報 文

タイロシンの微生物学的定量法

(昭和 41 年 7 月 16 日 受理)

河端 俊治^{*1} 植松 智之^{*1} 古庄 一夫^{*1}

Studies on the Microbiological Assay of Tylosin in Food

Toshiharu KAWABATA, Tomoyuki UEMATSU
and Kazuo FURUSHO(Department of Food Research, National Institute of Health:
Kamiosaka-chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo)

Factors affecting the sensitivity and recovery of tylosin assay for various foods have been studied by the agar diffusion plate method with *Sarcina lutea* (ATCC 9341) as the test organism. And a modified cylinder-plate or paper disk-plate method was developed based on the experimental results, and brief outline of the technique is as follows:

Extraction of tylosin from a food sample is carried out by addition of 4-fold volume of M/15 phosphate buffer of pH 8.0 to the minced sample, and it is homogenized by a blender. The supernatant or filtrate of the homogenate can be used as a test solution for tylosin assay (if necessary, further dilution should be made with the aforementioned extractant).

Fifteen peni-cylinders or paper disks are placed in a 15 cm diameter plate with a single 17 ml seeded layer of modified streptomycin assay agar of pH 8.5. One test solution should be placed in each 3 cylinders or disks on 3 plates. Inhibition zone may be measured after being incubated for 16 to 18 hours at 32°C, and with the average diameter of 9 inhibition zone for one test solution, the tylosin concentration can be calculated in comparison with the standard curve prepared with standard tylosin solution series. Employing this method, the standard curve extends from 0.16 to 2.5 ppm ($\mu\text{g/ml}$) which corresponds to the tylosin contents of about 1 to 16 $\mu\text{g/g}$ of sample.

The sensitivity of the paper disk-plate method is about 1/4 that of the cylinder-plate technique under the identical condition.

(Received July 16, 1966)

緒 言

Macrolide 系抗生物質の一種であるタイロシン (tylosin, 以下 T1 と略) はグラム陽性菌に対して強い抗菌力を有しており, 毒性も低く, かつ熱に安定なところから, わが国でも2~3年前から, 加熱と包装を併用する魚肉ソーセージ, 包装豆腐および一部の缶詰への応用が試みられている。ところで現在までに食品中の T1 の化学的定量方法は確立されていないが, 微生物学的方法是は幾つか提唱されてきた。Eli Lilly の研究所では *Staph.*

aureus H (ATCC 9144) を用いる比濁法¹⁾と, *Sarcina lutea* (ATCC 9341) を用いるディスク法²⁾を報告し, また米国缶詰協会では好熱細菌 *B. stearothermophilus* を用いる方法を報告している²⁾。いずれの方法にも一長一短があるが, 一般に多数検体の測定を行なう日常検査では術式の簡易な平板法 (ディスク法²⁾またはシリンダー法³⁾) が便利であろう。T1 の平板法については

^{*2} Paper disk-agar diffusion plate assay or paper disk-plate assay

^{*3} Cylinder-agar diffusion plate assay or cylinder-plate assay [473]

^{*1} 国立予防衛生研究所食品衛生部: 東京都品川区上大崎長者丸

Eli Lilly の文献²⁾中には詳細な記載がなく、また種々検討の余地も多いと考えたので、われわれはその基礎的条件について種々検討を行なった。その結果、一応食品中の Tl 定量が標準化できる見通しがついたので、これを報告するとともに、それらを決めた根拠についてここでまとめて記載する。

定量方法

1. 必要な器具、試薬および培地

1) ペトリザラ： 水平で平坦な内部底面をもつ径 9 cm のペトリザラでも代用できるが、径 15 cm のものはステンレス製シリンダーまたはペーパー・ディスクが15個置けるのに対し、径 9 cm の場合は4~6個である。

2) ステンレス製シリンダー： 外径 8 mm 筒の内厚 1 mm、高さ 10 mm (いずれも ± 0.1 mm 以下) (日本抗生物質学術協議会より入手可能)

ペーパー・ディスク (パッド)： Carl Schleicher & Schuell Co. の No. 740-E, 1/4 inchi 径のものをを用いる。

3) ブレンダー： 市販のものをを用いる。

4) 抽出剤および希釈液： とともに M/15 リン酸塩緩衝液 pH 8.0 のものをを用いる。

5) タイロシン標準液： タイロシン乳酸塩 (分子量 994) 50 mg を精ひょうし、これは滅菌蒸留水で 50 ml の容量とする ($1000 \mu\text{g/ml}$)。この液を 5.0 ml ずつ共セン小型ポリエチレン製試験管に分注し、フリーザーで保存する。これを標準原液とする。凍結状態ではかなり長期間効果の低下はないが、融解したものは再び凍結は避けるべきである。融解液は冷蔵庫中で数日間は保存できる。

6) 定量用の標準曲線を描くには標準原液を融解し、その 1 ml をとり蒸留水で 10 ml の定容とし ($100 \mu\text{g/ml}$)、この液を pH 8.0 の M/15 リン酸塩緩衝液で10倍希釈を行ない ($10 \mu\text{g/ml}$)、さらにこの液から順次 2 倍希釈を行なって 5, 2.5, 1.25, 0.64, 0.32, $0.16 \mu\text{g/ml}$ の希釈標準液を作成する。ただし、シリンダー法には $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以下の4段階、ディスク法には5~0.64の4段階の希釈液を使用する。

7) 接種菌液： 定量を行なう前日、*Sarcina lutea* ATCC 9341を斜面培養からブイヨンに移植し、 32° で1夜を培養する。

8) 定量用培地： pH 8.5 に修正した Streptomycin Assay medium³⁾ をを用いる。その組成は、ペプトン 6 g、酵母エキス 3 g、肉エキス 1.5 g、ブドウ糖 1 g、精製寒天末 15 g、蒸留水 1000 ml の割合で滅菌後の pH が 8.5 になるようにあらかじめ 10% Na_2CO_3 で pH を修正し、 121° で15分間滅菌する。

2. 定量操作

1) タイロシンの抽出

検体は細切してから乳パチでよくすりつぶすか、あるいは肉ひき器にかけて均一化し、その 20.0 g を採取しブレンダーカップ中に入れる。これに 80 ml の抽出液を加え約 2 分間細碎し、つぎに乾燥ろ紙でろ過するか、3000 rpm で10分間遠心分離し、上清をとり被検液とする。なお、上清中のタイロシンの濃度が 1 ml 当り $3 \mu\text{g}$ を越すときは2倍希釈を行ない、適当濃度の試料液を作る。

2) 定量用培地の準備

定量用培地は加熱溶解後 $48\sim 50^\circ$ に保ち、供試菌 *Sarcina lutea* の1夜培養を培地 100 ml 当り 0.3 ml の割合に加え、よく振りまぜる。接種した培地はすみやかに径 15 cm のペトリザラに 17 ml ずつ分注して、厳密に水平な台の上で均一な厚さに固まらせる (冬期にはペトリザラをあらかじめ約 40° に保温しておいた方が均一な厚さの寒天層を作るのに便利である。なお直径 9 cm のペトリザラを用いるときは培地を 6 ml ずつ分注する)。

3) シリンダーまたはディスクの配列

シリンダーはあらかじめ等間隔に置けるよう目印をつけた下敷を作成し、この上にペトリザラを置き定量用寒天培地上に配置する。4段階希釈標準液 ($1.25\sim 0.16 \mu\text{g/ml}$ の4段階) および試料からの抽出液を駒込ピペットでそれぞれ 3 個ずつのシリンダーに入れる。1試料当り3枚の寒天培地にそれぞれ3個ずつのシリンダー総計9個に加える。

ディスク (パッド) 法では、標準液 ($5\sim 0.64 \mu\text{g/ml}$ の4段階) または試料液にディスクを浸してから、これらを入れてある試験管の壁にディスクを触れさせ、余分の液を除くようにする。ディスクの配列にはシリンダー法と同様、目印をつけた下敷き上にペトリザラを置き同一被検液につき3枚のディスクを用い、3枚のペトリザラ上に計9枚のディスクを配列する。

4) 培養と結果の計算

シリンダーに被検液を入れ、またはディスクを配列したペトリザラは静かに 32° のフラン器中に移し、17時間培養し、生じた阻止帯の直径を計測する。計測には Quebec の見取器もあるが、キャリパーで十分である。

片対数方眼紙上に、濃度を対数軸に、阻止径を普通目盛にとり、各濃度の標準液の阻止径9個ずつの平均値をプロットすると直線が得られる。これを標準曲線 (検量線) とする。つぎに各試料について得られる阻止径 (各9個の平均値) を標準曲線に照らし合わせて、濃度を求める。原検体中のタイロシン濃度を求めるには、この値に希釈倍数を乗ずればよい。なお、ペーパーディスク法による感度はシリンダー法の約 1/4 である。

実験および考察

1. タイロシン検定菌の選定

Eli Lilly の平板法¹⁾では *Sarcina lutea* (ATCC 9341) を供試菌とすることになっている。われわれもこの菌を入手し、平板法の定量条件の吟味を行なったが、その前に研究室の保存株 27 株を用い、nutrient broth その他の培地中におけるタイロシンに対する感受性を調べたが、とくに感受性の高い菌株は見いだせなかった⁵⁾、一応 Eli Lilly の報告にある *Sarcina lutea* (ATCC 9341) を検定菌として使用することにした。

2. タイロシンの感度と供試菌 *Sarcina lutea* の濃度の関係

前出 pH 8.5 の検定用培地に接種する *Sarcina lutea* の濃度のタイロシン感度に及ぼす影響を調べた。供試菌はブイヨン中で 32° で 1 夜培養し、これを加熱溶解後約 50° に保った定量用培地 100 ml 当り、それぞれ 0.05 (培養を生理的食塩水で 10 倍に希釈し、その 0.5 ml)、0.1, 0.2, 0.4, 0.5 ml ずつ加え、それぞれ 3 枚の平板培地 (径 15 cm のペトリザラ中に 17 ml の割で加える) を作成した。これら平板にシリンダーを配列し、それらに 0.16 $\mu\text{g/ml}$ から 2.5 $\mu\text{g/ml}$ までの 4 段階の希釈標準液を入れ標準曲線を作成した。得られた結果は Fig. 1 に示してある。

この図からわかるように菌濃度の低下につれ感度が高まることがわかる。菌量 0.05 ml では阻止円の周囲が明りょうでなく測定不能であったので、Fig. 1 には 0.1~0.5 ml の結果を示しておいた。その後の繰返した実験で明りょうな阻止円を得るには最低 0.3 ml であることがわかったので、添加量は培地 100 ml 当り 0.3 ml と決定した。

3. 検定培地の pH と感度の関係

pH 6.5, 7.5, 8.5 に修正した検定用培地で平板を作成し、実験 2 と同様希釈標準液を用いて標準曲線を作成した。

得られた結果は Fig. 2 に示してあるが、この図からわかるように、実験を行なった範囲では pH 8.5 が最も感度が高かった。これはタイロシン自身の活性が酸性側より微アルカリ性において強いものであり、タイロシンの寒天培地中への拡散速度の違いによるものではない⁴⁾。

4. 抽出剤および希釈液の pH の感度に及ぼす影響

Eli Lilly の方法⁶⁾では、食品からのタイロシンの抽出に蒸留水を用いている。一方、塩野義製薬研究所ではタイロシンを加えた魚肉 (生および加熱マグロ肉) から蒸留水 (1:3) で抽出し、これを pH 4.0 および 7.0 に修正して回収率を比較している。その結果、蒸留水および pH 7.0 を用いる回収率はともに 75% で等しく、pH 4.0 は 20% と低いことをみている。ここでは予備実験として抽出液の pH を考えた場合、タイロシンの定量感度に及ぼす影響を標準タイロシンについて行なった。

Fig. 1. Effect of seeding size of test organism, *Sarcina lutea* on the sensitivity of tylosin by the cylinder-plate assay method

Fig. 2. Effect of pH of the assay medium on the sensitivity of tylosin bioassay

まず標準タイロシン原液から pH 6.0, 7.0, 8.0 の M/15 リン酸塩緩衝液を用いて 0.16~2.5 $\mu\text{g/ml}$ までの希釈標準液を作り、これを pH 8.5 の定量用培地上においたシリンダーに入れて標準曲線を作成し、pH の違いによる感度を比較した。

その結果 pH 6.0~8.0 の希釈液を用いたときの標準曲線はほとんど一致し、pH の違いによる有意差が見られなかった。

つぎにマグロ肉について実験を行なった。まず肉ひき

器にかけてよく細砕したマグロ肉を作り、これに40 ppm になるようにタイロシン標準液を加えよく磨砕を行なった。つぎにこの肉を2分し、半分を無加熱生肉、残りを魚肉ソーセージ用ケーシング(塩化ビニリデン)に詰め85°で30分間加熱した。別にタイロシンを加えないでマグロ細砕肉を上記同様85°で30分加熱し、冷却後これに40 ppm になるようタイロシンを加えよく混和した。

上記3種類のマグロ肉試料にそれぞれ9倍量の pH 6.0, 7.0または8.0の M/15リン酸緩衝液を加え、2分間ブレンダーをかけ、さらに遠心分離して上清を得た。上清にはそれぞれ同量の pH 8.0の緩衝液を加え、シリンダーを用いる平板法によりタイロシンの量を測定した。得られた結果は Fig. 3 に示してある。

この図からわかるように生肉、タイロシンをあらかじめ加熱した肉、およびあらかじめ加熱した肉にタイロシンを加えた肉からの、異なった pH のリン酸塩緩衝液によるタイロシンの抽出率に有意差が見られなかった(ただしタイロシンを加えて加熱した場合の回収率の低下は加熱によるもので、吸着⁷⁾ または失活⁸⁾ によると考えられる)。

5. 抽出剤として有機溶媒を使用する試み

今までの実験では検体食品からのタイロシンの抽出は pH 8.0の M/15 リン酸塩緩衝液を使用してきたが、タイロシンは有機溶媒に溶けやすい性質があるので、これを利用して食品からの抽出効果を検討した。まずリン酸塩緩衝液(pH 8.0)にアセトン、メタノール、ジメチルホルムアミド(DMF)を加えた場合のタイロシン標準曲線を作成し、感度に及ぼす影響を調べ、つぎにこれらを抽出剤とした場合魚肉からのタイロシンの回収率に及ぼす影響を調べた。

(1) アセトン、メタノール、DMF を用いたときの標準曲線

タイロシンの希釈標準液を pH 8.0の M/15リン酸塩緩衝液、同リン酸塩緩衝液35部にアセトン、メタノール、または DMF を65部加えたものを希釈液として、タイロシンとしてそれぞれ 0.16 µg/ml から 2.5 µg/ml までの希釈標準液を作り、これらの力価をシリンダー法で測定し、それぞれの標準曲線を求めた。

得られた結果は Fig. 4 に示してある。図からわかるようにアセトンおよびメタノール緩衝液を用いたときにはほぼ同様の値が得られ、かつ緩衝液のみのときよりもかなり感度がよいことがわかったが、反面 DMF では感度が低下した。ただメタノールを用いると平板上の菌の発育が著しく悪いので阻止円の周囲が明りょうでなくなるため、測定がやや困難になる。

(2) タイロシンの定量感度および肉からの回収率に及ぼすアセトン濃度の影響

前の実験で65%アセトン-緩衝液を用いたときに得られたタイロシンの標準曲線からみると、緩衝液単用

Fig. 3. Effect of pH of extractant (phosphate buffer) on the recovery of tylosin in the tuna flesh

Note ○ : Phosphate buffer, pH 8
 ⊖ : Acetone-buffer (65 : 35)
 ① : MeOH-buffer (65 : 35)
 ⊙ : DMF-buffer (65 : 35)

Fig. 4. Comparison of standard curves of tylosin obtained with various diluents

のときに比べ、はるかに高い感度を示すことがわかったので、つぎに pH 8.0 のリン酸塩緩衝液に種々の割合にアセトンを加えた混合液でタイロシン(1 ppm)の希釈を行なって感度の比較を行なうとともに、マグロ生肉に加えた同濃度タイロシンからの抽出率を比較した。この場合の標準曲線は50%アセトン-緩衝液を希釈液に用いたもので、得られた結果はタイロシン溶液についての実験では10%アセトンから100%アセトンまで定量的回収率は90~100%でほぼ一定であった。一方肉からの場合は30%アセトンまでは濃度の高まるにつれ回収率が上昇し、30%以上100%までの回収率は70~80%と一定値を示した。ただアセトンが30%ま

では肉に加えたとき泡立ちがひどく、遠心後の抽出液も混濁が著しかった。また70%を越すとアセトン緩衝液を混合すると直ちに白色の沈殿を生じ、また pH が低下する。これらの結果、実際に用いられるアセトン濃度は40~60%であると考えられる。

(3) 抽出剤の使用量の回収率に及ぼす影響

検体と抽出剤の比の回収率に及ぼす影響を知るため、つぎのような実験を行なった。20 ppm のタイロシンを加えたマグロ肉の細碎肉をソーセージ用ケーシング中で85°で30分間加熱したものを材料とし、これに5倍、10倍、20倍および40倍(いずれも容量)の pH 8.0 の M/15 リン酸塩緩衝液、または50%アセトン-リン酸塩緩衝液 (pH 8.0) を加えて、それぞれ2分間ブレンダーにかけたのち、遠心分離して得た上清についてタイロシンの残存量を定量した。ただし、標準曲線は抽出剤に合わせて2種類作成した。得られた結果は Table 1 に示してあるが、抽出剤が20倍までの回収率はほぼ一定であったが、40倍ではやや低目の値が得られた。

なお、pH 8.0 の緩衝液を用いた方が回収率が高い結果が得られた。

Table 1. Effect of Volume of Extractants on the Recovery of Tylosin from the Cooked Tuna Flesh

Ratio of extractant	Phosphate buffer, pH 8.0		Acetone-buffer (1:1)	
	tylosin found	recovery	tylosin found	recovery
× 5	1.94 ppm	47%	1.22 ppm	33%
× 10	0.90	45	0.68	34
× 20	0.44	44	0.32	32
× 40	0.18	36	0.14	28

以上のように有機溶媒を抽出剤として用いればタイロシンの定量感度は高まるが、回収率はむしろ低下することになり、必ずしも好ましいとはいえないことがわかった。

6. 検体中のタイロシン濃度と回収率

タイロシンを実際の食品に添加する量は今までの実験では大体 20 ppm 以下である。しかし魚肉ソーセージのような食品に入れて加熱すると残存抗菌力はかなり低下することが知られている⁷⁾⁸⁾。ここではマグロ肉にいろいろな濃度のタイロシンを加え、加熱したときの回収率の比較を行なった。

まず肉ひき器にかけたマグロ肉に0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 ppm になるようにタイロシンを加え、これを魚肉ソーセージ用ケーシング中に入れ85°で30分間加熱した。加熱後は0.5~4 ppm までは同量の、8 ppm は3倍量、16 ppm は7倍量の pH 8.0 のリン酸塩緩衝液を

Table 2. Effect of Initial Concentration of Tylosin Added to the Tuna Flesh on the Recovery of the Drug after Heating at 85°C for 30 minutes

Initial concentration	Tylosin found	Recovery
0.5 ppm	0.15 ppm	30%
1.0	0.34	34
2.0	0.66	33
4.0	1.46	37
8.0	3.00	38
16.0	6.00	38

加え、それぞれ2分間ブレンダーにかけたのち、遠心分離し上清を被検液としシリンダー法で残存タイロシンを定量した。結果は Table 2 に示してある。

この結果からわかるようにマグロ肉中では加熱により、かなりの失活が見られるが、実験した範囲ではタイロシン添加量の違いによる回収率にはほとんど差が見られなかった。

7. 標準曲線に関する検討、とくに食品に添加したタイロシンの回収率および定量妨害物質の吟味

原則的にいって食品中のタイロシンの定量を行なうときには、タイロシンを含まない同一食品にタイロシンを加えて、検体と同一操作で抽出したもので標準曲線を作成すべきである。しかし毎回これを実施するのは材料の入手その他きわめて複雑なことである。そこで、二、三のタイロシンの応用実験の行なわれた食品についてタイロシンの回収率の比較検討を行ない、合わせて食品中に定量妨害物質の存在の有無を調べてみた。

(1) 魚肉ソーセージおよびゼラチン

薬剤無添加の魚肉ソーセージの内容物の肉ひき器に3回かけ均一化したものに1.6~2.5 ppm の5段階濃度のタイロシンを加えたもの、10%ゼラチンに魚肉ソーセージと同一濃度のタイロシンを加えたものについて、それぞれ9倍量の抽出液 (pH 8.0 の M/15 リン酸塩緩衝液) を加えて2分間ブレンダーにかけ、さらに遠心分離して上清をとった。ただしゼラチンの場合は遠心分離は省略した。これらの試料についてシリンダー法でタイロシン抗菌力の測定を行ない、同時に作ったタイロシンのみの標準曲線と比較を行なった。得られた結果は Fig. 5 に示すように、誤差の範囲で同一曲線にのった。これは魚肉ソーセージおよびゼラチンに加えたタイロシンは完全に回収されることを示すものである。また魚肉ソーセージ、ゼラチンの本定量法に対する盲検値も0であった。このことから、魚肉ソーセージ中のタイロシンの定量を行なうときの標準曲線は、タイロシンのみの標準曲線を使用すればよいことがわかった。

Fig. 5. Recovery of tylosin added to the fish sausage (pre-cooked), and gelatine

Fig. 7. Recovery of tylosin added to raw or cooked tuna flesh

(2) アスパラガス缶詰および包装豆腐

上記実験と全く同様、薬剤を含まないアスパラガス缶詰および包装豆腐について検討した。なお、アスパラガスは液汁、固形分および全体について検討したが、得られた結果は Fig. 6 に示すようにタイロシン標準曲線上にのることがわかった。

Fig. 6. Effect of food components of canned asparagus and soy bean curd on the recovery of tylosin

(3) マグロ生肉および加熱肉

上記同様、マグロ肉および加熱したマグロ肉に種々濃度のタイロシンを加えたときの回収を調べた。得られた結果は Fig. 7 に示してある。これにより、マグロ生肉および加熱肉に加えたタイロシンは完全に回収されることがわかる。

以上3種の実験から、食品中のタイロシンの定量を行なうときの標準曲線は希釈タイロシンの標準液について行なえばよいことがわかった。

8. シリンダー法とディスク法の感度の比較⁹⁾

希釈タイロシン標準液についてシリンダー法とディスク法の標準曲線を作り感度の比較を行なった。得られた結果は Fig. 8 に示してあるが、20 mm の阻止円を示す濃度で比較するとシリンダー法は 0.58 ppm、ディスク法では 2.4 ppm という値を示し、前者は後者に比べ感度が4倍高いことがわかる。したがってシリンダー法では 0.16 ~ 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4段階、ディスク法では 0.64 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の4段階の希釈標準液を準備する必要がある。

9. シリンダー法の誤差について

一般に薬剤の生物学的定量法は化学的定量法に比べ測定誤差が大きい。タイロシンの微生物学的定量法も例外ではない。実際問題としてどのくらいの定量誤差が生ずるかは培地の組成、菌を接種するときの培地の温度、

Fig. 8. Comparison of sensitivity of tylosin assay between cylinder-plate and paper disk-plate techniques

培養温度および時間, 平板の厚みとその均一性, その他
じん速を要するピペットによる分注など定量操作による
誤差も見のがすわけにはいかない. また微生物学的定量
法は操作そのものは簡単ではあるが, 再現性をよくする
には細心の注意と熟練を要することも事実で, キャリバ
ーを用いる阻止径の読みや, 定量法による標準曲線の作
成にも個人差が見られる. 以上のことを前提に, われわ
れの研究室で過去1年間のタイロシンの実験中に得られ
たシリンダー法による多数の標準曲線のなかから任意に
選び出した5回の測定値について測定誤差を検討した結
果をつぎに示した. これの定量操作および測定は常に同

一人で行なっているものである.

その結果は Table 3にまとめてある. 1回の実験で一
つの濃度の薬剤に対しては9個のシリンダー (1枚のペ
トリザラで3個, 3枚で合計9個) を使用して阻止円径
の測定を行なった. 各濃度の測定値とその標準偏差から
測定誤差を算出すると平均2.45%, 最高では4.35%とい
う値を示した. 誤差の要因がいくつも包含され, しかも
肉眼的にキャリバーで阻止円径を測定する結果として
は, この程度の測定誤差は決して大きいとは考えられな
い. しかし Fig. 9に示すように, 阻止円の直径は薬物
の濃度の対数と比例するものである. そして, 阻止円の

Table 3. Errors in the Determination of Tylosin by the Cylinder-plate Assay Technique
(Calculations were done with those figures obtained from the standard
tylosin solution of 2-fold dilution series in 5 experiments)

Conc. of tylosin	Diameter of inhibition zone, and its standard deviation	Error in diameter (%)	Calculated from the standard curve	
			Deviation in concentration	Range of error (%)
0.16 ppm	11.1±0.44	3.96	0.16~0.12	-25.0 ~ 0
	13.7±0.03	0.22	≈0	≈ 0
	11.5±0.50	4.35	0.14~0.17	- 1.25 ~ +6.25
	12.4±0.28	2.26	0.13~0.16	-18.8 ~ 0
	12.4±0.50	4.03	0.12~0.17	-25.0 ~ +6.25
		Av. 2.96±1.73		
0.32 ppm	14.7±0.39	2.65	0.29~0.34	- 9.38 ~ + 6.25
	16.5±0.42	2.54	0.28~0.34	- 1.25 ~ + 6.25
	15.2±0.39	2.56	0.30~0.36	- 6.25 ~ +12.5
	16.2±0.64	3.95	0.28~0.36	-12.5 ~ +12.5
	16.1±0.54	3.48	0.31~0.36	- 3.12 ~ +12.5
		Av. 3.06±0.64		
0.64 ppm	18.8±0.71	3.78	0.64~0.90	0 ~ +40.6
	20.2±0.46	2.28	0.64~0.78	0 ~ +21.9
	18.3±0.38	2.08	0.58~0.68	-9.38 ~ + 6.25
	20.3±0.38	1.85	0.64~0.84	0 ~ +31.3
	19.7±0.53	2.69	0.64~0.88	0 ~ +37.5
		Av. 2.54±0.76		
1.25 ppm	21.3±0.73	3.43	1.15~1.55	- 8.0 ~ +24.0
	22.5±0.35	1.56	1.10~1.34	-12.0 ~ + 7.2
	21.7±0.42	1.97	1.16~1.40	- 7.2 ~ +12.0
	22.5±0.45	2.00	1.15~1.38	- 8.0 ~ +10.4
	21.5±0.23	1.07	1.10~1.28	-12.0 ~ + 2.4
		Av. 2.01±0.88		
2.5 ppm	23.9±0.82	3.58	2.05~2.85	-18.0 ~ + 1.40
	25.5±0.46	1.83	2.23~2.80	-10.0 ~ +12.0
	24.8±0.26	1.05	2.30~2.60	- 8.0 ~ + 4.0
	25.6±0.30	1.17	2.30~2.68	- 8.0 ~ + 7.2
	24.7±0.20	0.81	2.35~2.67	- 6.0 ~ + 6.8
		Av. 1.69±1.13		
		Total average 2.45%

Fig. 9. Standard deviations for tylosin bioassay by the cylinder-plate technique

標準偏差を濃度の測定値の変動に投影すると、濃度における誤差は意外に大きくなることがわかる。描いた標準曲線上の各濃度のそれぞれの阻止径の標準偏差を濃度の変動に換算し、これを百分比で表わすと、Table 3 の最右端の濃度の変動の欄に示したように、多くの場合誤差は数%から十数%、極端な場合には約40%の誤差が認められた。一般的にいて、平板法ではこのように阻止径の小さな変動も濃度としては比較的誤差が大きく現われる結果となる。実際問題としてはある程度までは避けられないとしても、定量の実施に当っては厳密に同一条件で、しかも使用するシリンダーやディスクの数はできるだけ多く用いることが必要である。しかも結果的にはしばしば10~20%の誤差が起ころうるのであるから測定値についての評価や現象の解析には十分に誤差についての考慮を払わねばならない。

要 約

食品中のタイロシン (Tl) の微生物学的定量法、とくに *Sarcina lutea* (ATCC 9341) を被検菌とする平板法について検討を行ない、その結果に基づく一つの定量術式をここに提唱した。本法によりシリンダーを用いる場合、Tl として $0.16 \mu\text{g/ml}$ 以上、食品中の Tl に対しては、抽出比を5とすれば約 $1 \mu\text{g/g}$ 以上の Tl の定量を行なうことができる。なお、ディスク法の感度はシリンダー法の約1/4であった。

本研究を行なうに当り実験材料の提供ならびに文献の入手に便宜を得た Eli Lilly & Co. ならびに塩野義製薬株式会社に対し感謝する。

本報の要旨は日本食品衛生学会第11回学術講演会（昭和41年5月18日）にて発表。

文 献

- 1) J. M. McGuire, W. S. Boniece et al.: *Antibiotic & Chemtherapy* **XI**, 320 (1961).
- 2) "Tylosin in Food Technology", Eli Lilly & Co. Publication.
- 3) D. C. Grove, W. A. Randall: *Assay Methods of Antibiotics*, A Laboratory Manual, Med. Encyclopedia, Inc., New York.
- 4) 河端俊治, 渋谷公代, 鈴木 健: 日水産. **31**, 357 (1965).
- 5) 興津知明, 河端俊治, 小嶋秩夫: 同上. **31**, 219 (1965).
- 6) B. Malin: Personal communication.
- 7) M. Yokoseki, C. Nemoto, K. Amano: 日水産. **31**, 619 (1965); **31**, 673 (1965).
- 8) 富山哲夫, 白石悦子: 同上. **31**, 312 (1965).