血清leucinamide分解酵素にかんする研究 Heterogeneityと肝疾患における変動について

北海道大学医学部第二内科学教室 (主任 真下 啓明教授)

辻 仁

A STUDY ON SERUM LEUCINAMIDE-SPLITTING ENZYMES WITH
SPECIAL REFERENCES TO ITS HETEROGENEITY AND
VARIATIONS IN HEPATOBILIARY DISEASES

Hitoshi Tsuji

The Second Department of Medicine
Hokkaido University School of Medicine, Sapporo

概要 血清中のleucinamide分解酵素の酵素学的な性質、電気泳動像をleucyl-naphthylamide分解酵素と比較検討し、両者は異なつた酵素であることを確認した。leucinamideを分解する酵素は従来leucine aminopeptidaseが知られているのみであるが、血清中に2種存在し、両者は酵素学的性質、電気泳動像を異にする。その一つは、leucine aminopeptidase (Smith) と同一と考えられ、肝炎血清中で主体を占め、電気泳動上、isozymeと思われる2峰に分かれる。他の一つは、正常血清、閉塞性黄疸血清で主体を占め、前者とは明らかに性質の異なるpeptidaseである。Mnイオンの影響の差を利用して、両者を同時に定量すれば黄疸の鑑別診断に役立たせ得る。

緒 言

近年における臨床酵素学の発展にともなつて、多数の酵素が診断、研究に使用され、とくに肝・胆道系疾患の診断には、重要な手段を提供している。しかし、peptidase系酵素は、その測定法が比較的困難なためか、その臨床応用は、比較的に少ない。

Leucine aminopeptidase (以下LAPaseと略す) は古くより血清中に存在することが知られているが^{1)~3)}、その臨床的利用は、1957年Fleischer⁴⁾がl-leucyl-glycineを基質として、肝炎に際して、活性上昇を起こすことを報告したのが最初であるが、測定法が複雑で、正確度を欠いたため、その後広く臨床的に使用されるに至らなかつた。

1958年に至り、Goldberg⁵⁾⁶⁾らは、Greenにより組織化学に使用されていたl-leucyl-l-β-naph-

thylamideを基質として、簡単な測定法を考案し、脾頭癌で高値を示すことを報告して、諸家の注目を集めた。しかし、その後の追試により、この酵素活性の上昇は、脾頭癌に特有でなく、閉塞性黄疸に由来することが明らかにされ、一方、肝炎では、軽度ないし中等度の上昇に止まるので、黄疸の鑑別に利用されるようになった⁷⁾⁸⁾⁹⁾。

一方、Fleischer⁴⁾の報告によれば、l-leucyl-glycineを基質とするときは、肝炎に高値を示すので、l-leucyl-glycine分解酵素 (LGase) とl-leucyl-β-naphthylamide分解酵素 (LNase) との同一性が問題となつた^{7)17)~20)}。

本論文では、従来LAPaseの特異基質と考えられて来たl-leucinamideを基質として、血清中のLAPaseの変動について、再検討を加え、LNaseはLAPaseではないことを確認するとともに、l-

leucinamide分解酵素 (LAase) も酵素学のおよび電気泳動による検討, さらに Mn^{2+} による活性化の差を利用して, 単一の酵素ではなく, 2種類の酵素が存在することを知り, この両者を測定して, 肝炎血清では, 主として本来のLAPaseが, 正常および閉塞性黄疸血清では本来のLAPase以外のLAaseが主として存在することを知り, この両者を測定し, 黄疸の鑑別診断に利用しうることを報告する。

実験方法

(I) l-leucyl- β -naphthylamide分解酵素

(LNase)

dl-alanyl- β -naphthylamide分解酵素

(ANase)

竹内・高橋法に若干の変更を加えて測定した¹⁰⁾

試 薬

(i) l-leucyl- β -naphthylamide HCl (東京化成製) (LN)

dl-alanyl- β -naphthylamide HCl (Sigma製) (AN)

20mg/dl水溶液。

(ii) 0.1Mol pH7.0磷酸緩衝液, (E. Merck製)

(iii) 4%p-dimethylaminobenzaldehyde エタノール溶液。

(iv) 0.2規定塩酸。

測定法

50倍磷酸緩衝液稀釈血清 0.5ml, 基質液 0.5mlを混合し, 37°C, 1時間反応させ, 室温に冷却後, 4%p-dimethylaminobenzaldehyde液 2ml, 0.2N塩酸 2mlを加え, 蒸留水 1mlに発色液を加えたものを対照として, 465m μ で比色定量した。

盲検としては, 基質液の代りに蒸留水を使用し, 同様操作したものを用い, 本試験との差を酵素活性とした。

(II) l-leucinamide分解酵素 (LAase)

降矢法に従って測定した¹¹⁾。

試 薬

(1) 基質混液(i) (ii) (iii)を1:3:1の割合に混合したもの。ただし, Mn^{2+} なしの測定では, (iii)の代りに蒸留水を使用。

(i) l-leucinamide HCl (N.B.C. 製) (LA)
0.005Mol 水溶液

(ii) 0.1Mol pH 8.6 veronal緩衝液

(iii) 0.004Mol 醋酸マンガナ水溶液

(2) アンモニア呈色液I: 2%石炭酸水, 0.1%nitroprussideソーダ水溶液, 蒸留水を4:3:1 (v/v)に混合。

(3) アンモニア呈色液II: 20%第3磷酸ソーダ水溶液, 20倍アンチフォルミン液を1:1 (v/v)に混合。(2)(3)は用時新調。

測定法

20倍稀釈血清 0.5ml, 基質混液 0.5mlを加え, 37°C 4時間反応させ, 冷却後, 呈色液I IIをおのおの2ml加え, 37°C 30分後, 蒸留水に呈色液を加えて, 同様操作したものを対照として, 660m μ で比色した。盲検として, 基質液の代りに蒸留水を用いて同様操作したものを用い, 本試験と盲検の差を酵素活性値とした。

(III) l-leucyl-glycine分解酵素 (LGase)

東京化成製l-leucyl-glycine (LG)を使用し, Feischer⁴⁾の方法に従って測定した⁴⁾

(IV) 蛋白量測定

Folin-Ciocalteu¹²⁾の方法によつた。

(V) 電気泳動法

Kunkel¹³⁾の澱粉ブロック法で, veronal緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.05$)を用い, 4°Cの低温室中で, 300V定電圧で18~24時間泳動後1cm幅に切断して生理的食塩水で抽出し, 各分画の蛋白量, 酵素活性を測定した。比色はすべて, 日立-Perkin-Elmer 120型分光光度計で, 10mmCuvetteを使用して測定した。

(VI) 患者血清

北大病院, およびその関連病院入院中または外来通院中の患者より, 空腹時に採血し, 血清分離後-20°Cに保存した。

患者は, 臨床検査, 手術, 剖検, 肝生検で臨床

診断の確認されたものを選んだ。

(Ⅶ) 組織抽出液

新しい剖検例よりえた組織を生理食塩水を用い、Waring型Blenderでhomogenateし、10000rpm 1時間遠沈した上清を使用した。

Desoxychol酸処理上清は、homogenateに0.25%の割合にpH 7.5に修正したdesoxychol酸水溶液(Difco)を加えて30分間放置後10000rpm 1時間遠沈した上清を使用した。

実験結果

(1) 正常および肝疾患患者血清のLAaseおよびLNase活性値。

正常健康者の血清LAase(Mn⁺⁺非添加), LAase(Mn⁺⁺添加) LNase活性値は各々表1の如く、平均LAase(Mn⁺⁺-)0.67, 0.076μg NH/25μl/4 hrs. LAase(Mn⁺⁺+)0.46, 0.034μg NH/25μl/4hrs. LNase2.18, 0.43μg naphthylamine/10μl/1hr.

LAaseをMn²⁺を加えて、各種疾患について測定すると、肝、胆道疾患以外では正常値を示し、肝炎患者血清では、中等度より高度に上昇するが、閉塞性黄疸患者では、軽度上昇を示すに過ぎず、一方、Mn²⁺を加えずにLAase活性を検すると、

Table 1. Serum LNase and LAase activities in normal and various diseases.

	LNase	LAase (Mn ⁺⁺ +)	LAase (Mn ⁺⁺ -)	
Case 1	1.96	0.46	0.54	Normal
2	2.65	0.50	0.79	Normal
3	2.34	0.47	0.75	Normal
4	2.13	0.45	0.61	Normal
5	1.64	0.48	0.68	Normal
6	2.86	0.48	0.70	Normal
7	1.79	0.40	0.69	Normal
8	2.04	0.40	0.62	Normal
mean	2.18 ±0.43	0.46 ±0.034	0.67 ±0.076	
	LNase	LAase (Mn ⁺⁺ +)	LAase (Mn ⁺⁺ -)	
Case 9	2.59	0.50	0.66	Nephritis
10	1.71	0.45	1.06	Pneumonia
11	2.10	0.58	0.69	Bronchitis
12	3.28	0.47	0.56	Fluorisy
13	1.91	0.48	0.62	Gastritis
14	2.03	0.49	0.56	Gastritis
15	1.63	0.45	0.83	Hypertension
16	1.63	0.47	0.68	Ulcus Ventraculi
17	1.79	0.44	0.75	Tuberculosis of Lung
18	1.64	0.49	0.50	"

肝炎では中等度の上昇を示すのに反して、閉塞性黄疸では中等度ないし高度の上昇を認めた。

(Table 2, 3, Fig. 1, 2)

この両者を比で表わすと(LAase(Mn⁺⁺+)/LAase

Table 2. Serum LNase and LAase activities in hepatitis.

	LNase	LAase (Mn ⁺⁺ +)	LAase (Mn ⁺⁺ -)	
Case 1	3.96	4.34	2.27	Hepatitis
2	2.10	2.02	0.99	Hepatitis
3	2.04	0.85	1.11	Hepatitis
4	1.89	0.88	1.00	Hepatitis
5	2.31	3.13	1.89	Hepatitis
6	2.75	0.68	1.27	Hepatitis
7	2.45	1.71	1.51	Hepatitis
8	3.50	3.07	1.57	Hepatitis
9	3.76	2.53	1.69	Hepatitis
10	2.19	1.33	1.22	Hepatitis
11	1.44	0.49	0.80	Hepatitis
12	3.79	3.24	1.85	Hepatitis
13	1.96	0.67	1.10	Hepatitis
14	1.31	3.03	0.66	Hepatitis
15	2.94	4.83	1.90	Hepatitis
16	1.81	0.99	0.88	Hepatitis
17	1.65	1.77	0.99	Hepatitis

Table 3. Serum LNase and LAase activities of obstructive jaundice.

	LNase	LAase (Mn ⁺⁺ +)	LAase (Mn ⁺⁺ -)	
Case 1	6.35	0.90	2.76	Obstructive Jaundice
2	2.15	0.27	1.05	"
3	7.73	0.91	2.65	"
4	1.70	0.38	1.09	"
5	2.06	1.58	1.71	"
6	6.53	1.04	1.99	"
7	3.80	0.30	1.54	"
8	5.22	0.68	2.13	"
9	6.66	1.14	2.28	"
10	11.91	1.29	3.33	"
11	5.29	0.61	1.93	"
12	5.48	0.58	2.10	"
13	3.88	0.58	1.35	"
14	4.08	0.54	1.65	"

Fig. 1. Serum leucine aminopeptidase activity with manganese.

Fig. 2. Serum LAase activity without manganese.

Fig. 3. LAase (Mn⁺⁺)/LAase (Mn⁻⁻)

Fig. 4. Correlation of serum LAase Mn(+) and LAase Mn(-).

(Mn⁻) 正常では0.43/0.98であるのに反し、肝炎では大部分 1.0以上、すなわちMn²⁺により活性化される。一方、閉塞性黄疸では逆に0.52, 0.20となり、逆に抑制の程度が強くなることが認められる (Fig. 3)。

LNaseは閉塞性黄疸時に高度の上昇を示すが、肝炎時には軽度ないし中等度の上昇をみるに止まった。この3者の間の相関をみると、LAase (Mn²⁺+) と LAase (Mn²⁺-) は、全群とすると相関を示さず 肝炎群、閉塞性黄疸群の中では相

Fig. 5. Correlation of serum LAase Mn⁽⁺⁾ and LNase. Fig. 6. Correlation of serum LAase Mn⁽⁻⁾ and LNase.

関を示した (Fig. 4)。またLNaseはLAase (Mn⁺⁺+) とは明らかな相関を示さず (Fig. 5), LAase (Mn⁺⁻-) とは相関を示した (Fig. 6)。

(2) LAase, LNaseの酵素学的性質

健康者、肝炎患者の血清LAaseとLNaseの性質を調べると、種々の点で差がみられた (Table 4)。

LNaseは健康者、肝炎、閉塞性黄疸で性質に差がみられず、健康者のLAaseとの間には、Mg, Mn, Zn, Cu, CNの作用が異なっており、肝炎患者のLAaseとは、至適pH, citrate, Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺の影響で差がある。健康者LAaseと肝炎LAaseとは、Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺の影響で明らかな差が認められるが、さらに基質濃度10⁻²~10⁻⁵Molの間で、Mn²⁺の存在下では健康者、肝炎患者の基質濃度上昇による活性上昇率は等しい

Table 4. Enzymological characteristics of LNase and LAase.

	LNase	LAase		
	Normal Serum Hepatitis Serum Obstructive Jaundice Serum	Normal Serum Obstructive Jaundice Serum	Hepatitis Serum	Swine Kidney Extract
Optimal pH	6.5~7.5	6.5~7.5	9.0	9.0
Aceton	—	—	—	0
Dialysis	0	—	—	0
EDTA 10 ⁻² M	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
Citrate 10M	—	↑	↓	↓↓↓
Mg 10 ⁻⁴ M	0	↑	↑	↑
Mn ²⁺ 10 ⁻⁴ M	↓	↓	↓	↓
Ca ²⁺ 10 ⁻⁴ M	↓	↓	0	0
Zn ²⁺ 10 ⁻⁴ M	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
Cu ²⁺ 10 ⁻⁴ M	↓↓↓	0	↓↓↓	↓↓↓
CN 10 ⁻² M	↓	↓↓↓	↓	—

O: No effect

↑: Activation

↓: Inhibition

* E.L. Smith et al., J. biol. Chem., 212: 271 (1955).

Fig. 7. Effect of substrate concentration on serum LAase.

が、 Mn^{2+} 非存在下では、正常人血清よりも、肝炎患者血清の方が上昇率が低い (Fig. 7).

また、至適pHは、 Mn^{2+} に関係せず、健康者血清がpH 7.6であるのに反して、肝炎患者血清ではpH 8.0~9.0に存在した (Fig. 8).

(3) 血清LNase, LAaseの電気泳動像

LNaseは、正常血清で、 α_1 -globulin領域に単一の峰を認め、肝炎、閉塞性黄疸でも、同一の峰の増高が認められるのみであるのに反し、LAaseは健康人血清では、 α_1 -globulin領域と原点附近に活性が認められる (Fig. 9).

Fig. 8. Effect of optimal pH on serum LAase.

normal

Fig. 9. Electrophoretic pattern of serum peptidases.

hepatitis

Fig. 10. Electrophoretic pattern of serum peptidases.

obstructive jaundice

Fig. 11. Electrophoretic pattern of serum peptidases.

Fig. 12. Enzymological characteristics of fractions from hepatitis serum.
(optimal pH and Mg concentration)

肝炎の場合には、この2峰の他に原点の両側に二つの鋭い峰が出現した (Fig. 10).

一方、閉塞性黄疸の場合には、正常人にみられる峰の増高がおり、典型的な閉塞性黄疸では、肝炎時に出現する峰は出現しなかつた (Fig. 11).

ANaseはLNaseと全く等しい泳動像を示したが、LAaseは活性値が低く、信頼しうる泳動像をうることができなかつた。

(4) 肝炎時に出現するLAase分画の性質

肝炎の場合に、電気泳動上、新たに出現するLAaseの分画を陽極側をHA、陰極側をHCと名付けて、その酵素学的性質を調べた。

HA、HCの至適pHはともにpH 8.5~9.0であ

Fig. 13. Enzymological characteristics of fractions from hepatitis serum.

Fig. 14. Electrophoretic pattern of tissue LAase.

り、 Mn^{2+} により活性化される (Fig. 12).

基質濃度上昇による活性の上昇率は、 Mn^{2+} 存在時にはほぼ等しいが、 Mn^{2+} の非存在下では、HCはHAに比して、その活性上昇率は高い (Fig. 13). Mg^{2+} の活性化の至適濃度はHAよりHCが高い (Fig. 12).

(5) 組織内酵素の電気泳動像

組織の生理食塩水上清の酵素の電気泳動像は、肝・腎・腸いずれの組織でもLNase活性の大部分は、不溶性の顆粒とともに、ほぼalbuminと等しい速度で泳動され、LAaseは原点よりalbuminの間に広く泳動され、両者は分離を示さなかつた (Fig. 14).

一方、desoxycholic acid処理抽出液では、これに反して、各臓器に特有の像を示した。すなわち、LNaseは、肝では、 α_1 -globulinの位置に鋭い峰を

Fig. 15. Electrophoretic pattern of tissue Lase.
(DOCA extract)

Fig. 16. Electrophoretic pattern of tissue LAase.
(DOCA extract)

呈し、腎では $\alpha_1 \sim \alpha_2$ -globulin領域のなだらかな峰と、原点の鋭い峰とに分かれ、小腸では原点より陰極に向って強くなる峰を示した (Fig. 15). ANaseはこれと全く等しいpatternを示した。これに反して、LAaseは全く異なり、肝では α_2 -globulinより陰極にわたって泳動し、腎では、 $\alpha_1 \sim \alpha_2$ -globulin領域に幅広く泳動され、小腸では、 α_1 -globulinより原点にかけて泳動された (Fig. 16). LGaseはLAaseとほぼ等しいpatternを示した。

考 案

1955年Smithは、ブタ腎組織よりえられたexopeptidaseの基質特異性を検討して、この酵素がaminopeptidaseであり、末端のアミノ酸がleucineである場合、最も作用が強いことより、leucine aminopeptidaseと命名した。

血清中のこの酵素の測定法としてFleischer⁴²⁾はleucyl-glycineを用い、最近では⁵⁾、leucyl- β -naphthylamideが使用されているが、基質特異性が明らかでないため、本論文では、従来leucine aminopeptidaseの特異基質とされているleucinamideを使用して、血清中の本酵素の変動について再検討を加えた。LNaseはGreen¹⁶⁾らにより、組織化学に導入され、Goldberg⁵³⁾により血清酵素定量に利用されたが、その基質特異性を検討したGreen¹⁶⁾の報告はaminopeptidaseであることを確認しているが、leucineの特異性については確認されておらず、血清中の本酵素の基質特異性を調べたNachlas¹⁷⁾はleucineよりもalanine化合物の方が速く分解することを報告しており、わたくしの結果でも、alanyl- β -naphthylamideがleucyl- β -naphthylamideよりも速く分解され、leucineに特異性を有する酵素ではないことが確認された。従来よりLNaseとleucine aminopeptidaseとの同一性について、多くの疑問が持たれ、中川ら⁷⁾は金属塩の影響がことなることを指摘し、Hanson¹⁸⁾はLNaseとLAaseの組織分布が異なることを報告し、Glenner¹⁹⁾もleucine, leucine aminopeptidaseよりもaminoacid-4-biphenylamidaseに似ていると述べている。Peterson²⁰⁾はEhrlich ascites tumor超遠沈上清でDEAE cellulose columnと電気泳動でLNaseとLAaseの分離を試みたが、完全に分離するには至らなかった。わたくしの電気泳動の結果では両者は、ほぼ完全に分離され、leucine aminopeptidaseはleucinamide分解性があり、leucine残基に比較的親和性があるから、LNaseはleucine aminopeptidaseでないことを結論する。最近LNaseのisozymeの存在について、多くの報告があるが、わたくしのstarch block electrophoresisの結果では、正常血清のみならず病的血清でも、単一の峰を認めたのみであり、この差は担体の差による分離の差に由来する可能性もあるが、通常使用される組織化学的染色法で、非特異的染色を起こすか、活性の極めて低い分画を染色している可能性が高く、血中のLNase主体とは関係がないものと思われる。LAを分解する酵素は従来

leucine aminopeptidaseが知られているのみであるが、正常血清、肝炎血清で主体をなすLAaseは、酵素学的性質が全く異なり、電気泳動でも分離することより異種の酵素と考えられる。肝炎血清中に存在する酵素は、その性質がSmithの記載¹⁴⁾と一致し、leucine aminopeptidaseと思われる。血清中のこの酵素は電気泳動的に2コに分かれ、性質が定性的には等しいが、基質濃度の影響、 Mg^{2+} 濃度の影響で定量的の差があり、いわゆるisozymeと考えられるが、peptidaseのように基質特異性の低い酵素にisozymeと判断するのは慎重を要するので、今後の精製後の分子的検討によらなければならない。また肝炎血清中のLAaseは肝より流出したものと想像されるが、肝のLAaseの泳動像と血清中のLAaseとは一致しないが、おそらく肝よりの流出時に分子型の変化を受けるためであろう。

正常および閉塞性黄疸血清中のLAaseはその性質がleucine aminopeptidaseと全く異なり新種のpeptidaseであると考えられる。電気泳動的に2峰に分かれるが、活性が低いので、その性質を比較することができず、別種の酵素かisozymeかを判断できない。

電気泳動上では、正常血清中にleucine aminopeptidaseの峰を証明できないが、 Mn^{++} による抑制が閉塞性黄疸より低い点よりみて、少量のleucine aminopeptidaseも存在するものと推測される。肝疾患時における変動からみて、leucine aminopeptidaseは逸脱酵素群に属し、他の一方のLAaseは蓄積酵素群に属する。従つてMnの影響の差により、両者を同時に定量すれば、黄疸の鑑別に役立つと思われる。現在、臨床的意義を結論的に論じえないが、現在までの症例では、肝性黄疸と閉塞性黄疸の鑑別診断能は優れており、同一反応で両者を測定しうる点で優れていると考える。

結 論

血清中のleucinamide分解酵素の酵素学的な性

質、電気泳動像をleucyl- β -naphthylamide分解酵素と比較検討し、両者は異なつた酵素であることを確認した。

Leucinamide分解酵素は血清中に2種存在し、酵素学的性質、電気泳動像を異にする。その一つはleucine aminopeptidase (Smith) と同一と考えられ、肝炎血清中で主体を占め、電気泳動上isozymeと思われる2峰に分かれる。他の一つは、正常血清、閉塞性黄疸血清で主体を占め、前者とは明らかに性質の異なるpeptidaseである。 Mn^{++} の影響の差を利用して、両者を比較すると、黄疸の鑑別に役立たせうる。

文 献

- 1) H. Pfeiffer: Wien. Arch. Int. Med., 15: 209, 1928. —2) W. Grassmann and W. Heyde: Zschr. Physiol. Chem., 188: 69: 1930. —3) G.A. Fleischer: J. biol. Chem., 206: 637, 1954. —4) G.A. Fleischer, H.R. Butt and K.A. Huizena: Proc. Mayo Clin., 32: 410, 1957. —5) J.A. Goldberg and Rutenburg: Cancer., 11: 283, 1958. —6) A.M. Rutenburg, J.A. Goldberg, and E.P. Pineda: New Engl. J. Med., 259: 467, 1958. —7) 中川昌一他: 日本臨床, 19: 1929, 1961. —8) E.P. Pineda, J.A. Goldberg, J.A. Banks and A.M. Rutenburg: Gastroenterology., 38: 698, 1960. —9) H.E. Arst: Amer. J. Med. sci., 238: 598, 1959. —10) 高橋, 竹内: 医学と生物学, 65: 74, 1962. —11) 降矢: 医化学シンポジウム, 3: 246, 1963. —12) Folin-Ciocalteu: J. biol. Chem., 73: 627, 1927. —13) H.H. Kunkel in D. Glick (Eds), Methods of biological Analysis Interscience, New York., 1954. —14) E.L. Smith and D.H. Spackman: J. biol. Chem., 212: 271, 1955. —15) M.N. Green, K.C. Tsou, R. Bressler and A.M. Seligman: Arch. Biochem., 57: 458, 1955. —16) M.N. Green: J. biol. Chem., 153: 627, 1944. —17) M.M. Nachlas, D.T. Crawford and A.M. Seligman: Arch. Biochem., 97: 233, 1962. —18) H. Hanson, P. Bohley and H.G. Mannsfeldt: Clin. chim. Acta., 8: 555, 1963. —19) G. G. Glenner, M.S. Burstone and D.B. Meyer: J. nat. Cancer Inst., 23: 857, 1959. —20) E.K. Peterson: J. Histochem., 9: 609, 1962.