

## 研 究

## 金ナノコロイドを用いたテトラサイクリン試験法の検討

江口 直<sup>1)</sup>、山田 侑希<sup>1)</sup>、阿部 美和<sup>2)</sup>、後藤 郁男<sup>2)</sup>  
中田 聡<sup>1)</sup>、荻原 康則<sup>1)</sup>

1) 宮城県食肉衛生検査所、2) 宮城県保健環境センター

## 要 約

食肉中の残留抗菌性物質の迅速検査を目的として、金ナノコロイドとDNAアプタマーによる比色分析法を用いたテトラサイクリン試験法について検討した。その結果、テトラサイクリンの残留基準値濃度を含む濃度範囲で検量線を作成し、テトラサイクリン系統の検出および定量の推定が可能であった。従って、本試験法は、食肉に残留したテトラサイクリンの迅速検査法として有用であると考えられた。

## I. はじめに

当検査所で行っている残留抗菌性物質検査では、スクリーニング検査として直接法および直接ディスク法<sup>1)</sup>を行う。この結果、抗菌性物質の残留が疑われる事例では、簡易検査法<sup>2)</sup>および分別推定法<sup>3)</sup>を行う。これらの検査法はバイオアッセイを用い、抗菌性物質の有無の確認とその系統を推定する。さらに、理化学的検査法である高速液体クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィー質量分析法を用いることで、抗菌性物質の定性および定量を行う。バイオアッセイは、検査手技が容易であるが、細菌を培養するため判定までに時間を要する。一方、理化学的検査法では、定性・定量ができる反面、作業が煩雑で検体の処理に時間を要し、高度な専門的知識を必要とする。

そこで、バイオアッセイと同時進行で抗菌性物質を定性・定量し、かつ、検査時間の短縮を目的として、金ナノコロイドを用いた試験法を検討した。この試験法は、金ナノコロイドが光学的に多様性を持つため、粒子径によって色調が変化すること、また、核酸合成物質であるアプタマーが特定の分子と特異的に結合することを利用した呈色反応である（図

1)。今回、抗菌スペクトルが広く、疾病予防を目的とした飼料添加物として畜産分野で広く使用されているテトラサイクリン (TC) について検討を行ったので、その概要を報告する。

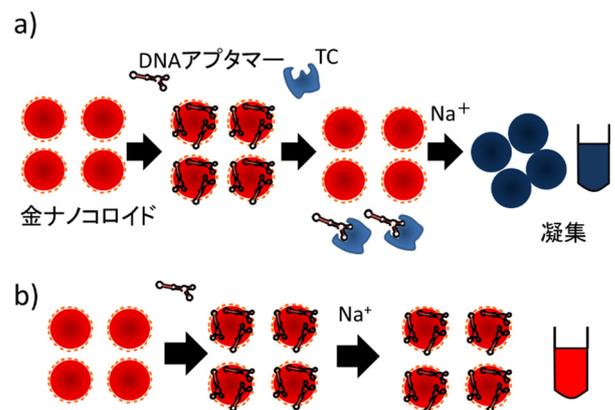


図1 金ナノコロイドとアプタマーを用いた比色分析法の原理

- a) 金粒子の表面にアプタマーが吸着し金粒子を覆う。TC存在下ではアプタマーがTCに吸着することで金粒子から脱着し、ナトリウムイオン( $\text{Na}^+$ )を添加することにより金粒子が凝集し、色調が赤色から青色へ変化する。
- b) アプタマーに覆われた金粒子は $\text{Na}^+$ を添加しても凝集しない。

## II. 材料および方法

### 1 材料

#### (1) DNAアプタマー

TCに結合するYoungらのアプタマー<sup>4, 5)</sup>を使用した。

#### (2) 金ナノコロイド溶液

塩化金(III)酸をクエン酸により還元 (Frens法)<sup>6)</sup>することで、直径約13nmの金ナノコロイド溶液を作出した。

#### (3) TC溶液

TC塩酸塩標準品 (富士フィルム和光純薬(株)、高速液体クロマトグラフ用) をメタノールで500ppmに調整し、適宜pH4.5のリン酸緩衝液 (PBS) で希釈した。

#### (4) 検体

抗菌性物質の残留がないことを確認した豚の筋肉。

### 2 測定方法

#### (1) 比色分析法を用いたTC溶液における検量線の作成

5 nmol/L 金ナノコロイド溶液180 $\mu$ Lと10nmol/L DNAアプタマー10 $\mu$ Lを混和させ15分静置後、各濃度 (0 ppm, 0.1ppm, 0.2ppm, 0.3ppm, 0.4ppm, 0.5ppm) のTC溶液10 $\mu$ Lを混和した。再度15分静置し、0.1mol/Lの塩化ナトリウム溶液を22 $\mu$ L入れ、色調の変化をマイクロプレートリーダーで波長620nmにて測定した。0 ppmはpH4.5のPBSを使用した。(1)の試験は5回繰り返し試行した。

#### (2) 添加回収試験

豚の筋肉10gにTCを残留基準値濃度 (0.2 ppm) となるように添加し、分別推定法に準じ、試験溶液A、B、Cを調製した。なお、マクロライド系は試験溶液A、テトラサイクリン系とペニシリン系は試験溶液B、アミノグリコシド系は試験溶液Cに溶出される<sup>3)</sup>。得られた試験溶液A、B、Cそれぞれを、上記(1)と同様にDNAアプタマーを混和した金ナノコロイド溶液に添加し、波長620nmにて吸光度を測定した。

また、TCの溶媒であるメタノールを試料に添加し、試験溶液としたものを陰性対照とした。定量上限値を超えた溶液と陰性対照に関してはpH4.5のPBSで3倍希釈後、吸光度を測定した。(2)の試験は5回繰り返し試行した。

## III. 結果

### 1 TC溶液における検量線の作成

直線性が得られた範囲は0.1ppmから0.5ppmまでであり、相関関係を示す決定係数 $r^2=0.9342\sim 0.9938$  (平均 $r^2=0.9837$ )であった(図2)。エラーバーは標準偏差を示している。

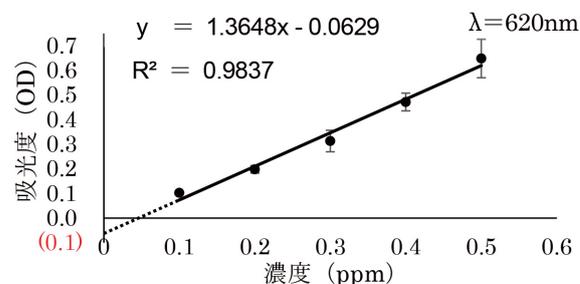


図2 比色分析法を用いたTC溶液における検量線

### 2 添加回収試験

TCを残留基準値濃度となるよう添加した豚の筋肉から得られた試験溶液Bにおいて呈色反応を示し、検量線から算出したTC濃度は平均0.092 ppm、回収率は46.0%、zスコアは0.07~1.63、変動係数は0.066であった(表1)。また、試験溶液AおよびCでは、呈色反応を示さなかった。

表1 添加回収試験の結果

	定量値 (ppm)	平均 (ppm)	回収率 (%)	標準偏差 (S)	Zスコア	変動係数
trial 1	0.090				0.22	
trial 2	0.085				1.04	
trial 3	0.102	0.092	46.0	0.095	1.63	0.066
trial 4	0.089				0.43	
trial 5	0.092				0.07	

#### IV. 考 察

本試験法のTCの定量的な測定可否を調べるため、検量線を作成した。検量線作成においてTC濃度と吸光度に強い相関を示し、TCの残留基準値濃度の検出が可能であった。また、豚の筋肉からのTC検出の可否を検討したところ、残留基準値濃度でのTC検出が可能であったが、回収率は46%と低かった。これは、試験溶液調製の過程でのTCの損失やアプタマーの結合は水素結合や電気的な力によると考えられるため<sup>8)</sup>、豚の筋肉中に残存した鉄などの金属因子による阻害が起こったことが要因として挙げられる。しかし、添加回収試験の結果は各試験のzスコアは2以下、変動係数は0.1以下であったことから、検査精度は良好と考えられ、本試験法はTC濃度の推定が可能と考えられた。

本試験法で用いたアプタマーは、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンに対して特異的に結合するとされており<sup>4)</sup>テトラサイクリン系抗生物質の検出が可能であると考えられる。また、作業が簡易であり、分別推定法で使用した溶液を流用することにより、抽出時間を除くと、検査時間が約30分に抑えられ、必要な設備も少ない手法である。当検査所では、抗生物質の残留疑い事例があった際には、生産者に対し、飼料給与や治療歴等の飼養状況について聞き取りを行っている。その際に、具体

的な残留薬剤の種類や量を提示できれば、原因究明の一助になるものと考えられる。

本試験法では修飾を行っていない金ナノコロイドとアプタマーを使用した。これらに修飾を加えることで高感度な検出が可能と考えられる。さらに、アプタマーの種類を変えることで、各種の抗菌性物質に対しても同様の検査が可能であるため、今後の発展が望まれる。

#### 引用文献

- 1) 厚生省通知昭和58年3月24日付け環乳第9号(第1集の5)「食肉の抗菌性物質簡易検査法(改訂)」
- 2) 厚生省通知平成6年7月1日付け衛乳第107号(別添2)「畜水産食品中の残留抗生物質の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」
- 3) 厚生省通知平成6年7月1日付け衛乳第107号(別添3)「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(改訂)」
- 4) Kwon Y. S, Ahmad Raston N.H. Gu M.B. (2014) An Ultra-sensitive Colorimetric Detection of Tetracyclines using the shortest Aptamer with Highly Enhanced Affinity, *Chem Commun.*,50(1), pp.40-42
- 5) Niazi J. H. Lee S. J. Gu M. B. (2008) Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines, *Bioorg Med Chem.*, 16(15), pp.7245-7253
- 6) Liu J. Lu Y. (2006) Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes, *Nature Protocol*,1(1), pp246-52
- 7) Muslum I. Marit N.H. (2016) Aptamers in Analytics, *HHS Public Access*, 141(5), 1551-1568