ブラックマッペのアンジオテンシン I 変換酵素阻害因子の検索

吉田 恵子^{*1}, 四十九院 成子^{*2}, 福場 博保^{*3}

田所 忠弘^{*4}, 前川 昭男^{*4}

^{*1}つくば国際短期大学生生活科学科

^{*2}東京家政学院短期大学生生活科学科

^{*3}昭和女子大学生生活機構研究科

^{*4}東京農業大学応用生物学部生物応用化学科

Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Substances in Black Matpe

Keiko YOSHIDA,^{*1} Shigeko TSURUSHIIN,^{*2} Hiroyasu FUKUBA,^{*3}

Tadahiro TADOKORO^{*4} and Akio MAEKAWA^{*4}

^{*1}Department of Living Sciences, Tsukuba International Junior College,
Tsuchiura 300-0051

^{*2}Department of Science of Life Management, Tokyo Kasei Gakuin Junior College,
Chiyoda-ku, Tokyo 102-0075

^{*3}Graduate School of Practical Sciences, Shouwa Women's University,
Setagaya-ku, Tokyo 154-0004

^{*4}Department of Applied Biology and Chemistry, Tokyo University of Agriculture,
Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **51**, 195~200 (1998)

Crude extracts of black matpe showed ACE inhibitory activity. The Sephadex G-100 gel filtration patterns of these extracts indicated that the ACE inhibitory activity was present in the low-molecular-weight fraction. The Sephadex G-15 gel filtration patterns of the active fraction obtained from the Sephadex G-100 column indicated that the molecular weight of the inhibitors was about 400-800. The active fractions obtained from the Sephadex G-15 column were purified by HPLC using an ODS column. The active fractions were not absorbed, and were eluted with 0.05% trifluoroacetic acid. The ACE inhibitory activity of seeds germinated for 6 days was 40% of that of the black matpe extracts. Oral and intraperitoneal administration of a pepsin hydrolysate of the black matpe extract decreased the blood pressure of SHR rats significantly.

Key words black matpe, angiotensin I-converting enzyme, inhibitor, SHR.

(Received January 4, 1998)

アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE, [EC 3.4.15.1]) は、アンジオテンシン I を強力な昇圧ペプチドであるアンジオテンシン II に変換するとともに、降圧ペプチドであるブラジキニンを不活性化するという両面から血圧上昇に関与している。この ACE 活性を特異的に阻害することにより、血圧の上昇を抑制させることができるといふ観点から、Ondetti *et al.*¹⁾ により ACE 阻害剤である

カプトプリルの開発がされ、現在では数種類の ACE 阻害剤が臨床応用されている。また鈴木ら²⁾ は、日常摂取する食品の ACE 阻害能を測定し、食品中に種々の阻害物質が存在することを示唆した。いままでに報告されている食品中の阻害物質としては、米糠のフィチン酸³⁾、茶のカテキン⁴⁾、テアフラビン⁴⁾、醤油⁵⁾ のニコチアナミンなどがある。また食品タンパク質を各種プロテアーゼにより加水分解し、生じたペプチドの阻害活性についても数多く報告されている⁶⁻⁹⁾。これらの中には動物実験により、経口投与での血圧降下作用が実証されているものもある¹⁰⁻¹⁴⁾。それらのうち豆類については、河村・杉本¹⁵⁾

^{*1} 〒300-0051 土浦市真鍋 6-7-10

^{*2} 〒102-0075 東京都千代田区三番町 22

^{*3} 〒154-0004 東京都世田谷区太子堂 1-7-57

^{*4} 〒156-8502 東京都世田谷区桜ヶ丘 1-1-1

が大豆のペプシン加水分解物中のペプチドを単離し、末綱¹²⁾は大豆のペプシン分解物を経口投与し降圧作用があることを報告している。

著者らはこれまで、ブラックマッペ (*Vigna mungo*) のタンパク質およびペプチドに関する研究を行ってきた¹⁶⁻¹⁹⁾。そこで今回はブラックマッペの ACE 阻害活性に着目し検討した。本報では、まずブラックマッペの ACE 阻害活性を測定し、阻害因子を検索した。さらにタンパク質を酵素で加水分解した加水分解物の阻害活性も検討した。ブラックマッペは、わが国においてもやしの原料豆として利用されているので、発芽体についても ACE 阻害活性を測定した。また血圧降下作用については高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rats, 以下 SHR と略す) を用いて *in vivo* での効果を検討した。

実験方法

1. 実験材料

ブラックマッペは、前報¹⁶⁻¹⁹⁾同様、タイ国産のものを用了。

2. 発芽

ブラックマッペを水洗後、50℃の超純水に1時間浸漬し、24℃の暗所で適宜吸水しながら発芽させた。発芽日数は6日とした。

3. 試料の調製法

ブラックマッペを粉碎後、60メッシュのふるいを通した粉末試料に、5倍量の0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、室温で1時間攪拌抽出後、14,000×g で15分間冷却遠心分離を行い上澄液を得た。この抽出液を凍結乾燥後、抽出粉末試料とした。発芽体は凍結乾燥後粉末とし、5倍量の0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、室温で1時間攪拌抽出後、14,000×g で15分間冷却遠心分離を行い上澄液を試料とした。

4. 加水分解

ブラックマッペ抽出粉末試料に2%のペプシン (SIGMA 製) を加え、至適 pH である pH 2.0 の 0.2 M ホウ酸緩衝液中 (20 倍量)、37℃で16時間加水分解した。反応後ペプシン分解物は pH を 8.4 に調整し、98℃5分間の加熱により酵素を失活させ、14,000×g で10分間遠心分離した上澄液を、凍結乾燥後粉末とし加水分解物とした。

5. ACE 阻害活性の測定法

Lieberman の測定法を改良した山本らの方法²⁰⁾に準じて行った。50 μL の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.4)、10 μL の 4 M 塩化ナトリウム、10 μL の 50 mM hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL, ペプチド研究所)、10 μL の超純水をマイクロチューブに入れ、10 μL の試料液を入れ

た後、10 μL の ACE (和光純薬 1.7 munit) を加え、37℃で45分間反応させた。その後 0.5 N 塩酸 100 μL で反応を停止後、酢酸エチル 0.6 mL を加え10秒間よく攪拌し、ACE により遊離するヒプリル酸を抽出した。酢酸エチル層を 0.4 mL 分取し 140℃で10分間乾固後、1 M 塩化ナトリウム 2.4 mL を加えて溶解し、228 nm の吸光度を測定した。

阻害率は、試料液中の吸光度を *S*、試料液の代わりに超純水を入れたときの吸光度を *C*、それらに対してあらかじめ反応停止液を加えて反応させたときの吸光度をそれぞれ *S*₀、*C*₀ として阻害率を次式により求めた：阻害率 (%) = $\{[(C - C_0) - (S - S_0)] / (C - C_0)\} \times 100$ 。各試料間の ACE 阻害活性の比較は、上式により求めた阻害率が 50% を示すときの試料量を 1 unit として、一定量の試料中での総活性を比較した。

6. ACE 阻害因子の精製

6.1 ゲル濾過 ブラックマッペ抽出粉末 1 g を 50 mL の 0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解し、Sephadex G-100 (Pharmacia) のカラム (5.0×57 cm) に供し、高分子量域 (フラクション 60~120) の画分と、低分子量域 (フラクション 190~240) の画分に分けた。溶出液は 0.01 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を用い、流速 60 mL/h で溶出し、1 フラクションは 5.0 mL とした。次に得られた活性画分 (フラクション 190~240) を減圧乾固後超純水に溶解し、Sephadex G-15 (Pharmacia) のカラム (1.8×93 cm) に供した。超純水を溶出液とし、流速 20 mL/h で溶出し、1 フラクションは 4.0 mL とした。

6.2 イオン交換 Sephadex G-15 でのゲル濾過で得られた活性画分を集め減圧乾固し、0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) に溶解し、SP-Sephadex C-25 カラム (1.6×21.8 cm) に供した。溶出は 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) をカラム容量の約 2 倍流した後、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 8.0) を用いて行った。

6.3 HPLC イオン交換クロマトグラフィーで得られた活性画分を、Sephadex G-15 カラムで脱塩後減圧乾固し、東ソー製 TSK ゲル ODS-80 Ts (4.5×150 mm) のカラムを用いた逆相系 HPLC で分析した。溶出は 0.1% トリフルオロ酢酸中で、アセトニトリル濃度 0~60% のリニアグラディエント (5分~20分) によった。流速 1.2 mL/min、検出は 215 nm で行った。ここで得られた活性画分を減圧乾固後、旭化成工業製 Asahipak GS-320 (7.6×250 mm) のカラムを用いて、HPLC でのゲル濾過を行った。溶出は 0.05 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用い、流速は 0.5 mL/min、検出は 215 nm で行った。

7. SHRを用いたペプシン分解物投与による降圧効果

ブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物をSHR (18週齢, 雄) に投与した。投与方法は, 経口投与(投与量 5 g/kg 体重)と腹腔内投与(投与量 2 g/kg 体重)とした。ブラックマッペのペプシン加水分解物は生理的食塩水に溶かし, 対照群には生理的食塩水のみ投与した。投与後 1, 3, 5, 7, 9, 24 時間後の血圧を非観血尾動脈血圧装置 (理研開発製 PS-100) を用いて測定した。

実験結果

1. ブラックマッペの ACE 阻害因子

1.1 ブラックマッペの ACE 阻害活性 ブラックマッペ抽出粉末試料を超純水に溶解し, ACE 阻害活性を検討したところ, Fig. 1 に示すように添加量を増すに従い ACE 活性はしだいに減少し, ACE 阻害効果が顕著に認められた。

1.2 ACE 阻害因子の精製 ブラックマッペ抽出粉末を Sephadex G-100 のカラムに供したところ, Fig. 2 に示したように, 高分子質画分と分子量 10,000 以下の画分に 280 nm の吸収のピークがみられた。高分子質画分には ACE 阻害活性は認められなかったが, 分子量 10,000 以下の低分子量画分に ACE 阻害活性が認められた。この活性画分を集め Sephadex G-15 のカラムに供したところ, Fig. 3 に示したように分子量 800 から 400 付近に活性画分が溶出した。次にこの活性画分をイオン交換カラムに供したところ, 活性画分は 0.01 M 酢酸緩衝液 (pH 3.5) で溶出し, pH を上昇させると色素が溶出した。溶出活性画分を濃縮後, ODS カラムを用いた逆相 HPLC により分析を行ったところ, 最初の 1.5 分付近に 215 nm での吸収が強く認められ, この画分に強い阻害活

Fig. 1. Effect of black matpe extract on ACE activity.

Fig. 2. Chromatogram of black matpe extract on Sephadex G-100 column.

One g of black matpe extract powder was applied on the column (5×57 cm), pre-equilibrated with 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 8.0), and eluted with the same buffer. The flow rate was 60 mL/h. The standard proteins were bovin serum albumin (MW=67,000), ovalbumin (MW=43,000) and ribonuclease A (MW=13,700). Absorbance of 280 nm (□). Inhibitory activity (○).

Fig. 3. Chromatogram of active fraction obtained from Sephadex G-100 chromatography on Sephadex G-15 column.

Active fraction obtained from Sephadex G-100 chromatography (fraction 190-240) was applied on the column (1.8×63 cm), pre-equilibrated with water, and eluted with water. The flow rate was 20 mL/h. The standard markers were flavin adenine dinucleotide (MW=830), hippuryl-L-histidyl-L-leucine (MW=430) and L-tyrosine (MW=181). Absorbance of 254 nm (□). Inhibitory activity (○).

Fig. 4. Chromatogram of active fraction obtained from ODS-80Ts chromatography on Asahipak GS-320.

Column, Asahipak GS-320 (0.76×50 cm); solvent, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0); flow rate, 0.5 mL/min absorbance of 215 nm (□). Inhibitory activity (○).

Table 1. Total ACE inhibitory activity of black matpe and 6 days' sprout.

Sample	Total ACE inhibitory activity (units/100 g)
Black matpe	8.2×10^5
6 days' sprout	3.2×10^5

性が認められた。また吸着部分に 215 nm の吸収の小さなピークが溶出し、そこにもわずかながら阻害活性が認められた。強い阻害活性をもつ最初の溶出画分をゲル濾過のカラム (GS-320) に供し、30 秒ずつ分取し阻害活性を測定した。Fig. 4 に示したように、215 nm の吸収では二つのピークに分かれたが、阻害活性はいずれの画分にも認められた。

2. 発芽体中の阻害活性

ブラックマッペ 6 日発芽体について、ACE 阻害活性を測定したところ、Table 1 に示したように、ブラックマッペの約 40% の阻害活性が認められた。

3. ブラックマッペ抽出粉末試料の加水分解物中の ACE 阻害活性

ブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物を、Sephadex G-100 に供したところ、高分子量域のピークは消失し、低分子量域にのみピークが存在し、この画分に阻害活性が認められた。活性画分を集め総活性を算出し、ブラックマッペの総活性と比較したところ、ほぼ同じ値を示した。またブラックマッペ抽出粉末試料の Sephadex G-100 のゲル濾過で得られた高分子量のタンパク質画分 (Fig. 2 のフラクション 60~120) のみを、ペプシンで加水分解したものについて阻害活性を調べたと

Fig. 5. Change of the blood pressure after oral administration of black matpe pepsin hydrolysate.

Values are the mean $\pm$ SE. Significantly different from control (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) by *t*-test. Control (Saline, □), black matpe pepsin hydrolysate (5 g/kg, ○).

Fig. 6. Change of the blood pressure after intraperitoneal administration of black matpe pepsin hydrolysate.

Values are the mean $\pm$ SE. Significantly different from control (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) by *t*-test. Control (Saline, □), black matpe pepsin hydrolysate (2 g/kg, ○).

ころ、阻害活性は認められなかった。

4. 動物実験

ブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物を、SHR に経口投与ならびに腹腔内投与した後の血圧の変化を Fig. 5, 6 に示した。経口投与では投与後 5 時間

で 35 mmHg 低下し、腹腔内投与では投与後 3 時間で 50 mmHg の降下が認められ、投与後 10 時間においても降下は持続していた。

考 察

近年食品の三次機能として生体調節機能が注目されている²¹⁾。その中の一つにアンジオテンシン I 変換酵素阻害がある。そこでブラックマッペおよびその発芽体、ならびにブラックマッペのペプシンでの加水分解物中の ACE 阻害活性について検討した。まずブラックマッペ抽出物を用いて調べたところ、阻害活性が認められた。この阻害因子の精製を試みたところ、ゲル濾過において分子量 400 から 800 であることがわかった。さらに逆相カラムを用いた HPLC で分析したところ、活性画分は吸着されず、最初に溶出したことから、この阻害物質は現在までに報告されている疎水性のペプチドではなく、親水性の物質と考えられた。また吸着画分にも弱いながら阻害活性が認められたことから、阻害因子としては疎水性の物質の関与も考えられるが、親水性の物質がおもなものと推察された。ゲル濾過のカラム (GS-320) において、215 nm の吸収では二つのピークに分かれたが、阻害活性は両方の画分に認められたことから、阻害物質は 215 nm に吸収をもつ物質であるか、215 nm に吸収を持つ物質と結合している可能性も考えられる。現在までにペプチド以外の ACE 阻害物質として、フィチン酸³⁾、カテキン⁴⁾、テアフラビン⁴⁾、ニコチアナミン⁵⁾ が報告されている。本因子とニコチアナミンとの異同については、キャピラリー電気泳動を用い検討したところ泳動位置が異なった(未掲載)。またカテキンは 270~280 nm に、テアフラビンは 380 nm と 460 nm に最大吸収をもつが、本因子は 210 nm 付近に最大吸収を示した(未掲載)。これらのことよりブラックマッペの阻害因子はカテキン、テアフラビン、ニコチアナミンではないことが示唆された。また豆類にはフィチン酸が含まれるので、今後フィチン酸を含めてこの阻害因子について検討したいと考えている。

次に 6 日発芽体において阻害活性を調べたところ、阻害活性が認められた。この活性画分についても精製を行ったところ、ゲル濾過での活性画分の溶出位置がブラックマッペのものと同じ(未掲載)であり、逆相カラムで最初の画分に溶出することから、ブラックマッペの阻害物質と同一の物質と推察された。

またブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物中の阻害活性を検討したところ、阻害活性が認められた。また加水分解物を Sephadex G-100 でのゲル濾過に供したところ、高分子量画分は消失し、低分子量画分に阻害活性が認められた。この低分子量画分の阻害物質は

ブラックマッペに元来含まれる ACE 阻害物質に加え、タンパク質のペプシン分解により新たに生成した物質が存在する可能性もある。そこで Sephadex G-100 のゲル濾過で得られた高分子量のタンパク質画分のみを、ペプシンで加水分解し生成した加水分解物中の阻害活性を調べたところ、阻害活性は認められなかった。またブラックマッペの抽出物と、そのペプシン加水分解物の総活性はほぼ同じ値を示した。これらのことよりブラックマッペには豆自体に ACE 阻害因子が存在し、この物質はペプシンで分解を受けないものであることが認められた。また、大豆タンパク質のペプシンでの加水分解物で報告されている¹⁵⁾ ACE 活性を阻害するペプチドは、ブラックマッペの場合、ペプシン分解では生成せず、ブラックマッペに元来存在する活性物質が阻害活性を示すことが認められた。

SHR に投与した試料は抽出粉末試料のペプシン加水分解物を用いた。試料としては、ブラックマッペの活性画分 (Sephadex G-100 での低分子量画分) を集め投与すべきであるが、投与する量を集めるのが困難であるため、高分子量画分が分解されているペプシン分解物を用いた。ペプシン加水分解物中の阻害物質は、ペプシン加水分解で生じたものではなく、ブラックマッペに元来存在するものであることが明らかであるので、この物質が動物実験において顕著な効果を示したと考えられる。Miyoshi *et al.*¹¹⁾ は α -zein の加水分解物では腹腔内投与で 5 時間後に 20 mmHg 位の血圧低下であり、経口投与では降下率は低かったと報告している。また末綱¹²⁾ はイワシ筋肉のトリペプチド画分と、大豆のトリペプチド画分を SHR に経口投与したときの降圧効果は、イワシでは投与後 2 時間位まで 25 mmHg 低下し、大豆においては投与後 1 時間で 20 mmHg 低下し、2 時間では投与前血圧に回復したと報告している。かつお節のサーモリン分解物は経口投与で 6~8 時間後に 30 mmHg の低下を示し、24 時間後でも有意差が認められた¹⁴⁾。ブラックマッペの場合、経口投与では投与後 5 時間で 35 mmHg 低下し、腹腔内投与では 3 時間で 50 mmHg の低下が認められた。現在までに報告されているものに比べても、その降下は顕著であり、かなり有効な血圧降下作用をもつ因子が存在するのではないかと推察される。

要 約

ブラックマッペ、その発芽体、およびブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物中の ACE 阻害活性を調べ、ブラックマッペに含まれる阻害因子について精製を試みた。またペプシン加水分解物を SHR に投与し、生体内での効果をも検討した。

1) ブラックマッペおよびその発芽体の抽出液に

ACE 阻害活性が認められた。

2) この物質を精製したところ、ゲル濾過より分子量は 400~800 と推定された。またおもな阻害因子は逆相カラムには吸着されず、水系の溶媒で溶出し親水性の物質と推察された。

3) この阻害因子はペプシンで分解されなかった。またブラックマッペ抽出物中のタンパク質を、ペプシン処理した加水分解物には、活性が認められなかった。

4) ブラックマッペ抽出粉末試料のペプシン加水分解物を、SHR に経口および腹腔内投与し血圧降下を検討したところ、顕著な血圧降下が認められた。

文 献

- 1) Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW (1977) Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: New class of orally active anti hypertensive agents. *Science* **196**: 441-4.
- 2) 鈴木健夫, 石川宣子, 目黒 照 (1983) 食品中のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. *日本農芸化学会誌* **57**, 1143-6.
- 3) 斉藤義幸, 中村桂子, 川戸章嗣, 今安 聡 (1992) 清酒, および副産物中のアンジオテンシン変換酵素阻害物質. *日本農芸化学会誌* **66**, 1081-7.
- 4) 原 征彦, 松崎妙子, 鈴木建夫 (1987) 茶成分のアンジオテンシン I 変換酵素阻害能について. *日本農芸化学会誌* **61**, 803-8.
- 5) Kinoshita E, Yanakoshi J, Kikuchi M (1993) Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biotech Biochem* **57**: 1107-10.
- 6) 丸山 進 (1989) 食品タンパク質からの血圧降下ペプチドの生成. *バイオサイエンスとインダストリー* **47**, 1182-6.
- 7) 河村幸雄 (1990) 食品タンパク質由来の生理機能性ペプチド. *食品工業* **30**(2), 20-9.
- 8) 吉川正明, 千葉英雄 (1990) 食品由来の生理活性ペプチド. *食品工業* **30**(4), 20-5.
- 9) 村元 学, 河村幸雄 (1991) 米タンパク質と米タンパク質由来の抗血圧上昇性 (アンジオテンシン変換酵素阻害) ペプチド. *食品工業* **34**(22), 18-26.
- 10) 末綱邦男, 箴島克裕 (1989) イワシ筋肉由来ペプチドの *in vivo* における血圧降下作用ならびに血管拡張作用について. *日本栄養・食糧学会誌* **42**, 47-54.
- 11) Miyoshi S, Kaneko T, Yoshizawa Y, Fukui F, Tanaka H, Maruyama S (1991) Hypotensive activity of enzymatic α -zein hydrolysate. *Agric Biol Chem* **55**: 1407-8.
- 12) 末綱邦男 (1991) イワシ筋肉, 大豆, ブタプラズマ由来トリペプチドのアンジオテンシン I 変換酵素阻害剤としての SHR に対する降圧効果. *基礎と臨床* **25**(7), 249-65.
- 13) Astwan M, Wahyuni M, Yasuhara T, Yamada K, Tadokoro T, Maekawa A (1995) Effects of angiotensin I-converting enzyme inhibitory substances derived from Indonesian dried-salted fish on blood pressure of rats. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 425-9.
- 14) 長谷川昌康 (1992) かつお節由来の血圧降下ペプチド. *食品と開発* **27**, 43-5.
- 15) 河村幸雄, 杉本俊男 (1991) アンジオテンシン変換酵素阻害物質. *公開特許公報*, 平 3-167198.
- 16) 吉田恵子 (1996) ブラックマッペタンパク質の分画とそれらの性状について. *土浦短期大学紀要* **24**, 60-8.
- 17) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保 (1986) 黒緑豆タンパク質画分とその発芽過程における変化について. *日本栄養・食糧学会誌* **39**, 415-21.
- 18) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペグロブリンの性質. *日本栄養・食糧学会誌* **50**, 73-6.
- 19) 吉田恵子, 四十九院成子, 福場博保, 田所忠弘, 前川昭男 (1997) ブラックマッペ発芽体の各部位におけるタンパク質および酵素活性の変動について. *日本栄養・食糧学会誌* **50**, 153-9.
- 20) 山本節子, 戸井田一郎, 岩井和郎 (1980) 血清アンジオテンシン変換酵素活性測定法の検討. *日本胸部疾患学会雑誌* **18**, 297-303.
- 21) 千葉英男監修 (1992) 食品の生体調節機能, p. 546-55. 学会出版センター, 東京.

(1998 年 1 月 4 日受理)