ブロムワレリル尿素の代謝について (第1報)

家兎尿からの2-(2-Amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butyrylurea の検出¹⁾

磯野秀夫,²⁾ 狐塚 寛^{2a)}

科学警察研究所²⁾

On Metabolism of Bromvalerylurea. I.

Detection of 2-(2-Amino-2-carboxy-ethylthio)-
3-methyl-butyrylurea from Rabbit Urine

HIDEO ISONO²⁾ and HIROSHI KOZUKA^{2a)}

National Research Institute of Police Science²⁾

(Received October 7, 1974)

It is well known that 3-methylbutyrylurea is one of the metabolites of α -bromoisovalerylurea (bromvalerylurea), and the present experiment was carried out in order to find other metabolites of this hypnotic. After the administration of bromovalerylurea to a rabbit, the urine was collected daily and passed through an anion-exchange resin column. As a result of thin-layer chromatography of the fractions eluted with dil acetic acid, a new Ninhydrin-positive spot was detected much more clearly in the first 24-hr urine than in any other excreted urine. From the first 24-hr urine, this substance was obtained as a pure crystalline compound. Mass spectra, infrared spectra, and other chemical analyses suggested that this Ninhydrin-positive spot is a cysteine derivative of bromvalerylurea. Finally, this compound was determined as 2-(2-amino-2-carboxyethylthio)-3-methylbutyrylurea by comparison with a synthetic compound.

緒 言

ブロムワレリル尿素は、我国では今なお代表的な催眠剤として、あるいは鎮静剤として複合製剤に混合し、広く使用されている。

しかし、この薬剤が繁用されていると同時に、各種中毒事故に関係することも多く、この薬剤の定性³⁾・定量^{4,5)}はもとより、中毒原因の解明の立場、あるいは解毒処置の立場からもこの薬剤の代謝機構の解明が重要で

ある。

現在確認されているこの薬剤の代謝物に関しては、これを家兎に経口投与して得た排泄尿の、酸性での酢酸エチル抽出物から3-methyl-butyrylurea⁶⁻¹²⁾が確認されている。しかしこの代謝物の収量は投与量に比して非常に少なく、未だ代謝機構の中で不明な点が残されている。

我々は先に¹⁴C-標識ブロムワレリル尿素(1-¹⁴C-isovaleric acid から合成した)を家兎に経口投与して行っ

1) 日本薬学会, 第93年々会, 東京, 1973年4月要旨発表。

2) Location: 6, Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo (東京都千代田区三番町6); a) Present address: 3190, Gofuku, Toyama (富山市五福3190)。

3) 磯野秀夫, 狐塚 寛, 岸 徹, 衛生化学, **18**, 76 (1972)。

4) 狐塚 寛, 磯野秀夫, 衛生化学, **14**, 72 (1968)。

5) 磯野秀夫, 狐塚 寛, 衛生化学, **17**, 255 (1971)。

6) V. Tamminen, A.R. ALha, *Kemistilehti*, **B 32**, 119 (1959)。

7) A.S. Curry, *Nature*, **188**, 58 (1960)。

8) V. Tamminen, A.R. ALha, *Kemistilehti*, **B 34**, 9 (1961)。

9) R. Lindfors, A. Buohonen, *Arch. Toxi.*, **19**, 402 (1964)。

10) T.C. Butler, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **143**, 23 (1964)。

11) 檜府直大, 薬誌, **87**, 357 (1967)。

12) 檜府直大, 薬誌, **89**, 796 (1969)。

た予備実験¹³⁾により次の結果を得た。すなわち、①投与量の大部分は、投与後24時間尿に排泄され、以後、2—3日にわたって僅かずつ排泄される。②排泄尿の塩酸酸性エーテル抽出物中には投与量の10%程度しか移行せず、大部分は抽出されずに水層に止まる。しかも、③抽出物中には未変化体のブロムワレリル尿素は痕跡程度であった。以上の知見ならびに既知代謝物である 3-methyl-butyrylurea の排泄量と合せて考察すると、これ以外にも何らかの変化体が尿抽出後の水層に存在するものと考えられる。一方、水層からの代謝物の検出については、ブロムワレリル尿素を経口投与した人尿から S-(iso-propyl-carboxymethyl)-L-cysteine を確認した報告¹⁴⁾がある。今回は、このような水溶性分画中の代謝物についてさらに検討を加えるため、ブロムワレリル尿素を経口投与した家兎尿の検索を試みた結果、新たに 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butyrylurea (ブロムワレリル尿素にシステインが結合した意味で BC と略称する) を結晶として単離し、合成品と比較することにより同定、確認することができた。

実 験

1. 試薬 ①強塩基性陰イオン交換樹脂：アンバーライト CG-400, Cl 型, 100—200メッシュ。②カラム用シリカゲル：メルク社製, 100—200メッシュ。③ブロムワレリル尿素 (BV と略称する)：局方品, 水-エタノール混液から再結晶, mp 156°。④ニンヒドリン試液：0.1%ニンヒドリンの *n*-ブタノール溶液 (氷酢酸を3%含有)。⑤混合溶媒 A：*n*-ブタノール-氷酢酸-水 (8:1:2 v/v/v)。

2. 装置 質量分析器：日本電子製, JMS-OISG, 二重収束型, 高分解能 (乾板検出)。

赤外分光光度計：日本分光製, DS-301。

3. 試料の調製 メノウ乳鉢を用いてアラビアゴム末数 mg を少量の水とよく練りつぶし、この中に BV 1 g を少量ずつ加えて、よく練り合わせてペースト状にする。これを数 ml の水によく懸濁し、その全量を家兎 (♂, 約 3.5 kg) に胃ゾンデを用いて経口投与した。投与後の各 24 時間の排泄尿 (平均 300 ml, pH 約 8.5) を直ちに東洋ろ紙 No. 2 を用いてろ過し、その全量を 1 回分の分析用試料とした。

4. 家兎尿からの BC の分離 新鮮な試料尿 (約 300 ml) を pH 8—9 の液性でアムバーライト CG 400 (OH 型) 20 g のカラム (直径 2.7 cm) に流し、流出液が中性

になるまでカラムを水洗する (約 300—400 ml)。ついで 10%酢酸 50 ml を加え、直ちに管口部に、二連球を付したゴム栓をはめ、軽く圧力をかけてカラムの乱れを防ぎながら溶出を行ない、さらに 10%酢酸 50 ml を加え、常圧で溶出を続ける (約 5 ml/分)。溶出液はいずれも 20 ml ずつ分画し、各分画液を減圧で濃縮した後、それぞれ薄層クロマトグラフィー (展開溶媒：混合溶媒 A。発色剤：ニンヒドリン試液) を行ない、BC の有無を検する。BC は *R_f* 値 0.4—0.5 に赤紫色のスポットを示す。BC 含有分画液を集め、溶媒を減圧で留去した後、残留物を混合溶媒 A 5—10 ml に加温して溶解させ、可溶物と不溶物とに分離する。

ここで得られた溶液を 5 g のシリカゲルを用いて製したカラム (径 2 cm) に流し、混合溶媒 A 50 ml で溶出を行なう。溶出液はいずれも 5 ml ずつ分画し、各々減圧濃縮した後、BC を先と同様に薄層クロマトグラフィーで検出する。BC 含有分画液を集め、溶媒を減圧で留去する。この蒸発残留物を水 10 ml にとかし、ロータリーエバポレーターを利用して、50—60°, 常圧で 1 時間回転し、酢酸エチル 20 ml で抽出を行なう。有機層を細口ピペットを用いて除去する。この抽出操作を数回繰返す。

この水層に先の混合溶媒 A に不溶性の物質を加えて減圧濃縮し、得られた粘稠性物質を 100—500 ml の三角フラスコの器壁に広く塗布し、50—60° の水浴上で放置する。褐色粘稠液が次第に底部に溜ると同時に、帯黄色の不溶性物質が器壁に残る。この粘稠液をピペットで採取し、再び別のフラスコの器壁に広く塗布する。以上の操作を繰返して不溶性物質を集める。各器壁上の不溶性物質は、総量約 100 ml の水を用いて粥状とし、一つのフラスコに集める。これを加熱して透明液とし、活性炭 (200 メッシュ以上) 約 20 mg を加えて加熱し、熱時ろ紙でろ過する。ろ液が無色透明になるまで同操作を繰返す。ろ液を減圧濃縮すると粗結晶が得られる。さらに、これを少量の *n*-ブタノールを含んだ水に加熱して溶解し、室温で放置して再結晶を繰返し、微細な針状結晶を得る。

5. BC の合成 28%アンモニア水 0.5 ml に L-システイン塩酸塩 60 mg を溶解させ、この中にエタノール 15 ml に溶解した BV 300 mg を加えてよく混合する。この際、白濁を生じたならエタノールを少量滴加して透明な溶液とし、60—80° の水浴上で、開口状態で加温する。加温中は時々液性を調べ、必要があればアンモニア

13) 狐塚 寛, 磯野秀夫, 原子力平和利用研究成果報告書, 第5集, p. 355 (1965)。

14) K. Haruna, *J. Biochem.*, **49**, 388 (1961)。

水およびエタノールを滴加して常時アルカリ性に、またエタノールが極度に減少しないように保つ。20—30分経過すると白濁が生じてくるが、さらに加温を続けると綿状の沈殿物が現われる。この綿状沈殿物が十分生じたら加温を止める。冷後、ガラスフィルターを用いてろ過する。フィルター上の残渣は、少量の水およびエタノールで順次洗浄する。ここで得られた粗結晶を水より再結晶する。

収率：50—60%，微細な針状結晶，分解温度：208—210°（褐色），バイルシュタイン反応は陰性，ニンヒドリン試薬で赤紫色，Sの定性試験は陽性である。

ここに得られた標品のマスペクトルを Fig. 4 に示す。予想した M^+ m/e 263 は出現していないが、次に記すような各フラグメントピークが認められた。M から CONHCONH₂ 部分が脱離した m/e 176，M から Mc Lafferty 転移により $[NH=C(OH)NH_2]$ および $CH_2=CH\cdot CH_3$ が脱離した m/e 161，M から $[NH=C(OH)\cdot NH_2]$ および CO_2 が脱離した m/e 159，M から $[NH=C(OH)NH_2]$ ， $CH_2=CH\cdot CH_3$ および NH_3 が脱離した m/e 144，M から $S-CH_2\cdot CH(NH_2)COOH$ 部分が脱離した m/e 143，M から $[CH_2=CH\cdot CH_3]$ および $CH_2=C\cdot (NH_2)COOH$ 部分が脱離した m/e 134，M から $[O=C=NH]$ および $CH_2=C(NH_2)COOH$ 部分が脱離した m/e 133，M から $NH=C(OH)NH_2$ ， $CH_2=CH\cdot CH_3$ および CO_2 が脱離した m/e 117 等。これらのフラグメントイオンから、合成標品が BC の構造を有していることを示すものと考えられる。

6. BC のエチルエステルの合成 BC 約 50 μg をミクロ試験管に採り、12 N 塩酸 10 μl を加えて溶解後、エタノール 100 μl を加える。これを 60—80° の水浴上にのせ、管の底部を数時間加温し、内容物を濃縮する。この濃縮物について直接マスペクトル (Fig. 6) を測定する。

BC のエステル体には M^+ m/e 291 が明瞭に出現した。また、このエステル体の構造を特徴的に示唆する下記の一連のフラグメントイオンが認められた。すなわち、M から NH_3 が脱離した m/e 274，M から Mc Lafferty 転移により $CH_2=CH\cdot CH_3$ が脱離した m/e 249，M から $[NH_3]$ および C_2H_5 が脱離した m/e 245，M から $NH=C(OH)\cdot NH_2$ あるいは $[O=C=NH]$ および NH_3 が脱離した m/e 231 等。特に m/e 218 は M からエトキシカルボニル $\cdot COOC_2H_5$ の脱離によるもので、アミノ酸のエ

チルエステルに共通して出現するフラグメントイオンである。¹⁵⁾ m/e 102 はエステルピーク $NH_2^+\cdot CHCOOC_2H_5$ で、フェニルアラニンのような C₆ に芳香環をもつアミノ酸のエチルエステルには強く出現するが、一般には弱い。また m/e 74 はエステルピーク $NH_2^+\cdot CHCOOC_2H_5$ から Mc Lafferty 転移により $CH_2=CH_2$ が脱離したフラグメントイオンで、エステルピークに伴って出現する。¹⁵⁾ m/e 204 は M から $\cdot CONHCONH_2$ が脱離したフラグメントイオンで、N 末端遊離の酸ウレイドに共通して出現した。

以上より、合成標品のエチルエステル化反応で生成したものは、BC のカルボキシル基がエチルエステル化されたものであり、もとの合成標品は 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butrylurea であることが確認された。

結 果

1) 新ニンヒドリン陽性物質の検出

BV の水溶性代謝物を検索する目的で、先ず BV を家兎に経口投与する前の尿（ブランク尿）および投与後の尿を減圧濃縮し、この濃縮物について、直接薄層クロマトグラフィーを試みた。各種展開溶媒、発色試薬を用いて検討した結果、家兎尿中の種々の常成分が夾雑するため、クロマトグラムは大きく乱され、両者の差異を見ることは困難であった。

次に、これら主な夾雑物を除去する目的で陰・陽イオン交換樹脂、シリカゲル、セファデックス等を用いて検討した。その結果、尿を陰イオン交換樹脂に通し、その酢酸溶出液について薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリンを噴霧したクロマトグラムにはじめて両者の間に顕著な差異が認められた。さらに、このニンヒドリン陽性物質を単離し、その構造決定を行なうことを目的として分離条件を検討した。

2) ニンヒドリン陽性物質の尿への排泄について

雄家兎（約 3.5 kg）に BV 1 g を経口投与し、投与後、7 日間にわたる各 24 時間尿およびブランク尿について、実験 4 に従って分析を行なった。その結果、投与後 1 日目の 24 時間尿からは、ブランク尿と比べて極めて強いニンヒドリン陽性スポットが検出された。2 日目の尿はブランク尿よりやや強い当該スポットが認められたが、1 日目の尿に比べて極めて弱かった。3 日目以後の尿についてはブランク尿とはほとんど差異が認められなかった。

一方、このニンヒドリン陽性物質が、尿中に排泄され

15) 北原喜男，佐々木慎一，村田一郎，“有機化学における物理的方法 6 巻，マスペクトルの見方，” 共立出版，東京，1965，pp. 101—110。

た未変化体の BV から、分離操作過程で生成する可能性を調べるため、微粉末とした BV 1 g を家兎の排泄尿 (pH 9) 500 ml に混ぜ、50–60° で加温して溶解後、室温で数日間放置した。これを試料として実験 4 の分離・検出方法を試みた結果、このニンヒドリン陽性物質は確認されず従って、この物質は代謝物であると思われた。

また、この物質の排泄は家兎の雌・雄の間に顕著な差異を認めることはできなかった。

3) ニンヒドリン陽性物質の単離

以上の実験から、このニンヒドリン陽性物質は投与後 1 日目の 24 時間尿に大部分排泄されるため、投与後 1 日目の尿を対象にして、この物質の分取を行なった。実験 4 の分離操作を行なった結果、BV 1 g を経口投与した家兎尿から最終的に本物の微細な針状結晶約 3 mg を得ることができた。

4) ニンヒドリン陽性物質の化学構造

ここで得られたニンヒドリン陽性物質は酢酸エチル、エーテル、クロロホルム等の有機溶媒に不溶。28% アンモニア水、氷酢酸、メタノール、エタノール、*n*-ブタノールに難溶。また、常温では水に難溶であるが、多量の熱水には可溶、塩酸酸性で水に易溶であった。混合溶媒 A を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィーでは R_f 値 0.45 を示し、S の定性反応は陽性、バイルシュタイン反応は陰性であった。

また、この物質のマイクロ錠剤法による赤外吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。1680 cm^{-1} に $-\text{CONH}-$ 結合に基づく CO の伸縮振動が現われており、また 1600 cm^{-1} 附近に、アミノ酸の NH_3^+ の変角振動および CO_2^- の伸縮振動に起因すると考えられる吸収がみられた。さらに、尿素の N 末端遊離の低級脂肪酸のウレイドに共通して強く現われる 1100 cm^{-1} 付近の吸収として、1095 および 950 cm^{-1} の吸収がみられた。

以上よりこの物質はイオウを有するニンヒドリン陽性化合物であり、有機溶媒に難溶性、しかも赤外吸収スペクトルでは酸アミドの結合を示唆しているところから、物質は BV とシステインが、それぞれ Br 部と SH 部で結合した化合物であると推定し、BV のシステイン誘導体を合成し、比較したところ合成標品の溶解性、赤外吸収スペクトル (Fig. 2) は、尿から単離したもの (Fig. 1) と全く一致した。

さらに、この物質のマススペクトルを測定した結果を Fig. 3 に示すように、これには期待した親イオン m/e 263 は出現しなかったが、合成標品のそれ (Fig. 4) と全く一致した。

また、BV を家兎に投与し、その尿から単離されたニ

Fig. 1. Infrared Spectrum of Isolated BC from Rabbit Urine Administered with α -Bromoisovalerylurea

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

Fig. 2. Infrared Spectrum of Synthesized BC

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

Fig. 3. Mass Spectrum of Isolated BC from Rabbit Urine Administered with α -Bromoisovalerylurea

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

Fig. 4. Mass Spectrum of Synthesized BC

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

Fig. 5. Mass Spectrum of Ethylester of Isolated BC from Rabbit Urine Administered with α -Bromoisovalerylurea

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

Fig. 6. Mass Spectrum of Ethylester of Synthesized BC

BC: 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea

ンヒドリン陽性の結晶についても、実験6に基づき、エチルエステル化を行った。このもののマスペクトルをFig. 5に示すように M^+ m/e 291 が明瞭に出現し、主なフラグメントイオンも合成標品のそれ (Fig. 6) と全く一致した。

以上の諸実験から、BV を家兎に経口投与し、その尿から得たニンヒドリン陽性の結晶は 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea (BC) の構造で

ある。

考 察

この実験において、BV を経口投与した家兎の尿から 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butylurea が結晶として単離された。この化合物が生成される機構については未だ不明な点もあるが、この種の誘導体を生成する機構が生体内に存在することは既に多くの報告があり、特にメルカプツール酸誘導体の生成は一般によく知られている。

基質である化合物の反応部位について考察すると、今回得られた BC は BV の臭素部分とシステインの SH 部分で結合した形である。これと類似するものとしては、例えば、1-モノクロロ-*n*-ブタン¹⁶⁾ のようなハロゲン化アルキルおよびベンジルハライド^{17,18)} も同様にハロゲン部分でメルカプツール酸誘導体を生成することが知られている。

しかし、この種の誘導体の生成には、必ずしも基質化合物がハロゲンを有している必要はなく、ベンゼン、ナフタリン、^{19,20)} フェナントレン、²¹⁾ アントラセン、²²⁾ ピレン、²³⁾ ベンツアントラセン、²⁴⁾ モノクロロベンゼンのようなハロゲン化ベンゼン、²⁵⁻²⁸⁾ 芳香族アミン²⁹⁾ 等の芳香族化合物およびニトロブタン³⁰⁾ 等の脂肪族化合物についての報告があり、これらの化合物は分子中の活性な水素原子がメルカプツール酸誘導体の生成に関与していることを示している。

さらにハロゲンを有しているものでも選択性があり、例えば、3,4-ジクロロニトロベンゼン、2,3,4-トリクロロニトロベンゼン等の代謝³¹⁾ に見られるように、ハロゲン部位でメルカプツール酸誘導体を生成する場合でも、核に置換しているハロゲンのうち、ニトロ基に対してオルトまたはパラ位のハロゲンが関与する。従って、以上

- 16) T.H. Grenby, L. Young, *Biochem. J.*, **75**, 28 (1960).
- 17) R.H. Knight, L. Young, *Biochem. J.*, **70**, 111 (1958).
- 18) J.A. Stekol, *J. Biol. Chem.*, **124**, 129 (1938).
- 19) S.H. Zbarsky, L. Young, *J. Biol. Chem.*, **151**, 211 (1943).
- 20) M.C. Bourne, L. Young, *Biochem. J.*, **28**, 803 (1934).
- 21) E. Boyland, P. Sims, *Biochem. J.*, **84**, 564 (1962).
- 22) E. Boyland, A.A. Levi, *Biochem. J.*, **30**, 1225 (1936).
- 23) E. Boyland, P. Sims, *Biochem. J.*, **90**, 391 (1964).
- 24) E. Boyland, *Brit. Med. Bull.*, **20**, 121 (1964).
- 25) M. Jaffé, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **12**, 1092 (1879).
- 26) E. Baumann, C. Preusse, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **12**, 806 (1879).
- 27) E. Baumann, P. Schmitz, *Hoppe-Seyl. Biochem. Z.*, **20**, 586 (1895).
- 28) W.M. Azouz, S.H. Zbarsky, *J. Biol. Chem.*, **154**, 389 (1944).
- 29) E. Boyland, D. Manson, R. Nery, *Biochem. J.*, **86**, 263 (1963).
- 30) M.M. Barnes, S.P. James, P.B. Wood, *Biochem. J.*, **71**, 680 (1959).
- 31) H.G. Bray, S.P. James, W.V. Thorpe, *Biochem. J.*, **67**, 607 (1957).

の事実と合せて、今回得られた BC を考察すると、BV の臭素とシステインが直接置換して BC が生成したものか、あるいは BV の脱ブロム体を中間体として生成したものであるかは代謝経路を考える上で重要となる。

低級脂肪酸のシステイン誘導体については、アイソバルシン³²⁻³⁶⁾ (イソ吉草酸の C α でシステインとチオエーテル結合) が高コレステロール血症患者の尿中に、またこのものはネコの尿中に常成分として存在することが報告され、アイソブチン³⁵⁾ (イソ酪酸の C β でシステインとチオエーテル結合) が人尿中に常成分として存在し、酢酸とシステインがチオエーテル結合したものが³⁷⁾ 糖尿病または高血圧患者の尿中に、また山羊の睾丸や雄牛の肝臓 (微量) に常成分として存在することが報告されている。低級アルコールのシステイン誘導体としてフェリニン³⁸⁾ (イソプロパノールの C γ でシステインとチオエーテル結合) がネコの尿中に常成分として存在するとの報告がある。しかし、低級脂肪酸のウレイド化合物にシステインが結合したものについては、常成分として存在するとの報告がないため、BV 投与尿から得られ

た BC は BV の代謝物と考えられる。

また、BC の生成を有機化学的な面から考察すると、一般にハロゲン化アルキルはアルカリ性の条件下でチオール化合物あるいは硫化アルカリと反応してスルフィドを容易に生成し、また、オレフィン類もメルカプタン等が付加してスルフィドを生成する。従って、今回得られた BC が酵素反応によるものか、あるいは非酵素的反応に基づいて生成したかは興味ある問題であるが、これについては検討中である。

結 論

1. ブロムワレリル尿素 (BV) 1 g を家兎に経口投与し、その24時間排泄尿から新ニンhidリン陽性物質を検出し、結晶として単離した。
2. この物質のマスペクトルを解析し、一方、この物質を合成することにより、この代謝物の化学構造は 2-(2-amino-2-carboxy-ethylthio)-3-methyl-butrylurea (BC) であることを確認した。
3. BC を検出し、結晶として取出す分析方法、BC の合成法ならびに BC のマイクロエステル化方法を確立した。

-
- 32) S. Mizuhara, K. Okuda, K. Kurahashi, Y. Iwada, *J. Biochem.*, **46**, 101 (1959).
 - 33) S. Oomori, S. Mizuhara, *Biophys. Res. Comm.*, **3**, 343 (1960).
 - 34) S. Mizuhara, S. Oomori, *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 53 (1961).
 - 35) 水原舜爾, 生化学, **33**, 354 (1961).
 - 36) S. Oomori, Mizuhara, *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 179 (1963).
 - 37) I. Ubuka, H. Kodama, S. Mizuhara, *Biochem. Biophys. Acta.*, **141**, 266 (1967).
 - 38) R.G. Westall, *Biochem. J.*, **55**, 244 (1952).