

(9) 残留抗菌性物質簡易検査法における検出感度向上の検討について

神奈川県食肉衛生検査所 ○徳永 芳子、篠原 良輔*、田中 勲
和泉 晶子 ※現神奈川県衛生研究所

はじめに

当所における残留抗菌性物質検査(簡易検査法)は、「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」(平成6年7月1日付け衛乳第107号厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知中)に準拠し標準作業書(SOP)を作成して実施している。簡易検査法はその検出感度が十分満足できるものではない[1]とされているが、阪口ら[2]は、培地中に抗菌性物質を添加することで同一系統の薬剤の検出感度が向上すると報告し、さらに山木ら[3]は、抗菌性物質を平板培地に塗布する方法でも培地中に添加した際と感度に差がないと報告している。

そこで、今回、当所における簡易検査法の検出感度を検証するとともに、検出感度を向上させるための新たな改良法を検討したので報告する。

材料及び方法

1 材料

試料は令和4年度及び5年度に実施した残留抗菌性物質検査において陰性であった豚の筋肉を使用した。培地は当所SOPに基づき作成した *Kocuria rhizophila* 含有検査用平板(K.r平板)、*Bacillus subtilis* 含有検査用平板(B.s平板)、*Bacillus mycoides* 含有検査用平板(B.m平板)を使用し、抗菌性物質はアンピシリン(ABPC)、カナマイシン(KM)、セファゾリン(CEZ)、オキシテトラサイクリン(OTC)及びドキシサイクリン(DOXY)を用いた。各抗菌性物質は、滅菌蒸留水又は0.1N塩酸で完全に溶解し、滅菌蒸留水を加えて各1000 μ g/mlに調整した原液を、MIC(最小発育阻止濃度)法に準じ2倍段階希釈し0.12~250ppmとたものを標準溶液として用いた。また、抽出溶媒及び陰性コントロール(以下、NCという。)としてクエン酸アセトン緩衝液を用い、ペーパーディスクは直径10mm、厚さ1.1mmの枝肉の抗菌物質検査用ろ紙(アドバンテック東洋(株))を121℃で15分間高圧蒸気滅菌し、乾燥後使用した。

2 方法

(1) 検出感度の検証

試料はフードプロセッサーで細切後、4.9g~5.1gをストマック袋に採取し、試料中1g当たりの抗菌性物質濃度が0.012~25ppmとなるように各濃度の標準溶液を500 μ l添加した。その後クエン酸アセトン緩衝液20mlを加えてからストマッカー処理を行い、3000rpmで15分間遠心した上清を試験溶液として簡易検査法を行い、各抗菌性物質について、12mm以上の阻止円が観測された最小濃度を検出限界とした。

なお、使用した培地と抗菌性物質の組合せを表 1 に示した。

表 1 使用した抗菌性物質と培地の組合せ

培地の種類	K.r 平板	B.s 平板	B.m 平板
抗菌性物質	ABPC	KM、CEZ	OTC、DOXY

(2) 検出感度向上の検討

ア 抗菌性物質の培地への添加方法及び添加濃度の設定

抗菌性物質の培地への添加方法は、コンラージで 50 μ l の ABPC、KM、OTC を培地に均一に塗布する方法（塗布法）と、ペーパーディスクを静置する箇所にあらかじめ ABPC、KM、OTC を 10 μ l 滴下し、その上にペーパーディスクを置き培地に固着させる方法（滴下法）の二種類を比較した。添加する抗菌性物質と培地の組合せは K. r 平板に ABPC、B. s 平板に KM、B. m 平板に OTC とし、添加濃度は当所で簡易検査法を実施する際の各抗菌性物質の陽性コントロール（PC）濃度とした。

イ 添加方法による検出感度の比較

アの結果から添加濃度を設定し、添加方法による検出感度の比較を行った。

成 績

1 検出感度の検証

検出限界は ABPC が 0.098ppm、KM が 12.5ppm、CEZ が 3.13ppm、OTC が 0.78ppm、DOXY が 0.20ppm となった（表 2）。

表 2 抗菌性物質濃度に対する阻止円の大きさ

抗菌性物質	試料中濃度									
	25ppm	12.5ppm	6.25ppm	3.13ppm	1.56ppm	0.78ppm	0.39ppm	0.20ppm	0.098ppm	0.049ppm
ABPC	+	+	+	+	33	28	25	20	15	—
KM	17	13	—	—	—	—	—	—	—	—
CEZ	24	20	16	12	—	—	—	—	—	—
OTC	28	25	24	20	18	15	11	—	—	—
DOXY	+	+	27	24	21	19	16	13	—	—

＋：阻止円計測不可

—：阻止円なし

単位：mm

2 検出感度向上の検討

(1) 抗菌性物質の培地への添加方法及び添加濃度の設定

それぞれの培地について、塗布法及び滴下法で陽性コントロール（PC）及び陰性コントロール（NC）を静置し培養すると、いずれの添加方法においても PC 周囲に 12mm 以上の阻止円が形成され、かつ PC 周辺以外は菌が良好に発育することを確認した。

(2) 添加方法による検出感度の比較

結果を表 3 に示した。いずれの添加方法も、検出感度が向上する傾向がみられたが、滴下法では塗布法と比較して KM、OTC、DOXY において 1 段階希積分の検出感度向上が認められた。また、塗布法ではゆがんだ阻止円が散見された。

表3 添加方法による検出感度の比較

抗菌性物質	添加方法	試料中濃度											
		25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0.20	0.098	0.049	0.024	0.012
		ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
ABPC	無添加								20	14	11	—	—
	塗布法								21	16	12	—	—
	滴下法								21	17	13	11	—
KM	無添加	17	15	—	—	—							
	塗布法	18	17	11	—	—							
	滴下法	18	17	14	11	—							
CEZ	無添加		20	16	11	—							
	塗布法		19	17	12	—							
	滴下法		19	16	12	—							
OTC	無添加					17	15	—	—	—	—		
	塗布法					18	15	—	—	—	—		
	滴下法					18	17	12	11	—	—		
DOXY	無添加						20	16	12	—	—		
	塗布法						19	17	13	11	—		
	滴下法						20	18	15	12	—		

数値は阻止円の大きさで単位はmm —：阻止円なし

考 察

検出感度の検証の結果は、神保ら[1]の報告とほぼ同様であった。また、塗布法で散見された阻止円のゆがみは、塗布する際の手技の差で生じた「塗りむら」により抗菌性物質濃度に偏りがあったためと考えた。滴下法では塗布法に比べ、手技による差が生じにくいこと、感度の上昇傾向があることや、簡易検査法を実施している平板内で同時に実施可能であることから、滴下法はより簡便に検出感度を向上できる可能性のある方法だと考えられた。一方、CEZの検出感度の向上をほとんど認めなかったように、他の抗菌性物質についても今後検討が必要であると考ええる。

まとめ

当所における抗菌性物質の検出感度の検証及び感度向上について検討を行ったところ、検出感度は既報とほぼ同様の結果となった。検出感度向上については、あらかじめ平板培地に抗菌性物質を滴下する方法が、平板培地に抗菌性物質を塗布する方法よりも簡便で検出感度が向上する可能性があると考えられた。

引用文献

- [1] 神保勝彦, 片岡潤, 小久保彌太郎, 小沼博隆, 近藤房生：畜水産食品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, 食品衛生雑誌, 36, 525-531 (1995)
- [2] 坂口岳志, 水谷裕子, 三浦義明, 三澤正和, 前野亀, 大木信也：平成22年度愛知県衛生研究所事業概要, 39-42 (2010)
- [3] 山木紀彦, 佐々木秀樹, 佐々木多栄子, 西村肇, 坂上亜希恵：平成23年度宮城県食肉衛生検査所事業概要, 52-53 (2011)