

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500613

研究課題名 (和文) バナメイシュリンプにおける抗菌剤の残留性と調理による影響

研究課題名 (英文) Pharmacokinetics and residues of oxytetracycline and oxolinic acid in vannamei shrimp (*Penaeus vannamei*) and the effect of cooking on the residues.

研究代表者

宇野 和明 (UNO KAZUAKI)

愛知江南短期大学・生活科学科・教授

研究者番号：80223585

研究成果の概要：本研究は輸入食品の安全確保を目的として、代表的な輸入エビであるバナメイシュリンプ養殖における抗菌剤使用評価についての基礎研究である。バナメイシュリンプはタイ国産を用い、評価対象の抗菌剤としてオキシテトラサイクリン(OTC)及びオキシリン酸(OA)を使用した。本研究はタイ国農務省水産局との協働で行われた。供試エビに抗菌剤をサイナス(静脈)内及び経口投与し、体内動態及び残留性を調べた。OTCは殻に高濃度長期間残留し、OAでは投薬量を多くするとバイオアベイラビリティ(生体内利用率)の低下が明らかとなった。加熱調理では残留抗菌剤を完全に分解消失させることはできないと判断された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000	0	1,700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
総計	2,900,000	360,000	3,260,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：食品衛生、食の安全、抗菌剤残留、養殖エビ、タイ国

1. 研究開始当初の背景

(1)バナメイシュリンプ (*Penaeus vannamei*) は、これまでエクアドルを中心とする中南米で広く養殖されていたホワイト系シュリンプである。平成12年以降、タイ国、インドネシア及び中国では、これまでのブラックタイガー (*Penaeus monodon*) 養殖からバナメイシュリンプ養殖への切り替えが進んできている。バナメイシュリンプはブラックタイガーに比べて価格が2割程度安い、飼育しやすく、その生産効率が2倍以上であるのが切り替えの主たる理由である。とりわけ、タイ国においてはその切り

替えが急速に進んでおり、平成16年にはほとんどがバナメイシュリンプ養殖となっている。また平成18年、我が国はタイ国との経済連携協定(EPA)及び自由貿易協定(FTA)が基本的合意に達したことで、今後これまで以上にタイ国からバナメイシュリンプの輸入が増加すると予想される。(2)エビ養殖においては発生するピブリオ病などの疾病予防・治療の目的で、オキシテトラサイクリン及びオキシリン酸をはじめとする種々の抗菌剤がバナメイシュリンプにも用いられており、それに伴い抗菌剤の残留が食品衛生上憂慮されている。我が国

では平成7年食品衛生法改正により、これまでの無残留規制から残留基準値設定に改められた。さらに、平成15年に公布された改正食品衛生法に基づきポジティブリスト制度が平成18年5月までに導入され、すべての動物用医薬品について残留基準値が設定される。現在オキシテトラサイクリンでは0.2 ppm、オキシソリン酸については0.03 ppmが残留基準値となっている。

(3)厚生労働省は輸入される魚介類について抗菌剤の残留検査を検疫所において実施し、並びに毎年、残留有害物質モニタリング検査を行うことにより、抗菌剤残留の監視を行っている。平成15年度には、中国産バナメイシュリンプからテトラサイクリン系抗生物質が検出され、食品衛生法違反として回収命令が出されている。一方、農林水産省は「動物用医薬品の使用の規制に関する省令」により水産用医薬品について用法、用量及び休薬期間について使用基準を定め、国内産養殖魚の安全性を確保している。また、国連のFAO/WHO合同委員会であるCodex委員会は抗菌剤使用に関する国際基準の策定を進めている。しかし現在のところ、諸外国における抗菌剤に関する規制事情はそれぞれの国により異なっており、上述したようにバナメイシュリンプから基準値を超えた抗菌剤が検出され、食品衛生法違反となっている。今後、我が国は輸入食品についてポジティブリスト制を実施していく上で、海外の養殖現場で用いられる化学療法について適正な評価及び指導をする必要があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ホワイト系シュリンプの一種であるバナメイシュリンプ養殖において広く用いられている抗菌剤のオキシテトラサイクリン及びオキシソリン酸の体内動態・残留特性を明らかにすることを目的とする。さらに、加熱調理がエビ体内に残留している抗菌剤の消長に及ぼす影響を検討する。また、エビ殻は酸・アルカリ処理されて、サプリメント素材のキチンに調製されている。それゆえ、酸・アルカリ処理によるエビ殻残留薬物の消長についても検討する。得られた知見により、東南アジア地域でのバナメイシュリンプ養殖に用いられる薬物療法について評価を行い、食品としての安全性を確保できる養殖技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)蛍光検出 HPLC 法によるエビ組織中におけるオキシテトラサイクリン(OTC)及びオキシソリン酸(OA)の定量法

組織試料として血リンパ 1 mL、筋肉 1 g 及び殻 0.5 g を実験に用いた。血リンパにつ

いては両抗菌剤ともハイセップカラム（スペルコ社製、USA）を用い、蛍光法による直接注入法によって行った。筋肉及び殻については、OTCで Sep-Pak C18、OAで Bond Elut C18 による固相抽出法によって分析を行った。

(2)オキシテトラサイクリンの体内動態及び残留性

飼育・投薬実験についてはタイ国立チャントブリ水産研究所で行い、平均体重 24.7 g のバナメイシュリンプを実験に用いた。

①サイナス内投与：OTC を滅菌 PBS に 1% となるように溶解し、27G 注射針を装着したマイクロシリンジによりエビ腹部サイナス内に投与した。

②経口投与：OTC の投与量が 10 mg/kg (10 mg 投与区)及び 50 mg/kg (50 mg 投与区)となるように餌料に混ぜ、ディスパーサーでペーストにした後、カテーテルを用いて強制投与した。投薬後、所定時間ごとに 5 尾ずつ取り上げ、血リンパ、筋肉及び殻を採取し、分析に供した。

(3)オキシソリン酸の体内動態及び残留性

タイ国立チャントブリ水産研究所で飼育及び投薬実験を行った。平均体重 26.2 g のバナメイシュリンプを実験に用いた。

サイナス内投与：1%オキシソリン酸水溶液を調製し、27G 注射針を装着したマイクロシリンジにより腹部サイナス内に投与した。

経口投与：オキシソリン酸の投与量が 10 mg/kg (10 mg 投与区)及び 50 mg/kg (50 mg 投与区)となるように餌料に混ぜ、ペーストにした後、カテーテルを用いて強制投与した。投薬後、所定時間ごとに 5 尾ずつ取り上げ、血リンパ、筋肉及び殻を採取し、分析に供した。

(4)解析方法

得られたデータを WinNonlin ver.1.1 (Scientific Consulting, Inc., USA)によりファーマコキネティック解析した。

(5)加熱調理による残留抗菌剤の消長

オキシテトラサイクリン及びオキシソリン酸とも、投与量 50 mg/kg が強制経口投与された投与 6 時間後の供試エビにおける筋肉及び殻を試料に用いた。それぞれの試料について茹でる（沸騰水、4 分間）、焼く（200℃、4 分間）及び揚げる（180℃、1 分間）の加熱調理を行った。調理後の残留濃度を HPLC 法により求めて、加熱処理による残留抗菌剤の消長について調べた。

(6)酸及びアルカリ処理によるエビ殻残留抗菌剤の消長

オキシテトラサイクリン及びオキソリン酸とも、投与量 50 mg/kg が強制経口投与された投与 6 時間後の供試エビにおける殻を試料に供した。酸処理：1M HCl に供試殻を 1 時間浸漬後、酸処理殻を調製した。アルカリ処理：1M NaOH に供試殻を 1 時間浸漬後、アルカリ処理殻を調製した。各処理殻における残留薬物濃度を HPLC 法により分析、酸及びアルカリ処理がエビ殻残留薬物の消長について調べた。

4. 研究成果

(1) 蛍光検出 HPLC 法によるエビ組織におけるオキシテトラサイクリン(OTC)及びオキソリン酸(OA)の定量法

①オキシテトラサイクリン(OTC)

本分析法により OTC は妨害物質と分離され、保持時間約 2 分にシャープなピークが得られた。添加回収率は、血リンパ：99.4±0.5%、筋肉：82.7±2.8%、殻：85.1±3.3%であった。それらの定量限界は血リンパ：0.02 ppm、筋肉：0.008 ppm、殻：0.01 ppmであった。

②オキソリン酸(OA)

本分析法により OA は保持時間約 5 分にシャープなピークが得られ、妨害成分と良好に分離された。添加回収率は、血リンパ：90.6±1.9%、筋肉：81.3±2.6%、殻：79.9±1.5%であった。それらの定量限界は血リンパ：0.03 ppm、筋肉：0.008 ppm、殻：0.02 ppmであった。

(2)オキシテトラサイクリン(OTC)の体内動態及び残留性

①サイナス内投与：OTC をサイナス内投与したバナメイシュリンプにおける血リンパ濃度を Fig. 1 に示した。サイナス内投与における OTC の体内動態は two-compartment open model により解析され、得られたモデル式は、 $C_t = 29.2\exp(-3.249t) + 10.9\exp(-0.0588t)$ であった。その分布容及びクリアランスはそれぞれ 839 mL/kg 及び 51.6 mL/kg/h であり、分布・排泄はともに速かった。

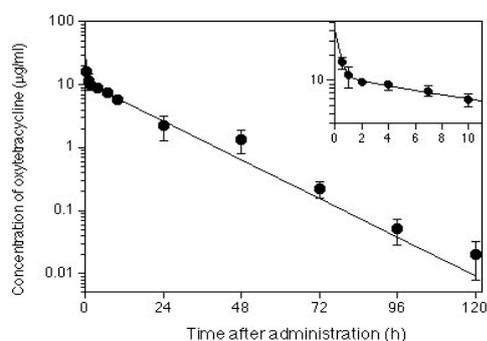


Fig. 1. Hemolymph concentration of OTC in vannamei shrimp following intra-sinus administration at a dose of 10 mg/kg.

②経口投与：経口投与後の血リンパ濃度を Fig. 2 に示した。

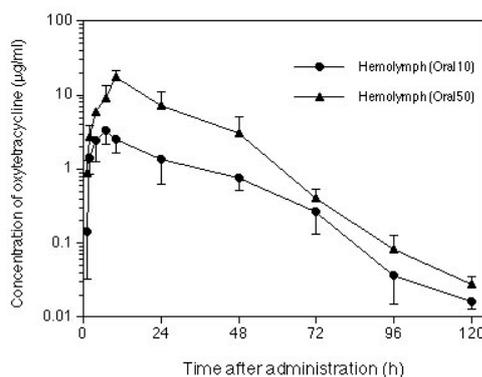


Fig. 2. Hemolymph concentration of OTC in vannamei shrimp following oral administration.

それらの体内動態を Non-compartment 法により解析した。その結果、最高濃度、最高濃度到達時間及び消失半減期は次のとおりであった。「10 mg 投与区」：3.37 µg/mL、7 h 及び 15.0 h、「50 mg 投与区」：17.4 µg/mL、10 h 及び 11.5 h。それらのバイオアベイラビリティ(BA)は「10 mg 投与区」で 48.2%、「50 mg 投与区」では 43.6%と算出され、投与量が多くなると BA はやや低下した。

筋肉及び殻における残留 OTC 濃度をそれぞれ Fig. 3 及び Fig. 4 に示した。

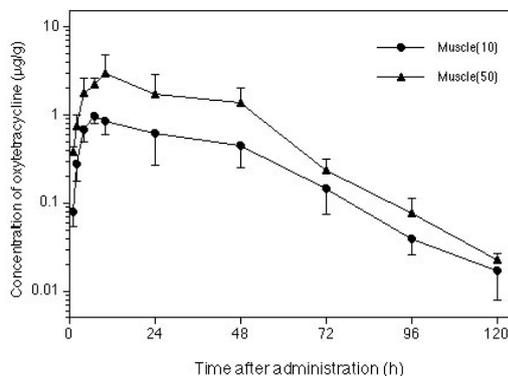


Fig. 3. OTC concentration in muscle of vannamei shrimp following oral administration.

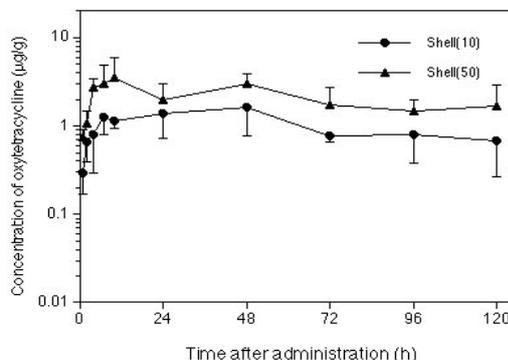


Fig. 4. OTC concentration in shell of vannamei shrimp following oral administration.

筋肉における OTC の最高濃度、最高濃度到達時間及び消失半減期は次のとおりであった。「10 mg 投与区」: 0.96 $\mu\text{g/g}$ 、7 h 及び 19.4 h、「50 mg 投与区」: 3.00 $\mu\text{g/g}$ 、10 h 及び 15.4 h。殻における OTC は両投与区ともサンプリング終了時(120 h)まで高濃度残留し、消失相が認められなかった。

(3)オキソリン酸(OA)の体内動態及び残留性
①サイナス内投与: OA をサイナス内投与したバナメイシュリンプにおける血リンパ濃度を Fig. 5 に示した。サイナス内投与における OA の動態は two-compartment open model により解析された。得られたモデル式は、 $C_t = 16.0\exp(-0.621t) + 6.28\exp(-0.0204t)$ であった。その分布容及びクリアランスはそれぞれ 1359 mL/kg 及び 29.9 mL/kg/h であった。

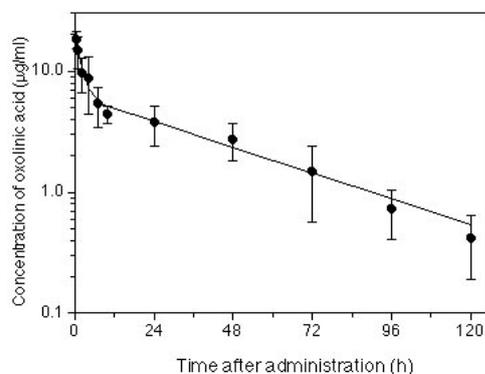


Fig. 5. Hemolymph concentration of OA in vannamei shrimp following intra-sinus administration at a dose of 10 mg/kg.

②経口投与: 経口投与後の血リンパ濃度を Fig. 6 に示した。それらの体内動態を Non-compartment 法により解析した。その結果、

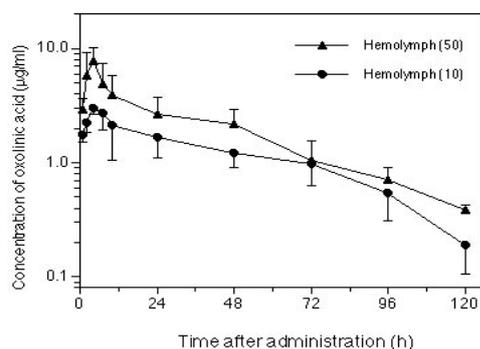


Fig. 6. Hemolymph concentration of OA in vannamei shrimp following oral administration.

最高濃度、最高濃度到達時間及び消失半減期は次のとおりであった。「10 mg 投与区」: 2.99 $\mu\text{g/mL}$ 、4 h 及び 34.8 h、「50 mg 投与区」: 7.71 $\mu\text{g/mL}$ 、4 h 及び 33.4 h。それらのバイオアベイラビリティ(BA)は「10 mg 投与区」で 45.2%、「50 mg 投与区」では

14.7%と算出され、投与量5倍が多くなると BA は 1/3 に低下した。

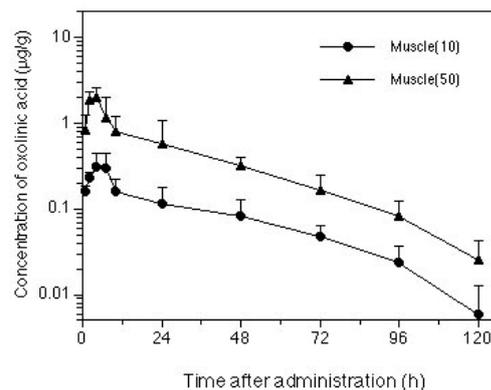


Fig. 6. OA concentration in muscle of vannamei shrimp following oral administration.

筋肉及び殻における残留 OA 濃度をそれぞれ Fig. 6 及び Fig. 7 に示した。筋肉における

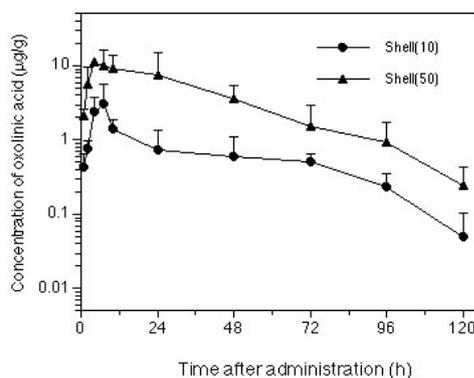


Fig. 7. OA concentration in shell of vannamei shrimp following oral administration.

OA の最高濃度、最高濃度到達時間及び消失半減期は次のとおりであった。「10 mg 投与区」: 0.31 $\mu\text{g/g}$ 、4 h 及び 23.8 h、「50 mg 投与区」: 2.02 $\mu\text{g/g}$ 、4 h 及び 22.5 h。一方、殻における最高濃度、最高濃度到達時間及び消失半減期は「10 mg 投与区」: 3.08 $\mu\text{g/g}$ 、7 h 及び 24.6 h、「50 mg 投与区」: 11.29 $\mu\text{g/g}$ 、4 h 及び 22.4 h であった。

(4)加熱調理及び酸・アルカリ処理による残留抗菌剤の消長

加熱調理及び酸・アルカリ処理操作前後の残留濃度から各操作における減少率を算出し、Fig. 8 (OTC)及び Fig. 9 (OA)に示した。残留 OTC は筋肉において「茹でる」、「焼く」及び「揚げる」の加熱調理により 30~50%程度消失したが、殻では 20~30%しか消失せず、加熱調理に対して安定であった。また、殻中の残留 OTC はアルカリ処理で 30%程度の消失であった。一方、酸処理では 80%以上の消失が認められた。消失した OTC は塩酸処理液に約 80%認められた。

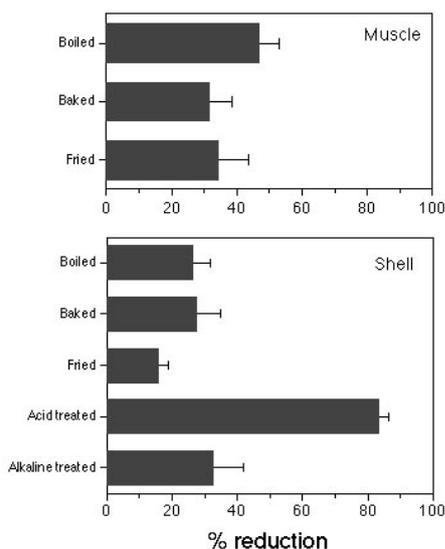


Fig. 8. Effect of cooking, acid and alkaline treatment on residual OTC in muscle and shell of vannamei shrimp.

筋肉及び殻における残留 OA は「茹でる」ことにより、40～65%程度消失した。しかし、「焼く」及び「揚げる」の加熱調理では、筋肉で 10%、殻で 20～35%程度の消失であった。殻中の残留 OA はアルカリ処理で 70%程度の消失が認められ、酸処理でも 60%の消失が認められた。

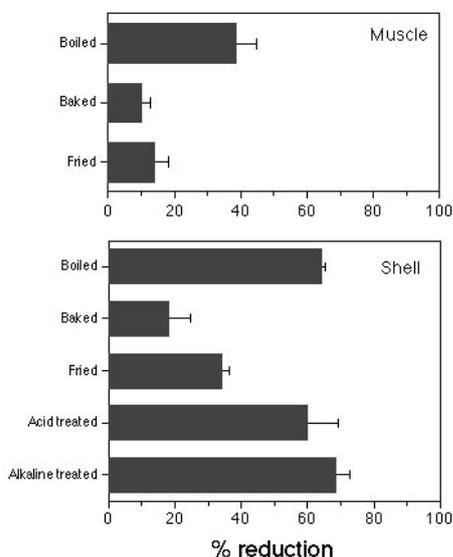


Fig. 9. Effect of cooking, acid and alkaline treatment on residual OA in muscle and shell of vannamei shrimp.

(5) まとめ

本研究では、タイ国産バナメイシュリンプにおけるオキシテトラサイクリン(OTC)及びオキソリン酸(OA)の体内動態を明らかにすることを目的とした。さらに、加熱調理及び酸・アルカリ処理による残留薬物の消長について調べ、以下の結論を得た。

①両抗菌剤ともサイナス内投与後の体内動態は 2-コンパートメントモデルに適合し、以下のモデル式が得られた。

$$\text{OTC: } Ct = 29.2\exp(-3.249t) + 10.9\exp(-0.0588t)$$

$$\text{OA: } Ct = 16.0\exp(-0.621t) + 6.28\exp(-0.0204t)$$

②経口投与後の残留 OTC 濃度は、「10 mg 投与区」で血リンパ及び筋肉において投与後 7 時間に最高濃度を示し、「50 mg 投与区」でのそれらは投与後 10 時間に最高濃度を示した。それらの半減期は「50 mg 投与区」の方が小さかった。両投与区におけるバイオアベイラビリティは、「10 mg 投与区」: 48.2%、「50 mg 投与区」: 43.6%となり、大差なかった。殻中の OTC は両投与区ともサンプリング終了時まで消失相が認められなかった。

③経口投与後の残留 OA 濃度は、両投与区とも血リンパ及び筋肉において投与後 4 時間に最高濃度を示した。それらの半減期は両投与区において大差なかったが、バイオアベイラビリティ(BA)は「10 mg 投与区」: 45.2%、「50 mg 投与区」: 14.7%となり、BA は 1/3 に低下した。

④通常の加熱調理では残留 OTC 及び OA を完全に分解消失させることはできないと判断された。一方、エビ殻に残留する OTC 及び OA は酸及びアルカリ処理により多くが消失し、それらの処理を組み合わせさせたキッチン調製処理では残留抗菌剤を完全に消失させることが期待され、今後詳細な研究が望まれた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kazuaki Uno, Takahiko Aoki, Walai Klechaya, Varin Tanasomwang and Lila Ruangpan: Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues. *Aquaculture* 254, 24-31, 2006. 査読有
- ② Kazuaki Uno, Takahiko Aoki, Walai Klechaya, Lila Ruangpan and Varin Tanasomwang: Pharmacokinetics of oxolinic acid in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius, and the effect of cooking on residues. *Aquaculture Research* 37, 826-833, 2006. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 宇野和明、Tidaporn Chawee-pack、宇野良子、Lila Ruangpan : 養殖エビにおける残留抗菌剤の調理加工による消長. 日本調理科学会平成 21 年度大会 (同志社女子大学)、2009, 8/28.
- ② 宇野和明、Tidaporn Chawee-pack、Lila Ruangpan : パナメイエビにおけるオキシテトラサイクリンのバイオアベイラビリティ. 平成 21 年度日本水産学会春季大会 (東京海洋大学)、2009, 3/28.
- ③ 宇野和明、東本吉史、三澤義知、ティダボン・チャウイーパック、リラ・ランパン : キッチン調製に伴う養殖パナメイエビ殻に残留するオキシテトラサイクリンの消長. 第 21 回キッチン・キトサンシンポジウム (神戸国際会議場)、2007, 7/27.
- ④ 東本吉史、宇野和明 : キッチン調製過程におけるエビ殻残留オキシテトラサイクリンの消長. 平成 19 年度日本水産学会大会 (東京海洋大学)、2007, 3/29.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 和明 (UNO KAZUAKI)
愛知江南短期大学・生活科学科・教授
研究者番号 : 80223585

(2) 研究分担者 (平成 18, 19 年度) ・ 連携研究者 (平成 20 年度)

青木 恭彦 (AOKI TAKAHIKO)
三重大学大学院・生物資源学研究科・
准教授
研究者番号 : 00212366

(3) 海外連携研究者

Lila Ruangpan
Department of Fisheries, Ministry of
Agriculture and Cooperative, Thailand
Technical Adviser

Tidaporn Chawee-pack
Chanthaburi Coastal Fisheries Research and
Development Center, Thailand
Fisheries Biologist