薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (2) 150-155 (1988)

活性酸素による生体障害に関する研究 (第2報) ヒポキサンチン-キサンチン・
オキシダーゼの O_2^- 産生系における分離ランゲルハンス氏島
からのインスリン分泌の阻害

桜井光一,* 小川陽子, 三浦俊明, 小木曾健人
北海道薬科大学

Studies on Biological Damage by Active Oxygens. II. Inhibition of Insulin Release
from Isolated Pancreatic Islets by Exposure to O_2^- -Generating
System of Hypoxanthine-Xanthine Oxidase

KOICHI SAKURAI,* YOKO OGAWA, TOSHIAKI MIURA and TAKETO OGISO

Hokkaido Institute of Pharmaceutical Sciences,
7-1 Katsuraoka-cho, Otaru, 047-02, Japan

(Received September 7, 1987)

When isolated pancreatic islets were exposed extracellularly for 5 min to oxygen radicals generating a system of hypoxanthine-xanthine oxidase (HX-X.O. system), glucose-induced insulin release from the islets was inhibited, indicating a high sensitivity of β -cell to the oxygen radicals. Addition of superoxide dismutase (SOD) together with catalase to the HX-X.O. system almost completely prevented the inhibition of the insulin release, suggesting that the islets were injured by some oxygen radicals produced by the reaction with O_2^- and H_2O_2 . Iron-chelator, diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC) and iron-binding protein, apotransferrin also protected the inhibition of the insulin release, suggesting the possible participation of a trace iron in the cell injury caused by O_2^- and H_2O_2 . Mannitol, the scavenger of hydroxyl radicals, protected the cell from oxidative damage but methylthiourea and dimethylthiourea had little effect.

These results suggest that some oxygen radicals generated an extracellularly attack to the pancreatic islets and result in the inhibition of glucose-induced insulin release.

Keywords—Langerhans islet; xanthine oxidase; oxygen radical; insulin release; superoxide dismutase; catalase

アロキサンによる膵臓 β -細胞の障害がスーパーオキシド・ジスムターゼ (SOD), カタラーゼ及び種々のヒドロキシル・ラジカル ($HO\cdot$) 消去剤により防御されることから, アロキサン糖尿病の発症機構には, アロキサンの酸化還元過程で産生される $HO\cdot$ が関与することが *in vivo*¹⁻⁵⁾ *in vitro*⁶⁻⁹⁾ の実験で示唆されている. この $HO\cdot$ による β -細胞の障害機構の1つとして組織学的観察より,¹⁰⁾ あるいは分離 β -細胞の Rb^+ の取り込みがアロキサンにより阻害されることより,¹¹⁾ アロキサンの酸化還元過程で産生される $HO\cdot$ が, β -細胞の細胞膜と反応してインスリン分泌機能を障害するものと考えられている.

一方, アロキサンは容易に β -細胞膜を透過し, β -細胞に選択的に取り込まれること,¹²⁾ また細胞内に産生する $HO\cdot$ によって β -細胞の核 deoxyribonucleic acid (DNA)¹³⁾ やミトコンドリア¹⁴⁾ が損傷されることが報告されている. 著者らは前報において,¹⁵⁾ SOD 又は各種 $HO\cdot$ 消去剤の *in vivo* におけるアロキサン糖尿病の発症に対する防御作用を検討した. そして生体膜を透過でない SOD あるいは $HO\cdot$ 消去剤が, アロキサン誘導の初期高血糖の発現を防御するが持続的高血糖の発現は防御しないこと報告した. これらのことより, アロキサン糖尿病の発症の初期段階では, アロキサンの酸化還元反応によって細胞外に産生された $HO\cdot$ が β -細胞を損傷し, その結果初期高血糖を誘発するものと考えた. それゆえ, 酸素ラジカル発生源としてヒポキサンチン-キサンチン・オキシダーゼの反応系 (HX-X.O. 系) を用いて, 細胞外部よりラ氏島を暴露したときのグルコース誘導のインスリン分泌に対する影響, また各種の酸素ラジカル消去剤の作用について検討した.

実 験 の 部

試薬 X.O. (バターミルク由来) はベーリンガー・マンハイム社より得、使用に先立って Krebs-Ringer bi-carbonate buffer (KRB) pH 7.4 で透析を行った。ウシ血清アルブミン、ブタ・インスリン、SOD (ウシ赤血球由来)、カタラーゼ (ウシ肝臓由来) 及びアポトランスフェリン (ヒト由来) はシグマ社、コラゲナーゼ (type IV) は Worthington Biochemicals 社、アロキサン、D-グルコース、ヒポキサンチン、マンニトールは和光純薬工業社、ジエチレントリアミン五酢酸 (DETAPAC) は関東化学社、デスフェリオキサミンはチバガイギー社、メチルチオ尿素 (MTU)、ジメチルチオ尿素 (DMTU) はアルドリッチ社より得た。また、インスリン・リアビーズはダイナボット社から購入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

HX-X.O. 系における O_2^- 産生量の測定 X.O. の活性は、0.1 mM ヒポキサンチンを含む 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.4, 25°C において X.O. を添加し産生する尿酸を、分光光度計 (Hitachi Model 200-20) を用いて 293 nm の吸光度を測定し、1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ の尿酸を産生する活性を 1 unit とした。 O_2^- の産生量は 0.1 mM ヒポキサンチン、50 μM フェリチトクローム c 及び 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カタラーゼを含む KRB pH 7.4, 25°C において X.O. を添加し、フェロチトクローム c への変化を吸光度 550 nm で測定し、モル吸光係数 ($\epsilon=29000$) により求めた。¹⁶⁾

ランゲルハンス氏島の分離 体重約 25 g ddy 雄マウスの頸椎を脱臼させたのち開腹し、総胆管の十二指腸側を結紮、肝臓側より注射針を挿入し、約 3 ml の Hank's 液を注入後、脾臓を摘出して細断した。その後 Lacy らの方法¹⁷⁾に準じて、コラゲナーゼ 15 mg、ウシ血清アルブミン 100 mg を含む 10 ml の Hank's 液中で 5 分間 37°C で激しく振盪した。あらかじめ氷冷した Hank's 液 90 ml を加え反応を停止したのち、円錐形メスシリンダーに入れ沈降操作を行い浮遊する脂肪組織等を取り除いた。同様な操作を 5—6 回繰り返してラ氏島を外分泌細胞より分離した。このようにして得られたラ氏島を含む沈査をシャーレーに分取し弱拡張顕微鏡下で毛細管ピペットによりラ氏島を採取した。

インスリン分泌の測定 上述の方法により分離したラ氏島を酸素：二酸化炭素 (95：5%) の混合ガス下、5 mM グルコースと 0.2% ウシ血清アルブミンを含む KRB 中 37°C で 30 分間プレインキュベーションしたのち、ラ氏島 5 個を 0.2% ウシ血清アルブミン、5 mM グルコースを含む対照系及び対照系に 0.025 U/ml X.O. と 0.1 mM ヒポキサンチンを加えた HX-X.O. 系に入れ、混合ガス下で 0—15 分間インキュベーションした。ラ氏島からのインスリンの分泌は、25 mM グルコースと 0.2% ウシ血清アルブミンを含む KRB pH 7.4 の 0.5 ml 中に 5 個のラ氏島を移し、混合ガス下 37°C で 90 分間インキュベートしたのち、反応液 0.1 ml 中に分泌されたインスリンをブタ・インスリンを標準として、ラジオイムノアッセイ法¹⁸⁾により測定した。

得られた結果は平均値±標準誤差で表示し、有意差は student の t 検定によって検定した。

実 験 結 果

1. HX-X.O. 系における分離ラ氏島からのグルコース誘導のインスリン分泌の阻害

Fig. 1 に示すように、分離ラ氏島からのインスリン分泌は対照系、すなわち 0.2% ウシ血清アルブミンを含む KRB 中に 25 mM グルコースを添加すると誘導され、30 分のインキュベーションで約 100 $\mu\text{U}/\text{islet}$ が分泌され、その後も増加し続け 90 分間で約 290 $\mu\text{U}/\text{islet}$ となった。一方、HX-X.O. 系では、グルコース誘導のインスリン分泌は各インキュベーション時間において、いずれも対照系に比較して著しく阻害され、90 分間においては約 55% の阻害率を示した。なお、対照系にグルコース 5 mM を添加したとき、ラ氏島からのインスリン分泌は経時的に増加せず 90 分のインキュベーションにおいて 50 $\mu\text{U}/\text{islet}$ であった。これらの結果より、分離ラ氏島を HX-X.O. 系に暴露するとグルコース誘導のインスリン分泌が抑制され、 β -細胞になんらかの障害が引き起こされることが分かった。

以後、ラ氏島からのインスリン分泌の測定は 25 mM グルコース添加後 90 分間のインキュベーションの条件下で行った。

2. インスリン分泌に対する HX-X.O. 系への暴露時間の影響

Fig. 2 に示すように、分離ラ氏島を酸素ラジカル産生系である HX-X.O. 系中で 0—15 分間暴露したのち、25 mM グルコースを含む KRB 中で 90 分間インキュベーションすると、インスリン分泌は暴露時間が 5 分まではその時間に依存して阻害され、5 分後でのインスリン分泌量は約 130 $\mu\text{U}/\text{islet}$ であり、このときの阻害率は約 55% であった。暴露時間を 5 分以上 15 分まで延長しても、インスリン分泌の阻害率はほとんど変化しなかった。一方、対照系においては、0—15 分までインスリン分泌量の阻害は全く認められずいずれの時間においてもその

分泌量は約 $290 \mu\text{U}/\text{islet}$ であった。なお、HX-X.O. 系から X.O. 又はヒポキサンチンを除いた場合には、インスリン分泌の阻害は全く認められなかった。HX-X.O. 系における O_2^- の産生量はインキュベーション 5 分まではほぼ直線的に増加し、その後やや増加速度は減少する傾向を示した。X.O. 又はヒポキサンチンを反応系より除いた場合には、 O_2^- 産生は全く認められなかった。

これらの結果は、ラ氏島からのグルコース誘導のインスリン分泌は、5 分間の酸素ラジカルの暴露により阻害され、 β -細胞は酸素ラジカルの暴露によって容易に障害されることを示すものであった。

3. 酸素ラジカル消去剤及び鉄キレート剤添加の影響

HX-X.O. 系ではラ氏島の酸素ラジカルによるインスリン分泌の阻害が、どのようなラジカルによって引き起こされるのかを検討するため、HX-X.O. 系に酸素ラジカル消去剤及び鉄キレート剤を添加してその影響について一連の実験を行った。

Table I に示すように、HX-X.O. 系におけるラ氏島からのインスリン分泌の阻害率は約 55% であるのに対し、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ SOD 又は $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ カタラーゼを添加した場合その阻害率は共に約 30% であった。このことはラ氏島の酸素ラジカルによる障害が、SOD 又はカタラーゼにより部分的に防御されることを示すものであった。一方、同一濃度の SOD とカタラーゼを共に HX-X.O. 系に添加した場合、ラ氏島からのインスリン分泌の阻害はほぼ完全に防御された。また加熱処理により失活させた SOD 及びカタラーゼはいずれもインスリンの分泌の阻害に対して全く防御作用を示さなかった。これらの結果は HX-X.O. 系でのラ氏島の障害には O_2^- と H_2O_2 が共に関与する可能性を示すものであった。

HX-X.O. 系に鉄キレート剤 DETAPAC の 1.0 mM を添加するとインスリン分泌の阻害は軽減され、このときの阻害率は約 25% であった。しかし 1.0 mM デスフェリオキサミンには有意な防御作用は認められなかった。一方、鉄結合性タンパク質アポトランスフェリン $1.0 \text{ mg}/\text{ml}$ の添加によってラ氏島の障害は防御され、このときの阻害率は約 25% であった。データには示さないが、鉄-DETAPAC や鉄飽和トランスフェリンは、HX-X.O. 系でのラ氏島の障害に対して有意な防御作用は示さなかった。これらの結果は、HX-X.O. 系におけるラ氏島の障害には、 O_2^- 、 H_2O_2 と共に、反応系又はラ氏島に混在する微量の鉄が関与する可能性を示唆するものであった。それゆえ、 O_2^- 、 H_2O_2 と微量の鉄存在下において産生される $\text{HO}\cdot$ の関与の可能性について、 $\text{HO}\cdot$ 消去剤であるマンニトール、MTU 及び DMTU を用いて検討した。その結果、 10 mM マンニトールのみが有意にインスリン分泌の阻害を防御し、MTU 及び DMTU には防御作用はほとんど認められなかった。なお、この実験に用いた酸素ラジカル消去剤又は鉄キレート剤は、いずれも使用した濃度において、対照系でのラ氏島のインスリン分泌に対して有意な作用を示さなかった。

考 察

本実験において、分離ラ氏島からのインスリン分泌は 25 mM グルコースによって誘導されたが、HX-X.O. 系にラ氏島を 5 分間暴露すると、グルコース誘導のインスリン分泌は強く阻害された (Fig. 1, 2)。このことは、

Fig. 1. Inhibition of Glucose-Induced Insulin Release from Pancreatic Islets by HX-X.O. System

Pancreatic islets of Langerhans were isolated from ddy mice weighting about 25 g by the method of Lacy *et al.*¹⁷⁾ After islets were exposed to the control system containing 5 mM glucose and 0.2% bovine serum albumin in KRB pH 7.4, for 5 min at 37°C , insulin release was induced with 25 mM ($\circ$) or 5 mM ($\bullet$) glucose at 37°C in atmosphere of $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5%). On the other hand, after islets were exposed to the HX-X.O. system containing 0.025 U/ml X.O. and 0.1 mM hypoxanthine in the control system for 5 min at 37°C , insulin release was induced with 25 mM glucose ($\blacktriangle$) under the conditions as described above. Insulin contents of the incubation medium were measured at various times after the incubation by double antibody radioimmunoassay method. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 3 to 12 experiments.

HX-X.O. 系で産生する O_2^- や H_2O_2 にラ氏島が暴露されると、短時間でインスリン分泌機能が障害されることを示すものであった。HX-X.O. 系への SOD 又はカタラーゼの単独添加によって、ラ氏島障害が部分的に、また両者の共存によってほぼ完全に防御されたことより (Table I), この障害には O_2^- と H_2O_2 の 2 つのラジカル種が関与することが示唆された。

また本実験において、100 $\mu\text{g/ml}$ SOD の添加によってラ氏島障害が亢進するよりも、むしろ抑制傾向を示すことより、 H_2O_2 が単独でラ氏島障害を引き起こす可能性は考えられない。事実、データーには示さないが、対照系に 0.1 mM H_2O_2 を添加してもラ氏島からのインスリン分泌には有意な変化は見られなかった。

HX-X.O. 系への鉄キレート剤 DETAPAC と鉄結合性タンパク質アポトランスフェリンの添加によって、ラ氏島の障害が有意に防御されたことは (Table I), この障害への微量鉄の関与が考えられる。また、DETAPAC とアポトランスフェリンが膜を透過しないことより,¹⁰⁾ 関与する微量鉄は反応系中又は細胞膜に局在するものと推定した。なお、鉄キレート剤であるデスフェリオキサミンは本実験条件下において、インスリン分泌の阻害を有意に防御しなかった。Grankvist ら²⁰⁾は、デスフェリオキサミンは *in vivo* においてアロキサン誘導の糖尿病を防御せずむしろ悪化させることを報告している。また Starke ら²¹⁾は、 H_2O_2 産生系としてグルコース・オキシダーゼ系を用いて、肝細胞の障害がデスフェリオキサミンによって防御されることより、 H_2O_2 と Fe^{2+} より Fenton 反応によって産生される $HO\cdot$ がその障害に関与することを報告している。しかしながら、Hinojosa ら²²⁾は electron spin

Fig. 2. Insulin Release from Pancreatic Islets at Various Times after Exposure to HX-X.O. System

After islets were exposed to the HX-X.O. system or control system for various times at 37°C, insulin release was induced with 25 mM glucose for 90 min under the same conditions as that described for Fig. 1. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 6 to 15 experiments. —○—, control system; —●—, HX-X.O. system. Dotted line shows the generation of O_2^- in the HX-X.O. system containing 0.1 mM hypoxanthine, 0.025 U/ml X.O., 1.0 $\mu\text{g/ml}$ catalase and 50 μM ferricytochrome c in KRB at pH 7.4.

TABLE I. Effect of Oxygen Radical Scavengers and Iron-Chelators on Inhibition of Glucose-Induced Insulin Release from Islet by HX-X.O. System

Conditions	Insulin ($\mu\text{U}/\text{islet}/90 \text{ min}$)	Inhibition (%)
Control system	288.0 $\pm$ 15.4 (12)	0
HX-X.O. system	129.3 $\pm$ 16.6 (13)	55.1
+100 $\mu\text{g/ml}$ SOD	198.4 $\pm$ 10.2 ^{b)} (4)	31.1
+100 $\mu\text{g/ml}$ catalase	198.4 $\pm$ 16.6 ^{b)} (4)	31.1
+100 $\mu\text{g/ml}$ SOD and 100 $\mu\text{g/ml}$ catalase	267.6 $\pm$ 14.1 ^{c)} (4)	7.1
+1.0 mM DETAPAC	217.6 $\pm$ 14.1 ^{c)} (4)	24.4
+1.0 mM desferrioxamine	137.0 $\pm$ 10.2 (4)	52.4
+1.0 mg/ml apotransferrin	217.6 $\pm$ 23.0 ^{b)} (4)	24.4
+10 mM mannitol	208.6 $\pm$ 30.7 ^{a)} (10)	27.6
+10 mM methylthiourea	125.4 $\pm$ 10.2 (10)	56.5
+10 mM dimethylthiourea	144.6 $\pm$ 10.2 (11)	49.8

Islets were exposed to control system or HX-X.O. system for 5 min. Oxygen radical scavengers and iron-chelators were added to HX-X.O. system. Values represent the mean $\pm$ S.E. Number of experiments were given in parentheses. Other conditions were the same as that described for Fig. 1.

a) $p < 0.05$; b) $p < 0.01$; c) $p < 0.001$ compared to HX-X.O. system treated islets.

resonance (ESR) による解析より, デスフェリオキサミンはその O_2^- 又は $HO\cdot$ 消去能のため, 鉄関与の $HO\cdot$ 産生を検討する試薬として不適當であることを報告している. これらの事実より, デスフェリオキサミンの本実験条件下における結果については, 更に検討する必要があるものと考えた.

本実験において, $HO\cdot$ 消去剤の 1 つマンニトールは, HX-X.O. 系におけるラ氏島からのインスリン分泌の阻害を有意に防御した. このことはラ氏島の障害が $HO\cdot$ によって誘起されることを示すものであった. しかしながら, ほかの $HO\cdot$ 消去剤, MTU 及び DMTU はインスリン分泌の阻害を有意に防御しなかった. $HO\cdot$ は寿命が極めて短いため,²³⁾ 反応系において $HO\cdot$ を消去するためには通常高濃度の消去剤が用いられている.⁸⁾ 本実験条件下において, 10 mM 以上の MTU 又は DMTU を添加すると, ラ氏島からのインスリン分泌に影響を与えるため, 高濃度における防御効果は検討できなかった. 著者らは前報において,¹⁵⁾ *in vivo* におけるアロキサン糖尿病の発症が, 細胞膜を通過する $HO\cdot$ 消去剤 (type 1), MTU 及び DMTU により強く抑制されることを報告している. これらの結果より, ラ氏島の障害に関与する $HO\cdot$ 消去剤の作用は *in vivo*, *in vitro* において, それぞれ異なるものと考えられる.

Grankvist ら²⁴⁾ は, ラ氏島細胞の Trypan blue 排除機能及び Idahl ら¹¹⁾ は, Rb^+ の取り込み能を指標としてアロキサンの *in vitro* での作用を検討し SOD, カタラーゼ, DETAPAC 及びマンニトールなどが防御効果を示すことから, この過程に $HO\cdot$ が関与し β -細胞の膜機能が傷害されることを推定した. しかしながら, SOD とカタラーゼの両酵素を共に添加した場合, 彼らの用いたアロキサン系では細胞障害は完全には防御されないことを報告している. また著者らも, アロキサン系におけるラ氏島のインスリン分泌能の障害は, SOD, カタラーゼの両者を添加しても完全には防御されないことを確認している (未発表). 一方, 著者らの用いた HX-X.O. 系では, 上述したように両者の添加によってほぼ完全にインスリン分泌の障害が防御された. これらの事実は, 膜透過性であるアロキサンと細胞外での酸素ラジカル産生系とのラ氏島に対する障害の違いを反映したものと考えられる.

本実験の結果は, HX-X.O. 系において細胞外で産生する酸素ラジカルによって β -細胞が障害されること, また細胞膜を透過しない SOD, カタラーゼ, マンニトールなどによってこの障害が防御されることより, β -細胞は外部よりの酸素ラジカルの暴露によって容易に傷害されることを示すものであった. このことは, アロキサンの糖尿病発症の機構においても, アロキサンの細胞外での酸化還元過程で産生する酸素ラジカルが, ラ氏島の傷害を誘起する可能性を示唆するものであった. なお, 傷害を引き起こす酸素ラジカル種については O_2^- と H_2O_2 の鉄触媒下, いわゆる Haber-Weiss 反応によって産生される $HO\cdot$ ²⁵⁾ 又は Fe^{2+} と H_2O_2 の反応によって産生するフェリルラジカル²⁶⁾の可能性が考えられるが, 目下その詳細については検討中である.

引用文献

- 1) R. E. Heikkila, H. Barden, G. Cohen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **190**, 501 (1974).
- 2) R. E. Heikkila, B. Winstor, G. Cohen, H. Barden, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 1085 (1976).
- 3) R. E. Heikkila, F. S. Cabbat, *Eur. J. Pharmacol.*, **52**, 57 (1978).
- 4) K. Grankvist, S. Marklund, I. B. Taljedal, *Nature* (London), **294**, 158 (1981).
- 5) J. Tibaldi, J. Benjamin, F. S. Cabbat, R. E. Heikkila, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **211**, 415 (1979).
- 6) K. Grankvist, S. Marklund, I. B. Taljedal, *FEBS Lett.*, **105**, 15 (1979).
- 7) L. J. Fischer, S. A. Hamburger, *Diabetes*, **29**, 213 (1980).
- 8) L. J. Fischer, S. A. Hamburger, *Life Sci.*, **26**, 1405 (1980).
- 9) G. Cohen, R. E. Heikkila, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447 (1974).
- 10) S. J. Cooperstein, D. Watkins (eds.), "The Islets of Langerhans," Academic Press, 1981, p. 392.
- 11) L. A. Idahl, A. Lernmark, J. Sehlin, I. B. Taljedal, *Biochem. J.*, **162**, 9 (1977).
- 12) a) D. C. Weaver, M. L. McDaniel, P. E. Lacy, *Endocrinology*, **102**, 1847 (1982); b) F. K. Grorus, W. J. Malaisse, D. G. Pipeleers, *Biochem. J.* **208**, 513 (1982).
- 13) Y. Uchiyama, H. Yamamoto, A. Kawamura, H. Okamoto, *J. Biol. Chem.*, **257**, 6084 (1982).
- 14) L. Boquist, *Diabetologia*, **27**, 379 (1984).
- 15) 桜井光一, 三浦俊明, 小木曾健人, 薬誌, **106**, 1034 (1986).
- 16) J. M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).

-
- 17) P. E. Lacy, M. Kostianovich, *Diabetes*, **16**, 35 (1967).
 - 18) M. Awai, M. Narasaki, Y. Yamanoi, S. Seno, *Am. J. Pathol.*, **95**, 633 (1979).
 - 19) C. Hershko, L. Eilon, L. Gelfand, *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 913 (1975).
 - 20) K. Grankvist, S. Marklund, *Life Sci.*, **33**, 2535 (1983).
 - 21) P. E. Starke, J. L. Farber, *J. Biol. Chem.*, **260**, 10099 (1985).
 - 22) O. Hinojosa, T. J. Jacks, *Analytical Letters*, **19**, 725 (1986).
 - 23) 浅田浩二, 生化学, **48**, 226 (1976).
 - 24) K. Grankvist, S. Marklund, J. Sehlin, I. B. Taljedal, *Biochem. J.*, **182**, 17 (1979).
 - 25) F. Haber, J. Weiss, *Proc. R. Soc. London A*, **147**, 332 (1934).
 - 26) W. H. Koppenol, J. F. Liebman, *J. Phys. Chem.*, **88**, 99 (1984).