

Low Density Lipoprotein の黄体細胞内 Cholesterol に対する 影響と Progesterone 産生の動態について

—ヒト黄体細胞単層培養法を用いて—

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

樋 口 泰 彦

Effect of Low Density Lipoprotein on Intracellular Cholesterol and Progesterone Production by Monolayer Cultured Human Luteal Cells

Yasuhiko HIGUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo

(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

概要 卵巣黄体での steroidogenesis におけるリポ蛋白の役割を解明する為, lipoprotein poor serum (LPPS) を medium として使用し, ヒト月経黄体単層培養系を用いて LPPS 単独培養時, human chorionic gonadotropin (hCG) 添加時, low density lipoprotein (LDL) 添加時における黄体細胞の progesterone (P) 産生能の変化, ならびに黄体細胞内 cholesterol 量を比較検討した。

1) P 産生. ① LPPS 単独培養に LDL を添加した時, LDL 200 μ g protein/ml で P 産生は最大値をとった. ② LPPS 単独培養群及び hCG 100ng/ml 添加群で P 産生は漸減傾向を示したが ($p < 0.05$), hCG 添加群で有意に高値を示した ($p < 0.05$). ③ LDL 200 μ g protein/ml 添加群及び LDL 200 μ g protein/ml + hCG 100ng/ml 添加群で P 産生は高値を持続したが, 両者の間に有意の差は認められなかった。

2) 細胞内 cholesterol 量. ① LPPS 単独培養 4 日群は 10 日群に比べ高値を示した ($p < 0.05$). ② 10 日間培養で hCG 非添加群は hCG 100ng/ml 添加群に比べ高値を示す傾向がみられたが, 有意の差は認められなかった ($p < 0.1$). ③ 10 日間培養で LDL 200 μ g protein/ml 添加群は非添加群に比べ高値を示した ($p < 0.05$).

以上の成績より, LDL は黄体細胞における細胞内 cholesterol の供給源として, また産生する P の基質として利用されている事が明らかとなった。そして LDL 欠乏時に, 黄体は細胞内 cholesterol を利用して少ないながら P 産生を維持している事も明らかとなり, hCG はその利用を促進している可能性が示唆された。

Synopsis The purpose of the present study was to define the effect of low density lipoprotein (LDL) on progesterone (P) synthesis and on intracellular cholesterol content using monolayer cultured human luteal cells.

1) When cultured in TC199 containing 10% lipoprotein poor serum (LPPS), P production decreased as culture time passed. In the presence of hCG, it also decreased, but slowly. In the presence of LDL, P production was kept at a higher level.

2) Intracellular cholesterol content in luteal cells was measured by gas chromatography. The cholesterol content of luteal cells in a 4 day LPPS culture was higher than that in a 10 day LPPS culture. The cholesterol content in a 10 day LPPS culture with LDL was higher than that in a 10 day LPPS culture. The cholesterol content in a 10 day LPPS culture with hCG had a tendency to be lower than that in a 10 day LPPS culture, but there was no statistical difference ($p < 0.1$).

It was concluded that LDL was utilized in supplying intracellular cholesterol to luteal cells as a substrate for P synthesis. And in a state of LDL depletion in the medium, the luteal cells produced a small amount of P utilizing intracellular cholesterol.

It was estimated from the results of the present study that hCG enhanced utilization of intracellular cholesterol.

Key words: LDL • Intracellular cholesterol • Human luteal cell • Monolayer culture • Progesterone

緒 言

正常月経周期における黄体期中期に、ヒト黄体は1日40mgものProgesterone(P)を産生すると言われている¹⁹⁾。その大きさを考えれば、黄体は人体の中で最大のステロイド合成能を持つ組織であると言える。

Pを含むsteroid hormoneはすべてcholesterolより合成される。黄体より産生されるPの基質となるcholesterolは、卵巣内でacetateから生合成されるか、血中リポ蛋白より供給されると考えられている。ヒトにおいては、Carr et al.⁷⁾ Tureck et al.¹⁷⁾の実験により、卵巣におけるcholesterol生合成はほとんど存在しない事が明らかにされており、cholesterolの供給源としてはリポ蛋白の中のlow density lipoprotein (LDL)がその役割を担っていると考えられている^{7,17)}。しかし黄体細胞内に蓄積された細胞内cholesterolがsteroid合成にどのように利用されているかも考慮する必要があり、ヒト黄体細胞単層培養によるこの種の研究はいまだにない。

著者らは今回実験に用いた黄体細胞単層培養系がin vivoのモデル化として十分使用しうる事を確認し¹⁾、黄体細胞におけるP産生とLDL、及び細胞内cholesterolの関係を検討したのでここに報告する。

実験材料ならびに方法

1. 対象

正常月経周期を有する30歳から38歳までの婦人の分泌期中期に行なわれた婦人科開腹手術の際に得られた黄体を20例用いた。基礎疾患は子宮筋腫、卵巣嚢腫であつた。月経周期の決定は基礎体温表、子宮内膜日付診によつた。

2. 培養液、培養条件

培養液は最初の48時間は、遊離した黄体細胞をculture dishに付着させる為、10% fetal calf serum (FCS)(GIBCO) 添加 TC199 (阪大微生物病研究会) に (GIBCO) の Penicillin 100IU/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Fungizon 2.5 μ g/ml を加えたものを用いた。それ以降は10%FCSにかえて、後述する方法で作製した10%lipoprotein poor serum (LPPS)を添加した TC199を用いた。培養

容器はFalconの tissue culture dish #3001を用い、各々の culture dish に培養液を1.5ml ずつ添加、48時間毎に全量交換した。medium を10%FCSより10%LPPSに変えた時点を0日とし、10日間培養した。培養条件は37 $^{\circ}$ C, 95% air-5%co₂とした。添加ホルモンとしての human chorionic gonadotropin (hCG) は、帝国臓器より提供された lot No. 36-H-2-H, 13676IU/mg を使用し、TC199にて100ng/ml に希釈して用いた¹⁾。なお hCG と後述する方法により作製した LDL の添加は培養第4日より開始した。培養液はsteroid濃度測定の為、-20 $^{\circ}$ Cにて凍結保存した。

3. 黄体細胞の培養方法

黄体細胞の培養方法は教室の亀井¹⁾の方法に準じた。採取した卵巣黄体組織を無菌的にプラスチックシャーレ上で眼科用小鋏にて黄体のみをen blockに取り出し、PBS溶液中にて約1~2mm³の薄片に細切する。PBS溶液にて数回洗浄後、0.25%trypsin 溶液にて37 $^{\circ}$ C, 15分間 incubate する。trypsin 溶液の上清を捨て、0.25%trypsin inhibitor 溶液で5分間 incubate した後、0.2% hyaluronidase, 0.2%collagenase を加えて37 $^{\circ}$ C, water bath で30分間攪拌消化する。これを105 μ mのナイロンメッシュにて濾過し、濾過細胞浮遊液を120g, 5分間遠沈後、上清を除去する。沈殿細胞に TC199を加えピペッティングにて均等拡散させ Thoma 計算盤上で細胞数を算定する。細胞数算定後再度120g, 5分間遠沈し、10%FCS 添加 TC199培養液にて生存細胞が 1×10^5 個/mlの割合になる様に調整後、culture dish に均等散布した。なお、細胞生存率は Thoma 計算盤上にて細胞浮遊液に0.5%trypan blue 生体染色を施し計算した。

4. LDL, LPPS 作製法

正常男子血清を使用し、Havel et al.¹⁰⁾の方法に準じて臭化カリウムを使用し、血清の比重を調整しながらLDL($1.03 < d < 1.05$), LPPS($1.21 < d$)を50,000rpm, 24時間の超遠心を繰り返して作製した。作製したLDL, LPPSをcut off 3500の透析チューブに入れ、0.15モルNaCl溶液中で 1×10^5 倍以上に透析し、臭化カリウムを除去した。ミリ

ポアを通した後、それぞれの蛋白量、cholesterol量を測定した。LDLの蛋白量とcholesterol量は約3g/dlと約200mg/dlであり、LPPSは約10g/dlと5mg/dl以下であった。

5. 細胞内 cholesterol 測定法

培養終了後の細胞に0.25%trypsin溶液を加えculture dishより剥離させる。Thoma計算盤上で細胞数を算定した後、0.15モルNaClにて数回洗浄し、細胞を0.15モルNaCl 5mlとともにFolch液(chloroform: methanol=2:1) 20mlにいれ細胞内の脂質を抽出する。33%KOHを加えてエステル化したcholesterolをケン化した後、ガスクロマトグラフィー(シマヅ4CM-PF)にかけ、total cholesterolを測定した。カラムは0.5m 1%-OV1を使用した。

6. ステロイド測定法及び統計的処理

培養液中に放出されたPの濃度はradioimmunoassay²⁾³⁾を用いて測定した。また有意差の検定は、Student-t検定、又は一元配置法とpaired-t検定にて行ない、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

実験成績

1. 培養黄体細胞の増殖率(図1)

培養黄体細胞数は10%LPPS単独培養群、10%LPPS+LDL 200 μ g protein/ml培養群ともに経日的に増加傾向を示し、培養10日目ではそれぞれ、 $14.7 \pm 0.7/10^4$ cells/mlと、 $13.2 \pm 1.1/10^4$ cells/mlとなった。LDLの添加は前述の如く培養第4日より開始した。LPPS+LDL培養群はLPPS単独培養群に比べ増殖率に低い傾向がみられたが、有意の差は認められなかった。

2. LDLの至適濃度(図2)

LPPS単独培養第4日よりLDL 200 μ g protein/ml, 400 μ g protein/ml, 600 μ g protein/mlを添加し、黄体細胞におけるP産生を比較した。P産生はLDL 200 μ g protein/ml添加時に最も高値を示した。また、hCG 100ng/ml添加時においても、LDLの至適濃度は200 μ g protein/mlであり、非添加群と同様の結果をみた。

3. 10%LPPS単独培養におけるP産生の経日的変化(図3)

10%LPPS単独で黄体細胞を培養すると、培養

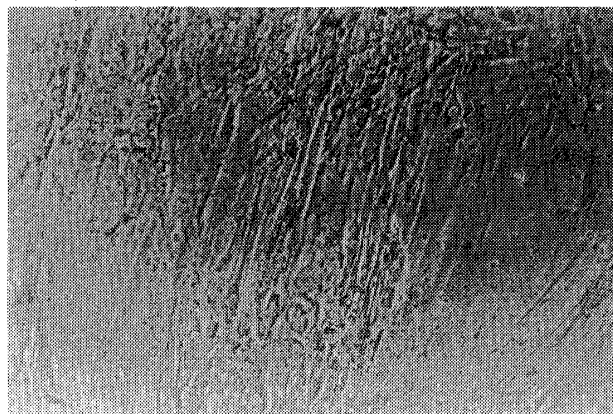


写真1 10%LPPS培養8日目の黄体細胞の位相差顕微鏡所見($\times 100$)
細長い紡錘形の細胞が多い。

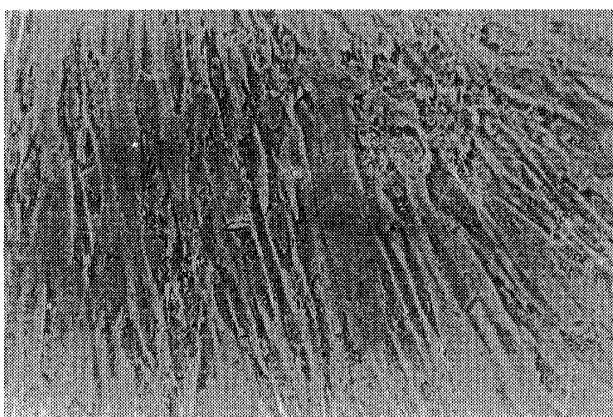


写真2 LDL 200 μ g protein/ml添加4日目(培養8日目)の黄体細胞の位相差顕微鏡写真($\times 100$)
紡錘形に加え、多辺形の細胞もみられる。

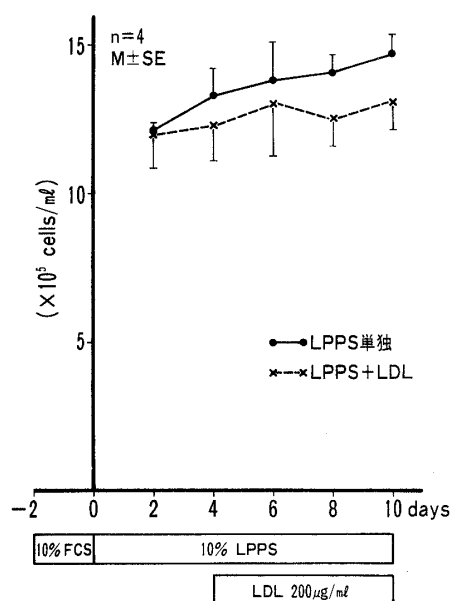


図1 黄体細胞の増殖曲線

液中に放出されるPの量は、hCGの添加、非添加によらず漸減傾向を示すが、培養10日目においてもP産生は存在している。しかし、hCG 100ng/ml添加群のP産生は非添加群に比べ、培養6日目と8日目において有意に高値を示した。

4. LDL添加時のP産生の変化(図4)

10%LPPS単独培養の第4日よりLDL 200 μ g protein/mlを添加すると、P産生は増加した。

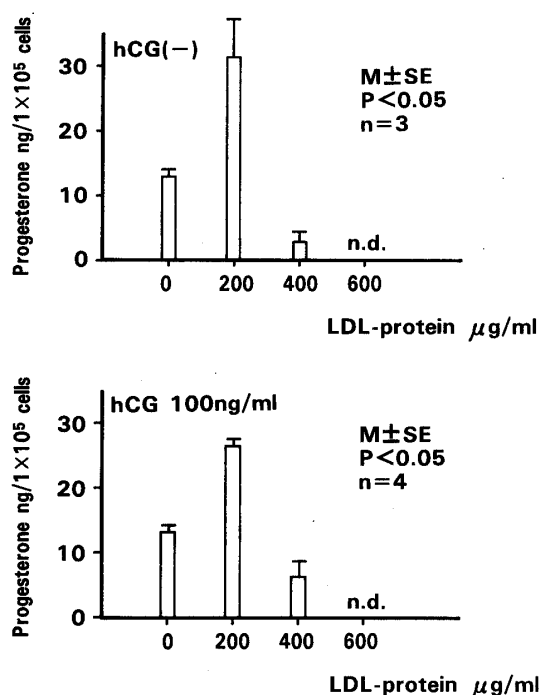


図2 LDL至適濃度(LDL添加6日目)

LDL 200 μ g protein/ml+hCG 100ng/ml添加群でもP産生は増加したが、hCG添加の有無によるP産生の有意差は認められなかった。LDL添加群と非添加群の間では培養8日目と10日目においてP産生量の有意の差が認められたが、培養6日目においては認められなかった。

5. hCG添加, LDL添加による黄体細胞内cholesterol量の変化(表1, 表2)

前述した方法によりガスクロマトグラフィーを用いて測定した1 $\times$ 10⁵個細胞あたりの黄体細胞内cholesterol量を表1, 表2に示した。表1に示す如く10%LPPS単独4日培養群は、10%LPPS単独10日培養群及び10%LPPS+hCG 100ng/ml 10

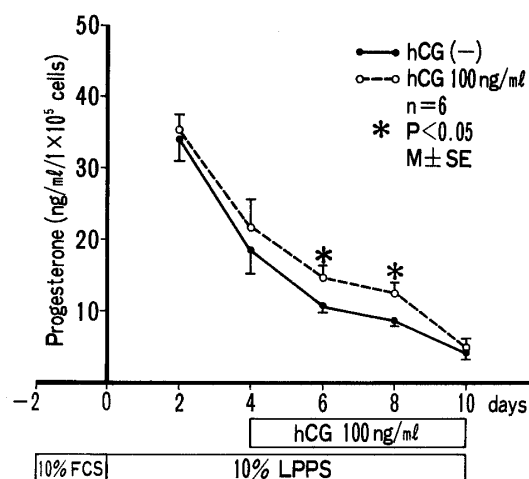


図3 LPPSにおけるProgesterone産生の推移

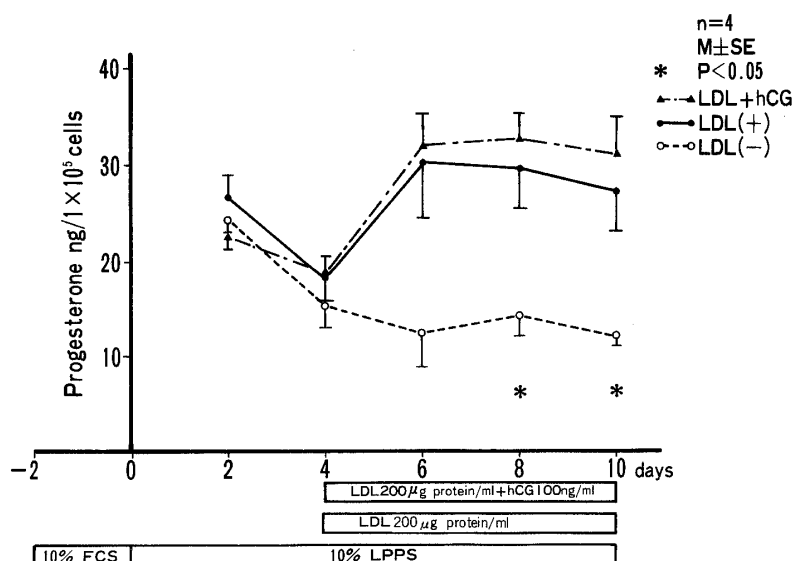


図4 LDL添加時Progesterone産生の推移

表1 LPPS 培養4日群, 10日群, LPPS+hCG
100ng/ml 培養10日群における平均細胞内コレステロール量 ($\mu\text{g}/1 \times 10^5 \text{cells}$)

LPPS 4 日群	LPPS 10日群	LPPS+hCG 10日群
$2.31 \pm 0.43 \text{ a}$	$1.62 \pm 0.27 \text{ b}$	$1.28 \pm 0.23 \text{ c}$

($n=4$, $M \pm \text{SE}$, $\mu\text{g}/1 \times 10^5 \text{cells}$) a.b a.c ($p < 0.05$)

表2 LPPS 培養4日群, 10日群, LPPS+LDL
200 μg protein/ml 培養10日群における平均細胞内コレステロール量 ($\mu\text{g}/1 \times 10^5 \text{cells}$)

LPPS 4 日群	LPPS 10日群	LPPS+LDL 10日群
$2.20 \pm 0.10 \text{ a}$	$1.60 \pm 0.04 \text{ b}$	$3.30 \pm 0.39 \text{ c}$

($n=4$, $M \pm \text{SE}$, $\mu\text{g}/1 \times 10^5 \text{cells}$) a.b b.c ($p < 0.05$)

日培養群に比べ, 細胞内 cholesterol 量が有意に高値を示した. 培養10日群での hCG 添加の有無による細胞内 cholesterol 量の比較では, hCG 添加で低い傾向がみられたが ($p < 0.1$), 有意の差は認められなかつた. LDL 200 μg protein/ml 添加培養10日群と10%LPPS 単独培養10日群では表2に示す如く LDL 添加群の細胞内 cholesterol 量が有意に高値を示した. また, LDL 添加群の細胞内 cholesterol 量は10%LPPS 4日群に比べても有意の差は認められないものの高値を示す傾向を認めた ($p < 0.1$).

考 案

黄体細胞より産生される大量の progesterone の precursor は cholesterol である. この cholesterol の供給源は卵巣内での acetate からの生合成と血中リポ蛋白が考えられるが, 哺乳類でも種により何を供給源とするか異なっている. ラビット妊娠黄体¹¹⁾では卵巣内で生合成した cholesterol を P 産生に利用している事が報告されているが, in vivo におけるラットの黄体⁵⁾や, in vitro におけるラット副腎⁹⁾では high density lipoprotein (HDL) がステロイド合成の為に cholesterol 供給源となつている. また in vitro でのマウス副腎の tumor cell⁸⁾やウシ副腎¹²⁾では, LDL が cholesterol の供給源となつている. ヒトにおいては in vitro の胎児副腎⁶⁾, 胎盤¹⁸⁾, 黄体⁷⁾, 顆粒膜細胞¹⁷⁾を使つた研究で LDL が cholesterol の供給源で

あると考えられている. またヒト卵巣内での cholesterol 生合成に関しては, cholesterol 生合成の key enzyme とされる HMG Co-A reductase (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase) の阻害剤である ML236B を使用した実験¹⁷⁾や, HMG Co-A の活性を測定した実験⁷⁾により, ほとんど存在しないと考えられている. よつてヒト黄体における cholesterol の主たる供給源は LDL であると言えるが, 黄体細胞におけるステロイド合成を考える場合, 黄体細胞内での cholesterol の動態も考慮する必要がある. LDL は主に原形質膜の coated pits に局在する LDL-receptor を介した endocytosis により細胞内に取り込まれ lysosome で分解される. 放出された cholesterol は ACAT (Acyl-Co A cholesterol acyl transferase) により一旦エステル化され細胞内に貯蔵される. そしてステロイド合成に利用される時にはまたフリーの状態に戻つて mitochondria で側鎖切断 (cholesterol side chain cleavage, CCCC) をうける. それ故に黄体細胞における P 産生の測定と同時に細胞内 cholesterol 量を測定する事は LDL の研究においては必要不可欠の事と考えられる.

本実験の黄体細胞単層培養系は十分に in vivo のモデル化となり得る事が証明されており¹⁾, また short incubation 法や organ culture 法と違い, 細胞が均質である事, 添加ホルモン等が一樣に細胞へ浸透する点などから, 添加された試料の細胞への直接的な反応を十分定量的に反映していると考えられる. また, 培養終了後の細胞内 cholesterol 量測定に際しても十分な定量と考察が行なえろと考えられる.

本培養系における細胞増殖をみると (図1) LDL 添加群では非添加群の細胞増殖を下廻る傾向がみられた. これは hCG や prolactin 添加における細胞増殖抑制傾向¹⁴⁾と同じである.

LDL の至適濃度を LDL 添加第6日目で検討すると, LDL 200 μg protein/ml で P 産生は最高値を示した. この時の cholesterol 値は約13—14 mg/dl であり, 20%FCS に含まれる cholesterol 量と近似している. Carr et al.⁷⁾は LDL 500 μg

protein/ml で実験を行なっているが、この場合は organ culture であり、著者の行なった monolayer culture では LDL が黄体細胞に直接接触できる為、より in vivo に近い至適濃度が得られたものと考えられる。この結果は最近の Soto et al.¹⁴⁾や、Rajendran et al.¹³⁾の実験結果と一致している。

10%LPPS 単独培養で黄体細胞の P 産生は漸減する (図3)。この事は外因性 cholesterol 欠乏状態では黄体細胞は P 産生を維持できない事を明らかにしている。hCG 添加により P 産生の減少傾向が鈍化する事は、hCG が細胞内 cholesterol の利用を促進している可能性を示唆している。細胞内 cholesterol の比較 (表1) でも、hCG 添加群での細胞内 cholesterol が、有意の差こそ認められないものの hCG 非添加群に比べ低値を示す傾向がみられる。これらの結果は、hCG の作用が mitochondria の CSCC の活性化と cholesterol の細胞内移動であるとした Strauss et al.¹⁵⁾の報告と一致している。また、培養4日群と10日群での細胞内 cholesterol 量の比較でも、10日群の方が有意に低く、この事からも外因性 cholesterol 欠乏時に黄体細胞は細胞内 cholesterol を利用して P 産生を行なっている事が強く示唆される。

10%LPPS 単独培養に LDL を添加すると P 産生は増加する (図4)。しかし、更に hCG を添加しても P 産生に有意の差は認められない。この現象は図2に示した LDL の至適濃度の検討時にも見られた。この結果は LDL 存在時に hCG 添加で P 産生が増大するという Carr et al.⁷⁾の実験と一致しないが、cholesterol の供給と P 産生が必ずしも一致しないとした Toaff et al.¹⁶⁾の報告もあり、前述した hCG の作用機序に対する考察もあわせて、hCG の作用に関しては今後の研究の待たれる所である。また、LDL 添加2日目 (培養第6日目) で黄体細胞の P 産生にバラつきのある事は、LDL の黄体細胞内への取り込みとその利用が必ずしも同一の mechanism で control されていない事を示唆している。LDL 添加後の細胞内 cholesterol 量を比較すると (表2)、培養10日群において LDL 添加群が10%LPPS 単独群に比べ有意に高値を示

している事がわかる。LDL 添加により黄体細胞の P 産生と細胞内 cholesterol 量が増加する事により、LDL は黄体細胞内に取り込まれ、P 産生に利用されている事が強く示唆される。

以上を総括すると、ヒト黄体細胞単層培養系を用いた実験により、1) LDL はヒト黄体細胞における cholesterol の供給源となつている。2) その cholesterol は合成される P の substrate として使用されている。3) 外因性 cholesterol 欠乏時にも黄体細胞の P 産生は少量ながら存在し、黄体はその細胞内 cholesterol を利用して P 産生を行なっている事が定量的に明らかにされた。

稿を終わるに際し、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師飯塚理八教授、ならびに終始御指導いただきました中村幸雄講師に深謝致します。さらに御指導、御協力をいただきました慶応義塾大学医学部老人内科研究室広瀬信義先生、山本 実先生に感謝致します。また検体採取に快く御協力下さいました荘病院、荻窪病院、済生会中央病院、国立埼玉病院、永寿総合病院、済生会神奈川病院の諸兄諸姉に感謝致します。

本論文の要旨は、第28回日本不妊学会総会、第57回日本内分泌学会秋季大会、第29回日本不妊学会総会にて発表した。

文 献

1. 亀井 清：ヒト月経黄体の単層培養による steroidogenesis の研究。日産婦誌，34：261，1982。
2. 牧野拓雄：性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay。日内分泌誌，49：629，1973。
3. 松本 茂，中村幸雄，川村尚道，田辺清男，飯塚理八：RIA によるステロイドホルモンの測定法について。ホと臨床，24：29，1976。
4. 澤田 富夫：ヒト黄体細胞単層培養を用いた Prolactin の卵巣直接作用。日産婦誌，34：2212，1982。
5. Anderson, J.M. and Dietschy, J.M.: Relative importance of high and low density lipoprotein in the regulation of cholesterol synthesis in the adrenal gland, ovary and testis of the rat. J. Biol. Chem., 253: 9024, 1978.
6. Carr, B.R., Parker, C.R. Jr., Milewich, L., Porter, J.C., MacDonald, P.C. and Simpson, E. R.: The role of low density, high density and very low density lipoproteins in steroidogenesis by the human fetal adrenal gland. Endocrinology, 106: 1054, 1980.
7. Carr, B.R., Sadler, R.K., Rochelle, D.B., Stalmach, M.A., MacDonald, P.C. and Simpson, E.

- R. : Plasma lipoprotein regulation of progesterone biosynthesis by human corpus luteum in organ culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52 : 875, 1981.
8. Faust, J.R., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. : Receptor-mediated uptake of low density lipoprotein and utilization of its cholesterol for steroid biosynthesis in cultured mouse adrenal cells. *J. Biol. Chem.*, 252 : 4861, 1977.
 9. Gwynne, J.T., Mahaffee, D., Brewer, H.B. Jr. and Ney, R.L. : Adrenal cholesterol uptake from plasma lipoproteins: Regulation by corticotropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 4329, 1976.
 10. Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H. : The distribution and chemical composition of ultra-centrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, 34 : 1345, 1955.
 11. Kovanen, P.T., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. : High levels of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol synthesis in the ovary of the pregnant rabbit. *J. Biol. Chem.*, 253 : 5126, 1978.
 12. Kovanen, P.T., Faust, J.R., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. : Low density lipoprotein receptors in bovine adrenal cortex. I. Receptor mediated uptake of its cholesterol for steroid synthesis in cultured adrenocortical cells. *Endocrinology*, 104 : 599, 1979.
 13. Rajendran, K.G., Hwang, J. and Menon, K.M. : Binding, degradation, and utilization of plasma high density and low density lipoproteins for progesterone production in cultured rat luteal cells. *Endocrinology*, 112 : 1746, 1983.
 14. Soto, E., Silavin, S.L., Tureck, R.W. and Strauss, J.F. III. : Stimulation of progesterone synthesis in lutenized human granulosa cells by human chorionic gonadotropin and 8-bromo-adenosine 3',5-monophosphate: The effect of low density lipoprotein. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 58 : 831, 1984.
 15. Strauss, J.F. III., Schuler, L.A., Rosenblum, M. F. and Tanaka, T. : Cholesterol metabolism by ovarian tissue. *Adv. Lipid. Res.*, 18 : 99, 1981.
 16. Toaff, M.E., Strauss, J.F. III., Flickinger, G.L. and Shattil, S.J. : Relationship of cholesterol supply to luteal mitochondrial steroid synthesis. *J. Biol. Chem.*, 254 : 3977, 1979.
 17. Tureck, R.W. and Strauss, J.F. III. : Progesterone synthesis by lutenized human granulosa cells in culture: The role of de novo sterol synthesis and lipoprotein-carried sterol. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52 : 875, 1981.
 18. Winkel, C.A., Synder, J.M., MacDonald, P.C. and Simpson, E.R. : Regulation of cholesterol and progesterone synthesis in human placental cells in culture by serum lipoproteins. *Endocrinology*, 106 : 1054, 1980.
 19. Winkel, C.A., Parker, C.R. Jr., Simpson, E.R. and MacDonald, P.C. : Production rate of deoxycorticosterone in women during the follicular and luteal phases of the ovarian cycle. : The role of extraadrenal 21-hydroxylation of circulating progesterone in deoxycorticosterone production. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51 : 1354, 1980.

(No. 5867 昭60・12・3 受付)