

討することを目的として、畜水産食品に残留するキノロン系抗菌性物質を対象とした機器分析法と ELISA 法との相関性を調査した。

## **B. 研究方法**

市販 ELISA キットを使用し、畜産食肉中キノロン系抗菌剤に関して検証する。

### **B.1 測定対象物質**

キノロン系抗菌剤である、エノキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、ロメフロキサシン、エンフロキサシン、ガチフロキサシンを測定対象物質とした。

### **B.2 ELISA キット**

フロンティア研究所社製 New Quinolone Kit を用い、キノロン系抗菌剤の測定を行った。定量値は反応率が 100 % であるエンフロキサシン量に換算することで求めた。

### **B.3 機器分析の測定条件**

キノロン系抗菌剤の測定は、高速液体クロマトグラフィー/蛍光検出法 (HPLC/FL) を使用した。分析用ポンプとして島津製作所社製 LC-10AS および蛍光検出器には RF-10A<sub>XL</sub> を用いた。移動相には 20 mM ギ酸緩衝液 (pH = 3.0) : アセトニトリル = 83 : 17 (v:v) を調製し、イオンペーパー試薬として Nonfluoropentanoic acid (NFPA) を 0.2 % になるように加え、送液した。分析カラムには Waters 社製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm) を用いた。蛍光検出器の測定波長は励起波長 270 nm、蛍光波長 447 nm として測定を行った。

### **B.4 前処理方法**

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、アセトニトリル 15 mL 加えた後に、ホモジナイズにより粉碎化を行った。その後、遠心分離操作 (3000 rpm、10 min) により得られた上清を回収し、残渣にアセトニトリル 15 mL を加え、遠心分離操作 (3000 rpm、10 min) を再度行った、アセトニトリル相を 40°C、減圧下で乾固させ、得られた残渣に 20 mM リン酸塩緩衝液 (pH 2.0) を加えて再溶解させた。その後、Oasis MCX (30 mg) を用いた固相抽出法を適用した。固相抽出条件は、洗浄溶媒にメタノール (1 mL) と 50 mM 炭酸アンモニウム (2 mL) を使用し、5 % アンモニア含有メタノール (3 mL) で固相カートリッジからキノロン系抗菌剤の脱離を行った。溶出液を 40°C、減圧下で乾固し、得られた残渣に PBS を加えて再溶解させ、HPLC/FL の測定試料とした。

### **B.5 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**

### **C.1 ELISA における交差反応性の評価**

New Quinolone Kit における交差反応性について、キノロン系抗菌剤標準品を用いて求めたところ、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンが 100 % 反応する結果を得ることができた。また、ダノフロキサシンは 80 %、ロメフロキサシンは

30 %前後で交差反応性を示した(Table 1)。また、ELISA キットによる定量限界値は 8 ng/mL であった。

### C.2 キノロン系抗菌剤の分離検討

キノロン系抗菌剤標準品を用い、HPLC/FL における分離条件の検討を行った。既報の条件をもとに分離を行ったところ、シプロフロキサシンとロメフロキサシンの分離が不十分であった。そこで、イオンペア試薬である NFPA を添加し、分離条件の再検討を行ったところ、構造が類似している 8 種類のキノロン系抗菌剤を一斉分析法することができた。

詳細な測定条件として、NFPA の濃度検討を行ったところ、最適な NFPA 濃度は 0.2 %であった。

蛍光検出器は移動相の pH および塩濃度に依存して蛍光強度が変化することから、それぞれの最適条件を検討した。キノロン系抗菌剤の蛍光強度は pH 7 以上の条件で蛍光を示さず、中性から酸性条件化で一定の蛍光強度を示したことから、キノロン系抗菌剤の測定には pH 3.0 を使用した。同様に、最大の強度を示した、塩濃度 20 mM を最適条件とした(Fig. 1)。

### C.3 試料の前処理方法

試料に含まれる共存物質の影響を取り除くため、Oasis HLB および Oasis MCX を使用した前処理方法を検討した。Oasis HLB を使用した場合、平均回収率が 50 % と低く、HPLC/FL においても共存物質の影響を完全に除去することができなかった。しかし、陽イオン交換系カートリッジである MCX を用いたことで、標準品に

おける平均回収率は 70 %以上と良好な結果を得ることができた(Table 2)。

### C.4 HPLC/FL の分析バリデーション

本分析法の、食肉中における検出限界および定量限界を求めた。検出限界(S/N = 3)は 1~100 ng/mL、定量限界(S/N > 10)は 5~500 ng/mL であった。また、食肉における添加回収試験を行ったところ、62.5 ~107.3 %の結果が得られた(Table 3)。

### C.5 実試料の測定結果

キノロン系抗菌剤標準品および実試料のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。他の共存物質の影響を受けることなく良好に分離された。本分析法を用いて、食肉中キノロン系抗菌剤を測定した。その結果、HPLC/FL において、一部の食肉からダノフロキサシンおよびエンロフロキサシンが検出された(< 5 ng/mL)が、定量限界未満であった。また、同一の試料を ELISA で測定したところ、同様に定量限界値 (8 ng/mL)未満となった(Table 4)。

## D. 考察

市販されている ELISA キットの有用性を検討するため、畜水産食品に残留する抗菌性物質の高精度な機器分析法を構築し、ELISA 法との相関性を検討した。

ELISA キットの交差反応性を調べたところ、構造特異的に交差反応率が変化することがわかった。

実際の食肉中に適用したところ、一部の試料からダノフロキサシンとエンロフロキサシンが検出された(< 5 ng/mL)。しかし、この濃度では質量分析器において

も検出することが困難であるため、今後は試料の濃縮等を検討し、定性を行っていく必要があると思われる。また、ELISAにおいても、全ての試料で定量限界未満(8 ng/mL)であったが、機器分析と比較し、わずかながら高値を示す傾向がうかがえた。このことは、共存物質による交差反応性もしくは、測定対象物質以外にも交差反応性を示す、抗菌剤が存在する可能性を示唆している。

#### E. 結論

ELISA 法は簡便な方法で、多検体を測定できる利点を有している。しかしながら、交差反応性などの問題から、客観的な情報が不足しており、汎用性に乏しかった。キノロン系抗菌剤を対象薬剤として、機器分析法と ELISA 法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料へと適用したところ、全ての試料が定量限界未満といった結果が得られた。機器分析における前処理等煩雑な操作を考慮すると、スクリーニング法としての ELISA の有用性が示唆された。現在、Table 5 に示すような動物用医薬品測定用市販 ELISA キットが市販されており、今後さらなる研究を進めていく必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

1) 伊東 岳、湧井 宣行、川口 研、岩崎 雄介、伊藤 里恵、堀江 正一、斉藤 貢一、中澤 裕之、環境水中の抗菌活性物質測定法の開発。日本分析化学会第 54 年会

(2005 年 9 月・名古屋)

2) 伊東 岳、湧井 宣行、川口 研、加藤 美穂子、小平 司、堀江 正一、岩崎 雄介、伊藤 里恵、斉藤 貢一、中澤 裕之、ELISA による河川水中に残留するニューキノロン系抗菌剤の測定。日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月・仙台)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Cross-reactivity of newquinolones

	<b>Enoxacin</b>	<b>Norfloxacin</b>	<b>Ofloxacin</b>	<b>Ciprofloxacin</b>
<b>Cross-reactivity</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>1.4</b>	<b>100</b>

	<b>Danofloxacin</b>	<b>Lomefloxacin</b>	<b>Enrofloxacin</b>	<b>Gatifloxacin</b>
<b>Cross-reactivity</b>	<b>80</b>	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>0.9</b>

(%)

Table 2 Recoveries of newquinolones in standard solution using MCX cartridge

<b>Analyte</b>	<b>Enoxacin</b>	<b>Norfloxacin</b>	<b>Ofloxacin</b>	<b>Ciprofloxacin</b>
<b>500 ng/mL</b>	<b>96.2 ± 13.3</b>	<b>80.3 ± 7.7</b>	<b>88.2 ± 3.2</b>	<b>74.5 ± 7.5</b>

<b>Analyte</b>	<b>Danofloxacin</b>	<b>Lomefloxacin</b>	<b>Enrofloxacin</b>	<b>Gatifloxacin</b>
<b>500 ng/mL</b>	<b>89.9 ± 7.7</b>	<b>151.4 ± 48.5</b>	<b>85.2 ± 12.9</b>	<b>84.4 ± 4.7</b>

Mean ± S.D.(%)  
(n = 3)

Table 3 Recoveries of newquinolones in meat sample using MCX cartridge

Analyte	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin
500 ng/mL	62.5 ± 27.8	73.2 ± 3.8	92.4 ± 6.8	78.2 ± 5.5

Analyte	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
500 ng/mL	94.2 ± 1.3	84.4 ± 6.5	107.3 ± 2.2	84.8 ± 2.3

Mean ± S.D.(%)  
(n = 3)

Table 4 Concentration of newquinolones in meat samples by ELISA and HPLC/FL

	ELISA	HPLC/FL							
	Enrofloxacin 等量	Enoxacin	Norfloxacin	Ofloxacin	Ciprofloxacin	Danofloxacin	Lomefloxacin	Enrofloxacin	Gatifloxacin
食肉(豚もも)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.
食肉(鳥レバー)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.
食肉(鳥砂肝)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
食肉(鳥むね肉)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
食肉(豚ロース)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.
食肉(鳥ササミ)	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
LOD		100	10	100	5	1	5	1	25
LOQ	8	300	50	500	15	5	25	5	100

(ng/mL)

N.D.: Not detection  
N.Q.: Not quantification

Table 5 動物用医薬品測定用市販 ELISA キット

対象物質	商品名	形態	定価	商品番号	販売等
クロラムフェニコール	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ クロラムフェニコール	96W	¥78,000	3321P	アヅマックス株式会社
テトラサイクリン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ テトラサイクリンル	96W	¥78,000	3511P	アヅマックス株式会社
ストレプトマイシン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ ストレプトマイシン	96W	¥78,000	3651P	アヅマックス株式会社
ニトロフラン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ ニトロフラン AOZ	96W	¥90,000	3911P	アヅマックス株式会社
ニトロフラン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ ニトロフラン AMOZ	96W	¥90,000	3912P	アヅマックス株式会社
サルファメタジン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ サルファメタジン	96W	¥78,000	3214P	アヅマックス株式会社
サルファメタジン	RIDA スクリーン 残留抗菌性物質シリーズ FAST サルファメタジン	48W	¥38,000	3214P	アヅマックス株式会社
フェニトロチオン	フェニトロチオン測定キット	96W			ホリババイオテクノロジー
イソプロチオラン	イソプロチオラン測定キット	96W			ホリババイオテクノロジー

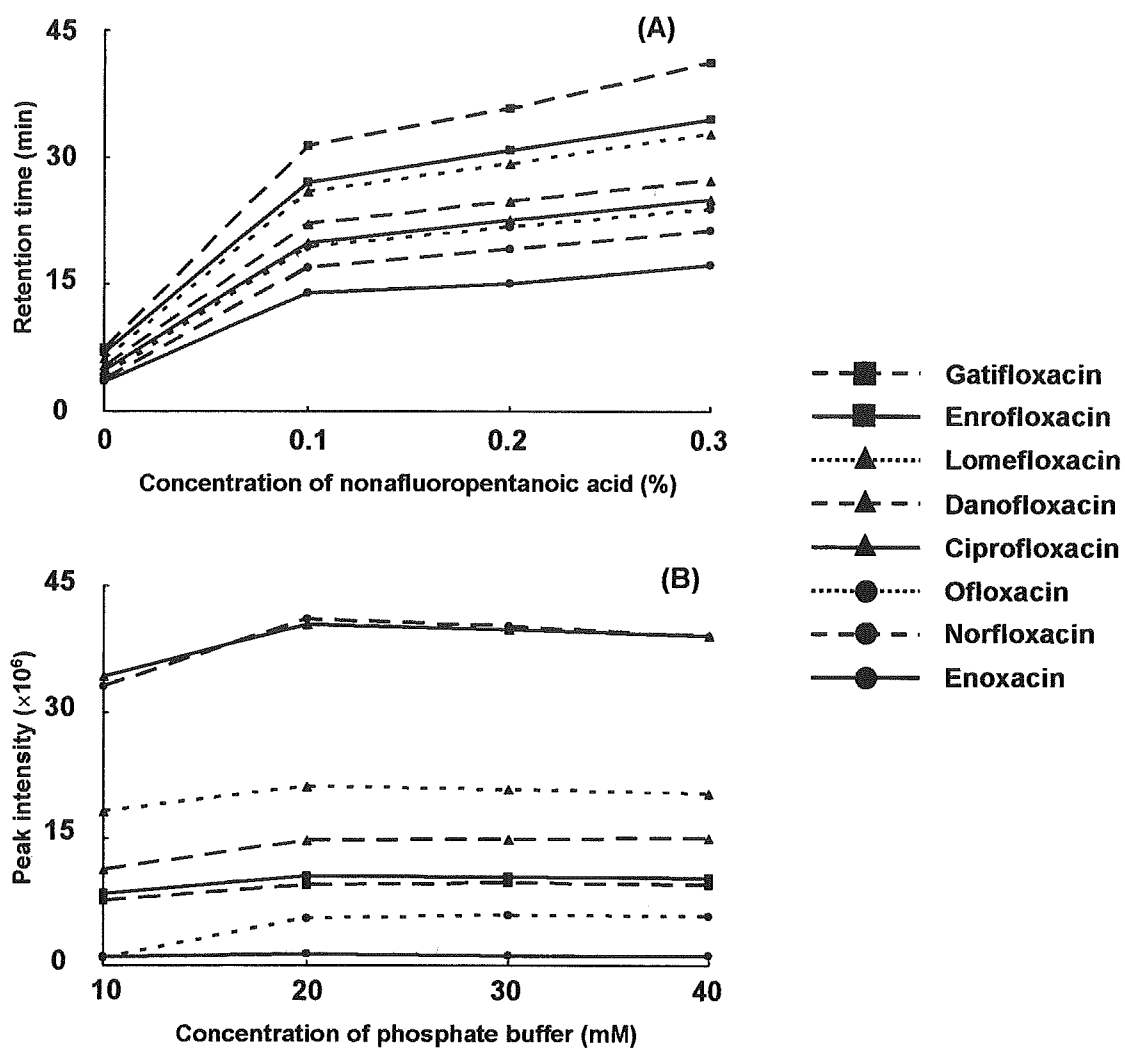


Fig.1 Optimal concentration of (A) nonafluoropentanoic acid and (B) formate buffer in the mobile phase

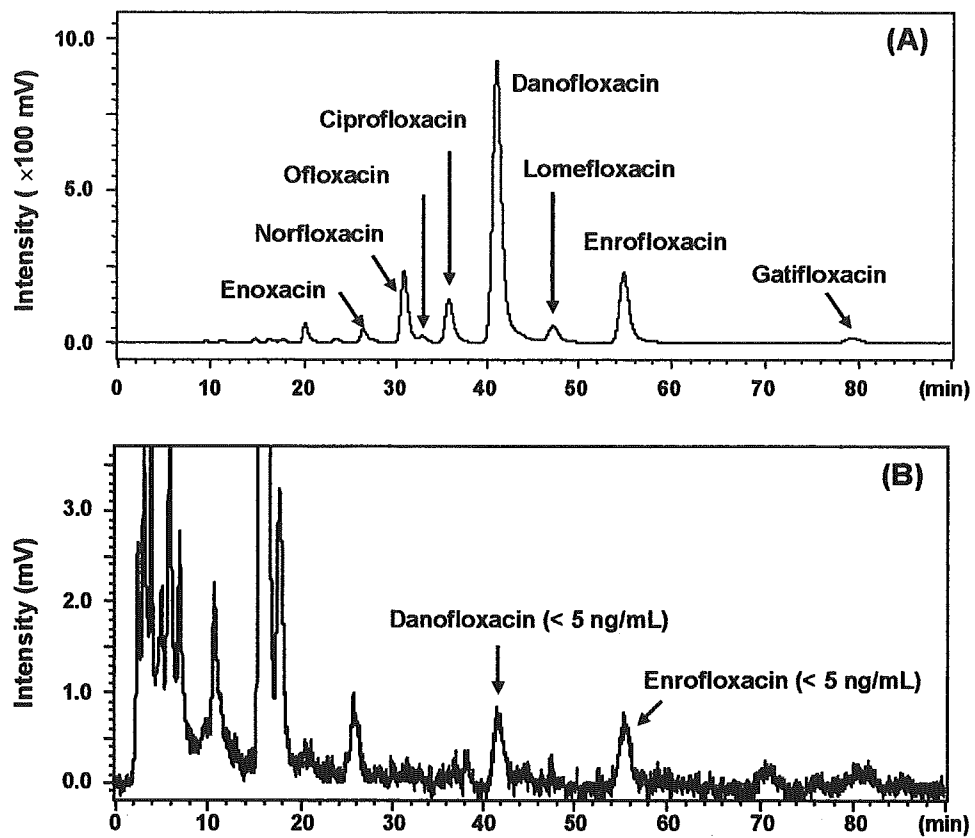


Fig. 2 Chromatograms of newquinolone standard (A) and meat sample (B)



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

「バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質及び  
テトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討」

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
分担研究者	丹野 憲二	財団法人 日本食品分析センター
研究協力者	藤田 和弘	財団法人 日本食品分析センター
	伊藤 裕信	財団法人 日本食品分析センター

研究要旨

バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質の系統別スクリーニング法の検討を行った。その結果、試験菌株としてβ-ラクタム系抗生物質には、*Bacillus stearothermophilus* 市販芽胞溶液が、テトラサイクリン系抗生物質には、*Bacillus subtilis* BGA 市販芽胞溶液が有効であった。標準溶液を用いた検出感度は、β-ラクタム系抗生物質では、0.0025~0.1 μg/mL、テトラサイクリン系抗生物質では、0.04~0.2 μg/mLであった。また、牛筋肉・肝臓または豚筋肉・肝臓を用いた添加回収実験における検出限界は、β-ラクタム系抗生物質では、0.001~0.1 ppm、テトラサイクリン系抗生物質では、0.02~0.1 ppm であり、概ね残留基準値をクリアする結果であった。よって、本分析法は、機器分析の前段階としての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**

ポジティブリスト制の導入により、動物用医薬品の残留基準値が数多く設定され、HPLC等の機器分析による手法が提示されている。一方で、「抗菌性物質は、検出してはならない。」という従来の規制も残されており、バイオアッセイにより、評価する側面も残されている。従来から輸入検査等で実施されている簡易検査法では、新たに設定された残留基準値をクリアできないものが数多くあり、整合性

がとれない面があることから、高感度なバイオアッセイへの改良が必要と考えられた。

本研究では、β-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質にターゲットを絞り、また、試験菌株の管理が煩雑であることから、市販芽胞溶液の有効性を評価することを考慮し、バイオアッセイによる系統別スクリーニング法の検討を行った。

**B. 研究方法**

## B.1 試料

牛の筋肉・肝臓及び豚の筋肉・肝臓(市販品)

## B.2 測定対象物質

$\beta$ -ラクタム系抗生物質としてアスポキシシリン(ASPC)、アモキシシリン(AMO)、アンピシリン(AMP)、オキサシリン(OX)、クロキサシリン(CX)、ジクロキサシリン(DCX)、セファゾリン(CEZ)、セファピリン(CEPR)、セファレキシン(CEX)、セファロニウム(CEN)、セフォペラゾン(CPZ)、セフキノム(CEQ)、セフロキシム(CXM)、ナフシリン(NF)、フェノキシメチルペニシリン(PCV)、ベンジルペニシリン(PCG)を、テトラサイクリン系抗生物質として、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)、テトラサイクリン(TC)、ドキシサイクリン(DC)を測定対象物質とした。

## B.3 ペーパーディスク法の測定条件

### B.3.1 $\beta$ -ラクタム系抗生物質

試験菌株：*Bacillus stearothermophilus* spore suspension(Merck 社製)

培地：Heart Infusion Agar(HIA)(Becton Dickinson 社製)

分注量：外形 90 mm のペトリ皿に対して 8 mL

菌濃度：培地 1 mL 当たり  $10^5$ cfu

培養温度：55 °C

培養時間：16～17 時間

### B.3.2 テトラサイクリン系抗生物質

試験菌株：*Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension(Merck 社製)

培地：Antibiotic Medium 8(AM8)  
(Becton Dickinson 社製)

分注量：外形 90 mm のペトリ皿に対して 8 mL

菌濃度：培地 1 mL 当たり  $10^4$ cfu

培養温度：36 °C

培養時間：16～17 時間

## B.4 前処理法

### B.4.1 $\beta$ -ラクタム系抗生物質

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、水 30 mL を加えた後、ホモジナイザーにより均一化した。次に 0.17 mol/L 硫酸 5 mL 及び 5 % タングステン酸ナトリウム溶液 5 mL を加えて振とう(5 分)した後、遠心分離(3,500 rpm、4 °C、5 分)を行い、上澄み液を分取して、ガラス繊維ろ紙(GFP 40  $\phi$  m/m)により吸引ろ過した。ろ液の pH を水酸化ナトリウム溶液で 7.5 に調整した後、あらかじめアセトニトリル 5 mL、水 5 mL 及び 2 % 塩化ナトリウム含有リン酸塩緩衝液(pH7.5)5 mL で活性化した Oasis HLB(200 mg)カートリッジに通した。カートリッジを 2 % 塩化ナトリウム含有リン酸塩緩衝液(pH7.5)10 mL、水 10 mL の順に洗浄した後、80 % アセトニトリル 5 mL を加えて溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、1 % リン酸塩緩衝液(pH6.0)1 mL を加えて残留物を溶解し、試料溶液とした。

### B.4.2 テトラサイクリン系抗生物質

細切した食肉約 10 g を正確に量り取り、0.001 mol/L EDTA2Na 含有 pH4.0 マツキルペイン緩衝液 100 mL を加えた後、ホモジナイザーにより均一化した。次にへ

キサン 100 mL を加えて振とう(5分)した後、遠心分離(3,500 rpm、4 °C、5分)を行い、下層をろ過した。ろ液 50 mL をあらかじめメタノール 10 mL、水 10 mL 及び飽和 EDTA2Na 溶液 5 mL で活性化した GL-Pak PLS-2(270 mg)カートリッジに通した。カートリッジを水 30 mL で洗浄した後、メタノール 10 mL を加えて溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、0.1 mol/L リン酸塩緩衝液(pH4.5)1 mL を加えて残留物を溶解し、試料溶液とした。

## B.5 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

### C.1 $\beta$ -ラクタム系抗生物質

#### C.1.1 試験菌株の検討

ベンジルペニシリンの公定法で用いられている *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 (旧 *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953)は栄養細胞を使用しており、煩雑な菌株の管理が必要となる。一方、*Bacillus stearothermophilus* spore suspension として、芽胞溶液が市販されていることから、これらについて PCG 標準溶液を用いて検討を行った。

その結果、市販芽胞溶液の方が若干阻止円の明瞭さが劣るものの同等の感度を示した。よって、取り扱いの容易さから、本研究では、市販芽胞溶液を用いることとした。

#### C.1.2 標準溶液による感受性の確認

各薬剤の標準溶液を用いて感受性の確認を行った。その結果、0.0025~0.25  $\mu$ g/mL の濃度範囲で 12 mm 程度の阻止円形成を確認することができた(Table 1)。

なお、代謝物であるデスフロイル体が残留基準値の対象となっているセフトオフルとグラム陰性菌に対して特異的に抗菌力を有するメシリナムは検討の対象としなかった。

#### C.1.3 固相抽出の検討

ベンジルペニシリンの公定法の前処理法では、アミノ基とフェノール性の水酸基を有する AMO の回収がほとんど得られなかった。原因として、固相カートリッジへの吸着が不十分であることが判明したことから、固相抽出の検討を行った。検討は、溶液中で不安定である PCG についても行った。

その結果、ポリマー系のカートリッジである Oasis HLB を用い、負荷時の pH を中性から弱アルカリ性にするにより AMO を保持させることが可能であった(Table 2)。本検討結果より、同時に実施した PCG の挙動を考慮し、カートリッジ負荷時の pH を 7.5 に調整することとした。

#### C.1.4 添加回収試験

牛筋肉及び肝臓を用いて、残留基準値濃度で添加回収試験を行い、また、その結果を考慮して、検出限界濃度の確認を行った。なお、検出限界は、12 mm の阻止円を形成する濃度とした。

その結果、各薬剤の回収率は 27.3~

92.6 %であり、検出限界は、CEQを除く薬剤については残留基準値をクリアすることが可能であった(Table 3)。

### C.1.5 他系統の抗生物質の挙動

本試験法について、他系統の抗生物質の挙動を確認した。薬剤は、各系統で最も強い抗菌力を有すると考えられるクロルテラサイクリン(CTC)、エリスロマイシン(EM)及びゲンタマイシン(GM)を用いた。

上記薬剤の標準溶液の本アッセイ系での感受性は、CTCで0.25  $\mu\text{g/mL}$ 、EM及びGMで0.5  $\mu\text{g/mL}$ であった(Table 4)。次に各薬剤を0.5 ppmの濃度になるように牛筋肉及び肝臓に添加して、回収試験を実施した。その結果、CTCとGMでは阻止円の形成が見られなかったが、EMでは14~15 mm程度の阻止円の形成がみられた。よって、EMをはじめとするマクロライド系抗生物質は、高濃度に残留する場合、本系統分析法に対して影響する可能性があるものと考えられた(Table 5)。

## C.2 テトラサイクリン系抗生物質

### C.2.1 試験菌株の検討

テトラサイクリン系抗生物質の公定法では *Bacillus. cereus* ATCC 11778 の芽胞溶液が用いられている。本菌株は芽胞溶液が市販されていないため、煩雑な菌株の管理が必要となる。一方、*Bacillus. subtilis* は芽胞溶液が市販されていることから、OTC 標準溶液を用いてこれらの菌株について検討を行った。

その結果、0.2  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において *Bacillus cereus* ATCC 11778 と比較して

*Bacillus. subtilis* 市販芽胞溶液は2 mm程度小さな阻止円ではあったが、明瞭な阻止円形成を示した。よって、取り扱いの容易さから、本研究では、*Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液を用いることとした。

### C.2.2 標準溶液による感受性の確認

各薬剤の標準溶液を用いて感受性の確認を行った。その結果、0.04~0.2  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で12 mm程度の阻止円形成を確認することができた(Table 6)。

### C.2.3 添加回収試験

豚筋肉及び肝臓を用いて、残留基準値濃度で添加回収試験を行い、また、その結果を考慮して、検出限界濃度の確認を行った。なお、検出限界は、12 mmの阻止円を形成する濃度とした。また、公定法では、試料採取量を5 g、抽出回数を2回として実施しているが、簡便性を考慮して試料採取量を10 g、抽出回数を1回として実施した。

その結果、各薬剤の回収率は46.7~82.7%であり、検出限界は、すべて残留基準値をクリアすることが可能であった(Table 7)。

### C.2.4 他系統の抗生物質の挙動

本試験法について、他系統の抗生物質の挙動を確認した。薬剤は、各系統で最も強い抗菌力を有すると考えられるアンピシリン(AMP)、エリスロマイシン(EM)及びゲンタマイシン(GM)を用いた。

上記薬剤の標準溶液の本アッセイ系での感受性は、AMPで0.08  $\mu\text{g/mL}$ 、EMで10  $\mu\text{g/mL}$ 、GMでは10  $\mu\text{g/mL}$ でも阻止

円の形成がみられなかった(Table 8)。次に感受性の高かった AMP について、0.016 ppm の濃度になるように豚筋肉及び肝臓に添加して、回収試験を実施した。その結果、いずれの試料においても 11~13 mm 程度の阻止円の形成がみられた。よって、AMP をはじめとするβ-ラクタム系抗生物質は、本系統分析法に対して影響する可能性があるものと考えられた。

#### D. 考察

##### D.1 β-ラクタム系抗生物質

ベンジルペニシリンの公定法を改良し、バイオアッセイによるβ-ラクタム系抗生物質の簡易、且つ高感度なスクリーニング法を検討した。

公定法では試験菌株の栄養細胞を用いているため前培養が必要であり、また、継代等の管理が必要となる。そこで、市販の *Bacillus stearothermophilus* の芽胞溶液について検討したところ、栄養細胞を用いた場合とほぼ同等の結果が得られた。本菌株を用いて、16種の抗生物質について標準溶液により感受性を確認したところ、最も低感度なセフキノムで 0.25 μg/mL、最も高感度なフェノキシメチルペニシリン及びベンジルペニシリンで 0.0025 μg/mL から検出が可能であった。さらに牛の筋肉・肝臓を用いて添加回収試験を行い、その検出限界を確認した。その結果、セフキノムについては基準値である 0.04 ppm よりも高い 0.1 ppm であったが、他の 15 種については基準値よりも低い濃度での検出が可能であった。また、本法について他系統の抗生物質の挙動について確認したところ、エリスロマ

イシンをはじめとするマクロライド系抗生物質が高濃度に残留する場合、影響することが示唆された。

よって、本法は、ベンジルペニシリンの公定法と同程度に高感度に、また広範囲にβ-ラクタム系抗生物質をスクリーニングすることが可能であり、マクロライド系抗生物質の影響をある程度は受けるものの、系統分析法として特異性を有するものと考えられた。

##### D.2 テトラサイクリン系抗生物質

テトラサイクリン系抗生物質の公定法を改良し、簡易、且つ高感度なスクリーニング法を検討した。

公定法で用いられている *Bacillus cereus* ATCC 11778 の芽胞溶液は、継代等の管理が必要となるため、市販されている *Bacillus subtilis* の芽胞溶液を用いて検討したところ、若干感度が劣るものの、明瞭な阻止円形成を示した。本菌株を用いて、4種の抗生物質について標準溶液により感受性を確認したところ、最も低感度なオキシテトラサイクリン、テトラサイクリンで 0.2 μg/mL、最も高感度なクロルテトラサイクリンで 0.04 μg/mL から検出が可能であった。さらに豚の筋肉・肝臓を用いて添加回収試験を行い、その検出限界を確認した。その結果、いずれも基準値よりも低い濃度での検出が可能であった。また、本法について他系統の抗生物質の挙動について確認したところ、アンピシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗生物質が影響することが示唆された。よって、本法は、テトラサイクリン系抗生物質の公定法と同程度にスクリーニングすることが可能であるが、β-ラクタム

系抗生物質の影響を受けることが示唆された。これは、今回用いた *Bacillus subtilis* が  $\beta$ -ラクタマーゼ活性を有しないことに起因するものと考えられたが、いずれにしても、バイオアッセイで検出された場合は機器分析により、物質の同定を行う必要があることから、スクリーニング法としては有用であると考えられた。

#### E. 結論

多種多様な抗菌性物質を一挙に、且つ高感度にスクリーニングすることは非常に困難である。そこで、本研究では、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質にターゲットを絞り、ポジティブリスト制の導入に際して残留基準値が設定された抗生物質について、高感度な系統別スクリーニング法について検討を行った。その結果、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質については、一部の抗生物質については残留基準値を下回る検出限界が得られなかったものの、16種の抗生物質については、残留基準値を下回る検出限界が得ることができ、また、ある程度の特異性を有していることも確認できた。テトラサイクリン系抗生物質については、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質の影響を受けるものの、4種の抗生物質すべてについて残留基準値を下回る検出限界が得ることができた。

今後は、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質など、他系統の抗生物質についても検討していく必要があると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究成果

- 1) 藤田 和弘、加藤 仁美、尾崎 由佳、丹野 憲二、堀江 正一、バイオアッセイによる食肉中の  $\beta$ -ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の検討、日本食品衛生学会第91年会 (2006年5月・東京 予定)
- 2) 伊藤 裕信、高田 由美子、藤田 和弘、丹野 憲二、堀江 正一、バイオアッセイによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討、日本食品衛生学会第91年会 (2006年5月・東京 予定)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Sensitivity of  $\beta$ -lactam antibiotics in standard solution

Antibiotics	Linearity range ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	Slope
Aspoxicillin (ASPC)	0.02~0.32	0.99680	11.7486
Amoxicillin (AMO)	0.005~0.08	0.99880	11.9820
Ampicillin (AMP)	0.004~0.064	0.99787	12.2424
Oxacillin (OX)	0.01~0.16	0.99743	12.4435
Cloxacillin (CX)	0.025~0.4	0.99566	12.6883
Dicloxacillin (DCX)	0.01~0.16	0.99870	12.8457
Cefazolin (CEZ)	0.01~0.16	0.99703	12.3960
Cefapirin (CEPR)	0.004~0.064	0.99797	12.8812
Cefalexin (CEX)	0.1~1.6	0.99809	13.7799
Cefalonium (CEN)	0.02~0.32	0.99731	13.8784
Cefoperazone (CPZ)	0.04~0.64	0.99725	12.0448
Cefquinome (CEQ)	0.25~4	0.99495	11.3518
Cefuroxime (CXM)	0.04~0.64	0.99943	13.1797
Nafcillin (NF)	0.005~0.08	0.99719	13.1961
Phenoxymethylpenicillin (PCV)	0.0025~0.04	0.99823	14.0435
Benzylpenicillin (PCG)	0.0025~0.04	0.99978	12.1981

Table 2 Recoveries of AMO and PCG in standard solution using Oasis HLB cartridge

Antibiotics	pH for adsorption	Recovery*(%)
AMO	7.0	81.8
	7.5	83.5
	8.0	79.8
PCG	7.0	86.4
	7.5	91.5
	8.0	81.9

\* N=2



Table 3 Recoveries and detection limits of  $\beta$ -lactam antibiotics in meat

Antibiotics	Spiked (ppm)	Sample	Recovery* <sup>1</sup> (%)	DL* <sup>2</sup> (ppm)	MRL (ppm)
ASPC	0.05	Cattle muscle	61.1	0.008	0.05
		Cattle liver	61.5	0.008	0.05
AMO	0.04	Cattle muscle	63.0	0.002	0.04
		Cattle liver	56.1	0.002	0.04
AMP	0.03	Cattle muscle	77.7	0.002	0.03
		Cattle liver	92.6	0.002	0.04
OX	0.3	Cattle muscle	49.0	0.005	0.3
		Cattle liver	62.8	0.005	0.3
CX	0.04	Cattle muscle	32.7	0.02	0.04
		Cattle liver	46.9	0.02	0.04
DCX	0.02	Cattle muscle	27.3	0.01	0.03
		Cattle liver	32.7	0.01	0.1
CEZ	0.05	Cattle muscle	59.2	0.005	0.05
		Cattle liver	68.7	0.005	0.05
CEPR	0.03	Cattle muscle	69.5	0.002	0.03
		Cattle liver	57.4	0.002	0.03
CEX	0.2	Cattle muscle	69.6	0.05	0.2
		Cattle liver	63.9	0.05	0.2
CEN	0.01	Cattle muscle	55.0	0.01	0.01
		Cattle liver	56.7	0.01	0.01
CPZ	0.05	Cattle muscle	35.0	0.04	0.05 (Milk)
		Cattle liver	70.2	0.04	0.05 (Milk)
CEQ	0.1	Cattle muscle	67.5	0.1	0.04
		Cattle liver	67.3	0.1	0.04
CXM	0.02	Cattle muscle	67.5	0.02	0.02
		Cattle liver	66.8	0.02	0.02
NF	0.005	Cattle muscle	40.4	0.004	0.005
		Cattle liver	44.5	0.004	0.005
PCV	0.03	Cattle muscle	47.0	0.002	0.03(Swine)
		Cattle liver	72.0	0.002	0.03(Swine)
PCG	0.05	Cattle muscle	63.0	0.001	0.05
		Cattle liver	69.4	0.001	0.05

\*1 N = 3

\*2 The concentration of each antibiotic which confirmed that inhibition zone of 12 mm was formed.

Table 4 Sensitivity of other type antibiotics in standard solution

Antibiotics	DL <sup>*1</sup> (µg/mL)
Chlortetracycline (CTC)	0.25
Erythormycin (EM)	0.5
Gentamicin (GM)	0.5

\*1 The concentration of each antibiotic which confirmed that inhibition zone of 12 mm was formed.

Table 5 Sensitivity of other type antibiotics in meat

Antibiotics	Spiked (ppm)	Sample	Result Inhibition zone (mm)
CTC	0.5	Cattle muscle	ND*
		Cattle liver	ND
EM	0.5	Cattle muscle	14.2
		Cattle liver	15.3
GM	0.5	Cattle muscle	ND
		Cattle liver	ND

\* Inhibition zone was not formed.

Table 6 Sensitivity of tetracyclines in standard solution

Antibiotics	Linearity range ( $\mu\text{g/mL}$ )	R	Slope
Oxytetracycline (OTC)	0.2~3.2	0.99853	8.8363
Tetracycline (TC)	0.2~3.2	0.99936	9.4193
Chlortetracycline (CTC)	0.04~0.64	0.99784	10.0970
Doxycycline (DC)	0.08~1.28	0.99871	8.6976