

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

総括・分担研究報告書

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究
(H17-食品-一般-013)

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
分担研究者	井部 明広	東京都健康安全研究センター
	丹野 憲二	財団法人 日本食品分析センター
	中澤 裕之	星薬科大学

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業)

【研究報告書目次】

I. 総括研究報告書

- 食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究 1
主任研究者 堀江正一 (埼玉県衛生研究所)

II. 分担研究報告書

1. 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) 13

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)

2. LC/MS/MS による β -ラクタム系抗生物質分析法の検討 39

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)

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法 (テトラサイクリン系抗生物質の検討) 47

主任研究員 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)
分担研究者 井部 明広 (東京都健康安全研究センター)
研究協力者 草野 友子 (東京都健康安全研究センター)
研究協力者 神田 真軌 (東京都健康安全研究センター)

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討・・・・・・・・・・・・・・・・ 55

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）

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 61

主任研究者 堀江 正一（埼玉県衛生研究所）
分担研究者 中澤 裕之（星薬科大学 薬品分析化学教室）
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）

Ⅲ. 研究成果一覧及び研究成果別刷

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

主任研究者 堀江正一 (埼玉県衛生研究所 水・食品担当部長)

研究要旨

本研究では、簡易且つ検出感度に優れた残留抗菌性物質の微生物学的試験法の構築を目的とした。併せて、同定確認法としての機器分析法の開発も試みた。

1. 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)

昨年度に引続き、*Bacillus subtilis* BGA (市販芽胞菌液)、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus* (市販芽胞菌液) に対する抗菌性物質(合計 122 種)の抗菌活性を調べた。多くの薬物がこれら 3 種の菌のいずれかに抗菌活性を示した。次に、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を検討した。メタノール抽出法では、水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質が回収されてこなかった。そこで、2%メタリン酸-メタノール(3:7)混液抽出法を採用した。更に昨年度に引続き、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抗菌性物質を抽出し、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いて精製する 2)高感度検出法について、ポリペプチド系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質等への適用を試みた。

2. LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立(β -ラクタム系抗生物質分析法の検討)

微生物学的試験法で阻止円が観測された場合、残留する抗菌性物質を特定することが行政処分上要求される。そこで本研究では、抗菌活性が高いことから微生物学的試験法で阻止円が観測される可能性の高い β -ラクタム系抗生物質(ペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質)の高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた選択性の高い分析法を検討した。畜産食品から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、Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を採用した。本法によるペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質 15 種の添加回収率は、0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加で概ね 70%以上、定量限界は、0.01 $\mu\text{g/g}$ まで検出が可能であった。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法(テトラサイクリン系抗生物質の検討)

平成 17 年度は、試料の前処理に逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジカラムを使用した食肉中に残留する抗生物質の微生物学的スクリーニング試験法の開発を進め、基本的骨格を構築した。平成 18 年度は、本試験法を用いて、これまでに知見の得られているオキシテトラサイクリン以外のテトラサイクリン(TC)系抗生物質(テトラサイクリン、クロルテトラサイクリンおよびドキシサイクリン)について検討を行った。その結果、本試験法における TC 系抗生物質の検出限界値は 0.01~0.05 $\mu\text{g/g}$ で、残留基準値より十分に低く、ポジティブリスト施行後の残留抗生物質検査として、TC 系抗生物質のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、微生物学的試験に用いた試験溶液をそのまま HPLC 測定を行う方法で、TC 系抗生物質 4 薬剤の定性が可能であった。

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド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、試験菌株としてマクロライド系抗生物質には、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 が、アミノグリコシド系抗生物質には、*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、マクロライド系抗生物質では、0.005~0.5 µg/mL、代表的なアミノグリコシド系抗生物質であるストレプトマイシンでは、0.04 µg/mL であった。

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析

複雑なマトリックスから構成されている食肉中に残留する抗生物質を分析するため、夾雑成分を効果的に除去できる前処理法を検討した。本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有するアフィニティーカラムによる試料精製法を構築した。アフィニティーカラムの有用性を検討するため、キノロン系抗菌剤のノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、エンロフロキサシンの 4 種類およびアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを測定対象物質とした。それぞれの標準品を食肉抽出液に添加して回収率を求めた結果、いずれの抗菌性物質においても良好な回収率が得られたことから、本研究で構築したアフィニティーカラムの有用性が示唆された。

分担研究者

井部明広 東京都健康安全研究センター
丹野憲二 (財)日本食品分析センター
中澤裕之 星薬科大学

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(抗生物質及び合成抗菌剤)が用いられ、畜水産物の安定供給に大きく寄与している。しかし、一方ではこれら抗菌性物質の畜水産食品中への残留が食品衛生上、強く懸念されている。このことから、より多くの抗菌性物質を一括して分析できる分析法の確立が必要とされている。微生物学的試験法は、前処理が比較的簡易であり、多くの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とから、これらの抗菌性物質の残留分析に有用である。しかし、現在示されている公定法は、検出感度および操作性の点で改善すべき問題がある。そこで本研究では、簡易且つ検出感度に優れた微生物学的方法を構築す

ることを目的とする。更に、残留する抗菌性物質を特定するための選択性に優れた LC/MS(MS)等を用いた機器分析法の開発を試みた。

1. 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)

現在公定法に用いられている試験菌に比べ、操作性、汎用性、検出感度に優れた試験菌を採用した、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。

2. LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立(β-ラクタム系抗生物質分析法の検討)

微生物学的試験法で阻止円が観測された場合、残留する抗菌性物質を特定することが行政処分上要求される。そこで本研究では、抗菌活性が高いことから微生物学的試験法で阻止円が観測される可能性の高いβ-ラクタム系抗生物質(ペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質)の高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた選択性の高い分析法の構築を目的とする。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法(テトラサイクリン系抗生物質の検討)

動物用医薬品の中でも TC 系抗生物質は国内外で汎用度が高く、食品中への残留が懸念される。そこで平成 18 年度は、昨年度構築した試験法を用いて、これまでに知見の得られているオキシテトラサイクリン以外のテトラサイクリン(TC)系抗生物質、テトラサイクリン、クロルテトラサイクリンおよびドキシサイクリンのスクリーニングが可能か検討を行った。また、微生物学的試験で TC 系抗生物質の残留が疑われた場合、迅速に TC 系抗生物質であることを確認し、薬剤の定性を行う方法が必須である。そこで、微生物学的試験に用いた試験溶液をそのまま HPLC 測定を行い、定性が可能かどうかについても検討を行った。

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

平成 17 年度の本研究において、 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分析法について検討を行った。本年度は、マクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質について、昨年度と同様に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。

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析

食品は複雑なマトリックスから構成されていることから、微量に残留している抗菌性物質を測定する際に、マトリックスに含まれる多くの夾雑成分の影響を受けて分析が困難となる。そのため、効果的に夾雑成分を除去できる前処理法が必要とされている。そこで本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有するアフィニティーカラムによる試料精製の有用性を検討し、畜水産食品に残留する抗生物質の実用可能な分析法を構築した。

B. 研究方法

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

1) 試料及び試薬

試料は、埼玉県内で市販されていた豚筋肉部、牛筋肉部、鶏筋肉部、豚肝臓、牛肝臓及び鶏肝臓を用いた。

供試抗菌性物質： β -ラクタム系抗生物質 18 種、マクロライド系抗生物質 12 種、アミノグリコシド系抗生物質 10 種、テトラサイクリン系抗生物質 4 種、サルファ剤 23 種、キノロン剤 17 種等合計 122 種類の抗菌性物質を用いた。

それぞれの標準品約 10mg を正確に量り、精製水又はメタノール 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。

・簡易検査法には、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sporin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。

・高感度検査法には、ポリペプチド系抗生物質(バージニアマイシン(VGM)、ノシヘプタイド(NHT))、ポリエーテル系抗生物質(サリノマイシン(SLM)、ナラシン(NRC))、その他の抗生物質(チアムリン(TML)、リンコマイシン(LCM))、ノボビオシン(NB)、ピルリマイシン(PLM))、計 8 種を用いた。

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) 及び *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*:市販芽胞菌液 Merck 社製)を用い

た。

2) 試験菌液及び検査用培地の作製

B.s BGA 及び *G. 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に準拠して調製した。

検査用平板は、Difco 社製の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)及び Merck 社製の残留薬剤テスト用寒天培地 (Test Agar for Residue Test)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、各試験菌液を加え、十分に混和した後、その 8mL をペトリ皿に注入し、検査用平板培地を作製した。

3) 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、*G.stearothermo philus* 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。

4) 検量線の作成

・最小発育阻止濃度測定用検量線

0.001~10ppm の範囲で数段階濃度の各標準溶液を調製し、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、検出下限値(最小発育阻止濃度 MIC)を求めた。

・簡易検査法、高感度検査用検量線

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、検出下限値あるいは回収率を求めた。

5) 簡易検査法試験溶液の調製

試料 10g を 50mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、メタノールあるいは 2%メタリン酸-メタノール(3:7)混液 10mL を加えてホモジナイズ抽出し、3,500 rpm で 10分間遠心分離後、その上清を試験溶液とした。

6) 高感度検査法試験溶液の調製

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、Oasis HLB カートリッジでクリーンアップを行った。

2. LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立

1) 試料及び試薬

試料は、埼玉県内で市販されていた牛肉及び埼玉県内の乳メーカーから供与された生乳を用いた。

供試抗菌性物質:β-ラクタム系抗生物質 17 種 (ペニシリン系抗生物質 9 種、セファロスポリン系抗生物質 8 種)を用いた。

除タンパク・抽出用溶液:0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリルを(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。

2) 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフー質量分析計:HPLC 装置には、Waters 社製 2695 HPLC システム、質量分析装置には、Quattro micro API を使用した。

3) 検量線の作成

0.01, 0.05, 0.1, 0.5 及び 1.0 µg/mL の混合溶液を調製し、その 5µL を LC/MS/MS 装置 に注入した。検出には MRM(Multiple Reaction Monitoring)法を採用した。

4) 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、ろ過した。ろ液を約 30mL に減圧濃縮した後、Oasis HLB カートリッジでクリーンアップを行った。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法

1) 試料及び試薬

牛、豚および鶏の筋肉(市販品)

抗生物質標準品:TC系抗生物質として、オキシテトラサイクリン(OTC)、テトラサイクリン(TC)、クロルテトラサイクリン(CTC)およびドキシサイクリン(DOXY)を使用した。

2) 試験菌液及び検査用培地の作製

供試菌株: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. s.*), *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*K. r.*), *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. m.*)および *Geobacillus stearothermophilus* (*G. s.*)の4菌株を使用した。検査用平板の作製法は「簡易検査法(改訂)」に準拠した。*G. s.* (Merk製)は、菌濃度 10^5 cfu/mLとなるようにPM Indicator Agar(フルカ製)と混合し、8 mLをペトリ皿に注入して平板を作製した。

3) 試験溶液の調製法

試料10 gを細切り0.01 mol/L EDTA含有pH 4.0マキルベン緩衝液を40 mL加え、ストマッカー80T(オルガノ製)を用いてホモジナイズした後、すべて50 mLのポリプロピレン製(PP製)遠心管に移した。3000回転、15分間遠心分離した後、上清を綿栓ろ過した。ろ液をMCXカラムに負荷し、試験溶液を調製した。

4) 微生物学的検査法

試験溶液75 μ Lを浸漬させたろ紙(枝肉の抗菌物質検査用)を、検査用培地上に置き、30分間冷蔵した後、18時間培養した。

5) 理化学的測定法

微生物学的検査法に用いた試験溶液をHPLCに供し、TC系抗生物質を検出定量した。

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

1) 試料及び試薬

マクロライド系抗生物質としてエリスロマイシン(EM)、オレアンドマイシン(OM)、キタサマイシン(KT)、酢酸イソ吉草酸タイロシン(AIV)、ジョサマイシン(JM)、スピラマイシン(SP)、タイロシン(TS)、

チアムリン(TM)、チルミコシン(TL)、テルデカマイシン(TDM)、ネオスピラマイシン(NSP)、ミロサマイシン(MM)を、また、マクロライド系抗生物質と類似した性状を示す、セデカマイシン(SCM)、ピルリマイシン(PR)、リンコマイシン(LCM)についても合わせて測定対象物質とした。アミノグリコシド系抗生物質としては、ストレプトマイシン(SM)を測定対象物質とした。

2) ペーパーディスク法の測定条件

・マクロライド系抗生物質

試験菌株: *Kocuria rhizophila* ATCC 9341

培地: 増菌用; Heart Infusion Agar (HIA)

培養温度: 36 $^{\circ}$ C

培養時間: 16~17時間

・アミノグリコシド系抗生物質

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

培地: 合成 LAB-LEMCO AGAR

培養温度: 36 $^{\circ}$ C

培養時間: 16~17時間

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及びHPLC/FLによる食肉中残留抗菌剤の分析

1) 試料及び試薬

鳥のむね肉・肝臓(市販品)

測定対象物質: ノルフロキサシン, シプロフロキサシン, ダノフロキサシン, エンロフロキサシンの4種およびアミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンを測定対象物質とした。

2) 機器分析の測定条件

キノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンの測定は、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。

・キノロン系抗菌剤

移動相には30 mMリン酸緩衝液(pH=3.0): アセトニトリル = 90:10 (v:v), 分析カラムには Waters社製 XBridge C18 (2.1 \times 150 mm)を用いた。蛍光検出器の測定波長を励起波長280 nm, 蛍光波長

を 448 nm として測定した。

・ゲンタマイシン

移動相には 10 mM ギ酸緩衝液(pH = 3.0) : アセトニトリル = 13 : 87(v/v), 分析カラムには Waters 社製 Atlantis C18(2.1 × 150 mm)を用いた。蛍光検出器の測定波長を励起波長 265 nm, 蛍光波長を 313 nm として測定した。

3) アフィニティーカラムの作製方法

・キノロン系抗菌剤

抗キノロン抗体 1 mg とカラムに充填したレジン 1 mL 相当を, 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 炭酸緩衝液(pH = 8.0)にてカップリング反応を室温で 2 時間行った。反応後, 0.5 M NaCl にてカラムの洗浄を行い, 次に未反応基のブロッキングのため, 0.5 M NaCl 含有 0.1 M トリス緩衝液(pH = 8.0)にて反応を行った。最後にカラムの平衡化として, PBS を流し, アフィニティーカラムの作製を完了とした。

・ゲンタマイシン

抗ゲンタマイシン抗体 1 mg を 0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)で希釈し, HiTrap NHS-activated HP Columns(GE ヘルスケア バイオサイエンス社製)に流し, 室温で 2 時間反応を行った。反応後, 0.5 M NaCl 含有 0.2 M 炭酸水素ナトリウム(pH = 8.3)を流した。次に未反応基のブロッキング及び洗浄のため, 0.5 M NaCl 含有 0.5 M モノエタノールアミン(pH = 8.3)と 0.5 M NaCl 含有 0.1 M 酢酸緩衝液(pH = 4.0)を交互に 3 回流した。最後にカラムの平衡化として PBS を流し, アフィニティーカラムを作成した。

4) 前処理方法

・キノロン系抗菌剤

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, ホモジナイズにより均質化した。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た。アセトニトリル相を, 40°C, 減圧下で濃縮乾固させ, 得られた残渣に PBS を加えて再溶解させた。その後, アフィニティーカラムによる精製を行い HPLC/FL の測定試料

とした。

・ゲンタマイシン

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り, 1.2%メタリン酸 15 mL 加え, ホモジナイズにより均質化した。その後, 遠心分離操作(3000 rpm, 10 min)により得られた上清を減圧下で濃縮乾固させ, 得られた残渣に PBS を加えて再溶解させた。アフィニティーカラムによる精製後, 9-fluorenyl methyl chloroformate (FMOC-Cl) を用いて蛍光誘導体化を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

1.1. 抗菌性物質の試験菌に対する抗菌活性

4 種の平板培地 *B.s* BGA (AM8, AM5), *M. l* ATCC 9341 及び *G. stearothersophilus* に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べたところ, 多くの薬物がこれら 3 種の菌のいずれかに抗菌活性を示すことが分かった。

β-ラクタム系, ポリペプチド系, ポリエーテル系抗生物質及びクロラムフェニコールは, *G. stearothersophilus* に強い抗菌活性を示した。マクロライド系抗生物質は, *M. l* ATCC 9341 に強い抗菌活性を示した。アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は, *B.s* BGA に強い抗菌活性を示した。なお, テトラサイクリン系抗生物質は, pH の低い *B.s* BGA (AM8) に, アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は, pH の高い *B.s* BGA (AM5) により強い抗菌活性を示した。一方, サルファ剤は, いずれの菌に対しても, ほとんど抗菌活性を示さなかった。

1.2. 簡易検査法の検討

1.2.1 メタノール抽出法

試料に豚肉, 豚肝臓を用い, 抽出溶媒としてメタノール, 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使用して検討した結果, メタノールが相対的に最も優れていた。そこで, メタノール抽出による簡易検査法を牛肉, 牛肝臓,

鶏肉及び鶏肝臓に適用した。本法による各抗菌性物質の検出感度は、ペニシリン系、セフェム系が0.005～0.1ppm、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0.05～0.5ppm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効率が悪いいためか、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、高い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。

1.2.2 メタリン酸-メタノール混液抽出法

水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質は、メタノールでは殆ど抽出されなかった。そこで、水溶性及び除タンパク効果を考慮して、メタノールにメタリン酸を混合した溶液(2%メタリン酸-メタノール(3:7))を用いることにした。本法により、アミノグリコシド系抗生物質の検出感度に向上が見られたが、ゲンタマイシンについては、十分な感度ではなく、更なる検討が必要であった。

1.3. 高感度検査法の検討

1.3.1 望まれる抗菌性物質の検出限界

今回、約250種前後の動物用医薬品に対して、残留基準が設定された。抗菌性物質の代表的な食品における残留基準は、ペニシリン系、セファロスポリン系抗生物質の残留基準は0.005～0.1ppm、マクロライド系は0.05～1.5ppm、アミノグリコシド系は0.04～2.0ppm、テトラサイクリン系は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の範囲に各グループの多くの抗菌剤が含まれている。抗菌性物質により、望まれる検出感度は異なるが、一律基準を含めた残留基準を総合的

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。

1.3.2 高感度検査法の適用

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。

そこで昨年度、試料10gを採り、0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)混液でホモジナイズした抽出後、Oasis HLBカートリッジにより精製濃縮する「高感度検査法」を構築した。本手法を用いて本年度は、ポリペプチド系抗生物質(バージニアマイシン(VGM)、ノシヘプタイド(NHT))、ポリエーテル系抗生物質(サリノマイシン(SLM)、ナラシン(NRC))、その他の抗生物質(チアムリン(TML)、リンコマイシン(LCM))、ノボビオシン(NB)、ピルリマイシン(PLM))、計8種について検出感度を検討した。

本前処理法では、ポリペプチド系抗生物質ノシヘプタイド(NHT)以外の7種の抗生物質は概ね70%以上と良好に回収されたが、NHTの回収率は10%前後であった。NHTは水やメタノールに殆ど溶けないことから、本抽出法では抽出されてこないものと考えられる。なお、今回検討した8種類の豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度は、0.05～0.5ppmレベルであった。

2. LC/MS/MSを用いた機器分析法の確立

2.1. LC/MS 測定条件の検討

ペニシリン系抗生物質9種、セファロスポリン系抗生物質8種を分析対象とした。ペニシリン系抗生物質、アモキシシリン、アスポキシシリン、アンピシリンは構造中にアミノ基とカルボキシル基を有する両性化合物であり、ポジティブ及びネガティブモードで検出可能であったが、ポジティブモードの方が感度良く検出された。他のペニシリン系抗生物質

は、ネガティブモードで感度良く検出できた。一方、セファロスポリン系のセフキノム、セファピリン、セファレキシン、セファロニウム、セファゾリン、セフトオフルはポジティブモード、セフロキシムはネガティブモード、セファペラゾンにはポジティブ及びネガティブモードで感度良く検出可能であった。

移動相であるが、カルボキシル基を有するペニシリン系、セファロスポリン系抗生物質の分離カラムへの保持は、移動相の pH に強く影響される。そこで、移動相に揮発性の酸であるギ酸を用いることにした。なお、アモキシシリン及びアスポキシシリンは、今回検討したギ酸を用いた逆相モードでは殆ど保持されなかったことから、今回は分析対象外とした。

2.2. 前処理法の検討

前処理法であるが、動物用医薬品の同時分析に汎用されているアセトニトリルで抽出し、ヘキサンで脱脂する方法では水溶性の高いペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質の前処理法としては十分な回収率が得られないものが見られた。そこで、操作性に優れた逆相系カートリッジ Oasis HLB を用いた前処理法を採用した。本法は、微生物学的試験法(高感度検査法)で採用した方法であり、微生物学的試験法で調製した試験溶液をそのまま採用できる利点がある。

2.3. 添加回収実験

検量線は 0.01 から 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (絶対量として 0.05 ~ 5ng) の範囲で良好な直線性($r=0.997$ 以上)を示した。市販の牛肉及び生乳に 15 種のペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質を 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し、回収率を求めた。各試料に対する回収率はいずれも概ね 70%以上(イオンサプレスの影響:標準添加法で補正)であり、残留分析法としてほぼ満足できる値が得られた。

2.4. 定量限界

本法によるペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質 15 種の定量限界は、セフキノム

が最も感度が悪く、0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、他の抗生物質はいずれも 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ まで十分検出が可能であった。ペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質の畜産食品に対する残留基準は、極一部を除き 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以上であり、本法はペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質の残留分析法としてほぼ満足できる結果であった。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法

3.1. 微生物学的試験による TC 系抗生物質の推定

牛筋肉に残留基準値相当の TC 系抗生物質 4 薬剤を各々添加し、MCX カラムから溶出された分画 1 および分画 2 の試験溶液を用いて微生物学的試験を行った。TC 系抗生物質 4 薬剤のいずれも、分画 2 の *B. s.*プレートに 12 mm 以上 19 mm 未満の阻止円を、*B. m.*プレートに 19 mm 以上の阻止円を形成した。TC は、分画 1 の *G. s.*プレートにも 12 mm 以上 19 mm 未満の阻止円を形成した。TC 系抗生物質は分画 1 にも 1~1.5 % 溶出される。TC の場合は *G. s.*プレートに感受性が高いため阻止円を形成したと考える。これにより、分画 2 の *B. m.*プレートに最大の阻止円を形成した場合、TC 系抗生物質が残留していると推定できることが示唆された。

3.2. TC 系抗生物質の添加回収試験

残留基準値相当の TC 系抗生物質 4 薬剤を各々食肉に添加し、MCX カラムから溶出された分画 2 の試験溶液を用いて HPLC 測定を行い、回収率を求めた。その結果、回収率は 30.5~67.8 % であった。

3.3. 微生物学的試験による TC 系抗生物質の検出限界値

微生物学的試験による検出限界値は、OTC 0.05, TC 0.05, CTC 0.01 および DOXY 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。これは、残留基準値より十分に低く、TC 系抗生物質 4 薬剤のスクリーニングが可能であ

ることが示された。

3.4. HPLC 測定による TC 系抗生物質の定性および検出限界値

微生物学的試験に用いたのと同じ MCX カラムから溶出された分画 2 の試験溶液を用いて、HPLC 測定を行った結果、TC 系抗生物質 4 薬剤を良好に検出定量できた。検出限界値は、0.005～0.01 $\mu\text{g/g}$ であった。以上のことから、微生物学的試験において TC 系抗生物質の残留が推定された場合、HPLC 測定により TC 系抗生物質 4 薬剤の定性が可能であることが示された。

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

4.1 マクロライド系抗生物質

4.1.1 試験菌株の検討

Kocuria rhizophila ATCC 9341 は、抗菌性物質簡易検査法で用いられている菌株中で最もマクロライド系抗生物質に対して感受性が高いが、栄養細胞であり、煩雑な菌株の管理が必要となる。そこで、昨年度と同様に市販芽胞液 *Geobacillus stearothermophilus* spore suspension 及び *Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension についても検討を行った。

4.1.2 平板用培地及び希釈緩衝液の検討

マクロライド系抗生物質を高感度に検出することを目的とし、平板用培地及び希釈緩衝液の検討を行った。その結果、培地の pH が高くなるほど抗菌力が高まり、高感度に検出することが可能であった。また、培地への拡散性を向上させるためにメタノールと Tween80 を緩衝液に加えることにより、さらに検出感度が向上した。培地は Antibiotic Medium 4 (AM4) を pH9.0 に調整した改変培地を、緩衝液は、0.5 % Tween80 含有及び 10 % メタノール含有 0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH9.0) を使用することが有効であると考えられた。

4.1.3 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、0.005～0.5 $\mu\text{g/mL}$ 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。

4.2 アミノグリコシド系抗生物質

4.2.1 平板用培地の検討

SM を用いて、平板用培地の検討を行った。なお菌株は *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を用いた。LAB-LEMCO AGAR と同じ組成の合成培地が最も良好な結果であった。

4.2.2 試験菌株の検討

芽胞菌液として市販されている *Geobacillus stearothermophilus* spore suspension 及び *Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension と抗生物質簡易検査法で使用されている *Bacillus subtilis* ATCC 6633 について検討を行った。その結果、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 及び市販芽胞溶液共に明瞭な阻止円形成を示した。従って、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。

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析

5.1 アフィニティーカラムの保持能の検討

5.1.1 キノロン系抗菌剤

エンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ダノフロキサシンの標準品 25 ng/mL を 5 mL アフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、95.3～98.4%の回収率であった。また、食肉に対して 50 ng/g となるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は 96.5～100.8%であった。どちらの場合でも良好な回収率が得られた。

5.1.2 ゲンタマイシン

ゲンタマイシンの標準品 500 ng/mL を 1 mL アフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、

103.1～111.3%の回収率であった。また、食肉に対して500 ng/gとなるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は89.3～96.8%であった。どちらの場合でも良好な回収率が得られた。

5.2 試料前処理法の回収率

5.2.1 キノロン系抗菌剤

食肉 5g をホモジナイズする段階で、100ng/g となるようにエンロフロキサシン、シプロフロキサシン、ノルフロキサシン、ダノフロキサシンの標準品を添加し、回収率を求めたところ、54.2～69.4%となった。

5.2.2 ゲンタマイシン

食肉 5g をホモジナイズする段階で、500ng/g となるようにゲンタマイシンの標準品を添加し、回収率を求めたところ 78.2～87.8%となった。

5.3 実試料のクロマトグラム及び従来法との比較

ニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムは、それぞれの標準品および食肉抽出液に添加した標準品を保持することが可能であったことから、夾雑成分の多い食肉抽出液を用いた場合でも十分な実用性があるものと考えられる。

また、HPLC クロマトグラムにおいて本法と従来の固相抽出法による精製を比較したところ、アフィニティーカラムにより従来法と同等かそれ以上に夾雑成分の影響の少ないクロマトグラムが得られたことから、食肉中に残留するニューキノロン系抗菌剤およびゲンタマイシン分析において、アフィニティーカラムを用いた前処理法が有用であると思われる。

D. 結論

1. 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)

昨年度に引続き、*Bacillus subtilis* BGA (市販芽胞菌液)、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus* (市販芽胞菌液) に対する抗菌性物質(合計 122 種)の抗菌活性を

調べた。多くの薬物がこれら 3 種の菌のいずれかに抗菌活性を示した。次に、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を検討した。メタノール抽出法では、水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質が回収されてこなかった。そこで、2%メタリン酸-メタノール(3:7)混液抽出法を採用した。更に昨年度に引続き、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抗菌性物質を抽出し、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いて精製する 2)高感度検出法について、ポリペプチド系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質等への適用を試みた。

2. LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立(β -ラクタム系抗生物質分析法の検討)

微生物学的試験法で阻止円が観測された場合、残留する抗菌性物質を特定することが行政処分量上要求される。そこで本研究では、抗菌活性が高いことから微生物学的試験法で阻止円が観測される可能性の高い β -ラクタム系抗生物質(ペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質)の高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた選択性の高い分析法を検討した。畜産食品から 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、Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を採用した。本法によるペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質 15 種の添加回収率は、0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加で概ね 70%以上、定量限界は、0.01 $\mu\text{g/g}$ まで検出が可能であった。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法(テトラサイクリン系抗生物質の検討)

平成 17 年度は、試料の前処理に逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジカラムを使用した食肉中に残留する抗生物質の微生物学的スクリーニング試験法の開発を進め、基本的骨格を構築した。平成 18 年度は、本試験法を用いて、これまでに知見の得られているオキシテトラサイクリン

以外のテトラサイクリン(TC)系抗生物質(テトラサイクリン, クロルテトラサイクリンおよびドキシサイクリン)について検討を行った。その結果, 本試験法におけるTC系抗生物質の検出限界値は0.01~0.05 µg/g で, 残留基準値より十分に低く, ポジティブリスト施行後の残留抗生物質検査として, TC系抗生物質のスクリーニングに有用であることが示唆された。また, 微生物学的試験に用いた試験溶液をそのままHPLC測定を行う方法で, TC系抗生物質4薬剤の定性が可能であった。

4. バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質及びアミノグリコシド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, 試験菌株としてマクロライド系抗生物質には, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 が, アミノグリコシド系抗生物質には, *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, マクロライド系抗生物質では, 0.005~0.5 µg/mL, 代表的なアミノグリコシド系抗生物質であるストレプトマイシンでは, 0.04 µg/mL であった。

5. アフィニティーカラムを用いた前処理及びHPLC/FLによる食肉中残留抗菌剤の分析

複雑なマトリックスから構成されている食肉中に残留する抗生物質を分析するため, 夾雑成分を効果的に除去できる前処理法を検討した。本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有するアフィニティーカラムによる試料精製法を構築した。アフィニティーカラムの有用性を検討するため, キノロン系抗菌剤のノルフロキサシン, シプロフロキサシン, ダノフロキサシン, エンロフロキサシンの4種類およびアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを測定対象物質とした。それぞれの標準品を食肉抽出液に添加して回収率を求めた結果, いずれの抗菌性物質においても良好な回収率が得られたことから, 本研究で構築したアフィニティ

ーカラムの有用性が示唆された。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

F.1. 論文発表

- 1) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による乳中のマクロライド系抗生物質の定量. 分析化学, 55, 651-660 (2006)
- 2) 岩崎雄介, 伊藤 岳, 北村 渉, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之: 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキノロン系抗菌剤の分析: 分析化学, 55, 943-948 (2006)
- 3) 堀江正一, 石井里枝, 竹上晴美, 井部明広, 丹野憲二, 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 (投稿準備中)

F.2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 竹上晴美, 石井里枝, 堀江正一「微生物学的簡易検査法による残留抗菌性物質分析の基礎的検討(第2法)」第43回全国衛生化学技術協議会(鳥取)
- 3) 堀江正一, 竹上晴美, 村山三徳「LC/MS/MSによる畜産物中のマクロライド系抗生物質セテカマイシン及びテルテカマイシンの定量」第93回日本食品衛生学会(東京)
- 4) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 井部明広ら「逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジを用いた食肉中残留抗生物質の微生物学的系統推定スクリーニング試験法(第4報)」第92回日本食品衛生学会(名古屋)
- 5) 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 β -ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の検討」第91回日本食品衛生学会(東京)

6) 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」第91回日本食品衛生学会(東京)

7) 北村渉, 椛沢圭介, 伊東岳, 岡山明子, 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「アフィニティーカラムを用いた前処理及びHPLC/FLによる食肉中残留抗菌剤の分析」日本薬学会第127年会(富山)

平成18年度 厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保推進研究事業)
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

『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

研究要旨

昨年度に引き続き、畜水産食品中に残留する抗菌性物質(合計122種)の抗菌活性を調べた。*Bacillus subtilis* BGA(市販芽胞菌液)、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus*(市販芽胞菌液)に対する抗菌活性を調べたところ、サルファ剤を除き、多くの薬物がこれら3種の菌のいずれかに抗菌活性を示した。次に、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、キノロン系抗菌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を検討した。メタノール抽出による方法では、水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質が回収されてこなかった。そこで、抽出溶媒として2%メタリン酸-メタノール(3:7)混液を採用したが、アミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンについては十分な検出感度が得られなかった。更に昨年度に引き続き、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 (200mg)を用いて精製濃縮する(2)高感度検出法について、ポリペプチド系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質、チアムリン、リンコマイシンなどのその他の抗生物質に適用した。高感度検出法を用いることにより、食肉中に残留するポリペプチド系抗生物質、ポリエーテル系抗生物質、その他の抗生物質について、一部の除外はあるものの、残留の有無をスクリーニングする手法として、日常検査に適用できるものと考えられる。

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、操作も煩雑な面がある。

昨年 5 月に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た。そこで昨年度に引続き、畜水産食品中に残留する抗菌性物質の 1) 抗菌活性、2) 簡易且つ迅速な検査法、及び 3) 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、牛筋肉部、鶏筋肉部、豚肝臓、牛肝臓及び鶏肝臓を用いた。

B.2. 試薬

1) 供試抗菌性物質：表 1 示す β -ラクタム系抗生物質 18 種、マクロライド系抗生物質 12 種、アミノグリコシド系抗生物質 10 種、テトラサイクリン系抗生物質 4 種、ポリペプチド系 9 種、ポリエーテル系抗生物質 6 種、クロラムフェニコール等、抗生物質 68 種。表 2 示すサルファ剤 23 種、キノ

ロン剤 17 種、フロルフエニコール等、合成抗菌剤 54 種。合計 122 種類の抗菌性物質を用いた。

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。なお、メタノールに溶解し難いオキシリン酸、ナリジクス酸、ナイカルバジン等については、最小量の 0.02 mol/L NaOH、あるいはジメチルスルホキシド(DMSO)等を用いて溶解後、メタノールに溶解した。

2) 供試抗菌性物質：簡易検査法には、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sporin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。

3) 供試抗菌性物質：高感度検査法には代表的な抗菌性物質として、ポリペプチド系抗生物質（バージニアマイシン(VGM)、ノシヘプタイド (NHT))、ポリエーテル系抗生物質（サリノマイシン(SLM)、ナラシン (NRC))、その他の抗生物質（チアムリン (TML)、リンコマイシン (LCM))、ノボビオシン(NB)、ピルリマイシン (PLM))、計 8 種を用いた。

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 *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*:市販芽胞菌液 Merck 社製)を用いた。

ペトリ皿 (シャーレ)：合成樹脂製で、内径 86mm の滅菌したものを用了。

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℃、15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてから用了。

Syringe Filter：(Whatman 社製)

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

50mL ポリプロピレン製遠心チューブ：Fisher Scientific Japan, Ltd 製。

その他の試薬は、いずれも特級品を用了。

B.3. 試験菌液及び検査用培地の作製

B.s BGA 及び *G. 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に準拠して調製した。

検査用平板は、Difco 社製の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)及び Merck 社製の残留薬剤テスト用寒天培地 (Test Agar for Residue Test) を

用了した。これらの培地を 121℃、15 分間高圧滅菌後、55℃±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 *G.stearothermophilus* 芽胞菌液 (使用培地；残留薬剤テスト用寒天培地) 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℃で 30 分間放置した後、*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は 30℃で 18 時間、*G.stearothermophilus* は、55℃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

B.5.1 最小発育阻止濃度測定用検量線

0.001～10ppm の範囲で数段階濃度の各標準溶液を調製し、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、検出下限値 (最小発育阻止濃度 MIC) を求めた。

B.5.2 簡易検査法、高感度検査用検量線

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、検出下限値あるいは回収率を求めた。

B.6. 簡易検査法試験溶液の調製

試料 10g を 50mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、メタノールあるいは 2% メタリン酸-メタノール (3:7) 混液 10mL を

加えてホモジナイズ抽出し、3,500 rpm で10分間遠心分離後、その上清を試験溶液とした。

B.7. 高感度検査法試験溶液の調製

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。なお、試料が肝臓の場合はホモジナイズ抽出液にもハイフロスーパーセル約 3g 加え、吸引ろ過した。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、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. 抗菌性物質の試験菌に対する抗菌活性

4 種の平板培地 *B.s* BGA (AM8, AM5), *M. l* ATCC 9341 及び *G. stearothermophilus* に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べたところ、多くの薬物がこれら 3 種の菌のいずれかに抗菌活性を示すことが分かった。

β-ラクタム系、ポリペプチド系、ポリエーテル系抗生物質及びクロラムフェニコールは、*G. stearothermophilus* に強い抗菌活性を示した。マクロライド系抗生物質は、*M. l* ATCC 9341 に強い抗菌活性を示した。アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤

は、*B.s* BGA に強い抗菌活性を示した。なお、テトラサイクリン系抗生物質は、pH の低い *B.s* BGA (AM8) に、アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は、pH の高い *B.s* BGA (AM5) により強い抗菌活性を示した。一方、サルファ剤は、いずれの菌に対しても、ほとんど抗菌活性を示さなかった（表 3, 4）。なお、サルファ剤に関しては、培地にトリメトプリムを添加することにより、感度良く検出されることが知られている。

C.2. 簡易検査法の検討

C.2.1 メタノール抽出法

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。そこで昨年度は、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。試料に豚肉、豚肝臓を用い、抽出溶媒としてメタノール、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使用して検討した結果、メタノールが相対的に最も優れていた（表 5, 6）。そこで、本年度は、メタノール抽出による簡易検査法を牛肉、牛肝臓、鶏肉及び鶏肝臓に適用した（表 7~10）。本法による各抗菌性物質の検出感度は、表 5~10 に示すとおり、ペニシリン系、セフェム系抗生物質が 0.005~0.1ppm、マクロライド系、テトラサイクリン系抗生物質、ニューキノロン剤が 0.05~0.5ppm 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効率が悪いいためか，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，高い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.2.2 メタリン酸-メタノール混液抽出法

水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質は，メタノールでは殆ど抽出されなかった。そこで，水溶性及び除タンパク効果を考慮して，メタノールにメタリン酸を混合した溶液を用いることにした。メタリン酸を含まない含水-メタノール系では，水の含量が20%以上になる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，メタリン酸濃度（0.5，1，2，5及び10%）及びメタリン酸-メタノール混液の混合比を変えてを検討した。図2に示すとおり，メタリン酸濃度及びメタリン酸の混合比が高くなるに従い，コントロールでも阻止円が形成された。また，メタリン酸濃度及びメタリン酸の混合比が高くなるに従い，酸性条件下で不安定なマクロライド系抗生物質の検出感度に低下が見られた。そこで，抽出溶媒には2%メタリン酸-メタノール(3:7)10mLを用いることにした。本法により，アミノグリコシド系抗生物質の検出感度に向上が見られたが（表11，12），ゲンタマイシンについては，十分な感度ではなく，更

なる検討が必要と考える。

C.3. 高感度検査法の検討

C.3.1 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。昨年度から検討してきたメタノール抽出法，あるいは2%メタリン酸-メタノール(3:7)混液抽出による簡易検査法は，操作法は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が施行され，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たが，その約半数が抗生物質及び合成抗菌剤である。そこで，表13，14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，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，ポリペプチド系，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の範囲に各グループの多くの抗菌剤が含まれている。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。