

令和4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 副所長
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。技能試験は試験所間比較試験などの外部精度管理は分析の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。下痢性貝毒の検査法として、わが国では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、現在定常的に実施されている下痢性貝毒検査のための外部精度管理はなく、この検査の信頼性を確保するうえでの問題点となっている。

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のパイロットスタディとして、試験所間比較試験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、試験所間比較試験において分析試料とする検査試料を調製するとともに、OA群のLC-MS/MS測定では分析値がマトリックス効果の影響を受けることを実証した。さらに令和3年度は、検査試料の均質性を評価するための分析法を確立するとともに、その方法によって前年度調製した検査試料の均質性を評価した。また、マトリックス効果の影響を受けない正確な分析を行うために、液体クロマトグラフィー蛍光検出法（HPLC-FLD）と、親水性及び親油性化合物用固相抽出充填剤を充填したHLBカートリッジによる精製を行うLC-MS/MSを検討し、特に検出感度において後者がより優れていることを確認した。

以上を受けて、3年計画の最終年度である令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがホタテガイ以外の2枚貝分析にも適用可能であるかを検証するとともに、令和2年度に調製した検査試料を用いてパイロットスタディを実施した。その結果、本研究で確立した検査試料の調製法並びに評価法を適用することにより、貝毒検査機関の技能を評価できることが確認された。

A. 研究目的

下痢性貝毒は、有毒渦鞭毛藻で汚染された二枚貝をヒトが摂取することにより下痢、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群と呼ぶ)。

わが国では、下痢性貝毒の検査にマウス毒性試験が適用されてきた。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防ぐことは、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試験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る。

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年計画の一年目である令和2年度は、パイロットスタディにおける分析試料とする検査試料を、ホタテガイを原料として調製した。また、OA群のLC-MS/MS測定では分析値がマトリックス効果の影響を受けることを実証した。これを受けて令和3年度は、検査試料の均質性を評価するための分析法を確立するとともに、その方法によって前年度調製した検査試料の均質性を評価した。また、マトリックス効果の影響を受けない正確な分析を行うために、液体クロマトグラフィー蛍光検出法 (HPLC-FLD) と、親水性及び親油性化合物用固相抽出充填剤であるHLBカートリッジを用いた精製を行うLC-MS/MSを検討し、特に検出感度において後者がより優れていることを確認した。

以上の成果を受け令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがホタテガイ以外の二枚貝であるムラサキガイ、カキ、ア

サリの分析にも適用可能であるかを検証し、良好な結果を得た。また、令和2年度に調製した検査試料を用いて、外部精度管理のパイロットスタディを実施した。貝毒検査機関29機関の参加を受け、分析値のばらつきを評価するとともに、各機関の能力を試験的に評価した。その結果、本研究で確立した検査試料の調製法並びに評価法を適用することにより、貝毒検査機関の技能を評価できることが確認された。

B. 方法

1. HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1) 材料・試薬

ムラサキイガイ、カキ、アサリは市販の殻付き試料を使用した。

LC-MS用アセトニトリル及びギ酸、高速液体クロマトグラフィー用メタノール、試薬特級ヘキサン、水酸化ナトリウム、塩酸は富士フイ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。1 ppm OA溶液（溶媒：メタノール）と1 ppm DTX1溶液（溶媒：メタノール）は産業技術総合研究所から入手した。DTX2 認証標準物質はNational Research Council Canadaから入手した。試料調製やLC-MS/MSの移動相には純水製造装置Milli-Q Reference（ミリポア）によって精製した超純水を用いた。

(2) 試料の前処理方法

二枚貝試料を開殻した後、可食部をブレンダーで細かく刻んだ。この試料2 gを食安基発0306第4号・食安監発0306第2号

の別紙2に従って前処理した。ただし、固相抽出による精製は、HLBカートリッジ（Waters社製Oasis PRiME HLB 200 mg）を用いて、次の通りに行った。加水分解処理を行い、さらにヘキサン洗浄を行った貝試料の抽出液（約2.5 mL）水2.5 mLを加え攪拌し、HLBカートリッジに注入し、流出液を捨てた。次に、アセトニトリル/メタノール（4：1）5.0 mLをカートリッジに注入し、得られた溶液を回収した。その際、少量のアセトニトリル/メタノール（4：1）で、抽出液が入っていたねじ口試験管の内壁を洗った。得られた溶出液を窒素下で2 mLまで濃縮させ、試料溶液とした。

(3) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、島津製作所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。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. 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 材料・試薬

検査試料は、本事業で令和2年度に調製し、令和3年度に均質性を評価したホタテガイ試料を使用した。試薬類は1(1)と同じものを使用した。

(2) パイロットスタディの実施

パイロットスタディの参加募集は令和3年10月から令和4年2月に行った。

参加機関による分析期間は、令和4年7～9月とした。7月1日に、機関番号を記した「分析試料送付のご案内」及び、取扱注意事項を記した「分析試料の取り扱いについて（注意事項）」とともに検査試料3瓶を冷凍便により送付した。また同日、結果報告用のファイルを電子メールによって送付した。また、この結果報告用のファイルに誤記があったため、これを修正したファイルを7月8日に電子メールによって送付した。9月26日までに全ての参加機関から分析結果を受領した。

(3)安定性評価試験

参加機関における検査試料の保存条件は、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度とした。分析期間における検査試料の安定性を評価するために、茨城大学において、分析期間前後検査試料を分析した。適用した分析法は、B1(2)及び(3)の通りである。

(4)報告値の解析

参加機関から報告された分析結果は、JIS Z8405 (ISO 13528) 及びAOACガイドライン(AOAC Int., 2005)に準じて統計的に解析した。

(5)茨城大学における検査試料の分析

茨城大学でも検査試料を分析した。分析法は適用した分析法は、B1(2)に準拠したが、前処理操作における分析対象物質の回収率やLC-MS/MSにおけるマトリックス効果の影響を補正するために、前処理前の検査試料に既知量のOAとDTX1を添加

する、標準添加法を適用した。また、LC-MS/MS測定は島津製作所LCMS-8060を用いて行った。

(倫理面への配慮)

研究に使用した貝毒や化学物質の取扱いは、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. HLB精製/LC-MS/MSのホタテガイ以外への適用

(1)マトリックス効果の評価

HLB 精製を組み合わせた LC-MS/MS については、これまでにホタテガイを試料に用いて妥当性確認を行った。この方法がアサリ、カキ、ムラサキイガイ分析へ応用できるかを検討した。精製後の試料を LC-MS/MS によって測定した際のマトリックス効果の評価するために、B1(2)の方法によって各試料を処理した溶液を添加した標準溶液（マトリックス添加標準溶液）と、メタノールを溶媒とした標準溶液を LC-MS/MS により分析した。標準溶液中の OA 群の面積に対する各マトリックス添加標準溶液中の OA 群の面積（相対値）を表した結果を図 1 に示す。マトリックス効果はアサリ 101 %～106 %、カキ 101 %～112 %、ムラサキイガイ 109 %～115 %であった。マトリックス効果は 80 %～120 %の範囲にある場合、イオン化抑制やイオン化増強が許容できると考えられる。アサリ、カキ、ムラサキイガイすべての試料において、マトリックス

効果が 80 %～120 %の範囲内であったことから、分析値がマトリックス効果の影響を受けないことが示唆された。

(2) 真度と併行精度の評価

添加回収試験によって、HLB 精製を組み合わせた LC-MS/MS の精確さを評価した。得られた結果を表 2 に示す。各試料の OA 群の回収率と標準偏差は 87.4 %～106.5 %と 3.5 %～10.8 %であり、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準 (70 %～120 %、15 %以下) を満たすことが確認された。

2. 外部精度管理のパイロットスタディ

(1) 安定性の評価

参加機関における比較試料の分析期間の前後に、茨城大学において検査試料を分析した。その結果、分析の併行精度に対して有意 ($p>0.05$) ではないものの、DTX1の分析値が減少した (図2)。ただし、類似試料の安定性に関するデータからは OAとDTX1はこの温度で十分に安定であると考えられた。分散分析の結果から安定性に関する (標準) 不確かさ (各濃度に対する相対標準偏差) を算出したところ、OAが3.1 %、DTX1が8.4 %であった。

(2) 参加機関の結果

a. 参加機関の分析法と結果

全参加機関に対して、適用した分析方法 (機器の校正に用いた校正用標準、抽出・精製法、測定法) の報告を求めた。参加機関は厚生労働省から通知された機器分析法によって検査試料を分析することを原則としたが、精製法や測定法は、

例示されている方法 (別紙 2 の方法) には限定されなかった。参加機関が適用した分析法のうち、特徴的な事例を記す。精製過程においては ODS 以外のカートリッジを用いた固相抽出を行った機関が 12 機関あり (うち 1 機関は ODS と併用)、なかでも 8 機関は Waters 製 Oasis PRiME HLB を使用していた。一方、3 機関は固相抽出による精製を省略していた。また、LC 分離における移動相としては、ギ酸及びギ酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリルを使用した機関が多かったが、ギ酸のみを加えた水/アセトニトリル、アンモニア水を添加した水/アセトニトリルを使用した機関もあった。また、ギ酸を加えた水/メタノールや水/アセトニトリル/メタノールを使用した機関もあった。

各参加機関には、異なる試料瓶を用いることにより、独立した 3 回の分析を行うことを求めた。報告値 (平均値) の分布を図 3 に示す。なお、参加機関にはクロマトグラムの提出も求めたが、標準液と試験溶液 (試験試料を前処理した処理液) の両方において、明らかな妨害ピークが認められた機関はなかった。

b. 併行精度と室間精度

AOAC ガイドライン (AOAC Int., 2005) に基づき、参加機関の報告値の外れ値検定を行った。Cochran 検定 (室内変動の検定) と Grubbs 検定 (室間変動の検定) を行ったところ、Cochran 検定において 2 機関の OA の報告値と、1 機関の DTX1 の報告値が棄却された。

そこで、これら以外の報告値を用いて総

平均（平均値の平均）を求めた。さらに、一元配置分散分析の結果から併行相対標準偏差（併行精度） RSD_r と室間再現相対標準偏差（室間精度） RSD_R を算出した。その結果を表3にまとめる。 RSD_R の値は、Horwitz の修正式（Analyst, 2000）から求めた予測値 $PRSD_R$ に対して 105 % (OA) 及び 121 % (DTX1) であり、参加機関間の分析値のばらつきは良好であることが確認された。

(3) 付与値の算出

技能試験における付与値の算出方法にはいくつかある。その一つである中央値（メジアン）を用いる方法は、機関数が少ない場合の付与値の算出方法として頑健であると考えられている。そこで、参加機関の報告値の中央値を、本比較試験の付与値とした。外れ値を除いた参加機関の報告値の中央値を求めたところ、OA : 0.0189 mg/kg、DTX1 : 0.0373 mg/kg だった。これらの値は、検査試料の調製値（原料として使用中腸線認証標準物質中の OA 及び DTX1 の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出）とおおよそ一致していた。

報告値のばらつきを表す正規四分位範囲は OA : 16.9 %、DTX1 : 25.1 %（中央値に対する相対値）であった。これに対し、令和3年に評価した均質性に関する（標準）不確かさと、(1)で算出した DTX1 の安定性に関する（標準）不確かさが、それぞれの物質における正規四分位範囲の 0.3 倍を上回った。そこで、JIS Z8415 (ISO 13528) を参考にして、各物質における正規四分位範囲、均質性に関

する不確かさ（標準偏差）、安定性に関する不確かさ（標準偏差）を合成することにより、技能評価のための標準偏差を算出した。算出の過程を表4に示す。また、最終的に算出した付与値と技能評価のための標準偏差を表5に示す。

(4) 技能評価

JIS Z8415 (ISO 13528) に基づき、次式より参加機関のパフォーマンスの指標である z スコアを算出した。

$$z = (x - X) / \sigma$$

ここに、 x : 参加機関の報告値
 X : 付与値
 σ : 技能評価のための標準偏差

参加機関の z スコアの分布を図4に示す。

算出された z スコアを基に、各機関のパフォーマンスは次のように評価できる。

$$|z| \leq 2.0 :$$

“満足な” パフォーマンス

$$2.0 < |z| < 3.0 :$$

“疑わしい” パフォーマンス

$$3.0 \leq |z| :$$

“不満足な” パフォーマンス

結果として、OA について3機関、DTX1 については1機関の z スコアが 3.0 以上となり、OA について3機関、DTX1 については1機関の z スコアが 2 から 3 の範囲であった。 z スコアが 3 以上の機関の分析方法や結果を精査したところ、定量計算における計算ミスや、LC-MS/MS における測定感度の不足が原因として考えられた。

(5) 参照値の評価

パイロットスタディにおける参加者の

分析値（中央値）から算出した付与値の妥当性を評価するため、本研究で開発した分析法にさらに標準添加法を組み合わせた方法により、検査試料を分析した。分析は、参加機関による分析期間中に4回行った。得られた検量線の一例を図5に、また、4回の分析結果を表6にまとめる。

分析期間中に有意な分析値の変化は見られず、安定性評価試験においてみられた分析値の変化は、分析対象物の濃度の変化に起因しないことが示唆された。

一方、この分析結果は、検査試料の調製値（原料として使用した中腸線認証標準物質中のOA及びDTX1の認証値と、検査試料に対する質量分率から算出）は、調製値が試料中の水分量の変化を考慮していないことを考慮する必要はあるものの、良好に一致していた。一方、付与値とその技能評価標準偏差は、標準添加法による分析結果よりも低かった。参加機関の分析値は、前処理過程における分析対象物質の回収率が考慮されていないことが原因であると考えられたが、今後より詳細な検討が必要である。

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を実施するために必要な分析方法を開発するとともに、実際に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年計画の最終年度である令和4年度は、HLBを用いたクリーンアップがムラサキイガイ、カキ、アサリの分析にも適用可能であるかを検証するとともに、パイロットスタディを主催し、本研究の検討結果の有用性を検証

した。その結果、分析法については、適用した貝試料に対する妥当性が確認されたことから、ホタテガイ以外の検査試料への適用も可能であることが明らかになった。一方、パイロットスタディにおいては、検査試料の調製方法、均質性及び安定性の評価方法、付与値の算出方法、分析結果の解析方法に特段の問題がないことが確認された。ただし、均質性及び安定性の評価結果が付与値の不確かさに影響を与えたことから、今後より高感度な分析法の検討が必要であることも明らかになった。

本研究の成果を基に下痢性貝毒検査における分析精度管理がより高まることを期待したい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Yarita, S. Inagaki, Characterization of diarrhetic shellfish toxins in the *Mizuhopecten yessoensis* (Scallop) midgut gland by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS), *Analytical Letters*, Taylor & Francis, 56, 531-540, 2023.

2. 学会発表

1) 鎗田孝, 上原由理香, 鳥居塚南, 渡辺卓穂, 下痢性貝毒検査に関する試験所間比較試験のためのホタテガイ試料の調製と評価, 日本食品化学学会 第28回総会・学術大会 (東京), 2023.

2) 鳥居塚南, 上原由理香, 渡辺卓穂, 鎗田孝, 下痢性貝毒の機器分析法における固相抽出法とマトリックス効果に関する検討, 日本食品衛生学会第118回学術講演会(長崎), 2023.

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

パラメータ	操作条件
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))

表2 アサリ、カキ、ムラサキイガイ試料による添加回収試験の結果

	回収率 (%)		
	OA	DTX1	DTX2
アサリ	95.6±4.6	97.6±10.8	96.2±5.0
カキ	87.4±5.7	96.1±5.3	89.0±5.1
ムラサキイガイ	96.1±3.5	106.5±5.8	106.5±7.8

表3 参加機関の報告値から算出した総平均、併行相対標準偏差 (RSD_r)、
室間再現相対標準偏差 (RSD_R)

分析対象物質	総平均 (mg/kg)	RSD_r (%)	RSD_R (%)
OA	0.0197	6.1	23
DTX1	0.0372	4.5	27

表4 技能評価のための標準偏差（相対値）の算出

分析対象物質	正規四分 位範囲	均質性に関す る不確かさ	均質性に関す る不確かさ	技能評価のた めの標準偏差
OA	16.9	5.6	3.1	18.0
DTX1	25.1	5.9	8.4	27.1

各値は付与値に対する相対値(%)

表5 付与値と技能評価のための標準偏差

分析対象物質	付与値 (mg/kg)	技能評価のための 標準偏差 (mg/kg)
OA	0.0189	0.0034
DTX1	0.0373	0.0101

表6 標準添加法による検査試料の分析結果

分析対象物質	分析値 (mg/kg)				
	1回目	2回目	3回目	4回目	平均±標準偏差
OA	0.0246	0.0264	0.0263	0.0244	0.0254±0.0010
DTX1	0.0436	0.0449	0.0447	0.0413	0.0436±0.0016

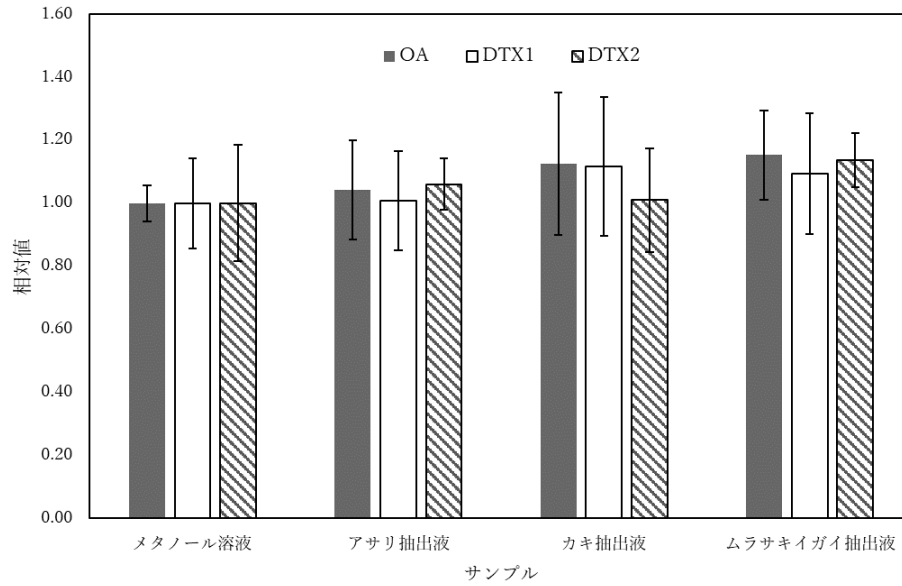


図 1 HLB 精製を行ったアサリ、カキ、ムラサキガイ試料の LC-MS/MS におけるマトリックス効果

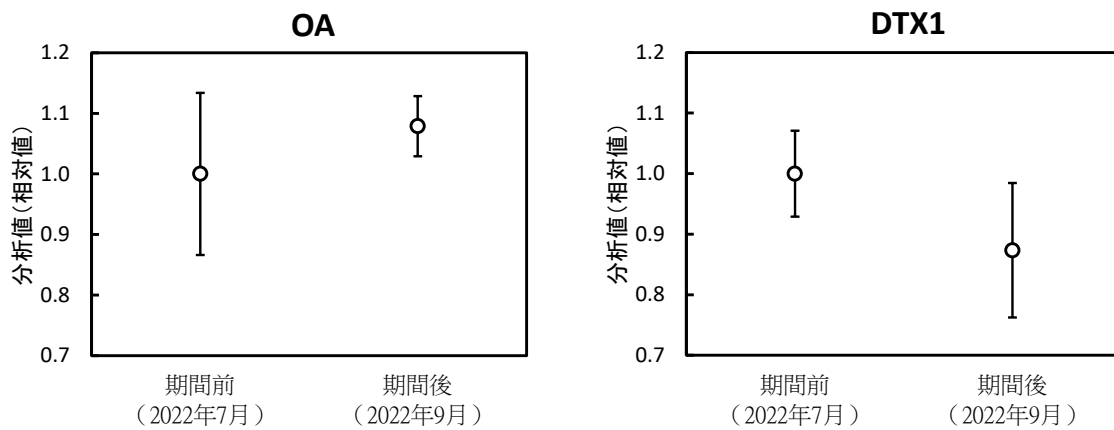


図 2 比較試料の安定性試験の結果

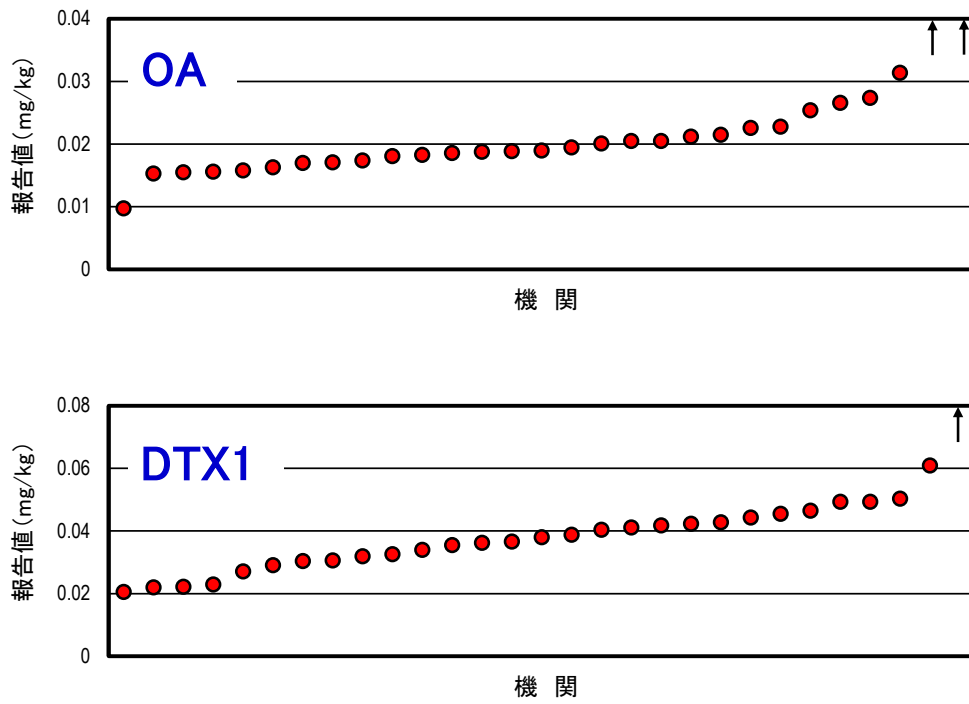


図3 参加機関の報告値（平均値）の分布
 （全報告値を横軸方向に昇順にならべた）

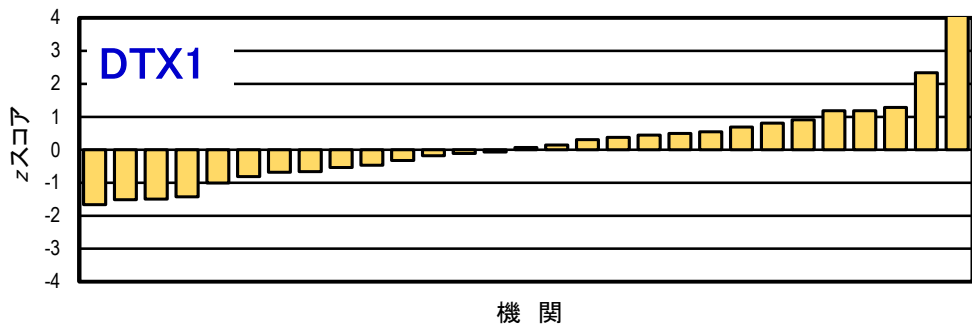
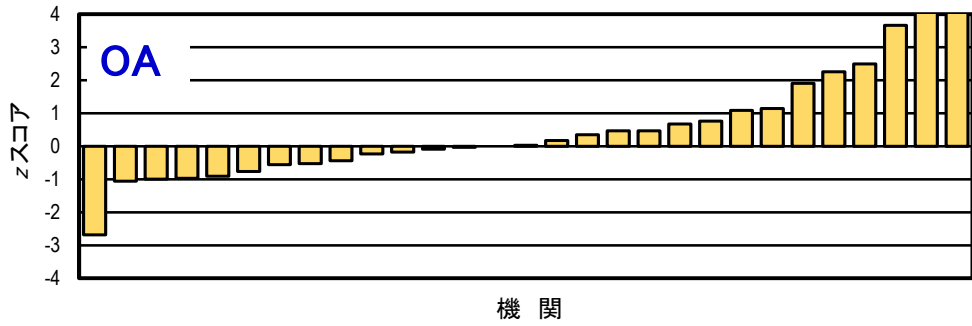


図4 参加機関の技能評価の結果
(参加機関のzスコアを昇順にならべた)

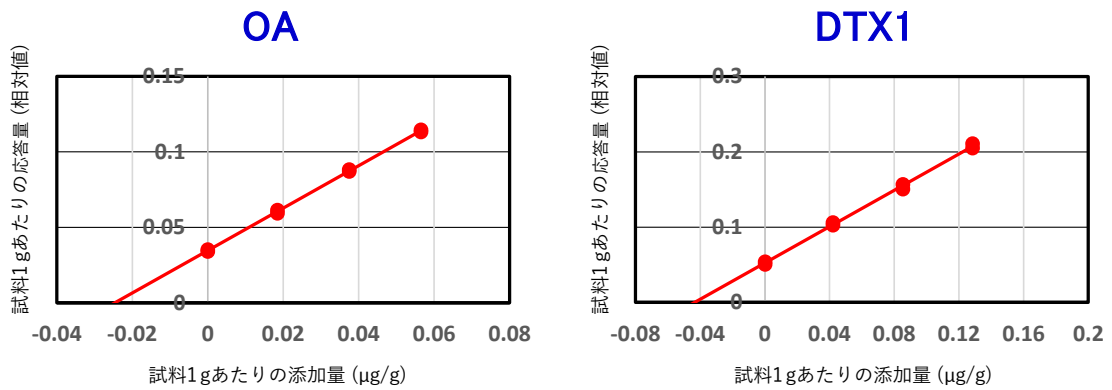


図5 標準添加法によって得られた検量線の一例