障害赤血球に対するアデノシン三リン酸-塩化マグネシウム (ATP-MgCl₂) の作用

清水一広,* 川添祥一, 山田 修, 長瀬英生

扶桑薬品工業株式会社研究開発センター

Effects of Adenosine Triphosphate-Magnesium Chloride (ATP-MgCl₂) on Shocked Red Blood Cells

KAZUHIRO SHIMIZU,* SHOUICHI KAWAZOE, OSAMU YAMADA
and HIDEO NAGASE

*Fuso Pharmaceutical Industries Ltd. Research and Development Department,
2-3-30, Morinomiya, Jyoto-ku, Osaka, 536, Japan*

(Received February 12, 1985)

The present study was undertaken to determine if adenosine triphosphate-magnesium chloride (ATP-MgCl₂) would have beneficial effects on the membrane electrolytes transport and deformability of shocked red blood cells (RBC) with impaired cellular energy metabolism.

Shocked RBC suspensions were obtained by incubation of 10% rabbit RBC suspension in phosphate buffered saline at 37°C for 14 h. Cellular ATP level was reduced to approximately 6% of normal value by this incubation. ATP-MgCl₂ (100 μM), added to the incubation medium along with glucose (10 mM) after 14 h of incubation, significantly prevented further decreases in cellular ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) levels. Increases in intracellular sodium concentration and potassium leakage from RBC were counteracted by simultaneous ATP-MgCl₂ and glucose treatment and pH of the incubation medium showed significant reduction compared with the control. It was also observed that glucose utility and deformability of shocked RBC were improved by ATP-MgCl₂ and glucose treatment.

These results indicate that ATP-MgCl₂ would be helpful to restore the impaired RBC function by improving the intracellular energy metabolism.

Keywords—red blood cell; adenosine triphosphate-magnesium chloride; 2,3-diphosphoglycerate; energy metabolism; red cell deformability

赤血球 (RBC) は嫌気的な代謝によって adenosine triphosphate (ATP) の産生を行い、その ATP は赤血球の形態保持や陽イオン能動輸送のエネルギー源として利用され赤血球の機能維持に果たす役割は大きい。

なんらかの原因によりショックが発生すると赤血球内電解質バランスは異常をきたし赤血球の変形能及び浸透圧抵抗性は低下し、いわゆる sick cell に陥ることが報告されている。^{1,2)} かかる赤血球障害が起こる原因の1つとして赤血球内 ATP レベルが低下することが考えられている。すなわちショックに陥った赤血球内ではアシドーシスが発生し、解糖系調節酵素の1つであるホスホフルクトキナーゼ (PFK) の活性が阻害され、解糖系が徐々に低下するためによるものと考えられている。³⁾

また解糖系中間代謝物である赤血球内 2,3-ジホスホグリセリン酸 (2,3-DPG) の減少によるヘモグロビンと酸素との結合能の低下と赤血球変形能の減少が微小循環における赤血球の通過性及び組織への酸素供給を低下させると言われている。⁴⁾ これらのことがひいては各種の臓器不全を発生させる原因ではないかと推察されている。⁵⁾

近年、虚血性急性臓器障害に対し ATP-MgCl₂ を投与することで、臓器機能が著明に改善されるという報告が多数発表されているが、⁶⁻⁸⁾ エネルギー代謝障害の赤血球に対する報告は見あたらない。

今回、著者らはこの ATP-MgCl₂ の作用機序を解明するため障害赤血球を ATP-MgCl₂ で処置し、赤血球内のエネルギー代謝、赤血球膜における電解質輸送、赤血球の酸素供給能及び赤血球形態に対する効果について検討し、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. ATP-MgCl₂ の調製 ATP·Na₂·3H₂O (シグマ社), MgCl₂·6H₂O (キンダ化学) を蒸留水で 100 μmol/ml に混合溶解し, 1 N NaOH で pH 7.4 に調製した.

2. 赤血球浮遊液の調製 ウサギをペントバルビタール麻酔下 (30 mg/kg, i.v.), 頸動脈にカニューレ (ヒビキ社製, No. 6) を挿入し, ガラスビーズの入ったガラス容器に採血した. 凝集終了後, 脱線維素血液を同量のリン酸緩衝液加生理食塩 (140.5 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 以下 PBS) 溶液を加えて遠心分離 (750 g, 10 min) した. 赤血球画分のみを分取し, 10 倍量の PBS 溶液を加えて遠心分離 (500 g, 5 min) を行い洗浄した. 同様の操作を 3 回繰り返しヘマトクリット値を算出後, PBS 溶液で希釈して赤血球浮遊液を調製した.

3. 障害赤血球に対する ATP-MgCl₂ の作用 10% 赤血球浮遊液 50 ml をマイヤーフラスコ (シリコン処理) に取り, 14 時間 37°C で振盪培養後, 対照 (PBS, 以下 A 群), グルコース (10 mM, 以下 B 群), ATP-MgCl₂ (100 μM, 以下 C 群) 及びグルコースと ATP-MgCl₂ 混合 (10 mM, 100 μM, 以下 D 群) の 4 群に分け, 各々の群に所定量になるように薬剤を添加した. 添加後 37°C で振盪培養を行い, 経時的に赤血球内 ATP, 2,3-DPG 及び Na⁺ 濃度さらに赤血球からの K⁺ 漏出率, グルコース利用率及び培養液の pH を測定した. また赤血球の形態観察は変形能を測定した.

4. 各種パラメータの測定 1) 赤血球内 ATP の測定——試料液 2.0 ml を遠心分離 (750 g, 10 min) し, 上澄液を取り除き, 冷生理食塩水 2.0 ml を加えて洗浄した. 同様の操作を 3 回繰り返した後, ヘマトクリット値を算出後, 10% トリクロル酢酸溶液 1.0 ml を加えて除タンパクを行い, その上澄液を用い high performance liquid chromatography (HPLC) 法⁹⁾ により ATP 量を測定した.

2) 赤血球内 2,3-DPG の測定——試料液 2.0 ml を ATP 測定操作と同様に冷生理食塩水を用いて洗浄後, 酵素法¹⁰⁾ により測定した.

3) 赤血球内 Na⁺ の測定——試料液 2.0 ml を遠心分離 (750 g, 10 min) し, 上澄液を取り除き, 冷 0.1 M MgCl₂ 溶液 2.0 ml を加えて洗浄した. 同様の操作を 3 回繰り返した後, ヘマトクリット値を算出後, -80°C のディープフリーザー内に放置した. 24 時間放置後, 室温中に凍解凍し, 溶血させた後, 遠心分離 (750 g, 10 min) し, 上澄液の Na⁺ 濃度を炎光光度法¹¹⁾ によって測定した.

4) 赤血球内 K⁺ 漏出率の測定——試料液 2.0 ml に蒸留水 2.0 ml を加えて赤血球を完全に溶血させ, 遠心分離 (750 g, 10 min) した. 分離後, 上澄液の K⁺ 濃度を炎光光度法¹¹⁾ によって求め赤血球内 K⁺ 量とした. つぎに各時間の試料液 1.0 ml を遠心分離 (750 g, 5 min) し, その上澄液の K⁺ 濃度を炎光光度法により求め全漏出 K⁺ 量から漏出率を求めた.

5) グルコース利用率の測定——各時間における試料液 1.0 ml を遠心分離 (750 g, 5 min) し, 上澄液中の残存グルコースを酵素法¹²⁾ により測定した. 求めた各時間におけるグルコース濃度を片対数グラフにプロットし, 最小二乗法により直線の傾きを求め (消失速度定数), グルコース利用率とした.

6) 赤血球変形能の測定 (Nucleopore Membrane Filter 法¹³⁾)——試料液と 0.145 M NaCl-0.01 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) を混じ約 0.1% の赤血球浮遊液を調製し, この浮遊液 1 ml を 20 cm 水柱陰圧下でポリカーボネートメンブランフィルター (General Electric 社製. 直径 13 mm, 厚さ 10 μm, 表面積 0.8 cm², 孔径 3 μm) に通過させ, その濾過時間を測定し変形能とした.

5. 統計処理 実験結果の統計学的有意差の検定はいずれも Student's t-test により行った.

実験結果

1. 赤血球内 ATP 濃度に対する作用 (Fig. 1)

赤血球内 ATP 濃度は初期において 1292.0±113.0 nmol/ml RBC であったが, 培養時間の経過とともに低下し, 14 時間目では 83.0±14.0 nmol/ml RBC と初期の値の約 6% まで低下し, さらに 20 時間目では 15.6±2.5 nmol/ml RBC と約 1% まで低下した. 培養 14 時間目に各薬物の添加をすると B, D 群の 15, 16, 18 及び 20 時間目は A 群に比べ対応するそれぞれの各時間において有意に高値を示した. しかし C 群は A 群と同様なパターンで徐々に低下し, 差は認められなかった.

2. 赤血球内 2,3-DPG 濃度に対する作用 (Fig. 2)

赤血球内 2,3-DPG 濃度は初期において 6.45±0.10 μmol/ml RBC であったが, 培養時間の経過とともに低下し, 14 時間目では 1.96±0.14 μmol/ml RBC と初期の値の約 30% まで低下した. 14 時間目に各薬物の添加を

Fig. 1. Effect of ATP-MgCl₂ on ATP Level in Red Blood Cells

A, ●—● control; B, ▲—▲ glucose; C, ■—■ ATP-MgCl₂; D, ○—○ glucose + ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$ compared to control group.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$)

Fig. 2. Effect of ATP-MgCl₂ on 2,3-DPG Level in Red Blood Cells

A, ●—● control; B, ▲—▲ glucose; C, ■—■ ATP-MgCl₂; D, ○—○ glucose + ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$ compared to control group.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$)

すると B, D 群は 15 時間目においてそれぞれ $1.92 \pm 0.35 \mu\text{mol/ml RBC}$, $1.74 \pm 0.26 \mu\text{mol/ml RBC}$ と A 群 $1.68 \pm 0.23 \mu\text{mol/ml RBC}$ と比べ有意な差は認められなかったが, 16, 18 時間目では A 群に比べ B 群及び D 群ともに有意に高値を示した. しかし, 20 時間目では B, D 群ともそれぞれ A 群 ($0.44 \pm 0.12 \mu\text{mol/ml RBC}$) と同濃度まで低下し有意差は認められなかった. また, C 群は時間経過とともに A 群と同様なパターンで減少し, A 群と差は認められなかった.

3. 赤血球内 Na⁺ 濃度に対する作用 (Fig. 3)

赤血球内の Na⁺ 濃度は初期に $12.76 \pm 0.43 \text{ meq/l RBC}$ であったが, 培養時間の経過とともに増加し, 14 時間目では $22.53 \pm 0.72 \text{ meq/l RBC}$ と初期の値の約 1.8 倍を示した. 14 時間目に各薬物の添加をすると B, D 群は A 群と比べ 16, 18 及び 20 時間目の各時間において有意に低値を示した. しかし, C 群の 15—20 時間目の Na⁺ は A 群と同様なパターンで増加し, 20 時間目では $29.07 \pm 0.68 \text{ meq/l RBC}$ となり A 群 ($30.99 \pm 0.79 \text{ meq/l RBC}$) とほぼ同値を示し有意な差は認められなかった.

4. 赤血球内 K⁺ 漏出に対する作用 (Fig. 4)

赤血球内からの K⁺ の漏出は培養時間の経過とともに増加し, 14 時間目では漏出率は $25.02 \pm 0.78\%$ になり, 以後時間経過とともに増加し 20 時間目では $42.67 \pm 1.72\%$ までになった. 培養 14 時間目に各薬物の添加をすると D 群は 16, 18 及び 20 時間目において, それぞれ $29.62 \pm 1.04\%$, $31.14 \pm 1.02\%$ 及び $37.64 \pm 1.32\%$ と A 群の対応する各時間の $31.41 \pm 1.16\%$, $35.67 \pm 1.12\%$ 及び $42.67 \pm 1.72\%$ と比べ有意に低い値であった. また, B

Fig. 3. Effect of ATP-MgCl₂ on Sodium Concentration in Red Blood Cells

A, ●—● control; B, ▲—▲ glucose; C, ■—■ ATP-MgCl₂; D, ○—○ glucose + ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$ compared to control group.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$)

Fig. 4. Effect of ATP-MgCl₂ on Potassium Leakage from Red Blood Cells

A, ●—● control; B, ▲—▲ glucose; C, ■—■ ATP-MgCl₂; D, ○—○ glucose + ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$ compared to control group.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$)

群は 18 時間目において $37.35 \pm 1.06\%$ と A 群に比べ有意に高値を示したが、他の時間においては差は認められなかった。さらに C 群は 15 時間目において $29.10 \pm 1.06\%$ と A 群 ($27.04 \pm 1.08\%$) に比べ有意に高値を示したものの 16, 18 時間目では A 群の対応する各時間において有意な差は認められなかった。

5. グルコース利用に対する作用 (Fig. 5)

培養 14 時間目に B, D 群に添加したグルコースの培養液中濃度を各時間ごとに求め、その培養液中グルコース濃度から消失速度を求めグルコース利用率とし Fig. 5 に示した。その結果、D 群の消失速度は $(7.86 \pm 1.12) \times 10^{-2}/h$ と B 群の $(4.61 \pm 1.10) \times 10^{-2}/h$ と比べ有意に高値であった。

6. ATP-MgCl₂ 添加後における培養液 pH の変化 (Fig. 6)

培養液 pH は初期において 7.32 ± 0.03 であった。A 群は時間経過とともにわずかの低下しか認められず、20

Fig. 5. Effect of ATP-MgCl₂ on Utility of Glucose in Red Blood Cells

a) $p < 0.01$, $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$).

Fig. 6. Effect of ATP-MgCl₂ on pH of Incubation Medium

A, ●—● control; B, ▲—▲ glucose; C, ■—■ ATP-MgCl₂; D, ○—○ glucose+ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$ compared to control group.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=3$)

Fig. 7. Effect of ATP-MgCl₂ on Deformability in Red Blood Cells

A, ■ control; B, ▨ glucose; C, ▩ ATP-MgCl₂; D, □ glucose+ATP-MgCl₂.
a) $p < 0.01$, b) $p < 0.05$.
 $\bar{X} \pm SD$ ($n=5$)

時間目では 7.24 ± 0.09 と初期の値とほとんど変化は認められなかった。B, D 群は 15, 16, 18 及び 20 時間目と時間が経過するにつれてそれぞれ 7.16 ± 0.08 , 7.02 ± 0.05 , 6.96 ± 0.02 及び 6.90 ± 0.03 と 7.12 ± 0.07 , 6.98 ± 0.04 , 6.78 ± 0.02 及び 6.75 ± 0.06 と徐々に低下し、A 群の各時間と比べ有意に低下した。また、B, D 群間を比較すると D 群の方がより低値であった。C 群は 15—20 時間において A 群とほとんど同値であり変化は認められなかった。

7. 赤血球変形能に対する作用 (Fig. 7)

濾過時間は初期では 47.8 ± 0.27 秒であったが時間経過とともに濾過時間は長くなり、A 群では 14, 15 及び 18 時間目ではそれぞれ 113.06 ± 12.49 秒, 295.39 ± 23.43 秒及び 396.96 ± 25.09 秒と延長した。各薬物添加後の 15 時間目の B, D 群はそれぞれ 259.20 ± 19.99 秒, 209.76 ± 25.75 秒と A 群 (295.39 ± 23.43 秒) と比べ有意に速やかだった。しかし 18 時間目では B, D 群はそれぞれ 448.49 ± 30.59 秒, 461.84 ± 34.37 秒と A 群と比べ有意に遅くなった。また C 群は 15, 18 時間目においてそれぞれ 288.07 ± 26.27 秒, 408.36 ± 18.50 秒と A 群に対応する各時間と比べ有意な差は認められなかった。

考 察

ショック及び虚血に起因して虚血性急性臓器障害が発症するとの報告が多くなされている。^{14,15)} かかる障害臓器の細胞内では ATP レベル及び energy charge (EC) が著明に低下し、これらの低下が細胞膜におけるイオンポンプ機構の失調から起こる細胞膨化、また細胞内 Ca^{2+} の増加により起こる細胞膜障害等をひき起こし、細胞

機能障害に陥らせているとの報告がなされている。^{8,16)} このような細胞障害に対して外因性 ATP-MgCl_2 を投与することにより細胞内エネルギー代謝を活性化し、細胞内 ATP レベルを増加させることで虚血性臓器障害の回復を早めるとの多数の報告がなされている。⁸⁻⁸⁾

今回、著者らはこの ATP-MgCl_2 の作用機序を解明する方法としてエネルギー代謝障害の赤血球を用い、赤血球膜透過性、エネルギー代謝及び赤血球形態に対する作用について検討を行った。

赤血球を PBS 溶液中で培養すると時間経過とともに赤血球内 ATP レベルは減少し、培養 14 時間目では初期濃度の約 6% まで低下した。この赤血球内 ATP レベルの低下と相関して赤血球内 Na^+ は増加し初期濃度と比べ約 1.8 倍まで増加し、また K^+ の赤血球からの漏出率は 25% 認められた。これらのことから赤血球膜における Na-K ポンプ機能の失調が推察され、いわゆる sick cell に陥っていることが考えられた。これらのことは培養液 (PBS) 中にエネルギー基質が存在しないため赤血球内で ATP 産生が出来ず、さらに赤血球機能を維持するために内在する ATP を消費した結果、起こったものと考えられた。このような細胞膜における Na-K ポンプ機構の失調については腎虚血時の腎細胞膜においても同様の結果が観察され報告されている。¹⁷⁾

さらに赤血球における解糖系中間代謝物の 2,3-DPG はヘモグロビンと結合し、組織への酸素供給を助長する因子として知られているが、¹⁸⁾ この 2,3-DPG も ATP の変化と同様に 14 時間目では初期濃度の 30% まで低下した。また赤血球変形能の指標として測定した濾過時間が延長することから赤血球膜が徐々に硬化していることも観察された。Devehat らも赤血球内 ATP 及び 2,3-DPG レベルの変化と変形能が良く相関すること、また赤血球内 ATP レベルを増加させることで変形能が保持されることをも報告している。⁴⁾

以上のような ATP が枯渇したエネルギー代謝障害から起こる赤血球機能障害に対してグルコース、 ATP-MgCl_2 及びグルコースと ATP-MgCl_2 混液の添加を行うと、グルコース単独添加では対照に比べて ATP レベルの減少抑制と 2,3-DPG の増加が認められ、さらに培養液に添加したグルコース利用と pH の低下が観察された。別の同実験系において培養液中の乳酸濃度が増加することを確認していることから、¹⁹⁾ この pH の低下は乳酸の H^+ によるものと考えられた。一般的に解糖系では pH の低下に伴い PFK 活性が阻害され解糖サイクルは低下することが知られているが、著者らの実験では pH が 6.75 程度まで低下しても赤血球内 ATP 及び 2,3-DPG が維持されていることから、赤血球内 ATP が極度に枯渇している時には PFK 活性は維持され解糖サイクルは活動していることが推察された。

一方、 ATP-MgCl_2 単独では赤血球内 ATP 及び 2,3-DPG レベルは維持されず対照と同様に低下し、赤血球内 Na^+ 濃度の増加、赤血球内からの K^+ の漏出が抑制出来ないこと、さらに pH の低下がほとんど認められないことから ATP-MgCl_2 は赤血球内へ直接通過し直接的なエネルギーとして利用されていないことが推察された。しかし、グルコースと ATP-MgCl_2 を混合添加すると、グルコース単独より有意にグルコース利用率は促進し、pH の低下は最大となり、さらに赤血球内 ATP レベル及び 2,3-DPG レベルも増加した。その結果、赤血球内 Na^+ の増加及び K^+ の漏出は対照に比べ有意に抑制され、 Na-K ポンプ機能の維持が示唆された。

以上のことから、障害赤血球に対して ATP-MgCl_2 は単独では細胞内エネルギーとして直接利用されないものと推察されるが、グルコースと併用するとグルコース利用を赤血球内解糖経路上において補助し、賦活しているものと考えられた。

臨床の場においてもショック時には赤血球機能は低下し、このことにより微小循環が障害され組織への酸素供給が低下する。これらのことがショック後の急性臓器障害の発生機序の 1 つであり、その具体例として意識障害をあげている論文もある。^{1,20)} かかる障害赤血球に対して ATP-MgCl_2 を投与することで赤血球機能が維持されるか否かについても今後、検討する必要があると思われる。

また、虚血性急性臓器障害時に ATP-MgCl_2 を投与することにより、臓器機能が回復するとの報告がある。²⁰⁾ この回復機構も、虚血により低下した解糖系に対し ATP-MgCl_2 が補助的因子として作用することにより、細胞内グルコース利用を亢進した結果によるものと推察された。

赤血球の変形能の測定法については種々な方法²¹⁾があるが、著者らはフィルター法を用いて検討した。赤血球の変形能は ATP 量とよく相関することが知られている⁴⁾が、その他に血液 pH、フィブリノーゲン濃度等多数の因子も関与していると報告されている。²²⁾ 著者らの結果では変形能と赤血球内 ATP 量とは培養初期においてよく相関したが、時間が経過するにつれて相関性は得られず、赤血球変形能は赤血球内 ATP 量に絶対的に依存

するのではなく、他因子も大きく関与していることが推察された。

以上エネルギー障害赤血球に対する ATP-MgCl₂ の作用について考察したが、赤血球内 ATP レベルが低下し、代謝機能が抑制されている状態下においてグルコースと ATP-MgCl₂ を併用することで、グルコース利用は亢進し赤血球内 ATP 及び 2,3-DPG 産生を増加させ、変形能などの赤血球機能を維持することが認められた。これらのことから今後、ATP-MgCl₂ は輸血用保存血中の赤血球の賦活化及びショック時における赤血球障害に対する治療法として有効である可能性が示唆された。

謝辞 本研究にあたり、終始御指導いただいた千葉大学医学部第二外科 佐藤 博教授、同救急部、集中治療部平澤博之助教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) 藤田達士, 木谷泰治, 小川 龍, 佐藤裕信, 木村トミ子, 川端五十鈴, 臨床生理, **7**, 350 (1977).
- 2) 藤田達士, 木谷泰治, 小川 龍, 佐藤裕信, 木村トミ子, 川端五十鈴, 臨床生理, **8**, 40 (1978).
- 3) A. E. Baue, I. H. Chaudry, *Angiol.*, **25**, 31 (1974).
- 4) C. L. Devehat, A. Lemoine, B. Cirette, M. Rament, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **41**, 301 (1981).
- 5) T. Kraven, B. F. Rush, S. S. Ghuman, G. S. Dikdan, *Surg. Forum*, **30**, 3 (1980).
- 6) H. Hirasawa, I. H. Chaudry, A. E. Baue, *Surgery*, **83**, 655 (1978).
- 7) 平澤博之, 田畑陽一郎, 大川昌権, 添田耕司, 小高通夫, 佐藤 博, 外科, **80**, 164 (1979).
- 8) 平澤博之, 大川昌権, 小高通夫, 佐藤 博, 千葉医学, **60**, 71 (1984).
- 9) 清水一広, 川添祥一, 白石美津子, 旭 哲也, 薬誌, **103**, 1323 (1983).
- 10) N. Maeda, H. Chang, R. Benesch, R. E. Benesch, *N. Engl. J. Med.*, **284**, 1239 (1971).
- 11) 菅 春美, 鈴木幸一郎, 田伏久之, 小濱啓次, 臨床病理, **27**, 136 (1979).
- 12) 金井 泉, 金井正光, “臨床検査法提要,” 金原出版, 東京, 1978, VII-56.
- 13) H. L. Reid, A. J. Barnes, P. J. Lock, J. A. Dormandy, T. L. Dormandy, *J. Clin. Path.*, **29**, 855 (1976).
- 14) I. H. Chaudry, M. M. Sayeed, A. E. Baue, *Arch. Surg.*, **108**, 208 (1974).
- 15) G. Horpacsy, G. Schnells, *Circ. Shock*, **7**, 49 (1980).
- 16) 添田耕司, 外科, **83**, 1331 (1982).
- 17) 清水一広, 田中修一, 半田 武, 川添祥一, 荒尾宣一郎, 中沢照喜, 白石美津子, 旭 哲也, 日薬理, **82**, 465 (1983).
- 18) 佐々木隆造, 千葉英雄, 蛋核酵, **28**, 957 (1983).
- 19) 清水一広, 川添祥一, 山田 修, 長瀬英生, 日本薬学会第 104 年々会, 仙台 1984 年 3 月.
- 20) A. E. Baue, *Surg. Clin. North Am.*, **56**, 1059 (1976).
- 21) 葛谷文男, 現代の診療, **20**, 575 (1978).
- 22) 望月紘一, 磁貝行秀, 小野寺一樹, 基礎と臨床, **13**, 193 (1979).