

I. 総括研究報告

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

研究代表者 根本 了 国立医薬品食品衛生研究所 食品部第一室長

研究要旨

食品に残留する農薬等(農薬、動物用医薬品及び飼料添加物)に関するポジティブリスト制度の導入に伴い、現在約 800 品目の農薬等に基準値が設定されている。食品の安全確保のためには、多種多様な食品中の膨大な数の残留農薬等を分析し監視しなければならない。そのためには、精確かつ効率的に分析が可能な食品中残留農薬等の分析法が必要である。そこで、28 年度は以下の 4 課題について実施した。

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

28 年度は、欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中の農薬の残留分析法の開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査した。農薬の残留分析法の開発では、抽出効率が鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができないため、適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施することが求められる。抽出法を変更する場合には、抽出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発するために活用できるものと思われる。評価基準については、評価パラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、コーデックス委員会の残留農薬部会で議論されている目標値が参考になるものと思われる。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速な分析法の開発を目的として、まず、アミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

両性イオン型官能基を修飾した親水性相互作用クロマトグラフィー用分析カラムを使用し、適切な移動相条件を検討した結果、選択した全ての検討対象化合物(11 化合物)において比較的良好なピーク形状が得られた。

課題3: 試料調製方法の検討

分析に供する試料量を少量化することができれば、検査の迅速化やコスト削減が期待される。しかし、試料の均質化が不十分な場合、少量の分析用試料を用いると分析値のばらつきが大きくなる。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきについて検討した。その結果、均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があった。これらの結果から、規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)は 10.0 ± 0.1 g が適切と考えられた。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物中の残留抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等(米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランド)における公定試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。併せて、我が国のバイオアッセイによる通知試験法を調査して、欧米等における試験法と比較した。

研究分担者

根本 了(国立医薬品食品衛生研究所

食品部第一室長)

坂井隆敏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

志田(齊藤) 静夏(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

菊地博之(国立医薬品食品衛生研究所

食品部主任研究官)

A. 研究目的

課題1:欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

我が国では、食品中の残留農薬等試験法開発のための公的なガイドラインは示されていない。食品の輸出入が増加し、食品中の残留農薬等の安全性について関心が高まる中、食の安全を確保するためには残留農薬等の検査が重要な役割を担っているが、国際貿易の場において検査結果の信頼性を相互に確保するためには、残留農薬等の検査に用いる分析法についても技術的進歩や国際的な動向等も踏まえて国際的な調和を図る必要がある。そこで、本研究では、欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中に残留する農薬等の分析法開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査し、技術的な観点から、日本との比較、海外の手法の日本の試験法開発への適用の必要性などについてまとめる事を目的とした。28年度は農薬の残留分析法について調査しまとめた。

課題2:食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

動物用医薬品として使用されるアミノグリコシド系抗生物質については、食品中の残留基準が設定されている。よって、各食品中のアミノグリコシド系抗生物質を検査する必要があるが、効率的な検査を実施するためには、簡易・迅速且つ高精度な分析法が必要不可欠である。

本研究では食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速、高感度且つ高精度な分析法の開発を目的として、平成28年度は、検討対象化合物であるアミノグリコシド系抗生物質をLC-MS/MSで高感度且つ高精度に測定可能な測定条件の確立について検討した。

課題3:試料調製方法の検討

分析に供する試料量を少量化することができれば、使用する溶媒・試薬量の削減や濃縮等の操作時間の短縮が可能となり、検査の迅速化やコスト削減が期待される。しかし、試料の均質化が不十分で、試料中の農薬等の濃度分布が一様でない場合、少量の試料を用いて分析を行うと分析値がばらつき、食品の規格基準への適否判定においては誤判定の原因となる可能性がある。

食品の種類によっては均質になりにくい場合があることや、試料調製方法によって均質性が大きく異なる場合があることは、経験的には分かっているものの、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した報告

は極めて少ない。本研究では、規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。また、食品の規格基準への適否判定のための試験における試料量(野菜・果実の場合)について提案した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物に残留する抗生物質の検査法は、高感度、高精度に分析することが可能な分析機器の普及に伴い、バイオアッセイ法から機器分析法への移行が進んでいる。我が国では、微生物学的試験法として 2 試験法が通知されているが、十分な検出感度が得られない等の多くの課題点が指摘されている。このため、欧米等のバイオアッセイ法の整備状況を把握し、バイオアッセイ法及び機器分析法の特性を踏まえた、新たな試験体系・試験法の提案が必要と考えられる。しかしながら、欧米等におけるバイオアッセイ法を詳細に調査した報告は極めて少ない。そこで、28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。

なお、「課題4:スクリーニング分析法のガイドライン策定のための基礎的検討」は 29 及び 30 年度に実施する予定である。

B. 研究方法

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

28 年度は、日本の厚生労働省及び農林水産省並びに欧米等の公的機関等 (EU、EPA (米国)、FDA (米国)、AOAC International (米国)、オーストラリア、ニュージーランド、コーデックス委員会、

IUPAC 及び OECD) において公開されている農薬の食品中の残留分析法の開発に関するガイドライン等について調査し、分析法の開発の方針及び評価基準についてまとめた。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

検討対象化合物は、構造や物性等を考慮し、アプラマイシン、アミカシン、カスガマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン C1、ジヒドロストレプトマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン及びハイグロマイシン B の合計 11 化合物を選択した。これらの検討対象化合物について、タンデム型質量分析計 (MS/MS) における測定条件を最適化した後、液体クロマトグラフ (LC) における測定条件の最適化として、種々の分析カラムの適用性検討、並びに、移動相条件の最適化を行った。

課題3: 試料調製方法の検討

予め農薬の残留を確認したオレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんごを、常温磨砕または凍結粉砕により試料調製した。得られた試料を 2、5、10 及び 20 g (各 5 個) 採り、通知一斉試験法「LC/MS による農薬等の一斉試験法 I (農産物)」に準じて試験溶液を調製後、LC-Orbitrap-MS で測定し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

欧米等で、動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署へのメールでの聞き取り調査及び文献調査を実施した。我が国のバイオアッセイによる検査の実施状況等は、検疫所、食肉衛生検査所、民間の検査機関等に対して、聞き取り調査を実施した。

(倫理面への配慮)

人、動物を研究対象としていないため特に必要としなかった。

C. 研究結果及び考察

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

分析法の開発は、抽出法、精製法及び測定法の検討の3つの過程に大別される。このうち、抽出法(抽出効率)は、農薬の添加試料のみの評価では実際の残留試料からの抽出を反映することができない場合があると考えられる。抽出法は、分析操作の中で鍵となる重要な操作であるが、実残留試料を用いた検討を、検査を実施する各試験室で行うことには限界があると考えられる。そこで、各ガイドライン等で抽出法(抽出効率)についてどのような方針を示しているかを中心に整理した。

分析法の評価基準については、各ガイドライン等について、分析法の評価基準に関して記載があるものについて整理した。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

MS/MS 測定においては、エレクトロスプレーイオン化法・ポジティブイオンモードを採用することで、全検討対象化合物について適切な測定イオンの選択が可能であった。

LC 測定条件の検討では、先ず、種々の分析カラムの適用性を検討し、両性イオン型官能基を修飾した親水性相互作用クロマトグラフィー用分析カラムを用いることで、全検討対象化合物について良好な保持が得られることを明らかにした。次いで、移動相 A 液に 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)を用いることで、全検討対象化合物についてテーリングの小さい良好なピーク形状が得ら

れることを確認した。

課題3: 試料調製方法の検討

規格基準への適否判定のための試験における適切な試料量を検討するため、野菜・果実を常温磨砕または凍結粉砕により試料調製後、得られた試料を 2、5、10 及び 20 g(各 5 個)採り、各試料量での分析値のばらつきを求めた。

まず、ナイフミル(理化学実験用の磨砕装置)を用いて、農薬が残留した野菜・果実(オレンジ、トマト、ぶどう、ほうれんそう及びりんご)を常温磨砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めた。その結果、ぶどうを除き、いずれの食品も試料量によらず分析値のばらつきは RSD10%未満となった。ぶどうにおいて検出されたアゾキシストロビン及びイミダクロプリドについても、試料量によらず、RSD10%未満となった。これに対し、同一の試料中に残留していたシアゾファミドは、試料量 10 及び 20 g では RSD5%未満となったが、試料量 5 g では 18.5%、2 g では 33.3%と非常に大きくなった。ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドを除き、試料量 2 g の場合においても、我が国の妥当性評価ガイドライン及び EU のガイドライン(SANTE/11945/2015)の併行精度の目標値を満たした。一方、ぶどうにおいて検出されたシアゾファミドは試料量 2 g では目標値を満たさなかった。ぶどうにおいて同一試料中に残留していた農薬の分析値のばらつきが、農薬によって大きく異なったのは、試料中の各農薬の濃度分布が異なることが原因と考えられた。

次に、家庭用フードプロセッサーを用いて比較的均質化が困難とされているトマトを常温磨砕し、分析値のばらつきを求めた。ボスカリドが残留したトマトを最大回転量で 15 秒間、10 回磨砕した結果、試料量 2 g でも分析値のばらつきは RSD10%未満となった。ボスカリドは浸透移行性が比較的高く、果皮だけではなく、果肉にも分布していたと考えら

れる。このため、家庭用フードプロセッサを用いて調製した試料は、ナイフミルを用いて調製した試料と比較して均質性はやや劣るものの、分析値のばらつきは大きくならなかったと考えられた。一方、フルジオキソニルが残留したトマトを最大回転量で15秒間、1回のみ磨砕し、各試料量での分析値のばらつきを求めたところ、試料量20gの場合においてもRSD20%以上と非常に大きくなった。フルジオキソニルは浸透移行性が低いため、果皮に多く残留し、果肉にはほとんど分布していなかったと推測される。このような場合は、試料の均質化が十分でないと分析値のばらつきが大きくなるものと考えられた。

最後に、フルジオキソニルが残留したトマトを凍結粉碎し、分析値のばらつきを求めた。その結果、試料量2gの場合でも分析値のばらつきはRSD10%未満となり、ナイフミルを用いて常温磨砕した場合とほぼ同程度であった。

以上の結果から、①試料調製方法(使用装置、操作方法を含む)によって試料の均質性は大きく異なること、②均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を5g以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があることが示された。本研究結果から、食品の規格基準への適否判定のための試験の試料量(野菜・果実の場合)は 10 ± 0.1 gが適切と考えられた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

米国では、食肉及び家禽組織における残留抗生物質のバイオアッセイ法として、7種の平板を使用した7-plate法が公定法として示されており、その他にも、STOP法、CAST法、FAST法が、と畜場などの現場の検査室でスクリーニング法として用いられている。EUでは、1980年代に開発された4種の平板を用いる4-plate法が残留抗生物質のスクリー

ニング法として用いられている。カナダでは、バイオアッセイによる公定試験法は示されておらず、LC-MS/MS等を用いた機器分析法が示されている。カナダで実施されている「全国残留化学物質のモニタリングプログラム」では、残留抗生物質の検査法として、STOP法が畜産物のスクリーニング法として示されている。オーストラリアでは、残留抗生物質のバイオアッセイによる公定検査法は示されていなかったが、LC-MS/MSを用いる機器分析法とEUで開発された4-plate法が検査に用いられている。日本の畜水産食品中の残留抗生物質の検査は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法並びに分別推定法」が微生物学的試験法として通知されている。本法は、現在でも食肉衛生検査所等で検査に汎用されている。

欧米等で用いられている上記のバイオアッセイ法は、検査試料をそのまま、または緩衝液で抽出した液体を培地に載せる方法である。一方で、我が国のバイオアッセイ法は、試料からの抽出操作、固相カラムを用いる精製操作を行う点において、他の国の方法と大きく異なっていた。このため、本法では操作がやや煩雑となるが、マトリックスの影響を比較的受けにくい方法であると推察された。

D. 結論

課題1: 欧米等における残留農薬等の公定試験法の開発手法の調査

28年度は、欧米等(EU、米国、国際機関等)における、食品中の農薬の残留分析法の開発の方針、開発の方法及び評価の基準等について調査した。農薬の残留分析法の開発では、抽出効率が鍵とみなされる最も重要なパラメータである。抽出効率は、添加回収試験では評価することができないため、適切な抽出効率を確保するためには、バリデーションされた抽出法は変更せずに実施することが求められる。抽出法を変更する場合には、抽

出効率の評価が必要であるが、試験実施機関ではラジオバリデーションを行うことは現実的ではないため、実残留試料を用いた評価や異なる溶媒・手順で得られた結果を比較する方法などの代替法も提案されている。これらの代替法は、抽出効率を損なうことなく分析法を開発するために活用できるものと思われる。

評価基準については、評価パラメータは調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については異なる場合が見られた。目標値の違い大きなものではないが、分析法の評価の判断に差が生じることになる。そのため、パラメータの目標値については、国際的整合性を考慮しつつ適切に設定することが望まれるが、コーデックス委員会の残留農薬部会で議論されている目標値が参考になるものと思われる。

課題2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発を目的として、平成28年度は、LC-MS/MSを用いたアミノグリコシド系抗生物質の高感度且つ高精度な測定法の確立について検討した。

種々の検討の結果、本研究で設定した LC-MS/MS 測定条件を用いることで、選択したアミノグリコシド系抗生物質 11 化合物について比較的良好的なピーク形状が得られた。一方、混合標準溶液の繰り返し測定においては、測定回数の増加に伴うピーク面積値の減少傾向が確認されたことから、原因を調査し、測定条件を改善する必要があると考えられた。

課題3: 試料調製方法の検討

食品の規格基準への適否判定のための試験に

おける適切な試料量を設定するため、農薬が残留した野菜・果実を用いて、試料調製方法や分析に供する試料量による分析値のばらつきの違いについて検討した。その結果、均質化が比較的困難な食品では、試料中の農薬の分布によっては試料量を 5 g 以下とすると分析値のばらつきが大きくなる場合があった。これらの結果から、規格基準への適否判定のための試験の試料量(野菜・果実の場合)は 10 ± 0.1 g が適切と考えられた。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

畜水産物中の残留抗生物質等を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における試験法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を調査した。本研究で調査した国では、様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査に用いられていることが明らかになった。しかし、いずれの方法においても、マトリックスの影響により誤判定となる可能性があり、また検出感度が低く基準値判定には適用できない等の課題が認められた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし