

畜水産食品中の残留抗菌性物質検査における微生物学的 簡易検査法の検出感度

誌名	食品衛生学雑誌
ISSN	00156426
巻/号	364
掲載ページ	p. 525-531
発行年月	1995年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



調査・資料

畜水産食品中の残留抗菌性物質検査における 微生物学的簡易検査法の検出感度

(平成7年1月24日受理)

神保勝彦*¹ 片岡潤*¹ 小久保彌太郎*¹
小沼博隆*² 近藤房生*³

Sensitivity of Microbiological Simplified Method to Residual Antibiotics in Meat and Marine Products

Katsuhiko JINBO*¹, Jun KATAOKA*¹, Yataro KOKUBO*¹, Hiroataka KONUMA*²
and Fusao KONDO*³

(*¹The Tokyo Metropolitan Resarch Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunincho, Shinjuku-ku, Tokyo 169, Japan; *²National Institute of Health Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan; *³Departement of Veterinary Public Health, Faculty of Agriculture, Miyazaki University: 1-1, Kibanadai-Nishi, Gakuen, Miyazaki 889-21, Japan)

Key words: 残留抗生物質 residual antibiotics; 微生物学的簡易検査法 microbiological simplified method; 畜産食品 livestock product; 水産食品 seafood

はじめに

残留抗菌性物質の微生物学的簡易検査法（スクリーニング）の基本は、畜水産食品中に残留している抗菌性物質をいかに幅広く、低濃度まで確実に、簡易、迅速に検出できるかである。これらの点については現在なお検査法の改良、開発が続けられている^{1)~7)}。著者らはこれまでに日常検査に実用的な微生物学的検査法について検討し報告してきた^{8)~13)}。

ところで、平成6年7月1日、厚生省から「畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施（以下、モニタリング検査と略記）」が通知された¹⁴⁾。本通知では、残留抗生物質検査は微生物学的簡易検査法（以下、簡易検査法と略記）でスクリーニングし、陽性になった食品については著者らが開発した分別推定法（簡易系統別検査法¹⁰⁾）で残留抗生物質を系統別に同定する方法が採用されている。しかし、分別推定法の各抗生物質に対する検出感度^{6), 10), 15)}については明らかにされているが、簡

易検査法の検出感度については不明である。そこで、現在動物用医薬品として使用が許可されている抗菌性物質の中から代表的な抗生物質36種類を選び、これらの抗生物質に対する簡易検査法の検出感度を食肉及び魚介類を対象に調べた。

試料及び方法

1. 供試抗生物質

調査に供試した抗生物質は、動物用医薬品として用いられている36種類の抗生物質であり、それらの名称、略号等はTable 1に示した。

抗生物質は滅菌精製水、メタノールあるいは1N NaOHで完全に溶かした後、滅菌精製水を加えて各々が1,000 µg又はIU/mlになるように調製し、これを原液とした。原液をリン酸緩衝液で、MIC法¹⁶⁾に準じて2倍段階希釈し、標準溶液を作製して用いた。

2. 試料

簡易検査法及び分別推定法で抗菌性物質が検出されなかった市販の牛肉、豚肉、鶏肉、牛肝臓、豚肝臓、鶏肝臓及びハマチ、ブラックタイガーの筋肉を用いた。

*¹ 東京都立衛生研究所: 〒169 東京都新宿区百人町3-24-1

*² 国立衛生試験所: 〒158 東京都世田谷区上用賀1-18-1

*³ 宮崎大学農学部: 〒889-21 宮崎市学園木花台西1-1

Table 1. The List of Investigated Antibiotics

Antibiotic	Titer
Penicillin antibiotics (PCs)	
Ampicillin (ABPC)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Amoxicillin (AMPC)	838 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Cloxacillin sodium (CX)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Dicloxacillin sodium (DCX)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Penicillin G potassium (PCG)	1,625 IU/mg
Cephem antibiotics (CEPs)	
Cephalonium (CEL)	896 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Cephoxazole (CXZ)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Aminoglycoside antibiotics (AGs)	
Destomycin A (DM-A)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Dihydrostreptomycin sulfate (DSM)	770 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Fradiomycin sulfate (FM)	600 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Gentamicin sulfate (GM)	590 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Hygromycin B (HM-B)	1,137 IU/mg
Kanamycin sulfate (KM)	788 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Spectinomycin hydrochloride (SPCM)	625 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Streptomycin sulfate (SM)	755 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Macrolide antibiotics (MLs)	
Erythromycin (EM)	925 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Josamycin (JM)	900 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Kitasamycin (KT)	1,769 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Oleandomycin phosphate (OM)	850 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Spiramycin (SP)	1,085 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Tylosin tartrate (TS)	963 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Lincosaminid antibiotics (LCMs)	
Lincomycin hydrochloride (LCM)	850 IU/mg
Peptide antibiotics (PTs)	
Avoparcin (AVP)	953 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Bacitracin (BC)	57.8 IU/mg
Colistin sulfate (CL)	19,400 IU/mg
Enramycin (ER)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Virginiamycin (VGM)	1,990 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Tetracycline antibiotics (TCs)	
Chlortetracycline hydrochloride (CTC)	950 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Doxycycline hydrochloride (DOXY)	846 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Oxytetracycline hydrochloride (OTC)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Tetracycline hydrochloride (TC)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Other antibiotics	
Bicozamycin (BCZ)	987 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Chloramphenicol (CP)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Fosfomicin (FOM)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Novobiocin sodium (NB)	1,000 $\mu\text{g}/\text{mg}$
Tiamulin (TML)	996 $\mu\text{g}/\text{mg}$

3. 試験溶液

モニタリング検査の簡易検査法に従って調製した。すなわち、各試料に各抗生物質標準溶液を1g当たり

0.05~100 μg 又は IU/g の範囲になるように添加し、かく拌混合したものを抗生物質添加試料とした。抗生物質添加試料から各々5gを採取し、これらにクエン酸・

Table 2. continued

Antibiotic	Test plate	Detection limit (μg , IU/g)								
		Swine muscle	Swine liver	Cattle muscle	Cattle liver	Chicken muscle	Chicken liver	Yellow tail	Black tiger	
TCs	DOXY	<i>B. subtilis</i> plate	0.39	0.78	0.39	0.39	0.39	0.78	0.39	0.39
		<i>M. luteus</i> plate	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	1.56	1.56
		<i>B. mycooides</i> plate	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
	OTC	<i>B. subtilis</i> plate	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
		<i>M. luteus</i> plate	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25
		<i>B. mycooides</i> plate	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	1.56	0.78	0.78
	TC	<i>B. subtilis</i> plate	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
		<i>M. luteus</i> plate	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	12.5	6.25	6.25
		<i>B. mycooides</i> plate	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56
Other antibiotics										
BCZ	<i>B. subtilis</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>M. luteus</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>B. mycooides</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
CP	<i>B. subtilis</i> plate	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	<i>M. luteus</i> plate	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	<i>B. mycooides</i> plate	25	25	25	25	25	25	25	25	25
FOM	<i>B. subtilis</i> plate	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	<i>M. luteus</i> plate	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	<i>B. mycooides</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
NB	<i>B. subtilis</i> plate	25	25	12.5	25	25	25	25	25	12.5
	<i>M. luteus</i> plate	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25	6.25
	<i>B. mycooides</i> plate	25	25	25	25	25	25	25	25	25
TML	<i>B. subtilis</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
	<i>M. luteus</i> plate	3.13	1.56	3.13	1.56	3.13	3.13	3.13	3.13	1.56
	<i>B. mycooides</i> plate	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

アセトン緩衝液 20 ml を加え、ホモジナイズした後ろ紙でろ過し、このろ液を試験溶液とした。

4. 検査用平板

モニタリング検査の簡易検査法に従って作製した。すなわち、Antibiotic medium 5 と *Bacillus subtilis* ATCC 6633 を組合わせた平板（以下、*B. subtilis* 平板）、Antibiotic medium 5 と *Micrococcus luteus* ATCC 9341 を組合わせた平板（以下、*M. luteus* 平板）、Antibiotic medium 8 と *Bacillus mycooides* ATCC 11778 を組合わせた平板（以下、*B. mycooides* 平板）の 3 種類の検査用平板を作製した。

5. 試験方法

モニタリング検査の簡易検査法に従って行った。すなわち、試験溶液に浸漬したペーパーディスクを 3 種類の検査用平板上に置いた。これらの平板を 30° で 18 時間培養した後、阻止円直径が 12 mm 以上示したものを陽性として判定した。

結 果

各抗生物質に対する簡易検査法の検出感度を Table 2 に示した。

ペニシリン系（PC 系）抗生物質の ABPC, AMPC 及び PCG に対しては *M. luteus* 平板が 0.2~0.39 μg 又は IU/g の値を示した。CX に対しては *B. subtilis* 平板と *M. luteus* 平板が 12.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、DCX に対しては *B. subtilis* 平板が 3.13~6.25 $\mu\text{g}/\text{g}$ の値を示した。なお、PC 系抗生物質に対する検出感度は試料による影響はほとんど認められなかった。

セファム系（CEP 系）抗生物質の CEL に対しては *B. subtilis* 平板が 1.56 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、CEZ に対しては *B. mycooides* 平板が 3.13 の値を示した。検出感度は試料による影響は認められなかった。

アミノグリコシド系（AG 系）抗生物質の DSM, GM, KM 及び SM に対しては *B. subtilis* 平板がこれ以外の平板に比べて高い値を示したが、検出値は 3.13~50 $\mu\text{g}/\text{g}$ と低く、特に肝臓からの検出が悪かった。DM-A,

FM, HM-B 及び SPCM はいずれの平板でも検出できなかった。

マクロライド系 (ML 系) 抗生物質に対しては *M. luteus* 平板が 0.78~12.5 $\mu\text{g/g}$ の値を示し、これ以外の平板に比べて高い値を示した。検出感度は肝臓が筋肉に比べて低い傾向がみられた。

ロイコマイシン (LCM) に対しては、*M. luteus* 平板が 6.25 IU/g の値を示し、検出感度は試料による影響は認められなかった。

ポリペプチド系 (PT 系) 抗生物質の BC 及び VGM に対しては *M. luteus* 平板が 3.13 IU/g 及び 1.56 $\mu\text{g/g}$ の値を示し、検出感度は試料による影響は認められなかった。AVP に対しては *B. mycoides* 平板が 6.25 $\mu\text{g/g}$ の値を示した。CL 及び ER はいずれの平板でも検出できなかった。

テトラサイクリン系 (TC 系) 抗生物質に対しては *B. mycoides* 平板が 0.1~1.56 $\mu\text{g/g}$ の値を示し、検出感度は試料による影響は認められなかった。

NB 及び TML に対しては *M. luteus* 平板が 6.25 $\mu\text{g/g}$ 及び 1.56~3.13 $\mu\text{g/g}$ の値を示した。CP に対しては *M. luteus* 平板と *B. mycoides* 平板が 25 $\mu\text{g/g}$ 、FOM に対しては *M. luteus* 平板が 25 $\mu\text{g/g}$ の値を示した。BCZ はいずれの平板でも検出できなかった。

考 察

今回、著者らは動物用医薬品として汎用されている代表的な抗生物質 36 種類を選び、簡易検査法の検出感度を調べた。

その調査結果から、*M. luteus* 平板は PC 系抗生物質 (ABPC, AMPC, PCG)、ML 系抗生物質、LCM、PT 系抗生物質 (BC, VGM)、NB、TML に対して、*B. subtilis* 平板は CEL、AG 系抗生物質 (DSM, GM, KM, SM) に対して、*B. mycoides* 平板は CXZ、TC 系抗生物質、AVP に対して各々高い検出感度を示すことが分かった。以上のように、供試抗生物質の検出感度が試験菌と検査用培地の組合せによって異なったのは、特に検査用培地の Antibiotic medium 5 の pH が 7.9 ± 0.1 と弱アルカリ性であるのに対して、Antibiotic medium 8 の pH は 5.85 ± 0.05 と弱酸性であるため、抗生物質の感受性が培地の pH によって影響を受けるためと考えられる。従って、使用する培地の pH は極めて重要であると考えられる。また、抗菌性物質の抗菌活性は培地組成によっても大きく影響する⁴⁾ことが知られていることから、微生物学的検査法の検出感度を高くするためには、近藤らが報告している Minimum medium⁴⁾についても検討する必要があるものと思われる。更に、今回調査した検査用平板培地では検出できなかった CL、BCZ などは、グラム陰性菌にのみ抗菌活性^{17), 18)}を示すことが知られていることから、今後試験菌として *Escherichia coli* などのグラム陰性菌の使用を検討しなければならないことを示唆

している。

畜水産食品中の残留抗生物質を検出するのに最も良い検査法は、検出感度、試験操作の簡易性及び多種類の物質を同時に検出できるなどの点から微生物学的方法であると考えられる。しかし、現行の微生物学的簡易検査法の検出感度は今回の調査から必ずしも満足できるものではないことが分かった。今後、微生物学的検査法の検出感度を大幅に向上させるには、高い感受性を示す新試験菌の発見とそれを使用した検査法の開発などの新しい展開がない限り、難しいものと考えられる。しかしながら、微生物学的方法の感受性が不十分であったとしても、どのような小さな検査室でも応用できる簡易な検査法で残留検査を堅実に実施し続けることが、家畜、養殖魚への抗菌性物質の不正使用にブレーキをかけ、安全な畜水産食品を確保する上で相当な効果を発揮することは事実であると考えられる。

ところで、現行の微生物学的検査法の検出感度を諸外国の残留基準値まで向上させる必要があるとしたら、簡易検査法で採用されている抽出法 (希釈法) のみでなく、濃縮法を採用することも考慮すべきであると考えられる。その点、分別推定法は濃縮法と微生物学的方法を組み合わせた方法であるので、本法で検査を行えば畜水産食品中に残留する微量の ML 系、PC 系、TC 系、AG 系抗生物質及びサルファ剤を同時に比較的簡易に検出できる。また、検出感度は諸外国の残留基準値に対しても十分満足できるものであることから、この方法をスクリーニング法として採用するののも一つの方法であると考えられる。

要 約

動物用医薬品として汎用されている 36 種類の抗生物質を対象にして、食肉及び魚介類からの簡易検査法の検出感度を実験的に調査し、次の結果が得られた。

1. PC 系抗生物質の ABPC、AMPC 及び PCG に対する検出感度は 0.2~0.39 μg 又は IU/g、CX 及び DCX に対する検出感度は 12.5 $\mu\text{g/g}$ 及び 6.25 $\mu\text{g/g}$ であった。検出感度は試料による影響は認められなかった。
2. CEP 系抗生物質に対する検出感度は 1.56~3.13 $\mu\text{g/g}$ であった。検出感度は試料による影響は認められなかった。
3. AG 系抗生物質の DSM、GM、KM 及び SM に対する検出感度は、筋肉で 3.13~12.5 $\mu\text{g/g}$ 、肝臓で 6.25~50 $\mu\text{g/g}$ であった。DM-A、FM、HM-B 及び SPCM は検出できなかった。
4. ML 系抗生物質に対する検出感度は 0.78~12.5 $\mu\text{g/g}$ であった。検出感度は肝臓が筋肉に比べて悪かった。
5. LCM に対する検出感度は 6.25 IU/g であった。検出感度は試料による影響は認められなかった。
6. PT 系抗生物質の AVP、BC 及び VGM に対する

検出感度は 6.25 $\mu\text{g/g}$, 3.13 IU g/g 及び 1.56 $\mu\text{g/g}$ であった。検出感度は試料による影響は認められなかった。CL, ER は検出できなかった。

7. テトラサイクリン系抗生物質に対する検出感度は 0.1~1.56 $\mu\text{g/g}$ であった。検出感度は試料による影響は認められなかった。

8. CP, FOM, NB 及び TML に対する検出感度は 25 $\mu\text{g/g}$, 25 $\mu\text{g/g}$, 6.25 $\mu\text{g/g}$ 及び 1.56~3.13 $\mu\text{g/g}$ であった。BCZ は検出できなかった。

本調査研究は、平成 5 年度厚生科学研究費（食品衛生調査研究事業）補助金で行ったものである。

文 献

- 1) Johnston, R. W., Reamer, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G., Schwab, B.: J. Food Protect. **44**, 828~831 (1981).
- 2) Korsrud, G. O., Macnil, J. D.: *ibid.* **51**, 43~46 (1988).
- 3) 近藤房生, 松本和之, 永田祥代: 畜産の研究 **43**, 353~356 (1989).
- 4) 近藤房生, 浜田江梨子, 林 士鈺: 同上 **44**, 1,239~1,242 (1990).
- 5) 門間千枝, 神保勝彦, 伊藤 武: 東京衛研年報 **43**, 92~97 (1992).
- 6) 神保勝彦: 食肉の科学 **33**, 181~190 (1992).
- 7) 吉田健一, 近藤房生: 食衛誌. **35**, 543~547 (1991).
- 8) 金西信次, 神保勝彦, 橋本常生: 東京衛研年報. **38**, 185~190 (1987).
- 9) 神保勝彦, 百瀬礼子, 丸山 務, 松本昌雄: 同上 **40**, 133~136 (1989).
- 10) 神保勝彦, 門間千枝, 丸山 務, 松本昌雄: 食衛誌. **32**, 86~92 (1991).
- 11) 門間千枝, 神保勝彦, 丸山 務, 松本昌雄: 同上 **32**, 112~117 (1991).
- 12) 神保勝彦, 門間千枝, 松本昌雄, 丸山 務: 同上 **33**, 217~222 (1992).
- 13) 神保勝彦, 松本昌雄: 食品と微生物 **8**, 227~232 (1992).
- 14) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: “平成 6 年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について” 平成 6 年 7 月 1 日, 衛乳第 107 号 (1994).
- 15) 神保勝彦, 片岡 潤, 門間千枝, 伊藤 武, 丸山 務, 松本昌雄: 食衛誌. **35**, 210~214 (1994).
- 16) 三橋 進: Chemotherapy **29**, 76~79 (1981).
- 17) 二宮幾代治: “動物の抗生物質” p. 342~347 (1987) 養賢堂.
- 18) 二宮幾代治: 同上 p. 423~428 (1987) 養賢堂.