

LC-MS/MSによる畜産物中の β 2作動薬分析法開発と流通食品における残留実態

林, 孝子

<https://hdl.handle.net/2324/4784555>

出版情報 : Kyushu University, 2021, 博士 (創薬科学), 課程博士

バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)

氏名	林 孝子			
論文名	LC-MS/MS による畜産物中の β_2 作動薬分析法開発と流通食品における残留実態			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	濱瀬 健司
	副査	九州大学	教授	植田 正
	副査	九州大学	教授	山田 健一
	副査	九州大学	准教授	坂元 政一

論文審査の結果の要旨

β_2 作動薬は平滑筋にある β_2 アドレナリン受容体に作用し、平滑筋を弛緩させる機序を持つ医薬品である。気管支拡張作用、子宮収縮抑制作用等によりヒト臨床および動物用医薬品として広く使用されている。一方、 β_2 作動薬にはこれら本来の用途に加えて肥育効果があり、ヒトの筋肉増強、畜産動物の増体重、赤身肉割合を向上させる成長促進剤としての使用実態がある。 β_2 作動薬であるクレンプテロールを家畜に違法投与したことに起因する中毒事例が、各国で報告されている。また近年、 β_2 作動薬のうちラクトパミンとジルパテロールは、海外の一部の国で成長促進剤としての使用が認められている。EU や日本では β_2 作動薬の成長促進剤としての使用は全て禁止されているが、我が国ではラクトパミンやジルパテロールの使用が許可されている国々からの畜産物の輸入実績があることから、食の安全性確保を目的に輸入畜産物の β_2 作動薬監視体制の強化が必要とされている。そこで申請者は、LC-MS/MS を用いた β_2 作動薬分析法の開発および評価を行い、畜産食品中の β_2 作動薬残留実態を調査した。はじめに中毒事例や輸入食品からの違反事例のあるクレンプテロールについて、開発した LC-MS/MS による分析法の豚肝臓への適用を行い、更に畜産物夾雑成分の影響を低減した特異的 LC-MS/MS/MS 分析法の構築および評価を行ったのち、様々な畜産内臓可食部での適用を試みた。次に、国内で規制のあるクレンプテロール、ラクトパミン、ジルパテロールを含む β_2 作動薬 7 化合物の一斉分析法の構築および評価を行い、流通畜産食品の残留実態調査を試みた。

申請者は、海外で中毒事例が報告されているクレンプテロールについて LC-MS/MS による簡便で特異性の高い測定系を構築し、豚肝臓への適用を試みた。本法では、試料に内標準物質としてクレンプテロール- d_9 を添加後、無水硫酸ナトリウムと塩化ナトリウムを加えアセトニトリルを用いて抽出を行い、C18 粒子による分散固相および陰イオン交換 PSA カートリッジによる精製を行うことで、これまでより簡便な前処理法を確立した。LC 分離では、逆相分配系の ODS カラムを固定相としたセミマイクロカラム (Mightysil RP-18GP、2.0 mm i.d. x 100 mm) を選択することで、高感度で短時間 (4.7 min) のクレンプテロール溶出分離を可能とした。MS/MS による検出を行った結果、豚肝臓試料ではクレンプテロールの保持時間付近に夾雑成分が認められ、添加試料ではクレンプテロールと試料由来の夾雑成分が共溶出し双方の分離は困難であった。そこで申請者は、夾雑成分の影響を低減した分析法として、LC-MS/MS/MS 測定の検討を行った。LC-MS/MS/MS 法は良好な真度および再現性が得られ、LC-MS/MS 法と同様に内部標準法による定量分析が可能であった。LC-MS/MS 分析で豚肝臓から検出された夾雑ピークは LC-MS/MS/MS 分析により除去され、夾雑成分の多い畜産物組織において特異性の高い定量分析を達成した。

クレンプテロールによる食中毒では、畜産動物の様々な部位の摂取により中毒が引き起こされていた。このためクレンプテロール分析では、畜産物の様々な可食部での適用が必要とされている。申請者は、クレンプテロール分析法の内臓可食部での適用を引き続き行った。LC-MS/MS 分析の結

果、豚と牛の肝臓、腎臓、小腸からクレンプテロールの保持時間近傍に夾雑ピークが溶出し、この影響で添加回収試験の真度は 67.6-185.6%と大きく変動した。開発した LC-MS/MS/MS 法により試験溶液を測定した結果、試料の夾雑ピークは全て除去され、真度は 92.0-106.0%と大きく改善された。LC-MS/MS 分析で畜産可食部から検出されたピークは LC-MS/MS/MS 測定では認められず、今回調査した畜産試料にクレンプテロールが含有していないことが確認された。LC-MS/MS/MS 法は特異性の高い定量分析法として、今後も引き続き夾雑成分の多い畜産内臓可食部や様々な食品分析での利用が期待される。

我が国では残留基準の設定されている B_2 作動薬 3 種（クレンプテロール、ラクトパミン、ジルパテロール）について試験法が厚生労働省より通知されている。しかしいずれも個別試験法であり、効率の良い一斉分析法が切望されている。そこで申請者は、 B_2 作動薬一斉分析法の構築および評価を行い、流通畜産食品における残留実態を調査した。国内で規制のあるクレンプテロール、ラクトパミン、ジルパテロールに、海外での使用報告があるシマテロール、イソクスプリン、サルブタモール、テルブタリンを加えた 7 化合物を選定し、LC-MS/MS を用いた一斉分析法を開発した。前処理は、試料に水および炭酸カリウム水溶液を加えたのち酢酸エチルを用いて抽出し、無水硫酸ナトリウムを加え脱水を行った。酢酸エチル層をアセトニトリルに転容後、ヘキサン脱脂、C18 粒子による分散固相精製を行い LC-MS/MS に導入した。LC 分離には Mightysil RP-18GP (2.0 mm i.d. x 100 mm) を用いた。畜産食品由来のマトリックス効果の補正として、食品の種類ごとにマトリックス添加標準溶液を調製した検量線により定量を実施した。得られたマトリックス添加検量線はいずれの対象化合物も良好な直線性 ($r^2 \geq 0.9961$) を示し、添加回収試験による真度は 60.1-103.5%、精度は併行精度 (RSD_r) が 1.26-8.94%、室内精度 (RSD_{dip}) が 1.93-10.55%と良好な再現性が得られ、マトリックス効果を補正した LC-MS/MS 一斉分析を達成した。構築した一斉分析法を用いた B_2 作動薬残留実態調査により、国内に流通している輸入食品（米国産）からラクトパミンのピークが検出された。LC-MS/MS/MS 測定により、ラクトパミンの保持時間に定量範囲未満ではあるが明確なピークが確認され、ラクトパミンが流通輸入食品に残留していることが示された。本研究で開発した LC-MS/MS による B_2 作動薬一斉分析法および LC-MS/MS/MS によるラクトパミン分析法により、微量の B_2 作動薬（ラクトパミン）を食品試料から検出可能な実用性のある高感度分析を達成した。

以上のように、申請者が開発したクレンプテロール分析法および B_2 作動薬一斉分析法は、従来の方法と比較して簡便な前処理と高感度分析を実現した。本分析法を用いることで、食中毒や輸入違反事例の報告があるクレンプテロールおよび海外で成長促進剤として使用され輸入食品の安全性が危惧されるラクトパミン、ジルパテロールについて様々な畜産食品での適用が可能である。また LC-MS/MS/MS 法の開発により、更に選択性が向上した確認分析を達成した。いずれの分析法も妥当性が確認されており、申請者が所属する神奈川県では開発したクレンプテロール分析法を用いて行政検査を既に実施している。さらに 2022 年度からは B_2 作動薬一斉分析法を用いた行政検査に移行し、輸入食品の検査体制が拡充される。本研究で開発した分析法は輸入食品の監視体制強化の一助となり、我が国における食品の安全性確保に貢献できるものと考えられる。

以上のように、本論文は食品中に残留する β 作動薬について、LC-MS/MS ならびに LC-MS/MS/MS 分析法を開発したもので、市場に流通する食肉および加工食品における精密定量を可能としている。本法はすでに神奈川県における行政検査に使用されており、我が国における食品の安全性確保に貢献できるものと考えられる。本研究の学問的価値は極めて高く、申請者は博士（創薬科学）の学位に値すると認める。