

亜鉛欠乏による免疫不全と脱毛

荒川 泰昭*¹⁾, 坂崎 弘章¹⁾, 栗山 孝雄¹⁾, 中島 晴信²⁾, 堀 伸二郎²⁾, 大森 佐与子³⁾,
武内 孝之⁴⁾, 中野 幸広⁴⁾, 森田 亮⁵⁾, 岩崎 徹⁵⁾, 小石 秀夫⁶⁾
(¹⁾静岡県立大・公衆衛生, ²⁾大阪府立公衛研, ³⁾大妻女子大・社会情報, ⁴⁾京大・原子炉研,
⁵⁾静岡県立大・動物実験センター, ⁶⁾静岡県立大・特殊栄養)

Immunodeficiency and alopecia induced by zinc deficiency

Yasuaki ARAKAWA¹⁾, Hiroaki SAKAZAKI¹⁾, Takao KURIYAMA¹⁾, Harunobu NAKASHIMA²⁾,
Shinjiro HORI²⁾, Sayoko OHMORI³⁾, Takayuki TAKEUCHI⁴⁾, Yukihiro NAKANO⁴⁾,
Akira MORITA⁵⁾, Toru IWASAKI⁵⁾, Hideo KOISHI⁶⁾

¹⁾Department of Hygiene & Preventive Medicine, Faculty of Health Sciences, The University of Shizuoka,

²⁾Osaka Prefectural Institute of Public Health, ³⁾Ohzuma Women University, ⁴⁾Research Reactor Institute, Kyoto University, ⁵⁾Animal Experimental Center and ⁶⁾Department of Human Nutrition, Faculty of Health Sciences, The University of Shizuoka

A zinc deficiency induces a severe immunodeficiency and alopecia. The mechanism of zinc deficiency-induced immunodeficiency was examined by analyzing the thymus atrophy and the changes in the membrane surface antigens of T cells of zinc-deficient SPF Wistar-derived rats. Zinc deficiency induced severe and reversible thymus atrophy. The zinc-deficient thymocytes revealed significant increases in the percentage of CD4 antigen cells (rat T helper cells and macrophages), CD8 antigen cells (rat T suppressor/cytotoxic cells) and CD4 & CD8 double-negative cells, and decreases in the percentage of CD4 & CD8 double-positive cells (undifferentiated cells) and Thy 1, 1 antigen cells (total T cells). In addition, significant decreases in the percentage of The 1, 1 antigen cells, slight decreases in the percentage of α/β (T cell receptor) antigen cells and CD2 antigen cells (E rosette forming cells), and a significant increase in the percentage of CD4 & CD8 double-positive cells were observed in the peripheral T cells of the zinc-deficient rats. Furthermore, thymulin activity decreased significantly in the serum of zinc-deficient rats. These findings indicate that the immunodeficiency induced by zinc deficiency is manifested as T cell dysfunction which is caused by not only quantitative changes in the T cells such as thymus atrophy, but also qualitative changes in the T cells such as changes of their membrane surface anti-

gens, that is, impairment of the process of differentiation and maturation of T cells in the thymus. The mechanism of zinc deficiency-induced alopecia was examined by analyzing the movement of trace elements in the hair and fatty acids in the skin of zinc-deficient SPF Wistar-derived rats. Zinc deficiency induced severe and reversible alopecia. With the progress of falling-out of the hair (or with the decrease in the concentration of zinc in the hair), a marked tendency for accumulation of manganese and calcium into the hair was seen, and a decrease in the concentration of linoleic acid and a increase in the concentration of palmitic acid in the skin were seen. The relations of manganese and unsaturated fatty acids such as linoleic acids to alopecia are now under investigation.

亜鉛欠乏症¹⁾には腸性肢端皮膚炎²⁾のような遺伝性欠乏症や、亜鉛欠乏性母乳によるもの、また輸液や血液透析などの加療過程にみられる医原性のものなどの獲得性欠乏症などがあるが、これらの主要症状として、重篤なる免疫不全と特異的脱毛症状がある。これらに関して、臨床例的な報告は数多いが、それぞれの発症メカニズムに関してはほとんど手がつけられていない。そこで、今回この亜鉛欠乏による免疫不全ならびに脱毛について、その発症メカニズムを解明するために、実際に亜鉛欠乏動物を作製し、種々検索を試みた。

実験方法

1. 動物実験

SPF 動物実験施設において、SPF Wistar 系幼若ラット（3週令，雄性，40g前後）に Table 1 に示す如き亜鉛無添加飼料（Zn 含量：0.05mg %，オリエンタル酵母 KK）もしくは亜鉛添加飼料（コントロール飼料，ZnCO₃ 添加，Zn 含量：5.8mg %，同社）および超純水（Zn 含量：0.1ppb 以下，自作）を与え，4～6週間飼育した。なお，回復実験ではその後さらに6週間コントロール飼料で飼育した。飼育開始後2，4，6，8，10週目に両群のラットより亜鉛欠乏状態の胸腺，体毛ならびに皮膚を採取した。

2. 細胞表面抗原の解析

各グループのラットの胸腺をステンレスメッシュ（200 μ ）上で解剖ハサミで細かく切り刻みながら PBS にて胸腺細胞を洗い出し，全量約20ml の細胞浮遊液を作製，一度800rpm（約300g），5分間で遠心後，再度20ml PBS にて細胞を浮遊させ，最終的に 5×10^7 cells/ml の細胞浮遊液を作製する。この浮遊液を100 μ l にそれぞれのモノクローナル抗体溶液（100 μ g/ml）10 μ l を単独（単染色）に，あるいは二重（二重染色）に添加し，氷中にて20分間暗所放置する。その後，PBS 2ml を加えて1500rpm で5分間遠心し，得た細胞ペレットに1%パラホルムアルデヒド（細胞固定剤）含有 PBS 0.5ml を加えて細胞浮遊液を作製する。この浮遊液を細胞自動解析分離装置（Fluorescence Activated Cell Sorter：FACS can, Becton Dickinson 社製）に供し，細胞10000個を用いて測定する。また，末梢血リンパ球の場合は，胸腺細胞の場合と同様に全血100 μ l にそれぞれモノクローナル抗体10 μ l を単独あるいは二重に加え，氷中で20分間暗所放置した後，さらに溶血剤 2 ml を加えて10分間室温にて放置する。

1500rpm, 5分間遠心した後, 得たペレットを一度, PBS 2ml でよく洗浄し, 再度1500rpm, 5分間遠心する。ここに得たペレットに1%パラホルムアルデヒド含有 PBS 0.5ml を加え, 細胞浮遊液を作製する。以後の測定操作は胸腺細胞の場合と同様である。用いた蛍光標識モノクローナル抗体は, 全て serotec 製のもので, 抗 CD 2 (E rosette forming T cells) 抗体・(FITC 標識 MRC OX-34), 抗 CD4 (Rat T helper cells and macrophages) 抗体・(Phycoerythrin 標識 W 3/25), 抗 CD 8 (Rat T suppressor/cytotoxic cells) 抗体・(FITC 標識 MRC OX-8), 抗 α/β (T cell receptor) 抗体・(FITC 標識 R73), および抗 Thyl, 1 (総 T cells) 抗体・(FITC 標識 MRC OX-7) である。

3. 血中サイムリン活性の測定

SPF Wistar 系幼若ラット (8週齢, 雄性, 200g 前後) にソムノベンチルと PBS を 1:1 の割合で混合したもの 0.28ml (0.14ml/100g body weight) を皮下注射し, 麻酔が効いた後, 胸腺を吸引摘出する。手術後, 2週間以上飼育した胸腺摘出ラットより, 脾臓をクリーンベンチ内で無菌的に採取し, ステンレスメッシュ (200 μ) 上で細かく切り刻みながら, 7% FBS (56℃ 30分間加熱処理して不活化した) 含有 RPMI1640 培養液を用いて脾細胞を洗い出し, 全量約 20ml の細胞浮遊液を作製する。これを 800rpm, 5分間遠心にかけ, 7% FBS 含有 RPMI を用いて, 10^8 cells/ml の細胞浮遊液 10ml に調製する。これに滅菌処理をした Lysing solution 20ml を加えて 5分間室温放置する。1500rpm, 5分間遠心した後, 得たペレットを 7% FBS 含有 RPMI 10ml でよく洗浄し, 1500rpm, 5分間遠心する。この操作を 2回行い, 全量 10ml の脾細胞浮遊液を作製する。これをナイロンファイバーカラムにかけ, 得られた前駆 T 細胞浮遊液を 2.5×10^6 cells/ml に調製し, 滅菌済試験管に 0.5ml 採り, 試験血清 0.5ml を加え, すなわち血清濃度 50% として, 37℃ の CO₂ インキュベーター内で 2時間インキュベートする。2時間後, 800rpm, 5分間で遠心後, 細胞ペレットに PBS 2ml を加えて細胞を浮遊させる。この操作を 2回行った後, PBS で細胞浮遊液 100 μ l を調製し, これに蛍光標識モノクローナル抗体溶液 (100 μ g/ml) 10 μ l を添加し, 氷中にて 20分間以上暗所放置する。放置後, PBS 2ml を加えて 1500rpm で 5分間遠心し, 細胞ペレットに 1%パラホルムアルデヒド含有 PBS 0.5ml を加えて細胞浮遊液を作製する。これをナイロンフィルターで濾過した後, 細胞自動解析分離装置 (FACS can) に供し, 細胞 10000個を用いて測定する。なお, 本実験で用いた蛍光標識モノクローナル抗体は抗 Thyl, 1 (Total T cells) 抗体 (FITC 標識, MRC OX-7, serotec 製) である。

4. 体毛試料の前処理

採取した体毛は IAEA (International Atomic Energy Agency) 推奨の洗浄法であるアセトン-超純水 (3回) -アセトンの順に各 25ml, 各 10分間ローリングシェーカーで振盪洗浄した後, 風乾して 30~80mg を秤量し, 硝酸洗浄済みポリエチレン袋に入れ, ポリシーラーで封入し, 照射試料とした。なお 60分間照射用試料に関しては, 長時間照射によってポリエチレン袋が破損して試料が漏れる恐れが考えられることから, 試料を硝酸洗浄済みポリエチレン袋に二重に封入した。

5. 体毛中微量元素の放射化分析

試料ならびに標準試料を照射カプセルに封入し, 京都大学原子炉実験所の圧気輸送管 (KUR-Pn-1) を用いて照射カプセルを炉心部に送り, 1分間ならびに 60分間, 熱中性子束: $2 \times$

$10^{13}\text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ の条件下で照射を行った。適時冷却後、照射カプセルを開封して試料を取り出し、それぞれを新しいポリエチレン袋に詰め替えて封入し、短寿命核種はそのまま、中・長寿命核種は試料を1つずつサンプルホルダーに入れ、高分解能 Ge 半導体検出器を装着した波高分析器 (Pulse height analyser, PHA) を用いて γ 線をスペクトロメトリーによる多元素分析を行なった。なお、本定量における核種別の照射時間、冷却時間、計測時間及び対象となる微量元素は以下のとおりである。

短寿命核種；1分間照射，2～5分間冷却，200秒計測：Cl, Br, I, Mg, Ca, S, V, Al, Mn, Cu

中寿命核種；60分間照射，36時間冷却，300秒計測：Na, K, As, Au

長寿命核種；60分間照射，60日間冷却，10000秒計測：Se, Sb, Cr, Zn, Hg, Ag, Fe, Co

6. 皮膚試料の前処理

採取した皮膚はその表面に付着する脂肪や汚れをガーゼでふき取った後、超純水でよく洗浄した。

Table 1. Composition of zinc-deficient diet

1. Diet composition

Ingredient	Zinc-supplement diet	Zinc-deficient diet
	Amount (g/100g)	
Egg white powder	20	20
Dextrin	63.7	63.7
Corn oil	10	10
Cellulose powder	2	2
Mineral mix	3.13	3.13
Vitamin mix	1.17	1.17
ZnCO ₃	0.0058	0
Total	100.0058	100.00

2. Mineral mix composition in 100g diet

Ingredient	Amount
NaCl	0.56g
K ₂ HPO ₄	1.07g
MgSO ₄	0.17g
CaPHO ₄	0.25g
CaCO ₃	1.00g
Fe-Citrate (Fe 17%)	0.09g
KI	2.66mg
MnSO ₄ · 4~5H ₂ O	0.88mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.00mg
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.19mg

3. Vitamin mix composition in 100g diet

Ingredient	Amount
Vitamin A	1000 IU
Vitamin D ₃	125 IU
Vitamin E	11 mg
Vitamin K ₃	0.03mg
Vitamin B ₁	1.00mg
Vitamin B ₂	0.60mg
Vitamin B ₆	0.40mg
Vitamin B ₁₂	2.00 μ g
Biotin	0.40mg
Folic acid	0.05mg
Pantothenate calcium	1.60mg
Nicotinic acid	2.50mg
Choline chloride	150 mg

皮膚は1gを水1mlとクロロホルム-メタノール(2:1)3mlの混合液に加え、ホモジナイズし、遠心後、クロロホルム層をN₂ガスで乾固し、脂質を取出した。得た脂質は0.5Nナトリウムメチラート1mlでメチル化後、ヘキサンで抽出し、濃縮後、GC法により脂肪酸を分析した。

7. ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸測定の実験条件

カラム: Unisole 3000 (Unipore C, 80-100 mesh), 3 m x 3mm I. D., 温度: カラム, 245℃; FID 検出器, 260℃; 試料注入部, 260℃, キャリアガス: N₂ 90ml/min. Sensitivity: 100, Range: 0.8V.

結果ならびに考察

1. 亜鉛欠乏によるT細胞膜表面抗原の変化

亜鉛欠乏は免疫不全を誘発する³⁾。この免疫不全はT細胞機能の障害が主であり、細胞性免疫機能の低下が顕著である。おそらく、この原因は免疫中枢臓器である胸腺の変化、すなわち量的には胸腺細胞(T細胞)の消失、質的には胸腺細胞の分化・成熟の程度にあるように思われる。従って、本研究では亜鉛欠乏が免疫機能の低下とどのように結びついているのかを明らかにするために、亜鉛欠乏による胸腺の萎縮やT細胞膜表面抗原の変化などについて検討した。その結果、亜鉛欠乏時(胸腺中Zn量は対照群の1/24以下)(Table 2)には胸腺萎縮(体重当たりの相対臓器重量は対照群の1/4以下、この萎縮は可逆的である)(Fig. 1)という量的変化と同時に、T細胞膜表面抗原の変化という質的变化も有意

Table 2. Trace element levels in the thymus of zinc deficient rat, compared with controls.

Element	Concentration ($\mu\text{g/g}$ dry tissue)	
	Control	Zn-deficiency
Mg	966.67 $\pm$ 350.02	958.00 $\pm$ 147.80
Ca	77.75 $\pm$ 25.25	166.50 $\pm$ 0.50 ※
Al	12.77 $\pm$ 4.53	14.67 $\pm$ 2.21
Mn	0.35 $\pm$ 0.18	0.47 $\pm$ 0.15
Zn	85.83 $\pm$ 5.54	24.17 $\pm$ 1.70 ※※※
Cu	1.83 $\pm$ 0.20	6.11 $\pm$ 0.49 ※※
S	9773.67 $\pm$ 4077.47	10170.00 $\pm$ 3897.51
Cl	1559.00 $\pm$ 270.88	3255.33 $\pm$ 224.19 ※※
Br	4.50 $\pm$ 1.54	8.17 $\pm$ 0.93 ※
I	0.59 $\pm$ 0.39	1.45 $\pm$ 0.06 ※

The thymus were prepared from SPF Wistar-derived male rats (9 weeks ages) fed with Zn-deficient diet for 6 weeks. The determination of trace elements was performed by using a thermal neutron activation analysis method. Each value represents the mean $\pm$ SE of five determinations. Those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from determinations. Those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value: ※ $p < 0.05$, ※※ $p < 0.01$, ※※※ $p < 0.001$.

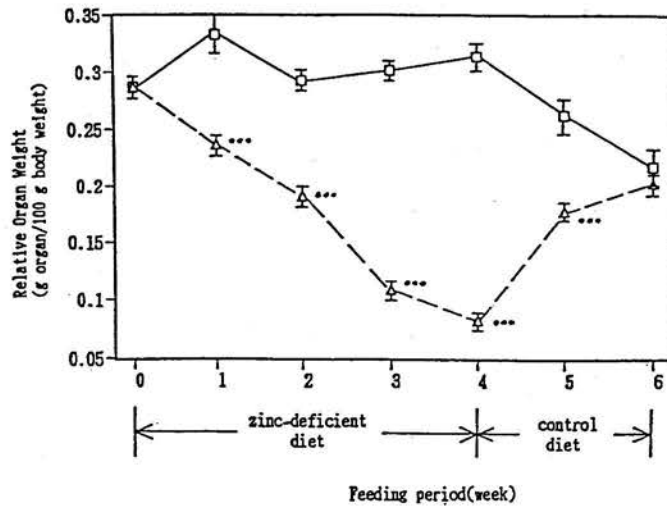


Fig. 1 Relative thymus weight of rats fed zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (control diet) for 4 weeks and after that period a control diet for 2 weeks. Vertical bars denote SE of the mean for 10 determinations ; those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value (*** $p < 0.001$). (□) control group, (△) zinc deficiency group.

Table 3. Cell surface marker analysis of thymocytes and peripheral T cells of zinc-deficient rats

Lymphocyte subpopulation	Relative count (%) ^{a)}			
	Thymocytes		Peripheral T cells	
	Control	Zn-deficiency	Control	Zn-deficiency
Thy 1,1 (MRC OX-7)	98.03±0.40	91.77±8.87	36.36±1.68	15.22±2.90***
CD2 (MRC OX-34)	99.02±0.16	97.95±1.31	97.72±1.05	91.03±3.55**
α/β (R73)	86.54±1.94	85.13±1.70	96.88±3.09	88.95±5.13*
CD4 (W 3/25)	6.40±1.46	22.80±9.40**	43.98±6.68	45.48±4.66
undifferentiated cells	84.21±2.62	54.16±9.86***	4.66±1.77	14.50±0.53***
unlabelled cells	2.51±0.19	11.16±4.68**	38.04±5.22	27.56±5.95*
CD8 (OX-8)	6.89±2.04	11.88±3.52*	13.32±3.40	17.44±3.25
CD4/CD8	1.03	1.75	3.63	2.69

a) The values are mean $\pm$ SE of 5 SPF Wistar-derived male rats per group. After 4 weeks of feeding with Zn-deficient diet or zinc-supplement diet (Oriental Yeast Co. Ltd.), cell suspensions were made of the thymus and peripheral blood cells, and lymphocyte subpopulations analyzed on a fluorescence activated cell sorter (FACS) with monoclonal antibodies to rat cell surface determinants. The clones of antibodies used are indicated between parentheses. Those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

に観察され、胸腺における分化・成熟過程への影響が確認された (Table 3)。とくに、胸腺細胞では CD4 や CD8 抗原に、また、末梢血リンパ球においては Thy 1, 1, CD2, α/β 抗原などに有意の変化が観察された。これは、抗原発現にかかわる胸腺ホルモン (あるいは血中サイムリン) が亜鉛を含有することからも推測できるように、亜鉛欠乏に伴うホルモン活性の低下によるものであらうと思われる⁴⁾。

2. 血中胸腺ホルモン因子の活性測定法の開発と亜鉛欠乏によるその活性低下

血中サイムリンは胸腺から分泌され、T 細胞の増殖や分化を促進する胸腺ホルモンの一種であり、亜鉛を結合したノナペプチドである。未熟細胞における Thy1, 1 抗原の発現や CD4 あるいは CD8 抗原をもつ成熟細胞の活性化などの作用をもち、亜鉛を失うことによって活性が消失することが知られている。今回、より高感度で精度の高い血中サイムリン活性測定法を確立するために、胸腺摘出動物を作製し、その脾臓から前駆 T 細胞を取り出し、これと試験血清 (血中サイムリン) を反応させることによって細胞膜表面上に出現する Thy 1, 1 抗原を蛍光標識モノクローナル抗体を使って細胞自動解析分離装置 (FACS can) で測定するという方法を検討した。そして、確立したこの方法を実際に亜鉛欠乏動物の血中サイムリン活性の測定に応用した。その結果、亜鉛欠乏時では、明らかに血中サイムリン活性が有意に低下していることが確認された (Table 4)。

3. 亜鉛欠乏による脱毛と毛中微量元素の動態

亜鉛欠乏による特異的脱毛症の発症メカニズムを解明するために、まず、脱毛の程度と毛中微量元素の動態との関連性を放射化分析を用いて経時的に観察した。その結果、亜鉛欠乏状態の進行とともに、脱毛症状も重篤化するが、このとき Cl や I の濃度は対照群に対して著しく低下し、逆に Na, Ca, Mg, Mn および Cu の濃度は上昇した。すなわち、脱毛が進行すると、Cl や I では正常時の加齢に伴う濃度上昇が抑制され、逆に Na, Cu, Mg では正常時の加齢に伴う濃度低下が抑制された。Ca や Mn に至って

Table 4. Thymulin activity in serum of zinc-deficient rats and normal rats

Serum	Relative count (%) ^{a)}
Control	77.23±2.65
Zn-deficiency	60.37±0.68***

a) Pre-T lymphocytes (2×10^6 cells/ml) separated from splenocytes of adult of thymectomized SPF Wistar-derived male rats were incubated with the serum of SPF Wistar-derived male rats fed zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (Oriental Yeast Co. Ltd.) for 3 weeks, for 2 hr at 37°C. Thymulin activity in serum was determined by analysing a newly-produced Thy 1, 1 antigen on T cell surface with fluorescein-labelled anti-Thy 1, 1-monoclonal antibodies on a fluorescence activated cell sorter (FACS, Becton Dickinson).

Those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value :

***p < 0.001.

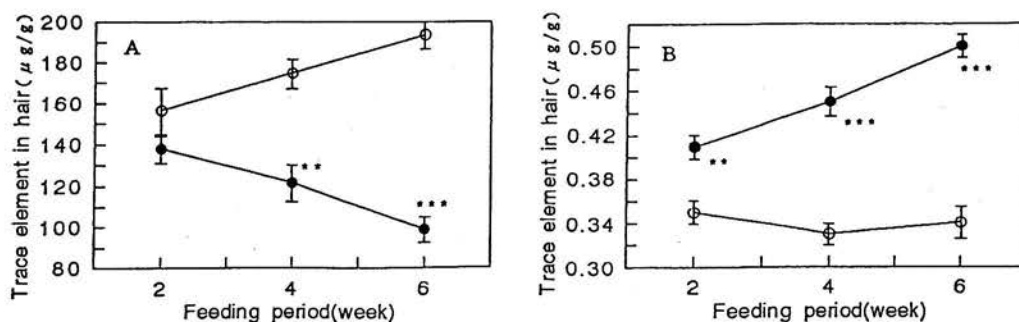


Fig. 2 Movement of Mn and Zn in the hair of zinc-deficient rat. SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet or zinc-supplement diet (control diet) for 6 weeks. Hair were analyzed for their Mn and Zn contents by using a thermal neutron activation analysis method. A : Zinc ; B : Manganese. (○) control group, (●) zinc deficiency group. Vertical bars denote S. E. of the mean for 5 determinations ; those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

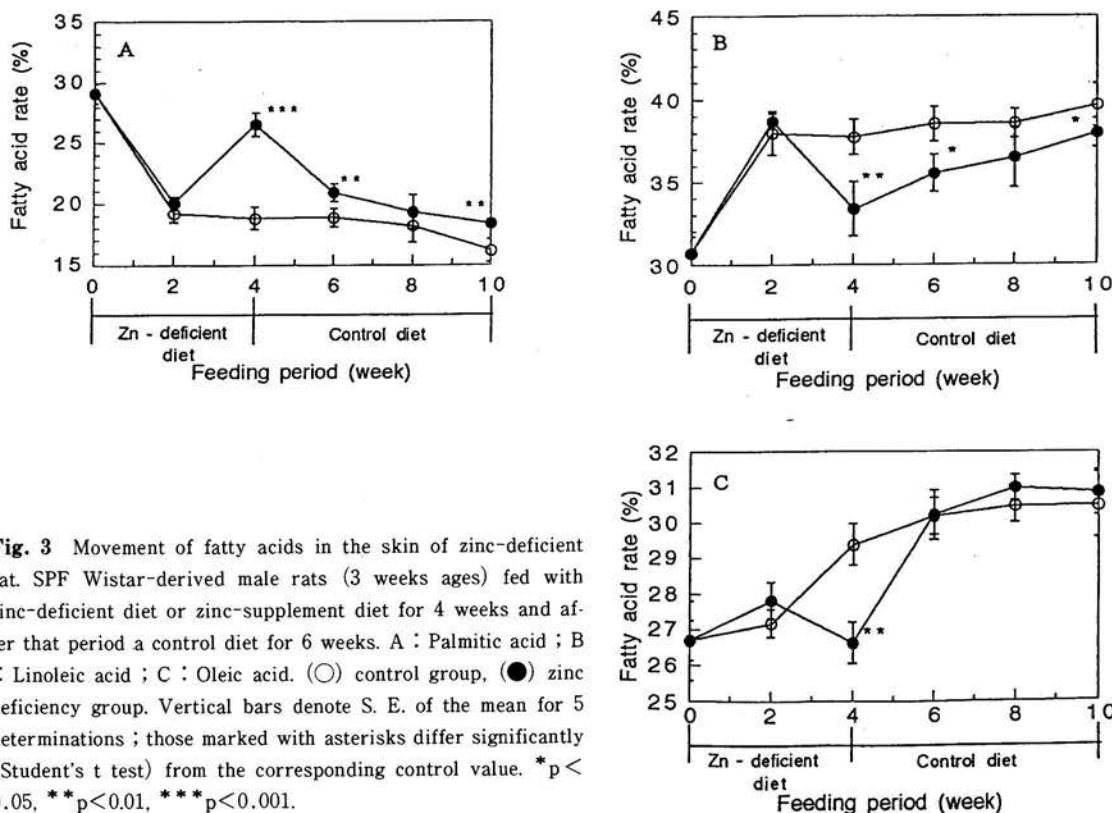


Fig. 3 Movement of fatty acids in the skin of zinc-deficient rat. SPF Wistar-derived male rats (3 weeks ages) fed with zinc-deficient diet or zinc-supplement diet for 4 weeks and after that period a control diet for 6 weeks. A : Palmitic acid ; B : Linoleic acid ; C : Oleic acid. (○) control group, (●) zinc deficiency group. Vertical bars denote S. E. of the mean for 5 determinations ; those marked with asterisks differ significantly (Student's t test) from the corresponding control value. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

は、抑制というよりはむしろ濃度増大、すなわち蓄積傾向を示した。また、K, Br, Al, S は脱毛の程度とは全く関係なく変化し、特に K や Br は加齢に伴って減少した⁵⁾。

4. 亜鉛欠乏による脱毛と皮膚中脂肪酸の変動

前項のごとく、亜鉛欠乏時の毛中の微量元素の動態を調べると、Fig.2 に示すように、亜鉛量の低下に伴って、マンガンが著しく蓄積してくる。一方、マンガンが脂質代謝に大きく関与していることが示唆されている。また、最近、脱毛の原因の1つとして皮膚中の栄養過多あるいは代謝障害による有害因子の蓄積などが挙げられ始めている。そこで、今回亜鉛欠乏による脱毛のメカニズムを調べる目的で、実際に SPF Wistar 系幼若ラットを用いて亜鉛欠乏動物を作成し、脱毛進行中あるいは回復中の皮膚における脂質代謝を脂肪酸の面から経日的に観察した。

その結果、亜鉛欠乏が進行し、脱毛症状が最も進展するのは実験開始より4週目以降であった。このときの皮膚中脂肪酸組成は、対照群に比べリノール酸やオレイン酸が著しく減少し、逆にパルミチン酸が著しく増加した (Fig.3)。しかし、欠乏群を4週目以降コントロール食に戻すと、脱毛症状や皮膚症状の回復と共に各脂肪酸の組成も対照群の値に近づいた。なお、ステアリン酸やアラキドン酸などの他の脂肪酸は本実験では、皮膚中に検知されなかった。亜鉛欠乏による脱毛進行状態の皮膚で、リノール酸、オレイン酸が減少し、パルミチン酸が増加するということが脱毛と如何なる関係にあるのか、またマンガンの蓄積とどのようにつながるのか目下検討中であるが、とくにリノール酸の如き必須不飽和脂肪酸の低下は特異的皮膚症状の発現とも考え合わせると、膜の構成脂質の構成脂肪酸の変動すなわち膜流動性の低下に伴う広範な機能失調ならびに成長阻害などを示唆している。

文 献

- 1) 和田 攻, 荒川泰昭, 山崎信行, 長橋 捷 (1983): 免疫と疾患, 国際医書出版, 特集“続発性免疫不全症候群” 6 (6): 763-767
- 2) Barnes, P. N. and E. J. Moynahan (1973): *Proc. Roy. Soc. Med.*, **66**: 329
- 3) Gross: RL, Osidin N, Fong L, Newberne PM (1979): *Am. J. Clin. Nutr.*, **32**: 1260-1265
- 4) 荒川泰昭, 栗山孝雄, 國友 譲, 森田 亮, 岩崎 徹, 中島晴信, 堀伸二郎 (1992): *Biomed. Res. Trace Elements*, **3**(3): 319-329
- 5) 荒川泰昭, 栗山孝雄, 小石秀夫, 森田 亮, 岩崎 徹, 中島晴信, 堀伸二郎, 大森佐与子, 武内孝之, 中野幸広 (1992): 微量栄養素研究, 第9集, 197-203