

令和2年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

食品衛生検査施設等の検査の信頼性確保に関する研究

研究分担報告書

下痢性貝毒検査の外部精度管理に関する研究

研究代表者 渡辺 卓穂 （一財）食品薬品安全センター秦野研究所 部長  
研究分担者 鎗田 孝 茨城大学農学部 准教授  
研究協力者

### 研究要旨

食品に関わる検査機関では、得られる分析値の信頼性を確保するために、分析の精度管理が必須である。技能試験は精度管理手法の一つであり、Codex CAC/GL 27 の要求事項であるほか、ISO/IEC 17025 では試験結果の妥当性を確保する手順の一つに挙げられている。

下痢性貝毒は下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状をともなう食中毒の一種であり、オカダ酸（OA）、ジノフィシストキシン-1（DTX1）、ジノフィシストキシン-2（DTX2）、これらのエステル誘導体（DTX3）を毒素とする。わが国では、その検査法として、2015年3月に液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法（LC-MS/MS）による機器分析法が導入された。しかしながら、下痢性貝毒検査に関する技能試験については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、同検査検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっていた。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査のパイロットスタディを実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、検査用試料の調製法を検討するとともに、OA群のLC-MS/MS測定を正確に行うための傷害となっているマトリックス効果の影響を検証した。

検査用試料の調製法については、ホタテガイ可食部と中腸腺を均質化および混合したもの5gずつ瓶詰することにより、検査用試料123本を調製した。一方、マトリックス効果の影響評価においては、中腸腺試料の分析において、明らかなマトリックス効果の影響を確認した。一方で、可食部を主とする試料の分析においては、マトリックス効果の影響よりもLC-MS/MSの測定精度が、正確な分析を行う上での阻害要因と考えられた。そのため、LC-MS/MS法以外の正確な分析技術の開発が必要と考えられた。

### A. 研究目的

れた二枚貝をヒトが摂取することにより  
下痢性貝毒は、有毒渦鞭毛藻で汚染さ 下痢、吐気、嘔吐、腹痛などの症状が引

き起こされる食中毒である。主な毒素は、オカダ酸 (OA)、ジノフィシストキシン-1 (DTX1)、ジノフィシストキシン-2 (DTX2)、これらのエステル誘導体 (DTX3) である (以下、これらをOA群と総称する)。

わが国では、下痢性貝毒の検査にマウス毒性試験適用されてきた。しかし、この方法には実験動物を使用することに対する倫理的な懸念があり、また、OA群に対する選択性や感度の低さなどの欠点があった。このような背景のもと、2015年3月に下痢性貝毒の公定検査法として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) による機器分析法が導入された。これと同時に規制値も変更され、それまでの可食部1 gあたりの毒量が0.05 MU (マウスユニット) であった規制値が、可食部につき0.16 mg OA/kgに変更された。

食品分析で得られる分析値は、分析方法や分析装置など様々な要因によって正しい値から偏ってしまう。そのため、各検査機関では分析値の信頼性確保が必須である。さらに、食品の輸出が促進され、輸入量も増加している状況に鑑みれば、食品分析によって規制値の誤判定を回避することは、輸出入国間での係争を回避するためにも重要といえる。

分析精度の管理手法の一つに技能試験がある。CodexのCAC/GL 27 (食品の輸出入規制にかかわる試験所の能力評価に関するガイドライン) における要求事項として適切な技能試験プログラムへの参加が挙げられている。また、ISO/IEC 17025 (試験所及び校正機関の能力に関する一般要求事項) においても、試験結果の妥当性を確保する手順の一つとして、技能

試験を含む試験所間比較への参加などが挙げられている。わが国では、外部精度管理調査プログラムにおいて、残留農薬、食品添加物、重金属等の技能試験が行われている。これに対し、下痢性貝毒検査については、現在のところ定常的に実施されている技能試験はなく、下痢性貝毒検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっていた。

そこで、本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することにした。3年計画の初年度である令和2年度は、検査用試料の調製法を検討した。さらに、調製した検査用試料を評価するためにはLC-MS/MSによる正確な分析が不可欠であることから、これを妨害すると考えられるマトリックス効果の影響を検証した。

## B. 方法

### 1. 検査用試料の調製と評価

#### (1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部 (国内産) と、OAおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料 (均質化済み) を用いた。

1 µg/mL OA溶液と1 µg/mL DTX1溶液 (いずれも溶媒はメタノール) は産業技術総合研究所から入手した。LC-MS用アセトニトリルおよびギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級 *n*-ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬から入手した。LC-MS用ギ酸アンモニウムはSigma Aldrichから入手した。

## (2) 調製方法

ホタテガイの可食部をブレンダーで細断し、裏ごし器（2 mm）で裏ごしを行った。得られた試料をポリ製広口瓶に入れ、スプーンで混ぜた。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1時間30分回転混合させた。

9個のガラス瓶を用意し、1個のガラス瓶につきOAおよびDTX1の濃度が既知であるホタテガイ中腸腺試料10 gを入れた。それぞれのガラス瓶に中腸腺の9倍量のホタテガイ可食部を加えた。それぞれのガラス瓶の内容物を葉さじで混ぜ合わせた後、1つのポリ製広口瓶にあわせ、混合した。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1時間回転混合させた。

回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、それぞれをガラス瓶に入れた。その後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管23～25本に5gずつ小分けした。

## (3) 分析方法

### a. 前処理

調製した検査用試料中のOAとDTX1の測定は、食安基発0306第4号・食安監発0306第2号「下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について」別紙2の「オカダ酸群分析操作例」に準拠して行った。

50 mL遠沈管に試料2 gを量りとり、メタノールを9 mL加えてホモジナイズした後、3000 rpmで10分間遠心分離し上清をとった。残さに90 %メタノール9 mLを加えて再度ホモジナイズした後、3000 rpmで10分間遠心分離した。この上清を前述の上清と合わせ、90 %メタノールを加えて正確に20 mLとした。この抽出液の2 mLをねじ

口試験管にとり、2.5 mol/L水酸化ナトリウム0.25 mLを加えて76 °Cで40分間加水分解した。放冷後、2.5 mol/L塩酸0.25 mLを加えて中和した。加水分解抽出液全量を*n*-ヘキサン2.5 mLずつで2回洗浄し、次に示す固相抽出を行った。カートリッジとしてオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム（GL Sciences製InertSep C18 200 mg、リバーザー容量：3 mL）を使用した。このミニカラムにメタノール（3 mL）と水（3 mL）を順次通してコンディショニングした後、ヘキサン洗浄液を注入した。さらに、ヘキサン洗浄液が入っていたバイアル内壁を40 %メタノール（2 mL）で2回洗い込み、この液もミニカラムに注入し、流出液は捨てた。次いで、90 %メタノール（5 mL）を注入し、溶出液を15 mL遠沈管にとり、メタノールを加えて5 mLとした。

### b. LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所のUFLC高速液体クロマトグラフ（ポンプ：LC-20AD、デガッサー：DGU-20A3、オートサンプラー：SIL-20ACHT、カラムオーブン：CTO-20AC、システムコントローラ：CBM-20A）と、質量分析計（Applied Biosystems 3200 Q TRAP）を用いた。カラムはCadenza CD-C18カラム（内径：2 mm、長さ：100 mm、粒子径：3 μm）を用いた。LC-MS/MSの測定条件を表1に示す。

## 2. マトリックス効果の影響評価

### (1) 材料・試薬

マトリックスとして、1.において検査用試料の原料に用いたホタテガイ可食部（国内産）と、産業技術総合研究所が

2015年に主催した試験所間比較試験における試験試料であるホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた。

1 µg/mL溶液と1 µg/mLDTX1溶液（いずれも溶媒はメタノール）は産業技術総合研究所から入手した。LC-MS用アセトニトリルおよびギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級*n*-ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フィルム和光純薬から入手した。LC-MS用ギ酸アンモニウムはSigma Aldrichから入手した。

#### (2) ホタテガイ可食部を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程によってホタテガイ可食部を処理したE液およびC液と、ホタテガイ可食部由来のマトリックスを含まないM液の3種類の検討用試料を調製した。

1 µg/mL OA溶液と1 µg/mL DTX1溶液を混合した後にメタノールで希釈し、各30 ng/mL OAおよびDTX1混合溶液を調製した。

E液の調製 ホタテガイ可食部2 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、および中和処理した。得られた溶液を2 mLになるまで窒素下で濃縮し、さらにフィルターろ過することにより処理液Eを得た。次に、各30 ng/mL OAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固し、得られた残さを処理液E600 µLに溶解した。得られた溶液を“E液”とした。

C液の調製 ホタテガイ可食部2 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサンによる洗浄、および固相抽出処理した。

得られた溶液を2 mLになるまで窒素下で濃縮し、さらにフィルターろ過することにより処理液Cを得た。次に、各30 ng/mL OAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固し、得られた残さを処理液E600 µLに溶解した。得られた溶液を“C液”とした。

M液の調製 各30 ng/mL OAおよびDTX1混合溶液300 µLを窒素下で乾固させ、得られた残さをメタノール600 µLに溶解した。得られた溶液を“M液”とした。

#### (3) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製

異なる分析前処理過程および濃度によってホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を処理したE1液、E液、C1液、C2液と、試験所間比較試料由来のマトリックスを含まないM1液の5種類の検討用試料を調製した。なお、各液はOAとDTX1含有濃度が異なる5種類の溶液群から構成される。これらの試料の調製過程の概要を図1に示す。

M1液の調製 1 µg/mL OA溶液と1 µg/mL DTX1溶液を混合した後にメタノールで希釈し、OAを0、5、10、15、20 ng/mL、DTX1を0、16、32、48、64 ng/mL含む5種類の混合溶液を調製した。この溶液を“M1液”とした。

E1液およびE2液の調製 試験所間比較試料0.5 gを1. (3)a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、および中和処理した。この溶液の容量を2.5 mLに調整したものを処理液E1とした。また、処理液E1をメタノールによって4倍希釈したものを処理液E2とした。

さらに、処理液E1と処理液E2各0.5 mLを窒素下で濃縮乾固し、得られた残さをC1液(5濃度レベル)に溶解させることにより、“E1液”および“E2液”を調製した。

C1液およびC2液の調製 試験所間比較試料0.5 gを1. (3) a. の手順に従ってホモジナイズ、遠心分離、加水分解、中和処理、ヘキサンによる洗浄、および固相抽出処理した。この溶液の容量を2.5 mLに調整したものを処理液C1とした。また、処理液C1をメタノールを用いて4倍希釈したものを処理液C2とした。

さらに、処理液C1と処理液C2各0.5 mLを窒素下で濃縮乾固し、得られた残さをM1液(5濃度レベル)に溶解させることにより、“E1液”および“E2液”を調製した。

#### (4) LC-MS/MS測定

ホタテガイ可食部を用いた検討用試料のLC-MS/MS測定には、島津製作所製液体クロマトグラフ(ポンプ: LC-20AD、デガッサー: DGU-20A3、オートサンプラー: SIL-20ACHT、カラムオープン: CTO-20AC、システムコントローラ: CBM-20A)と、質量分析計(Applied Biosystems 3200 Q TRAP)を用いた。ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料のLC-MS/MS測定には、島津製作所製液体クロマトグラフ(ポンプ: LC-20AD、デガッサー: DGU-20A3、オートサンプラー: SIL-20ACHT、カラムオープン: CTO-20AC、システムコントローラ: CBM-20A)と、質量分析計LCMS8030を用いた。いずれにおいても、カラムはCadenza CD-C18カラム(内径: 2 mm、長さ: 100 mm、粒子径: 3 μm)を用いた。それぞれのLC-MS/MSの測

定条件は表1と同じである。

(倫理面への配慮)

研究に使用した貝毒や化学物質の取り扱いは、法令を遵守し、特定の区域でのみ行った。実験廃棄物は定められた方法に従い、必要に応じて専門業者に搬出した。

### C. D. 研究結果および考察

#### 1. 検査用試料の調製と評価

##### (1) 検査試料の調製の結果

検査用試料の調製には、ホタテガイ100匹分の可食部約2.4 kg(図1(a))を用いた。これをブレンダーで細断し、試料約2.3 kgを得た。さらにこの試料を裏ごし(図1(b))、可食部に含まれる繊維質分を除去した。回収した試料量は約1.8 kgであった。この試料をポリ製広口瓶に入れて約1時間30分回転混合した。

均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料は、得られる試料中の両者の混合比が一様になるように、2段階に分けて混合した。すなわち、ホタテガイ中腸腺試料10 gを精秤し、その9倍量のホタテガイ可食部を加えて混合し(図1(c))、得られた9つの混合物をさらに混合した。これにより、両者の混合物約770 gを得た。外観上混合物の均質性に外観上の問題はないと判断された(図1(d))。

そこで、回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、それぞれをガラス瓶に入れた。その後、各ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管23~25本に5gずつ小分けした。

以上によって、検査用試料123本を調製することができた(図1(e))。この試料の

均質性は、来年度評価する予定である。

## (2) 検査用試料の分析の結果

本報告書では、検査用試料の分析結果は、調製値に対する相対値としてのみ記載している。これは、実測値を記した場合にはパイロットスタディにおいて参加機関の技能を正確に評価できなくなるためである。

本研究で使用したホタテガイ可食部を分析したところ、OAとDTX1は検出されなかった。一方で、ホタテガイ中腸腺試料中のOAとDTX1濃度は既知であることから、(1)で調製した検査用試料中のOAとDTX1の濃度（調製濃度）が算出可能である。もし調製濃度の正確さが担保できれば、パイロットスタディにおいて調製濃度を参照値とすることが可能となる。そこで、調製した検査試料中のOAホタテガイ中腸腺試料中のOAとDTX1濃度を測定し、調製値と比較した。

その結果、OAとDTX1それぞれの調製濃度を1としたときの測定結果は、1.6(OA)および1.4(DTX1)であった。分析回数が少ないため(n=2)。この結果の精確さを評価することはできないが、分析値が何らかの誤差要因を含んでいることは否定できない。文献調査の結果、下痢性貝毒検査においてはLC-MS/MS測定におけるマトリックス効果が分析値に影響を与えうることが報告されていたため、これを検証する必要があると考えられた。

## 2. マトリックス効果の影響評価

### (1) ホタテガイ可食部を用いた評価結果

ホタテガイ可食部から調製した検査用

試料の分析(1. (2))において、検査用試験試料のOAとDTX1の定量結果が調製値よりも大きいことの原因として、マトリックス効果の可能性が考えられた。そこで、これを検証するためにM試料、E試料、C試料のLC-MS/MS測定を行った。これらの試料中のOAとDTX1濃度は、OA群の規制値である0.16 mg/kgの可食部試料から調製される試料溶液の濃度（16 ng/mL）相当となるように調整した。

LC-MS/MS測定における経時的な感度変化などによる影響を除外するために、3種類の試料の測定順はランダムとして、各試料について合計10回ずつ分析した。M液中のOAおよびDTX1の面積を1とした場合の相対値として、得られた結果を表2にまとめる。OAについては、E液およびC液の測定感度はM液の測定感度よりも高かった。一方、DTX1については、E液およびC液の測定感度はM液の測定感度よりも低く、1. (2)の結果とは反対の傾向を示した。しかしながら、M液とE液の測定結果およびM液とC液の測定結果のt検定を行ったところ、OAとDTX1の感度に有意な差は見られなかった（有意水準：0.05）。また、E液とC液の測定結果の比較においては、OAとDTX1の両方とも測定感度に大きな違いはみられず、少なくとも測定感度に関してはヘキサン洗浄および固相抽出処理の明確な効果はみられなかった。ただし、いずれの測定結果においても、測定の再現精度は10%以上(相対値)であり、測定の際につきが、試料間のマトリックス効果の違いよりも大きかったことは否定できない。そのため、LC-MS/MSと相補的に使用

可能な測定法の開発が必要と考えられる。本研究においては、来年度に蛍光検出法を利用した HPLC 法を検討する予定である。

## (2) ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試験を用いた評価結果

ホタテガイ中の下痢性貝毒検査では、可食部ではなく中腸腺を分析することにより、OA 群が基準値以下であるかを判定することも可能である。この方法は、OA 群が中腸腺に濃縮されることを利用したものである。分析操作においては、抽出および加水分解後の精製操作を省略し、希釈のみを行うことにより LC-MS/MS 測定が可能になる利点がある。しかし、この分析方法においても LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果が測定結果に影響しうると考えられた。そこで、中腸腺から調製した試験所間比較試験料をマトリックスとして、検証を行った。

試験所間比較試験料には OA と DTX1 が含まれていることから、(1)のアプローチとは異なり、既知量の OA と DTX1 を添加した検討溶液の LC-MS/MS 測定の結果から関係線を作成し、その傾きを用いて検証することにした。検討の結果、得られた関係線を図 3 に、また、関係線の傾きの回帰結果を表 3 に示す。各直線の切片が異なるのは、試験所間比較試験料そのものに OA と DTX1 が含まれるためである。一方、これら OA と DTX1 は、関係線の傾きには影響しない。すなわち、傾きの違いはマトリックス効果の影響を示唆している。本測定条件においては、中腸腺マトリックスによって LC-MS/MS の感度

(すなわちイオン化の効率)が高くなるエンハンスメントが確認された。また、固相抽出処理をした場合ほど、および、希釈倍率が高いほど、マトリックス効果の影響は小さくなった。しかし、いずれの関係線の傾きについても、試験所間比較試験料由来のマトリックスを含まない M1 液の関係線の傾きとは、有意な違いがみられた。

以上より、中腸腺試験料中の OA と DTX1 を正確に測定するためには、マトリックス効果の影響を除外する必要がある。その方法としては、更なる精製過程の追加、検量線標準のマトリックスマッチング、試料溶液の更なる希釈（より高感度な LC-MS/MS が必要）などが考えられた。

## E. 結論

本研究において、下痢性貝毒検査に関する外部精度管理調査パイロットスタディを実施することを最終目的としている。3年計画の初年度である令和2年度は、ホタテガイ可食部と中腸腺を原料とすることにより、検査用試料123本を調製することができた。また、調製した検査用試料を評価するためにはLC-MS/MSによる正確な分析が不可欠であることから、これを妨害すると考えられるマトリックス効果の影響を検証した。その結果、中腸腺試験料の分析においては、明らかなマトリックス効果の影響が確認された。一方で、可食部を主とする試料の分析においては、マトリックス効果の影響よりもLC-MS/MSの測定精度が、正確な分析を行う上での阻害要因であった。来年度、これらの間

題を克服可能な分析技術を検討する予定  
である。

**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 LC-MS/MSの測定条件

移動相	A：水（2 mMギ酸アンモニウム及び50 mMギ酸含有） B：95 %アセトニトリル（2 mMギ酸アンモニウム及び50 mMギ酸含有）
グラジエント条件	B：40 % (2分) → +5 %/分 (14分) → 100 % (20分) → -60 %/分 (21分) → 40 % (25分)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 µL
イオン化法	ESI(-)
プリカーサーイオンおよびプロダクトイオン	OA：803→255(定量用)、803→113(確認用) DTX-1：817→255(定量用)、817→113(確認用)

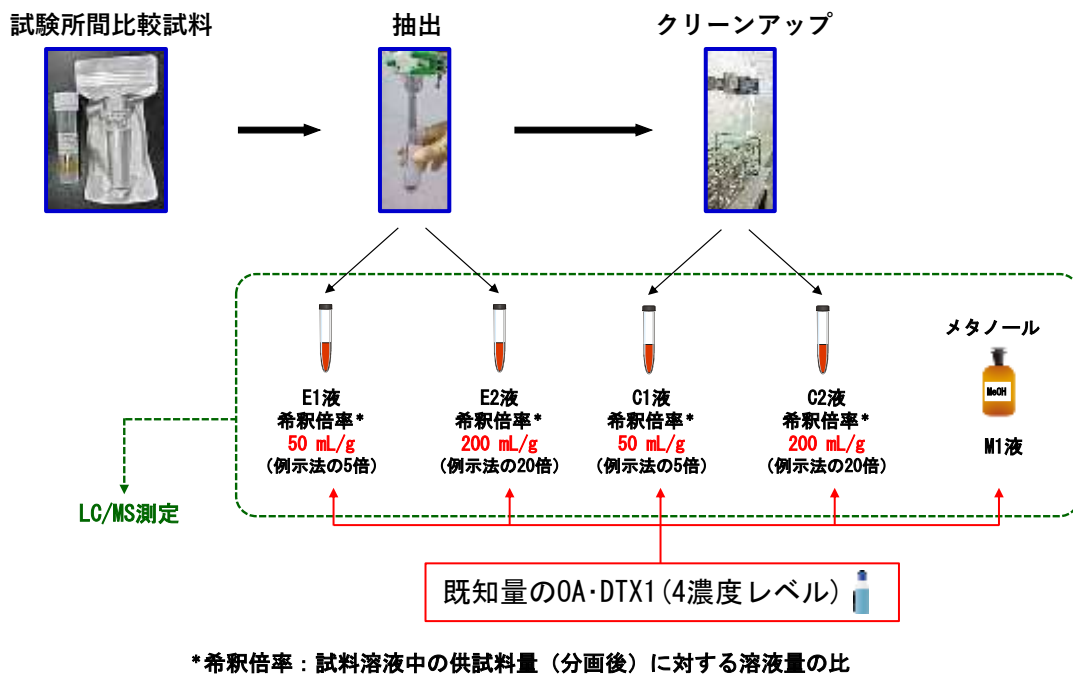


図1 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いた検討用試料の調製方法の概略



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)

図2 検査用試料の調製の記録写真

- (a) 原料として用いたホタテガイ可食部
- (b) ホタテガイ可食部の均質化
- (c) 均質化したホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料の混合（右：混合前、左：混合後）
- (d) ホタテガイ可食部とホタテガイ中腸腺試料の混合によって得られた試料
- (e) 調製した検査用試料

表2 ホタテガイ可食部から調製した検討用試料のLC-MS/MS測定における  
OAとDTX1の面積

検討用試料 <sup>a)</sup>	面積 <sup>b)</sup> (平均±標準偏差)	
	OA	DTX1
E液	1.14 ± 0.13	0.93 ± 0.13
C液	1.18 ± 0.21	0.80 ± 0.11
M液	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.19

a) E液、C液、M液の詳細は本文参照

b) M液中OAおよびDTX1の平均面積を1としたときの相対値

表3 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料から調製した検討用試料の  
LC-MS/MS測定における関係線の傾き

検討用試料 <sup>a)</sup>	面積関係線の傾き (傾き±標準誤差)	
	OA	DTX1
C1液	82.1 ± 4.5	143.9 ± 6.9
E1液	75.2 ± 2.2	140.1 ± 6.8
C2液	69.9 ± 5.2	152.3 ± 5.6
E2液	65.6 ± 2.4	135.3 ± 1.1
M1液	52.7 ± 3.7	91.2 ± 3.7

a) 各溶液の詳細は本文参照

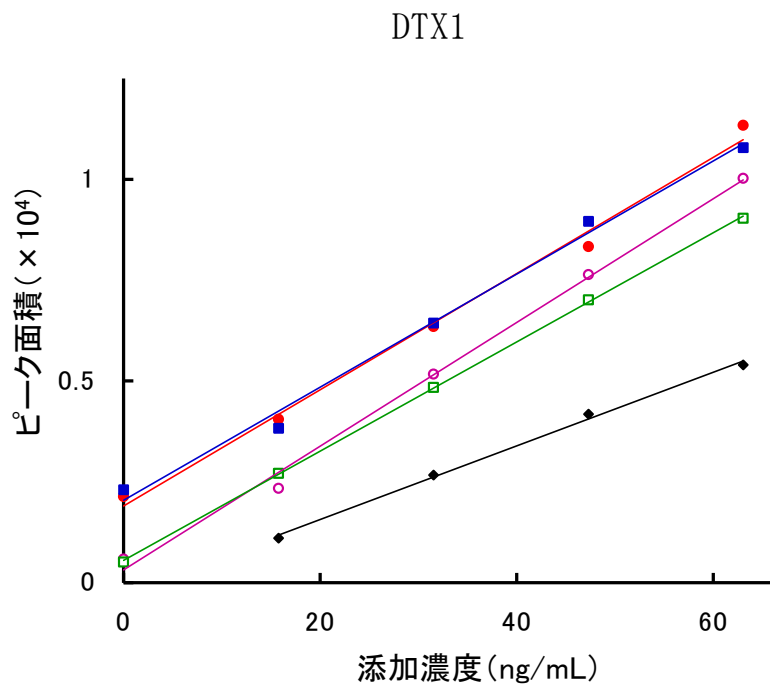
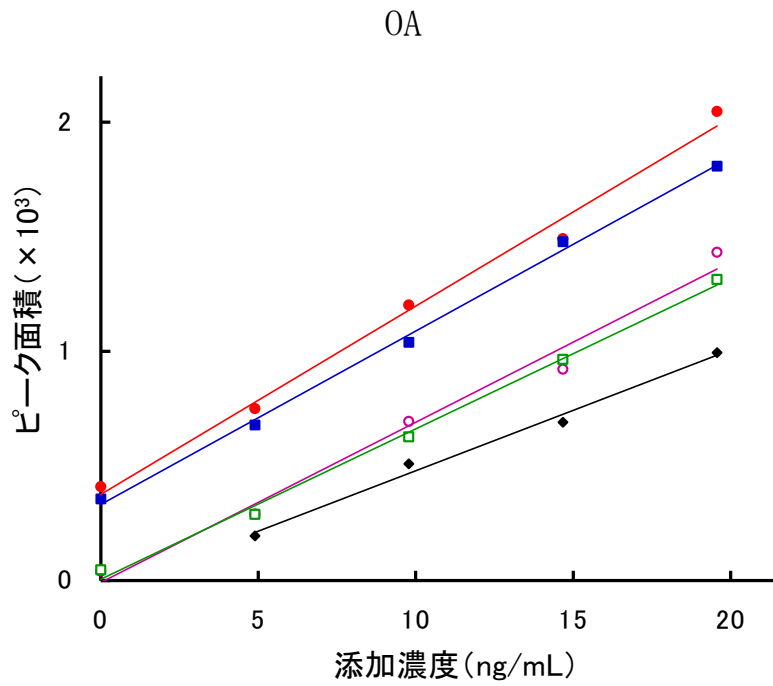


図3 ホタテガイ中腸腺の試験所間比較試料を用いたマトリックス効果の影響評価  
 ● C1液、■ E1液、○ C2液、□ E2液、◆ M1液