

船坂委員提出意見

1. アセトン溶解法では界面活性剤添加 PBS、PTFE メンブランフィルター法では PET 溶液が用いられているが、PTFE メンブランフィルター法で PET の代わりに界面活性剤添加 PBS-Tween を用いることはできないのか。
→界面活性剤等変更の独自法は実際に行われていると聞きます。試験方法通知に全て紹介することはいたしません、検査担当者が結果に支障がないか確認のうえでご使用いただくことに問題はありません。
2. アセトン溶解法では Tween80 の使用濃度が 0.1%、PTFE 法では 0.01%となっている。過度の発泡を抑える意味でも使用濃度は 0.01%程度が良いと思われるが、前者において 10 倍濃度の界面活性剤を用いる理由は何故か。
→2 つの方法は、元々の提案者が異なるため、濃度は統一されたものではありません。高濃度の界面活性剤の使用は、手の届かない容器内部からの回収を期待していると考えられます。加圧ろ過では問題になっていないことを確認済みです。
3. 一般に、異なった界面活性剤を混合すると競合により界面活性効果が失われるなどの問題が生じる恐れがある。また、基本的に異なった組成の緩衝液を混合することは避けるべきだと考える。ところで、検査工程の中で、免疫磁性体法あるいは蛍光抗体染色においては市販の検査試薬が用いられ、その際には試薬キットに添付の緩衝液(+界面活性剤)が用いられる。添付の緩衝液(+界面活性剤)の組成は開示されていないことから、指針指定の緩衝液(+界面活性剤)が残存した状態で、市販試薬キットを用いる工程に移行することは避けるべきと考える。市販キットを用いる工程に移行する際にはそれ以前工程で使用された緩衝液等の影響を受けないよう、精製水等への置換・洗浄を行う必要があると考える。
→市販キットの使用説明で注意がなされているため、試験方法通知への追記は不要と考えます。
4. PTFE メンブランによる濃縮では、ろ過前の試料水に界面活性剤(PET 溶液)を加えているが、アセトン溶解法では行っていない。試料水にあらかじめ界面活性剤を加えておくことは、容器等へのオーシスト/シストの付着を抑える効果が期待できることから、試料水採取時に界面活性剤を添加するよう変更すべきではないか。
→「1 試料の採取」に、ご指摘の主旨を踏まえて備考を追加します。
5. P2、1. 試料の採取 :当該文章は解釈の仕方によって「濃縮物の半量を検査し、」

が文章全体に係るように読めなくもない。実際、通常の検査において、原水で 5L、上水で 10L の検査結果を行っていた検査機関があったとの情報を得ている。そこで、下記のように修文し、文章の明確化を図ることが必要と考える。

「採取検査水量は原水で概ね 10L、水道水で 20L を標準とするが、し、その全量を用いて検査する。応急対応のための検査にあつては、水道水 40L(消毒のみで給水する水道等であつて原水を対象とする場合も原水 40L)を採水場所毎に3試料採取し、その全量を濃縮して、各濃縮物の半量を検査し、残りの半量を保存しなければならない」

→ご指摘のとおり修文します。なお、「検査水量」は「試験水の量」に置き換えます。

6. アセトン溶解法において、最も注意すべき操作としてアセトンによるフィルターの溶解・除去であるが、それを安全に確認する方法として、以下の説明を追加することを提案する。

「遠心沈殿後の上清から少量のアセトンを取り、新しいチューブに用意した精製水に滴下し、セルロースの白濁が生じないことを確認する」

→アセトン溶解法のトラブルが指摘されることがあり、原因はご指摘のセルロースの残存と考えられておりますので、ご指摘の主旨を踏まえて追記します。

7. P4, 2.1、3) (3) 注 1) に試験管 1 本当たりアセトン溶解に用いるフィルター枚数の上限が記載されているが、推奨枚数の記載が望まれる。

→溶解フィルター数は極力少なくすることが望ましいことを追記します。

8. P7、2.3、3) (1) i) 及び P7、2.3、4) (1) にある「PET」は「100 倍濃度 PET」の誤りか。

→必ずしも誤りではありません。特に吸引に際しては発泡することから 100 倍の使用は避けられていると聞きます。指針以後に出された文献では 1 倍とするものもあります。

9. 免疫蛍光抗体染色反応あるいは免疫磁性体粒子法における反応時間は 37℃、1 時間を基本とするのが一般と考えるが、低温下(冷蔵庫内)で一晩の反応でも良好な結果が得られる。(当該検査法は極めて多くの工程からなっており、試料水の搬入時間などの都合から、必ずしも連続的に実行できない場合もある。そこで、反応の途中で止められる工程が明示されることは実務者にとって重要と考える。)

→低温長時間の免疫反応は、古典的な操作方法と言えます。免疫磁気ビーズと試料の接触頻度が高まることで回収率の向上が見込める可能性もあるため、ご指摘の

内容を追記します。

10. P15、4.1.1 3) (2)フィルターの調製:メンブランフィルターのブロッキング試薬処理は不要ではないか。以下のような修文が必要と考える。

「メンブランフィルターの中央に撥水ペンで直径約 15mm の円を描き、PBS で濡らす^{注1)}。フィルターホルダーのベースを吸引瓶等にセットし、弱く吸引しながら、ベース上端面を PBS でゆっくりと洗浄したのち、円を描いた面を上にしてメンブランフィルターをホルダーベース上に載せる。吸引を停止し、少量の~~ブロッキング試薬~~ PBS をメンブランフィルターの円内全面に行き渡るように滴下し、~~室温で約5分間[※]作用させた後、残ったブロッキング試薬~~を吸引除去する。除去したら直ちに吸引を停止し、速やかに(3)の操作に移る。」

→省略可能であり、試験時間短縮のため、「吸引を停止し…」以降を削除します。

以上