

さらにケミカル粉碎器で粉碎したものおよびマイクロディスマンプレートで粉碎したものを1%CMCに懸濁後、あずきあん、カボチャペーストに加えて落花生添加試料を作製した。落花生添加試料の落花生タンパク質を調製直後にモリナガ FASPEK 落花生 測定キットおよび、ASTKIT エライザ Ver. II 落花生で測定し、測定値を添加タンパク質量で除して回収率を求め、いずれのキットでも18週までおおむね90~110%の範囲に収まっており、落花生を細かく粉碎したことにより、より安定性の高い試料が作製できたものと考えられた。

4) 小麦試料作製の検討: Naturart 薄力粉を1%CMCに懸濁後、ハンバーグまたはカボチャペーストに混合して小麦添加試料を作製し検討したが、昨年検討したハルユタカと比べキット間の測定値の乖離が少なくなった。調製試料は-20℃の保存で昨年に比べ安定であると判断できる。

5) そば、落花生、小麦添加試料の定性検査法の検討: 2) で調製したそば添加カボチャペーストおよびあずきあん、3) で調製した落花生添加カボチャペーストおよびあずきあん、4) で調製した小麦添加カボチャペーストおよびハンバーグ、さらに各基材(ハンバーグ、カボチャペースト、あずきあん)について、PCR法による特定原材料の検出の可否を検討した。DNA抽出法は通知に記載のCTAB法、シリカゲル膜タイプキット法(DNeasy Plant Mini kit)、イオン交換樹脂タイプのキット(Genomic-Tip 20/G)のそれぞれとし、各試料につき2並行で実施した。小麦、落花生、そばの各特定原材料を添加した試料について定性PCRによる確認試験を行った結果を示したが、PCR結果をDNA抽出法ごとに見た場合、いずれの試料もGenomic-Tip 20/Gを用いた抽出液では添加した特定原材料、植物に由来する増幅物を100%確認できた。またDNeasy Plant Mini kitでもそばの植物プライマーの1つを除い

て特定原材料、植物に由来する増幅物を確認できた。一方、CTAB法では、小麦を添加したカボチャペースト、落花生を添加したあずきあんなどで、検出率が低かった。

6) 卵試料作製の検討: 卵試料は過去に調製量200g程度の試作レベルで添加試料を作製し、回収率、安定性等の検討を実施した。しかし、精度管理の実施を想定した場合、配布量および参加機関数にもよるが、さらに多くの試料が必要なことは明らかである。このため本年は新たに混合用のミキサーとしてBLIXER-5Plusを導入し、これを使用して約3kgのスケールで試料を調製した。添加基材としてはカボチャペーストおよびハンバーグを用い、それぞれに全卵を水でうすめたものを加えて均一になるように混合し、試料を作製した。その結果として外部精度管理実施に向けて、均一かつ確認試験にも対応した試料を大量に作製することができたものと考えられる。

(4) 組換えDNA技術応用食品検査のための適正試料の作製検討

1) 外部精度管理調査

i) 外部精度管理調査に使用するコメ加工品の検討: 外部精度管理調査に使用するコメ加工品を選ぶ条件として、検査目的の遺伝子混入が無いこと、コメ内在性遺伝子(SPS遺伝子)が検出されること、および定性PCRで検査目的遺伝子の増幅物に近い易動度の非特異的な増幅バンドがないことの3点が必須である。また、DNA溶液試料の作製にはマトリックスとして使用するDNA、すなわち遺伝子組換え米を含まないコメDNA溶液が大量に必要である。したがって、抽出の際に試料の前処理が容易であること、および抽出されるDNA量が多いことも条件とした。タイ産ビーフンBと台湾産ビーフンAは抽出量の、台湾産ビーフンBは抽出量およびSPS遺伝子不検出の、上新粉Aは非特異的な増幅バンド検出の観点から、外部精度管理調査試料の原料としては不適切であると考えた。残るタイ産ビ

ーフンAと上新粉Bのうち、実際に中国産遺伝子組換え米混入事例があり、上新粉に比べて加工度が高いビーフンがDNA抽出操作の信頼性確認用の試料として適切であると考え、タイ産ビーフンAをコメ加工品粉砕物試料として用いることとした。また、前処理をせずにそのままDNAの抽出に使用できる上新粉Bを、定性PCR用およびリアルタイムPCR用DNA溶液試料の調製に用いるコメDNA溶液の抽出原料として使用することとした。

ii) コメ加工品からのDNA抽出方法の検討:

定性PCR用およびリアルタイムPCR用DNA溶液試料は、陽性対照プラスミド溶液をコメ加工品から抽出したコメDNA溶液で希釈して作製するため、多量のコメDNA溶液が必要になる。そこで、コメDNAを効率的に準備するため、通知の方法に加え、市販されている他のDNA抽出キットの使用も含めて、抽出方法を検討することにした。この結果から Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) による抽出DNAは GM quicker2 (通知法) で抽出したDNAと、質および精製度が同等であると判断し、DNA溶液試料を調製するためのコメDNAの抽出には Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用することとした。

iii) 定性PCR、リアルタイムPCRの検出下限:

コメ加工品粉砕物試料は陰性試料であるため、市販の陽性対照プラスミド溶液を使用して、陽性試料を作製することにした。市販の陽性対照プラスミド溶液は、定性PCR用とリアルタイムPCR用の2種類があり、それぞれDNA配列の異なるプラスミドの溶液であるため、指定の検査法以外では使用できない。そのため、外部精度管理調査のDNA溶液試料は、定性PCR用とリアルタイムPCR用の2種類を別々に調製することとした。

その結果を見ると両方のプローブで1.5倍以上の増幅が期待できる1500コピーを高濃度リアルタイムPCR用DNA溶液試料、少なく

ともNNBt コメ検出用のプローブについては全ての反応で1.5倍以上の増幅が期待できる300コピーを低濃度リアルタイムPCR用DNA溶液試料として使用することが妥当と考えた。

4) 外部精度管理調査の結果: 定性PCR用およびリアルタイムPCR用DNA溶液試料においては、高濃度試料は全ての検出系で陽性となり、低濃度試料はいずれかの検出系で陰性となっても最終的な判定は陽性となることを想定し、濃度を設定した。外部精度管理調査を実施したところ、想定どおりの結果が得られたため、調査に適した濃度の試料を作製できたことが分かった。それとともに、定性PCRおよびリアルタイムPCRのいずれにおいても、検討した検出下限の妥当性を示すことができた。

2) コメ加工品からのDNA抽出方法の検討

i) DNA収量: 1) - i)、1) - ii) の検討で、コメ加工品の種類および抽出法によってDNA収量が異なることが分かった。通知の方法ではDNA収量が少ないものが多かったため、1) - ii) の検討で1カラムあたりのDNA収量が最も多かった Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて15種類のコメ加工品からDNAを抽出し、GM quicker2 (通知法) を用いて抽出したDNAによる結果と比較した。その結果では、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を使用することにより、GM quicker2 (通知法) では十分な量のDNAを得られなかった加工品からのDNA収量を増やせる場合があることが分かった。また、コメ加工品ごとに、より高収量のDNAが得られるキットが異なることが示されたため、検査対象に適したキットを選択することによって、より多くの加工品から遺伝子組換え食品の検出が可能になるものと考えられた。

ii) 陽性対照プライマー対による定性PCR:

2) - i) で抽出したDNAについて陽性対

照プライマー対による PCR を行い、SPS 遺伝子の検出の可否を調べた。抽出される DNA の量および総 DNA に占めるコメ DNA の割合が少なく、その結果 SPS 遺伝子が検出できない可能性が考えられた。このうち GM quicker2 (通知法) は DNA 収量が極めて低く、O. D. 260 は検出限界以下であったため、PCR 反応に十分な濃度の DNA が抽出できないことが、SPS 遺伝子の検出ができなかった原因のひとつであると考えられた。

Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて抽出した DNA は、定性 PCR における SPS 遺伝子の検出に関しては、GM quicker2 (通知法) を使用した場合と同等であることが分かった。しかし、抽出 DNA の収量は平均して高く、GM quicker2 (通知法) で吸光度測定に十分な量の DNA が抽出できなかった加工品からでも、吸光度測定ができる量の DNA 抽出が可能であった。したがって、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

E. 結論

1. 尾花分担研究

外部精度管理試験の結果において全ての測定項目で良好な結果を得た機関は、2 機関だけであった。それ以外の機関では測定項目の中の一つ以上の農薬で Xbar 管理図、R 管理図、Z スコアのいずれかが適正範囲外となった。このことは、今回試料に選択したレトルトカレーが脂肪や香辛料を多量に含むため、最も測定困難と思われる部類の試料であったこと、また、メタミドホスやアセフェートのように極性が高く、一斉分析法での分析が困難な農薬が含まれていたことが原因として考えられる。GC-MS では夾雑物のピークが多く見られ、定性や定量に支障をきたす例もあり、アセフェートの定量ができなかった機関も 1 機関存在した。LC-MS/MS では MRM 測定のため夾雑物

ピークとしては観測されなかったが、多量に共存する物質によるイオン化抑制を受け、見かけ上の回収率が低下する原因になったと考えられた。さらに、GC システム評価試料で大きな変動が見られた機関があることから、今回の試料を連続して測定し、安定した分析結果を得ることは容易ではないと考えられる。今回は通常業務で使用している分析法ではないため、使用した分析方法に習熟する時間的余裕がなかったことも大きな要因であると考えられるが、カレーのように香辛料や多種類の食材を含む試料を用いての一斉分析は、現時点では高い精度を得ることは困難であると思われる。しかし、市場流通品に対する残留農薬分析は主としてスクリーニングであり、現在の加工食品中の農薬分析において、地方衛生研究所に求められる有事に際した即応性は高く評価できるものと思われる。

2. 中澤分担研究

今回の実験により CPA 分析では LC-UV による汎用性の高いスクリーニング測定が行えた。また、LC/TOF-MS を用いることで、さらに高精度の分析が行えることが示された。

本法を CPA 汚染が危惧される食品に適用することで安全性評価を行うことが可能となり、今後、実用的な分析法として活用されることが期待される。

3. 松木分担研究

残留農薬混合標準液中での残留農薬標準品の安定性については、農薬の一斉分析において市販の混合標準溶液には含まれないような検査対象を含めて測定することが必要である。その場合には、分析者自らが混合溶液の調製及びその溶液中での農薬の安定性についての確認が必要と考える。本検討結果は、検査機関の分析者に対して、安定性の確認試験等を行う上での貴重な情報が提供でき、ひいては、検査の信頼性向上に寄与できる。

一般的な標準液の保存条件下、あるいは過酷な保存条件下での混合液中での各農薬の安定性に関わるデータが入手できることから、

試薬メーカーに対しては混合標準液調製時における調製時又は保存時における農薬の安定性に影響を与える要因に関する情報提供ができるものとする。混合農薬標準品液の調製法や使用者への提供の見直しあるいは、今後より高品質な残留農薬混合標準液の調製における貴重な情報提供についても可能となる。

検査機関においては、試薬メーカーから購入する混合標準液の作製方法や品質管理の現状が把握でき、また、混合標準品の保管管理や定量時における精度管理上の注意を促すこともできる。今後の各検査機関での精確な検査結果の確保にも繋がることを期待できる。

残留農薬標準品の汎用溶解液への溶解性については、個別分析法を用いた農薬検査を実施している各検査機関の現場において、農薬の標準原液や標準液を調製する時の溶解液への農薬の溶解性に関する情報の提供ができる。また、溶解状態の確認の必要性、重要性が認識でき、今後の各検査機関でのより精確な検査遂行に寄与できると考える。

4. 大島分担研究

(1) 理化学検査のための適正試料の作製 精度管理調査における適正な調査試料作製は重要であり、調査対象項目の濃度の均一性および調査期間中の濃度の安定性の確保が必須となる。今回の結果より、①鶏肉(ささみ、むね、もも)を3度挽きペーストにすることによって、スジおよび脂肪が均一である肉を得ることができ、ロボ・クープ・ミキサーで肉ペーストとSDDを混合することにより、肉を基材とした調査試料を作製することができた。②鶏ささみ肉ペーストは粘性があり、水を20%添加することにより、均一性が得られた。冷凍保存86日、冷蔵保存7日、3回の冷凍・解凍においても安定であり、平成20年度の外部精度管理調査用試料として採用した。③鶏むねおよびもも肉ペーストは脂肪含有により、水無添加で均一性が得られた。今後の調査試料とすることが可能であることが示された。④ソルビン酸および安息香酸は、測定を

妨害する可能性があり、亜硝酸ナトリウムはSDDを分解するため、使用できないことが確認された。

(2) 微生物学検査のための適正試料の作製:

今回使用した標準菌株(*B. cereus* HIC 080115、HIC 080116、HIC 080117、いずれも栄養型)および市販の*B. subtilis* ATCC 6633芽胞液を用いてNGKG寒天培地およびMYP寒天培地上での集落形成を確認したところ、*B. cereus*についてはいずれの菌株も典型集落の形成を認めた。これに対して、*B. subtilis*ではNGKG寒天培地上に発育集落はほとんど認められなかったが48時間培養により擬陽性と判定しうる集落の形成を認めた。一方、MYP寒天培地上には陰性集落の発育を認めたものの、これについても培養時間を延長することにより擬陽性集落を認めた。なお、NGKG寒天培地については3社について実施したが、判定のしやすさ等に差があるものの、概して同様の反応性を示した。以上のことから*B. cereus*については外部精度管理試料として適用できると考えられたが、*B. cereus*の芽胞液を作製したところ、作製後1週間の時点で菌数の減少が認められた。このことは芽胞液として安定した回収が得られていないことを示しており、芽胞液の作製方法について検討することに加え、栄養型で菌液調製をしたときのマッシュポテト中での安定性についても検討する必要があるものと考えられた。セレウス菌は芽胞形成菌であることを考慮すると、芽胞状態で調査試料を作製したほうが、調査試料の安定性という点では有利であると考えられるが、その至適条件を見出すことは困難が予想される。この予測を踏まえると、これまで実績のある無芽胞形成菌での安定性の確保方法がセレウス菌にも適用できる可能性は高いものと思われる。

これに対して、一部の陰性対照菌は選択培地において48時間培養により擬陽性を示すことが明らかとなった。この事実は、最終的な菌種の同定を行わない限り、検査結果を

陽性と判断する可能性を示しており、新規項目の導入時には避けるべき条件であると考えられる。そのため、陰性対照菌の選択培地上での反応性について、「発育しない」ということも含めて再考する必要がある。ただし、選択培地上に発育集落を認めないことは、場合によっては添加菌が存在しないことを意味することもありうることから、普通寒天培地等の一般的な栄養培地上で発育することが絶対条件となろう。

また基材の検討においては、今回白米を候補として挙げたが、オートクレーブ処理後の物性変化のため採用することは難しいものと判断した。これまでの外部精度管理調査試料用基材の条件として、オートクレーブ処理ができるもの、その後の形状が少なくとも1ヶ月間保持できるもの、対象菌の接種が容易であるものが挙げられる。そのため、別の候補となりうる基材を選定する必要があると考えられた。しかし、マッシュポテトはこれまでも採用実績があることに加え、基材としての大きな問題点はないことから、これについて検討することは調査試料の新規開発という意味において今後の進捗に大きく関わるものであると考えている。

(3) アレルギー関連物質検査のための適正試料の作製

1) そば試料作製の検討: 自家製一次標準粉末をマイクロディスマンプレートでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った結果、タンパク質の抽出量がケルダール法によるタンパク質量に近づいた。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISA キットでそばタンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。FASTKIT エライザ Ver. II そば では昨年と同様回収率が添加量を上回ったが、昨年と比べ安定性が改善した。これらの試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例でそばプライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応で

きる試料が調製できた。

2) 落花生試料作製の検討: 自家製一次標準粉末をマイクロディスマンプレートでさらに粉砕して標準品規格による抽出を行った。そばとは異なり、さらに粉砕した粉末を使用しても、抽出液のタンパク質含量はケルダール法に比べて低かった。この粉末をあずきあんおよびカボチャペーストに添加し、ELISA キットで落花生タンパク質を測定し、回収率および安定性を検討した。作製時の回収率は昨年度と変わらなかったが、FASTKIT エライザ Ver. II 落花生 で安定性がやや改善した。これらの試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例で落花生プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

3) 小麦試料作製の検討: 小麦一次標準粉末の代替品を見つけるべく、新たに全粒粉2種について検討を行った。これらの全粒粉の標準品規格による抽出液の2-D Quant Kitによるタンパク質量はELISA法によるタンパク質量とは差があったが、ELISAキット間の測定値の乖離はハルユタカに比べて小さかった。またこのうち1つを食材に添加したものでELISAキット間の測定値は類似していた。この小麦添加試料についてPCR法による確認試験を行った結果、Genomic-Tip 20/GによるDNA抽出液では、全例で小麦プライマーによる増幅物が確認でき、確認試験にも対応できる試料が調製できた。

4) 卵試料作製の検討: 混合用のミキサーとしてBLIXER-5Plusを導入し、これを使用して約3kgのスケールで卵添加試料を調製した。調製した試料の均一性を一元配置による分散分析により検討した結果、調製した試料はいずれも測定キットにかかわらず、均一と判定された。これらの試料は-20℃で18週間保存後のELISA法の測定およびウエスタンブロットによる確認試験においても良好な結果を示した。

(4) 組換え DNA 技術応用食品検査のための適正試料の作製検討

1) 外部精度管理調査：中国産安全性未審査遺伝子組換え米を検査対象とした外部精度管理調査において、調査試料を DNA 抽出操作の信頼性の確認を目的としたコメ加工品粉砕物試料と、定性 PCR 法およびリアルタイム PCR 法による遺伝子組換えコメ検出操作の信頼性の確認を目的とした DNA 溶液試料のそれぞれにすることとし、調査試料の作製方法を検討した。DNA 溶液試料を作製するための DNA 抽出に用いる遺伝子組換え米を含まないコメ加工品の選定、DNA 抽出方法の検討および各検出系における検出下限のコピー数の検討を行い、その結果から外部精度管理調査試料を作製した。外部精度管理調査参加 33 機関からの報告は、想定したとおりの結果であった。

2) コメ加工品からの DNA 抽出方法の検討：より多くのコメ加工品から PCR 反応に必要な濃度の DNA を抽出し、SPS 遺伝子の検出率を向上させることを目的として、DNA 抽出方法の検討を行った。15 種類のコメ加工品を対象とし、GM quicker2 (通知法) と Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いて DNA を抽出し、収量および SPS 遺伝子検出の可否を検討した。

GM quicker2 (通知法) では PCR に用いる DNA 濃度である 10ng/μL に満たない DNA 収量の加工品が 4 種類あったが、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) では全て 10ng/μL 以上の DNA 収量であった。また 15 種類のうち 10 種類は Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) を用いた方がより高い収量が得られ、GM quicker2 (通知法) で十分な抽出 DNA が得られなかったコメ加工品からも、PCR に必要な濃度の DNA を抽出することができた。

SPS 遺伝子の検出においては、今回検討した 15 種類のコメ加工品では、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) と GM quicker2 (通知法) による抽出 DNA は同等であることが分かった。したがって、Genomic DNA Extraction Kit for Food Samples (APPENDIX A 法) は、コメ加工品からの DNA 抽出方法として有効な方法のひとつであると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

「検査機関の信頼性確保に関する研究」

平成 20 年度 分担研究報告書

食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究

分担研究者 尾花 裕孝

検査機関の信頼性確保に関する研究

分担研究報告書

食品中に含まれる微量農薬の分析法と精度管理体制の構築に関する研究

主任研究者	小島幸一	財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 所長
分担研究者	尾花裕孝	大阪府立公衆衛生研究所 食品化学課長
研究協力者	畠山えり子	岩手県環境保健研究センター
	土田由里子	新潟県保健環境科学研究所
	上野英二	愛知県衛生研究所
	田中健	奈良県保健環境研究センター
	田中敏嗣	神戸市環境保健研究所
	河瀬志保	広島市衛生研究所
	堤泰造	徳島県保健環境センター
	衛藤修一	北九州市環境科学研究所

研究要旨

食品中の残留農薬基準は、主に使用後の残留を監視する目的で生鮮農産物を対象に設定されており、検査体制もそれに則っている。そのため、複数食材を加工、調理して製品化されている加工食品や冷凍食品に対しては、残留農薬分析は行われていなかった。しかし、平成 20 年初頭に冷凍餃子への農薬混入事件が発覚したため、加工食品に対する不安が急激に増大し、これを受けて加工食品に対する農薬分析の需要が喚起された。加工食品といってもその種類は多種多様であり、生鮮食品に準じた検査方法で農薬分析が行える範囲は限定的である。そこで、加工度が高く脂質を含む加工食品を対象に分析法を考案、例示し、消費段階の分析機関である地方衛生研究所で、加工食品中の農薬分析への対応の可否を検証した。参加した地方衛生研究所は岩手県、新潟県、愛知県、奈良県、大阪府、神戸市、広島市、徳島県、北九州市の 9 機関であり、検証方法としては内部精度管理試験および外部精度管理試験を実施した。

今回、加工食品の代表例となる精度管理用試料には、含有する原材料数、脂質含有量、試料調製時の利便性を考慮してレトルトカレーを用いた。添加農薬としては、農薬混入事件の実例をもとに、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をもつ有機リ

ン系、カーバメート系農薬とし、使用する農薬標準品を共通化する為に、市販品の農薬混合標準液に含まれる15種類を選択した。例示した分析法の概略は次の通り。吸水剤として硫酸マグネシウムと混合した試料より、酢酸エチルで農薬成分を抽出し、アセトニトリル分配で脱脂した後にグラファイトカーボンおよび一級二級アミン固相カートリッジで精製を行って、GCおよびLCの質量分析計で測定した。

全機関で無添加試料を用いた内部精度管理試験、外部精度管理試験を行い、平均回収率と変動係数を算出した。品質管理などに用いられているXbar-R管理図や、Zスコアによる評価を行った結果、全ての測定農薬で全項目が適正範囲に入ったのは2機関のみであり、その他の7機関では一つ以上の項目が適正範囲に入らなかった。このことは、今回試料に選択したレトルトカレーが測定困難な試料であったこと、また、メタミドホスやアセフェートのように極性が高く、一斉分析法での分析が困難な農薬が含まれていたことが原因として考えられる。GC-MSでは夾雑物のピークが多く見られ、定性や定量に支障をきたす例もあった。LC-MS/MSではMRM測定のため、夾雑物のピークとしては観測されなかったが、共存する物質によるイオン化抑制を受け、見かけ上の回収率が低下する原因になったと考えられた。さらに、GCシステム評価試料で大きな変動が見られた機関があることから、今回の試料を連続して測定し、安定した分析結果を得ることは容易ではないと考えられた。加工食品は通常業務の検査対象でないため、分析方法に習熟する時間的余裕がなかったことも大きな要因であると考えられるが、カレーのような高度に加工された試料を用いての一斉分析は、現時点では高い精度を得ることは困難であると思われる。しかし、市場流通品に対する残留農薬分析は主としてスクリーニングであり、現在の加工食品中の農薬分析において、地方衛生研究所に求められる有事に際した即応性は高く評価できると思われる

A. 研究目的

2007年12月から2008年1月にかけて、中国製輸入冷凍餃子を原因食品とした健康被害事件が複数発生した。患者は有機リン系農薬による中毒症状を示したが、それは冷凍餃子中に高濃度で混入されていたメタミドホスが原因であった。この濃度は農業目的での使用による残留とは考えられなかったが、これを機に加工食品中の農薬に対する消費者の不安が大きく増大した。これまで加工食品は、細菌検査に重点を置いた検査が行われており、残留農薬は原材料が食品衛生法で規制されているため、検査が行われていなかった。このため、事件発覚後に生産、流通、消費の各段階で、加工食品に対して多くの検査が行われることになった。現在、農薬分析を行っている機関では、生鮮食品だけでなく加工食品中の残留農薬分析にも対応することが求められている。加工食品の種類は多岐にわたり、様々な種類の食品を含んだ製品の総称である。生産段階での分析は各原材料に絞った対応が可能な場合もあるが、消費段階では全ての加工食品に対応する必要が生じる。また、平成17～19年度に行われた厚生労働科学研究費補助金研究「検査機関の信頼性確保に関する研究」において、地方衛生研究所の生鮮食品中の残留農薬分析精度が良好であることが示されているが、加工食品においては分析法も整備されておらず、生鮮食品で運用される方法では対処できない事例も考えられる。そこで、本研究では加工食品を対象に運用可能な分析法を考案し、消費段階の分析機関である地方衛生研究所で、その方法による対応の可否を検証する。今年度の検討課題として、1)加工食品を対象にした分析法の考案、2)分析法の評価を行うための内部および外部精度管理方法の確立のうち、加工食品を用いた試料の均質化方法の確立、3)地方衛生研究所9機関で行う精度管理試験において、加工食品試料の

マトリックスが分析機器へ及ぼす影響の調査、同一試料をGC-MSおよびLC-MS/MSで測定した際の再現性の調査を行った。

B. 研究方法

1. 実施機関

大阪府立公衆衛生研究所は加工食品中の農薬分析法の検討を行い、協力機関へ分析法案を例示した。また、試料として加工食品である市販のレトルトカレーを使用して、外部精度管理試料の調製、送付、均質性確認、安定性確認および分析結果の解析を行った。さらに、試料調製班とは別に分析班を設定し、協力機関と同様に試料の分析を行った。

2. 協力機関

精度管理試験に参画した研究協力機関は、岩手県環境保健研究センター、新潟県保健環境科学研究所、愛知県衛生研究所、奈良県保健環境研究センター、神戸市環境保健研究所、広島市衛生研究所、徳島県保健環境センター、北九州市環境科学研究所の計8機関の地方衛生研究所であった。

3. 実施概要および日程

加工食品の分析法を平成20年7月までに確立した。加工食品は多種類の食材を含み、流動性があるために均質化が容易である利点を考慮し、レトルトカレーを食品試料に使用した。レトルトカレーを使用した外部精度管理試料の調製方法を平成20年8月までに検証した。レトルトカレーに15種類の農薬を添加したものを外部精度管理試料とし、無添加のレトルトカレーを内部精度管理のための添加試料および対照用試料とした。測定機器にはGC-MSおよびLC-MS/MSを使用することとし、分析結果等の報告期限は同年10月31日とした。

4. 加工食品中の農薬分析法

4-1. 例示分析法

生鮮食品からの抽出溶媒は、アセトニトリルが一般的となってきたが、アセト

ニトリルでは脂質を含む食品試料からの農薬抽出能力に懸念があったため、抽出溶媒に酢酸エチルを用いた。また、抽出後に溶媒を置換してヘキサン/アセトニトリル分配を行い、抽出液より脂質を除去した。精製操作は、これまで生鮮食品の前処理に用いられてきたグラファイトカーボン (GCB)/PSA の固相カラムを用いた。フードプロセッサーで均一化した試料 5g をコニカルチューブにとり、無水硫酸マグネシウム 6g と酢酸エチル 20mL を加えてホモジナイザーで 1 分間攪拌抽出した。その後 3000rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清を抽出液とした。この抽出液 8mL (試料 2.0g 相当) をなす型フラスコに分取し、濃縮して溶媒を留去した。残渣をヘキサンに溶解させ別のコニカルチューブに移し、液量を約 10mL とした。そこにヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加え、激しく振盪した後に遠心分離を行い、アセトニトリル層を GCB/PSA 固相カラムに負荷した。残ったヘキサン層に再びヘキサン飽和アセトニトリル 20mL を加えて同じ操作を行い、アセトニトリル層を同じ GCB/PSA 固相カラムに負荷した。固相カラムからの通過液はあわせてなす型フラスコに採取し、さらにアセトニトリル/トルエン (3:1) 30mL を流出させ、通過液とあわせた。これを 40°C 以下で減圧濃縮後、アセトン 2mL に溶解して GC 用試験液とした。このうち 0.5mL を窒素気流下で乾固し、25% メタノールで 5mL (試料相当 0.1g/mL) に溶解したものを LC-MS/MS 用試験液とした。

4-2. 参加機関の分析法および測定条件

参加機関の分析法を表 1 にまとめ、機関の詳細なフロー図を資料 1-1-1-9 に示した。あらかじめ参加機関に示した B-4-1. 例示分析法と同じく、抽出溶媒に酢酸エチルを使用した機関は 6 機関、その他の機関はアセトニトリルもしくは水+アセトン+ヘキサンを用いた。6 機関は脱脂工程にヘキサン-アセトニトリル分配を、3 機関はゲル浸

透クロマトグラフィー (GPC) を用いた。精製工程では 6 機関で GCB/PSA を、他の機関が C18 および PSA、SAX/PSA、GCB/NH₂ を用いた。GC-MS および LC-MS/MS の測定条件を資料 2-1-3-2 に示した。

5. 農薬標準品

添加農薬としては、農薬混入事件の実例をもとに、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用をもつ有機リン系、カーバメート系農薬を選択した。また、各協力機関で共通の標準品として、市販品である関東化学農薬混合標準液 15 (メタミドホス、アセフェート、ジメトエート、トルクロホスメチル、マラチオン、イソフェンホス、イソフェンホス P=0、ブタミホス; 各 10mg/mL アセトン溶液)、農薬混合標準液 39 (オキサミル、アルジカルブ、エチオフェンカルブ、フェノブカルブ、ペンダイオカルブ、ピリミカール、カルバリル; 各 10mg/mL メタノール溶液)、農薬混合標準液 50 (エトプロホス、エトリムホス; 以上 2 種 5mg/L、Z-ジメチルピリンホス、クロルフェンピリンホス、バミドチオン、エディフェンホス、ピラクロホス; 以上 5 種 10mg/mL アセトン溶液) を使用した。配布した混合標準液に含まれる農薬のうち、メタミドホス、アセフェート、ジメトエート、トルクロホスメチル、マラチオン、イソフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、Z-ジメチルピリンホス、エディフェンホス、ピラクロホス、フェノブカルブ、ペンダイオカルブ、ピリミカール、カルバリルの 15 種類を添加する農薬に選択した。

GC システム評価試料として、林純薬 NAGINATA クライテリアサンプル Mix (シマジン、ペンタクロロフェノール、クロルピリホスメチル、フェニトロチオン、2,4-ジニトロアニリン、クロルピリホス、イソキサチオン、カブタホール; 各 1 μ g/mL、その他アルカン類等合計 51 種類含有 ジクロロメタン溶液) を使用した。

6. 精度管理試料の調製および送付方法

水を入れた20Lのステンレスバケツを80-90℃に加熱し、レトルトカレーのバック(1バックあたり250g)を包装容器のまま5分間加熱した。容器から取り出したカレーはフードプロセッサー(東芝精米機QS-7)に移し細砕した。その後、湯煎しながら60℃に保温した、攪拌機(ケンミックス・アイコーKM-800)付属のステンレス容器へ移し、5分間攪拌して内部精度管理試料を作成した。外部精度管理試料は上記と同様に攪拌機でカレーを攪拌しながら、農薬をホールピペットで正確に加えた。内部精度管理試料および外部精度管理試料共に、参加機関への送付分として、120gずつアルミ製シールバッグ(30個)に分包し密封した。分包した精度管理試料は-20℃で保存した。

協力機関へは、内部精度管理試料1-2個、外部精度管理試料1-3個、プラスチックケースに入れた関東化学農薬混合標準液15、39、50および林純薬NAGINATAクライテリアサンプルMixをダンボール箱に入れ、2008年9月1日午前中必着になるように冷凍宅配便で送付した。

7. 試験方法

7-1、分析機器の再現性試験

配布した標準品を精度管理試料の測定と同じ濃度(例示した分析法の場合は0.1mg/L)に調製し、GC-MSおよびLC-MS/MSで5回以上測定した。ひとつのデータのピーク面積を100とし、残りをその比で示し、各農薬の平均と変動係数およびZスコアを求めた。

7-2、内部精度管理試験

配布した無添加試料と標準品を用いて添加回収試験を行った。添加濃度は100ng/g(エトプロホス、エトリムホスは50ng/g)とした。添加には0.5mLホールピペットを用い、試料重量に合わせた添加用標準溶液を調製しておき(試料重量5gの場合は

1mg/L)、試料秤量後に添加を行い直ちに分析を開始した。測定機器はGC-MSおよびLC-MS/MSとした。並行数は5以上とし、測定値、平均回収率とその変動係数、Zスコアを求めた。

7-3、外部精度管理試験

配布した外部精度管理試料を並行数5以上でGC-MSおよびLC-MS/MSで測定し、測定値、平均回収率とその変動係数およびZスコアを求めた。添加濃度は100ng/g(エトプロホス、エトリムホスは50ng/g)とした。

7-4、GCシステム評価試料測定

GC-MSを用いて、標準品や一連の加工食品試料を測定する前と後に林純薬NAGINATAクライテリアサンプルMixをスクリーンモードで測定し、シマジン(m/z 201)、ペンタクロロフェノール(266)、クロルピリホスメチル(286)、フェントロチオン(277)、2,4-ジニトロアニリン(183)、クロルピリホス(314)、イソキサチオン(105)、カプタホール(79)の各マスキンググラム上のピーク面積、高さの変化を比で求めた。

7-5、LC-MS/MSマトリックス効果調査

標準品と別途調製したマトリックスで、精度管理試料の測定時と同濃度に希釈したもの(例示した分析法の場合は0.01mg/L)を測定し、ピーク面積および高さの変化を比で求めた。

7-6、評価方法

各機関から報告された値について、基本統計量とZスコアの算出を行い、外部精度管理試験においてはXbar-R管理図の作成を行った。「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」では回収率(真度)が70-120%とされているため、Xbar管理図では70-120%の区域で良好との判定をした。R管理図では管理限界の為の係数をn=5の2.114とし、上部管理限界(UCL)を設定した。Zスコアは絶対値

2 以下で良好とした。なお、これらの数値の計算には Microsoft Excel を使用した。

C. 研究結果

1. 外部精度管理試料の検討

1-1. 外部精度管理試料の調製

精度管理試料は、同一ロットについて分析対象物質の均質性および一定期間における安定性が保障された試料を、調製・送付し、各協力機関において分析回数および分析方法に応じて必要量を秤量して用いる。しかし、加工食品が多種類の食材から構成される性質上、精度管理試料中の添加された農薬濃度の均質性を確保しつつ調製し、また安定性を確保しながら送付することが難しいと考えられた。そのため、均質な精度管理試料を調製するために、試料調製の方法を検討した。試料はその必要量を勘案し、レトルトカレー2kgを用意し、メタミドホス、アセフェート、ジメトエート、トルクロホスメチル、マラチオン、イソフェンホス、エトプロホス、エトリムホス、Z-ジメチルピピンホス、エディフェンホス、ピラクロホス、フェノブカルブ、ベンダイオカルブ、ピリミカール、カルバリル、オキサミル、クロルフェンピピンホスの17種類を添加した。これらの回収率を指標とした添加回収試験を行い、均質な試料調製のための諸条件を検討した。調製は、室温でレトルトカレーをフードプロセッサーで細砕し、20L ステンレスバケツ内で攪拌しながら17種類の農薬を添加した。これを容器に小分けし、密封した後に -20°C で凍結保存した。添加回収試験は、凍結した容器から無作為に選び、室温にて解凍、混和した上で、ピペットで採取し、B-4-1. 例示分析法に従い、添加した農薬の回収率を測定した。結果は、容器内および容器間での回収率に大きな差が生じ、真度および精度ともに不良であった。原因として、試料の調製および採取の段階において、油脂が固化したとみ

られるものが散見されたため、これが農薬の不均一な分布を生じたと推測した。そこで農薬を均一に分布させるため、試料の調製および採取において、加温し油脂を融解後再均質化することで改善を試みた。レトルトカレーは包装容器のまま、沸騰した水で加温し、ステンレスバケツを湯煎で 60°C に保温しながら調製した。採取は、解凍した試料を 60°C に保温しながら激しく混和しながら行った。その結果、容器間の回収率の差は縮小し、真度および精度はともに良好であった。(表2)

1-2. 外部精度管理試料の均質性試験

添加した農薬の均一性が確保できることが確認された B-6. 精度管理試料の調製および送付方法に従い、調製した外部精度管理試料について各協力機関に送付する前に均質性試験を実施した。試験では、送付試料の容器間の農薬濃度の均一性を評価した。外部精度管理試料の中から、無作為に6個の容器を選択し、1容器につき繰り返し2回採取し、B-4-1. 例示分析法に従い、添加した15種類の農薬濃度を測定した。各農薬濃度は $33.7\sim 83.4\text{ng/g}$ 、変動係数は $4.1\sim 6.1\%$ であり、すべての農薬について変動係数が 10% 以下であった。各農薬の均質性は、一元配置分散分析を行った結果、カルバリルを除く農薬は有意水準 0.05 を上回り、これらの農薬濃度に容器間において、差があると言えず均質性が確認された。(表3)

1-3. 外部精度管理試料の安定性試験

試料を調製し、各協力機関が分析を行うまでの期間、試料中の農薬の安定性を証明するために安定性試験を実施した。試験は、約2カ月間凍結保存した外部精度管理試料の1個の容器から、繰り返し8回採取し、B-4-1. 例示分析法に従い、添加した15種類の農薬濃度を測定し、試料を送付する前の濃度に対する残存率を評価した。アセフェートを除く14種類の農薬の残存率は、 $96.4\sim 107.5\%$ となり、精度管理の実施期間中の

安定性は確認された。(表4)

2. 再現性試験結果

参加機関の再現性試験結果を表5および表6に示した。GC-MSでの測定においては、メタミドホス、アセフェート、エディフェンホス、ピラクロホス、カルバリルが3~5機関で変動係数が10%を超えた。メタミドホスとアセフェートは測定不能であった機関も存在した。LC-MS/MSで再現性試験においては、複数機関で変動係数が10%を超えた例は見られなかったが、トルクロホスメチルは測定不能の機関もあり、他の機関から報告されているピーク面積も小さかった。

3. 内部精度管理試験結果

参加機関の内部精度管理試験結果を表7に示した。内部精度管理ではD、E、FおよびI機関において、回収率が70~120%、変動係数が20%以下とならなかった農薬が見られた。また、これらのうちDおよびI機関では、GC-MSとLC-MS/MSのうち一方で異常に高い回収率が得られた。

4. 外部精度管理試験結果

参加機関の外部精度管理試験結果を表8に示し、Xbar-R管理図(図1)を作成した。これをB-7-6. 評価方法の基準で判定し、表9にまとめた。農薬ごとの評価結果を以下に示す。

(1) メタミドホス(表8-1、図1-1)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる8機関の平均値は74.2 ng/g(回収率74.2%)であった。(A機関で測定不能) Xbar管理図は、3機関が適正域を外れた。R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は70.8 ng/g(回収率70.8%)であった。Xbar管理図は3機関が適正域を外れた。R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(2) アセフェート(表8-2、図1-2)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる7機関の平均値は89.5 ng/g(回収率89.5%)であった。(A、E機関で測定不能) Xbar管

理図、R管理図では各々1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は80.5 ng/g(回収率80.5%)であった。Xbar管理図は3機関が適正域を外れた。R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(3) ジメトエート(表8-3、図1-3)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる全機関の平均値は87.9 ng/g(回収率87.9%)であった。Xbar管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は1機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は88.2 ng/g(回収率88.2%)であった。Xbar管理図は1機関が適正域を外れた。R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(4) トルクロホスメチル(表8-4、図1-4)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる全機関の平均値は86.4 ng/g(回収率86.4%)であった。Xbar管理図、R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる8機関の平均値は78.3 ng/g(回収率78.3%)であった。(E機関で測定不能) Xbar管理図は3機関が適正域を外れた。R管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(5) マラチオン(表8-5、図1-5)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる全機関の平均値は94.4 ng/g(回収率94.4%)であった。Xbar管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は1機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は85.8 ng/g(回収率85.8%)であった。Xbar管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は1機関が適正域を外れた。

(6) イソフェンホス(表8-6、図1-6)

添加濃度100 ng/gに対し、GC-MSによる全機関の平均値は95.1 ng/g(回収率95.1%)であった。Xbar管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R管理図は1機関が

適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は85.2 ng/g (回収率85.2%)であった。Xbar 管理図は2機関が適正域を外れ、R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。

(7) エトプロホス (表8-7、図1-7)

添加濃度 50 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は44.9 ng/g (回収率89.8%)であった。Xbar 管理図は全機関が「良好」であった。R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは絶対値が2以上の機関が1機関あった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は45.5 ng/g (回収率90.9%)であった。1機関において Xbar 管理図、R 管理図共に適正域を外れ、Zスコアも不良であった。

(8) エトリムホス (表8-8、図1-8)

添加濃度 50 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は39.1 ng/g (回収率78.2%)であった。Xbar 管理図は3機関が適正域を外れ、R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は36.7 ng/g (回収率73.3%)であった。Xbar 管理図は3機関が適正域を外れ、Zスコアは1機関が不良であった。R 管理図は全機関が「良好」であった。

(9) ジメチルピホス (表8-9、図1-9)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は84.5 ng/g (回収率84.5%)であった。Xbar 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R 管理図は2機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は80.2 ng/g (回収率80.2%)であった。1機関において Xbar 管理図が適正域を外れ、Zスコアも不良であった。R 管理図は全機関が「良好」であった。

(10) エディフェンホス (表8-10、図1-10)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は89.1 ng/g (回収率89.1%)

であった。Xbar 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R 管理図は1機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は80.1 ng/g (回収率80.1%)であった。Xbar 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R 管理図は1機関が適正域を外れた。

(11) ピラクロホス (表8-11、図1-11)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は94.1 ng/g (回収率94.1%)であった。Xbar 管理図は2機関が適正域を外れ、R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は83.7 ng/g (回収率83.7%)であった。Xbar 管理図は2機関が適正域を外れ、Zスコアは1機関が不良であった。R 管理図は全機関が「良好」であった。

(12) フェノブカルブ (表8-12、図1-12)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は99.0 ng/g (回収率99.0%)であった。Xbar 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R 管理図は1機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は96.9 ng/g (回収率96.9%)であった。Xbar 管理図、R 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(13) ペンダイオカルブ (表8-13、図1-13)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は91.6 ng/g (回収率91.6%)であった。Xbar 管理図は1機関が適正域を外れ、R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は85.6 ng/g (回収率85.6%)であった。1機関において Xbar 管理図、R 管理図共に適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。

(14) ピリミカブ (表8-14、図1-14)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる

全機関の平均値は93.9 ng/g(回収率93.9%)であった。Xbar 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。R 管理図は1機関が適正域を外れた。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は88.5ng/g(回収率88.5%)であった。Xbar 管理図、R 管理図、Zスコアは全機関が「良好」であった。

(15) カルバリル (表8-15、図1-15)

添加濃度 100 ng/g に対し、GC-MSによる全機関の平均値は86.6 ng/g(回収率86.6%)であった。Xbar 管理図は2機関が適正域を外れた。R 管理図は1機関が適正域を外れた。Zスコアは全機関が「良好」であった。また、LC-MS/MSによる全機関の平均値は87.2 ng/g(回収率87.2%)であった。1機関においてXbar 管理図、R 管理図共に適正域を外れ、Zスコアも不良であった。

5. GC システム評価

各機関の GC-MS システム評価試料の測定結果を表10に示した。一連の加工食品試料の測定前後における、ピーク面積とピーク高さの変化率を求め、ピーク面積変化率対ピーク高さ変化率の比を用いて、ピーク形状の変化を数値化した。GC-MS システム評価試料に含まれる農薬のうち、イソキサチオンとカブタホールはGC注入口、シマジン、ベンタクロロフェノール、2,4-ジニトロアニリンはカラム注入口側、フェニトロチオンはカラム検出器側の評価に用いられている。この結果、多くの機関で変化が見られたが、ピーク強度が大幅に増大した機関、やや増加した機関、減少した機関、と様々であった。しかしピーク形状に関しては、ベンタクロロフェノールと2,4-ジニトロアニリンが面積と高さの変化率が一致せず、ピーク幅が変化している共通の傾向が確認された。これらは共にカラム注入口側の指標物質であり、レトルトカレーマトリックスによってカラムが劣化していることが示された。

6. LC-MS/MS マトリックス効果調査

各機関で標準溶液とマトリックス入り標準溶液を測定し、そのピーク面積とピーク高さの変化率を求め、ピーク面積変化率対ピーク高さ変化率の比を用いて、ピーク形状の変化を数値化した。(表11)多くの機関でピーク強度に変化が見られたが、機関間での傾向は共通しなかった。また、ほぼ全ての機関でピーク形状に変化は見られなかった。

D. 考察

1. 加工食品中の農薬分析法

加工食品中の農薬分析で重要と思われた脱脂操作は、GPCとアセトニトリル/ヘキサン分配に分かれたが、参加機関の分析条件が異なるため比較が困難であった。そこで、試料調製班で上記の脱脂操作の比較検討を行ったが、回収率の差となるような違いは見られなかった。表9でXbar、R、Zの項目全てが良好であったB、C機関、および1項目だけが適正範囲外であったG機関は、分析法が例示した方法より精製工程が多い。これら3機関の内部および外部精度管理試験において、変動係数が10%以上となったのはG機関の3項目だけであった。さらにLC-MS/MSの測定結果に限定すると、Xbarが適正範囲外であったG機関のアセフェート以外は、全て変動係数が10%未満であったが、これら3機関共にLC-MS/MSの測定においてマトリックス補正を行っていなかった。これら3機関のLC-MS/MSマトリックス効果測定結果(表11)は、B機関はマトリックス効果が非常に小さく、C、G機関も比較的小さかった。また、C機関はGCBカラムの溶出にアセトン/ヘキサン(1:1)を使用したため、カレーの色素が溶出されなかったと報告している一方、他機関ではGCB系カラムにアセトニトリル/トルエン(3:1)を使用しており、最終液でのカレーの色素や香りが確認されている。以上のことから、今回使用した試料では、例示した方法より

も精製操作を追加した機関では、より測定時のマトリックスが少なく、精度の良い測定が可能であったと思われる。参加機関への聞き取り調査の結果、GC-MS の測定においては、スキャン測定の結果ターメリック類やオイゲノールと思われる強度の非常に強いピークが確認されたなど、精製不足を指摘する報告が多く寄せられた。LC-MS/MS の測定においては、注入する最終溶液を含水状態にすると、測定結果の変動が大きくなるなどの報告が複数あった。これは含水状態となったために水に不溶な成分が析出し、農薬を吸着しているのではないかと考えられた。以上のようにレトルトカレー中の農薬分析は様々な困難が報告されたが、各機関の内部および外部精度管理試験において、測定対象の農薬の回収率の変動係数は、概ね 20%以内に収まっており、加工食品の残留農薬分析の主目的がモニタリングであることを考慮すれば、残留傾向を把握するには良好な精度であったと考えられる。

2. 外部精度管理試料の調製

当初外部精度管理用の試料を調製する際に、その均質性の確保が大きな問題になると考えられた。複数の食材から構成される加工食品を均質に混和するには、食材に流動性が必要であると考え、レトルトカレーを選択した。しかし、実際に添加して均質化を行い、輸送条件の再現のために凍結すると、油脂成分と水分の融点の違いから、油脂の固化物が発生して、均質性が失われる。その結果、脂溶性の高い農薬の均一性が保てないことが判明した。このため、サンプリング時に再均質化する手法として、加温して攪拌することを各機関に依頼した。この段階での各機関の取扱いが大きく異なる場合、分析結果に影響する可能性がある。また、試料調製班での均一性試験や安定性試験において、分析値が一貫して低く、回収率が 70%に満たない農薬もあった。このうちカルバリルは均一性を示さなかったが、

他の回収率が良好な農薬が均一性を示したため、試料全体では均質であると判断した。

3. 再現性試験

GC-MS で一般に使用されている微極性カラムでは、高極性化合物の測定には不向きであるため、カルバリルや測定不能とした機関のあったメタミドホスとアセフェートは最適なピーク形状が得られないことが知られている。また、エディフェンホスとピラクロホスは測定項目中最も保持時間が遅く、カラム温度が 250℃以上になったところにピークが得られている。GC-MS 分析においてカラム温度が高温になるとバックグラウンドノイズが増加し、定性や定量に影響が及ぶ場合もある。これらの理由のため、上記農薬では標準品の測定において変動係数が大きくなったと考えられる。また、マトリックス入り標準品として測定していた H 機関では、マトリックス由来の成分が GC 注入口付近に蓄積し、当該測定の次の測定時にピラクロホス付近に大きな夾雑物ピークが見られ、連続測定した結果良い再現性が得られなかった。同一標準品の連続測定という操作から、当初は大きな変動は無いと考えていたが、実際には 10%以上の変動係数を示した例もあった。いくつかの機関では精度管理試験よりも大きな変動を示していたが、一部の機関では測定機器の安定化の為に試料を数回測定し、その後データ取得を行って安定した測定値を得ており、測定機器の維持管理には十分注意する必要があることが示された。

4. 再現性試験、内部精度管理試験および外部精度管理試験の比較

各機関の再現性試験、内部精度管理試験および外部精度管理試験の結果をまとめた。横軸を各農薬の平均回収率、縦軸を変動係数として測定機器ごとに散布図で示した。

(図 2-1-2-3) また、全機関の結果を再現性試験、内部精度管理試験、外部精度管理試験ごとにまとめた図も示した。(図 2-4)

これから、測定機器自体の測定誤差が少なからずあるということが明確である。再現性試験において、点の分布がV字を形成しており、試験内容からみても当然であるが、回収率が100%から離れるにつれて変動係数が大きくなる傾向が見られた。(図2-4) 内部精度管理試験および外部精度管理試験の結果では、GC-MS、LC-MS/MSのいずれの分析機器においても、2機関の報告値が大きく分散していたが、それ以外の7機関では、内部精度管理試験と外部精度管理試験を比較して大きな差はなかった。これらの7機関では、GC-MS、LC-MS/MSのいずれにおいても、再現性試験は回収率100%付近に分布し、内部精度管理試料と外部精度管理試料の分析値はそれより回収率がやや低下した位置に分布する傾向が見られる。このことから、分析操作で一定の喪失があり、結果として精度管理試料の回収率が低くなっていると考えられる。C機関では、再現性試験、内部精度管理試験、外部精度管理試験のいずれにおいてもGC-MSでの分析値は非常に良好で、回収率は100%付近で変動係数は低い。これは、GC-MSでの定量において、内部標準品による補正を行ったためと思われる。

5. GC-MSとLC-MS/MSの結果比較

各機関の内部精度管理試験および外部精度管理試験における測定機器間の相関をまとめた。横軸をGC-MS測定値、縦軸をLC-MS/MS測定値として農薬ごとに散布図で示した。(図3)各農薬の中で、ジメチルピピンホスは特に点が中央の斜線付近に集中しており、GC-MSとLC-MS/MSの測定値が一致し易い、定量値に影響の出にくい農薬であったことが示された。マラチオンやイソフェンホス等では、中央の斜線より下側に点が集中する傾向が見られ、GC-MS測定値の方が大きな値が得られ易いことが示された。トルクロホスメチルはLC-MS/MSでの感度が悪いことも報告されており、ほとんど

の点が斜線より下側であった。ジメトエートやフェノブカルブ、ペンダイオカルブでは、斜線より離れている点もあったが、全体としては斜線の上下にほぼ均等に分布していた。機関ごとで見た場合、A、E、F機関(図2-1、2-2)は、GC-MSの結果よりもLC-MS/MSの結果の方が広範囲に分布し、表9に示したように外部精度管理試験結果で適正範囲外となる項目も多かった。測定対象とした農薬はGC、LC共に測定が可能であったが、今回の試験条件ではGC-MSの方がより安定した測定ができたと考えられる。報告値が大きく分散した2機関(D、I)では、同一の試料を測定しているにもかかわらず、GC-MSとLC-MS/MSで平均回収率の分布が全く異なり、内部精度管理試験と外部精度管理試験でもその傾向は異なっていた。

(図2-2、2-3)両機関ともB-4-1.例示分析法を用いていたが、分析操作としては抽出、精製後に両測定機器用へ試験液を分けているため、最後の溶媒置換以外は共通の操作となっている。農薬の特性や、GCとLCの質量分析計でのイオン化手法の違いもあり、分析値に差が生じることはやむを得ないが、他の7機関では測定機器間の差は内部精度管理試験と外部精度管理試験で類似した傾向を示しており、D、I機関では操作中に何らかの問題があったことが考えられた。また、試料調製班が分析操作を行った際に、LC-MS/MSでの測定値がGC-MSの測定値を下回る例が見られたため、抽出液を分割してGC-MS用とLC-MS/MS用で個別にカラム精製を行い、濃縮後にアセトンとメタノールでそれぞれ溶解する検討を行った。その結果、測定機器間の測定値の差は縮小し、微量の溶液の溶媒置換操作は十分注意する必要があること、また回避する手段がある場合には行わない方が良いことが示された。

6. GCシステム評価

一般的に、新品のカラムやインサートガラスを用いると、試料の一部が吸着され、

見かけ上の感度が減少することがある。このような場合、食品抽出液等のマトリックスを数回注入し、安定化を図った後に使用する。今回の加工食品試料としたレトルトカレーは、通常の農薬分析検体である生鮮食品とは全く異なり、小麦粉や野菜、肉類や香辛料等の混合物であり、より多種類の夾雑物が試験液中に存在していると考えられる。多くの機関でピーク強度に変化が見られたのは、これらのマトリックスが GC システムに影響を及ぼしたものと考えられるが、それまでの GC システムがどのような状態であったかが一様でないため、ピーク強度が増大した機関と減少した機関に分かれたと思われる。あまり変化のなかった E 機関は新しいカラムを安定化後使用しており、減少傾向を示した F 機関は、長期間検査で使用したカラムを用いていた。また H 機関は、新しいカラムを安定化操作を行わず使用したため、1 回目に評価試料を測定した後に、レトルトカレーマトリックスの注入によってカラムが安定化し、その後測定した 2 回目の評価試料測定で著しいピーク強度の増大を示した。これらのことから、GC システムはマトリックスが注入されることによって安定化し、その後耐久性が持続する範囲で性能を維持し、やがて性能が低下することが示唆された。

7. LC-MS/MS マトリックス効果調査

LC は GC と異なり、試験液の状態のままカラムに負荷されるため、GC 注入口付近で発生する、気化させた試料の損失、吸着やカラムの劣化といった問題とは無縁である。しかし、質量分析計への導入時には、大量の移動相を気化させる必要があるため、イオン化効率も GC-MS より劣る。また、イオン化時に共存するマトリックスの影響をうけ、阻害や促進といった効果が見られる。これは、目的物質が観測される時間に、どれだけ多くのマトリックスが存在するかによって決定されるが、MRM 測定では他のイ

オンは観測されないため、クロマトグラムからの判断は難しい。LC-MS/MS で測定しているマトリックス濃度は機関によって異なるが、今回の結果では機関間でのマトリックス効果の共通性は見いだせなかった。これは分析法が全機関で同じではなく、また LC の移動相条件も共通でなかったため、マトリックスの状態にも差が生じたと考えられた。

E. 結論

外部精度管理試験結果で、全ての測定項目で良好な結果を得た機関は B、C の 2 機関だけであった。それ以外の機関では、一つ以上の農薬がいずれかの測定機器で \bar{X} 管理図、R 管理図、Z スコアのいずれかが適正範囲外となった。このことは、今回試料に選択したレトルトカレーが脂肪や香辛料を多量に含むため、最も測定困難と思われる部類の試料であったこと、また、メタミドホスやアセフェートのように極性が高く、一斉分析法での分析が困難な農薬が含まれていたことが原因として考えられる。GC-MS では夾雑物のピークが多く見られ、定性や定量に支障をきたす例もあり、E 機関ではアセフェートの定量ができなかった。LC-MS/MS では MRM 測定のため、夾雑物のピークとしては観測されなかったが、多量に共存する物質によるイオン化抑制を受け、見かけ上の回収率が低下する原因になったと考えられた。さらに、GC システム評価試料で大きな変動が見られた機関があることから、今回の試料を連続して測定し、安定した分析結果を得ることは容易ではないと考えられる。平成 17-19 年度に行われた検査機関の信頼性確保に関する研究で、生鮮食品における外部精度管理試験が行われたが、その際は全般的に良好な結果が得られていた。今回は通常業務で使用している分析法でないため、使用した分析方法に習熟する時間的余裕がなかったことも大きな

要因であると考えられるが、カレーのように香辛料や多種類の食材を含む試料を用いての一斉分析は、現時点では高い精度を得ることは困難であると思われる。しかし、市場流通品に対する残留農薬分析は主としてスクリーニングであり、現在の加工食品中の農薬分析において、地方衛生研究所に求められる有事に際した即応性は高く評価できると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 北川陽子、岡本葉、高取聡、起橋雅浩、村田弘、住本建夫、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）、田中之雄（大阪食品衛生協会）：健康危機事例への対応について—冷凍餃子が原因とされる有機リン系農薬中毒—，大阪府立公衆衛生研究所研究報告，46，35-43，2008.
- 2) 梶島由佳、上野英二、大島晴美、大野勉（愛知県衛生研究所）、斎藤勲（東海コープ事業連合商品安全検査センター）：愛知県における野菜・果実中の農薬残留データに基づいたポジティブリスト制度下での農薬検査対象設定方法の検討，食品衛生学雑誌，49，283-293，2008.
- 3) 上野英二、梶島由佳、大島晴美、大野勉（愛知県衛生研究所）：データベースソフトウエアを用いた GC/MS による農産食品中残留農薬の多成分一斉分析法の検討，食品衛生学雑誌，49，316-319，2008.
- 4) 上野英二、梶島由佳、大島晴美、大野勉（愛知県衛生研究所）：NCI モード GC/MS およびデュアルカラム GC-マイクロ ECD による畜水産物中残留農薬の多成分分析，食品衛生学雑誌，49，390-398，2008.

2. 学会発表

- 1) 起橋雅浩、高取聡、北川陽子、岡本葉、田口修三、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）：Pesticide Analysis in Processed Foods，7th EUROPEAN PESTICIDE RESIDUE WORKSHOP, Berlin, Germany, 2008.
- 2) 岡本葉、高取聡、福井直樹、北川陽子、起橋雅浩、村田弘、住本建夫、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）：加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発（1）—LC-MS/MS を用いた検討—，第 96 回食品衛生学会学術講演会，神戸，2008.
- 3) 北川陽子、起橋雅浩、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）：加工食品中の残留農薬一斉分析法の開発（2）—GC-MS および GC-MS/MS を用いた検討—，第 96 回食品衛生学会学術講演会，神戸，2008.
- 4) 村田弘、織田肇、岩上正蔵、田中之雄、尾花裕孝、住本建夫、高取聡、北川陽子、柿本幸子、岡本葉（大阪府立公衆衛生研究所）、土田由里子（新潟県保健環境科学研究所）、上野英二（愛知県衛生研究所）、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）、宇野正清（奈良県保健環境研究センター）、木野善夫（和歌山市衛生研究所）、佐々木珠生（広島市衛生研究所）、堤泰造（徳島県保健環境センター）、花田喜文（北九州市環境科学研究所）：農薬等のポジティブリスト化に伴う検査の精度管理に関する研究（第 3 報），第 45 回全国衛生化学技術協議会年会，佐賀，2008.
- 5) 起橋雅浩、北川陽子、高取聡、岡本葉、福井直樹、村田弘、住本建夫、尾花裕孝（大阪府立公衆衛生研究所）：加工食品中の残留農薬分析，第 31 回農薬残留分析研究会，宮崎，2008.