

## A. 研究目的（緒言）

1997年に香港で高病原性鳥インフルエンザ（H5N1型）が流行した際、人への最初の感染が確認されたが、その後も東南アジアや東アジアの養鶏場を中心に散発的な流行が起こっており、人への感染も報告されている。鳥インフルエンザはニワトリ、ウズラ、アヒルなどの家禽がもっているA型インフルエンザウイルスによる感染症であり、ヒトへ感染する可能性は極めて低いとされており、ヒトからヒトへの感染例は確認されていない。しかし、鳥インフルエンザウイルスの宿主である鳥は繁殖やエサを求めて長距離を移動するため、養鶏場などへの感染が広域化する可能性がある。さらに、感染した豚などの家畜やヒトの体内で突然変異を起こし、鳥インフルエンザが新型ヒトインフルエンザとして流行した場合、免疫を獲得していない人に対する危険性が指摘されている。

鶏インフルエンザは日本においても、過去、京都府京丹波町、宮崎県新富町や日向市、岡山県高梁市、佐賀県有田町などの養鶏場で発生し、周辺養鶏場への伝播が懸念されたが迅速な殺処分により被害の拡大が防止された。このように鳥インフルエンザが発生した場合、通常は殺処分によって感染を局限し、よって周囲への伝播を阻止するという対応が最も一般的に行われる。また、治療や感染防止対策の1つとしてワクチンを投与して免疫を獲得させ、これによって感染の予防に役立てようという対応策もある。実際に2005～6年に中国で大々的に鶏などにワクチンを投与して大きな効果を上げたといわれている<sup>1)</sup>。さらに抗ウイルス剤を用いて治療を行う方法も実施されている。事実、中国ではワクチン投与とほぼ同じ頃、H5N1ウイルスに効くとされた抗ウイルス剤のアマンダジンを餌に混ぜ込み広く使用された<sup>2)</sup>。2012年には実際に中国産鶏肉から抗ウイルス剤であるアマンダジンとリバビリン検出され、わが国でも社会的な問題となった。しかし、これらの薬剤はわが国において動物用医薬品として指定されておらず、その残留の有無は食品衛生上大きな問題である。

抗ウイルス剤はインフルエンザウイルス

の細部内での複製の過程を阻害することにより効果を発揮する。代表的なものとして、ウイルスが細胞に侵入後、細胞内へのRNAの放出を行う脱殻過程を阻害する、いわゆるM2プロトンチャンネル阻害剤としてのアマンタジン、複製されたウイルスの細胞外への遊離を促進する酵素であるノイラミニダーゼを阻害するオセルタミビルやラニナニビルなどがある。また、細胞内でのウイルスの核酸複製を妨害するRNAポリメラーゼ阻害剤としてリバビリンがあるが、インフルエンザ薬としては実用化されず、C型肝炎用として実用化された<sup>3)</sup>。今回のように2種の抗ウイルス剤が検出された事例は、作用機序の異なる薬剤を組み合わせることで効果の拡大を狙ったものと考えられる。このように複数の抗ウイルス剤が用いられた事例もあり、また、アマンダジンやリバビリン以外の抗ウイルス剤が使用される可能性も否定できない。そのため、これらの抗ウイルス剤を網羅的に分析できる方法の開発が望まれる。

抗ウイルス剤の分析は、これまでは生体内の薬物の挙動に関する研究が中心であり、人や動物の血清<sup>4),5)</sup>、血漿<sup>6)~10)</sup>、尿<sup>6),8),9),11)</sup>、唾液<sup>9)</sup>、肝臓<sup>12)</sup>などからの分析がほとんどであり、また、単品もしくは2,3剤の投与による実験が主体である。食品からの分析法としては、Chanら<sup>14)</sup>によるLC-MS/MSによる分析法やBerendsenら<sup>15)</sup>によるLC-MS/MSによる複数の抗ウイルス剤を対象にした分析法が報告されているが、いずれも鶏筋肉のみを対象としており、唐揚げや我が国で好まれる焼き鳥などに代表される鳥の内臓部や鶏卵などは対象にしていない。国内の報告例では、著者ら<sup>16)</sup>が2013年11月に第106回日本食品衛生学会(沖縄)において鶏肉中のアマンダジンとリバビリンの分析法について報告したのが最初であり、その後、鶴岡ら<sup>17)</sup>、前田ら<sup>18)</sup>により、鶏肉中のアマンダジンの分析法が報告されている。

今回、著者らは抗ウイルス剤の一斉分析法を開発する必要があると考え、すでに報告したアマンタジンとリバビリンに加え、抗インフルエンザ薬として汎用されるオセルタミビル、ザナミビル、近年、開発されたペラミ

ビル、ラニナミビル、諸外国で使用実績のあるリマンタジンとアルビドール、さらに、その他の抗ウイルス剤として、ヘルペスウイルスに対するアシクロビル、尖圭コンジローマに対するイミキモドを加え、計 10 種の抗ウイルス剤について鶏肉及びその加工品からの分析法を検討することにした。今回取り上げた抗ウイルス剤の構造式を図 1 示した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

東京都内のスーパーで購入した鶏筋肉、肝臓、鶏卵、唐揚げ、焼き鳥を試料とした。

### 2. 器具・試薬

標準品：

リバビリン標準品：純度 99.9% (和光純薬工業(株)製)

アシクロビル標準品：純度 99% (和光純薬工業(株)製)

アルビドール標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

オセルタミビルリン酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

イミキモド標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

1-(1-アダマンチル)エチルアミン塩酸塩(リマンタジン塩酸塩)標準品：純度 99.9% (Sigma Aldrich 社製)

1-アダマンタナミン(アマンタジン)標準品：純度 99.7% (和光純薬工業(株)製)

1-ペラミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

ラニナミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

ザナミビル標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

リバビリン-<sup>13</sup>C<sub>5</sub> 標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

アシクロビル-d<sub>4</sub> 標準品：純度 97% (Tronto Research Chemicals 社製)

オセルタミビル-d<sub>3</sub> リン酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

リマンタジン-d<sub>4</sub> 塩酸塩標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

1-アミノアダマンタン-2, 2, 2', 2', 2", 2"-d<sub>6</sub> (C/D/N Isotopes 社製)

ザナミビル-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub> 標準品：純度 98% (Tronto Research Chemicals 社製)

標準原液：リバビリン、アルビドール、オセルタミビル、リマンタジンおよびアマンタジンについては、それぞれ 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

アシクロビルおよびイミキモドは、それぞれ 10 mg 精秤し、DMSO に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ペラミビルおよびラニナミビルは、それぞれ 10 mg 精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ザナミビルは、10 mg 精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

リバビリン-<sup>13</sup>C<sub>5</sub> は、その 1 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

アシクロビル-d<sub>4</sub> は、その 1 mg 精秤し、DMSO に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

オセルタミビル-d<sub>3</sub>、リマンタジン-d<sub>4</sub> およびアマンタジン-d<sub>6</sub> については、それぞれ 10 mg を精秤し、メタノールに溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (100 µg/mL)。

ザナミビル-<sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N<sub>2</sub> は、その 1 mg を精秤し、水に溶解して 100 mL としたものを標準原液とした (10 µg/mL)。

標準溶液：標準原液を適時希釈して使用した。

その他の試薬：

メタノール：LC-MS 用 (関東化学(株)製)、高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業(株)製)

アセトニトリル：LC-MS 用 (関東化学(株)製)

ギ酸アンモニウム：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業(株)製)

ギ酸：高速液体クロマトグラフィー用 (和光純薬工業(株)製)

塩酸：特級 (和光純薬工業(株)製)

固相カラム(ODS ミニカラム) : Inert Sep C18 (1 g/6 mL)(GLサイエンス(株)製)

固相カラム(MCX ミニカラム) : OASIS MCX (150 mg/6 mL)(Waters社製)

固相カラム(PBA ミニカラム) : Bond Elut PBA (500 mg/6 mL)(Agilent Technologies社製)

### 3. 装置および測定条件

高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)は、LC部、島津製作所製 LC20A、MS部、ABサイエックス社製 5500Qを使用した。

測定条件

<LC部>

カラム : Triart Diol-HILIC plus (内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 $\mu$ m, YMC社製),  
カラム温度 : 40 , 注入量 : 10  $\mu$ L, 移動相 A : 0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル, 移動相 B : 0.1vol%ギ酸溶液, グラジエント条件 : 0~5分(A:B=90:10) 5~25分(A:B=10:90) 25~30分(A:B=10:90), 流速 : 0.2 mL/min.

<MS部>

イオン化法 : ESI-positive, イオン化温度 : 350 , 測定モード : SRM, 各抗ウイルス剤のSRMの条件は表1に示した。

### 4. 試験方法

#### 1) 試料溶液の調製

試料をフードプロセッサーを用いて粉碎して均一化したのち、その5.00 gを100 mLの遠心管に採取し、これに0.1vol%塩酸・メタノールを50 mL加え、ホモジナイザーで攪拌後、3,000 rpmで5分間遠心分離を行った。得られた上清を100 mLメスフラスコに採取したのち、さらに残渣に0.1vol%塩酸・メタノールを30 mL加えてホモジナイザーで攪拌後、同様に遠心分離を行った。得られた上清をメスフラスコに合わせ、0.1vol%塩酸・メタノールを用いて正確に100 mLに定容したものを試料溶液とした。

#### 2) 試験溶液の調製

試料溶液の5 mLをあらかじめメタノール-水(9:1)10 mLでコンディショニングしたODSミニカラムに負荷し、その溶出液を50 mLナスフラスコに集めた。さらにメタノール-水(9:1)混液10 mL、メタノール10 mLを流し、溶出液を先の50 mLナスフラスコに集め、減圧濃縮した。得られた残留物を0.5vol%ギ酸・メタノール5 mLで溶解し、予め0.5vol%ギ酸・メタノール10 mLでコンディショニングしたMCXミニカラムに全量負荷した。0.5vol%ギ酸・メタノール10 mLで洗浄後、25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液10 mLと25%アンモニア水-メタノール(1:9)混液10 mLで溶出したものを溶出液Aとした。また、先の0.5vol%ギ酸・メタノールでの負荷液と洗浄液を集め、これに25%アンモニア水500  $\mu$ Lを加えよく混和したのち、予め25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液10 mLでコンディショニングしたPBAミニカラムに負荷した。25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液10 mLで洗浄後、0.5vol%ギ酸・メタノール10 mLで溶出したものを溶出液Bとした。溶出液AとBを合わせ、減圧で溶媒を留去したのち、残渣をアセトニトリル-メタノール-ギ酸(8:1:1)混液2 mLで溶解したものをLC-MS/MS用の試験溶液とした。

#### 3) 検量線の作成

抗ウイルス剤標準原液の一定量を取り、アセトニトリル-メタノール-水(8:1:1)混液で希釈し、数点の検量線用標準溶液を調製し、それぞれLC-MS/MSに注入し、ピーク面積法により検量線を作成した。なお、本法に従って試験溶液を調製した場合、試料中0.01  $\mu$ g/gに相当する試験溶液中の濃度は0.00125  $\mu$ g/mLであった。

## C. 結果

### D. 考察

#### 1. 抽出条件の検討

鶏肉からの抗ウイルス剤の抽出には一般的にメタノールやアセトニトリルなどの極性溶媒が用いられる。今回取り上げる抗ウイルス剤の大部分は塩基性物質であるが、ペラ

ミビルやアシクロビルのような分子構造中にカルボキシル基のあるものやリバビリンのような配糖体もあり、化学的性質が大きく異なるため、これらを効率よく抽出できる溶媒系について検討することにした。鶏肉の筋肉試料 5g にそれぞれの抗ウイルス剤 0.1  $\mu$ g を添加し、抽出溶媒として水、メタノール、アセトニトリル、酢酸エチル、アセトン、メタノール-アセトニトリル混液を用いてそれぞれの抽出率について比較検討した。その結果、いずれの溶媒を用いてもすべての薬剤を良好に抽出することはできなかった。しかし、それらの中でもメタノール及びメタノール・アセトニトリル混液ではザナミビル、ペラミビルおよびラニナミビルの回収率が 30% 以下と低かったものの他の抗ウイルス剤では 50% 以上の比較的良好な回収率が得られた。これらの結果から比較的極性の高い溶媒が抽出に適しているものと思われた。

次に抗ウイルス剤はその置換基の違いにより抽出における pH の影響が大きいと考えられたため、抽出溶媒の pH の影響について検討を行った。溶媒系については pH 調整に緩衝液や塩酸溶液を用いることにし、これらとの混合に適したメタノールとの混合液を用いることとした。メタノールとリン酸緩衝液 (pH2.6)、酢酸緩衝液 (pH6.5) およびホウ酸緩衝液 (pH9.5) の比率が 4:1 になるように調整した混液とメタノールに塩酸を添加して pH を 1.0 以下に調整した溶媒を用いて回収率を調べた。結果は表 2 に示した通り、塩酸を添加して pH を強酸性にした抽出溶媒が最も良好な回収率が得られた。

抽出溶媒を強酸性にすることで回収率が改善したため、添加する塩酸の濃度の検討を行った。0.1vol% ~ 0.4vol% になるように塩酸を加えたメタノールを用いて添加回収試験を行った。結果は表 3 に示した通り、いずれの濃度においても比較的良好な回収が得られたが、塩酸濃度が高くなるほど夾雑物が増加する傾向が見られたため、抽出溶媒には 0.1 vol% 塩酸・メタノールを用いることとした。

## 2. 精製条件の検討

今回分析対象とした抗ウイルス剤はほと

んどが塩基性物質であるため、精製用ミニカラムとして一般的に汎用される逆相系ミニカラムよりも陽イオン交換体を用いる方が精製効果が大きいと考えられた。そこで、強陽イオン交換体の OASIS MCX を用いて精製効果について検討した。まず、抗ウイルス剤を含有した 0.5vol% ギ酸・メタノール 5 mL を OASIS MCX に負荷したところ、リバビリン以外の抗ウイルス剤は良好に保持されたが、リバビリンは保持されなかった。Berendsen ら<sup>15)</sup>も、リバビリンは強陽イオン交換体の SCX カラムに保持されなかったと述べており、配糖体であることが保持を困難にしているものと思われる。そこで、カチオン化が促進されるのを期待して負荷溶媒の pH を 1 付近に調整して負荷を試みたが全く保持されなかった。そこで、リバビリンについては別に追加精製を行うこととし、他の 9 種類の抗ウイルス剤の溶出条件について検討した。

OASIS MCX カラムに、0.5vol% ギ酸・メタノールで調整した抗ウイルス剤の標準溶液 5 mL を負荷し、洗浄溶媒には精製効果が大きいことから 0.5vol% ギ酸・メタノールを用いて洗浄後、カチオン型になっている抗ウイルス剤のイオン化を抑制してカラムからの脱離を促進するために 25% アンモニア水-メタノール混液を用いて溶出することとし、その溶出条件について検討した。その結果、各抗ウイルス剤の溶出挙動に幅があり、溶出溶媒量が増加する傾向があったため、できる限り溶出溶媒の量を少なくし、かつ精製効果を維持するために、混合比の異なる溶媒を段階的に用いることとした。すなわち、25% アンモニア水-メタノール (1:19) 混液 10 mL で溶出した後、25% アンモニア水-メタノール (1:9) 混液 10 mL を用いて溶出することとした。この画分を溶出液 A とした。各抗ウイルス剤の各段階での溶出挙動を表 4 に示した。

リバビリンについては MCX ミニカラムに試料溶液を負荷したのち、その負荷溶媒と洗浄液である 0.5vol% ギ酸・メタノール画分を別に捕集し、分画分については PBA ミニカラムを用いて精製を行うこととした。すなわち、リバビリンは構造内に cis-ジオール基を持つため、cis-ジオール基との親和性の強

いPBA ミニカラムを用い、これに保持させることによって精製を行うこととした。リバビリンの PBA ミニカラムからの溶出挙動について検討したところ、図 2 に示した通り、25%アンモニア水-メタノール(1:19)混液 10mL で洗浄後、0.5vol%ギ酸・メタノール 10mL での溶出が可能であった。この溶出画分を溶出液 B とした。

以上の操作で得られた溶出液 A および B を合わせ、減圧濃縮したものを LC-MS/MS 用の試験溶液とすることとした。

以上の精製条件を鶏筋肉に適用した場合、概ね良好な結果を得ることができたが、唐揚げなどの加工品では、試料溶液に移行してくる夾雑物が多く、特に脂質の多いものでは抽出溶液が濁るようなものもあり、イオン交換カラムに負荷する前に、これらを除去する必要があった。

そこで、脂質などの低極性の物質をあらかじめ ODS ミニカラムで除去する操作を追加することにした。すなわち、1)抽出条件の検討で調整した試料溶液 5 mL を Inert Sep C18 ミニカラムに負荷し、さらにカラムに残留している抗ウイルス剤を洗い出すためにメタノール-水(9:1)混液 10 mL を流したところ、アマンダジンの約 15~20%、オセルタミビルの約5%がカラムに残留していることが分かった。そこで、さらにメタノールを 10 mL を流したところこれらも完全に回収することができた。一方、脂質などの低極性物質はそのまま保持され、本操作で除去することができた。以上の結果から、カラムに残留している抗ウイルス剤はメタノール-水(9:1)混液 10 mL、メタノール 10 mL を用いて洗い出し、これらの溶出液を合わせて捕集することにした。得られた溶出液を減圧濃縮後、残留物を 0.5vol%ギ酸・メタノール 5 mL に溶解し、強陽イオン交換ミニカラムに負荷する操作をすべての試料で追加することとした。

### 3 .安定同位体を用いた内部標準添加法の検討

対象とする薬剤の化学的性質が異なり、薬剤によって回収率に差が認められたため、安定同位体を用いた内部標準添加法について

検討した。安定同位体が入手できたリバビリン、オセルタミビル、アマンダジン、リマンダジン、ザナミビルおよびアシクロビルについて検討した。その結果、マトリックス標準による回収率と有意差は認められず、どちらの手法を用いても定量には問題がないことが分かった。しかし、安定同位体を用いた補正は、正確な定量値を得ることができるが、安定同位体はすべての薬剤について入手できるわけではなく、また非常に高額であるため、今後の検討においては参考値として取り扱うこととした。

#### 1)MS 条件の検討

イオン化モードを選択するために、インフュージョン測定を行ったところ、ESI(+)モードでプロトン化分子[M+H]<sup>+</sup>が感度よく検出されたことから、測定には ESI(+)モードを用いることとした。0.1vol%アセトニトリルおよび 0.1vol%ギ酸(1:1)混液を移動相としてフローインジェクションで各抗ウイルス剤の測定イオンおよびそれぞれの電圧等の MS 条件を検討した。各抗ウイルス剤のプロトン付加分子[M+H]<sup>+</sup>をプリカーサーイオンとした場合のプロダクトイオンスペクトルを図 3 に示した。

#### 2)LC 条件の検討

まず、汎用される ODS 系カラムを用いて 10種の抗ウイルス剤の分析条件を検討した。その結果、9種の抗ウイルス剤については良好な LC-MS/MS クロマトグラムを得ることができたが、リバビリンはカラムに保持されず同一条件での測定が困難であることが分かった。そこで、これらの抗ウイルス剤はいずれも極性化合物であるため、親水性相互作用を有する HILIC(Hydrophilic Interaction Chromatography)カラムを用いて検討することにした。移動相に HILIC 分析で広く使われるアセトニトリル/水系を用い、有機酸で pH を調整することで、すべての抗ウイルス剤で夾雑物の影響を受けることなく良好なクロマトグラムが得られることが分かった。

そこで、アセトニトリルと LC-MS/MS の移動相の添加剤として広く使用されているギ酸、酢酸、ギ酸アンモニウムを用いて種々検

討した結果、0.1vol%ギ酸含有アセトニトリルと0.1vol%ギ酸を移動相とするグラジェント溶離を行った場合に最も良好なピーク形状、感度が得られた、そこで、0.1vol%ギ酸含有アセトニトリル-0.1vol%ギ酸を移動相として用いることとした。

## 5. 添加回収試験

鶏の筋肉および内臓に各抗ウイルス剤を0.1 µg/gとなるように添加して回収試験を実施した。その結果を表5に示した通り、鶏の筋肉では、すべての抗ウイルス剤について、96.2~111.3%の回収率が得られ、標準偏差も11.3%以内であった。また、肝臓では100.1~109.2%の回収率、標準偏差も7.9%以内と良好な結果が得られた。図4にその際のSRMクロマトグラムを示した。さらに、安定同位体のある6種類の抗ウイルス剤について、内部標準法を用いて添加回収実験を行ったところ、回収率は80.3~116.6%以内とマトリックス標準で補正した結果と同程度であった。

現在、鶏卵や鶏肉加工品についての本法の適用性について検討中である。

## 6. LC-MS/MS の機種(メーカー)の違いによる感度の差について

LC-MS/MSを販売してる5社に分析を依頼して機種による感度の差や特異性を検証した。

本検討に使用した機種とメーカーは、QTrap® 4500 システム(ABサイエックス社)、Xevo TQ-S micro(waters社)、Agilent 6460 (Agilent社)、TSQ Endura (Thermo Fisher Scientific社)、LCMS-8050 システム(島津製作所株)である。

各メーカーの機種の違いによる感度の差は認められるが、特異的な差は認められず、本検討に使用した機種においては一律基準である0.01 µg/gを測定するには十分な感度を要していることが分かった。

## E. 結論

鶏肉中から抗ウイルス剤を定量する一斉分析法の開発をした。

1. 対象としたのは、検出事例のあるアマンタジンとリバビリンに加え、抗インフルエンザ薬として汎用されるオセルタミビル、ザナミビル、近年、開発されたペラミビル、ラニナミビル、諸外国で使用実績のあるリマンダジンとアルビドール、さらに、その他の抗ウイルス剤として、ヘルペスウイルスに対するアシクロビル、尖圭コンジローマに対するイミキモドに加え、計10種の抗ウイルス剤を分析対象とした。

2. 鶏肉および肝臓中からの抗ウイルス剤の抽出には5vol%塩酸・メタノール混液を用い、ODSミニカラムおよび強陽イオン交換体ミニカラムを用いて精製後、LC-MS/MSを用いて定量する方法を作成した。

3. LC-MS/MSでの定量は、ESI ポジティブモードにより行った。LCカラムには親水性相互作用を有するHILICカラムを用いることにより10種類の抗ウイルス剤を分離測定することができた。

4. 筋肉および肝臓に0.1 µg/g相当の10種の抗ウイルス剤を添加し、添加回収試験を実施した結果、筋肉では回収率96.2~111.3%、標準偏差11.3%以下、肝臓では回収率100.1~109.2%、標準偏差7.9%以下と良好な結果が得られた。なお、本法の定量下限値は0.01 µg/gであった。

5. 今後、抗ウイルス剤の分析の必要性等について再検討し、最終的には6~8剤の同時分析法としたい。今後、外部機関による試験法の妥当性確認を行う予定である。

## 謝辞

本研究に際し、依頼分析を実施していただいたABサイエックス社、waters社、Agilent technologies社、Thermo Fisher Scientific社および島津製作所株の担当各位、HILICカラムの作成に協力していただきましたGLサイエンス社の担当各位に深謝いたします。

## 文献

- 1) 食品安全情報 国立医薬品食品衛生研究所 No. 24 / 2005 (2005. 11.22)
- 2) 中国、鳥インフルエンザ抑制のために抗

ウイルス剤を大量利用、人間治療用薬剤が無効に（農業情報研究所，05.6.21）

<http://www.juno.dti.ne.jp/tkitaba/earth/epidemic/05062101.htm>

3) Ribavirin History,

<http://www.news-medical.net/health/Ribavirin-History.aspx>

4) Alken, G.D., Brookes, S.T., Barrow, A., Dunn, J.A., Grosse, C.M.

Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the determination of the neuraminidase inhibitor zanamivir (GG167) in human serum. *J chromatogr B*, **732**, 383-393(1999).

5) Bahrami, G., Mohammadi, B., Kiani, A. Determination of oseltamivir carboxylic acid in human serum by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with UV detection. *J chromatogr B*, **864**, 38-42(2008).

6) Lindegardh, N., Hanpithakpoong, W., Wattagoon, Y., Singhasivanon, P., White, J.N., Day N.P.J. Development and validation of a liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for determination of Oseltamivir and its metabolite oseltamivir carboxylate in plasma, saliva and urine. *J chromatogr B*, **859**, 74-83 (2007).

7) Liu, Y., Xu, C., Yan, R., Lim, C., Yeh, L.T., Lin, C.C. Sensitive and specific LC-MS/MS method for the simultaneous measurements of zanamivir and ribavirin in human plasma. *J chromatogr B*, **832**, 17-23(2006)

8) Heining, K. Bucheli, F. Sensitive determination of oseltamivir and oseltamivir carboxylate in plasma, urine, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J chromatogr B*, **876**, 129-136(2008).

9) Sioufi, A., Pommier, F.

Gas chromatographic determination of amantadine hydrochloride in human plasma and urine. *J chromatogr B*, **183**, 33-39 (1980).

10) Baughman, T.M., Wright, A.L., Hutton, K.A. Determination of zanamivir in rat and monkey plasma by positive ion Hydrophilic interaction chromatography(HILIC) / tandem mass spectrometry. *J chromatogr B*, **852**, 505-511(2007).

11) David, J.S., Geoffrey, L., Alison, M.B., Willard, L., Ke-Yu, W., Kenneth, C.C. Metabolism of the Influenza Neuraminidase Inhibitor Prodrug Oseltamivir in the Rat. *DRUG METABOLISM & DISPOSITION*, **28**, 737-741(2000).

12) Ohura, K., Tasaka, K., Hashimoto, M., Imai, T. Distinct Patterns of Aging Effects on the Expression and Activity of Carboxylesterases in Rat Liver and Intestine. *Drug Metab Dispos*, **42**, 264-273(2014).

13) Liu, Z., Yang, F., Yu, K., Lin, Y., Liu, S., Zhang, Q., Su, Z. Multi-residue determination of five antiviral drugs in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chinese J Chromatogr*, **30**, 1253-1259(2012).

14) Chan, D., Tarbin, J., Sharman, M., Carson, M., Smith, M., Smith, S. Screening method for the analysis of antiviral drugs in poultry tissues using zwitterionic hydrophilic liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, **700**, 194-200 (2011).

15) Berendsen, B. J. A., Wegh, R. S., Essers, M. L., Stolker, A. A. M., Weigel, S. Quantitative trace analysis of a broad range antiviral drugs in poultry muscle using column-switch liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal chem*, **402**, 1611-1623(2012).

16) 萩原 踏, 朝倉敬行, 寶龍久枝, 村上麻里子, 中里光男, 安田和男. LC-MS/MS を用いた抗ウイルス剤の分析法, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 講演要旨集, p121 (平成25年11月21~22日、沖縄)

17) 鶴岡由美, 中島崇行, 橋本常生, 神田真

軌，林 洋，松島陽子，吉川聡一，永野智恵子，高野伊知郎．LC-MS/MS による鶏組織および鶏卵中アマンタジンの分析法の開発，第107 回日本食品衛生学会学術講演会，講演要旨集，p47（平成 27 年 5 月 4～5 日、東京）  
18) 前田尚之，田中絵美，榎 加奈恵，吉田由香，佐々木道夫，吉田 博．LC-MS/MS による鶏肉およびその加工品中のアマンタジン 分析法の開発，食品衛生研究，64，35-45(2014)

#### **F．健康危険情報**

無し

#### **G．研究発表**

本研究の一部は日本食品衛生学会 第108 回学術講演会（平成 26 年 12 月 4～5 日、金沢）において発表した。

#### **H．知的財産権**

無し