

残留抗生物質簡易検査で使用されるクエン酸・アセトン緩衝液の pH 調整による抗生物質の阻止円形成に対する影響について

○佐藤政人, 上村健人

1 背景

当所で実施している畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法¹⁾(以下 通知法)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(以下 緩衝液)で抽出し, その抽出液を染みこませたディスクを3種類の試験菌, *Bacillus cereus*(旧名 *Bacillus mycoides*)(以下 BM)), *Bacillus subtilis*(以下 BS), (*Kocuria rhizophila*(旧名 *Micrococcus luteus*)(以下 ML)の平板培地にのせ, 培養後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する。しかし, 上記検査法では, BM 培地において緩衝液のみをしみ込ませた陰性コントロールで, 阻止円及び不明瞭な阻止円を形成し, 検査結果に苦慮する場合がある。不明瞭な阻止円は通知法では陰性と判断されるものの, 陰性コントロールとしては他の2種の培地と同様に菌が均一に発育することが望ましい。

2 目的

報告によると緩衝液の pH を調整したところ不明瞭な阻止円は形成されなかった²⁾。このことから, 不明瞭な阻止円を形成する原因の一つは緩衝液の pH の変化によるものだと考えられるため, 緩衝液の pH を変化させ, それによる BM 培地での阻止円の形成の有無を調査した。また, 緩衝液の pH の変化による抗生物質の阻止円形成に対する影響を調査するため, アンピシリン(以下 ABPC)及びドキシサイクリン(以下 DOXY)を各濃度で添加した検体を, pH が未調整の緩衝液と pH を調整した緩衝液で抽出し, 培養後得られる阻止円の大きさを確認したところ, 若干の知見が得られたので報告する。

3 材料

【試料】

豚の筋肉

【試薬】

・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(N)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

・pH4.5 リン酸緩衝液

リン酸一カリウム 13.6g を水に溶解して 1000ml に定容したもの

・pH6.0 リン酸緩衝液

リン酸一カリウム 8.0g 及びリン酸二カリウム 2.0g を水に溶解して 1000ml に定容したもの

・水は超純水, アセトンは試薬特級を使用

【標準溶液】

・アンピシリン(ABPC)

ABPC 塩酸塩(富士フィルム和光純薬工業(株), HPLC 用)を 100%メタノールで 500ppm に調整し, pH6.0 リン酸緩衝液で適宜希釈したもの

・ドキシサイクリン(DOXY)

ドキシサイクリン DOXY 塩酸塩(富士フィルム和光純薬工業(株), HPLC 用)を 100%メタノールで 500ppm に調整し, pH4.5 リン酸緩衝液で適宜希釈したもの

【培地】

試験菌株 ML, BS, BM を混釈した平板培地を通知法に準じてそれぞれ調整

【ペーパーディスク】

直径 10mm, 厚さ 1.1mm のペーパーディスク(アドバンテック東洋(株), 枝肉の抗菌物質検査用濾紙)を 121°C で 15 分間高圧滅菌し, 乾燥後使用

4 方法

(1) 緩衝液の pH 変化による陰性コントロールの阻止円形成

0.2M クエン酸溶液 35 容と 0.5M 水酸化カリウム溶液 35 容と水 60 容を混合する。非水溶媒中における pH は基準が定められていないため³⁾⁴⁾, アセトン混合前に 5 規定水酸化カリウム溶液で pH5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 7.0, 7.5 にそれぞれ調整し, その後 pH 未調整と pH 調整したものにそれぞれアセトン 70 容を混合する。この緩衝液をペーパーディスクに 80 μ l 浸漬し, 培地に固着させ, 30 分以上冷蔵放置し 30°C で 18 時間培養後, ペーパーディスク周縁に形成される阻止円の有無を確認した。

(2) 緩衝液の pH 変化による ABPC 及び DOXY の阻止円形成への影響

抗生物質が含まれていないことが確認された試料を 5g 遠沈管にとり, ABPC 及び DOXY がそれぞれ 0.2ppm, 0.1ppm, 0.05ppm になるように添加し, 30 分間静置後, 3 の(1)と同様の方法で pH を 6.0, 7.0, 7.5 に調整し, pH 未調整と pH を調整したものにアセトンを加えた緩衝液を試料にそれぞれ加えた。それぞれの遠沈管について, 15,000rpm で 1 分間ホモジナイズ後, 3,000rpm で 15 分間遠心分離し, この上清を試験溶液とした。ペーパーディスクに試験溶液を 80 μ l 浸漬し, 培地に固着させ, 30 分以上冷蔵放置し 30°C で 18 時間培養後, ペーパーディスク周縁に形成される阻止円直径を測定した。

5 結果

(1) 緩衝液の pH 変化による陰性コントロールの阻止円形成

結果を表1に示す。表1から BM 培地において緩衝液 pH 未調整, 5.4 で阻止円を形成し, pH5.6, 5.8 では不明瞭な阻止円を形成した。そして pH6.0 以上では阻止円を形成しなかった。

表1 緩衝液の pH 変化による陰性コントロールの阻止円形成の有無

pH	未調整 (5.2)	5.4	5.6	5.8	6.0	7.0	7.5
BM培地	+	+	±	±	-	-	-
BS培地	-	-	-	-	-	-	-
ML培地	-	-	-	-	-	-	-

+ : 阻止円の形成, - : 阻止円を形成せず, ± : 不明瞭な阻止円を形成

(2) 緩衝液の pH 変化による ABPC 及び DOXY の阻止円形成への影響

結果を表2及び表3に示す。表2より BM 培地で ABPC の濃度が 0.2ppm の時, 緩衝液が pH 未調整で阻止円を形成し, また緩衝液の pH が 6.0 の時に不明瞭な阻止円を形成した。ABPC の濃度が 0.1ppm 及び 0.05ppm の時, 緩衝液の pH 未調整で BM 培地に不明瞭な阻止円を形成した。ML 培地で ABPC の濃度が 0.2ppm 及び 0.1ppm の時, 緩衝液の pH が 5.2 から 7.5 に上昇するにつれ阻止円の直径が徐々に小さくなった。0.05ppm においては緩衝液の pH が未調整の時, 不明瞭な阻止円を形成した。

表3より DOXY の濃度が 0.2ppm の時, 緩衝液の pH が 7.0 の BM 培地で形成される阻止円の直径は他の緩衝液の pH と比較し, 一番大きくなった。BM 培地で DOXY の濃度が 0.1ppm の緩衝液の pH が 5.2, 6.0, 7.0 において, そして DOXY の濃度が 0.05ppm の緩衝液の pH が未調整, 7.0 において不明瞭な阻止円が形成された。

表2 ABPC の各濃度における阻止円の直径

ABPC添加濃度 (ppm)		0.2				0.1				0.05			
緩衝液のpH		未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5	未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5	未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5
阻止円 の直径 (mm)	BM培地	14.8	±	-	-	±	-	-	-	±	-	-	-
	BS培地	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ML培地	20.1	18.1	17.2	16.1	14.2	12.8	12.1	11.8	±	-	-	-

- : 阻止円を形成せず, ± : 不明瞭な阻止円を形成

表3 DOXY の各濃度における阻止円の直径

DOXY添加濃度 (ppm)		0.2				0.1				0.05			
緩衝液のpH		未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5	未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5	未調整 (5.2)	6.0	7.0	7.5
阻止円の直径 (mm)	BM培地	14.0	15.5	16.1	14.0	±	±	±	—	±	—	±	—
	BS培地	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ML培地	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

—:阻止円を形成せず, ±:不明瞭な阻止円を形成

6 考察

緩衝液の pH 変化による陰性コントロールの阻止円形成について, BM 培地で緩衝液が pH 未調整及び pH5.4 で阻止円が形成され, pH5.6 及び pH5.8 では不明瞭な阻止円が形成された。これは BM の発育する pH は 4.3 から 9.3 であるが, BM の発育至適 pH は 6.0 から 7.0⁵⁾の間であるため, pH5.8 以下では発育至適 pH から外れており, 菌の発育が阻害されたためだと考えられる。

次に緩衝液の pH 調整による抗生物質への影響について, ABPC では濃度が 0.2ppm 及び 0.1ppm の時, 緩衝液の pH が 5.2 から 7.5 に上昇するごとに ML 培地で形成される阻止円が徐々に小さくなった。これについて直接の原因は解らないが, ABPC の酸解離定数は 2.5 と 7.0 であり, pH の変化に従って異なるイオン種の割合も変化し,⁶⁾この事が阻止円形成に影響しているのではないかと推察された。DOXY では濃度が 0.2ppm の時, 緩衝液の pH7.0 の BM 培地で阻止円が一番大きくなった。また, DOXY の濃度が 0.05ppm の時, 緩衝液の pH7.0 の BM 培地で不明瞭な阻止円を形成していた。これらのことから, pH が DOXY の抗菌作用に及ぼす影響について不明であるが, DOXY の抗菌作用は pH7.0 において最も強く表れることが今回の調査で結果が得られた。

以上の結果から, 緩衝液の pH を高くすることにより, BM 培地における陰性コントロールでの不明瞭な阻止円形成を抑制できるものの, 抗生物質の抗菌作用は, pH による影響を受けており, 各抗生物質によってその至適 pH がそれぞれ異なっていると考えられる。したがって通知法の緩衝液の pH 変更を検討したものの pH を変更することは, 本来想定されている検出限界等を逸脱したものになってしまう可能性も考慮する必要がある。

今後は他の抗生物質・畜種において更に検討を重ねていきたいと考えている。

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) 広島市衛生研究所年報第21号:抗生物質簡易検査における検体希釈液の影響(2002)
- 3) 筒井清二:非水溶液の pH 測定とその応用, 日本ポーラログラフ学会 編, 4, 103-112(1964)
- 4) 大滝仁志:非水溶媒中の pH 測定法と標準緩衝溶液 1275-1280(1973)
- 5) 農林水産省:食品安全に関するリスクプロファイルシート(細菌), 1-7(2016)

6)湯川美穂ら: β -ラクタム系薬と β -シクロデキストリン類の水溶液中包接複合体構造に及ぼすpHの影響, 高分子論文集, 67-3, 192~197(2010)

(MEMO)