

試験目的

本試験は、回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断することを目的に実施した。まず、超音波法による試験条件設定のための検討を行い、次いで、設定した条件による超音波法と、従来法およびストマッカー法の3種類の方法により回収虫卵数を求めて比較した。

試験方法

1. 試験項目

回虫卵検査法としての超音波利用の是非について判断するための試験

2. 被験物質

名称 : ブタ回虫
受領日 : 2013年11月26日(受付番号 AA13-13-05803 で受領)
提供者 : 国立感染症研究所 寄生動物部

3. 試薬

消泡剤添加 0.5% Tween80・クエン酸緩衝液(洗浄液): 自家製
0.1M クエン酸溶液 614.5mL : 自家製
0.2M リン酸二ナトリウム溶液 385.5mL : 自家製
Tween80 5g : 関東化学
Antifoam A 150 μ L : SIGMA
酢酸エチル : 和光純薬
Sigmacote® : SIGMA

4. 使用器具

4.1. 回虫卵懸濁液作製用器具

眼科剪刀
ピンセット
5mL ポリスチレンラウンドチューブ
マイクロピペット(チップ: 200 μ L , 1,000 μ L)
ボルテックスミキサー(VTM-252): 和光純薬
: Sigmacote でコーティング

4.2. 各試験法で使用した器具

4.2.1. 共通器具

茶漉し(6cm , メッシュ#40)
メッシュ(10cm , 目開き 180 μ m , 線径 125 μ m)
円錐型液量計(500mL , 1,000mL)
遠沈管(15mL , 50mL)
スポイト

スライドガラス
カバーガラス
アスピレーター
遠心分離機 (5930): クボタ
顕微鏡 (BX51): オリンパス

4.2.2. 超音波法

超音波洗浄水槽：ダルトン（発振器：東京超音波技研製，型番 UP-305，出力 700W，周波数 27kHz）

洗浄容器：広口ねじ口瓶 1000mL：デュラン

4.2.3. 従来法

洗浄容器：ステンレス製バット

洗浄器具：歯ブラシ

4.2.4. ストマッカー法

洗浄機器：ストマッカー（Pro・media SH- M）：エルメックス

洗浄容器：ストマッカー袋（細菌検査用ポリ袋 400mL）：オルガノ

5. 回虫卵接種野菜（検体）の調製

虫卵を接種する野菜として白菜を選定し，下記の操作により検体を調製した．

5.1. 回虫卵を，ブタ回虫のメス成虫の膈と子宮より採取し，はさみで細切したのち，精製水に懸濁した．得られた回虫卵懸濁液の 10 μ L または 20 μ L をスライドガラス上に取り，カバーガラスを掛けて顕微鏡下に虫卵数を計数し，その数を基に検体の調製に必要な虫卵の懸濁液量を求めた．

5.2. 白菜はざく切りにして全体を混ぜ合わせ，所定の重量を秤量してトレイに重ならないように広げ，所定の虫卵数となるよう回虫卵懸濁液を滴下して室温で自然乾燥させた．乾燥させた検体はトレイごと密閉して，試験当日まで冷蔵保管した．

6. 超音波法の試験条件設定

6.1. 超音波処理時間の検討

超音波洗浄装置を用いて検体から回虫卵を回収するために至適な超音波処理時間について，検討を行った．

検体 100g（回虫卵 1000 個接種）と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた．

約 10 分間検体を洗浄液に浸したのち，超音波処理を行った．超音波処理時間として 0，1，3，5，7，10，15 分の 6 群を設定した．

超音波処理後，洗浄液の全量を液量計に移し，30 分間静置したのち，上清 400 mL をアスピレーターで吸引除去した．

3) で残った洗浄液（100mL）を 50mL 遠沈管に分注した．液量計の管壁を精製水 50mL で洗い，50mL 遠沈管に移した．管壁の洗いは 2 回行った．

これら 50 mL 遠沈管（計 4 本）を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した．

上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15mL 遠沈管に移した。さらに精製水で 50mL 遠沈管の管壁を洗い、これを 15mL 遠沈管に加えた。

6) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。

上清を吸引除去した後、8 ml の洗浄液で沈渣を再浮遊し、これに酢酸エチルを 2mL ずつ加えて密栓し、1 分間激しく振とうした。

8) を 2000 回転で 5 分間遠心分離した。

沈渣を残して上清を吸引除去し、管壁に付着した浮遊層の残渣を綿棒でふき取った。

得られた沈渣（回収沈渣）を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

6.2. 洗浄容器のリンス回数の検討

洗浄容器の壁面等に虫卵が付着して、回収虫卵数の低下を招く可能性があることから、洗浄容器のリンス回数について検討を行った。

検体（回虫卵 1000 個）100g と洗浄液 500mL を洗浄容器に入れた。

10 分間検体を洗浄液に浸したのち軽く攪拌し、5 分間超音波処理を行った。

洗浄液全量を液量計に移したのち、容器に新たに洗浄液 250mL を入れ、手で容器を回しながら検体をリンスした。リンスは合計 3 回実施し、各回の洗浄液は各々別の液量計に採取した。

3) の液量計を 30 分間静置したのち、洗浄液の上清をアスピレーターで吸引除去して 100 mL とし、2 本の 50mL 遠沈管に移した。液量計はそれぞれの管壁を精製水 50mL で 2 回洗って遠沈管に加えた。

4) を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。

上清をアスピレーターで吸引除去し、沈渣を 15ml 遠沈管に集め、さらに水で各 50mL 遠沈管に付着した沈渣を洗い、これも遠沈管に加えた。

遠沈管を 2,000 回転で 5 分間遠心分離した。

回収沈渣を少量の洗浄液に再浮遊させ、顕微鏡下に全量を観察し、虫卵数を求めた。

7. 超音波法と、従来法およびストマッカー法の比較

7.1. 回収虫卵数の比較

超音波法と、従来法およびストマッカー法により虫卵回収を試み、回収虫卵数を比較した。ストマッカー法と従来法の操作は、本研究所発行の試験検査成績書（2014 年 2 月 27 日発行、AA13-13-05803 号）記載の方法に準拠した。いずれの試験法においても、検体重量は 50g、接種虫卵数は 1000 個または 200 個、洗浄液量は 250mL とした。試験数は各々 5 回（n=5）とした。得られた値は F 検定により分散を見極め、t-検定で有意差を調べた。

また、検体とした白菜に回虫卵の付着がないことを確認するため、無処理の白菜 50g を超音波法にて検査した。

7.2. 回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法における回収沈渣の量と性状を比較するため、白菜 50g を超音波法および従来法、ストマッカー法でそれぞれ処理した。沈渣の重量は秤量し、性状を顕微鏡下に観察した。試

験数は各々2回 ($n=2$) とした .

試験結果

1. 超音波処理時間の検討

超音波処理の時間を0分から15分に設定し、虫卵の回収に最も有効な超音波処理時間について検討した。その結果、5分処理において最も回収虫卵数が多かったことから、本試験における超音波処理時間は5分間とした。なお、無処理群を除き、いずれの処理時間においても卵殻が破損された回虫卵がごく少数認められた。

表1 超音波処理時間と回収虫卵数

処理時間 (分)	回収虫卵数 (破損数)
0	336 (0)
1	70 (2)
3	654 (4)
5	935 (5)
7	206 (9)
10	97 (3)
15	256 (2)

2. 洗浄容器のリンス回数の検討

虫卵の回収に有効な洗浄容器のリンス回数について検討を行った。その結果、2回のリンスで虫卵総数の96%が回収できたことから、リンスの回数は2回とした(表2)。

表2 洗浄容器のリンス回数と回収虫卵数

リンス回数 (回目)	回収虫卵数 (個)	累積回収数 (個)	累積回収率 (%)
0	192	192	26
1	436	628	86
2	72	700	96
3	28	728	100

3.3 種類の試験法による回収虫卵数の比較

3.1. 接種虫卵数 1000 個での検討

1. および 2. により設定した条件で超音波法を実施し、回収虫卵数を従来法およびストマッカー法によるものと比較した。その結果、回収虫卵数はストマッカー法が最も多かった(表3)。超音波法と従来法、超音波法とストマッカー法による回収虫卵数の有意差検定を行ったところ、 $P(T \leq t)$ の両側は各々0.07, 0.11 が得られて 0.05 以上となり、有意水準 5%で有意差は認められなかった。一方、従来法とストマッカー法については、 $P(T \leq t)$ の両側が 0.02 で 0.05 以下となり、有意水準 5%で有意差が認められた。なお無処理の白菜からは、虫卵は検出されなかった。

表3 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)						t 検定: $P(T \leq t)$ 両側	
	平均 ± SD						超音波法	従来法
超音波法	1031	1032	1263	1210	1112	1130 ± 105	-	-
従来法	854	469	1074	777	1132	861 ± 264	0.07	-
ストマッカー法	1505	1813	1670	1640	800	1486 ± 399	0.11	0.02*

* : 有意水準 5%で有意差あり

3.2. 接種虫卵数 200 個での検討

より少数(約 200 個)の回虫卵接種検体について、回収虫卵数を比較した。超音波法および従来法、ストマッカー法のいずれにおいても、有意水準 5%での有意差は認められなかった(表4)。

表4 3種の回収法による回収虫卵数

試験法	回収虫卵数 (個)						t 検定: $P(T \leq t)$ 両側	
	平均 ± SD						超音波法	従来法
超音波法	160	110	131	143	121	133 ± 19	-	-
従来法	122	151	185	107	102	133 ± 35	0.98	-
ストマッカー法	71	187	181	156	178	155 ± 48	0.38	0.45
添加回虫卵数	181	241	181	213	135	190 ± 40		

4. 各試験法により回収された沈渣の量と性状の比較

各試験法により回収された沈渣の量と性状を比較した(表5)。従来法ではメッシュを使用しないため粒子状の沈渣の混入を認めたが、その量は検体ごとにばらつきがあった。ストマッカー法では沈渣の重量は従来法の2分の1以下であったが、メッシュを通過する微細な沈渣が多く、その結果として肉眼的に認める沈渣の容量は最大となった(図1および2)。超音波法では沈渣量が最少となった。

各試験法により回収され沈渣を顕微鏡下に観察したところ、超音波法と従来法では沈渣に夾雑物が少ないのに対し、ストマッカー法では夾雑物が多数認められた(図3)。

表5 3種の回収虫卵方法による検体沈渣量の比較

試験数	超音波法	従来法	ストマッカー法
1	0.02	0.18	0.04
2	0.01	0.07	0.06
平均	0.01	0.13	0.05

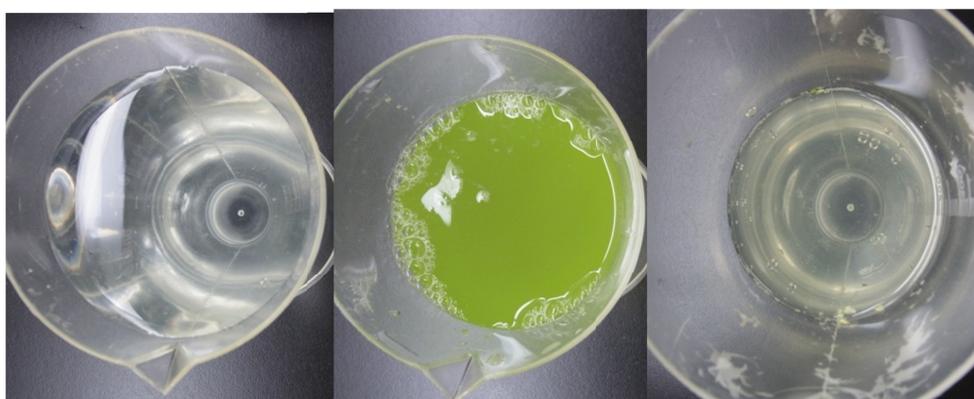


図1 3方法の回収洗浄液の性状(肉眼所見1)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

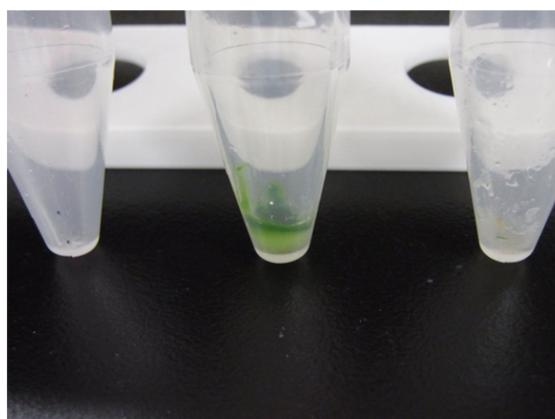


図2 3方法の検体沈渣の性状(肉眼所見2)
(左, 超音波法; 中, ストマッカー法; 右, 従来法)

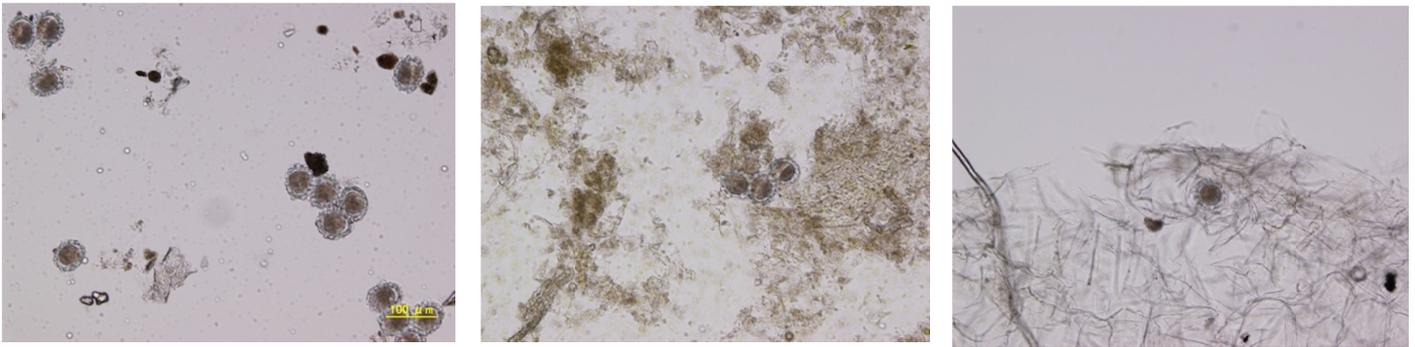


図3 3方法の検体沈渣の性状（顕微鏡所見）（×100）
（左，超音波法；中，ストマッカー法；右，従来法）

まとめ

回虫卵検査法として超音波利用の是非について判断するため、試験条件について虫卵回収数を指標に検討を行った。その結果、今回用いた機種では、5分間の超音波処理の後、洗浄容器を2回リンスすることにした。その上で超音波法による本試験を実施し、同時に実施した従来法およびストマッカー法による試験結果と相互に比較した。その結果、超音波法は他の試験法との間に、回収虫卵数で有意な差を認めなかった（接種回虫卵数が1,000個及び200個の場合共に）。なお接種回虫卵数を1,000個とした場合に、ストマッカー法による回収虫卵数が、従来法のそれより有意に高いとの結果を得た。

試験検査区分責任者： 小高 秀正 印