チトクロム c-ヘムオクタペプチド (CHP) の生理活性 その 3 脂肪酸過酸化物の
生成抑止と分解促進に対する CHP の影響¹⁾

村田正弘, 安田 紘, 馬場義彦
三共株式会社中央研究所²⁾

The Biological Activities of Cytochrome c Hemeoctapeptide (CHP). (3). The Effects
of CHP on the Formation and the Decomposition of Lipid Peroxide

MASAHIRO MURATA HIROSHI YASUDA, and YOSHIHIKO BABA
Central Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.²⁾

(Received October 4, 1974)

An octapeptide fragment containing the heme moiety (CHP), which was prepared from *Candida krusei* cytochrome c, showed a protective effect against the denaturation of cells and organelles due to oxygen deficiency in various types of experimental hypoxia. *In vivo* and *in vitro* experiments were carried out to investigate the effect of CHP on the lipid peroxide as a result of the oxidation of unsaturated fatty acids. Lipoxidase-catalyzed oxidation was more effectively blocked by the addition of CHP solution (2×10^{-6} M) than of other antioxidants such as vitamin E and α -naphthol (1.7×10^{-5} M). Linolenic acid peroxide was decomposed in the presence of CHP, as well as other heme containing molecules, although vitamin E and α -naphthol were not effective.

The increase of lipid peroxide formation in liver tissues in rabbits fed on a vitamin E deficient diet was proved by the colorimetric thiobarbituric acid method (TBA). The TBA values of CHP-treated group (0.5 mg/kg/day, 4 weeks) were significantly lower than that of saline control ($p < 0.05$). Liver homogenates of rats in hemic hypoxia also formed much lipid peroxide as measured by the TBA method, and the degree of increase in CHP-treated group (1 mg/kg) was somewhat lower.

These results suggested that CHP may serve as a protective agent against cellular damage in hypoxia, when its native cytochrome c or itself is properly administered.

われわれはチトクロム c を酵素化学的に加水分解して得たヘムを含むオクタペプチド (チトクロム c-ヘムオクタペプチド, 以下 CHP と略す) が hypoxia に起因する生体組織の損傷に対して防御的に作用することを種々の形態の実験的 hypoxia において示した。^{1,3)} これらの事実はチトクロム c を外部より投与した場合にあらわれる本来の酵素作用とは別の生理活性と深い関連を有することが示唆された。しかしその作用機序については二、三の推測はなされても実験的証明は得られていない。今回われわれは CHP を投与した動物において細胞の壊死が抑制されているという組織学的観察の結果を重視し、細胞の膜崩壊に関連する生理現象の中で脂肪酸の自動酸化に対する CHP の作用に焦点をあわせて検討した。この結果、CHP が *in vitro* において不飽和脂肪酸、リノレン酸の過酸化物形成に抑止的に作用し、また形成された過酸化物の分解にも関与することを確認した。

つぎに *in vivo* の実験で、ウサギをビタミン E 欠飼料で飼育し、CHP 投与と非投与で比較したところ、肝における脂肪酸過酸化物形成が CHP の投与により抑制されていることが判明した。また瀉血性貧血による hemic hypoxia のラットでも CHP の連続投与により肝の脂肪酸過酸化物形成を抑止する傾向を認めた。

実験の部

試薬 チトクロム c は酵母 *Candida krusei* の培養の菌体より抽出し、分離精製したものである (以下 CA-cyt

1) CHP の研究 第 4 報, 第 3 報 CHP の生理活性 その 2: 村田正弘, 馬場義彦, 松尾英一, 安田 紘, 小此木丘, 渡辺 宏, 薬誌, 94, 1 (1974).

2) Location: 2-58, 1-chome, Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo.

3) 村田正弘, 馬場義彦, 松尾英一, 安田 紘, 小此木丘, 渡辺 宏, 薬誌, 93, 762 (1973).

Fig. 1. Amino Acid Sequence of Heme containing Octapeptide (CHP) from *Candida krusei* Cytochrome c

c と略す).⁴⁾ CHP は精製 CA-cyt c をトリプシン, ペプシン処理した後精製分離した Fig. 1 に示すアミノ酸配列を有するヘムを有するオクタペプチドである.³⁾ いずれも前報³⁾ と同様に不純物を厳格に検索し除去した. リノレン酸はシグマ社 (米国, セントルイス) の Grade III (99.0%), リポキシゲナーゼは大豆由来のもので同じくシグマ社製品 (8200 units/mg) を使用した. ビタミン

E, α -ナフトールは東京化成社 (東京) の特級品である. その他緩衝液作成等に用いた試薬類は特級, またはそれに準じる製品である.

動物 ラットはウィスター今道系雄性, 6—7 週令, 体重 130—150 g を使用した. ウサギは日本在来種白色系統のもので雌雄共実験開始時の体重は 2.5—3.5 kg であった. 動物の管理, 群選別等の詳細は前報³⁾ に記載した条件, 規準にしたがった.

吸光法によるリノレン酸過酸化物の生成と分解の測定方法 リノレン酸基質溶液は Hamberg ら⁵⁾ の方法を若干修正して調製した. すなわちリノレン酸を 2.5 mg/ml になるように 0.019M アンモニア水にバイブレーターを用いて強力に攪拌して液が透明になるまで溶解し, これを 50—75 倍に適宜 0.1M ホウ酸緩衝液 pH 9.0 を用いて希釈して使用した. 吸光法によるリノレン酸過酸化物の測定は基質標準液 3 ml を紫外線用吸光測定セルに注入し, リポキシゲナーゼ水溶液 (1 mg/ml, 緩衝液を用いて測定直前調製) 10 μ l をエッペンドルフマイクロピペットで注入し, 直ちに攪拌し 232.5 m μ の吸光波長の増加を日立パーキンエルマー 139 測定装置により 30 sec または 1 min 毎に経時測定した. 測定は全て恒温 (25 $^{\circ}$) の室内にて行なった. リノレン酸の過酸化物をあらかじめ大量に作成するためには, 上記実験に準じて容量 50—100 ml の三角フラスコで基質溶液およびリポキシゲナーゼを混合し, 25 $^{\circ}$ の恒温槽内でおだやかに振盪し, 232.5 m μ の吸収増加が停止しほぼ一定となるまで (平均約 25 min) 行ない, 冷却し濃度を適宜緩衝液で 232.5 m μ の吸光度が 2.0 以下に希釈して用いた. CHP, ビタミン E 等は緩衝液またはエタノールで希釈した溶液をマイクロピペットで 10 μ l ずつ添加し直ちにガラス棒にて攪拌し, 吸光値の変化を 30 sec または 1 min 毎に 10—20 min 間経時測定した. CHP, ビタミン E 等添加した試薬自身の吸光は基質, 酵素を除いた緩衝液中で測定し上記の実測値を補正した.

TABLE I. Ingredients of the Feeding Diets Which Contain Highly Unsaturated Fatty Acids without Vitamin E (%)

Casein	15.0	Corn starch	36.0
Sucrose	39.3	Lard	3.0
Cod liver oil	3.0	Salt mixture	3.0
Inositol	0.1	Choline chloride	0.1
Nicotinamide	0.02	Pyridoxine hydrochloride	0.0005
Thiamine chloride	0.0005	Riboflavin	0.0005
Calcium pantothenate	0.001	Folic acid	0.0005
Biotin	0.5×10^{-5}	2-Methyl naphthoquinone	0.25×10^{-4}
Vitamin B ₁₂	0.45×10^{-5}		

One hundred mg of Vitamin E per 1 kg of the diet was added for normal feeding.

ビタミン E 欠食餌によるウサギの飼育と CHP 連続投与の影響の観察 ウサギは総数 13 羽を Table I に示す混合飼料を投与し, 投与開始 10 日目より対照群 (3 羽) にはビタミン E を投与し, CHP 投与群 (5 羽) には毎日 CHP 0.5 mg/kg を 0.9% 食塩液 15 ml に溶解して静脈内投与した. 非投与群 (5 羽) にも同量の生理食塩液を同様に投与した. 31 日目に全動物を屠殺し, 主要臓器を摘出し肝臓については TBA 法⁶⁾ により脂肪酸過酸化物を測定した. また他の主要臓器については肉眼および顕微鏡観察による組織学的な観察を実施した.

瀉血性貧血症ラットの作成と CHP 連続投与の影響の観察 ラットは比較的小さい体重 130—150 g のものを選別し, 体重の 2% を目標として初日より 3 日目までは主として眼底内にガラス細管を穿入して採血, 3—7 日目は軽度にてエーテル麻酔後, 尾部動脈を鋭利な刃で傷つけ出血させることにより目的量を滴出採取した. 毎回ザリー法によるシアンメトヘモグロビン量を定量して正常値 (初日測定値) の $\frac{1}{2}$ 以下になったときに瀉血性貧血による hypoxic な病態の成立と設定した.⁷⁾ これら動物は脂質量の変化を測定する目的から大豆油 5% を添加した特別食を実験開始前より実験中も継続して与えた. 第 8 日目に断頭により屠殺し主要臓器を摘出し前報^{1,3)} に準じて組織学的観察を行なったが, 特に肝臓についてはホモジネートを作製し TBA 法⁶⁾ により脂肪酸過酸化

4) K. Narita, K. Titani, *Proc. Japan Acad.*, **41**, 831 (1965).

5) M. Hamberg, B. Samuelsson, *J. Biol. Chem.*, **242**, 5329 (1967).

6) E.O. Wills, *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 475 (1964).

7) A. Louhija, *Ann. Med. et Biol. Fenniae*, suppl., **43**, 2 (1965).

物の量を定量した。CHP の投与は 1 mg/kg を生理食塩液に溶解して腹腔内投与し、非投与群にも同量の生理食塩液を同様に投与した。

TBA 法による組織の脂肪酸過酸化物の定量 Willbur⁸⁾ らの方法に基いて Wills⁶⁾ の検討した点を参考として行なった。各動物の肝臓 5 g を蒸留水 4 ml に入れ、ユニバーサルホモジナイザー HB-2 (日本精機, 東京) で攪拌粉砕してホモジネートを作成し、この 2 ml を検体とした。これに 20% トリクロル酢酸 1.0 ml, 0.67% チオバルビツール酸 2.0 ml を加え、沸騰水浴上で 10 min インキュベートした後、遠心分離した上清の 535 m μ の吸光値を比較した。

結 果

CHP のリノレン酸過酸化物生成, 分解促進に対する作用

リノレン酸のアンモニウム塩に大豆のリポキシゲナーゼを作用させると直ちに過酸化物が形成され Fig. 2 の対照に示すように 232.5 m μ の吸光度が増大する。反応は経時的に進行するが、次第に緩徐となり過酸化物の生成がほぼ停止の状態にいたるのには約 15 min を要した。吸光度の増大はこの時点で停止し、一定となった。

この反応系にあらかじめビタミン E, α -ナフトール, チトクロム c, CHP を添加すると濃度に依存して吸光度の増大が抑止され、過酸化物の形成が抑制されていることが示された (Fig. 2)。

CHP の過酸化物形成抑止に要する最小濃度は他のビタミン E, α -ナフトールと比較して低く、基質のリノレン酸とのモル比からみると約 1/5 以下で完全に過酸化物の生成を阻止した。

つぎにこの作用が形成された脂肪酸過酸化物の分解に対しても関与するか否かを検討するため、あらかじめリノレン酸を基質としてリポキシゲナーゼを十分作用させて過酸化物を得、これを用いて分解に対する作用を測定した。Fig. 3 は CHP の種々の濃度における吸光度の減少を経時的に測定した結果を示した。分解促進は CHP の濃度に依存する傾向を示したが CHP の最終濃度が 10^{-5} M 以上ではむしろ分解作用が減弱する傾向がうかがえた。しかしこれはこの濃度範囲における CHP 自身の吸光に影響されて正確な実測が困難であった。

この分解促進作用がチトクロム c, またはチトクロム c のトリプシン分解物においてもみられることは Fig. 4 に示したとおりであり、天然物であるチトクロム c のほうがモル濃度当りでは CHP のようなヘムペプチドより作用は強い傾向を示した。一方、先に過酸化物形成抑制作用を示したビタミン E, α -ナフトールにはこの分解促進作用はみられなかった。

Fig. 2. Effects of CHP, Vitamin E and α -Naphthol on Lipoxidase-Catalyzed Oxidation of Linolenate

Linolenic acid emulsion (27.5 μ M) in 0.1M borate buffer, pH 9.0 was incubated at 25° with soy-bean lipidperoxidase (1 mg/ml solution, 10 μ l). The changes of OD at 232 m μ were measured immediately after adding CHP and various antioxidants of which final concentrations were as follows, —○—: control, —△—: vitamin E 1.7×10^{-5} M, —□—: CHP 2.0×10^{-6} M, —●—: α -naphthol 1.7×10^{-5} M.

Fig. 3. Decomposition of Linolenate Peroxide by CHP

Linolenate peroxide emulsion (100 μ M) in 0.1M borate buffer pH 9.0 was incubated at 25° with various concentrations of CHP as follows, —□—: 0.8×10^{-7} M, —△—: 0.4×10^{-6} M, —△—: 0.2×10^{-6} M, —○—: 0.4×10^{-5} M, —●—: 1.0×10^{-5} M.

8) K.M. Willbur, F. Bernheim, O.W. Shapiro, *Arch. Biochem. Biophys.*, **24**, 305 (1949).

Fig. 4. Decomposition of Linolenate Peroxide by Heme-Containing Compounds

Linolenate peroxide emulsion was incubated at 25° with heme-containing compounds. The procedure was as the same as described in Fig. 3. ●—: CHP $4 \times 10^{-7}M$, ○—: trypsin-treated cytochrome c $4.3 \times 10^{-7}M$, —△—: cytochrome c $4.3 \times 10^{-7}M$.

ビタミンE欠ウサギにおける過酸化化物形成と CHP 連続投与の影響

ビタミンE欠、高不飽和脂肪食による飼育により、ウサギの体重は1—3週間で若干の減少がみられたが、対照群にも同様の変化があり、また飼育開始後4週間終末にはいずれの群もほぼ実験開始時と同じ体重に回復した。飼育開始31日後に全群のウサギを静脈内空気注入により屠殺し、肝臓を採取しホモジネートを作成しTAB法により脂肪酸過酸化物含量を比較した結果をFig. 5に示した。CHP 0.5 mg/kgを連続投与した群は対照非投与群との2試料-t検定で有意差($p < 0.05$)を示し、ビタミンEを添加して飼育したものと同様に過酸化物の形成が阻止されていることが認められた。

つぎに肝臓、腎臓、筋肉について包埋切片をヘマトキシリン-エオシン染色、PASS染色により組織変化を、また抗酸性フグシン染色、Sudan-black染色により ceroid とよばれる lipopigment の沈着状況を各実験動物について比較した。総合した結果はTable IIにまとめた。これらの観察からビタミンE欠食飼育により肝臓、腎

Fig. 5. TBA Values of Liver Tissues in Rabbits Fed on a Vitamin E Deficient Diet (Mean ± Standard Deviation)

Rabbits were fed during four weeks on the diet of which ingredients were shown in Table I. Animals in "CHP" group were received 0.5 mg/kg of CHP as a saline solution (15 ml) daily during four weeks intravenously, and those in "Control" one were also received an equal volume of saline. On the 31st day all animals were sacrificed and principal organs were removed. A 2.0 ml of sample of a dilute solution of liver tissue homogenate (5 g of tissue in 4 ml of distilled water) was treated with 1.0 ml of trichloroacetic acid (20%, w/v) and 2.0 ml of thiobarbituric acid (0.67%, w/v). The mixture was heated for 10 min. in a boiling water bath, then centrifuged. The absorbancy of a supernatant was read in the spectrophotometer at 535 mμ.

TABLE II. Histopathological Changes in Various Organs of the Examined Animals

Animal No.	Normal			V.E. (-) C.H.P. received					V.E. (-) Control				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Liver	cellular infiltration	±	—	++	±	+	+		±	+	+	++	
	macrophage	—	—	±	±	+	±		+	+	+	++	
	ceroid in macrophage	—	—	±	±	+	±		+	+	+	++	
	ceroid in liver cell	—	—	—	±	±	+	±	+	±	+	+	++
Kidney	cast	—	—	+++	—	+	±		—	++	+	±	
	ceroid	±	±	—	±	±	—	—	+	++	+	++	++
Muscle	necrosis	—	±	+++	—	+++	++		±	+	—	+	
	cellular infiltration	—	±	+++	—	+++	++		—	+	±	++	
	vascular change	—	—	+++	—	±	±		±	±	±	+	

臓で ceroid 色素の沈着が増加すること, また CHP 投与群ではこれが抑えられていることが明らかであった. 一方 CHP 投与群では筋肉の病変が認められた. この原因が CHP によるものか否かについて検討する目的で正常食飼育によるウサギに 3 週間 CHP を同一条件で投与したが筋肉にこのような病変は認められなかった.

瀉血性貧血ラットにおける脂肪酸過酸化物の生成と CHP の影響

前報^{1,3)}で報告した hypoxia の病態中, 比較的緩慢な病変が起これと考えられる hemic hypoxia を小動物で再現し, 血清中の脂質の変化, 肝臓における脂肪酸過酸化物含量の変化を観察した. 連日体重の 2% の瀉血を行なったラットは, 第 7 日目にシアノメトヘモグロビン検量値が 5.0—7.5 g/dl を示し, 初日 (正常値) の平均値約 15.0 g/dl の半数値となった. 全動物中, 瀉血が完全に行なわれ, この条件値を満たしたものについて CHP 投与群 5 匹, 対照非投与群 4 匹の肝臓における脂肪酸過酸化物含量を TBA 法により測定比較した結果を Fig. 6 に示した. 瀉血により, TBA 値は上昇し, 肝細胞の病変の進行が推測された. CHP 投与群は対照非投与群に較べてやや低い値を示したが両群間に有意差は得られなかった. 血中の脂質値も正常値と比較して目立った上昇は認められなかった.

Fig. 6. TBA Values of Liver Tissues in Rats in Hemic Hypoxia (Mean $\pm$ Standard Deviation)

Rats were bled daily an amount of blood corresponding to 2% of body weight. Animals in "CHP" group were received CHP (1 mg/kg) intraperitoneally, and those in "Control" one also received an equal volume of saline. On the 8th day animals were sacrificed and liver was removed. The preparation of liver tissue homogenates and the measuring by the TBA method were described in Fig. 5.

考 察

ヘムペプチドが生体の膜崩壊の基因とも考えられている脂肪酸過酸化物の形成阻止, 分解促進作用を有していることは CHP の生理活性と関連してきわめて注目をひくものである. ヘム含有タンパク質と脂肪酸酸化との関連については古くより研究が行なわれており, Tappel⁹⁾ は早くからヘミン, チトクロム c, ヘモグロビンなどが lipid peroxide 形式を促進し, 一方この分解にも関与することを報告している. しかし Bernheim¹⁰⁾ は組織内で触媒役を果しているのはむしろ non-heme 型の鉄であると述べ, Wills¹¹⁾ も組織内でヘモグロビンなどのヘムタンパク質は 10 μ M 以下では lipid peroxide の形成促進に働き, この濃度以上では形成抑止に働くと報告している. 今回の *in vitro* の実験系においては CHP は脂肪酸過酸化物形成阻止に基質濃度の 1/5 以下で活性を有することが明らかとされ, これは他のフェノール系 antioxidant よりはるかに強力でビタミン E の約 80 倍であった. また CHP はいったん形成された過酸化物の分解促進も行なうことも明らかとされた. O'Brien ら¹²⁾ はチトクロム c が lipid peroxide を分解するとして, その量比をチトクロム c の Soret 帯の吸収を 50% 減少させるために lipid peroxide 35 分子が必要だと述べている. 今回の実験からも CHP 濃度があまり高くなると分解作用が減少する傾向がみられたが, 実験技法上反応系に CHP 濃度が高いと吸収帯が重複し測定が困難となり, CHP が何分子の lipid peroxide と結合するかを決定するにはいたらなかった. 定性的にはガスクロマトグラフィーを使用して, リノレン酸の過酸化物と思われるピークが CHP によって実際に減少することも確認している.¹³⁾

実際の生体内でヘムタンパク質, あるいはヘムペプチド類がどのような挙動を行なっているかは不明な点が多

9) A.L. Tappel, *J. Biol. Chem.*, **217**, 721 (1955).

10) F. Bernheim, *Implications of Organic Peroxides in Radiobiology: Radiat. Res.*, suppl., **3**, 17 (1963).

11) E.D. Wills, *Biochem. J.*, **99**, 667 (1966).

12) P.J. O'Brien, A.C. Frazer, *Proc. Nutr. Soc.*, **25**, 9 (1966).

13) 安田 紘他未発表.

いが、先の O'Brien ら¹²⁾ は lipid peroxide は他の生体内の過酸化水素に較べヘムタンパク質との結合は強力で、チトクロム c との結合では 166—426 倍でありカタラーゼでは分解されないと述べている。最近、Little ら¹⁴⁾ はさらに lipid peroxide の分解にもっとも関与しているのはグルタチオン、ペルオキシダーゼであると指摘している。これらの報告から生体内で lipid peroxide の形成は膜崩壊、細胞崩壊死を招くものとしてなんらかの分解防衛機構が働くことは想像される。そして CHP が本来のチトクロム c にはない peroxidase 活性を有することが、^{15,16)} 生体組織での生理作用と関連している可能性が考えられる。

一方、*in vivo* の実験系においても脂肪酸過酸化物の消長と CHP の投与の間に関連性があることが明らかとされた。ビタミン E 欠食飼育のウサギでは明らかに肝臓を中心に lipid peroxide の上昇が認められ、CHP の投与はこの病変をほぼ抑制しビタミン E 添加食飼育の動物とほぼ同じ程度に保つことができた。しかし実験期間を 1 カ月と限定したこと、E 欠飼育で CHP は投与群に筋肉病変を認めたことなど今後検討すべき問題も残した。3 種の hypoxia 病態^{1,3)} ではいずれにおいても lipid peroxide の形成が予測されるが、今回はラットの瀉血性貧血症においてこれを認めた。この実験系は瀉血条件の検討を目的として数次行なったが、血清脂質の上昇に関しては既報⁷⁾ のような高値を得られなかった。

脂肪酸過酸化物の形成、分解が、生体組織内におけるリノレン酸など不飽和脂肪酸の絶対濃度に依存するか、あるいはヘムタンパク質—生体内に存在する天然のものおよび外部より投与されたチトクロム c, CHP など—との相対濃度によるかはきわめて重要な問題である。TBA 法を用いて行なった予備実験では基質とヘムタンパク質の濃度以外に生体ホモジネートの添加の有無が複雑に関与して結論を得ていない。著者の中、安田は lipid peroxide の形成促進は基質不飽和脂肪酸の一定濃度以上を必要とし、それはヘムタンパク質の濃度と基質の溶解状態などには影響されないことを観察している。¹⁷⁾

脂肪酸過酸化物の形成と組織変化について組織学的に研究したものも多く、西岡¹⁸⁾ はビタミン E 欠動物にあらわれる ceroid とよばれる色素沈着は脂質代謝障害に起因し、老人の脳、肝に認められる組織変化も同一のものと論じている。また宮岸¹⁹⁾ も電顕的解析により老ラットとビタミン E 欠ラットの大脳皮質の lipopigment を確認し、神経系老化過程を説明している。今回の E 欠飼育ウサギでの ceroid 様 lipopigment の沈着状況もほぼ同様で、CHP 投与群と非投与群の間で *in vitro* の実験で得たのと同じ結果を得た意義は大きいと考える。

以上の事実を総合して考慮すると、生体組織の変化、壊死と平行して起こる脂肪酸過酸化物の形成阻止、分解促進にヘムペプチド特にその peroxidase 活性が関与する可能性は大きいと思われるので今後詳細について検討をすすめたい。

総 括

- 1) CHP は *in vitro* においてリノレン酸のリポキシゲナーゼによる過酸化物の形成を抑制し、また形成された過酸化物の分解促進にも作用することが明らかとなった。
- 2) ビタミン E 欠食飼育のウサギ肝臓では脂肪酸過酸化物の形成が促進されることが TBA 法により明らかとなり、CHP の連続投与は非投与群に較べ有意にこれを抑制した。
- 3) Hemic hypoxia のラット肝においても同様に脂肪酸過酸化物の形成促進がみられ、CHP 投与群では若干抑制される傾向がうかがわれた。

謝辞 組織標本観察に適切な御指導を賜った松尾英一博士、実験に御協力頂いた佐藤徳子、関根伊津代さん達に感謝の意を表します。

14) C. Little, P.J. O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145 (1968).

15) Y. Baba, H. Mizushima, H. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **16**, 763 (1968).

16) Y. Baba, H. Mizushima, H. Watanabe, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **17**, 82 (1969).

17) 安田 紘 他未発表。

18) 西岡信博, 精神経誌, **68**, 836 (1966).

19) 宮岸 勉, 精神経誌, **68**, 855 (1966).