

# I. 総合研究報告

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



厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)  
平成 28 年度～平成 30 年度 総合研究報告書(総括)

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、食品中残留農薬等の分析法開発に資する以下の5課題について研究を行った。このうち課題1は平成 28～29 年度に、課題3は平成 28 年度に実施した。

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

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整備されていない。そこで、欧米等(EU、米国、オーストラリア、国際機関等)における食品中の残留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。平成 28 年度は農薬の残留分析法について、平成 29 年度は動物用医薬品(及び畜産物)を対象とした残留分析法について調査した。試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 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。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
  - 1) 認証標準物質を用いた評価
  - 2) 参照分析法との分析値の比較
  - 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較
    - ①2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)
    - ②実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。
  - 4) 添加回収試験: 抽出残留物を異なる溶媒の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法であると考えられる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望ましい。

## 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、LC-MS/MS を用いた高感度且つ高精度な測定法、畜産食品からの効率的な抽出法、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。検討結果を基に効率的な分析法を構築し、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における試料量(野菜・果実の場合)は  $10.0 \pm 0.1$  g が適切と考えられた。

## 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

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

欧米等を調査対象として、各国における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、公定検査法の整備状況、検査方法の概要等を調査し取り纏めた。その結果、多くの国で、様々なバイオアッセイによる検査が行われていることを明らかにした。また、我が国で公定検査法として通知されている簡易検査法による検査結果の信頼性を評価するために、本法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の両検査法で分析して、検査結果を比較した。その結果、バイオアッセイによる検査では多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が高いことが示された。平成 30 年度には、簡易検査法を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。本法で規定されている抽出液量を半量にするとともに、試験菌を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、いずれの検討においても、良好な結果は得られなかった。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改良するためには、試料からの抽出方法、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。しかし、本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、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。

## 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(国際機関、EU、米国、オーストラリア等)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。平成 28 年度の農薬の残留分析法について、平成 29 年度は動物用医薬品及び畜産物を対象とした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

アミノグリコシド系抗生物質は、人や動物用の医

薬品として広く使用されている。使用された動物由来の食品の摂食により人の健康に害を及ぼすことのないよう、食品中の残留基準が設定されている。畜水産食品中のアミノグリコシド系抗生物質の試験法としては、「ゲンタマイシン試験法(畜水産物)」及び「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及びネオマイシン試験法(畜水産物)」が通知されているが、食品によっては効率的に精確な分析値が得られない場合があることが報告されている。以上のような理由から、本研究においては、食品中のアミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速、高精度な分析法の開発を検討した。平成 28 年度は、イオンペア試薬を使用することなく、また、誘導体化などの煩雑な操作を行うことなく、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。平成 29 年度は、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。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、検討した抽出法及び測定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。海外の残留農薬等分析法に関するガイドライン等について、スクリーニング分析に関する項目を調査後、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、機器分析法では検査が困難な化合物が存在するが、バイオアッセイ法は多数の抗生物質を簡便に検査できることから、現在でも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。本法は、分析操作が簡便で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ないこと等の課題点が多く指摘されている。そこで、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、検査法の概要等を調査した。更に、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、簡易検査法と機器分析法の両検査法により同一試料を分析して、検査結果の比較を行った。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量を変更するとともに、試験菌を米国の公定法等で使用されている試験菌に変更して検査を実施して、その検討結果を考察した。

## **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

平成 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。平成 29 年度は、欧米等の公的機関等(Codex、OECD、EU、米国、オーストラリア及びニュージーランドなど)において公開されている動物用医薬品及び畜産物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

平成 28 年度は、LC-MS/MS 測定条件の確立について検討した。すなわち、検討対象化合物のタンデム質量分析における測定パラメータを最適化した後、LC 分析における適切な分析カラムの選択及び最適グラジエント条件の確立について検討した。平成 29 年度は、種々の畜産物からの効率的な抽出法の確立について検討した。牛の筋肉、牛の肝臓、牛乳、鶏卵を対象に、種々の抽出溶媒を用いた際の操作性や回収率について検討した。また、試料中のタンパク質等を沈殿させるための添加剤として、塩及び酸の添加について検討した。平成 30 年度は種々の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について検討した。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。また、検討した抽出法、精製法及び測定法を組み合わせる分析法を構築し、添加回収試験の実施により適用性を評価した。

### 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碎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**

平成 29 年度は、EU、コーデックス委員会 (Codex Alimentarius Commission: CAC) の残留農薬部会 (Codex Committee on Pesticide Residues: CCRP) 及び食品残留動物用医薬品部会 (Codex

Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods: CCRVDF) において公開している食品中の残留農薬等の分析法に関するガイドライン(1)～(3)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。また、米国農務省 (USDA) が公開している畜産物中の農薬のスクリーニング分析法(4)に記載されている性能基準等についてもまとめた。平成 30 年度は、EU において公開している動物用医薬品等の分析法の性能基準等に関するガイドライン(5)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(6)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。

(1) SANTE/11813/2017 (EU) 「Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (食品及び飼料中の残留農薬分析法についての精度管理およびバリデーション手順に関するガイダンス文書)」

(2) CAC/GL 90-2017 (CCPR) 「Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed (食品及び飼料中残留農薬の分析法についての性能基準に関するガイドライン)」

(3) CAC/GL 71-2009 (CCRVDF) 「Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals (食料生産動物における動物用医薬品の使用に関連する国家規制食品安全保証プログラムの設計及び実施に関するガイドライン)」

(4) CLG-PST5.07 (USDA) 「Screening for Pesticides by LC/MS/MS and GC/MS/MS (LC-MS/MS 及び GC-MS/MS を用いた農薬のスクリーニング分析法)」

(5) 2002/657/EC (EU) 「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」

(6) CRLs 2010 (2002/657/EC (EU) 付属文書) 「Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer) (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)」

## 2. 性能評価方法への分析データの適用検討

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

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。また、簡易検査法とLC-MS/MS等による機器分析法による検討結果の比較は、牛の筋肉、肝臓を試料とした。基準値濃度の抗生物質を添加した検体を作成し、同一検体を簡易検査法と機器分析法により検査を実施した。更に、簡易検査法に改良検討は、牛の筋肉を試料として、基準値濃度の抗生物質を添加した検体を作成した。簡易検査法では、クエン酸・アセトン緩衝液が抽出液として用いられているが、その液量を20 mLから半量の10 mLに変更して検査を行った。また、試験菌は米国の公定法で使用されている試験菌を用いて検査を実施した。

(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、分析法の抽出法(抽出効率)は、真の残留濃度を測定するための重要な要素であるが、添加回収試験のみの評価では、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。そのため、多くのガイドライン等において、抽出法(及び抽出効率)に関する方針が示されている。そこで、平成28年度は農薬の残留分析法の開発については、平成29年度は動物用医薬品及び畜産物の残留分析法の開発について、抽出法(抽出効率)を中心に、分析法開発に関連する事項を整理した。

分析法の評価基準については、各ガイドライン等で評価基準に関する記載があるものについてまとめた。評価するパラメータは、調査した国・機関とも概ね同じであるが、目標値については国・機関により異なる場合が見られた。目標値の違いは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、CodexのCCPR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

LC-MS/MS測定条件については、分析カラムとして両性イオン型官能基を修飾したZIC-cHILIC(MERCK MILLIPORE社製)を、移動相として20



mmol/L ギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)及び 0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液を用い、適切なグラジェント条件を設定することで、各検討対象化合物について良好な測定感度及びピーク形状が得られた。また、混合標準溶液の繰り返し測定においても良好な精度が得られた。畜産食品からの効率的な抽出法については、水及びメタノールの混液を抽出溶媒とし、食品由来のタンパク質などを沈殿させることを目的として塩酸及びギ酸アンモニウムを添加することで、種々の畜産食品において比較的清澄な抽出液が得られ、また、得られた抽出液中への各検討対象化合物の回収率も比較的良好であった。畜産食品由来の試料マトリックスの効率的な精製法については、種々の精製用固相カートリッジカラムの適用性を検討した。強酸性陽イオン交換カラム(InertSep MC-1, 500 mg)を用いた場合には、種々の畜産食品で比較的良好的な精製効果が得られるものの、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンはカラムから溶出されず、これらの化合物には適用出来ないことが確認された。弱酸性陽イオン交換カラム(Oasis WCX, 500 mg)を用いた場合には、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得られたものの、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいては良好な精製効果が得られない場合があることも確認された。検討した抽出法、精製法及び測定法を組み合わせることで構築した分析法を用いて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、概ね真度は 50%以上であり、併行精度は良好であった。

### 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ー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、フルジオキシ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 20 g 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 2 g 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 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  $10 \pm 0.1$  g が適切と考えられた。

#### 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)では測定感度が変動するため、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) =  $S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$  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) =  $B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$  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、 $B_{SD}$ : ブ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

米国では、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た。EU では、4種の平板を用いる 4-plate 法が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。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。簡易検査法と機器分析法による検査結果の比較については、牛の筋肉を試料とした場合は、簡易検査法では 30 化合物のうち 5 化合物、機器分析法では 26 化合物が正しく判定された。上記の通り、簡易検査法による検査結果と、機器分析法による検査結果を比較すると、バイオ

アッセイ法においては、多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が極めて高いことが示された。簡易検査法の改良検討では、抽出液量及び試験菌を変更して検査を行ったが、良好な結果は得られなかった。

## 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

試験法開発に関しては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同様な考え方を適用できると思われる。以下に分析法開発に関する基本的な考え方をまとめた。

1. 抽出効率の評価は、放射性標識された分析対象化合物を用いたラジオバリデーションによって行うべきであり、ラジオバリデーションにより確立された申請時の抽出法が残留分析法の基本となる。適切な検証が行えない場合には、申請時の抽出法を用いる。
2. 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。
3. 分析法を変更する場合は、抽出液を得た以降の精製操作に対してのみ行うのが原則である。
4. 抽出法を変更する場合[ラジオバリデーションによらない抽出効率の評価方法(真度の評価)]
  - 1) 認証標準物質を用いた評価
  - 2) 参照分析法との分析値の比較
  - 3) 実残留試料を用いた抽出法の比較
    - ① 2つの溶媒系の間を「ブリッジ(橋渡し)」する方法。(例えば、実残留試料を用いて、申請時の抽出条件で抽出した場合と、検討中の溶媒を用いて抽出した場合とで、分析結果を比較する。)
    - ② 実残留試料の抽出残留物(残渣)を異なる溶媒の組み合わせで徹底抽出をする。
  - 4) 添加回収試験: 抽出残留物を異なる溶媒

の組合せで抽出して分析値を比較することにより、より適切な抽出法が確立できると思われる。

実残留試料を用いた評価も、実際の検査機関では実施が困難であると思われることから、試験法を開発する場合や抽出法を変更する場合には、添加回収試験が最も採用可能な方法であると考えられる。しかし、添加回収試験は実際の抽出効率を反映しない場合があることに留意し、抽出法の開発・変更に当たっては慎重に行うことが望まれる。

分析法の性能評価パラメータについては、農薬及び動物用医薬品ともに概ね同じであったが、目標値については国・機関により異なる場合があった。性能評価パラメータ及び目標値については、分析法の評価の判断に差が生じないように、国際的な動向も踏まえ、適切に設定することが望ましいと思われる。

### 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、LC-MS/MS 測定条件、抽出法及び精製法について検討した。検討した各方法を組み合わせることで分析法を構築し、種々の畜産食品を用いて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、真度は概ね 50%以上であり、併行精度は良好であった。よって、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法として有用であると考えられ、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、効率的な分析が可能と考えられた。

### 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  $10 \pm 0.1$  g が適切と考えられた。

#### 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に関するガイドライン等について、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 の付属文書 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る。

#### 課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

欧米等におけるバイオアッセイによる検査法の整備状況、概要等を調査した。調査した国では、各国で様々な検査法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。また、

簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の検査結果を比較したところ、本研究において検討した 30 種の抗生物質を検査対象とした限りでは、簡易検査法においては、多くの抗生物質で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。今後は、簡易検査法の高感度化に向けた改良を行うとともに、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。次に、簡易検査法の高感度に向けた検討を行った。クエン酸・アセトン緩衝液の液量を半量に減らして、牛の筋肉を試料に用い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、良好な検査結果をえることが出来なかった。以上のことから、簡易検査法をより高感度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。しかし、本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、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. 研究発表**

### **1. 論文発表**

Saito-Shida S., Nemoto S., Teshima R., Akiyama H. • Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2016 • 33 (119-127)

Saito-Shida S., Sakai T., Nemoto S., Akiyama H. • Quantitative analysis of veterinary drugs in bovine muscle and milk by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. • Food Addit. Contam. A • 2017 • 34 (1153-1161)

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

坂井隆敏, 菊地博之, 根本 了, 穠山 浩: HILIC カラムを用いた LC-MS/MS によるアミノグリコシド系抗生物質の測定条件の検討: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会 (2017.11.22)

志田(齊藤)静夏, 林智子, 根本 了, 穠山 浩: 残留農薬分析における試料量と分析値のばらつきについて: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会

(2017.11.22)

菊地博之, 坂井隆敏, 根本 了, 穠山 浩: 欧米等における畜水産食品中の残留抗生物質のバイオアッセイ法に関する調査: 第 54 回全国衛生化学技術協議会年会 (2017.11.22)

菊地博之, 坂井隆敏, 大倉知子, 根本 了, 穠山 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)

## F. 知的所有権の取得状況

なし

