

エキノкокクス症 及び 消化管寄生蠕虫症検査の基本

目次

- I. エキノコックス症の概説
 - 1) エキノコックス症の概説
 - 2) エキノコックス症の病態
 - 3) エキノコックス症の診断

- II. 検査の進め方
 - 1) エキノコックス症の検査材料
 - 2) エキノコックス症の免疫血清学的検査
 - 2)-1 抗原の調製
 - 2)-2 ELISA 法
 - 2)-3 ウェスタンブロット法
 - 3) 病理組織検査
 - 4) 遺伝子検査

- III. 参考文献

- IV. 検査の問い合わせと依頼先

- V. 執筆者一覧

1. エキノコックス症の概説

1) エキノコックス症の概念

ヒトのエキノコックス症（包虫症）を発症させる原因種として主に問題となるのは、多包条虫と単包条虫である^{注1)}。ヒトの場合、終宿主（イヌ科の動物）から糞便とともに排泄される虫卵の経口摂取により感染が成立し、幼虫が肝臓や肺などに定着して、袋状の病巣を形成する。日本国内では、北海道において多包条虫の生活環がキタキツネ（終宿主）と野ネズミ（中間宿主）の間で維持されており、ヒトの多包虫症（多包条虫の幼虫＝包虫、エキノコックスが引き起こす）が風土病的に流行している（文献 1, 2）。一方、単包条虫については国内では土着の生活環は確認されておらず、稀に見られるヒトの単包虫症（単包条虫の幼虫が引き起こす）事例は基本的には海外からの輸入症例である。いずれのエキノコックス種によるヒト症例は感染症法による第 4 類感染症として、届出が義務付けられている。

^{注1)} 単包条虫については、従来より中間宿主動物の違いなどから 10 の strains に分けられていたが、現在、ミトコンドリアゲノム解析から 5 つの独立種に分類されるという説が認識されつつある（文献 3）。

2) エキノコックス症の病態

エキノコックス症は潜伏期間が長い（感染後、数年～10 数年）ことが特徴であり、この間、無症状で経過することが多い。わが国で流行する多包虫症は、肝臓や肺などに微細な嚢胞が無数に形成され、周囲の組織へ浸潤し、さらに転移病巣が形成される。肝腫大、腹痛、黄疸、肝機能障害などの症状が現れる。また、脳、腎臓、骨などにも病巣が形成されることがある。一方、単包虫症においては、単包性の独立した嚢胞が徐々に増大し、周辺組織を圧迫していく。肝腫大、腹痛、肝機能障害などが引き起こされる。

3) エキノコックス症の診断

エキノコックス症の診断は血清学的検査、画像診断、病理診断により行われる（文献 2, 4）。潜伏期間の間でも血清検査や画像診断で感染が判明することもある。病態の進行につれ、血清診断において陽性となる可能性が高まるとともに画像所見も顕著なものとなる。なお、患者の居住歴、職業、ライフスタイル、

キツネやイヌとの接触の度合い等の情報が診断上で有益である。

II. 検査の進め方

1) エキノコックス症の検査材料

診断には、血清を用いてエキノコックスに対する特異抗体を検出する方法がある。病原体自体の検出には、外科的に切除された病巣を病理組織学的に検索する。生検は病巣の腹腔内や穿刺創への播種、生着を誘発する危険性があるので、原則的に行わない。また、摘出された病巣組織を用いた遺伝子検査を行い、病理組織学的診断をより確定的にすることもある。

2) エキノコックス症の免疫血清学的検査(文献 4)

診断用抗原を調製するためには、エキノコックスを実験動物（スナネズミやコトナラットなど）で継代する必要がある。感染動物の腹腔内に形成された嚢胞から原頭節を分離し、緩衝液で抽出して、粗抗原を得る。多包虫症の流行地域である北海道においては、住民健診システムが確立されており、粗抗原を用いた酵素抗体法（ELISA 法）が一次スクリーニング検査として実施されており、この検査で陽性、及び疑陽性の場合には、ウェスタンブロット法による確認検査が行われている。検査法の概略は 2)-1 以降に記載する。

2)-1. 抗原の調製

【一般的注意】

実験動物への感染、感染動物の維持、および感染動物からの嚢胞摘出と原頭節の分離は、バイオセーフティーレベル 2（BSL2）の実験室で行う。

【調製法】

- (1) 感染後数ヶ月のスナネズミか、コトナラットの腹腔から嚢胞を摘出する。
- (2) 嚢胞中に原頭節を確認できたら、ハサミで嚢胞を細切する。
- (3) 生理食塩水を加え、乳棒と金属製の篩（100 メッシュ）を用いてすり潰しながら、原頭節を濾過し、容器に原頭節を集める。
- (4) 適宜、生理食塩水を加えながらデカンテーションを繰り返し、原頭節を洗

浄する。

- (5) 軽く遠心し（3000回転/分、10分）、上清を捨てた後、0.2%Triton X-100を含むPBSを加え、激しく振とうする。
- (6) 軽く遠心した上清を透析膜チューブに入れ、これをPBSに対し透析する。
- (7) 抗原液を適宜、小分けして凍結乾燥し、使用時まで-30℃で保存する。
- (8) 使用時に蒸留水を加えて再溶解する。
- (9) 抗原のタンパク質濃度はBradford法（クーマシーブルー法）等で測定する。
- (10) 通常、抗原濃度は概ね12μg/mL程度に調製するが、コントロール血清との反応（予備実験）により抗原性を確認し、前ロットとの差が出ないように必要に応じ、希釈倍率を調整する場合がある。

2)-2. ELISA法（文献1, 2, 4, 5, 6, 7）

【一般的注意】

検査は一般実験室（P1レベル）で可能である。

【試薬・器具】

- ・0.05 M bicarbonate buffer (NaHCO₃ / Na₂CO₃), pH 9.6（抗原感作用）
- ・PBS（0.05% Tween 20含有、PBS/T）（洗浄液）
- ・ブロッキング試薬（ナカライテスクのブロッキング溶液 PBS系など）（ブロッキング用、抗体希釈用）
- ・酵素（パーオキシダーゼ）標識抗ヒトIgG抗体（二次抗体）：道衛研では現在、Dako, HRP標識 polyclonal rabbit anti-human IgGを使用）。
- ・基質（ABTS, OPDなど。道衛研では現在、KPL, ABTS peroxidase substrate (1-Component)を使用）。
- ・反応停止薬（1% SDSなど）
- ・96穴ELISA用マイクロプレート
- ・ピペット各種
- ・マイクロプレートリーダー

【手順】

- (1) 一定の濃度（予備実験により、ストック抗原液の希釈倍率を決める。通

- 常、数千～数万倍希釈)に調製した抗原液をマイクロプレートの各ウェルに 100・L ずつ加え、4℃で一晩、または 37℃で 2 時間、固相化する。
- (2) 抗原液を捨て、PBS/T で各ウェルを数回洗浄後、ブロッキング液を 100・L/ウェルずつ加え、ブロッキングする。
 - (3) ブロッキング液を捨て、PBS/T で各ウェルを数回洗浄し、その後、ブロッキング液で 250 倍に希釈した血清を加え (100・L/ウェル)、4℃で一晩、あるいは 37℃で 1 時間反応させる。血清を加えないウェルには同量の PBS をブランクとして加える。また、被検血清と同じ倍率で希釈した陰性対照血清と陽性対照血清も同量、それぞれ別のウェルに入れる。
 - (4) 血清を捨て、PBS/T で数回洗浄後、酵素標識抗ヒト IgG 抗体を加え (100・L/ウェル)、さらに 37℃で 1 時間反応させる。
 - (5) PBS/T で数回洗浄後、基質溶液 (ABTS など) を加え、室温で 5～10 分間発色させる。
 - (6) マイクロプレートリーダーで吸光度 (405 nm) を測定する。判定基準は、陰性対照血清の吸光度からブランクの吸光度を引いた値の 3 倍以上を陽性とするなどの方法で決める。

2)-3. ウェスタンブロット法 (文献 1, 2)

【一般的注意】

検査は一般実験室 (P1 レベル) で可能である。

【試薬・器具】

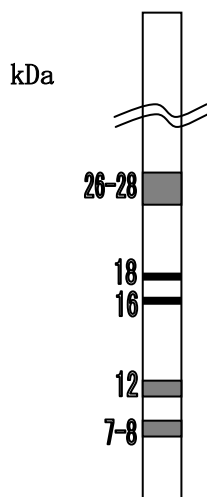
- ・ Acrylamide / bis solution (12.5 % ポリアクリルアミドゲル、市販のプレキャストゲルが便利)
- ・ 25 mM Tris/192 mM glycine/0.1% SDS (電気泳動用緩衝液)
- ・ タンパク質分子量マーカー (染色済み)
- ・ 10 mM Tris-HCl/0.15 M NaCl, pH 7.0 (TBS)
- ・ ブロッキング溶液 (ナカライテスクのブロッキング溶液 TBS 系など)
- ・ 酵素 (パーオキシダーゼ、あるいはアルカリフォスファターゼ) 標識抗ヒト IgG 抗体 (二次抗体): 道衛研では現在、Sigma, anti-human IgG (γ -chain specific)-alkaline phosphatase antibody Produced in goat を使用。

- ・基質 (DAB, NBT/BCIP など) : 道衛研では現在、KPL, BCIP/NBT phosphatase substrate (1-Component) を使用。
- ・ミニスラブ電気泳動装置
- ・ブロッキング装置
- ・パワーサプライ
- ・振とう器
- ・ニトロセルロース膜、あるいは PVDF 膜
- ・プラスチックトレイ
- ・ピンセット

【手順】 (一般的なウェスタンブロット法の手順に準ずる)

- (1) 抗原を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離する (40 mA 定電流)。
- (2) ゲルカセットからゲルを注意深く取りだし、TBS に 5 分間入れる。
- (3) その後、ゲルとニトロセルロース膜 (PVDF 膜を用いる場合、直前にメタノールに浸漬する) を密着させ、さらに濾紙を重ねて転写装置にセットし、膜へ転写 (ブロッキング) する (80V、1 時間)。転写による発熱防止のために転写装置は氷水中で冷却する。セミドライ型の転写装置を使用する場合は、冷却の必要はない。
- (4) 転写装置から膜を取りだし、ブロッキング液に膜を浸し、室温で 1 時間インキュベートする。
- (5) 膜を乾燥させないようにして、抗原が転写された面を上にしてパラフィルムで包み、検体数に応じて、幅 2~3 mm の短冊状にカッターで切る。
- (6) プラスチックトレイに膜を入れ、ブロッキング液で希釈した 100 倍希釈した血清と室温で 1 時間反応させる。
- (7) 血清を捨て、TBS/T を加え、振とうしながら膜を洗浄する (5 分、3 回)
- (8) ブロッキング液で希釈した酵素標識抗ヒト IgG 抗体 (二次抗体液) と室温で 1 時間反応させる。
- (9) 二次抗体液を捨て、TBS/T を加え、振とうしながら膜を洗浄する (5 分、3 回)
- (10) 膜を TBS で軽く洗浄し、Tween 20 を除く。
- (11) 基質を加え、室温で 5~10 分反応させ、発色を待つ。
- (12) 発色液を捨て、過剰量の水を加え、発色反応を停止させる。

- (13) 乾燥後、分子量 18 kDa 等、エキノコックス特異的な抗原に対する発色バンドを確認する。陽性であれば、分子量 18 kDa 等にバンドが現れる（模式図参照）。



- 注 1) 抗原-抗体反応を基本とする血清検査においては、他の寄生虫種との交差反応に注意しなければならない（例：肝蛭症）。
- 注 2) 市販キット：フランスの LDBIO DIAGNOSTICS 社から、エキノコックス症診断用のウェスタンブロット法キット” ECHINOCOCCUS WB IgG” が販売されている。本キットは、多包虫症と単包虫症の鑑別ができるよう作製されている（文献 7）。
- 注 3) 国内では、リコンビナント多包虫抗原を用いたイムノクロマト法による簡便で迅速な抗体検出キットも作製されている（文献 8）

3) 病理組織検査（文献 2, 4, 9）

外科的に摘出された病巣と周囲組織は、10%中性ホルマリンで直ちに固定した後、常法に従ってパラフィン包埋切片を作製する。ヘマトキシリン・エオジン染色と PAS 染色を行い、顕微鏡下で標本を観察する。包虫の嚢胞は、外層となる厚い無細胞で層状の角皮層（laminated layer）と、内層となる薄い胚層（germinal layer）より構成されている。角皮層はエオジン好性で PAS 陽性、その外側には肉芽組織、壊死組織、線維組織などが見られる。

4) 遺伝子検査（文献 2, 10, 11, 12, 13）

外科的に摘出された病巣と周囲組織は遺伝子検査にも適用され、原因とな

ったエキノコックスの分子同定による確定診断や類似疾患との鑑別に資する。遺伝子検査を行う場合には、摘出組織は70～80%エタノールで固定する。ホルマリン固定標本でも遺伝子検査は可能であるが、ホルマリン固定によってDNAが分解するので、PCRによる増幅産物の大きさが200 bp前後となるよう、プライマーを設定する必要がある。PCRは種特異的な増幅や増幅産物を制限酵素で切断することで判定する方法がある。標的遺伝子として、U1 snRNA 遺伝子（文献10）、ミトコンドリアDNAの12S rRNA（文献11, 12）やシトクロムcオキシダーゼ酸化酵素（cox1）遺伝子（文献13）が用いられている。ここでは検査材料がエタノール固定され、DNAが分解していない場合とホルマリン固定によってDNAが分解された場合について、前者はU1 snRNA 遺伝子と12S rRNA 遺伝子を、後者については感染研で実施しているcox1 遺伝子を用いた例をそれぞれ紹介する。

【一般的注意】

検査は一般実験室（P1 レベル）で可能である。

【試薬・器具】

- ・市販のDNA抽出キット（Qiagen社のDNeasy Blood & Tissue kitなど）
- ・DNAポリメラーゼ（U1 snRNA 遺伝子の増幅に関して、非特異的な産物が多数増幅されることがある。これら非特異的バンドの増幅を抑制するには、hot start方式のDNA polymeraseの使用が薦められる（文献2））。
- ・プライマーセット
U1 snRNA 遺伝子（377 bp）
UP1 5' -GTGAGGCGATGTGTGGTGATGGAGA-3'
UP2 5' -GAAGGCAAGTGGTCAGGGCAGTAG-3'
ミトコンドリア12S rRNA 遺伝子（373 bp）
P60F 5' -TTAAGATATATGTGGTACAGGATTAGATACCC-3'
P375R 5' -AACCGAGGGTGACGGGCGGTGTGTACC-3'
ミトコンドリアcox1 遺伝子（200 bp）
Em cox1/F1201-1225 5' -ATTACTGGTTTGAGGTTGAATAAGT- 3'
Em cox1/R1400-1376 5' -CACCCACTAAACGCAGATATAAAAG- 3'
- ・buffer と dNTPs（DNAポリメラーゼを購入すると通常添付されている）
- ・滅菌ミリQ水

- 1% アガロースゲル
- Tris/Borate/EDTA buffer (20 x) (電気泳動用)
- DNA サイズマーカー (Promega の 100 bp ladder など)
- 臭化エチジウム水溶液 (1 · g/mL) ゲル染色用 (発がん性があり、取扱い・廃棄には注意が必要)
- Dye (bromophenol blue/ xylene cyanol/glycerol) (DNA サイズマーカーに添付)
- サーマルサイクラー
- アガロースゲル電気泳動装置 (Mupid など)
- 紫外線照射器
- 0.2 mL 滅菌マイクロチューブ (ドーム型キャップ付き)
 - マイクロピペット各種
 - フィルター付き滅菌チップ各種
 - ディスポーザブルグローブ

【手順】

1)-1. エタノール固定試料の場合

(1) 0.2 mL のマイクロチューブに各チューブ当たり下記の量になるよう PCR カクテルを調製する。この場合、陰性対照、陽性対照、検査すべきサンプル数より 1 本分多い量の混合液をまず調製し、それを各チューブに 14 · L ずつ分注する。その後、採材した試料から市販の組織用 DNA 抽出キットを用いて抽出した DNA を、鋳型 DNA とし、各チューブに 1.0 · L ずつ加え、チューブを軽く指でタッピングして反応液を攪拌し、軽く遠心して反応液をチューブの底に集め、キャップを閉める。U1 snRNA 遺伝子を増幅する際、プライマーとして UP1 と UP2 を用いる。12S rRNA 遺伝子を増幅する際、プライマーとして P60F と P375R を用いる。

鋳型 DNA	1.0 · L
Buffer (10x)	2.5 · L
dNTPs	5.0 · L
プライマー (forward)	1.0 · L
プライマー (reverse)	1.0 · L
DNA polymerase	0.5 · L
MilliQ water	14.0 · L
総量	25.0 · L/tube

(2) サーマルサイクラーにチューブを入れ、下記の条件で PCR を行う。

1) U1 snRNA 遺伝子 (337 bp) の増幅
denaturation 94°C、1分
annealing 62°C、1分
extention 73°C、1分、 45 cycles

2) 12S rRNA 遺伝子 (373 bp) の増幅
denaturation 93°C、1分
annealing 55°C、1.5分
extention 73°C、2分、 40 cycles

(3) パラフィルム上で下記のような電気泳動用サンプルを調製し、
1%アガロースゲル電気泳動を行う (100V、約 30 分)。

PCR 産物	5.0 · L
Dye	2.0 · L
MilliQ water	3.0 · L
総量	10.0 · L/tube

PCR 産物の大きさを確認するために、DNA サイズマーカーをサンプルとは別のレーンで同時に泳動する。黄色の前線 (BPB) がゲル下端から 5~6 mm 程度まで泳動された時点で泳動を止める。

(4) アガロースゲルを泳動槽から取りだし、臭化エチジウム水溶液 (1 · g/mL) 中で 10~15 分間、ゆっくり振とうさせて、ゲルを染色する。

(5) 染色後、紫外線下でオレンジ色に染まった PCR 産物 (U1 snRNA 遺伝子の場合 337 bp、12S rRNA の場合は 373 bp) を確認し、ゲルの写真、あるいはデジタルデータとして保存する。

(6) 12S rRNA 遺伝子の場合、PCR 産物の制限酵素 (SspI) による処理を行う。

PCR 産物の増幅が確認されたら、エキノコックスの DNA であることを確認するために、以下のような反応液を作製して、制限酵素処理を行う

PCR 産物	4.0 · L
Buffer 2 (NEB)	1.0 · L
SspI (NEB)	2.0 · L
MilliQ water	3.0 · L
総量	10.0 · L/tube

37°C、2 時間インキュベートする。

- (7) 1.5~2.0%アガロースゲル電気泳動による制限酵素処理の確認
 パラフィルム上で下記のような電気泳動用サンプルを調製する。

反応液	5.0	・L
Dye	2.0	・L
MilliQ water	3.0	・L
総量	10.0	・L/tube

- (8) 染色後、制限酵素によって PCR 産物が切断されたかどうか確認する。北海道産の多包条虫であれば 175、105 および 93 bp の 3 断片に切断される (文献 12)。

1)-2. ホルマリン固定試料の場合

ホルマリン固定試料からの DNA 抽出は市販のキット (Qiagen の DNeasy Blood & Tissue kit など) で可能であるが、組織の融解に時間を要する。また、パラフィン切片から DNA 抽出する場合は、DEXPAT (タカラバイオ) のような市販のキットが有効である (文献 13 を参照)。

(1) PCR カクテルの調製

鋳型 DNA	2.0	・L
Buffer (2x)	12.5	・L
dNTPs	5.0	・L
プライマー (F1201-1225)	0.75	・L
プライマー (R1400-1376)	0.75	・L
KOD FX DNA polymerase (東洋紡)	0.5	・L
MilliQ water	3.5	・L
総量	25.0	・L/tube

(2) 1st PCR による cox1 遺伝子の増幅

94°C, 2 分 → 94°C, 30 秒; 58°C, 30 秒; 72°C, 60 秒; 35 cycles + 72°C, 5 分, 1 cycle

- (3) 最初の PCR で増幅産物が確認できない場合、その反応液 1 ・L を鋳型 DNA として、同じ条件で PCR を試みる。

(4) 1.5~2%アガロースゲル電気泳動による PCR 増幅産物の確認

PCR 産物	5.0	・L
Dye	2.0	・L
MilliQ water	3.0	・L
	10.0	・L/tube

100V、~30 分、泳動

(5) PCR 産物の制限酵素 (SspI) 処理

PCR 産物	4.0	・L
Buffer 2 (NEB)	1.0	・L
SspI (NEB)	2.0	・L
MilliQ water	3.0	・L
<hr/>		
	10.0	・L/tube

37°Cで1~2時間、消化し、その後、電気泳動で切断されたかどうか確認する。被検サンプルが多包条虫の場合、143 と 57 bp のバンドに切断されるが、単包条虫では切断されない。

III. 参考文献

- 1) Uchino J. and Sato N. 1993. Alveolar Echinococcosis of the Liver. Hokkaido University Medical Library series. Vol. 30, Sapporo: Kohoku Printing Co.
- 2) 北海道立衛生研究所編集・発行、1999、北海道のエキノコックス
- 3) Nakao M., McManus D. P., Schantz P. M., Ito A. 2007. A molecular phylogeny of the genus *Echinococcus* inferred from complete mitochondrial genomes. *Parasitology* 134:713-722.
- 4) 北海道エキノコックス症対策協議会エキノコックス症患者調査専門委員会編・発行、2011. エキノコックス症（多包虫症）診断と治療医のガイドライン
- 5) Woller A., Bidwell D.E. and Bartlett A. 1976 Enzyme immunoassay in diagnostic medicine. *Bull. WHO.* 53: 55-64.
- 6) Towbin H., Staehelin T. and Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 76:4350-4354.
- 7) Liance M., Janin V., Bresson-Hadni S., Vuitton D.A., Houin R. and Piarroux R. 2000. Immunodiagnosis of *Echinococcus* infections: Confirmatory testing and species differentiation by a new commercial Western blot. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3718-3721.
- 8) Sako Y., Fukuda K., Kobayashi Y., Ito A. 2009. Development of an immunochromatographic test to detect antibodies against recombinant Em18 for diagnosis of alveolar echinococcosis. *J. Clin. Microbiol.*

47:252-254.

- 9) カラーアトラス 「検体別ヒトの寄生虫」 株式会社 SRL 発行、2000.
- 10) Bretagne S., Guillou J.P., Morand M. and Houin R. 1993. Detection of *Echinococcus multilocularis* DNA in fox faeces using DNA amplification. Parasitology. 106:193-199.
- 11) Dinkel A., von Nickisch-Rosenegk M., Bilger B., Merli M., Lucius R., Romig T. 1998. Detection of *Echinococcus multilocularis* in the definitive host: coprodiagnosis by PCR as an alternative to necropsy. J. Clin. Microbiol. 36:1871-1876.
- 12) 八木欣平、大山徹、岡本宗裕、奥祐三郎、神谷正男、木村浩男. 1999. 多包条虫および近縁のテニア科条虫のミトコンドリア 12S rRNA 遺伝子の部分配列の決定と PCR-RFLP による虫種同定の検討. 北海道立衛生研究所所報、49 : 163-166.
- 13) Kimura M., Toukairin A., Tatezaki H., Tanaka S., Harada K., Araiya J., Yamasaki H., Sugiyama H., Morishima Y., Kawanaka M. 2010. *Echinococcus multilocularis* detected in slaughtered pigs in Aomori, the northernmost prefecture of mainland Japan. Jpn. J. Infect. Dis. 63:80-81.

IV. 検査の問い合わせと依頼先

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部

(〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目 Tel: 011-747-2211)

国立感染症研究所寄生動物部第二室

(〒162-8640 東京都新宿区戸山 1 丁目 23-1 Tel: 03-4582-2692)

V. 執筆者

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部

山野公明、八木欣平

国立感染症研究所寄生動物部第二室

森嶋康之、杉山 広、山崎 浩

消化管寄生蠕虫類の虫卵検出を目的とした糞便検査法

目次

- I. 消化管寄生蠕虫類の虫卵検査の概説
- II. 検査の進め方
 - 1) ホルマリン・エーテル法
- III. 参考文献
- IV. 検査の問い合わせと依頼先
- V. 執筆者一覧

I. 消化管寄生蠕虫類の虫卵検査の概説

消化管寄生虫（蠕虫・原虫）の感染を確認する上で、糞便を試料とした寄生虫検査（以下、糞便検査と呼称）は、古典的ではあるが有効な検査方法である。

糞便中に出現する寄生虫種は多岐に渡り、これまでさまざまな糞便検査の方法が考案されてきた。よく知られる直接塗抹法は最も簡単な方法であるが、糞便中の夾雑物により観察が困難であり、供試糞便量が少ないこともあって、少数感染の場合見逃しの可能性がある。そこで、浮遊や沈殿等の操作によって虫卵の濃縮を行う集卵法を用いることが望ましい。この項では、遠心沈殿法の一つである MGL 法（ホルマリンエーテル法）を紹介する。本法は線虫卵や条虫卵に加え、高比重のため通常の浮遊法では検査対象外となる吸虫卵も検出することができ、また、原虫類の集シスト法としても適用可能である。

II. 検査の進め方

- 1) ホルマリン・エーテル法（MGL 法）

【試薬・器具】

- ・ 10%ホルマリン
- ・ 酢酸エチル（注1）

注1：本法はホルマリン・エーテル法と呼ばれているが、原法で用いられている溶媒のジエチルエーテルは引火性が高く、取り扱いに注意を払わねばならないため、現在は酢酸エチルで代替されることが多い。

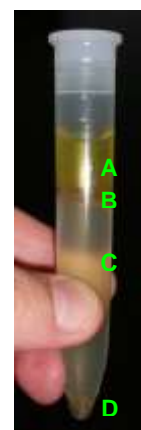
- ・ 遠沈管（スクリーキャップ付きのポリプロピレン製 15 mL 遠沈管が使いやすい）
- ・ ゴム栓（スクリーキャップのない通常のガラス製またはプラスチック製遠沈管を用いる場合に必要）
- ・ 試験管立て
- ・ 竹串
- ・ 小漏斗（ガラス製またはオートクレーブ可能な材質のものが望ましい）
- ・ ガーゼ
- ・ パスツールピペットとニップル
- ・ スライドグラス
- ・ カバーグラス
- ・ 卓上遠心機
- ・ 光学顕微鏡

【検査手順】

- 1) 小試験管に糞便約 1 g を入れ、適当量の水を加え、割り箸でよく溶く。
- 2) 遠沈管にガーゼ 1 枚を敷いた漏斗をのせ、1) の糞便溶解液を濾過する。
- 3) 2,500 rpm で 5 分間遠心する。
- 4) 沈渣を残して上清を捨てる。
- 5) 10%ホルマリンを 7 mL 加え、沈渣とよく攪拌・混和後、10 分間静置する（注 2）。

注 2：これは原虫類のシストの固定を目的としたものなので、検索対象を蠕虫のみに限定する場合はホルマリンの添加を省略してかまわない。その場合は、ホルマリンの代わりに水（7 mL）を加え、沈渣とよく混和後、静置を行うことなく 6) のステップへ進む。

- 6) 酢酸エチル 2 mL を加え、管口を密栓して 30 秒間激しく振盪する。
- 7) 2,500 rpm で 5 分間遠沈する。
- 8) 遠沈後の試料は、上から順に酢酸エチル層（右図 A）、浮上糞便層（同 B）、ホルマリン層（同 C）、沈渣（同 D）の 4 層に分離した状態で観察される。このうち、浮上糞便層は竹串を使って管壁からはがし、少量のホルマリン層を残して上部 3 層を捨てる。



- 9) パスツールピペットを用い、沈渣とホルマリンをピペッティングによって混和後、適当量の沈渣をスライドグラス上に滴下し、カバーグラスをかけて鏡検する。

III. 参考文献

- 1) 板垣博、深瀬徹、1993、小動物臨床 寄生虫カラーアトラス

VI. 検査の問い合わせと依頼先

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部

(〒060-0819 札幌市北区北 19 条西 12 丁目 Tel: 011-747-2211)

国立感染症研究所寄生動物部第二室

(〒162-8640 東京都新宿区戸山 1 丁目 23-1 Tel: 03-4582-2692)

V. 執筆者

北海道立衛生研究所感染症センター感染症部

山野公明、八木欣平

国立感染症研究所寄生動物部第二室

森嶋康之、杉山 広、山崎 浩