

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

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

平成 30 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 根本 了

令和元(2019)年 5 月

目 次

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 -----	1
根本 了	
II. 分担研究報告	
1. 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 -----	9
坂井隆敏	
2. 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 -----	25
志田(齊藤)静夏	
3. 課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究 -----	47
菊地博之	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	65

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」及びその附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}: ブラ

ッ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、簡易検査法の高感度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。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

Ⅱ．分担研究報告

1. 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

研究分担者 坂井隆敏

食品中残留農薬等の分析法に関する研究
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

研究分担者 坂井隆敏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

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ことで分析法を構築し、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。

A. 研究目的

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。

農薬・動物用医薬品等の成分である物質については、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おり、アミノグリコシド系抗生物質についても、動物用医薬品として使用される物質については食品中の残留基準が設定されている。したがって、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、食品中アミノグリコシド系抗生物質の簡易・迅速・高精度な分析法が必要不可欠である。

畜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。また、当該試験法は、LC-MS(/MS)測定においてイオンペア

試薬(ヘプタフルオロ-*n*-酪酸)を含む移動相が使用されているが、LC-MS 用のイオンペア試薬の多くは腐食性が高く、分析機器への負担が大きい。

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 30 年度は、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方法の確立について検討した。また、前年度に検討した抽出法と組み合わせることで分析法を構築し、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。

B. 研究方法

①標準原液及び標準溶液の調製

検討対象化合物について、それぞれ 1 mg/mL の標準原液を調製した。次いで、調製した標準原液を 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(1:1)混液で希釈・混合し、必要な濃度の標準溶液もしくは混合標準溶液を調製した。

②抽出法の改良

昨年度の検討で設定した抽出溶媒において、試料によっては上澄液の採取が困難な場合があること、検討した精製法と組み合わせた場合に回収率が低下する場合があることが確認されたため、抽出法の改良について検討した。すなわち、抽出溶媒における塩酸濃度及び添加するギ酸アンモニウム量を再検討した。

③効率的且つ効果的な精製法の検討

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。

すなわち、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。

④添加回収試験

検討対象食品として、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。各食品に、検討対象化合物を基準値濃度(基準値が設定されていない場合は0.1 ppm)添加し、各食品の添加試料5個を以下に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液をLC-MS/MSで測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。

試料10.0 gを量り採り、2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液50 mL、ギ酸アンモニウム2 gを加えてホモジナイズした。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン50 mLを加えてホモジナイズした。毎分3,000回転で5分間遠心分離後、水/メタノール混液層を採った。牛の脂肪の場合は、*n*-ヘキサン層を除去し、水/メタノール混液層を採った。残留物に2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液30 mL、ギ酸アンモニウム2 gを加えてホモジナイズした。上記と同様の条件で遠心分離後、水/メタノール混液層を採り、先の水/メタノール混液層と合わせ、水を加えて100 mLに定容した。定

容後の抽出液10 mLを採り、酢酸エチル及び*n*-ヘキサン(1:1)混液10 mLを加えて振とう後、上記と同様の条件で遠心分離した。上層(酢酸エチル/*n*-ヘキサン混液層)を捨て、下層(水/メタノール混液層)を採った。この1 mLに水4 mLを加えた後、アンモニア水を用いてpHを7.0~7.5に調整した。

Oasis WCX(500 mg)にメタノール5 mL及び水5 mLを順次注入してコンディショニングした後、上記で得られた溶液を注入した。次いで、アセトニトリル及び水(1:4)混液5 mL、100 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH 7.0)5 mL、水5 mLで順次洗浄した後、アセトニトリル、ギ酸及び水(2:1:7)混液10 mLで溶出した。溶出液に2 mol/Lギ酸アンモニウム溶液0.1 mLを加えた後、エタノールを加えながら40°C以下で濃縮し、溶媒を除去した。残留物を0.1 vol%ギ酸・アセトニトリル溶液及び20 mmol/Lギ酸アンモニウム溶液(pH 2.5)(1:1)混液1 mLに溶解したものを試験溶液とした。

また、検討対象化合物を添加していない試料(ブランク試料)からマトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MSで測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出し、測定の際の試料マトリックスの影響を確認した。

図1に、試験溶液調製操作のフローを示した。

⑤装置及び測定条件等

以下に、本研究で使用した装置及び測定条件等を示した。

LC: Acquity UPLC (Waters 製)

分析カラム: ZIC-cHILIC PEEK HPLC Column (内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 µm、MERCK MILLIPORE 社製)

カラム温度: 40°C

流速:0.4 mL/分

注入量:5 μ L

移動相:

A 液 20 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH 2.5)

B 液 0.1 vol% ギ酸・アセトニトリル溶液

グラジエント条件:

t_0 , B=60%; t_6 , B=5%; t_{14} , B=5%; $t_{14.1}$, B=60%; t_{24} , B=60%

MS/MS: Xevo TQ-S (Waters 製)

ソース温度: 150°C

脱溶媒温度: 600°C

窒素ガス流量: 1000 L/hr

コーンガス流量: 150 L/hr

キャピラリー電圧: 1.5 kV

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法・ポジティブイオンモード

C. 研究結果及び考察

①抽出溶媒の再検討

昨年度の検討において、抽出溶媒として水及びメタノール(1:1)混液(終濃度 0.2 mol/L の塩酸を含む)を用い、抽出の際にギ酸アンモニウム 5 g を添加することにより、極性の高い検討対象化合物を畜産物から効率的に抽出可能であると推察された。

本年度は、検討した精製法における操作性や精製効果、回収率などを考慮し、抽出溶媒における塩酸濃度及びギ酸アンモニウムの添加量を再検討した。

抽出溶媒中の塩酸濃度については、濃度の増加に伴い遠心分離後の抽出液が清澄になることが確認された。2 mol/L(終濃度 1 mol/L)以上の塩酸濃度では抽出液の状態に違いは観察されなかったことから、抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸

及びメタノール(1:1)混液を選択した。

次いで、抽出時に添加するギ酸アンモニウム量について検討した。抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を用いた場合には、ギ酸アンモニウムを添加しない場合であっても比較的清澄な抽出液を得ることが可能であった。しかしながら、ギ酸アンモニウム無添加の場合の抽出液を Oasis WCX 精製に供した結果、ピークの保持時間が大きく異なり、良好な回収率が得られない化合物があることが確認された。昨年度と同様に、抽出時にギ酸アンモニウム 5 g を添加した場合の抽出液を Oasis WCX 精製に供したところ、保持時間のずれは改善されたものの、回収率は改善されなかった。原因を調査したところ、Oasis WCX に負荷する溶液中のギ酸アンモニウム量が多い場合に低回収率となることが確認されたことから、抽出時のギ酸アンモニウム添加量について再検討した。その結果、抽出時にギ酸アンモニウム 2 g を添加することにより、各畜産食品で比較的清澄な抽出液が得られ、また、Oasis WCX 精製においても良好な回収率が得られることが確認された。

以上の結果から、抽出溶媒として 2 mol/L 塩酸及びメタノール(1:1)混液を用い、抽出時にギ酸アンモニウム 2 g を添加することとした。

②効率的且つ効果的な精製法の検討

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。すなわち、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。

先ず、強酸性陽イオン交換基を有する InertSep MC-1 (500 mg) について検討した。カラム負荷においては、強酸性の抽出液をそのまま注入可能であった。また、抽出液 10 mL(試料 1

g 相当量)を負荷した場合であっても、各検討対象化合物の保持は良好であった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、アセトニトリル、アンモニア水及び水(5:1:4)混液などを用いることで比較的良好な回収率が得られたが、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全く溶出しないことが確認された。表 1 に、牛の肝臓及び鶏卵の添加試料(添加濃度 0.1 ppm, n=1)における各検討対象化合物の回収率を示した。

次いで、分子鑄型ポリマーを充填した SupelMIP(アミノグリコシド系抗生物質用、50 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、充填剤量が 50 mg と少量であるため、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合には、良好な保持は得られなかった。洗浄においてはアセトニトリルやアセトン、メタノールなど、洗浄効果が高いと考えられる種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、2 vol%ギ酸(アセトニトリル及び水(1:4)混液)などを用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、鶏卵試料におけるストレプトマイシンなど、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいて良好な回収率が得られなかった。

続いて、弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCX(500 mg)について検討した。カラム負荷においては、抽出液の pH を 7 付近に調整して注入することで良好な保持が得られた。なお、抽出液 10 mL(試料 1 g 相当量)を負荷した場合でも比較的良好な保持が得られたが、食品や抽出

液中の塩濃度等の影響により回収率が低下する可能性があることが確認された。洗浄においては、アセトニトリルやメタノールなど、種々の有機溶媒を使用することが可能であった。カラムからの溶出においては、高濃度(10 vol%程度)のギ酸を含む溶液を用いることで良好な回収率が得られた。畜産食品由来の試料マトリックス存在下で適用性を確認したところ、一部の食品と検討対象化合物の組み合わせにおいてはイオン化抑制傾向が確認されたが、比較的良好な回収率が得られた。

以上の結果から、本研究においては弱酸性陽イオン交換基を有する Oasis WCX を用いた精製法を採用した。

なお、精製用固相カートリッジカラムからの溶出液を測定用試験溶液に置換する際など、検討対象化合物を含む溶液を効率的に濃縮するためには、エタノールなどを加えながらロータリーエバポレーター等で減圧濃縮を行う必要があるが、一部の検討対象化合物については濃縮工程において回収率が低下することが確認された。ギ酸アンモニウム等の塩を添加して濃縮することで、回収率低下を抑制することが可能であったことから、本研究においては、2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を 0.1 mL 添加して濃縮操作を実施した。

③ 添加回収試験

本研究で構築した分析法を用いて添加回収試験を実施した。検討対象食品には、牛の筋肉・脂肪・肝臓・乳及び鶏卵を用いた。添加濃度は各食品における各検討対象化合物の基準値とし、基準値が設定されていない場合は 0.1 ppm を添加濃度とした。本研究で用いた検討食品と検討対象化合物の添加濃度の組み合わせを表 2 に示した。作成した添加試料を「B. 研究方法

④添加回収試験」に記載した方法に従って操作し、試験溶液を調製した。得られた試験溶液を LC-MS/MS で測定し、絶対検量線法により各検討対象化合物の真度及び併行精度を求めた。また、マトリックス添加標準溶液を調製後、LC-MS/MS で測定し、「マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値」を算出した。

本検討で得られた結果を表 3 及び表 4 に示した。また、牛の筋肉における各検討対象化合物のクロマトグラムを図 2～11 に示した。

牛の筋肉では、スペクチノマイシン及びジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、カナマイシン及びネオマイシンにおいては若干低い真度が得られたが、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試験溶液調製工程における損失が原因であることが推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の脂肪においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン、ハイグロマイシン B 及びアミカシンにおいては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

牛の肝臓においては、ストレプトマイシンで真度 10%程度、その他の化合物で真度 50%～60%程度と低値であった。マトリックス添加標準溶液の測定結果から、ストレプトマイシンを除い

て測定の際の試料マトリックスの影響は小さく、試料マトリックスの影響により精製用固相カートリッジカラムである Oasis WCX への保持が弱まったことなどが原因と推察された。

牛乳においては、ジヒドロストレプトマイシンの真度が高く、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化促進が原因であると推察された。また、スペクチノマイシン及びハイグロマイシン B においては若干低い真度が得られ、マトリックス添加標準溶液の測定結果から測定の際のイオン化抑制が原因であると推察された。その他の化合物については、比較的良好な真度及び併行精度が得られた。

鶏卵においては、ジヒドロストレプトマイシンで高い真度が得られ、スペクチノマイシン、カナマイシン、ハイグロマイシン B、アブラマイシン及びネオマイシンで若干低い真度となった。

なお、カスガマイシンについては、使用した Oasis WCX に保持されなかったため、全ての検討食品において回収が得られなかった。

以上のように、本研究で構築した分析法を用いて畜産食品中のアミノグリコシド系抗生物質を分析した場合には、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。このことから、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ると考えられた。実際の検査においては、本法を実施し、残留が疑われる場合には、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンについては弱酸性陽イオン交換カートリッジカラムへの負荷量を減らして実施し、その他の化合物については強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製の実施により、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。

D. 結論

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について検討した。次いで、前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分析法としての適用性を検討した。

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、カスガマイシン、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンには適用できないものの、その他の検討対象化合物については比較的良好的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的な真度が得られない場合もあることが確認された。

精製カラムとして弱酸性陽イオン交換基を有する固相カートリッジカラムを採用した分析法を用い、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的な真度が得られ

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。

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

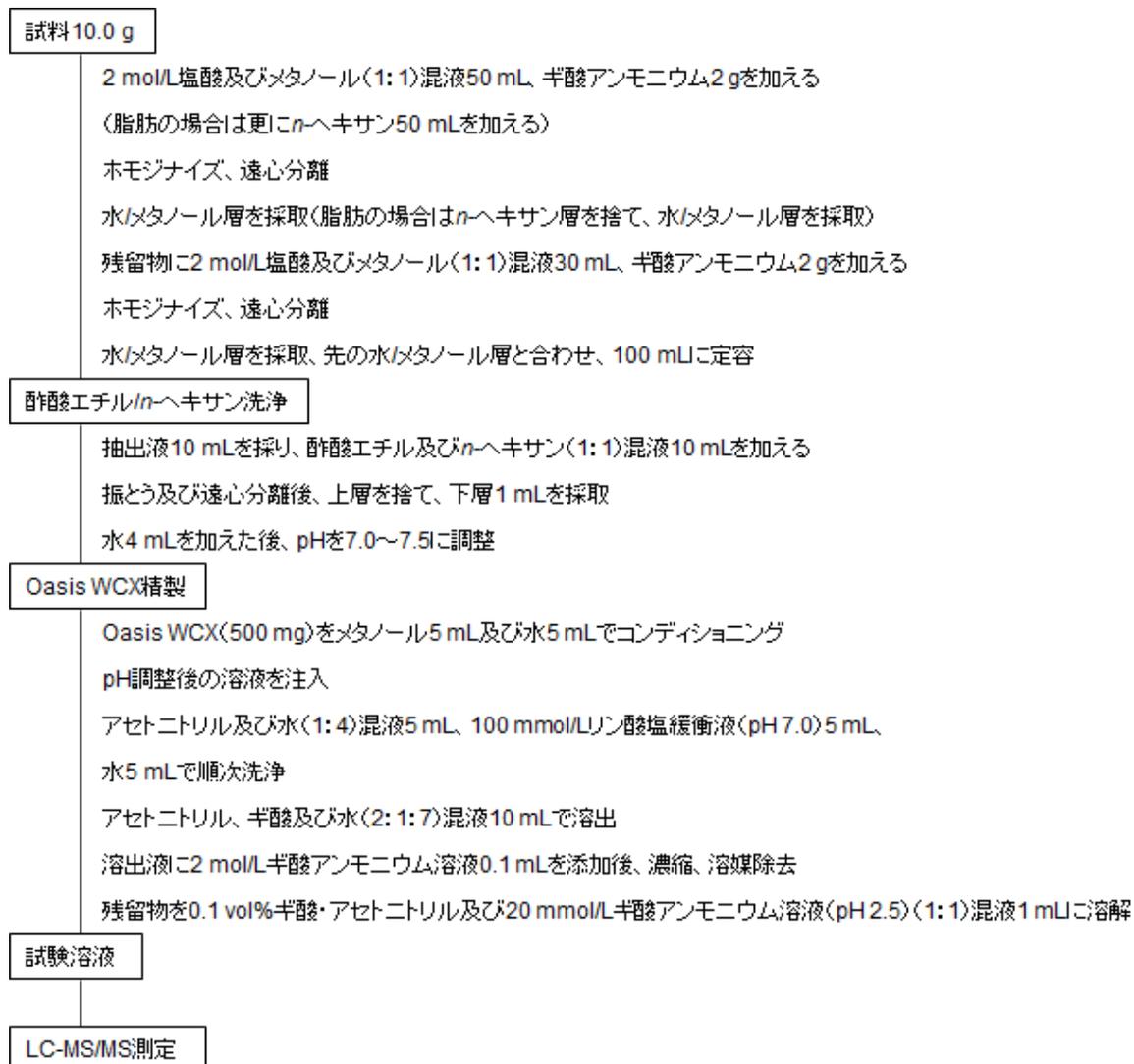


図 1 試験溶液調製法のフローチャート

表 1 強酸性陽イオン交換固相カートリッジカラム精製における検討対象化合物の回収率

	回収率(%、n=1、添加濃度0.1 ppm)	
	牛の肝臓	鶏卵
スペクチノマイシン	37	72
カスガマイシン	-	-
ネチルマイシン	110	184
ゲンタマイシンC1	80	104
カナマイシン	103	108
ハイドロマイシンB	42	133
アブラマイシン	99	99
ストレプトマイシン	-	-
ジヒドロストレプトマイシン	-	-
アミカシン	62	155
ネオマイシン	105	104

表 2 添加回収試験における検討対象化合物の添加濃度

	添加濃度(ppm)				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	0.5	2	2	0.2	2
カスガマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネチルマイシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ゲンタマイシンC1	0.1	0.1	2	0.2	0.1
カナマイシン	0.04	0.04	1	0.7	0.2
ハイドロマイシンB	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
アブラマイシン	0.5	0.5	5	0.1	0.1
ストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
ジヒドロストレプトマイシン	0.6	0.6	0.6	0.2	0.1
アミカシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ネオマイシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

*: 基準値が未設定の食品と検討対象化合物の組み合わせ

表 3 添加回収試験結果

	牛の筋肉		牛の脂肪		牛の肝臓		牛乳		鶏卵	
	真度 (%)	併行精度 (RSD%)								
スペクチノマイシン	233	13.0	44	5.0	63	4.2	59	5.3	48	10.2
カスガマイシン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	95	2.6	85	5.5	62	5.8	87	5.0	75	6.0
ゲンタマイシンC1	76	2.9	88	6.2	58	4.2	94	4.4	78	4.7
カナマイシン	61	10.2	78	4.9	55	7.5	71	6.4	62	6.7
ハイゲロマイシンB	78	5.0	47	11.9	60	2.4	61	12.6	54	5.5
アブラマイシン	74	3.4	76	3.9	58	3.6	80	9.0	69	7.1
ストレプトマイシン	80	1.1	103	5.9	13	4.8	110	11.0	105	12.0
ジヒドロストレプトマイシン	133	2.1	171	9.7	53	5.5	172	11.0	154	5.3
アミカシン	83	7.2	63	9.3	54	14.4	78	7.0	76	11.0
ネオマイシン	59	9.5	72	3.2	51	8.7	84	4.8	68	4.9

表 4 測定の際の試料マトリックスの影響

	測定の際の試料マトリックスの影響*				
	牛の筋肉	牛の脂肪	牛の肝臓	牛乳	鶏卵
スペクチノマイシン	3.80	0.51	0.91	0.69	0.76
カスガマイシン	-	-	-	-	-
ネチルマイシン	1.20	1.02	1.01	0.99	0.84
ゲンタマイシンC1	1.14	1.05	0.92	1.00	1.33
カナマイシン	1.01	1.02	1.01	0.80	0.94
ハイゲロマイシンB	1.03	0.71	0.91	0.73	0.81
アブラマイシン	0.99	0.94	0.93	0.94	1.16
ストレプトマイシン	1.02	0.85	0.31	1.33	1.74
ジヒドロストレプトマイシン	1.37	2.24	0.75	2.06	2.27
アミカシン	1.19	0.77	0.90	0.87	1.13
ネオマイシン	1.07	0.92	1.05	1.01	0.87

*:マトリックス添加標準溶液のピーク面積値/溶媒標準溶液のピーク面積値

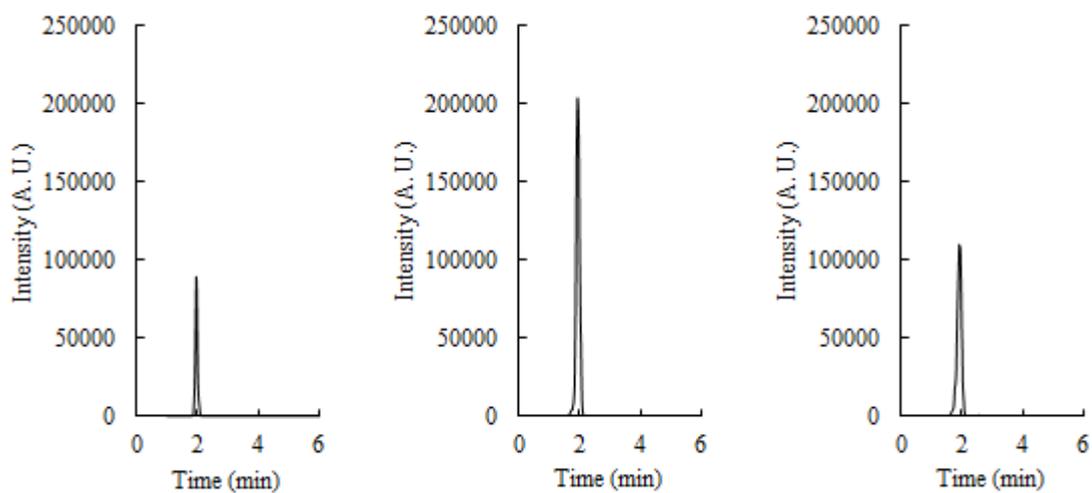


図 2 筋肉における SRM クロマトグラム(スペクチノマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

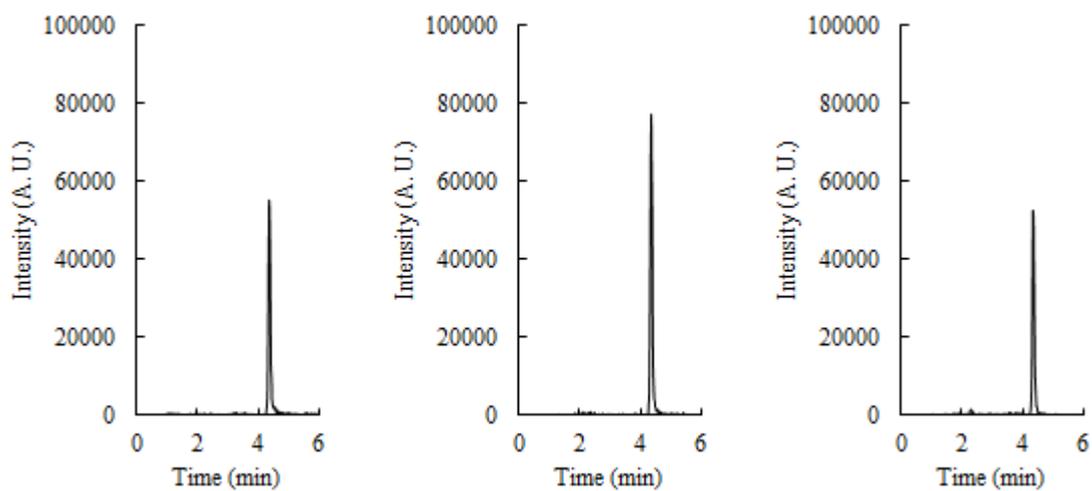


図 3 筋肉における SRM クロマトグラム(ネチルマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

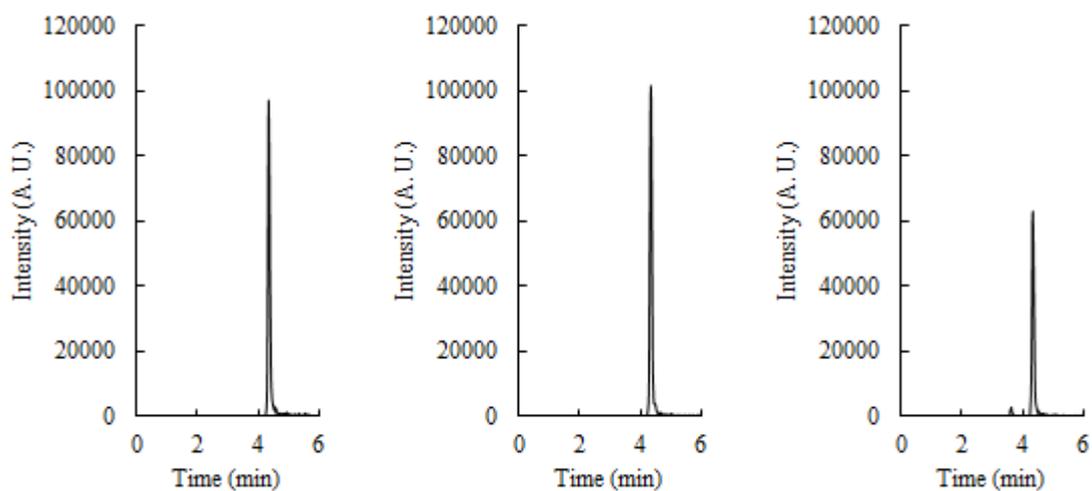


図 4 筋肉における SRM クロマトグラム(ゲンタマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

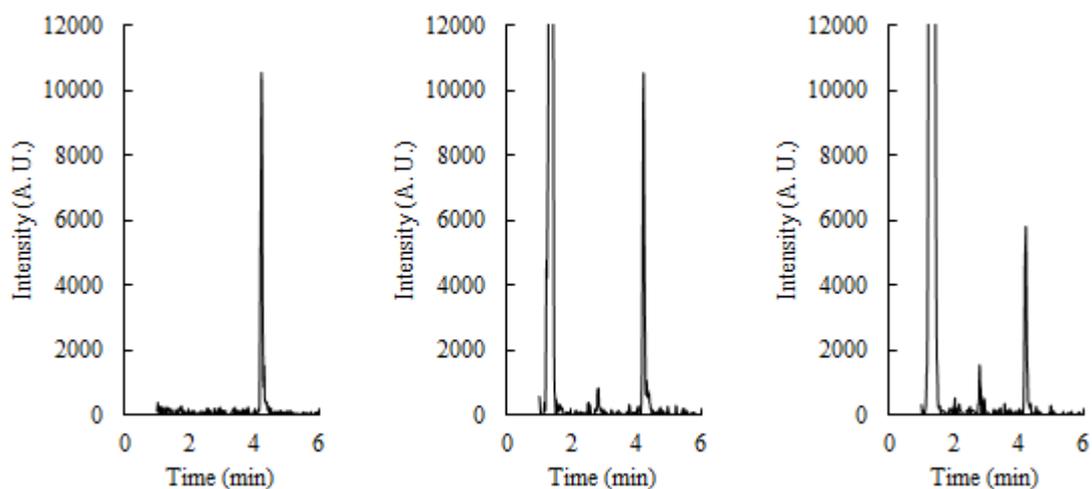


図 5 筋肉における SRM クロマトグラム(カナマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

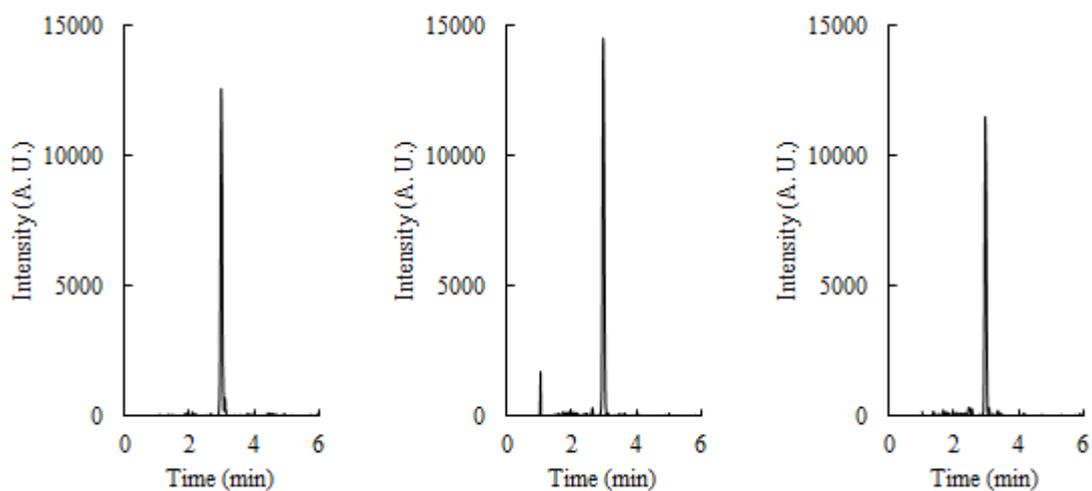


図 6 筋肉における SRM クロマトグラム(ハイグロマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

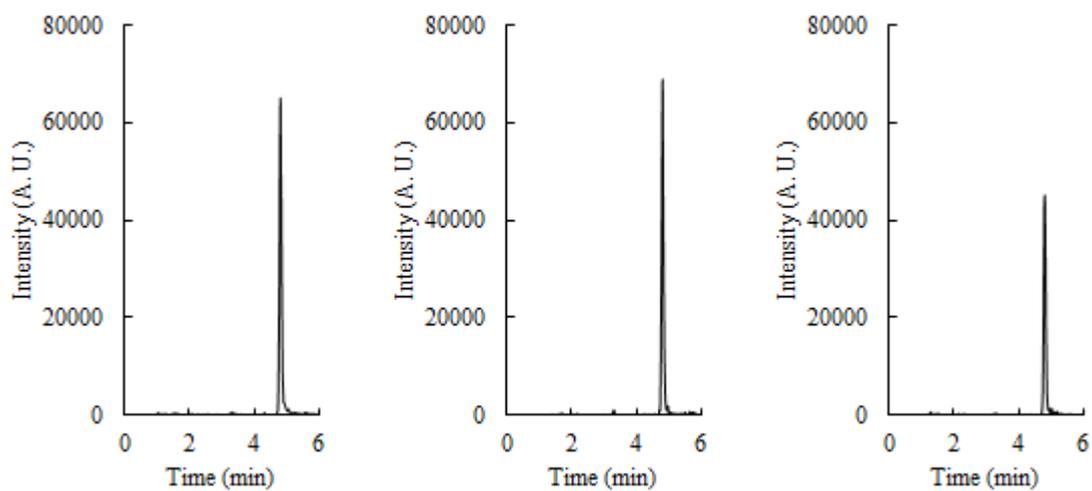


図 7 筋肉における SRM クロマトグラム(アプラマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

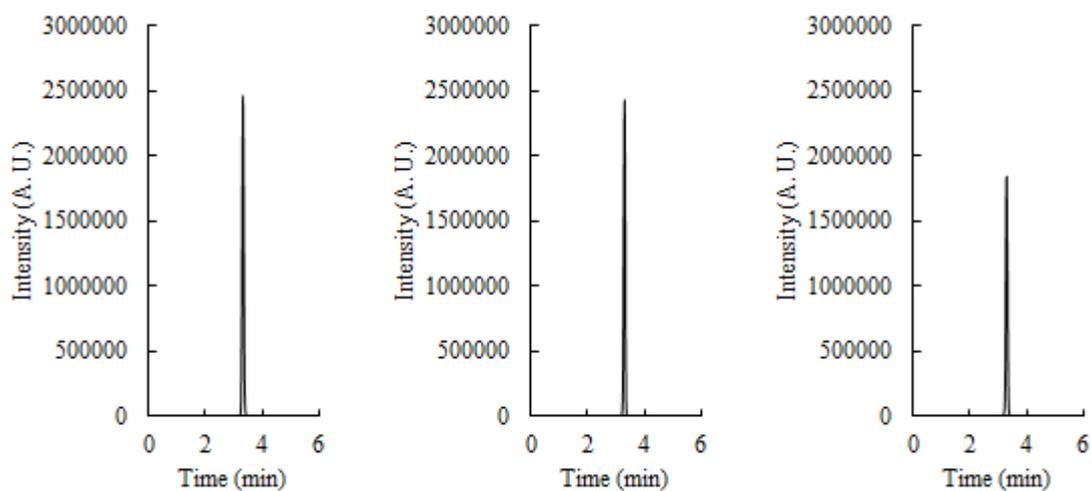


図 8 筋肉における SRM クロマトグラム(ストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

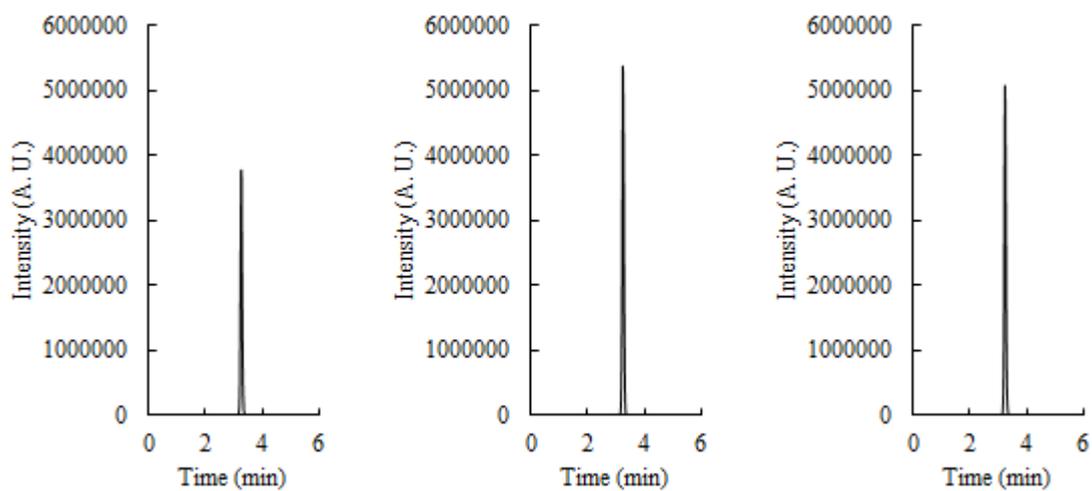


図 9 筋肉における SRM クロマトグラム(ジヒドロストレプトマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

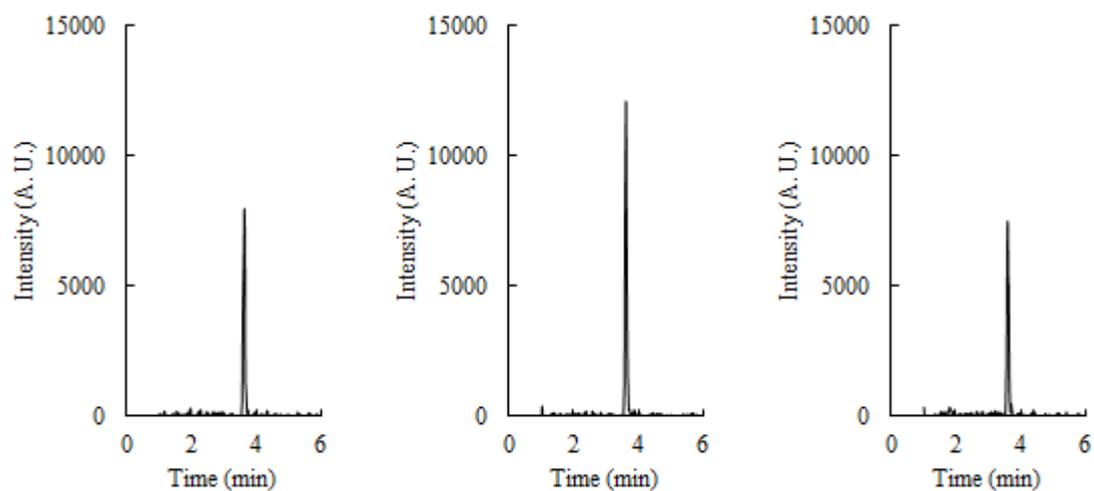


図 10 筋肉における SRM クロマトグラム(アミカシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

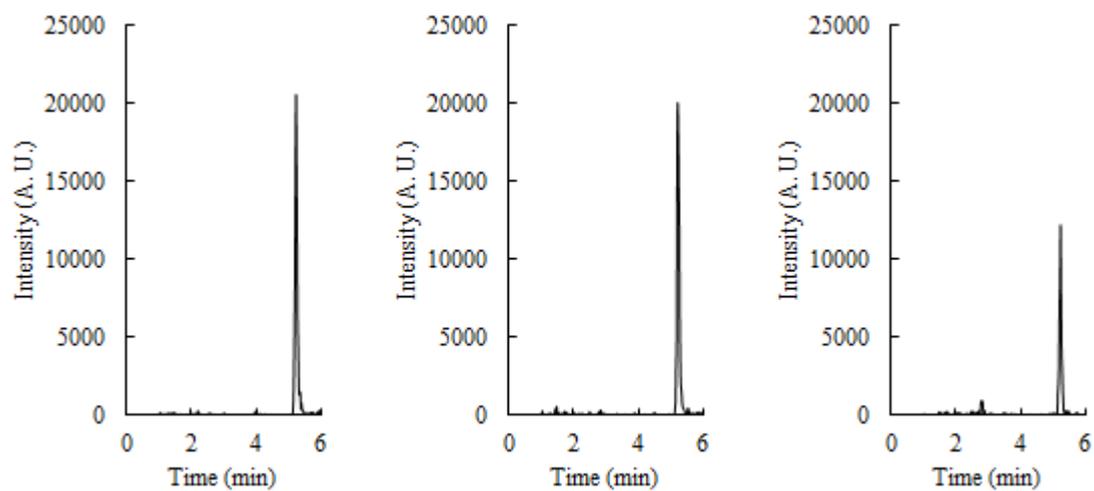


図 11 筋肉における SRM クロマトグラム(ネオマイシン)

左:溶媒標準溶液(回収率 100%相当濃度)、中:マトリックス添加標準溶液、右:添加試料

Ⅱ. 分担研究報告

2. 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

研究分担者 志田(齊藤)静夏

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

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

研究分担者 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

研究要旨

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のうち、EU において公開している Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (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、2002/657/EC 付属文書)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)できるように分析データを基に性能評価方法及び性能要件を提案した。

A. 研究目的

食品中の農薬等(農薬、飼料添加物及び動物用医薬品)の残留基準は、現在、約 740 品目に設定されている。地方公共団体や検疫所による国産及び輸入食品中残留農薬等の検査(平成 27 年度、約 298 万件)における検出割合は 0.36%(基準値超過の割合は 0.008%)と非常に低く、検出される農薬の種類も 100 前後と言われている。しかし、農薬等の不適切な使用や意図的/非意図的な混入の可能性もあることから、検出頻度の高い農薬等だけではなく、残留の可能性の低い農薬等も対象とした効率の良い検査方法の確立が望まれている。

食品中の残留農薬等の基準値は低いものが多いため、精確な分析値を求めるためには、時間やコストを要する分析法で分析を行う必要がある。しかし、前述のように残留農薬等の検出頻度は非常

に低いことから、まず、迅速且つ簡便な分析法でスクリーニング(基準値超過の可能性のない検体をふるい分け)し、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可能である。海外の残留農薬等分析法のガイドライン等では、スクリーニング分析について言及されているものが多いが、我が国には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。

B. 研究方法

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」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 **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)」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。

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⁷⁾を、(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⁸⁾に従って評価した。

添加回収試験： 1 日 2 併行、5 日間、2 食品(牛肉、牛乳)

検討化合物： 動物用医薬品 81 化合物

添加濃度： 0.01 ppm

試験溶液の調製方法： 通知一斉試験法「HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法I(畜水産物)」

を改良した方法⁷⁾

(1)スクリーニング分析法の性能評価方法による評価

ブランク試料及び添加試料について回収率 100%相当濃度の標準溶液に対するピーク面積比を求めた。以下のように閾値(T)及びカットオフ値(C)を求め、CRLs 2010 (EU)の性能要件(C>T、 $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)または性能要件①～④で評価した。なお、スクリーニング濃度(添加濃度)は 0.01 ppm とした。

閾値(T)

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

$B_{Average}$: 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
(ブランク試料にピークがない場合は $T=0$ とした)

カットオフ値(C)

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD} \text{ または}$$

$$C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$$

$S_{Average}$: 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

性能要件①: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$
($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件②: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$
($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

性能要件③: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件④: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

(2)妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従った評価

検量線(6 点)を用いて定量したデータを用いて

妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従って評価した。

C. 研究結果及び考察

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、SANTE/11813/2017 (EU)¹⁾、CAC/GL 90-2017 (CCPR)²⁾、CAC/GL 71-2009 (CCRVDF)³⁾の各ガイドラインのスクリーニング分析に関する部分、及び USDA が公開しているスクリーニング分析法 CLG-PST5.07⁴⁾に記載されている性能基準等についてまとめた。本年度は、2002/657/EC (EU)⁵⁾のスクリーニング分析に関する部分及び 2002/657/EC (EU)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 (EU)⁶⁾についてまとめた。

(1) 2002/657/EC (EU)⁵⁾

『分析法の性能基準、その他の要求事項および手順

1. 定義

1.35. 「スクリーニング分析法」とは、目的濃度において物質または物質クラスの存在を検出するために用いられる分析法をいう。このような分析法はサンプルのハイスルーput能力を有し、大量のサンプルから不適合結果を示す可能性のあるサンプルを選別するのに用いられる。この分析法は特に偽適合(陰性)結果を避けるようにデザインされている。

2. 分析法の性能基準およびその他の要求事項

2.2. スクリーニング分析法

指令 96/23/EC に準拠したスクリーニング目的には、妥当性が確認され、目的濃度において 5%未満の偽適合(β 過誤)率を示す分析法であることが、文書化された追跡可能な方法で証明できる分析法のみを使用するものとする。不適合結果が疑われる場合、この結果を確認分析法で確認するもの

とする。

3. バリデーション

バリデーションは、分析法が関連する性能特性に適用される基準に準拠していることを示すものとする。

異なる規制目的には、異なる種類の分析法が要求される。以下の表に分析法の種類ごとに検証すべき性能特性を規定する。

表 分析法の分類と測定が求められる性能特性

		判定限界 CC α	真度/ 回収率	精度	選択性/ 特異性	適合性/ 頑健性/ 安定性
定性分 析法	S	+	-	-	+	+
	C	+	+	-	+	+
定量分 析法	S	+	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+

S = スクリーニング分析法、C = 確認分析法、+ = 測定が義務付けられる 』

(2) CRLs 2010 (EU)⁶⁾

『2. 定義

2.2. スクリーニング標的濃度

スクリーニング標的濃度は、スクリーニング試験においてスクリーニング陽性と判定する濃度である。

- ・スクリーニング標的濃度は基準値以下とする(基準値の 1/2 濃度に設定するのが望ましい)。
- ・使用が禁止されている化合物や認可されていない化合物のスクリーニング標的濃度は最小要求性能限界(MRPL)以下としなければならない。

2.3. 検出能力 CC β

検出能力(CC β)は、 β の過誤確率をもって試料中の分析対象化合物の検出、同定および/または定量が可能となる最低含有量をいう。 β 過誤は、陽性の試料に対して陰性の結果が得られる確率である。スクリーニング試験の場合、 β 過誤(偽陰性率)は<5%であるべきである。基準値が設定されてい

る試料の場合、 $CC\beta$ は $1-\beta$ の統計学的確かさをもって分析法が許容基準濃度を検出できる濃度である。 $CC\beta$ は、偽陰性率が $\leq 5\%$ の濃度である。この場合、 $CC\beta$ は基準値濃度以下でなければならない。

2.4. カットオフレベル

カットオフレベルは、スクリーニング分析のレスポンスまたはシグナルであり、試料がスクリーニング標的濃度以上の分析対象化合物を含むことを示す。カットオフレベルを超えた場合、確認試験を行う。

4. スクリーニング分析法の性能評価を行う上で従うべき原則

4.1. 必須要件

(定性または(半)定量)スクリーニング分析法に対する必須要件は、選択されたスクリーニング標的濃度で分析対象化合物を確実に検出し、偽陰性を回避する能力である。スクリーニング標的濃度は、分析対象化合物が基準値濃度で試料中に存在する場合、試料が「スクリーニング陽性」として確実に判定されるのに十分に低くあるべきである。性能評価は、この重要な要件が満たされているという客観的な証拠を提供するべきである。

5. 性能評価方法

5.1. 古典的アプローチによる特異性/選択性および検出能力 $CC\beta$ の決定

5.1.1. 性能評価に必要な試料数

各分析対象化合物のスクリーニング陽性試料(すなわち、スクリーニング標的濃度で添加した試料)の数は、要求される統計的信頼度、およびスクリーニング標的濃度と基準値の関係に依存する。基準値と比較してスクリーニング標的濃度が低いほど、基準値濃度で汚染された試料のスクリーニング判定において同程度の信頼性を与えるのに必要な試料数は少ない。

- ・スクリーニング標的濃度が基準値の 1/2 濃度の場合、少なくとも 20 のスクリーニング陽性試料を分析して偽陰性が 1 または 0 個であれば、 $CC\beta$ は基準値の 1/2 濃度以下である。

- ・スクリーニング標的濃度が基準値の 50~90% の場合、少なくとも 40 のスクリーニング陽性試料を分析して、偽陰性が 2 個以下であれば $CC\beta$ は基準値以下である。

- ・スクリーニング標的濃度が、基準値に近い場合は、より多くのスクリーニング陽性試料を分析する必要がある。 $CC\beta$ がその目的に適合していることを実証するためには、最大 60 の試料を分析(偽陰性が 3 個以下)する必要がある。

5.1.2. カットオフレベルの同定と $CC\beta$ の計算

カットオフレベルを設定するために、ブランク試料に添加するスクリーニング標的濃度 (x_1) は、理想的には基準値の 1/2 濃度に設定すべきである。不可能な場合は、基準値の 50~100% の濃度を選択すべきである。

マトリックスが牛の筋肉の場合、各試料は異なるバッチのものを用いる。信頼性の高い $CC\beta$ を求め、特異性を評価するためには、少なくとも 60 個のブランク試料と 60 個の添加試料を分析する必要がある。

ステップ 1

60 個のブランク試料に分析対象化合物を濃度 x_1 で添加する。

ステップ 2

SOP に従って、60 個の添加試料と 60 個のブランク試料を分析する。これらの分析は、異なる日に行うべきであり、好ましくは異なる分析者によって行われるべきである。理想的には、方法を使用するときに遭遇する可能性のある全ての条件を模倣すべきである。

ステップ 3

半定量スクリーニング分析法のカットオフレベルの設定方法は、後述するアプローチ I(付属文書)及びアプローチ II(付属文書)に示されている。

ステップ 4

カットオフレベル以下の添加試料の数を確認する。60 個のうち 3 個 (5%) 以上の添加試料がカットオフレベルを下回っている場合、スクリーニング標的濃度は低すぎる。

ステップ 5 $CC\beta$ の計算

60 個の添加試料を分析して偽陰性が 5% 以下となった場合、添加濃度 (スクリーニング標的濃度) が分析法の検出能力 $CC\beta$ である (60 個の添加試料のうち、偽陰性が 3 個以下の濃度)。

5.1.3. スクリーニング分析法の適用性及び堅牢性の評価

適用性

スクリーニング分析法を、性能評価を行ったマトリックスとは別のマトリックスに適用した場合、同じ $CC\beta$ が得られるとは限らない。このため、新たに適用するマトリックスを用いて $CC\beta$ を求めなければならない。

検討スキーム

例: 4 つの異なる種からの同じ種類のマトリックス (筋肉など) の場合

基準値がすべての種で同じであり、既に性能評価したマトリックスと同じである場合、 $CC\beta$ は 20 個のブランク試料 (1 種あたり 5 試料) 及び同じ 20 個のブランク試料にスクリーニング標的濃度を添加した添加試料を分析して求める。

- ・ 20 個の添加試料がすべて陽性である (カットオフレベルを超える) 場合、またはカットオフレベル以下が 1 個までの場合、新しいマトリックス (または種) は既に性能評価されたマトリックスと同じ $CC\beta$ を適用できる。
- ・ 陰性となった添加試料が 2 個以上ある場合、そ

れらの種の $CC\beta$ は既に性能評価されたマトリックスの $CC\beta$ よりも大きいと推測される。そのような場合、スクリーニング分析法は新たに適用するマトリックスについて完全に性能評価すべきである (スクリーニング標的濃度を上げて、性能評価を行う)。

異なるマトリックスおよび/または異なる種への分析法の適用拡大

最初の性能評価試験で 1 つのマトリックス (例えば、牛の筋肉) に対して $CC\beta$ を求め、その分析法を同じ種または別の種の異なるマトリックス (例えば、肝臓) に適用する場合、ほぼ確実に顕著なマトリックス効果があり、同じ $CC\beta$ を新たなマトリックスに適用できるとは限らない。そのため、 $CC\beta$ は新たに適用するマトリックスで求めなければならない。

この問題への一つのアプローチは、2002/657/EC の 3.1.3 に示されているようなマトリックス包括的アプローチを使うことである。あるいは、20 個のブランク試料 (例えば、豚肝臓) および同じ 20 個のブランク試料 (豚肝臓) にスクリーニング標的濃度を添加した試料を分析することによって、それぞれの新しい種/マトリックスの組み合わせについて $CC\beta$ を求めることができる。この試験は、各分析対象化合物、または各グループの代表的な分析対象化合物について実施すべきである。

5.2. マトリックス包括的アプローチによる特異性/選択性および検出能力 ($CC\beta$) の決定

マトリックス包括的アプローチによる性能評価方法は 2002/657/EC の 3.1.3 に示されている。この多因子アプローチを使用すると、性能評価に必要な分析数 (因子-レベルの組み合わせ) を減らすことができる。』

10. 付属文書

CRLs 2010 の付属文書には、半定量スクリーニング分析法のカットオフレベルを設定するための

2つのアプローチが示されている。

『I. 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルとCCβの設定

例 A (表 1)

MRL = 1.0 µg/ kg

望ましいスクリーニング標的濃度 = 0.5 µg/kg

20個(またはその倍数)の異なるブランク試料を選択する。これらにスクリーニング標的濃度、この場合は 0.5 µg/ kg で添加する。

ブランク試料及び添加試料は、好ましくは異なる日に分析する。ブランク試料のレスポンスのうち、最大のレスポンスを選択する- この場合 0.137 units。添加試料のレスポンスのうち、最小のレスポンスを選択する- この場合、0.252 units。

示されている例では、添加試料のレスポンスとブランク試料のレスポンスの範囲は重ならないため、このスクリーニング分析法のCCβは 0.5 µg/ kg 以下と言える。

示されている例では、最小のレスポンスが 0.252 であるため、カットオフレベルは 0.252 である。この値を超えるレスポンスを示す試料は全て「スクリーニング陽性」と見なされ、スクリーニング分析法のCCβを超える。

スクリーニング試験においては、バッチ許容基準として、添加試料のレスポンスは 0.25 以上でなければならない。

例 B (表 2)

MRL = 1.0 µg/ kg

望ましいスクリーニング標的濃度 = 0.5 µg/kg

この例では、ブランク試料の最大のレスポンスは 0.137 units であるが、添加試料の最小のレスポンスは 0.132 units である。この場合、2つの母集団の間に5%を超える重なりがある(2つの添加試料のレスポンスが、ブランク試料のレスポンスの最大値よりも小さい)。

明確なカットオフレベルを設定することはできない(ブランク試料と添加試料のレスポンスの範囲が重なっているため)。これらのデータから、CCβは 0.5 µg/ kg より大きく、この分析法で 0.5 µg/ kg のスクリーニング標的濃度を確実に検出することはできないと推論することができる。分析法を改良するか、より高いスクリーニング標的濃度で性能評価を行う必要がある。

II. 半定量スクリーニングのためのカットオフレベルとCCβの設定

閾値 T

$T = B + 1.64 \times SDb$ またはテクニカル閾値

B: ブランク試料のレスポンスの平均値、

SDb: ブランク試料のレスポンスの標準偏差

カットオフ ファクター Fm

$Fm = M - 1.64 \times SD$

M: 添加試料のレスポンスの平均値

SD: 添加試料のレスポンスの標準偏差

$Fm > B$ の場合: 分析法の検出能力の妥当性が確認される

$B < Fm < T$ の場合: 偽陽性率は5%より大きい

$Fm > T$ の場合: 偽陽性率は5%未満 』

2. 性能評価方法への分析データの適用検討

調査した海外の残留農薬等分析法のガイドライン^{1~3, 5, 6)}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)⁶⁾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、CRLs 2010(EU)⁶⁾に示されている性能評価方法を分析データに適用し、問題点等を考察した後、性能評価方法及び性能要件を提案することとした。

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⁷⁾を用いて行った。CRLs 2010 (EU)⁶⁾では、カットオフレベルを設定する方法として、2つの方法(I及びII)を示している。本検討では統計学的方法であるIIを用いることとした。CRLs 2010 (EU)⁶⁾では分析対象化合物のレスポンスを用いて評価しているが、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した。また、CRLs 2010 (EU)⁶⁾では食品毎に性能評価を行うこととなっているが、本検討では牛乳及び牛肉の2食品のデータ(1食品につきブランク試料及び添加試料各10試料)を用いた。スクリーニング濃度は0.01 ppmとし、動物用医薬品81化合物を対象とした。CRLs 2010 (EU)⁶⁾と同様に、カットオフ値(C)は $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$ とし、性能要件は $C > T$ (偽陰性率5%未満、偽陽性率5%未満)とした。

代表的な結果を図1～3に示した。アザペロン(図1)は $C > T$ であり、CRLs 2010 (EU)⁶⁾の性能要件を満たした。一方、オラキンドックス(図2)は牛肉においてマトリックスの影響を大きく受けて $C < T$ となり、性能要件を満たさなかった。牛肉において定量を妨害するピークが認められたスルファチアゾール(図3)も $C = T$ となり、性能要件を満たさなかった。牛乳のデータのみを用いて評価した場合は、オラキンドックス、スルファチアゾールのいずれも $C > T$ となり、性能要件を満たした。これらの結果から、回収率やマトリックスの影響、選択性は食品によって大きく異なる場合があるため、スクリーニング分析法の性能評価は食品毎に行う必要があると考えられた。

カットオフ値(C)の下限值

図4に回収率が低いダノフロキサシンの結果を示した。Cは低いものの、 $C > T$ であり、CRLs 2010 (EU)⁶⁾ではCの下限値は設定されていないため、性能要件を満たしている。しかし、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、Cの下限値を設定した方がよいと考えられた。Cは0.2程度がよいと考えられる。

偽陰性率

CRLs 2010 (EU)⁶⁾では、偽陰性率5%未満となるように $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$ としている。しかし、 $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$ としても、一部の化合物では添加試料20試料のうち、2試料のピーク面積比がCよりも低い値となった(図5)。

$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$ (偽陰性率5%未満)とした場合、検討した81化合物中40化合物でCよりピーク面積比が低い試料が1試料以上あった(図6)。6化合物はCよりピーク面積比が低い試料が2試料あった。一方、 $C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$ (偽陰性率1%未満)とした場合、Cよりピーク面積比が低い試料があったのは81化合物中5化合物のみであり、いずれも1試料のみであった。これらの結果から $C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$ (偽陰性率1%未満)とするのがよいと考えられた。

偽陽性率

調査したガイドライン^{1-3, 5, 6)}のうち、偽陽性率の許容範囲を設定しているのはCRLs 2010 (EU)⁶⁾のみであった。偽陽性があっても確定試験を行えば正しい判定は可能である。しかし、確定試験が必要な化合物/検体が多いと検査の効率は向上しない。このため、CRLs 2010 (EU)⁶⁾の方法と同様に偽陽性率5%未満となるように性能要件($T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$, $C > T$)を設定するのがよいと考えられた。

感度

CRLs 2010 (EU)⁶⁾の性能評価方法では、感度が非常に低い場合でも、 $C > T$ を満たせば、性能要件を満たす。しかし、非常に感度が低い場合、定量性は低いと考えられることから、「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のがよいと考えられた。

試料数

CRLs 2010 (EU)⁶⁾の性能評価方法では、スクリーニング標的濃度が基準値の 1/2 の場合、試料数はブランク試料及び添加試料各 20 試料としている。試料数を多くすれば信頼性の高い評価が可能であるが、性能評価に時間を要する。このため、試料数はブランク試料及び添加試料各 10 試料以上とするのが良いと考えられた。

表 3 及び表 4 に各性能要件(①～④)での性能評価結果を示した。また、図 7 にスクリーニング分析法の性能評価方法及び妥当性評価ガイドライン⁸⁾による評価での適合化合物数を示した。スクリーニング分析法の性能評価では性能要件を厳しくすると不適合となる化合物数が増加したが、性能要件が最も厳しい④($C > T$, $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ (ただし $C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$))を用いた場合においても、妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従った評価と比較して不適合となる化合物数は 4 割以下と少なかった。

3. 性能評価方法及び性能要件の提案

分析データの適用検討の結果を基に、以下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する。性能要件は、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)できるように設定した。

(1) 性能評価方法

農薬等を含まない試料(ブランク試料)及び農薬等を添加した試料(添加試料)を各 10 試料以上分析し、標準溶液に対するピーク面積比から①閾値(T)及び②カットオフ値(C)を求め、(2)性能要件に適合していることを確認する。添加濃度(スクリー

ニング濃度)は基準値の 1/2 濃度とする。性能評価は食品毎に行う。異なる試料を用いて、異なる日に実施するのが望ましい。

① 閾値(T)

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

$B_{Average}$: 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

(ブランク試料にピークがない場合は $T = 0$ とする)

② カットオフ値(C)

$$C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$$

$S_{Average}$: 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

(2) 性能要件

以下の性能を有する分析法とする。

- $C > T$
- $C \geq 0.2$
- 添加試料から得られるピークは $S/N \geq 10$

(3) 判定基準

試料を分析し、基準値の 1/2 に相当する濃度の標準溶液に対するピーク面積比がカットオフ値(C)以上となった場合、「陽性」とする。陽性となった場合、妥当性が確認された定量分析法での確定試験を行う。

なお、スクリーニング濃度は、基準値の 1/2 濃度より低い濃度でもよいが、残留濃度が基準値より低い試料を陽性と判定してしまう可能性が高くなる。また、カットオフ値(C)は $C < S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$ としてもよいが、残留濃度が基準値より低い試料を陽性と判定してしまう可能性が高くなる。

D. 結論

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のうち、2002/657/EC⁵⁾の付属文書 CRLs 2010⁶⁾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。

E. 参考文献

- 1) European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. 21 – 22 November 2017 rev.0.
- 2) Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 90-2017, Guidelines on performance criteria for methods of analysis for the determination of pesticide residues in food and feed. Adopted in 2017.
- 3) Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 71-2009, Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. Adopted 2009. Revision 2012, 2014.
- 4) United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of

Public Health Science. CLG-PST5.07. Screening for Pesticides by LC/MS/MS and GC/MS/MS. Revision: .07. 03/14/2016.

5) Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results (2002/657/EC). Off. J. Eur. Commun. L221:8–36.

6) Community Reference Laboratories Residues (CRLs) 20/1/2010. Guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer).

7) 厚生労働科学研究補助金 食品の安全確保推進研究事業 「食品中残留農薬等の安全性確保に関する研究」、平成 27 年度総括・分担研究報告書

8) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知 「食品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」平成 19 年 11 月 15 日、食安発第 1115001 号(平成 22 年 12 月 24 日一部改正、食安発 1224 第 1 号)

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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルと CCβ の設定 (例 A)

Sample number	Negative samples	Spike sample (0.5 µg/kg)
1	0	0.355
2	0.09	<u>0.252</u>
3	0	0.532
4	0	0.554
5	0	0.408
6	0.07	0.501
7	0	0.524
8	0.015	0.559
9	0	0.471
10	0.01	0.661
11	0.07	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.64
16	<u>0.137</u>	0.75
17	0.112	0.655
18	0.12	0.66
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

表 2 半定量スクリーニング試験におけるカットオフレベルと CCβ の設定 (例 B)

Sample number	Negative samples	Spike sample (0.5 µg/kg)
1	0	0.355
2	0.09	<u>0.132</u>
3	0	0.532
4	0	0.554
5	0	<u>0.135</u>
6	0.07	0.501
7	0	0.524
8	0.015	0.559
9	0	0.471
10	0.01	0.661
11	0.07	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.64
16	<u>0.137</u>	0.75
17	0.112	0.655
18	0.12	0.66
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

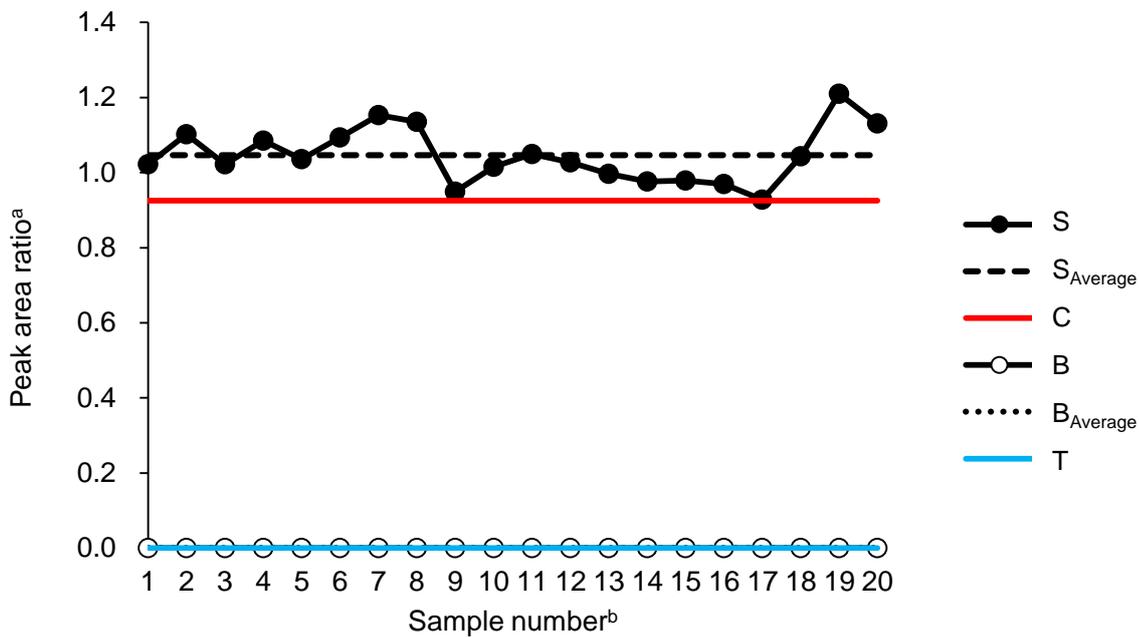


図 1. アザペロンの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1~10 は牛乳、11~20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$$

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: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

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

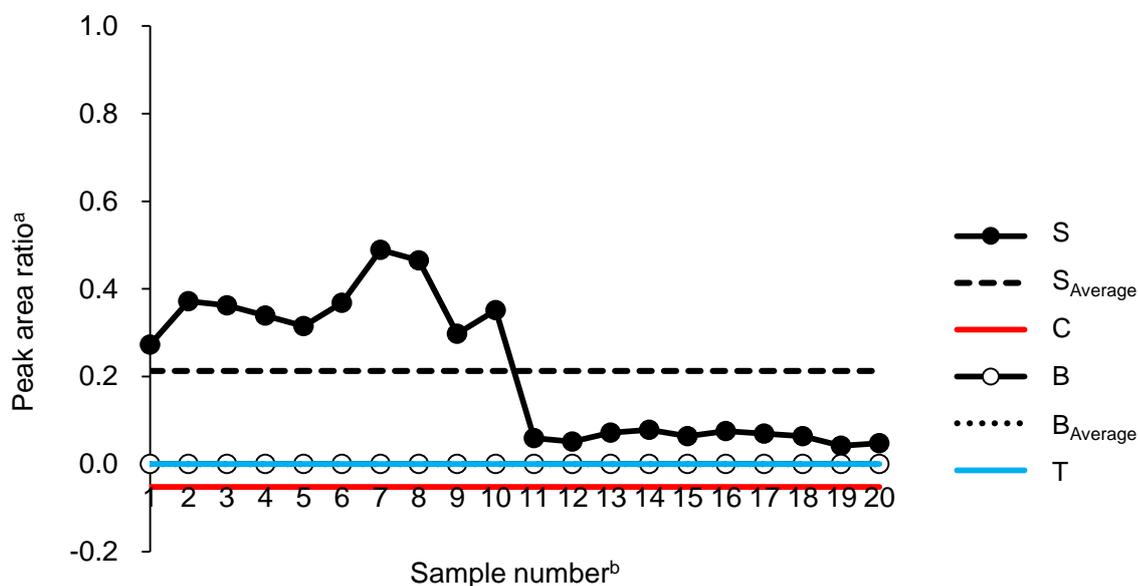


図 2. オラキンドックスの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

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: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

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

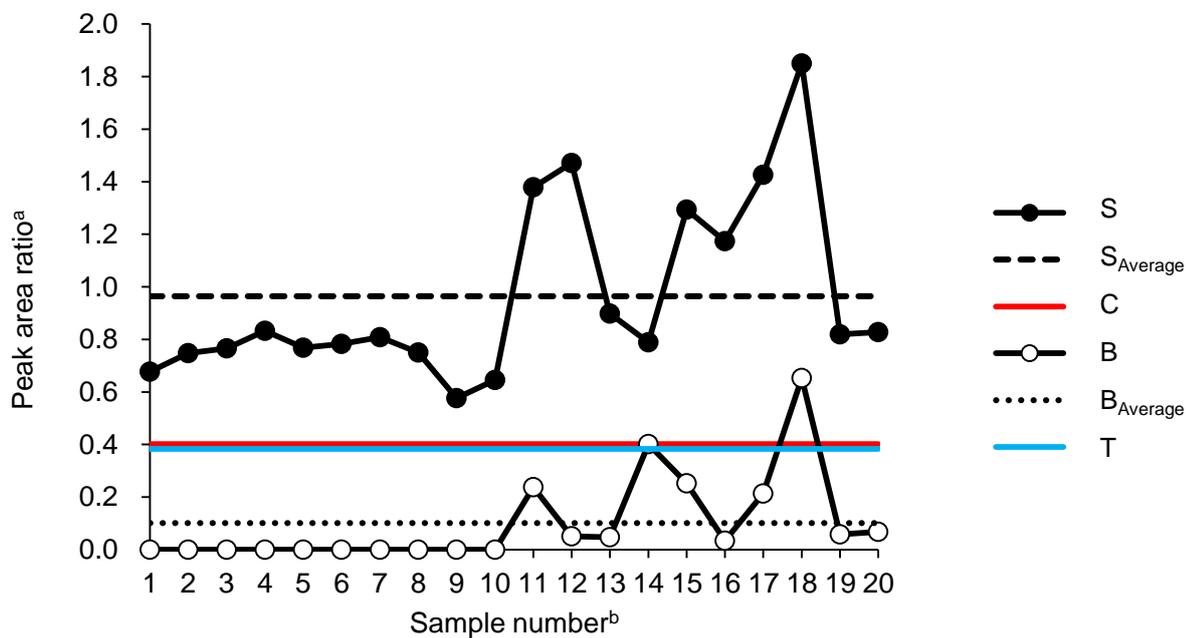


図 3. スルファチアゾールの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$$

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: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{Average} + 1.64 \times B_{SD}$$

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

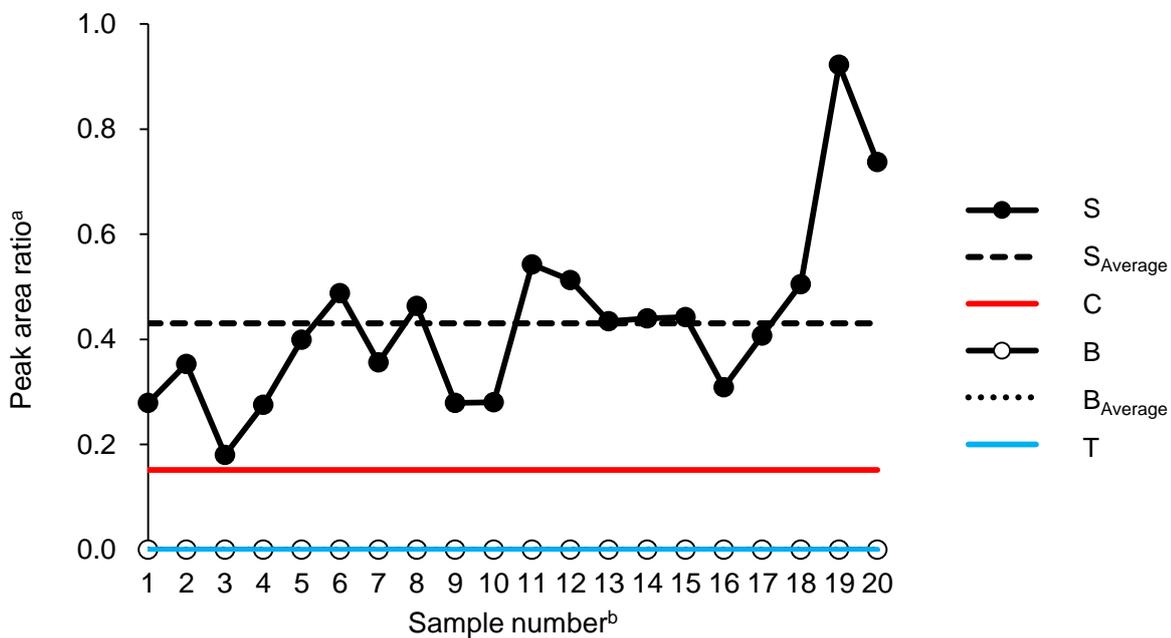


図 4. ダノフロキサシンの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

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: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

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

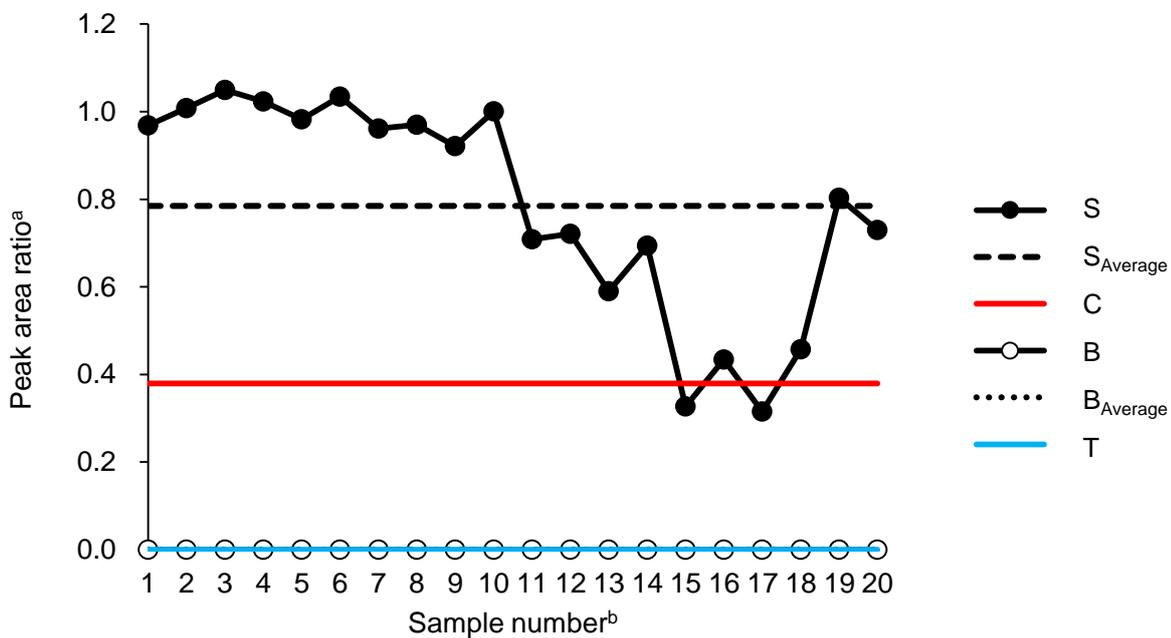


図 5. 5-ヒドロキシチアベンダゾールの標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^a 標準溶液に対する添加試料またはブランク試料のピーク面積比

^b 試料番号 1～10 は牛乳、11～20 は牛肉

S: 添加試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$C = S_{\text{Average}} - 1.64 \times S_{\text{SD}}$$

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: ブランク試料のピーク面積/標準溶液のピーク面積

$$T = B_{\text{Average}} + 1.64 \times B_{\text{SD}}$$

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



図 6. S(標準溶液に対する添加試料のピーク面積比) < C(カットオフ値)となる試料の数
 A : $C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$ 、B : $C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$

数字は化合物数

表3 牛乳のスクリーニング分析の性能評価結果

		ブランク試料			添加試料			性能要件への適合				備考	
		B _{AVERAGE}	B _{SD}	T	S _{AVERAGE}	S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -1.64×S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -2.33×S _{SD}	①	②	③		④
1	2-Acetylmisofenbutrazole	0.00	0.00	0.00	1.00	0.14	0.77	0.67	○	○	○	○	
2	Abendazole	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.94	○	○	○	○	
3	Alrenogest	0.00	0.00	0.00	0.84	0.04	0.76	0.73	○	○	○	○	
4	Azaperone	0.00	0.00	0.00	1.06	0.06	0.96	0.91	○	○	○	○	
5	Benzoic acid	0.00	0.00	0.00	0.60	0.04	0.53	0.50	○	○	○	○	
6	Bromacil	0.00	0.00	0.00	1.10	0.15	0.85	0.75	○	○	○	○	
7	Brotizolam	0.00	0.00	0.00	1.08	0.04	1.01	0.98	○	○	○	○	
8	Cefoperazone	0.00	0.00	0.00	0.94	0.27	0.50	0.32	×	×	×	×	低感度
9	Chlormadinone	0.00	0.00	0.00	1.01	0.07	0.90	0.85	○	○	○	○	
10	Cisbucol	0.00	0.00	0.00	1.04	0.05	0.97	0.93	○	○	○	○	
11	Danofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.34	0.10	0.18	0.11	○	○	×	×	
12	Dexamethasone	0.00	0.00	0.00	0.99	0.09	0.85	0.79	○	○	○	○	
13	Diazepam	0.00	0.00	0.00	0.75	0.15	0.51	0.40	○	○	○	○	
14	Dicyclanil	0.00	0.00	0.00	0.91	0.06	0.81	0.77	○	○	○	○	
15	Difloxacin	0.00	0.00	0.00	0.64	0.08	0.52	0.47	○	○	○	○	
16	Diflufenuron	0.00	0.00	0.00	1.02	0.07	0.90	0.86	○	○	○	○	
17	Emamectin Benzoate	0.00	0.00	0.00	0.96	0.06	0.87	0.83	○	○	○	○	
18	Enrofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.50	0.09	0.35	0.28	○	○	○	○	
19	Ethopazine	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	0.99	0.94	○	○	○	○	
20	Famotidine	0.00	0.00	0.00	1.07	0.05	0.99	0.96	○	○	○	○	
21	Fenobucarb	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.53	0.48	○	○	○	○	
22	Flibendazole	0.00	0.00	0.00	1.08	0.04	1.01	0.98	○	○	○	○	
23	Flunixin	0.00	0.00	0.00	0.86	0.08	0.74	0.68	○	○	○	○	
24	Flunixin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.93	○	○	○	○	
25	Halofuginone	0.00	0.00	0.00	0.64	0.10	0.48	0.41	○	○	○	○	
26	5-Hydroxythiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.99	0.04	0.93	0.90	○	○	○	○	
27	Ketoprofen	0.00	0.00	0.00	1.06	0.05	0.98	0.94	○	○	○	○	
28	Levamisole	0.00	0.00	0.00	0.93	0.04	0.87	0.85	○	○	○	○	
29	Lincomycin	0.00	0.00	0.00	0.93	0.04	0.86	0.83	○	○	○	○	
30	Mafloxacin	0.00	0.00	0.00	1.04	0.02	1.00	0.99	○	○	○	○	
31	Marfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.31	0.08	0.18	0.12	○	○	×	×	
32	Mebendazole	0.00	0.00	0.00	1.06	0.03	1.02	1.00	○	○	○	○	
33	Mebexicam	0.00	0.00	0.00	0.88	0.04	0.82	0.79	○	○	○	○	
34	Mebutone	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	0.99	0.95	○	○	○	○	
35	Methyprednisolone	0.00	0.00	0.00	1.09	0.08	0.96	0.91	○	○	○	○	
36	Mifloxacin	0.00	0.00	0.00	0.59	0.13	0.39	0.30	○	○	○	○	
37	Morantel	0.00	0.00	0.00	0.72	0.03	0.68	0.66	○	○	○	○	
38	Nalidixic acid	0.00	0.00	0.00	0.85	0.07	0.73	0.68	○	○	○	○	
39	Ofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.37	0.10	0.21	0.14	○	○	○	×	
40	Oquinox	0.00	0.00	0.00	0.36	0.07	0.25	0.20	○	○	○	○	
41	Orfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.74	0.06	0.64	0.60	○	○	○	○	
42	Omeprazole	0.00	0.00	0.00	0.95	0.04	0.87	0.84	○	○	○	○	
43	Oxibendazole	0.00	0.00	0.00	1.04	0.02	1.01	0.99	○	○	○	○	
44	Oxolinic acid	0.00	0.00	0.00	0.62	0.17	0.34	0.22	○	○	○	○	
45	Phenoxymethylpenicillin	0.00	0.01	0.01	0.72	0.15	0.46	0.36	×	×	×	×	低感度
46	Praziquantel	0.00	0.00	0.00	1.09	0.04	1.03	1.00	○	○	○	○	
47	Prednisolone	0.00	0.00	0.00	1.08	0.11	0.89	0.82	○	○	○	○	
48	Prinidazole	0.00	0.00	0.00	0.90	0.02	0.87	0.86	○	○	○	○	
49	Pyrantel	0.00	0.00	0.00	0.85	0.02	0.81	0.80	○	○	○	○	
50	Pyrimethamine	0.00	0.00	0.00	1.00	0.02	0.96	0.94	○	○	○	○	
51	Robenidine	0.00	0.00	0.00	0.83	0.10	0.67	0.60	○	○	○	○	
52	Sarafloxacin	0.00	0.00	0.00	0.56	0.08	0.43	0.37	○	○	○	○	
53	Sulfabenzamide	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
54	Sulfabromomethazine	0.00	0.00	0.00	0.84	0.06	0.75	0.71	○	○	○	○	
55	Sulfacetamide	0.00	0.00	0.00	0.74	0.10	0.57	0.50	○	○	○	○	
56	Sulfachloropyridazine	0.01	0.03	0.06	0.84	0.08	0.71	0.66	○	○	○	○	
57	Sulfadiazine	0.00	0.00	0.00	0.40	0.23	0.03	-0.13	○	×	×	×	
58	Sulfadimethoxine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
59	Sulfadimidine	0.00	0.00	0.00	0.78	0.06	0.67	0.63	○	○	○	○	
60	Sulfadoxine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
61	Sulfathoxypyridazine	0.00	0.00	0.00	0.77	0.08	0.64	0.59	○	○	○	○	
62	Sulfamerazine	0.00	0.00	0.00	0.79	0.07	0.67	0.62	○	○	○	○	
63	Sulfamethoxazole	0.00	0.00	0.00	0.87	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
64	Sulfamethoxypyridazine	0.00	0.00	0.00	0.75	0.06	0.65	0.61	○	○	○	○	
65	Sulfamonomethoxine	0.00	0.00	0.00	0.84	0.06	0.74	0.70	○	○	○	○	
66	Sulfapyridine	0.00	0.00	0.01	0.90	0.13	0.69	0.60	○	○	○	○	
67	Sulfiquinoxaline	0.00	0.00	0.00	0.78	0.04	0.71	0.68	○	○	○	○	
68	Sulfisoxazole	0.00	0.00	0.00	0.74	0.08	0.61	0.55	○	○	○	○	
69	Sulfisoxazole	0.00	0.00	0.00	0.87	0.06	0.77	0.73	○	○	○	○	
70	Temephos	0.00	0.00	0.00	1.01	0.13	0.79	0.70	○	○	○	○	
71	Thiabendazole	0.00	0.00	0.00	1.04	0.10	0.87	0.80	○	○	○	○	
72	Thiamulin	0.00	0.00	0.00	1.00	0.03	0.95	0.92	○	○	○	○	
73	Thiamein acid	0.00	0.00	0.00	0.89	0.05	0.81	0.78	○	○	○	○	
74	Thiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.96	0.05	0.88	0.85	○	○	○	○	
75	Trichlorfon	0.00	0.00	0.00	0.77	0.12	0.57	0.49	○	○	○	○	
76	Trimethoprim	0.00	0.00	0.00	0.93	0.09	0.78	0.72	○	○	○	○	
77	Triphenylamine	0.00	0.00	0.00	0.90	0.06	0.80	0.76	○	○	○	○	
78	Tylosin	0.00	0.00	0.00	1.04	0.33	0.49	0.26	○	○	○	○	
79	Vahemulin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.04	0.95	0.93	○	○	○	○	
80	Warfarin	0.00	0.00	0.00	1.06	0.04	1.00	0.97	○	○	○	○	
81	Xylazine	0.00	0.00	0.00	0.86	0.05	0.77	0.74	○	○	○	○	

性能要件①: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件②: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 性能要件③: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件④: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 ○: 適合、×: 不適合

表 4 牛肉のスクリーニング分析の性能評価結果

		ブランク試料			添加試料			性能要件への適合				備考	
		B _{AVERAGE}	B _{SD}	T	S _{AVERAGE}	S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -1.64×S _{SD}	C=S _{AVERAGE} -2.33×S _{SD}	①	②	③		④
1	2-Acetylmisofluthazole	0.00	0.00	0.00	0.85	0.11	0.66	0.58	○	○	○	○	
2	A benzazole	0.00	0.00	0.00	0.88	0.03	0.83	0.80	○	○	○	○	
3	Atrenogest	0.00	0.00	0.00	0.57	0.07	0.46	0.42	○	○	○	○	
4	Azaperone	0.00	0.00	0.00	1.03	0.08	0.89	0.84	○	○	○	○	
5	Benzocaine	0.00	0.00	0.00	0.63	0.04	0.56	0.53	○	○	○	○	
6	Bromacil	0.00	0.00	0.00	0.91	0.05	0.84	0.81	○	○	○	○	
7	Butizolam	0.00	0.00	0.00	1.18	0.11	1.01	0.93	○	○	○	○	
8	Cefoperazone	0.00	0.00	0.00	0.65	0.30	0.16	-0.05	×	×	×	×	低感度
9	Chlormedazone	0.00	0.00	0.00	0.59	0.04	0.52	0.49	○	○	○	○	
10	Cisbuprolol	0.00	0.00	0.00	0.91	0.05	0.82	0.79	○	○	○	○	
11	Danofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.53	0.18	0.23	0.11	○	○	○	×	
12	Dexamethasone	0.00	0.00	0.00	0.87	0.11	0.70	0.63	○	○	○	○	
13	Diazepam	0.00	0.00	0.00	0.66	0.03	0.62	0.60	○	○	○	○	
14	Dicyclanil	0.00	0.00	0.00	0.74	0.07	0.62	0.56	○	○	○	○	
15	Difloxacin	0.00	0.00	0.00	0.75	0.08	0.62	0.57	○	○	○	○	
16	Diflufenuron	0.00	0.00	0.00	0.27	0.07	0.15	0.10	○	○	×	×	
17	Emamectin Benzoate	0.00	0.00	0.00	0.93	0.22	0.57	0.42	○	○	○	○	
18	Enrofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.68	0.10	0.51	0.44	○	○	○	○	
19	Ethopazine	0.00	0.00	0.00	0.98	0.08	0.85	0.79	○	○	○	○	
20	Famotidine	0.00	0.00	0.00	0.97	0.05	0.90	0.86	○	○	○	○	
21	Fenobucarb	0.00	0.00	0.00	0.69	0.05	0.61	0.58	○	○	○	○	
22	Flubendazole	0.00	0.00	0.00	1.03	0.04	0.96	0.93	○	○	○	○	
23	Flumequine	0.00	0.00	0.00	0.94	0.08	0.81	0.76	○	○	○	○	
24	Furazolidone	0.00	0.00	0.00	0.94	0.02	0.90	0.89	○	○	○	○	
25	Halofuginone	0.00	0.00	0.00	0.59	0.04	0.52	0.49	○	○	○	○	
26	5-Hydroxythiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.58	0.18	0.28	0.16	○	○	○	×	
27	Ketoprofen	0.00	0.00	0.00	0.98	0.05	0.90	0.87	○	○	○	○	
28	Levamisole	0.00	0.00	0.00	0.88	0.04	0.82	0.79	○	○	○	○	
29	Lincomycin	0.00	0.00	0.00	0.71	0.04	0.64	0.61	○	○	○	○	
30	Mafloxacin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.03	0.96	0.94	○	○	○	○	
31	Marfloxacin	0.00	0.00	0.00	0.48	0.11	0.29	0.21	○	○	○	○	
32	Mebendazole	0.00	0.00	0.00	1.03	0.04	0.97	0.95	○	○	○	○	
33	Mebexicam	0.00	0.00	0.00	0.87	0.05	0.79	0.76	○	○	○	○	
34	Mebutolone	0.00	0.00	0.00	0.91	0.08	0.78	0.72	○	○	○	○	
35	Methylprednisolone	0.00	0.00	0.00	0.98	0.11	0.80	0.72	○	○	○	○	
36	Mifloxacin	0.00	0.00	0.00	0.77	0.13	0.57	0.48	○	○	○	○	
37	Morantel	0.00	0.00	0.00	0.76	0.04	0.70	0.68	○	○	○	○	
38	Nalidixic acid	0.00	0.00	0.00	0.99	0.09	0.83	0.77	○	○	○	○	
39	Ofloxacin	0.00	0.00	0.00	0.52	0.06	0.42	0.38	○	○	○	○	
40	Oxiquinox	0.00	0.00	0.00	0.06	0.01	0.04	0.03	○	○	×	×	
41	Orbifloxacin	0.00	0.00	0.00	0.71	0.06	0.62	0.58	○	○	○	○	
42	Omeprazole	0.00	0.00	0.00	0.89	0.03	0.85	0.83	○	○	○	○	
43	Oxibendazole	0.00	0.00	0.00	0.97	0.03	0.92	0.90	○	○	○	○	
44	Oxolinic acid	0.00	0.00	0.00	0.74	0.11	0.55	0.47	○	○	○	○	
45	Phenoxymethylpenicillin	0.01	0.02	0.05	0.86	0.23	0.48	0.32	×	×	×	×	低感度
46	Praziquantel	0.00	0.00	0.00	1.09	0.06	1.00	0.96	○	○	○	○	
47	Prednisolone	0.00	0.00	0.00	0.89	0.07	0.77	0.72	○	○	○	○	
48	Priflutim bromide	0.00	0.00	0.00	0.90	0.03	0.84	0.82	○	○	○	○	
49	Pyrantel	0.00	0.00	0.00	0.85	0.04	0.78	0.75	○	○	○	○	
50	Pyrimethamine	0.00	0.00	0.00	0.90	0.03	0.85	0.83	○	○	○	○	
51	Robenidine	0.00	0.00	0.00	0.66	0.09	0.52	0.46	○	○	○	○	
52	Sarafloxacin	0.00	0.00	0.00	0.53	0.16	0.26	0.14	○	○	○	×	
53	Sulfabenzamide	0.00	0.00	0.00	0.62	0.06	0.52	0.48	○	○	○	○	
54	Sulfabromomethazine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
55	Sulfacetamide	0.00	0.00	0.00	0.15	0.06	0.05	0.01	○	○	×	×	
56	Sulfachlorpyridazine	0.00	0.00	0.00	0.72	0.06	0.63	0.58	○	○	○	○	
57	Sulfadiazine	0.00	0.00	0.00	0.42	0.07	0.30	0.25	○	○	○	○	
58	Sulfadimethoxine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
59	Sulfadiazine	0.00	0.00	0.00	0.71	0.06	0.61	0.56	○	○	○	○	
60	Sulfadoxine	0.00	0.00	0.00	0.65	0.07	0.54	0.50	○	○	○	○	
61	Sulfathiazopyridazine	0.00	0.00	0.00	0.73	0.07	0.62	0.58	○	○	○	○	
62	Sulfamerazine	0.00	0.00	0.00	0.73	0.04	0.66	0.63	○	○	○	○	
63	Sulfamethoxazole	0.02	0.03	0.06	0.72	0.06	0.62	0.58	○	○	○	○	
64	Sulfamethoxyypyridazine	0.00	0.00	0.00	0.59	0.11	0.40	0.32	○	○	○	○	
65	Sulfamonomethoxine	0.00	0.00	0.00	0.76	0.06	0.66	0.62	○	○	○	○	
66	Sulfapyridine	0.00	0.00	0.00	0.66	0.05	0.58	0.55	○	○	○	○	
67	Sulfiquinoxaline	0.00	0.00	0.00	0.72	0.05	0.63	0.60	○	○	○	○	
68	Sulfithiazole	0.20	0.20	0.53	1.19	0.35	0.61	0.37	○	×	○	×	
69	Sulfisoxazole	0.00	0.00	0.00	0.85	0.07	0.73	0.67	○	○	○	○	
70	Temephos	0.00	0.00	0.00	0.54	0.05	0.47	0.44	○	○	○	○	
71	Thiabendazole	0.00	0.00	0.00	0.83	0.04	0.77	0.74	○	○	○	○	
72	Thiamulin	0.00	0.00	0.00	0.97	0.04	0.91	0.88	○	○	○	○	
73	Thiolenamic acid	0.00	0.00	0.00	0.65	0.05	0.57	0.54	○	○	○	○	
74	Thiorenolone	0.00	0.00	0.00	0.72	0.02	0.68	0.67	○	○	○	○	
75	Trichlorfon	0.00	0.00	0.00	0.59	0.05	0.51	0.48	○	○	○	○	
76	Trimethoprim	0.00	0.00	0.00	0.79	0.03	0.74	0.72	○	○	○	○	
77	Triphenylamine	0.00	0.00	0.00	1.00	0.06	0.89	0.85	○	○	○	○	
78	Tylosin	0.00	0.00	0.00	1.01	0.19	0.70	0.57	○	○	○	○	
79	Vahemulin	0.00	0.00	0.00	0.85	0.06	0.75	0.70	○	○	○	○	
80	Warfarin	0.00	0.00	0.00	0.80	0.09	0.66	0.60	○	○	○	○	
81	Xylazine	0.00	0.00	0.00	0.80	0.04	0.74	0.71	○	○	○	○	

性能要件①: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件②: C>T、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 性能要件③: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-1.64×S_{SD})
 性能要件④: C>T、C ≥ 0.2、添加試料のピーク S/N ≥ 10 (C=S_{Average}-2.33×S_{SD})
 ○: 適合、×: 不適合

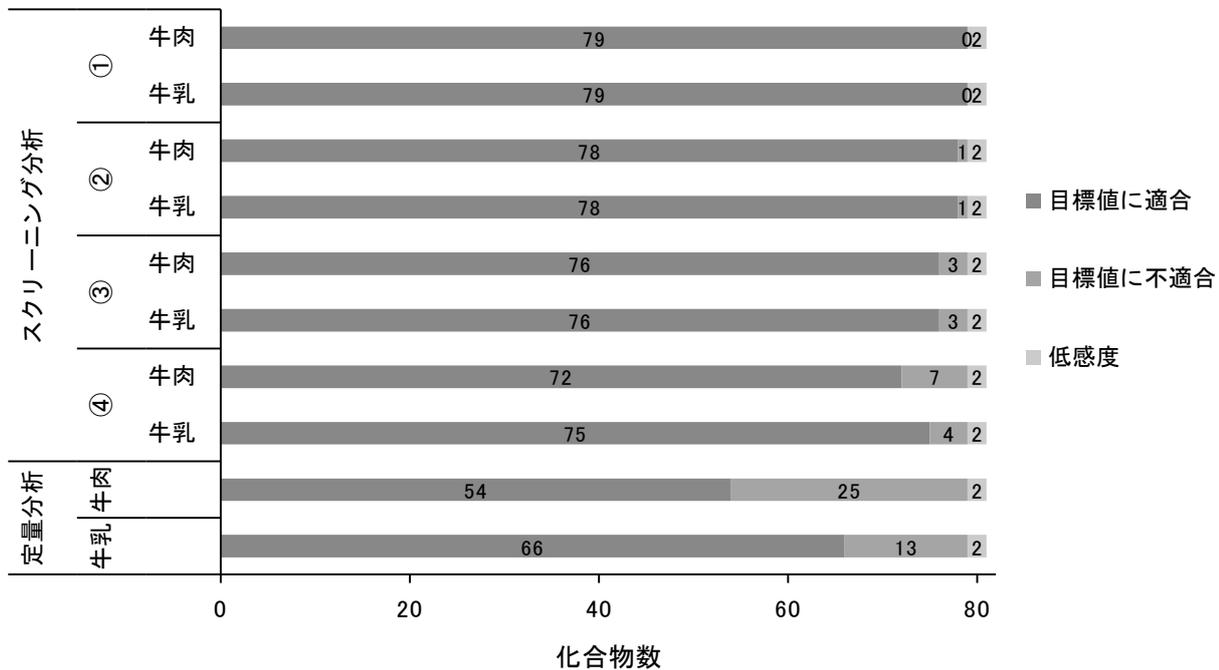


図 7. スクリーニング分析法の性能評価方法 (性能要件①～④) 及び妥当性評価ガイドラインによる評価での適合化合物数

スクリーニング分析: 1日2併行、5日間の添加回収試験(スクリーニング濃度: 0.01 ppm)によって得られたデータ(試料数: 添加試料 10、ブランク試料 10)を用いて評価した。

性能要件①: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件②: $C > T$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

性能要件③: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 1.64 \times S_{SD}$)

性能要件④: $C > T$ 、 $C \geq 0.2$ 、添加試料のピーク $S/N \geq 10$ ($C = S_{Average} - 2.33 \times S_{SD}$)

定量分析: 1日2併行、5日間の添加回収試験(添加濃度: 0.01 ppm)を行い、検量線(6点)を用いて定量したデータを妥当性評価ガイドライン⁸⁾に従って評価した。

COMMUNITY REFERENCE LABORATORIES RESIDUES (CRLs)
20/1/2010

**GUIDELINES FOR THE VALIDATION OF SCREENING METHODS
FOR RESIDUES OF VETERINARY MEDICINES
(INITIAL VALIDATION AND TRANSFER)**

Table of Contents

1.	Scope	1
2.	Definitions	1
2.1.	Regulatory/Action Limit for validation purposes	1
2.2.	Screening Target Concentration	1
2.3.	Detection capability $CC\beta$	2
2.4.	Cut-Off Level.....	2
2.5.	"Negative Control" (Blank matrix) Samples.....	2
2.6.	"Screen Positive Control" Samples.....	2
2.7.	Test Matrix	2
2.8.	Standard Operating Procedure (SOP) for the method	2
2.9.	Initial validation	3
2.10.	Abridged validation	3
2.11.	Screening Methods.....	3
3.	Screening Method classification.....	3
3.1.	Classification by detection principle	3
3.2.	Classification by their degree of quantification.....	3
4.	Principles to be followed for the validation of screening methods.....	4
4.1.	Key requirements	4
4.2.	Choice of analytes used for validation and selectivity of the method	4
4.3.	Preparation of "simulated tissue" for validation of microbial growth inhibition tests.....	6
5.	Validation procedure	7
5.1.	Determination of specificity/selectivity and detection capability $CC\beta$ according to classical approach	7
5.2.	Determination of specificity/selectivity and detection capability $CC\beta$ according to alternative matrix-comprehensive approach.....	10
6.	Transfer of screening methods between laboratories.....	10
6.1.	Conditions of transfer.....	10
6.2.	What is included in the abridged validation according to the classical concept.....	11
6.3.	What is included in the abridged validation according to the alternative concept.....	11
7.	Continuous verification.....	12
7.1.	Quality control (QC) samples.....	12
7.2.	Proficiency tests	13
8.	Validation report	13
9.	References.....	13
10.	Annexes	15

1. Scope

This guideline document supplements Commission Decision 2002/657/EC [1] regarding the validation of screening methods. The guideline covers two distinct phases in the validation process: the initial validation of screening methods in the originating laboratory and the shortened or 'abridged' validation of these methods in the receiving laboratory following their transfer to that laboratory. The objectives of this guideline document are to define:

- the minimum requirements to be fulfilled by the initial validation (in the 'originator' laboratory);
- criteria which are necessary to determine whether screening methods can be transferred to another laboratory and under which conditions;
- the minimum requirements to be fulfilled by the abridged validation (in the 'receptor' laboratory);

This guideline document includes:

- an 'initial validation' protocol for demonstrating performance characteristics for newly developed or introduced screening methods;
- a description of the conditions under which methods developed and validated according to Commission Decision 2002/657/EC [1] in one laboratory (hereafter referred to as the 'originator' laboratory) can be transferred to a 'receptor' laboratory and the abridged validation necessary to demonstrate that the receptor laboratory is able to apply the transferred method correctly; and
- recommendations on routine quality control (continuous verification) for screening methods.

2. Definitions

2.1. Regulatory/Action Limit for validation purposes

For the purpose of validation of analytical methods in the laboratories it is understood that the Regulatory Limit for authorised veterinary medicinal products in the EU is the Maximum Residue Limit (MRL) as defined in Regulation (EC) No 470/2009 [2] (repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 [3]). Also, the Regulatory Limit for certain prohibited or unauthorised analytes is the Minimum Required Performance Limit (MRPL) or the Reference Point for Action (RPA) as defined in Article 4 of Commission Decision 2002/657/EC [1] and Article 2 of Commission Decision 2005/34/EC [4] and Articles 18/19 of Council Regulation (EEC) No 470/2009 [2].

2.2. Screening Target Concentration

The Screening Target Concentration is the concentration at which a screening test categorises the sample as "Screen Positive" (potentially non-compliant) and triggers a confirmatory test.

- 1- For authorised analytes, the Screening Target Concentration is at or below the Regulatory Limit (MRL)
(and should preferably be set at one half of the MRL wherever possible).
- 2- For prohibited & unauthorised analytes, the Screening Target Concentration must be at or less than the MRPL (or RPA).
- 3- For analytes for which Maximum Residue Limits (MRLs) have not been established according to Council Regulation (EC) No 470/2009 [2], Screening Target Concentration should wherever possible be at or less than the recommended concentrations as described in the CRL Guidance Paper of 7 December 2007 [5].

The further the Screening Target Concentration is below the Regulatory Limit, the lower the probability of obtaining a false compliant (i.e. false-negative) result in samples containing the drug at the Regulatory Limit.

2.3. Detection capability $CC\beta$

Detection capability ($CC\beta$) is defined in point 1.12. of the Annex to Commission Decision 2002/657/EC [1]. $CC\beta$ is the smallest content of the analyte that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . The β error is the probability that the tested sample is truly non-compliant even though a compliant measurement has been obtained. **For screening tests the β error (i.e. false compliant rate) should be $< 5\%$.**

In the case of analytes for which no Regulatory Limit has been established, $CC\beta$ is the lowest concentration at which a method is able to detect truly contaminated samples with a statistical certainty of $1 - \beta$. **In this case, $CC\beta$ must be as low as possible or lower than Recommended Concentrations when exist [5].**

In the case of analytes with an established Regulatory Limit, $CC\beta$ is the concentration at which the method is able to detect permitted limit concentrations with a statistical certainty of $1 - \beta$. **$CC\beta$ is the concentration at which only $\leq 5\%$ false compliant results remain. In this case, $CC\beta$ must be less than or equal to the Regulatory Limit.**

2.4. Cut-Off Level

The Cut-Off Level is the response or signal from a screening test which indicates that a sample contains an analyte at or above the Screening Target Concentration. If the Cut-Off Level is exceeded a subsequent confirmatory test is carried out. During the initial validation process the Cut-Off Level may be established through analysis of matrix blank samples and replicates of those same samples spiked (fortified) at the Screening Target Concentration. Two examples of how Cut-Off levels could be established are given in Annexes I and II.

2.5. "Negative Control" (Blank matrix) Samples.

These are samples from animals of known history which have not been exposed to the substance in question. If samples from such animals are not available, samples which have been previously confirmed as compliant and not containing residues of the substance of interest by suitably sensitive physicochemical tests would also be acceptable.

2.6. "Screen Positive Control" Samples.

These are Negative Control Samples that are fortified (spiked) with the test analyte at the Screening Target Concentration. They may, however also be incurred-positive samples (i.e. samples taken from animals which have been treated with the substance in question) or Certified Reference Materials. When Screen Positive Control samples are run in the screening test, they should be classified as 'screening positive' if the test is performing correctly.

2.7. Test Matrix

The test matrix is the tissue or fluid submitted for analysis e.g. liver, kidney, urine, muscle, honey, milk. The test matrix is specified in the Standard Operating Procedure (SOP) of the screening method. For example the test matrix may be "bovine muscle" or may be just "muscle". In the former case the screening method has been shown to be applicable to bovine muscle. In the latter case, the method has been shown to be applicable to muscle from several species with no significant difference in the test responses between the different species. The applicable species should be specified in the SOP.

2.8. Standard Operating Procedure (SOP) for the method

The method SOP should be drafted *before* any initial or abridged validation is carried out and should cover those points listed in section 5.4.4. of ISO 17025:2005. During the development of an analytical method, the scope of the method has to be determined (i.e. the analytes which can be detected, the matrices which can be tested etc). During method development, all relevant parameters of the method have to be optimised and critical points (e.g. temperature, pH) of the method identified and controlled.

When a method is transferred to a receptor laboratory, this laboratory should draw up its own SOP which should correspond with the SOP of the originator laboratory. Concerning physico-chemical methods, the equipments could be supplied by different manufacturers in the originator laboratory and in the receptor laboratory; therefore the performance could be significantly different. In the receptor

laboratory, the operator will be free to adapt the conditions with the only objective to achieve the same performance criteria.

2.9. Initial validation

The validation procedure applied to a newly developed analytical method in the originator laboratory which demonstrates that the method is fit for purpose.

2.10. Abridged validation

The shortened validation procedure applied in the receptor laboratory to a method which has been previously validated in the originator laboratory. The abridged validation procedure should allow the receptor laboratory to demonstrate that the method will work reliably in that laboratory and is fit for purpose.

2.11. Screening Methods

Screening methods are defined in Commission Decision 2002/657 [1] as "methods used to detect the presence of an analyte or class of analytes at the level of interest. These methods have the capability for a high sample throughput and are used to sift large numbers of samples for potential non-compliant results. They are specially designed to avoid false compliant results".

The "Level of interest" is usually either the Regulatory Limit (MRL, MRPL) or an "Action Level/Limit". (see section 2.2).

3. Screening Method classification

Screening methods can be classified either according to the principle of detection or according to whether they are qualitative or (semi-)quantitative.

3.1. Classification by detection principle

Biological methods detect cellular responses to analytes (e.g. oestrogenic effect, inhibition of bacterial growth, cellular effect, hormonal effect). These methods are not selective and can cover several chemical classes of active analytes (e.g. hormones, antimicrobials). They do not allow the identification of individual analytes.

Biochemical methods detect molecular interactions (e.g. antigens, proteins) between analytes and antibodies or receptor proteins (ELISA, RIA, ...). Chemical labelling of either the analyte or antibody/receptor allows the interaction to be monitored and measured. These methods are either selective for a family of analytes having related molecular structures or are sometimes analyte-specific.

Physicochemical methods distinguish the chemical structure and molecular characteristics of analytes by separation of molecules (e.g. TLC, GC, HPLC) and the detection of signals related to molecular characteristics (e.g. UV- DAD, Visible, Fluo, FID, ECD, MS, tandem MS, trap MS, ToF MS, other hybrid MS). They are able to distinguish between similar molecular structures and allow the simultaneous analysis of several analytes.

3.2. Classification by their degree of quantification

Qualitative methods give a yes / no response, with no indication of the concentration of the putative analyte. Examples include:

- bacterial growth inhibition tests which give a result of either "no zone" or "zone of inhibition";
 - inhibition tests which give a colour change;
-

- immunochemical / ligand binding tests, where a response is considered as “above” or “below” a Cut-Off Level; or where analytes with different cross-reactivities are included within the method scope;
- chromatographic tests (HPLC, LC-MS/MS, ...), where a peak is considered as “present” or “absent”. They could be simply validated as qualitative screening methods as it is described in this document when quantification is not required at the screening step [6].

Semi-quantitative methods give an approximate indication of the concentration of the putative analyte. Whilst the numerical result may not be regarded as reportable, this may be useful to the analyst in deciding the calibration range for the subsequent (quantitative) confirmatory test. Examples include:

- microbial growth inhibition tests where an attempt is made to relate the size of the inhibitory zone to the putative analyte concentration;
- biochemical tests which include a calibration curve (e.g. ELISA, but only if the test is specific for a single analyte);
- chromatographic tests, calibrated over a short range which may not include the sample response;
- any physicochemical test (e.g. HPLC, LC-MS/MS, ...) where the measured method precision characteristics do not meet the requirements for quantitative tests.

Quantitative methods meet the same requirements for accuracy, dynamic range, and precision as confirmatory tests. And thus, when the quantification is required, these methods shall be validated as confirmatory methods, as detailed in the Commission Decision 2002/657/EC [1].

When the method is only used for screening purposes, the specific requirements concerning the confirmation of identity (identification points according to the section 2.3.2.2. Table 6 of the Decision EC/2002/657 [1]) are not necessarily needed.

4. Principles to be followed for the validation of screening methods

4.1. Key requirements

The key requirement for a screening method (whether qualitative or (semi-)quantitative) is its ability to reliably detect the analyte in question at the chosen Screening Target Concentration and to avoid false-compliant results. The Screening Target Concentration should be low enough to ensure that if the analyte in question is present in the sample at the Regulatory Limit, the sample will be classified as 'Screen Positive'. **Validation (whether initial or abridged) should provide the objective evidence that this key requirement is met.** Validation (both initial and abridged) must cover the entire matrix / species / analyte combinations claimed within the scope of the method SOP. **However, the extent of validation required will vary depending on whether the validation is initial or abridged.**

Minimum performance parameters for screening tests are specified in Chapter 3, Table 9 of Commission Decision 2002/657/EC [1].

As a general principle, there has to be a sufficient margin of difference between the Screening Target Concentration and the Regulatory Limit. **Therefore CCB must be less than or equal to the Regulatory Limit.**

It is important to note that screening methods may not be able to reliably detect all relevant target analytes at the Regulatory Limit in all matrices and species. If essential analytes or species are not covered, then additional tests, using an alternative method, must be added.

4.2. Choice of analytes used for validation and selectivity of the method

The selection of analytes which will be used for either the initial or abridged validation study depends on the scope of the screening method which is described in the method SOP.

If the screening method can not distinguish between different analytes within one chemical family (e.g. tetracyclines or beta-lactams), validation should be carried out for each analyte which is considered relevant for the laboratory. For example, relevant analytes are each analyte that the laboratory might be required to include in an analytical programme for detection of residues in Control Plans.

Alternatively, validation may be performed using a number of analytes which are representative for the analyte group in question (see sections 4.2.1., 4.2.2., 4.2.3.).

4.2.1. Multi-class methods using inhibition tests

For inhibition-based multi-class methods, at least one analyte should be chosen in the validation study to represent each analyte group (e.g. for microbial growth inhibition tests, one tetracycline, one sulphonamide, one β -lactam, one aminoglycoside and one macrolide could be used). It should be noted however that in the case of microbial growth inhibition tests, not all analytes in the one antimicrobial family will display the same antimicrobial activity profile. Therefore it is recommended, prior to validation, that activity profiles are determined for all of the relevant analytes in each antimicrobial family using standard solutions at different concentrations around the MRL. These activity profiles allow at least one or two representative analytes per family of analytes to be considered for the validation study.

The analyte(s) to be selected for the validation study should ideally be the least sensitive in their class i.e. the Screening Target Concentration the closest to the Regulatory Limit. When the MRL is the same for all the family (e.g. tetracyclines), a single analyte (the least sensitive) could be chosen. For example, it has been demonstrated by CRL AFSSA-Fougères that oxytetracycline is the less sensitive tetracycline (among those having an MRL set) which can be detected by many multi-plate microbial growth inhibition tests. When different MRLs were set in one family (e.g. penicillins), several analytes should be validated and the Screening Target Concentration will be set regarding the respective MRLs. For example, in the penicillin family, ampicillin and cloxacillin were the less sensitive penicillins and both have to be chosen as representative antibiotics, with different Screening Target Concentrations.

The CRL can provide specific advice on the choice of representative analytes for bacterial growth inhibition tests [8-10].

4.2.2. Multi-class methods using biochemical tests

For biochemical tests (e.g. ELISA), which can bind several analytes with varying cross-reactivities, if all of these analytes are included in the scope of the method, initial validation must be sufficient to demonstrate that all of the analytes in question will be reliably extracted (if necessary) and detected.

Commonly encountered problems include the fact that ELISA kit manufacturers may not indicate whether the supplied information on antibody-antigen cross-reactivities has been generated in buffer (standard) solution or in biological matrix. In ELISAs with a chemical extraction step, recoveries may not be specified. Therefore it may not always be possible to calculate the detection capabilities of each of the cross-reactive analytes from the $CC\beta$ of the representative analyte.

The detection capability has to be determined for the single analyte detected by the test or for the representative analyte (e.g. the analyte with the lowest cross-reactivity). In case the test is not specific for one analyte (e.g. a multi-sulphonamides test), the cross-reactivities with different other analytes have to be determined. Finally the detection capabilities of the other analytes from the multi test could be derived from the detection capability of the representative analyte in relation with the percentages of cross-reactivities.

4.2.3. Multi-class methods using physicochemical screening techniques

Concerning physico-chemical methods which allow analytes to be differentiated on the basis of their chemical properties, the first idea is to validate for at least one analyte which should be selected from each known chemical class or sub-class (e.g. for quinolones, one acidic compound and one amphoteric compound can be chosen for the validation study).

However, by using a multi-class screening method (e.g. an LC-ToF-MS screening method), if analytes have a different retention time (Rt), they may undergo different effects (ion suppression or ion enhancement) because of different amounts of co-eluting matrix compounds. For that reason, it is advisable to test for all analytes and not for a subselection even if the analytes have very similar physicochemical properties.

4.2.4. Summary

Examples of criteria that could be used to choose the analytes included in the method that have to be validated:

- for microbial growth inhibition tests:
 - choice of the analyte(s) which give (s) the lowest inhibition in the conditions used;
 - when the method is a multiplate test, the validation study is performed at least on the most sensitive plate towards the concerned antibiotic;
- for immunological tests:
 - the analyte with the lowest cross-reactivity;
- for (semi-)quantitative methods with an extraction step:
 - the analytes with the lowest analytical recovery;
 - all the analytes included in the method when ion suppression may occur.

4.3. Preparation of "simulated tissue" for validation of microbial growth inhibition tests

For those methods with an extraction step prior to the analysis (biochemical and physicochemical methods), the matrix preparation for is rather simple with spiking samples. Even some microbial growth inhibition tests use fluid extracted from the tissue, and therefore can be validated also simply using spiked samples. However, there is a special issue with those microbial growth inhibition tests which use solid matrices (e.g. slices of whole tissue - muscle, kidney – applied directly to the plate) and where there is no extraction step. In such cases validation must be carried out using "simulated tissue". This simulated tissue should contain the analyte at the concentration of interest and the sample should behave the same way as an incurred tissue slice, i.e. possible matrix effects could be observed and taken into account in the results.

There are two practical options for the generation of a simulated tissue.

Option 1 Tissue is minced, weighed, spiked and frozen. Pieces of frozen spiked tissue are placed directly on the plates. (NB This procedure may not be applicable to kidney samples - due to false positive results because endogenous components may be released during the mincing process - or for tests where tissue fluid is soaked onto a paper disc - due to insufficient fluid uptake from the minced sample).

Option 2 Paper discs are placed on the plates and then spiked with standard solutions. Paper discs are still wet when finally pieces of tissue are placed onto the spiked discs in a 'sandwich' format (in the following order: agar-paper disc-tissue slice). This protocol maintains the integrity of the tissue.

The CRL could provide advice on the protocol of preparation of simulated tissues for validation of microbial growth inhibition tests.

5. Validation procedure

5.1. Determination of specificity/selectivity and detection capability $CC\beta$ according to classical approach¹

5.1.1. Number of samples required for validation

The number of "Screen Positive" Control Samples (i.e. samples spiked at the Screening Target Concentration) for each analyte depends on the degree of statistical confidence required in the result, and the relationship between the Screening Target Concentration and the Regulatory Limit. The lower the Screening Target Concentration in comparison with the Regulatory Limit, the fewer replicates are required to give the same degree of confidence that the screening test will correctly identify truly contaminated samples at the Regulatory Limit. For example:

- If the Screening Target Concentration is set at half the Regulatory/Action Limit or lower (e.g. 1/2 MRL), the occurrence of one or no false-compliant results following the analysis of at least 20 "Screen Positive" Control Samples is sufficient to demonstrate that $CC\beta$ is less than the Regulatory/Action Limit (MRL) and less than or equal to the 1/2 MRL;
- If the Screening Target Concentration is set between 50 % and 90 % of the Regulatory/Action Limit, at least 40 "Screen Positive" Control Samples (with no more than 2 false-compliant results) will be sufficient to demonstrate that $CC\beta$ is less than the Regulatory/Action Limit;
- If the sensitivity of the screening test is such that the Screening Target Concentration approaches the Regulatory/Action Limit (10 % below the Regulatory/Action Limit), more "Screen Positive" Control samples may be required. A maximum of 60 replicates (with no more than 3 false-compliant results) is needed to demonstrate that $CC\beta$ is fit for the purpose. These larger studies can be undertaken in sequential stages i.e. the first twenty pairs of control samples tested, and if more than one spiked sample falls below the Cut-Off level, the validation can be abandoned at this point, the Screening Target Concentration has to be increased and the validation exercise repeated.

If the screening method is applicable to one matrix but to different animal species, the 60 different samples could be taken from the different species (e.g. 20 porcine muscles, 20 bovine muscles, and 20 poultry muscles) (see section 5.1.3.).

5.1.2. Identification of the Cut-Off Level and calculation of $CC\beta$

Validation of screening methods (whether qualitative or semi-quantitative) requires identification of a Cut-Off Level at, or above which the sample is categorised as 'screen positive' and liable to physicochemical confirmation. Two different approaches for establishing Cut-Off Levels for semi-quantitative screening tests are given in Annexes I and II.

In the case of a microbiological growth inhibition test, a typical Cut-Off Level would be an inhibition zone with a width of > 2mm. In this case, any sample giving a zone of > 2mm would be classified as 'screen positive'. All samples spiked at the screening target concentration should give zones > 2mm to be classified as 'screen positive'.

- The Screening Target Concentration (x_1) at which the matrix blank samples will be spiked in order to establish the Cut-Off Level for the analyte in question should be ideally set at **half** the Regulatory/Action Limit; if not possible, a concentration between 50 and 100 % of the Regulatory/Action Limit should be chosen.
- Select **60² samples of one matrix**. If for example the matrix is bovine muscle, each sample should result from a different batch. For the reliable determination of $CC\beta$ and specificity, at least 60 blank samples and 60 spiked samples should be analysed. Where the screening

¹ An alternative multi-factorial 'matrix comprehensive' validation model may be used. This is described in section 5.2.

² It is not always necessary to analyse as many as 60 samples. See Section 5.1.1.

method detects more than one analyte, this spiking exercise must be repeated for each analyte or at least for each of the analytes considered to be representative.

Step 1 Spike 60 blank samples with the analyte in question at concentration x_1 ;

Step 2 Analyse the 60 spiked samples and 60 blank samples according to the method SOP. These analyses should be carried out on different days and should preferably be carried out by different operators, and should ideally mimic the whole range of operating conditions likely to be encountered when using the method. It is recommended that this study is carried out in 'blind' conditions (the operators do not know which samples are spiked and which samples are blank).

Step 3

Approach 1 (see example in Annex I):

Evaluate the range of analytical responses for the blank samples and the range for the spiked samples. Select the lowest response in the spiked samples. This is the Cut-Off Level provided that the lowest response for the spiked samples does not overlap with the highest response for the blank samples. (See Annex I).

Approach 2 (see example in Annex II):

The second approach is a statistical approach which takes into account the β error of 5 %. The analytical response B_i of the blank samples is determined for each of the investigations. Then, the mean response of the set of blanks B and the standard deviation " SD_b " of their response are calculated. A "Threshold value" T can be calculated (see annex II). The analytical response Y_i is determined for each of the investigations of the spiked samples. Then, the mean response M and the standard deviation " SD " of the response of the spiked samples are calculated. A "cut-off factor" F_m can be calculated. Positivity threshold T and cut-off factor F_m are matrix-specific.

Step 4 Identify the number of spiked samples with results *below* the Cut-Off Level. If more than 3 spiked samples out of 60 (i.e. 5%) are below the Cut-Off Level, the Screening Target Concentration chosen for the spiking study is too low as this Screening Target Concentration will not give a response above the cut off level and therefore be judged 'screen positive'.

Note: If x_1 is at the MRL (or Regulatory/Action Limit) and if more than 3 samples (out of 60) spiked at x_1 are below the Cut-Off Level, the validation study has to be abandoned for this concentration until the method has been improved.

If x_1 is half of the MRL (or half the Regulatory/Action Limit) and if more than 3 samples (out of 60) spiked at x_1 fall below the Cut-Off Level, the spiking concentration should be increased (e.g. to three quarters of the MRL) and the spiking study repeated.

Step 5 Calculation of $CC\beta$. After the analysis of 60 spiked (or incurred) samples, the spiking level, (Screening Target Concentration) where $\leq 5\%$ of false compliant results would be present at the Regulatory/Action Limit, is the detection capability $CC\beta$ of the method (i.e. the concentration at which there are ≤ 3 false compliant out of 60 spiked samples).

5.1.3. Determining the applicability and ruggedness of a screening method

Applicability:

In general MRLs do not differ in the same matrix type (e.g. muscle) between species but they often vary for different matrix types within the same species. Nevertheless, if $CC\beta$ has been determined for one matrix (e.g. bovine muscle) during the initial validation and the method is to be applied to the same matrix in another species (e.g. porcine muscle), an interfering matrix effect should be anticipated and it cannot be assumed that the same $CC\beta$ will apply to this new matrix. **Therefore $CC\beta$ must be established for the analyte(s) in question in this new matrix.** Again, this should be performed for each analyte the laboratory is required to include in a residue analysis programme or, at least on a selected number of analytes which are representative for the analyte group in question (see section 4.2).

Operational scheme:**Example : For the same matrix type (e.g. muscle) from four different species.**

Provided the Regulatory/Action Limit is the same for all species and is the same as the original matrix, $CC\beta$ should be determined by analysing 20 blank samples (5 samples per species) and the same 20 blank samples spiked at the Screening Target Concentration used for the original matrix (5 samples per species). Then provided all blank samples are shown to be negative for the residue in question:-

- If the 20 spiked samples are all "screen positive" (i.e. exceed the Cut-Off Level) or if there is a maximum of 1 result below the Cut-Off Level, the method is applicable to the new matrices (or species), with the same $CC\beta$ as the original matrix.
- If there are 2 or more of the spiked samples which "screen negative" it can be inferred that $CC\beta$ for those species is greater than that estimated for the original matrix. In such a case the screening method should be fully validated for the new matrix (i.e. the Screening Target Concentration should be increased and the spiking study repeated).

Extension of the method to different matrix types and/or different species.

If $CC\beta$ has been determined for one matrix (e.g. bovine muscle) during the initial validation and the method is to be applied to a different matrix (e.g. liver) in either the same species or another species, there will almost certainly be a marked matrix effect and it can not be assumed that the same $CC\beta$ will apply to this new matrix. Therefore $CC\beta$ must be established for the analyte(s) in question in this new matrix. One approach to this issue is to use the matrix-comprehensive approach as described in Chapter 3.1.3 of the Annex to Commission Decision 2002/657/EC [1]. Alternatively, $CC\beta$ could be determined for each new species/matrix combination by analysing 20 blank samples (e.g. 20 porcine livers) and the same 20 blank porcine livers over-spiked at the Screening Target Concentration. This study should be carried out for each analyte or for a representative analyte of the analyte group in question. The interpretation of results is as described above. In the case the validation in the first matrix has been performed on each analyte, the matrix extension of the method could be either tested on each analyte again or reduced to a list of representative analytes (if matrix effect is not suspected). In the case the validation in the first matrix has been performed on a list of representative analytes, the same list could be used for the extension of the validation of the method to a new matrix. In both cases, the same analytes could be used for the validation in the new matrix only if these analytes are also relevant for the new matrix (e.g. one analyte relevant for the validation in bovine muscle could not be relevant for ovine muscle because the drug is not authorised to be used for the ovine species).

Ruggedness:

Ruggedness studies use the deliberate introduction of minor reasonable variations by the laboratory and the observation of their consequences on the results. Ruggedness studies should be conducted as it is recommended in the Commission Decision 2002/657/EC [1], by means of experimental plans.

Matrices or animal species could be included in the ruggedness study as factors that could influence the results. In this case, applicability study and ruggedness study are combined.

To investigate the ruggedness of a screening method, it is recommended to focus on one analyte found to be representative of the other analytes (if the method displays a wide detection spectrum).

The ruggedness should be evaluated by the analysis of at least 10 different blank materials and 10 different materials spiked (or incurred) at the level of interest. It is recommended to perform the studies for evaluating the detection capability and the specificity for this analyte as a blind test (unknown samples) at different days with different trained operators, if possible.

When it has been demonstrated that one factor has an effect on the performance of the method, the performance characteristics (specificity, detection capabilities) should be determined for this factor. Moreover, the impact of this factor on the performance characteristics has to be described in the validation report and in the final SOP.

5.1.4. Stability

When the stability of analyte(s) is known (bibliographical references or already characterised in the laboratory), there is no need to determine the stability again. Otherwise, the stability of the analyte in standard solution, and the stability of analyte in the biological matrix should be determined as detailed in the Commission Decision 2002/657/EC [1].

5.2. Determination of specificity/selectivity and detection capability $CC\beta$ according to alternative matrix-comprehensive approach.

An alternative matrix-comprehensive approach for method validation is described in Chapter 3.1.3 of the Annex to Commission Decision 2002/657/EC [1]. Using this multi-factorial approach reduces the number of runs (factor-level combinations) needed for validation [11-12].

Approach:

Firstly, eight samples are to be investigated according to the statistical design described in Chapter 3.1.3 of the Annex to Commission Decision 2002/657/EC [1].

After this initial validation study, quality assurance samples (QA-samples) are to be used for validation purposes and at least 20 QA-samples per year must be included (see section 6.3.1.). In cases where this cannot be fulfilled, the eight-sample-validation has to be repeated every year and as many QA-samples have to be investigated as possible. After one year the QA sample results can be statistically compared with the combined initial and/or transfer validation data.

An example of the validation procedure according to the alternative approach is presented in Annex III. A comprehensive description of this procedure will be available at the reference contact CRL-BVL (Berlin, Germany).

6. Transfer of screening methods between laboratories

The objective of the abridged validation is to demonstrate that the receptor laboratory is able to apply the transferred method correctly in accordance with the method SOP. The SOP used in the receptor laboratory must not deviate from the SOP developed in the originator laboratory. Concerning physico-chemical methods (e.g. LC-MS/MS) and biochemical tests (e.g. ELISA reader), the equipments could be purchased from different manufacturers. Particular attention has to be paid to the switching between instruments which could strongly influence the results (see section 2.8.).

Even though the principles of validation (determination of performance characteristics) are common to initial validation and to abridged validation of transferred methods, this chapter particularly deals with abridged validation requirements.

6.1. Conditions of transfer

When a screening method validated in one laboratory (the “originator”) is passed to a second laboratory (the “receptor”), then the receptor can use an abridged validation protocol **provided that**:

- the receptor laboratory has the **necessary equipment and skills** to use the method;
- the receptor laboratory has **full access to the original SOP and to initial validation data (e.g. validation report)**;
- the method is **used as described** in the original SOP using the **same operational conditions** (matrices, measurement technique, sample preparation, clean-up, critical equipment*), the **same Screening Target Concentrations** and, if applicable, the same Cut-Off Level(s).

*If the equipment (manufacturer, reference) is different from that of the originator laboratory, the receptor laboratory has to check if this equipment is critical or not for implementing satisfactorily the method. If the equipment is not critical, the SOP could be applied exactly as in the originator laboratory. In biochemical methods, change in equipment type and/or is apparently not critical (e.g. ELISA washer or reader). Concerning ELISA kits, the manufacturer of the kit should be the same as in

the initial validation. If the equipment is critical, the SOP could be slightly changed to reach the same performance characteristics.

Before abridged validation is undertaken in the receptor laboratory, the receptor laboratory **must** demonstrate that the operational conditions prevailing in the initial laboratory are covered by the receptor laboratory. If not, the transferred method will need to have a 'full' validation in the receptor laboratory.

The **choice of analytes** used for the abridged validation should be based on the one from the initial validation and, as a general principle, should be the worst-case examples reported by the originator laboratory. However there are some exceptions to this statement. If for example the method has been transferred to another country where different antibiotics within an antibiotic family are used more frequently compared to the originator country, it would be more appropriate to use these analytes in the abridged validation study, provided of course that these analytes are within the scope of the original SOP. The receptor laboratory may also have to validate more than one analyte, if the originator laboratory has demonstrated significant intra-class variation in response to the test. Again, in order to be eligible for abridged validation, the analytes chosen must be within the scope of the original SOP.

NB: In those cases where the receptor laboratory wishes to **modify** the initial screening method (e.g. extend the scope to **other matrices**, include other analytes etc), a full validation must be carried out in the receptor laboratory for the new matrices and analytes.

When deciding to adopt a screening method which has been developed in the originator laboratory (or when purchasing a commercially available screening test), the receptor laboratory must investigate the performance of the method by consulting scientific literature, examining data from the originator laboratory or supplier (initial validation report), and, if available, data from national and international standardisation organisations (e.g. ISO, AOAC, AFNOR).

Once the method is in place and before undertaking abridged validation, the skill of technicians and their ability to implement the method needs to be addressed. Staff must receive training on the principles of the method and how to run the test. Once trained, staff must run negative (section 2.5) and screen positive control (section 2.6) samples on several occasions to show that they are capable of running the test according to the SOP.

6.2. What is included in the abridged validation according to the classical concept

Provided that the conditions referred to in 6.1. are met, abridged validation may be carried out. By definition, abridged validation is less intensive than full (initial) validation. Its purpose is solely to indicate that the transferred method will work reliably in the receptor laboratory.

During abridged validation, only specificity and detection capabilities have to be determined on a reduced number of samples (20 samples whichever is the Screening Target Concentration) and these characteristics have to be compared to those obtained during the initial validation in the originator laboratory (see validation report or scientific articles). The transfer of the method will be valid when the performance characteristics are of the same order. A difference in the performance characteristics means that the method has not been transferred properly. In these conditions, the receptor laboratory has to take advice from the originator laboratory, until the problem is solved.

6.3. What is included in the abridged validation according to the alternative concept

Provided that the conditions referred to in 6.1. are met, abridged validation may be carried out. Principle of validation of transferred methods is the combined use of data of the initial validation and data of the abridged validation. This allows a substantial reduction of the workload for the routine laboratories. The combination of the gathered data however is only possible if there are no significant differences. If the in-house reproducibility obtained in the transfer validation is worse than 1.5 times the in-house reproducibility of the initial validation, the receptor laboratory has to reconsider its proceeding of the method.

In order to reduce the workload to the highest extent possible, a combination validation strategy can be applied. The statistical design of the abridged validation is equivalent to the design of the initial validation but takes into account only one concentration level. This means that only eight samples have to be investigated. These samples have to be fortified at or close to the MRL.

Additionally quality assurance samples (QA-samples) are to be used for validation purposes. It has to be required that at least 20 QA-samples are available per year. In cases where this cannot be fulfilled, the eight-sample-validation has to be repeated every year and as many QA-samples has to be investigated as possible.

7. Continuous verification

7.1. Quality control (QC) samples

Regardless of the type of screening test (qualitative or (semi-)quantitative), on-going quality control (QC) is vital to supplement data generated during either the initial validation or abridged validation studies. To this end, each batch of analyses should include both "Negative Control" (blank matrix) and "Screen Positive Control" Samples (spiked at the Screening Target Concentration). If the "Screen Positive Control" sample gives a "Negative" result (i.e. less than the Cut-Off Value), the batch of analyses should be discarded. Similarly, if the "Negative" control samples give a Positive result (i.e. above the Cut-Off Value), the batch of analyses should be discarded. In both cases, there should be an investigation into why the test has failed and remedial action taken. Results from these samples should be recorded continuously and these data should verify that the screening test works reliably and has a false-compliant rate of no more than 5% for the target analytes.

The choice of analytes to include in routine QC samples should follow the same rules as those selected for the initial or abridged validation exercise *i.e.* the worst-case analytes that are listed in the method scope or the most relevant analyte in a national control plan.

The use of spiked samples as QC is applicable to qualitative tests (e.g. tube tests (Premi®Test, Delvotest®, COPAN®, etc...), receptor-based tests (Tetrasensor®, Twinsensor®), semi-quantitative (e.g. ELISA kits) and quantitative tests (e.g. LC-MS/MS methods).

It is more problematic (for the reasons described in section 4.3.) to use spiked matrix QC samples for microbiological growth inhibition plate tests. In such cases, positive QC samples should at least be the spiked antibiotic standard paper discs (for each plate). However it is highly preferable to use incurred samples where possible, or spiked 'simulated tissue' slices as used during the initial and abridged validation phases.

The goal of continuous verification is to produce more than 20 quality control results within 12 months. QC samples should be stored for a period determined by the laboratory according to stability data available for the analyte/matrix. The data obtained with the QC samples should be stored and remain traceable as long as the method is used in the laboratory. This includes routine use of commercially available test kits.

The results obtained from the QC samples should be used to supplement the initial and abridged validation data. They may be used to verify:

- the method performance;
- batch quality of commercially available test kits;
- quality and stability of reagents and
- the skill and test performance of the technicians carrying out the analyses.

Within 12 months of routine use of the method, all available validation data (from initial validation, abridged validation and quality control) should be statistically analysed. If the number of quality control samples is below 20, additional validation samples must be carried out. The sum of initial validation results, abridged validation results and ongoing QC results for the "Screen Positive Control" samples should raise at least 40 samples during the first year. Then the number of QC should reach 20 samples each subsequent year. If the test is working reliably and is robust, no more than 5% of these 40 or 20 "Screen Positive Control" samples should fall below the Cut-Off Level of the test. If the

method is not currently employed in the laboratory, the number of QC could be reduced during the subsequent years.

7.2. Proficiency tests

Regular participation in relevant proficiency tests is strongly recommended. On an annual basis the CRLs for analytes run proficiency tests for selected analytes for which they have responsibility. There are also other commercial providers in the veterinary drug analyte field and the relevant CRLs can give further information on the options available. Investigations and corrective actions should be undertaken and documented whenever questionable or unsatisfactory results are obtained.

8. Validation report

When a screening method has been validated, either in the originator laboratory (initial validation) or in the receptor laboratory (abridged validation), a report of the validation study should be drawn up. The initial validation report should:

- identify the application range of the method, including the ruggedness statements, concentration range, matrices, species, matrix conditions and laboratory conditions;
- describe the validation study design, including the prerequisites, assumptions and formulae used in the design of an experimental plan;
- provide and summarise the results for all validation parameters,
- identify conditions which do not allow reliable analysis to be performed;
- address interferences observed during validation studies or during the analysis of quality control samples (these ongoing QC data will be added to the validation report later);
- establish for inhibitor tests a list of the different analytes which have produced a result above the cut-off level for each analyte/matrix combination on each plate;
- if applicable, provide results of participation in proficiency tests.

When a screening method has been transferred, the receptor laboratory should have access to the original validation report. Additionally the receptor laboratory should:

- document the source of the method (i.e. from where it was transferred);
- cross reference the initial validation data, with data used from scientific publications or other sources (including references);
- document on the results of the abridged validation study which it has carried out to verify that the method works reliably in their hands.

9. References

- [1] EC 2002. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Official Journal of the European Community*. L 221:8-36.
 - [2] EC 2009. Council Regulation (EC) No 470/2009 of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90. *Official Journal of the European Community*. L 152:11-22.
 - [3] EEC 1990. Council Regulation (EEC) N° 2377/90 of 26 June 1990: laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Community*. L224:1-8.
-

- [4] EC 2005. Commission Decision 2005/34/EC of 11 January 2005 laying down harmonised standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries. *Official Journal of the European Community*, L 16: 61-63.
- [5] CRL Guidance Paper of 7th December 2007. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans, 1-8.
- [6] M. Gaugain-Juhel, B. Delépine, S. Gautier, M.P. Fourmond, V. Gaudin, D. Hurtaud-Pessel, E. Verdon, P. Sanders. 2009. Validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk : qualitative approach. *Food Additives & Contaminants: Part A*. *In press*.
- [7] V. Gaudin, C. Hedou, and P. Sanders. 2007. Validation of a Biacore Method for Screening Eight Sulfonamides in Milk and Porcine Muscle Tissues According to European Decision 2002/657/EC. *JOURNAL OF AOAC International*. 90 (6) 1706-1715.
- [8] V. Gaudin, P. Maris, R. Fuselier, J.L. Ribouchon, N. Cadieu, A. Rault. 2004. Validation of a microbiological method : the STAR protocol, a Five Plate Test, for the screening of antibiotic residues in milk *Food Additives & Contaminants*, 21 422-433.
- [9] V. Gaudin; C. Hedou; A. Rault; P. Sanders; E. Verdon. 2009. Comparative study of 3 screening tests, Explorer® test, Premi®Test 2 microbiological tube tests and a multi-sulphonamides ELISA kit, for the detection of antimicrobial and sulphonamide residues in eggs. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 26 (4) 427–440.
- [10] V. Gaudin, C. Hedou and E. Verdon. 2009. Validation of a wide-spectrum microbiological tube test, the EXPLORER® test, for the detection of antimicrobials in muscle from different animal species. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 26 (8) 1162–1171. .
- [11] B. Jülicher, P. Gowik and S. Uhlig. 1998. Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173.
- [12] P. Gowik, B. Jülicher and S. Uhlig. 1998. Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221.
-

10. Annexes

Annex I. Determining Cut-Off Levels and CC β in a semi-quantitative screening test.

Example A:

- MRL = 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- Desired Screening Target Concentration = 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Twenty (or multiples thereof) different blank matrix samples are selected. Replicates of these samples are spiked at the Screening Target Concentration, in this case 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

The matrix blank samples and spiked samples are analysed, preferably over a number of different days. The range of responses in the blank samples is examined. The **highest response in the blank** samples is noted – in this case it is 0.137 units. The **lowest response in the spiked** samples is noted – in this case it is 0.252 units.

In the case shown none of the responses of the spiked samples overlaps with the range of responses of the blanks. Therefore we can say that **the CC β of this screening method is less than or equal to 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.**

In the example shown we can see that the lowest response is 0.252. Therefore **the Cut-Off Level of this test is 0.252 units.** Any sample giving a response greater than this level is deemed to be a 'screen positive' and exceeds the CC β of the screening method.

Sample Number	Negative Samples	Spike @ 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	0.000	0.355
2	0.090	0.252
3	0.000	0.532
4	0.000	0.554
5	0.000	0.408
6	0.070	0.501
7	0.000	0.524
8	0.015	0.559
9	0.000	0.471
10	0.010	0.661
11	0.070	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.640
16	0.137	0.750
17	0.112	0.655
18	0.120	0.660
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

For this test, as a batch acceptability criterion, the response generated by the "Screen Positive Control Sample" must be ≥ 0.25 units otherwise the batch is rejected.

Example B:

- MRL = 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
- Desired Screening Target Concentration = 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

In this example the **highest response in the blank** samples is 0.137 units. However the **lowest response in the spiked** samples is noted – in this case it is 0.132 units.

In this case there is an overlap between the two sample populations which is greater than 5% (the responses of two of the spiked samples are less than the highest response in the blank samples).

A clear Cut-Off Level can not be established (due to the overlap of responses between blank and spiked samples). From these data it can be inferred that **CC β must be greater than 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$** and the **Screening Target Concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ can not be reliably detected using this method.**

Either the method must be modified, or the validation study repeated using a higher Screening Target Concentration (provided this can be kept at or below the MRL).

Sample Number	Negative Samples	Spike @ 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	0.000	0.355
2	0.090	0.132
3	0.000	0.532
4	0.000	0.554
5	0.000	0.135
6	0.070	0.501
7	0.000	0.524
8	0.015	0.559
9	0.000	0.471
10	0.010	0.661
11	0.070	0.642
12	0.129	0.724
13	0.046	0.596
14	0.034	0.599
15	0.041	0.640
16	0.137	0.750
17	0.112	0.655
18	0.120	0.660
19	0.132	0.695
20	0.063	0.635

Annex II. Determining Cut-Off Levels and $CC\beta$ in a semi-quantitative screening test.

Threshold value T:

$$T = B + 1.64 \times SDb \text{ or technical threshold.}$$

B the mean response and "*SDb*" the standard deviation of blank samples.

Cut-off factor Fm:

$$Fm = M - 1.64 \times SD$$

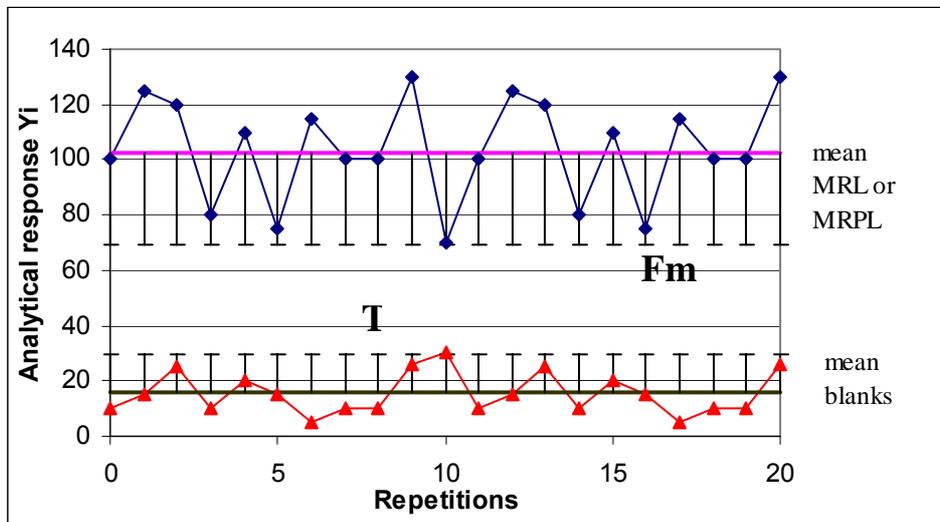
M the mean response and "*SD*" the standard deviation of spiked samples.

For ELISA tests, the response (B/B0 %) is inversely proportional to the concentration. Therefore:

$$Fm = M + 1.64 \times SD$$

Threshold value T and cut-off factor Fm are matrix-specific.

Graphical representation of threshold value T and "cut-off" factor Fm.



Between the mean of blanks *B* and *T* the false positive rate is higher than 5 %.

According to the Commission Decision 2002/657/EC [1], the detection capability is validated when: $Fm > B$.

Also the laboratory has to determine the rate of false positive (FP) which is acceptable with the method.

If $B < Fm < T$, the false positive rate is higher than 5 %.

In case of $Fm > T$, the rate of FP is below 5 %.

Annex III. Validation of quantitative and semi-quantitative methods according to the alternative approach.

Validation according to the alternative approach is derived from the principles of the experimental design used for confirmatory methods (cf. alternative approach in Commission Decision 657/2002/EC).

According to this approach, at least 8 samples have to be selected following an orthogonal design. Each sample has to be divided into at least 4 aliquots and to be spiked on 4 concentrations around the MRL. If samples are no blank samples, their content has to be tested by means of a reference method.

It is recommended to include non-spiked blank matrix samples in order to get a measure of the method behaviour regarding blank samples. This serves to determine the false-positive rate and thus also serves economic ends, i.e. for each sample in the experimental plan, 5 aliquots have to be analysed. The total number of analyses then increases to 40.

The 32 or 40 sub-samples are processed on different days according to the orthogonal design. In the framework of this experimental plan, matrix and/or species can be varied on 2 levels each, forming 2 factors. Moreover the different conditions in the laboratories in which the method is to be used have to be taken into account by laying down further factors, each with two factor levels. When selecting the factors, exclusively noise factors (which cannot be controlled in routine analysis) are to be taken into consideration. This includes for example fluctuations in temperature or the operators' different skills.

It should be noted that skill and matrix influence the measured response through many different "paths". Quite often they provoke interactions with specific measurement conditions (e.g. certain skills are required only for certain matrices) or a change of precision under repeatability or reproducibility conditions. Therefore when it comes to design and analysis, one has to be aware that results might be affected not only by simple factorial "main" effects as in a ruggedness study, but also by interaction effects or "dispersion" effects (change of precision).

Up to 7 factors with principally predictable (reproducible) effects (such as incubation temperature or incubation time or skill) can be taken into account if the study comprises 8 different samples. With more samples, more factors with predictable effects can be taken into account. However, 3 to 7 factors are sufficient if they represent the major error sources.

In addition, effects from factors with unpredictable effects (e.g. effects from different technicians with equal skills or different lots or different measurement days) have to be taken into account. Factors with unpredictable effects (e.g. different lots of reagents or media) should be varied 8 times.³ Only the combined effect of these factors can be quantified.

With these factors and the corresponding variation levels the experimental plan is designed.

The following table describes a typical experimental design for 6 factors with predictable effects and 2 factors with unpredictable effects. Factor levels 1 and 2, respectively, represent the two categories or the two levels (high-low) of the respective factor.

Species	Factors with predictable effects					Factors with unpredictable effects			Spike levels [ppm]				
	Matrix	Storage of sample	Temperature	Incubation time	Skill	Day	Lot of reagent A	Lot of reagent B					
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	10	20	30	40
2	2	2	1	1	1	2	2	2	0	10	20	30	40
1	2	1	2	1	2	3	3	3	0	10	20	30	40
1	2	2	2	2	1	4	4	4	0	10	20	30	40
2	2	1	1	2	2	5	5	5	0	10	20	30	40
1	1	2	1	2	2	6	6	6	0	10	20	30	40
2	1	2	2	1	2	7	7	7	0	10	20	30	40
2	1	1	2	2	1	8	8	8	0	10	20	30	40

³ In case that not 8 lots are available, one might consider to deviate from the prescribed design and to use 4 lots only.

A statistical evaluation of the data is performed in order to provide both the required parameters and the concentration-response curve for the determination of the false non-compliant rate at different concentrations.

The evaluation is based on a generalised mixed linear model which is described in [Gowik/Uhlig 2009]. The calculations can be carried out by means of a special software, e.g. *InterVal bioscreen*.

If the outcome of the evaluation is not satisfactory with regard to the rate of false non-compliant or to the rate of false compliant, another cut-off level may be established. Then the calculation of the false-compliant rate and of the false non-compliant rate has to be repeated.

Note:

The reference contact for detailed information about the alternative matrix-comprehensive approach is the CRL Berlin.

References:

Uhlig/Gowik 2009: Factorial Interlaboratory Tests for Microbiological Measurement Methods Journal of Consumer Protection and Food Safety, 2010, DOI 10.1007/s00003-009-0524-z

InterVal bioscreen 2009, Software for in-house validation of biochemical screening methods. quo data GmbH, www.quodata.de.

Ⅱ. 分担研究報告

3. 課題5:抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之

食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題 5 : 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

研究要旨

我が国では、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おり、と畜場などの検査室を中心にスクリーニング検査法として汎用されている。昨年度は、簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法により同一の検体を検査して、得られた検査結果の比較を行った。その結果、機器分析法では、ほぼ全ての抗生物質で正しい測定結果を得ることが可能であったが、簡易検査法ではテトラサイクリン系抗生物質の一部を除いて、多くの抗生物質で正しい検査結果を得ることが出来なかった。これらの問題に適切に対応するためには、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が必要であると考えられる。本年度は、これまでに調査した欧米等で用いられているバイオアッセイ法に関する知見を基に、より高感度な検査が可能となるように、簡易検査法の改良を試みた。はじめに、本検査法で規定されている抽出液量 20 mL を半量の 10 mL とすることで、試験溶液中における分析対象化合物の濃度が高くなり、より正しい検査結果を得ることが可能であるかを検討した。また、本法で規定されている試験菌を、米国の公定法など(7-plate 法、STOP 法、FAST 法)で使用されている試験菌(*K. rhizophila*、*S. epidermidis*、*B. megaterium*)に変更して検査を実施した。本検討では、マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、キノロン系抗生物質、サルファ剤、合成抗菌剤など、15 種の抗生物質を検査対象とした。その結果、抽出液量を半量とした場合には、テトラサイクリン系抗生物質及びエリスロマイシン以外では、すべて陰性と判定された。本検討結果は、抽出液量を 20 mL とした公定法に準拠した場合と明確な差は認められなかった。また、米国の公定法等で使用されている試験菌を用いた検討では、添加試料と標準溶液の両方で阻止円が認められた試料は認められなかった。このため、これらの試験菌を用いる場合には、抽出溶液の pH などを詳細に検討して使用する必要があると考えられた。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、試料からの抽出方法、精製方法等を含めて、試験法の大幅な見直しが必要であると考えられた。

A. 研究目的

畜水産物に残留する抗生物質の検査法は、分析対象化合物を高感度、高精度に分析することが可能な LC-MS/MS 等の分析機器の普及に伴い、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、検査が困難な化合物が存在する一方で、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、と畜場等の検査室を中心に、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、平成 6 年に示された「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。これらの検査法は、試料の前処理が簡便であり、多数の検体を同時に検査することが可能である。

一方で、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、抗生物質の種類を同定するところが出来ない等の課題点が指摘されている。

近年では、抗菌性物質の不適切な使用を背景として、薬剤耐性菌が世界的に増加しており、国際社会でも大きな課題となっている。これら薬剤耐性の問題に適切に対応するためにも、国際的に整合性のある新たな試験体系・試験法の提案が必要と考えられる。しかしながら、欧米等で実施されている畜水産物中の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法について、その詳細を調査した報告は極めて少ない。そこで、平成 28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる公定検査法の整備状況、検査法の概要等を調査した。多くの国で、現在でも様々なバイオアッセイによる検査が残留抗生物質のスクリーニング検査法として用いられていることを明らかにした。しかし、いずれの検査法においても、試料マトリックスの影響による誤判定、検出限界濃度が高く基準値判定には適用できないなど、我が国のバイオアッセイ法と同様に、多くの課題点が認められた。平成 29 年度には、簡易検査法による検査結果の信頼性を評価するために、同一試料を簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法とで、検査を実施して、得られた検査結果の比較を行った。マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、セファロスポリン系、キノロン系抗生物質、サルファ剤、合成抗菌剤など、30 種の抗生物質を検査対象とした。その結果、機器分析法では、ほぼ全ての抗生物質で正しい測定結果を得ることが可能であったが、簡易検査法ではテトラサイクリン系の複数の抗生物質を除き、多くの抗生物質で偽陰性と判定された。本研究で検討した範囲においては、簡易検査法では偽陰性と判定される抗生物質が多く存在する可能性が高いことが示されたが、簡便で多検体を同時に検査がで

きるなどの利点も多くあることから、今後は、簡易試験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。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。はじめに、簡易検査法で規定されている抽出液量 20 mL を半量の 10 mL とすることで、検出感度が上がり、より正しい検査結果を得ることが可能であるかを検討した。また、本法で規定されている試験菌 (*M. luteus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*) を、米国の公定法等 (7-plate 法、STOP 法、FAST 法) で使用されている試験菌 (*K. rhizophila*, *S. epidermidis*, *B. megaterium*) 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

1) 試料

牛の筋肉を用いた。

2) 分析対象化合物

表 1 に示す 15 種類の抗生物質を対象とした。マクロライド系抗生物質 3 化合物 (エリスロマイシン、オレアンドマイシン、タイロシン)、テトラサイクリン系抗生物質 3 化合物 (オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)、ペニシリン系抗生物質 1 化合物 (ベンジルペニシリン)、キノロン系抗生物質 3 化合物 (フルメキン、エンロフロキサシン、オキシソリン酸)、サルファ剤 3 化合物 (スルファジメトキシシン、スルファジアジン、スルファモノメトキシシン)、合成抗菌剤 2 化合物 (クロピドール、クロラムフェニコール)。

3) 添加濃度

牛の筋肉の残留基準値を超過する最低の濃度を添加濃度とした。(表 1)

4) バイオアッセイ法

平成6年7月1日付衛乳第107号中の厚生労働省「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」を基に改良を行った。試料5gにクエン酸・アセトン緩衝液20mL、または10mLを加えてホモジナイズ抽出した後、ろ紙でろ過した。それぞれの抽出液にペーパーディスクを浸漬した後、これを検査用平板上に置き、ピンセットを用いて平板に固着させた。これを30分間冷蔵で放置した後、30℃で18時間培養した。培養後の阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した。また、添加濃度に調製した抗生物質の標準溶液に浸漬したペーパーディスクを陽性対照、クエン酸・アセトン緩衝液に浸漬したペーパーディスクを陰性対照として、同一の平板で培養した。(スキーム1)

4-1) 試験菌

クエン酸・アセトン緩衝液の抽出液量を変化させた検討では、簡易検査法に規定されている試験菌(*Micrococcus luteus* ATCC9341、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Bacillus mycoides* ATCC 11778)を用いた。一方で、米国の公定法など(7-plate法、STOP法、FAST法)で使用されている試験菌としては、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341a、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Bacillus megaterium* ATCC 9885を用いた。

4-2) 試液及び培地

クエン酸一水和物、水酸化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、アセトンは、富士フィルム和光純薬工業製のものを用いた。アンピシリンナトリウム、カナマイシン硫酸塩、オキシテトラサイクリン塩酸塩は、富士フィルム和光純薬製を用いた。普通寒天培地(日水製薬製)、感受性測定用ブイヨン(日水製薬製)、Antibiotic Medium 4 (Difco製)、Antibiotic Medium 5 (Difco製)、Antibiotic Medium 8 (Difco製)、Antibiotic Medium 11 (Difco製)、Mueller Hinton Ager (日本BD製)を

用いた。

4-3) 装置

安全キャビネット:LAL-1300XA2(オリエンタル技研工業製)、オートクレーブ:LSX-500(トミー精工製)、恒温槽:MIR-262(サンヨー製)、遠心分離機:H-201FR(コンサン製)、ペーパーディスク(直径10mm、厚さ1.1~1.2mm)を用いた。

4-4) 判定方法

阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した。なお、陽性対照において、阻止円が形成されない平板は、検査が成立していないものとし、3プレートの中で、2枚以上のプレートの阻止円の直径の平均値で判定した。

C. 研究結果及び考察

1. 抽出液量が検査結果に与える影響に関する検討

昨年度に、30種類の抗生物質を対象として、残留基準値を超過する濃度の抗生物質を添加した牛の筋肉及び肝臓を検体として検査を実施したところ、多くの抗生物質で阻止円が形成されず、陰性と判定された。更に、標準溶液を用いた試験区においても、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。このことから、現行の検査法では、検出限界が高く、基準値濃度の判定が困難であるものと考えられた。そこで、本年度は、試験溶液中の分析対象化合物の濃度を高くするために、クエン酸・アセトン緩衝液の液量を現行の20mLから半量の10mLに変更して検査を実施した。牛の筋肉を試料として、簡易検査法により検査した結果を表2に纏めた。本法では、3種の試験菌(*M.luteus*、*B.subtilis*、*B.mycoides*)を用いて、1枚の平板に陽性対照(抗生物質の標準溶液)、陰性対照(クエン酸・アセトン緩衝液、牛の筋肉の抽出液)、添加試料から得られた抽出液を浸漬したペーパーディ

スク、計 4 枚を培地に静置して培養を行った。各平板の培養後の写真を図 1 に示した。平板上では、上段左に牛の筋肉の抽出液、上段右に添加試料から得られた抽出液、下段左にクエン酸・アセトン緩衝液、下段右には、標準溶液を浸潤したペーパードискを静置した。その結果、正しく陽性と判定された検体は 4 化合物(エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)のみであった。また、検査したすべての平板において、陰性対照からは阻止円は認められなかったが、陽性対照とした標準溶液を用いた試験区では、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。これらの検討結果は、抽出液量を 20 mL とした現行の検査法と殆ど同様の結果であった。抽出液量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が高くなり、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。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、検査法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。

2. 試験菌の種類が測定結果に与える影響に関する検討

現行の簡易試験法では、3 種の試験菌(*M. luteus*、*B. subtilis*、*B. mycoides*)を用いて検査を行うこととされている。先の抽出液量を半量した検討結果からも、基準値濃度の判定に適用可能な検査法にするためには、大幅な試験法の改良が必要と考えられた。そこで、本検討では、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、検査を行った。試験菌は、7-plate 法で使用されている *K. rhizophila*、*S. epidermidis* の他、スワブテスト・オンプレミス法(STOP 法: Swab Test On Premises)、STOP 法を改良したファスト法(FAST 法: Fast Antimicrobial Screening Test)で用いられている *B. megaterium* を用いた。牛の筋肉を試料として、検

査した結果を表 3 及び図 2 に纏めた。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、多くの試験菌と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

本研究では、簡易検査法の高感度化に向けた検討として、クエン酸・アセトン緩衝液の液量を半量に減らして検査を実施した。また、米国の公定法等で用いられている試験菌 3 種(*K. rhizophila*、*S. epidermidis*、*B. megaterium*)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、陽性対照、添加試料共に、阻止円が形成される抗生物質及び試験菌の組み合わせは殆ど認められなかった。以上のことから、簡易検査法をより高感度に検査が可能な方法とするためには、検査法の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。今後は、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。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

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)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 分析対象化合物及び添加濃度

抗生物質の系統	分析対象化合物	添加濃度 (ppm)
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0.25
	オレアンドマイシン	0.055
	タイロシン	0.15
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0.25
	クロルテトラサイクリン	0.25
	テトラサイクリン	0.25
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0.055
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0.55
	エンロフロキサシン	0.055
	オキシリン酸	0.15
サルファ剤	スルファジメトキシ	0.055
	スルファジミジン	0.15
	スルファモノメトキシ	0.015
合成抗菌剤	クロピドール	0.25
	クロラムフェニコール	0.00055

スキーム1 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改訂）のフローチャート

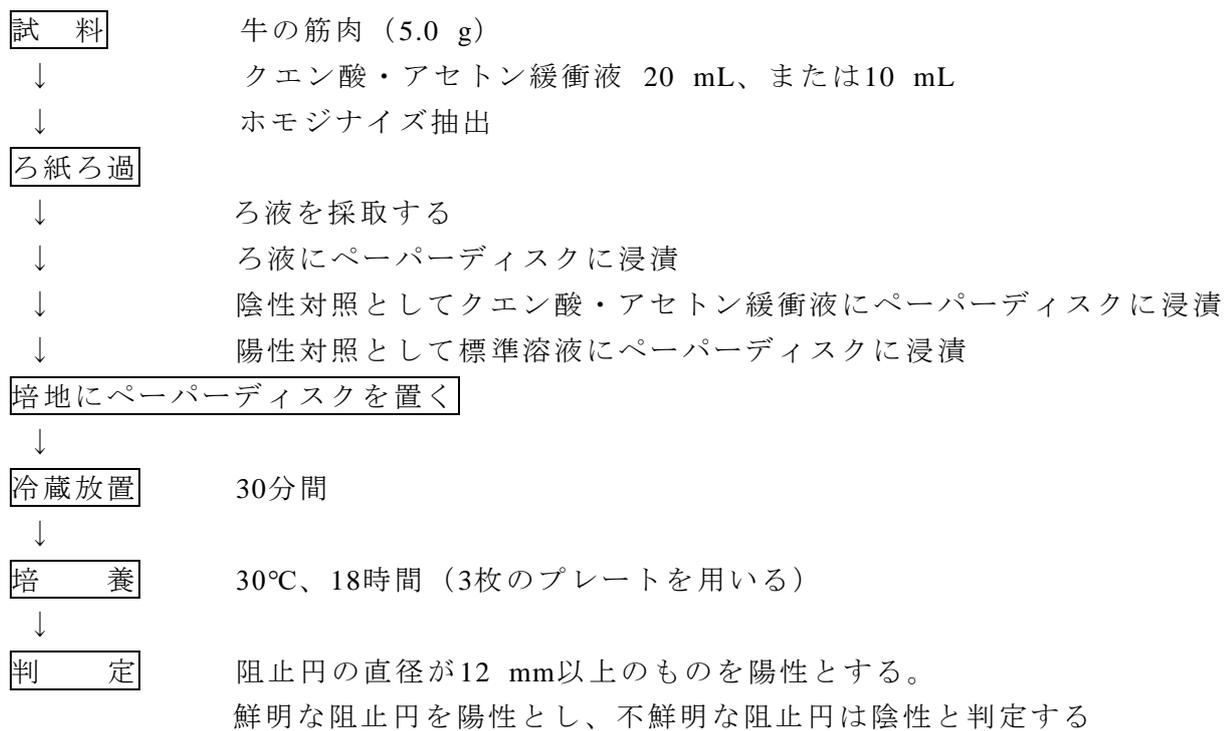
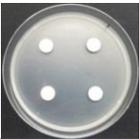
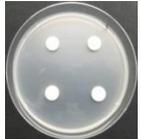
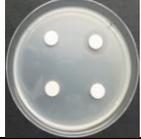
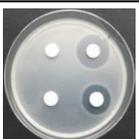


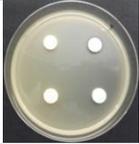
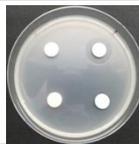
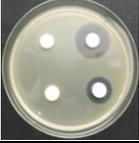
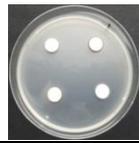
表 2 抽出液量を 10 mL としたときの検査結果

抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)									判定
		<i>M. luteus</i>			<i>B. mycoides</i>			<i>B. subtilis</i>			
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	23	17	0	13	12	0	16	13	陽性
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	タイロシン	0	15	0	0	0	0	0	0	0	陰性
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	12	0	0	21	16	0	13	12	陽性
	クロルテトラサイクリン	0	17	12	0	26	22	0	23	18	陽性
	テトラサイクリン	0	13	0	0	22	16	0	20	13	陽性
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	26	19	0	0	0	0	13	0	陰性
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	15	0	陰性
	オキソリン酸	0	0	0	0	0	0	0	14	0	陰性
サルファ剤	スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性

表3 米国の公定法で使用されている試験菌を用いた検査結果

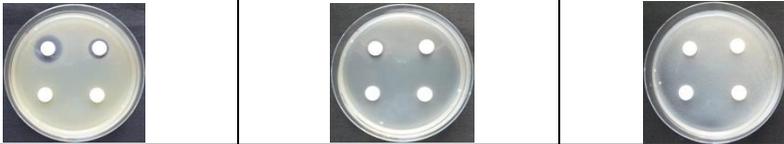
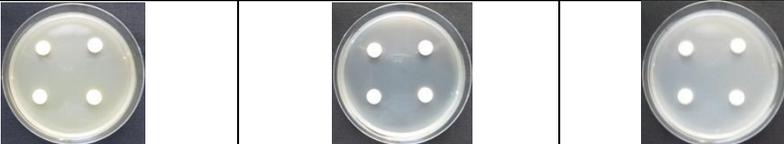
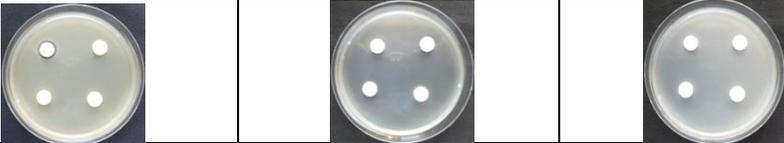
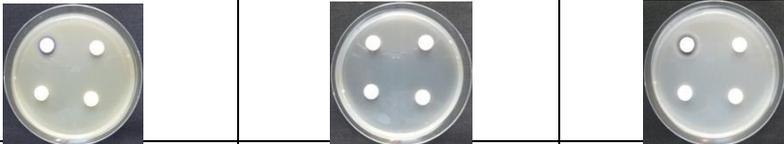
抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)								
		<i>K. rhizophila</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>B. megaterium</i>		
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	21	15	0	13	0	0	0	0
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	タイロシン	0	13	0	0	0	0	0	0	0
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	13.5	0	0	0	0	0	13	0
	クロルテトラサイクリン	0	16	11	0	0	0	0	15	0
	テトラサイクリン	0	12	0	0	0	0	0	0	0
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	27	20	0	0	0	0	0	0
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	14	0	0	17	13
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	0	12
	オキシリン酸	0	0	0	0	0	0	0	0	13
サルファ剤	スルファジメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファモノメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0

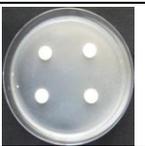
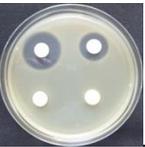
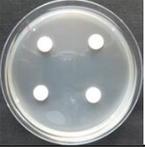
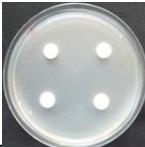
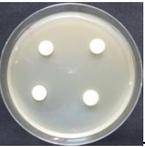
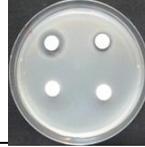
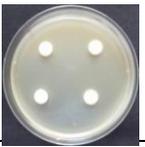
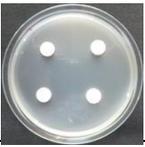
抗生物質		試料	試験菌及び阻止円の直径 (mm)		
			<i>M. luteus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	添加試料	23	13	16
		標準溶液	17	12	13
					
	オレアンドマイシン	添加試料	0	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
	タイロシン	添加試料	15	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	添加試料	12	21	13
		標準溶液	陰性	16	12
					
	クロルテトラサイクリン	添加試料	17	26	23
		標準溶液	12	22	18
					

	テトラサイクリン	添加試料	13	22	20
		標準溶液	陰性	16	13
					
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	添加試料	26	陰性	13
		標準溶液	19	陰性	陰性
					
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	添加試料	陰性	陰性	12
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	エンロフロキサシン	添加試料	陰性	陰性	15
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	オキシリン酸	添加試料	陰性	陰性	14
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
サルファ剤	スルファジメトキシ	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性

	スルファジミジン	添加試料			
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
		添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
合成抗菌剤	クロピドール	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	クロラムフェニコール	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					

図 1 抽出液量を 10 mL としたときの簡易検査法の検討結果

抗生物質		試料	試験菌及び阻止円の直径 (mm)		
			<i>K. rhizophila</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. megaterium</i>
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	添加試料	21	13	0
		標準溶液	15	0	0
					
	オレアンドマイシン	添加試料	0	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
	タイロシン	添加試料	13	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	添加試料	14	0	13
		標準溶液	0	0	0
					
	クロルテトラサイクリン	添加試料	16	0	15
		標準溶液	11	0	0

					
	テトラサイクリン	添加試料	12	0	12
		標準溶液	0	0	0
					
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	添加試料	27	0	0
		標準溶液	20	0	0
					
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	添加試料	0	14	17
		標準溶液	0	0	13
					
	エンロフロキサシン	添加試料	0	0	12
		標準溶液	0	0	0
					
オキシリン酸	添加試料	0	0	13	
	標準溶液	0	0	0	
					
サルファ剤	スルファジメトキシ	添加試料	0	0	0

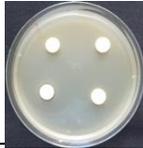
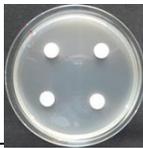
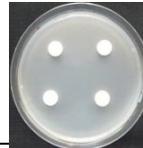
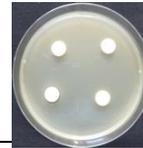
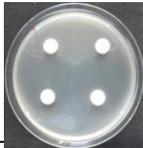
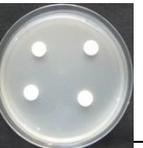
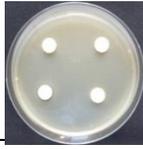
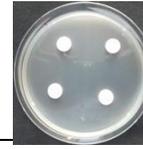
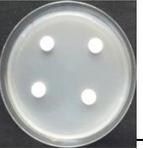
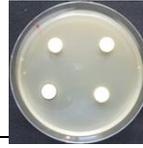
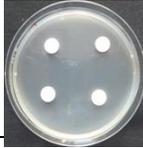
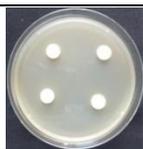
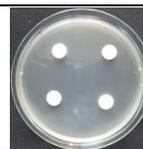
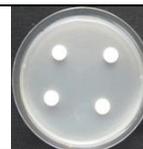
		標準溶液	0	0	0	
						
	スルファジミジン	添加試料	0	0	0	
		標準溶液	0	0	0	
						
	スルファモノメトキシ	添加試料	0	0	0	
		標準溶液	0	0	0	
						
	合成抗菌剤	クロピドール	添加試料	0	0	0
			標準溶液	0	0	0
						
		クロラムフェニコール	添加試料	0	0	0
標準溶液			0	0	0	
						

図 2 試験菌を変更して実施した簡易検査法の検討結果

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	256	140～ 148	2018

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の分析法に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部・第一室長
(氏名・フリガナ) 根本 了・ネモト サトル

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の分析法に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 坂井 隆敏・サカイ タカトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 食品中残留農薬等の分析法に関する研究
3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 志田 静夏・シダ シズカ
4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年3月28日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田晴宏

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 2. 研究課題名 食品中残留農薬等の分析法に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 食品部・主任研究官
(氏名・フリガナ) 菊地 博之・キクチ ヒロユキ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。