

評価ガイドライン(案)

・資料 2-5(参考)農薬試験法の妥当性評価ガイドライン

2) 内容:

(1) アフラトキシン M1 コラボの評価

・小西より資料 1-1 (表) について説明がなされた。測定 HPLC のみ。添加回収 A, B, C, D 液、A 液 1.0 ng/g、B 液 0.5 ng/g、C 液 0.05 ng/g、D 液ブランク液(アセトニトリル液)、自然汚染乳、粉末乳は FAPAS より購入。11 機関中 10 機関からデータ提出があった。

以下: 議論

- ・LOD、LOQ を ng/g に統一する必要がある。
- ・LOD、LOQ 算出時の有効数字の取り扱いを統一すべき。
- ・サンプル量を勘案して計算すると全体に 0.01 ng/g 程度。
- ・C 液 (添加 0.05 ng/g) が回収率、RSD_r、RSD_R とも値をクリアしているの、0.05 ng/g まで測定できるとするのか。
- ・機関 10 は LOQ が 0.05 ng/g とは高い。通常は機関 1 の 0.003 g/ng 程度測定できるはず。
- ・クロマトグラフより、機関 10 は機械的に問題あり。島津の蛍光なら一世代前のものでも感度がでる。
- ・ブランク液の扱いについて意見が出された。平均値が 0.01 ng/g となっているが各液からブランク値として引き算するのか。
- ・各機関のブランク値をそれぞれ引くのか、それとも平均値等を算出して引くのか。
- ・コラボの場合、1 機関の信頼性が高い場合はその数値を引く。試験所の能力の低い場合は 20 機関ぐらゐの値の CRM(認可承認物質)と比較する。定量性のしっかりしている機関、分析専門の機関等の値を採用する

方が望ましいのでは。

・今回は A、B、C、D 液に関しては 0.01 ppb がブランクの汚染量として引き算して再計算することにした。

・FAPAS (粉末乳) の値 (公表値) を真値として回収率計算した。

・FAPAS の値でよい。機関 9 は N=2 の値がばらつき大。A 液以外。機関 9 をのぞく自然汚染乳の結果もよくなるのでは。

・機関 9 のすべてのデータをのぞくと合計 7 機関になる試料もある。

・一部の試料が 8 機関より少なくなっても OK である。

・機関 9 を除いて再計算してはいかがか。

・機関 9 は A 液も含め、全て除いてしまいか参考値として扱うのはどうでしょう。

・室内でのばらつきが大きく、なんらかの要因が考えられるため、すべての値を採用しないことにした。

・今回のコラボの分析法は試験法として問題ないので、通知法として採用できるとの評価が得られた。

・LOD、LOQ の単位を統一して再計算後、評価の方がよいのではないか。

・各機関の表示してきた LOQ を ng/g 単位に再計算すると機関 10 の 0.05 ng/g、機関 3 の 0.025 ng/g 以外 0.01 ng/g 以下となった。

・この分析法は LOQ、0.01 ppb までいけるとしてよいか。

・0.01 ppb~1.0 ppb の範囲と言えるのでは。

・機関 10 はクロマトグラムからもランプの劣化の可能性も高い。

・機関 10 は検出器のメンテナンス不良による、ランプの劣化、光軸のずれが考えられる。以後コラボの際は、標準溶液を測定し、

ある一定の S/N 比をクリアしてから実際の試料分析を行うプロトコールを作成する。

(2) 総アフラトキシン分析のクライテリア (案)について 資料 2-4(案), 2-5 (農薬)

・ LC/MS/MS を使用できるようにとの目的で作成している。アフラトキシン B₁ も同じ理由で審議することとなった。原案を審議し、作成した。

・ 「通知」の定義を入れる。通知の No. 等を入れる。

・ 記述はトータルアフラトキシンではなく総アフラトキシンに統一する。

・ 「特異性」と「選択性」も統一されていない。農薬の分析法のガイドラインも統一されていないが、「特異性」が前文にだけ出てくる。

・ 真度、精度及び定量限界という文言が入っているので、特異性を選択性に変更した方がよい。

・ 特異性は選択性にする。

・ サロゲートをいれる。

・ 大見出し 4 の評価方法の下に「農薬に準ずる」を入れる。

・ 真度の表について：真度（回収率）が 70-110 % になっているが、農薬の場合 GC があるため 70-120 になっている。

・ コラボの結果を基に 110 としたいが、下が 90 ぐらいになってしまう。

・ (4) 定量限界については全削除。

・ 5. 添加を行う際の留意点について：添加濃度は（農薬）の場合は基準値と基準値の 1/2。

・ 基準値は 10 ppb であることから、添加濃度の表 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は 15→10 にする。B₁、B₂、G₁、G₂ 各 4.0、1.0、4.0、1.0 (各 $\mu\text{g}/\text{kg}$) とする。

・ B₁ のみの場合、基準値が 10 なので定量限界値付近での添加回収も必要。

・ 10ppb と 1ppb で問題ない。

・ 総アフラトキシンの場合、B₂、G₂ が 1 よりもっと低い値にする必要あり。

・ 濃度比は大切なのか。汚染実態にならうの比率だろうが。比率変更して全て 1 ppb、10 ppb などは？

・ アフラトキシンは発がん性があるのであまり高濃度ではリスクが高い。

・ 市販品の比率は「2:0.5」「1:0.3」が一般的である。

・ 総アフラトキシン分析の対象食品は落花生、アーモンド、ピーナッツ、ヘーゼルナッツ。B₁ は全食品である。

・ 昨年 3 月の総アフラトキシンのコラボの室間精度を参考にする場合、室内精度：室間精度=1:1.6 の計算式がある。コラボ室間精度を 1.6 で割った値を参考にできる。

・ 併行精度と室内精度の値について：B₁ は対象試料が多い（全食品）なので、併行精度とも木の実より厳しくしない。

・ 回収率、併行精度、室内精度の数字はこの表 1 の数字でいいのでは。

・ 修正版を作成し、各委員へ送り、4 月末までに修正してもらう。

(3) 総アフラトキシン分析通知法 (案)

資料 2-1

・ 総アフラトキシンのイムノアフィニティー法について：イムノアフィニティーカラムに負荷する前に水希釈と PBS 希釈とどちらが良いか？水の方が良い場合が多い。抽出前に NaCl を入れるか？どちらでも良いが、世界的には NaCl を加えている。

・ NaCl は加えることとする。希釈については注解に記載する。

・B1の現通知法も通知文に商品名がいてあるが、農薬の場合は全て商品名はいれなかった。事務連絡で別に商品名リストを出している。「同等の試験法」と言っても通知法に掲載されていないものは使わない傾向がある。

・商品名の記載については本省とも打ち合わせる。

・ファイルを送るので、メールで訂正箇所を指摘していただき、まとめることとなった。

2. ピーナッツ中の総アフラトキシン試験法の妥当性確認のためのコラボラティブスタディ

2-1. 抽出溶剤としてアセトニトリルを使用し、多機能カラムで精製した後、HPLCで測定した場合の結果を表1、2、3、4に示した。

ピーナッツに総アフラトキシンを添加した試料における回収率及びRSDRはそれぞれ89.3%から95.6%、16.4%から18.7%でいずれも良好な結果であった。

また、自然汚染試料の測定結果は18.7 g/gで期待濃度の95.9%で、RSDRは18.4%であった。

定量限界は多機能カラムではB1、G1 0.8 µg/kg、B2、G2 0.24 µg/kg、総（トータル）アフラトキシンで2.08 µg/kg、IACではB1、G1 0.4 µg/kg、B2G2 0.12 µg/kg 総（トータル）アフラトキシンで1.04 µg/kgであった。

2-2. 「カビ毒試験法評価委員会」による評価

得られた有効なデータから、室内併行性(RSD_r)と室間併行性(RSD_R)を算出し、その値からHorRat値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた総アフラトキシン添加量である8 ng/gから32 ng/gまでの範囲において、本分析法の妥当性は認め

られると判断された。

2-2. 抽出溶剤としてメタノールを使用し、多機能カラムで精製した後、HPLCで測定した場合

抽出溶剤としてメタノールを用いた場合の総アフラトキシン20 ng/gを添加した結果を表5に示した。

抽出溶剤としてアセトニトリルを用いた表2と比較した場合、回収率はやや低い傾向及び妨害成分がやや多く認められたが、真度、精度等において許容の範囲で本分析法の妥当性は認められると判断された。

2-3. 精製カラムとしてイムノアフィニティーカラムを使用し精製した後、HPLCで測定した場合の総アフラトキシン20 ng/gを添加した結果を表5に示した。多機能カラムを用いた表2と比較した場合、回収率はやや低い傾向が認められたが、精度、HorRat値において良好な結果で本分析法の妥当性は認められると判断された。

2-4. LC/MSによる測定結果は総アフラトキシン20 ng/gを添加した結果を表6に示した。

イムノアフィニティーカラムによる精製した場合と多機能カラムを用いた値を比較すると、RSD_r、RSD_R、HorRatがいずれも低い結果であった。アフラトキシン分析においてLC/MS測定、特にESIによるイオン化法は試験溶液中のマトリックスに影響されやすいことが知られていることから、イムノアフィニティーカラムの精製能力が高いことが示唆される。また、分析結果のばらつきが大きい機関が認められ、HPLCに比べ測定精度の問題点があることが示唆されたことから、事前のLC/MSの測定の留意点等検討する結果であった。

2-5. コラボラティブスタディ参加機関

1	(財)マイコトキシシン検査協会
2	アサヒビール(株)
3	明治乳業(株)
4	日本エコテック(株)
5	(財)食品分析開発センター SUNATEC
6	(株)日清製粉グループ本社
7	川崎市衛生研究所
8	(財)食品環境検査協会
9	(財)日本冷凍食品検査協会
10	キューピー(株)研究所
11	森永製菓(株)

3. 乳中のアフラトキシシン M1 試験法の妥当性確認のためのコラボティブスタディについて

3-1. 抽出溶液をイムノアフィニティーカラムで精製した後、HPLCで測定した結果を表3-1に示した。

乳に添加した試料及び粉末乳における回収率及び RSDR はそれぞれ 88.1 %から 94.5 %、6.2 %から 11.9 %であった。

また、自然汚染乳の測定結果は 0.46 ng/g で期待濃度の 92.0 %で RSDR は 8.3 %でいずれも良好な結果であった。

定量下限値は液体乳に換算して 0.002 ng/g から 0.050 ng/g で、機関間や使用機器による差が認められた。

3-2. 「カビ毒試験法評価委員会」による評価得られた有効なデータから、室内併行性 (RSD_r) と室間併行性 (RSD_R) を算出し、その値から HorRat 値を評価した。本コラボラティブスタディに用いた総アフラトキシシン添加量である 0.05 ng/g から 1.0 ng/g までの範囲において、本分析法の妥当性は認められると判断された。

3-3. コラボラティブスタディ参加機関

1	(財)日本食品分析センター
2	キューピー(株)研究所
3	雪印乳業(株)
4	川崎市衛生研究所
5	(財)食品分析開発センター SUNATEC
6	森永製菓(株)
7	明治乳業(株)
8	日本エコテック(株)
9	浜松市保健環境研究所
10	三重県保健環境研究所

4. 食品中に残留する総アフラトキシシン及びアフラトキシシン B₁ に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて

4-1. 本ガイドラインの趣旨

通知試験法を定めている総アフラトキシシン及びアフラトキシシン B₁ について、通知試験法以外の方法によって試験をする場合に、その試験法の妥当性を各試験機関が評価するための手順を示したものである。

4-2. 本ガイドラインの対象

通知で示している試験方法以外の方法によって試験を実施するために、各試験機関において用いる試験法とする。

4-3. 用語の定義

平成 19 年 11 月 15 日付け食安発第 1115001 号「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について」に準じる。

4-4. 評価の方法

食品ごとに総アフラトキシシンまたはアフラトキシシン B₁ を添加して、測定結果から以下のパラメーターを求め、それぞれの目標値等に適合していることを確認する。また、次に示す方法以外は、平成 19 年 11 月 15

日付け食安発第 1115001 号「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について」に準じる。

(1) 選択性

総アフラトキシンまたはアフラトキシン B₁ を含まない試料（ブランク試料）について操作を行い、定量を妨害するピークがないことを確認する。

(2) 真度（回収率）

同一濃度の総アフラトキシンまたはアフラトキシン B₁ を添加した試料 5 個以上を試験法にしたがって、定量し、得られた定量値の平均値の添加濃度に対する比率を求め、これを回収率とする。目標値は表 7 のとおりとする。

(3) 精度

添加試料の分析を繰り返し、定量値の標準偏差および相対標準偏差を求め、併行精度および複数の分析者または分析日による室内精度を評価する。目標値は表 7 のとおりとする。

4-5. 添加を行う食品及び添加濃度

(1) 添加を行う食品の種類

添加を行う食品は、原則として試験法を適用しようとする食品から選択する。

(2) 添加濃度

添加濃度は、原則として各アフラトキシン 2.5 ng/g の合計 10 ng/g とする。

(3) 添加試料を作成等に当たっての留意事項

手順は平成 19 年 11 月 15 日付け食 1115001 号「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について」に準じる。但し、標準溶液の添加後よく混合し、一時間放置した後抽出操作を行う。

4-6. 定量限界

各アフラトキシン 1 ng/g

以上のそれぞれの基準に適応していることを確認することとし、各試験機関が評価するためのガイドラインとした。

E. 研究発表

1. 学会発表

1) 中島正博（名古屋市衛生研究所）、永山敏廣（東京都健康安全研究センター）、石黒瑛一（日本食品分析センター）、堀江正一（大妻女子大学）、内藤成弘（農研機構・食品総合研究所）、伊藤嘉典、大西貴弘、鎌田洋一、小西良子（国立医薬品食品衛生研究所）、山本勝彦（名古屋学芸大学）、田中敏嗣（神戸市環境保健研究所）：トータルアフラトキシン試験法の妥当性評価、第 98 回日本食品衛生学会学術講演会、函館国際ホテル、2009 年 10 月 8-9 日

F. 知的所有権の取得状況

なし

表 1 アフラトキシン添加試料のアセトニリル/多機能カラム/HPLCによる共同試験結果

アフラトキシン	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	総アフラトキシン
濃度 (ng/g)	16	2	12	2	32
機関数	11	11	11	11	11
有効機関数	11	11	11	11	11
回収率 (%)	93.8	96.8	81.6	91.1	89.3
有効データ総平均	15.0	1.9	9.8	1.8	28.6
RSDr (%)	5.1	4.9	11.8	8.7	7.5
RSDR (%)	13.7	16.3	22.1	23	16.6
HorRat	0.46	0.40	0.69	0.56	0.61
修正HorRat	0.62	0.74	1.00	1.05	0.75

表 2 アフラトキシン添加試料のアセトニリル/多機能カラム/HPLCによる共同試験結果

アフラトキシン	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	総アフラトキシン
濃度 (ng/g)	10	1.25	7.5	1.25	20
機関数	11	11	11	11	11
有効機関数	11	11	10	10	11
回収率 (%)	94.9	95.6	84.7	91.6	89.8
有効データ総平均	9.5	1.2	6.4	1.1	18.0
RSDr (%)	5.1	4.7	6.3	5.2	8.8
RSDR (%)	12.8	15	19.6	22.6	16.4
HorRat	0.40	0.34	0.57	0.51	0.56
修正HorRat	0.58	0.68	0.89	1.03	0.75

表 3 アフラトキシン添加試料のアセトニリル/多機能カラム/HPLCによる共同試験結果

アフラトキシン	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	総アフラトキシン
濃度 (ng/g)	4	0.5	3	0.5	8
機関数	11	11	11	11	11
有効機関数	11	11	11	11	11
回収率 (%)	99.2	92.7	91.7	92.7	95.6
有効データ総平均	4.0	0.5	2.8	0.5	7.6
RSDr (%)	11.6	9.2	17.2	14.5	13.4
RSDR (%)	15.4	23.1	24.5	30.7	18.7
HorRat	0.42	0.45	0.63	0.60	0.56
修正HorRat	0.70	1.05	1.11	1.40	0.85

表 4 自然汚染試料のアセトニリル/多機能カラム/HPLCによる共同試験結果

アフラトキシン	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	総アフラトキシン
濃度 (ng/g)	15.7	0.6	2.9	0.3	19.5
機関数	11	11	11	11	11
有効機関数	11	11	11	11	11
期待値率 (%)	90.7	145.5	109.6	147.0	96.1
有効データ総平均	14.2	0.9	3.2	0.4	18.7
RSDr (%)	7.7	7.7	7.1	10.8	7.5
RSDR (%)	16.9	22.9	26.5	39	18.4
HorRat	0.56	0.50	0.70	0.76	0.63
修正HorRat	0.77	1.04	1.20	1.77	0.84

表 5 HPLCによる3種類の方法での総アフラトキシン共同試験結果

方法	多機能カラム		IACカラム
	アセトニトリル	メタノール	アセトニトリル
濃度 (ng/g)	20	20	20
機関数	11	11	11
有効機関数	11	11	11
回収率 (%)	89.8	82.3	87.8
有効データ総平均	18.0	16.5	17.6
RSDr (%)	8.8	4.2	3.4
RSDR (%)	16.4	17.4	10.2
HorRat	0.56	0.59	0.35
修正HorRat	0.75	0.79	0.46

表 6 LCMSによる3種類の方法での総アフラトキシン共同試験結果

方法	多機能カラム		IACカラム
	アセトニトリル	メタノール	アセトニトリル
濃度 (ng/g)	20	20	20
機関数	11	11	11
有効機関数	10	10	10
回収率 (%)	81.5	72.6	81.9
有効データ総平均	16.3	14.5	16.4
RSDr (%)	13.4	6.9	5.4
RSDR (%)	28.6	23.9	19.5
HorRat	0.96	0.79	0.66
修正HorRat	1.30	1.09	0.89

表 7 真度 (回収率) および精度の目標値

対象マイコトキシン	試行回数 (回)	真度 (回収率) %	併行精度 %	室内精度 %
総アフラトキシン	5	70-110	25 >	30 >
アフラトキシン B ₁	5	70-110	25 >	30 >

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dewa Y, Kemmochi S, Kawai M, Saegusa Y, Harada T, Shimamoto K, Mitsumori K, Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Shibutani M	Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice.	Experimental and Toxicologic Pathology			2009
Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, Tanaka T, Toriba A, Hayakawa K.	Determination of nivalenol and deoxynivalenol by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry.	Rapid Commun Mass Spectrom	23 (19)	3119-24	2010
Sugiyama KI, Muroi M, Tanamoto KI, Nishijima M, Sugita-Konishi Y,	Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells.	Toxicol Lett	192(2)	150-154	2010
Sugita-Konishi, Y. Sato, T., Saito, S., Nakajima, M, Tabata, T., Tanaka, S. Norizuki, H., Itoh, Y., Kai, S., Sugiyama, K., Kamata, Y., Yoshiike, N. & Kumagai, S.	Exposure to aflatoxins in Japan: Risk assessment for aflatoxin B ₁	Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess	27 (3)	365-72	2010
Tanaka H., Sugita-Konishi Y., Takino M., Tanaka T., Toriba A., Hayakawa K.	A survey of the occurrence of Fusarium Mycotoxins in Biscuits in Japan by using LC/MS	J.Health Science	56 (2)	1-7	2010

Aoyama K, Nakajima M, Tabata, S Ishikuro, E. Tanaka, T Noriduki, H Itoh, Y Fugita, K Kai, S Tsutsumi, T Takahashi, M Tanaka, H Iizuka, S Ogiso, M Maeda, M. Yamaguchi, S Sugiyama, K, Sugita-Konishi, Y, Kumagai, S.	Four-year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan	J.Food Protection	73 (2)	344-352	2010
--	---	----------------------	--------	---------	------

