タイロシンの安定性および抗菌力に及ぼす 金属イオンの影響—I.

Cylinder-plate 法で測定した場合

河端俊治・渋谷公代・鈴木 健

(1965 年 3 月 1 日受理)

EFFECT OF METAL IONS UPON THE HEAT STABILITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF TYLOSIN—I. RESULTS OBTAINED BY THE CYLINDER-PLATE ASSAY METHOD

Toshiharu KAWABATA, Kimiyo SHIBUYA and Takeshi SUZUKI*

Present studies aimed to disclose the effect of pH value of test solution on the heat stability of tylosin, and that of various metal ions added to test solutions of varying pHs on the heat stability and antimicrobial activity of tylosin. In the present paper, determination of tylosin activity was carried out by the cylinder-plate assay technique with *Sarcina lutea*, and a modified streptomycin assay agar of pH 8.5.

Results obtained may be summarized as follows:

1. No appreciable change in the antibacterial activity was observed in the test solution of SÖRENSEN phosphate buffer of pH 6.0, 7.0 or 8.0, as well as of Difco nutrient broth of same pHs on heating at 100°C for 1 hour (Table 1).

2. Tylosin was heated at 100°C for 30 minutes in distilled water, and in SÖRENSEN phosphate buffer solution or Difco nutrient broth of pH 6.0, 7.0 or 8.0 in the presence of metal ions listed in Table 2.

No appreciable decrease in the activity was noted at pH 7.0 and 8.0 in spite of the presence of metal ions, while a marked change was noted in aqueous solution containing each 300 ppm of Al^{+++} , Fe^{+++} or Sn^{++} , and similar change was seen with Al^{+++} and Fe^{+++} in the phosphate buffer of pH 6.0 and nutrient broth as well.

The presence of such metal ions as Al^{+++} , Fe^{+++} or Sn^{++} in test solution resulted in increment of activity as expressed in tylosin equivalent value, although we have expected a reduction in antibacterial activity (Table 3).

3. Below pH 5 at elevated temperature, tylosin has been reported to convert into desmycosin (tylosin B), although antibacterial activity is still retained. However, the activity of desmycosin when measured by the cylinder-plate assay method showed 3 times as much as that of the same concentration of tylosin (see Fig. 1).

This discrepancy might be indicating the necessity of use of an appropriate method other than the cylinder-plate assay technique in order to evaluate precisely the phenomena mentioned above.

ま え が き

タイロシン** (Tylosin, 以下 Tl と略) は *Streptomyces fradiae* から分離したアクロライド系抗生物

* 国立予防衛生研究所食品衛生部 (Department of Food Control, National Institute of Health, Shinagawa-ku, Tokyo)

** 現在各方面で検討中の薬剤であつて、わが国では今のところ使用許可されてはいない。

質の一種で、主としてグラム陽性菌に有効な狭域抗生物質である。Tl は加熱に対しかなり安定で、毒性も極めて低いところから、容器・包装と加熱を併用する食品に適用できる可能性があり、最近罐詰、魚肉ソーセージ、包装とうふなどについて応用実験が行なわれている。

一般に防腐剤の抗菌力は基質の pH によつて異なり、また加熱に対する安定性も、加熱条件のほか食品の成分や添加物により影響され、しばしば失活や抗菌力の低下などの現象が見られる。

したがつて、実際の食品に適用する前に、これらの要因と、その程度について十分に明らかにする必要がある。

“Tylosin in Food Technology”¹⁾ においては、水溶液や培地中の Tl はある種の金属イオン（それぞれ 300 ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} ）の存在下で放置すると、抗菌力の低下がみられることが示されている。一方富山²⁾ はアサリ剥身に加えた Tl は、加熱によつて不活化されることをみ、これは組織中の Fe^{+++} および油の過酸化物によるものとした。

われわれは Tl の加熱破壊に及ぼす pH の影響を基礎的に調べるとともに、Tl の加熱安定性に及ぼす各種金属イオンの影響を調べた。

なおこの実験は、Tl の抗菌力を *Sarcina lutea* を定量菌とし、pH 8.5 に修正した streptomycin assay medium³⁾ を用い、cylinder-plate 法で測定した。

予め、cylinder-plate 法の測定条件を一定にし、かつ最も感度のよい方法を求めるための予備実験を行ない、上記実験を行なつたのであるが、予期に反し、cylinder-plate 法では、Tl は金属イオンの存在によつて失活するという現象は見られなかつた。しかしその理由は測定自身に欠陥があることが明らかになつたので、ここでは一応 cylinder-plate 法について得た結果を報告し、さらに妥当と思われる測定法について得た結果について別に報告する。

実 験

〔予備実験〕 Cylinder-plate 法による Tl の生物学的定量の標準化

Tl の生物学的定量法については、*Staphylococcus aureus* H を用いる比濁法（pH 7.0 の Edamin broth）、*Sarcina lutea* (ATCC 9341) を用い、ペーパー・パッドによる平板法⁴⁾ および *B. stearothermophilus* No. 1518 を用い、ブドウ糖から酸生成の阻止によつて判定するという方法が報告されている¹⁾。多数の試料を同時にしかも簡易に測定するには平板法が最も便利であると考え、*Sarcina lutea* ATCC 9341 を被検菌⁵⁾とし、測定条件の検討を行なつた。測定方法の概要は次の如くである。

使用培地： pH 8.5 に修正した streptomycin assay agar。

接種菌： Difco nutrient broth, 32°C 1 夜培養。

測定法： 予め加温溶解し 45°C に保つた検定用培地に一定量の菌液を加え、よく混ぜた後、その 17 ml ずつを径 15 cm の底の平らなシャーレに注加し、平板を作成する。以下ステンレス・カップまたはペーパー・パッドを用いる手技は常法通り行なう。なおこの径のシャーレでは 1 枚に 15 個のカップまたはパッドを置くことができる。3 枚のシャーレ中の 3 個ずつのカップに同一試料を注加し、計 9 個の阻止輪の平均値を求めた。

Tl の標準液： Eli Lilly 製 Tl 乳酸塩 (Lot. P-81-893) の 1,000 ppm 水溶液を作り、5 ml ずつ共栓ポリエチレン小試験管中に分注し、フリーザー中に保存し、用時融解し、SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液 (pH 8.0) にて希釈して使用した。

なお測定条件についての予備実験結果を要約すると次のようになる。

* Paper disk-agar diffusion plate assay または disk-plate assay method.

** Tl に対しできるだけ感受性の高い菌を求めるため、多くの stock strain について検索したが、高感度の菌株は得られなかつたので、一応 Tl の検定菌として報告されている上記菌株を用いることにした。

1. 検定菌の接種量について:

検定菌の Difco nutrient broth, 32°C, 18 時間培養の 10 倍稀釈液 1 ml を 100 ml の検定培地に加えた場合が最も感度が高かった。

2. 稀釈液の pH の影響:

稀釈液として pH 6.0, 7.0, 8.0 の SÖRENSEN 燐酸塩緩衝液を用いた場合, その 3 者については実用上有意な差は見られなかった。

3. 検定用培地の pH の影響:

同一組成で pH を 6.5, 7.5, 8.5 に修正した streptomycin assay agar について, 標準 T1 について感度の比較を行なった (ただし稀釈液の pH は 8.0)。その結果, pH 8.5 の培地が最も高感度であった。(最低検出限界; pH 8.5 = 0.07 ppm, pH 7.5 = 0.1 ppm, pH 6.5 = 0.17 ppm)。

4. カップ法とペーパー・パッド法の感度の比較:

使用したパッドは CARL SCHLEICHER and SCHUELL 製 No. 740 E, 1/4" (6.35 mm)。同一条件で標準 T1 について, それぞれ標準曲線を作成したが, カップ法はパッド法にくらべ 4 倍の感度を示した。

以上のことから, 次に示す実験における T1 の定量は, *Sarcina lutea* ATCC 9341 の Difco nutrient broth, 32°C, 18 時間培養を使用し, その 10 倍稀釈 1 ml を 100 ml の streptomycin assay agar (pH 8.5) に接種する。また T1 の稀釈液は pH 8.0 の SÖRENSEN 燐酸塩緩衝液を用い, 定量はカップ法にて行ない, 同一試料 9 個のカップの阻止輪の平均値を, T1 の標準曲線に対比して濃度を算出することにした。(上記方法で, T1 は 0.1~1.0 ppm の範囲で標準誤差 10~20 %にて測定することができる)。

実験 1. T1 の加熱に対する安定性

SÖRENSEN 燐酸塩緩衝液 (pH 6.0, 7.0, 8.0) および Difco nutrient broth (pH 6.0, 7.0, 8.0 に修正) 中における T1 の加熱に対する安定性を調べた。

実験方法:

被検液: SÖRENSEN 燐酸塩緩衝液 pH 6.0, 7.0 および 8.0 に T1 (T1 乳酸塩として) 40 ppm を含む液, および pH 6.0, 7.0, 8.0 に修正した Difco nutrient broth 中に 40 ppm の T1 を加えたもの。

Table 1. Effect of Heating Period on the Stability of Tylosin in SÖRENSEN Phosphate Buffer or Difco Nutrient Broth of pH 6.0, 7.0 and 8.0.

Conc. of tylosin in test solution; 40 p.p.m.

Diluent; SÖRENSEN phosphate buffer of pH 8.0.

Determination of tylosin activity; by the cylinder-plate method with a modified streptomycin assay agar of pH 8.5, and *Sarcina lutea*.

I. Change in antibacterial activity of tylosin in SÖRENSEN phosphate buffer of pH 6.0, 7.0 and 8.0.

II. Change in antibacterial activity of tylosin in Difco nutrient broth of pH 6.0, 7.0 and 8.0.

Period of heating in minutes	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0	Period of heating in minutes	pH 6.0	pH 7.0	pH 8.0
	ppm	ppm	ppm		ppm	ppm	ppm
0	1.1	1.1	1.1	0	1.1	1.0	1.0
5	1.1	1.0	1.0	5	1.0	0.9	0.9
10	1.2	1.1	1.1	10	0.9	1.0	1.0
15	1.2	1.0	1.1	15	0.9	0.9	0.9
20	1.0	1.0	1.2	20	1.0	1.0	0.9
30	1.0	1.0	1.1	30	0.9	1.1	0.9
60	1.0	1.0	1.1	60	0.9	0.9	0.8

Table 2. Test Metal Solutions*

Metal	Final concentration in test solutions
Al ⁺⁺⁺ (AlCl ₃ ·6H ₂ O)	300 ppm as Al ⁺⁺⁺
Sn ⁺⁺ (SnCl ₂ ·2H ₂ O)	300 " " Sn ⁺⁺
Pb ⁺⁺ (Pb(CH ₃ COO) ₂ Pb(OH) ₂)	7 " " Pb ⁺⁺
Cu ⁺⁺ (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	50 " " Cu ⁺⁺
Ca ⁺⁺ (CaCl ₂)	300 " " Ca ⁺⁺
Zn ⁺⁺ (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	100 " " Zn ⁺⁺
Fe ⁺⁺⁺ (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	300 " " Fe ⁺⁺⁺
Mg ⁺⁺ (MgCl·6H ₂ O)	300 " " Mg ⁺⁺

* Kinds of metal ions and their concentrations were referred from the "Tylosin in Food Technology".

稀釈液: pH 8.0 の SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液。

加熱方法: 被検液を 1 ml ずつ目盛付共栓中試験管中に分注, 綿栓を施し, 沸騰水浴中で 60 分まで加熱した。加熱後はただちに水浴中で急冷し, 滅菌した稀釈液を加えて 20 ml の標線まで満し, これを原液として, 上記稀釈液を用い 2 倍稀釈を行なった。

T1 の定量方法: 前述の通り。

結果:

得られた結果は Table 1, I および II に示してある。上記加熱条件の範囲内では T1 の加熱による失活は全く認められな

Table 3. Effect of Metal Ions upon the Stability of Tylosin at 100°C.

I. In SÖRENSEN phosphate buffer of pH 6.0, 7.0 or 8.0, and in distilled water

Metal ions	SÖRENSEN phosphate buffer solution						Distilled water	
	pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0			
	ppm	pH**	ppm	pH**	ppm	pH**	ppm	pH**
Al+++	1.95	(2.96)	1.15	(6.49)	1.05	(7.15)	1.95	(3.97)
Ca++	1.25	(5.42)	1.15	(6.90)	1.05	(7.64)	1.15	(4.94)
Cu++	1.25	(6.00)	1.25	(7.04)	1.15	(7.94)	1.15	(5.45)
Fe+++	1.95	(3.38)	1.05	(6.77)	1.05	(7.45)	1.75	(2.64)
Mg++	1.05	(5.81)	1.25	(6.96)	1.05	(7.68)	1.15	(4.29)
Pb++	1.15	(6.03)	1.25	(7.01)	1.05	(7.93)	1.15	(5.49)
Sn++	1.15	(5.72)	0.96	(6.93)	0.96	(7.73)	1.65	(2.50)
Zn++	1.05	(5.89)	1.25	(6.99)	1.15	(7.84)	1.05	(5.70)

II. In Difco nutrient broth of pH 6.0, 7.0 or 8.0, and in distilled water

Metal ions	Difco nutrient broth						Distilled water
	pH 6.0		pH 7.0		pH 8.0		
	ppm	pH**	ppm	pH**	ppm	pH**	
Al ⁺⁺⁺	1.61	(3.35)	1.15	(6.70)	1.12	(7.31)	2.03
Ca ⁺⁺	1.00	(6.99)	1.12	(7.69)	1.0	(7.73)	1.12
Cu ⁺⁺	1.20	(5.49)	1.0	(6.67)	1.0	(7.75)	1.0
Fe ⁺⁺⁺	1.35	(4.12)	1.12	(6.60)	1.12	(7.45)	1.85
Mg ⁺⁺	1.00	(7.45)	1.22	(7.83)	1.0	(8.18)	1.12
Pb ⁺⁺	1.00	(6.00)	1.12	(6.99)	1.0	(7.91)	1.12
Sn ⁺⁺	0.90	(4.79)	1.0	(5.50)	1.0	(7.52)	1.50
Zn ⁺⁺	1.00	(5.86)	1.12	(6.64)	1.0	(7.80)	1.0

Note: 1). Change in tylosin activity by heating was expressed in tylosin equivalent value in ppm, and antimicrobial activity of tylosin was determined by the cylinder plate assay method with modified streptomycin assay agar of pH 8.5, and *Sarcina lutea* ATCC 9341.

2). ** Figures in parentheses are indicating pH values of test solutions after having been heated.

つた。

実験 2. Tl の加熱安定性に及ぼす金属イオンの影響

蒸溜水, pH 6.0, 7.0, 8.0 の SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液および, pH 6.0, 7.0, 8.0 に修正した Difco nutrient broth 中で各種金属イオンを加えたときの Tl 加熱安定性を調べた。

実験材料および方法:

使用金属イオン: 使用した金属塩の種類および濃度は Table 2 に示した通りで, 薬品はすべて JIS 特級品を使用した。なお金属イオンの種類および濃度は “Tylosin in Food Technology” に示されたものと同一である。

Tl: 被検液中の Tl の濃度はすべて 20 ppm とした。

加熱は 100°C で 30 分間行ない, 力価の測定は, 実験 1 と同様である。

結 果:

種々な金属イオンが存在したときの Tl の 100°C における安定性についての実験結果は Table 3 に示した, なお表中蒸溜水については実験を 2 回繰返した結果を示してある。また同一条件で行なつた別の被検液について, 加熱前後の pH 値を BECKMAN pH 計の内部電極にて測定したが, その結果は Table 3 中に括弧を付して示してある。

Table 3 から判るように, cylinder-plate 法にて力価は, Tl 相当量として, SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液の pH 6.0 においては Al^{+++} , Fe^{+++} を添加したもの, 蒸溜水中にては Al^{+++} , Fe^{+++} , Sn^{++} を添加したものの, また pH 6.0 に修正した broth 中では Al^{+++} , Fe^{+++} を加えたものが, 過大値を示すことがわかつた。これら変化を示した被検液は Table 3 の pH 値からわかるように, いずれも低い pH 値を示した (ただし加熱の前後における pH の変化は有意差がみられなかつた)。

“Tylosin in Food Technology” においては, Tl は金属塩水溶液中において, 室温において 2 日放置すると, Al^{+++} , Fe^{+++} , Sn^{++} は Tl の抗菌力を低下させると記載してある。この実験でみると, 予期に反し失活ではなく, 過大値が得られたのである。この矛盾をとくため次の実験を行なうことにした。

実験 3. Tl とデスマイコシン (Dm) の感度の比較

Tl は pH 5 以下においては分解してデスマイコシン (Dm) に変化するといわれている¹⁾。しかし文献では Dm は Tl に近い抗菌力を有することが示されている。そこでわれわれの定めた条件下で, cylinder-plate 法により Tl と Dm の標準曲線を求め, 感度の比較を行なつた。

実験材料および方法:

標準 Tl 液: ELI LILLY and Co. 製 (Lot. No. P-85893)。

標準 Dm 液: 同上製 (Lot. No. 361-370 B-126-6)。

上記をそれぞれ 50.0 mg を精秤し, Tl は蒸溜水, Dm は 1 滴の酢酸を加えた後, 水で 50 ml の定容とし, これを標準原液とした (1,000 ppm)。

稀釈液: pH 8.0 の SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液。

力価の測定: 前に記載した方法。

結 果:

得られた標準曲線 (阻止径—薬剤濃度の対数) は Fig. 1 に示した通りである。最も誤差の少ない阻止径 20 mm における抗菌力は, 図中に示してあるように, Dm は Tl の 3 倍

Fig. 1. A Standard Curve for Assay of Tylosin and Desmycosin

に相当することがわかった。

考 察

1. Tl の cylinder-plate 法による生物学的定量法について。

抗生物質などの生物学的定量法については、最も感受性が高く、かつ取扱い易い菌株の選定が重要である。われわれもこの目的のため、保存菌株について感受性を調べたのであるが、とくにすぐれた菌株を見出し得なかつたので、ここでは ELI LILLY and Co. の規定した Tl の disk-plate 法に使用している *Sarcina lutea* ATCC 9341 株を使用することにした。予備実験の項にて示したような条件で本実験を行なうことにしたのである。

2. Tl の安定性に及ぼす金属イオンの影響。

Tl 自体は加熱にかなり安定な物質であるといわれているが、われわれの実験でも pH 6.0, 7.0, 8.0 において 100°C で1時間の加熱では失活しないことが明らかになった。しかし“Tylosin in Food Technology”においては、300 ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} , または Sn^{++} が存在すると、常温でも Tl の失活が起こることが示されている。ただこの実験はすべて水溶液として測定したものである。われわれは上記の追試を行なうとともに、実際の食品中で金属イオンが果して Tl の失活の原因となるかどうか知るための基礎実験として、pH 6.0, 7.0, 8.0 の磷酸塩緩衝液および broth 中で加熱したときの抗菌力の変化を調べた。その結果 pH 7.0 および 8.0 においては全く失活は起こらなかつた。しかし蒸溜水中においては Fe^{+++} , Al^{++} および Sn^{++} , また pH 6.0 の磷酸塩緩衝液または broth 中においては Fe^{+++} , Al^{+++} の添加で抗菌力に大きな変化がみられた。しかし予期に反して失活という現象ではなく、Tl 相当量としてはむしろ著るしく抗菌力が增大するという結果を示したのである。

一方 Tl は pH 5 以下の酸性領域では分子を構成している mycarose という糖が脱落して Dm (desmycosin または tylosin B ともう) に変化することがわかつている。しかし Dm も依然として抗菌力を有するものであるから、抗菌力の変化のみでは、その生成の確認はできない。

ところで Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} はすべて水溶液では強い酸性を示し、また pH 6.0 の緩衝液や broth に 300 ppm の割合で加えたときには、 Fe^{+++} , Al^{+++} は Table 3 に示したようにかなりの酸性を示した。これらの溶液中では加熱によつて Tl は容易に Dm に変化するはずである。

次に Tl と Dm の標準曲線について、*Sarcina lutea* に対する感受性を比較したところ、Fig. 1 に示したように、同一濃度で Dm は見掛け上3倍の抗菌力を示すことがわかつた。そこで Table 3 中の蒸溜水、pH 6.0 の緩衝液および broth についての測定値中、 Al^{+++} , Fe^{+++} に対するものを Dm の標準曲線を用いて結果を示すと、次の Table 4 のような数値が得られた。

初めの被検液 (1 ml) の Tl の濃度は 20 ppm であり、加熱後稀釈液を加えて 20 ml の定容としたので、

Table 4. Comparison of Change in Activity of Tylosin by Fe^{+++} or Al^{+++} at Elevated Temperature when expressed in Tylosin Equivalent and Desmycosin Equivalent Values in ppm.

Original figures in activity were based on Table 3.

Change of tylosin activity after being heated was expressed in tylosin equivalent value in ppm and desmycosin equivalent value in ppm, both of which were calculated by the respective standard curves in Fig. 1.

Metal ion	SÖRENSEN phosphate buffer of pH 6.0		Difco nutrient broth of pH 6.0		Distilled water	
	as Dm	as Tl	as Dm	as Tl	as Dm	as Tl
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
Al^{+++}	0.53	1.95	0.35	1.60	0.53	1.95
Fe^{+++}	0.53	1.95	0.30	1.35	0.41	1.85

もし加熱後変化しなければ、Tl として 1 ppm が期待値になる。また酸性で加熱したために Tl のことごとくが Dm になつたとすたば、Tl 相当量として 3 ppm が期待値となるはずである。

ところで Al^{+++} , Fe^{+++} の存在下で加熱した Tl は Table 4 に示したように Tl で示せば約 2 ppm に、また Dm 相当量としては約 1/2 と失活が起つたという結果になる。そしてこの場合の Tl の失活ということとは $Tl \rightarrow Dm \rightarrow ?$ という過程を経るのであろう。

しかし Tl と Dm は cylinder-plate 法での感度のちがいは 3 倍もあり、われわれの得た結果から上のような変化を定量的に説明することはほとんどできない。むしろこのような研究を行なうには cylinder-plate 法は不適当手段ということができよう。Tl と Dm の平板法における感度の差は、両物質の寒天培地中への拡散速度の差という可能性と、両物質の測定条件 (pH 8.5) における抗菌力の差によるという可能性とが考えられるが、いずれにせよこのような要因の加わらない測定方法でなければ、金属イオンの影響を正確に論ずることはできないであろう。これについては、次の段階で TREFFERS らの方法に準じた比濁法でこの現象を追求したところ、 Fe^{+++} , Al^{+++} などの影響がかなり明らかになつた。これについては次の報告で記載することにする。

総 括

タイロシン (Tl) の加熱安定性に対する金属イオンの影響を、*Sarcina lutea* を用いる cylinder-plate 法で調べた。得られた結果を要約すると：

1. Tl は pH 6.0, 7.0, または 8.0 の SÖRENSEN 磷酸塩緩衝液または Difco nutrient broth 中において、100°C, 60 分間加熱しても抗菌力に変化はみられなかつた。
2. Tl は各 300 ppm の Fe^{+++} , Al^{+++} , Sn^{++} の存在下で加熱すると、抗菌力の低下を起こすことが知られているが、これらの金属イオンの存在下でも、pH 7.0 または 8.0 の磷酸塩緩衝液および broth 中では 100°C, 30 分間の加熱によつて抗菌力の変化は見られなかつた。一方水溶液、pH 6.0 の磷酸塩緩衝液または broth 中で加熱すると抗菌力に大きな変化がみられた。しかし cylinder-plate 法で Tl 相当量として表わすと、むしろ著しい抗菌力の増大という結果がみられた。
3. Tl は酸性で加熱するとデスマイコシン (Dm) に変化する。cylinder-plate 法では Dm は Tl の 3 倍の抗菌力を有することがわかつた。Tl を金属イオンの存在下でとくに酸性で加熱すると Dm を経てさらに分解し、失活するように思われるが、少なくとも cylinder-plate 法ではこの結果を正確に説明することはできない。

なおこの研究を行なうにあたり、ELI LILLY and Co. および塩野義製薬 K. K. から種々便宜を得た。ここに記して謝意を表わす。

文 献

- 1) ELI LILLY and Co. Report, 1962: Tylosin in Food Technology; Food Processing with Tylosin Lactate.
- 2) 富山哲夫・北原慶子：昭和 39 年度日本水産学会年会にて講演 (1964 年 4 月, 東京).
- 3) D. C. GROVE and W. A. RANDALL: Assay Methods of Antibiotics, A Laboratory Manual, Med. Encyclopedia, Inc., New York.