

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
(H17-食品-一般-013)

平成 17 ～ 19 年度 総合研究報告書

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

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. 総合研究報告書	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表 28
III. 研究成果の刊行物・別刷 29

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

動物用医薬品として用いられている抗生物質や合成抗菌剤は、畜水産動物の疾病予防及び治療に大きく貢献しており、今日の畜水産業においては欠くことのできないものである。しかし、一方ではこれら薬物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、迅速で精度の高い残留動物用医薬品の分析法が必要とされている。

ポジティブリスト制度の導入により、動物用医薬品等の残留基準値が数多く設定され、高速液体クロマトグラフ(HPLC)等を用いた機器分析法が汎用されている。一方、「食品は抗菌性物質を含有してはならない」とする従来の規制も残されており、微生物学的試験法による検査も極めて有用である（ポジティブリスト制度が施行され、200品目以上の動物用医薬品に暫定基準が設定されたが、その過半が抗生物質（約70種）及び合成抗菌剤（約50種）である）。しかし、現在用いられている公定法は、約20年前に作成されたものであり、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、迅速且つ検出感度に優れた簡易試験法、及び残留抗菌性物質を推定する信頼性の高い系統的試験法、更に微生物学的試験法で陽性が示唆された場合、残留する抗菌性物質を特定する機器分析法等を開発するものである。具体的には、次の3つの研究を推し進めることとした。

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

現在用いられている試験菌に比べ、汎用性、検出感度に優れた試験菌の採用、並びに検出感度に優れた簡易検査法、更に簡易な前処理を加えた高感度検査法の検討を行った。試験菌には、公定試験菌の代替菌として市販芽胞菌液の検討を行った結果、市販芽胞菌の感受性は公定試験菌とほぼ同等であった。市販芽胞菌液は、継代保存等の操作が必要なく、検査用平板の作製も容易であることから、公定試験菌の代替菌として有用である。畜水産物中に含まれる抗菌性物質の簡易検査法として、試料5gをメタノール5mLで抽出する方法を構築し、5機関による共同試験を実施し、良好な結果を得た。さらに、高感度検査法として、固相抽出法を用いた簡易な前処理を加えることにより、畜水産物中に含まれる抗菌性物質を精製濃縮し、感度よく多くの抗菌性物質を検出する試験法を構築した。

2. 信頼性の高い微生物学的試験法の構築

抗菌性物質として汎用されている抗生物質及び合成抗菌剤の系統的推定試験法を開発した。

2.1 系統推定試験法によるペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤の分析の検討

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試みた。分析対象薬物として、残留事例の多いペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤を選択した。本法によるテトラサイクリン系抗生物質の回収率は、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。ニューキノロン剤の残留基準値相当添加回収率は、59.8~90.1%、検出限界値は 0.005~0.05 $\mu\text{g/g}$ であった。また、微生物学的スクリーニングにおいて、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残留が推定された場合、検出された薬物を確認する HPLC を用いた機器分析法も構築した。

2.2 バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系、テトラサイクリン系、マクロライド系およ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

β -ラクタム系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質について、18年度からはマクロライド系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開発に着手した。本研究で検討した16種の β -ラクタム系抗生物質、4種のテトラサイクリン系抗生物質については、残留基準値レベルでの検出が可能であった。構築した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では、マクロライド系抗生物質の11種類の薬剤について、0.001~0.05 $\mu\text{g/g}$ で、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。一方、アミノグリコシド系抗生物質については、5種類の薬剤について 0.02~0.06 $\mu\text{g/g}$ で、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が、ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシンについては検出感度上、さらなる検討が必要であった。

3. 残留抗菌性物質を特定する機器分析法等の構築

3.1 LC/MS/MSを用いた機器分析法の検討

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。しかし、微生物学的試験法の結果を機器分析に繋げて行くことが現在、最も困難な課題の一つである。そこで、分離分析法として有用性の高い高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析系(LC/MS/MS)等を用いた方法により抗菌性物質を特定する分析法の開発を検討した。分析対象薬物として、抗菌活性が高く且つ動物用医薬品として汎用されている β -ラクタム系抗生物質(ペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質)及びキノロン系抗菌剤を選択した。

3.2 アフィニティーカラムを用いた前処理及びHPLC/FLによる残留抗菌剤の分析

ニューキノロン系抗菌剤、アミノグリコシド系抗生物質は、畜水産動物の感染症治療薬として汎用されている。そこで、特異性の高い抗原抗体反応を利用した、極めて優れた精製能力を有するアフィニティーカラムを用いたクリーンアップ法を検討し、いずれも良好な結果を得た。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による前処理法を検討した結果、精製能に優れた良好な結果が得られた。

分担研究者

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

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
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
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
斉藤 貢一	星薬科大学
伊藤 里恵	星薬科大学
岩崎 雄介	星薬科大学
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

A. 研究目的

動物用医薬品として用いられている抗生物質や合成抗菌剤は、畜水産動物の疾病予防及び治療等に大きく貢献しており、今日の畜水産業においては欠くことのできないものである。しかし、一方ではこれら薬物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、迅速で精度の高い残留動物用医薬品の分析法が必要とされている。

ポジティブリスト制度の導入により、動物用医薬品等の残留基準値が数多く設定され、高速液体クロマトグラフ(HPLC)等を用いた機器分析法が汎用されている。一方、「食品は抗菌性物質を含有してはならない」とする従来の規制も残されており、微生物学的試験法による検査も極めて有用である(ポジティブリスト制度が

施行され、200品目以上の動物用医薬品に暫定基準が設定されたが、その過半が抗生物質(約70種)及び合成抗菌剤(約50種)である。しかし、現在用いられている公定法は、約20年前に作成されたものであり、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、迅速且つ検出感度に優れた簡易試験法、及び残留抗菌性物質を推定する信頼性の高い系統的試験法、更に微生物学的試験法で陽性が示唆された場合、残留する抗菌性物質を特定する機器分析法等を開発するものである。

B. 研究方法

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

1) 試料及び試薬

試料は、埼玉県、神奈川県、東京都および大阪府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、鶏肝臓、鶏卵、ハチミツおよびハマチを用いた。

供試抗菌性物質:β-ラクタム系抗生物質18種、マクロライド系抗生物質12種、アミノグリコシド系抗生物質10種、テトラサイクリン系抗生物質4種、サルファ剤23種、キノロン剤17種等合計122種類(表1-2)の抗菌性物質を用いた。

それぞれの標準品約10mgを正確に量り、精製水又はメタノール50mLに溶解して、標準原液を調製し、適宜、10%メタノールで希釈して標準溶液とした。

・簡易検査法および高感度検査法には、ペニシリン系抗生物質(アンピシリン(ABPC)、ベンジルペニシリン(PCG))、セファロ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。

供試試験菌:試験菌として *Bacillus subtilis* BGA (*B.s* BGA:市販芽胞菌液 Merck 社製)、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M.l* ATCC 9341) 及び *Geobacillus stearothermophilus* (*G. stearothermophilus*:市販芽胞菌液 Merck 社製)を用いた。

2) 試験菌液及び検査用培地の作製

B.s BGA 及び *G. stearothermophilus* 芽胞菌液は市販品を、*M.l* ATCC 9341 試験菌液は、公定法である簡易検査法に準拠して調製した。

検査用平板は、Difco 社製の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)及び Merck 社製の残留薬剤テスト用寒天培地 (Test Agar for Residue Test)を使用した。これらの培地を 121°C、15 分間高圧滅菌後、55°C±1 に保持し、各試験菌液を加え、十分に混合した後、その 8mL をペトリ皿に注入し、検査用平板培地を作製した。

3) 微生物学的試験法

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検査用平板培地上に置いた。それらの平板培地は、約 5°C で 30 分間放置した後、*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は 30°C で 18 時間、*G.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) 検出下限値および検量線の作成

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。

各標準品の濃度が 0.01~10ppm である標準溶液を調製し、微生物学的試験法に供した。出現した阻止円の直径から検量線を作成し、検出下限値あるいは回収率を求めた。

5) 簡易検査法試験溶液の調製

試料 5g 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。

6) 高感度検査法試験溶液の調製

試料 10g を採り、除タンパク・抽出用溶液 (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、Oasis HLB カートリッジでクリーンアップを行った。

2. 信頼性の高い微生物学的試験法の構築

2.1 系統推定試験法によるペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤の分析の検討

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[®] MCX カートリッジ(6mL, 150 mg, Waters 社製)を使用した。

2) 試験菌液及び検査用培地の作製

供試菌株: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. s*)、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*K. r*)、*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 (*B. m*)および *Geobacillus stearothermophilus* (*G. s*)の 4 菌株を使用した。検査用平板の作製法は「簡易検査法(改訂)」に準拠した。*G. s* (Merk 製)は、菌濃度 10⁵ cfu/mL となるように PM Indicator Agar(フルカ製)と混合し、8 mL をペトリ皿に注入して平板を作製した。

3) 試験溶液の調製法

試料 5.0 g にマキルベン緩衝液を 100 mL 加え、ホモジナイズし、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 Oasis[®] MCX カートリッジに負荷し、試験溶液を調製した。

4) 微生物学的検査法

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

5) 理化学的測定法

微生物学的検査法に用いた試験溶液を HPLC に供し、TC 系抗菌物質およびキノロン剤を検出定量した。分離カラムには ODS 系を用いた。移動相は、テトラサイクリン系抗菌物質分析用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物質は 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。

2.2 バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系、テトラサイクリン系、マクロライド系及びアミノグリコシド系抗菌物質のスクリーニング法の検討

1) 試料及び試薬

大阪府内で市販されていた牛、豚の筋肉および肝臓を用いた。

測定対象物質： β -ラクタム系抗菌物質としてアスポキシシリン(ASPC)、アモキシシリン(AMO)、アンピシリン(AMP)、オキサシリン(OX)、クロキサシリン(CX)、ジクロキサシリン(DCX)、セファゾリン(CEZ)、セファピリン(CEPR)、セファレキシン(CEX)、セファロニウム(CEN)、セフォペラゾン(CPZ)、セフキノム(CEQ)、セフロキシム(CXM)、ナフシリン(NF)、フェノキシメチルペニシリン(PCV)、ベンジルペニシリン(PCG)の 16 種類を、テト

ラサイクリン系抗菌物質として、オキシテトラサイクリン(OTC)、クロルテトラサイクリン(CTC)、テトラサイクリン(TC)、ドキシサイクリン(DC)を測定対象物質とした。マクロライド系抗菌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、マクロライド系抗菌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菌物質としては、アラマイシン(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) 微生物学的試験法

・ β -ラクタム系抗菌物質

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

培地：Heart Infusion Agar (HIA) (Becton Dickinson 社製)

・テトラサイクリン系抗菌物質

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

培地：Antibiotic Medium 8 (AM8) (Becton Dickinson 社製)

・マクロライド系抗菌物質

試験菌株：*Kocuria rhizophila* ATCC 9341

培地：増菌用；Heart Infusion Agar (HIA)

・アミノグリコシド系抗菌物質

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

培地：合成 LAB-LEMCO AGAR

いずれも培養温度は 36 $^{\circ}$ C、培養時間は 16~17

時間とした。

3) 前処理法

・β-ラクタム系抗生物質

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、水 30 mL を加えてホモジナイザーし、Oasis HLB(200 mg)カートリッジによりクリーンアップを行った。

・テトラサイクリン系抗生物質

細切した食肉約 10 g を正確に量り取り、0.001 mol/L EDTA2Na 含有 pH4.0 マッキルベイン緩衝液でホモジナイズ抽出し、GL-Pak PLS-2 カートリッジによりクリーンアップを行った。

・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。

3. 残留抗菌性物質を特定する機器分析法等の構築

3.1 LC/MS/MS による抗菌性物質の分析

1) 試料及び試薬

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

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

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。

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)。

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。

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

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

4) 試験溶液の調製

試料 10g を採り、除タンパク・抽出用溶液 100mL を加えてホモジナイズした後、ろ過した。ろ液を約 30mL に減圧濃縮した後、Oasis HLB カートリッジでクリーンアップを行った。

3.2 アフィニティークラムを用いた前処理及び HPLC/FL による残留抗菌剤の分析

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、キノロン系抗菌剤 8 種、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) 及びクロラムフェニコールを用いた。

ELISA キット:市販キット (フロンティア研究所社製 New Quinolone Kit) を用いた。

2) 機器分析の測定条件

・キノロン系抗菌剤

移動相には 30 mM リン酸緩衝液(pH = 3.0): アセトニトリル = 90 : 10 (v:v)、分析カラムには Waters 社製 XBridge C18 (2.1 × 150 mm)を用いた。蛍光検出器の測定波長を励起波長 280 nm、蛍光波長を 448 nm として測定した。

・アミノグリコシド系抗生物質

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

・クロラムフェニコール

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方法

・キノロン系抗菌剤

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

・アミノグリコシド系抗生物質

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

4) 前処理方法

・キノロン系抗菌剤

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、アセトニトリル 15 mL 加え、ホモジナイズにより均質化した。その後、遠心分離操作 (3000 rpm、10 min) により得られた上清を回収した。アセトニトリル相を、

40°C、減圧下で濃縮乾固させ、得られた残渣に PBS を加えて再溶解させた。その後、アフィニティーカラムによる精製を行い HPLC/FL の測定試料とした。

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

・クロラムフェニコール

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

1.1 簡易検査法の構築

1) 公定法試験菌及び市販芽胞菌の感受性比較

B.s ATCC 6633 は、抗菌性物質の残留試験法に最も汎用されている試験菌であり、日本でも汎用されている。一方、*B.s* BGA は EU で汎用されている試験菌であり、調製された芽胞菌液が市販されている。そこで、代表的な抗生物質、合成抗菌剤 12 種に対する *B.s* ATCC 6633 および *B.s* BGA の感受性の比較を行ったところ、ほぼ同等の感受性を示した。

次に、*calidolactis* C-953 であるが、β-ラクタム系抗生物質を感度良く検出できることから国際酪農連盟 (IDF) スタンダードとして用いられてきた。そこで、*calidolactis* C-953 および芽胞菌液として市販されている *G.*

stearothermophilus の各抗菌性物質に対する感受性の比較を行ったところ、これら2種の菌は、今回検討したβ-ラクタム系抗生物質に対し、ほぼ同等の感受性を示した。

今回、公定法試験菌の代替菌として、市販されている芽胞菌液の適用性の検討を行った結果、市販芽胞菌の感受性は公定法試験菌とほぼ同等であり、代替菌として用いることが可能であった。

2) テトラサイクリン系抗生物質の検出

「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」では、試験菌として *B.s* ATCC 6633、*M.l* ATCC 9341 および *B.m* ATCC 11778 の3試験菌を採用している。3試験菌の中で、特に *B.m* ATCC 11778 は TCs を感度良く検出する目的で採用されている。しかし、試験菌 *B.m* ATCC 11778 は、試験菌液の調製が煩雑な面がある。そこで、試験菌 *B.m* ATCC 11778 の代わりに *B.s* BGA を使用することが可能か検討した。TCs は、弱酸性領域で安定であることから、抽出溶液および培地の pH とも弱酸性領域(pH4.5 および 6.5)が用いられている。そこで、*B.s* BGA を試験菌に用い、培地の pH を弱酸性(pH 5.9)に調整済みの AM 8 を採用したところ、*B.m* ATCC 11778 に比べ、幾分劣るものの TCs を感度良く検出することが可能であった。

以上の結果から、*B.s* ATCC 6633 および *B.m* ATCC 11778 の代わりに市販されている芽胞菌液 *B.s* BGA を、*calidolactis* C-953 の代わりに *G. stearothermophilus* を用いることにより、より簡易な微生物学的試験法を構築することができた。

3) 抗菌性物質の試験菌に対する抗菌活性

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

β-ラクタム系、ポリペプチド系およびポリエーテル系抗生物質等は、*G. stearothermophilus* に強い抗菌活性を示した。マクロライド系抗生物質は、*M.l* ATCC 9341 に強い抗菌活性を示した。アミノグリコシド系抗生物質およびキノロン剤は、*B.s* BGA に対して強い抗菌活性を示した。なお、テトラサイクリン系抗生物質は、培地の pH が低い *B.s* BGA (AM8) に、アミノグリコシド系抗生物質およびキノロン剤は、pH が高い *B.s* BGA (AM5) により強い抗菌活性を示した。したがって、3試験菌、4種類の培地に対する感受性のパターンから、残留する抗菌性物質を系統別に推定することが可能であると考える。

一方、サルファ剤は、いずれの菌に対しても、ほとんど抗菌活性を示さなかった(Table 3、4)。なお、微生物学的試験法で感度良くサルファ剤を検出するには、トリメトプリム添加培地の使用が知られている。

4) 簡易検査法の検討

現在用いられている微生物学的簡易検査法は、試料 5g をクエン酸・アセトン緩衝液 20 mL 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、固相抽出法等の前処理を用いずに、試料中の抗菌性物質の希釈倍率を極力少なくする方法を検討した。抽出溶媒として先ず、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%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感度は、ペニシリン

系、セフェム系抗生物質が 0.005~0.1ppm、マクロライド系、テトラサイクリン系抗生物質、ニューキノロン剤が 0.05~0.5ppm であった。一方、アミノグリコシド系抗生物質（ストレプトマイシン、ゲンタマイシン）はメタノール抽出では抽出効率が十分でなく、検出感度は 5ppm 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。総合的に考慮すると 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された。

5) 簡易検査法の妥当性評価

5 機関による豚筋肉部、牛筋肉部、鶏筋肉部、豚肝臓、牛肝臓、鶏肝臓、鶏卵、ハチミツおよびハ

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。ABPC、PCG は、試験菌 *M.l* ATCC 9341 で 0.05 μ g/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、0.05-0.5 μ g/g であった。EM、SPM とも *M.l* ATCC 9341 で 0.1-0.5 及び 0.5-2.5 μ g/g、OTC、CTC は *B.s* BGA (培地 AM8) で 0.5-1.0 及び 0.1 μ g/g であり、残留基準値レベルでの検出は CTC は可能であったが、SPM、OTC 等は不十分であった。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 0.25 μ g/g、SRFX が 0.5-1.0 μ g/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 5-10 μ g/g であり、残留レベルでの検出は困難であった。

1.2 高感度検査法の検討

1) 試験溶液調製法

畜水産食品中の残留抗菌剤の前処理法として種々の方法が用いられている。著者らはこれまでにメタリン酸-メタノール系あるいはメタリン酸-アセトニトリル系溶液で除タンパクと同時に抽出し、多くの薬物が保持される逆相系カートリッジによる前処理法を採用してきた。マクロライド系やテトラサイクリン系抗生物質はメタリン酸-メタノール系が、一方キノロン剤は、メタリン酸-アセトニトリル系を用いることにより高回収率を得た。なお、除タンパク・抽出溶媒中のメタリン酸濃度であるが、メタリン酸の濃度が高くなるに従い、除タンパク効果は優れるが、回収率が低下する薬物も見られた。そこで、除タンパク・抽出溶媒には試料抽出液の pH が 4.5~5 程度となる 0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)を採用することにした。

次に、カートリッジであるが、テトラサイクリン系抗生物質やキノロン剤はシリカベースの ODS 系カートリッジでは、充填剤中の残存シラノール基や金属不純物の影響を強く受け、

不可逆的に一部が吸着される。そこで、カートリッジには汎用性に優れたポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いることにした。なお、本前処理法ではアミノグリコシド系抗生物質は、そのほとんどがカートリッジに保持させず流出した。アミノグリコシド系抗生物質は、アミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であるため、逆相系のカートリッジに保持されない。そこで、カートリッジ流出液にイオンペア剤を加え、アミノグリコシド系抗生物質を保持させる手法を採用した。

2) 添加回収実験

豚の筋肉にベンジルペニシリン、スピラマイシン、オキシテトラサイクリン、エンロフロキサシン及びストレプトマイシンを選び、添加回収実験を行った。本法による添加回収率(0.1ppm 添加時)は、概ね 70%以上であり、残留分析法としてほぼ満足すべき結果であると思われる。

3) 検出感度

本法により、代表的な抗菌性物質の検出限界を調べた。今回検討した 12 種類の豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度は、0.001~0.05ppm レベルであった。また、今回用いた、3 種類の試験菌(4 種類の検査用培地)に対する感受性パターンを観察することにより、残留抗菌性物質の系統を推定することも可能であった。

2. 信頼性の高い微生物学的試験法の構築

2.1 系統推定試験法によるペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤の分析の検討

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

2.2 バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系、テトラサイクリン系、マクロライド系及びアミノグリコシド系抗生物質のスクリーニング法の検討

1) テトラサイクリン系抗生物質

テトラサイクリン系抗生物質の公定法では *Bacillus cereus* ATCC 11778 の芽胞溶液が用いられている。本菌株は芽胞溶液が市販されていないため、煩雑な菌株の管理が必要となる。一方、*Bacillus subtilis* は芽胞溶液が市販されていることから、OTC 標準溶液を用いてこれらの菌株について検討を行った。その結果、*Bacillus cereus* ATCC 11778 と比較して *Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液は同等の感受性を示した。そこで、本研究では、*Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液を用いる

こととした。

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、0.04~0.2 µg/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。

2) マクロライド系抗生物質

2-1) 試験菌株の検討

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

2-2) 平板用培地及び希釈緩衝液の検討

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

2-3) 感受性の確認

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、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。

3) アミノグリコシド系抗生物質

3-1) 平板用培地の検討

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

3-2) 試験菌株の検討

芽胞菌液として市販されている *Geobacillus stearothermophilus* spore suspension 及び *Bacillus subtilis* (BGA) spore suspension と抗生物質簡易検査法で使用されている *Bacillus subtilis* ATCC 6633 について検討を行った。その結果、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 及び市販芽胞溶液共に明瞭な阻止円形成を示した。従って、取り扱いの容易さから、本研究では、*Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液を用いることとした。

3-3) 感受性の確認

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、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。

3. 残留抗菌性物質を特定する機器分析法等の構築

3.1.1 LC/MS/MS を用いた β-ラクタム系抗生物質の検討

1) LC/MS 測定条件の検討

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

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

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

2) 前処理法の検討

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

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 17 種のペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質を 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し、回収率を求めた。各試料に対する回収率はいずれも概ね 70%以上(イオンサプレスの影響:標準添加法で補正)であり、残留分析法としてほぼ満足できる値が得られた。

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 17 種の定量限界は、セフキノムが最も感度が悪く、0.02 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、他の抗生物質はい

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

3.1.2 LC/MS/MS を用いたキノロン剤の検討

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 ($\text{M}+\text{H}$)⁺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 β -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、 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 $\mu\text{g}/\text{g}$ の濃度に添加し、回収率を求めた。各試料に対する回収率はいずれも 70%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 $\mu\text{g}/\text{g}$ まで十分検出が可能であつ

た。

3.2 アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による残留抗菌剤の分析

3.2.1 ELISA によるキノロン剤の分析

1) ELISA における交差反応性の評価

New Quinolone Kit における交差反応性について、キノロン剤標準品を用いて求めたところ、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンが 100%、ダノフロキサシンは 80%、ロメフロキサシンは 30%前後の交差反応性を示した。

2) HPLC-FL 条件

キノロン剤の HPLC-FL 測定条件の検討を行った。蛍光検出器は移動相の pH および塩濃度に依存して蛍光強度が変化することから、それぞれの最適条件を検討した。キノロン剤の蛍光強度は pH 7 以上の条件で蛍光を示さず、中性から酸性条件化で一定の蛍光強度を示したことから、移動相の pH は 3.0 とした。

3) 試料の前処理方法

試料に含まれる共存物質の影響を取り除くため、Oasis HLB および Oasis MCX を用いて検討し結果、陽イオン交換系カートリッジである MCX を用いることで良好な結果を得ることができた。

4) 実試料への応用

実際の食肉中に適用したところ、一部の試料からダノフロキサシンとエンロフロキサシンが検出された(<5 ng/mL)。ELISA と機器分析による結果を比較したところ、ELISA の方がわずかながら高値を示す傾向が見られた。このことは、共存物質による交差反応性もしくは、測定対象物質以外にも交差反応性を示す物質が存在する可能性を示唆している。

3.2.2 アフィニティーカラムを用いた残留抗菌剤の分析

1) アフィニティーカラムのキノロン剤保持能の検

討

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

2) アフィニティーカラムのゲンタマイシン保持能の検討

ゲンタマイシンの標準品 500 ng/mL を 1 mL アフィニティーカラムに負荷し、回収率を求めたところ、103.1~111.3%の回収率であった。また、食肉に対して 500 ng/g となるよう標準品を添加した食肉抽出液を用いて、同様な操作を行ったところ、回収率は 89.3~96.8%であった。どちらの場合でも良好な回収率が得られた。

3) 試料前処理法

・キノロン系抗菌剤

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

・ゲンタマイシン

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

4) 実試料への応用

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

また、HPLC クロマトグラムにおいて本法と従来の固相抽出法による精製を比較したところ、アフィニ

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

3.2.3 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、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

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)を確立した。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 5mL で抽出する方法とした。また、現公定法で採用されている試験菌の代替菌として市販芽胞菌を用いることが可能であることを明らかにした。すなわち、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。

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）、ニューキノロン系抗菌剤（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であった。

本法は、動物用医薬品として汎用され、畜水産食品中に残留する可能性の高いPCs、CEs、MLs、TCs、QNs等を0.05~0.5 ppmレベルで簡易かつ迅速に検出することが可能である。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られる。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。

・高感度検査法

畜水産食品から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を用いてクリーンアップする前処理法を構築した。各グループから代表的な薬剤を選び、残留基準値レベル(0.05~0.5 ppm)で添加回収実験を行った結果、その回収率は概ね70%以上であった。

本法は、動物用医薬品として汎用され、畜水産食品中に残留する可能性の高い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、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン系抗菌剤を簡易かつ高感度に検

出することが可能であり、残留抗菌性物質の簡易かつ高感度な検出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。

2. 信頼性の高い微生物学的試験法の構築

2.1 系統推定試験法によるペニシリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質およびニューキノロン系抗菌剤の分析の検討

逆相・カチオン交換ミックスマードカートリッジを用いた、食肉中に残留する系統の異なる抗生物質のPCG、OTC、SPM、GMの微生物学的検査法を構築した。本試験法は簡易な前処理法で各抗生物質の残留基準値レベルでの検出が可能であり、系統推定も可能であった。次に、上記の試験法を一部改良し、PC系抗生物質PCG、ABPC、NFPC、MDIPC、MCIPCに応用した結果、暫定基準値レベルでの検出が可能であった。本試験法は簡易な前処理法で多数の検体を同時に検査することが可能であった。

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TCs4薬剤およびNewQ5薬剤の同定・定量が可能であった。

2.2 バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系、テトラサイクリン系、マクロライド系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

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、 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。今回検討した 16 種の抗生物質については、残留基準値レベルでの検出が可能であった。

次に、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。マクロライド系抗生物質は 11 種類について、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。

3. 残留抗菌性物質を特定する機器分析法等の構築

3.1 LC/MS/MS を用いた機器分析法の検討

微生物学的試験法で阻止円が観測された場合、残留する抗菌性物質を特定することが行政処分上要求される。そこで本研究では、抗菌活性が高いことから微生物学的試験法で阻止円が観測される可能性の高い β -ラクタム系抗生物質(ペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質)の高

速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析計(LC/MS/MS)を用いた選択性の高い分析法を検討した。畜産食品から 0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)で除タンパクと同時に薬物を抽出し、Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を採用した。本法によるペニシリン系抗生物質及びセファロスポリン系抗生物質 17 種の添加回収率は、0.1 $\mu\text{g/g}$ 添加で概ね 70%以上、定量限界は、0.01 $\mu\text{g/g}$ まで検出が可能であった。

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 $\mu\text{g/g}$ 添加で概ね 70%以上、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。

3.2 アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による残留抗菌剤の分析

ELISA 法は簡便な方法で、多検体を迅速に測定できる利点を有している。しかし、交差反応性などの問題から、客観的な情報が不足しており、汎用性に乏しかった。キノロン剤を対象薬剤として、機器分析法と ELISA 法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料へと適用したところ、全ての試料が定量限界未満であった。機器分析における前処理等煩雑な操作を考慮すると、スクリーニング法としての ELISA の有用性が示唆された。

複雑なマトリックスから構成されている食肉中に残留する抗生物質を分析するため、夾雑成分を効果的に除去できる前処理法を検討した。本研究では抗原抗体反応を利用した高い精製能力を有す

るアフィニティーカラムによる試料精製法を構築した。アフィニティーカラムの有用性を検討するため、キノロン系抗菌剤のノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ダノフロキサシン、エンロフロキサシンの4種類およびアミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンを測定対象物質とした。それぞれの標準品を食肉抽出液に添加して回収率を求めた結果、いずれの抗菌性物質においても良好な回収率が得られたことから、本研究で構築したアフィニティーカラムの有用性が示唆された。

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) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之: 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法による乳中のマクロライド系抗生物質の定量. 分析化学, 55, 651-660 (2006)
- 2) 岩崎雄介, 伊藤 岳, 北村 渉, 加藤美穂子, 小平 司, 堀江正一, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之: 酵素免疫測定法及び高速液体クロマトグラフィーによる食肉中のキノロン系抗菌剤の分析: 分析化学, 55, 943-948 (2006)
- 3) 石井里枝, 堀江正一, 村山三徳, 米谷民雄: LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のクロラムフェニコールの分析, 食品衛生学雑誌, 47, 58-65 (2006)
- 4) 石井里枝, 堀江正一, 村山三徳, 米谷民雄: LC/MS/MSによるハチミツおよびローヤルゼリー中のテトラサイクリン系抗生物質の分析, 食品衛生学雑誌, 47, 277-283 (2006)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) Kazuhiro Fujita, Hironobu Ito, Munetomo

Nakamura, Masatoshi Watai, and Makoto Taniguchi: 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) 草野友子, 神田真軌, 井部明広「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」日本食品衛生学会代 89 回学術講演会 (2005 年 5 月, 東京).
- 2) 伊東 岳, 湧井 宣行, 川口 研, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 堀江 正一, 斉藤 貢一, 中澤 裕之. 環境水中の抗菌活性物質測定法の開発. 日本分析化学会第 54 年会 (2005 年 9 月・名古屋)
- 3) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 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法の検討」第 126 年回日本薬学会 (2006 年 3 月, 仙台)
- 4) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之「微生物学試験法による残留抗菌性物質の基礎的検討」第 126 年会日本薬学会 (2006 年 3 月, 仙台)
- 5) 伊東 岳, 湧井 宣行, 川口 研, 加藤 美穂子, 小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵, 斉藤 貢一, 中澤 裕之. ELISA による河川水中に残留するニューキノロン系抗菌剤の測定. 日本薬学会第 126 年会 (2006 年 3 月・仙台)
- 6) 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 (2006 年 5 月, 東京)
- 7) 藤田 和弘, 加藤 仁美, 尾崎 由佳, 丹野 憲二, 堀江 正一. バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の検討. 日本食品衛生学会第 91 年会 (2006 年 5 月, 東京)
- 8) 伊藤 裕信, 高田 由美子, 藤田 和弘, 丹野 憲二, 堀江 正一. バイオアッセイによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討. 日本食品衛生学会第 91 年会 (2006 年 5 月, 東京)
- 9) 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 (2006 年 11 月, 鳥取)
- 10) 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フェマイシン及びテルフェマイシンの定量」第 93 回日本食品衛生学会 (2007 年 5 月, 東京)
- 11) 神田真軌, 草野友子, 小山内たか, 井部明広ら「逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジを用いた食肉中残留抗生物質の微生物学的系統推定スクリーニング試験法(第 4 報). 第 92 回日本食品衛生学会 (2006 年 10 月, 名古屋)
- 12) 藤田和弘, 加藤仁美, 尾崎由佳, 丹野憲二, 堀江正一「バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の検討」第 91 回日本食品衛生学会(2006 年 5 月, 東京)
- 13) 伊藤裕信, 高田由美子, 藤田和弘, 丹野憲二, 堀江正一「バイオアッセイによる食肉中のテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討」第 91 回日本食品衛生学会 (2006 年 5 月, 東京)
- 14) 北村渉, 椛沢圭介, 伊東岳, 岡山明子, 加藤美穂子, 小平司, 堀江正一, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之「アフィニティーカラムを用いた前処理及び HPLC/FL による食肉中残留抗菌剤の分析」日本薬学会第 127 年会(2007 年 3 月, 富山)
- 15) 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フェマイシン及びテルフェマイシンの定量」第 93 回日本食品衛生学会 (2007 年 5 月, 東京)
- 16) 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