

## 輸入ウナギ蒲焼きから検出されたニューキノロン系合成抗菌剤について

牛山慶子\*, 井草京子\*, 神田真軌\*,  
草野友子\*, 鎌田国広\*

New quinolone series antimicrobial medicine detected of an import broiled eel

Keiko USHIYAMA\*, Kyoko IGUSA\*, Maki KANDA\*  
Tomoko KUSANO\* and Kunihiro KAMATA\*

**Keywords** : 合成抗菌剤 antimicrobial medicine, ウナギ蒲焼き broiled eel, エンロフロキサシン enrofloxacin,

### 緒言

近年, 家畜や養殖魚介類に疾病治療や予防のために様々な抗菌性物質が使用され, 畜水産食品への残留が問題となっている. 食品衛生法で「動物用医薬品の残留基準」が設定されていない食品には, 合成抗菌剤や抗生物質を含有してはならないことが定められている. 現在, 畜水産食品について27種の動物用医薬品に残留基準値が設定されている.

著者らは, 畜水産食品である食肉及び魚介類の安全性の確保を目的として残留実態調査を継続して行っている. その中で平成13年度に調査した輸入ウナギ蒲焼きから残留基準値が設定されていないニューキノロン系合成抗菌剤のエンロフロキサシンが検出されたので報告する.

### 方法

1. 試料 2001年4月から2002年3月までに, 東京都内に流通していた輸入食品で, 食品環境指導センターの食品監視班が収去した輸入ウナギ加工品 12 検体(台湾産: 1 検体, 中国産: 11 検体)を用いた. 加工品の種類は蒲焼き 10 検体, 白焼き 1 検体, 肝串 1 検体であった.

#### 2. 微生物学的方法

1) 供試菌株 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Bacillus mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides*), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M. luteus*)の3菌株を使用した.

2) 標準品, 試薬 ニューキノロン系合成抗菌剤の標準品としてオフロキサシン, ダノフロキサシン, エンロフロキサシン, オルビフロキサシンを用いた. 薬品はすべて特級品を使用した.

カートリッジカラム: Sep-pak C18カートリッジカラム(日本ウオーターズ社製), BAKER 10 SPE COOHカートリッジカラム(ベーカー社製)を使用した.

検査用平板: 「簡易検査法」に従って作製した.

3) 試験方法 「簡易検査法」, 「分別推定法」<sup>1)</sup>によって調製した試験溶液に直径10 mmのペーパーディスクを浸し, 3種類の検査用平板上に, 固着させ, 30分間冷蔵した後, 30分, 18時間培養した. 培養液平板上に形成された阻止円の直径をノギスで測定した.

4) バイオオートグラフィー 安福らの方法<sup>2)</sup>に従って, セルロースプレート(MERCK 105552)に試験溶液(分別推定法)をスポットし, 乾燥後エタノール-3%塩化アンモニウム(2:1)で展開した. 展開の後セルロースプレートを乾燥し, 角シャーレに表面を上にして貼り付けた. その後, *B. subtilis*を加えたAntibiotic Medium No.5(MERCK)を注入し凝固させた後30分以上冷蔵放置し, 30分, 18時間培養した. 培養後に0.05%INT(3-(*p*-ヨードフェニル)-2-(*p*-ニトロフェニル)-5-フェニル-2Hテトラゾリウムクロリド)溶液を寒天平板表面に流し発色させ阻止帯の位置からRf値を測定した.

#### 3. 理化学的方法

1) 標準品, 試薬 ニューキノロン系合成抗菌剤の標準品としてオフロキサシン, ダノフロキサシン, エンロフロキサシン, オルビフロキサシンを用いた.

アセトニトリルはHPLC用, その他の試薬はすべて特級品を用いた.

2) 装置 HPLC:(株)島津製作所製LC-10A, LC/MS:Finnigan MAT TSQ-7000.

3) 試料溶液の調製 ウナギ蒲焼き10 gにアセトニトリル30 mLを加え, ホモジナイズ後, 3000 rpm, 15分遠心分離し, 上清を分取した. 残さにアセトニトリル30 mLを加え, 再度ホモジナイズ後, 遠心分離し, 上清を分取し上清をあわせた. これにヘキサン60 mLを加え, 振盪し, 下層を分取し, 減圧下で溶媒留去し, 残留物をメタノールで溶解し試料溶液とした<sup>3)</sup>.

4) HPLC 測定条件 カラム:J'sphere H80-ODS, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 移動相; マキルベン緩衝液 pH 3.0

\* 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, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

85 % , アセトニトリル 15 % , 流速 1.0 mL/min , 測定 ; 励起波長 285 nm , 蛍光波長 460 nm . カラム温度 ; 40 , 注入量 : 10  $\mu$ L .

5 ) LC/MS 測定条件 ESI モード , カラム : Mighytsil RP-18 150 mm , 内径 2.0 mm , 移動相 : アセトニトリル 15 % : , 0.05 % トリフルオロ酢酸 85 % , 流速 0.2 mL/min , 注入量 : 5  $\mu$ L .

## 結果と考察

### 1 . 微生物学的試験の結果

ウナギ加工品 12 検体につき簡易検査法で試験を実施した . その結果 , 中国産ウナギ蒲焼き 1 検体から *B. subtilis* 検査用平板で 12 mm の阻止円の形成が観察され , 動物用抗菌剤の残留が示唆された . そこで , この陽性 1 検体について分別推定法で試験を行った . その結果を表 1 に示した . この検体は分画液 A に対し , *B. subtilis* と *B. mycooides* に , 分画液 B に対し *B. subtilis* が阻止円を形成した . この感受性パターンからマクロライド系 , ペニシリン系 , テトラサイクリン系 , アミノグリコシド系以外の抗菌性物質と推測された .

表 1 . エンロフロキサシン陽性検体の分別推定法による阻止円形成

分画	阻止円形成		
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. mycooides</i>
A*	+	-	+
B	+	-	-
C	-	-	-

\*A,B,Cは分別推定法<sup>1)</sup>でのそれぞれの分画

安福らの報告<sup>2)</sup>にニューキノロン系合成抗菌剤でこの検体のような感受性パターンがみられることから , この陽性検体の残留物質の確認をバイオオートグラフィーで行った . この結果 , エンロフロキサシンと同じ位置 ( Rf値 0.5 ) に阻止帯が形成された . このことから , 今回調査した輸入ウナギ蒲焼き 1 検体に残留基準値が設定されていないエンロフロキサシンの残留が推察された .

### 2 . 理化学分析の結果

微生物学的試験において陽性を示した 1 検体につき , 抗菌性物質の同定 , 定量を目的として HPLC 及び LC/MS による分析を行った . 今回 , 試料溶液の調製およびエンロフロキサシンの HPLC 測定条件は , 著者らが鶏肉での分析に用いた方法で行った<sup>3)</sup> . 図 1 にエンロフロキサシン標準ならびに陽性検体の , 陰性検体 HPLC クロマトグラムを示した . 陽性検体のクロマトグラム上にエンロフロキサシン標準品の保持時間と一致する位置にピークが認められた . なお , 図 1 に微生物学的試験で陰性であったウナギ蒲焼き検体のクロマトグラムを示したが , クロマトグラム上にエンロフロキサシンのピークは認められなかった .

今回 , 検出器に蛍光検出器を用い , エンロフロキサシンに特異的な測定波長を設定しているにも関わらず , ウナギ蒲焼き検体の場合 , クロマトグラム上に多くの妨害

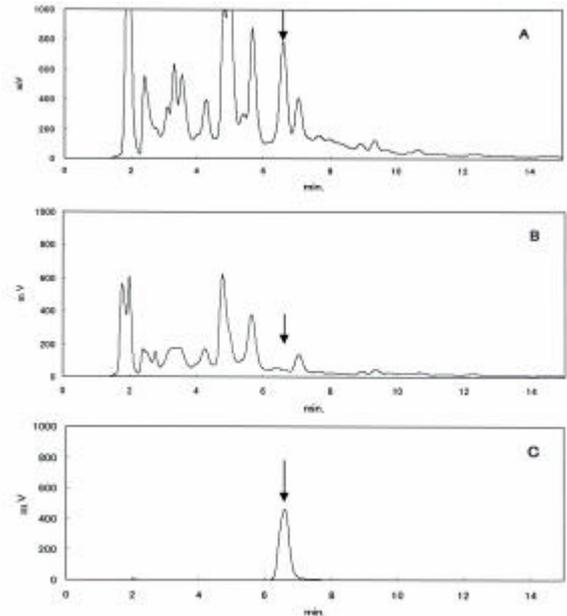


図 1 . 輸入ウナギ蒲焼きおよびエンロフロキサシン標準溶液の HPLC クロマトグラム

A : 微生物学的検査陽性検体

B : 微生物学的検査陰性検体

C : エンロフロキサシン標準物質 0.50  $\mu$ g/mL

矢印はエンロフロキサシンの保持時間

ピークが認められた . これは加熱調理 , たれ等の影響によるものと考えられる . そこで , エンロフロキサシンをより正確に確認するために LC/MS による同定を行った . その結果 , 図 2 に示すようにエンロフロキサシン標準と残留物質は SIM クロマトグラム ( $m/z$  360,  $[M + H]^+$ ) の保持時間及びマススペクトルが一致したことから , 残留物質はエンロフロキサシンと同定した . なお , 検体の MS スペクトルの  $m/z$  182.9 に大きなフラグメントが見られるが , これはウナギ蒲焼き由来の夾雑物の影響によるものであった .

HPLC を用い , エンロフロキサシンの定量を行った結果 , 定量値は 0.11 ppm であった .

## ま と め

輸入ウナギ蒲焼き 12 検体について動物用抗菌剤の調査を行った結果 , 1 検体から食品衛生法で残留基準値が設定されていないエンロフロキサシン 0.11 ppm を検出した .

今回の検出事例は , 微生物学的試験でスクリーニングを行い , 抗菌性物質が検出されたことから理化学試験を実施し , HPLC 及び LC/MS でエンロフロキサシンの確認ならびに定量を行った . 畜水産物中の抗菌性物質検査では , 微生物学的試験と理化学的試験を組み合わせることで , 迅速且つ効率的な試験が行えると考える .

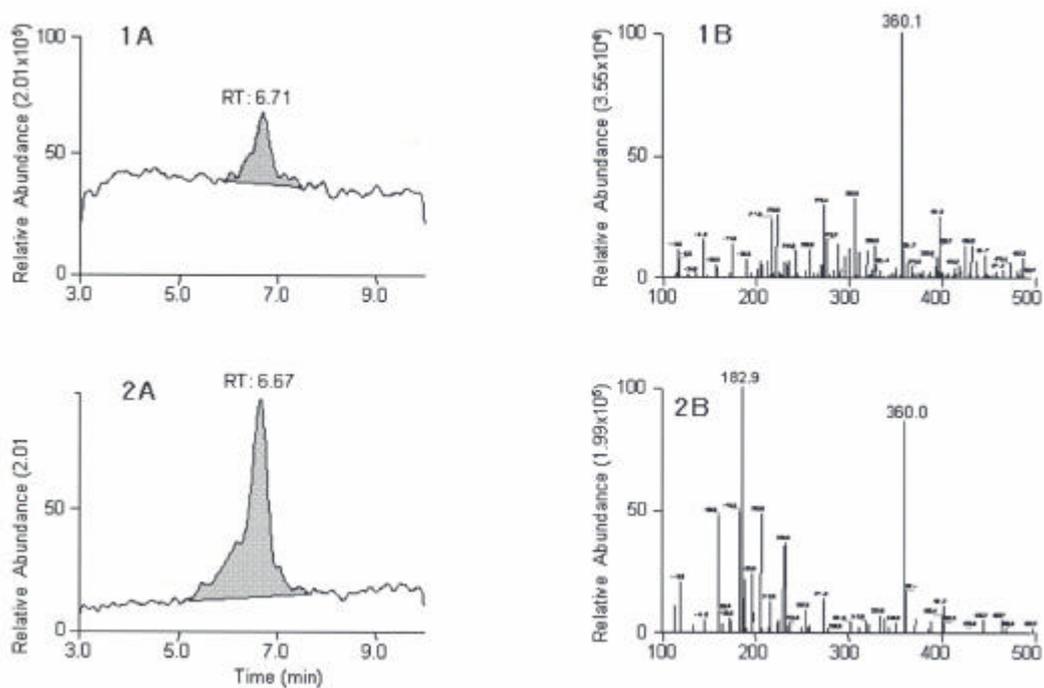


図 2 . エンロフロキサシン標準溶液、陽性検体の LC/MS-SIM クロマトグラムおよび MS スペクトル

- 1 : エンロフロキサシン標準溶液 1.0  $\mu\text{g/mL}$   
 2 : バイオアッセイ陽性検体  
 A : SIM クロマトグラム ( $m/z$  360,  $[\text{M}^+ \text{H}]^+$ )  
 B : ピークの MS スペクトラム

#### 文 献

- 1) 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, 衛乳第 107 号 (1994)
- 2) 安福 潔 他: 日獣会誌, 51, 100-104 (1998)
- 3) 牛山慶子, 井草京子, 堀井昭三, 宮崎奉之: 日本食品衛生学会第 76 回学術講演会講演要旨集, 31 (1998)