

リキッド型エコフィードに添加された抗菌薬の濃度変化

五十嵐優・坂本倫子・佐竹敦子・信平和代・工藤百合香・
中村裕子・荒木久美子・青木葉一・江口正志

財団法人 畜産生物科学安全研究所 (〒 252-0132 神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11)

1. はじめに

リキッド型エコフィードは加工屑の食品製造副産物や売れ残りなど、いわゆる食品廃棄物のうち有用な食品循環資源を原料にして加工処理されたリサイクル飼料である[1]。平成 21 年よりリキッド型エコフィードを含むエコフィード認証制度が開始されており [1]、更なる食品循環資源の飼料化の促進と、安心かつ安定的な利用が期待されている。

食品循環資源を原料とするリキッド型エコフィードは様々な食材を含む。リキッド型エコフィードには感染症治療を目的として動物用抗菌薬が添加される可能性があるが、その場合に添加された抗菌薬がどのような影響を受けるのかということに関する情報はほとんど無い。そこで、抗菌薬を製造時期及び成分組成の異なる 3 種のリキッド型エコフィードに添加し、リキッド型エコフィードが抗菌薬の安定性に及ぼす影響を検証した。

2. 材料及び方法

(1) 試験材料

家畜が直接摂取する 3 種類のリキッド型エコフィードを試験に供した。リキッド型エコフィード A (以下、エコフィード A と略す) は米、小麦などの炭水化物を多く含む食品残渣、リキッド型エコフィード B (以下、エコフィード B と略す) はタンパク質を多く含む食品残渣から作成されたものであり、リキッド型エコフィード C (以

下、エコフィード C と略す) は焼酎粕に市販配合飼料を加えたものである。また、リキッド型エコフィードの原材料の違いによる影響も検証するため、エコフィード A、B 及び C それぞれについて製造時期が 3 週間以上異なり、原材料も異なる 3 時点 (時期 I、時期 II 及び時期 III) で製造されたリキッド型エコフィードを試験に供した。なお、リキッド型エコフィードは分析に供するまで -18°C 以下で保存した。

試験には予備試験 (データ未発表) により安定性への影響が想定された 5 種類の抗菌薬、即ち酒石酸タイロシン (TS)、アモキシシリン三水和物 (AMPC)、ミロサマイシン (MRM)、ノルフロキサシン (NLFX) 及びコリスチン硫酸塩 (CL) を供試した。

(2) 試験方法

時期 I、時期 II 及び時期 III で製造されたエコフィード A、B 及び C に抗菌薬を添加して、添加直後 (0 時間目) 及び 20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間保存後の抗菌薬の濃度を測定した。抗菌薬の添加濃度は TS が 400 $\mu\text{g/g}$ 、AMPC は 400 $\mu\text{g/g}$ 、MRM は 100 $\mu\text{g/g}$ 、NLFX は 40 $\mu\text{g/g}$ 及び CL は 200 $\mu\text{g/g}$ とした。0 時間目及び 24 時間保存後の測定濃度から抗菌薬の残存率 (表 1 の脚注参照) を算出し、各リキッド型エコフィードが抗菌薬に及ぼす影響を解析した。

(3) 抗菌薬の定量方法

抗菌薬濃度の測定は予め添加回収率 70 ~ 120%、変動係数 15% 以内であることを確認した

表1 リキッド型エコフィードの抗菌薬への影響

抗菌薬	時期	保存時間 (hr)	エコフィード A		エコフィード B		エコフィード C	
			濃度 ^{a)}	残存率 ^{b)}	濃度 ^{a)}	残存率 ^{b)}	濃度 ^{a)}	残存率 ^{b)}
			($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)	($\mu\text{g/g}$)	(%)
TS	I	0	375	100	390	100	360	100
		24	295	79	301	77	255	71
	II	0	374	100	382	100	400	100
		24	312	83	335	88	274	69
	III	0	371	100	339	100	331	100
		24	343	92	329	97	240	73
AMPC	I	0	382	100	414	100	387	100
		24	312	82	418	101	362	94
	II	0	489	100	477	100	549	100
		24	412	84	450	94	472	86
	III	0	316	100	314	100	329	100
		24	270	85	254	81	272	83
MRM	I	0	123	100	104	100	104	100
		24	72	58	88	85	69	66
	II	0	98	100	98	100	91	100
		24	96	98	96	98	97	107
	III	0	81	100	81	100	83	100
		24	82	101	82	101	82	99
NFLX	I	0	42	100	46	100	42	100
		24	39	93	43	93	33	79
	II	0	37	100	39	100	35	100
		24	36	97	39	100	31	89
	III	0	40	100	39	100	44	100
		24	40	100	42	108	43	75
CL	I	0	223	100	239	100	180	100
		24	219	98	207	87	121	67
	II	0	245	100	239	100	201	100
		24	228	93	233	97	169	84
	III	0	232	100	252	100	155	100
		24	192	83	239	95	126	81

a) : n = 3 の平均値, b) : 残存率 = (24 時間保存後の測定濃度 / 0 時間目の測定濃度) \times 100

以下の分析条件で実施した(データ未発表)。なお、抗菌薬の定量は、TS、AMPC、MRM 及び CL については飼料分析基準 [2] を参考にした平板法により、NFLX については食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 [3] を参考にした高速液体クロマトグラフ法により行った。

TS : 試験試料 5 g を採取し、飼料分析基準 4 号緩衝液-メタノール (9/1, v/v) 20 mL を加えて 30 分間振とうした後、冷却遠心分離 (5°C, 2,900

rpm, 5 min) し、上清を得た。これを綿栓ろ過した後、ろ液を飼料分析基準 4 号緩衝液-メタノール (9/1, v/v) で 25 mL の定容とした。これを 0.5% Tween 含有 4 号緩衝液-メタノール (9/1, v/v) で 100 倍希釈し、検液とした。定量は微生物学的手法で実施し、試験菌には *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び培地には Antibiotic Medium 4 を用いた。

AMPC : 試験試料 5 g を採取し、80% アセトン 20 mL を加えて 30 分間振とうした後、冷却遠心

分離 (5°C, 2,900 rpm, 10 min) し、上清を得た。残渣に 80% アセトン 20 mL を加えて 15 分間振とうした後、冷却遠心分離 (5°C, 2,900 rpm, 10 min) し、上清を得た。先の上清と併せ、綿栓ろ過した後、n-プロパノール 15 mL を加えて減圧乾固し、飼料分析基準 3 号緩衝液 5 mL に溶解した。これを飼料分析基準 3 号緩衝液で 10,000 倍希釈し、検液とした。定量は微生物学的手法で実施し、試験菌には *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 及び培地には Standard Methods Agar を用いた。

MRM：試験試料 5 g を採取し、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH9.5) -メタノール-n-プロパノール (4/5/1, v/v) 10 mL 及びクロロホルム 10 mL を加えて 10 分間振とうした後、冷却遠心分離 (5°C, 2,900 rpm, 10 min) し、下層を得た。残渣にクロロホルム 10 mL を加えて 10 分間振とうした後、冷却遠心分離 (5°C, 2,900 rpm, 10 min) し、下層を得た。先の下層と併せ、減圧乾固し、0.01% Tween80 含有 0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH9.5) 5 mL に溶解した。これを 0.01% Tween80 含有 0.1mol/L リン酸緩衝液 (pH9.5) で 1,000 倍希釈し、検液とした。定量は微生物学的手法で実施し、試験菌には *Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び培地には Antibiotic Medium 5 を用いた。

NLFX：試験試料 5 g を採取し、アセトニトリル-0.2%メタリン酸溶液 (2/3, v/v) 30 mL を加えてホモジナイズ後、シャフトをアセトニトリル-0.2%メタリン酸溶液 (2/3, v/v) 20 mL で洗浄した。均質化した試料及びシャフト洗浄液をハイフラスーパーセルを敷いたろ紙を用いて吸引ろ過した。ろ紙上の残留物にアセトニトリル-0.2%メタリン酸溶液 (2/3, v/v) 10 mL を加え、吸引ろ過し、先のろ液と合わせた。ろ液にアセトニトリル 10 mL 及び n-プロパノール 10 mL を加えて減圧乾固し、0.05 mol/L クエン酸水溶液-アセトニトリル (91/9, v/v) 5 mL で溶解した。これを 0.05 mol/L クエン酸水溶液-アセトニトリル (91/9, v/v) で 1,000 倍希釈し、検液とした。定量は高速液体グラフ法で実施し、カラムは XBridge C18 (4.6 mm i. d. × 250 mm) を用いた。移動相は A 液に 0.05 mol/L クエン酸水溶液、B 液にアセト

ニトリルを用い、A と B の混合比を 91/9 としたイソクラティック条件とした。検出器には蛍光検出器を用い、励起波長 290 nm, 蛍光波長 455 nm の条件で定量を行った。

CL：試験試料 5 g を採取し、飼料分析基準 5 号緩衝液 20 mL を加えて 30 分間振とうしたのち、冷却遠心分離 (10°C, 2,800 rpm, 5min) し、上清を得た。これを綿栓ろ過した後、ろ液を飼料分析基準 5 号緩衝液で 25 mL の定容とした。これを飼料分析基準 5 号緩衝液で 50 倍に希釈し、検液とした。定量は微生物学的手法で実施し、試験菌には *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617 及び培地には飼料分析基準 F-9 号培地を用いた。

3. 結果及び考察

0 時間目及び 24 時間保存後の抗菌薬の測定濃度及び残存率を表 1 に示す。

TS：エコフィード A は時期 I 及び II において残存率が低下したが、時期 III では影響は小さかった。エコフィード B では時期 I において残存率が低下し、時期 II においてもやや残存率が低下したが時期 III ではほとんど影響はなかった。エコフィード C では全ての時期において残存率が低下した。以上より、TS はエコフィード A 及び B では製造時期の違いによっては残存率が低下し、エコフィード C では製造時期の違いによらず残存率が低下することが示唆された。

AMPC：エコフィード A の全ての時期において残存率が低下した。エコフィード B では時期 III において残存率が低下した。エコフィード C では時期 III において残存率が低下し、時期 II においてもやや低下した。時期 I における影響は小さかった。以上より、AMPC はエコフィード A では製造時期によらず残存率が低下し、エコフィード B 及び C では製造時期の違いによっては残存率が低下することが示唆された。

MRM：全ての試料種において時期 I では残存率が低下したが、それ以外の時期においての影響は小さかった。以上より、MRM はエコフィード A, B 及び C 共に、製造時期が残存率に影響することが示唆された。

NLFX: エコフィード A 及び B では製造時期によらず影響は小さかった。エコフィード C では時期 I 及び III において残存率が低下し、時期 II においてもやや低下した。以上より、NLFX はエコフィード A 及び B では製造時期が残存率に影響することはなく、一方エコフィード C では製造時期によらず残存率が低下することが示唆された。

CL: エコフィード A では時期 III において残存率が低下し、それ以外の時期では影響は小さかった。エコフィード B では時期 I においてやや残存率が低下したが、それ以外の時期では影響は小さかった。エコフィード C では全ての時期において残存率が低下した。以上より、CL はエコフィード A 及び B では製造時期の違いによっては残存率が低下し、エコフィード C では製造時期によらず残存率が低下することが示唆された。

リキッド型エコフィードは一部の抗菌薬の 24 時間後の残存率に影響を与える可能性があり、その影響の程度はリキッド型エコフィードの種類、製造時期によって一定ではないことが明らかになった。なお、継時的な減衰については不明であり、今後詳細な検討が必要であると考えられる。リキッド型エコフィードの原材料として製造業者毎に異なる様々な食品循環資源が使われ、また、製造時期によって使われる原材料の種類、割合も

異なることが予想されることから、それぞれのリキッド型エコフィードの抗菌薬への影響を事前に確定することは必ずしも容易ではないと考えられた。以上のことから、リキッド型エコフィードへ抗菌薬を添加する場合、可能な限り給与直前に添加し、添加飼料は速やかに使い切るなどの注意が必要であると考えられた。

4. 謝辞

本研究の成果は、(社)日本動物用医薬品協会を実施主体とする JRA 助成事業「エコフィード利用安全推進事業」において得られたものである。

引用文献

- 1) Sugiura K, Yamatani S, Watahara M, Onodera T: Ecofeed, animal feed produced from recycled food waste. *Vet Ital*, 45, 397-404 (2009)
- 2) 平成 20 年 4 月 1 日付け 19 消安第 14729 号農林水産省消費・安全局長通知, 飼料分析基準
- 3) 平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知, 食品に残留する農薬, 飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法

Remaining Activities of Some Antibiotics Added in Liquid Ecofeed

Yu IGARASHI, Noriko SAKAMOTO, Atsuko SATAKE, Kazuyo NOBUHIRA, Yurika KUDOU,
Hiroko NAKAMURA, Kumiko ARAKI, Youichi AOKI and Masashi EGUCHI

*Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology,
3-7-11, Hashimotodai, Midori-ku, Sagami-hara-shi, Kanagawa, 252-0132, Japan*

Though veterinary antibiotics might be added in liquid animal ecofeed processed from recycled food waste for the treatment of infectious diseases, there are few reports about influence of the liquid ecofeed on antibiotics added. We examined the influence of three kinds of liquid ecofeed processed at three differing time points on several antibiotics. The examined liquid ecofeed affected the remaining activities of antibiotics added at various degrees. These results indicate that the some kind of liquid ecofeed affect remaining activities of some antibiotics at various degrees and those degrees of influence are not constant at different processing time, if antibiotics were added.