

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

『LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立
—LC/MS/MS による β -ラクタム系抗生物質分析法の検討—』

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

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、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB (200mg) 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、セフキノムが最も感度が悪く 0.02 $\mu\text{g/g}$ 、他の抗生物質はいずれも 0.01 $\mu\text{g/g}$ まで十分検出が可能であった。本法は、動物用医薬品として汎用され、畜産食品中に残留する可能性の高い抗菌活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を選択的且つ高感度に検出することが可能であり、残留抗菌性物質の同定確認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られる。

A. 研究目的

簡易且つ検出感度に優れた微生物学的試験法の構築は、液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)の様な高価な分析機器を利用せずとも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り、安全性の高い農畜水産食

品の流通に大きく寄与することが期待できる。しかし、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。

B. 研究方法

B.1. 試料

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。

B.2. 試薬

供試抗菌性物質:表1に示す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。

それぞれの標準品約 10mg を正確に量り, メタノール 10mL 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。但し, 溶解性の低いセファロニウムはメタノール 100mL に溶解し, 標準原液とした。なお, 標準原液は-30℃のフリーザーで保存し, 標準溶液は用時調製した。

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℃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。

その他の試薬は, いずれも特級品を用いた。

B.3. 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ-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。測定条件は表 2, 3 のとおりとした。

B.4. 検量線の作成

β-ラクタム系抗生物質 17 種の 0.01, 0.05,

0.1, 0.5 及び 1.0 µg/mL の溶液を調製し, 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, それぞれ表 3 に示したモニターイオンにより得られた MRM クロマトグラムよりピーク面積を求め, 絶対検量線法により検量線を作成した。

B.5. 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, ろ過補助剤ハイフろ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℃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.6. 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

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抗生物質のセフキノム, セファピリン, セファレキシム, セファロニウム, セファゾリン, セフチ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

フォペラゾン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(表3)。

移動相であるが、カルボキシル基を有するペニシリン系抗生物質、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酢酸、ギ酸及びトリフルオロ酢酸(TFA)を用いて、カラムへの保持及びピーク形状に及ぼす影響を調べた。弱酸の酢酸を用いた場合、カラムへの保持並びにピーク形状にやや問題があった。一方、ギ酸及び TFA では良好なピーク形状が得られた。TFA を用いた場合、TFA と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が強固なイオンペアーを形成するため、イオン強度は顕著に低下した。以上の結果から、移動相にはギ酸を用いることにした。

なお、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(セフチオフルは親化合物のみ)は、比較的水溶性が高く、逆相モードでは保持が比較的弱い。特にアモキシシリン、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、保持が極めて弱かった。中でも、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。このことから、今回はアモキシシリン及びアスポキシシリンは分析対象外とした。

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見られなかった。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(高感度試験法)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。

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。表4に示すとおり、各試料に対する回収率はいづれも概ね 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。

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と思われる。

D. 結論

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、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB (200mg) 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 µg/g 添加で概ね 70%以上、定量限界は、セフキノムが最も感度が悪く、0.02 µg/g、他の抗生物質はいずれも 0.01 µg/g まで十分検出が可能であった。本法は、動物用医薬品として汎用され、畜産食品中に残留する可能性の高い抗菌活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を選択的且つ高感度に検出することが可能であり、残留抗菌性物質の同定確認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られる。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

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) 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)

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 供試抗生物質

分類	抗生物質	メーカー
ペニシリン系	アモキシシリン	Amoxicillin 関東化学（株）
	アンピシリン	Ampicillin Dr.Ehrenstorfer
	アスポキシシリン	Aspoxicillin 大日本住友製薬（株）
	ベンジルペニシリン	Benzylpenicillin SIGMA
	クロキサシリン	Cloxacillin Dr.Ehrenstorfer
	ジクロキサシリン	Dicloxacillin SIGMA
	ナフシリン	Nafcillin 関東化学（株）
	オキサシリン	Oxacillin Dr.Ehrenstorfer
	ペニシリンV	Penicillin V Riedel-deHaen
	セフォペラゾン	Cefoperazone 関東化学（株）
セファロスポリン系	セフロキシム	Cefuroxime 関東化学（株）
	セファピリン	Cephapirin 関東化学（株）
	セファロニウム	Cephalonium 供与品
	セファレキシン	Cephalexin Dr.Ehrenstorfer
	セフキノム	Cefquinome （株）インターベット
	セフトيوفル	Ceftiofur Dr.Ehrenstorfer
	セファゾリン	Cephazolin 関東化学（株）

表2 LC/MS/MS 測定条件

LC Conditions	
Column	L-column ODS (2.1mm x 10cm, 3 μ m)
Eluent	A=water, B=MeCN, C=0.1% Formic acid
	Gradient
Flow rate	0.2 mL/min
MS/MS Conditions	
Ionization	ESI (Posi/Nega)
Monitor ion	別紙のとおり

Time(min)	A%	B%	C%
0	90	5	5
1	90	5	5
15	15	80	5
20	15	80	5

表3 MS/MS条件

	Cephem Antibiotics	mol wt	Posi/Nega	定量イオン	確認イオン	Cone (V)	Collision (eV)
	Amoxicillin	AMPC 365.40	Posi	365.8>207.8	365.8>113.8	20	15, 25
	Ampicillin	ABPC 349.40	Posi	349.8>191.9	349.8>105.8	20	20, 20
	Aspoxicillin	ASPC 493.53	Posi	493.9>348.8	493.9>249.9	30	20, 20
	Benzylpenicillin	PCG 334.39	Nega	332.7>288.8	332.7>191.8	20	10, 10
ペニシリン系	Cloxacillin	CX 435.88	Nega	433.8>389.7	433.8>292.8	20	10, 15
	Dicloxacillin	DCX 470.33	Nega	467.7>423.7	467.7>326.7	20	10, 15
	Nafcillin	NFPC 414.47	Nega	412.7>369.1	412.7>271.9	15	10, 15
	Oxacillin	OXPC 401.44	Nega	399.8>355.9	399.8>258.8	15	10, 15
	Penicillin V	PCV 350.39	Nega	348.8>207.8	348.8>113.8	10	10, 20
	Cefquinome	CQN 528.60	Posi	528.9>396	528.9>133.9	20	15, 20
	Cefalexin	CEX 347.39	Posi	347.8>173.8	347.8>157.8	20	15, 15
	Cefazolin	CEZ 454.51	Posi	454.8>322.9	454.8>155.7	20	15, 20
セファロsporin系	Cefapirin	CEPR 423.47	Posi	423.7>291.8	423.7>151.8	20	15, 20
	Cefalonium	CEN 458.52	Posi	458.7>336.8	458.7>151.8	20	10, 20
	Ceftiofur	CFT 523.56	Posi	523.7>284.8	523.7>240.8	30	20, 20
	Cefoperazone	CEPR 645.68	Nega	643.8>527.9	643.8>188	20	10, 20
	Cefuroxime	CXM 424.39	Nega	422.6>317.5	422.6>206.9	10	10, 15

表4 添加回収実験

	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	添加回収率(%)							
		PCG	PCV	OXPC	NFPC	CXM	CX	DCX	CEP
乳	0.1	78.8	75.4	73.8	73.6	97.5	73.1	79.3	97.0
牛肉	0.1	73.2	70.4	74.6	73.6	98.2	77.8	77.8	97.0

	添加濃度 ($\mu\text{g/g}$)	添加回収率(%)						
		CEX	ABPC	CEPR	CEZ	CEN	CQN	CFT
乳	0.1	89.3	91.5	96.2	94.3	98.4	89.8	78.6
牛肉	0.1	92.9	81.9	94.0	93.7	95.1	92.3	80.2

n=2 (平均値)

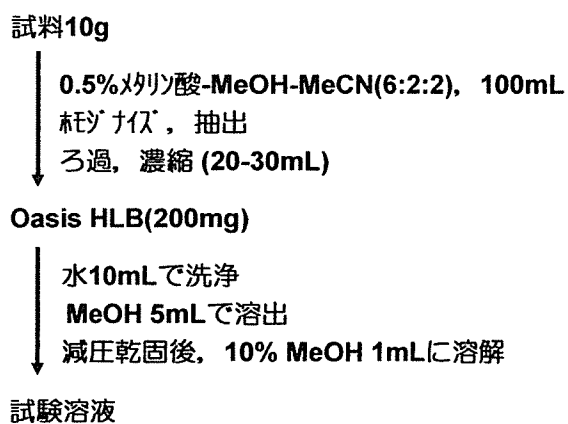


図1 試験溶液調製法の概略

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
食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

「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」

ーテトラサイクリン系抗生物質の検討ー

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

研究要旨

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マ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、スクリーニング可能な薬剤数の増加を目的とし検討を行った。

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ることを示した。

A.研究目的

ポジティブリスト施行により、動物用医薬品の残留基準値が設定され、機器分析による一斉もしくは個別試験法が示されている。しかし、その種類は 300 種類にのぼり、通常検査を効率よく行っていくのは至難である。そこで、抗菌活性を有する動物用医薬品は、その特性を生かして、第一スクリーニングとして微生物学的試験法が有用であると考え

る。現在、厚生労働省モニタリング試験法である「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」は検出感度が悪く、現在設定されている抗生物質の残留基準値をスクリーニングすることができない。

また、微生物学的試験法で陽性と判定される 12 mm 以上の阻止円を形成した場合、阻止円を形成した抗菌

性物質を同定することが難しい。そこで、抗生物質の系統が推定できる「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂)」(以下「分別推定法」と略)が通知されているが、操作が煩雑であり多くの検体を同時に処理するのには適さない。

そこで平成 17 年度は、試料の前処理に逆相・カチオン交換ミックスマードカートリッジカラム(MCX カラム)を使用し、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行った。このスクリーニング試験法では、MCX カラムから溶出される分画 1 および分画 2 を、抗生物質に対し感受性が異なる菌株を用いた微生物学的試験に適用することで、抗生物質の各系統を推定することが可能であった(図 1)。

ペニシリン系 5 剤、TC 系のオキシテトラサイクリン(OTC)、マクロライド系のチルミコシンおよびアミノグリコシド系のゲンタマイシンの本試験法における検出限界値は、残留基準値より低く、また、通知されている分別推定法における検出限界値と同程度かそれ以下であり、この試験法を用いてスクリーニングが可能であることを示した(表 1)。

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、本試験法を用いて、これまでに知見の得られている OTC 以外の TC 系抗生物質、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)のスクリーニングが可能かどうかについて検討を行った。

また、実際、残留事例も度々報告され、スクリーニング試験においても陽性率が高い。そのため、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。

B. 研究方法

B.1. 試料

牛、豚および鶏の筋肉(市販品)

B.2. 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。

B.3. 試薬および標準品

1) 抗生物質標準品：TC 系抗生物質として、力価の明らかなオキシテトラサイクリン塩酸塩(和光純薬工業製)、TC(関東化学製)、クロルテトラサイクリン(CTC)(関東化学製)および DOXY(林純薬工業製)の 4 薬剤を使用した。

2) 抗生物質標準溶液の作製：各抗生物質標準品を秤量し、力価 1000 µg/mL の標準原液を作製し、適宜 pH 7.0 リン酸緩衝液を用いて希釈して標準溶液を調製した。

3) 緩衝液および溶媒等：0.01 mol/L EDTA 含有 pH 4.0 マキルベン緩衝液、0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液は「分別推定法」にしたがって調製した。pH 7.0 リン酸緩衝液は 0.1 mol/L のリン酸一カリウム と 0.1 mol/L のリン酸二カリウムを混合して pH 7.0 に調整した。試薬はすべて特級品を使用した。メタノール、アセトニトリルは和光純薬工業の HPLC 用、アンモニア水(28%)は和光純薬工業の特級品を使用した。

4) カートリッジカラム：逆相およびカチオン交換のミックスモード充填剤を使用した Oasis MCX (150 mg LP/6 cc)カートリッジ(日本ウォーターズ社)(以下 MCX カラム)を使用した。カラムのコンディショニングはメタノール 10 mL、pH 4.0 マキルベン緩衝液 10 mL で行った。

5) MCX カラムからの溶出溶液として、分画 1 には、アセトニトリルと 0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液を 9:1 (v/v)に混合した上清を使用した。分画 2 には、28%アンモニア水 5%含有アセトニトリルと 0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液を 9:1 (v/v)に混合した上清を使用した。これらの溶出液は用時調製した。

B.4. 試験溶液の調製法

試料 10 g を細切し 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 カラムに流速約 1 mL/min で負荷した後、カラムを 0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液 10 mL で洗浄し、3 分間減圧下で乾燥させた。次にカラムから 5 mL のアセトニトリル-0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液(9:1, v/v)を用いて、分画 1 を PP 製遠心管に溶出し、40°C で減圧乾固した。残留物を 0.1 mol/L pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解し、これを試験溶液 1 とした。分画 1 を溶出したカラムは、再び 0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液 10 mL を用いて洗浄し、3 分間減圧下で乾燥させた。次に 28%アンモニア水 5%含有アセトニトリル-0.1 mol/L pH 4.5 リン酸緩衝液(9:1, v/v) 5 mL を用いて、分画 2 を溶出し、40 °C で減圧乾固した。残留物を 0.1 mol/L pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解し、これを試験溶液 2 とした(図 2)

B.5. 微生物学的検査法

1) 方法：試験溶液 75 µL を浸漬させたろ紙(枝肉の抗菌物質検査用:直径 10 mm、厚さ 1.1 mm、吸水量 70~75 µL、アドバンテック社製)を、*B. s.*プレート、*K. r.*プレート、*B. m.*プレートおよび *G. s.*プレート上に固着させた。*B. s.*プレート、*K. r.*プレートおよび *B. m.*プレートは 30 分間冷蔵した後、30°C 下で倒置し、18 時間培養した。*G. s.*プレートは 20 分間室

温下で放置後、64°C 下で正置し、ブランクである pH7 リン酸緩衝液を浸漬させたろ紙が黄色になるまで、5～6 時間培養した。

試験溶液 1 には *K. r.* プレートおよび *G. s.* プレートを使用し、試験溶液 2 には *B. s.* プレート、*K. r.* プレートおよび *B. m.* プレートを使用した。

2) 判定：各プレートは、培養後のプレート上に形成された阻止円の直径をノギスで測定し、阻止円の直径 12 mm 以上を陽性と判定し、また、感受性パターンから抗生物質の推定を行った。

B.6. 理化学的測定法

1) 方法：微生物学的検査法に用いた試験溶液 2 を HPLC に用い、以下の条件で測定した。

HPLC 装置：島津 LC-10Avp

カラム：Sunfire (日本ウオーターズ)
5 μ m, 4.6mm x 150mm

流速：1.0 mL/min

カラム温度：40°C

注入量：10 μ L

移動相：イミダゾール緩衝液

-メタノール (78:22, v/v)

検出：蛍光検出器励起波長 390 nm

蛍光波長 512 nm

2) TC 系抗生物質の検量線：OTC、TC および CTC は 0.5, 1, 2 μ g/mL、DOXY は 0.125, 0.25, 0.5 μ g/mL の標準希釈溶液を用い、得られたピーク面積から検量線を作成し回収率を算出した。

B.7. 倫理面への配慮

本研究では、人および動物由来の組織、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. 研究結果および考察

C.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。各試験菌における感受性パターンを表 2 に示した。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。

C.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(表 3)。

C.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、MCX カラムから溶出された分画

2 の試験溶液が *B. m.* プレート に 12 mm 以上の阻止円を形成する限界値は、OTC 0.05、TC 0.05、CTC 0.01 および DOXY 0.01 µg/g であった(表 4)。これは、残留基準値より十分に低く、また、通知されている分別推定法の検出限界値と同程度であった。以上のことから、MCX カラムを用いて調製した試験溶液の微生物学的試験により 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。

C.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。図 3 のクロマトグラムに示すように、TC 系抗生物質 4 薬剤のピークと牛、豚および鶏筋肉由来の夾雑ピークとの分離が良好であった。検出限界値は、0.005~0.01 µg/g であった。これは、微生物学的試験による検出限界値より低いか、もしくは同程度であった(表 4)。

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。

D. 結論

平成 17 年度に構築した本試験法は、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。

本試験法の特徴は次の 3 点である。

① MCX カラムから溶出される分画 2 の試験溶液が *B. mycoides* プレートに最大の阻止円を形成するという感受性パターンを示した場合、TC 系抗生物質が残留していると推定できること。

② 微生物学的試験における検出限界値は、0.01~0.05 µg/g で、残留基準値より十分に低く、従来の分別推定法と同程度であること。

③ 微生物学的試験に用いた試験溶液をそのまま 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。

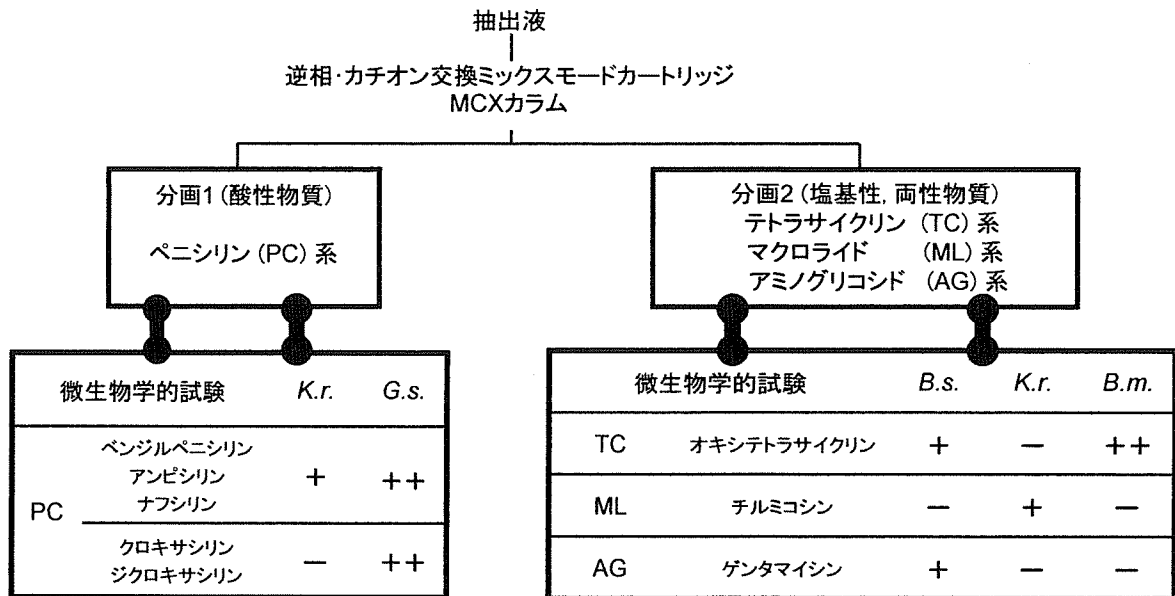
陽性検体の場合、検査結果の信頼性を高める上で、微生物学的試験と機器分析の併用は有意義である。本試験法において試料から抽出精製した試験溶液を同時に両方で確認できることを示したことは、今後、日常検査を実施する上で有用と考えられる。

E. 研究成果

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). 日本食品衛生学雑誌第 92 回学術講演会講演要旨集、p65, 2006.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし



各薬剤(残留基準値)を牛筋肉に添加したときの各試験菌における感受性パターン

試験菌 K. r. : *Kocuria rhizophila* G. s. : *Geobacillus stearothermophilus*

B. s. : *Bacillus subtilis* B. m. : *Bacillus cereus* var. *mycoides*

- : 阻止円の直径12 mm未満 + : 阻止円の直径12 mm以上19 mm未満 ++ : 阻止円の直径19 mm以上

図1 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

表1 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の検出限界値

動物用医薬品		検出限界値(μg/g, IU/g) *		残留基準値 (μg/g) [#]
		本試験法	分別推定法	
PC系	ベンジルペニシリン	0.00025	0.0025	0.05
	アンピシリン	0.0025	0.0025	0.03
	ナフシリン	0.001		0.005
	クロキサシリン	0.0025		0.03
	ジクロキサシリン	0.0025		0.04
TC系	オキシテトラサイクリン	0.05	0.05	0.2 [‡]
ML系	テルミコシン	0.025		0.1
AG系	ゲンタマイシン	0.1	1.0	0.1

* : 筋肉(牛)に対して # : 筋肉(牛)に対して † : 3剤の和として

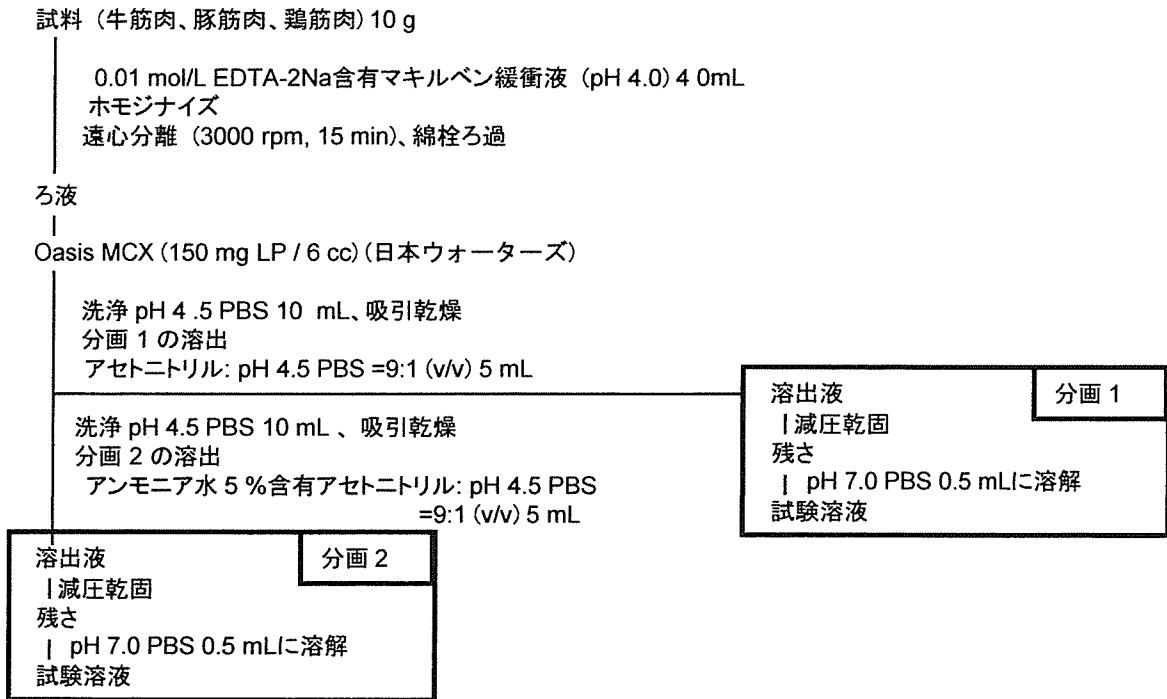


図2 試験溶液の調製

表2 TC系抗生物質(残留基準値)を添加した牛筋肉に本試験法を適用したときの微生物学的試験の各試験菌における感受性パターン

TC系 抗生物質	分画1		分画2		
	<i>K.r.</i>	<i>G.s.</i>	<i>B.s.</i>	<i>K.r.</i>	<i>B.m.</i>
OTC	—	—	+	—	++
TC	—	+	+	—	++
CTC	—	—	+	—	++
DOXY	—	—	+	—	++

— : 阻止円の直径12 mm未満 + : 阻止円の直径12 mm以上19 mm未満
 ++ : 阻止円の直径19 mm以上

表3 本試験法におけるTC系抗生物質食肉に対する添加回収実験

TC系 抗生物質	試料	残留基準値 ($\mu\text{g/g}$)	回収率(% , n=3) #	
			平均	相対標準偏差
OTC	牛筋肉	0.2	67.8	2.6
	豚筋肉	0.2	64.5	2.8
	鶏筋肉	0.2	52.5	6.6
TC	牛筋肉	0.2	53.8	1.8
	豚筋肉	0.2	51.8	1.1
	鶏筋肉	0.2	43.6	7.2
CTC	牛筋肉	0.2	45.7	1.8
	豚筋肉	0.2	40.3	0.3
	鶏筋肉	0.2	30.5	2.0
DOXY	牛筋肉	0.1	59.0	0.3
	豚筋肉	0.05	65.7	2.0
	鶏筋肉	0.05	55.6	4.2

試験溶液：分画2 HPLC測定

表4 本試験法におけるTC系抗生物質の検出限界値

TC系 抗生物質	微生物学的試験 による検出限界値# $\mu\text{g/g}$	HPLC測定 による検出限界値 $\mu\text{g/g}$	残留基準値 $\mu\text{g/g}$
OTC	0.05	0.005	0.2*
TC	0.05	0.005	0.2*
CTC	0.01	0.01	0.2*
DOXY	0.01	0.01	0.1 [†] 0.05 [‡]

*：牛筋肉、豚筋肉、鶏筋肉 †：牛筋肉 ‡：豚筋肉、鶏筋肉の残留基準値
試験溶液：分画2 試験菌：B. m.

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
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」

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 $\mu\text{g/mL}$ 、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 $\mu\text{g/mL}$ であった。

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。

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。

B. 研究方法

B.1 測定対象物質

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。

B.2 ペーパーディスク法の測定条件

B.2.1 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) (Becton Dickinson 社製)
平板用；Antibiotic Medium 4 (AM4) (Becton Dickinson 社製)
を pH9 に調整して使用

分注量：外形 90 mm のペトリ皿に対して 8 mL

菌液調製：増菌用培地で 36°C、4 時間振とう培養

菌濃度：平板用培地 100 mL 当たり 0.1 mL

培養温度：36 °C

培養時間：16～17 時間

B.2.2 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 (LLA) [Bacto Peptone (Becton Dickinson 製)、LAB-LEMCO POWDER (OXOID 製)、PURIFIED

AGAR (OXOID 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 10⁴ cfu

培養温度：36 °C

培養時間：16～17 時間

B.3 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 マクロライド系抗生物質

C.1.1 試験菌株の検討

Kocuria rhizophila ATCC 9341 (旧 *Micrococcus luteus* ATCC9341) 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である *Bacillus stearothermophilus* spore suspension 及び *Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension についても検討を行った。

SP を用いて検討した結果、いずれの市販芽胞溶液よりも *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 が高感度であった。よって、本研究では、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 を用いることとした。なお、試験菌液の前培養は、36 °C で 4 時間振とう培養とした。

C.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、SP を用いて、平板用培地及び希釈緩衝液の検討を行った。その結果、Table 1 に示したように、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。よって本結果から、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。

C.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 (Table 2)。

C.2 アミノグリコシド系抗生物質

C.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。その結果、Table 3 に示したように、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。合成培地で使用した、精製度の高い PURIFIED AGAR は、他の寒天と比較して不純物として含まれるミネラル量が少ないため、SM の抗菌力が高まったものと考えられた。よって、本結果から、培地は LAB-LEMCO AGAR と同じ組成の合成培地

を使用することとした。

C.2.2 試験菌株の検討

芽胞菌液として市販されている *Bacillus 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、C.2.1 で検討した条件で SM を用いて検討を行った。

その結果、0.04 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において *Bacillus subtilis* ATCC 6633 は 14~16 mm、*Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液は 13~15 mm の阻止円が形成された。市販芽胞溶液のほうが 1 mm 程度小さな阻止円ではあったが、共に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。

D. 考察

D.1 マクロライド系抗生物質

バイオアッセイによるマクロライド系抗生物質の簡易、且つ高感度なスクリーニング法を検討した。

試験菌株を検討した結果、簡易検査法において最も感受性が高い、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (旧 *Micrococcus luteus* ATCC 9341) が、市販の芽胞溶液と比較して良好な感度を示した。次に平板用培地及び希釈緩衝液について、スピラマイシンを用いて検討した。その結果、培地に関しては、簡易検査法で用いられている AM5 よりも AM4 の pH を 8.0 に調整したもののほうが、良好な感度を示し、さらに pH をアルカリ側にするこ

り、感度が上昇した。pH9.0 を越えると菌の生育が不十分になったことから、pH 9.0 が最も良好な条件であると考えられた。希釈緩衝液についてはpH の上昇による感度の上昇の傾向はそれほどみられなかったが、界面活性剤である Tween を加えることにより、さらに感度が上昇した。アルカリ下では、マクロライド系抗生物質の塩基性基の解離が抑えられるため、薬剤自身の極性が下がり、寒天培地中へ拡散しにくくなるが、Tween を加えることにより、十分な拡散ができ、感度が高まったものと考えられた。

これらの条件で、各薬剤の標準溶液を用いて感受性の確認を行った結果、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、高感度にマクロライド系抗生物質を検出できた。

D.2 アミノグリコシド系抗生物質

バイオアッセイによるアミノグリコシド系抗生物質の簡易、且つ高感度なスクリーニング法を検討した。

ストレプトマイシンを用いて平板用培地を検討したところ、精製度の高い PURIFIED AGAR を用いた合成培地を使用した場合、高感度に検出することが可能であった。本条件で試験菌株の検討を行ったところ、自家調製した *Bacillus subtilis* ATCC 6633 の芽胞溶液よりも若干感度が劣るものの、市販芽胞溶液である *Bacillus subtilis* (BGA)でも明瞭な阻止円形成を示した。よって、管理の容易さから市販芽胞溶液が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、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、マクロライド系抗生物質については、平板用培地及び希釈緩衝液をアルカリ側にすることにより、高感度に検出することが可能であった。アミノグリコシド系抗生物質については、精製度の高い寒天を使用することにより、高感度に検出することが可能であった。

今後は、試料中からの抽出方法を含めた各系統に適した前処理法を検討し、試料中における検出感度を確認する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究成果

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 Comparison of pH in media and buffer solutions using spiramycin

Buffer solution	Medium			
	AM5*		AM4**	
	pH 8.0	pH 8.0	pH 8.0	pH 9.0
0.1 M Phosphate buffer (pH8.0)	19.0	21.7	22.0	23.9
0.1 M Phosphate buffer (pH9.0)	18.1	21.2	22.2	24.8
0.1 M Phosphate buffer (pH9.0) including 0.5 %Tween80 and 10 % methanol	—	—	—	28.1

Diameter of inhibition zone : mm, — : Not tested

* : Antibiotic medium 5 (Becton Dickinson), ** : Antibiotic medium 4 (Becton Dickinson)

Table 2 Sensitivity of macrolide antibiotics in standard solution

Antibiotics	Minimum detection concentration ($\mu\text{g/mL}$)
Erythromycin (EM)	0.005
Oleandomycin (OM)	0.025
Kitasamycin (KT)	0.1
Acetyl isovaleryl tylosin (AIV)	0.3
Josamycin (JM)	0.1
Spiramycin (SP)	0.02
Tylosin (TS)	0.08
Tiamulin (TM)	0.05
Tilmicosin (TL)	0.005
Terdecamycin (TDM)	0.5
Neospiramycin (NSP)	0.02
Mirosamycin (MM)	0.01
Sedecamycin (SCM)	0.4
Lincomycin (LCM)	0.025
Pirlimycin (PR)	0.01