- 4) 田中：化学の領域 **9**, 638 (1955)
- 5) 神原：理論ポラログラフイー講習会テキスト pp. 81~85 (1956)
- 6) H. F. Weber: Wied. Ann., **7**, 536 (1879)
- 7) H. J. S. Sand: Phil. Mag., **1**, 45 (1901)
- 8) T. R. Rosebrugh and W. L. Miller: J. Phys. Chem., **14**, 816 (1910)
- 9) Z. Karaoglanoff: Z. Elektrochem., **12**, 5 (1906)
- 10) 館研究室：未発表
- 11) P. Delahay & T. Berzins: J. Am. Chem. Soc., **75**, 2486 (1953)
- 12) T. Berzins & P. Delahay: J. Am. Chem. Soc., **75**, 4205 (1953)
- 3) L. Gierst & A. Juliard: "Proceedings of the

- 2nd Meeting of the Internal Committee of Electrochemical Thermodynamics and Kinematics", 1950, Tamburini, Milan, pp. 117 and 279.
 - 14) P. Delahay, C. C. Mattax, T. Berzins: J. Am. Chem. Soc. **76**, 5319 (1954)
 - 15) P. Delahay: Discussions Faraday Soc., **17**, 205 (1945)
 - 16) 未発表
 - 17) P. Delahay & C. C. Mattax: J. Am. Chem. Soc., **76**, 874 (1954)
 - 18) J. Bjerrum: Chem. Revs., **46**, 381 (1950)
- (1956-5-15 受理)

ポラログラフ蛋白波の最近の研究*

秦 忠 夫**

1. は し が き

ポラログラフによる蛋白質の研究は同法の創始に僅か遅れて1930年頃から始まったのであるが、今日に至るまでのこの分野の研究をふり返つてみると興味ある変遷がみられる。

第1図は1950年までの文献集¹⁾について、

Fig. 1 ポラログラフイー論文数とそれに対する蛋白関係論文数の割合

* Some Recent Trends in the Study of Polarographic Protein Waves

** Tadao Hata, 京都大学食糧科学研究所

1930~1950年の間、毎年ポラログラフ関係論文数とそれに対する蛋白質関係の研究の数の割合を調べた結果である。

図に明らかなごとく、1933年及び1938年に大きな peak が見られる。前者はすなわち Brdička による cobalt 溶液中の接触波（之を蛋白波とよぶ）の発見の年であり、後者は同じく Brdička 等により蛋白波が癌の診断に利用されうことを提唱された年である。衆知のごとくコバルトのポラログラフ研究中偶然見出された²⁾ 接触波は特に発見者 Brdička を中心としてその成因の解明。就中アミノ酸特にシスチンとの関係³⁾、Wieland の不安定水素説の適用⁴⁾ 或は緩衝液の影響⁵⁾⁶⁾⁷⁾ 等が研究せられていたが未だその発生機構の詳細が適確に解明せられないうちに、応用方面の研究が急速に進展した。即ちそれが蛋白の SH 基と関係あることから1937年に至つて、当時 Waldschmidt-Leitz らが研究していた血清の SH 基の活性低下の問題と関聯して、ポラログラフ蛋白波によつて

癌の血清学的な診断に応用できると提唱せられ⁸⁾⁹⁾特に医学方面においてはなばなく研究せられるようになり第2の peak を示すことになったのである。その後 Filtrate test 及び Digest test¹⁰⁾¹¹⁾等により変化を更に明確化しようとする試み或は所謂 Protein Index¹¹⁾¹²⁾の提案による変化の定量的取扱い等の努力がなされたにもかかわらず第1図に見られるごとく一般ポーラログラフイーの目覚しい発展に比して漸次衰微している。これはかかる反応が癌に特異的でないことがようやく明かになったことも大きな原因であるが、それにも増して重要なことは蛋白波そのものの理論的解明が充分なされていないうちに应用方面が発達したことにあると思われる。

1950年以降現在に至る間においても、なお蛋白波の研究は低調の域を脱していないのであつて、此の曲線を高め第三の peak をもたらす為には先づ蛋白波の本質の解明が急務であると信ずる。

本綜説においては主として1950年以降の蛋白関係の研究について上のような見地に立つて基礎的な研究に重点をおいて述べることとし、応用面の研究は一応の紹介に止めて置くことにしたい。

2. 蛋白波に影響する蛋白質の“量”と“質”の問題

蛋白試料についてその波高を比較して各蛋白の性質を検討する場合、従来は単にその見掛上の濃度或は窒素含量を同一にして比較していた。例えば血清の蛋白波の比較の場合の如きが著しい例であり、唯単に血清としての同一釈釈度で比較するのではその含有蛋白の量的差異によつて変化があらわれるのか、或は質的な差異が起因するのかを判断できない。これに対しては従来から例えば Tropp¹³⁾は血清中の蛋白量に補正を必要とすることを述べていたが笹井・江川¹⁴⁾は特に蛋白量の考慮の必要性を強調している。血清アルブミンがグロブリンより波高が大である¹⁵⁾ことは古くから知られ、血清の蛋白波は血清アルブミンの量に相関関係を有するこ

と¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾も明かにされているので常にこれらの組成比は考慮されねばならぬことは当然である。尙同時にアルブミン或はグロブリン等の成分蛋白の質的な変化も考えねばならない。例えば Vassel et al.¹⁹⁾²⁰⁾によれば肺炎に感染した犬の血清について芒硝で分別したアルブミンのシスチン含量が僅かではあるが確かに変化したと述べている。

然し乍ら之に関しては Müller¹⁸⁾は Cohn²⁰⁾の方法によつて normal 及び choriocarcinoma の両血清を分別し albumin (Fraction V) を比較して同一限度で全く同一の波が見られたという。因みに Müller は同じ論文において精密に分別し、且つ電気泳動的に純度を確めた血清 fraction について詳細に研究し、Digest test は血液中のアルブミン含量によつて大体決定づけられること、及び Filtrate test は α -及び β -globulin の含量に加うるに mucoprotein の abnormal な量の存在によつて定まり、 γ -globulin は Digest test に殆んど関係しないことを確めている。尙これらの2つの test が本質的に異なる fraction によつて各々が定まることから filtrate material の生成を仮定する Brdička¹⁰⁾の見解を否定している。

何れにせよ著者が茲に強調したいことは我々が従来単一の蛋白であると考えていたものでも最近の進歩した蛋白化学の見地からすれば必しも単一でなく、例えば牛乳カゼインの如きものも α , β , γ の三成分に分別せられ²¹⁾その内の β -カゼインは蛋白波を示さないことも明かにせられ²²⁾又それらの成分の割合も変異することにもいわれている²⁴⁾。従つて我々が蛋白波を理論的に特に発生機構等について詳細に論じようとする場合には常にその蛋白の純度を考えに入れて取扱わねばならぬということであり、前掲の Müller の論文においてもその点が特に指摘されているのである。

3. 蛋白濃度と波高の関係について

蛋白濃度と蛋白波の波高の関係について Brdička²⁵⁾は Langmuir の等温吸着式の適用の可能性を示し、この反応が電極表面における吸

着に基くことを推定しているが1953年 Millar²⁶⁾はこの問題に関して興味ある議論を展開している。彼はインシュリン、牛血清アルブミン、キモトリプシン、トリプシン及びペプシンの各結晶蛋白を用い、0.001 M Co Cl₂, 0.1 M NH₄ Cl の溶液を pH 9.6 に NH₃ で調節し、各蛋白の濃度-波高曲線を求めたのであるが、その場合一般に Langmuir の吸着式 (1) が適用されるならば

$$H = \frac{aBC}{1+aC} \quad (1) \quad \begin{array}{l} H: \text{波高}(\mu a) \\ C: \text{濃度}(\text{mg/ml}) \\ a, B: \text{恒数} \end{array}$$

が成立つ、この曲線において H_{max} は C が充分大るとき B と一致し、 H が B に近づく速度が a に比例することになる。今 (1) 式を変形すると (2) 式が得られる。

$$\frac{C}{H} = \frac{aB}{1} + \frac{C}{B} \quad (2)$$

従つて実験結果について $\frac{C}{H}$ を C に対して plot して見ると直線を示すことからこの式の適用の正当性が観察され同時にこの直線から a 及び B が求められる。そして彼は B は H_{max} に等しいものであり H_{max} は蛋白濃度が高く電極表面が飽和されているとき電極表面に吸着される蛋白の量に比例するものであるから、吸着された分子或いはその aggregate の形、大きさが B を決定する。何故ならば一定面積につきうる分子の数の大きさによつて、左右されるからである。そこで彼は各蛋白の第 I 波及び第 II 波について B_I 及び B_{II} を求めそれらと各蛋白の aggregate の容積 (之は他の研究者が主として X線回折によつて求めた値を採用している) との関係調べた結果第 2 図の如き関係を得ている。

即ち aggregate の容積が大きい程 B の値は小さい。更に彼は蛋白波高特に第 I 波及び第 II 波の高さと total potential RSH (これは蛋白の含有するシスチン或はシステインを全部システインに還元したときの $\mu\text{moles RSH/g-protein}$ であらわす) との関係に注目し、 B と protein aggregate の単位容積当りの total

Fig. 2 蛋白 Aggregate の容積と Langmuir 式の B との関係 (Millar 1953)

Fig. 3 蛋白 Aggregate の単位容積当りの Potential SH 量と恒数 B の関係 (Millar, 1953)

potential RSH との間の関係を調べ第 3 図の如き結果を得て、第 II 波の B_{II} に充分な相関関係の存在すること、及び B_I 即ち第 I 波においては充分な相関関係を認めることが出来ないと述べている。

Millar のこれらの説は結果としては特に目新しい発見でもなくとりわけ重要とも思われぬが唯実験結果の検討に当つて、最近目覚しく進歩した一般蛋白物理化学の data を導入し、例えば aggregate の大きさ等の概念を入れて

考えていることは注目すべきものであり将来此の種の研究こそ期待されるべきものと考えるのである。

4. 蛋白波に及ぼす pH 及び緩衝液組成の影響

蛋白波の波形及び波高は蛋白濃度、アンモニア、塩化アンモン或いはコバルト等の緩衝溶液の組成濃度によつて影響されることは既によく知られたことである²⁷⁾。例えばこの問題について Millar は綿密な実験を行い、二三興味ある結果を得ている。彼は先述の 5 種の蛋白を用い、アンモニア緩衝液の total molarity 及びコバルト濃度を一定にして pH を変化した時の第 I 波及び第 II 波の変化を調べた。それによると 2 価のコバルトを使つた時は pH 3.5 から 8.5 まで pH が上ると波高は上昇するが 3 価のコバルトの場合では酸性及び中性では波高は pH によつて変化しないことを示した。又酸性及び中性における蛋白波高（これを i_a で表す）は蛋白の total potential RSH 含量との間に Fig. 4 に見られる如く強い correlation があることを示している。これは SH 含量と蛋白波高を量的に関係づけようとする興味ある試みであるが果して酸性 pH において総ての potential

SH がポーログラフ的に活性となるかどうかについての説明、特に蛋白の変性等による蛋白波の増高等についての説明は充分なされていない。

又電解液の pH が buffer system の pK に近づくと波高は増大され buffer の pK の少しアルカリ側の pH において最高になることも明かにしている。最高の波高を示す pH はその蛋白のチロシン含量及びアルギニン＋リジン含量によつて定まると述べていることは注目に値するがその時における波高即ち H_{max} と potential SH との間には直線的な関係は見出すことは出来ない。

又 Millar は結晶牛血清アルブミンについて pH を殆ど一定に保つて NH_3 及び NH_4^+ の濃度を変化したときの波高の変化を調べ buffer の total molarity が増加すると第 I 波及び第 II 波は増大し、又 buffer の一方の成分例えば NH_3 を一定に他方（例えば NH_4^+ ）を増加したときも波は高くなることを示した。以上のような実験結果から Millar は蛋白波発生機構について若干興味のある discussion を展開している。その論旨には少しく疑問点も存在するが先にも述べた如く、成るべく純粋な試料を用いてのこの種の理論的な研究こそ望ましいものであり、将来の発展が期待される。

5. 第 I 波と第 II 波の意義

シスチンは 2 価のコバルトの存在において単一な波（シスチン波）を示すが蛋白は 2 価及び 3 価のコバルト溶液において 2 つの極大を有する波を示す。この両者の差異或は蛋白波の内の 2 種の極大の性質に関しては現在の処正確なことは判つていない。Brdička²⁹⁾ は蛋白波の波高の差異は多分シスチンまたはシステインが蛋白分子の骨格中における特異な結合によるものであり、ある種の隣接した蛋白基によつて電極における接触反応が多少 modify されることによるのであらうといつている。この見解を支持するものとして、彼はアンモニアを過剰に加えたときに 2 つの極大は重なつて丸い単一な波（稍シスチン波に似る）になる現象を挙げている。

Fig. 4 i_a と total potential RSH の関係

E: Egg albumin, P: pepsin, Cg: Chymotrypsinogen
C: Chymotrypsin, I: Insulin (Millar, 1953)

一方 Tropp et al¹⁵⁾ は嘗て第Ⅱ波はシスチン波と殆んど同じ電位で見られるので蛋白のシスチン及びシステイン含量を表すものと考え第Ⅰ波は acidamide 又は diketopiperadine のような特殊な結合に起因するであろうと考えたが最近 Müller¹⁸⁾³⁰⁾ は3価のコバルトの存在で第Ⅰ波のみを示す蛋白を血清中から単離し(第5図参照). 第Ⅰ波第Ⅱ波は夫々異つた蛋白結合

Fig. 5 三価のコバルトで第Ⅰ波のみを示す濾液物質の蛋白波

に起因するのであり, 第Ⅰ波は含硫黄基は必要としないのであろうと考えている. 因みにこの第Ⅰ波のみを示す蛋白は血清試料から ultrafiltrate して得たものである.

これらの見解は明かに先に紹介した Millar²⁸⁾ の説とは相反するものであり, Millar は Fig. 4 に示した如く, 酸性側の pH においては第Ⅰ波第Ⅱ波共, total potential SH の量に比例するとのべている. この間の矛盾については現在何れを正しいとも判断することは出来ないが著者³¹⁾ が Schöberl の方法³²⁾ によりゼラチン分子の Lysine- ϵ -NH₂ 基に SH 基を導入して Thioglycolyl gelatin を作り3価のコバルトによつて得た波が第Ⅱ波の電位に単一な peak を示

すものであつたこと (Fig. 6 参照) 及び Müller の最近の報告³³⁾ によれば bovine albumin にシステインを加えて incubate すると3価のコバ

Fig. 6 Thioglycolyl gelatin

ルトによつても第Ⅱ波が増高するといつていることから考えても第Ⅱ波が SH 基に関係することだけは間違いなく断言しうと思う.

6. SH 量との関係について

現在生化学のあらゆる分野において蛋白質の SH 基の働きは最も注目されているものであり, ポーラログラフ蛋白波が今日まで臨床的に或いは生化学の研究に利用されて来たのも, 生体活性 SH 基の定性定量の手段としての可能性を前提としている. 然し乍ら果して蛋白波によつて活性 SH 基の定量が可能であろうか.

先に述べた如く, Tropp¹⁵⁾ らは第Ⅱ波はシスチン, システイン含量と関係があるといい, Millar²⁸⁾ によれば Total potential SH は ia と定量的関係にあるという (この Millar の提案は劃期的なものではあるがそれでは蛋白が変性等により masked type の SH がより reactive になつた時に見られる蛋白波の増高例えば³⁴⁾³⁵⁾ などの説明ができない) 然うして我々が知り度い SH 基はむしろ potential なものではなく, 種々の状態とそれに応じた量であり, いいかえれば活性をもつた SH の量が知り度いのであ

る。

蛋白波の applied voltage においては-S-S-も-SHに還元されて2倍の波を示す事は衆知の如くであり、従つて蛋白波をそのまま眺めていただけでは少くともそれが蛋白の-S-S-groupであるか或いはSH groupによるものかの判断ができない。この点について考えられるのは適当な reagent を用いて active なSH基を抑制して波の変化を見る方法である。その為には monoiodoacetic acid のようなSH試薬が利用された、唯その際注意しなければならないのはその試薬が充分SH基のみに特異的でなければならぬことである。SH基の最良の特異試薬であると考えられている p-chloromercuribenzoate では他の一般の定量法ではSH基は消失するけれども蛋白波は全然変化を受けない³⁴⁾。これは著者は蛋白波の applied voltage では reversible に離脱する為であろうと考えている。又 dinitrofluorobenzene³⁴⁾ はSH基と結合して波を低下せしめるが、予め p. C. M. B. を作用させて置くと、DNFBを加えても波は低下しないことは p. C. M. B がSHを保護していると考えられ興味深い。先にも少しく述べた如く、少くとも第II波は蛋白のSHの性質及び量と密接な関係がある。従つてこれを巧みに利用すれば一応SH基に関係ある現象の研究に応用しうるのであるが、遺憾乍ら現在定量的関係の説明はなされていないのでその利用に際しては、常に個々の蛋白の性質の差異を考慮し、且つ常に蛋白波によつて判断しうることの限界を知ることが肝要であると思う。

7. 第III波について

1939年Turka³⁸⁾は蛋白が第I波第II波について第3の波を出すことを発見したが、Millar²⁶⁾は第III波もLangmuirの吸着式に従うことから蛋白波の一種であるとし、この波の種々の性質を調べている。インシュリンのアミノ基をKeteneでアセチル化したり、フォルムアルデヒドを加えるとBIIIが低下することから第III波はむしろSH基ではなく含窒素基が関係すると説明している。

8. その他の研究

先づ一般的な問題として、シスチン波についてはHamamoto³⁹⁾等はシスチン波の測定からthiamine中の-SH, fromを研究し、Wiele⁴⁰⁾等はシステインの接触波が monohydric alcohol で抑制される現象を研究している。

Rossi⁴¹⁾は0.1N NH₄OH中で血清蛋白が電解された時-1.5Vで示すポーラログラフ波が、試料に赤外線或は紫外線照射時如何に変化するかを調べている。

蛋白波研究の新しい technique としては、Homolka⁴²⁾⁴³⁾は濾紙電気泳動法と蛋白波の組合せによる微量で簡単に行える診断学的利用法を考案した。医学以外の蛋白波の応用では、牛乳蛋白についてStricks⁴⁴⁾ら及びGal⁴⁵⁾の研究があり、後者は電気泳動法を併用して乳清蛋白を詳細に研究している。

穀実蛋白についてはWöstmann⁴⁶⁾、Kotlyar⁴⁷⁾ Lesaffre⁴⁸⁾が研究しKotlyarのそれは穀類の蛋白分解酵素の研究に蛋白波を利用し、他の2つは穀類中のシスチン量をはかつたものである。又Hintzer⁴⁹⁾は各種小麦粉の蛋白波を比較してグルテンの性質との関係を調べているがこの論文には方法論的に疑問が多い。

生化学の分野ではMillar⁵⁰⁾がfibrinogenの凝固作用をポーラログラフ的に研究し、Stockrova⁵¹⁾は基質蛋白の蛋白波の変化からTrypsinの活度を間接に測定しようとのべHrdy⁵²⁾はpepsinについて同様の研究をしている。

医学方面ではやはり血液学的な研究が多く

53)42)51)55)56)57)特に癌に関係する論文が多くみられる58)59)60)61)62)63)64)それらの内でHasselbach⁶⁰⁾らは電解溶液にZnCl₂を加えるとコバルト蛋白波の変化がより顕著になりSpecificityがますますいつている。Stricks⁶¹⁾らはSH滴定と併用して蛋白波を研究している。又Ledvina⁶⁴⁾は血清にhyaluronidaseを予め作用させて蛋白波の変化を調べている。何れにしてもなかなか癌診断のさめ手とはならないようである。

その他だ液⁶⁵⁾のポーラログラフ的研究も見られた。なお我国においては医学方面における蛋

白液の研究は最近漸く盛んになりつつあり、特に従来の臨床化学的な研究と関聯し、その新しい解析の手段として蛋白波が用いられた結果、医学上の新知見が二三見出されていることは喜ばしいことであり、例えば血清凝固反応の本態⁶⁶⁾或いは尿ドナジオ反応の本態⁶⁷⁾が明かにされた。又蛋白波の研究によつて胃液中に新しい蛋白フラクシオンと考えられるポリムコペプチドが発見されている。又癌血清特にアルブミンフラクシオンの蛋白波の考察⁶⁸⁾や胃液内蛋白の蛋白波の動態の研究⁶⁹⁾や脳髓の蛋白波⁷⁰⁾や或いはシヨツク時における各種組織の蛋白波の変化の研究等各方面の研究も見られるがこれら医学的な方面に関しては笹井博士に綜説を御願ひすることにし度い。

9. あ と が き

以上極めて簡単ながら、最近の特に1950年以降の蛋白波の研究について紹介したのであるが全般的にこれを眺めるとポーラログラフィー一般の研究に比して質はともかくとしてその量を見て依然低調であることは否めない。

これは先にのべた如く蛋白波の根本問題である発生機構が未だに解明されない事に起因する。我々の蛋白化学一般の智識は近年各種実験技術の進歩と共に目覚しく進展しつつあり、電気泳動法クロマトグラフ法超遠心分離法等により先づ純一な試料を調製確認し、その分子量分子形或いはアミノ酸組成並びにその配列等を解明する努力と相並んで蛋白波を研究するならば蛋白波の基礎的な問題も更に解明され、かくすれば応用の途も自ら展開されうであらう。その意味において本文において比較的詳細に説明した O.H. Müller 並びに G.J. Millar の研究方法と努力は注目すべきものであり、これらを契期として蛋白波の研究に第三の peak があらわれることを期待して筆をおくことにする。

文 献

1) 館勇編：「ポーラログラフィー」巻末

2) Brdicka, R.: Collection **5**, 112 (1933)

3) Brdicka, R.: *ibid.* **5**, 148 (1933)

4) Brdicka, R.: Biochem. Z. **272**, 104 (1934)

5) Brdicka, R.: Collection **8**, 366 (1936)

6) Brdicka, R.: Bull. intern. Acad. Boheme. (1936)

7) Brdicka, R.: Rozpravy II tr. cesk. akad. **37**, (1937) No. 25

8) Brdicka, R.: Nature, **139**, 330 (1937)

9) Brdicka, R.: *ibid.* 1020, (1937)

10) Brdicka, R.: Klin. Wochsch. **18**, 305 (1939)

11) Müller, O.H. and Davis, J. S. Jr.: J. Biol. Chem., **159**, 667 (1945)

12) Müller, O.H. and Pavis, J. S. Jr.: Arch. Biochem., **15**, 39 (1947)

13) Tropp, C.: Klin. Wochsch., **17**, 1141 (1938)

14) 笹井・江川：京大化研報 No. 24, 48 (1951)

15) Tropp, C., Jühling, L. and Geiger, F.: Z. physiol. Chem., **262**, 225 (1939)

16) Wedemeyer, H.E. and Daur, T.H.: Z. Krebsforsch. **49**, 10 (1939)

17) Rusch, H. P., Klatt, T., Meloche, V. M. and Dirksen A.J.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **44**, 365 (1940)

18) Müller, O.H.: Electrochemistry in Biology and Medicine, (1955) p. 301

19) Vassel, B., Partridge, R., and Crossley, M. L. Arch. Biochem., **1**, 403 (1943)

20) Vassel, B., Partridge R. and Crossley, M. L.: *ibid.* **14**, 451 (1947)

21) Cohn, E. J., et al.: J. A. C. S. **72**, 465 (1950)

22) Mellander, O.: Upsara Läkarefören, Förh., **52**, 107 (1947)

23) 秦・松下：Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. No. 2, 1, (1952)

24) 近藤・森田：京大食研報告 No. 6, 70 (1951)

25) Brdicka, R.: Collection, **11**, 370, (1939)

26) Millar, G.J.: Biochem. J. **53**, 385 (1953)

27) 秦・松下：京大食研報告 No. 7, 33 (1951)

28) Millar, G.J.: Biochem. J. **53**, 393 (1953)

29) Brdicka, R.: Research, **1**, 25, (1947)

30) Müller, O.H.: Federation Proceedings. **13**, No. 1 (1954)

31) 秦・松下：日本農芸化学会, 1954年大会で講演

32) Schöberl, A. and Krung, F.: Ber., **77**, 371 (1944)

33) Müller, O.H.: Federation Proceeding **14**, No. 1 (1955)

34) 秦・松下：京大食研報告 No. 7, 42 (1951)

35) 秦・松下：Mem. Res. Inst. Food. Sci. Kyoto Univ., No. **4**, 25 (1952)

- 36) Baumberger, J. P.: Am. J. physiol., **133**, 206 (1941)
- 37) 秦・松下: 日本農芸化学会昭和29年大会に講演
- 38) Jurka, E.: Collection, **11**, 243 (1939)
- 39) Hamamoto, E. and Yamanouchi, I.: Sbor. Mez. Pol. Sjez. Praze, 1st Cong. part I, 77, (1951)
- 40) Wiele, H. and Gerlich, N.: Z. Elektrochem., **57**, 351 (1953) (C. A. **47**, 12043)
- 41) Rossi, G. D. and Strocchi, P. M., Arch. Sci. Biol. (Italy) **37**, 153 (1953) (C. A. **48**, 13772)
- 42) Homolka, J. and Krapicka,,: Sbor. Mez. Pol Sjez. Praze Pol. Cong. 1951 pt III 665 (C. A. **46**, 10223)
- 43) Homolka, J.: Chem. Listy **47**, 278 (1953)
- 44) Stricks, W. and Kolthoff, I. M.: Sb. Mez. Pol. Sjez. Pr. 1st Cong. (1951) pt I. 386
- 45) Gal, T.: Prumysl Potravin, **5**, 152, 206 (1954) (C. A. **48**, 13471)
- 46) Wöstman, B.: Chem. Weekblad **46**, 697 (1950) (C. A. **45**, 273)
- 47) Kotlyar, G. I.: Biokhimiya, **18**, 423 (1953) (C. A. **48**, 5298)
- 48) Lesaffre, D.: Bull. école meunerie belge **67**, 94, 114 (1953) (C. A. **49**, 526)
- 49) De Lange, P. and Hintzer, H. M. R.: Cereal Chem., **32**, 307, 314 (1955)
- 50) Millar, G. J., Schucher, T. and Jaques, L. B. Conf. Blood Clotting and allied Prob. Trans. **4**, 261 (1951) (C. A. **46** 7604)
- 51) Stokrova, S.: Chem. Listy **48**, 1082 (1954)
- 52) Hrdy, O.: Chem. Listy **44**, 169 (1950)
- 53) Sasai, T. and Egawa, M.: Sb. Mez. Pol. Sjez. 1st Cong. 1951, pt. I, 255
- 54) Verain, M.: ibid. 542
- 55) Balle-Helaers, E.: Bruxelles méd, 2571 (1954) (C. A. **49**, 6437)
- 56) Rubina, Kh. M.: Byell. Exptl. Biol. Med., **37**, No. 341 (1954) (C. A. **48**, 8895)
- 57) Sasai, T., Egawa, M. and Oka, M.: Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ. **31**, 1 (1953)
- 58) Crossley, M. L.: Sbor. Mez. Pol. Sjes, Praz. 1st Cong. pt. I., 23 (1951)
- 59) Robinson, A. M.: ibid. 213
- 60) Hasselbach, H. and Schwabe, K.: Naturwissenschaften **40**, 627 (1953)
- 61) Stricks, W., Kolthoff, I. M., Bush, D. G. and Kuroda, P. K.: J. Lancet **73**, 328 (1953) (C. A. **48**, 7168)
- 62) Maraglioli: Minerva Med. 1953; II, 1814 (C. A. **48**, 10201)
- 63) Podrouzek, V.: Chem. Listy **47**, 1869 (1953)
- 64) Ledvina, M. and Nosek, J.: Casopis Lekarů, Ceskych. **93**, 606 1954 (C. A. **48**, 11614)
- 65) Mounier, D. and Besso, Z.: Anal. Chimica Acta **8**, 572 (1953) Helv. Chim. Acta, **36**, 990 (1953)
- 66) 笹井・江川・岡: 京大化研報告, **31**, 1 (1953)
- 67) 笹井・江川・速見・岡: 内科宝蔵, **3**, 87 (1956)
- 68) 吉田・熊原・藤田・福本: 癌 April 75 (1954)
- 69) 和田: ポーラログラフイー, **3**, 49 (1955)
- 70) 難波: ポーラログラフイーの研究, **2**, 123 (1955)

(1956-6-1 受理)