

食安基発 0306 第 4 号
食安監発 0306 第 2 号
平成 27 年 3 月 6 日

各 検疫所長 殿

医薬食品局食品安全部基準審査課長
医薬食品局食品安全部監視安全課長
(公 印 省 略)

下痢性貝毒（オカダ酸群）の検査について

下痢性貝毒を含む貝類の取扱いについては、「麻痺性貝毒等により毒化した貝類の取扱いについて」（平成 27 年 3 月 6 日付け食安発 0306 第 2 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知）に基づき、機器分析法を導入することとし、オカダ酸（以下「OA」という。）群に対して 0.16mgOA 当量/kg の規制値を定めたところである。

今般、国立医薬品食品衛生研究所における検討の結果、別添のとおり試験法が報告されたので御了知されたい。

なお、現時点において、OA 群の認証標準品の供給が不安定であるため、当面の間においては昭和 56 年 5 月 19 日付け環乳第 37 号「下痢性貝毒の検査について」により試験を実施しても差し支えないが、可食部 1g 当たりの毒量が 0.05MU（マウスユニット）を超える結果が得られた場合は、本試験法により OA 群の定量を行い、食品衛生法第 6 条第 2 号の規定に違反するか判断すること。

下痢性貝毒（オカダ酸群）検査法^{注1)}

I 分析対象化合物

オカダ酸群（オカダ酸（OA）、ジノフィシストキシン-1（DTX1）及びジノフィシストキシン-2（DTX2）並びにそれらのエステル化合物）

II 分析法の概要

検査に用いる分析法は、OA、DTX1 及び DTX2 について、Ⅲの 2. に示す性能を満たす方法とする。別紙 1 に示す方法により当該分析法の妥当性を評価の上で実施すること。なお、ホタテガイへの妥当性が確認されている方法^{注2)}を別紙 2 に示す。

III 検査について

1. 検体の採取及び調製

(1) 検体の採取・運搬

検体としては、貝類の殻付きのもの、むき身、外とう膜及びこれらを更に調理、加工したもの等があるが、当該ロットを代表する十分な個体数を採取する必要がある。1 検体を構成する貝の数はできるだけ個体差をなくし、かつ、予備の試料を確保するために十分な個数で^{注3)}少なくとも 200 g 以上（殻付きのものにあつてはむき身相当量、缶詰等で容器包装に入れられたものにあつては、その内容量でそれぞれ 200 g 以上が得られる個数）を採取する^{注4)}。

採取した検体は適切な容器に入れ、生鮮検体にあつては冷蔵し、凍結検体にあつては凍結状態のまま、その他のものにあつては、加工品等常温で品質の変化がないと思われるものを除き、冷蔵し速やかに試験室に搬入する。

ただし、搬入に時間を要するなど、その間に品質の変化が予想されるものについては、適切な容器に入れ凍結し輸送する。

この場合、殻付きのものにあつては、(2) 試料の調製の項に掲げる方法により開殻及び水切りをした後凍結し、生鮮のむき身等で外部に水分の付着しているものにあつては、同項に掲げる方法により水切りをした後、凍結して輸送する。

(2) 試料の調製

① 生鮮の殻付きの検体は、ナイフなどで閉殻筋（貝柱）を切って開殻し、むき身を調製する。この場合殻を開くために熱や薬品を用いてはならない。また閉殻筋以外の組織、特に中腸腺を傷つけないように注意する。なお、調製時に砂などの異物の除去が困難な場合は、少量の水で洗い流しても良い。ただし、凍結した、もしくは組織が損傷された検体については適用しない。

このようにして得たむき身及び既にむき身となっている検体は目の細かい金網などにのせ、約 5 分間水切りを行ったのち④又は⑤により試料を調製する。

② 凍結した殻付きの検体は、室温で半解凍の状態にし前記の方法でむき身を得る。このよ

うにして得たむき身及び既にむき身の状態で凍結してある検体（検体輸送のためあらかじめ検査用に水切りを行った後に凍結したものを除く。）は外部に付着している氷片を取り除き、軽く水をふき取った後に④又は⑤により試料を調製する。

なお、検体の輸送のためあらかじめ検査用に水切りを行った後に凍結してある検体については、その全部についてそのまま④又は⑤により試料を調製する。

③ 外とう膜の乾製品等①及び②以外の検体は、その全部をそのまま⑤により試料とする^{注5)}。

④ ホタテガイ、アカザラ、ムラサキイガイ等の、オカダ酸群が中腸腺に局在するものにあつては、当該むき身の重量をあらかじめ測定した後、中腸腺をていねいに切り取り、当該中腸腺のみを細切混和し試料としてもよい^{注6)}。

⑤ 組織毎のオカダ酸群の分布が明らかでない貝類にあつては、その全部を均質化し試料とする。この場合、乾製品等ホモジナイズが困難なものはできるだけ細切混和の後試料とする。

2. 分析法

以下の性能基準を満たす方法とする。

① 選択性

ブランク試料を分析法に従って分析した時、定量を妨害するピークがないこと。

妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積（又は高さ）が、試料中各オカダ酸群濃度 0.01 mg/kg に相当するピーク的面積（又は高さ）と比較し 1 / 10 未満であること。

② 真度及び精度の目標値

評価対象	試行回数*	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX1	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX2	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥

*自由度 4 以上とする。

③ 定量限界

0.01 mg/kg 以下

3. 分析結果の取り扱い

測定により得られた OA、DTX1 及び DTX2 濃度に、以下に示したそれぞれの毒性等価係数（TEF）を乗じ、その総和をオカダ酸群濃度とする。

分析結果には、各分析対象化合物の濃度（mg/kg）、各分析対象化合物の濃度に TEF を乗じた

値 (mg OA 当量/kg) 及びそれらの総和を記載する。その際に、各分析対象化合物の濃度及びそれらに TEF を乗じた値は有効数字 3 桁で示すこととし、これらの総和は 3 桁目を四捨五入して有効数字 2 桁で示すものとする。なお、定量下限値未満の値については ND と表記し、濃度は 0 とし計算する。

オカダ酸群の毒性等価係数 (TEF)

化合物名	TEF 値
OA	1
DTX1	1
DTX2	0.5

分析結果表記例

化合物名	化合物の濃度 (mg/kg)	TEF 値	TEF 変換値 (mg OA 当量/kg)
OA		1	
DTX1		1	
DTX2		0.5	
合計			

注釈

- 1) 下痢性貝毒とは、有毒プランクトンを捕食した二枚貝を人が摂食すると下痢を主徴とする食中毒を起こすことから、このように呼ぶ。
- 2) オカダ酸群を試料からメタノールで抽出し、加水分解により貝類に含まれる DTX3 などのエステル化合物を OA、DTX1 及び DTX2 に変換したものを機器分析で測定及び確認する方法である。
- 3) ホタテガイ等の大型の貝にあつては、少なくとも 5 個体以上とする。
- 4) むき身 1 個体あたりの重量が 10g 未満の二枚貝については、100 g 以上としてもよい。
- 5) 缶詰等容器包装に入れられたもので大容量の場合は開缶後固形物と液の重量を測定しておき、その割合に応じて必要量をとる。
- 6) ホタテガイ等にあつては、オカダ酸群が中腸腺に局在していることが明らかにされていることから、当該中腸腺について毒性試験を行い、むき身全体の毒力を求めるものである。この場合中腸腺の個数としては 5 個以上、重量としては 25 g 以上を試料とする。

妥当性確認の方法

分析対象とする貝類のオカダ酸群を含まない試料（ブランク試料）を分析法に従って分析し、選択性を確認する。次に各オカダ酸群を添加した試料（添加試料）^{1) 2)}を、分析法に従って分析し、その結果から真度及び精度パラメータを求め、表に示す目標値等に適合していることを確認する。添加濃度は、原則として各オカダ酸群につき 0.05 mg/kg とする。

あるいは適切な認証標準試料を分析法に従って分析し、その結果から真度及び精度を求め、それぞれ表に示す目標値等に適合していることを確認する。

なお、各パラメータの定義及び評価の手順は「食品中の有害物質等に関する分析法の妥当性確認ガイドライン」（平成 26 年 12 月 22 日付け食安発 1222 第 7 号）に準じるものとする。

1. 選択性

ブランク試料を分析法に従って分析し、定量を妨害するピークがないことを確認する。

妨害ピークを認める場合は、妨害ピークの面積（又は高さ）が、試料中各オカダ酸群濃度 0.01mg/kg に相当するピークのアreal面積（又は高さ）と比較し 1/10 未満であることを確認する。

2. 真度³⁾

添加試料又は濃度及びマトリクスが適切な認証標準試料を分析し、得られた定量値の平均値の添加濃度又は認証値に対する比率を求め、真度を評価する。

3. 精度

添加試料又は認証標準試料を指定された条件下で繰り返し分析し、併行精度及び室内精度を推定する。室内精度を推定するためには、室内条件に含まれる最低 1 つの因子の効果が現れるよう実験を計画する。また、実験計画では、自由度 4 以上で分散の推定が可能な定量値を得るよう、分析の繰り返し回数を設定する。分析を繰り返し、得られた定量値の標準偏差及び相対標準偏差を求め、併行精度及び複数の実施者又は実施日による室内精度を評価する。

<真度及び精度の目標値>

評価対象	試行回数*	真度 (%)	併行精度 (RSD%)	室内精度 (RSD%)
OA	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX1	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥
DTX2	5	70 ~ 120	15 ≥	20 ≥

*自由度 4 以上とする。

注釈

- 1) 別紙2に示した方法により抽出操作をする際、添加試料調製に必要な標準品が十分に入手できない場合は、試料の90%メタノール抽出液を加水分解処理する前に添加しても良い。
- 2) 本分析法の分析対象は天然に存在する物質であり、これらを含まないブランク試料の準備には困難が予想される。そのような場合にも、添加濃度から得られる信号への影響を無視できるよう、より低い濃度の試料(以下「トレース試料」という)を用いることが望ましい。トレース試料中の分析対象化合物の濃度の目安は、添加濃度の1/2未満とする。
- 3) トレース試料から調製した添加試料を分析して得られる定量値は、トレース試料中の濃度と添加濃度の和を期待値とする推定値である。従って、トレース試料を添加試料と同様に操作し得られた定量値の平均値を、個々の添加試料の定量値から差し引いた値の平均値を求め、その値の添加濃度に対する比を真度とする。

オカダ酸群分析操作例¹⁾

1. 装置

液体クロマトグラフ・タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)

2. 試薬、試液

次に示すもの以外は、「食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について」(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号) 別添の第 1 章総則の 3 に示すものを用いる。

オカダ酸 (OA) 認証標準品²⁾

ジノフィシトキシニン-1 (DTX1) 認証標準品²⁾

ジノフィシトキシニン-2 (DTX2) 認証標準品²⁾

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用又は高速液体クロマトグラフ-質量分析用に製造されたもの

水：超純水もしくは高速液体クロマトグラフ用又は高速液体クロマトグラフ-質量分析用に製造されたもの

ギ酸：高速液体クロマトグラフ用又は高速液体クロマトグラフ-質量分析用に製造されたもの

ギ酸アンモニウム：高速液体クロマトグラフ用又は高速液体クロマトグラフ-質量分析用に製造されたもの

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (200 mg)：内径 8～9 mm のポリプロピレン製のカラム管に、オクタデシルシリル化シリカゲル 200 mg を充てんしたもの又はこれと同等の分離特性を有するものを用いる。

標準溶液：OA、DTX1 及び DTX2 の認証標準品を適宜混合し、メタノールで希釈して調製する。

90%メタノール：メタノール 90 mL に水を加え 100 mL にする。

40%メタノール：メタノール 40 mL に水を加え 100 mL にする。

3. 試験溶液の調製

(1) 抽出

均質化した試料 2.00 g を量り採り、メタノール 9 mL を加え、ホモジナイズ (又はボルテックス) した後、遠心分離し上清を得る。沈殿に 90%メタノール 9 mL を加え、ホモジナイズ (又はボルテックス) した後、上記と同様に遠心分離する。得られた上清を合一し、これに 90%メタノールを加えて正確に 20 mL とする。

(2) 加水分解

(1) で得られた液 2.00 mL を取り、2.5 mol/L 水酸化ナトリウム 0.25 mL を加え、76°C で 40 分間加水分解する³⁾。放冷後、2.5 mol/L 塩酸 0.25 mL を加えて攪拌し中和する。

(3) 精製

(2) で得られた液に n-ヘキサン 2.5 mL を加えて振り混ぜた後、n-ヘキサンを除去する操作を 2 回繰り返す。メタノール層に水 2.5 mL を加えて攪拌し⁴⁾、この液をあらかじめメタノール、水でコンディショニングをしたオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム (200 mg) に注入し、容器を 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、流出液は捨てる。ミニカラムに水 3 mL、40%メタノール 3 mL を順次注入し、各流出液は捨てる。次いで、90%メタノール 3 mL を注入し⁵⁾、抽出液を採り、40°C以下で濃縮し、溶媒を完全に除去する。この残留物をメタノールに溶解し、正確に 2 mL としたものを試験溶液とする⁶⁾。

4. 検量線の作成

OA、DTX1 及び DTX2 の各認証標準品を適宜混合してメタノールで希釈した溶液を数点調製し、それぞれ 5 µL を LC-MS/MS に注入し、ピーク高法又はピーク面積法で検量線を作成する⁷⁾。

5. 定量

試験溶液 5 µL を LC-MS/MS に注入し、4. の検量線から OA、DTX1 及び DTX2 の含量を求める⁸⁾。

6. 測定条件例

カラム：オクタデシルシリル化シリカゲル (内径 2.1 mm、長さ 75 mm、粒子径 2 µm)

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)

移動相 B の濃度 40%を 2.5 分間維持し、40%~100%までの濃度勾配を 5 分間行い、そのまま 5 分間維持する。

カラム温度：40°C

流速：0.2 mL/min

注入量：5 µL

イオン化モード：ESI (-)

観測イオン

OA 及び DTX2 プリカーサーイオン 803 プロダクトイオン 255、113

DTX1 プリカーサーイオン 817 プロダクトイオン 255、113

保持時間の目安

OA：7.4 分

DTX1：8.3 分

DTX2：7.6 分

7. 定量限界

0.01 mg/kg

注釈

1) 本法は、ホタテガイむき身試料に対して妥当性が確認されている。また、アサリ及びイガイの

むき身試料に対しては、真度と併行精度 (n=5) が性能基準を満たすことが確認されている。

- 2) 認証標準品の入手が困難な場合には、認証標準品を用いて値付けをした試薬等を用いても良い。
- 3) メタノールの蒸発に注意し、乾固させないようにする。
- 4) メタノール濃度が 40%程度になるように調製する。
- 5) カートリッジカラムからの溶出が不十分で真度が低い場合には、90%メタノールの量を 4 mL にする。
- 6) 前処理による夾雑物の除去が不十分な場合には、カートリッジカラムを用いた固相抽出等による処理を追加するとよい。また、装置が十分に高感度である場合には、試験溶液を希釈することにより前処理を省略することも可能である。
- 7) DTX2 は国内での発生が確認されていないため国内産貝類の汚染の可能性は低い。そのため、標準品の入手が困難な場合は、0A の検量線を代用し 0A よりも遅れて溶出するピークをモニターする。なお、オクタデシルシリル化シリカゲルカラムからの一般的な溶出順位は、0A、DTX2、DTX1 である。
- 8) DTX2 が疑われるピークが観測され、規制値超過の可能性がある場合には、DTX2 の認証標準品を用いて確認すること。