

(東女医大誌 第34巻 第8号)
頁 387—402 昭和39年8月)

実験的 atherosclerosis におけるウサギ 大動脈の酸素代謝について

東京女子医科大学三神内科学教室 (主任 三神美和教授)

東京女子医科大学第1生理学教室 (主任 養島 高教授)

沢 井 明 子
サワ イ アキ コ

(受付 昭和39年6月20日)

目 次

I 緒論

II 実験方法

1. 実験装置

- 1) オキングラフ
- 2) 電極
- 3) トノメータ
- 4) 攪拌器

2. 実験方法

- 1) 実験動物
- 2) 実験的 atherosclerosis の起こし方
- 3) 材料の摘出
- 4) 使用溶液
- 5) 較正
- 6) 組織の酸素消費測定法
- 7) 組織の重量
- 8) atherosclerosis の肉眼的分類
- 9) 血清 cholesterol 測定

III 実験成績

1. 組織の酸素消費測定法における攪拌の影響

- 1) 組織の酸素消費値
- 2) 組織の酸素消費曲線

2. 大動脈壁の酸素消費

- 1) 正常の場合
- 2) cholesterol 飼育 atherosclerosis の場合

a) cholesterol 飼育期間と大動脈壁の酸素消費

の関係について

b) atherosclerosis の程度と大動脈壁の酸素消費の関係について

3. cholesterol 飼育期間と血清 cholesterol との関係

IV 考按

V 総括および結論

文献

I. 緒 論

近年、動脈硬化の問題は医学上注目をあびる焦点の1つである。その中でも atherosclerosis は心、脳等の重要臓器の血流障害、機能不全を起こさせ、死因となる重篤な疾患を招来するために臨床的に最も重要視されている。しかしまだその成因については不明な点が多い。

Anitschkow¹⁾ が cholesterol (以後 chol. と略す) 飼育によりウサギに人の atherosclerosis に極く類似した病変を作るのに成功して以来、実験的 atherosclerosis およびその脂質代謝に関する研究が数多くみられる。先に北大の藤田²⁾、本学第1生理学教室の鳥居³⁾、土肥⁴⁾ はウサギ、ニワトリの chol. 飼育 atherosclerosis の血清の濾紙電気泳動的検索を行なっている。

atherosclerosis の成因に関する研究は多面性

Akiko SAWAI (Mikami Clinic, Department of Internal Medicine and First Department of Physiology, Tokyo Women's Medical College): On the oxygen metabolism of rabbit's aorta in experimental atherosclerosis.

にわたつて盛んに行なわれている。病理学的方法としては、肉眼、組織、電子顕微鏡的に、生化学および組織化学的方法としては、血中および動脈壁の lipoprotein (以後 lipo. と略す) を中心に、また動脈壁の酸性ムコ多糖類の動きについても追究され、なお最近、酵素学的研究が可能となり、動物実験を中心にして動脈壁の酵素について研究されている。

動脈壁の酸素代謝的研究としては、1938年 Michelazzi⁵⁾ が成熟ウサギの大動脈壁の酸素消費を Warburg 法で測定したのが始めてである。その後若、老ラットの動脈壁の酸素消費について Briggs ら⁶⁾ (1948) 始め2, 3の報告がみられる⁷⁾⁸⁾。

chol. 飼育による大動脈壁の酸素消費は、Loo-meijer ら⁹⁾ が chol. 6—7週間投与ラットの胸部大動脈で酸素消費の増加を認め、Munro ら¹⁰⁾ は chol. 飼育ラットでは増加するが、雄幼鶏 (cockere) では減少すると報告した。ウサギにおいては Fischer ら¹¹⁾ が hypercholestermia の大動脈では酸素消費は減少すると、また Whereat¹²⁾ は atherosclerotic intima では上昇すると述べている。

以上は Warburg 法で測定したもので、従来より多く用いられる方法であるが、著者は、組織の酸素消費測定にオキシグラフ¹³⁾を使用した。この方法は、白金電極を負極として用いる電気的測定法である¹³⁾。最近、人工被膜で白金電極を被うようになり^{14—18)}、記録的に一層精密に血液、尿などの酸素分圧および組織の酸素消費測定が行なわれるようになった。

著者は、酸素代謝の面より atherosclerosis (アテローム硬化症、以後動脈硬化と略す) の成因の一端を解明しようと試み、本学第1生理学教室において改良作製した白金電極を用いて、オキシグラフにより、ウサギの大動脈壁の酸素消費を測定し、最も普遍的な方法で、atherosclerosis をウサギに起こさせ、その進行の程度と、大動脈壁の酸素消費との関係を追究したので報告する。

II. 実験方法

1. 実験装置

1) オキシグラフ

簗島、望月の考案により作製されたオキシグラフの改良型島津 OX 2 型を使用した。その原理については簗島¹⁹⁾により、その外観図および使用法は小泉²⁰⁾により記載されているので省略する。その原理の大略を述べると、白金電極を陰極とし、陽極としては銀塩化銀電極を用い、一定の範囲 (0.5—0.8V) の電圧を加えると拡散限界電流を示す。この拡散限界電流が酸素濃度に比例することにより、酸素の定量を行なうものである。但しオキシグラフは交番電圧を加えて、電極の安定性を維持するようになっていて、白金電極が陰極になった際の一定時間の電流値のみが記録されるようになってい。著者の実験では、正負の電圧は、-0.6V, +0.6V を与え、加電圧パターンは、陰極相7秒、短絡相2秒、陽極相3秒、短絡相3秒計15秒を1週期としたもので、記録紙は1分間1cmで走らせたものである。

2) 電極

電極と測定管は、Gleichmann & Lübberts¹⁶⁾ が発表したものを1部改良したもので、すべてガラス製である (Fig. 1)。

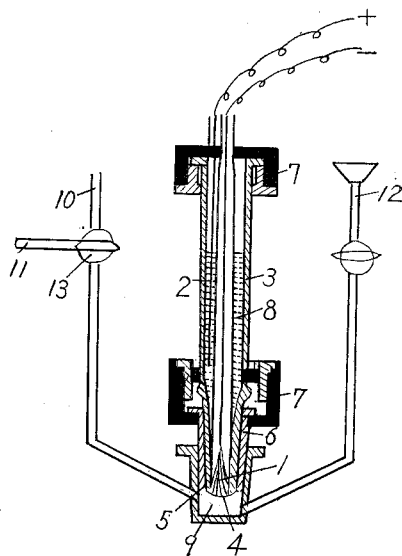


Fig. 1. Pt-electrode with accessories

1. platinum cathode
2. Ag-AgCl reference anode
3. inner vessel for electrode
4. teflon membrane
5. cotton thread
6. outside vessel for electrode
7. screw cap
8. 2.5M KCl + 0.3 M Na₂CO₃
9. measuring vessel
10. gas inlet
11. outlet for solution
12. inlet for solution
13. three way stop-cock

白金電極は直径 60μ の白金線15~18本をガラスの中に気泡を入れなくて封入したものである。電極面はよく磨いておく。対電極は、銀塩化銀電極を用いた。

内筒に 20μ のテフロン膜を張り、木綿糸で結びグリースをつけ、外筒を被しテフロンでねじで止める。内筒内に 2.5MK Cl 、 $0.3\text{M Na}_2\text{CO}_3$ の支持塩溶液を入れ、両電極を浸して、テフロンでねじで止める。

測定管は、電極とすり合わせになつていて、2本のガラス管がついている。これらはすべて 37°C の恒温槽内に装置されている。一方は溶液を入れる管で、他の一方は溶液の流出口、およびガスの導入口で三方活栓を備えている。

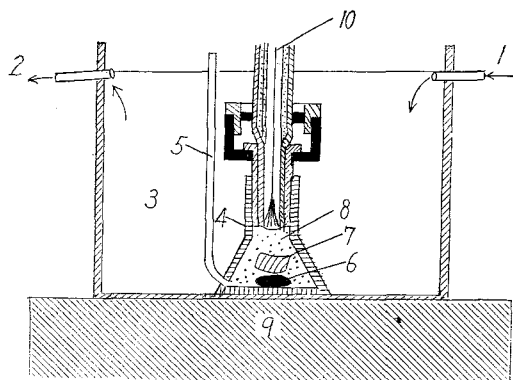


Fig. 2. Stirring device

1. in let from thermount 37°C
2. outlet to water bath 37°C
3. water bath 37°C
4. measuring vessel
5. capillary
6. stirring glass bar
7. sample tissue
8. KRp solution
9. magnetic ministirrer
10. platinum-electrode

攪拌を行なう際には、この測定管が恒温槽内に設置してあるために、この中で攪拌器を使用するには特殊な装置を要するので、Fig. 2. に示すように 37°C の恒温槽より灌流し、別の測定管を使用した。この測定管は電極を測定管に挿入するとき電極面が陽圧に、また電極を測定管より引き抜く時に陰圧になることを避けるために、1側に開放した毛細管のガラス管をつけ、且つ電極は攪拌時に組織が電極面に直接ぶつかることを避けるために、少し上に固定するようにすり合わせをつけた。

3) トノメータ

較正を行なうのにガスに平衡させた溶液を必要とする。その溶液を作製するのにトノメータを使用する。血液等には一般に Kugeltonometer が利用されるが、著者の実験では Staub²¹⁾の報告を参考に Fig. 3. に示すよ

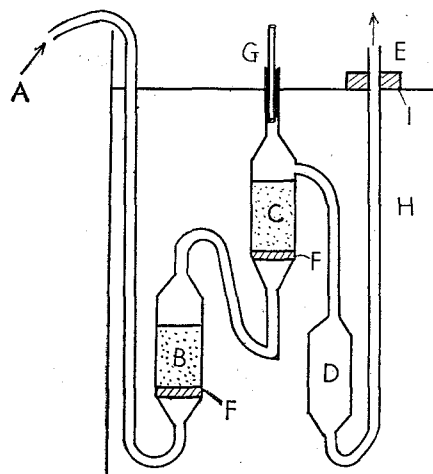


Fig. 3. Tonometer

- | | |
|-----------------|--------------------------------|
| A. gas inlet | F. sintered glass filter plate |
| B. aqua dest. | G. out let for KRp solution |
| C. KRp solution | H. water bath 37°C |
| D. glass tube | I. cork plate |
| E. gas outlet | |

うに、恒温槽内にそれぞれ3本のガラス管を使用した3本のトノメータを作製した。

ガスボンベAよりゴム管にてガスをガラスフィルターFを通して蒸留水Bに導き、その温度の蒸気圧で飽和させた後、更にガラスフィルターFを通してCの溶液に導き飽和させる。その後ガスはガラス管Dを通つてゴム管Eより空气中に抜ける。平衡を要する溶液をCに入れ、約30分間ガスを通して平衡させ、Gよりピペットにてその溶液を取り使用する。

4) 攪拌器

攪拌器としては、magnetic ministirrer を使用し、組織が浮遊する程度に回転させた。攪拌棒はガラス管の中に鉄片を封入したもので、Fig. 2. に示すように測定管の中に入れて、その下から magnetic ministirrer で攪拌を行なつた。

2. 実験方法

1) 実験動物

体重 2.5kg 前後の雄ウサギ65羽を用いた。

2) 実験的動脈硬化の起こし方

chol. 1日量 0.5g/kg の割合で与えるために、2%chol. 含有の固形飼料(実験動物中央研究所 C.R. 1)を作成し、投与した。但し体重が 3kg を越えると chol. 投与量は1日量 1.5g とした。

投与期間は、4週間、12週間、20週間である。

3) 材料の摘出

無麻酔で心臓より瀉血し、速かに大動脈を剔出した。
大動脈は外部の脂肪組織と結合織を剥離して縦に開き、弓部、胸部、腹部、の3部分に分割し、それぞれ3カ所について測定し、その平均値を用いた。剔出後は約5°Cの氷室に保存した Krebs-Ringer phosphate pH 7.4 + 0.1% glucose でよく洗い、実験使用直前まで、これに浸して氷室に保存した。剔出後4時間以内に測定を終了するようにした。

4) 使用溶液

Krebs-Ringer-phosphate (以下 KRp とする) pH 7.4 でその組成は、0.9% NaCl 100ml, 1.15% KCl 4 ml, 1.22% Ca₂Cl₂ 3 ml, 2.11% KH₂PO₄ 1 ml, 3.82% Mg SO₄ 7H₂O 1ml に、Na₂HPO₄ 12H₂O 35.8 g と 1N. HCl 20ml を 1 l にしたものを 12ml を加え、更に 0.1% の割に glucose を加えた。

5) 較正

a) ガスの較正

Scholander 測定装置で測定した酸素と窒素の混合ガス(約40, 60, 80 O₂vol%)を通じ、電流値を読み (Fig. 5), 次式で酸素分圧を求め、Fig. 4 に示すように較正直線をかく。

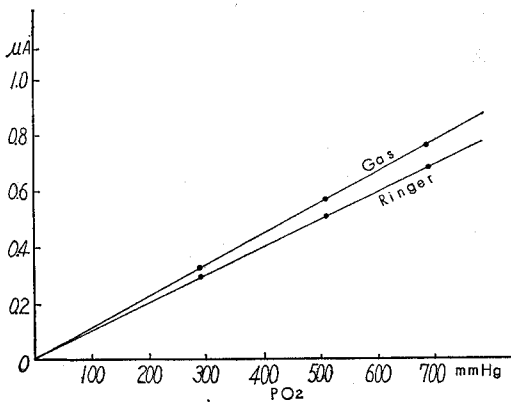


Fig. 4. Calibration

$$P_{O_2} \text{ (mmHg)} = \frac{P_B - P_{H_2O}}{100} \times \text{Vol \% } O_2 \text{ gas} \dots\dots 1)$$

但し P_B: 大気圧, P_{H₂O}: 水蒸気圧(37°Cでは47mmHg)

b) 溶液の較正

correction factor の求め方

correction factor (以後 f と略) とは、ガスの電流値の続き (g.h) に対するその平衡溶液の電流値の続き (s.h) の割合で次式によつて表わされる。

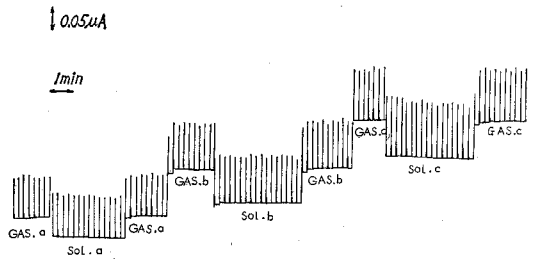


Fig. 5. Calibration

$$f = \frac{s.h}{g.h} \dots\dots\dots 2)$$

f は、溶液の酸素分圧を求める際に、溶液で較正を行なう代わりに、ガスで較正して求める簡便法として利用される。

なお f は、次のようにして求める。

上記の既知の酸素の混合ガス (a.b.c とする) をそれぞれトノメータ中の KRp 液に導き、約30分間で平衡溶液を得る。まずこのガス a, 次に平衡させた溶液 a, 更に再びガス a を通じ、それぞれの電流値の読みを Fig. 5 に示すように、gas. a, h sol. a, h, gas. a, h すると

$$f_a = \frac{\text{sol. a, h}}{\frac{1}{2} (\text{gas. a, h} + \text{gas. a, h})} \dots\dots\dots 3)$$

である。

同様にガス b, c についても、それぞれ2回ずつ施行して f を求め、その平均 f_m を得るのでこれを使用する。この際、電流値の続きはガスで2分値、溶液で4分値を使用する。著者の実験では、f_m は0.80~0.93であった。溶液の較正直線は、Fig. 4 に示す通りである。また、電極は使用しているうちに0点が上昇して来る場合があるが、上昇して落着いた時は補正を行なつて使用した。

ガス、溶液の較正は毎日施行した。テフロン膜は、4~5日に1回の割に張り替えたが、少しでも異常の時は毎日、時には1日に1~2回でも張り替えた。

6) 組織の酸素消費の測定法

a) 非攪拌の場合

湿性重量で40~80mgの組織切片を約600mmHgのKRpと共に恒温槽内の測定管に入れ、4分値より14分値迄の10分間に減少した電流値を読み (Fig. 6) ΔP_{O₂} を求め、酸素消費量を計算するが、次の場合に準ずるので省略する。

b) 攪拌の場合

湿性重量で40~80mgの組織切片を約600mmHgのKRp液と共に37°Cの恒温槽より灌流した装置の中の測定管に

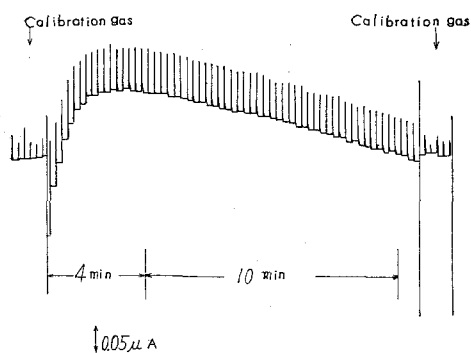


Fig. 6. Oxygen consumption curve without stirring (thoracic aorta)

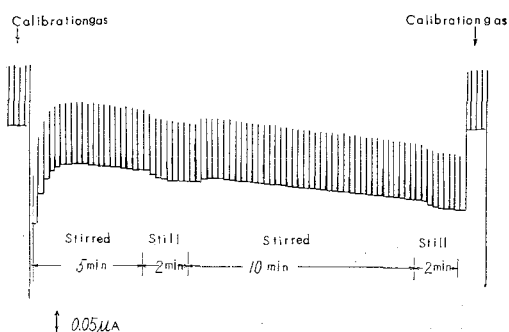


Fig. 7. Oxygen consumption curve with stirring (aortic arch)

入れる。

まず5分間攪拌し、停止2分間、更に10分間攪拌し、停止2分間とする。始めの停止2分値より、後の停止2分値迄の12分間に減少した電流値を読み (Fig. 7), ΔP_{O_2} を求める。

なお、同時に KRp 液のみで同様の測定を行なった。また1測定の前後に、溶液の較正の代りにガスを2分間通して、前述の f で較正し溶液の酸素分圧測定を容易にした。

酸素消費値の求め方

酸素分圧 P_{O_2t} のものが t_{min} 後に減少して P_{O_2e} になつたとすると、その t_{min} 間に減少した酸素濃度を Aml , V を測定管の容積 ml, α を Bunsen の吸収係数とすると

$$Aml/t_{min} = \frac{V \cdot \alpha}{760} \times P_{O_2t} - \frac{V \cdot \alpha}{760} \times P_{O_2e}$$

$$\Delta P_{O_2} = P_{O_2t} - P_{O_2e} \text{ であるから}$$

$$Aml/t_{min} = \frac{V \cdot \alpha}{760} \times \Delta P_{O_2} \text{ ml/tmin} \dots\dots\dots 4)$$

で表わされる。

なお、この溶液の ΔP_{O_2} は次のようにしてガスの P_{O_2} より求められる。

12分間に減少した電流値の読みを Δh , 既知の O_2 vol % ガス c を較正に使用したとすると、その分圧 P_{O_2c} は 1) 式により求められる。酸素分圧 P_{O_2c} の電流値の読みを $gas. c.h$ とすると 2) 式より

$$sol. c.h = f \times gas. c.h \dots\dots\dots 5)$$

ゆえに

$$\Delta P_{O_2} = \frac{P_{O_2c}}{f \cdot gas. c.h} \times \Delta h \dots\dots\dots 6)$$

となる。組織の乾性重量を W とすると12分間の酸素消費は

$$\frac{V \cdot \alpha}{760} \times \frac{P_{O_2c}}{f \cdot gas. c.h} \times \Delta h \times \frac{1}{W} \text{ ml/mg/12min}$$

となる。ゆえに1時間の酸素消費は次式で表わされる。

$$Q_{O_2} = \frac{V \cdot \alpha}{760} \times \frac{P_{O_2c}}{f \cdot gas. c.h} \times \Delta h \times \frac{5}{W} \text{ ml/mg/hour} \dots\dots\dots 7)$$

但し、本実験では酸素消費の単位は $\mu\text{l/mg/hour}$ で表わした。

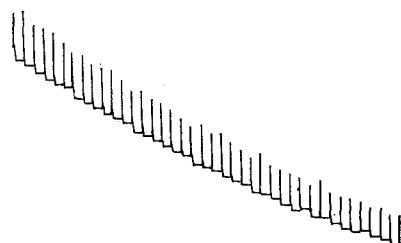
7) 組織の重量

a) 湿性重量

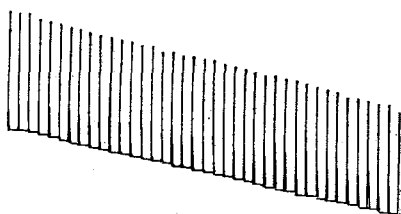
酸素消費測定後の組織片を濾紙で水分を取り、トーションバランスで測定した。

b) 乾性重量

湿性重量を測定した組織片を比重測定²²⁾した後に、90

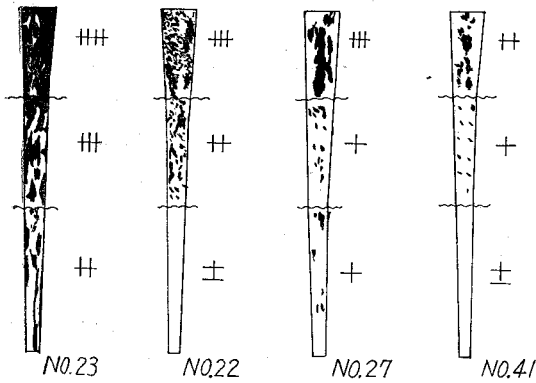


a) without stirring (cortex No. 5)



b) with stirring (cortex No. 56)

Fig. 8. Oxygen consumption curve



Gross grading	Degree of elevation	Extent of lesion
—	no finding (normal)	
±	no finding (cholesterol-feeding)	
+	Slightly elevated lesion	less than $\frac{1}{2}$
++	Slightly elevated lesion Moderately elevated lesion	more than $\frac{1}{2}$ less than $\frac{1}{2}$
+++	Moderately elevated lesion Severely elevated lesion	more than $\frac{1}{2}$ less than $\frac{1}{2}$
####	Severely elevated lesion	more than $\frac{1}{2}$

Fig. 9 Macroscopic approach

～100℃で数時間乾燥させて翌日、トーションバランスで測定した。

8) 動脈硬化の肉眼的分類

ウサギの大動脈の動脈硬化の肉眼的分類については多数の報告^{23) - 25)}が見られるが、著者は木村²³⁾の分類に従ってFig. 9に示すように分類した。

9) 血清 chol. 測定

正常, chol 飼育4週, 12週, 20週後とそれぞれ屠殺時、瀉血の血清を用いて、Zak-Henly 法²⁶⁾によつて測定した。

III. 実験成績

1. 組織の酸素消費測定法における攪拌の影響

1) 組織の酸素消費値

a) 非攪拌の場合

非攪拌の正常ウサギ大動脈の酸素消費値は、Table 1.に示すように測定値が散らばっている。これは組織の測定管への入れ方、すなわち、電極面と組織との距離、例えば組織がぴったりと測定管の底についている場合、また電極面に組織が極めて近い場合では異なり、大動脈の内臓面が電極面に相対しているかどうかによつても異なる。それゆえに次の攪拌法を使用した。

b) 攪拌法の場合

攪拌での酸素消費値は、Table 1 に示すように、大動脈では非攪拌法と大差はないが、著者²⁷⁾が行なつた腎臓では、非攪拌の4～5倍の高値を示した。

2) 組織の酸素消費曲線

非攪拌の場合の酸素消費曲線は、Fig. 6, 8a に示すように直線的に減少していない場合が多い。殊に腎臓²⁷⁾においては著明である。

これに反して攪拌の場合は、いずれもFig. 7.8b に示すように直線的に減少している。

以下の data はすべて攪拌法を使用した。

2. 大動脈壁の酸素消費

1) 正常の場合

a) 摘出より測定迄の時間と酸素消費との関係
本法による測定には、1 sample 測定に前述のように約25分を必要とする。また1回に1 sample しか測定できないために大動脈剔出後測定迄に時間を要する。したがつて剔出後測定迄の時間と酸素消費との関係を見ると、Fig. 10に示すように剔出後75 min, 150 min, 225 min では、75 min の時、酸素消費はやや高値を示したものが多く、他は殆んど同程度であつた。

しかし以下の実験では、一応これを考慮に入れ剔出後は直ちに測定を開始し、測定順位を適当に代えて同じ条件で測定できるようにした。

b) 大動脈の各部位による相違

正常ウサギ大動脈壁の酸素消費は、Table 1, に示すようにその平均値は、弓部0.69, 胸部0.90, 腹部0.70で胸部が最も高く、弓部、腹部は殆んど同じである。

2) chol. 飼育動脈硬化の場合

a) chol. 飼育期間と大動脈壁の酸素消費

(1) 弓部大動脈

Table 2, Fig. 11a に示すように chol. 飼育4週後には9例中2例に肉眼的に内膜表面に微細な黄色顆粒状隆起を認め、12週後には全例において同様の変化が広範囲に拡大し、半数にその融合、膨隆がおり、更に20週後ではそれが高度となり、いわゆるアテローム斑を形成する。

弓部大動脈の酸素消費は、飼育4週後にやや増

Table 1. Oxygen consumption of aorta and kidney in normal rabbits with and without stirring

Method	No.	Body weight (kg)	Aorta			Kidney		Serum cholesterol (mg/dl)
			Arch	Thoracic	Abdominal	Cortex	Medulla	
without stirring	2	2.55	0.96	1.16	1.64	2.90	4.12	—
	3	2.25	1.25	1.18	0.61	1.86	2.91	—
	4	2.40	1.23	1.98	0.42	3.30	3.06	—
	5	2.35	2.51	1.07	1.33	2.20	3.84	—
	6	2.10	2.45	1.24	1.93	1.99	3.75	—
	8	2.85	0.32	0.40	0.42	1.27	3.66	—
	9	2.85	0.50	0.51	0.29	1.12	2.83	—
	10	2.40	0.38	0.61	0.27	1.31	2.64	—
	11	2.50	0.48	0.71	0.48	1.49	2.99	—
	12	3.10	0.30	0.59	0.29	1.29	2.23	—
	mean			1.04	0.95	0.77	1.87	3.20
with stirring	53	2.44	0.29	0.37	0.38	13.75	11.92	21
	54	2.50	1.06	0.98	0.81	14.25	12.00	63
	56	2.60	0.74	1.02	0.65	11.93	16.95	44
	57	2.48	0.60	0.91	0.81	14.63	11.51	38
	58	2.40	0.88	1.07	0.74	13.35	13.95	35
	59	2.10	0.44	0.97	0.43	12.45	11.71	68
	63	3.00	0.72	0.88	1.37	11.10	6.91	67
	64	2.56	0.86	0.85	0.48	11.46	12.89	28
	65	2.82	0.86	1.17	0.61	11.38	13.53	46
	mean			0.69	0.91	0.70	12.70	12.38

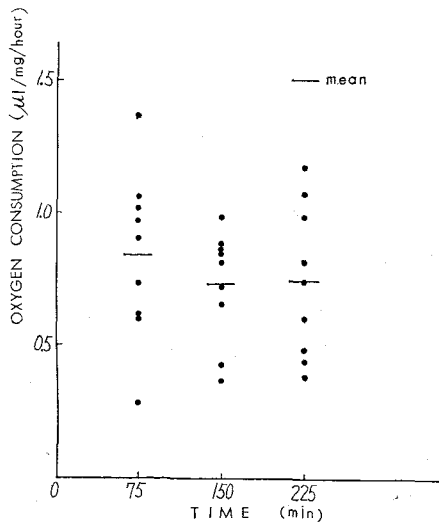
oxygen consumption in $\mu\text{l}/\text{mg}$ dry weight/hour

Fig. 10. Influence of storage on the oxygen consumption of aorta in normal rabbits.

加し、12週後は最高となり、20週後では減少の傾向を示す。

(2) 胸部大動脈

Table 2, Fig. 11b に示すように胸部大動脈の変化は弓部より遅れて発生し、飼育4週後は殆んど変化なく、12週後に僅な変化を認め、20週後では病変が融合して帯状になるのを認めた。

胸部大動脈の酸素消費は、飼育4週後にやや増加し、その後も飼育期間に平行して増加し、20週後に最高になった。

(3) 腹部大動脈

腹部大動脈の変化は更に遅れて発生し、12週後で10例中2例に始めて腎動脈分岐部に病変を認め、20週後では少数に帯状隆起を認めた (Table 2, Fig 11 c).

腹部大動脈の酸素消費は、4週後にやや増加したが、その後は4週と大差がない。

Table 2. Oxygen consumption and atherosclerotic grade of aorta in cholesterol-fed rabbits.

No.	Body weight (kg)	Week	Arch		Thoracic		Abdominal		Serum cholesterol
			Oxygen consumption	Athero-sclerose	Oxygen consumption	Athero-sclerose	Oxygen consumption	Athero-sclerose	
36	2.60	4	0.71	±	1.34	±	1.30	±	694
43	2.78	4	1.21	±	0.82	±	0.59	±	816
45	2.79	4	1.29	±	1.81	±	1.07	±	—
46	2.80	4	0.25	±	0.67	±	0.62	±	422
48	2.80	4	0.65	±	0.77	±	1.04	±	429
51	2.80	4	0.78	±	0.65	±	0.58	±	—
52	2.90	4	0.70	±	0.91	±	1.35	±	658
47	3.24	4	0.97	+	1.07	±	0.76	±	338
44	2.82	4	0.68	+	1.39	+	0.58	±	—
mean			0.81		1.05		0.88		560
50	3.40	12	1.02	+	1.64	±	1.18	±	3100
31	3.72	12	1.49	+	1.38	±	0.69	±	1490
33	3.06	12	1.05	+	0.88	+	0.49	±	2460
38	2.50	12	0.73	+	0.80	+	0.64	±	1180
49	3.14	12	1.09	+	1.07	+	0.69	±	3025
32	2.16	12	1.06	+	1.35	+	1.43	±	2870
41	2.82	12	0.55	+	1.17	+	0.70	±	1470
39	2.85	12	1.36	+	1.43	+	1.15	±	1340
37	3.26	12	1.11	+	1.29	+	1.46	+	1465
35	2.60	12	1.27	+	0.44	+	0.69	+	3480
mean			1.07		1.15		0.91		2188
30	3.66	20	1.09	+	1.26	+	0.70	+	2410
19	3.65	20	0.82	+	0.89	+	0.80	±	1280
22	3.75	20	0.94	+	0.86	+	0.76	±	1470
27	2.60	20	1.48	+	1.65	+	1.73	+	2710
29	3.30	20	0.85	+	1.26	+	0.72	+	1680
24	3.50	20	0.54	+	1.43	+	0.55	+	3510
20	2.96	20	0.97	+	0.84	+	0.66	+	1960
21	3.50	20	0.86	+	1.78	+	0.83	+	2980
28	4.00	20	0.92	+	1.28	+	1.14	+	2510
23	3.00	20	0.74	+	1.49	+	0.76	+	2760
mean			0.92		1.27		0.87		2327

oxygen consumption in $\mu\text{l}/\text{mg}$ dryweight/hour

b) 動脈硬化の程度と酸素消費

弓部, 胸部, 腹部大動脈の各部位毎に, 動脈硬化の進行の程度を Fig. 9 に示すように, 肉眼的に -, ±, +, ++, +++, Ⅲ の 6 段階に分類した。

(1) 弓部大動脈

弓部大動脈には Table 2, Fig 12a, 13a に示すように分類の全段階の病変が見られ, その酸素消

費は動脈硬化の進行にともなつて増加し, Ⅲで最高値を示し, 更に高度の變化Ⅲになつた時には減少している。

(2) 胸部大動脈

胸部大動脈は, Table 2, Fig 12b, 13b に示すように分類Ⅲ迄の變化しかみられない。その酸素消費は, 動脈硬化の進行にともなつて増加している。

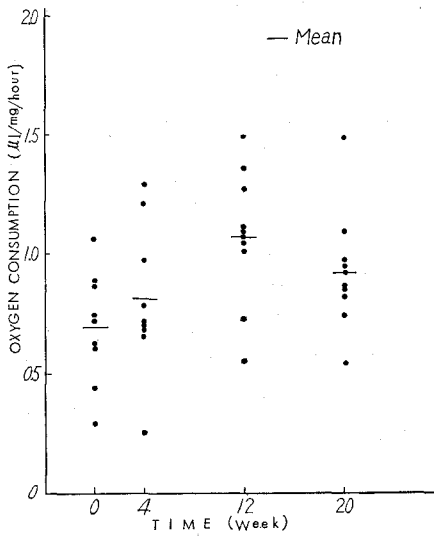


Fig. 11a. Relation between duration of cholesterol-feeding and oxygen consumption of aortic arch in rabbits.

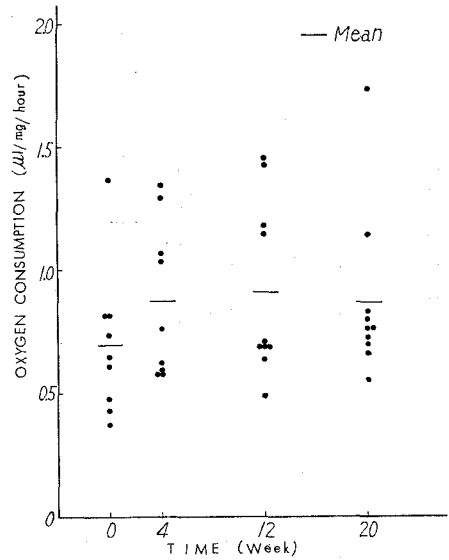


Fig. 11c. Relation between duration of cholesterol-feeding and oxygen consumption of abdominal aorta in rabbits.

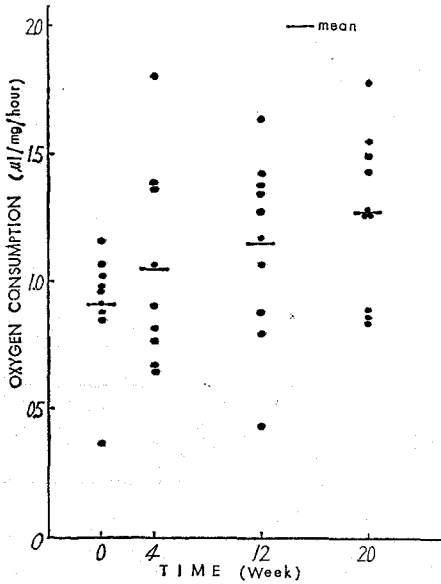


Fig. 11b. Relation between duration of cholesterol-feeding and oxygen consumption of thoracic aorta in rabbits.

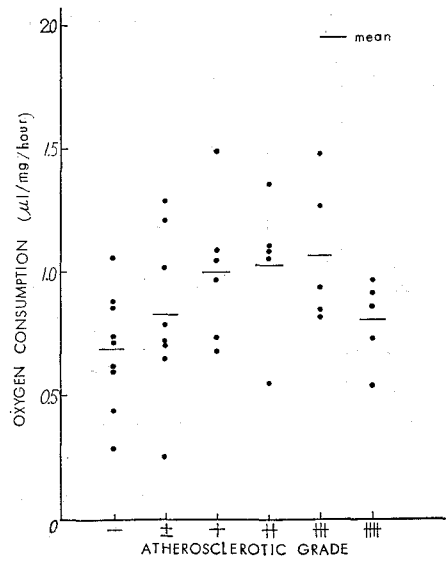


Fig. 12a. Relation between atherosclerotic grade and oxygen consumption of aortic arch in rabbits.

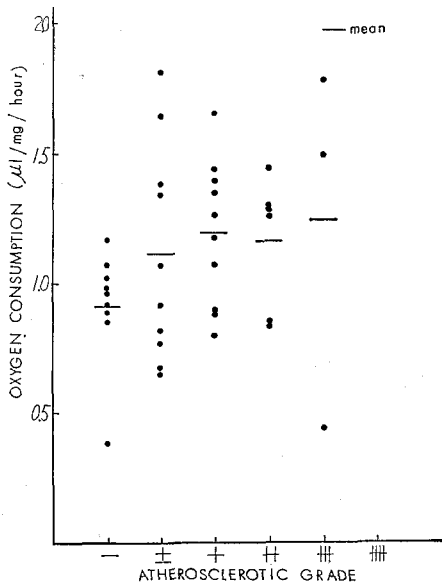


Fig. 12b. Relation between atherosclerotic grade and oxygen consumption of thoracic aorta in rabbits.

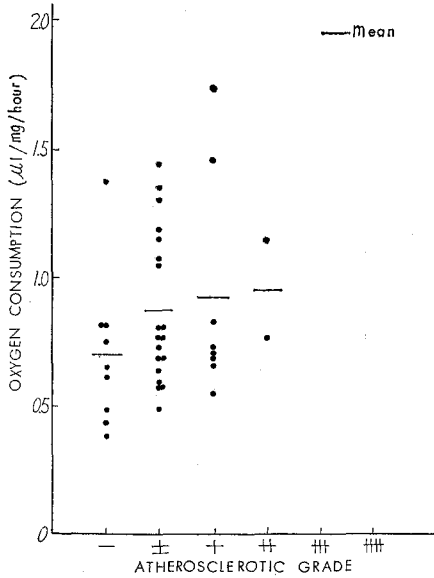


Fig. 12c. Relation between atherosclerotic grade and oxygen consumption of abdominal aorta in rabbits.

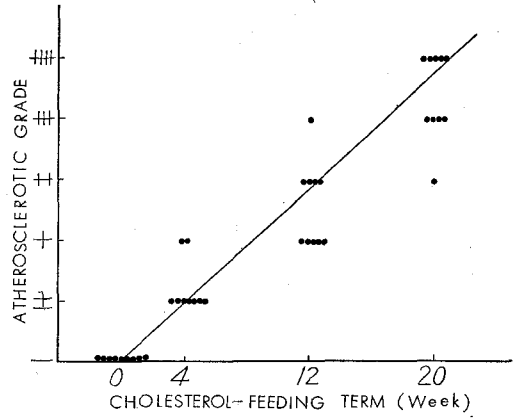


Fig. 13. a. Relation between cholesterol-feeding term and atherosclerotic grade of aortic arch in rabbits.

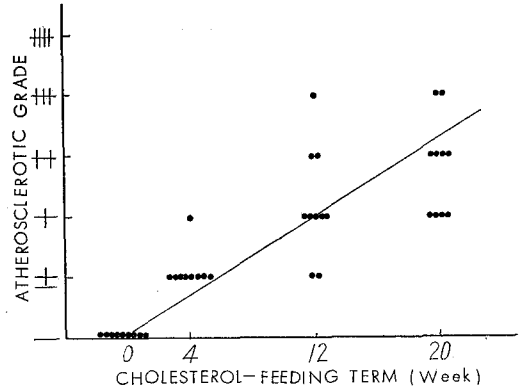


Fig. 13b. Relation between cholesterol-feeding term and atherosclerotic grade of thoracic aorta in rabbits.

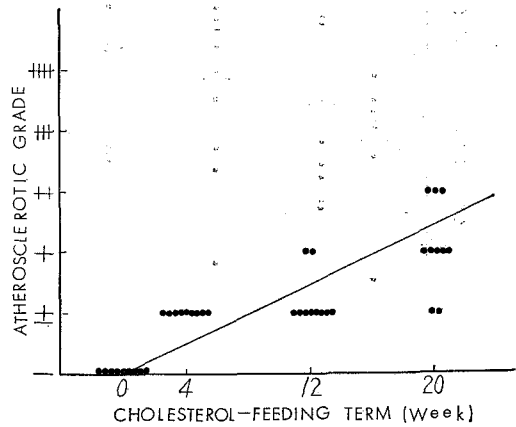


Fig. 13c. Relation between cholesterol-feeding term and atherosclerotic grade of abdominal aorta in rabbits.

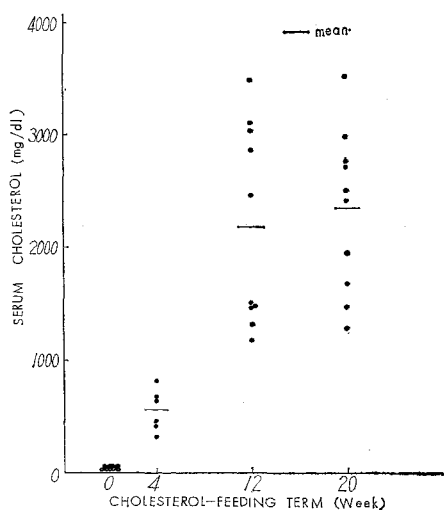


Fig. 14. Relation between cholesterol-feeding term and serum cholesterol in rabbits.

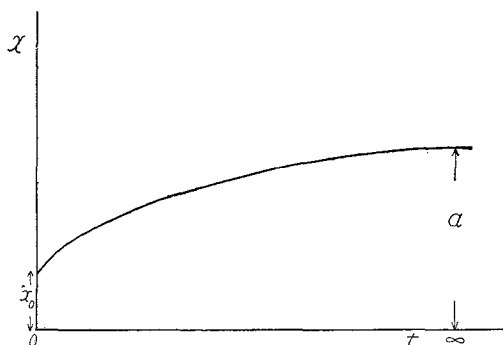


Fig. 15. Curve of equation 10)
 $x = x_0 e^{-kt} + a(1 - e^{-kt})$

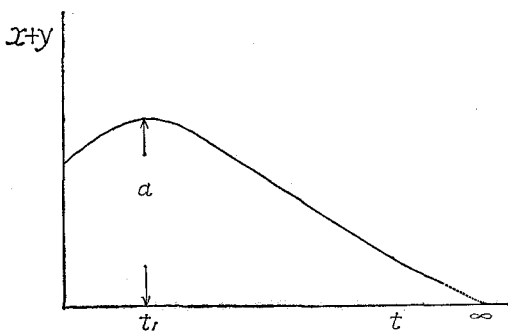


Fig. 16 Curve of equation 13)

$$x + y = a \left\{ \frac{k_2}{k_2 - k_1} e^{-k_1(t-t_1)} - \frac{k_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2(t-t_1)} \right\}$$

(3) 腹部大動脈

腹部大動脈は、Table 2, Fig. 12c, 13c に示すように分類并迄の変化した認められない。その酸素消費は、動脈硬化の進行にともなつてやや増加している。

3. chol. 飼育期間と血清 chol. との関係

血清 chol. は、飼育4週後に対照のほぼ10倍になり、12週以後は個体差は大きい、平均値で約40倍の2118 mg/dl と高値を示しているが、20週後では、12週よりわずかに増加しているにすぎない (Table 1.2, Fig. 14).

IV. 考 按

1. 本法による組織の酸素消費測定の考察

1) 白金電極の酸素消費

テフロン膜で被つた白金電極も酸素消費をする。白金電極の酸素消費により1分間に減少する圧は Gleichmann & Lübbers¹⁸⁾によるもので次式に示す。

$$\Delta P \text{ (mmHg)/min} = 2.66 \times \frac{i \text{ (mA)}}{\alpha \cdot V \text{ (ml)}} \text{ mmHg/min} \tag{8}$$

但し i = 電流 mA, V = 測定管の容積 ml. α = 1気圧で1 ml の溶液にとけている1 ml のガスの溶解係数

著者の実験では、KRp 液のみで攪拌法で測定した場合、殆んど時間的減少を示していないし、8) 式にあてはめて計算すると

$$P_{O_2} = 570 \text{ mmHg}, i = 0.535 \times 10^{-3} \text{ mA}. V = 3.51 \text{ ml } \alpha = 0.02273 \text{ であるから}$$

$$\Delta P \text{ (mmHg)/min} = 2.66 \times \frac{0.535 \times 10^{-3}}{0.02273 \times 3.51} = 0.0179 \text{ mmHg/min}$$

ゆえに12分間では

$$\Delta P \text{ (mmHg)/12min} = 0.214 \text{ mmHg/12min}$$

となる。

一方組織の酸素消費測定に際して、12分間に減少する組織分圧は、大動脈では10~50mmHg, 腎臓²⁷⁾では100~260mmHgである。したがつて白金電極の酸素消費は、これらに比してほんの僅かであるから省略した。

2) 攪拌の影響

a) 非攪拌の場合の酸素消費

著者の実験において非攪拌の場合の酸素消費曲線は、Fig 6.8a に示すように直線的に減少しない場合が多い。組織投入後、4分値より測定を開始しているのは下記の理由によるためである。すなわち、①冷却された組織片投入による器械的攪拌 (mechanical disturbance)、②高温の上層部と低温の下層部との液体の対流 (convection current) とにより小泉²⁸⁾の示した如く Prandtl のいわゆる拡散層の減少、したがって拡散電流の増加を示すことによる。

非攪拌では、溶液内酸素分圧が均等化されないため酸素消費曲線も直線を示さず、かつ測定値としても不正確である。

b) 攪拌の場合の酸素消費

攪拌する場合、拡散層は減少するので電流値は増加する (Fig. 7)。著者の実験では、攪拌における較正を施行していないので、攪拌停止後2分では電流値が安定するので、その2分値を測定した。

酸素消費曲線が Fig. 7, 8b に示すように、直線を示しているのは、攪拌により溶液内酸素分圧が均等化されるためである。また攪拌による測定値は、従来の Warburg 法によるものとはほぼ一致するのに対し、非攪拌の場合、大動脈はほぼこの範囲内に入るが、腎臓²⁷⁾は $1/4 \sim 1/5$ であることは注目に値するが、この点については別の機会にゆずる。

2. 動脈壁物質代謝異常の考察

1) 大動脈壁の構造との関係

動脈は単に血液を輸送する管だけではなく、収縮、拡張の機能を営み、動脈壁自体もかなり活発な代謝を行なっている器官であり、組織である。動脈の内膜側はその内腔を流れる血液によつて直接に栄養され、外膜側は栄養血管によつて栄養されるが、その境界については、中膜の中央が境であるとか、中膜全層が内腔から栄養されるといわれているが、一概に断定できない。

a) 動脈硬化の場合の chol. 又は lipo. の壁内移動

動脈硬化は主に血液の脂質異常、lipo. の変動によつて起こると考えられる。血中脂質、lipo. の動

脈壁への移動は古くから考えられていたが、最近、Buck²⁹⁾、Courtice ら³⁰⁾はそれぞれ、lipo. が small vesicle を通つて内膜に侵入するのを認めている。

一方生体内で、³H 又は ¹⁴C で標識した chol. を用いて実験が行なわれ、これにより chol. は血管腔より浸潤により大動脈壁内膜に侵入すると考えられた³¹⁾。

Doerr³²⁾は、人で血漿中の chol. が内膜の間隙を通つて壁内に灌流する Perfusionstheorie der Arteriosklerose を発表した。これは実験的動脈硬化の場合にも適用されると考えられる。

b) 大動脈壁に対する機械的影響

動脈硬化は血行力学的に余分の方が加わる部分、すなわち大動脈弓部の大弯側、動脈が分岐する部分等に硬化がおり易いことから機械的影響も無視できない。また動脈内膜に損傷を与えるとそこには動脈硬化を作りやすいことから動脈内膜の状況にも問題点がある³¹⁾。

2) 動脈壁酸素消費に関する先人の研究結果について

動脈壁は肝、腎等の実質的臓器に比して細胞成分に乏しく、その酸素消費は、肝の10分の1、腎の20分1程度である。従来 Warburg 法で測定されたウサギ大動脈壁の酸素消費は、1.0 μ /dryweight mg/hour 前後である⁵⁾¹¹⁾¹²⁾³⁴⁾³⁵⁾。著者の実験では0.69—0.91であつた。

動物の種類による大動脈壁の酸素消費は、Henderson & Mac Dougall³⁴⁾によつて報告されたようにラット、ウサギ、羊、豚、牛では体の大きい動物程小さく、chick embryo では年令、体重の増加と共に減少している。Krebs³⁶⁾は先に、他の組織についてこの関係を発表し、この現象は結合組織は動物の大きさに比例して増加するが、結合組織は酸素消費が少ないので低い値を示すと説明している。

chol. 飼育ウサギにおいて一般に動脈硬化は、弓部ほど強く、腹部に最も弱い点を考えると、大動脈自身の部位による呼吸の差が問題になる。この部位による酸素消費についてすでに若干の報告がみられる。

Briggs ら⁶⁾, Maier ら³⁵⁾ はそれぞれラット, ウサギで部位による有意の差はないと, Christie ら⁷⁾ はラットで胸部は腹部より常に高く, 老ラットでは若に比して減少するが, 腹部が胸部より著しく減少するのでこの関係が著明であると報告した. Priest³⁷⁾ もラットで胸部は腹部より酸素消費の増加を示し, この原因として, 胸部は N, D.N.A. の含有量が腹部より多いので, 胸部と腹部の酸素消費の相違を, 細胞数の数をもとにして完全ではないけれども大体説明している.

一方 Whereat¹²⁾, Fisher¹¹⁾ ウサギで, Munro ら¹⁰⁾ は雄幼鶏でそれぞれ胸部が最も酸素消費は低いと述べている. 著者の実験では, ウサギで胸部が最も高く, 弓部, 腹部では殆んど差を認めなかつた.

Briggs ら⁶⁾ はラット大動脈壁の酸素消費は, ビルビン酸や T.C.A. cycle の構成物質により増加し, 殊にコハク酸では著しい. また老若の酸素消費の相違はないと発表した. その後 Christie ら⁷⁾, Werthermer ら⁸⁾ はラットの老は若より酸素消費は減少し, Maier³⁵⁾ らは人間で老人は若人より大動脈壁の酸素消費は少ないと報告した. chol. 飼育による過 chol. 血症, および動脈硬化の大動脈壁の酸素消費についてもすでに2, 3の報告がみられる.

Loomeijer ら⁹⁾ は過 chol. 血症ラットの酸素消費は, 対照に比して増加しているが, in vitro で過 chol. 血清を加えてもその影響はないと述べ, Whereat¹²⁾ も動脈硬化ウサギの大動脈の内膜は対照に比して酸素消費は増加し, 殊にアテローム形成の強い弓部は, その弱い胸, 腹部に比して酸素消費は高値を示す. この酸素消費の促進は多分必要エネルギー(synthesis また catabolism) の増加によると述べている.

Fischer ら¹¹⁾ は chol, 又は chol. と cortison 併用ウサギの酸素消費は対照より低く, 腎性高血圧と cortison との両者の併用, および更に, chol. を加えた三者併用では増加している. この増加は高血圧と cortison は大動脈の metabolic activity を変えることによるもので, chol. 飼育動脈硬化の程度と酸素消費は関係ないと述べている.

Munro ら¹⁰⁾ は chol. 飼育雄幼鶏では, 酸素消費は対照に比して低く, ラットでは高いと報告し, 更に動脈硬化は高い酸素消費を示す動脈の部位に起こりやすいこと, また動物の種類により chol. 投与による動脈硬化の感受性は chol. による大動脈壁の metabolic response に関係すると述べている.

以上のように現在では, 動脈硬化とその動脈壁の酸素消費との関係はまだはつきりせず, 且つその意味づけとして決定されるべきものはない.

3. 大動脈壁の動脈硬化の進行と酸素消費との関係

1) 病理組織学的所見の考察

chol. 飼育ウサギの顕微鏡的所見については, すでに多数の報告がみられるが, ここではその初期像, ことに foam cell を中心にして述べる.

木村²³⁾ は chol. 飼育ウサギの顕微鏡像は, 飼育4週後では大動脈弓部に微細な脂質顆粒を含有する foam cell の少数が内膜に出現し, 飼育8週後には foam cell は2~3層となつて内膜に集積し, 内膜は高度に肥厚する. この時期の foam cell は内膜深層に近きもの程大きく, 深部において foam cell は崩壊し, いわゆるアテローム形成がみられ, 内膜の表面では線維組織が増殖し, 24週後では foam cell は著明に減少し, また局在して一部に存在するのに反し, 線維化および均一無構造の硝子様化を思わせる病変が主体であると報告した.

新井³⁸⁾ も chol. 飼育ウサギの初期像, 泡沫細胞の形成について追究し, 脂質含有細胞ないし泡沫細胞形成の準備期(第1期), 泡沫細胞形成(第2期), アテローム形成および第二次的変性期(第3期)に分けている.

foam cell の起原としては, 動物壁の常在組織成分による脂肪摂取か, あるいは脂質をもつた外来性の細胞が動脈壁に沈着するかであるが, 一般には常在組織成分の食作用によるという説が有力である.

Hashim ら³⁹⁾, Leary⁴⁰⁾ は過剰に摂取した脂質が循環血に集まり, その余分の lipo. が動脈壁の内皮を通して濾過され, 組織の組織球によつ

て foam cell になると言っているが、その mechanism はまだはつきりしていない。他方、新井³⁸⁾はこの foam cell は、明らかに中膜の平滑筋細胞が脂質を摂取したものと考え、組織球性細胞の浸潤とは、foam cell と平滑筋細胞は移行を示しているので比較的明瞭に区別されると述べている。

著者の実験で chol. 飼育大動脈壁の酸素消費は、木村²³⁾、新井³⁸⁾の述べているいわゆる、foam cell の経過と平行関係を示す。すなわち弓部大動脈において foam cell の出現し始める4週後では、酸素消費は僅かに増加するが、foam cell が高度に出現する12週後には、酸素消費も最高となり、foam cell の崩壊およびアテローム形成のみられる20週後では、酸素消費も減少している。

2) 動脈硬化の進行の程度と大動脈壁の酸素消費との関係の理論的考察

chol. 飼育期間と動脈硬化度との関係は、Fig. 13 a.b.c に示すように大体直線の関係がみられる。したがって理論的考察を行なう際に動脈硬化度の代りに飼育期間を用いてもよいと考えられる。

a) 先ず内膜に沈着する chol. 又は lipo. の量には一定の限度があると考え、これらの物質の濃度に比例して lipophage 又は foam cell が生じると仮定する。

x を内膜に沈着する chol. 又は lipo. の量とし、時間を t 、極値を a とすると時間的変動は

$$\frac{dx}{dt} = k(a-x) \dots\dots\dots 9)$$

で表わされる。但し k は速度恒数である。

これを解いて $t=0$ $x=x_0$ とすると

$$x = x_0 e^{-kt} + a(1 - e^{-kt}) \dots\dots\dots 10)$$

を得る。この曲線は $t=0$ の時 $x=x_0$ 、 $t=\infty$ の時 $x=a$ となつて Fig. 15 の如き経過を示す。lipophage 又は foam cell の酸素消費が中に取り入れた chol. 又は lipo. の量に比例すると考えると

$$[O_2] = k'x$$

すなわち

$$[O_2] = k' [x_0 e^{-kt} + a(1 - e^{-kt})] \dots\dots\dots 11)$$

となる。

しかしながら Fig. 10a, 11a にみられるように動脈硬化の程度(あるいは chol. 飼育期間)と酸素消費との関係は、初め酸素消費が増加し、次いで極値に達し、その後減少する経過を示す。したがって a) の考え方は近似的であつて、次の b) の考え方より妥当と考える。

b) compartment analysis による考察

今内膜を3つの compartment に分けて考え、
compartment A……組織球が集まつて来ると考えられる層。

compartment B……lipophage 又は foam cell のできた層。

compartment C……foam cell の機能の衰え層た。

x ……A内(細胞外)の chol. 又は lipo. の沈着の量(濃度)。

y ……B内の chol. 又は lipo. の沈着の量(濃度)。

z ……C内の chol. 又は lipo. の沈着の量(濃度)。

とする。A内に血中の余分の chol, 又は lipo. が内皮で濾過されてくると、これに比例して組織球が集まりこれが酸素を消費する。やがてA内の chol. 又は lipo. は lipophage の活動によつて lipophage 内に取り込まれ foam cell となる。この活動は酸素の大きな消費を伴う。続いて foam cell は、一部は破壊され、一部は活動能力が減退して、いわゆるアテローム形成をおこす。したがつてこのC内での foam cell の酸素消費は少ない。

以上の関係は、物理化学で取扱われる逐次反応 (consecutive reaction) で、古くは Lewis⁴¹⁾ が取扱つており、龔島⁴²⁾、Burton⁴³⁾などで論ぜられている。

これらの文献を考慮に入れると次の速度連立微分方程式が成り立つ。

$$\left. \begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= -k_1x \\ \frac{dy}{dt} &= k_1x - k_2y \\ \frac{dz}{dt} &= k_2y \end{aligned} \right\} \dots\dots\dots 12)$$

但し, k_1, k_2 は速度恒数, 全量すなわち $x+y+z=a$ とする.

この形は一般的方法で解かれるが, 酸素消費は主としてAおよびBの compartment で行なわれから, この部位の総和すなわち, $x+y$ の経過を知ればよい. これは $t=t_1$, (但し t_1 は極値 a に達する期間) $z=0, \frac{dz}{dt}=0$ の条件で

$$x+y=a \left\{ \frac{k_2}{k_2-k_1} e^{-k_1(t-t_1)} - \frac{k_1}{k_2-k_1} e^{-k_2(t-t_1)} \right\} \dots\dots\dots 13)$$

を得る. この曲線は $t=t_1$ の時 $x+y=a$, $t=\infty$ の時 $x+y=0$ となつて Fig. 16の如き経過を示す.

したがつて lipophage, 又は foam cell の中に取り入れた chol. 又は lipo. の濃度の変化, 或はこれに正比例して生ずる酸素消費は

$$[O_2] = k' (x+y)$$

すなわち

$$[O_2] = k'a \left\{ \frac{k_2}{k_2-k_1} e^{-k_1(t-t_1)} - \frac{k_1}{k_2-k_1} e^{-k_2(t-t_1)} \right\} \dots\dots\dots 14)$$

となり著者の得た動脈硬化の進行と酸素消費の関係を定性的に示すことになる.

V. 総括および結論

atherosclerosis の成因の一端を酸素代謝の面より解明する目的で, cholesterol 飼育ウサギにおける atherosclerosis の進行と, 島津OX2型オキシグラフで測定した大動脈壁の酸素消費との関係を追究し, 次の結果を得た.

1) 本法による測定として, 非攪拌および攪拌法を行なつたが, 攪拌法の方がより正確であるので以下の結果はすべて攪拌法により測定したものである.

2) 正常大動脈壁の酸素消費は, 胸部が最も高く, 弓部, 腹部は殆んど同程度であつた.

3) cholesterol 飼育期間と大動脈壁の酸素消費は, 各部位とも cholesterol 飼育と共に酸素消費は増加したが, 弓部では20週後に減少した.

4) atherosclerosis の程度と大動脈壁の酸素消費の關係は, 各部位とも atherosclerosis の進行に伴なつて酸素消費は増加したが, atherosclerosis

の強いところでは減少した.

5) cholesterol 飼育期間と血清 cholesterol の關係は, 血清 cholesterol は cholesterol 飼育期間と共に12週後迄は急激に増加するが, その後は大して増加しない.

6) atherosclerosis の進行に際して, 従来報告された foam cell の経過と, 著者の酸素消費の経過は平行關係を示す.

7) atherosclerosis の進行と, 大動脈壁の酸素消費の理論的考察を行なつた. すなわちこれは compartment analysis で説明できるもので,

a =atherosclerosis 形成に關係する cholesterol 又は lipoprotein の全量, t =cholesterol 飼育期間, t_1 =極値に達する期間, k', k_1, k_2 を常数とすると

$$[O_2] = k'a \left\{ \frac{k_2}{k_2-k_1} e^{-k_1(t-t_1)} - \frac{k_1}{k_2-k_1} e^{-k_2(t-t_1)} \right\}$$

で表わされる.

8) 以上の結果より atherosclerosis の成因において, 大動脈壁の酸素消費は, その進行に重要な關係があると結論できる.

稿を終るにあたり, 終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた第1生理学教室箕島高教授, 三神内科学教室三神美和教授に謝意を表すと共に, 種々御援助と御教示いただいた第1生理学教室草地良作助教授に深謝致します.

文 献

- 1) Anitschkow, N.: Experimental Atherosclerosis in Animals, Chapter 10 in Arteriosclerosis, E.V. Cowdry, ed., 1933 MacMillian Co., N.Y.
- 2) 藤田平治郎: 綜合医学 13 740 (1956)
- 3) 鳥居綾子: 東女医大誌 29 574 (1959)
- 4) 土肥浩子: 東女医大誌 30 292 (1960)
- 5) Michelazzi, L.: Arch ital di med sper 3 43 (1938)
- 6) Briggs, F.N. et al.: J Biol Chem 179 103 (1949)
- 7) Christie, R.W & L.K. Dahl: J Exper Med 106 357 (1957)
- 8) Werthermer, H.E & V. Ben-Tor: Circulation Reserch 9 23 (1961)
- 9) Loomeijer, E.J & J.P. Ostendorf: Circulation Reserch 7 466 (1959)
- 10) Munro, A.F. et al.: J Atheroscler Reserch 1 296 (1961)
- 11) Fischer, E.R & J.H. Geller: Circulation

- Research 8 820 (1960)
- 12) **Whereat, A.F.:** Circulation Research 9 571 (1961)
 - 13) **Keltkoff, J.M. & J.J. Lingane:** Polarography Interscience Publishers Inc N.Y. (1941) ①
 - 14) **Clark, L.C. et al.:** J Appl Physiol 6 189 (1953)
 - 15) **Spreule, B.J. et al.:** J Appl Physiol 11 365 (1957)
 - 16) **Kreuzer, F.K. et al.:** J Appl Physiol 12 65 (1958)
 - 17) **Severinghaus, J.W. A.F. Bradley:** J Appl Physiol 13 515 (1958)
 - 18) **Gleichmann, U. & D.W. Lübbers:** Pflügers Arch ges Physiol 271 431 (1960)
 - 19) 籾島 高: 操・若林・阪本編 医学エレクトロニクス 第1版 南山堂 東京 (1956) 269頁
 - 20) 小泉とし: 東女医大誌 32 272 (1962)
 - 21) **Staub, N.C.:** J Appl Physiol 15 963 (1960)
 - 22) 沢井明子: Cholesterol 飼育ウサギ大動脈, 腎の比重について. 東女医大誌 投稿中
 - 23) 木村 登・他: 呼吸と循環 71 19 (1959)
 - 24) **O' Dell, T.B. et al.:** Circulation Research 10 904 (1962)
 - 25) **Fisher, E.R. et al.:** Lab Invest 7 231 (1958)
 - 26) **Zak, B.:** Amer J Clin Path 27 583 (1957)
 - 27) 沢井明子: Cholesterol 飼育ウサギ腎の酸素消費について. 東女医大誌 投稿中
 - 28) 小泉とし: 東女医大誌 31 598 (1961)
 - 29) **Buck, R.C.:** J Biophys & Biochem Cytol 4 187 (1958)
 - 30) **Courtice, F.C. et al.:** Amer Heart J 60 664 (1960)
 - 31) 村上元孝・他: 最新医学 18 783 (1963)
 - 32) **Doerr, W.:** Perfusionstheorie der Arteriosklerose Georg Thieme Verlag Stuttgart (1963)
 - 33) **Courtice, F.C. et al.:** Brit J Exper Path 44 339 (1963)
 - 34) **Henderson, A.F. & T.D.B. MacDougall:** Biochem J 62 517 (1956)
 - 35) **Maier, N. & H. Haimovici:** Proc Soc Exper Biol & Med 95 425 (1957)
 - 36) **Krebs, H.A.:** Biochim Biophys Acta 4 249 (1950)
 - 37) **Priest, R.E.:** Amer J Physiol 205 1200 (1963)
 - 38) 新井恒人: 日新医学 48 558 (1961)
 - 39) **Hashim, S.A. et al.:** Handbook of Physiology, Sec 2 circulation Vol II, American Physiological Society Washington (1963) p. 1167
 - 40) **Leary, T.:** 臨床病態生理学大系 2 循環器 中山書店 東京 (1957) 371頁より引用
 - 41) **Lewis, W.C. McC.:** A System of Physical Chemistry, Vol I Longman Green Co. London (1921) p. 402
 - 42) 籾島 高: 北海道医誌 6 1382 (1928)
 - 43) **Burton, A.C.:** J Cell Comp Physiol 14 327 (1939)