89			
	9	1			2	91	6	
	14						3	97
	18							100
-24°C	5	3	2	22	73			
	9	1			12	87		
	14	1				1	12	86
	18			1			11	88
-29°C	5	9	5	49	37			
	9	1	1	2	25	71		
	14	1		1	3	6	47	42
	18	2			1		36	61
-29°C	25	2			1		33	64

でほぼ -190°C に達するので、氷點から -50°C ぐらいまでの範圍での冷却速度はほぼ $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$ となる。一方最も冷却速度の小さな場合は -42°C のブライン中の2重管による凍結であつて、その冷却速度は凡そ $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ であつた。なお實驗方法の項で述べたように、この中間の冷却速度約 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ のものも多數試みた。このような條件で凍結させた場合の試料自身の冷却曲線を圖示すれば第1圖の通りである。

次に、種々の溫度で凍結融解した場合の未熟卵への影響を、まず冷却速度の遅い場合についてみるに第2表及び第3表に示すように、 -6°C (この溫度でも浮游液は凍結していることは確認した) ぐらいまでは殆んど影響がなく、融解後すべて正常卵と同様の發育を示す。 -15°C まで達したものは、發育の經過が一般にやや遅れる。 -24°C のものでは更に發育が遅延するが、しかしまだ死亡卵はみられない。 -30°C に達すると、死亡卵が少し現われ始め、それより溫度

第3表 未熟卵の凍結融解後の生殘率 (特に冷却速度の比較)

浮游液の到達溫度 ($^{\circ}\text{C}$)	到達時間			生殘率 %		
	非常に急激な凍結法	比較的緩徐な凍結法	緩徐な凍結法	非常に急激な凍結法	比較的緩徐な凍結法	緩徐な凍結法
-15.0		1'45"		72 (42)	100 (100)	
-25.0	} 20''~35''	2'	20'	21 (17)	100 (95)	100 (100)
-30.0		2'15"	22'30"	15 (10)	98 (46)	100 (64)
-32.0				0		
-35.0		2'50"	29'		80 (36)	93 (63)
-37.5		3'20"	35'30"		25 (14)	48 (37)
-38.5		4'	39'		0.5 (0.5)	6 (3)
-39.0			50'			1.5 (0.5)
-40.7		6'30"	60'		0	0



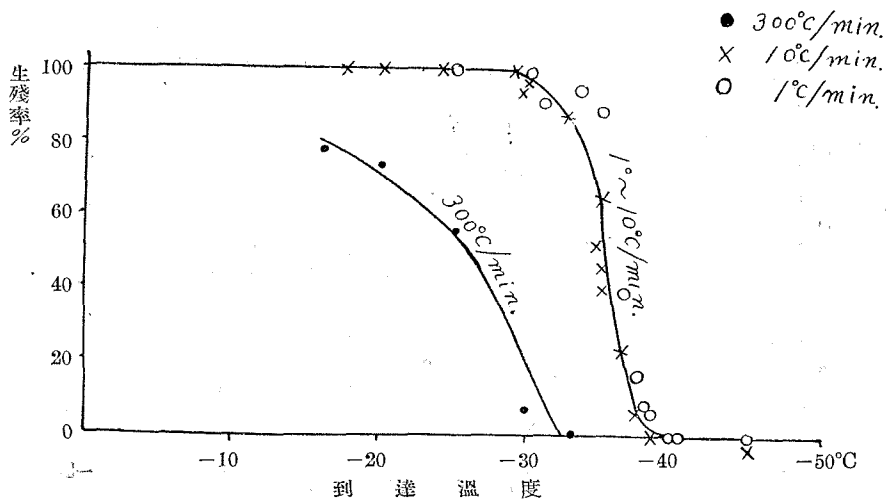
第2圖 未熟卵の凍結融解後の生殘率 (内徑 15 mm の試験管, 浮游液 1 cc)

の低下するに伴つて死亡率が増し、 -35°C では10%、 -37.5°C では約半数50%に達するようになる。そして -40°C では全卵が死亡して全然發育しなくなる。 -40°C より低温の場合は勿論すべて死亡することが確認された(第2圖)。

このような到達温度と凍結による障害との関係は、凍結条件特に冷却速度を變えることにより多少變つてくることが次に認められた。即ち前述のような冷却速度の遅い場合($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$)に比し、冷却速度の速い場合(約 $300^{\circ}\text{C}/\text{min}$)は、 -25°C で死亡率79%、 -32°C で100%となつており、高い温度で死亡卵が現われ、同一到達温度では、冷却速度の大きい方が死亡率が大きいというような結果になつた。

第4表 仔虫卵の凍結融解後の生残率(特に冷却速度の比較)

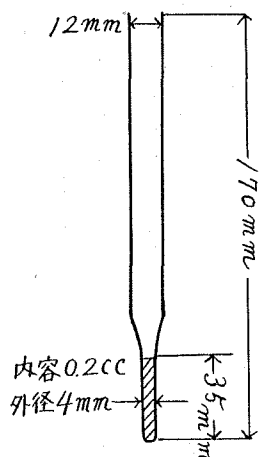
浮游液の到達温度($^{\circ}\text{C}$)	到達時間			生残率%		
	非常に急激な凍結法	比較的緩徐な凍結法	緩徐な凍結法	非常に急激な凍結法	比較的緩徐な凍結法	緩徐な凍結法
-2.0				94.0		
-16.0				78.0		
-20.0	} 20''~35''	2' 2''		73.0	100.0	
-25.0		2' 7''		55.0	100.0	100.0
-30.0		2' 25''	20'	6.0	97.0	99.0
-33.0		2' 55''	22'	0	70.0	
-35.0		3' 30''	27'		64.5	89.0
-36.5		5'	28' 30''		23.0	39.0
-37.5		6' 30''	31'		6.0	16.0
-38.5		8'	35'		2.0	6.0
-39.0		9' 30''			0	
-40.0			55'			



第3圖 仔虫卵の凍結融解後の生残率(内径15mmの試験管, 浮游液1cc)

次に仔虫卵について同様の實驗を行つてみると、未熟卵の場合とほぼ同様の成績が得られるが、(第4表、第3圖)、同一温度での死亡率はそれぞれ未熟卵よりもやや高いようである。

ただし、これらの低温處理を行う場合温度測定法が問題であつて、1ccのようなかなり大量の試料を冷却するのに、液体空氣中に直接挿入のような急激な温度降下を行つると、どうしても液の内層と外層の部分で温度勾配ができる。従つて、熱電對で測つている試料中心部の温度より、試験管壁に接する周辺部のほうが、實際には低温度に達しているものと考えてよいであろう。そこで測定上の誤差をできるだけ避けるために、第4圖のような毛細試験管に試料を0.2cc入れて、 -70°C のドライアイス・アルコールに直接浸した。凍結は約5秒ぐらゐではじまり、10秒以内で -40°C に達する。ただ、冷却速度が凡そ $500^{\circ}\text{C}/\text{min}$ というように非常に速いため、技術的に所定の温度でとめることは困難であるが、前記のような誤差は多少さけられる。



第4圖

第5表 急速凍結 ($500^{\circ}\text{C}/\text{min}$) で凍結融解した場合の生殘率

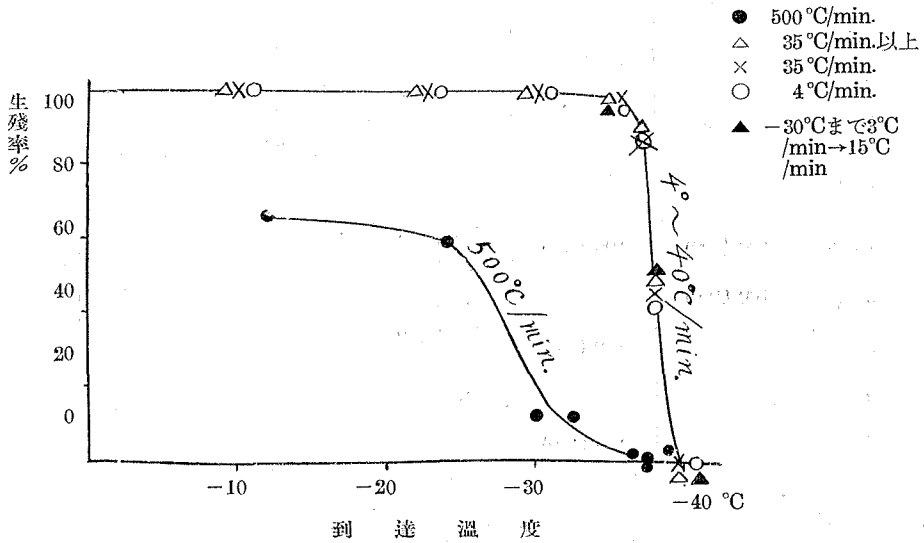
温度 ($^{\circ}\text{C}$)	未熟卵	仔虫卵
-7		95
-12	65 (19)	
-13		98
-20		60
-22		56
-24	44 (9)	
-30	12 (2)	
-32	10 (1)	
-33		7
-36	2 (1)	8
-37	1 (0.5)	
-39	3 (2); 0	
-40		2; 0
-44	0	

その成績は第5表に示すように、未熟卵でも仔虫卵でも、 -25°C 附近で死亡率が約50%、 -30°C 附近で死亡率が約90%で、試料1ccの場合と同様に冷却速度の遅い場合 ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) よりも高い温度で死亡卵が現われ、同一到達温度では死亡率が大きい、試料1ccの場合と異なり、 -37°C 附近でも數%の生殘率がみられる。

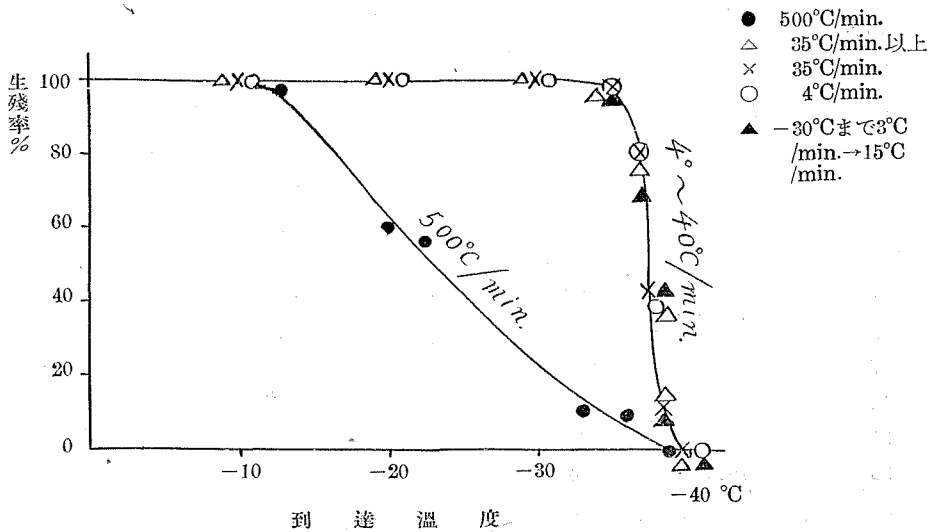
更にこの毛細管を用い (試料0.2cc)、豫め準備した -10°C 、 -20°C 、 -30°C 、 -35°C 、 -38°C 、 -40°C のドライアイス・アルコール中に浸して凍結した。従つてこの場合の冷却速度は各温度によつて多少異なるが、凡そ $1\sim 40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲内にあつた。また念の爲、更に冷却速度のおそい場合即ち2重管にして凡そ $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の速度で凍結させた例もある。それらの成績は第5圖及び第6表に示すように、未熟卵でも仔虫卵でも、 -30°C では死亡卵はみられず、 -35°C で約10%、 -38°C で約50%の死亡率を示し、 -40°C では全卵死亡する。この成績は試験管内1ccの場合 ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) にほぼ一致するが、それよりもやや死亡率が少ないくらいであつた。

めてあるから問題にならない。結局このように、薄層で急速凍結した場合の成績は緩徐凍結(4~40°C/min)の場合とほぼ同様であることは第6表に示す通りである。

以上要するに、液体空氣又はドライアイス・アルコール(-70°C)に直接挿入する場合を除いては、いずれも-30°Cでは死亡卵がみられず、-35°Cで約10%、-38°Cで約50%の死亡率がみられ、-40°Cでは全卵死亡し、4~40°C/min くらいの多少の冷却速度の遅速によつては死亡率の差はみられない(第6, 7圖)。



第6圖 種々の冷却速度で凍結融解した未熟卵の生残率(毛細管, 浮游液 0.2 cc)



第7圖 種々の冷却速度で凍結融解した仔虫卵の生残率(毛細管, 浮游液 0.2 cc)

第 7 表 未熟卵の凍結保存期間と生残率 (括弧内は仔虫卵率)

保 存 時 間	保 存 東 度					
	-1~-5°C	-5~-10°C	-15~-25°C	-35~-36°C		-40°C
	低 温 室			ブ ラ イ ン		低 温 室
	1 重 管			2 重 管		1 重 管
30分						90 (73)
60					100 (31)	4 (0.5)
90						0
1日				50 (0)	87 (4)	
2				37 (0)		
3				6 (0)	18 (0)	
4				3 (0)	4 (0)	
5				0	0	
1ヶ月	100 (100)	100 (100)	100 (100) 92 (75)			
2	100 (100)		70 (40)			
3		100 (100)	100 (100)			
4			19 (4)			
5		100 (100)	7 (2) 0			

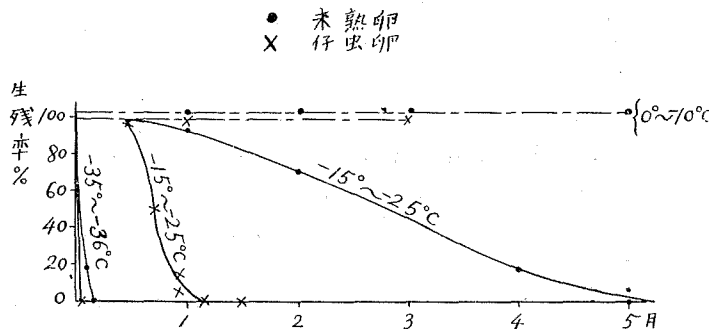
第 8 表 仔虫卵の凍結保存期間と生残率

保 存 時 間	保 存 温 度					
	低 温 室		ブ ラ イ ン		低 温 室	
	-2~-6°C	-20~-25°C	-32~-34°C	-35~-36°C	-40°C	-41~-43°C
10分						100
20					100	
30						0
40					13	
60			100	89	4	0
90					0	
300				44		
1日			100	1		
2			93	0		
7		100				
14		95				
21		50				
28	100	4				
35		0				
3ヶ月	100					

一般に仔虫卵は未熟卵よりも多少死亡率が大きいように見えるが、餘り明瞭な差ではない。

2. 凍結時間の虫卵に及ぼす影響 (保存死)

試料を凡そ +10°C の室温から種々の温度の低温室及び低温室内のブライン中に移して、そのまま保存した。この場合は 1°C/min (試料を入れた試験管を直接低温室に放置した場合及び試験管を更に外套管に入れて、ブライン中に浸した場合)、または 10°C/min (試験管を直接ブライン中に浸した場合) ぐらいの冷却速度である。保存温度は低温室恒温槽不備のため、時に ±5°C ぐらいの変動があつた。成績は第 7, 8 表に示すように 0°C ~ -10°C では、未熟卵は 5 ヶ月、仔虫卵は 3 ヶ月でも死亡卵はみられなかつた (これ以上長期間保存は検査していない)。-15 ~ -25°C では、未熟卵は 3 ヶ月で 5% 以下の死亡率をみ、5 ヶ月で全卵死亡するのに、仔虫卵は 3 週間で約 50% 死亡し、5 週間で全卵死亡する。また、-35 ~ -36°C では、未熟卵は 1 日で 50% 以下の死亡率をみ、5 日で全卵死亡するに、仔虫卵では 5 時間で約 50% 死亡し、2 日で全卵死亡する。



第 8 圖 蛔虫卵の凍結保存期間と生存率

要するに、第 8 圖に示すように、0°C ~ -10°C では未熟卵も仔虫卵も數ヶ月凍結保存されても影響を受けないが、大体 -20°C よりも低い温度では温度が低くなるほど生存期間が短くなり、かつ、未熟卵は仔虫卵よりもはるかに長期間生存する。

3. 冬期自然気温の虫卵に及ぼす影響

虫卵浮游液 1 cc を内徑 15 mm の試験管に入れて、冬期間室内、廊下及び屋外 (窓の外で、日光の直射しない個所に吊して) 放置した。室内は冬期間暖房があるので、日中は最高 +12°C のこともあるが、平均 7 ~ 9°C で、夜間又は休日の際は -2 ~ -3°C まで低下することがあつた。しかしこのような場合でも凍結することはなかつた。

廊下の暖房設備のない個所では -5 ~ -6°C になることが數日間あつたが、大概日中 +2 ~ +3°C、夜間 -2 ~ -3°C で日變化 4 ~ 5°C で、平均気温 0°C であつた。

札幌地區の昭和 27 年 11 月から翌年 4 月までの屋外の月別最高、最低、平均気温は札幌氣象臺調査によれば第 9 表に示す通りである。以上のような屋外、屋内での保存による成績は第 10, 11 表に示す通りである。即ち屋内保存では 3 ヶ月乃至 5 ヶ月を経過しても、未熟卵、仔虫

第 9 表 昭和 27 年 11 月から 28 年 4 月までの札幌地区戸外気温

温度 (°C)	月					
	XI	XII	I	II	III	IV
最高	17.5	5.9	6.5	10.8	10.9	20.2
最低	-11.5	-19.7	-20.0	-19.6	-12.3	-6.5
平均	1.5	-6.0	-6.6	-6.1	0.0	5.5

第 10 表 未熟卵の冬期気温による影響 (生残率 %)

期間	月 日	場 所		期間	月 日	場 所	
		屋 内 温 度					場 所
		+12~-3°C	+3~-6°C				
1ヶ月	4/XII~4/I	100 (90)		1ヶ月	13/XI~14/XII	62 (42)	
2ヶ月	27/I~27/III		100 (96)	2ヶ月	13/XI~14/I	25 (15)	
3ヶ月10日	27/I~7/V		93 (87)	3ヶ月	27/I~28/III	0	
5ヶ月	4/XII~10/V	85 (82)			13/XI~28/II	0	

第 11 表 仔虫卵の冬期気温による影響 (生残率 %)

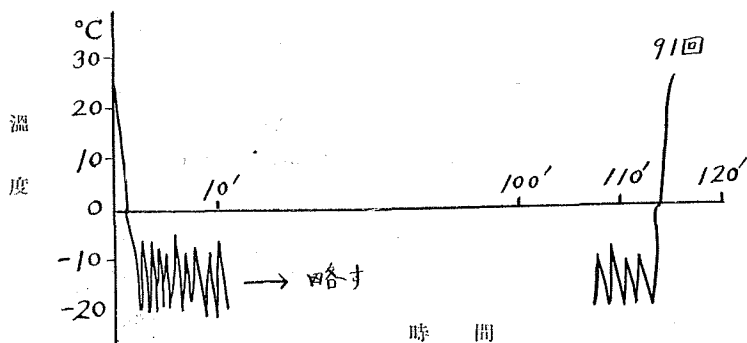
期間	月 日	場 所		期間	月 日	場 所	
		屋 内 温 度					場 所
		+14~+3°C	+10~0°C				
1月	1/X~30/XI	100	100	7日	4/III~11/III	94	
2月	1/X~28/II	100	100	21日	4/III~25/III	25	
				28日	4/III~1/IV	16	
				35日	4/III~8/IV	0	
				45日	22/XI~8/I	8	
				60日	22/XI~22/II	0	

卵ともに生残率が僅かに低下するにすぎないが、屋外保存では、未熟卵では 2~3 ヶ月で、仔虫卵では 1 箇月餘で完全に死滅する。

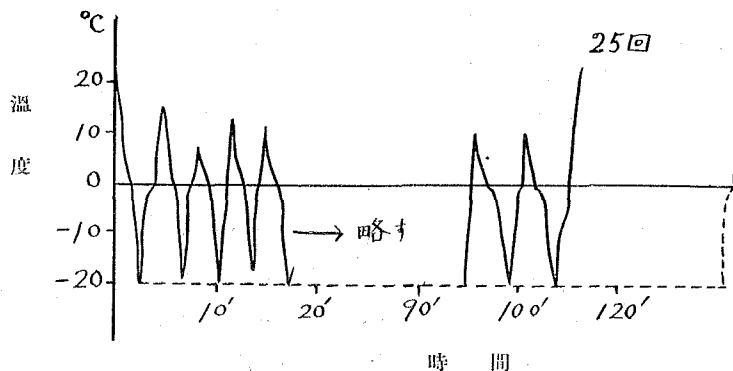
この冬期屋外放置の場合の生残率を、その最低気温に相当する低温室内の実験成績に比較すると、一般に生残率が少ないように思われる。例えば未熟卵が $-15 \sim -25^{\circ}\text{C}$ の低温室内 1 ヶ月で 92%、2 ヶ月で 70% であるのに反し、 $+17.5 \sim -20^{\circ}\text{C}$ の屋外放置では 1 ヶ月で 62%、2 ヶ月で 25% となっている。この理由を考えてみるに、低温室内実験ではほぼ一定温度であるのに對し、自然気温では温度の日變化が甚だしいことを第一に挙げねばならない。

そこで實驗的にこの點を追及してみるため、次のような條件で實驗を試みた。即ち所定の時間内に於て、(i). -20°C に凍結保存した場合、(ii). 凍結したままで -20°C と -10°C との間の温度の變動を繰返えした場合、(iii). -20°C と $+10^{\circ}\text{C}$ との間で凍結融解を繰返えした場合のそ

それぞれの虫卵の生残率を比較検討した。その冷却曲線及び成績は第9圖、第10圖、第12表及び第11圖、第13表に示す通りで、以上3つの條件に未熟卵ではそれぞれ1時間半、仔虫卵ではそれぞれ4時間おいた場合、未熟卵ではその生残率は $-20^{\circ}\text{C}+10^{\circ}\text{C}$ でのみ僅かに減少するにすぎないが、その仔虫卵率は -20°C の凍結保存で100%、 $-20^{\circ}\text{C}-10^{\circ}\text{C}$ で25%、 $-20^{\circ}\text{C}+10^{\circ}\text{C}$ で1%となつている。また仔虫卵でも $-20^{\circ}\text{C}+10^{\circ}\text{C}$ でのみ生残率の減少がみられる。



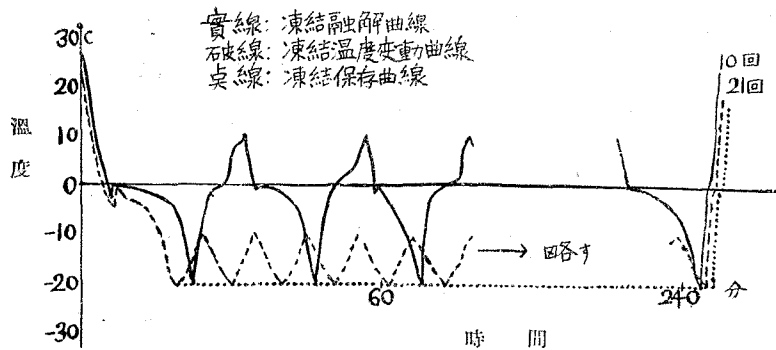
第9圖 未熟卵の凍結温度變動曲線



第10圖 未熟卵の凍結融解曲線

第12表 未熟卵の凍結融解、凍結温度變動及び凍結保存による影響の比較

作用回数	作用時間			生残率及び仔虫率 (%)		
	$-20^{\circ}\text{C}+10^{\circ}\text{C}$	$-20^{\circ}\text{C}-10^{\circ}\text{C}$	-20°C 保存	$-20^{\circ}\text{C}+10^{\circ}\text{C}$	$-20^{\circ}\text{C}-10^{\circ}\text{C}$	-20°C 保存
1	4'			100 (100)		
5	19'			100 (36)		
10	39'	12'		100 (24)	100 (36)	
15	63'			100 (16)		
20	1°22'	20'		100 (7.5)	100 (30.5)	
25	1°46'	33'		98 (1)	100 (25)	
91		1°54'			99.5 (16.5)	
			2°			100 (100)



第11圖 仔虫卵凍結融解及び凍結温度變動曲線

第13表 仔虫卵の凍結融解，凍結温度變動及び凍結保存による影響の比較

作用回数	作用時間			生残率 %		
	-20°C→+10°C	-20°C→-10°C	-20°C保存	-20°C→+10°C	-20°C→-10°C	-20°C保存
1	24'			100.0		
6	2°18'			94.2		
10	4°7'	2°5'		82.7	100.0	
13		2°39'			100.0	
21		4°9'	4°10'		100.0	100.0

以上要するに最低温度は等しくても，温度変化の激しいものの方が虫卵に障害をきたすことから，自然気温に於ける放置虫卵の生残率の小さいことが説明される。また，低温室内 -20°C 保存では死亡卵が認められないにも拘わらず，この温度で凍結融解を繰返えすと，急激に死亡卵がますのは，凍結という状態変化の影響が反復累積される結果であろうと考えられる。

4. 蛔虫卵が凍結によつて障害をうけることの機序について

以上の実験成績から蛔虫卵浮游液は冷却速度が $500\sim 1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の範囲では， -30°C に達すれば死亡卵が現われ， -40°C に達すればすべて死滅することが認められた。つまり試料がこの温度まで冷却された場合には何か致死的な現象がおこるものと考えられる。そこでその機序を明らかにしたいと思ひ次のような検討を試みた。

1) 凍結過程での形態的所見 既に述べたようにして作つた虫卵浮游液を1滴載物ガラスにとり覆いガラスをおくと，液はきわめて薄い層になる。これを低温室にもちこみ，豫め装置した顕微鏡下で凍結過程を観察するのである。低温室の温度は $-35\sim -40^{\circ}\text{C}$ と $-15\sim -25^{\circ}\text{C}$ とである。試料自身の温度変化は測定しないが，載せガラス全体は凡そ数分でその時の顕微鏡の載物臺の温度に達するものと思われる。

(i) $-35\sim -40^{\circ}\text{C}$ の低温室内での鏡檢所見を述べると，試料を装置にとりつけて後まもな

く虫卵周圍のメジツムの凍結がみられる。それも、早期に覆いガラスの周邊に植氷した場合には、比較的高温で凍結が始まるためか氷晶がゆつくり延びて次第に網目を形成するのがみられるが、もし豫め植氷しない場合は、かなり低温度になるまで過冷却しやがて突然凍結が始まるためか全視野に一時に氷晶の出現するのがみられる。

次いで氷晶に囲まれた虫卵のうち突然パツと眞黒くなる卵がみられる。このようにして、散在した虫卵が次々とポツポツと暗黒化してゆく。これを強麻大で仔細に觀察すると、胚細胞または虫体が黒くなつており、なお胚細胞と卵殻の間の兩極の新月形の透明帯または虫体と卵殻の間に黒い微粒が多數みられる。しかし、卵殻や胚細胞や虫体の形狀、大きさ、位置等には殆んど變化がみられない(圖版4, 5)。

なお、この虫卵の暗黒化は朝比奈¹²⁾の從來の所見及び同氏自身のこの標本觀察結果からみて、卵殻内に凍結がおこつたためとみなしてさしつかえないようである。

この凍結標本を融解後そのまま培養するか(未熟卵の場合)、またはそのまま恒温箱中で檢鏡して(仔虫卵の場合)、凍結しない虫卵率と生殘率との關係をみるに、第14表に示すように、

第14表 不凍結卵と生殘卵との關係

冷却時間	未 熟 卵				仔 虫 卵			
	-36~37°C		-37~39°C		-37~39°C		-37°C	
	不凍結卵 %	生殘卵 (仔虫卵) %	不凍結卵 %	生殘卵 (仔虫卵) %	不凍結卵 %	生殘卵 %	不凍結卵 %	生殘卵 %
5分	99	96 (27)			14	15		
10			55	52 (49)	38	35	49	48
20			0	0	0	0		
30	41	37 (12)					36	32

不凍結卵率と、培養によつて發育を示す未熟卵または下記のような形態的變化もなく運動性も有する仔虫卵即ち凍結融解後も生存する虫卵の率とがほぼ一致することが判つた。この點からみて、卵殻内に凍結がおこれば虫卵は死亡するものと考えてさしつかえないようである。

(ii) -25°Cより高い温度では、凍結過程でも、また數ヶ月凍結保存した場合でも、形態的變化例えば暗黒化はみられない。即ちこの温度での長期保存で死亡卵のできる場合は、卵殻内凍結がおこらなくても死亡卵となることを示している。

(iii) 更に冷却速度による生殘率の差を檢討してみるのに、まず同様に作つた載せガラス上の標本を-20°Cの低温室で植氷して凍結を起させ、5分間放置しても卵殻内凍結を起すものないのを確認してから、今度は-36°C又は-38°Cの低温室に移すと凍結卵を生じ、漸次その數を増して來る。しかし、10分、30分、60分位の所見を、室温から直接-36°C、-38°Cの低温室に入れて急速に凍結させたものと比較してみても凍結卵數は殆んど同じである(第15表)

第15表 凍結方法と卵殻内不凍結卵との関係
(低温室内凍結標本の観察)

凍結法	到達温度	未 熟 卵 仔 虫 卵					
		經 過 時 間					
		10'	30'	60'	10'	30'	60'
急 速	-36°C	95					
		98	97	91	97	95	78
	-38°C	43	31	19		2	1
				35			
緩 徐	-36°C	94					
		98	97	92	95	96	76
	-38°C	48	25	17		1	1
				33			

註 急速凍結: +10°Cより-36°C又は-38°Cの低温室に入れた場合

緩徐凍結: +10°Cのものを-20°Cの室で植氷し、5分經過後、-36°C又は-38°Cの室に入れた場合

かかる點からみて、卵殻内凍結を起す機序は冷却速度によつてはあまり左右されず、到達温度によつて殆んどきまるものであることが判つた。

(iv) 不受精卵浮游液1滴を前記のような標本に作つて、-15°C前後の低温室でこれを檢鏡すると、メジウムが凍結するとともに卵は縮小し不正形となるのが觀察される(圖版6)。この現象は卵の周圍に氷晶が出来るとともに卵は脱水されるために起るものであり、不受精卵の殻は未熟卵または仔虫卵の殻と異なつて、殻の水の透過性の大きいことを示すものであると考えられる。

2) 凍結融解後の形態的所見 卵殻内凍結卵は凍結融解後胚細胞や虫体に大小數箇の空泡の生ずるのがみられる。之に反し、非凍結卵では形態的變化がみられない。この空泡の出来ることが最も顯著な變化であるが、そのほかに胚細胞が大小不同、不規則に顆粒状になつて不均等になること、また細胞膜の邊緣に多少凹凸を生ずること、或いは細胞膜が破れて胚細胞の内容が卵殻内を満すことなどの變化がみられる(圖版7, 8)。しかし凍結卵でみられたところの、新月形の透明帯や仔虫体と卵殻との間に生じた黒い微粒は融解とともに消失して、正常卵と同様に透明にみえる。

-20°C前後より高い温度に凍結保存した場合は、數箇月後、たとえ、死亡卵が生じていても形態的變化がみられないことは前述した通りであるが、融解直後にも明瞭な形態的變化がみられない。しかし、數日間28°Cの孵卵器中に放置すると死亡卵に空泡がみられるようになる。

3) 卵殻の構造、特に水の透過性についての吟味

(i) 正常卵の顯微鏡的所見

受精卵は大概外表に蛋白膜があり、また厚い卵殻を有する。卵殻は3層から成ることは明瞭で

あるが (圖版1,2), 井田 (1929) が酸, アルカリ等を用いて卵殻を剝離しての觀察では, 卵殻は4層から成るといふ。

化學的には, 蛋白膜も卵殻も類脂体を含んでいるので, 溶脂性物質は卵内に浸透し得るといわれるが, 然し光學顯微鏡では卵殻の形態的な微細構造は明らかでない。

(ii) 各種メジウム中の虫卵の容積

卵殻の透過性を檢する目的で, 飽和食鹽水, 50% ブドウ糖液, 純グリセリンをメジウムとしたときの虫卵の容積變化を檢討した。第16表に示すように, これらの液に +15°C, 1時間おいても外殻容積に變化がないことを認めた。また胚細胞或いは虫体自身の大きさや形にも, 變化が認められなかつた。以上の事實から, 卵殻は水の透過性に乏しいものと想像される。

また, 飽和食鹽水及び50% ブドウ糖液中で培養すると正常卵と同様に仔虫にまで發育し, 3週前後に至るとはじめて卵殻の收縮するものがみられる。

しかるに, 卵殻の薄い不受精卵では, 以上の溶液中では直ちに卵殻の收縮や胚細胞の縮小がみられる。

(iii) 種々のメジウムを用いた虫卵浮游液の凍結融解

種々の細胞例えば細菌などはメジウムの性状によつて, 凍結融解に伴なう障害の程度に差が

第16表 各種メジウム中の未熟卵の容積
(計測個数各30個の平均値)

大 き さ (mm)		處 置		
		水 道 水	飽 和 食 鹽 水	50%ブドウ糖液
卵 (卵殻の外測から)	長徑	0.062±0.004	0.065±0.004	0.066±0.003
	短徑	0.05 ±0.002	0.05 ±0.002	0.05 ±0.002
卵 細 胞	長徑	0.051±0.002	0.05 ±0.002	0.05 ±0.002
	短徑	0.042±0.002	0.043±0.002	0.042±0.002

第17表 種々のメジウムを用いた場合の凍結融解後の生殘率
(冷却速度 2°C/min)

	°C	メ ジ ウ ム					0.5% -ゼラチン液
		水 道 水	1%食鹽水	1%蔗糖液	10%食鹽水	10%蔗糖液	
未 熟 卵	-35.0	97 (93)	90 (89)	98 (87)	94 (92)	96 (88)	
	-37.5	64 (49)		55 (37)			57 (47)
	-38.0	35 (33)	32 (30)	30 (25)	32 (31)	35 (31)	
	-38.5	13 (11)		14 (11)			12 (10)
	-40.0		0	0	0	0	0
仔 虫 卵	-37.0	69	70	59	79	60	
	-38.5	19	12	14	19	18	
	-40.0	0	0	0	0	0	

あり、糖液、蛋白液等は細菌に對し保護膠質作用を示すことが知られている。¹³⁾ そこで、メジウムの種類時に滲透壓の異なるメジウムでは虫卵の凍結融解に際してどのような作用を示すかを知り度いと考へて、1%及び10%食鹽水、1%及び10%蔗糖液、0.5%ゼラチン液を用いて虫卵浮游液を作り、凍結融解を行つたが、第17表に示すように、結局メジウムの種類、濃度に拘わらず低温に對する抵抗性には殆んど差は認められなかつた。

(iv) 流動パラフィン中の虫卵の凍結状態

子宮からとりだした虫卵をそのまま流動パラフィンにまぜて、殆んど水を含まない浮游液とし、これを熱電對で温度を測定しつつ冷却し、 -40°C に達した時に低温室に移して檢鏡すると、全卵が暗黒化しているのが認められた。即ち流動パラフィンの場合も水道水と殆んど同じ條件で卵殻内凍結がおこることがみとめられ、その凍結は周囲のメジウムに左右されないことが判つた。

(v) 卵殻破壊後の仔虫の凍結

虫卵標本を作る際、カバーガラスに軽く壓を加えると、一部虫卵は卵殻が破裂しつぶされて中の仔虫が殻外に出る。この標本を -13°C ～ -25°C の低温室内顯微鏡下で凍結過程を觀察すると、この範圍の温度では卵殻の損傷のない卵は黒くならないのに、卵殻のこわれた卵の仔虫体または殻外に出た仔虫体はメジウムの凍結と殆んど同時に暗黒化するのが認められた(圖版9)。即ち卵殻がないと、通常卵殻内凍結がおこらないくらいの高い温度でも虫体の凍結のおこることがわかる。

未熟卵では卵殻をこわすと同時に細胞膜もこわれて内容が殻外に流出散出してしまふので、卵殻のこわされた未熟卵の凍結状態を觀察することは困難であつた。

IV. 考 察

蛔虫卵を浮游液として冷却した場合、未熟卵でも仔虫卵でも -15°C 以下で發育障害をうけ、 -35°C 以下で即時死亡卵を生じ、 -40°C に達すればすべて死滅することが認められた。

かかる温度まで冷却されると浮游液は勿論凍結するが、その中に含まれる虫卵自身は果して凍結しているか否かは問題となる。従來、微生物などの低温に對する抵抗性の實驗の場合にも微生物自身の凍結の有無が論ぜられていたが¹⁴⁾、著者の實驗に於ては -35°C 以下で顯微鏡下に虫卵内凍結を確認し得た。しかも凍結卵と融解後の死滅卵との比率の一致する點から考へて、短時間の凍結にみとめられる虫卵の死滅は虫卵自身の凍結に基づくものとみなしてさしつかえないようである。

また、 -35°C ～ -40°C という比較的はつきりした臨界致死温度を示すことについては次のような説明を下してよいであろう。即ち著者の卵殻の透過性についての種々の實驗の結果からみて、蛔虫卵の卵殻は甚だ水を通し難いので、メジウムの種類、濃度或いは冷却速度の如何に拘わらず卵殻内の水分の増減は殆んどなく、従つて胚細胞或いは仔虫の細胞内液の濃縮などの現

象もみられず、また一方構造的にも周圍からの氷晶の侵入を許さず、虫卵自身はメジウムの凍結とは全く無關係の状態にあるが、やがて試料温度が $-35\sim-40^{\circ}\text{C}$ に達した時に卵殻内液の過冷却が破れて氷結がおこり、それまで透明であつた虫卵が一瞬にして暗黒化するものであると考えられる。

このことは、また著者の實驗結果からも推論し得る。即ち、凍結状態は實際に著者が低温室内顯微鏡下の凍結經過の觀察から確認し得た處であり、また種々のメジウムを用いた場合の所見から考えても妥當と思われる。

一般に、生細胞で水の透過性の大きなものでは、冷却速度によつて細胞内の過冷却度が左右されることが知られている。^{12,14)}即ち冷却速度が小さい場合はメジウムの凍結によつて細胞が脱水され、このため細胞内液が濃縮されて過冷却度が大きくなり、細胞内凍結がおこり難くなる。かかる場合には細胞は殆んど障害を受けないことが多い。之に反して、冷却速度が大きい場合は、メジウムの凍結とほぼ同時に細胞内凍結がおこり、従つて細胞の障害も著しくなる。このように、一定の臨界致死温度の認め難い生物が多いが、今回蛔虫卵に於て比較的はつきりした臨界致死温度を認めたことは極めて注目すべき事實であつて、蛔虫卵の低温に對する抵抗性に關しては他の多くの單細胞生物と同一に論ずることはできない。

しかし、細胞の障害は、細胞内に凍結が起つた時のみ、みられるというのではなく、外圍の氷晶による機械的障害も多少考えられるであろうし、また長期間低温におかれた場合の温度そのものによる細胞の機能的な變化も當然考えられると思う。

かかる意味から、虫卵を -20°C 前後に長期間凍結保存した場合の死滅卵の増加は低温そのものの障害によるもの即ち過冷却死であると考えられる。

ただ、冬期自然気温に放置した場合の生存期間が、實驗室内の一定温度保存のものに比して短いのは、恐らく気温の日變化のため試料自身の温度が上下するためであろうと考えられる。この場合に、たとえ融解までに至らなくても温度の變動が繰返えされると多少の影響があることから想像される處である。

一方、實際に積雪地の地面に撒布された虫卵の場合を考えてみるに、積雪に覆われた地表面の温度はほぼ 0°C 前後であり、しかも温度變化は割合に少ないから、容易に越冬生存し得るものといつてさしつかえないであろう。

なお、蛔虫卵の低温に對する抵抗性については、從來の報告は殆んど自然気温に於ける實驗結果であつて、その成績が必ずしも一致していなかつた。この點に於ても著者の今回の實驗は嚴格な温度測定のもとに行われて、低温條件と抵抗性とが關係が明確にされたものと信ずる。また更に進んで、低温による障害の機序を検討することによつて、他の種々な生細胞とは多少異なつた虫卵獨特の性質が認められたわけである。

V. 結 論

豚の蛔虫卵の低温に対する抵抗性、換言すれば蛔虫卵の低温による障害を検討した結果、

1) 短時間の低温処理では、未熟卵は -15°C 以下で發育障害され、未熟卵も仔虫卵もともに -35°C 以下で死亡卵がみられ、 -40°C に達したものは全卵の死滅をみとめた。

2) 低温保存の期間が長くなるほど障害の程度が大きくなる。特に仔虫卵は未熟卵よりも障害が大きい。

3) 低温処理の場合の冷却速度による影響はあまりみられない。

4) 自然気温に於ける障害の度の比較的大きいのは、温度の變動のはげしいことによるものと考えられる。

5) これらの障害の起る機序について種々の検討の結果、處理直後にみられる即時死は卵殻内に凍結が起つたためであり、長期間後にみられる保存死は過冷却による障害であろうとの見解に達した。

御指導、御校閲を賜つた根井教授、並びに御助言及び顯微鏡寫眞撮影された朝比奈助教授に厚く感謝します。

文 献

- 1) 森下 薫 1953 蛔虫及び蛔虫症. 増補第2版, 永井書店.
- 2) 小縣誠治 1924; 1925 余の蛔虫卵撲滅法に就いて (其の一, 二; 三. 完) 温度に対する抵抗力試験, 蛔虫成熟卵の温度に対する抵抗力試験. 大阪醫學會雜誌, 23, 969, 同誌, 23, 1373; 同誌, 24, 93.
- 3) 青木忠博 1934 温度の蛔虫卵發育に及ぼす影響に就いて. 慶應醫學, 14, 293.
- 4) 吉田貞雄 1919 蛔虫卵の抵抗力に就いて. 東京醫事新誌, No. 2126, 956.
- 5) 小林晴次郎 1922 腸寄生虫卵の抵抗力. 朝鮮醫學會雜誌, No. 38, 91.
- 6) 淺田順一 1923 蛔虫卵殻仔虫の抵抗力試験. 東京醫事新誌, No. 2339, 2443.
- 7) E. B. Cram 1924 The influence of low temperatures and of disinfectants on the eggs of *Ascaris lumbricoides*. J. Agricult. Res., 27, 167.
- 8) Zwadowski 1926 (B. J. Luyet and P. M. Gehenio 1938 The lower limit of vital temperatures. A Review. Biodynamica, No. 33, 26. より引用).
- 9) 佐藤千代三郎・千葉隆 1936 鶏蛔虫卵子の發育並びに豚蛔虫卵子との比較. 慶應醫學, 16, 1529.
- 10) 山崎繁・富田俊雄・山下六郎 1953 蛔虫卵の低温に対する抵抗力に関する研究, 特に攝氏零下21度に対する抵抗力に就いて. 第13回日本寄生虫學會關東支部會講演.
- 11) 稻留藤次郎 1932 自然界に於ける蛔虫仔虫の經皮感染ありや. 慶應醫學, 12, 863.
- 12) 朝比奈英三 1950 生物の凍結過程の分析 II. 植物柔組織の凍結過程の顯微鏡的觀察. 低温科學, 3, 229.
- 13) 根井外喜男・佐藤徹・有馬純 1951 生物學的材料の凍結乾燥法, 第6報 種々なメヂウムを用いた細菌浮游液の乾燥. 低温科學, 8, 179.
- 14) 根井外喜男・小川忠人・兼平信一・秋元博 1954 酵母の機能に及ぼす低温の影響. 農化, 28, 94.

Résumé

This paper presents the results of experiments on the resistance of *Ascaris* eggs to low temperatures.

Fresh fertilized eggs and embryos of *Ascaris lumbricoides* from pig suspended in tap-water were employed as materials and the effects of cooling and freezing on them under various conditions at low temperatures were examined.

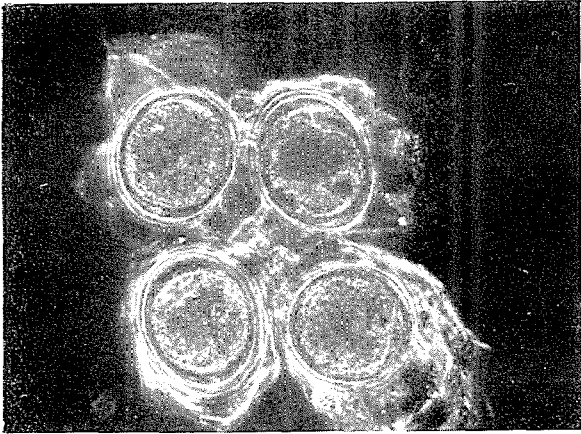
By thawing immediately after freezing at temperatures ranging from -15°C to -30°C , the development of fresh eggs in subsequent culture at 28°C proved to be retarded. It was further found that the fresh eggs and embryos in the shells suffered great damage by freezing at about -35°C and below, while their vitality was completely destroyed at -40°C .

Low temperature injury occurred with increasing markedness as the storage period was prolonged, but the cooling rate in the course of low temperature treatment had very little influence on the destructive effects.

It may be assumed that the harmful effects on eggs of the cold climate in winter is due to the repeated fluctuation of temperature.

As regards the mechanism of low temperature injury to *Ascaris* eggs and embryos in shells, it was concluded that the "immediate death" following freezing and thawing was caused by ice-formation within shells and the "storage death" by the destructive effect of supercooling during the prolonged period.

飛澤實論文附圖

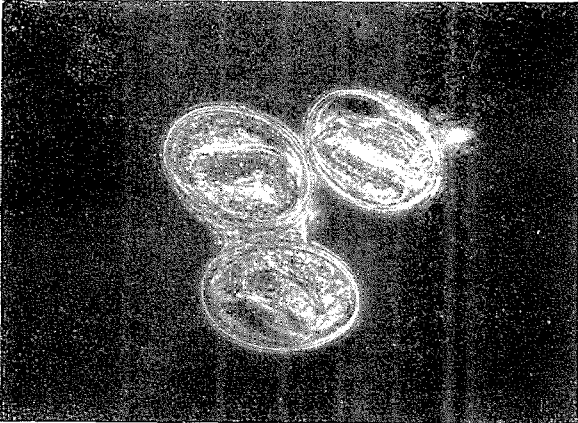


圖版 1

無處置未熟卵

豚の雌成虫の子宮からしぼりだしたもので、
蛋白層は形成されていない。卵は粘液様のも
のの中にあつて、個々に分離しがたい。

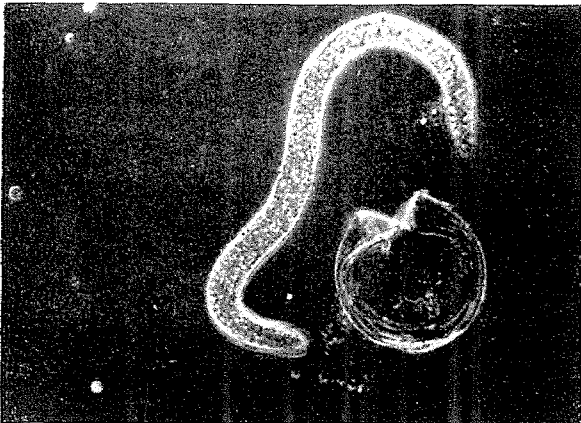
×300 (位相差顕微鏡による)



圖版 2

無處置仔虫卵

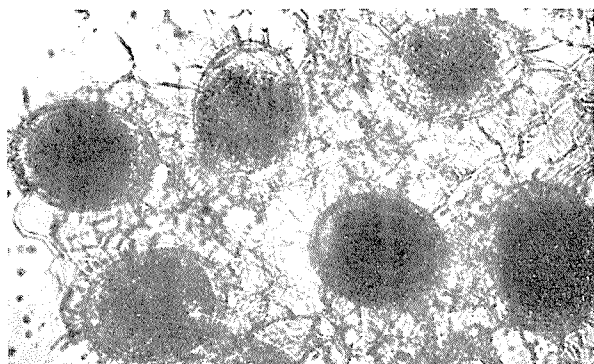
培養1ヶ月後のもの。×300 (位相差顕微鏡
による)



圖版 3

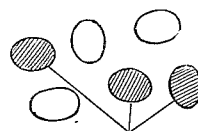
標本に軽く壓を加えた場合の破壊された卵殻
と脱殻した仔虫。×300 (位相差顕微鏡によ
る)

飛澤實論文附圖

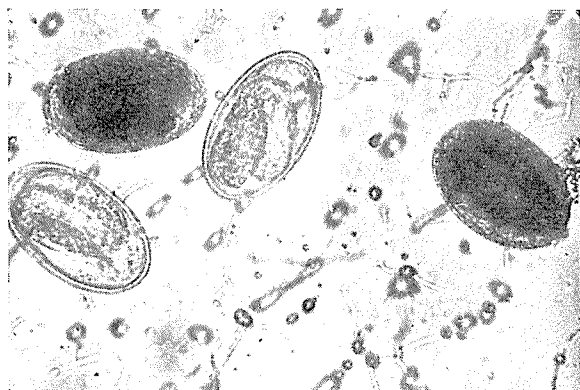


圖版 4

未熟卵を室温より直接 -38°C に入れて30分後の凍結所見：3ヶだけ卵殻内凍結を起し、他は凍結していない。 $\times 300$

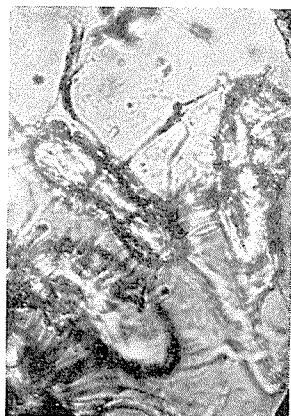
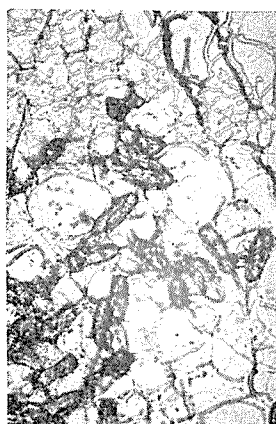


卵殻内凍結卵は黒くなっている



圖版 5

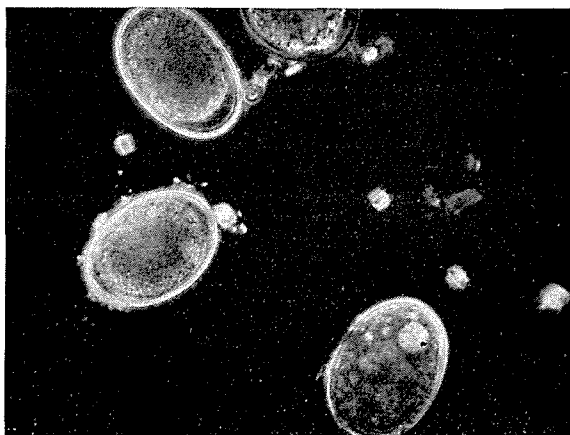
仔虫卵を室温より直接 -38°C に入れて30分後の凍結所見：2ヶ卵殻内凍結，2ヶ不凍。 $\times 300$



圖版 6

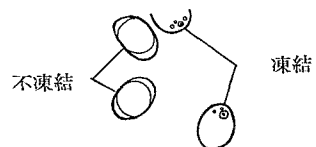
不受精卵を -12°C で凍結させた場合，左圖 $\times 100$ ，右圖 $\times 300$
卵内の水分が脱水されて収縮したものと思われる。

飛澤實論文附圖

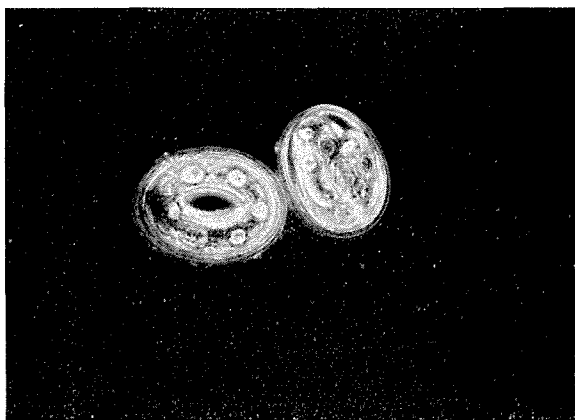


圖版 7

卵殻内凍結をした未熟卵の融解後の所見
×300 (位相差顕微鏡による)



凍結卵に空泡がみられ、なお細胞膜がやぶれて、細胞内容が卵殻内を満たしている。



圖版 8

卵殻内凍結をした仔虫卵の融解後の所見
×300 (位相差顕微鏡による) 虫体に数ヶ
の空泡がみられる。



圖版 9

仔虫卵を -10°C で凍結させた場合。
卵殻内仔虫は凍結せず、脱殻仔虫は凍結
して黒くなっている。