

肝蛭症の診断に関する研究

(1) ヒト糞便内肝蛭卵を対象とした数種集卵法の効果

赤羽啓栄 大島智夫 嶋津武

信州大学医学部寄生虫学教室

広沢毅一

信州大学医療技術短期大学部

(昭和49年9月13日 受領)

糞便内寄生虫卵の集卵法は集卵率が高く安定し、沈渣量が少なく虫卵が破壊されない。操作が簡単で安価であるなどの条件を満たすことが望ましい。しかし現在までにすべての寄生虫卵に対し上記の条件を充す万能の集卵法はなく、目的虫卵によつてそれに適当な集卵法を選択しなくてはならない。

一般に吸虫卵の集卵法としては A. M. S. III法が好成績を得ているが、ヒト糞便内肝蛭卵の集卵法に関してはまだ十分検討されていない。草食獣で実施されている集卵法は人と糞便内食物残渣の性質が全く異なるためそのまま応用することはできない。

著者らは今回人肝蛭症患者の糞便について数種集卵法の効果を比較する機会を得たのでその結果を報告する。

材料および方法

実験材料は1966年5月信州大学医学部付属病院第2内科へ入院した人肝蛭症患者(小田ら1967, 大島1972)の糞便(肝蛭卵の E.P.G. 440個)を用いた。検討した集卵法はホルマリンエーテル法, 稀塩酸エーテル法, 稀塩酸 Tween 80エーテル法, Tween 80クエン酸緩衝液法, A.M.S III法である。ホルマリンエーテル法は Ritchie (1948), 稀塩酸エーテル法は宮川(1913) 稀塩酸 Tween 80エーテル法は Weller & Darmin (1945), Tween 80クエン酸緩衝液法は大島ら(1965) A.M.S III法は Hunter *et al.*(1948) に準じたが, Triton NE を使用するものはすべて Tween 80 に統一した。すべての集卵法とも糞便をまず水道水または0.2%アニオン A.B.S 洗剤(ライボン F®) 溶液でといて, ガーゼ1枚で濾過後, 遠心して得た沈渣について集卵した。

患者糞便0.5g を上記集卵法で集卵し全虫卵数を数え, これを2倍して stoll 法で得られた E.P.G に対する百

分率を求め虫卵回収率とした。それぞれの集卵法につき8~10回の試行を行い, 虫卵回収率の平均値を求めて成績を比較した。つぎに水道水とライボンFで前処置した際の各集卵法に及ぼす影響を検討し, 最後に肝蛭卵に最も適した集卵法を虫卵回収率で比較した。

得られた虫卵回収率は逆正弦変換し, 分散分析法で集卵法のちがによつて回収率に有意差があるか否か検討し, 有意差があればそれぞれの集卵法間の有意差を Sheffé の線型比較(北川1958)により検定した。

実験成績

1. 各集卵法における虫卵回収率

水道水およびライボンFで前処置した材料を用いての各集卵法の虫卵回収率は Table 1 に示す通りである。括弧内には逆正弦変換した数値を示してある。各集卵法の虫卵回収率の有意性を検討した結果は Table 2 の分散分析表に示した。

表からも明らかな通り

$$F_s = 34.9344$$

$$\therefore F_s > F_{0.01}$$

となり集卵法のちがによつて虫卵回収率に有意差がみとめられた。

1) 水道水前処置後の各集卵法の虫卵回収率

糞便を水道水に溶かしガーゼで濾過した後の各集卵法の虫卵回収率はホルマリンエーテル法5.3%, 稀塩酸エーテル法7.8%, Weller-Darmin 変法37.7%, Tween 80クエン酸緩衝液法25.3%, A.M.S III法30.5%であった。前述の如く集卵法のちがによつて虫卵回収率に有意差がみとめられたので Sheffé の線型比較により, どの集卵法間に有意差がみとめられるか検討した。順をおつて結果を述べる。

Table 1 Recovery rates of various concentration technics

	After diluting feces by tap water					After diluting feces by 0.2% Lipon F solution		
	Formalin-ether	HCl-ether	HCl-Tween 80-ether (Weller-Darmin's modif.)	Citrate buffer-Tween 80-ether (MacIlvane buffer)	A.M.S III (Tween 80)	HCl-Tween 80-ether (Weller-Darmin's modif.)	Citrate buffer-Tween 80-ether (MacIlvane buffer)	A.M.S III (Tween 80)
1	2.7(9.46)	15.9(23.50)	44.1(41.61)	15.0(22.79)	30.5(33.52)	52.7(46.55)	36.8(37.35)	77.7(61.82)
2	11.4(19.73)	7.3(15.68)	54.7(46.55)	22.7(28.45)	21.8(27.83)	42.3(40.57)	38.6(38.41)	65.9(54.27)
3	4.5(12.25)	1.8(7.71)	26.4(30.92)	23.6(29.06)	31.8(34.33)	50.0(45.00)	31.3(34.02)	44.5(41.84)
4	3.6(10.94)	5.0(12.92)	18.2(25.25)	23.2(28.79)	30.0(33.21)	62.7(52.36)	31.3(34.02)	65.0(53.73)
5	9.1(17.56)	5.0(12.92)	29.1(32.65)	23.2(28.79)	46.4(42.94)	56.4(48.68)	37.3(37.64)	55.9(48.39)
6	4.5(12.25)	13.2(21.30)	38.2(38.17)	42.3(40.57)	23.2(28.79)	39.1(38.70)	21.8(27.83)	57.7(49.43)
7	2.7(9.46)	5.9(14.06)	34.5(35.97)	21.8(27.83)	22.7(28.45)	34.5(35.97)	23.2(28.79)	31.8(34.33)
8	5.0(12.92)	0.4(3.63)	55.5(48.16)	28.2(32.06)	37.2(37.58)	52.7(46.55)	17.7(24.88)	38.2(38.17)
9	4.5(12.25)	22.7(28.45)	43.6(41.32)	27.7(31.76)		42.7(40.80)	40.5(39.52)	58.6(49.95)
10		0.9(5.44)	35.0(36.27)			39.5(38.94)	27.3(31.50)	31.4(34.08)
Average	5.33(12.98)	7.81(14.56)	37.73(37.59)	25.30(30.01)	30.45(33.33)	47.26(43.42)	30.58(33.40)	52.66(46.60)

() : Arcsine value

Table 2 Analysis of variance

Source	S.S	D.F	M.S	F
Technic	10044.9222	7	1434.9888	
Error	2793.2092	68	41.0766	34.9344
Total	12838.1314	75		

ホルマリンエーテル法

ホルマリンエーテル法の虫卵回収率は5.3%で検討した中で最小の値を示した。他の集卵法の虫卵回収率と有意差を検討すると Table 3 に示す通りである。表からも明らかな如く虫卵回収率がホルマリンエーテル法とほぼ同程度なのは稀塩酸エーテル法、明らかに高いものは Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法 A.M.S III法であつた。

稀塩酸エーテル法

稀塩酸エーテル法の虫卵回収率は7.8%でホルマリンエーテル法につづいて低い値を示した。虫卵回収率を他の集卵法と比較すると Table 3 に示す通りである。虫卵回収率が稀塩酸エーテル法と有意差がみとめられないものはホルマリンエーテル法、明らかに高いものは Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法、A.M.S III法であつた。

Weller-Darmin 変法

Weller-Darmin 変法の虫卵回収率は37.7%で検討した集卵法の中で最も高い値を示した。これを他の集卵法と比較すると Table 3 に示す通りである。虫卵回収率が Weller-Darmin 変法より明らかに低いものはホルマリンエーテル法、稀塩酸エーテル法有意差のみとめられなかつたものは Tween 80クエン酸緩衝液法、A.M.S III

Table 3 Statistical analysis of recovery rates of eggs in the sediments among several concentration technics by the method of linear comparison by Sheffé

	Formalin-ether	HCl-ether	HCl-Tween 80-ether (Weller-Darmin's modif.)	Citrate buffer-Tween 80-ether (MacIlvane buffer)	A.M.S III (Tween 80)
Formalin-ether	—	1.58	-24.61*	-17.03*	-20.35*
HCl-ether		—	-23.03*	-15.45*	-18.77*
HCl-Tween 80-ether (Weller-Darmin's modif.)			—	7.58	4.26
Citrate buffer-Tween 80-ether (MacIlvane buffer)				—	3.32
A.M.S III (Tween 80)					—

* significantly different

法であつた。

Tween 80クエン酸緩衝液法

Tween 80クエン酸緩衝液法の虫卵回収率は25.3%で、これを他の集卵法と比較すると Table 3 に示す通りである。虫卵回収率が Tween 80クエン酸緩衝液法より明らかに低いものはホルマリンエーテル法、稀塩酸エーテル法で、Weller-Darmin 変法、A.M.S III法とは有意差がみとめられなかつた。

A.M.S III法

A.M.S III法の虫卵回収率は30.5%で Weller-Darmin 変法について高い値を示した。これを他の集卵法と比較すると Table 3 に示す通りである。虫卵回収率が本法より低い集卵法はホルマリンエーテル法、稀塩酸エーテル法であり、Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法との間には有意差がみとめられなかつた。

2) ライポソF前処置の効果

ライポソF溶液で糞便を前処置することにより虫卵回収率が向上するか否かを対照の水道水の場合と比較した。検討した集卵法は虫卵回収率の高かつた Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法、A.M.S III法でライポソFの濃度は0.2%である。結果は Table 1 の右半分に示す通り3種集卵法とも、ライポソFで処置した虫卵回収率は水道水のそれに比し上昇した。Shefféの線型比較による検定結果は Table 4 に示す通りである。3種集卵法を一括して検討するとライポソF溶液処置は水道水処置にくらべて、虫卵回収率は明らかに高くなつた。つぎに各集卵法について両者を比較すると Weller-Darmin 変法ではライポソF使用により虫卵回収率は約9.5%高くなつたが、統計学的な有意差はみとめられなかつた。Tween 80クエン酸緩衝液法もライポソF使用で虫卵回収率は5.3%高くなるが、有意差はなかつた。一方 A.M.S III法はライポソF使用によつて虫卵回収率は22%高くなり、有意差がみとめられた。

3) 肝蛭卵に最も適した集卵法

前項の資料から肝蛭卵に最も適した集卵法を統計学的に検討した。なお前項でライポソF使用の効果がみとめられたことからここではライポソFで前処置後、Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法、A.M.S III法で得られた虫卵回収率の有意性を検定した。Table 5 に示す通り回収率の最も高かつた集卵法は A.M.S III法であつた。Weller-Darmin 変法は A.M.S III法にくらべ約5%低かつたが有意差はみとめられなかつた。一方 Tween 80クエン酸緩衝液法は A.M.S III法にくらべ回

Table 4 Statistical analysis of egg-recovery rates emulsing feces with Lipon F or tap water, at the first step of concentration technics.

HCl-Tween 80-ether (Weller-Darmin's modif.)	5.83
Citrate buffer-Tween 80-ether (MacIlvane buffer)	3.39
A.M.S III (Tween 80)	13.27*
Total	7.50*

* significantly different

Table 5 Significancy of differences in the egg-recovery rates between AMS III and other technics

	HCl-Tween 80-eter (Well-Darmin's modif.)	Citrate buffer Tween 80-ether (MacIlvance buffer)
A.M.S. III (Tween 80)	3.18	13.18*

* significantly different

収率は約22%低く統計学的にも有意差がみとめられた。従つて肝蛭卵を対象とした集卵法は糞便を0.2%ライポソF溶液でとかし、ガーゼ濾過後遠心し、沈渣を A.M.S III法もしくは Weller-Darmin 変法で行うのが最も有効である。

考 察

吸虫卵では一般に界面活性剤、エーテル、酸性溶液による集卵が用いられ日本住血吸虫卵 (Hunter *et al.* 1946, 1948, Faust *et al.* 1946, 伊藤・何1957), 肺吸虫卵 (Komiya & Yokogawa 1953), 横川吸虫卵 (横川ら 1963) の場合は A.M.S III法が推奨され、肝吸虫卵では分島ら (1961) は Weller-Darmin 変法、岡部ら (1963) はライポソF法が有効だとしている。一方大島ら (1965) は比較的広範囲の吸虫卵に Tween 80クエン酸緩衝液法が有効だと述べた。しかし肝蛭卵についてはまだ検討されていない。

数種集卵法の効果を比較するには2つの方法があり、その1つはある地域住民について異なつた集卵法で集団検便を実施し、虫卵検出率の大小から比較する方法である。他方は E.P.G. 既知の同一糞便を材料にして数種の集卵法を実施しその虫卵回収率の大小から比較する方法である。前者は相対的順位はわかるが母集団の感染密度により虫卵検出率が異なる欠点を有する。後者は用いる

糞便の性状を無視できないが、通常の糞便で虫卵密度がある程度以上高ければ虫卵回収率は再現性がかなり高いものと思われる。本論文は後者によつたが、より普遍性を高めるため数回の試行をくりかえし資料を統計的に処理した。なお使用した糞便は尋常で E.P.G. 440個と上記の条件を十分満たしたものであつた。

糞便を水道水で前処置後集卵し、その虫卵回収率の最も高かつた集卵法は Weller-Darmin 変法で37.7%であつた。しかし A.M.S Ⅲ法、Tween 80クエン酸緩衝液法との間には有意差はなかつた。一方古典的なホルマリンエーテル法と稀塩酸エーテル法の虫卵回収率は著しく低く、最も高かつた Weller-Darmin 変法との間には統計的に有意差がみとめられた。この結果は以前より住血吸虫卵の集卵法で知られているように (Maldonado 1954) 肝蛭卵の集卵においても Tween 80などの界面活性剤が必要であることを示している。

1 標本40mg の糞便を使用する厚層塗抹法では本材料 (E.P.G 440個) の場合 1 標本中に平均17.6個の虫卵が含まれる。一方糞便0.5g を用いたホルマリンエーテル法、稀塩酸エーテル法の虫卵数の平均はそれぞれ11.8個、17.2個で厚層塗抹法の1標本中の虫卵数より少なく、集卵法としての利点がなかつた。

一方陰イオン系の界面活性剤であるライポンFに集卵効果のみられることは以前より知られており (福田ら 1959, 岡部ら1963), その効果は中性の場合に大きく、一般に酸性域である諸集卵液にこれを加えても効果はない (大島ら1965)。一方各集卵法とも集卵に先だち糞便を稀釈後ガーゼで濾過して大型の食物残渣をとり除くのが普通である。しかしガーゼ濾過時の虫卵亡失は著しく大きく蛔虫不受精卵ではほぼ半分が失なわれ (谷口1953), さらに大型の肝蛭卵では亡失する虫卵がより多いことも予想される。これを少なくするためにはライポンFを中性域である前処置段階で使用すると効果があり、水道水処置にくらべ、虫卵回収率は明らかに高くなつた。特に A.M.S Ⅲ法においてその効果が大きく虫卵回収率は約20%上昇したが、Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液法においては5~10%上昇するにとどまつた。何故 A.M.S Ⅲ法でライポンF処理すると集卵効果が飛躍的に上昇するか不明であるが、界面活性剤を2種以上併用するとある条件下では相乗効果の現われる例が知られている (小林1960, 平野1960)。いずれにしても0.2%ライポンF溶液で糞便を前処置した後 A.M.S Ⅲ法で集卵すると、WellerDarmin 変法との間に有意差は

みとめられなかつたが、虫卵回収率は最も高く50%以上の成績が得られた。

まとめ

人肝蛭症患者の糞便を材料にして、日本産肝蛭卵の集卵法について検討した。E.P.G 既知の同一糞便を数種集卵法で集卵し、それぞれの虫卵回収率を求めこれを逆正弦変換して、分散分析法と Sheffé の線型比較により有意性検定をおこなつた。得られた結果は次の通りである。

1. 糞便を水道水でとかしガーゼ1枚で濾過した後、沈渣を集卵した虫卵回収率は下記の通りであつた。ホルマリンエーテル法5.3%稀塩酸エーテル法7.8%, Tween 80クエン酸緩衝液法25.3%, A.M.S Ⅲ法30.5%, Weller-Darmin 変法37.7%。このうちホルマリンエーテル法および稀塩酸エーテル法に比べて界面活性剤を使用した他の3集卵法では虫卵回収率が明らかに高かつた。

2. 糞便を0.2%ライポンF溶液でとかしガーゼ濾過後、沈渣を Weller-Darmin 変法、Tween 80クエン酸緩衝液、A.M.S Ⅲ法で集卵すると虫卵回収率は水道水処置にくらべ5~20%高くなつた。この差は統計学的にも有意であり、A.M.S Ⅲ法でこの効果は特に大きかつた。

3. 肝蛭卵を対策とした集卵法としては、0.2%ライポンF溶液で糞便をとかし、ガーゼ濾過後沈渣を A.M.S Ⅲ法もしくは Weller-Darmin 変法で行うのが、虫卵回収率の点では最良であつた。

稿を終るに当り御指導御助言いただいた本学の内川公人講師に深謝いたします。

なお本論文の要旨は第26回日本寄生虫学会東日本大会で発表した。

文 献

- 1) Faust, E. C. and Ingalls, J. W. (1946) : The diagnosis of Schistosomiasis japonica III Techniques for the recovery of the eggs of *Schistosoma japonicum*. Amer. J. Trop. Med., 26, 550-584.
- 2) 福田武夫・岩倉利明・谷川博利(1959) : 糞便内肺吸虫卵の集卵法について. 医学と生物学, 51 (4), 154-156.
- 3) 平野二郎(1960) : 界面活性剤の相互作用, 界面活性剤便覧, 338-355, 産業図書, 東京.
- 4) Hunter, G. W. III., Ingalls, J. W. and Cohn, M. C. (1946) : Comparison of methods for recovery of eggs of *Schistosomas japonicum* from feces. Amer. J. Clin. Path., 16, 721-

- 724.
- 5) Hunter, G. W. III., Hodges, E. P., Jahnes, W. G., Diamond, L. S. and Ingalls, J. W. (1948) : Studies on shistosomiasis. II Summary of further studies on method of recovering eggs of *Schistosoma japonicum* from stools. U.S. Army. Med. Dept., 8, 128-131.
 - 6) 伊藤二郎・何尚英(1957) : 日本住血吸虫卵検査法の比較, 寄生虫誌, 6, 465-467.
 - 7) 北川敏男(1958) : 推測統計学, 岩波書店, 東京.
 - 8) 小林正雄(1960) : 界面活性剤について, 界面活性剤便覧, 1-36, 産業図書, 東京.
 - 9) Komiya, Y. and Yokogawa, M. (1953) : The recovery of paragonimus eggs from stools of paragonimiasis patients by AMS III centrifuging technic Jap. J. Med. Sci. Biol., 6, 207-212.
 - 10) Maldonado, J. F., Acosta-Matienzo, J. and Ve'lez-Herrera, F. (1954) : Comparative value of fecal examination procedures in the diagnosis of helminth infection. Exp. Parasit., 3, 403-416.
 - 11) 宮川米次(1913) : 日本住血吸虫病と皮膚炎(かぶれ)との関係, 付, 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, 東京医学雑誌, 26(7), 385-409.
 - 12) 小田正幸・荻原洋三・古田精市・市川澄夫・高山秀夫・千葉恭・大島智夫・嶋津武・赤羽啓栄(1967) : 巨大肝蛭 (*Fasiola gigantica* Cobbold, 1856) の人体寄生, 内科, 19, 523-532.
 - 13) 岡部浩洋・小野典雄・高尾善則(1963) : 肝吸虫を対象とした2~3集卵法の比較. 寄生虫誌, 13(4), 78.
 - 14) 大島智夫・影井昇・木畑美知江・藤野訓男・野口宏・藤岡勝美(1965) : 肝吸虫および横川吸虫を対象とした Tween 80クエン酸緩衝液による新遠心集卵法. 寄生虫誌, 14, 195-203.
 - 15) 大島智夫(1972) : 人肝蛭症, 家畜・人の肝蛭症, (小野豊編), 85-104, 日本獣医師会, 東京.
 - 16) Ritchie, L. S. (1948) : An ether sedimentation technique for routine stool examination. Bull. U.S. Army. Med. Dep., 8, 326.
 - 17) 谷口富士雄(1953) : 矢尾板氏法における虫卵の亡夫について, 寄生虫誌, 2(1), 80.
 - 18) 分島整・小津茂弘・瓜谷竜一・会田忠次郎・保坂幸男(1961) : 人糞便内寄生蠕虫卵の新集卵法(Weller-Darmin 法の変法)について. 寄生虫誌, 10, 605-613.
 - 19) Weller, T. H. and Darmin, G. J. (1945) : An improved method of examination of feces for the diagnosis of intestinal shistosomiasis. Amer. J. Clin. Path., 15, 496-500.
 - 20) 横川宗雄・佐野基人・大倉俊彦・稲坂好信・田谷利光(1963) : 腸管内寄生吸虫類に関する研究, (3) 浮遊法及び A.M.S III法による横川吸虫卵の検出法の比較及び北霞浦麻生町の横川吸虫について. 寄生虫誌, 12, 168-173.

Abstract

DIAGNOSIS OF FASCIOLIASIS

I. COMPARISON OF THE EFFICACIES OF VARIOUS
CONCENTRATION TECHNIQS OF OVA IN STOOL

HIROSHIGE AKAHANE, TOMOO OSHIMA, TAKESHI SHIMAZU

(*Department of Parasitology, School of Medicine Shinshu
University, Matsumoto, Japan*)

AND KIICHI HIROSAWA

(*School of Health Sciences, Shinshu University, Matsumoto, Japan*)

No precise reports on the evaluation regarding the concentration technics of *Fasciola* sp. eggs in human feces have been available in the literatures.

Efficacies of various concentration technics and pre treatment were compared by the recovery rates of eggs in the sediment using 0.5g feces of the patient of human fascioliasis (E.P.G. 440).

In the cases of emulsified fecal material at first with tap water and strained through one layer of gauze, average recovery rates of eggs by respective concentration technics were as follows: Formalin-ether method, 5.3%; HCl-ether method, 7.8%; Weller Darmin's modification method 37.7%; Citrate buffer-Tween 80-ether method (Oshima *et al*, 1965), 25.3%; AMS III (Tween 80) method, 30.5% (Table 1). Recovery rates of the technics using detergent such as Tween 80 were significantly higher than those not using detergent (Table 3).

In the cases of emulsified fecal materials with 0.2% ABS detergent (Lipon F®) and strained through one layer of gauze, recovery rates of respective concentration technics increased 5-20% comparing with those of the cases of emulsifying feces with tap water (Table 4, Table 5). Especially in the cases of A.M.S III, the recovery rate increased from 30.45% to 52.66%.

From above results, it is preferable to find *Fasciola* eggs from human feces to use AMS III method or Weller Darmin's modified method emulsifying feces at first with 0.2% (Lipon F) solution in stead of tap water.