

## Ⅱ．分担研究報告

### 4. 課題5. 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之



食品中残留農薬等の分析法に関する研究

課題 5. 抗生物質の系統的分析法に関する評価研究

研究分担者 菊地博之 国立医薬品食品衛生研究所 食品部主任研究官

**研究要旨**

畜水産物中の残留抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における公定試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドを調査対象として、各国政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署への聞き取り調査及び文献調査等を行った。得られた調査結果から、各国で実施されている残留抗生物質のバイオアッセイ法の整備状況等を取り纏めた。併せて、我が国のバイオアッセイによる通知試験法を調査して、欧米等で行われているバイオアッセイによる試験法と比較した。欧米等の多くの国では、抗生物質の検査法として、現在でも様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられていた。しかし、マトリックスの影響による誤判定、検出限界濃度が高く基準値判定には適用できない等の多くの課題点があることが明らかになった。しかし、と畜場等の現場の検査室では、バイオアッセイ法は極めて有効な方法であることから、バイオアッセイ法の特性を生かした新たな検査方法の提案が必要であると考えられた。

**A. 研究目的**

畜水産物に残留する抗生物質の検査法は、高感度、高精度に分析することが可能な LC-MS/MS、GC-MS/MS 等の分析機器の普及に伴い、バイオアッセイ法から機器分析法への移行が世界的に進んでいる。しかしながら、機器分析法では、試験法が未開発の抗生物質が存在する一方で、バイオアッセイ法は低コストで多数の抗生物質を簡便に試験できることから、と畜場等の検査室を中心に、現在でも一次スクリーニング法として汎用されている。

我が国では、平成 6 年に示された「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法並びに分別推定法」が微生物学的試験法として通知されている。本法は、試料の前処理が簡便であり、多数の検体を同時に検査することが可能であるが、抗生物質の種類によっては十分な検出感度が

得られないこと、抗生物質の同定が出来ない等の課題点も指摘されている。また、本法は、試験法が通知されてから 20 年以上が経過しているが、その間に試験法の改定は行われていない。

近年では、抗菌物質の不適切な使用を背景として、薬剤耐性菌が世界的に増加する一方で、新たな抗菌薬の開発は減少傾向にあり、国際社会でも大きな課題となっている。これら薬剤耐性 (AMR: Antimicrobial Resistance) の問題に適切に対応するためにも、国際的なバイオアッセイ法の整備状況等を把握し、バイオアッセイ法及び機器分析法の特性を踏まえた、新たな試験体系・試験法の提案が必要と考えられる。しかしながら、欧米等で実施されている畜水産物の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法について、その詳細を調査した報告は極めて少ない。

そこで、初年度は、欧米等(米国、カナダ、EU、

オーストラリア、ニュージーランド)におけるバイオアッセイによる試験法の整備状況、試験法の概要及び検査の実施状況等を調査した。併せて、欧米等で実施されている試験法と比較するために、我が国におけるバイオアッセイによる試験法の概要及び検査の実施状況を調査した。

## B. 研究方法

欧米等(米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランド)で、動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査、担当部署へのメールでの聞き取り調査及び文献調査を実施した。また、各国独自に「残留抗生物質のモニタリング調査」を実施している場合には、それらの検査方法を調査した。我が国のバイオアッセイによる検査の実施状況等は、検疫所、食肉衛生検査所、民間の検査機関に対して、聞き取り調査を実施した。

## C. 研究結果及び考察

### 1. バイオアッセイによる残留抗生物質の検査法

最も初期に利用されていた食品中の残留抗生物質の検出方法は、種々の微生物の成長阻害を検出する方法であり、現在用いられているバイオアッセイ法も同様の原理に基づいている。基本的な微生物阻害試験は、寒天または液体培地中に播種した微生物を用いる。多くの場合、*Bacillus stearothermophilus*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus cereus*、*Micrococcus luteus*、*Escherichia coli*、*Bacillus megatherium*、*Streptococcus thermophiles* 等の培養を行う。次いで、これに乳、尿、組織、卵、または蜂蜜試料等を培地上に載せて、インキュベートする。検査試料は、試料を含浸させたペーパーディスク、またはステンレススチール製シリンダーで培地に直接載せる。イ

ンキュベーション中に液体が培地中に拡散することがあるが、試料に十分量の阻害化合物が含まれている場合、微生物の成長が低減あるいは阻害され、試料中の阻害化合物の存在は、阻止円によって示される。一般に、バイオアッセイ法は、ペニシリンをはじめとするβ-ラクタム系抗生物質に対して極めて高い感受性を示す一方で、マクロライド系抗生物質、サルファ剤、テトラサイクリン系抗生物質、クロラムフェニコールなどの場合には、検出感度は 1/100 程度に低下する。また、検査の性能は、①寒天培地の組成及び pH、②試験菌株の種類、③インキュベーションの温度及び時間、④寒天培地の深さなどの多様な要因が影響することが示されている。特に、試料由来のマトリックスに大きく影響を受けることが報告されており、リゾチーム、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ、長鎖脂肪酸、胆汁、乳酸などが、測定結果に大きな影響を与える因子となる。これらの影響は、ペーパーディスクを使用すること、試験前にサンプルの熱処理を行うこと、または低分子量の抗生物質から高分子量のタンパク質を分離するための透析膜を使用することで払拭できることが報告されている。

米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドで動物用医薬品の規制等を執り行う政府機関が公開しているウェブ情報の調査を実施したが、LC-MS/MS、GC-MS/MS 等の分析機器を用いる残留抗生物質の試験法の情報はあるものの、バイオアッセイに関する情報は極めて少なかった。また、文献調査の結果、多くの国で、主にと畜場の検査室において、バイオアッセイによる試験を実施しているようであるが、具体的な試験方法や検査結果は、殆ど公開されていなかった。以下に、各国におけるバイオアッセイによる試験法について調査した結果を示した。

## 2. 米国におけるバイオアッセイ法

米国では、米国農務省(USDA:United States Department of Agriculture)の食品安全検査局(FSIS:Food Safety and Inspection Service)により、食肉及び家禽組織における残留抗生物質のバイオアッセイ法として、7種の平板を使用した試験法(7-plate法)が公定法として示されている。本法では、*Bacillus cereus* ATCC 11778(以下、*B. cereus* という。)とペニシリナーゼを含む培地(プレート1)、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341a(以下、*K. rhizophila* という。)を植菌した培地(プレート2)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート3)、*B. subtilis* とペニシリナーゼを含む培地(プレート4)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート5)、*K. rhizophila* とペニシリナーゼを含む培地(プレート6)、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228(以下、*S. epidermidis* という。)とペニシリナーゼを含む培地(プレート7)の7枚のプレートを用いて検査を行う。各プレートは、それぞれ、テトラサイクリン系、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、ストレプトマイシン、マクロライド系抗生物質、エリスロマイシン、アミノグリコシド系抗生物質を検出することを目的としている。試料は各培地に適したpHの緩衝液で抽出した溶液200  $\mu$ Lをプレートに注入して、プレート1~6は、29°Cで16~18時間、プレート7は、37°Cで16~18時間インキュベートする。インキュベート後の阻止円の大きさと標準溶液を用いて作成した標準曲線により、試料中の残留濃度を算出する。

この他の残留抗生物質のバイオアッセイ法として、スワブテスト・オンプレミス法(STOP法:Swab Test On Premises)、STOP法を改良したキャスト法(CAST法:Calf Antibiotec and Sulfa Test)、及

びファスト法(FAST法:Fast Antimicrobial Screening Test)等などが同機関により開発され、と畜場などの現場の検査室でスクリーニング法として用いられている。なお、米国で実施している「食肉、家禽、及び卵製品を対象とした全米残留物検査プログラム」では、上記のバイオアッセイ法による検査は採用されておらず、LC-MS/MSを用いた一斉分析法が採用されている。

## 3. EUにおけるバイオアッセイ法

EUでは、1980年に開発された4種の平板を用いる4-plate法(FPT:Four Plate Test)が残留抗生物質のスクリーニング法として用いられている。本法では、pHを6、7.2、8とした培地に*B. subtilis*を播種した3種のプレートと、pHを8とした培地に*M. luteus*を播種したプレートの4種のプレートを用いる。なお、pHを7.2とした培地には、サルファ剤への感受性を高めるために、培地にトリメプリムを加える。本試験法では、試料からの抽出操作、クリーンアップの操作を行わない。-5°C程度の試料の表面をメスで除去した後、試料の中心部をくり抜き、2mmの厚さで8つの試料を採取する。各プレートに対角線上に試料をそのまま載せて、*B. subtilis*のプレートは、30°Cで18~24時間、*M. luteus*のプレートは、37°Cで18~24時間インキュベートする。4つのプレートのうち、阻止円の大きさが2mm以上のものを陽性と判断する。本法では、検体を事前に抽出、精製することなく、 $\beta$ -ラクタム、テトラサイクリン系抗生物質、アミノグリコシド系抗生物質、サルファ剤、マクロライド系抗生物質の残留を検出することが可能である。しかしながら、同試験で得られる検出限界に対する試料マトリックスの影響を調査した研究によると、セフトオフル、サ

ルファ剤、ストレプトマイシン及びマクロライド系抗生物質は、検出が困難であることが明らかとなっている。また、腎臓を試料とした場合に、マトリックスの影響により疑陽性と判定されることも問題視されている。

#### 4. カナダにおけるバイオアッセイ法

カナダでは、カナダ食品検査局 (CFIA : Canadian Food Inspection Agency) のホームページの調査及び担当部署への聞き取り調査を行った。カナダでは、抗生物質の検査法として、バイオアッセイによる公定試験法は示されておらず、LC-MS/MS 等を用いた理化学的試験が示されている。カナダで実施されている「全国残留化学物質のモニタリングプログラム」では、残留抗生物質の検査法として、USDA の FSIS により開発された STOP 法が畜産物の一次スクリーニング法として示されている。本法では、腎臓等の試料にコットンの綿棒を挿入して、30 分間程度、湿潤液を綿棒に十分に吸収させる。*B. subtilis* を播種した寒天培地に、ネオマイシンを添加したディスク (N5 disc) 及び試料を浸潤させた綿棒を載せて、28~30°C で 16~18 時間インキュベートする。綿棒の周辺に 1 mm 以上の阻止帯幅が認められたものを陽性と判定する。なお、本法は家禽類の検査にはマトリックスの影響による疑陽性及び偽陰性となる場合が報告されていること、及びサルファ剤の検出が出来ない点が問題視されている。また、カナダのと畜場の検査室では、STOP 法を改良した CAST 法や FAST 法が一次スクリーニング法として用いられている。CAST 法では、試験菌に *Bacillus megaterium* ATCC 9885 (以下、*B. megaterium* という。) を用いて、Mueller Hinton 培地に播種したプレートで試験を行う。コットンの綿棒を用いた試料のサンプリン

グは、STOP 法と同様であるが、インキュベーションは、45°C で 16~20 時間行う。本法は、STOP 法に比べて、サルファ剤への検出感度が向上している。一方、FAST 法では、CAST 法と同じ試験菌を用いるが、培地にデキストロース及びプロモクレゾールパープルが含まれている。これにより、微生物の成長が早く、インキュベーション時間も CAST 法の 16~20 時間から 6 時間に大幅に短縮されており、迅速に測定結果を得ることが可能な方法である。

#### 5. オーストラリアにおけるバイオアッセイ法

オーストラリアでは、農薬及び動物用医薬品の残留を規制しているオーストラリア農薬、動物用医薬品局 (APVMA : Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority) のホームページを調査したが、抗生物質の公定試験法等は示されていなかった。そこで、国立残留調査所 (National Residue Survey) の残留化学物質及び性能評価局 (Residue Chemistry and Laboratory Performance Evaluation Section) に聞き取り調査を行った。オーストラリアでは、残留抗生物質のバイオアッセイによる公定検査法はないが、一般に、LC-MS/MS を用いる機器分析法と EU で開発された FPT 法が用いられている。具体的な検査法は、各企業や分析機関により独自に改良、開発した方法を用いており、それらの詳細な情報は公開されていなかった。

#### 6. ニュージーランドにおけるバイオアッセイ法

ニュージーランドでは、農薬及び動物用医薬品の登録、輸入食品のモニタリング、製造、販売等を規制しているニュージーランド食品安全局 (NZFSA : New Zealand Food Safety Authority) の農薬及び動物用医薬品グループ (ACVM :

Agriculture Compounds and Veterinary Medicines)のホームページ等を調査した。バイオアッセイによる試験法の情報はなく、担当部署への問い合わせを行ったが、回答は得られなかった。

#### 7. 日本におけるバイオアッセイ法

我が国の畜水産食品中の残留抗生物質の検査は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易法という。）」、「畜水産食品中の残留抗生物質の分別推定法(以下、分別推定法という。）」が微生物学的試験法として通知されている。簡易法では、抗生物質を試料からクエン酸・アセトン緩衝液で抽出する。この抽出液にペーパーディスクを浸漬した後、3種の試験菌(*Micrococcus luteus* ATCC 9341(以下、*M. luteus* という。)、*Bacillus subtilis* ATCC 6633(以下、*B. subtilis* という。)、*Bacillus mycoides* ATCC 11778(以下、*B. mycoides* という。))を用いた検査用平板上に載せて、培養後に得られた阻止円の大きさが直径12 mm以上のものを陽性と判定する方法であり、主に一次スクリーニングとして用いられている。一方、分別推定法は、簡易法で陽性と判定された試料に対して、抗生物質の系統、すなわちマクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、アミノグリコシド系抗生物質のいずれかであるかを決定するために実施される。本法では、抗生物質を試料からエチレンジアミン四酢酸含有マルキベン緩衝液で抽出した後、*n*-ヘキサンで脱脂を行う。その後、抽出液からクロロホルムに対する溶解性を利用して、マクロライド系抗生物質を分離し、次いで、ODS ミニカラムを使用して、テトラサイクリン系及びペニシリン系抗生物質を分離する。ミニカラムを通過する高極性の塩基性化合物であるアミノグリコシド系抗生物質は、

カルボキシル基を有するイオン交換カラムで分離する。それぞれの溶出液を簡易法で用いた3種の試験菌による検査用平板上に載せる。培養後に得られた阻止円について、3種類の試験菌感受性パターンから、残留する抗生物質を系統別に推定する(7判定法)。判定は、阻止円の大きさが直径12 mm以上のものを陽性と判定する。本法は、「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査」において採用されている方法であるが、7判定法に基づき陽性と判定されたものについては、告示法又は通知法により陽性物質名の同定及び定量を行いように努めることとされている。本法は、試料の前処理が簡便であり、多数の検体を同時に検査することが可能であるため、抗生物質の残留の有無を判定するスクリーニング法として、極めて有用である。このため、検疫所、食肉衛生検査所、検査機関、地方衛生研究所等では、本通知試験法が現在でも汎用されている。しかし、抗生物質の種類によっては十分な検出感度が得られないこと、抗生物質の同定が出来ないこと、使用する固相カラムが高価である等の多くの課題点が指摘されている。

#### 8. 日本と欧米等におけるバイオアッセイ法の比較

本研究で調査した多くの国では、残留抗生物質の検査法として、現在でも、サンプリング方法、試験菌、培養条件が異なる様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられている(表1)。しかし、それらの多くは、1970年代頃に開発された方法を基礎とした改良法である。操作が簡便で短時間に検査結果が得られるため、と畜場等の現場の検査室では有効な試験法であると考えられた。一方で、抗生物質の種類によっては、十分な感度が得られない場合

があり、またマトリックスの影響により、疑陽性及び偽陰性と判定される場合が多く報告されている。このため、国際的な残留抗生物質の検査法の傾向としては、バイオアッセイ法からLC/MS/MS等による機器分析法に移行が進むものと推察された。また、多くの国で用いられているバイオアッセイ法は、検査試料をそのまま、または緩衝液で抽出した液体を培地に載せる方法である。一方で、我が国で用いられているバイオアッセイ法(分別推定法)は、試料からの抽出操作、固相カラムを用いる精製操作を行う点において、他の国の試験法と大きく異なっていた。このため、我が国の試験法は操作がやや煩雑となるが、マトリックスの影響を比較的受けにくい方法であると推察された。表2に各バイオアッセイ法による抗生物質の検出限界濃度と我が国で牛の筋肉に設定されている残留基準値をまとめた。バイオアッセイ法では、基準値レベルを検出できない場合があることが明白であった。バイオアッセイ法は、スクリーニング法としては、有用であるが、偽陰性、偽陽性となる可能性は否定できないため、更なる改良が必要であると考えられた。

#### **D. 結論**

畜水産物中の残留抗生物質等を検査するバイオアッセイ法について、欧米等における試験法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を

調査した。各国政府機関への聞き取り調査及び文献調査を行い、得られた調査結果から、米国、カナダ、EU、オーストラリア、ニュージーランドで実施されている残留抗生物質のバイオアッセイ法の検査現状を取り纏めた。併せて、諸外国で実施されているバイオアッセイによる試験法と比較するために、我が国におけるバイオアッセイによる試験法の概要並びに実施状況を整理した。本研究で調査した多くの国では、抗生物質の検査法として、現在でもサンプリング方法、試験菌、培養条件が異なる様々なバイオアッセイによる試験がスクリーニング検査として用いられていることが明らかになった。しかし、マトリックスの影響による誤判定、検出限界濃度が高く基準値判定には適用できない等の多くの課題点があることが明らかになった。しかし、と畜場等の現場の検査室では、バイオアッセイ法は有効な方法であるため、バイオアッセイ法の特性を生かした新たな検査方法の提案が必要であると考えられた。

#### **E. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

なし

##### **2. 学会発表**

なし

#### **F. 知的財産権の出願・登録状況**

なし



表 1 欧米等で用いられているバイオアッセイ法のまとめ

使用国	日本		米国		EU、オーストラリア		米国、カナダ		米国、カナダ		米国、カナダ			
バイオアッセイ法	簡易法		分別推定法		6-Plate法		FPT法		STOP法		CAST法		FAST法	
	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地	試験菌	培地
	<i>M. luteus</i>	Antibiotic Medium (AM 5)	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>B. cereus</i>	AM 8 + penicillinase	<i>B. subtilis</i>	pH 6	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>B. megaterium</i>	Mueller Hinton agar	<i>B. megaterium</i>	Mueller Hinton agar+glucose+Bromocresol Purple
	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>B. subtilis</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4	<i>B. subtilis</i>	pH 7.2 + trimethoprim						
試験菌及び培地	<i>B. mycooides</i>	AM 8	<i>B. mycooides</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4 + penicillinase	<i>B. subtilis</i>	pH 8						
					<i>B. subtilis</i>	AM 5 + penicillinase	<i>M. luteus</i>	pH 8						
					<i>K. rhizophila</i>	AM 11 + penicillinase								
					<i>S. epidermidis</i>	AM 11 + penicillinase								
試料調製	緩衝液による抽出操作のみ		緩衝液による抽出操作 固相カラムによる精製操作		緩衝液による抽出操作のみ		試料(厚さ2 mm)をそのまま培地に載せる		綿棒に直接、湿潤液を取る		綿棒に直接、湿潤液を取る		綿棒に直接、湿潤液を取る	
培養温度、時間	30℃、18時間		30℃、18時間		29℃、16～18時間 (プレート1～6) 37℃、16～18時間 (プレート7)		30℃、18～24時間 ( <i>B. subtilis</i> ) 37℃、18～24時間 ( <i>M. luteus</i> )		28～30℃、16～18時間		45℃、16～20時間		45℃、6時間	
判定方法	阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止円の大きさが8 mm以上を陽性と判定 標準曲線により定量		阻止円の大きさが12 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定		阻止帯幅2 mm以上を陽性と判定	

表2 欧米等で用いられているバイオアッセイ法の検出限界濃度と我が国で設定されている基準値

抗生物質	簡易法	分別推定法	FPT法	STOP法	CAST法	FAST法	日本のMRL*
Ampicillin	0.2	0.0025	0.01	0.01	0.1		0.03
Amoxycillin	0.2	0.0025			0.5		0.04
Bacitracin	3.13		2.5	100	0.5		0.5
Benzylpenicillin	0.39	0.0025					0.05
Chloramphenicol			1.0	0.5	0.5		不検出
Chlortetracycline	0.1	0.01		0.01	0.05	0.3	0.2**
Colistin	>10		50.0	50	10.0		0.15***
Doxycycline	0.2	0.01			0.25		0.05
Erythromycin	0.78	0.05	0.05	0.1	0.1	0.05	0.2****
Gentamicin		2.5	0.5	0.01	0.1	0.05	0.1
Kanamycin	12.5	1.0	50.0	0.025	0.05		0.04
Kitasamycin	3.13	0.25			2.5		0.2
Neomycin			0.5	0.1	0.1	0.1	0.5
Oleandomycin	1.56	0.1		0.25	0.5		0.05
Oxytetracycline	0.78	0.05		0.1	0.1	0.7	0.2**
Penicillin				0.01	0.1	0.1	
Spiramycin	6.25	1.0	0.1	0.5	1.0	0.125	0.2*****
Streptomycin		1.0		0.025	0.5	1.0	0.6*****
Sulfadimethoxine	>10	0.1		10	0.1	4.0	0.05
Sulfaguanidine					2.5		0.1
Sulfamethazine				50.0	0.25	3.0	0.1
Tetracycline	1.56	0.05		0.05	0.1	0.7	0.2**
Tylosin	3.13	0.1		0.125	2.5	0.125	0.1

\*牛の筋肉の場合

\*\* オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン及びテトラサイクリンの総和とする

\*\*\* コリスチンA及びコリスチンBの和とする

\*\*\*\*エリスロマイシンとは、エリスロマイシンAとする

\*\*\*\*\*スピラマイシン I 及びネオスピラマイシン I の和とする

\*\*\*\*\*ジヒドロストレプトマイシン及びストレプトマイシンの和とする