adrenals, epididymal fat, perirenal fat and body weight. Testosterone propionate and progesterone caused no change in plasma lipid levels. Norethynodrel (17 α -Ethynyl-17 β -hydroxy-5(10)-estren-3-one) produced the decrease of plasma cholesterol with similar pattern to that caused by the stilben-type of estrogen. Cortisol acetate produced the increase of both cholesterol and phospholipid level in the similar experiment. Discrepancies appeared in the previous reports of other workers on the estrogen effect on rat plasma cholesterol were discussed and somewhat resolved with our results.

Influence of the Thyrotropic Hormone on Active Peroxidase of the Thyroid Gland

Takeshi NIIYA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe Medical College
(Director : Prof. Yasuo Ueda)

An attempt was made by the author to devise a new method of determining the active peroxidase of thyroid gland by modified Randall's method of determining active peroxidase, by adding K.I. & l-tyrosine to a substrate and by evaluating the rate of H₂O₂ loss with use of Warburg's manometer and through which variation of the amino iodides could be traced.

By means of the manometric method, the influence of TSH on peroxidase was examined by adding TSH to the substrate and paperchromatographically tested of the reacted solution.

The following results were obtained upon analysis of the formed substances :

1. TSH directly accelerates activation of peroxidase.
2. No specific character could be observed whether peroxidases are from vegetative or animal sources on the oxidation process of the iodides based on the fact that they are equally activated in the presence of TSH 10⁻²-10⁻³-10⁻⁴ J.S.U., whether standard product of peroxidase employed, or tried with the thyroid homogenate of guinea pigs.
3. Direct relationship has been shown between the concentrated TSH and the rate of increased activity in TSH concentration range of 10⁻²-10⁻³-10⁻⁴ J.S.U.
4. Paperchromatographic examination of solution with the standard peroxidase revealed the fact that formation of moniodotyrosine and diiodotyrosine at TSH 10⁻² J.S.U. was most increased, and the rate of amino iodide decrease was noted in the order of TSH 10⁻²-10⁻³-10⁻⁴ J.S.U. The formation of both moniodotyrosine and diiodotyrosine was observed with the thyroid homogenate of male guinea pigs also.
5. It is assumed that increased formation of amino iodides was due to activation of peroxidase by TSH which in turn seems to accelerate oxidation of iodide and the other iodizing processes.

甲状腺 Peroxidase 活性に及ぼす甲状腺刺戟

ホルモンの影響

神戸医科大学産婦人科教室 (指導 植田安雄教授)

新 谷 毅

(昭和38年1月10日受付)

緒 論

Peroxidase は H_2O_2 を分解し、その際発生機酸素を生じ、生体内の酸化過程に関与する酵素である。1855年, Schönbein¹⁾ により発見され、次いでその本体が次第に明らかにされ、1898年, Linossier²⁾ により peroxidase と命名され、更に Raundniz³⁾, Loew⁴⁾ により、同じく生体酸化還元過程に関与する catalase とは異なる酵素である事が明らかにされた。その後、Willstätter⁵⁾ は、活性測定法を考案し、それを利用して吸着法により西洋ワサビの peroxidase の精製を試み、かなり高純度のものを分離し得た。更に1941年, Theorell⁶⁾ は、ワサビを処理して peroxidase の結晶化に成功した。次いで乳汁中の peroxidase も結晶化され、又、Agner⁷⁾ により白血球中の peroxidase も精製分離された。動物性 peroxidase としては、上述の牛乳と白血球に由来するものが知られていたが、近年、その他の臓器、即ち、肝臓、子宮、唾液腺、甲状腺等の中にも、peroxidase の存在する事が発見された。此、peroxidase は、生体内酸化の終末に於て発生する細胞毒である H_2O_2 を消滅させ、細胞を H_2O_2 の害から保護すると共に、酸素消費の節約に役立つと考えられていた。しかしながらその後の研究により、細胞中に存在すると予想される H_2O_2 を分解するに必要な量よりも、遙かに多量の peroxidase が、特に甲状腺細胞内に存在する事が明らかにされた。沃度代謝に重要な意義を持つ甲状腺に於て、この peroxidase が、甲状腺ホルモン合成の第一段階たる沃度イオン酸化に関与する事はほぼ確実とされている。即ち、1943年, Dempsey⁸⁾ が甲状腺濾胞中に peroxidase の存在を暗示する組織化学的研究を発表して以来、De Robertis⁹⁾ & Grasso, Rosenberg¹⁰⁾, Alexander¹¹⁾, De Groot¹²⁾ & Davis 等によりその存在が確められている。これらの peroxidase は、上述の沃度イオンの酸化の他に、更に酸化的 thyroxine 縮合にも関与すると云われている。

一方、甲状腺刺戟ホルモン (以下 TSH と略記する) は、甲状腺に於ける沃度代謝の各段階に於て、促進的に作用するものとされている。従つて甲状腺に於て沃度イオンの酸化に関与する、此の peroxidase と TSH との間に、何等かの関連のある事が予想される。1946年, De Robertis⁹⁾ は、組織化学的研究で、TSH が甲状腺 peroxidase 活性を増強させると記載したのみで、その他には見るべき業績がない。従つて、両者の関係を生化学的に解明する事は、極めて重要な意義を持っている。

処で、従来の peroxidase 活性測定法では、peroxidase 活性そのものは測定し得るが、その際の沃度代謝の状態を検討する事が出来なかつた。そこで著者は、peroxidase 活性を manometry で測定し、同時に沃度アミノ酸の定量をも検討し得る新法を案出し、この方法によりこれらの問題を検討した。

第一章 「Warburg 検圧計による peroxidase 活性の新測定法」

ま え が き

従来より peroxidase の活性測定法には、Purpurogallin 法⁵⁾, Guajacol 法¹³⁾, Etti 検圧法¹⁴⁾, Randall

法¹⁵⁾等がある。Purpurogallin 法、及び guajacol 法は、夫々基質として、pyrogallol、及び guajacol を用い、それに H_2O_2 と酵素液を作用させ、酸化生成物 purpurogallin、又は tetraguajacol を比色して peroxidase の活性を測定する方法で、以上の二つは比色法 (colorimetry) であるが、次の Ettori 検圧法、及び Randall 法は、Warburg 検圧計を用いる gasmetry である。即ち、Ettori 法は、基質として pyrogallol を用い、それに H_2O_2 、酵素液を加えると、purpurogallin、水、 CO_2 を生ずるが、この CO_2 発生量を、peroxidase 活性の示標とした。又、Randall 法は、基質として p-amino 安息香酸を用い、それに H_2O_2 、酵素液を加え、その際生ずる発生機酸素の p-amino 安息香酸酸化への利用率を Warburg 検圧計により求め、之を以て peroxidase 活性としている方法である。これ等は何れも基質に pyrogallol、guajacol、p-amino 安息香酸を使用するのみで、その反応系に沃度化合物を含んでいない為に、その際の沃度代謝の推移を検討する事は不可能である。そこで著者は、Randall 法を改良して、基質として KI、及び l-tyrosine を用い、peroxidase が沃度イオンの酸化に利用した発生機酸素量を Warburg 検圧計で測定して、peroxidase の活性値を求めると共に、その際の沃度アミノ酸生成過程をも同時に究明し得る様考案した。先ず本章に於ては、此測定法の基礎的な実験条件を検討し、その至適条件を決定し、次いで Ettori 法を追試し、本法と Ettori 法との優劣を比較した。

実験材料並びに方法

I 実験材料

1) peroxidase 源として、標品 peroxidase (horse radish peroxidase) とモルモット甲状腺を用いた。

a) 標品 peroxidase

標品 peroxidase は、関東化学株式会社製の力価60単位/1 mgのものを、生理的食塩水に溶かし1容器当たり 50 γ 使用した。

b) モルモット甲状腺 homogenate は、生後3カ月の体重400 g前後の雄モルモット15匹を、エーテル麻醉下で屠殺後、直ちにその甲状腺を採取して、pH 7.4 の Krebs-Ringer's bicarbonate 液に浸して、充分に血液を洗滌し、濾紙上で脂肪、結合織等の不純物を除去した後に、濾紙にて脱水、直ちに torsion balance で秤量し、氷冷しながら金属 homogenizer で30秒間3回処理し、甲状腺組織 homogenate を作製し、これを10%の割合に Krebs-Ringer's bicarbonate 液に混和した。実験は、屠殺後2時間以内に行う事とし、その間 homogenate は4℃に保存した。モルモットを用いたのは、TSH への感受性が高いと云う Bergmann¹⁶⁾ の意見に従ったのである。又、性周期の影響のない雄を積んだ。

2) Catalase は、関東化学株式会社製のもので、牛の肝臓より作製され、力価は、1200—1400K.U. である。

3) medium としては、Krebs-Ringer's bicarbonate 液を stock solution よりその都度調製し、pH 7.4 として使用した。TSH 活性は酸性側に於て低下すると云う望月¹⁷⁾の報告に従って、TSH の溶媒の pH として7.4を選んだ。

4) H_2O_2 (江戸川化学製) は、1容器当たり種々の μmol . を使用した。

5) 基質としては、KI (和光製) を1容器当たり 40 μmol . を用い、更にこれに1容器当たり 30 μmol の l-tyrosine (和光製) を添加した。

次いで Ettori 検圧法を行う為に、次のものを用意した。即ち、主室に 5% pyrogallol 0.2ml., 0.25% 磷酸塩 (pH 6.0) 0.5ml., 0.01M H_2O_2 1.5ml., を入れ、次いで第1側室に酵素溶液 0.1ml 第2側室に 20% H_2SO_4 0.5ml. (作用停止用) を入れた。

II. 実験方法

1) 実験装置

Warburg 検圧計と、第1図の如き容器を使用した。

a) 先ず Fig.1 の主室には、標品 peroxidase 50 γ 、又は10%雄モルモット甲状腺 homogenate 浮遊液

0.3ml (新鮮重量50mg) に, 1 容器当り KI $40\mu\text{mol}$. と l-tyrosine $30\mu\text{mol}$. を添加した.

b) 側室

i) 第1側室には, Krebs-Ringer's bicarbonate 液 1.0ml. に H_2O_2 を夫々, 1, 5, 10, 20, 及び $30\mu\text{mol}$. 入れた.

ii) 更に第2側室には, 一定時間 peroxidase を作用させた際, 残っている H_2O_2 を分解する為に注加する catalase 10mg. を含む生理的食塩水 0.5ml. を入れた.

c) 副室

CO_2 吸収の目的で, 20%苛性カリ0.2mlを濾紙と共に入れた.

2) 実験操作

peroxidase 活性の測定には, Warburg

検圧計を用い, 気相は空気とし, 温度は 37.5°C にて, 通常毎分 100回振盪した. 先ず10分間予備振盪の後, 第1側室より H_2O_2 溶液を加え, 一定時間振盪して H_2O_2 に peroxidase を反応せしめる. 一定時間の後, 第2側室の catalase を加え, 残っている H_2O_2 を分解して O_2 を発生せしめ, 分解遊離された酸素量を manometer にて読みとる. (此値をAとする). 他方, 別の容器で第1側室に同量の H_2O_2 と, 第2側室に同量の catalase とを入れたものを作り, 同時間振盪した後, 両者を混和し, その際発生した酸素量を manometer にて読みとる. (此値をWとする). 各容器により異なる容器恒数 (flask constant) KをW, 及びAに乘すると, それぞれの酸素量 (μl) が得られる. Avogadro の法則によれば, H_2O_2 $1\mu\text{mol}$. よりの酸素発生量は, 標準状態にて $11.2\mu\text{l}$ であるから, この $KW-KA$ の値 (μl) を $11.2\mu\text{l}$ にて除する事により μmol . として表わし得る. これが peroxidase の沃度酸化利用酸素量 X, 即ち, peroxidase の活性測定値である. なお甲状腺 homogenate に於ては, 乾燥重量 1 mg. 当りとする為, 更に活性測定値を甲状腺乾燥重量mにて除した. 即ち, 次式 $X = \frac{KW-KA}{11.2} \times \frac{1}{m}$ にて peroxidase 活性測定値を表わし得る.

次に Ettori 法の実施に当つては, 先ず 20°C の恒温槽にて10分間予備振盪を行つた後に閉栓し, 第1側室より酵素液を加え, 5分後に H_2SO_4 を加え作用を停止せしめ, その時の CO_2 発生量を Warburg 検圧計を以て測定した.

実験成績

1) H_2O_2 濃度と peroxidase 活性測定値との関係

peroxidase 源として標品 peroxidase 50 γ を用い, 1 容器当り H_2O_2 1. 5. 10. 20. $30\mu\text{mol}$. を入れて, peroxidase 活性を測定した所, Fig. 2 の如く, H_2O_2 の濃度の増加と共に測定活性値は上昇するが, $20\mu\text{mol}$. では最高に達し, $30\mu\text{mol}$. ではやや低値となる.

2) l-tyrosine 添加の影響

Fig. 1. Vessels and Reaction mixture in it.

- i) peroxidase solution 0.3ml
 { horse radish
 or 10% Thyroid homogenate of male guinea pig
- ii) Krebs Ringer's bicarbonate solution 1.2ml.
 { l-tyrosine $30\mu\text{mol}$.
 { KI $40\mu\text{mol}$.
 (TSH $10^{-1} \sim 10^{-4}$ J.S.U./vessel)

Fig. 2. Relationship between Peroxidase activity and Concentration of H_2O_2

peroxidase 源として、標品 peroxidase 50 γ を用い、 H_2O_2 の濃度を 20 μ mol. とし、他は実験方法の項に記載したと同一条件にて、基質に 1 容器当たり l-tyrosine 30 μ mol. を添加した場合と、添加しない場合との peroxidase 活性値を測定した処、Table 1 の如く両者の間に殆んど差異を認めなかった。

Table 1. Peroxidase activity with or without adding l-tyrosine

Time (min.)	2	4	6	8	10
Standard peroxidase (l-tyrosine (+))	2.3	2.4	2.9	3.1	3.3
Standard peroxidase (l-tyrosine (-))	2.1	2.4	2.7	2.9	3.2

3) Peroxidase の各種濃度とその活性測定値

H_2O_2 濃度を 1 容器当たり 20 μ mol. とし、標品 peroxidase の濃度を、1 容器当たり 1, 5, 10, 50, 100, 1000 γ として、peroxidase 活性値を測定した処、Fig. 3 の如くの peroxidase 濃度が増加するにつれ、その活性値の上昇するのを認めた。

4) モルモット甲状腺 homogenate の酸素消費量 (QO_2) の測定

Fig. 3. Peroxidase activities at various Concentrations of peroxidase

Table 2. Oxygenconsumption of Thyroid homogenate of male guinea pig

No.	I	II	III	IV	mean
Time (min.)					
10	2.5	2.2	2.0	2.8	2.4
20	5.0	4.5	4.6	5.1	4.8
40	9.4	9.7	9.2	10.2	9.6
60	14.8	14.0	14.1	14.8	14.4

homogenate の酸素消費を、10分、20分、40分、60分と経時的に測定した結果、Table 2 に示す如く酸素消費量 QO_2 (μ l./mg./hrs.) は、14.4 μ l. の微量であつた。なお標品 peroxidase では、酸素消費量は零であつた。

5) 反応時間と peroxidase 活性測定値

1 容器当たり H_2O_2 20 μ mol. にて、標品 peroxidase の場合は 50 γ 、homogenate では 50mg. を使用して、その peroxidase 活性値を、2分、4分、6分、8分、10分の 5 回にわたり測定した処、共に Fig. 4 の如き値を得た。標品 peroxidase を用いた場合でも、甲状腺 homogenate を用いた場合でも、反応時間の経過と共に、peroxidase 活性の上昇を見た。又、甲状腺 homogenate を用いた場合に比べて、標品 peroxidase を用いた場合の方が活性値の高い事を認めた。

6) Ertori 法による peroxidase 活性の測定値

標品 peroxidase の濃度を、1, 10, 50 γ として、それぞれの CO_2 発生量を、Warburg 検圧計を用いて測定した処、Fig. 5 の如く、peroxidase の濃度の増加と共に、 CO_2 発生量の増加するのを認めた。併し本法では、100 γ 以上は測定出来なかつた。

Fig. 4. Peroxidase activities at Response Time

Fig. 5. Peroxidase activity measured by Ettore's method

考 案

peroxidase 活性測定法には, purpurogallin 法, guajacol 法, Ettore 検圧法, Randall 法等があるが, 著者は Randall 法を改良し, 基質に沃度化合物を添加し, peroxidase による H_2O_2 の消失率を Warburg 検圧計を用いて測定し, その沃度酸化利用酸素量を以て, peroxidase の活性を測定すると同時に, 沃度アミノ酸の推移を観察し得る測定法を案出した。

本測定法の原理として, peroxidase による H_2O_2 の分解は, $\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{peroxidase}} \text{H}_2\text{O} + \text{O}$ で, この発生機酸素は, 直ちに沃度酸化に利用されるから, $2\text{I}^- + \text{O}^{--} + 2\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{ "active I"} + \text{H}_2\text{O}$, 又は,

なり, この O^{--} は直ちに 2H^+ と結合して H_2O となり, O_2 ガスとはならないので, manometer には現れない。これに反して catalase が H_2O_2 に作用すると, $2\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ となり, O_2 ガスの形で酸素が発生するので, これが manometer に現れる。故に添加した H_2O_2 に, peroxidase を一定時間作用させた後に, 残った H_2O_2 を catalase によつて分解させ, 発生した酸素量を, 同時に別の容器で同量の H_2O_2 を, catalase のみで分解させた時に発生する総酸素量から差引くと, 沃度酸化に利用された発生機酸素の量が得られる。これを peroxidase の活性値とするのである。本法に於て, 先ず H_2O_2 濃度を变化させた場合の, peroxidase の活性値を測定した処, Fig. 2 の如く, H_2O_2 濃度が増加すると共に, peroxidase 活性測定値も増加し, $20\mu\text{ mol.}$ で最高に達し, $30\mu\text{ mol.}$ では, 却つて稍低下するのを認めた。此の事実から, 本法を行う場合には, 1 容器当り H_2O_2 $20\mu\text{ mol.}$ を入れるのが適当と考えられる。従つて, 以下の実験には, すべて H_2O_2 の濃度を 1 容器当り $20\mu\text{ mol.}$ とした。

次に, 著者の考案した方法では, 沃度代謝をも同時に検討する為に, 容器中に l-tyrosine を混入するのであるが, この添加した l-tyrosine が, peroxidase 活性値に影響を及ぼすか否かを検討した処, Table 1 の如く, l-tyrosine を添加した場合の peroxidase 活性測定値と, 添加しない場合のそれとの間に, 有意の差を認めなかつた。従つて, l-tyrosine 1 容器当り $30\mu\text{ mol.}$ を入れても, peroxidase 活性値の測定が可能である事を知つた。

更に, peroxidase の濃度と, その活性測定値との関係を検討する為に, H_2O_2 濃度を 1 容器当り $20\mu\text{ mol.}$ として, 標品 peroxidase の濃度をいろいろ変えてその活性値を測定した処, Fig. 3 に見られる如く,

peroxidase 量の増加と共に、その活性測定値も増加する。此事実から、peroxidase 量とその活性測定値との間に、一定の比例関係の成立し得るのを確め得た。従つて、此測定法は、peroxidase の活性値測定法として用い得る事を確認した。

以上は、標品を用いた実験であつたが、甲状腺 homogenate を用いた場合、甲状腺組織が O_2 を消費する為に、測定値が変動する事が考えられるが、Table 2 で明らかにした様に、 QO_2 は $14.4\mu l$. と云う微量であつた事から、本法に於て、標品 peroxidase に代えて甲状腺 homogenate を用いた場合でも、標品 peroxidase を用いた場合と同様、 QO_2 は無視し得ると考えられる。

以上の種々の基礎的実験の結果より、1 容器当り H_2O_2 20μ mol. 標品 peroxidase 50γ . homogenate は $50mg$ を用いる事とし、2 分乃至 10 分間反応せしめた処、その peroxidase 活性値は、Fig. 4 の如く、両者共時間と共に直線的に上昇するのを確めた。併し、標品 peroxidase を用いた場合の方が、その絶対量が多く、又、比較的精製されたものである為、甲状腺 homogenate に比し活性値が高いのを認めた。

更に、Ettori 法により、標品 peroxidase の活性を測定した処、Fig. 5 の如き成績を得た。即ち、peroxidase の各種濃度とその活性値を測定すると、peroxidase 量が増加するにつれ、その活性測定値の上昇するのを認めた。併し、Ettori 法に於ては、 H_2O_2 $0.01M$ $1.5ml$. を使用しているので、 CO_2 発生量は、計算上 $112\mu l$ が限界となる。従つて peroxidase 量が 100γ 以上の場合は、Fig. 5 の結果から見て明らかな如く測定不能であつた。更に、比の Ettori 法は、基質に沃度化合物を添加していないから、沃度生成物の推移を見る事は不可能である。

以上の基礎的な検討の結果から、著者の考案せる方法は、gasmetry 法としての peroxidase 活性測定法として利用し得るものであり、且つ同じく gasmetry 法として従来賞用されて来た Ettori 法に比べて、その測定範囲が広いと云う長所がある。又、原法である Randall 法では、基質に沃度化合物を含まないから、沃度代謝を追求する事は出来ないが、著者の考案した本法では、基質に沃度化合物を添加してあるから、反応後の沃度生成物をも同時に検索し得ると云う利点がある。

結 論

Randall の peroxidase 測定法を改良し、その基質に KI、及び l-tyrosine を添加し、 H_2O_2 の消失率を Warburg 検圧計を用いて測定すると同時に、その際の沃度アミノ酸の推移を究明し得る peroxidase 活性測定法を案出し、その基礎的実験条件を検討した。

1) 此測定法では、1 容器当り使用する H_2O_2 量は、 20μ mol. が最適である。

2) l-tyrosine 添加による peroxidase 活性値への影響は認められなかつた。従つて基質に l-tyrosine を添加して差支えない事を知つた。

3) 標品 peroxidase の濃度と、本法で測定したその活性値とは、略々正比例する事から、本法は peroxidase 活性の測定に用い得る事を確認した。

4) モルモット甲状腺 homogenate そのものの酸素消費量は、極めて微量である事から、甲状腺 homogenate を反応系に加えた場合でも、活性値への影響は無視し得る。

5) 標品 peroxidase、又は甲状腺 homogenate と H_2O_2 との反応時間と、本法で測定した peroxidase 活性値とは、正比例する。

6) Ettori 法は、本法に比べて測定範囲が限られている。

7) 本法では、基質として沃度化合物を添加しているから、反応後の沃度アミノ酸の推移を、peroxidase 活性の変動と同時に究明する事が出来る筈である。

第二章 「甲状腺 peroxidase, 及び沃度アミノ酸生成に及ぼす

甲状腺刺激ホルモンの影響」

まえがき

甲状腺の沃度代謝は、体外より摂取された無機沃度が腸管より吸収され、血液中に移行し、更に甲状腺にとり込まれるが、この沃度イオンは、甲状腺濾胞上皮の細胞膜を通過して細胞内に侵入すると直ちに、peroxidase により酸化されて I_2 となる。この酸化された沃度分子は甲状腺蛋白分子の tyrosine 基に結合し、出来た diiodotyrosine の2分子は、更に縮合して thyroxine となる。thyroxine の殆んど総ては globulin 分子に結合し、thyroglobulin として甲状腺濾胞中に貯蔵される。以上の様な甲状腺の沃度代謝は、TSH によつて促進されるが、甲状腺組織内で沃度の酸化に関与する peroxidase の活性が、TSH によつて賦活される事は、1946年、De Robertis⁹⁾ & Grasso により組織化学的に検討が行われて来た。

TSH が甲状腺の沃度摂取、及び沃度有機化に及ぼす影響については、Leblond,¹⁸⁾ Morton,¹⁹⁾ 等の如く種々の報告があるが、従来の研究を通覧すると、TSH が選択的に peroxidase 活性を高めるとする説と、TSH が甲状腺の機能を全般的に亢進させ、その結果として沃度代謝の亢進を見ると云う説と、TSH が甲状腺の沃度代謝を促進する為に、二次的に沃度有機化を促進させると云う説の3つに大別出来るが、何れも推定の域を脱せず、未だはつきりとした定説が見られない。

そこで私は、peroxidase 及び甲状腺に於ける沃度代謝の機構に TSH が如何に作用するかを、前章に記述した測定法を用い、即ち manometry と paperchromatography を併用して研究し、些かの新知見を得たのでここに報告する。

実験材料並びに方法

I. 実験材料

前章に記載したと同じ。

但し、TSH としては、Pretiron (Schering Co.) を生理的食塩水にて溶解し、TSH 溶液は氷室に保存し、少くとも5日以内に使用した。此、TSH を1容器当り 10^{-1} — 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. となる様に基質に添加した。なお、 H_2O_2 は1容器当り $20\mu\text{mol}$. を使用し、基質としての KI を1容器当り $40\mu\text{mol}$. とし、これに l-tyrosine を1容器当り $30\mu\text{mol}$. 添加した。

反応終了後の生成物の検出には、東洋濾紙 No. 51 を以て、paperchromatography を行つたが、展開液として n-butanol-acetic acid-water (75 : 10 : 15) を用いた。

II. 実験方法

実験方法は以下の如く行う。

1) 実験装置

前章と同じ

2) 実験操作

Gasmetry の操作は、前章に記載通りである。

反応終了後の溶液の paperchromatography は次の様に行つた。即ち、Warburg 検圧計を用いて、peroxidase 活性値を測定した後の、主室中の溶液の水分を出来るだけ蒸発し、その約5倍量の n-butanol、アンモニア (50 : 1) 溶液を加え振盪抽出の後、その抽出液を濃縮して、東洋濾紙 No. 51 の一端に塗抹した。展開液には、n-butanol-acetic acid-water (75 : 10 : 15) を用い、一次元上昇法で展開した。約25cm 展開させた後、濾紙は室温で風乾した。呈色には、0.5% ninhydrin 溶液を用い、風乾した展開濾紙に噴霧し、 90°C 10分間発色を行つた。標準物質として、monoiodotyrosine, diiodotyrosine, 353l -triiodothyronine,

l-thyroxine, を使用し, 主室内溶液の抽出液と同時に展開し, 同様の操作で発色し, それ等の Rf. より, 未知の spot の沃度アミノ酸の種類を判定した.

実験成績

A. peroxidase 活性値

a. 標品 peroxidase を用いた実験

標品 peroxidase 活性に及ぼす TSH の影響を, 逐時的に検討した結果は, Fig. 6 に示す如くである.

Fig. 6. Peroxidase activity with adding TSH (standard peroxidase)

Fig. 7. Relationship between TSH Concentration and Peroxidase activity studied at different time. (Standard peroxidase)

即ち, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 及び 10^{-4} J.S.U. の濃度の TSH を反応系に加え, 2分, 4分, 6分, 8分, 10分の順に, 各々 catalase を添加する事により peroxidase の反応を停止せしめ, 2分, 4分, 6分, 8分, 10分間反応せしめた時の, それぞれの peroxidase 活性値を測定したが, 各濃度の TSH を加えた場合の peroxidase 活性値は, 夫々時間経過と共に増加するが, その増加率は TSH の各濃度によつて異つてゐる. 而し, 6分間反応せしめた場合は, その活性値は略々等しく, 10分間反応せしめた場合は, その活性値の大きさの順は, 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-1} J.S.U. であり, 対照とした TSH を加えない場合に比して, 何れも活性値が大であつた. 更にこの成績を反応時間別に, TSH 濃度と peroxidase 活性値との関係を図示すると, Fig. 7. の如くである. 2分, 4分, 6分では, 両者の関係は直線的でないが, 10分間反応せしめた場合は, TSH 濃度と peroxidase 活性測定値とが, ほぼ完全な直線関係を示している. 此, 実験結果から見て, peroxidase 活性は, 10分間反応せしめた後に測定するのが, 最適である事を示している.

次に, 以上の両者の相互関係を推計学的に検討する為に, 標品 peroxidase を用い, TSH を添加し10分間反応せしめた実験を詳細に行つたが, その場合の peroxidase 活性測定値は, Table 3 の通りであつた. これをグラフに示すと, Fig. 8 の如くである. この第3表の実験値より, TSH の各濃度を作用せしめた場合の, 夫々の peroxidase 活性測定値を, 推計学的に検討した. 併し, TSH 10^{-1} J.S.U. を添加した場合の実験値は, 分散が大である為, 推計学的検討を加える事が出来ないが, 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. ではこの検討を行い得た. TSH の各種濃度添加時の peroxidase 活性値間の有意差の検討を行つた処, 危険率 $p = 5\%$ に於て有意差を認めた. 更に此, 3種の濃度の TSH を添加した場合の, 用量反応曲線の直線性の検定を行つたが, TSH 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. の間では, 危険率 $p = 5\%$ にて, $F_{21}^3 = 3,072$, $F_0 = 0$, $F_0 < F_{21}^3$,

Table 3. Peroxidase activity with adding TSH (standard peroxidase)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	total	mean
K	0.31	0.43	0.37	0.69	0.46	0.94	0.87	0.31	4.38	0.548 ± 0.064
10^{-1}	0.50	1.33	2.31	0.37	0.62	0.40	2.50	2.54	10.57	1.32 ± 1.286
10^{-2}	2.54	2.77	2.53	2.52	2.76	2.52	2.93	2.47	21.04	2.63 ± 0.027
10^{-3}	1.72	1.58	1.76	1.59	1.91	1.80	1.16	2.19	13.71	1.71 ± 0.088
10^{-4}	0.76	0.62	0.85	0.56	1.11	0.72	0.97	0.74	6.33	0.79 ± 0.031

Fig. 8. Peroxidase activity with adding TSH (standard peroxidase)

Fig. 10. Peroxidase activity with adding TSH (homogenate)

Fig. 9. Dose Response Curve (standard peroxidase)

Fig. 11. Relationship between TSH Concentration and Peroxidase activity studied at different time (homogenate)

であつた。従つてその用量反応曲線の直線性が成立し、回帰係数 $b = 0.919$ となるから、最良近似曲線は、Fig. 9 の如く、 $Y = -0.919x + 4,469$, $\lambda = 0.39$ となる。此の際の回帰係数 b に対する信頼限界を、危険率 $p = 5\%$ で検討した処、 b が有意である事が認められた。即ち、標品 peroxidase を用いた実験では、 10^{-2} , 10^{-3} , 及び 10^{-4} J.S.U. の範囲内で、TSH 濃度と、TSH を添加した場合の peroxidase 活性値との間に、推計学上有意の関係が認められた。

b. モルモット甲状腺 homogenate を用いた実験

peroxidase 源として、モルモット甲状腺 homogenate を用い、TSH がその活性値に及ぼす影響を、時間的経過を追つて検討した結果は、Fig. 10に示す如くである。即ち、 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 及び 10^{-4} J.S.U. の濃度の TSH を反応系に加え、2分、4分、6分、8分、10分の順に、各々 catalase を添加する事により peroxidase の反応を停止せしめ、2分、4分、6分、8分、10分間反応せしめた場合の、peroxidase 活性を測定したが、TSH の各濃度を加えた場合の peroxidase 活性値は、夫々時間的経過と共に増加するが、その増加率は TSH の各濃度によつて異つてゐる。而し、約5分間反応せしめた場合は、その活性値は略々等しく、10分間反応せしめた場合は、その活性値の大きの順は、 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-1} , 10^{-4} J.S.U. であり、対照とした TSH を加えない場合に比して、何れも活性値が大であつた。更に、この成績を反応時間別に、TSH 濃度と peroxidase 活性値との関係を図示すると、Fig. 11 の如くである。4分間反応せしめた場合、やや直線に近づいている。10分間反応せしめた場合の peroxidase 活性測定値は、標品 peroxidase を用いた場合と異り、直線とはならなかつた。併し、標品 peroxidase を用いた場合と比較する為に、10分間反応せしめた場合の実験値 (Table 4 を推計学的に検討した。その実験値をグラフで表わすと Fig. 12の如くである。こ

Table 4. Peroxidase activity with adding TSH (homogenate)

	I	II	III	IV	V	total	mean
K	0.21	0.85	0.92	0.51	0.99	3.48	0.696 ±0.651
10^{-1}	0.11	0.39	0.89	0.95	1.33	3.67	0.734 ±0.965
10^{-2}	0.81	1.45	1.52	0.71	1.05	5.54	1.108 ±0.752
10^{-3}	0.58	0.77	1.12	1.25	0.85	4.57	0.914 ±0.540
10^{-4}	0.70	0.95	1.20	0.65	0.78	4.28	0.856 ±0.446

の Table 4 の実験値より判る通り、標品 peroxidase を用いた場合と異り、 10^{-2} , 10^{-3} 及び 10^{-4} J.S.U. 濃度の TSH 添加時の、peroxidase 活性測定値の分散が大である。TSH を添加しない場合、即ち、対照と各種 TSH 濃度を添加した場合との peroxidase 活性測定値間には、有意差を認めず、又、TSH の各濃度による peroxidase 活性測定値間にも、危険率 $p = 5\%$ で、何れに於ても有意差は認められなかつた。更に、此3種の濃度の TSH を添加した場合の、用量反応曲線の直線性の検定を行つたが、TSH 10^{-2} , 10^{-3} , 及び 10^{-4} J.S.U. の間では、危険率 $p = 5\%$, $F_{12}^3 = 3.49$, $F_0 = 0.069$, となり $F_0 < F_{12}^3$ であつた。従つて、その用量反応曲線の直線性が成立し、回帰係数 $b = -0.127$ となるから、最良近似曲線は、Fig. 13 の如く、 $Y = -0.127x + 1.34$, $\lambda = 7.99$ となる。此の際の、回帰係数 b に対する信頼限界を、危険率 $p = 5\%$ で検討した処、 b が有意であるとは認められなかつた。即ち、推計学上、peroxidase 源として、モルモット甲状腺 homogenate を用いた場合では、TSH 各種濃度と peroxidase 活性測定値との間に、有意の関係が認められなかつた。

Fig. 12. Peroxidase activity with adding TSH (homogenate)

Fig. 13. Dose Response Curve (homogenate)

Fig. 14. Densitogram of fractions separated by Paperchromatography of test solution.

B) 反応溶液の paperchromatography

a) 標品 peroxidase を用いた実験

標品 peroxidase を用いた実験の、反応溶液の paperchromatography では、monoiodotyrosine, diiodotyrosine の spot が、共にかなり明瞭に表われ、しかもその生成量は、TSH 濃度により異つてゐる。即ち、TSH 10⁻², 10⁻³ J.S.U. で spot はかなり濃く、これを densitometer にかけた処、Fig. 14の如く、TSH 10⁻² J.S.U. で monoiodotyrosine, diiodotyrosine の生成量が最も多く、TSH 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻¹ J.S.U. 対照の順に、その生成量が減少している。又、添加した tyrosine の量は、monoiodotyrosine, diiodotyrosine, の量に反比例して減少している。

b) モルモット甲状腺 homogenate を用いた実験

雄モルモット甲状腺 homogenate を用いた場合の、反応溶液の paperchromatography では、monoiodotyrosine, diiodotyrosine, 共に淡い spot として表われるが、その spot の濃度と添加した TSH の濃度との相関関係は、明らかでなかつた。

C) Peroxidase を添加しなかつた実験.

尚、Fig. 14 の最下段は、酵素源である標品 peroxidase, 及び homogenate を反応系に添加せず、他は全く同様に操作した場合の反応溶液の、paperchromatography の densitometer の所見であるが、monoiodotyrosine, diiodotyrosine は全く生成されていない事を示している。

考 案

甲状腺に於ける TSH の作用点については、種々論議されている所である。即ち、抗甲状腺剤、及び I¹³¹

の導入によつて、TSH は甲状腺の機能の総ての面に作用する事が明らかにされた。即ち、沃度摂取、甲状腺ホルモン合成、thyroglobulin 貯蔵、甲状腺ホルモン分泌等が TSH により促進されるのである。しかし、TSH の作用が、甲状腺の何れの機能に最も早く現われるか、又、甲状腺機能を全面的に亢進するものであるかどうかは、今日尚、論議されている処である。

その内、TSH が選択的に peroxidase 活性を高めるとする説では、組織化学的研究により、1946年、De Robertis,⁹⁾ & Grasso は、ラットに 5 単位の Thyrotropin を注射し、甲状腺細胞とコロイドの双方に於て、対照と比較して明らかに peroxidase 反応の陽性化を認めた事から、TSH が peroxidase の活性を賦活すると報告した。次に Keating²⁰⁾ (1945)、Rawson²¹⁾ (1949)、Olin, Lamberg²²⁾ (1953) 等は、甲状腺内の有機沃度が減れば、当然 I^{131} 摂取が亢進する訳であるが、TSH の作用が有機沃度減少を招いて、その結果として I^{131} 摂取を促進すると述べている。次いで Leblond & Süe¹⁸⁾ (1941)、Morton¹⁹⁾ (1941)、Stanley & Astwood²³⁾ (1949) 等は、TSH により総ての沃度有機化の過程、特に diiodotyrosine から thyroxine への過程が促進されると云つている。

扱て、著者の実験によつて、peroxidase 源として標品 peroxidase、又はモルモット甲状腺 homogenate を用い TSH を添加すると、TSH を添加しない場合に比して peroxidase 活性が上昇し、両者共 TSH 10^{-2} — 10^{-8} — 10^{-4} J.S.U. の範囲で、TSH 濃度と peroxidase 活性値との間に、直線関係を認めた事は、TSH によつて peroxidase が賦活されたものと云い得る。此事実から、TSH が直接的に peroxidase 活性を賦活する事が明かとなつた。

而も、peroxidase に対する TSH の賦活作用が、標品 peroxidase を用いた場合でも、甲状腺 homogenate を用いた場合と同様に、寧ろより著明に証明された事、即ち、植物性 peroxidase たる標品 peroxidase も、動物性 peroxidase たる甲状腺 homogenate も、共に同様に賦活される事実から、沃度酸化に關与する peroxidase には特異性はないものと考えられる。peroxidase の特異性については、従来より諸説があり一致していないが、以前は特異性があるとの説が有力であつた。鈴木²⁴⁾も著者の此報告に対し、蕪の peroxidase を用いた実験で、沃度酸化が行われなかつた事から、植物性 peroxidase と動物性 peroxidase との間に相違する点のある事を述べているが、Klebanoff (1959. 1961. 1962) は、植物性 peroxidase たる horse radish peroxidase も、動物性 peroxidase たる lacto-peroxidase (牛乳)、及び myelo-peroxidase (骨髓) も、沃度の酸化に於ては同じ態度である事より、peroxidase には特異性がないと述べている。

次に、TSH 10^{-2} — 10^{-8} — 10^{-4} J.S.U. に於て、peroxidase 活性測定値が上昇するが、TSH 10^{-1} J.S.U. に於て peroxidase 活性測定値は、却つて低下していると云う結果を得たが、此の TSH の濃度差による作用上の相違は、所謂 2 相性作用 (少量刺激、大量抑制) と考えられる。即ち、高濃度 TSH の場合、TSH が peroxidase 活性を賦活し、多量の沃度分子を生じ、此の結果、TSH 自身が沃度化され急速に TSH の活性を失ひ、従つて peroxidase への賦活作用が低下する。それに反し、低濃度である TSH 10^{-2} — 10^{-8} — 10^{-4} J.S.U. では、TSH 自身の沃度化される事が少く、従つて peroxidase を賦活する為に、反応時間に比例して peroxidase 活性値が増加し、その増加率は此濃度範囲内の TSH 濃度に比例するものと考えられる。以上兎に角、peroxidase を賦活する TSH 濃度には、至適濃度閾値の存在する事が予想される。

次に peroxidase 源として甲状腺 homogenate を用いた場合より、標品 peroxidase を用いた場合の方が、TSH 添加による peroxidase 活性値の増加が著明である事の理由として、先ず考えられる事は、標品の方が peroxidase 含有量が多い事、標品は純化されている為に、deiodinase 等の沃度代謝に干渉するものが混在していない為であろう。従つて、TSH 10^{-2} — 10^{-8} — 10^{-4} J.S.U. に於て、TSH 濃度と peroxidase 活性測定値との間に、直線関係の成立するのも当然である。

次に、反応溶液の paperchromatography による成績の検討であるが、著者の実験では、反応終了後の溶液中に monoiodotyrosine, diiodotyrosine を証明した。

処が、標品 peroxidase を使用した場合の反応溶液の paperchromatography では、TSH 10^{-2} — 10^{-8} — 10^{-4} J.S.U. の順に monoiodotyrosine, diiodotyrosine の生成量の減少するのを認め、又、添加した tyrosine

の量は, monoiodotyrosine, diiodotyrosine の量に反比例して減少しているのを見たが, これは Warburg 検圧計を用いて peroxidase 活性値の測定を行った際, TSH 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. の順に peroxidase 活性が低下すると云う実験成績と一致する. 即ち, TSH 10^{-2} J.S.U. で peroxidase 活性が最も賦活され, 同時に沃度アミノ酸の生成も, 最も著明に行われる事を示している.

これに対し, 雄モルモット甲状腺 homogenate を用いた場合にも, monoiodotyrosine, diiodotyrosine の生成を認めた. 此の場合, 標品 peroxidase を用いた場合より, monoiodotyrosine, diiodotyrosine の生成量の少いのは, peroxidase の絶対量の少い事によるもので, gasmetry での成績とも一致する. 更に又, 甲状腺 homogenate に存在する deiodinase 等の干渉も, これに関与するものと考えられる. この点に関して, 1951年, Roche²⁹⁾³⁰⁾ は, deiodinase は甲状腺での活性が特に高く, しかも TSH により賦活される事を明らかにしているが, 此の事実から, 反応系に添加した TSH によつて賦活された deiodinase が, 一旦生成された沃度アミノ酸を脱沃度化する事も予想される. 以上の実験結果よりみて, TSH によつて賦活された peroxidase が沃度酸化を促進し, 生成された沃度分子は tyrosine と結合して, monoiodotyrosine, 及び diiodotyrosine が生成されたものと著者は理解するが, 而し, 沃度アミノ酸の生成には, 非酵素的酸化が起り得ると云う可能性も否定出来ない. そこで酵素源である標品 peroxidase 又は甲状腺 homogenate を反応系に添加せず, 他は総て前述の条件で操作した後, 反応溶液を paperchromatography で展開した所, 全然沃度アミノ酸の生成を見なかつた. 此の結果から沃度アミノ酸の生成に関しては, この実験条件では, 非酵素的酸化は否定し得る. 従つて, 甲状腺沃度代謝に peroxidase が必須であるとする著者の説が正しいと云える.

処で, 甲状腺 peroxidase が, 甲状腺に於ける沃度代謝のどの過程に, 如何に関与するかについては種々の説がある. 此のうち, 第1段階である沃度酸化過程に関与する事は, Dempsey⁸⁾ (1944), Keston³¹⁾ (1944), Haley³²⁾ (1955), Wyngarden³³⁾ (1955), Alexander¹¹⁾³⁴⁾ (1959, 1961), De Groot & Davis (1960, 1961, 1962)¹²⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾等によつて明らかにされている. 第2段階である沃化過程への関与については, 諸説があつて一致していない. 即ち, De Groot³⁷⁾は非酵素的に進行すると述べ, Klebanoff³⁸⁾は, 酸化段階と同じく peroxidase により触媒されるか, 又は, 非酵素的に行われると主張し, 又, Fawcett, Kirkwood³⁹⁾ (1953) の如く, 特異性のある tyrosine iodinease の存在を唱える人もある. 更に, Westerfeld & Lowe³⁹⁾ (1942) は, 次の段階たる thyroxine の酸化的縮合に, peroxidase が関与すると述べている. 而し, 少くとも上述した実験結果からみて, TSH が peroxidase を直接賦活する事により, 沃度酸化が促進され, 更に沃化段階も促進され, その結果, 沃度アミノ酸の生成量も増加するものと著者は考える. なお tyrosine iodinease 等の含有されていない標品 peroxidase を使用した場合にも, monoiodotyrosine, diiodotyrosine, の生ずる事から, 沃化段階にも酸化段階と同じく, peroxidase が関与する可能性もあり, 又, 他方沃化過程が非酵素的に行われる可能性もあるとする Klebanoff³⁸⁾ の所説が妥当である. 併し, 此2つの可能性の何れが真であるかは, 本研究の範囲外である.

結 論

前章に詳述した peroxidase 活性測定法の基質に, TSH を添加して, peroxidase に対する TSH の影響を, manometric に検討すると共に, 反応後の基質を paperchromatography で展開して, その生成物を分析した結果, 次の事実を明らかにした.

- 1) TSH は, 直接的に peroxidase 活性を促進するものと思われる.
- 2) 標品 peroxidase を用いた場合でも, モルモット甲状腺 homogenate を用いた場合でも, TSH 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. で同様に賦活される事実から, 沃度酸化に於て, 植物性 peroxidase, 動物性 peroxidase 共に特異性は認められない.
- 3) TSH の濃度 10^{-2} — 10^{-3} — 10^{-4} J.S.U. の範囲では, TSH 濃度と peroxidase 活性値の上昇率との間に, はば直線関係のある事を認めた.

4) 反応溶液の paperchromatography で標品 peroxidase を用いた場合には, TSH 10^{-2} J.S.U. で monoiodotyrosine, diiodotyrosine, の生成量が最も多く, TSH 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} J.S.U. の順に, これらの沃度アミノ酸生成量の減少するのを認めた. 雄モルモット甲状腺 homogenate でも, monoiodotyrosine, diiodotyrosine, の生成を認めた.

5) 沃度代謝に於て, TSH が peroxidase を賦活する事により, 沃度酸化が促進され, 更に沃化段階も促進される結果, 沃度アミノ酸の生成が増加するものと思われる.

本論文の要旨は, 第9回日本内分泌学会西日本地方会, 及び第35回日本内分泌学会総会に於て発表した.

稿を終えるに臨み, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった恩師植田安雄教授に深甚なる謝意を表明致します. 尚本研究に御協力戴いた竹内医学士に衷心より謝意を表すると共に, 御援助戴いた望月医学博士に感謝致します.

文 献

- 1) SCHÖNBEIN, C.F.: Verhandl. Naturforsch. Ges., Basel, 1: 339 (1855)
- 2) LISSA, M.G.: Compt. rend. biol. soc., 50: 381 (1898)
- 3) RAUNDNITZ, R.: Zenter. Physiol., 12: 790 (1899)
- 4) LOEW, O.: U.S. Dept. Agric. Rep., No. 8: 47 (1901)
- 5) WILLSTÄTTER, R.: A.Stoll: Ann., 416: 21 (1918)
- 6) THEORELL, H.: Enzymol., 10: 250 (1942)
- 7) AGNER, K.: Acta. Physiol. Scand., 2, Suppl. 8 (1941)
- 8) DEMPSEY, E.W.: Endocrinology, 34: 27 (1944)
- 9) DeROBERTIS, E. and GRASSO, R.: Endocrinology, 38: 137 (1946)
- 10) ROSENBERG, I.N.: Science, 116: 503 (1952)
- 11) ALEXANDER, N.M.: J.B.C., 234: 1530 (1959)
- 12) DeGROOT, L.J. and DAVIS, A.M.: J.B.C., 236: 2009 (1961)
- 13) 近藤金助, 雄田雄平: 京大食研報, No. 4: 12 (1951)
- 14) ETTORI, J.: Biochem. J., 44: 35 (1949)
- 15) RANDALL, L.O.: J.B.C., 164: 521 (1946)
- 16) BERGMANN, A.J. and TURNER, C.W.: Endocrinology, 24: 656 (1939)
- 17) 望月真人: 日本内分泌学会雑誌, 第36巻: 第4号, 668 (昭35)
- 18) LEBLOND, C.P. & SÜE, P.: Amer. J. Physiol., 134, 549 (1941)
- 19) MORTON, M.E. et al.: J.B.C., 140, 603 (1941)
- 20) KEATING, F.R. et al.: Endocrinology, 36: 137 (1945)
- 21) RAWSON, R.W. & MONEY, W.L.: Recent Prog. Hormone Res. 4: 397 (1949)
- 22) OLIN-LAMBERG, C. & LAMBERG, B.A.: Acta Endocrinol., 14: 83 (1953)
- 23) STANLEY, M.M. & ASTWOOD, E.B.: Endocrinology, 44: 49 (1949)
- 24) 鈴木光雄: 日本内分泌学会雑誌, 第38巻, 第3号, 288 (昭37)
- 25) KLEBANOFF, S.J.: J.B.C., 234: 2437 (1959)
- 26) KLEBANOFF, S.: J.: Bioch. Biophys. acta, 48: 93 (1961)
- 27) KLEBANOFF, S.J.: Bioch. Biophys. acta, 56: 460 (1962)
- 28) KLEBANOFF, S.J.: Bioch. Biophys. acta, 58: 563 (1962)
- 29) ROCHE, J. et al.: C.r. Soc. Biol., 145: 288 (1952)
- 30) ROCHE, J. et al.: C.r. Soc. Biol. 147: 234 (1954)
- 31) KESTON, A.S.: J.B.C., 153: 335 (1944)
- 32) HALEY, H.L.: Arch. Path., 59: 635 (1955)
- 33) WYNGARDEN, J.B.: J.B.C., 212: 151 (1955)
- 34) ALEXANDER, N.M.: Endocrinology, 68: 671 (1961)
- 35) DeGROOT, L.J.: J.B.C., 235: 1390 (1960)
- 36) DeGROOT, L.J.: J.B.C., 70: 505 (1962)
- 37) DeGROOT, L.J.: Endocrinology, 70: 492 (1962)
- 38) FAWCETT, D.M. & KIRKWOOD, S.: J.B.C. 205: 795 (1953)
- 39) WESTERFELD, W.W. and LOWE, C.: J.B.C., 145: 463 (1942)