

土壤中から犬回虫卵を検出する方法の効率について

森 啓至, 藤曲 正登

The Efficiency of Techniques for the Recovery of *Toxocara canis* Werner Eggs from Soil.

Keiji MORI and Masato FUJUMAGARI.

I. はじめに

イヌカイチュウ *Toxocara canis* Wernerは、一才未満の幼犬を固有宿主とする特異な生活史を持つ¹⁾寄生線虫であり、イヌに対するその寄生率の高い事が報告されており^{2),3)}、我々の調査でも1.5ヶ月未満の幼犬の回虫卵陽性率が53.8% (7/13)を示し、最高8,600E.P.G.の個体もいた。

また、非固有宿主である人に対するイヌカイチュウによる人体内幼虫移行症は、1952年にアメリカのビーバーが報告をして以来、日本でも75例以上の症例報告がなされている⁴⁾。これらの症例の感染源はゴキブリを疑う報告⁵⁾や牛・鶏肉、肝臓の生食によるとされるもの⁶⁾もあるが、イヌの糞便で汚染された砂場も原因の一つとされており、各地で虫卵汚染調査が行われ、地域によっては60%以上の汚染率を示すとの報告^{6),7)}もある。これらの調査では、回虫卵の比重が1.09~1.17であることから、硫酸亜鉛溶液浮遊法 (ZnSO₄法)、硫酸マグネシウム溶液浮遊法 (MgSO₄法)、シヨ糖溶液浮遊法 (シヨ糖法) などの遠心沈澱浮遊法が主として用いられている。

今回我々は、こうした検査方法のうち廃液処理が面倒なZnSO₄法を除いた、MgSO₄法とシヨ糖法について虫卵検出の効率を調査したのでその結果について報告する。

II. 方法

1. 生後1.5ヶ月以内の幼犬の糞便中よりイヌカイチュウ卵 (図1.) を分離し、あらかじめカイチュウ卵陰性を確認している

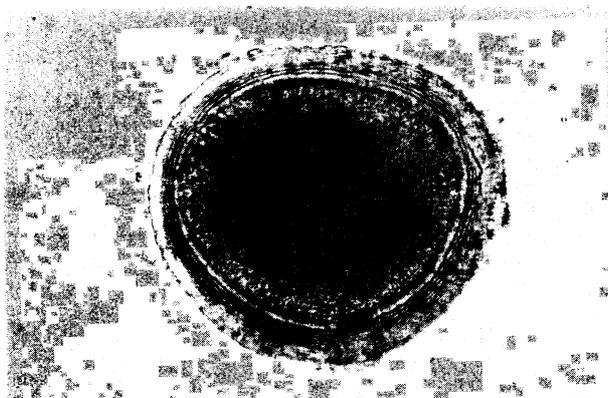


図1. イヌカイチュウ卵 (×400)

砂場の砂を分析用篩 (メッシュNo14: φ1.19mm) にかけて小石などを除去したもの1gあたりに虫卵を1個の割合で混入し、それを検体とし、以下の2方法を比較した。

1) MgSO₄法⁹⁾ (図2.)

検体5gを50ml遠沈管に移し、30%次亜塩素酸ソーダ20mlを加えよく攪拌して1時間放置する。

2,000r.p.m.で2分間遠沈して上清を捨てる。

蒸留水を加えて50mlとして遠心洗浄 (2,000r.p.m. 2分) を2回繰り返す。

沈渣に比重1.26の硫酸マグネシウム溶液 (蒸留水1,000mlに硫酸マグネシウムMgSO₄ · 7 H₂O約1,000gを溶解したもの) を加えて50mlとしてラボミキサーで30秒間攪拌する。

2,500r.p.m.で5分間遠沈する。

試験管立てに立てて、静かに硫酸マグネシウム溶液を追加して液面を盛り上げさせる。

30分~1時間静置後、24×32mmカバーガラスで液面を接触させてスライドグラスにのせ鏡検する。

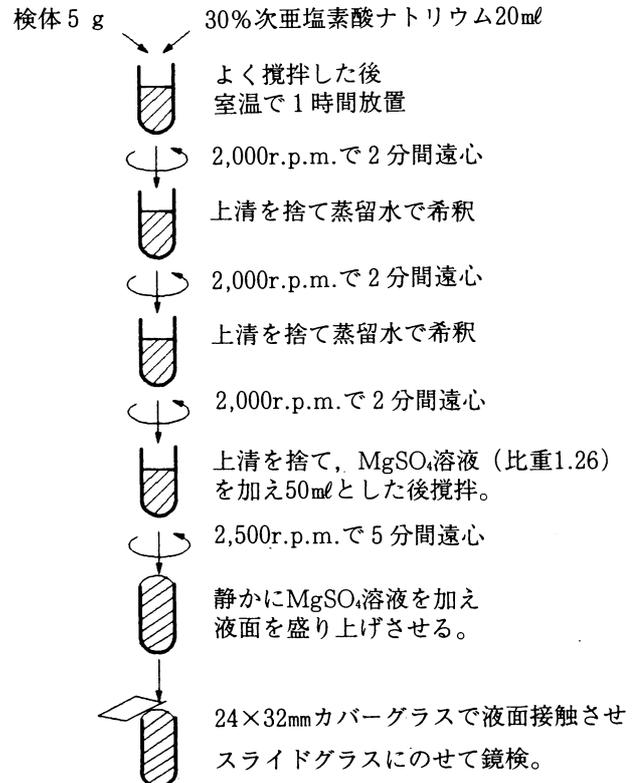


図2. 硫酸マグネシウム溶液浮遊法検査手順

2) ショ糖法⁶⁷⁾ (図3.)

検体20gを口径4cmのアクリル樹脂管の筒先に170 μ mのメッシュを装着したフィルターに入れ紙性のコップの中に入れる。

界面活性剤入り蒸留水(蒸留水1,000mlに0.5gのTween80を溶解したもの)45mlを加えて約100回攪拌し砂の中に含まれるカイチュウ卵をろ過する。

このろ過液をTween80入り蒸留水を用いて大遠沈管(50ml用アシストチューブ)に移し、1,500r.p.m.で5分間遠沈する。

上清を捨てスポイトを用いてTween80入り蒸留水約10mlにて沈渣を小遠沈管に移して、再び1,500r.p.m.で5分間遠沈する。

上清を捨て、沈渣に比重1.20のショ糖溶液(蒸留水1,000mlにショ糖約750g溶解させたもの)10mlを注いでパラフィルムで栓をし、ラボミキサーで30秒間攪拌した後、2,500r.p.m.で10分

間遠沈する。

沈渣をショ糖溶液に浮遊させ、小遠沈管に浮遊液を表面張力が生じるまで満たし、その縁にカバーガラスをのせて2時間静置後、カバーガラスを取りスライドガラスにのせて鏡検する。

残った虫卵を回収するため50回容器の内面を細い針金でこすった後、容器の上にカバーガラスを乗せて一晩置いて同様に鏡検する。

2. 公園の砂場4 m^2 毎に深さ約3cmの所から砂20gずつを採集し、ビニール袋で検査室に搬入後、1公園ごとに検体をよく混ぜ合わせ室温で乾燥させ、分析用篩でゴミを取り除いた後に、上記2方法で虫卵検出に務めた。

なお、両法の虫卵検出数の差の検定は、Studentのt-test、陽性検出率の差は、Wilcoxonの符号検定法を用いた¹⁰⁾。

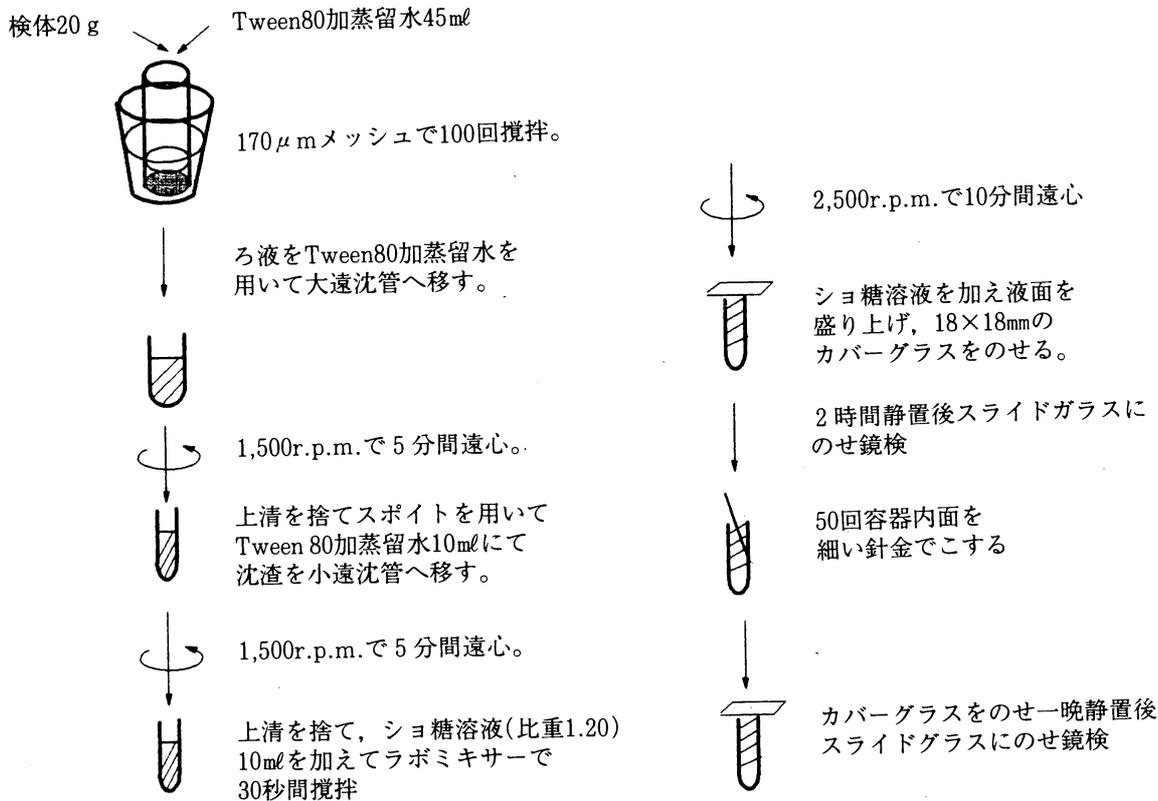


図3. ショ糖溶液浮遊法検査手順

III. 結果

1. 両法とも各20回繰り返す、その結果は表1., 2.に示した。

MgSO₄法では、平均虫卵回収数は2.1個/5gで、100%の回収率を示した2検体を含み回収率42.0%であったが、虫卵を回収できなかった検体が3件あった。

次亜塩素酸ナトリウムの洗浄によると思われる蛋白膜の変性(図4.)や、結晶化した硫酸マグネシウムの析出(図5.)が見られ、虫卵の同定がしづらい検体もあった。

ショ糖法の虫卵回収率は18.3%と低く、最高でも45%の回収率であったが、回収率0%の検体は無かった。また、平均虫卵回収数は3.65個/20gであった。

虫卵回収率はMgSO₄法の方が有効であった(P<0.01)が、検体陽性率に有意差はなかった。

表1. 硫酸マグネシウム溶液浮遊法(MgSO₄法)による虫卵回収率

回収虫卵数	検体数	虫卵数合計	陽性率	虫卵回収率
0	3	0		
1	4	4		
2	5	10		
3	6	18		
5	2	10		
合計	20	42	17/20 (85.0%)	42/100 (42.0%)

表2. ショ糖溶液浮遊法(ショ糖法)による虫卵回収率

回収虫卵数	検体数	虫卵数合計	陽性率	虫卵回収率	
1	1	2			
2	5	10			
3	5	15			
4	1	4			
5	3	15			
6	3	18			
9	1	9			
合計	3.65/回	20	73	20/20 (100%)	73/400 (18.3%)

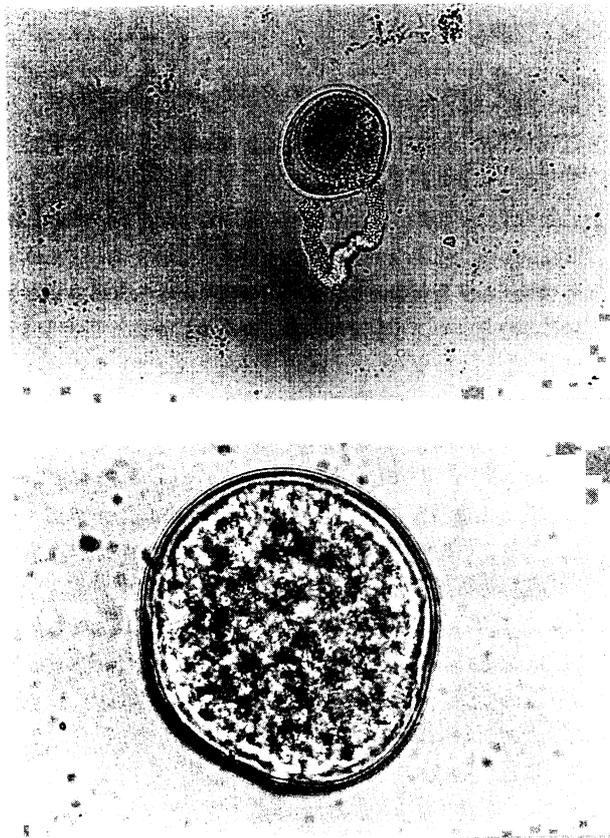


図4. (A) 蛋白膜が変性した虫卵(×100)
(B) 蛋白膜が変性した虫卵(×400)



図5. 硫酸マグネシウム結晶の析出した中の虫卵(×100)

2. 砂場での虫卵検出状況は表3. に示した。MgSO₄法では検体量を5gとしたので20g当たりとなるように換算した。

表3. 砂場からの検査法別虫卵陽性率

検査方法	検体数	陽性検体数	虫卵検出状況(検体20gあたり)		
			平均数	最高数	総数
①MgSO ₄ 法	97	9	7.1	20	64
②ショ糖法	97	19	10.1	83	191
①+②	97	23	5.5	43.5	127.5

※①+②の虫卵検出状況は検体量が2倍となるため換算してある。両法とも陽性の検体は5検体。

MgSO₄法でのみ虫卵陽性となった検体は4件、ショ糖法のみ陽性検体は14件で、両法とも陽性となった検体は5件しかなく、MgSO₄法での陽性率は9.3%、ショ糖法での陽性率は19.6%、両法併用の場合の陽性率は23.7%であった。

MgSO₄法の平均虫卵検出数は7.1個/20gであったのに対して、ショ糖法では10.1個/20gとなっていた。

検体陽性率はショ糖法の方が有効であった(P<0.109)。

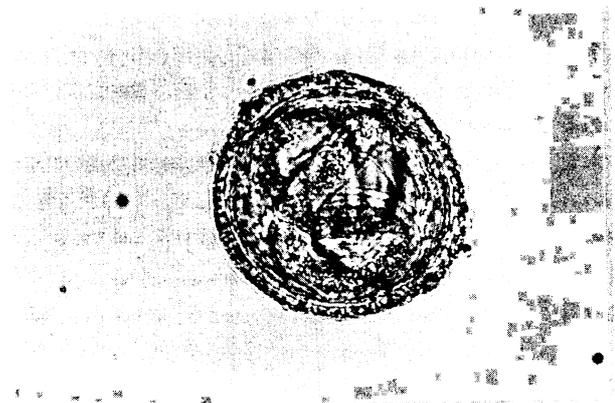


図6. 幼虫包蔵卵(×400)

検出されたカイチュウ卵は幼虫包蔵卵(図6.)が多く、50.3~86.1×45.3~68.4μmとやや小さめであった。砂場のカイチュウ卵はイヌカイチュウ(23.5%)よりもネコカイチュウ*T. cati* Schrank(76.5%)の方が多という報告⁶⁾もあり、この種の同定にはイヌカイチュウの方がやや大きい(75~80×65~70μm)¹⁰⁾ことのほか、蛋白膜構造(図7.)が重要¹¹⁾である。今回検出された虫卵はその大きさからほとんどネコカイチュウ卵であると思われる。

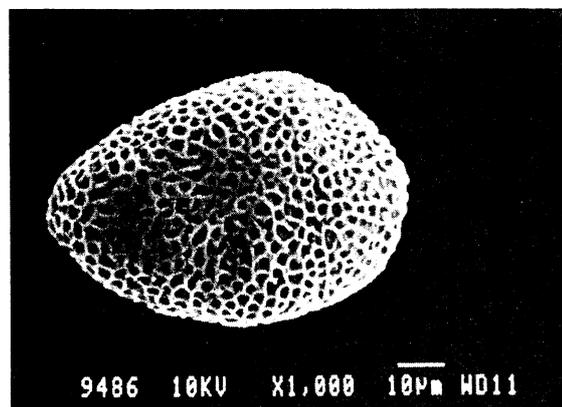


図7. イヌカイチュウ卵の走査電顕像(×1,000)

IV. 考 察

MgSO₄法の虫卵回収率は42%であり、最後まで同じ50ml遠沈管を用いているためシヨ糖法より回収率がよかったが、50%以上の未回収分があり、3件の回収率0%の検体が出た。これは、合計3回の上澄みを捨てる時の流失と遠沈管の内径が30mmなのに24×32mmのカバーガラスで浮遊液面の接触を行っている事も原因であると思われる。

シヨ糖法の虫卵回収率は、Uga et al.の報告⁶⁾した40%よりさらに低く、18.3%であった。ろ過する際に通過できない虫卵が存在することが大きな理由と思われるが、その他に上澄みを捨てた時の流失や紙コップ、50ml遠沈管、10ml遠沈管と3種の容器を換える時の流失も原因であったと思われる。

シヨ糖法の方が陽性率が高かったのは、検体量が4倍であるため同濃度であればそれだけ検体中の虫卵数が多くなるためである。

一昼夜放置後の虫卵回収率は、最高3個、合計9個で、陽転した検体も1件あり、砂場からの検体でも、最高8個、計37個で、陽転した検体も2件あった。このことから、比重の小さい溶媒では長時間の放置が有効なことがわかった。

公園からの検体では両法とも陽性なのが5検体だけであったが、一法のみ陽性の検体の最高虫卵数は12個と汚染卵数が少ないためこのような結果になったと思われる。

本来、浮遊法は、定量的検査というより定性的な検査の性格が強いことから、虫卵検出効率はあまりよくなく、手技が面倒で、時間がかかるが、同時に多くの検体量を利用できるので1g当たり1虫卵の濃度であれば検出できるシヨ糖法の方がより有効な検出方法だと思われる。

V. ま と め

イヌカイチュウ卵の土壌中からの検出効率を比較するために硫酸マグネシウム溶液浮遊法(MgSO₄法)とシヨ糖溶液浮遊法(シヨ糖法)との比較を行った。

1gあたり虫卵1個を混入した検体からの平均虫卵検出数は、MgSO₄法2.1個、シヨ糖法3.65個で、虫卵検出率はそれぞれ42.0%、18.3%であったが、扱う検体量が各々5g、20gのため、検体陽性率はそれぞれ85.0%、100%となっていた。

公園の砂場からの検体では、検体陽性率がMgSO₄法9.3%、シヨ糖法19.6%、両法の併用で23.7%であった。MgSO₄法のみ陽性検体は4件、シヨ糖法のみ陽性検体は14件、両方法とも陽性の検体は5件であった。

この両法を比較すると、一時に多くの検体量を扱えるシヨ糖法の方が有効だと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、検体の提供にご協力頂いた千葉県動物愛護センター小山裕士主任技師、野中理華子技師、その他関係職員および、走査電子顕微鏡のご指導をいただきました当研究所、高橋治男主任研究員に深謝いたします。

VI. 文 献

- 1) 近藤力王至(1989): 犬蛔虫幼虫移行症, 最新医学, 44, 774-779.
- 2) Nakauchi, K., Ohtaka, H., Morishima, K. and Hiki, M. (1993): A Survey on *Toxocara canis* of Stray Dogs in Ibaraki Prefecture, Japan. Jpn. J. Parasitol., 42, 365-367.
- 3) 近藤力王至(1993): 環境と寄生虫-トキソカラ症の感染の背景から, 予防医学, 35, 35-45.
- 4) 近藤力王至(1993): イヌ・ネコ蛔虫症について, 寄生虫誌, 42 (suppl.), 34.
- 5) 高橋純子, 宇賀昭二, 松村武男(1990): 犬・猫蛔虫卵の伝搬におけるクロゴキブリの役割, 寄生虫学雑誌, 39, 551-556.
- 6) Uga, S., Matsumura, T., Aoki, N. and Kataoka, N. (1989): Prevalence of *Toxocara* Species Eggs in the Sandpits of Public Parks in Hyogo Prefecture, Japan. Jpn. J. Parasitol., 38, 280-284.
- 7) 五十嵐健二, 矢富謙治(1992): 犬と猫の回虫卵による公園の砂場の汚染状況, 日獣会誌, 45, 597-599.
- 8) Shimizu, T. (1993): Prevalence of *Toxocara* Eggs in Sandpits in Tokushima City and its Outskirts. J. Vet. Med. Sci., 55, 807-811.
- 9) 松林久吉: 人体寄生虫ハンドブック(再版), 378, 朝倉書店, 東京, 1965.
- 10) 仮谷太一: 医学・生物学の統計学, 172-182, 共立出版, 東京, 1979.
- 11) 板垣四郎, 板垣博: 家畜寄生虫学, 194-202, 金原出版, 東京, 1965.
- 12) 宇賀昭二(1989): 人畜共通寄生虫症の疫学, 小動物臨床, 8, 14-17.