(6) 残留抗菌性物質スクリーニング検査におけるプレミテスト導入の検討

○山口 麻綾、佐々木 秀樹

1. はじめに

当所では残留抗菌性物質のスクリーニング検査において、簡易検査法[1]を行っている。しかし、簡易検査法は試験菌の調製や培地の作成等において煩雑な作業が多く、また培養時間が 18 時間と結果判定まで時間を要する上、現在のポジティブリスト制となる前に通知されていることから、検出感度の設定に、残留基準値が考慮されていない。近年では簡易検査法よりも迅速かつ作業が簡便で、感度が比較的高いとされるプレミテストを用いてスクリーニング検査を行う方法が他自治体[2]や令和3年度の当所調査研究[3]で検討されており、既に一部の自治体では簡易検査法に代わる検査として採用されている。当所でも液体クロマトグラフタンデム四重極型質量分析計(以下、LC-MS/MS)を用いた一斉分析法のスクリーニング検査としてプレミテストの導入を検討していることから、当所の動物用医薬品一斉分析法の対象化合物及び妥当性の確認を取る予定の化合物について、再度その性能を確認する必要がある。そこでプレミテストの検出感度を確認し簡易検査法の代替法として採用できるか検討したところ、一定の成果が得られたのでその概要を報告する。

2. 材料及び方法

(1) 材料

検体はあらかじめ抗菌性物質の残留がないことを確認した牛、豚及び鶏の筋肉を用いた。抗菌性物質化合物の各標準品は 10mg 秤量し、50%アセトニトリルもしくは 100%メタノールに溶解させて濃度が 100ppm になるように調整して標準溶液とし、適宜希釈して試験に供した。使用した化合物は表 1 に示す。検査キットはプレミテスト(DSM 社製)を使用した。

表 1 使用した化合物と各検体の基準値

化合物(略称*)	基準値(ppm)		
	牛の筋肉	豚の筋肉	鶏の筋肉
オキシテトラサイクリン(OTC)	0.2	0.2	0.2
ドキシサイクリン(DOXY)	含有してはならない	0.05	0.05
アンピシリン(ABPC)	0.03	0.06	0.02
セファゾリン(CEZ)	0.05	含有してはならない	含有してはならない
リンコマイシン(LCM)	含有してはならない	0.2	0.2
スルファジミジン(SDD)	0.10	0.10	0.10
エリスロマイシン A(EM)	0.2	0.2	0.1
カナマイシン(KM)	0.04	0.04	0.2

※以降は各化合物について略称で示す

(2) 方法

①通常法

後の作業で肉汁が出やすいようにあらかじめ凍結融解を行った筋肉を用意した。脂肪やスジを取り除いた各畜種の筋肉を約 8.5g とり、各化合物の濃度が基準値の 2 倍、基準値、基準値の 2 分の 1 になるよう調整したものを筋肉に添加し 30 分静置した。基準値が「含有してはならない」となっている場合は一

律基準値の 0.01ppm を基準値と見なして標準溶液の調整を行った。その後肉汁を 100 μ l 採取し、プレミテストの培地上に滴下して室温で 20 分培養した。化合物を添加していない筋肉の肉汁を陰性コントロールとし、上記の検体と同時に培養を行った。その後、超純水で 2 回洗浄し 64℃で 3 時間以上培養を行った。陰性コントロールの培地が黄変したことを確認した段階で培養を停止し判定を行った。培地の下部 3 分の 2 が黄変している場合を陰性、色の変化がない(紫色) 場合を陽性として判定した。

②翌日以降判定法

週末の夕方に検体を採取する等、翌日以降に判定を行う必要が生じる場合があることから、①の通常法で判定した後、2～3 日間冷蔵保管し判定結果に変化があるか確認した。

3.結果

結果は表 2 のとおりとなった。複数回に分けて実験を行ったが、全てにおいて陰性コントロールの培地は黄変し陰性と判定された。牛及び豚の筋肉では 8 化合物全てにおいて基準値もしくはそれ以下の濃度で陽性となった。鶏の筋肉では、KM 以外の 7 化合物において基準値以下の濃度で陽性となり、KM は基準値 2 倍の濃度で陽性となった。また、翌日以降判定法において、通常法から判定結果が変更となったものはなかった。

表 2 通常法及び翌日以降判定法の結果一覧

		化合物							
		OTC	DOXY	ABPC	CEZ	LCM	SDD	EM	KM
牛	基準値 2 倍	+	+	+	+	+	+	+	+
	基準値	+	+	+	+	+	+	+	+
	基準値 1/2	+	-	+	+	-	+	+	-
豚	基準値 2 倍	+	+	+	+	+	+	+	+
	基準値	+	+	+	+	+	+	+	+
	基準値 1/2	-	-	+	-	+	+	+	+
鶏	基準値 2 倍	+	+	+	+	+	+	+	+
	基準値	+	+	+	+	+	+	+	-
	基準値 1/2	+	+	+	+	+	+	+	-

陽性:+ 陰性:-

4.考察

簡易検査法の検出限界は食品衛生法に基づく基準値の約 4 倍～10 倍以上[4]であり、平成 18 年に施行されたポジティブリスト制度に対応した検査方法ではない。そこで、簡易検査法よりも感度が優れているとされているプレミテストを用いてスクリーニング検査を行う方法を検討した。

プレミテストで陽性と判定した場合は原因化合物を特定する必要があり、そのためには定性・定量能力が高い LC-MS/MS を用いた検査を行うことができる体制が必要である。当所では令和 4 年度末に LC-MS/MS を導入してからおよそ 2 年が経過し、機器検査体制が整ったことから、さらなる検査体制の拡充のために、前段階もしくは機器検査を補完するためのスクリーニング検査においてプレミテストを導入することを検討した。

今回検討した 8 化合物のうち 7 化合物において、基準値かそれ以下の濃度で陽性となった。KM は鶏筋肉で基準値 2 倍の濃度で陽性となった。鶏筋肉の KM の基準値は牛筋肉や豚筋肉よりも 5 倍高いこと

から、検体によって結果に差異が出たのは基準値が低く設定されているからではないと考えられる。プレミテストに付属している取扱説明書には牛・豚・鶏筋肉それぞれ約 27 化合物の検出限界値が記載されているが、検体の種類毎にその値が多少異なる。また、他自治体の報告[2]でも畜種ごとに化合物の検出感度が異なることが報告されていることから、検体によって結果に差異が出るのは筋肉由来の成分によるものと推察される。

検体の採取時間が遅くなる場合など当日中に判定できない場合を想定して翌日以降判定法についても検討を行った。その結果、陰性コントロールを含めて色の変化は認められなかったことから、翌日以降に判定を行っても支障はないと考えられ、同様の検査を行っている病畜のスクリーニング検査にも応用できると考える。

今回の結果から、プレミテストは残留抗菌性物質のスクリーニング検査において簡易検査法よりも検出感度が高く、検査方法として有用であると考ええる。且つ、培地作成の手順の煩雑さや培養時間を考慮すると簡易検査法よりも簡便かつ迅速に結果を出せることから、プレミテストを導入することにより、さらに精度が高く効率的な検査が可能になると考える。

5. 引用文献

- [1]厚労省通知平成 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(改訂)」
- [2]木村雅子ら:プレミテストによる残留抗菌性物質の簡易検査法の検討、獣医畜産新報、Vol.64 No.2、127-132(2011)
- [3]佐藤政人ら:プレミテストによる残留抗菌性物質検査法の検討、令和 3 年度宮城県食肉衛生検査所業績発表会抄録集、3-5(2021)
- [4]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)