

抗体 ELISA のためのコイの血清採取法

水産研究・教育機構 水産技術研究所 三輪 理

血清の採取なので注射器や針にヘパリン処理はしない。ヘパリン処理をし、血漿を採取しても理論的に抗体価の測定には問題ないと思われるが、完全に凝固を阻害するのはなかなか難しいので、逆に完全に凝固させて血清を採取するほうがよいと思われる。

尾柄部の血管（尾動脈と尾静脈）から採血するのが一般的である。これらの血管は脊椎骨の直下（腹側）に尾動脈が上に、尾静脈が下になって対向して存在するので、魚の下側（腹側）から脊椎骨の下側（腹側）を目指して注射針を刺していく。脊椎骨の背中側には脊髄が走っているが、これを傷付けると、そこから魚体に変形したり、体色が黒化したりすることがあるので気をつける。この方法で採血した場合、おそらく尾動脈と尾静脈の両方が破れているので、採取される血液は動脈血と静脈血が混合していると考えられる。

直前に注射筒のピストンを動かして、ピストンがスムーズに動くようにする。

コイを水平に置く。麻酔した方がやりやすいが、大型のコイでも採血者以外の方がしっかり押さえていれば採血可能。

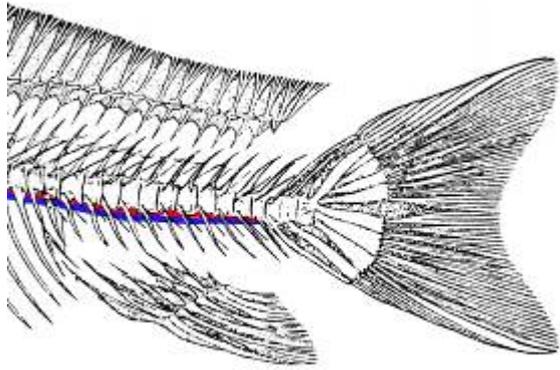


小型のコイ（写真のものは全長 15cm。注射針は 25G、シリンジは 1ml のものを使用）では注射針を臀鰭の後端の付け根あたりの正中線上から水平に脊椎骨に向かって刺す。



大型のコイ（写真のものは全長 50cm。注射針は 23G、シリンジは 2.5ml のものを使用）では水平に針を刺すと脊椎骨までの距離が遠いので、臀鰭の後端の付け根あたりの、下側の体側から斜めに脊椎骨の下側を目指して針を刺してもよい。脊椎は尾柄の中央にあるので、針先がまっすぐそこを目指すように刺す。大型のコイでは写真のように針を刺す位置のウロコを一枚取り去ったほう

がやりやすい。



左にコイの骨格と脊椎骨の下に尾動脈(赤)と尾静脈(青)が走っている様子を示す。(図は魚類解剖大図鑑(落合明編, 緑書房)よりコピー)

針先が脊椎骨に当たらなければ、わずかに針先を戻して、方向を変えて刺し、脊椎骨を探す。

針先がコツンと脊椎骨に当たったら、軽くピストンを引いて血液が入ってくるかどうか確かめる。

脊椎骨に強く針先を押しつけていると、針先が組織に密着して血液が入りづらい。また、あまり強くピストンを引くと組織を吸引して針先が詰まり、血液が入らないことがある。

中途半端に針先に血液が入った状態のままだと、血液が凝固して採血できなくなるので、脊椎骨に当たっているのに血液がなかなか入ってこない場合はいったん針を抜いてピストンを動かし、凝固していないか確かめる。その場合、次には少し位置を前方に変えて針を刺す。

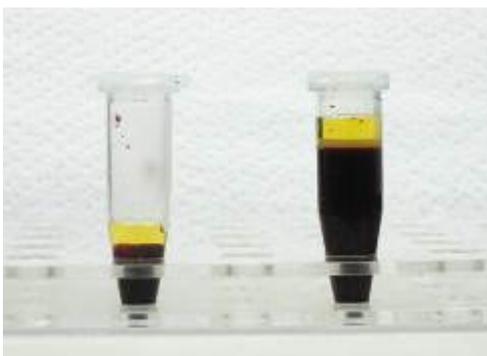
血液が入ってくればそのまま**ゆっくりと**ピストンを引いて採血する。いったん針先が血管を破れば、針先は組織に押しつけず、浮かせたような状態でピストンを引いたほうが血液は採取しやすい。この時、ピストンは**血液の流入速度に合わせて、なるべくゆっくりと**、シリンダー内部の陰圧が常に一定になるように引くのがコツである。必要以上に強く引いたり、何度も強くピストンを引いたりゆるめたりする動作を繰り返すと溶血する。コイの心臓が動いていれば、普通は体重の1%まではスムーズに血液が採取できる。出来ない場合は手技に問題がある。

血液が入ってくればそのまま**ゆっくりと**ピストンを引いて採血する。いったん針先が血管を破れば、針先は組織に押しつけず、浮かせたような状態でピストンを引いたほうが血液は採取しやすい。この時、ピストンは**血液の流入速度に合わせて、なるべくゆっくりと**、シリンダー内部の陰圧が常に一定になるように引くのがコツである。必要以上に強く引いたり、何度も強くピストンを引いたりゆるめたりする動作を繰り返すと溶血する。コイの心臓が動いていれば、普通は体重の1%まではスムーズに血液が採取できる。出来ない場合は手技に問題がある。

血清は最低数十マイクロリットルあれば一応測定可能なので、血液が0.1ml以上取ればよい。1.5 mlの遠心チューブに入りきれないほど採取する必要はない。



採取した血液が凝固する前に、速やかに1.5mlの遠心チューブに移し、1~2時間室温に静置する。



採血して2時間後の血液。左が小型魚、右が大型魚から採血した血液。赤血球が下に沈み凝固が始まっている。白血球は赤血球よりわずかに軽いため、白血球がある程度多ければ、右の血液のように赤血球の上に白く薄く積もって見える。これを「バッフィーコート」と呼ぶ。上の黄色い上清が血清である。左の血液は白血球が少ない。

健康魚でもこれくらいの個体差はある。これを冷蔵庫でさらに一晩静置し、完全に凝固させる。



冷蔵庫で一晩放置したもの。凝固が進んで血餅が収縮し、血清の層が深くなっている。凝固が十分でないと、血清を凍結して解凍したとき再び凝固してしまう。十分な血清があれば、このあと遠心分離をしなくてもよい。



2000g (中心から、セットしたチューブの先端までの距離が7cmのロータで5000回転)で10分遠心分離した後のもの。遠心器は室温以上には温度が上がらないようにする。



血餅の上には血餅に巻き込まれなかったフリーの赤血球があるので、それを舞い上がらせないように上清の血清を、そっと採取する。多く取ればそれに越したことはないが、血液量が少なくても、血清が50マイクロリットル以上取れば、それ以上無理して取る必要はない。



採取した血清。うまくいけばこのように濁りのない透明な黄色い血清が採れる。この状態で測定用に希釈するまで冷凍保存する。凍結・解凍を何度も繰り返すことは避ける。冷蔵庫で保存したいときは0.1%の割合でアジ化ナトリウムを加える。チューブのフタの締まりが十分でないときは凍結中に乾燥してしまうので、パラフィルムでフタをするか、完全に密封できるチューブで凍結する。

多少溶血して血清が赤くなっても理論的には測定に問題ないと思われる。

以上