

調査報告書

動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査

平成 26 年 3 月 31 日

一般財団法人生物科学安全研究所

調査の概要

動物用医薬品及び飼料に添加される抗菌性物質のヒト（健康者）から分離された腸内細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度（MIC）を測定し、 MIC_{calc} を算出し、抗菌性物質の微生物学的一日摂取許容量（ADI）を算定した。

ヒトを対象とする生物科学研究倫理規定に基づく審査において科学、倫理面から適切な研究実施を担保し、検体（糞便）の提供を受けた。対象菌として、*Escherichia coli*、*Enterococcus species*、*Bacteroides species*、*Fusobacterium species*、*Bifidobacterium species*、*Eubacterium species*、*Peptococcus/Peptostreptococcus species*、*Prevotella species*、*Lactobacillus species*、*Propionibacterium species*、*Clostridium species* をヒトの糞便から分離し、分子生物学的手法、生化学的手法を用い、菌属を同定した。*Peptococcus/Peptostreptococcus species* については本調査では分離されなかった。

分離した菌のゲンタマイシン、スペクチノマイシン、ネオマイシン、酢酸イソ吉草酸タイロシン、センデュラマイシンへの MIC を測定し、 MIC_{50} を算出し、これらの抗菌性物質の微生物学的 ADI を試算した。

1. 表題

動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査

2. 調査番号

13-090

3. 調査目的

動物用医薬品及び飼料添加物における抗菌性物質の食品影響評価において、微生物学的影響評価に用いるため、ヒト（健常者）臨床由来腸内細菌における動物用抗菌性物質のMIC (最小発育阻止濃度)について調査するものである。

4. 委託者

内閣府 食品安全委員会事務局 評価第二課

5. 調査機関名

一般財団法人生物科学安全研究所 事業統括部 試験研究グループ
神奈川県相模原市緑区橋本台 3-7-11
電話: 042-762-2775

6. 調査責任者

萬田 富治 理事長

7. 調査担当者

馬場光太郎 試験研究グループ
山崎裕子 試験研究グループ
中島隆二 試験研究グループ
野田篤 試験研究グループ長
濱岡隆文 事業統括部長

8. 調査スケジュール

8.1 人由来検体（糞便）採材

- (1) 当調査でヒト由来検体を扱うために生物科学研究倫理審査を行う倫理委員会の設立、採材スケジュールの調整 平成 25 年 10 月 23 日～平成 26 年 1 月 10 日
(2) 採材 平成 26 年 1 月 14 日～平成 26 年 3 月 14 日

8.2 通性嫌気性菌と偏性嫌気性菌（以下、嫌気性菌）の分離同定

- (1) 分離・同定準備とプロトコール確定 平成 25 年 10 月 23 日～平成 25 年 12 月 27 日
(2) 分離・同定実施 平成 26 年 1 月 14 日～平成 26 年 3 月 31 日

8.3 最小発育阻止濃度（MIC）の測定と微生物学的 ADI の試算

- (1) 抗菌性物質及び各種試薬・微量液体プレート等入手期間 平成 25 年 10 月 23 日～平成 26 年 3 月 12 日
(2) MIC 測定期間 平成 26 年 3 月 12 日～平成 26 年 3 月 31 日
(3) MIC₅₀ と微生物学的 ADI 算出期間 平成 26 年 3 月 17 日～平成 26 年 3 月 31 日

8.4 報告書作成期間

平成 26 年 3 月 17 日～平成 26 年 3 月 31 日

9. 調査内容

9.1 検体採集

一般財団法人生物科学安全研究所におけるヒトを対象とする生物科学研究倫理規定に基づく審査において科学、倫理面から適切な研究実施を担保した。平成 26 年 1 月 14 日から平成 26 年 3 月 14 日までに生物科学安全研究所の職員と麻布大学の教職員・学生に新鮮便の提供を依頼した。3 ヶ月間抗菌薬を服用していないことを確認するために文面で署名を求めた (付録 1)。提供された 111 検体を試験に供試した。

9.2 対象菌種の分離・同定

9.2.1 通性嫌気性菌

(1) *Escherichia coli*

DHL 寒天培地に糞便を直接塗抹し一晚培養した。釣菌・純培養した菌について、IMVIC テストを実施し、*Escherichia coli* の性状を示した菌を MIC 測定試験に供試した。

(2) *Enterococcus species*

1 白金耳分の糞便をエンテロココセル液体培地に接種し、一晚培養後にエンテロココセル寒天培地に塗抹し、3 日間培養した。寒天培地から釣菌・純培養した菌をラピッド ID32 ストレップ アピで同定した。

9.2.2 嫌気性菌

嫌気性菌の分離・同定で使用した液体・寒天培地等は、使用前にできるかぎり 1 晩以上嫌気状態に置いた。

(1) *Bacteroides species*、*Fusobacterium species*、*Bifidobacterium species*、*Eubacterium species*、*Peptococcus/Peptostreptococcus species*、*Prevotella species*、*Lactobacillus species*、*Propionibacterium species*

糞便 0.5 g を PBS4.5mL に入れ均質になるまでよく攪拌し、順次 10 倍段階希釈し、その 0.1 mL を寒天平板培地上に滴下し、コンラージ棒で塗抹した。寒天平板培地は選択培地と非選択培地を併用し、各培地について出現集落数 5~200 個の希釈系列を検討した。非選択培地については 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、選択培地は 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} の希釈倍率で上記の集落数が確認できた。使用した培地は以下のとおりである。

5%馬血液加 BL 寒天培地: 非選択培地、全ての嫌気性菌用 (出現集落に特徴がでる)

BBE 寒天培地: *Bacteroides* 属への選択培地

PEA 加ブルセラ HK 寒天培地 (ウサギ血液加) : *Peptococcus/Peptostreptococcus*
Propionibacterium species への選択培地

PV 加ブルセラ HK 寒天培地 (ウサギ血液加、*Prevotella*、*Fusobacterium species* への選択培地

MRS 寒天培地 (BD): *Lactobacillus species* への選択培地

検体を各寒天平板培地上に塗抹後、培地と嫌気ガスパック（三菱ガス化学）を角型ジャーに入れ、37°C 2～3日培養した。

分離株をグラム染色し、形態を確認し、記録した。遺伝子解析による同定手順は以下のとおりである。DNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen）を用い分離株のDNAを抽出した。Bacterial 16S rDNA PCR Kit（タカラ）を用い、16S rRNAをコードするDNAをそのキットで増幅し、PCR産物をユーロフィンオペロン（東京）にDNAシーケンス解析を依頼した。塩基配列500～800 bpを以下のweb上でBLASTし、同定した。

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes)

BLASTの結果、ID 98%以上の菌について「疑いなくその菌属に分類される」とし、追加の同定試験を実施しなかった。ID93%以上の菌株については腸内細菌の世界（光岡知足）を参考としグラム染色と培地上の菌のコロニー性状を確認した。*Fusobacterium species* には api 嫌気、*Lactobacillus species* については BD クリスタルと api 嫌気、*Eubacterium species* についてはアピケンキと菌種を同定する PCR 法（Kageyama et al., 1999, Kageyama and Benno 2001）を行い、BLAST の ID の結果と併用し、その結果を参考とし菌属を決定した。PCR 法でバンドが確認できなかった *Eubacterium* 属の菌株にはアピケンキを補助的に用いて菌属を同定した。

(2) *Clostridium species*

糞便 1g を 99.5%エタノール 1mL に加えよく攪拌後、1時間室温で放置した。その攪拌物 0.1 mL を 5%馬血液加 BL 寒天培地と CW 寒天培地に滴下し、コンラージで塗抹した。アルコール処理後の上清を 4800 × g で 10 分間遠心し、上清を捨て、沈殿物を変法 GAM ブイヨン 5 mL と混合し 37°C の嫌気状態で 1 週間増菌培養した。培養後の液体培地と 99.5%エタノール 5 mL を混合し、室温で 1 時間放置した。4800 × g で 10 分間遠心し、上清を捨て、0.1mL の滅菌蒸留水を加え、全量を 5%馬血液加 BL 寒天培地と CW 寒天培地に塗抹し、37°C で 2～3 日間培養した。分離株にグラム染色を行い、すべてのグラム陽性桿菌から DNeasy Blood & Tissue Kit を用い DNA を抽出し、(1)の嫌気性菌と同じ手法で同定した。

ID 98%以上の菌は *Clostridium spp* として同定した。ID95%～97%の菌は BLAST の結果の上位 10 位が *Clostridium* 属で、アピケンキの結果が *Clostridium* 属だった場合は *Clostridium spp* と同定した。

9.3 MIC 測定

栄研化学（栃木）に表 1 の薬剤の微量液体フローズンプレートの作成を依頼した。試験実施まで、-80°C の冷凍庫で保存した。

表 1 MIC 測定用抗菌性物質

系統	物質名	英名
アミノグリコシド系	ゲンタマイシン	Gentamicin (GM)
	スペクチノマイシン	Spectinomycin (SPE)
	ネオマイシン	Neomycin (NEO)
ポリエーテル系	センデュラマイシン	Semduramicin (SEM)
マクロライド系	酢酸イソ吉草酸タイロシン	Acetylisovaleryltylosin(ACE)

9.3.1 微量液体希釈法

微量液体フローズンプレートの希釈倍率を表 2 に記載する。

表 2 微量液体フローズンプレートの希釈倍率

抗菌性物質名		希釈濃度範囲 (µg/mL)
通性嫌気性菌 用プレート	ゲンタマイシン	0.06-128
	スペクチノマイシン	0.06-128
	ネオマイシン	0.06-128
	センデュラマイシン	0.06-32
	酢酸イソ吉草酸タイロシン	0.06-32
嫌気性菌用 プレート	ゲンタマイシン	0.06-128
	スペクチノマイシン	0.06-32
	ネオマイシン	0.06-128
	センデュラマイシン	0.06-8
	酢酸イソ吉草酸タイロシン	0.06-32

(1) 通性嫌気性菌

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First informational Supplement (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2011)に記載されている方法に準拠し、ガイドラインから逸脱した点はなかった。*Staphylococcus aureus* ATCC29213、*Enterococcus faecalis* ATCC29212、*Escherichia coli* ATCC25922、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を MIC 測定の精度管理株として使用した。CLSI (2011) にはゲンタマイシンの MIC 値範囲は規定されているが、本事業で使用した他の薬剤については規定されていない。

新鮮培養菌体を滅菌生理食塩水 1mL に McFarland 1 の濁度で浮遊した。さらに滅菌生理食塩水 9mL に混合し、菌液トレイに流し込み、96 ピンの接種器を用いてフローズプレートに接種した。最終接種菌量は 5×10^4 CFU/spot とした。培養条件は表 3 に記載する。

(2)嫌気性菌

Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard Eighth Edition (CLSI 2012)に記載されている方法に準拠し、ガイドラインから逸脱した点はなかった。精度管理株として *Bacteroides fragilis* ATCC 25285、*Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC29741、*Eubacterium (Egerthella) lentum* ATCC43055 を使用して MIC を測定した。

新鮮培養菌体を ABCM ブイヨン 1 mL に McFarland 2 の濁度に調整し浮遊した。さらに滅菌生理食塩水 9 mL に混合し 10 倍希釈した。菌液調整後できるだけ早く、菌液 10 mL を菌液トレイに流し込み、96 ピンの接種器にてプレートに接種した。最終接種菌量は 1×10^5 CFU / spot とした。培養条件は表 3 に記載する。

表3 各菌種の微量液体法での MIC 測定条件

対象菌種	使用培地	培養条件	温度、時間
通性嫌気性菌	<i>Escherichia coli</i>	Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ 添加	好気 36°C 20 時間
	<i>Enterococcus species</i>	ミューラヒン トンプロス	
嫌気性菌	<i>Bacteroides species</i>	ヘミン ビタミン K ₁ 添加 5%馬血液加 ブルセラ ブロス	嫌気 36°C 42-48 時間
	<i>Fusobacterium species</i>		
	<i>Bifidobacterium species</i>		
	<i>Eubacterium species</i> (<i>Eggerthera</i> を含む)		
	<i>Clostridium species</i>		
	<i>Prevotella species</i>		
	<i>Lactobacillus species</i>		
	<i>Propionibacterium species</i>		

(3) MIC 判定

菌の発育が認められない最小の抗菌性物質濃度を MIC とした。判定基準は「肉眼的に混濁又は直径 1mm 以上の沈殿が認められた場合」と「沈殿物の直径が 1mm 未満であっても沈殿塊が 2 個以上認められた場合」は発育しているものとした。

9.3.2 寒天平板希釈法

微量液体フローズンプレートで溶解不良のため 128 µg/mL の濃度まで MIC を測定できず MIC₅₀ が算定されなかった大腸菌の酢酸イソ吉草酸タイロシン、同じく大腸菌、*Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Prevotella*、*Lactobacillus* のセンデュラマイシンの MIC 測定を寒天平板希釈法で実施した。酢酸イソ吉草酸タイロシンは少量の 95%エタノールで溶解した後、滅菌蒸留水で溶解した。センデュラマイシンは少量のメタノールで溶解後、滅菌蒸留水で溶解した。

(1) 通性嫌気性菌

CLSI (2011) に記載されている方法（培地作成、培養、接種方法、判定）に沿って実施した。希釈列は 0.6~128 µg/mL の希釈列で 2 段階に希釈した。各抗菌性物質の希釈列 2 mL ずつを滅菌シャーレーに分注し、ミューラヒントン寒天培地 18 mL と混和した。新鮮培養株を McFarland 0.5 の濁度になるように滅菌生理食塩水に懸濁し、それを 27 ピンの接種器を用い自動のミクロ

プランターで寒天培地に接種した。抗菌性物質不含用培地を作成し、発育コントロールとした。菌液を測定培地に 2 μ L 接種した。接種菌量は 5×10^5 CFU/spot とした。

培養条件は表 4 に記載する。

(2) 嫌気性菌

CLSI (2012)の方法に準拠し、ガイドラインから逸脱した点はなかった。希釈列は 0.6~128 μ g/mL の希釈列で 2 段階に希釈した。各抗菌性物質の希釈列 2 mL ずつを滅菌シャーレーに分注し、5%LSB 加ブルセラ寒天培地 18 mL と混和した。新鮮培養株を McFarland 0.5 の濁度になるように滅菌生理食塩水に懸濁し、(1) 通性嫌気性菌と同様に寒天培地に接種した。抗菌性物質不含用培地を作成し、発育コントロールとした。菌液を測定培地に 2 μ L 接種した。接種菌量は 5×10^5 CFU/spot とした。培養条件は表 4 に記載する。

表 4 各菌種の寒天平板希釈法での MIC 測定条件

対象菌種		使用培地	培養条件	温度、時間
通性嫌気性菌	<i>Escherichia coli</i>	ミューラヒントン 寒天培地	好気	36°C 20 時間
嫌気性菌	<i>Bacteroides species</i> <i>Bifidobacterium species</i> <i>Prevotella species</i> <i>Lactobacillus species</i>	5%LSB 加 ブルセラ 寒天培地*	嫌気	36°C 42-48 時間

*ブルセラ寒天培地に 5 μ g/mL のヘミン、1 μ g/mL のビタミン K₁ と 5%羊溶血液を加えた。

9.4 MIC₅₀、MIC_{calc} の算出

Guidance for Industry, Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: General Approach to Establish a Microbiological ADI (VICH GL36, 2013) に記載されている算出方法に準拠し、MIC₅₀、MIC_{calc} を算出した。

9.5.1 MIC₅₀ と Lower 90% Confidence Limit の計算

各対象菌種に対する各抗菌性物質の MIC 値より MIC₅₀ を算出した。物質ごとに Lower 90% Confidence Limit (Lower 90% CL) を計算した。

$$\text{Lower 90\% CL} = \text{Mean MIC}_{50} - \frac{\text{Std Dev}}{\sqrt{n}} \times t_{0.10 \text{ df}}$$

Mean MIC₅₀: Log₂(各対象菌種に対する MIC₅₀) – Log₂(minimum MIC₅₀ / 2)の平均
 Std Dev: Log₂(各菌種に対する MIC₅₀) – Log₂(minimum MIC₅₀ / 2)の標準偏差
 t_{0.10}: t 分布 片側検定
 df: 自由度 = n-1

9.5.2 MIC_{calc} の計算

抗菌性物質毎に MIC_{calc} を計算した。

$$\text{MIC}_{\text{calc}} = 2^{(\text{Lower } 90\% \text{ CL} + \text{Log}_2(\text{minimum MIC}_{50}/2))}$$

MIC_{calc} を計算する際、小数点以下第四位以降は四捨五入し、10⁻³まで表示した。

MIC₅₀ が >128 µg/mL もしくは 128 µg/mL は R とし、計算対象外とした。MIC₅₀ が 0.06 µg/mL 以下のものは 0.03125 µg/mL として計算した。

9.5.3 微生物学的 ADI 試算

VICH GL36 (2013)を参照し、記載されている方法に準拠し、微生物学的 ADI を算出した。

微生物学的 ADI =

$$\text{MIC}_{\text{calc}}(\mu\text{g/mL}) \times \text{1日の糞便塊 (220g)}^{\text{a}}$$

(µg/kg 体重/日)

$$\frac{\text{経口用量として} \times \text{ヒトの体重}^{\text{c}} (60\text{kg})}{\text{生物学的に利用可能な比率}(x)^{\text{b}}}$$

^a ヒトの1日の糞便重量を 220g とした。

^b X は微生物暴露分画を 10%と仮定した場合は 0.1、50%と仮定した場合は 0.5、50%と仮定した場合は 0.5%、80%と仮定した場合は 0.8 を用いた。

^c ヒトの体重は 60kg とした。

微生物学的 ADI は小数点以下第3位まで求めた後、四捨五入し、小数点以下第2位表示とした。

9.6 報告書の構成

9.6.1 調査報告書

(1) 検査方法

採材、菌の分離・同定方法と MIC 測定方法、測定条件を記載した。

(2) 分離株

分離株について分離数を菌属ごとに同定基準を含めまとめた。

(3) MIC₅₀

MIC₅₀をまとめた表を作成した。

9.6.2 付録

検体提出の際の同意書と MIC 測定の際の精度管理株の MIC 値を記載した表を別添した。

各抗菌剤の MIC_{calc} と ADI についても、付録として別添した (付録 1～付録 25)。

*調査報告書と付録は同一媒体に保存した。

10. 調査結果

10.1 対象菌株の分離同定

- (1) 通性嫌気性の *Escherichia coli* と *Enterococcus species* を生化学的同定で各 30 株収集した。
- (2) *Bacteroides* spp、*Bifidobacterium* spp、*Propionibacterium* spp: 分離された全ての株の BLAST の結果は ID98%以上だった。上記 3 菌属の菌を spp と同定した。
- (3) *Eubacterium* spp
6 株は BLAST の ID が 98%以上だった。97%以下の菌の内 2 株は PCR 法で *Eubacterium species* と確認された。他の 2 株は PCR 法で *Eubacterium species* として確認できなかったが、api 嫌気とグラム染色で *Eubacterium* 属であることが確認され、*Eubacterium* spp と同定した。
- (4) *Lactobacillus* spp
12 株の BLAST の ID は 98%以上だった。ID93%~97%の菌は生化学的同定、BD クリスタルと api 嫌気で *Lactobacillus* 属と同定された菌を *Lactobacillus* spp と同定した。
- (5) *Fusobacterium* spp
2 株の BLAST の ID は 98%だった。他の株についてはアピケンキで *Fusobacterium* 属と同定された菌を *Fusobacterium* 属とした。
- (6) *Prevotella* spp
BLAST の ID の結果が 90%以上かつ上位 8 位以上が *Prevotella* 属の株を api 嫌気テストに供試した。その結果が *Prevotella* 属だったものを *Prevotella* spp と同定した。
- (7) *Peptococcus species/Peptostreptococcus species*
分離されなかった。
- (8) *Clostridium species*
20 株は BLAST の ID 結果が 98%以上だった。BLAST の ID が 95%~97%の 10 株について上位 8 位以上が *Clostridium* 属で、アピケンキで *clostridium* 属だった菌を *Clostridium* spp と同定した。

対象菌種の分離株数を表 5 に記載する。

10.2 MIC₅₀ の測定結果

MIC₅₀ の結果を表 6 に記載する。

10.3 CLSI で規定されている ATCC 株の MIC 値

本調査で使用した薬剤への MIC 値を記載した表を付録 2~4 に別添する。通性嫌気性菌のゲンタマイシンの精度管理株の MIC 値は CLSI で規定されている値だった。

10.4 分離された菌の各薬剤への MIC

分離された菌の各薬剤への MIC 値をまとめた表を付録 5~14 に別添する。

10.5 各薬剤への MIC 値分布表

薬剤ごとの MIC 値分布表を付録 15～19 に別添する。

10.6 MIC_{calc} の算定結果

各薬剤の MIC_{calc} の計算式と結果を付録 20～24 に記載する。

10.7 微生物学的 ADI の算出結果

各薬剤の微生物学的 ADI の算出結果を付録 25 に記載する。

表 5 対象菌種の収集株数

対象菌種		収集株数
通性嫌気性菌	<i>Escherichia coli</i>	30
	<i>Enterococcus</i> species	30
嫌気性菌	<i>Bacteroides</i> species	30
	<i>Fusobacterium</i> species	12
	<i>Eubacterium</i> species (<i>Eggerthera</i> を含む)	10
	<i>Clostridium</i> species	30
	<i>Bifidobacterium</i> species	30
	<i>Prevotella</i> species	20
	<i>Lactobacillus</i> species	30
	<i>Propionibacterium</i> species	15
<i>Peptococcus</i> species/ <i>Peptostreptococcus</i> species	0	
計		237

表 6 各菌種に対する抗菌性物質の MIC₅₀ 値

抗菌剤名	MIC ₅₀ (μg/mL)									
	通性嫌気性菌		嫌気性菌							
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
ゲンタマイシン	1	16	>128	8	16	2	>128	8	8	2
スペクチノマイシン	32	128	>128	8	16	32	>128	64	8	32
ネオマイシン	4	128	>128	16	16	32	>128	64	16	8
酢酸イソ吉草酸タイロシン	>128*	4	1	≤0.06	0.25	0.12	0.5	≤0.06	0.25	0.25
センデュラマイシン	>128*	16	>128*	8*	4	4	8	128	8	8*

*寒天平板法で測定した値

11. 参考文献

- (1) A Kageyama, Y Benno, and T Nakase. Phylogenetic evidence for the transfer of *Eubacterium lentum* to the genus *Eggerthella* as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology (1999), 49, 1725-1732.
- (2) A Kageyama and Y Benno. Rapid Detection of Human Fecal *Eubacterium* Species and Related Genera by Nested PCR Method (2001), 45, 315-318.
- (3) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First informational Supplement (CLSI 2011)
- (4) Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard Eighth Edition (CLSI 2012)
- (5) 光岡 知足 腸内細菌の世界 嫌気性菌の分離と同定 叢文社、(1980)
- (6) Guidance for Industry, Studies to Evaluate the Safety of Residues of Veterinary Drugs in Human Food: General Approach to Establish a Microbiological ADI (VICH GL36, 2013)

12. 謝辞

調査を実施するにあたり、技術的指導をいただいた 理化学研究所 イノベーション推進センター 辨野義己先生、麻布大学の検体採取に関わる倫理委員会の審査申請に助力を尽くして下さった獣医学部 加藤行男先生、研究推進・支援本部 学術支援課 根本拓也氏、検体を提供していただいた麻布大学の獣医学部、生命・環境学部の学生・教職員の皆様、試験の円滑な実施に協力をいただいたエコアニマルヘルスジャパン 石垣克至氏、農林水産消費安全技術センター 肥飼料検査部 飼料管理課 高木昌美氏、渡邊千晴氏に深く感謝します。

(付録1)

一般財団法人生物科学安全研究所における
ヒトを対象とする生物科学研究への参加同意書

1 研究内容の説明

① 目的と背景

食の安全を守るために実施される動物用抗菌性物質の微生物学的影響評価の基礎資料作成のため、ヒト（健康者）由来腸内細菌の動物用抗菌性物質のMIC（最小発育阻止濃度）について調査する。

② 研究に参加することに伴うリスク

便の提供のみであるため、リスクはないと考えます。

③ 研究に参加することに伴う利益

動物用抗菌性物質の食品健康影響評価に係る社会への貢献は大きいと考えます。

④ 研究成果の公表

試験の委託者である内閣府食品安全委員会へ報告書を提出します。

⑤ 人体から採取された試料の利用

便から分離された腸内細菌を利用します。

⑥ 試料等の保管等

分離された腸内細菌株は一定期間保管されます。ただし、委託者である内閣府食品安全委員会からの指示により、菌株の廃棄又は他の研究機関へ提供されることがあります。また、この研究のために集められた菌株やデータは、将来別の調査・研究に再度利用される場合もあります。ただし、その際も菌株やデータに個人の特定できる情報を含むことはありません。

2 意思決定の自由

この研究への協力の同意は自由意思でお決め下さい。同意しなくても不利益を被ることは一切ありません。また、本研究に参加を同意した後でも不利益を受けることなく、いつでも同意を取り消すことができます。

3 試料の提供者の要件（現在、健康な状態であり、直近の3ヶ月間抗菌性物質を飲んでいないこと）を確認するため、以下にお答えください。

- ・ 性別（男・女）

- ・ 年齢（20歳未満・20から30歳代・40から50歳代・60歳以上）
- ・ 直近の3ヶ月、入院しましたか？ はい ・ いいえ
- ・ 直近の3ヶ月 病院に行きましたか？ はい ・ いいえ
- ・ 入院・通院の時点で薬の服用又は注射を受けましたか？
はい ・ いいえ

「はい」の場合は、薬品名がわかればその薬品名をお書きください

薬品名 _____

- ・ 抗菌性剤（抗生物質）の服用又は注射を受けましたか。
はい ・ いいえ

「はい」の場合は、抗菌性剤（抗生物質）名がわかればその薬品名をお書きください

薬品名 _____

私は、研究計画名「動物用抗菌性物質の微生物学的影響についての調査」の研究について、研究目的、研究内容、研究方法、期待される成果及びその結果を内閣府食品安全委員会に報告することなどについて説明を受け、よく理解しました。また、上記の質問に対する回答に偽りはありません。

よって、本書への署名、捺印をもって当研究の対象者として協力することに同意いたします。

一般財団法人生物科学安全研究所
理事長 殿

平成 年 月 日(必須)

住所(自由)〒

氏名(必須)：

印

(電話番号(自由)：

(付録2) CLSIで規定された精度管理株 (通性嫌気性菌) のMIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)

微量液体法

抗菌剤^a

	GM	GM 精度 管理範囲	ACE	SPE	SEM	NEO
1 回目						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	0.5	(0.12-1) ^b	2	64	16	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	0.25	(0.25-1) ^b	>32	8	>32	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	4	(4-16) ^b	1	64	16	64
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	0.5	(0.5-2) ^b	>32	128	>32	32
2 回目						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	1	(0.12-1) ^b	4	64	32	2
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	1	(0.25-1) ^b	>32	16	>32	2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	16	(4-16) ^b	2	128	32	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	- ^c	(0.5-2) ^b	-	-	-	-

寒天平板希釈法

抗菌剤^a

	ACE	SEM
1 回目		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	2	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	1	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>128	>128
2 回目		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	2	32
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	1	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>128	>128

^aGM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

^bCLSI (2011)にて規定された値

^c未実施

(付録 3) CLSI で規定された精度管理株 (嫌気性菌) の本調査の微量液体希釈法で使用した薬剤への MIC 値 (参考値、 $\mu\text{g/mL}$)

微量液体法					
抗菌剤 ^a					
	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	1	≤ 0.06	32	2	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	1	>128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	4	>128	>8	>128
2 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	4	0.12	64	2	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	1	>128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	4	>128	>8	>128
3 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	4	0.12	32	4	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	0.5	128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	4	>128	>8	>128
4 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	4	0.12	32	1	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	0.5	>128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	4	>128	>8	>128
5 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	4	0.12	64	4	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	0.5	>128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	2	>128	>8	>128
6 回目					
<i>Eggerthella lentum</i> ATCC 43055	4	≤ 0.06	32	4	32
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	1	>128	>8	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	2	>128	>8	>128

^aGM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録4) CLSIで規定された精度管理株（嫌気性菌）の本調査の寒天平板希釈法で
使用したセンデュラマイシンへのMIC値（参考値）

寒天平板希釈法	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目
<i>Eggerthella</i> ATCC 43055	4	2	2	2	2
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC25285	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC29741	>128	>128	>128	>128	>128

(付録5) 分離された*Escherichia coli*の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO	ACE 寒天平板	SEM 寒天平板
1	大 1	1	>32	32	>32	4	>128	>128
2	大 2	0.5	>32	16	>32	2	>128	>128
3	大 3	1	>32	32	>32	4	>128	>128
4	大 4	1	>32	32	>32	8	>128	>128
5	大 5	1	>32	16	>32	8	>128	>128
6	大 6	0.5	>32	16	>32	2	>128	>128
7	大 7	1	>32	32	>32	4	>128	>128
8	大 8	64	>32	32	>32	4	>128	>128
9	大 9	1	>32	16	>32	4	>128	>128
10	大 10	1	>32	32	>32	4	>128	>128
11	大 11	2	>32	32	>32	2	>128	>128
12	大 12	1	>32	32	>32	4	>128	>128
13	大 13	2	>32	32	>32	4	>128	>128
14	大 14	1	>32	>128	>32	4	>128	>128
15	大 15	0.5	>32	32	>32	4	>128	>128
16	大 17	0.5	>32	16	>32	4	>128	>128
17	大 18	0.5	>32	32	>32	2	>128	>128
18	大 19	1	>32	64	>32	4	>128	>128
19	大 24	1	>32	64	>32	4	>128	>128
20	大 25	1	>32	32	>32	4	>128	>128
21	大 26	0.5	>32	16	>32	4	>128	>128
22	大 30	1	>32	16	>32	4	>128	>128
23	大 31	0.5	>32	16	>32	4	>128	>128
24	大 32	1	>32	16	>32	>128	>128	>128
25	大 35	2	>32	32	>32	4	>128	>128
26	大 36	1	>32	64	>32	4	>128	>128
27	大 37	128	>32	64	>32	4	>128	>128
28	大 38	1	>32	32	>32	4	>128	>128
29	大 39	1	>32	32	>32	4	>128	>128
30	大 40	1	>32	16	>32	4	>128	>128

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクトリノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録6) 分離された*Enterococcus*の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1	エン1	8	32	64	32	64
2	エン2	1	4	128	16	4
3	エン3	8	8	32	32	8
4	エン4	16	2	128	32	>128
5	エン6	16	4	128	32	>128
6	エン7	16	2	128	16	>128
7	エン9	8	2	128	8	64
8	エン15	8	16	64	32	64
9	エン23	16	4	128	32	>128
10	エン25	16	>32	>128	32	128
11	エン27	16	2	128	16	>128
12	エン30	16	>32	128	32	>128
13	エン32	32	2	128	16	>128
14	エン33	16	2	128	32	64
15	エン36	4	2	64	32	16
16	エン37	4	2	>128	16	64
17	エン41	8	4	128	32	64
18	エン59	8	2	128	16	64
19	エン62	16	2	128	16	>128
20	エン64	8	4	64	16	64
21	エン66	16	4	128	16	>128
22	エン67	16	2	128	32	128
23	エン70	16	2	128	16	>128
24	エン72	16	2	128	16	128
25	エン78	16	4	128	16	128
26	エン79	16	4	128	32	>128
27	エン81	16	>32	128	16	>128
28	エン82	8	4	128	16	64
29	エン86	16	4	128	16	>128
30	エン87	16	2	128	16	>128

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録7) 分離された*Bacteroides*属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO	SEM (寒天平板)
1	1-2	>128	1	>128	>8	>128	>128
2	3-5	>128	1	>128	>8	128	>128
3	87-5	>128	0.12	>128	>8	>128	>128
4	5-7	>128	0.5	16	>8	128	>128
5	8-4	>128	0.5	>128	>8	>128	>128
6	9-4	>128	2	>128	>8	>128	>128
7	10-1	>128	0.5	>128	>8	>128	>128
8	11-1	>128	2	>128	>8	>128	>128
9	12-3	>128	0.25	128	>8	>128	>128
10	13-3	>128	0.25	>128	>8	>128	>128
11	14-2	>128	0.5	16	>8	>128	>128
12	15-6	>128	8	>128	>8	>128	>128
13	90-9	>128	2	>128	>8	>128	>128
14	19-9	>128	2	>128	>8	>128	>128
15	21-5	>128	8	>128	>8	>128	>128
16	22-3	>128	1	128	>8	>128	128
17	26-9	>128	2	>128	>8	>128	>128
18	27-1	>128	0.25	>128	>8	>128	>128
19	28-6	>128	4	>128	>8	>128	128
20	29-11	>128	2	>128	>8	>128	>128
21	31-4	>128	2	>128	>8	>128	>128
22	91-1	>128	0.5	>128	>8	>128	>128
23	37-13	>128	0.25	>128	>8	>128	>128
24	46-1	>128	2	>128	>8	>128	>128
25	48-7	>128	1	>128	>8	>128	>128
26	50-3	>128	0.25	>128	>8	>128	>128
27	52-2	>128	8	>128	>8	>128	>128
28	57-2	>128	1	16	>8	>128	>128
29	71-2	>128	0.5	>128	>8	>128	>128
30	72-4	>128	0.25	>128	>8	>128	>128

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録8) 分離された*Lactobacillus*属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO	SEM (寒天平板)
1	21-3	1	0.12	32	>8	16	8
2	36-4	1	0.25	32	>8	2	8
3	37-4	16	1	128	2	32	4
4	43-8	0.5	0.5	64	4	2	8
5	50-6	2	0.25	32	>8	8	8
6	55-5	1	0.25	32	>8	2	8
7	56-3	16	1	128	2	64	8
8	58-3	2	0.25	32	>8	8	4
9	61-2	16	1	128	2	32	8
10	64-1	2	0.25	32	>8	4	8
11	66-1	1	0.25	32	>8	8	8
12	67-3	1	0.25	64	>8	4	8
13	68-3	1	0.25	32	>8	2	8
14	72-2	1	0.25	32	>8	1	8
15	79-3	1	0.12	32	>8	8	8
16	82-4	0.5	0.25	32	>8	4	8
17	85-3	2	0.25	16	>8	16	8
18	83-3	16	1	128	1	32	4
19	88-2	2	0.25	64	>8	1	8
20	89-7	0.5	0.25	128	>8	32	8
21	95-6	1	0.25	16	8	4	4
22	96-6	2	0.25	16	4	4	4
23	98-1	1	0.5	64	>8	4	8
24	100-2	2	0.25	16	8	4	4
25	101-2	16	1	128	8	32	4
26	103-4	32	1	>128	>8	64	8
27	108-3	1	0.25	16	8	4	4
28	109-2	16	0.5	>128	>8	32	8
29	110-4	16	1	128	2	32	4
30	111-4	16	≤ 0.06	128	>8	64	16

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録9) 分離された*Clostridium*属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1	4-I	64	0.5	>128	8	>128
2	5-I	64	0.5	>128	8	>128
3	7-II	>128	0.5	>128	8	>128
4	11-I	>128	0.5	>128	8	>128
5	16B	>128	1	>128	8	>128
6	21-B	>128	2	>128	8	>128
7	24-I	16	0.25	>128	2	128
8	26A	>128	1	>128	8	>128
9	28III	64	2	128	>8	>128
10	39-I	64	0.5	>128	8	>128
11	47A	>128	4	>128	8	>128
12	42C	>128	1	>128	8	>128
13	51B	>128	1	>128	>8	>128
14	54C	>128	0.5	>128	>8	>128
15	58A	>128	0.5	128	8	>128
16	59C	>128	0.5	>128	>8	>128
17	60A	>128	0.5	>128	>8	>128
18	65D	>128	0.5	>128	>8	>128
19	66B	>128	0.5	>128	>8	>128
20	67A	128	1	128	8	>128
21	69I	>128	1	>128	>8	>128
22	71I	>128	0.25	64	4	8
23	75B	64	0.5	32	>8	>128
24	76I	>128	4	>128	8	>128
25	81B	>128	0.5	>128	>8	>128
26	82A	32	1	64	>8	>128
27	86A	32	0.5	>128	8	128
28	89B	32	0.5	16	>8	>128
29	91B	>128	2	>128	>8	>128
30	92A	2	0.25	128	4	32

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録10) 分離された*Bifidobacterium*属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO	SEM (寒天平板)
1	74-4	≤ 0.06	≤ 0.06	32	2	≤ 0.06	2
2	3-4	16	≤ 0.06	8	>8	64	8
3	5-2	4	≤ 0.06	4	>8	32	4
4	89-4	8	≤ 0.06	64	8	8	16
5	16-1	4	≤ 0.06	≤ 0.06	4	32	4
6	17-1	32	≤ 0.06	4	>8	4	8
7	19-2	8	0.12	4	>8	32	16
8	20-1	0.25	≤ 0.06	0.12	>8	16	16
9	21-7	4	≤ 0.06	16	>8	4	16
10	94-2-1	16	≤ 0.06	32	>8	32	32
11	95-2	16	≤ 0.06	32	>8	8	8
12	26-1	2	≤ 0.06	32	4	16	8
13	27-3	4	≤ 0.06	32	8	0.5	8
14	28-1	4	≤ 0.06	0.5	4	0.25	8
15	29-1	8	≤ 0.06	16	>8	16	8
16	96-5	16	≤ 0.06	32	8	16	8
17	31-7	4	≤ 0.06	2	>8	64	4
18	32-2	16	≤ 0.06	8	>8	32	16
19	37-2	8	≤ 0.06	2	8	16	16
20	38-6	8	≤ 0.06	16	>8	8	16
21	44-19	2	0.12	1	>8	8	16
22	46-14	8	≤ 0.06	4	>8	8	16
23	47-1	8	≤ 0.06	4	>8	32	16
24	48-3	0.5	≤ 0.06	8	>8	1	16
25	97-1	0.5	≤ 0.06	16	>8	8	16
26	52-1	8	≤ 0.06	2	8	32	8
27	54-3	4	≤ 0.06	32	>8	1	32
28	98-2	8	0.12	32	>8	4	8
29	59-1	8	≤ 0.06	16	>8	64	8
30	104-8	8	≤ 0.06	32	>8	16	8

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録11) 分離された*Prevotella*属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO	SEM (寒天平板)
1	1-10	>128	≤ 0.06	32	8	64	16
2	2-2	2	≤ 0.06	64	>8	32	128
3	9-7	2	≤ 0.06	64	>8	64	128
4	4-1	64	≤ 0.06	>128	>8	32	64
5	24-3	128	≤ 0.06	128	>8	128	128
6	54-11	>128	≤ 0.06	128	>8	>128	128
7	57-4	8	≤ 0.06	64	>8	64	128
8	60-3	32	0.12	128	>8	128	128
9	73-5	16	0.12	128	>8	64	128
10	77-3	32	0.12	128	>8	128	128
11	83-2	16	≤ 0.06	64	>8	>128	128
12	96-1	0.5	≤ 0.06	64	>8	64	128
13	101-3	0.5	≤ 0.06	0.5	>8	4	128
14	102-2	8	≤ 0.06	64	>8	128	128
15	104-7	0.12	≤ 0.06	64	>8	64	128
16	105-2	0.5	≤ 0.06	64	>8	32	128
17	106-5	32	0.12	128	>8	64	128
18	107-3	0.25	≤ 0.06	64	>8	64	128
19	109-3	0.12	≤ 0.06	128	>8	16	128
20	110-3	32	0.12	64	>8	64	128

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録12) 分離された *Propionibacterium* 属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1	3-3	16	≤ 0.06	32	>8	8
2	32-8	4	0.25	16	8	16
3	38C	8	0.25	8	8	16
4	56-2	8	0.25	16	8	16
5	58-5	1	0.25	8	8	8
6	95-7	8	0.25	8	8	8
7	100-6	4	0.25	8	8	8
8	101-4	16	0.25	8	>8	16
9	102-3	16	0.25	8	2	16
10	104-9	16	0.25	8	4	16
11	105-6	16	0.25	8	4	16
12	106-4	8	0.25	4	8	8
13	107-5	8	0.25	8	8	8
14	108-4	4	0.25	8	4	8
15	110-5	16	0.25	8	4	16

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録 13) 分離された *Fusobacterium* 属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1	24-5	16	0.25	8	8	16
2	43-10	16	0.25	16	8	16
3	46-10	16	0.25	16	8	16
4	49-3	16	0.25	16	8	32
5	64-3	16	0.25	8	8	16
6	80-4	16	0.25	8	4	16
7	82-2	16	0.25	16	4	32
8	83-4	16	0.25	16	4	32
9	85-4	16	0.25	16	4	32
10	88-4	32	0.25	16	4	16
11	89-6	1	0.25	16	4	16
12	90-1	32	0.25	16	8	16

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録 14) 分離された *Eubacterium* 属の各薬剤への最小発育阻止濃度 (MIC、 $\mu\text{g/mL}$)

保存番号	分離番号	GM	ACE	SPE	SEM	NEO
1	35B	16	0.12	64	8	128
2	5-9	16	0.12	32	8	64
3	22-5	16	≤ 0.06	32	8	64
4	52-8	1	≤ 0.06	32	4	16
5	56-1	4	0.12	32	4	32
6	101-1	2	0.12	64	4	32
7	102-1	2	0.12	32	4	32
8	104-1	2	0.12	32	4	16
9	105-1	4	0.12	32	4	32
10	109-7	2	0.12	32	4	16

GM: ゲンタマイシン、ACE: 酢酸イソ吉草酸タイロシン、SPE: スペクチノマイシン、SEM: センデュラマイシン、NEO: ネオマイシン

(付録15)ゲンタマイシンの各菌種への最小発育阻止濃度分布図 (μg/mL)

	≦0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	64	128	>128
<i>Escherichia coli</i>				7	18	3						1	1	
<i>Enterococcus species</i>					1		2	8	18	1				
<i>Bacteroides species</i>														30
<i>Fusobacterium species</i>					1				9	2				
<i>Eubacterium species</i>					1	4	2		3					
<i>Clostridium species</i>						1			1	3		5	1	19
<i>Bifidobacterium species</i>	1		1	2		2	7	11	5	1				
<i>Prevotella species</i>		2	1	3		2		2	2	4		1	1	2
<i>Lactobacillus species</i>				3	11	7			8	1				
<i>Propionibacterium species</i>					1		3	5	6					

(付録 16)酢酸イソ吉草酸タイロシンの各菌種への最小発育阻止濃度分布図 (μg/mL)

	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	64	128	>128
<i>Escherichia coli</i> *														30
<i>Enterococcus species</i>						14	10	1	1	1	3			
<i>Bacteroides species</i>		1	6	6	5	8	1	3						
<i>Fusobacterium species</i>			12											
<i>Eubacterium species</i>	2	8												
<i>Clostridium species</i>			3	15	7	3	2							
<i>Bifidobacterium species</i>	27	3												
<i>Prevotella species</i>	15	5												
<i>Lactobacillus species</i>	1	2	17	3	7									
<i>Propionibacterium species</i>	1		14											

*寒天平板希釈法での最小発育阻止濃度値

(付録 17) スペクチノマイシンの各菌種への最小発育阻止濃度分布図 (μg/mL)

	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	64	128	>128
<i>Escherichia coli</i>									10	15		4		1
<i>Enterococcus species</i>										1		4	23	2
<i>Bacteroides species</i>									3				2	25
<i>Fusobacterium species</i>								3	9					
<i>Eubacterium species</i>										8		2		
<i>Clostridium species</i>									1	1		2	4	22
<i>Bifidobacterium species</i>	1	1		1	1	3	5	3	5	9		1		
<i>Prevotella species</i>				1						1		10	7	1
<i>Lactobacillus species</i>									5	11		4	8	2
<i>Propionibacterium species</i>							1	11	2	1				

(付録 18)センデュラマイシンの各菌種への最小発育阻止濃度分布図 (μg/mL)

	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	>8	16	32	>32	64	128	>128
<i>Escherichia coli</i> *															30
<i>Enterococcus species</i>								1		16	13				
<i>Bacteroides species</i> *														2	28
<i>Fusobacterium species</i>							6	6							
<i>Eubacterium species</i>							7	3							
<i>Clostridium species</i>						1	2	14	13						
<i>Bifidobacterium species</i> *						1	3	12		12	2				
<i>Prevotella species</i> *										1			1	18	
<i>Lactobacillus species</i> *							9	20		1					
<i>Propionibacterium species</i>						1	4	8	2						

*寒天平板希釈法での最小発育阻止濃度値

(付録 19) ネオマイシンの各菌種への最小発育阻止濃度分布図 (μg/mL)

	≤0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32	64	128	>128
<i>Escherichia coli</i>						4	23	2						1
<i>Enterococcus species</i>							1	1	1			9	4	14
<i>Bacteroides species</i>													2	28
<i>Fusobacterium species</i>									8	4				
<i>Eubacterium species</i>									3	4		2	1	
<i>Clostridium species</i>								1		1			2	26
<i>Bifidobacterium species</i>	1		1	1	2		3	6	6	7		3		
<i>Prevotella species</i>							1		1	3		9	4	2
<i>Lactobacillus species</i>					2	4	8	4	2	7		3		
<i>Propionibacterium species</i>								7	8					

(付録20) ゲンタマイシンのMIC_{calc}の計算過程とMIC_{calc}値

MIC _{calc} (ゲンタマイシン)									
<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Enterococcus</i> (n=30)	<i>Bacteroides</i> (n=30)	<i>Bifidobacterium</i> (n=30)	<i>Fusobacterium</i> (n=12)	<i>Eubacterium</i> (n=10)	<i>Clostridium</i> (n=30)	<i>Prevotella</i> (n=20)	<i>Propionibacterium</i> (n=15)	<i>Lactobacillus</i> (n=30)
MIC ₅₀									
1	16	>128	8	16	2	>128	8	8	2
Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)									
1	5	R	4	5	2	R	4	4	2
Mean Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均=3.375 StdDev(各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差=1.506 t _{0.10, (8-1)} =1.415 Lower 90% Confidence Limit=3.375-1.506/sqrt (8)*1.415=2.621 MIC _{calc} =2 ^{(2.621+log₂(0.5))} =2 ^{1.621} =3.076									

(付録 21) スペクチノマイシンの MIC_{calc} の計算過程と MIC_{calc} 値

MIC _{calc} (スペクチノマイシン)									
<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Enterococcus species</i> (n=30)	<i>Bacteroides</i> (n=30)	<i>Bifidobacterium</i> (n=30)	<i>Fusobacterium</i> (n=12)	<i>Eubacterium</i> (n=10)	<i>Clostridium</i> (n=30)	<i>Prevotella</i> (n=20)	<i>Propionibacterium</i> (n=15)	<i>Lactobacillus</i> (n=30)
MIC ₅₀									
32	128	>128	8	16	32	>128	64	8	32
Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)									
3	R	R	1	2	3	R	4	1	3
Mean Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均=2.429 StdDev(各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差=1.134 t _{0.10, (7-1)} =1.440 Lower 90% Confidence Limit=2.429-1.134/sqrt (7)*1.440=1.812 MIC _{calc} =2 ^{(1.812+log₂(8/2))} =2 ^{3.812} =14.045									

(付録 22) ネオマイシンの MIC_{calc} の計算過程と MIC_{calc} 値

MIC _{calc} (ネオマイシン)									
<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Enterococcus species</i> (n=30)	<i>Bacteroides</i> (n=30)	<i>Bifidobacterium</i> (n=30)	<i>Fusobacterium</i> (n=12)	<i>Eubacterium</i> (n=10)	<i>Clostridium</i> (n=30)	<i>Prevotella</i> (n=20)	<i>Propionibacterium</i> (n=15)	<i>Lactobacillus</i> (n=30)
MIC ₅₀									
4	128	>128	16	16	32	>128	64	16	8
Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)									
1	R	R	3	3	4	R	5	3	2
Mean: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均 =3.000									
StdDev: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏 差=1.291									
t _{0.10, (7-1)} =1.440									
Lower 90% Confidence Limit=3.000-1.291/sqrt (7)*1.440=2.297									
MIC _{calc} =2 ^{(2.297+log₂(4/2))} =2 ^{3.297} =9.829									

(付録 23) 酢酸イソ吉草酸の MIC_{calc} の計算過程と MIC_{calc}

MIC _{calc} (酢酸イソ吉草酸タイロシン)									
<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Enterococcus</i> (n=30)	<i>Bacteroides</i> (n=30)	<i>Bifidobacterium</i> (n=30)	<i>Fusobacterium</i> (n=12)	<i>Eubacterium</i> (n=10)	<i>Clostridium</i> (n=30)	<i>Prevotella</i> (n=20)	<i>Propionibacterium</i> (n=15)	<i>Lactobacillus</i> (n=30)
MIC ₅₀									
>128	4	1	≦0.06	0.25	0.12	0.5	≦0.06	0.25	0.25
Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)									
R	8	6	1	4	3	5	1	4	4
Mean: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均=4 StdDev: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) – Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差=2.236 t _{0.10, (9-1)} =1.397 Lower 90% Confidence Limit=4-2.236/sqrt (8)*1.397=2.895 MIC _{calc} =2 ^{(2.895+log₂(0.03125/2))} =2 ^{-3.105} =0.116									

(付録 24) センデュラマイシンの MIC_{calc} の計算過程と MIC_{calc} 値

MIC _{calc} (センデュラマイシン)									
<i>Escherichia coli</i> (n=30)	<i>Enterococcus</i> (n=30)	<i>Bacteroides</i> (n=30)	<i>Bifidobacterium</i> (n=30)	<i>Fusobacterium</i> (n=12)	<i>Eubacterium</i> (n=10)	<i>Clostridium</i> (n=30)	<i>Prevotella</i> (n=20)	<i>Propionibacterium</i> (n=15)	<i>Lactobacillus</i> (n=30)
MIC ₅₀									
>128	16	>128	8	4	4	8	128	8	8
Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) - Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)									
R	3	R	2	1	1	2	R	2	2
Mean: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) - Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の平均=1.857 StdDev: Log ₂ (各対象菌種に対する MIC ₅₀) - Log ₂ (minimum MIC ₅₀ / 2)の標準偏差=0.690 t _{0.10, (7-1)} =1.440 Lower 90% Confidence Limit=1.857-0.690/sqrt (7)*1.440=1.481 MIC _{calc} =2 ^{(1.481+log₂(4/2))} =2 ^{2.481} =5.583									

(付録 25) 算出された各薬剤の微生物学的 ADI ($\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)

	微生物暴露 (%)		
	10%	50%	80%
ゲンタマイシン	112.79	22.56	14.10
スペクチノマイシン	514.98	103.00	64.37
ネオマイシン	360.40	72.08	45.05
センデュラマイシン	204.71	40.94	25.59
酢酸イソ吉草酸タイロシン	4.25	0.85	0.53