

セロファン厚層塗抹標本による寄生虫卵検査法の検討

小宮 義孝 小林 昭夫 熊田 三由
久津見 晴彦 小島 邦子

国立予防衛生研究所寄生虫部

(昭和34年8月13日受領)

塗抹標本による寄生虫卵検査の場合に、ふつうのカバー・ガラスのかわりにセロファン紙を代用してこれを行う検査法は、各地の保健所、学校などで、各々独立、散発的に行っているところもあるが、これを正式に学会に発表したのは加藤(1954)註1である。

同氏によればこの方法は、ふつうのカバー・ガラスを用いる方法よりも、はるかにその検出率が良く、場合によっては浮游法で行った成績にも劣らず、むしろ優ることがある、とのことである。

こえて1958年8月、仙台で日本寄生虫予防会の大会が開かれた際、同会各支部の技術者たちが集つて、このセロファン厚層塗抹標本による寄生虫卵検査の問題についての合同検討があつた。その際の資料によれば、同会東京支部(東京寄生虫予防協会)、神奈川支部(神奈川同上)およびその他から呈示されたデータも、ひとしくその検出力は、浮游法には及ばないまでも、カバー・ガラスを用いる塗抹法よりは、かなり高いという成績が見られた。たまたま著者の1人、小宮もこの会合に参加していたので、試みに加藤氏に実際にセロファン厚層塗抹標本を自から作成してもらい、若干の検討をしてみたところ、1枚の塗抹標本に供する便量が、カバー・ガラスを用いる塗抹法にくらべていちじるしく多いことが判明した。すなわち加藤氏の場合はセロファン・カバーの大きさは32×24mm以上で、この1枚に採取鏡検する便量は約90~120mg、東京寄生虫予防協会では約26×28mmのカバーの大きさで、平均採便量は約60~70mgであつた。

が、いずれにもせよ、このセロファン厚層塗抹法による検便方法は、現在、日本寄生虫予防会各支部その他で、実際に広く使用されようとする状態にもあるので、この方法の再検討をすることは、いわばそうした意味で

必要にせまられている。そこで私たちは、この方法を、種々の角度から再検討してみたわけであるが、以下はその結果の報告である。

検討を要すべき部分と検討の方法

検討を要すべき部分としては、第一にこの方法を用いた場合の検出力如何の問題と、第二にそうした検出力を招来する理由の解明、即ち1標本に用いる便量の問題がある。第三には塗抹の方法および鏡検の方法の問題がある。さらにかような方法は広く一般に適用することが可能であるか、また可能であればその条件如何、という問題がある。で、以下、以上のような問題点を考慮しつつその一、一の点についての吟味を行つてみた。

まず、セロファン厚層塗抹法のやり方であるが、これは東京寄生虫予防協会で日常行つている方法を採用した。この方法は、上記加藤氏の方法のように、まづ蒸溜水500cc、グリセリン500cc、3%マラカイト・グリーン5ccの割合で混じた液を作り、この中に約26×28mmに切つたセロファン紙を約24時間浸漬したものを、カバー・ガラスの代用として用いる註2。この浸漬液につけたセロファンは、やや青色を呈するが、この目的は、一つには虫卵を識別し易くするためであるが、一つには鏡検にさいしての眼の疲労を多少なりとも防止しようとする意味もあるようである。この方法と加藤氏原法との差は、カバー・ガラス代用のセロファンの大きさがやや異なるが、主として両者の採便量の差異である。

検出力の比較に用いた材料は、埼玉県本庄市藤沢中学校生徒中、予じめ飽和食塩水浮游法で検査して、鉤虫卵陽性なることが判明している生徒175名の便。採便量は各拇指頭よりやや大なる程度とし、同一の材料を、同時にカバー・ガラス塗抹法1枚法、セロファン厚層塗抹法、

註1 なお本法は1951年第20回日本寄生虫学会総会において、演題70に対する追加として加藤によりその概要が発表されている。おそらくこれが学会における最初の発表であらう。

註2 この液の処方 は加藤氏の原法と同一である。

飽和食塩水浮游法、濾紙培養法の4法で検査した。検出力の指標としては鉤虫卵をもつてした。ただし鉤虫卵は目下の集団検便において、かんたんな方法ではその検出がなかなか困難である一方、公衆衛生的にその検出が強く要請されている卵であるからである。

検出力の比較のために用いた塗抹1枚法には、18×18 mmのカバー・ガラスを用いた。被検材料は同1枚につき大約2~5 mg、飽和食塩水浮游法に用いた材料の量は約500 mg、試験管は中試験管1回値、ガーゼ1枚で予め濾過するやり方を採用した。濾紙培養法に用いた便量は約250 mgである。なお各検査に当つて全視野の虫卵、ないし游出仔虫数は各事例ごとにこれを一、一算定した。なお以上の試験は1959年6~7月中にこれを行った。

検討成績

1. 厚層標本作成時の採取便量

既述のセロファン厚層標本による検査に習熟した検者のルーチ的なセロファン紙1枚分えの採取便量を、無作為に20例について秤量してみた。結果は第1表に示す

第1表 セロファン厚層塗抹法における
1回採取便量

No.	便量 x mg
1	77
2	72
3	60
4	56
5	71
6	68
7	64
8	56
9	67
10	56
11	58
12	69
13	80
14	69
15	71
16	71
17	72
18	69
19	59
20	64

$\bar{x}=66.5$
 $s=6.89$

とおりであつて、平均 66.5 ± 6.89 mg という数字を示している。この量は濾紙培養法に使用する便量には及ばないが、塗抹1枚検査の場合の便量(平均約3 mg)にくらべ約20倍以上に当り、同法同時3枚検査時の便量約10 mgに比較しても、なお6~7倍の量に当っている。

2. 検出力の比較成績

第2表 各種検査法による鉤虫卵陽性率

検査法	検査人員	陽性者数	陽性率
塗抹	175	32	18.3%
セロファン	175	92	52.6
浮游	167	108	64.7
培養	142	113	79.6

第2表はセロファン厚層塗抹標本による検査成績を、他の上記3法のそれと比較して示したものである。これを見ると、検出力のもつとも良いのは培養法であるが、それでも予備検査での検出事例の約20%は陰性となっている。セロファン法による検出力は、浮游法には及ばないが、塗抹1枚検査法のそれに比べれば、はるかに凌駕している。

3. 塗抹度の濃淡

すべての塗抹法においてそうであるが、各例検査に当つて一一採取便量を秤量でもしない限り、一定限界内においてはであるが、各例における材料の採取量にはある程度の動揺がある。したがつて採取便の性状が仮りに一定しており、かつカバー全面にたとえ平等な塗抹が行われたとしても、標本の塗抹状態にはある程度の濃淡が生ずる。しかも実際には各便の性質の差異があり、場合々々で材料が必ずしもカバーの全面に一樣の濃度に塗抹されるとは限らないので、塗抹面の濃淡の幅はさらに増加される傾向にある。第1図(写真1~5)は、実際に作成した各標本につき投射光線下における濃、中等度、淡の塗抹の状態とその際における鉤虫卵の見え方を写真により示したもので、その間これだけの差が生じてくる。

4. 塗抹面の濃淡と虫卵識別に適切な光度

厚生省衛生検査指針の「寄生虫検査指針」には、塗抹標本検鏡時の注意に、塗抹標本の厚さは、塗抹便の色が黄褐色からやゝ灰色に移行する程度、または下にしいた新聞紙の活字が明らかに見える程度が良い、としてあり、また視野の明るさは生鮮標本を鏡検する場合には、やゝ暗目に、と規定している。しかし数量的には何等の記載がない。しかし実際には、標本面の材料の濃度と採取光量とのバランスによつて、虫卵は塗抹のある程度の濃淡の如何にかかわらず、かなり明瞭に識別しうるものである。そこで、ここでは前項3に示した標本の各濃度に対して、どの位な光度を与えたら虫卵はかなり明瞭に識別しうるか、ということ調べてみた。

まず上記の各濃度の虫卵含有標本を作成、これを習熟した検者に検鏡せしめ、光源を調節して視野の虫卵が明

第3表 各種濃度セロファン厚層塗抹標本の作製後
時間別の鏡検に必要な照度 Lux.

経過時間	A (厚い標本)	B (中位の標本)	C (薄い標本)
3~10分	30,000~	19,500~30,000	14,100~24,000
20分	21,000~30,000	15,900~24,000	8,400~22,500
40分	21,300~30,000	9,000~23,100	6,300~15,000
60分	16,500~30,000	6,000~22,500	5,100~10,500
90分	9,000~24,000	5,100~20,100	4,350~9,900
対照 (直接塗抹標本)	Max. 9,000 Min. 2,400	Med. 6,000	

測定条件：温度 26°C，湿度 77%，光源 オリンパス LSC 型，顕微鏡 千代田 L 型双眼，倍率 100×，アッペ照明装置は集光器開口数 1.4，絞り開放，青色フィルター 1 枚挿入
照度測定方法：Sekonic L III 型露出計にて照度測定，これより Lux meter を介し Lux (露出計目盛×3=Lux であった) をもとめた。照度測定面は反射鏡中心，光源凸レンズより 13.7 cm. 光線と直角面で測定。

らかに識別しうるに適当な光量をとらしめた。次にそうした場合における顕微鏡の反射鏡面の照度を照度計で測定した。ただしこの場合，顕微鏡には，アッペの照明装置附属，しぼりは全開という条件である (第3表の註参照)。第3表はその結果を示したものである。なお対照としてふつうの適当な明るさの場合のカバー・グラスを用いた標本鏡検時の適当な明るさの場合の同鏡面照度も記録，表示しておいた。

いまこの結果を見ると，カバー・グラスを用いた標本の鏡検時にくらべて，標本の厚さが中等度の場合でも標本作成直後より 40 分以内位では約 2 倍，厚い場合にはほぼその 3 倍近くの明るさを必要とする。

5. 標本作成後の経過時間と虫卵の識別度

カバー・グラスを用いた塗抹標本の鏡検は標本作成後それが乾燥しないうちに鏡検するのを原則とする。乾燥以前には虫卵の識別度にはほぼ変化が認められないが，標本が乾燥すると虫卵が破壊し，識別が困難になる場合があるからである。セロファン・カバー厚層塗抹標本においては，その鏡検光量を適当に調節するときは，作成直後から乾燥直前までの虫卵は，おおむね識別可能であるが，どちらかというとな作成直後よりも乾燥直前の方が，虫卵識別度はやや高いようである (写真 6~8) 註1。標本が全く乾燥した場合にも虫卵は破壊されない限り，

その識別度にはさして変りはない。しかし乾燥は虫卵を破壊せしめるおそれがあるので，鏡検は，乾燥直前までの間に之を行うのが良い。

標本作成より乾燥にいたるまでの時間は，盛夏7月の候(気温約 25°C，気湿約 75%)室内で約1時間位であった。このデータは，本邦においては比較的乾燥し易い時期であるので，これより気温の低い時期においては乾燥にいたるまでの時間は更に延長させられると考えられる註2。

6. 標本作成時の加圧の限界

カバー・グラス標本作成時には特別の圧は加えない。しかしセロファン・厚層標本作成においては，材料たる便をそのまま加圧，延展して検鏡に便ならしめる必要がある。そのためセロファン・カバーとスライドグラスとの間に置いた便を，手指，印字のないゴム判，またはローラー等を用いて，ある程度の圧を加えてこれを圧平する必要がある。しかしこの場合の加圧が甚しい場合には，便中の虫卵が加圧のため破壊されるおそれがある。

第4表は台秤を用いて標本加圧時の瞬間最大圧力を測定して見た結果である。

第4表 厚層塗抹標本作製時における加圧の程度と虫卵破壊

加圧手段	圧力 (kg)	加圧平均面積 (cm ²)	圧力/cm ² (kg)	観察虫卵		虫卵材料		
				破壊しない	破壊した			
右第2手指 ゴム栓 (No. 2)	5~5.5	2.05~2.28	2.4	11	0	犬鉤虫卵		
	5.5	1.58					11	1
	10.5	2.65					4.0	8
右第2手指 ゴム栓 (No. 2)	10	1.58	6.3	11	0	犬鉤虫卵		

いまこの結果を見ると，少なくとも上記の測定方法による瞬間最大圧約 5 kg/cm² までは加圧により虫卵の破壊するおそれはない。

考 察

1. 虫卵の検出力について

すでに前章の2項でのべたように，セロファン使用厚層標本法による鉤虫卵の検出力は，かなりの程度においてその検出力は高い。東京寄生虫予防協会法においても，その検出力は，飽和食塩水浮游法にはやや及ばない

註1 ただしこの写真では蛔虫卵の識別度を示している。

註2 更に高温，低湿の盛夏期においては，特に鉤虫卵は標本作成 40 分位でも乾燥のため変形することがあるので注意を要する。第2図 (写真 9~12) 参照。

がカバー・ガラス塗抹1枚法に比べれば数倍の検出力を示している。

元来塗抹法の虫卵検出力は、標本全体をくまなく検鏡するという条件の下にあつては、その採取する便の絶対量の如何に依存する。とりわけ鉤虫軽感染時のように、単位便量中の虫卵密度が稀薄の場合においては、採取便絶対量の増加は、場合によつてはいちじるしくその検出力を増大せしめる。

いま、便内の蛔虫卵および鉤虫卵が、大体においてポアソン分布を示すもの(石崎, 1950; 佐藤, 1953)として、その各雌1匹寄生時の10 mg中の平均卵数を見るのに(小宮ら, 1954)、前者は最小推定平均値5コ、後者は約0.2コ以下となる。いまここで特に鉤虫卵を問題にすれば、カバー・ガラス法(18×18 mm)3枚検査の場合における鉤虫雌1匹寄生時における検出確率は、ポアソン分布($e^{-m} \times m^x / x!$)における $m=0.2$ の場合のそれで、ポアソン分布表(北川, 1951)によれば、 $1.0 - 0.8187 = 0.18$, すなわち約18%にすぎない。それがこのセロファン厚層塗抹法の場合には、採取便量は平均約65 mg、したがつてその中に含有さるべき卵平均数は $0.2 \times 6.5 = 1.3$ となる。 $m=1.3$ の場合の検出確率は、 $1.0 - 0.27 = 0.73$, すなわち約73%といちじるしく向上する。

ついでにここで触れておくが、セロファン厚層塗抹法の加藤氏の原法では、カバー・セロファンの大きさは32×24 mm以上で東京寄生虫予防協会使用のそれよりはやや大きく、かつこの標本1枚のための採便量は、加藤氏によれば冒頭に記したように約100 mg内外と増大して採取しうる便100 mg中に含む鉤虫雌1匹寄生時の平均虫卵数を算出してみると、これは約2コとなる。 $m=2$ の場合の検出確率を再びポアソン分布表にしたがつて調べてみると、 $1.0 - 0.135 = 0.865$ となる。即ちその検出力は約87%に向上する理窟となる。

本試験で行つた浮游法時の採取便量は約500 mgであるが、これは中試験管を用いたために採便量がやや多くなつてゐる。実際に寄生虫予防会その他での浮游法を行う場合には、小試験管を用いる場合が多い。この場合の採便量は、せいぜい約半量250 mg内外であろう。飽和食塩水浮游法施行時の被検全便中の虫卵の検出比率は、必ずしもそう高いものではなく、低い場合には30%を下廻る場合もある(安田, 未発表)。いまその検出比率を約40~30%とすれば、これは便量100~75 mg中の虫

卵を全部調べたと同じ結果となる。そうだとすれば、加藤氏の云うように、同氏原法での虫卵検出力は、その標本に採取する便量が100 mg内外であるから標本の鏡検が完全である限り、時として浮游法を凌駕していることがあり得ることも、理論上充分にうなづけることである。

なお、場合によつては鉤虫卵検出に関する限り培養法よりもその検出力が高い場合も存在しうる。特に濾紙培養法において被検材料が少いとき、および冬期被検材料が検出に先立つて寒冷に放置された場合(集団検便時においてはかような事は冬期ではむしろふつうである)において、卵死滅を来しているような場合においてはそうである。

2. 虫卵識別度について

セロファン厚層塗抹標本による検便法が、カバー・ガラス塗抹法に比して(その同時3枚検査法をも含めて)、その採便量が多いため、虫卵の識別および全標本の鏡検が完全に行われる限り、いちじるしく高いことは、実際的にも理論的にも明らかとなつた。そこで問題は、この方法を利用する場合の虫卵の識別度がどうか、という問題である。

すでに前章でのべたように、標本作成が適切に行なわれれば、鉤虫卵の識別度は、光源の明るさを適当に調節しさえすれば、その視野はカバー・ガラス塗抹法の場合にくらべてやや暗いとは言ひ、必ずしもこれに劣つていない。ただしこの厚層標本にあつては、虫卵の識別度を高くするためには、その光度を適当に調節する必要があるが、前章4においてのべたように、濃厚標本においては顕微鏡の反射鏡面照度を20,000~30,000 Lux以上に保つ必要がある場合がある。ところがこのような照度の保持には、照明のためのどうしても光源ランプの必要が生じてくる。したがつて、かような光源ランプの設備の行ないがたい場合には、この方法は必ずしも推奨しえない。

標本作成後の時間的経過も、虫卵の識別度に関係がある。が、標本が乾燥し切るにいたらない間であれば、その識別度にそれほどいちじるしい変化はない。むしろ乾燥による虫卵の破壊とこれに基づく識別度のいちじるしい低下の方が、より注意を要する点であろう。この意味からして、標本作成直後から乾燥直前までの間、具体的には気温25°C以下なら標本作成から約1時間以内に検鏡すれば、まず差支えないと考えられる。但し盛夏高温低湿

註 ただし、この程度の採便量だと圧平した場合の面積が大きくなりすぎて、十字動装置を使いにくいという不便がある。

時にはこの時間は半減せしめた方がよい。

虫卵の破壊と関連して考えられることは、標本作成時に便に加える加圧の強さが問題となりうることである。あまりに強い圧を加えると標本内の虫卵が破壊されるおそれがあるが、こと鉤虫卵に関する限りは、私たちの手指を用いての実験では、瞬間手指圧 5~6 kg までの加圧では、虫卵破壊のおそれは認められなかつた。なおこの瞬間手指圧は、ふつうの男子成人が手指ではぼ力一杯に標本面を押しつけた時の圧の約 2 分の 1 に相当する。

まとめ

筆者らは、寄生虫卵検査のための検便方法としてのいわゆるセロファン厚層塗抹法を、鉤虫卵の検出をその指標として、種々の角度から実験的に検討してみた。その結果は次のごとくである。

1. セロファン厚層塗抹法は、カバー・ガラス塗抹法にくらべて、一般に採取する便量がかなり多いので、標本の検鏡が完全なる限り鉤虫卵の検出力は前者に比較していちじるしく良い。飽和食塩水浮游法時の一標本当りの採便量がいちじるしく少ない場合には、セロファン厚層塗抹法の方が検出力がやや高い場合すらもあり得ることも考えられる。また特に冬期集団検便時にあつては、不用意に行なわれた培養法よりも鉤虫卵検出比が優れていることも有りうる。

2. 同法による虫卵の識別度を良好にするためには、視野の明るさ、したがって顕微鏡の反射鏡面の照度を、場合によってはかなり高く保つことが必要とされる。そしてそのためには原則的に人工光源ランプの設備を必要とするので、そうした設備の不備な状況下にあつては、

この方法は一般に推奨しがたい。

虫卵の識別度を考慮して、標本への加圧、標本作成直後より鏡検までの経過時間の許容限界等について注意する必要がある。私たちの実験では、気温 25°C 以下の場合には経過時間の許容限界は約 1 時間以内、加圧は合秤を用いての瞬間最大圧 5~6 kg 以内ならば、虫卵の破壊のおそれはないようであつた。

本研究の要旨は第 19 回日本寄生虫学会東日本支部大会（昭和 34 年 9 月）において発表した。

主要文献

- 1) 石崎達 (1950) : 直接塗抹標本による蛔虫卵数定量法とその応用, 総合医学, 7(20), 979-982.
- 2) 石崎達 (1953) : 蛔虫症の臨床的研究, (1) 直接塗抹標本による蛔虫卵数定量法とその応用, 寄生虫誌, 2(2), 137-142.
- 3) 加藤勝也・三浦光生 (1954) : 検査比較について, 寄生虫誌, 3(1), 35(抄).
- 4) 加藤勝也 (1958) : 集団検便に理想的と思考せられる余のセロファン塗抹検査と浮遊法との比較検査成績について(抄), 寄生虫誌, 7(3), 239.
- 5) 加藤勝也 (1959) : 優れた寄生虫卵集団検査法, バンフレット, 公衆保健協会, 1~6, 名古屋.
- 6) 北川敏彦 (1951) : ポアソン分布表, 1-156, 東京, 培風館.
- 7) 小宮義孝ら (1954) : 直接塗抹標本における蛔虫卵検出率と駆虫剤駆虫効果検査における「見かけの陰転」, 寄生虫誌, 3(3), 216-219.
- 8) 小宮義孝 (1953) : 寄生虫卵検査法の理論と技術, 衛生検査, 4(4), 149-156.
- 9) 佐藤澄子 (1953) : 鉤虫卵検査法の研究, 1. 人尿内鉤虫卵分布状況について, 寄生虫誌, 2(2), 146~150.

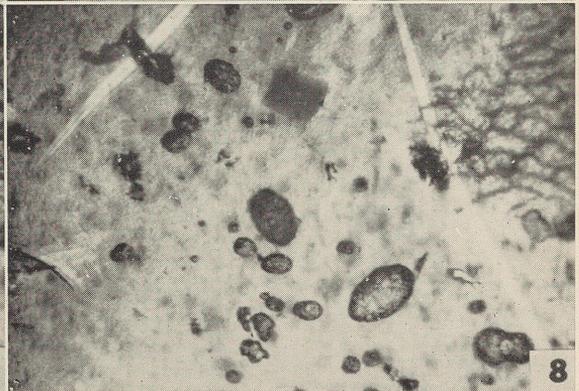
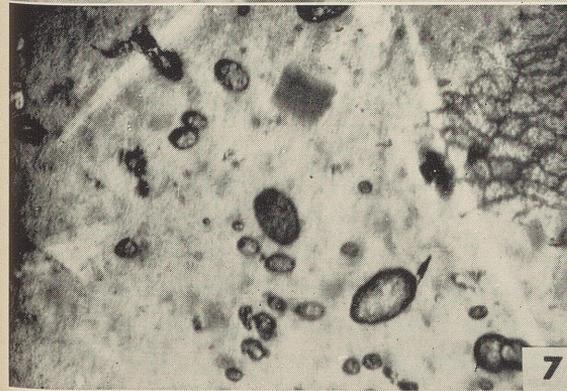
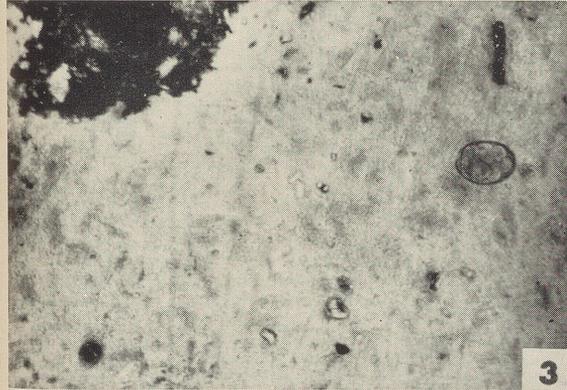
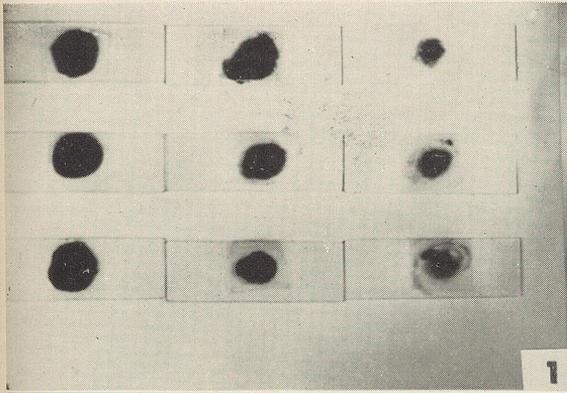
STUDY ON THICK SMEAR TECHNIC WITH CEROPHAN COVER FOR STOOL EXAMINATION FOR HELMINTHES OVA

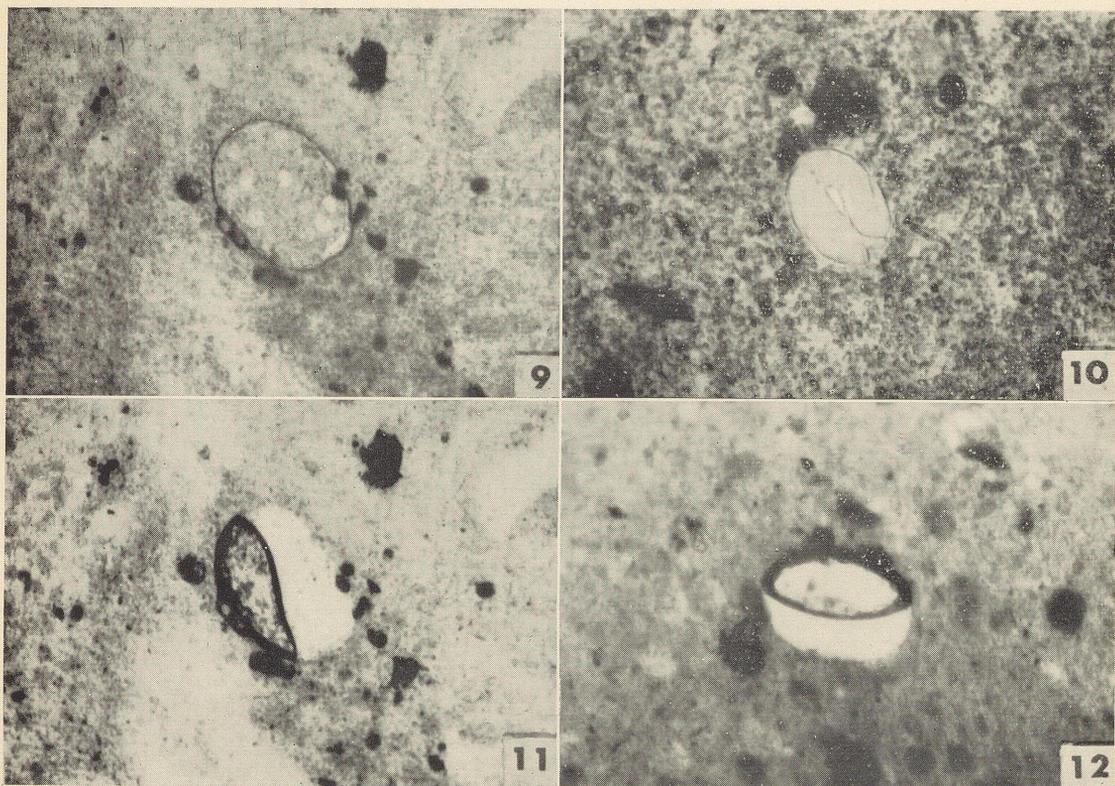
YOSHITAKA KOMIYA, AKIO KOBAYASHI, MITSUYOSHI KUMADA,
HARUHIKO KUTSUMI & KUNIKO KOJIMA

(Department of Parasitology, National Institute of Health, Tokyo, Japan)

This technic is a new one originally invented by Kato. The principle of this technic is to use a cerophan cover instead of the ordinary cover glass for the stool examination for the helminthes ova. On applying this technic a larger amount of stool can be applied for one time examination, while the detectability of ova is not diminished. The result of the experiments showed that the rate of the detectability of ova is much higher with this technic as compared with that of the routine direct smear technic applying the cover glass.

There should be postulated several conditions under which this technic should be effectively carried out. They are as follows. A constant intensive light source should be necessary to observe the ova because the smear becomes markedly thicker with this technic as compared with the routine direct smear one with coverglass and during the warmer climate the examination of specimens should be completed within ca. two hours after the smearing, otherwise the ova could be destructed owing to the dessication etc. To make the adequate specimen for the examination a pressure should be added upon the cover cerophan which could be able to attain up to 5-6 kg at the maximum without injuring the ova contained.





写真説明

1. セロファン塗抹標本の尿層の各種濃度，
左方：濃厚なもの 中央：中等度のもの
右：薄いもの
- 2~5. 視野における鉤虫卵鮮明度 (×100)
2. (対照)，飽和食塩水浮遊法の視野
3. セロファン厚層塗抹法の視野，尿層薄き事例
4. 同上，尿層の厚さ中等度の事例
5. 同上，尿層厚き事例
- 6~8. セロファン塗抹標本，標本作成後の経過時間
と視野における蛔虫卵鮮明度 (×100)，室温 26°C，
湿度 77%
6. 作成後 10分
7. 同 50分
8. 同 120分

- 9~12. 標本の乾燥による鉤虫卵の変形 (×400)，環境
条件：気温 30°C，湿度 55%，この位の環境条件下
では標本乾燥度はきわめて早く，標本作成後約 30
分で乾いてしまう。以下の像は標本作成後約 40 分
時のもの
9. 卵殻内細胞が圧されて殻内ほぼ一杯に拡つたも
の，細胞核はやや明瞭，多細胞期卵なることが分る。
10. 卵殻内仔虫がやや透明化し圧されて卵殻内に一杯
に拡がっている。仔虫体幅が著しく大となっている。
- 11, 12. 卵細胞が片側に押しよせられて気泡状に見え
る，こうなると識別は困難である。