無蛋白食摂取によるラット肝細胞内小器官の形態変化*

宮沢 栄次, 亀高 正夫

(東京大学農学部農芸化学科)

昭和 51 年 7 月 14 日 受 理

Morphological Changes Produced by Protein-free Diet in the Rat Liver Cells and Subcellular Organells

By Eiji MIYAZAWA and Masao KAMETAKA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture,
The University of Tokyo, Tokyo*

Male rats weighing about 180g were fed a protein-free diet for 0, 2 and 7 days. The liver cells and subcellular organells were observed by electron and light microscopy and their profiles were analysed statistically. The results obtained are summarized below.

1. The volumes of cells, cytoplasm and nuclei were reduced, but the volume fraction of nuclei was increased a little. 2. The volume fraction of mitochondria (Mt) did not show any change, but with peroxisomes (Per) a little decrease was observed at the 2nd day. With lipid droplets (LD) several times increase was observed. 3. The number of Mt per unit cytoplasmic volume was decreased at the 2nd day, but returned to an almost normal level at the 7th day. With Per almost the same tendency was observed with less variation. 4. The proportion of non-elliptic shaped mitochondrial profiles was increased. 5. The volume of Mt was increased at the 2nd day and returned to an almost normal level at the 7th day. With Per a little decrease was observed at the 2nd day. 6. The surface area of mitochondrial outer membrane per unit cytoplasmic volume showed a little decrease at the 2nd day. With rough endoplasmic reticulum (RER) a decrease to 83% of the control was observed at the 7th day. The surface area of cristae membrane per unit mitochondrial volume did not show any change. 7. Parallel lamellar formations of the RER were reduced and singly oriented cisternae of RER surrounding Mt were increased.

(Received July 14, 1976)

緒 言

無蛋白食摂取初期において、肝臓重量は他の諸臓器に比して急激に減少するが、同時にアミノ酸分解系の種々の酵素、尿素サイクル関連酵素、キサントキシンダー

ゼ⁽¹⁾、薬剤代謝⁽²⁾および血清アルブミン合成⁽³⁾等の活性も減少する。一方、肝臓蛋白質へのアイソトープの取り込みは増大する⁽⁴⁾。このように多くの生化学的過程に変化が引き起こされるが、この時期の細胞の形態学的変化に関する報告はない。そこで著者らは、Weibel の統計的手法⁽⁵⁾を用いて、電子顕微鏡(電顕)および光学顕微鏡(光顕)写真を解析し、細胞および細胞内の種々の小器官について考察した。

実 験 方 法

1. 実験動物 標準飼料(20%カゼイン)で飼育した体重約180gのウイスター系雄ラット9頭を1区3頭、3区に分け、無蛋白質飼料を0, 2, 7日間与えた後、実

* 本報文では、次の略号を用いる。PPA: 門脈周辺区域(門脈より細胞数層以内の区域), PCA: 中心静脈周辺区域(中心静脈より細胞数層以内の区域), MA: 中間区域(PPA および PCA 以外の区域), Mt: ミトコンドリアまたはミトコンドリオン, Per: パーオキシソーム, RER: 粗面小胞体, SER: 滑面小胞体, LD: 脂肪滴, Lys: ライソソーム, C, PF 2, PF 7 群: それぞれ、無蛋白食摂取 0, 2, 7 日の群, PF 群: 無蛋白食摂取群。

験に供した。飼料の切り替えは、午後6時に行なった。飼料組成については、前報⁽⁶⁾を参照されたい。

2. 顕微鏡観察用切片の作製⁽⁷⁾および写真撮影 午前10時～11時にラットを断首放血し、解体して直ちに肝臓を取り出し、左葉のはぼ中央部から体積約50～100 mm³の組織片を切り取った。1% オスミック酸固定液(0.1 N の s-コリジン緩衝液および0.14 M のショ糖を含む)中でさらに細かく切り、体積約2 mm³の組織片にし、上記固定液中で、0°C、2時間固定した。その後、50% (10分)、75%、80%、90%、95% (各15分)、100% (5分、3回) のエタノールで順次脱水し、無水アセトン(10分、3回)で置換、エポソ混合液(Epon 812: methylnadic anhydride: dodecenyl succinic anhydride: DMP 30, 17.2: 8.9: 11.7: 0.75 by volume)と無水アセトンの等容混合液中に1時間、両者の3:1混合液中に3～4時間放置後、エポソ混合液を満たしたゼラチンカプセル中に包埋し、40°Cで12時間、さらに60°Cで2日間、加温して樹脂を重合させた。Ultratome 4801 A (LKB社、スウェーデン)を用いて、厚さ約1.2 μの切片を1ブロックより1枚ずつ切り出し、トルイジンブルーで染色後、顕微鏡観察に供した。さらに、その顕微像から、小葉内区域を定めた後、その区域が含まれるようにブロック表面を小さくトリミングし、厚さ50～100 μmの電顕用切片を作製した。酢酸ウラニル飽和溶液(70%エタノール)およびReynoldsのクエン酸鉛溶液で染色した後、電子顕微鏡JEM-7 A (日本電子(株))で観察および撮影を行なった。肝小葉は、PCA、MA、PPAの3区域に分け、CおよびPF2群は3区域とも、PF7群はMAのみを観察した。1頭より各区域当り6～10枚(1ブロックより1～2枚、4～5ブロック)の低倍率(×6100～8400)と高倍率(×23,900～26,500)の電顕写真および1頭より5～6枚(×590)の光顕写真を撮影した。低倍率電顕写真は、肝実質細胞の細胞質部分の観察用であるので、その部分が多く含まれ、かつ像が鮮明であることを条件に撮影視野を選んだ。高倍率電顕写真はMtのクリステの観察用なので、なるべくMtが多数含まれるように視野を選んだ。光顕写真については、像が鮮明であること以外には、無作為に視野を選び撮影した。

3. 顕微鏡写真の統計的処理法および各種パラメータの計算法⁽⁸⁾ たて、横1 cmの間隔の格子を書き入れた透明なアクリル板を写真(電顕写真は25×30(cm)、光顕写真は12×16.5(cm))に重ね、以下の処理を行な

った。電顕写真: Mt, Per, LDの体積比(細胞質に占める各成分の体積の割合) V_v は、各成分の像と重なった点(格子の交点)の数を、細胞質上の全点数で除すことにより算出し、また RER 膜および Mt の外膜の密度(単位細胞質体積当りの表面積)、さらに Mt のクリステ膜の密度(単位 Mt 体積当りの表面積) S_v は、格子のたて線のみに着目して、その直線を横切った回数を数えて、次の式から算出した。

$$S_v = 2 \times \frac{I}{L} \quad (1)$$

ただし、 I は RER 膜、Mt 外膜またはクリステ膜が直線を横切った回数、 L は細胞質中、または Mt 中での直線の長さ(実際の長さを写真の倍率で除して算出)である。Mt および Per の単位細胞質体積当りの個数 N_v は、次の式により算出した。

$$N_v = \frac{K}{\beta} \times \sqrt{\frac{N_A^3}{V_v}} \quad (2)$$

ただし、 N_A は単位細胞質断面積当りの Mt または Per の像の数、 K は大きさの分布により決まる係数で、ほとんどの場合、1.0～1.1の間におさまる。本報告では1.0と仮定するが、そうすると数%程度過小評価になる。 β は回転楕円体と仮定した場合、その短軸と長軸の比により決まるが、本報告では、Mt および Per の比をそれぞれ1:4 および1:1と仮定して、前者は2.38、後者は1.382とした。単一 Mt および単一 Per の体積比、体積比と N_v から算出した。

RER 膜と100 μm 以内の距離に位置している Mt 外膜の割合 Mt% (RER)、および Mt 外膜と100 μm 以内の距離に位置している RER 膜の割合 RER% (Mt) を求めた(RER の1層の厚さは約数十 μm である)。両者は Mt と RER との近接度を表示するために、本報告で新たに算定したものである。前者は、《Mt 外膜が格子のたて線により横切られた全回数》で、《そのうち、たて線との交点から膜面に垂直方向に100 μm 以内に RER が存在する回数》を除すことにより、また、後者は《RER 膜がたて線により横切られた全回数》で、《そのうち、たて線との交点から膜面に垂直方向に100 μm 以内に Mt 外膜が存在する回数》を除すことにより算出した。たとえば Fig.1 で、Mt% (RER) は $(2/4) \times 100 = 50$ 、RER% (Mt) は $(3/10) \times 100 = 30$ となる。

光顕写真: (2)式に次の値、すなわち、Weibel ら⁽⁸⁾に従い $\beta = 1.382$ (核を球とみなす) および $K = 1.03$ を代入して、単位細胞体積当りの核の個数を算出し、その

Fig. 1. Locational Relationship between Mt and RER.

From this figure the values of Mt % (RER)¹⁾ and RER % (Mt)²⁾ are calculated to be $(2 \div 4) \times 100 = 50$ and $(3 \div 10) \times 100 = 30$ respectively.

¹⁾ Mt % (RER) is the per cent of mitochondrial outer membrane which is located within 100 mμ from RER membrane. ²⁾ RER % (Mt) is the per cent of RER membrane which is located within 100 mμ from mitochondrial outer membrane.

Fig. 2. Various Non-elliptic Shaped Mitochondrial Profiles.

Inner membranes are not depicted in this figure.

逆数を細胞体積とした。写真上の核の直径を測定することにより核の断面積を算出し、それを細胞の断面積で除して核の体積比を求めた。また、核の体積は《核の体積比》×《細胞体積》から、細胞質体積は《細胞体積》-《核の体積》から算出した。

実験結果

1. 定性的観察

全般的にいえば (Fig. 8, 9), C群では Weibel ら⁽⁸⁾ および Loud⁽⁹⁾ の観察とはほぼ同様であるが, PF 群との比較について, 各小器官ごとに以下に述べる。

Mt: 区域により体積が異なり, 特に PCA で小さかった。PF 2 群では, どの区域においても, C群に比べ体積が増大していたが, 特に PPA で著しかった。Mt の数は

Fig. 3. Changes in the Locational Relationship between Mt and RER.

A: control group, B: protein-free group.

C, PF 2 両群において, PCA で最も多かった。Mt の断面の形としては, Fig. 2 に示すようなものが, PF 群において, より多く現われた。

RER: C 群では平行に数層から十数層ずつの群を形成しているものが多いが, PF 群では, 1 層ずつばらばらになり, Mt の周囲を取り囲むものが顕著に増加した (Fig. 3, 10, 11)。

LD: C 群においてもときおり認められ, その大きさの分布は広範囲にわたるが, 大きくても直径約 2 μ 以下である。断面の形はほぼ円形であるが, 周囲には凹凸がある。PF 群では大きな LD が多数認められ, 直径が 5 μ くらいにおよぶものもあった。LD は, 毛細血管に近い細胞周辺に多く存在し, 特に小型のものほどその傾向が強い。Mt や RER が LD の周囲を取り囲んでいる像も多く認められた (Fig. 12, 13)。PF 群の中でも, 飼料摂取量が少なかった個体において, LD が多く認められた。

その他: SER, Per, Lys に関しては, 特に注目すべき

Fig. 4. Changes in the Volume Fraction of Mt (○—○), Per (●—●), and LD (○---○).

Each point is the mean of three rats. The vertical bars indicate standard error.

Table I. Changes in the Liver Weight and in the Volume of Cell, Cytoplasm and Nucleus¹⁾

Group	Liver weight (g) per 100g initial body weight	Volume (μ^3)			Volume fraction of nuclei (%)
		Cell	Cytoplasm	Nucleus	
C	5.40 $\pm$ 0.06	10,790 $\pm$ 1490	10,000 $\pm$ 1450	795 $\pm$ 56	7.54 $\pm$ 0.79
PF 2	3.94 $\pm$ 0.24 ^{a)}	8240 $\pm$ 490	7550 $\pm$ 460	693 $\pm$ 51	8.43 $\pm$ 0.55
PF 7	3.72 $\pm$ 0.43 ^{b)}	7140 $\pm$ 710	6470 $\pm$ 680	669 $\pm$ 36	9.49 $\pm$ 0.67

¹⁾ The rats maintained on a 20% casein diet till about 180g of body weight were fed a protein-free diet 0, 2 and 7 days (C, PF 2, and PF 7 group, respectively). Each figure shows mean $\pm$ SE of 3 rats. ^{a)} $p < 0.01$, significantly different from the control group; ^{b)} $p < 0.02$, significantly different from the control group.

変化は認められなかった。

全体的に, Mt, RER および LD 等の相対的な位置関係の変化が顕著であった。

2. 定量的観察

Table I に示すように, 細胞, 細胞質および核の体積は, 初めは急激に, その後はゆるやかに減少し, 肝臓重量とはほぼ同様なパターンで減少した。また, 核の体積比は上昇した。Mt の体積比はほとんど変化しなかったが, Per の体積比は2日でやや減少の傾向を示した。LD の体積比は増加したが, 個体差が大きかった (Fig. 4)。Mt および Per の単位細胞体積当りの数は, PF 2群のすべての区域において, 減少の傾向を示しているが, PF 7群で, 両者とも PF 2群の値よりも増加した (Fig. 5 (A))。PF 2群のすべての区域において, Mt の体積は増大した

Fig. 5. Changes in the Number (A) and Volume (B) of Mt (○—○) and Per (●—●).

Each point is the mean of three rats. The vertical bars indicate standard error.

が, PF 7群の MA では PF 2群よりも減少した。Per の体積は, PF 7群において減少した (Fig. 5 (B))。中央部にくびれがあったり, 枝分かれしている等, 回転楕円体の切り口からでは期待されない形の Mt の切断面が, すべての区域において増加した (Table II, Fig. 2)。単位細胞質体積当りの Mt 外膜の表面積は, PF 2群でやや減少の傾向を示し, RER 膜は

Fig. 6. Changes in the Surface Area of Mitochondrial Outer Membrane (○—○), RER Membrane (●—●), and Cristae Membrane (□—□).

Each point is the mean of three rats. The vertical bars indicate standard error.

Fig. 7. Changes in Mt%(RER) and RER%(Mt).

○—○ Mt%(RER), ●—● RER%(Mt). See the legend of Fig. 1 for the meanings of Mt%(RER) and RER%(Mt). Each point is the mean of three rats. The vertical bars indicate standard error.

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

Fig. 8 and 10 and Fig. 9, 11, 12 and 13 are the Electron Micrographs of Liver Parenchymal Cells of Rats from C and PF 2 Group Respectively.

Well developed parallel lamellar formations of RER are seen in rats from C group (Fig. 8 and 10). In rats from PF 2 group singly oriented cisternae of RER are prominent and most Mt are surrounded by them, (Fig. 11) and big LD are numerous (Fig. 9). Note the close association of LD and Mt or RER (Fig. 12 and 13).

Magnification of electron micrographs are $\times 3500$ (Fig. 8 and 9), $\times 5000$ (Fig. 10 and 11), $\times 7000$ (Fig. 12) and $\times 12,700$ (Fig. 13).

Table II. Changes in the Percentage of Non-elliptic Shaped Mitochondrial Profiles.¹⁾

Group	Area		
	PCA	MA	PPA
C	7.16±0.88	6.08±1.08	6.76±1.37
PF 2	10.83±1.35	10.87±0.82 ^{a)}	10.30±1.86
PF 7		9.28±1.66	

¹⁾ Mean±SE of 3 rats. See Fig. 2 for non-elliptic shaped mitochondrial profiles.

^{a)} $p < 0.05$, significantly different from the control group.

PF 7 群で約 83% に減少した。単位 Mt 体積当りのクリステ膜の表面積は、ほとんど変化しなかった (Fig. 6)。Fig. 7 に示すように、無蛋白食摂取によって、すべての区域において、Mt と RER が顕著に接近し、Mt%(RER) および RER%(Mt) が上昇した。

考 察

Table I に示したように、肝臓重量および細胞容積は、ほぼ同程度に減少しており、無蛋白食摂取による肝臓重量の減少は、個々の細胞容積の減少が主原因であると判明した。

Mt は PPA において最も大きく、数が最も少ないこと、および PCA においては、その逆になることは Loud の報告⁽⁹⁾と一致した。無蛋白食を摂取すると、すべての区域において、細胞当りおよび単位細胞質体積当りの Mt 数は減少したが、個々の Mt の体積は増大した。それと同時に、Fig. 2 に示したような断面図を与える Mt が、より多く現われるようになった。これらの形の Mt は多分、融合の結果できたものや、分裂しかかっているものなのであらうと考えられる⁽¹⁰⁾。

Kimberg ら⁽¹¹⁾は、ラットに酢酸コルチゾンを投与すると、肝臓の Mt 数は 4 分の 1 に減少するが、単一 Mt の体積は約 4 倍になり、かつ、MtDNA 量に変化していないことから、酢酸コルチゾン投与時の Mt 数の減少は、融合によるものであらうと推定している。細胞全体が縮小しつつある無蛋白食時における Mt 数の減少は、Mt の融合以外の要因、すなわち、Mt 生成速度の減少や、Mt 分解の促進も、かなりの割合を占めていると考えられるが、特に前者の比重が大きいと考えられる。その理由として、現在、Mt の生成に関しては、既存の Mt の生長・分裂という説が最も有力であるが、もし、この過程のうち分裂過程が、なんらかの要因で遅くなれば、生成したての比較的小さい Mt は減少し、分裂前の比較

的大きな Mt の割合が増すことになり、このことは、無蛋白食時に観察された単一 Mt の体積の増大を良く説明している。

平均的な Mt の形を短軸と長軸の比が 1:4 で長軸のまわりを回転してできる回転楕円体と仮定したが、そうすると $(\text{Mt 外膜の表面積})/(\text{Mt の体積})$ は、たとえば、C 群の MA においては $4.77 \mu^{-1}$ となる。この値を、Fig. 4 と Fig. 6 とから計算した値 $4.69 \mu^{-1}$ と比較すると、ほとんど一致した。他の群区においても同様に、良い一致を示した。後者は、なんら Mt の大きさや形に関する仮定を設けなくて得られる値であり、この値と前者の値が良く一致することは、平均的な Mt の形に関する仮定が、ほぼ妥当であるといえよう。もちろん、回転楕円体の断面からは期待され得ない像が明らかに認められるのであるから、すべての Mt がこの仮定に当てはまるわけではない。

数層から十数層ずつ平行に並んで群をなして存在していた RER は、無蛋白食摂取により、1 層ずつばらばらになり、Mt のまわりを取り囲んだり、複数の Mt の間を縫って存在したりして、Mt とのなんらかの関係の増大を示唆するような存在形態を取るようになった。無蛋白食摂取初期に血清アルブミンの合成は減少し⁽⁸⁾、かつ、肝臓自身の蛋白質へのアイソトープの取り込みが増大することから、血清アルブミン等の輸出性蛋白質は、標準食時に多く観察される平行に群をなして存在している型の RER のポリゾームでもおにも合成され、一方、肝臓自身の蛋白質は、群をなさずに 1 層ずつばらばらに存在し、Mt のまわりを取り囲んでいる型の RER のポリゾームおよび遊離のポリゾームで、おにも合成されているのではないかと推察される。

約 $100 \text{ m}\mu$ 以内の距離で互いに近接している Mt 外膜と RER 膜の MA における表面積 ($\mu^2/100 \mu^3$ 細胞質) は、Fig. 6 と Fig. 7 の値から計算して、それぞれ C 群で 25.4, 28.8, PF 2 群で 38.8, 44.0, PF 7 群で 41.2, 45.7 となるが、これを細胞当りの表面積 ($1000 \mu^2/\text{細胞}$) にすると、C 群で 2.54, 2.88, PF 2 群で 2.93, 3.32, PF 7 群で 2.67, 2.96 となり、互いに近接している表面積が無蛋白食を摂取しても、ほぼ一定に保たれている (Mt 外膜の方が RER 膜よりも、接している表面積が小さいのは、Mt が RER より内側に存在するためである)。細胞当りの Mt 外膜および RER 膜の減少にもかかわらず、両者の近接している部分の面積がほとんど減少していないのは興味

深い。無蛋白食摂取により乏しくなったアミノ酸を、輸出用蛋白質でなく自己の蛋白質の合成、特に Mt の蛋白質の合成のために利用しようとしていると考えられないであろうか。ただし、アロキサン糖尿病⁽¹²⁾、副腎除去⁽¹³⁾、甲状腺機能亢進症⁽¹⁴⁾、トリヨードチロニン投与⁽¹⁵⁾、食餌摂取量の制限⁽¹⁶⁾等、無蛋白食摂取以外の種々の要因によっても、Mt の周囲を取り囲む RER の増加が認められるので、現時点では RER の形態変化に関する明確な意義付けが困難である。

細胞内の種々の基質は均等に分布しているのではなく、種々の膜系により、多くのコンパートメント（小器官）に分割されて、それぞれ場で異なった濃度で存在しており、かつ、コンパートメント間で、基質の授受がある。たとえば、RER は Mt で作られた ATP を利用して蛋白質を合成し、Mt は RER で合成された蛋白質を利用する。もし両小器官が接近すれば、非常に効率良く反応が進むであろう。細胞内小器官を研究する際、遠心分離により分画して純化する手法は、小器官の性質を調べるには有効な手段であるが、実際のその小器官の活性は基質の濃度により制約を受けることを考えると、小器官相互の位置関係はきわめて重要なものとなってくる。その意味で、種々の生化学的変化が起きている場合、*in situ* による細胞観察は、貴重な情報を提供するであろうと考えられる。

従来の多くの電顕観察に基づく報告は、小葉内区域を考慮しなかった。同一区域にある細胞同士との比較のみが意義を持っていることは、たとえば、Mt の大きさや数の検討をする際、明らかであろう。さらに、典型的な写真を掲載して、定性的な観察のみに終わっている報告では、よほど特異的な変化でない限り、もともと正常な組織中においても、細胞間に種々の様相の差があるので、参考にしにくい場合がある。そこで著者らは、肝小葉を3区域に分け、多数の写真について統計処理を試みた。

本報告における種々のパラメーターの数値の中には、Weibel ら⁽⁸⁾および Loud⁽⁹⁾の報告とやや異なるものがあるが、これらは動物の日令、系統、性、切片の固定法、包埋剤等の相違によるものであろうと考えられる。

要 約

体重約 180 g の雄ラットに無蛋白食を 0, 2, 7 日間与え、肝臓細胞および細胞内小器官を電顕および光顕で観察し、統計的手法で解析した。その結果、無蛋白食の影響として、次のような成績が得られた。

響として、次のような成績が得られた。

1. 細胞、細胞質および核の体積は減少し、核の体積比はやや増加した。
2. Mt の体積比はほとんど変化しなかったが、Per では、2 日目やや減少の傾向を示した。LD では、平均値で約 6 倍に上昇した。
3. 単位細胞質体積当りの Mt 数は 2 日で減少し、7 日でほぼ回復した。Per 数も、変動幅は Mt 数よりも少ないが、ほぼ同様な傾向を示した。
4. 断面が楕円形以外の形をした Mt の割合が増加した。
5. 個々の Mt の体積は 2 日で増大し、7 日でほぼ C 群の値に戻った。Per の体積は 7 日でやや減少した。
6. 単位細胞質体積当りの Mt の外膜の表面積は、2 日でやや減少の傾向を示した。RER 膜では、7 日で約 83% に減少した。単位 Mt 体積当りのクリステ膜の表面積は、ほとんど変化しなかった。
7. RER は群を形成するものよりも、1 本 1 本ばらばらになり Mt の周囲を取り囲むものが顕著に増加した。

本研究にあたり、ご助言を賜った岩手大学農学部野口忠助教授、ならびに電子顕微鏡技術全般に関する懇切ていねいなご指導をいただいた本学部家畜解剖学教室の方々に深く感謝いたします。

本報告の要は、日本農芸化学会昭和 50 年度大会において発表した。

- (1) J. H. Kaplan and H. C. Pitot: "Mammalian Protein Metabolism," Vol. IV, ed. by H. N. Munro, Academic Press Inc., New York and London, 1970, p. 387.
- (2) R. Kato, T. Oshima and S. Tomizawa: *Japan. J. Pharmacol.*, **18**, 356 (1968).
- (3) R. Kirsh, L. Frith, E. Blach and R. Hoffenberg: *Nature*, **217**, 578 (1968).
- (4) 後藤明彦, 亀高正夫: 農化, **49**, 197 (1975).
- (5) E. R. Weibel: *Int. Rev. Cytol.*, **26**, 235 (1969).
- (6) T. Noguchi, E. Miyazawa and M. Kametaka: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 253 (1974).
- (7) 串田 弘: 超薄切片法, 文光堂, 1971, p. 25, 55, 90, 162, 187, 200.
- (8) E. R. Weibel, W. Stäubli, H. R. Gnägi and F. A. Hess: *J. C. B.*, **42**, 68 (1969).
- (9) A. V. Loud: *ibid.*, **35**, 27 (1968).
- (10) J. Wiener, A. V. Loud, D. V. Kimberg and D. Spiro: *ibid.*, **37**, 47 (1968).
- (11) D. V. Kimberg and J. N. Loeb: *ibid.*, **55**, 635 (1972).
- (12) C. R. Morgan and R. A. Jersild, Jr.: *Anat. Rec.*, **166**, 575 (1970).
- (13) R. R. Cardell, Jr.: *ibid.*, **180**, 309 (1974).
- (14) G. Callas and M. S. Cannon: *ibid.*, **181**, 71 (1974).
- (15) A. Reith: *Lab. Invest.*, **29**, 216 (1973).
- (16) P. B. Herdson, P. J. Garvin and R. B. Jennings: *Am. J. Path.*, **45**, 157 (1964).