骨粗鬆化速度の実測[†]

森 田 真 史* 糸 満 盛 憲** 笹 田 直***

Measurement of Progressive Rate of Osteoporosis

by

Masafumi MORITA, Moritoshi ITOMAN and Tadashi SASADA

Osteoporosis is such a disease that the bone volume decreases with aging. As the mechanism of osteoporosis, the following is accepted widely: the bone resorption exceeds relatively the bone formation owing to a decrease in bone metabolic activity. In the past, the present authors have analyzed theoretically the progressive rate of the osteoporosis generated in a cancellous bone, and have clarified that the dynamic change in bone volume density depends on the remodeling activity of bone as well as the structural characteristic of trabecular architecture.

In order to confirm this theory, an experimental study was carried out in this paper. Firstly, the real bone volume fraction was measured by using the upper end of the osteoporotic femur dissected from cadavers. Then the result was compared with the theoretical value. As a result, it was learned that the decreasing tendency of the density predicted by the theoretical equation was well in accordance with the actual one.

キー・ワード：海綿骨，骨粗鬆症，画像解析，骨再構築，骨梁構造特性

1 緒 言

老人に多発する大腿骨頸部内側骨折は、骨粗鬆症による骨の強度低下が主要因である^{1,2)}。その発生機序や治療対策に関連した臨床報告は、これまでに多数存在する^{3,4)}。

本骨折は、一般に考えられている偶発的事故に観られる外傷性のいわゆる骨折とは異なり、骨自身の退行性変化によるところが大きいために、一種の病的骨折であると考えられる。すなわち、骨粗鬆症の進行に伴い、骨の体積密度が低下し、骨の強度や疲労耐久性能が低下することに起因した骨折であるというのが今日の通説である⁵⁾。

幸い、本骨折は、偶発的因子の関与が少ないため、骨代謝活性に支配された骨質部の体積密度の動態とそれに伴う骨強度変化の関係を研究することで骨折発生時期を予測することは、ある程度可能であると推察される。

以上のような目的から、大腿骨中樞部に存在する海綿骨の骨梁体積密度の経時的変化を理論的に解析し、Singh の行った骨粗鬆症の X 線学的観察結果と矛盾することなく⁶⁾、その進行過程を説明し得ることを先に報告した^{7,8)}。

本紙では、前報^{7,8)}に示した海綿骨の骨梁体積密度の動態に関する理論的解析結果の妥当性を確認するために、著明な骨粗鬆症を起したヒト大腿骨中樞部を屍体から採取し、その骨梁体積密度を実際に計測することによって計算値と比較した。その結果について報告する。

2 材料および実験方法

2.1 骨代謝活性能の測定

骨体積の増減は、骨芽細胞による骨形成能 (VF) と破骨細胞による骨吸収能 (VR) の両活性能によって決定される。Fig. 1 は、骨の体積変化と両活性能の関係を説明している。

$VF > VR$ の状態であれば、骨体積は増加する。 $VF = VR$ で両活性能が平衡状態にあれば、見かけ上、体積の変動は無い。一方、 $VF < VR$ の状態では、体積は減少し、いわゆる骨粗鬆化を来す。具体的には、骨粗鬆化が進行すると、皮質骨にあっては、その厚さが減少し、髓腔の拡大を招く。海綿骨にあっては、骨梁のやせ細りによって一段と多孔化が進む^{7,8)}。

海綿骨の骨梁体積密度の変化率は、前報に示すごとく、骨形成能と骨吸収能の両活性能の差によって定義される。

海綿骨の任意断面中における骨梁断面積の占める割

† 本報を「加齢に伴う海綿骨の組織形態学的変化について (第2報)」(A Study on Histomorphological Change of Cancellous Bone with Aging, II) とする。

原稿受理 昭和59年11月24日 Received Nov. 24, 1984

* 正 会 員 北里大学医学部 相模原市北里, School of Medicine, Kitasato University, Kitasato, Sagami-hara

** 北里大学医学部 相模原市北里, School of Medicine, Kitasato University, Kitasato, Sagami-hara

*** 東京工業大学工学部 東京都目黒区大岡山, Faculty of Engineering, Tokyo Institute of Technology, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo

Fig. 1. Relationship between bone volume change and bone metabolic activity.

合(面積密度)は,

$$A_f = A_{f0} \cdot \exp(R \cdot K \cdot t) \quad (1)$$

で示される。ただし、 $R(=a_f \cdot \beta_f \cdot m_f - a_r \cdot \beta_r \cdot m_r)$ は、骨再構築活性能を示すパラメータであり、 $K(=L_i/A_i)$ は、骨梁構造特性を示すパラメータである。また、式(1)から、骨梁構造異方性を考慮し、その体積密度を算出するならば、簡単な stereology technique を用いて、

$$V_f = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n A_{fi} \quad (2)$$

で表される。

式(1)、(2)によると、骨梁体積密度の経時変化は、 R と K の両パラメータに依存することがわかる。

そこで、次の方法によって、両パラメータを定量的に計測した。

2・1・1 骨再構築活性能の測定 3～150週令の家兎39羽に塩酸テトラサイクリン^{*1}(アクロマイシン：日本レダリー社製)を30 mg/kg/日の割合で3日間連続に静脈注射し、7日間放置後、再び同量のテトラサイクリンを投与した。

テトラサイクリンの最終投与が完了した後、数日間経過したあとで、家兎を屠殺し、その大腿骨中極端を摘出した。摘出した骨を70、80、95、100%のアルコール濃度溶液系列で脱脂し、MMA樹脂(Methyl-Methacrylate ragin)で包埋した。樹脂硬化後、ダイヤモンドホイール型カッター(平和工業社製)を用いて500 μmごとに薄切し、各切片を更に10～50 μm厚さまで硬組織研摩機(マルトー社製)を用いて研摩して非脱灰標本を作成した。

このようにして得られた各標本を50倍の蛍光顕微鏡下で観察し、視野面積 A_0 中に含まれた骨梁部面積 A_i 、骨梁周囲長 L_i 、テトラサイクリンを投与した期間中に骨新生があった箇所の面積から、1日あたりの

骨新生量 v_f (テトラサイクリン2重骨標識によって囲まれた部分の面積を投与期間で割った値)および、 A_i の週令変化をもとに1日あたりの骨梁部面積変動量 ΔA_i を算出し、 $v_r = \Delta A_i - v_f$ から骨吸収量 v_r を求めた。また、これらの値から R を算出した。なお、同計測にはIBAS-I画像解析装置(カールツァイス社製)を用いた。

2・1・2 骨梁構造特性の測定 正常ヒト大腿骨中極部5例を屍体から採取し、同赤道部を前額面にて厚さ7 mmに切断した骨片を試験材料に用いた。

このようにして得た骨片をFig.2に示す方法に従って樹脂包埋し、200 μm間隔の連続断面標本を作成した。

これらの標本に対し、画像解析システムRSX-11M(ナック社製)およびIBAS-Iを用いて一定視野面積 A_0 中に含まれる骨梁部の面積 A_i と同周囲長 L_i を計測した。計測部位は、Fig.3に示す比較的明りょう

Fig. 2. Procedure to obtain the serial sections at an interval of 200 μm.

Fig. 3. Regional difference in trabecular structure of the upper end of human femur.

*1 塩酸テトラサイクリンは、抗生物質の一種であり、少量の服用であれば、骨には何等影響を与えず⁹⁾、新生骨のハイドロキシアパタイトと結合し、蛍光を発する。この性質を活用し、塩酸テトラサイクリンは、骨標識薬として、広く骨代謝計測に利用されている。

Fig. 4. Bone trabeculae extraction method using an image analysis.

Fig. 5. (3×3) smoothing treatment for the original image.

な骨梁構造パターンを示す15か所を選んだ。

骨梁部の染色むらや樹脂表面の染色剤による汚染等による入力画像上のノイズを画面から除去するために、次に示す手順に従って骨梁像の抽出を行った (Fig. 4 参照)。

① 原画像 (写真) を灰色レベルで64段階の輝度にデジタル化し、これを入力画像(a)とする。

② Fig. 5 に示す(3×3)画素の平滑化処理を行い、平滑化画像(b)を得る。

③ ①の入力画像(a)から、②の平滑化画像(b)を画面上にて引き算し、その値が正であれば骨梁であるとみなした。

④ ③の演算で正になった画素のみを一率に最高輝度レベルに変換し、他をすべて最低輝度に変換することによって2値化画像(d)を得る。

⑤ 2値化画像(d)を細線化処理し、細線化処理画像

(e)を得る。この細線化処理は、(d)像の骨梁部の幅の常に中央部 (尾根) を算出し、表示したものである。

骨梁断面積 A_i は、2値化画像(d)から、最高輝度レベルを示す画素数を数えることによって求めた。入力画像の拡大率を調整すると、このような簡単な2値化処理だけでも面積測定に十分な精度の骨梁部の抽出が可能である。また、ほとんどの骨梁が帯状の断面積を呈することから、細線化画像に表示された画素数を2倍することで骨梁周囲長とした。ただし、後述する棒状骨梁要素のみによって構成された海綿骨については、その2値化画像がきれいな帯状像を示さないために、IBAS-I のシステムを用いて半手動でその骨梁周囲長を計測した。

2・2 骨梁体積密度の実測

Fig. 6 のように、X線像上、著明な骨粗鬆症が認められるヒト大腿骨中樞部を屍体から採取したもの2件、および、実際に大腿骨頸部内側骨折を起し、人工骨頭置換手術施行のために摘出した骨頭8例を試験材料にした。

2・1・2 項に示したのと同様の方法で同骨の連続断面標本を得た。それぞれの標本に対し、Fig. 3 に相当する部位の骨梁体積密度を画像解析装置を用いて計測した。

Fig. 6. X-ray photograph showing a severe osteoporosis.

3 結果および考察

3・1 骨再構築活性能について

ヒト骨の代謝活性能を直接計測したいところであるが、それは許されないので、やむを得ず実験用家兎で代用し、測定結果に対する評価もこの範囲で行う。

Fig. 7 は、 R を決定するのに必要な骨新生量 v_f 、骨吸収量 v_r を各週令家兎ごとに計測した結果である。家兎の成長過程を示す一指標として、各週令家兎の体重値を同図上にプロットした。体重増加が著しい幼若期は、骨構築を促す骨形成能が活発である。成熟期に達する16～32週令で成長はほぼ完了し、骨代謝も一応

Fig. 7. Bone formation rate V_f and resorption rate V_r in a rabbit at different growth stages.

平衡状態になる。老令期に達すると、わずかではあるが、骨吸収能が骨形成能を上回る。しかし、両活性能が逆転する時期と両活性差は、個体差が大きく、骨粗鬆症を起さず、平衡状態を維持したまま老令期を経過する家兎も観られた。

また、部位別に活性差を比べた場合 (Fig. 8 参照),

幼若期は、骨頭中央部 (骨端成長線) に旺盛な骨形成能を示すテトラサイクリン像 (写真中に示された白線像) が認められるのに対し、成熟期と老令期では、部位別による活性能の変化はほとんど認められなかった。

老令期の特に、骨粗鬆症の著明 (Fig. 8 に示した 110 週令家兎がこれに相当する) な家兎では、テトラサイクリンによる骨の 2 重標識像は、ほとんど観察されず骨再構築活性がほとんど停止し、部位依存性はなくなり、均等に分散した蛍光像が観察された。

Frost らは、代謝異常のないヒト肋骨の再構築活性能を同様の方法で計測し、その経年的変化を調べている。彼らの研究によると、成熟期である 30 歳ごろを境に、骨形成と骨吸収の跡を示す箇所数が逆転しており、著者らの行った家兎の場合とほぼ同様の骨形成能の低下傾向が認められている。

3・2 骨梁構造特性について

ヒト大腿骨中極部を構成する海綿骨の骨梁構造は、

Fig. 8. Photomicrographs of doubly labeled bone with Tetracycline at different growth stages.

Fig. 9. Typical cancellous bone structure in the proximal end of human femur.

骨梁走方向に沿って配列する主骨梁と走方向に対し直角に配列する横小骨梁の形態学的な特徴から次の3種類に大別できる。その典型的な海綿骨骨梁構造をFig. 9に示す。すなわち、Type 1は、主骨梁と横小骨梁が共に板状を呈するもの、Type 2は、主骨梁が板状で横小骨梁が棒状を呈するもの、そして、Type 3は、主骨梁と横小骨梁が共に棒状を呈するものである。

大腿骨中極部を構成している海綿骨（おそらくは、あらゆる部位の海綿骨についてもこの分類は適用可能であると考えられる）は、このいずれかのTypeに属すると考えてよい。また、家兎の場合も、原則的にはこの分類に従うと思われるが、骨自体が小さいこともあってヒトほど明らかな骨梁構造パターンは示さない（Fig. 8のX線像参照）。

Fig. 3は、ヒト大腿骨中極部の赤道前額面において、これら3種類の比較的に明らかな骨梁構造パターンを示す箇所をType別に選択したものである。

Type 1は、主圧縮骨梁群と主引張り骨梁群が交差する骨頭中央部に存在する。Type 2は、骨梁走方向性が最も明瞭に現れる部位、すなわち、主引張り、主圧縮骨梁群に多く存在する。一方、Type 3は、それ以外の非荷重部（大きな負荷を受けない部位）に存在し、骨梁走方向性は低いのが特徴である。

Table II. Bone volume fraction V_V in the upper end of human femur.

Case No.	Samp.	Sex	Age	Bone volume fraction V_t (%)														
				1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	2-4	2-5	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7
1	Femoral head	Female	82	23.3	24.0	20.4	—	—	—	21.7	—	—	—	—	—	6.7	8.7	
2	Femoral head	Female	92	21.2	27.3	22.0	—	13.7	12.5	23.0	—	—	—	—	—	5.0	9.8	
3	Femoral head	Male	79	22.5	21.2	19.2	—	—	—	16.7	—	—	—	—	—	5.8	—	
4	Femoral head	Female	87	23.2	17.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	10.0	—	
5	Femoral head	Female	77	17.5	15.8	14.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	Femoral head	Female	?	24.5	20.7	18.3	—	17.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
7	Proximal end (R)	Female	98	25.4	20.1	22.6	2.3	15.1	13.0	11.5	16.7	4.0	3.9	3.5	7.3	0	1.8	7.9
8	Proximal end (L)*	Female	98	25.0	—	20.4	—	—	—	—	—	5.7	6.1	2.0	1.3	—	5.8	—
9	Proximal end (L)	Male	79	23.2	26.3	22.1	15.3	13.0	9.9	5.2	17.8	6.9	5.4	2.3	8.5	2.3	4.7	9.8
	Normal		Mean 62.8	28.7	26.0	24.1	17.0	18.3	14.1	13.7	13.0	12.1	10.0	6.7	6.6	5.8	8.0	12.7

* This sample is injured a femoral neck fracture.

Table Iは、家兎とヒトの大腿骨中極部に存在する海綿骨の K 値を計測した結果である。家兎についてはX線上に骨粗鬆化の認められなかった64週令家兎3羽の骨梁構造別に計測した K の平均値および、骨粗鬆化の著明な110週令1羽の同部位計測値を示す。また、ヒトについては、2・1・2項、2・2節で示した材料の骨梁構造別平均値である。家兎の場合は、明らかな骨梁構造パターンを示す部位が少なく、その結果、Type 1、Type 2の K 値の差は、ヒトに比べわずかになった。

Table I. Structural parameter K for each cancellous bone.

Type	Rabbit		Human	
	64W	110W	Normal	Osteoporosis
1	0.397±0.028	0.349	0.189±0.036	0.203
2	0.422±0.021	0.375	0.277±0.010	0.285
3	0.545±0.022	0.539	0.543±0.035	0.539

$K: 1/\text{mm}$

3・3 骨粗鬆化の著明なヒト症例の骨梁体積密度

前節で分類した海綿骨骨梁構造の違いに注目し、それぞれのTypeごとに骨粗鬆化進行速度を比較検討した。

Table IIは、2・1・2項の方法にもとづいて、骨粗鬆症例および、大腿骨頸部内側骨折により摘出した骨頭側の骨梁体積密度の測定結果を示す。計測部位は、正常例の場合と同様にFig. 3に示す15か所である。なお、比較のために、正常5例の平均値を表中の最下段に示す。

Fig. 10は、大腿骨中極部をほぼ完全な形で摘出したものを入手することができた98歳女性（Fig. 6のX

Fig. 10. Comparison between the normal case without osteoporosis and the case with osteoporotic case.

線像に示される症例) の場合の骨梁体積密度をグラフ化したものである。本症例が骨粗鬆症を起す以前の骨梁体積密度の状態は不明であるので、Table II に示した正常 5 例の平均値を一応ここでは基準とし、その差を骨粗鬆化による体積密度減少量であると判断した。図中の●印は、正常 5 例の骨梁体積密度の平均値であり、▲印は、本症例の密度値を示す。矢印上向きは、体積密度の増加、下向きは減少を意味している。

個々の部位についてみると、減少幅にかなりのばらつきがみられるが、Type 1 は、平均 $7.3 \pm 5.2\%$ 、Type 2 は $9.0 \pm 5.6\%$ および Type 3 は $9.4 \pm 2.4\%$ の減少が認められる。これらの値から判断して、体積密度減少量は、Type 別にみた場合に有意の差があるとは認められず、いずれの部位もほぼ同量の体積密度減少があったと解釈される。このような体積密度減少傾向を示すことは、骨再構築活性 R が、老令期においては、海綿骨全域ではほぼ一様であることを意味する。

Fig. 11 は、Type 別の体積密度の減少傾向を一層明確にするために、正常例の密度平均値に対する本症例の密度減少率 $((V_{f0} - V_f)/V_{f0})$ を縦軸に Fig. 10 を再プロットしたものである。Type 3 が最も体積密度の減少率が高く、ついで Type 2、Type 1 の順にその減少率が緩慢になることがわかる。この体積密度減少率は、骨粗鬆化に伴う骨強度低下傾向を直接反映した値であり、大腿骨頸部内側骨折の発生機序を推察す

Fig. 11. Change of bone volume fraction showing its dependence on each trabecular structure.

るのに重要な意味を持つ。

3・4 骨粗鬆症の進行

前報において、著者らは、海綿骨の骨梁体積密度の動態を式(1)、(2)で表した。

これらの式の妥当性は、次に示す家兎の骨梁体積密度の変化を実際に計測することによって、また、3・3 節で示したヒトの場合とその挙動を比較することによって確かめられる。

3・4・1 家兎の骨梁体積密度変化について 式(1)、(2)から、骨梁体積密度の経時的変化を算出するために、次のようにして R と K を決定した。

3・1 節で述べたテトラサイクリン像の分布および Fig. 7 の骨形成、骨吸収両活性能の値から 64 週令家兎の骨再構築活性能 $R = -1.25 \times 10^{-3} \text{mm}^2/\text{日}$ を決定した。前述したように、成熟期、老令期では、 R の活性能の部位別による差は特に認められないことから、すべての骨梁構造に対し、 R は一定であると仮定した。

K は、Table I に示す 64 週令家兎における各値を用いた。

Fig. 12-(a) は、その結果である。

Table III は、64 週令、110 週令家兎の骨梁体積密

(a) Rabbit.

(b) Human.

Fig. 12. Progressive behavior of osteoporosis calculated by the equations (1) and (2).

Table III. Bone volume change for an osteoporotic rabbit.

Type	Bone volume fraction		ΔV_f ($V_{f0}-V_f$)	$\Delta V_f/V_{f0}$
	$V_{f0}(64W)$	$V_f(110W)$		
1	34.5±2.5%	29.7%	4.8%	13.9%
2	27.7±3.8	22.4	5.3	19.1
3	18.6±3.5	13.7	4.9	26.3

度を実際に測定し、その減少傾向についてまとめたものである。

64週令家兎の体積密度 (V_{f0}) を対照として、骨粗鬆化の進んだ110週令家兎の体積密度 (V_f) および減少量 (ΔV_f)、減少率 ($\Delta V_f/V_{f0}$) を示す。Fig. 12 (a) で $T=50$ 週における V_f/V_{f0} 値から体積密度減少率 ($\Delta V_f/V_{f0}$) を求めると、Type 1 は、16.0%、Type 2 は16.9%、Type 3 は21.3%であり、これらの減少傾向は、実測値とほぼ一致した。

3・4・2 ヒト海綿骨への本式の適用 家兎の場合と同様に、Table I に示すヒト海綿骨の各 K 値 (正常例) を使って体積密度の経時的変化を算出した。Fig. 12(b)がその結果である。ただし、 R 値は、ヒトについては計測不能であるので、便宜的に、家兎の値を用いた。

3・3節で述べた骨粗鬆症例 (98歳女性) について、 ΔV_f 、および $\Delta V_f/V_{f0}$ の値を Fig. 12 (b)と比較し、骨梁構造別にみた骨梁体積密度の減少傾向について検討した。

同症例の場合、Fig. 10 から ΔV_f は、いずれの骨梁構造もほぼ一様に、8.5%程度である。これは、Table III に示した家兎の場合と値そのものは異なるが、同種の減少傾向を示すと考えてよい。一方、 $\Delta V_f/V_{f0}$ は、Fig. 11 から Type 1 が平均6.7%、Type 2 が18.2%、Type 3 が39.6%である。このことは、Type 3 の骨梁構造が最も強く骨粗鬆化の影響を受けることを意味する。各 Type 別に観た骨梁体積密度の減少傾向は、家兎に比べより一層明確に区別できる。ただし、本症例の R 値は、家兎の値であるので、時間軸は、実際とは一致しない。

以上の理論的解析およびその実験的裏付けから、大腿骨中極部における骨粗鬆化の進行を考察すると、大きな負荷を受けない Type 3 の海綿骨で構成された転子間中央部¹²⁾ および骨頭下端部ほどその進行が速く、担荷能力を必要とされる骨頭上端部と頸部を構成する Type 1, 2 の海綿骨は、骨粗鬆化進行速度が比較的遅く、骨粗鬆化の影響を受け難い構造であるといえる。

また、大腿骨中極部に構成しているこれらの海綿骨は、力学的環境に適応し、合目的な骨梁構造配列を有している。このことばを信じるならば、正常状態で力学的に調和のとれていた構造が、骨粗鬆化進行速度のちがいによって崩され、これらの力学的不調和が大腿骨頸部内側骨折を誘発させる可能性も十分考えられる。

4 結 言

海綿骨の骨粗鬆化進行速度を理論的に解析した結果の妥当性を確認する目的で、正常および骨粗鬆症の著明な症例の大腿骨中極部と、実際に骨粗鬆症に起因したと思われる大腿骨頸部内側骨折を起した症例の摘出骨頭の骨梁体積密度を計測した。

その結果、骨梁体積密度の減少率は、骨梁構造に依存するところが大きくあることが認められ、理論的解析と実測結果がよく一致することが確かめられた。

画像解析については、東京都臨床医学総合研究所医療工学部門の神沼二真先生並びに同部門研究員の諸氏に有益なご指導、ご助言を頂き、謝意を表します。

なお、本研究は文部省科学研究補助金 (No. 58770958, No. 59771032) の援助を得て行われたことを付記する。

(昭和59年9月12日 第28回材料研究連合講演会にて講演)

参 考 文 献

- 1) M. R. Urist, "Observations Bearing on the Problem of Osteoporosis", p. 18 (1960) McGraw-Hill.
- 2) G. S. Gordan, Tex Med., **57**, 740 (1961).
- 3) 山本 真, 南沢育雄, 森田真史, 整形外科, **32**, 339 (1981).
- 4) 山本 真, 整形外科, **30**, 10 (1979).
- 5) M. A. R. Freeman, et al., J. Bone and Joint Surg., **53-B**, 698 (1974).
- 6) M. Singh, A. R. Nagrath, P. S. Maini, J. Bone and Joint Surg., **52-A**, 457 (1970).
- 7) M. Morita, M. Itoman, M. Yamamoto and T. Sasada, The 27th Japan Cong. on Mat. Res., p. 301 (1984).
- 8) 森田真史, 糸満盛憲, 山本 真, 笹田 直, 材料, **34**, 370 (1980).
- 9) 柳 京三, 乗松尋道, 高橋栄明, 今野俊幸, "骨形態計測", 高橋栄明編, p. 19 (1981) 医歯薬出版.
- 10) H. M. Frost, J. Bone and Joint Surg., **48-A**, 1192 (1966).
- 11) 宮永 豊, 劉 華昌, 二ノ宮節夫, 日整会誌, **51**, 129 (1977).
- 12) 例えば, 山本敏行, "図解人体解剖学", p. 9 (1972) 共立出版.
- 13) 梅谷陽二, "生物工学", p. 76 (1977) 共立出版.