

## 馬肉中の住肉胞子虫 (*Sarcocystis fayeri*) の顕微鏡検査法

### 【1】実体顕微鏡による検査法

#### 1：検体の調整

馬肉がブロック状であれば、筋肉の走行に直角にスライスする。スライスの厚さは1 cm 程度とする。既にスライスされている検体については、筋束の走行に注意しながら、出来るだけ筋束の走行が垂直になるように、実体顕微鏡の観察部分にスライスを置く。

馬肉片の上方から斜めに光を当てる。添付する写真に類似する光源機器が望ましい。観察部分に影が生じないように注意する。

#### 2：顕微鏡観察、シストの特徴

手袋をした指先、眼科用ピンセット、24 G 注射針を装着した 10 ml シリンジを持ち、筋束を分離しながら、筋側の走行と平行に走る住肉胞子虫シストを探す。筋束の分離をスライス全体に施す。筋束表面を観察して行く。

シストは透明感やつやのない濃い白色を示す。長いシストは1 cm に達する。シストの幅は0.5～1 mm 程度である。脂肪との類別に注意する。筋束を分離する際、小さな筋状の構造物ができることがある。筋膜に脂肪が巻き付いたもので、シストが筋膜に包まれた筋側の内部（具体的には筋膜直下）にあるのに対し、脂肪や筋状構造物は、簡単に赤色筋束から分離できるが、シストは筋束表面かつ筋膜内直下にある。比較的小さなシストは直線状だが、大きなシストを拡大して観察すると、うねうねと屈曲している。脂肪や筋状構造物はキラキラした反射を示す。シストには光沢がない。

#### 3：シストの分離

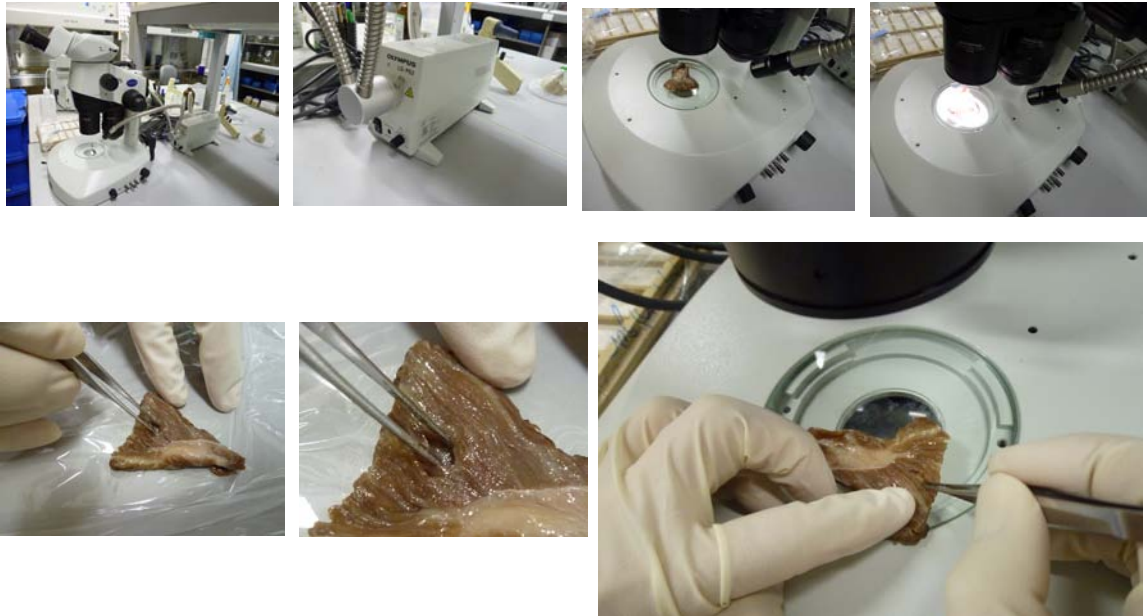
シストの分離を試みる。新品の 24G 注射針をメスのようにして、シストの左右に、シストの走行に平行に筋膜に切れ目を入れる。シストの両側に切れ目をいれたほうが、分離しやすくなる。

先端が極細のピンセット、あるいは、先端を針穴と逆方向に反らせた（釣り針のようにする）24G 注射針を用いて、シストを引っ掛け、あるいは柔らかく保持し、ゆっくりとシストを引き抜く。

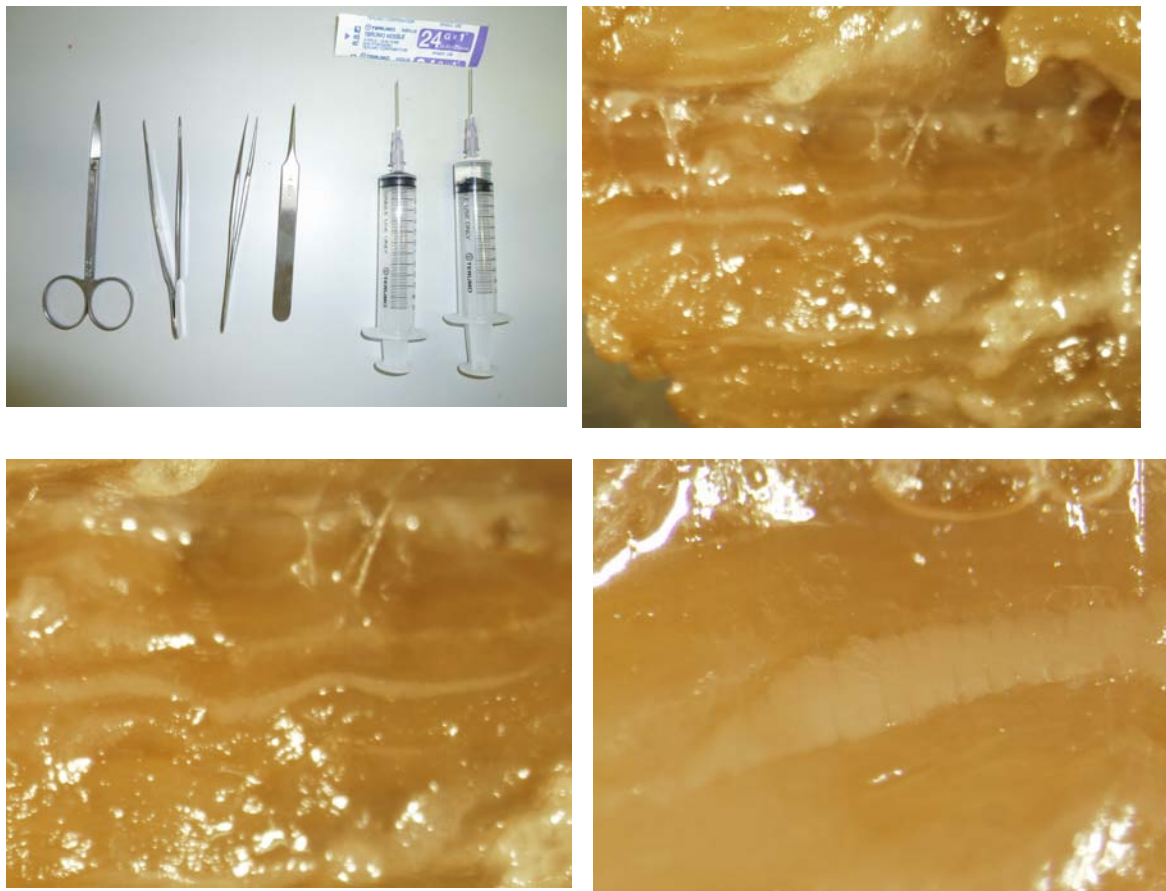
#### 4：シストおよびシストから遊出するブラディゾイトの確認

スライドガラスに PBS を一滴落とし、ピンセットや注射針の先端を PBS 滴中にこすりつけ、白い物体が PBS 中にあることを確認する。シストをピンセット、あるいは注射針でつつき、また、PBS 中で上下左右に揺する。適当な大きさのカバーガラスを掛け、実体顕微鏡下でシストを確認した後、光学顕微鏡で遊出しているブラディゾイトを観察する。400 倍の倍率が必要である。三日月状、あるいは紡錘状のブラディゾイトを確認する。

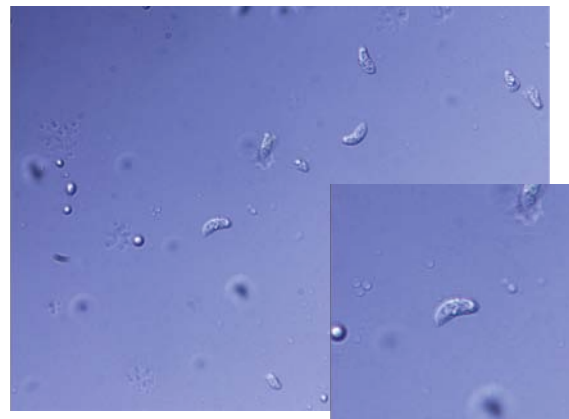
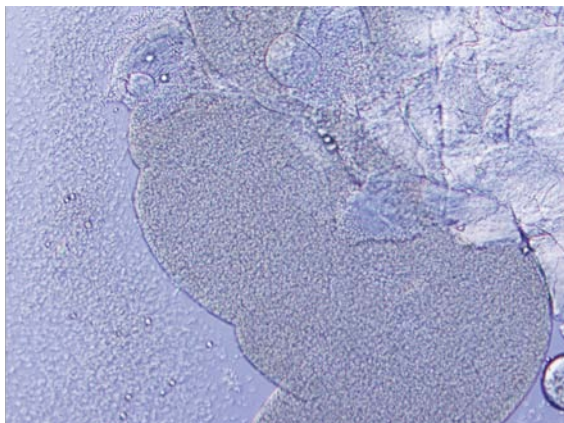
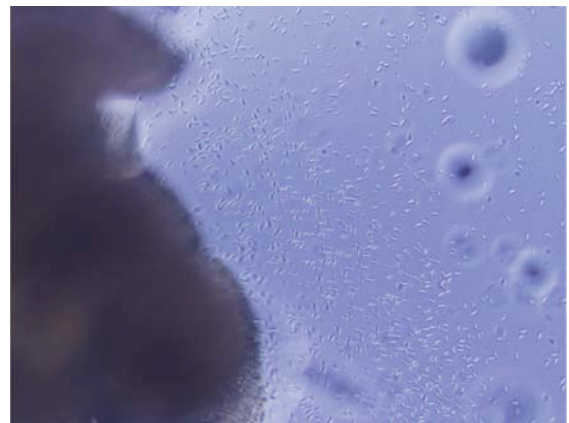
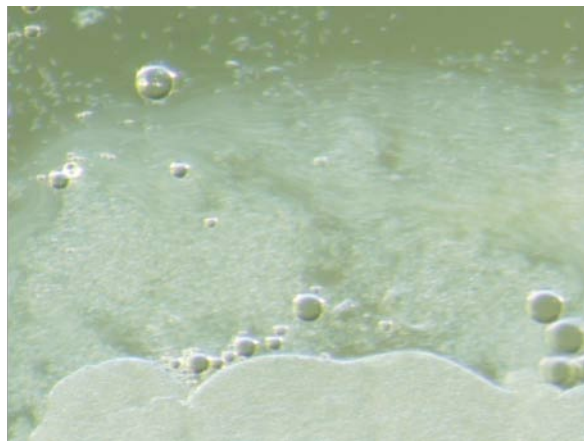
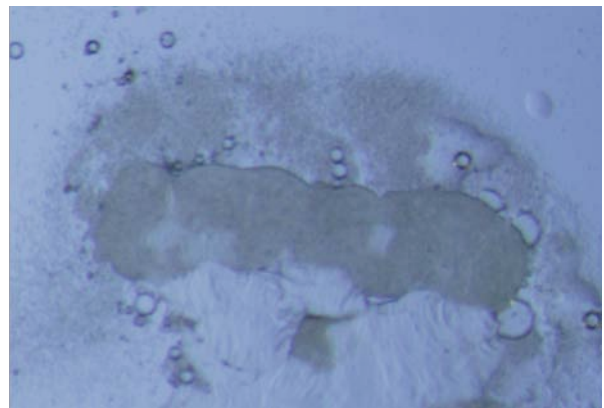
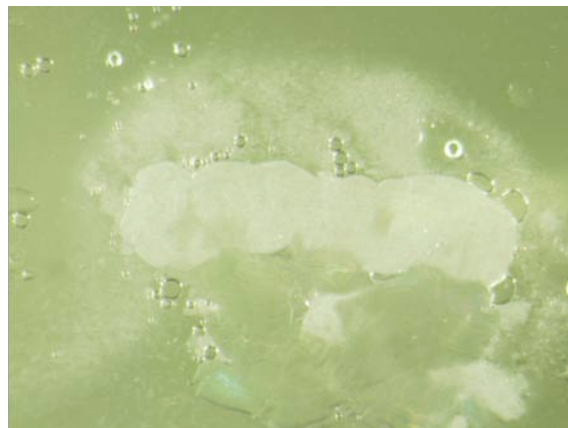
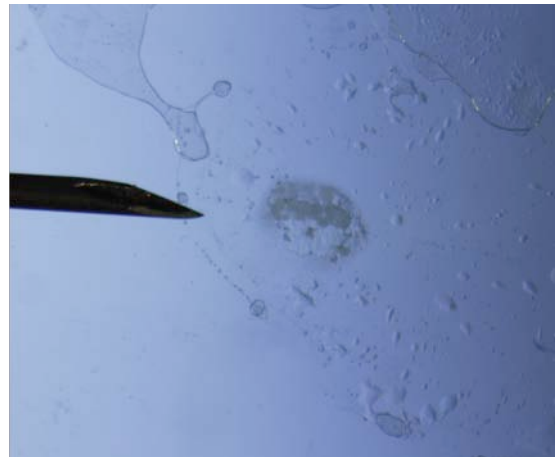
実体顕微鏡と光源、馬肉片の取り扱い



馬肉片中のシストを取り出す道具、馬肉中のシスト



摘出したシスト、シストから遊出するブラディゾイト



本法で住肉胞子虫シストが確認できない場合、以下の顕微鏡検査を実施する。

## 【2】検体が5グラム以上ある場合のブラディゾイト確認法

等量の PBS を加え、30秒のストマッキングを行う。1～2分、激しく手で揉んでも良い。肉片を避け、上清全量を回収する。血球計算盤に上清をセットし、ブラディゾイトの確認を行う。400倍の光学顕微鏡下で、ブラディゾイトを確認する。確認できなければ、以下の濃縮作業を行う。後述する計数法でグラムあたりのブラディゾイト数を算出する。上清を0.5 g 馬肉/ml として計算する。ブラディゾイトが確認されるものの、計数出来ない場合が多い。その際は、ブラディゾイト陽性という定性的判断とする。

上清全量について3,000 rpm 10分の遠心分離を行う。沈渣に1 ml の PBS を加え、懸濁し、その0.5 ml を1.5 ml チューブに移し、10,000回転10分間の遠心分離を行う。上清を捨て、0.05 ml の PBS を加えて沈殿を懸濁したのち、血球計算盤にセットし、ブラディゾイトを確認する。馬肉由来の固形物が多く、ブラディゾイトの確認が難しい場合、適宜希釈して確認を試みる。

上清濃縮物の残りは住肉胞子虫の遺伝子検査の材料とすることも出来るが、遺伝子検査は別紙の方法を適応する。

上記の検査でブラディゾイト陰性の場合、あるいは検体の馬肉量が少ない場合、以下を実施する。

## 【3】住肉胞子虫の遺伝子検査用検体を利用したブラディゾイト確認法

別紙にあるように、住肉胞子虫の遺伝子検査を実施する際、0.3 g の検体に TE 緩衝液を加え、攪拌したものの遠心分離上清物が核酸抽出の直接の材料になっている。この際の上清を血球計算盤にセットし、ブラディゾイトの確認を行う。

## 【4】馬肉のトリプシン消化法によるブラディゾイト確認法

馬肉の赤み部分をミンチ状にする（詳細は遺伝子検査法に記載されている）。検体0.15 g を1.5 ml チューブにとる。室温にもどした X10 Trypsin (Sigma T4549、25 mg/ml) を0.5 ml になるように加える。1.5 ml 用ホモジナイザーペッスル（アズワンなど）を用いて馬肉片を均質化する。3,000 rpm 1分の遠心分離を行う。油分を避け、上清を血球計算盤にセットし、ブラディゾイトの確認を行う。

上述の方法で確認できない場合、上清0.1～0.2 ml を10,000 rpm 10分で遠心分離し、沈渣を得る。0.01～0.02 ml の PBS で沈渣を懸濁し、血球計算盤に懸濁液をセットしブラディゾイトを確認する。

（トリプシンは凍結状態で納品される。融解し、少量のサイズに分注後再凍結して保

存する。使用時に溶解し、室温に置く。室温においたトリプシンの残りは再利用しない)

### 馬肉のストマッキングと回収液



### 馬肉のトリプシン消化



血球計算盤上で観察されるブラディゾイト

