

表3 抗生物質の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 ($\mu\text{g/mL}$)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G.stearother-</i> <i>mophilus</i>	
β -ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	0.25	0.1	0.025	0.001
	アンピシリン	Ampicillin	0.05	0.05	0.01	0.001
	アスポキシシリン	Aspoxicillin	1	2.5	0.5	0.001
	ベンジルペニシリン	Benzylpenicillin	0.05	0.1	0.01	0.001
	クロキサシリン	Cloxacillin	0.25	2.5	2.5	0.001
	ジクロキサシリン	Dicloxacillin	0.25	1	1	0.002
	メシリナム	Mecillinum	>5	>5	>5	0.1
	ナフシリン	Nafcillin	0.5	2.5	0.05	0.01
	オキサシリン	Oxacillin	0.1	2.5	0.25	0.01
	ペニシリン V	Penicillin V	0.01	0.1	0.05	0.001
	セフォペラゾン	Cefoperazone	2	>50	0.5	0.001
	セフトキシム	Cefuroxime	0.25	>50	0.5	0.001
	セファピリン	Cephapirin	0.01	0.5	0.1	0.001
	セファロニウム	Cephalonium	0.25	5	1	0.005
	セファレキシン	Cephalexin	0.5	5	0.5	0.01
	セフキノム	Cefquinome	1	2.5	0.25	0.1
セフトيوفル	Ceftiofur	0.05	2.5	0.1	0.0005	
セファゾリン	Cephazolin	5	10	10	0.002	
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	0.5	0.1	0.05	1
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	5	0.5	0.25	25
	キタサマイシン	Kitasamycin	2.5	0.5	0.25	2.5
	ジョサマイシン	Josamycin	2.5	1	0.25	2.5
	スピラマイシン	Spiramycin	10	1	0.5	5
	ネオスピラマイシン I	Neospiramucin I	10	2.5	0.5	5
	タイロシン	Tylosin	2.5	0.5	0.5	0.25
	チルミコシン	Tilmicosin	2.5	0.5	0.5	0.5
	ツラスロマイシン	Tulathromycin	>50	0.5	0.5	25
	ミロサマイシン	Mirosamicin	2.5	2.5	0.5	0.1
	セデカマイシン	Sedecamycin	>50	>50	2.5	5
	テルデカマイシン	Terdecamycin	>50	>50	1	50
アミノグリコシド系	アブラマイシン	Apramycin	10	2.5	10	5
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomyc	10	0.5	2.5	2.5
	パロモマイシン	Paromomycin	10	0.5	10	5
	ネオマイシン (フラジオマイシン)	Neomycin (Fradiomycin)	2.5	2.5	2.5	1
	ゲンタマイシン	Gentamycin	1	0.5	5	0.5
	ハイグロマイシンB	Hygromycin B	>50	25	10	50
	カナマイシン	Kanamycin	2	1	5	5
	スペクチノマイシン	Spectinomycin	>10	12.5	10	5
	ストレプトマイシン	Streptomycin	5	0.5	2.5	5
カスガマイシン	Kasugamycin	>50	>50	>50	>50	

表3 抗生物質の各試験菌に対する検出感度（続き）

分類	抗生物質	検出感度 ($\mu\text{g/mL}$)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.l</i> ATCC 9341	<i>G.stearother-</i> <i>mophilus</i>	
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	0.25	5	10	0.1
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	0.05	0.5	10	0.5
	テトラサイクリン	Tetracycline	0.25	5	10	0.1
	ドキシサイクリン	Doxycycline	0.05	0.1	1	0.1
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	2.5	2.5	5	0.1
	コリスチン	Colistin	>50	>50	>50	25
	チオペプチン	Thiopeptin	0.5	1	0.5	0.1
	ノシヘプタイド	Nosiheptide	5	2.5	0.1	0.05
	バージニアマイシン	Virginiamycin	2.5	5	0.1	0.1
	バシトラシン	Bacitracin	>10	>10	0.4	0.5
	ポリミキシン B	Polymyxin B	>50	>50	>50	10
	アホパルシン	Avoparcin	2.5	2.5	10	1
	フラボフォスホリポール	Flavophospholipol	2.5	>50	>50	1
ポリエーテル系	ラサロシド	Lasalocid	2.5	10	50	1
	モネンシン	Monensin	10	10	50	1
	サリノマイシン	Salinomycin	1	10	50	0.25
	マデュラマイシン	Maduramicin	2.5	25	>50	1
	ナラシン	Narasin	1	10	>50	0.1
	センデュラマイシン	Semduramicin	25	>50	>50	5
	その他	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	10	10	5
アビラマイシン		Avilamycin	1	10	10	2.5
チアムリン(フマル酸チアムリン)		Tiamulin fumarate	>50	50	0.25	0.5
リンコマイシン		Lincomycin	>50	10	0.5	0.25
ビコザマイシン		Bicozamycin	>50	>50	>50	50
ノボビオシン		Novobiocin	0.5	10	10	0.1
エフロトマイシン		Efrotomycin	50	>50	>50	0.5
ナナフロシン		Nanafrocin	2.5	10	50	0.25
ピルリマイシン		Pirlimycin	0.5	0.1	0.1	0.25
バルネムリン		Valnemulin	50	10	2.5	0.05

表4 合成抗菌剤の各試験菌に対する検出感度

分類	抗生物質	検出感度 ($\mu\text{g/mL}$)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.I</i> ATCC 9341	<i>G.stearother</i> - <i>mophilus</i>	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	>50	>50	>50	>50
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimidine	>50	>50	>50	>50
	スルファドキシ	Sulfadoxine	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファメトキシピリダジ	Sulfamethoxypridazi	>50	>50	>50	>50
	スルファメラジン	Sulfamerazine	>50	>50	>50	>50
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	>50	50	>50	>50
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	>50	50	>50	>50
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	>50	>50	>50	>50
	スルファニトラン	Sulfanitran	>50	50	>50	>50
	スルファブロモメタジン	Sulfabromomethazine	>50	50	>50	>50
	スルファニルアミド	Sulfanilamide	>50	50	>50	>50
	スルファモイルダプソン	Sulfamoyldapsone	>50	50	>50	>50
	スルフィソゾール	Sulfisozole	>50	50	>50	>50
	スルファトロキサゾール	Sulfatroxazole	>50	>50	>50	>50
	スルファグアニジン	Sulfaguanidine	>50	50	>50	>50
	スルファクロピリダジン	Sulfachlorpyridazine	>50	50	>50	>50
	スルファジミジン	Sulfadimidine	>50	50	>50	>50
	スルファセタミド	Sulfacetamide	>50	50	>50	>50
スルファピリジン	Sulfapyridine	>50	50	>50	>50	
スルファベンズアミド	Sulfabenzamide	>50	50	>50	>50	
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	1	0.1	2	2
	ジフロキサシン	Difloxacin	0.5	0.05	>50	2.5
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	エノキサシン	Enoxacin	2.5	2.5	>10	1
	フルメキン	Flumequine	1	2.5	>50	>50
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	1	0.1	5	1
	ミロキサシン	Miloxacin	0.5	2.5	>50	50
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	1	10	>50	>50
	ノルフロキサシン	Norfloxacin	1	0.5	>50	1
	オフロキサシン	Ofloxacin	0.5	0.25	10	0.5
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	0.5	0.25	25	2.5
	オキシリン酸	Oxolinic acid	0.5	1	>50	5
	サラフロキサシン	Sarafloxacin	0.5	0.25	50	0.5

分類	抗生物質	検出感度 (μg/mL)				
		<i>B.s</i> BGA (AM 8)	<i>B.s</i> BGA (AM 5)	<i>M.I</i> ATCC 9341	<i>G.stearother</i> - <i>mophilus</i>	
キノロン剤	スパフロキサシン	Sparfloxacin	0.5	0.1	5	1
	ベブフロキサシン	Vebufloxacin	2.5	0.5	25	2.5
	ピロミド酸	Piromidic acid	1	10	>50	>50
	シプロフロキサシン	Ciprofloxacin	0.5	0.25	5	1
その他	オラキンドックス	Olaquinox	>50	>50	>50	>50
	ナイカルバジン	Nicarbazin	>50	>50	>50	>50
	チアンフェニコール	Thiamphenicol	10	25	25	2.5
	フロルフエニコール	Florfenicol	2.5	2.5	5	1
	アンプロリウム	Amprolium	>50	>50	>50	>50
	エトパベート	Ethopabate	>50	>50	>50	>50
	オルメトプリム	Ormethoprim	50	10	50	50
	クロピドール	Clopidol	>50	>50	>50	>50
	トリメトプリム	Trimethoprim	25	2.5	25	50
	ピリメタミン	Pyrimethamine	>50	50	>50	>50
	デコキネート	Decoquate	>50	>50	>50	>50
	ジアベリジン	Diaveridine	>50	10	10	5
	ジニトルミド	Dinitolmide	>50	>50	>50	>50
	マラカイトグリーン シュウ酸塩	Malachite green oxala	5	1	25	1

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－』

主任研究者 堀江 正一 埼玉県衛生研究所

研究要旨

合計5機関で本研究事業で構築した微生物学的簡易検査法のバリデーションを行った。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。本簡易検査法の各機関で得られた検出下限値は概ね同様の結果であった。

今回検討した薬剤は，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，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，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られる。但し，残留基準値レベルで検出可能な薬剤には限界があるが，畜水産食品中に残留する数多くの抗菌性物質を簡易かつ迅速に ppm レベル検出することが可能であり，食の安全性確保に寄与できる試験法であると考えられる。

研究協力者		伊藤 裕信	(財)日本食品分析センター
石井 里枝	埼玉県衛生研究所	飯塚 太由	(財)食品環境検査協会
小林 晴美	埼玉県衛生研究所	那須 朗	(財)食品環境検査協会
井部 明弘	東京都健康安全研究センター	前田 守	(財)日本冷凍食品検査協会
草野 友子	東京都健康安全研究センター	澤田 千尋	(財)日本冷凍食品検査協会
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		

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。抗菌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菌物質簡易検査法(改訂)」が汎用されている。しかし、本検査法は、検出感度の面で改善の余地がある。本研究では、畜産食品中に残留する可能性が高い抗菌性物質の簡易かつ迅速な簡易検査法の確立を試みた。そこで、本研究事業で確立した簡易検査法について、合計5機関により、試験法としての妥当性を評価することとした。

B. 研究方法

B.1. 試料

試料は、埼玉県、東京都及び神奈川県内で市販されていた豚筋肉部、豚肝臓、ハマチ、鶏卵、牛乳及びハチミツを用いた。

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、ペニシリン系抗菌物質(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菌物質(セファピリン(CEPR)、セファレキシン(CEX))、マクロライド系抗菌物質(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菌物質(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菌物質(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菌物質は精製水、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0.02 mol/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)及び *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)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0.08mL±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いた。

Syringe 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 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)及び Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)を使用した。これらの培地を 121°C, 15 分間高圧滅菌後, 55°C±1 に保持し, これに *B.s* BGA (使用培地; AM5 及び AM8 の 2 種類) 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, 30°C で 18 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

0.01~10µg/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. 共同実験による妥当性評価

C.1.1 簡易検査法の検出限界 (豚筋肉)

4 機関による試料に豚筋肉を用いた共同実験を行った結果を表 1 に示す。機関間で多少ばらつきが見られたが, 概ね同様の結果が得られた。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。

C.1.2 簡易検査法の検出限界 (豚肝臓)

4 機関による試料に豚肝臓を用いた共同実験を行った結果を表 2 に示す。豚筋肉と同様, 機関間で多少ばらつきが見られたが, 概ね同様の結果が得られた。検出下限値は豚筋肉に比べ, 幾分悪く, 同程度から倍程度であった。残留基準値レベルで検出可能な薬剤は, ABPC, PCG 及び CTC であった。

C.1.3 簡易検査法の検出限界 (卵黄)

2 機関による試料に卵黄を用いた共同実験を行った結果を表 3 に示す。2 機関間で概ね同様の結果が得られた。

なお, 残留基準値は鶏卵 (全卵) に設定されているが, 卵黄には設定されていない。全卵を検査対象にして検査を行った場合, 卵白中には抗菌活性を有するリゾチームが

含まれている。このため、微生物学的試験法では卵の場合、卵黄が検査対象となっている。一般的に多くの抗菌性物質は卵黄に残留することから、残留薬物を検出する上ではより効果的と言える。

C.1.4 簡易検査法の検出限界（ハマチ）

2機関による試料にハマチを用いた共同実験を行った結果を表4に示す。2機関間で概ね同様の結果が得られた。今回分析対象とした12薬剤のうち、7薬剤に残留基準値が設定されていない。残留基準値が設定されている5薬剤の中で、残留基準値レベルで検出可能な薬剤は、ABPC、PCG及びEMであった。

C.1.5 簡易検査法の検出限界（ハチミツ）

2機関による試料にハチミツを用いた共同実験を行った結果を表5に示す。2機関間で概ね同様の結果が得られている。今回分析対象とした12薬剤のうち、3薬剤ABPC、PCG及びTCs(OTC、CTC)にのみ残留基準値が設定されている。ハチミツに設定されているABPC、PCGの残留基準値は0.004、0.009 $\mu\text{g/g}$ と豚肉等に設定されている基準より10倍程度低く、これら3薬剤はいずれも残留基準値レベルでの検出は困難であった。

C.1.6 簡易検査法の検出限界（牛乳）

2機関による試料に牛乳を用いた共同実験を行った結果を表6に示す。2機関間で概ね同様の結果が得られている。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。

D. 結論

合計5機関で本研究事業で構築した微生

物的簡易検査法の共同試験を行った。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sporin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。本簡易検査法の各機関で得られた検出下限値は概ね同様の結果であった。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、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、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。但し、残留基準値レベルで検出可能な薬剤には限界があるが、畜水産食品中に残留する数多くの抗菌性物質を簡易かつ迅速にppmレベル検出することが可能であり、食の安全性確保に寄与できる試験法であると考え。

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 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

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 簡易検査法の検出限界(豚筋肉)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.5	0.5	0.05	0.06
		機関B	0.25	0.25	0.05	
		機関C	0.5	0.5	0.05	
		機関D	0.25	0.5	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.05	0.1	0.05	0.05
		機関B	0.1	0.25	0.05	
		機関C	0.1	0.5	0.05	
		機関D	0.05	0.1	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.05	0.25	0.5	
		機関B	0.05	1	0.5	
		機関C	0.5	0.5	0.5	
		機関D	0.05	0.25	0.5	
	Cephalexin	機関A	0.5	5	1	
		機関B	0.5	5	1	
		機関C	2.5	5	0.5	
		機関D	2.5	5	0.5	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	10	0.5	0.5	0.05
		機関B	5	0.5	0.1	
		機関C	5	0.5	0.5	
		機関D	5	0.25	0.25	
	Spiramycin	機関A	>10	10	1	0.2
		機関B	>10	10	0.5	
		機関C	>10	>10	2.5	
		機関D	>10	>10	2.5	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	5	>10	0.6
		機関B	>10	5	10	
		機関C	>10	5	10	
		機関D	>10	5	>10	
	Gentamycin	機関A	>10	10	>10	0.1
		機関B	>10	>10	>10	
		機関C	>10	10	>10	
		機関D	>10	10	>10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	1	5	10	0.2
		機関B	0.5	10	10	
		機関C	1	5	5	
		機関D	0.5	1	10	
	Chlortetracycline	機関A	0.1	0.5	10	
		機関B	0.1	0.5	10	
		機関C	0.1	0.5	5	
		機関D	0.1	0.5	5	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	1	0.25	>10	0.05
		機関B	0.5	0.25	10	
		機関C	1	0.25	>10	
		機関D	1	0.25	>10	
	Sarafloxacin	機関A	2.5	1	>10	
		機関B	1	0.5	>10	
		機関C	2.5	1	>10	
		機関D	2.5	1	>10	

表2 簡易検査法の検出限界(豚肝臓)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.5	0.5	0.05	0.06
		機関B	0.1	0.25	0.05	
		機関C	0.5	0.5	0.1	
		機関D	0.25	0.5	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.05	0.1	0.05	0.05
		機関B	0.05	0.25	0.1	
		機関C	0.1	0.5	0.05	
		機関D	0.05	0.1	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.05	0.5	1	
		機関B	0.05	0.5	0.5	
		機関C	0.25	0.5	0.5	
		機関D	0.1	0.5	0.5	
	Cephalexin	機関A	0.5	10	1	
		機関B	1	10	1	
		機関C	5	5	0.5	
		機関D	2.5	5	0.5	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	5	0.5	0.5	0.05
		機関B	5	0.25	0.1	
		機関C	5	0.5	0.5	
		機関D	5	0.5	0.25	
	Spiramycin	機関A	>10	>10	1	0.6
		機関B	>10	10	1	
		機関C	>10	>10	5	
		機関D	>10	>10	5	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	>10	>10	0.6
		機関B	>10	>10	>10	
		機関C	>10	>10	>10	
		機関D	>10	>10	10	
	Gentamycin	機関A	>10	>10	>10	2.0
		機関B	>10	>10	>10	
		機関C	>10	>10	>10	
		機関D	>10	>10	>10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	2.5	10	>10	0.6
		機関B	1	>10	>10	
		機関C	2.5	5	10	
		機関D	2.5	5	>10	
	Chlortetracycline	機関A	0.5	5	>10	
		機関B	0.5	5	>10	
		機関C	0.5	5	10	
		機関D	0.5	5	>10	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	5	0.5	>10	0.1
		機関B	1	0.5	>10	
		機関C	1	0.5	>10	
		機関D	1	0.5	>10	
	Sarafloxacin	機関A	5	1	>10	
		機関B	1	0.5	>10	
		機関C	5	1	>10	
		機関D	5	1	>10	

表3 簡易検査法の検出限界(卵黄)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.5	0.25	0.05	0.01
		機関B	0.5	0.5	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.1	0.25	0.05	0.004
		機関B	0.05	0.25	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.05	1	0.5	
		機関B	0.05	0.25	0.5	
	Cephalexin	機関A	1	5	1	
		機関B	2.5	10	2.5	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	5	0.5	0.1	0.09
		機関B	5	0.25	0.05	
	Spiramycin	機関A	>10	10	0.5	
		機関B	>10	5	0.5	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	5	10	
		機関B	>10	5	>10	
	Gentamycin	機関A	>10	>10	>10	
		機関B	>10	>10	>10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	1	10	10	0.4
		機関B	5	>10	>10	
	Chlortetracycline	機関A	1	5	10	
		機関B	2.5	>10	>10	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	1	0.25	10	
		機関B	1	0.25	>10	
	Sarafloxacin	機関A	5	0.5	>10	
		機関B	5	1	>10	

表4 簡易検査法の検出限界(ハマチ)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.25	0.25	0.05	0.05
		機関B	0.25	0.25	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.1	0.25	0.05	0.05
		機関B	0.1	0.25	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.05	1	0.5	
		機関B	0.1	0.5	0.5	
	Cephalexin	機関A	0.5	5	1	
		機関B	2.5	10	0.5	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	5	0.5	0.1	0.2
		機関B	5	0.5	0.25	
	Spiramycin	機関A	>10	10	0.5	
		機関B	>10	10	1	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	5	10	
		機関B	>10	2.5	10	
	Gentamycin	機関A	>10	>10	>10	
		機関B	>10	>10	>10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	0.5	10	10	0.2
		機関B	1	5	10	
	Chlortetracycline	機関A	0.1	0.5	10	
		機関B	0.1	0.5	10	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	0.5	0.25	10	
		機関B	1	0.5	10	
	Sarafloxacin	機関A	5	0.5	>10	
		機関B	2.5	1	>10	

表5 簡易検査法の検出限界(ハチミツ)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.5	0.5	0.1	0.009
		機関B	0.25	0.25	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.5	0.1	0.05	0.004
		機関B	0.1	0.25	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.5	0.5	0.05	
		機関B	0.05	1	0.5	
	Cephalexin	機関A	1	10	1	
		機関B	0.5	5	1	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	>10	5	0.5	
		機関B	5	0.5	0.1	
	Spiramycin	機関A	>10	10	1	
		機関B	>10	10	0.5	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	5	10	
		機関B	>10	5	10	
	Gentamycin	機関A	>10	5	>10	
		機関B	>10	5	>10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	0.5	5	5	0.3
		機関B	0.5	10	10	
	Chlortetracycline	機関A	0.5	0.5	5	
		機関B	0.1	0.5	10	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	1	0.5	>10	
		機関B	1	0.25	10	
	Sarafloxacin	機関A	2.5	1	>10	
		機関B	5	1	>10	

表6 簡易検査法の検出限界(牛乳)

分類	抗菌性物質	検査機関	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	
ペニシリン系	Ampicillin	機関A	0.5	0.5	0.05	0.02
		機関B	0.5	0.5	0.05	
	Penicillin G	機関A	0.1	0.25	0.05	0.004
		機関B	0.1	0.5	0.05	
セフェム系	Cephapirin	機関A	0.25	1	0.5	0.03
		機関B	0.5	0.5	0.5	
	Cephalexin	機関A	2.5	5	1	
		機関B	5	10	0.5	
マクロライド系	Erythromycin	機関A	5	0.5	0.1	0.04
		機関B	5	0.5	0.5	
	Spiramycin	機関A	>10	10	0.5	
		機関B	>10	5	0.5	
アミノグリコシド系	Streptomycin	機関A	>10	5	10	0.2
		機関B	10	0.5	5	
	Gentamycin	機関A	>10	>10	>10	
		機関B	10	0.5	10	
テトラサイクリン系	Oxytetracycline	機関A	0.5	10	10	0.1
		機関B	1	5	10	
	Chlortetracycline	機関A	0.5	0.5	10	
		機関B	0.5	5	10	
キノロン剤	Enrofloxacin	機関A	0.5	0.25	10	0.05
		機関B	0.5	0.5	>10	
	Sarafloxacin	機関A	5	0.5	>10	
		機関B	5	1	>10	

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
『LC/MS/MS を用いた機器分析法の確立
ーキノロン系分析法の検討ー』

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

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、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。

前処理法は、本研究事業で検討した高感度検出法を準用した。即ち、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 µg/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。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キノロン系抗菌剤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豚肉及び豚肝臓を用いた。

B.2. 試薬

供試抗菌性物質:表 2 に示すキノロン系抗菌剤 14 種(オールドキノロン剤 3 種, ニューキノロン剤 11 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 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。但し, 溶解性の低いオールドキノロン剤(オキシリン酸, ナリジクス酸及びフルメキンは, 0.02mol/L NaOH 溶液 5mL に溶解後, メタノールで 50mL とし, 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 1, 2 のとおりとした。

B.4. 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 $\mu\text{g/mL}$ 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, それぞれ表 2 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, ろ過補助剤ハイフロスーパーセルを厚さ約 2mm に敷いた吸引ろ過器(桐山漏斗)を用いてろ過した。ろ液を 45℃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 2.0mL 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

キノロン系抗菌剤 14 種(オールドキノロン剤 3 種, ニューキノロン剤 11 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)⁺で, 主なプロダクトイオンは, 前記したとおり, キノロン剤は構造中にカルボキシル基を有していることから, 脱炭酸イオン(-44)がいずれのキノロン剤でも観測された。表 2 にコーン電圧, プリカーサーイオン, 定量イオン, 確認イオン等の MS/MS 測定条件を示した。

分離カラムであるが、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β-ジケトン部位で金属イオンに配位することから、分離カラムやクリーンアップに用いるカートリッジ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。

移動相は、分離カラム中に微量に含まれる金属不純物や残存シラノール基の影響を抑制する目的で 0.01%ギ酸を用いた。溶出順位であるが、ニューキノロン剤は、塩基性を示すピペラジニル基と酸性を示すカルボキシル基を持つ親水性の強い両性化合物である。一方、オールドキノロン剤は、カルボキシル基のみを有する酸性物質である。従って、移動相に 0.01%ギ酸を用いた本条件（酸性条件）では、ニューキノロン剤が速く溶出し、オールドキノロン剤は遅く溶出する傾向であった。

2. 前処理法の検討

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β-ジケトン部位で金属イオンに配位することから、クリーンアップに用いるカートリッジ充填剤中の金属不純物の影響を強く受ける。そこで、分離カラムと同様に、金属不純物の含有量の少ないカートリッジを使用することが必要である。本前処理では、ポリマー系カートリッジ（ジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム、Oasis HLB）を採用した。

3. 添加回収実験

検量線は 0.01 から 1.0 μ g/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。市販の豚肉及び豚肝臓に 14

種のキノロン剤を 0.1 μ g/g の濃度に添加し、回収率を求めた。表 3 に示すとおり、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系抗菌剤 14 種（オールドキノロン剤 3 種、ニューキノロン剤 11 種）の定量限界は、いずれも 0.01 μ g/g まで十分検出が可能であった。キノロン系抗菌剤の畜産食品に対する残留基準はいずれも 0.01 μ g/g 以上であり、本法はキノロン系抗菌剤の残留分析法として日常検査に用いることが可能な方法であると思われる。

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キノロン系抗菌剤 14 種（オールドキノロン剤 3 種、ニューキノロン剤 11 種）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。

本法によるキノロン系抗菌剤 14 種の添加回収率は、0.1 μ g/g 添加でいずれも 80%以上、定量限界は、いずれも 0.01 μ 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

活性の高いキノロン剤 14 種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 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

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 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)
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2 MS/MS条件

No.	分子量	ESI+	Cone(V)	定量値	確認値	Collision(eV)	Collision(eV)	
1	Marbofloxacin (MBFX)	362.36	362.8	30	71.8	319.8	20	20
2	Norfloxacin (NRFX)	319.34	319.9	30	276	301.9	20	20
3	Vebufloxacin (VBFX)	359.40	359.9	30	316	259	20	30
4	Ofloxacin (OFLX)	361.38	361.8	30	317.7	260.8	20	30
5	Ciprofloxacin (CPFX)	331.35	332.0	30	287.9	313.9	20	20
6	Danofloxacin (DNFX)	357.38	357.8	30	339.9	313.8	20	20
7	Enrofloxacin (ERFX)	359.40	360.1	30	316	245	20	30
8	Sarafloxacin (SRFX)	385.37	385.8	35	341.7	367.6	20	20
9	Sparfloxacin (SPFX)	392.40	392.9	40	349	292	20	30
10	Orbifloxacin (OBFX)	395.38	395.8	30	351.9	377.8	20	20
11	Difloxacin (DFLX)	399.39	399.9	30	355.8	298.8	20	30
12	Nalidixic acid (NA)	232.23	232.9	20	186.9	214.9	20	30
13	Flumequine (FQ)	261.26	261.9	30	201.9	243.9	20	20
14	Oxolinic acid (OXA)	261.24	262.0	30	216	244	20	30

表3 添加回収実験

	添加濃度($\mu\text{g/g}$)	回収率(%)
Marbofloxacin (MBFX)	0.1	87.5 \pm 5.7
Norfloxacin (NRFX)	0.1	92.3 \pm 2.8
Vebufloxacin (VBFX)	0.1	89.7 \pm 3.3
Ofloxacin (OFLX)	0.1	90.3 \pm 4.8
Ciprofloxacin (CPFX)	0.1	88.5 \pm 3.6
Danofloxacin (DNFX)	0.1	91.7 \pm 7.2
Enrofloxacin (ERFX)	0.1	89.2 \pm 2.9
Sarafloxacin (SRFX)	0.1	82.3 \pm 5.7
Sparfloxacin (SPFX)	0.1	93.4 \pm 4.9
Orbifloxacin (OBFX)	0.1	92.1 \pm 4.5
Difloxacin (DFLX)	0.1	87.9 \pm 2.0
Nalidixic acid (NA)	0.1	88.8 \pm 3.2
Flumequine (FQ)	0.1	86.4 \pm 2.1
Oxolinic acid (OXA)	0.1	85.7 \pm 4.1

n=3

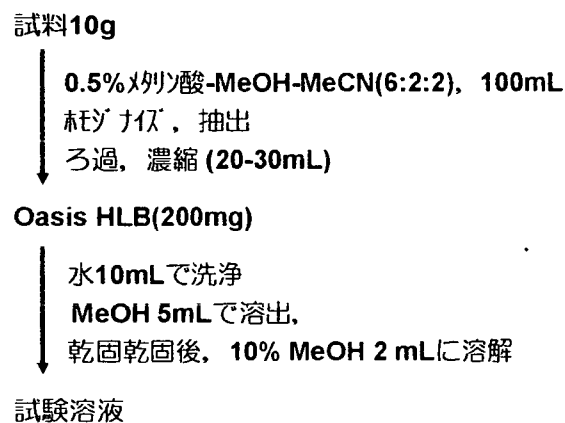


図1 試験溶液調製法の概要

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

「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 および 18 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 19 年度は、残留事例の多いテトラサイクリン(TC)系抗生物質の回収率を向上させ、微生物学的スクリーニングと同時に、機器分析を用いて定量および確認が可能な精度の高い試験法とすることを目的とし、平成 18 年度に報告した試験溶液の調製方法の再検討を行い改良した。また、今年度の改良法を用いて、検出薬剤数の拡大を目的に、ニューキノロン(NewQ)系合成抗菌剤をスクリーニングすることが可能か否かについて検討を行った。

今年度の改良法における添加回収率は、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 $\mu\text{g/g}$ であった。この値は残留基準値より低いかもしれないもしくは同等であることから、今年度の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、TC 系抗生物質および NewQ 系合成抗菌剤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、TC 系抗生物質および NewQ 系合成抗菌剤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 TC 系抗生物質 4 薬剤および NewQ 系合成抗菌剤 5 薬剤の同定・定量が可能であることを示した。