報 文

養殖ウナギ及びアユにおけるオキシテトラサイクリンの
残留性と調理による変化

(平成9年8月4日受理)

丸山良子^{*1} 宇野和明^{*1, 2}Oxytetracycline Residues in Tissues of Cultured Eel and Ayu and
the Effect of Cooking Procedures on the ResiduesRyoko MARUYAMA^{*1} and Kazuaki UNO^{*1, *2}(*¹Konan Women's Junior College: 172, Omatsubara, Takaya-cho,
Konan, Aichi 483, Japan; *²Corresponding author)

The tissues levels of oxytetracycline were determined after oral administration (50 mg/kg) in cultured eel (*Anguilla japonica*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). The water temperature was adjusted to 28°C for eel and 18°C for ayu. Oxytetracycline levels were determined by HPLC. Concentrations of oxytetracycline were in the order of bone>liver>skin>muscle>serum for eel and liver>bone>skin>muscle>serum for ayu. The elimination half-lives of serum, muscle and liver were 4, 6 and 11 days for eel, and 5, 7 and 6 days for ayu, respectively. The elimination times of serum, muscle and liver were calculated to be 4, 5 and 25 days for eel, and 10, 14 and 24 days for ayu, respectively. However, the elimination half-lives and elimination time of skin and bone could not be calculated because oxytetracycline residues persisted in skin and bone in both fish species, and no elimination phase could be recognized up to 30 days. Residual oxytetracycline was reduced by 70~80% in muscle and liver by the usual methods of cooking (boiling, baking and frying), whereas the reduction in bone was only 30~50%.

(Received August 4, 1997)

Key words: オキシテトラサイクリン oxytetracycline; ウナギ eel *Anguilla japonica*; アユ ayu *Plecoglossus altivelis*; 残留性 residue; 調理 cooking

緒 言

近年、養殖魚の疾病の予防・治療の目的で、種々の抗生物質や合成抗菌剤が水産用医薬品として用いられている。それに伴い、これら薬物の養殖魚への残留が食品衛生上憂慮されている。最近の養殖魚における抗菌性物質残留実態調査¹⁾では、養殖ウナギ及びアユにテトラサイクリン系抗生物質の残留が報告されている。テトラサイクリン系抗生物質のうち、オキシテトラサイクリンは水産用医薬品として広く使用されており、「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」²⁾により使用基準が定めら

れている。これまで我が国では、抗菌性物質の「無残留」規制がなされてきたが、1995年、食品衛生法の改正により畜水産食品中のオキシテトラサイクリンの残留基準値が設定された³⁾。

これまで、魚類組織におけるオキシテトラサイクリンの体内動態に関する研究はいくつかみられるが^{4)~11)}、残留性についての詳細な報告は少ない^{12)~16)}。また、魚介類は生食以外に煮物、焼き物、揚げ物など種々の調理がなされて食されている。しかしながら、調理加工処理が魚類の残留オキシテトラサイクリンに及ぼす影響を調べた報告は Herman *et al.*¹⁷⁾ 及び Kitts *et al.*¹⁸⁾ のもの以外に見当たらない。そこで、著者らは我が国の代表的淡水養殖魚種であるウナギ及びアユにおけるオキシテ

*¹ 江南女子短期大学: 〒483 愛知県江南市高屋町大松原 172

*² 別刷請求等連絡者

Table 1. Recovery of Oxytetracycline from Fortified Eel and Ayu Tissues^{a)}

Fish	Tissues	Recovery (%) ^{b)}	C.V. (%) ^{c)}
Eel	Serum	99.7	0.9
	Muscle	84.1	4.8
	Liver	86.3	3.9
	Skin	77.3	2.5
	Bone	87.3	2.5
Ayu	Serum	97.3	2.7
	Muscle	82.0	4.5
	Liver	86.6	2.3
	Skin	75.9	4.9
	Bone	86.9	3.0

^{a)} The serum (1.0 mL), muscle (2.5 g), liver (1.0 g), skin (0.5 g) and bone (1.0 g) samples were fortified at 2 ppm oxytetracycline.

^{b)} The average of 5 replicates

^{c)} The coefficient of variation

ラサイクリンの残留性について調べ、更に、調理処理が残留オキシテトラサイクリンに及ぼす影響について検討した。

実験方法

1. 供試魚

供試魚として、愛知県産の養殖ウナギ *Anguilla japonica* (平均体重 141 g) 及びアユ *Plecoglossus altivelis* (平均体重 62 g) を用いた。飼育をウナギでは水温 28℃、換水率 40%/day の水槽で行い、アユでは水温 18℃ の流水水槽で行った。供試魚をそれぞれ 10 日間馴致飼育した後、実験に用いた。実験期間中、ウナギについては無給餌で飼育し、アユでは市販ペレット (2% 魚体重/日) で給餌飼育した。

2. 試薬

オキシテトラサイクリン塩酸塩及び Sep-Pak C18 はそれぞれ Sigma 社製及び Waters 社製を用いた。その他の試薬は高速液体クロマトグラフ用又は特級品を用いた。

3. 投薬方法及びサンプリング

オキシテトラサイクリンを餌料に混ぜ、麻酔した供試魚に投与量が 50 mg/kg となるようにカテーテルを用いて強制経口投与した。投薬後、所定時間ごとに 4 尾ずつ取り上げ、採血後、血清分離用チューブ (住友ベークライト (株) 製) を用いて血清を分離した。また、筋肉、肝臓、皮及び骨を採取した。それらを分析時まで -50℃ で保存し、各個体ごとに分析した。ただし、アユの肝臓、皮及び骨は 4 尾分を 1 検体として分析に供した。

4. 分析方法

血清中のオキシテトラサイクリン濃度を既報¹⁹⁾ に従い Hisep シールド疎水性カラム (Supelco 社製) を用いた血清試料直接注入法により行った。一方、筋肉、肝

臓、皮及び骨におけるオキシテトラサイクリン濃度は YMC Pack C18 A-303 (ワイエムシ社製) を分析カラムとして、Sep-Pak C18 による固相抽出法を用いて、既報²⁰⁾ に従い HPLC 分析を行った。HPLC 装置は次のとおりである。JASCO PU-980 ポンプ (日本分光工業 (株) 製)、JASCO UV-970 検出器 (日本分光工業 (株) 製)、Rheodyne 7125 (20 µL loop, レオダイン社製)、クロマトパック C-R6A ((株) 島津製作所製)。

5. 調理操作

オキシテトラサイクリンが残留するウナギ (筋肉、肝臓、皮、骨) 及びアユ (筋肉、皮) の組織を試料とした。ウナギでは、茹でる (沸騰水、8 分間)、焼く (リンナイコンベックオープン RCK-10NG(a), 200℃, 8 分間) 及び揚げる (180℃, 2 分間) の加熱操作を行った。アユでは試料が少なかったため、焼く (リンナイコンベックオープン RCK-10NG(a), 200℃, 8 分間) 操作についてのみ行った。それらの調理操作後の残留オキシテトラサイクリン濃度を上記の HPLC によって求めた。

結果及び考察

1. 添加回収実験

ウナギ及びアユの血清 (1.0 mL)、筋肉 (2.5 g)、肝臓 (1.0 g)、皮 (0.5 g) 及び骨 (1.0 g) にオキシテトラサイクリンを 2 ppm となるように添加し、それらの回収率及び変動係数を求めた。それらの結果を Table 1 に示した。両魚種とも皮における平均回収率は 70% 台であったが、それ以外は 80% 以上、変動係数 5% 以内と良好な結果が得られた。なお、本法における定量限界は両魚種とも血清で 0.02 µg/mL、筋肉で 0.02 µg/g、肝臓及び骨で 0.05 µg/g、皮で 0.1 µg/g であった。

Table 2. Half-life and the Time Required for Drug Levels to be Decrease to the Tolerance

Fish	Tissues	$T_{1/2}$ (days) ^{a)}	$T_{0.1}$ (days) ^{b)}
Eel	Serum	3.5	4.4
	Muscle	6.1	5.0
	Liver	11.3	25.2
	Skin	— ^{c)}	—
	Bone	—	—
Ayu	Serum	5.0	10.4
	Muscle	6.6	14.2
	Liver	5.5	23.8
	Skin	—	—
	Bone	—	—

a) Half-life (days)

b) $T_{0.1}$ (days) was calculated as the time required for drug levels to be decrease to the tolerance (0.1 ppm).

c) Not calculated

Fig. 1. Semi-log plot of oxytetracycline concentration in tissues of cultured eel after oral administration at a dose of 50 mg/kg

2. オキシテトラサイクリンの残留性

ウナギ及びアユにおけるオキシテトラサイクリン経口投与後の組織内濃度推移を Fig. 1 及び Fig. 2 に示した。組織内濃度序列は、ウナギで骨>肝臓>皮>筋肉≧血清の順であり、アユでは、肝臓>骨>皮>筋肉>血清の順であった。いずれの魚種も骨、皮及び肝臓での濃度が高く、筋肉で低かった。

両魚種の組織におけるオキシテトラサイクリンの消失半減期及び残留基準値(0.1 ppm)以下になるのに要する時間(以下、消失時間と記す)を消失曲線から求めた。それらの結果を Table 2 に示した。消失半減期はウナギでは肝臓(11日)、アユでは筋肉(7日)で最も長かった。消失時間は両魚種とも肝臓で長く、ウナギでは24日、アユで25日であった。これらの値は現在設定されている休薬期間の30日間以内であった。しかし、両魚種とも骨・皮において、残留オキシテトラサイクリンは投薬後30日間、ほぼ一定の濃度で推移したため、

Fig. 2. Semi-log plot of oxytetracycline concentration in tissues of cultured ayu after oral administration at a dose of 50 mg/kg

明瞭な消失曲線は認められなかった。テトラサイクリン系抗生物質は Ca^{2+} のような2価の金属イオンと安定なキレートを形成し、魚類の骨、皮、うろこ及び耳石などの硬組織への蓄積がよく知られている。なお、オキシテトラサイクリンが残留するウナギの骨(投薬後30日)に紫外線ランプ(366 nm)を照射したところ、Fig. 3 のようにオキシテトラサイクリン特有の蛍光色²¹⁾を確認することができた。近年、Grondel *et al.*⁴⁾ はコイ (*Cyprinus carpio*)、Jacobsen¹³⁾ 及び Rogstad *et al.*¹¹⁾ はニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、Namdari *et al.*¹⁵⁾ はマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) 及びギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*)、Malvisi *et al.*¹⁶⁾ は sea bream (*Sparus aurata*) の骨及び皮において、オキシテトラサイクリンが長期間残留することを報告している。現在、家畜・家禽ではオキシテトラサイクリンについて可食部位別、すなわち、肉、脂、肝臓及び腎臓ごとに残留基準

A

B

Fig. 3. Photographs of bones from cultured eel

The left bone in each photograph was sampled from control fish and the right, from oxytetracycline treated fish (50 mg/kg, 30 days after administration).

A: white lighting; B: UV lighting (366 nm)

値が設定されている。一方、魚介類は残留基準値として、0.1 ppm が設定されているにすぎない。アユについてはオキシテトラサイクリンの使用が禁止されているが、ウナギでは使用が認められているため、現在の使用基準では硬組織への残留が懸念される。一般に、ウナギの皮は筋肉とともに可食され、骨は揚げ物など珍味として食される場合が多い。したがって、今後、皮・骨への残留を考慮した用量、用法及び休薬期間など使用基準についての詳細な研究が望まれる。

3. 調理操作による残留オキシテトラサイクリンの変化

ウナギは白焼き、蒲焼き、きも焼き及びきも吸い、アユでは塩焼きなど加熱調理されて食されている。そこで、ウナギでは茹でる、焼く及び揚げる、アユでは焼くについてそれぞれ加熱調理を行い、それらの調理操作が残留オキシテトラサイクリンに及ぼす影響について調べ

Fig. 4. Effect of cooking methods on residual oxytetracycline in muscle, liver, skin and bone from eel

Values are mean $\pm$ standard deviation for three experiments.

Fig. 5. Effect of baking on residual oxytetracycline in muscle and skin from ayu

Values are mean $\pm$ standard deviation for three experiments.

た。その結果、いずれの加熱調理においても残留オキシテトラサイクリンは減少した。それらの減少率を Fig. 4 及び Fig. 5 に示した。加熱調理操作により残留オキシテトラサイクリンは、筋肉及び肝臓で 70~80% 消失した。これは加熱によってオキシテトラサイクリンが分解されたためと考えられる。Herman *et al.*¹⁷⁾ 及び Kitts *et al.*¹⁸⁾ もまた加熱処理によるニジマス及びサケにおける残留オキシテトラサイクリンの加熱分解を報告している。Ibrahim-Moats²²⁾ は加熱調理により、ラム肉中のオキシテトラサイクリンが分解することを示している。一方、骨では残留オキシテトラサイクリンの調理による消失は 30~50% にすぎなかった。それ故、骨中でカルシウムとキレート形成しているオキシテトラサイクリンは他の組織のものに比べて安定であると考えられた。Honikel *et al.*²³⁾ もまた、牛骨中の残留クロルテトラサイクリンは加熱処理に対してかなり安定であることを報告している。したがって、養殖魚に対するオキシテトラサイクリンの使用に当たっては残留させないことが食品衛生上重要であり、前述したように硬組織への残留を考慮した使用基準に関する研究が今後必要であると考えられる。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金（課題番号：08780029）によって行われた。記して謝意を表します。

文 献

- 1) 神保勝彦, 片岡 潤, 門間千枝, 伊藤 武, 丸山 務, 松本昌雄: 食衛誌, **35**, 210~214 (1994).
- 2) 農林水産省令第 42 号: “動物用医薬品の使用の規制に関する省令” 昭和 55 年 9 月 30 日 (1980).
- 3) 厚生省告示第 218 号: “食品, 添加物の規格基準の一部改正” 平成 7 年 12 月 26 日 (1995).
- 4) Grondel, J. L., Nouws, J. F. M., Dejong, M., Schutte, A. R.: J. Fish Dis. **10**, 153~163 (1987).
- 5) Grondel, J. L., Nouws, J. F. M., Schutte, A. R., Driessens, F.: J. Vet. Pharmacol. Therap. **12**, 157~162 (1989).
- 6) Bjorklund, H. V., Bylund, G.: Xenobiotica **21**, 1,511~1,520 (1991).
- 7) Black, W. D., Ferguson, H. W., Byrne, P., Claxton, M. J.: J. Vet. Pharmacol. Therap. **14**, 351~358 (1991).
- 8) Uno, K., Aoki, T., Ueno, R.: Nippon Suisan Gakkaishi **58**, 1,151~1,156 (1992).
- 9) Uno, K.: Aquaculture **143**, 33~42 (1996).
- 10) Uno, K., Aoki, T., Ueno, R., Maeda, I.: Fisheries Science **63**, 90~93 (1997).
- 11) Rogstad, A., Hormazabal, V., Ellingsen, O. F., Rasmussen, K. E.: Aquaculture **96**, 219~226 (1991).
- 12) Bruno, D. W.: J. Fish Dis. **12**, 77~86 (1989).
- 13) Jacobsen, M. D.: *ibid.* **12**, 29~36 (1989).
- 14) Bjorklund, H. V., Bylund, G.: Aquaculture **84**, 363~372 (1990).
- 15) Namdari, R., Abedini, S., Law, F. C. P.: *ibid.* **144**, 27~38 (1996).
- 16) Malvisi, J., Rocca, G. D., Anfossi, P., Giorgetti, G.: *ibid.* **147**, 159~168 (1996).
- 17) Herman, R. L., Collis, D., Bullock, G. L.: U. S. Fish Wildl. Serv., Tech. Pap. **37**, 1~6 (1969).
- 18) Kitts, D. D., Yu, C. W. Y., Aoyama, R. G., Burt, H. M., McErlane, K. M.: J. Agric. Food Chem. **40**, 1,977~1,981 (1992).
- 19) Ueno, R., Uno, K., Aoki, T.: J. Chromatogr. **573**, 333~335 (1992).
- 20) Ueno, R., Uno, K., Kubota, S. S., Horiguchi, Y.: Nippon Suisan Gakkaishi **55**, 1,273~1,276 (1989).
- 21) Tsukamoto, K.: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. **51**, 903~911 (1985).
- 22) Ibrahim, A., Moats, W. A.: J. Agric. Food Chem. **42**, 2,561~2,563 (1994).
- 23) Honikel, K. O., Schmidt, U., Woltersdorf, W., Leistner, L.: J. Assoc. Off. Anal. Chem. **61**, 1,222~1,227 (1978).