

8 血清を用いた HPLC によるサルファ剤の迅速分析法の有効性について

豊橋市食肉衛生検査所 ○吉川雅己 山内由美 福田和弘
本島雅昭 細井美博

はじめに

サルファ剤は家畜の生産現場において治療薬や飼料添加剤として使用頻度の高い薬剤であり、食肉への残留が懸念される。食肉衛生検査所は、これら規格違反食肉の流通を未然に防止するため、迅速な残留監視が求められる。しかし、抗菌性物質の一般的なスクリーニング検査法である簡易検査法での検出感度は 10ppm 以上 [1] であり、十分とは言えない。そこで、当所では、サルファ剤が生体内で血漿タンパクと結合することに着目し、平成 12 年から血清を用いた HPLC によるサルファ剤迅速分析法 [2] を腎臓の直接法と併用することで対応してきた。今回、ベンジルペニシリン (PCG) とスルファジメトキシシン (SDMX) の同時残留事例に遭遇し、血清によるサルファ剤の迅速分析法の有効性について確認したので報告する。

材料及び方法

当該獣畜は起立困難の状態と搬入された 6 ヶ月齢の豚で、動物用医薬品等の使用歴は無いとの申告であった。検査には当該獣畜の血清（放血時の血液）、筋肉及び腎臓を用いた。

1 スクリーニング検査

(1) 腎臓の直接法（バイオアッセイ）

腎臓（1 cm 角）を通知に基づき調整した 3 菌種（*Kocuria rizophilia* ATCC 9341 (ML:旧名 *Micrococcus luteus* ATCC 9341)、*Bacillus spizizenii* ATCC 6633 (BS:旧名 *Bacillus subtilis* ATCC 6633)、*Bacillus cereus* ATCC 11778 (BC:旧名 *Bacillus mycoides* ATCC 11778)) 平板培地上で 18 時間培養した。なお、BS 培地にはトリメトプリムを添加した。

(2) 血清の迅速分析法（HPLC）

試験溶液の調整は、血清 1.0mL を約 2mL の蒸留水で希釈したものを、あらかじめメタノール 1mL、蒸留水 1mL の順でコンディショニングした OASIS HLB（充填量 60mg、Waters 社製）に負荷し、蒸留水 2mL で洗浄後、メタノール 2mL で溶出した。溶出液を減圧乾固したものを移動相 1.0mL で溶解し、その 40 μ L を HPLC の試験溶液とした（図 1）。なお、HPLC の装置及び測定条件を表 1 に示した。分析対象薬剤は合成抗菌剤 11 剤で、その保持時間から標準溶液を 1 と 2 に分けて測定した（表 2）。

血清*

OASIS HLB カートリッジに負荷
蒸留水 2ml で洗浄
メタノール 2ml で溶出

溶出液

減圧乾固 (40℃以下)

残留物

移動相 1.0ml で超音波溶解 (30 秒)

HPLC

* : 1 検体の場合は血清 1.0ml を、多検体の場合は 1 検体につき血清 0.4ml を 0.8~1.2ml (2~3 検体) に集合し、約 2 倍量の水で希釈したものを用いる。

図 1 血清の迅速分析法フローチャート

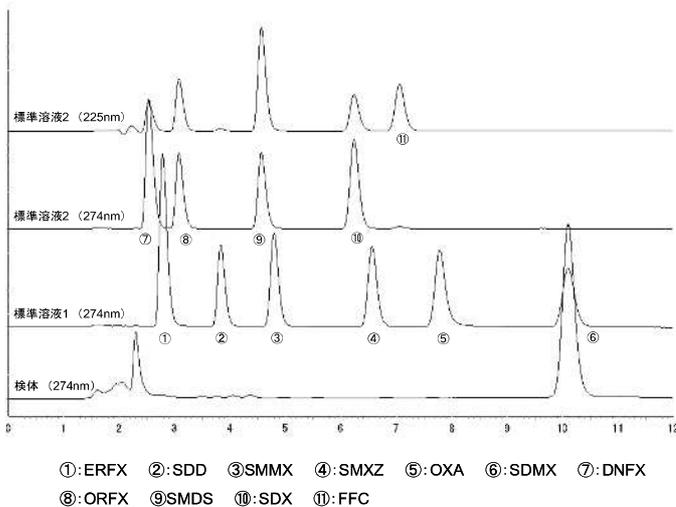


図 2 血清の迅速分析法のクロマトグラム

表 1 HPLC 装置及び測定条件

機器	(株) 島津製作所製 LC-10A システム
UV 多波長検出器	(株) 島津製作所製 SPD-M10AVP
分析カラム	Capcellpack C18 AGR (資生堂)
カラム温度	40℃
移動相	アセトニトリル-0.05%トリフルオロ酢酸 (25 : 75)
流速	0.7ml /min
注入量	40μl
測定波長	UV 検出 225nm (フルフェニコール) 274nm (その他の薬剤)

表 2 分析対象合成抗菌剤

サルファ剤	標準溶液
スルファジミジン (SDD)	1
スルファモメトキシ (SMMX)	1
スルファメキサゾール (SMXZ)	1
スルファジメトキシ (SDMX)	1
スルファモイルダゾン (SMDS)	2
スルファトキシ (SDX)	2
ニューキノロン系	
エンロフロキサシ (ERFX)	1
ダノフロキサシ (DNFX)	2
オルビフロキサシ (ORFX)	2
オールドキノロン系	
オキシリン酸 (OXA)	1
チアゾフェニコール系	
フルフェニコール (FFC)	2

2 確認検査 (収去検査)

スクリーニング検査の結果、残留が疑われたペニシリン系抗生物質 (PCG 及びアンピシリン) と SDMX について、腎臓と筋肉の通知試験法を実施した。

成績

1 腎臓の直接法

ML 培地 13mm、BS 培地 10mm の阻止帯が形成された。

2 血清の迅速分析法

血清中に 3.4ppm の SDMX が検出された (表 3)。標準溶液、検体のクロマトグラムを図 2 に示した。

3 確認検査

ペニシリン系抗生物質の定性試験の結果、Rf 値は PCG と一致した。PCG、SDMX の腎臓、筋肉

表 3 血清の迅速分析法及び確認検査における残留量

	血清	腎臓	筋肉	基準値	
				腎臓	筋肉
PCG	—	0.03ppm	0.01ppm	0.05ppm	0.05ppm
SDMX	3.4ppm	3.9ppm	0.4ppm	0.1ppm	0.2ppm

における残留量を表 3 に示した。PCG は腎臓、筋肉ともに基準値以下であったが、SDMX は腎臓、筋肉ともに基準値を超える残留が確認された。

4 行政措置

筋肉中の SDMX 残留量が基準値を超える値であったため、食品衛生法第 11 条 2 項違反により同法第 54 条に基づき廃棄命令処分とした。

考察

直接法は、3 菌種培地上にできた阻止帯の形成パターンから抗菌性物質の系統を推定することができる。本事例では、ML 培地 13mm、BS 培地 10mm であったことから、ペニシリン系抗生物質の残留を疑い、確認検査で筋肉中に 0.01ppm の PCG の残留を確認した。また、血清の迅速分析法では、SDMX が検出され、確認検査で筋肉中に 0.4ppm の残留を確認した。結果として、PCG は基準値以下であり、SDMX の規格違反として行政処分を行ったが、直接法の結果のみでは SDMX の残留を見逃していた可能性があった。一般的には、簡易検査法で阻止帯が形成された場合、分別推定法を行い薬剤の系統別確認を行う。分別推定法は、簡易検査法より検出感度が高い[1] ため、本事例も分別推定法を行えば SDMX の残留を疑えた可能性はあった。しかし、その前処理は煩雑であり培養時間も要する。一方、血清の迅速分析法は、定量下限が 0.02~0.05 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ であり簡易検査法に比べて検出感度が高い上に、HPLC 検出器に多波長検出を用いることによって検出薬剤の定性が可能である。更に、検体の前処理に要する時間は約 10 分であり、極めて迅速簡便である。

当所での血清によるスクリーニング検査は、平成 12~20 年度の 9 年間で 12,782 頭(牛 1,288 頭、豚 11,494 頭) 実施し、合成抗菌剤を検出したものが 106 頭(牛 28 頭、豚 78 頭)、このうちサルファ剤が 99 頭(牛 25 頭、豚 74 頭) であった。合成抗菌剤を検出した 106 頭のうち 72 頭(牛 17 頭、豚 55 頭) が規格違反(SMMX 32 頭、SDD 11 頭、SMXZ 9 頭、SDMX 9 頭、SMDS 3 頭、SDX 1 頭、ERFX 5 頭、OXA 1 頭、FFC 1 頭) となったが、このうち簡易検査法で阻止帯が形成されたものは 26 頭(サルファ剤は 21 頭) のみであった。

日常的なスクリーニング検査には、多検体処理が可能な迅速性及び簡便性に加え信頼性が求められるため、簡易検査法と血清の迅速分析法の併用は、抗菌性物質のスクリーニング検査として有効であると考えられる。

今後も、生産段階での動物用医薬品の使用動向に留意し、検査業務の効率化を図り、迅速な行政対応につなげていきたいと考える。

[1] 神保勝彦：食衛誌．44，195～202（1999）

[2] 合川敏彦ほか：平成 12 年度食肉衛生技術研修会衛生発表会資料 164～166