

Ⅱ. 分担研究報告

3. 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

我が国では、畜水産物に残留する抗生物質の公定検査法として、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(以下、簡易検査法という)、並びに分別推定法」が、バイオアッセイ法として通知されており、と畜場などの検査室を中心にスクリーニング検査法として汎用されている。昨年度は、簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法により同一の検体を検査して、得られた検査結果の比較を行った。その結果、機器分析法では、ほぼ全ての抗生物質で正しい測定結果を得ることが可能であったが、簡易検査法ではテトラサイクリン系抗生物質の一部を除いて、多くの抗生物質で正しい検査結果を得ることが出来なかった。これらの問題に適切に対応するためには、国際的な整合性を考慮した試験体系・試験法を提案することが必要であると考えられる。本年度は、これまでに調査した欧米等で用いられているバイオアッセイ法に関する知見を基に、より高感度な検査が可能となるように、簡易検査法の改良を試みた。はじめに、本検査法で規定されている抽出液量 20 mL を半量の 10 mL とすることで、試験溶液中における分析対象化合物の濃度が高くなり、より正しい検査結果を得ることが可能であるかを検討した。また、本法で規定されている試験菌を、米国の公定法など(7-plate 法、STOP 法、FAST 法)で使用されている試験菌(*K. rhizophila*、*S. epidermidis*、*B. megaterium*)に変更して検査を実施した。本検討では、マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、キノロン系抗生物質、サルファ剤、合成抗菌剤など、15 種の抗生物質を検査対象とした。その結果、抽出液量を半量とした場合には、テトラサイクリン系抗生物質及びエリスロマイシン以外では、すべて陰性と判定された。本検討結果は、抽出液量を 20 mL とした公定法に準拠した場合と明確な差は認められなかった。また、米国の公定法等で使用されている試験菌を用いた検討では、添加試料と標準溶液の両方で阻止円が認められた試料は認められなかった。このため、これらの試験菌を用いる場合には、抽出溶液の pH などを詳細に検討して使用する必要があると考えられた。簡易検査法を国際的に整合性のある検査法にするためには、試料からの抽出方法、精製方法等を含めて、試験法の大幅な見直し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、分析対象化合物を高感度、高精度に分析することが可能な LC-MS/MS 等の分析機器の普及に伴い、従来の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、抗生物質の物理化学的特性により機器分析法では、検査が困難な化合物が存在する一方で、バイオアッセイ法

は多数の抗生物質を簡便に検査できることから、と畜場等の検査室を中心に、現在でも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(以下、簡易検査法という)、並びに分別推定法」がバイオアッセイ法として通知されている。これらの検査法は、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。

一方で、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、抗生物質の種類を同定するところが出来ない等の課題点が指摘されている。

近年では、抗菌性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しており、国際社会でも大きな課題となっている。これら薬剤耐性の問題に適切に対応するためにも、国際的に整合性のある新たな試験体系・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中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、平成 28 年度は、欧米等におけるバイオアッセイによる公定検査法の整備状況、検査法の概要等を調査した。多くの国で、現在でも様々なバイオアッセイによる検査が残留抗生物質のスクリーニング検査法として用いられていることを明らかにした。しかし、いずれの検査法においても、試料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など、我が国のバイオアッセイ法と同様に、多くの課題点が認められた。平成 29 年度には、簡易検査法による検査結果の信頼性を評価するために、同一試料を簡易検査法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法とで、検査を実施して、得られた検査結果の比較を行った。マクロライド系、テトラサイクリン系、ペニシリン系、セファロスポリン系、キノロン系抗生物質、サルファ剤、合成抗菌剤など、30 種の抗生物質を検査対象とした。その結果、機器分析法では、ほぼ全ての抗生物質で正しい測定結果を得ることが可能であったが、簡易検査法ではテトラサイクリン系の複数の抗生物質を除き、多くの抗生物質で偽陰性と判定された。本研究で検討した範囲においては、簡易検査法では偽陰性と判定される抗生物質が多く存在する可能性が高いことが示されたが、簡便で多検体を同時に検査がで

きるなどの利点も多くあることから、今後は、簡易試験法の高感度化に向けた改良を行うとともに、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。平成 30 年度は、国際的な整合性を考慮した試験体系・試験法を提案することを目的として、これまでに得られた知見を基に、簡易検査法の改良を試みた。はじめに、簡易検査法で規定されている抽出液量 20 mL を半量の 10 mL とすることで、検出感度が上がり、より正しい検査結果を得ることが可能であるかを検討した。また、本法で規定されている試験菌 (*M. luteus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*) を、米国の公定法等 (7-plate 法、STOP 法、FAST 法) で使用されている試験菌 (*K. rhizophila*, *S. epidermidis*, *B. megaterium*) に変更して検査を実施して、その検討結果を考察した。

B. 研究方法

1) 試料

牛の筋肉を用いた。

2) 分析対象化合物

表 1 に示す 15 種類の抗生物質を対象とした。マクロライド系抗生物質 3 化合物 (エリスロマイシン、オレアンドマイシン、タイロシン)、テトラサイクリン系抗生物質 3 化合物 (オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)、ペニシリン系抗生物質 1 化合物 (ベンジルペニシリン)、キノロン系抗生物質 3 化合物 (フルメキン、エンロフロキサシン、オキシソリン酸)、サルファ剤 3 化合物 (スルファジメトキシシン、スルファジアジン、スルファモノメトキシシン)、合成抗菌剤 2 化合物 (クロピドール、クロラムフェニコール)。

3) 添加濃度

牛の筋肉の残留基準値を超過する最低の濃度を添加濃度とした。(表 1)

4) バイオアッセイ法

平成6年7月1日付衛乳第107号中の厚生労働省「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」を基に改良を行った。試料5gにクエン酸・アセトン緩衝液20mL、または10mLを加えてホモジナイズ抽出した後、ろ紙でろ過した。それぞれの抽出液にペーパーディスクを浸漬した後、これを検査用平板上に置き、ピンセットを用いて平板に固着させた。これを30分間冷蔵で放置した後、30℃で18時間培養した。培養後の阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した。また、添加濃度に調製した抗生物質の標準溶液に浸漬したペーパーディスクを陽性対照、クエン酸・アセトン緩衝液に浸漬したペーパーディスクを陰性対照として、同一の平板で培養した。(スキーム1)

4-1) 試験菌

クエン酸・アセトン緩衝液の抽出液量を変化させた検討では、簡易検査法に規定されている試験菌(*Micrococcus luteus* ATCC9341、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Bacillus mycoides* ATCC 11778)を用いた。一方で、米国の公定法など(7-plate法、STOP法、FAST法)で使用されている試験菌としては、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341a、*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228、*Bacillus megaterium* ATCC 9885を用いた。

4-2) 試液及び培地

クエン酸一水和物、水酸化カリウム、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、アセトンは、富士フィルム和光純薬工業製のものを用いた。アンピシリンナトリウム、カナマイシン硫酸塩、オキシテトラサイクリン塩酸塩は、富士フィルム和光純薬製を用いた。普通寒天培地(日水製薬製)、感受性測定用ブイヨン(日水製薬製)、Antibiotic Medium 4 (Difco製)、Antibiotic Medium 5 (Difco製)、Antibiotic Medium 8 (Difco製)、Antibiotic Medium 11 (Difco製)、Mueller Hinton Ager (日本BD製)を

用いた。

4-3) 装置

安全キャビネット:LAL-1300XA2(オリエンタル技研工業製)、オートクレーブ:LSX-500(トミー精工製)、恒温槽:MIR-262(サンヨー製)、遠心分離機:H-201FR(コンサン製)、ペーパーディスク(直径10mm、厚さ1.1~1.2mm)を用いた。

4-4) 判定方法

阻止円の直径が12mm以上のものを陽性と判定した。なお、陽性対照において、阻止円が形成されない平板は、検査が成立していないものとし、3プレートの中で、2枚以上のプレートの阻止円の直径の平均値で判定した。

C. 研究結果及び考察

1. 抽出液量が検査結果に与える影響に関する検討

昨年度に、30種類の抗生物質を対象として、残留基準値を超過する濃度の抗生物質を添加した牛の筋肉及び肝臓を検体として検査を実施したところ、多くの抗生物質で阻止円が形成されずに、陰性と判定された。更に、標準溶液を用いた試験区においても、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。このことから、現行の検査法では、検出限界が高く、基準値濃度の判定が困難であるものと考えられた。そこで、本年度は、試験溶液中の分析対象化合物の濃度を高くするために、クエン酸・アセトン緩衝液の液量を現行の20mLから半量の10mLに変更して検査を実施した。牛の筋肉を試料として、簡易検査法により検査した結果を表2に纏めた。本法では、3種の試験菌(*M.luteus*、*B.subtilis*、*B.mycoides*)を用いて、1枚の平板に陽性対照(抗生物質の標準溶液)、陰性対照(クエン酸・アセトン緩衝液、牛の筋肉の抽出液)、添加試料から得られた抽出液を浸漬したペーパーディ

スク、計4枚を培地に静置して培養を行った。各平板の培養後の写真を図1に示した。平板上では、上段左に牛の筋肉の抽出液、上段右に添加試料から得られた抽出液、下段左にクエン酸・アセトン緩衝液、下段右には、標準溶液を浸潤したペーパードискを静置した。その結果、正しく陽性と判定された検体は4化合物(エリスロマイシン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、テトラサイクリン)のみであった。また、検査したすべての平板において、陰性対照からは阻止円は認められなかったが、陽性対照とした標準溶液を用いた試験区では、多くの化合物で阻止円は形成されなかった。これらの検討結果は、抽出液量を20 mLとした現行の検査法と殆ど同様の結果であった。抽出液量を半量とすることで、試験溶液中での分析対象化合物の濃度が高くなり、検出感度が向上することを期待したが、そのような結果は得られなかった。簡易検査法をより高感度分析が可能な検査法とするためには、検査法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。

2. 試験菌の種類が測定結果に与える影響に関する検討

現行の簡易試験法では、3種の試験菌(*M. luteus*、*B. subtilis*、*B. mycoides*)を用いて検査を行うこととされている。先の抽出液量を半量した検討結果からも、基準値濃度の判定に適用可能な検査法にするためには、大幅な試験法の改良が必要と考えられた。そこで、本検討では、試験菌を米国の公定法等で使用されている試験菌に変更して、検査を行った。試験菌は、7-plate法で使用されている *K. rhizophila*、*S. epidermidis* の他、スワブテスト・オンプレミス法(STOP法: Swab Test On Premises)、STOP法を改良したファスト法(FAST法: Fast Antimicrobial Screening Test)で用いられている *B. megaterium* を用いた。牛の筋肉を試料として、検

査した結果を表3及び図2に纏めた。テトラサイクリン系の一部の抗生物質では阻止円が形成されたが、多くの試験菌と化合物で阻止円は形成されなかった。これらの試験菌を用いる際には、培地のpHが測定結果に大きな影響を与えられられるため、pH等を変化させて更なる検討が必要であると考えられた。

D. 結論

本研究では、簡易検査法の高感度化に向けた検討として、クエン酸・アセトン緩衝液の液量を半量に減らして検査を実施した。また、米国の公定法等で用いられている試験菌3種(*K. rhizophila*、*S. epidermidis*、*B. megaterium*)を用いて、検査を実施した。抗生物質15種を対象に検査を行ったところ、陽性対照、添加試料共に、阻止円が形成される抗生物質及び試験菌の組み合わせは殆ど認められなかった。以上のことから、簡易検査法をより高感度に検査が可能な方法とするためには、検査法の大幅な見直しが必要と考えられた。しかし、本法は、簡便で多数の抗生物質を検査することが可能な方法であるため、本法をスクリーニング検査法として用いる場合には、抗生物質の検出感度等の確認を十分に行った上で、運用すべきであると考えられた。今後は、機器分析法の導入も併せて検討する必要があると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

菊地博之、坂井隆敏、大倉知子、根本了、穂山浩: 畜産食品中の残留抗生物質を対象としたバイオアッセイ法とLC-MS/MSの比較: 第55回全国衛生化学技術協議会年会(2018.11.30)

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 分析対象化合物及び添加濃度

抗生物質の系統	分析対象化合物	添加濃度 (ppm)
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0.25
	オレアンドマイシン	0.055
	タイロシン	0.15
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0.25
	クロルテトラサイクリン	0.25
	テトラサイクリン	0.25
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0.055
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0.55
	エンロフロキサシン	0.055
	オキシリン酸	0.15
サルファ剤	スルファジメトキシ	0.055
	スルファジミジン	0.15
	スルファモノメトキシ	0.015
合成抗菌剤	クロピドール	0.25
	クロラムフェニコール	0.00055

スキーム1 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改訂）のフローチャート

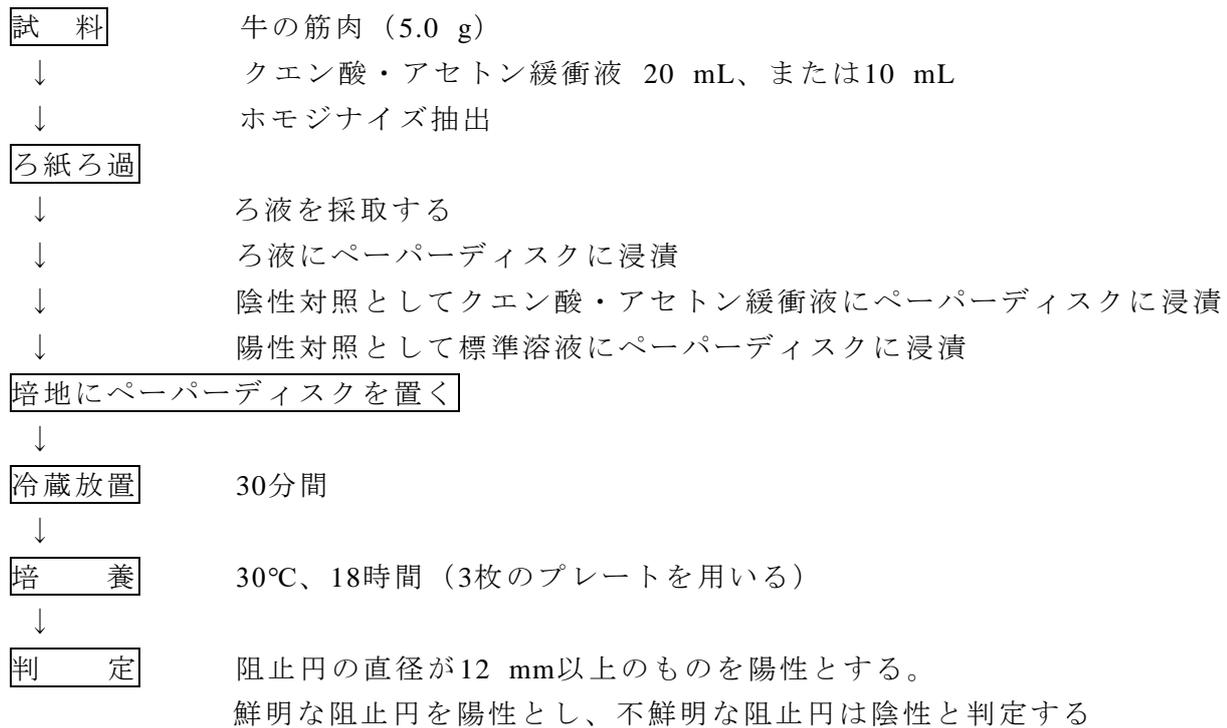
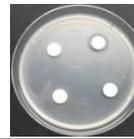
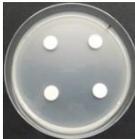
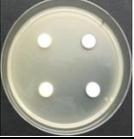
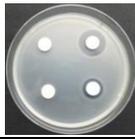
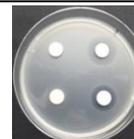


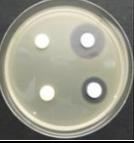
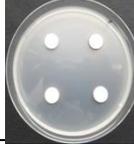
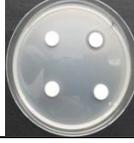
表 2 抽出液量を 10 mL としたときの検査結果

抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)									判定
		<i>M. luteus</i>			<i>B. mycoides</i>			<i>B. subtilis</i>			
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	23	17	0	13	12	0	16	13	陽性
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	タイロシン	0	15	0	0	0	0	0	0	0	陰性
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	12	0	0	21	16	0	13	12	陽性
	クロルテトラサイクリン	0	17	12	0	26	22	0	23	18	陽性
	テトラサイクリン	0	13	0	0	22	16	0	20	13	陽性
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	26	19	0	0	0	0	13	0	陰性
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	15	0	陰性
	オキソリン酸	0	0	0	0	0	0	0	14	0	陰性
サルファ剤	スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0	陰性

表3 米国の公定法で使用されている試験菌を用いた検査結果

抗生物質の系統	分析対象化合物	阻止円の直径(mm)								
		<i>K. rhizophila</i>			<i>S. epidermidis</i>			<i>B. megaterium</i>		
		ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照	ブランク試料	添加試料	陽性対照
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0	21	15	0	13	0	0	0	0
	オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	タイロシン	0	13	0	0	0	0	0	0	0
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0	13.5	0	0	0	0	0	13	0
	クロルテトラサイクリン	0	16	11	0	0	0	0	15	0
	テトラサイクリン	0	12	0	0	0	0	0	0	0
ペニシリン系	ベンジルペニシリン	0	27	20	0	0	0	0	0	0
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	0	0	0	0	14	0	0	17	13
	エンロフロキサシン	0	0	0	0	0	0	0	0	12
	オキソリン酸	0	0	0	0	0	0	0	0	13
サルファ剤	スルファジメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	スルファモノメトキシシン	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合成抗菌剤	クロピドール	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	0	0	0

抗生物質		試料	試験菌及び阻止円の直径 (mm)		
			<i>M. luteus</i>	<i>B. mycoides</i>	<i>B. subtilis</i>
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	添加試料	23	13	16
		標準溶液	17	12	13
					
	オレアンドマイシン	添加試料	0	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
	タイロシン	添加試料	15	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	添加試料	12	21	13
		標準溶液	陰性	16	12
					
	クロルテトラサイクリン	添加試料	17	26	23
		標準溶液	12	22	18
					

	テトラサイクリン	添加試料	13	22	20
		標準溶液	陰性	16	13
					
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	添加試料	26	陰性	13
		標準溶液	19	陰性	陰性
					
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	添加試料	陰性	陰性	12
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	エンロフロキサシン	添加試料	陰性	陰性	15
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	オキシリン酸	添加試料	陰性	陰性	14
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
サルファ剤	スルファジメトキシ	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性

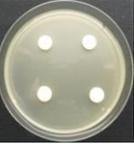
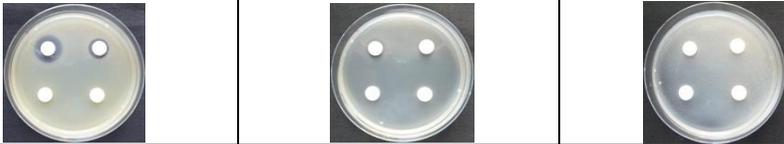
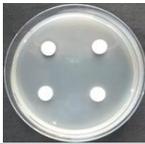
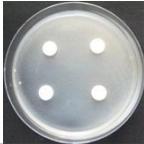
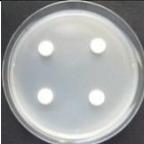
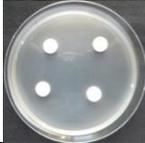
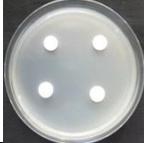
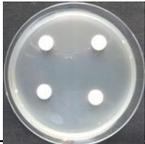
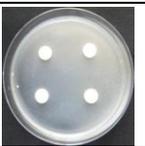
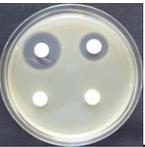
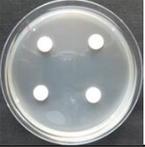
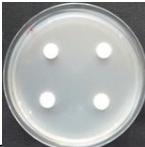
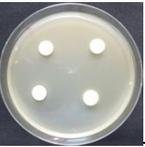
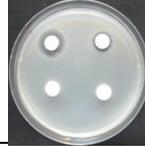
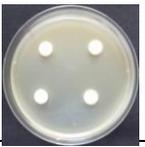
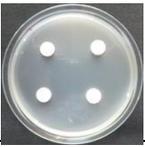
	スルファジミジン	添加試料			
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
		添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
合成抗菌剤	クロピドール	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					
	クロラムフェニコール	添加試料	陰性	陰性	陰性
		標準溶液	陰性	陰性	陰性
					

図1 抽出液量を10 mLとしたときの簡易検査法の検討結果

抗生物質		試料	試験菌及び阻止円の直径 (mm)		
			<i>K. rhizophila</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. megaterium</i>
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	添加試料	21	13	0
		標準溶液	15	0	0
					
	オレアンドマイシン	添加試料	0	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
	タイロシン	添加試料	13	0	0
		標準溶液	0	0	0
					
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	添加試料	14	0	13
		標準溶液	0	0	0
					
	クロルテトラサイクリン	添加試料	16	0	15
		標準溶液	11	0	0

					
	テトラサイクリン	添加試料	12	0	12
		標準溶液	0	0	0
					
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	添加試料	27	0	0
		標準溶液	20	0	0
					
キノロン系合成抗菌剤	フルメキン	添加試料	0	14	17
		標準溶液	0	0	13
					
	エンロフロキサシン	添加試料	0	0	12
		標準溶液	0	0	0
					
オキシリン酸	添加試料	0	0	13	
	標準溶液	0	0	0	
					
サルファ剤	スルファジメトキシ	添加試料	0	0	0

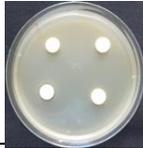
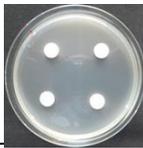
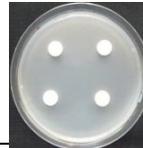
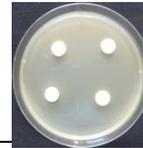
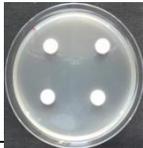
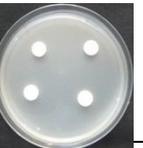
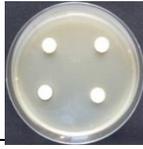
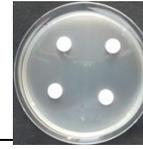
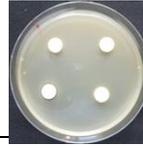
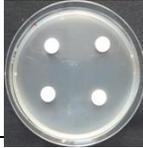
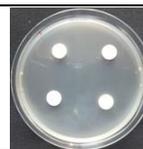
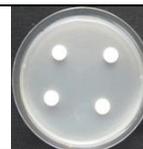
		標準溶液	0	0	0	
						
	スルファジミジン	添加試料	0	0	0	
		標準溶液	0	0	0	
						
	スルファモノメトキシ	添加試料	0	0	0	
		標準溶液	0	0	0	
						
	合成抗菌剤	クロピドール	添加試料	0	0	0
			標準溶液	0	0	0
						
		クロラムフェニコール	添加試料	0	0	0
標準溶液			0	0	0	
						

図 2 試験菌を変更して実施した簡易検査法の検討結果

