

200501064A

平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

総括・分担研究報告書

**食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究
(H17-食品・一般-013)**

主任研究者 堀江 正一 埼玉県衛生研究所

分担研究者 丹野 憲二 財団法人日本食品分析センター

井部 明広 東京都健康安全研究センター

研究報告書目次

I. 総括研究報告書

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究..... 1

主任研究者 堀江 正一
(埼玉県衛生研究所 水・食品担当部長)

II. 分担研究報告書

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

—試験菌及び培地の検討—..... 11

主任研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)

協力研究者 石井 里枝 (埼玉県衛生研究所)

竹上 晴美 (埼玉県衛生研究所)

吉田 絵美子 (埼玉県衛生研究所)

2. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

—簡易検査法及び高感度検査法の検討—..... 23

主任研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)

協力研究者 石井 里枝 (埼玉県衛生研究所)

竹上 晴美 (埼玉県衛生研究所)

吉田 絵美子 (埼玉県衛生研究所)

3. キノロン系抗菌剤の残留分析における ELISA 法と機器分析法の比較..... 39

主任研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)

協力研究者 斉藤 貢一 (星薬科大学 薬品分析化学教室)

伊藤 里恵 (星薬科大学 薬品分析化学教室)

岩崎 雄介 (星薬科大学 薬品分析化学教室)

伊藤 岳 (星薬科大学 薬品分析化学教室)

4. バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質
及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討..... 49

主任研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)
分担研究者 丹野 憲二 (財団法人 日本食品分析センター)
研究協力者 藤田 和弘 (財団法人 日本食品分析センター)
伊藤 裕信 (財団法人 日本食品分析センター)

5. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法
の開発とペニシリン系抗生物質の検討..... 63

主任研究者 堀江 正一 (埼玉県衛生研究所)
分担研究者 井部 明広 (東京都健康安全研究センター)
研究協力者 草野 友子 (東京都健康安全研究センター)
神田 真軌 (東京都健康安全研究センター)

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

主任研究者 堀江正一（埼玉県衛生研究所 水・食品担当部長）

微生物学的試験法は、前処理が比較的簡易であり、多くの抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングすることが可能であることから、抗菌性物質の残留分析に有用である。本研究では、簡易且つ検出感度に優れた微生物学的試験法を構築することを目的とした。

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

公定法試験菌に比べ、操作性、汎用性に優れた試験菌の採用を目的に、市販芽胞菌液の検出感度を調査した結果、市販芽胞菌は公定法試験菌とほぼ同等の感受性を示すことが分かった。市販芽胞菌液は、継代保存等の操作が必要なく、検査用平板の調製が容易であることから、公定法試験菌に代わる残留抗菌性物質のスクリーニング法として有用と考える。次に、畜水産食品中に残留する主な抗菌性物質を一括して検出できる高感度な微生物学的試験法を検討した。代表的薬剤を選び、0.1ppm レベルで添加回収実験を行った結果、その回収率は概ね70%以上であった。本法は、畜水産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質、セファロsporin系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤を簡易且つ高感度に検出することが可能であった。

2. バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討

本研究では、β-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質にターゲットを絞り、ポジティブリスト制の導入に際して残留基準値が設定された抗生物質について、高感度な系統別スクリーニング法について検討を行った。今回検討した16種の抗生物質については、残留基準値レベルでの検出が可能であった。今後は、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質など、他系統の抗生物質についても検討していく予定である。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法の開発

逆相・カチオン交換ミックスモードカートリッジを用いた食肉中に残留する系統の異なる抗生物質ベンジルペニシリン（PCG）等4種の微生物学的検査法を構築した。本試験法は簡易な前処理法で各抗生物質の残留基準値レベルでの検出が可能であり、系統推定も可能であった（第1法）。次に、上記の試験法を一部改良し、他のPC系抗生物質に応用した結果、暫定基準値レベルでの検出が可能であった（第2法）。

4. 残留分析におけるキノロン剤のELISA法と機器分析法の比較

ELISA法は簡便な方法で、多検体を迅速に測定できる利点を有している。キノロン剤を対象薬剤として、機器分析法とELISA法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料に適用した結果、スクリーニング法としてELISAの有用性が示唆された。

分担研究者

井部明広 東京都健康安全研究センター
丹野憲二 (財)日本食品分析センター

A. 研究目的

畜水産動物の疾病予防及び治療を目的に数多くの抗菌性物質（抗生物質及び合成抗菌剤）が用いられ、畜水産物の安定供給に大きく寄与している。しかし、一方ではこれら抗菌性物質の畜水産食品中への残留が食品衛生上、強く懸念されている。このことから、より多くの抗菌性物質を一括して分析できる分析法の確立が必要とされている。微生物学的試験法は、前処理が比較的簡易であり、多くの抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングすることが可能であることから、これらの抗菌性物質の残留分析に有用である。しかし、現在示されている公定法は、検出感度および操作性の点で改善すべき問題がある。そこで本研究では、簡易且つ検出感度に優れた微生物学的方法を構築することを目的とする。なお、本研究では簡便且つ迅速な微生物学的試験法を中心に検討するが、ELISA 等の簡易検査キットを用いた検出法も併せて検討する。

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

現在公定法に用いられている試験菌に比べ、操作性、汎用性、検出感度に優れた試験菌の採用を検討した。更に、簡易且つ迅速な検査法、及び検出感度に優れた高感度検査法開発のための基礎的検討を行った。

2. バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討

本研究では、β-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質にターゲットを絞り、また、試験菌株の管理が煩雑であることから、市販芽胞溶液の有効性を評価することを考慮し、バイオアッセイによる系統別スクリーニン

グ法の検討を行った。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法の開発

今年度は、単一カラムで残留基準値レベルの検出及び抗生物質の系統推定も可能な簡易迅速微生物学的試験法の基本的骨格を構築し、次に構築した試験法を用いペニシリン系抗生物質の検出数拡大を試みた。

4. 残留分析におけるキノロン剤のELISA法と機器分析法の比較

本研究では、市販 ELISA キットの有用性を検討することを目的として、畜水産食品に残留するキノロン剤を対象とした機器分析法と ELISA 法との相関性を検討した。

B. 研究方法

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

1) 試料及び試薬

試料は、埼玉県内で市販されていた豚筋肉部及び豚肝臓を用いた。

供試抗菌性物質：β-ラクタム系抗生物質 9 種、マクロライド系抗生物質 8 種、アミノグリコシド系抗生物質 9 種、テトラサイクリン系抗生物質 4 種、ポリペプチド系 6 種、ポリエーテル系抗生物質 3 種、クロラムフェニコール、サルファ剤 10 種、キノロン剤 15 種及びフロロフェニコールの 66 種。

供試試験菌：公定法試験菌及び市販芽胞菌液である 5 種 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B.s* ATCC 6633), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (*M.l* ATCC 934) *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 (*B.Calidolactis*) , *Bacillus subtilis* BGA (*B.s* BGA) , *Bacillus stearothermophilus* (*B.stearothermophilus*) の菌株を使用した。

2) 試験菌液及び検査用培地の調製

B.s ATCC 6633 芽胞菌液は、公定法である簡易検査法に、*B.Calidolactis* 試験菌液はベンジ

ルペニシリン試験法に準拠して調製した。なお、*M.l* ATCC 9341 試験菌液は、公定法である簡易検査法の調製法を一部変更して調製した。

検査用平板は、いずれも Difco 社の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地)及び Brain Heart Infusion Agar (BHI 培地)を使用した。

3) 微生物学的試験法

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検査用平板培地上に置いた。それらの平板は、約5℃で30分間放置した後、*B.s* ATCC 6633、*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は 30℃で 18 時間、*B.calidolactis* 及び *B. stearothermophilus* は、55℃で6時間培養した。パルプディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定して、直径12mm以上のものを陽性とした。

4) 検量線の作成

0.001~10ppm の範囲で数段階濃度の各標準溶液を調製し、微生物学的試験法に供した。出現した阻止円の直径から検量線を作成し、検出下限値（最小発育阻止濃度 MIC）を求めた。

5) 簡易検査法試験溶液の調製

試料 10g を採り、メタノール 10mL を加えてホモジナイズ抽出し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離後、その上清を試験溶液とした。

6) 高感度分析法試験溶液の調製

試料 10g を採り、除タンパク・抽出用溶液 100mL を加えてホモジナイズした後、Oasis HLB カートリッジでクリーンアップを行った。

2. バイオアッセイによる食肉中の β-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討

1) 試料

牛の筋肉・肝臓及び豚の筋肉・肝臓

2) 測定対象物質

β-ラクタム系抗生物質 16 種、テトラサイクリン系抗生物質 4 種を測定対象物質とした。

3) ペーパーディスク法の測定条件

・β-ラクタム系抗生物質

試験菌株：*Bacillus stearothermophilus* spore suspension(Merck 社製)

培地：Heart Infusion Agar (HIA) (Becton Dickinson 社製)

・テトラサイクリン系抗生物質

試験菌株：*Bacillus subtilis* BGA spore suspension(Merck 社製)

培地：Antibiotic Medium 8 (AM8) (Becton Dickinson 社製)

4) 前処理法

・β-ラクタム系抗生物質

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り、水 30 mL を加えてホモジナイズ抽出し、Oasis HLB(200 mg)カートリッジによりクリーンアップを行った。

・テトラサイクリン系抗生物質

細切した食肉約 10 g を正確に量り取り、0.001 mol/L EDTA2Na 含有 pH4.0 マッキルベイン緩衝液でホモジナイズ抽出し、GL-Pak PLS-2 カートリッジによりクリーンアップを行った。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法の開発

1) 試料及び試薬

豚肉、豚肝臓、鶏肉、牛肉を使用した。β-ラクタム系抗生物質等 9 種を測定対象物質とした。

2) 供試菌株

Bacillus subtilis ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 (*Micrococcus luteus* ATCC 9341 が名称変更) (*K. rhizophila*), *Bacillus cereus var.mycoides* ATCC 11778 (*B. mycoides*)、この3試験菌株に加え、PC系抗生物質の検討には *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* C-953 (C-953) を用いた。

3) 試験溶液の調製法

試料 10g を細切し、マッキルベイン緩衝液で抽出

後, Oasis MCX カートリッジでクリーンアップを行った。

4. 残留分析におけるキノロン剤の ELISA 法と機器分析法の比較

1) 測定対象物質

キノロン剤 8 種を測定対象とした。

2) ELISA キット

市販キット (フロンティア研究所社製 New Quinolone Kit) を用いた。

3) 機器分析の測定条件

キノロン剤の測定は, 高速液体クロマトグラフィ-蛍光検出法(HPLC-FL)を使用した。蛍光検出器の測定波長は励起波長 270 nm, 蛍光波長 447 nm とした。

4) 前処理方法

細切した食肉約 5 g を正確に量り取り, アセトニトリル 15 mL 加えた後に, ホモジナイズ抽出した。その後, Oasis MCX を用いてクリーンアップを行った。

C. 研究結果及び考察

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

1) 公定法試験菌及び市販芽胞菌の感受性比較

B.s ATCC 6633 及び *B.s* BGA, *B.calidolactis* 及び *B. stearothermophilus* の各抗菌性物質に対する感受性はほぼ同等であった。

2) *B. stearothermophilus* の型別による感受性の比較

B. stearothermophilus の栄養細胞型及び芽胞の各抗菌性物質に対する感受性は, ほぼ同等であった。以上の結果から市販芽胞菌液は公定法試験菌の代替菌として有用であると思われた。

3) 抗菌性物質の試験菌に対する抗菌活性

4 種の平板培地 *B.s* BGA (AM8,AM5), *M.l* ATCC 9341 及び *B. stearothermophilus* に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べたところ, 多くの薬物がこれら 3 種の菌のいずれかに高い抗菌活性を示すことが分かった。

β-ラクタム系, ポリペプチド系, ポリエーテル系抗生物質及びクロラムフェニコールは, *B. stearothermophilus* に, マクロライド系抗生物質は, *M.l* ATCC 9341 に, アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は, *B.s* BGA に強い抗菌活性を示した。なお, テトラサイクリン系抗生物質は, pH の低い *B.s* BGA (AM8) に, アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は, pH の高い *B.s* BGA (AM5) により強い抗菌活性を示した。一方, サルファ剤は, いずれの菌に対しても, ほとんど抗菌活性を示さなかった。

4) 簡易検査法の検討

固相抽出法等の前処理を用いずに, 試料中の抗菌性物質の希釈倍率を極力少なくする方法を検討した。抽出溶媒としてメタノール, アセトニトリル, 20%含水メタノール及び 20%含水アセトニトリルを用いて検討した結果, メタノールを用いることにした。本法による各抗菌性物質の検出感度はペニシリン系, セファロsporin系が 0.005~0.01ppm, マクロライド系, テトラサイクリン系, ニューキノロン剤が 0.1~0.5ppm であった。一方, アミノグリコシド系抗生物質 (ストレプトマイシン, ゲンタマイシン) はメタノール抽出では抽出効率が悪いめか, 検出感度は 5ppm 以上であった。本法は, アミノグリコシド系抗生物質を除き, 現在用いられているクエン酸-アセトン緩衝液で抽出する簡易検査法に比べ, 検出感度において数倍優れており, 操作も試料 10g をメタノール 10mL でホモジナイズ抽出するのみと簡易であり, 抗菌性を有する動物用医薬品の迅速なスクリーニング法として, 有効な分析法の一つになるものと期待される。

5) 高感度検査法の検討

5-1) 試験溶液の調製

畜水産食品中の残留抗菌剤の前処理法として種々の方法が用いられている。著者らはこれ

までにメタリン酸-メタノール系あるいはメタリン酸-アセトニトリル系溶液で除タンパクと同時に抽出し、多くの薬物が保持される逆相系カートリッジによる前処理法を採用してきた。マクロライド系やテトラサイクリン系抗生物質はメタリン酸-メタノール系が、一方キノロン剤は、メタリン酸-アセトニトリル系を用いることにより高回収率を得た。なお、除タンパク・抽出溶媒中のメタリン酸濃度であるが、メタリン酸の濃度が高くなるに従い、除タンパク効果は優れるが、回収率が低下する薬物も見られた。そこで、除タンパク・抽出溶媒には試料抽出液の pH が 4.5~5 程度となる 0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)を採用することにした。

次に、カートリッジであるが、テトラサイクリン系抗生物質やキノロン剤はシリカベースの ODS 系カートリッジでは、充填剤中の残存シラノール基や金属不純物の影響を強く受け、不可逆的に一部が吸着される。そこで、カートリッジには汎用性に優れたポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いることにした。なお、本前処理法ではアミノグリコシド系抗生物質は、そのほとんどがカートリッジに保持させず流出した。アミノグリコシド系抗生物質は、アミノ糖を有する水溶性塩基性化合物であるため、逆相系のカートリッジに保持されない。そこで、カートリッジ流出液にイオンペアー剤を加え、アミノグリコシド系抗生物質を保持させる手法を採用した。

5-2) 添加回収試験

豚の筋肉にベンジルペニシリン、スピラマイシン、オキシテトラサイクリン、エンロフロキサシン及びストレプトマイシンを選び、添加回収実験を行った。本法による添加回収率(0.1ppm 添加時)は、概ね 70%以上であり、残留分析法としてほぼ満足すべき結果であると思われる。

5-3) 検出感度

本法により、代表的な抗菌性物質の検出限界を調べた。今回検討した 12 種類の豚筋肉部及び豚肝臓における検出感度は、0.001~0.05ppm レベルであった。また、今回用いた、3 種類の試験菌(4 種類の検査用培地)に対する感受性パターンを観察することにより、残留抗菌性物質の系統を推定することも可能であった。

2. バイオアッセイによる食肉中の β -ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討

1) β -ラクタム系抗生物質

1-1) 試験菌株の検討

ベンジルペニシリンの公定法で用いられている *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 (旧 *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953)は栄養細胞を使用しており、煩雑な菌株の管理が必要となる。一方、*Bacillus stearothermophilus* spore suspension として、芽胞溶液が市販されていることから、これらについて PCG 標準溶液を用いて検討を行った。その結果、市販芽胞溶液の方が若干阻止円の明瞭さが劣るものの同等の感度を示した。よって、取り扱いの容易さから、本研究では、市販芽胞溶液を用いることとした。

1-2) 標準溶液による感受性の確認

各薬剤の標準溶液を用いて感受性の確認を行った。その結果、0.0025~0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 12 mm 程度の阻止円形成を確認することができた。

1-3) 固相抽出の検討

ベンジルペニシリンの公定法の前処理法では、アミノ基とフェノール性の水酸基を有するアモキシリン(AMO)の回収がほとんど得られなかった。原因として、固相カートリッジへの吸着が不十分であることが判明したことから、固相抽出の検討を行った。検討は、溶液中で不安定である PCG についても行った。その結果、

ポリマー系のカートリッジである Oasis HLB を用い、負荷時の pH を中性から弱アルカリ性 にすることにより AMO を保持させることが可能であった。

1-4) 添加回収試験

牛筋肉及び肝臓を用いて、残留基準値濃度で添加回収試験を行い、また、その結果を考慮して、検出限界濃度の確認を行った。なお、検出限界は、12 mm の阻止円を形成する濃度とした。その結果、各薬剤の回収率は 27.3~92.6 %であった。本法は、ベンジルペニシリンの公定法と同程度に高感度に、また広範囲に β -ラクタム系抗生物質をスクリーニングすることが可能であり、マクロライド系抗生物質の影響をある程度は受けるものの、系統分析法として特異性を有するものと考えられた。

2) テトラサイクリン系抗生物質

2-1) 試験菌株の検討

テトラサイクリン系抗生物質の公定法では *Bacillus cereus* ATCC 11778 の芽胞溶液が用いられている。本菌株は芽胞溶液が市販されていないため、煩雑な菌株の管理が必要となる。一方、*Bacillus subtilis* は芽胞溶液が市販されていることから、OTC 標準溶液を用いてこれらの菌株について検討を行った。その結果、*Bacillus cereus* ATCC 11778 と比較して *Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液は同等の感受性を示した。そこで、本研究では、*Bacillus subtilis* 市販芽胞溶液を用いることとした。

2-2) 標準溶液による感受性の確認

各薬剤の標準溶液を用いて感受性の確認を行った。その結果、0.04~0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度範囲で 12 mm 程度の阻止円形成を確認することができた。

2-3) 添加回収試験

豚筋肉及び肝臓を用いて、残留基準値濃度で添加回収試験を行い、また、その結果を考慮して、検出限界濃度の確認を行った。その結果、

各薬剤の回収率は 46.7~82.7 %であり、検出限界は、すべて残留基準値をクリアすることが可能であった。

本法は、テトラサイクリン系抗生物質の公定法と同程度にスクリーニングすることが可能であるが、 β -ラクタム系抗生物質の影響を受けることが示唆された。バイオアッセイで検出された場合は機器分析により、物質の同定を行う必要があることから、スクリーニング法としては有用であると考えられた。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法の開発とペニシリン系抗生物質の検討

1) 第 1 法

1-1) 各抗生物質の感受性パターン

ペニシリン系抗生物質 PCG(1)、テトラサイクリン系抗生物質 OTC、マクロライド系抗生物質 SPM、アミノグリコシド系抗生物質 GM(2) をそれぞれ分画した。PCG は、*K. rhizophila* に、OTC は *B. mycoides* に、SPM は *K. rhizophila* に、GM は *B. subtilis* に最大の阻止円を形成し、抗生物質の系統推定が可能であった。

1-2) 添加回収試験

豚筋肉に残留基準値レベルで PCG、OTC、SPM、GM を添加し、回収率を調べた。PCG は 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加で 70.5 %、OTC は 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加で 57.2 %、SPM は 0.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ で 78.8 %、GM は 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ で 74.6 %であった。豚肝臓では、PCG は 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加で 58.9 %、OTC は 0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加で 28 %、SPM は 0.6 $\mu\text{g}/\text{g}$ 添加で 33.1 %、GM に関しては、検量線が直線性が得られず、定量不可であった。

1-3) 検出限界

検出限界は豚筋肉で PCG 0.0025 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、OTC 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、SPM 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、GM 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ であり、各薬剤の残留基準値レベルでの検出が可能であった。

2) 第 2 法

2-1) 各抗生物質の感受性パターン

PC系抗生物質の多くは、分画溶液Aに溶出され、C-953プレートに最大の阻止円を形成した。両性を示すABPCは一部が分画溶液Bに溶出され完全に分画はできなかった。TC系抗生物質のOTC、ML系抗生物質のTLM、AG系抗生物質のGMは、分画溶液Bに分画され、OTCは*B. mycoides*プレートに、TLMは*K. rhizophila*プレートに、GMは*B. subtilis*プレートに最大の阻止円を形成した。以上のことから抗生物質の系統推定が可能であった。

2-2) PC系抗生物質の添加回収試験及び検出限界

牛筋肉に残留基準値レベルでPCGを添加し、回収率を調べた。0.05 μ g/g添加で70.7%、標準偏差は3.9であり、残留基準値レベルの検出可能であった。

2-3) 他系統の抗生物質の添加回収

今回の検査法で他系統の抗生物質の添加回収を行った。牛筋肉にOTC、TLM、GMを添加した場合の回収率は、OTCは0.2 μ g/g添加で52.1%、TLMは0.1 μ g/g添加で75.0%、GMは0.1 μ g/g添加で26.6%であった。3剤とも残留基準値レベルで検出可能であった。

4. 残留分析におけるキノロン剤のELISA法と機器分析法の比較

1) ELISAにおける交差反応性の評価

New Quinolone Kitにおける交差反応性について、キノロン剤標準品を用いて求めたところ、ノルフロキサシン、シプロフロキサシンが100%、ダノフロキサシンは80%、ロメフロキサシンは30%前後の交差反応性を示した。

2) HPLC-FL条件

キノロン剤のHPLC-FL測定条件の検討を行った。蛍光検出器は移動相のpHおよび塩濃度に依存して蛍光強度が変化することから、それぞれの最適条件を検討した。キノロン剤の蛍光強度はpH7以上の条件で蛍光を示さず、中性

から酸性条件化で一定の蛍光強度を示したことから、移動相のpHは3.0とした。

3) 試料の前処理方法

試料に含まれる共存物質の影響を取り除くため、Oasis HLBおよびOasis MCXを用いて検討した結果、陽イオン交換系カートリッジであるMCXを用いることで良好な結果を得ることができた。

4) 実試料への応用

実際の食肉中に適用したところ、一部の試料からダノフロキサシンとエンロフロキサシンが検出された(<5 ng/mL)。ELISAと機器分析による結果を比較したところ、ELISAの方がわずかながら高値を示す傾向が見られた。このことは、共存物質による交差反応性もしくは、測定対象物質以外にも交差反応性を示す物質が存在する可能性を示唆している。

D. 結論

1. 簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

今年度、公定法試験菌に比べ、操作性、汎用性に優れた試験菌の採用の検討を目的に、市販芽胞菌液の検出感度を調査した結果、市販芽胞菌は公定法試験菌とほぼ同等の感受性を示すことが分かった。市販芽胞菌液は、継代保存等の操作が必要なく、検査用平板の作製が容易であることから、公定法に代わる残留抗菌性物質のスクリーニング法として有用と考える。また、多くの抗菌性物質が、市販芽胞菌を含めた4種の検査用平板培地(*B.s* BGA (AM8,AM5), *M.l* ATCC 9341 及び *B. stearothermophilus*) において阻止円を形成した。

次に、畜水産食品中に残留する主な抗菌性物質として、ペニシリン系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤などを中心とした、より多くの抗菌性物質を一括して検出できる

高感度な微生物学的試験法を検討した。

畜水産食品から0.5%メタリン酸-メタノール-アセトニトリル(6:2:2)で除タンパクと同時に薬物を抽出し、ポリマー系逆相カートリッジ Oasis HLB を用いてクリーンアップする前処理法を構築した。各グループから代表的薬剤を選び、0.1ppm レベルで添加回収実験を行った結果、その回収率は概ね70%以上であった。

本法は、動物用医薬品として汎用され、畜水産食品中に残留する可能性の高いペニシリン系抗生物質、セファロsporin系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、キノロン剤を簡易且つ高感度に検出することが可能であり、残留抗菌性物質のスクリーニング法として日常検査に用いられる実用的な方法であると考えられる。

2. バイオアッセイによる食肉中のβ-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質のスクリーニング法の検討

多種多様な抗菌性物質を一挙に、且つ高感度にスクリーニングすることは非常に困難である。そこで、本研究では、β-ラクタム系抗生物質及びテトラサイクリン系抗生物質にターゲットを絞り、ポジティブリスト制の導入に際して残留基準値が設定された抗生物質について、高感度な系統別スクリーニング法について検討を行った。今回検討した16種の抗生物質については、残留基準値レベルでの検出が可能であった。今後は、マクロライド系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質など、他系統の抗生物質についても検討していく必要があると思われる。

3. 食肉中残留抗生物質の系統推定微生物学的スクリーニング試験法の開発

逆相・カチオン交換ミックスマードカートリッジを用いた、食肉中に残留する系統の異なる抗生物質のPCG, OTC, SPM, GMの微生物学

的検査法を構築した。本試験法は簡易な前処理法で各抗生物質の残留基準値レベルでの検出が可能であり、系統推定も可能であった(第1法)。次に、上記の試験法を一部改良し、PC系抗生物質PCG, ABPC, NFPC, MDIPC, MCIPCに応用した結果、暫定基準値レベルでの検出が可能であった。本試験法は簡易な前処理法で多数の検体を同時に検査することが可能であった(第2法)。

4. 残留分析におけるキノロン剤のELISA法と機器分析法の比較

ELISA法は簡便な方法で、多検体を迅速に測定できる利点を有している。しかし、交差反応性などの問題から、客観的な情報が不足しており、汎用性に乏しかった。キノロン剤を対象薬剤として、機器分析法とELISA法を用いて食肉中の残留分析法を検討し、実試料へと適用したところ、全ての試料が定量限界未満であった。機器分析における前処理等煩雑な操作を考慮すると、スクリーニング法としてのELISAの有用性が示唆された。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

- 1) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之「微生物学的試験法による残留抗菌性物質のスクリーニング法の検討」第126年回日本薬学会(2006年3月, 仙台)
- 2) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之「微生物学試験法による残留抗菌性物質の基礎的検討」第126年会日本薬学会(2006年3月, 仙台)
- 3) 竹上晴美, 堀江正一「残留抗菌性物質の微生物学的簡易検査法の検討」第91回日本食

品衛生学会 (2006年3月, 東京)

4) 伊東 岳, 湧井 宣行, 川口 研, 岩崎 雄介,
伊藤 里恵, 堀江 正一, 斉藤 貢一, 中澤 裕之

「環境水中の抗菌活性物質測定法の開発」日本
分析化学会第54年会 (2005年9月, 名古屋)

5) 伊東 岳, 湧井 宣行, 川口 研, 加藤 美穂子,
小平 司, 堀江 正一, 岩崎 雄介, 伊藤 里恵,

斉藤 貢一, 中澤 裕之「ELISA による河川水
中に残留するニューキノロン系抗菌剤の測定」

日本薬学会第126年会 (2006年3月, 仙台)

6) 藤田 和弘, 加藤 仁美, 尾崎 由佳, 丹野 憲
二, 堀江 正一「バイオアッセイによる食肉中

のβ-ラクタム系抗生物質のスクリーニング法の
検討」日本食品衛生学会第91年会 (2006年5

月, 東京)

7) 伊藤 裕信, 高田 由美子, 藤田 和弘, 丹野
憲二, 堀江 正一「バイオアッセイによる食肉

中のテトラサイクリン系抗生物質のスクリー
ニング法の検討」日本食品衛生学会第91年会

(2006年5月, 東京)

8) 草野友子, 神田真軌, 井部明広「逆相・カ
チオン交換ミックスマードカートリッジを用

いた食肉中残留抗生物質の微生物学的系統推
定スクリーニング試験法」日本食品衛生学会第

89回学術講演会 (2005年5月, 東京).

平成17年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進）

食品中に残留する抗生物質の分析法に関する研究

研究報告書

『簡易且つ迅速な微生物学的試験法の構築

－試験菌及び培地の検討－』

主任研究者	堀江 正一	埼玉県衛生研究所
研究協力者	石井 里枝	埼玉県衛生研究所
	竹上 晴美	埼玉県衛生研究所
	吉田 絵美子	埼玉県衛生研究所

研究要旨

今年度、公定法試験菌に比べ、操作性、汎用性に優れた試験菌の採用の検討を目的に、市販芽胞菌液の検出感度を検討した。市販芽胞菌は公定法試験菌とほぼ同等の感受性を示すことが分かった。市販芽胞菌液は、継代保存等の操作が必要なく、検査用平板の作製が容易であることから、公定法試験菌に代わる残留抗菌性物質のスクリーニング法として大変有用と考える。また、多くの抗菌性物質が、市販芽胞菌を含めた4種の検出用平板培地（*B.s* BGA (AM8,AM5), *M.l* ATCC 9341 及び *B. stearothermophilus*）を用いることにより感度よく検出された。今後は、簡便な前処理を加えることにより、残留基準値を満足する高感度試験法を検討する予定である。

A. 研究目的

畜水産動物の疾病予防及び治療を目的に数多くの抗菌性物質が用いられ、畜水産物の安定供給に大きく寄与している。しかし、一方ではこれら抗菌性物質の畜水産食品中への残留が食品衛生上、強く懸念されており、より多くの抗菌性物質を一括して分析できる分析法の確立が必要とされている。微生物学的試験法は、前処理が比較的簡易であり、阻止円の有無を観測することにより抗菌性物質の残留の有無をスクリーニングすることが可能である。このことから、抗生物質を中心に抗菌性物質の残留分析に汎用されており、日常検査には、平成6年

に厚生省から示された「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改訂）」が公定法として用いられている。しかし、本検査法は希釈法であるため、その検出感度は残留基準値を必ずしも満足していない。また、簡易検査法と同時に厚生省から示された「畜水産食品中の残留抗生物質分別推定法（改訂）」は、液-液分配法と固相抽出法により抗生物質を分別し、多くの抗生物質に対して感受性を示す3菌株 *Bacillus subtilis* ATCC 6633（以下 *B.s* ATCC 6633 と略す）、*Micrococcus luteus* ATCC 9341（以下 *M.l* ATCC 9341 と略す）及び *Bacillus mycoides* ATCC 11778 に対する感受性パターンから、

畜水産食品中に残留する抗生物質を系統別に推定しようとする方法である。しかし、本検査法は、操作が煩雑で且つエマルジョンが形成され易い。また、液-液分配法に有害な有機塩素系のクロロホルムを使用するなどの問題がある。

そこで本研究では、現在用いられている微生物学的試験法に比べ、より簡易で検出感度に優れた試験法の構築を試みた。先ず初めに、現在公定法に用いられている試験菌に比べ、操作性、汎用性、検出感度に優れた試験菌の採用を検討した。

B. 研究方法

B.1. 試料及び試薬

供試抗菌性物質：表 1 及び表 2 に示す β-ラクタム系抗生物質 9 種、マクロライド系抗生物質 8 種、アミノグリコシド系抗生物質 9 種、テトラサイクリン系抗生物質 4 種、ポリペプチド系 6 種、ポリエーテル系抗生物質 3 種、クロラムフェニコール、サルファ剤 10 種、キノロン剤 15 種及びフロルフェニコールの 66 種。

それぞれの標準品約 20mg を正確に量り、メタノール 50mL に溶解して、標準原液を調製し、適宜、10%メタノールで希釈して標準溶液とした。

ただし、一部の溶けにくいキノロン剤については、0.02M 水酸化ナトリウム-メタノール(2:8)50mL、アミノグリコシド系抗生物質及び一部のポリペプチド系抗生物質については、50%メタノールに溶解して標準原液を調製した。

供試試験菌：公定法試験菌及び市販芽胞菌液である 5 種の菌株を使用した。

B.s ATCC 6633, *M.l* ATCC 9341, *Bacillus*

stearothermophilus var. calidolactis C-953 (以下 *B.Calidolactis* と略す) *Bacillus subtilis* BGA (Merk 製; 以下 *B.s* BGA と略す), *Bacillus stearothermophilus* (Merk 製; 以下 *B. stearothermophilus* と略す)

ペトリ皿：合成樹脂製で、内径 86mm の滅菌したものを用いた。

パルプディスク：アドバンテック東洋(株)製の直径 10mm、厚さ 1.2mm (吸水量 0.08mL±0.01mL) のパルプディスクを 121°C、15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてから用いた。

その他の試薬は、いずれも特級品を使用した。

B.2. 試験菌液及び検出用培地の作製

B.s ATCC 6633 芽胞菌液は、公定法である簡易検査法に、*B.Calidolactis* 試験菌液はベンジルペニシリン試験法に準拠して調製した。なお、*M.l* ATCC 9341 試験菌液は、公定法である簡易検査法の調製法を一部変更し、次のとおり調製した。即ち、普通寒天斜面培地で継代した菌株を、白金耳 (2μL 用) で掻き取り、滅菌精製水 10mL に接種して試験菌液とした。

検査用平板は、いずれも Difco 社の Antibiotic Medium 8 (AM8 培地)、Antibiotic Medium 5 (AM5 培地) 及び Brain Heart Infusion Agar (BHI 培地) を使用した。これらの培地を 121°C、15 分間高圧滅菌後、55°C±1 に保持し、これに *B.s* ATCC 6633 または *B.s* BGA 芽胞菌液は培地の 1/100 量、*M.l* ATCC 9341 試験菌液は、培地の 1/20 量加え、*B.calidolactis* 及び *B. stearothermophilus* 試験菌液は培地の 1/200 量を加え、十分に混合した後、その 8mL をペトリ皿に注入し、水平に静置して凝固させ、平板培地を作製

した。

B.3. 微生物学的試験法

パルプディスクを試験溶液に浸漬し、検出用平板培地上に置いた。それらの平板は、約5°Cで30分間放置した後、*B.s* ATCC 6633、*B.s* BGA 及び *M.l* ATCC 9341 は30°Cで18時間、*B. calidolactis* 及び *B. stearothermophilus* は、55°Cで6時間培養した。

パルプディスク周辺に出現した阻止円の直径をノギスで測定して、直径12mm以上のものを陽性とした。

B.4. 検量線の作成

0.001~10ppmの範囲で数段階濃度の各標準溶液を調製し、微生物学的試験法に供した。出現した阻止円の直径から検量線を作成し、検出下限値(最小発育阻止濃度MIC)を求めた。

B.5. 倫理面への配慮

本研究では、ヒト及び動物由来の組織、臓器、細胞などを実験に使用していないため、倫理面への特別な配慮は行っていない。

C. 研究結果及び考察

C.1. 公定法試験菌及び市販芽胞菌の感受性比較

B.s ATCC 6633 及び *B.s* BGA の各抗菌性物質に対する感受性の比較を行ったところ、これら2種の菌は今回検討した抗菌性物質に対し、ほぼ同等の感受性を示した(表3)。

次に、*B. calidolactis* 及び *B. stearothermophilus* の各抗菌性物質に対する感受性の比較を行ったところ、これら2種の菌は今回検討した抗菌性物質に対し、ほぼ同様の傾向の感受性を示した(表4)。

C.2. *B. Stearothermophilus* の型別による感受性の比較

栄養型 *B. stearothermophilus* 及び芽胞 *B. stearothermophilus* の各抗菌性物質に対する感受性の比較を行ったところ、阻止円が形成されるまでの時間に多少の差があったものの、その感受性はすべての薬剤に対し、ほぼ同等であった(表5)。

今回、公定法試験菌の代替菌として市販芽胞菌液の検討を行った結果、市販芽胞菌の感受性は公定法試験菌とほぼ同等であることが分かった。また、公定法では栄養型を用いている *B. stearothermophilus* は、栄養型でも芽胞でもほぼ同等の感受性を示すことが分かった。このことから、市販芽胞菌液は公定法の代替菌として有用であると思われる。

C.3. *M.l* ATCC 9341 試験菌液の調製

公定法では、「継代保存した菌株を感受性測定用ブイヨンに接種し、30°C、18時間の培養を3代継代し、3代目の培養液を試験菌液とする」となっており、試験菌液の調製に長時間を要する。そこで、より操作を簡便に、且つ再現性ある結果を得る試験菌液の調製法として、継代保存した菌株を白金耳で一定量掻き取り、直接滅菌蒸留水に接種する方法を検討した。2µL用の白金耳で掻き取って調製した試験菌液と公定法に準拠して調製した試験菌液を用いて作成した平板培地は、抗菌性物質に対してほぼ同等の感受性を示した。

C.4. 抗菌性物質の試験菌に対する抗菌活性

4種の平板培地 *B.s* BGA (AM8,AM5)、*M.l* ATCC 9341 及び *B. stearothermophilus* に対する各抗菌性物質の抗菌活性を調べたところ、多くの薬物がこれら3種の菌のいずれかに高い抗菌活性を示すことが分かった。

β-ラクタム系、ポリペプチド系、ポリエーテル系抗生物質及びクロラムフェニコールは、*B. stearothersophilus* に強い抗菌活性を示した。マクロライド系抗生物質は、*M.l* ATCC 9341 に強い抗菌活性を示した。アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は、*B.s* BGA に強い抗菌活性を示した。なお、テトラサイクリン系抗生物質は、pH の低い *B.s* BGA (AM8) に、アミノグリコシド系抗生物質及びキノロン剤は、pH の高い *B.s* BGA (AM5) により強い抗菌活性を示した。一方、サルファ剤は、いずれの菌に対しても、ほとんど抗菌活性を示さなかった (表 6,7)。

D. 結論

今年度、公定法試験菌に比べ、操作性、汎用性に優れた試験菌の採用の検討を目的に、市販芽胞菌液の検出感度を調査した結果、市販芽胞菌は公定法試験菌とほぼ同等の感受性を示すことが分かった。市販芽胞菌液は、継代保存等の操作が必要なく、検査用平板の作製が容易であることから、公定法に代わる残留抗菌性物質のスクリーニング法として大変有用であると考えられる。

また、多くの抗菌性物質が、市販芽胞菌を含めた 4 種の検出用平板培地 (*B.s* BGA (AM8,AM5), *M.l* ATCC 9341 及び *B. stearothersophilus*) において阻止円を形成した。今後は、簡便な前処理を加えることにより、残留基準値を満足する高感度試験法を検討していく予定である。

E. 健康危害情報

なし

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

- 1) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之「微生物学的試験法による残留抗菌性物質のスクリーニング法の検討」第 126 年回日本薬学会 (2006 年 3 月, 仙台)
- 2) 竹上晴美, 堀江正一, 中澤裕之「微生物学試験法による残留抗菌性物質の基礎的検討」第 126 年会日本薬学会 (2006 年 3 月, 仙台)
- 3) 竹上晴美, 堀江正一「残留抗菌性物質の微生物学的簡易検査法の検討」第 91 回日本食品衛生学会 (2006 年 5 月, 東京)

G. 知的財産権の出願・登録情報

なし

表1 供試抗生物質

分類	抗生物質	メーカー	
β-ラクタム系	アモキシシリン	Amoxicillin	関東化学(株)
	アンピシリン	Ampicillin	Dr.Ehrenstorfer
	ペニシリン G	Penicillin G	SIGMA
	セフォペラゾン	Cefoperazone	関東化学(株)
	セフロキシム	Cefuroxime	関東化学(株)
	セファピリン	Cephapirin	関東化学(株)
	セファロニウム	Cephalonium	供与品
	セファレキシム	Cephalexin	Dr.Ehrenstorfer
	セファゾリン	Cephazolin	関東化学(株)
マクロライド系	エリスロマイシン	Erythromycin	Dr.Ehrenstorfer
	オレアンドマイシン	Oleandomycin	SIGMA
	キタサマイシン	Kitasamycin	和光純薬工業(株)
	ジョサマイシン	Josamycin	山之内製薬(株)
	スピラマイシン	Spiramycin	協和発酵(株)
	タイロシン	Tylosin	Dr.Ehrenstorfer
	チルミコシン	Tilmicosin	Dr.Ehrenstorfer
	ミロサマイシン	Mirosamicin	東洋醸造(株)
アミノグリコシド系	アプラマイシン	Apramycin	関東化学(株)
	ジヒドロストレプトマイシン	Dihydrostreptomycin	Dr.Ehrenstorfer
	パロモマイシン	Paromomycin	Dr.Ehrenstorfer
	ネオマイシン (フラジオマイシン)	Neomycin (Fradimycin)	Dr.Ehrenstorfer
	ゲンタマイシン	Gentamycin	和光純薬工業(株)
	ハイグロマイシンB	Hygromycin B	武田薬品工業(株)
	カナマイシン	Kanamycin	Dr.Ehrenstorfer
	スペクチノマイシン	Spectinomycin	SIGMA
	ストレプトマイシン	Streptomycin	Dr.Ehrenstorfer
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	Oxytetracycline	SIGMA
	クロルテトラサイクリン	Chlortetracycline	SIGMA
	テトラサイクリン	Tetracycline	SIGMA
	ドキシサイクリン	Doxycycline	Dr.Ehrenstorfer
ポリペプチド系	エンラマイシン	Enramycin	武田薬品工業(株)
	コリスチン	Colistin	Dr.Ehrenstorfer
	チオペプチン	Thiopeptin	供与品
	ノシヘプタイド	Nosiheptide	供与品
	バージニアマイシン	Virginiamycin	日本全薬工業(株)
	バシトラシン	Bacitracin	Dr.Ehrenstorfer
ポリエーテル系	ラサロシド	Lasalocid	SIGMA
	モネンシン	Monensin	Dr.Ehrenstorfer
	サリノマイシン	Salinomycin	科研製薬(株)
その他	クロラムフェニコール	Chloramphenicol	供与品

表2 供試合成抗菌剤

分類	合成抗菌剤	メーカー	
サルファ剤	スルファジアジン	Sulfadiazine	SIGMA
	スルファジメトキシ	Sulfadimethoxine	SIGMA
	スルファジミジン	Sulfadimazine	関東化学(株)
	スルファドキシ	Sulfadoxine	関東化学(株)
	スルファメトキサゾール	Sulfamrthoxazole	SIGMA
	スルファメトキシピリダジン	Sulfamethoxypyridazine	SIGMA
	スルファメラジン	Sulfamerazine	関東化学(株)
	スルファモノメトキシ	Sulfamonomethoxine	関東化学(株)
	スルファキノキサリン	Sulfaquinoxaline	関東化学(株)
	スルファチアゾール	Sulfathiazole	SIGMA
キノロン剤	ダノフロキサシン	Danofloxacin	関東化学(株)
	ジフロキサシン	Difloxacin	Dr.Ehrenstorfer
	エンロフロキサシン	Enrofloxacin	関東化学(株)
	エノキサシン	Enoxacin	SIGMA
	フルメキン	Flumequine	関東化学(株)
	マルボフロキサシン	Marbofloxacin	SIGMA
	ミロキサシン	Miloxacin	住友製薬(株)
	ナリジクス酸	Nalidixic acid	関東化学(株)
	ノルフロキサシン	Norfloxacin	関東化学(株)
	オフロキサシン	Ofloxacin	関東化学(株)
	オルビフロキサシン	Orbifloxacin	林純薬工業(株)
	オキソリン酸	Oxolinic acid	関東化学(株)
	サラフロキサシン	Sarafloxacin	Dr.Ehrenstorfer
	スパフロキサシン	Sparfloxacin	SIGMA
ベブフロキサシン (ベノフロキサシン)	Vebufloxacin	供与品	
その他	フロルフェニコール	Florfenicol	Dr.Ehrenstorfer

表3 B. s ATCC6633とB. s BGAの感受性比較

分類	抗菌性物質	薬剤に対する感受性									
		濃度(ppm)	0.05	0.1	0.25	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0	
β-ラクタム系	ATCC6633	-	±	±	+	+					
	BGA	-	±	±	+	+					
マクロライド系	ATCC6633	-			-	±	+	+	+		
	BGA	-			-	±	+	+	+		
アミノグリコシド系	ATCC6633	-			-	-	+	+	+		
	BGA	-			-	±	+	+	++		
テトラサイクリン系	ATCC6633							-	-	+	
	BGA							-	±	+	
キノロン剤	ATCC6633										
	BGA										
キノロン剤	ATCC6633										
	BGA										

表4 *G. calidolactis*と*B. stearothermophilus*の感受性比較

分類	抗菌性物質	薬剤に対する感受性													
		濃度(ppm)	0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0			
β-ラクタム系	アンピシリン	<i>G. Calidolactis</i>	±	+	++	+++									
		<i>B. stearothermophilus</i>	±	+	++	++									
マクロライド系	チルミコシン	<i>G. Calidolactis</i>					-	±	+	+	+	+	+	+	
		<i>B. stearothermophilus</i>					-	±	+	+	+	+	+	+	
アミノグリコシド系	カナマイシン	<i>G. Calidolactis</i>											-	+	+
		<i>B. stearothermophilus</i>											-	+	+
テトラサイクリン系	テトラサイクリン	<i>G. Calidolactis</i>								+	++	++	++	++	++
		<i>B. stearothermophilus</i>								±	+	++	++	++	++
キノロン剤	オルビプロキサシン	<i>G. Calidolactis</i>										-	+	++	++
		<i>B. stearothermophilus</i>										-	+	++	++