

食肉中に残留するアミノグリコシド系抗生物質の微生物学的検査法

草野友子*, 神田真軌*, 八巻ゆみこ*,
平井昭彦**, 鎌田国広*

Microbiological Method for the Detection of Aminoglycoside Antibiotic Residues in Meat

Tomoko KUSANO*, Maki KANDA*, Yumiko YAMAKI*,
Akihiko HIRAI** and Kunihiro KAMATA*

Keywords: アミノグリコシド系抗生物質 aminoglycoside antibiotic residue, 食肉 Meat, 微生物学的検査法 microbiological method, 分別推定法 classifying and estimating method

はじめに

アミノグリコシド系(AGs)抗生物質はグラム陽性菌, 陰性菌等広範囲の抗菌スペクトルをもち, また抗菌作用が強いため細菌性下痢症や呼吸器疾患等に有効である. さらに他の抗菌薬と協力作用を示すために複合製剤の成分としても使用されるなど動物用医薬品や飼料添加物に汎用されており, 畜水産食品中への残留が懸念される.

これら残留動物用医薬品問題に対しては, FAO/WHO 合同食品規格委員会(Codex)による最大残留基準値(MRLs)の設定作業が続いており, 国内でもそれらの値に準じた残留基準値の設定が進められている. AGs 抗生物質についても平成 14 年 12 月にゲンタマイシン(GM), スペクチノマイシン(SPCM)およびネオマイシン(NM)の残留基準値が告示され, 平成 15 年 7 月 1 日から施行された¹⁾. (表 1)

表 1. 主な AG 系抗生物質と食肉の Codex MRLs

薬剤名	Codex MRL	食肉	我が国における残留基準値* 1	分別推定法検出感度
ゲンタマイシン(GM)	0.1ppm	牛, 豚	0.1ppm	1.0ppm
ジヒドロストレプトマイシン(DSM), ストレプトマイシン(SM)	0.6ppm	牛, 豚, 羊, 鶏		1.0ppm
スペクチノマイシン(SPCM)	0.5ppm	牛, 豚, 羊, 鶏	0.5ppm	
カナマイシン(KM)				1.0ppm
ネオマイシン(NM)	0.5ppm	牛, 豚, 羊, 鶏, やぎ, 七面鳥, あひる	0.5ppm	

* 1: 平成 15 年 7 月 1 日施行

畜水産食品中に残留する AGs 抗生物質に対する試験法には, 理化学試験法^{2,3,4)}, 微生物学的試験法^{5,6)}, ELISA や EIA 等免疫反応を利用した試験法⁷⁾がある. これらのう

ち, 理化学試験法と免疫学的試験法は薬剤ごとの個別試験法が多く, また理化学試験法に関しては蛍光誘導体化等の前処理が必要である. 今回示された告示法¹⁾は高速液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)を用いた理化学試験法で, GM, SPCM および NM 3 薬剤の定量試験法である. そのため AGs 抗生物質の検査は, 残留基準の定められた薬剤については LC-MS 法で, それ以外の薬剤については従来法の微生物学的試験法を併用して行わなければならない. このため, 日常的に多検体を検査しなければならない現場では, 多大な時間と労力を要し迅速性及び効率性に問題があり, 迅速簡便な一斉検出が行えるスクリーニング検査法の開発が望まれている. 現在, 畜水産食品中残留抗生物質のスクリーニング検査法として平成 6 年度厚生省通知「残留有害物質モニタリング検査」⁸⁾による微生物学的試験法の簡易検査法と分別推定法がある. 特に検出感度の高い分別推定法はオキシテトラサイクリン, クロルテトラサイクリン, テトラサイクリン, ベンジルペニシリンおよびスピラマイシンの残留基準値の検出が可能であり⁵⁾, 残留抗生物質のスクリーニング法として使用可能である. しかしながら AGs 抗生物質については検出感度が不足しており今回設定された GM, SPCM, NM の基準値検出は困難である.

そこで今回我々は, AGs 抗生物質のスクリーニング検査法の開発を目的とし分別推定法の一部改良を試みた. その結果, SPCM を除く AGs 抗生物質 5 剤について検出感度が従来の分別推定法に比較して 10~20 倍高くなり残留基準値が検出可能となったので報告する.

材料及び方法

1. 試料

あらかじめ抗生物質の残留がないことを確認した市販の鶏肉, 豚肉, 牛肉を使用した.

* 東京都健康安全研究センター食品化学部残留物質研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科

2. 供試菌および検査平板

残留有害物質モニタリング検査文書中の簡易検査法⁸⁾に準拠した。

3. 試薬および標準品

抗生物質標準品：力価の明らかなゲンタマイシン硫酸塩(GM), カナマイシン硫酸塩(KM), ストレプトマイシン硫酸塩(SM), (以上和光純薬社製) ジヒドロストレプトマイシン(DSM), スペクチノマイシン(SPCM), (以上シグマ社製), ネオマイシン(NM)(和光純薬社製)を使用した。

抗生物質標準溶液の作成：各抗生物質は 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を作成し pH 8 リン酸緩衝液で段階希釈して 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準溶液を調製した。

緩衝液及び溶媒等：0.01 M EDTA 含有 pH 4.0 マキルベン緩衝液, pH 4.0 マキルベン緩衝液, pH 3.0 マキルベン緩衝液, pH 4.5 リン酸緩衝液, pH 6.0 リン酸緩衝液, pH 8.0 リン酸緩衝液は簡易検査法と分別推定法⁹⁾に準拠した。pH 7.0 リン酸緩衝液は 0.1M リン酸一カリウムと 0.1M リン酸二カリウムを混合して pH 7.0 に調製した。

カートリッジカラム：Sep-Pak C₁₈ カートリッジ(Waters 社製)(C₁₈ カラム), BAKER 10 SPE COOH カートリッジ(Baker 社製)(COOH カラム)を使用した。各カラムのコンディショニングは分別推定法⁹⁾に準拠したが COOH カラムは最後に pH 4.0 マキルベン緩衝液あるいは上記各 pH のリン酸緩衝液各 5 mL でコンディショニングを終了した。

4. 試験溶液の調製

分別推定法の前処理法を一部改良した。すなわち試料 10 g に 0.01 M EDTA 含有 pH 4.0 マキルベン緩衝液 30 mL を加えてホモジナイズした後, 3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を分取し, ヘキサン 10 mL を加えて激しく振とう後, 3,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った。水層を分取しクロロホルム 30 mL を加え激しく振とう後, クロロホルム層を除去し水層を C₁₈ カラムに負荷した。

この後の操作を次のとおり改良した。流出液を遠心管に分取し, 5 N NaOH 0.5 mL を加え混和後 3,000 rpm で 15 分間遠心分離した。上清を COOH カラムに負荷した後 pH 3.0 マキルベン緩衝液で溶出した。最初の 1 mL を捨てて次の 2 mL をとり, 2 N の NaOH で pH を 7.5 付近まで調整した後, 1 N の NaOH で pH を 7.5 に調整した。(図 1)

5. 試験法

分別推定法に従って作製した *B. subtilis* 検査用平板に, 試験溶液を浸せきさせた「枝肉の抗菌性物質検査用紙(直径 10 mm, 厚さ 1.1 mm, 吸水量 70 ~ 80 μL , アドバンテック社製)」をそれぞれ固着させ, 30 分間冷蔵放置後, 30 で 18 時間培養した。

6. 判定及び検量線の作成

判定：培養後, 各検査用平板のペーパーディスク周辺に出現した発育阻止円直径をノギスで測定し, 12 mm 以上の明瞭なものを陽性とした。

検量線：既知濃度の各標準溶液を用い試験法に従って操作し, 得られた阻止円の直径から検量線を作成した。

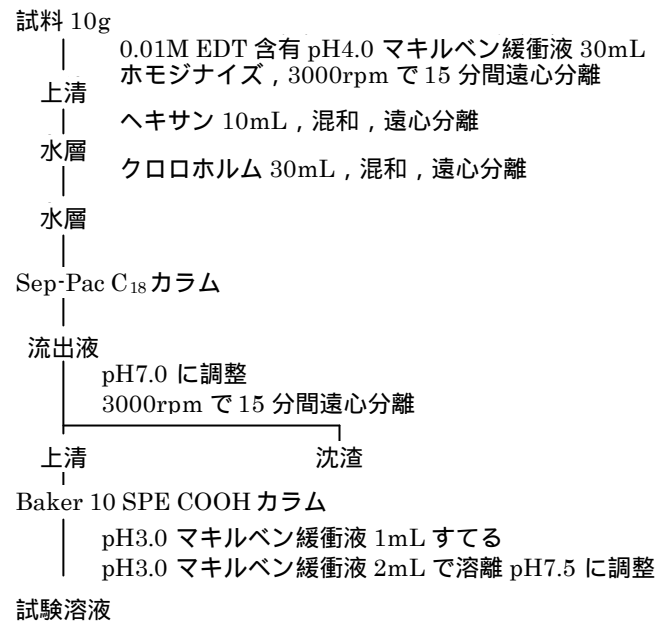


図 1. 試験溶液調製法

結果及び考察

1. COOH カラムの保持に関する検討

分別推定法で AGs 抗生物質の検出感度の悪い原因の一つとして, 試験溶液の調製に問題があると考えられる。分別推定法では, AGs 抗生物質を分画するために弱陽イオンカートリッジである COOH カラムを用いている。しかし, カラムに負荷する溶液の pH が最適条件となっていないため, AGs 抗生物質のカラムへの保持が不十分となり, 回収率が悪いことが考えられる。

そこで, COOH カラムに負荷する溶液の pH による薬剤の回収率への影響を検討した。本試験で使用する COOH カラムの pKa は 4.8 前後と推察され, 負荷する溶液の pH は官能基の解離が 100 %促進される pH 7.0 前後が薬剤の保持に最適であると考えた。試験には鶏肉を用い, SM 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ を添加後, 試験溶液の調製の項に従い操作し, C₁₈ カラムからの流出液を得た。この流出液を 5 N NaOH を用いて pH 5.0 ~ 9.0 までに調整し, 試験溶液とした。なお, 従来法どおりに pH 4.0 マキルベン緩衝液を用いて抽出した試験溶液 (pH 4.7) も参考に用いた。これらの試験溶液を, 各々試験溶液の pH に一番近い pH 4.0 マキルベン緩衝液または pH 4.5 リン酸緩衝液, pH 6.0 リン酸緩衝液, pH 8.0 リン酸緩衝液でコンディショニングを終了させた COOH カラムに負荷した後, pH 3.0 マキルベン緩衝液 5 mL で溶出した。溶出液の pH を 5 N および 1 N の NaOH で pH 7.5 に調整した後, *B. subtilis* 検査平板を用いて作成した検量線より回収率を算出した。

その結果, 図 2 に示すとおり SM の回収率は, COOH カラムに負荷する溶液の pH が 6.5 から 7.5 の間で良好であった。なお, 従来法である pH 4.7 の試験溶液では, SM の回収は殆ど認められなかった。このことから COOH カラ

ムに負荷する溶液の pH が検出感度に大きく影響することが明らかとなった。

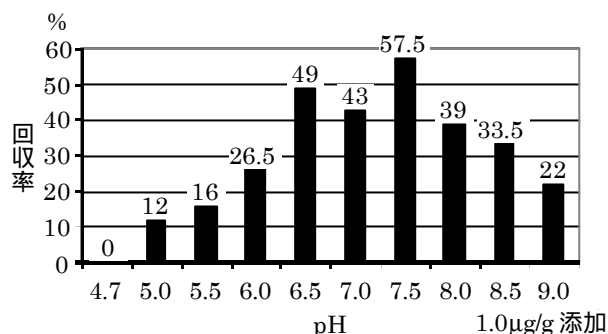


図2．抽出液の pH と各 pH 域での COOH カラムによる SM の回収率

2. COOH カラムに負荷する抽出液の pH 調整について

COOH カラムは負荷する抽出溶液の pH 値により回収率が大きく異なることから、各種試料における抽出溶液の pH 調整について検討した。牛、豚、鶏各 5 検体を用い、pH 4.0 マキルベン緩衝液でホモジネートを作成した。これを 3,000 rpm で 15 分間遠心分離した上清を抽出液とし、この抽出液の pH を測定した。その結果、牛肉の pH は平均で 4.61、豚肉は 4.64、鶏肉は 4.72 であった。次にこの抽出液の pH を 7.0 にするために必要な 5 N NaOH 量を求めた。その結果、牛肉、豚肉は 0.50 mL、鶏肉は 0.51 mL であった。(表 2) これらの結果を基に、食肉に関しては C₁₈ カラムからの流出液に 5 N NaOH を一律 0.5 mL 加えることとし、流出液の pH 調整とこれに伴う試験操作を簡略化することとした。

表 2．飼料と抽出液のホモジネートの pH およびこれを pH 7.0 にするのに要した NaOH 量

試料	ホモジネートの pH	pH7.0 にするのに要した 5N-NaOH の量(mL)
牛肉	4.61 ± 0.05	0.50 ± 0.00
豚肉	4.64 ± 0.08	0.50 ± 0.01
鶏肉	4.72 ± 0.08	0.51 ± 0.01

n = 5

3. 溶出法に関する検討

次に COOH カラムからの溶出法について検討した。現在の分別推定法では AGs 抗生物質が溶出される C 分画は 5 mL の pH 3.0 マキルベン緩衝液で溶出している。残留基準値の検出が可能である A 分画、B 分画に比べ溶出液量が多く、薬剤濃度が希釈されるために AG 系抗生物質の検出感度が低いと考えられる。そこで COOH カラムからの抽出液を 1 mL ずつのフラクションに分け、薬剤がどのフラクションに回収されるかを調べた。

pH 4.0 マキルベン緩衝液 30 mL に DSM を 10 µg 添加

し、NaOH で pH 7.0 に調整した試験溶液を COOH カラムに負荷した後、pH 3.0 マキルベン緩衝液で 1 mL ずつ計 5 つのフラクションに溶出した。各溶出液の pH を NaOH 溶液で pH 7.5 に調整した後、*B. subtilis* 検査平板を用いて作製した検量線より回収率を算出した。(図 3)

5 回繰り返し試験を行った結果、いずれの検体でも最初と 4 番目、5 番目のフラクションには薬剤の溶出が認められず、2 番目と 3 番目のフラクションに溶出された。このことから COOH カラムからの pH 3.0 マキルベン緩衝液による溶出は、最初の 1 mL を捨て次の 2 mL をとり、NaOH 溶液で pH 7.5 に調整後、試験溶液とすることとした

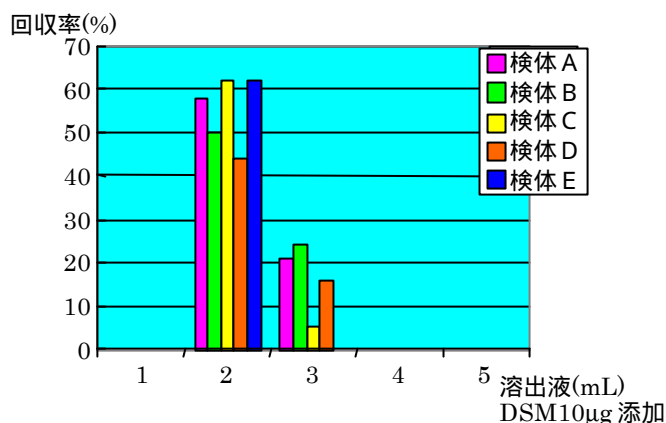


図3．COOH カラムからの DSM の溶出パターン

4. 改良分別推定法における検出感度

本法を用いて、各食肉の AGs 抗生物質に対する検出感度を検討した。その結果を表 3、4 に示した。

GM および SM の検出感度は鶏肉が 0.05 µg/g、豚肉と牛肉が 0.1 µg/g であった。DSM と NM は鶏肉および豚肉が 0.1 µg/g、牛肉が 0.05 µg/g であった。KM は鶏肉と牛肉が 0.05 µg/g、豚肉が 0.1 µg/g であった。

これらの検出感度を残留基準値と比較すると、GM の残留基準値は 0.1 µg/g であり、各食肉とも本試験法で検出可能であった。NM の残留基準値は 0.5 µg/g であり本法で検出可能であった。SM、DSM には我が国における残留基準値は設定されていないが、本法で Codex MRL の 0.6 µg/g を検出可能であった。KM の検出感度は、従来の分別推定法が 1.0 µg/g であったのに対し、本法で 0.1 µg/g と感度が 10 倍になった。

SPCM に関しては今回使用した試験菌 *B. subtilis* では標準溶液濃度で 25 µg/mL まで感受性がなく、本法では検出できなかった。

以上の結果をまとめて表 5 に改良分別推定法による AGs 抗生物質の検出感度を示した。これらの検出感度から、今回残留基準値が設定された GM および NM のスクリーニング検査法としてだけでなく、SM、DSM、KM などのスクリーニング法としても有用なものと考えられた。

表 3 . AG 系抗生物質の検出感度 (1)

薬剤	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	鶏肉	豚肉	牛肉
GM	0.25	+	+	+
	0.1	+	+	+
	0.05	+	-	-
SM	0.25	+	+	+
	0.1	+	+	+
	0.05	+	-	-
DSM	0.25	+	+	+
	0.1	+	+	+
	0.05	-	-	+

+ : 阻止円直径 12 mm 以上 - : 阻止円直径 12 mm 未満

表 4 . AG 系抗生物質の検出感度 (2)

薬剤	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	鶏肉	豚肉	牛肉
KM	0.25	+	+	+
	0.1	+	+	+
	0.05	+	-	+
NM	0.25	+	+	+
	0.1	+	+	+
	0.05	-	-	+
SPCM	0.25	-	-	-
	0.1	-	-	-
	0.05	-	-	-

+ : 阻止円直径 12 mm 以上 - : 阻止円直径 12 mm 未満

表 5 . 改良分別推定法における
AG 系抗生物質の検出感度

薬剤	濃度 ($\mu\text{g/g}$)		
	鶏肉	豚肉	牛肉
GM	0.05	0.1	0.1
SM	0.05	0.1	0.1
DSM	0.1	0.1	0.05
KM	0.05	0.1	0.05
NM	0.1	0.1	0.05
SPCM	> 25	> 25	> 25

ま と め

残留基準値が設定された AGs 抗生物質のスクリーニン

グ検査法開発を目的として分別推定法の一部改良を試みた。

COOH カラムへ負荷する抽出液の pH が 6.5 から 7.5 の間にあるとき良好な回収率が得られることがわかったため、抽出液の pH を 7.0 にして COOH カラムへ負荷することとした。

pH 3.0 マキルベン緩衝液での溶出法を検討したところ最初の 1 mL で溶出されず、次の 2 mL で溶出されることがわかったため、その 2 mL のみのフラクションを分取することとした。

本法は GM, NM の残留基準値の検出が可能であった。また SM, DSM については Codex MRL の検出が可能であり、KM については 0.1 $\mu\text{g/g}$ の検出が可能であった。

本法を用いることにより、従来の分別推定法では検出できなかった残留事例を検出することが可能になるものと推察された。

本研究の一部は日本食品衛生学会第 84 回学術講演会で発表した。

文 献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令及び食品、添加物等の規格基準の一部改正について”平成 14 年 12 月 20 日食発第 1220004 号(2002)。
- 2) 大口克志, 高原ひろみ, 松本真理子, 他: 食衛誌, **37**, 5, 1996
- 3) Guggisberg, D. and Koch, H.: *Mitt-Geb-Lebensmittelunters-Hyg*, **86**, 14-28, 1995.
- 4) Edder, P., Cominoli, A. and Corvi, C.: *J.Chromatogr. A.*, **830**, 345-351, 1999.
- 5) 神保勝彦, 門間千枝, 丸山務, 他: 食衛誌, **32**, 86-92, 1991.
- 6) 門間千枝, 神保勝彦, 丸山務, 他: 東京衛研年報, **42**, 112-117, 1991.
- 7) 門間千枝, 神保勝彦, 丸山務: 東京衛研年報 **41**, 91-94, 1990.
- 8) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長: “平成 6 年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について”平成 6 年 7 月 1 日, 衛乳第 107 号(1994)。