

サイアミナーゼに関する研究

—コイの組織のビタミン B₁ 量におよぼす抗生物質の影響について—

佐藤 雅子

(1982年10月18日 受理)

Studies on Thiaminase.

—Effect of Antibiotic on the Thiamine Concentration in the Tissues of Carp.—

Masako SARO

動物の腸内におけるビタミンの生合成は、動物の種類によって異なるが¹⁾, Sniesko²⁾は、魚類では温血動物に比べ、腸内細菌が少なく、空腹時には消化管が無菌になると考えている。手島³⁾⁴⁾⁵⁾らは、魚類の腸内細菌がビタミン栄養に果している役割をみるために、コイの腸内細菌を混合培養し、ビタミンの消長を調べた結果、パントテン酸、B₁、B₂は腸内細菌によって供給される可能性が少ないが、B₁₂はその可能性が大きいことを明らかにし、またコイの腸内細菌について、短桿菌が多く、球菌、長桿菌は比較的少なく、グラム陽性菌とグラム陰性菌はほぼ同じであったと述べている⁶⁾。橋本⁷⁾らはコイの飼料に B₁₂ オーレオマイシン、テラマイシン、ストレプトマイシンを添加した場合、B₁₂の投与は、成長促進に効果はなく、B₁₂無添加群の魚でも相当量の B₁₂を含み、腸内細菌が B₁₂を合成すると報告している。

本実験では、ストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシンを添加した飼料でコイを飼育し、組織の B₁ 量の変動を比較し、これらの抗生物質添加が、組織の B₁ に及ぼす影響を検討した。

実験方法

(1) 飼料の調整

実験に使用した飼料は前回¹¹⁾同様 Halver らのビタミン試験飼料⁸⁾を一部変更したものである。実験1では、Table 1のように B₁無添加の Halver 食に、ストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシンの3種の抗生物質を 0.015%、0.045% 添加した。実験2では、Table 2のように、B₁無添加の Halver 食、または B₁ 5mg 添加の Halver 食に実験1と同様にストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシンを同量ずつ添加し 0.15%、1.5%、15% とした。ストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシン (塩酸オキシテトラサイクリン) は、それぞれ東洋、萬有、協和醸酵のものを使用した。

給餌量は、体重の約 10% 又は 6% に相当する量を 1日2回、午前 10時と午後 4時に投餌した。給餌したものは完全に摂餌するようにし、残渣がみられる時は、給餌量を調整した。

Table 1. The composition of the test diet

Group	Basal diet	Added thiamine to Halver's dry diet	Added antibiotic to Halver's wet diet	Antibiotic in the test diet
		mg/100 g	mg/Kg	%
1	Halver's diet	0	none	0
2	Halver's diet	0	kanamycin 50 mg, asmycin 50 mg, streptomycin 50 mg	0.015
3	Halver's diet	0	kanamycin 150 mg, asmycin 150 mg, streptomycin 150 mg	0.045

Table 2. The composition of the test diet

Experimental group	Basal diet	Added thiamine to Halver's dry diet	Added antibiotic to Halver's wet diet	Thiamine in the test diet
		mg/100 g	g/100 g	mg/100 g
I	Halver's diet	0	0.15	0
II	Halver's diet	0	1.5	0
III	Halver's diet	0	15	0
IV	Halver's diet	5	0.15	2.51
V	Halver's diet	5	1.5	2.34
VI	Halver's diet	5	15	1.42

(2) 実験魚

コイは、鹿児島県水産試験場（指宿）から求め、入取後ネグホンで薬浴させ、B₁無添加のHalver食で約3週間飼育した。60 l容量のガラスの水槽に体重約10gのコイを20匹宛入れ、循環口過式、水温23±1°Cで飼育した。飼料を投与して2~3時間後、水槽内の水を完全に交換した。

(3) 組織のB₁量

飼育4週間毎に、コイの組織の中でB₁濃度の高い眼球、筋肉、肝臓のB₁量を測定した。組織のB₁浸出は、硫酸浸出法⁹⁾、B₁定量は¹⁰⁾、チオクロム法で行なった。

実験結果

実験 1.

Table 1のように、B₁無添加のHalver食に3種の抗生物質ストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシンをそれぞれ添加したもの（2群、3群）で、コイを8週間飼育した。対照は、抗生物質無添加、B₁無添加のHalver食で、同様に飼育した（1群）。

(1) 成長曲線

コイは、食欲は旺盛で元気に活動し、体長、体重の増加はいずれの群（1, 2, 3群）もほとんど同じであり、8週間の飼育で体重は飼育はじめの約3.5倍になった（Table 3, 4, Fig. 1）。

(2) 組織のB₁量

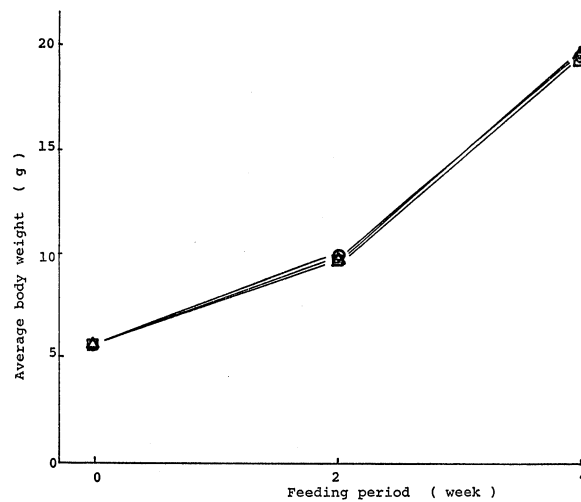
出発時の組織のB₁は、B₁無添加食で予備飼育したこともあり、筋肉ではきわめて低い値

Table 3. Average body weight of the carp fed on thiamine-free Halver's diet containing antibiotic.

Feeding Period	Thiamine-free Halver's diet		
	Antibiotic		
	0 1群	0.015% 2群	0.045% 3群
week	body weight (g)		
0	5.5±0.5	5.4±0.7	5.5±0.7
2	10.3±1.2	10.0±2.2	9.9±1.5
4	19.2±1.0	19.5±3.5	18.8±2.7

Table 4. Average body length of the carp fed on thiamine-free Halver's diet containing antibiotic.

Feeding period	Thiamine-free Halver's diet		
	Antibiotic		
	0 1群	0.015% 2群	0.045% 3群
week	body length (cm)		
0	7.4±0.1	7.5±0.1	7.4±0.1
2	9.0±0.1	8.9±0.2	8.9±0.1
4	10.9±0.3	11.0±0.2	11.0±0.2



Thiamine; 0 mg, ○—○ Antibiotic 0%, △—△ Antibiotic: 15 mg%, □—□ Antibiotic: 45 mg%

Fig. 1. Average body weight of the carp fed on thiamine-free Halver's diet containing antibiotic.

であった。B₁無添加, 抗生物質添加の Halver 食投与により組織の B₁量は低下するが, 抗生物質 0.015g% 添加群 (2群), 抗生物質 0.045g% 添加群 (3群) の2週, 4週目の眼球, 筋肉, 肝脾臓の B₁量は, いずれも大体同じであり, これらの値は, 抗生物質無添加群 (1

Table 5. Thiamine concentration in the tissue of the carp fed on thiamine-free Halver's diet containing antibiotic.

Feeding Period	Tissue	Thiamine-free Halver's diet		
		Antibiotic		
		0 1群	0.015% 2群	0.045% 3群
week		thiamine mg/wet tissue 100 g		
0	Hepato-pancreas	0.203	0.203	0.203
	Muscle	0.006	0.006	0.006
	Eye	2.38	2.38	2.38
2	Hepato-pancreas	0.01	0.093	0.100
	Muscle	0.014	0.009	0.019
	Eye	1.78	1.85	1.82
4	Hepato-pancreas	0.034	0.012	0.006
	Muscle	0.007	0.005	0.004
	Eye	1.01	1.04	1.11

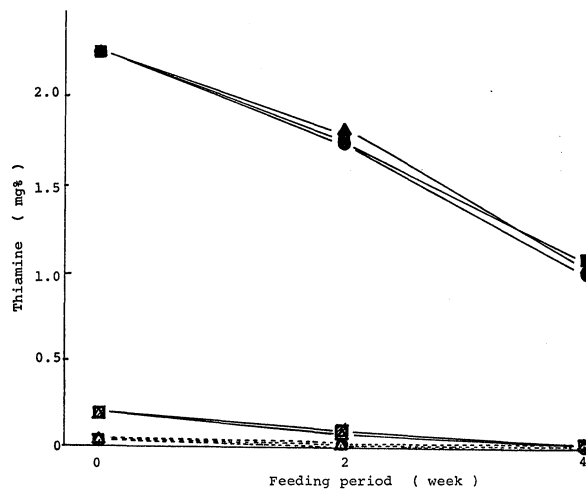


Fig. 2. Thiamine concentration in the hepato-pancreas, muscle and eye of the carp fed on thiamine-free Halver's diet.

Antibiotic: 0 mg%, ●—● Hepato-pancreas, ○··○ Muscle, ●—● Eye
 Antibiotic: 15 mg%, ▲—▲ Hepato-pancreas, △··△ Muscle, ▲—▲ Eye
 Antibiotic: 45 mg%, ■—■ Hepato-pancreas, □··□ Muscle, ●—● Eye

群) とほとんど同じであった (Table 5, Fig. 2)。

実験 2.

実験 1 で抗生物質の添加群と無添加群との間に体長, 体重の変化, 組織の B₁ 量の変化に相異が認められなかったのは, 抗生物質の添加量が少なく, 飼育期間が短かったことも関係したのではないかと考え, 実験 2 では, 抗生物質の添加量を 0.15 g%, 1.5 g%, 15 g% とし, 16 週間コイを飼育した。基本食は, B₁ 無添加の Halver 食と B₁ 5 mg 添加の Halver 食の 2 種類の飼料に抗生物質を添加した。抗生物質 15% 添加群では, 抗生物質の量が多く, 飼料の調整時水分が不足して餌が固くなり, 均一な飼料を作ることがむずかしかつたため, 最低量の水分を補給した。その結

Table 6. Average body weight of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Feeding Period	Thiamine : 0 mg			Thiamine : 5 mg		
	Antibiotic					
	0.15% I 群	1.5% II 群	15% III 群	0.15% IV 群	1.5% V 群	15% VI 群
week	body weight (g)					
0	17.2±0.8	17.4±0.6	17.3±0.7	17.4±0.5	17.9±0.6	18.2±0.6
4	27.4±0.3	26.0±2.2	16.8±0.6	28.2±1.5	25.7±1.0	16.8±0.6
6	36.1±5.2	34.2±3.6	17.3±0.9	38.5±3.4	33.2±2.2	17.7±0.8
8	42.5±6.8	41.9±4.1	17.6±1.0	50.1±4.6	42.3±3.5	17.9±0.8
10	55.1±7.2	54.7±7.0	18.5±1.4	64.3±7.8	58.0±7.0	19.4±1.0
12	71.9±10.1	59.2±7.5	20.3±1.7	75.9±9.6	64.8±7.8	20.1±1.3
14	82.5±12.2	72.9±11.9	21.1±2.8	90.6±16.8	79.3±13.0	22.0±2.2
16	98.2±16.0	84.6±13.4	24.6±4.0	120.4±24.3	96.7±15.9	25.1±3.2

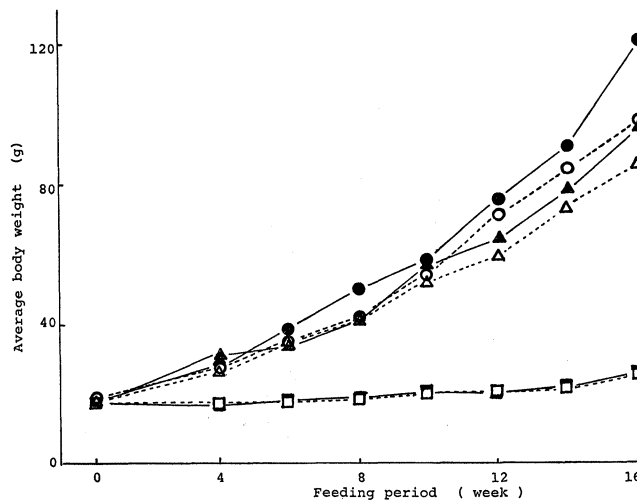


Fig. 3. Average body weight of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Thiamine: 0 mg, ○—○ Antibiotic: 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5%, □—□ Antibiotic: 15%
Thiamine: 5 mg, ●—● Antibiotic: 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5%, ■—■ Antibiotic: 15%

果, B₁ 5mg 添加の飼料の B₁ 量は Table 2 のようになった。

(1) 成長曲線

Table 6, Fig. 3 のように, 平均体重の変化については, 抗生物質 0.15%, 1.5g% 添加では, B₁ 無添加 (I, II 群), B₁ 5mg 添加 (IV, V 群) のいずれの場合も成長は良好であり, 16 週間の飼育で, 飼育はじめの 6~7 倍に成長した。これに対し抗生物質 15% 添加では, B₁ 無添加 (III 群), B₁ 5mg 添加 (VI 群) のいずれも飼育はじめは体重はやや減少し, その後増加したが, 16 週目の体重は, 飼育はじめのおよそ 1.5 倍の増加にすぎなかった。

平均体長についても同様に, 抗生物質 0.15%, 1.5% 添加群については, B₁ 無添加, B₁ 5mg 添加群いずれも飼育はじめの 1.8~1.9 倍に増加したが, 抗生物質 15% 添加群では,

Table 7. Average body length of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Feeding period	Thiamine : 0 mg			Thiamine : 5 mg		
	Antibiotic					
	0.15%	1.5%	15%	0.15%	1.5%	15%
	I 群	II 群	III 群	IV 群	V 群	VI 群
week	body length (cm)					
0	10.9±0.1	10.8±0.1	10.8±0.1	10.7±0.1	10.9±0.1	10.9±0.3
4	12.4±0.3	12.6±0.3	10.9±0.1	12.4±0.2	12.2±0.2	11.1±0.1
8	14.0±0.6	14.2±0.1	11.0±0.2	14.9±0.4	14.3±0.4	11.2±0.4
12	16.0±1.1	15.9±0.6	11.3±0.3	16.8±0.8	16.1±0.7	11.3±0.2
16	18.6±1.6	17.6±0.8	12.2±0.5	19.0±1.4	18.4±1.1	12.0±0.5

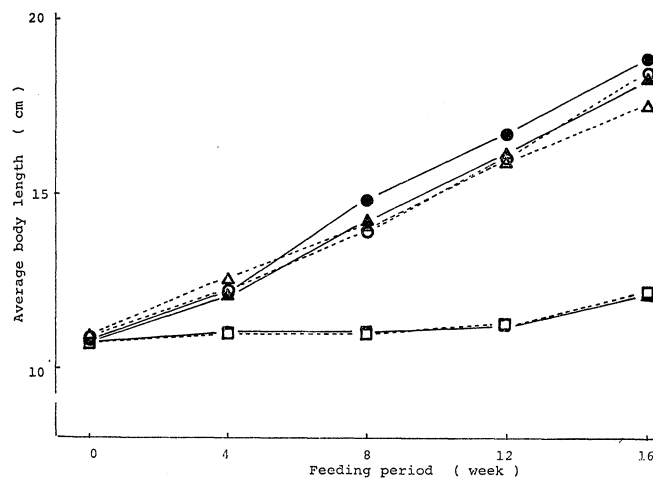


Fig. 4. Average body length of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Thiamine: 0 mg, ○—○ Antibiotic 0.15%, △—△ Antibiotic: 1.5% □—□ Antibiotic: 15%
 Thiamine: 5 mg, ●—● Antibiotic 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5% ■—■ Antibiotic: 15%

B₁ 無添加, B₁ 5 mg 添加群いずれも約 1.2 倍の増加にすぎなかった (Table 7, Fig. 4)。

(2) 飼料転換効率

Fig. 5 のように, 飼料転換効率は, 抗生物質 0.15%, 1.5% 添加群について B₁ 無添加群 (I, II 群) は, B₁ 5 mg 添加群 (IV, V 群) に比べ幾分低くなるが全体的に高い値を示した。ところが, 抗生物質 15% 添加群は, B₁ 無添加 (III 群), B₁ 5 mg 添加 (VI 群) のいずれも 0~4 週では飼料転換効率はマイナスとなり, その後は高くなるが, 抗生物質 0.15%, 1.5% 添加群に比べると低い値であった。

(3) 組織の B₁ 量

眼球の B₁ を Table 8, Fig. 6 に示したが, B₁ 無添加群 (I, II, III 群) では眼球の B₁ は徐々に減少した。抗生物質 0.15% (I 群), 1.5% (II 群), 15% (III 群) の B₁ 量を比較すると, 15% 添加群は 0.15%, 1.5% 添加群に比べ 12 週, 16 週目には幾分高い値を示した。

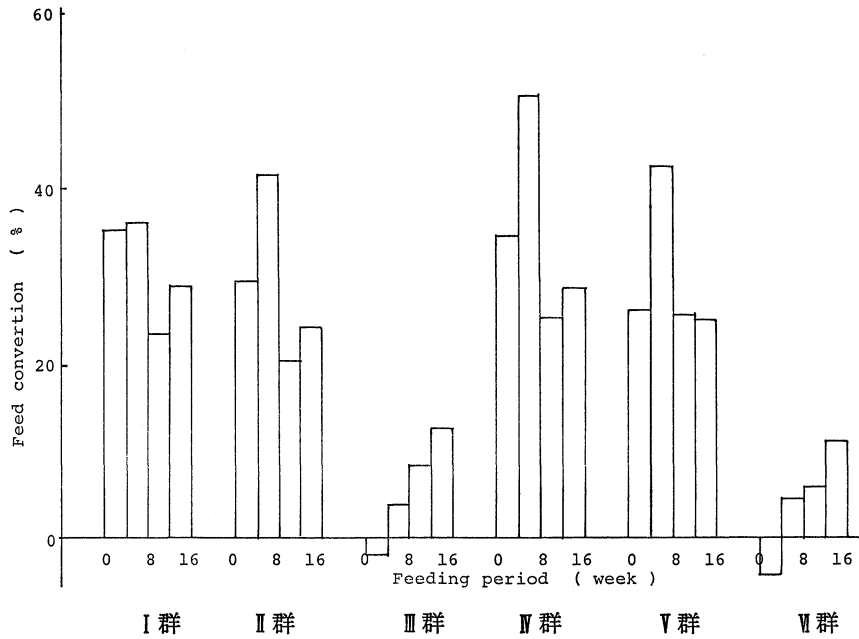


Fig. 5. Feed conversion of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

一方 B₁ 5mg 添加群の眼球の B₁ は、抗生物質 0.15% (IV 群), 1.5% (V 群) では眼球の B₁ は徐々に増加し、12 週目にやや低下したが、16 週目には 2.5mg% 以上になった。しかし、抗生物質 15% 添加群では、飼育中 B₁ は徐々に減少した。

筋肉の B₁ の変化は Table 9, Fig. 7 に示した。

B₁ 無添加群 (I, II, III 群) は抗生物質の添加量が異なっても筋肉の B₁ 量は大体同じであり、出発時の B₁ が低かったこともあるが、全期間を通じ、きわめて低い値であった。B₁ 5mg 添加群 (IV, V, VI 群) では、筋肉の B₁ は徐々に増加し、飼育 16 週の抗生物質 0.15% (IV 群) 1.5% (V 群) の B₁ 量はそれぞれ 0.8, 1.0mg% であり、筋肉の B₁ 飽和量と思われる値に近くなった。抗生物質 15% 添加群 (VI 群) では、IV 群 V 群に比べると、

Table 8. Thiamine concentration in the eye of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Feeding Period	Thiamine : 0 mg			Thiamine : 5 mg		
	Antibiotic					
	0.15%	1.5%	15%	0.15%	1.5%	15%
	I 群	II 群	III 群	IV 群	V 群	VI 群
week	thiamine mg/wet tissue 100 g					
0	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72	1.72
4	0.946	0.915	0.900	2.07	2.00	1.53
8	0.625	0.600	0.689	2.50	2.31	1.41
12	0.318	0.328	0.361	2.40	1.67	0.774
16	0.256	0.222	0.317	2.50	3.00	0.401

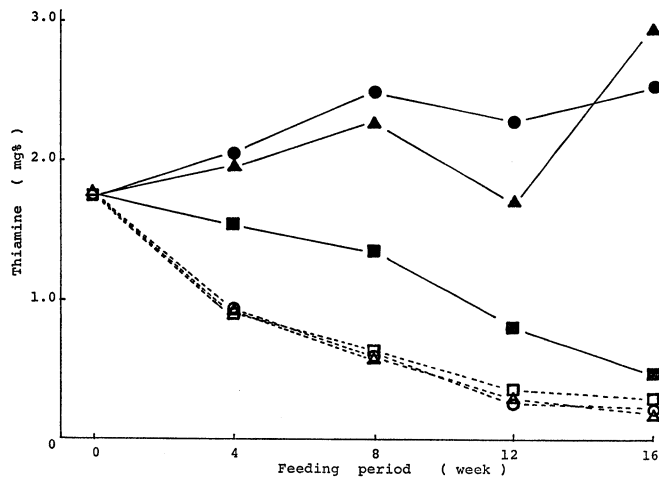


Fig. 6. Thiamine concentration in the eye of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Thiamine: 0 mg, ○—○ Antibiotic 0.15%, △—△ Antibiotic: 1.5%, □—□ Antibiotic: 15%
Thiamine: 5 mg, ●—● Antibiotic 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5%, ■—■ Antibiotic: 15%

Table 9. Thiamine concentration in the muscle of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Feeding period	Thiamine: 0 mg			Thiamine: 5 mg		
	Antibiotic					
	0.15%	1.5%	15%	0.15%	1.5%	15%
	I 群	II 群	III 群	IV 群	V 群	VI 群
week	thiamine mg/wet tissue 100 g					
0	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
4	0.001	0.001	0.013	0.162	0.239	0.004
8	0.001	0.002	0.013	0.576	0.387	0.060
12	0.001	0.002	0.001	0.647	0.313	0.161
14	0.002	0.003	0.002	0.842	1.025	0.412

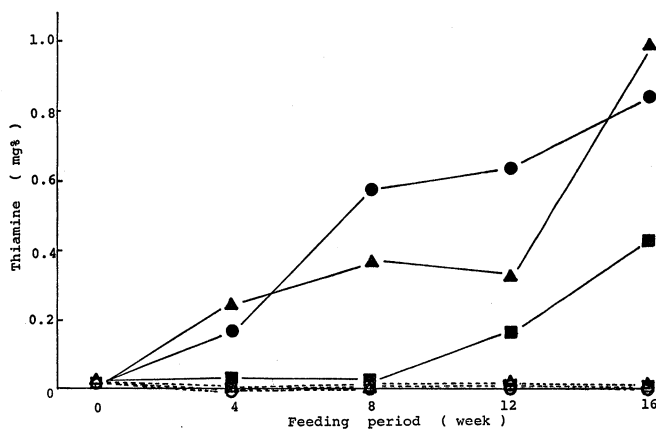


Fig. 7. Thiamine concentration in the muscle of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Thiamine: 0 mg, ○—○ Antibiotic 0.15%, △—△ Antibiotic: 1.5%, □—□ Antibiotic: 15%
Thiamine: 5 mg, ●—● Antibiotic 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5%, ■—■ Antibiotic: 15%

Table 10. Thiamine concentration in the hepato-pancreas of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Feeding period	Thiamine: 0 mg			Thiamine: 5 mg		
	Antibiotic					
	0.15% I 群	1.5% II 群	15% III 群	0.15% IV 群	1.5% V 群	15% VI 群
week	thiamine mg/wet tissue 100 g					
0	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048	0.048
4	0.010	0.079	0.083	0.009	0.051	0.093
8	0.003	0.002	0.154	0.183	0.247	0.206
12	0.004	0.004	0.004	0.007	0.005	0.196
16	0.003	0.001	0.108	0.011	0.003	0.021

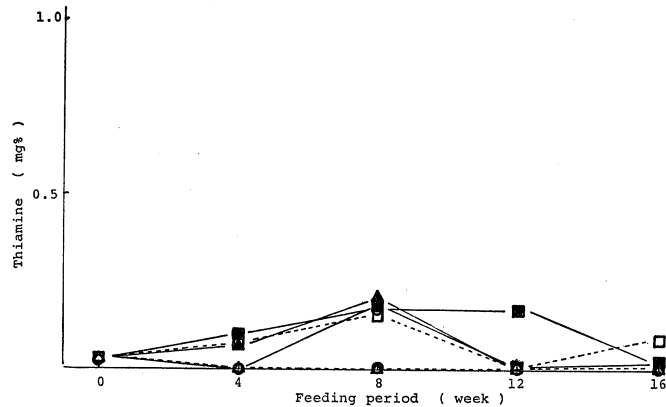


Fig. 8. Thiamine concentration in the hepato-pancreas of the carp fed on thiamine-free or thiamine added Halver's diet containing antibiotic.

Thiamine: 0 mg, ○—○ Antibiotic: 0.15%, △—△ Antibiotic: 1.5%, □—□ Antibiotic: 15%
Thiamine: 5 mg, ●—● Antibiotic: 0.15%, ▲—▲ Antibiotic: 1.5%, ■—■ Antibiotic: 15%

B₁ 増加量は小さいが、16週目には、0.4mg%に増加した。

肝臓の B₁ の変化は Tabel 10, Fig. 8 に示した。

B₁ 無添加, B₁ 5mg 添加群いずれもやゝ変動がみられたが、全体的に低い値であった。

16週間の飼育中、小さいながら卵巣又は精巣がみられるものがあり、これらの組織の B₁ 量を測定したが、いずれの場合も B₁ は 0.05mg% 以下であり、低い値であった。

考 察

B₁ 無添加, B₁ 5mg 添加の Halver 食にストレプトマイシン, カナマイシン, アスマイシンを 0.015% から 15% まで添加した飼料でコイを飼育し、体重の変化, 眼球, 筋肉, 肝臓の B₁ の変化を検討した。

抗生物質 0.015~1.5% 添加では、コイは食欲も旺盛で、体重の増加は著しく、抗生物質無添加群とほとんど同じであるが、抗生物質多量投与 (15% 添加) では、飼料転換効率は低く体重の増加はほとんどみられず、体重が減少する例もみられた。

B₁ 無添加群について組織の B₁ の変化をみると、最も B₁ 量の高い眼球の B₁ は、抗生物質の添加量 0.015~15% では、どの添加群でも B₁ は徐々に減少した。筋肉の B₁ は、B₁ 無添加食で予備飼育したため、飼育はじめの B₁ はかなり低い値であり、抗生物質の添加による B₁ の変動をみるとは困難であったが、全期間を通し、きわめて低い値であった。肝臓の B₁ は、変動がかなりみられたが、筋肉と同様全体的に低い値であった。抗生物質 15% 添加群では、眼球、筋肉、肝臓の B₁ は、抗生物質 0.15%、1.5% 添加群に比べ、やや高い値であったが、抗生物質 15% 添加群では、体重の増加がほとんどみられなかったのに対し、抗生物質 0.15%、1.5% 添加群では、体重の増加がおよそ 6 倍であり、きわめて高かったので、B₁ 濃度と組織の重量から、組織の B₁ 含量を算出すると Table 11 のようになり、眼球、筋肉、肝臓の B₁ 含量の合計は、II 群と III 群であまり差はみられずいずれも低い値であった。

Table 11. Thiamine content in the eye, muscle and hepato-pancreas of the carp fed on thiamine-free Halver's diet containing antibiotic 1.5% and 15%.

Group	Eye	Muscle	Hepato-pancreas	Total
	mg	mg	mg	mg
II	1.92	0.98	0.03	2.93
III	1.90	0.12	0.65	2.67

B₁ 5mg 添加群について、筋肉の B₁ は、抗生物質 0.15%、1.5%、15% いずれの場合も増加が顕著であり、抗生物質 1.5%、0.15% の B₁ 量は 1.0mg%、0.8mg% で前回¹¹⁾行なった B₁ 多量投与時の筋肉の B₁ 量およそ 1.0mg% に近い値であった。これに対し、抗生物質 15% 添加群の筋肉の B₁ は 0.4mg% であった。眼球の B₁ は抗生物質 0.15%、1.5% 添加群では、かなり増加したが、B₁ 多量投与時の眼球の B₁ 量と比べると幾分低い値であった。抗生物質 15% 添加群では、眼球の B₁ は徐々に減少した。このことについて抗生物質添加食の調整時、抗生物質 0.15%、1.5% 添加群は、抗生物質をそのまま添加することが可能であったが、抗生物質 15% 添加群では、抗生物質が多量であったため、均一で適当な固さの餌を作ることが出来ず、水分を補給した。そのため餌の B₁ は Table 2 のように、抗生物質 0.15%、1.5%、15% 添加群では、それぞれ 2.51mg%、1.98mg%、1.43mg% であり、15% 添加群の飼料中の B₁ が低かったことも関係していると思われる。その他、抗生物質多量添加のため、体内での B₁ の利用に変化が起こったことも予想される。

以上、本実験では広範囲の抗菌スペクトルをもつストレプトマイシン、カナマイシン、アスマイシンの 3 種の抗生物質を飼料に添加し、コイを飼育した。これらの抗生物質が、手島ら⁶⁾の示した腸内細菌の B₁ を合成する菌の働きを完全に抑制したかどうか検討しなかったが、体重増加がほとんどみられなかった B₁ 無添加、抗生物質 15% 添加群の組織の B₁ の合計は、顕著な体重増加を示した B₁ 無添加、抗生物質 1.5% 添加群の組織の B₁ の合計と大体同じであり、これらの値は、きわめて低い値であったことなどを考えると、コイの腸内で B₁ が合成され、組織で利用されていることは推定しがたい。B₁ 5mg 添加、抗生物質 15% 添加群の組織の B₁ の増加は低かったが、これ

は、抗生物質による B₁ 合成の阻害と考えるよりは、体内での B₁ の利用障害ではないかと思われる。

要 約

B₁ 無添加, または B₁ 5mg 添加の Halver 食に抗生物質を添加した飼料でコイを飼育し, 体重の変化, 眼球, 筋肉, 肝臓の B₁ の変化を検討した。

(1) 抗生物質 1.5% 以下の添加ではコイはきわめて良好な成長をし, 抗生物質無添加群とほとんど同じであった。抗生物質 15% 添加では体重の増加はほとんどみられなかった。

(2) B₁ 無添加の飼料に抗生物質を添加したものは, どの添加群でも組織の B₁ は徐々に減少した。飼育 16 週目の組織の B₁ はきわめて低い値であり, 抗生物質 15% 添加群と 1.5% 添加群の組織の B₁ 含有量は大体同じであった。

(3) B₁ 5mg 添加の飼料に抗生物質を添加した場合, 組織の B₁ は徐々に増加し, 特に筋肉の B₁ の増加は顕著であった。抗生物質 15% 添加群の組織の B₁ は幾分低い値であった。

本研究にあたり御指導賜った鹿児島大学医学部生化学 大保不二夫教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 宮川正澄; 日病会誌: **50**, 53 (1961)
- 2) S.F. Sniesko; Prog. Fish. Cult., **19**, 81 (1957)
- 3) 柏田研一, 手島新一; Bull. J. Soc. Scie. Fish; **32**, 961 (1966)
- 4) 柏田研一, 手島新一; 鹿大水紀要, **15**, 1 (1966)
- 5) K. Kashiwada, S. Teshima & A. Kanazawa; Bull. J. Soc. Scie. Fish; **36**, 421 (1970)
- 6) 手島新一, 柏田研一; ibid **33**, 979 (1967)
- 7) 橋本芳郎; ibid **19**, 899 (1953)
- 8) J.E. Halver, & J.A. Coates; Prog. Fish-Cult., **19**, 112 (1957)
- 9) 佐藤雅子; 鹿大教育学部紀要, **25**, 48 (1974)
- 10) 藤原元典; ビタミン **9**, 148 (1955)
- 11) 佐藤雅子; 鹿大教育紀要 **27**, 9 (1976)