

# 平成29年度地域保健総合推進事業に係る精度管理事業 (ヒスタミン) について

【化学衛生室】

米澤友紀子、田邊奈都子、福田武史、岡田達郎<sup>1)</sup>、赤木正章<sup>2)</sup>、寺田正史<sup>3)</sup>、井原紗弥香<sup>4)</sup>、佐々木珠生<sup>5)</sup>、増井陽介<sup>6)</sup>、氏家あけみ<sup>7)</sup>、岩佐智佳<sup>8)</sup>、宇川夕子<sup>9)</sup>、影山温子<sup>10)</sup>

## 1 序論

地域保健総合推進事業に係る精度管理事業については、中国四国支部内の地方衛生研究所における検査技術の強化及び研究所間の連携を図ることを目的として、例年実施している。今年度は当県が幹事県として、本事業の実施、取りまとめを行ったので、概要を報告する。平成26年度はリコリン、平成27、28年度はコルヒチンを対象項目としており、植物性自然毒を対象とした精度管理事業を実施したため、今年度は動物性食品に由来する化学物質を対象項目として選定した。ヒスタミン食中毒は、ヒスタミンが多く発生した魚介類を摂取することにより発症し、低温保存技術の普及した今日においても一定数発生している。また、従来からの誘導體化-蛍光HPLC法に加え、近年ではLC/MS/MS法も普及してきているため、各施設の分析技術を比較検討して、分析技術のさらなる向上を図るため、ヒスタミンの定量分析を今年度の対象項目とした。

## 2 実施方法

### 2.1 参加機関及びデータ数

#### (1) 参加機関

中国四国支部内の地方衛生研究所10機関

#### (2) データ数

無添加試料 1件併行試験なし

添加試料 1件3併行

#### (3) 実施期間

試料調製日：平成29年10月2日

試料発送日：平成29年10月3日

回答期限：平成29年11月17日

### 2.2 配布試料の調製

#### 2.2.1 無添加試料

オオバイワシを三枚におろし、皮をむき、身の部分1000gをフードプロセッサにかけてミンチにした後、

ボウルに入れ、氷冷しながら混ぜ合わせた。その後、実施機関毎に55～110gをポリ袋に小分けにし、発送まで冷凍保管した。

#### 2.2.2 添加試料(調製濃度95.2mg/100g)

##### (1) 標準品

ヒスタミン二塩酸塩(和光純薬工業製、特級、純度97%)

##### (2) 添加試料調製用標準液

ヒスタミン二塩酸塩3415mg(ヒスタミンとして2000mg)を量り取り、水で100mLとした。

##### (3) 添加試料調製方法

オオバイワシを三枚におろし、皮をむき、身の部分を400g量りとり、軽くフードプロセッサにかけた後、ヒスタミン標準液(20mg/mL)を20mL添加し、再度フードプロセッサにかけてミンチにした。同様の操作を5回行った後、全ての添加試料を1つのボウルに合わせて、氷冷しながら混ぜ合わせた。その後、実施機関毎に110～210gをポリ袋に小分けにし、発送まで冷凍保管した。

### 2.3 配布試料の均質性確認

小分けした添加試料の中から2袋を無作為に取り出し、当所配布分の添加試料とあわせて3袋を、それぞれ3併行で誘導體化-蛍光HPLC法で分析した。結果は表1のとおりであり、良好な室内精度を示しており均質性に問題はなかった。

表1 均質性確認の結果

検体番号	分析結果(mg/100g)			
	n=1	n=2	n=3	平均値
①	110.2	105.5	107.4	107.7
②	102.3	105.4	103.9	103.9
③	99.9	103.4	102.4	101.9

試験結果の平均値 104.5 mg/100g

併行精度(RSD%) 1.85%

室内精度(RSD%) 3.20%

1) 現 鳥取市保健所、2) 岡山県環境保健センター、3) 岡山市保健所衛生検査センター、4) 広島県立総合技術研究所保健環境センター、5) 広島市衛生研究所、6) 山口県環境保健センター、7) 香川県環境保健研究センター、8) 徳島県立保健製薬環境センター、9) 愛媛県立衛生環境研究所、10) 高知県衛生研究所

### 3 結果

#### 3.1 試験方法

参加機関が採用した試験方法は表 2 のとおりであった。

表2 参加機関の試験方法

試験方法	定量方法	機関数
誘導体化-蛍光 HPLC 法	内部標準法	4
LC/MS/MS 法	マトリクス検量線法	1
	溶媒検量線法	5

#### 3.2 試験結果

各機関の試験結果は表3のとおりであり、添加試料の結果は、全体の平均が96.2mg/100gで、設定濃度(95.2mg/100g)に対する割合は101%と良好であった。

表 3 参加機関の試験結果

機関 No.	試験方法	分析結果 (mg/100g)					設定濃度に対する平均値の割合 (%)	変動係数 (%)
		無添加試料	添加試料			平均値		
			①	②	③			
A	誘導体化-蛍光 HPLC 法	定量下限未満	96.9	95.8	95.3	96.0	100.8	0.9
B	LC/MS/MS 法	定量下限未満	88.4	85.4	91.6	88.5	92.9	3.5
C	誘導体化-蛍光 HPLC 法	定量下限未満	110	106	107	107.7	113.1	1.9
D	LC/MS/MS 法	定量下限未満	118	116	115	116.3	122.2	1.3
E	LC/MS/MS 法	0.169	64.1	65.9	66.2	65.4	68.7	1.7
F	LC/MS/MS 法	定量下限未満	93.4	92.4	97.8	94.5	99.3	3.0
G	誘導体化-蛍光 HPLC 法	定量下限未満	96.2	99.0	97.5	97.6	102.5	1.4
H	LC/MS/MS 法	定量下限未満	95.4	93.1	94.4	94.3	99.1	1.2
I	LC/MS/MS 法	定量下限未満	104	103	97.0	101.3	106.4	3.7
J	誘導体化-蛍光 HPLC 法	定量下限未満	101	99.4	99.9	100.1	105.1	0.8
全体		-	-	-	-	96.2	101.0	13.5

なお、今回の精度管理はあくまでも緊急時の検査を念頭においているため、回収率の範囲を50%以上から200%以下<sup>1)</sup>であれば良好と考え、各機関の回答はこの範囲に入ったためデータの棄却は行わなかった。

また、無添加試料の結果は、1機関でわずかに検出されたものの、他の機関では定量下限未満であった。ヒスタミンは魚肉中のヒスチジンが微生物に分解されて生じるとされている。無添加試料の調製は、概ね鮮度を保った状態で実施できたものと考えた。

## 4 試験法の評価

試験方法別の試験精度は表4のとおりであり、LC/MS/MS法は誘導体化-蛍光HPLC法に比べて変動係数が約3倍となり、ばらつきが大きい傾向が見られた。各機関における併行精度は変動係数が0.8～3.7%と良好であることから、抽出方法や分離条件の違いが原因と考えられるが、ばらつきの詳細は不明である。希釈して低濃度で測定することから、ヒスタミンがガラス等へ吸着することが支障になったと回答した機関や吸着の影響を小さくするために、無添加試料からの抽出液を希釈に用いる工夫をした機関、検量線の範囲が高濃度となり検出器が飽和して検量線の直線性が不良となっている機関もあった。

また、LC/MS/MS法では用いた分離カラムや移動相組成も様々であり、6機関中2機関のクロマトグラムに妨害が見られた。

誘導体化-蛍光HPLC法を採用した4機関の結果は、良好な室間精度であった。前処理方法やHPLCの条件は衛生試験法<sup>2)</sup>等に掲載された条件に準拠し、参加機関の間で差異は少なかった。

表4 試験方法別の試験精度

試験方法	定量平均値 (mg/100g)	設定濃度に対する割合 (%)	変動係数 (%)
誘導体化-蛍光HPLC法	100.3	105.4	4.8
LC/MS/MS法	93.4	98.1	17.0

## 5 まとめ

参加機関でヒスタミンの定量試験を実施し、緊急検査として必要な精度で定量できていることが確認できた。また、参加機関の中には過去5年間にヒスタミンの検査事例がない機関もあり、技術習得の良い機会となったと考える。なお、LC/MS/MS法は前処理が簡易で迅速に試験結果を得られるが、用いられた分離カラムや移動相の条件は様々であり統一された方法がない状態にある。今回の精度管理事業を通してより良い条件の設定に活用していきたい。

## 6 謝辞

本事業の実施について、ご協力いただきました各参加機関に対して、深謝いたします。

## 7 参考文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課事務連絡:加工食品中に高濃度に含まれる農薬等の迅速検出法について.平成25年3月26日
- 2) 日本薬学会編:衛生試験法・注解2010,東京,金原出版株式会社,2010,p199-201