

プレミテストによる残留抗菌性物質検査法の検討

○佐藤政人, 関浩, 佐々木秀樹, 額田優花

1 はじめに

当所では残留抗菌性物質検査におけるスクリーニング検査に簡易検査法¹⁾(平成6年7月1日付け衛乳第107号)(以下, 従来法)を実施している。従来法では, 検体に含まれる抗生物質をクエン酸・アセトン緩衝液で抽出し, その抽出液を含ませたペーパーディスクを3種類の試験菌を含む培地にのせ, 培養後に得られた阻止円の大きさにより抗生物質の残留の有無を判定している。

従来法は試験菌の調製が煩雑であり, 培地の作製に時間を要し, 作製した培地の使用期限は約2週間のため使用の都度作製が必要となる。また, 検査開始から結果を得るまでに18時間も要するなど, 検査にあたっての負担が大きい。

このため, 一部の食肉衛生検査所ではスクリーニング検査法として, 従来法と比較し検出可能な薬剤の範囲が広く, 手技が簡便で検査に要する時間が比較的短い市販の残留抗菌性物質スクリーニングキットであるプレミテスト(以下, Pt)が使用されている。

牛及び豚の筋肉中の薬剤の検出感度について従来法とPtを比較した報告²⁾はあるものの, 鶏の筋肉についての検討は見当たらない。そこで今回, 鶏で使用頻度の高い薬剤の検出感度について従来法とPtで比較し, Ptの有用性について検討したところ若干の知見が得られたので報告する。

2 材料

従来法及びPtの材料を表1に示した。

表1 検討に用いた材料の比較

	従来法	Pt
試料	鶏の筋肉 (抗生物質が含まれていない)	
培地	試験菌株 ・ <i>Kocuria rhizophila</i> (旧名 <i>Micrococcus luteus</i>) (以下ML) ・ <i>Bacillus subtilis</i> (以下BS) ・ <i>Bacillus cereus</i> (旧名 <i>Bacillus mycoides</i>) (以下BM) を混釈した平板培地を通知に準じて調整。	・プレミテスト(Premi test) (製造元:DSM社, 輸入元:アヅマックス)
器具	・ホモジナイザー ・pHメーター ・スターラー ・遠心機 ・冷蔵庫 ・インキュベーター	・遠心機 ・恒温水槽 ・ヒートブロック恒温槽
試薬等 消耗品	・0.2Mクエン酸溶液 クエン酸一水和物4.2gを水に溶解して100mlに定容したもの ・0.5M水酸化カリウム溶液 水酸化カリウム2.8gを水に溶解して100mlに定容したもの ・5規定水酸化カリウム溶液 水酸化カリウム14gを水に溶解して50mlに定容したもの ・アセトン ・ペーパーディスク 直径10mm, 厚さ1.1mmの市販のペーパーディスク(枝肉の 抗菌物質検査用濾紙)を121℃で15分間高圧滅菌し, 乾燥後 使用した。	・ストマッカー用ポリ袋 ・ストマッカー用コンシーラー
標準品	アンピシリン(ABPC), カナマイシン(KM), オキシテトラサイクリン(OTC), スルファメトキサゾール(SMX), ノルフロキサシン(NFLX), いずれも市販の標準品を使用した。	

3 方法

① 標準溶液の調製

各標準品 10mg を可溶性に応じて 10ml の水またはメタノールを加え 1000ppm の標準原液とした。ただし、NFLX は 100ppm に調製した。

② 従来法

培地及び試薬は通知のとおり調製した。ただし、クエン酸・アセトン緩衝液は 5 規定の水酸化カリウム溶液で pH7.0 に調製し用いた。各薬剤の標準原液を可溶性に応じて水またはメタノールで段階希釈し、その 500 μ l を鶏の筋肉 5g に加え添加試料とした。添加試料からは通知のとおり抽出し、抽出溶液をペーパーディスクに 80 μ l 浸漬させ、培地に密着させ冷蔵後に培養した。培養後、陽性と判定される直径 12mm 以上の阻止円を示す最小濃度を検出限界とした。

③ Pt の各試験法

Pt の各試験法は表2に示した。

表2 Pt の各試験法

	Pt通常法	Pt80℃法	Pt翌日判定法
検体の調製	検体を約2cm ³ 程度に切り出し→抽出(64℃、15分)→遠心分離(3000rpm、5分) →標準原液を遠心分離後の上清で段階希釈→標準希釈液を100 μ l アンプルに添加		
前培養	室温、20分→洗浄(水で2回)	80℃、10分	室温、20分→冷蔵(4℃、13時間)
本培養	64℃、約3時間		
判定及び検出限界の確認	アンプルの下2/3が黄色に変化→陰性 無変化(紫色)あるいはあいまいな変化→陽性 陽性を示した最小濃度を検出限界とした。		

4 結果

従来法と Pt の各試験法における検出感度を表3に示した。各薬剤の残留基準値は鶏の筋肉における値とした。

表3 従来法及び Pt の各試験法における検出感度

	薬剤 基準値 (ppm)	ABPC	KM	OTC	SMX	NFLX
検出感度 (ppm)	従来法	0.2	5	0.8	>100	5
	Pt 通常法	0.02	10	0.8	0.08	10
	Pt 80℃法	0.02	20	1.6	0.32	10
	Pt 翌日判定法	0.01	5	0.4	0.04	5

5 考察

当所における残留抗菌性物質検査は現在、牛、豚、鶏で行われているが、Pt をスクリーニング検査に用いる事を想定し、Pt が実際の検査で利用できるか確認を行った。従来法とPt の検出感度を比較し、Pt の有用性を牛と豚で検討した報告があるものの鶏では検討がなされていない。そこで鶏の筋肉で従来法とPt の取扱説明書に記載された筋肉を検体とする試験法(以下、Pt 通常法)で比較した結果、ABPC、SMX ではPt 通常法が高感度であった。従来法ではKM、NFLX の検出感度が若干高くなり、薬剤によっては従来法の方が検出感度の高いものも見られ、菌株の感受性に由来するものだと考えられた。

牛の筋肉の陰性検体においてPt 通常法を行ったとき、偽陽性となることがあり、これは取扱説明書に記載の腎臓を検体とする場合に前培養を80℃で行う方法(以下、Pt80℃法)を適用することで抑制できると報告されている²⁾。そこで鶏の筋肉でも偽陽性を疑う場合に用いる事を想定し、Pt80℃法について検討を行い、Pt 通常法と比較した結果、KM、OTC、SMX においてPt80℃法で検出感度が下がった。これは80℃処理によって薬剤が変質し、効力が下がり菌の発育阻害が抑えられたのではないかと考えられた。

検体の採材が遅くなり当日の判定が出来ない場合を想定し、Pt 通常法で前培養後に冷蔵保管した場合(以下、Pt 翌日判定法)と冷蔵保管をはさまない場合を比較し、翌日の判定の可否について検討した。全ての薬剤でPt 翌日判定法の検出感度が若干高くなった。これは、前培養で標準希釈液を作用させる時間が長くなり、Pt 通常法より低濃度で菌の発育が阻害されたためだと考えられた。結果よりPt 翌日判定法は冷蔵保管で検出感度を落とすことなく、翌日の判定が可能であった。

6 まとめ

今回の検討から、従来法と比較しPt 通常法で検出感度を大きく下げた薬剤はなく、Pt は従来法に劣らない試験法だと考えられた。

今回の結果を含め、Pt は従来法で行っていた試験菌の調製や培地の作製が不要であり、短時間で判定が可能で、スクリーニング検査の省力化を図る事ができるためPt は有用であると考えられた。Pt を従来法の代替として利用することで食肉中の残留抗菌性物質の効率的な検査が可能となり、安心安全な食肉の流通に一層、貢献できるものと思われる。

参考文献

- 1)厚生省通知平成6年7月1日付け衛乳第107号(別添2)「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)」
- 2)大森恵梨子ら:平成20年度全国食肉衛生検査所協議会第26回理化学部会抄録,37-39(2008)
- 3)堀江正一ら:食肉中に残留する抗菌性物質の微生物学的簡易検査法,食品衛生雑誌,vol.49.No3(2008)
- 4)農林水産省 動物医薬品検査所:動物医薬品,医薬部外品及び医療危機販売高年報(別冊)各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量,令和元年(2019)

- 5) 神保勝彦ら: 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, 食品衛生雑誌, 36, 525-531 (1995)
- 6) 郡山市食肉衛生検査所: 平成 30 年度事業概要, 27-29