

特集 II 畜・水産物中の残留抗菌性物質の検出法*

Symposium II: Methods of Inspection for Residual Antibacterial Agents in Livestock Farm Products and Marine Products

1. バイオアッセイによる食肉中の残留抗菌性物質の簡易系統別検査法**

神保勝彦 (東京都立衛生研究所)

緒言

近年、わが国の畜産および魚の養殖は大規模化、集団飼育の形態をとるようになった。これに伴って発生する疾病の治療、あるいはその予防として抗生物質や合成抗菌剤が常時使用され、その種類、使用量ともに増えている。その結果、これら抗菌性物質が食用組織へ移行残留し、食品衛生上問題となっている。残留抗菌性物質検査法としては厚生省が通知した「畜水産食品中の残留物質検査法¹⁻⁶⁾ (以下、厚生省法と略す)」があり、これは個別検査法^{1-4,6)}、分別同定法⁹⁾ および簡易検査法⁹⁾ に大別される。しかし、個別検査法は不明の抗菌性物質が残留する食品に応用することは難しい。一方、簡易検査法は残留する抗菌性物質を広くスクリーニングできるが、検出物質を同定できない欠点がある。これに対して、分別同定法はマクロライド系 (MLs)、テトラサイクリン系 (TCs) およびアミノグリコシド系 (AGs) 抗生物質を同定できるが、試験操作の簡易性に難点がある。

そこで著者らは、抗菌性物質を簡易かつ迅速に検出できる微生物学的検査法について検討した。その結果、分別同定法を改良した簡易な方法、すなわち、カートリッジタイプのカラムを用いて濃縮、クリーンアップ操作を簡易化し、抗菌性物質を抽出、分画した。次に、*B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* による3試験菌の感受性パターンの違

いを利用して薬剤を系統別に推定する方法を開発した。

材料および方法

1. 抗菌性物質

実験に供した抗菌性物質：テトラサイクリン系 (TCs) として塩酸オキシテトラサイクリン (OTC)、塩酸クロルテトラサイクリン (CTC) および塩酸ドキシサイクリン (DOXY)、マクロライド系 (MLs) としてリン酸タイロシン (TS)、オレアンドマイシン (OM)、キタサマイシン (KT)、エリスロマイシン (EM) およびスピラマイシン (SP)、アミノグリコシド系 (AGs) として硫酸ストレプトマイシン (SM)、硫酸ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、硫酸カナマイシン (KM) および硫酸フラジオマイシン (FM)、ペニシリン系 (PCs) としてペニシリンGカリウム (PCG) とアンピシリン (ABPC)、サルファ剤 (SAs) としてスルファジメトキシシン (SDM) とスルファモノメトキシシン (SMM) で、これら5系統16薬剤はいずれも各製薬会社から分与された純品である。

2. 供試菌株

実験に供した指標菌：*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778 の3菌株 (以

* 1991年4月1日に開催された本会の第18回シンポジウムの講演要旨

** 協同研究者：門間千枝，丸山 務，松本昌雄

下, *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* と略す)である。

3. 器具

a) ペトリ皿：合成樹脂製で、内径 86 mm の滅菌したものを用いた。

b) パルプディスク：東洋ろ紙(株)製の直径 10 mm, 厚さ 1.2 mm (吸水量 $0.08 \text{ ml} \pm 0.01 \text{ ml}$) のパルプディスクを 121° , 15 分間高圧滅菌後、十分乾燥させてから用いた。

4. 緩衝液

a) pH 4.5 リン酸緩衝液：個別検査法¹⁾に従って調製した。

b) pH 8.0 リン酸緩衝液：個別検査法¹⁾に従って調製した。

c) 0.01 M di-Na EDTA 含有 pH 4.0 マキルベン緩衝液：分別同定法³⁾に従って調製した pH 4.0 マキルベン緩衝液 99 ml に 1 M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (di-Na EDTA) を 1 ml 加えて調製した。

d) pH 3.0 マキルベン緩衝液：0.1 M クエン酸溶液 15.86 ml と 0.2 M リン酸二ナトリウム溶液 4.11 ml を混合して調製した。

5. カラム

a) SEP-PAK C₁₈ カートリッジカラム (以下, C₁₈ カラムと略す)：ウォーターズ社製の C₁₈ カラムをメタノール 5 ml, 蒸留水 5 ml, 飽和 di-Na EDTA 溶液 5 ml の順に前処理して用いた^{7,8)}。

b) COOH 型エクストラクションカラム (以下, COOH 型カラムと略す)：ベーカー社製の COOH 型カラムにヘキサン 5 ml 通筒し、空気を引いて 1 分間乾燥した後、メタノール 5 ml, 蒸留水 5 ml, pH 4.0 マキルベン酸緩衝液 (di-Na EDTA 不含有) 5 ml の順に前処理して用いた。なお、カラムの中は使用前まで pH 4.0 マキルベン緩衝液で湿潤状態に保った。

6. 使用培地

a) 継代保存用培地：普通寒天培地(日水製薬)を用いた。

b) 増殖用液体培地：*M. luteus* の増殖用培地として感受性測定用ブイヨン(日水製薬)を用いた。

c) 抗菌性物質検査用培地：Antibiotic Medium 8 (Difco), Antibiotic Medium 5 (Difco) および感性ディスク用培地 N (日水製薬)を用いた (以下, AM 8 培地, AM 5 培地および SD 培地と略す)。

7. 試験菌液および芽胞浮遊液

B. subtilis の芽胞浮遊液および *M. luteus* の試験菌液は簡易検査法⁵⁾, *B. cereus* 芽胞浮遊液は個別検査法¹⁾に従って調製した。

8. 抗菌性物質検査用平板培地

1) *M. luteus* 平板

AM 5 培地を 121°C , 15 分間高圧滅菌後, $55^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ に保持し, これに試験菌液を培地の 1/5 量加え, 十分混和した後, その 8 ml をペトリ皿に注入⁵⁾し, 水平に静置して凝固させ, 平板培地を作製した。

2) *B. subtilis* 平板

AM 5 培地を 121°C , 15 分間高圧滅菌後, $55^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ に保持し, これに芽胞浮遊液を培地の 1/100 量⁵⁾加え, 以下, *M. luteus* 平板作製と同様に行った。

3) *B. cereus* 平板

AM 8 培地を 121°C , 15 分間高圧滅菌後, $55^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ に保持し, これに芽胞浮遊液を培地の 1/100¹⁾量加え, 以下, *M. luteus* 平板作製と同様に行った。

4) SAs 用平板

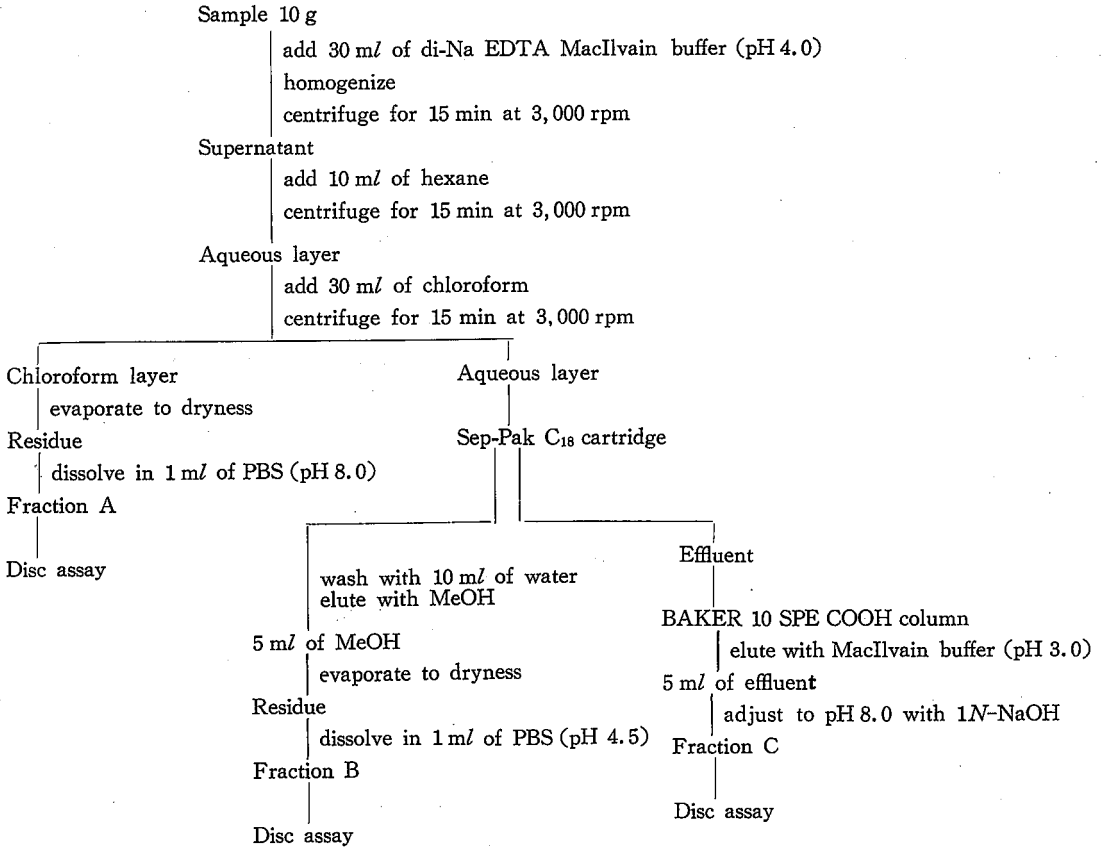
SD 培地を 121° , 15 分高圧滅菌後, $55 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持し, これにトリメトプリムを培地 100 ml 当たり $7.5 \mu\text{g}$ ⁹⁾ および *B. subtilis* 芽胞浮遊液を培地の 1/100 量加え, 以下, *M. luteus* 平板作製と同様に行った。

9. 分画液

分画液の調製は, Scheme 1 に示すように分別同定法³⁾を改良した方法で行った。

10. 試験法

分画液 A に浸漬したパルプディスクは, *B. subtilis* 平板, *M. luteus* 平板, *B. cereus* 平板および SAs 用平板の 4 種類に, 分画液 B および C に浸漬したパルプディスクは SAs 用平板を除いた 3 種類の平板に置いた。それら平板は氷室に 30 分間放置した後, *B. subtilis* 平板, *M. luteus* 平



Scheme 1 Analytical procedure for antibacterial agents in meat

板および *B. cereus* 平板は 30°C, SAs 用平板は 35°C でそれぞれ 18 時間培養した。パルプディスク周辺に出現した阻止円直径をノギスで測定して、直径 12 mm 以上のものを陽性⁵⁾とした。

実験結果

1. 抗菌性物質に対する試験菌の感受性

供試抗菌性物質16種類に対する3試験菌の感受性を Table 1 に示す。

供試した抗菌性物質に対して、*B. subtilis*, *M. luteus* および *B. cereus* の3試験菌中いずれかが高い感受性を示し、系統別に特徴のある感受性を示した。すなわち、TCs に対しては *B. cereus* > *B. subtilis* > *M. luteus* の順に、AGs に対しては *B. subtilis* > *B. cereus* > *M. luteus* の順に、MLs および PCs に対しては *M. luteus* > *B.*

subtilis > *B. cereus* の順に高い感受性を示した。また、SAs に対しては *B. subtilis* (SAs 用平板) のみが感受性を示した。このことから、Table 2 に示すように *B. subtilis*, *M. luteus* および *B. cereus* の3試験菌の感受性パターンにより、抗菌性物質を系統別に4つの型に分類できた。

2. 食肉中からの抗菌性物質の抽出と確認

抗菌性物質を添加した豚ひき肉を対象に、今回著者らが改良した方法 (Scheme 1) で抗菌性物質を抽出、分画し、各分画液に対する *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* による3試験菌の感受性パターンで、抗菌性物質を推定できるか否かを検討した。その成績を Table 3 に示す。

OTC を添加した豚ひき肉では、分画液 B のみに対して *B. subtilis* と *B. cereus* が感受性を示し、*B. cereus* の方が高い感受性を示した。このことから、OTC は分画液 B に抽出され、3試験

Table 1 Sensitivity of Test Organisms to Antibacterial Agents

Antibacterial agent	Detection limit ($\mu\text{g/ml}$)			
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
TCs	OTC (Oxytetracycline)	1.0	2.5	0.25
	CTC (Chlortetracycline)	0.5	1.0	0.05
	DOXY (Doxycycline)	1.0	5.0	0.25
AGs	SM (Streptomycin)	0.25	2.5	1.0
	DSM (Dihydrostreptomycin)	0.25	2.5	1.0
	KM (Kanamycin)	0.5	25.0	5.0
	FM (Fradiomycin)	0.5	25.0	10.0
MLs	TS (Tylosin)	1.0	0.25	2.5
	OM (Oleandomycin)	1.0	0.25	1.0
	KT (Kitasamycin)	2.5	0.25	5.0
	EM (Erythromycin)	0.1	0.05	0.25
	SP (Spiramycin)	5.0	0.5	10.0
PCs	PCG (Benzylpenicillin)	0.025	0.01	5.0
	ABPC (Ampicillin)	0.025	0.01	5.0
SAs	SMM (Sulfamonomethoxine)	0.5	>1,000	>1,000
	SDM (Sulfadimethoxine)	0.5	>1,000	>1,000

Table 2 Grouping of Antibacterial Agents from Sensitivity of Test Organisms

Group	Sensitivity of test organism			Antibacterial agent
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
I	+	≡	-	PCs, MLs
II	≡	-	+	AGs
III	+	-	≡	TCs
IV	≡	-	-	SAs

菌の感受性パターンで推定できることが判った。同様に、DSM は分画液 C、TS は分画液 A、PCG は分画液 B、SMM は分画液 A に抽出され、3 試験菌の感受性パターンでそれらを推定することができた。OTC と TS の 2 剤および OTC、TS、DSM の 3 剤を同時に添加した豚ひき肉でも同様の傾向がみられ、OTC は分画液 B、TS は分画液 A、DSM は分画液 C にそれぞれ抽出され、3 試験菌の感受性パターンでそれらを推定できた。また、これら以外の抗菌性物質でも同様の結果が得られたことから、Table 4 に示す方法、すなわち分画液と 3 試験菌の感受性パターンの組合せにより、抗菌性物質を推定できることが判った。

分画液 A に対して、*M. luteus* > *B. subtilis* > *B. cereus* の順に高い感受性を示す場合は MLs、*B. subtilis* (SAs 用平板) だけが感受性を示す場合は SAs である。分画液 B に対して、*M. luteus* > *B. subtilis* > *B. cereus* の順に高い感受性を示す場合は PCs、*B. cereus* > *B. subtilis* > *M. luteus* の順に高い感受性を示す場合は TC 系である。分画液 C に対して、*B. subtilis* > *B. cereus* > *M. luteus* の順に高い感受性を示す場合は AGs である。以下、Scheme 1 の方法で抽出、分画し、3 試験菌の感受性パターンで推定する方法を簡易系統別検査法と略す。

2. 簡易系統別検査法の検出感度

抗菌性物質を添加した豚肉を対象に、簡易系統

Table 3 Sensitivity of Test Organisms for Antibacterail Agents and Each Fraction

Antibacterail agent	Amount added ($\mu\text{g/g}$)	Fraction	Test organism		
			<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>
OTC	0,1	A ¹⁾	—	—	—
		B ²⁾	+	—	‡
		C ³⁾	—	—	—
DSM	2.5	A	—	—	—
		B	—	—	—
		C	‡	—	+
TS	0.5	A	+	‡	—
		B	—	—	—
		C	—	—	—
PCG	0.005	A	—	—	—
		B	+	‡	—
		C	—	—	—
SMM	1.0	A	‡	—	—
		B	—	—	—
		C	—	—	—
TS	0.5	A	+	‡	—
OTC	0.1	B	+	—	‡
		C	—	—	—
TS	0.5	A	+	‡	—
OTC	0.1	B	+	—	‡
DSM	2.5	C	‡	—	+

- 1): Chloroform layer
- 2): Adsorbed of SEP-PAK C₁₈ cartridge
- 3): Adsorbed of BAKER 10 SPE COOH column

Table 4 Classification of Antibacterial Agents in Each Fraction by Inhibition Patterns of Test Organism

Fraction	Test organism			Determination of Antibacterial agent
	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	
A	+	‡	—	MLs
A	‡	—	—	SAs
B	+	—	‡	TCs
B	+	‡	—	PCs
C	‡	—	+	AGs

別検査法の検出感度を調べた。その成績を **Table 5** に示す。

本法による MLs, TCs および AGs の検出感度は、厚生省法の分別同定法³⁾ のそれと同等であった。一方、前記分別同定法の検査対象となっていない PCG, ABPC の検出感度は共に 0.0025

$\mu\text{g/g}$ であった。また、厚生省法で、化学的検査法が採用されている SDM, SMM の検出感度は共に 0.1 $\mu\text{g/g}$ であった。

3. 簡易系統別検査法の応用

屠畜場で注射痕を認めた牛、豚の筋肉および腎臓を対象に、本法と厚生省法の分別同定法および

Table 5 Sensitivity of Simplified Classification Method to Antibacterial Agents

Antibacterial Agent		Detection limit
		(μg , IU/g)
TCs	OTC	0.05
	CTC	0.01
	DOXY	0.01
AGs	SM	1.0
	DSM	1.0
	KM	1.0
	FM	1.0
MLs	TS	0.1
	OM	0.1
	KT	0.25
	EM	0.05
	SP	0.1
PCs	PCG	0.0025
	ABPC	0.0025
SAs	SDM	0.1
	SMM	0.1

簡易検査法⁵⁾における残留分析の比較を行った結果を **Table 6** に示す。

検体 No. 1 (牛) の筋肉および腎臓からは、本法によって PCs が推定され、バイオオートグラフィ¹⁰⁾で PCG と同定された。これに対して、分別同定法では抗菌性物質は検出されなかった。検体 No. 2 (豚) の筋肉および腎臓からは、本法

によって TCs が推定され、バイオオートグラフィ^{3,7,11)}で OTC と同定された。また、分別同定法でも同様の結果が得られた。検体 No. 3(豚) については、本法によって筋肉から SAs, 腎臓から SAs と TCs の2種類が推定された。これら SAs および TCs はガスクロマトグラフィ¹²⁾あるいはバイオオートグラフィ^{3,7,11)}でそれぞれ SDM, CTC に同定された。これに対して、分別同定法では筋肉から抗菌性物質が検出されず、腎臓から CTC が検出されたのみで、SAs は検出されなかった。検体 No. 4 (豚) の筋肉および腎臓からは、本法によって PCs と AGs の2種類が推定され、これらはバイオオートグラフィ^{3,10)}で PCG と KM にそれぞれ同定された。これに対して、分別同定法では筋肉及び腎臓から KM が検出されたが、PCG は検出されなかった。なお、簡易検査法では全検体の腎臓から不明の抗菌性物質が検出されたが、筋肉から抗菌性物質は検出されなかった。

考 察

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、現在その感度および実用性の点から微生物学的な方法であろう。しかし、この方法の難点は検出した物質が抗生物質なのか、ある

Table 6 Detection of Residual Antibacterial Agents in Muscle and Kidney of Pork and Beef by MHW^{a)} and Present Method

Specimen	Method		
	MHW No. 1-5	MHW No. 1-3	Present method
No. 1 Muscle	-	-	PCs (PCG ^{b)})
(Beef) Kidney	+	-	PCs (PCG ^{b)})
No. 2 Muscle	-	OTC	TCs (OTC ^{b)})
(Pork) Kidney	+	OTC	TCs (OTC ^{b)})
No. 3 Muscle	-	-	SAs (SDM ^{c)})
(Pork) Kidney	+	CTC	SAs (SDM ^{c)}), TCs (CTC ^{b)})
No. 4 Muscle	-	KM	PCs (PCG ^{b)}), AGs (KM ^{b)})
(Pork) Kidney	+	KM	PCs (PCG ^{b)}), AGs (KM ^{b)})

a) : Standard method of the Ministry of Health and Welfare

b) : identified by bioautography

c) : identified by gas-chromatography

いはその他の抗菌性物質等の薬剤であるかを区別できないことである。そこで著者らは、抗生物質検定用標準菌株の中から、とくに MLs, TCs, AGs, PCs, SAs に対してそれぞれ異なる感受性を示すと期待される *B. subtilis*, *M. luteus*, *B. cereus* の3試験菌を選び、各抗菌性物質に対する感受性を調べてその感受性パターンから抗菌性物質を推定することを試みた。MLs, TCs, AGs, PCs, SAs に対しては、3試験菌は特徴ある感受性パターンを示すので、この3試験菌の感受性パターンにより、これら抗菌性物質を系統別に推定できることが判った。なお、*B. subtilis* と *M. luteus* は厚生省法の簡易検査法、*B. cereus* は TCs の試験菌として用いられているので、これらを常備することは容易であると考ええる。

次に、微量の残留抗菌性物質の同定検査では、如何に残留抗菌性物質を濃縮するかが課題である。そこで著者らは、厚生省法の MLs, TCs, AGs の分別同定法の抽出操作を **Scheme 1** に示すように簡易かつ迅速な方法に改良した。この改良法を用いて、食肉中に残留する微量の抗菌性物質を抽出、分画した後、*B. subtilis*, *M. luteus* および *B. cereus* の3試験菌の感受性を観察し、そのパターンから抗菌性物質の種類を系統別に推定できることを証明した。なお、この改良法では MLs と SAs は分画液 A, TCs と PCs は分画液 B へと同じ分画液にそれぞれ抽出・分画されるが、3試験菌の感受性パターンからそれらを区別することは容易であった。さらに、SAs は p-アミノ安息香酸^{13, 14)}で中和され、PCs はペニシリン¹⁵⁾。TCs は 100°C, 30 分間加熱⁸⁾ によって不活化されることから、これらの性状を調べればより確実にそれらを確認できると考えられる。一方、抗菌性物質は家畜の治療、予防あるいは添加物として、数種が共に複合使用されていることが多く、現行の厚生省法では、それらを分別同定することは困難である。本法によれば、2種類以上の異なる抗菌性物質を混合した場合も、それぞれの分画液に抽出され、3試験菌の感受性パターンから容易にそれらを推定することができた。

本法の検出感度は MLs, TCs, AGs に対しては分別同定法と同等であり、個別検査法および簡

易検査法より高かった。また、PCs および SAs に対する検出感度は、分別同定法では検査対象になっていないので比較できないが、十分満足できる値であると考ええる。

本法を屠畜場で注射痕を認めた牛および豚の筋肉と腎臓に応用した。その結果、簡易検査法では検出できなかった筋肉から抗菌性物質を検出することができ、さらに、分別同定法では検査の対象となっていない PCs および SAs を検出することができた。また、簡易検査法および分別同定法では1種類だけしか検出されなかった検体から、本法によって SAs と TCs あるいは PCs と AGs の2種類の抗菌性物質が検出された事例があった。このことは、本法を食肉に応用すれば、抗菌性物質の残留実態はさらに明らかになると考える。また、検出された抗菌性物質の系統別推定は、その後のバイオオートグラフィー、ガスクロマトグラフィーなどによる同定に有力な手掛りとなると考える。このように、簡易系統別検査法は食肉中に残留する微量の MLs, TCs, AGs, PCs および SAs が単剤あるいはそれらが複合で残留している場合も、検出は容易であり、しかも、系統別に推定できることから、日常検査法として実用性の高い方法であると考ええる。

要 約

食肉中に残留する抗菌性物質を微生物学的方法により簡易、迅速に系統別に推定する検査法を開発した。すなわち、厚生省法の分別同定法を改良した簡易な方法で抽出、分画し、その分画液を試験液とし、これに対する *B. subtilis*, *M. luteus* および *B. cereus* の3試験菌の感受性パターンから抗菌性物質を系統別に推定する方法、すなわち、簡易系統別検査法を考案した。

本法によれば、MLs と SAs はクロロホルム層に抽出される分画液 A, TCs と PCs は C₁₈ カラムで抽出される分画液 B, AGs は COOH 型カラムで抽出される分画液 C にそれぞれ分画された。

分画液 A に対して *M. luteus* > *B. subtilis* の順に感受性を示す場合は MLs, *B. subtilis* (SAs

用平板)のみが感受性を示す場合は SAs であった。分画液 B に対して *B. cereus* > *B. subtilis* の順に感受性を示す場合は TCs, *M. luteus* > *B. subtilis* の順に感受性を示す場合は PCs であった。分画液 C に対して *B. subtilis* > *B. cereus* の順に感受性を示す場合は AGs であった。

本法の検出感度は, MLs, TCs および AGs では分別同定法と同等であり, PCs および SAs では残留抗菌性物質検査としては十分満足できる値であった。

本法を屠畜場で注射痕を認めた牛および豚の筋肉および腎臓に応用した結果, PCs, TCs および SAs がそれぞれ単剤で, SAs と TCs あるいは PCs と AGs が複合でそれぞれ検出され, 分別同定法および簡易検査法より高い確立で検出できた。

(本論文は食衛誌, 32, 86~92 (1991) に掲載したものである。)

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1977). 畜産物中の残留物質検査法 第1集.
- 2) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1976). 畜産物中の残留物質検査法 第1集の2.
- 3) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1979). 畜水産食品の残留物質検査法 第1集の3.
- 4) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1982). 畜水産食品の残留物質検査法 第1集の4.
- 5) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1983). 畜水産食品の残留物質検査法 第1集の6.
- 6) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1986). 畜水産食品の残留物質検査法 第1集の5.
- 7) 竹葉和江, 神崎政子, 村上文子, 松本昌雄 (1984). 東京衛研年報, 35, 187~191.
- 8) 神保勝彦, 百瀬礼子, 丸山 務, 松本昌雄 (1988). 東京衛研年報, 39, 108~111.
- 9) 神崎政子, 竹葉和江, 村上文子, 丸山 務, 松本昌雄 (1984). 東京衛研年報, 35, 202~206.
- 10) Yoshimura, H., Itoh, O., Yonezawa, S. (1981). Jpn. J. Vet. Sci. 43, 833~840.
- 11) 丹野憲二, 岡崎真紀子, 斉藤文一, 内部博泰 (1982). 食衛誌, 23, 259~264.
- 12) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課 (1979). 畜産物中の残留物質検査法 第2集の3.
- 13) 松本昌雄, 池部美好 (1980). 食衛誌, 21, 446~450.
- 14) 神崎政子, 竹葉和江, 村上文子, 丸山 務, 松本昌雄 (1983). 東京衛研年報, 34, 159~164.
- 15) IDF Sessions in Moscow (1986). V—DOC 86.

Simplified Classification Method for Residual Antibacterial Agents in Meat by Microbiological Assay

Katsuhiko JINBO

(The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health)

Simplified classification method was developed for the detection of residual antibacterial agents in meat by microbiological assay.

Bioassay was carried out by pulp disc method using *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 and *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778. Antibacterial agents were grouped into type I including penicillin (PCs) and macrolide antibiotics (MLs), type II including aminoglycoside antibiotics (AGs), type III including tetracyclines (TCs), and type IV including sulfa drugs (SAs), according to the patterns of growth inhibition of these three strains.

Animal tissues were homogenized in 0.01 M di-Na EDTA McIlvaine buffer (pH 4.0) and centrifuged. Hexane was added to the supernatant and the mixture was centrifuged. The aqueous layer was mixed well with chloroform and centrifuged. The chloroform layer was evaporated to dryness and the residue was dissolved in phosphate buffer (pH 8.0) to prepare fraction A.

The aqueous layer was passed through a Sep-Pak C₁₈ cartridge column and followed by a BAKER 10 SPE COOH column. The Sep-Pak C₁₈ cartridge column was washed with water and adsorbed antibacterial agents were eluted with methanol. The eluate was evaporated to dryness. The residue was dissolved in phosphate buffer (pH 4.5) to prepare fraction B. The antibacterial agents on the BAKER 10 SPE COOH column were eluted with 5 ml of McIlvaine buffer (pH 3.0). The eluate was adjusted to pH 8.0 with IN-NaOH to prepare fraction C.

Fraction A, B and C contained MLs and SAs, TCs and PCs and AGs, respectively. Antibacterial agents in each fraction were confirmed by the different patterns of growth inhibition of the above three strains.

討 論 (座長: 鈴木 昭)

追加 (鈴木 昭, 茨城大)

今の講演に付言すると、昭和52年に厚生省から出された畜・水産物の残留抗生物質の検査法は必ずしも満足すべきものではなかったため、平成2年12月に改正されたが、その原案を提供したのが、神保氏である。

質問 (青木 宙, 宮崎大水産)

簡易系統別推定法に使用している菌株について、各薬剤の耐性変異株を用いて検出したらどうか。

答 (神保勝彦)

M. luteus 変異株を用いて ML 系, PC 系を区別できるようになったが、菌株の管理が難しいので、当分3種試験菌で検討したい。なお、現在 AGs などに対する変異株については検討中である。

座長 (鈴木 昭)

今の質問の件で、私もこの研究に関与していたので、同様の考えはあったが、変異株がなかなかうまくできない点と、もしできたにしても、その安定性の面で保管の問題もある。青木先生のご提案は示唆に富むが、若干面倒でも、三種の菌を使ってやる方がむしろ混乱はおきないと思われる。

質問 (広瀬一美, 日大農獣医水産)

先に示されたデータで魚類の例は養殖魚のみの例か。また筋肉だけの例か、肝臓などはやっているか。

答 (神保勝彦)

今回のデータは、すべて筋肉だけである。食品衛生学会等で報告したときは、筋肉、内臓、エラなどの成績も示したが、今回は時間の関係上省いた。魚の検査法は、今回示したものと若干異なる点がある。養殖魚では、AGはほとんど使われていないため、省いている(試験液はAとBのみ)。また魚ではナリジキシン酸やオキソリン酸が対象となるので、その分布も若干異ってくる(スライドで示す)。魚で使われている合成抗菌剤は試験液Aの方にすべて抽出されてくる。

質問 (高橋佐喜子, 日本食肉加工協会)

recovery test はやられたことがあるか。例えば微量の TC を入れて、このテストで何%ぐらい検出できるか。

答 (神保勝彦)

あくまで検出感度に目標をおくため、重点的にやっていないが、一部やっている。例えば TC のデータでは90%以上の recovery があると思う。また AGs は悪く、多分60~70%ぐらいだと思う。

質問 (上野隆二)

分析技術はどのレベルの者を対象としているのか。例えば業者対象を対象とした場合、装置の問題がないか。

答 (神保勝彦)

大した機械はいらない。薬剤の同定でなく、系統別までできれば保健所などで普通の細菌検査で使用する器

具で十分である。

座長（鈴木 昭）

補足として、演者の発想では、基幹保健所レベルの試験室の施設と技術でやれることを目標としている。また明らかに抗生物質を使った例で従来の厚生省の方法でや

った場合、可食部分から検出されないことがあり、行政的に問題があり、これを解決するのも演者の目標で、この方法なら十分検出されるだけの感度はあると理解している。