

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生外部精度管理調査における適性調査試料の作製と  
信頼性確保に関する研究（その 2）  
—食品基材中のサルモネラ属菌の安定性確保に関する検討—

主任研究者	遠藤 明	(財)食品薬品安全センター	理事長
分担研究者	大島 赴夫	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 部長
協力研究者	鈴木 達也	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 室長補佐
	山田 健一	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	中阪 聡亮	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員
	山本 奈々美	(財)食品薬品安全センター	秦野研究所 研究員

研究要旨

サルモネラ属菌の検査を対象とした食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、サルモネラ属菌検査のための基材として食鳥卵（殺菌液卵；鶏卵）を選択し、調査試料の輸送による生菌数の変動、検査法（公定法）による添加菌の検出確認について検討し、試験菌の増減を抑制した安定な調査試料の提供のための条件検討を行った。作製した試作試料を通常の発送手順に従い冷蔵宅配便で外部に配送して接種菌数の推移を観察した結果、輸送前後において試験菌の生菌数は、一般的に減少傾向にあったが、添加菌数レベル（ $10^1$ cfu/mL～ $10^4$ cfu/mL）に依存した変動は認められず、試験菌として選択した *Salmonella* Enteritidis では全ての点可能で減少傾向を、*Salmonella* Typhimurium では全ての添加濃度で増加傾向を示し、標準菌株の性状に依存した傾向が示唆された。また、前増菌培養、増菌培養、選択増菌培地の組み合わせによって、試験菌の検出率が大きく異なり、ラパポート・バシリアディス液体培地による選択増菌の後に MLCB 寒天培地を用いた確認では、多くの場合添加菌の集落形成が認められず、この結果も標準菌株の性状に大きく影響を受けることが推測された。検査に使用する選択増菌培地にテトラチオネート液体培地を用いた場合とラパポート・バシリアディス液体培地、確認培地として MLCB 寒天培地、DHL 寒天培地、XLD 寒天培地、BG 寒天培地、ES サルモネラ及び ES サルモネラ II 寒天培地など選択されるが、検査においてこれら培地の組み合わせも重要であることが示唆された。

A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査（特定微生物の同定検査）試料の作製にあたって特

に考慮しなければならない事項として

「実食材を基材とした調査試料の開発」と「試験菌（標準菌）株の選択」並びに

試験に用いる培地の組み合わせが上げられる。これまでマッシュポテトを主材料とした基材の開発について検討してきた。本基材による調査試料は、輸送の影響が少なく、試験菌の死滅変動も少ない比較的安定な調査試料であり、外部精度管理調査試料として作製が可能なものであった。この調査試料に対し食材のカテゴリー（見立て食材）を提示して調査試料を提供してきたが、外部精度管理調査も回を重ねるごとに模擬食材（マッシュポテト）に代えて食品・添加物等規格基準に定められている実食材を基材とした調査試料の提供が強く求められてきている。実食材を基材として安定な調査試料を作製する場合、基材の変質抑制、長期間安定で均一な試料作製に心がけなければならないが、試験菌を人為的に添加した食材中の汚染分布は自然汚染によるものとは異なり試験菌の増減を長期間コントロールすることが困難な場合が多い。加えて採用された検査法（通常選択される試験培地の組み合わせを含む）で確実に菌を検出することができるような調査試料としなければならない。

今年度は、これらの要望に対応するため、サルモネラ属菌検査を対象に実食材として食鳥卵（殺菌液卵）を選択して作製した試料中での試験菌の安定性、輸送（冷蔵宅配便）による添加菌の消長（増減）を確認し、適正な試料作製を試みることにした。食品・添加物等規格基準に示されている食品のカテゴリーのうち冷凍食品、食肉製品、食鳥卵（殺菌液卵）でサルモネラ属菌の検査が指定されており、これらのカテゴリーに適合する食材として殺菌液卵を選択し、調査試料の作製検討に着手した。

## B. 研究方法

### 1. 試験菌株

試験菌株は、秦野研究所保存の以下の5菌種を用いた。

*Salmonella* Enteritidis HIC12042

*Salmonella* Typhimurium HIC12041

*Proteus mirabilis* HIC12051

### 2. 基材（食品・食品添加物等規格基準のカテゴリーを参考とした選択）

サルモネラ属菌検査用試料作製には、市販の殺菌液卵（鶏卵）を用いた。

### 3. 試料の調製

殺菌液卵（市販品）に安定化剤を加えて調製した基材中に各試験菌（*S. Enteritidis*、*S. Typhimurium*、*P. mirabilis*）を加え、基材中の最終菌液濃度がそれぞれ約 $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  cfu/mLとなるように調査試料を作製し、4℃下に保存した。

### 4. 殺菌液卵基材中の接種菌数測定および液卵のサルモネラ検査法（公定法）による検出確認

殺菌液卵中の生菌数測定は、標準寒天培地を用いて実施した。液卵中のサルモネラ属菌の検出確認は、公定法（図1）にしたがって各段階での増菌確認、発育集落の検出確認を行った。また、発育集落の生化学的性状確認は、簡易同定キットを用いて行った。

### 5. 調査試料の輸送による生菌数の変動と添加菌の検出確認

各菌液濃度の調査試料を4℃で1週間保存した後、宅配便（冷蔵）で外部に輸送し、輸送後の生菌数、並びに検査手順にしたがって検査をした場合の検出確認を行った。

#### （倫理面への配慮）

研究に使用する微生物などの取り扱いには特定の区域内で行う。実験に使用した微生物や微生物汚染試料は、実験終了後

すみやかに廃棄処理方法に従って滅菌処理する。さらに、実務担当者は自らの健康管理に十分配慮し、健康診断などの記録の保管を行う。

## C. 研究結果

### 1. 輸送中の生菌数の変動

試験結果は、表 1～3 に示した。

*S. Enteritidis* を添加して作製した調査試料では、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、いずれの濃度においても減少する傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $-0.37 \sim -0.56$  であった (表 1～3)。添加菌数の最終濃度が約  $10^4$  cfu/mL の場合、最も大きな減少傾向を示していた。

*S. Typhimurium* を添加して作製した調査試料では、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、いずれの濃度においても増加する傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $0.03 \sim 0.38$  であった (表 1～3)。添加菌数の最終濃度が約  $10^4$  cfu/mL の場合、最も大きな増加傾向を示していた。

試験対照として作製した *P. mirabilis* 添加試料では、*S. Enteritidis* を添加して作製した調査試料と同様に、輸送前の生菌数測定結果に比べて輸送後の生菌数は、約  $10^1$  cfu/mL を除き、いずれの濃度においても減少する傾向を示し、発送前後の変動菌数を log 表示すると  $-0.29 \sim -0.44$  であった (表 1～3)。添加菌数の最終濃度が約  $10^4$  cfu/mL の場合、最も大きな減少傾向を示していた。

### 2. 輸送前の調査試料からのサルモネラ属菌の検出

試験結果は、表 4 に示した。

殺菌液卵 (鶏卵) 25 g を秤量し、緩衝ペプトン水 (OXOID +  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  54mg/L) 225mL に加えて 10 倍希釈液作

製し、これを  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で培養した結果、いずれの添加菌濃度 (約  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  cfu/mL) においても増菌を認めた。この培養液 1mL を選択増菌培地 [テトラチオネート液体培地 10mL ; ベクトン・デッキンソン(TT)、ラパポート・バシリアデイス液体培地 10mL ; OXOID (RV) ] に添加して増殖確認を行った結果、全ての試料で添加菌の発育を確認した。確認培地として DHL (栄研化学)、MLCB (日水製薬)、XLD (栄研化学)、ブルルアントグリーン寒天培地 (栄研化学)、E Sサルモネラ II (栄研化学) 用い、TT および RV で選択増菌した培養液を塗抹して添加菌の発育確認を行った結果、*S. Typhimurium* 添加試料を TT および RV で増菌させた後、MLCB 寒天培地に塗抹した場合、集落形成はほとんど認められず、*S. Enteritidis* でも高濃度添加試料のみ発育集落を検出した。他の選択培地では、多くの場合発育集落を認めるが、RV で増菌させた後の培養液塗抹は添加菌の濃度が高濃度の試料のみ集落形成を認める結果であった (表 4)。なお、確認培地は、いずれも  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  で  $22 \pm 2$  時間培養した後に判定した。また、対照として用いた *P. mirabilis* は、XLD 寒天培地上での発育は認めるものの、他の確認培地上では発育集落を認めない。

### 2. 輸送後の調査試料からのサルモネラ属菌の検出

試験結果は、表 5 に示した。

輸送後の調査試料を用いた検査は、輸送前の調査試料からのサルモネラ属菌の検査と同様に実施した。検出傾向は、輸送前の結果とほぼ同様の傾向を示していた (表 5)。

### 3. 発育集落の簡易同定キットによる性状確認

検査手順にしたがって得られた集落に

ついて、その生化学的性状を簡易同定キット (API) で確認した結果、いずれの調査試料からも添加菌である *S. Typhimurium*、*S. Enteritidis*、*P. mirabilis* を確認し、外部汚染による発育集落でないことを確認した。

#### D. 考察

実食材を用いて、サルモネラ属菌検査のための調査試料(殺菌液卵)の作製、接種菌量の設定、輸送による接種菌数の変動、公定法による添加菌の検出について検討した。

サルモネラ属菌検査用調査試料として検討した殺菌液卵(鶏卵)は、液状であるため取り扱いや接種菌の均一化は容易であったが、試験菌が低温保存下でも発育増殖を示すため、増殖抑制を考慮して基材に安定化剤を添加する必要がある。低温で保存すれば接種菌量を調整することにより、調査試料中の菌数を期待する菌数範囲に留めることは可能であったが、今回のような基材の場合、菌の増殖抑制と基材の変質(腐敗臭の発生)防止のため安定化剤の添加は必須と考えられた。輸送前後において菌数測定を行った結果では、低濃度から高濃度接種試料中での生菌数に極端な変動は認められないものの、菌種によって増加傾向にあるものと減少傾向にあるものとが観察されており、標準菌の選択に注意が必要である結果となった。また、輸送による接種菌の変動、公定法による接種菌の検出についても、標準菌株の性状を十分考慮しなければならない結果であった。すなわち、前増菌培地に緩衝ペプトン水(OXOID + FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 54mg/L)、選択増菌に TT、RV を用いた場合、試験菌の発育は認められるが、選択培地上での試験菌の発育集落観察においては、MLCB 培地での確

認が困難であり、特に RV を選択増菌培地に採用して増菌を行った後、確認培地に移植して発育集落を観察すると、低濃度接種試料においてはいずれの確認培地(MLCB、DHL、XLD、ES Sal II)上でも、発育集落を認めることが困難であった。また、接種菌量が多い試料からの確認検査においても、RV と MLCB の組み合わせは最も検出率の悪い結果であった。この結果は、輸送後の検体についても同様の傾向を示していた。

#### E. 結論

食品衛生外部精度管理調査の特定微生物検査用調査試料として、これまでマッシュポテトを基材とした均一で安定な調査試料を提供してきたが、実食材を基材とした調査試料配布の要望に対応するためサルモネラ属菌検査用試料として殺菌液卵(鶏卵)を選択し調査試料作製、並びに接種菌の推移、検出方法について検討した。

サルモネラ属菌検査のための調査試料として殺菌液卵(鶏卵)を採用して検討した結果、安定化剤の添加によって4℃保存下で約4週間、接種菌の死滅は抑制することが可能であった。しかしながら、調査試料を宅配便にて輸送する場合、実験室での一定温度保存と異なり、温度変化が大きく、基材中の試験菌が増殖または死滅するリスクが高い。輸送条件を出来るだけ一定温度にして、配布が可能であれば、特に生菌数の変動に大きな影響を及ぼさないものとするが、温度管理は非常に困難を極める。したがって、輸送の温度条件に極端に依存しない調査試料が必要となる。検査実施施設からは、添加菌量を低濃度にして欲しいとの要望もあるため、10<sup>1</sup>/mL レベルから 10<sup>4</sup>/mL レベルまでの接種菌量を設定して輸送前

後における生菌数の変動と添加菌の検出確認を行った。殺菌液卵を基材としたサルモネラ属菌検査試料は、前増菌培地や選択増菌培地中で試験菌の十分な発育を認め、サルモネラ属菌検査用調査試料として配布することは可能である。しかしながら、基材への低接種菌数（ $10^4$ /mL レベル）では、秤量が 25 g であるため、理論上は前増菌培地中に約  $10^2$  個オーダーの菌が添加されていることになるが、選択増菌または確認培地の培地の性能によっては十分な検出菌数で無い場合も考えられる。実際問題として菌種によっては RV で選択増菌した後、MLCB 培地を仮に選択した場合、検出できないリスクが非常に高い。液卵のサルモネラ属菌検査における推奨培地の記載は、緩衝ペプトンによる前増菌、TT や RV での選択増菌、DHL、ES サルモネラまたは ES サルモネラ II のような確認培地が示されているが、食肉では MLCB や DHL など硫化水素産生確認を指標にした培地が記載されている。調査試料中の菌数を一定範囲のコントロールすることが出来、輸送による菌数変動を極力小さくして調査試料を配布しても、選択される培地の組み合わせによっては添加した試験菌が検出できない場合も生じる。

調査試料中の接種菌数をある程度確保し、輸送によって大きな変動を生じないようは調査試料の作製は、基本的な事項ではあるが、選択される標準菌株の性状も検査成績に対して重要な影響を与える要因となっており、加えて検査施設において選択される検査法や培地の種類によっても検査成績が大きく異なる場合があることを留意しなければならない結果であった。

今後の食品衛生外部精度管理調査の実施に当たり、食品の規格基準に示されて

いる食品カテゴリーを参考とした調査試料作製のための実食材の選択とそれらを基材とした均一で安定な調査試料作製を継続して検討する必要がある、これまで問題とされてきている「指定された特定微生物に対する検査方法の適正とその検査方法の検証」、「標準菌株の選択と採用検査方法による特定微生物の検出の検証」、「調査試料の輸送条件における試験菌数の変動」など様々な局面を考慮して、外部精度管理調査の目的に応じて適切な標準菌株を選択し、日常の検査試料に近い調査試料を提供することにより、さらに向上した精度管理の実施が遂行されるものとする。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1. 液卵中の生菌数測定(発送前)

試験菌株	添加直後の生菌数	1週間保存後の生菌数
	CFU/mL	CFU/mL
<i>Proteus mirabilis</i> HIC 12051	$1.7 \times 10^1$	$1.9 \times 10^1$
	$3.0 \times 10^2$	$5.9 \times 10^2$
	$2.2 \times 10^3$	$5.1 \times 10^3$
	$2.2 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC 12042	$2.2 \times 10^1$	$7.9 \times 10^1$
	$3.1 \times 10^2$	$9.4 \times 10^2$
	$2.5 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$
	$2.1 \times 10^4$	$2.0 \times 10^5$
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC 12041	$2.1 \times 10^1$	$1.3 \times 10^1$
	$1.5 \times 10^2$	$1.4 \times 10^2$
	$1.3 \times 10^3$	$9.0 \times 10^2$
	$1.3 \times 10^4$	$5.0 \times 10^3$

表2. 液卵中の生菌数測定(発送後)

試験菌株	添加直後の生菌数	1週間保存後の生菌数
	CFU/mL	CFU/mL
<i>Proteus mirabilis</i> HIC 12051	$1.7 \times 10^1$	$2.4 \times 10^1$
	$3.0 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2$
	$2.2 \times 10^3$	$2.6 \times 10^3$
	$2.2 \times 10^4$	$3.6 \times 10^4$
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC 12042	$2.2 \times 10^1$	$3.4 \times 10^1$
	$3.1 \times 10^2$	$3.2 \times 10^2$
	$2.5 \times 10^3$	$4.5 \times 10^3$
	$2.1 \times 10^4$	$5.5 \times 10^4$
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC 12041	$2.1 \times 10^1$	$1.4 \times 10^1$
	$1.5 \times 10^2$	$2.5 \times 10^2$
	$1.3 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$
	$1.3 \times 10^4$	$1.2 \times 10^4$

表3.保存期間および発送による生菌数の変動

試験菌株	1週間保存後の 生菌数変動 (log)	発送後の 生菌数変動 (log)	発送による 生菌数変動 (log)
<i>Proteus mirabilis</i> HIC 12051	0.05	0.15	0.1
	0.29	-0.13	-0.43
	0.37	1.11	-0.29
	0.66	0.21	-0.44
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC 12042	0.56	0.19	-0.37
	0.48	0.01	-0.47
	0.64	0.26	-0.39
	0.98	0.42	-0.56
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC 12041	-0.21	-0.18	0.03
	-0.03	0.22	0.25
	-0.16	-0.03	0.12
	-0.41	-0.03	0.38

表4.サルモネラ属菌検査法による添加菌の検出確認結果(発送前)

試験菌株	測定時の 中の生菌	選択増菌 確認培地							
		培地	MLCB	DHL	ES Sal II	XLD	BG	LIM	TSI
<i>Proteus mirabilis</i> HIC 12051	1.9 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL	TT	×	+(弱)	×	+	+(弱)	—	—・+・+
		RV	×	+(弱)	×	+	+(弱)	—	—・+・+
	5.9 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL	TT	×	+(弱)	×	+(弱)	+(弱)	—	—・—・+
		RV	×	+(弱)	×	+(弱)	+(弱)	—	—・+・+
	5.1 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	TT	×	+(弱)	×	+(弱)	+(弱)	—	—・+・+
		RV	×	+(弱)	×	+(弱)	+(弱)	—	—・+・+
1.0 × 10 <sup>5</sup> cfu/mL	TT	×	+(弱)	×	+(弱)	+	—	—・+・+	
	RV	×	+(弱)	×	+(弱)	+	—	—・+・+	
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC 12042	7.9 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL	TT	+	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	×	×	×	×	+(弱)		
	9.4 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL	TT	+	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	+	+	+	+	+	+	—・+・+
	1.1 × 10 <sup>4</sup> cfu/mL	TT	+	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	+(弱)	+(弱)	+(弱)	+(弱)	+(弱)	+	—・+・+
2.0 × 10 <sup>5</sup> cfu/mL	TT	+	+	+	+	+	+	—・+・+	
	RV	+	+	+	+	+	+	—・+・+	
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC 12041	1.3 × 10 <sup>1</sup> cfu/mL	TT	×	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	×	×	×	×	—		
	1.4 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL	TT	×	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	×	+(弱)	+(弱)	+(弱)	—	+	—・+・+
	9.0 × 10 <sup>2</sup> cfu/mL	TT	×	+	+	+	+	+	—・+・+
		RV	×	+	+	+	+	+	—・+・+
5.0 × 10 <sup>3</sup> cfu/mL	TT	×	+	+	+	+	+	—・+・+	
	RV	×	—	+(弱)	+(弱)	+(弱)	+	—・+・+	

1. 前増菌培養は緩衝ペプトン水(FeSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O加)で実施
2. TTはテトラチオネート、RVはラパポート・バシリアディスを示す
3. LIMの判定で+はリジン脱炭酸試験陽性、-は陰性を示す
4. TSIの判定は「斜面部(白糖の分解)・硫化水素産生・ガス産生」の順に判定結果を示す



表5.サルモネラ属菌検査法による添加菌の検出確認結果(発送後)

試験菌株	判定時の試料中の生菌数	選択増菌 確認培地						
		培地	MLCB	DHL	ES Sal II	SIM	LIM	TSI
<i>Proteus mirabilis</i> HIC 12051	$2.4 \times 10^1$ cfu/mL	TT	-	+	-	·-·+·	-	-·+·+
		RV	-	+	-	·-·+·	-	-·+·+
	$2.2 \times 10^2$ cfu/mL	TT	-	+	-	·-·-·	-	-·-·+
		RV	-	+	-	·-·-·	-	-·+·+
	$2.6 \times 10^3$ cfu/mL	TT	-	+	-	·-·-·	-	-·+·+
		RV	-	+	-	·-·-·	-	-·+·+
	$3.6 \times 10^4$ cfu/mL	TT	-	+	-	·-·-·	-	-·+·+
		RV	-	+	-	·-·-·	-	-·+·+
<i>Salmonella</i> Enteritidis HIC 12042	$3.4 \times 10^1$ cfu/mL	TT	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
	$3.2 \times 10^2$ cfu/mL	TT	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	-	-	-	·-·+·	+	-·+·+
	$4.5 \times 10^3$ cfu/mL	TT	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
	$5.5 \times 10^5$ cfu/mL	TT	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
<i>Salmonella</i> Typhimurium HIC 12041	$1.4 \times 10^1$ cfu/mL	TT	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
	$2.1 \times 10^2$ cfu/mL	TT	+	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
	$1.2 \times 10^3$ cfu/mL	TT	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
	$1.2 \times 10^4$ cfu/mL	TT	-	+	+	·-·+·	+	-·+·+
		RV	-	-	-	·-·+·	+	-·+·+

1. 前増菌培養は緩衝ペプトン水(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O加)で実施
2. TTはテトラチオネート、RVはラパポート・バシリアディスを示す
3. LIMの判定で+はリジン脱炭酸試験陽性、-は陰性を示す
4. SIMの判定は「硫化水素産生・インドール・運動性・IPA」の順に判定結果を示す
5. TSIの判定は「斜面部(白糖の分解)・硫化水素産生・ガス産生」の順に判定結果を示す

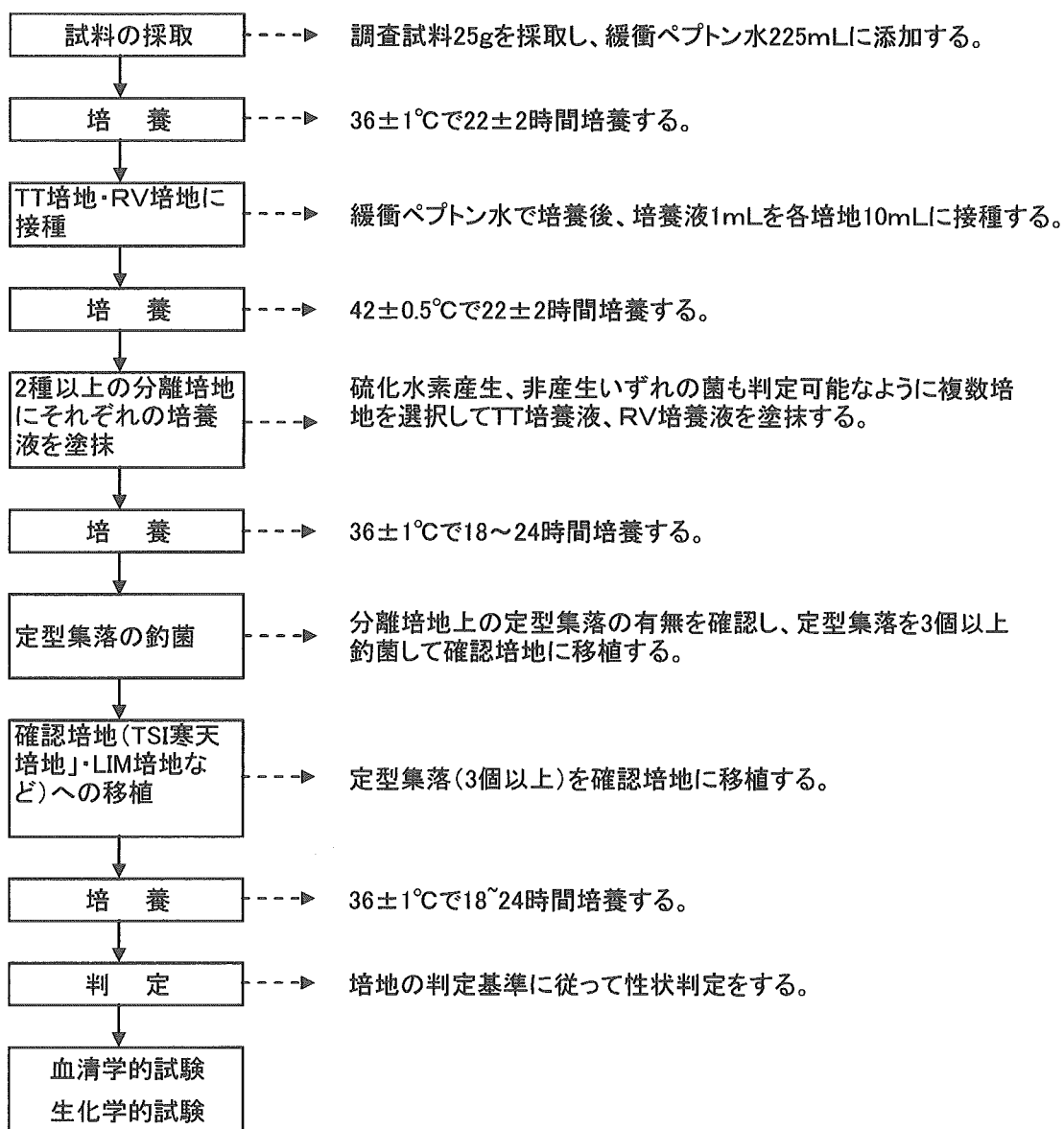


図1. 液卵のサルモネラ属菌検査手順(公定法)

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品衛生検査精度管理調査における適正調査試料作製と  
質向上に関する調査研究（その 3）

ー貝毒検査の外部制度管理用適正調査試料の作製と信頼性確保に関する研究ー

主任研究者 遠藤 明 (財) 食品薬品安全センター 理事長  
分担研究者 大島 赴夫 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 部長  
協力研究者 川崎 勝 (財) 食品薬品安全センター秦野研究所 研究員  
研究指導者 町井 研士 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部第 2 室室長

研究要旨

下痢性貝毒調査用試料として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸をホタテホモジネートに添付する方法を検討しているが、吸着オカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧された。また、外部精度管理調査を多数の検査施設に対して行う上で、生鮮海産物ホモジネートサンプルの大量かつ長期保管方法の早期確立が望まれていた。そこで、今年度の検討課題として①蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の濾紙中の定量法の確立を行う。②濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温条件で調査する。③ホタテ中腸腺及び剥き身ホモジネートの長期保存サンプルについて精度管理調査用サンプルとして使用可能かどうかの検討を加えた。オカダ酸の濾紙中の定量は ADAM 試薬による蛍光誘導体化により HPLC により測定可能になったが、その検討過程で測定結果がやや変動する傾向が観察された。その要因として、HPLC の平衡待ち時間、吸着濾紙の種類、メンブランフィルターの種類等が明らかになった。オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の 3 条件について比較検討した。今回の実験では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の 1/4 で行い、オカダ酸はどの条件でも経時的に緩徐に減少することが明らかになった。冷蔵及び冷凍条件下では 3 週間程度なら比較的安定であることが明らかになり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆された。しかし、今回濾紙に吸着したオカダ酸の回収率の経時的低下傾向が観察されたので、今後はオカダ酸の分解或いは抽出基材への吸着等も考慮に入れて精度管理用リファレンスマテリアルの作成を検討しなければならないことが明らかとなった。生鮮海産物ホモジネートの長期保管に関しての予備的検討は、昨年調製し -70℃ で保管したほたて剥き身及び中腸腺ホモジネートをつき下痢性貝毒試験を行った。剥き身は毒性が無く一応精度管理用サンプルとして適する事が判明した。一方、中腸腺のサンプルについては 1 年経過後下痢性貝毒試験

で毒性が観察されたので、其の儘では外部精度管理調査用検体として使用が不適切であったが、水で希釈することにより使用可能となった。長期保存サンプルは目下検査機関に配布して問題点を検討する予定である。今後は更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS 等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

## A. 研究目的

食品衛生外部精度管理調査は現在、理化学的検査調査として、食品添加物、重金属、残留農薬、残留動物用医薬品が行われ、細菌学的検査調査として一般細菌数、細菌同定について行われている。

一方貝毒検査については外部精度管理調査が実施されていない。貝毒検査については、食品マトリックスが生鮮海産物のため、大量入手、保管等に特別な注意が必要で、さらに、指標とするアッセイが動物実験を用いているために煩雑な予備検討が予想された。国内では麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査については国立医薬品食品衛生研究所の町井研士博士が対 EU 輸出ホタテ検査機関に対して小規模に実施している。そこで、町井博士のご厚意により国立医薬品食品衛生試験所で実施している麻痺性貝毒と下痢性貝毒の外部精度管理調査に必要な作業及び手技の一連の行程を見学し、特に作業が複雑で組織的に実施する上で問題点が多いと考えられた下痢性貝毒試料の作成から始める事とした。

下痢性貝毒の主要原因物質としてオカダ酸が挙げられる。外部精度管理用のリファレンスマテリアル作製は、市販のオカダ酸を毒性が出ると予想される濃度で、陰性サンプルに添加する事を考えた。オカダ酸をサンプルに添加する方法は、下痢性貝毒検査試料として安定して供給できるよう、サンプルと混和せずオカダ酸を別に添付して、調査時に各検査施設がそれを陰性サンプル

に添加して、検査を行う方法が現状では最適であると考え、ダラム管または濾紙ディスクに吸着させて添付する方法を検討した。今までの検討で濾紙ディスク法が、簡便で検査資料として優れている事が示唆された。添加量としては、剥き身 125g 中に 80  $\mu$ g、中腸腺 25g 中に 40  $\mu$ g で概ね良好な結果が得られた。そこで、濾紙ディスク中でのオカダ酸の長期安定性が確認できれば、毒性のあるサンプルを海産試料と別に少ない容積で保管でき、今後のリファレンスマテリアル作成の効率化に大きく寄与するものと思われる。また、外部精度管理調査を行う上で、生鮮海産物ホモジネートサンプルの大量かつ長期にわたる保存は不可欠であり、その保存方法の確立の必要性があった。そこで今年度の検討課題として①蛍光 HPLC 法による濾紙中のオカダ酸の測定法の確立を行う。②濾紙中に吸着させたオカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の 3 条件について 3 ヶ月間追跡調査する。③ホタテ中腸腺ホモジネート及び剥き身ホモジネートの長期（1 年）冷凍保存サンプルについて下痢性貝毒試験を行い、精度管理調査用サンプルとして使用可能かどうかの基礎的調査を行った。

## B. 研究方法

### 1) 下痢性貝毒検査調査

下痢性貝毒については公定法の安元パイオアッセイ法 1～2)を用いて予め陰性を確認した試料に、24 時間以内での致死量の和

光純薬製オカダ酸標準品をサンプル管ビン底に附着又は、濾紙ディスクに吸着後サンプル管ビンに密封した、それを予め凍結してある陰性試料中に挿入し冷凍保存した。陽性サンプルと陰性サンプルの相違は管ビンに附着したオカダ酸の有無ないし濾紙ディスクに吸着したオカダ酸の有無による。従って各検査施設は抽出に先立ちサンプル管ビン法では、ビンに附着したオカダ酸を溶剤で抽出し試料に添加する工程が必要になり、一方濾紙ディスク法では、サンプル管ビンより濾紙ディスクを取り出して試料に加える操作が必要になる。作製した中の一定数の陽性サンプルと陰性サンプルをマウスアッセイにより定性後各検査施設に冷凍輸送する。

## 2) 濾紙吸着オカダ酸の蛍光 HPLC によるオカダ酸の測定

### 2-a) 試薬

蛍光化試薬：フナコシ製 9-anthryl diazometane (ADAM) 試薬を用いた。反応用に 0.1% ADAM MeOH 溶液を調製した。溶剤：アセトンとはワコー純薬製の試薬特級品を用いた。MeOH、MeCN、はワコー純薬製 HPLC グレードを用いた。CHCl<sub>3</sub> 5000 はワコー純薬製を用いた。

オカダ酸標準品：Okadaic acid はワコー純薬製の生化学用試薬を用いた。

内部標準物質：docosanoic acid (C10:0) は GL サイエンス社製を用い 10 μg/mL の濃度になるように CHCl<sub>3</sub> に溶解した。

2-b) オカダ酸吸着濾紙ディスクの作成オカダ酸標準品をアセトンに溶解し、Φ 13mm の whatman AA disc 又は東洋濾紙製抗生物質検定用ペーパーディスク厚手 8mm に各添加濃度になるよう添加量を調製して添着後風乾した。オカダ酸吸着濾紙ディスクは 1.5 mL 容遮光サンプル管に密封保管した。

### 2-c) 濾紙中のオカダ酸の抽出

濾紙に吸着させたオカダ酸の測定は、濾紙を 2 mL のアセトンに浸漬して 2 min 超音波抽出を行い、抽出液をエキクロディスク 13CR (0.45 μm) で加圧濾過する。同じ操作を 3 回繰り返し 3 回分の濾液を合し、窒素気流下濃縮乾涸して ADAM 化の試料とする (Schema 1)

### 2-d) 蛍光(ADAM)誘導体化

蛍光誘導体用の OA 画分を濃縮乾涸した後、最小量のアセトンでバイヤルへ移行後内部標準物質 100 μL を加えて窒素気流中で乾涸する。残渣に ADAM 試薬 100 μL を添加し、常温、遮光下で 1 時間反応して HPLC 用のサンプルとした (Scheme 2)。

### 2-e) 機器類

ポンプ：東洋曹達工業製 CCPM グラジェントポンプと CCP 用コントローラを使用した。

カラム：野村化学社製 Deverosil ODS-5 (250 mm X 4.6 mm ID) を用いた。

移動相：A (MeCN-MeOH-H<sub>2</sub>O, 8:1:1,v/v/v) と B (MeOH)。溶出条件は流速 1.1 mL/min で室温下グラジェント溶出を行った。グラジェント条件は 100% A を 15 分保持した、その後 55 分に B が 100% になるよう溶出し、90 分まで 100% B を保持した。

検出機：東洋曹達工業製の FS-8000 蛍光検出機を用い、Em 412, Ex 365 で検出した。

レコーダー：東洋曹達工業製の Chromatocorder 21 を用い、ATT 4, chart speed 0.2 cm/min で記録した。

定量：サンプル注入量；20 μL, ピークの帰属は IS による保持時間の補正後、標準品との直接比較により行った。定量計算は IS で補正後ピーク高法により行い、検量線は最小二乗法により行った。

### 3) オカダ酸測定に於ける最適平衡待ち時間の決定

2-e) のグラジエント溶出終了後の平衡待ち時間を 1 min, 2 min, 5 min, 10min, 15 min と変化させて、同一のオカダ酸 ADAM 誘導体溶液で測定し、ピーク高及びピーク形状を比較した。

#### 4) メンブランフィルターの比較。

非水系(有機系)フィルター：日本ポール株式会社製エキクロディスク 13CR 0.45  $\mu\text{m}$ 、水系/非水兼用フィルター：GL サイエンス社製クロマトディスク) 13P 0.45  $\mu\text{m}$  を用いた。オカダ酸 5  $\mu\text{g}$  を 50  $\mu\text{L}$  のアセトンに溶解し、ワットマン AA ディスクに添着後風乾し、2 b に従ってアセトン抽出を行い各フィルターで濾過して蛍光誘導体化後 Flu-HPLC で測定を行った。ピーク高の測定データを内部標準法で補正後オカダ酸の回収率を  $n=5$  で求める。各データを JUSE-QCUS により統計処理を行い箱髭図を比較する。

#### 5) オカダ酸の whatman AA disc 又は東洋濾紙製抗生物質検定用ペーパーディスクの回収率の比較。

濾紙：whatman 社製 AA DISCS 13mm, 東洋濾紙製ペーパーディスク抗生物質検定用 厚手 8 mm を用いた。オカダ酸 5  $\mu\text{g}$  を 50  $\mu\text{L}$  のアセトンに溶解し、各ディスクに添着後風乾し、2 b に従ってアセトン抽出を行いエキクロディスクで濾過して蛍光誘導体化後 Flu-HPLC で測定を行った。ピーク高の測定データを内部標準法で補正してオカダ酸の回収率を  $n=5$  で求めた。各データを JUSE-QCUS により統計処理を行い箱髭図を比較する。

#### 6) 冷凍、冷蔵及び室温条件下での濾紙中のオカダ酸の回収率の経時変化

オカダ酸吸着濾紙の調製：今回の実験では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の 1/4 で行った。オカダ酸 10  $\mu\text{g}$  を 50  $\mu\text{L}$  のアセトンに溶解し、各ディスクに添着後風乾した。1.5 mL 容

遮光サンプル管ビンに保管した。オカダ酸吸着濾紙を経時的にアセトンで抽出して、ADAM 試薬により蛍光誘導体化を行い、Flu-HPLC により測定して回収率を求めた ( $n=5$ )。

温度条件：冷凍(-35  $^{\circ}\text{C}$ )、冷蔵(5  $^{\circ}\text{C}$ )、室温の3条件について3ヶ月追跡調査した。

測定間隔：回収率の測定頻度は1ヶ月までは0日、1週、2週、3週、4週、1ヶ月と2ヶ月間は6週と8週に行いそして最後に3ヶ月を測定した。

測定データの解析：各データを JUSE-QCUS により統計処理を行い箱髭図を比較する。

#### 7) ほたて：ホモジネートサンプルの長期(1年)冷凍保存の予備検討

剥き身：下痢性貝毒試験法により陰性確認済みのホタテ剥き身を1年間-75 $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。ホタテ剥き身ホモジネート 125g を解凍後、下痢性貝毒試験を行って毒性を調査した。

中腸腺：下痢性貝毒試験法により陰性を確認済みで1年間-75 $^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存したホタテ中腸腺ホモジネート 25g を解凍後、下痢性貝毒試験行って毒性を調査した。

中腸腺：希釈サンプルの調製：冷凍ホタテ中腸腺ホモジネート 25g を解凍後倍量の水を加え良く攪拌後希釈ホモジネートを 25g ずつ分注して凍結した。下痢性貝毒試験は解凍後に実施した。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1) 下痢性貝毒検査調査の概略

下痢性貝毒の陽性サンプルの作成は公定法の安元バイオアッセイ法 1~2) を用いて陰性を予め確認後、凍結保存してある陰性ホタテホモジネート試料に、毒性が出ると予想される濃度の市販のオカダ酸の標準品を別添する。添加法としてはオカダ酸をサンプル管ビンに附着させる方法と濾紙ディ

スクに吸着させる方法の 2 つの添加法が考えられるが、昨年までの検討により、現在は濾紙ディスク法を採用している。濾紙ディスク法は、一定量のオカダ酸アセトン溶液を濾紙ディスクに添着後風乾してサンプル管ビン中に密栓する。陰性サンプルは濾紙ディスクをそのまま用いる。各検査施設は検査に先立ち濾紙ディスクをサンプル管ビンより取り出し試料に加える操作が必要になる。陽性サンプルと陰性サンプルは、マウスアッセイで毒性の有無を確認後各検査施設に冷凍輸送する。確認試験の結果如何によりオカダ酸の量を適宜加減することもある。

現在問題となることが予想される下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性があり、また、陰性サンプルを長期冷凍保存するとマウスアッセイ変動の要因となることが危惧される。そこでそれらの問題を解決するために、今年度の検討課題として①蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の測定法の確立を行い、濾紙に吸着させたオカダ酸の定量法の確立を行う。②濾紙中に吸着させたオカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の 3 条件について 3 ヶ月追跡調査する。③ホタテ中腸腺ホモジネート及び剥き身ホモジネートの長期（1 年）冷凍保存サンプルについて精度管理調査用サンプルとして適切かどうか検討を加える。

## 2) 濾紙吸着オカダ酸の ADAM 化蛍光 HPLC による測定

### 2-1) 蛍光 HPLC によるオカダ酸の測定法の確立

蛍光 HPLC によるオカダ酸の測定は LEE 3) 等の方法を一部変更した。測定機器を脂肪酸測定と共用するために、測定機器、カラム、溶離液、検出波長等の諸条件は全く同一設定にした。蛍光誘導体化はオカダ酸

画分を濃縮乾涸後内部標準物質 100  $\mu$ L を加えて窒素気流中で乾涸し、ADAM 試薬 MeOH 溶液 100  $\mu$ L を添加し、常温、遮光下で 3 時間反応して HPLC 用のサンプルとした。測定結果はデカン酸による内部標準法で補正した。その結果 100ng ~ 50  $\mu$ g/mL の範囲で良好な直線性が得られた。

### 2-2) 濾紙吸着オカダ酸の測定

濾紙に吸着させたオカダ酸の測定は、濾紙を 2 mL のアセトンに浸漬して 2 min 超音波抽出を行い、抽出液をエキクロディスク 13CR (0.45  $\mu$ m) で加圧濾過する。同じ操作を 3 回繰り返して 3 回分の濾液を合し、窒素気流下濃縮乾涸して ADAM 化の試料とした。以上より濾紙ディスク中の吸着オカダ酸の測定は確立した。

測定法を検討する過程でオカダ酸の回収率に往々変動が観察された。その変動の原因に関して、①平衡待ち時間、②メンブランフィルター、③吸着濾紙の種類に関して若干の知見が得られた。

### 3) オカダ酸測定に於ける最適平衡待ち時間の決定

Fig.1 に示す通り平衡待ち時間を変化させるとピーク高が変化し、測定値に大きな誤差を生じる事が危惧されたが、5 min ~ 15 min にはピーク高が一定になる事が明らかになった。そこで安定したピーク高を得るために、平衡待ち時間を 10 min とした。

### 4) メンブランフィルタの比較

超音波抽出時に濾紙片が一部抽出液中に溶け出し白濁傾向が観察されたので、メンブランフィルターによる濾過を試みた。メンブランフィルターについては溶出液がアセトンであり、その溶剤の極性を考慮に入れて、非水系（有機系）のフィルター（エキクロディスク）と水系/非水兼用フィルター（クロマトディスク）を検討した。その結果、Fig. 2 に示す通り非水系のフィルターの方が良好な回収率を示しバラツキも少ない事

が判明した。そこで今回は非水系のエキクロディスクを精製に用いた。

#### 5) オカダ酸の濾紙ディスクによる回収率の比較

オカダ酸を吸着させる濾紙ディスクについてワットマン社製と東洋濾紙製の検討を加えた。Fig.3 に示す通り明らかにワットマン社製の濾紙ディスクの方が、回収率が良くバラツキが少ない事が明らかとなった。以上をまとめるとオカダ酸測定上のバラツキの要因として、HPLC の平衡待ち時間、吸着濾紙の種類、精製時に用いるメンブランフィルターの種類等が今回の実験で示唆された。このように ADAM 試薬による蛍光誘導体化法には誤差を生じやすい要因が存在するが、測定には細心の注意を払って測定すれば、再現性の良い測定が可能であることが判明した。

#### 6) 濾紙に吸着したオカダ酸の冷凍、冷蔵、室温条件での回収率の経時変化について

下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中等に本来の力価が失われる可能性が危惧されている。そこで濾紙中に吸着させたオカダ酸の回収率の低下が観察されるかどうか確認するために、経時的に調査する事にした。濾紙吸着オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍(-35 °C)、冷蔵(5 °C)、室温の3条件について3ヶ月追跡調査した。濾紙吸着オカダ酸をアセトンで抽出して、ADAM 試薬により蛍光誘導体化を行い、Flu-HPLC により測定して回収率を求めた (n=5)。回収率の測定頻度は1ヶ月までは毎週、1ヶ月と2ヶ月間は隔週に行いそして最後に3ヶ月を測定した。今回の実験では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の1/4で行った。結果は Fig. 4 ~ Fig. 6 に示した。グラフは縦軸に回収率、横軸に時系列を示し、n=5 の回収率は箱髭図で示した。Fig.

4 ~ Fig. 6 に示した通り、オカダ酸はどの条件でも経時的に緩徐に減少することが明らかになった。冷蔵及び冷凍条件下では3週間程度なら比較的安定であることが明らかになり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆された。現在のところ安定な期間が3週間程度と短いため、更に安定に供給できるよう今後更に改良を加える必要が生じた。オカダ酸回収率の減少の原因として現在、熱によるオカダ酸の分解、濾紙による吸着性の増加等が考えられるが更に検討を要す。また、今回回収率の減少は同一期間内のバラツキが大きい結果となった。また、常温保存では約3週間回収率が50%程度維持された。昨年までの調査でLD50が192 µg/kgであるオカダ酸の添加濃度は、40 µgを予想した。中腸腺では40 µgで毒性を発現する結果となったが、剥き身のサンプルでは40 µg添加時には毒性が発現する時としない時があった。この理由については剥き身のサンプルではエーテル分配の行程が余分に入る事も考えられるが、今回経時的に濾紙に吸着したオカダ酸の回収率の低下傾向が観察されたので、今後はオカダ酸の分解或いは抽出基材への吸着等も考慮に入れる事が示唆される結果となった。今後の外部精度管理調査ではオカダ酸の添加量を多めに設定する必要性が示唆された。更に昨年度までの検討で、オカダ酸の添加方法として従来サンプル管ビンに一定量附着させて添加する方法よりも、オカダ酸を濾紙ディスクに吸着させ、その濾紙ディスクをアッセイ時にホモジネートに添加する方法がより適切であるとの結論に達していた。濾紙ディスク法の利点は、各検査施設でのオカダ酸の添加は濾紙ディスクをサンプル管ビンより取り出し、ホモジネートサンプルに加える丈という簡便な操作で、サンプル管法のような抽出操作が不要であり、実際に行われている貝毒検査に近い



点である。しかし今回の実験で濾紙中の吸着オカダ酸が減少傾向が観察されたので、オカダ酸のより安定な保存方法の確立と、新しい吸着基材の検討も考慮に入れる必要性が生じた。

#### 7) ほたてホモジネートサンプルの長期（1年）冷凍保存の予備検討

外部精度管理調査を行う上で、貝のホモジネートサンプルの大量かつ長期にわたる保存は不可欠であり、その保存方法の確立の必要性があった。そこで今年度は長期保管に関して予備的に検討するために、昨年調製したほたて剥き身ホモジネートとほたて中腸腺ホモジネートを  $-70^{\circ}\text{C}$  で一年保管しマウスアッセイを行い精度管理用サンプルとして適するかどうか検討を加えることにした。その結果、ほたて剥き身ホモジネートはマウスアッセイで陰性であったが、ほたて中腸腺ホモジネートは陽性であった。そこで中腸腺ホモジネートに水を等量加え攪拌後再度マウスアッセイを行ったところ陰性であった。

剥き身に関しては  $-70^{\circ}\text{C}$  に保管すれば、1年間は精度管理用サンプルとして適する事が判明した。これについては今後さらに継続検討する予定である。一方中腸腺のサンプルについては1年経過後、其の儘では外部精度管理調査用検体として使用が不適切であったが、水で希釈することにより使用可能となった。中腸腺ホモジネートサンプルについては今後陽性化の原因追及と陽性化サンプルを希釈することの是非について目下検討中である。

#### 8) 試験機関への試料の配布テストについて

今年度は、ほたて剥き身ホモジネートほたて中腸腺ホモジネート1年保管サンプルについて、オカダ酸吸着濾紙ディスクを添付した方法での配布を目下検討中である。

## E. 結論

現在問題となることが予想される下痢性貝毒調査用試料の検討課題として、濾紙ディスクに吸着させたオカダ酸が保存中、輸送中、精製操作中に本来の力価が失われる可能性があり、また、陰性サンプルを長期冷凍保存するとマウスアッセイ変動の要因となることが危惧される。そこでそれらの問題を確認して解決するために、今年度の検討課題として①蛍光 HPLC 法によるオカダ酸の測定法の確立を行い、濾紙に吸着させたオカダ酸の定量法の確立を行う。②濾紙中に吸着させたオカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の3条件について3ヶ月追跡調査する。③ホタテ中腸腺ホモジネート及び剥き身ホモジネートの長期（1年）冷凍保存サンプルについて精度管理調査用サンプルとして適切かどうか検討を加えることにした。オカダ酸は ADAM 試薬による蛍光誘導体化による HPLC 分析により確立されたが、条件検討中に測定のパラツキが観察された。オカダ酸測定上のパラツキの要因として、HPLC の平衡待ち時間、吸着濾紙の種類、精製時に用いるメンブランフィルターの種類等が今回の実験で示唆された。再現性の良い測定データを得るためには、これらの点に関して細心の注意を払って測定する必要性があった。オカダ酸の回収率の経時変化を冷凍、冷蔵、室温の3条件について比較検討した。今回の実験では結果をより早くモニターするために、実際予定される添加量の1/4で行った事も原因の一つに挙げられるが、オカダ酸はどの条件でも経時的に緩徐に減少することが明らかになった。冷蔵及び冷凍条件下では3週間程度なら比較的安定であることが明らかになり、外部精度管理用サンプルとして使用の可能性が示唆された。現在のところ安定な期間が3週間程度と短いので、更に安定に供給できるよう今後更に改良を加える

必要が生じた。また、今回経時的に濾紙に吸着したオカダ酸の回収率の低下傾向が観察されたので、今後はオカダ酸の分解或いは抽出基材への吸着等も考慮に入れて精度管理用リファレンスマテリアルを作成しなければならない結果となった。外部精度管理調査を行う上で、生鮮海産物のホモジネートサンプルの大量かつ長期にわたる保存は不可欠であり、その保存方法の確立の必要性があった。そこで今年度は長期保管に関して予備的に検討するために、昨年調製したほたて剥き身ホモジネートとほたて中腸腺ホモジネートを  $-70^{\circ}\text{C}$  で一年保管しマウスアッセイを行い精度管理用サンプルとして適するかどうか検討を加えることにした。剥き身に関しては  $-70^{\circ}\text{C}$  に保管すれば、1年間は精度管理用サンプルとして適する事が判明した。これについては今後さらに長期にわたり継続検討する必要がある。一方、中腸腺のサンプルについては1年経過後下痢性貝毒試験で毒性が観察されたので、其の儘では外部精度管理調査用検体として使用が不適切であったが、水で希釈することにより使用可能となった。これらの長期保存サンプルのついでには、試験的にサンプルを試験機関に配布し問題点を更に確認するよう目下検討中である。また貝毒検査全体について云える事であるが、海産生鮮食品マトリックス独特の不可解な要素の存在を払拭しきれず、今後更にリファレンスマテリアル作成には難航が予想されるが、検討を充分に加えることにより解決するものと思はれる。更に、毒性の評価をより正確に行うために、LC-MS 等による活性成分の多成分同時分析法を導入することも不可欠である。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

○川崎 勝、大島 赴夫、山本 茂貴、伊藤 嘉典、町井 研士

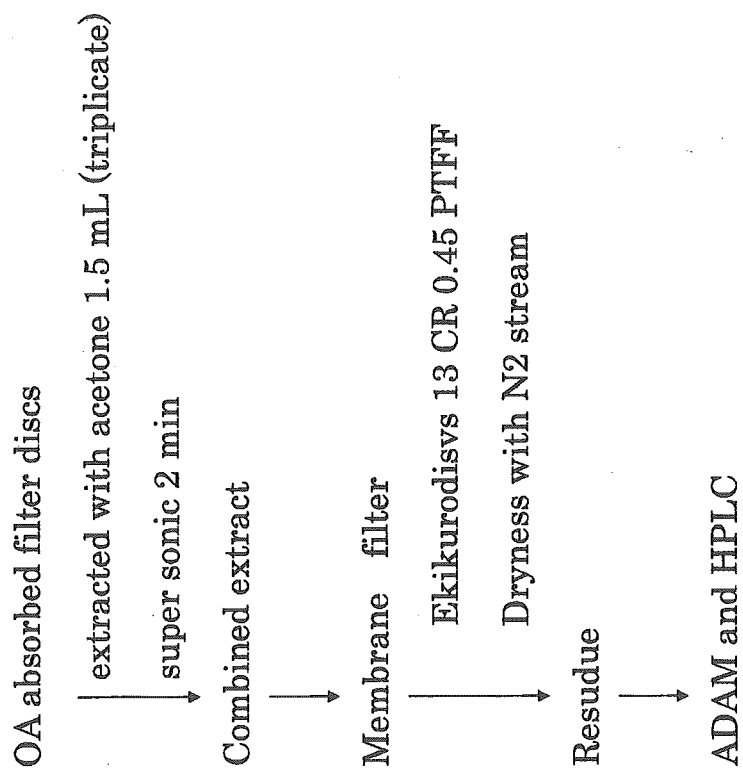
Basic research on development of scallop tissue reference material for diarrhetic shellfish poisoning (DSP) in quality assurance

環太平洋化学会議、2005、ホノルル

#### H. 知的所有権の取得状況

なし

## Scheme 1 Recovery of OA



## Scheme 2 Method of ADAM derivative

sample solution

add 100  $\mu$ L IS solution

(10 $\mu$ g/ml of decanoic acid in  $\text{CHCl}_3$ )

dryness with  $\text{N}_2$  gas

add ADAM (9-anthryl diazomethane) solution

(0.1 % ADAM in MeOH solution).

Dark, room temp  
↓  
3h

HPLC sample, 20 $\mu$ L Inject