〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
30 (6) 356-362 (1984)

フタル酸エステルの人血清及び血漿中の分解並びに血液製剤中の定量

新谷英晴,^a 辻 楠雄,^a 水町彰吾,^a 大場琢磨,^a 越村栄之助^b
国立衛生試験所療品部,^a 東京都駒込赤十字血液センター^b

The Breakdown of Phthalates in Human Serum and Plasma
and Their Determination in Blood Products

HIDEHARU SHINTANI,^a KUSUO TSUJI,^a SHOGO MIZUMACHI,^a
TAKUMA OBA^a and EINOSUKE KOSHIMURA^b
National Institute of Hygienic Sciences, Department of Medical
Devices,^a 18-1, Kamiyoga 1-chome, Setagaya-ku, Tokyo 158,
Japan and Tokyo Komagome Red Cross Blood Center,^b 2-2,
Komagome 2-chome, Toshima-ku, Tokyo 170 Japan

(Received May 8, 1984)

Di 2-ethylhexyl phthalate (DEHP), mono 2-ethylhexyl phthalate (MEHP), and phthalic acid (PA) in human serum or plasma were determined by high performance liquid chromatography and serum or plasma pretreatment methods were also studied. We determined these compounds in blood products and studied what amount of these compounds in flexible bags were migrated into blood products and studied whether MEHP and PA in blood products were produced by the enzymatic action to DEHP. From the comparison of the amount of these compounds in blood products and the amount in flexible bag, it was clarified that MEHP and PA was produced by the action of lipase and esterase to DEHP. The action of esterase was greater than that of lipase and the pathway of MEHP to PA was a rate determining step of DEHP hydrolysis.

Keywords — plasticizer; medical device; blood product; polyvinyl chloride; di 2-ethylhexyl phthalate; plasticizer-plasma protein binding; phthalate enzymatic hydrolysis; HPLC; lipase; esterase

緒 言

医療用具 例えば 血液 バックや 血液チューブ等の材質に主としてポリ塩化ビニル (PVC) が用いられている。そして PVC の可塑剤として主にフタル酸ジ-2-エチルヘキシルエステル (DEHP) が使用されている。近年、DEHP の毒性が問題にされ、^{1a)} その安全性について議論されている。^{1b)} 更に DEHP は熱や酵素によりフタル酸モノ-2-エチルヘキシルエステル (MEHP) やフタル酸 (PA) に変化することが指摘されており、²⁾ これらの化合物の安全性についても考慮する必要がある。特に MEHP は DEHP より強い毒性を有するという報告^{1b, 3)} がある。

我々は衛生化学的見地から血液バッグから血液製剤中

への DEHP, MEHP 及び PA の溶出移行を検討する目的で高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて血液製剤中のこれらの化合物を定量した。DEHP については同様な実験が既になされている。⁴⁾ また、これらの化合物の人血漿蛋白との結合を調べた。更に血液バッグ中に含まれる DEHP, MEHP 及び PA を定量し、人血漿中へ移行する割合を調べた。DEHP を含む人血漿を加温して MEHP 及び PA へ変化する割合とエステラーゼ及びリパーゼを血漿に添加して DEHP の加水分解反応が酵素によるかどうかを調べた。従来の報告⁵⁾ では、阻害剤等を用いた検討がなされていなかった。それゆえ我々が検討したところ興味ある結果が得られたので先の結果と合わせて報告する。

実験方法

1. 試薬 MEHP 及びフタル酸モノメチルエステル (MMP) を除いて市販試薬特級品を用いた。MEHP, MMP は既報⁶⁾により合成した。リパーゼ (ベーリンガー, リパーゼ [I], EC3.1.1.3, 抽出源 クモノスカビ, 比活性 14901 U/mg), エステラーゼ (ベーリンガー, EC3.1.1, 抽出源 ブタ肝臓, 比活性 100 U/mg) リパーゼ及びエステラーゼキット (大日本製薬)。

2. 試料 新鮮凍結人血漿 (日赤, -30°C 1週間保存),⁷⁾ 濃縮血小板血漿 (日赤, 22°C 2日間保存, その間1日間は超遠心処理を行なう),⁷⁾ 人血清 (日赤 ガラス瓶保存), 人血漿 (日赤, 凍結21日間保存), プラスマネート® (ミドリ十字, 分画後ガラス瓶中で60°C 10時間加熱処理を行なう),⁷⁾ 乾燥人血漿 (日本製薬), 人血漿及び馬血漿 (日本生物材料センター, 日生材と略す, 人血漿については 2°C 25日間保存), 馬血清 (フロー社, ガラス瓶保存), 血液バッグ (テルモ社, 材質PVC)。

3. 装置 高速液体クロマトグラフ: 島津 LC-3A, 紫外吸光検出器: 島津 SPD2A, カラム: センシュア

ック 5C18, データ処理装置: クロマトパック C-R1A, 限外濾過装置: アミコン MPS-3。

4. 実験操作 我々が確立した HPLC 条件と血清及び血漿前処理条件を Table I に示した。Table I の条件で得られた血清 DEHP, MEHP 及び PA の代表的なクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

結果及び考察

1. 赤外吸収スペクトル (IR) 及び核磁気共鳴スペクトル (NMR) による MMP, MEHP の同定

当室で合成したこれらの化合物の IR, NMR 及びマススペクトルを測定し (Fig. 2, 3, マススペクトルのデータ省略) 同定した。

2. 限外濾過法を用いた DEHP, MEHP 及び PA と血清あるいは血漿蛋白との結合率の測定

DEHP, MEHP 及び PA が検出されなかった人血清 5—8 ml に DEHP の 39.08 mg/ml のヘキサン溶液 10 μ l 及び MEHP, PA のそれぞれ 39.4, 10 mg/ml のアセトニトリル: 水 (60:40) 溶液それぞれ 10 及び 20 μ l を添加し, よく攪拌した後一昼夜 4°C に静置したものと DEHP, MEHP 及び PA で汚染されており, その濃度

TABLE I. Running Conditions for HPLC and the Condition for Pretreatment of Phthalate

HPLC			
Compound	PA	MEHP	DEHP
Injection volume (μ l)	10	10	10
Column	SENSHU PAK 5C18 (4.6 $\times$ 150 mm)		
Temperature	Ambient		
Flow rate (ml/min)	0.8	0.8	1.2
Detection	UV 254 nm		
Retention time (min)	4.6	10.6	6.0
Mobile phase	a)	b)	c)
Internal standard	MMP ^{d)}	MBP ^{e)}	DnOP ^{f)}
Pretreatment			
Serum PA	Serum 1 ml, water 3ml and 50% phosphoric acid 0.1 ml were mixed and after ultrafiltration by centrifree MPS-3, the ultrafiltrate was injected into HPLC.		
Serum MEHP	Serum 1 ml, 50% phosphoric acid 50 μ l and the mixing solution of ethylether: methanol (2:1) 3 ml were mixed, kept one day at 4°C, again mixed and after applying centrifuge the upper layer of ether was injected into HPLC.		
Serum DEHP	Serum 1 ml, 1 N sodium hydroxide 1 ml and acetonitrile 3 ml were mixed and after applying centrifuge the upper layer was injected into HPLC.		

a) Five mM mono sodium phosphate aqueous solution: acetonitrile, 80:20, pH 2.8.

b) Five mM mono sodium phosphate aqueous solution: acetonitrile, 50:50, pH 2.8.

c) Water: acetonitrile, 10:90.

d) Mono methyl phthalate.

e) Mono butyl phthalate.

f) Di *n*-octyl phthalate.

PA: phthalic acid, MEHP: mono 2-ethylhexyl phthalate, DEHP: di 2-ethylhexyl phthalate.

Fig. 1. Typical Chromatogram of Phthalic Acid (PA), Mono 2-Ethylhexyl Phthalate (MEHP) and Di 2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP) in Serum

Arrows a, b, and c indicate peaks of PA, MEHP and DEHP, respectively. Concentration of PA, MEHP and DEHP were 6.1, 39.4 and 26.0 $\mu\text{g/ml}$, respectively and 10 μl was injected. Retention time of PA, MEHP and DEHP were 4.6, 10.6 and 6.0 min, respectively. Conditions of serum pretreatment and HPLC were mentioned in the text.

Fig. 2. Infrared Spectra of Mono 2-Ethylhexyl Phthalate (Upper) and of Mono Methyl Phthalate (Down)

Sampling method for mono 2-ethylhexyl phthalate was sodium chloride film sandwich method and for mono methyl phthalate was potassium bromide tablet method.

(DEHP 69.6, MEHP 6.7, PA 2.6 $\mu\text{g/ml}$) が既知の人血漿を試料として用いた。これらを限外濾過し、濾液中のこれらの化合物を定量し、DEHP, MEHP 及び

Fig. 3. Nuclear Magnetic Resonance Spectra of Mono 2-Ethylhexyl Phthalate (Upper) and of Mono Methyl Phthalate (Down)

Nucleus; ^1H , zero reference; Tetra-methylsilane (TMS), sample temperature; ambient, solvent; CDCl_3 .

PA と血清及び血漿蛋白との結合率を調べた。その結果、血清中の DEHP, MEHP 及び PA はそれぞれ 0, 3.3 及び 76.8 %が、そして血漿中ではそれぞれ 0, 1.0 及び 73.2%が非結合型で存在していることがわかった。

3. 血溶バッグ中の DEHP, MEHP 及び PA の定量と人血漿中への移行

血液バッグの血液と接触する部分 (約 15 g) のうち約 1 g を正確に採り細断し、これにエチルエーテル及びリン酸酸性エチルエーテル (pH 2) をそれぞれ 100 ml 添加した。室温で 4 日間攪拌し、汙別したのち溶媒を留去し、移動相に再溶解後、DEHP, MEHP 及び PA を定量した。その結果、血液バッグをエーテル抽出した時の DEHP, MEHP 及び PA の総抽出量はそれぞれ $3128.1 \pm 179.4 \text{ mg}$, $130.8 \pm 14.3 \mu\text{g}$ 及び $0 (n=3)$ であった。リン酸酸性エーテル抽出量もこれらとほぼ同じ値であった。DEHP, MEHP 及び PA の血小板血漿への総移行量がそれぞれ 4005.0 ± 457.5 , 589.5 ± 101.3 及び $9.0 \pm 1.2 \mu\text{g} (n=3)$ であった (Table II の血小板血漿の総容量は 15 ml) ので DEHP は約 0.13% が血液バッグから血小板血漿中に移行していることがわかった。血液バッグ中で検出されなかった PA が血漿中で検出されたこ

とから PA は溶出した DEHP より酵素的加水分解を受けて生じたものであると考えられる。同時にこの推察は血液バッグ中の DEHP : MEHP の比が約 24000 : 1 であったにもかかわらず、血小板血漿中ではその割合が約 7 : 1 であったことから MEHP についてもあてはまると考えられる。

PVC に添加するための工業用 DEHP (石川製作所) の 10000 ppm 中には不純物としての MEHP 及び PA は検出されなかった。このことから血液バッグ中に検出されなかった MEHP (DEHP の約 $4 \times 10^{-3}\%$) は PVC 成型工程中に DEHP より加熱のために生成した可能性が考えられた。

4. 人血漿中のリパーゼ及びエステラーゼ活性値とミハリス定数 (K_m)

人血漿中のリパーゼ及びエステラーゼの活性値を測定したところ、それぞれ 10.73 ± 0.44 及び 47.04 ± 5.15 ($n=3$) $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ であった。人血漿 20 ml に種々の濃度の DEHP を添加し、更にリパーゼあるいはエステラーゼをそれぞれ等重量 (1 mg) 添加して Lineweaver Burk プロットよりリパーゼ及びエステラーゼの DEHP に対する K_m を求めたところ、それぞれ 1.47 及び 0.46 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ であった。以上の結果よりエステラーゼの方がリパーゼより DEHP に対し親和性が高いことがわかった。

5. 加水分解酵素添加及び無添加時における人血漿中の DEHP, MEHP 及び PA 量の経時変化

DEHP を含む人血漿 100 ml を 37°C の水浴で振盪し、経時的に DEHP, MEHP 及び PA を定量した (Fig. 4a)。DEHP は経時的に減少し、MEHP, PA は経時的に増加した。次いで DEHP を含む人血漿 25 ml にリパーゼ (3.6 mg/ml, 比活性 54185 U/ml), エステラーゼ (10 mg/ml, 比活性 1000 U/ml) を 100 μl ずつと、それぞれ 280 μl 及び 100 μl 添加したものを 37°C で振盪し、経時的に DEHP, MEHP 及び PA 量を定量した (Fig. 4b, c)。その結果、リパーゼ及びエステラーゼを添加することにより DEHP の減少速度あるいは MEHP の増加速度が無添加時 (Fig. 4a) に比べ増大することがわかった。エステラーゼとリパーゼの血漿 DEHP 加水分解反応に対する寄与の大小を比較したところ、比活性がエステラーゼの方が 54—150 倍低いにもかかわらず、その寄与はエステラーゼの方がはるかに大きかった。PA の増加速度が MEHP の増加速度より、はるかに小さいことから (Fig. 4a, b, c) DEHP $\rightarrow$ MEHP $\rightarrow$ PA の一連の加水分解反応で律速段階は既報⁸⁾ のような DEHP $\rightarrow$ MEHP ではなく、MEHP $\rightarrow$ PA の反応であると推察

された。リパーゼ 280 μl 添加の場合も 100 μl 添加の場合とほぼ同じ経時変化を示した。酵素添加の場合 (Fig. 4b, c) も無添加の場合 (Fig. 4a) と同様 DEHP の減少モル数と、MEHP と PA の合計の増加モル数との間には化学量論が成立していたことから 4—6 時間の反応中には DEHP より MEHP 及び PA 以外のアルキルフタレートは生成しないと考えられる。

更に血漿中の MEHP 及び PA の生成が DEHP に対するエステラーゼとリパーゼのいずれの作用によるか調べるため、血漿各 20 ml にエステラーゼ阻害剤 (フェニルメチルスルホニルフルオリド)⁹⁾ のそれぞれ 3.48 及び 13.92 mg/ml 各 2 ml ずつを添加し、 37°C で振盪して DEHP, MEHP 及び PA の経時変化を調べた (Fig. 5)。その結果、2 時間後まで調べたが、血漿中の DEHP, MEHP 及び PA の経時変化はほとんど見られなかった。しかも阻害剤の濃度による差はなかった。これらの阻害剤の濃度でエステラーゼは完全に阻害されている。⁹⁾ それゆえ Fig. 4 に示した血漿中の DEHP の経時的減少、MEHP 及び PA の経時的増加は、主としてエステラーゼの作用によると推察され、同時に DEHP に対するリパーゼの加水分解作用の寄与と 37°C 加温による DEHP に対する非酵素的分解作用の寄与は小さいと推察された。次いで 2 時間経過後、それぞれに血液バッグ 4.5 g の細片を添加し、 37°C に加温して、DEHP, MEHP 及び PA の経時変化を調べた。その結果、DEHP は顕著に増大したが、エステラーゼが阻害されているため、MEHP 及び PA の増加は緩慢であった。この現象に阻害剤の濃度による差はみられなかった。今回用いた血漿のエステラーゼは完全に阻害されているにもかかわらず、MEHP 及び PA がわずかながら増加した理由は、血漿中に存在しているリパーゼの加水分解作用によると推察された。そこでリパーゼ作用を停止させるため、5.5 時間経過後の血漿中にリパーゼキットの反応停止液 (アニオン界面活性剤) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 2 ml を添加したところ MEHP 及び PA の経時変化は見られなくなった。

エステラーゼ阻害剤に代えてリパーゼ阻害剤 (ジイソプロピルフルオロホスフェートあるいは SDS^{9,10)}) を血漿中の濃度として 2—4 mM 添加し、2 時間振盪した後、先と同様の血液バッグの細片 4.5 g を添加し、更に続けて 3.5 時間振盪した場合の MEHP の増加速度は、エステラーゼ阻害剤添加の場合の MEHP の増加速度より大きかった。DEHP の増加速度は両者の間でほとんど差はみられなかった。更に MEHP の増加速度はリパーゼ阻害剤の種類及び濃度により大きな影響を受けなか

Fig. 4. Changes of the Concentration of Di 2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP), Mono 2-Ethylhexyl Phthalate (MEHP) and Phthalic Acid (PA) When They Are Incubated at 37°C

(a): Incubated without addition of enzymes to plasma.

○: DEHP, △: MEHP, ▽: PA.

(b): Incubated with addition of lipase (3.6 mg/ml) 100 μl or esterase (10 mg/ml) 100 μl to plasma.

(c): Incubated with addition of lipase (3.6 mg/ml) 278 μl or esterase (10 mg/ml) 100 μl to plasma.

	DEHP	MEHP	PA
lipase added	●	▲	▼
esterase added	○	△	▽

った。

また、血液バッグの添加と同時に、エステラーゼ阻害剤及びリパーゼ阻害剤を同時に添加した場合、DEHPは経時的に顕著に増加したが MEHP 及び PA の経時変化は見られなかった。

Fig. 4 及び Fig. 5 の実験結果及び人血漿中のエステラーゼの活性値がリパーゼの活性値に比べて高かったことやエステラーゼの方がリパーゼよりも DEHP に対し親和性が高かったことから、血漿 DEHP に対する加水分解作用はリパーゼとエステラーゼによるが、その寄与はエステラーゼの方が大きいことがわかった。

6. 血液製剤中の DEHP, MEHP 及び PA の定量

血液製剤である新鮮凍結人血漿、濃縮血小板血漿、加

熱人血漿蛋白 (プラスマネート®)、乾燥人血漿、人血漿及び馬血漿を用い、PVC で製造された血液バッグから、これら血液製剤中への DEHP, MEHP 及び PA の溶出移行量を定量した (Table II)。その結果、血液バッグとの接触時間、貯蔵温度等の差異により可塑剤の溶出量に違いが見られた。貯蔵温度が高く (22°C) 長時間超遠心操作を受けた濃縮血小板血漿中への DEHP 溶出量が顕著に多く、MEHP の量も多かった。毒性の強い MEHP が凍結人血漿と濃縮血小板血漿中に DEHP の約 1/7-1/17 量が検出されたことは注目しなければならない。血液バッグで採血し、1 時間後血漿を分離したのちガラス瓶中で 60°C、10 時間加熱して製造されたプラスマネート中の DEHP は熱及び酵素の作用によりほとん

TABLE II. Concentration of Plasticizer in Several Blood Products

Sample	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	PA	MEHP	DEHP
Fresh frozen human plasma NISSEKI ($n=3$)	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3	26.7 ± 0.3
Concentrated human plasma platelet NISSEKI ($n=3$)	0.6 ± 0.1	39.3 ± 6.8	267.0 ± 30.5
Plasmanate ($n=3$)	12.0 ± 1.0	0.9 ± 0.1	2.0 ± 0.2
Dried human plasma ($n=3$)	0.7 ± 0.1	N.D.	1.0 ± 0.1
Human plasma NISSEKI ($n=3$)	3.0 ± 0.4	5.6 ± 1.1	72.5 ± 2.9
Human serum NISSEKI ($n=3$)	N.D.	N.D.	N.D.
Human plasma NISSEIZAI (imported from USA ($n=2$))	4.9 ± 0.0	54.4 ± 2.5	172.6 ± 5.6
Horse plasma ($n=1$)	0.6	0.4	2.2
Horse serum ($n=3$)	N.D.	N.D.	N.D.

DEHP: di 2-ethylhexyl phthalate, MEHP: mono 2-ethylhexyl phthalate, PA: phthalic acid, N.D.: not detected.

Fig. 5. Changes of the Concentration of Di 2-Ethylhexyl Phthalate (DEHP), Mono 2-Ethylhexyl Phthalate (MEHP) and Phthalic Acid (PA) When They Are Incubated at 37°C

From incubation start to 2 h, esterase in plasma was inhibited and two h later after start, PVC film was added into the incubated plasma and 5.5 h later after start, lipase in plasma was inhibited.

↓: indicates the time when PVC film was added.

↓↓: indicates the time when lipase was inhibited.

○: DEHP, △: MEHP, ▽: PA.

ど PA まで加水分解されていた。人血漿（日生材）中の DEHP, MEHP 及び PA は顕著に多かった。これはアメリカより輸入されたもので 22°C で長期間保管されていた。それゆえ、保管中に人血漿（日赤）に比べ多量の DEHP が溶出したものと思われる。更に 22°C にて保管されていたため、溶出した DEHP が MEHP 及び PA に変化しやすかったものと思われる。

結 論

血液製剤中への血液バッグからの DEHP の溶出量は攪拌時間や貯蔵温度等により差が見られた。血小板血漿中には、かなり大量の DEHP が検出された。MEHP の量は DEHP の溶出量の約 1/7 であった。DEHP 以外に MEHP 及び PA が検出されたことから加水分解酵素の関与が考えられる。高温長時間加熱して製造されたプラスマネート中の DEHP はほとんど PA まで加水分解されていた。人血漿（日生材）は 22°C で長期間保管されていたため DEHP の溶出と MEHP 及び PA への分解が人血漿（日赤）に比べ顕著に多かった。

DEHP, MEHP 及び PA のそれぞれ、100, 97—99, 約 25% が血漿あるいは血清蛋白と結合していた。

血液バッグに含まれる DEHP の約 0.1% が血漿中へ移行することがわかった。血漿中で検出された MEHP 及び PA のほとんどは血液バッグから移行したものではなく、移行した DEHP に対する加水分解酵素の作用で生じたものであることがわかった。

DEHP を含む人血漿を 37°C で加温したところ DEHP が減少し、MEHP 及び PA が増加した。これらの間には化学量論が成立していた。DEHP を含む人血漿にリパーゼあるいはエステラーゼを添加したものと添加しないものとの間で DEHP, MEHP 及び PA の変化速度を比較したところ、酵素が添加された血漿中の DEHP, MEHP 及び PA の変化速度は無添加の場合の

変化速度より著しく大きかった。また、変化速度は比活性がエステラーゼの方がリパーゼよりはるかに小さいにもかかわらず、エステラーゼ添加の方がリパーゼ添加の場合より著しく大きかったことや、人血漿中の活性値や親和性がエステラーゼの方がリパーゼより大きかったこと、更にエステラーゼあるいはリパーゼ阻害剤を用いた実験結果から人血漿中の DEHP 加水分解反応はエステラーゼとリパーゼによるが、その寄与はエステラーゼの

方が大きいことがわかった。酵素を添加した場合も添加しない場合も PA の生成速度が極端に小さかったことから DEHP→MEHP→PA の一連の加水分解反応において MEHP→PA の反応が律速段階であると考えられる。

謝辞 血液製剤を提供していただいた日本赤十字社中央血液センターに謝意を表します。

引用文献および注

- 1) a) A.F. Kaul, P.F. Souney, R. Osathanondh, *Drug Intell. Clin. Pharm.*, **16**, 689 (1982); J.A. Thomas, S.J. Northup, *J. Toxicol. Environ. Health*, **9**, 141 (1982); b) Conference on phthalate, June 9-11 (1981) Washington DC, *Environ. Health Perspect.*, **45**, 1 (1982).
- 2) C.C. Peck, D.G. Odom, P.W. Albro, D.A. Jess, B.B. Barrett, *Transfusion*, **21**, 163 (1981).
- 3) K. Yoshikawa, A. Tanaka, T. Yamaha, H. Kurata, *Fd. Chem. Tox.*, **21**, 221 (1983).
- 4) 笹川 滋・徳永栄一, 大野 修, 日本輸血学会誌, **20**, 100 (1974).
- 5) J.E. Carter, D.B. Roll, R.V. Petersen, *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 341 (1974); P.W. Albro, R.O. Thomas, *Biochim. Biophys. Acta.*, **360**, 380 (1973).
- 6) I. Chu, D.C. Villeneuve, V. Secours, C. Franklin, G. Rock, A. Viau, *Drug Metab. Dispos.*, **6**, 146 (1978).
- 7) 大戸 斉, モダンメディア, **30**, 137 (1984).
- 8) R. Gollamudi, H.R. Prasanna, R. Hanumantha Rao, W.H. Lawrence, J. Autian, *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**, 623 (1983); P.W. Albro, R. Thomas, L. Fishbein, *J. Chromatogr.*, **76**, 321 (1973); J.E. Carter, D.B. Roll, R.V. Perterson, *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 341 (1974).
- 9) S. Kurooka, S. Okamoto, M. Hashimoto, *J. Biochem. (Tokyo)*, **81**, 361 (1977).
- 10) R. Paoletti, D. Kritchevsky ed., "Advances in Lipid Research" Vol. 3, Academic Press, New York and London, 1965.