飼料脂質に対するハマチ肝臓酵素の適応^{*1}示野 貞夫・細川 秀毅・竹田 正彦
高山 三圭・福井 章夫・佐々木 広治

(1980 年 8 月 22 日受理)

Adaptation of Hepatic Enzymes to Dietary Lipid in Young Yellowtail^{*1}Sadao SHIMENO^{*2}, Hidetsuyo HOSOKAWA^{*2}, Masahiko TAKEDA^{*2},
Sankei TAKAYAMA^{*2}, Akio FUKUI^{*2}, and Hiroji SASAKI^{*2}

The effects of dietary lipid on the activities of several hepatic enzymes relating to the metabolism of protein, lipid and carbohydrate were investigated in young yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, fed for 30 days on isocaloric diets containing differing levels of lipid (5-22%) and protein (68-40%). Each enzyme activity changed markedly in response to the dietary lipid, but it required a long period (20-30 days) for the adaptation. In general, the feeding of high fat diets lowered the activities of hepatic alanine aminotransferase, arginase, glucose-6-phosphatase, fructose-biphosphatase, phosphorylase, 6-phosphofructokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) and malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP⁺). At the end of the experiments, the highest activity of most enzymes was found in the liver of the fish fed on the lowest lipid diet, and the enzyme activities correlated negatively with the dietary lipid levels. There were similar negative correlations between dietary lipid level and concentrations of protein, amino nitrogen and glucose in the plasma and of glycogen in the liver, but there was a positive correlation between dietary lipid level and the liver fat content. These data suggest that dietary lipid causes a repression of amino acid degradation, gluconeogenesis, glycolysis and lipogenesis as well as a facilitation of the assimilation or preservation of the lipid in the fish liver, and that the protein sparing effect of lipid results from the comprehensive regulation of many enzymes relating to the metabolism of protein, lipid and carbohydrate.

魚類の成長や体成分に及ぼす飼料の脂質含量の影響については多くの報告があり、筆者ら^{1,2)}も、飼料のタンパク質を減らしても脂質を添加してエネルギーを高く保つと、ハマチの成長は低下せず、また体脂肪は増大することを報告した。一方、飼料脂質に対する酵素の適応については、脂肪酸合成系酵素の動態が調べられているにすぎない³⁻⁵⁾。また養魚飼料でも脂質にタンパク質節約作用のあることが知られているが^{1,2,6)}、その作用機作についてはほとんど研究されていない。そこで本報では、魚類の代謝調節に関する研究の一環として、脂質含量の異なる飼料でハマチを飼育し、肝臓と血液の一般成分、ならびにタンパク質、脂質および糖質の代謝に関する肝臓酵素の変動や差異を調べ、脂質摂取魚の代謝調節および脂質のタンパク質節約作用の基礎知見を得ようとした。

実験方法

供試魚と飼料 供試魚および飼料は前報²⁾で述べたものと同じである。すなわち飼料 3 に馴致した平均体重 106 g のハマチ *Seriola quinqueradiata* にエネルギーと糖質の含量が等しくてタンパク質および脂質の含量がそれぞれ 68~40 および 5~22% と異なる 5 飼料 (Table 1) を一定の給餌率で与えて、8 月 8 日から 30 日間網生簀で飼育した。飼育開始時から 10 日おきに、摂餌 17 時間後に各区から 17 尾程度を取りあげ、肝臓酵素ならびに肝臓と血液の一般化学成分の分析に供した。

肝臓酵素 摘出した肝臓を 9 倍量の純水とともに氷冷下で 2 分間ガラスホモジナイザーで摩砕し、3,000 rpm で 10 分間冷却遠沈して得られる上澄液を酵素液とした。アミノ酸分解酵素として alanine aminotransferase

^{*1} 魚類の代謝調節—I (Metabolic Adaptation in Fishes—I). 本研究費の一部は昭和 52 年度文部省科学研究費によるものである。

^{*2} 高知大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kochi University, Nankoku 783, Japan).

Table 1. Composition of the experimental diets (%)^{*1}

Diet No.:	1	2	3	4	5
White fishmeal	85.7	71.6	61.8	54.5	44.9
Pollack liver oil	0	6.4	10.9	13.8	18.5
Cellulose	0	7.7	13.0	17.4	22.3
The others ^{*2}	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3
Nutrient on dry matter basis					
Crude protein	67.7	58.9	52.6	47.8	40.0
Crude fat	4.9	10.9	15.2	18.0	22.3
Digestible carbohydrate	3.6	3.7	3.9	3.8	3.9
Energy (kcal/100 g)	353	363	369	369	369

^{*1} Details of the composition are the same as those reported previously²⁾.

^{*2} Containing gluten, vitamin mix, mineral mix and sodium polyacrylate.

(AAT, EC 2.6.1.2) と arginase (ARG, EC 3.5.3.1), 糖新生酵素として glucose-6-phosphatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) と fructose-biphosphatase (FBPase, EC 3.1.3.11), 解糖酵素として phosphorylase (Plase, EC 2.4.1.1) と [6-phosphofructokinase (PFK, EC 2.7.1.11), 脂肪酸合成系酵素として glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) (PGDH, EC 1.1.1.44) および malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP⁺) (MDH, EC 1.1.1.40) の計 9 種類の酵素活性を測定した。AAT は上田らの REITMAN-FRANKEL 法の变法⁷⁾, ARG は山村らの方法⁸⁾, Plase は SCHWARTZ らの活性型酵素測定法⁹⁾, MDH は YEH らの方法¹⁰⁾, その他の酵素は既報の方法¹¹⁾によりそれぞれ測定した。

いずれの酵素についても, 1 分間に 1 μ mol の基質または補酵素を変化させる活性を 1 unit と定義して, 特別に断わらないかぎり, 体重 100 g あたりの活性の unit 数を示した。

血液成分 あらかじめヘパリン処理した注射器で動脈球から採血し, 3,000 rpm で 10 分間遠沈して得られる上澄液を血漿試料としてタンパク質, 非タンパク態窒素, アミノ態窒素, 尿素, アンモニアおよびグルコースの含量を測定した。非タンパク態窒素はアルカリ性次亜臭素酸塩法¹²⁾, アミノ態窒素はジニトロフルオロベンゼン法¹³⁾, 尿素はジアセチルモノオキシム法¹⁴⁾, アンモニアは和光純薬のキットによる方法, その他の成分は既報の方法¹¹⁾によりそれぞれ測定した。

結 果

肝臓酵素 酵素活性の変化や差異を調べる場合に, 多くの活性表示法があるが, 表示法によつて結果の異なることがある。そこで AAT と G6PDH を例にとつて, 単位肝臓重量あたり, 全肝臓あたり (全活性), 単位体

Fig. 1. Changes in activities of alanine aminotransferase (AAT) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) in the liver of young yellowtail fed diets containing varying levels of lipid and protein: diet 1, ○; 2, □; 3, ●; 4, ■; 5, ▲. The activities are expressed as units per g liver, per 100 g body weight, and per g liver protein, and values are the average of 5 fish. One unit of enzyme activity represents the conversion of 1 μ mol of the substrate or coenzyme per minute under standard assay conditions.

重あたり, および単位肝臓タンパク重量あたり (比活性) の活性変化を Fig. 1 に示した。いずれの酵素でも, 全活性は飼育日数の経過とともに増大したが, 他の 3 表示法ではいずれの活性も 10 日目に減少するが 20 日目には増大して区間差も大きくなるというように, 酵素活性の変化や区間差は表示法と無関係に類似していた。しかし単位肝臓重量あたりの活性は高肝量係数の 4・5 区で相対的に低いというように, 表示法によつてある程度の違いはみられた。

Fig. 2. Changes in activities of hepatic alanine aminotransferase (AAT), arginase (ARG), glucose-6-phosphatase (G6Pase), fructose-biphosphatase (FBPase), phosphorylase (Plase), 6-phosphofructokinase (PFK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating) (PGDH) and malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating) (NADP⁺) (MDH). Activities are expressed as units per 100 g body weight, and vertical lines indicate the standard deviation of mean. The definition of enzyme unit and symbols are the same as Fig. 1.

各区の体重や組織重量は前報²⁾で述べたとおりであるが、魚体重、肝臓重量および肝臓タンパク量のいずれもが変動する本実験のような場合には、単位体重あたりの活性を比較するのが適当であると思われるので、体重100gあたりの各酵素活性の経時変化をFig. 2に、終了時の活性をTable 2に示した。いずれの値も5尾の平均値と標準偏差である。

アミノ酸分解酵素のAATとARGの活性は他の7酵素の活性より高く、変動幅も大きかったが、全体的には経時的に低下する傾向にあった。経時変化を飼料区別にみると、低脂質（高タンパク質）飼料の1・2区の両活性は20日目以後でも比較的高く維持されたのに対して、高脂質（低タンパク質）飼料の4・5区のそれらは顕著に低下した。したがって20日以後の両活性と飼料の脂質含量との間に負の相関関係があり、また1区と5区とのAAT活性には有意差が認められた（Table 2）。糖新生酵素のG6Pase活性はいずれの区でも低下する傾向にあったが、その低下率は高脂質飼料区ほど高く、20日目以後ではアミノ酸分解酵素と同様に飼料の脂質含量と本活性との間に強い負の相関関係がみられた。FBPase活性に及ぼす飼料脂質の影響は他の8酵素と対

照的であり、両者の間に正の相関関係が認められた。しかしその区間差は小さく、有意差はみられなかった。

解糖酵素のPFK活性は20日目まで減少したが、30日目には増大した。20日目を除いて、本活性は低脂質飼料区に比較的高く、飼料の脂質含量と弱い負の相関を示した。Plase活性は経時的に増大する傾向にあったが、その増大率は低脂質飼料区ほど高く、20日目以後には本活性と飼料の脂質含量との間に強い負の相関関係が認められた。糖代謝と脂肪酸合成に関与するG6PDH、PGDHおよびMDHの活性はきわめて類似した変化を示した。すなわち低脂質飼料の1・2区の各活性は顕著に増大したのに対して、高脂質飼料の4・5区のそれはわずかに減少する傾向にあった。したがって終了時には、両群の各酵素活性に有意差がみられたし、各活性と飼料の脂質含量との間には強い負の相関関係が認められた。

以上のように、ハマチ肝臓の9酵素活性は飼料の脂質含量あるいはタンパク質含量の影響を顕著に受け、さまざまに変動したが、概略的にみると、アミノ酸の分解利用に関与する酵素（AAT・ARG・G6Pase・FBPase）の活性は経時的に低下するのに対して、糖質の分解利用に関

Table 2. Activities of liver enzymes and contents of liver and plasma constituents at the end of experiments

	Diet No.					r*1	
	1	2	3	4	5	Lipid content in diet	Protein sparing effect
Liver enzyme*2 (units/100 g body weight)							
AAT	94.9±16.7	91.5±4.5	83.7±3.4	79.8±10.3	74.7±3.3	-0.984	-0.910
ARG	126±86	103±33	88±35	101±10	95±45	-0.783	-0.924
G6Pase	15.7±3.8	15.1±2.7	14.6±1.7	12.4±1.1	12.2±1.5	-0.923	-0.782
FBPase	2.30±0.71	2.35±0.66	2.78±0.61	2.45±0.45	3.06±0.77	+0.804	+0.815
Plase	6.39±2.56	6.49±2.43	3.94±1.51	3.97±1.85	2.42±0.20	-0.928	-0.865
PFK	0.60±0.16	0.51±0.24	0.92±0.20	0.29±0.18	0.16±0.07	-0.514	-0.297
G6PDH	14.7±6.0	11.1±1.3	6.29±2.00	5.43±1.05	5.61±0.94	-0.942	-0.946
PGDH	12.0±6.0	8.83±1.23	5.31±2.16	3.75±0.65	3.73±0.86	-0.965	-0.946
MDH	2.11±0.99	1.46±0.34	1.02±0.41	0.78±0.25	0.68±0.22	-0.979	-0.968
Liver constituent*3 (mg/100 g body weight)							
Crude protein	219	214	221	255	215	+0.266	+0.140
Crude fat	79	148	321	349	417	+0.976	+0.938
Glycogen	71	42	56	53	34	-0.746	-0.773
Crude ash	20	19	20	22	20	+0.370	+0.201
Plasma constituent (mg/100 ml plasma)							
Protein-N	524±38	558±34	508±36	488±24	504±12	-0.614	-0.417
Amino-N	16.4±1.7	16.1±0.8	16.1±1.3	16.2±1.0	14.8±0.7	-0.755	-0.693
Urea-N	22.3±2.7	29.0±3.0	25.7±3.4	24.3±1.6	22.8±3.0	-0.106	-0.112
Ammonia-N	0.78±0.03	0.99±0.19	0.65±0.11	1.14±0.31	0.93±0.27	+0.342	+0.193
Nonprotein-N	54.3±1.3	68.5±8.3	54.3±8.4	53.7±3.5	51.4±3.4	-0.399	-0.245
Glucose	105±15	107±16	96±15	93±13	96±14	-0.801	-0.729

*1 Correlation coefficient between experimental parameters and the lipid contents in diets or the protein sparing effects of lipid calculated from the weight gain and the protein intake in Table 3.

*2 The definition of enzyme unit and abbreviations are the same as in Figs. 1 and 2. Mean±standard deviation for 5 fish.

*3 Pooled sample of 8 fish.

与する酵素 (Plase・G6PDH・PGDH) の活性は増大する傾向にあった。また FBPase を除く 8 酵素の活性はいずれも低脂質・高タンパク質飼料区に比べて高脂質・低タンパク質飼料区で減少率が大きいが増大率が小さい傾向にあった。

肝臓の一般成分 Table 2 から明らかなように、各区の粗タンパク質および粗灰分の含量 (mg/体重 100 g) はほぼ等しかつたが、粗脂肪およびグリコーゲンの含量は飼料組成の影響を顕著に受け、大きな差異があつた。すなわち高脂質飼料区の肝臓脂肪は経時的に増大したのに対して、低脂質飼料区のそれは減少し、終了時の肝臓脂肪量と飼料脂肪量との間に強い正の相関関係があつた。一方、低脂質飼料区のグリコーゲン量は実験期間中ほぼ一定であつたが、高脂質飼料区のそれは経時的に減少し、終了時のグリコーゲン量と飼料脂肪量との間に負の相関関係がみられた。

血液成分 終了時の血液成分は Table 2 に、窒素化合物の経時変化は Fig. 3 に示したとおりである。いずれの成分についても、かなり大きな経時変化や個体差が

みられたが、各成分は概して低脂質飼料区に高く、終了時におけるタンパク質、アミノ態窒素およびグルコースの含量と飼料の脂質含量との間に弱い負の相関関係がみられた。また 2 区と 5 区とのタンパク質、尿素および非タンパク態窒素の含量に有意差があつた。

脂質のタンパク質節約効果 タンパク質節約効果の優劣を表わすのに、何を基準にしてどのような数値を用いるかという問題があるが、本報では 100 g の増重に要した飼料タンパク量が無添加区に比べて脂質添加区ではどの程度少ないかという数値を用いることとする。飼料に十分馴れた最終の 10 日間について、この方法で脂質のタンパク質節約効果を算出し、Table 3 に示した。スケトウダラ 肝油無添加飼料の 1 区では 100 g の増重に 155 g の飼料タンパク質が必要であつたが、6.4% の肝油を添加した飼料の 2 区では同必要量は 116 g であり、1 区に比べて 25% のタンパク質が節約されたこととなる。肝油添加量が多い飼料の 3 区以下でも同様に、それぞれ 39、35 および 48% のタンパク質が節約され、脂質が多くてタンパク質が少ない飼料区ほどタンパク質

Table 3. Protein sparing effect of lipid on the basis of the weight gain and protein intake during the last 10-day period

Diet No.:	1	2	3	4	5
Average weight gain (g)	44	64	69	53	56
Diet fed (g)	101	126	123	111	111
Protein fed (g)	68	74	65	53	44
Protein required for 100 g weight gain (g)	155	116	94	100	80
(%)	100	75	61	65	52
Protein spared (%)	—	25	39	35	48

節約効果は高い傾向にあった。

一方、多くの肝臓酵素の活性は多脂質飼料区ほど低い傾向にあったので、最終の 10 日間における脂質のタンパク質節約効果と終了時における酵素活性や体成分量との相関係数を算出し、Table 2 に示した。アミノ酸分解酵素の AAT および ARG の活性は脂質無添加の 1 区に最も高く、タンパク質節約効果の高い飼料区ほど低下する傾向にあり、両者の間に -0.9 以上の強い負の相関関係が認められた。また G6Pase, Plase, G6PDH, PGDH および MDH の活性も同効果と強い負の相関を示したが、PFK 活性はあまり相関せず、逆に FBPase 活性は正の相関を示した。

考 察

飼料脂質への適応 高脂質飼料を長期間摂取したハマチの代謝特性を知るために、試験終了時における低脂質（高タンパク質）飼料の 1 区の酵素活性または成分量に対する高脂質（低タンパク質）飼料の 5 区のその比を Fig. 4 に示した。したがって 1 以下の数値は、高脂質区の酵素活性または成分量が低脂質区のそれより低いことを示し、また点線は有意な区間差を意味する。

低脂質区に比べて高脂質区では肝臓の脂肪は著しく多いがグリコーゲンは少なく、また FBPase を除いてアミノ酸分解、糖新生、解糖および脂肪酸合成に関与する 8 酵素の活性はいずれも低く、7 酵素活性に有意な区間差が認められた。これらの比と各成分の経時変化 (Figs. 2 および 3) とを総合すると、高脂質飼料を長期間摂取したハマチの肝臓では、アミノ酸分解、糖新生、解糖および脂肪酸合成系が抑制されるとともに、摂取脂質をエネルギー源として有効に利用貯蔵できるように、総合的な代謝調節が行なわれていたものと推察される。飼料の脂質含量と各酵素活性との間に強い相関関係があることから明らかなように (Table 2)、脂質含量が比較的低い飼料を摂取した 3・4 区についても同様の代謝調節が行なわれていたものと考えられる。陸上動物についても、必ずしも一致しないが類似した結果が報告されており^{10,15,16)}、また肝臓の酵素活性は飼料の脂質ばかりでな

Fig. 3. Changes in concentrations of protein, ammonia, amino nitrogen and nonprotein nitrogen in the plasma.

くタンパク質や糖質の含量にも関係することが知られている¹²⁾。本実験に用いた 5 飼料では (Table 1)、エネルギー量が一定で脂質量の増大につれてタンパク質量が減少しているので²⁾、上記の高脂質飼料摂取時の代謝特性には低タンパク質飼料の影響もあると考えられ、今後、一定のタンパク質含量の飼料で脂質の影響を調べる必要がある。

Fig. 4 から明らかなように、高脂質飼料を 30 日間摂取したハマチの肝臓酵素は、アミノ酸分解や脂肪酸合成系を抑制する方向に適応したが、その適応速度はゆるやかであつた。すなわち 20 日以前にも 30 日目と類似した適応はみられたが (Fig. 2)、各酵素活性の区間差は小さく、また飼料組成と各活性との相関係数は小さかつた。特に 10 日目にはその傾向が著しかつた。ハマチの糖代謝酵素が飼料糖質に適応するのに 20~30 日が必要であつた^{11,17)}、コイ^{11,18)}、サケ・マス類^{4,19,20)}、ウナギ²¹⁾などでも飼料の質的量的変化に対する肝臓酵素の応答は遅いと報告されている。一方、陸上動物での応答は数日間で起こるといわれているので^{22,23)}、飼料に対する魚類の適応能は低いとも考えられ、比較生化学的に興味深い。

Fig. 4. Metabolic adaptation to dietary lipid. Values are expressed as a ratio of the activity, content and concentration in fish fed the diet 5 to those in fish fed the diet 1. Arrows in boldface and dashed lines indicate the significant differences.

ハマチ肝臓の G6PDH, PGDH および MDH の活性と飼料の脂質含量との間に強い負の相関関係が認められたが (Table 2), LIN ら³⁻⁵⁾はギンザケ肝臓の脂肪酸合成を詳しく研究し、上記 3 酵素のほかに脂肪酸合成酵素とクエン酸開裂酵素の活性も飼料脂質により抑制されること^{3,4)}, またアイソトープ実験から脂質摂取魚の脂肪酸合成が抑制されること⁵⁾を報告している。したがって魚類肝臓のペントースリン酸回路脱水素酵素やリンゴ酸酵素 (MDH) は脂肪酸の生合成に重要な役割を果たしているものと推察される。最近、脂質摂取ラットの脂肪酸合成系酵素の抑制は総脂質量よりも特定の高度不飽和脂肪酸量と密接に関係することが CENTURY¹⁰⁾により報告され、また高度不飽和脂肪酸の給与がショザケの成長に有効であることが竹内ら²⁴⁾により明らかにされたので、魚類の栄養や代謝に及ぼす飼料脂質の質的な影響は、今後に残された重要な課題である。

脂質のタンパク質節約作用 アミノ酸の分解に関与する AAT および ARG の活性はタンパク質節約効果の低い区に高く、同効果の高い区ほど低い傾向にあり、両者の間にはそれぞれ -0.91 および -0.92 と強い負の相関関係があつた (Table 2)。低脂質高タンパク質飼料区では、両酵素活性が高く維持されてアミノ酸がエネルギー源などに比較的多く利用されるので、そのタンパク質効率^{1,2)}が低かつたものと考えられる。これと対照的に高脂質低タンパク質飼料区では、脂質がエネルギー源に比較的多く利用されるので、アミノ酸分解酵素の活性が抑制され、飼料タンパク質の効率や蓄積率^{1,2)}が高まつたものと推察される。血中窒素化合物の差異もこの推察を支持している (Table 2, Fig. 3)。したがって中野ら^{25,26)}が述べているように、これらのアミノ酸分解酵素

の活性変化を通じてタンパク質節約作用が発現することが示唆される。しかし G6Pase, Plase, G6PDH, PGDH および MDH の活性も同効果と強く相関していたし、糖質含量のきわめて低い本飼料では、上記諸酵素の究極的な基質となるアミノ酸の消費という効果を通じて、タンパク質、脂質および糖質の代謝に関与する多くの酵素活性の変動が総合されて、脂質のタンパク質節約作用が発現したものと推察される。

一方、飼育初期にもタンパク質節約効果がみられたのに、各酵素活性は同効果とあまり相関しなかつたことから、同効果を酵素活性のみから説明することは困難である。またアミノ酸分解酵素などの活性は飼料のタンパク質含量やタンパク摂取量と密接に関係するので²⁰⁾, それらを考慮した実験が必要である。さらにその節約機構を解明するためには、排泄窒素、ホルモンなどを含めた総合的な研究が望まれる。

文 献

- 1) 竹田正彦・示野貞夫・細川秀毅・梶山英俊・会所建志: 日水誌, **41**, 443-447 (1975).
- 2) 示野貞夫・細川秀毅・竹田正彦・梶山英俊: 日水誌, **46**, 1083-1087 (1980).
- 3) H. LIN, D.R. ROMSOS, P.I. TACK and G.A. LEVEILLE: *J. Nutr.*, **107**, 846-854 (1977).
- 4) H. LIN, D.R. ROMSOS, P.I. TACK and G.A. LEVEILLE: *J. Nutr.*, **107**, 1477-1483 (1977).
- 5) H. LIN, D.R. ROMSOS, P.I. TACK and G.A. LEVEILLE: *J. Nutr.*, **107**, 1677-1682 (1977).
- 6) 竹田正彦: 養魚と飼料脂質 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1978, pp. 78-92.
- 7) 上田英雄・太田明生・原田 尚: 臨床酵素学 (赤堀四郎・沖中重雄監修), 朝倉書店, 東京,

- 1965, pp. 411-426.
- 8) 山村雄一・勝沼信彦・藤井節郎：臨床酵素学必携，南山堂，東京，1966，pp. 321-324.
 - 9) A.L. SCHWARTZ and T.W. RALL: *Biochem. J.*, **134**, 985-993 (1973).
 - 10) Y. YEH, G.A. LEVEILLE, and J.H. WILEY: *J. Nutr.*, **100**, 917-924 (1970).
 - 11) 示野貞夫：高知大水実研報，No. 2, 1-107 (1974).
 - 12) 柴田進・佐々木匡秀：超微量定量法，第2版，金芳堂，京都，1967，pp. 270-275.
 - 13) J.F. GOODWIN: *Clin. Chem.*, **14**, 1080-1090 (1968).
 - 14) 柴田進・佐々木匡秀：超微量定量法，第2版，金芳堂，京都，1967，pp. 239-245.
 - 15) N. PEREZ, L. CLARK-TURRI, E. RABAILLE, and H. NIEMEYER: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2420-2426 (1964).
 - 16) B. CENTURY: *J. Nutr.*, **102**, 1067-1078 (1972).
 - 17) 示野貞夫・細川秀毅・梶山英俊・竹田正彦・高知大水実研報，No. 3, 89-99 (1978).
 - 18) 永山文男・大島寛史・梅沢一民・海宝守一：日水誌，**38**, 595-598 (1972).
 - 19) D.R. BUHLER and P. BENVILLE: *J. Fish. Res. Board Can.*, **26**, 3209-3216 (1969).
 - 20) S.J. WHITING and A.J. WIGGS: *Comp. Biochem. Physiol.*, **58B**, 189-193 (1977).
 - 21) Y. INUI and M. YOKOTE: *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **24**, 33-46 (1974).
 - 22) B. SZEPESI and R.A. FREEDLAND: *J. Nutr.*, **94**, 37-46 (1968).
 - 23) R.M. EVANS and R.W. SCHOLZ: *J. Nutr.*, **101**, 1127-1136 (1971).
 - 24) 竹内俊郎・渡辺武・能勢健嗣：日水誌，**45**, 1313-1323 (1979).
 - 25) K. NAKANO and K. ASHIDA: *J. Nutr.*, **100**, 208-216 (1970).
 - 26) K. NAKANO, M. KATSUZAKI, M. MIZUTANI, and K. ASHIDA: *J. Nutr.*, **102**, 283-290 (1972).