

平成 19 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 19 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検討 (簡易検査法の確立) . . . . . 12

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)  
小林 晴美 (埼玉県衛生研究所)

2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討 (簡易検査法の妥当性評価) . . . 22

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)  
井部 明弘 東京都健康安全研究センター  
草野 友子 東京都健康安全研究センター  
神田 真軌 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  
藤田 和弘 (財)日本食品分析センター  
伊藤 裕信 (財)日本食品分析センター  
飯塚 太由 (財)食品環境検査協会  
那須 朗 (財)食品環境検査協会  
前田 守 (財)日本冷凍食品検査協会  
澤田 千尋 (財)日本冷凍食品検査協会

3. LC/MS/MS によるキノロン系抗菌剤分析法の検討 . . . . . 31

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)  
小林 晴美 (埼玉県衛生研究所)

4. 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 (改良法によるテトラサイクリン系抗生物質および ニューキノロン系合成抗菌剤の分析) . . . . .	37
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)
5. 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 . . . . .	49
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)
6. アフィニティーカラムによるアミノグリコシド系抗生物質の保持検討および 分子認識法またはアフィニティーカラムを用いた試料精製の比較 . . . . .	60
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 . . . . .	71
-------------------------------	----

## 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、簡易且つ操作性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、特異性の高いアフィニティーカラムを用いた分析法並びに同定確認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検討（簡易検査法の確立）

畜産食品中に残留するペニシリン系抗生物質(PCs), セファロスポリン系抗生物質(CEs), テトラサイクリン系抗生物質(TCs), マクロライド系抗生物質(MLs), キノロン系抗菌剤(QNs)などを中心とした、より多くの抗菌性物質を同時に検出できる微生物学的試験法（簡易検査法）を確立した。食肉からメタノールでホモジナイズ抽出し、遠心分離後、その上清を微生物学的試験法に供した。市販芽胞菌を含めた4種の検査用平板培地（*Bacillus subtilis* BGA (AM8 培地, AM5 培地), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus*）を用いることにより、畜産食品中に残留する可能性の高いPCs, CEs, MLs, TCs, QNs等を簡易かつ迅速に検出することが可能であった。

#### 2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討（簡易検査法の妥当性評価）

本研究事業で構築した簡易検査法について共同試験による評価を行った。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、ベンジルペニシリン）、セファロスポリン系抗生物質（セファピリン、セファレキシム）、マクロライド系抗生物質（エリスロマイシン、スピラマイシン）、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）、テトラサイクリン系抗生物質（オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン）、ニューキノロン剤（エンロフロキサシン、サラフロキサシン）、計12種を用いた。対象食品には、豚肉、豚肝臓、卵黄、ハマチ、ハチミツ及び牛乳を用いた。各機関で得られた本簡易検査法の検出下限値は概ね同様の値であった。

#### 3. LC/MS/MSを用いた機器分析法の確立(キノロン剤分析法の検討)

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要求される。そこで本研究では、昨年度に引き続き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キノロン系抗菌剤（オールドキノロン剤及びニューキノロン剤）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。試料から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した。本法によるキノロン系抗菌剤の添加回収率は、0.1 $\mu$ g/g 添加で概ね80%以上、定量限界は、いずれも0.01  $\mu$ g/g まで十分検出が可能であった。

#### 4. 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 (改良法によるテトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系合成抗菌剤の分析)

微生物学的スクリーニングと機器分析を用いた精度の高いテトラサイクリン系抗生物質(TCs)の試験法を再検討した。また、ニューキノロン系合成抗菌剤(NewQ)に対して、本改良法の適用が可能かについても検討を行った。改良法における TCs の添加回収率は、残留基準値相当の各薬剤を豚肉に添加したとき、59.8~90.1%(変動係数 1.6~4.6%)と良好であった。微生物学的スクリーニングの検出限界値は 0.005~0.05 µg/g であった。改良法はポジティブリスト施行後の残留抗生物質検査法として、TCs および NewQ のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、微生物学的スクリーニングにおいて TCs および NewQ の残留が推定された場合、選択性および汎用性の高い HPLC を用いて TCs 4 薬剤および NewQ 5 薬剤の同定・定量が可能であった。

#### 5. パ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

微生物学的試験法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、マクロライド系抗生物質は 11 種類の薬剤について、アミノグリコシド系抗生物質は 5 種の薬剤について、残留基準値もしくはそれを上回る高感度な分析法を確立することができた。本試験法は、系統別に多くの物質について残留基準値レベルのスクリーニングができる可能であることが示唆された。

#### 6. アフィニティーカラムによるアミノグリコシド系抗生物質の保持検討および分子認識法またはアフィニティーカラムを用いた試料精製の比較

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として、特にその試料前処理が困難とされているアミノグリコシド系抗生物質ゲンタマイシンを分析するため、夾雑物質を効果的に除去できる高い精製能力を有する前処理として、抗原抗体反応を利用したアフィニティーカラムによる試料精製法を検討した。本研究では、ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムを作製して、構造が類似した他のアミノグリコシド系抗生物質 (ゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシン) への適用性について検討した結果、良好な結果が得られた。他方、アフィニティーカラムと同様に、特異的な前処理が可能な分子認識ポリマー (MIP)による精製法と、従来用いられている固相抽出カートリッジ(Oasis HLB)およびアフィニティーカラムによる試料精製について、ハチミツを試料として比較・検討した。その結果、精製能においては MIP とアフィニティーカラムが優れ、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラム、コスト面においては Oasis HLB と MIP が優れていた。

#### 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、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抗菌性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) 等を用いた機器分析法の開発を試みた。

## B. 研究方法

### 1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討(簡易検査法の確立)

#### 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：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

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。

#### 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。

#### 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。*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は 30°C で 18 時間、*G.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。

#### 4) 検出下限値

0.001~50µg/mL の範囲で各抗菌性物質について、阻止円が形成される前後の適切な数段階濃度の標準溶液を調製し、微生物学的試験法に供した。各抗菌性物質について、阻止円 (12 mm 以上) が観測された最小濃度を検出下限値とした。

#### 5) 簡易検査法試験溶液の調製

試料 5 g を 50 mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り、メタノール 5 mL を加えて 1 分間ホモジナイズし、10°C、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、その上清を試験溶液とした。

### 2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討(簡易検査法の妥当性評価)

今回、確立した簡易検査法(前記)について共同試験を実施した。共同試験参加機関は次の 5 機関である。

- ・埼玉県衛生研究所
- ・東京都健康安全研究センター
- ・(財)日本食品分析センター
- ・(財)食品環境検査協会
- ・(財)日本冷凍食品検査協会

### 3. LC/MS/MS を用いた機器分析法の検討(キノロン系抗菌剤分析法の確立)

#### 1) 試料及び試薬

試料は、埼玉県内で市販されていた豚肉及び豚肝臓を用いた。

供試抗菌性物質：キノロン系抗菌剤 14 種（オールドキノロン系 3 種，ニューキノロン系 11 種）を用いた。

#### 2) 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。

#### 3) 検量線の作成

キノロン系抗菌剤 14 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 5 µL を LC/MS/MS 装置 に注入した。検出には MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法を採用し，絶対検量線法により検量線を作成した。

#### 4) 試験溶液の調製

試料 10g を量り，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(6:2:2) 100mL を加えてホモジナイズした後，ろ過補助剤ハイフラ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 カートリッジを用いて試験溶液を調製した。

### 4. 微生物学的試験法によるテトラサイクリン系抗菌剤およびニューキノロン系抗菌剤の分析

#### 1) 試料及び試薬

あらかじめ抗菌性物質が残留していないことを確認した，市販の豚筋肉を使用した。

標準品：オキシテトラサイクリン，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 4 薬剤を使用した。ニューキノロン系抗菌剤として，エンロフロキサシン，シプロフロキサシン，ダノフロキサシン，ジフロキサシンおよびマルボフロキサシンの 5 薬剤を使用した。

カートリッジカラム：Oasis<sup>®</sup> MCX カートリッジ(6mL, 150 mg, Waters 社製)を使用した。

#### 2) 試験溶液の調製法

試料 5.0 g をマキルベン緩衝液を 100 mL 加え，ホモジナイズし，Oasis<sup>®</sup> MCX カートリッジを用いてクリーンアップした。

#### 3) 測定法

・微生物学的スクリーニング

試験菌には，*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides*)，*Bacillus subtilis* BGA (*B. subtilis* BGA) および *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*K. rhizophila*) の 3 菌株を使用した。

・HPLC 測定

微生物学的検査法に用いた試験溶液を HPLC に供し，TC 系抗菌剤およびキノロン系抗菌剤を検出定量した。分離カラムは ODS 系を用いた。移動相は，テトラサイクリン系抗菌剤にはイミダゾール緩衝液-メタノール(4:1)，ニューキノロン系抗菌剤には 0.2%ノナフルオロペンタン酸-アセトニトリル (3:1) を用いた。測定条件は，テトラサイクリン系抗菌剤は Ex 390/Em 512 nm，ニューキノロン系抗菌剤は Ex 285/Em 445 nm とした。

### 5. 微生物学的試験法によるマクロライド系抗菌剤及びアミノグリコシド系抗菌剤の分析

#### 1) 試料及び試薬

豚の筋肉・肝臓(市販品)

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), 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), 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, ピルリマイシン (PR), リンコマイシン (LCM) を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, アプラマイシン (APM), カナマイシン (KM), ゲンタマイシン (GM), ジヒドロストレプトマイシン (DSM), ストレプトマイシン (SM), デストマイシン A (DM), ネオマイシン (NM), パロモマイシン (PM) 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

試験菌： *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 及び *Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension (Merck 社製)を用いた。

## 3) 前処理法

### ・マクロライド系抗生物質

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り, 0.01 mol/L EDTA 含有 0.001 mol/L マキルベン緩衝液 (pH4.0) - メタノール (6:4)を加え, ホモジナイザーした後, Oasis HLB (60 mg) カートリッジを用いて試験溶液を調製した。

### ・アミノグリコシド系抗生物質

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り, 10 mol/L リン酸二水素カリウム及び 0.4 mmol/L EDTA2Na 含有 2 %トリクロロ酢酸溶液を加え, ホモジナイザーした後, Oasis MCX (150 mg) カートリッジを用いて試験溶液を調製した。

## 6. アフィニティーカラムおよび分子認識法を用いた試料精製法の検討

### 6.1 アフィニティーカラムによるアミノグリコシド系抗生物質の前処理法の検討

#### 1) 試料及び試薬

試料は, 東京都内で市販されていた鶏肉を用いた。測定対象物質には, ゲンタマイシン, シノマイシンおよびネチルマイシンを用いた。

#### 2) 機器分析の測定条件

測定には, 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。測定波長は, 励起波長 265 nm, 蛍光波長 313 nm とした。

#### 3) アフィニティーカラムの作製

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)に負荷し, 室温で 2 時間反応させて, ゲンタマイシン用のアフィニティーカラムを作製した。

#### 4) 試料前処理法

鶏肉約 5 g を精密に量り取り, 1.2%メタリン酸を加えてホモジナイズし, 遠心分離により得られた上清をアフィニティーカラムに負荷し, 蛍光誘導体化用の試料溶液を調製した。その後, 9-フルオレニルメチルクロロホルメート (FMOC-Cl)を加えて蛍光誘導体化し, HPLC 試料溶液とした。

### 6.2 分子認識ポリマー(MIP)による試料精製と, アフィニティーカラムおよび固相抽出カートリッジによる試料精製効果の比較

#### 1) 測定対象物質および試料

試料は, 東京都内で市販されていたハチミツを用いた。測定対象物質には, クロラムフェニコールを選んだ。

#### 2) 機器分析の測定条件

クロラムフェニコールの測定には, 高速液体クロマトグラフィー/紫外吸光度法(HPLC/UV)を使用した。測定波長は 278 nm とした。

#### 3) アフィニティーカラムの作製

ゲンタマイシン用アフィニティーカラム作製法と同様に行った。

#### 4) 前処理法

ハチミツ約 5g を精密に量り取り, PBS をハ



チミツと合わせて 10 mL になるよう添加した。その溶液をメンブランフィルター(孔径 0.45 μm)でろ過し、分子認識ポリマー (MIP)、アフィニティーカラム、Oasis HLB によりそれぞれ精製を行った。

## 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検討(簡易検査法の確立)

抽出溶媒としてまず、メタノール、アセトニトリル、20%含水メタノールおよび20%含水アセトニトリル各 5 mL 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が優れていた。また、メタノール、アセトニトリルとも水を 20%以上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、抽出溶媒にはメタノール 5 mL を用いることにした。本法による豚肉、豚肝臓に対する代表的抗菌性物質の検出限界は、ペニシリン系、セフェム系抗生物質が 0.005~0.01μg/g、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 0.1~2.5μg/g であった。一方、アミノグリコシド系抗生物質の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十分でなく、検出限界は 5μg/g 以上であった。鶏肉、牛肉、鶏肝臓、牛肝臓に対する代表的抗菌性物質の検出感度は、豚肉、豚肝臓とほぼ同じであった。

水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質は、メタノールでは抽出率が極めて低いと考えられる。そこで、水溶性およ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て検出感度に及ぼす影響を調べた。メタリン酸を含まない水-メタノール系では、前述のとおり水の含量が 20%以上になると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 および 10%) およびメタリン酸-メタノール混液の混合比を変えて阻止円形成に及ぼす影響を検討した。メタリン酸濃度およびメタリン酸溶液の割合が高くなるに従い、コントロールでも阻止円が形成された。また、メタリン酸濃度およびメタリン酸溶液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は低下した。総合的に評価すると 1%メタリン酸-メタノール(3:7) 混液が最も良好な検出感度を与えた。しかし、アミノグリコシド系抗生物質の検出感度に改善が見られたが、酸に不安定なマクロライド系抗生物質及び一部のペニシリン系抗生物質には検出感度の低下が見られた。操作の簡便性と総合的な検出感度を考慮するとメタノールのみによる抽出法が最も好ましいと評価した。

### 2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討(簡易検査法の妥当性評価)

#### 1) 簡易検査法の検出限界 (豚筋肉)

4 機関による豚筋肉を用いた共同実験を行った結果、概ね同様の検出下限値が得られた。ABPC, PCG は 4 機関とも試験菌 *M.l* ATCC 9341 で 0.05μg/g まで検出され、残留基準値レベルでの検出が可能であった。CEPR, CEX は機関間でばらつきが見られ、0.05-0.5μg/g であった。EM, SPM とも *M.l* ATCC 9341 で 0.1-0.5 及び 0.5-2.5μg/g、OTC, CTC は *B.s* BGA (培地 AM8) で 0.5-1.0 及び 0.1μg/g であり、残留基準値レベルで検出できたのは CTC のみであった。キノロン剤は *B.s* BGA (培地 AM5) で最も感度良く検出され、ERFX が 0.25μg/g、SRFX が 0.5-1.0μg/g であった。アミノグリコシド系抗生物質はいずれの培地を用いても 5-10μg/g であり、残留レベルでの検出は不適であった。

#### 2) 簡易検査法の検出限界 (豚肝臓)

4 機関による豚肝臓を用いた共同実験を行っ

た結果、検出下限値は豚筋肉に比べ、幾分劣ったが同様の傾向の結果であった。

### 3) 簡易検査法の検出限界 (卵黄)

2 機関による卵黄を用いた共同実験を行った結果、概ね同様の検出下限値が得られた。

### 4) 簡易検査法の検出限界 (ハマチ)

2 機関によるハマチを用いた共同実験を行った結果、概ね同様の検出下限値が得られた。

### 5) 簡易検査法の検出限界 (ハチミツ)

2 機関によるハチミツを用いた共同実験を行った結果、概ね同様の検出下限値が得られた。

### 6) 簡易検査法の検出限界 (牛乳)

2 機関による牛乳を用いた共同実験を行った結果、概ね同様の検出下限値が得られた。乳に設定されている薬剤の残留基準値は低く、今回検討した薬剤のほとんどは、残留基準値レベルでの検出は困難であった。

## 3. LC/MS/MS を用いた機器分析法の検討(キノロン剤分析法の確立)

### 1) LC/MS 測定条件の検討

キノロン剤 14 種を分析対象とした。キノロン剤は、いずれも構造中にカルボキシル基とアミンを有しており、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。プリカーサーイオンは、いずれもプロトン化分子 ( $M+H$ )<sup>+</sup>で、主なプロダクトイオンは、脱炭酸イオン (-44) であった。

分離カラムは、キノロン剤は、3 位のカルボキシル基と 4 位のカルボニル基から成る  $\beta$ -ジケトン部位で金属イオンに配位することから、カラム充填剤中の金属不純物の影響を強く受ける。本法では、金属不純物の含有量の少ない高純度シリカゲルを基材とした充填剤からなる L-columu ODS を用いた。

### 2) 前処理法の検討

キノロン剤は、 $\beta$ -ジケトン部位で金属イオン

に配位することから、クリーンアップには、金属イオンの影響のないポリマー系カートリッジ (Oasis HLB) を採用した。

### 3) 添加回収実験

市販の豚肉及び豚肝臓に 14 種のキノロン剤を 0.1  $\mu\text{g/g}$  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 80%以上であり、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

本法によるキノロン剤 14 種の定量限界は、いずれも 0.01  $\mu\text{g/g}$  まで十分検出が可能であった。

## 4. 微生物学的試験法によるテトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン剤の分析

### 1) 試験溶液の調製方法の検討

TC 系抗生物質の回収率を向上させ、定量可能とするため、試験溶液の調製方法について、溶出溶液の組成並びに抽出液量の検討を行った。検討の結果、MCX カラムからの溶出溶液には、アセトニトリル-0.25 mol/L 塩化カリウム溶液-TEA (80:20:0.01) 混液を選択した。また、抽出液であるマキルベン緩衝液量は 100 mL とした。

### 2) 添加回収実験

豚の筋肉 5.0 g に、各々残留基準値相当量もしくは残留基準値 1/2 相当量の TC 系抗生物質 OTC, TC, CTC 0.2  $\mu\text{g/g}$ , DOXY 0.05  $\mu\text{g/g}$  およびニューキノロン剤 ERFX 0.05  $\mu\text{g/g}$ , CPMX 0.05  $\mu\text{g/g}$ , DNFX 0.1  $\mu\text{g/g}$ , DFLX 0.02  $\mu\text{g/g}$ , MBFX 0.2  $\mu\text{g/g}$  を添加し、添加回収実験を行った結果、回収率は 59.8~90.1% (CV 1.6~4.6%) と良好であった。

### 3) TC 系抗生物質およびニューキノロン剤の微生物学的スクリーニング

豚筋肉に残留基準値相当の TC 系抗生物質 4 薬剤およびニューキノロン剤 5 薬剤を各々添加

し、微生物学的スクリーニングを行った。微生物学的スクリーニングにおけるこれらの薬剤の検出限界値は、0.005～0.05 µg/gであった。これは、残留基準値より低いもしくは同等の値であり、ポジティブリスト制度施行後の残留検査に十分適用できることが示された。

#### 4) HPLC測定によるTC系抗生物質およびニューキノロン剤の定量・確認

微生物学的スクリーニングにおいてTC系抗生物質およびニューキノロン剤の残留が推定された場合、HPLC測定によりこれら9薬剤の同定・定量が可能であることが示された。

### 5. 微生物学的試験法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分析

#### 1) マクロライド系抗生物質

各薬剤について豚筋肉・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。その結果、基準値濃度の添加回収試験では、リンコマイシン(LCM)は筋肉では検出できなかったが、それ以外の薬剤では基準値レベルの検出が可能であった。LCM除く薬剤の回収率は17.3～105.3%であり、検出限界は、0.001～0.05 ppmであった。

#### 2) アミノグリコシド系抗生物質

各薬剤について豚筋肉・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。その結果、デヒドロストレプトマイシン(DSM)、ストレプトマイシン(SM)はカートリッジへの吸着が強く、溶出出来ないため検出できなかったが、それ以外の薬剤では基準値レベルの検出が可能であった。また、SM及びDSMを除く薬剤の回収率は90.7～176.1%であり、検出限界は、0.02～0.06 ppmであった。

### 6. アフィニティーカラムおよび分子認識法を用いた試料精製法の検討

#### 1) アフィニティーカラムの保持能の検討

ゲンタマイシン(ゲンタマイシン C1 (40%), C1a (23%), C2 (37%)の混合標準品)、シソマイシンおよびネチルマイシンの標準品 500 ng/mL 各 1mL をアフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、それぞれ、104.6, 111.3, 103.1, 106.3 および 105.1%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 89.5, 96.8, 89.3, 68.4 および 87.1%であり、食肉抽出液でのシソマイシンを除いて、どれも良好な回収率であった。しかし、食肉抽出液での回収率は、標準品の回収率に比べていずれも若干低下していることが分かった。特にシソマイシンでは低下が顕著であった。このことから、食肉など多くの夾雑物質が共存すると、アフィニティーカラムへの保持が弱まることが示唆された。また、シソマイシンはゲンタマイシンおよびネチルマイシンに比べ、抗原抗体反応における親和力が弱いことが推察された。

#### 2) 試料精製能の比較

ハチミツを試料として、分子認識ポリマー(MIP)、アフィニティーカラムおよび Oasis HLB により精製した。精製後の溶液にクロラムフェニコールの標準品 1000 ng を添加し、HPLC/UV により測定を行った。その結果、MIP およびアフィニティーカラムにより精製した場合、Oasis HLB により精製した場合に比べ、良好なクロマトグラムが得られた。このことから、MIP およびアフィニティーカラムは同等な精製能を有しており、精製能は、Oasis HLB に比べ高いと考えられた。

#### 3) 操作性

MIP による試料精製では、洗浄に計9回の操作が必要であり、また、試料負荷の際には 0.5 mL/min 以下、溶出の際には 0.2 mL/min 以下と

いう流速の制限もあったことから煩雑となり、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラムが優れていた。しかし、今回用いたアフィニティーカラムは自家調製であったことから、事前の調製も考慮すると操作の簡便性では、Oasis HLB > MIP > アフィニティーカラムの順となった。

#### D. 結論

##### 1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討(簡易検査法の確立)

畜産食品中に残留するペニシリン系抗生物質(PCs), セファロスポリン系抗生物質(CEs), テトラサイクリン系抗生物質(TCs), マクロライド系抗生物質(MLs), キノロン系抗菌剤(QNs) などを中心とした、より多くの抗菌性物質を同時に検出できる微生物学的試験法(簡易検査法)を確立した。食肉からメタノールでホモジナイズ抽出し、遠心分離後、その上清を微生物学的試験法に供した。市販芽胞菌を含めた4種の検査用平板培地(*Bacillus subtilis* BGA (AM8 培地, AM5 培地), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus*) を用いることにより、畜産食品中に残留する可能性の高い PCs, CEs, MLs, TCs, QNs 等を簡易かつ迅速に検出することが可能であった

##### 2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の検討(簡易検査法の妥当性評価)

本研究事業で構築した簡易検査法について共同試験による評価を行った。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, ベンジルペニシリン), セファロスポリン系抗生物質(セファピリン, セファレキシン), マクロライド系抗生物質(エリスロマイシン, スピラマイシン), 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), テトラサイクリン系抗生物質(オキシテトラサ

イクリン, クロルテトラサイクリン), ニューキノロン剤(エンロフロキサシン, サラフロキサシン), 計12種を用いた。対象食品には、豚肉, 豚肝臓, 卵黄, ハマチ, ハチミツ及び牛乳を用いた。各機関で得られた本簡易検査法の検出下限値は概ね同様の値であった。

##### 3. LC/MS/MS を用いた機器分析法の検討(キノロン剤分析法の確立)

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要求される。そこで本研究では、昨年度に引き続き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キノロン系抗菌剤(オールドキノロン剤及びニューキノロン剤)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。試料から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した。本法によるキノロン系抗菌剤の添加回収率は、0.1µg/g 添加で概ね80%以上、定量限界は、いずれも0.01 µg/g まで十分検出が可能であった。

##### 4. 微生物学的試験法によるテトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン剤の分析

微生物学的スクリーニングと機器分析を用いた精度の高いテトラサイクリン系抗生物質(TCs)の試験法を再検討した。また、ニューキノロン系合成抗菌剤(NewQ)に対して、本改良法の適用が可能かについても検討を行った。改良法におけるTCsの添加回収率は、残留基準値相当の各薬剤を豚肉に添加したとき、59.8~90.1%(変動係数1.6~4.6%)と良好であった。微生物学的スクリーニングの検出限界値は0.005~0.05 µg/g であった。改良法はポジティブリスト施行

後の残留抗生物質検査法として、TCs および NewQ のスクリーニングに有用であることが示唆された。また、微生物学的スクリーニングにおいて TCs および NewQ の残留が推定された場合、選択性および汎用性の高い HPLC を用いて同定・定量し TCs 4 薬剤および NewQ 5 薬剤の同定・定量が可能であった。

## 5. 微生物学的試験法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分析

微生物学的試験法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、マクロライド系抗生物質は 11 種類の薬剤について、アミノグリコシド系抗生物質は 5 種の薬剤について、残留基準値もしくはそれを上回る高感度な分析法を確立することができた。本試験法は、系統別に多くの物質について残留基準値レベルのスクリーニングができる可能であることが示唆された。

## 6. アフィニティーカラムおよび分子認識法を用いた試料精製法の検討

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として、特にその試料前処理が困難とされているアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを分析するため、夾雑物質を効果的に除去できる高い精製能力を有する前処理として、抗原抗体反応を利用したアフィニティーカラムによる試料精製法を検討した。本研究では、ゲンタマイシンに特異的なアフィニティーカラムを作製して、構造が類似した他のアミノグリコシド系抗生物質（ゲンタマイシン、シソマイシンおよびネチルマイシン）への適用性について検討した結果、良好な結果が得られた。また、アフィニティーカラムと同様に、特異的な前処理が可能な分子認識

法（MIP）と、従来用いられている固相抽出カートリッジ(Oasis HLB)およびアフィニティーカラムによる試料精製について、ハチミツを試料として比較・検討した。その結果、精製能においては MIP とアフィニティーカラムが優れ、操作の簡便さにおいては Oasis HLB とアフィニティーカラム、コスト面においては Oasis HLB と MIP が優れていた。

## **E. 健康危害情報**

なし

## **F. 研究発表**

### 1. 論文発表

- 1) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 中澤裕之: 微生物学的試験法による畜産物中に残留する抗菌性物質の高感度測定法. 分析化学, 56, 1097-1103 (2007)
- 2) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 井部明広, 藤田和弘, 丹野憲二, 中澤裕之: 食肉中に残留する抗菌性物質の微生物学的簡易検査法, 食品衛生学雑誌, 49, 印刷中 (2008)
- 3) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan, James D. MacNeil: Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Food Additives and Contaminants, to be submitted (2008)
- 4) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 牛山慶子, 竹葉和江, 坂本美穂, 林洋, 井草京子, 井部明広, 永山敏廣: 微生物学的スクリーニング, HPLC および LC/MS/MS による食肉中の残留テトラサイクリン系抗生物質 4 薬剤の迅速分析, 日本食品衛生学雑誌, 49(1), 37-44 (2008)
- 5) Kazuhiro Fujita, Hironobu Ito, Michiyo Ishihara, Sachi Inukai, Hiroyuki Tanaka, Makoto Taniguchi: Analysis of Trace residues of Tetracyclines in Dark Colored Honeys by High-Performance Liquid

Chromatography Using Polymeric Cartridge and Metal Chelate Affinity Chromatography : 食品衛生学雑誌, 49, 投稿中 (2008)

6) 八津川洋一, 藤田和弘, 中村宗知, 渡井正俊, 村山三徳, 米谷民雄 : LC/MS による畜産物中のセデカマイシンおよびテルデカマイシンの同時分析法 : 食品衛生学雑誌, 49, 投稿中 (2008)

7) Kazuhiro Fujita, Hironobu Ito, Munetomo Nakamura, Masatoshi Watai, and Makoto Taniguch: Determination of Chloramphenicol Residues in Bee Pollen by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: J. AOAC Int. to be submitted (2008)

## 2. 学会発表

1) 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デカマイシン及びテルデカマイシンの定量」第 93 回日本食品衛生学会 (2007.5 ; 東京)

2) 堀江正一, 竹上晴美, 村山三徳「LC/MS/MS による畜水産食品中のニトロフラゾンの分析」第 94 回日本食品衛生学会 (2007.10 : 静岡)

3) 堀江正一, 大坂郁恵, 石井里枝「LC/MS/MS 及び微生物学的試験法を用いた  $\beta$ -ラクタム系抗生物質の分析」第 44 回全国衛生化学技術協議会 (2007.10 ; 三重)

4) 石井里枝, 堀江正一「LC/MS/MS を用いたアミノグリコシド系抗生物質の一斉分析」第 94 回日本食品衛生学会 (2007.10 : 静岡)

5) 堀江正一, 田原弥生, 石井里枝「LC/MS/MS による畜水産食品中に含まれるヒドロコルチゾンの分析」第 128 回日本薬学会 (2008.3 ; 横浜)

6) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan, James D. MacNeil “Multi-residue Confirmation of Aminoglycoside Antibiotics in Kidney and Meat by Liquid Chromatography with Tandem Mass

Spectrometry”

Saskatoon International Validation Workshop for Regulatory Analysis of Residues in Foods (2007,5): Saskatoon, Canada

7) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椛沢 圭介, 岡山 明子, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之 ; 食肉中ゲンタマイシン測定におけるアフィニティーカラムの有用性の検討 ; 第 51 回日本薬学会関東支部大会(2007 年 10 月・星薬大)

8) 北村 渉, 斉藤 貢一, 椛沢 圭介, 岡山 明子, 加藤 美穂子, 小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 中澤 裕之 ; アフィニティークロマトグラフィーを用いた食肉中残留抗菌性物質の試料精製 ; 日本薬学会第 128 年会(2008 年 3 月・横浜)

## G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

平成19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  
『簡易かつ迅速な微生物学的試験法の検討  
—簡易検査法の確立—』

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
	小林 晴美	埼玉県衛生研究所

研究要旨

畜産食品中に残留するペニシリン系抗生物質(PCs), セファロsporin系抗生物質(CEs), テトラサイクリン系抗生物質(TCs), マクロライド系抗生物質(MLs), キノロン系抗菌剤(QNs)などを中心とした, より多くの抗菌性物質を同時に検出できる微生物学的試験法(簡易検査法)を検討した. 食肉からメタノールでホモジナイズ抽出し, 10分間遠心分離後, その上清を微生物学的試験法に供した. 市販芽胞菌を含めた4種の検査用平板培地 (*Bacillus subtilis* BGA (AM8培地, AM5培地), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Geobacillus stearothermophilus*) を用いることにより, 代表的な抗菌性物質(ペニシリンG, アンピシリン, セファピリン, セファレキシン, エリスロマイシン, スピラマイシン, オキシテロラサイクリン, クロルテトラサイクリン, エンロフロキサシン, サラフロキサシン)を感度よく検出できた. 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PCs, CEs, MLs, TCs, QNs等を簡易かつ迅速に検出することが可能であると思われる.

**A. 研究目的**

畜水産動物の疾病予防およ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懸念されおり, 残留の有無を確認する簡易かつ迅速な試験法の確立が必要とされている. 残留抗菌性物質の

試験法は, 微生物学的試験法と理化学的試験法に大別される. このうち, 微生物学的試験法とは, 抗菌性物質が有する微生物の増殖を抑制する作用(抗菌作用)を指標とした試験法であり, 形成された阻止円の大きさを測定することにより, 試料中の抗菌性物質の量を求めることができる. 抗生物質をはじめとする抗菌性物質の残留分析に

は、従来から微生物学的試験法が汎用されてきた。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)」が汎用されている。しかし、本検査法は、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。そこで本研究では、畜産食品中に残留する可能性が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、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の残留の有無をより簡易かつ迅速にスクリーニングできる実用的な残留試験法の構築を試みた。

## 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

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。なお、メタノールに溶解し難いキノロン剤については、最小量の0.02mol/L NaOHを用いて溶解後、メタノールに溶解した。

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 *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 $0.08\text{mL}\pm 0.01\text{mL}$ )の厚手のパルプディスクを $121^{\circ}\text{C}$ 、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)

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いた。

### 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 *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 1/10 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, *G.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. 検出下限値

0.001~50 µg/mL の範囲で各抗菌性物質について, 阻止円が形成される前後の適切な数段階濃度の標準溶液を調製し, 微生物学的試験法に供した。各抗菌性物質について, 阻止円 (12 mm 以上) が観測された最小濃度を検出下限値とした。

#### B.6. 簡易検査法試験溶液の調製

試料 5 g を 50 mL ポリプロピレン製遠心チューブに採り, メタノール 5 mL を加えて 1 分間ホモジナイズし, 10°C, 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. 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

抽出溶媒としてまず, メタノール, アセトニトリル, 20%含水メタノールおよび 20%含水アセトニトリル各 5 mL 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が優れていた。また, メタノール, アセトニトリルとも水を 20%以上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, 抽出溶媒にはメタノール 5 mL を用いることにした。本法による豚肉, 豚肝臓に対する代表的抗菌性物質の検出限界は, ペニシリン系, セフェム系抗生物質が 0.005~0.01 µg/g, 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 0.1~2.5 µg/g であった。一方, アミノグリコシド系抗生物質の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十分でなく, 検出限界は 5 µg/g 以上であった (表 1~2)。鶏肉, 牛肉, 鶏肝臓, 牛肝臓に対する代表的抗菌性物質の検出感度は, 豚肉, 豚肝臓とほぼ同じであった。

水溶性が極めて高いアミノグリコシド系抗生物質は, メタノールでは抽出率が極めて低いと考えられる。そこで, 水溶性およ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て検出感度に及ぼす影響を調べた。メタリン酸を含まない水-メタノール系では, 前述のとおり水の含量が 20%以上になるとコントロー

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 および 10%) およびメタリン酸-メタノール混液の混合比を変えて阻止円形成に及ぼす影響を検討した。メタリン酸濃度およびメタリン酸溶液の割合が高くなるに従い、コントロールでも阻止円が形成された。また、メタリン酸濃度およびメタリン酸溶液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は低下した。総合的に評価すると 1% メタリン酸-メタノール(3:7) 混液が最も良好な検出感度を与えた。しかし、アミノグリコシド系抗生物質の検出感度に改善が見られたが、酸に不安定なマクロライド系抗生物質及び一部のペニシリン系抗生物質には検出感度の低下が見られた。操作の簡便性と総合的な検出感度を考慮するとメタノールのみによる抽出法が最も好ましいと評価した。

#### **D. 結論**

昨年度に引き続き、畜水産食品中に残留する抗菌性物質の簡易検査法を検討した。本法は、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として試料 5g をメタノール 5 mL で抽出する方法とした。従来の簡易検査法に比べ、操作性に優れ、かつ検出感度も数倍向上した。しかし、感度的に残留基準値レベルの残留の有無の判定に用いるには問題のある抗菌性物質も見られた。今回検討した薬剤は、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、キノロン系抗菌剤等、各グループ 2 剤のみ

であるが、各グループの抗菌活性は同様のパターンを示すことから(表 3~4)、平成 18 年度報告書から引用)、畜水産食品中に残留する可能性の高いこれら抗菌性物質を簡易かつ迅速に検出することが可能であると考ええる。高価な分析機器のない検査機関でも畜水産食品の安全性を確保する自主検査法として有用であると考ええる。また、機器分析で検出された抗菌性物質のクロスチェック法としても日常検査に応用が可能であると期待される。

#### **E. 健康危害情報**

なし

#### **F. 研究発表**

##### **F.1. 論文発表**

- 1) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 中澤裕之: 微生物学的試験法による畜産物中に残留する抗菌性物質の高感度測定法. 分析化学, 56, 1097-1103 (2007)
- 2) 堀江正一, 小林晴美, 石井里枝, 井部明広, 藤田和弘, 丹野憲二, 中澤裕之: 食肉中に残留する抗菌性物質の微生物学的簡易検査法, 食品衛生学雑誌, 49, 印刷中 (2008)
- 3) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan, James D. MacNeil: Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, Food Additives and Contaminants, to be submitted (2008)

##### **F.2. 学会発表**

- 1) 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(2007.5;東京)

2) 堀江正一, 竹上晴美, 村山三徳  
「LC/MS/MS による畜水産食品中のニトロフ  
ラゾンの分析」第94回日本食品衛生学会  
(2007.10:静岡)

3) 堀江正一, 大坂郁恵, 石井里枝  
「LC/MS/MS 及び微生物学的試験法を用  
いたβ-ラクタム系抗生物質の分析」第44  
回全国衛生化学技術協議会(2007.10;三重)

4) 石井里枝, 堀江正一「LC/MS/MS を用い  
たアミノグリコシド系抗生物質の一斉分  
析」第94回日本食品衛生学会(2007.10:静  
岡)

5) 堀江正一, 田原弥生, 石井里枝  
「LC/MS/MS による畜水産食品中に含ま  
れるヒドロコルチゾンの分析」第128回  
日本薬学会(2008.3;横浜)

6) Rie Ishii, Masakazu Horie, Wayne Chan,  
James D. MacNeil “Multi-residue Confirma  
-tion of Aminoglycoside Antibiotics in Kidney  
and Meat by Liquid Chromatography with  
Tandem Mass Spectrometry”

Saskatoon International Validation Workshop  
for Regulatory Analysis of Residues in Foods  
(2007,5): Saskatoon, Canada

#### G.知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 微生物学的簡易検査法の検出限界 (µg/g) : 試料, 豚筋肉部

分類	抗菌性物質	検出濃度 (µg/g)				残留基準 (ppm)
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearothermophilus	
ペニシリン系	Ampicillin	0.25	0.25	0.05	0.005	0.06
	Penicillin G	0.1	0.25	0.05	0.005	0.05
セフェム系	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	0.05
	Spiramycin	>10	10	0.5	10	0.2
アミノグリコシド系	Streptomycin	>10	5	10	>10	0.6*
	Gentamycin	>10	>10	>10	>10	0.1
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	0.5	10	10	0.5	0.2**
	Chlortetracycline	0.1	0.5	10	0.5	
キノロン剤	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5	0.05
	Sarafloxacin	1	0.5	>10	1	

\*残留基準値：ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンとは、ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンの和

\*\*残留基準値：オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの総和

表2 微生物学的簡易検査法の検出限界 (µg/g) : 試料, 豚肝臓

分類	抗菌性物質	検出濃度 (µg/g)				残留基準 (ppm)
		B.s BGA (AM 8)	B.s BGA (AM 5)	M.I ATCC 9341	B.stearothermophilus	
ペニシリン系	Ampicillin	0.1	0.25	0.05	0.005	0.06
	Penicillin G	0.05	0.25	0.1	0.005	0.05
セフェム系	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	0.05
	Spiramycin	>10	10	1	10	0.6
アミノグリコシド系	Streptomycin	>10	>10	>10	>10	0.6*
	Gentamycin	>10	>10	>10	>10	2.0
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	1	>10	>10	1	0.6**
	Chlortetracycline	0.5	5	>10	1	
キノロン剤	Enrofloxacin	1	0.5	>10	1	0.1
	Sarafloxacin	1	0.5	>10	1	

\*残留基準値：ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンとは、ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンの和

\*\*残留基準値：オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの総和