

普通寒天平板培地法を用いた糞線虫の侵淫状況調査 および検査法の検討について

安里龍二 仲宗根民男 新垣民樹¹⁾ 池城毅²⁾

Prevalence of *S. stercoralis* Infection Among Inhabitants of Okinawa by Agar Plate Method and Evaluation of the Methods for Detection

Ryuzi ASATO, Tamio NAKASONE, Tamiki ARAKAKI
and Tsuyoshi IKESHIRO

I はじめに

糞線虫の検査はこれまで佐々ら (1958) が報告した試験管内ろ紙培養法が最も優れた検査法として広く使われるようになり、沖縄県においても同検査法によって1%前後の糞線虫が浸淫していると考えられていた。しかし安里ら (1983) は一般住民の検査に際し、試験管内ろ紙培養法の試験管1本では不十分である事を指摘し、MGL法との併用による検査を推奨してきた (安里・長谷川、1987)。Arakaki et al. (1988) は普通寒天平板培地上に便を乗せて虫体の這った軌跡を確認する方法が従来の検査法と比較して最も良い検査法である事を報告した。しかし虫体の這った軌跡だけでは糞線虫と診断することが出来ないために今回著者らは普通寒天平板培地法、試験管内ろ紙培養法およびMGL法による虫体の確認率を比較検討し、更に普通寒天平板培地法を用いて沖縄本島中南部地区における糞線虫の侵淫状況調査を行ってきたのでその結果について報告する。

II 調査地および方法

1. 調査地は沖縄本島中南部の4市1町3村で、対象者は糸満市、勝連町、中城村は小学生以上、他の市町村は16歳以上の住民で、便は回収後遅くとも翌日までには検査に供した。
2. 検査の方法：普通寒天平板培地法 (直径9.5 cm、高さ1.5 cmのシャーレに普通寒天培地を入

れ、その中央に約1.5～3gの便を乗せて28℃で2～3日間培養)、試験管内ろ紙培養法 (28℃で5日間培養)、MGL法 (ホルマリン・エーテル集卵法、1,500 rpm、5分間) で行った。

3. 虫体の確認：当初は試験管内ろ紙培養法、MGL法で行い、途中からは普通寒天平板培地を弱拡大下で這痕 (ジャコン) 形成例を検出し、這痕形成例を対象に実体顕微鏡下で虫体を検索し、検出した虫体を生物顕微鏡下で同定した。
4. 判定の方法：何れかの方法で虫体が同定できた者を陽性とし、普通寒天平板培地法で這痕が確認されながら虫体が検出できなかった者は疑陽性とした。

III 結果

1. 市町村別による疑陽性率および陽性率

普通寒天平板培地上に虫体の這った軌跡、即ち這痕 (図1、2) 形成率が最も高かったのは糸満市の18.2%、次に勝連町の12.5%、具志川市の10.6%、中城村の8.6%、宜野湾市の6.1%、読谷村の5.8%、石川市の4.7%、北中城村の3.7%の順で、平均7.8%であった (表1)。また糞線虫の陽性率も疑陽性率の高い地域程高くなり、最高は糸満市の13.1%、次に勝連町の12.5%、具志川市の9.9%、中城村の5.5%、読谷村の4.8%、宜野湾市の4.7%、石川市の3.9%、北中城村の3.2%の順で、平均6.2%であった。

2. 性別、年齢別に見た疑陽性率および陽性率

性別で見ると疑陽性率はいずれの年齢層も女性よりも男性の方が高くなる傾向を示し、平均で男性

1) 琉大・医・細菌

2) 予防医・協会

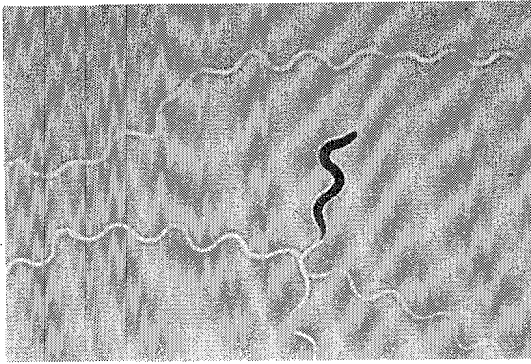


図1. 培地上に這痕を形成する糞線虫の幼虫.

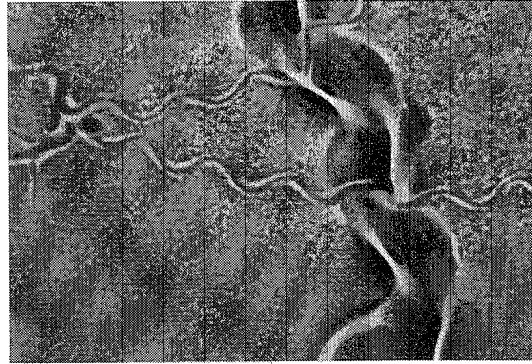


図2. 糞線虫によって形成された這痕。
(細いのが幼虫、太いのが自由世代の成虫によるもの)

表1. 市町村別による疑陽性率及び陽性率.

市町村名	対象者(回収率)	検査数	疑陽性率	糞線虫	人糞虫
糸満市	8,325(13.8%)	1,148	209(18.2%)	152(13.2%)	3(0.3%)
読谷村	16,881(18.5%)	3,117	181(5.8%)	148(4.8%)	3(0.3%)
石川市	7,089(18.0%)	1,274	60(4.7%)	49(3.9%)	0
北中城村	6,210(13.2%)	819	30(3.7%)	26(3.2%)	0
具志川市	3,665(11.1%)	406	43(10.6%)	40(9.9%)	0
宜野湾市	3,843(5.5%)	212	13(6.1%)	10(4.7%)	0
勝連町	248(32.3%)	80	10(12.5%)	10(12.5%)	0
中城村	605(21.2%)	128	11(8.6%)	7(5.5%)	0
合計	46,866(15.3%)	7,184	558(7.8%)	442(6.2%)	6(0.08%)

表2. 性別、年齢別に見た疑陽性率及び陽性率.

年齢層	男 性			女 性			計		
	検査数	疑陽性率	陽性率	検査数	疑陽性率	陽性率	検査数	疑陽性率	陽性率
7 ~ 19	109	2(1.8%)	0	71	0	0	180	2(1.1%)	0
20 ~ 29	120	0	0	150	2(1.3%)	0	270	2(0.7%)	0
30 ~ 39	300	6(2.0%)	3(1.0%)	142	4(0.9%)	1(0.2%)	742	10(1.4%)	4(0.5%)
40 ~ 49	371	37(9.9%)	26(7.0%)	573	17(3.0%)	14(2.4%)	946	54(5.7%)	40(4.2%)
50 ~ 59	562	85(15.1%)	70(12.5%)	981	54(6.5%)	40(4.1%)	1543	139(9.0%)	110(7.1%)
60 ~ 69	618	83(13.4%)	76(12.3%)	1079	70(6.5%)	59(5.5%)	1697	153(9.0%)	135(8.0%)
70歳以上	576	87(15.1%)	69(12.0%)	941	101(10.7%)	81(8.6%)	1517	188(12.4%)	150(9.9%)
不明	104	6(5.8%)	3(2.9%)	146	2(1.4%)	0	250	8(3.2%)	3(1.2%)
不明	—	—	—	—	—	—	39	1(2.6%)	0
合計	2762	306(11.1%)	247(8.9%)	4383	250(5.7%)	95(4.5%)	7184	557(7.8%)	442(6.2%)

が11.1%に対し、女性は5.7%で、男性が女性の約2倍の疑陽性率を示した(表2)。年齢別では少数ながら若年齢層から疑陽性者は見られるが特に40歳以上の男性では9.9%以上を示し、最も高かったのは50代と70歳以上の15.1%であった。それに対し、女性では70歳以上の10.7%以外は0.9~6.5%であった。また糞線虫陽性者は男女とも29歳以下では1人も検出されず、いずれも30歳以上から確認されたが、特に40歳以上では男性が7.0~12.5%(平均11.3%)、女性が2.4~8.6%(平均5.4%)で、男性は女性の2.1倍の陽性率を示した。また糞線虫保有者の99.1%は40歳以上で占め、40歳以上の陽性率は7.6%であった。

3. 這痕形成例の内訳

這痕形成例476人を対象に普通寒天平板培地法、試験管内ろ紙培養法、MGL法による数回の検査を行った結果、虫体が確認できた者が409人(85.9%)、未確認が67人(14.1%)であった(表3)。また虫体が確認できた者の内406人

表3. 初回および再検査による這痕形成者の内訳。

	検査数	陽性率
糞線虫	406	85.3%
人糞虫	3	0.6%
虫体未確認	17	3.6%
全て陰性	50	10.5%
合計	476	100.0%

(85.3%)が糞線虫で、他の3人(0.6%)は人糞虫であった。更に虫体未確認例の内、這痕を形成しながら虫体が確認できなかった者が17人(3.6%)、全ての検査で陰性になった者が50人(10.5%)

に見られた。

4. 這痕形成例からの虫体検出率の比較

這痕形成例を対象に試験管内ろ紙培養法、MGL法、試験管内ろ紙培養法の培養液を遠心する方法、普通寒天平板培地上に1/5程度の培地の空間を作り、その空間に水道水を入れ、2~3日後に空間の水を遠心する方法、這痕形成例を実体顕微鏡下で検索する方法による虫体の検出率を比較すると虫体の検出率は普通寒天平板培地上で直接実体顕微鏡下で検索する方法が83.1%で最も高く(表4)、次に試験管内ろ紙培養法の培養液を遠心

表4. 検査法による這痕形成者からの虫体検出率の比較。

検出方法	検査数	検出数	検出率
培地に水を加え遠心	40	15	37.5%
寒天培地から直接検出	154	128	83.1%
試験管内ろ紙培養法	172	67	39.0%
MGL法	172	38	22.1%
ろ紙培養水を遠心	174	114	65.5%
ろ紙+MGL法	172	75	43.6%

する方法が65.5%で高い検出率を示したが他の単独による検査では何れも39.0%以下の検出率でしかなかった。

5. 糞線虫保有者の5日間連続検査による累積陽性率

試験管内ろ紙培養法とMGL法で確認できた糞線虫保有者57人について5日間連続検査による累積陽性率を見ると普通寒天平板培地では培養温度が37℃よりも28℃の方が這痕形成率が高くなる傾向を示し、1回の検査で37℃では85.9%、28℃では92.9%の這痕形成率を示した(表5)。また37℃

表5. 糞線虫保有者(57名)の5日間連続検査による累積陽性率。

検査方法	1日目	2日目	3日目	4日目	5日目
普通寒天平板培地法	85.9%	92.9%	96.4%	98.2%	100.0%
37℃(1.5g)					
28℃(1.5g)	92.9	98.2	98.2	100.0	100.0
37+28℃(3.0g)	94.7	98.2	100.0	100.0	100.0
試験管内ろ紙培養法	29.8	38.5	70.1	89.4	89.4
MGL法	29.8	45.6	47.8	63.1	68.4
ろ紙+MGL法	49.1	64.9	84.2	98.2	100.0

では5日目に、28°Cでは4日目に、3gの便量で3日目に100%の這痕形成率を示した。それに付し、試験管内ろ紙培養法、MGL法はいずれも1回の検査では29.8%の検出率で、併用しても49.1%以下の検出率でしかなかった。また5日間連続検査をしても試験管内ろ紙培養法で89.4%で、100%の検出率に達することはなかった。

6. 糞線虫保有者の5日間連続検査による陽性回数

糞線虫保有者37人について5日間連続検査による陽性回数を見ると試験管内ろ紙培養法、MGL法では5回とも陽性になったのが前者で4人(10.8%)、後者で5人(13.5%)に対し、5回とも陰性になったのが前者で7人(18.9%)、後者で9人(24.3%)で、陽性になる回数よりも陰性になる回数の方が多かった。それに付し、普通寒天平板培地法では1.5gの便量で5回とも這痕を形成した者が24人(64.9%)、3gでは30人(81.1%)に対し、這痕を形成しなかった者は1例も見られなかった(表6)。

表6. 糞線虫保有者(37名)の5日間連続による陽性回数.

検査方法	陽性回数						
	0	1	2	3	4		5
糞便量 普通寒天平板培地法	1.5g	0	0	3	5	5	24 [78.4%]
	3.0g	0	0	2	1	4	30 [91.9%]
ろ紙培養法	7	7	10	6	3	4	[64.9%]
M G L 法	9	8	8	4	3	5	[67.6%]

7. 採便後の日数と這痕形成率

普通寒天平板培地法では便量3.0gの当日検査で94.9%の再現性が見られるが採便後3日以上経過すると這痕形成率が50%以下に低下した(表7)。

表7. 採便後の日数と陽性率.

日数	検査数	陽性数	陽性率
当日	39	37	94.9%
1日目	38	32	84.2%
2日目	37	21	56.8%
3日目	32	15	46.9%

即ち普通寒天平板培地法では採便後、可及的すみやかに処理しなければならない。

8. 普通寒天平板培地法の留意点

- (1) 普通寒天平板培地法では虫体が生存している事が条件になるので集便時や輸送時には高温に曝さないで、集便後は可及的すみやかに処理すること。
- (2) 培地を入れるシャーレも既成のものでは糞線虫がシャーレ外に脱出する(図3)。現在の所

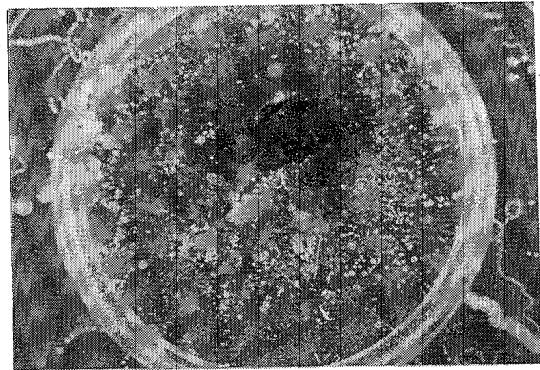


図3. シャーレ外へ脱出して形成された這痕上の細菌コロニー.

脱出防止策はそれ程検討はされていないがシャーレの縁から約1cm幅で二重の壁を作り(図4)、

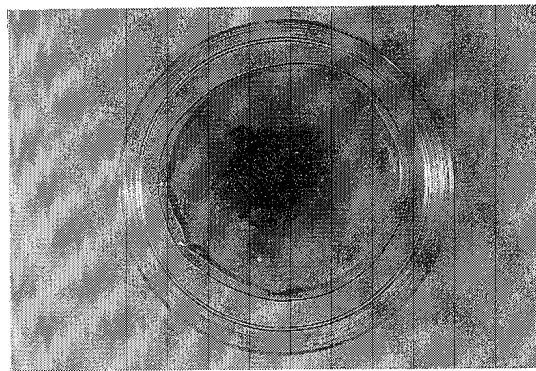


図4. シャーレの壁を二重にして内側に寒天培地を入れて便を乗せ、外側にグリセリン水(25%)を入れる.

内側に普通寒天培地、外側にグリセリン水(25%)等を入れれば虫体の脱出防止はできる。しかし蒸発性の水溶液を入れると蓋に付着した水滴が落下し、這痕が形成されにくい等の難点がある。また水道水を使うと水滴の中に虫体が集

合し、感染の危険があるので留意しなければならない。

- (3) 現在、普通寒天平板培地法専用のシャーレはメーカーからの購入が可能であり、必要な方は公害衛生研究所か琉大第一内科に問い合わせされたい。

IV 考 察

沖縄県における糞線虫の浸淫はこれまでの予防医学協会の検査で1%内外だと考えられていた(沖縄県予防課資料, 1984)。しかし安里ら(1984)は従来の検査法による1回だけの検査では陽性者の40~50%の検出率でしかなく、また試験管内ろ紙培養法(1検体につき試験管3本)とMGL法を併用した3日間連続検査で、11.7%の陽性率になる事を報告し、沖縄県には従来の検査法による約7倍の糞線虫の浸淫を推測してきた。また安里ら(1988)は試験管内ろ紙培養法とMGL法の併用によって沖縄県の7島3市5町13村の住民の糞便検査を行い、全ての市町村に1~7.16%(平均3.9%)の糞線虫が浸淫している事を報告してきた。今回、琉球大学第一内科との共同研究によって開発した普通寒天平板培地法を用いた検査法によって這痕を形成した者が最低3.7~最高18.2%(平均7.8%)も見られ、この這痕形成率は安里ら(1988)が報告した糞線虫陽性率の3倍以上を示す。また這痕を形成した者全てから虫体を確認する事は出来なかったが糞線虫が確認できた者だけでも最低3.2%~最高13.2%(平均5.5%)の陽性率を示し、少なくとも沖縄県には全ての市町村に数%から十数%は糞線虫が浸淫している事は明かである。また地域によっては若年齢層にもごく少数ながら糞線虫保有者は存在すると思われるが糞線虫保有者の99.1%は40歳以上で占め、特に40歳以上では這痕形成者が男性で13.7%、女性で6.8%(平均10.7%)、糞線虫の確認できた者が男性で11.3%、女性で5.4%(平均7.6%)も見られ、沖縄県の40歳以上の住民には現在でも従来の検査法による7~8倍の糞線虫保有者が存在すると推測される。即ち沖縄県の40歳以上の住民には未だに8%前後の糞線虫保有者がいると考えられる。また現在の糞線虫保有者の90%以上は40

歳以上で占める事から糞線虫保有者の大部分は今から30~40年前の非衛生的な環境状態で感染した人達が自家感染を繰り返して持ち続けてきたものと考えられる。

糞線虫の検査法については安里ら(1978)は糞便1g当りの虫数と検査法との関係を検討し、糞便1g当りの虫数が50隻以下では従来の検査法による1回だけの単一の検査では36.8~42.1%の検出率にしかならず、いかに少数寄生者を検出するかが問題であると報告してきた。Arakaki et al. (1988)が報告した普通寒天平板培地法は最初に弱拡大下で這痕形成者を検出した後、這痕形成者を対象に実体顕微鏡下で虫体を検索する2段階の検査が必要で、這痕を検出するだけで糞線虫の確定診断にはならない。しかし糞線虫が確認される大部分が這痕形成例から検出され、しかも3gの便量による1回だけの検査で従来の検査法による3倍以上の94.7%に這痕が確認されることから這痕を検出するだけでもスクリーニング・テストとしては最も有効な検査法だと言える。またステロイドホルモンや抗癌剤が投与される患者の場合、糞線虫の少数寄生者でも播種性の重症化が起こる可能性があり、沖縄県の医療機関では糞線虫の100%の検出率が要求されている。しかし従来の検査法では数種類の検査法による5日間連続の検査を行っても100%の検出は不可能であったのが普通寒天平板培地法では3gの便量による3回の連続検査でほぼ100%の這痕検出率が可能であり、ステロイド剤や抗癌剤の投与による播種性糞線虫症の重症化を未然に防ぐ事ができると考えられる。また駆虫効果を見るためには這痕形成を確認するだけで充分であり、駆虫効果の正確な判定ができると考えられる。更に虫体の這痕形成者を対象に実体顕微鏡下で検索すれば従来の検査法の3倍以上の虫体が検出できる。従って糞線虫の検査法としてはスクリーニング・テスト、駆虫効果の判定、糞線虫の診断のいずれでも普通寒天平板培地法は現在のところ最も優れた検査法だと考えられる。普通寒天平板培地法で重要なことは①. 這痕を検出する時、生物顕微鏡のコンデンサーを最大に拡散すること②. 便量は3g以上使用すること③. 培養温度は28℃で2~3日間培養すること④. 虫

体の検出は実体顕微鏡下で行うのが操作が簡単である⑤。シャーレの縁まで寒天培地を入れると虫体がシャーレ外まで這い出すのでシャーレの壁を二重にして内側に寒天培地を入れ、外側にグリセリン水 (25%) を入れて脱出防止策等を考慮すること⑥。グリセリン水に替わって水道水を入れたりするとシャーレの蓋に付着した水滴の中に虫体が集合して大変危険なので注意しなければならない。

V まとめ

普通寒天平板培地法を用いて沖縄本島中南部の4市1町3村における糞線虫の浸淫状況調査と検査法の検討を行った。

1. 普通寒天平板培地法で這痕を形成した者が最低3.7%から最高18.2% (平均7.8%) であった。その内、糞線虫が確認された者は最低3.2%から最高13.2% (平均5.5%) であった。
2. 年齢別では低年齢層から這痕形成例が見られるが特に40歳以上では5.7~12.4%の這痕形成率を示し、平均10.7%であった。糞線虫が確認できたものは何れも30歳以上からで、特に40歳以上では4.2~9.9%の陽性率を示し、平均7.6%であった。
3. 性別では何れの年齢層も女性より男性の方が高くなる傾向を示し、這痕形成率が女性5.7%に対し、男性は11.1%で、女性の約2倍であった。また糞線虫陽性率も女性が4.5%に対し、男性は8.9%であった。
4. 数回の検査による這痕形成者476人中、虫体が確認できた者は409人で、その内糞線虫が406人 (85.3%)、人糞虫が3人 (0.6%) であった。また虫体が確認出来なかった者の67人中50人 (10.5%) は全ての検査で陰性になり、他の17人 (3.6%) は這痕を形成しながら虫体を確認することが出来なかった。
5. 糞線虫の確定診断は普通寒天平板培地法で這痕形成者を対象に実体顕微鏡下で虫体を検索すれば1回の検査で這痕形成者の80%以上から虫体が確認できた。

6. 糞線虫保有者の這痕形成率は培養温度が37°Cよりも28°Cの方が高くなる傾向を示し、便量3gでは3日連続の検査で這痕形成率が100%に達した。それに対し試験管内ろ紙培養法やMGL法では5日間連続検査をしても前者で89.4%、後者で68.4%の検出率でしかなかった。
7. 5日間連続検査で陽性になった回数は普通寒天平板培地法で4~5回の這痕を形成するのが3gの便量で91.9%を占めるのに対し、試験管内ろ紙培養法やMGL法では4~5回の陽性になると陰性になるのがほぼ同じ20%前後を占めていた。
8. 普通寒天平板培地法では採便後、1日経過すると這痕形成率が約10%減少し、2日経過すると40%以上が減少した。
9. 普通寒天平板培地法では既成のシャーレ内に二重の壁を作り、外側にグリセリン水 (25%) 等を入れて虫体の脱出防止策を考慮しなければならない。

VI 参考文献

- 1) 安里龍二、長谷川英男、他2名、“沖縄県における糞線虫の疫学的調査研究”、沖縄県公害衛生研究所報、17、58~63。(1983)
- 2) 安里龍二、長谷川英男、他2名、“検査、診断 (1) 糞便検査法に関する最近の問題”、沖縄県公衆衛生誌、15、91~95。(1984)
- 3) 安里龍二、長谷川英男、“糞線虫検出に用いられる糞便検査法の検討”、沖縄県公害衛生研究所報、21、37~41。(1987)
- 4) 安里龍二、池城毅、“沖縄県における腸管寄生虫の現状”、22、61~67。(1988)
- 5) Arakaki, T. et al. “A New Method to Detect *Strongyloides stercoralis* from Human Stool”, Jpn. J. Trop. Med. Hyg. 23, 16~21.(1988)
- 6) 沖縄県環境保健部予防課、“沖縄県の鉤虫病 (糞線虫症含む) 対策の現状”、23。(1984)
- 7) 佐々学、他6名、“奄美大島の寄生虫相、(1) 塗抹、浮遊及び培養検便法による腸管寄生虫の検出状況”、寄生虫誌、7 (5)、357~362。(1958)