

8 豚用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良

大島 慎司^{*1}, 篠田 直樹^{*1}, 橋本 仁康^{*2}, 千原 哲夫^{*3}

Improved Determination of Avilamycin in Formula Feed for Swine by Microbiological Assay

Shinji OSHIMA^{*}, Naoki SHINODA^{*}, Yoshiyasu HASHIMOTO^{*} and Tetsuo CHIHARA^{*}

(^{*1} Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Fertilizer and Feed Inspection Department,

^{*2} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Kobe Regional Center Osaka Office),

^{*3} I.A.A. Fertilizer and Feed Inspection Services, Headquarters

(Now Food and Agricultural Materials Inspection Center (I.A.A.), Nagoya Regional Center))

An improved microbiological assay was developed for the determination of avilamycin in formula feed for swine.

Avilamycin in formula feeds was extracted with acetone-water (4:1). The extract was diluted with phosphate buffer-acetone (4:1) and phosphate buffer-acetone (19:1) to prepare sample solutions of 0.2 µg(potency)/mL, so that the concentration of acetone in each sample solutions be came 20 percent. *Micrococcus luteus* ATCC 10240 was added as the test organism to the agar medium F-8 added with 30 g/1,000 mL of sodium chloride, and avilamycin was determined by the standard response line method. The recovery test was conducted with 3 kinds of formula feed for swine added with avilamycin at levels of 10, 20, and 40 g(potency)/tons. The mean recovery was 94.1~112.7%, and the relative standard deviations (RSD) were within 7.8%.

The collaborative study was conducted with formula feed for swine added with avilamycin at the level of 20 g(potency)/tons in 8 laboratories. The mean recovery was 101.3%, and the relative standard deviation of repeatability and reproducibility (RSD_r and RSD_R) were 4.0% and 5.5%, respectively.

Key words: アビラマイシン avilamycin ; 抗生物質 antibiotics ; 豚用配合飼料 formula feed for swine ; 微生物学的定量法 microbiological assay ; 共同試験 collaborative study

1 緒 言

アビラマイシンは, *Streptomyces viridochromogenes* の産生するオルトソマイシン系の抗生物質で, 飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を用途として, 飼料添加物に指定され¹⁾, 鶏用(幼すう用, 中すう用及びブロイラー用)飼料に 2.5~10 g(力価)/トン及び豚用(ほ乳期用及び子豚期用)飼料に 10~40g(力価)/トン添加することができる²⁾.

配合飼料中のアビラマイシンの定量法は, 菅野ら³⁾が検討した微生物学的定量法が既に飼料分析基準⁴⁾(以下「現行法」という.)に記載されているが, 近年, 加熱加工された配合飼料に現行法を

^{*1} 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

^{*2} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター神戸センター大阪事務所

^{*3} (独) 肥飼料検査所本部, 現 (独) 農林水産消費安全技術センター名古屋センター

適用した場合，アビラマイシン添加量に対して低く定量される事例が認められている．

また，現行法は，抽出溶媒にクロロホルムを用いており，環境面，分析者の健康面等から，使用を避けることが望まれている．

今回，以上の問題点を解決し，より簡便な方法となるように，荒木ら^{5),6)}が検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法を基に，豚用配合飼料に適用できる改良法を検討したので，その概要を報告する．

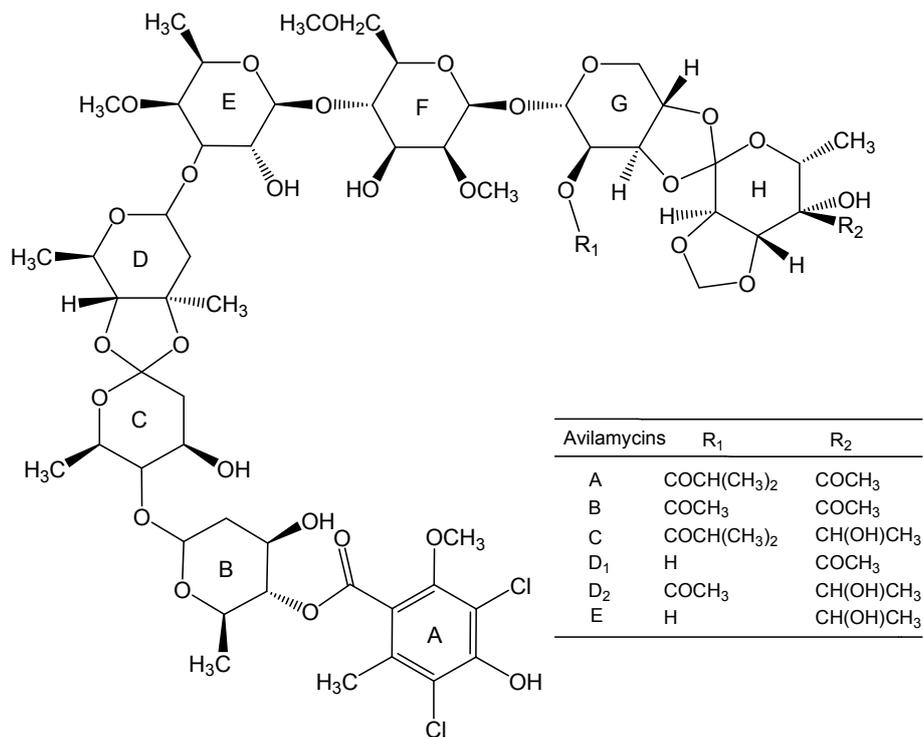


Fig. 1 Chemical structure of avilamycin

2 実験方法

2.1 試料の調製

抗菌性物質を含まない市販の3種類の豚用配合飼料にアビラマイシン製剤（Eli Lilly & Co.製）を添加し，アビラマイシンを10, 20及び40 g(力価)/t含有する試料をそれぞれ調製した．調製後，0.5 mmの網ふるいを通すまで粉碎した．

試料の調製に用いた配合飼料の配合割合の概要は，Table 1のとおりである．

Table 1 Example of component of formula feed

| Kind of formula feed | Classification of ingredient | Ratio (%) | Ingredient |
|-------------------------------|------------------------------|-----------|---|
| For swine 1 (suckling pig) | Animal by-product feeds | 43 | Powdered skimmed milk, Fish meal |
| | Grains | 33 | Wheat |
| | Oil meals | 3 | Soybean protein concentrate |
| | Others | 21 | Glucose, Granulated sugar, Feed yeast, Calcium phosphate, Salt, Powdered fat |
| For swine 2 (suckling pig) | Grains | 65 | Corn, Wheat, Wheat flour |
| | Animal by-product feeds | 15 | Powdered skimmed milk, Fish meal |
| | Oil meals | 7 | Soybean protein concentrate |
| | Others | 13 | Glucose, Feed yeast, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt, Powdered fat |
| For swine 3 (growing pig) | Grains | 73 | Corn, Wheat flour |
| | Brans | 9 | Wheat bran |
| | Oil meals | 9 | Soybean meal |
| | Animal by-product feeds | 5 | Fish meal |
| | Others | 4 | Alfalfa meal, Calcium phosphate, Calcium carbonate, Salt |

2.2 試薬の調製

1) 7号緩衝液

リン酸二水素カリウム 6.4 g 及びリン酸水素二ナトリウム・12水 18.9 g を水 750 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とし、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

2) 希釈溶媒

7号緩衝液ーアセトン (4+1)

3) アビラマイシン標準液

常用標準アビラマイシン適量を減圧下 (2.67~3.33 kPa 以下)、60°C で 3 時間乾燥した後、40 mg 以上を正確に量り、アセトンを正確に加えて溶かし、1 mg(力価)/mL のアビラマイシン標準原液を調製した。

使用に際して、標準原液を希釈溶媒で正確に希釈し、0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及び 0.05 µg(力価)/mL の各標準液を調製した。

4) F-8 号培地

Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 45 g (ペプトン 7.2 g, 肉エキス 1.8 g, 酵母エキス 3.6 g, ブドウ糖 7.2 g, 塩化ナトリウム 7.2 g 及びカンテン 18 g) を水に溶かして 1,000 mL にし、水酸化ナトリウム 1 mol/L を用いて pH を 7.9~8.1 に調製した後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

5) F-25 号培地

Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 45 g 及び塩化ナトリウム 30 g を水に溶かして 1,000 mL にし、水酸化ナトリウム 1 mol/L を用いて pH を 7.9~8.1 に調製した後、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

6) 菌液

試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、飼料分析基準⁴⁾に準じて菌液を調製した。

7) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51°C に保温した培地に菌液の 10 倍希釈液を培地 100 mL に対して 0.5 mL 程度加えて十分にかき混ぜ、その 20 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 15 mm、合成樹脂製）に一様に広がる様に分注し、水平に静置して凝固させた。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔となる位置に、せん孔機（システムサイエンス製 ZP-SM）を用いて 4 個のせん孔（内径 8 mm）を設けた。

8) 抽出溶媒

アセトン-水（4+1）

2.3 定量方法

1) 抽出

分析試料 10.0 g（アビラマイシンとして 0.1~0.4 mg(力価)相当量）を量って 200 mL の共栓三角フラスコに入れ、抽出溶媒 100 mL を加え、マグネチックスターラー（柴田科学製 MU-4）で 20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙（5 種 A）でろ過した。

2) 希釈

ろ液の一定量を試料液中のアセトン濃度が 20 v/v%となるように、希釈溶媒及び 7 号緩衝液-アセトン（19+1）で正確に希釈し、0.2 µg(力価)/mL の試料溶液を調製した。

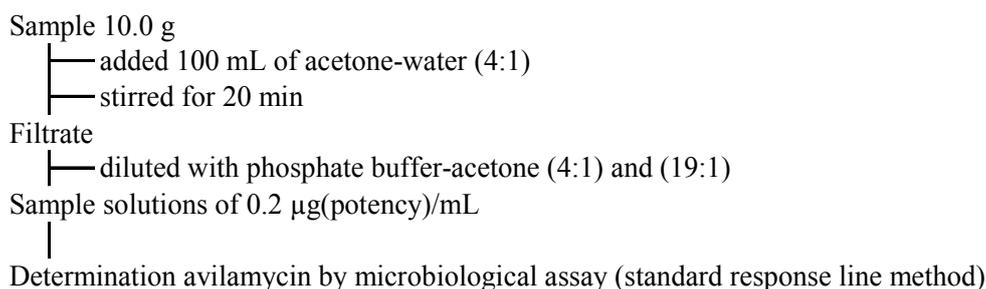
3) 分注及び培養

2.2 の 7) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準⁴⁾の標準曲線法に準じ、標準液及び試料溶液をそれぞれ 100 µL ずつ各せん孔に分注し、9~11°C で 2 時間静置した後、35~37°C で 16~24 時間培養した。

4) 阻止円直径の測定及び計算

ゾーンアナライザー（システムサイエンス製 ZA-F MODEL PCA-11）を用い、培養を終えた寒天平板上の阻止円の直径をそれぞれ 0.1 mm まで正確に測定し、飼料分析基準⁴⁾の標準曲線法に準じ、試料中のアビラマイシン濃度を求めた。

なお、定量法の概要を Scheme 1 に示した。



Scheme 1 Analytical procedure for avilamycin in formula feed for swine

3 結果及び考察

3.1 培地の検討

試験菌には、アビラマイシンに対する感受性が高いことから、アビラマイシン原体及び製剤の力価試験法²⁾並びに菅野ら³⁾及び荒木ら^{5),6)}も用いている *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用いることとし、豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量に最適な培地を検討することとした。

豚用飼料に対するアビラマイシンの添加量 (10~40 g(力価)/t) 及び試料採取量を 10 g に設定した場合、参照標準液 (RP) の濃度は最高でも 0.2 μg (力価)/mL にしかできず、そのためには、RP 濃度 0.2 μg (力価)/mL での標準液の最低濃度 0.05 μg (力価)/mL においても明瞭な阻止円を形成するような、感度の高い培地の選定が必要であった。

菅野ら³⁾及び荒木⁵⁾が配合飼料及びプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討で用いている F-8 号培地並びに荒木ら⁶⁾がサリノマイシンナトリウム及びラサロシドナトリウムを含むプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討で用いている F-25 号培地について、0.01~2 μg (力価)/mL のアビラマイシン標準液を用い、せん孔法におけるアビラマイシンの *Micrococcus luteus* ATCC 10240 に対する感受性及び阻止円の鮮明度を比較した。

その結果、Fig. 2 のとおり、F-25 号培地は F-8 号培地よりもアビラマイシンに対する感受性が高く、0.025 μg (力価)/mL 程度まで阻止円が明瞭であることを確認した。

以上のことから、以後の検討では F-25 号培地を用いることとし、0.05~0.8 μg (力価)/mL の範囲で標準曲線を作成することとした。

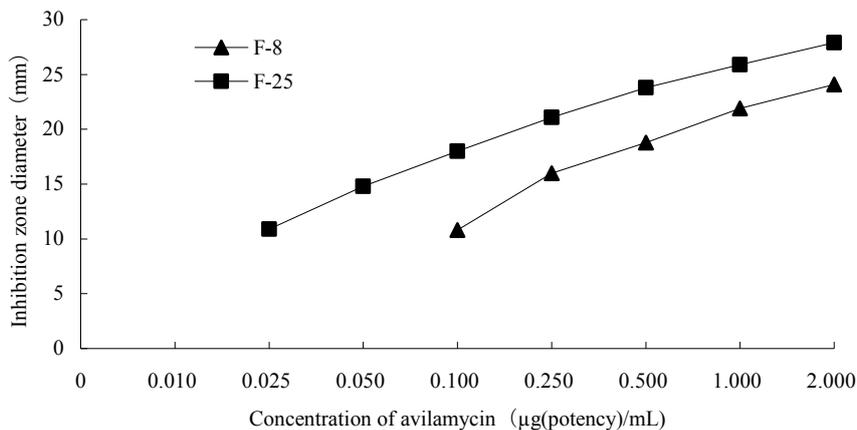


Fig. 2 Sensitivity curve of avilamycin on each culture medium

3.2 抽出溶媒の検討

アビラマイシンが 20g(力価)/t 添加された市販の豚用配合飼料を用い、クロロホルムを用いない抽出溶媒の検討を行った。

配合飼料中のアビラマイシンを荒木⁵⁾が検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法と同様に、7号緩衝液 20 mL を加え、5 分間かき混ぜた後、さらにアセトン 80 mL を加え、20 分間かき混ぜて抽出し、以下本法に従ってアビラマイシンを定量したところ、回収率にばらつきが認められた。

次に、アセトンと 7号緩衝液を混合し、アセトン濃度を 60%から 90%まで 10%ずつ変えて調整した抽出溶媒 100 mL で 20 分間抽出した後、同様にアビラマイシンを定量した。その結果、アセトン-7号緩衝液 (4+1) で抽出した場合に、回収率が最も高く、またばらつきも小さくなった。

しかし、アセトン-7号緩衝液 (4+1) は、混合液中に塩の析出が認められたため、7号緩衝液を水に変えて同様に回収率の検討を行った。

その結果、Table 2 のとおり、アセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした場合にはアセトン-7号

緩衝液（4+1）で抽出した場合とほぼ同等の回収率が得られたため、以後の検討では同溶媒を抽出溶媒として用いることとした。

Table 2 Recovery of avilamycin in various extracting solvents

| Kind of extracting solvent | Mean ^{a)} (RSD) ^{b)} (%) | |
|----------------------------|--|---------------------|
| | Mean ^{a)} | (RSD) ^{b)} |
| Acetone-water (9:1) | 94.9 | (3.5) |
| Acetone-water (4:1) | 112.9 | (1.6) |
| Acetone-water (7:3) | 94.7 | (10) |
| Acetone-water (3:2) | 73.9 | (6.1) |

a) Mean recovery ($n=2$)

b) Relative standard deviation

3.3 分析用試料の調製方法の検討

アビラマイシンが添加された市販の豚用配合飼料を 1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、本法に従ってアビラマイシンを定量したところ、マッシュ状の試料で回収率にばらつきが認められた。

荒木ら^{5),6)}はプレミックス中のアビラマイシンの定量法の検討の際に、分析用試料を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕し、分析値のばらつきを改善しており、配合飼料についても同様の措置を採ることにより改善される可能性が考えられた。そこで、0.5 及び 1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した 5 種類の市販の加熱加工されていないほ乳期子豚用配合飼料（アビラマイシン表示量：20 g (力価)/t）を用い、本法に従って繰り返し 3 回分析し、その回収率を求め、試料の粉砕粒度の違いによる影響を確認した。

その結果、Table 3 のとおり、0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した試料の繰り返し精度は相対標準偏差（RSD）として 4.5%以下となり、1.0 mm の網ふるいを通過するまで粉砕した試料の結果と比較してばらつきが改善された。

このことから、豚用配合飼料中のアビラマイシンを定量する場合には、試料を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉砕することが必要であると考えられた。

Table 3 Influence on recovery of avilamycin by the difference of sample preparing method

| Sample number | Declared content (g(potency)/ton) | Particle size (%) | | | |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|---------------------|--------|--------|
| | | 1.0 mm | | 0.5 mm | |
| | | Mean ^{a)} | (RSD) ^{b)} | Mean | (RSD) |
| 4 (before heat processing) | 20 | 120.9 | (19) | 108.1 | (4.5) |
| 5 (before heat processing) | 20 | 100.2 | (20) | 114.3 | (4.3) |
| 6 (before heat processing) | 20 | 91.8 | (11) | 82.8 | (4.1) |
| 7 (before heat processing) | 20 | 119.9 | (26) | 114.9 | (3.4) |
| 8 (before heat processing) | 20 | 108.3 | (9.9) | 100.5 | (3.9) |

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.4 加熱加工飼料への適用性

市販の加熱加工されたほ乳期子豚用配合飼料（アビラマイシン表示量：20 g (力価)/t）5種類を用い、現行法及び本法によりそれぞれ繰り返し3回分析し、アビラマイシンの回収率を求め、本法の加熱加工飼料への適用性について検討した。

その結果、Table 4 のとおり、本法により、加熱加工飼料の回収率に改善が認められた。

Table 4 Comparison of recovery of avilamycin by the existing and this method

| Sample number | Declared content (g(potency)/ton) | Methods of analysis (%) | | | |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|-------------|--------|
| | | Existing method | | This method | |
| | | Mean ^{a)} | (RSD) ^{b)} | Mean | (RSD) |
| 4 (after heat processing) | 20 | 75.9 | (0.91) | 95.7 | (1.3) |
| 5 (after heat processing) | 20 | 73.5 | (2.1) | 90.6 | (3.1) |
| 6 (after heat processing) | 20 | 86.4 | (16) | 91.8 | (3.8) |
| 7 (after heat processing) | 20 | 80.2 | (6.4) | 96.3 | (8.1) |
| 8 (after heat processing) | 20 | 102.7 | (8.8) | 106.9 | (5.1) |

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.5 妨害物質の検討

現在、飼料添加物に指定されている抗菌性物質のうち、豚用配合飼料でアビラマイシンとの併用が可能なものには、クエン酸モランテル、デストマイシン A、ビコザマイシン及び硫酸コリスチンの4種類がある。これらの標準液を用い、F-25号培地における試験菌 *Micrococcus luteus* ATCC 10240 に対する感度曲線を求め、その感受性、阻止円の状態及び配合飼料への添加量等から、これらの併用が豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害する可能性を検討した。

この結果、いずれの抗菌性飼料添加物も試験菌に対して感受性が認められず、豚用配合飼料中のアビラマイシンの定量を妨害することはないと考えられた。

3.6 添加回収試験

2.1 で調製した試料を用い、本法により3点併行分析を行い、回収率及び繰り返し精度を検討した。

その結果は、Table 5 のとおり、平均回収率は94.1~112.7%、その繰り返し精度は相対標準偏差(RSD)として7.8%以下の成績が得られた。

Table 5 Recovery tests of avilamycin in formula feeds

| Added level (g(potency)/ton) | Formula feeds (%) | | | | | |
|---------------------------------|--------------------|---------------------|-------------|--------|-------------|-------|
| | For swine 1 | | For swine 2 | | For swine 3 | |
| | Mean ^{a)} | (RSD) ^{b)} | Mean | (RSD) | Mean | (RSD) |
| 40 | 106.8 | (1.6) | 100.1 | (1.1) | 105.8 | (4.4) |
| 20 | 107.5 | (6.1) | 97.6 | (0.49) | 94.1 | (3.2) |
| 10 | 95.6 | (7.8) | 111.2 | (4.4) | 112.7 | (5.6) |

a) Mean recovery ($n=3$)

b) Relative standard deviation

3.7 共同試験

本法の再現精度を調査するため、Table 1 の豚用配合飼料 3 にアビラマイシンとして 20 g(力価)/t 相当量を添加した共通試料を用い、財団法人日本食品分析センター名古屋支所、全国酪農業協同組合連合会分析センター、独立行政法人肥飼料検査所（現（独）農林水産消費安全技術センター）本部、同札幌事務所（現 同札幌センター）、同仙台事務所（現 同仙台センター）、同名古屋事務所（現 同名古屋センター）、同大阪事務所（現 同神戸センター大阪事務所）及び同福岡事務所（現 同福岡センター）の 8 試験室において、本法による共同試験を実施した。

その結果、Table 6 のとおり、アビラマイシンの総平均回収率は 101.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差（ RSD_r 及び RSD_R ）としてそれぞれ 4.0%及び 5.5%であった。

Table 6 Collaborative study results

| Laboratory | Recovery (%) | |
|---------------------------|--------------|-------|
| 1 | 96.1 | 91.0 |
| 2 | 100.3 | 101.7 |
| 3 | 104.4 | 113.5 |
| 4 | 108.1 | 104.8 |
| 5 | 103.3 | 92.6 |
| 6 | 99.0 | 102.4 |
| 7 | 100.5 | 100.7 |
| 8 | 98.9 | 102.9 |
| Total ^{a)} (%) | 101.3 | |
| RSD_r ^{b)} (%) | 4.0 | |
| RSD_R ^{c)} (%) | 5.5 | |

a) Total mean recovery ($n=18$)

b) Relative standard deviation of repeatability

c) Relative standard deviation of reproducibility

4 まとめ

豚用配合飼料中のアビラマイシンの微生物学的定量法の改良法について検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) F-8号培地に培地1,000 mLあたり塩化ナトリウムを30 g加えたF-25号培地はF-8号培地よりもアビラマイシンに対する感受性が高く、0.025 µg(力価)/mL程度まで阻止円が明瞭であった。
- 2) 抽出溶媒としては、アセトン-水(4+1)が最適であった。
- 3) 豚用配合飼料中のアビラマイシンを定量する場合には、分析用試料を0.5 mmの網ふるいを通過するまで粉砕することが必要であった。
- 4) 市販の加熱加工された豚用配合飼料5種類について、本法を適用したところ、現行法に比較して回収率に改善が認められた。
- 5) アビラマイシンとの併用が認められている抗菌性物質のうち、豚用配合飼料への使用が認められているクエン酸モランテル、デストマイシンA、ビコザマイシン及び硫酸コリスチンは、アビラマイシンの定量を妨害することはなかった。
- 6) 本法による添加回収試験を実施した結果、平均回収率は94.1~112.7%、その繰返し精度は相対標準偏差(RSD)として7.8%以下であった。
- 7) 豚用配合飼料にアビラマイシンとして20 g(力価)/t相当量を添加した共通試料を用い、8試験室において、本法による共同試験を実施した結果、アビラマイシンの総平均回収率は101.3%、その室内繰返し精度及び室間再現精度は相対標準偏差(RSD_r及びRSD_R)としてそれぞれ4.0%及び5.5%であった。

謝 辞

共同試験にご協力頂いた財団法人日本食品分析センター及び全国酪農業協同組合連合会の試験室の各位に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 農林省告示：“飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づき飼料添加物を定める件”，昭和51年7月24日，告示第750号(1976)。
- 2) 農林省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令”，昭和51年7月24日，省令第35号(1976)。
- 3) 菅野 清，佐々木 隆：飼料研究報告，17，83(1992)。
- 4) 農林水産省畜産局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成7年11月15日，7畜B第1660号(1995)。
- 5) 荒木誠士：飼料研究報告，22，87(1997)。
- 6) 荒木誠士，風間鈴子：飼料研究報告，22，97(1997)。