

令和 5 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

下痢性貝毒検査の試験所間比較に関する研究

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 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。技能試験を含む試験所間比較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 5 年度は、調査試料の調製法を検討するとともに、OA 群の LC-MS/MS 測定を正確に定量するための精確な分析法を検討した。

調査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 5 g ずつ瓶詰することにより、調査試料 160 本を調製した。一方、精確な分析法の検討においては、移動相の組成等が異なる LC-MS/MS 条件 4 条件について、各々を最適化したのちに感度を比較するとともに、LC-MS/MS 測定におけるマトリックス効果の影響を評価した。さらに、最適化された分析条件を用いて添加回収試験を行い、分析が良好な精確さを有することを確認した。

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ニン-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や試験所間比較はない。そのため、下痢性貝毒検査を行う試験所がISO/IEC17025の認定を取得する際には、技術的な障害となりうる。

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年計画の初年度である令和5年度は、パイロットスタディの調査試料の調製方法を検討し、実施に調製した。さらに、調製した調査試料を評価するためにはLC-MS/MSによる定量が不可欠であることから、高感度かつ精確な定量を可能とする分析方法を検討した。

B. 方法

1. 調査試料の調製

(1) 材料・試薬

検査用試料の調製には、ホタテガイ可食部 (北海道産) 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)、OA標準品 (富士フイルム和光純薬、生化学用) および1 µg/mL DTX1溶液 (メタノール溶液) (産業技術総合研究所) を用いた。LC-MS/MSの移動相に用いた超純水は、純水製造装置Milli-Q Reference (ミリポア) によって調製した。他の試薬は、LC-MS用または試薬特級品を用いた。

(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（1.4 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、混合した。このポリ製広口瓶をポットミル機で約1.5時間回転混合させた。

7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20 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。さらに、あらかじめOA標準品と1 µg/mLDTX1溶液の混合溶液を適量添加した。それぞれのガラス瓶の内容物をスパチュラで混ぜ合わせた後、ポットミル機を用いて約30分回転混合した。得られた内容物を1つのポリ製広口瓶にあわせ、ポットミル機を用いた2.5時間回転混合した。

回転混合させた試料をおおよそ5等分に分け、各瓶の内容物を混合した。さらに各瓶の内容物を約20 gを取り出し、別のガラス瓶に入れ、混合した。この操作を10瓶について行った。その後、ガラス瓶の内容物をポリ製遠沈管に5gずつ小分けした。

(3) 分析方法

OA標準品の不純物を評価するために、LC-MS/MS測定を行った。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. 精確な分析法の検討

(1) 材料・試薬

ホタテガイ試料には青森産のホタテガイを用いた。

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（CRM-DTX2-b）はNational Research Council から入手した。試料調製やLC-MS/MSの移動相に用いた超純水は、純水製造装置Milli-Q Reference（ミリポア）によって調製した。他の試薬は、LC-MS用または試薬特級品を用いた。

(2) ホタテガイ試料の前処理方法

あらかじめブレンダーで処理したホタテガイ2.00 gを遠沈管にとり、メタノール9 mLを加えてホモジナイズした後に遠心分離し、上清をとった。沈殿物に90 % (V/V) メタノール9 mLを加えてホモジナイズした後に遠心分離し、上清をとった。得られた上清を合一し、さらに90 % (V/V) メタノールを加えて正確に20 mLとした。

得られた抽出液の2 mLに2.5 mol/L水酸化ナトリウム水溶液250 µLを加え、76 °Cで40分間加水分解した。その後、2.5 mol/L塩酸を250 µLまたは300 µL加え中和し、*n*-ヘキサン2.5 mLによる脱脂処理を2回行った。

得られた処理液を次の2固相抽出（SPE）条件のいずれかで処理した。

a. HLBカートリッジを用いたSPE

脱脂した処理液に水2.5 mLを加えて攪拌した溶液をHLBカートリッジ（Waters社製Oasis PRiME HLB 200 mg）に注入し、その流出液は捨てた。次に、アセトニトリル/メタノール（4：1）5 mLをカートリッジに注入し、流出液を回収した。その際、溶液の一部を用いて加水分解を行った試験管の内壁を洗った。その後、回収した溶液を窒素下で2 mLに濃縮した。

b. ODSカートリッジを用いたSPE

脱脂した処理液に水2.5 mLを加え攪拌した。この溶液を、あらかじめメタノール5 mLと水を5 mLを順次注入してコンディショニングしたODS カートリッジ（ジューエルサイエンス社製 Inert-Sep C18 200 mg）に注入し、その流出液は捨てた。次に、加水分解を行った試験管に40 %（V/V）メタノール2 mLを加えて攪拌し、得られた溶液をカートリッジに注入し、その流出液は捨てる操作を2回行った。さらに、カートリッジに水3 mL、40 %（V/V）メタノール3 mLを順次注入し、各流出液は捨てた。次いで、90 %（V/V）メタノール3 mLをカートリッジに注入し、得られた流出液を回収し、窒素下で2 mLまで濃縮した。

(3) LC-MS/MS測定

LC-MS/MS測定には、1(3)と同じ装置を用いた。測定条件として、表1～4に示した条件A～Dを適用した。

（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、法令を遵守し、特定の区域での

みを行った。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. 調査試料の調製

調製する調査試料に含有するOAとDTX1の濃度を調整するために、市販のホタテガイ可食部に、OAとDTX1が含有されたホタテガイ中腸腺試料とOAおよびDTX1の混合溶液を適量混合することにした。その際、OAは生化学用の標準品を用いたため、あらかじめその希釈溶液をLC-MS/MSで測定し、不純物を確認した。その結果、下痢性貝毒の機器分析における一般的な測定条件では、OAやDTX1の溶出時間付近に不純物が認められないことを確認した。

調査試料の調製には、ホタテガイ可食部約1.7 kg（図1(a)(b)）を用いた。これをブレンダーで細断した（図1(c)）後に裏ごしし（図1(d)）、繊維質分等を除去した試料約1.4 kgを得た。

一方、OA標準品適当量と1 µg/mLDTX1溶液適当量を混合し、添加用の混合溶液を得た。

均質化したホタテガイ可食部、ホタテガイ中腸腺試料、及び添加用の混合溶液は、最終的に得られる試料中のOA及びDTX1ができるだけ均質に分布されるように、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20 gを精秤し、その9倍量のホタテガイ可食部と、それぞれの比に応じた混合溶液適当量を加えて混合し（図1(e)(f)）、得られた7つの混合物をさらに混合した（図1(f)）。さらに、各瓶の内容物を合わせ、約30分回転混合す

ることで（図2(g)）、混合試料約1.25 kgを得た。外観上混合物の均質性に問題はないと判断された。

回転混合させた試料を5等分に分けて内容物を混合した後、各瓶の内容物約20 gずつを別の瓶10本に合一した（図1(h)）。各瓶から内容物5 gずつを16本のポリ製遠沈管に小分けした（図1(i)(j)）。

以上によって、調査試料160本を調製することができた（図1(k)(1)）。これらは約-60℃で保管しており、来年度その均質性を評価する予定である。

2. 分析法の検討

(1) 検出感度の比較

下痢性貝毒分析における一般的な LC-MS/MS では、酸性の水/アセトニトリルが移動相に用いられている（測定条件Aが該当）。一方、アセトニトリルの代替にメタノールを用いることにより、感度が上昇したという報告がある（測定条件Bが該当）。また、塩基性の移動相を用いることにより、測定感度が上昇したとする報告もある（測定条件CおよびDが該当）。

そこで、これらの4条件によってOA、DTX1 および DTX2 の混合標準液を測定した。得られたクロマトグラムを図2に示す。測定条件A、C、Dでは、同じイオンチャンネルで検出されるOAとDTX2を含め、対象物質は良好に分離できた。一方、測定条件Bでは、OAとDTX2はベースライン分離することができなかった。

4測定条件におけるLC-MS/MS測定の感度を比較した（図3）。その結果、OA、DTX1、DTX2のすべてについて、測定条件

Cが最も優れた感度を示した。測定条件AやBでは酸性移動相を用いることでOA群の解離を抑制している。これに対し、測定条件Cでは塩基性条件で官能基は解離し、イオン化効率が改善されたためと考えられた。

(2) マトリックス効果の評価

B2(2)a および b で調製した溶液にOA群を添加した溶液を用いて、マトリックス効果の評価した。OA群の添加濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各0.05 ppmとした。これらの溶液と、同濃度のOA群を含む標準溶液を測定条件A～Dで測定した。標準溶液の測定におけるOA群のピーク面積を1とし、HLBおよびODSを用いたSPEによる処理液の測定におけるOA群の面積を比較した図を図4に示す。マトリックス効果がない場合には、標準溶液とホタテガイの処理液の測定における強度が等しくなるため、両者の面積比は1となる。一般的なLC-MS/MS条件である条件Aでは、HLB固相抽出溶液とODS固相抽出溶液の両方において、イオン化抑制が認められた。一方、(1)で最も優れた感度を示した測定条件Cは、HLBカートリッジを用いたSPE処理液に関する面積比が0.81～0.87、ODSカートリッジを用いたSPE処理液に関する面積比は0.89～1.00であった。一般に、面積比が0.8～1.2の範囲であればマトリックス効果によるイオン化促進やイオン化抑制が許容されうるとされており、HLBとODSのいずれのカートリッジを用いた場合でも、条件Cで測定することにより正確に定量可能であることが示唆さ

れた。

(3) 添加回収試験

HLB カートリッジを用いた SPE による前処理と、検討した条件の中で最も感度が高く、精確であった測定条件Cを組み合わせた方法について、添加回収試験を行った。添加濃度は、ホタテガイ試料中の相当量として各 0.05 ppm とした。得られた結果を表 5 に示す。0A 群のいずれについても、下痢性貝毒の機器分析法に求められる性能基準である正確さ：70 %～120 %、及び併行精度：15 %以下を満たしており、精確さは良好であることが確認できた。

以上の検討によって、従来よりも高感度かつ精確な下痢性貝毒分析法を開発した。この方法をさらに高度化すれば、今年度調製した試験所間比較の調査試料の均質性等を正確に評価することが可能と考えられる。

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5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160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による精確な定量が不可欠であることから、測定感度が高く、かつ、分析値の偏りの原因となるマトリックス効果の影響が少ない分析方法を確立した。今年度得られたこれらの成果を基に、来年度、調査試料の分

析に適用し、均質性等試験所間比較に不可欠な性能試験を実施する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 鳥居塚南，上原由理香，長谷川守文，渡辺卓穂，鎗田孝，親水性－親油性バランス型充填剤を用いた簡便な固相抽出精製による二枚貝中オカダ酸群の精密定量，分析化学，印刷中。

2. 学会発表

1) 鎗田孝，鳥居塚南，上原由理香，川口研，渡辺卓穂，ホタテガイ中のオカダ酸群分析に関する試験所間比較試験，日本食品衛生学会第119回学術講演会（東京），2023。

2) 栗本悠可，柳瀬望，小玉玲菜，鎗田孝，分散固相抽出を利用した下痢性貝毒分析法の簡易化，日本分析化学会関東支部第17回茨城地区分析技術交流会（水戸），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A

移動相	A液：水（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有） B液：95 %アセトニトリル（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有）
グラジエントプログラム	B：40 % (0 min)→40 % (2.5 min)→100 % (7.5 min)→100 % (14 min)
カラム	GL Sciences InertSustain C18（内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm）
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255（定量用）、803→113（確認用） DTX1：m/z 817→255（定量用）、817→113（確認用）
カーテンガス（CUR）	10 psi
コリジョンガス（CAD）	8
イオンスプレー電圧（IS）	-4500 kV
スプレー温度（TEM）	600 °C
ネブライザーガス（GS1）	30 psi
ヒーターガス（GS2）	80 psi

表2 LC-MS/MSの測定条件B

移動相	A液：水（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有） B液：95 %メタノール（2 mMギ酸アンモニウムおよび50 mMギ酸含有）
グラジエントプログラム	B：40 % (0 min)→100 % (10 min)→100 % (15 min)→40 % (15.5 min)
カラム	GL Sciences InertSustain C18（内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm）
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255（定量用）、803→113（確認用） DTX1：m/z 817→255（定量用）、817→113（確認用）
カーテンガス（CUR）	10 psi
コリジョンガス（CAD）	8
イオンスプレー電圧（IS）	-4500 kV
スプレー温度（TEM）	600 °C
ネブライザーガス（GS1）	30 psi
ヒーターガス（GS2）	80 psi

表3 LC-MS/MSの測定条件C

移動相	A液：2 mM炭酸水素アンモニウム水溶液 B液：アセトニトリル
グラジエントプログラム	B：30 % (0 min)→95 % (8 min)→95 % (14 min)→30 % (15 min)
カラム	GL Sciences InertSustain C18 (内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 μm)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255 (定量用)、803→113 (確認用) DTX1：m/z 817→255 (定量用)、817→113 (確認用)
カーテンガス (CUR)	20 psi
コリジョンガス (CAD)	8
イオンスプレー電圧 (IS)	-4500 kV
スプレー温度 (TEM)	500 °C
ネブライザーガス (GS1)	30 psi
ヒーターガス (GS2)	50 psi

表4 LC-MS/MSの測定条件D

移動相	A液：水 (0.05 %アンモニウム) B液：90 %アセトニトリル (0.05 %アンモニウム)
グラジエントプログラム	B：30 % (0 min)→30 % (1 min)→100 % (8 min)→100 % (14 min)
カラム	Waters X-Bridge C18 (内径：2.1 mm、長さ：100 mm、粒径：3.5 μm)
カラム温度	40 °C
流速	0.2 mL/min
注入量	10 μL
イオン化法	ESI(-)法
プリカーサーイオン 及びプロダクトイオン	OA・DTX2：m/z 803→255 (定量用)、803→113 (確認用) DTX1：m/z 817→255 (定量用)、817→113 (確認用)
カーテンガス (CUR)	20 psi
コリジョンガス (CAD)	8
イオンスプレー電圧 (IS)	-4500 kV
スプレー温度 (TEM)	500 °C
ネブライザーガス (GS1)	30 psi
ヒーターガス (GS2)	80 psi

表5 添加回収試験の結果

貝毒素	回収率（平均±標準偏差，%）
OA	104±2
DTX1	109±8
DTX2	82±4



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

図1 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 (1)
- (b) 原料として用いたホタテガイ可食部 (2)
- (c) ホタテガイ可食部の均質化
- (d) 均質化したホタテガイ可食部の裏ごし
- (e) ホタテガイ可食部、中腸腺試料および添加用混合溶液の混合
- (f) 混合前 (左) 及び混合後 (右) の試料



(g)



(h)



(i)



(j)



(k)



(l)

図1 検査用試料の調製の記録写真（続き）

- (g) 合一した混合物の回転混合
- (h) 合一した混合物の縮分
- (i) 小分け(1)
- (j) 小分け(2)
- (k) 調製した調査試料(1)
- (l) 調製した調査試料(2)

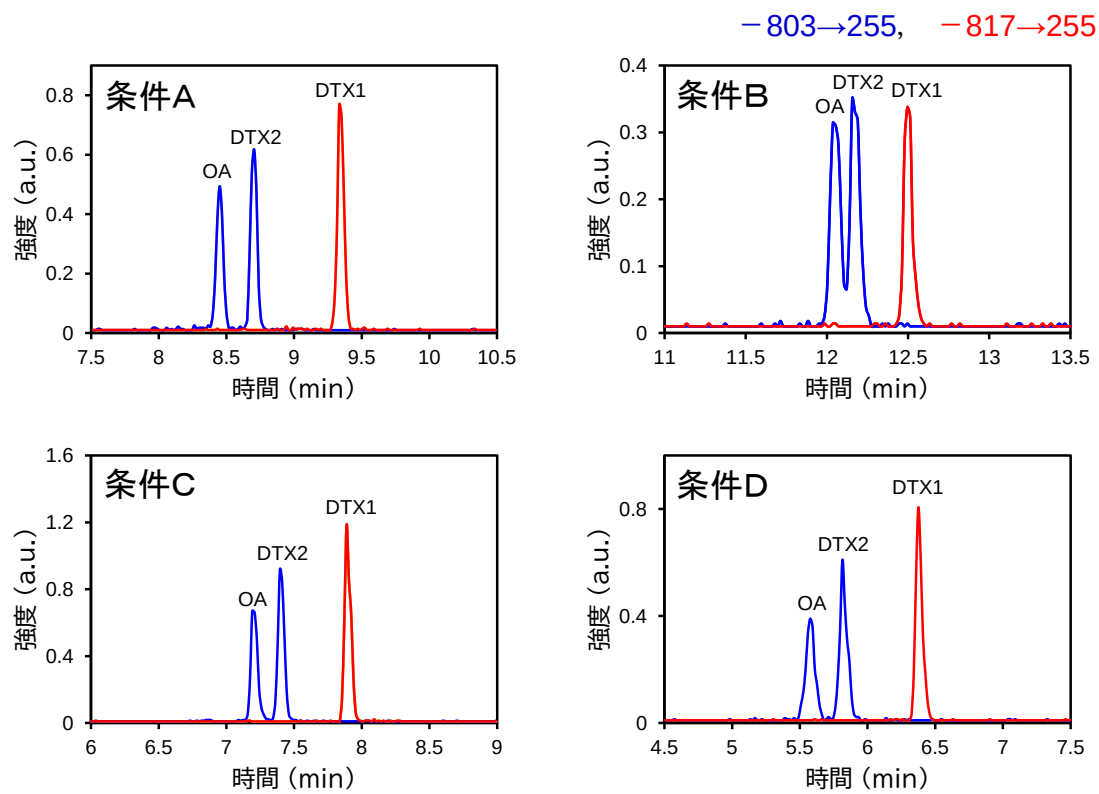


図2 異なるLC-MS/MS条件によって得られたクロマトグラム

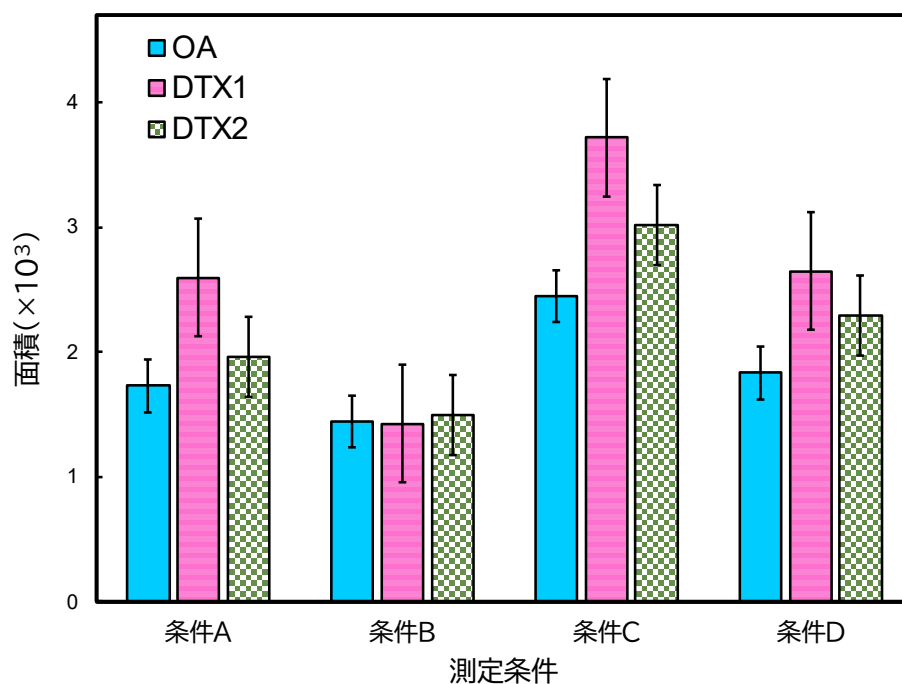


図 3 異なる LC-MS/MS 条件における感度の比較

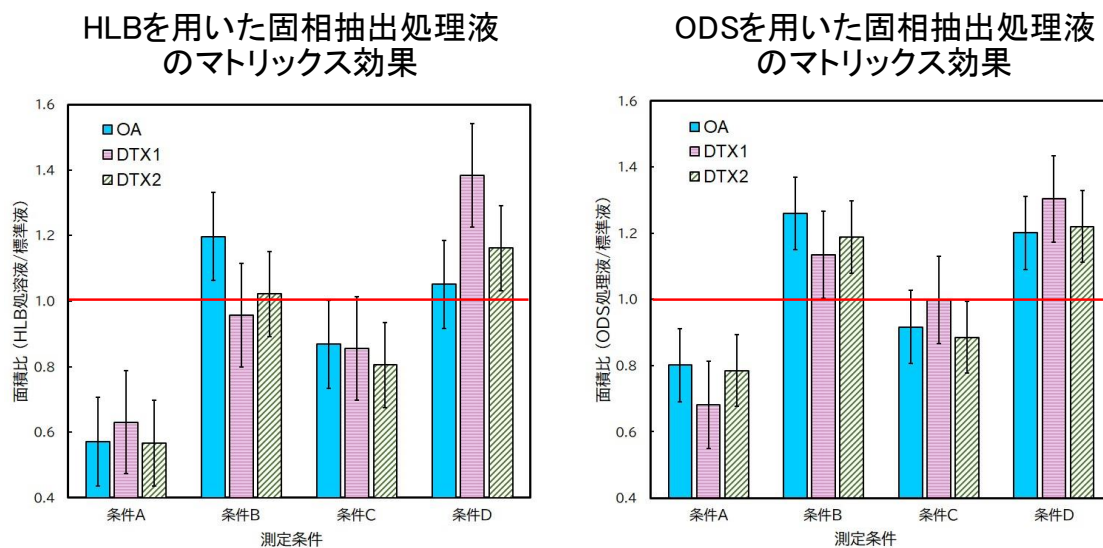


図 4 異なる前処理条件と LC-MS/MS 条件におけるマトリックス効果の比較