

短報

肉骨粉の顕微鏡鑑定における 塩化亜鉛水溶液による比重分離操作の改良

小林 敏満・久保田 貴志

キーワード：肉骨粉、鑑定、塩化亜鉛、比重分離、牛海綿状脳症(BSE)

I 結 言

2001年9月に、わが国初の牛海綿状脳症(BSE)の患者が確認され、これ以降、国産牛肉に対する「安全・安心」の確立が最重要課題となっている。これに伴い、家畜に給与する飼料に、BSE感染源の恐れのある肉骨粉の混入を防ぐための様々な取り組みが、生産者をはじめ飼料製造会社、販売会社や行政機関などで実施されている。千葉県では、同年11月より「肉骨粉等を家畜に使用しない運動」を推進し(千葉県、2001)、この運動の一つとして、県内で流通している畜産飼料の安全検査体制を強化している。このため、この検査を担当している当千葉県農業総合研究センターでは、飼料中の肉骨粉の有無を調べる検査件数が急増している。

2003年2月現在、国で定められた肉骨粉の有無を調べる検査方法は、顕微鏡鑑定法(平成13年6月1日付け13生畜第1366号農林水産省畜産局長通知、2001)、PCR法及びELISA法(平成14年4月9日付け14生畜第181号農林水産省生産局長通知、2002)の3種類である。このうち、顕微鏡鑑定法は、一番早く公定法として定められた分析法で、高価な機器や煩雑な操作を必要とせず、比較的高感度で肉骨粉の検出ができるため、EU(1998)各国をはじめとして多くの分析及び検査機関で採用されている。

顕微鏡鑑定法は、通常比重分離液としてクロロホルムを用いて分離し、沈降した部分を検鏡して肉骨粉由来組織の有無の確認を行う方法である。しかし、クロロホルムを使用した場合は、沈降した部分に骨組織以外の肉組織や飼料中の植物原料などの夾雑物が多く、肉骨粉由来組織の鑑定が困難になりやすい。さらに、クロロホルムは有毒で揮発性であるため、作業者の健康安全上好ましくない。このようなことから、坂上ら(2002)は、比重分離液として比重を1.8に調整した塩化亜鉛水溶液を比重1.5のクロロホルムに代替して、分離する方法を開発した。

坂上らの方法(以下、塩化亜鉛法とする)は、比重の大きい動物質の骨組織が選択的に沈降するため、骨以外の夾雑物が少なく肉骨粉の鑑定が容易であり、利便性が高い。また塩化亜鉛は、分離ろ過後の洗浄時に用いられるエタノールなどのアルコール類にも可溶で、実用性が高いと考えられる。しかし、この方法では沈降した部分をろ過して分離物を得るときに、沈降物とともに粘性を呈した多量の塩化亜鉛が残り、そのままではその後のアルカリ処理が困難である。また、沈降した部分をろ過した後、塩化亜鉛を除去するために洗浄する場合、多量の水を必要とし、洗浄から乾燥まで多くの時間がかかる。このため、多量の検体を処理する場合は迅速性に欠ける。

そこで、これらの点を改善するため、新たな操作方法を検討し、その実用性が確認できたので報告する。

なお、本試験の実施にあたっては、千葉県農業総合研究センター検査業務課長中島信夫氏に貴重なご助言を頂いた。また、独立行政法人肥飼料検査所本部飼料鑑定第一課長石黒瑛一博士に本稿のご校閲を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

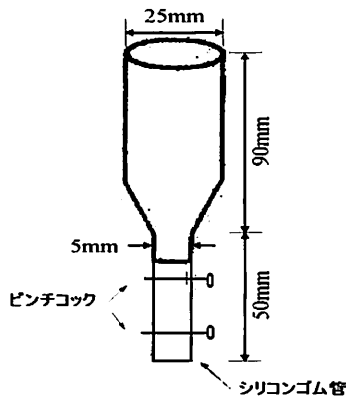
II 材料及び方法

1. 供試試料

供試試料は、肉骨粉が混入していないことを確認した牛用配合飼料(飼料名：和牛仕上用、飼料の種類：肉用牛肥育用配合飼料、製造業者：丸紅飼料株式会社、製造年月：2002年11月)に、肉骨粉(製造業者：富士化学株式会社、製造年月：2001年7月)を、0%、0.1%、0.3%、0.5%、1.0%混合し、それぞれ粉砕後1mmの篩を通したものを用了。

2. 塩化亜鉛酸処理法の検討

緒言で述べた塩化亜鉛法の問題を解決するために、比重分離後からアルカリ処理までの間の操作、すなわち比重分離物の回収、ろ過、水洗及び乾燥の操作を、以下に記述する硫酸(1+34)で処理する「塩化亜鉛酸処理法」として検討した。



第1図 比重分離用ロート

坂上ら(2002)に従い、比重1.8に調整した塩化亜鉛水溶液を用いて試料1gを比重分離させた。下層に沈降した試料を、ろ紙を用いずに100mLのトルビーカーに直接受けて回収し、さらに沈降した試料を全て回収するために比重分離用ロート(第1図)内の沈降した箇所を中心に少量の水で洗浄した。このとき、試料を含んだ水溶液はコロイド状となるため、この液が透明になるように硫酸(1+34)を添加した。その後トルビーカーの上部まで水を入れ静置した後、塩化亜鉛を除くために沈降物を流失ないように上澄み液を除去し、この操作を3回繰り返した。その後10mL程度まで上澄み液を除去し、5%水酸化ナトリウム溶液を約40mL加えた。以後は、坂上ら(2002)に従い、アルカリ処理及び洗浄操作を行った後、実体顕微鏡を用いて肉骨粉の鑑定を行った。

この塩化亜鉛酸処理法において酸処理の条件を検討するため、酸処理前のコロイドを含む沈降物回収液と、酸処理後でコロイドを消去した沈降物回収液について、それぞれのpHを測定した。また、塩化亜鉛酸処理法の作業性を検討するため、塩化亜鉛法と異なる操作での作業時間を測定した。

3. 三種類の比重分離法による肉骨粉の鑑定

上記(供試試料)のとおり作成した各肉骨粉混入飼料1gを用いて、以下の三種類の比重分離法により鑑定を行った。

(1) クロロホルム法

比重分離液にクロロホルムを用い、0.3%肉骨粉混入飼料について飼料分析基準注解(1998)に従って比重分離操作を行った。

(2) 塩化亜鉛法

比重分離液に比重1.8に調整した塩化亜鉛水溶液を用い、各肉骨粉混入飼料について坂上ら(2002)に従って比重分離操作を行った。

(3) 塩化亜鉛酸処理法

II 2に記述した処理方法に従って、各肉骨粉混入飼料について比重分離操作を行った。

各比重分離操作法により分離した試料を、実体顕微鏡(オリンパス社製・SZX12)を用い、20~30倍の倍率で鑑定し、肉骨粉数を計測した。

顕微鏡鑑定法による試料中の肉骨粉などの飼料原料の計測は、通常飼料分析基準注解(1998)に示された方法により行われる。これは、検鏡で確認された飼料原料に対して、測定者が大きさの基準となる対象物を定め、これと比較しながらその個数を計測する方法である。このため、この計測方法では基準となる対象物の大きさが第三者からはとらえにくい。そこで、具体的に各試験区での計測結果が判断できるように、直径0.7mmの円が描かれた透明なシートを作成し、実体顕微鏡のステージ部に貼り付け、検鏡で比較確認できるようにした。そして、この円と同等の大きさである肉骨粉の骨片を1個とし、それより小さい肉骨粉はその大きさを1/4、1/2、3/4の3段階に分けて、それぞれ0.25、0.5、0.75個として計測した。

なお、顕微鏡鑑定法では、試料は粉碎後1.0mmの篩を通すことが一般的であることから、直径0.7mmの円が大きさの単位として都合がよいと考えた。

III 結果及び考察

1. 塩化亜鉛酸処理法の検討

化石研究において、花粉化石だけを鉱物質から分離するための比重分離液として塩化亜鉛を用いているが、この比重分離操作で水洗の際に塩化亜鉛によるコロイドが生じた場合、希塩酸で酸性にしてコロイドを消去させて、花粉化石を分離・回収している(化石研究会編、2000)。したがって、弱い酸で、短時間の処理であれば、肉骨粉をはじめとした飼料原料を分解させることなく、コロイド状の塩化亜鉛を溶解させることが可能と考えた。また、顕微鏡鑑定法の酸処理に用いられている硫酸(1+34)の利用がより実用的と考え、本法では、硫酸(1+34)を酸処理剤として用いた。

本法において、沈降物を全量回収するための洗浄で生じた、コロイドを含む沈降物回収液のpHは5.7~6.3であった。また、硫酸(1+34)を添加しコロイドを消去した時点でのpHは2.6~3.0であった(第1表)。このことから、

第1表 沈降物回収液の酸処理前及び処理後のpH変化

項目	点数	pH	
		範囲	平均値
酸処理前	20	5.7~6.3	5.9
酸処理後	20	2.6~3.0	2.9

注1) 比重分離液として用いた塩化亜鉛水溶液のpHは1.2、洗浄に用いた純水のpHは6.8。

2) 使用した酸は硫酸(1+34)。

実際にはpHが約3以下になるように硫酸(1+34)を添加することで、コロイドを除去できると考えられる。なお、本試験において、コロイドが除去した時点の添加した硫酸(1+34)量は、約2 mLであった。

また、塩化亜鉛酸処理法及び塩化亜鉛法の、処理の異なる操作で要する作業時間を第2表に示した。特に、塩化亜鉛酸処理法は塩化亜鉛法での塩化亜鉛の洗浄や乾燥の操作時間が大幅に短縮できるので、操作項目が減り、操作がより簡易で、塩化亜鉛法に比べて合計時間は1/6程度であった。

なお、比重分離液として本試験で用いた塩化亜鉛水溶液は、クロロホルムとは異なり、揮発性に対してより安全であるが、塩化亜鉛は劇物に属し、また使用後の廃液は重金属を含むので、取り扱いには下水などに直接流さないよう十分な注意を要する。

2. クロロホルム法、塩化亜鉛法及び塩化亜鉛酸処理法による肉骨粉の鑑定

0%、0.1%、0.3%、0.5%、1.0%肉骨粉混入飼料での、塩化亜鉛酸処理法及び塩化亜鉛法で計測した肉骨粉数を第3表に示した。クロロホルム法で検出が可能な最小混入割合である0.1%の肉骨粉混入飼料(Official Journal of the European Communities, 1998)でも、両

法ともに約3個の肉骨粉が確認された。すなわち、両法とも0.1%以上の肉骨粉混入飼料に対して肉骨粉の鑑定が可能と考えられる。

塩化亜鉛酸処理法と塩化亜鉛法について、各混入割合での両法の肉骨粉数に、有意水準5%で有意な差が認められなかった。また、両法について飼料中の肉骨粉混入割合と肉骨粉数の回帰分析を行い、それぞれの相関係数は塩化亜鉛酸処理法が0.892、塩化亜鉛法が0.848であった。一方、両法における回帰係数については、勾配、切片ともにそれぞれ有意水準5%で有意な差は認められなかった。以上のことから、飼料中の肉骨粉鑑定において、塩化亜鉛酸処理法は塩化亜鉛法と同等の鑑定が可能であると考えられる。

クロロホルム法による0.3%肉骨粉混入飼料の肉骨粉数は21.0±9.0個であり、塩化亜鉛酸処理法の約2.2倍、塩化亜鉛法の約1.8倍の肉骨粉数が確認された。また、0.3%肉骨粉混入飼料での肉骨粉数の変動係数(%)は、クロロホルム法の43.1%に対して、塩化亜鉛酸処理法及び塩化亜鉛法はそれぞれ28.4%、20.0%で小さかった。これは、クロロホルム法では植物質由来の飼料原料などの夾雑物が増加することによる妨害が起こるため、計測に大きな差が生じたものと考えられる。

第2表 塩化亜鉛酸処理法及び塩化亜鉛法での作業時間の比較^{注1)}

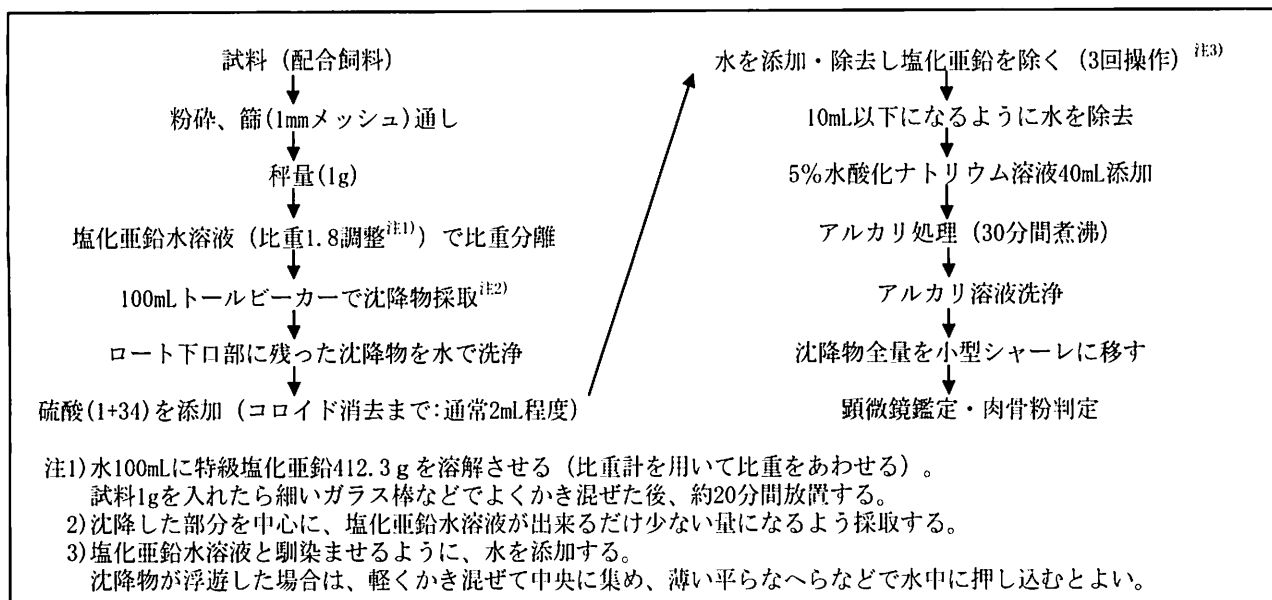
比重分離法	操作項目	作業時間(分)
塩化亜鉛酸処理法	酸処理(硫酸(1+34)添加)	10
	水処理(洗浄)	25~30
	合計作業時間	35~40
塩化亜鉛法	ろ過・洗浄	60~90
	乾燥 ^{注2)}	約180以上
	残さ物をビーカーへ移しかえ	10
	合計作業時間	約250以上

注1) 作業人数2人、10検体同時処理で計測。
各試験区の操作項目は、いずれも比重分離・沈降物採取後からアルカリ溶液添加・アルカリ処理に至るまでの項目。
2) 室温25℃で放置。

第3表 各比重分離法での肉骨粉混入飼料ごとの肉骨粉数(個)

比重分離法	肉骨粉混入割合(%)				
	0%	0.1%	0.3%	0.5%	1.0%
塩化亜鉛酸処理法	0	2.8 ± 1.2	9.5 ± 2.7	17.9 ± 6.5	45.6 ± 15.2
塩化亜鉛法	0	3.8 ± 1.3	11.6 ± 2.3	20.1 ± 8.4	45.8 ± 18.5
クロロホルム法	-	-	21.0 ± 9.0	-	-
p値	-	0.0761 ^{ns}	0.0595 ^{ns}	0.4669 ^{ns}	0.9786 ^{ns}

注1) 肉骨粉数は平均±標準偏差。
2) 塩化亜鉛酸処理法と塩化亜鉛法は12反復、クロロホルム法は8反復。
3) p値：塩化亜鉛酸処理法と塩化亜鉛法との比較。ns：p > 0.05(Student's t 検定)。



第2図 塩化亜鉛酸処理法による肉骨粉の顕微鏡鑑定法のフロー

3. 塩化亜鉛酸処理法による操作フローの作成

以上より、肉骨粉の顕微鏡鑑定における塩化亜鉛酸処理法の適用が可能であり、本法は特に多検体の処理に有効であると考えられた。

これを踏まえて、本法による肉骨粉の鑑定分析のフロー図を作成した(第2図)。

IV 摘 要

肉骨粉の顕微鏡鑑定における比重分離操作法の改善を目的に試験を行い、塩化亜鉛酸処理法を開発した。その結果は以下のとおりである。

1. 塩化亜鉛水溶液による比重分離後の沈降物の回収において、水洗時に沈降物を含んだ溶液は塩化亜鉛のコロイドを生じる。これを消去するにはpH3.0以下になるように硫酸(1+34)の添加(通常2mL程度)が有効であった。
2. 塩化亜鉛酸処理法での操作は、塩化亜鉛法より簡易で、その操作時間は1/6程度となった。
3. 塩化亜鉛酸処理法は、塩化亜鉛法と肉骨粉の鑑定結果が近似し、0.1%以上の肉骨粉混入飼料で肉骨粉の鑑定が可能であった。
4. 以上の結果から、塩化亜鉛法を改良した塩化亜鉛酸処理法による、飼料中の肉骨粉の顕微鏡鑑定フローを作成した。

V 引用文献

- 千葉県農林水産部長通知(2001). 「肉骨粉等を家畜に使用しない運動」推進要領の制定について. 平成13年10月10日. 畜第664号.
- 化石研究会編(2000). 化石の研究法-採取から最新の解析法まで. 54-57. 共立出版. 東京.
- 農林水産省畜産局長通知(2001). 反すう動物用飼料への反すう動物等由来たん白質の混入防止に関するガイドラインの制定について. 平成13年6月1日. 13生畜第1366号.
- 農林水産省生産局長通知(2002). 飼料中の動物由来たん白質等の検出法について. 平成14年4月9日. 14生畜第181号.
- Official Journal of the European Communities(1998). Establishing guidelines for the microscopic identification and estimation of constituents of animal for the official control of feedingstuffs. COMMISSION DIRECTIVE 98/88/EC.
- 坂上光一・中村行伸・小森谷敏一・堀切正賀寿・橋本亮(2002). 鑑定の比重分離操作に用いる比重液について. 飼料研究報告. 27. 251-252.
- 飼料分析基準研究会編(1998). 飼料分析基準注解(第三版). 778-784. 社団法人日本科学飼料協会. 東京.

Improvement of the procedure of specific gravity separation using zinc chloride solution in the microscopic identification for meat and bone meal

Toshimitsu KOBAYASHI and Takashi KUBOTA

Key words : meat and bone meal, identification,
zinc chloride, specific gravity separation,
bovine spongiform encephalopathy(BSE)

Summary

A new specific gravity separation method was developed for identification of meat and bone meal by microscope. The results obtained were as follows.

1. During the recovery of the precipitates following specific gravity separation by aqueous zinc chloride solution, the solution containing the precipitates produces a colloid of zinc chloride when water rinse is performed. To eliminate this, it was effective to add sulfuric acid (1+34) (normally, about 2mL) so that the pH is less than 3.0.
2. When aqueous zinc chloride solution was used as the specific gravity separating solution, the procedure using the above acid treatment was simpler than the conventional analysis treatment, and it took only about 1/6 of the time.
3. According to this method, the evaluation results for meat and bone meal were similar to those of the conventional analysis method, and this method was detectable in feedstuffs containing 0.1% or more meat and bone meal.
4. From the above results, a flowchart of the microscopic identification for meat and bone meal in feedstuffs using this improved method was drawn up.