

第2報 自然沈降検査法に於ける孢子検出率 増進に關する試験

池田正五郎
岡卓郎

II. Shōgorō IKEDA and Takurō OKA: — On the method of accumulation of pebrin-spore by gravitation.

緒言

著者等は前報に於て柞蠶微粒子病孢子の検査方法として既に實施され、又は公表されたる各種方法中、自然沈降検査法が最も孢子發見率高き成績を示したる點を報告した。

併して本法に關しては、既に家蠶の微粒子病孢子検査に於て多數の人々に依り實驗が行はれ、普通検査法より遙かに孢子發見率高き事が認められてゐる。然れども之が實施方法に就ては實驗者に依り未だ一致せざる點が尠くない。

著者等は本法を柞蠶微粒子病孢子の検査に應用する場合の實施方法に就て、各種の方面より實驗した。以下夫等の結果を報告する。

I. 試験方法

(1) 供試沈降管

本試験には、昭和商行蠶具製作所に於て製作されたセルロイド製管の上下にゴム栓を附したる沈降試験管にして、口径14mm強、下部細く、その口径7mm弱のものである。

(2) 供試材料

供試母蛾又は雄蛾は、安陽産又は萬家嶺産の無毒のものにして生體のまま供用した。供試微粒子孢子は本春發蛾せる有毒蛾より遠心分離器を以て純粹に孢子を集め、自然乾燥せるものを其の都度清水に浮游せしめて使用した。

(3) 實驗材料

供試無毒蛾體は頭胸部を除き腹部のみを試験區數に應じて等分に分割し、之を1箇宛集めたるもの1蠶分に對し、所定の水(普通3c.c.)を加へて磨潰し、脱脂綿を以て濾過し、苛性加里液を一定量加へ、所定量の孢子浮游液を注加し試験した。特に記載なき以外は被檢液の苛性加里濃度を0.5%とした。猶鏡檢には、Leitz 顯微鏡800倍(III×8)を使用し、オキュラーネットマイクロメーターを以て孢子を算定した。

II. 試験成績

(1) 磨潰液に關する試験

自然沈降法に於ける磨潰液は蛾體に散在寄生する孢子を磨潰操作により、充分に液中に游離せしむるに共に、沈降操作の際、孢子の沈降を速ならしむる如きものなるを要する。

從來より使用されつゝある苛性加里は、脂肪組織其他の組織をよく溶解し、孢子を液中に游離せしむるには甚だ有效であるが、液を精稠ならしめ、孢子の沈降を遅からしむるの憾あり。殊に柞蠶蛾の如く、短期間内に検査終了を要するものに於ては、必然的に生體検査を行ふ必要

を生ずる。此の際に於て、液は一層粘稠となり易き傾向がある。著者等は磨潰液濾液中の胞子の沈降を速かならしむるため、次の実験を試みた。即ち、既述の方法により被検液(3c.c.)を作り、一定胞子液を加へ、更にフォルマリン1%液、エチルアルコール10%液、メチルアルコール10%液を0.15~0.30c.c.加へて、常法により1晝夜静置後検出胞子数を比較せるに、苛性加里のみの對照區に比し、他の各區は何れも検出胞子数の増加せるを認めた。尙使用藥品中、フォルマリン區最も良好なる成績を示せり。即ち次表に示す如くである。

第 1 表

要 項	區 別 注 加 量(c.c.)	對 照 (水)		1%フォルマリン		10%エチル アルコール		10%メチル アルコール	
		0.15	0.30	0.15	0.30	0.15	0.30	0.15	0.30
1		9	7	31	15	12	8	16	13
2		27	18	35	22	33	13	25	18
平 均		18.0	12.5	28.0	18.5	22.5	10.5	20.5	15.5
指 數		100	100	150	148	125	84	114	124

備考 液温20℃、2鏡面40視野合計胞子数を示す。

磨潰液にアルコールを使用する事に就ては、既に家蠶に於て三谷、伊與田兩氏の成績あり。その成績に依れば、アルコールは胞子の沈降を速かならしむるも、實際管底に於て検出し得る胞子数は却つて少しも述べた。著者等の場合は被検液に對しその少量を加へたるを以て、上記の如き成績を示したるものと考へる。

次に、以上の試験に依り、最も好成績を示したるフォルマリン1%液の注加量に關し行ひたる結果は次の如くである。

第 2 表

被検液3c.c. 對する注加量	實 驗 例	1	2	3
對 照		8	16	47
0.1c.c.		12	17	—
0.3	◇	15	22	50
0.6	◇	8	15	40
1.0	◇	11	13	—

備考 静置時間24時間、液温21℃、2鏡面40視野合計胞子数を示す。

上表に依れば被検液3c.c.に對し、0.1乃至0.3c.c.加へたるもの検出胞子数多く、フォルマリンの量それ以上に及ぶ時は却つて検出胞子数少き結果を示した。

(2) 苛性加里の濃度と沈降集胞子検出數

苛性加里の濃度と沈降集胞子数の關係に就ては、既に家蠶に於て、勝又、河内氏等の實驗がある。著者等も亦之が關係につき反復試験したるに、2%乃至0.3%の範圍に於ては、苛性加里の濃度低き程検出胞子数多きを認めた。

その結果の一部を表示すれば次の通りである。

第 3 表 (其の1)

被検液苛性加里濃度	1 例	2 例	平均 1 視野胞子数
(%) 2.0	16	42	1.5
1.0	32	56	2.2
0.5	110	70	4.5
0.3	86	104	4.8

備考 被検液3c.c.、静置時間24時間、液温21°C、2 鏡面30視野合計胞子数を示す。

第 3 表 (其の2)

苛性加里濃度	1 例	2 例	3 例	4 例	5 例	平均 1 視野胞子数
(%) 2.0	18	37	48	37	108	1.7
1.0	57	42	82	126	213	3.5
0.5	81	51	143	117	186	3.9

備考 初め3c.c.の水を以て磨潰し、濾液2c.c.を採液し、これに所定の濃度となる様苛性加里液を加へた、勿論一定胞子を加へた。静置時間24時間、液温20°C、2 鏡面30視野合計胞子数を示す。

然し乍ら實際問題に當りては、母蛾の状態一定でない。故に加里の濃度餘りに稀薄に失する時は夾雑物多く鏡檢困難なるを以て、磨潰液の苛性加里濃度を0.5%とすのがよい。

(3) 被検液量竝に液高と沈降集胞子檢出數

被検液の量の問題を解決せんむするに當りては、二方面より試験するの要がある。即ち一は被検液に注加する胞子数を一定にせる場合、他の一は被検液の胞子濃度一定の場合とである。

(1) 注加胞子を一定にせる場合

著者等は被検液の量を2c.c. 4c.c. 6c.c.とし、各に同一量の胞子を加へ、所定時間静置後、管底の胞子を常法に依り検査せるに、液量の少き程檢出胞子数多きを認めた。是胞子の沈降距離に關係し、距離の長き程長時間を要するは明かである。

その成績を示せば次の如くである。

第 4 表

液量(c.c.)	静置時間 24		48		平均 1 視野 胞子 数	
	1 例	2 例	3 例	4 例	24時	48時
2 (液高2.7cm)	46	37	23	30	1.0	0.7
4 (〃 4.0 〃)	24	23	24	27	0.6	0.6
5 (〃 6.0 〃)	19	14	19	19	0.4	0.5

備考 液温19°C、2 鏡面40視野合計胞子数を示す。

(2) 被検液の胞子濃度を一定にせる場合

一定濃度を有する胞子含有液の量を異にせる場合は勿論、液量の多き程檢出胞子数の増加を示すも、液量の増加割合と檢出胞子数の増加割合とは一致しない。即ち前者の増加割合に比し

後者の増加割合は少ない。これは恐らく液の高さに依る以外に何等か他の要因に依るのではなからうか。

試験結果を示せば次の如くである。

第 5 表

液量(c.c.) 静置時間 実験例	24		48		平均1視野胞子数	
	1	2	3	4	24時	48時
2 (液高2.7c.m.)	298	190	298	204	5.4	6.3
4 (〃 4.0 〃)	310	266	334	440	7.2	9.7
6 (〃 6.0 〃)	422	348	356	516	9.6	10.9

備考 液温19°C, 2鏡面40視野合計胞子数を示す。

以上(1)及(2)の実験結果に基き、磨潰液の量は可及的少量に止め、被検液の胞子濃度を濃厚ならしめ、被検液量を2~3c.c.内外にするのが最も有効である。

(4) 静置時間と沈降集胞子検出数

沈降操作中の静置時間と沈降集胞子数との關係に就ては實驗者により一致せざる點が多い。一般的には3日以上を必要とするもの様である。

著者等も此の點を確むるため、所定液量に一定胞子を加へ、管底に集積せる胞子の検出状態の時間的消長關係を多くの例につき試験せるに、2日間静置のものに於て検出胞子数最も多き成績を示した。即ち、その成績の一部を表示すれば次の如くである。

第 6 表

經過時間 液量(c.c.) 実験例	1		2		3		平均	
	2	4	2	4	2	4	2	4
24	109	82	46	24	37	23	84.0	43.0
48	143	85	64	41	45	34	84.0	53.3
72	112	53	47	32	40	26	66.3	37.0
96	109	49	37	21	30	27	58.7	32.3

備考 液温22~24°C, 2鏡面40視野胞子数を示す。

然し乍ら3日以後に於ても沈降管中の全胞子数には變りはないから、恐らく時間と共に管底に沈降集せられたる胞子の一部がプレバート製作迄の操作に依り失はるものと思惟する。此の事實から考察するに、現在廣く使用されてゐる沈降試験管に對し何等か不備の點あるを思はしむるのである。

(5) 被検液の温度並にその變化と沈降集胞子検出数

液温と胞子検出数との關係に就ては家蠶に於て、三谷、伊與田兩氏の成績がある。著者等も亦是等の事項を明かならしめんとし、電氣恆溫器、冷蔵庫等を使用し實驗を行ひたる結果、30°C乃至15°C、18°C乃至8°Cの範圍に於ては15°C附近に於て最も検出数多きを認めた。

尚液温を變化した場合は、本試験の範圍に於ては低溫の方に支配される傾向がある。

即ち、次表の如くである。

第 7 表 (其の1)

温度(C)	実験例				
	1	2	3	4	平均
30	19	40	4	10	18.3
25	13	31	7	26	19.0
20	17	51	14	33	28.8
15	32	69	22	39	40.5
15-30	36	52	18	31	34.3
30-15	30	59	22	42	38.3

備考 静置時間24時間 15~30°Cは、15°Cに12時静置後 30°Cに12時静置し鏡検せることを示す。
30°C~15°Cはその反対にせるもの、2 鏡面40視野合計胞子を示す。

第 7 表 (其の2)

温度(C)	実験例		
	1	2	平均
18	180	324	252
12	184	266	225
8	172	266	219

備考 其の1に同じ。

(6) 被検液の防腐剤に関する試験

被検液は苛性加里の存在する場合、20°C以下に於ては、1~2日間は腐敗を來す如きことはないが、更に高温となる時はその惧がある。著者等は防腐剤としてフォルマリン、石炭酸、クレゾール石鹼等が胞子検出数に及ぼす影響を試験せるに、フォルマリン1%液の少量添加に依り防腐の目的を達するのみならず、更に検出胞子数を増加せしめ得ることを認めた。石炭酸5%水、クレゾール石鹼5%水等は何れもフォルマリン1%水に比すれば劣る結果を示した。即ち、次表の如くである。

第 8 表 (其の1)

區別	実験例 経過日数	1			2		
		2 日	3 日	平均	2 日	3 日	平均
対 照 區		39	81	60.0	47	31	39.0
フォルマリン1%區		72	74	73.0	51	44	47.5
石炭酸5%區		39	50	44.5	37	25	31.0
水 區		23	20	21.5	28	29	28.5

備考 液温30°C、対照區は苛性加里0.3% 3c.c.に對し水0.15c.c.を加へ、水區は水3.15c.c.のみとす。

他の2區は苛性加里0.3% 3c.c.に對し夫々0.15c.c.を加へたり。

各區2 鏡面40視野合計胞子数を示す。

水のみ區は2日に於て腐敗せり。

第 8 表 (其の2)

區 別 \ 實 驗 例	1	2	3	平 均
對 照 區	26	45	83	51.3
フ オ ル マ リ ン 1 % 區	38	59	102	66.3
ク レ ゴ ー ル 石 鹼 2.5 % 區	19	27	56	34.0
ク 5 % 區	30	42	51	41.0

備 考 其の1に同じ、但し對照區、クレゾール石鹼區は0.5c.c.の水又はクレゾール石鹼を加ふ。フ
 オルマリン1%區はフォルマリンを0.3c.c.を加へたるものとす。

III. 總 括

自然沈降検査法を柞蠶の微粒子病胞子の検査に應用する場合の實施方法に就て、特に胞子の
 檢出率を増進する目的を以て試験せる結果を要約すれば次の如くである。

1. 被檢液に1%フォルマリン水を1/30~1/10量加へる事に依り、胞子の檢出数を増加せし
 めることが出来る。エチルアルコール10%液又はメチルアルコール10%液をフォルマリン水
 と同様に加へたる場合も然らざる場合に比して有效である。
2. 磨潰被檢液の苛性加里の濃度は2乃至0.3%の範圍に於ては、稀薄な程胞子檢出數
 が多い。然し乍ら實用的には0.5%を以て適當と認める。
3. 注加胞子一定の場合、液量の少きもの程胞子檢出數が多い。又胞子浮游濃度一定の場合
 は液量の多き程檢出數が多い。然し液量の増加割合に比し胞子檢出數の増加割合は少い。従
 つて磨潰液は可及的少量に止め、被檢液の全量を2~3c.c.内外とすのが最も有效である。
4. 沈降操作中の靜置時間は2日に於て最も胞子檢出數が多い。
5. 被檢液の液温は15°C内外に於て胞子檢出數が最も多い。高低2種の温度に同時間接觸した
 場合には低温に支配される傾きがある。
6. 被檢液に防腐剤として1%フォルマリン水を加へることは、(1)の記載と共に甚だ良好な
 る成績を示す。石炭酸5%液、クレゾール石鹼5%液は何れもフォルマリン液に比すれば劣
 る結果を示した。

(於滿洲國熊岳城農事試驗場)