クロレラ原藻末中のクロロフィラーゼ活性と光過敏症発現

(昭和 55 年 7 月 4 日受理)

関 洋 治^{*1} 富金原 孝^{*1}
松 浦 栄 一^{*2} 山 田 幸 二^{*3}

Relation between Photosensitization of Rats by *Chlorella* Powder and Chlorophyllase Activity in the Powder

Yoji SEKI^{*1}, Takashi FUKIMBARA^{*1}, Eiichi MASTURA^{*2}
and Koji YAMADA^{*3}

(^{*1}Rokko Bio-science Research Laboratory Co., Ltd.: 730-5, Tsurugasone, Yashio-shi, Saitama;

^{*2}Kitazato University: 1, Asamizodai, Sagamihara-shi Kanagawa; ^{*3}Koriyama Women's College: 3-25-2, Kaisei, Koriyama-shi, Fukushima)

Rats were fed *Chlorella* powder, and the appearance of photosensitization was investigated in relation to chlorophyllase activity in the *Chlorella* powder. The sensitivities of different experimental animals to photosensitization were also examined. The differences of chlorophyllase productivity among three strains of *Chlorella* were studied. The following results were obtained.

1. The appearance of photosensitization in rats seemed to be correlated with chlorophyllase activity in *Chlorella* powder, and particularly with total contents of formed chlorophyllide and initial pheophorbide.
2. It was observed that the rat was more sensitivity to the photosensitization than the mouse.
3. It was found that the chlorophyllase activities in three strains of *Chlorella* were rather different from each other under the same conditions of culture.

(Received July 4, 1980)

Key words: クロレラ原藻末 *Chlorella* powder; 光過敏症 photosensitization; クロロフィラーゼ活性 chlorophyllase activity; フェオホーバイド pheophorbide; クロロフィライド chlorophyllide

まえがき

クロレラの光過敏症については、ほとんど知られていないが、昭和52年に、クロレラ錠剤摂取による皮膚炎事

件が起きた¹⁾。

その原因について、田村ら²⁾は、原因物質はフェオホーバイド a とそのエステル類であると推定し、また成形工程にアルコールを用いると、クロロフィラーゼが賦活化され、フェオホーバイド a が多量に生成されることを指摘し、これにより皮膚炎を発生したのではないかと推論した。

真野ら³⁾は、同じく光過敏症の誘因を追究し、成型加工法は別にして、クロレラ原藻末中に既にその誘因が存

^{*1} (株)鹿光生物科学研究所: 埼玉県八潮市鶴ヶ曾根 730-5

^{*2} 北里大学: 神奈川県相模原市麻溝台 1

^{*3} 郡山女子大学: 福島県郡山市開成 3-25-2

^{*4} 真野 覚, 松浦栄一, 関 洋治, 富金原 孝: 昭和 53 年日本農芸化学大会講演要旨集, p. 394 (1978).

在し、原藻末中のクロロフィラーゼ活性が比較的強い場合は、これを摂取すると、消化過程を通じて光感作物質が生成され、原藻末に既存する光感作物質にこれが加算されて同症を発生することを動物試験により確かめ、原藻末中のクロロフィラーゼ活性を熱処理により減少させることにより、同症の発生を防ぐことの可能なことを示唆した。

また、天野ら³⁾はクロレラ製品および原藻末（東海緑藻工業(株)製）から抽出した色素を分析し、クロロフィルに分解物で光学的作用を有する既知物質中にフェオホーバイド a の存在を確認し、またクロロフィル分解物の生成にはクロロフィラーゼが関与し、この酵素活性が原藻末のみならず製品中にも残存していることを認め、この酵素作用は温度、湿度により賦活化されることを指摘し、クロロフィル分解物の量的規制だけでは不十分で、クロロフィラーゼの残存活性について十分に注意を払うことの必要性を示唆した。

以上の知見を総合すると、クロレラ製品を製造するに当たって、安全性のある加工法を選ぶ必要のあることは言うまでもないが、その前提として、まず使用する原料の安全性の確認が必要であると思われる。

本報告は、クロレラの光過敏症発生防止の一対策として、原藻末中のクロロフィラーゼ活性に着目し、動物試験により光過敏症発現との関連性を観察すると同時に、光過敏症検定に対する実験動物の感受性の差異ならびにクロレラ藻種によるクロロフィラーゼ活性の差異について検討し、2, 3 の知見を得たので報告する。

実験方法

1. クロレラ原藻末中のクロロフィラーゼ活性と光過敏症発現の関連性について

1-1) 供試試料

台湾および国内産のクロレラ原藻末 11 種を試料とした。

1-2) クロロフィル総量の測定

クロロフィル総量の測定は A. O. A. C.⁴⁾ によった。

1-3) クロロフィル誘導体量の測定

クロロフィル誘導体量の測定は、柳沢ら⁵⁾の方法によった。すなわち、クロレラ原藻末に水を加えて十分に磨砕した後、これに 80% 濃度になるようにメタノールを加えて放置後、遠心操作により上澄液を分離した。残渣は 90~95% メタノールで同一操作で 4 回繰り返して抽出した。次いで総抽出液に等量のエーテルを加えて水洗操作で色素をエーテル層に移行させ、エーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水した後一定容量とし、光電分光光度計((株)島津製作所, UV-200型)を用い、660 と 642.5 nm の吸光度を測定して、これを粗クロロフィル量とした。次いで、同一エーテル溶液一定量を取り、エーテル

を蒸発後 70% アセトン溶液で色素を溶解し、等量の n-ヘキサンを加えて十分にかくはんした後、遠心分離して上層の全ヘキサン層を取り出し、ヘキサンを蒸発させて色素をエーテルに再溶解し、前記同様に吸光度を測定し、これを純クロロフィル量として、また粗クロロフィル量と純クロロフィル量の差をクロロフィル誘導体量として表した。なお、この測定法によるクロロフィル誘導体は、ペーパークロマトグラフィーでは、主にフェオホーバイド a, b, クロロフィライド a, b, カロチノイドなどが検出される。

1-4) フェオホーバイド総量の測定⁵⁾

試料 50 mg をとり、85% アセトン 20 ml を加えて、30 分間放置した後、これを石英砂とともに磨砕してクロロフィル類を抽出し、この抽出液に同量のエチルエーテルを加えて、これを分液漏斗に移し、5% 硫酸ナトリウムを加えて振り混ぜ、2 層に分離させた後、上部のエーテル層を取り、蒸留水で洗う。次に、このエーテル層を濃度の異なる塩酸溶液 (1, 8 および 15%) で分画抽出を行い、15% 塩酸区分を分取し、同量のクロロホルムを加えて、激しく振とうして放置する。このクロロホルム層を取り、同量の蒸留水で数回水洗した後、減圧下で、クロロホルムを蒸発させ、これをエチルエーテルに溶解させて、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、これを一定容積とした。

このエーテル溶液の吸収スペクトルを光電分光光度計を用いて、700 から 630 nm までスキャンさせて、最大吸収波長 667 nm の点から 680 nm と 650 nm を結ぶ直線上に、垂線をおろし、この直線の長さを測り、天野ら³⁾の方法で調製したフェオホーバイド a を用いて、その標準曲線をつくり、試料中の 15% 塩酸区分中のクロロフィル分解物の濃度をフェオホーバイド a の量として求めた。

1-5) クロロフィラーゼ活性の測定

クロロフィラーゼ活性の測定については、種々の方法が報告されている^{6)~10)}。これらの方法は主として、生の状態の試料が用いられている。本報告では、試料は熱処理による乾燥工程を経たものであるため、上記の方法がそのまま用いられるかについて検討したところ、クロロフィラーゼの抽出が十分に行われないことがわかり、これらを採用することは避けた。そこで、Holden の方法¹¹⁾に準じて、試料中に存在しているクロロフィルを基質として、同試料中にあるクロロフィラーゼで分解して、クロロフィラーゼ活性を求めた。

すなわち、試料 0.5 g をとり、70% アセトン 50 ml 中に懸濁させ、密栓して室温、暗所に 16 時間放置し、試料中のクロロフィラーゼを同試料中のクロロフィルに反応させた。この懸濁液を 70% アセトン溶液と残渣に別し、残渣を 99% アセトンで洗浄し、この溶液を上記の 70% アセトンに合し、この溶液にエチルエーテル

⁵⁾ 柳沢 晃永, 遠藤 寛, 代田 稔: 昭 36 年日本農芸化学大会講演要旨集, p. 81 (1961)。

を加えて色素類をエーテルに転溶させ、エーテル層を十分に水洗してアセトンを除いた後、無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後一定容積とした。この一部をとり、光電分光光度計を用いて、660 nm および 642.5 nm における吸光度を測定し、これよりクロロフィル量 (I) を求めた^{12), 13)}。

次に、上記エーテル残渣液を適度に減圧濃縮したのち分液漏斗に移し、0.05% の水酸化ナトリウム溶液を加えて¹⁴⁾、ゆるやかに振とうし、しばらく放置すると2層に分離する。この下層 (クロロフィライド層) を捨て、上部のエーテル層を分取し、これに無水硫酸ナトリウムを加えて脱水後一定容積とし、クロロフィライドを除いたクロロフィル量 (II) を、前記と同様に求めた。

クロロフィライドの生成量は、(I)-(II) の値で示し、クロロフィラーゼ活性は次式により算出した。

$$\text{クロロフィラーゼ活性 (mg\%)} = \frac{\text{クロロフィライド生成量 (mg)}}{\text{試料 (g)}} \times 100$$

1-6) 動物試験

体重 100 g 前後のドンリュウ型雄ラットを用いて、基本飼料 (カゼイン 20%, 大豆油 5%, 混合塩 4%, ビタミン末 1% および小麦でん粉を含む) に、試料の各クロレラ原藻末 10% を添加した飼料を1日量 20 g として2日間投与し、その間恒温恒湿の暗室で飼育し、3日間に照度 20,000 lux の可視光線を7時間照射した。なお、光照射装置は^{5), 15)}光源としてタングステンランプ (200 W) 8 個を用い、金網製のケージにラットを入れて、紫外線および熱線を除くために、光源ランプから約 5 cm 下にガラス製水槽を設けて、照射中絶えず 2 cm の深さで冷水を循環させ、ケージ内の温度を $25 \pm 3^\circ$ 以下に保った。試験には1群5匹を用い、光過敏症の発生は、供試動物の耳介の障害 (紅斑) および死亡を以て判定した。なお、後記の Table 2 および 3 に示されている分数は、分母は供試動物数、分子は紅斑発生あるいは死亡動物数を示した。

2. 光過敏症に対する実験動物の感受性について

光過敏症の検定用動物としては、主としてラットが用いられているが^{16)~21)}、時にはマウスも用いられているので^{22), 20)}、両動物を用いて光過敏症に対する感受性について試験した。なお、試験方法は次の2つの方法に分けて行った。

2-1) 短期間投与による動物試験

東海緑藻工業製のクロレラ原藻末 (A) を用いて、これを 1-6) に示した基本飼料に 10% 添加して供試飼料 A とした。

ラットに対しては、1-6) に示した方法で試験を行い、マウスに対しては体重 30 g 前後の ICR 系マウス 5 匹を1群として、上記飼料を1日量 5 g として2日間投与し、その間恒温恒湿の暗室で飼育し、3日目に照度

20,000 lux の可視光線を7時間照射し、その間の光過敏症の発生について観察した。

2-2) 長期間連続投与による動物試験

供試飼料は、前記の供試飼料 A のほか、もう一種の東海緑藻工業 (株) 製のクロレラ原藻末 (B) を用いて、これを前記同様に 10% 添加して供試飼料 B とした。なお、(B) については、2-1) の方法により、光過敏症の判定済 (紅斑 5/5, 死亡 3/5) のもので、長期間連続投与試験は、マウスについてのみ行った (ラットについては、前記の判定結果を代用することにした)。

マウスについては、体重 30 g 前後の ICR 系マウス 5 匹を1群とし、5日間自由給与させて、6日間に照度 20,000 lux の可視光線を5時間照射して、その影響を観察したのち、再び暗室にもどして7日間観察を続けた。両投与方法とも光照射装置は、1-6) に示したものを用いた。

3. 藻種によるクロロフィラーゼ生成の差異について

3-1) 分析方法

Chlorella A-28, *Chlorella pyrenoidosa* 77105 および *Chlorella* No. 5 を用いた。

酢酸を炭素源とする混合培養 (mixotrophic) 方式で、坂口フラスコで振とう培養したものを種藻とし、これをジャー培養に移して増殖培養を行った。

培地組成: Table 1 に示す培地を用いた。

培養条件: 振とう培養は、500 ml 容坂口フラスコに Table 1 の培地を 100 ml 入れて、殺菌冷却後、それぞれ供試藻種を無菌的に接種して振幅 6.5 cm, 振とう数 150 rpm, 照度 1400 lux, 温度 $30 \sim 35^\circ$ で7日間培養したものを、それぞれ種藻とした。

ジャー培養は、2 L 容ガラス製ジャーを用い、上記同様の培地を 1 L 入れて、殺菌冷却後、無菌的に上記の種藻をそれぞれ接種し、照度 3,000~5,000 lux, 温度 28° , 通気量 1 vvm (1 L/min), かくはん 700 rpm で、7日間増殖培養を行った。

藻体容積: ヘマトクリット管を用いて、3000 rpm, 20分間遠心分離した後の同管の目盛 (ml/L) で示した。

藻体乾燥重量: 105° で乾燥させたときの重量 (g/L) で示した。なお、藻体の洗浄は、蒸留水で2回行った。

Table 1. Medium Composition in *Chlorella* Cultivation

CH ₃ COONa	5 g/L
CO(NH ₂) ₂	2 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/L
KH ₂ PO ₄	1 g/L
CaCl ₂	0.01 g/L
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005 g/L
A ₅ stock soln.	1 ml/L
pH	6.0

Shaking culture: $30 \sim 35^\circ\text{C}$, 1,400 lux, 150 rpm
Jar culture: 28°C , 3,000~5,000 lux, 1 vvm

クロロフィラーゼ活性の測定：培養液 20 ml を 24 時間ごとにとり、洗浄、遠心分離して得られるペースト状の生藻体について、1-5) に示す分析法によりクロロフィラーゼ活性を測定した。

クロロフィル含量：上記同様の方法で得られたペースト状の生藻体について、1-2) に示す分析法によりクロロフィル含量 (%) を測定した。

結果および考察

1. クロレラ原藻末中のクロロフィラーゼ活性と光過敏症発現の関連性について

台湾および国内産11種のクロレラ原藻末中のクロロフィル総量、クロロフィル誘導体量、フェオホーバイド総量およびクロロフィラーゼ活性の測定結果ならびに各原

藻末に対する光過敏症発現の判定結果は、Table 2 に示す通りであった。

Table 2 にみられるように、原藻末中に既存するフェオホーバイド量については、この値が低いものでも光過敏症は発現している。またクロロフィル誘導体量については、この値が低いものでも同症は発現し、また逆に比較的に高いものでも同症は発現しないので、既存のフェオホーバイドおよびクロロフィル誘導体量だけでは、光過敏症発現の関連性を求めることはできない。しかしクロロフィラーゼ活性値については、この値が低い場合は、同症を発現しておらず、高い場合に同症を発現しているの、光過敏症の発現には、クロロフィラーゼ活性の大小が関連性をもっていることがうかがわれ、光過敏

Table 2. Relation between Chlorophyllase Activity of *Chlorella* Powder and Photosensitization in rats

Sample	Chlorophyll (%)	Chlorophyllase activity (mg%)	Pheophorbide (mg%)	Chlorophyll derivatives (mg%)	Photosensitivity	
					Erythema	Death
1	1.27	108.0	73.7	170.0	0/5	0/5
2	2.78	117.1	22.6	181.7	0/5	0/5
3	3.41	257.3	93.6	309.1	0/5	0/5
4	2.09	185.2	41.0	131.0	—	—
5	1.74	201.7	45.1	66.3	—	—
6	2.11	997.2	786.2	134.2	5/5	5/5
7	2.47	287.8	38.4	21.0	5/5	4/5
8	2.16	337.9	24.7	539.7	5/5	5/5
9	3.34	561.7	50.7	300.6	5/5	4/5
10	1.43	547.5	82.7	89.1	2/5	2/5
11	1.20	979.7	443.3	73.7	5/5	5/5

Chlorophyllase activity: Chlorophyllide formed (mg)/Sample (g)×100

Chlorophyll derivatives: Crude chlorophylls (ether soln)—Pure chlorophylls (*n*-hexane layer)

Photosensitivity: No. of rats with lesions/Total No. of rats

Table 3. Difference of Sensitivity between Rat and Mouse in Photosensitization

Diets		Dose period (days)	Species	Photosensitivity	
				Erythema	Death
Exp. 1	A	2	Rat	2/5	3/5
	A	2	Mouse	0/5	0/5
Exp. 2	A	5	Mouse	0/5	0/5
	A*	2	Rat	2/5	3/5
	B	5	Mouse	5/5	5/5
	B*	2	Rat	5/5	3/5

Exp. 1: Dose period for two days

Exp. 2: Dose period for five days

A: Basal diet+10% *Chlorella* powder (A)

B: Basal diet+10% *Chlorella* powder (B)

Photosensitivity: No. of rats with lesions/Total No. of rats

* Reference data

症の発現の予知については、クロロフィラーゼにより生成されるフェオホーパイド量を知ることが肝要であると示唆された。

クロレラの光過敏症の発現の主な原因物質はフェオホーパイド a であり、これには原藻体中に既存するフェオホーパイド a と、生体内でクロロフィラーゼの作用および消化過程により生成されるフェオホーパイド a が、同症の発現に関与する^{*4}。したがってクロレラ錠剤の安全性管理のためには、両者の値を測定し、その兼ね合い（既存フェオホーパイド＋生成フェオホーパイド）をみるのが大切なことになる。

2. 光過敏症に対する実験動物の感受性について

同種類のクロレラ原藻末を用いて、ラットおよびマウスの光過敏症の発現について、その感受性を比較検討したところ、Table 3 に示すとおりの結果が得られた。

Table 3 にみられるように、短期間投与試験 (Exp. 1) においては、ラットでは光過敏症の発現が明らかにみられるが、マウスでは、同症の発現がまったくみられなかった。長期間連続投与試験 (Exp. 2) においては、ラットに対しては、短時間投与試験と全く同様の結果が得られると想定されるので、前記のように、この試験は省略して、短期間投与試験結果 (A: 紅斑 2/5, 死亡 3/5, B:

紅斑 5/5, 死亡 3/5) で代用させた。

ラットに対しては、供試飼料 A, B 共に、光過敏症を発現するが、マウスに対しては、A では光過敏症の発現はみられなかったが、B では同症の発現がみられた。すなわち、両試験においてラットで光過敏症を発生するものが、マウスでは同症を発生しない事例が得られ、同症の動物感受性に対して、両者に幾分の差異があるように観察された。なお、細部について検討する必要はあるが、クロレラの光過敏症検定動物としては、マウスよりラットを用いる方が適切な判定が得られるように推察された。

3. 藻種によるクロロフィラーゼ生成の差異について

同一条件で培養された、3 藻種の各増殖培養における藻体容積、藻体乾燥重量、クロロフィラーゼ活性およびクロロフィル量を測定したところ、Table 4 に示す通りの結果が得られた。

各藻種の増殖状態を藻体容積および乾燥重量からみると、培養後 144～168 時間経過すると、おおむね成長は定常状態に入り、各藻種のクロロフィラーゼ活性値は、対数期を過ぎ定常状態に入ること (96～120 時間) に最高値に達し、それ以後は減少の傾向を示し、またこの活性値は藻種間で相当の差異が認められたが、これは培養条件など一定にして培養を行っているので、各藻種の遺伝

Table 4. Time Course of Jar Culture by Three Strains of *Chlorella*

<i>Chlorella pyrenoidosa</i> 77105		Cultivation time (hr)						
		24	48	72	96	120	144	168
Packed cell volume	(ml/L)	—	—	—	5.6	6.0	6.4	6.7
Dry weight	(g/L)	—	—	—	1.38	1.66	1.74	1.68
Chlorophyll	(%)	—	—	—	3.01	2.91	2.95	3.36
Chlorophyllase activity*	(mg%)	—	—	—	956	927	717	722
<i>Chlorella</i> A-28		Cultivation time (hr)						
		24	48	72	96	120	144	168
Packed cell volume	(ml/L)	1.9	6.0	7.6	8.5	8.5	9.4	9.6
Dry weight	(g/L)	0.52	1.64	1.78	1.98	1.98	2.24	2.34
Chlorophyll	(%)	—	1.52	2.26	2.85	2.85	2.68	2.42
Chlorophyllase activity*	(mg%)	—	1312	2095	2595	2595	2304	2026
<i>Chlorella</i> No. 5		Cultivation time (hr)						
		24	48	72	96	120	144	168
Packed cell volume	(ml/L)	0.8	4.0	6.4	7.2	7.6	8.2	8.8
Dry weight	(g/L)	0.1	0.77	1.26	1.48	1.48	1.96	2.72
Chlorophyll	(%)	—	2.66	2.37	3.29	3.54	3.78	4.08
Chlorophyllase activity*	(mg%)	—	547	544	610	599	409	527

* Chlorophyllide formed (mg)/Sample (g)×100

的性質の相違から生じているように思われ、藻種の選択により、適正なクロロフィラーゼ活性値の生藻体が得られる可能性が示された。

なお、生藻体におけるクロロフィラーゼ活性値は、クロレラ原藻末に比べてはるかに高い値であるが、これは、クロレラが回収され乾燥原藻末になるまでに、人為的な物理的・化学的変化を受けるために、クロロフィラーゼが失活し、原藻末では、活性が弱くなっていることによる（例えば、スプレイ乾燥など）。

要 約

1. クロレラ原藻末における光過敏症発現とクロロフィラーゼ活性の間には、相関関係が認められ、かつ同症の発現には、既存フェオホーバインド量とクロロフィラーゼによる生成クロロフィライド量が関与することが認められた。

2. 光過敏症検定用動物について、ラットとマウスを用い、同症の感受性について検討したところ、マウスよりラットの方が同症の感受性が敏感であるように観察された。

3. クロレラの藻種を用いて、一定培養条件下で、クロロフィラーゼの生成の差異について検討したところ、藻種間では同酵素の生成量に相当の差異のあることを認め、光過敏症発生防止の対策として藻種の選択も一つの方法になることが示された。

おわりに、本研究の発表の許可を頂いた（株）鹿光生物科学研究所社長鹿野光雄氏に深謝致します。

本報告の概要は、日本食品衛生学会第36回学術講演会（昭和53年12月、静岡）で発表した。

文 献

- 1) 駒井嘉明, 大貫憲一, 山岸 宏, 白鳥憲行: 食品衛生研究, **28**, 747~752 (1978).
- 2) 田村行弘, 西垣 進, 真木俊夫, 嶋村保洋, 直井家壽太: 同上, **28**, 753~759 (1978).
- 3) 天野立爾, 池 慶子, 内山 充: 同上, **28**, 739~745 (1978).
- 4) Offic. Method of Analysis of Assoc. Offic. Anal. Chem., 12 Edition, **3**, 107 (1975).
- 5) Hashimoto, Y., Tsutsumi, J.: Bull. Japan Soc. Sci. Fisheries, **27**, 859~866 (1961).
- 6) West, C. A., Mackinney, G.: J. Biol. Chem., **133**, 551~558 (1940).
- 7) Gage, R. S., Aronff, S.: Plant Physiol., **31**, 477~478 (1956).
- 8) Ardao, C., Vennesland, R.: *ibid.*, **35**, 368~371 (1960).
- 9) Böger, P.: Phytochem., **4**, 435~443 (1965).
- 10) Chiba, Y., Idemori, M., Satoh, Y., Matsushita, K., Sasa, T.: Plant & Cell Physiol., **8**, 623~635 (1967).
- 11) Holden, M.: Biochem. J., **78**, 359~364 (1967).
- 12) Comar, C. L., Zscheile, F. P.: Plant Physiol., **17**, 198~209 (1942).
- 13) Holt, A. S., Jacobs, E. E.: Amer. J. Botany, **41**, 710~717 (1954).
- 14) 林 孝三: “生物学実験講座”, 第6巻上, 植物色素実験法, p. 11 (1966), 中山書店.
- 15) 山田幸二, 中村延生蔵: 栄養と食糧, **25**, 466~471 (1972).
- 16) Hashimoto, Y., Naito, K., Tsutsumi, J.: Bull. Japan Soc. Sci. Fisheries, **26**, 1216~1221 (1960).
- 17) Hove, E. L., Lohrey, E., Urs, M. K., Allison, R. M.: Br. J. Nutr., **31**, 147~157 (1974).
- 18) Lohrey, E., Tapper, B., Hove, E. L.: *ibid.*, **31**, 159~166 (1974).
- 19) Tapper, B., Lohrey, E., Hove, E. L., Allison, R. M.: J. Sci. Fd. Agric., **26**, 277~284 (1975).
- 20) 磯部明彦, 木村修一: 栄養と食糧, **29**, 221~224 (1976).
- 21) 松浦栄一, 青木喜代子, 平野隆司, 山田幸二, 河原裕憲: 同上, **30**, 307~311 (1977).