

## ベンジルペニシリン検査法について

福本智也<sup>1</sup>, 塩見哲生<sup>1</sup>, 辻由起<sup>1</sup>, 梶政彦<sup>1</sup>, 新美達也<sup>1</sup>,  
森田恵一<sup>1</sup>, 川上雅弘<sup>1</sup>, 井崎やゑ子<sup>1</sup>, 森田正和<sup>1</sup>

### Detection of residual benzylpenicillin in livestock products

Tomoya FUKUMOTO, Tetsuo SHIOMI, Yoshiki TSUJI, Masahiko KAJI,  
Tatsuya NIIMI, Keiichi MORITA, Masahiro KAWAKAMI, Yaeko IZAKI, Masakazu MORITA

**Key Words** : 抗生物質 antibiotics, ベンジルペニシリン benzylpenicillin (PCG)

#### I はじめに

ベンジルペニシリン (benzylpenicillin : PCG) は、天然のペニシリン系抗生物質で、家畜・家禽等に汎用されている。PCG をはじめとする動物用医薬品が不適切に使用された場合、畜水産食品に残留し人の健康を脅かす可能性がある。このような健康被害対策の一環として、「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査実施要領（厚生労働省）」に基づき、抗生物質、合成抗菌剤及び内寄生虫用剤について検査を実施している（第2部参照）。

厚生労働省は、安全性評価がなされた動物用医薬品から最大残留基準値を設定し（表1）、その検査法を告示している。平成12年度から新しく基準値が設定された PCG については、モニタリング検査への導入、すなわち、検査実施標準作業書（SOP）の策定が前年度からの課題となっていた。SOP 導入における検討時に得られた若干の知見について報告する。また、第二市場においてと畜検査時に抗生物質残留疑いのため保留となった豚に検査法を適用した例についても報告する。

#### II 材料と方法

##### 1. 材料

モニタリング検査には、市内各保健所及び病理部門にて収去した検体を用いた。また、平成14年2月に第二市場においてと畜された豚（敗血症により内蔵は廃棄決定済、筋肉部は抗生物質残留疑いのため保留）についても検査した。

##### 2. 抗生物質の簡易検査法

抗生物質のスクリーニング検査には、微生物学的方法を用いた簡易検査法<sup>1)</sup>を行った。

##### 3. PCG の抽出

PCG の検査は、食品衛生法 法令 1－食品衛生 食品の規格基準 D各条 ○食肉及び鯨肉 (15)ベンジルペニシリン試験法で示された方法（以下「公定法」）に準じて行った。硫酸及びタングステン酸ナトリウム溶液で抽出、C18カートリッジカラムにて精製し、試験溶液とした。操作の詳細は藤田らの報告<sup>2)</sup>に準じた。

表1 畜水産食品における動物用医薬品の残留基準値（一部抜粋）

|     | ベンジルペニシリン (ppm) | スピラマイシン (ppm) | テトラサイクリン類 <sup>*1</sup> (ppm) |
|-----|-----------------|---------------|-------------------------------|
| 牛 肉 | 0.05            | 0.2           | 0.2                           |
| 腎臓  | 0.05            | 0.3           | 1.2                           |
| 肝臓  | 0.05            | 0.6           | 0.6                           |
| 豚 肉 | 0.05            | 0.2           | 0.2                           |
| 腎臓  | 0.05            | 0.3           | 1.2                           |
| 肝臓  | 0.05            | 0.6           | 0.6                           |
| 鶏 肉 | 0.05            | 0.2           | 0.2                           |
| 腎臓  | 0.05            | 0.8           | 1.2                           |
| 肝臓  | 0.05            | 0.6           | 0.6                           |
| 牛乳  | 0.004           | 0.2           | 0.1                           |
| 鶏卵  |                 |               | 0.4                           |
| 魚介類 |                 | 0.2           | 0.2 <sup>*2</sup>             |

<sup>\*1</sup> オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリンの和として

<sup>\*2</sup> オキシテトラサイクリンのみ

<sup>1</sup> 京都市衛生公害研究所 生活衛生部門

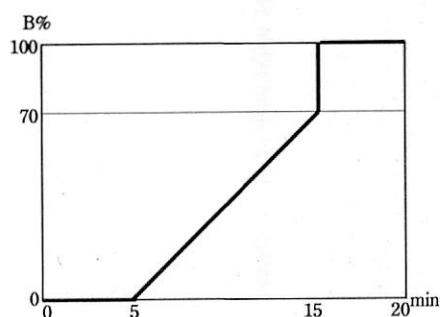
表2 PCG検出のためのLC/MS測定条件

## 1) HPLC

測定装置 : Agilent 1100 series  
 カラム : ZORBAX SB-C18 (2.1×30mm) Agilent 社製  
 カラム温度 : 40℃  
 移動相 : A 40mM CH<sub>3</sub>COOH aq / B CH<sub>3</sub>CN  
 流速 : 0.3ml/min  
 注入量 : 20  $\mu$ l  
 グラジエント : 右図

## 2) MS

測定装置 : FINNIGAN LCQ DECA  
 イオン化条件 : ESI (ElectroSpray Ionization)  
 検出条件 : 質量数 (250.00–450.00) の範囲で negative イオンをモニターする



## 4. PCG の定量試験

公定法に準じ、マイクロバイオアッセイ（ペーパーディスク法）で定量した。ペニシリン系抗生物質に高感受性の *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 を増殖用培地で55℃にて3日間継代培養または55℃の水浴中で6時間振とう培養し、試験菌液とした。リン酸緩衝液に溶媒置換した試験溶液を100  $\mu$ l含むディスクを、試験菌液を混合した検査用平板に置き、55℃18時間培養し、阻止円の有無から判定した。また、PCG 標準溶液を吸着させたディスクを同時に試験し、阻止円の大きさから定量した。

## 5. PCG の確認試験

公定法に準じ、薄層クロマトグラフと微生物学的手法を組み合わせたマイクロバイオオートグラフィーで確認した。試験溶液をアセトン及び蒸留水の混液に溶媒置換した後、シリカゲル薄層板に10  $\mu$ lをスポットし、アセトン、蒸留水及び1-ペンタノールの混液（上層）を用い展開<sup>2)</sup>した。定量試験と同様に培養した *B. calidolactis* を含む検査用培地で薄層板を覆った。培養後、0.05% INT [3-(*p*-iodophenyl)-2-(*p*-nitrophenyl)-5-pheney-2H-tetrazolium chloride] 試薬を用い、培地中の試験菌を染色し、薄層板上での抗菌スポットの移動度 (Rf 値) を検出<sup>3)</sup>した。

## 6. PCG の LC/MS による定量及び確認試験

平成12年度に導入された液体クロマトグラフ質量分析計 (liquid chromatography / mass spectrometry, LC/MS) を用い PCG の定量・確認試験を試みた。試験溶液をアセトンニトリル及び蒸留水の混液に溶媒置換し HPLC 試験溶液とした。LC/MS は表2の条件で測定した。

## 7. ペニシリナーゼ (PCase) による失活試験

ペニシリナーゼ溶液 (1000IU/ml) を PCG の定量試験に供する試験溶液に1/20vol で加える。室温で反応後、定量試験と同様にディスクに吸着させ試験する。

## III 結果及び考察

## 1. SOP の確立の経緯

新しい SOP を導入するためには、公定法の文章には記されていない部分について独自に試行錯誤する必要がある。その結果に基づき公定法を補完することで SOP を確立することができる。

PCG 定量試験（マイクロバイオアッセイ）に用いる試験菌 (*B. calidolactis*) の培養条件について、公定法、藤田らの方法<sup>2)</sup> 及び食品衛生検査指針の方法<sup>4)</sup> について検討した（表3）。検出感度と検査の迅速性から、ルーチンのスクリーニング検査には指針の方法を、PCG の定量・確認試験には藤田らの方法を採用することとした。

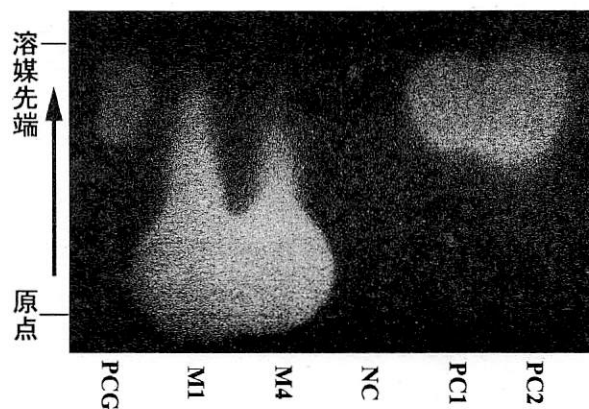
PCG 確認試験（マイクロバイオオートグラフィー）では、シリカゲル薄層板上の培地中に増殖した試験菌を肉眼で判別することは困難である。公定法には、培養後に抗菌スポットを検出する方法について明示されていない。そこで INT 試薬<sup>3)</sup> を用い細菌を染色し可視化することにより、抗菌スポットを検出した。測定された抗菌スポットの Rf 値に加え、PCase による失活試験<sup>5)</sup> を実施することで、抗菌活性の本体を推定することができる。しかし、薄層クロマトグラフの場合、標準品と検体の Rf 値が異なれば異なる物質であるといえるものの、Rf 値が同じ場合には他の展開溶媒で試験するなどの検証を加えなければ同じ物質であると判断できない。

食品衛生法では、食肉及び鯨肉の試験法として、「公定

表3 試験菌 (*B. calidolactis*) の培養条件と検出感度

|           | 公定法                   | 藤田ら     | 指針法               |
|-----------|-----------------------|---------|-------------------|
| 培養温度      | 55℃                   | 55℃     | 55℃               |
| 培養時間      | 6時間                   | 6時間     | 3日間 <sup>*2</sup> |
| 培養状態      | 静置                    | 振とう     | 静置                |
| 検出感度(試験液) | 0.01ppm <sup>*1</sup> | 0.01ppm | 0.004ppm          |

<sup>\*1</sup> 菌量少なく判定困難, <sup>\*2</sup> 1日ごとに継代



PCG : ペンジルペニシリン (標準) M1, M4 : 豚筋肉抽出液  
NC : 陰性対照 PC1, PC2 : 添加回収試験

図1 マイクロバイオオートグラフィーの結果

法と同等以上の性能を有すると認められる試験法」を採用してもよいとされている。そこで、LC/MS による定量・確認試験を試みた。これまでの既報<sup>6, 7, 8)</sup>を参考に表2に示す条件でPCGが検出できることを確認した。

PCGのSOPとして、マイクロバイオアッセイ、マイクロバイオオートグラフィー及びLC/MSを採用した。

## 2. PCG 確認検査を実施した事例について

平成14年2月、病理部門（第二検査室）より「と畜した豚に抗生物質陽性の疑いがあるので精査してほしい」との依頼があった。

当該豚のスクリーニング検査では、ペニシリン系抗生物質の残留が強く示唆された。また、PCaseによる失活試験を行ったところ、阻止円は消失した。マイクロバイオオートグラフィーの結果、検体とPCG標準品ではRf値が異なっていた（図1）。また、LC/MSにおいてもPCGが検出されなかったことから、「定性的にベンジルペニシリン以外のペニシリン系抗生物質を検出する」と結論づけられた。

食品衛生法では、「食品は、抗生物質を含有してはならない」が、成分規格（残留基準値 表1参照）に適合するものは「この限りではない」とされている。すなわち、基準値の設定された抗生物質ならば基準値を越える残留が確認された場合、または、基準値のない抗生物質の残留が定性的に確認された場合に食品衛生法違反となるのである。この判断基準から、当該豚は食品衛生法第7条第2項違反と判断され、と畜検査不合格となった。

## 3. モニタリング検査

平成13年度に実施したモニタリング検査では、牛の肝臓からPCGを検出（0.01ppm）したが、基準値（0.05ppm）

以下であった。また、豚、鶏及び鶏卵からはPCGは検出されなかった。

## IV おわりに

抗生物質の残留が疑われる場合、残留基準値が定められている物質か否か、量的関係を説明できるか否か、など手順が煩雑である。しかし、全体を把握し、順序立てて検査し、迅速な判断を積み重ねる事が重要であると思われる。

スピラマイシン及びテトラサイクリン類の公定法はHPLCを用いた理化学的検査法であるのに対し、PCGは微生物学的方法を公定法としている。微生物学的方法では、広範囲にスクリーニングできる反面、複数成分が含まれる場合に個別に定量できないといった欠点がある。一方、LC/MSは、目的成分についての定性・定量能力は高いが、目的外の成分を見逃してしまう危険性がある。それぞれの特性をふまえ、微生物学的手法とLC/MSを組み合わせ、総合的に検査を実施するのは大変有効であると考えられる。

平成14年2月の豚の事例で残留していたのは、アンピシリンなどのPCase感受性ペニシリン系抗生物質と推測されるが、同定できなかった。基準値のない物質についてもLC/MSで定性・定量できるようあらかじめ検討しておくことは今後の課題である。

## V 参考文献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課「畜水産食品中の残留質検査法」(1990)
- 2) 藤田和弘, 他: 食品衛生学雑誌, 41, 149-153 (2000)
- 3) 神保勝彦: 食品衛生学雑誌, 40, 195-202 (1999)
- 4) 食品衛生検査指針 理化学編 (1991), (社) 日本食品衛生協会
- 5) IDF standard 57: Detection of penicillin in milk by a disc assay technique (1970)
- 6) 岡尚男, 他: 食品衛生学雑誌, 42, 159-173 (2001)
- 7) 伊藤裕子, 他: J. Chromatogr. A, 911, 217-223 (2001)
- 8) Agilent Technologies 社, HP1100LC/MS テクニカルインフォメーション集

## 謝辞

御助言いただきました(財)日本食品分析センター名古屋支所 藤田和弘氏に深く感謝いたします。