

OAの各種保存条件の検討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の濃度で行った。保存方法は試料の状態としては①遮光スクリーバイアル中にアセトン溶液で密栓、②遮光スクリーバイアルの底に吸着風乾させる方法を、温度条件としては①冷凍(-35℃)、②冷蔵(5℃)、③室温(夏季)の3条件について追跡調査した。以上、保存方法と温度条件の組み合わせを変えて6種の保存条件につきOAの回収率を経時的に追跡した。

OAの温度に対する安定性の調査では加熱試験を行った。加熱試験は50℃～200℃の温度範囲で48時間以内過熱したときの回収率を調査した。

2) OAの各種保存による回収率

OAの各種保存による回収率の結果は図1～図2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。

図2-1～図3-3に示した通り、遮光バイアルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイアルに吸着したOAは当初の予想に反し冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも24週安定であることが明らかとなり、現在更に長期に亘り観察中である。60週経過後の試料はHPLCレベルでは10%程度の減少傾向を示すが、マウスアッセイでは陽性を示した。因みにバイアル室温及び冷凍、アセトン溶液冷凍が3匹中2匹死亡(陽性)であるが、他は3/3死亡した。やや活性の低下傾向が観察されるも60週の長期にわたり力価が残存することが明らかになった。以上より実際に使用を予定している冷凍条件のみならずどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。今後安定してOA標準品を長期保存するための基礎的な検討を更に

加える予定である。

3) OAの加熱試験の結果

OAの加熱試験の結果は図4と図5に示したが、熱処理に対しても想像以上に安定であることが判明した。図4に示した通り50℃では48時間安定で、100℃では経時的に回収率が減少し48時間後には30%程度まで減少した。またグラフより100℃加熱時に半減期が24時間であることが推定された。120℃では8時間で30%以下に回収率が減少し、150℃および200℃では1時間の加熱処理で回収率が0%であることが判明した。この事実より120℃を超える加熱処理で急激に回収率が低下することが観察されたので、は加熱時間を1時間に固定して、温度を100℃～150℃に可変させた(図5)。そのときの回収率は、シグモイド曲線状に減少が観察され、OAの半減期は1時間加熱で120℃～130℃であり、150℃で完全に分解する事が推定された。OAは120℃以上の加熱処理により急激に回収率の低下を招くが、通常の外部精度管理に於ける輸送、分析操作で負荷されると予想される程度の熱に対しては安定である事が明らかとなった。

4) 超音波、マイクロウェーブ、UVによるOAの暴露

OAが実験中に暴露されると想定される一般的処理として、超音波、マイクロウェーブ、UVが挙げられる。

超音波処理は試料の溶解等に一般的に用いる処理である。そこで最大暴露時間として60 min程度を想定した。

マイクロウェーブ処理は、線源として家庭用電子レンジを用いる場合が多いので、15 min程度を想定した。

UV照射は、クリーンベンチ内へ置き忘れ等を想定して、6hと24hを検討した。以上の暴露

条件ではOAの回収率は微減傾向を示すものの比較的安定であることが示唆された(図6)。

5) 下痢性貝毒検査外部精度管理用試料大量作製法の検討および検査件数が多い7機関への実試料配布と検査結果の検討

5-1) 貝の細切物(貝ホモジネート)作製及び配布用袋への充填

当初、実際の精度管理用試料配布に向けた大量の試料作製法の予備検討として、青森県内のホタテ処理業者より、貝柱を除去した残りの部位を取り寄せ、良く洗浄したものを、手動式の小型挽肉器を用い、貝の身の細切を試みたが、今年度は、導入が容易であることを考慮し、100 V電源を使用する電動式のミンチ機〔株)なんつね:MS-12B〕を使用した。その結果、細切は十分なされており、精度管理用試料ホモジネートとして問題はなく、また、半解凍状態の貝材料を短時間にミンチに出来る事により低温が保たれるため、試料の質を損なうことがなく、効率的にも実用的で、満足できるものである事が確認できた。

更に、ホモジネートを配布用の袋に分注充填する作業においても、従来は、計量器の上に袋を置き、ひしゃく状の物を用いて、ホモジネートを流し入れ、重量計測をしていたが、袋の口が汚れるためにヒートシールが不十分になるなど、作業上不都合な点が多かったが、今年度は圧搾空気を動力源とする半流動動物用の充填機〔充填機本体; (株)荒畑製作所、ESM-DX/エアコンプレッサー; リョービ販売(株)、ACP-50〕の導入を試みた所、袋の口が汚れる問題は解消し、充填量の誤差も少なく、非常に効率良く充填作業を進めることが出来た。この充填機も100 V電源で運転できるものであるため、導入は容易で、実用上非常に有効である事が確認できた。

5-2) 下痢性貝毒検査件数の多い機関の試験室による同一ロット試料の性能調査(Table A)

試験協力各機関へは、陰性試料、陽性試料各1検体を、昨年度と同様に、陽性試料は、小径ろ紙(φ13 mm)に一定量のOAを含浸、乾燥させたものを小型バイアルビンに入れ、MBAにより下痢性貝毒陰性と判断できた貝ホモジネートと同梱し、また、陰性試料として、OAを含浸しないろ紙を上記陽性試料と同形態で同時に試験協力施設へ発送する方式を踏襲した。各試料は、送付機関ごとに乱数表を用いて陰性、及び陽性試料に試料番号を割り当てた。また、添加毒素量は、確実にマウスが死亡する量、即ち、120 gの貝ホモジネート(マウス6匹分の注射液ができる)当りOAを96 µgとした。試験結果の判定は、食品衛生検査指針に則り、20 g未満のマウス3匹に腹腔内注射の後24時間以内の死亡週が2匹以上陽性とするものとした。

その結果、協力7機関全てにおいて陰性、陽性の判断は正しく出された。陰性試料に関しては、全ての機関で3匹中全て生存し、陽性試料においては、5機関では3匹中3匹死亡、2機関では3匹中2匹死亡であった。死亡までの時間については、夜間に死亡した個体では死後硬直の具合などから推定した時間での回答を求めたため、詳細な考察は出来ないが、試料送付前の確認試験においては、2~5時間であったが、協力各機関からの回答では、1時間から22時間の範囲で広範にばらつきが見られ、同一機関でも大きくばらつく例が見られた。

以上のように、昨年度同様添加した毒素量は致死量に十分な量であったが、マウスの死亡状況に若干の差が認められた事から、毒素を含浸したろ紙から毒素が十分抽出されてい

ない可能性も考えられるため、試料の抽出方法の詳細な確認をする事、マウスへの毒素の注射法の実際についての聞き取り調査、或いは講習会などによる指導についても検討する事などの必要性が示唆された。また、アンケートへの回答で判明したが、通常は中腸腺を用いて試験をしている機関においては、試料の状況が異なり、通常使用している器具が使えないなどの戸惑いがあった事が伺われた。この事から、試料は大多数の機関で試験されている部位を用い、器具などをスケールアップせずに実施できるような量になるように配慮して精度管理調査を行なう必要性も考えられた。また、毒素の添加方法についても、ろ紙へ毒素を含浸する方法を見直し、新たな添加法（現在検討中）に移項し、抽出操作が確実に実施できる様、更に工夫を重ねる必要性も示唆された。

このほか、アンケートにより判明した点を示すと、1)本精度管理用試料は、試料の劣化を防ぐ目的で、各機関に到着後-70℃程度での保管を希望したが、-30℃冷凍庫しか所持していない機関もあった。しかし、その機関での試験は、試料到着後8日目で行われたが、結果に問題を認めなかった。

2)精度管理用調査用試料として今後配布される事になった場合の価格設定について解答を求めた所、5万円から10万円までの希望が出され、アンケート実施機関は少なかったが、10万円程度が価格の限界と考えられた。

3)麻痺性貝毒試料作製についての検討:近年、高い毒値を示す例が少なく、十分量の適切な毒値の試料が作製出来なかった。従って、次年度に元となる高毒値の試料の収集に努力する。

E. 結論

①遮光バイアルにアセトン溶液で密栓及び遮光バイアルに吸着したOAは冷凍、冷蔵、室温のどの条件でも6ヶ月間安定であることが明らかとなり、1年3ヶ月経過後のサンプルはHPLCレベルで微減傾向を示したが、マウスアッセイでは力価の残存が観察された。現在更に長期に亘り観察中である。

②昨年までの知見で濾紙に吸着したOAはどの条件でも回収率は経時的に緩徐に減少することが明らかであったが、冷蔵及び冷凍条件下では3週間比較的安定であった。

③以上より実際に使用を予定している冷凍条件はどの条件でも外部精度管理用サンプルとして使用可能である事が示唆された。

④OAの熱に対する耐性を検討するため、50℃について経時的に回収率を求めたところ、48時間安定であり、通常の分析及び輸送等に影響の無い事が示唆された。

⑤OAは120℃を境に急激に分解が始まる可能性が示唆された。そこで、OAの加熱時間を1時間に固定して、温度を100℃～150℃に変えさせ、回収率を求めると、回収率はシグモイド状に減少し、半減期は120℃～130℃と推定され、150℃では完全に分解する事が明らかとなった。

⑥今回加熱時間と加熱温度の相関に関する基礎的データが得られたので、加熱時間と分解の予測の可能性が示唆され、今後のリファレンスマテリアル作製に大きく寄与すると考えられる。

⑦小型挽肉器を導入し、貝の身の細切を試みた。従来用いていたフードプロセッサーに比し、細切されきれずに残る、残渣となるようなものが比較的少なく、効率良く、良好な細切物が得られた。また、この細切物は、この後の抽出

作業においても扱いやすく、特に問題が発生せず、実用上推奨されるものと判断された。

⑧下痢性貝毒検査の経験豊富な試験所の試験室による同一ロット試料の性能調査で、その結果、協力7機関全てにおいて陰性、陽性の判断は正しく出された。陰性試料に関しては、全ての機関で3匹中全て生存し、陽性試料においては、5機関では3匹中3匹死亡、2機関では3匹中2匹死亡であった。死亡までの時間については、夜間に死亡した個体では死後硬直の具合などから推定した時間での回答を求めたため、詳細な考察は出来ないが、試料送付前の確認試験においては、2～5時間であったが、協力各機関からの回答では、1時間から22時間の範囲で広範にばらつきが見られ、同一機関でも大きくばらつく例が見られた。

このことから、濾紙への毒素の含浸法の更なる検討、或いは新たな添加法の検討、また、別の観点からは、マウスへの毒素の注射法の実際についての聞き取り調査、或いは指導についても検討する必要性も考えられた。

今後は安定してOA含有試料を供給できる条件について更に検討を加える予定である。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。

文献

- 1) AOAC official methods of analysis (2000)
Natural toxins chapter 49, p59
- 2) 昭和56年5月19日 厚生省通知環乳第37号
- 3) J. S. Lee et. Al. Agric. Biol. Chem., 51 (2), 877 ~ 881, 1987

F. 健康危害情報
特になし

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
なし

【方法】

OAの抽出

OAを濾紙に添着

↓
アセトン1.5 mLで抽出
(3回)

超音波 2分
抽出液を合わせる

↓
ADAM 化後HPLC

ADAM 化

サンプル溶液

内部標準液100 μ L 添加

(10 μ g/ml デカン酸 CHCl_3 溶液)

N_2 気流下乾涸

ADAM (9-anthryl diazomethane) 溶液添加
(0.1 % ADAM メタノール溶液)。

↓
暗所室温

3時間

↓
HPLC 溶液, 20 μ L 注入

HPLC 条件

ポンプ:

CCPM gradient pump and CCP controller
(TOYO soda)。

カラム:

Deverosil ODS-5 (250 mm X 4.6 mm ID)

(Nomura pure chemical)。

移動相:

A (MeCN-MeOH-H₂O, 8:1:1, v/v/v), B (MeOH)。

溶出条件:

1.1 mL/min, room temperature

gradient:

100% A, 15 min; 100 %B, 55min; 100 % B, 90min.

検出器:

FS-8000 fluorescent (TOYO soda)、Em 412, Ex 365。

レコーダー:

Chromatocorder 21, ATT 4,

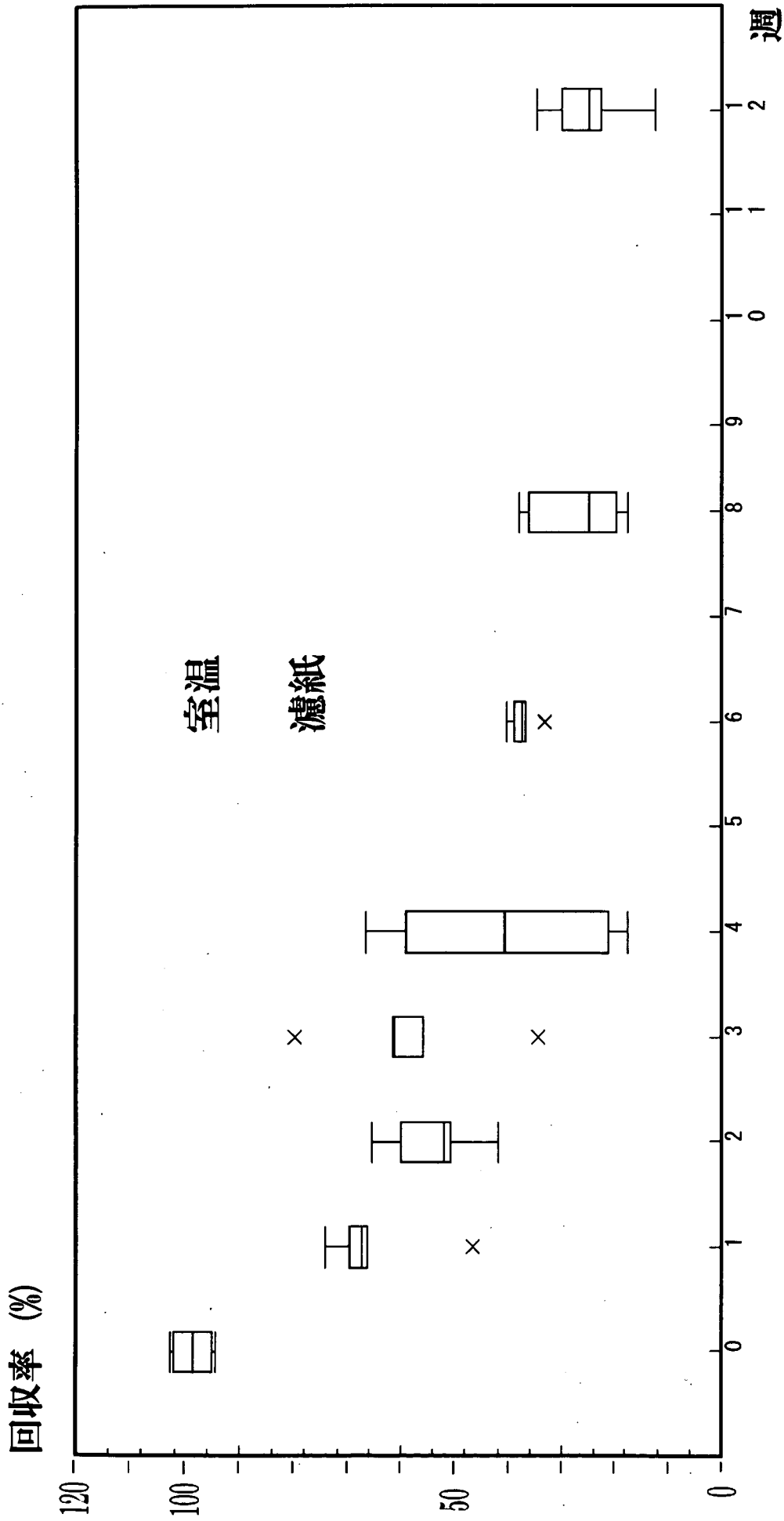


図1-1 濾紙からの00Aの回収率の経時変化 (室温)

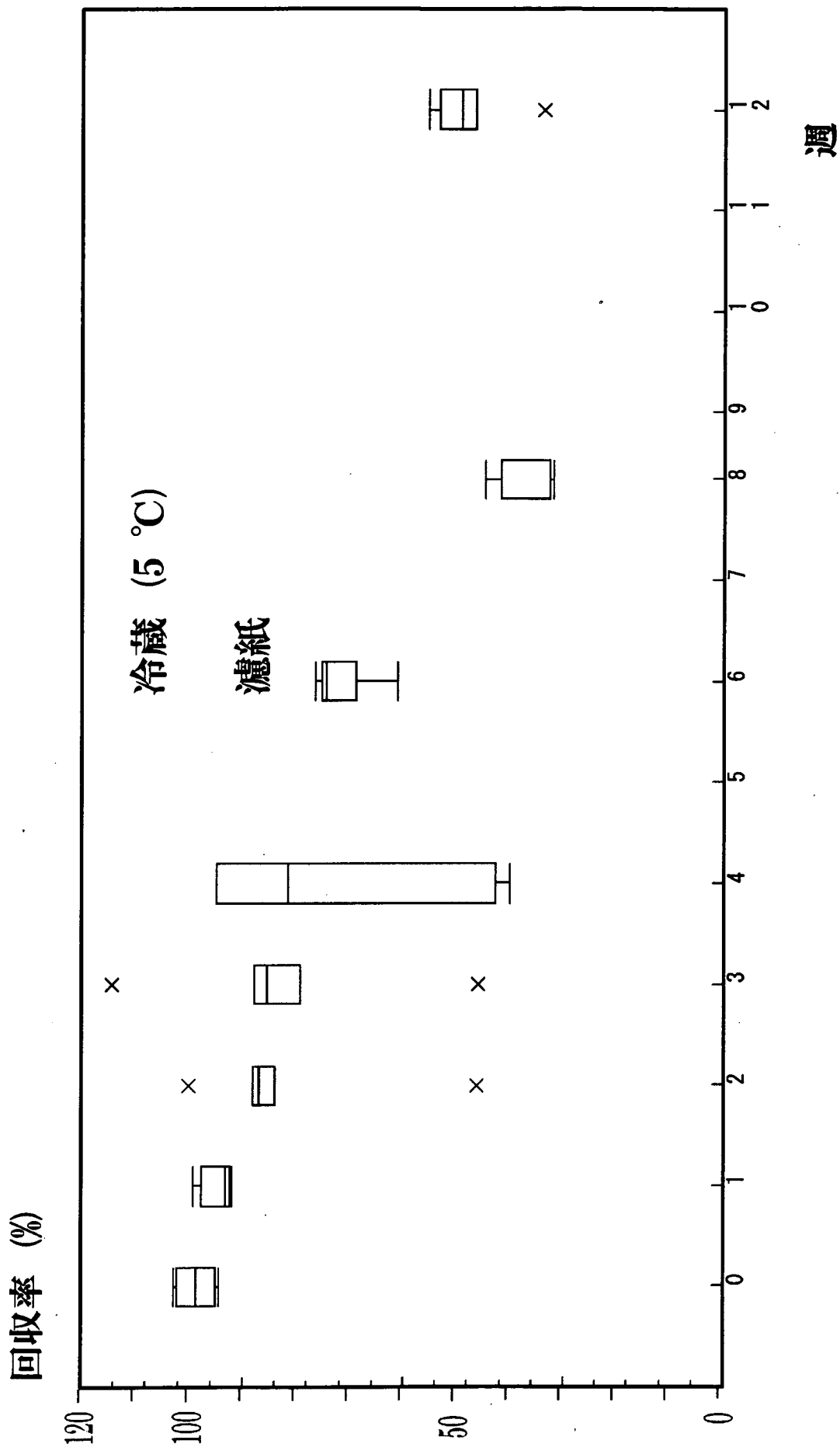


図1-2 濾紙からの00Aの回収率の経時変化 (冷蔵: 5 °C)

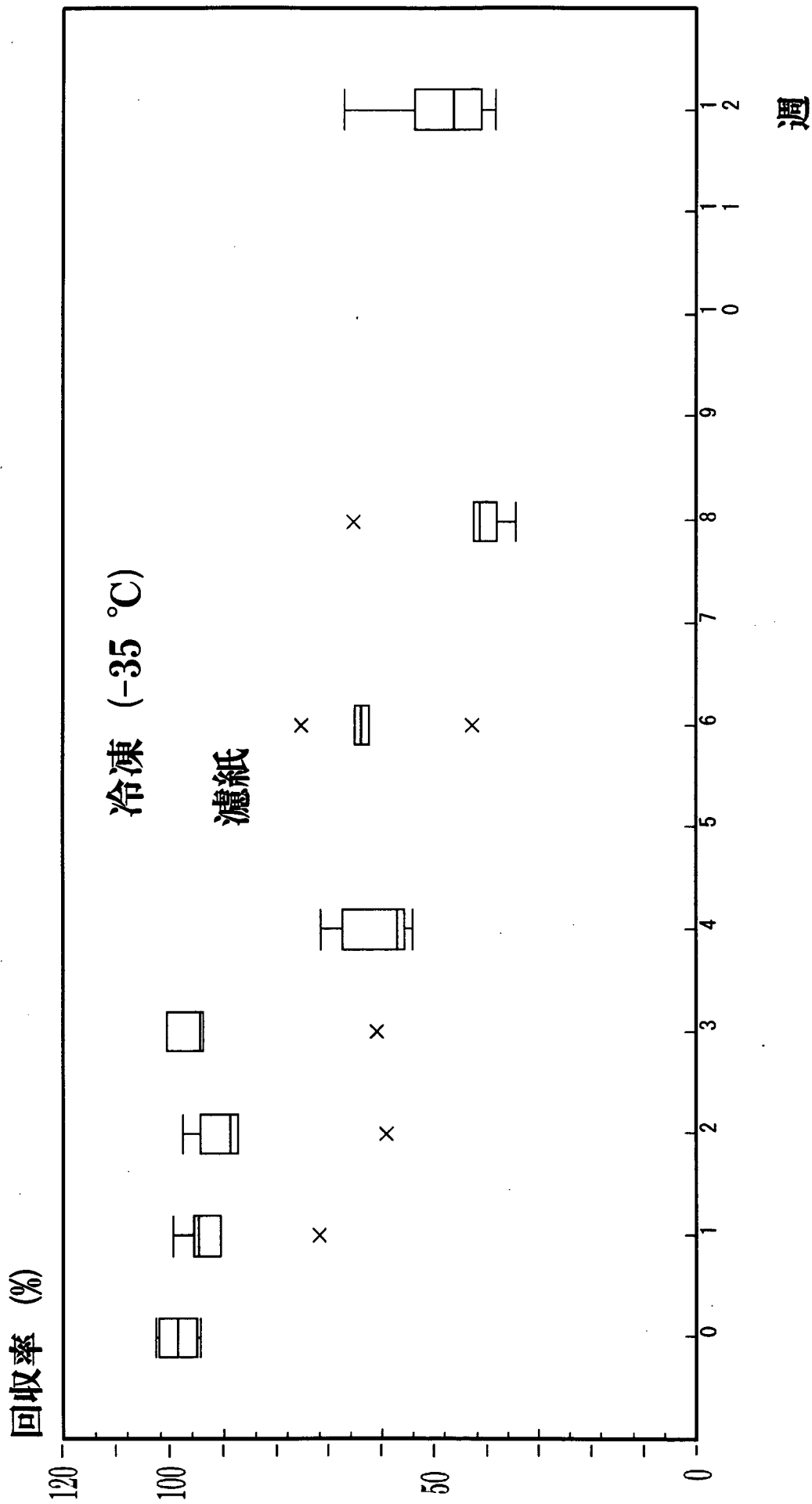


図1-3 濾紙からの00Aの回収率の経時変化 (冷凍: -35°C)

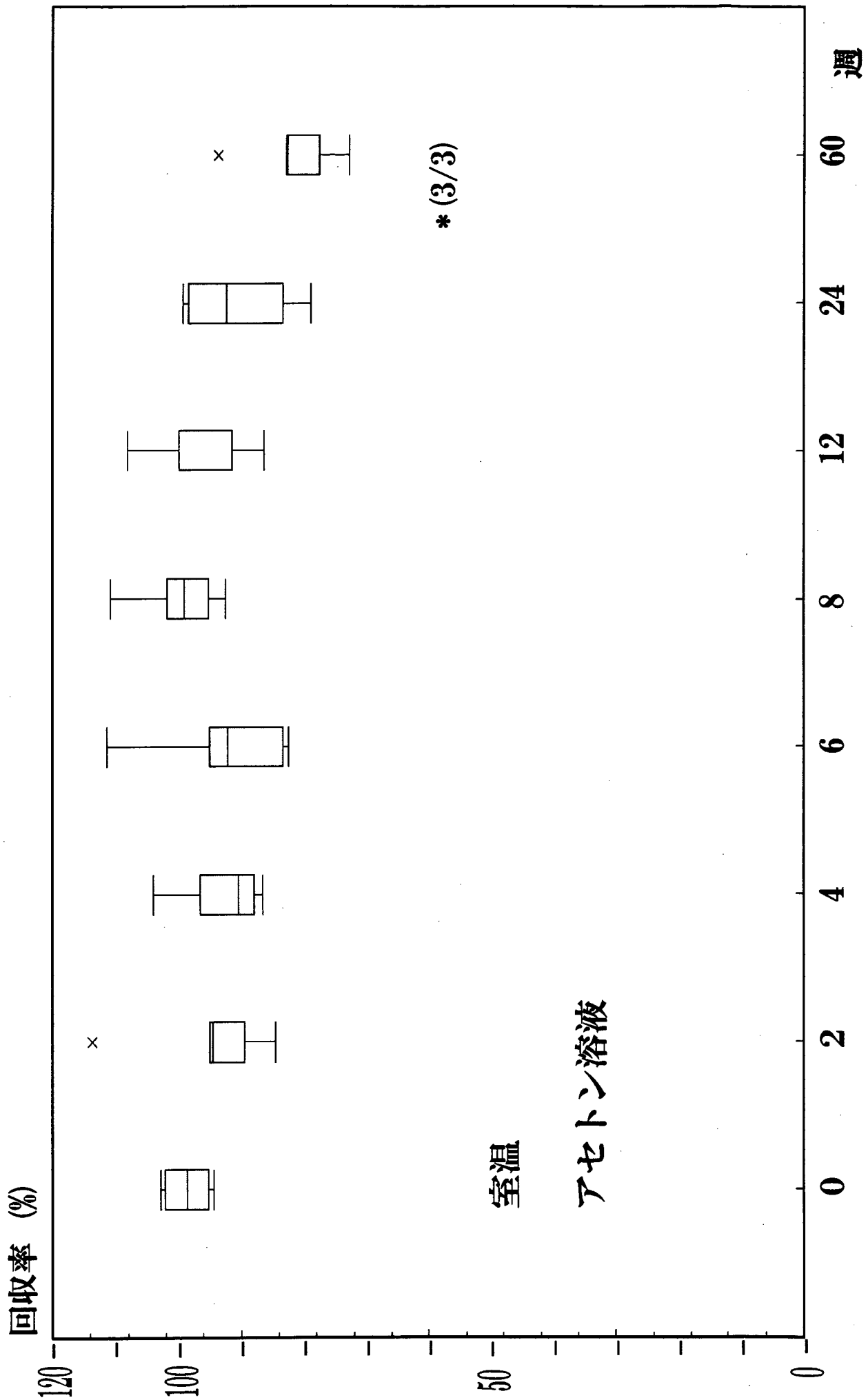


図3-1 アセトン溶液からの0Aの回収率の経時変化 (室温)

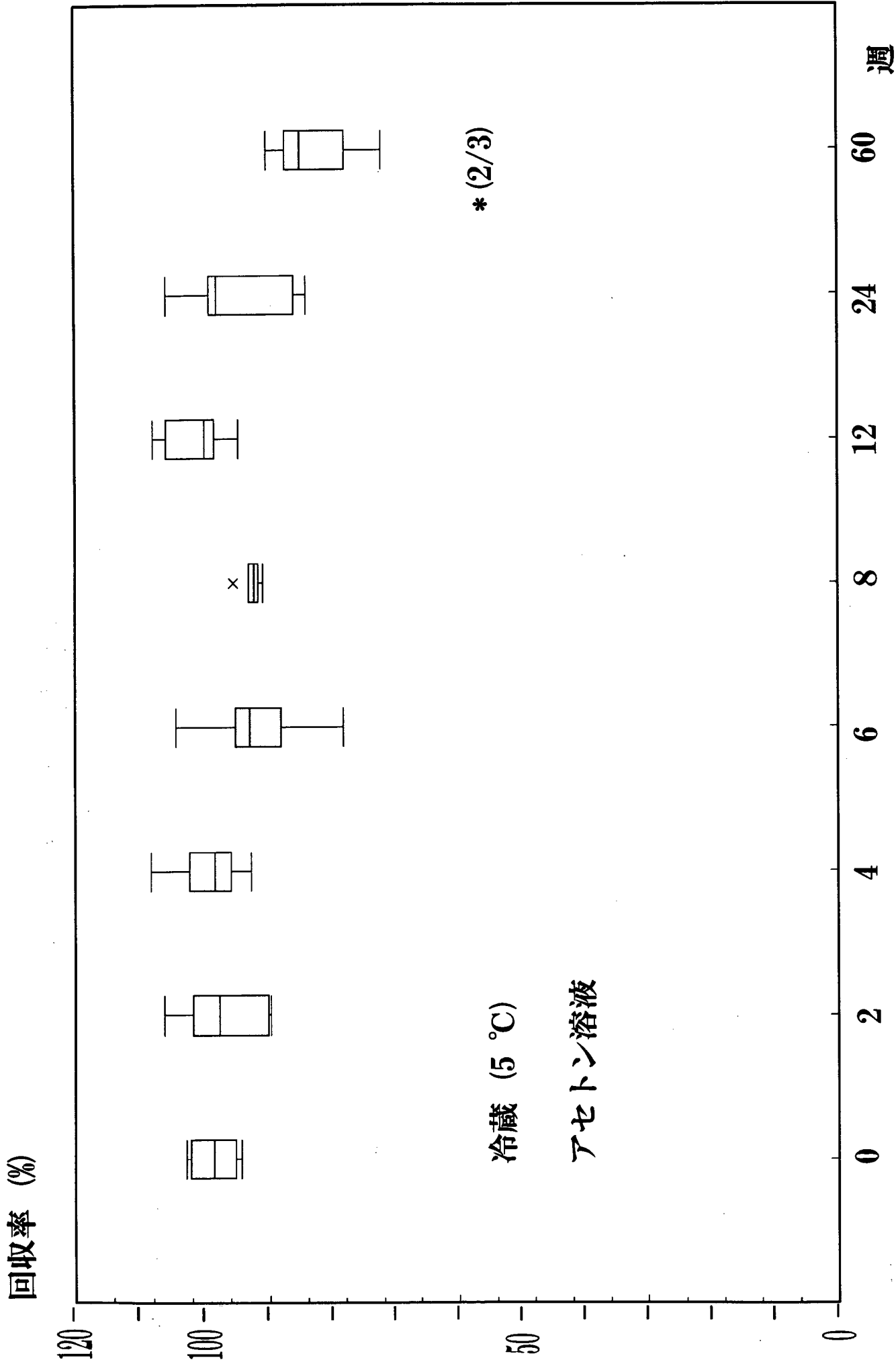


図3-2 アセトン溶液からの00Aの回収率の経時変化 (冷蔵: 5 °C)

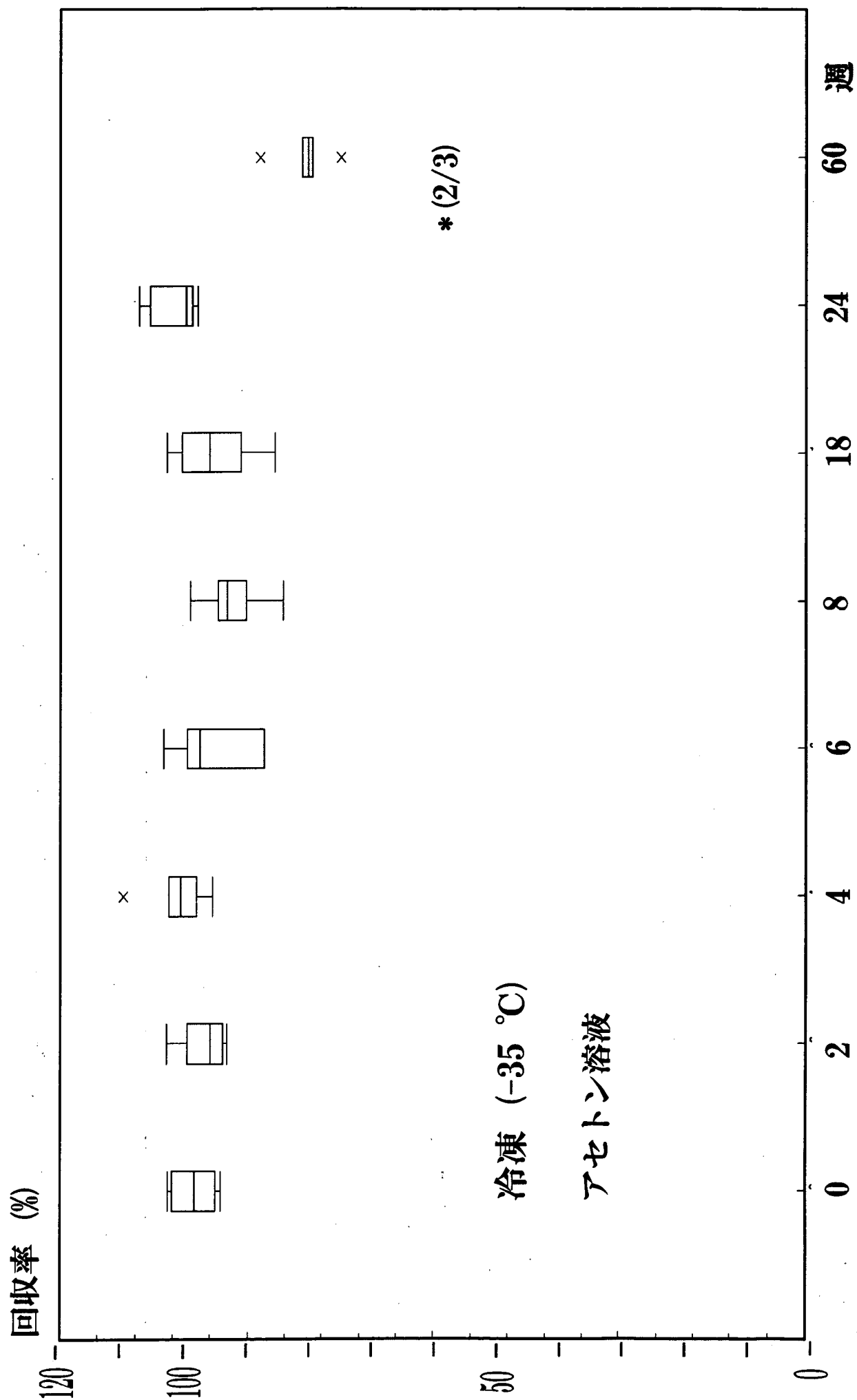


図3-3 アセトン溶液からの00Aの回収率の経時変化 (冷凍：-35 °C)

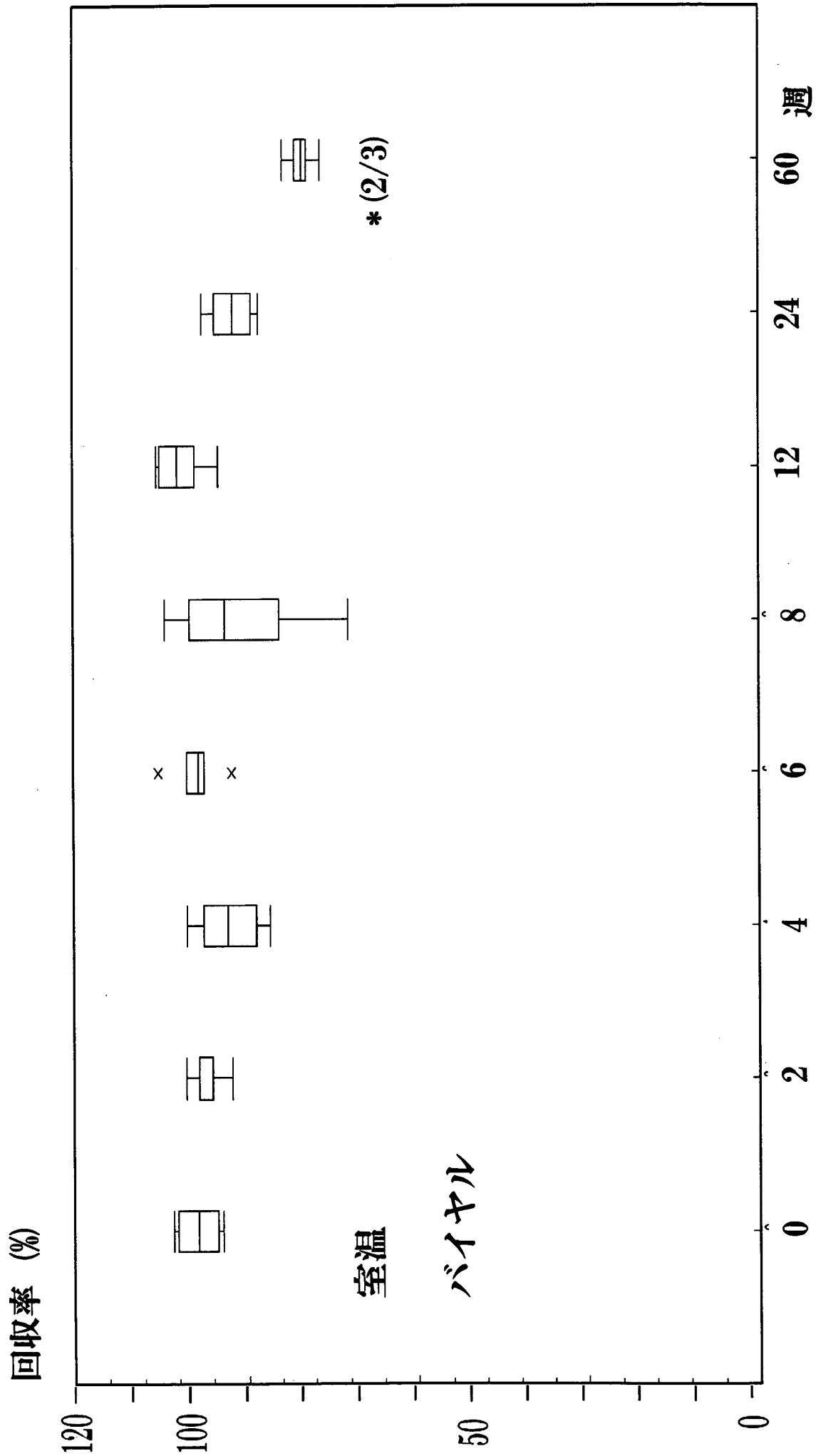


図2-1 バイヤルからの0Aの回収率の経時変化 (室温)

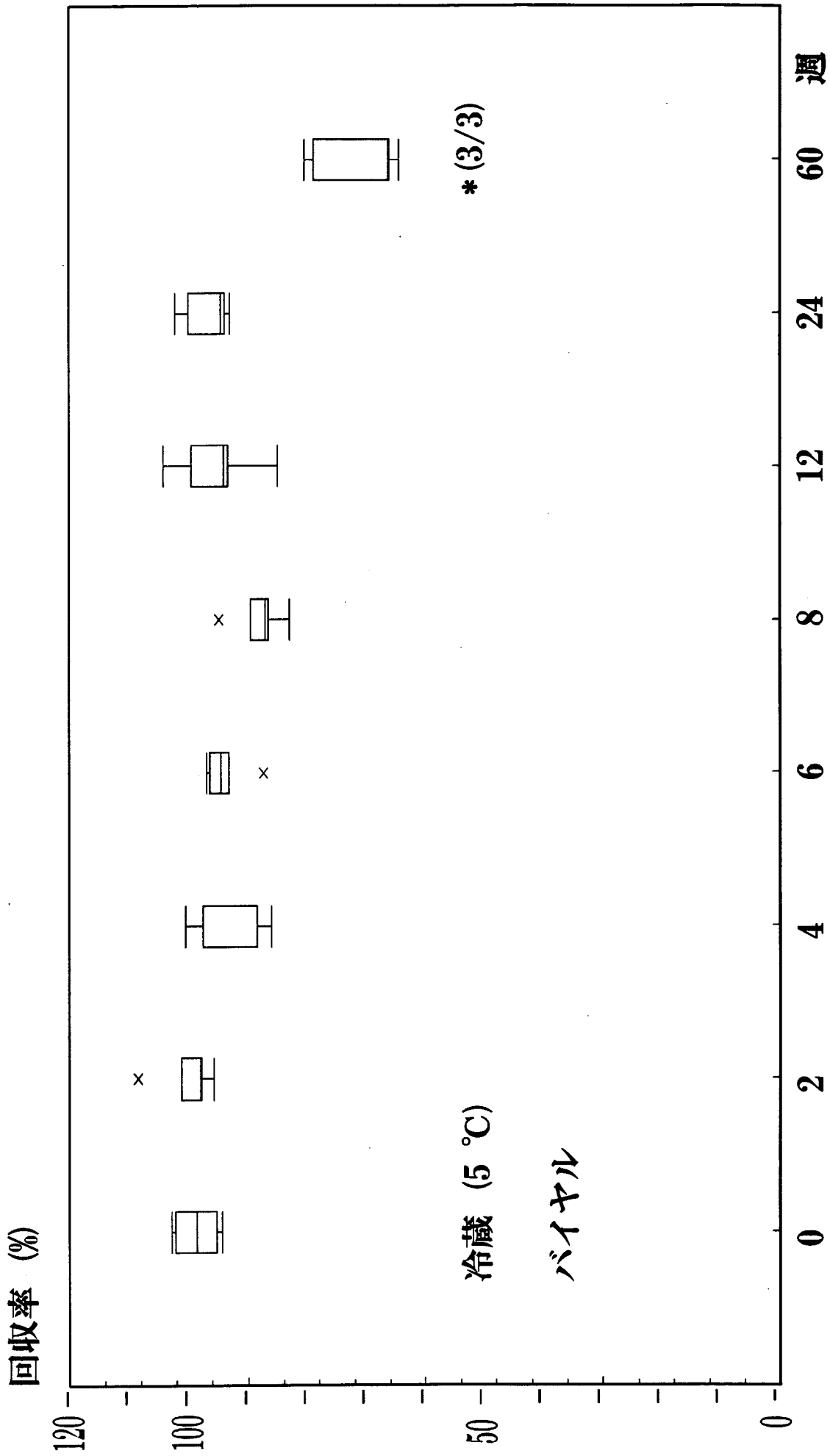


図2-2 バイヤルからの00Aの回収率の経時変化 (冷蔵: 5°C)

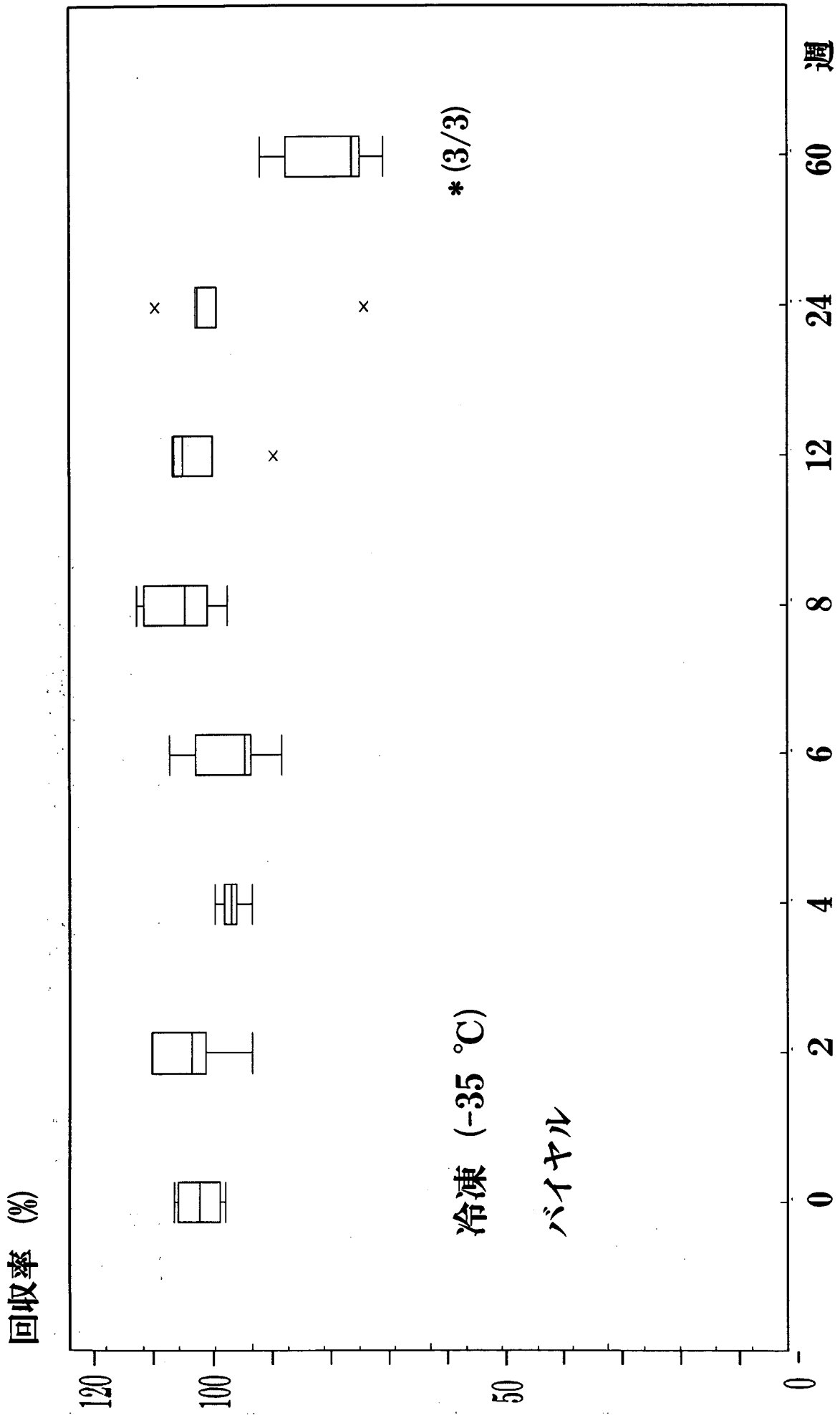


図2-3 バイヤルからの00Aの回収率の経時変化 (冷凍: -35°C)

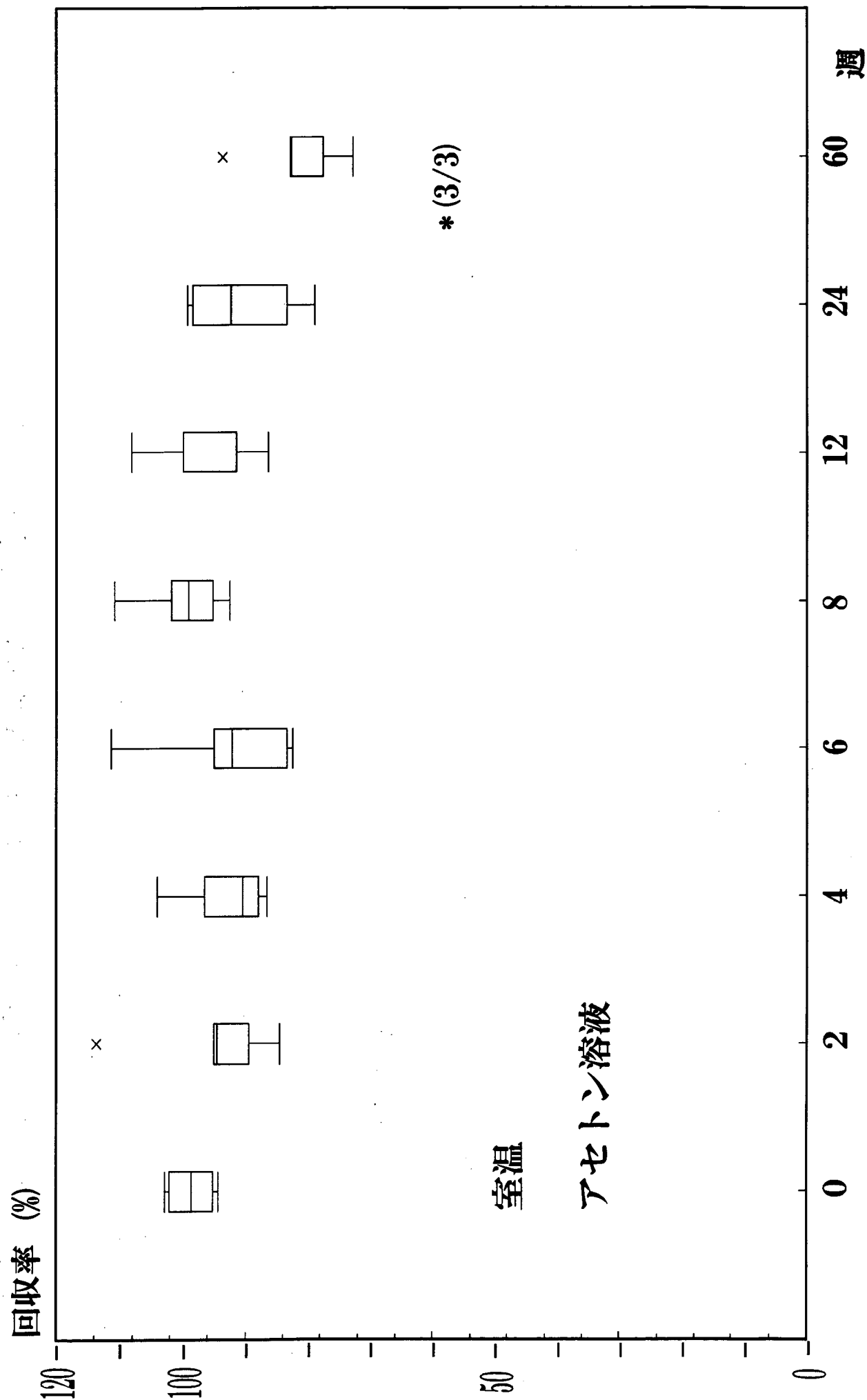


図3-1 アセトン溶液からのOAの回収率の経時変化 (室温)

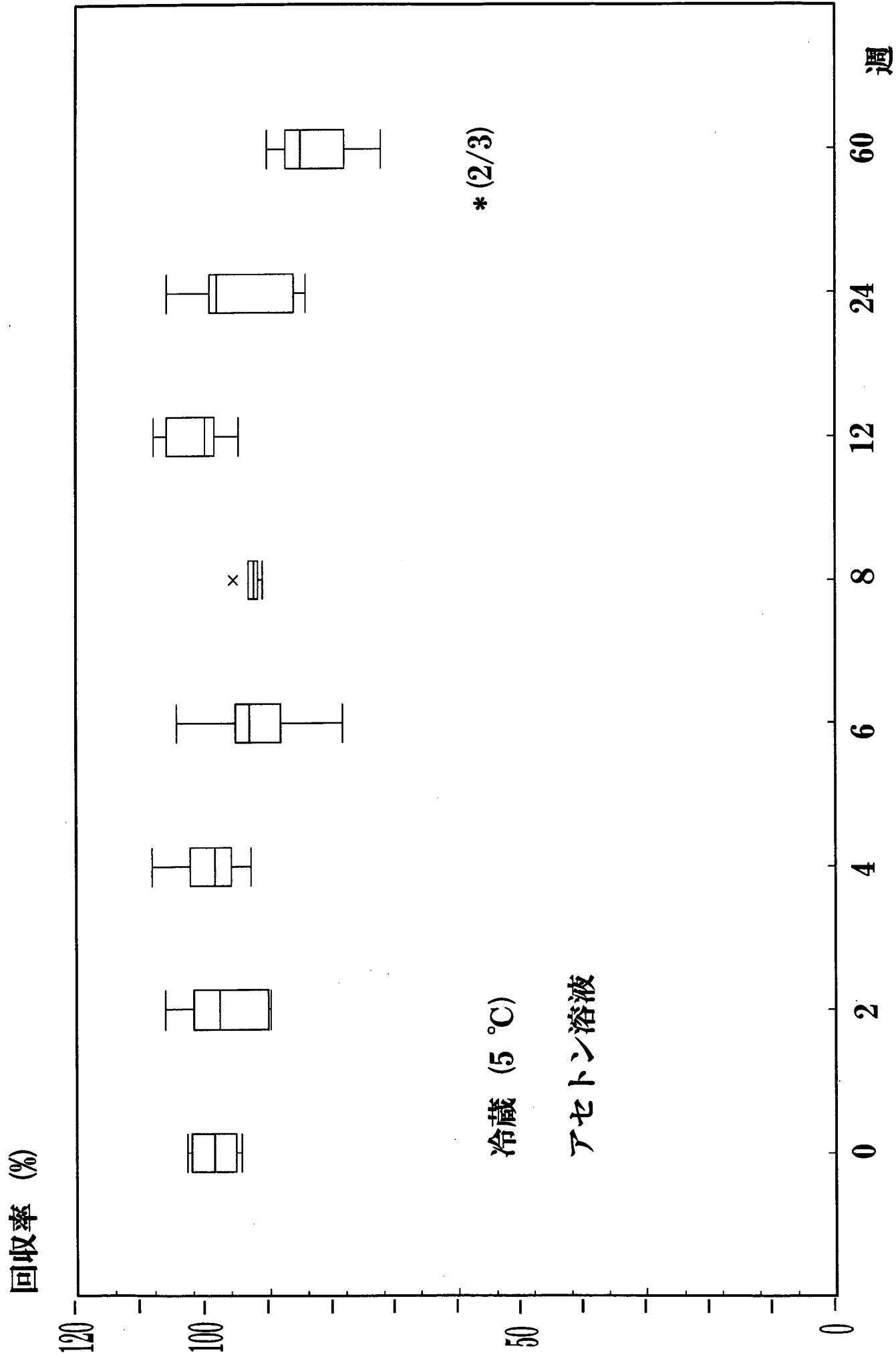


図3-2 アセトン溶液からの00Aの回収率の経時変化 (冷蔵: 5 °C)

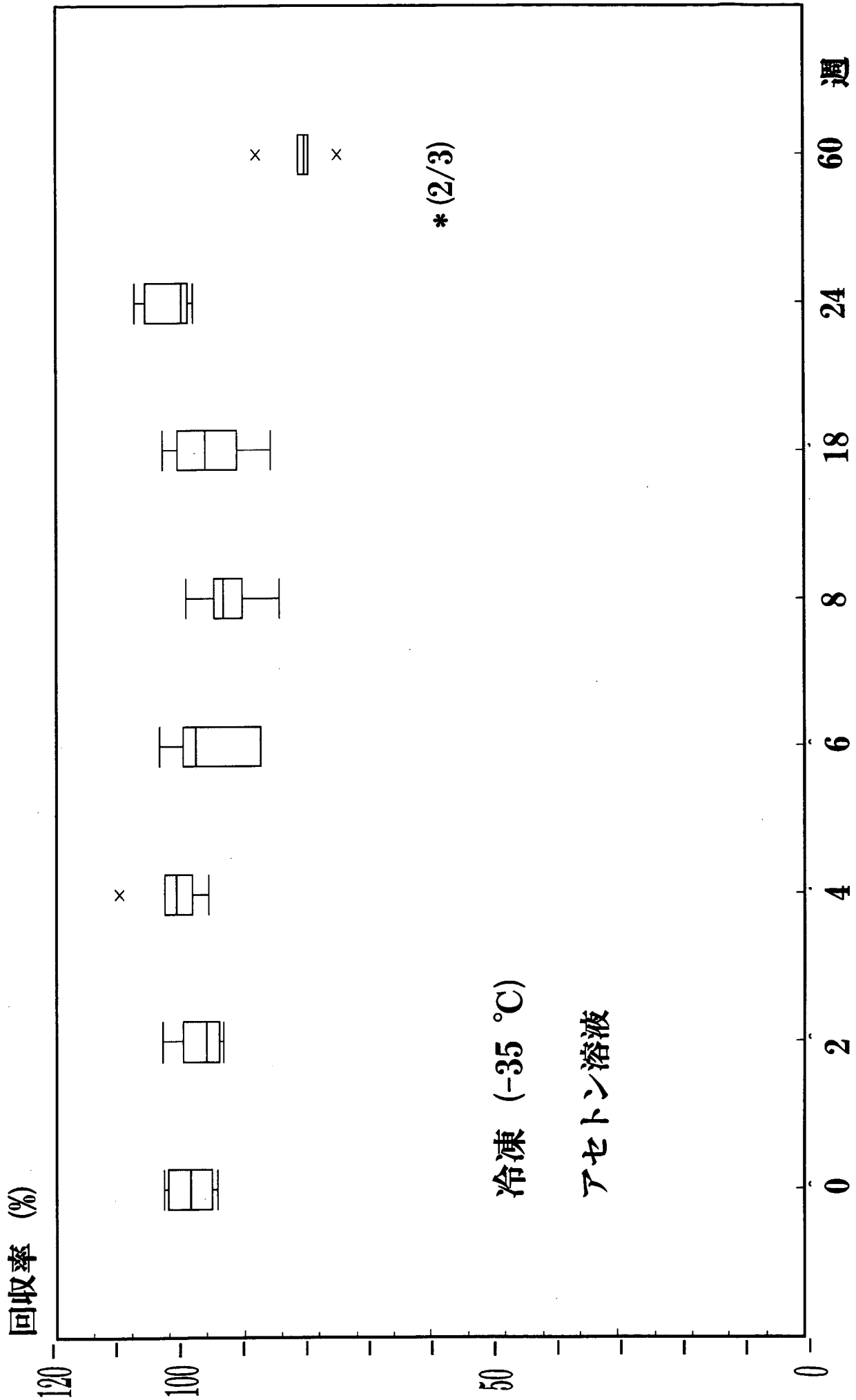


図3-3 アセトン溶液からの00Aの回収率の経時変化 (冷凍: -35 °C)

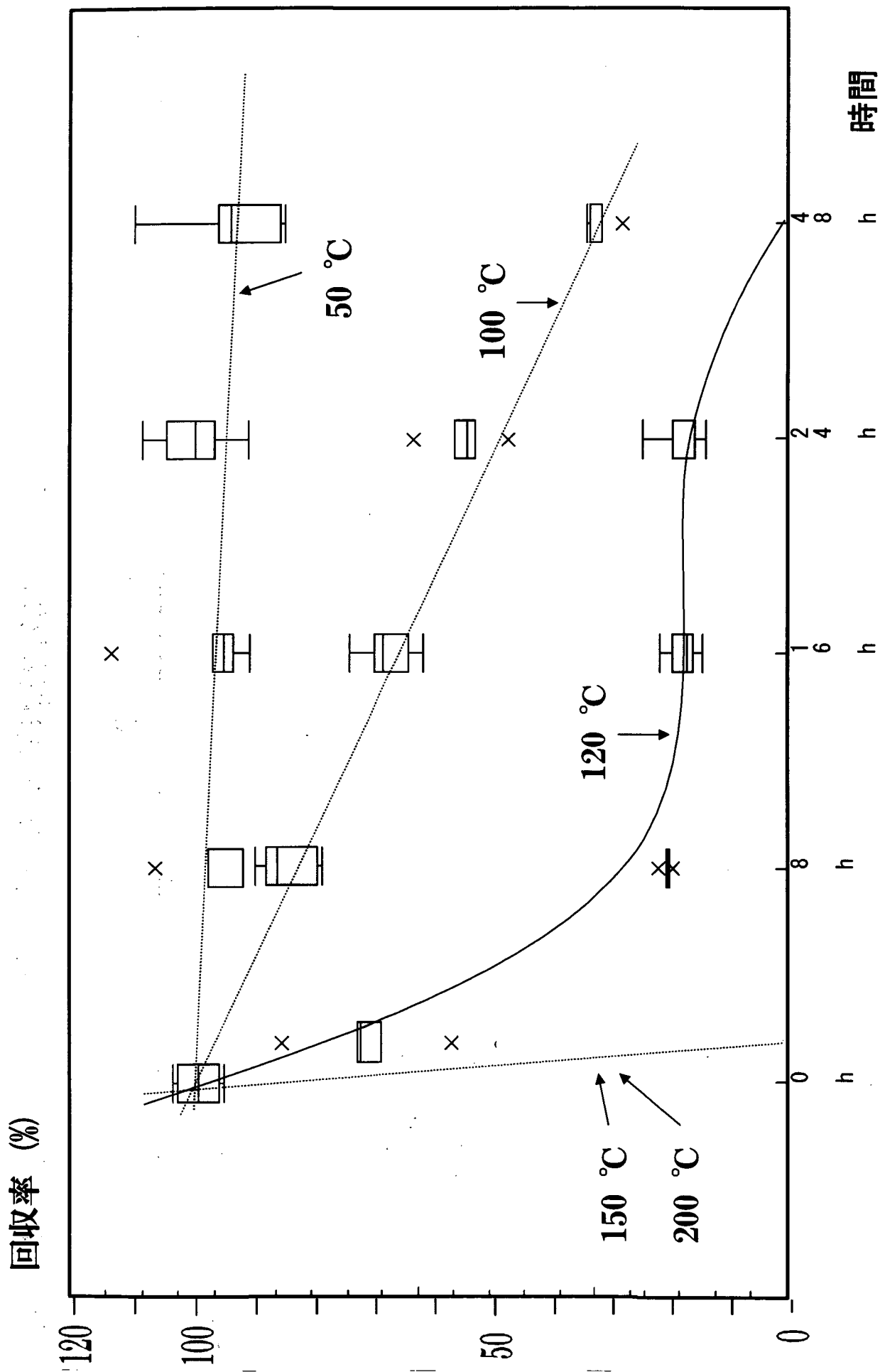


図4 0Aの50°C~200°C下に於ける回収率の経時変化

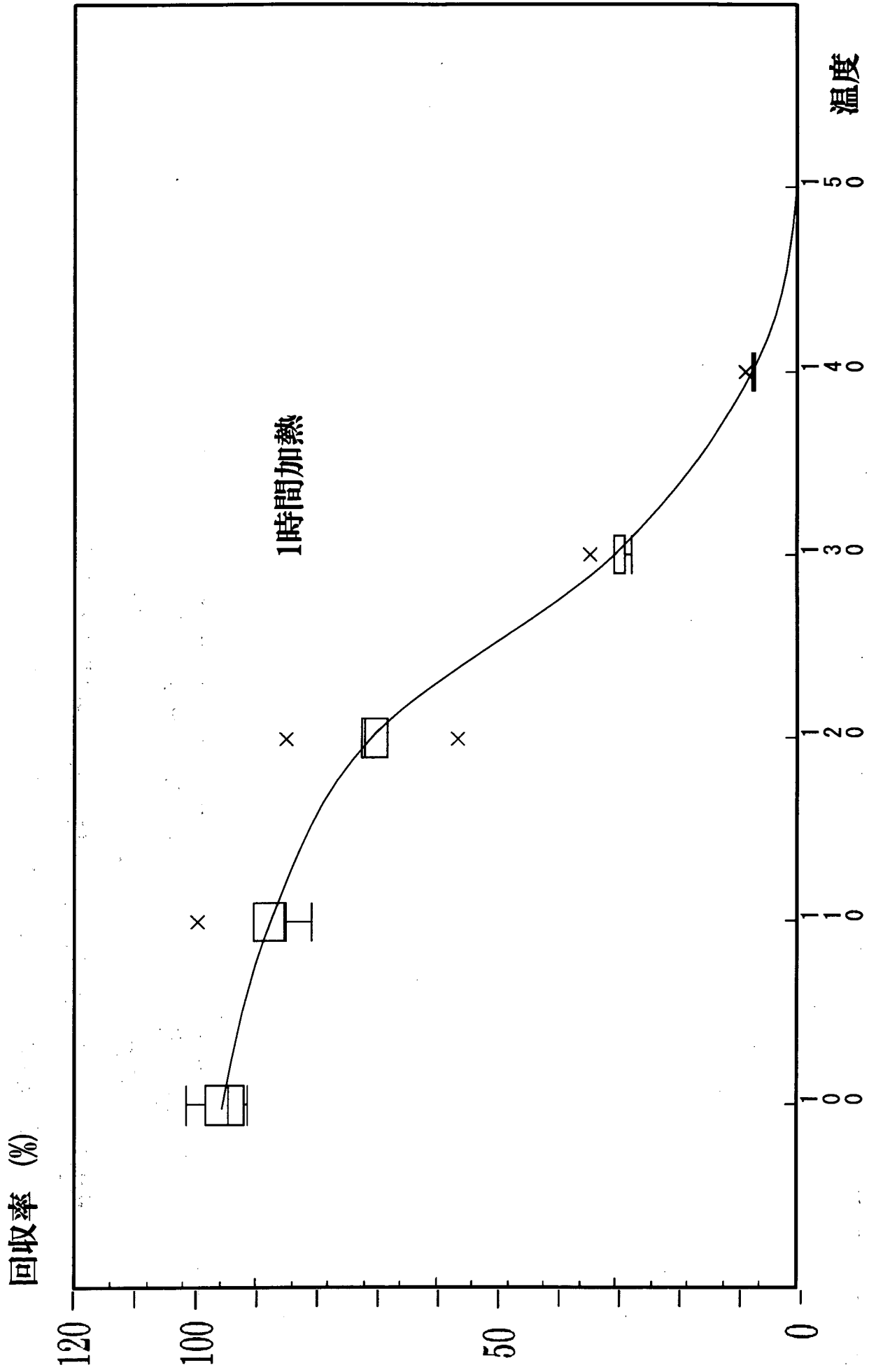


図5 0Aの100°C~150°Cで1時間加熱下に於ける回収率

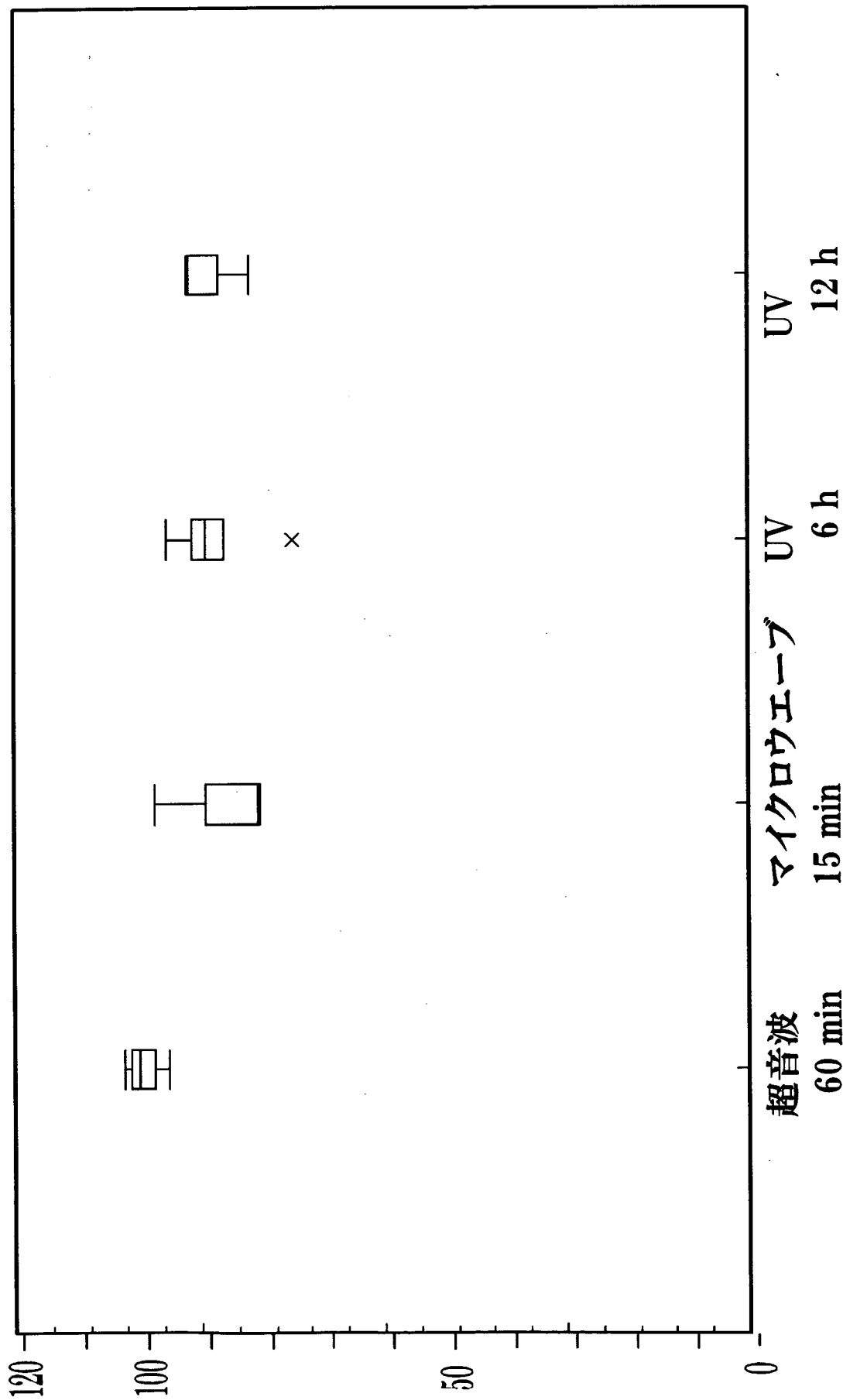


図6 超音波、マイクロウェーブそしてUVに暴露した時のオカダ酸の回収率 (n=3 ~ 5)