COMMENTARY

動物用医薬品の残留規制と LC/MS による分析

Legal Restriction on Veterinary Drug Residues and Analysis of Residual Veterinary Drug in Food by LC/MS

堀江正一*・竹上晴美

Masakazu HORIE* and Harumi TAKEGAMI

* 埼玉県衛生研究所 *Saitama Prefectural Institute of Public Health, Saitama, JAPAN*

In recent years, there has been a steadily growing demand in Japan for variety of livestock products as the eating habits of the Japanese become more Westernized. This has brought about great changes in the methods of raising livestock in Japan and elsewhere, notably with larger numbers of animals being raised together within limited space. In spite of the increased demand for meat and fowl, the Japanese, who populate an island archipelago, still prize seafood as a main source protein. The internationally implemented limitations on fishing, necessary for conservation, have created a need for farm-raised seafood to supplement catches. This relatively new industry is becoming more prosperous year by year. Various veterinary drugs, such as antibiotics and synthetic antibacterials, are widely used in the rearing of food-producing animals to prevent and treat infectious diseases and to promote their growth. Although these drugs have been a boon to the aquiculture industry, there are some problems in using them in the same way that the use of certain pesticides in agriculture has been paradoxically both beneficial and detrimental to human and animal welfare. Residues of antibiotics and synthetic antibacterials are found in the edible tissues and resistant bacterial strain have appeared. According to the Japanese Food Sanitation Law, no food should contain antibiotics and, in addition, meat, poultry eggs, fish, and shellfish should not contain synthetic antibacterials. In order to monitor the drug residues levels in livestock products, simple and reliable method are required. For the analysis of residual veterinary drugs in food, many assay techniques have been developed such as HPLC and LC/MS. Legal regulation and LC/MS analysis of these chemicals are outlined in this paper.

(Received February 1, 2006; Accepted February 7, 2006)

1. はじめに

畜水産動物の疾病の治療や予防を目的に数多くの動物用医薬品が用いられ、畜水産物の安定供給に大きく貢献している。しかし、一方では使用した薬物の畜水産物への残留物が食品衛生上問題となっている。そこでわが国では、生産段階において「薬事法」および「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（飼料安全法）」により動物用医薬品や飼料添加物の適正使用を義務づけ、畜水産物中に薬物が残留することがないように規制している。さらに、と畜処理あるいは水揚げされて畜水産物となった段階では「食品衛生法」により残留規制が行われ、畜水産物の安全性確保が図られている (Fig. 1)。これに伴い、畜水産物の安全性を担保するため、迅速で精度の高い動物用医薬品の残留分析法が必要とされている。なお、すでに食品中に残留す

る動物用医薬品の法規制や分析法については、いくつかの総説、解説、成書^{1)~5)}があり、また、規制に関する最新情報については厚生労働省のホームページが詳しいので参照されたい。

2. 動物用医薬品・飼料添加物

ウシ、ブタなどの畜産動物やブリ、マダイなどの養殖魚

Fig. 1. Outline of legal restrictions on veterinary drug residues in livestock products.

* The Law for Safety Assurance and Quality Improvement of Animal Feed

* Correspondence to: Masakazu HORIE, *Saitama Prefectural Institute of Public Health, 639-1 Kamiokubo, Sakura-ku, Saitama, Saitama 338-0824, JAPAN*, e-mail: a0135608@pref.saitama.lg.jp
堀江正一, 埼玉県衛生研究所, 〒338-0824 さいたま市桜区上大久保 639-1

Table 1. Comparison of Feed Additives and Veterinary Drugs

	Feed additives	Veterinary drugs
Application	Growth promotion	Prevention and treatment of infectious diseases
Period	Long (2–3 months)	Short
Dose	Trace	Relatively large amount
Regulation	SAQIF*	Pharmaceutical Affairs Law

* The Law for Safety Assurance and Quality Improvement of Animal Feed

も生き物であり、生理に反した過密飼育下では病気にかかりやすくなっている。したがって、高い生産性を得るためには畜水産動物を疾病から守る必要があり、このために用いられる医薬品を「動物用医薬品」と呼ぶ。動物用医薬品は薬事法により規制されており、使用目的により感染症治療薬として用いられる抗生物質や合成抗菌剤、寄生虫の駆除を目的に使用される寄生虫用剤、成長促進や肉質改善に用いられる肥育用ホルモン剤に大別される。一方、治療を目的としたものではなく、飼料効率の改善や成長促進を目的に飼料に混ぜて用いられる薬剤を「飼料添加物」と言い、飼料安全法により規制されている。例えば、テトラサイクリン系抗生物質オキシテトラサイクリンは、動物用医薬品として、また飼料添加物として用いられているが、一般に動物用医薬品として用いられる場合は、短期間、高用量投与で用いられ、飼料添加物として用いられるときは、疾病の治療・予防を目的としたものではないことから、長期間、低用量投与されている (Table 1)。

3. 食品衛生法による残留規制

わが国では安全な畜水産食品を確保するため、食品衛生法により抗生物質や合成抗菌剤などが畜水産物中に残留することがないように強く規制されている。それでは、日本における抗生物質などの規制はいつ頃から行われたのか、その変遷を見ることにする。

動物用医薬品、特に抗生物質に関しては、昭和31年の食品衛生法改正により食品中には含まれてはならないとされた。本規制は食品に抗生物質を直接使用することを禁止する措置であり、今日の残留規制とは目的が異なったものである。合成抗菌剤については昭和54年、食肉、食鳥卵および魚介類は含有してはならないとされた。このように抗生物質と合成抗菌剤は長い間「無残留」規制がとられてきた。無残留規制は、薬物の残留した食品を摂取することによる人体への影響を考慮しての措置であった。しかし、最近、科学的な安全性評価が国内外で確立され、これら薬物が含まれている食品を摂取しても、ヒトの健康に影響がないレベルを把握できるようになった。また、ガットウルグアイ・ラウンドにおいて、各国の食品規格基準が自由貿易の障壁とならぬよう国際基準 (Codex 基準) と整合性を図ることが求められた。このような経緯から、わが国においても「無残留規制」から「基準値設定」に移行することとなった。平成7年12月に抗生物質オキシテトラサイクリンなど6品目について残留基準値が設定され、平成18年1月現在まで合計33品目について残留基準値が設定され

Fig. 2. Decision tree on provisional maximum residue limits (MRLs) for veterinary drugs in food.

* WHLs: Approval Withholding Limits under the Pharmaceutical Affairs Law or the Law for Safety Assurance and Quality Improvement of Animal Feed

** Foreign Standards: Standards in foreign countries (US, EU, Australia, New Zealand and Canada).

ている。

4. ポジティブリスト制の導入

平成15年5月、食品衛生法が抜本的に改正され、残留基準値が設定されていない農薬・動物用医薬品を含む食品の流通を禁止する「ポジティブリスト制」の導入が図られている。現在、残留基準値が設定されている品目数は33であるが、平成18年5月までに、250品目近くの動物用医薬品について暫定基準を設定しようとするものである。平成7年から約10年の歳月をかけて33品目の動物用医薬品について残留基準を設定してきた。しかし、現在進められているポジティブリスト制は、平成18年5月に施行される。昨年の11月には、現在食品衛生法で残留基準が設定されていない200品目以上の動物用医薬品について暫定基準が示された。厚生労働省は、暫定基準を適切かつ速やかに設定するに当たり、(1) Codex 国際基準、(2) 国内で承認されている動物用医薬品にあっては、承認時の定量限界、(3) FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) に準拠して残留基準を設定している米国、カナダ、EU、オーストラリア、およびニュージーランドの基準値などを参考値として基準を設定することとした (Fig. 2)。すなわち、Codex 基準がある動物用医薬品については Codex 基準を暫定基準の参考値とする。次に、Codex 基準はないが国内で承認使用されている薬物に関しては承認時の定量限界を参考とする。さらに、国内で承認使用されていないが、米国、カナダ、EU、オーストラリア、および

ニュージーランドにおいて残留基準が設定されているものはそれらの国の基準を参考とし、これらの国においても基準のない動物用医薬品については「一律基準値」を適用することを基本方針とした。

5. 動物用医薬品の残留基準設定

現在行われている動物用医薬品の残留基準値設定プロセスについて紹介する。Fig. 3 に示すように残留基準値設定に当たっては、動物を用いた急性毒性試験、慢性毒性試験、発癌性試験や細胞を用いた変異原性試験、さらに微生物（腸内常在細菌叢）に対する影響や生体内運命（吸収、分布、代謝、排泄）などのさまざまな安全性に関する情報が用いられている。これらの各種毒性試験をもとに、動物が一生にわたって毎日食べ続けても、何ら影響の出ない最大の摂取量（無影響量 (No Observed Effect Level; NOEL)、または無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level; NOAEL)）を求め、これを根拠にヒトが生にわたり毎日摂取し続けても危害を受けない許容一日摂取量 (Acceptable Daily Intake; ADI) を算出する。一般に ADI は、動物実験で得られた結果をヒトに外挿するため、安全係数（不確実係数）として多くの場合 1/100 をかけて算出される。したがって、毒性試験が不十分である場合には、安全性を高めるために 1/200 とか 1/1,000 などの安全係数が用いられる。なお、通常用いられている安全係数 (1/100) は、ヒトと実験動物の種差の相違による影響 (1/10) と、ヒトにおいても個人差があり、感受性が異なることから、固体差による影響 (1/10) を考慮して設定されたものである。

次に、日本人の平均的な畜水産物の一日摂取量（厚生労働省国民栄養調査成績）から試算される理論最大摂取量が ADI を超えることがないように残留基準値が設定される。すなわち、各畜水産物に設定された残留基準値と各畜水産物の日本人の平均な摂取量を掛けることにより、それぞれの畜水産物からの理論最大摂取量が算出される。このようにして求められた各畜水産物の理論最大摂取量の合計値が ADI を超えることがないように残留基準値は設定されて

いる。なお、遺伝毒性発癌物質のように ADI を設定することができない物質の残留基準値は、「検出されてはならない」、すなわち「ND」となっている。

6. 残留分析法

残留動物用医薬品の分析法を大別すると微生物学的試験法と理化学的試験法に大別される。微生物学的試験法とは、抗生物質が有する微生物の増殖を抑制する作用（抗菌作用）を利用した分析法であり、阻止円の有無およびその大きさを観測することにより、試料中の抗菌性物質の有無とその量を測ることができる。日常検査法としては、平成 6 年に示された「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法及び分別推定法」が汎用されている。本法は試験菌に多くの抗生物質に対して感受性を示す 3 菌株、*B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *B. mycoides* 11778 を採用している。微生物学的試験法は試料の前処理が簡易であり、かつ多数の検体を一度に検査できることから、抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングする手法として有用と考える。

しかし、微生物学的試験法は、数種類の抗菌性物質が同時に残留している場合、各成分を同定することは困難である。また、合成抗菌剤の多くは試験菌に対して抗菌活性が弱く、微生物学的試験法では検出できない短所がある。このことから、今日では分析機器を用いた理化学的試験法が汎用されている。分析機器の中では、HPLC に関する技術の進歩が目ざましく、UV 検出器や蛍光検出器を用いた HPLC 法が多用されている。最近では検出器に質量分析計を用いた高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) が最も有用視され、告示試験法においても採用されている。

本稿では紙数の関係で LC/MS を用いた動物用医薬品の分析例としてアミノグリコシド系抗生物質^{6), 7)}の分析を中心に紹介する。なお、マクロライド系抗生物質^{8), 9)}、遺伝毒性発癌物質であるカルバドックス関連化合物¹⁰⁾、肥育用ホルモン剤¹¹⁾などに関しては参考文献を参照されたい。

LC/MS によるアミノグリコシド系抗生物質の分析例

ストレプトマイシン (SM) およびジヒドロストレプトマイシン (DSM) などのアミノグリコシド系抗生物質 (AGs, Fig. 4) は、UV も蛍光吸収もないことから、*o*-phthalaldehyde (OPA) などを用いて蛍光誘導体とした後、蛍光検出 HPLC で測定されている。しかし、誘導体化法は、日常検査法として用いるには操作が煩雑である。そこで、最近では LC/MS による畜産食品中に残留する SM および DSM など AGs の残留分析法が有用視されている。

◎LC/MS 測定条件の検討

SM および DSM はアミノ糖を有する水溶性塩基性化合物である。そこで、インターフェイスには極性化合物のイオン化に適したエレクトロスプレーイオン化 (ESI) を選択し、イオン化モードはポジティブとした。本条件により SM および DSM のプロトン化分子 $[M+H]^+$ （それぞれ m/z 582 および 584）およびフラグメントイオン (m/z

Fig. 3. Outline of decision on maximum residue limits (MRLs) for veterinary drugs in food.

Fig. 4. Chemical structures of aminoglycoside antibiotics.

Fig. 5. Electrospray mass spectra of streptomycin and dihydrostreptomycin.

263: SM および DSM の構成成分 streptidine) が良好に観測された (Fig. 5).

SM および DSM は、水溶性塩基性化合物であり、逆相モードではカラムに保持されない。このことからトリフルオロ酢酸 (TFA)、ペンタフルオロプロピオン酸 (pentafluoropropionic acid; PFPA) やヘプタフルオロ酪酸 (heptafluoro-*n*-butyric acid; HFBA) などのイオンペアー剤が用いられている。保持、相互分離および検出感度を総合的に評価し、移動相には 5 mmol/L HFBA-アセトニトリル (88:12) を用い、流速は毎分 0.18 mL とした。

◎前処理法の検討

HPLC 分離モードと同様に、イオンペアー剤と逆相系

カートリッジを組み合わせた前処理法を検討した。その結果、除タンパク剤としてメタリン酸、イオンペアー剤としてヘプタンスルホン酸 (heptanesulfonic acid)、逆相系カートリッジには OASIS HLB (60 mg) を用いた。すなわち、除タンパク・抽出用溶液には 1% メタリン酸、イオンペアー剤には 0.1 mol/L ヘプタンスルホン酸、カートリッジには OASIS HLB (60 mg) を用いたとき、最も良好な結果を得ることができた。なお、本法では試料由来成分をより多く除去するために、まずはじめにメタリン酸抽出液にイオンペアー剤を加えないでカートリッジに負荷した。

市販の牛、豚の筋肉部、肝臓、ハチミツに SM および DSM を 0.2 あるいは 1.0 $\mu\text{g/g}$ の濃度に添加し、回収率を

Fig. 6. LC-ESI-MS-SIM chromatograms of (A) standard mixture of streptomycin (0.5 $\mu\text{g/mL}$) and (B) honey extract and (C) honey extract containing 0.17 $\mu\text{g/g}$ of streptomycin.

求めた結果、各試料に対する回収率は平均でおおむね70%以上、標準偏差(S.D.)も10%以内であり、残留分析法としてほぼ満足できる値が得られた。本法による検出限界は、SMおよびDSMとも豚肉、牛肉、ハチミツにあっては $0.01\text{ }\mu\text{g/g}$ 、ブタ肝臓・ウシ肝臓にあっては $0.02\text{ }\mu\text{g/g}$ ($S/N=3$)まで十分検出することが可能であった。Fig. 6に代表的なハチミツ抽出液のLC/MS-SIMクロマトグラムを示す。

7. 残留分析法開発の方向性

畜水産食品の安全性を担保するため、畜水産食品中に残留する動物用医薬品の迅速で精度の高い残留分析法の開発が必要とされている。現在、UV検出器などを用いたHPLC法が動物用医薬品の残留分析法として汎用されており、これら既存の方法に他の動物薬を組み入れるなど、既存法の効果的応用も解決手法の一つである。また、抗菌性を有する動物用医薬品の残留分析法として、従来から汎用されている微生物学的試験法についても、数多くの抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングする手法として、上手に利用していくことも必要と考える。しかし、選択性、検出感度、多成分同時分析などを考慮すると、HPLCの検

出器に質量分析計が直結したLC/MSを用いた分析法の開発が残留動物用医薬品の効果的分析法として、今後最も重要になると考える。

文 献

- 1) 堀江正一, 村山三徳, 食衛誌, **45**, J211 (2004).
- 2) 堀江正一, 食肉の科学, **45**, 1 (2004).
- 3) 堀江正一, 竹上晴美, 月刊フードケミカル, No. 12, 100 (2004).
- 4) 堀江正一, 中澤裕之, 食衛誌, **36**, 329 (1995).
- 5) 城戸靖雅, 中澤裕之, 堀江正一編著, “動物用医薬品・飼料添加物”, 中央法規, (2001)
- 6) 堀江正一, 吉田栄充, 菊池好則, 中澤裕之, 食衛誌, **42**, 374 (2001).
- 7) M. Horie, H. Saito, T. Natori, and H. Nakazawa, *J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol.*, **27**, 863 (2004).
- 8) M. Horie, H. Takegami, K. Toya, and H. Nakazawa, *Anal. Chim. Acta*, **492**, 187 (2003).
- 9) M. Horie, R. Ishii, T. Yoshida, Y. Hoshino, and H. Nakazawa, *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 309 (1999).
- 10) 堀江正一, 村山三徳, 食衛誌, **45**, 135 (2004).
- 11) M. Horie and H. Nakazawa, *J. Chromatogr. A*, **882**, 53 (2000).