

**技術レポート****2 鶏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**関口 好浩<sup>\*1</sup>, 佐藤 梢<sup>\*2</sup>, 吉村 哲史<sup>\*3</sup>**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<sup>1)</sup>, 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, ほ乳期子豚用飼料に 10~40 g(力価)/トン及び子豚期用飼料に 5~40 g(力価)/トン添加することができる<sup>2,3)</sup>.

配合飼料中のアビラマイシンの定量法は, サリノマイシンナトリウム又はラサロシドナトリウムを含まない飼料を対象として菅野らが検討した微生物学的定量法<sup>4)</sup>(以下「菅野らの方法」という.), 豚用飼料を対象として大島らが検討した微生物学的定量法<sup>5)</sup>が飼料分析基準<sup>6)</sup>に記載されている.

しかし, 菅野らの方法<sup>4)</sup>は抽出溶媒にクロロホルムを用いており, 環境面及び分析者の安全性確保等の理由により塩素系溶媒の使用を避けることが望まれていることから方法の改良が求められていた. そのため, 豚用飼料を対象とした改良法が検討された<sup>5)</sup>が, 鶏用配合飼料については未だ検討されていない.

今回, これらの問題を解決するために, 荒木らが検討したプレミックス中のアビラマイシンの定量法<sup>7)</sup>と大島らが検討した改良法<sup>5)</sup>を基に, 鶏用配合飼料を対象とした改良法を検討したので, その概要を報告する.

なお, アビラマイシンの構造式は Fig. 1 に示したとおり, アビラマイシン A, B, C, D1, D2, E の混合物であり, 主成分はアビラマイシン A である.

**2 実験方法****2.1 試 料**

抗生物質を含まない市販の配合飼料(幼すう育成用, 中すう育成用及びブロイラー肥育前期用)及びアビラマイシン製剤(Eli Lilly & Co.製)を 0.5 mm の網ふるいを通過するまで粉碎した.

粉碎後, 各配合飼料にアビラマイシン製剤を添加して, アビラマイシンとしてそれぞれ 2.5, 5 及び 10 g(力価)/トン含有する試料をそれぞれ調製した.

試料の調製に用いた配合飼料の配合割合は, Table 1 に示した.

\*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)農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部, 現 同仙台センター

\*3 (独)農林水産消費安全技術センター神戸センター

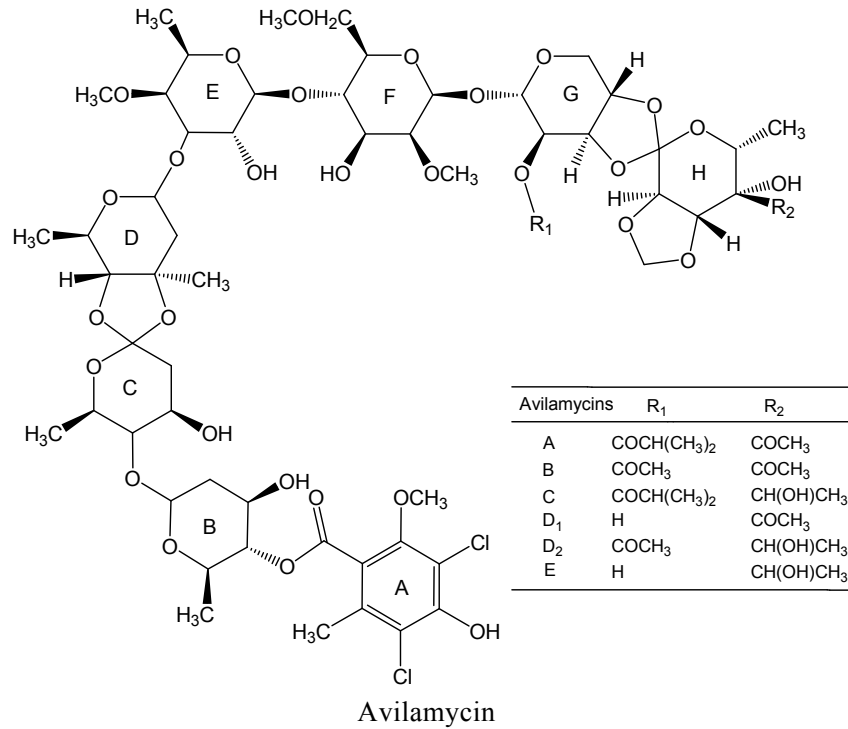


Fig. 1 Chemical structure of avilamycin

Table 1 Compositions of the formula feeds

Formula feed types	Ingredient types	Proportion (%)	Ingredients
For starting chick	Grains	59	Corn, Milo
	Oil seed meal	32	Soybean meal, Corn gluten meal
	Animal by-products	2	Fish meal
	Brans	2	Rice bran, Wheat bran, Corn gluten feed
	Others	5	Calcium carbonate, Calcium phosphate, Salt, Fructose, Glucose, Green tuff, Sugar cane extracts, Isomalt oligosaccharide, Yeast, Animal fat, Alfalfa meal, Feed additives
For growing chick	Grains	62	Corn
	Oil seed meal	26	Soybean meal, Rapeseed meal
	Animal by-products	3	Fish meal
	Brans	5	Wheat bran, Corn gluten feed
	Others	4	Calcium phosphate, Animal fat, Calcium carbonate, Salt, Isomalt oligosaccharide, Silicic acid, Molasses, Green tuff, Fructose, Glucose, Sugar cane extracts, Yeast, Malic acid, Citric acid, Tartaric acid, Lactic acid, Feed additives
For broiler starting chick	Grains	54	Corn, Wheat flour
	Oil seed meal	39	Soybean meal
	Others	7	Animal fat, Calcium carbonate, Salt, Yeast, Calcium phosphate, Feed additives

## 2.2 試 薬

### 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－アセトン (4+1)

### 3) アピラマイシン標準液

常用標準アピ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 のアピ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-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、水酸化ナトリウム溶液 1 mol/L を用いて pH を 7.9~8.1 に調整した後、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

### 5) 菌液

試験菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 を用い、飼料分析基準<sup>6)</sup>に準じて菌液を調製した。

### 6) 寒天平板

高圧蒸気滅菌した後、49~51 °C に保温した培地に 2.2 の 5) で調製した菌液の 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) に様に広がるように分注し、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、せん孔機を用いて 4 個のせん孔 (内径 8 mm) を設けた。

### 7) 抽出溶媒

アセトン－水 (4+1)

### 8) 溶出溶媒

7号緩衝液－アセトン (1+1)

なお、試薬は全て特級を用いた。

## 2.3 装置及び器具

### 1) マグネチックスターラー：柴田科学製 MU-4

### 2) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラム

：Waters 製 Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> Cartridge (充てん剤量 360 mg) にリザーバーを連結したもの

### 3) 吸引マニホールド：Waters 製 Sep-Pak Vacuum Manifold

### 4) ロータリーエバポレーター：BÜCHI 製 R-200

### 5) せん孔機：システムサイエンス製 ZP-SM

### 6) 培養器：東京理化器械製 LTI-1001ED

7) ゾーンアナライザー：システムサイエンス製 ZA-F Model PCA-11

## 2.4 定量方法

### 1) 抽出

分析試料 5.0~20.0 g (アビラマイシンとして 50 µg(力価)相当量) を正確に量って 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で 20 分間かき混ぜて抽出した後、ろ紙 (5 種 A) でろ過した。ろ液 10 mL を試験管 (内径 25 mm, 長さ 200 mm) に正確に入れ、7 号緩衝液 6 mL を加えてアセトン濃度を 50 v/v% とした後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、カラム処理に供する試料溶液とした。

### 2) カラム処理

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムをアセトン 10 mL 及び溶出溶媒 10 mL で順次洗浄した後、50 mL のなす形フラスコをミニカラムの下に置き、試料溶液全量をミニカラムに入れ、吸引マニホールドで 6 kPa 程度減圧してアビラマイシンを流出させた (流速はおよそ 2 mL/min.)。先の試験管、ろ紙及び試料溶液の入っていた容器を順次、溶出溶媒 5 mL ずつで 3 回洗浄し、洗液を順次ミニカラムに加え同様に流出させた。

流出液を 40 °C 以下の水浴で約 15 mL まで減圧濃縮した後、残留物を 25 mL の全量フラスコに入れた。先のなす形フラスコをアセトン 5 mL で洗浄し、洗液を全量フラスコに合わせた。更に全量フラスコの標線まで 7 号緩衝液を加えた後、ろ紙 (5 種 A) でろ過し、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 6) で調製した寒天平板を用い、飼料分析基準<sup>6)</sup>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又はノギスを用い、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<sup>6)</sup>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。

## 3 結果及び考察

### 3.1 抽出溶媒の検討

大島らの豚用飼料での検討<sup>5)</sup>において、アセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした場合に加熱加工された飼料に対する回収率の改善が認められたことから、本検討でもアセトン-水 (4+1) を抽出溶媒とした。

### 3.2 培地の検討

*Micrococcus luteus* ATCC 10240 を試験菌としてアビラマイシンの定量を行う場合、F-25 号培地が適していることが報告されている<sup>5,7)</sup>ため、本検討でもこの培地を用いることにした。

### 3.3 併用できる抗菌性物質の影響

現在、飼料添加物に指定されている抗菌性物質のうち、鶏用配合飼料でアビラマイシンと併用可能なものには、サリノマイシンナトリウム、センデュラマイシンナトリウム、ナラシン、ピコザマイシン、モネンシンナトリウム、ラサロシドナトリウム、硫酸コリスチン、アンプロロウ

ム, エトパベート, スルファキノキサリン, デコキネート, ナイカルバジン及びハロフジノンポリスチレンスルホン酸カルシウムの 13 種類があり, その含有量及び本分析法での最終試料溶液中の濃度は Table 2 に示した.

Table 2 Concentrations of antibiotics approved to use with avilamycin in feeds and in sample solution

Antibiotics and synthetic antibacterials	Concentration	
	in feed (g(potency)/ton)	in sample solution ( $\mu$ g(potency)/mL)
Salinomycin sodium	50	1~4
Semduramicin sodium	25	0.5~2
Narasin	80	1.6~6.4
Bicozamycin	5~20	0.1~1.6
Monensin sodium	80	1.6~6.4
Lasalocid sodium	75	1.5~6
Colistine sulfate	2~20	0.04~1.6
Amprolium	40~250	0.8~20
Ethopabate	2.56~16	0.0512~1.28
Sulfaquinoxaline	60	1.2~4.8
Decoquinat	20~40	0.4~3.2
Calcium halofuginone polystyrenesulfonate	40	0.8~3.2

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, これらの併用が鶏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結果, Fig. 2 のとおり, サリノマイシンナトリウム, ナラシン, モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムの 4 種類の抗菌性物質が鶏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が示唆された.

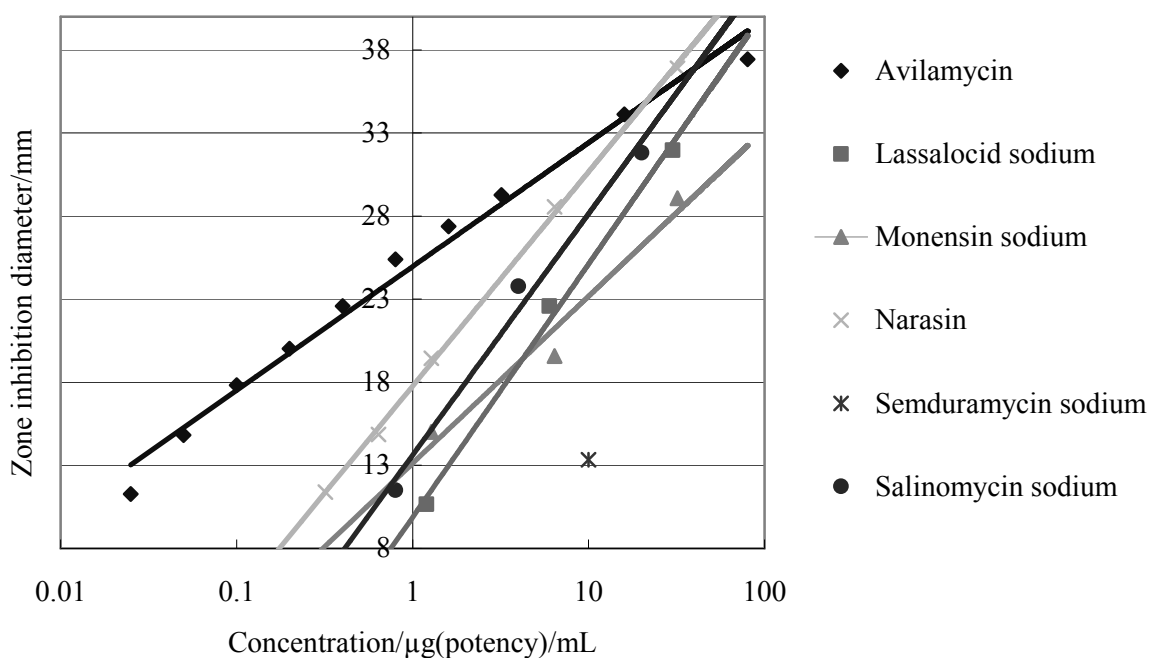


Fig. 2 Standard curves of antibiotics approved to use with avilamycin

### 3.4 カラム処理による精製方法の検討

荒木ら<sup>7)</sup>は、プレミックス中の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除去するためにオクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いた。そこで、鶏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のある4種類の抗生物質を同様に、カラム処理で除去することを検討した。

#### 1) 溶出溶媒の検討

プレミックスでのカラム処理は、溶出溶媒として7号緩衝液-アセトン(11+9)が適当とされている。鶏用配合飼料でも同じ溶出溶媒が使用できるか確認するために、アビラマイシン標準原液を抽出溶媒で正確に希釈して、 $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL}$ 及び $1 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL}$ の各標準液を調製し、それぞれミニカラムに $5 \mu\text{g}(\text{力価})$ 相当量負荷した。さらに溶出速度を変えるため吸引マニホールドの減圧条件を変えて溶出を行った。

その結果、Table 3のとおり、7号緩衝液-アセトン(11+9)を溶出溶媒とした場合、7号緩衝液-アセトン(1+1)の場合より回収率が低く、バラツキの大きい結果となった。また、7号緩衝液-アセトン(1+1)が溶出溶媒の場合、ミニカラムへのアビラマイシンの負荷量を $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL} \times 10 \text{ mL}$ とした方が、減圧条件に関わらずバラツキが少なく100%に近い回収率が得られたことから、本検討では以降、溶出溶媒を7号緩衝液-アセトン(1+1)、負荷量を $0.5 \mu\text{g}(\text{力価})/\text{mL} \times 10 \text{ mL}$ として検討することとした。

Table 3 Differences of proportion of acetone of eluent, vacuum condition and loading volume of avilamycin into Sep-Pak plus C<sub>18</sub> cartridge

Eluent	Vacuum condition	Loading volume			
		0.5 µg(potency)/mL × 10 mL		1 µg(potency)/mL × 5 mL	
		Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
Phosphoate buffer (pH 7) - acetone (1:1)	-2 kPa	105	12	122	12
	-6 kPa	105	11	114	16
Phosphoate buffer (pH 7) - acetone (11:9)	-2 kPa	88.1	30	104	18
	-6 kPa	96.1	14	92.7	40

a) Mean ( $n = 6$ )

b) Relative standard deviation

2) アビラマイシンの定量を妨害する抗生物質の除去の確認

3.4 の 1)の結果から、7号緩衝液-アセトン (1+1) を溶出溶媒として用いアビラマイシンの定量を妨害する抗生物質の除去について確認した。

アビラマイシンの定量を妨害する可能性のあるサリノマイシンナトリウム、ナラシン、モネンシンナトリウム及びラサロシドナトリウムを用いて、併用の許される最大量相当の抽出溶液を調製し、本分析法で試験を行った。

その結果は Table 4 に示した。回収率はすべてアビラマイシンに換算した値 (0.2 µg(力価)/mL を 100 %とした値) である。

モネンシンナトリウムの除去は、荒木ら<sup>7)</sup>と同様に、本検討でも除去できなかった。ラサロシドナトリウム及びナラシンは、アビラマイシンの定量を妨害する程度は小さいものと考えられた。サリノマイシンナトリウムは定量に妨害を与えなかった。また、減圧条件の違いについてはモネンシンナトリウムを除けば大きな差はなかった。

これらの結果から、ナラシン及びラサロシドナトリウムによる妨害は少なく、サリノマイシンによる妨害の影響はないと考えられることと、モネンシンナトリウムについてはどちらの減圧条件でも除去することはできなかったことから分析時間を考慮し、今後の検討は減圧条件を -6 kPa で行うこととした。

Table 4 Removals of antibiotics that prevent detection of avilamycin

Antibiotics	Vacuum condition			
	-2 kPa		-6 kPa	
	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)	Recovery <sup>a)</sup> (%)	RSD <sup>b)</sup> (%)
Salinomycin sodium	0	0	0	0
Narasin	0	0	3.6	173
Monensin sodium	67.2	56	108	62
Lasalocid sodium	11.3	106	14.0	87

a) Mean recovery as 0.2 µg(potency)/mL of avilamycin ( $n = 3$ )

b) Relative standard deviation

## 3) オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムのロット間差の確認

オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムによる処理に使用している Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> Cartridge のロット間差を確認するために、7号緩衝液-アセトンで希釈したアビラマイシンを4つのロットの異なるミニカラムに負荷した結果、ロット間差は認められなかった (Table 5).

Table 5 Inter lot difference of Sep-Pak Plus C<sub>18</sub> cartridge

Lot	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	(%)	(%)
029138142A	117	3.0
029138142B	119	2.0
029038100A	119	1.0
029538165A	118	4.0

a) Mean ( $n = 4$ )

b) Relative standard deviation

## 3.5 添加回収試験

2.1 で調製した試料を用いて、本法により3点併行で定量し、回収率及び繰返し精度を検討した。

その結果、平均回収率は、92.1~114%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として15%以下の成績が得られた (Table 6).

Table 6 Recoveries of avilamycin from three kinds of feed

Added level (g(potency)/ton)	Formula feed					
	For starting chick		For growing chick		For broiler starting chick	
	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>	Recovery <sup>a)</sup>	RSD <sup>b)</sup>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
2.5	114	7.5	109	6.3	104	13
5	96.3	15	99.9	1.3	102	8.6
10	104	6.2	93.8	3.7	92.1	6.8

a) Mean ( $n=3$ )

b) Relative standard deviation

## 4 まとめ

鶏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を検討したところ、次の結果が得られた。

- 1) 鶏用配合飼料中のアビラマイシンをアセトン-水 (4+1) で抽出し、オクタデシルシリル化シリカゲルミニカラムを用いて精製した後、*Micrococcus luteus* ATCC 10240 を試験菌として F-25 号培地で標準曲線法により定量することができた。
- 2) 本法では、鶏用配合飼料中のモノニンナトリウムがアビラマイシンの定量に与える妨害を除去することはできなかった。
- 3) 幼すう育成用配合飼料、中すう育成用配合飼料及びブロイラー肥育前期用配合飼料にアビラマ



イシンとして、それぞれ 2.5, 5 及び 10 g(力価)/トン相当量を添加し、本法にて添加回収試験を実施したところ、平均回収率は、92.1~114%，その繰返し精度は、相対標準偏差 (RSD) として 15% 以下の成績が得られた。

- 4) 本法の飼料分析基準への適用の可否について検討した結果、必要な繰返し精度が得られなかった。

## 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) 農林水産省令：“飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令”，平成 20 年 8 月 29 日，省令第 55 号 (2008).
- 4) 菅野 清，佐々木 隆：飼料研究報告，17，83 (1992).
- 5) 大島 慎司，篠田 直樹，橋本 仁康，千原 哲夫：飼料研究報告，32，61 (2007).
- 6) 農林水産省消費・安全局長通知：“飼料分析基準の制定について”，平成 20 年 4 月 1 日，19 消安第 14729 号 (2008).
- 7) 荒木誠士，風間鈴子：飼料研究報告，22，97 (1997).