いた帯広畜産大学獣医学科家畜病理学 小野 威教授に
深謝します。

参 考 文 献

- 1) CARPENTER, J.L.: *J. Amer. vet. med. Ass.*, 158, 857~859 (1971).
- 2) CSIZA, C. K., SCOTT, F. W., DELAHUNTA, A. and GILLESPIE, J.H.: *Infection and Immunity*, 3, 833~837 (1971).
- 3) CSIZA, C.K., SCOTT, F. W., DELAHUNTA, A. and GILLESPIE, J.H.: *Infection and Immunity*, 3, 838~846 (1971).
- 4) 土井邦雄, 仁田修治, 小島明広, 稲見芳治, 大川仁, 八十島 昭, 佐久間貞童, 岡庭 梓: 第77回日本獣医学会講演要旨, p. 166 (1974).
- 5) GOTO, H., YACHIDA, T., SHIRAHATA, T. and SHIMIZU, K.: *Jap. J. vet. Sci.*, 36, 203~211 (1974).
- 6) HAMMON, W.D. and ENDER, J.F.: *J. exp. Med.*, 69, 327~353 (1939).
- 7) HAMMON, W.D. and ENDER, J. F.: *J. exp. Med.*, 70, 557~567 (1939).
- 8) HINDLE, E. and FINDLAY, G.M.: *J. comp. Path. Therap.*, 45, 11~26 (1932).
- 9) HORVÁTH, Z., PAPP, L. and BARTA, A.: *Acta Vet. Acad. Sci. Hungarica.*, 24, 7~17 (1974).
- 10) ICHJO, S., OSAME, S., KONISHI, T. and GOTO, H.: *Jap. J. vet. Sci.*, 38, 197~205 (1976).
- 11) LANGHEINRICH, K.A. and NIELSON, S.W.: *J. Amer. vet. med. Ass.*, 158, 863~872 (1971).
- 12) LAWRENCE, J.S., SYVERTON, J.T.: *Proc. Soc. exp. Biol.*, 38, 914~918 (1938).
- 13) LAWRENCE, J.S., SYVERTON, J.T., SHAW, J.S. and SMITH, F.P.: *Amer. J. Path.*, 16, 333~363 (1940).
- 14) NEWBERN, J.W., JOHNSON, R.V. and ROBINSON, V.B.: *Southwest vet.*, 10, 111~118 (1957).
- 15) RISER, W.H.: *North amer Vet.*, 24, 293~299 (1943).
- 16) RISER, W.H.: *Amer. J. vet. Res.*, 8, 82~90 (1947).
- 17) ROHOVSKY, M.W. and FOWLER, E.H.: *J. Amer. vet. med. Ass.*, 158, 872~875 (1971).

公衆衛生

各種薬剤耐性菌を用いた食肉中の残留抗生物質検出法の検討

斉田 清* 栗原 貯* 信沢敏夫* 中嶋 隆* 渋谷幸一*

(昭和 54 年 4 月 20 日受理)

Detection of Residual Antibiotics in Meat by Using Drug-Resistant Bacteria

KIYOSHI SAIDA et al. (Central Meat Inspection Station, Prefecture of Gumma)

SUMMARY

A new method was devised to detect residual antibiotics in meat. *Escherichia coli* was used in it by a direct or filter-paper technique with efficiency. Samples were

collected satisfactory from the kidney and muscle at 2 sites, the site of injection and a site far from this site.

家畜の健康保持・増進および疾病の治療等の目的で
使用した抗菌性物質が、家畜の体内に移行・残留すること
により、これらの畜産食品およびこれを介して人体への
影響が考えられる^{8,12)}。

日常のと畜検査においては、この抗菌性物質の食肉中
の残留問題に業務上対処できる検査法の確立が必要であ
る^{2,10-13)}。

そこで、従来から抗生物質の検査に応用され、その力
価試験等^{1,9)}に採用されている常法(以下、一般試験法)
のうち、平板円筒法(以下、カップ法)と枝肉の簡易検査
法(以下、ろ紙法)および臓器を直接試験に用いる、い
わゆる直接法の3種類の方法について検討を行なったと

ころ、これらの方法では、検体中の未知抗生物質を検出
するのに、各種試験菌に対する各種抗生物質の抗菌域の
相違にもとづく発育阻止帯の状態から、検体中の抗生物
質を推定するにとどまり、同定は一部の薬剤を除いて困
難であるとされている^{2,10,11)}。

著者らは今回、食肉中の残留抗生物質の検出と同定が
同時に実施できる検査法として、薬剤耐性菌¹²⁾を使用す
る方法(以下、薬剤耐性菌法)を検討し、次の知見を得
たので報告する。

実 験 材 料 と 方 法

1. 供 試 材 料

と畜場に搬入された事故動物等のうち、と殺解体後に
注射痕が認められたものについて、牛、犢(生後1年末

* 群馬県中央食肉衛生検査所(群馬県佐波郡玉村町樋
越1834-1)

満の牛), 豚各5頭を選び, 検体として筋肉(横隔膜筋および注射部位), 肝および腎をそれぞれ50gずつ採取し, それらの内部を汚染防止に注意しながら, 約10gとて実験に供した。

実験に使用した試験菌株としては, *Escherichia coli* の薬剤耐性野外株 NA-s およびその変異株8株⁹⁾, K12 ML 1410 met-NA⁺株および NIHJ 株ならびに *Bacillus subtilis* ATCC 6633 株, *Sarcina lutea*(*Micrococcus luteus*) ATCC 9341 株を用い, 薬剤としては, ストレプトマイシン(SM), カナマイシン(KM), アンピシリン(AB-PC), クロラムフェニコール(CP), テトラサイクリン(TC) およびナリジックス酸(NA)を使用した。

2. 実験方法

1) 薬剤耐性菌法

(1) 各種薬剤耐性大腸菌の作製法: 薬剤耐性菌の作製は, まず大腸菌のR⁺野外株およびその耐性変異株⁹⁾のなかから, SM, KM, AB-PC, CP および TC の各単剤のみに耐性を示す耐性株 NA-s を選び, それぞれの薬剤とNAを選択薬剤として接合伝達により, *E. coli* K12 ML 1410 株に薬剤耐性遺伝子(Rプラスミド)を移して, ML 1410 NA-γ R⁺株を得た^{3,4,7)}。

このR⁺株をL-broth (組成: バクトトリプトン10g, 酵母エキス 5g, ブドウ糖 1g, 食塩 5g に水を加え1,000 ml としたもの)に1夜培養し, その培養菌液を遠心洗浄した後, 50・100および200μg(力価)/mlの濃度の各薬剤をそれぞれ添加したBTB乳糖寒天(栄研化学)平板に塗抹培養(37℃・24時間)を行なった⁷⁾。

その発育した集落について, 再度薬剤を添加したBTB乳糖寒天平板上で, 薬剤耐性値が100~200μg(力価)/mlであることを確認した後, そのRプラスミドをブドウ糖加Med, A培地(組成: リン酸2ナトリウム12水塩 8g, リン酸1カリウム 2g, 硫酸アンモニウム 1g およびL-グルタミン酸ソーダ 5g に水を加え1,000 ml とし, pH 7.0 確認後, BHI-broth 0.1ml, ブロムチモールブルー 0.02g, ブドウ糖 2g, 硫酸マグネシウム 0.4g およびL-メチオニン 0.002gを加えたもの)を用いて, それぞれの薬剤耐性とメチオニンを選択標識として接合伝達により, *E. coli* NIHJ 株に移した^{3-5,7)}。

こうして得られた *E. coli* NIHJ R⁺株が, 各薬剤に対する耐性値の安定していることを, それぞれの薬剤の100~200 μg(力価)/ml添加BTB乳糖寒天平板上で確認後, 以下の薬剤耐性菌法の試験菌として用いられた。

また, 試験菌の薬剤検出感度の検定は, 最小発育阻止濃度(MIC; Minimum inhibitory concentration)の測定法⁹⁾に準じて行なった。

(2) 実験平板の作製法: 実験平板の作製は, まず90 mmのシャーレに基層用として, 試験菌を含まないBTB乳糖寒天培地 20 ml ずつ分注し, 固化させた^{1,8)}。

ついで, 試験菌液(試験菌をL-brothで37℃・24時間培養後, その菌液を滅菌生理食塩液で100倍希釈としたもの)をBTB乳糖寒天培地 4 ml に0.4 mlの割合で混合して基層表面に平らに流し, 種層とし固化させ実験に供した。

(3) 実験操作: 実験操作は, 試験菌の添加平板培地上に, まず標準薬剤(5~10μg(力価)/ml), 検体(2gをとり18 mlの生理食塩液を加えてホモジナイズ後, その原液を低希釈液, 5倍液を中希釈液, 10倍液を高希釈液とした。)および対照(抗生物質の使用が認められない同種動物の同一臓器等)を, それぞれカップ法ではカップ内に分注し, ろ紙法ではろ紙(東洋ろ紙No. 27, 径10mm, 吸収量0.08 ml)に吸着させ, 直接法では検体の約1cm角のブロックをそのまま培地上に配置して行なった。

また, 直接法の標準薬剤は, 健康動物の筋肉の約1cm角のブロックを標準薬剤液中に2時間浸したものをを用いた。

(4) 結果の判定: 図1のTC系薬剤を使用した実験操作と結果の判定法に示すとおり, この例ではTC耐性菌の平板上には, 試験菌の発育阻止帯を欠き(または, 極めて小さい阻止帯), 他のSM, KM, CP, AB-PC耐性菌の平板上には, それぞれ検体中の薬剤含有濃度に応じた発育阻止帯が認められたものを, TC系薬剤の検出と判定した。

2) 一般試験法による対照実験

薬剤耐性菌法の対照として, 一般試験法^{1,8)}により, 薬剤耐性菌法に用いた検体と同一の検体を用いて, カップ法, ろ紙法および直接法の3種類の方法で行なった。

また, この実験に使用した試験菌株の薬剤検出感度の検定は, MICの測定法⁹⁾に準じて行なった。

3) 検体として使用した事故動物の追跡調査

検査結果と診療獣医師等による治療経過の一致率を把握するため, 治療状況の追跡調査を行なった。

検査成績

1. 薬剤耐性菌法における成績

試験菌(*E. coli* NIHJ 株)における薬剤検出感度(MIC測定値)の検定値からみた検出可能範囲は表1に示すとおりで, 下限は各試験菌のそれぞれの薬剤に対する自然耐性獲得の最高値の2倍濃度(各試験菌のそれぞれの薬剤に対する変異株の発生を考慮した濃度)とし, 上限は各試験菌のそれぞれの薬剤に対する耐性を高めた最高値とした場合, SM耐性菌は6.25~100 μg(力価)/ml, KM耐性菌は6.25~200 μg(力価)/ml, AB-PC耐性菌は0.78~200 μg(力価)/ml, CP耐性菌は3.125~200 μg(力価)/ml およびTC耐性菌は3.125~200 μg(力価)/mlの薬剤濃度の範囲が検出可能であることが認められた。

この試験菌を用いた各検体からの薬剤検出は, TC系

各種薬剤耐性菌を用いた食肉中の残留抗生物質検出法の検討

1 実験操作(検体等の配置)

標準薬剤(5~10 μ g/力価)

(A) 検体(高希釈)

(B) 検体(中希釈)

(C) 検体(低希釈)

対照(検体と同一臓器で薬剤を含まないもの)

※ 薬剤耐性菌法についてもカップ法, ろ紙法および直接法を用いた

※ ろ紙法および直接法は(A)(B)(C)ともに, 検体そのものを配置した

2 結果の判定法(カップ法)

TC耐性菌平板

SM耐性菌平板

KM耐性菌平板

CP耐性菌平板

AB-PC耐性菌平板

※TC系薬剤検出例である

図1 実験操作と結果の判定法

表1 *E. coli* NIHJ R⁺ 株における薬剤検出感度(MIC測定値)

<i>E. coli</i> NIHJ R ⁺ 株	各薬剤感受性値 (μ g(力価)/mL)					薬剤検出感度の検定 (検出可能範囲= μ g(力価)/mL)
	SM	KM	AB-PC	CP	TC	
SM	100	3.125	0.78	0.78	0.195	6.25 ~100
KM	3.125	200	0.78	0.78	0.195	6.25 ~200
AB-PC	0.195	0.39	200	0.78	0.195	0.78 ~200
CP	1.56	1.56	0.78	200	0.195	3.125 ~200
TC	1.56	1.56	0.78	0.78	200	3.125 ~200

注) — : 上の数値は, 各薬剤耐性値を高めた最高値

..... : 上の数値は, 自然耐性獲得の最高値

薬剤検出例(写真1, 2, 3)に示すとおり, TC系薬剤の使用されていた場合は, TC耐性菌平板上において検体中の抗生物質による試験菌の発育阻止帯を欠き, 他の薬剤耐性菌の平板上には, 試験菌の発育阻止帯が著明に認められた。

また, SM系薬剤, KM系薬剤, AB-PC系薬剤およびCP系薬剤がそれぞれ治療等に使用されていた場合は, TC系薬剤検出例と同様に, 同系列薬剤耐性菌使用の平板上には, 試験菌の発育阻止帯を欠き, 他の薬剤耐性菌の平板上には, 試験菌の発育阻止帯が認められた。

薬剤耐性菌法の実験に供した15頭(牛, 猪, 豚各5頭)のうち12頭(80.0%)から抗生物質を検出した。

薬剤別の同定結果は, 単剤としてAB-PC系; 4/15頭(26.7%), TC系; 3/15頭(20.0%), SM系; 2/15頭(13.3%)およびKM系; 2/15頭(13.3%)であり, 2剤としては, AB-PC・CP系; 1/15頭(6.7%)であっ

た。

検体別では, 腎からの検出が最も高く12/15頭(80.0%), ついで肝10/15頭(66.7%), 注射部位および横隔膜筋7/15頭(46.7%)の順であった。また, 腎と他の全検体より検出されたものは7/15頭(46.7%), 腎と肝では2/15頭(13.3%), 腎のみでは2/15頭(13.3%), 肝のみでは1/15頭(6.7%)であり, 1個体から腎と他の検体より同一薬剤を検出したものは, 10/15頭(66.7%)に認められた。

実験方法別では, 各検体ともに直接法による検出が最も高く12/15頭(80.0%), ついでろ紙法11/15頭(73.3%), カップ法7/15頭(46.7%)の順であった。

2. 一般試験法による対照実験成績

薬剤耐性菌法の対照実験として行なった一般試験法においては, まず試験菌の薬剤に対する検出感度(MIC測定値)をみると, *B. subtilis* ATCC 6633株は, SM;

写真1 TC系薬剤の検出 (カップ法)

写真2 TC系薬剤の検出 (円紙法)

写真3 TC系薬剤の検出 (直接法)

0.098 μ g(力価)/ml, KM; 0.049 μ g(力価)/ml, *S. lutea* ATCC 9341 株は AB-PC; 0.003 μ g(力価)/ml, *E. coli* NIHJ 株は CP; 0.098 μ g(力価)/ml, TC; 0.195 μ g(力価)/ml であることを確認した。

この試験菌と薬剤を併用した結果、実験に供した 15 頭(牛, 猪, 豚各 5 頭)のうち 12 頭(80.0%)から抗菌性物質を検出し、薬剤耐性菌法との一致を認めた。

検体別では、腎からの検出が最も高く 12/15 頭(80.0%), ついで肝 9/15 頭(60.0%), 注射部位 8/15 頭(53.3%), 横隔膜筋 4/15 頭(26.7%) の順であった。全部の採取臓器より検出したものは 7/15 頭(58.3%), 腎と肝のみは 1/15 頭(6.7%), 腎のみは 4/15 頭(26.7%), 肝のみは 1/15 頭(6.7%) であった。

実験方法別では、各検体ともに直接法による検出が最も高く 12/15 頭(80.0%), ついで円紙法 11/15 頭(73.3%), カップ法(53.3%) の順であった。

3. 事故動物の追跡調査

実験に供した事故動物のうち、12/15 頭からなんらかの抗菌性物質が検出された。これらの事故動物を診療した獣医師等に治療経過等の追跡調査を行なったところ、薬剤の検出結果と治療のため使用した事実(聴聞結果)は、11/15 頭(73.3%) と高い一致が認められた。

考 察

日常のと畜検査は、生産食肉の食用適否を決定するため、迅速な判定と、簡易で正確度の高い方法が必要であると考えられる。

従来、と畜検査に応用されている、食肉中の抗菌性物質を検出するための一般試験法は、抗生物質の製品検査等の力価測定目的には極めて優れている^{8,15)}。しかし、食肉等から抗生物質を検査する方法としては、その検体中に目的以外の抗生物質や乳酸・胆汁等の抗菌性物質が存在するため、検体により出現した試験菌の発育阻止帯が、目的の抗生物質の存在を意味するのか、目的以外の試験菌発育阻止因子によるものなのか、確認することが困難な場合が多い^{8,10,11,15)}。

今回の薬剤耐性菌法に用いた *E. coli* NIHJ R⁺ 株は、一般に家畜の疾病の治療等に用いられている各種抗生物質の注射使用量⁹⁾を 5~10mg(力価)/kg と推定することにより、各試験菌のそれぞれの薬剤に対する検出感度(下限は *E. coli* NIHJ 株の各薬剤に対する MIC 以上の濃度、上限は *E. coli* NIHJ R⁺ 株の各薬剤に対する耐性を高めた最高値の濃度)が、SM; 6.25~100 μ g(力価)/ml, KM; 6.25~200 μ g(力価)/ml, AB-PC; 0.78~200 μ g(力価)/ml, CP; 3.125~200 μ g(力価)/ml および TC; 3.125~200 μ g(力価)/ml の濃度の範囲まで検出可能で、

しかも耐性値の安定した試験菌株として使用できた。それゆえ、この試験菌では、検体中に存在する抗生物質による対応薬剤耐性菌の発育阻害は少なくとも存在しない状態なので、当該薬剤耐性菌に対する発育阻害は、対応する抗生物質以外のものと考えられる。また、ペニシリン系薬剤については、使用菌株である大腸菌のベンジルペニシリンに対する感受性が低い^{3,4,15)}ため、今回の試験では合成ペニシリンである AB-PC のみについて検討した。今後ペニシリンの細胞膜透過性や、それと関係の

あるペニシリン結合蛋白の存在⁹⁾等を考慮し、遺伝学的手法を用いて、より感受性の高い菌株の作製について検討する必要があると考えられる。

SCHOTHORST¹²⁾によれば、薬剤耐性菌を用いた場合、他の抗生物質に対しても耐性値が上昇し、同定できない場合があるとされているが、今回著者が用いた *E. coli* NIHJ R⁺ 株は、感受性菌の耐性値を段階的に上昇させたものではなく、感受性菌へ遺伝子を含む R 因子を感染^{4,7)}させたものであるため、他の抗生物質に対する耐性値の上昇は殆んど認められなかった。ただし、SMにおいては、R 因子の耐性値が比較的低いので、100~200 μ g(力価)/ml の耐性値に上昇させた際、同じアミノ配糖体^{3,4,15)}の KM 耐性値も極く僅かな上昇を示したが、同定の目的に使用するには十分耐え得るものと考えられる。

さらに、薬剤耐性菌法に用いた *E. coli* NIHJ R⁺ 株は、培養・継代・保存等が比較的容易であり、筋肉中の乳酸や胆汁等の物質による発育阻害が、一般試験法に用いた *B. subtilis* や、*S. lutea* に比べて少なかった。

検査材料別にみた検出率は、腎が最も高く、ついで筋肉(注射部位)、肝の順であった。これは、排泄器官である肝や腎が、常に注射部位を除いた筋肉より高いという成績^{10,11-13)}と一致し、とくに腎の高いのは、SM や KM の腎蓄積¹²⁾によるものと考えられた。

まとめ

今回の実験結果から、食肉中の残留抗生物質の検出には、一般試験法より簡易で正確度が高く、残留薬剤の検出と同定が同時に実施できる薬剤耐性菌法が最適と考えられる。

この薬剤耐性菌法に大腸菌を用いた場合、つぎの利点があげられる。

1. 大腸菌は各薬剤耐性菌を容易に作製することができる。
2. 検査の術式で、一般試験法(カップ法、ろ紙法および直接法)の種層部に直接応用できる。また、試験菌液の調整が容易である。
3. 結果の判定の際、残留抗生物質の検出と同定が同時にできる。

ただし、今回実験に用いた試験菌の薬剤に対する検出感度は、SM; 6.25~100 μ g(力価)/ml, KM; 6.25~200 μ g(力価)/ml, AB-PC; 0.78~200 μ g(力価)/ml, CP; 3.125~200 μ g(力価)/ml および TC; 3.125~200 μ g(力価)/ml の濃度の範囲で、実験に供した検体中に含まれる抗生物質が測定可能な範囲であった。しかし、検体中に含まれる抗生物質が各試験菌の耐性限界値以上の濃度の場合も考えられるので、この時は検体の希釈により実験可能と判断された。

4. 試験菌の維持管理上、大腸菌は他の試験菌に比

べ、培養・継代・保存等が比較的容易である。さらに筋肉中の乳酸・胆汁等の物質による発育阻害が比較的少ない。

日常のと畜検査における検査方法としては、直接法またはろ紙法の応用が最適であり、腎および筋肉(注射部位と注射遠位部)を検体とすることが望ましい。

稿を終るにあたり、終始ご指導とご協力を賜った群馬大学医学部微生物学教室 三橋 進教授、同教室研究員 池 康嘉博士ならびに群馬県中央食肉衛生検査所長 下田忠男氏他職員の方々に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課：畜産物中の残留物質検査法(第1・2集)(1977)。
- 2) 松本寿男, 福田二三男, 小山 考, 長井 章, 中島 隆, 大島 貳：日本獣医公衆衛生学会(関東)講演要旨, p. 36 (1978)。
- 3) MITSUHASHI, S.: *Drug Action and Drug Resistance in Bacteria*, Tokyo, University of Tokyo Press (1971)。
- 4) 三橋 進(編)：薬剤耐性, 東京, 朝倉書店(1973)。
- 5) NAKAJIMA, T., SUZUKI, M., KAMEDA, M., HARADA, K. and MITSUHASHI, S.: *Japan J. Microbiol.*, 17, 251 (1973)。
- 6) 日本化学療法学会効果判定基準委員会, MIC 小委員会：*Chemotherapy*, 16, 78 (1968)。
- 7) 日本細菌学会教育委員会：R プラスミット実習書(1977)。
- 8) 二宮幾代治(編)：家畜の抗生物質と化学療法, 東京, 養賢堂 (1976)。
- 9) 斉田 清, 池 康嘉, 三橋 進：日本細菌学会雑誌, 6, 33, 786 (1978)。
- 10) 斉田 清, 大沢一之, 栗原 貯, 信沢敏夫, 渋谷幸一：日本獣医公衆衛生学会(関東)講演要旨, p. 35 (1978)。
- 11) 斉田 清, 栗原 貯, 信沢敏夫, 中嶋 隆：全国と畜検査員研修会講演要旨, 厚生省 (1979)。
- 12) SCHOTHORST, M. van. and PEELLEN-KNOL, G.: *Neth. J. Vet. Sci.*, 3, 85 (1970)。
- 13) 下田忠男, ほか：獣医畜産新報, 608, 5 (1974)。
- 14) SPRATT, B. G.: *Proc. Natl. Acad.*, 72, 2999(1975)。
- 15) 田中信男, 中村昭四郎(編)：抗生物質大要, 化学と生物活性, 第2版, 東京, 東京大学出版会(1977)。

日本動物薬事協会発行

動物用要指示医薬品の手引 1978年版

定 価 1,700 円 (送料 160 円) A 5 版 265 頁

日本獣医師会取扱い：所属地方会または日本獣医師会へ直接申込みください。