

原 著

各種呼吸器疾患々者における気管・気管支分泌物
および喀痰の蛋白分画

藤 本 宗 行

信州大学医学部第一内科学教室 (主任: 戸塚忠政教授)

Protein Fractions of Tracheobronchial Secretions and Sputa
from the Patients of Respiratory Diseases

Muneyuki FUJIMOTO

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,

Shinshu University

(Director: Prof. T. TOZUKA)

緒 言

気管および気管支分泌物の蛋白分画に関する研究は既に1896年 F. Müller¹⁾により初めて紹介されている。しかし唾液の混入なく純粋に気管および気管支分泌物を採集することが困難であったため、その後の多くのこの種の研究は主に喀痰についてなされている²⁾。その後、濾紙³⁾および glass bead⁴⁾を用いての電気泳動による喀痰の蛋白分画が多く試みられたが、分離が不十分であるため、これらの方法は今日ではかえりみられていない。M. Z. Atassi 等⁵⁾はセルローズアセテートを用いることにより、気管・気管支分泌物、あるいはまた喀痰の蛋白分画をより改善するに至った。さらに G. R. Biserte 等⁶⁾はこれらの研究に DEAE セルローズ・クロマトグラフィー、寒天ゲル内電気泳動法、および免疫電気泳動法などの手段を導入し、より詳細な分画化に成功している。

著者はこれらの知見にもとづいて、各種呼吸器疾患々者からの気管・気管支分泌物あるいはまた喀痰中の蛋白分画について観察し臨床的検討を加えた。気管・気管支分泌物または喀痰中の蛋白分画のもつ、呼吸器疾患診断上の意義に関し、主として定性的変化について述べる。

材料と方法

気管・気管支分泌物および喀痰は、信州大学医学部附属病院入院中の各種呼吸器疾患々者、および長野県下の関連病院に入院中の同様の疾患の患者より得られたものを用いた。なおこの際、肝機能障害を示したり、呼吸器疾患以外に重大な合併症を有するような患

者は対象から除外した。気管・気管支分泌物は気管支鏡下に気管分岐部または病巣部主気管支開口部より採取された。また、喀痰は患者の起床時、5回口腔および咽頭をうがいせしめ、その後滅菌シャーレに喀痰を喀出させ、混入した唾液を濾紙にてただちに吸収し喀痰塊のみとし、これを材料に用いた。この際気管・気管支分泌物または喀痰が血性である場合は本研究の対象から除外した。

得られた材料には各種の薬剤を用い、その融解を試みた。融解には N-acetyl-L-cysteine, N-cyclohexyl-N-methyl-(2-amino-3, 5-dibromobenzyl)-ammoniumchlorideなどが試みられたが、これらのうち特に融解能の優れたものは N-acetyl-L-cysteine であった。しかしこれらによって融解された分泌物の電気泳動の結果は、未融解のものそれと変りなく、また免疫電気泳動の結果は、融解したものでは沈降線が不明瞭となることを認めたので、本研究では全て分泌物および喀痰は未融解のもののみを用いた。また分泌物および喀痰を蒸留水に対し、48時間透析した後、遠心沈澱することにより(3000rpm, 30min.), ゾル相とゲル相に分離すると、蛋白分画は大部分ゾル相に移行し、ゲル相には抗人全血清家兔血清に反応する蛋白分画は認められないか、あるいは認められても極めて微弱であった。このゾル相の濃縮物の寒天ゲル内電気泳動像および免疫電気泳動像も、未処理の分泌物および喀痰のそれらと同様の結果を示したが、免疫電気泳動像では未処理のものの方がより鮮明な像を発生したので、以下の本研究では気管・気管支分泌物あるいは喀痰は全て未処理のものを用いている。

また、寒天ゲル内電気泳動、免疫電気泳動および免疫拡散法は次のような方法で行った。

寒天ゲル内電気泳動法：0.01M, pH 8.6, $\mu = 0.05$ のペロナルアセテート緩衝液に2%の割合に特殊寒天(中外製薬)を加え、water bath にて煮沸し、溶解したものを濾紙パルプにてさらに濾過し不純物を除去し、泳動用ゲルとして用いた。また上記緩衝液にて2%の agarose のゲルも作成し実験に供した。

免疫電気泳動法：上述のゲル内で泳動した材料に対し、ベーリングベルケ社の各種抗血清(家兎)を用い、沈降線の発現を行わせ24~48時間後に判定した。

免疫拡散法：上述のゲルを用い、Ouchterlony 法により一次元拡散を行った。

結 果

前節において述べたように N-acetyl-L-cysteine を用いて融解させた気管・気管支分泌物あるいは喀痰、または分泌物および喀痰を蒸留水にて透析後遠沈して得られた上清の濃縮物などの免疫電気泳動像と未処理のものとの比較は図1に示す如くである。

ここにみられるように未処理の分泌物あるいは喀痰の方がより鮮明な沈降線を生じ、その上泳動結果は両者とも本質的に変りないことが確認された。

寒天ゲル内電気泳動像

著者は気管・気管支分泌物および喀痰の電気泳動像を次の6型に分類し、各種呼吸器疾患におけるこれらの型の出現頻度を検討した。(図2)

O型：電気泳動像で可視的な蛋白分画を全く示さないもの。

I型：アルブミンが多く、 γ グロブリンの少い型、(G. R. Biserte 等⁷⁾の Bronchoalveolar cancer 型のもの)。

II型：アルブミンが多く、 α_1 , α_2 , β 領域も多く、かつ γ グロブリンの多いもの (G. R. Biserte 等の Purulent bronchitis 型のもの)。

III型：アルブミンがごく少量認められ、slow moving の γ グロブリンが中等度に認められるもの (G. R. Biserte 等の Allergic asthma 型のもの)。

IV型：アルブミンが認められず、slow moving の γ グロブリンが中等度に認められるもの(G.

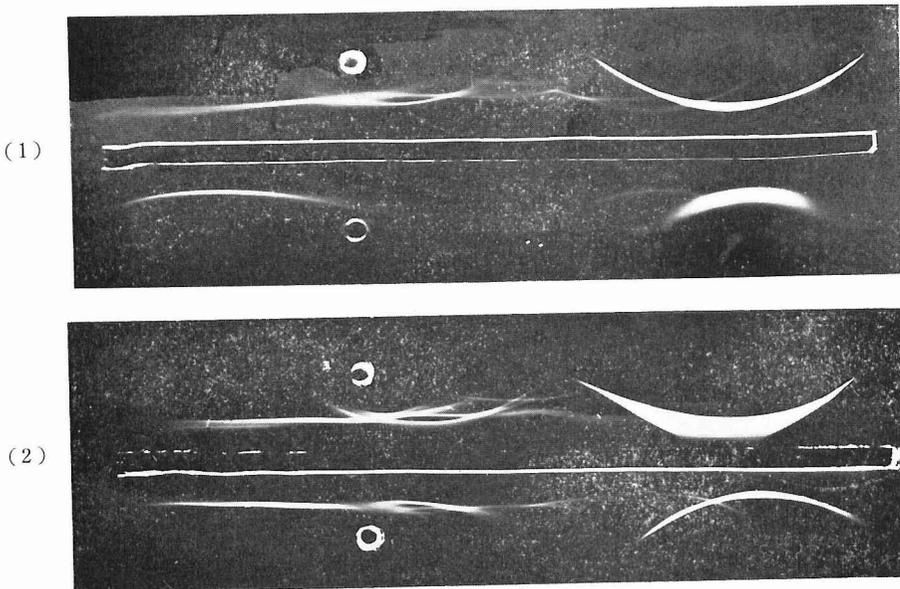


図1. 喀痰の免疫電気泳動像

2%寒天ゲル内泳動, 0.01M, $\mu = 0.05$, pH 8.6, ペロナルアセテート緩衝液使用, 泳動時間90分; 6.0~8.5V/cm, 1.3~1.8mA/cm.

(1): 溝より上は肺癌患者未処理喀痰, 溝より下は N-acetyl-L-Cysteine にて融解処理した, 同じ患者の喀痰, 中央の溝は抗人全血清家兎血清

(2): 溝より上は肺癌患者未処理喀痰, 溝より下は蒸留水にて48時間透析した後, 3,000rpm, 30分遠沈した上清をカーボワックス 6,000にて濃縮したもの, 中央の溝は抗人全血清家兎血清

R. Biserte 等の Non-purulent bronchitis 型のもの)。

V型：アルブミン，slow moving のγグロブリンとともに中等度認められるもの。

図3は肺癌，気管支喘息，慢性気管支炎，気管支拡張症，肺結核，肺化膿症および非呼吸器疾患などの患者別にみた気管・気管支分泌物および喀痰の分類である。この表にみられるように，肺癌患者ではI型およびII型が著しく多く，肺癌患者の分泌物および喀痰中の57.5%を占めている。また，気管支喘息患者の分泌物および喀痰はO型またはV型を示すものが多く認められ，G. R. Biserte 等のいうIII型はむしろ少いことが注目される。さらに，肺結核ではO型，I型およびIII型を示すものが多く認められる。しかしこの肺結核を浸潤型と陳旧性硬化型の二つに分け，それぞれについて蛋白分画の型をみると，図4に示す如く，浸潤型にはII型およびIII型が多く，O型が全くみられないのに対し，陳旧性硬化型ではO型が多くII型は全くみられない点が認められた。したがって，肺結核においては病巣の活動期には蛋白量の多いII型，III型を示すものが多く，治癒に向うにしたがって蛋白量の少い喀痰に変化してゆくことが認められる。

G. R. Biserte 等⁷⁾によると，肺癌ではI型を示すものが多いとしているが，著者の成績でもほぼ同様の結果が得られた。しかしII型も多く認められた。II型は気管支拡張症，浸潤型肺結核，肺化膿症など感染の活動性のものに多くみられているが，肺癌においてもII型を示すものはしたがって混合感染をおこしているものに多いものと考えられる。こころみに肺癌でO型，I型およびII型を示したものの赤沈値(1時間値)の平均をみるとO型52.5mm，I型54.0mm，II型68.4mmとII型に亢進し

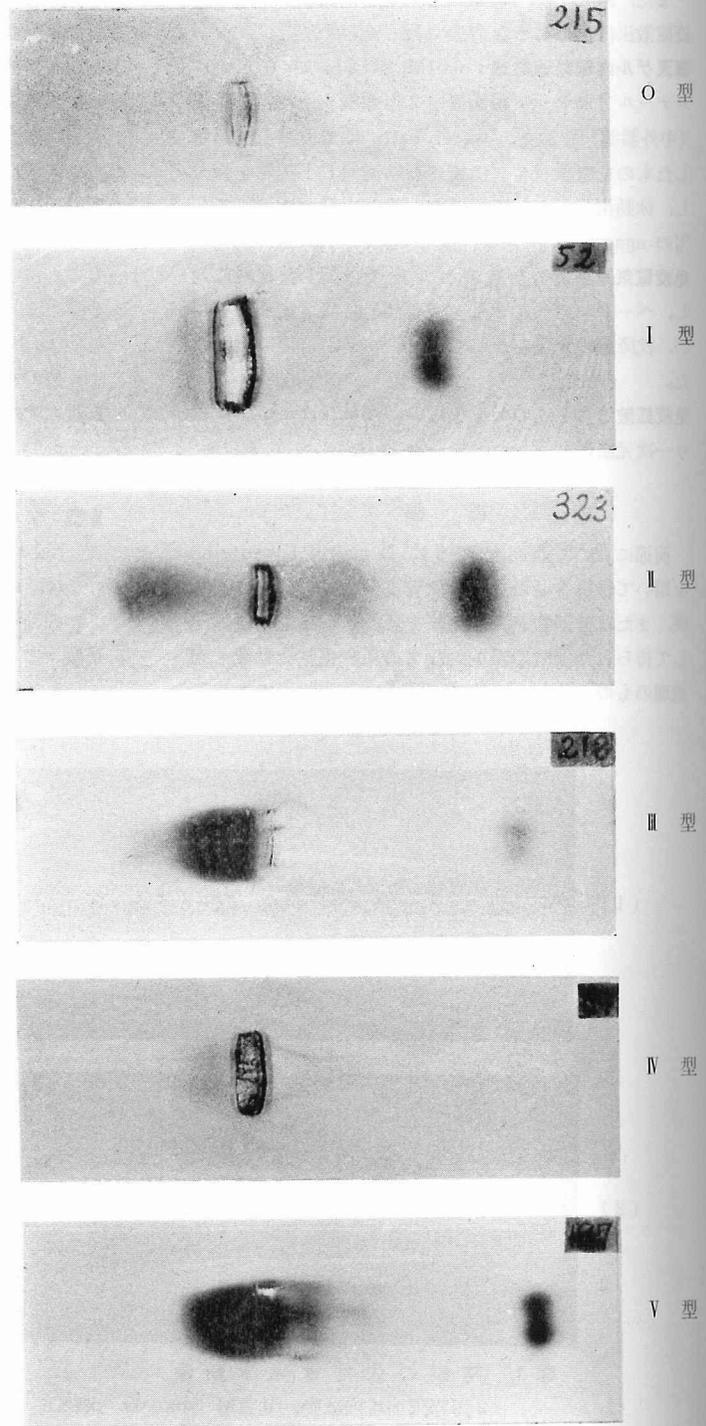


図2. 各種呼吸器疾患患者の気管・気管支分泌物および喀痰の電気泳動像。2%寒天ゲル，0.01M， $\mu=0.05$ ，pH 8.6，ペロナルアセテート緩衝液使用，泳動時間90分；6.0~8.5V/cm；1.3~1.8mA/cm 染色はアミドシュバルツ10B使用

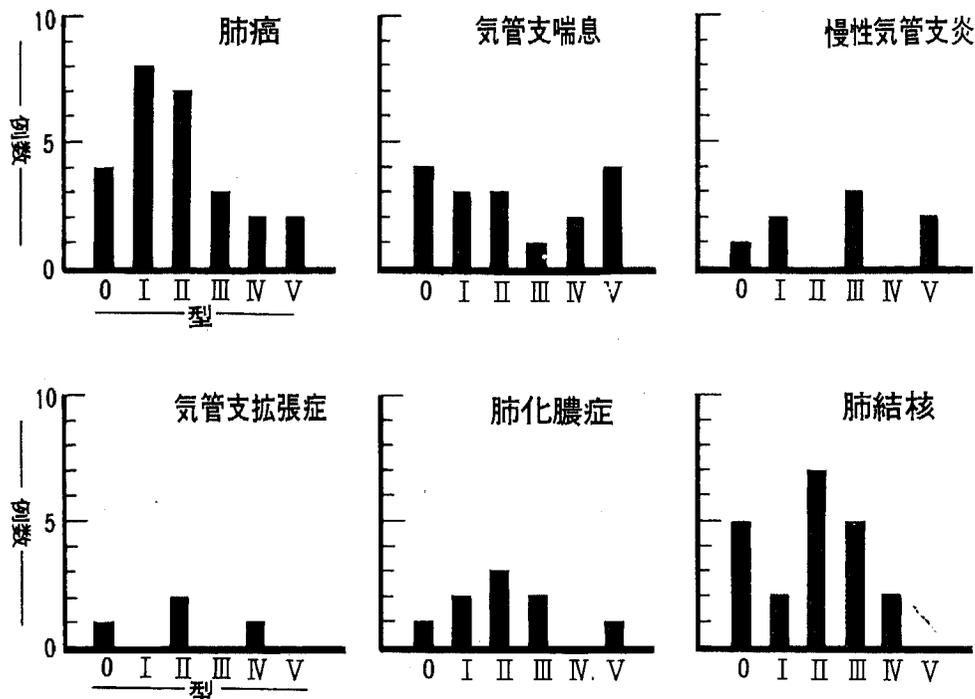


図 3. 各種呼吸器疾患患者の気管・気管支分泌物および喀痰の電気泳動像の分類型別出現頻度

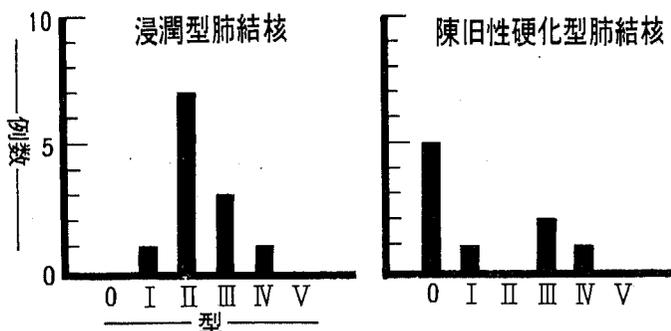


図 4. 浸潤型ならびに陳旧性硬化型肺結核患者の気管・気管支分泌物および喀痰の電気泳動像の分類型別出現頻度

ているものが多く、上述のことを裏書きしているような結果が得られた。

免疫電気泳動像

図5は気管・気管支分泌物および喀痰の寒天ゲル内電気泳動を行ったものを、抗人全血清、抗人 α_1 酸性糖蛋白血清、抗人トランスフェリン血清、抗人 γ Aグロブリン血清、抗人 γ Gグロブリン血清および抗人 γ Mグロブリン血清に対し反応させたものである。こ

こにみられるように、気管・気管支分泌物および喀痰中には血清中におけると同様、アルブミン、 α_1 酸性糖蛋白、トランスフェリン、 γ Aグロブリン、 γ Gグロブリン、 γ Mグロブリン等が認められる。ただしこれらの量的な変動は各疾患ごとにかなり著明に認められることは前述の通りである。

肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰には寒天ゲル内電気泳動の結果、 α_1 、 α_2 、および β 領域の濃厚

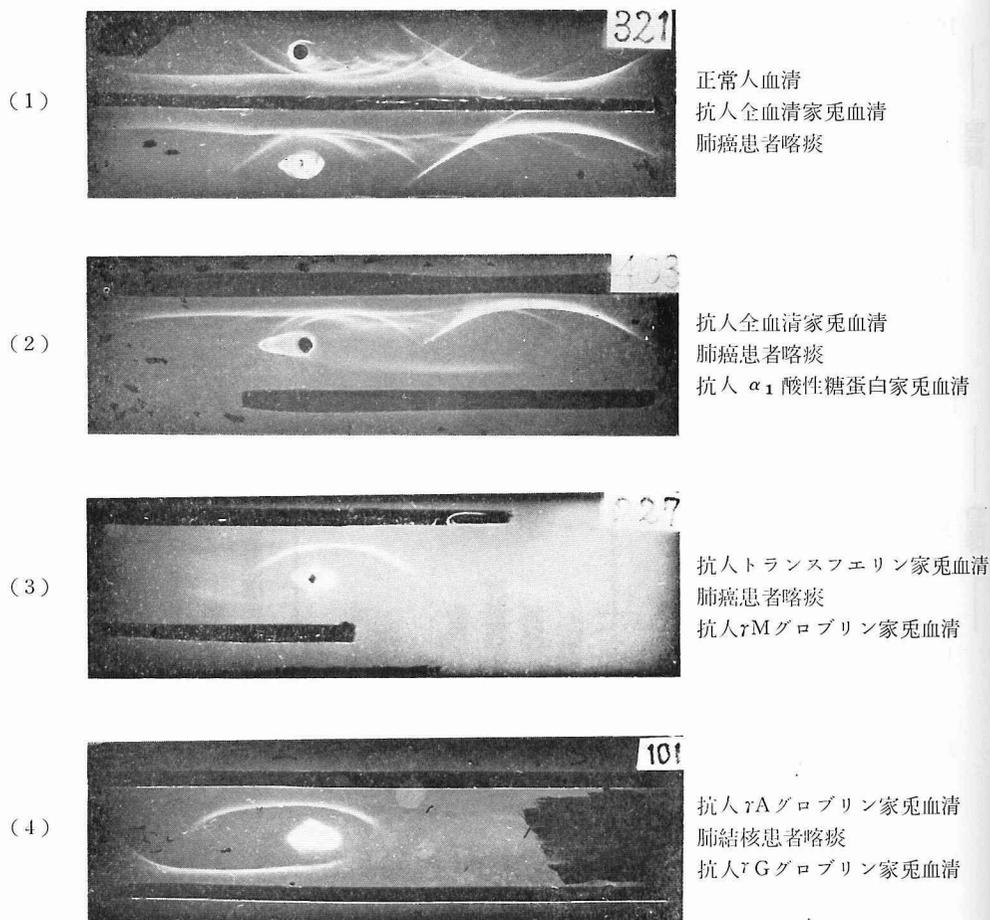


図 5. 呼吸器疾患々者の喀痰の免疫電気泳動像
2%寒天ゲル, 0.01M, $\mu=0.05$, pH 8.6, ペロナルアセテート緩衝液使用
泳動時間90分, 6.0~8.5V/cm, 1.3~1.8mA/cm.

なⅡ型およびⅠ型に属するがやはり同領域の濃厚なものが多く認められたので、これらの気管・気管支分泌物および喀痰を寒天ゲル内電気泳動にかけ、展開後ボンソー3RおよびPAS染色を行った(図6)。この結果、肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰の泳動像には、他の呼吸器疾患々者のそれに比べ、PAS染色に染る α_1 領域が著明であり、かつ出現頻度も大であることが認められた。したがって、各種呼吸器疾患々者の気管・気管支分泌物および喀痰の寒天ゲル内電気泳動を行い、その後抗人 α_1 酸性糖蛋白血清(家兎)にて免疫反応を行った。その結果は表1および図7にみられるように、肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰では α_1 酸性糖蛋白陽性のものが極めて多く、15例中12例(80.0%)に認められた。一

方、肺癌以外の呼吸器疾患々者のうちで同様のものの陽性例は30例中わずかに4例(13.3%)であった。この肺癌患者と肺癌以外の呼吸器疾患々者との間にみられる気管・気管支分泌物および喀痰中の α_1 酸性糖蛋白の出現頻度の差は0.1%の有意水準で有意であり $\{\chi^2=16.912>\chi^2(0.01)=6.635\}$ 、なお信頼度95%の母出現率の信頼区間は次のとおりである。肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰に α_1 酸性糖蛋白陽性:52%~96%、また肺癌以外の呼吸器疾患々者の気管・気管支分泌物および喀痰に α_1 酸性糖蛋白陽性:4%~31%、したがって、 α_1 酸性糖蛋白の出現は肺癌の診断上有力な手段となりうるものと認められる。

図8は正常人血清、肺癌患者喀痰および肺癌以外の呼吸器疾患々者の喀痰と抗人 α_1 酸性糖蛋白血清

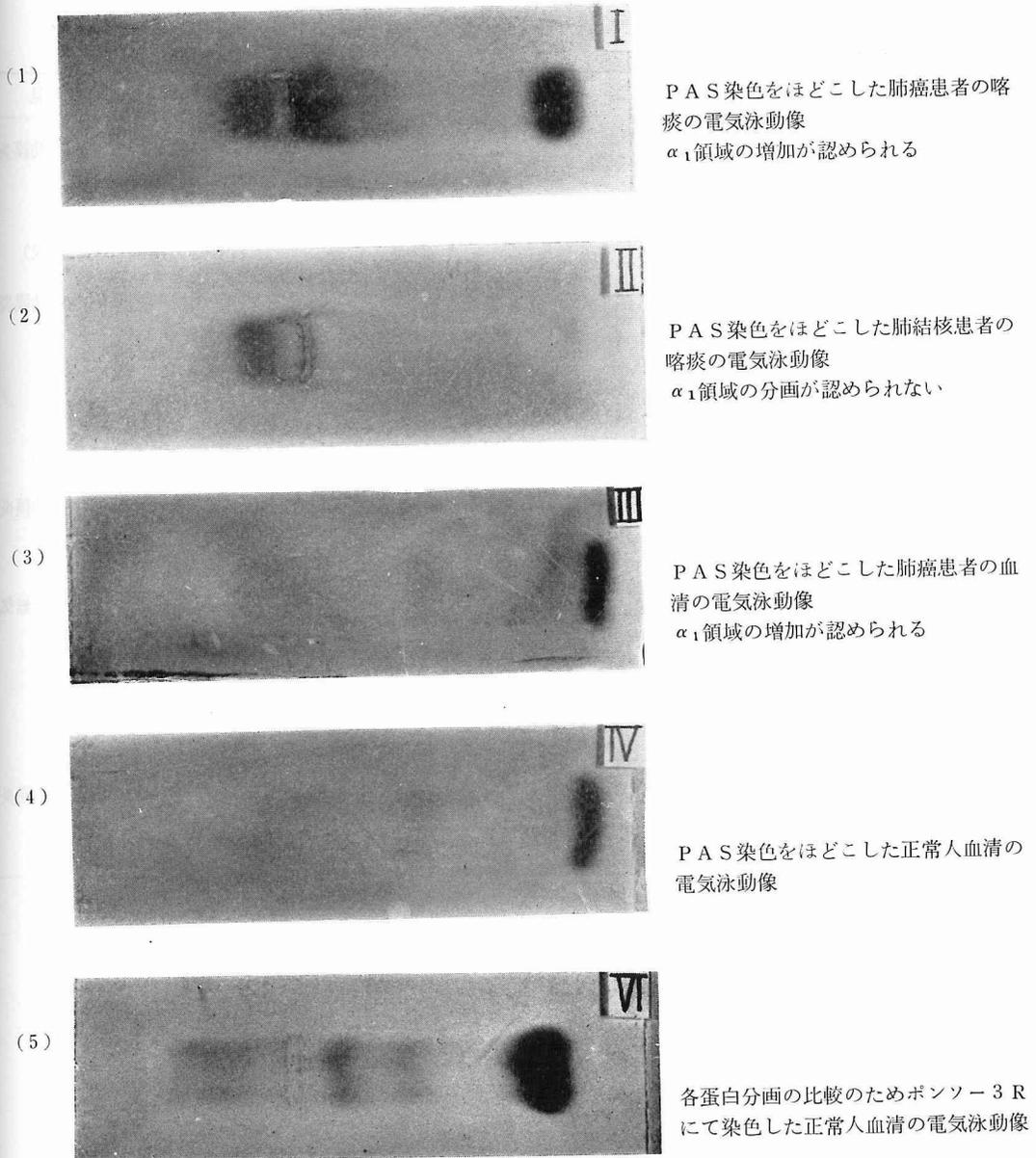


図 6. 肺癌患者の血清および喀痰，肺癌以外の呼吸器疾患々者の血清および喀痰の電気泳動像
2%寒天ゲル，0.01M， $\mu=0.05$ ，pH 8.6，ペロナルアセテート緩衝液使用

(家兔)との間の Ouchterlony 法展開像および正常人血清と肺癌患者喀痰の抗人 α_1 酸性糖蛋白血清に対する免疫電気泳動像である。この結果から，正常人血清の反応線と肺癌患者喀痰の反応線とは連続的で，spur が認められないことから，喀痰中の α_1 酸性糖蛋白が血清中のそれと異なるものではなく，免疫学的には同一のものと考えられる。しかしながら，正常人血清

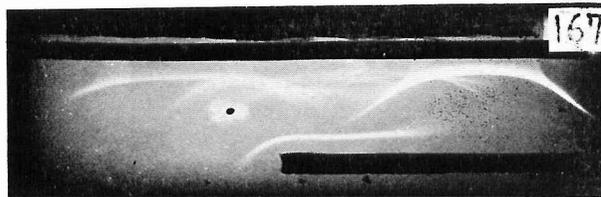
と肺癌患者喀痰の抗人 α_1 酸性糖蛋白血清に対する免疫電気泳動像では，沈降線の様相が多少異っており，喀痰の沈降線が血清のそれに比し，やや泳動度が遅いことおよび二重の反応線が認められるものも出現していることから，正常血清中の α_1 酸性糖蛋白と癌患者喀痰のそれとが必ずしも同一であるとは言い難い。

表 1 症例別にみた、肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰中の α_1 酸性糖蛋白の出現状況と細胞学的ならびに組織学的所見

症 例	材 料	α_1 酸性糖蛋白	細 胞 診	組 織 像	胸 部 X 線 所 見
M. S.	sp.	卅	リンパ節穿刺 腺癌	腺 癌	左末梢腫瘤型+左癌性肋膜炎
H. Y.	sp.	卅	気管支ブラッシング 未分化細胞癌	未分化細胞癌	右肺門浸潤型
T. A.	sp.	卅	気管支ブラッシング 扁平上皮癌		右末梢腫瘤型 (空洞形成)
S. O.	sp.	+	胸水 扁平上皮癌		右肺門浸潤型+右癌性肋膜炎
S. S.	sp.	+	リンパ節穿刺 腺癌	腺 癌	左肺門部腫瘤型
Y. N.	b.s.	+	気管支ブラッシング 扁平上皮癌		右末梢腫瘤型
T. O.	b.s.	卅	気管支ブラッシング パパニコローⅣ		特殊型, 右上肺野無気肺
B. O.	sp.	-	喀痰 パパニコローⅣ		右肺門浸潤型+右癌性肋膜炎
S. H.	sp.	+	喀痰 異常細胞なし		左肺門浸潤型
I. K.	b.s.	卅	気管支ブラッシング パパニコローⅣ		左末梢腫瘤型+左上肺野無気肺
K. M.	b.s.	-	気管支ブラッシング パパニコローⅣ		右肺門浸潤型
K. H.	b.s.	-	気管支ブラッシング パパニコローⅤ		左肺門浸潤型
K. S.	sp.	+	喀痰 扁平上皮癌		右末梢腫瘤型
T. M.	sp.	+	リンパ節穿刺 腺癌		左末梢腫瘤型+左癌性肋膜炎
T. S.	sp.	+	喀痰 パパニコローⅤ		—

sp.: 喀痰 b.s.: 気管・気管支分泌物を気管支鏡下採取

(1)



(2)

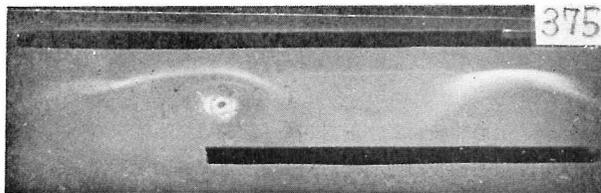


図 7. 肺癌患者の喀痰 (1) および肺癌以外の呼吸器疾患患者の喀痰 (2) の免疫電気泳動像
 (1), (2) ともに上の溝は抗人全血清家兎血清, 下の溝は抗人 α_1 酸性糖蛋白家兎血清, したがって (1) は α_1 酸性糖蛋白陽性であるが, (2) は陰性である

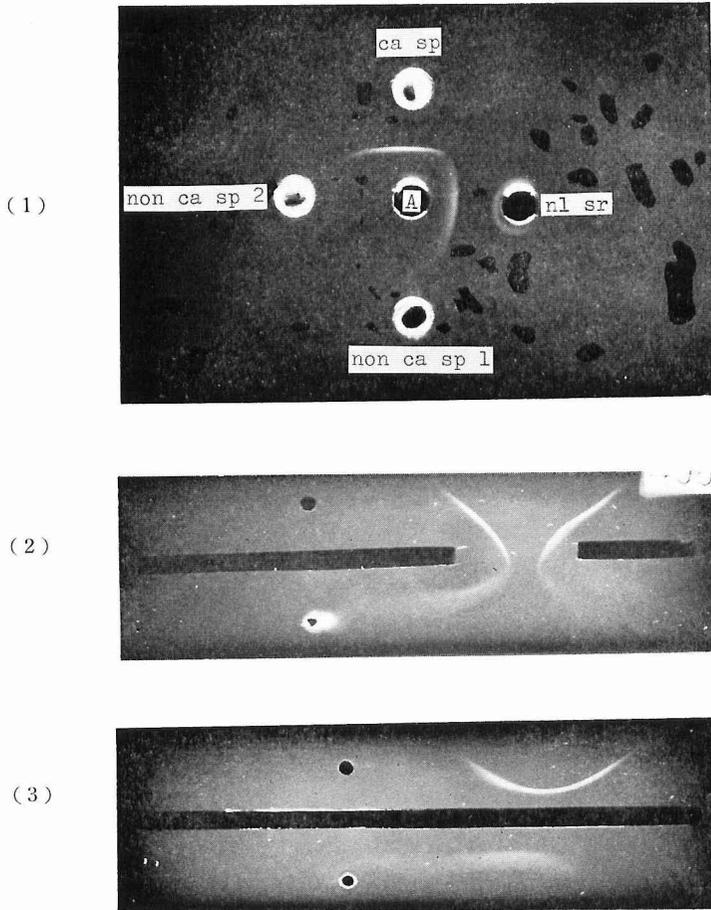


図 8.

- (1) 肺癌患者喀痰 (ca sp), 正常人血清 (nl sr) および肺癌以外の呼吸器疾患々者喀痰 (non ca sp) の抗人 α_1 酸性糖蛋白血清(A)に対する Ouchterlony 法による展開
- (2) 溝より上は正常人血清, 溝より下は肺癌患者喀痰の電気泳動。中央の溝は抗人 α_1 酸性糖蛋白血清
- (3) (2)と同様の配列による免疫電気泳動像
 喀痰の反応線は血清のそれより遅い泳動度を示し、かつ二重の反応線を示している

考 按

冒頭に述べたごとく、喀痰の蛋白分画の追求の際、唾液の混入が問題となるが、唾液の蛋白質濃度は 100~300mg/dl⁸⁾で、その含有量が喀痰中のそれ(2000~8000mg/dl⁹⁾に比べ極めて微量であり、非濃縮唾液では免疫電気泳動で蛋白分画の認められないものが大部分であるので、実際には少量の唾液の混入は考慮に入れなくてよいと考えられる。気管・気管支分泌物およ

び喀痰中の主な蛋白質はアルブミン、 γ A グロブリン、 γ G グロブリン、トランスフェリン、 α_1 酸性糖蛋白など、血清中にみられるものが大部分である¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾。著者の結果から、これらの各蛋白分画の量的変動と疾患との間には厳密な関係が存在するとは言いが、一定の傾向が認められることは確かである。一般に感染の活動期にあるものの喀痰には、II型すなわちアルブミン、 α_1 、 α_2 、 β 領域および γ グロブリンなど総

じて蛋白量の多いパターンが示される点が注目される。とくに γ グロブリン量の多い点は感染防禦機構と関係があるものと思われる。気管・気管支分泌物および喀痰中では γ G グロブリンよりも γ A グロブリンが多く、これが感染防禦に大きな役割を持つものと考えられている²⁰⁾²²⁾。E. G. Dennis 等¹⁹⁾も気管支喘息患者の喀痰と気管支喘息に感染が加った患者の喀痰の比較において、後者に γ A グロブリン、 γ G グロブリンの著増を認めている。

また肺癌ではI型、すなわちアルブミンの圧倒的に増量しているパターンが多く認められる点、G. R. Biserte 等と同一の結果が得られた。担癌生体の血清中に α_1 酸性糖蛋白を初めとし、糖蛋白体が増量することは既に多くの報告にみられる¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。しかし α_1 酸性糖蛋白の血中増加は癌の他、糖尿病¹⁸⁾、肝炎および肝硬変症¹⁹⁾、白血病および骨髄腫²⁰⁾、吉田肉腫動物²¹⁾などにも報告されており、必ずしも担癌生体に特異的な変化とは考えられない。しかし気管・気管支分泌物および喀痰中のこのものの増加と肺癌との関係については全く報告はみられず、本論文がこの問題に対する最初の接近と思われる。正常の生体における、 α_1 酸性糖蛋白の産生は肝臓とされており、担癌生体においては癌の発生が肝臓における正常の α_1 酸性糖蛋白産生能を何らかの機構で刺激亢進させることが考えられる。しかしながら、癌組織の局所にて α_1 酸性糖蛋白が産生されるか否かはなお不明である²²⁾。今日単離されている癌性抗原の多くは糖蛋白体であることから²³⁾、特異な糖蛋白が癌組織で形成され、血中に入り血中濃度を増加せしめることも否定できない。K. Schmid 等の報告によると、 α_1 酸性糖蛋白は単一のものではなく、化学的に数種の糖蛋白体のグループの総括であるとしている²⁴⁾²⁵⁾。したがって上述の著者のOuchterloy 法展開像の結果のみにて、正常血清中の α_1 酸性糖蛋白と喀痰中のそれとの異同を簡単に決めることは危険である。とくに α_1 酸性糖蛋白の抗原性は一般に家兎に対し弱いので²⁶⁾、沈降線の状態のみでは異同を決定でき難い。われわれの行った正常血清と癌患者喀痰の抗 α_1 酸性糖蛋白血清に対する免疫電気泳動では、前者と後者の泳動度の相違が認められ、かつ後者では二重の反応線が出現していることから、必ずしも両者が同一のものであるとは認め難い。この点に関してはさらに詳細な解析が必要と思われる。

総括および結語

著者は各種呼吸器疾患患者の気管・気管支分泌物および喀痰の蛋白分画を寒天ゲル内電気泳動法および

Ouchterloy 法などを用い検索した。その結果次のような事柄が明らかになった。

1) 気管・気管支分泌物および喀痰の電気泳動像を6つの型に分類し、各種呼吸器疾患別に、それぞれの型の出現頻度をみると、感染の活動性病変を有する肺結核、気管支拡張症、肺化膿症などの喀痰および分泌物ではアルブミン、 α_1 、 α_2 、 β 領域および γ グロブリンの増加したII型を示すものが多い。肺癌ではII型のもの、I型すなわちアルブミンが多く γ グロブリンの少い型を示すものが57.5%を占めていた。肺癌でII型を呈するものは感染を合併した症例が多いと看做される。

2) 免疫電気泳動法では肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰の α_1 酸性糖蛋白の陽性に出現するものが多く、15例の検索の結果12例(80.0%)に α_1 酸性糖蛋白が陽性であり、一方肺癌以外の各種呼吸器疾患患者の気管・気管支分泌物および喀痰中には30例中わずかに4例(13.3%)が陽性を示すのみであった。したがって、気管・気管支分泌物および喀痰中の α_1 酸性糖蛋白出現の検査は肺癌診断上極めて有力な手段となり得るものと思われる。

3) 肺癌患者の気管・気管支分泌物および喀痰中に出現する α_1 酸性糖蛋白と正常人血清中に存在するそれとの比較では電気泳動度の相違があることが認められた。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師戸塚忠政教授に深甚なる謝意を表するとともに、本研究に終始御助言御教示いただいた草間昌三助教授、半田健次郎講師、望月一郎講師ならびに直接御懇切なる御指導をいただいた伊藤公夫博士、統計学上の御教示をいただいた本学衛生学教室広沢毅一講師に感謝の意を表します。また、資料提供上御協力下さった教室員各位、須坂職員病院、長野赤十字病院、長野中央病院、長門町病院、岡谷市立病院、伊那中央病院の各位に深謝します。

文 献

- 1) Mueller, F.: Molecular biology of human proteins. Ed. H. E. Schultze and J. F. Heremans, Elsevier, London, 1966. より引用。
- 2) Masson, P. L.: Biochim. Biophys. Acta, III: 466, 1965.
- 3) Bukantz, S. C. and Berns, A. W.: J. Allergy, 29: 29, 1958.
- 4) Warfringe, L. E.: Acta Med. Scand. 158: 49, 1955.
- 5) Atassi, M. Z., Barker, S. A. and Stacey, M.

- : Clin. Chim. Acta, 7 : 706, 1962.
- 6) Atassi, M. Z., Barker, S. A., Houghton, L. E. and Mullard, K. S. : Nature, 192 : 1269, 1961.
 - 7) Biserte, G. R. and Cuvelier, R. : Exposes Ann. Biochem. Med., 24 : 85, 1963.
 - 8) Koestlin A., Rauch, S. : Helv. Med. Acta, 24 : 500, 1957.
 - 9) Gernez-Rieux, C., Biserte, G. R., Voisin, C., Havez, R., Delahousse, P. and Cuvelier, R. : Selected Papers (The Hague) 3 : 35, 1962.
 - 10) Keimowitz, R. I. : J. Lab. Clin. Med., 63 : 54, 1964.
 - 11) Anzai, T., Ibayashi, J., Carpenter, C. M. and Hyde, L. : Am. Rev. Respirat. Dis., 88 : 503, 1963.
 - 12) Ibayashi, J., Anzai, T., Hood, J. E. and Carpenter, C. M. : Dis. Chest., 44 : 514, 1963.
 - 13) Dennis, E. G., Hornbrook, M. M. and Ishizaka, K. : J. Allergy, 35 : 464, 1964.
 - 14) 倉田暁, 他 : 日本病理学会々誌, 53 : 140, 1964.
 - 15) 中村喜吉 : 東北薬科大学研究年報, 12 : 17, 1965.
 - 16) 川内広明, 他 : 日本癌学会24回総会記事, 104, 1966.
 - 17) 長瀬すみ, 他 : 日本癌学会24回総会記事, 110, 1966.
 - 18) 高山弘平, 他 : 糖尿病, 9 : 175, 1966.
 - 19) 吉利和, 他 : 日本消化器病学会雑誌, 63 : 685, 1966.
 - 20) Kuehn, R. A. : Z. ges. inn. Med., 18 : 244, 1963.
 - 21) Caputo, A., Marcante, M. L. : Arch. Biochem., 105 : 193, 1964.
 - 22) Macbeth, R. A. and Bekesi, J. G. : Arch. Surg., 88 : 4, 1964.
 - 23) 石川大刀雄 : 免疫病理, 2 : 111, 1966.
 - 24) Robert, B. et al. : Clin. Chim. Acta, 4 : 828, 1959.
 - 25) Schmid, K., MacNair, M. B. and Buergi, A. F. : J. Biol. Chem., 230 : 853, 1958.
 - 26) Popenoe, E. A. : J. Biol. Chem., 217 : 61, 1955.

(昭和43年11月11日 受付)