畜産食品中の残留ハイグロマイシン B 検出法に関する研究

(昭和 55 年 8 月 25 日受理)

渡 辺 昭 宣^{*1} 徳 丸 雅 一^{*1}
池 内 俱 子^{*1} 近 藤 貞 雄^{*2}

Methods for the Detection of Residual Hygromycin B in Animal Tissues

Akinobu WATANABE^{*1}, Masakazu TOKUMARU^{*1}, Tomoko IKEUCHI^{*1}
and Sadao KONDO^{*2}

(^{*1}Saitama Institute of Public Health: 639-1, Kamiokubo-Higashi, Urawa-shi, Saitama;

^{*2}Research and Development Department Animal Health Products Division, Takeda
Chemical Industries, Ltd.: 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka)

Experimental studies on the detection of residual hygromycin B in animal tissues were carried out by bioautography on thin-layer chromatographic plates, with *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

A linear calibration plot was obtained in the range of 0.0625 to 1.0 unit per spot of hygromycin B standard solution by bioautography.

The assay sensitivity was improved to give a detection limit of 0.5 unit per spot (0.8 unit per gram) in muscles and liver and 1.0 unit per spot (1.6 unit per gram) in kidneys of pigs.

The average recoveries in the muscles, liver and kidneys were 57.1%, 50.9% and 22.0%, respectively.

(Received August 25, 1980)

Key words: ハイグロマイシン B hygromycin B; バイオオートグラフィー bioautography; 畜産食品 animal tissues; 枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

緒 言

農林水産省は飼料添加物の乱用防止のため、昭和50年7月「飼料の安全性の確保および品質の改善に関する法律」を公布して飼料添加物の使用規制を行い、一方、厚生省では畜産食品中のこれら残留抗生物質の検査法を統一し、昭和52年「畜産物中の残留物質検査法」を通知し食品の安全を確保することにつとめている。

しかるに、この検査法の中でハイグロマイシン B (以下 HM と略す) については、その検定用試験菌に *Pseudomonas Syringe* ATCC 12885 を指定しているが、本菌は植物防疫法で有害植物に指定されているため

め、一般には入手することがむずかしく、強いて米国 ATCC から輸入する場合は農林水産大臣の許可を必要とし、その手続きおよび輸入後の本菌の取扱いには厳重な規制が設けられている。そのため、一般の検査機関では HM の検査を行うことは実際上不可能と思われる。そこで、本報では HM の検定用試験菌として *Ps. syringe* に代わる検定菌を選定すると共に、その検査法を確立するための基礎的検討を行ったので、その結果を報告する。

実験材料

1) 使用菌株

実験に供した菌株は、東京都立衛生研究所分与の *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (以下 ATCC 6633 と略す)、*Bacillus cereus* ATCC 11778 (以下 ATCC 11778 と略す)、*Bacillus cereus* ATCC 19637 (以下 ATCC 19637

^{*1} 埼玉県衛生研究所: 浦和市上大久保東 639-1

^{*2} 武田薬品工業(株) 畜産研究開発部: 大阪市淀川区十三本町 2-17-85

と略す), *Bacillus stearothermophilus* var *calidolactis* C-953 (以下 C-953 と略す), *Escherichia coli* NIHJ (以下 NIHJ と略す) および同菌変異株のテトラサイクリン耐性株 (以下 NIHJ TC res と略す), *Staphylococcus aureus* 6538p (以下 6538p と略す), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (以下 ATCC 12228 と略す), *Sarcina lutea* ATCC 9341 (以下 ATCC 9341 と略す), *Micrococcus flavus* ATCC 10240 (以下 ATCC 10240 と略す) の計10株である。

2) 使用培地

a) 培地 A; 試験菌の継代用斜面寒天で, ATCC6633, ATCC 11778, ATCC 19637 の芽胞形成用寒天平板として用いる他, C-953 以外の菌株を用いる抗生物質検出用寒天平板の作成に用いるもので, 次の組成からなる。培地 1 L 当たり, ポリペプトン (和光純薬工業(株)) 10.0 g, 肉エキス (和光純薬工業(株)) 5.0 g, 塩化ナトリウム 2.5 g, 寒天 (和光純薬工業(株)) 20.0 g, pH 6.5, 121° 15分間滅菌後それぞれの目的に応じて使用した。

b) 培地 B; バイオオートグラフィ用培地で, その組成は培地 1 L 当たりポリペプトン (和光純薬工業(株)) 5.0 g, 肉エキス (和光純薬工業(株)) 3.0 g, 寒天 (和光純薬工業(株)) 15.0 g で, pH 8.0, 121° 15分間滅菌後使用した。

c) 培地 C; C-953 株の増殖用培地で, 日水製薬(株)の牛乳ペニシリン検出用 BC 増菌培地を用い, pH 8.0, 120° 20 分間滅菌後使用した。

d) 培地 D; C-953 株の抗生物質検出用寒天平板培地で, 日水製薬(株)の牛乳ペニシリン検出用 BC 感受性培地を用い, pH 8.0, 120° 20 分間滅菌後使用した。

3) パルプディスク

東洋濾紙(株)製の直径 10 mm の厚手のパルプディスクで, 使用に先立ち, 121° 15 分間高圧滅菌した後, 乾燥器内で十分乾燥させた。

4) ATCC 6633, ATCC 11778 および ATCC 19637 株の芽胞浮遊液の作製

継代保存した種菌は使用するに当たって培地 A に3~4 代継代した。その各菌株をルービン中の培地 A に移植し, 37° 7 日間培養して芽胞を作らせ, その後菌苔を滅菌精製水約 200 ml にかきとり 65° で 30 分間加熱する。これを 3,000 rpm で 10 分間遠心し, その上清をすて沈渣に適量の滅菌精製水を加えて再浮遊させ, 再び 3,000 rpm で 30 分間遠心する。この操作を 3 回繰り返す。最後に適量の滅菌精製水で再浮遊させた後, 65° で 30分間加熱しそのまま 5° に保存する。用時に当たって, 保存芽胞液の一部を滅菌精製水で希釈し, (株)日立製作所製 分光光度計 (S 33型) を用いて 660 nm における透過率が 50% になるように希釈調製した。

5) HM 標準溶液の作製

常用標準 HM (厚生省乳肉衛生課分与) (分析用 HM

標準品 Lot No. 1 HR, 力価 1190 units/mg) を精確に秤量し, 精製水を加えて 1,000 u/ml とし, これを原液として冷蔵保存した。この原液は2週間以内に使用することとし, 用時に精製水で2段階希釈し標準希釈液を作った。

6) アンバーライト IRC 50 (Li⁺ 型) 樹脂の調製

アンバーライト IRC 50 ((株)オルガノ商会) 100 g を 1.0 N 硫酸 1,000 ml に 3 時間浸漬した後, 洗液の pH が 5.0 以上になるまで水洗する。その後樹脂を 5 倍量の水に懸濁し, pH が 7.0~8.0 になるまで酸化リチウムの結晶をかきまぜながら加え, 1 夜放置した後約10 倍量の精製水で 10 回以上水洗し, 1.0 N リン酸溶液で pH を 7.0 に調製しガラス容器に入れて室温に保存した。

7) IRC 50 カラム

筋肉および腎臓から HM を抽出した液の精製操作に使用するもので $\phi 10 \times 300$ mm のガラス製カラムに前填の IRC 50 (Li⁺ 型) 2 ml を充てんし, 樹脂を 100 ml の精製水で洗い, 水が樹脂表面と一致するまで流出させる。

8) キーゼルグールカラム

肝臓から HM を抽出する場合に IRC 50 カラムと併用するもので $\phi 10 \times 300$ mm のガラス製カラムの底部にガラスウールを詰め精製水 10 ml を入れ, キーゼルグール (Merck 社製, 液体クロマトグラフィ用キーゼルグール Art, 10601) 1.2 g を加えてから, 5 ml の水でカラム壁を洗い落とし, ガラス棒でかきまぜながら脱気し, しばらく放置して充てん剤を沈降させる。その表面に少量のガラスウールを置き, この面まで水を流出させる。これに 1.0 N アンモニア 40 ml を加えて洗浄し, 充てん剤の表面までアンモニア水を流出させてカラム調製を行った。

9) 薄層クロマト板

ガラス板の大きさ 20×20 cm, 薄層の厚さ 0.10 mm の Merck 社製 5716 (けい光指示薬を含まず) の市販セルロース薄層板を用いた。

10) 展開溶媒

メタノール: クロロホルム; 29% アンモニア混液 (5:3:4) を用いた。

11) 1 N T 溶液

塩化 3-(*p*-ロードフェニル)-2-(*p*-ニトロフェニル)-5-フェニルテトラゾリウム (和光純薬工業(株)) を 1 mg/ml になるように加温溶解したもので, バイオオートグラフィにおける発色剤として用いた。

実験方法

1) HM の抽出および精製法

a) 筋肉および腎臓について

ブタの筋肉および腎臓に標準 HM を所定の濃度に添加した試料について, Scheme 1 の方法で抽出・精製を

Scheme 1. Extraction of hygromycin B in muscles and kidneys

行った。まず、細切した組織 25 g をホモジナイザーカップに秤量し、10% トリクロル酢酸 50 ml を加えて磨砕する。これを 2,500 rpm で 15 分間遠心し、上清液をロ紙 (Whatman No. 1) でろ過し、ろ液にジエチルアミンを加えて pH を 7.0 にした後、5° で約 60 分間放置する。ついで、3,000 rpm で 5 分間遠心し上清液を分取する。

pH の影響をみるため、一部のものについてはジエチルアミンで pH を 10.0 に調製し、同様に操作した。この液を IRC-50 のカラムに加え、3.0 ml/min の速度でカラムを通過させ、液面が樹脂表面に達した後、精製水 100 ml を加えて 3.0 ml/min の速度で同様に洗浄する。次にカラムに 1.0 N アンモニア 15 ml を加え、1.0 ml/min の速度で HM を 100 ml のナス型フラスコに溶出させる。このアンモニア溶出液は 40° の水浴中で約 3.0

Scheme 2. Extraction of hygromycin B in liver

ml になるまで減圧濃縮し、その内容液を 30 ml のナス型フラスコに移す。100 ml ナス型フラスコは精製水 1.0 ml で 3 回洗浄し、その洗液は 30 ml のナス型フラスコに追加する。これをさらに濃縮乾固させた後、残留物に精製水 0.4 ml を加えてとかし薄層クロマト用試料液とした。

b) 肝臓について

ブタの肝臓に標準 HM を所定の濃度に添加した試料について Scheme 2 の方法で行った。すなわち肝臓 25 g から IRC 50 カラムにかかるまでの操作は筋肉の場合と同様であるが、IRC 50 カラムは HM の吸着後、精製水およびシクロヘキサンそれぞれ 100 ml で順次 3.0 ml/min の速度で洗浄し、最後に 1.0 N アンモニア 15 ml を加えて 1.0 ml/min の速度で HM を溶出させる。そして別に準備したキールグールのカラムに、IRC 50 カラムからのアンモニア溶出液の全量を注ぎ、3.0 ml/min の速度で通過させ、その通過液を 100 ml のナス型フラスコに集めた後、カラムは 1.0 N アンモニア 5 ml で同様の速度で洗浄し、その洗液を通過液と合わせ、筋肉の場合と同様に濃縮乾固し、精製水の 0.4 ml にとかし薄層クロマト用試料液とした。

Table 1. Growth Inhibition Patterns of Hygromycin B
(Simple pulp disk zone inhibition method)

Test organisms used	HM (u/ml)					
	200	100	50	25	12.5	6.25
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24.88	21.25	18.43	18.00	14.20	—
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	23.10	20.45	18.80	17.20	13.75	—
<i>B. cereus</i> ATCC 19637	20.25	17.54	16.43	14.40	11.78	—
<i>E. coli</i> NIHJ	21.70	18.75	16.10	14.30	11.50	—
<i>E. coli</i> NIHJ TC res	18.75	16.25	14.55	12.30	11.20	—
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 P	13.45	11.70	11.00	—	—	—
<i>S. epidermydes</i> ATCC 12228	15.28	12.50	11.15	—	—	—
<i>S. lutea</i> ATCC 9341	17.45	14.85	11.50	—	—	—
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	18.65	14.33	11.50	—	—	—
<i>B. calidolactis</i> C-953	21.00	18.30	14.25	—	—	—

Note: Stated in figures are indicating the diameter of inhibition zone (in mm).

Table 2. Growth Inhibition Patterns of Hygromycin B by Quantitative Thin-layer Bio-autography

Test organisms used	HM (u/spot)					
	2.0	1.0	0.5	0.25	0.125	0.0625
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	24.14	20.67	15.29	12.32	9.66	6.89
<i>E. coli</i> HIHJ	18.97	16.22	12.85	8.86	5.98	4.10
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	13.89	10.60	7.19	6.21	—	—
<i>B. cereus</i> ATCC 19637	16.99	12.34	9.22	—	—	—

Note: Stated in figures are indicating the diameter of inhibition zone (in mm).

2) 使用菌株の抗菌スペクトルの測定

抗菌スペクトルの測定は公定法における簡易検査法(ディスク法)に準じて行った。すなわち常法通り調製した10種の菌株の各寒天平板上に標準 HM の各希釈液を吸収させたパルプディスクを置き、それぞれの菌の所定温度で18時間培養した後、出現した阻止円の大きさをノギスを用いて測定した。

3) 薄層クロマトグラフィー

あらかじめ 110° で 30 分間加熱活性化したセルロース薄層板の下端より 3 cm の位置に試料液又は HM 標準液をそれぞれ 10 μ l ずつスポットし、乾燥させた後展開液をもって 10 cm まで展開した。

そして薄層板は溶媒臭がなくなるまで十分に乾燥させた。

4) バイオオートグラフィー

Kline & Golab¹⁾の方法に準じて行った。すなわち風乾した薄層板に沸騰水中で溶解した培地 B をスプレイヤーを用いて吹きつけた後、アルミかん(バイオオートグラフィー用ふた付アルミかん、205×310×20 mm)に

入れる。一方、55° 前後に保った培地 B 80 ml に希釈調製した ATCC 6633 芽胞液 0.4 ml を接種し、その全量を薄層板上に流しこみ、室温で約 1 時間放置して固化させる。その後、アルミかんにふたをして 37° 18 時間培養し、その寒天平板面に INT 溶液 10 ml を平等に流し込み30分間放置して発色させる。

判定は、形成された阻止円の Rf とその長径 (a mm) および短径 (b mm) を計り、幾何学的平均値 $\sqrt{ab}$ (mm) をもって阻止円直径とした。また HM 標準希釈液より得られた阻止円直径と HM 量 (u/spot) との関係を片対数グラフに目盛り、その検量線から試料液の阻止円直径に相当する HM 量を算出した。

実験成績

1) HM のディスク法による抗菌スペクトル

10 種類の抗生物質検定用標準株の HM に対する感受性を調べ、検定菌の予備選択を行った。

結果は Table 1 にみられるように、ATCC 6633, ATCC 11778, ATCC 19637, NIHJ および NIHJ TC res の 5 菌種は 12.5 u/ml まで感受性を示したが、

Fig. 1. Calibration curve for hygromycin B

ATCC 6538P, ATCC 12228, ATCC 9341, ATCC10240 および C-953 の 5 菌種は 50 u/ml までしか感受性がなかった。そのため、前者 5 菌種について検定株の選択を検討することとした。

2) HM のバイオオートグラフィーによる抗菌スペクトル

ディスク法で選出された 4 菌種についてバイオオートグラフィーによる抗菌スペクトルを比較した。結果は Table 2 に示す如くで、ATCC 6633 および NIHJ は 0.0625 u/spot まで感受性を示したのに対し、ATCC 11778 は 0.25 u/spot まで、ATCC 19637 は 0.5 u/spot までしか感受性を示さなかった。

このことから、HM の検定用試験菌としては ATCC 6633 および NIHJ の 2 菌種が最も感受性の高い菌株であることがわかった。次に HM 標準希釈液を単独スポ

ットした場合の検量線について両菌株を比較した。結果は Fig. 1 にみられるように、ATCC 6633 ではスポット量が 0.0625 から 1.0 u/spot の範囲でほぼ直線関係を示し、NIHJ では 0.125 から 1.0 u/spot の範囲で直線性が得られた。また阻止円形成の大きさ、めいりょうさなどを比較すると ATCC 6633 の方が良好な結果を得られるものと判断し、本菌を検定菌に選んだ。

3) 組織成分のバイオオートグラフィー標準曲線に与える影響

バイオオートグラフィーにおける標準曲線はしばしば組織からの抽出成分によって影響されることがあるため、HM を含まないブタの筋肉、肝臓および腎臓の抽出液を用いてそれらの影響を検討した。Fig. 2 は HM 無添加の各組織試料液を薄層板上に 10 μ l ずつスポットした後、HM 標準希釈液を重ねて 10 μ l ずつスポットし

Fig. 2. Effects of extracted materials from various tissues on the calibration curve for Hygromycin B

●—●, HM; ×---×, HM+extracted materials

た場合 (図の点線) と HM 標準希釈液のみを単独でスポットした場合 (図の実線) のバイオオートグラフィーを比較したもので、各組織抽出液とも両直線はほとんど重なり、0.25 から 1.0 u/spot の範囲で直線性が得られた。このことから組織成分の標準曲線に与える影響はないものと考えられた。

4) HM 添加回収実験とその検出限界

HM 無投与のブタの筋肉、肝臓および腎臓に標準 HM を 0.25~2.0 u/spot の範囲で所定濃度を添加し、バイオオートグラフィーによる回収率と検出限界を求めた。結果は Table 3 に示す如くで、筋肉からの回収実験では 0.25 u/spot 添加量ではめいりょうな阻止円は形成されず、0.5 u/spot で阻止円が形成された。したがって筋肉での検出限界は 0.5 u/spot とみられ、これを筋肉 1 g 当たりの含有量に換算すると 0.8 u/g までが検出可能となる。また、その回収率は抽出操作を pH 10.0 で処理した場合は 0.5 u/spot 添加量で 46.6%, 1.0 u/spot 添加量で 61.6~86.4%, 平均 70.8% であった。

これに対し、pH 7.0 の処理の場合は 0.5 u/spot 添加量で 54.0~65.0%, 平均 57.1%, 1.0 u/spot 添加量で 73.3~76.1%, 平均 74.7% となり pH 10.0 の処理より回収率は上昇した。

肝臓からの回収率は筋肉と同様の結果を示し、検出限界は 0.5 u/spot で、肝臓 1 g 当たりに換算すると 0.8 u/g まで検出可能となる。また、その回収率は、pH 10.0 の処理では 0.5 u/spot 添加量で 29.8%, 1.0 u/spot 添加量で 40.7%, 2.0 u/spot 添加量で 73.0~86.9%, 平均 80.0% であった。

これに対し、pH 7.0 での回収率は 0.5 u/spot 添加量で平均 50.9%, 1.0 u/spot 添加量で平均 50.5%, 2.0 u/spot 添加量で平均 85.2% となり、何れの場合も pH 7.0 で処理した時の回収率の方が良い結果を得た。

腎臓からの回収実験では、肝臓、筋肉に比べ悪い結果を示し、検出限界では pH によって差がみられ pH 7.0 の処理の場合は 1.0 u/spot 添加量で阻止円が形成されたのに対し、pH 10.0 の処理では 1.25 u/spot 添加量でやっと阻止円が形成される程度であった。したがって、腎臓での検出限界は pH 7.0 で 1.0 u/spot とみられ、これを腎臓 1 g 当たりに換算すると 1.6 u/g までが検出可能となる。また、その回収率をみると pH 10.0 の処理では 1.25 u/spot 添加量で 23.0%, 2.0 u/spot 添加量で平均 48.8% であった。これに対し、pH 7.0 の場合は 1.0 u/spot 添加量で平均 21.9%, 2.0 u/spot 添加量で平均 56.2% となった。

Table 3. Recovery of Hygromycin B from Animal Tissues

Treated pH	Tissue No.	Muscles			Livers			Kidneys		
		Added (u/spot)	Found (u/spot)	Recovery (%)	Added (u/spot)	Found (u/spot)	Recovery (%)	Added (u/spot)	Found (u/spot)	Recovery (%)
pH 7.0	1	0.25	ND	—	0.25	ND	—	0.5	ND	—
	2	0.5	0.270	54.0	0.5	0.266	53.2	1.0	0.216	21.6
	3	0.5	0.270	54.0	0.5	0.243	48.6	1.0	0.222	22.2
	4	0.5	0.276	55.2	1.0	0.431	43.1	2.0	1.386	69.3
	5	0.5	0.325	65.0	1.0	0.578	57.8	2.0	1.109	55.4
	6	1.0	0.761	76.1	2.0	1.668	83.4	2.0	1.220	61.0
	7	1.0	0.733	73.3	2.0	1.738	86.9	2.0	0.781	39.0
pH 10.0	1	0.25	ND	—	0.25	ND	—	5.5	ND	—
	2	0.5	0.233	46.6	0.5	0.149	29.8	1.0	ND	—
	3	1.0	0.692	69.2	0.75	0.297	39.6	1.25	0.288	23.0
	4	1.0	0.864	86.4	1.0	0.407	40.7	2.0	1.184	59.2
	5	1.0	0.616	61.6	1.25	0.571	45.7	2.0	0.705	35.3
	6	1.0	0.686	68.6	2.0	1.738	86.9	2.0	1.331	66.6
	7	1.0	0.684	68.4	2.0	1.460	73.0	2.0	0.678	33.9

以上のように、3種類のブタ組織からの HM 検出値を比較すると、検出限界では筋肉と肝臓はほぼ同様で 0.5 u/spot となったが、腎臓の場合は感度低く 1.0 u/spot となった。また、同濃度添加量における回収率を比較すると、筋肉からの場合が最も高く、ついで肝臓、腎臓の順になった。また、抽出操作における pH 処理を比較すると、各組織とも pH 7.0 で処理した場合の方が良好な成績を得ることができた。

考 察

畜産物中の残留抗生物質検査法²⁾に記載されている HM の検出には、試験菌として *Ps. syringe* が規定されているが、本菌の特殊性からこれに代るべき試験菌の選定にせまられると共に、その検査法も確立しなければならなかった。

現在の HM の微生物学的検査法については、ペーパードиск法が採用され、その判定基準は常用標準抗生物質高希釈液 (HM では 50 u/ml) で阻止円直径が 15~20 mm, 低希釈液 (HM では 200 u/ml) で 20~25 mm の阻止円が検出された時、陽性と判定するよう定められている。そこで今回の実験で選定した ATCC 6633 のディスク法による阻止円の形成をみると、最高希釈濃度としての感度は 12.5 u/ml まで認められ、大体基準内におさまることが確認されたが、組織中からの検出では感度はさらに低下する。

そこで、Begue ら³⁾はこの検出感度を上げる方法としてバイオオートグラフィーを採用し、鶏卵中の添加 HM 回収実験を行って 0.015 u/g の微量濃度まで定量できることを報告しているが、この実験では試験菌とし

て *Ps. syringe* を用いているため、国内の実情では参考にはできないと思われる。そこで、我々はディスク法で感度の良かった ATCC 6633 を用い、バイオオートグラフィーを応用してブタ組織からの添加回収実験を行った。その結果、筋肉および肝臓では 0.5 u/spot (0.8 u/g) まで定量可能となり、その回収率は 57% および 50% であった。しかるに、腎臓では感度が低下し検出限界は 1.0 u/spot (1.6 u/g) で、その回収率は 22% 程度であった。

この結果を Begue らのものと比較すると検出限界で約 1 オーダー差の開きがみられるが、これは使用した試験菌の感度の問題と考えられ、*Ps. syringe* の特殊事情からみてやむをえない結果と考えられるが、ディスク法に比べるとはるかに検出感度が上昇することから ATCC 6633 の検定菌としての目的は達せられたと思われる。

また、近藤らも ATCC 6633 を検定菌として同様の検討を加え、抽出時の pH を 10 で処理したが試料量が 50 g から出発したため、我々の pH 10 処理よりは検出限界が高かったが、pH 7.0 の処理では検出感度が良いことを認めている。また、Begue も抽出時の pH は 7.0 をこえないようにすることを強調している。

なお、バイオオートグラフィーは試験操作が煩雑で、かつ、検査の所要時間も長いことから日常検査面では色々難点はあると思われるが、抗生物質個別の標準検査法を設定する目的のためには、*B. subtilis* ATCC 6633 を検定菌とする本検査法は、それなりに価値があると考えられる。

結 論

ブタ組織を用いて残留 HM の検査法を検討した結果、次の結論を得た。

- 1) 畜産食品中の残留 HM 検出のための検定菌に *B. subtilis* ATCC 6633 を選定することができた。
- 2) ATCC 6633 を用いて薄層クロマトグラフィー・バイオオートグラフィーによる HM の定量を行ったところ、標準曲線は組織成分の影響を受けず、0.0625～1.0 u/spot の範囲で直線性を示した。
- 3) 本法による HM の検出感度は、ペーパーディスク法より優れ、約10倍以上の差があった。
- 4) ブタの筋肉および肝臓における検出限度は、共に

0.5 u/spot (0.8 u/g) で、回収率はそれぞれ 57.1% および 50.9% であった。しかし、腎臓については検出限界 1.0 u/spot (1.6 u/g)、回収率 22% と低下した。

本研究の一部は昭和54年度厚生科学研究費補助金の援助を受けたものであり、関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Kline, R. M., Golab, T.: J. Chromatogr. 18, 409～411 (1965).
- 2) 厚生省乳肉衛生課：畜産物中の残留抗生物質検査法。(第2集), (1977).
- 3) Begue, W. J., Kline, R. M.: J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 56, 20～22 (1973).