

Ⅱ. 分担研究報告

5. 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いる。これらの検査法は前処理操作が簡便で多検体の同時検査が可能であることから、と畜場などの検査室を中心に汎用されている。しかし、抗生物質の種類に依り、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などの多くの課題点が指摘されている。また、検査法の国際的整合性の観点からも、十分に対応可能であるとは言い難い。このため、欧米等の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それぞれの特性を踏まえた、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、欧米等におけるバイオアッセイ法を詳細に調査した報告は少ない。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て、取り纏めた。平成 29 年度は、簡易検査法による検査の信頼性を評価するために、30 種の抗生物質を添加した検体を作成して、本法と LC-MS/MS 等を用いる機器分析法の両検査法で検査を行い、検査結果を比較した。その結果、本研究で検討した化合物においては、バイオアッセイ法では多くの抗生物質で偽陰性となる可能性が高いことが示された。平成 30 年度は、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及びこれまでの検討結果を基に、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。本検査法で規定されている抽出量を減量するとともに、米国の公定法で使用されている試験菌を用いて検査を実施した。その結果、両検討ともに、正しい検査結果を得ることは出来なかった。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、抗生物質の物理化学的特性により機器分析法では分析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」が微生物学的試験法(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、試料の前処理操作が機器分析法に比べて比較的簡便であり、多検体の同時検査が可能である。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。更に、本検査法が通知さ

れてから 20 年以上が経過しているが、その間に検査法の改定等を行われおらず、国際的な整合性の観点からも検査法の改良等の検討が必要であると考えられる。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 (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、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。このため、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試験法の整備状況、検査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検査法の概要及び検査の実施状況を調査した。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。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。簡易検査法で規定されている抽出液量を半量とし、及び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実施して、その検討結果を考察した。

B. 研究方法

1) 欧米等におけるバイオアッセイ法の調査方法

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。

2) 試料

平成 29 年度の検討では、牛の筋肉、肝臓を用いた。平成 30 年度の検討では、牛の筋肉のみを試料とした。

3) 分析対象化合物

表 3 に示す 30 種類の抗生物質を対象とした。マクロライド系抗生物質 4 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、チルミコシン)、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 5 化合物 (ベンジルペニシリン、クロキサシン、メシリナム、ナフシリン、オキサシリン)、セファロスポリン系抗生物質 (セファピリン)、キノロン系抗生物質 4 化合物 (フルメキン、エンロフロキサシン、ダノフロキサシン、オキシソリン酸)、サルファ剤 7 化合物 (スルファジメトキシム、スルファジアジン、スルファキノサリン、スルファジミジン、スルファメラジン、スルファドキシム、スルファモノメトキシム)、合成抗菌剤 6 化合物 (オルメトプリム、トリムトプリム、チアンフェニコール、クロピドール、クロラムフェニコール、ニトロフラントイン)。なお、平成 30 年度の検討では、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、オキシリン酸)、サルファ剤 3 化合物(スルファジメトキシ、スルファジアジン、スルファモノメトキシ)、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)。

4) 添加濃度

機器分析法は基準値濃度とし、バイオアッセイ法では基準値を超過する最低の濃度を添加濃度とした。(表 3)

5) 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)」に準拠した。試料 5 g にクエン酸・アセトン緩衝液 20 mL、または 10 mL を加えてホモジナイズした後、ろ紙でろ過した。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 12 mm 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)

5-1) 試験菌

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。

5-2) 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。

5-3) 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 10 mm、厚さ 1.1~1.2 mm)を用いた。

5-4) 判定方法

阻止円の直径が 12 mm 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。

6) 機器分析法

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(平成 17 年 1 月 24 日付け食安発第 0124001 号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知)HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 I(畜水産物)、HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 II(畜水産物)、HPLC による動物用医薬品等の一斉試験法 III(畜水産物)に準拠した。また、ニトロフラントインは、昭

和 34 年 12 月厚生省告示第 370 号「食品、添加物等の規格基準」ニトロフラントイン、フラゾリドン及びフラクタドン試験法(個別試験法)に準拠した。

6-1) 装置

液体クロマトグラフ: Prominence (島津製作所製)、質量分析計; API 4000 QTRAP (SCIEX 製)、ホモジナイザー: T25 digital (IKA 製)、振とう機: KM Shaker V-DX (IWAKI 製)、遠心分離機: HM-5R (コクサン製)。

6-2) LC-MS/MS 測定条件

6-2-1) 一斉試験法 I

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%ギ酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=1%、t₁:B=1%、t₃₅:B=100%、t₄₀:B=100%、t_{40.1}:B=1%、t₄₈:B=1%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-2) 一斉試験法 II

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%ギ酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=1%、t₁:B=1%、t₃₅:B=100%、t₄₀:B=100%、t_{40.1}:B=1%、t₄₈:B=1%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-3) 一斉試験法 III

分析カラム: Inertsil ODS-4 (3.0×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%酢酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=5%、t₁:B=5%、t₁₅:B=80%、t₂₀:B=80%、t_{20.1}:B=5%、t₃₀:B=5%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-4) 個別試験法

分析カラム: Inertsil ODS-4 (2.1×150 mm、粒子径 3 μm、ジーエルサイエンス製)、移動相: 0.1 vol%酢酸(A液)及びアセトニトリル溶液(B液)、グラジエント(t:時間(分)) t₀:B=80%、t₁:B=80%、t₁₅:B=20%、t_{15.1}:B=80%、t_{20.1}:B=80%、流速:0.2 mL/min、カラム温度:40°C、注入量:2 μL。

6-2-5) MRM 条件

イオン化法は、ESI 法とし、ポジティブモードで測定した。各分析対象化合物の MRM 測定において設定した各種パラメータは表 4 に示した。

C. 研究結果及び考察

1. 欧米等におけるバイオアッセイ法の調査

1-1. 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、*B. cereus*とペニシリナーゼを含む培地(プレート1)、*K. rhizophila*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)、*S. epidermidis*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、β-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 μL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。

1-2. 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、培地にトリメプリンを加える。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、2 mm 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 2 mm 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、β-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。

1-3. 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 *B. megaterium* 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。

1-4. 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、国立残留調査所の残留化学物質及び性能評価局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。

1-5. 日本におけるバイオアッセイ法

簡易検査法では、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ドイスクを浸漬した後、3 種の試験菌 (*M. luteus*、*B. subtilis*、*B. mycoides*) 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。

1-6. 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。

2. 簡易検査法と機器分析法による検査結果の比較

2-1. 簡易検査法による検査結果

牛の筋肉及び肝臓を試料として、簡易検査法により検査した結果を表 5、6 に纏めた。本法では、3種の試験菌を用いて、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)、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3枚を培地に静置して培

養を行った。牛の筋肉、肝臓ともに、30化合物中25化合物が陰性と判定された。一方で、正しく陽性と判定された検体は5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、フルメキン)であり、牛の筋肉と肝臓で同様の結果が得られた。このため、テトラサイクリン系抗生物質は、本法においても高感度に検出することが可能であると考えられた。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。一方で、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。このことは、これまでに文献等で報告されている通り、簡易検査法における抗生物質の検出限界濃度が高く、基準値の判定には適用が困難であるとする結果と一致した。また、抗生物質の系統別では、特にサルファ剤、セファロスポリン系抗生物質、合成抗菌剤のすべてで、陽性対照からも阻止円は認められず、全て陰性と判定された。以上の結果から、本検討の限りにおいては、現行の公定法である簡易検査法では、テトラサイクリン系抗生物質を除き、偽陰性と判定される可能性が高いものと考えられた。

2-2. 機器分析法の検討結果

一斉試験法 I(畜水産物)、一斉試験法 II(畜水産物)、一斉試験法 III(畜水産物)及び個別試験法としてニトロフラントイン、フラゾリドン及びフルタルドン試験法に準拠して試験した。添加回収試験の結果を表 7 に示す。牛の筋肉の場合には、エリスロマイシン、メシリナム、セファピリンの3化合物で、回収率70%を下回り、クロルテトラサイクリンでは、回収率120%を上回った。一方で、牛の肝臓の場合には、エリスロマイシン、タイロシン、ベンジルペニシリン、クロサキシリン、メシリナム、ナフシリン、オキサシリン、セファピリンの6化合物が回収率70%を下回った。本検討では、機器分析法として、多検体

の同時分析が可能な一斉試験法を適用して検討を実施したが、これらの十分な回収率が得られなかった化合物は、個別試験法を適用することで良好な回収率が得られるものと考えられる。

2-3. 機器分析法による簡易検査法の評価

牛の筋肉を試料とした場合には、簡易検査法では 5 化合物、機器分析法では 26 化合物が正しく判定された。また、牛の肝臓の場合には、簡易検査法では 5 化合物、機器分析法では 22 化合物が正しく判定された。上記に通り、簡易検査法による検査結果と、LC-MS/MS を用いる機器分析法による検査結果を比較すると、簡易検査法では、多くの抗生物質で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。

3. 簡易検査法の改良検討

3-1. 抽出量が検査結果に与える影響

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、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、現行の方法では、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、本検討では、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 20 mL から半量の 10 mL 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 8 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、牛の筋肉の抽出溶液)、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。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 とした場合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、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。このことは、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、方法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。

3-2. 試験菌の種類の変更が測定結果に与える影響

現行の簡易試験法では、3 種の試験菌が指定されているが、先の抽出液量を変化させた検討結果からも、基準値濃度の判定に適用可能な方法にするためには、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、STOP 法、FAST 法で用いられている *B. megaterium* を用いた。牛の筋肉を試料として、検査した結果を表 9 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、pH が測定結果に大きな影響を与えると考えられるため、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

平成 28 年度には、畜水産物に残留する抗生物質を検査するバイオアッセイ法について、欧米等

における検査法の整備状況、概要及び検査の実施状況等を調査した。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徴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。

平成 29 年度には、30 種の抗生物質を検査対象として、同一の検体をバイオアッセイ法と LC-MS/MS 等による機器分析法により検査を行い、その結果の比較を行った。本検討の結果からは、簡易検査法においては、多くの検体で偽陰性と判定される可能性が極めて高いことが示された。

平成 30 年度は、簡易検査法の高感度化に向けた検討を実施した。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、試験法の大幅な変更、見直しが必要と考えられた。しかし、テトラサイクリン系抗生物質については、基準値濃度を正しく判定することが出来た。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。

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	
試験菌及び 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	試験菌	培地
	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>M. luteus</i>	AM 5	<i>B. cereus</i>	AM 8 + penicillina se	<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						
	<i>B. mycooides</i>	AM 8	<i>B. mycooides</i>	AM 5	<i>K. rhizophila</i>	AM 4 + penicillina se	<i>B. subtilis</i>	pH 8						
					<i>B. subtilis</i>	AM 5 + penicillina se	<i>M. luteus</i>	pH 8						
					<i>K. rhizophila</i>	AM 11 + penicillina se								
					<i>S. epidermidis</i>	AM 11 + penicillina se								
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
Amoxicyllin	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

表3 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	牛の筋肉への添加濃度		牛の肝臓への添加濃度	
		機器分析法	バイオアッセイ法	機器分析法	バイオアッセイ法
マクロライド系抗生物質	エリスロマイシン	0.2	0.25	0.2	0.25
	オレアンドマイシン	0.05	0.055	0.05	0.55
	タイロシン	0.1	0.15	0.1	0.15
	チルミコシン	0.1	0.15	1	1.5
テトラサイクリン系抗生物質	オキシテトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
	クロルテトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
	テトラサイクリン	0.2	0.25	0.6	0.65
ペニシリン系抗生物質	ベンジルペニシリン	0.05	0.055	0.05	0.055
	クロキサシリン	0.04	0.045	0.04	0.045
	メシリナム	0.05	0.055	0.05	0.055
	ナフシリン	0.005	0.0055	0.005	0.0055
	オキサシリン	0.3	0.35	0.3	0.35
セファロスポリン系抗生物質	セファピリン	0.03	0.035	0.03	0.035
キノロン系抗生物質	フルメキン	0.5	0.55	0.5	0.55
	エンロフロキサシン	0.05	0.055	0.1	0.15
	ダノフロキサシン	0.2	0.25	0.4	0.45
	オキソリン酸	0.1	0.15	0.1	0.15
サルファ剤	スルファジメトキシ	0.05	0.055	0.05	0.055
	スルファジアジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファキノサリン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファジミジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファメラジン	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファドキシ	0.1	0.15	0.1	0.15
	スルファモノメトキシ	0.01	0.055	0.05	0.055
合成抗菌剤	オルメトプリム	0.02	0.025	0.02	0.025
	トリムトプリム	0.05	0.055	0.05	0.055
	チアンフェニコール	0.02	0.025	0.02	0.025
	クロピドール	0.2	0.25	2	2.5
	クロラムフェニコール	0.0005	0.00055	0.0005	0.00055
	ニトロフラントイン	0.001	0.0015	0.001	0.0015

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

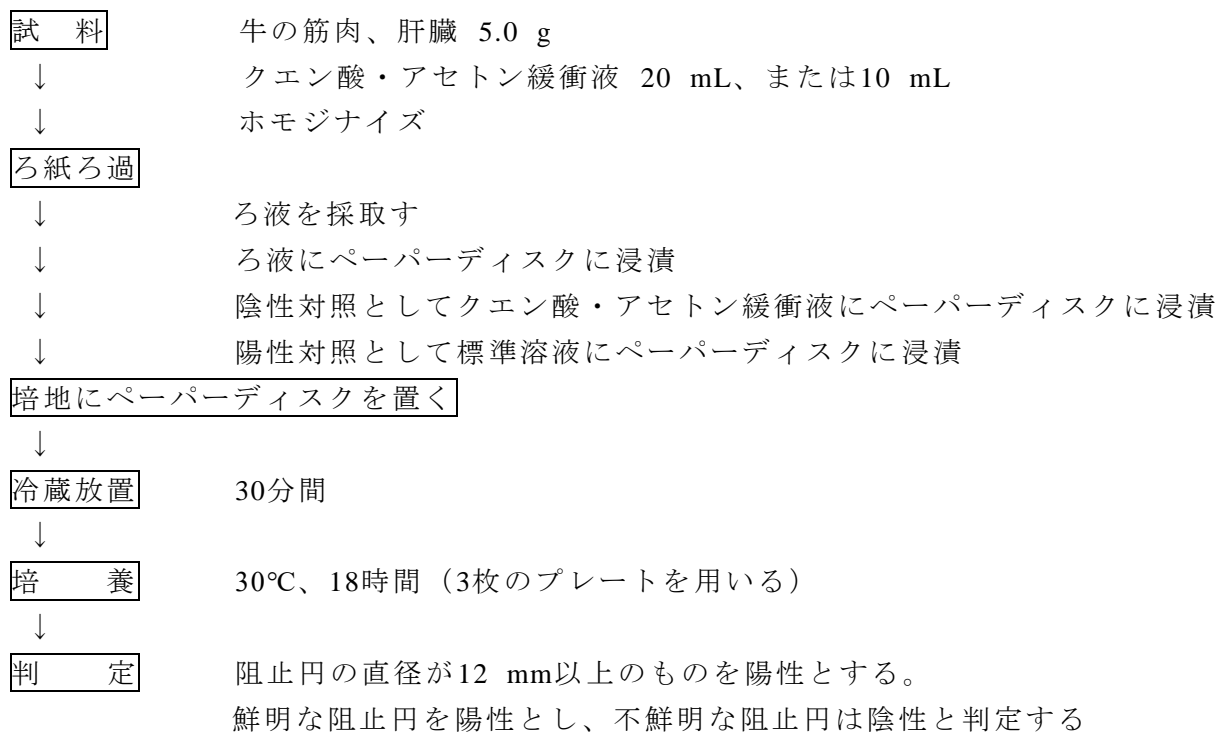


表 4 分析対象化合物のMRM条件

分析対象化合物	デクラスタリング電位 (DP)	定量イオン			確認イオン		
		MRMトランジッション	コリジョンエネルギー (CE)	コリジョンセルイグジット電位 (CXP)	MRMトランジッション	コリジョンエネルギー (CE)	コリジョンセルイグジット電位 (CXP)
エリスロマイシン	86	m/z 734.4 → 158.2	43	18	m/z 734.4 → 576.2	29	12
オレアンドマイシン	96	m/z 688.4 → 544.2	25	14	m/z 688.4 → 158.2	41	12
タイロシン	106	m/z 917.4 → 174.2	57	10	m/z 917.4 → 773.4	43	14
チルミコシン	116	m/z 870.5 → 174.1	57	18	m/z 870.5 → 697.4	63	16
オキシテトラサイクリン	71	m/z 461.2 → 426.1	27	4	m/z 461.2 → 443.0	19	4
クロルテトラサイクリン	76	m/z 479.2 → 440.0	31	4	m/z 479.2 → 462.1	25	4
テトラサイクリン	76	m/z 445.2 → 410.1	29	4	m/z 445.2 → 154.1	39	4
ベンジルペニシリン	61	m/z 335.0 → 160.0	15	4	m/z 335.0 → 176.0	17	4
クロキサシリン	96	m/z 436.0 → 277.0	19	21	m/z 436.0 → 160.1	21	16
メシリナム	110	m/z 326.1 → 167.3	31	12	m/z 326.1 → 139.2	45	14
ナフシリン	110	m/z 415 → 199.0	19	4	m/z 415.0 → 177.0	33	16
オキサシリン	71	m/z 402.1 → 160.1	21	14	m/z 402.1 → 243.2	19	16
セファピリン	61	m/z 424.0 → 292.1	23	24	m/z 424.0 → 152.1	35	12
フルメキン	56	m/z 262.0 → 244.0	27	20	m/z 262.0 → 202.0	47	16
エンロフロキサシン	91	m/z 360.3 → 316.2	27	8	m/z 360.3 → 245.1	39	14
スルファジアジン	56	m/z 251.1 → 156.2	21	4	m/z 251.1 → 92.2	35	4
スルファキノサリン	51	m/z 301.0 → 156.2	23	4	m/z 301.0 → 92.3	39	4
スルファジミジン	46	m/z 279.0 → 186.0	25	4	m/z 279.0 → 92.0	45	4
スルファメラジン	46	m/z 265.1 → 92.2	41	4	m/z 265.1 → 108.0	33	4
スルファドキシシン	61	m/z 311.1 → 156.1	23	4	m/z 311.1 → 92.1	43	4
オルメトプリム	81	m/z 275.2 → 123.1	33	4	m/z 275.2 → 81.1	53	4
ニトロフラントイン	70	m/z 249.1 → 134.0	19	8	m/z 249.1 → 178.0	25	14

表 5 簡易検査法による牛の筋肉の検査結果

	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	判定
試験菌	<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus mycoides</i>		
品目	阻止円の直径 (mm)						
エリスロマイシン	24	17	13.5	12	15	11	陽性
オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	陰性
タイロシン	13	0	0	0	0	0	陰性
チルミコシン	13	0	0	0	0	0	陰性
オキシテトラサイクリン	14	11	17	13	23	16	陽性
クロルテトラサイクリン	18	12	20	17	28	22	陽性
テトラサイクリン	13	11	18	12	23	16	陽性
ベンジルペニシリン	30	20	0	0	0	0	陰性
クロキサシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
メシリナム	0	0	0	0	0	0	陰性
ナフシリン	11	0	0	0	0	0	陰性
オキサシリン	27	21	11	0	14	0	陰性
セファピリン	0	0	11	0	11	0	陰性
フルメキン	0	0	20	18	25	16	陽性
エンフロキサシン	0	0	12	0	0	0	陰性
ダノフロキサシン	0	0	16	0	0	0	陰性
オキシリン酸	0	0	11	0	0	0	陰性
スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジアジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファキノサリン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファメラジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファドキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
オルメトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
トリムトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
チアンフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロピドール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
ニトロフラントイン	0	0	0	0	0	0	陰性

表 6 簡易検査法による牛の肝臓の検査結果

	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	添加試料	陽性対照	判定
試験菌	<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Bacillus mycoides</i>		
品目	阻止円の直径 (mm)						
エリスロマイシン	21	17	14	11	12	12	陽性
オレアンドマイシン	0	0	0	0	0	0	陰性
タイロシン	13	0	0	0	0	0	陰性
チルミコシン	12	0	0	0	0	0	陰性
オキシテトラサイクリン	18	13	13	13	24	21	陽性
クロルテトラサイクリン	21	17	17	20	30	27	陽性
テトラサイクリン	19	11	14	16	27	20	陽性
ベンジルペニシリン	29	20	0	0	0	0	陰性
クロキサシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
メシリナム	0	0	0	0	0	0	陰性
ナフシリン	0	0	0	0	0	0	陰性
オキサシリン	29	22	13	0	13	0	陰性
セファピリン	11	0	0	13	0	0	陰性
フルメキン	0	0	19.5	16.5	25	16	陽性
エンロフロキサシン	0	0	16	11	0	0	陰性
ダノフロキサシン	0	0	19.5	0	0	0	陰性
オキシリン酸	0	0	11	0	0	0	陰性
スルファジメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジアジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファキノサリン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファジミジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファメラジン	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファドキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
スルファモノメトキシ	0	0	0	0	0	0	陰性
オルメトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
トリムトプリム	0	0	0	0	0	0	陰性
チアンフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロピドール	0	0	0	0	0	0	陰性
クロラムフェニコール	0	0	0	0	0	0	陰性
ニトロフラントイン	0	0	0	0	0	0	陰性

表 7 機器分析法による検査結果

分析対象化合物	試験法	添加濃度 (mg/kg)	牛の筋肉			牛の肝臓		
			回収率 (%)			回収率 (%)		
			n = 1	n = 2	平均値	n = 1	n = 2	平均値
エリスロマイシン	一斉 I 法	0.2	66	58	<u>62</u>	36	31	<u>34</u>
オレアンドマイシン	一斉 I 法	0.05	120	106	113	96	82	89
タイロシン	一斉 I 法	0.1	94	80	87	27	23	<u>25</u>
チルミコシン	一斉 I 法	0.1	115	98	106	88	88	88
オキシテトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	83	79	81	85	87	86
クロルテトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	125	123	<u>124</u>	87	86	86
テトラサイクリン	一斉 III 法	0.2	114	107	111	77	79	78
ベンジルペニシリン	一斉 II 法	0.05	98	98	98	80	52	<u>66</u>
クロキサシリン	一斉 II 法	0.04	83	68	76	78	52	<u>65</u>
メシリナム	一斉 I 法	0.05	55	49	<u>52</u>	21	18	<u>19</u>
ナフシリン	一斉 I 法	0.005	89	91	90	52	73	<u>63</u>
オキサシリン	一斉 II 法	0.3	95	85	90	82	57	<u>69</u>
セファピリン	一斉 II 法	0.03	56	64	<u>60</u>	17	16	<u>16</u>
フルメキン	一斉 I 法	0.5	103	98	101	89	84	87
エンロフロキサシン	一斉 I 法	0.05	97	91	94	78	81	80
スルファジアジン	一斉 I 法	0.1	96	91	93	90	84	87
スルファキノサリン	一斉 I 法	0.1	98	89	93	82	76	79
スルファジミジン	一斉 I 法	0.1	98	90	94	83	81	82
スルファメラジン	一斉 I 法	0.1	105	96	100	90	80	85
スルファドキシム	一斉 I 法	0.1	104	98	101	88	85	86
オルメトプリム	一斉 I 法	0.02	98	92	95	82	72	77
ニトロフラントイン	個別試験法	0.001	76	-	76	90	-	90

表 8 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>Micrococcus luteus</i>			<i>Bacillus mycooides</i>			<i>Bacillus 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9 米国の公定検査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>Kocuria rhizophila</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>			<i>Bacillus 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

