

食品中残留農薬分析の現状

1. 日本の農業の現状

戦後日本の近代農業は狭い耕地面積の中で多量の作物を生産してきており、高収量、高品質を維持するために単位面積当たり高い農薬使用量となっている。稲のウンカやニカメイチュウに有効であったBHCは、米国などが活性成分であるリンデン (γ -BHC) を多く用いたのに対して、日本では α , β , γ , δ 4異性体の混合物を用いた結果、残留性の強い β -BHCの牛乳への残留等が問題となった。このように昭和40年代有機塩素系農薬DDT、BHC等の残留、環境汚染問題が起こり、昭和46年に使用禁止となった。その後使用される農薬の中心は有機りん剤、カーバメート剤、ピレスロイド剤へと変化し、その性質も残留性の少ない低毒性の農薬へと変わってきている。しかし、日本農業を取り巻く環境は厳しく、国民の食生活の多様化、食品の国際流通の進展に伴い、食品の輸入件数は平成5年に約85万件とこの10年間で2.5倍になっている。食料需給率をカロリーベースで見ると、約6割を海外に依存している状況であり、スーパーマーケットの食料品売場をみると日本の実状を痛感させられる。このような状況の中、農薬の残留も国内的な対応だけでなく、国際的な対応に迫られている。

2. 残留農薬問題

近年、食品の安全性が問題となり、中でも食品中残留農薬への関心は強い。特に、輸入農産物に関しては相手国での農薬使用状況が把握しにくい事や従来日本の農薬使用の概念にはなかったポストハーベストアプリケーション(いわゆるポストハーベスト農薬)の問題があり、収穫後使用のため分解、気散が少なくそのため高い残留量が検出されるものがある。これら輸入食品の安全性を確保することは、国民の健康を守る上で重要な課題となっている。しかし、日本ではつい最近まで食品衛生法に定められた農薬残留基準は有機塩素系、有機リン系農薬を中心に53農産物26農薬であり、日本で使用される農薬の数は約300種といわれる実体を反映していなかった。この様な状況の中、厚生省は昭和62年度より新たな規制に向けて、新しい残留農薬試験法の開発、実態調査を開

始した。平成4年度より食品衛生法の農薬残留基準が大幅に改正され現在では130農産物103農薬に拡大され、現在108の農薬に残留基準が設定されている。今世紀中には200を超える農薬に残留基準が設定される予定である。

3. 農薬の分類

“農薬”とは「農作物を害する病原菌、昆虫、ダニ、線虫、ネズミ、その他の動植物やウィルスの防除に用いられる薬剤、及び成長促進、発芽抑制等の薬剤」と定義される化合物の総称であり、分析対象としては種々雑多な有機化合物全般を分析するのと同じことであり、性質の異なる化合物を1回の分析で到底検査することは不可能である。食品衛生法では、個々の農薬、類似の農薬毎に分析法が定められており、現在108の農薬の分析に52の分析法が告示されている。農薬の分析が一筋縄ではいかないことを理解していただけたらと思う。

4. 分析法の概略

食品中残留農薬分析は、大まかに分けると食品から農薬を抽出する段階、夾雑物を分離精製する段階、測定機器を用いて定量する段階の3つのステップに分けられる。

抽出 → 精製 → 定量

基本的に食品中残留農薬の分析は、官報の方法に従って分析を行うわけであるが、限られた人数、設備の中では多くの検体の残留農薬をくまなく分析する事は到底不可能である。従って日常的な食品中残留農薬の分析法として、出来るだけ同一操作で数多くの農薬を分析できる多成分一斉分析法(Multi Residue Method)が必要となってくる。しかし、“農薬”とは先に述べた如く有機化合物全般と同じことである。即ちDDT、BHC等の水にほとんど溶けない化合物から、アセフェートの様に水溶性の高い化合物まで全てを対象とする。これらの農薬を一度に抽出する際、当然食品成分(色素、脂肪分等検体によって異なる)も抽出され定量の妨害物質となり、当然分離精製が必要となる。食品衛生検査指針(厚生省生活衛生局編)、衛生試験法注解(日本薬学会編)等には残留農薬分析法が記載されているが、有機塩素系、有機りん系、カーバメート系等いわゆるグループ別分析法

(Selected Multi Residue Method) が主流である。近年多成分分析法の開発が厚生省関係、地方衛生研究所等で数多く行われている。

抽出方法としては、食品中に残留する出来るだけ多く農薬を1回の抽出で行えるように抽出溶媒、抽出補助剤、固相抽出法の検討等がなされている。

精製方法としては、吸着クロマトグラフィーのフロリジル、シリカゲルカラムを市販のカートリッジを用いたミニチュア化、簡便化が検討されている。又、従来脂質成分と農薬の分離に主に用いられてきたゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)が多成分分析の有用な精製法として用いられ、野菜果実に多く含まれるクロロフィル、カロチノイド等分析の妨害になる化合物と農薬を効率良く(分子量の違いにより)分離することができる。

定量には、従来の選択的検出器(ECD: 塩素系、ピレスロイド系、NPD: 含窒素系、有機リン系、PPD: 有機リン系)に加えて、食品から検出された農薬の最終確認手段として用いられていたガスクロマトグラフ質量分析器(GC-MS)が小型化、操作性が向上し、いわゆるガスクロ(GC)のマスディテクター(MSD)と検出器の一つの位置づけになり、かつ微量検体でも分析可能になったため、ルーチン分析の1機種として多く用いられるようになってきている。

5. 日本での多成分分析法開発の現状

厚生省では1994年に監視モニタリング業務の効率化のために、残留基準値告示農薬のスクリーニング法として使用するための迅速分析法(従来は簡易分析法と言って

いたが誤解をまねくので変更された)の開発検討を開始した(筆者も委員として参加)。初年度には、従来法の基礎的な検討部分が多いが、農薬残留基準が定められた農薬の中で多成分分析可能なものを中心に選び、検体からの抽出方法としてはアセトン抽出法を採用した。アセトンを減圧濃縮後、酢酸エチル/ヘキサン混液で抽出し、脂肪性食品の場合は従来のヘキサン/アセトニトリル分配か固相抽出(Extrelut + C₁₈)による脱脂操作を行う。食品からの夾雑物の除去のための精製操作には市販の充填ミニカラム(シリカゲル、フロロジル)の導入による操作の簡略化、使用溶媒の削減をはかり、73農薬に適用可能な試験法を策定した(食品衛生研究Vol.45, No.9, 1995参照)。さらに適用農薬の範囲及び精製効率の向上をめざして以下の検討を行っている。従来の酢酸エチル/ヘキサン混液での抽出では困難であった水に溶解しにくい極性農薬をケイソウ土を詰めたカラムに抽出液を保持させ、酢酸エチルで溶出する固相抽出、酢酸エチル/シクロヘキサンを分離溶媒に用いたGPC(ゲル浸透クロマトグラフィー)による脂質分離及び精製、市販の充填ミニカラム(SAX, PSA)による精製、超臨界流体抽出、液体クロマトグラフィーによる同時分析、GC/MSによる定量などを検討中であり、本年中にはその一部が公表されるものと思われる。

食品中残留農薬分析の精製操作の一つとして、GPC(ゲル浸透クロマトグラフィー)を紹介する。ゲル浸透クロマトグラフィーは多孔性の樹脂の間をさまざまな大きさの化合物が通過する間に、大きい分子量のものが先に

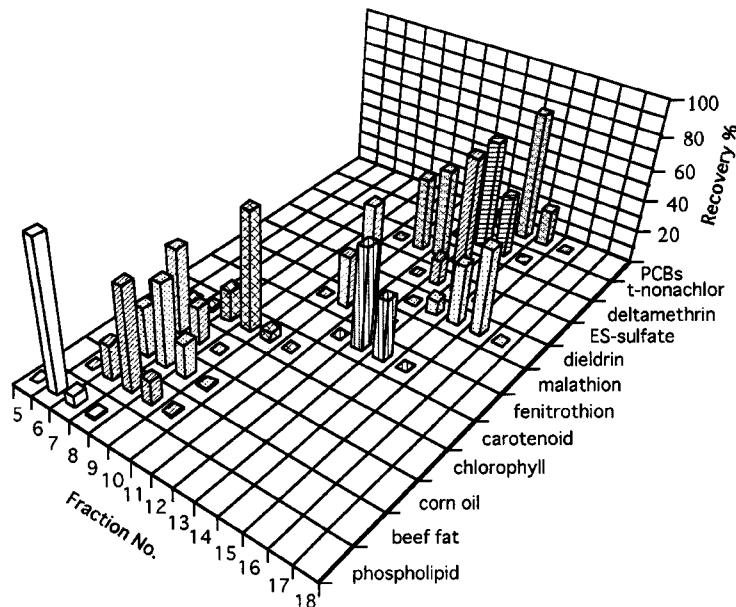


図1 Elution Profiles from GPC(2.2cm i.d. x 50cm, CH₂Cl₂-cyclohexane 1:1)

溶出し、小さい分子量のものが後から溶出することにより、分離が可能となる。

従来肉、魚等の脂肪成分と農薬を分離するために用いられていた有機溶媒系GPCが、野菜果実中の残留農薬分析に効果を発揮している。食品中の脂質、色素等は抽出段階で分析対象の農薬と同時に抽出され、農薬分析において妨害物質となり、定量操作の前に除去する必要がある。これらの物質は相対的には農薬よりも高分子量であり、有機溶媒用ゲル（BioBeads S-X3 等スチレンジニルベンゼン-ポリアクリル）を用いてGPCを行うと、原則的には分子量大きい化合物からリン脂質、脂質、クロロフィル、カロチノイド、大部分の農薬の順に溶出されてくる（図1、1分画10ml）。

ほうれん草の様なクロロフィル、カロチノイドの多い作物の抽出物でもこのGPC精製（ジクロロメタン/シクロヘキサン）を行うことにより、ほぼ無色の検液が得られ、多数の検体を分析する際、分析データに非常に影響する機器の汚れの低減にも効果的である。GPCは日常のルーチン分析に適しており、地方衛生研究所でもGPCを食品中残留農薬分析に応用している所が増加している。また、この分子量の違いにより分離するGPCと従来の市販ミニカートリッジのシリカゲル、フロリジル（けい酸マグネシウム）等の吸着型クロマトグラフィーと組み合わせる事によりより一層の精製効果が期待でき、我々もこの方法を日常分析に応用している。

6. 今後の課題と方向性

前述のように今世紀末には200を超える農薬に残留基準が決められ、それに対応した検査体制の確立が要求される現在、多くの矛盾と問題を抱えている。最近NHKの報道で問題になった検体粉碎時の農薬の分解の問題に触れてみたい。

本年1月のNHKニュースのトップ記事で食品衛生法の残留農薬分析法の欠陥が報じられた。内容の概略はキャベツなどの検体を処理する際、摩砕均質化した段階でキャベツ自身が持っている酵素によりキャプタン、カプタホール、クロロタロニル等が分解されてしまい、実際は残留していたものが官報の方法では残留していない結果になってしまうという不備を指摘されたものである。環境庁の登録保留基準の分析法ではキャプタン、カプタホールはリン酸添加後摩砕均質化して分解を抑えている。このため次回の告示の時に改正されるとのことである。問題は、キャプタン等の含硫黄化合物などの一部に酵素や酸化物に弱いものがあるのは事実であり、それらの農薬に対する個別対応は必要であろう。しかし、現在の農薬残留基準作成の方向性そのものが間違っているわけで

はなく、早急に200以上の農薬について残留基準を作成することが第一義である。当然一部の限られた分析法のなかには不備もあると思われるが、それは冷静に対処し修正すれば済むことであり、それらの蓄積が分析法全体をより一層完成度の高いものにすることが出来る。

200を超える農薬の残留基準が設定された場合、食品中残留農薬の分析をどの程度まで行うのかという現実の問題がある。この問題を考えるうえで非常に参考になるデータがある。それは、毎年米国のFDA（食品医薬品局）が発行している前年度の農薬残留モニタリングの報告書がある。これを見てみるとFDAは約300を超える農薬を分析対象として輸入食品、国内品1万数千件の検体を分析しているが、実際に検出される農薬の数は、毎年90-100農薬である。また、食品からの農薬の摂取量を知るためのトータルダイエットスタディでは検出頻度の高い農薬のリストが示されている（表1）。

表1 Total diet Study で検出された農薬

農 薬	検出回数
Malathion	151
Chlorpyrifos methyl	128
pp'-DDE	115
Chlorpyrifos	91
Endosulfan	83
Dieldrin	58
Chlorpropham	47
Methamidophos	42
Diazinon	38
Carbaryl	34
Thiabendazole	28
Dicloran	25
Dimethoate	25
Acephate	23
Permethrin	23
Omethoate	18
Methoxychlor	16
Ethion	16
Lindane	16

分析検体数 783 (FDA, 1994)

当然国によって使用される農薬の傾向は異なるので米国の検出頻度はそのまま参考にはならないが、基本的に残留しやすい農薬は、ポストハーベストで使用されたもの（マラチオン、クロルピリホスメチル）、有機塩素系農薬（DDT代謝物 pp'-DDE、ディルドリン）のように残留性の強い農薬、使用頻度の高い農薬である。

これらのデータから、当面の我々の食品中残留農薬分析の方向は、検出頻度の高い農薬を優先的に検査できる体制、検査項目数として100程度の農薬が確実に分析できる体制の確立が現時点での第1目標であることがおぼろげながら見えてくる。

（食品薬品部 斎藤 勲）

ウイルスと宿主細胞膜レセプター

1. はじめに

ウイルスは他の細胞生物とは異なり、栄養分のみでは自己増殖できず、宿主細胞に寄生し、宿主の生命維持の為に種々のしくみを利用して自己を大量にコピーすることにより増殖している。ウイルスの感染、増殖はウイルス粒子が宿主細胞表面にとりつき、細胞質内に侵入する事により始められる。細胞の表面にはこのウイルス粒子がとりつく特定の部分があり、これをレセプターと呼ぶ。レセプターはウイルスがどの器官や臓器を好んで増殖するかを決定する重要な因子の一つとなっている。近年の研究により、多くのウイルスの認識する宿主細胞膜レセプターが解明され始めている。レセプターの多くはタンパク質である。しかし糖タンパク質や糖脂質など一般にはなじみの薄い分子がレセプターとなっていることも多い。これら分子中に糖を含むものは最近多くの機能を持つことが分かり始めている。糖タンパク質はタンパク質に糖が鎖状にいくつもつながった糖鎖が結合している構造をもっており、糖脂質はセラミドという疎水性の脂質部分に糖鎖が結合している。糖鎖の部分の構造は単一の単糖から成ることはほとんどなく、グルコース、ガラクトースといったよく知られた単糖のほかにアミノ基を持つアミノ糖や糖でありながら酸性部分をもつシアル酸などを含んだ多彩な構造をとっている。図に糖タンパク質と糖脂質の構造の例を示した。これら分子中に糖鎖を持つ分子は複合糖質と呼ばれている。複合糖質は細菌やウイルスの感染をはじめとして発生、形態形成、恒常性の維持、病態などの生体の特徴的な機能に関与していると考えられている。例を挙げると、癌化により細胞上に現れる糖鎖の構造が変化するのでこれを癌化のマーカーとして臨床検査に応用されたり、コレラ菌の毒素が糖脂質のGM1をレセプターとして認識していることなどは古くからよく知られている。最近では脳などの神経細胞のシナプス形成や細胞接着を起こすなどの機能がある事が明らかになってきた。今回はこの様に最近多くの機能が明らかになりつつある糖鎖を含め、ウイルスの認識する宿主細胞膜レセプターについて紹介したい。

2. ウイルスとレセプターの結合の検出法

(1) タンパク質の場合

宿主細胞の膜タンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分子量ごとに分離して、ニトロセルロースなどの膜に転写する。これにウイルスを重層し結合したウイルスを検出する。この方法は糖タンパク質にも有用であるが、分子量の情報しかない為詳しくは、

レセプターと思われるタンパク質を単離して調べる必要がある。

(2) 糖タンパク質の糖鎖の部分、糖脂質の場合

糖タンパク質上の糖鎖の場合タンパク質一分子にいろいろな構造の糖鎖が結合しているため、どの糖鎖と結合しているかの解析が困難である。そこで一般的に分子中に一つの糖鎖構造しか持たない糖脂質を用いる。糖脂質は薄層クロマトグラフィーで分離し、これにウイルスを重層し結合するかどうかを観察する。

(3) その他の方法

赤血球を凝集する能力のあるウイルスでは赤血球凝集抑制反応を利用する事ができる。ウイルスと共に調べたい物質を混和するとレセプターであればウイルスと結合し、赤血球を凝集できなくなる事を利用している。赤血球凝集を起こさなかった場合その物質はレセプターであると考えられる。

さらに(1)、(2)、を簡便にして、試料をプラスチックプレートに附着し、そこにウイルスを加え結合を観察する方法もある。但し精製された試料しか使用できない。

ここに挙げた全ての場合についても詳しくは宿主細胞よりレセプター物質を単離して確認する必要がある。

3. ウイルスレセプターの種類

表に主なウイルスとそのレセプターを示した。特徴的なのは半数以上のウイルスが何らかの形で糖タンパク質や糖脂質の糖鎖の部分でレセプターとしていることである。糖鎖の部分でも特にシアル酸を含有しているものをレセプターとしているウイルスが多いが、糖鎖の部分からシアル酸だけを取り除いてやるとウイルスは結合しなくなってしまう事から、シアル酸がレセプターの本体であると考えられている。もう一つ特徴的であることは、例えば種痘に用いられたワクシニアウイルスのレセプターのようなウイルスとは無関係の上皮成長因子レセプターであったり、いわゆる風邪を起こすライノウイルスのレセプターの細胞内接着因子-1など他に機能を持った物質をレセプターとしていることで非常に興味深い。また、単純ヘルペスウイルス1型やエイズウイルス1,2型の様に複数の、性質の異なる物質をレセプターとしている場合もある。エイズウイルスは免疫系の細胞であるヘルパーT細胞上のCD4分子をレセプターとしていることはよく知られているが、他にも4つの分子がレセプターであるとの報告がされている。このうち脳に多く含まれるガラクトシルセラミドと硫酸化糖脂質はエイズウイルスが脳を攻撃するエイズ脳症となる時にレセプ

ターとなっているのではないかと考えられている。この様に一つのウイルスが複数の器官へ感染ができる場合複数のレセプターを持っている可能性が考えられるが、詳しくは今後の研究の進展が待たれる。最近の分子生物学的技術の進歩により、ポリオウイルスの様にレセプター遺伝子が決定されているものもある。まだ増殖できる細胞が見つからないウイルスについてこの技術の応用が考えられている。レセプター遺伝子をマウスに導入し、レセプターを発現したトランスジェニックマウスを作り、本来マウスでは増殖しないウイルスを増殖させ、病原性の解明のための実験動物を人工的に作製したり、ウイルスの増殖のメカニズムの解明に利用しようとするものであり期待が持たれている。

4. おわりに

多くのウイルスのレセプターが解明されてきているが、このレセプター物質そのものやそれを基にしてウイルスと結合するような物質を合成する事により予防的な医薬品やワクチンなどへの応用が考えられている。レセプ

ターは近年解明が進んでおり今後もどんどん新しいものが見つけられていくと思われる。

参考文献

- 1) 入村達郎編, 糖鎖と細胞, 別冊日経サイエンス, 1994
- 2) 鈴木康夫, 日本臨床, 47, 705-713, 1989
- 3) 内貴正治, 蛋白質核酸酵素, 37(11), 136-145, 1992
- 4) 小池智, 蛋白質核酸酵素, 37(14), 397-403, 1992
- 5) 佐藤智, 蛋白質核酸酵素, 37(14), 423-428, 1992
- 6) 大木浩司ら, 蛋白質核酸酵素, 37(14), 429-433, 1992
- 7) 鈴木康夫, グリコパソロジー, 5-49, 講談社, 1993
- 8) 高橋理明ら, 免疫薬理, 9(2), 75-86, 1991
- 9) Breau, J.F., et al, J.Virol., 66, 2037-2045, 1992
- 10) Becker, S., et al, J.Gen.Virol., 76, 393-399, 1995

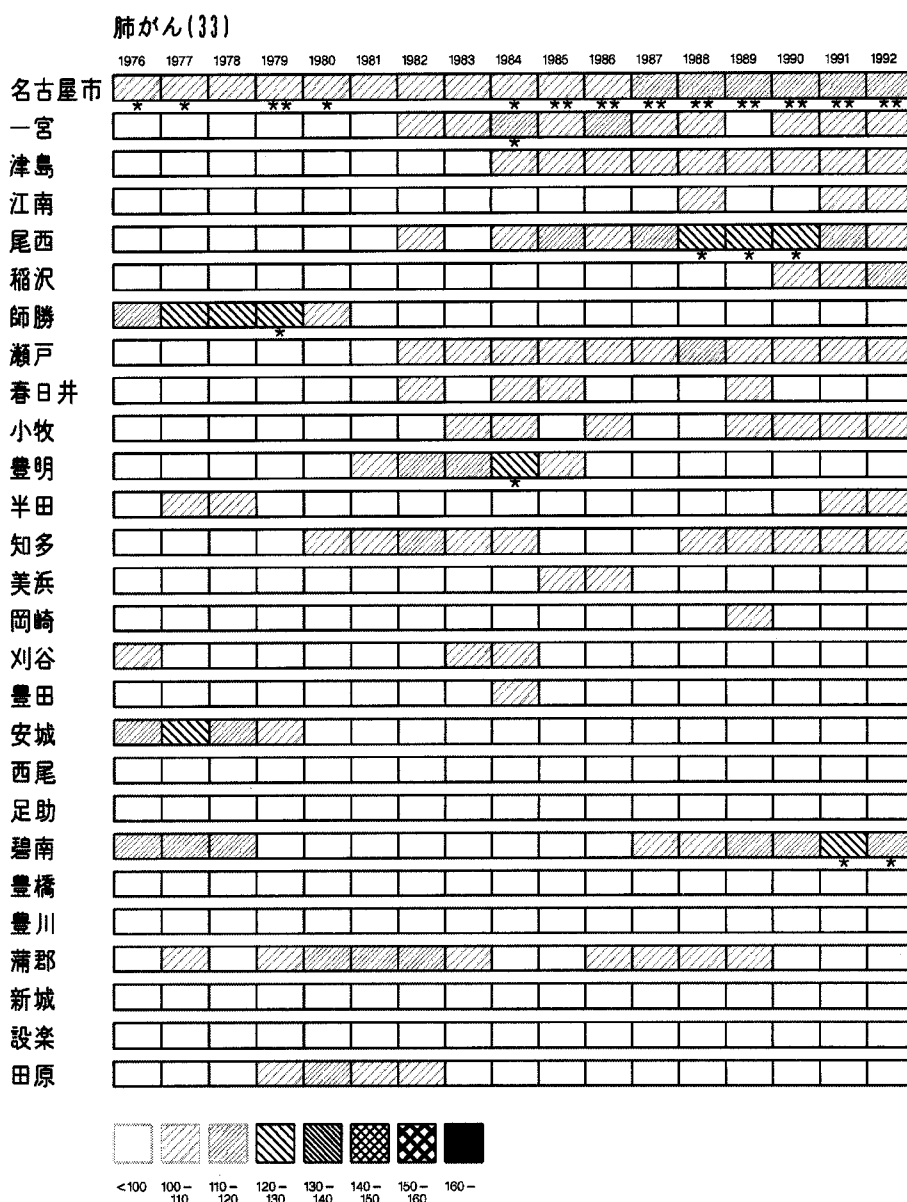
アミノ酸-ガラクトース-グルコース-タンパク質部分
シアル酸-ガラクトース-グルコース-セラミド
図 糖タンパク質(上)と糖脂質(下)の例

表 ウイルスのレセプター

ウイルス名	レセプター
ワクシニアウイルス	上皮成長因子(EGF)レセプター
単純ヘルペスウイルス1型	繊維芽細胞成長因子(FGF)レセプター, ヘパラン硫酸
E Bウイルス	ヒト補体レセプタータイプ2 (CR2)
SV40	クラスI主要組織適合性抗原(MHC-1)
B型肝炎ウイルス	重合アルブミン
small Sタンパク質	シアル酸含有糖タンパク質
パルボウイルスB19型	糖脂質(グロボシド, P抗原)
インフルエンザウイルス(A, B型)	シアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
インフルエンザウイルスC型	9-O-アセチル基を持つシアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
パラインフルエンザウイルス(1~4型)	シアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
ムンプスウイルス	シアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
ニューカッスル病ウイルス	シアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
センダイウイルス	シアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
麻疹ウイルス	CD46
狂犬病ウイルス	ニコチン性アセチルコリンレセプター
水疱性口内炎ウイルス	ホスファチジルセリン
マールブルグウイルス	シアル酸を持たない糖タンパク質
コロナウイルス	9-O-アセチル基を持つシアル酸含有糖タンパク質又は糖脂質
日本脳炎ウイルス	脳膜画分(マンノース含有糖鎖)
レオウイルス(1, 3型)	シアル酸含有糖タンパク質(フェツインなど)
ロタウイルス	中性糖脂質又はムチン型シアル酸含有糖タンパク質
ポリオウイルス(1~3型)	イムノグロブリンスーパーファミリー
コクサッキーウイルスB型	HeLa細胞由来50KDタンパク質
エコーウイルス1型	インテグリンファミリーに属する接着分子(VLA-2)
ライノウイルス	細胞内接着因子-1(ICAM-1)
脳心筋炎ウイルス	ヒトグリコホリン又はムチン型シアロ糖鎖
エイズウイルス(1, 2型)	CD4, 補体レセプター, Fcレセプター ガラクトシルセラミド, 硫酸化糖脂質

(ウイルス部 佐藤克彦)

地域特異性 (5)肺がんのSMRの経年変化



【説明】

昭和47年から平成4年の人口動態調査から、連続する5年間の死亡数及びその間に含まれる国勢調査の性・5歳年齢階級別人口を用いて標準化死亡比を計算した。

これを、その5年間の最後の年の標準化死亡比として表示した。また、全国死亡比との比較には χ^2 検定を用いた。標準化死亡比が100を越える場合には、危険率5%以下を有意とし*、1%以下を**で示した。なお、調査地域の人口に全国の性・5歳年齢階級別死亡率を当てはめて求められる期待死亡数が30人以下となる場合には、ポアソン分布を用いて直接その死亡数以下となる確率を計算し、上記の基準に従って有意差を判定した。

(保健情報室)

~~~~~

愛知衛研技術情報 第20巻 第1号 平成8年3月1日発行 愛知県衛生研究所  
(この技術情報は、古紙再生紙を使用しています。)