

クルマエビから分離された色素 産生性 *Vibrio* の病原性ならびに性状

高橋幸則・閻 愚*・伊丹利明

Pathogenicity and Characteristics of a Brown Pigment-Producing
Vibrio sp. Isolated from Kuruma Prawn *Penaeus japonicus* Bate

Yukinori Takahashi, Yu Yan*, and Toshiaki Itami

From July to October in 1988, an epizootic occurred among cultured kuruma prawn *Penaeus japonicus* Bate in Yamaguchi Prefecture. The typical symptoms of the diseased kuruma prawn were light brown of the gills and swelling of the lymphoid organ. A bacterium was isolated from the hearts and the lymphoid organs of all the diseased kuruma prawns. By infectivity trials the bacterium was proved to be pathogenic to kuruma prawn. This bacterium was gram-negative, non-sporing rods with single or double polar flagellum, and usually 0.6 to 1.0 by 1.2 to 2.0 μm in size. Growth on nutrient agar was observed at 15 to 35 $^{\circ}\text{C}$. The bacterium produced a light brown pigment on the media. Growth occurred in media with NaCl concentration of 0.5 to 6.0%, but no growth in the medium with 7.0%. Growth occurred on BTB Teepol agar and Aronson agar, but no growth on SS agar. The bacterium gave positive oxidase and catalase reaction, utilized glucose fermentatively in Hugh-Leifson's medium and did not produce gas from carbohydrates. IMViC reaction were (+, +, -, +). Distinguishing features of the organisms were negative to lysine, arginine, ornithine decarboxylation test, arginine hydrolytic test, 2,3-butandiol dehydrogenized test and swarming test, and utilization of cellobiose, DL-lactate, D-sorbitol and β -alanine. The bacterium was sensitive to the vibriostatic agent O/129 and novobiocin.

The above-mentioned properties suggest that the bacterium was referred to the genus *Vibrio*, but these properties disagreed with those of the known species of *Vibrio*. Therefore, under the present conditions that the organisms were not examined for DNA base composition, the isolates should be identified as *Vibrio* sp.

水産大学校研究業績 第1336号, 1990年12月11日受付.

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No.1336. Received Dec. 11, 1990.

*山東省水産学校 (Shandong Fisheries School, Yantai, Shandong, China).

1 緒 言

1988年7月から10月にかけて、水産大学校の野外養殖池において、クルマエビに鰓の淡褐色化およびリンパ様器官の腫脹などの症状を伴って斃死する疾病が発生した。病エビについて、細菌学的検査を行ったところ、すべての個体から純培養状に細菌が分離された。

そこで、分離菌のクルマエビに対する病原性および再現性の有無を確認し、菌の形態学的、生物学的ならびに生化学的性状を調べ、分類学的位置を検討した。その結果、分離菌はクルマエビに対して比較的強い病原性と再現性を有すること、また *Vibrio* 属に同定できる細菌であるが、既往の報告の種とは多くの性状において異なることが明らかになったので報告する。

2 材料および方法

2.1 供試病エビ

1988年7月から10月に、水産大学校の野外養殖池において、体重4.6~17.0gのクルマエビに発生した疾病群のうち、斃死直後の個体(体重7.0~11.5g)を5尾用いた。病エビには鰓の淡褐色化およびリンパ様器官の腫脹が認められた(Fig. 1)。

2.2 細菌の分離

上記の病エビを滅菌海水で十分洗浄し、70%アルコール綿で体表面を消毒したのち、心臓およびリンパ様器官に白金耳を穿刺し、普通寒天培地(NaCl 2%, 以下略す)に塗抹して、25℃, 24時間培養後、出現したコロニーから5株を選び、以下の試験に供した(Table 1)。

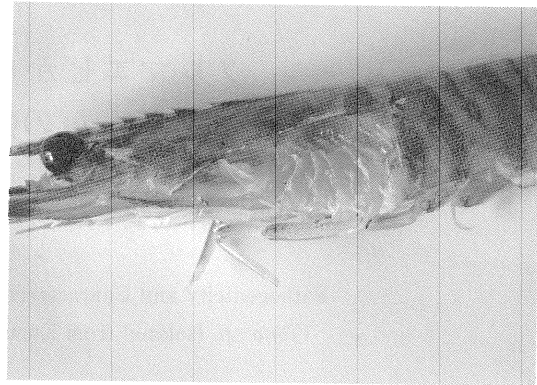


Fig. 1. The typical external symptom of the diseased kuruma prawn, showing the light brown gill.

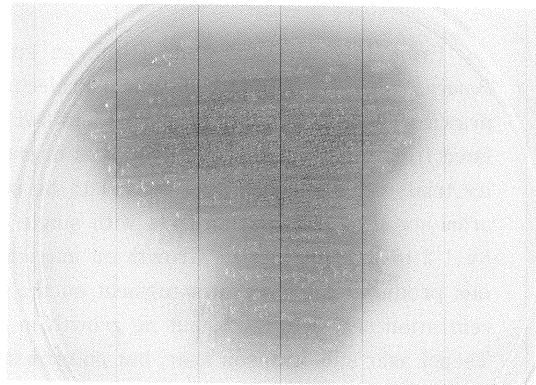


Fig. 2. The colonies of the isolates grown on the nutrient agar medium, showing the light brown pigment.

Table 1. Isolates used in this study

Strain No.	Isolates	
	Date of search	Location of search
YK-1	Aug. 25, 1988	Shimonoseki, YAMAGUCHI
YK-2	Aug. 30, 1988	Shimonoseki, YAMAGUCHI
YK-3	Aug. 30, 1988	Shimonoseki, YAMAGUCHI
YK-4	Sept. 20, 1988	Shimonoseki, YAMAGUCHI
YK-5	Sept. 22, 1988	Shimonoseki, YAMAGUCHI

2.3 分離菌の病原性ならびに再現性確認試験

分離菌を普通寒天培地で25℃, 24時間培養後, 滅菌整理食塩水に懸濁したのち, クルマエビ (平均体重13.8g) の第4腹節筋肉内に, 体重あたりの生菌数が $5.1 \times 10^4 \sim 10^6$ 細胞の3段階となるように接種した。接種後10日間, 症状の観察ならびに斃死の有無を確認して, Behrens=Kärberの法に基づき, クルマエビに対する分離菌のLD₅₀値を求めた。

2.4 細菌学的性状検査

分離菌株ならびに対照菌株 (Table 2) の各種性状は, 普通寒天培地に25℃, 18~24時間培養した菌を用い, 常法にしたがって検査した。有機化合物の炭素源としての利用性試験は, Simmonsのアンモニウム寒天培地に30種の有機化合物を0.05~0.5%の割合に加えて検査した。炭水化物の分解性は, 糖分解試験用半合成基礎培地 (日本) に25種の

炭水化物を1%添加して検査した。

2.5 分類学的検討

検査した118項目の性状をもとにして, Sokal and Michenerの式¹⁾により, 全菌株間のS-valueを求め, 相似度に基づいて陰影マトリックスを作製した。また, 各種の性状をBergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1²⁾ および坂崎^{3,4)}の記載などと比較した。

2.6 薬剤に対する感受性試験

分離菌を普通寒天培地で25℃, 24時間培養後, 滅菌生理食塩水に懸濁し, その0.1mlを感受性ディスク用培地 (日本) 平板上に塗抹して, 15種の薬剤の感受性ディスクをのせ, 4℃, 1時間放置後, 25℃, 24時間培養して, 発育阻止円の直径を計測した。

Table 2. Reference strains used in this study

Strain No.	Reference strains Species name
NCMB6*	<i>Vibrio anguillarum</i>
NCMB407*	<i>V.anguillarum</i> (<i>V.ichthyodermis</i>)
TUF*	<i>V.anguillarum</i> (<i>V.piscium</i> var. <i>japonicus</i>)
PS7702**	<i>V.cholerae</i> (Non-cholera vibrio)
PS7705**	<i>V.cholerae</i> (Non-cholera vibrio)
127-71*	<i>V.parahaemolyticus</i> , biotype I
15-71*	<i>V.parahaemolyticus</i> , biotype II (<i>V.alginolyticus</i>)
6330-62*	<i>Vibrio</i> sp. (Marine vibrio, biotype 6330-63)
6267-48*	<i>Vibrio</i> sp. (Marine vibrio, biotype 6267-63)
NCMB1281*	<i>V.fischeri</i>
K-3*	<i>Vibrio</i> sp.
V-23*	<i>Vibrio</i> sp.
AO-1	<i>Vibrio</i> sp.
KA-1	<i>Vibrio</i> sp.

*: Supplied by Dr.R.Kusuda, Kohchi University.

** : Supplied by Dr.K.Muroga, Hiroshima University.

3 結果

3.1 分離菌の病原性ならびに再現性

分離菌のクルマエビに対する病原性試験の結果を Table 3 に示した。5.1×10⁶ (細胞/g 体重) の分離菌を接種したクルマエビは、接種後 4 日以内にすべてが斃死し、5.1×

10⁵ (細胞/g 体重) 接種群は 5 日以内に70%が斃死した。クルマエビに対する分離菌の LD₅₀ 値は3.2×10⁵ (細胞/g 体重) であった。分離菌の接種によって、斃死したエビの心臓、リンパ様器官および筋肉から接種菌と同一性状の細菌が例外なく再分離された。しかも、斃死したエビには鰓の淡褐色化およびリンパ様器官の腫脹など、自然発病エビと同様の症状が認められた。

Table 3. Pathogenicity of the isolate (YK-1) to kuruma prawn by intramuscular injection

Group	Inoculated number of viable cells/g (b.w.)	Number of prawns challenged	Number of deaths	Mortality (%)
1	5.1×10 ⁶	10	10	100
2	5.1×10 ⁵	10	7	70
3	5.1×10 ⁴	10	0	0
4	0*	10	0	0

* Injected with physiological saline only.

3.2 分離菌の形態学的性状ならびに培養性状

分離菌はいずれもグラム陰性で、端在性の単鞭毛 (まれに 2 本の鞭毛) を有し、活発に運動する。大きさおよび形態は、通常 0.6~1.0×1.2~2.0 μm の短桿菌である。普通寒天培地で 25℃, 24 時間培養後、直径約 1 mm のコロニーを形成し、淡褐色色素を産生する (Fig. 2)。コロニーは正円形、周縁円滑でやや隆起し、湿潤性の光沢を呈する。

3.3 分離菌の生物学的性状

分離菌株の生物学的性状検査の結果を Table 4 に示した。なお、特記しない限り培地の食塩濃度は 2.0% とし、培養温度は 25℃ とした。分離菌は遊走発育をせず、SS 寒天、マッコンキー寒天およびブリリアントグリーン寒天培地上には発育しないが、BTB ティポール寒天および Aronson 寒天培地上に発育する。普通寒天培地上では、20~35℃ でよく発育し、15℃ での発育はやや悪く、10℃ 以下および 37℃ 以上では発育しない。塩分濃度は 0.5~5% でよく発育し、6% での発育はやや悪く、0% および 7% 以上では発育しない。pH は 6~10 の範囲内で発育する。ノボビオシンならびに Vibriostatic agent 0/129 に感受性を有する。

3.4 分離菌の生化学的性状

生化学的性状検査の結果を Table 5 に示した。分離菌はオキシダーゼおよびカタラーゼを産生し、ブドウ糖を酵素的に分解するが、ガスを産生しない。IMViC 反応は (+, +, -, +) であり、硫化水素を産生しない。また、硝酸塩ならびにメチレンブルーを還元し、コレラ赤試験、β-ガラクトシダーゼ産生性、でん粉加水分解性、ゼラチン液化性、KP 試験 (クエン酸塩) は陽性であるが、グルコン酸酸化性、PPA 試験、ペプトンからのアンモニア産生性、2, 3-ブタンジオールからのアセトイン産生性、アルギニン分解性、チロシンおよびキサンチン溶解性、皮粉消化性、リジン・アルギニン・オルニチン脱炭酸性、アルギニン試験、KCN 試験、マロン酸塩利用性は陰性である。1 株を除くすべての株のカゼイン消化性は陽性である。また、ウサギ血液に対して溶血性 (β 型) を示す。

生化学的性状のうち、唯一の炭素源としての有機化合物の利用性試験の結果を Table 6 に示した。分離菌は乳酸、コハク酸、リンゴ酸、グルコン酸、アラニン、ブドウ糖、フラクトース、マンノース、サッカロース、トレハロース、セロピオース、グリセリン、マンニト、ソルビットなど

Table 4. Biological characteristics of the isolates

Characteristics	Isolates(5 strains)
Pellicle on broth	+
Swarming	-
Growth on selective media:	
SS Agar	-
BTB Teepol Agar	+
MacConkey Agar	-
Aronson Agar	+
Brilliant Agar	-
Temperature for growth:	
5°C	-
10°C	-
20~25°C	+
30~35°C	+
37°C	-
42°C	-
NaCl tolerance:	
0 %	-
0.5%	+
1.0%	+
2.0~3.0%	+
4.0%	+
5.0%	+
6.0%	(+)
7.0%	-
8.0%	-
pH for growth:	
5	-
6~9	+
10	+
Sensitivity to:	
Novobiocin	+
0/129	+

(+): Weak or delayed positive.

Table 5. Biochemical characteristics of the isolates

Characteristics	Isolates(5 strains)
Oxidase	+
Catalase	+
O-F test	F
Indole	+
MR test	+
VP reaction	-
Simmons' citrate	+
Hydrogen sulfide	-
Nitrate reduction	+
MB reduction	+
Gluconate oxidation	-
KCN test	-
Chorela red	+
P.P.A test	-
NH ₃ from peptone	-
Urease	(+)
β-galactosidase	+
2,3-butanediol	-
Rennet production	(+)4/5
Arginine hydrolysis	-
Arginine test	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Casein digestion	+
Tributylin digestion	(+)
Tyrosine dissolution	-
Xantine dissolution	-
Chitin decomposition	(+)4/5
Hide powderlysis	-
Haemolysis rabbit	+(β)
Lysine decarboxylase	-
Arginine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
KP-citrate	+
Malonate utilization	-

(+): Weak or delayed positive.

を利用するが、ギ酸、しゅう酸、ピルビン酸、アルギン酸、トリプトファン、フェノール、安息香酸、カテコール、アラビノースなどを利用しない。

また、炭水化物の分解性試験の結果を Table 7 に示した。

分離菌はブドウ糖、フラクトース、マンノース、ガラクトース、サッカロース、マルトース、トレハロース、セロビオース、デンプン、デキストリン、グリコーゲン、グリセリン、マンニット、ソルビット、サリシンなどを分解するが、ガ

Table 6. Utilization of organic compounds of the isolates

Characteristics	Isolates(5 strains)
Utilization of a sole carbon source:	
Formate	—
Acetate	(+)
Lactate	+
Oxalate	—
Succinate	+
Malate	+
Malonate	(+)
Pyruvate	—
Tartrate	(+)
Alginate	—
Tryptophan	—
Phenylalanine	(+)
Phenol	—
Benzoate	—
Catechol	—
Gluconate	+
Alanine	+
Tyrosine	(+)
Glucose	+
Arabinose	—
Rhamnose	(+)
Fructose	+
Mannose	+
Sucrose	+
Lactose	(+)
Trehalose	+
Cellobiose	+
Glycerol	+
Mannitol	+
Sorbitol	+

Table 7. Utilization of carbohydrates of the isolates

Characteristics	Isolates(5 strains)
Acid from:	
Glucose	+
Arabinose	—
Xylose	—
Rhamnose	—
Fructose	+
Mannose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Lactose	—
Maltose	+
Trehalose	+
Cellobiose	+
Melibiose	—
Raffinose	—
Starch	+
Dextrin	+
Glycogen	+
Glycerol	+
Adonitol	—
Mannitol	+
Dulcitol	—
Sorbitol	+
Salicin	+
Esculin	—
Inositol	—

(+): Weak or delayed positive.

スは産生しない。一方、アラビノース、キシロース、ラムノース、ラクトース、メリピオース、ラフィノース、アドニット、ズルシット、エスクリン、イノシットなどを分解しない。

3.5 数値分類

分離菌株と対照菌株合計19株の性状をもとに、全菌株間のS-valueを求め、陰影マトリックスにしてFig. 3に示した。分離菌株間のS-valueは97.5%であり、いずれも高い相似性が認められた。分離菌5株と対照菌株の各々のS-valueを比較すると、*Vibrio* sp. KA-1および*V. cholerae* (non-cholera vibrio) PS7702との相似性が比較的高く、それぞれ81.6~82.5%、78.6~81.6%であった。

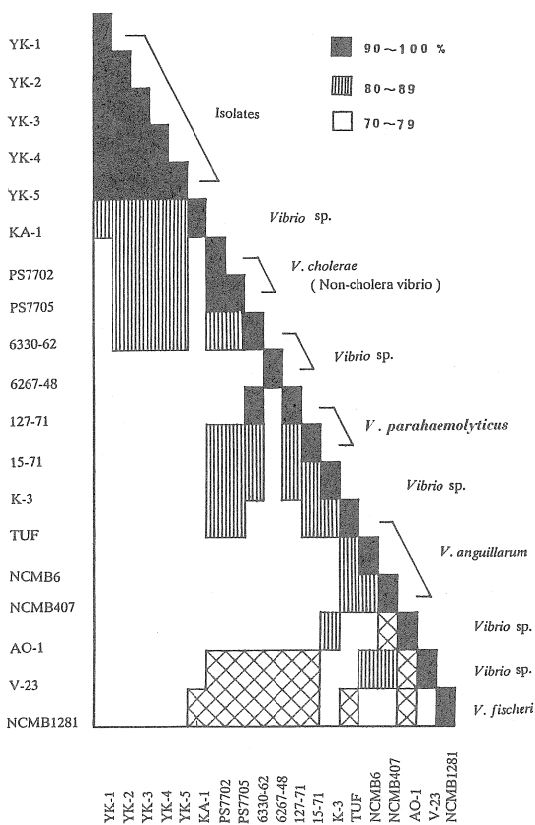


Fig. 3. Shaded S-value matrix of 19 strains studied.

3.6 薬剤に対する感受性

分離菌の薬剤に対する感受性の測定結果をTable 8に示した。分離菌はオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、クロラムフェニコール、スルファモノメトキシ、オキシリン酸、ニフルスチレン酸ナトリウムに高い感受性を示したが、コリスチン、ペニシリン、アンピシリン、スビラマイシンに耐性を示した。

Table 8. Drug sensitivity of the isolates

Drugs	Sensitivity Isolates(5 strains)
Oxytetracycline	+++
Chlortetracycline	+++
Chloramphenicol	+++
Colistin	-
Kanamycin	++
Penicillin	-
Ampicillin	-
Spiramycin	-
Erythromycin	+
Sulfamonomethoxine	+++
Nalidixic acid	++
Oxolenic acid	+++
Piromidic acid	+
Sodium nifurstyrenate	+++
Furazolidone	++

4 考 察

今回、いずれも同じ症状の病エビから分離された細菌は、数値分類による分離菌株間のS-valueが97.5%であったこと、また健康なクルマエビに対して比較的強い病原性と再現性を有し、再現個体からも接種菌と同一性状を示す細菌が再分離されたことなどから、クルマエビに鰓の淡褐色化およびリンパ様器官の腫脹などの症状を伴って斃死した疾病の原因菌と考えられた。

つぎに、分離菌の形態学的、生物学的ならびに生化学的性状をBergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1²⁾, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,

8th ed⁵⁾ および坂崎^{3,4)}の記載などと比較した結果、分類学上の位置としては、*Vibrio* 属に同定するのが妥当と思われる。すなわち、分離菌はグラム陰性、無芽胞の桿菌で端在性の単鞭毛(まれに2本の鞭毛)をもち、運動性を有する。ブドウ糖を酵素的に分解するが、ガスを産生せず、唯一の炭素源としてのブドウ糖、サッカロース、フラクトース、トレハロースなどを利用する。また、オキシダーゼを産生し、Vibriostatic agent 0/129 およびノボピオンシに感受性を有するなどの性質を示し、Bergey's manual^{2,5)} および坂崎^{3,4)}による *Vibrio* 属細菌の定義と完全に一致した。

また、分離菌の種としての位置関係を明確にするために、高橋ら⁶⁾が養殖クルマエビから分離した *Vibrio* sp. KA-1 および Muroga ら⁷⁾がアユから分離した *V. cholerae* (non-cholera vibrio) PS7702 など既知の *Vibrio* 属細菌と比較して、数値分類を試みたところ、*Vibrio* sp. KA-1 および *V. cholerae* (non-cholera vibrio) PS7702 との間に比較的高い相似性が認められたが、分離菌と上記菌種との S-value は 78.6~82.5%であったことから、同一種と断定するには無理があるように思われる。つぎに、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1²⁾に掲げられた *Vibrio* 属細菌20種の主要性状と分離菌のそれとの比較を Table 9 に示した。すなわち、分離菌の性状は *V. harveyi*, *V. pelagius* II, *V. nigripulchritudo* のそれと比較的類似しているものの、淡褐色色素を産生する点が大きく異なる。また、分離菌と *V. harveyi* とは乳糖、D-ソルビットおよびβ-アラニン利用性などの性状が、また、*V. pelagius* II とはセロビオース、D-ソルビットおよびチロシン利用性などの性状が、*V. nigripulchritudo* とは、35℃での発育性、サッカロースおよびチロシンの利用性などの性状が異なった。

そのほか、Bergey's manual²⁾に記載されていない新しい *Vibrio* 属細菌に関する報告がいくつかある。Love ら⁸⁾は、Damselfish の病魚から分離された細菌に対して、*V. damsela* と命名している。Tison ら⁹⁾は、ウナギから *V. vulnificus* biogroup 2 に同定すべき細菌を分離している。著者らの分離菌と上記2種の性状を比較すると、*V. damsela* とは VP 反応、インドール産生性、アルギニン加水分解性などの性質が相違し、*V. vulnificus* biogroup 2 とはインドール産生性、リジン脱炭酸性、白糖分解性などの主要性状が異なる。また、Schiewe ら¹⁰⁾は、*V. anguillarum* biotype II に位置づけられている菌種に対して、*V. ordalii* という新種名の提案をしているが、著者らの分離菌とは、インドール産生性、MR テスト、シモンズのクエン酸塩利用性など多くの点で性状が異なる。そのほか、魚病細菌としての既報の *Vibrio*

属細菌の性状^{7,11-17)}と分離菌のそれとを比較したが、近縁関係はみいだせなかった。本分離菌は淡褐色色素を産生し、培養温度37℃以上では発育せず、VP 反応、アルギニン加水分解性、リジン脱炭酸性がいずれも陰性で、β-アラニンを唯一の炭素源として利用するなどの性質で特徴づけられるが、魚類由来の既知の *Vibrio* 属細菌には、このような性質をもつものはみあたらない。

一方、病エビ類からしばしば分離される細菌として、*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* およびそれらと近縁の細菌が知られている¹⁸⁻²²⁾が、この種の細菌と本分離菌とは、普通寒天培地上の色素産生性、遊走発育性、発育温度、発育塩分濃度およびリジン脱炭酸性をはじめ多くの生化学的性状の相違などから、明瞭に区別できると考える。また、Kusuda and Watada²³⁾はエラが黒化したイセエビからメラニン様色素を産生する細菌を分離し、*V. panulirus* と命名しているが、著者らの分離菌とは、マッコンキー寒天上の発育性、10℃での発育性、7~8% NaCl 加普通寒天平板上での発育性、ペプトンからのアンモニア産生性、ガラクトース、サリシン、グルコーゲン、サッカロース、グリセリン、ソルビット分解性など、多くの点で性状が異なる。また、Zheng²⁴⁾がタイショウエビの病エビから *V. cholerae* (non-01) に同定される細菌を分離しているが、著者らの分離菌とは、色素産生性、発育温度、VP 反応、リジンおよびオルニチン脱炭酸性などの主要性状が異なる。

このように、今回著者らが病クルマエビから分離した細菌の生物学的ならびに生化学的性状は、既知の *Vibrio* 属のそれとは異なった点が多く、該当する菌種はみいだせなかった。したがって、分離菌のもつ DNA の G+C 含量が検討されていない現状においては、本菌を *Vibrio* sp. としておくのが妥当と思われる。

つぎに、分離菌はオキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリン、クロラムフェニコール、スルファモノメトキシン、オキシソリン酸、ニフルスチレン酸ナトリウムに高い感受性を示した。したがって、これらの薬剤については、本病の治療薬としての有用性を検討する価値があるものと思われる。

文 献

- 1) R.R.Sokal and C.D.Michener : *Univ. Kansas Sci. Bull.*, **38**, 1409-1438(1958).
- 2) N.R.Krieg and J.G.Holt : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, pp. 964.
- 3) 坂崎利一 : 腸炎ビブリオとその類似細菌 (藤野恒三郎・福見秀雄編), 納谷書店, 東京, 1967, pp. 83-115.
- 4) 坂崎利一 : モダンメディア, **18**(4), 25-32(1972).
- 5) R.E.Buchanan and N.E.Gibbons : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974, pp.1246.
- 6) 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫 : 日水誌, **51**, 721-730(1985).
- 7) K.Muroga, S.Takahashi, H.Yamanoi, and M.Nishibuchi : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **45**, 829-834(1979).
- 8) M.Love, D.Teebken-Fisher, J. E. Hose, J. J. Farmer III, F. W. Hickman, and G. R. Fanning : *Science*, **214**, 1139-1140(1981).
- 9) D.L.Tison, M.Nishibuchi, J. D. Greenwood, and R. J. Seidler : *Appl. Environment. Microbiol.*, **44**, 640-646(1982).
- 10) M. H. Schiewe, T. J. Trust, and J. H. Crosa : *Current Microbiol.*, **6**, 343-348(1981).
- 11) 楠田理一 : 京都水試業績, **25**, 1-116(1965).
- 12) 楠田理一・佐古 浩・川合研児 : 魚病研究, **13**, 123-137(1979).
- 13) U. Shimidu and E. Kaneko : *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 689-703(1973).
- 14) 江草周三 : 魚病研究, **4**, 31-44(1969).
- 15) 室賀清邦 : 広大水畜産学部紀要, **14**, 101-215(1975).
- 16) 安永統男 : 魚病研究, **7**, 67-71(1972).
- 17) 畑井喜司雄・岩崎義人・江草周三 : 魚病研究, **10**, 31-37(1975).
- 18) D. V. Lightner and D. H. Lewis : *Mar. Fish. Rev.*, **37**, 25-28(1975).
- 19) C. Vanderzant, R. Nickelson, and J. C. Parker : *J. Milk Food Technol.*, **33**, 161-162(1970).
- 20) 山本博敬・北田哲夫・山元宣征・安永統男 : 長崎水試研報, **3**, 10-15(1977).
- 21) 安永統男・山元宣征 : 長崎水試研報, **4**, 71-76(1978).
- 22) 高橋幸則・名古屋博之・桃山和夫 : 水産大研報, **32**, 23-31 (1984).
- 23) R. Kusuda and A. Watada : *Res. Rept. Kochi Univ.*, **18**(8), 1-3(1939).
- 24) Zheng Guoxing : *J. Fish. China.*, **10**(4), 433-439(1986).