

ガラス球層をふるいとした牛糞内肝蛭卵検査法

1. 振動を与える方法の基礎試験

平 詔 亨† 吉 原 忍† 上 野 計†
吉 原 豊 彦§ 岩 瀬 賢 介†

(昭和53年3月17日 受領)

一般に肝蛭寄生牛の糞便内に排泄される虫卵数は少ない。少数の虫卵を高率に集める必要性から、肝蛭卵検査法に関する研究は古くから検討されており、多くの検査法(小野, 1972)が知られている。この中で現在わが国の獣医師が実施している主な検査法は渡辺法(渡辺ら, 1953)、時計皿法(岩田, 1963)、原法(原・中出, 1969)およびこれらの変法などである。

現行の諸検査法は、検体をひとつずつ術者の手操作によつて処理するため熟練を要し、検査に多くの労力を要することなどから、必ずしも満足とはいえず、より省力的な検査法の開発が望まれている。

牛の肝蛭卵検査法開発のポイントは、糞塊の粗大な繊維からなるべく純粋に肝蛭卵を分離することにある。今回、微細なガラス球相互の間隙をふるい目とし、これに振動を与えるふるい分けを応用した肝蛭卵検査法(以下VGB法と略)を考案した。

この報告はVGB法における振動条件およびその精度を知るため、あらかじめ一定数の肝蛭卵を加えた牛糞材料についてその虫卵回収率を調べた基礎試験である。

材料と方法

VGB法の術式の概要を下記に示す(Fig. 1)。

- 1) 牛糞1gを水道水20mlにとかす。
- 2) 糞液を100メッシュの金網で濾過。
- 3) 濾液をガラス球3gを敷いた丸底遠心管に移す。
- 4) 遠心管に水道水を満たし、5分静置。

- 5) 水平振動機で5分間振動を与える。
- 6) すべての上液を吸引除去。
- 7) 遠心管に水道水50mlを加え、ガラス球層を攪拌。
- 8) 数秒間静置(ガラス球が沈下する)。
- 9) ガラス球を残して上液を別の遠心管に移し、5分静置。
- 10) 上清を静かに吸引除去し、沈渣2mlを残す。
- 11) 沈渣をスライドグラスにとり鏡検。

鏡検を容易にするため、4)~6)の操作を繰り返して2回実施し、11)では1検体の沈渣全量を1枚のスライドグラスに移した後、1%メチレンブルー1滴を加え、カバーグラスをかけることなく鏡検した。

肝蛭卵と牛糞：肝蛭卵は肝蛭寄生牛の胆嚢内虫卵を用い、牛糞は当场で飼育されている肝蛭非寄生牛の新鮮便(風乾量21.5%)を使用した。

可検材料の作成：牛糞1g中に既知の肝蛭卵数を有する材料を使用するため、3)の遠心管へ所定数の肝蛭卵を加えた。ひとつの遠心管に加えた肝蛭卵の数は、振動条件を調べる実験においては約60個、VGB法の精度を調べる実験で1~64までを2を底とする対数で等間隔7段階の虫卵数とした。

虫卵回収率：3)で加えた虫卵数に対する11)で検出された虫卵数の百分率とした。

ガラス球と遠心管：ガラス球は粒径500~710 μ m、比重2.5の工業用ガラスビーズ(東芝製)を用いた。遠心管は市販のガラス製丸底遠心管で60ml容量、外径35mm、内径30mm、高さ110mmのものを使用した。ひとつの遠心管にはガラス球3gを入れた。

振動機：振動数が調節できる水平振動機で大洋科学工

† 農林省家畜衛生試験場寄生虫第2研究室

§ 日本中央競馬会競走馬総合研究所

‡ 埼玉県食肉衛生検査センター

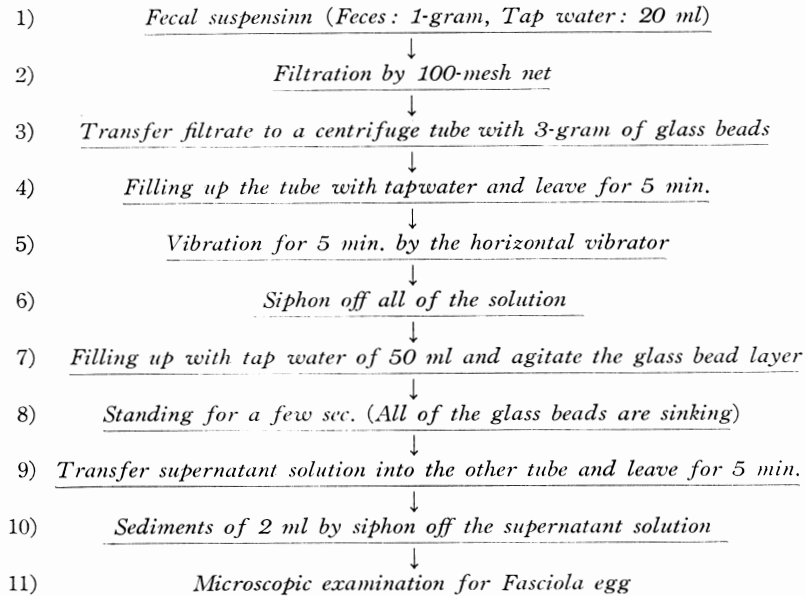


Fig. 1 Procedures of the VGB-technique.

業株式会社製レシプロシェーカー R-I 型 (幅 450mm, 奥行 300mm, 高さ 260mm, 重量 13kg, 交流モーター使用) を一部改造した。すなわち振幅は偏心 0.6mm の偏心輪をモーターの回転軸に接続することによって, その大きさを 1.2mm に調整した。また振動台には遠心管 20 本が固定できる遠心管立を載せた。被振動体は振動台, 遠心管立および糞液を満たした遠心管 20 本から成り, これらの重量は 4 kg であった。

振動数の測定は電磁カウンターにより, 振幅は振動台に固定したペンに白紙をあてこれに描かれた波形の大き

さを鏡下で測定することによって求めた。

成 績

1. 肝蛭卵回収率におよぼす振動数の影響 (Table 1) 振動数を 1 分間あたり 660~1,110 まで 75 の等間隔で 7 段階にかえ, それぞれの段階で虫卵回収率と振幅の大きさを調べた。虫卵回収率と振幅の大きさは振動数の影響を強く受けたが, 振動数 960/分・振幅 1.5mm において虫卵回収率は最も高く, その値は 72.7 (±10.7) % であった。

Table 1 Effects of the frequency on the recovery rate of *Fasciola* eggs and the amplitude of the vibration with portable type of a horizontal vibrator in the VGB-technique

		Frequency/min. of the horizontal vibrator						
		660	735	810	885	960	1,035	1,110
Recovery rate of egg in %	1	35.2	50.6	46.5	47.2	65.0	68.5	41.2
	2	45.5	50.0	60.5	72.7	72.9	56.1	43.2
	3	38.7	31.9	50.0	87.5	71.6	60.8	61.9
	4	41.3	53.0	48.4	74.3	81.4	66.3	60.0
	Mean	40.2	46.4	51.4	70.4	72.7	62.9	51.6
Confidence limit		±6.9	±15.5	±10.0	±26.8	±10.7	±8.9	±17.3
Amplitude of the vibration in mm	1	.94	.94	.94	1.32	1.45	2.26	2.64
	2	1.00	1.00	1.00	1.40	1.55	2.20	2.45
	Mean	.97	.97	.97	1.36	1.50	2.23	2.55

Table 2 Number of *Fasciola* eggs recovered from 1 gram cattle feces mixing a serial number of eggs by the VGB-technique under the optimum condition

Sample No.	No. of <i>Fasciola</i> eggs mixed						
	1	2	4	8	16	32	64
1	0	2	4	5	13	24	36
2	1	2	2	4	12	23	43
3	0	2	4	6	11	18	47
4	1	2	3	5	11	18	41
5	1	2	2	6	13	22	41
6	1	1	2	7	9	20	54
7	0	2	2	7	14	22	44
8	1	1	2	6	11	25	43
9	0	2	3	3	11	18	46
10	1	1	3	4	11	27	46
11	1	2	1	7	11	17	45
12	1	1	2	6	11	23	55
13	0	2	3	4	14	29	53
14	0	2	3	4	10	25	44
15	1	1	2	7	12	26	38
16	0	2	3	5	14	18	43
17	0	2	3	5	11	19	42
18	1	2	3	6	11	20	37
19	1	2	3	6	15	22	45
20	1	1	4	6	12	21	41
No. of positive samples	12	20	20	20	20	20	20
Positive rate of sample in %	60.	100.	100.	100.	100.	100.	100.
Total No. of eggs mixed	20	40	80	160	320	640	1280
Total No. of eggs recovered	12	34	54	109	237	437	884
Recovery rate of egg in %	60.	85.	68.	68.	74.	68.	69.

2. VGB 法における肝蛭卵回収の精度 (Table 2)

牛糞 1g の糞液に肝蛭卵を 1, 2, 4, 8, 16, 32, および 64 個を加えた材料についてそれぞれ 20 回の検査を, 振動数 960/分・振幅 1.5mm の条件下で実施した。その結果, 虫卵回収率はそれぞれ 60, 85, 68, 68, 74, 68 および 69% であった。また 20 回の検査における肝蛭卵検出率は虫卵 1 個を加えた材料で 12/20 (60%) であり, 虫卵 2 個以上の材料で 20/20 (100%) であった。

考 察

肝蛭卵検査法に関する報告は, 多くが沈殿法に属しその原理から, (1) 傾斜面への沈殿を応用した渡辺法 (渡辺ら, 1953), (2) 求心性操作による時計皿法 (岩田,

1963), (3) 網目の大きさが異なる複数の網でのふるい分けを応用した Willmott-Rester (1952) 法および (4) 二層分配系による方法 (吉原ら, 1973) などに分けられる。

VGB 法は, 原理的には前記 (1) (2) (3) の組合せと考えられるが, ガラス球層の振動によるふるい分けを応用したところに特徴がある。ガラス球層によって寄生虫を分離する報告としては *Eimeria* のスポロゾイト (Wargenbach, 1969) および牛肺虫 (平, 1975) がある。しかし, これはガラス球を静置した濾過層として使用しており, 振動などの運動を与えていない。

今回使用したガラス球相互の間隙の径は約 77~110 μ m であった。肝蛭卵はこの間隙にもぐり込むことが可能で

あり、その状態は実体顕微鏡下で明瞭に観察された。このようなふるい分けを行なう VGB 法では、多くの糞成分が除去されるため、1 検体が 1 枚のスライドガラスで鏡検された。しかも本法によれば同時に多数の検体が機械的に処理される大きな特徴がある。

本実験の結果、VGB 法での肝蛭卵回収率は約 70% であり、その値はかなり安定しているものと考えられた。しかしながら、今回の実験は人為的に肝蛭卵を混入した特殊な材料についての成績にすぎない。VGB 法の肝蛭卵検査法としての価値は、野外試験および他の検査法との比較試験を実施し、総合的に判定されなければならない。

ま と め

ガラス球層の振動によるふるい分けを応用した牛糞内肝蛭卵検査法 (VGB 法) を考案した。本法には粒径 500 ~ 710 μ m のガラス球 3g を敷いた 60ml 容量の丸底遠心管および水平振動機を用い、可検材料としては肝蛭非寄生牛の糞 1g の液に所定数の肝蛭卵を実験的に加えたものを作成し、その虫卵回収率を調べた。

高い虫卵回収率は振動数 960/分・振幅 1.5mm において得られ、その値は 72.7% であった。この条件のもとで、肝蛭卵 1, 2, 4, 8, 16, 32 および 64 個を含む牛糞 1g の材料について、それぞれ 20 回の検査を実施したところ、虫卵回収率はそれぞれ 60, 85, 68, 68, 74, 68 および 69% であった。また 20 回の検査における肝蛭卵検出率は、虫卵 1 個を含む材料で 12/20 (60%) および虫卵 2 個以上を含む材料で 20/20 (100%) であった。

謝 辞

稿を終るにあたり、振動機の試作・提供の労を賜った大洋科学工業株式会社、ならびに振動に関する御助言を頂いた日本国有鉄道・鉄道労働科学研究所荒井正一主任研究員に深謝します。また終始御指導を頂いた家畜衛生試験場寄生虫第 2 研究室長角田清博士および日本獣医畜産大学藤田潤吉教授に感謝します。

文 献

- 1) 原 茂・中出万茂溜 (1969) : 肝蛭卵簡易検査法の一考察。獣医畜産新報, 507, 1276-1279.
- 2) 岩田神之介 (1963) : 糞便検査改良法と従来の簡易検出法との比較試験。日獣学誌, 25 [学会記事], 503-504.
- 3) 小野 豊 (1972) : 肝蛭症の診断。小野 豊・大島智夫・木村 重・磯田政恵編 : 家畜・人の肝蛭症。105-119, 日本獣医師会, 東京.
- 4) 平 昭亨 (1975) : 微細なガラス球層濾過による牛肺虫第 1 期子虫の分離法。家畜試研究報告, 70, 51-52.
- 5) Wagenbach, G. E. (1969) : Purification of *Eimeria tenella* sporozoites with glass bead columns. J. Parasit., 55, 833-838.
- 6) 渡辺昇蔵・永山文昭・岩田神之介 (1953) : 肝蛭卵の簡易検査法について。日獣会誌, 6, 176-177.
- 7) Willmott, S. and Pester, F. R. N. (1952) : Variation in faecal egg-counts in *Paramphistome* infections as determined by a new technique. J. Helminth., 26, 147-156.
- 8) 吉原 忍・上野 計・須藤恒二 (1973) : Polyethylenglucose (PEG)・Dextran (D) による糞便内肝蛭卵の集卵法について。第 75 回日本獣医学学会講演要旨, 85.

Abstract

NEW SIEVING TECHNIQUES WITH THE GLASS BEAD LAYER FOR THE
DETECTION OF *FASCIOLA* EGGS FROM CATTLE FECES

1. PROCEDURES AND PRELIMINARY TESTS
ON THE VIBRATION TECHNIQUE

NORIYUKI TAIRA, SHINOBU YOSHIHARA HAKARU UENO
(*National Institute of Animal Health, Tokyo, Japan*)

TOYOHICO YOSHIHARA
(*Equine Health Laboratory, Tokyo, Japan*)

AND

KENSUKE IWASE
(*Saitama Meat Inspection office, Saitama, Japan*)

A new sieving technique with the vibration to the glass bead layer (VGB-technique) was applied for the detection of *Fasciola* eggs from cattle feces. The procedures of the VGB-technique are shown in Fig. 1. Steps 4)–7) of the procedures were repeated twice. Special equipments necessary for this sieving were a layer consisting of fine glass beads as a mesh and a portable type of horizontal vibrator. The glass bead layer composed in the centrifuge tube with rounded bottom of 60 ml in capacity, in which held 3 grams of glass beads 500–710 μ m in diameter and 2.5 in specific gravity. The fecal materials containing known number of *Fasciola* eggs were prepared for this experiment by mixing the egg to the tube of step 3) in Fig. 1.

The frequency of the vibration affected remarkably to the width of the amplitude of the vibration. However, the highest recovery rate of eggs, 72.3%, was obtained when the frequency of 960/min. and the amplitude of 1.5 mm as shown in Table 1. An experiment on the recovery rates of *Fasciola* eggs were carried out 20 times with the fecal material containing 1, 2, 4, 8, 16, 32 and 64 eggs separately under the optimum conditions mentioned above. As the results, the recovery rates of eggs were 60, 85, 68, 68, 74, 68, 74, 68 and 69%, respectively. The positive rates of egg-recovery were 12/20 (60%) in the case contained only one egg and 20/20 (100%) in the other cases of 2–64 eggs as shown in Table 2.