コガネガレイ筋肉のジェリー化ならびにプロテアーゼ活性と、 粘液胞子虫との関連^{*1}

小 長 谷 史 郎

(1980 年 4 月 28 日受理)

Jellification and Protease Activity of Yellowfin Sole Muscle in Association with a Myxosporidian Parasite

Shiro KONAGAYA^{*2}

Numerous spores of a myxosporidian parasite, tentatively classified as the genus *Kudoa*, were found in many of the muscle specimens of the yellowfin sole *Limanda aspera* which were caught in the Bering Sea.

The muscle infected heavily with the parasite, displayed a considerably high protease activity. Such muscle was observed to be easily jellified when left standing at room temperature.

Two types of protease occurred in the heavily infected muscle, one designated protease A hydrolyzing hemoglobin optimally at pH 3 and the other designated protease B casein optimally at pH 6.5 under the conditions applied. Protease B activity was not always detected in less infected muscles. The muscle containing both proteases was jellified very rapidly. Both protease activities were strongly inhibited by Hg^{+2} , PCMB or leupeptin, indicating them to be of thiol enzyme.

It was concluded from these results that the proteases were produced by the parasite and responsible for the jellification of the muscle.

1977 年秋、ベーリング海産のコガネガレイ *Limanda aspera* の凍結原料から製造した文化干しに、筋肉組織が流動状を呈する、いわゆる“ジェリーミート”と考えられる異常肉が出現し、加工業者の間で問題となつた。本研究はこの異常肉の成因を明らかにする目的で、コガネガレイ筋肉における粘液胞子虫の寄生、プロテアーゼ活性、筋肉のジェリー化の相互関係などにつき検討を加えたものである。

材料と実験方法

材料 1976 年 8 月、ベーリング海域で漁獲後、 $-20^{\circ}C$ 以下に凍結貯蔵されたコガネガレイ *Limanda aspera* のうち、異常肉が出現した文化干しの原料と同一ロットのもの、ならびに異常および正常文化干し筋肉を凍結保存したものを材料とし、ともに背部筋肉を以下の実験試料とした。

粘液胞子虫の胞子の検出法 凍結保存中の文化干し、あるいは凍結原料から常法^{1,2)}により塗抹標本を作製した。メチレンブルーで染色後、光学顕微鏡で 200~400 倍の倍率下で検鏡した。寄生の程度は、便宜的に 200 倍

の視野中に見える胞子数を 3~5 個の標本について数え、その数値の幅、すなわち、1~2(+), 3~9(++)、10~30(###)、31~100(####) の 4 段階で示した。胞子が検出されないものは (-) で示した。

プロテアーゼ活性の測定法 試料の筋肉片を 3 倍量の 0.5% KCl とともにポリトロンホモジェナイザーに付し、遠心分離 (9,000×g, 30 分) 後の上澄みを被検液とした。活性の測定条件、単位などは前報³⁾になつた。すなわち、基質溶液 (3% ヘモグロビンまたは 3% カゼイン) 0.5 ml、緩衝液 (M/10 クエン酸-リン酸 2 ナトリウム緩衝液 (pH 3.0) または M/15 リン酸緩衝液 (pH 6.5)) 1.5 ml、被検液 0.5 ml を混合して 37°C で 2 時間インキュベートした。5% トリクロル酢酸 2.5 ml を加えて反応を停止した後、その汨液中の水解物を FOLIN 法⁴⁾ (汨液 1 ml, 5.5 M Na_2CO_3 5 ml, フェノール試薬 1 ml) で発色し、 E_{680nm} を測定した。基質または被検液の代りに水を用いたほかは上記と同様に操作した対照の E_{680nm} との差をとり活性の単位とした。なお、3% カゼイン溶液は萩原の方法⁴⁾で調製した。

ジェリー化の程度の測定法 凍結試料魚の扁平な側面

^{*1} 東海区水産研究所業続 B-677 号。

^{*2} 東海区水産研究所 (Tokai Reg. Fish. Res. Lab., Kachidoki-5, Chuo-ku, Tokyo 104).

Fig. 1. Jellied yellowfin sole.

に対し垂直方向から内径 15 mm のコルクボーラーを挿入して筋肉片を円柱状に抜き取った。これから表皮および骨（神経棘）を避けつつ、骨の両側から厚さ約 5 mm の円柱肉片各 1 枚を凍結状態で切り取った。レオロメーター（飯尾電気（株））用のアクリル製試料皿（内径 50 mm、深さ 20 mm）の中心に 2 枚の肉片を重ねて置き、この円柱肉片（直径 15 mm、高さ約 10 mm）の重量が 1.50～1.60 g の範囲にあることを確認後、試料皿を密閉し、25°C に所定時間温置した。温置後、肉片を円盤状のプランジャー（径 30 mm）で 3 mm の厚さに圧延するときの最大応力（便宜上これを圧縮応力（ S ）と呼ぶ）をレオロメーターで測定した。対照には、上記と同様に切り取った円柱肉片を試料皿中で解凍（4°C、1 時間）し、

温置することなく直ちに用いた。

ジェリー化の進行状況は円柱肉片の S の変化率 $A = [(S_t - S_0)/S_0] \times 100 (\%)$ で表わした。 S_0 および S_t はそれぞれ温置時間を 0 および t 時間としたときの肉片の S とする。温置時間（ H 時間）と温度（ $T^\circ\text{C}$ ）を示す必要があるときは A_{HT} のように表わした。

S を測定した後の肉片について、非タンパク質、水溶性タンパク質、塩溶液タンパク質、ストローマの各区中の窒素を常法²⁾ によつて定量した。ただし、塩溶性タンパク質の一部は冷凍変性していることが考えられたので、肉片の水抽出後の残渣を 0.05 N NaOH で抽出、測定し、これを塩溶性タンパク質とみなした。このようにして各区窒素量の割合（%）の変化を追跡し、この面からもジェリー化の程度を調べた。

筋肉の組織学的観察法 試料魚から解凍直後および 25°C に 20 時間温置後、小さな肉片（約 5×5×10 mm）を切り出し、冷 10% ホルマリンで固定した。組織が崩壊して流動状のときは、大きな塊として取り出し、表面が固定されてから小さく切り、さらに固定を続けた。常法¹⁾ に従つて水洗、ゼラチン包埋後、凍結ミクロトームで切削した。切片をエオシンで染色後、光学顕微鏡で観察した。

結 果

異常文化干し筋肉中のプロテアーゼ活性と孢子の存在
異常文化干し（Fig. 1）および正常文化干し、それぞれ 7 尾および 2 尾について、筋肉中のプロテアーゼ活性

Fig. 2. Proteolytic activity against hemoglobin (A) and casein (B), of the heavily (—), moderately (---) and slightly (---) jellied muscles of yellowfin sole, and of the normal fish (·····). Δ : M/10 HCl-acetate buffer, $\circ$: M/10 citric acid-phosphate buffer, $\bullet$: M/15 phosphate buffer, $\square$: M/10 acetate buffer, ∇ : M/10 borate buffer.

Fig. 3. Photomicrograph of spores of myxosporean parasite in yellowfin sole muscle.

を pH 2~10 の範囲で測定した。Fig. 2 に示すように、異常肉には、基質のヘモグロビンに対して pH 3 付近で最高の活性を示すプロテアーゼ活性が検出された (Fig. 2A)。正常肉の場合にも低いながら同活性がみつめられた。他方、カゼインに対しては、pH 6.5 付近で最高活性を示すプロテアーゼ活性が検出される場合と、ほとんど検出されない場合があつた。したがつて、少なくとも 2 種のプロテアーゼの存在が推定されるので、以下便宜上、pH 3 および 6.5 付近で活性を示す酵素をそれぞれプロテアーゼ A および B と呼ぶ、また場合により、それぞれの酵素活性を単に活性 A、活性 B と呼ぶ。異常肉は両酵素活性の相対的關係から次の 3 つの型に分けられる。I) 活性 A より B の方が高く、かつ両活性ともかなり高い。II) 活性 A より B の方が低く、かつ活性は I 型に比べてともに低い。III) 活性 A は検出されるが活性 B は検出されない。また、活性 A は正常肉の活性 (多分カタレプシン D によるもの) よりかなり高い。

これらの異常肉には Fig. 3 に示すような粘液胞子虫の胞子 (以下まぎらわしくないかぎり単に胞子と記す) が多数検出された。このものは未同定であるが、形態的特徴から *Kudoa* 属の 1 種と考えられる⁹⁾。

ジェリー化の追跡 異常文化干しの出現した原料と同一ロットの凍結試料からの活性 A、B とともに高かつた異常肉 (Fig. 8 中の No. 17) と正常肉 (同図中 No. 2) について、解凍直後および 25°C に温置後の S を測定した。Fig. 4 に示すように解凍直後の S は両者ともほぼ等しいが、温置中徐々に異常肉では小さくなり、正常肉では逆に大きくなった。圧延後の筋肉片の状態は Fig. 5 に示すように、異常肉の 10 時間温置のもの ($d_{10}^{25^\circ} = -57$) では組織が部分的に崩壊、軟弱化し、20 時間温置のもの ($d_{20}^{25^\circ} = -87$) は組織が全体的に崩壊し、一部流動状を呈した。すなわち、筋肉片は温置中にジェリー

Fig. 4. Changes during incubation in compressive stress of the muscle from yellowfin sole specimen (No. 17 in Fig. 8) having strong protease activity (—) and from the normal fish (No. 2 in Fig. 8) (---). The muscle cylinder, 15 mm in diameter and ca. 10 mm in thickness, was prepared, incubated at 25°C for various periods and determined for compressive stress by a rheolometer when pressed down to 3 mm thickness. S_0 : compressive stress before incubation, S_t : compressive stress after incubation (t hours).

化した。一方、正常肉の圧延後の組織は明らかに硬さと繊維性を増していた ($d_{20}^{25^\circ} = 52$)。

前記の I, II, III 型に属すると考えられる異常肉 (I: Fig. 8 中の No. 1 と 17, II: No. 22 と 35, III: No. 31 と 37), および正常肉 (同図中 No. 2 と 4, 以下正常肉を便宜上 IV 型と称する) の各 2 試料の筋肉片を 25°C に 5~20 時間温置したときの d 値の測定結果を Fig. 6 に示す。I, II 型の場合の d 値の急減は筋肉片のジェリー化の進行に対応するもので、他方 IV 型の d 値の増加はこの筋肉片が硬さを増したことを示している。III 型試料の一つ (No. 31) では d 値がほぼ一定で、官能的にもジェリー化を判別できなかったが、上記 IV 型試料の挙動からこの筋肉片も軽度ながらジェリー化したものと考えられる。これは活性 A のみが存在する場合でも筋肉がジェリー化することを示唆するものであろう。

Fig. 6 の結果はプロテアーゼ活性とジェリー化速度の間の密接な関係を示すもので、ジェリー化がプロテアーゼの作用で起ることを強く示唆するものである。なお、 $d_{15}^{25^\circ}$ 値はプロテアーゼ活性とはほぼ対応するので、ジェリー化の程度の比較のためには 25°C, 15 時間の温置が適当と考えられる。

ジェリー化に伴うタンパク質各区の窒素量の消長は

Fig. 5. Photographs of the muscle cylinders (Specimen No. 17 in Fig. 8) pressed after 0 h (A), 10 h (B) and 20 h (C) incubation at 25°C. Refer to Fig. 4.

Fig. 6. The rate of change in compressive stress ($\Delta = [(S_t - S_0)/S_0] \times 100\%$, refer to Fig. 4) of yellowfin sole muscle specimens having strong (●—●), moderate (●---●) and weak (●...●) protease activity, and of the normal fish muscle (○—○) during incubation at 25°C. Changes in muscle pH are also given.

Fig. 7 のようであつた。試料 No. 2 (IV 型) および No. 31 (III 型) では、温置中各区の窒素量に著しい変化は見られないが、No. 1 (I 型) および No. 35 (II 型)、とくに前者では非タンパク質窒素の増加と塩溶性タンパク質窒素の減少が顕著である。水溶性タンパク質窒素量があまり変わらないのは、筋形質タンパク質の純減と塩溶性タンパク質の部分水解物のこの区への移行に

Fig. 7. Hydrolysis of muscle protein of yellowfin sole during incubation at 25°C. Figures at top of columns indicate the rate of change in compressive stress, $\Delta = [(S_t - S_0)/S_0] \times 100$. Figures at bottom show incubation time in hour, As to specimen No., refer to Fig. 8. (stippled): non-protein nitrogen; (white): water-soluble protein nitrogen; (hatched): salt-soluble protein nitrogen; (black): stroma nitrogen.

よる増加とがある程度相殺するためと考えられる。これらの結果は、ジェリー化の進行とともに、筋形質および筋原繊維タンパク質が無差別に水解されることを示すものといえよう。ストローマは少ないため、量的変化は判然としないが、筋隔が細かい糸屑状のものに変ることから、ある程度の水解作用は受けるものと考えられた。なお、筋肉片の pH は温置中はほぼ一定であつた (Fig. 6)。

胞子虫の寄生、プロテアーゼ活性およびジェリー化の関係 コガネガレイ 凍結試料魚 1 ケース (20 kg, 70 尾入り) より 48 尾を無作為に抽出し、胞子虫の寄生の程度、プロテアーゼ A, B 活性、およびジェリー化の程度 (Δ_{15}^{25}) の 3 者の相互関係を調べた。Fig. 8 に示すように、3 者間に極めて密接な関係がみられた。さらに、異常文化干し筋肉を活性 A と B の強弱から 3 つの型 (I, II, III) に分類した。Fig. 8 の試料中 No. 1, 3, 17, 21 は I 型, No. 22, 28, 35, 42, 46 は II 型, No. 31, 34, 37 は III 型に相当し、その他は正常 (IV 型) と考えられる。

胞子虫の寄生が重度のも (I, II 型) では活性 A, B とともに高く、ジェリー化が顕著である。活性 A と B とが必ずしも並行しないのは、これらが互いに異なるプロテアーゼによるとの前記の推定を支持する。IV 型における活性 A は魚類筋肉にも通常存在するカテプシン D によるものと考えられる。IV 型の Δ_{15}^{25} 値は例外なく

Fig. 8. Relationship among the degree of myxosporidian infection of yellowfin sole, the protease activity against hemoglobin at pH 3 (○) and casein at pH 6.5 (●), and the rate (Δ) of change in compressive stress (15 h-incubation at 25°C). Degrees of infection were defined as follows to correspond to the numbers of spores observed in a microscopic field on a slide smear stained with methylene blue at a magnification of 200. —, not detected; +, 1 or 2 spores; ++, 3–9 spores; +++, 10–30 spores; +++++, 31–100 spores.

Table 1. Degree of jellification*¹ of yellowfin sole muscle having high protease activity

Incubation time (h)	Yellowfin sole specimens* ²							
	No. 1				No. 28			
	Incubation temperature (°C)				Incubation temperature (°C)			
	5	15	25	35	5	15	25	35
1.5	—	—	—	—95	—	—	—	—19
5	—	—	—78	—	—	—	—4	—
20	—	—23	—96	—	—	—33	—80	—
50	—18	—53	—	—	—25	—60	—	—

*¹ Expressed by the rate of change in compressive stress of muscle,
 $\Delta = [(S_t - S_0)/S_0] \times 100$.

*² Refer to Fig. 8 for the details of both specimens.

正で、すべて温置中に筋肉片が硬くなったことを意味する。寄生が極めて軽度な III 型のものでは、活性 B はほとんどみられず、活性 A が正常肉 (IV 型) の 2~3 倍高いレベルにある。このような筋肉の Δ_{15}^{25} は 0 に近い僅かに負という程度であるが、前記のようにこれらにもジェリー化が軽微ながら起きているものと考えられる。活性 B のみの筋肉はみつからなかった。

温度とジェリー化速度 Fig. 8 中の No. 1 (I 型) および No. 28 (II 型) の各筋肉試料を種々の温度に一定時間放置し、ジェリー化の速度を測定した。Table 1 に

示すように、ジェリー化速度が温度に依存することは明白であるが、5°C でも 50 時間後には軽微ながらジェリー化することから、これらの試料のように活性 (A, B) がかなり高いものでは、文化干し製造工程中あるいは製品の流通過程中にもジェリー化が進むものと思われる。

正常肉と異常肉中の水分、タンパク質量および pH Fig. 8 に掲げた試料魚を、胞子が検出されないもの 35 尾と、検出されたもの 13 尾のグループに分け、前者を正常区、後者を異常区とした。両区の魚の筋肉中の水分、粗タンパク量を比較した結果を Fig. 9 に示す。図

Fig. 9. Relationship between protein and moisture contents in yellowfin sole muscle. ●: muscle infected with the parasite; ○: normal muscle.

中の直線は、水分+粗タンパク量=100(%)の関係を示す。したがって、点と直線との隔たりは粗脂肪量とみなせる。Fig. 9の結果から、筋肉の主成分の量には両区の間で本質的差異はないものと考えられる。

次に両区の魚について筋肉 pH と 4_{15}^{25} 値との関係を調べた。正常区の解凍直後の筋肉 pH は 5.9~6.7 異常区のそれは 5.8~6.4 と、両区間に有意の差異はなかった。また、pH と 4_{15}^{25} 値の間にも一定の傾向はみられず、このような比較的狭い pH 範囲では、ジェリー化速度に対する pH の影響は、たとえあるとしても、無視できる程度であろう。

組織学的観察 孢子虫の寄生が重度でプロテアーゼ活性が高い異常肉試料 (Fig. 8 中の No. 1) の解凍直後および 25°C に 20 時間温置後の組織、および比較のため正常肉 (Fig. 8 中の No. 5) の解凍直後のものおよび同様に温置したものの組織の顕微鏡写真を Plate 1 に示す。異常肉の解凍直後のものに孢子虫の孢子袋²⁾が観察された (Plate 1C および D)。この孢子袋以外には組織像は正常肉のそれとくに異なる点は認められなかった。ただし、両者とも筋細胞間や細胞中に空隙が多く、筋肉は凍結貯蔵中にかなりスポンジ化していたものと考えられる。異常肉の 20 時間温置後の筋細胞には多くの亀裂や崩壊がみられ、また無数の孢子が散在していた (Plate 1E および F)。

プロテアーゼの性質 種々のプロテアーゼインヒビターその他試薬類の、プロテアーゼ活性 A および B に対

する影響を調べた結果を Table 2 にあげた。BPB, IAA, TPCK, NEM, Zn^{2+} などの影響が両活性間で明らかに異なっており、両活性が互いに異なる 2 種 (あるいはそれ以上) のプロテアーゼによるものとの推定がここでも裏付けられた。一方、両活性は共通して DFP, STI, pepstatin⁷⁾ で阻害されず、 Hg^{2+} , PCMB, leupeptin⁷⁾ で強く阻害され、さらに cysteine によりいくらか増強された。したがって、活性 A および B を示すプロテアーゼはともにチオール酵素ということになる。次に活性 A, B ともに高い筋肉試料からの抽出液について、カテプシン B (チオール酵素) がよく作用する合成基質^{8,9)} (Bz-Arg-NH₂, Bz-D,L-Arg-β-NPA) に対する活性を pH 3.0 および 6.5 で測定したが、活性は極めて微弱であつた。したがって、コガネガレイ異常肉の 2 種のプロテアーゼがカテプシン B である可能性はほとんど否定される。Table 2 にみられる活性 A のうち、pepstatin で阻害され、leupeptin で阻害されない活性 (この試料 (Fig. 8 中の No. 3) の場合、全活性の 5~15%) はカテプシン D 活性¹⁰⁾ に相当するものと考えられる。この部分は別として、活性 A および B を示すプロテアーゼの大部分は正常肉には存在しないと考えられる。したがって、これらは孢子虫に由来する可能性が極めて高い。孢子虫の寄生の度合とプロテアーゼ活性の間の相関性 (Fig. 8) もこれを支持するものである。

考 察

前述のように、常温放置によりジェリー化するコガネガレイ筋肉中には必ず孢子虫の孢子と高いプロテアーゼ活性が検出される。プロテアーゼは酸性 (pH 3 付近) で基質としてのヘモグロビンをよく水解するもの、および中性付近 (pH 6.5 付近) でカゼインをよく水解するものとの少なくとも 2 種類が存在する。本報では便宜上前者をプロテアーゼ (活性) A、後者をプロテアーゼ (活性) B と仮称した。ただし、活性 B は寄生度の低いものには検出されない場合もあつた。これらのプロテアーゼは孢子虫から、その生活環のある段階、多分宿主の死直後のようなときに分泌されるものと想像される。活性 A および B を示す酵素の由来が互いに無関係であるとすれば、2 種以上の孢子虫が同時に寄生する可能性も考えられるが、孢子虫の形態学的観察からは 1 種のみのものである。

孢子虫の寄生がみられるジェリーミート¹¹⁾、いわゆる“アズキ”、“milky meat”、“mushy meat”などの原因として、孢子虫由来のプロテアーゼ作用が推定されてきた¹²⁾*が、いずれも根拠に乏しかつた。今回のコガネガ

* 松本浩一：日本輸出冷凍水産物検査協会参考資料，第 7 号，1-32 (1954)。

Plate 1. A: Longitudinal section of the frozen stored-thawed normal yellowfin sole muscle.
 B: Longitudinal section of the same muscle as A, after incubation at 25°C for 20 h.
 C: Longitudinal section of yellowfin sole muscle having high protease activity. A myxosporidian cyst is indicated by an arrow.
 D: A portion of the cyst in C.
 E: Longitudinal section of the same muscle as C after incubated at 25°C for 20 h. A disintegrated part is shown by an arrow.
 F: A portion of the disintegrated tissue in E.

レイの異常肉は、種々の点からみて、典型的なジェリーミートで、ジェリー化は孢子虫由来のプロテアーゼによるものと考えられる。この結果は上記の推定を積極的に支持するものである。

今回取り上げた文化干し製品におけるジェリーミート発生の頻度は不明である。これについては、前記のよう

に同一ロットの凍結原料から無作為に抽出した試料魚 48 尾のうち、急速にジェリー化したものが 9 尾、軽微のものが 3 尾あつた (Fig. 8) ことから、かなりの高頻度であつたものと考えられる。

コガネガレイに近縁な魚種、たとえば、オヒョウ *Hippoglossus stenolepis*, シタビラメ *Paraphrys vetulus*,

Table 2. Effects of various protease inhibitors and chemical agents on the protease activity of infected yellowfin sole against hemoglobin at pH 3 (A) and casein at pH 6.5 (B)

Effector*	Activity (%)		Effector	Activity (%)	
	A	B		A	B
None	100	100	IAA	84	11
Leupeptin	15	2.3	IANa	19	3.2
Pepstatin	90	107	Hg ²⁺	4.8	1.0
Antipain	24	0.9	NEM	98	35
Chimostatin	11	0	Cu ²⁺	52	22
Leupeptin+pepstatin	3.5	1.9	Cu ²⁺ +DAN	12	1.8
TLCK	7.0	0	BPB	91	34
TPCK	61	3.0	Zn ²⁺	94	28
STI (0.2 mg/ml)	100	101	OPH	96	61
DFP	100	110	EDTA	97	114
PCMB	9.0	1.2	Cysteine	115	105

* Muscle extract was preincubated with each effector at a concentration of 5 mM at 37°C for 15 min. The concentration of each effector in the assay mixture was 1 mM unless otherwise specified. TLCK: *N*-*p*-toluenesulfonyl-L-phenylalanine-chloromethyl ketone, STI: soybean trypsin inhibitor, DFP: diisopropylphosphorofluoride, PCMB: *p*-chloromercuribenzoate, IAA: iodoacetamide, IANa: sodium iodoacetate, NEM: *N*-ethylmaleimide, DNA: diazoacetyl-DL-norleucine methylester, BPB: bromophenacyl bromide, OPH: *o*-phenanthroline, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt.

Dover sole *Microstomus pacificus*, petrale sole *Eopsetta jordani*, starry flounder *Platichthys stellatus* などでは古くから粘液胞子虫の寄生および筋肉のゼリー化現象が知られている^{8,12)}。また、キハダマグロ^{3,8)}、メカジキ¹³⁾でも同様な現象が観察されている。さらに近年、メルルーサおよびその近縁魚種の筋肉のゼリー化が水産業上しばしば問題になつてゐる。しかし、著者が調査したキハダマグロ⁸⁾、ペルー沖で漁獲されたメルルーサ *Meruliccius gayi peruanus* などの胞子虫に感染した筋肉では、酸性 (pH 3 付近) で活性を示すプロテアーゼしか検出されなかつた。これらの異常肉の問題についてはさらに検討中である。

終りに、試料の入手に御協力いただいた千代田化学工業所 山中 茂、榎本 恭、日魯漁業株式会社技術研究部 赤沢治夫の諸氏に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 田中克己・浜 清：顕微鏡標本の作り方，第10版，裳華房，東京，1971，pp. 1-271.
- 中島健次・江草周三：魚病診断指針，3，水産庁，1976，pp. 55-68.
- S. KONAGAYA and K. AMANO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 1169-1178 (1973).
- 萩原文二：酵素研究法（赤堀四郎編），第2巻，朝倉書店，東京，1956，pp. 234-246.
- 小長谷史郎・小長谷庸夫：東海水研報，96号，67-74 (1978).
- 松本浩一：ジャパンプードサイエンス，2(2)，67-73 (1963).
- H. UMEZAWA: in "Enzyme Inhibitors of Microbial Origin", University of Tokyo Press, Tokyo, 1972, pp. 15-52.
- K. OTTO: in "Tissue Proteinase" (ed. by A. J. BARRETT and J. T. DINGLE), North-Holland Pub. Co., New York, 1971, pp. 1-28.
- A. J. BARRETT: in "Proteinases in Mammalian Cells and Tissue" (ed. by A. J. BARRETT), North-Holland Pub. Co., New York, 1977, pp. 181-208.
- 小長谷史郎：東海水研報，94号，1-28 (1978).
- 小長谷史郎：さかな（東海区水産研究所業績C集，15号，32-39 (1975).
- M. PATASHNIK and H. S. GRONINGER: *J. Fish. Res. Board Can.*, **21**, 335-346 (1964).
- K. MATSUMOTO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **20**, 469-480 (1954).