

表5 *B. stearothermophilus* の型別別活性比較

分類	抗菌性物質	薬剤に対する感受性													
		濃度 (ppm)	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0				
β-ラクタム系	セファピリン	芽胞液	-	+	++										
	増殖試験液		-	+	++										
マクロライド系	タイロシン	芽胞液				-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
	増殖試験液					-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	芽胞液				-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
	増殖試験液					-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
テトラサイクリン系	クロルテトラサイクリン	芽胞液				-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
	増殖試験液					-	+	+	++	++	++	++	++	++	++
キノロン剤	サラフロキサシン	芽胞液				-	±	+	+	+	+	+	+	+	++
	増殖試験液					-	-	-	+	+	+	+	+	+	++

表6 抗生物質の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 ($\mu\text{g/mL}$)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>B.stearother-</i> <i>mophilus</i>	
β -ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	0.001
	アンピシリン	Ampicillin	0.05	0.05	0.01	0.001
	ペニシリン G	Penicillin G	0.05	0.1	0.01	0.001
	セフォペラゾン	Cefoperazone	2	>50	0.5	0.001
	セフトキシム	Cefuroxime	0.25	>50	0.5	0.001
	セファピリン	Cephapirin	0.01	0.5	0.1	0.001
	セファロニウム	Cephalonium	0.25	5	1	0.005
	セファレキシン	Cephalexin	0.5	5	0.5	0.01
	セファゾリン	Cephazolin	5	10	10	0.002
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	0.5	0.1	0.05	1
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	5	0.5	0.25	25
	キタサマイシン	Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	2.5
	ジョサマイシン	Josamycin	2.5	1	0.25	2.5
	スピラマイシン	Spiramycin	10	1	0.5	5
	タイロシン	Tylosin	2.5	0.5	0.5	0.25
	チルミコシン	Tilmicosin	2.5	0.5	0.5	0.5
	ミロサマイシン	Mirosamicin	2.5	2.5	0.5	0.1
アミノグリコシド系	アプラマイシン	Apramycin	10	2.5	10	5
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomycin	10	0.5	2.5	2.5
	パロモマイシン	Paromomycin	10	0.5	10	5
	ネオマイシン (フラジオマイシン)	Neomycin (Fradiomycin)	2.5	2.5	2.5	1
	ゲンタマイシン	Gentamycin	1	0.5	5	0.5
	ハイグロマイシンB	Hygromycin B	>50	25	10	50
	カナマイシン	Kanamycin	2	1	5	5
	スペクチノマイシン	Spectinomycin	>10	12.5	10	5
	ストレプトマイシン	Streptomycin	5	0.5	2.5	5
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	0.25	5	10	0.1
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	0.05	0.5	10	0.5
	テトラサイクリン	Tetracycline	0.25	5	10	0.1
	ドキシサイクリン	Doxycycline	0.05	0.1	1	
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	2.5	2.5	5	0.1
	コリスチン	Colistin	>50	>50	>50	25
	チオペプチン	Thiopeptin	0.5	1	0.5	0.1
	ノシヘプチド	Nosiheptide	2.5	2.5	0.25	
	バージニアマイシン	Virginiamycin	2.5	5	0.4	0.5
	バシトラシン	Bacitracin	>10	>10	0.4	0.5
ポリエーテル系	ラサロシド	Lasalocid	2.5	10	50	1
	モネンシン	Monensin	10	10	50	1
	サリノマイシン	Salinomycin	2.5	10	50	0.5
その他	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	10	10	5	5

表7 合成抗菌剤の各試験菌に対する検出感度

分類	合成抗菌剤	検出感度 ($\mu\text{g/mL}$)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>B.stearother-</i> <i>-mophilus</i>	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	>50	>50	>50	>50
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimazine	>50	>50	>50	>50
	スルファドキシ	Sulfadoxine	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキシピリダジン	Sulfamethoxy pyridazine	>50	>50	>50	>50
	スルファメラジン	Sulfamerazine	>50	>50	>50	>50
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	>50	50	>50	>50
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	>50	>50	>50	>50
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	1	0.1	2	2
	ジフロキサシン	Difloxacin	0.5	0.05	>50	2.5
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	エノキサシン	Enoxacin	2.5	2.5	>10	1
	フルメキン	Flumequine	1	2.5	>50	>50
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	1	0.1	5	1
	ミロキサシン	Miloxacin	0.5	2.5	>50	50
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	1	10	>50	>50
	ノルフロキサシン	Norfloxacin	1	0.5	>50	
	オフロキサシン	Ofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	0.5	0.25	25	2.5
	オキソリン酸	Oxolinic acid	0.5	1	>50	5
	サラフロキサシン	Sarafloxacin	0.5	0.25	50	0.5
	スパフロキサシン	Sparfloxacin	0.5	0.1	5	1
	ベブフロキサシン (ベノフロキサシン)	Vebufloxacin	2.5	0.5	25	2.5
	その他	フロルフェニコール	Florfenicol	5	2.5	5

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進）

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

研究報告書

『簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

－簡易検査法及び高感度検査法の検討－』

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	石井 里枝	埼玉県衛生研究所
	竹上 晴美	埼玉県衛生研究所
	吉田 絵美子	埼玉県衛生研究所

研究要旨

畜水産食品中に残留する主な抗菌性物質として、ペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤などを中心とした、より多くの抗菌性物質を一括して検出できる(1)簡易且つ迅速な試験法及び(2)高感度な微生物学的試験法を検討した。(1)簡易検査法は畜水産食品からメタノール抽出のみ、(2)高感度検査法は、0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)で除タンパクと同時に薬物を抽出し、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を採用した。

今回構築した高感度検査法は、動物用医薬品として汎用され、畜水産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質、セファロsporin系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤を簡易且つ高感度に検出することが可能であり、残留抗菌性物質のスクリーニング法として日常検査法として実用的な方法であると考えられる。

A. 研究目的

畜水産動物の疾病予防及び治療を目的に数多くの抗菌性物質が使用され、畜水産物の生産性向上に大きく寄与している。しかし、一方ではこれら薬物の畜水産物中への残留が食品衛生上強く懸念されており、簡易且つ迅速な分析法の開発が求められている。微生物学的試験法は、前処理が簡易であり、阻止円の有無を観測することにより抗菌性物質の残留の有無をスクリーニング

することが可能である。このことから、抗生物質を中心に抗菌性物質の残留分析に汎用されている。現在、日常検査には平成6年に厚生省から示された「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改訂）」及び「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法（改訂）」が公定法として用いられている。しかし、現在用いられている簡易検査法は、試料5gをクエン酸・アセトン緩衝液20mLで抽出する方法であり、結果として試料中

に残留する抗菌性物質を 5 倍希釈することとなり、検出感度の面で改善すべき問題がある。一方、分別推定法は、試料前処理に有害な有機塩素系溶媒を使用しており、操作も煩雑である。

本年 5 月にはポジティブリスト制度が導入され、数多くの動物用医薬品に対して暫定基準値が設定される。そこで今回、畜水産食品中に残留する抗菌性物質の簡易且つ迅速な検査法、及び検出感度に優れた高感度検査法開発のための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

B.1. 試料

試料は、埼玉県内で市販されていた豚筋肉部及び豚肝臓を用いた。

B.2. 試薬

供試抗菌性物質：代表的な抗菌性物質として、ペニシリン系抗生物質（アンピシリン(ABPC)、ベンジルペニシリン(PCG)), セファロスポリン系抗生物質（セファピリン(CEPR), セファレキシン(CEX)), マクロライド系抗生物質（エリスロマイシン(EM), スピラマイシン(SPM)), アミノグリコシド系抗生物質（ストレプトマイシン(SM), ゲンタマイシン(GM)), テトラサイクリン系抗生物質（オキシテトラサイクリン(OTC), クロルテトラサイクリン(CTC)), ニューキノロン剤（エンロフロキサシン(ERFX), サラフロキサシン(SRFX)), 計 12 種を用いた。

それぞれの標準品約 10mg を正確に量り、アミノグリコシド系抗生物質は精製水、その他の標準品はメタノール 50mL に溶解して、標準原液を調製し、適宜、10%メタノールで希釈して標準溶液とした。

供試試験菌：試験菌として *Bacillus subtilis* BGA (*B.s* BGA：市販芽胞菌液 Merck 社製), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M.l* ATCC 9341；最近では名称が *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 と呼ぶように提唱されている)及び *Bacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*:市販芽胞菌液 Merck 社製)を用いた。

ペトリ皿：合成樹脂製で、内径 86mm の滅菌したものをを用いた。

パルプディスク：アドバンテック東洋(株)製の直径 10mm, 厚さ 1.2mm (吸水量 0.08mL±0.01mL) の厚手のパルプディスクを 121°C, 15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてから用いた。

Srynge Filter：(Whatman 社製)

除タンパク・抽出用溶液：0.5%メタリン酸-アセトニトリル-メタノールを(6:2:2)の割合に混合し、約 10°C に冷却して用いた(用時調製)。

Oasis HLB カートリッジ(200mg)：Waters 社製、カートリッジはあらかじめメタノール 5mL 及び蒸留水 5mL を通してコンディショニングした後、使用した。

イオンペア剤：0.5 mol/L ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液を用いた。

その他の試薬は、いずれも特級品を用いた。

B.3. 試験菌液及び検査用培地の作製

B.s BGA 及び *B. stearothermophilus* 芽胞菌液は市販品を、*M.l* ATCC 9341 試験菌液は、公定法である簡易検査法の調製法を一部変更し、次のとおり調製した。即ち、普通寒天斜面培地で継代した菌株を、白金耳(2 µL 用)で掻き取り、滅菌精製水 10mL に接種して試験菌液とした。

検査用平板は、いずれも Difco 社の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)及び Brain Heart Infusion Agar (BHI 培地)を使用した。これらの培地を 121°C、15 分間高圧滅菌後、55°C±1 に保持し、これに *B.s* BGA (使用培地; AM5 及び AM8 の 2 種類) 及び *B.stearothermophilus* 芽胞菌液 (使用培地; BHI 培地) は、培地の 1/100 量、*M.l* ATCC 9341 試験菌液 (使用培地; AM5) は培地の 1/5 量加え、十分に混合した後、その 8mL をペトリ皿に注入し、水平に静置して凝固させ、検査用平板培地を作製した。

B.4. 微生物学的試験法

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検査用平板培地上に置いた。それらの平板培地は、約 5°C で 30 分間放置した後、*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は 30°C で 18 時間、*B.stearothermophilus* は、55°C で 6 時間培養した。

パルプディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定して、直径 12mm 以上のものを陽性とした。

B.5. 検量線の作成

各標準品の濃度が 0.01~10ppm である標準溶液を調製し、微生物学的試験法に供した。出現した阻止円の直径から検量線を作成し、回収率等を求めた。

B.6. 簡易検査法試験溶液の調製

試料 10g を採り、メタノール 10mL を加えてホモジナイズ抽出し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、その上清を試験溶液とした。

B.7. 高感度分析法試験溶液の調製

試料 10g を採り、除タンパク・抽出用溶液 100mL を加えてホモジナイズした後、ろ

過補助剤ハイフロスーパーセルを厚さ約 2mm に敷いた吸引ろ過器 (桐山漏斗) を用いてろ過した。ろ液を 45°C の水浴中で約 30mL に減圧濃縮した後、Oasis HLB カートリッジに負荷した。カートリッジを蒸留水 10mL で洗浄後、メタノール 5mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を 10% メタノール 1.0mL で溶解し、ペニシリン系、セファロsporin 系、マクロライド系、テトラサイクリン系及びキノロン剤検査用の試験溶液とした。一方、Oasis HLB カートリッジ流出液にイオンペア剤、0.5 mol/L ヘプタンスルホン酸ナトリウム溶液 0.5mL を加え、十分混合した後、Oasis HLB カートリッジに負荷した。カートリッジを精製水 10mL で洗浄した後、メタノール 5mL で溶出した。溶出液を減圧乾固した後、残留物を 10%メタノール 1.0mL で溶解し、アミノグリコシド系抗生物質検査用試験溶液とした (図 1)。

B.8. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト及び動物由来の組織、臓器、細胞などを実験に使用していないため、倫理面への特別な配慮は行っていない。

C. 研究結果及び考察

C.1. 簡易検査法の検討

現在用いられている微生物学的簡易検査法は、前述したとおり試料 5g をクエン酸・アセトン緩衝液 20mL でホモジナイズ抽出し、その上清を試験溶液としている。即ち、試料中の抗菌性物質を 5 倍希釈する結果となり、検出感度の面で改善の余地がある。そこで、固相抽出法等の前処理を用いずに、試料中の抗菌性物質の希釈倍率を極力少なくする方法を検討した。抽出溶液としてメ

タノール、アセトニトリル、20%含水メタノール及び20%含水アセトニトリルを用いて検討した。アセトニトリルに比べ、メタノールの方が全体的に抽出効率に優れていた。また、メタノール、アセトニトリルとも水を20%含むと除蛋白が不十分となり、コントロールでも阻止円が形成される場合が時々観測された。そこで、抽出溶液にはメタノール10mLを用いることにした。本法による各抗菌性物質の検出感度は、表1、2に示すとおり、ペニシリン系、セフェム系が0.005~0.01ppm、マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン剤が0.1~0.5ppmであった。一方、アミノグリコシド系抗生物質（ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）はメタノール抽出では抽出率が悪いいためか、検出感度は5ppm以上であった。

本法は、アミノグリコシド系抗生物質を除き、現在用いられているクエン酸-アセトン緩衝液で抽出する簡易検査法に比べ、検出感度において数倍優れており、操作も試料10gをメタノール10mLでホモジナイズ抽出するのみと簡易であり、抗菌性を有する動物用医薬品の迅速なスクリーニング法として、有効な分析法の一つになるものと期待される。

C.2. 高感度検査法の検討

C.2.1 望まれる抗菌性物質の検出限界

畜水産食品中に汎用されている抗菌性物質標準溶液の検出限界は、表3、4のとおりである。今回、検討したメタノール抽出による簡易検査法は、操作法はメタノール抽出のみと簡易且つ迅速であるが、結果として、試料中に残留する抗菌性物質を約2倍に希釈することとなり、表3、4に示した検

出感度以上の結果を得ることは不可能である。

食品に残留する農薬等に関するポジティブリスト制度の施行が間近に迫っている。本制度の導入により、一定以上の農薬、動物薬が残留する食品の流通が禁止されることとなる。従って、畜水産食品中に含まれる抗菌性物質の検出感度としては、暫定基準及び一律基準(0.01ppm)を満足する検出感度が望まれる。

今回、約250種前後の動物用医薬品に対して、暫定基準が設定されるが、その約半数が抗生物質及び合成抗菌剤である。そこで、表5、6に抗菌性物質の代表的な食品における暫定基準を示した。ペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質の暫定基準は0.005~0.1ppm、マクロライド系抗生物質は0.05~1.5ppm、アミノグリコシド系抗生物質は0.04~2.0ppm、テトラサイクリン系抗生物質は0.05~0.6ppm、ポリペプチド、ポリエーテル系抗生物質は0.01~0.5ppm、キノロン剤は、0.01~0.2ppmの範囲にある。抗菌性物質により、望まれる検出感度は異なるが、一律基準を含めた暫定基準を総合的に考慮すると、0.01~0.1ppmを微生物学的試験法による望まれる検出感度とした。

今回検討した抗菌性物質標準品の検出感度を表3、4に示した。ペニシリン系及びセファロスポリン系抗生物質は、試験菌に*B. stearothermophilus*を用いることにより、高感度検出が可能であるが、他の多くの抗菌性物質に関しては、前処理により試料中の抗菌性物質を10~20倍程度濃縮する必要がある。なお、サルファ剤は、表6-1に示すとおり、標準溶液での検出感度が著しく低く、微生物学的試験法による検出は不適

と考え、以後の検討からは対象外とした。

C.2.2 前処理法の検討

現在公定法として採用されている「畜水産食品中の残留抗生物質分別推定法」を用いることにより、最終的に試料中に残留する薬物は10倍濃縮されることになる。しかし、操作に有機塩素系溶媒、クロロホルムを使用し、且つ操作が極めて煩雑である。

畜水産食品中の残留抗菌剤の前処理法として種々の方法が用いられている。著者らはこれまでにメタリン酸-メタノール系あるいはメタリン酸-アセトニトリル系溶液で除タンパクと同時に抽出し、多くの薬物が保持される逆相系カートリッジによる前処理法を採用してきた。マクロライド系やテトラサイクリン系抗生物質はメタリン酸-メタノール系が、一方キノロン剤は、メタリン酸-アセトニトリル系を用いることにより高回収率を得た。なお、除タンパク・抽出溶液中のメタリン酸濃度であるが、メタリン酸の濃度が高くなるに従い、除タンパク効果は優れるが、回収率が低下する薬物も見られた。即ち、メタリン酸濃度が高くなるに従い、試料抽出液のpHが低くなり、酸性条件下で不安定であるマクロライド系抗生物質、特にエリスロマイシンの分解が見られた。そこで、除タンパク・抽出溶液には試料抽出液のpHが4.5~5程度となる0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)を採用することにした。

次に、カートリッジであるが、テトラサイクリン系抗生物質やキノロン剤はシリカベースのODS系カートリッジでは、充填剤中の残存シラノール基や金属不純物の影響を強く受け、不可逆的に一部が吸着される。そこで、カートリッジには汎用性に優れた

ポリマー系逆相カートリッジOasis HLBを用いることにした。

なお、本前処理法ではアミノグリコシド系抗生物質は、そのほとんどがカートリッジに保持させず流出した。アミノグリコシド系抗生物質は、アミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であるため、逆相系のカートリッジに保持されない。そこで、カートリッジ流出液にイオンペア剤を加え、アミノグリコシド系抗生物質を保持させる手法を採用した。

C.2.3 添加回収実験

豚の筋肉にペニシリン系抗生物質からベンジルペニシリン、マクロライド系抗生物質からスピラマイシン、テトラサイクリン系抗生物質からオキシテトラサイクリン、キノロン剤からエンロフロキサシン、アミノグリコシド系抗生物質からストレプトマイシンを選び、添加回収実験を行った。添加レベルは、暫定基準を参考にして、0.1ppmとした。本法による添加回収率は表7に示すとおり、概ね70%以上であり、残留分析法としてほぼ満足すべき結果であると思われる。

C.2.4 検出感度

本法により、代表的な抗菌性物質の検出限界を調べた。表8,9に示すとおり、今回検討した12種類の豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度は、0.001~0.05ppmレベルであった。今回用いた、3種類の試験菌(4種類の検査用培地)に対する感受性パターンを観察することにより、残留抗菌性物質の系統を推定することも可能である。今回構築した本法は、食肉中に残留する抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングする手法として、日常検査法として実用的な試験

法であると考える。

D. 結論

畜水産食品中に残留する主な抗菌性物質として、ペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤などを中心とした、より多くの抗菌性物質を一括して検出できる高感度な微生物学的試験法を検討した。

畜水産食品から 0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)で除タンパクと同時に薬物を抽出し、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した。各グループから代表的薬剤を選び、0.1ppm レベルで添加回収実験を行った結果、その回収率は概ね70%以上であった。

本法は、動物用医薬品として汎用され、畜水産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤を簡易且つ高感度に検出することが可能であり、残留抗菌性物質のスクリーニング法として日常検査に用いられる実用的な方法であると考える。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

1) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之「微生物学的試験法による残留抗菌性物質のスクリーニング法の検討」第126年回日本薬学会(仙台)

2) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之「微生物学試験法による残留抗菌性物質の基礎的検討」第126年会日本薬学会(仙台)

3) 竹上晴美, 堀江正一「残留抗菌性物質の微生物学的簡易検査法の検討」第91回日本食品衛生学会(東京)

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

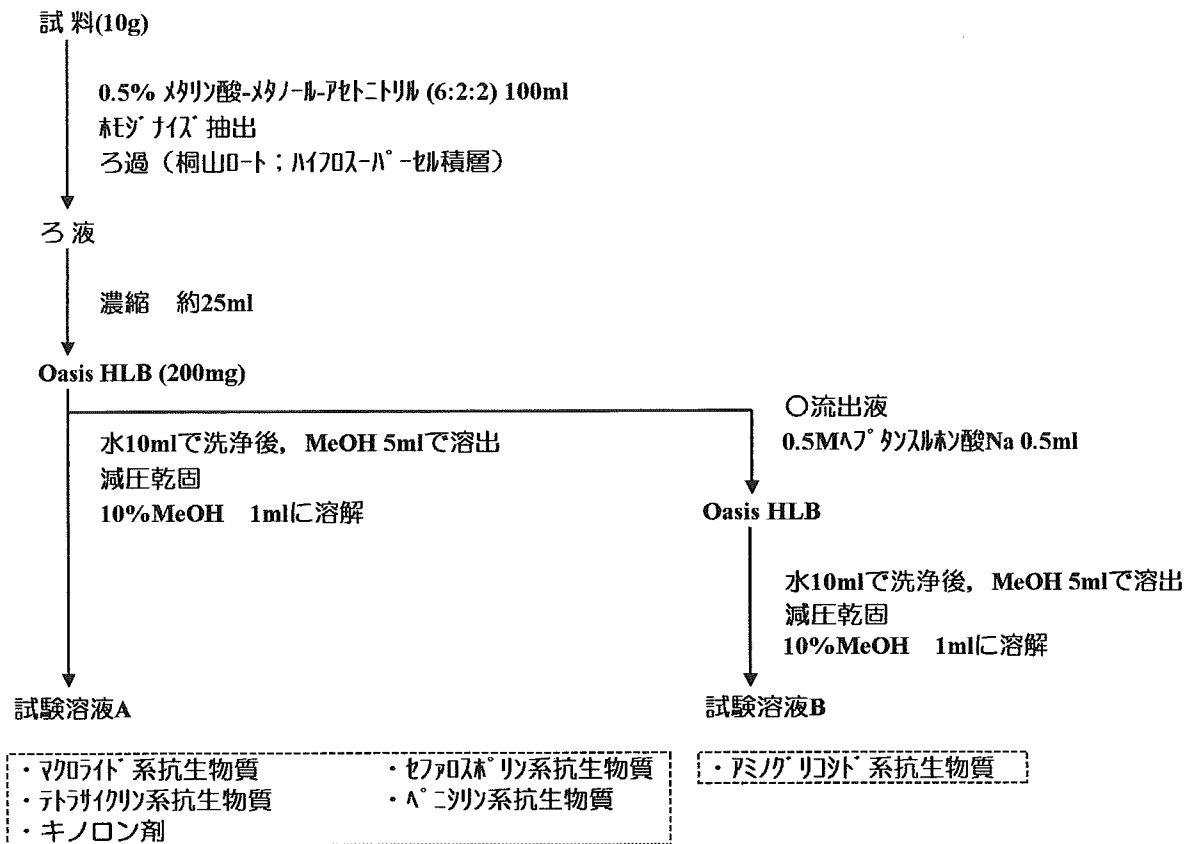


図1 高感度分析法の試験溶液調製法

表1 微生物学的簡易検査法の検出感度(μg/g)：試料 豚筋肉部

分類	抗菌性物質	検出感度 (μg/g)			
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearother -mophilus
ペニシリン系	Ampicillin	0.25	0.25	0.05	0.005
	Penicillin G	0.1	0.25	0.05	0.005
セファロスポリン系	Cephapirin	0.05	1	0.5	0.005
	Cephalexin	0.5	5	1	0.01
マクロライド系	Erythromycin	5	0.5	0.05	0.5
	Spiramycin	>10	10	0.5	10
アミノグリコシド系	Streptomycin	>10	5	10	>10
	Gentamycin	>10	>10	>10	>10
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	0.5	10	10	0.5
	Chlortetracycline	0.1	0.5	10	0.5
キノロン剤	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	Sarafloxacin	1	0.5	>10	1

表2 微生物学的簡易検査法の検出感度(μg/g)：試料 豚肝臓

分類	抗菌性物質	検出感度 (μg/g)			
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearother -mophilus
ペニシリン系	Ampicillin	0.1	0.25	0.05	0.005
	Penicillin G	0.05	0.25	0.1	0.005
セファロスポリン系	Cephapirin	0.05	0.5	0.5	0.01
	Cephalexin	1	10	1	0.05
マクロライド系	Erythromycin	5	0.25	0.05	0.5
	Spiramycin	>10	10	1	10
アミノグリコシド系	Streptomycin	>10	>10	>10	>10
	Gentamycin	>10	>10	>10	>10
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	1	>10	>10	1
	Chlortetracycline	0.5	5	>10	1
キノロン剤	Enrofloxacin	1	0.5	>10	1
	Sarafloxacin	1	0.5	>10	1

表3 抗生物質の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 (µg/mL)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>B.stearother</i> -mophilus	
β-ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	0.001
	アンピシリン	Ampicillin	0.05	0.05	0.01	0.001
	ペニシリンG	Penicillin G	0.05	0.1	0.01	0.001
	セフォペラゾン	Cefoperazone	2	>50	0.5	0.001
	セフトキシム	Cefuroxime	0.25	>50	0.5	0.001
	セファピリン	Cephapirin	0.01	0.5	0.1	0.001
	セファロニウム	Cephalonium	0.25	5	1	0.005
	セファレキシン	Cephalexin	0.5	5	0.5	0.01
	セファゾリン	Cephazolin	5	10	10	0.002
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	0.5	0.1	0.05	1
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	5	0.5	0.25	25
	キタサマイシン	Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	2.5
	ジョサマイシン	Josamycin	2.5	1	0.25	2.5
	スピラマイシン	Spiramycin	10	1	0.5	5
	タイロシン	Tylosin	2.5	0.5	0.5	0.25
	チルミコシン	Tilmicosin	2.5	0.5	0.5	0.5
	ミロサマイシン	Mirosamicin	2.5	2.5	0.5	0.1
アミノグリコシド系	アプラマイシン	Apramycin	10	2.5	10	5
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomycin	10	0.5	2.5	2.5
	パロモマイシン	Paromomycin	10	0.5	10	5
	ネオマイシン	Neomycin	2.5	2.5	2.5	1
	ゲンタマイシン	Gentamycin	1	0.5	5	0.5
	ハイグロマイシンB	Hygromycin B	>50	25	10	50
	カナマイシン	Kanamycin	2	1	5	5
	スペクチノマイシン	Spectinomycin	>10	12.5	10	5
	ストレプトマイシン	Streptomycin	5	0.5	2.5	5
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	0.25	5	10	0.1
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	0.05	0.5	10	0.5
	テトラサイクリン	Tetracycline	0.25	5	10	0.1
	ドキシサイクリン	Doxycycline	0.05	0.1	1	
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	2.5	2.5	5	0.1
	コリスチン	Colistin	>50	>50	>50	25
	チオペプチン	Thiopeptin	0.5	1	0.5	0.1
	ノシヘプタイド	Nosiheptide	2.5	2.5	0.25	
	バージニアマイシン	Virginiamycin	2.5	5	0.4	0.5
	バシトラシン	Bacitracin	>10	>10	0.4	0.5
ポリエーテル系	ラサロシド	Lasalocid	2.5	10	50	1
	モネンシン	Monensin	10	10	50	1
	サリノマイシン	Salinomycin	2.5	10	50	0.5
その他	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	10	10	5	5

表4 合成抗菌剤の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 (µg/mL)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>B.stearo</i> ther -mophilus	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	>50	>50	>50	>50
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimazine	>50	>50	>50	>50
	スルファドキシ	Sulfadoxine	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキシピリダジン	Sulfamethoxypyridazin	>50	>50	>50	>50
	スルファメラジン	Sulfamerazine	>50	>50	>50	>50
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	>50	50	>50	>50
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	>50	>50	>50	>50
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	1	0.1	2	2
	ジフロキサシン	Difloxacin	0.5	0.05	>50	
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	エノキサシン	Enoxacin	2.5	2.5	>10	1
	フルメキン	Flumequine	1	2.5	>50	>50
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	1	0.1	5	1
	ミロキサシン	Miloxacin	0.5	2.5	>50	50
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	1	10	>50	>50
	ノルフロキサシン	Norfloxacin	1	0.5	>50	
	オフロキサシン	Ofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	0.5	0.25	25	
	オキシリン酸	Oxolinic acid	0.5	1	>50	5
	サラフロキサシン	Sarafloxacin	0.5	0.25	50	0.5
	スパフロキサシン	Sparfloxacin	0.5	0.1	5	1
	ベブフロキサシン (ベノフロキサシン)	Vebufloxacin	2.5	0.5	25	2.5
その他	フロルフェニコール	Florfenicol	5	2.5	5	2.5

表5-1 抗生物質・暫定基準(MRLs)

分類	抗生物質	牛肉	豚肉	鶏肉	牛肝臓	豚肝臓	鶏肝臓	乳	魚介類
β-ラクタム系(β-Lactams)	アスピキシリン	0.05	0.05	0.02	0.05	0.05	0.02	0.05	0.05
	アモキシシリン	0.04	0.04	0.02	0.04	0.04	0.02	0.008	0.05
	アンピシリン	0.03	0.06	0.02	0.04	0.06	0.03	0.05	0.05
	オキサシリン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.03	0.3
	クロキサシリン	0.04	0.3	0.3	0.04	0.3	0.3	0.02	0.3
	ジクロキサシリン	0.03	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.01	0.3
	ナフシリン	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
	ペニシリンG	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.004	0.05
	メシリンAM	0.05	0.05		0.05	0.05		0.05	
	セファセトリン							0.1	
	セファゾリン	0.05			0.05			0.05	
	セファピリン	0.03			0.03			0.03	
	セファレキシン	0.2			0.2			0.1	
	セファロニウム	0.01			0.01			0.01	
β-ラクタム系(β-Lactams)	セフォペラゾン					0.1		0.05	
	セフキノム	0.04	0.05		0.04			0.02	
	セフチオフル	1.0	1.0		2.0	2.0		0.1	
	セフロキシム	0.02			0.02			0.02	
	エリスロマイシン	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.2
	オレアンドマイシン	0.05	0.1	0.2	0.05	0.1	0.2	0.05	0.05
	キタサマイシン		0.2	0.2		0.2	0.2		
	ジョサマイシン		0.04	0.04		0.04	0.04		0.05
	スピラマイシン	0.2	0.2	0.2	0.6	0.6	0.6	0.6	0.2
	セチカマイシン		0.05			0.05			
	タイロシン	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.1
	酢酸イソバレルイロシン								
	チルミコシン	0.1	0.1	0.08	1.0	1.5	1.0	0.05	0.05
	テルデカマイシン		0.05	0.3		0.05	0.3		
ミロサマイシン		0.05	0.04		0.05	0.04			
マクロライド系	アプラマイシン	0.5	0.06	0.2	6	0.06	0.8		
	デストマイシンA		0.5			0.5			
	ジヒドロストレプトマイシン及びストラプトマイシン(和)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.2	
	フラジオマイシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	ゲンタマイシン	0.1	0.1	0.1	2.0	2.0	0.1	0.2	
	カナマイシン	0.04	0.1	0.5	0.04	0.1	0.5	0.4	
	スペクチノマイシン	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0	2.0	0.2	0.3
	パロモマイシン	0.5	0.5	0.5	2.0	2.0	2.0	0.2	0.5

表5-2 抗生物質・暫定基準(MRLs)

分類	抗生物質	牛肉	豚肉	鶏肉	牛肝臓	豚肝臓	鶏肝臓	乳	魚介類
テトラサイクリン系	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(和)	0.2	0.2	0.2	0.6	0.6	0.6	0.1	
	Oxytetracycline/Chlortetracycline/Tetracycline								
ポリペプチド系	ドキシサイクリン	0.1	0.05	0.05	0.3	0.05	0.05		0.05
	アポパルシン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01	
	エンラマイシン		0.03	0.03		0.03	0.03		
	コリスチン	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.05	0.2
	ノシヘプチド		0.03	0.03		0.03	0.03		
	ポリミキシンB							0.5	
	バージニアマイシン	0.1	0.1	0.05	0.2	0.3	0.2	0.1	
	バクトラシン	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	
	アビラマイシン		0.03	0.05		0.03	0.05		
	ラサロシド	0.02	0.05	0.01	0.02	0.7	0.01	0.01	0.005
ポリエーテル系	モネンシン	0.05	0.05	0.5	0.05	0.05	0.5	0.01	
	マジュラマイシン			0.1			0.8		
	ナラシン	0.05		0.1	0.05		0.3		
	サリノマイシン	0.02	0.1	0.1	0.4	0.2	0.5		
	センデュラマイシン			0.09			0.5		
	ビコザマイシン	0.2	0.2	0.05	0.2	0.2	0.05	0.1	0.05
	クロラムフェニコール	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ナナフロシン	0.03			0.03			0.03	
	エフロトマイシン		0.03			0.03			
	フラボフォスホリポール	0.01	0.01	0.03	0.01	0.01	0.03	0.03	0.01
その他	ホスホマイシン	0.5			0.5			0.05	0.05
	リンコマイシン	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5	0.5	0.15	0.1
	ノボビオシン	0.7		0.05	0.7		0.05	0.08	0.05
	バルネムリン		0.05			0.05			
	チアムリン		0.04	0.1		0.04	0.6		

表6-1 合成抗菌剤・暫定基準(MRLs)

分類	合成抗菌剤	牛肉	豚肉	鶏肉	牛肝臓	豚肝臓	鶏肝臓	乳	魚介類
サルファ剤	スルファエトキシピリダジ	0.1	0.1		0.1	0.1		0.01	
	スルファプロモメサジン	0.1			0.1			0.01	
	スルファクロピリダジン	0.1	0.05		0.1	0.05			
	スルファジアジン	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.05	0.07	
	スルファジメトキシ	0.05	0.2	0.05	0.05	0.2		0.02	
	スルファジミン	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.025	
	スルファドキシ	0.1	0.1		0.1	0.1		0.06	
	スルファグアニジン	0.1	0.1		0.1	0.1		0.01	
	スルファメトキサゾール		0.02	0.02		0.02	0.02		
	スルファメトキシピリダジン		0.03			0.05			
	スルファメラジン	0.1	0.1		0.1	0.1			
	スルファモノメトキシ	0.01	0.02	0.1	0.05	0.05	0.1	0.01	0.1
	スルファキノキサリン	0.1		0.05	0.1	0.1	0.05	0.01	
	スルファチアゾール	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.09	
	スルファセタアミド								
	スルファトロキサゾール	0.1	0.1		0.1	0.1		0.1	
	スルファニトラン			0.1			0.1		
	スルファミラミド	0.1	0.1		0.1	0.1		0.01	
	スルファピリジン	0.1	0.1		0.1	0.1		0.01	
	スルファベンズアミド	0.1			0.1			0.01	
	スルファモイルダブソン		0.1			0.1			
	スルフィンゾール								0.1
	キノロン剤	ダノフロキサシン	0.20	0.10	0.20	0.40	0.05	0.40	0.05
ジフロキサシン		0.4	0.02	0.3	1	0.02	2		0.3
エンフロキサシン		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.1
フルメキン		0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.1	0.5
ミロキサシン									0.5
ナリジクス酸		0.03			0.03				
ノルフロキサシン			0.02	0.02		0.02	0.02	0.02	
オフロキサシン				0.05			0.05		
オルビフロキサシン		0.02	0.02		0.02	0.02		0.02	
オキソリン酸		1	1	1	1	1	1		0.05
サラフロキサシン				0.01			0.08		0.03
マルボフロキサシン		0.2	0.2		0.2	0.2		0.08	

表6-2 合成抗菌剤・暫定基準(MRLs)

分類	合成抗菌剤	牛肉	豚肉	鶏肉	牛肝臓	豚肝臓	鶏肝臓	乳	魚介類
ニトロフラン剤	ニトロフラン類	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	ニフルスチレン酸Na								0.05
ジオキシキノキサリン系	カルバドックス	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	オラキンドックス	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3		
抗原虫剤	アンプロリウム	0.5		0.03	0.5		0.03		
	クロピドール	0.2	0.2	5	2	0.2	20		
	デコキノート	1		0.1	2		0.1		
	ジニトルミド			0.1			0.1		
	エトバベート			0.04			0.04		
	ナイカルバジン			0.2			0.2		
	ピリメタミン		0.05	0.05		0.05	0.05		
	ロベニデイン			0.1			0.1		
	フロルフェニコール	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	3		0.2
	ハロフジノン	0.01		0.01	0.02		0.4		
	モランテル	0.3	0.3	0.03	1	5	0.03	0.1	
その他	ピランテル		1			10			
	オルメトプリム	0.02	0.05	0.1	0.02	0.05	0.1		0.1
	チアンフェニコール	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.02
	トリメトプリム	0.05	0.1	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.08

表7 添加回收實驗

抗菌性物質		Added ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%) (mean, n=2)
Penicillin G	豚筋肉部	0.1	77
	豚肝臟	0.1	67
Cephapirin	豚筋肉部	0.1	82
	豚肝臟	0.1	75
Spiramycin	豚筋肉部	0.2	80
	豚肝臟	0.2	63
Chlortetracycline	豚筋肉部	0.1	68
	豚肝臟	0.1	57
Streptomycin	豚筋肉部	0.1	75
	豚肝臟	0.1	77
Enrofloxacin	豚筋肉部	0.1	80
	豚肝臟	0.1	76

表8 高感度検査法の検出限界（豚肉）

分類	抗生物質等	検出感度 (µg/g)			
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearother -mophilus
ペニシリン系	Ampicillin	0.01	0.01	0.005	0.001
	Penicillin G	0.005	0.01	0.005	0.001
セファロスポリン系	Cephapirin	0.005	0.01	0.01	0.001
	Cephalexin	0.05	0.5	0.1	0.01
マクロライド系	Erythromycin	0.05	0.01	0.005	0.05
	Spiramycin	2	1	0.05	0.1
アミノグリコシド系	Streptomycin	0.1	0.01	0.20	1
	Gentamycin	0.1	0.02	1>	0.2
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	0.05	0.5	0.5	0.01
	Chlortetracycline	0.01	0.1	0.5	0.005
キノロン剤	Enrofloxacin	0.05	0.02	1	0.05
	Sarafloxacin	0.05	0.05	5	0.05

表9 高感度検査法の検出限界（豚肝臓）

分類	抗生物質等	検出感度 (µg/g)			
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearother -mophilus
ペニシリン系	Ampicillin	0.01	0.01	0.005	0.001
	Penicillin G	0.005	0.01	0.005	0.001
セファロスポリン系	Cephapirin	0.005	0.01	0.02	0.001
	Cephalexin	0.05	0.5	0.1	0.01
マクロライド系	Erythromycin	0.5	0.02	0.005	0.05
	Spiramycin	2	1	0.05	0.1
アミノグリコシド系	Streptomycin	0.2	0.01	0.2	1.00
	Gentamycin	0.2	0.02	1>	0.20
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	0.05	0.5	0.5	0.01
	Chlortetracycline	0.01	0.1	0.5	0.005
キノロン剤	Enrofloxacin	0.05	0.02	1	0.05
	Sarafloxacin	0.05	0.05	5	0.05

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進) 研究報告書
食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

分担研究報告書

「キノロン系抗菌剤の残留分析における ELISA 法と機器分析法の比較」

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学 薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学 薬品分析化学教室
	伊東 岳	星薬科大学 薬品分析化学教室

研究要旨

食品において抗菌性物質の残留が数多く検出されていることから、残留を評価するのに簡便且つ迅速に分析可能な市販 ELISA キットの有用性を検討した。また、畜水産食品に残留する抗菌性物質の測定に際して高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法(HPLC/FL)を用いた高精度な機器分析法を構築した。ELISA 法との相関性を検討するため、食肉を試料として機器分析法および ELISA 法をそれぞれ適用したところ、共に定量限界値以下であった。機器分析法では煩雑な前処理を必要とするため、ELISA 法はスクリーニング法として有用であると考えられる。

A. 研究目的

近年、粉卵やハチミツなどの輸入食品を中心に抗菌性物質の残留が数多く検出されている。これらの薬剤は、主に動物用医薬品や飼料添加物として使用されており、法的に規制された用法用量、休薬期間等が遵守されずに使用された場合、畜水産食品中に残留するといわれている。

抗菌性物質の定量には機器分析が主に使用されており、これまでキノロン系抗菌剤の分析法も数多く報告されてきた。しかし、対象薬剤や試料によって前処理方法を変えなければならず、更に測定時間が長いことを考慮すると、多数の検体を簡便に測定するためには適当でない。

他方、多数の検体を対象に医薬品の残留を評価するには簡便且つ迅速に分析可能な Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法が有用性であると考えられる。ELISA 法は抗原抗体反応を利用した免疫化学的な測定法の一つで、特定の物質に対して特異的に検出することが可能なため、比較的簡単な前処理操作で、短時間に多数の検体を分析することができる。しかし、ELISA 法では安定した活性を持った抗原や抗体の作製が難しいことや、固相化の作業などが煩雑であるため、普及が進んでいないのが現状である。

そこで本研究では、これらの問題点を克服した市販 ELISA キットの有用性を検