畜水産食品中残留動物用抗菌剤の検査に用いる分析法の開発

神田　真軌[a]

健康安全研究センターでは，畜水産食品中に残留する動物用抗菌剤について，適否判定に必要な結果を確実に得るため，バイオアッセイと液体クロマトグラフタンデム型質量分析（LC-MS/MS）を用いてスクリーニングと同定・定量を行っている．本稿では，検査の概要，検出事例及び同一試験溶液をバイオアッセイによるスクリーニングと LC-MS/MS による確認・定量の双方に用いる 3 つの連結法を概説する．開発法Iでは多系統抗菌剤の一斉分析法として，2 種の抽出溶媒と固相精製を組み合わせて試験溶液を調製した．妥当性評価，内部品質管理及び技能試験等の性能評価により，行政検査への適用性を確認した．さらに同一試験溶液をバイオアッセイにも適用するため，感度向上と擬陽性低減を目的に条件を再検討し，対象 33 剤について残留基準値相当濃度での検出を可能とした．開発法IIではサルファ剤 10 剤及びキノロン剤 11 剤の計 21 剤，開発法IIIではアミノグリコシド系抗生物質 12 剤を対象に，新たなバイオアッセイ試験平板及び前処理条件を導入し，バイオアッセイでの検出と検出試料に対する LC-MS/MS 測定による薬剤の同定・定量を可能とした．これらの方法により，検出試料のみを追加前処理なしに LC-MS/MS で確認・定量できる検査体系を構築し，検査の迅速化，結果の信頼性向上，試薬使用量や廃液量の削減に資することを示した．本連結法は，網羅性，定量性及びグリーン分析化学を両立する有用な残留検査法である．

キーワード：動物用抗菌剤，畜水産食品，残留検査，バイオアッセイ，LC-MS/MS，連結法，グリーン分析化学

は　じ　め　に

動物用抗菌剤（抗生物質及び合成抗菌剤）は，家畜，養殖水産動物及び養蜂において，感染症の治療，発生予防又はまん延防止を目的として使用されており，動物の健康保持及び畜水産食品の安定供給に重要な役割を担っている．これらの薬剤は，注射，飲水，飼料添加等により投与され，医薬品医療機器等法，農林水産省令，飼料安全法等に基づく使用基準及び休薬期間の遵守により，食品中の残留が基準値以下となるよう管理されている．一方で，休薬期間の不遵守や過剰投与，対象外動物への使用に加え，飼料調製又は投与過程における交差汚染等により，予期しない残留が生じる可能性がある．残留により薬剤によってはアレルギー誘発，発がん性，生体機能への影響等が懸念されることから，食品を介した曝露を適切に管理する必要がある[1–3]．また，動物分野における抗菌剤の使用は，薬剤耐性（AMR）対策の観点からも重要な課題であり，ワンヘルスの考え方に基づく適正使用及び慎重使用が求められている[4–8]．我が国では，食品衛生法に基づくポジティブリスト制度の下，食品中に残留する農薬，飼料添加物及び動物用医薬品について残留基準値等が設定され，基準値を超えて残留する食品の販売等は認められていない．このため，畜水産食品中の動物用抗菌剤残留を的確に把握し，法令に基づく適否判定に資する検査は，食品衛生行政上，重要な位置を占めている．

健康安全研究センターでは，1980 年代以降，畜水産食品中に残留する動物用抗菌剤について，行政検査に適用可能な試験法の整備及び改良に継続して取り組んできた[9–28]．代表的な薬剤を Table 1 に示す．動物用抗菌剤は，化学的性質，対象食品，残留基準値及び検査目的が多岐にわたるため，行政検査においては，限られた時間内に残留の有無を網羅的に把握するとともに，バイオアッセイにおいて陽性又は擬陽性を示した試料では，薬剤の確実な同定・定量が求められる．バイオアッセイは，抗菌活性を指標として，対象外薬剤を含む広範な抗菌性物質を検出し得る利点を有するが，薬剤の同定及び定量には機器分析による確認が不可欠である．これに対し，液体クロマトグラフタンデム型質量分析計（LC-MS/MS）は選択性及び定量性に優れるものの，測定対象はあらかじめ設定された薬剤に限られ，食品由来成分の影響を受ける場合がある．したがって，両者の特長を生かし，両方を用いた検査体系の構築は，検査の迅速性，信頼性及び効率性を向上するうえで有用である．

本稿では，検査の概要及び検出事例を示すとともに，同一前処理で得られた試験溶液をバイオアッセイによるスクリーニングと LC-MS/MS による確認・定量の双方に用いる 3 つの連結法を概説する（Fig. 1）．具体的には，多系統抗菌剤を対象とする開発法I，サルファ剤・キノロン剤計 21 剤を対象とする開発法II，及びアミノグリコシド（AG）系抗生物質 12 剤を対象とする開発法IIIを取り上げる．これらの開発における技術的工夫，性能評価及び行政検査への適用性を整理し，残留動物用抗菌剤検査における連結法を活用した効率的な体制構築の考え方を紹介する．

動物用抗菌剤の検査に関する概要

1. 食品衛生法による規制

動物用抗菌剤は，流通段階では食品衛生法により規制されている．2006 年のポジティブリスト制度施行に伴い，

[a] 東京都健康安全研究センター食品化学部食品添加物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

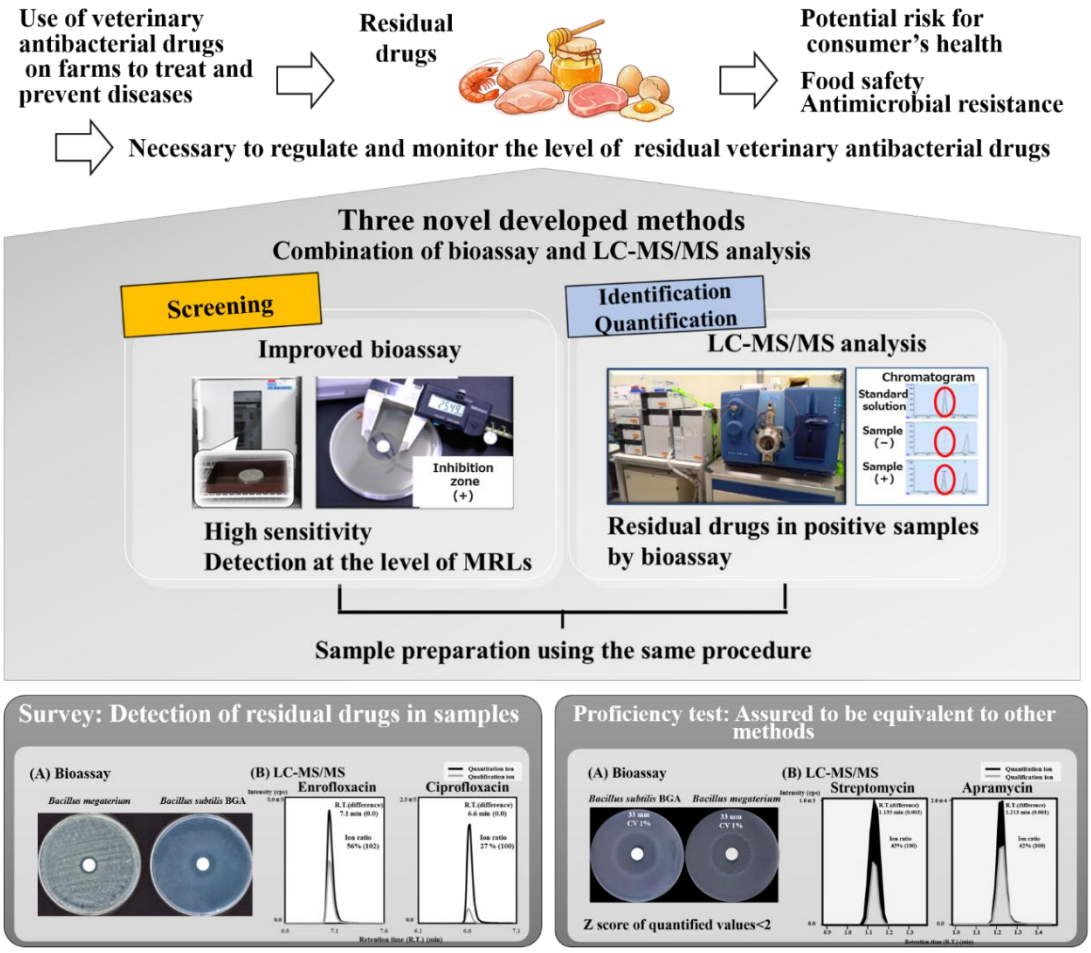


Fig. 1. Overview of the development of a bioassay (for screening) and LC-MS/MS (for confirming) for analysing veterinary antibacterial drug residues in livestock and fishery products

健康影響評価に基づき，1 日摂取許容量（ADI）及び食品摂取量等を踏まえて，食品ごとに残留基準値が設定されている[29–31]．残留基準値が設定されていない農薬等については一律基準（0.01 ppm）が適用されるが，抗菌性物質については，薬剤耐性（AMR）対策の観点も踏まえ，「食品中に含有してはならない」とする，いわゆるゼロ規制が適用される[32]．

2. 検査の進め方

当センターでは，畜水産物における薬剤の使用実態及び食品ごとの残留基準値等を踏まえ，検査対象薬剤を食品ごとに設定している．対象食品は，都内に流通する食肉，養殖魚介類，鶏卵，乳及びはちみつである．検査では，対象部位を切り分けて均一化後，一定量を秤量して試料とする．

検査は，Fig. 2 に示すように二段階で実施する．第一段階では，対象食品中における残留の有無を確認するため，スクリーニングを行う．スクリーニングでは，食品の円滑な流通を妨げることなく，残留の有無を迅速かつ確実に判定することが求められる．残留が認められた場合には，第二段階として，高精度な分析法により当該薬剤を正確に同定し，定量する．得られた定量値を残留基準値と照合し，食品衛生法に基づく適否判定を行う．

Table 1. Veterinary antimicrobial drugs

Classes	Target Analytes
Tetracyclines	Chlortetracycline, Doxycycline, Oxytetracycline, Tetracycline
Penicillins	Ampicillin, Benzylpenicillin, Cloxacillin, Dicloxacillin, Nafcillin, Oxacillin, Phenoxymethylpenicillin
Cephalosporins	Cefalexin, Cefalonium, Cefapirin, Cefazolin, Cefoperazone, Cefquinome, Ceftiofur, Cefuroxime
Carbapenem	Biapenem, Doripenem, Ertapenem, Imipenem, Meropenem
Macrolides	Erythromycin A, Josamycin, Mirosamicin, Oleandomycin, Spiramycin, Tilmicosin, Tylosin,
Lincosamides	Lincomycin, Pirlimycin
Aminoglycosides	Amikacin, Apramycin, Dihydrostreptomycin, Gentamicin, Hygromycin B, Kanamycin, Neomycin, Netilmicin, Paromomycin, Ribostamycin, Sisomicin、Spectinomycin, Streptomycin, Tobramycin
Quinolones	Flumequine, Nalidixic acid, Oxolinic acid Ciprofloxacin, Danofloxacin, Difloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Orbifloxacin, Sarafloxacin
Sulfonamides	Sulfadiazine, Sulfadimethoxine, Sulfadimidine, Sulfadoxine, Sulfamerazine, Sulfamethoxazole, Sulfamonomethoxine, Sulfaquinoxaline, Sulfathiazole, Sulfisozole

3. 検査に用いる試験法

この二段階の検査を実施するため，当センターではバイオアッセイ及び機器分析を薬剤の性質や検査目的に応じて組み合わせている．食品中に残留する薬剤は微量であるため，測定には前処理工程が必要である．まず，目的薬剤の性質に応じた抽出溶液を食品に加え，薬剤を溶液中へ抽出する．続いて，液液分配やカラムクロマトグラフィー等により，抽出溶液中の測定妨害成分を分離・精製する．必要に応じて，溶媒を留去後，少量の溶液に再溶解することにより，測定溶液中の薬剤を濃縮し，または測定に適した溶液へ置換する．対象薬剤は多様な化学的特性を有することから，当センターでは，類似の性質を有する薬剤群ごとに，数十種類の薬剤を一斉に分析できる試験法を開発している[12,17–20]．そのうち 2 法 [12,17,18]を第一段階のスクリーニング検査に適用し（Fig. 3），一斉分析に適さない薬剤については，個別試験法を用いている．

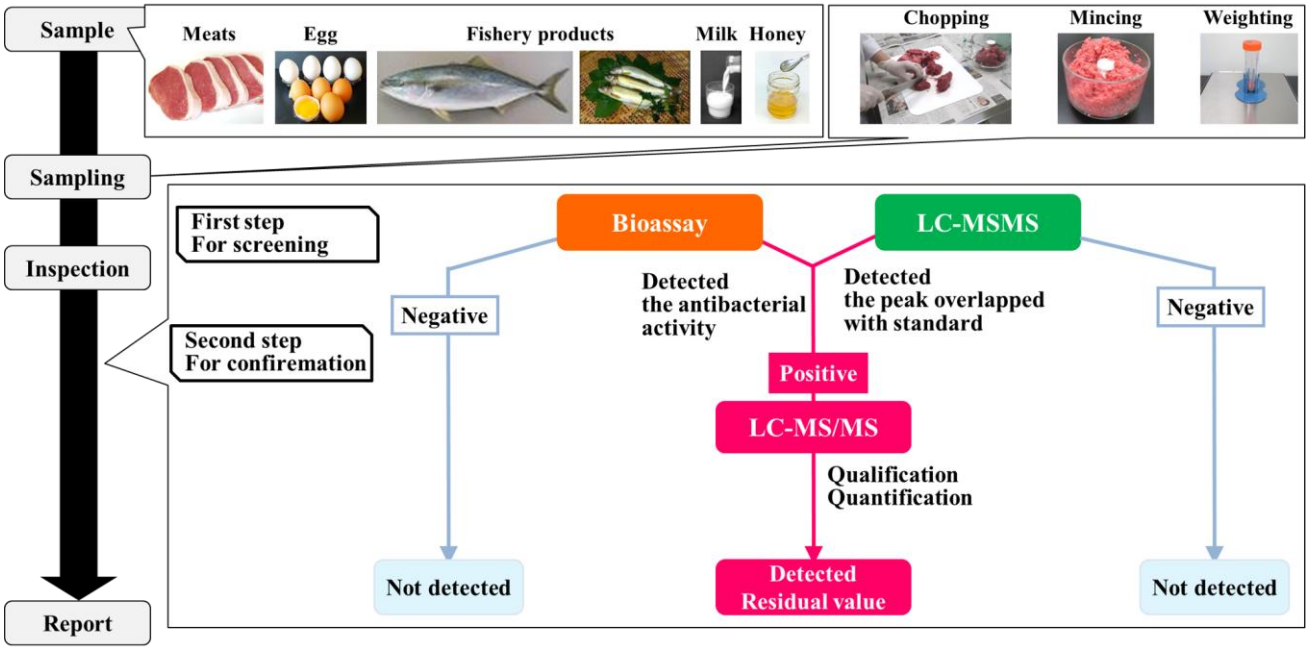


Fig. 2. Inspection procedure for veterinary antibacterial drugs in livestock and fishery products at Tokyo Metropolitan Institute of Public Health (Reproduced with permission from YAKUGAKU ZASSHI, **145(2)**, 109–115 [28])
Copyright 2025 The Pharmaceutical Society of Japan)

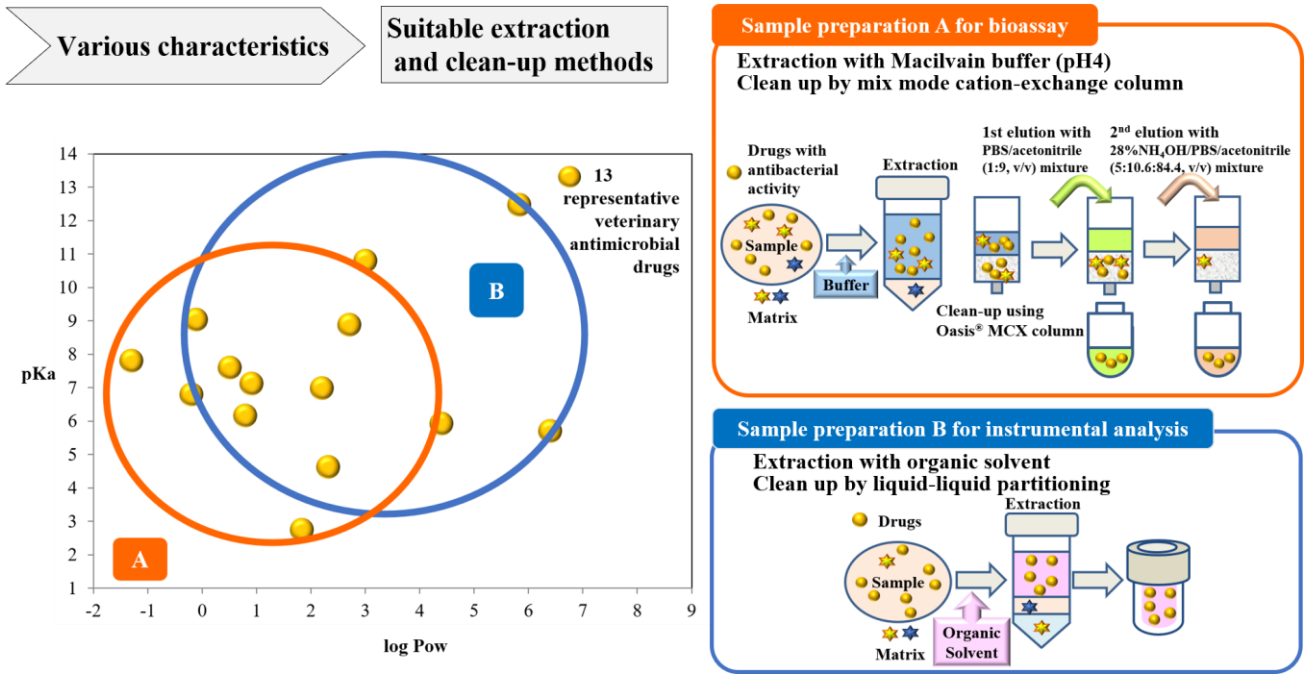


Fig. 3. Characteristics of veterinary antibacterial drugs and sample-preparation conditions for multiple-residue analytical methods

前処理工程で得られた試験溶液を測定する方法の一つに，薬剤の抗菌活性，すなわち微生物の生育抑制作用を利用するバイオアッセイがある[9-14]（Fig. 4）．試験平板（微生物を混釈して固化した培地）上に試験溶液を含ませたペーパーディスクを置き，培養後，阻止円が認められた場合，抗菌活性を有する物質が含まれると推定する．バイオアッセイは，複数検体について抗菌性物質の有無を目視で判定でき，阻止円の大きさから残留濃度を半定量できる．さらに，感受性パターンの異なる試験菌を用い，薬剤系統を一定程度推定できる簡便な方法である．行政検査では，ペニシリン（PC）系，テトラサイクリン（TC）系，マクロライド（ML）系，AG 系抗生物質及びキノロン剤の 5 系統について，バイオアッセイを用いたスクリーニングを行っている．これに対し，抗菌活性を有しない薬剤やバイオアッセイでは残留基準値相当濃度の検出が困難な薬剤については，HPLC-蛍光検出器（FL），LC-MS/MS 等を用いた理化学的試験を行っている．また，バイオアッセイで検出された抗菌性物質についても，同様に理化学的試験により同定・定量を行っている．薬剤の検出は，高感度かつ高選択性を有する MS/MS 検出が主流である．標準品の保持時間及び検出イオンを比較することにより薬剤同定が容易である．しかしながら，測定対象は設定した目的物質に限られ，標準品の調製が必要である．また，特に定量において食品由来成分の影響を受けやすいという課題がある．多系統の動物用抗菌剤を迅速かつ安定的に検査するには，バイオアッセイと機器分析の特長を踏まえた両者の効率的な活用が重要である．次章に，バイオアッセイの有用性と確認分析の重要性を示す事例を示す．

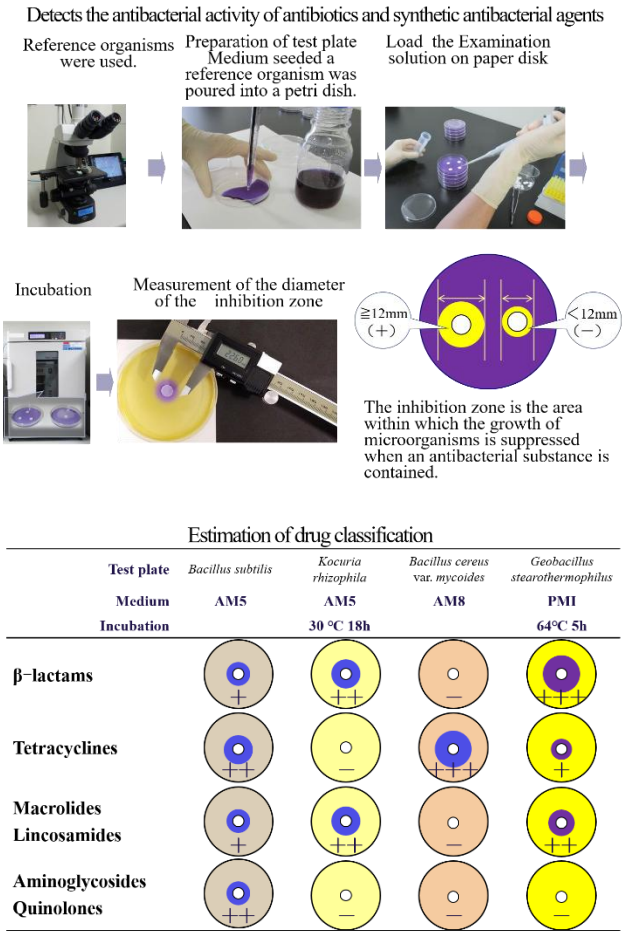


Fig. 4. Bioassay procedures (Reproduced with permission from YAKUGAKU ZASSHI, **145(2)**, 109–115 [28]. Copyright 2025 The Pharmaceutical Society of Japan)

4. バイオアッセイによる検出事例

TC 系抗生物質は，畜水産現場で広く使用される薬剤であり，国内外で残留事例が報告されている．当センターでも，エビ及びブリ等よりオキシテトラサイクリン，鶏肉及び豚肉よりクロルテトラサイクリン並びにドキシサイクリン等を検出してきた[13,19,34,35]．これまで残留事例のなかった鶏卵からドキシサイクリンを検出した令和 4 年度の事例[35]より，行政検査における確認体制を示す（Fig. 5）．

本事例では，まずバイオアッセイによるスクリーニングを実施した．前処理は，逆相－強陽イオン交換カラム（MCX カラム）を用いて薬剤を物性別に分画し，得られた各試験溶液を複数の試験平板に適用することにより薬剤系統を推定する（MCX 法）[12]．鶏卵試料では，分画 2 の *Bacillus cereus var. mycoides* 平板に 16 mm の阻止円を検出し，TC 系抗生物質の残留を推定した．同一試験溶液を HPLC-FL で測定したところ，対象とした TC 系抗生物質 4 剤のピークを検出しなかった．鶏卵から抗生物質が検出される事例は稀であることから，結果の妥当性を確認するため，複数の観点から検証を行った．まず，再試験として，バイオアッセイを再度実施し，同様の結果を確認した．

続いて，TC 系抗生物質の溶液中での不安定性を考慮し，再前処理後速やかに HPLC-FL 測定を行った．その際，移動相組成及び蛍光検出条件の調整により感度を向上させた結果，ドキシサイクリンと保持時間が一致するピークを確認した．次いで，前処理工程の異なる LC-MS/MS による抗生物質一斉分析法[19]により，ドキシサイクリン 0.01 μg/g の残留を確認・定量した（Fig. 5）．併せて，内部品質管理，他機種の LC-MS/MS による測定及び同一ロット別包装品の測定結果から，結果の信頼性を担保した．これらの結果から，「食品中に含有してはならない」に該当するとして，食品衛生法違反と判定された．

このように，バイオアッセイは測定対象を限定せず，抗菌活性を指標として想定外又は検査対象外の薬剤を含む多様な残留を把握できる．当センターでは，この特長を活用し，ウナギかば焼き中のエンロフロキサシン[36]，はちみつ中のノルフロキサシン[15]等の検出につなげ，畜水産食品における残留実態の把握に役立ててきた[34,35]．

さらに，検出後には，法令に基づく判定に資するため，速やかに薬剤を同定・定量する必要がある．これらの事例は，バイオアッセイで得られた同一試験溶液を機器分析でも測定可能な連結法開発の重要性を示している．

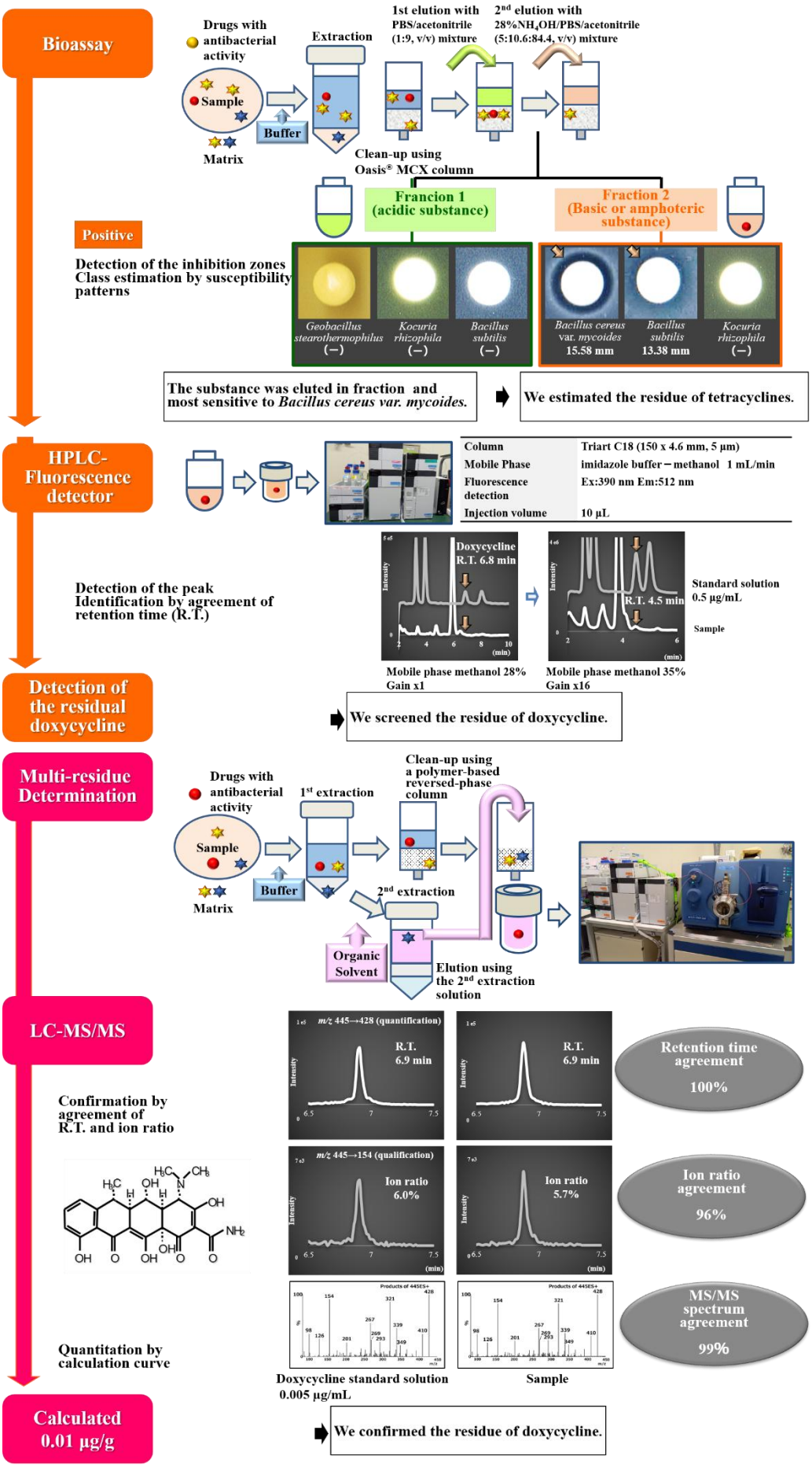


Fig. 5. Detection and confirmation of residual doxycycline in eggs using multiple analytical methods based on different principles

バイオアッセイ・LC-MS/MS 連結法の開発

前項で述べたように，バイオアッセイは，あらかじめ測定対象として設定していない薬剤を含め，抗菌活性を有する物質を広く検出できる点に大きな利点がある．特に，残留基準値が設定されていない抗菌性物質については，「食品中に含有してはならない」とされていることからも[32]，抗菌活性の有無を直接確認できるバイオアッセイは，行政検査におけるスクリーニング法として有用である．また，多検体を簡便に処理でき，試薬使用量や廃液量の抑制にもつながるため，近年食品分析でも重視される分析法の環境調和性，すなわちグリーン分析化学の観点からも利点を有する[37-39]．一方で，薬剤によっては残留基準値相当濃度での検出感度が不足する場合があり，前処理試薬や食品由来成分に起因する擬陽性も課題となる．さらに，薬剤系統の推定には限界があり，最終的な同定・定量には LC-MS/MS 等の機器分析が必要である．しかし従来は，バイオアッセイと機器分析で別々の前処理を要し，検査工程の煩雑化，結果判定の遅延，検査に供する試料量及び試薬使用量が多くなることといった問題があった．加えて，薬剤が不安定な場合には，再前処理や再測定が困難となった．これらを解決するため，バイオアッセイの測定条件を改良するとともに，前処理で得られた同一試験溶液を，バイオアッセイによるスクリーニングと LC-MS/MS による確認・定量の双方に適用できる連結法の開発に取り組んできた（Fig. 1）．

1. LC-MS/MS による一斉分析法開発とバイオアッセイへの適用（開発法I）

動物用抗菌剤のうち親水性が高い薬剤は，MS/MS 測定において食品由来夾雑成分の影響を受けやすい．このため，既存の合成抗菌剤一斉分析法[17, 18]をそのまま適用しても，十分な精度を確保することは困難であった．そこで，検出頻度の高いニューキノロン剤及び TC 系抗生物質に，ML 系及びリンコサミド系抗生物質を加えた計 37 薬剤を対象として，LC-MS/MS による多系統一斉分析法を確立した[19]．本法では，極性の異なる 2 種類の抽出溶媒を用いて段階的に対象薬剤を抽出した．すなわち，親水性薬剤を EDTA-2Na 含有 McIlvaine 緩衝液で抽出し，続いて中程度の親水性を示す薬剤を 0.1%ギ酸含有アセトニトリルで抽出した．さらに，単一のポリマー系固相抽出カラムを用い，1 回目抽出溶液中の薬剤を保持させた後，2 回目抽出溶液を同カラムに通液することで，保持された薬剤を溶出させるとともに食品由来成分をカラムに保持させ，マトリックス効果を低減した（Fig. 6）．畜水産食品 10 試料における妥当性評価では，評価項目の 98%がガイドラインの基準を満たした．また，技能試験試料による評価でも，他機関の平均値に対する Z スコアは 2 以内であり，同等の分析能を有することを確認した．本法は，このように信頼性を確認したうえで，TC 系抗生物質の確認・定量等に実装している．

次に，一斉分析法で得られた試験溶液をバイオアッセイによるスクリーニングにも適用するため，検出感度の向上と擬陽性の低減を目的に条件を検討した[22]．まず，吸水量の大きいディスクで試験溶液の負荷量を増やすとともに，界面活性剤（TWEEN®80）処理により薬剤の試験平板内での拡散性を高めた．さらに，培地量及び菌液濃度を調整し，残留基準値相当濃度でのスクリーニングに必要な感度を確保した．加えて，前処理試薬又は食品由来成分による擬陽性を抑制するため，薬剤の回収率を維持しつつ，抽出溶液の組成及び最終試験溶液への置換条件を見直した．薬剤が残留していない豚筋肉由来の試験溶液を用いた検証により，1 回目抽出に用いる McIlvaine 緩衝液の pH 及び EDTA 濃度，並びに 2 回目抽出溶液中のギ酸が，*Geobacillus stearothermophilus* 平板での阻止円形成に関与することを見出した．この結果に基づき，1 回目抽出溶液の pH を 6 に調整して EDTA 濃度を低減し，2 回目抽出溶液をアセトニトリルに変更した．加えて，各試験平板の培地量及び培養条件（温度・時間）を再調整し，食品由来成分による擬陽性を抑えた，より堅牢な条件へ改善した（Table 2）．

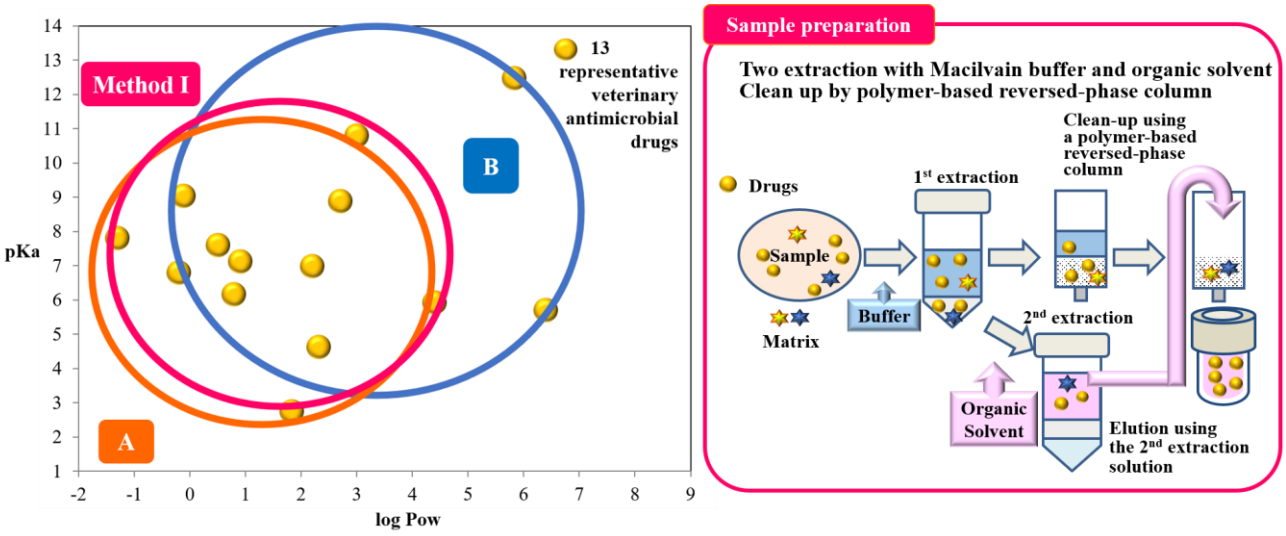


Fig. 6. Schematic of sample preparation for Method I

Table 2. Improvement of screening specificity in Method I

Sample	n[a]	Number of false-positive samples		Number of positive samples	
		The previous method	The developed method I	The previous method	The developed method I
Bovine muscle	13	3	0	0	0
Swine muscle	35	2	0	0	3[b]
Chicken muscle	29	1	0	0	1[c]
Fishly products	8	1	0	0	1[d]
Honey	15	4	0	0	0

a number of samples
b Lincomycin residues were detected 3 samples
c Cefquinome residue was detected 1 sample
d Oxytetracycline residue was detected in 1 sample

本法の性能確認では，豚筋肉に対象 33 剤を残留基準値相当濃度で添加し，基準値が設定されていない薬剤については一律基準等を参考に評価した．3 併行で一定以上の阻止円を形成し，陰性判定を生じないことを指標として，スクリーニング法としての検出可能性及び検出限界を評価した．その結果，MCX 法と同等の検出限界を示す PC 系薬剤に加え，従来検出が困難であったニューキノロン系，リンコサミド系及びセフェム系薬剤についても，残留基準値相当濃度での検出が可能となった．また，LC-MS/MS 測定では，マトリックス検量線等を用いることで良好な直線性が得られ，回収率及び併行精度も概ね良好であり，既報と同等の定量性能を確保した．さらに，LC-MS/MS の定量下限はバイオアッセイの検出限界より低く設定できたことから，阻止円を示した試料について，同一試験溶液を用いて迅速に同定・定量できることを確認した．実態調査への適用では，バイオアッセイで阻止円を認めた豚筋肉の試験溶液から，LC-MS/MS 測定によりリンコマイシンに相当するピークを検出した（Fig. 7）．以上より，本法は，多系統抗菌剤のスクリーニングと確認・定量を同一試験溶液で連結できる，行政検査に適用可能な方法であることを示した．

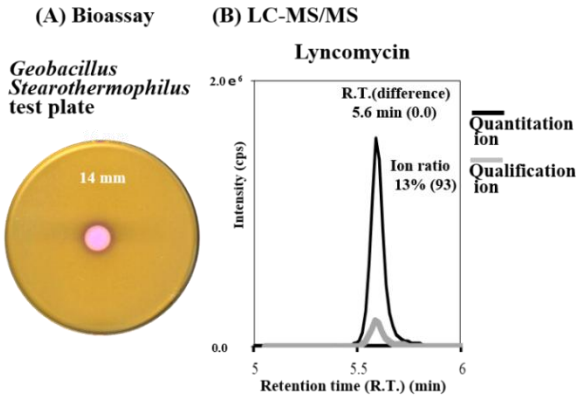


Fig. 7. Determination of lincomycin residues in swine muscle

2. 畜水産食品中サルファ剤及びキノロン剤（開発法II）

サルファ剤及びキノロン剤は畜産現場で使用頻度が高く，類似構造を有する薬剤も多いため，食品中残留を網羅的にモニタリングする必要がある．このため，バイオアッセイの適用を試みてきたが，現行法で用いる 4 種の試験菌に対する抗菌活性が十分でない薬剤があり，開発法Iを適用しても，残留基準値相当濃度での検出は困難であった．そこで，サルファ剤 10 剤及びキノロン剤 11 剤を対象に，高感度に検出可能なバイオアッセイ測定条件を開発するとともに，同一試験溶液を LC-MS/MS 測定にも適用可能とする前処理工程を検討した [7,27]．

バイオアッセイ条件では，サルファ剤に対して現行法で使用していなかった *Bacillus megaterium*[40]を用いる画線法平板を導入し，培養温度を 45°C とすることで，検出感度を現行法の約 100 倍に向上させた．また，キノロン剤では，金属量の少ない培地に *Bacillus subtilis* BGA を混釈した平板を用いることで，感度が現行法に比べて 2–5 倍向上した．これらの条件により，対象 21 剤の検出限界は 0.25–0.5 µg/mL であった．2 種の新試験平板はいずれも試行数 60 で統計学的管理限界値内にあり，日常検査に必要な測定精度を安定して確保できることを確認した（Table 3）．

試験溶液の調製では，食品由来成分及び前処理試薬の影響を抑えつつ，バイオアッセイと LC-MS/MS 測定の双方に適用できる条件を検討した．開発法Iの前処理条件では *Bacillus subtilis* BGA 平板に擬陽性を生じたため，MCX 法を基礎に前処理条件を改良した．30 mL の抽出溶液で 2 回抽出することにより回収率を高めた．さらに，MCX カラムからの溶出溶液について，バイオアッセイで擬陽性を示さず，かつ LC-MS/MS 測定にも支障を与えない組成を検討した．その結果，不溶性塩を含まず，対象薬剤の回収率も十分であったトリエチルアミン・メタノール・水（0.5:75:24.5）混液を溶出溶液として選択した（Fig. 8）．

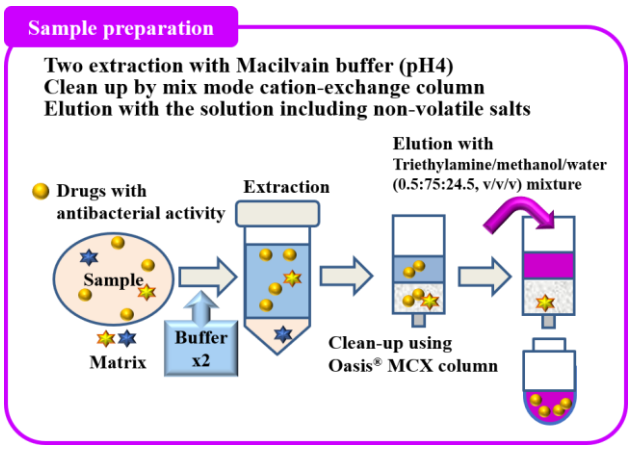
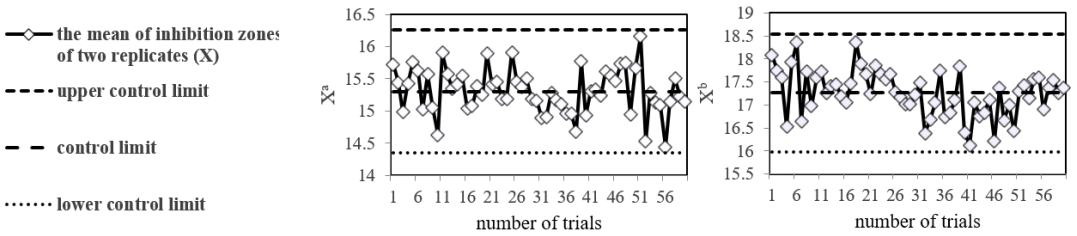


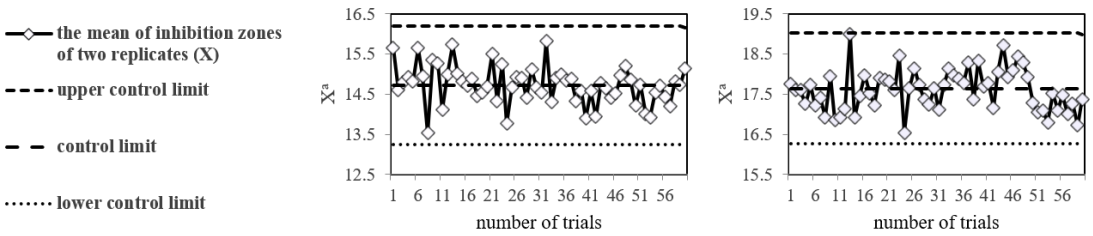
Fig. 8. Schematic of sample preparation for Method II

Table 3. Bioassay conditions for Method II

	The previous method	The developed method II	
Reference organisms	*Bacillus subtilis* BGA	*Bacillus megaterium*	*Bacillus subtilis* BGA
Characteristics of the culture medium	Antibiotic medium 5	Mueller hinton agar including trimethoprim	Lab-lemco agar with low levels of metal impurities
Plate preparation	Spore suspension was seeded in the medium.	Spore suspension was spread on this plate.	Spore suspension was seeded in the medium.
Paper disk	Non preparation	Preparation with Tween® 80	Preparation with Tween® 80
Volume of sample solution	75 µL	100 µL	150 µL
Diameter of the inhibition zone at 0.5 µg/mL sulfamethoxazole	N.D.	20 mm	N.D.
Diameter of the inhibition zone at 0.5 µg/mL enrofloxacin	17 mm	15 mm	28 mm
Quality control			

a diameter of the inhibition zone at 0.5 µg/mL enrofloxacin
b diameter of the inhibition zone at 0.1 µg/mL enrofloxacin
(Reproduced in part from annual report of Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, 72, 43–55 [27]. Copyright 2021 Tokyo Metropolitan Institute of Public Health)

Table 4. Bioassay conditions for Method III

	The previous method	The developed method III	
Reference organisms	*Bacillus subtilis* BGA	*Bacillus megaterium*	*Bacillus subtilis* BGA
Characteristics of the culture medium	Antibiotic medium 5	Lab-lemco agar with low levels of metal impurities	Lab-lemco agar with low levels of metal impurities
Plate preparation	Spore suspension was seeded in the medium.	Spore suspension was seeded in the medium.	Spore suspension was seeded in the medium.
Paper disk	Non preparation	Preparation with Tween® 80	Preparation with Tween® 80
Volume and pH of sample solution	75 µL, 7.5	150 µL, 8.5	150 µL, 8.5
Diameter of the inhibition zone at 0.5 µg/mL streptomycin	17 mm	24 mm	28 mm
Quality control			

a: diameter of the inhibition zone at 0.1 µg/mL enrofloxacin

本法を鶏筋肉，鶏卵及びエビで評価したところ，いずれの試料でもバイオアッセイによる擬陽性は認められず，LC-MS/MS 測定においても定量を妨げるピーク等は認められなかった．バイオアッセイでは 5–25 µg/kg で対象薬剤を検出でき，LC-MS/MS の定量下限は 0.1–1 µg/kg で，バイオアッセイの検出限界より低く設定できたことから，阻止円を示した試料を同一試験溶液により迅速に同定・定量できることを確認した．妥当性評価では 21 剤中 18 剤がガイドライン基準を満たし，内部品質管理では 28 回中 Z スコアが 2 を超えたのは 1 回のみであった．技能試験試料（鶏筋肉，付与値スルファジミジン 150 µg/kg）でも Z スコアは 2 以内であり，他法と同等の分析能を有することを確認した．実態調査では 93 試料中，鶏筋肉 2 試料で阻止円を認め，LC-MS/MS によりエンロフロキサシン及びシプロフロキサシンと同定したが，いずれも残留値は基準以内であった．

以上より，本法はサルファ剤及びキノロン剤の高感度なスクリーニングと確認・定量を同一試験溶液で連結できる，実用性の高い方法であることを示した．

3. はちみつ中 AG 系抗生物質（開発法III）

AG 系抗生物質は，養蜂での使用は認められていないが，2002 年にはちみつからストレプトマイシン（SM）及びジヒドロストレプトマイシンが検出され，当センターでもバイオアッセイによる検査（SM 法）を実施してきた [11]．しかし，AG 系抗生物質十数種類を網羅的にスクリーニングするには，薬剤間で検出感度が大きく異なり，物性差により同時前処理も困難であったため，対象は 2 剤に限られていた．また，pH 試験紙による調整は再現性と操作性に課題があった．さらに AG 系抗生物質は高親水性かつ高塩基性であることから，逆相カラムでの保持が弱く，精製カラムや分析カラムの選定が難しい．食品由来成分による影響も受けやすく，LC-MS/MS による同定・定量には，イオンペア試薬や精製等の条件検討を要することが報告されている [41]．そこで，AG 系抗生物質 12 剤を高感度に検出可能なバイオアッセイ条件及び LC-MS/MS による確認・定量条件を検討した．さらに，抽出から溶出及び最終 pH 調整までの前処理条件を最適化し，両測定に適用可能な試験溶液調製のための前処理工程を構築した [8]．

バイオアッセイ条件では，新規試験菌株を含む 3 菌株，2 種類の培地及び平板作成方法等を組み合わせた 8 条件を比較し，*Bacillus megaterium* 又は *Bacillus subtilis* BGA を金属量の少ない培地に混釈した 2 平板を採用した．また，分子型で抗菌活性が高いことを踏まえ，最終試験溶液の pH を 7.5 から 8.5 に変更した．分子型比率の増加及び培地中金属との相互作用抑制により，現行法に比べ感度は 20–50 倍向上し，12 剤の検出限界は 0.0025–0.1 µg/mL であった．2 種の新試験平板はいずれも試行数 50 で統計学的管理限界値内にあり，測定精度を安定して確保できることを確認した（Table 4）．

試験溶液の調製では，SM 法を基礎に，弱陽イオン交換カラムの溶出溶液を 1%ギ酸含有 0.2 mol/L ギ酸アンモニウム溶液へ変更し，陽性時に同一試験溶液を LC-MS/MS 測定に供する構成とした．また，5 種類の弱陽イオン交換カラムを，溶出溶液の種類及び量を一定とした条件で比較し，ゲンタマイシン等でも十分な回収率が得られる，イオン交換能の高い InertSep CBA を選択した．抽出溶液には回収率が良好な 2%トリクロロ酢酸溶液（pH 1）を用い，pH 調整には微小電極 pH メーター及び 1 mol/L トリス水溶液を用い，操作性と阻止円の明瞭性を高めた（Fig. 9）．

本法を評価したところ，27 種の蜜源由来はちみつのいずれでも，バイオアッセイによる擬陽性は認められず，LC-MS/MS 測定においても定量を妨げるピーク等は認められなかった．バイオアッセイの検出限界は 2.5–50 µg/kg，LC-MS/MS の定量下限は 2.5–10 µg/kg であり，バイオアッセイの検出限界と同等又はそれ以下であったことから，阻止円を示した試料を同一試験溶液で迅速に確認・定量できた．妥当性評価では 12 剤すべてがガイドライン基準を満たした．内部品質管理では試行数 38 回中，Z スコアが 2 を超えたのは 2 回であり，分析カラムの劣化が一因と考えられた．技能試験試料（付与値 SM 43 µg/kg 及びアプラマイシン 1.308 µg/kg）でも Z スコアは 2 以内であり，他法と同等の分析能を有することを確認した．また，100 試料の実態調査では，バイオアッセイ陽性試料は認められなかった．

以上より，本法は，はちみつ中 AG 系抗生物質の高感度スクリーニングと確認・定量を同一試験溶液で連結できる実用的な方法であることを示した．

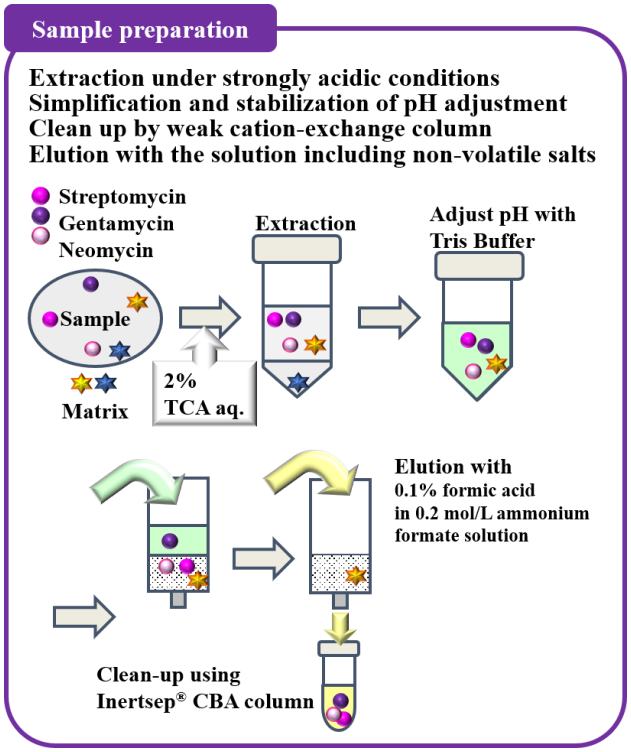


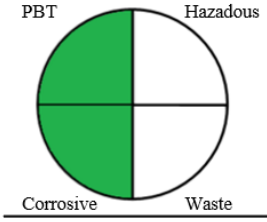
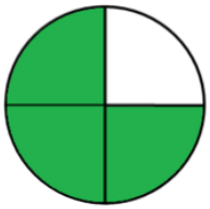
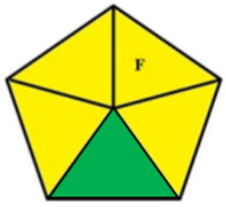
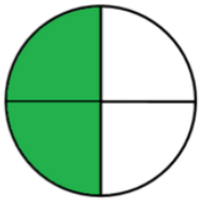
Fig. 9. Schematic of sample preparation for Method III

4. グリーン分析化学の評価

本研究で検討した開発法I–IIIは，バイオアッセイと LC-MS/MS を連結した分析法であり，単一の前処理工程で抗菌活性のスクリーニングと残留薬剤の同定・定量を実施できる．両測定を同一試験溶液で行うことにより，試料の再分取や追加前処理が不要となり，工程の簡素化に加え，試料使用量，試薬使用量，廃液量及びエネルギー消費量の削減が期待できる．特に，行政検査では多数の陰性試料を迅速に処理する必要があるため，陽性又は擬陽性を示した試料のみを同一試験溶液で機器分析に供することができる点は，検査工程の効率化と環境負荷低減の両立に資する．したがって，これらの方法はグリーン分析化学の考え方にも合致する[37]．近年食品分析においても，分析法の性能だけでなく，試薬使用量，廃液量，操作工程数及び作業者安全性等を含めて環境調和性を評価する考え方が広がっている[38,39]．また，動物用医薬品残留分析においても，多成分一斉分析，高感度化及び前処理の簡素化が進められており，近年ではグリーン分析化学評価を併用した報告もみられる[42,43]．グリーン分析化学の評価には，National Environmental Methods Index（NEMI）[44]，Green Assessment Profile（GAP）[45]，Green Analytical Procedure Index（GAPI）[46]及び Analytical GREEnness metric（AGREE）[47]等の複数の指標が提案されており，評価項目やスコア化の方法が異なる．そこで，本研究では開発法について，4 種類の評価ツールを用いてグリーン分析化学を評価した．

開発法IIを代表例として Table 5 に示す．定性的な評価を主体とする NEMI 及び GAP では，バイオアッセイ用と LC-MS/MS 用に別々の前処理を行う方法との差は明確ではなかった．これは，これらの指標が有害試薬の有無や廃棄物量を主に評価する，また，同一試験溶液を用いることによる工程削減効果を十分に反映しにくいためと考えられる．

Table 5. Evaluation of the green analytical chemistry of Method II

Method	National environment methods index		Green assessment profile	
	bioassay	LC-MS/MS method	bioassay	LC-MS/MS method
the developed method II				
the conventional method				

Method	Grenn analytical procedure index		Analytical GREEnness	
	bioassay	LC-MS/MS method	bioassay	LC-MS/MS method
the developed method II				
the conventional method[a]				

a The sample preparation of LC-MS/MS method was reported by Nakajima et al. (2012).
(Reproduced in part from *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **41**, 900–913 [27].
Copyright 2024 Taylor and Francis)

一方，サンプリング，前処理及び測定の各工程を評価できる GAPI では，本法においては追加サンプリング及び前処理が不要であることから，工程削減による環境負荷の低減が示唆された．ただし，単一指標のみでは本法の優位性を十分に反映しにくかった．そこで，グリーン分析化学の概念に基づいた定量評価が可能な AGREE を用いたところ，本法の最終スコアは 0.45 であり，別途前処理を必要とする方法（スコア 0.25）より高かった．この差は，試薬の種類や毒性だけでなく，前処理回数，測定対象となる試料数及び確認分析までの工程数の総合的削減を反映していると考えられた．また，単独法として比較した場合でも，バイオアッセイはスコア 0.40 を示し，LC-MS/MS 単独法よりも環境負荷の低いスクリーニング法であることを示した．

以上より，本連結法の意義は，環境負荷の低いバイオアッセイを入口とし，必要な試料のみを高選択性の LC-MS/MS で確認する検査フローを構築した点にある．本法は，分析精度や行政判断に必要な信頼性を保ちながら，迅速性，効率性及びグリーン分析化学を同時に高める方策として有用である．

お わ り に

当センターでは，食品衛生法に基づくポジティブリスト制度や試験法の妥当性評価ガイドライン等に対応し，畜水産食品中に残留する動物用抗菌剤をはじめとした動物用医薬品について，行政検査に適用可能な分析法の整備及び改良を進めてきた[48–62]．動物用医薬品は化学的性質，使用実態及び残留基準値が多様であり，検査では残留の有無を広く把握するとともに，法令に基づく判定に必要な同定及び定量を確実に行うことが求められる．

本稿では，バイオアッセイと LC-MS/MS を同一試験溶液で連結し，抗菌活性を指標としたスクリーニングと LC-MS/MS による確認・定量を一連の検査工程として活用する考え方を紹介した．多系統抗菌剤，サルファ剤・キノロン剤，AG 系抗生物質を対象に，試験菌，培地，抽出・精製条件及び測定条件を見直し，感度向上，擬陽性低減及び定量性能の確保を実現した．また，妥当性評価，内部品質管理及び技能試験により，行政検査に必要な信頼性を確認した．

本連結法は，多数の陰性試料を効率的に処理し，陽性又は擬陽性を示した試料を追加前処理なしに LC-MS/MS で確認できる点に実用上の意義がある．これにより，検査の迅速化，結果判定の信頼性向上に加え，試薬使用量，廃液量及びエネルギー消費量の削減も期待される．今後も，分析困難な薬剤や使用実態の変化に応じて対象範囲を広げ，精度管理を継続しながら試験法の高度化を進める必要がある．当センターでは，引き続き科学的根拠に基づく検査法の整備を通じて，食の安全確保と食品衛生行政の推進に貢献していく．

文　　献

1) Turnidge, J.: *J. Antimicrob. Chemother.*, **53**, 26–27, 2004.
2) Stolker, A.A.M., Zuidema, T., Nielen, M.W.F., *et al.*: *Trends Anal. Chem.*, **26**, 967–979, 2007.
3) Beyene, T.: *J. Vet. Sci. Technol.*, **7**, 1–7, 2016.
4) Review on Antimicrobial Resistance (Chair: O'Neill, J.): Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014, https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf （2026 年 6 月 19 日現在．なお本 URL は変更または抹消の可能性がある）
5) Ministry of Health, Labour and Welfare: National Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR) 2016–2020, https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/0000138942.pdf （2026 年 6 月 19 日現在．なお本 URL は変更または抹消の可能性がある）
6) Ministry of Health, Labour and Welfare: National Action Plan on Antimicrobial Resistance (AMR) 2023–2027, https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001096228.pdf （2026 年 6 月 19 日現在．なお本 URL は変更または抹消の可能性がある）
7) 斎藤育江，大場由実，木下輝昭，他：東京健安研セ年報，**72**, 43–55, 2021.
8) 神田真軌，小林甲斐，西野由香里，他：東京健安研セ年報，**75**, 41–57, 2024.
9) 神保勝彦，門間千枝，丸山　務，他：食衛誌，**32**, 86–92, 1991.
10) 神保勝彦，平井昭彦，仲真晶子，他：食微誌，**13**, 179–184, 1997.
11) 草野友子，神田真軌，八巻ゆみこ：東京健安研セ年報，**54**, 142–145, 2003.
12) 草野友子，神田真軌，鎌田国広，他：食衛誌，**45**, 191–196, 2004.
13) 神田真軌，草野友子，小山内たか，他：食衛誌，**49**, 37–44, 2008.
14) 堀江正一，小林晴美，石井里枝，他：食衛誌，**49**, 168–176, 2008.
15) Kanda, M., Kusano, T., Kanai, S., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **93**, 1331–1339, 2010.
16) Nakajima, T., Sasamoto, T., Hayashi, H., *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **53**, 91–97, 2012.
17) Nakajima, T., Nagano, C., Sasamoto, T., *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **53**, 243–253, 2012.
18) Nakajima, T., Nagano, C., Kanda, M., *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **54**, 335–344, 2013.

19) Kanda, M., Nakajima, T., Hayashi, H., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **98**, 230–247, 2015.
20) Yoshikawa, S., Nagano, C., Kanda, M., *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1057**, 15–23, 2017.
21) 神田真軌：都薬雑誌，**41**, 8–13, 2019.
22) 関村光太郎，神田真軌，林　洋，他：食衛誌，**61**, 109–118, 2020.
23) 神田真軌：フードケミカル，**36**, 121–126, 2020.
24) Koike, H., Hayashi, M., Kazama, K., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **40**, 528–541, 2023.
25) Hayashi, M., Kanda, M., Yoshikawa, S., *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **64**, 53–60, 2023.
26) Ohba, Y., Hayashi, H., Kanda, M., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **41**, 151–161, 2024.
27) Kanda, M., Sekimura, K., Yoshikawa, S., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **41**, 900–913, 2024.
28) Kanda, M.: *YAKUGAKU ZASSHI*, **145**, 109–115, 2025.
29) 厚生労働省：厚生労働省告示第497号，食品衛生法第十一条第三項の規定により人の健康を損なうおそれのない量として厚生労働大臣が定める量を定める件，平成17年11月29日.
30) 厚生労働省：厚生労働省告示第498号，食品衛生法第十一条第三項の規定により人の健康を損なうおそれのないことが明らかであるものとして厚生労働大臣が定める物質，平成17年11月29日.
31) 厚生労働省：厚生労働省告示第499号，食品，添加物等の規格基準の一部を改正する件，平成17年11月29日.
32) 厚生労働省：食品，添加物等の規格基準（昭和34年厚生省告示第370号）第1食品A食品一般の成分規格.
33) 厚生労働省健康・生活衛生局食品監視安全課長：食品に残留する農薬等の監視指導に係る留意事項について，健生食監発1218第3号，令和5年12月18日.
34) Koike, H., Kanda, M., Hayashi, H., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part B Surveill.*, **14**, 66–73, 2021.
35) Koike, H., Yoshikawa, S., Nakajima, T., *et al.*: *J. Environ. Sci. Health B.*, **60**, 447–455, 2025.
36) 牛山慶子，井草京子，神田真軌，他：東京健安研セ年報，**54**, 162–164, 2003.
37) Gałuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J.: *Trends Anal. Chem.*, **50**, 78–84, 2013.
38) Nowak, P.M., Kościelniak, P., Tobiszewski, M.: *Trends Anal. Chem.*, **93**, 251–265, 2017.
39) Płotka-Wasylka, J., Wojnowski, W.: *Green Chem.*, **23**, 8657–8665, 2021.
40) Tumini, M., Nagel, O. G., Althaus, R.L.: *Rev. Argent. Microbiol.*, **51**, 345–353, 2019.
41) Nowacka-Kozak, E., Gajda, A., Gbylik-Sikorska, M.: *Molecules*, **28**, 4595, 2023.
42) Saleh, S.S., Samir A., Lotfy, H.M., *et al.*: *J. Chromatogr. A*, **1724**, 464901, 2024.
43) Sharkawi, M.M.Z., Abdelaleem, E.A., Mohamed, M.A., *et al.*: *Sci. Rep.*, **15**, 32537, 2025.
44) Keith, L.H., Gron, L.U., Young, J.L.: *Chem. Rev.*, **107**, 2695–2708, 2007.
45) Raynie, D.E., Driver, J.L.: *Green Chem.*, **11**, 1007–1010, 2009.
46) Płotka-Wasylka, J.: *Talanta*, **181**, 204–209, 2018.
47) Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M.: *Anal. Chem.*, **92**, 10076–10082, 2020.
48) 神田真軌，牛山慶子，井草京子，他：食衛誌，**44**, 110–113, 2003.
49) Sakamoto, M., Takeba, K., Sasamoto, T., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **93**, 1340–1346, 2010.
50) Kanda, M., Sasamoto, T., Takeba, K., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **94**, 878–885, 2011.
51) Nakajima, T., Kanda, M., Hayashi, H., *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Jpn.*, **52**, 178–182, 2011.
52) 坂本美穂，竹葉和江，笹本剛生，他：食衛誌，**52**, 51–58, 2011.
53) Kanda, M., Sasamoto, T., Takeba, K., *et al.*: *J. AOAC Int.*, **95**, 923–931, 2012.
54) Nakajima, T.: *Bull. IDF*, **472**, 73–82, 2014.
55) Nakajima, T., Tsuruoka, Y., Kanda, M., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **32**, 1099–1104, 2015.
56) Nakajima, T., Tsuruoka, Y., Kanda, M., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **32**, 1833–1841, 2015.
57) 鶴岡由実，中島崇行，橋本常生，他：食衛誌，**56**, 83–87, 2015.
58) Tsuruoka, Y., Nakajima, T., Kanda, M., *et al.*: *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **1044–1045**, 142–148, 2017.
59) Ohba, Y., Nakajima, T., Kanda, M., *et al.*: *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.*, **35**, 2375–2386, 2018.
60) 奥富　幸，林　洋，松島陽子，他：食衛誌，**59**, 206–212, 2018.
61) 中川由紀子，神田真軌，林　洋，他：食衛誌，**60**, 52–60, 2019.
62) 大場由実，中島崇行，神田真軌，他：食衛誌，**63**, 92–96, 2022.

利益相反（COI）利益相反はない.

Development of Analytical Methods for the Inspection of Residual Veterinary Antibacterial Drugs in Livestock and Fishery Products

Maki KANDA[a]

The Tokyo Metropolitan Institute of Public Health screens livestock and fishery products for residues of veterinary antibacterial drugs using both bioassay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). These screening methods support compliance evaluation, whereas LC-MS/MS enables confirmatory identification and quantification when definitive analytical evidence is warranted. This review outlines the residue inspection framework, representative detection cases, and three linked analytical methods that utilize a single sample solution for both bioassay and LC-MS/MS. In Method I for multiclass veterinary antibacterial drugs, the sample solution was prepared through sequential extraction with two solvents followed by solid-phase cleanup. Validation in 10 livestock and fishery products, supported by internal quality control and proficiency testing, revealed that the method was suitable for regulatory use. To extend the same sample solution to bioassay screening, the bioassay format and sample preparation conditions were further optimized, which improved sensitivity, reduced false-positive results, and enabled detection of 33 target drugs at concentrations corresponding to their maximum residue limits or reference levels. In Method II, newly developed bioassay plates and optimized sample preparation conditions were introduced for 10 sulfonamides and 11 quinolones that were insufficiently detected with Method I. In Method III, the linked approach was applied to 12 aminoglycoside antibiotics in honey. These modifications enabled bioassay screening and LC-MS/MS–based confirmatory identification and quantification employing the same sample solution. Consequently, samples that test positive by bioassay can be confirmed and quantified by LC-MS/MS without additional sample preparation, streamlining the residue inspection workflow, improving the reliability of confirmatory identification and quantification, and reducing reagent consumption and waste generation. Together, these three linked methods provide a practical approach for the residue inspection of veterinary antibacterial drugs in livestock and fishery products by integrating broad bioassay screening, LC-MS/MS–based confirmatory identification and quantification, and enhanced green analytical chemistry.

Keywords: veterinary antibacterial drugs, livestock and fishery products, residue inspection, bioassay, LC-MS/MS, linked analytical method, green analytical chemistry

[a] Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan