

食品中残留農薬等の公示試験法開発について

国立医薬品食品衛生研究所・食品部

○志田（齊藤）静夏

【はじめに】

食品中に残留する農薬、飼料添加物及び動物用医薬品（農薬等）は食品衛生法で規制されており、平成 18 年からポジティブリスト制度が導入されている。現在、約 750 品目の農薬等に残留基準が設定されており、対象外物質を除き、基準値が設定されていない農薬等/食品には一律基準(0.01 ppm)が適用される。食品部では、残留基準への適否を判断するための公示試験法を地方衛生研究所や登録検査機関等の協力を得て整備している。これらの試験法は基準値の設定根拠となった（作物）残留試験で用いられた分析法等を参考に開発を行っており、現在、350 試験法以上が公示されている。本発表では、農産物を対象とした一斉試験法及び個別試験法 2 試験法（アセトクロール試験法、エトフメセート試験法）を例に、我々がどのように試験法の検討を行っているか紹介したい。

【一斉試験法の開発】

農産物を対象とした一斉試験法（LC/MS I 法¹、LC/MS II 法²及び GC/MS 法³）は、ポジティブリスト制度が告示された平成 17 年に規制対象農薬等/食品の大幅な増加に対応するため、開発された（食安発第 1129002 号、平成 17 年 11 月 29 日）。しかしながら、LC/MS I 法及び GC/MS 法は夾雑成分が多い茶葉等には適用できず、改良が望まれていた。また、LC/MS I 法では分析できない酸性農薬を対象とする LC/MS II 法についても、低回収率となる農薬が多い等の問題があった。そこで、これら 3 試験法について精製方法等を見直し、農薬の損失が少なく、夾雑成分の除去効果が高い方法を確立した。現在、試験法開発当初、対象としていなかった農薬の適用検討や妥当性評価試験を実施中である。加えて、新規測定法の適用性についても検討を行っている。LC/MS 法では LC-TOF-MS や LC-Orbitrap-MS を用いても一律基準濃度の農薬を定量可能であることを示した。GC/MS 法では大気圧化学イオン化（APCI）法を用いた測定を検討した。汎用されている電子イオン化（EI）法ではヘリウムの代替ガスとして窒素をキャリアーガスに用いると感度が大幅に低下するが、APCI 法では窒素を用いても大きな感度低下は見られず、選択性も大きな問題はなかったことから、特にヘリウムの入手が困難な際は有用な方法と考えられた。

¹ LC/MS による農薬等の一斉試験法 I（農産物）；² LC/MS による農薬等の一斉試験法 II（農産物）；³ GC/MS による農薬等の一斉試験法（農産物）

【個別試験法の開発】

[1] アセトクロール試験法の開発

アセトクロール (図 1(a)) は酸アミド系除草剤である。我が国では農薬登録されていないが、アメリカや中国等では大豆やとうもろこしなどの栽培に用いられている。平成 28 年に暫定基準及び規制対象の見直しが行われ、規制対象は「アセトクロール並びに塩基性条件下で EMA 及び HEMA に変換される代謝物をアセトクロールに換算したものの和」とされた (図 1(b))。本試験法の開発で参考とした残留試験の分析法は、市販されていない安定同位体標識化合物を内標として用いて、変換反応での損失やマトリックスの影響を補正して定量する方法であり、公示試験法として採用することはできなかった。そこで、反応条件や精製方法等を検討し、操作中の損失やマトリックスの影響がほとんどなく、内標を用いずに定量可能な方法を確認した。本法は「アセトクロール試験法 (農産物)」として厚生労働省より通知された (生食発 1012 第 1 号、令和 4 年 10 月 12 日)。

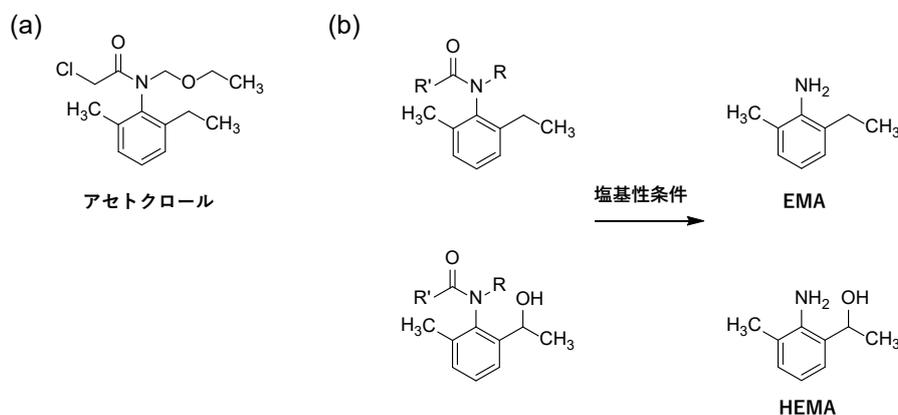


図 1 アセトクロール、アセトクロール代謝物、EMA 及び HEMA の構造

[2] エトフメセート試験法の開発

エトフメセート (図 2) はベンゾフラン環を有する除草剤であり、てんさい等の栽培に使用されている。平成 29 年に暫定基準及び規制対象の見直しが行われ、規制対象は「エトフメセート、代謝物 M2 をエトフメセートに換算したものと及び熱酸処理で代謝物 M2 に変換される代謝物 (代謝物 M3 及び代謝物 M3 抱合体を含む。) をエトフメセートに換算したものの和」とされた。本試験法の開発で参考とした残留試験の分析法では、代謝物 M2 及び M3 が低回収率となった。原因を調査した結果、残留試験の分析法の反応条件では代謝物 M2 及び M3 の平衡混合物になり、代謝物 M2 への変換が十分進まないことが判明した。そこで、代謝物 M3 から代謝物 M2 への変換反応条件等を検討し、規制対象を精確に定量することができる試験法を確認した。本法は「エトフメセート試験法 (農産物)」として厚生労働省より通知された (生食発 0217 第 1 号、令和 3 年 2 月 17 日)。

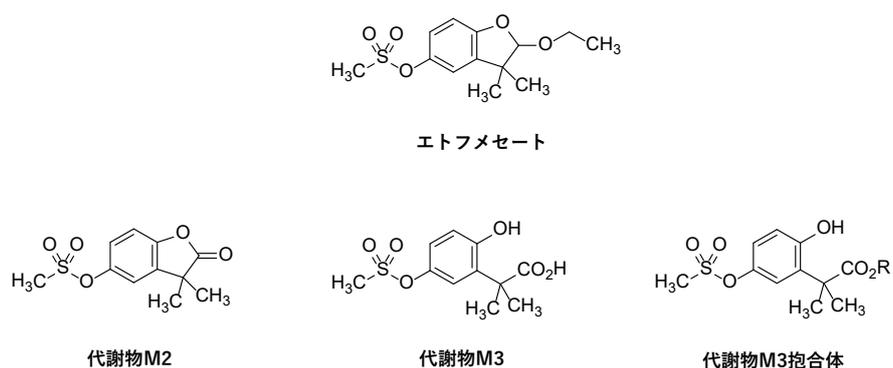


図2 エトフメセート及びその代謝物の構造

【おわりに】

公示試験法は残留基準への適否判断に用いられる試験法であり、基準値濃度付近を精確に定量可能な方法であることが求められるため、操作がやや煩雑な方法となる場合がある。一方、食品の安全性確保のためには検査数を増やし、監視を強化する必要がある、簡便・迅速な方法が望まれている。公示試験法の簡便化を図ることに加え、スクリーニング法等、より効率良く適合判定する方法の導入も必要と考えている。

Development of official analytical methods for pesticide residues in foods

Shizuka Saito-Shida

Department of Foods, National Institute of Health Sciences

Tel.: +81-44-270-6721; Fax: +81-44-270-6552

E-mail: shizsaito@nihs.go.jp

食品を汚染するカビ毒の分析法・汚染実態に関する研究及び SARS-CoV-2

検出法の開発

国立医薬品食品衛生研究所・衛生微生物部

○吉成 知也

【はじめに】

食品を汚染する危害として、微生物による汚染や自然毒・化学物質などの混入が知られている。衛生微生物部第四室では、微生物が産生する毒素を対象とした試験及び検査並びにこれらに必要な研究が進められている。私は、主に食品を汚染するカビ毒に関して、行政対応を目的とした分析法の開発や汚染実態調査、さらに新規カビ毒の探索や食品における汚染防除法の開発などの基礎的研究を着任以来行ってきた。一方で、2019 年末より生じた SARS-CoV-2 感染症の世界的な拡大を受け、ウイルスの検出法の開発にも携わってきた。本講演では、カビ毒に関する研究の一部、並びに開発に成功した SARS-CoV-2 の質量分析器による新規検出法をご紹介します。

【デオキシニバレノールの汚染実態調査及び公定法の開発】

デオキシニバレノール (DON) は、小麦、トウモロコシなどの穀類を汚染するカビ毒である。急性毒性として、消化器系やリンパ組織への障害、慢性毒性として、体重減少や食欲の減退などが知られている。我が国では、1940~50 年代にかけて、DON を含むカビ毒に汚染された穀類の摂食に起因する食中毒事故が複数報告されている。近年では、DON による食中毒事故の発生は起きていないが、平成 13 年に実施された調査により、国内で流通する麦類に高濃度の DON 汚染が確認されたことを受け、小麦において暫定基準値 1.1 mg/kg が設定された。

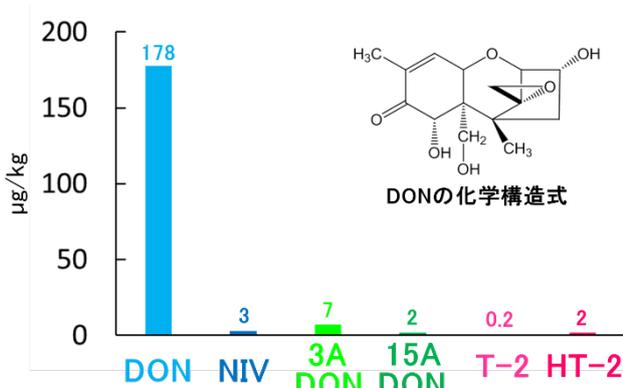


図1 海外産小麦におけるDONとその類縁体の平均濃度

その後、DON に対して正式な基準値を設定するにあたり、「DON 及びその類縁体の日本に流通する食品における汚染実態」、「日本人における DON の推定ばく露量」、「妥当性の確認された分析法」に関する情報が必要とされたため、これらを取得するための試験を実施した。DON とその類縁体であるニバレノール (NIV)、アセチル化 DON (3ADON 及び 15ADON)、T-2 トキシン及び HT-2 トキシンの分析法を開発し、妥当性を評価後、国内に流通する麦類を対象とした汚染実態

調査を行った。その結果、図 1 に示すように、小麦においては DON の汚染レベルが最も高く、他の類縁体の平均濃度は DON と比較して 0.1~4%であった。毒性の違いを考慮しても、日本人の健康に対するリスクが最も高いのは DON であったことから、基準を優先的に設定する対象は DON のみとされた。小麦における DON とその類縁体の汚染実態調査の結果を用い、日本人におけるばく露量を推定した結果、全年齢及び 1~6 歳の集団における 95 パーセンタイル値は、それぞれ 0.38 µg/kg 体重/日及び 0.94 µg/kg 体重/日であり、内閣府食品安全委員会が設定した DON の一日耐容摂取量 (TDI) 1 µg/kg 体重/日を下回っていた。これらの結果を基に行われた内閣府食品安全委員会による食品健康影響評価、さらに厚生労働省の食品衛生分科会食品規格部会の審議を経て、小麦中の DON に対する規格基準 1.0 mg/kg

が設定され、令和4年4月より施行された。また、我々が妥当性を評価した分析法を基に、DONの公定法が基準値施行に先立って令和3年9月に大臣官房生活衛生・食品安全審議官通知として発出された。このように、我々の行政支援研究は、DONの規格基準設定への貢献につながった。

【新規モディファイドマイコトキシン「ニバレノール配糖体」に関する研究】

食品を汚染するカビ毒としては、カビにおける二次代謝の最終産生物が主と考えられていたが、2003年にDONのグルコース配糖体(D3G)が小麦から単離同定されて以降、修飾を受けたカビ毒(モディファイドマイコトキシン)も新たな食品危害物質として認識されるようになった。モディファイドマイコトキシンは、カビ毒に汚染された植物体による化学修飾や、カビ毒を含む穀類が加工されることによって生成される。毒性は元のカビ毒よりも低下している例が多いが、胃酸や腸内細菌による代謝によって修飾が外され、元のカビ毒が体内で生じるという報告もあり、健康へのリスクは元のカビ毒と同等とみなす方針が世界的な流れとなっている。NIVは、DONの類縁体の一つである。図1に示したように、輸入小麦におけるNIVの汚染レベルは、DONと比較して非常に低いものの、国産の小麦ではDONに匹敵する汚染が認められており、日本人の健康に対するリスク因子と考えられている。我々は、存在は示唆されていたものの、未同定であったNIVの配糖体について、その汚染実態を調べるための分析法を開発する上で必要な標準品を得るために、単離同定を行った。

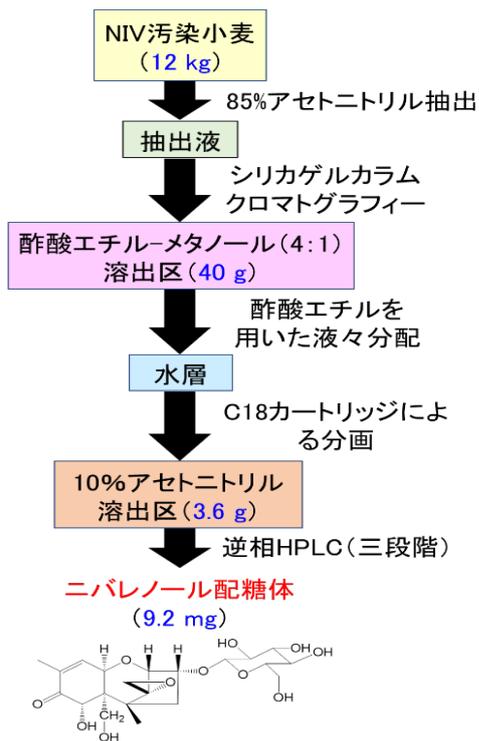


図2 NIV配糖体の精製スキーム

NIV配糖体の推定分子量を指標に、NIV汚染小麦12kgから精製を行い、最終的に9.2mgのNIV配糖体を取得した。NMRスペクトル解析などにより、得られた化合物を新規化合物ニバレノール-3-O-β-D-グルコピラノシド(N3G)と同定した(図2)。続いて、食品中のN3Gの分析法の開発に取り組み、配糖体にも交差性を示すNIV精製用のイムノアフィニティーカラムを用いたNIVとN3Gの同時分析法の開発に成功した。開発した分析法を用い、小麦中のNIVとN3Gの汚染濃度を調べた結果、N3Gの平均濃度は、NIVの64%であり、高い割合でN3Gが混入していた。このことから、NIVの健康へのリスクを評価する際には、N3Gも考慮に入れる必要性が明らかとなった。これらの成果は、欧州食品安全機関(EFSA)が2017年にモディファイドマイコトキシンのリスク評価を行った際に参照され、配糖体の食品危害物質としての重要性を示す知見の提供につながった。

【新型コロナウイルスの新規検出法に関する研究】

SARS-CoV-2による感染症は、2019年12月に中国で初めて報告されて以降、日本を含めて世界各国で流行が続いている。患者での診断法としては、リアルタイムPCR法及びイムノクロマト法が主に用いられているが、前者では感染性を失ったウイルスのRNAを検出し、他者への感染性を有しない人も陽性

判定となり、後者では製品によって検出感度が異なることが知られている。このため、これら検査法の代替としての多検体を一斉に処理し、かつ臨床検体中の感染性を有する SARS-CoV-2 由来成分を直接検出する新規の SARS-CoV-2 検出法として、高分解能 MALDI-TOF MS を用いた検出系の確立を行った。ウシコロナウイルスを用いた予備試験の結果から、ウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質 (NP) を検出対象とした。分画分子量 300kDa の限外ろ過カートリッジと陰イオン交換樹脂を用いて、鼻咽頭拭い液から NP を精製し、トリプシン消化して得られるペプチドを MALDI-TOF MS で検出した (図 3)。開発した検出法の検出限界は、鼻咽頭拭い液 1mL あたり $10^{7.9}$ ウイルスコピーであり、他者に感染性を有するウイルス濃度 ($10^{8.1}$ ウイルスコピー/mL) と同等であることが明らかになった。次に、COVID-19 患者由来検体中のウイルスを検出できるか検討を行った。リアルタイム PCR で陽性と判断された鼻咽頭拭い液計 19 検体を解析した結果、全ての検体から SARS-CoV-2 の NP 由来のペプチドのシグナルが検出された。これらの結果より、開発した MALDI-TOF MS を用いた SARS-CoV-2 感染症の診断法は、ウイルス由来成分を直接検出するため、高い特異性で感染を判断可能であることが明らかになり、現在も蔓延する COVID-19 に対し、他者への感染性を有する陽性者の識別が可能な検出法として有用と考えられた。

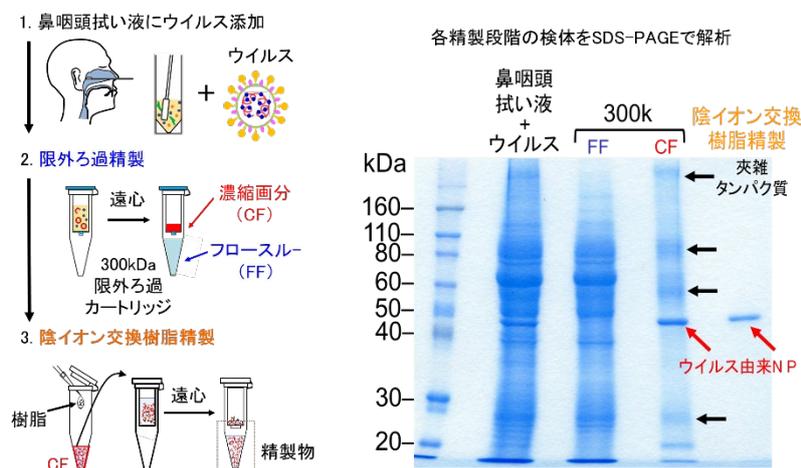


図 3 鼻咽頭拭い液からの SARS-COV-2 精製法のスキーム

ナノ医薬品の規制動向と品質評価に関する研究

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部

○阿部 康弘

【はじめに】

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）に対する mRNA ワクチンの台頭により、有効成分の体内・細胞内動態を精密に制御する薬物送達システム（Drug Delivery System; DDS）が新規モダリティ開発における不可欠な創薬基盤技術として注目を集めている。薬品部第四室では、リポソームや脂質ナノ粒子（Lipid Nanoparticle; LNP）といった DDS 技術を活用した「ナノ医薬品」を対象に、品質評価に関する業務・研究を行っている。また、最近では厚生労働省より委託を受けて、他部署と共同で mRNA-LNP 製剤の異物混入事案の対応や温度変化や振動といった外部ストレス検証試験を担当してきた。本発表では、ナノ医薬品に係る国内外の規制動向について整理するとともに、LNP 製剤を一例に、当室で取り組んでいる品質特性解析について紹介させて頂く。

【ナノ医薬品の規制動向】

本邦において「ナノ医薬品」の規制上の明確な定義はないが、一般に「ナノテクノロジーを製剤技術に応用し、臨床で優れた特性を発揮するよう意図して設計されたナノスケールの構成要素を有する医薬品」とされている。具体的には、難溶性薬物をナノサイズに微小化することで溶解性の改善を図ったナノ結晶や、薬物の体内安定性や放出性、生体内分布の最適化を目的に DDS キャリアとして応用した、リポソーム、LNP、高分子ミセル、エマルシ

表 1. ナノ医薬品に関する主なガイドライン

カテゴリー	地域	ガイドライン
ナノ医薬品 全般	EMA	Reflection paper on nanotechnology-based medicinal products for Human Use (2006)
	FDA	Guidance for Industry: Drug Products, including Biological Products, that Contain Nanomaterials (2022)
リポソーム	EMA	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product. (2013)
	FDA	Guidance for Industry: Liposome Drug Products (2018)
	JP	Guideline for the development of liposome drug products (2016)
ブロック共重 合体ミセル	EMA JP	Joint MHLW/EMA reflection paper on the development of block copolymer micelle medicinal products. (2013)
核酸搭載 ナノ医薬	JP	Reflection paper on nucleic acids (siRNA)-loaded nanotechnology-based drug products (2016)
mRNA ワクチン	WHO	Evaluation of the quality, safety and efficacy of messenger RNA vaccines for the prevention of infectious diseases: regulatory considerations, Annex 3, TRS No 1039

* FDA や EMA は、この他に後発医薬品開発のための Product Specific Guidance を発出している。

オン等があげられる。これらナノ医薬品のうち、特に後者は、従来までの医薬品と比較して複雑な構造を有する超分子集合体であるため、より高度な製造技術と品質管理が求められる。そのため、ナノ医薬品の開発支援と審査基準の明確化に向けて、国内外で様々なガイドラインが策定されてきた（表1）。

本邦ではナノ医薬品の開発指針として、「リポソーム製剤の開発に関するガイドライン」、「核酸（siRNA）搭載ナノ製剤に関するリフレクションペーパー」、「ブロック共重合体ミセル医薬品の開発に関する厚生労働省／欧州医薬品庁の共同リフレクションペーパー」の3件が発出されている。リポソーム製剤については、これまで国内で5製品が承認されているものの、後発医薬品の開発には至っていないのが現状である。米国食品医薬品局（FDA）や欧州医薬品庁（EMA）では、後発医薬品開発のための Product Specific Guidance を発出して対応している状況を鑑みると、本邦でもリポソーム製剤の後発医薬品の開発促進に向けたガイドラインの拡充が必要と考えられる。

詳細は割愛するが、本発表では LNP 製剤を含む mRNA ワクチンの品質管理に関連するガイドラインの現状についても議論したい。

【LNP 製剤の品質特性解析】

LNP の構造は図1に示すように、mRNA と複合体を形成してエンドソーム膜からの脱出を促す「pH 応答性脂質」、粒子の構造を安定化させる「中性リン脂質」や「コレステロール」、ステルス性（免疫応答回避）の付与や血中半減期を延長させる「ポリエチレングリコール（PEG）脂質」の4種類の脂質から構成されており、非常に複雑な機能と構造を有するナノ粒子である。

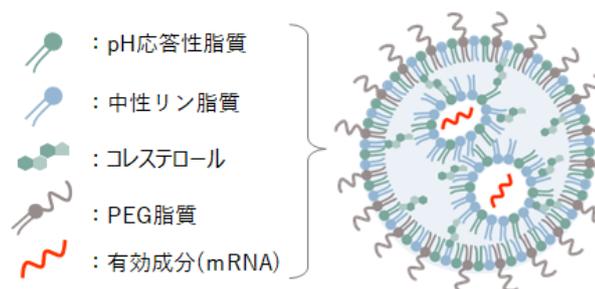


図1. 脂質ナノ粒子(LNP)の構成成分と構造

mRNA-LNP 製剤は革新的な創薬プラットフォームとして脚光を浴びる一方で、温度変化や振動といった外部ストレスの影響を受けやすいなど、製剤としての品質確保に課題が指摘されている。実際、モデルナ製 mRNA ワクチンでは-20°Cで、ファイザー/ビオンテック製 mRNA ワクチンでは-90~-60°Cと超低温下での保管を基本とし、タッピング等の激しく降り混ぜる操作は禁忌とされている。そこで当室では遺伝子医薬部と共同で、外部ストレスが mRNA-LNP 製剤に及ぼす影響を製剤学的観点から検証している。

凍結融解を意図的に複数回繰り返す、過度にストレスを与えた mRNA-LNP 製剤の粒子径をナノ粒子軌跡解析（NTA）により評価したところ、凍結融解を繰り返すことで粒子径が徐々に増大していることが判明した。さらに、Flow cytometry を用いて spike タンパク質の発現量を *in vitro* で評価したところ、凍結融解回数の増大に伴いタンパク質の発現レベルが低下する傾向が認められた。現在、この生物活性低下の原因を追究すべく、構成成分の質

的・量的な変化と製剤特性（粒子サイズ、形態・構造、表面電位、膜の熱力学特性、薬物封入率、薬物放出性等）との連関を明らかにしようと研究を進めている。

また、本研究を通じて、原子間力顕微鏡（AFM）を用いた mRNA-LNP 製剤の形態・サイズ評価手法を新たに開発したので、紹介したい（Haraya et al. *J Pharm Sci, in press*）。

【おわりに】

科学技術の進歩に伴いモダリティの多様化・複雑化が加速するなかで、有効成分の体内・細胞内動態を精密に制御する DDS キャリアは、今後益々重要な役割を担うことが期待される。当室では引き続き、DDS 技術を活用したナノ医薬品のレギュラトリーサイエンス研究を通じて、有効性/安全性や安定性に寄与する製剤の重要品質特性を明確化し、品質評価法の開発・標準化や品質管理指針案の策定に貢献していきたいと考えている。

Current Regulatory Landscape and Quality Assessment for Nanomedicines

Yasuhiro Abe

Division of Drugs, National Institute of Health Sciences

Tel: +81-44-270-6510, E-mail: abey@nihs.go.jp