（7）残留動物用医薬品検査における LC-MS/MS の導入とワルファリンの検出事例

○推野千紘、山口麻綾、佐々木秀樹

1．はじめに

動物用医薬品は畜産動物の疾病の治療や予防を目的に使用され、畜産物の安定供給に大きく貢献している。一方で食品衛生上の観点から、動物用医薬品の食肉中への残留が問題となっており、適切な使用が求められている。

動物用医薬品が、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）に基づく残留基準値を超えて食肉中に残留していないことを確認するため、当所でも残留有害物質モニタリング検査（以下、モニタリング検査）を行っている。今年度からは液体クロマトグラフタンデム質量分析装置（以下、LC-MS/MS）の運用を本格化し、モニタリング検体数を例年よりも拡大して実施しているところである。今回、殺鼠剤として広く用いられているワルファリンをモニタリング検査で検出した事例があったため、当所における LC-MS/MS 運用の現状と併せてその概要を報告する。

2．LC-MS/MS 導入から現在に至るまで

平成 18 年にポジティブリスト制度が施行され、残留した動物用医薬品を正確に定性、定量する必要が生じた。以前、当所のモニタリング検査は、高速液体クロマトグラフ（以下、HPLC）を用いて実施していたが、令和4年度末に LC-MS/MS を導入し、以降は同機器を用いた検査を実施することとした。厚生労働省通知[1]による検査法（以下、通知試験法）では、結果を得るまでに相当の時間を要するため、多検体を処理することは難しく、後述のガイドラインに準拠した検体数の検査は難しい。そのため、通知試験法と同等の性能を有し、かつ迅速に結果を得られる方法（以下、当所試験法）を検討し、モニタリング検査で運用すべく妥当性評価を実施した。

図1に HPLC を用いた旧試験法、LC-MS/MS による当所試験法及び LC-MS/MS による通知試験法の各抽出・精製工程のフローチャートを示した。特に時間がかかる工程としてホモジナイズ工程や濃縮工程が挙げられるが、当所試験法では濃縮工程を必要とせず、ホモジナイズ工程も1回となっている。これにより、抽出・精製に要する時間の短縮が可能になり、旧試験法では1日に処理できる検体数が3～4検体程度であったが、当所試験法では最大 10 検体程度の処理が可能となった。

また、20 種類の化合物を用いて妥当性評価を実施したところ、牛及び豚筋肉で 13 種類、鶏筋肉で 10 種類の化合物について妥当性が確認されたことから、令和5年度から当所試験法を用いたモニタリング検査を実施している。

今年度からは LC-MS/MS の運用を本格化し「畜水産食品の残留有害物質等モニタリングにおける検査計画策定及びサンプリングに関するガイドライン」（以下、ガイドライン）[2]に沿った検体数の検査が可能となった（表1）。

3．令和6年度モニタリング検査における材料および方法

（1）材料

当所が所管すると畜場または大規模食鳥処理場に搬入される牛、豚及び鶏を対象とし、生産者毎に1～4検体の計 185 検体を検査に供した（表1）。検体数はガイドラインに準拠して決定した。また、牛は頸部筋肉、豚は横隔膜、鶏はモモ肉を検体とした。

（2）試薬等

標準品は13種類の化合物全てにおいて富士フィルム和光純薬（株）製の HPLC グレードを使用した。

その他検査に使用した試薬等は表2に示した。

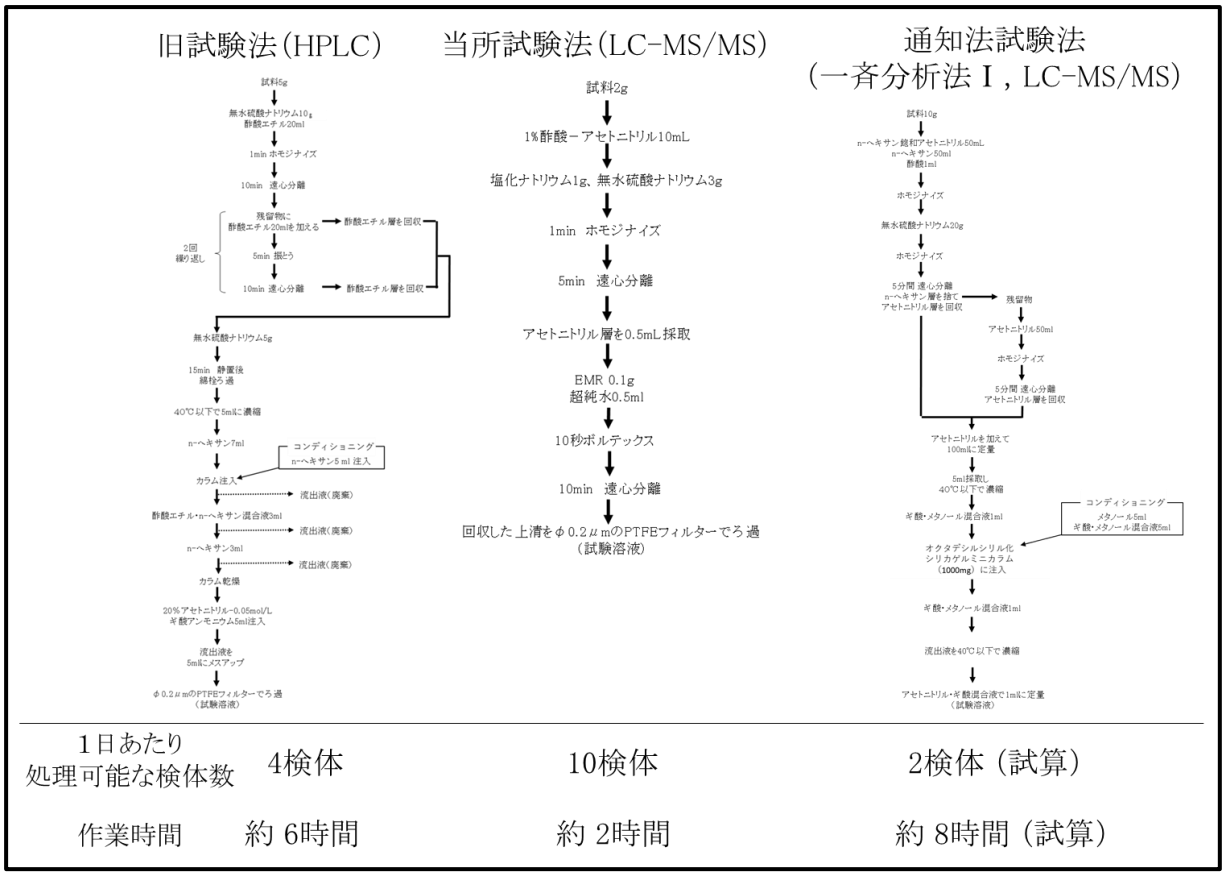

図1　各試験法の抽出・精製工程

表 1　令和4年度から令和6年度（12 月末現在）の畜種ごとのモニタリング検査の検体数

	令和 4 年度	令和 5 年度	令和 6 年度
牛肉	3	15	3※
豚肉	6	15	119
鶏肉	12	12	63

※1　令和6年度から牛のと畜頭数が大幅に減少したことに伴い、検体数をそれに合わせて調整。

表 2　使用した試薬等

試薬名	グレード等
水	超純水
アセトニトリル	LCMS 用（移動相用） 試薬特級（抽出溶液用）
ギ酸	LCMS 用
酢酸 無水硫酸ナトリウム 塩化ナトリウム	試薬特級
Enhanced Matrix Removal-Lipid（EMR）	粉末状の吸着材 アジレント・テクノロジー（株）製

(3)検査方法

① 前処理

試料をドライアイスとともにミルブレンダーで凍結・粉砕処理し、パウダー状に均一化する。

② 抽出・精製(図1のとおり)

③ 分析

LC-MS/MS によりバッチ分析を行う。対象化合物は表3、測定条件は表4のとおり。

④ 結果の解析

表 3 分析対象化合物

化合物名	m/z	
	定量イオン	確認イオン
ダノフロキサシン	358.15 > 340.20	358.15 > 82.10
マルボフロキサシン	365.15 > 72.15	363.15 > 320.10
オルビフロキサシン	396.15 > 352.20	396.15 > 295.10
スルファジメトキシン	311.10 > 156.00	311.10 > 92.10
スルファジミジン	279.10 > 92.15	279.10 > 186.15
スルファメラジン	265.10 > 156.05	265.10 > 92.05
スルファメトキサゾール	254.05 > 155.95	254.05 > 92.15
スルファモノメトキシン	281.05 > 156.05	281.05 > 92.15
スルファキノキサリン	301.10 > 156.05	301.10 > 92.00
ベンジルペニシリン	335.10 > 160.10	335.10 > 176.10 335.10 >114.10
エリスロマイシン A	734.45 > 158.10	734.45 > 576.30
タイロシン	916.55 > 174.10	－
ワルファリン	309.10 > 163.05	309.10 > 251.10

表の化合物は牛筋肉、豚筋肉で妥当性が確認されており、塗りつぶし部分は鶏筋肉で妥当性が確認されている。

表 4 LC-MS/MS の測定条件

LC-MS/MS	島津製作所社製　LCMS－8050
分離カラム	オクタデシルシリル化シリカゲル(内径 2.1mm、長さ 150mm、粒子径 3μm)
カラム温度	40 度
移動相	A 液:0.1%ギ酸－水　B 液:0.1%ギ酸－アセトニトリル
注入量	試験溶液 2μL を超純水 8μL と共注入する
グラジエント	A 液:B 液＝99:1(0min)→85:15(1min)→60:40(6min)→0:100(10min)→0:100(18min)→99:1(18.01min)→99:1(22min)
流速	0.2mL/min
イオン化モード	ESI(+)、MRM モード

4. 結果

(1)モニタリング検査の結果

令和 6 年度に実施したモニタリング検査において、185 検体中1検体でワルファリンの残留基準値超過を認めた(表 5)。

表 5　令和6年度モニタリング検査結果

	検体数	陽性数
牛肉	3	0
豚肉	119	1
鶏肉	63	0
計	185	1

(2)ワルファリンの検出事例への対応

① 事例の概要

健康畜として同一生産者から搬入された豚 85 頭のうち、4頭を検査したところ、1頭からワルファリンの残留基準値を超過(0.002ppm)する個体が確認された。なお、豚筋肉におけるワルファリンの残留基準値は 0.001ppm である。

② 残留した原因の推定

ワルファリンは治療目的で使用される薬剤ではなく、主に殺鼠剤として用いられている薬剤である。当該畜の飼養状況の聞き取り調査の結果、過去にそ族対策としてワルファリン系殺鼠剤を使用したことがあったが、豚が殺鼠剤を直接喫食できる状況ではなかったとのことであった。

また、ネズミが摂食した殺鼠剤量、殺鼠剤のワルファリン含有量、豚が誤食したネズミの重量、ワルファリンの体内薬物分布等を考慮して、殺鼠剤を摂食し死亡等したネズミを二次誤食した場合の豚筋肉中のワルファリン濃度を試算したところ、測定結果と同オーダーになった。

本事例ではと畜検査で、当該生産者から同日に出荷された豚 85 頭全てにおいてワルファリン中毒に典型的な症状(出血性の症状)を認めなかった。豚での中毒例[3]では肝臓のワルファリン濃度 0.02ppm で出血性の症状を認めており、本事例では中毒症状を呈する濃度に至っておらず、と畜検査結果と測定結果にも矛盾は無かった。以上から、残毒餌を摂食し死亡等したネズミの二次誤食が原因として推定され、当該個体のみの違反と判断した。

③ 措置

食品衛生法第十三条第二項に違反する旨を出荷者及び生産者に指摘したところ、出荷者より自主的に廃棄する旨の申し出があった。当該枝肉は流通前であり、自主廃棄により食品衛生上の危害防止が図られると判断し、当所職員立会いのもと、自主廃棄を行わせた。また、薬剤の使用状況、残留の原因、再発防止策等を記載した報告書を提出するよう併せて指導を行った。

5. 考察

LC-MS/MS の導入から2年で、ガイドラインで求められている検体数の検査が可能な体制を構築することができた。HPLC と比較して LC-MS/MS は感度と定性能力がともに高い。ワルファリンを含め、残留基準値が低いまたは検出に化学的修飾が必要な化合物などは一般に HPLC による測定が困難である。本事例は LC-MS/MS による検査でなければ摘発できない事例であった。

ワルファリンの検出事例は他の自治体でもあり、令和元年には東京都の検査において千葉県産の豚枝肉から 0.006 ppm 検出された事例が報告されている[4]。モニタリング検査は幅広く全国の自治体で実施されており、動物用医薬品の残留があれば検査で摘発される可能性がある。

本事例のワルファリン基準値超過の原因として、残毒餌を摂食し死亡等したネズミの二次誤食が推定された。農場でワルファリン系殺鼠剤を使用していない場合であっても、付近の農地で使用された殺鼠剤を摂食したネズミが豚舎内へ侵入して死亡する等も考えられる。本事例のようなケースはどの生産者でも起こり得ると考えられる。そのため、当所が発行する検査所だよりを活用し、ネズミ対策で使用する殺鼠剤を設置する場所や、死亡等したネズミを発見した場合は速やかに片付ける旨を広く注意喚起した。

当所検査法では妥当性を確認できていない化合物も多くあるため、検査対象化合物の拡充を進めていきたい。また、検査結果を可能な限り迅速に得ることで、残留基準値の超過が判明した場合に流通前もしくは初期の段階で排除することが可能であることから、検査方法を再検討し、検査時間のより一層の短縮を図りたい。

6. 参考文献

[1]厚労省通知令和 3 年 9 月 6 日付生食発 0906 第 1 号「『食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法について』の一部改正について」

[2]厚労省通知令和 6 年 6 月 10 日付健生食監発 0610 第 3 号(別添3)「畜水産食品の残留有害物質等モニタリングにおける検査計画策定及びサンプリングに関するガイドライン」

[3]山内俊平、細井美博、橋爪直規、野尻貴康、安藤毅欣、都築利元:全身性出血を呈した豚 2 例、平成 6 年度日本獣医公衆衛生学会講演要旨－中部、441(1994)

[4]東京都保健医療局 食品安全アーカイブズ「食品衛生関係違反処理集計表」令和元年度 食品衛生関係違反処理集計表
https://www.hokeniryo1.metro.tokyo.lg.jp/shokuhin/foods_archives/publications/violationHandling/pdf/violationHandling_r1/violationHandling_r1-02.pdf（令和 7 年 2 月 10 日）