

MRL（残留基準）設定に対応する抗菌性物質の新たな分析・サンプリング手法の確立について

村山三徳

厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所（〒 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1）

1. はじめに

平成 17 年度導入予定の通称ポジティブリスト制により、畜水産食品に残留する抗菌性物質を始めとする動物用医薬品、農薬の規制が大きく変わろうとしている。従来は、毒性評価に基づき残留基準が設定された一部のものを除き、食品は抗菌性物質を含有してはならない、また、食肉、食鶏卵および魚介類は化学的合成品たる抗菌性物質を含有してはならないと規定されていたが、ポジティブリスト制により各化合物に残留基準または暫定基準が設けられる。

これに伴い、抗菌性物質の分析法は、従来の抗菌活性を指標とした微生物学的試験法から、化合物を特定するための理化学的試験法へとシフトしつつある。本稿では、MRL 設定に対応する抗菌性物質の分析法の今後を探る一助として、厚生労働省が示した畜水産食品に残留する動物用医薬品の告示試験法、通知試験法の現状と将来の展望を紹介する。

2. 残留動物用医薬品の公定試験法

公定試験法は食品の安全性を確保するために、定性、定量両面での高い精度が要求される。

残留動物用医薬品の分析法として主なものは、抗菌活性を指標とする微生物学的試験法と、化合物の化学的性質に基づく理化学的試験法がある。

一般的に、微生物学的試験法は、操作が簡便で、高価な装置類を必要とせず、多数の試料を同時に分析することができるが、定性、定量能力では理化学的試験法が優れている。

1990 年以前の通知試験法では、抗生物質 31 種類に対して微生物学的試験法が採用され、合成抗菌剤など 35 種類に対してガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）などの理化学的試験法が採用されていた。一方、1990 年以降に示された約 50 種類の残留動物用医薬品についての告示試験法、通知試験法は、そのほとんどが HPLC によるもので、さらに 2000 年以降は定量試験または確認試験に HPLC—質量分析装置（LC/MS）の使用が求められるようになった。微生物学的試験法はスピラマイシン試験法の一部およびベンジルペニシリン試験法のみを採用されているが、スピラマイシン試験法の一部は、残留基準が抗菌活性を指標として定められている唯一の例であり、ベンジルペニシリン試験法は、理化学的試験法では必要な感度が得られなかった唯一の例である。

今後、導入が予定されているポジティブリスト制では、食品の種類毎に、また化合物毎に基準値または暫定基準値が定められるので、化合物を特定した上での定量が重要であり、残留分析法としては理化学的試験法の重要性がさらに増すと考えられる。しかしながら、基準の増加に伴い要求される試験数も増加するであろうことを踏まえると、微生物学的試験法の簡便さ、試料処理能力の

高さは、けっして無視することのできない利点であり、各試験法の長所を生かして、より効率のかつ確実な分析法を構築する必要がある。

3. 残留分析法の開発

告示試験法、通知試験法の開発は、公的研究機関および登録検査機関などで分析法開発に従事している研究者からなる試験法検討委員会により行われている。

公定試験法は、定性、定量両面での高い精度が要求されるとともに、より多くの試験検査機関において実施可能な方法でなければならない。したがって分析法開発の第一選択肢は、従来法の適用または改良である。従来法では分析が困難な場合は、諸外国で採用されている方法あるいは学術論文などに発表されている方法を元にして、国内の試験検査機関が実施可能な方法を検討する。

告示試験法、通知試験法は、試験溶液の調製および測定操作からなる。

1) 試験溶液の調製

試験溶液の調製は、抽出、精製、濃縮および必要に応じて誘導体化により行われる。

抽出操作は試料に抽出溶媒を加えて、超高速ホモジナイザーにより細胞レベルまで破碎し、激しく振とうする方法が多い。

精製操作は液-液分配、固層抽出が汎用されている。固層抽出法は適切な操作条件を設定することにより、目的化合物を効果的に回収することができる便利な方法であるが、用いる固層によっては製品間、ロット毎の特性にかなり差がある場合があるので注意を要する。

誘導体化は目的化合物の測定感度を上げるため、また試験溶液の精製効率を高めるために行われる。誘導体化反応は用いる試薬、反応時間、温度など様々なファクターの影響を受けるので、検量線作成用の標準溶液についても同時に誘導体化して反応率の補正を行う。

2) 測定操作

告示試験法、通知試験法の測定操作は、一般的

に定性、定量、確認試験からなる。

HPLCによる測定の場合、定性試験は標準品と比較して保持時間の一致を確認する。定量試験は、ピーク高さあるいはピーク面積を求めて、絶対検量線法、内標準法などにより算出する。確認試験は、紫外-可視吸収スペクトル、蛍光スペクトル、質量スペクトルなどが標準品と一致することを確認する。

4. 分析法のバリデーション

バリデーションとは、分析法の誤差が原因で生じる分析の判定の誤りの確率が許容できる程度である（分析の目的に適合している）ことを科学的に立証することである。

試験法のバリデーションについては、公定法など多数の検査機関で普遍的に実施される標準試験法に対して行われる、共同実験によるバリデーション (Collaborative study, Interlaboratory study) と、個々の試験室にて行われる試験法に対して行われる、試験室単位でのバリデーション (Inhouse validation, Single laboratory validation) がある。

共同実験によるバリデーションは多数の研究室により、併行精度、室内再現精度、室間再現精度を求める。用いる試料、試薬、機器、データの取り扱いなど全てにわたり、詳細な計画に基づいて実施される。現在最も評価されているガイドラインとしては、「Guidelines for Collaborative Study Procedures to Validate Characteristics of a Method of Analysis (Appendix D: AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2002))」, 「JIS Z8402 測定方法及び測定結果の精確さ」などがある。

試験室単位でのバリデーションは、試験室の数以外に共同実験によるバリデーションに準じて行われるべきものである。最も評価されているガイドラインとしては、「Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analysis (IUPAC technical report: Pure Appl. Chem. 74(5), 835-855 (2002))」, 「JIS Z8402-6 精確さに関する値の実用的な使い方, 7.2 以前に評価されていない試験室による、ある測定方法の使用の評価」などがある。

公定試験法のバリデーションも上記ガイドラインなどに準じて実施しているが、上記ガイドラインを厳密に適用すると、労力、時間、費用など全てにおいてかなりの負担となる。残留有害物質に対応しなければならない緊急時においては、早急に試験法を開発し、より速やかに検査態勢を整備しなくてはならない。したがって、緊急時には独自の試験法迅速作成ガイドラインを設けて試験法開発にあたることもある。代表的な試験法迅速作成ガイドラインの概要を以下に示す。緊急時においても、試験法の信頼性を確保するためには、以下の要求を満たす必要がある。

食品毎に、試験法を検討する物質の基準値（基準値が設定されていない場合は想定される定量下限）濃度を添加し、検討した試験法の測定結果から、以下のパラメータを推定する。

1) 選択性

無添加（ブランク）試料について定量操作を行い、定量を妨害するピークがない、あるいはピークを認める場合には基準値（基準値が設定されていない場合は想定される定量下限）相当量の 1/5 ～ 1/10 以下であることを確認する。

2) 真度（回収率）

添加試料を定量し、得られた定量値と添加濃度を比較する。

LC/MS のように、食品により回収率の変動が大きい場合は、標準添加法あるいは安定同位体を用いる内標準法とする。

3) 精度（併行再現性）

添加試料の分析を併行して行い、定量値の標準偏差、相対標準偏差を求める。

可能であれば、複数の分析者（日）による室内再現性も評価する。

4) 確認法

下記から、3条件以上で標準品と保持時間、スペクトルが一致することを確認する。

- ・保持時間：クロマトグラフィー条件毎に標準品と比較する。
- ・紫外一可視吸収スペクトルを標準品と比較する。
- ・蛍光スペクトルを標準品と比較する。
- ・質量スペクトル：イオン化条件毎にスペクトルを標準品と比較する。

3条件の確認については、カラムの変更、移動相の変更、イオン化条件の変更についてもそれぞれ1条件として考える。LC/MS 以外は測定できないような場合では、移動相の変更、イオン化条件の変更などについても1条件として考える。LC/MS で特定の質量数で測定しており、スペクトルが得られない場合は、カラム極性の変更などで条件を変えて確認する。

5. 残留分析の実施

1) サンプリング

残留動物用医薬品の公定試験法には、試料についての採取および保存に関する包括的な規定は無いが、必要に応じて以下の趣旨の注意が通知されることがある。

(1) 試料の採取

畜水産食品に残留する動物用医薬品の分布は、その化学的性質（親水性、親油性、タンパク結合性など）により、また経口、皮下注射、筋肉注射、包埋、塗布などの使用方法により異

真度・精度の目標値

濃度 (ppm)	試行回数	回収率 (%)	併行再現性 (RSD%)	室内再現性 (RSD%)
～ 0.001	5	50 ～ 120	30>	35>
0.001 ～ 0.01	5	60 ～ 120	25>	30>
0.01 ～ 0.1	5	70 ～ 110	15>	20>
0.1 ～	5	80 ～ 110	10>	15>

なる。したがって、試料の採取を行う際には、可能な限り多くの部位から、可能な限り多量に採取した後、十分に均一化する必要がある。

残留動物用医薬品の試験法では1回の試験に5～10gの試料を用いるので、再検査、保存用試料を含めて200～400gが1試料あたりの最少必要量である。

残留試験において、試験法の標準作業書が吟味されたものであるにもかかわらず、測定値の再現性が低い場合は、試料の均一性に問題があることが多い。試料が均一でないと、測定値の信頼性が損なわれるばかりでなく、同一機関あるいは他機関による再検査の際に、異なる測定値が出ることもあるので、試料採取後の均一化は重要である。

(2) 保存

畜水産食品のほとんどは、元の生体活動が停止した時点から、酵素分解、酸化反応などにより成分変化が始まる。これらの変化が進むことにより、試験対象である残留動物用医薬品の分解、さらに試験を妨害する成分が生じることがあるので、試料採取後は速やかに試験を行うことが望ましい。

保存用試料の調製、あるいは採取後直ちに試験することが困難な場合は、可能な限り低温に、可能な限り急速に冷却することにより、酵素分解、酸化反応などの進行を抑えることができる。冷凍、解凍を繰り返すと、氷の結晶により組織が損傷を受け、成分変化が促進されるので、一回の試験に必要な量ずつに小分けした後、一定の低温下で保存することが望ましい。

2) 精度管理

分析法の信頼性は分析法のバリデーションにより証明される。精度管理は分析結果の信頼性を確保するために重要である。

精度管理については、各種分野でさまざまなガイドラインが示されている。食品衛生分野では、厚生省生活衛生局食品保健課長通知（平成9年4月1日・衛食第117号）「食品衛生検査施設等における検査等の業務の管理の実施について（別添）精度管理の一般ガイドライン」において、試験の実施、試験結果の取り扱い、試験結果の評価方法などについて記載されている。

6. まとめ

MRL設定に対応する抗菌性物質の分析法の今後を探る一助として、厚生労働省が示した畜水産食品に残留する動物用医薬品の公定試験法の現状と今後について紹介した。

定性、定量両面で高い信頼性を要求される公定試験法においては、理化学的試験法が第一選択肢として取り上げられている。その測定方法としては、現在最も定性、定量能力が高い技術としてLC/MSが一般的に用いられるようになった。

ポジティブリスト制の導入などにより、残留動物用医薬品分析への要求は質的にも、量的にも増加すると考えられる。微生物学的試験法と理化学的試験法それぞれの長所を生かして、信頼性を確保しつつ効率化を図ることが可能な分析法を構築する必要がある。

The Establishment of a New Analysis and Sampling Method of Antibacterials Corresponding to the MRL Setting

Mitsunori MURAYAMA

*National Institute of Health Sciences, Ministry of Health, Labour and Welfare,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan*

The regulation of residual veterinary drugs in foods will be changed in 2005. The Food Sanitation Law in Japan regulates residual antibacterials as follows, food shall not contain antibiotics and also meat, poultry eggs, fish and shellfish shall not contain synthetic antibacterials. After the positive list system is established, residual standard or tentative standard of every antibacterials will be installed for all foods.

According to the change in the standard, the analytical method of residual antibacterials is shifting to physical and chemical methods to specify a compound from microbiological methods which based on antibacterial potency. In this paper, the official methods of analysis for residual veterinary drugs in foods were introduced for help to probe into the future of the analytical method of antibacterials which cope with the MRL setting examination.

討 論（座長：小久江栄一 東京農工大）

質問（小久江栄一，東京農工大）

発表の中で紹介された，試験法迅速作成ガイドラインは公開されているか。

答（村山三徳）

紹介したガイドラインは，あくまで緊急を要する分析法開発のためのものであり，緊急時に必要に応じて

示されることはあるが，公式なガイドラインではない。厚生労働省では，分析法開発のためのガイドラインについての研究班を立ち上げる予定であるので，公式ガイドラインは研究班の検討結果を待ち公表されると思われる。今回紹介したガイドラインは，分析法に要求される最低レベルを示している。