

寄生虫検査としてのセロハン厚層 塗抹法の検討

(1) グリセリン濃度の検討

内 田 昭 夫 齊 藤 正 己 柳 沢 利 喜 雄

千葉大学医学部農山村医学研究施設 (主任 柳沢利喜雄教授)

(昭和 39 年 9 月 16 日受領)

緒 言

本法が 1951 年、加藤により紹介されて以来、小宮ら(1960)、後藤(1960)、齊藤(1961)、西ら(1962)によつて追試され、現在寄生虫予防協会によつて広く採用されている。それは本法が従来の塗抹法に比して簡便で、かつ鉤虫卵、鞭虫卵の検出率が高く、更に条虫卵、吸虫卵等まで検出し得ることによる。しかし、多数の検査者は、加藤の原法によつて実施する場合、必ずしも標本視野が鏡検に容易でないことを指摘し、小宮らは 20,000~30,000 Lux 以上の光源が必要であるといひ、西らは、本法の検出が安定性に欠けることを指摘し、戸谷・加藤(1962)は本法と他方法との検出比較を行うと共に、標本乾燥による卵破壊を防ぐために水に浸したスポンジ等で標本を覆えば良好な成績を得ると報告した。著者らの一人齊藤(1961)は、標本を乾燥することにより、視野の澄明を計れば、虫卵検出力が高まることを報告したが、その際空泡形成による卵変形像(以下変形卵と略。寄生虫誌, 10(2), 202 頁参照)が生ずるので、それを熟知識別することが本法では極めて重要であり、またセロハン紙浸漬液のグリセリンが濃いと卵の萎縮が出現することを指摘した。しかし、この変形卵についての基礎的な検討がなかつた。そこで著者らは、変形卵の出現は、浸漬液のグリセリンの濃度、時間の経過に伴う尿による物理的、化学的現象と考えて、1) 水とグリセリンの混合比をかえ、更に水の代りにメタノールを使用して検討し、2) 他法との比較を単純塗抹法、浮游法について尿内虫卵濃度別に行ひ、二、三の知見を得たので報告する。なお本試験は主として鉤虫卵について行つたものである。

試験材料および方法

試験 I.

試験材料は Stoll 法による EPG(Eggs per gram)1,520

(10 標本平均値) のヅビニ鉤虫卵陽性有形便を用いた。まずスライドガラス上に便量 60 mg を塗抹した上に、第 1 表、第 2 表に示すごとく、I ~ X までの処方による

第 1 表 浸漬液の処方 (1) 水とグリセリン

処方番号	I	II	III	IV	V	加藤氏 原法
水 (ml)	900	800	700	600	500	
グリセリン(ml)	100	200	300	400	500	
3%マラカイト トグリーン(ml)	5	5	5	5	5	
フェノール(%)	3	3	3	3	3	

第 2 表 浸漬液の処方 (2) メタノールとグリセリン

処方番号	VI	VII	VIII	IX	X
メタノール(ml)	900	800	700	600	500
グリセリン(ml)	100	200	300	400	500
マラカイトグリーン(mg)	150	150	150	150	150

各浸漬液に 24 時間以上浸漬せる 2 × 3 cm² のセロハン紙を覆い、ゴム栓を以てセロハン紙上から検体を平等に伸展させ、標本の 30 cm 上方から 100 W 電球による加熱乾燥(約 35°C)を同一標本について 20 分および 30 分間行ひ、それぞれの直後に鏡検し、更にそれを自然放置して 1 時間および 2 時間後に鏡検した。すなわち同一標本について 4 回観察し、標本作製後の時間的変化をみたわけである。虫卵は正常卵、変形卵を区別して数えた。標本数は各処方毎に 10 標本とした。

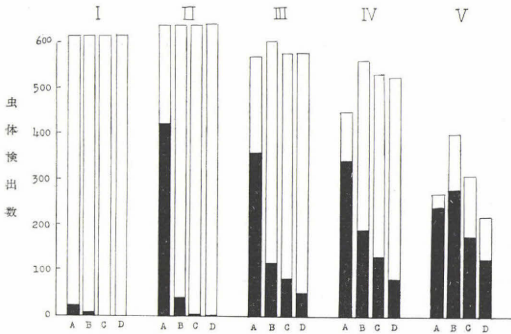
試験 II.

上記材料のヅビニ鉤虫卵陽性便を寄生虫卵陰性便で 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍に稀釈、よく攪拌混和したものを使用して、単純塗抹法、セロハン厚層塗抹法、浮游法別に検便し、虫卵検出率を比較した。単純塗抹法は便量 3 mg を生食食塩水でよく溶かし、18 cm² のカバーガラスで覆つて標本下の活字が読める程度の薄層とし全視野の虫卵数を算定した。セロハン厚層塗抹法

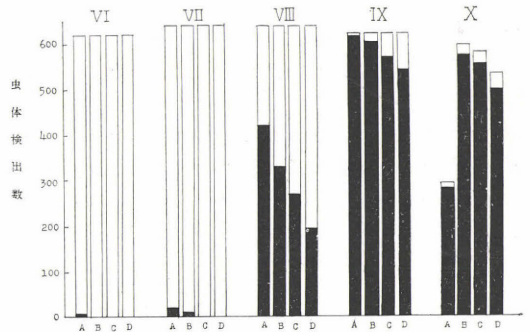
第3表 処方別鉤虫卵検出成績(各10標本宛総検出数による)

出現卵 処方別	加熱乾燥時間						30分加熱乾燥後の自然放置時間						最検 出 高数	虫回 収 卵率
	20分後			30分後			60分後			120分後				
	正	変	小計	正	変	小計	正	変	小計	正	変	小計		
I	23	594	617	6	611	617	0	617	617	0	617	617	617	67.7%
II	422	215	637	39	598	637	5	632	637	3	634	637	637	69.9%
III	358	165	573	117	480	597	83	493	576	52	518	577	597	65.5%
IV	343	106	449	193	367	560	135	399	534	83	444	527	560	61.4%
V	243	24	267	284	118	402	179	130	309	130	88	218	402	44.1%
VI	2	638	640	0	640	640	0	640	640	0	640	640	640	70.2%
VII	16	622	638	5	633	638	0	638	638	0	638	638	638	69.9%
VIII	416	221	637	329	308	637	265	372	637	187	448	635	637	69.8%
IX	620	3	623	602	21	623	567	56	623	539	84	623	623	68.3%
X	283	2	285	581	14	595	553	27	580	498	54	532	595	65.2%

正：正常卵 変：変形卵



第1図 処方別鉤虫卵検出成績
(1)水とグリセリン



第2図 処方別鉤虫卵検出成績
(2)メタノールとグリセリン

註 A, Bは加熱乾燥20分30分後の成績 C, Dは加熱乾燥30分後自然放置1時間, 2時間後の成績

は試験Iの要領で、V, II, IX 処方について、加熱乾燥20分後鏡検した。浮游法は便量500mgを、口内径1.4cm、高さ9cmの試験管に入れ、硫苦加飽和食塩水(比重1.240)で溶解混和後40分放置18cm²カバーガラスで集卵した。各法10標本宛の全虫卵を数え、その平均値、最小・最大値、EPGより想定せる標本内の期待虫卵数および卵検出0の標本数を算出し、虫卵検出能を比較検討した。なお試験I・IIを行つた室内条件は温度21~22°C、湿度64%であつた。

成績および考察

試験I

第3表、第1図よりまず加熱乾燥20分後の虫卵検出数を見ると、I, II, III, VI, VII, VIII, IXに高く、V, Xは約1/2しか検出されない。V, Xはグリセリンの濃度が高いため、視野が澄明とならず検出数が低い。虫卵検出数に対する正常卵検出率は、II, III, IV, V, VIII, IX, Xに高

く、I, VI, VIIに低い。I, VI, VIIでは大部分の虫卵が変形卵であつた。すなわちグリセリンの濃度が低い場合、変形卵が生じ易い。加熱乾燥30分後では、20分後に比してV, Xにおいて検出虫卵数は一段と高い。視野が充分に澄明となり、標本内の虫卵がすべて鏡検算定されたものと思われる。しかし正常卵検出率はIX, X以外では小さくなり、Vでは約2%, VIIIで約半数、その他の処方では大部分の虫卵が変形卵と認められた。本法においては変形卵の鑑別が虫卵検出の重要な鍵となつている。Vでは、正常卵が比較的多数残存しているが、他処方と比較し、検出率が劣つている。同一標本について加熱乾燥30分後、自然放置1時間および2時間後の成績をみると、全般的に変性傾向が徐々に進行しているごとくで、I, II, VI, VIIでは、ほとんどが変形卵に移行している。Vにおいては検出虫卵数が30分後402であつたものが、1時間後309、2時間後218に減少している。この減少傾向はIII, IV, Xにもみられる。いずれもグリセリン濃度

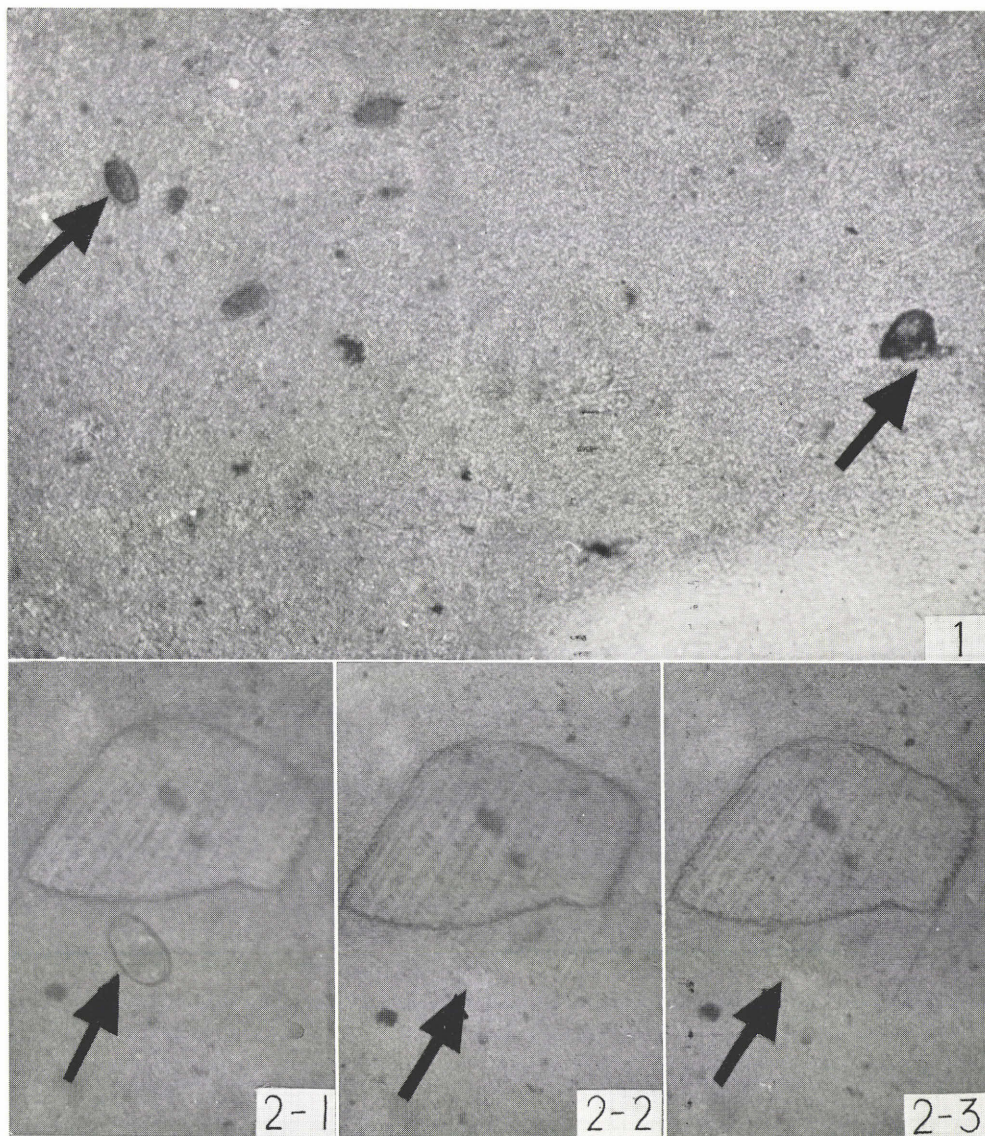
の高い処方である。正常卵はV, VIII, IX, Xに比較的多く認められるが、特にIX, Xに高い。各処方の最高検出虫卵数と EPG から想定した期待虫卵数より得た虫卵回収率をみるに、V以外はほとんど差がなくVが他に比して低い。以上の成績をまとめて考察すると、加藤の処方によるVは、現在最も広く使用されているが、乾燥が不充分の場合には虫卵の検出率が低く、乾燥が充分で視野が澄明となつたときには卵の萎縮変形像(写真1以下萎縮変形卵と略)、卵の消失(写真2-1・2・3)がみられるので、標本作製後の乾燥放置が短かくとも、長くとも問題があるわけで、安定した成績が得られない。グリセリンの混合比を低くした場合は、視野は澄明であるが、容易に変形卵を生じ、そのため、この変形卵の鑑別ができないと鉤虫卵検出は極めて低くなる。一方、変形卵の鑑別については、すでに著者らの1人齊藤(1961)が報告したが、今回の試験で水とグリセリンの混合比4:1としたII処方では、卵かく破壊、空泡形成による不規則なくずれ等による鑑別困難また萎縮変形卵等もないので、鏡検上変形卵像が把握し易く、したがってある程度習熟すれば、検出率も高くなるので、水とグリセリンを使用する本法においては、II処方が検便実施上適切であると考えられる。しかしグリセリンと水による処方液のうち正常卵のみを以て鉤虫卵検出成績とするときはVが良いわけであるが、見落しの危険性を多分にもつ萎縮変形卵、卵の消失等の問題があり、決して優れた処方とはいえない。それに比してグリセリンにメタノールを混じた処方液では、グリセリンの濃度が低い場合は、水の場合と同様変形卵が多く出現し問題があるが、メタノール、グリセリンの混合比を3:2にした時は、検出虫卵数も高く、なお大部分が正常卵の形で固定され、標本価値が一段と優れている。なお一言すれば、変形卵の出現は標本が乾燥すれば出現するもので、熱乾燥による出現ではなく、われわれは自然放置、通風乾燥等も試みたが、いずれにおいても、視野が澄明となり鏡検し易い条件に到れば、変形卵が同様に出現していることを経験してい

る。で、熱乾燥を広く行っているが、それによると多数の標本が一定条件で、短時間に鏡検し得る。今まで多くの追試が、加藤の処方で行われているが、グリセリン濃度について行つたものはなかつたので検出率の不安定性が目立っていた。IX処方の虫卵検出状況は優秀であるが、この点の考察を加えるため、以下のごとき試験を行つた。浮游法によつて多数の鉤虫卵を分離集卵し、濃厚な鉤虫卵を含む水0.036mlをとり、スライドガラス上におき、これにV, IX処方液に浸漬したセロハン紙を載せて鏡検し確実に虫卵数を数え、加熱30分直後およびその後自然放置して2時間後鏡検、更に引続いて20日以上自然放置して毎日あるいは2日おきに鏡検した。V処方では全般的に卵の萎縮変性を生じ、21コ中、30分後2コ、2時間自然放置後1コ、計3コの卵の消失があり、7日後に5コが検出されなかつた。このことより写真2に示すような尿内の卵消失現象は第1図および第3表の成績から考えてかなり起り得るのではないかと思われる。それに比して、IX処方では、いずれの鏡検時も安定した成績で20日すぎても虫卵数および形態に変化なく永く観察可能であつた。この試験で水分量0.036mlとしたのは、普通人尿硬便の水分含有量は約60%であるので、60mgの便量では0.036mlとなるによつた。この場合セロハン紙に附着せる浸漬液量の実測値の平均が0.12mlであるので、メタノールは約70%となり、一般に組織等の固定に用いるメタノールの濃度とほぼ等しかつた。すなわちメタノール、グリセリン混合比3:2は、虫卵固定の働きをもつので、虫卵検出に際しても安定した優れた成績が得られたのであろう。また、この試験では、V, IX処方共に変形卵が認められなかつたことより、尿内における変形卵は虫卵の組織化学的因子によるものではなく、尿による物理的、化学的現象が大きな要因であると推測された。なお本試験では主として鉤虫卵について述べたが、他の虫卵についても、IX処方は極めて安定した正常の形態をもつ虫卵像として検出できたことを附記する。

第4表 浸漬液附着量

処方別実測値		No.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V	処方 ml 平均 0.12	0.120	0.120	0.120	0.119	0.121	0.120	0.120	0.120	0.120	0.122
IX	処方 ml 平均 0.12	0.120	0.120	0.118	0.121	0.120	0.120	0.120	0.120	0.121	0.120

V処方 水 : グリセリン 5 : 5
IX処方 メタノール : グリセリン 3 : 2



写真説明

1. 加藤処方で視野が澄明になった場合の鉤虫の萎縮変形卵 (↗) と鞭虫卵 (↖)
- 2-1 加藤処方による加熱乾燥 20 分後の鉤虫卵 (↗)
- 2-2 同上加熱乾燥 30 分後の同卵の消失状況 (↗)
- 2-3 同上自然放置 1 時間後の同卵の消失状況 (↗)

試験 II.

第 5 表に示す通り、検査法別にみると 10 標本の平均検出虫卵数の最大は浮游法で最小は単純塗抹法である。厚層塗抹法は V 処方がやや低いと単純塗抹法に比べれば、検出率ははるかに高い。しかして虫卵濃度別に、

検出虫卵数と期待虫卵数からみた虫卵回収率は厚層塗抹法の II, IX 処方が 45~80%, 単純塗抹法が 35~70%で、厚層塗抹法の V 処方が 12~30%で低く、浮游法の 8~13%が最も低かった。ただし浮游法において低率であるのは液表面から一度カバーガラスに附着した虫

第5表 虫卵濃度

稀 積 度	ツビニ鉤虫卵陽性便 EPG 1,520				2 倍 稀 積 (760)				4 倍 稀 積 (380)							
	検出状況	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値
方法																
単純塗抹法		2.1	1~3	0	4.56	0.8	1~2	4	2.28	0.5	1~2	6	1.14			
セロハン V		22.6	23~31	0	91.2	11.1	9~16	0	45.6	5.1	2~8	0	22.8			
厚層塗抹法 II		65.9	58~72	0	91.2	31.8	28~37	0	45.6	18.1	13~22	0	22.8			
IX		63.4	58~73	0	91.2	31.9	28~38	0	45.6	19.0	16~25	0	22.8			
浮 游 法		100.1	96~105	0	760.0	49.5	45~56	0	380.0	21.4	18~26	0	190.0			

() 内は推定を示す

卵を以て算出したもので浮上虫卵中の一部の値である。それ故に最も低率であつた。一方、虫卵濃度の減少によつて単純塗抹法は虫卵の検出されない標本が高率に出現し、推定 EPG 380 で半数以上におよび、その他の方法に比べて多数回検査の必要を示唆する。この点については、すでに小宮らが単純塗抹法の虫卵濃度と理論的必要検査回数の問題の検討を行つている。厚層塗抹法は推定 EPG 95 で、V 処方では虫卵の検出されない標本が始めてみられたが、II, IX 処方では全標本に虫卵が検出され、更に虫卵濃度が小さくなくても、2~3 枚の標本検査を行えば、浮游法に劣らない成績を得ると考えられる。浮游法は最も検出率が優れているが、操作手技が複雑なので、この点を考慮するとき、集団検査法としては厚層塗抹法が比較的簡便で検出力も高く優秀であるといえよう。なおしばしば述べるごとく現段階における厚層塗抹法では、多少にかかわらず鉤虫卵の空泡形成による変形像すなわち変形卵の出現は阻止できず、正常卵のままの形態で観察している単純塗抹法や浮游法と異なつて、これが一般の空泡との鑑別に若干の習熟が必要である。変形卵が出現しないよう処方液等の工夫を重ねる一方、現行の厚層塗抹法の技術者に変形卵の鑑別について注意を喚起すべきであると考え、変形卵防止の処方液として水の代りにメタノールを使用した IX 処方では、虫卵検出率が II 処方とほぼ等しく高率で、かつ多くの虫卵が正常卵として検出されたことは、試験 I の加熱乾燥 20 分後の成績に一致していた。すなわち IX 処方の場合は、通常、加熱乾燥 20 分前後で澄明な視野が得られ、その後 1 時間以内に鏡検を終了し得れば、優れた成績を示すと考えられる。

ま と め

加藤原法によるセロハン厚層塗抹法は、セロハン浸漬液の水とグリセリンの混合比を 1 : 1 としているが、標本が未乾燥の場合は視野が澄明ではないため、虫卵の見

逃しが少なく、視野が澄明になるよう乾燥すると、萎縮変形卵、更にまた卵の消失が認められる。そこで著者らは浸漬液の処方特にグリセリンの濃度を種々かえてみたところ、グリセリン濃度を低くすると、虫卵の検出は良好であつて萎縮変形卵の出現、卵の消失等はないが、大多数の虫卵は変形卵を示すので、鏡検に際してはその形態を十分に識別することが必要である。次に虫卵の固定を意図して水の代りにメタノールを使用した場合、メタノール、グリセリンの混合比 3 : 2 の処方では最も虫卵検出が優れていた。すなわち萎縮変形卵の出現、卵の消失も認められず、かつ変形卵を生ずることも少く、またある程度長期観察に耐えることが明らかになつた。しかし、なお変形卵の出現がみられるので今後更にこの点について検討の要がある。

終稿に際し貴重な御助言を仰ぎました予研寄生虫部長小宮義孝博士ならびに千葉大学医学部農山村医学研究施設内田ふき博士その他の方々に深く感謝申し上げます。

なお本論文の要旨は第 32 回日本寄生虫学会総会において発表した。

主 要 文 献

- 1) Beaver, P. C. (1949) : Quantitative hookworm diagnosis by direct smear. J. Parasit., 35, 125-135.
- 2) 後藤寿作(1960) : 集団検便に最適と思考される加藤氏セロファン厚層塗抹法の再検討, パンフレット, 名古屋市立大学医動物学教室.
- 3) 板橋卓(1958) : 千葉県衛生研究所年報, 6.
- 4) 加藤勝也(1951) : 第 20 回日本寄生虫学会総会, 演題 70 追加発表.
- 5) 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游法との比較検査成績について(抄). 寄生虫誌, 7(3), 239.
- 6) 加藤勝也(1959) : 優れた寄生虫卵検査法, パンフ

と 検 出 率

8 倍 稀 釈 (190)					16 倍 稀 釈 (95)					32 倍 稀 釈 (48)					64 倍 稀 釈 (24)				
平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値	平 均	最 小	最 大	0 本 の 数	期 待 値
0.4	1	~	6	0.57	0.2	0	~	9	0.29	0.1	0	~	9	0.14	0.1	0	~	9	0.07
1.4	1	~	0	11.4	0.8	1	~	3	5.7	0.4	1	~	7	2.9	0.2	1	~	8	1.4
8.9	7	~	0	11.4	4.0	3	~	0	5.7	1.3	1	~	3	2.9	0.6	1	~	6	1.4
9.5	6	~	0	11.4	4.2	3	~	0	5.7	1.3	1	~	3	2.9	0.6	1	~	5	1.4
9.2	7	~	0	95.0	4.0	3	~	0	47.5	2.8	2	~	0	23.8	0.8	1	~	2	11.9

レット, 公衆保健協会, 1-6, 名古屋.

- 7) 加藤俊一・三浦光生(1954): 検査比較について. 寄生虫誌, 3(1), 35(抄).
- 8) 厚生省編纂(1955): 寄生虫検査指針, 衛生検査指針, (1) 細菌, 血清学的検査指針(V-2), 改訂
- 9) 小平敬子・矢島ふき(1952): ストール氏法による鉤虫卵検査法の研究, (1) 検査単位容積中の虫卵分布について. 11回寄生虫学会関東部会発表.
- 10) 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.
- 11) 小宮義孝(1960): セロファン厚層塗抹標本による寄生虫卵検査法の検討. 寄生虫誌, 9(1), 61-68.
- 12) 小宮義孝・佐藤澄子(1954): 直接塗抹標本における蛔, 鉤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, (1) 直接塗抹標本における蛔, 鉤虫卵検出力について. 寄生虫誌, 3(3), 216-219.
- 13) 西三郎・大島智夫・木畑美知江(1962): 寄生虫卵検査法の感染濃度別検出率(抄). 寄生虫誌, 11(4), 310.
- 14) 齊藤正己(1961): 人体寄生虫卵集団検査におけるセロファン厚層塗抹法に関する研究(殊に空泡

形成によると思われる卵変形像について). 寄生虫誌, 10(2), 196-203.

- 15) 齊藤正行・小西井望・竹内正(1959): 臨床検査技術提要. 改訂第14版, 克誠堂出版株式会社, 東京.
- 16) 佐藤澄子(1957): 鉤虫卵検査法の研究, (3), 直接塗抹法の再検討. 寄生虫誌, 6(1), 57-66.
- 17) Stoll, N.R.(1923): Investigations on the control of hookworm disease, XV. An effective method of counting hookworm eggs in feces. Am. J. Hyg., 3, 59-70.
- 18) Stoll, N.R. & Hansheer, W.C.(1926a): Accuracy in the dilution egg counting method. Am. J. Hyg., 6, March Suppl., 80-133.
- 19) 戸谷徹造・加藤勝也(1962): セロハン厚層塗抹法による寄生虫卵検査法の紹介. 臨床内科小児科, 17(7), 643-650.
- 20) 矢島ふき(1960): 鉤虫 Carrier に関する公衆衛生学的研究, (3) 浮游法及び塗抹法の検出力と寄生虫数の関係. 寄生虫誌, 9(2), 80-133.
- 21) 横川定・横川宗雄(1957): 寄生虫研究の実際, 第2版, 杏林書院. 東京.

STUDY ON THICK SMEAR TECHNIC WITH CELLOPHANE COVER
FOR STOOL EXAMINATION FOR HELMINTH OVA
I. EXAMINATION OF SOAKING LIQUID

AKIO UCHIDA, MASAMI SAITO & RIKIO YANAGISAWA

(Institute of Rural Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba)

Since Kato (1951) invented the thick smear technic with cellophane cover for stool examination for helminth ova, this technic was reexamined by some workers and has widely been adopted in this country.

The principle of this technic is to use a cellophane cover instead of the original cover glass, in which the cellophane cover is to be soaked into the mixture of water and glycelin in 1:1 ratio for over 24 hours before the use. Under this procedure, when the specimen is dried it becomes difficult to detect the ova because they are atrophied and transformed with dryness, while the ova can easily be detected when the specimen is adequately wetted.

The authors, therefore, reexamined this technic with attention to the preparation of soaking liquid, particularly to the ratio of glycelin to water. As a result of this it was proved that in a lower concentration of glycelin, such as a ratio of water to glycelin of 4:1, a higher and uniform detection rate of ova was obtained, though the most of ova was transformed. In this case, the transformed ova should be carefully examined.

In the next place, menthol was employed instead of water and it was proved that the soaking liquid consisting of menthol and glycelin in 3:2 ratio gained the most superior detection rate of ova with a few transformed ova. This satisfactory result would be due to fixing action of menthol. Further work needs to be done in order to completely prevent ova from degenerating.