

## 蛍光検出 HPLC による豚血液中イベルメクチンの 迅速分析と食肉残留モニター効果

豊橋市食肉衛生検査所 ○齊藤奈穂子 大島由美 松田克也  
山内俊平 細井美博 齋藤富士雄

### はじめに

寄生虫剤イベルメクチン（IVM）は世界の動物用医薬品販売高のトップ[1]を占める。当所が実施した管内農場調査[2]においても IVM は最も使用頻度の高い動物用医薬品の一つであり、特に繁殖豚において子豚への垂直感染防止目的で多用されている。本剤は、使用頻度の高さに加えその体内残留性及び毒性から食肉への残留監視が特に重要であり、使用目的を考慮すると廃用豚における多頭数検査が不可欠と考えられる。

一般に食肉の IVM 残留検査は告示試験法によるが、同法は精度に優れる反面、検査に長時間を要する。そこで前回[3]、我々は迅速分析法を示し、これにより年間数百頭レベルの検査が可能となった旨を報告したが、管内と畜場では数千頭の高リスク豚（廃用豚）が搬入される現況にある。食肉の安全確保には一層の検査の迅速化・多頭数検査が望まれるが、脂肪等の固形材料を検査試料とした場合、その迅速化は既に限界に達している。

そこで今回、より一層の検査のスピード化を図るため抽出操作等の前処理が簡易に行える血液を用いた IVM 迅速分析法を確立するとともに、本法によりと畜豚の血清中 IVM 量を測定し脂肪組織中の残留量と比較した。その結果、本法は脂肪における規格基準値（MRL：20ng/g）レベルの残留監視にほぼ十分な検出感度が得られたので報告する。

### 材料及び方法

#### 1 豚血液中 IVM の迅速分析法の検討

IVM 未使用農場の豚放血約 10ml を採取し、3000rpm で 5 分間遠心分離して得られた血清を材料とした。血清 2ml を小試験管に採り、メタノール 8ml を加え十分混和した後、3000rpm で 5 分間遠心分離する。上清に蒸留水を加え 20ml に定容したものを、メタノール 5ml、蒸留水 5ml でコンディショニングしたカートリッジ（Sep-Pak Plus C18:Waters 社製）に負荷し、50%メタノール 10ml で洗浄後、メタノール 10ml で 50ml のナス型フラスコ内に溶出した。溶出液を 60℃以下で減圧乾固した後、残留物に 1-メチルイミダゾール 300  $\mu$ l、トリフルオロ無水酢酸 200  $\mu$ l を加え十分に混和し、メタノール 300  $\mu$ l を加え攪拌後、室温下で 5 分間反応させ蛍光誘導体化を行い、これを試験溶液とした。なお、標準品は林純薬

工業（株）製を使用し、厚生労働省通知（H11.12.22 衛乳 241 号）に従い溶解希釈し標準溶液とした。HPLC 及び蛍光検出器は、（株）島津製作所製 LC-10A システムと RF10A を、分析カラムに Mightysil RP-18GP 150-4.6（5 $\mu$ m）（関東化学（株）製）、移動相にメタノール-水（97:3）を用い、流速 1.0ml/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、注入量 80 $\mu$ l、励起波長 360nm、蛍光波長 460nm で測定した。

## 2 と畜豚の血清と脂肪組織における残留イベルメクチンの定量

2002 年 8 月から 12 月に脂肪組織での IVM 残留検査に供した豚のうち本剤の残留（ $\geq 1$  ng/g）が確認された 28 頭の血清を検査に用いるとともに、対照として脂肪組織中に IVM の残留を認めなかった 28 頭の血清を合わせて検査に供した。なお、血清中 IVM は本法を、脂肪組織中のものは既報[3]の流速条件を 0.5ml/min から 1.0ml/min に変更し定量した。

## 成 績

### 1 検量線及び添加回収試験

検量線は 0.02~10ng の範囲で良好な直線性（ $r \geq 0.995$ ）を示し、0.1ng/ml、1ng/ml 及び 5ng/ml の濃度で実施した添加回収試験（n=5）における回収率は各々  $82.4 \pm 14.8\%$ 、 $97.6 \pm 6.7\%$  及び  $95.2 \pm 7.1\%$ 、変動係数は 18.0%、6.9% 及び 7.5% といずれも良好な成績が得られた。このため、検量線の直線域並びに Codex 規格適合性から判断される本法の定量下限は 0.1ng/ml であった。

### 2 と畜豚の血清と脂肪組織における残留イベルメクチン量の比較

脂肪組織で IVM の残留を認めた 28 頭中 23 頭（82.1%：残留量 2.1~72.2ng/g）の血清中から 0.1~1.8ng/ml の IVM が検出（図 1）されたが、5 頭（17.8%）では未検出（定量下限未満）であった。なお、これら 5 頭における脂肪組織中の IVM 量は、平均 2.7ng/g（1.7~6.0ng/g）といずれも低濃度であった。

また、同時に検査に供した脂肪組織における IVM 無残留（定量下限未満）の豚 28 頭の血清からはいずれも本剤は検出されなかった。添加回収試験並びにと畜豚の血清及び脂肪組織の代表的クロマトグラムをそれぞれ図 2 と 3 に示した。

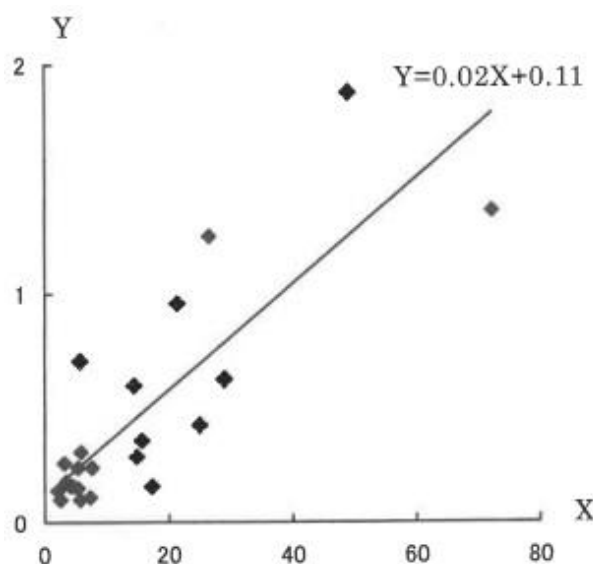


図 1 と畜豚 23 頭の残留 IVM 量（X 軸：脂肪組織（ng/g）、Y 軸：血清（ng/ml））

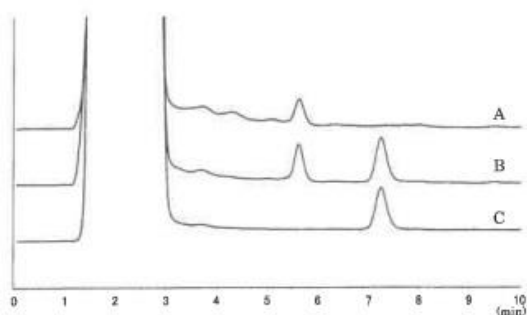


図 2 IVM 添加回収試験における代表的クロマトグラム (A: 豚血清 B: A に IVM 添加(2ng) C: IVM 標準液(2ng/ml))

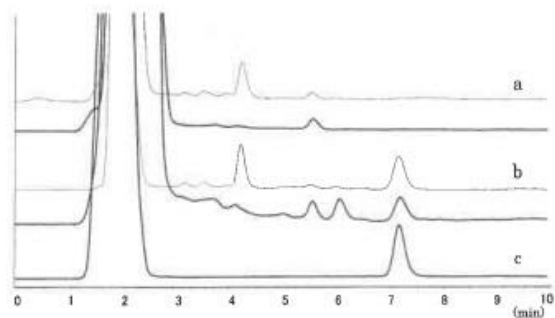


図 3 豚血清と脂肪組織における代表的クロマトグラム (a 及び b: 試料(太線は血清、細線は脂肪) c: IVM 標準液)

## 考 察

食肉（脂肪組織）に残留する IVM を簡易にモニターする方法として血液を用いた迅速分析法を検討した。脂肪親和性の高い IVM はその一部が血液中にも放出されるが、城戸らの残留試験[4][5]からは、血清中濃度は脂肪組織中濃度のおおむね 1/10 以下にあることが示唆された。そこで本法の確立に際しては、前処理に固相抽出法を用いクリーンアップ効果を高めるとともに蛍光誘導体化試薬の量を必要最小限として検出感度の向上を図った。その結果、本法は検査感度及び迅速性（検査時間約 40 分）においてほぼ満足できる成績が得られ、また、試験管内で抽出が行えることから操作性にも優れ、加えて使用する有機溶剤が少量で済むことから検査実務者の曝露リスク回避の上からも有効なものであった。

次に、本法の行政検査導入に際しての必要要件、すなわち「脂肪組織に MRL を超える IVM が残留した場合、本法によりそのモニターが可能であること」について、と畜豚の脂肪組織と血清中の残留 IVM を定量比較することで検証した。その結果、脂肪組織における IVM 残留豚 28 頭中 23 頭で血清から 0.1~1.8ng/ml の IVM が検出され、未検出であった 5 頭では脂肪組織中 IVM 量が MRL のおよそ 8~30%といずれも低濃度であった。以上のことから本法は脂肪組織の MRL を十分にクリアする検出感度を有するものであったが、今後、さらにデータを集積しより詳細な検証を加えたい。

- [1] 細貝祐太郎、松本昌雄：動物医薬品・飼料添加物、22（2001）
- [2] 高嶋拓也他：平成 13 年度食肉衛生検査技術研修会衛生発表資料、92~94
- [3] 三浦義明他：平成 12 年度食肉衛生検査技術研修会衛生発表資料、161~163
- [4] 城戸靖雅他：畜産生物科学安全研究所、ハルメク注射剤の牛による残留試験(1)1986.
- [5] 城戸靖雅他：畜産生物科学安全研究所、ハルメク注射剤の豚による残留試験(1)1986.