

直射日光による牛血清ビタミンA濃度への影響調査

東部家畜保健衛生所 宮本純子

1 はじめに

ビタミンAは日光・酵素・熱により容易に酸化分解され、活性を失うことが知られており、血液採取後の保存や輸送に関して、遮光・保冷を実施しているが、実際にどの程度の影響がでているのかは不明である。今回、牛血清を用いた直射日光の感作時間によるビタミンA濃度への影響調査を実施したので報告する。

2 材料および方法

牛血清には、ブルセラ検査等の余剰血清を使用し、2ml エッペンチューブに約 1ml 分注し試験血清とした。対照区は分注後直ちにアルミ箔による遮光、試験区は分注した状態の非遮光とした（表-1）。

平成 20 年 7 月、気温 35℃の屋外直射日光条件下で 60 分間感作し、0 分から 5 分間隔でサンプル採取を行い、対照区：199 検体、試験区：201 検体の検査を実施した（表-2）。

ビタミンA濃度の測定は、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定し、血清前処理は表-3のとおり実施し分析用試料とした。分析機器の高速液体クロマトグラフィーは、島津社製のシステムを使用し、分析条件は表-4のとおり。

材料及び方法

- ・材料
 - ブルセラ等余剰血清(凍結保存)を使用
 - 血清の準備
 - ブル血清をろ過し、2mlエッペンチューブに分注
- ・方法
 - 直射日光下(気温35℃)にて0分～60分(5分毎)感作
 - 対照区:アルミ箔で包む(遮光)
 - 試験区:エッペンチューブのまま(非遮光)




表-1

被検血清

	0分	5分	10分	15分	20分	25分	30分	35分	40分	45分	50分	55分	60分
対照区	18	18	18	18	14★	12	6	17★	18	18	6	18	18
試験区	18	18	18	18	18	12	6	18	18	18	6	15★	18

★:血清前処理中のミスによる減少

表-2

HPLC法によるビタミンA濃度の測定(1)

血清前処理

血清 250 μl + DW 1ml
+ エタノール 1ml
+ ヘキサン 5ml

↓

振倒混和 5min
遠心分離 3000rpm 5min

↓

ヘキサン層 4ml

↓

ヘキサン乾固 37℃、N₂流下中
+ イソプロパノール 200 μl

↓

HPLC分析用試料

表-3

HPLC法によるビタミンA濃度の測定(2)

SHIMAZU社製HPLCシステム(UV)

カラム :CLC-ODS (15cm×6.0mm)
温度 :55℃
移動相 :メタノール
流速 :1.0ml/min
検出波長:325nm
試料注入:20 μl




表-4

3 成績

縦軸にビタミンA濃度（IU/dl）、横軸は感作時間（分）で表し、対照区では、調査開始時の0分に100IU前後の濃度を示したが、調査終了時には80IU前後に失活していた（図-1）。試験区では、調査開始時の0分には対照区同様に100IU前後あったビタミンA濃度は、感作10分では80IUを下回っており、感作30分では、ビタミンA欠乏の危険性が高い濃度指標となる30IU前後、調査終了時の60分については、ほとんどが10IUを下回った結果となった（図-2）。

図3では、対照区と試験区のグラフを重ねて比較し、各検体の濃度差にばらつきはあるものの、感作時間5分の検体までは対照区・試験区の濃度がほぼ同程度であるが、感作時間が10分以上経過すると、両者の差は拡大した結果となった。（図-3）

表-5では各検体の平均値・標準偏差・0分時の平均を100としたときの割合を示した。感作時間5分では対照区が97%に対して試験区では91%、10分では、対照区が86%に対して試験区は68%と明らかな差が見られた。

また、試験区は感作時間10分以降のサンプルについては、各項目ごとに10%程度の減少が見られた。

この結果から、直射日光の感作を10分間受けた血清は本来のビタミンA濃度の70%程度の濃度として検出されること、25分間以上の感作を受けた血清については、本来のビタミンA濃度が100IU程度であったとしても、30IU程度として検出されることから、ビタミンA欠乏状態の個体として診断される可能性が示唆された。

対照区に見られた約20%程度の減少については、調査時の気温が35℃であったため、温度による失活ではないかと思われる。

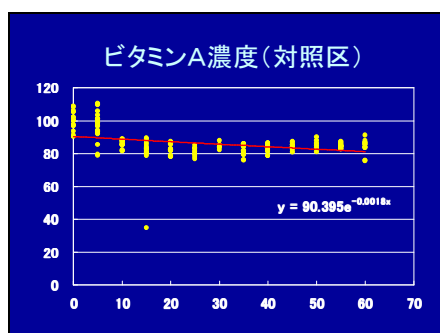


図-1

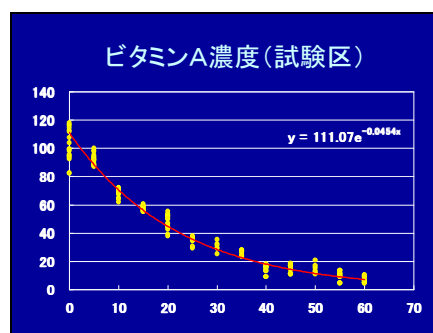


図-2

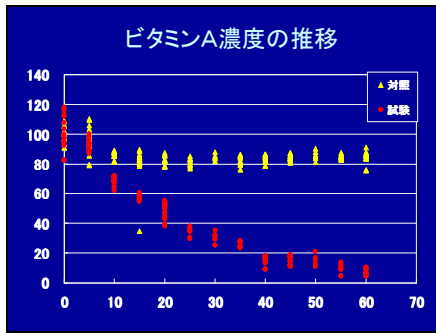


図-3

試験結果

	対照区			試験区		
	濃度平均	標準偏差	割合	濃度平均	標準偏差	割合
0分	100.17	5.42	100	101.96	11.32	100
5分	96.68	8.85	97	92.29	3.89	91
10分	86.07	2.37	86	68.86	2.85	68
15分	83.52	3.34	83	57.69	1.75	57
20分	82.28	3.10	82	48.37	5.14	47
25分	81.12	2.58	81	34.56	2.89	34
30分	84.55	1.99	84	30.64	3.36	30
35分	82.63	3.39	82	26.34	1.64	26
40分	83.23	2.69	83	15.16	3.08	15
45分	84.26	1.82	84	15.00	2.92	15
50分	85.62	3.22	85	14.91	3.64	15
55分	84.68	1.28	85	9.83	3.03	10
60分	84.13	4.30	84	7.09	2.12	7

表-5

4 まとめ

今回の調査により、直射日光の感作時間は5分以内に抑えることが重要であり、速やかな遮光の必要性が実感された。

対照区での約20%の失活は、調査時の気温によるものと思われることから、特に夏季での輸送・保存時には、遮光だけではなく保冷をすることの重要性が示唆され、今後、冬季もしくは遮光状態での温度感作による調査が必要である。

また、採取・輸送において直射日光の感作は、血清分離前の全血状態であるため、本来の影響を比べるには全血状態での調査が必要と考えられたが、牛個体間での濃度差が大きく、各感作時間での被検血液の濃度が一定にならないこと、血液採取から、血清分離までの時間など各種の条件設定が難しいことから、実際の調査を行うのは困難であることが判明した(表-6)。

まとめ

- 感作時間5分:約90%に減少
→ 5分以内での遮光が重要
- 対照区:約80%に減少
→ 気温35°Cにおける失活
- 冬季気温での調査が必要
- 全血での調査の必要性
検体間の差が大きい・条件設定が困難

表-6

今後、今回の調査結果を元に、全血における影響を推測できるような、様々な条件設定を考慮した調査を実施したい。