

## ガラス球層をふるいとした牛糞内肝蛭卵検査法

### 3. 野外応用ならびに定量的検査法としての価値の検討

平 詔 亨† 上 野 計†  
河 野 幹 生§ 角 川 明 央§

(昭和53年7月31日 受領)

現在、草食獣について各種の肝蛭卵検査法が応用されているが、その多くは検体をひとつずつ術者の手操作によつて処理する方法であり、かなりの熟練と労力を必要としている。また現行の諸検査法の多くは非定量的な検査法であり、術者が異なる検査成績の比較検討は事実上、困難に近い。これまでの検査法に比べて、省力的で熟練を要せず、肝蛭卵の検出率も劣ることなく、しかも肝蛭卵数を定量的に検査することができる新しい検査法の開発は、肝蛭病の診断・調査ばかりでなく、基礎的研究のためにも強く望まれている。

このような背景から、著者らは微細なガラス球層をふるいとした VGB 法 (平ら, 1978a) と, SRGB 法 (平ら, 1978b) を考案し、基礎実験から高い肝蛭卵回収率が期待できることを述べた。

今回の報告は、VGB 法と SRGB 法の肝蛭卵検査法としての価値を、虫卵検出率 (定性) および虫卵検出数 (定量) の両面から検討するため、2・3の基礎実験および野外実験を行なった成績である。

#### 材料と方法

供試牛糞：神奈川県足柄郡の酪農家 A～J の 10 戸について、一戸あたり 10 頭計 100 頭および、当試験場で飼育する 1 頭の牛糞を使用した。牛糞は直腸より採取後冷室に保存され、2 週間以内に検査された。

糞液を濾過した金網：虫卵検査用の金網 (富士工業 KK, 東京) を使用した。これは 100 メッシュで直径 7 cm, 深さ 2.3 cm の丸底の金網である。

肝蛭卵検査法：VGB 法, SRGB 法, Dennis ら (1954) の法 (以下 De 法), 渡辺法 (渡辺ら, 1953) および時計皿法 (岩田, 1963) の 5 種を実施した。供試牛糞の量は VGB 法, SRGB 法および De 法において 1 g を、渡辺法および時計皿法では 5 g を用いた。

VGB 法における振動には、前報 (平ら, 1978a) に述べた水平振動機を使用し、振動条件は振動数 960/分・振幅 1.5 mm・振動時間 5 分とした。SRGB 法の回転には、1 回転あたり 10 秒を要する速度を目安とした手動による回転を、前報 (平ら, 1978b) に準じて 5 回行なった。De 法は、VGB 法と SRGB 法との比較を目的としたため、VGB 法と SRGB 法に用いた遠心管と同一のものを使用した。他は原法にしたがった。

渡辺法では、鏡検材料となる白線部の採取を 4 回繰返し、その全量を鏡検した。また時計皿法においては、残渣の除去操作を 5 回行なった後、その沈査の全量を鏡検した。これらの検査法における牛糞の処理操作には術者のちがいによる誤差をなくすため、同一の術者が行なった。また鏡検には、スライドガラスに採取した沈査に 1% メチレンブルー 1 滴を加え、カバーガラスをかけることなく観察した。

金網濾過が肝蛭卵回収率におよぼす影響：金網濾過操作によつて肝蛭卵の回収率が有意に低下しないことを明らかにする目的から、供試材料としては次のものを作成した。すなわち、VGB 法と SRGB 法で肝蛭卵を認めない A～J の 10 農家の牛各 1 頭、および前報 (平ら, 1978a; 1978b) で用いた牛 1 頭、計 11 頭の牛糞を選び、その 1 g に I または II の方法によつて約 60 個の肝蛭卵を実験的に加えた。

† 農林水産省家畜衛生試験場寄生虫第 2 研究室

§ 神奈川県足柄家畜保健衛生所

Table 1 Effects of the metal screen sieving of cattle feces on the recovery rate of *Fasciola* eggs in SRGB-technique

Farm		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K <sup>1)</sup>
Cattle No.		5	12	27	38	47	60	63	72	82	93	0 <sup>2)</sup>
Dry matter contents in %		15.1	15.3	14.4	17.5	14.0	17.5	15.6	19.3	16.1	12.3	21.5
I <sup>3)</sup>	Eggs were not sieved with 100 mesh net	1	2	3	4	5	Mean a	Confidence limit				
		60.7	56.9	68.3	54.8	48.3	67.3	48.5	52.6	55.6	59.1	64.3
		63.2	71.4	56.4	68.9	68.6	67.3	67.5	56.6	69.1	56.6	73.2
		38.2	92.0	28.8	71.6	56.8	59.4	62.7	52.2	63.2	66.7	55.0
		69.0	75.0	58.6	83.1	91.9	39.3	80.3	68.1	61.3	70.7	62.9
		82.9	66.1	75.4	73.2	97.0	79.3	75.5	77.8	60.4	57.7	75.0
	Mean a	62.8	72.3	57.5	70.3	72.5	62.5	66.9	61.5	61.9	62.2	66.1
	Confidence limit	20.1	16.1	22.1	12.7	26.5	18.4	15.3	13.9	6.1	7.7	10.1
II <sup>4)</sup>	Eggs were sieved with 100 mesh net	1	2	3	4	5	Mean b	Confidence limit				
		81.8	36.9	40.0	59.3	63.2	58.6	59.0	58.6	80.0	48.6	62.9
		65.7	82.3	39.0	68.1	76.3	52.3	36.8	62.5	59.7	47.2	61.8
		50.0	46.7	57.6	73.3	71.9	75.7	61.4	76.2	76.8	67.4	49.1
		67.9	79.6	65.1	68.7	65.5	66.7	71.27	48.9	59.7	56.4	56.3
		53.7	57.4	41.7	64.6	76.0	50.0	72.3	73.0	54.3	54.7	58.1
	Mean b	63.8	60.6	48.7	68.8	70.6	60.7	60.1	63.8	66.1	54.5	57.6
	Confidence limit	15.7	24.8	14.8	6.5	7.5	13.2	17.8	13.7	14.3	10.0	6.8
Reduction in % (a-b)		-1.0	11.7	8.8	1.5	1.9	1.8	6.8	-2.3	-4.2	7.3	8.5
t value between a and b		0.11	1.10	0.92	0.30	0.20	0.23	0.80	0.34	0.75	1.61	1.92

1) Author's laboratory

2) This cattle was the same which was used in preliminary tests on previous reports.

3) Eggs were mixed after the proces of passing through the 100 mesh screen in 1 gram feces.

4) Eggs were mixed before the proces of passing through the 100 mesh screen in 1 gram feces.

Table 2 Comparison of the number of *Fasciola* eggs recovered from 1 gram feces of three cattle by VGB-, SRGB- and Dennis' techniques

Sample No.	Cattle No. 3			Cattle No. 32			Cattle No. 41		
	VGB-	SRGB-	Dennis'	VGB-	SRGB-	Dennis'	VGB-	SRGB-	Dennis'
1	0	1	0	2	3	4	7	9	12
2	0	0	2	6	4	4	8	13	6
3	0	1	0	4	4	2	8	8	10
4	2	1	0	5	1	3	6	10	10
5	0	0	0	2	1	1	7	7	8
6	1	1	0	4	2	0	8	9	4
7	1	1	1	0	1	1	9	5	5
8	0	1	2	1	4	3	13	10	10
9	1	0	0	4	4	2	9	8	11
10	0	0	0	4	0	2	5	9	6
No. of positive sample	4	6	3	9	9	9	10	10	10
Positive rate in %	10	60	30	90	90	90	100	100	100
No. of eggs total	5	6	5	32	24	22	80	88	82
Mean	0.5	0.6	0.5	3.2	2.4	2.2	8.0	8.8	8.2

Table 3 Comparison of the positive rates and number of *Fasciola* eggs recovered from feces of 100 cattle\* by five different techniques

Farm	Cattle No.	1-gram feces			5-gram feces		
		VGB	SRGB	Dennis'	Watanabe's	Watch-glass	
A	1	0(1)	0	1(1)	0(4)	1(12)	
	2	1	1	0	0	0	
	3	1	0	1	0	0	
	4	0	0	0	0	1	
B	11	0(1)	0(1)	1(2)	2(4)	2	
	12	0	0	0	0(5)	1(1)	
	13	0	0	4(1)	4(7)	1(20)	
	14	0(2)	1	0(1)	0(1)	0	
	15	1	3(3)	0	2	1	
	16	0(1)	0	2	0	1	
	17	0	1	0	2(2)	0(3)	
	18	1	1	0	0	1(1)	
	19	0(11)	1(5)	0(7)	0(12)	2(20)	
	20	0	3	1	5	1	
C	21	2	2	2	6	9	
	22	1	0	0	0	0	
	23	3	1	1	2	4	
	24	1	1	1	3	7	
	25	14	9	4	21	14	
	26	1	1	3	2	3	
D	31	1	2	1	1	5	
	32	2	5	2	8	4	
	33	6	3	5	13	9	
	34	7	7	3	11	37	
	35	4	4	4	4	7	
	36	11	9	6	4	30	
	37	18	14	9	16	31	
E	41	15	9	8	15	60	
	42	3	2	3	2	12	
	43	8	1	9	16	17	
	44	3	1	4	17	13	
	45	1	2	3	7	22	
	46	9	4	7	10	21	
	47	0	0	3	16	3	
	48	12	17	11	44	34	
	49	35(113)	20(37)	28(98)	108(436)	93(117)	
	50	2	1	1	4	2	
F	51	0(1)	0	3	0(1)	0	
	52	2	0	1	0	2	
	53	1	0	1	0	1	
	54	2	2	3	0	1	
	55	3	0	2	3	0	
	56	0	0	0	4	2	
	57	2	2	1	2(1)	1	
	58	1	1	1	11	3	
	59	3	3	2	5	1	
G	61	0	1	0	0(1)	1(1)	
	62	2	0	0	0	3(2)	
H	71	0	0	0	1	0	
I	81	0(1)	0	0(1)	0	1(2)	
J	91	0	1	0	1	3	
	92	9	6	5	30	31	
No. of positive cattle		35(8)	35(4)	37(7)	36(11)	44(10)	
Positive rate in %		35.0	35.0	37.0	36.0	44.0	
Geometric mean of eggs per gram		Mean	3.0	2.6	1.1	1.2	
		Upper limit	4.3	3.4	3.5	1.6	1.8
		Lower limit	2.1	1.8	2.0	0.7	0.8

\* : 52 cattle were egg positive.

( ) : Number of *Paramphistomum* egg recovered

I の材料は、肝蛭卵を前報 (平ら, 1978a) に述べた Fig. 1 の手順 3) で加え、また II の材料は肝蛭卵を同手順 1) で加えた。すなわち、I の材料中の肝蛭卵は金網で濾過されることなく、II の肝蛭卵は金網で濾過された。I と II の材料は 1 頭の牛糞についてそれぞれ 5 個作成された。これらについて SRGB 法によつて虫卵回収率を求め I と II の材料における平均虫卵回収率の差を  $t$  検定し、金網への虫卵残留率を調べた。

繰返し検査による肝蛭卵検出数のバラツキ：検出卵数が異なる 3 頭 (牛 No. 3, 32, 41) の自然感染牛の糞便について VGB 法, SRGB 法および De 法によつて、それぞれ 10 回検査した。

比較試験と野外応用試験：前述した搾乳牛 100 頭の糞便について VGB 法, SRGB 法, De 法, 渡辺法および時計皿法を、それぞれ 1 回ずつ行なつた。検査結果の比較は、定性的および定量的な面から行なつた。前者は 5 つの検査法での陽性頭数から求めた肝蛭卵検出率の差を、 $X^2$  検定した。後者は、De 法での検出卵数に対する VGB 法および SRGB 法での検出卵数について、それぞれの常用対数を用いて回帰式と相関係数を求めた。

## 成 績

### 1. 金網濾過が肝蛭卵回収率におよぼす影響 (Table 1)

I と II の材料での平均虫卵回収率の差は、 $-4.2 \sim 11.7\%$  であつたが、 $t$  値は  $0.11 \sim 1.92$  であり、いずれも有意差を認めなかつた ( $t_{(8, 0.05)} = 2.57$ )。

### 2. 繰返し検査における肝蛭卵数のバラツキ (Table 2)

VGB 法, SRGB 法および De 法での肝蛭卵検出率は、牛 No. 3 でそれぞれ 40, 60 および 30%, No. 32 ではいずれも 90%, そして No. 41 ではすべて 100% であつた。また、それぞれの平均検出卵数は、牛 No. 3 で 0.5, 0.6 および 0.5, No. 32 で 3.2, 2.4 および 2.2, そして No. 41 で 8.0, 8.8 および 8.2 であつた。

### 3. 比較試験と野外応用試験 (Table 3)

この表は検査頭数 100 頭のうち、肝蛭卵陽性牛 52 頭の虫卵数および同時に検出された双口吸虫卵数を付記したものである。VGB 法, SRGB 法, De 法, 渡辺法および時計皿法による肝蛭卵の検出率は、それぞれ 35, 35, 37, 36 および 44% であつた。これらの百分率の間には有意差を認めなかつた ( $X^2_{(3)} = 2.43$ ,  $X^2_{(4, 0.05)} = 9.49$ )。

また前記 5 種の検査法における糞便 1 g あたりの肝蛭

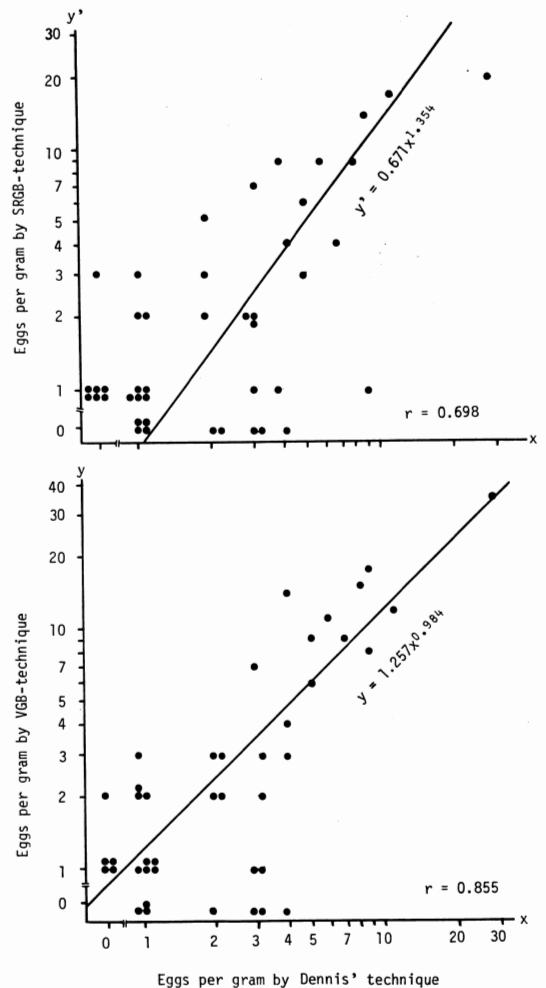


Fig. 1 Correlation of the number of *Fasciola* eggs per gram of cattle feces between VGB- and Dennis' technique, between SRGB- and Dennis' technique.

卵検出数の幾何平均は、それぞれ 3.0, 2.5, 2.6, 1.1 および 1.2 個であつた。

### 4. VGB 法, SRGB 法および De 法による肝蛭卵検出数の関係 (Fig. 1)

定量的検査法とされている De 法での検出卵数 ( $x$ ) に対する VGB 法での検出卵数 ( $y$ ) は、回帰式  $y = 1.257x^{0.984}$  で示され、相関係数  $r = 0.855$  であつた。また前記  $x$  に対する SRGB 法での検出卵数 ( $y'$ ) の関係は、回帰式  $y' = 0.671x^{1.354}$  で示され、相関係数  $r = 0.698$  であつた。

## 考 察

これまでに述べた VGB 法 (平ら, 1978a) と SRGB 法 (平ら, 1978b) のねらいは, 現行の肝蛭卵検査法に比べて, 1) 省力的であること, 2) 定性的な虫卵検出率の点で差がないこと, そして 3) 検出卵数の定量化への意図がある。以下これらについて考察する。

### 1) 省力化

VGB 法と SRGB 法では同時に多数の検体を簡単に処理することができ, ガラス球層によるふるい分けを行なうため鏡検する沈渣が少ない。その結果, ひとつの検査材料は 1 枚のスライドグラスで鏡検され, 省力的に検査することができる大きな利点がある。

### 2) 肝蛭卵検出率 (定性)

今回野外試験を行なった検査 5 法における肝蛭卵検出率は, 35~44% の範囲にあつたが, これらの百分率の間には有意差を認めなかつた。そのため, VGB 法と SRGB 法の肝蛭卵検出率 (定性) は, 他の検査法と差がないものと考えられる。

### 3) 肝蛭卵検出数の定量化

一定量の牛糞から検出される肝蛭卵数が一般に少量であり, 日々の変動が大である (Dorsman, 1956b; Honer, 1965) ことから, 肝蛭卵検査法の多くは高い検出率を得ることを目的とした定性的な方法である。しかし実験目的によつては肝蛭卵数を定量的 (EPG) に調べる必要も多く牛肝蛭 EPG の検査法として Honer (1965) は硫酸亜鉛浮遊法, Coyle (1958) は水流を利用した沈殿法, Dorsman ら (1956a) は金網でのふるい分けと特殊な計算盤を併用する方法, そして Dennis ら (1954) は牛糞 1g の沈渣全量を鏡検する方法を行なっている。これらの肝蛭 EPG 検査法は検査に多くの労力を要すること, あるいは特殊な器材を必要とするため, 研究上の目的で使用されているにすぎず, 新しい検査法の開発が望まれている。

そこで先に報告した VGB 法 (平ら, 1978a) および SRGB 法 (平ら, 1978b) が, 定量的な検査法として使用できるかどうかを明らかにするため, 2・3 の基礎実験および野外実験を行なったところ, 検査手技の過程のひとつである 100 メッシュの金網濾過による肝蛭卵検出率の低下は認められず (Table 1), また同一材料に対する検査成績の再現性についてもほぼ満足できる結果を得た (Table 2)。そして, 肝蛭 EPG 検査法である De 法での検出卵数と VGB 法での検出卵数, および De 法

での検出卵数と SRGB 法での検出卵数の間には, 高い相関が認められ, 一次式が成立した (Fig. 1)。このことから, De 法での検出卵数が EPG にあたるとすれば, VGB 法と SRGB 法での検出卵数もほぼ EPG として扱えるであろう。VGB 法と SRGB 法は, ほぼ同一の精度とみなされるが, SRGB 法の方が簡易な器材によつて容易に検査できるため, 応用価値が高いと思われる。

## ま と め

ガラス球層によるふるい分けを応用した VGB 法と SRGB 法が, 牛糞内肝蛭卵の検出ばかりでなく, 肝蛭卵数の定量にも使用できるかどうかを検討するため実験を行なった。供試牛糞の前処理として行なう 100 メッシュの金網濾過による虫卵回収率の影響を調べたところ, これによる回収率の低下は認められなかつた。また同一材料の繰返し検査における検出卵数のバラツキは小さく, 検査成績の再現性が認められた。

搾乳牛 100 頭の糞便について VGB 法, SRGB 法, De 法, 渡辺法および時計皿法を行なった。これら 5 種の検査法での虫卵検出率の間には有意差を認めなかつた。また, De 法での肝蛭卵検出数 (x) に対する VGB 法での検出虫卵数 (y) および SRGB 法での検出虫卵数 (y') には,  $y=1.258 x^{0.984}$ ,  $y'=0.671 x^{1.354}$  が成立した。De 法は肝蛭 EPG の検査法として応用されているので, VGB 法と SRGB 法による検出卵数も肝蛭 EPG とみなされ, VGB 法と SRGB 法は牛糞内肝蛭卵の定量的検査法としても使用できることが示唆された。手動による簡易な回転装置によつて容易に検査できる SRGB 法は, 肝蛭卵の定量的検査法として野外応用が期待される。

## 謝 辞

稿を終るにあたり, 種々御指導頂いた農林水産省家畜衛生試験場寄生虫第 2 研究室長角田清博士および同室鈴木恭博士に深謝します。

## 文 献

- 1) Coyle, T. J. (1958): Experiments in the diagnosis and treatment of Fascioliasis in Uganda cattle. Bull. Epiz. Dis. Afr. 6, 255-272.
- 2) Dennis, W. R., Stone W. M. and Swanson, L. E. (1954): A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 124, 47-50.

- 3) Dorsman, W. (1956a): A new technique for counting eggs *Fasciola hepatica* in cattle faeces. J. Helmint. 30, 165-172.
- 4) Dorsman, W. (1956b): Fluctuation within a day in the liver-fluke egg-count of the rectal contents of cattle. Vet. Rec. 68, 571-573.
- 5) Honer, M. R.. (1965): The interpretation of faecal egg-counts 1. Daily variations in *Fasciola hepatica* egg-counts in cattle. Z. Parasitenk., 26, 143-155.
- 6) 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.
- 7) 平 昭亨・吉原 忍・上野 計・吉原豊彦・岩瀬賢介(1978a): 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. 寄生虫誌, 27, 191-195.
- 8) 平 昭亨・吉原 忍・上野 計・吉原豊彦・岩瀬賢介(1978b): ガラス球層をふるいとした牛糞内肝蛭卵検査法 2. 傾斜状態での回転を与える方法の基礎実験. 寄生虫誌, 27, 387-391.
- 9) 渡辺昇蔵・永山文昭・岩田神之介(1953): 肝蛭卵の簡易糞便検出法について. 日獣会誌, 6, 176-177.

## Abstract

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

#### 3. EVALUATION AS METHODS OF PRACTICAL FIELD FECAL EXAMINATION AND QUANTITATIVE EGG COUNT

NORIYUKI TAIRA, HAKARU UENO

(National Institute of Animal Health, Tokyo, Japan)

MIKIO KAWANO AND AKIO TSUNOKAWA

(Ashigara Live Stock Hygiene Service Center, Kanagawa, Japan)

VGB-technique (Taira *et al.*, 1978 a) and SRGB-technique (Taira *et al.*, 1978 b) were evaluated as a practical use on the stand point of qualitative and quantitative measurement of *Fasciola* eggs in cattle feces. To strain the fecal material through 100 mesh metal screen had little or no effect on the recovery of eggs in SRGB-technique as shown in Table 1. The number of eggs recovered by VGB-, SRGB- and the Dennis' technique (Dennis *et al.*, 1954) were compared with the feces of three cattle of different grade of infection. The number varied greatly by any method in the case of fecal material of light infection, however, constant results were obtained with cattle feces of relatively heavy infection as shown in Table 2.

Feces of 100 dairy cattle in Kanagawa prefecture were examined for the detection of *Fasciola* eggs by the five methods, VGB-, SRGB-, the Dennis' the Watanabe's sedimentation (Watanabe *et al.*, 1953) and watch-glass sedimentation (Iwata, 1963) technique, and results were compared. Positive rates of *Fasciola* eggs by each method had no statistical significant differences as high as 35, 35, 37, 36 and 44 %, respectively. The number of eggs recovered from 1 gram feces by VGB- and SRGB-technique showed strong correlation to the number of eggs recovered by Dennis' technique as shown in Fig. 1. As the Dennis' technique is known as a good quantitative *Fasciola* egg counting method, so VGB- and SRGB-technique are also good for the egg counting method.

The amounts of volume of final samples by VGB- and SRGB-technique were very small, enough to mount on single slide glass. The VGB-technique needs special vibrator, however, SRGB-technique needs only simple apparatus with manual rotation. SRGB-technique would be considered effective and exact method for *Fasciola* egg count from cattle feces.