

## 染色による蛔虫卵の生死判別法に就いて\*

千葉大学医学部衛生学教室(主任 谷川教授)

天 谷 博

HIROSHI AMAGAI

昭和30年10月27日受付

## 第1章 緒 論

寄生虫特に蛔虫問題は我国の公衆衛生にとって従来も大きな課題であつたが、其の重要性は戦後の現在益々痛感せられるに至つた。人糞を肥料として使用している我国の現状に於て、感染者の糞便から他の人の口への蛔虫卵の循環を断つには、蛔虫卵を殺滅せしめ感染力をなくすることが大切な問題である。此の蛔虫卵の各種の条件に対する抵抗力を知ることは蛔虫の防遏に於ける重要な拠点となる。抵抗力を知るには結局その生死を知ることが基礎となる、併し卵の生死判別が培養法によらねばならず、3~4週間もの長時日を要するため研究が遅々として進まず、蛔虫感染予防の研究の最大の隘路となつており、卵の簡単な生死判別法が切望せられる次第である。然るにこの問題に関しては従来研究に乏しく未だ良法が発見されていない。そこで著者は谷川教授指導の許に染色による蛔虫卵の生死判別法に関する研究に従事した。今迄知られている生死判別の方法にズダンⅢ染色法があるが、その信頼性については諸家によつて疑義が述べられている。著者は先ずズダンⅢ染色法を追試し、更に酸或はアルカリの前処置によりその染色性を亢めんと試み、次に多数の色素特に脂肪染色剤等を集めて実験したが、遂にルゴール氏液による新染色法を発見し、従来のズダンⅢ法より優れている事を見出した。更にこれら染色の機転を知るべく種々実験を試みた。尙最近蛍光色素による生死判別法が報告されたのでこの方法との比較検討を行つた。

こゝに得た成績を報告し諸家の参考に供する次第である。

## 第2章 文 献

文献を渉獵するに、1915年堀沢は人蛔虫卵を少時乾燥した後、10%ホルマリン或はホルマリン蒸気を以つて固定し、ズダンⅢ又はニールブラウ等の脂肪染色剤を以つて染色すると、不受精卵の卵黄内に多数の中性脂肪或は類脂肪体あるを証明するも、受精卵に於ては染色せる部分あるを認めずと述べ、受精卵も加熱又は24時間以上ホルマリンに固定すると染色可能卵が出て来ることを認め、要するに卵黄の脂肪染色如何は虫卵の生死に関係あるものゝ如しと提言した。1922年小泉は蛔虫卵に沸騰水を灌流して死滅せしめると、卵はズダンⅢで濃染するのでそれによつて生死判別が可能であると云つた。其の後

1923年吉田は子宮内卵の如く卵殻が未だ形成されないか、或は形成不十分な間はたとえ卵が死滅しなくとも能く染まり、又完成した卵でも蛋白膜を失い卵殻だけとなつたものでは往々染色することがあると云つた。後年小泉(1928)、松崎(1928)、内藤・濃野(1928)、小田(1928)等も亦、卵の染色如何は生死を示すものではなく卵殻質の透過性の変調に起因するもので、死滅したものは大体悉く染色されるが生存するのでも時に染色されることがあり、又死滅したものでも染色しないものがある点に絶対性が無いと述べている。

糞便内寄生虫卵の染色に就いては、小山はエオジン、クリスタルバイオレット、ギームザ稀釈液、トリ

\* (本論文の要旨は昭和28年5月日本衛生学会第23回総会に於て発表した)

アチッド液, レフレル氏液, ビスマルク褐, ヘマトキシリン, フクシン, ピクリン酸, 重クローム酸等の色素を用いて無鉤條虫卵, 蛔虫卵, 十二指腸虫卵, 鞭虫卵の染色を行い, 無鉤條虫卵に於てのみ少々美麗なる標本を得たるも其の他の虫卵は着色不完全であると述べた。又土井もアニリン色素, 酸性アニリン色素, カルミン色素, ヘマトキシリン液, ルゴール液等で煮沸染色を行つているが, 氏はルゴール氏液にて着色殆んど認むるを得ずと述べている。最近アクリヂンオレンジ等の螢光色素で加熱死卵を処理すると黄緑色の螢光を発する事が知られ, 沢田等はこれを以つて蛔虫卵の生死判定が出来ると発表した。

第3章 ズダンIII染色と前処置

ズダンIII染色の方法は次の如くである。スピッツグラスの底に卵を置き, 50%の酒精を加えて12分間放置, 上清を去り, ズダンIIIの75%酒精飽和液で染色すること10~30分, 次で50%酒精を以つて洗い, 水洗後グリセリンで封ずる。蛔虫卵が加熱死滅すると大部分のものはズダンIIIで染色されるが, これは卵殻の透過性が充満しているためと解されている。著者は本染色法を追試し, 更に染色性を充めるために卵殻の透過性を充進するような前処置を試みた。

第1節 実験材料

生きた雌豚蛔虫を解体し, 子宮後端より1cm迄の卵を使用した。而して顕微鏡的に受精卵であり蛋白膜及び他の卵殻にも異常のなきことを確めた。

第2節 実験方法

2%石炭酸, 2%クレゾール石鹼液, 20%ホルマリン, 2000倍二硫化炭素液を各々100cc入りの褐色共栓の瓶に50cc入れ, この各々の中に前記蛔虫卵を入れ, 一定時日25°Cに保つた後ズダンIII染色を行つた。尚アルコール固定を行わないズダンIII染色, 発煙硝酸, 濃塩酸, 濃硫酸, アンチホルミン原液, 濃硝酸等を夫々30分作用後充分に水洗し, ズダンIII染色を行つた。同時に培養を行い100%死滅していることを確かめた。無酸素状態の実験は嫌気鐘の中にカラケにのせ適度の水分を与えてある蛔虫卵を黄磷燃焼法により無酸素状態とし, 25°Cの孵卵器に入れて置いたものに就いて行つた。

第3節 実験成績

前処置を行いズダンIII染色を行つたその成績は表1の通りである。即ち発煙硝酸では100%染色される様になるが生卵でも30分作用させると100%染色されてしまうので使用出来ず。濃硫酸も卵殻に対する作用が強すぎるので不適であり。濃塩酸では, ホルマリン或は二硫化炭素にて殺卵せるものは染色性が充進したが, 生卵でも30分作用させると染色されて来るものがあるので確実なものでない。濃硝酸, アンチホルミンでは殆んど変化が見られなかつた。尚この実験によりズダンIII染色にアルコール固定は不要であり, 却つて染色性を低下させるものと思われた, 故に以後の実験にはアルコール固定を行わずズダンIII染色を行つた(表1)。

表1. 前処置後のズダンIII染色(染色卵%)

	2%石炭酸 (22日間)	2%クレゾール 石鹼液 (10日)	無酸素(4カ月)	20%ホルマリ ン (57日)	2000倍二硫化 炭素 (50日)
ズダンIII染色	41.8	71.8	5.8	8.5	1.0
アルコール固定なき ズダンIII染色	45.7	73.9	6.9	14.9	0.5
発煙硝酸作用30分	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
濃塩酸作用30分	58.0	83.0	3.6	66.5	14.0
濃硫酸作用30分	卵殻膨大淡染	卵殻膨大淡染	卵殻膨大淡染	卵殻膨大淡染	卵殻膨大淡染
アンチホルミン 原液作用30分	47.5	72.1	3.5	26.7	0.2
濃硝酸作用30分	56.3	71.3	4.9	10.9	4.2

第4章 ルゴール染色

蛔虫卵に就いて種々の染色法を実施中スピッツグラスに虫卵を入れ, ルゴール氏液(以下「ル」と記す)を作用させると生卵も死卵も全部染色され, アルコールにて脱色すると, 死卵及び未受精卵は脱色されて無色となることを発見した。そこで生卵が全部染色され死卵が全部脱色される様に染色時間, 脱色時

間に就いて次の実験を行つた。

第1節 染色時間

蛔虫卵は豚蛔虫子宮後端1cm迄の卵を用い, 死卵は煮沸殺卵した卵を用いた。染色法はスピッツグラスに蛔虫卵を入れ, それに「ル」液の2~3ccを加え良く振盪して染色した。表2の如く「ル」液にて何分染色すると濃染するかはその作用温度に係る

表2. ルゴール染色の時間

染色時間 (分)	生 卵		死 卵	
	室温 13°C	37°C	13°C	37°C
1	淡 染	淡 染	濃 染	濃 染
3	淡 染	中等染一部淡染	濃 染	濃 染
5	中等染一部淡染	濃染一部中等染	濃 染	濃 染
10	濃染一部中等染	濃 染	濃 染	濃 染
20	濃 染	濃 染	濃 染	濃 染
30	濃 染	濃 染	濃 染	濃 染

り、冬の寒い室温では10分作用しても生卵に於ては濃染されないことがあり、条件を一定にするため37°Cの孵卵器中にて10分間染色することとした(表2)。

第2節 脱色時間

脱色法は「ル」液にて染色された蛔虫卵の入っているスピットグラスに、無水アルコールを入れ良く振盪、遠沈上清を去り、この操作を繰り返す、然し脱色用アルコールに「ル」液の色が仲々とれないため、無水アルコールにて一度洗滌し脱色の最後に脱色液中に50%アンチホルミン液2~3滴を滴下、良く振盪することによりヨードの色が褐色され、操作を簡単にすることが出来ると同時に、蛋白膜を取ることが出来るので非常に見易くなる(表3)。

表3. ルゴール染色せる蛔虫卵の無水アルコール脱色(染色卵%)

脱色時間 (分)	生 卵		死 卵	
	13°C	37°C	13°C	37°C
5	100.0	100.0	0	0
10	100.0	80.3	0	0
20	100.0	25.4	0	0
30	100.0	5.0	0	0

第3節 ルゴール染色法の術式

以上述べた事より次の様な術式を選んだ。先ず被検卵子をスピットグラスにとり「ル」液を37°Cにて10分間作用し、遠沈上清を去り無水アルコールにて一度洗滌し、次に無水アルコールで5分間脱色し、最後に此の脱色液中に50%アンチホルミン液2~3滴を滴下良く振盪し、遠沈上清を去り水道水にて一度洗滌して検鏡する。検鏡所見は生卵はヨードの色をとり茶褐色に染色されるが、未受精卵、死卵は無色である。

第5章 各種殺卵法とズダンIII染色法並びにルゴール染色法

ズダンIII染色法並びにルゴール染色法は共に加熱殺卵の場合には、比較的好く生死判別に役立つも、他の方法で生じた死卵の鑑別には必ずしも正確でない。「ル」染色法が生死判別法としてどの程度の信頼度があるか、又ズダンIII法と比較してどうであるかを見るために、種々の条件の下で殺卵した豚蛔虫卵についてルゴール染色並びにズダンIII染色を行い、培養法との比較研究を行つた。

第1節 実験材料及び実験方法

実験材料は前章同様に豚蛔虫子宮卵を使用した。殺卵法としては化学薬剤によるものと、物理的方法を用いた。先ず化学薬剤としては、20%ホルマリン、2%石炭酸、0.5%アンモニア、10%塩酸、5%硝酸、20%硫酸、2%クレゾール石鹼液、1000倍二硫化炭素、飽和硫化水素水を使用した。100cc入りの褐色共栓の瓶に各々50cc入れ、前記蛔虫卵を投じ25°Cの孵卵器中に置いて時日を追つて、「ル」染色、ズダンIII染色並びに培養を行つた。培養は25°Cの孵卵器中にてカワラケ培養を行い、30日後に検鏡し生死の判定をした。次に物理的方法中温熱作用の場合は、マッチの頭に蛔虫卵をつけ50°C以上の温液に種々の時間つけた卵について、「ル」染色、ズダンIII染色、培養を行つた。無酸素作用の実験では嫌気鐘の中にカワラケにのせ適度の水分を与えてある蛔虫卵を、黄燐燃焼法により無酸素状態としたものを数本作り25°Cの孵卵器に入れ、夫々時日を追つて開放して「ル」染色、ズダンIII染色、培養を行つた。乾燥殺卵の場合は和紙に蛔虫卵を付け、塩化カルシュームの入ったデシケータの中に入れて、温度5°C~15°Cの暗室中に置き必要の日にデシケータを開け、「ル」染色、ズダンIII染色及び培養を行つた。

第2節 実験成績

第1項 化学的殺卵

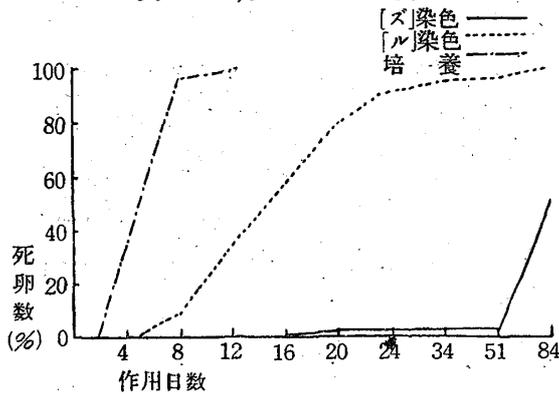
1) 20%ホルマリン殺卵によるもの

2日では培養により全卵仔虫となり、「ル」染色では全卵染色され、ズダンIII全卵不染である。8日では大部分卵は死滅するが、「ル」染色では10%不染、ズダンIIIでは全く染色されるものはない、其後「ル」不染率は上昇するが、ズダンIII染色率は仲々高まらず、84日後に「ル」染色は全卵不染となるが其の時ズダンIIIでは50%が染色されるにすぎない(表4)。

2) 2%石炭酸殺卵によるもの

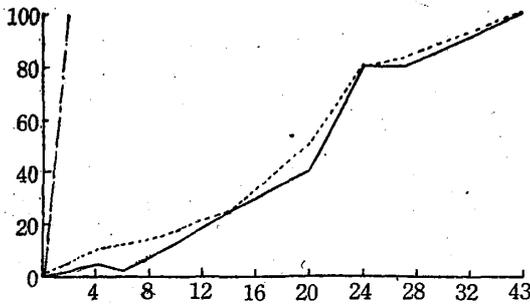
2日にて全卵死滅するが「ル」染色では5%不染で

表4. 20% ホルマリン殺卵



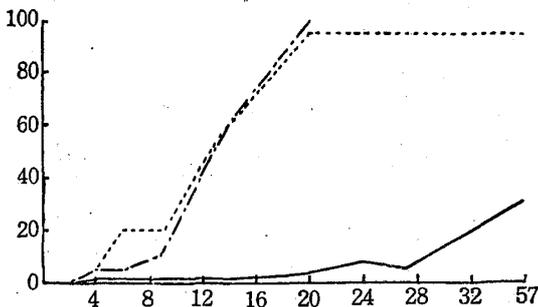
ありズダンIIIでは3% 染色である, 其の後「ル」不染卵, ズダンIII染色卵がほぼ平行して増加し43日にて始めて両者100%となる(表5)。

表5. 2% 石炭酸殺卵



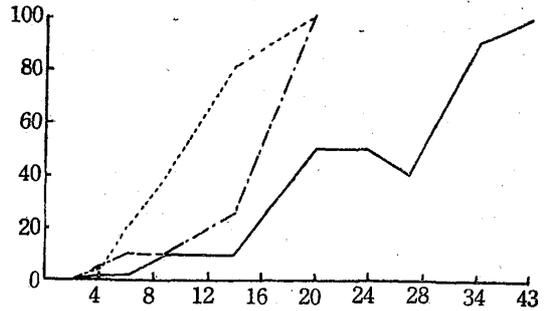
3) 0.5% アンモニア殺卵によるもの  
9日目頃より死滅卵増加すると共に「ル」不染卵も同様に増加し20日で全卵死滅する, 「ル」染色では95% 不染であるが, 其の時のズダンIII染色率は4% にすぎず, 57日後も25% にすぎない(表6)。

表6. 0.5% アンモニア殺卵



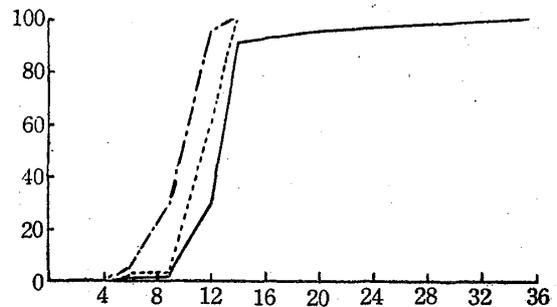
4) 10% 塩酸殺卵によるもの  
死滅卵数より「ル」不染卵数の方が常に多く, 14日では25% が死滅されるが「ル」染色では80% 不染でありズダンIIIでは10% 染色である, 20日で全卵死滅, 「ル」染色で全卵不染となる。ズダンIIIでは43日後に始めて全部染色される(表7)。

表7. 10% 塩酸殺卵



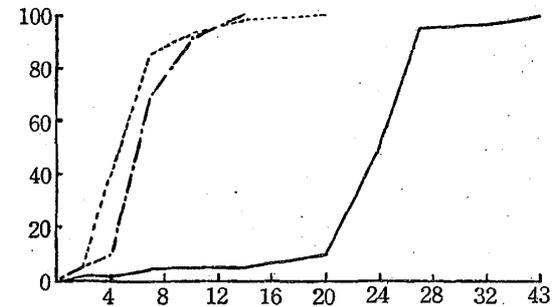
5) 5% 硝酸殺卵によるもの  
12日で大部分死滅するが「ル」染色は60% 不染, ズダンIIIは30% 染色であり, 14日で全卵死滅, 「ル」染色全不染, ズダンIIIでは90% 染色し結果が比較的一致する(表8)。

表8. 5% 硝酸殺卵



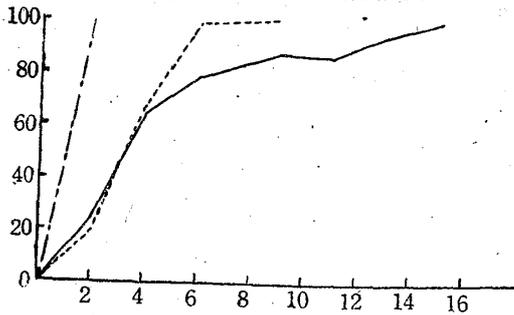
6) 20% 硫酸殺卵によるもの  
培養, 「ル」染色略々同様で14日で全卵死滅, 「ル」染色98% 不染となるが, ズダンIII染色では僅かに5% 染色するにすぎず, 全卵染色するのは43日後であつた(表9)。

表9. 20% 硫酸殺卵



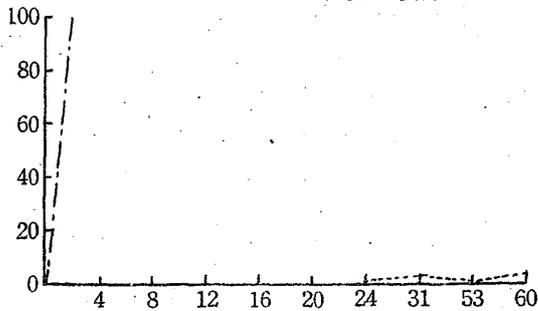
7) 2% クレゾール石鹼液殺卵によるもの  
2日で全卵死滅するが「ル」染色では20% 不染, ズダンIIIで23% 染色し, 其の後「ル」染色, ズダンIII染色略々同様の経過をとり, 6日で「ル」染色98% 不染, ズダンIII78% 染色となつた(表10)。

表10. 2%クレゾール石鹼液殺卵



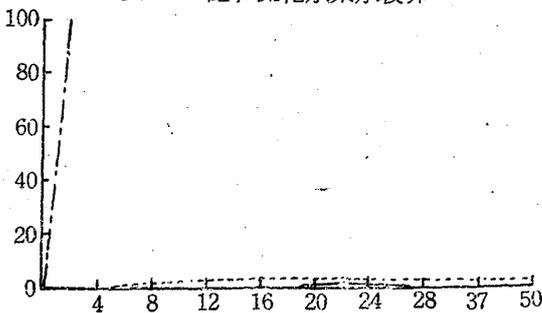
8) 1000倍二硫化炭素殺卵によるもの  
 2日で全卵死滅するが「ル」染色では60日後に僅か4%不染となるにすぎず、ズダンIIIでは全く染色されない(表11)。

表11. 1000倍二硫化炭素殺卵



9) 飽和硫化水素水殺卵によるもの  
 2日で全卵死滅するが二硫化炭素の場合同様50日経過しても、「ル」不染は極めて少数であり、ズダンIII染色も同様極めて染色され難い(表12)。

表12. 飽和硫化水素水殺卵

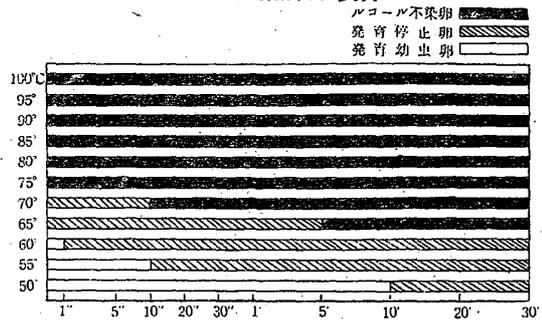


第2項 物理的殺卵

1) 温熱作用によるもの

65°C以上には於ては1秒作用させると卵は死滅するが、「ル」染色は65°Cでは5分、70°Cでは10秒以上作用させないと不染とならない、このことはズダンIIIでも同様である。作用温度が低くなる程、培養結果と「ル」不染、ズダンIII可染となる時間の開きが大きくなる(表13)。

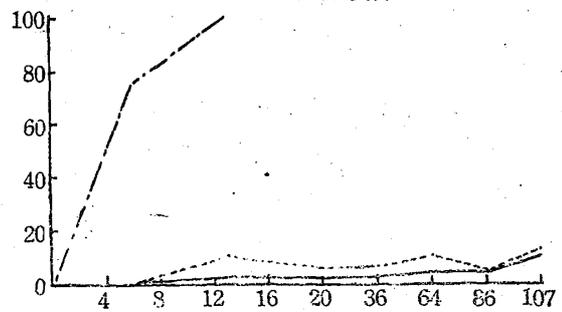
表13. 温熱作用殺卵



2) 無酸素状態にせるもの

13日で全卵死滅するが「ル」不染率、ズダンIII染色率共に悪く107日経過しても約10%にすぎない(表14)。

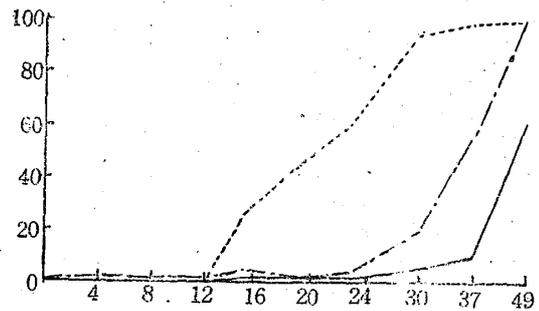
表14. 無酸素殺卵



3) 乾燥によるもの

「ル」不染率常に高く、49日で全卵死滅、「ル」全不染となり、ズダンIII 60%可染となる(表15)。

表15. 乾燥殺卵



第6章 子宮内卵のズダンIII及び

ルゴール染色

第1節 実験材料及び実験方法

千葉郊外千葉屠場に於て屠殺せる豚より得た生きた豚蛔虫を使用した、10隻の成熟した雌虫を選び子宮及び輸卵管をとりだしこれを次の6部に分けてその卵について、ズダンIII染色、ルゴール染色を行い同時に顕微鏡下にて卵殻の成熟状態を観察した。使用した蛔虫の体長は最大37.0cm 最少28.7cm 平均30.9cm であり、子宮長は最大24.0cm 最少18.9cm

平均22.1 cmであった。

- 1) 子宮後端部
- 2) 第2部位, 子宮後端部と子宮中央部の中間を云う。
- 3) 子宮中央部
- 4) 第4部位, 子宮中央部と子宮始部の中間を云う。
- 5) 子宮始部
- 6) 輸卵管

第2節 実験成績

第1項 染色所見

子宮後端部の卵に於ては、ズダンⅢでは全く染色せられず、「ル」染色に於ては不染卵は殆んどない。子宮第2部位に於ても同様である。子宮中央部に於ては少数ながらズダンⅢ染色卵、「ル」不染卵が出て来る。子宮第4部位に於てはズダンⅢ染色では約30%染色され、「ル」染色では約70%が不染となる。子

宮始部に於ては大部分ズダンⅢ染色卵、「ル」不染卵となり。輸卵管の卵は全部がズダンⅢに染色され、「ル」染色では脱色された(表16)。

第2項 顕微鏡的所見

- 1) 子宮後端部の卵は外形糞便中のものと等しく、蛋白膜、卵殻共に厚く、卵細胞の両極には半月状部がある。
- 2) 第2部位の卵は子宮後端部の卵と同様である。
- 3) 子宮中央部の卵は蛋白膜薄く卵殻は厚い、約半数に半月状部を認む。
- 4) 第4部位の卵は蛋白膜薄く、又はこれを欠き、卵殻は薄い。
- 5) 子宮始部の卵は蛋白膜なく、卵殻又薄く細胞充満す。
- 6) 輸卵管の卵は卵殻を被らず、形大きく長楕円形、時に不正形である。

表16. 子宮内卵のズダンⅢ及びルゴール染色(染色卵%)

蛔虫番号	染色法	子宮後端	第2部位	子宮中央	第4部位	子宮始部	輸卵管
I	ズダンⅢ	0	0	0	10.3	94.8	100
	ルゴール	100	100	100	43.5	0	0
II	ズダンⅢ	0	0	0	60.4	100	100
	ルゴール	99.5	100	97.2	30.2	0	0
III	ズダンⅢ	0	0	3.1	13.1	90.8	100
	ルゴール	100	100	98.2	25.3	4.3	0
IV	ズダンⅢ	0	0	0.2	10.3	100	100
	ルゴール	100	100	98.0	35.4	0	0
V	ズダンⅢ	0	0	2.0	40.5	100	100
	ルゴール	100	100	98.2	30.2	0	0
VI	ズダンⅢ	0	0	0	35.2	100	100
	ルゴール	100	100	100	34.8	0	0
VII	ズダンⅢ	0	0	0	59.2	89.4	100
	ルゴール	100	100	100	2.0	0	0
VIII	ズダンⅢ	0	0.5	2.0	50.2	98.0	100
	ルゴール	100	99.0	96.5	35.5	0	0
IX	ズダンⅢ	0	0	0	40.2	100	100
	ルゴール	100	100	99.0	10.5	0	0
X	ズダンⅢ	0	0	0	10.2	83.9	100
	ルゴール	100	100	100	53.4	0	0
平均	ズダンⅢ	0	0.05	0.73	32.96	95.69	100
	ルゴール	99.95	99.9	98.69	30.08	0.43	0

第7章 卵殻剝離とズダンIII及び

ルゴール染色

蛔虫卵の卵細胞が普通の染色剤で容易に染色されず、又種々の薬剤に対し抵抗強く長く生存することは一にその強力なる卵殻によるものと思われる。著者は此の卵殻の剝離を試み、これにズダンIII染色、「ル」染色を行つた。

第1節 実験材料及び実験方法

生きた雌豚蛔虫を解体し子宮後端1cm迄の卵を使用した。而して顕微鏡的に成熟した卵殻を有することを確めた。

1) 蛋白膜の剝離

30%のアンチホルミンをスピッツグラスにとりこれに虫卵を投じ5分間振盪してよく作用させて後、水道水にて何回も遠洗を行ないながら水道水で良く洗滌した。

2) 卵殻第1層の剝離

スピッツグラス内で蛋白膜の剝離を行つた卵に濃硝酸を加え強く振盪して30分間作用させ水道水にて良く洗滌し、卵殻第1層を剝離した。

3) 卵殻第2層の剝離

第1層剝離卵にアンチホルミン原液をスピッツグラス内で一夜作用せしめ、水道水にて良く洗滌し第2層剝離卵を作つた。

4) 卵殻第3層は剝離困難にして強酸、強アルカリ等を作用させると卵細胞も同時に破壊されてしまうので行わなかつた。

5) 生卵と煮沸殺卵せる卵とを半々に混じこれにつき蛋白膜、卵殻第1層、第2層の剝離を行つた。

以上の如く処理した卵につきズダンIII染色、「ル」染色を施行した。

第2節 実験成績

1) 蛋白膜のみ剝離した卵に於てはズダンIII染色性、「ル」染色性共に変化なく、ズダンIIIでは全部不染であり、「ル」染色では全部染色される。

2) 卵殻第1層剝離卵に於ても又両染色性に变化なく、ズダンIII全不染、「ル」全卵可染である。

3) 卵殻第2層剝離卵に於ては顕微鏡的には卵殻は非常に薄くなつてゐるが、ズダンIIIでは全部不染であり、「ル」染色では全卵染色された。

4) 生卵と煮沸殺卵との混合のものに於ては表17の如く蛋白膜、卵殻第1層剝離によつてズダンIII染色性、「ル」染色性に变化は認められないが、卵殻第2層の剝離を行つたものではズダンIII染色率、「ル」不染率が低下することを認めた(表17)。

表17. 卵殻剝離と染色性

	蛋白膜剝離	第1層剝離	第2層剝離
ズダンIII染色卵数	54.5%	52.3%	8.2%
ルゴール不染卵数	53.0%	55.2%	5.3%

第8章 薬液中煮沸卵のズダンIII及び

ルゴール染色

第1節 実験材料及び実験方法

実験材料は前同様豚蛔虫の子宮内卵を使用した。スピッツグラスにこの卵を投じ、5%石炭酸、20%石炭酸、液状石炭酸、20%ホルマリン、35%ホルマリン、5%クレゾール石鹼液、20%クレゾール石鹼液、クレゾール石鹼原液、20%硫酸、40%硫酸、7%アンモニア、14%アンモニアを各々5ccずつ入れ、30分間重湯煎中にて煮沸せしめたものを良く水洗し、ズダンIII染色、並びに「ル」染色を行つた。

第2節 実験成績

「ル」染色に於ては全て不染であつたが、ズダンIII染色では5%石炭酸、5%クレゾール石鹼液、20%硫酸、40%硫酸、7%アンモニア、14%アンモニア等では濃染するが、20%ホルマリン、35%ホルマリンでは中等染であり、20%クレゾール石鹼液、クレゾール石鹼原液では淡染であり、20%石炭酸、液状石炭酸と煮沸したものは全く染色されなかつた。

第9章 螢光色素による生死判別

螢光物質に紫外線をあてると可視光線に変じ、その物質の性質に依つて種々の綺麗な色を出すことは古くから知られているが、これを光学顕微鏡に応用したのが螢光顕微鏡である。植物の組織は一般に美麗な螢光を發するも、動物の組織は螢光を發することが少ない。蛔虫卵も螢光色素を作用せずに螢光顕微鏡で観察したのでは明らかに認められる様な螢光を發しない。併し加熱死卵を螢光色素オウラミンで染色して鏡見すると、暗緑色の視野に卵細胞が黄緑色に螢光を發して見える。又アクリジンオレンジ(以下「ア」と記す)では暗緑色の視野に黄緑橙色の螢光を發し生卵と区別される。そこで著者は本法を以つて確実に蛔虫卵の生死判定が可能かどうかを追試し、著者のルゴール法と比較検討せんとして次の実験を行つた。

第1節 子宮内卵のルゴール染色及び

螢光色素処理

第1項 実験材料及び実験方法

蛔虫卵は前述の如く6部に分けて染色した。使用した螢光顕微鏡光源装置は千代田製の超高压水銀

灯、紫外線フィルターは400 m $\mu$ 透過のもの、接眼フィルターは千代田製Y型を使用した。顕微鏡は同じく千代田製のものを使用した。染色方法は「ル」染色は既述の如くであるが、「オ」染色は虫卵をスピッガラスに入れ1000倍溶液にて15分作用させた。「ア」染色は1000倍溶液を15分作用させて行つた。而して標本は水道水にて数回洗滌して検鏡した。

第2項 実験成績

子宮後端部より子宮中央部迄の卵は「ル」染色では

殆んど染色され、「ア」、「オ」染色では殆んど染色されない。子宮第4部位の卵は「ル」染色で約40%染色される、即ち約60%が不染であるのに対し、「ア」、「オ」染色では約十数%が染色されるにすぎず、ズダンIII染色の時と同様な結果を示す。子宮始部、輸卵管の卵は「ル」では全部不染であり、「ア」、「オ」では大部分染色される。「ル」染色と此等螢光色素との関係はあたかも「ル」とズダンIII染色の場合と同じ様な関係にある(表18)。

表18. 子宮内卵のルゴール染色及び螢光色素染色比較 (染色卵%)

蛔虫番号	染色法	子宮後端	第2部位	子宮中央	第4部位	子宮始部	輸卵管
I	ル ゴ ー ル	100	100	100	40.5	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	0	8.2	100	100
	オウラミン	0	0	0	9.0	100	100
II	ル ゴ ー ル	100	100	98.0	34.2	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	0	13.2	100	100
	オウラミン	0	0	0	8.5	100	100
III	ル ゴ ー ル	100	100	97.3	32.5	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	1.0	20.4	100	100
	オウラミン	0	0	0	18.7	100	100
IV	ル ゴ ー ル	100	100	100	60.2	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	0	12.0	100	100
	オウラミン	0	0	0	14.8	99.0	100
V	ル ゴ ー ル	100	100	100	23.4	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	0	11.3	100	100
	オウラミン	0	0	0	10.5	100	100
平均	ル ゴ ー ル	100	100	99.1	40.2	0	0
	アクリヂンオレンジ	0	0	0.2	13.0	100	100
	オウラミン	0	0	0	12.3	99.8	100

第2節 各種殺卵法とルゴール染色法

並びに螢光色素染色法

「ア」染色が生死判別法としてどの程度の信頼度があるか、又「ル」染色法と比較して見るために種々の条件の下で殺卵した豚蛔虫卵について培養法を対照として両染色法を試みた。

第1項 実験材料及び実験方法

実験材料は前に述べたと同様なものを用い、殺卵には20%硫酸、10%塩酸、0.5%アンモニア、20%ホルマリン、2%石炭酸、1000倍二硫化炭素を使用した。100 cc入りの褐色共栓の瓶に各液50 cc容れ、この中に蛔虫卵を投じ25°Cの孵卵器中に置き、時日を追つて「ル」染色、「ア」染色並びに培養試験を行

つた。

第2項 実験成績

1) 20%硫酸殺卵によるもの  
培養では3日頃より死卵数増加し12日で全卵死滅する。「ル」染色不染卵は3日頃より増加し12日では約90%となる。「ア」では仲々染色され難く、染卵は12日では約5%にすぎず、40日後に始めて100%となる(表19)。

2) 10%塩酸殺卵によるもの  
「ル」不染率の方が培養死卵数より常に高く、17日で培養に於て全卵死滅、「ル」では全部不染となつた。「ア」染色は17日では約30%陽性、全卵染色されるのは30日後であつた(表20)。

表 19. 20% 硫酸殺卵

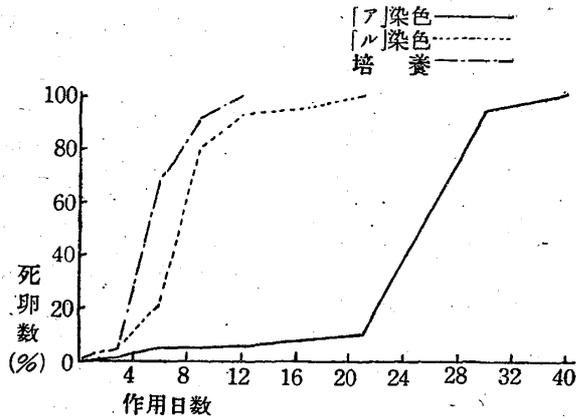
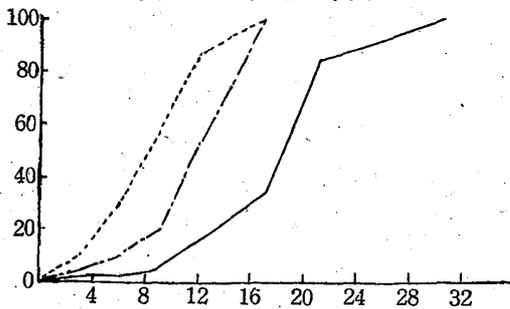


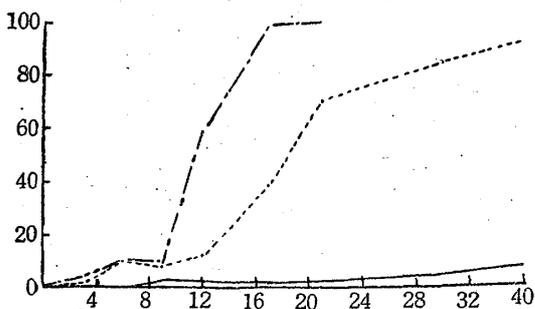
表 20. 10% 塩酸殺卵



3) 0.5% アンモニア殺卵によるもの

17日で大部分卵は死滅するが、「ル」染色約40%不染であり、「ア」では極少数染色されるにすぎず、40日後に於ても略同様である(表21)。

表 21. 0.5% アンモニア殺卵



4) 20% ホルマリン殺卵によるもの

9日で卵は死滅するが、「ル」では約10%不染であり、「ア」では2%染色されるにすぎず、其の後「ル」不染率は上昇するが「ア」染色に於ては40日後も同様の状態であつた(表22)。

5) 2% 石炭酸殺卵によるもの

3日で卵は死滅するが、「ル」不染率、「ア」染色率略同様の経過をとり40日後に漸く夫々100%となつた(表23)。

6) 1000倍二硫化炭素殺卵によるもの

3日で卵は死滅するが、40日後に於ても「ル」不染

率、「ア」染色率共に殆んど上昇しなかつた(表24)。

表 22. 20% ホルマリン殺卵

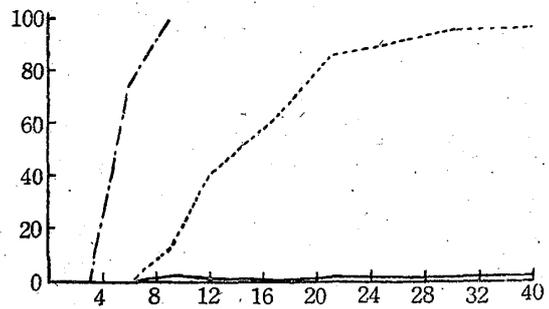


表 23. 2% 石炭酸殺卵

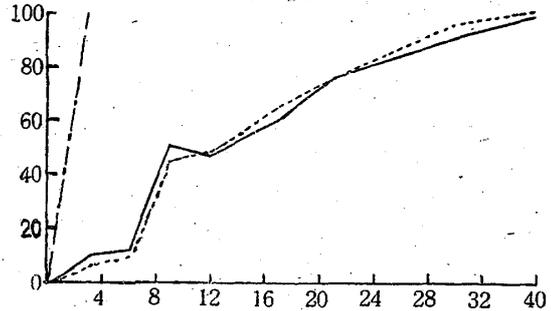
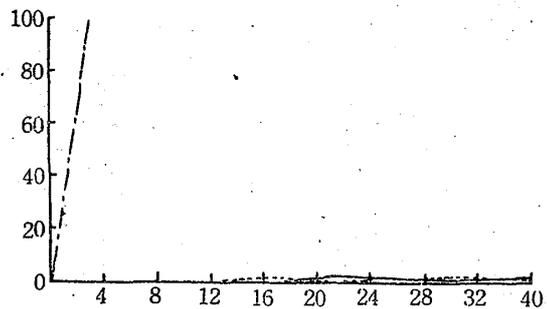


表 24. 1000倍二硫化炭素殺卵



第10章 考 察

蛔虫卵は死滅すると卵細胞と共に卵殻が破壊されて、卵殻の透過性が亢進するものと考えられる。死滅してもズダンⅢに染色されるものもあり染色されないものもあることは、卵殻の破壊程度即ち透過性に関係があるものと思われ、死滅しながらズダンⅢに染色される程度迄卵殻の透過性の亢進していない卵を、酸、アルカリ等の前処置を行い、ズダンⅢ染色性を高めんと思ひ、2%石炭酸、2%クレゾール石鹼液、無酸素、20%ホルマリン、2000倍二硫化炭素等で殺卵せるものを前処置を行い染色を行つたが、発煙硝酸では卵殻に対する作用強く100%染色される様になるが生卵も100%染色される。濃硫酸も卵殻に対する作用が強すぎ、濃塩酸も生卵でも30分作用させると染色されて来るものあり、濃硝酸、アンチホルミン等では殆んど変化がなく、死卵の染

色性を高めるものは生卵に対しても卵殻を破壊してしまうので応用出来なかつた。なおズダンⅢ染色にアルコール固定は不用と思えた。

生卵も死卵も卵細胞が全部染色される如き染色剤があるならば、生きた細胞と死んだ細胞とで染色され方が異なるであろう、併し蛔虫卵はキチン質で出来た厚い卵殻を持つており、種々の染色剤を作用させて見たが生卵をそのままの状態に染色する色素はなかつた。ところが「ル」液を作用させると生卵も死卵も細胞がヨードの色により褐色に染色されることを発見した。「ル」液を作用させると生卵の細胞よりも煮沸死卵、未受精卵の細胞の方が強く染色されるが、無水アルコールで脱色すると煮沸死卵、未受精卵は脱色されて無色となるが生卵は依然染色されている。そこで「ル」液を用い生死判別を行わんとし染色時間、脱色時間について実験し一定の術式を定めた。

次に「ル」染色法が生死判別法としてどの程度の価値があるか、又ズダンⅢ染色法と比較してどうかを詳細に検べる為に、種々の条件で殺卵した卵につき日時を追つて培養法と比較しながら検査を行った。5%硝酸殺卵では「ル」染色、ズダンⅢ染色、培養が比較的一致した。10%塩酸、乾燥殺卵では培養成績より常に「ル」染色で判定した死卵数の方が多く、ズダンⅢでは培養成績より常に少なかつた。0.5%アンモニア、20%硫酸殺卵では培養と「ル」染色が略一致しズダンⅢ染色率は遙かに低かつた。2%石炭酸、2%クレゾール石鹼液殺卵では培養は2日で全卵死滅するが、「ル」染色、ズダンⅢ染色は培養より遅れて略平行して「ル」不染率、ズダンⅢ染色率が高まるのが見られた。温熱作用では75°C以上の高温では培養、「ル」染色、ズダンⅢ染色とも一致するが、温度が低くなるにつれて培養成績との間に開きが出来て来る。1000倍二硫化炭素、飽和硫化水素水、無酸素殺卵等では培養により卵が死滅しても「ル」不染率、ズダンⅢ染色率共に非常に悪く、長時日を経過しても「ル」不染、ズダンⅢ染色となつて来ない。かように「ル」不染率、ズダンⅢ染色率は殺卵方法により種々であり、卵が急激に短時日の間に死滅するから早く「ル」不染、ズダンⅢ染色となつて来るものではなく、薬液の殺卵力には無関係である。全般的に見て「ル」染色の方がズダンⅢ染色より培養成績に近い結果が得られた。

吉田、松崎等は子宮内卵のズダンⅢ染色を行い、卵殻の未だ形成せられざるか若しくは形成不十分な

間は、仮令卵細胞死滅せざるも能く染色すると述べ、染色の可能不可能は恐らく卵殻の透過性に由るものであらうと述べた。著者は「ル」染色の本態を知るべく子宮内卵に就いて「ル」染色を行うと同時にズダンⅢ染色と比較を行った。子宮始部の卵の如く未だ卵殻が薄く卵殻の透過性が高いと思われるものにあつては「ル」染色では全部不染であり、ズダンⅢ染色では殆んど全部染色された。子宮後端の如く卵殻の發育の完成されたものでは「ル」染色では脱色されず殆んど全部染色され、ズダンⅢ染色では全部不染であつた。これは「ル」染色もズダンⅢ染色同様卵殻の透過性に関係し、一度「ル」液により全卵染色されるが、卵殻の透過性の高いものは無水アルコールにより脱色され不染卵として見られるのであらう。併し第4部位の卵の如く子宮始部よりは卵殻が發育しているが未だ完成されない卵にあつては、「ル」染色では70%不染であり、ズダンⅢ染色では30%染色となり兩者の間に開きが出来、これはズダンⅢ染色より「ル」染色の方が卵殻の透過性のより低いものをも鑑別することが出来ることを示していると思われる。

蛔虫卵の卵細胞が種々の染色剤で容易に染色されず、又種々の薬剤に対し抵抗強く長く生存するのは一つにその強力な卵殻によるものと思われる。著者は此の卵殻の剝離を行い卵殻剝離卵に就き「ル」染色、ズダンⅢ染色を行った。先ず生卵に就いて、蛋白膜、卵殻第1層、卵殻第2層の剝離を行い染色を行ったが、第2層迄剝離しても「ル」染色では全卵染色され、ズダンⅢ染色では全卵不染であり、染色性に変化がない。煮沸死卵では卵殻第2層迄剝離すると「ル」不染卵数、ズダンⅢ染色卵数が減少する、これは死卵が卵殻の第3層が破壊されていて第2層迄剝離すると卵が破壊され死卵即ち「ル」不染卵、ズダンⅢ可染卵が減少するためによるものと思われ、卵殻の透過性に重大な意義をもつものは卵殻第3層であると思われる。

「ル」染色、ズダンⅢ染色かはたして卵殻の透過性にのみ関係し、卵内容の変化には関係が無いかどうかを検するため各種の薬液と共に煮沸殺卵せる卵につき「ル」染色、ズダンⅢ染色を行ったが、ズダンⅢ染色では、20%石炭酸、液状石炭酸と煮沸したものは不染であり、20%クレゾール石鹼液、クレゾール石鹼原液と煮沸したものは淡染色であつた。「ル」染色では全卵不染であつた。小田も又液状石炭酸、純リゾール等と共に煮沸殺卵せる卵はズダンⅢに染色

されず、ズダンⅢ染色は卵殻の透過性と卵内容の変化にも関係ありと述べている。著者は「ル」染色は卵殻の透過性のみに関係し、ズダンⅢ染色は卵殻の透過性と卵内容の変化に関係するものと思ふ。而して生卵の細胞と死卵の細胞とで「ル」液に対する親和性が異なるであろうと思われるが確実なことは不明である。

次に螢光色素、オウラミン、「ア」を用いて染色を

行つた。螢光色素染色も卵殻の透過性に関係するものと思われ、子宮内卵の染色に於てはオウラミン、「ア」等より「ル」染色の方がより透過度の低い卵をも鑑別することが出来るものと思われた。又各種条件で殺卵した卵についての螢光色素染色はズダンⅢ染色の場合と同様の経過をとり、卵が死滅しても染色率が低く特に優れているとは思えなかつた。

## 第11章 結 論

著者は染色による蛔虫卵の生死判別法の研究に於て、先ず既知の方法を追試し更に種々の色素について検索中比較的優れた方法を見出した。こゝに得た成績を要約すると次の通りである。

- 1) ズダンⅢ染色法によつて加熱死蛔虫卵は好染するが他の方法で殺卵された死卵の染色性は高くない。これを亢進させる種々の前処置を試みたが良法は見出せなかつた。
- 2) ルゴール氏液で染色された生卵はアルコールで脱色しないが死卵は脱色する。これを利用して蛔虫卵の生死判別が可能である。本法は絶対的価値はないが、ズダンⅢ染色法より優秀であり、充分使用出来る。
- 3) ルゴール染色法は卵殻の透過性のみに関係するものゝ如く、殺卵の方法により多少の差異はあるが多くの場合死滅することによりある程度卵殻の透過性が亢進し、そのため脱色を促進するものと考えられる。
- 4) 蛔虫卵の卵殻透過性に重大な意義をもつものは卵殻第3層と推定される。
- 5) 螢光色素による染色の生死鑑別法としこの価値はズダンⅢ染色と略同様で、ルゴール染色法より劣ると思われる。

稿を終るに当り、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜わり又御校閲を辱うした恩師谷川教授に深甚なる謝意を表すると共に、種々御助言御協力を賜わつた田波助教授、実川講師並びに衛生学教室員各位に深く感謝致します。

## 主 要 文 献

- |                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 1) 小泉誠治：日本之医界，18，79，1928.           | 17) 皆川弘毅・皆川静明：東医新誌，2136，1919. |
| 2) 小泉誠治：東医新誌，2322，1923.             | 18) 浅田順一・高亀良樹：日病会誌，13，1923.   |
| 3) 小泉誠治：大阪医会誌，23，9，12，1924.         | 19) 大場辰之允：台湾医会誌，227，1923.     |
| 4) 小泉誠治：大阪医会誌，24，2，1925.            | 20) 小林晴次郎：朝鮮医会誌，27，1919.      |
| 5) 松崎義周：慶応医学，8，6，1928.              | 21) 小林晴次郎：朝鮮医会誌，38，1922.      |
| 6) 内藤和行・濃野垂：日新医学，17，10，1928.        | 22) 小林晴次郎：南満医会誌，8，2，1921.     |
| 7) 小山石太郎：東医新誌，1778，1912.            | 23) 小林晴次郎：日本之医界，11，1，1921.    |
| 8) 土井壽正：医事新聞，874，1913.              | 24) 青木忠博：慶応医学，14，2，1934.      |
| 9) 坪井速水：日内会誌，1，1903.                | 25) 谷川久治：千葉医会誌，27，2，1951.     |
| 10) 小田又蔵：朝鮮医会誌，89，1928.             | 26) 松村龍雄：小児臨床，4，9，1951.       |
| 11) 吉田貞雄：大阪医会誌，22，3，1923.           | 27) 和泉精一：臨牀医学，36，1，1951.      |
| 12) 井田正二：慶応医学，10，6，12，1930.         | 28) 岡常晴：日本寄生虫学会，昭29.          |
| 13) 堀沢治吉：日病会誌，4，1915.               | 29) 森下薫：蛔虫及蛔虫症，昭28.           |
| 14) 吉田貞雄：日病会誌，13，1923.              | 30) 宮川米次：臨床人体寄生虫病学（蠕虫病篇），昭23. |
| 15) 沢田卓・片田武揚：愛知医会誌，31，1925.         | 31) 工藤得安・趙仁濟：螢光顕微鏡学，1950.     |
| 16) 吉田貞雄・堀田邦之助：東医新誌，2125，2126，1919. |                               |