

研究報文

十二指腸粘膜フェリチンと鉄吸収制御機構 との関係についての実験的研究

説田 武*, 岩淵 敦子*, 佐藤 弘美*
下野 拓子, 稲葉 雅子*

Study on the Role of Duodenal Mucosal Ferritin in Controlling Iron
Absorption from Duodenal Mucosa in Rat

Takeshi Setsuda, Atsuko Iwabuchi, Hiromi Sato, Hiroko Shimono
and Masako Inaba

食物中の鉄は十二指腸及び空腸上部の絨毛上皮細胞の刷子縁 (Brush border) に Fe^{2+} の形で吸着され、膜を通過して細胞内に入ると、一部の鉄は分子量約45万¹⁾のタンパク質、即ちアポフェリチン (Af) の皮殻内に取り込まれ、微細な結晶粒子の集合体²⁾である iron core を形成し、フェリチン (Fr) となって貯蔵される。その際、 Fe^{2+} は多分 Af の触媒作用で Fe^{3+} に酸化³⁾され、更に加水分解を受けて主として ferric oxyhydroxide^{3),4)} ($\text{FeO}\cdot\text{OH}$) の形で iron core を形成するが、体内の鉄需要に応じて恐らく FMNH_2 の作用で Fe^{3+} が Fe^{2+} に還元³⁾されて血中に動員される。血中ではアポトランスフェリンの receptor site⁵⁾ に Fe^{2+} が結合してトランスフェリンとなり、各臓器に鉄を輸送する。鉄は骨髄では赤血球造血に利用され、又肝、脾などではフェリチン又はヘモジデリンとして貯蔵される。吾々の体内では約 4g⁶⁾ の鉄が閉鎖循環⁷⁾を営んでおり、大便や尿などに排泄される鉄の量は1日に僅か約 5mg⁸⁾と言われている。従って、体内の鉄量を一定に保つには、体外へ失われた鉄量だけを腸から吸収すればよいことになる。Granick^{9),10)} は十二指腸

腸粘膜に鉄吸収の制御機構が存在することを想定して“mucosal block”説を提唱したが、これを支持する人も少なくない^{8),11),12)}。吾々は成熟した Wistar 系雄ラットを用い、以下述べる4つの条件下に、過剰鉄を経口的、或いは非経口的に投与して、十二指腸粘膜 (腸粘膜と略) の Fr が、鉄吸収制御機構とどんな係りを持つかについて検討した。

実験材料及び実験方法

体重約 300g の Wistar 系雄ラットを一定の温度 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) と湿度 ($40 \pm 10\%$) に保った空調室内で、オリエンタル固形飼料と水を自由に与えて飼育し、16時間絶食の後に実験に供した。実験条件としては、(1) 正常ラットの胃内にクエン酸鉄 (Fe^{3+}) 90mg (鉄 18mg) を水 5ml にとかしてゾンデで注入、(2) 引き続き15分後に同量の鉄を胃内に注入、(3) 正常ラットの尾部を切断して 5ml の瀉血を行ない、同時に鉄欠乏飼料で 5 日間飼育した後、上記と同量の鉄を胃内に注入、(4) 正常ラットの体重 100g 当り 500 μg (鉄 59.2 μg) のクエン酸アンモニウム鉄 (Fe^{3+}) を生食水 0.5ml にとかして腹腔内に注入、の各々について、ラット 2 匹ずつを、鉄を投与して 15, 30, 60 分、3, 24 時間後に解剖して肝、脾、腸粘膜の Fr-鉄と Af を測定し、同時に血清鉄 (SI)、血清の総鉄結合能¹³⁾ (TIBC)、血中の RBC、

* 京都女子大学栄養生理学 (Laboratory of Nutritional Physiology, Department of Food Science, Kyoto Women's University, Higashiyama-ku, Kyoto 605, Japan)

Table 1 The isolation procedures of apoferritin according to R.R. Crichton et al.(1973)

Homogenize tissue in 3 vol. of water
 ↓
 Heat at 75°C for ten minutes
 ↓
 Centrifuge at 2500g for ten minutes
 ↓
 Treat supernatant with 50%-saturated
 (NH₄)₂SO₄ overnight
 ↓
 Centrifuge at 2500g for 15 minutes
 ↓
 Redissolve precipitate in water and dialyse
 against water overnight
 ↓
 Centrifuge at 23,000g for 30 minutes
 ↓
 Chromatograph on Sephadex G-200

Hb, RC, 骨髄の含鉄赤芽球 (SB) と E/M 比 (赤芽球対骨髄球の比) を測定した。又、肝、脾、腸粘膜の鉄沈着を Prussian blue 染色により調べた。各臓器の Fr-鉄と Af は、Crichton¹⁴⁾らの方法 (Table 1) に準じて得た各臓器のフェリチン分画について測定した鉄 (日本ロッシュのキット法) とタンパク量 (Lowry法) から求め、又両者の値からフェリチンの Fe/P 比を算出した。なお、各臓器のフェリチン分画を 1/5 に濃縮して 20% ショ糖液を作り、Polyacrylamide gel disc 電気泳動¹⁵⁾を行ない、馬脾フェリチンを対照としてフェリチンの同定を行なった。網赤血球 (RC) は Pappenheim¹⁶⁾法で、又 SB は 寺田¹⁷⁾法で測定し、E/M 比は骨髄塗抹標本にギムザ染色を施し、Rohr¹⁸⁾法で求めた。

実験成績

1) 正常ラットの SI 及び肝、脾、腸粘膜の Fr-鉄と Af 値

正常ラット 6 匹の平均では、SI が 203.0 ± 7.3 μg/dl, TIBC が 450.2 ± 21.4 μg/dl, UIBC が 247.2 ± 16.3 μg/dl, 又肝、脾、腸粘膜の Fr-鉄と Af が、それぞれ 6.2 ± 0.3, 22.6 ± 1.3, 9.9 ± 0.9 μg/g, 及び 347 ± 42, 600 ± 68, 701 ± 98 μg/g で、又 Fe/P 比が 0.018 ± 0.001, 0.038 ± 0.002, 0.014 ± 0.001 であった。

2) 正常ラットに過剰鉄を 1 回経口投与の場合

鉄投与後、腸粘膜の Fr-鉄と Af が増加し、Fr-鉄は 15 分後に、Af は 30 分後にピークを示し、以後両者とも急減し、Fr-鉄は 60 分後に、Af は 24 時間後に回復した。Fe/P 比は 3 時間後まで軽度に増加した。SI は 15 分後から増加し、30 分後にピークとなり、3 時間後も

高値を示したが、24 時間後に回復した。なお、肝の Fr-鉄と Af は 60 分後から増加傾向を示し、24 時間後も正常値を上回ったが、脾の Fr-鉄は殆ど変化しなかった (Fig. 1)。血中では RBC が 3 時間後から、又 Hb が 60 分後から 24 時間後にかけて軽度に増加し、RC が 15 分後から 24 時間後にかけて漸減した。骨髄では SB が 15 分後から 3 時間後にかけて僅かに増加し、E/M 比は 24 時間後に軽度の減少を示した (Fig. 5)。

3) 正常ラットに過剰鉄を 2 回連続経口投与の場合

鉄を 1 回経口投与して 15 分後に同量の鉄を経口投与すると、腸粘膜の Fr-鉄と Af は 15 分後にピークを示すが、ピークの高さは鉄の 1 回投与と差がなく、30 分後には両者とも著減し、3 時間後にはほぼ回復した。又、Fe/P 比は 60 分後まで増加の傾向を示した。SI は 15 分後から増加、30 分後にピークを示したが、ピークの高さは鉄の 1 回投与に近似しており、60 分以後漸減し、24 時間後には正常値を僅かに上回った。なお、肝の Fr-鉄は 3 時間後から漸増したが、鉄の 1 回投与に比べて軽度で、又脾の Fr-鉄は 24 時間後に軽度の増加を示したにすぎない (Fig. 2)。血中では RBC の変動が鉄の 1 回投与に比べて少なく、又 Hb が 15 分後から増加したが、24 時間後の増加は鉄の 1 回投与と差がなかった。RC の減少は鉄の 1 回投与に比べて軽度であった。骨髄では SB に著変がなく、又 E/M 比は鉄の 1 回投与と同じく、24 時間後に軽度の減少を示した (Fig. 5)。

4) 瀉血貧血ラットに過剰鉄を 1 回経口投与の場合

瀉血貧血ラットでは肝、脾、腸粘膜の Fr-鉄が著減したが、これに鉄を 1 回経口投与すると、腸粘膜の Fr-鉄は 15 分後から増加し始め、3 時間後にピークに達し、以後減少するが、24 時間後も正常値の上限を示し、又 Af は 30 分後と 24 時間後に著増した。又、Fe/P 比は、鉄投与前は著しく低値で、鉄投与後も殆ど変化せず、24 時間後には著しい低値を示した。なお、鉄投与して 15 分と 60 分後の腸粘膜では、絨毛の先端部の粘膜下組織に鉄沈着が軽度に認められた。SI は 15 分後から漸増して 3 時間後にピークとなり、24 時間後も正常値を可成り上回った。肝の Fr-鉄は 3 時間後までは変化がなく、24 時間後に漸く正常値近くまで回復したが、脾の Fr-鉄は 24 時間後も殆ど変化がなかった (Fig. 3)。

瀉血貧血ラットでは、血中の RBC と Hb, 又骨髄の SB が減少し、血中の RC と骨髄の E/M 比が増加したが、鉄投与後はいずれも改善の傾向を示した。

RC は24時間後に回復したが, RBC と Hb 及び E/M 比は完全には回復せず, SB は正常値を下回った (Fig. 5)。

5) 正常ラットに過剰鉄を1回腹腔内に注入の場合

正常ラットの腹腔内に鉄を1回注入すると, 腸粘膜のFr-鉄と Af は15分から30分後に僅かな一過性増加を示したのみで, 又 Fe/P 比は60分後に一時的増加を示したにすぎない。然し, 肝の Fr-鉄は30分後から漸

増し, 3時間後にピークとなり, 24時間後も正常値を僅かに上回り, Fe/P 比は15分後から次第に著増した。又, 脾の Fr-鉄は, 鉄の経口投与の場合と異なり, 15分後からすでに増加して30分後にピークとなり, 以後減少して24時間後には正常値に戻った。又, Fe/P 比は3時間後に著増したが, 24時間後にはほぼ正常値に戻った。なお, 30分後にはすでに脾の赤色髄に鉄顆粒の増加を認めた。SI は15分後から増加し, 30分後に

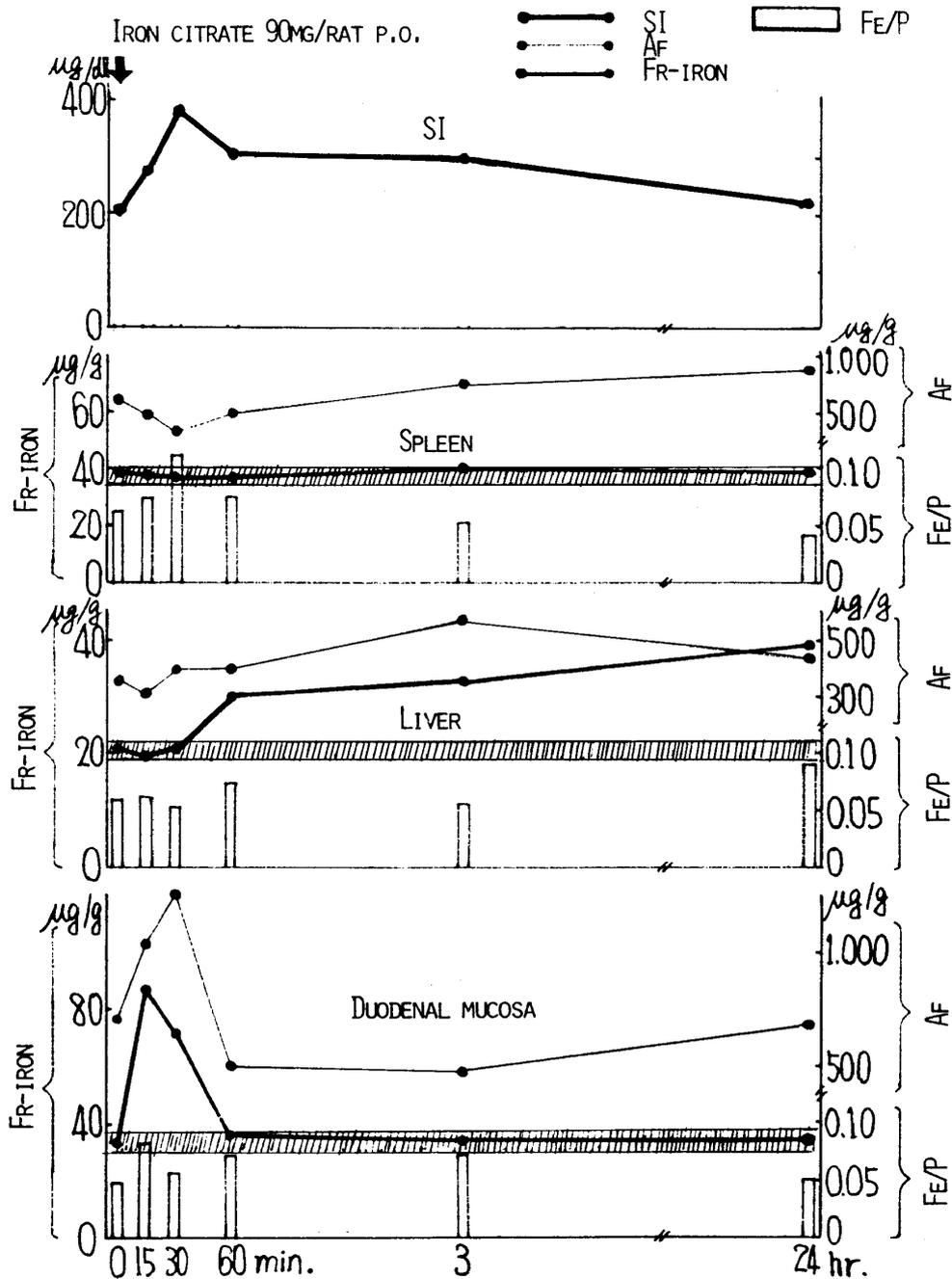


Fig. 1 The time course of SI as well as Fr-iron and AF levels of the organs in the normal rats given iron citrate p.o., The normal range of Fr-iron

ピークとなり、3時間後も高値を示し、24時間後に正常値に戻った (Fig. 4)。血中では RBC が30分後から、又 Hb が3時間後から24時間後にかけて軽度増加し、又 RC が60分後から24時間後にかけて軽度減少した。骨髄では E/M 比が60分後から24時間後にかけて軽度に減少し、又 SB は24時間後に正常値を僅かに下回った (Fig. 5)。

考 察

Crichton¹⁴⁾ らの方法では、従来の方法^{19),20)} に比べて、Af 以外の不純なタンパク質が平均65%除去され、Af の分離には良い方法と思われる。また同時に鉄が平均84%失われる。又、Polyacrylamide gel disc electrophoresis の結果、馬脾フェリチンの移動度 (Rf)

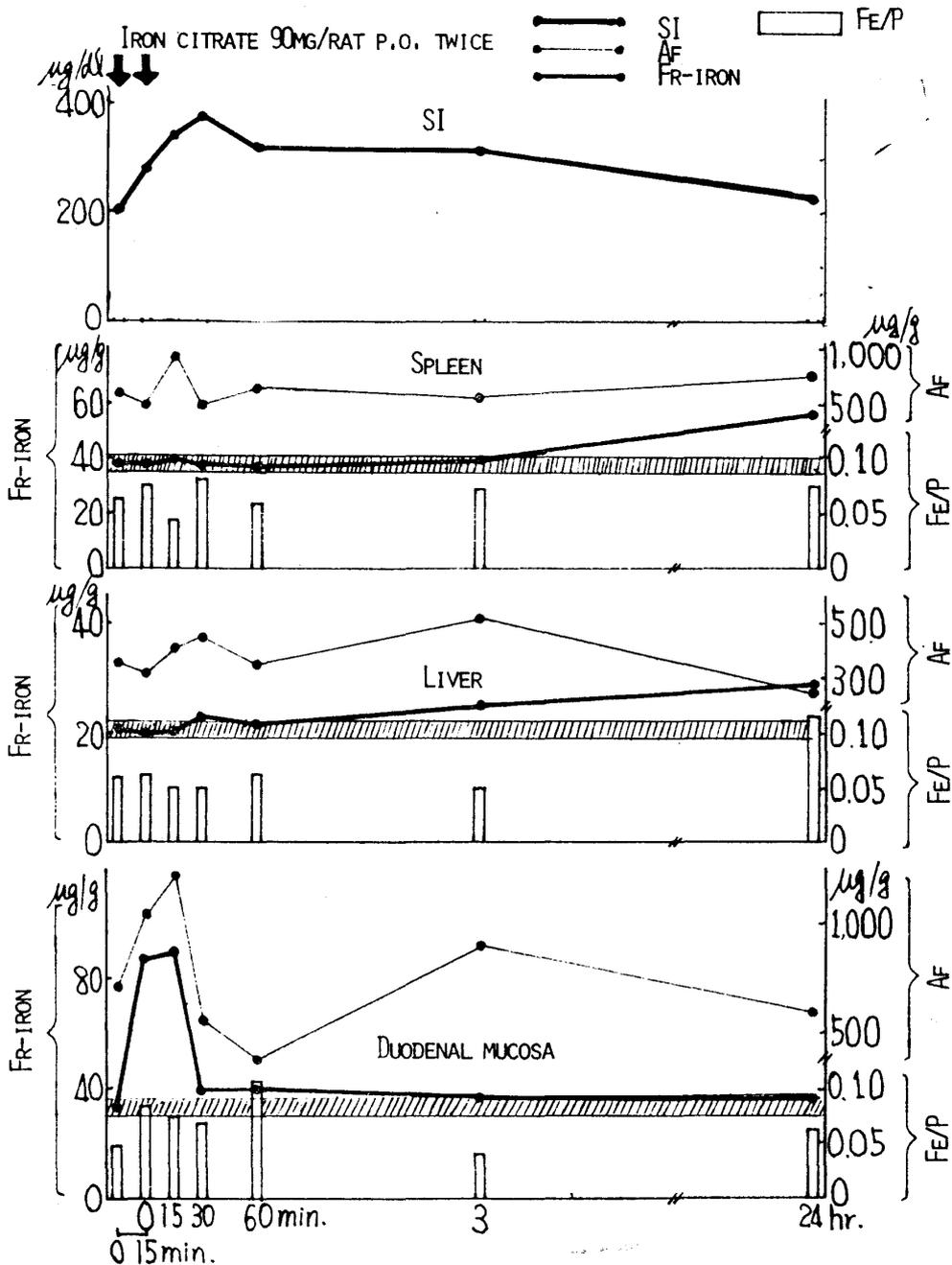
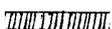


Fig. 2 The time course of SI as well as Fr-iron and AF levels of the organs in the normal rats given iron citrate p.o. twice at an interval of 15 minutes.  The normal range of Fr-iron

と比べて、肝と脾の Fr の Rf は同値で、又腸粘膜の Fr の Rf は馬脾 Fr の Rf に近似することを確認した。正常ラットの腸粘膜では、Af が肝、脾に比べて多く、又 Fe/P 比が著しく低値で、従ってフェリチンの鉄含有量が少ないことがわかった。この事は、恐らく消化管内の鉄を吸収するのに好都合な適応のように考えられる。腸絨毛の基底部分にある腺窩から新生された粘膜細胞は、約 2-3 日^{11),12)} の half life で成熟しながら

絨毛の先端部に向かって移動し、遂に消化管内に剥離、脱落するが、それと同時に粘膜細胞内のフェリチンが消化管内へ排泄される。此の新生された粘膜細胞は、フェリチンが少なく、消化管から鉄を活発に取り込むと同時に、鉄を盛んに放出²¹⁾ と言われている。吾々²²⁾の研究では、正常ラットの1日の鉄摂取量は、平均 6.3mg (雄)、又は 3.5mg (雌) であるから、正常雄ラットの胃内にクエン酸鉄 90mg (鉄 18mg) を注

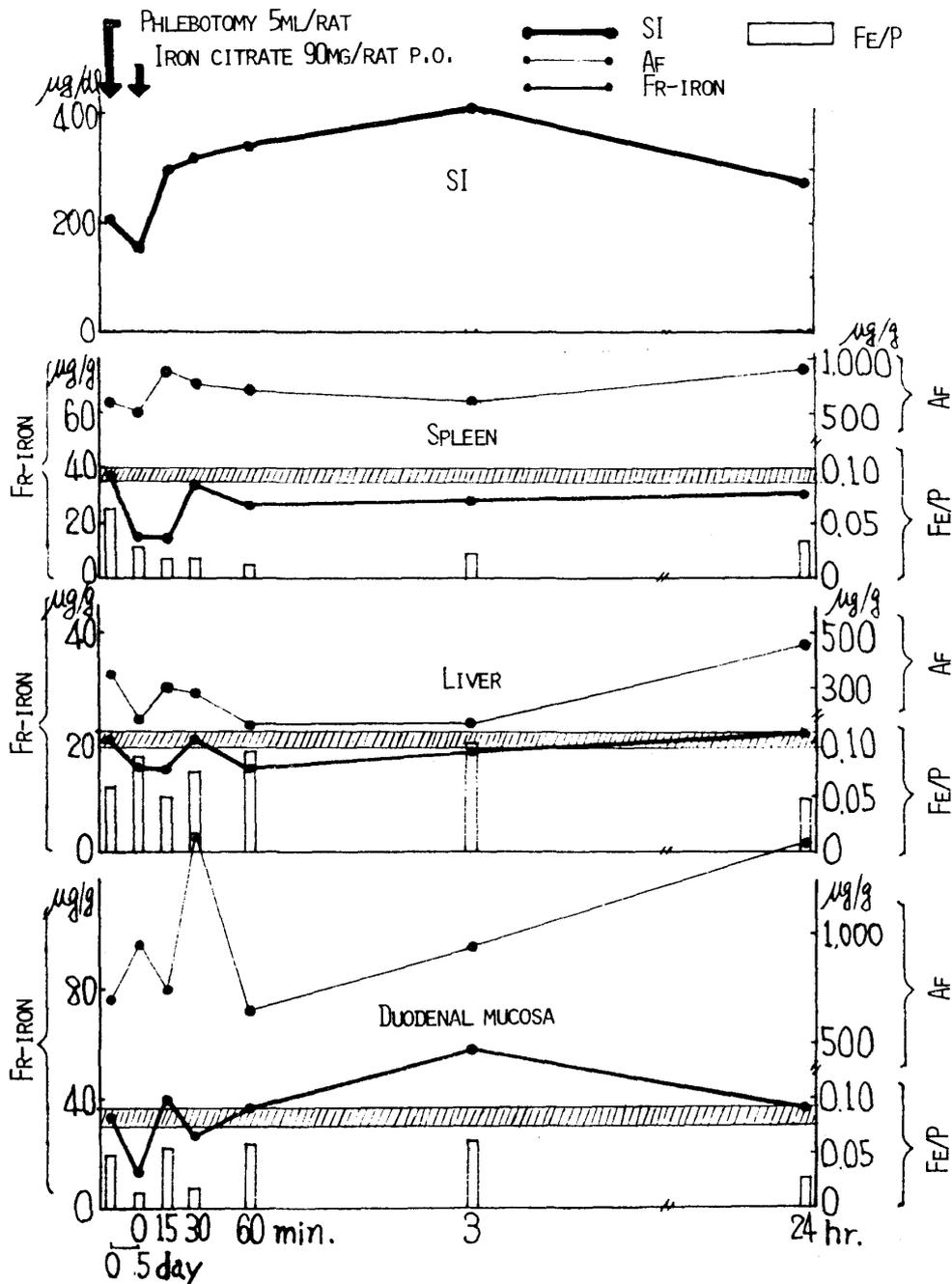


Fig. 3 The time course of SI as well as Fr-iron and AF levels of the organs in the phlebotomized anemic rats given iron citrate p.o.. The normal range of Fr-iron

入することは、生理的な1日の鉄摂取量の約3倍量の過剰鉄を空腹時に与えたことになる。

SI が鉄投与後急上昇し、3時間後も高値を示したことは、少なくとも腸粘膜から鉄が速かに吸収されて血中に移行したことを示唆する。一方、腸粘膜のFr-鉄は、鉄投与後速かに増加し、15分後にはすでにピークに達したが、以後急減して60分後には回復した。又、Af は Fr-鉄より多少遅れて30分後にピークとなった

が、60分後には前値に戻り、Fe/P 比は3時間後まで軽度の増加を示した。以上の所見から、腸から吸収された鉄は速かに血中に移行すると同時に、鉄の一部は粘膜細胞内の Af に速かに取り込まれ、又鉄の刺激で Af が粘膜細胞内で生合成²³⁾されたものと考えられるが、Fe/P 比の増加が一過性であったことは鉄がフェリチンから動員されたことを示唆する。更に鉄投与後の腸粘膜のFrとAfの増加が急速で、而かも一過性で

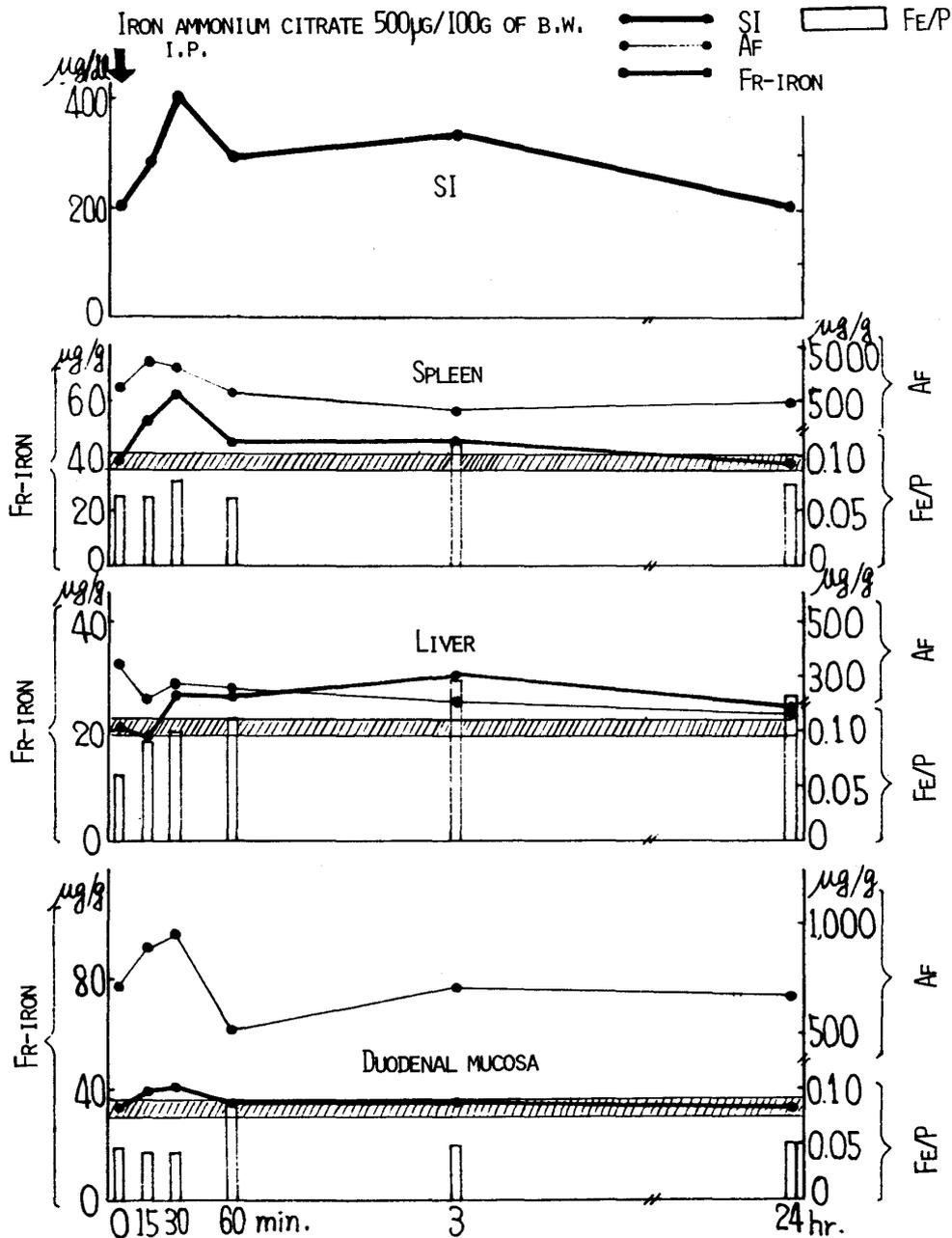


Fig. 4 The time course of SI as well as Fr-iron and AF levels of the organs in the normal rats given iron ammonium citrate intraperitoneally.

▨ The normal range of Fr-iron

あったことと併せ考えると、腸粘膜のフェリチンが腸からの鉄吸収に積極的に関与したと考えるよりはむしろ、フェリチンの反応性増加が不必要な鉄の吸収を阻害するために、messenger inon,²³⁾ 或は一種のシグナルとして働いたと考える方が妥当のように思われる。

なお、肝の Fr-鉄は鉄投与して60分後から次第に増加したが、脾の Fr-鉄は24時間後も変化を示さなかったことから、吸収された鉄は主に肝に移行し、フェリチンとなって貯蔵されたものと思われる。又、血中の RC、特に成熟型 (IV型) が鉄投与後減少したことは、

RC が鉄を取り込んで Hb 合成が促進された結果と考えられる。

正常ラットに過剰鉄を1回経口投与し、更に15分後に同量の鉄を経口投与すると、腸粘膜の Fr-鉄は15分後にピークを示したが、ピークの高さは鉄の1回投与時のピークと差がなく、30分後には正常値近くまで著減し、3時間後には回復した。又、SI の増加も鉄の1回投与時の増加に似ており、又肝の Fr-鉄の増加の程度は鉄の1回投与に比べてむしろ軽度であった。以上の事から、正常ラットに過剰鉄を短時間内に連続2

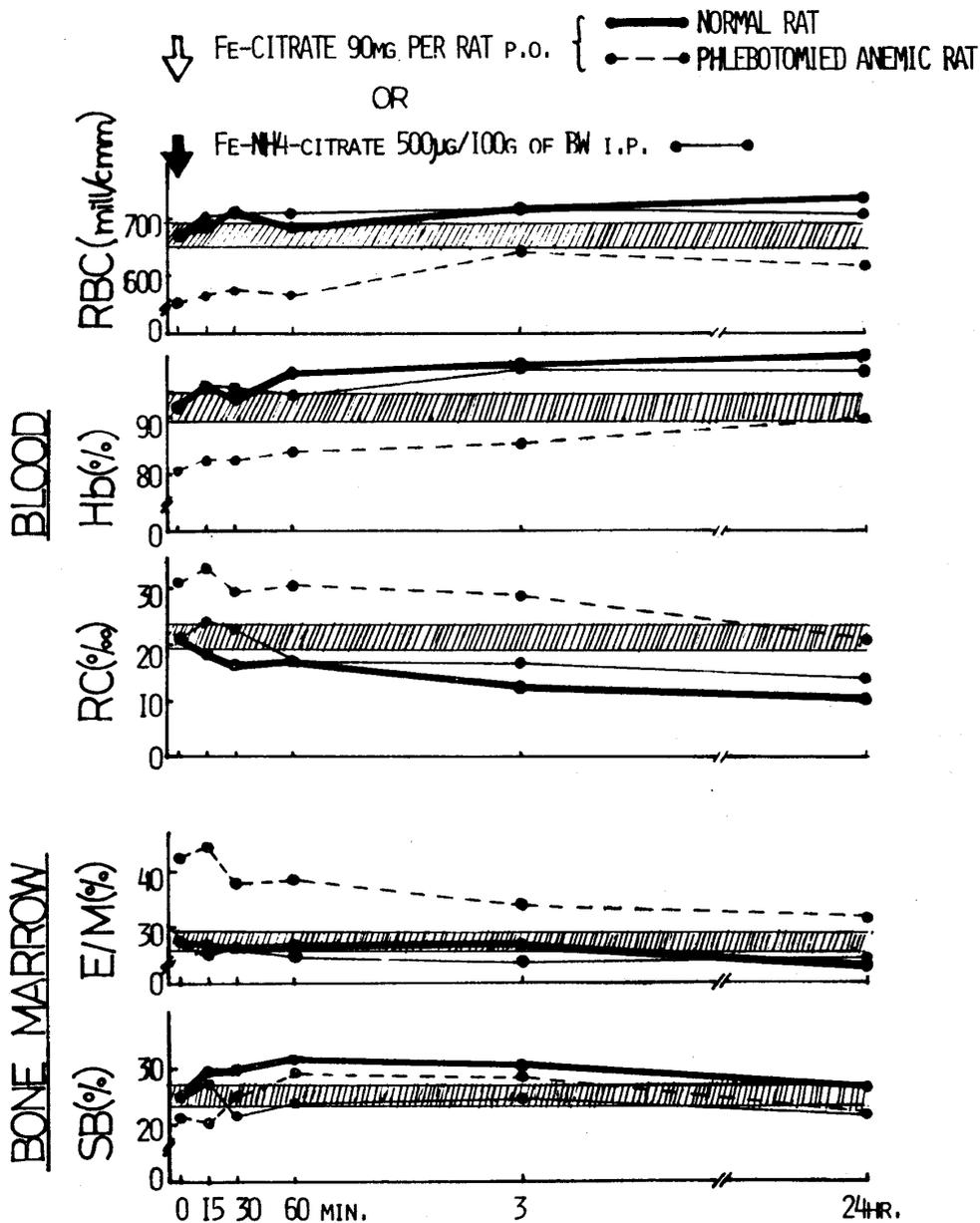


Fig. 5 The time course of blood and bone marrow findings in the normal and phlebotomized anemic rats given iron citrate p.o., or iron ammonium citrate i.p.  The normal range of RBC, Hb, RC, SB or E/M ratio

回経口投与しても、腸からの鉄の吸収は、鉄の1回経口投与と大差がなく、従って腸粘膜からの鉄の吸収が鉄の1回経口投与ですでに block されたことを示唆する。即ち、腸粘膜の Fr-鉄が過剰鉄の1回経口投与に対して速かに反応して一過性増加を示したのは、Crosby⁸⁾も指摘したように、不必要な鉄の吸収を阻止するために、腸粘膜フェリチンが一種のシグナル的役割を果たしたものと考へて差支なからう。然し、この点については更に、鉄の投与量や、鉄の再投与の時間的間隔などを考慮して検討する必要がある。

瀉血貧血ラットでは各臓器の Fr-鉄が著減するが、これに正常ラットに投与した時と同量の鉄を1回経口投与すると、腸からの鉄吸収は極めて活発で、SI が急上昇し、又血中の RBC と Hb が24時間後には可成りの程度に回復した。この事から、腸から吸収されて血中に移行した鉄が、骨髓造血に優先的に利用されたものと考えられる。一方、腸粘膜の Fr-鉄は、鉄投与後徐々に増加して3時間後にピークとなり、以後減少するが24時間後も正常値の上限を示した。この点は、正常ラットに鉄を1回経口投与すると、15~30分後に腸粘膜の Fr-鉄が一過性に増加したのと異なっており、恐らく腸粘膜のフェリチンが体内の鉄不足を補うために、腸からの鉄吸収に積極的に関与した可能性が考えられる。事実、吾々²²⁾は先に、鉄欠乏飼料で60日間飼育して貧血と体内の各臓器の Fr-鉄の著減を来したラットに、連日鉄を経口投与すると、腸粘膜の Fr-鉄が約2週間にわたって著明に増加することを認め、報告した。此の事は、体内の鉄のニードを急速に満たすために腸粘膜では、鉄の吸収が促進すると同時に、フェリチンへの鉄の取り込みと、恐らくはフェリチンからの鉄の動員^{3),21)}が行われたことを示唆する。鉄投与して15分から60分後に、十二指腸絨毛の先端部の粘膜下組織に鉄顆粒の沈着を軽度認めしたが、これは恐らく RES 細胞、或は遊走細胞内に取り込まれた鉄顆粒と考えられ、瀉血貧血ラットの腸粘膜からの鉄吸収が活発なことを示す一つの証拠とも言えよう。反対に、肝の Fr-鉄は鉄投与後の回復が遅く、24時間後に漸く正常値に戻ったが、脾の Fr-鉄の回復は更に遅れ、24時間後も正常値を下回った。この事は、体内の鉄不足が著しい瀉血貧血ラットでは、投与された鉄が主に骨髓造血に向けられ、肝や脾に移行した鉄が著しく少ないことを示唆する。

正常ラットに過剰鉄を腹腔内に注入すると、SI が急上昇して30分後にピークとなり、3時間後も高値を示したが、24時間後には回復した。肝の Fr-鉄は急増

して3時間後も高値を示し、24時間後も正常値を上回り、又脾の Fr-鉄も急増して30分後にピークとなったが、以後減少して24時間後には回復した。なお、鉄投与して30分後の脾では、赤色髓に鉄顆粒の著増を認めしたが、これはヘモジデリンの沈着によるものと思われる。脾の Fr-鉄が、鉄の投与後急増した後減少したのは、恐らくフェリチンがヘモジデリンに変化^{24),25)}した結果であろうと考えられる。然るに、腸粘膜では Fr-鉄と Af が、15分後から30分後にかけて僅かに一過性増加を示したのみで、Fe/P 比には変化がなかった。従って、正常ラットの腹腔内に過剰鉄を注入しても、腸粘膜の Fr-鉄には殆ど影響がなく、鉄は主として肝と脾に運ばれ、そこでフェリチン、或はヘモジデリンとして貯蔵されたものと思われる。なお、鉄の腹腔内投与では、血中の RBC と Hb が増加の傾向を、又血中の RC と骨髓の E/M 比が減少の傾向を示したが、SBには著変がなく、24時間後には正常値を下回った。従って、非経口的に投与された鉄は、主に肝と脾に運ばれ、骨髓へは SB に変化を来たす程の量の鉄が移行しなかったものと思われる。

結 論

十二指腸粘膜のフェリチンが腸粘膜における鉄吸収制御機構とどんな係りを持つかを明らかにする目的で、正常ラット或は瀉血貧血ラットに過剰鉄を経口的、又は非経口的に投与して、SI 及び腸粘膜の他に肝と脾の Fr-鉄と Af の変動を中心にして検討し、次の結果を得た。

1) 正常ラットに過剰鉄を1回経口投与すると、SI が急上昇し、腸粘膜の Fr-鉄は一過性に急増するが、鉄を短時間内に連続2回経口投与しても、SI 及び腸粘膜の Fr-鉄には殆ど影響がみられなかった。従って、体内に鉄不足がない場合には、腸粘膜のフェリチンは必要以上の鉄の吸収を阻止するために、一種のシグナルとして働くことが示唆された。

2) 瀉血貧血ラットに過剰鉄を1回経口投与すると、SI が急上昇して長時間高い値を持続し、又腸粘膜の Fr-鉄は徐々に増加し、かつ増加が長時間持続した。従って、瀉血貧血ラットでは、腸からの鉄吸収が活発であると同時に、腸粘膜ではフェリチンの鉄の取り込みのみならず、鉄の動員も行われ、フェリチンが鉄吸収に関与することが示唆された。

3) 正常ラットの腹腔内に過剰鉄を1回投与すると、SIは速かに著増するが、腸粘膜の Fr-鉄には殆ど変化

がなかった。非経口的に投与された鉄は、主として肝と脾に移行し、そこでフェリチン或はヘモデジリンとして貯蔵されることが示唆された。

以上より、十二指腸粘膜のフェリチンは、体内に鉄不足がない場合には、腸からの不要の鉄の吸収を阻止するように働くが、体内に鉄不足がある場合には、腸から吸収された鉄を取り込むと同時に放出して鉄の吸収に協力的に関与するものと考えられる。然し、体内に鉄の不足がない場合には、鉄を非経口的に投与しても、十二指腸粘膜のフェリチンには殆ど影響がないものと思われる。

本研究の要旨は、第42回日本血液学会(東京, 1980年4月)及び第34回日本栄養・食糧学会(札幌, 1980年8月)で発表した。

主要参考文献

- 1) Harrison, P.M. and Hoy, T.G. : *Biochem. J.* 143, 445-451, 1974.
- 2) Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D. and Finch, C.A. : *Iron metabolism in man*, p. 312-315, 1979. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- 3) Crichton, R.R. : *Topics in Hematology; Proc. 16th Internat. Congr. Hematol.*, Kyoto, 1976 (edited by Seno, S., Takaku, F. and Irino, S.), p. 437-439, 1977. Excerpta medica, Amsterdam-Oxford.
- 4) Harrison, P.M., Hoare, R.T., Hoy, T.G., Russell, S.M. and Treffry, A. : *ibid.* p. 434-436, 1977.
- 5) Jacobs, A. : *ibid.* p. 496-497, 1977.
- 6) Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Cook, J.D. and Finch, C.A. : *Iron metabolism in man*, p. 1-2, 1979. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne.
- 7) 吉川春寿 : *医学のあゆみ* 87, 651-655, 1973.
- 8) Crosby, W.H. : *Blood* 22, 441-449, 1963.
- 9) Granick, S. : *Bull. N.Y. Acad. Med.* 30, 81-105, 1954.
- 10) 吉川春寿, 中尾喜久 : *血液の生化学; 基礎と臨床* p. 228-246, 1964. 朝倉書店, 東京.
- 11) Van Campen, D. : *Fed. Proc.* 33, 100-105, 1974.
- 12) Pike, R.L. and Brown, M.L. : *Nutrition: An integrated approach*, 2nd ed., p. 289-290, 1975. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- 13) 斉藤 宏, 牧健太郎, 中沢信彦 : *医学のあゆみ* 87, 669-675, 1973.
- 14) Crichton, R.R. and Millar, J.A. : *Biochem. J.* 131, 51-59, 1973.
- 15) 荻田喜一, 中村正二郎 : *電気泳動実験法*, 4版, p. 241-274, 1967. 文光堂, 東京.
- 16) 金井 泉, 金井正光 : *臨床検査法提要*, 26版, VI p. 41-42, 1941, 金原出版, 東京.
- 17) 寺田秀夫 : *血液検査の基礎知識*, p. 88-90, 1969, 医歯薬出版, 東京.
- 18) Rohr, K. : *Das menschliche Knochenmark*, 3te Aufl., p. 109-120, 1960. Georg Thieme, Stuttgart.
- 19) Pearson, W.N. and Reich, M.B. : *J. Nutrit.* 99, 137-140, 1969.
- 20) 説田 武, 山本葉子, 内田 聖, 北出明子, 北村明美, 松田佳子 : *京都女子大学食物学会誌* 32, 19-28, 1977.
- 21) Drysdale, J.W. and Munro, H.N. : *J.B.C.* 241, 3630-3637, 1966.
- 22) Setsuda, T., Yamamoto, Y. and Shimoura, Y. : *Acta Haematol. JPN* 43, 115-123, 1980.
- 23) Conrad, M.E. and Crosby, W.H. : *Blood* 22, 406-415, 1963.
- 24) Macara, I.G., Hoy, T.G. and Harrison, P.M. : *Biochem. J.* 126, 151-162, 1972.
- 25) Pike, R.L. and Brown, M.L. : *Nutrition: An integrated approach*, 2nd ed., p. 193, 1975. John Wiley and Sons, Inc., New York.