

杜仲葉の研究 (II)

杜仲葉水エキス長期投与によるラットへの影響について

馬 永華^{a)} 葉 加南^{a)} 服部 征雄^{a)} 金子 周司^{b)} 野村 靖幸^{b)}
若木 邦彦^{c)} 倉茂 洋一^{c)} 難波 恒雄^{*a)}

^{a)}富山医科薬科大学和漢薬研究所資源開発部門, ^{b)}富山医科薬科大学和漢薬研究所生物試験部門

^{c)}富山医科薬科大学医学部病理学教室

Studies on Tu-Chung leaves (II)

Effects of long-term administration of the Tu-Chung leaves extract on rats

Yong-Hua MA^{a)} Jia-Nan YIE^{a)} Masao HATTORI^{a)} Shuji KANEKO^{b)} Yasuyuki NOMURA^{b)}
Kunihiko WAKAKI^{c)} Yoichi KURASHIGE^{c)} and Tsuneo NAMBA^{*a)}

^{a)}Department of Development for Natural Drug Resources, Research Institute for Wakan-Yaku (Oriental Medicine),
Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{b)}Department of Pharmacology, Research Institute for Wakan-Yaku, Toyama Medical and Pharmaceutical University

^{c)}Department of Pathology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Received December 19, 1986. Accepted February 9, 1987.)

Abstract

The experimental study was performed by the administration of a Tu-Chung leaves extract for 10 weeks in 16 Wistar rats which were divided into two groups, administered and control groups. The water extract of Tu-Chung leaves was orally administered to 8 rats at a dose of 1 g/kg body weight/day. Although the body weight was not obviously different between the administered and control groups, the relative weights of adrenal glands and testes proportional to the body weights were significantly increased in the administered group compared to the control group. Histological studies and measurements with a fluorescence microscope showed that : i) the contents of glycogen, vitamins B₁ and E in the livers were significantly increased in the administered group ; ii) obvious differences in the levels of lipids, vitamins A, B₂, D, F and P were not detected in the livers of both groups ; iii) liver cells of the administered group were smaller in size and larger in number compared to the control group. These findings suggest that the long-term administration of the water extract of Tu-Chung leaves may improve the reserved nourishment and function of liver cells.

Key words *Eucommia ulmoides*, water extract, Tu-Chung leaves, vitamines, lipid, glycogen, size of liver cells, number of liver cells

Abbreviation Ext. (water extract from Tu-Chung leaves), 杜仲葉水エキス

緒 言

杜仲 (*Eucommia ulmoides* OLIV.) はトチュウ科に属する樹木で、中国では漢代からその樹皮を強壯、強精薬として用いている^{1,2)}。これまでに、薬理

学的研究から杜仲樹皮は学習行動 (記憶) の低下や性行動の低下を抑制することが報告されているが³⁾、杜仲葉の薬理効果についてはほとんど報告がない。前報において、われわれは杜仲葉水エキスの利尿、血圧降下作用について報告した⁴⁾。今回、杜仲葉水エキスをラットに長期投与し、体重および各臓器の重

*〒930-01 富山市杉谷 2630
2630, Sugitani, Toyama 930-01, Japan

Journal of Medical and Pharmaceutical Society for
WAKAN-YAKU 4, 26-34, 1987

量の変化、肝臓内のビタミン類、グリコーゲンおよび中性脂肪の含有量、肝細胞の数および大きさを対照群と比較検討したのでここに報告する。

材料と方法

(1) 使用動物：Wistar 系雄ラット（生後4週齢、体重150–160 g）を温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50–60%、12時間明/12時間暗のサイクルの飼育室で、市販の固形飼料（三協ラボサービス、MM-3）を用い、自由に水を摂取させて飼育した。杜仲葉水エキス投与群と対照群の各群、8匹ずつ計16匹を用いた。

(2) エキスの調製および投与と体重測定：長野県で栽培されている杜仲（*Eucommia ulmoides* OLIV.）の夏葉（播種後1年目の苗木を植えかえ、3年目の枝から7–8月頃採集）を使用した。1 kgの杜仲葉粉末に蒸留水10 lを加え 100°C で3時間抽出し、濾過、濃縮、凍結乾燥後、340 gの水エキス粉末を得た。このエキス粉末は 4°C で遮光保存し、用時、生理食塩水に200 mg/mlの割合で溶解し、ラットに1 g/kg body weight/dayの割合で胃ゾンデを用いて経口投与した。投与期間は10週間で対照群には同容量の生理食塩水を同様な方法で投与した。また動物の体重を毎日、投与前と断頭の直前に測定した。

(3) 臓器の摘出と重量測定：実験開始後11週間目に 4°C の低温室でラットの頸部を切断、脱血した後、各臓器を摘出した。摘出した臓器は、速やかにその周囲の結合組織、脂肪組織を取り除き、重量を測定した。また、体重100 g当たりの臓器比重量を求めた。^{5,6)}

(4) 肝組織切片の作成と組織化学的測定： 4°C の低温室で摘出した肝臓を直ちに $4 \times 4 \times 2 \text{ mm}$ の組織片にし、以下に述べる方法により各々切片の作成と組織化学的に成分の検索、半定量を行なった。

①ビタミンB₁（thiamine）検出のための標本作成と測定：純アルコール固定のパラフィン切片を 60°C の恒温器で乾燥させた。次にこの切片を脱パラフィンし、純アルコールで洗った。さらに組織内に残っている脂溶性ビタミンや脂質などによる非特異的蛍光をのぞくため、切片をイソブチルアルコールにつけてから取り出し、室温で乾燥させた。4%フェリシアン化カリウム水溶液と40%水酸化ナトリウム水溶液の等量混合液を切片上に滴下して2分間酸化した後、蒸留水でかるく洗い、グリセリンで封入した。^{7,8)} ビタミンB₁は蛍光顕微鏡（Leitz Wetzlar・MPV 2 Microscope Photometer・West Germany）

下でコバルト青色（460 nm）の蛍光として認められ、その強度をMPV 2 Photometer Digitalvoltmeterで記録した。ブランクとして上記等量混合液を滴下しない切片を用いた。⁷⁻⁹⁾

②ビタミンB₂（riboflavin）検出のための標本作成と測定：純アルコール固定のパラフィン切片を脱パラフィン後、0.001%過マンガン酸カリウム水溶液に5分間つけ、ついで過酸化水素で脱色し、かるく水洗してそのままグリセリンで封入した。¹⁰⁾

ビタミンB₂は蛍光顕微鏡下で弱い黄緑色（530 nm）の蛍光を呈し、その強度を記録した。他の多くの物質が同じような蛍光を示すため、次の方法でビタミンB₂を鑑別した。すなわち切片にハイドロサルファイト液を5–6分間作用させ、ビタミンB₂を還元した後（黄緑色の蛍光の消失）、軽く水洗し、しばらく室温に放置した。空気酸化により、再び、蛍光が現れた部分をビタミンB₂と判断した。¹¹⁾

③ビタミンA、D、F、P、E検出のための標本作成と測定：ホルマリン固定の組織片の凍結ブロックをBRIGHT-Cryostat Microtome（Instrument Company Ltd., Huntigdon, England）で 10μ の厚さに薄切りし、その切片を風乾させた。¹²⁻²¹⁾

ビタミンAの測定は凍結切片に水を1滴おとし蛍光顕微鏡で行なった。紫外線照射により、退色しやすい黄緑色と黄褐色の蛍光を呈するものをそれぞれビタミンA₁、ビタミンA₂と判別した。¹²⁾

ビタミンDの測定は凍結切片を水で封入し蛍光法で測定した。紫外線照射により急速に消失する黄色の蛍光をビタミンDと判定した。^{13,14)}

ビタミンF（葉酸）の測定は凍結切片に水を1滴おとし蛍光顕微鏡下で測定した。紫外線照射で、葉酸は乳青白色（450 nm）の蛍光として認められ、その蛍光強度を記録した。葉酸の乳青白色の蛍光は 10^{-5} 過マンガン酸カリウム水溶液によって増強され、一方0.1 M塩酸を加えると黄緑色に変わるとともにその蛍光が弱まることを用いて鑑別試験とした。^{15,16)}

ビタミンP（flavonoid）の測定は凍結切片の蛍光顕微鏡下で呈する淡黄色の蛍光顆粒を測定した。¹⁷⁻¹⁹⁾

ビタミンEの測定は、蛍光顕微鏡下で呈する黄緑色（540 nm）の蛍光を測定し、その強度を記録した。^{20,21)}

④中性脂肪および類脂肪検出のための標本作成と測定：凍結切片をズダン・ブラックBの染色法で染色した後、グリセリン・ゼラチンで封入して光顕的に検索した。²²⁾

染めた肝組織の切片は、光学顕微鏡 (OLYMPUS・AH-2・MICROSCOPE) でそれぞれの脂肪滴の感光強度を OLYMPUS・AH-2・spot photometer で測定した。

⑤グリコーゲン検出のための標本作成と測定：肝組織の冷 Carnoy 液固定のパラフィン切片に対して過沃素酸・Schiff 反応 (PAS 反応) を行い、PAS 反応の陽性物質であるグリコーゲンの紫紅色顆粒の感光強度を測定した。グリコーゲンは唾液消化試験を行ない、PAS 反応が陰転することにより確認した。^{23, 24)}

⑥肝細胞の大きさおよび数の算定のための標本作成と測定：アルコール固定のパラフィン切片 (5 μ) をヘマトキシリン・エオジン重染色法で染色した。²⁵⁾

次に、光学顕微鏡下で肝小葉内の中間層における肝細胞を $\times 400$ に拡大し接物測微計によって校正し

た接眼測微計で1匹あたり100個の肝細胞の長径および短径を計った。肝細胞の長径に短径を乗じた値の平方根を肝細胞の大きさの指標とした。また、一定視野内 ($\times 400$) の肝細胞の数を1匹あたり3視野で計測し平均肝細胞数を算出した。^{26, 27)}

(5) 測定値の *t* 検定：測定して得たデータを平均値と標準偏差を求め、student の unpaired *t*-test により対照群と実験群との間における有意差を検討した。

結 果

1. 杜仲葉水エキスの体重に及ぼす影響

Fig. 1 に示すように杜仲葉水エキス投与群では実験開始5週以降において対照群に比較し体重の増加傾向が見られたが、両群間に有意差は認められなかった。

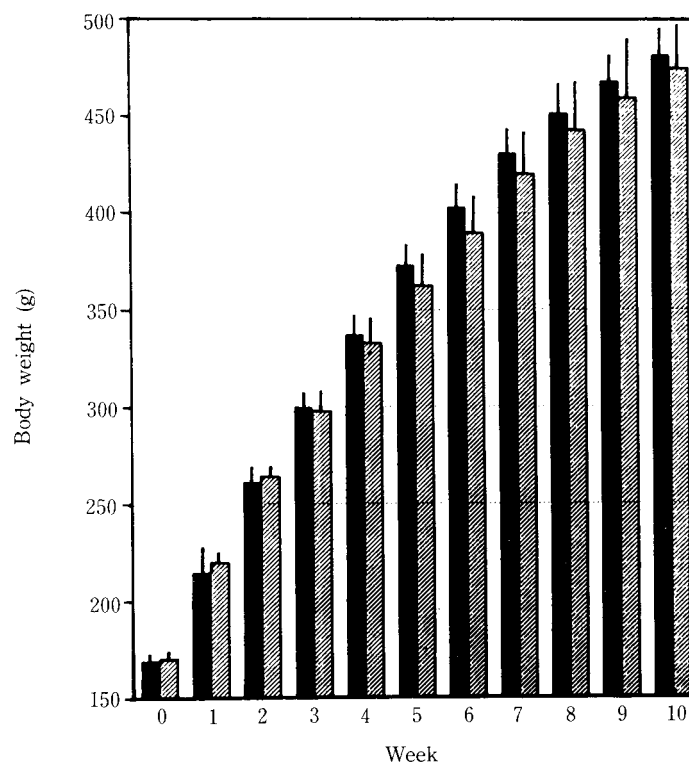


Fig. 1 Chronological changes of body weights of the administered and control groups.
■ : Administered group, ▨ : Control group

2. 杜仲葉水エキスの各臓器重量への影響

各臓器の重量を Table I に示す。副腎では対照群の比重量が 0.01 ± 0.001 g であるのに対し、杜仲葉水エキス投与群では 0.02 ± 0.0005 g と増大している ($p < 0.01$)。また精巣に対し杜仲葉水エキス投与群では、 0.72 ± 0.001 g と増加している ($p <$

0.001)。杜仲葉水エキス投与群の副腎および精巣では有意差をもって臓器比重量の増加が見られたが、脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、精巣上体、肺臓、胃および脾臓の重量および比重量は対照群と比べて有意差は認められなかった。

Table I Effect of the Tu-Chung leaves extract on organ weights in rats (g).

Organs	Control group	Administered group
Brain	0.42 ± 0.02 (2.00 ± 0.07)	0.42 ± 0.006 (2.03 ± 0.06)
Thymus	0.15 ± 0.02 (0.70 ± 0.09)	0.15 ± 0.003 (0.74 ± 0.02)
Lungs	0.51 ± 0.16 (2.39 ± 0.71)	0.45 ± 0.090 (2.15 ± 0.38)
Heart	0.32 ± 0.04 (1.53 ± 0.09)	0.35 ± 0.010 (1.70 ± 0.10)
Liver	3.12 ± 0.11 (15.35 ± 0.32)	3.27 ± 0.100 (15.69 ± 1.14)
stomach	0.95 ± 0.07 (4.52 ± 0.22)	0.78 ± 0.160 (3.77 ± 1.12)
Spleen	0.21 ± 0.02 (0.99 ± 0.11)	0.18 ± 0.010 (0.88 ± 0.04)
Kidneys	0.56 ± 0.22 (2.69 ± 0.05)	0.65 ± 0.050 (3.07 ± 0.19)
Adrenals	0.01 ± 0.001 (3.18 ± 0.17)	$*0.02 \pm 0.0005$ (0.11 ± 0.005)
Testes	0.66 ± 0.006 (3.18 ± 0.17)	$**0.72 \pm 0.001$ (3.47 ± 0.09)
Epididymises	0.22 ± 0.01 (1.05 ± 0.04)	0.28 ± 0.02 (1.35 ± 0.12)

Annotation : ① Data : praportion of organ weight for body weight
 $= (\text{absolute weight/body weight}) \%$, () : absolute weight,
 mean $\pm$ S.E., ② 「*」 : $p < 0.01$, 「**」 : $p < 0.001$

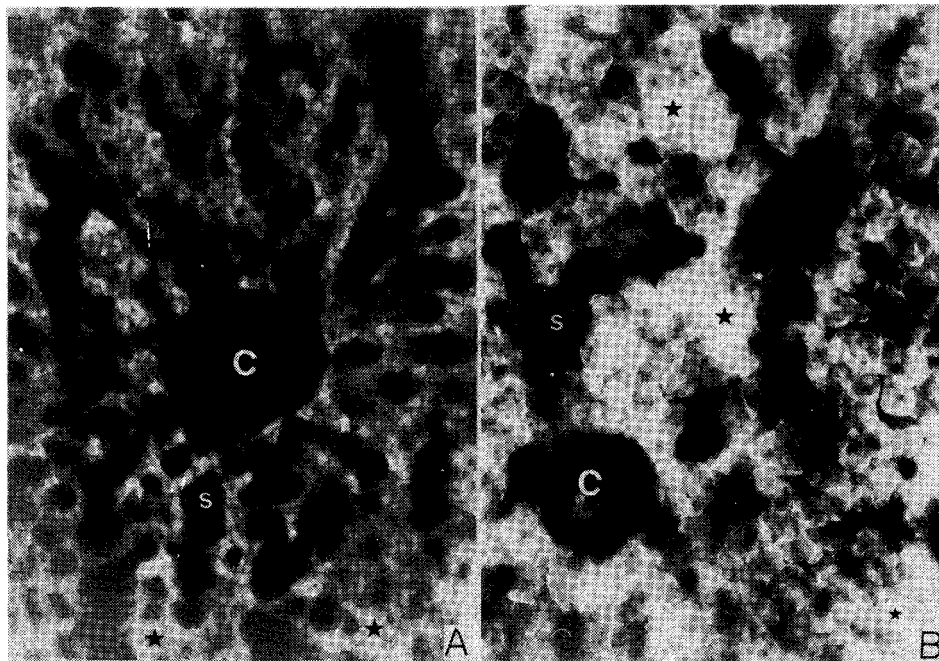


Fig. 2 Fluorescence of vitamine B₁ (★) in livers of the control (A) and administered (B) groups.

C : central vein, S : sinusoid

3. ビタミンB₁ (thiamine) の測定結果

ラット肝臓組織におけるビタミンB₁は Table II
及び Fig. 2 に示すように対照群に比し杜仲葉水エ

キス投与群では、 $p < 0.05$ の有意差をもってビタミンB₁の増加がみられた。

Table II Histochemical changes in the rat liver after long-term administration of the Tu-Chung leaves extract.

	Control group	Administered group
Vitamine B ₁	284.42 ± 21.01	*380.58 ± 88.32 ^{a)}
Vitamine B ₂	135.96 ± 13.70	155.33 ± 39.27 ^{a)}
Vitamine F	6.49 ± 1.77	5.79 ± 1.25 ^{a)}
Vitamine E	22.67 ± 1.61	***33.92 ± 5.09 ^{a)}
Grease drops	0.87 ± 0.13	0.97 ± 0.04 ^{b)}
Glycogen granule	0.87 ± 0.09	**1.11 ± 0.08 ^{b)}
Size of hepatocytes	19.97 ± 0.41	*19.01 ± 0.87 ^{c)}
Number of hepatocytes	22.40 ± 1.60	**25.63 ± 2.10

a) : data of fluorescence intensity, b) : data of sensitivity,
c) : square root of area in hepatocyte, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$,
*** $p < 0.001$

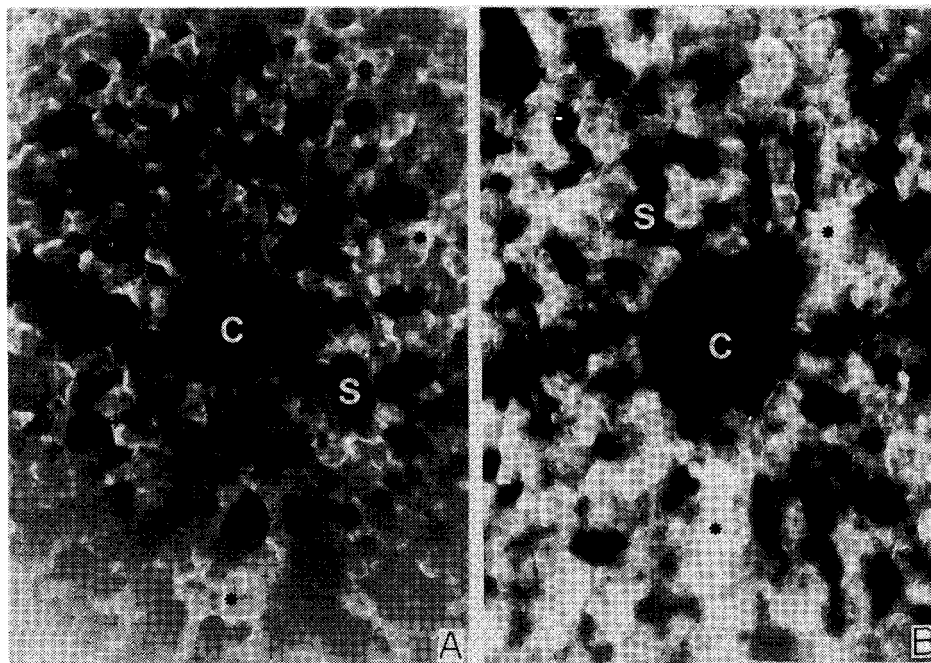


Fig. 3 Fluorescence of vitamine E (*) in livers of the control (A) and administered (B) groups.

C : central vein, S : sinusoid

4. ビタミンB₂ (riboflavin) の測定結果

ラット肝臓組織のビタミンB₂の測定では Table II に示すように杜仲葉水エキス投与群と対照群の間に、有意差は認められなかった。

5. ビタミンAとDの測定結果

蛍光顕微鏡による測定では、杜仲葉水エキス投与群および対照群のラット肝臓組織中には、ビタミンAおよびDの蛍光は認められなかった。

6. ビタミンF (葉酸) の測定結果

鑑別試験によってラット肝臓組織にはビタミンFが検出されたが、Table II に示すように、杜仲葉水エキス投与群と対照群の間に有意差は認められなかった。

7. ビタミンP (フラボノイド) の測定結果

蛍光顕微鏡の測定と鑑別試験によって、杜仲葉水エキス投与群および対照群のラット肝臓組織中にはビタミンPの蛍光は認められなかった。

8. ビタミンEの測定結果

ラット肝臓組織中のビタミンEの測定では、対照

群に比較して杜仲葉水エキス投与群では Table II および Fig. 3 で示すように $p < 0.001$ の有意差でビタミンEの蛍光強度の増加が認められた。

9. 中性脂肪および類脂肪の測定結果

光学顕微鏡を用いてズダン・ブラックB染色肝組織中の杜仲葉水エキス投与群と対照群の中性脂肪および類脂肪含量を比較した結果を Fig. 4 に示す。投与群の中性脂肪および類脂肪の含有量は光学顕微鏡下の感光度から対照群に比較してやや減少していたが有意差は認められなかった (Table II)。

10. グリコーゲンの測定結果

ラット肝臓組織におけるグリコーゲンは、Table II および Fig. 5 で示すように、杜仲葉水エキス投与群では、対照群に比して $p < 0.01$ の有意差をもって増加していた。

11. 肝細胞のサイズおよび数の測定結果

1) 肝細胞の大きさの測定結果：杜仲葉水エキス投与群の肝細胞の大きさは Table II および Fig. 6 で示すように、対照群と比較して、 $p < 0.05$ の有意

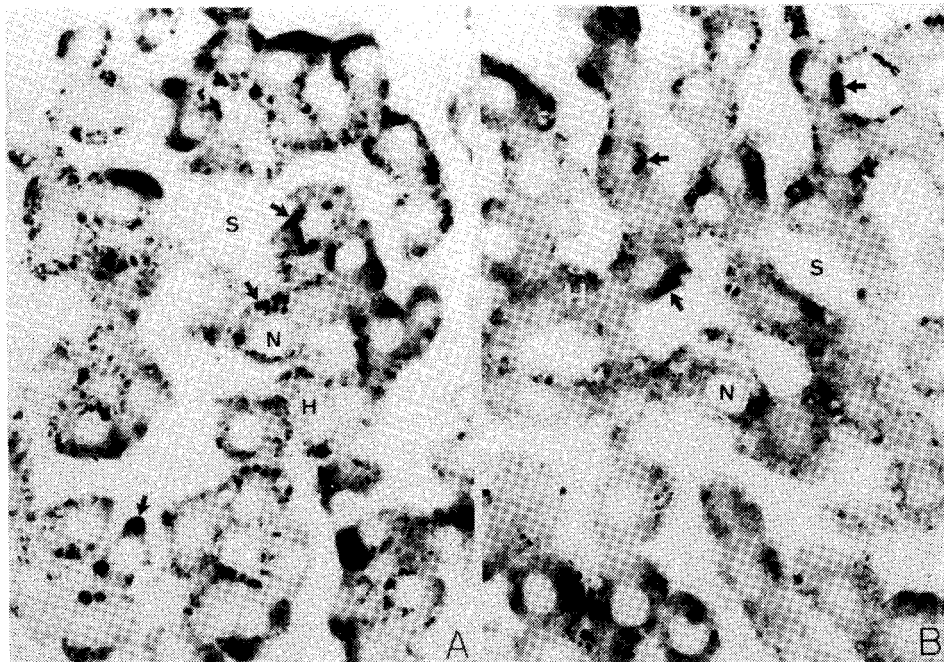


Fig. 4 Sudan black B positive granules (arrows) in livers of the control (A) and administered (B) groups.

H : hepatocyte, N : nucleus, S : sinusoid

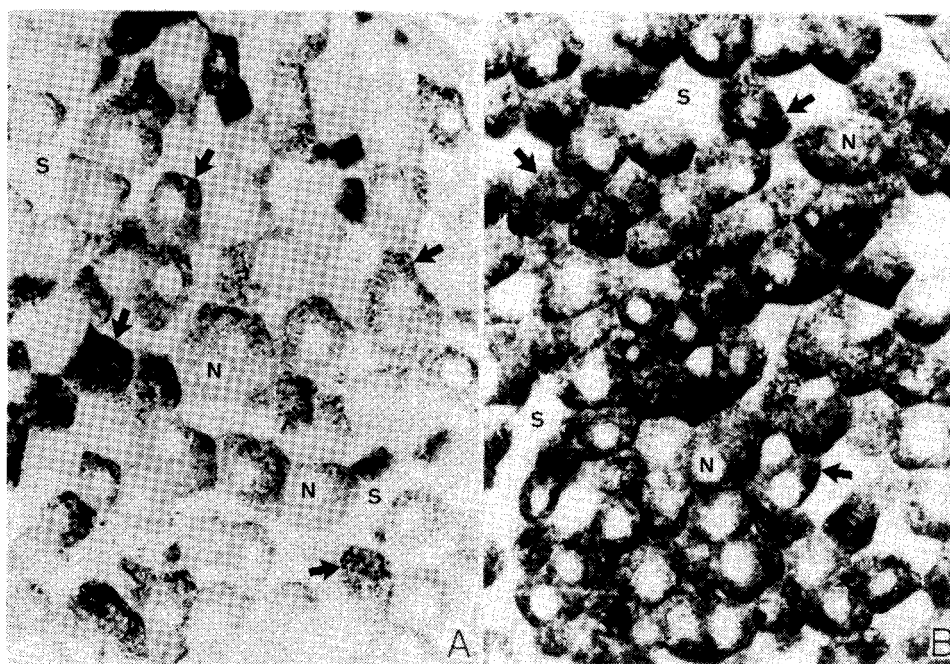


Fig. 5 Glycogen granules (arrows) in livers of the control (A) and administered (B) groups.
N : nucleus, S : sinusoid

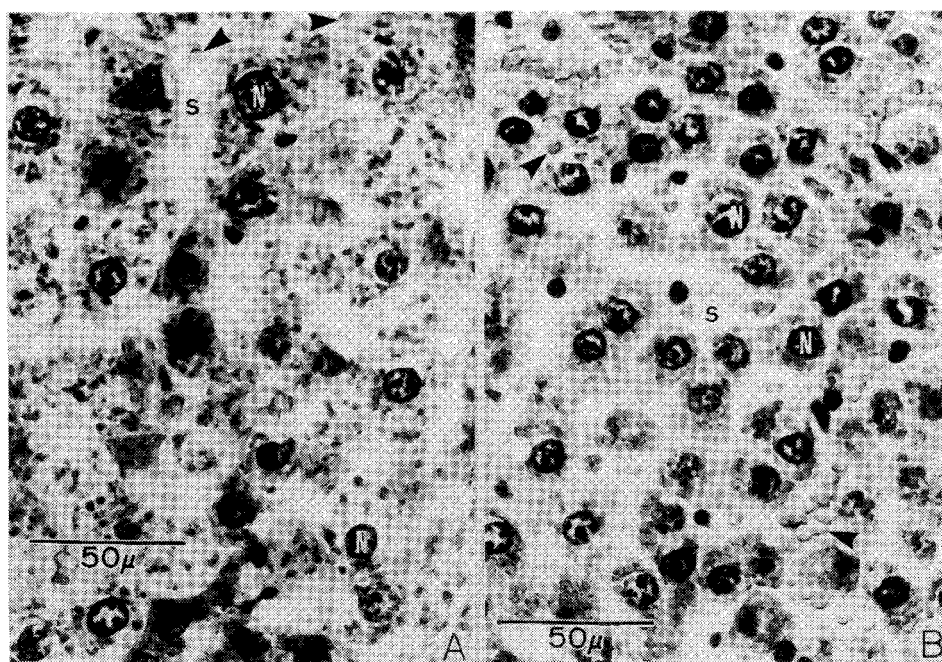


Fig. 6 Size of hepatocytes of the control (A) and administered (B) group ($\times 400$).
N : nucleus, S : sinusoid, Arrows : erythrocytes

差をもって小さかった。

2) 肝細胞数の測定結果：同一倍率視野内($\times 400$)における肝細胞数を杜仲葉水エキス投与群と対照群で比較した結果は Table II の示すように、 $p < 0.01$ の有意差をもって前者が後者より、肝細胞数が多いことが認められた。

考 察

著者らは杜仲葉水エキスをラットに1回投与すると、利尿、血圧降下作用があることを前回報告した。⁴⁾

本実験では杜仲葉水エキスをラットに10週間投与し、滋養強壮作用や老化と関係がある体重、各臓器の重量、肝臓におけるビタミン類やグリコーゲンおよび脂肪の含有量、肝細胞の大きさと数に関して組織化学的に比較検討した。

その結果、まず杜仲葉水エキスをラットに長期投与した場合、体重や各臓器重量への影響をみると、実験開始5週以降では対照群に比し投与群では体重の増加傾向が見られたが、両群間での有意差はみられなかった。

しかし副腎および精巣の比体重は杜仲葉水エキス投与群では対照群より有意に増大していた(それぞれ $p < 0.01$ 及び $p < 0.001$)。その他の臓器重量および比体重には有意差が認められなかった。すなわち、杜仲葉水エキスの長期投与により、副腎、精巣の増大が起こることは杜仲葉の強壮作用を示唆するものと考えられる。

生体の組織内におけるビタミン類の含有量は非常に少なく直接測定することは難しいが、本実験では杜仲葉水エキスの長期投与群と対照群のラット肝細胞内のビタミン類を蛍光顕微分光計を利用して比較した。

その結果、ビタミンB₁、ビタミンEは両群間に有意の差があり、杜仲葉水エキス投与群に多く認められた。ビタミンB₁はラットの肝臓中には比較的多く含まれ、神経系機能と密接に関係していると言われている。²⁸⁻³⁰⁾ また、ビタミンEは哺乳動物体内で抗酸化や生体膜安定化に関与しているとされている。³¹⁻³³⁾

またビタミンB₂およびビタミンFは蛍光所見として認められたが両群間で有意の差はなかった。しかしビタミンA、D、Pの蛍光^{12,14,18)}は両群ともに認められなかった。

グリコーゲンはエネルギー源として肝細胞内に多く含まれる貯蔵多糖類であるが^{34,35)}本実験のラッ

ト肝細胞内におけるグリコーゲン量は、杜仲葉水エキスの長期投与で、対照群より有意に多く認められた。すなわち杜仲葉水エキスの長期投与はラット肝細胞内のグリコーゲンを増加させる作用があると考えられる。しかし杜仲葉水エキスが胃腸からの糖吸収や、膵臓のinsulin分泌とどのように関与して肝臓内グリコーゲンを増加させるかは³⁶⁾今後更に検討しなければならない。

杜仲葉水エキス長期投与群の肝細胞の大きさは対照群と比較して有意に小さくかつ数が多いことが認められたが、このことは、先のビタミンB₁、ビタミンE、グリコーゲン含有量が多い所見とあわせ、投与群の方が肝機能の予備能が高いと判断される。³⁷⁾ 杜仲葉水エキス長期投与のこのような効果は杜仲葉の滋養強壮作用と密接に関係していると思われるが、更に詳細な検討を行なわなければならない。

結 論

① ラットの杜仲葉水エキス投与群と対照群との間に体重の有意差は認められなかったが、副腎および精巣の比重量(体重に対する)の増大がみられた。

② 肝臓のビタミンB₁及びビタミンEは投与群と対照群との間に有意差が認められ(それぞれ $p < 0.05$ 及び $p < 0.001$)、前者で各々増加していた。

③ 肝臓のビタミンB₂およびビタミンFは、両群に有意差は認められなかった。

④ 肝臓のビタミンA及びビタミンD、ビタミンPの蛍光は両群ともに認められなかった。

⑤ 肝細胞内における中性脂肪および類脂肪の含有量は投与群にやや減少傾向があったが有意差は認められなかった。

⑥ グリコーゲンの含有量は対照群と比較して、投与群で有意に増加していた($p < 0.01$)。

⑦ 投与群の肝細胞の大きさは対照群のそれと比較して有意に小さく、数が多く認められた。これらの所見は杜仲葉水エキス長期投与が杜仲葉の滋養強壮作用と密接に関係しているものと考えられる。

文 献

- 1) 李 時珍：“本草綱目(第3冊),”人民衛生出版社,北京, pp. 1986-1987, 1987
- 2) 矢数道明：“臨床応用—漢方処方解説(増補改定版),”創元社,大阪, p. 13, 1981
- 3) 斎藤 洋, 亀ヶ谷俊彦, 西山信好, 松山稲子, 奥山 徹, 柴田承二, 藤岡章二, 今井俊司, 貴志豊和：慢性ストレ

- ス負荷マウスの学習及び性行動に対する杜仲およびその成分の影響. 日本薬学会第103年会講演要旨集, p. 270, 1983
- 4) 難波恒雄, 服部征雄, 葉 加南, 馬 永華, 野村靖幸, 金子周司, 北村佳久, 小泉 保, 片山和憲, 盧 偉: 杜仲葉の研究 (I). 水抽出成分の一般薬理作用. 和漢医薬学会誌 **3**, 89-97, 1986
- 5) 藤井儔子, 小山良修: “動物実験手技,” 協同医書出版社, 東京, pp. 385-414, 1975
- 6) “実験動物の飼育管理と手技” (今道友則監修), ソフトサイエンス社, 東京, p. 252, 1979
- 7) 荒木正哉, 陳 震東: ビタミンB₁の組織化学的研究 (I-V). 日本病理学会会誌 **38**, 65-74, 1949
- 8) 陳 震東: ビタミンの組織化学的検索法. ビタミン **12**, 461-467, 1957
- 9) 佐野 豊: ビタミンB₁検出のためのフェリシアン化カリウムにするチオクロム法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, p. 561, 1981
- 10) 内山和男, 荒木正哉, 陳 震東: ビタミンB₂の組織化学的研究. 日本病理学会会誌 **46**, 389, 1957
- 11) 佐野 豊: ビタミンB₂検出のための蛍光法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, p. 563, 1981
- 12) 佐野 豊: 蛍光法によるビタミンA検出法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, pp. 557-558, 1981
- 13) 陳 震東: ビタミンの組織化学的検索法. ビタミン **12**, 334, 1957
- 14) 佐野 豊: 蛍光法によるビタミンD検出法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, p. 559, 1981
- 15) 岡本一也: 葉酸の組織化学的研究. ビタミン **28**, 49-58, 1963
- 16) 佐野 豊: 葉酸 (Folic acid) とその検出法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, pp. 568-569, 1981
- 17) 陳 震東, 王 才蔭, 荒木正哉: ビタミンPの組織化学的研究. 日本病理学会会誌 **46**, 389-390, 1957
- 18) 王 才蔭: フラボノイドの組織化学的研究. ビタミン **17**, 347-364, 1959
- 19) 佐野 豊: フラボノイド (Flavonoid) とその検出. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, pp. 567-568, 1981
- 20) 宮崎 治: ビタミンEの組織化学的研究. ビタミン **19**, 279-294, 1960
- 21) 佐野 豊: ビタミンE検出のための1次蛍光法. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, p. 560, 1981
- 22) 佐野 豊: ズダン黒B (Sudan black B) 染色. “組織学研究法,” 南山堂, 東京, p. 480, 1981
- 23) McManus, J.F.A.: Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Tech.* **23**, 99-108, 1948
- 24) 佐野 豊: 過沃素酸-Schiff反応 (PAS反応). “組織学研究法,” 南山堂, 東京, pp. 455-456, 1981
- 25) ヘマトキシリン・エオジン染色. “病理組織標本の作り方 (第4版)” (影山圭三監修), 医学書院, 東京, pp. 70-77, 1976
- 26) 田内 久, 森川 猛: 肝臓の老性萎縮と栄養障害性萎縮 (続報). 日本病理学会会誌 **42**, 289-290, 1953
- 27) 佐藤秩子, 田内 久: 老化と環境 (在ハワイ日本人剖検例の検討を中心として). 総合臨床 **23**, 453-458, 1974
- 28) Yonezawa, T. and Iwanami, H.: An experimental study of thiamine deficiency in nervous tissue, using tissue culture techniques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **25**, 362-372, 1966
- 29) Watanebe, I.: Pyridoxamine-induced acute thiamine-deficient encephalopathy in the mouse. *Exp. Mol. Pathol.* **28**, 381-394, 1978
- 30) Robertson, D.M., Wasan, S.M. and Skinner, D.B.: Ultrastructural features of early brain stem lesions of thiamine-deficient rats. *Am. J. Pathol.* **52**, 1081-1097, 1968
- 31) Rotruck, J.T., Pope, A.T., Ganther, H.E., Swanson, A. B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G.: Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 588-590, 1973
- 32) Tappel, A.L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* **32**, 1870-1874, 1973
- 33) Frigg, M. and Rohr, H.P.: Ultrastructural and stereological study on the effect of vitamin E on liver mitochondrial membranes. *Exp. Mol. Pathol.* **24**, 236-343, 1976
- 34) 大浦彦吉, 日合 葵, 妹尾八郎, 竹村玲子, 横沢隆子: 人參成分 (prostisol) 投与による糖および脂質代謝の促進作用. 和漢薬シンポジウム **6**, 33-37, 1972
- 35) 中島義蔵, 石川栄世: 人体肝に於ける糖原及び脂肪に就いて. 日本病理学会会誌 **42**, 291-292, 1953
- 36) Stetten, D. Jr. and Stetten, M.R.: Glycogen metabolism. *Physiological Rev.* **40**, 505-537, 1960
- 37) Shock, N.W.: Physiological aspects of aging in man. *Ann. Rev. Physiol.* **23**, 97-122, 1961