

## 希釈尿染色液を用いたジアルジア簡易検出法の考察

池上 裕<sup>1)☆</sup> 浅川満彦<sup>2)</sup>

1) あい動物病院（兵庫県尼崎市南武庫之荘2-22-7 〒661-0033）

2) 酪農学園大学獣医学部感染・病理教育群（北海道江別市文京台緑町582 〒069-8501）

☆連絡責任者：池上 裕（あい動物病院）

〒661-0033 兵庫県尼崎市南武庫之荘2-22-7 TEL 06-6432-1388

## A Study of a Simple *Giardia* Detection Method Using Diluted Sternheimer-Malbin Stain Solution for Urine Sediment Stain

Hiroshi IKEGAMI<sup>1)</sup>, Mitsuhiro ASAKAWA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Ai Animal Hospital, 2-22-7 Minamimukonosou, Amagasaki-shi, Hyogo 661-0033, Japan

<sup>2)</sup> Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyoudai-midorimachi, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-8501, Japan

(Received 7 February 2011 / Accepted 6 May 2011)

**SUMMARY :** *Giardia* is a potentially zoonotic parasite; nevertheless tests for detecting *Giardia* are not commonly performed in small animal clinics, because of difficulty of the fecal test, the need of sufficient skills for the cyst test, and the lack of information about *Giardia*. Therefore, we contrived a simpler method to detect cysts of *Giardia* by negative staining with urinary stain solution (Sternheim-Malbin Stain Solution) diluted three times with normal saline. In comparison with enzyme linked immunosolvent assay (ELISA), this simple technique is valuable as a screening test for *Giaradia* cysts.

**KEY WORDS :** *giardia* cyst, negative stain method, sternheimer-malbin stain solution, zoonosis

— (J Anim Clin Med, 20 (2) 41-45, 2011) —

**要約：**ジアルジアは、人獣共通感染症としての可能性を持つ病原微生物でありながら小動物臨床の現場では十分に検査が行われてきたとは言い難い。その理由は、検査方法の煩雑さ、検出の難しさ、情報の少なさにある。そこで我々は、生理食塩水で約3倍に希釈した尿染色液を使用した陰性染色による簡便なジアルジアのシスト検出方法を考案した。また酵素抗体法（ELISA）による検査方法との比較を行い、本法がジアルジアシストのスクリーニング検査として優れた方法であることを確認した。

**キーワード：**ジアルジアシスト、陰性染色法、希釈尿染色液、人獣共通感染症

— (動物臨床医学 20 (2) 41-45, 2011) —

## はじめに

ジアルジアは、古く1859年にLamblによって発見され、1915年にはStilesによって*Giardia lamblia*と命名された[1]。以来、すでに100年以上が過ぎているが、その発育史、分類、感染経路には未だ不明な点が多い。特に分類に関しては、かつて犬ジアルジア、猫ジアルジア、牛ジアルジア等として動物種に特有の種が存在するとして各種別に分類された時期もあった[1]。しかし、ここ10年足らずの間に人の医療において免疫不全患者におけるジアルジア感染症が問題になり[2]、研究が急速に進み遺伝子解析からの分類や抗原性からの検査方法など基礎の研究は目覚しく進歩した。そのため現在では、人と飼育動物との間で相互に感染する種が存在することが明らかになっている。このことから、ジアルジアは人獣共通感染症として認知されているが[3]、小動物の臨床現場でその認識が広まっているようには思われない。

ジアルジアの感染はシストの経口感染によって伝播し、シストは薬剤抵抗性が強く飼育環境中に残存し易い。

日本では臨床的なジアルジア感染の診断は主に糞便検査によって行われている。糞便検査では、まれに遊走性を持つトロフォゾイトが検出されることもあるが、あくまでも例外的であり下痢の症状がない限りトロフォゾイトが糞便中にあらわれることはほとんどない。したがってジアルジアの感染に関しては、シストの検出が重要である。無染色標本の直接鏡検による糞便検査では、シストは食物残渣と見分けがつきにくく見逃され易い[4]。一方、集中法は特殊な方法を行わねばならず[5]手順も煩雑なことから一般的には行われにくく一般診療においてジアルジアを検出することは容易ではない。

今回、我々は人獣共通感染症としての観点をふまえ、実際の臨床現場で誰にでも簡単に健常な便からジアルジアのシストを検出できる方法を模索した。その結果、尿染色液を希釈した液を用いて糞便を陰性染色することで、ほぼ通常の糞便検査と同じ方法で簡便にシストを検出することが出来たのでその方法と結果を報告する。

## 材料および方法

### 【糞便検査】

#### ＜直接塗抹法＞

少量の糞便を取り、スライドガラスの上に乗せ、生理食塩水を一滴加えて良く混和した後にカバーガラスを乗せて軽く押さえてから鏡検を行った。

最初は100倍で観察し、その後400倍で観察を行った。1000倍の観察は、カバーガラスの上に油浸液をのせ観察を行った。

#### ＜希釈尿染色液による染色法＞

本報では、ジアルジアシストと糞便中の食物残渣との判別を容易にする目的で、希釈した尿染色液を用いて標

本を染色し、ジアルジアのシストだけを無染色状態で残す陰性染色法を試みた。

#### ==希釈尿染色液==

ステルンハイマー・

マルビン染色液（石津製薬）	3 ml
生理食塩水	7 ml

前記、直接塗抹法と同じく、少量の糞便を取りスライドガラスの上に乗せて希釈尿染色液を1滴加えて良く混和し、カバーガラスを乗せて軽く押さえてから鏡検を行った。

観察も、直接塗抹法と同じく100倍、400倍で観察し1000倍はカバーガラスの上に油浸液を乗せて行った。

#### ＜ヨウ素ヨウ化カリウム液による染色法＞

通常ジアルジアは、食物残渣との判別が困難なためヨード染色を行って内部構造を確認し易くするのが良いとされている。

今回は、D'Antoniのヨウ素ヨウ化カリウム液[6]を使用した。

#### ==D'Antoniのヨウ素ヨウ化カリウム液==

ヨウ化カリウム	1 g
水	100 ml
ヨウ素	1.5 g

方法は前記2法と同じく、少量の便を取りスライドガラスの上に乗せて生理食塩水の代わりにヨウ素ヨウ化カリウムの液を1滴加えて糞便と良く混和した後にカバーガラスを乗せ、軽く押さえた後に鏡検を行った。

観察は、直接塗抹法と同じく100倍、400倍と順次行い1000倍はカバーガラスの上に油浸液を滴下して行った。

### 【酵素抗体検査法(ELISA)との比較】

2008年1月から2010年1月までの間に本院で採取した糞便を、院内で希釈尿染色液による検査法でジアルジアのシストの検索を行った後、冷蔵保存して北里大学に輸送しELISA（スナップジアルジア、IDEX社）でジアルジアの抗原検査を依頼しその検査結果の比較を行った。

## 結 果

直接塗抹法無染色標本でジアルジアのシストを観察した結果、100倍では検出が困難であった（Fig.1左）。

100倍で観察する時にピントを少しずらすことでシストがやや明るく見えるが、実際には周囲の食物残渣も明るく見えるため、シストだけを選択的に検出できなかった。400倍の観察ではシストが周囲と同色であるうえに視野が狭くなるため、短時間で簡単に検出は出来なかった。これを1000倍の観察で十分に時間をかけ精査すると、シストの特徴である嚢子壁を確認できた。また場合によっては、無染色でも内部構造がある程度確認できた（Fig.1右）。



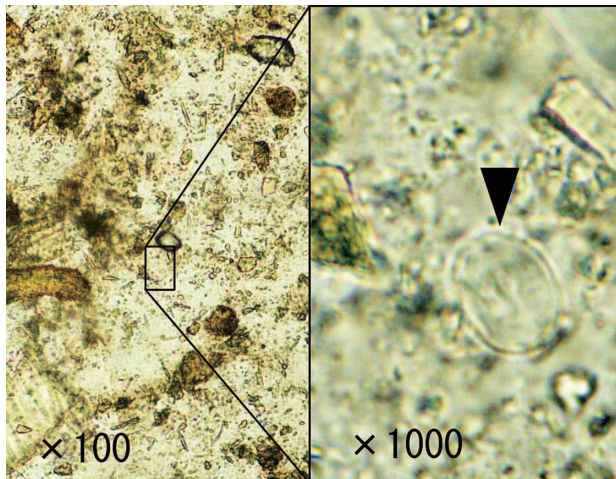


Fig.1 無染色標本の100倍（左）と1000倍（右）  
無染色の標本を100倍で観察すると、左のようにほとんど確認ができないが、1000倍（右）ではかろうじて形が確認でき嚢子壁を見ることができた。

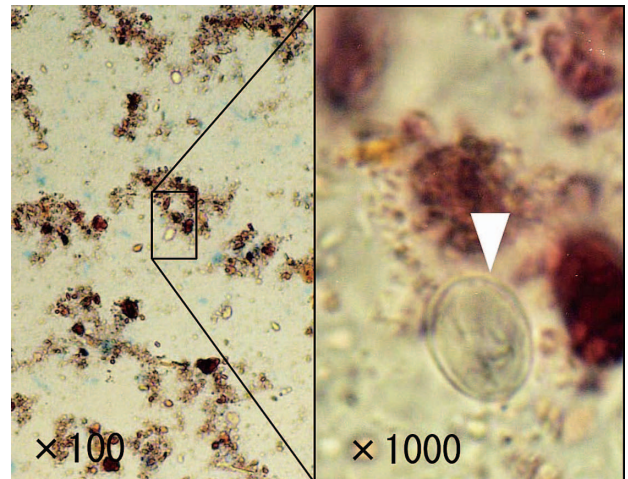


Fig.2 希釈尿染色液標本の100倍（左）と1000倍（右）  
希釈尿染色液によって陰性染色をほどこした標本では、100倍の視野でもシストが観察できた（左）。ピントを少しずらすことでさらに明るく見えて十分に発見しやすくなった。1000倍の視野（右）では嚢子壁を確認することでジアルジアであることを確かめることができた。

希釈尿染色液で染色した標本では、全体が染色されやや薄暗く見える。その中でジアルジアのシストは、染色されないためにやや明るく見える。さらにピントをずらすとシストだけがより明るく見えて周りから浮き上がって見える（Fig.2左）。そのため100倍の観察でも容易にシストを見つけだすことが出来た。実際には、シストの他にも明るく見える食物残渣が少数存在するが、数は少なく400倍に拡大することで確認が可能であった。400倍の拡大視野では、シストの嚢子壁が明瞭に見えるためシストであることを確認するのは容易であった。1000倍の観察ではシストの成熟度によって内部構造が見える場合も有るがそれほど明瞭に確認出来なかった（Fig.2右）。

ヨード染色した塗抹標本では、周囲の食物残渣はすべてヨードの色に染色されていた。100倍の観察では、ジアルジアのシストが周囲の色と同じ色に染色されているため、シストだけを選択的に発見することはほとんど不可能であった（Fig.3左）。ピントをずらして明るい顆粒を探すが、食物残渣も同様の染まり具合でシストだけを選択的に見つけだすのは困難であった。400倍での観察は、かなり内部構造が見えるためにジアルジアのシストと食物残渣とを判別するのは容易であった。1000倍の観察では、核や軸索、嚢子壁などが、明瞭に観察できた（Fig.3右）。

本法の検出感度を知るために同一の検体で本法とELISAの検査結果を比較し、その結果をTable 1に示した。

検出率を比較すると、希釈尿染色液の検査法では7.7%（17/218）であったがELISAによる検査法では16.9%（37/218）であった。ELISAによる検査結果を基準に感度・特異性を算出すると、それぞれ40.5%（15/37）、98.9%（179/181）であった。

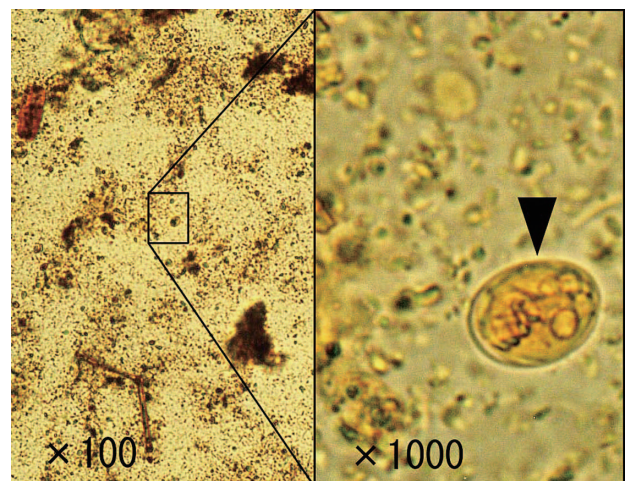


Fig.3 ヨード染色標本の100倍（左）と1000倍（右）  
ヨード染色標本では、100倍の視野（左）でジアルジアを見つけ出すことはかなり困難であった。しかし1000倍の視野では内部の構造が明瞭に確認できた。

Table 1 ELISA法と希釈尿染色液染色法との比較

		ELISA	
		陽性	陰性
希釈尿染色液検査法	陽性	15	2
	陰性	22	179

## 考 察

ジアルジアは、発見から100年以上経っているが獣医学領域における疫学的研究は思った程進んでいない。その理由はジアルジアに対する情報の少なさが原因の一つであると考えられる。また、長径が12 $\mu$ mのシストの検出の難しさは想像以上で、熟練していない臨床家にとってはほとんど不可能である。そのことがジアルジアへの誤解を招き対策の遅れへとつながっている。ジアルジアに対する認識が高まってきた今日でも、ジアルジアの検査の煩雑さからジアルジアを対象とした検査が積極的に行われることは少ない。

小動物臨床の専門書等によると、ジアルジアは不潔な場所で飼育されている場合にのみ伝播し集団発生するとされているが[4]、それはジアルジアの伝播が消毒液の使用で阻止できるといった誤解からきている。運動性を持つ遊走型の成熟した虫体であるトロフォゾイトは、十二指腸以下の小腸に寄生しており通常外界に姿を現わすことはないが、重度の下痢や嘔吐の際に体外に排出され検査で見つかることがある。トロフォゾイトは体外に排出されると環境の変化に弱いため、各種の消毒液に感受性が有り水道に含まれる塩素系消毒剤でも死滅する[5]。そのため感染防御のためには一般的な消毒が有効であるという誤解を受け易い。

だが現実には、かなり飼育状況に気を使っても蔓延してしまうケースが少なくない。なぜならジアルジアの感染は、通常トロフォゾイトではなくシストの経口感染によって起こるからである。感染の伝播の中心的役割を果たしているシストは、ほとんどの消毒薬に抵抗する[5]。また環境中の変化に対し強い耐性を持っており湿潤状態で数カ月生存することが知られている[7]。すなわち感染した個体から排出されたシストが土壌に落ちると、そのままの状態で長く生存し続ける。また土壌ではなく室内に落ちた場合や体表に付着した場合でも、生存したシストからの感染で同居の動物に感染することは容易に可能である。臨床的見地からみると、ジアルジアは不顕性感染することが多く感染中にも症状が出ないことが多い。すなわち宿主の健康状態によって症状の出方はまちまちである。よって無症状でありながらシストを排出していることも有れば、感染していてもシストを排出しないことも有る。このことが、問題をより複雑にしている。

一般的な臨床の現場では、通常、糞便検査は100倍の視野で行われることが多い。時間的な制約もさることながらほとんどの虫卵が100倍の視野で発見出来るからである。

ジアルジアの検出も同様に100倍で出来ると思われていることが多い。それは、ジアルジアのトロフォゾイトに遊走性が有る為100倍の視野でも十分に目立つので、それ以上に拡大する必要が無いと思われている。しかし、

前でも述べたように遊走型のトロフォゾイトは下痢の時のみ排出される物であり、不顕性に感染している個体から検出されることはほとんど無い。したがってジアルジアの感染を調べる為にトロフォゾイトを探すのは不適切でありシストを探さなければならない。

ジアルジアのシストを探す場合、Fig.1にみられるように、通常100倍の視野で発見することはかなり困難で十分な熟練を要するものと思われる。また100倍の視野でシストと思われるものを見つけた場合、次に診断の為に400倍の視野で内部構造や囊子壁の確認が必要になる。しかし無染色の場合、400倍の視野ではシストを見つけ出すことさえ難しい。

今回の報告で紹介した希釈尿染色液による染色法は、尿染色液が生きている細胞に取り込まれにくい性質ならびにジアルジアの囊子膜が染色液を透過させない性質を利用することで、生物活性のない夾雑物との判別を容易にしているため100倍の視野でも比較的簡単にジアルジアのシストを見つけ出すことが出来た。さらにピントを少しずらすことでジアルジアのシストがより明るく見えることと、周囲が染色されて薄暗く見えることでジアルジアのシストだけが明るく浮き上がって見えた (Fig.2左)。明るく見えた顆粒を400倍に拡大し、シストの囊子壁を確認すれば間違えることは少ない。中には、シストではない物が、明るく見える場合も有るが、他のどの方法よりもそのような夾雑物は少なく、またヨード染色のようにシスト自体が周囲と同じ色調に染まることがないので、周囲に同化して見逃してしまうおそれが最も少ないと言える。また、希釈尿染色液による染色法は、400倍の視野でも囊子壁が観察しやすいため確認も難しくはない。

ELISAとの比較では、感受性では劣るものの特異性は非常に高く日常の検査法としては十分使用に耐えると考えられる。

感受性が劣る原因は、1) 検査に供する糞便の量的な問題、2) ELISAとの本質的な検査対照の違い等が考えられる。1) 検査に供する糞便の検体量の違いによる感度の低下は、検査スライド数を増やすことで、多少の改善は見られるかもしれない。2) ELISAとの検査対照の違いであるが、ELISAは抗原を検出しているため必ずしも糞便中にシストが排出されていることを必要とはしていない。一方、本法は顕微鏡下でシストの検出を行うことから宿主がシストを排出することが必要となる。従ってシストを排出しない不顕性感染の状態や治療中の検体では検出できない可能性が高く抗体検査法との差は不可避である。しかし、これは本法が簡易検査であり圧倒的に廉価かつ簡便かつ短時間である利点を考慮すればなら問題にならないであろう。

また本法は、陰性染色法である為に診断的な内部構造の観察ができないと云う欠点がある。したがって本法の



位置付けとしては、あくまでも日常のスクリーニング的な役割としての検査であり、その役割としては大変優れた方法であると言える。

一方、内部構造を明確に確認できるのはヨード染色法のみであり、この方法がスクリーニング的な検査としては不向きであったとしても最終的な確定診断にはヨード染色法もしくはELISAを用いるべきであろう。

## 謝 辞

本稿の研究においてジアルジアの抗原検査を実施していただきご協力を下さいました北里大学獣医学部小動物第1内科学研究室の伊藤直之先生に深謝致します。

## 引 用 文 献

- 1) 板垣四郎, 板垣博: 第1編 原生動物門(原虫). 家畜寄生虫学, 16-19, 金原出版, 東京(1965)
- 2) Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson

RC: The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol*, 12-13, 1369-1377 (2000)

- 3) Sprong H, Cacciò SM, Giessen van der JWB: Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *Negl Trop Dis*, 12, 558 (2009)
- 4) Pidgeon GL (友田勇, 本好茂一監訳): 25章 急性発症下痢. 小動物臨床における臨床徴候と診断, 401-414, 文永堂, 東京(1993)
- 5) Kirkpatrick CE, Farrell JP (伊藤百合子 訳): ジアルディア症(ランブル鞭毛虫症). 世界動物病院協会会誌, 4(5), 83-93 (1982)
- 6) 金井泉, 金井正光: 腸管内寄生虫原虫検査. 臨床検査法提要, 第30版, 204-208, 金原出版, 東京(1993)
- 7) Barr SC, Bowman DD: Giardiasis in dogs and cats. *Comp Cont Educ Vet Pract*, 16(5), 603-610 (1994)