血清 Haptoglobin に関する研究

第1報 肝脾疾患を中心とする Anisidine 法 による定量知見について

札幌医科大学内科学教室（指導 和田武雄教授）

別 役 郁 子（旧姓 小野）

STUDIES ON SERUM HAPTOGLOBIN

1. QUANTITATIVE DETERMINATION BY ANISIDINE METHOD ON HEPATIC AND SPLENIC DISORDERS

Ikuko BETSUYAKU

Department of Internal Medicine, Sapporo Medical College

(Prof.: Takeo Wada)

概要 血清型物質の一つである haptoglobin (Hp)の病態生理学的研究を意図した。型判定は Smithies の原法に従い正常対照 120例、各種疾患 155例について、型別出現頻度を比較観察した。定量は Javid の変法に従って、正常98例、肝脾疾患および貧血等52例について行なった。正常平均値は 108 ± 39.2 mg/dl（正常域は30～186mg/dl）で、これに対して肝疾患は一般に低 Hp 血症を示し、慢性肝炎、肝硬変症等では機能障害度と平行して無 Hp 血症を呈するに至る。病的血清蛋白像、血清 seromucoid 値との直接関係は証明されない。溶血性貧血、hypersplenism、その他一見正常対象における低 Hp の観察から、網内系機能その他の影響因子について推論した。

1938年 Jayle¹⁾らによつて報告された haptoglobin (以下 Hp) は、その後 α_2 -glob. に属する糖蛋白体であることが明らかにされたが、Smithies²⁾ は澱粉 gel 電気泳動法によつて Hp に個体差を見出すと共に、遺伝学的立場における Hp 型を發表して注目された。近年いわゆる血清型を中心に多くの業績が報告され、本邦においても二、三の發表が行なわれているが、これを臨床医学的見地に立つて研究した報告は必ずしも多くない。Jayle³⁾、Nyman⁴⁾ ら諸家⁵⁾⁶⁾⁷⁾の研究は、貧血あるいは肝機能障害が血清 Hp の消長に何らかの関係を持つことを示唆しているが、その消長あるいは代謝機構の詳細は充分には解明されていない。Hp が比較的以前から血清蛋白質の一組成

としてその特異的存在が認められながらも、臨床知見のつけ加えが少ない最大の理由としては、Hp定量法の困難性によると見なければなるまい。従来方法⁴⁾⁸⁾⁹⁾は条件の規正が煩雜である割に結果の正確を期し難く、一時に多くの試料を定量し得ない難点があつた。最近 Javid¹⁰⁾ は Anisidine 染色による新法を發表し、本法が上述の欠陥を補うとのべているところから、今回はその臨床応用を試みるにあたり、まず諸条件の規正を図り、肝脾疾患および貧血についてその変動を観察した。

実験方法

1. Hp 型の判定

(1) starch gel electrophoresis: Smithies²⁾ の原法に従い電気泳動用 plastic tray (20×230

× 6.5mm) を用意しこれに水解澱粉 (Connaught Lab., Tronto) を borate buffer (0.0088M H_3BO_3 , 0.022M NaOH) に溶解して加熱 gel 化したものを流しこみ、一夜氷室保存不透明化してから使用に供した。約200~300mg/dlのhemoglobin (Hb) 加血清の0.01ccを濾紙片 (6.5×10mm) につけ、一定間隔の gel 間の切りこみに挿入して泳動する。型判定の正確を期し、またmodified type の発見を容易ならしめるために、原則として型既知の対照血清と対比しつつ、double run を施行した。泳動にあたっては borate buffer (0.044 M H_3BO_3 , 0.01M NaOH, $\mu=0.077$) 0.05mA/mm², 270 V, 3.5時間泳動を基準条件として実施した。

(2) 型判定：泳動後 gel を水平に薄く二分し、比較的薄い一片は benzidine 試験に、他の一片は Amidoshwarz 10B 染色に供し、型を判別すると共に後者は保存標本とした。型そのものは Smithies¹¹⁾ の記載により、1-1, 2-1, および 2-2 の3型と、本法で Hp 帯を証明し得ない 0-0 型とを分類した。

II. Hp の定量法

Javid¹⁰⁾ の方法に準じて次のごとく行なつた。

(1) Hb 原液の調製：上清が完全に透明になるまで生理的食塩水でよく洗ったヒト血球に、約4倍量の蒸留水を加えて溶血させ、遠沈 (3,000 r.p.m.×40分間) する。上清の Hb 溶液 (Hb 原液) の Hb 濃度を cyanmethemoglobin 法¹²⁾ により正確に測定し、それが 3~4 g/dl の間のものを小試験管に分注し、-15°C に凍結保存する。

(2) Paper electrophoresis：血清泳動試料は、Hb 原液1容に対し血清9容の割合に混ざる。試料0.02ml を 2.5cm 巾に micropipette で濾紙につけ、phosphate buffer (pH 7.0, $\mu=0.233$) 内で、1 mV/cm 130 V, 5 時間泳動を行なう。泳動後100°C 15分間熱固定してから Anisidine (3,3'-dimethoxybenzidine) 染色を行なう。

(3) Anisidine 染色法：Anisidine 100mg を ethanol 70ml に溶解し、acetate buffer (pH 4.7) 18ml および蒸留水10ml を加える。使用直前に H_2O_2 を加えて総量 100ml とする。これを染色液として泳動濾紙片を10分間染色した後、たぐちに蒸留水で3回水洗し、100°Cにおいて乾燥する。densitometry により陰極側から free Hb, Hb-Hp complex, methemalbumin と分かれた3画分についての相対濃度を求め、加えた Hb 総量より Hb binding capacity としての Hb 量を求めた。

(4) Anisidine 染色による Hp 定量法の再現性の検討：100~400 mg/dl間の各 Hb 溶液そのものを泳動して Anisidine 染色を施し、定量上の信頼度を検討すると共に、血清3例について 300 および 400mg/dl の Hb 添加を行ない、それぞれの Hb-Hp complex として測定するさいの変動を検討した。

III. 血清蛋白分画および seromucoid 測定

前者は paper electrophoresis により (veronal buffer pH 8.6, $\mu=0.05$, 0.5mA/cm, 250V, 4時間), 後者は Winzler¹³⁾ 法によつて測定した。

実験成績

I. Anisidine 染色法による Hp 定量法の再現性について

a) 100~400 mg/dl 間の各 Hb 溶液0.02ml を泳動して、本法の定量上の信頼性を検討すると、各濃度試料とも実験誤差は約5%程度で、よく直

Fig. 1. Examination of reproducibility of Anisidine stain method.

線関係が保たれる (Fig. 1-a).

b) 血清3例にそれぞれ Hb 300および 400mg/dlを加え、同一条件下に各4回泳動を行ない Hp量を求めた。同一血清に Hb 300mg/dlを加えた場合と、400mg/dl加えた場合の Hp値にはほとんど差異を認めず、それぞれの測定値もほぼ一定して高い再現性を認め得る (Fig. 1-b). ゆえに Hb濃度 300~400 mg/dlを使用する限り実験誤差は5%を超えず、加えた Hb濃度差による Hp値の差はほとんど無視し得ると考えられる。したがって準備した Hb原液を10倍稀釈して血清に添加し、泳動試料の調製を計つてよいと考えられる。

II. Hp型出現頻度について

正常対照は理学的に異常の認められない19才から79才にわたる健康者男子94名および女子26名、計120名を選び、疾患対象は各種肝病変33名、貧血13名、脾腫5名、その他104名、計155名を選択した。これらの調査対象について Hp各型の出現頻度を村井の成績と対比すると Tab. 1のごとくである。正常対照群における各型出現頻度は、男女間に有意差なく ($\chi^2=4.33$, $P>0.05$), 全体として1-1型4.2%, 2-1型45.8%, 2-2型50%で、これらの中からは0-0型は検出されなかった。村井が健康者集団649例について調査したさいの成績では、4例に0-0型を見出しているが、この点を除き他の3型の出現率はほぼ一致する。各種疾患群については、肝硬変、溶血性貧血等において0-0型を見出したが、他の3型の出現率はそれぞれ1-1型5.8%, 2-1型37.4%, 2-2型47.0%で正常対照群のそれと差異を

Table 1. Hp types of sera from normal controls and miscellaneous diseases.

Hp Type		1-1		2-1		2-2		0-0		Total No.
		No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	No.	(%)	
Betsuyaku	normal male	2	(2.1)	44	(46.8)	48	(51.0)			54
	female	3	(11.5)	11	(42.3)	12	(46.2)			26
	total	5	(4.2)	55	(45.8)	60	(50.0)			120
	pathological	9	(5.8)	58	(37.4)	73	(47.0)	15	(9.6)	155
Total		14	(5.0)	113	(41.0)	133	(48.3)	15	(5.4)	275
Murai (1960)	normal male	20	(7.7)	93	(35.6)	147	(56.3)	1	(0.38)	261
	female	22	(5.7)	136	(35.0)	227	(58.5)	3	(0.77)	388
	total	42	(6.5)	229	(35.3)	374	(57.6)	4	(0.62)	649

Table 2. Serum Hp concentrations of normal controls.

Hp-Type	2-1 (mg/dl)	2-2 (mg/dl)	1-1 (mg/dl)	Total (mg/dl)
male	120±42.3	100±35.0	139	
Betsuyaku female	112±32.9	89±39.0	126	
total	118±41.1	97±36.6		108±39.2
normal range (2)	36~220	24~170		30~186
Murai (1960)	133.33 ±44.2	92.29 ±34.2	135.0 ±41.8	111.27 ±46.7
Hyman (1959)	106±37.0	82±33.7	136±29.6	110±41.0

認め得ない ($\chi^2=0.93$, $P>0.05$).

III. 正常対照における Hp 測定値について

正常対照120例中98例について Hp定量を行なった (Tab. 2). すなわち2-1型は118±41.1, 2-2型は97±36.6mg/dlを示し、両者間の差は有意である ($P<0.05$). なお1-1型は例数不足のため断定を下し得ない。これをさらに男女別に見ると、2-1型では男120±42.3, 女112±32.9, 2-2型男100±35.0, 女89±39.0mg/dlと各型共男がやや高値を示す傾向がある。全体を通じて本実験における Hp濃度の正常域は30~186mg/dlである。これら定量値の度数分布をみると Fig. 2のごとく、2-2型は単峰性を示すが、

Fig. 2. Incidence of serum Hp concentrations in different Hp types (normal controls).

2-1型には二峰性分離の傾向を認める。

IV. 諸種疾患における Hp 測定値について

(1) 肝疾患時における Hp 値

(a) 肝疾患の種類ならびに経過と Hp 値

各種肝機能障害例52例について、基礎病変別ならびに経過別に Hp 値を測定した。一般に基礎疾患の如何にかゝりなく、肝機能変化が高度に及ぶ時期には、しばしば Hp を検出し得なくなる (Fig. 3)。52例の最高値は277mg/dlで閉塞性黄疸例に認められ、これらの平均は 52 ± 53.5 mg/dlと広い変動を示す。急性肝炎では 90 ± 2 で、1例の重症例ではその最盛期に Hp 0 となり、3週後回復期に入つて88mg/dlと正常に復した。慢性肝炎では一般に低値を示し 48.3 ± 15.4 、その6例中2例に Hp 0 を見出した。肝硬変症では10例中8例までが Hp 0 を示し、平均 21.8 ± 24.2 で病変の慢性化、機能変化の進行と共に Hp 0 を示す例が多い。また肝硬変症を基盤とする hepatoma 3例も Hp 0 であり、長期にわたり閉塞性黄疸を呈した胆道癌の1例も末期において Hp 0 を示した。他の癌では一般に正常よりも高値を示す傾向があるが、転移性肝癌

Fig. 3. Serum Hp concentration of sera from patients with liver diseases, splenomegalies or anemias.

では正常域を出ず、必ずしも高くない。

(b) 血清蛋白画分との関係

これら肝疾患につき血清蛋白画分との関係をみると、全般を通じて有意の相関を認め得る画分はなく、特に Hp の含有画分である α_2 -glob. と関連を認め難い (Fig. 4)。試みに albumin (alb.) 2.5 g/dl 以上と、以下の症例別にそれぞれの Hp 値を比較すると (Fig. 5), 2.5 g/dl 以上の例においても Hp 0 のものが少なくない α_2 -glob. 0.40 g/dl 以上、以下別に比較しても、 α_2 -glob. 0.4 g/dl 以上の群にもかなり Hp 0 の場合が認められ、両者は必ずしも平行しない。しかし γ -glob. 2.2 g/dl 以上、以下別に比較すると、 γ -glob. 上昇例においては Hp 0 を示す例が比較的多い。

(c) seromucoid 値との関係

従来 Hp は seromucoid の一下分層であることが知られているところから両者の関係をみると、Fig. 6 に示すごとくで、seromucoid 値が正常

Fig. 4. Serum Hp and serum protein fraction (1).

Fig. 5. Serum Hp and serum protein fraction (2).

Fig. 6. Correlation between serum Hp levels and seromucoid concentrations.

範囲の肝硬変3例，慢性肝炎，原発性肝癌の各1例はそれぞれ Hp 0 を示した。

(2) 諸種貧血ならびに脾腫を伴う疾患における Hp 値

各種貧血について Hp 値をみると，溶血性貧血3例および再生不良性貧血1例についてはすべて Hp 0 を示すが，出血による二次性貧血は正常域にあり，本態性低色素性貧血3例はむしろ正常上界ないしそれ以上の値を示した。日本住血吸虫

症，Banti 症候群，急性白血病等で脾腫を伴う5例はすべて Hp 値が低く，hypersplenismの1例は脾摘後 Hp 0 から正常値に復した。

(3) 原因不明の低 Hp 血症について

さらに村井¹⁵⁾は既報の健康人集団における無 Hp 血症4例について，再度追求調査を行なった結果，今回はこれらはいずれも型判定が可能で，全例が2-1型を示した。また定量上1例は低値を示すが，その他は正常値を示した (Fig. 3)。

なお肝疾患全般について Hp 値と予後との関係を見ると，Fig. 3に示すごとく Hp 0 を示した15例中9例までが短期間に死亡し，特に肝硬変，肝癌等の諸例では病期とよく平行して死亡前 Hp 0 に移行する例が多く，Hp 量の低下によつて予後の判断が可能であつた。

総括ならび考案

本実験対象における Hp 型の出現頻度は2-2型が50%以上を占め最も多く見出され，2-1型がこれに次ぐ。1-1型は4~6%で少なく，0-0型は正常対照からは見出されなかつた。正常対照および病的対象間には有意差を認めない。

Hp の型別分布に関しては Smithies²⁾ 以来多くの研究^{4) 14)}によつて人種的分布の差が注目され，Allison¹⁴⁾は Nigeria 人において32.3%に及ぶ0型を報告し，また一般に有色人種においては白人種に比して1-1型の頻度が高いとされている。日本人集団に関する報告はさきに村井¹⁵⁾によつてなされたが，これに続いて行なつた今回の検索でもほぼ同様の成績が得られた。しかし今回は健康対照からは Hp 0 は発見されず，この中には村井¹⁵⁾が無 Hp 血症と報告した4例も含まれる。この点よりすれば0型の出現頻度はさらに定量的知見や，生理的変動等の基本的知見によつて再検討さるべきものと考えられる。今回はその主目的を Javid法による定量知見においたため，すでに Hp 減少の事実が推測されている肝脾疾患と二，三の貧血を対象に選んだが，これら疾病例の Hp 型出現頻度も正常例と大差を認めなかつた。むしろ疾患個々についての Hp 型出現頻度に関しては

今後例数を増して検討せねばならない。

正常対照98例の Hp 値は平均 $108 \pm 39.2 \text{ mg/dl}$ を示し、1-1型は例数不足であるが、92~157 mg/dl と高く、2-1、2-2型の順を示す。2-1および2-2型 Hp 値の間には有意差を認める。

かゝる定量値は Nyman⁴⁾ の平均 110 ± 41 、村井¹⁵⁾ の $111 \pm 46.7 \text{ mg/dl}$ によく一致し、測定法を異にしてもほぼ同じ結果が得られる。したがって Anisidine 法がより簡易な点においてその応用価値が認められ、予じめ試みた本法の信頼度検討でも高い再現性が示された点、本法は臨床研究上、資するところが大きいと考えられる。

型別定量値の差は従来より1-1、2-1、2-2の順に高いと言われているところであり、今回の成績からも1-1型の例数不足から結論的なことは言えないまでも、2-1型 118 ± 41.1 、2-2型 $97 \pm 36.6 \text{ mg/dl}$ と明らかにその差が認められる。このことは遺伝子 Hp¹ により合成される Hp は、遺伝子 Hp² により合成される Hp よりも量的に多いか、あるいは両者の Hb 結合能の上に差異があるかを示唆するものと言えよう。Hp 型別に定量値の分布をみても、2-2型は単峰性を示すが2-1型は二峰性を示し、この点でも定量法は異なるが村井¹⁵⁾、Nyman⁴⁾ の成績に一致する。型別 Hp 濃度の有意差と考え合わせ、諸家¹¹⁾¹⁶⁾ 報告のごとく2-1型の heterozygote である性格が立証される。なお男女間の Hp 値の差異については村井¹⁵⁾ は有意差なしとし、Nyman⁴⁾ は女が低いとしている。今回の成績ではやゝ女に低い傾向を認めた。

肝障害、特にそのび慢性実質性変化の推測される病変においては明らかに Hp 値は低下し、しばしば検出不能の状態を呈する。また同時にその消長は病態の経過に伴う。

従来 Hp の肝産生説には賛否両論あり一定しないが、肝機能と血清 Hp 値との関係は一般に推測されているところである。今回肝障害を伴う疾患群について得られた測定値の変動では、特に慢性肝炎、肝硬変、肝癌等におけるその減少が目

され、症例の経過観察上忠実に機能障害の程度と平行する事実を見出した。特に肝病変の慢性悪化にさいし Hp 0 を示すものゝ多くが死亡し、急性肝障害例でもその極期において Hp 0 を呈することがあると共に、それより再び検出可能となる場合には経過の好転が示され、よく予後判断の上に資し得る。一方肝腫脹は著明でも機能低下の著しくない鬱血肝においては正常値を示し、高 bilirubin 血症では一般に低 Hp を示すと言われるが、胃癌切除後の機械性黄疸例では高 Hp 値を示す等、鑑別診断の上においても考慮の余地が多い。むろん肝の如何なる機能と関係を有するかは今後の問題である。Nyman²⁰⁾ が estrogen 投与時に Hp 低下を認めた事実は、その肝における不活性化の関係において一つの手がかりを与えるかもしれない。

血清蛋白画分および seromucoid の変動と Hp 値の消長との間に相関を検討したが、有意な関係を明らかにし得ない。特に Hp の含まれる $\alpha_2\text{-glob.}$ あるいは seromucoid として測定される画分との間にも、特定の関係を立証し得なかつた。

一般に血清蛋白画分の変動上、alb. 減少、 $\gamma\text{-glob.}$ 増加あるいは $\alpha_2\text{-glob.}$ の減少は肝障害 pattern とされ、教室における谷内¹⁷⁾ の研究においては、本邦人については、alb. 2.5、 $\gamma\text{-glob.}$ 2.2、 $\alpha_2\text{-glob.}$ 0.40g/dl を以てその限界値としている。これを一応の基準として Hp 値との関係を見たが、有意の関連を認め得ない。むろん肝障害 pattern を呈する例に無 Hp 血症を認める場合が多いが、血清蛋白画分正常例でも低 Hp 血症あるいは無 Hp 血症を呈する例が見出される。このことは Nyman⁴⁾ は正常人においては Hp 含有画分である $\alpha_2\text{-glob.}$ 値と Hp 値との間に明らかに相関関係を認めているが、病的血清においては同一に論じ得ないことを示すものである。このことは $\alpha_2\text{-glob.}$ の不均一性と、それら画分内組成の病的変動が一定の動きを営まないことに起因するものであり、それぞれの分析的研究によつて解明されなければならぬまい。同様のことは seromucoid として

測定される組成値との間にも認められ、佐分利¹⁸⁾の報告からも病的 seromucoid 画分の不均一性が明らかにされており、それらの消長の不一致が首肯される。しかし肝障害時における Hb-Hp complex としての Hb 結合能の変化も一応は考慮すべきであるかもしれない。

諸種貧血ならびに脾腫を伴う疾患の中、本態性低色素性貧血では正常域、ないしその上界を占めるが、溶血性貧血、再生不良性貧血では著明な Hp 低下、無 Hp 血を呈する。Banti 症候群等脾腫を伴う例はほとんどが無 Hp 血を示し、1例は摘脾後正常値に復した。

Nyman⁴⁾、Allison¹⁹⁾らの報告にもあるように、Hb の catabolism の増加が Hp を減少せしめる因子の一つであることが考えられているが、これらの臨床知見は明らかにその考えを支持するものといえよう。特に溶血性貧血3例が全例無 Hp 血症を示した事実は、Laurell & Nyman⁵⁾らが Hb を静注する時速かに血漿 Hp と結合して流血中より消失し、Hp はそれが再生されるまで血中に見出し得ないという実験に基づく Hp の生理的役割に関する推論に一致する。すなわち Hp の低下には溶血現象の増加が関連をもち、したがって脾をはじめとする網内系機能もこれと密接な関係があるといえよう。hypersplenism の1例において摘脾後 Hp の血中出現を見た現象はこれを支持するものであり、Hp 代謝過程を研究する上に興味ある問題と考えられる。また先述のごとく一見健康対照例として選択されたものの中の無 Hp 例が、数次の検索においてこれを検出するに至った事例と考え合わせ、かゝる臓器組織機能の潜在性変化や、生活周期に関連する hormonal balance 等の意義も無視し得ず、いわば二次的無 Hp 血症の生起条件の究明は興味ある臨床課題の一つといえよう。

以上の成績を通じ、Anisidine 染色による Hp 定量法は比較的簡易かつ正確であり、今後広い応用価値を有するものと認め得た。

結 論

以上血清 Hp の臨床的研究においてまず Anisidine 染色法による定量法を検討し、Hp 型別に正常対照および各種肝脾疾患、貧血を中心に調査した。得られた結果を要約すると、

1) 正常対照および病的対象計 275名について Hp 型別頻度分布は、村井の成績とほぼ一致し、対照ならびに疾患別の差異は顕著でない。しかし今回は Hp 0 を示す場合は病的対象に限られ、正常対照には見出されなかつた。

2) 正常血清 Hp 値平均は 108 ± 39.2 mg/dl (30 ~ 186 mg/dl) である。型別にみると 2-1 型 Hp 値は明らかに 2-2 型 Hp 値よりも高い。

3) 肝機能障害における血清 Hp は一般に低値を示し、肝実質障害高度となるにつれて Hp 値の低下も著明で、無 Hp 血症を来すに至る。また急性肝炎等では回復に伴ない減少した Hp の正常復帰を認める。したがってその産生母地との関係はとも角として、少なくとも肝機能の健否は Hp 値に影響する重要な一因子といえる。

4) 肝障害時 Hp 値と血清蛋白画分ならびに seromucoid 値の消長との間には相関を認めない。その含有画分たる α_2 -glob. および seromucoid と平行消長しない事実はそれらの成分の不均一と、その不均一成分の病的変動が一律でないことによると考えられる。

5) Banti 症候群をはじめ脾腫を伴う二、三の疾患、特に溶血性貧血ではその大部分が無 Hp 血症を示し、Hp が Hb と結合する特性の果す役割が重視されると共に、網内系機能もまたその消長に関係を有すると考えられる。

6) さきに村井により報告された無 Hp 血症を追求調査した結果、1例は低値を示すが、その他は完全に正常域への復帰を示した。これらの事実より、いわゆる二次性無 Hp 血症の原因として、潜在性肝ないし網内系機能変化等のほかに、生活周期、hormonal balance 等も関係を有しはせぬかと推測する。

文 献

- 1) Polonovski, M. & Jayle, M.F.: Bull. Soc.

- Chim. Biol. 20, 978 (1938). —2) Smithies, O.: Biochem. J. 61, 629 (1955). —3) Jayle, M.F., Boussier, G. & Batias, M.J.: Compt Rend. Soc. Biol. 149, 46 (1955). —4) Nyman, M.: Scand. J. Clin. & Lab. Invest. 11, Suppl. 39 (1959). —5) Laurell, C.B. & Nyman, M.: Blood 12, 493 (1957). —6) Nosslin, B.F. & Nyman, M.: Lancet 1, 1000 (1958). —7) Allison, A.C.: Proc. Roy. Soc. Med. 51, 641 (1958). —8) Jayle, M.F.: Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 876 (1951). —9) Owen, J.A., Better, F.C. & Hohen, J.: J. Clin. Path. 13, 163 (1960). —10) Javid, J. & Horowitz, H.I.: Am. J. Clin. Path. 34, 35 (1960). —11) Smithies, O. & Walker, N.F.: Nature 178, 694 (1956). —12) 嶋谷亮一: 日新医学, 36, 452 (1949). —13) Winzler, R.J.: Methods of Biochemical Analysis 2, 279 (1955). —14) Allison, A.C., et al.: Nature 181, 824 (1958). —15) 村井京子: 人類遺伝誌, 5, 205 (1960). —16) Bearn, A.G. & Franklin, E.C.: Science 128, 596 (1958). —17) Yachi, A.: Sapporo Med. J. 17, 389 (1960). —18) 佐分利収: 札幌医誌, 投稿中. —19) Allison, A.C. & Phil, D.: Brit. Med. J. 2, 1137 (1957). —20) Nyman, M.: cit. in 4).