

肝吸虫卵および横川吸虫卵を対象とした Tween 80 クエン酸緩衝液による 新遠心沈澱集卵法

大島 智夫 影井 昇 木畑美知江

国立公衆衛生院

藤野 訓男 野口 宏 藤岡 勝美

岩手県大東保健所 岡山県勝央保健所 高知県中村保健所

(1965 年 2 月 15 日受領)

はじめに

糞便内寄生虫卵検査のために工夫された遠心沈澱集卵法については、Teleman(1908)のエーテル・塩酸法以来、エーテル・稀塩酸法(宮川, 1913), アンチホルミン・エーテル法(矢尾板, 1913)などの方法と Mathieson & Stoll(1945)の日本住血吸虫卵に対する諸法の比較試験などがあり、Weller & Dammin(1945)が塩酸・エーテルと界面活性剤として Triton NE を使用するようになってより、Hunter *et al.*(1946, 1948), Faust *et al.*(1946)は日本住血吸虫卵の検出に界面活性剤が有効であることを確認した。本邦でも伊藤(1953)は日本住血吸虫卵を有する糞便を用いて多くの集卵法を詳しく比較し、Hunter *et al.*(1948)の AMSIII 法が最良であることを認めた。小宮・横川(1953)は AMSIII 法を肺吸虫卵の糞便よりの検出に応用して勝れた成績をあげ、この方法が吸虫類の虫卵検出一般に有効であることが想像された。AMSIII 法は鉤虫卵、蛔虫卵の検出度が低く、Maldonado *et al.*(1954)は Weller-Dammin 法は蛔虫卵、特に不受精卵の検出に不適当とし、MGL 法に Triton NE を加えたものが一般的集卵法として好適であるとした。分島ら(1961)は Weller-Dammin 法の Triton NE を邦産品 Emasol 4130 で代用し、蛔虫不受精をのぞいた各種虫卵の検出率の高いことを報告している。一方以上の報告に用いられた界面活性剤は主として非イオン性の乳化剤であつたのに対し、いわゆる陰イオン性洗剤(ライポン F®)を用いる方法で福田・岩倉・谷川(1959)が肺吸虫卵につき、岡部・小野・高尾(1964)が肝吸虫卵について試み、実用に供し得る

ことを述べている。一方 Ritchie (1948)は界面活性剤を使用しないフォルマリン・エーテル法(MGL)を考案し、この方法は主としてアメリカの一般検査室で広く用いられるようになり、糞便中の虫卵および原虫嚢子検査法としての価値が認められた(Wyckoff *et al.*, 1958; Brooke, 1958. その他)。Ritchie *et al.*(1960)はこの方法の虫卵回収率を検討し、液の比重と pH が大きな影響を有することを見いだしたが、その回収率の最大となる pH は虫卵により著るしく異つていた。

以上種々な方法が今日まで報告されているが、およその傾向として蠕虫類の虫卵を糞便より検出する際には、界面活性剤を含んだ集卵液とエーテルを用いると沈渣中の虫卵検出率が高くなることが認められている。しかしこの方法に関しては Ritchie *et al.*(1960)が行つたような pH, 比重等に関する検討がなされていない。またわが国の重要な寄生虫病である肝吸虫、横川吸虫等の虫卵については、分島ら(1961)以外ほとんど検討していない。今回、数種の界面活性剤を濃度と pH を変化させて作用させ横川吸虫卵および肝吸虫卵を含む糞便よりの集卵効果を定量的に測定したところ、集卵法に関する二、三の新しい現象を見だし従前の方法よりすぐれたと思われる Tween 80 とクエン酸緩衝液による新しい集卵液を見いだすにいたつたので報告する。

材料および方法

詳細は各実験成績の順にそれぞれ説明するが共通する原則的なものを述べる。

1. Tween 80 クエン酸緩衝液:

本研究は一部を文部省科学研究費によつた。ここに附記して謝意を表する。

処方：クエン酸	12.914 gm
リン酸 2 ナトリウム (12 水塩)	27.614 gm
Tween 80	5.0 ml
マーゾニン	0.1 gm
以上に、蒸留水を加え	1,000 ml とする。

作り方：

クエン酸とリン酸 2 ナトリウムは 200~300 ml の蒸留水に加蒸溶解せしめ、Tween 80 はまず 50-100 ml の蒸留水によく攪拌して溶解させ、これらが蒸留水を加え全量を 1,000 ml とする。マーゾニンを加えた直後に一部白濁するが混和すれば透明となる。

本液は McIlvane 緩衝液の pH 4.0 に相当するものに Tween 80 を 0.5% に加え、防腐用として 1 万倍マーゾニンを加えたもので、比重 1.020 であり、一度作成すれば数カ月の長期保存にたえうる。

2. 集卵効果の比較法：

従来の方法は Maldonado *et al.* (1954), Wykoff *et al.* (1958) 等にみられるようにある同一の集団の検査を異にする方法で行ってその陽性率を比較する方法が多いが、それでは相対的な順位しかわからないので、今回はより定量的で普遍性のある虫卵回収率と沈渣量に比較の重点をおいた。

虫卵を含む糞便 10 gm を約 50 ml の水道水とホモジナイザーまたはミキサーで混和し、ガーゼで濾過して粗大消化残渣を除き、さらに水を加えて 300 ml とし、充分攪拌後その 0.1 ml をとって虫卵数を数え、これを 10 回繰返して平均をとる。この平均値が 10~20 であることが望ましい。これはもとの糞便の E.P.G. にして 3,000~6,000 であり、濃厚なばあいは、虫卵を含め健康者便にて適宜稀釈する。稀薄なばあいは 0.1 ml 中の虫卵数が 1 前後のばあいは約 30 回、2 のばあいは 20 回、3 以上であれば 10 回繰返して平均をとる。

この糞便液を 5 ml づつよく混和して遠心管に分注し、2,000 r.p.m. 2 分間遠心後上清を捨て被検材料とする。

これに集卵液 7 ml、エーテル 3 ml を加え、拇指またはゴム栓で密栓して充分振盪攪拌し、2,000 rpm 2 分間遠心し、浮上したエーテル層、スクラム層を細い棒で管壁より離し、管を傾けて上清とともに捨て、管壁に附着したスクラムは綿棒でぬぐいとる。全沈渣を毛細ピペットで数枚のスライド上にうつし、24×32 mm のカバーをかけて鏡検、沈渣中の全虫卵数を数える。

あらかじめ算定した糞便液 5 ml 中の全虫卵数に対する沈渣中の虫卵数の百分比を虫卵回収率とした。

一方最終沈渣量を容積または乾燥重量で測定した。乾燥重量は含有する塩類重量を計算によりさしひくか、よく洗滌し塩類を除去した沈渣について測定した。乾燥はふ卵器に 48 時間入れて行った。虫卵回収率が高く沈渣量の少ないものをもって集卵効果は高いものとした。

3. 動物実験の際の飼料：

虫卵材料として犬の糞便を使用するばあいは、後述のように食餌の種類により集卵効果が異なるので原則としてウドン (1 日 3 タマ, 1 タマ 220 gm) を 5 日間食べさせ、最後の 2 日の糞便を材料として用いた。

4. pH は日立、堀場の直読 pH メーター、表面張力は Stalagmeter を使用し測定した。

実験成績

A. 横川吸虫卵の場合

1. 横川吸虫卵を指標とした従来の遠心集卵法の集卵効果比較：

実験材料は横川吸虫感染者糞便より、2 ml (遠心沈渣量として 0.67 ml) のサンプル中に横川吸虫卵 290 個を含む糞便液を作成し、2 人の術者 (A, B) に 1 法につき 4 回づつ集卵法を繰返して平均値の大差ないことを認めたと上に両者をプールしてその効果を比較した。術式は埼玉衛研法は分島ら (1961)、稀塩酸エーテル法は宮川 (1913)、MGL 法は Ritchie (1948)、アンチホルミンエーテル法は矢尾板 (1912)、AMS III 法は Hunter *et al.* (1948)、MIFC 法は Blagg *et al.* (1955) によつたが Sapiro *et al.* (1953) の Merthiolate チンキが入り困難なため太田 (1957) の発表している変法によつた。結果は第 1 表のように虫卵回収率はきわめて低率であり、僅かに界面活性剤を使用した埼玉衛研法および AMS III 法が 4~

Table 1 Comparison of the recovery rates of the eggs of *Metagonimus yokogawai* and sediments volumes among various centrifugal concentration methods

Methods	Recovery rate of eggs in sediments	Sediments volumes	Reduction rates of volumes
Weller-Dammin's Modif. (Saitama Eiken Methods)	4.78%	0.16 ml	24%
A.M.S.III	3.82%	0.19 ml	28%
M.I.F.C. (Modif.)	2.24%	0.18 ml	27%
M.G.L.	1.90%	0.13 ml	19%
HCl-Ether (Miyagawa)	1.89%	0.22 ml	33%
Antiformin-Ether (Yaoita)	0.0%	0.10 ml	15%

5%の虫卵を回収できたに過ぎない。

矢尾板法にいたつては沈渣量は少ないが、虫卵が沈渣中に殆んど見出されないのので集卵法としては全く使用できない。5%以下の集卵率では0.5gmの糞便を使用したときに、その沈渣虫卵数は2.5mgの糞便中のものに相当するので40mgを使用する厚層塗抹法を入念にみたばあいより検出率は低いのは当然である。

2. 横川吸虫卵を指標とした各種界面活性剤と集卵液のpHの集卵効果に対する影響:

1. で界面活性剤が有効であることが判明したので、非イオン性乳化剤として Tween 80 (1%), Triton NE (1%), エマゾール 4130 (1%) (花王石鹼), 陰イオン洗剤としてライポン F (0.3%), ABS として 0.1%) を McIlvane 緩衝液により pH 2.0, 4.0, 7.0, 8.0 としたものに溶解させたものを集卵液として、1と同様の材料につき同様の方法で集卵効果をみた。結果は第2表のようで、沈渣量率(検体を水洗遠心時の沈渣量に対する最終沈渣量率)は界面活性剤を使用することにより減少するが、いずれの界面活性剤を使用しても、沈渣量は酸性の方が少く、中性およびアルカリ性の液では沈渣量の著増することが認められる。虫卵回収率は中性洗剤であるライポン F は、中性のばあいに回収率が高いが、酸性域では全く集卵効果のないことは注目すべきである。Tween 80, Triton NE は pH に対してほぼ同様の態度をとり、回収率の最高は pH 4.0 で各々 54.86% および 60.54% を示し、アルカリ側では急減した。Emasol は pH 差による回収率の変動はもつとも少いが、回収率はやや下り。最高が pH 4.0 で 50% に充たなかつた。

3. Tween 80 の濃度と横川吸虫卵の集卵効果:

材料として横川吸虫卵を E.P.G. 1,716 個含む人糞便

Table 2 Effects of pH on the recovery of the eggs of *Metagonimus yokogawai* and the volume of the sediments using various detergents by centrifugal sedimentation methods

Detergents	pH	Rate of the recovery of eggs in sediments (%)	Rate of the volume of sediments. (Reduction rates by %)
Tween 80 (1.0%)	2.2	24.29	3
	4.0	54.86	6
	7.0	18.18	13
	8.0	17.78	16
Triton NE (1.0%)	2.2	50.67	3
	4.0	60.54	6
	7.0	21.45	10
	8.0	28.75	13
Emasol 4130 (1.0%) (Kao Soap)	2.2	32.81	3
	4.0	49.21	6
	7.0	40.62	10
	8.0	35.22	16
Lipon F (0.3%)	2.2	0.18	unmeasureable small
	4.0	2.75	"
	7.0	61.16	10
	8.0	48.78	15

0.5 gm づつをガーゼで濾過して1標本とし、1つの Tween 80 濃度段階に4標本づつを用い、その平均の虫卵回収率を計算した。集卵液は McIlvane 緩衝液 pH 2.2 を用いた。

Tween 80 の濃度は 0.001% より 3.0% までを 10 倍稀釈で 2 系列を作り、液の表面張力を Stalagmometer により測定した(水の表面張力を 20°C で 72.75 dyne/cm とする)。Tween 80 の濃度 0.1% 以上ではエーテル層はエーテル粒子が融合せずゼリー状となつた。虫卵回収率は、濃度 0.001% 以下では殆ど 0 に近く、殆どの虫卵は浮上層に捕えられて沈下しない。これより濃くなるにつれ、沈渣の虫卵回収率は上昇し 0.1% 以上で 80~

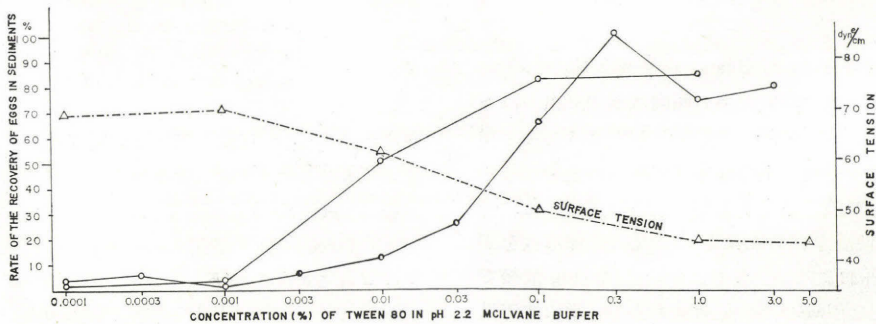


Fig. 1 Effect of the concentration and surface tension of Tween 80 solution in pH 2.2 McIlvane buffer on the recovery rate of the eggs of *Metagonimus yokogawai* in the sediments of ether sedimentation procedure

100%の間のほぼ安定した虫卵回収率を示し、1%以上濃くしても効果は同じであつた。集卵液の表面張力も0.001%以下ではほぼ水と同様で低下が認められないがこれ以上では Tween 80 の濃度に比例して表面張力は低下し1%以上で 44 dyne/cm 前後の定常状態に達する。虫卵回収率と表面張力は相関々係が認められた。

4. 小 括 :

1) 糞便内横川吸虫卵の集卵法として、界面活性剤を用いぬ方法は虫卵回収率が3%以下で、集卵の意義は少く、ことにアンチホルミン・エーテル法は逆に虫卵が消失し、不適當である。

2) 沈渣量はいずれの界面活性剤を用いても集卵液の pH 上昇とともに増大するので、虫卵回収率の最高値(61.68%)が pH 7.0 前後にある中性洗剤は沈渣量が多く、検鏡に不便なため、集卵法に用いるには不適當である。

3) Tween 80, Triton NE, Emasol 4130 等の非イオン性乳化剤は虫卵回収率は、酸性側で高く、pH 4.0 で最高となる(50~60%)。

4) 最も入手しやすい Tween 80 につき濃度と虫卵回収率の関係を調べると、0.001%以下で集卵効果なく0.1~1.0%の間で80~100%の集卵効果があり、1%以上の高濃度は不必要である。

5) Tween 80 使用の虫卵回収率の増減は集卵液の表面張力と逆相関がある。

B. 肝吸虫卵のばあい

1. Tween 80 の濃度の虫卵回収率および沈渣量に対する影響 :

実験材料としてはウドンのみを5日間与えた感染犬の4日目、5日目の糞便を用い、実験材料および方法に記した通りの試験標本を作成し、1回に2標本づつを使用した。

集卵液は pH 4.0 の McIlvane 緩衝液を用いた。第2図にみられるように虫卵回収率の傾向は横川吸虫のばあいと全く同一で、Tween 80, 0.01%以下ではほとんど集卵効果はないが、0.1%以上ではほぼ100%の虫卵回収率がみられた。1.0%液では多少虫卵回収率が減少した。一方 10 ml の糞便液を用いたばあいの沈渣乾燥重量を測定すると、0.1%および0.5%のばあいには5mg前後で最少で、1.0%に Tween 80 を増量すると一挙に沈渣量が倍増する現象が観察された。よつて虫卵回収率が高く沈渣量の少いためには0.1%~0.5%に Tween 80 を使用することが望ましい。0.5% Tween の pH 4.0 の乾

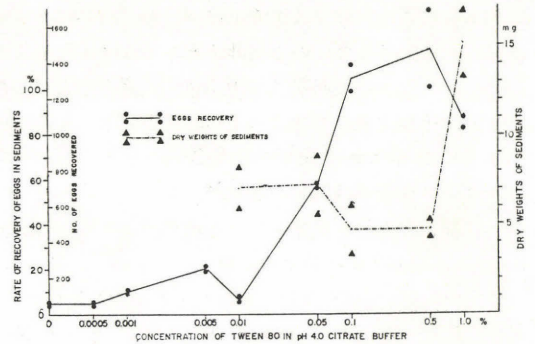


Fig. 2 Effect of the concentration of Tween 80 solution in pH 4.0 McIlvane buffer on the recovery rate of the eggs of *Clonorchis sinensis* in the sediments and the weight of the dry sediments

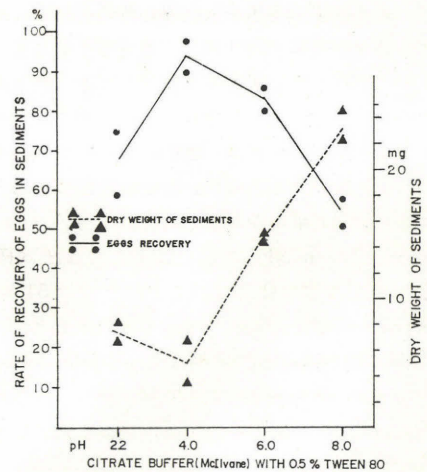


Fig. 3 Effect of the pH of McIlvane buffer with 0.5% Tween 80 on the recovery rate of eggs of *Clonorchis sinensis* in the sediments and dry weights of the sediments.

燥沈渣重量は 4.8 mg, 無処置糞便液のそれは 58.1 mg, 比率は 8.3%であつた。浮上エーテル層のゲル化は A.3. 同様 Tween 80 0.1%以上においては毎回みられた。

2. Tween 80 を使用したばあいの pH の虫卵回収率と沈渣量に対する影響 :

試験材料, 方法は B.1. と同じ。Tween 80 は B.1 により 0.5%とし, pH は McIlvane 緩衝液により 2.2, 4.0, 7.0, 8.0 の4種を設定した。沈渣量は糞便液 10 ml について最終沈渣量の乾燥重量を測定した。第3図のよう

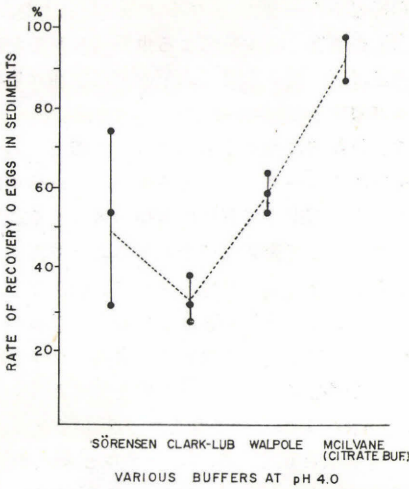


Fig. 4 Influence of 0.5% Tween 80 in various buffers of pH 4.0 on the recovery rate of the eggs of *Clonorchis sinensis* in the sediments of ether concentration procedure

に虫卵回収率は pH 4.0 で最高で 90~100% を示し、アルカリ側で低下が著しく、沈渣量はやはり pH 4.0 が最少で、アルカリ側で急増する傾向がみられ、ほぼ A 2 の横川吸虫卵のばあいと同様であった。pH 4.0 の沈渣乾燥重量は 5.2mg、無処置糞便液の乾燥重量は 43.0mg、比率は 12.1% であった。

3. 緩衝液の種類と虫卵回収率への影響：

以上より McIlvane 緩衝液で Tween 80 は濃度 0.5%、pH 4.0 の条件で虫卵回収率は最高で、沈渣量も少いことが確認されたが、Sørensen, Clark-Lub, Walpole, の各緩衝液で pH 4.0 の液を作成し、McIlvane のばあいと比較した。第 4 図に示されるように McIlvane のクエン酸、磷酸 2 ナトリウム緩衝液が、虫卵回収率最高であった。pH 4.0 であればどの緩衝液でも同じ虫卵回収率を示すわけではなかつた。クエン酸を用いた集卵法は Jacques *et al.* (1917) の報告があるが、クエン酸の意義については不明である。

以上の点から pH 4.0% クエン酸、磷酸 2 ナトリウム緩衝液 (McIlvane) による 0.5% Tween 80 液は、肝吸虫集卵液としても他の緩衝液よりもすぐれていることが判明した。

4. 食餌別による糞便性状の差異の、Tween 80 クエン酸緩衝液法、AMS III 法、ライボン F 法の集卵効果に対する影響：

界面活性剤の集卵作用が糞便の性質によつてはなほ大きく異なることが経験的にわかつていたので、実験用の同一肝吸虫感染犬にウドン 1 日 3 タマづつ 5 日間 (1 タマ 220 gm)、鮭カン (内容 220 gm) 1 日 3 カン 5 日間、犬用ビスケット (ビタワンペレット) 1 日 500 gm 5 日間をひきつづき与え、おのおの 4 日目、5 日目の便を採取しそれぞれ材料および方法にある通りのサンプルを作成した。各糞便液 5 ml (糞便 1/6 gm に相当) 中の肝吸虫卵数は、ウドン便 950、鮭カン便 1440、ビスケット便 70 であつた。比較に用いた集卵液は 0.5% に Tween 80 を溶解した pH 4.0 のクエン酸緩衝液 (McIlvane)、0.5% に Triton NE をとこした AMS III 液 (pH 1.2)、ABS としてライボン F を 0.3% にとこした pH 7.2 の M/15 磷酸緩衝液を用いた。ライボン F はこれ以上濃度を高めると白濁して使用に耐えない。

結果は第 5 図のようである。食餌別にみると犬用ビスケット便は不消化残渣多く、しかもその大部分は植物性の角皮、細胞膜破片および断裂繊維で、これらのものに対しては、いずれの方法によるも同様に沈渣量はきわめ

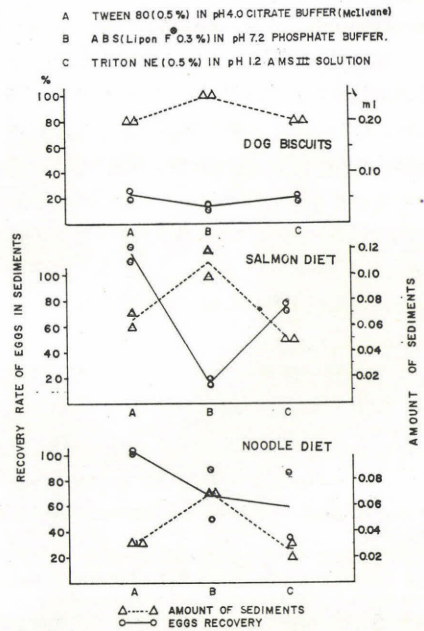


Fig. 5 Influence of the various diets on the recovery rate of the eggs of *Clonorchis sinensis* in the sediments and the amounts of the sediment's volume by ether sedimentation procedure with the solution A, B, and C

で多く、虫卵回収率も10~20%の低率を示し、標本は虫卵をみわけるのに困難な状態であった。

鮭カンおよびウドンの便はビスケットに比し沈渣量少く、ことにウドンの便は沈渣量少く、検鏡にきわめて好適であった。方法別にみるに、ライポソF法はいずれの食餌でも沈渣量最大であり、虫卵回収率はウドン便のばあいにはややよく平均69%であるが、鮭カン便のばあいには最低で17%にすぎない。AMS III法は、沈渣量が最も少ないが、虫卵回収率はTween 80、クエン酸緩衝液法に劣ってウドン便で平均60%、鮭カン便で平均76%であった。Tween 80、クエン酸緩衝液法は沈渣量はAMS III法よりやや多いが、虫卵回収率は最高でウドン便、鮭カン便とも100%であった。

5. 小 括 :

1) 肝吸虫卵に対する Tween 80 の pH 4.0 における虫卵回収率の濃度勾配は、横川吸虫に対するのとはほぼ同様 0.1~1.0% で最高となりほぼ 100% を示し、0.001% 以下は無効である。

2) 沈渣量は Tween 80, 0.1~0.5% が最小で、1.0% に増量すると 0.5% のばあいの 3 倍に増加する。

3) Tween 80, クエン酸緩衝液 (McIlvane) における沈渣量は pH の増加とともに急増するが、肝吸虫卵回収率は酸性側が高く pH 4.0 で 90~100% である。

4) pH 4.0 を示す各種緩衝液のなかで、クエン酸緩衝液 (McIlvane) が肝吸虫卵回収率最高であった。

5) いずれの界面活性剤によっても植物性繊維、角皮細胞膜破片の多い糞便では、沈渣量多く、虫卵回収率も低くしたがって集卵効果が低く、ウドン、鮭カン等の含水炭素、蛋白質消化糞便では界面活性剤使用による集卵効果は高かった。

6) 中性洗剤の使用は至適 pH の関係上沈渣量多く集卵法に使用するには不適当である。

7) 非イオン性乳化剤としては Tween 80 が、Triton NE よりウドン食、鮭カン食のばあいともに集卵効果がすぐれていた。

考 察

従来の遠心集卵法は主として糞便内の住血吸虫卵の検出を目的として改良されてきたもので、本邦において集卵法の対象としてはより重要である肝吸虫卵、横川吸虫卵等に関して系統的な改良は行われていなかった。

肝吸虫卵および横川吸虫卵はほぼ同大の小型吸虫卵であるが、その表面構造が異なるので(稲臣, 1962, 1964),

遠心集卵経過中の行動が異なると思われたが、pH, Tween 80 の濃度の変化等による虫卵回収率の変動状況は両者共ほぼ同じであった。以下両者に共通な集卵の機序につき考察する。

1. 遠心集卵法におけるエーテルの意義 :

遠心集卵法でエーテルを加える場合、エーテルにより脂質系のものが溶出して糞便の容積の減少することは集卵法として、さして重要な意義のあることでなく、エーテルを加えることによつて浮上スクラム層ができ、沈渣量が少くなることこそ集卵法として最大の意義がある。これが決して比重の関係でないことはエーテルを加えず集卵液のみで遠心すれば全く浮上層を生ぜぬことより判明する。Vogel (1952) はこれをエーテル粒子による糞便質の吸着現象としている。エーテルと集卵液と糞便を強く振盪すれば、瞬間的にきわめて不安定な oil in water 型のエマルジョンができ、そのエーテルエマルジョンを安定化させる方向に粒子の表面に細い糞便質が吸着されることは充分考えられ、遠心力により、強い排液が行われれば、大部分のエーテル粒子は上昇して合一しようとし、細い糞便質は附着しているエーテル粒子の浮力により上昇してエーテル層と集卵液の間にスクラム層となり比較的重い大きい粒子や虫卵のみが沈澱すると解すべきであろう。

2. 界面活性剤のはたらき :

一般に界面活性剤を集卵液に含まねばあいは、肝吸虫卵、横川吸虫卵などのような小型虫卵はほとんど沈渣中に回収されず、スクラム層に糞便質とともに捕捉されてしまう。これが従来の界面活性剤を使用せぬ集卵法の虫卵回収率の低い理由である。

界面活性剤はまずエーテル粒子の分散状態の安定したエマルジョンをつくり、放置してもエーテル層が分離しなくなり、細い糞便質のエーテル粒子への吸着は充分行われる。

遠心力を作用させればあいは、排液現象により、集卵液層が下方に分離するが、エーテル粒子の合一はおこらず上に粒子は接近して網状構造となつて、粘度の高いゲル状のエーテル層となり、糞便質は、明確な層を作らずにこのゲル状エーテル層内に下方ほど密度高く分散される。この際虫卵がスクラム層に捕捉されずに沈降する機構は恐らく虫卵の表面エネルギー増加によつて糞便質より分離し、糞便質のみがエーテル粒子に吸着されて上昇し、虫卵は直接エーテル粒子と結合することなく、遠心力により沈降するものと思われるが、これ以外にも実際

には多くの物理化学的要因が加わつて、さらに複雑な機構が存在するものと思われる。

3. 集卵法に適切な界面活性剤、およびその pH と濃度：

A. 2 および B. 2 にみられるように McIlvane 緩衝液を使用したばあい原則として沈渣量は集卵液の pH が上昇するにつれ、増加する傾向がみられるので、至適 pH の高い界面活性剤は集卵法に不適當であり、中性洗剤はその意味で適當といえない。実際にライボン F 法は沈渣量多く、検鏡に不便であつた。経験上使用されてきたものは主として Triton NE, Emasol 4130, Tween 80 などの非イオン性乳化剤であり。虫卵回収率は pH 4.0 で最高であつたが、回収率の高さ、沈渣の量からみて Tween 80 が最適であり、入手も最も容易であつた。Tween 80 の濃度は最も集卵効果を高めるには 0.1~0.5% の範囲がよく、それ以上濃くすれば沈渣量が増大する。この有効最低濃度は表面張力がそれ以上濃くしてもさらに低下せずに安定する点であり、限界ミセル濃度 (c.m.c) に一致する。この点で、個体の表面に吸着される界面活性剤は飽和に達し、親水基が外側に向くようになり結合物から離れやすくなる。至適条件下では Tween 80 はほとんど 100% の沈渣への虫卵回収率を示している。

従来の界面活性剤を使用した集卵法が虫卵回収率が低く不定であつたのは、明確に濃度を規定せず、また至適 pH を考えずに強酸性液を使用したことによるものと思われる。

4. 植物繊維、角皮、細胞膜破片に富む糞便が遠心沈澱集卵法に不適當な理由：

これらの不消化残渣はきわめて粗大であり、エーテルの乳化された粒子表面に物理的に吸着され難いか、あるいはエーテル粒子と静電反発力を有する状態となつていて、ほとんど沈澱して浮上しないため、沈渣量がきわめて多く集卵の目的は達しない。このため草食獣の検便には本法は一般に不適當であることはいうまでもない。Vogel (1952), Porter (1964) も塩酸エーテル法および塩酸エーテル・トライトン法が草食獣の検便に適せぬことを述べている。

まとめ

横川吸虫卵、肝吸虫卵を対象として糞便の遠心沈澱集卵法を検討し、従来の方法より集卵効果のよい方法を考案し、下記の結果を得た。

1) 界面活性剤を使用せざる従来の集卵法は、虫卵回

収率は 3% 以下で、集卵法としての価値は少く、ことにアンチホルミン・エーテル法は虫卵が消失して検査法として無価値である。

2) 従来界面活性剤を使用した集卵法もその界面活性剤の至適 pH、濃度を考慮していないので、必ずしも集卵効果は高くない。

3) 界面活性剤として中性洗剤は至適 pH では沈渣量が増大するので不適當である。

4) 沈渣量の少い酸性域に至適 pH を有する界面活性剤として主に非イオン性乳化剤が集卵法に適している。

5) それらのうち、沈渣量少く、虫卵回収率の高いものとして Tween 80 が集卵法に適している。

6) Tween 80 の虫卵回収率の最高は pH 4.0 で得られる。

7) Tween 80 の濃度が 0.1% 以上で虫卵回収率 90~100% となるが、沈渣量は 0.1~0.5% が最少であり、1.0% になると 3 倍に増加する。

8) pH 4.0 の緩衝液としてはクエン酸リン酸 2 ナトリウム緩衝液 (McIlvane) が最適である。

9) 植物繊維、角皮、細胞膜破片のない糞便は浮上スクラム層を生ぜず、沈渣量が多く、集卵効果は少ない、したがって草食獣の検便には本法は応用できない。

10) 新しい集卵液として“材料および方法”に述べた 0.5% Tween 80 加 pH 4.0 クエン酸緩衝液に $1/10,000$ にマージオンを加えた液を提唱する。本液 7 ml、エーテル 3 ml による遠心集卵法は沈渣量少く、横川吸虫卵、肝吸虫卵を 90~100% 沈渣中に回収する。

終りにのぞみ、本集卵法の基礎的実験を当研究室で第 14 回細菌検査学科学生として担当して下さつた東京都衛生研究所佐々木敬一氏、三重県津保健所館正夫氏に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Blagg, W., Schlaegel, E. L., Mansour, N. S. & Khalaf, G. I. (1955): A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. Amer. J. Trop. Med. & Hyg., 4, 23-29.
- 2) Brooke, M. M. (1958): Amebiasis. Method in laboratory diagnosis. U. S. Department. of Health and Education and Welfare, C. D. C. Atlanta, Ga.
- 3) Faust, E. C. & Ingalls, J. W., Jr. (1946): The diagnosis of Schistosomiasis japonica. III Tech-

- nics for the recovery of the eggs of *Schistosoma japonicum*. Amer. J. Trop. Med., 26, 550-584.
- 4) 福田武夫・岩倉利明・谷川博利(1959) : 糞便内肺吸虫卵の新集卵法について. 医学と生物学, 51(4), 154-156.
 - 5) Hunter, G. W. III, Ingalls, J. W. & Cohn, M. G. (1946) : Comparison of methods for recovery of eggs of *Schistosoma japonicum* from feces. Amer. J. Clin. Path., 16, 721-724.
 - 6) Hunter, G. W. III, Hodges, E. P., Jahnes, W. G., Diamond, L. S. & Ingalls, J. W. Jr. (1948) : Studies on schistosomiasis. II Summary of further studies on methods of recovering eggs of *Schistosoma japonicum* from stools. U. S. Army Med. Dept. Bull., 8(2), 128-131.
 - 7) 稲臣成一(1962) : 寄生虫卵卵殻の構造について. 岡山医学会誌, 74, 31-81.
 - 8) 稲臣成一(1964) : 私信.
 - 9) 伊藤二郎(1953) : 日本住血吸虫卵の外界環境に対する抵抗性. 1. 本虫卵に対する各種集卵法の比較. 日新医学, 40(8), 450-454.
 - 10) Jacques, C. & Bartheymy, E. (1917) : Les procédés de enrichissement des selles en coprologie. Procédé spécial de simili-homogénéisation pour la recherche des kystes et des oeufs de parasites. J. Méd. Bordeaux, 47, 195-199 (Cited by Faust in Clinical Parasitology, 1964, p. 977).
 - 11) Komiya, Y. & Yokogawa, M. (1953) : The recovery of paragonimus eggs from stools of paragonimus patients by AMSIII centrifugating technique. Jap. J. Med. Sci. Biol., 6, 207-212.
 - 12) Maldonado, J. F., Matienzo, J. A. & Vélez-Herra, F. (1954) : Comparative value of fecal examination procedures in the diagnosis of helminth infections. Exp. Parasitol., 3 : 403-416.
 - 13) Mathieson, D. R. & Stoll, A. M. (1945) : Comparison of methods for detecting eggs of *Schistosoma japonicum* in feces. Rept. No. 1, Naval Med. Research Inst. Bethesda, Md., 6pp.
 - 14) Miyagawa, Y. (1913) : Beziehung zwischen Schistosomiasis japonica und der Methode der Auffindung von Parasiteneiern in den Faeces und Beitrage Dermatitis unter Berücksichtigung der zur Kenntnis der Schistosomum-Infektion. Zbl. Bakt. usw. Orig., 69, 132-142.
 - 15) 宮川米次(1913) : 日本住血吸虫病と皮膚炎(かぶれとの関係), 附, 糞便内における寄生虫卵検査法並びに同感染に関する知見補遺. 東京医学会誌, 26(7), 385-409.
 - 16) 岡部浩洋・小野典雄・尾高善剛(1963) : 肝吸虫卵を対象とした2-3集卵法の比較. 寄生虫誌, 13(4).
 - 17) 大田秀浄・佐藤重房(1957) : 寄生虫卵の各種集卵法についての研究, 特に日本住血吸虫卵のMIFCによる集卵法について. 北関東医学, 7, 68-71.
 - 18) Porter, J. A. (1964) : Evaluation of the formalin-triton-ether sedimentation technique for counting sheeps nematode eggs. J. Parasitol., 50, Sec. 2, 33.
 - 19) Ritchie, L. S. (1948) : An ether sedimentation technique for routine stool examinations. Bull. U. S. Army Med. Dept., 8, 326.
 - 20) Ritchie, L. S., Lin, S., Moon, A. P., Frick, L. P., Williams, J. E., Asakura, S. & Hishinuma, Y. (1960) : The possible effects of pH and specific gravity on the ether sedimentation procedure in concentrating eggs and cysts. Amer. J. Trop. Med. & Hyg., 9, 444-449.
 - 21) Saper, J. J. & Lambers, D. K. (1953) : The "MIF" stain-preservation technic for the identification of intestinal protozoa. Am. J. Trop. Med. & Hyg., 2 : 613-619.
 - 22) Telman, W. (1908) : Eine Method zur Erleichterung der Auffindung von Parasiteneiern in der Faeces. Dtsch. med. Wschr., 34, 1508.
 - 23) Vogel, H. (1952) : Leitfaden zur Untersuchung der tierischen Parasiten des Menschen und der Haustiere. (Reichenow-Vogel-Weyer), Johan Ambrosius Barth Verlag, Leipzig, p. 100-103.
 - 24) 分島整・小津茂弘・爪谷竜一・会田忠次郎・保阪幸男(1961) : 人糞便内寄生蠕虫卵の新集卵法(Weller-Dammin法の変法)について. 寄生虫誌, 10(5), 605-613.
 - 25) Weller, T. H. & Dammin, G. J. (1945) : An improved method of examination of feces for the diagnosis of intestinal schistosomiasis. Amer. J. Clin. Path., 15, 496-500.
 - 26) Wykoff, D. E., Frick, L. P. & Ritchie, L. S. (1958) : Statistical evaluation of the formalin-ether (406 MGL) fecal sedimentation concentration procedure. Amer. J. Trop. Med. & Hyg., 7, 150-157.
 - 27) Yaoita, S. (1912) : Eine neues Verfahren zur Auffindung säprlicher Parasiteneiern in Faeces. Dtsch. med. Wschr., 38, 1540-1541. ■

A NEW EFFECTIVE ETHER SEDIMENTATION PROCEDURE FOR THE
RECOVERY OF THE EGGS OF *CLONORCHIS SINENSIS* AND
METAGONIMUS YOKOGAWAI IN THE STOOLS

TOMOO OSHIMA, NOBORU KAGEI, MICHIE KIHATA,
(Division of Parasitology, Institute of Public Health, Tokyo)

NORIO FUJINO,
(Daito Health Center, Iwate Prefecture)

HIROSHI NOGUCHI,
(Katsunaka Health Center, Okayama Prefecture)

&

KATSUMI FUJIOKA
(Nakamura Health Center, Kochi Prefecture)

For the improvement of the technic of the ether sedimentation procedure for the recovery of small and heavy eggs such as the eggs of *Clonorchis sinensis* and *Metagonimus yokogawai* in stools very few trials have been made.

The known procedures such as, AMS III, MGL, MIFC and Hcl-ether methods failed to recover more than 5 % of the eggs of *M. yokogawai* in the sediments. (Table 1)

As a detergent Tween 80 showed the higher recovery rate than Triton NE. (Fig. 5) To enhance the recovery rate of eggs in sediments, the pH and the concentration of the solution of detergent were the most important factors. The highest recovery rate of both eggs was always found at the point of pH 4.0 in the case of Tween 80. The amount of the volume of the sediments were minimum between pH 2.2 to 4.0. The more alkaline the solution, the less recovery rate and the more sediments. (Table 2, Fig. 3)

The marked enhancing effect of Tween 80 on the eggs recovery rate of both eggs was observed at the concentration of more than 0.1 %, however, the sudden increase of the volume of the sediment was observed at the 1.0 % concentration of Tween 80. (Fig. 1 & 2) As the buffer of pH 4.0 the McIlvane buffer showed the most preferable results. (Fig. 4)

The best solution for the recovery of small heavy eggs was decided as follows.

pH 4.0 McIlvane buffer with 0.5 % of Tween 80 and 0.01 % of merthiolate as a preservative. With this solution and ether procedure the recovery rates of the eggs of *C. sinensis* and *M. yokogawai* were increased to 90-100 % in small amount of the sediment. Exceptionally only in the case of fibrous stool the results was not satisfactory.