

2. 畜・水産物中の残留抗菌性物質の検出法

—免疫学的検出法について—

伊佐山 康 郎 (麻布大学)

抗菌性物質の使用は、畜産、養鶏、養魚の生産性向上に多大な貢献をもたらしたが、食品へのこれら薬物の残留が懸念される。食品における残留抗菌性物質検査には、迅速で高感度かつ安価な測定法が望まれるが、従来の微生物学的測定法¹⁾や液体クロマトを用いる方法²⁾には、前処理や測定操作方法の繁雑さ、結果を知るのに長時間を要する、特別な設備や高価な機器を用いるなど幾つかの欠点があった。そこで免疫学的測定法、特に酵素免疫測定法 (ELISA) を用いて、抗菌性物質の定量を試み、現在20種類の測定法 (表 1) が完成しているので、その概要について解説する。

表 1 Test name

Aminoglycosides	FRM, KM
Lincomycin	LCM
Macrolide antibiotics	LM, OL TS, SPM
Penicillin	PCG, ABPC
Polypeptide	BC, CL, ER TPT, VGM
Sulfur drugs	SDZ, SDMX SDD, SMR SMX, SQ

1. 特異抗体の作製

1) 免疫原の作製： 抗菌性物質を免疫学的方法にて測定する場合、特異抗体が必要であるが動物に抗菌性物質をそのまま免疫しても、ほとんど抗体は得られない。そこで、ヘモシアニンや牛血清アルブミン (薬剤の溶解性等によりキャリア蛋白の種類を選択する) と薬剤を結合させ、動物に

表 2 Production of antibodies

Antigen (Hapten)	Carrier protein	Coupling mechanism	Harvest timing
LM	BSA	Shiff	78(days)
FM	BSA	GMBS	73
KM	BSA	GMBS	62
BC	BSA	GMBS	68
SQ	BSA	Diazo	80
LCM	KLH	Shiff	66
SPM	KLH	Shiff	91

免疫する (表 2)。この際蛋白と薬剤構造の結合位置や方法によって、抗体の出来易さや、鋭敏性、特異性など得られる抗体の性質がほとんど決定されてしまう。基本的には、目的薬剤の特徴となる化学構造からなるべく離れた部位で、蛋白と結合させている^{3,4,5)}。

2) 動物への免疫：動物には、ウサギを用い、1羽当たり免疫原を蛋白量として0.5~1.0 mgをフロイドの完全アジュバンドと混合して免疫する。2週間毎に追加免疫を行い、この間に抗原を固定した ELISA 法にて抗体力価の推移を検定しピークに達した時期に全採血する。通常免疫期間40~90日で良好な抗血清が得られる。

3) 抗体の精製：力価の高い抗血清は、硫酸あるいは DEAE 分画による粗精製の IgG でも測定に用いる事はできるが、アフィニティ精製を行った方が非特異的の反応を低下させ、感度も上昇する。抗菌性物質を固定したアフィニティカラムに特異抗体を結合させ、グリシン—塩酸緩衝液にて切り離す方法にて精製し、測定に用いる。

抗菌性物質の種類毎にカラム基材や結合方法を変える必要があり、また免疫原や酵素標識物の作製の際の蛋白との結合方法とは異なった結合方法

でアフィニティカラムを作製するのが良い。

2. 酵素標識物の作製⁶⁾

標識用の酵素には、Peroxidase を用いている。抗菌性物質との結合には、アミノ基あるいは糖鎖を酸化してアルデヒドに変えた部位を用いる。この酵素標識物の結合方法も、基本的に免疫原の作製とは異なる方法とするのが良く、また、同一の結合方法を採用する場合には長鎖分子や芳香族環などを導入し、酵素蛋白と抗菌性物質を架橋させる間の構造を異なったものにする。

3. 抗体固定マイクロプレートの作製

特異抗体を $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度に 0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて希釈し、ELISA 用マイクロプレートに $100 \mu\text{l}$ 入れ、 4°C で一晩吸着させる。抗体を結合させたマイクロプレートは、洗浄後乾燥させれば 4°C 保存で半年以上使用出来る。なお、マイクロプレートの他に、ポリスチレン製のチューブでも同様に抗体を結合させられるが、この場合には抗体溶液を $500 \mu\text{l}$ 使用する。

4. 試料からの抽出方法

畜肉や鶏肉などの材料の場合には、測定試料 $0.5\sim 1.0 \text{ g}$ に7倍量の緩衝液を加え、ホモジナイズした後の液層の部分の採取する。ホモジナイズは、ガラスやテフロン製ホモジナイザー、超音波等のような器具を用いても良い。肉の抽出液の場合油が分離する事があるが、測定の際に油が抗体を結合させたマイクロプレートやチューブに付着すると、正しい結果が得られないので注意する必要がある。牛乳や卵のような液状の材料の場合は、肉と同様に7倍量の緩衝液を加え攪拌するだけで良い。また、飼料など緩衝液に溶解しない成分を測定する場合には、試料重量の8倍量の緩衝液を加え攪拌、静置後の液を用いる。液クロ用の精製試料などを測定する事もできるが、この場合に有機溶媒が存在すると、抗原-抗体反応に悪影響があるので完全に有機溶媒を揮発させ、抽出用緩

衝液にて再溶解する必要がある。ただし、5% 以下のメタノールやアセトニトリルならば、ほとんど問題はない。

5. 測定操作方法

マイクロプレートの場合には $50 \mu\text{l}$ の抽出試料を、またチューブの場合には $250 \mu\text{l}$ を入れ、さらに酵素標識抗菌性物質を同量加えて攪拌した後、室温に1時間放置する。その後、緩衝液にてマイクロプレートなどを十分に洗浄して、未反応の酵素標識物や試料の夾雑物を洗い流し、過酸化水素と ABTS または、*o*-フェニレンジアミンを基質として、酵素反応を行わせる。酵素反応は室温30分で良い。酵素反応は、硫酸あるいはフッ化ナトリウムで停止させ、吸光度を測定する。標準抗菌性物質により検量線を作成し、これと未知試料の吸光度を比較して、残留の有無や濃度を求める。

6. 測定法の評価

1) 測定感度と検量線： 測定の吸光度と標準液濃度の対数の間には、ほぼ直線関係が成り立っている。測定の範囲は、最低検出感度として測定系自体は 1 ppb 前後に調節しているが、測定試

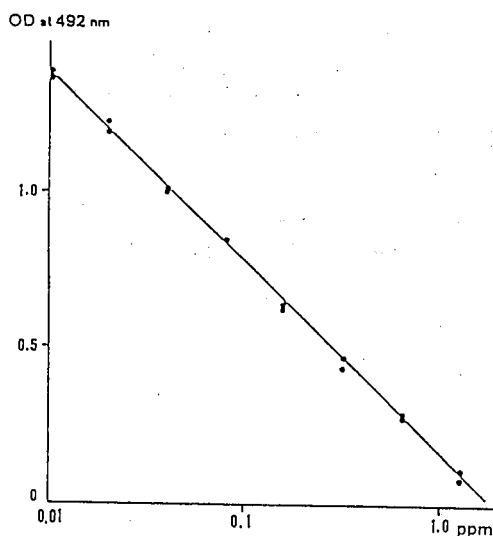


図1 Standard curve of colistin

表 3 Specificity analysis

Antibody Antigen	Olcando- mycin	Spira- mycin	Tylosin	Kana- mycin	Bacitracin	Colistin	Virginia- mycin	Sulfaquino- xaline
Olcandomycin	100	—	—	—	—	—	—	—
Spiramycin	4.6	100	0.1	—	—	—	—	—
Tylosin	1.0	6.2	100	—	—	—	—	—
Fradiomycin	—	—	—	0.2	—	—	—	—
Kanamycin	—	—	—	100	—	—	—	—
Bacitracin	—	—	—	—	100	—	—	—
Colistin	—	—	—	—	0.5	100	—	1.4
Enramycin	—	—	—	—	—	—	—	1.0
Virginiamycin	—	—	—	—	—	—	100	—
Oxytetracycline	—	—	—	—	—	—	—	—
Lincomycin	2.6	1.5	—	—	—	—	—	—
Salinomycin	—	—	—	—	—	—	—	—
Lasalocid	—	—	—	—	—	—	—	—
Amprolium	—	—	—	0.2	—	—	—	—
Sulfadimethoxine	—	—	—	—	—	—	—	3.1
Sulfaquinoxaline	—	—	—	—	—	—	—	100

料が8倍に希釈されるので、実際には 10 ppb が下限となる。同様に上限としては、約 2 ppm である (図 1)。

2) 測定精度： 同時、日差再現性ともいずれの項目でも 0.01~0.5 ppm の濃度範囲での変動係数 (CV) は 10% 以下であるが、0.5 ppm 以上の高濃度では、15~20% と低下する。

3) 特異性： 私達の測定法は、大半が極めて高い特異性を持つが、これは対象とする抗菌性物質の特徴的な構造を認識する抗体を使用する事による (表 3)。例えば、マクロライド系のオレアンドマイシンは、スピラマイシンと 4.6%、タイロシンとは 1% の交差性を示し、またリンコマイシンとは 2.6% の反応をするが、他の抗菌性物質とは 0.05% 以下の反応しか示さない。オレアンドマイシンと最も構造の類似したエリスロマイシンとも全く交差しない。ペニシリンの測定法に関しては、非常に特異性の高い方法と、アンピシリン、ペニシリン G に対して、同様に反応する測定法が開発出来ている。アンピシリン、ペニシリン G に対して反応する測定法は、ヘタシリンとペニシリン V にも弱いながら交差性を持ち、ナフシリンやアモキシリンとは交差しない。

表 4 Recovery of sulfadimethoxine and spiramycin

	Added (ppm)	Recovered (ppm)	% Recovery
SDMX	0.110	0.130	118.2
	0.290	0.224	112.0
	0.370	0.320	86.5
SPM	0.270	0.230	85.2
	0.140	0.163	116.4

(Sample: broiler meat, OD at 492 nm, N=8)

4) 添加回収試験： 鶏胸肉試料にスルファジメトキシンを 0.11, 0.29, 0.37 ppm 加え添加回収試験を行ったところ、86.5~118.2% の回収率であった。同様に 0.14, 0.27 ppm のスピラマイシンでは、116.4, 85.2% とスルファジメトキシンと近似する結果が得られた (表 4)。測定材料が肉の場合には、総てが溶液状にはならず固形分が存在し、抽出液としての正確な 8 倍希釈が困難であるために 2~3% の正誤差が生じる。さらに抽出液中の蛋白により、抗原-抗体反応が妨害される事から、酵素標識抗菌性物質の抗体との結合が低下し (蛋白誤差)、数% の正誤差を受ける。従って、低濃度の標準品添加の場合には、添

加量よりも 10~20% 程度高めの値を示す場合が多い。高濃度域での回収率の低下は、測定原理上、高濃度域での誤差を受け易い事と検量線からの適合が不完全な事による。

7. 代謝実験と組織内分布^{7,8)}

孵化後46日目のブロイラーにスルファジメトキシ、スピラマイシンなどの抗菌性物質を含んだ飼料を1週間与えた後、休薬飼料に切り換え、この間に休薬0日目、1、2、3、5、7日目と3羽づつ殺し、測定まで凍結で保存した。コリスチンを5 ppm 含む飼料にて飼育した場合、休薬を全く行わなくても筋肉組織や内臓諸器官に残留は認められず、唯一胆汁からの検出されており、従来より言われているように鶏ではポリペプチド系抗生物質が、腸管からほとんど吸収されない事が確認できた。スピラマイシンを20 ppm 投与した場合も、コリスチンと同様筋肉からは休薬期間が無くても、検出されなかったが内臓諸器官には残留が認められ、胆汁、肝臓、腎臓での残留性が強かった(表5)。スピラマイシンの残留性が特に強かった組織では、検出限界以下となるまでに休薬5~7日が必要であった。サルファ剤の、サルファキノキサリン(図2)、スルファジメトキシについても試験を行ったが、これらは休薬を行わない

表5 Distribution of antibiotics in broiler

	Sulfadimethoxine	Spiramycin
	mean SD	mean SD
[Organs]		
Serum	0.053±0.040	—
Lung		0.043±0.021
Muscle lower limb	0.017±0.006	—
Pectoral	0.010±0.010	—
Heart muscle	0.023±0.015	0.050±0.044
Liver	0.077±0.021	0.397±0.136
Bile	1.063±0.299	9.167±3.109
Spleen	0.017±0.006	0.220±0.026
Kidney	0.063±0.025	0.150±0.104
Skin	0.020±0.010	0.137±0.228
[Digestive Organs]		
Proventriculus	0.030±0.035	0.120±0.139
Gizzard		0.010±0.017
Small intestine	0.057±0.031	0.123±0.171
[Internal Matter in]		
Proventriculus	0.740±0.663	1.650±2.164
Gizzard	1.187±1.345	2.333±3.870
Small intestine	2.093±3.012	4.242±6.806

(N=3 ppm)

We fed 46 day-old broilers with sulfadimethoxine (30 g/ton) and spiramycin (20/ton) for 7 days.

と筋肉組織からも検出された。内臓諸器官では、他の抗菌性物質と同様に、胆汁、肝臓、腎臓に多く残留していた。

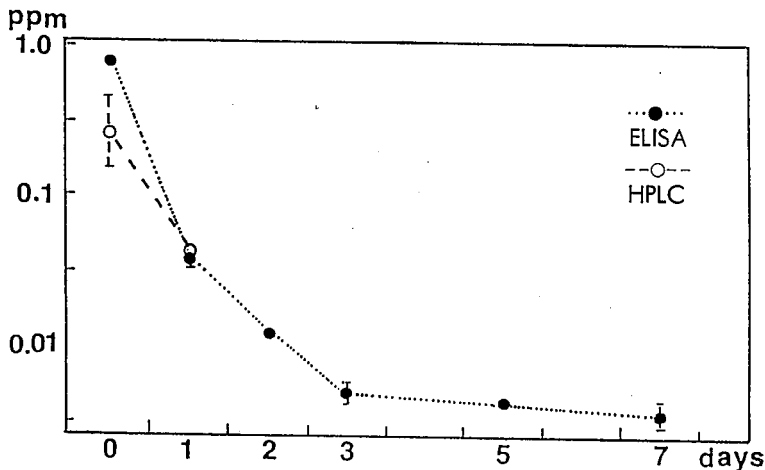


図2 Levels of surfaquinoxaline in breast meats

ま と め

私達の開発した抗菌性物質測定法は測定感度、操作性、迅速性などに優れているが、一方いくつかの問題点も含んでいる。第一には、特異性が高過ぎる点で、類縁薬剤であっても反応しないものが多く、薬剤系統別スクリーニングなどには適していない。この点については、抗体の認識部位を基本骨格にするなど対応の取れるように検討中である。第二には、標準品の問題がある。合成抗菌剤のように、構造や純度が明示されるものはよいが、抗菌活性で示されるような抗生物質の中には、活性は失っても、抗体との反応性が維持される成分の存在する可能性がある。このような場合には、標準品のロットによって力価は同じでも、ELISA の測定結果は異なる事になり、基準が明確に出来ない。特に、この点は特異性を低めて、多くの薬剤と交差性を持つような測定系にした場合に著しいと思われる。また、現在他の測定法との比較データをいくつかの施設にお願いして蓄積中であるが、液体クロマト法との比較の中に ELISA の測定結果が、液体クロマト法に比べて極端に高い例が見られた。この原因として、(1) ELISA では代謝物まで含めて測定され、液クロでは代謝物は測れない。(2) 組織中の抗菌性物質は、蛋白成分と緩い結合をしており、有機溶媒や中性塩による除蛋白の際に完全に回収出来ないなどが考えられ、さらに検討を続ける予定である。

要 約

酵素免疫測定法による、残留抗菌性物質の定量

法開発を試み、現在20薬剤の測定法が完成している。この方法は、感度、特異性、操作性に優れ測定範囲は 0.01-2.00 ppm で、精度も変動係数でほぼ 10% 以下である。試料も微量で済み抽出方法も、液体クロマト等に比較すると極めて迅速、簡便で、この方法は薬物動態の解析にも適用可能であろう。将来的には、スクリーニング用の測定法も開発したいと考え、検討を続けている。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課(編). 1990. 畜水産食品中の残留物質検査法
- 2) (財)畜産生物科学安全研究所(編). 1985. 動物用医薬品・飼料添加物の畜・水産物への残留とその分析法
- 3) Butler, V.P., Jr. and Beiser, S.M. 1973. Antibodies to small molecule: Biological and clinical application. *Adv. Immunol.*, 17: 255-310.
- 4) 藤田政之ら. 1989. 酵素免疫測定法による食肉中の抗菌剤検出法の開発. 1. 特異抗体の作製と精製法, 第108回日本獣医学会講演要旨, 183.
- 5) Hamburger, R. N. 1966. Chloramphenicol-specific antibody. *Science* 152: 302-305.
- 6) 石川栄治, 河井 忠, 宮井 潔(編). 1987. 酵素免疫測定法. 医学書院.
- 7) 伊佐山康郎ら. 1989. 酵素免疫測定法による食肉中の抗菌剤検出法の開発. 3. 鶏肉におけるコリスチン, スルファキノキサリンの検出, 第108回日本獣医学会講演要旨, 184.
- 8) 藤田政之ら. 1990. 酵素免疫測定法による食肉中の抗菌剤検出法の開発. 4. 鶏肉におけるスルファジメトキシム, スピラマイシンの検出, 第109回日本獣医学会講演要旨, 199.

Enzyme immunoassay of antibiotics in animal meat and organ tissue

Yasuro ISAYAMA

(Department of Immunology, Faculty of Environmental Health, Azabu University)

Twenty competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) methods for the measure-

ment of antibiotics were developed. They allow rapid detection with outstanding sensitivity and good specificity. Most drugs in meat, fish, feed were detected in about 2 hours within the range 0.01—2.0 ppm. Regarding their accuracy, interwell and inter/intraassay variability was below 10%. Compared to HPLC, sample preparation for ELISA is much simpler, and faster and requires a small amount of sample, ELISA itself is easier to handle, and yet its results are highly accurate. These characteristics allow us to perform a large number of tests in a short time. At the next stage, we plan to develop ELISA tests specific to a family or a group of drugs, which we believe will provide quick and reliable screening for a wide variety of industrial needs.

討 論（座長：佐藤静夫）

追加（伊佐山康郎）

この測定法のサンプルの要求が多数きているが、キットは現在のところ20種類のすべてが供給できるようになっているわけではないので補足する。

追加（藤田政之，三菱油化 BCL）

開発担当者として補足すると，1) 本法の実験の測定時間は，1時間半～2時間である。抽出やレポート作製を含めて6時間でできる。2) 現在20薬剤の測定系を開発しているが，要望に応じてサンプルを提供できるのは，現在のところ5薬剤である。製造能力や抗体在庫を考慮して順次項目をふやしてゆきたい。

質問（上野隆二，三重大）

1) 水産用の主要薬剤（OA，OTC など）はまだ20種類の中に入っていないのか。2) 一検体当りの検査経費はどれぐらいなのか。

答（藤田政之）

1) 経費の点だが，企業的にまだ明らかにできないが，広く使われるようになると従来の液クロや微生物学的測定法より安値にできると思う。未発売だが，国内供給として現在1テスト35本入測定キットで8万円ほどでき，定量用で30検体ぐらいの使用が可能である。プレート（96ウェル）も作製中であり，まだ価格は設定していないが，おそらく最終的な単価はチューブの半分ぐらいとなる。

いずれにしても多量に販売するようになれば安価となってゆくものと思う。

追加（伊佐山康郎）

本法は残留測定への応用のみでなく，抗生物質の治療効果を検討するとき，その体内分布の測定への応用も大きな目的としている。血液 0.5 ml の微量で測定可能なので，従来の方法よりすぐれている。