Str. faecalis の葉酸代謝及びこれに及ぼすビタミン B₁₂ 並びに 2, 3 アミンの影響について

田 中 定 平

名古屋大学医学部細菌学教室 (指導 小笠原一夫教授)

[受付: 6 月 15 日 1956 年]

はじめに

当教室における疫痢の成因に関する一連の研究によれば, 宿主腸管内における正常細菌叢を構成する *Streptococcus faecalis* と疫痢原因菌とみなされる *Shigella*, *Escherichia* などとは拮抗関係にあり, *Str. faecalis* の一新代謝物質 “Enterocin” により上記の疫痢原因諸細菌の発育が阻害されることがみとめられた¹⁾²⁾。

また主としてビタミン B 群の不足する動物はヒスタミンその他の細菌産生アミンに対する抵抗力が著しく減弱するが, この抵抗力の減弱は少くともビタミン B 群に属する葉酸 (PGA) の投与により防止されること及び, この減弱効果の防止は PGA の生体内誘導体ケトロボルム因子 (CF, folinic acid) の作用であることが考えられるにいたつた。³⁾⁴⁾⁵⁾

生体内における CF は摂取食餌中にふくまれる CF の生体内吸収によるものの外に, 同じく摂取された PGA が肝, 腎等の組織に存在する一酵素系により CF に転換されることも基因することは言うまでもない。

私は茲に *Str. faecalis* が PGA を CF に転換する強力な酵素作用を有することを報告し且つ, PGA → CF 反応にヒスタミンその他のアミンが影響を与えるか否かを吟味し, 併せてビタミン B₁₂ が PGA → CF に及ぼす酵素学的意義を検索し, 疫痢における腸内細菌叢としての *Str. faecalis* の意義にふれたいと思う。

なお, 本文にて取扱う術語につきあらかじめ次の様に約束しておきたい。

即ち, 葉酸 (FA) という言葉は *Lactobacillus casei* あるいは *Streptococcus faecalis* の発育を刺激する PGA や CF を含めた一群の物質の代表語と考え, PGA (pteroylglutamic acid) という言葉は合成した化合物だけをさし, チトロボルム因子 (CF) は *Leuconostoc citrovorum* 8081 の発育を著しく促進する物質を呼ぶこ

とにする。

CF の合成品が leucovorin である。

実 験

(I) 実験の材料と方法

1) FA の測定法

微生物学的測定法を採用した。

スネル基礎培地 (Table 1)⁶⁾ を選出し, *Str. faecalis* No. 8181 を測定菌株とし Turbidimetry 法によりその透

Table 1. FA 測定用基礎培地 (× 2)

* salt A	2 ml	P. A. B. A.	10.0 r
* salt B	2 ml	calcium	
sodium acetate	2.0 g	pantothenate	50.0 r
glucose	2.0 g	nicotinic acid	50.0 r
cystine	10.0 mg	pyridoxine	100.0 r
uracil	1.0 mg	casein	
adenine	1.0 mg	hydrolysate	2.0 g
guanine	1.0 mg	tryptophane	5.0 mg
biotin	0.4 r	final	50.0 ml
thiamine	50.0 r	pH	6.8
riboflavin	50.0 r		

* salt A { KH_2PO_4 5.0 g
 K_2HPO_4 5.0 g
 H_2O (to make 50 ml)

* salt B { $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g
 NaCl 0.5 g
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g
 $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.337 g
 H_2O (to make 250 ml)

TANAKA Sadahei: Effects of vitamin B₁₂ and some biogenic amines on the conversion of pteroylglutamic acid to citrovorum factor by *Str. faecalis*. Department of Bacteriology, Nagoya University School of Medicine. Jap. J. of Bact., 11 (10), 879-884, 1955.

本論文の要旨は昭和 31 年 (1956) 4 月 4 日第 29 回日本細菌学会総会において発表した。

過度 Transmission % (T) を算出し、試料含有葉酸量を比較検討した。

2) CF の測定法

FA の測定法に準拠し、近藤等による Sauberlich 改良基礎培地 (Table 2)⁷⁾ を選用、Leuc. citrovorum No. 8081 を測定菌株として用いた。

標準 CF (leucovorin) 保存液、並びに供試液は酸に對し不安定のため弱アルカリ性に保った。

なお透過度測定は TOHO-B 型光電型比色計を使用した。

3) PGA は武田薬品製フォリアミン、CF (leucovorin) は Lederle 研究所 Dr. H.A. Broquist より恵与された Ca-塩 (R-3654-117)、ビタミン B₁₂ (cobalamin) は武田薬品製フレスミンを夫々用いた。

4) ヒスタミンは武田薬品製、アグマチンは本教室伊藤により L-Arginine に E. coli. communis を作用、脱炭酸せしめ、分離精製せるもの、カダベリン、プトレスチン、アルカインは岐阜薬大、高取教授により合成され分与を受けたものを用いた。

5) 供試株：

Str. faecalis (Andrewes et Horder) No. 3181

Leuc. citrovorum {(Hammer) Hucker et Pederson} No. 8081

Table 2. CF 測定用基礎培地

salt A	2.0 ml	xanthine	1.0 mg
salt B	2.0 ml	thiamine	50.0 r
casein		riboflavin	50.0 r
hydrolysate	0.5 g	pyridoxine	100.0 r
L-cystin	1.0 mg	pyridoxamine	30.0 r
L-tryptophane	4.0 mg	pyridoxal phosphate	30.0 r
DL-alanine	20.0 mg	calcium pantothenate	50.0 r
asparagine	40.0 mg	nicotinic acid	100.0 r
glucose	2.5 g	P. A. B. A.	10.0 r
sodium acetate	2.0 g	biotin	0.1 r
ammonium chloride	0.3 g	folic acid	1.0 r
adenine	1.0 mg	final	50.0 ml
guanine	1.0 mg	pH	7.2
uracil	1.0 mg		

実験成績

(I) Str. faecalis の PGA あるいはチトロボルム因子要求性

Str. faecalis の發育に對しては PGA と CF は共に有効であるが、その増殖過程に、より大きな影響を与え

るのはいずれであるか。PGA, CF を夫々 0~1.0 m γ Per 5 ml の各段階に稀釈し、1.2 気圧にて 5 分間高圧滅菌後、基礎培地 (Table 1) の一定量を注加し 5 ml とする。接種菌の Str. faecalis は PGA 加 (1 m γ /5 ml) 基礎培地、並びに CF 加 (1 m γ /5 ml) 基礎培地に 37°C, 24 時間培養せるもの一白木耳宛接種し 37°C, 18 時間培養後の透過度をみた。

成績は Fig. 1, Table 3 に示した。

Fig. 1.

Table 3.

PGA, CF 濃度 m γ /tube	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
PGA 添加系 T (%)	90.0	79.0	75.5	72.5	71.0	71.0
CF 添加系 T (%)	90.0	73.0	69.0	67.0	65.0	65.0

上記の実験成績にみられる如く PGA, CF の同一濃度における Str. faecalis の發育は CF を添加した系は PGA を添加した系におけるより良好である。(即ち、CF は PGA より本菌の發育因子としての活性が強い)。両發育曲線における 0-点の透過度は培地自身のもの示し、本菌は共に發育しない。

(II) Str. faecalis の PGA より CF への転換酵素作用

1) PH による影響

Str. faecalis 休止菌懸濁液を用い磷酸塩緩衝液 ($M/15$ Na₂HPO₄— $M/15$ KH₂PO₄) の液性の变化に伴う PGA → CF 反応を Leuc. citrovorum の發育曲線より比較観察した。ブドウ糖加ペプトン水 200 ml に 37°C, 24 時間培養せる Str. faecalis の菌体を遠心分離、菌体を生理食塩液 500 ml にて洗滌再び遠心分離し適量の蒸留水に懸濁して酵素液とした。共栓遠心管に各々 pH の異

る磷酸塩緩衝液 3.5 ml 宛採る。PGAの濃度は各系列とも 100 m γ per ml とし前記の酵素液 1 ml 宛添加し全量を 5 ml とする。トルエンス 0.2 ml 宛重畳し、37°C, 5時間静置孵卵後、直ちに4,000 r. p. m. にて10分間遠心分離し上清 1 ml を採取, pHを補正後蒸留水にて100倍に稀釈し, その1 ml を供試液とした。(供試液はPGAに換算して1 m γ に相当する。) 高压滅菌後, 基礎培地 (Table 2) を加え全量を 5 ml としLeuc. citrovorum を一白金耳宛接種, 37°C, 22時間培養しCF形成の有無をみた。その成績は Fig. 2 に示した。

Fig. 2. pH の変化による PGA $\rightarrow$ CF 反応

乾燥菌量: 1 mg per tube

上記の Leuc. citrovorum 发育曲線より, Str. faecalis 休止菌による PGA $\rightarrow$ CF 反応は, pH 6.4 にて孵卵を行つた系がCFの形成は最大となる。pH 4.5, 8.0 における系のCF形成は微であり, pH 8.6 においては Leuc. citrovorum の发育は全く認められなかった。Str. faecalis により転換をうけたCFは合成CFに比し Leuc. citrovorum の发育に対する有効度は高い。

2) 作用時間による PGA $\rightarrow$ CF 転換酵素作用

Str. faecalis 休止菌懸濁液 (M/10, 磷酸塩緩衝液 pH 6.8) を用い, 前実験に準じて作用時間を追つて PGA $\rightarrow$ CF 反応の過程を観察した。

成績を Fig. 3, Table 4 に示した。

作用時間と共にCF形成は増大する。2時間作用においては Leuc. citrovorum の发育は認められなかったが, 4時間作用より以後殆んど直線的にCF形成の増大を示した。

(II) PGA $\rightarrow$ CF 反応に及ぼすブドウ糖, 並びにビタミン B₁₂ (cyanocobalamin) の影響

1) ビタミン B₁₂ の Str. faecalis, Leuc. citrovorum の发育に及ぼす影響

Fig. 3. 作用時間による PGA $\rightarrow$ CF 反応 Table 4. 作用時間による PGA $\rightarrow$ CF 反応

作用時間	0	2	4	8	16
T (%)	85.0	85.0	75.0	70.0	68.0

PGA $\rightarrow$ CF 反応に及ぼす B₁₂ の影響をみるため, 先ず B₁₂ の両菌の发育に対する態度を検討した。B₁₂ 終末濃度を夫々 3.75 γ , 2.5 γ , 1.25 γ per ml とした。PGA, CF 濃度は 1 m γ per ml とし基礎培地 (Table 1, 2) を夫々添加し 37°C, 24時間培養後の両菌の透過度を算出したが, B₁₂ のどの濃度においても対照と全く等しい数値 (Str. faecalis T 52%, Leuc. citrovorum T 62%) を示した。即ち, B₁₂ は両菌の发育には影響を及ぼさなかった。

2) ブドウ糖並びにビタミン B₁₂ の影響

Str. faecalis 休止菌懸濁液, PGA, 磷酸塩緩衝液よりなる比較的簡単な作用系においても, Str. faecalis はPGAよりCFに転換する酵素活性を有するが, この作用系にエネルギー源或いは炭素源としてのブドウ糖を添加するか, 葉酸と類似の酵素系に關与する B₁₂ を添加して作用する時の PGA $\rightarrow$ CF 反応を検索した。

作用ブドウ糖の終末濃度 1×10^{-5} mol per ml までは, 作用時間の延長とともに, ブドウ糖分解による pH の低下を来し, CF の形成は著明でなかった。又ブドウ糖の濃度を下げ pH の低下を除いても対照と比し何ら有意の影響は認められなかったが, B₁₂ を同時添加せる作用系におけるCF形成は Table 5 に示す成績を得た。

供試液は (II) 実験 1 に準じ調整した。

即ち, 適量の B₁₂ を添加せることにより PGA $\rightarrow$ CF 反応は著しい促進を示し, 更に Mg⁺⁺ の添加によりこの傾向は著明になった。

Table 5. PGA→CF 反応に及ぼす
ブドウ糖, ビタミン B₁₂ の影響

実験 番号	作用条件	Leuc. citrovorum: T (%)		
		実験 1		実験 2
		5時間作用	8時間作用	14時間作用
1	対照+B ₁₂ + glucose+Mg ⁺⁺	57.5	39.0	—
2	対照+B ₁₂ + glucose	63.5	44.0	63.0
3	〃〃+B ₁₂	—	—	51.0
4	〃〃+glucose	81.0	77.0	72.0
5	対 照	78.0	62.0	64.0
6	合成 CF 1 m γ	—	—	70.0
		培 養 時 間 37°C, 24hs		37°C 17hs

対照

PGA 100 m γ per ml
Bacterial cell 1 mg
Phosphate Buffer pH 6.8
Final Volume 5 ml
B₁₂ 1.5 γ per ml
Mg⁺⁺ 1 mg 〃
glucose 1×10⁻⁶ mol per ml

(IV) *Str. faecalis*, *Leuc. citrovorum* の発育に及ぼすアミン類の影響

Str. faecalis 並びに *Leuc. citrovorum* が夫々 PGA, CF を発育因子とする時, 予め培地中にアミン類を共存せしめ, 両菌の発育過程を観察し, またこれより PGA, CF とアミン類の直接的関係の有無を検討した。アミン類としてヒスタミン, アグマチン, カダベリン, プトレスチンを用いた。

以下アミン類は常時 pH 7.0 に補正し使用した。PGA, CF 濃度は各々 1 m γ per tube とし各アミン類 (終末濃度: 10 γ per ml) を添加減菌後基礎培地。(Table 1, 2) を注加し全量を 5 ml とする。

両菌の菌液を一白金耳宛接種し 37°C, 24時間後の透過度を算出した。その成績は Table 6 に示した。

上記成績における如く供試 4 種のアミンのうちアグマチンは両菌の発育に刺激的に働くことが観察された。これはグアニジン核を有するアグマチンに特異的なものであるかをその濃度を変え改めて検討した。アグマチン終末濃度を各々 200 γ , 100 γ , 20 γ per ml として前実験に準じ観察した。その成績は Fig. 4 に示した。

Fig. 4 に示す通り アグマチン濃度に比例して両菌の発育は増大を示した。

(V) PGA→CF 反応に及ぼすアミン類の影響

Fig. 4. *Str. faecalis*, *Leuc. citrovorum* の発育に及ぼすアグマチンの影響

Table 6. *Str. faecalis*, *Leuc. citrovorum* の発育に及ぼすアミン類の影響

	His.	Agm.	Put.	Cad.	Cont.
PGA + アミン T (%)	44.0	42.5	45.0	45.0	45.0
CF + アミン T (%)	65.0	62.0	65.0	65.0	69.0

Str. faecalis 休止菌懸濁液, PGA (100 m γ per ml), 磷酸塩緩衝液, アミン類 (終末濃度: 50 γ per ml) を共栓遠心管に採り全量を 5 ml とし 37°C, 5時間静置解卵後遠心分離, 上清 1 ml を採取し蒸留水にて 100 倍に稀釈しその 1 ml を供試液とした。

37°C, 24時間培養後の *Leuc. citrovorum* の透過度を Fig. 5 に示した。PGA→CF 反応に供試アミン類のうちヒスタミン, プトレスチン, カダベリンは阻害的に働いた。又アグマチンの影響は見かけ上は認められなかった。

Fig. 5. PGA→CF 反応に及ぼすアミン類の影響

特にヒスタミン, プトレスチンの阻害作用は著しくあらわれた。そこでヒスタミン, プトレスチン, カダベリンの PGA→CF 反応に及ぼす抑制を濃度を変え更に吟味した。

アミン類の終末濃度を 200 γ , 100 γ , 40 γ per ml として前実験に準じて CF 形成阻害を観察した。その成

績は Table 7 に示した。ヒスタミン、プトレスチンの濃度 200 γ per ml においては CF 形成は全く認められなかった。(実験 2)

又アミン濃度を下げ終末濃度を 50 γ , 10 γ , 1 γ per ml とした作用系においても, 10 γ per ml の系まで PGA $\rightarrow$ CF 反応に阻害を示したのと対蹠的に, 特に低濃度における阻害作用はプトレスチンにおいて著しくみられた。

(VI) アミン類の PGA $\rightarrow$ CF 反応阻害に対するビタミン

Table 7. PGA $\rightarrow$ CF 反応に及ぼすアミン類の影響

実験番号	作用条件 起始 pH 6.8 ~ 終末 pH 6.8	Leuc. citrovorum 透過度 (%)					
		実験 1			実験 2		
		アミン濃度	200 γ	100 γ	40 γ	アミン濃度 200 γ 5時間作用	8時間作用
1	対照 + Histamine		83.0	80.0	77.0	80.5	80.5
2	" + Putrescine		79.5	76.5	71.5	80.5	80.5
3	" + Cadaverine		75.5	72.0	67.0	81.0	81.0
4	" + Agmatine		—	—	—	77.0	68.0
5	" + Histidine		—			81.0	42.0
6	対 照		65.0			78.0	62.0
		培養時間	37°C, 21hs			培養時間	37°C, 24hs

対照: 第 5 表に同じ Histidine 200 γ per ml

Table 8.

実験番号	作用条件	Leuc. citrovorum 透過度 (%)
		10 時間作用
1	対 照 + Histamine	76.0
2	" + Putrescine	72.0
3	" + Cadaverine	66.0
4	対 照	65.0
5	1 + glucose + B ₁₂	55.0
6	2 + " + "	54.0
7	3 + " + "	51.0
8	4 + " + "	51.0

培 養 時 間 37°C, 24hs

対照: 第 5 表に同じ Amines 50 γ per ml
B₁₂ 15 γ "
glucose 2×10^{-7} mol per ml

ン B₁₂ の態度

B₁₂ の PGA $\rightarrow$ CF 反応における協力作用が認められたが, アミン類による本反応阻害も適当濃度の B₁₂ の添加により, かなりの回復効果を示した。その成績は Table 8 に示した。

供試液は (V) に準じ調整した。

考 按

疫痢患児, 乃至疫痢成立の準備状態にある小児においては, その腸内細菌叢を構成する *Str. faecalis* の減少が考えられるが¹⁾, この予想は臨床的に確認された²⁾。赤痢菌, 大腸菌は比較的簡単な合成培地に発育可能であるが, これに反し *Str. faecalis* の発育にはビタミン B₁, ビオチン, リボフラビン, パラアミノ安息香酸, パントテン酸, ニコチン酸, ウラシル, アデニン, ピリドキシン, 並びに葉酸等多数の発育因子を必須とすることは注目すべきことである。

これ等細菌の栄養要求よりみれば, 宿主の栄養状態即ち, 諸栄養素とくにビタミン摂取の適否は, その小腸棲息菌である *Str. faecalis* の繁殖に強い影響を与えるであろうし, 上記ビタミン類のいずれか一つを欠乏しても, その増殖は阻止される。本邦夏季における気温, 気湿の上昇により発汗旺盛な小児では体内葉酸量の減少³⁾, 及びこれに伴うアミン感受性の増大が考えられる。アミン抵抗性を強化するものは PGA ではなく寧ろこれをプロビタミン乃至基質として生成されたチトロボルム因子であろうことが報告された^{1) 2) 4) 5)}。私は *Str. faecalis* が PGA よりチトロボルム因子に転換する強い酵素活性をもつことを本実験において認めた。

Str. faecalis は適当な pH においては, その PGA $\rightarrow$ CF 反応は強力であり, その至適 pH は 6.0 ~ 7.5 においてみとめられた。又本菌の増殖過程においては, PGA より寧ろ CF が発育をより強く刺激することをみた。動物の肝における PGA $\rightarrow$ CF 転換酵素作用が証明され^{10) 11) 12) 13) 14)}, 又ビタミン B₁₂ を投与した動物の肝では PGA $\rightarrow$ CF 反応の促進が見られ¹³⁾, *in vitro* における肝のこの酵素作用はビタミン C により増強されることが報告された¹⁰⁾。ビタミン B₁₂ の関与する酵素の一つは C 1 個の中間体 (one-carbon-intermediate) の生成と転移であり, これは活性蟻酸塩 (active-formate) の変化である¹⁵⁾。PGA は CF となる際, 還元とフォルミル化によつて active formate の転移を行うものと想像されるが, B₁₂ を共存せしめた時において, この反応の促進がうかがわれ, 又アミン類による本反応阻害も B₁₂ の添加により回復することは, B₁₂ の磷酸エネルギーの生

成、転化に関与することが考えられ、このサイクルを2, 3のアミン類が阻害すると思われる。一方フォルミルアミンの形成を考慮に入れる必要もある。

Broquist 等は B_{12} の C F 形成促進作用を認め得なかつたが¹⁷⁾、この作用はビタミン B_{12} の濃度にもかなり影響され、高濃度においては著明でなかつた。

この現象は高濃度においては蛋白の凝集を来し酵素蛋白として活性化される条件に一致しなかつたものによる。換言すればビタミン B_{12} の PGA → C F 促進作用は酵素蛋白との直接的な関係ではなく、活性化因子に働く間接的なものの一つである。ビタミン B_{12} が PGA, C F と同様に、マウスの有毒アミンに対する感受性の上昇に回復効果を示すことが認められたが¹⁶⁾、更に生体内 PGA → C F 反応に B_{12} が関与する可能性のあることは興味深い。上述数種のアミン類は PGA 或いは、C F と共存したとき、*Str. faecalis* 並びに *Leuc. citrovorum* の発育に夫々刺激的に作用したが、これは PGA, C F とアミン類との直接的な関係ではなく、アミンの構造式の中に持つ N がこのような態度を示したものであろう。特にグアニジン核を有するアグマチンにおいて強く刺激作用がみられた。又アルカイン、アルギニンにおいても同様の傾向が観察された。

アミン類の中、PGA → C F 反応に抑制的に働くものはヒスタミン、プトレスチンなどであるが、ビタミン B_{12} の添加により、かなりの回復効果を示した。アミン類による本反応阻害は、肝ホモゲネートによる実験においても実証された。

赤痢菌、大腸菌等が適応的に脱炭酸酵素を獲得し、夫々対応するアミンを形成、この形成アミンスペクトルを基準として疫痢、乃至疫痢様中毒症状の原因を考察するとき、或る種のアミンが「PGA → チトロボルム因子」反応に抑制的に作用することは注目すべきことである。

Str. faecalis の減少は必然的に“Enterocin”の産生並びに“チトロボルム”形成能の減弱を招く。即ち、これは疫痢症状の外因と考えられる細菌の腸上部における対数的増殖を許すことになり、これに伴い形成されるヒスタミンを中心とした有毒アミンに対する抵抗力の弱化をも意味することにもなる。

私は *Str. faecalis* が、与えられた PGA を C F に転換する活潑な酵素作用を有し、ビタミン B_{12} がこの酵素作用を増強せしむるものの一つであること、並びに或る種の有毒アミンがこの酵素作用を阻害することをここに述べた。

従来生体内の C F として生体組織内特に肝、腎におけ

る PGA → C F 酵素作用にもとづく C F の形成が注目されていたが、ここに腸内細菌叢を構成する *Str. faecalis* が強力な C F 形成者として宿主の生理的機能に重要な役割を果たすことをのべ、あわせて腸内棲息 *Str. faecalis* の減少が宿主の生理機能に重大な影響を与える可能性のあること、並びにその疫痢成立の準備状態の醸成と関連している可能性につき述べた次第である。

総 括

1) *Str. faecalis* は PGA より チトロボルム 因子への転換酵素活性を有し、その至適 pH は 6.5 ~ 7.2 附近にある。

2) ビタミン B_{12} は PGA → C F 反応の酵素活性を増強せしむる因子となる。

3) ヒスタミン、並びにプトレスチンは、PGA → C F 酵素反応の活性に対し阻害抑制的に働く。又ビタミン B_{12} はこの抑制作用に対し回復効果を示す。

4) *Str. faecalis* はその発育因子として PGA を要求するが、この代りに C F が与えられるとき、その発育はより良好となる。

5) 腸内細菌叢としての *Str. faecalis* の代謝の宿主に及ぼす影響に関し、及び疫痢の内因に関連して考按を試みた。

拙筆するにあたり、恩師小笠原教授の御指導、御校閲に深謝し、阿多助教授の御助言に感謝致します。

文 献

- 1) 小笠原一夫：日伝誌，29：199，(1955)。
- 2) 小笠原一夫：細菌毒素シンポジウム報告，(1955)。
- 3) 磯典理：名古屋医学，69：198，(1953)。
- 4) 田中一男：名古屋医学，69：247。
- 5) 田中一男：日細関支報告，(1955)。
- 6) Snell, E. E. : J. Biol. Chem., 163 : 499 (1946)。
- 7) 近藤金助ほか：京大食糧科学研究所報告，13：82。
- 8) 佐々木哲丸：第三回乳幼児の栄養と発育協議会報告，(1954)。
- 9) Welch, A. D. : J. Biol. Chem., 155 : 401 (1944)。
- 10) Nichol, C. A. et al : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 74 : 52, (1950)。
- 11) Nichol, C. A. et al : J. Biol. chem., 204 : 469, (1953)。
- 12) Doctor, V. M. et al : Fed. Proc., 13 : 200 (1954)。
- 13) Doctor, V. M. et al : Arch. Biochem. Biophys., 48 : 249, (1954)。
- 14) Doctor, V. M. et al : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 84 : 29, (1953)。
- 15) Shive : Vitamins & Hormons. 9 : 110, (1951)。
- 16) 小笠原一夫：日本臨床，132 : 61, (1954)。
- 17) Doctor, H. A. et al : J. Biol. Chem., 202 : 59, (1953)。