

厚生労働科学研究費補助金（食の安全確保推進研究事業）
（分担）研究報告書

自然毒等のリスク管理のための研究

－国際的に妥当性が評価された LC/MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立－

研究分担者	渡邊龍一	水産技術研究所	主任研究員
	小澤真由	水産技術研究所	研究員
	内田 肇	水産技術研究所	研究員
	松嶋良次	水産技術研究所	安全管理グループ長
	鈴木敏之	水産技術研究所	環境・応用部門長
研究協力者	沼野 聡	水産技術研究所	任期付研究員

要旨：国際的に妥当性が評価された、親水性相互作用カラムを用いた液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて、単一試験室による妥当性評価試験を実施した。対象成分は、麻痺性貝毒 11 成分 (C1/C2, GTX1-6, dcGTX2/3, dcSTX) およびフグ毒テトロドトキシン (TTX) とした。まず、市販の標準品を用いて、検出下限 (LOD) および定量下限 (LOQ) を算出し、感度良く検出、測定可能であることを確認した。次に、産業上重要な水産物であるホタテガイを対象として、2 濃度 (毒成分の合算値が海外の規制値 0.8 mg STX-2HCl 当量/kg 相当の濃度、その 1.3 倍の濃度) で妥当性評価試験を実施した。

妥当性評価結果は、麻痺性貝毒 11 成分において溶媒検量線およびマトリックス検量線 (ムラサキイガイ、ホタテガイ) で、CODEX で定められた性能基準の真度 (回収率)、室内精度を満たした。一方で、TTX では溶媒検量線よりもマトリックス検量線で良好な回収率となったことや、同一濃度における標準液のピークエリア値の差から、LC/MS/MS 測定時におけるイオン化抑制が起きていると考えられた。

また、前年度の事業成果より、二枚貝代謝物 M-toxins が総毒力に寄与していることが推定されたため、M-toxins を含めた麻痺性貝毒分析法の検討や毒化二枚貝の部位別分析を行った。高毒化したホタテガイを対象とし、部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、生殖腺、鰓) を分析したところ、M-toxins の主な蓄積部位が中腸腺と腎臓であることが明らかになった。一方で、標準品が存在せず、毒性不明の M-toxins と考えられるピークも多数検出されたことから、さらなる調査が必要である。

A. 研究目的

麻痺性貝毒 (Paralytic Shellfish toxin, 以下 PST) は、サキシトキシン (STX) を代表として、C トキシンやゴニオトキ

シン (GTX) など約 70 種類が知られる化合物群である。電位依存性ナトリウムチャンネルを特異的に阻害することが知られている。PST は、海洋において有毒

プランクトンが産生し、同海域に生息、養殖されている二枚貝が有毒プランクトンを摂取することで毒化する。

日本では、生産海域に発生するプランクトンをモニタリングしており、その発生状況や細胞密度に基づき、監視強化に移行する措置をとっている。また、出荷の判定には、公定法としてマウス毒性試験が採用されており、規制値は4 MU/g (CODEX における 0.8 mg STX-2HCl eq./kg 相当) と定められている。一方で、代替法として、機器分析機器 (HPLC や LC/MS/MS) を用いた分析法が開発されている。欧州連合 (EU) 域では、2019 年より蛍光 HPLC による機器分析法を公定法として採用している。LC/MS/MS を用いた分析法は、A.D. Turner らによって単一試験室での妥当性確認がなされ、のちに本研究所も含む諸外国の主要研究機関による国際妥当性評価試験が行われた。このような背景の下、2020 年 10 月に EU 向け二枚貝輸出において機器分析を使用するよう通知 (SPS 通報) が発出され、2021 年 10 月から施行されている。こうした背景から、国際的な麻痺性貝毒の検査方法は、マウス毒性試験に替わり機器分析法が主流になりつつある。

また、近年、フグ毒テトロドトキシン (TTX) が、EU 域やニュージーランド、日本の一部海域で採取されたカキ、イガイ、ホタテガイ、アカザラガイなどの二枚貝に低濃度含有されていることが相次いで報告されている。EFSA では、リスク管理として 44 µg/kg のしきい値を設定している。麻痺性貝毒と TTX は、

同じ水溶性化合物である特性のほか、電位依存性ナトリウムチャンネルを特異的に阻害する共通点を有し、作用機序の類似性で相加性を示す。また、現在の麻痺性貝毒の公定法では、塩酸加熱抽出が行われるが、TTX も抽出されるため、仮に検体中に TTX が入っていたとしても、PST と同時に毒性評価がなされている状況と考えられる。

そこで、我が国で麻痺性貝毒の機器分析法を普及させていくために不可欠な要因を、本事業や別事業で一つずつ検討、解決していく必要がある。

まず、国内機関における麻痺性貝毒および TTX の妥当性評価試験実施の必要である。各検査機関や衛生研究所においては、食品中の残留農薬や動物用医薬品、そのほか有害物質の検査の信頼性を担保するために、内部精度管理や外部精度管理を実施している。麻痺性貝毒のマウス毒性試験については、一般財団法人食品薬品安全センターが外部精度管理調査を実施しており、各機関で精度管理を実施している。我が国で麻痺性貝毒の公定法が機器分析法へと移行する際、各機関で妥当性確認を行うことが求められる。

次に、麻痺性貝毒の代謝物 M-toxins の存在である。近年、国内外の二枚貝より PST の主要毒に加えて、M-toxins の検出が報告されている。Quilliam によって、12 種類の M-toxins (M1-12) が提唱されているが、沼野・山下らがヘミアミナル型を有する M5-HA、M6-HA の報告をしている。これらの毒成分は、毒性等価係数が不明であり、かつ、認証標準物質

が市販されていないため、その濃度および毒力を算出することはできない。前年度の本事業において、マウス毒性試験による毒力と LC/MS/MS から得られた毒値から換算した毒力とが、一部乖離する結果となった。このことより、試料中に含まれる M-toxins が、毒力にある程度寄与している可能性が示唆された。

さらに、STX が化学兵器禁止法で特定物質に指定されているため、機器分析法の普及の妨げになっている。これまで、貝類中の STX を定性、定量するために、STX を使わない定量法 (dcSTX を用いた代替検量線など) が検討されたが、実用には至っていない。

近年、東京農工大学の長澤らによって、STX 鏡像異性体 (エナンチオマー) である ent-STX の合成技術が確立され、本研究所が中心となって有用性の検証を進めているところである。

以上の背景から、今年度は LC/MS/MS 法による国内貝毒検査法の確立を目的としたデータ拡充のために、国内主要二枚貝であるホタテガイを用いて、LC/MS/MS 法の妥当性評価試験を実施することとした。対象成分を麻痺性貝毒 11 成分、二枚貝から検出されるフグ毒 TTX として、溶媒検量線およびマトリックス検量線で検証した。また、M-toxins について、分析法の構築を検討し、部位別の毒蓄積について測定をした。

B. 研究方法

(1) 妥当性評価試験

A.D. Turner らの報告や、下痢性貝毒に関する通知^{*1} および妥当性評価ガイ

ドライン^{*2}を参考として、枝分かれ試験 (分析者 1 名、2 併行、5 日間) の添加回収試験を実施した。

試料は、市場に流通した青森県産ホタテガイを入手し、中腸腺を含む可食部全体を用いた。ホタテガイむき身 5 個体、200g 以上をミキサーで均一化した。試験に際して、試料としたホタテガイは麻痺性貝毒を含有していないことや、定量に妨害するピークが検出されないことを確認した。LC/MS/MS 分析に供する検体は、*J. Chromatogr. A* 1387 (2015) p1-12 に従い、抽出・前処理を行った。分析に用いた標準物質は、カナダの NRC 認証標準物質 12 成分 (C1/2, GTX1-6, dcGTX2/3, dcSTX, TTX) を用いた。組成標準物質は、CRM-Zero-Mus (Mussel tissue matrix for negative control、イガイペースト) は NRC 製を用いた。また、検量線は、溶媒検量線 (0.25 % 酢酸含有 80 %アセトニトリルによる希釈)、マトリックス検量線 (ホタテガイペーストの抽出液もしくはムラサキイガイペーストの抽出液による希釈) を用いた。本試験では、選択性、検量線の直線性、検出下限、定量下限、真度、併行精度、室内精度について検証した。CODEX の性能規準に定められている項目について、適合しているか判断した。

*1 下痢性貝毒 (オカダ酸群) の検査について (平成 27 年 3 月 6 日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発 0306 号第 4 号)

*2 食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインの一部

改正について (平成 22 年 12 月 24 日厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知食安発第 1224 第 1 号)

*3 FAO / WHO, CODEX STAN 292-2008

(2) M-toxins の分析法検証、部位別の蓄積

毒化ホタテガイより単離した M1, M3, M5-HA および、化学誘導で得られた M2, M4 を定性用標準品として用いて、分析法の検証を行った。また、麻痺性貝毒により毒化したホタテガイを入手し、産地から届いてすぐに部位別 (貝柱、中腸腺、腎臓、鰓、外套膜、生殖腺) に切り出した。これは、冷凍および解凍を行うと、毒成分が他部位を汚染する可能性があったためである。

毒抽出は、沼野らの方法および Turner らの方法を組み合わせて行った。すなわち、希塩酸による加熱抽出し、ヘキサン脱脂をした後、固相カートリッジ (Waters 社 Oasis HLB) に通し、限外ろ過 (Merck 社 Amicon Ultra) で得られた検液を、ENVI-Carb でクリーンアップした。

C. 研究結果と考察

D. (1) 妥当性評価試験

麻痺性貝毒 11 成分の検出下限および定量下限について、Table 1 に示す。

添加回収試験は、2 濃度により実施した。結果を、Table 2 に示す。溶媒検量線による定量では、真度 78.3~105.3 %、併行精度 15.0 %以下、室内精度 24.1 %以下であった。また、マトリックス検量線 (ホタテガイ抽出液) では、真度 69.4

~101.8 %、併行精度 13.1 %以下、室内精度 24.7%以下であった。さらに、マトリックス検量線 (ムラサキイガイ抽出液) を用いた際には、真度 65.6~93.2%、併行精度 13.1 %以下、室内精度 30.2 %以下であった。これらの結果は、CODEX の性能評価規準に定められている検出下限、定量下限、真度 (回収率)、室内精度の基準を満たしていた。

一方で、ホタテガイ中のフグ毒 TTX は、溶媒検量線を用いた定量において、27.3~38.2%の回収率であった。同検液をマトリックス検量線 (ムラサキイガイ抽出液) で定量したところ 34.7~49.7%の回収率であったが、マトリックス検量線 (ホタテガイ抽出液) で定量したところ、57.8~74.0%の回収率が得られた。TTX 標準液を溶媒もしくはマトリックスで希釈し、同一濃度におけるピークエリアを比較したところ、マトリックス希釈でエリア値が小さいことが分かった。このことより、TTX は、LC/MS/MS 測定時において、ホタテガイ中のマトリックスによるイオン化抑制の影響を受けていることが考えられた。

マトリックス検量線を用いる際は、ムラサキイガイとホタテガイのマトリックスの影響が異なることを考慮し、適切なマトリックスを選択することが望ましいと考えられる。

また、本試験では *J. Chromatogr. A* 1387 (2015) p1-12 に従って Supelco 社の ENVI-Carb 固相カートリッジを用いたが、Agilent 社の Bond Elut Carbon 固相カートリッジを使用した場合においても同様の結果が得られることを確認し

た。

(2) M-toxins の分析法検証、部位別の蓄積

入手した毒化ホタテガイ (2023 年 6 月～9 月採取) において、M-toxins は中腸腺と腎臓が主な蓄積部位であったが、貝柱と鰓には蓄積していないことが確認できた。一方で、C トキシンや GTX 群、STX 類等の主要成分は、中腸腺、腎臓、鰓、生殖腺、外套膜のいずれの部位から検出された。このことは、呼吸および海水中のプランクトンをろ過する機能を有する鰓においては、M-toxins への変換がなされていないと示唆された。また、部位によって代謝物の蓄積能が異なることが考えられた。M-toxins の構造上の特徴は、水酸基 (-OH 基) が多いことであり、極性は代謝される前の毒と比較して高くなる。貝体内の解毒メカニズムとして、M-toxins へと変換することで、海水に溶けやすくなり、体外への放出が促進されると考えられる。今回の部位別分析により、M-toxins は体外に排出されていく一方で、ある程度体内に蓄積していることが明らかになった。

また、今回の試験液からは、他の M-toxins と思われるピークが多数検出された。これらの M-toxins は前年度にマウス毒性試験と LC/MS/MS との毒力が乖離した要因となっている可能性がある。

E. 結論

国際的に妥当性が評価された麻痺性貝毒の機器分析法について、我が国にお

ける単一試験室の妥当性評価を実施した。麻痺性貝毒 11 成分については、概ね良好な結果が得られたが、TTX については溶媒検量線よりもマトリックス検量線を用いて定量することにより良好な結果が得られた。

また、麻痺性貝毒の代謝物 M-toxins について、分析法の検証およびホタテガイにおける部位別蓄積を検証した。主な蓄積部位は、中腸腺や腎臓であったが、他部位にも M-toxins が蓄積していることが明らかになった。現時点において、M-toxins の毒性は明らかになっておらず、毒力にどの程度寄与しているか不明である。

未知ピークの同定および各 M-toxins の毒性を明らかにすることで、機器分析法で標準物質が必要な麻痺性貝毒代謝物を選定することも今後の検討課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

沼野 聡, 渡邊龍一, 小澤眞由, 内田肇, 松嶋良次, 鈴木敏之. ホタテガイ中の麻痺性貝毒およびテトロドトキシンを対象とした液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法の妥当性評価, 食品衛生学雑誌 (2024.05 現在, 投稿中)

2. 学会発表

沼野 聡, 渡邊龍一, 小澤眞由, 松嶋良次, 工藤雄大, 山下まり, 鈴木敏之, 二

枚貝が含有する麻痺性貝毒の代謝物に関する研究, 第119回日本食品衛生学会学術講演会 (2023, 東京, 優秀演題賞受賞)

性貝毒の代謝物 (M トキシン) 蓄積について, 漁場環境保全関係研究開発推進会議 赤潮貝毒部会 東日本貝毒分科会 (2023.11, 仙台)

3. その他

沼野 聡, 渡邊龍一, 小澤真由, 内田肇, 松嶋良次, 加賀新之助, 工藤雄大, 山下まり, 鈴木敏之, 二枚貝類における麻痺

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

Table.1 妥当性評価の結果 (検出下限および定量下限)

dilution	Analyte (Molecular weight, g/mol)	Solvent		Matrix (scallop)		Matrix (mussel)		Criteria (Codex) *1		Criteria (Codex) *2	
		LOQ (nmol/L)	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)	LOD (nmol/L)	LOQ (mg/kg)	LOD (mg/kg)
dcSTX	256.26	14.5	5.0	22.3	5.2	18.6	5.6	78.0	39.0	0.02	0.01
GTX1	411.4	7.7	2.5	7.4	1.9	9.9	3.0	48.6	24.3	0.02	0.01
GTX2	395.4	4.3	1.3	3.7	1.1	3.4	1.0	151.7	75.9	0.06	0.03
GTX3	395.4	9.9	3.2	9.7	3.2	12.7	2.9	151.7	75.9	0.06	0.03
GTX4	411.4	3.4	1.0	3.4	0.8	3.4	1.6	48.6	24.3	0.02	0.01
GTX5	379.35	3.6	1.4	4.8	1.2	4.4	0.9	158.2	79.1	0.06	0.03
GTX6	395.35	2.5	0.8	11.8	3.6	5.9	2.2	151.8	75.9	0.06	0.03
dcGTX2	352.3	17.1	2.6	25.8	6.4	27.8	8.3	170.3	85.2	0.06	0.03
dcGTX3	352.3	2.9	1.0	5.1	1.1	3.3	1.0	170.3	85.2	0.06	0.03
C1	475.4	4.3	1.3	6.4	1.9	10.4	3.1	126.2	63.1	0.06	0.03
C2	475.4	3.6	1.2	4.4	1.3	12.2	3.3	126.2	63.1	0.06	0.03
TTX	319.27	2.3	1.1	7.9	3.1	3.1	1.5	(not set)	(not set)	(not set)	(not set)

LOQ (Limit of quantification) : s/n = 10, LOD (Limit of detection) : s/n = 3

*1 Codex の性能規準では、各毒成分の LOD 値および LOQ 値が mg/kg で記されている。

参考として、*2 に記した。よって、mg/kg から nmol/L への変換は、次の計算例のように行った。また、他の毒成分も同様に算出した。

例) dcSTX の LOD 値, $0.01 \text{ (mg/kg)} \div 256.26 \text{ (g/mol)} \times 1,000,000 \doteq 39.0 \text{ (nmol/L)}$

各毒成分の Molecular weight 値 (g/mol) は、National Research Council Canada 標準品付属の添付文書による。

Table.2 妥当性評価試験の結果 (回収率、併行精度)

Result of validation study (Low concentration)

Analyte	Calibration curve (solvent)			Calibration curve (scallop)			Calibration curve (mussel)			Criteria (Codex)	
	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _{WR} (%)
dcSTX	90.1	12.2	12.3	69.4	7.3	8.9	90.3	5.9	7.9	50-130	≦ 44
GTX1	93.0	8.6	10.1	101.7	7.4	9.1	76.9	10.4	14.8	50-130	≦ 44
GTX2	105.1	7.2	9.5	95.0	4.9	8.6	88.0	4.4	6.3	50-130	≦ 38
GTX3	97.2	5.5	8.6	85.2	11.1	14.9	80.8	5.6	5.8	50-130	≦ 38
GTX4	105.3	12.2	15.0	99.5	8.7	12.7	80.0	7.7	12.9	50-130	≦ 44
GTX5	95.3	6.8	10.3	91.8	10.2	10.3	85.0	2.9	13.8	50-130	≦ 38
GTX6	88.7	5.5	14.0	101.8	11.7	15.3	83.4	13.1	15.2	50-130	≦ 38
dcGTX2	103.8	8.5	10.6	87.0	13.1	18.3	93.2	8.7	9.9	50-130	≦ 38
dcGTX3	91.4	7.9	18.5	96.6	8.8	10.4	84.9	3.4	12.5	50-130	≦ 38
C1	91.8	13.3	14.5	98.0	5.1	8.9	83.5	4.0	7.8	50-130	≦ 38
C2	79.2	10.6	11.4	100.1	9.6	16.9	69.2	10.8	11.0	50-130	≦ 38
TTX	38.2	9.3	22.1	74.0	13.2	17.9	49.7	11.6	16.5	-	-

Result of validation study (High concentration)

Analyte	Calibration curve (solvent)			Calibration curve (scallop)			Calibration curve (mussel)			Criteria (Codex)	
	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _r (%)	RSD _{WR} (%)	Trueness (%)	RSD _{WR} (%)
dcSTX	81.9	9.3	12.6	81.7	10.0	21.0	73.8	9.2	10.7	50-130	≦ 44
GTX1	79.9	6.1	16.7	90.7	7.5	21.1	66.3	6.9	19.0	50-130	≦ 44
GTX2	95.3	4.2	13.6	101.8	3.5	6.6	81.3	3.7	22.8	50-130	≦ 38
GTX3	83.3	4.3	13.6	91.0	3.5	9.9	69.7	3.2	23.3	50-130	≦ 38
GTX4	86.0	6.1	13.8	98.8	12.5	14.8	72.9	12.1	25.4	50-130	≦ 44
GTX5	83.8	5.3	9.4	89.3	6.7	17.2	70.7	6.0	24.6	50-130	≦ 38
GTX6	78.4	9.0	14.3	95.6	6.4	11.1	65.6	6.6	30.2	50-130	≦ 38
dcGTX2	88.8	8.0	9.6	87.3	9.5	24.7	84.7	5.6	29.7	50-130	≦ 38
dcGTX3	78.7	3.6	4.6	90.5	6.4	16.7	69.4	3.2	25.0	50-130	≦ 38
C1	78.3	15.0	24.1	94.0	7.9	24.4	70.4	8.1	10.5	50-130	≦ 38
C2	80.4	7.1	14.6	95.0	9.9	18.0	66.1	7.9	22.6	50-130	≦ 38
TTX	27.3	19.4	21.4	57.8	26.7	30.7	34.7	21.8	28.7	-	-

RSD_r : Relative standard deviation (Repeatability) , RSD_{WR} : Relative standard deviation (Within-laboratory reproducibility)

Shaded texts : Trueness (%) ≦ 50, - : Not se