

# 9 沈降速度差を利用した新たな肝蛭虫卵検査法の可能性

県北家畜保健衛生所

松本 輝久・秦 祐介・松田 廣志

## 1 緒言

肝蛭虫卵の検査法には代表的なものとして表1のとおり3種類あるが、現在、使われているのは主にメッシュ法とビーズ法である。<sup>1)</sup>各検査の特徴は表のとおりであるが、検査機会の減少により、これらの検査に必要な専用器具の入手が困難な状況になりつつある。<sup>2)</sup>

表 - 1

検査法	原理	器具	術式・時間	精度
濾過法	沈降	汎用品	簡単・短時間	低・定性
メッシュ法	乾度	専用器具	簡単・短時間	中・中間
ビーズ法	沈降+乾度	専用器具	多段階・長時間	高・定量

このような中で、新たな検査法と、そのための基礎的試験に取り組んだので報告する。

今回目指す検査法は特別な器具を要しない、精度は定性的である、莢雑物との沈降速度の差を利用すること、特に顕微鏡検査の妨げとなる比重の重い莢雑物の除去をコンセプトにした。

## 2 予備検査材料と方法

材料は一般農家で飼育されている黒毛和種成牛の糞便を用いた。

### 1) 予備検査 沈降速度の測定

測定に用いる肝蛭虫卵（以下虫卵）はメッシュ法で収集した。図-1で示すとおり、自作したプラスチック製の透明な四角柱容器に満杯の水をいれ垂直に立て、上部にメランジュールで虫卵を入れた後、さらに水を入れ空気のない状態で密栓し静置する。所定時間経過後、これを横にして水平に保持、底面に沈んだ虫卵を実体顕微鏡で観察しその位置を特定した。

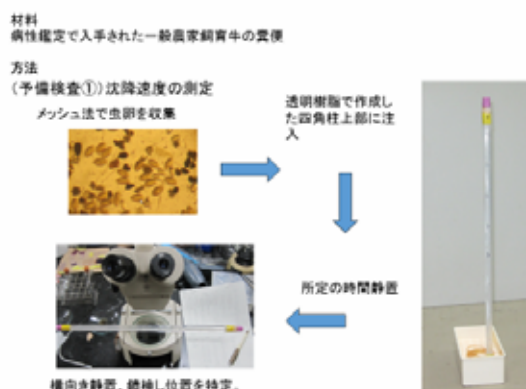


図 - 1 沈降速度の測定

### 2) 予備検査 糞便液静置時間の検討

図-2に検査に使用した容器を示す。断面図に示すとおり、突起をつけたダンボール製の箱を使用した。この容器にビニール袋を入れ、その中に5gの糞便を500mlの水で溶解し100メッシュでろ過した糞便液を満杯まで入れ密閉、まっすぐ立てる。虫卵は沈降するので所定の時間静置後、横にして水平に保つ。虫卵は突起で区分された各領域に沈む。これを冷凍庫で凍結させた後、青矢印の位置で切断、各ブロックを溶かし、メッシュ法により集卵し計数した。

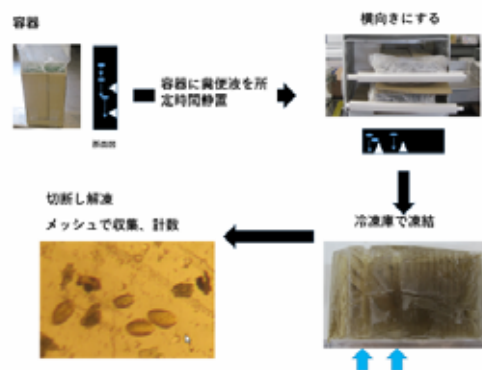


図 - 2 静置時間の検討

### 3 予備検査結果

#### 1) 予備検査

各牛個体別の虫卵を用いての沈降距離の測定結果は図 - 3 - に示すとおりである、横軸は3分間沈降時の起点からの距離を示し、2cm毎の各階層の虫卵の個数を縦軸にとったヒストグラムで示す。平均値と標準偏差は図に示すとおりで、平均値は18.4cmから22.9cmと開きがあったが、No37を除くと他の個体間に有意差は無かった。

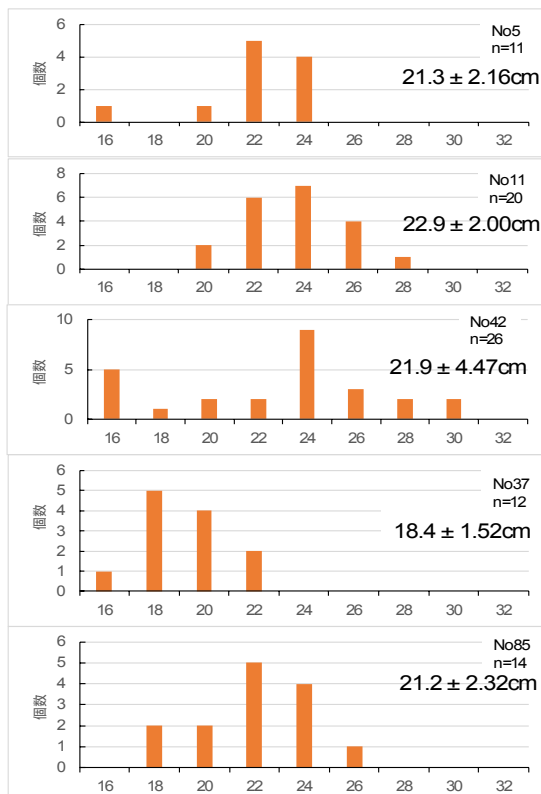


図 - 3 - 個体別の沈降距離(3分間)

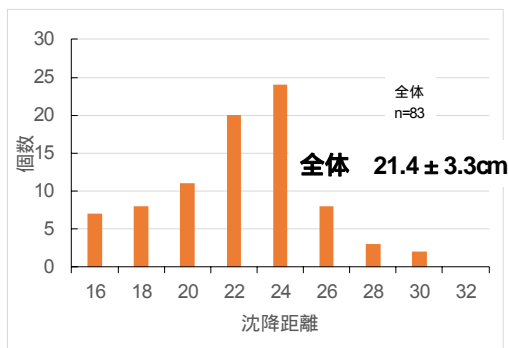


図 - 3 - 全体の沈降距離(3分間)

全体(N=83)の沈降距離は図 - 4 - に示すとおりで平均値は21.4cm、標準偏差は3.3cmであっ

た。

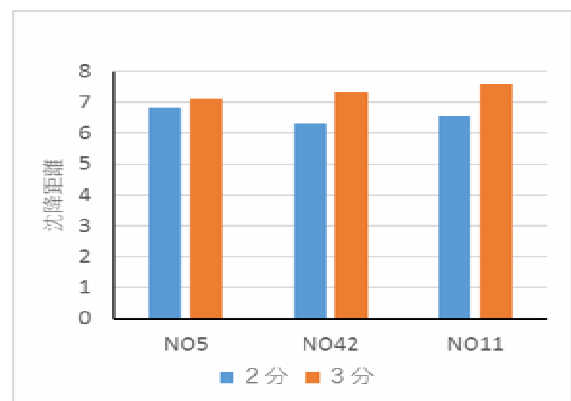
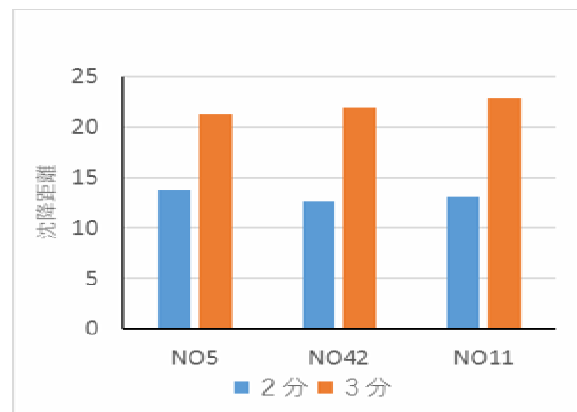


図 - 4 沈降時間による沈降速度の変化

沈降速度の加速を検討するために3頭の個体から得られた虫卵の2分間沈降と3分間沈降を測定した。各個体の左カラムに2分間での平均距離、右カラムに3分間での平均距離を示した。下グラフには1分間あたりの距離を示した。1分あたりの距離は2分間で6.3cmから6.8cm、3分間で7.1cmから7.6cmであった。時間経過による速度に本検査で考慮すべき大きな加速度はないと思われた。

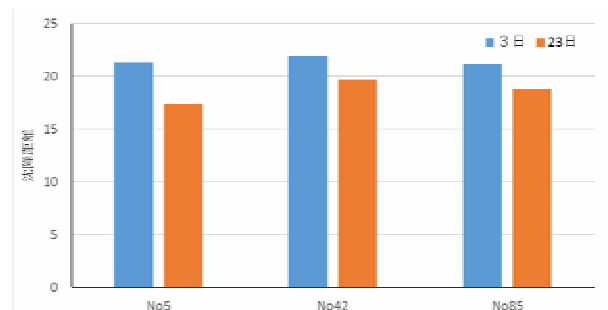


図 - 5 糞便冷蔵保存の沈降距離への影響

寄生虫検査は保存して行うことも多いことから冷蔵による沈降速度の変化を見た。3頭の糞便を4の冷蔵庫に保存し3日目と、23日目に

沈降距離を調べた。

図-5に3分間の平均距離を示す。保存により沈降距離は有意に短くなった。(P>0.05)

しかし、個々の卵の沈降速度のばらつきと比較し検査上は大きな差とは認められなかった。

## 2) 予備検査

予備検査の結果を図-6に示す。2分、4分放置後の虫卵の底辺への集まり具合を見たもので、2分では73%が、4分で87%が底辺から3cm以内に集まっていた。

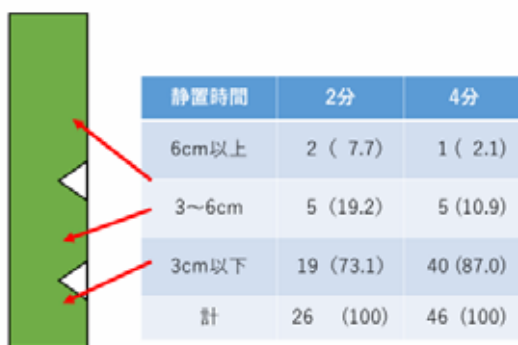


図 - 6 糞便液の静置時間と虫卵の存在位置

## 3 本試験

### 1) 材料と方法

検査には地域の肝蛭症浸潤状況調査で収集した管内飼養の肉用牛または乳用牛の糞便を供した。



- ★幅8cmのごぼう袋
- ★開口部から50cmを斜めにシール
- ★800mlの容量
- ★割り箸とゴム管

図 - 7 本試験の概要

図-7に本試験の概要を示した。試験にはポリエチレン製の幅8cmのごぼう袋を使用した。

開口部から約50cmのところから斜めにシールし余分な部分を切り取った袋をペットボトルで自作したホルダーに装着した。この状態で水は約800ml入る。遮断は割り箸とゴム管で作成した2本の棒をゴムバンドで固定することにより行った。

図-8から検査手法を模式的に示す。袋に界面活性剤(台所用洗剤)を0.1%の割合で入れた水道水を満杯に入れる。次に袋中央部を圧迫し入れる糞便液とほぼ同量の水をあふれさせる。

次に、アルミホイルを開口部に置き、圧迫をゆるめることにより水面を徐々に下げながら糞便液を重層する。糞便液は所定量の糞便を500mlの水道水に溶かし100メッシュでろ過、ピーカーに入れ予備検査の結果から5分間静置、上清3/4を除去した。

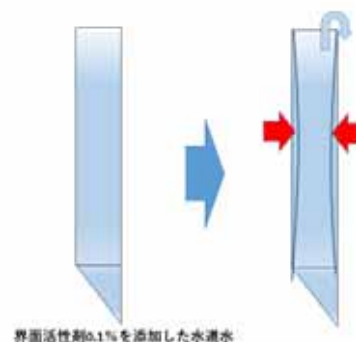


図 - 8 手法



図 - 9 手法

図-10のとおり所定の時間後、下部を遮断する。

重い莢雑物は図のように下に集積する。

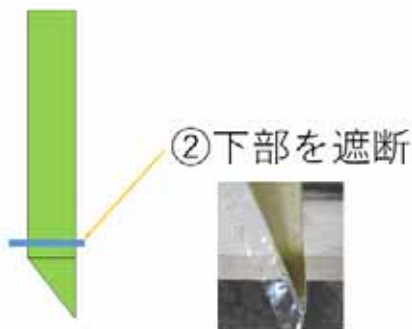


図 - 10 下部の遮断

図 - 11 のように所定時間後、遮断部位から約 8 cm 上部をさらに遮断する。中間部に卵が集まることから、更に集卵後、虫卵を顕微鏡で検査した。集卵はロート、または図のように検査に用いた袋の下部で 10 分間静置し行なった。観察しやすいようメチレンブルー液で染色した。

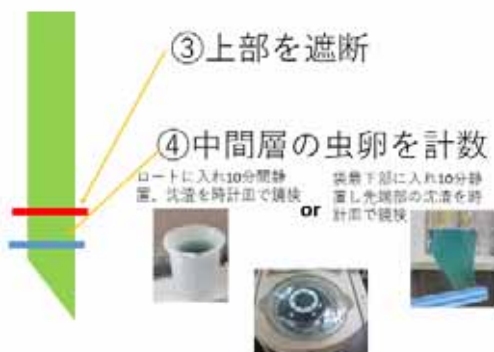


図 - 11 上部の遮断と集卵

## 2) 遮断時間の決定

図 - 12 に予備検査を元に経過時間と虫卵の位置関係を示す。矢印は虫卵が存在する位置の 95% 限界を示し、たとえば 3 分では 15cm から 28cm の間に虫卵は 95% があるという推定である。3 分では大部分が 30cm より上にあり、6 分では、遮断がなければ、ほとんどが 30cm より下にあることを示している。3 分で青線を遮断し、6 分で赤線を遮断すればこの間にほとんどの虫卵が存在することが推測された。

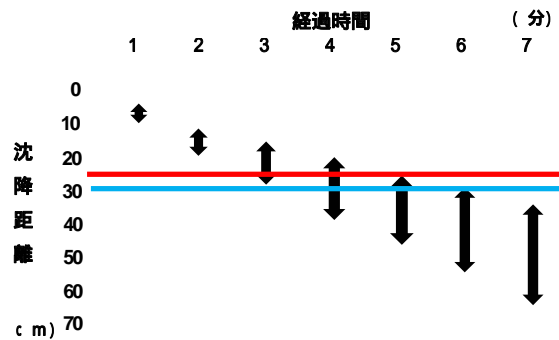


図 - 12 遮断時間の検討

3) 袋上部での糞便液をビーカー内で静置することに代え図 - 13 のとおり、袋上部による糞便液の作成も行なった。所定の糞便を約 250ml の水道水に溶き 100 メッシュでろ過、遮断した袋の上部に入れ、5 分間静置後、上 3/4 の液を注射器で除去、そののち遮断を解除し沈降開始時間とした。

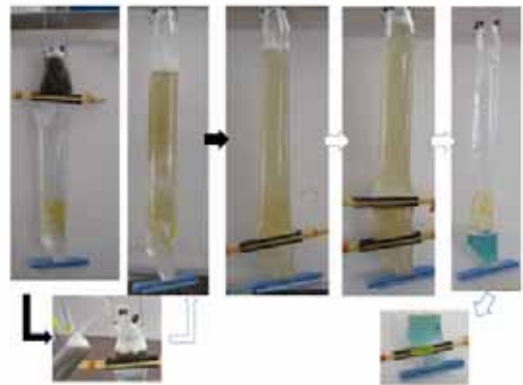


図 - 13 袋上部での糞便液静置

## 4) 結果

異なる牛の糞便の 5 g、10 g を用いメッシュ法と本検査との比較を行った。下部遮断時間、上部遮断時間は 3 分、6 分とした。糞便は比較のため倍量の糞便を 500ml の水に溶き半量ずつを両検査に用いた。

メッシュ法及び本検査（ビーカー静置）による検出個数は表 - 2 のとおりであった。個別別には大きな濃度差があった。比較はメッシュ法に対する虫卵の検出率で行った。低いもので 40%、高いもので 133% と格差が見られたが検出されなかった例はなかった。検出率の平均値は 76.1% だった。

また、袋上部静置での検出結果を表 - 3 示し

た。上記と同様、糞便は異なる牛の糞便を用い、沈降時間は3分、6分とした。本検査は2回行った。

表 - 2 メッシュ法と本検査の比較

検査NO	糞便量	メッシュ法個数 (個)	本法個数 (個)	検出率 (%)
1	5g	39	20	51.3
2	5g	10	4	40.0
3	5g	3	3	100.0
4	10g	43	19	44.2
5	10g	96	128	133.3
6	10g	5	3	60.0
7	10g	11	13	118.2
8	10g	29	16	55.2
9	10g	30	14	46.7
10	10g	50	52	104.0
11	10g	19	16	84.2
平均				76.1

\*条件 糞便液は5分間静置、3/4を除去。遮断は下部3分後、上部6分後

メッシュ法と比較した検出率は0%から250%と大きな差があった。しかし、個体別にはある程度の再現性はあると考えられた。個数の少ないNo.5は検出することができなかった。

表 - 3 メッシュ法と本検査の比較

検査NO	糞便量	メッシュ法個数 (個)	本法個数 (個)	検出率 (%)
1	10g	33	33 (100)	35 (106)
2	10g	7	6 (85.7)	5 (71.4)
3	10g	6	5 (83.3)	15 (250)
4	10g	9	8 (88.9)	5 (55.5)
5	10g	2	0 (0)	0 (0)

平均検出率 84.1%

#### 4 まとめと考察

肝蛭虫卵の水中での沈降速度は虫卵により、ばらつきがあるが平均速度は1分間当たり約7cmであった。由来する牛による個体差は小さいと思われた。このことから、沈降速度の差による莢雑物除去は可能で検査に活用できると思われた。特に顕微鏡検査の妨げとなる比重の大きい土砂粒の除去には有効と思われた。予備検査の結果、また今回は示さなかったが卵のみの袋内での沈降検査の結果から莢雑物の存在は

その濃度により沈降速度に大きな影響を与えられた。そのことから莢雑物による影響低減のため界面活性剤の添加を行い、無添加(未発表)より良好な成績が得られた。今回の検出率はメッシュ法より低い値となったが検出率向上のためには糞便液で使用する糞便の増量、処理の仕方、例えば遠心分離による高度分離による糞便液の減量が考えられた。沈降時間と遮断位置の改善については袋の断面積と長さの変更が必要である。希釈は分離の大きな要因であることからより大きいほうが良いと思われるが断面積が増すと対流という要因が加わると考えられる。また、水中での沈降速度の測定に用いた虫卵はメッシュ法で集めたものであることからメッシュで収集できなかった虫卵を含めた虫卵の沈降速度は予備検査の結果と異なる可能性は残っている。このことから遮断位置、時間についてはさらに多くのケースを試行する必要がある。また添加物については今回、台所用洗剤を使用した但他の薬剤も検討すべきと思われた。

今後は当初の目的である特別な機材を要せず実施者による格差のない、より簡略な方法への改良を行いたい。

#### 文献

- 1) 川村芳夫, ほか: 日獣会誌, 34,14-18 (1981)
- 2) 堀井洋一郎: J.Farm Animal in nfectious Desease,1-8(2016)