

## A.研究目的

ポジティブリスト制度施行により、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、検査の第一段階として微生物学的スクリーニングが有用であると考えられる。

そこで平成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、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の開発を進め、基本的骨格を構築した。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る(図1)。平成17および18年度の試験法におけるペニシリン系5薬剤、テトラサイクリン(TC)系4薬剤、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検出限界値は、残留基準値より低く(表1)、これら11薬剤の同時スクリーニングが可能であることを示した。しかし、TC系抗生物質4薬剤の回収率は30.5~67.8%(変動係数(CV)0.3~7.2%)であり、平成17および18年度の試験法で調製し

た試験溶液のHPLC測定において、定性のみ可能であった。

動物用医薬品の中でもTC系抗生物質は、広範囲の微生物に抗菌スペクトルを有すること、また安価であることなどから、国内外で動物用医薬品および飼料添加物として汎用されている。そのため、食品中の残留事例も多く、とくに近年、ドキシサイクリン(DOXY)の残留が多く報告されている。

そこで、平成19年度は、TC系抗生物質の回収率を向上させ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年度に報告したスクリーニング試験法の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、これも残留事例の多いニューキノロン系(NewQ)系合成抗菌剤5薬剤のスクリーニング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

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。

### B.2. 試薬および標準品

1)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(OTC)(和光純薬工業製)、テトラサイクリン(TC)(関東化学製)、クロルテトラサイクリン塩酸塩

(CTC)(和光純薬工業製)および DOXY(Riedel-deHaen 製)の 4 薬剤を使用した。NewQ 系合成抗菌剤として、エンロフロキサシン(ERFX)(関東化学製)、シプロフロキサシン(CPFX)(Riedel-deHaen 製)、ダノフロキサシン(DNFX)(関東化学製)、ジフロキサシン(DFLX)(Riedel-deHaen 製)およびマルボフロキサシン(MBFX)(Dr. Ehrenstofer GmbH 製)の 5 薬剤を使用した。

2) 標準溶液の作製: 各標準品を秤量し、力価 1000  $\mu\text{g/mL}$  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(マキルベン緩衝液)は、0.1 mol/L クエン酸溶液に 0.2 mol/L リン酸二ナトリウム溶液を混合し、pH 4.0 に調整し、0.01 mol/L になるように EDTA を加えた。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。メタノールおよびアセトニトリルは HPLC 用を、その他の試薬は特級を使用した。

4) 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。使用前には、メタノール 10 mL およびマキルベン緩衝液 10 mL を用いてコンディショニングを行った。

5) 溶出溶液(改良法): アセトニトリル、0.25 mol/L 塩化カリウム溶液およびトリエチルアミン(TEA)を

80:20:0.01 に混合した。この混液は用時調製した。

### B.3. 試験溶液の調製法

試料は細切均一化した後、その 5.0 g を秤量した。これに、マキルベン緩衝液を 100 mL 加え、ホモジナイズした。3,000 回転/分で 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 1~2 mL/min で負荷した。カラムを 0.1 mol/L リン酸一カリウム溶液 10 mL で洗浄し、3 分間アスピレーターで通気を行い乾燥させた。次いで、カラムをアセトニトリル 5 mL および 0.1 mol/L リン酸一カリウム溶液 10 mL で順次洗浄した後、再び 3 分間乾燥させた。溶出溶液(改良法)10 mL を用いて薬剤を溶出した。この溶出液を 40°C で減圧乾固した。残留物を pH 7.0 リン酸緩衝液 0.50 mL に溶解し、これを微生物学的スクリーニングおよび HPLC に供した(図 2)。

### B.4. 測定法

#### 1) 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。試験菌液、検査平板の作製、培養条件および判定は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」に準拠した。ただし、試験溶液 75  $\mu\text{L}$  をペーパーディスクに負荷した。

#### 2) HPLC 測定

装置: 島津 LC-10Avp

測定条件：表 2 に示した。

検量線の作成：0.05～2 µg/mL の TC 系抗生物質標準溶液および 0.025～4 µg/mL の NewQ 系合成抗菌剤標準溶液を用い、10 µL を HPLC に注入し、得られたピーク面積から検量線を作成した。

#### B.5. 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. 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以下の検討を行った。

##### C.1.1 溶出溶液の検討

マキルベン緩衝液 40 mL に、OTC、TC および CTC 10 µg/mL、DOXY 2.5 µg/mL の混合標準溶液 100 µL を添加し、MCX カラムに負荷後、以下の溶液で溶出し、HPLC 測定を行って求めた回収率を比較した。平成 18 年度に用いた溶出溶液(前法)である 28% アンモニア水 5% 含有アセトニトリル-0.1 mol/L リン酸一カリウム(9:1) 混液 5 mL では、TC、CTC および DOXY の 3 薬剤の回収率が 70% 以下と低かった。この溶出溶液(前法)を 2 倍の 10 mL にしても、CTC の回収率は 59% と改善が見られなかった。そこで、TC 系抗生物質 4 薬剤の同時分析に適した溶出溶液の組成について検討した。CTC はアルカリ溶液中で

エピマー化およびアイソマー化されやすいことが知られており、この溶出溶液(前法)に用いたアンモニア水の影響で一部変化したのではないかと推察された。そこで、この溶出溶液(前法)5 mL に CTC の標準溶液 10 µg/mL を 100 µL 加え、溶媒を留去した後、pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解し、CTC 量を測定した。その結果、CTC は 50% に減少することが判明し、これが低回収の原因と考えられた。アンモニア水を TEA に替え、溶出溶液としてアセトニトリル-水-TEA (80:20:0.01) 混液 10 mL で検討を行った。初めに、この溶出溶液に CTC の標準溶液 10 µg/mL を 100 µL 加え、溶媒を留去した後、pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mL に溶解したところ、CTC はほとんど減少しないことを確認した。しかし、OTC 以外の TC 系抗生物質 3 薬剤の MCX カラムからの回収率が 70% 以下であった。そこでさらに回収率を上げるため、溶出力の強いカリウムイオンを加えた。カリウムイオンとして、アセトニトリルとの混液で溶解する塩化カリウムを用いた。塩化カリウムの濃度は、アセトニトリル-塩化カリウム溶液-TEA (80:20:0.01) 混液を作製したとき二層に分離しない 0.25 mol/L とした。この溶出溶液中では、CTC はほとんど減少しないことを確認した上で、これを 10 mL を用いて MCX カラムから溶出したとき、TC 系抗生物質 4 薬剤の回収率はいずれも 89% 以上、CV は 5% 以内と良好な結果が得られ。そこで、今回の改良法では、

これを溶出溶液(改良法)とし、以下の検討を行った。

### C.1.2 抽出液量の検討

豚の筋肉 10.0 g もしくは 5.0 g に各々残留基準値相当量の OTC、TC および CTC 0.2 µg/g、DOXY 0.05 µg/g を添加し、マキルベン緩衝液を用いて抽出した後、改良法に従い精製した。試料 10.0 g およびマキルベン緩衝液 40 mL では、TC 系抗生物質 4 薬剤の回収率は 70%以下、CV は 5%以上であった。抽出液中のマトリックス濃度を下げ、MCX カラム上の精製効率を上げるため、試料の量を 5.0 g に減少し、マキルベン緩衝液の量を 100 mL に増加して検討した。TC 系抗生物質 4 薬剤の回収率はすべて 70%以上、CV も 5%以下と良好な結果が得られたので、試料量を 5.0 g および抽出液量を 100 mL とした。

### C.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 µg/g、DOXY 0.05 µg/g および NewQ 系合成抗菌剤 ERFX 0.05 µg/g、CPFEX 0.05 µg/g、DNFX 0.1 µg/g、DFLX 0.02 µg/g、MBFX 0.2 µg/g を添加し、添加回収実験を行った。薬剤の定量には HPLC を用いた。表 3 に示すように、回収率は 59.8~90.1% (CV 1.6~4.6%) と良好な結果が得られた。

### C.3. TC 系抗生物質および NewQ 系合成抗菌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 NewQ 系合成抗菌剤 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。各試験菌の感受性パターンを表 4 に示した。これらの結果から、改良法を用いて調製した試験溶液が *B. mycoides* プレートに最も強い感受性を示した場合、TC 系抗生物質の残留を推定できることが示唆された。また、*B. subtilis* BGA プレートに最も強い感受性を示した場合、NewQ 系合成抗菌剤の残留を推定できることが示唆された。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(表 5)。これは、残留基準値より低いか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。

### C.4. HPLC 測定による TC 系抗生物質および NewQ 系合成抗菌剤の同定・定量

HPLC のクロマトグラムを図 3 に示した。TC 系抗生物質 4 薬剤および NewQ 系合成抗菌剤 5 薬剤のピークと豚筋肉由来の夾雑ピークとの分離は良好であった。定量限界値 (S/N=10) は、0.001~0.05 µg/g であった(表 5)。これにより、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、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。

## D. 結論

今年度検討した試料溶液の調製方法は、抽出液中のマトリックスの濃度を下げ精製に用いるカラムへの保持率を上げたこと、またカラムからの溶出に用いる溶液中の薬剤の変化を抑制したこと、この2点の改良により、TC系抗生物質の回収率を向上させ、定量を可能とすることができた。また、この改良法を用いて、NewQ系合成抗菌剤5薬剤についても、ポジティブリスト制度施行後のスクリーニング検査として十分適用できることを示した。さらに、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、HPLC測定により薬剤の同定・定量が可能であることを示した。本試験法は、現行の個別試験法に比べ、簡便な前処理のため、実試料に応用する場合、検査の迅速化において、また結果の信頼を高める上で極めて有用であると思われる。

## **E. 研究成果**

### **E.1. 論文発表**

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)

## **F. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

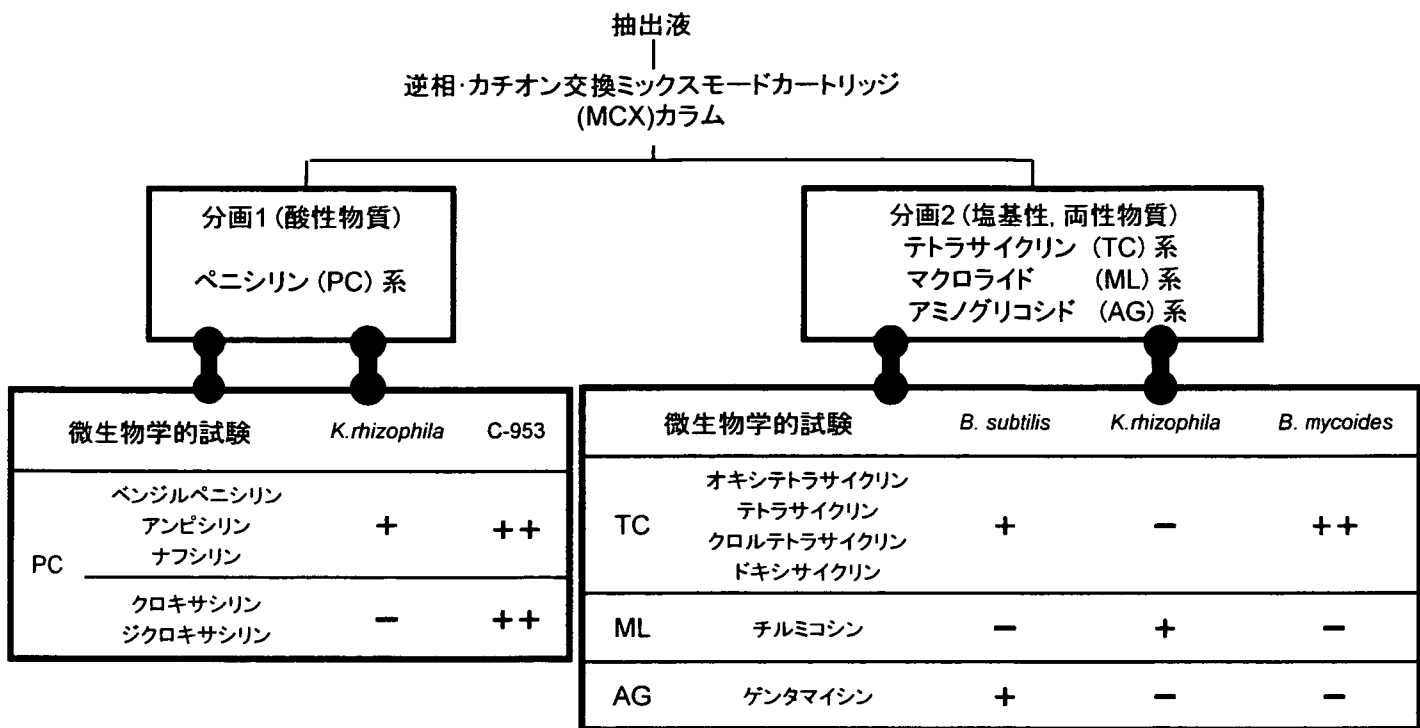


図1 食肉中残留抗生物質の微生物学的系統推定スクリーニング試験法(前法)

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. rhizophila* : *Kocuria rhizophila* C-953 : *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953

*B. subtilis* : *Bacillus subtilis* *B. mycooides* : *Bacillus cereus* var. *mycooides*

- : 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(前法)

動物用医薬品	検出限界値(μg/g, IU/g)		残留基準値 (μg/g) <sup>#</sup>	
	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 †
	テトラサイクリン	0.05		0.2 †
	クロルテトラサイクリン	0.01	0.01	0.2 †
	ドキシサイクリン	0.01	0.01	0.05
ML系	チルミコシン	0.025		0.1
AG系	ゲンタマイシン	0.1	1.0	0.1

# : 豚筋肉 † : 3剤の和として

試料 (豚筋肉) 5 g

0.01 mol/L EDTA-2Na含有マキルベン緩衝液 (pH 4.0) 100 mL  
ホモジナイズ  
遠心分離 (3000 rpm, 15 min)、綿栓ろ過

ろ液

Oasis MCX (150 mg LP / 6 cc)

洗浄 0.1 mol/L リン酸一カリウム溶液 10 mL、吸引乾燥  
アセトニトリル 5 mL

洗浄 0.1 mol/L リン酸一カリウム溶液 10 mL、吸引乾燥  
溶出  
アセトニトリル-0.25 mol/L 塩化カリウム溶液-TEA  
=80:20:0.01 10 mL

溶出液

| 減圧乾固

残さ

| pH 7.0 リン酸緩衝液 0.5 mLに溶解

試験溶液

図2 試験溶液の調製(改良法)

表2 HPLC測定条件

薬剤	TC系抗生物質	NewQ系合成抗菌剤
カラム	Sunfire (150×3.0 mm i.d., 3.5 mm p.d.)	Capcell Pak MGⅢ (150×4.6 mm i.d., 5 mm p.d.)
移動相	イミダゾール緩衝液 -メタノール (4:1)	0.2% ノナフルオロペンタン酸-アセトニトリル (3:1)
流速	0.2 mL/min	1 mL/min
カラム温度	40 °C	40 °C
注入量	10 μL	10 μL
蛍光検出 (励起波長/測定波長)	390 nm / 512 nm	285 nm / 445 nm

表3 豚筋肉に改良法を適用したときの各薬剤の添加回収実験

薬剤	残留基準値 ( $\mu\text{g/g}$ )	回収率(%)*	CV(%)
TC系 抗生物質	OTC	90.1	1.6
	TC	76.7	4.5
	CTC	86.1	4.6
	DOXY	87.9	2.2
NewQ系 合成抗菌剤	ERFX	87.8	3.4
	CPFX	59.8	2.7
	DNFX	73.4	4.4
	DFLX	75.4	2.8
	MBFX	84.6	1.6

n=5

\*HPLC測定



表4 各薬剤(残留基準値)を添加した豚筋肉に改良法を適用したときの微生物学的スクリーニングの各試験菌における感受性パターン

薬剤	試験菌			
	<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. rhizophila</i>	
TC系 抗生物質	OTC	++ <sup>*1</sup>	+ <sup>*2</sup>	- <sup>*3</sup>
	TC	++	+	-
	CTC	++	+	-
	DOXY	++	+	-
NewQ系 合成抗菌剤	ERFX	-	++	-
	CPFX	-	+	-
	DNFX	-	++	-
	DFLX	-	+	-
	MBFX	-	++	-

\*1 ++ : 阻止円の直径17 mm以上

\*2 + : 阻止円の直径12 mm以上17 mm未満

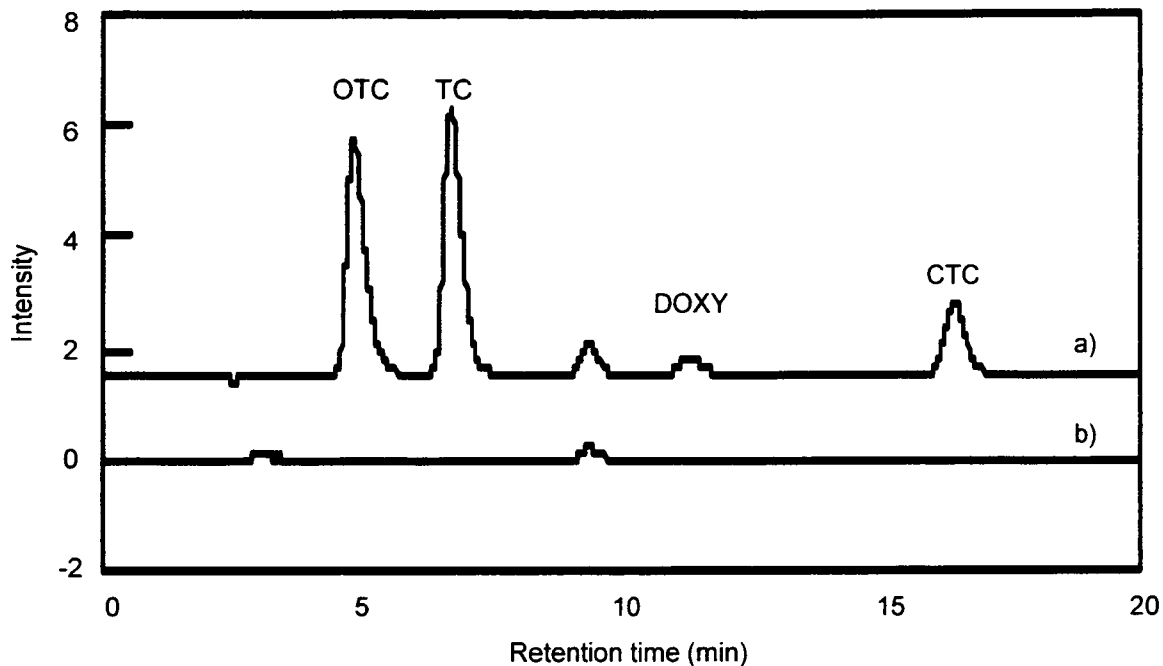
\*3 - : 阻止円の直径12 mm未満

表5 豚筋肉に改良法を適用したときの各薬剤の検出限界値および定量限界値

薬剤	微生物学的スクリーニング		HPLC測定 による定量限界値 μg/g	残留基準値 (μg/g)
	による検出限界値 μg/g			
TC系 抗生物質	OTC	0.03	0.003	0.2 †
	TC	0.02	0.003	0.2 †
	CTC	0.005	0.005	0.2 †
	DOXY	0.008	0.005	0.05
NewQ系 合成抗菌剤	ERFX	0.02	0.005	0.05
	CPFX	0.04	0.01	0.05
	DNFX	0.03	0.001	0.1
	DFLX	0.02	0.002	0.02
	MBFX	0.05	0.05	0.2

† : 3剤の和として

**A) TC系抗生物質(残留基準値相当)を添加した豚筋肉試料**



**B) NewQ系合成抗菌剤(残留基準値相当もしくは1/10相当)を添加した豚筋肉試料**

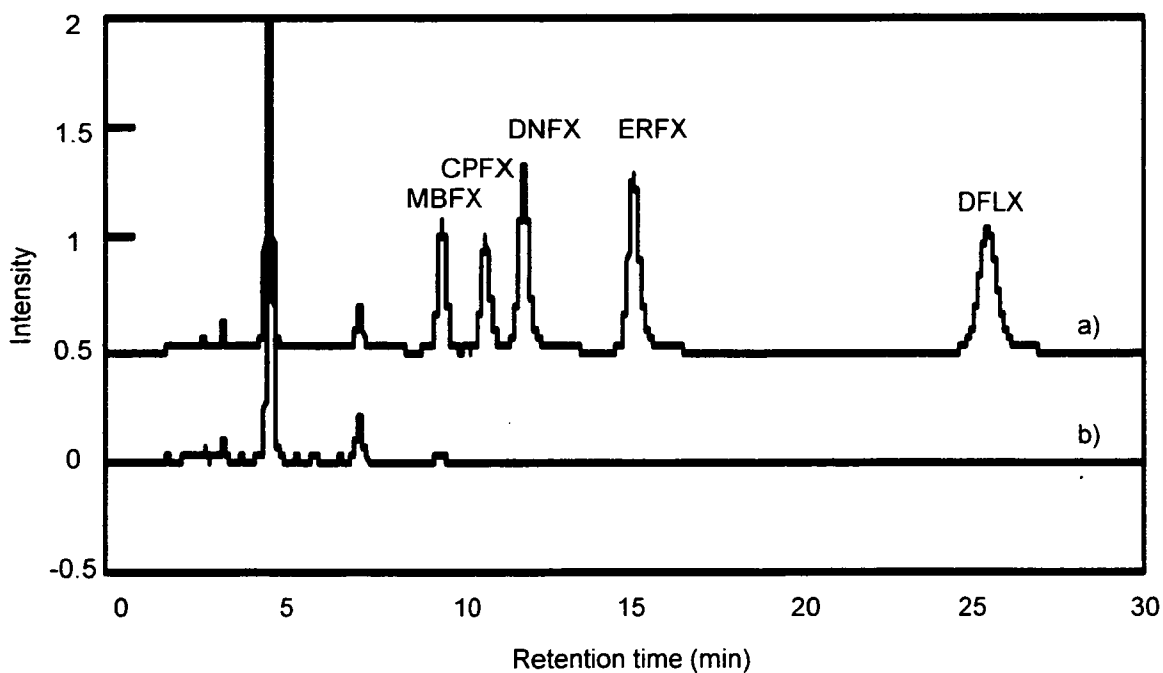


図3 各薬剤を豚筋肉に添加したときのHPLCクロマトグラム

- a) 各薬剤を添加した食肉
- b) 無添加の豚筋肉(ブランク)

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

「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、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下回る高感度な分析法を確立することができた。よって、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薬剤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。

**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 年度の本研究では、 $\beta$ -ラクタ

ム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質の系統分析法について検討を行った。また、平成 18 年度の本研究では、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ついて、微生物学的試験法における、試験菌株、培地及び希釈緩衝液の検討を行った。本年度は、昨年度に引き続き、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、豚筋肉及び肝臓を用いての残留基準値レベルの添加回収実験等、バイオアッセイによる系統別スクリーニング法の検討を行った。

**B. 研究方法**

## B.1 試料

豚の筋肉・肝臓(市販品)

## B.2 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) についても合せて測定対象物質とした。なお、昨年度の検討結果より、検出感度が良好でなかった酢酸イソ吉草酸タイロシン(AIV)、テルデカマイシン(TDM)及びセデカマイシン(SCM)は、対象薬剤から削除した。

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。

## B.3 ペーパーディスク法の測定条件

### B.3.1 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℃、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.3.2 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) 5 g、LAB-LEMCO POW-DER (OXOID 製) 3 g、PURIFIED AGAR (OXOID 製) 15 g] を pH 7.5 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

菌濃度：培地 1 mL 当たり  $10^4$  cfu

培養温度：36 °C

培養時間：16～17 時間

## B.4 前処理法

### B.4.1 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/LEDTA 含有 0.001 mol/L マキルベン緩衝液 (pH4.0) - メタノール (6:4) 45 mL を加えた後、ホモジナイザーにより均一化した。次に遠心分離 (3,500 rpm、4 °C、5 分) を行い、上澄み液を分取して、ガラス繊維ろ紙 (GFP 40 φ m/m) にハイフロスーパーセルを約 2 mm 積層した桐山ロートにより吸引ろ過した。ろ液を減圧下約 10 mL まで濃縮し、濃縮液を、あらかじめメタノール 5 mL 及び水 5

mLで活性化した Oasis HLB (60 mg) カートリッジに通した。カートリッジを水 5 mLで洗浄した後、メタノール 10 mLを加えて溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、0.5 %Tween80 含有 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH9.0) 1 mLを加えて残留物を溶解し、試料溶液とした。

#### B.4.2 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 30 mLを加えた後、ホモジナイザーにより均一化した。次に遠心分離 (3,500 rpm、4 °C、5 分) を行い、上澄み液をあらかじめメタノール 10 mL及び水 10 mLで活性化した Oasis MCX (150 mg) カートリッジに通した。カートリッジを水 10 mLで洗浄した後、25 %アンモニア - 水 - メタノール (1 : 6 : 3) 10 mLを加えて溶出した。溶出液を減圧下濃縮乾固した後、0.025 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH8.0) 1 mLを加えて残留物を溶解し、試料溶液とした。

#### B.5 倫理面への配慮

本研究では、ヒト及び動物由来の組織、臓器、細胞などを実験に使用していないため、倫理面への特別な配慮は行っていない。

### C. 研究結果

#### C.1 マクロライド系抗生物質

##### C.1.1 希釈緩衝液の検討

昨年度、培地の検討と同時に実施した希釈緩衝液について、SP を用いて追

試を行った。その結果、Table 1 に示したように、pH を 9.0 にし、さらに Tween80 を加えることにより、検出感度が向上した。よって、本結果から、希釈緩衝液は、0.5 %Tween80 含有 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH9.0) を使用することとした。

##### C.1.2 標準溶液による感受性確認

各薬剤の感受性の確認を行った。その結果、Table2 示したように、0.004~0.1  $\mu$ g/mL の濃度範囲で 12 mm 程度の阻止円形成を確認することができた。

##### C.1.3 抽出溶媒の検討

Oasis HLB (60 mg) を用いて、2 種類の抽出溶媒について検討を行った。なお、試料は豚肝臓を、薬剤は EM を用いて添加濃度は 0.05 ppm とした。

その結果、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)が良好であった。

##### C.1.4 基準値濃度での添加回収試験

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。なお、検出限界は、12 mm の阻止円を形成する濃度とした。

その結果、基準値濃度の添加回収試験では、LCM の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 (Table 3)。

## C.2 アミノグリコシド系抗生物質

### C.2.1 希釈緩衝液の検討

昨年度の検討の結果、希釈した 0.1 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH8.0) を用いて GM、NM、KM、SM 及び DSM の感受性の確認を行ったところ、GM 及び NM は緩衝液の塩濃度が高くなるほど高感度に、逆に KM、SM 及び DSM は塩濃度が低いほど高感度になることが判明した。そこで、タイプの違う 2 薬剤 (KM 及び NM) を用いて緩衝液の塩濃度についてさらに検討を行った。その結果を Table 4 に示した。残留基準値は NM より KM の方が低いため、KM が検出しやすい条件を優先し、0.025 mol/L リン酸塩緩衝液 (pH8.0) を使用することとした。

### C.2.2 平板用培地の pH の検討

昨年度の検討結果より、培地は精製度の高い PURIFIED AGAR を寒天として使用することにより、高感度にアミノグリコシド系抗生物質を検出することが可能であることが判明した。そこで、さらに KM 及び NM を用いてその pH について検討を行った。その結果、pH が 7.5 の場合、KM 濃度が 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で 12 mm を超える阻止円が形成され、NM は全ての培地で 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  より高濃度で阻止円が形成された。よって、培地 pH は pH は 7.5 に調整することとした (Table 5)。

### C.2.3 標準溶液による感受性確認

各薬剤の感受性の確認を行った。その結果、Table 6 に示したように、DM を除く薬剤について、0.05~0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$

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。

### C.2.4 固相抽出の検討

弱カチオンイオン交換カートリッジである Oasis WCX (Waters 製)、Strata-X-CW (phenomenex 製) 及び Baker Bond CBX (Baker 製) を用いて豚肝臓について検討したが、Oasis WCX 及び Baker Bond CBX では無添加区において阻止円が形成され、NM 及び SM を用いた添加回収試験においては、Strata-X-CW による精製では SM の回収が得られなかった。

そこで、SM 及び DSM の回収が期待できないが、その他の薬剤については高回収率が見込め、精製効果の高いポリマー系強カチオンイオン交換カートリッジである Oasis MCX (Waters 製) を用いて検討を行った。標準溶液による溶出条件を NM を用いて、25 %アンモニア水、水及びメタノールの比率を変えて確認した。その結果、Table 7 に示したように、全ての条件で 70 %以上の回収が得られた。この結果からメタノール含量を高くすることで他成分が溶出することを抑えるため、溶出液を 25 %アンモニア水 - 水 - メタノール (1:6:3) とした。

### C.2.5 基準値濃度での添加回収試験

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。なお、検出限界は、12 mm の阻止円を形成する濃度とした。

その結果、DSM、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 (Table 8)。

## 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により、感度が上昇した。pH 9.0 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、0.004 ~ 0.1  $\mu\text{g/mL}$  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。

さらに豚の筋肉・肝臓を用いて添加回収試験を行い、その検出限界を確認した。その結果、リンコマイシンについて回収率が不十分で、基準値レベルの検出が困難であったが、他の 11 種の薬剤については基準値よりも低い濃度での検出が可能であった。

よって、本法は、高感度に、また広範囲にマクロライド系抗生物質をスクリーニングすることが可能な系統分析法として有用であると考えられた。

### 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。希釈緩衝液については、塩濃度が高い場合に高感度となる物質と低い場合に高感度になる物質に 2 分されることが判明したが、残留基準値が低いカ



ナマイシンを優先して低濃度の希釈緩衝液を採用することとした。

前処理において使用する固相抽出カートリッジについては、弱カチオンイオンカートリッジと強カチオンイオンカートリッジについて検討した結果、強カチオンカートリッジである Oasis MCX (150 mg) を使用することとした。

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、デストマイシン A を除く 5 薬剤について 0.05 ~ 0.4  $\mu\text{g/mL}$  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。

さらに豚の筋肉・肝臓を用いて添加回収試験を行い、その検出限界を確認した。その結果、Oasis MCX からの溶出が不十分であるストレプトマイシンとジヒドロストレプトマイシンについては、基準値レベルの検出が困難であったが、他の 5 種の薬剤については基準値よりも低い濃度での検出が可能であった。

よって、本法は、ストレプトマイシンとジヒドロストレプトマイシンについては適用できないが、他のアミノグリコシド系抗生物質を高感度に、また広範囲にスクリーニングすることが可能な系統分析法として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、一部の抗生物質については残留基準値を下回る検出限界を得られなかったものの、11 種の抗生物質については、残留基準値を下回る検出限界が得ることができた。アミノグリコシド系抗生物質については、ストレプトマイシンとジヒドロストレプトマイシンの検出が困難であったが他の 5 種の抗生物質について残留基準値を下回る検出限界を得ることができた。

## **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 of buffer solutions using spiramycin (1 µg/mL)

Buffer solution	Diameter of inhibition zone (mm)*
0.1 M Phosphate buffer (pH9.0) (adjusted in the acidity side)	17.1
0.1 M Phosphate buffer (pH9.0) (adjusted in the basic side)	16.5
0.1 M Phosphate buffer (pH9.0) including 0.5 %Tween80 (adjusted in the acidity side)	19.2
0.2 M Phosphate buffer (pH9.0) including 0.5 %Tween80 (adjusted in the basic side)	18.8

\* N=4

Table 2 Sensitivity of macrolide antibiotics in standard solution

Antibiotics	Linearity range (µg/mL)	R	Slope
Erythromycin (EM)	0.004~0.064	0.99920	11.0534
Oleandomycin (OM)	0.02~0.32	0.99951	11.8880
Kitasamycin (KT)	0.08~1.28	0.99968	10.0272
Josamycin (JM)	0.1~1.6	0.99955	10.3204
Spiramycin (SP)	0.02~0.32	0.99757	10.4784
Tylosin (TS)	0.1~1.6	0.99903	10.1044
Tiamulin (TM)	0.05~0.8	0.99991	11.9290
Tilmicosin (TL)	0.002~0.032	0.99694	8.8861
Neospiramycin (NSP)	0.02~0.32	0.99959	10.5861
Mirosamycin (MM)	0.005~0.08	0.99920	10.7813
Lincomycin (LCM)	0.08~1.28	0.99569	13.2652
Pirlimycin (PR)	0.01~0.16	0.99649	13.9379

Table 3 Recoveries and detection limits of macrolide antibiotics in meat

Antibiotics	Spiked (ppm)	Sample	Recovery* <sup>1</sup> (%)	DL* <sup>2</sup> (ppm)	MRL (ppm)
EM	0.05	Swine muscle	65.5	0.002	0.05
		Swine liver	70.3	0.002	0.05
OM	0.1	Swine muscle	56.3	0.01	0.1
		Swine liver	54.0	0.01	0.1
KT	0.2	Swine muscle	71.5	0.05	0.2
		Swine liver	56.0	0.05	0.2
JM	0.04	Swine muscle	49.5	0.04	0.04
		Swine liver	48.9	0.04	0.04
SP	0.2	Swine muscle	66.7	0.01	0.2
	0.6	Swine liver	17.3	0.03	0.6
TS	0.05	Swine muscle	76.0	0.03	0.05
		Swine liver	38.6	0.05	0.05
TM	0.04	Swine muscle	105.3	0.01	0.04
		Swine liver	105.9	0.01	0.04
TL	0.1	Swine muscle	62.3	0.001	0.1
	1.5	Swine liver	59.2	0.001	1.5
NSP	0.2	Swine muscle	50.5	0.01	0.2
	0.6	Swine liver	20.8	0.03	0.6
MM	0.05	Swine muscle	70.3	0.002	0.05
		Swine liver	58.3	0.002	0.05
LCM	0.2	Swine muscle	ND* <sup>3</sup>	NT* <sup>4</sup>	0.2
	0.5	Swine liver	3.0	0.2	0.5
PR	0.1	Swine muscle	60.0	0.005	0.1
	1.0	Swine liver	45.0	0.005	1.0

\*1 N = 3

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

\*3 Inhibition zone were not confirmed

\*4 Not tested

Table 4 Comparison of concentration of phosphate buffer (PB) solutions using kanamycin (KM) and neomycin (NM)

Concentration of PB (mol/L)	Antibiotics	Concentration of antibiotics ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0.05	0.1	0.2	0.4	0.8
0.1	KM	ND	ND	14.8	20.6	25.8
	NM	ND	ND	ND	16.2	22.2
0.05	KM	ND	ND	18.0	22.1	26.0
	NM	ND	ND	ND	16.7	18.9
0.03	KM	ND	ND	18.1	23.2	26.0
	NM	ND	ND	ND	14.2	17.5
0.025	KM	ND	11.2	16.6	21.3	25.5
	NM	ND	ND	ND	13.3	16.2
0.02	KM	ND	11.5	16.1	21.3	25.4
	NM	ND	ND	ND	11.6	17.0

Diameter of inhibition zone : mm

ND: Inhibition zone were not confirmed

Table 5 Comparison of pH of media using kanamycin (KM) and neomycin (NM)

pH of medium	Antibiotics	Concentration of antibiotics ( $\mu\text{g/mL}$ )				
		0.1	0.2	0.4	0.8	1.6
7.5	KM	13.7	18.6	23.0	26.4	28.9
	NM	ND	ND	13.9	16.6	19.0
8.0	KM	11.2	16.6	21.3	25.5	28.5
	NM	ND	ND	14.5	18.2	20.8
8.5	KM	ND	11.8	16.0	20.3	23.9
	NM	ND	ND	14.4	19.7	24.2

Diameter of inhibition zone : mm

ND: Inhibition zone were not confirmed