

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、約 800 品目の農薬等に基準値が設定された。食品の安全確保のためには、多種多様な食品中の多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、これまで 5 課題について検討してきたが、平成 30 年度は以下の 3 課題について実施した。なお、「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」及び「課題3:試料調製方法の検討」は平成 29 年度までに終了した。

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

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、種々の畜産食品由来の試料マトリックスの効率的且つ効果的な精製法について検討した。種々の固相抽出カートリッジカラムを用い、精製効果及び適用性について検討した。検討した抽出法及び精製法を組み合わせる分析法を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験を実施することで、構築した分析法の適用性を評価した。

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

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な試験法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本研究ではスクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法のガイドラインのスクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインを参考にして、分析データを基にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

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公定検査法として、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という)、並びに分別推定法」が、バイオアッセイ法として通知されている。平成 29 年度の検討において、簡易検査法では偽陰性と判定される可能性が高いことが示唆されたため、平成 30 年度は、より高感度な検査が可能となるように、検査法の改良を試みた。本検査法で規定されている抽出液量 20 mL を半量とすることで、試験溶液中での分析対象化合物の濃度を上げ、より高感度な検出が可能であるかを検討した。また、試験菌は、米国の公定法で用いられている菌に変更して検査を実施した。その結果、抽出液量を半量とした場合には、公定法に準拠した場合と検査結果に明確な差は認められず、また、米国の公定法で使用されている菌を用いた検討では、阻止円が認められた試料は数種のみであった。以上のことから、簡易検査法を国際的に整合性のある検査法にするためには、抽出方法、精製方法等を含めて、検査法の大幅な見直しが必要であると考えられた。

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 30 年度は畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製方法の確立について検討した。また、平成 29 年度に検討した抽出法と組み合わせて分析法を構築し、畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の分析法としての適用性について検討した。

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

残留農薬等の検査では、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある場合のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・効率化が可能であるが、我が国には残留農薬等のスクリーニング分析に関するガイドラインはない。本分担課題で

は、スクリーニング分析法の性能評価方法を確立することを目的とした。平成 29 年度は海外の残留農薬等分析法のガイドライン等のスクリーニング分析に関する項目を調査した。平成 30 年度は EU において公開している動物用医薬品等分析法の性能基準等に関するガイドライン 2002/657/EC 及びその付属文書 CRLs 2010 について調査を行った。調査したガイドライン等を参考にして、分析データを基にスクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

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は、従来のバイオアッセイ法から機器分析法への移行が世界的に進んでいる。しかしながら、抗生物質の物理化学的特性により、機器分析法では分析が困難な化合物が存在する一方で、バイオアッセイ法では、多検体を簡便に検査できることから、スクリーニング法として汎用されている。我が国では、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という。)、並びに分別推定法」がバイオアッセイ法として通知されている。簡易検査法は、多検体を同時に検査することが可能であるが、抗生物質の種類によっては十分な検出感度が得られず、偽陰性と判定される可能性がある。更に、抗生物質の同定が出来ないなどの課題点が指摘されている。平成 30 年度は、国際的な整合性を考慮した試験体系・試験法を提案することを目的として、これまでに得られた知見を基に、簡易検査法の改良を試みた。本法で規定されている抽出液量を変更するとともに、試験菌を米国の公定法で使用されている菌に変更して検査を実施して、その検討結果を考察した。

なお、「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」及び「課題3: 試料調製方法の検討」は平成 29 年度までに終了した。

B. 研究方法

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

平成 29 年度の検討で設定した抽出溶媒について、精製の際の固相カートリッジカラムへの保持や精製効果を考慮し、若干の改良を加えた。

精製法の検討については、種々の固相カートリッジカラムを用い、負荷、洗浄、溶出条件等を検討した後、適用性を検討した。検討した抽出法と精製法を組み合わせ分析を構築し、畜産食品を用いた添加回収試験により構築した分析法の適用性を評価した。

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

1. スクリーニング分析に関するガイドライン等の調査

EU において公開している動物用医薬品等の分析法の性能基準等に関するガイドライン 2002/657/EC「Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221:8-36」及びその付属文書の残留動物用医薬品のスクリーニング分析法の性能評価に関するガイドライン **CRLs 2010**「Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer)」について、スクリーニング分析に関する項目を調査し、まとめた。

2. 性能評価方法への分析データの適用検討

性能評価方法への分析データの適用検討は、

平成 27 年度に行った LC-TOF-MS を用いた動物用医薬品一斉分析法の妥当性評価試験データを用いて、(1)スクリーニング分析法の性能評価方法または(2)妥当性評価ガイドラインに従って評価した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

残留基準値を超過する最低濃度の抗生物質を添加した牛の筋肉を検体とした。検討には、15 種の抗生物質を用いた。簡易検査法では、クエン酸・アセトン緩衝液による抽出液量は、20 mL と規定されているが、その緩衝液量を半量の 10 mL に変更して検査を行った。その他の検査方法は、公定法に準拠した。次に、簡易検査法で規定されている試験菌 3 種を、米国の公定法で使用されている菌 (*K. rhizophila*, *S. epidermidis*, *B. megaterium*) に変更して検査を実施した。なお、検査結果は、培養後の阻止円の直径の大きさにより判定した。

(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2: 食品中アミノグリコシド系抗生物質分析法の開発

抽出法については、精製用固相カートリッジカラムにおける保持及び精製効果等を考慮し、抽出溶媒を 2 mol/L 塩酸及びメタノール (1:1) 混液に変更し、抽出時に添加するギ酸アンモニウム量を 2 g に変更した。

精製法については、カスガマイシンを除く検討対象化合物について良好な保持及び溶出が確認された弱酸性陽イオン交換固相カートリッジカラムを選択した。

構築した分析法を用いて牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を対象に添加回収試験を実施した結果、食品と検討対象化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合があることが確認されたものの、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。これらの結果から、構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であり、本法の実施により残留が疑われる場合には、精製に供する溶液量の調整や異なる固相カートリッジカラムを用いた精製の実施により、効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

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

調査した海外の残留農薬等分析法のガイドラインではいずれもスクリーニング分析について言及しているが、CRLs 2010 (EU)を除き、性能評価方法の詳しい手順については示されていない。そこで、分析データを CRLs 2010 (EU)に示されている性能評価方法へ適用した。その結果、CRLs 2010 (EU)の性能評価方法を以下のように変更するのがよいと考えられた。

- LC-MS (/MS) や GC-MS (/MS) では測定感度の変動するため、標準溶液に対するピーク面積比を用いて評価する。
- 偽陰性率 1%未満となるように、カットオフ値 (C) = $S_{\text{Average}} - 2.33 \times S_{\text{SD}}$ とする。偽陽性率は、CRLs 2010 (EU)と同様に、5%未満となるように、閾値 (T) = $B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$ とする。(S_{Average}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値、S_{SD}: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差、B_{Average}: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の平均値、B_{SD}: プラ

ンク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積の標準偏差)

- 添加試料のピーク面積が標準溶液のピーク面積と比べて非常に小さい場合、定量性が低くなるため、カットオフ値 (C) は 0.2 以上とする。
- 「添加試料のピークは $S/N \geq 10$ であること」を性能要件に加える。

分析データの適用検討の結果を基に、スクリーニング分析法の性能評価方法及び性能要件を提案した。

課題5: 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

抽出液量を半量に変更して検査を行った結果、15 化合物中 4 化合物のみが正しく陽性と判定された。本検討結果は、抽出液量を 20 mL とした現行の簡易試験法の検査結果とほとんど同様の結果であった。抽出液量を半量とすることで、検出感度が向上することを期待したが、そのような結果は得られなかった。また、試験菌を米国の公定法で使用されている試験菌に変更して検査を行った結果、テトラサイクリン系の一部の抗生物質では阻止円が形成されたが、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。これらの試験菌を用いる際には、培地の pH が測定結果に大きな影響を与えられられるため、pH 等を変化させて更なる検討が必要であると考えられた。

D. 結論

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分析法開発を目的として、平成 30 年度は畜産食品由来の試料マトリックスの効果的且つ効率的な精製法の確立、添加回収試験による構築した分析法の適用

性について検討した。

固相カートリッジカラムを用いた精製において、強酸性陽イオン交換基を有するカラムを用いた場合には、一部の化合物については適用が制限されるものの、適用可能な化合物については比較的良好な回収率が得られた。弱酸性陽イオン交換基を有するカラムを用いた場合には、カスガマイシンを除く化合物に適用可能であったが、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあることが確認された。

構築した分析法を用い、添加回収試験を実施した結果、食品と化合物の組み合わせによっては良好な真度が得られない場合もあるが、概ね 50%以上の真度が得られ、併行精度は良好であった。

以上の結果から、本検討で構築した分析法は畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング分析法として有用であると考えられた。本法を用いた分析の実施により残留が疑われる場合には、精製用固相カートリッジカラムへの負荷液量の調整や異なる固相カートリッジカラムを用いた精製の実施などにより効率的な畜産食品中アミノグリコシド系抗生物質の分析が可能と考えられた。

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

スクリーニング分析法の性能評価方法を確立するため、海外の残留農薬等分析法のガイドラインについてスクリーニング分析に関する項目を調査した。調査したガイドラインのうち、2002/657/EC の附属文書 CRLs 2010 を参考にして、残留濃度が基準値の 1/2 以上の試料を「陽性」と判定(偽陰性率 1%未満及び偽陽性率 5%未満)できるように性能評価方法及び性能要件を設定した。本方法によって評価した分析法でスクリーニング分析を行い、基準値超過の疑いがある検体のみ、精確に定量可能な分析法で確定試験を行えば、検査の迅速化・

効率化を図ることができると考えられた。

課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

本研究では、簡易検査法の高感性に向けた検討を行った。クエン酸・アセトン緩衝液の抽出液量を半量に減らして検査を実施するとともに、米国の公定法で用いられている試験菌を用いて、検査を実施した。抗生物質 15 種を対象に検査を行ったところ、両検討ともに良好な検査結果を得ることが出来なかった。簡易検査法をより高感性分析が可能な検査法とするためには、抽出方法、精製方法等を含めて、検査法的大幅な見直しが必要と考えられた。本法をスクリーニング検査法として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Saito-Shida S., Hamasaka T., Nemoto S., Akiyama H. • Multiresidue determination of pesticides in tea by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison between Orbitrap and time-of-flight mass analyzers. • Food Chemistry • 2018 • 256 (140–148)

2. 学会発表

菊地博之、坂井隆敏、大倉知子、根本 了、穂山 浩: 畜産食品中の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法と LC-MS/MS の比較: 第 55 回全国衛生化学技術協議会年会(2018.11.30)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

