

令和7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

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年計画の最終年度となる令和7年度は、令和5年度に調製し令和6年度に均質性を評価した調査試料の安定性評価試験を実施するとともに、パイロットスタディを実施した。また、令和6年度までに検討した分析法に標準添加法と内部標準法を適用してさらに高精度化するとともに、パイロットスタディにおける付与値の妥当性を評価した。

#### 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1年目である令和5年度には、下痢性貝毒分析法の定量分析を3条件以上検討し、分析感度と精度が最も高い条件を確立した。また、ホタテガイを原料とし、パイロットスタディに用いる調査試料を調製した。2年目である令和6年度には、前年度検討した貝毒分析法に内部標準法を適用してさらに高精度化するとともに、アセトニトリルを抽出溶媒とした新たな試料調製法を開発し、これらの分析法を適用して調査試料の均質性評価試験を行った。これを受けて最終年度となる令和7年度は、調査試料の安定性評価試験を実施するとともに、パイロットスタディを実施した。また、前年度までに検討した分析法に標準添加法を適用してさらに高精度化したうえで調査試料分析に適用し、パイロットスタディにおける付与値の妥当性を評価した。

## B. 方法

### 1. 材料・試薬

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。

調査試料は、本事業で令和5年度に調製し。令和6年度に均質性を評価したホタテガイ試料を使用した。

## 2. 分析方法

### (1)前処理方法

昨年度までに開発した前処理法に標準添加法を適用し、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の補正を試みた。調査試料2 gに測定対象物質であるOAとDTX1を既知量添加した後、内部標準物質としてDTX2を既知量添加した。この試料を食安基発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。

### (2)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。

## 3. パイロットスタディの実施

### (1)実施方法

パイロットスタディの参加募集は令和7年1月から令和7年3月に行った。

参加機関による分析期間は、令和7年7～9月とした。7月8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)」とともに調査試料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。9月12日までに全ての参加機関から分析結果を受領した。

### (2)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℃～-30℃程度とした。参加機関における比較試料の分析期間の前後、及び、分析期間中の2回(合計4回)、試料の安定性評価を目的として茨城大学においてOAとDTX1の安定性評価試験を実施した。適用した分析法は2.分析方法の通りである。

### (3)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。

#### (4) 茨城大学における調査試料の分析

茨城大学でも調査試料中のOAとDTX1を定量した。適用した分析法は2. 分析方法の通りである。

#### (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、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. 調査試料の安定性評価試験

参加機関における調査試料の分析期間中及び前後に、茨城大学において調査試料中のOAとDTX1濃度を定期的に定量した。その結果を図1に示す。OAとDTX1の濃度変化に関する数学的モデルがないため、単純な直線回帰を仮定した。その結果、得られた回帰式の傾きは経過時間に対して有意とはいえなかった ( $p>0.05$ )。また、類似試料の安定性に関するデータからもOAとDTX1はこの温度で十分に安定であると考えられた。そこで、4回の定量結果の相対標準偏差(OA: 4.8%、DTX1: 1.2%)を安定性に関する(標準)不確かさ(各濃度に対する相対標準偏差)とした。

#### 2. パイロットスタディにおける参加者の分析結果

##### (1) 適用した分析法

全参加機関に対して、適用した分析方法の報告を求めた。参加機関が適用した分析法のうち、特徴的な事項を記す。精製

過程においてはODSカートリッジを用いた固相抽出を行った機関は7機関(うち2機関は他のカートリッジと併用)であり、他では7機関がWaters製Oasis PRiME HLBを使用していた。また、4機関は固相抽出による精製を省略していた。一方、LC分離における移動相に関して、ギ酸及びギ酸アンモニウム水溶液/ギ酸及びギ酸アンモニウム含有95%アセトニトリルを使用した機関が7機関、ギ酸及びギ酸アンモニウム水溶液/アセトニトリルを使用した機関が5機関、ギ酸水溶液/アセトニトリルを使用した機関が4機関あった。塩基性移動相を用いた機関も3機関あった。

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2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。

##### (2) 精度の評価

AOACガイドライン(2005)に基づき、参加機関の報告値の外れ値検定を行った。Cochran検定とGrubbs検定を行ったところ、Grubbs検定によって1機関のOA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)  $RSR_p$  と室間再現相対標準偏差(室間精度)  $RSR_R$  を算出した(表2)にまとめる。 $RSR_R$ 値はHorwitzの修正式(Thompson, 2000)から

求めた予測値 $PRSD_k$  に対して79 % (0A) 及び102 % (DTX1) であり、本試験結果のばらつきは妥当と考えられた。

### 3. 技能評価

#### (1) 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、0A : 0.0263 mg/kg、DTX1 : 0.0359 mg/kgだった。

報告値のばらつきを表す正規四分位範囲は0A : 13.5 %、DTX1 : 20.4 % (中央値に対する相対値) であった。これに対し、1. 調査試料の安定性評価試験算出した0Aの安定性に関する (標準) 不確かさが、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と、安定性に関する不確かさを合成することで、技能評価のための標準偏差を算出した。算出の過程を表3 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4 に示す。

#### (2) 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。

$$z = (x - \bar{x}) / \sigma$$

ここに、 $x$  : 参加機関の報告値

$\bar{x}$  : 付与値

$\sigma$  : 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、0Aについて2機関の $z$ スコアが3.0以上となり、0Aについて1機関、DTX1については2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が、定量計算における計算ミスや、LC-MS/MSにおけるクロマトグラムに異常は認められず、原因の解明には至らなかった。

### 4. 付与値の評価

茨城大学において、標準添加法と内部標準法を組み合わせた定量法により調査試料を分析した。得られた検量線の一例を図5に示す。さらに、この方法による分析値 (平均) を、付与値及び調査試料の調製値と比較した (表5)。ただし、調製算出においては、ホタテガイ試料に添加した0Aの純度等は評価していないことに留意する必要がある。本法による定量値は調製値とおおむね一致していたのに対して、付与値はこれらの値よりも小さかった。参加機関による分析では0AやDTX1の回収率補正は行われていなかった。そのため、前処理過程における分析対象物質の損失が、付与値が低くなった原因の一つと考えられる。ただし、原因の確定には至らなかったため、今後より詳細な検討が必要である。

## E. 結論

本研究では、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目標とした。3年計画の最終年度である令和7年度は、昨年度までに確立した分析法をさらに高精度化するとともに、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、パイロットスタディにおいて、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、今後分析法をさらに高精度化することでより信頼性の高い付与値を算出することが望まれる。

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

なし

### 2. 学会発表

- 1) 柳瀬望、高坂典子、渡辺卓穂、鎗田孝、下痢性貝毒検査の試験所間比較のためのホタテガイ試料の評価、A0AC International Japan Section第28回年次大会（東京）、2025.
- 2) 柳瀬望、鎗田孝、下痢性貝毒分析における分散固相抽出法を用いた簡易クリ

ーンアップ法の開発、日本分析化学会関東支部第19回茨城地区分析技術交流会（水戸）、2025.

## 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 液：水（2 mM ギ酸アンモニウムおよび 50 mM ギ酸含有）<br>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 min）→100 %（14 min）→100 %（20 min）                              |
| カラム                     | GL Sciences InertSustain C18（内径：2.1 mm、長さ：75 mm、粒径：2 $\mu$ m）                      |
| カラム温度                   | 40 $^{\circ}$ C                                                                    |
| 流速                      | 0.2 mL/min                                                                         |
| 注入量                     | 10 $\mu$ L                                                                         |
| イオン化法                   | ESI(-)法                                                                            |
| プリカーサーイオン<br>及びプロダクトイオン | OA・DTX2： $m/z$ 803→255（定量用）、803→113（確認用）<br>DTX1： $m/z$ 817→255（定量用）、817→113（確認用）  |
| イオンスプレー電圧（IS）           | -4500 kV                                                                           |
| スプレー温度（TEM）             | 600 $^{\circ}$ C                                                                   |

表 2 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<br>(mg/kg) | $RSD_r$<br>(%) | $RSD_R$<br>(%) |
|--------|----------------|----------------|----------------|
| OA     | 0.0255         | 4.6            | 17.4           |
| DTX1   | 0.0364         | 4.2            | 22.4           |

表 3 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<br>範囲 | 均質性に関する<br>不確かさ | 均質性に関する<br>不確かさ | 技能評価のため<br>の標準偏差 |
|--------|-------------|-----------------|-----------------|------------------|
| OA     | 13.5        | (2.0)*          | 4.8             | 14.4             |
| DTX1   | 20.4        | (5.6)*          | 1.2             | 20.5             |

各値は付与値に対する相対値(%)

\*均質性に関する不確かさは、技能評価のための標準偏差には含めない

表 4 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<br>(mg/kg) | 技能評価のための<br>標準偏差 (mg/kg) |
|--------|----------------|--------------------------|
| OA     | 0.0263         | 0.0038                   |
| DTX1   | 0.0359         | 0.0074                   |

5 付与値と技能評価のための標準偏差

| 対象物質 | 分析結果 (mg/kg)               |                                                                    |                   |
|------|----------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------|
|      | 参加機関<br>(付与値±技能評価<br>標準偏差) | 標準添加法と内部<br>標準法を組み合わ<br>せた方法 <sup>1)</sup><br>(平均±標準偏差、<br>$n=4$ ) | 調製値 <sup>2)</sup> |
| OA   | 0.0263 ± 0.0038            | 0.0397 ± 0.019                                                     | 0.0349            |
| DTX1 | 0.0359 ± 0.0074            | 0.0474 ± 0.006                                                     | 0.0483            |

1) 茨城大学において実施

2) 添加した OA の純度や調製過程における水分の揮発等は考慮していない

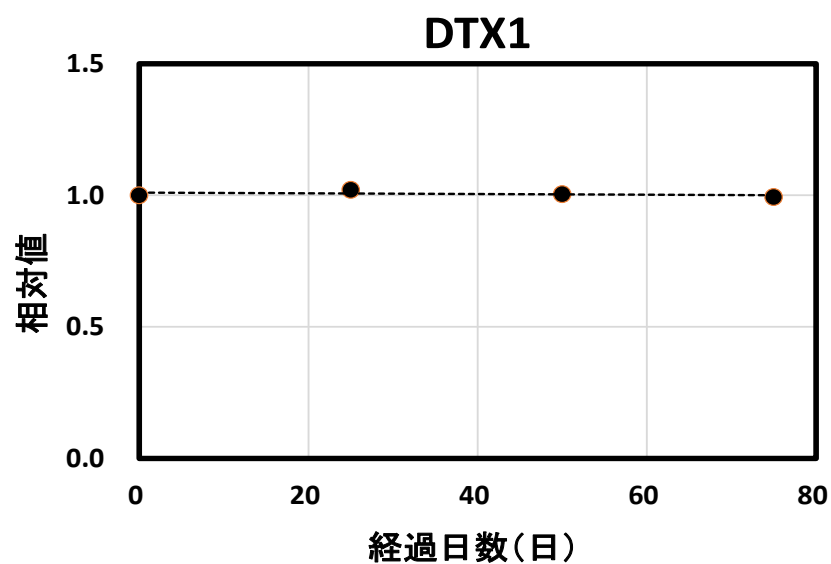
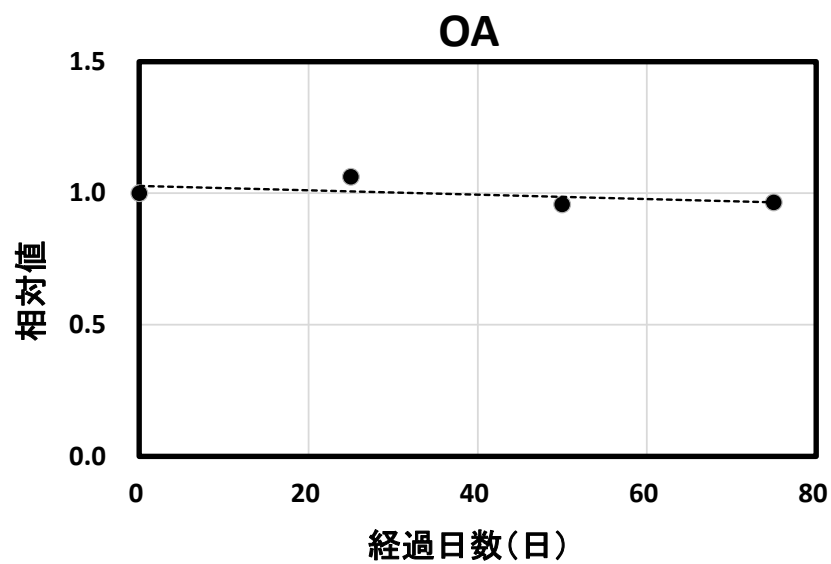


図1 調査試料中 OA と DTX1 の安定性評価試験の結果.

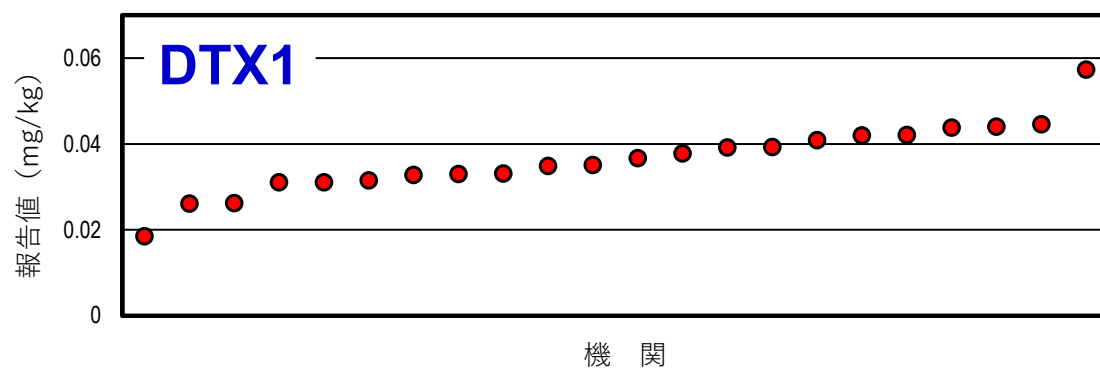
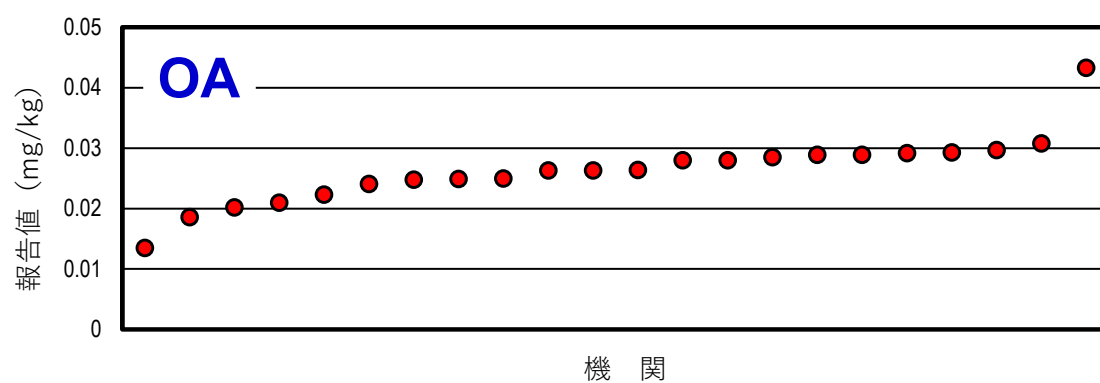


図 2 参加機関の報告地（平均）の分布.

(Cochran 検定により、1 機関の OA の分析結果を除外した．また、全報告値を横軸方向に昇順にならべた)

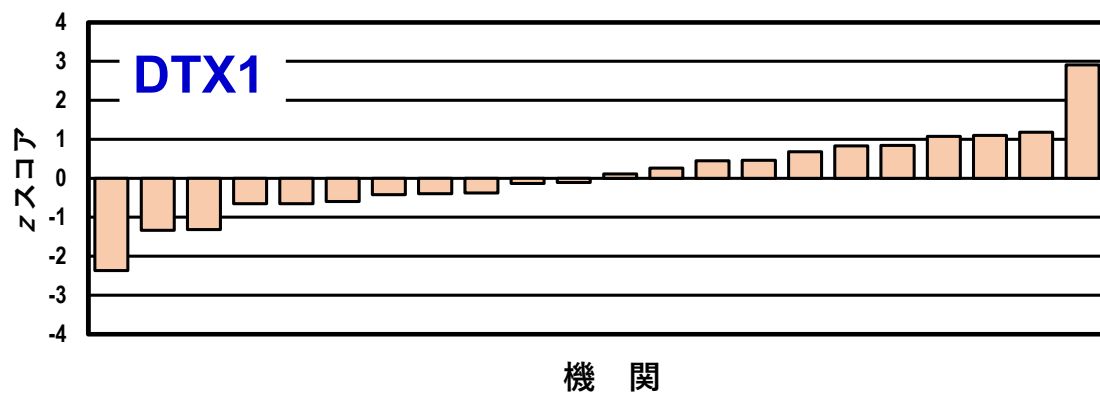
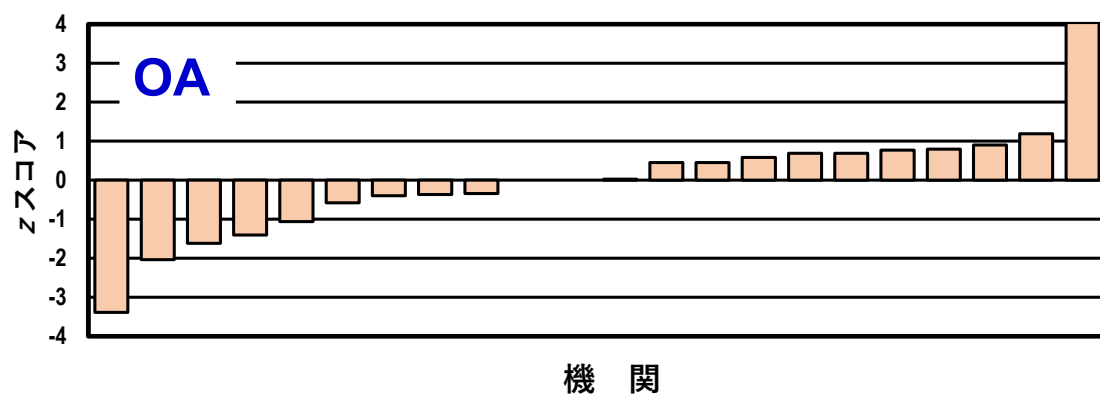


図 3 参加機関の技能評価の結果.

(参加機関の  $z$  スコアを昇順にならべた)

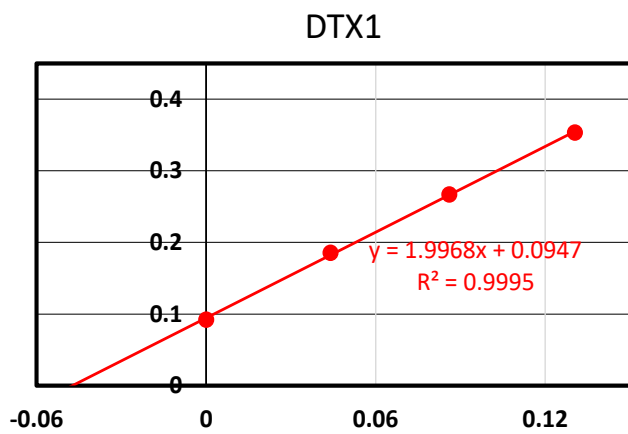
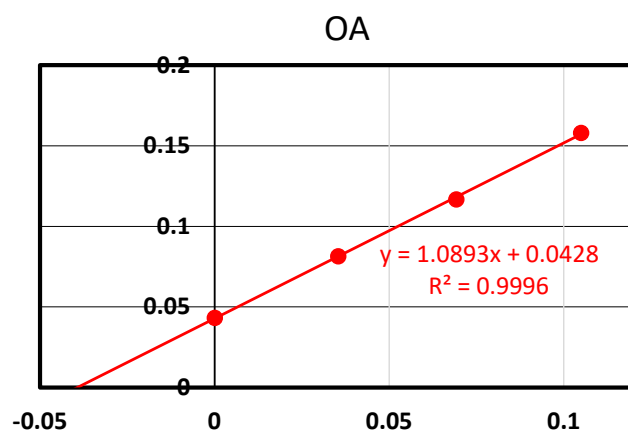


図 4 標準添加法と内部標準法を組み合わせた分析法における検量線の例.