

第9章 抗生物質

第1節 微生物学的試験法通則

水、試薬等並びに器具類は必要に応じ、滅菌したものを用いる。

1 平板法

A 試薬等の調製

1) 緩衝液

緩衝液は、次に掲げる方法により調製し、121 °C で15分間高圧蒸気滅菌する。なお、pHの調整を要する場合には、リン酸(1 mol/L)又は水酸化カリウム溶液(1 mol/L)を用いて行う。

i) 1号緩衝液 (pH 4.5)

リン酸二水素カリウム 13.6 g を量って水 750 mL に溶かし、pH を 4.4~4.6 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

ii) 2号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 3.5 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 3 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

iii) 3号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 7 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 6 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

iv) 4号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 13.3 g を量って水 750 mL に溶かし、水酸化カリウム溶液(1 mol/L) 100 mL 程度を加えて pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

v) 5号緩衝液 (pH 6.0)

リン酸二水素カリウム 80 g

リン酸水素二カリウム 20 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 5.9~6.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

vi) 6号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 13.3 g

塩化ナトリウム 100 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、水酸化カリウム溶液(1 mol/L) 100 mL 程度を加えて pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

vii) 7号緩衝液 (pH 7.0)

リン酸二水素カリウム 6.4 g

リン酸水素二ナトリウム・12水 18.9 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 6.9~7.1 に調整した後、更に水を

加えて 1,000 mL とする。

viii) 8号緩衝液 (pH 4.0)

乳酸 7.5 mL を量って水 750 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) 50 mL 程度を加えて pH を 3.9~4.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

ix) 9号緩衝液 (pH 8.0)

リン酸二水素カリウム 0.5 g
リン酸水素二カリウム 16.7 g
炭酸水素ナトリウム 20 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.9~8.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

x) 10号緩衝液 (pH 9.2)

リン酸 2.3 mL
酢酸 2.3 mL
ホウ酸 2.5 g

上記分量を量って水 1,000 mL に溶かし、水酸化ナトリウム溶液 (0.2 mol/L) 700 mL 程度を加えて pH を 9.1~9.3 に調整する。

xi) 11号緩衝液 (pH 4.0)

1,2-ジヒドロキシベンゼン-3,5-ジスルホン酸ナトリウム 15.7 g を量って水 750 mL に溶かし、乳酸 7.5 mL 及び水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) 50 mL 程度を加えて pH を 3.9~4.1 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

xii) 12号緩衝液 (pH 7.5)

リン酸二水素カリウム 3.5 g
リン酸水素二ナトリウム・12水 3 g

上記分量を量って水 750 mL に溶かし、pH を 7.4~7.6 に調整した後、更に水を加えて 1,000 mL とする。

2) 標準液

標準液は、第2節各条に規定するところにより調製する。

この場合、標準原液は、常用標準品（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）別表第2の6の(13)に規定する常用標準品又は従前に規定されていた常用標準品）を用いて相対湿度 50 % 以下の大気中で調製し、密封して -20 °C 以下で保存する。

3) 培地

培地は、次の表に掲げる組成及び pH を有するものを調製し、121 °C で 15 分間 高圧蒸気滅菌する。なお、pH の調整を要する場合は、塩酸 (1 mol/L) 又は水酸化ナトリウム溶液 (1 mol/L) を用いる。

培地 1,000 mL あたりの組成及び pH

培地番号	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10
ペプトン (g)	10	10	5	6	10	7.2	6	7.2		10
胨消化カゼイン (g)									17	
パパイン消化大豆 (g)									3	
パパイン消化肝臓 (g)										
肉エキス (g)	5	5	3	1.5	2	1.8	1.5	1.8		10
牛心臓浸出液 (g)					250					
子牛脳浸出液 (g)					200					
酵母エキス (g)				3		3.6	3	3.6		
ブドウ糖 (g)				1	2	7.2	1	7.2	2.5	
塩化ナトリウム (g)	2.5	2.5			5	17.4		7.2	5	5
塩化マグネシウム (g)										
硫酸マグネシウム七水和物 (g)										
リン酸水素二カリウム (g)									2.5	
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)					2.5					
リン酸二水素カリウム (g)										
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)									10	
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)										
カンテン ^{注2} (g)	13~20		13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	6.4~6.6	6.9~7.1	7.9~8.1	6.4~6.6	7.9~8.1	5.9~6.1	7.9~8.1	7.9~8.1	7.2~7.4	6.4~6.6

注 1 Tergitol Type NP-10 (Sigma Aldrich 製) 又はこれと同等のもの

2 Bacto-Agar (Difco 製) 又はこれと同等のもの

培 地 番 号	F-11	F-12	F-13	F-14	F-15	F-16	F-17	F-18	F-19	F-20
ペプトン (g)		3.75	5	5		2	6			
胨消化カゼイン (g)										
パパイン消化大豆 (g)										3
パパイン消化肝臓 (g)		0.63								
肉エキス (g)			5	3			1.5			
牛心臓浸出液 (g)										
子牛脳浸出液 (g)										
酵母エキス (g)	1	1.25			2.5	2.5	3	2.5	2.5	
ブドウ糖 (g)	10				10	1		10	10	
塩化ナトリウム (g)		1.25	80		70					
塩化マグネシウム (g)								10	10	
硫酸マグネシウム七水和物 (g)					50					
リン酸水素二カリウム (g)										
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)			2							
リン酸二水素カリウム (g)										
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)										
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)	3									
カンテン ^{注2} (g)	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	5.9~6.1	7.2~7.4	7.9~8.1	5.9~6.1	4.9~5.1	5.9~6.1	5.6~5.8	無調整	6.9~7.1	5.9~6.1

培 地 番 号	F-21	F-22	F-23	F-24	F-25	F-111 ^{注3}	F-112 ^{注4}	F-201 ^{注5}	F-202 ^{注6}
ペプトン (g)	5		5	10	7.2	6	7.2	10	10
胨消化カゼイン (g)						4			
パパイン消化大豆 (g)									
パパイン消化肝臓 (g)									
肉エキス (g)	5		1.5	5	1.8	1.5	1.8		
牛心臓浸出液 (g)								500	250
子牛脳浸出液 (g)									200
酵母エキス (g)		2.5	1.5		3.6	3	3.6		
ブドウ糖 (g)		10	1		7.2	1	7.2		2
塩化ナトリウム (g)	50		3.5	2.5	37.2		7.2	5	5
塩化マグネシウム (g)									
硫酸マグネシウム七水和物 (g)		50							
リン酸水素二カリウム (g)			3.68						
リン酸水素二ナトリウム・12水 (g)	0.5								2.5
リン酸二水素カリウム (g)			1.32						
ポリオキシエチレンソルビタンモノオレイン酸エステル (mL)									
ポリグリコールエーテル界面活性剤 ^{注1} 溶液 (1w/v%) (mL)									
カンテン ^{注2} (g)	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	13~20	
水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
滅菌後の pH	5.9~6.1	5.9~6.1	6.9~7.1	7.9~8.1	7.9~8.1	7.9~8.1	5.9~6.1	7.3~7.5	7.3~7.5

注 3 Antibiotic Medium 11 (Difco 製) 又はこれと同等のもの

4 Antibiotic Medium 12 (Difco 製) 又はこれと同等のもの

5 Bacto-Heart Infusion Agar (Difco 製) 又はこれと同等のもの

6 Brain Heart Infusion Broth (Difco 製) 又はこれと同等のもの

4) 菌液又は孢子液及び添加量

試験菌の菌液又は孢子液は、次に掲げる方法により調製する。添加量は、第2節各条に規定する量を目安とし、2-2 用量法により定量する場合には、高濃度標準液による阻止円直径が 20~25 mm に、かつ、低濃度標準液による阻止円直径が 15~20 mm になるように、また、標準曲線法により定量する場合には、参照標準液による阻止円直径が 20 mm 前後になるように菌液又は孢子液を第2節各条に規定する培地に加える。なお、菌液を希釈する場合には、F-2 号培地又は F-202 号培地を用い、孢子液を希釈する場合には、水又は生理食塩液を用いる。

i) *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617、*Escherichia coli* ATCC 27166、*Micrococcus luteus* ATCC 9341 及び *Micrococcus luteus* ATCC 10240 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、35~37 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。

ii) *Brevibacterium citreum* var. *polynactinus* の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 20 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養して菌液とする。

iii) *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-2 号培地又は F-202 号培地 10 mL に移植し、35~37 °C で 4 時間振とう培養して菌液とする。

iv) *Escherichia coli* BS-10 の菌液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 29~31 °C で 16~24 時間、少なくとも 3 回継代培養する。この菌 1 白金耳を F-202 号培地 10 mL に移植し、29~31 °C で 16~24 時間振とう培養する。

更に、培養液 1 mL を F-202 号培地 10 mL に移植し、29~31 °C で 3 時間振とう培養して菌液とする。

v) *Bacillus cereus* ATCC 11778、*Bacillus subtilis* ATCC 6633 及び *Bacillus subtilis* ATCC 11774 の孢子液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 35~37 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、35~37 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。さらに、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、孢子を浮遊させて孢子液とする。

vi) *Bacillus cereus* ATCC 19637 の孢子液

試験菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に 27~29 °C で 16~24 時間、3 か月間隔で継代培養する。この菌を F-1 号培地又は F-201 号培地に接種し、27~29 °C で 1 週間以上培養して孢子を作らせる。孢子をかき取って水又は生理食塩液に均等に浮

遊させ、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加えて振とうし、65 °C で 30 分間ずつ、24 時間間隔で 2 回加熱する。更に、1,500×g で 10 分間遠心分離して上澄み液を捨てた後、水又は生理食塩液を加え、胞子を浮遊させて胞子液とする。

5) 寒天平板

寒天平板は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により調製し、その日のうちに使用する。

i) 円筒法

4)により調製した菌液又は胞子液を一度融かして 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地に加えて十分にかき混ぜ、10 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 20 mm の合成樹脂製又は硬質ガラス製のもの）に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔になるような位置に 4 個の円筒（外径 7.9~8.1 mm、内径 5.9~6.1 mm、高さ 9.9~10.1 mm のステンレス鋼製のもの）を 10~13 mm の高さから垂直に落して置く。

ii) せん孔法

4)により調製した菌液又は胞子液を一度融かして 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地に加えて十分にかき混ぜ、20 mL をペトリ皿（内径 90 mm、高さ 20 mm の合成樹脂製又は硬質ガラス製のもの）に一様に広がるように分注した後、水平に静置して凝固させる。平板上の半径 25 mm の円周上の相隣する各々が中心に対して 90°の間隔になるような位置に径 7.9~8.1 mm の 4 個の正円のせん孔を設ける。

B 試料溶液の調製

試料溶液は、第 2 節各条に規定するところにより速やかに調製する。

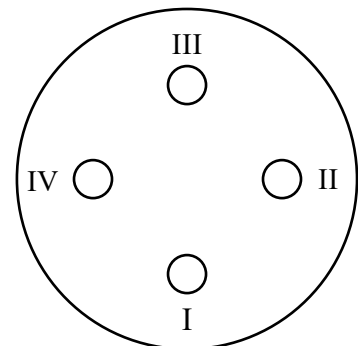
なお、第 2 節各条に規定する試料溶液の濃度は、表示量より算出されるものである。

C 定 量

定量は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により行う。

1) 2-2 用量法

分 注 寒天平板 5 枚をとり、図のように、各寒天平板の第 I の円筒又はせん孔には高濃度標準液 (S_H)、第 II の円筒又はせん孔には高濃度試料溶液 (U_H)、第 III の円筒又はせん孔には低濃度標準液 (S_L)、第 IV の円筒又はせん孔には低濃度試料溶液 (U_L) をそれぞれ円筒法による場合には 0.25 mL、せん孔法による場合には 0.1 mL ずつ分注する。



培 養 各寒天平板は、10~20 °C で 2 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

阻止円直径の測定 培養を終えた寒天平板をふ卵器から取り出し、阻止円直径をそれぞれ 0.25 mm 以下まで正確に測定し、結果を次の様式の表に記入する。

(単位：mm)

番号	I	III	II	IV
寒天平板 内容	高濃度標準液 (S _H)	低濃度標準液 (S _L)	高濃度試料溶液 (U _H)	低濃度試料溶液 (U _L)
1				
2				
3				
4				
5				
計	Σ S _H	Σ S _L	Σ U _H	Σ U _L

計算 標準液の濃度 (μg(力価)又は単位/mL) に対する試料溶液中の抗生物質の濃度 (μg(力価)又は単位/mL) の比 (θ) を(1)式により求めた後、試料中の抗生物質の濃度 (g(力価)又は単位/kg (g(力価)又は単位/トン)) を(2)式により求める。

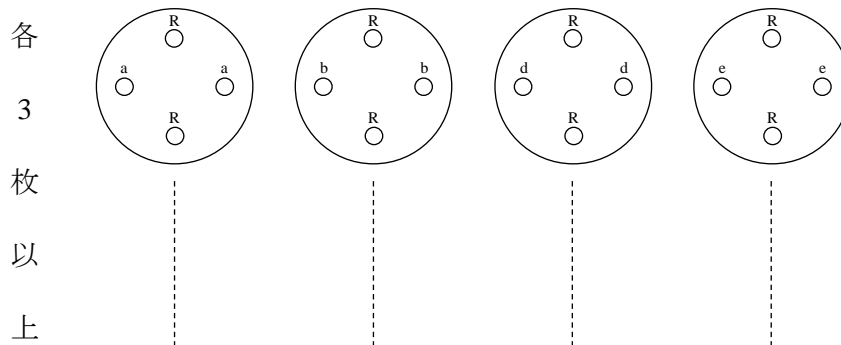
$$\log \theta = \frac{(\sum U_H + \sum U_L) - (\sum S_H + \sum S_L)}{(\sum U_H + \sum S_H) - (\sum U_L + \sum S_L)} \times \log X \dots (1)$$

X : 低濃度標準液の濃度に対する高濃度標準液の濃度の比

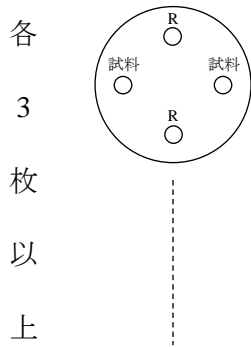
試料中の抗生物質の濃度 = θ × 試料中の抗生物質の推定濃度 … (2)

2) 標準曲線法

標準液の分注 各標準液について寒天平板 3 枚以上をとり、標準液の濃度を高濃度から順に a、b、c、d、e とした場合、c を参照標準液 (RP) とし、図のように、各標準液を円筒法による場合には 0.25 mL、せん孔法による場合には 0.1 mL ずつ分注する。



試料溶液の分注 寒天平板 3 枚以上をとり、図のように、試料溶液及び参照標準液を円筒法の場合には 0.25 mL、せん孔法の場合には 0.1 mL ずつ分注する。



培 養 各寒天平板は、10~20 °C で 2 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

阻止円直径の測定 培養を終えた寒天平板をふ卵器から取り出し、阻止円直径をそれぞれ 0.25 mm 以下まで正確に測定し、結果を次の様式の表に記入する。

(単位：mm)

寒天平板 \ 内容	RP	a	RP	b	RP	d	RP	e	RP	試料
1										
1'										
2										
2'										
3										
3'										
⋮										
⋮										
阻止円直径の 平均値										
阻止円直径 の修正値										

計 算 参照標準液及び標準液を分注した 4 組の寒天平板について、各組ごとの参照標準液の阻止円直径の平均値及び標準液の阻止円直径の平均値並びに 4 組すべての参照標準液の阻止円直径の平均値 (C: 補正用平均値) を求める。

各組の参照標準液の阻止円直径の平均値が補正用平均値と相違する場合には、この差をその組の標準液の阻止円直径の平均値に加減して各標準液の阻止円直径の修正値を求める。

例えば、ある組の標準液の阻止円直径の平均値が 18.0 mm であって、その組の参照標準液の阻止円直径の平均値が 19.8 mm であり、補正用平均値が 20.0 mm であるとき、これを $18.0 + (20.0 - 19.8)$ mm と修正する。

次に、片対数方眼紙を用い、各標準液の濃度 (µg(力価)又は単位/mL) の対数を横軸に各標準液の阻止円直径の修正値を縦軸にとり、補正用平均値及び各標準

液の阻止円直径の修正値を記入し、これらの点の最も近くを通る直線を引き、標準曲線とする。

なお、補正用平均値及び各標準液の阻止円直径の修正値がほぼ直線上にある場合には、次式により得られる H 点及び L 点を片対数方眼紙上に印し、これを直線で結ぶことができる。

$$H = \frac{3A + 2B + C - E}{5} \qquad L = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

H : 標準液 a に対応する阻止円直径の計算値

L : 標準液 e に対応する阻止円直径の計算値

A, B, D, E : 各標準液 (a, b, d, e) の阻止円直径の修正値

更に、参照標準液及び試料溶液を分注した寒天平板について、参照標準液の阻止円直径の平均値及び試料溶液の阻止円直径の平均値を求める。

参照標準液の阻止円直径の平均値が標準曲線上の参照標準液の阻止円直径の修正値と相違する場合には、この差を試料溶液の阻止円直径の平均値に加減して試料溶液の阻止円直径の修正値を求める。

次に、この修正値に対する標準曲線上の点から試料溶液中の抗生物質の濃度 (μg (力価)又は単位/mL) (n) を求め、参照標準液の濃度 (μg (力価)又は単位/mL) に対する n の比 (θ) を求めた後、試料中の抗生物質の濃度 (g (力価)又は単位/kg (g (力価)又は単位/トン)) を次式により求める。

試料中の抗生物質の濃度 = $\theta \times$ 試料中の抗生物質の推定濃度

2 バイオオートグラフ法

A 試薬等の調製

- 1) 緩衝液 1 の A の 1)による。
- 2) 標準液 1 の A の 2)による。
- 3) 培地 1 の A の 3)による。
- 4) 菌液又は孢子液及び添加量 1 の A の 4)による。

B 試料溶液の調製

試料溶液は、第 2 節各条に規定するところにより速やかに調製する。

C 定 量

定量は、第 2 節各条に別段の規定のある場合を除き、次に掲げる方法により行う。

薄層クロマトグラフィー 薄層板の下端から 20 mm の位置を原線とし、左右両端から 25 mm 離し、標準液及び試料溶液各 20 μL ずつをマイクロシリンジでそれぞれ正確に原線上に 30 mm 間隔でスポットし、風乾する。

薄層板をあらかじめ展開溶媒の気体で 1 時間以上飽和した展開槽に入れ、20~25 $^{\circ}\text{C}$ で展開溶媒を上昇させる。展開溶媒の上達線が、第 2 節各条に規定する位置に達したとき、展開をやめ、薄層板を取り出し、室温で静置して展開溶媒を乾燥除去する。

寒天平板の調製 薄層板をそのガラス面を下にして培養箱 (縦 210 mm、横 210 mm、高さ約 15 mm のステンレス鋼製又は合成樹脂製のもの) に入れ、一度融かし

て 49~51 °C に保温した第 2 節各条に規定する培地を薄層板全面に均一にスプレーする。数分間静置した後、A の 4)により調製した菌液又は孢子液を培地 100 mL に加えて十分にかき混ぜ、一様に広がるように流し込み、水平に静置して固化させる。

培 養 培養箱は、10~20 °C で 3 時間静置した後、ふ卵器に収め、35~37 °C で 16~24 時間培養する。

同 定 培養を終えた培養箱をふ卵器から取り出し、第 2 節各条に規定する発色試薬を培地表面全面に注いで発色させ、標準液及び試料溶液の阻止円の Rf 値^{注 1}を測定し、同定する。

阻止円直径の測定 阻止円の長径 (a mm) 及び短径 (b mm) を 0.25 mm 以下まで正確に測定し、幾何学的平均値 (\sqrt{ab} mm) をもって阻止円直径とする。

計 算 標準液より得られた阻止円直径を方眼紙に目盛り、検量線を作成し、検量線から試料溶液の阻止円直径に相当する試料中の濃度を算出する。

注 1 Rf 値 = $\frac{\text{原線から阻止円中心までの距離}}{\text{原線から展開溶媒上達線までの距離}}$

(付 記)

以下、抗生物質の名称を次の略号で表わす場合がある。

亜鉛バシトラシン	: BC
アビラマイシン	: AVM
アボパルシン	: AV
アルキルトリメチルアンモニウムカルシウムオキシテトラサイクリン	: OTC
エフロトマイシン	: ET
塩酸オキシテトラサイクリン	: OTC
エンボン酸スピラマイシン	: SP
エンラマイシン	: ER
オリエンチシン	: OR
キタサマイシン	: KT
クロラムフェニコール	: CP
クロルテトラサイクリン	: CTC
ケベマイシンナトリウム	: QM
サリノマイシンナトリウム	: SL
セデカマイシン	: SCM
センデュラマイシンナトリウム	: SD
チオペプチン	: TP
デストマイシン A	: DM-A
ナラシン	: NR
ノシヘプタイド	: NH
ハイグロマイシン B	: HM-B
バージニアマイシン	: VM
ビコザマイシン	: BZM
フラボフォスフォリポール	: FV
ポリスチレンスルホン酸オレアンドマイシン	: OM
ポリナクチン	: PN
マカルボマイシン	: MC
マンガンバシトラシン	: BC
モネンシンナトリウム	: MN
ラサロシドナトリウム	: LS
硫酸カナマイシン	: KM
硫酸コリスチン	: CL
硫酸フラジオマイシン	: FM
リン酸タイロシン	: TS