

琥珀酸酸化酵素系に及ぼす性 steroids 及び合成発情物質の影響

Effect of the Sexual Steroids and Synthetic Estrogens on the Succinic Oxidase System

大阪通信病院産婦人科（部長 足立春雄博士）

住 谷 孝 子 Takako SUMITANI

第1編 絨毛組織の琥珀酸酸化酵 素系に及ぼす性 steroids 及び 合成発情物質の影響

第1章 緒 論

性 steroids が生体に及ぼす顕著な影響を，酵素並に酵素系に及ぼす性 steroids の作用として解明しようと云う試みから，まず短期間に旺盛な発育能力を持ちその生物学的態度が古くから多くの研究の対象として選ばれているものの1つである絨毛組織に就て Phosphatase の消長並に之に及ぼす性 steroids 及び合成発情物質の影響を実験測定して，本誌³³⁾に発表した所である．引続き琥珀酸酸化酵素系に及ぼす性 steroids 及び類似物質の直接的な影響を検討したので，その概要を報告する．

第2章 実験材料及び実験方法

§ 1 実験材料

1. 酵素液 実験に用いた絨毛組織は本誌第8巻第5号³³⁾に準じ，その詳細は重複するので省略する．但し緩衝液はM/20磷酸緩衝液を用いた．
2. 基 質 石津製薬の琥珀酸ソーダを用い，使用に際し蒸留水に溶解し 0.1N塩酸を用い pH 7.2とした．
3. 性 steroids 及び合成発情物質 本誌第8巻第5号³³⁾に準ず．

§ 2 実験方法

酸素吸収量の測定はすべて Warburg 検圧計を用い 37.5°Cで行った．第3章，§ 1の実験に於ては，主室に酵素液 0.5ml，M/20磷酸緩衝液（pH 7.2）1.0ml，側室には 0.1M琥珀酸ソーダ溶液 0.5ml を注入し，蒸留水を加えて容器内の全量を 2.7ml とし，副室に30%苛性ソーダ溶液 0.3ml を入れ測定した．尚酵素のみの自家呼吸を測定し上記の酸素吸収量より差引いた．§ 2の実験の場合は，主実験としては各種 hormone 溶液を夫々添加したものに就て実測し，対照として hormone の溶媒を添加した．

第3章 実験成績

§ 1 正常妊娠に於ける絨毛組織の琥珀酸酸化酵素系の妊娠月数に依る消長

1. 妊娠月数に依る琥珀酸酸化酵素活性の消長 最終月経，胎児の大きさ等より判定し得た材料に就て1表に示したような月数及例数に就て測定した．その成績を簡明を期す爲，図表に依つて示すと1表及び1圖の如くである．

2. 小 括 絨毛組織乾燥重量 1 mgの琥珀酸酸化酵素活性は，妊娠2カ月に可成りの活性を現し，3カ月，4カ月と逐次増加するが5カ月，6カ月には急激に低下し6カ月では2カ月の約半量となり，7カ月ではやゝ上昇するが5カ月の値迄に達せず以後妊娠末期迄有意の増減を認めない．

§ 2 妊娠初期絨毛組織（第3カ月）の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす性 steroids 及び合成発情物質の影響

1. (1) estrogens: estrone, estradiol, estradiol benzoate (est. benz. と略記す)，合成発情物質 (hexestrol, diethylstilbestrol) の終末濃度 $5 \times 10^{-3}M$ から $2 \times 10^{-5}M$ 迄の実験成績は2，3表の如くである．

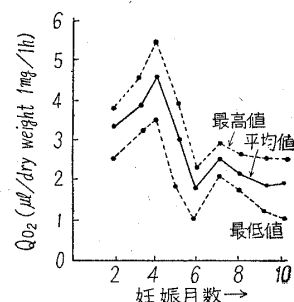
(2) androgens 及 progesterone: testosterone, testosterone propionate, methylandrostenediol (MA

第1表 妊娠月数に依る琥珀酸酸化酵素活性の消長

月数	例数	算術平均値	範 囲	標準偏差
2	10	3.28	2.50~3.76	± 0.43
3	12	3.86	3.07~4.53	± 0.61
4	10	4.51	3.46~5.40	± 0.21
5	5	2.96	1.80~3.90	± 0.95
6	5	1.76	1.00~2.30	± 0.48
7	4	2.50	2.10~2.90	± 0.29
8	5	2.16	1.80~2.70	± 0.34
9	5	1.84	1.17~2.60	± 0.59
10	15	1.95	1.10~2.63	± 0.53

Q_{O_2} (μ l/dry weight 1mg/1h)

第1図 妊娠月数に依る琥珀酸酸化酵素活性の消長



第2表 妊娠初期絨毛組織の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす estrogens(estrone, estradiol, estradiol benzoate)の影響

	対照	$5 \times 10^{-3} M$	$2 \times 10^{-3} M$	$1 \times 10^{-3} M$	$9 \times 10^{-4} M$	$7 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-4} M$	$3 \times 10^{-4} M$	$2 \times 10^{-4} M$	$1 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-5} M$	$2 \times 10^{-5} M$
estrone	2.6	(8)	(20)	(20)	(20)	(30)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
estradiol	2.7	(25)	(25)	(25)	(25)	(25)	(20)	(15)	(15)	(20)	(20)	(20)
estradiol benzoate	2.6	(20)	(20)	(20)	(25)	(25)	(20)	(20)	(15)	(20)	(20)	(20)

Q_{O_2} (μl /dry weight $1mg/1h$) () 内は阻害の%を示す

第3表 妊娠初期絨毛組織の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす合成発情物質の影響

	対照	$5 \times 10^{-3} M$	$1 \times 10^{-3} M$	$7 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-4} M$	$3 \times 10^{-4} M$	$1 \times 10^{-4} M$	$7 \times 10^{-5} M$	$5 \times 10^{-5} M$	$2 \times 10^{-5} M$
hexestrol	2.8	(8)	(8)	(22)	(22)	(30)	(20)	(20)	(20)	(20)
diethylstilbestrol	3.4	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)

Q_{O_2} (μl /dry weight $1mg/1h$) () 内は阻害の%を示す

第4表 妊娠初期絨毛組織の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす androgens 及び progesterone の影響

	対照	$5 \times 10^{-3} M$	$2 \times 10^{-3} M$	$1 \times 10^{-3} M$	$8 \times 10^{-4} M$	$5 \times 10^{-4} M$	$2 \times 10^{-4} M$	$1 \times 10^{-4} M$	$8 \times 10^{-5} M$	$5 \times 10^{-5} M$	$2 \times 10^{-5} M$
testosterone	3.8	3.8	3.9	3.9	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8	3.9	3.8
testosterone propionate	3.8	3.7	3.8	3.8	3.7	3.7	3.8	3.8	3.8	3.8	3.8
MAD	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.3	3.4	3.4	3.4	3.4	3.3
progesterone	3.6	3.5	3.6	3.5	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6	3.7	3.6

Q_{O_2} (μl /dry weight $1mg/1h$)

Dと略記す) 及び progesterone 等では実験した範囲では4表のように特異的な影響を示さなかつた。

2. 小括 絨毛組織 homogenate の琥珀酸酸化酵素系に対する性 steroids の影響は終末濃度 $5 \times 10^{-3} M$ から $2 \times 10^{-5} M$ 迄の範囲では estrogen の濃度のみ認むべき影響があり他の性 steroids は直接本酵素反応に影響を與えぬものの様である。即ち estrone の $3 \times 10^{-4} M$ で10%, $5 \times 10^{-4} M$ では20%に, $7 \times 10^{-4} M$ で80%にも阻止作用を示した。併し之より高濃度の $1 \times 10^{-3} M$ ではその阻止作用は減弱し20%に, $5 \times 10^{-3} M$ で約8%にしか認められなかつた。estradiol でも同様の傾向が認められ $3 \times 10^{-4} M$ では其阻止作用は最も強く約30%に達し $5 \times 10^{-4} M$ で26%, $7 \times 10^{-4} M$ で18%の阻止を認めた。est. benz. は $5 \times 10^{-5} M$ から濃度の高くなるに従って阻止傾向が強くなり $2 \times 10^{-4} M$ で80%である。又、合成 estrogen の hexestrol は estradiol と同じく $3 \times 10^{-4} M$ 邊りで30%を, $5 \times 10^{-4} M \sim 7 \times 10^{-4} M$ で22%阻止を認めたのに対し、同じく合成 estrogen の diethylstilbestrol では何等の影響も認めなかつた。

上述の様に濃度のみ阻止作用が最も強く現れた事は一般に阻害剤と呼ばれるものの影響と少く様相が異っており注目すべき一知見であると考えられる。

第4章 総括並びに考按

琥珀酸酸化酵素系は生体内酸化の終末過程である枸橼酸廻路中の重要な酵素系の1つで、古くから Thunberg^{37) 38)} ('09) ('10), Szent-Györgyi³⁶⁾ ('24), Batteli & Stern⁴⁾ ('10), Burris⁶⁾ ('49), Slater³⁰⁾ ('49) 等多くの

人々に依り研究されている。且つ其分布も甚だ廣く動植物或は微生物界に廣く存在している。動物体内では心臓、肝臓、腎臓に特に多く含まれ、脳、骨骼筋、肺臓、網膜には少量存在していると云われる。

ヒト絨毛中の琥珀酸酸化酵素系を測定した報告は比較的少く、多くは胎盤の代謝を窺う一端として絨毛組織の組織呼吸の測定のみ止っている。先ず Loeser²¹⁾ ('32), Wang & Hellmann⁴⁹⁾ ('41), Page²⁷⁾ ('48) 等は検圧的に測定して、妊娠月数の進むに従って酸素消費の量と嫌気性解糖作用の速度が減少する事を報告しているし、我國に於ても外山等³²⁾ ('56), 齋藤²⁹⁾ ('57), 荒川²⁾ ('58) 強口等³⁹⁾ ('59) が胎盤の酸素消費に就て述べている。Wislocki & Dempsey⁵¹⁾ ('46) は胎盤の組織化学的検索により、分娩期のものでは妊娠早期胎盤より組織呼吸量は遙かに減少すると云っているし、Villee⁴⁴⁾ ('53) も分娩期の胎盤は“老衰の状態”にあると述べており、又 Villee & Hagermann^{13) 45)} ('53) は妊娠初期絨毛組織及分娩時胎盤の homogenate や切片に依つて種々の基即ち, glucose, pyruvate, acetate, citrate, α -ketoglutarate 等の酸化が estradiol 添加に依り促進されると説き、その後 Villee & Gordon¹¹⁾ ('55) は estradiol が Krebs cycle の α -ketoglutarate と citrate の間の酵素系を活性化する事を結論している。又 Villee & Gordon^{12) 47)} ('56), Villee⁴⁸⁾ ('57) は胎盤組織切片に estradiol $4 \times 10^{-4} M$ 添加に依りイソ枸橼酸脱水素酵素作用が促進され estradiol 以外の estrogens — 即 estrone, equilin, equilenin でも同様の作用を認めたと報告した。

又琥珀酸脱水素酵素に就ては、植田等⁴¹⁾ ('56) はヒト胎盤絨毛組織を用いて組織化学的所見を逐月比較検討し、妊娠3カ月、4カ月で其機能が最も旺盛で積極的に物質代謝に関与するが妊娠後半期では其機能が減退すると説いている。又 Kyank²⁰⁾ ('57) は20例の正常妊娠胎盤と30例の妊娠中毒症の胎盤の homogenate の琥珀酸脱水素酵素作用を比較し妊娠中毒症の胎盤 homogenate のそれは正常妊娠胎盤 homogenate より酵素活性が低下している事を認めた。

本実験に於ても、嘗て胎盤中の acid phosphatase に就て筆者³³⁾ の述べたのと同じ傾向を示し、estradiol ($3 \times 10^{-4} M$), estrone ($7 \times 10^{-4} M$), est. benz. ($2 \times 10^{-4} M$), hexestrol ($3 \times 10^{-4} M$) の高濃度で夫々30%の阻止作用を認めた。之は恐らく早期の絨毛組織の増殖と phosphomonoesterase や琥珀酸酸化酵素系が密接な関連を持つものである事を暗示するし、且つ絨毛組織の發育に estrogen が大きな役割を演じるだろうと云う臨床的知見に1つの生化学的な示唆を與えるものであ

る。testosterone, test. prop., progesterone, MAD の如き非フェノール型性 steroids や合成発情物質の中でも diethylstilbestrol が何等の影響を示さなかつた事は、單に性 hormone の構造の相違のみに帰するとしても、阻害の詳細は将来の研究に俟つ所が大きいと思惟される。他方、唯 estrogen の或濃度にのみ見られた此の阻害作用は、妊娠の末期に血中の estrogen が著しく増加する事と、妊娠末期の胎盤で琥珀酸化酵素の活性が減少する事と胎盤の機能が低下する事実との間に何等かの生物学的意義を持つものであると推論される。

第5章 結 論

妊娠2カ月乃至10カ月のヒト絨毛組織 homogenate を用い、71例に就き Warburg 検圧計により、琥珀酸化酵素作用を定量し、併せて in vitro で正常妊娠の初期絨毛組織の酵素作用への各種性 steroids の影響を検索した。

1. 琥珀酸化酵素の活性は、妊娠前半期に高く妊娠第4カ月に最高値を示し、その後次第に下降し第6カ月で最も低値を示し第7カ月ではやゝ上昇するがその後妊娠末期まで有意の増減を認めなかつた。

2. 琥珀酸化酵素に対する性 steroids の影響は、終末濃度 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ から $2 \times 10^{-5} \text{M}$ の間の実験範囲では estrone $7 \times 10^{-4} \text{M}$ で30%, estradiol $5 \times 10^{-4} \text{M}$ で26%, $3 \times 10^{-4} \text{M}$ で30%の阻止作用を示し, est. benz. の $2 \times 10^{-4} \text{M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ で30%~20%の阻止作用を示した。又 hexestrol では $7 \times 10^{-4} \text{M} \sim 5 \times 10^{-4} \text{M}$ で22%, $3 \times 10^{-4} \text{M} \sim 1 \times 10^{-4} \text{M}$ で30%~20%の阻止作用を示した。他方 diethylstilbestrol, androgens 及び progesterone では有意の影響を認めなかつた。

第2編 性 steroids 及び合成発情物質に依る動物組織琥珀酸化酵素系の活性化作用

第1章 緒 論

第1編に引続き種々の動物組織を用いて前回と同じく性 steroids 及び合成発情物質の添加実験を行い、特に牛心臓筋肉の琥珀酸化作用に特異的な活性化作用を見たので、其本態を窺知する目的で最も著明に活性化が認められた hexestrol と心臓筋肉を用いて検討を加えて2, 3の成績を得たのでその概要を報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

§ 1 実験材料

1. 酵素材料及び酵素液 (1) 酵素材料—食牛の心臓、肝臓、脾臓、子宮、卵巢、黄体等を用い、其の他牛以外の動物組織としては家兎の心臓、脾臓、肝臓、副

腎、骨骼筋；白鼠心臓、骨骼筋、脾臓、肝臓；鳩の胸筋、心臓；及び豚心臓を使用した。(2) 酵素液—屠殺後可及的速かに入手した上記動物組織の脂肪、結合織を除去した後、之に4倍重量のM/20冷磷酸緩衝液を加えて冷却しつゝ waring blender で磨碎して其れを冷却遠心分離器で 0°C , $1100 \times \text{g}$, 5分間遠心分離して得た懸濁液を粗酵素液とし、之を更に冷却しながら1Nの醋酸でpH 5.8とした後生じた沈澱を冷却遠心分離器で 0°C , $1100 \times \text{g}$, 15分間遠心分離して集めたものを酸性沈澱酵素液とした²⁶⁾。尚蛋白沈澱は最初の筋肉100g当り、100mlの割合にM/20磷酸緩衝液に懸濁しpH 6.8に調整し実験に供した。

上述の様に作成した酵素液は一部マイクロキールダール法²⁵⁾に依り蛋白窒素量を測定して、凡ての実験成績を蛋白窒素1mgが単位時間内に消費する酸素吸収量に換算して比較検討した。

2. 基質—第1編に準ず。

3. 性 steroids 及び合成発情物質 estrone, estradiol, testosterone, progesterone, MAD, hexestrol, diethylstilbestrol 等の結晶を用い、使用に際して acetone に溶解した。

§ 2 実験方法

第1編に準ず。但し此の場合は各種 hormone の acetone 溶液は予め検圧計の主室に注入し、acetone を蒸発させた後対照と同様な実験を行った。又恒温槽の温度は 35.0°C で測定した。

第3章 実験成績

§ 1 各種性 steroids 及び合成発情物質が心筋の琥珀酸化酵素系に及ぼす活性化作用

酸性沈澱酵素を用い性 steroids 及び合成発情物質は夫々終末濃度 $2 \times 10^{-4} \text{M}$ になる様に添加した。実験成績は5表の様に hexestrol に最も活性化作用が強く約200%であった。

§ 2 hexestrol 添加量に依る活性化作用の変動

前節で hexestrol を用いた場合に活性化作用が最も強く認められたので、添加量との関係を窺う爲 hexestrol を終末濃度 $2 \times 10^{-3} \text{M}$ から $1 \times 10^{-5} \text{M}$ に至る種々の濃度で就て実験を繰返した。

その成績は第6表の様で終末濃度 $1.5 \times 10^{-3} \text{M} \sim 2 \times 10^{-5} \text{M}$ の間では活性化作用は240%~180%に及ぶが濃度が高くなつたり或はより低い場合には殆ど影響を與えず $2 \times 10^{-3} \text{M}$ の様な高濃度では反つて阻害作用を認めた。

§ 3 種々の動物組織に於ける琥珀酸化酵素系に及ぼす hexestrol の影響

1. 牛の心筋以外の組織に於ける hexestrol の影響

牛心筋以外の臓器より調製した酵素でも上述と同様の結果を得るか否かを検する爲、活性化作用の最も著明であつた hexestrol ($2 \times 10^{-4} \text{M}$) を添加し2圖の様な種々の組織を用いて実験した。その成績は心筋以外の組織

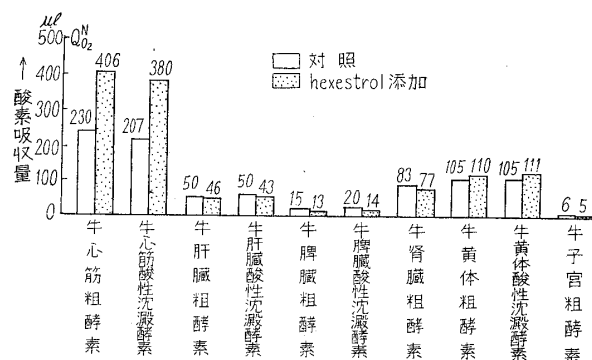
第5表 各種性 steroids 及び合成発情物質の心筋の琥珀酸酸化酵素に及ぼす活性化作用

	対 照	estrone	estradiol	testosterone	progesterone	MAD	hexestrol	diethylstilbestrol
酵素吸収量 μl Q ₀₂	205	347	355	325	330	320	410	390
効果	100%	169%	170%	156%	160%	156%	200%	190%

第6表 hexestrol 添加量に依る活性化作用の変動

	対 照	2×10 ⁻³ M	1.5×10 ⁻³ M	1×10 ⁻³ M	5×10 ⁻⁴ M	2×10 ⁻⁴ M	1×10 ⁻⁴ M	5×10 ⁻⁵ M	2×10 ⁻⁵ M	1×10 ⁻⁵ M
酵素吸収量 μl Q ₀₂	120	105	220	265	275	290	255	241	147	135
効果	100%	88%	183%	220%	229%	241%	212%	200%	120%	110%

第2図 hexestrol 牛の心筋以外の組織に於ける hexestrol の影響

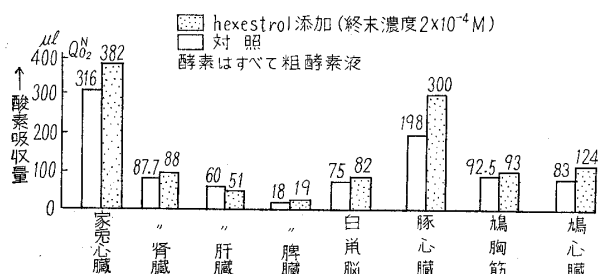


の琥珀酸酸化酵素系では hexestrol 添加に依り有意差を認めず、寧ろ肝臓、脾臓、腎臓等では阻害の傾向を示す事を知った。

2. 牛以外の動物組織に於ける hexestrol の影響

1. と同様の実験を牛以外の 2, 3 の動物の心臓筋肉其他に就て繰返し、動物の種属及び臓器の特異性を検討する爲 3 圖の様な種々の組織を用いて実験した。その成績は牛の場合と同様、心筋のみが hexestrol により 150% ~ 250% に及ぶ活性化作用を示し、其他の臓器では有意差を認めず寧ろ阻害作用を認めた。

第3図 家兎、白鼠、豚、鳩等の組織の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす hexestrol の影響

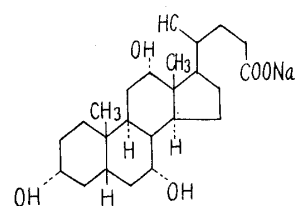


§ 4 性 steroids に近似の構造を有する他の有機化合物及びその他の 2 ~ 3 の物質の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす影響

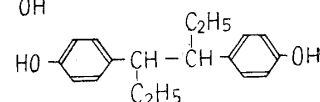
構造式と活性化作用との関連性を探究する爲に性 ste-

第 7 表

sodium cholate

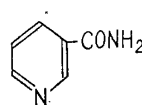


hexestrol



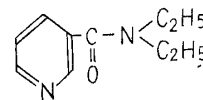
nicotinamide

(3-pyridine carboxylic acid amide)



aminocordine

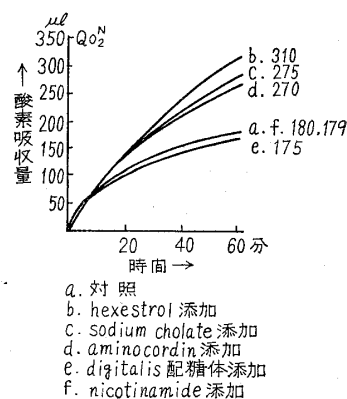
(pyridine-3-carboxylic acid diethyl amide)



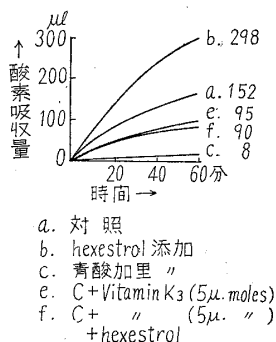
roids に近似の構造を有する有機化合物即第7表に示した様に sterin 核を有する sodium cholate を又前節迄の実験で心筋のみが性 steroids により著しい活性化作用を示す事を知つたので生理作用上の興味から強心循環剤として用いられる aminocordin を、又構造式と生理作用上の興味から digitalis 配糖体を用い hexestrol ($2 \times 10^{-4}M$) と夫々等モル濃度になる様に添加し実験した。その成績は第4圖の様に sodium cholate では 152% に aminocordin では 150% の活性化を示したが、digitalis 配糖体では対照と殆ど差を示さなかつた。aminocordin が150%にも活性化を認めたので之と類似の構造を有する即ち pyridin 核をもつ nicotinamide に就ても同様の実験を併せ行つたが此の場合には対照と殆ど差を示さなかつた。

§ 5 琥珀酸酸化酵素系の活性化作用部位の検討

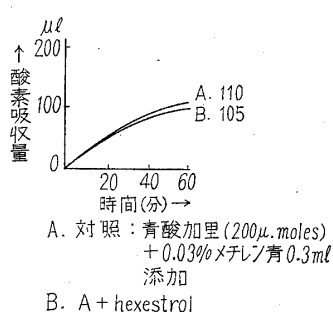
第4図 性 steroid に近似の構造を有する他の有機化合物及びその他の 2 ~ 3 の物質の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす影響



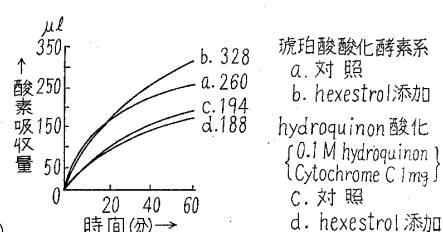
第5図 Vitamin K₃ を水素受容体とした場合の琥珀酸脱水素酵素に及ぼす hexestrol の影響



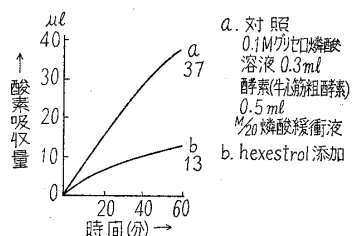
第6図 メチレン青を水素受容体とした場合の琥珀酸脱水素酵素に及ぼす hexestrol の影響



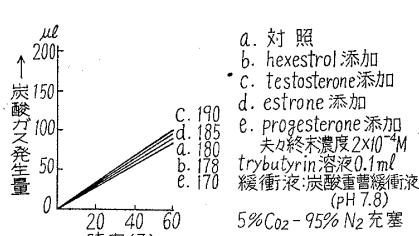
第7図 cytochrome oxidase に及ぼす hexestrol の影響



第8図 グリセロ 磷酸脱水素酵素に及ぼす hexestrol の影響



第9図 lipase に及ぼす性 steroids 及び hexestrol の影響

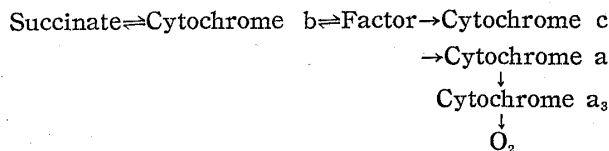


第8表 蛋白分解酵素に及ぼす hexestrol の影響

保 温 時 間	対 照	アミノ窒素量				
		hexestrol 添加				
		7×10 ⁻³ M	5×10 ⁻³ M	3×10 ⁻³ M	1.5×10 ⁻³ M	7×10 ⁻⁴ M
60分	2.04	2.04	2.06	2.06	2.08	2.07
120分	2.80	2.80	2.78	2.79	2.78	2.74

方法: 牛心筋粗酵素液 5.0ml. 及びこれに hexestrol (終末濃度 7×10⁻³M ~ 7×10⁻⁴M) を夫々添加したものを 37.0℃ に 60分及 120分 保温後 10% トリクロル酢酸 1ml を加えて反応中止した。夫々の懸濁液を 0℃, 1100xg 5分間遠心分離して得た上清液 1ml について夫々のアミノ窒素量を測定した。

琥珀酸酸化酵素系は下式³¹⁾の如く説明されているので、



本研究に際しては琥珀酸脱水素酵素と cytochrome oxidase の2者に就て、hexestrol が之等酵素に及ぼす影響を追究してこの酸化酵素系への侵襲点を窺った。

1. 琥珀酸脱水素酵素に及ぼす hexestrol の影響

青酸加里で cytochrome oxidase を阻害し Vitamin K₃⁴²⁾ 或はメチレン青を水素受容体として琥珀酸脱水素酵素に就て実験し、hexestrol 添加に依る変動を検した所 5, 6図の様に hexestrol 添加に依て寧ろ阻害作用を認めた。

2. cytochrome oxidase に及ぼす hexestrol の影響

hexestrol 添加に依る cytochrome oxidase の影響を知る爲に直接 cytochrome c に結びついて酸化される hydroquinone の酸化作用への hexestrol の影響を検索した。その成績は 7 図の様に hexestrol 添加に依る変化は認められなかった。

3. グリセロ磷酸脱水素酵素系に及ぼす hexestrol の

影響

心筋中に含まれている酸化還元酵素の1つとして琥珀酸酸化酵素系と同じく、メチレン青或は cytochrome c の関与するグリセロ磷酸脱水素酵素を選び之に及ぼす hexestrol の影響をみた。グリセロ磷酸脱水素酵素は Green の方法⁹⁾ に準じて Warburg 検圧計により測定した。その成績は 8 図の様に hexestrol に依る活性化作用はなく、寧ろ 65% にも及ぶ阻害を呈した。

§ 6 其他の活性化機構に関する検討

前節の実験結果から琥珀酸酸化酵素系に直接影響を與える様でもないの、本酵素系に関連する他の酵素系を活性又は不活性化する爲に 2 次的に本酵素系を活性化するように見えるのではないかと考え、次の 2, 3 の酵素に就て検討した。

1. lipase に及ぼす性 steroid 及び hexestrol の影響

琥珀酸酸化酵素系中には多量の lipid を含んでいるとされるが hexestrol がこの lipid を分解する爲に上述の活性化作用が現われるのではないかと考え lipase に及ぼす性 steroids 及び hexestrol の影響をみた。基質は Rona & Lasnitzki²⁸⁾ の提唱する trybutyrin 溶液 (Merk 製) を用い Warburg 検圧計により炭酸ガス発生量を測定した。その成績は 9 図の様に何れの場合にも

有意差を認めなかった。

2. 蛋白分解酵素に及ぼす hexestrol の影響 次いで hexestrol に依る琥珀酸化の活性化作用は、本来の酵素と結合している巨大蛋白が分解される爲に、その結果として琥珀酸化酵素系が活性化されるのではないかと考え、牛心筋のアミノ窒素量の hexestrol 添加に依る変動を Van Slyke 氏法⁴³⁾により測定比較して、蛋白分解酵素に及ぼす hexestrol の影響を窺った。その方法及び成績は8表に示す様に hexestrol 添加による影響は認められなかった。

§ 7 酵素調製後の時間的経過及び酵素材料の新鮮度による変動

1. 屠殺直後の牛心筋から調製した hexestrol に依る活性化作用を示す酵素を攝氏5度の氷室に24時間、48時間、72時間保存し同様の実験を試みた処、10圖の様に調製直後に見られた hexestrol の著しい活性化作用は保存時間の経過と共に漸次減少し72時間後では反って阻害作用が現れる事を認めた。

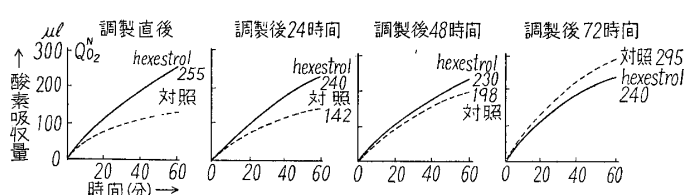
2. 又牛心筋を予め攝氏5度の氷室に24時間、48時間、72時間放置した後に、夫々から調製した場合は、摘出後短時間内に調製した酵素で著しい活性化作用を認めた場合でも、72時間後に調製した酵素では阻害作用を示し前項と全く同様の傾向であつたので图表を省略する。

§ 8 反応前の保存時間に依る活性化作用の変動

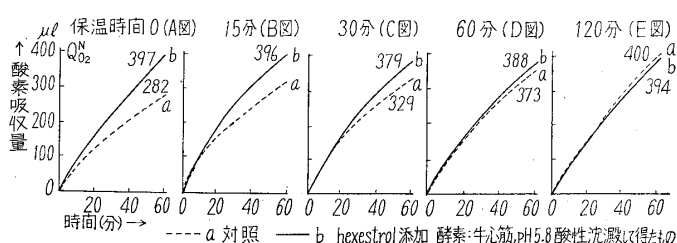
前節で酵素調製後時間を経たものでは hexestrol に依る活性化作用が現れない事を知つたが、之は活性化を受ける因子が保存時間の経過と共に自動的に活性化されるのではないかと考え更に次の様な実験を行つた。即ち調製直後に活性化作用を認めた酵素及び之を認めなかったものを、夫々一定時間、一定温度に保ち其後に於ける此の現象の変動を検索した。

1. 新鮮な牛心筋より調製した hexestrol に依る活性化作用を示す酵素を5等分し40°Cの恒温槽中で夫々15分、30分、60分、120分保つた後、夫々の琥珀酸化酵素作用と、それに対する hexestrol 添加の影響を比較した。その成績は11圖の様に保温処理した酵素の琥珀酸化作用は15分、30分、60分、120分と保温時間の長いもの程漸次増大する(11圖 A,B,C,D,E 圖 a 曲線)。併し夫々の酵素に hexestrol を添加した場合の酸素吸収量は(11圖, A,B,C,D,E 圖 b 曲線)、保温処理をしない酵素に hexestrol を添加した場合の値(第11圖, A圖, b 曲線)と大差なく、保温時間による増加は認められない。即ち保温処理をしない酵素で hexestrol に依る活性化作用が140%にも認められたものでも(第11圖, A圖),

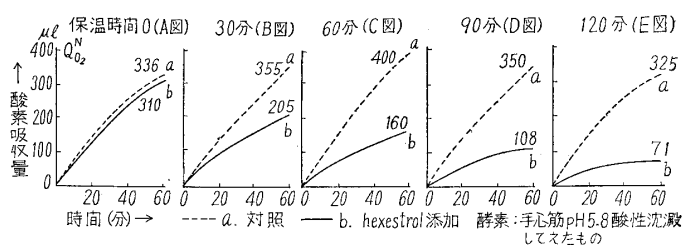
第10圖 酵素調製後の時間的経過による活性化作用の変動



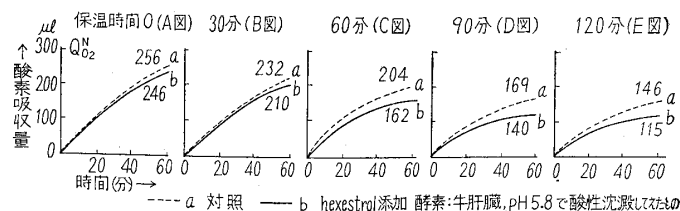
第11圖 保温処理時間に依る活性化作用の変動 (牛心臓)



第12圖 保温処理時間に依る活性化作用の変動 (牛心臓)



第13圖 保温処理時間による活性化作用の変動 (牛肝臓)



120分間保温処理をした酵素では hexestrol 添加に依り見かけ上は寧ろ阻害効果を示している。(11圖E圖)

2. (1) hexestrol に於ける活性化作用の認められない牛心筋より調製した酵素を上と同様恒温槽に保ち同様の実験を繰返した。保温処理した酵素の琥珀酸化作用は60分迄は保温処理時間の経過と共に増大するのは前項と全く同じ傾向を示すが90分、120分では僅かに低下を認めた(12圖, A,B,C,D,E 圖 a 曲線)。夫々の酵素に hexestrol を添加した場合の酸素吸収量は時間の経過と共に低下している(12圖, A,B,C,D,E 圖 b 曲線)。即ち保温処理しない酵素に hexestrol 添加した場合に僅か8%の阻害であつたものが(12圖A圖), 120分保温処理酵素の場合は, hexestrol 添加により78%にも阻害効果を示している事になる(12圖, E圖)。

昭和34年7月1日

住 谷

1115—99

(2) hexestrol に依る活性化作用の認められなかつた心筋以外の臓器として牛肝臓を選び(1)と同様の実験を行った。その成績は13圖の様に酵素のみの琥珀酸酸化作用(13圖 A,B,C,D,E 圖 a 曲線)も hexestrol 添加の場合も(13圖 A,B,C,D,E 圖 b 曲線)共に保温処理時間の経過に従つて低下した。

§ 9 hexestrol に依る活性化の見られる区分の分離

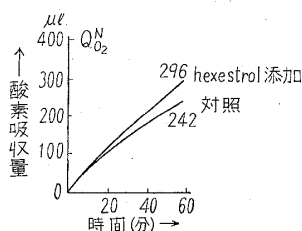
以上前節迄の実験で hexestrol による活性化作用は、琥珀酸酸化酵素系自体の作用部位の検討に於てもその侵襲点を明かにし得ず、又琥珀酸酸化酵素系以外の酵素系と本活性化作用との関連性をも究明出来ず、又前節の実験で明かな様に反應前の保温時間による活性化作用と hexestrol 添加による活性化作用ともその機構を異にする様である。従つて次に酵素調製法を種々に変化して hexestrol による活性化の見られる区分を検討する目的で次の様な実験を行った。

粗酵素液に hexestrol を添加した場合の成績は14圖の様で、約 122%に活性化作用を示している。

次に粗酵素液から比較的沈澱し易い区分を遠心分離(2500×g, 15分間)し(此沈澱をA沈澱とする)、こゝに得られた懸濁液から 10,000 × g, 15分間で沈澱するものを得(此を B 沈澱とする)、此懸濁液から 20,000 × g, 15分間で沈澱するものを分離し(此を C 沈澱とする)、更にその懸濁液を 25,000 × g, 15分間遠心分離した(此沈澱を D 沈澱とする)。A,B,C,D の各沈澱は M/20 冷磷酸緩衝液に懸濁して実験に供した。之等の酵素の hexestrol による活性化作用は第9表に示す様に A, B の沈澱では 147%~ 227%の活性化作用が見られたが C 沈澱では有意差を認めず、D 沈澱では寧ろ阻害作用を呈した。

更に hexestrol に依る活性化作用の見られる区分に就ての知見を深める爲に pH を変化させて同様の実験を行った。即ち粗酵素液を冷却しながら 1 N の醋酸で最初 pH 5.8 とした時生じた不溶性物質を冷却遠心分離器で 0°C, 1100 × g, 15分間遠心分離し(此を E 沈澱とした)更に此の懸濁液を pH 5.2 として生じた沈澱を(此を F 沈澱

第14圖 粗酵素液に及す hexestrol の活性化作用
第9表 hexestrol に依る活性化の見られる区分の分離



酵素の種類	酸素吸収量 μl(O ₂) hexestrol 添加 対照	効果 %
A 沈澱	302 204	147%
B "	330 145	227%
C "	324 310	104%
D "	292 309	95%
E "	297 198	150%
F "	341 354	96%

澱とする)同様遠心分離して集めたものに就て実験した。その成績は第9表の様に E 沈澱で hexestrol による活性化作用は 150%に達しているが、F 沈澱では此の様な作用は見られず僅かに阻害作用を認めた。

§ 10 hexestrol の琥珀酸酸化酵素系に及ぼす活性化作用と酵素調製時の抽出用緩衝液、調製酵素懸濁用緩衝液及び測定時緩衝液の種類及び濃度による変動

心臓筋肉の琥珀酸酸化酵素の hexestrol による著しい活性化作用が前節の如く酵素調製方法により著しい強弱を示す事を知つたので、此の活性化を受ける因子が酵素調製時の抽出用緩衝液或は酵素の懸濁用緩衝液及び活性測定に際しての緩衝液の種類に依つても影響を蒙るものであるか否かを知る爲次の実験を行った。その成績は簡明を期す爲表示すると10表の様である。即ち酵素抽出液或は調製酵素溶解液及び測定時緩衝液に磷酸緩衝液を使用し

第10表 hexestrol の酵琥珀酸酸化酵素系に及す活性化作用と酵素調製時の抽出用緩衝液、調製酵素懸濁用緩衝液及び測定時緩衝液の種類及び濃度による変動

酵素抽出用緩衝液	pH	酵素調製法	酵素懸濁用緩衝液	pH	酵素活性測定時緩衝液	pH	酸素吸収量 μl(O ₂)		効果 %
							対照	hexestrol 添加	
M/20 磷酸緩衝液	7.2	10,000×g 遠心酵素	M/10 磷酸緩衝液	7.2	M/10 磷酸緩衝液	7.2	250	356	143
					M/20 "	7.2	282	490	170
					蒸溜水	7.0	240	480	200
					M/10 磷酸緩衝液	7.2	245	392	160
					"	7.6	150	234	160
					"	8.0	133	193	145
					"	8.5	115	198	172
					M/10 磷酸緩衝液	7.2	307	357	120
					蒸溜水	7.0	250	218	86
					0.25M 蔗糖液		806	752	94
					0.9% 氯化鈉液		284	306	115
					M/10 Tris-緩衝液	7.2	520	437	85
					M/10 磷酸緩衝液	6.8	185	270	146
					M/10 磷酸緩衝液		220	253	116
M/20 磷酸緩衝液	7.2	pH 5.8 酸性沈澱酵素	M/20 "	7.2	M/10 磷酸緩衝液	7.2	725	730	有差なし
					M/20 "	7.2	228	302	133
					M/10 "	7.2	31	81	260
					M/10 磷酸緩衝液	7.0	54	30	67
					蒸溜水	7.0	64	47	74
					M/10 磷酸緩衝液	7.0	66	87	132
					蒸溜水	7.0	66	89	134
					M/10 "	7.2	440	490	112
					M/20 "	7.2	384	426	110
					M/10 "	7.2	198	265	133
					蒸溜水	7.0	47	65	138
					M/40 磷酸緩衝液	7.2	88	107	122
					蒸溜水	7.0	38	53	153
					M/40 "	7.0	270	324	129
M/40 "	7.0	10,000×g 遠心酵素	M/5 磷酸緩衝液	7.0	M/10 磷酸緩衝液	7.0	195	423	209
					M/10 氯化鈉液	7.0	232	426	184
					M/10 "		155	285	184
					M/40 "	7.0	232	423	183
					M/40 氯化鈉液	7.0	93	334	364
					M/40 磷酸緩衝液		82	553	675
							96	475	495

た場合は、燐酸イオン濃度に関係なく琥珀酸酸化作用の測定値は大きく、hexestrol 添加に依る活性化作用の程度は 115%～170%の間にある。無機燐を含まない炭酸重曹緩衝液で抽出した場合の成績はその濃度が M/10 の場合には hexestrol による活性化作用が現れずに却つて阻害作用を呈した。酵素抽出及溶解に M/20 燐酸緩衝液を用い、0.25M 蔗糖液を測定時緩衝液とした場合酸性沈澱酵素では活性化を示したのに反し、10,000 × g, での沈澱酵素では僅かに阻害作用を認めた。M/20 Tris 緩衝液で測定した場合にも活性化作用は認められなかった。又 pH の影響としては此実験の pH 6.4～pH 8.5 の間では活性化作用の低下を認めず緩衝液の種類に依り左右される様であり、抽出液として M/40 炭酸—重曹緩衝液を酵素の溶解及測定用として M/40 塩化加里—炭酸重曹緩衝液の組合せて行った場合には 10 表にみられる様に活性化作用が最も強く 364%～675%にも達しているのを認めた。

第 4 章 総括並びに考按

生物に対する性 hormones の作用を検討する手段として in vitro に於ける酵素に及ぼす hormones の直接的な影響が漸次追求され始めた。併し現在迄に hormones が或る特定の酵素系又は酵素を活性化したと云う成績は、之を阻害したという報告に比較して少なく、Villem & Hagerman⁽⁴⁵⁾ ('53), Villem⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁶⁾ ('53) ('55), Villem & Gordon⁽¹²⁾⁽⁴⁷⁾ ('56), Villem⁽⁴⁸⁾ ('57) 等の一部の成績を除いては、Meyer & McShan⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾ ('47) ('50) ('53), Hochster & Quastel⁽¹⁴⁾ ('49), Wight & Burk⁽⁵⁰⁾ ('49), Kalman⁽¹⁵⁾ ('53), 河田⁽¹⁷⁾ ('54) 等の成績は凡て阻害的である。従つて本実験に見られた様に牛、白鼠、鳩、豚、雞等の動物組織の内、心筋の琥珀酸酸化酵素系のみが estrogen 特に hexestrol に依つて著しい活性化作用を受ける事は確かに特筆すべき現象であると信じる。併し其活性化の詳細は凡て明確であるとは云えないが、添加した hormone の種類、hormone の添加量、酵素源、酵素の新鮮度、酵素の調製状態等により発現の程度が異なり、先ず添加した hormones と活性化作用の関係は § 1, § 2 の如く此実験の範囲内では hexestrol の 2×10^{-4} M が最適でそれより低濃度では其作用が低下し、 1×10^{-5} M では殆ど皆無となる事は、以前桂⁽¹⁸⁾ ('54) が犬の心筋の琥珀酸酸化作用に及ぼす種々の濃度の thyroxin の影響を観察して thyroxin 濃度 0.1～1.0 μ g/ml の範囲では酵素の活性化を来し、0.06 μ g/ml 以下では無影響、5～6 μ g/ml では強い抑制作用が見られたと報じている如く添加した hormone の量に左右される事も明瞭である。

他方 hormones の構造式と酵素に及ぼす影響との関連を説いたのは Meyer, Mc Shan & Erway⁽²²⁾ ('47)

等で、白鼠肝臓 homogenate 中の琥珀酸脱水素酵素が合成発情物質及び estrone 等により阻害される事は此等物質の phenol 基の存在に依るものとして、phenol 基を持たぬ estrone の硫酸塩では此の様な阻害作用がなく又 hexestrol の一方の phenol 基を acetyl 化すると阻害効果が $\frac{1}{4}$ に低下すると述べた。其後 Wight & Burk⁽⁵⁰⁾ は腫瘍 homogenate よりの mitochondria 区分の実験で琥珀酸脱水素酵素が diethylstilbestrol で阻害され、此現象が progesterone や testosterone を同時に添加する事により減弱又は消失するとして單に構造式からではなく hormone の生理作用の拮抗性からの説明を企てた。然し Kalman⁽¹⁵⁾ ('53) は白鼠肝臓 homogenate を用いて testosterone の阻害作用を認めているし、曾て河田⁽¹⁷⁾ ('54) も家兎肝臓 homogenate での実験で estrogen のみならず progesterone に依つても阻害される事を見ている事からも單に phenol 基を有する合成発情物質のみに特異的なものでなく、in vitro では必ずしも testosterone や progesterone が常に estrogen に拮抗的な結果を示すとは云い得ない様である。本実験でも § 1 及び § 4 で明かな様に sterin 核を有する estrone, estradiol, progesterone, testosterone, MAD 等の hormones 或は sodium cholate の如き有機物質或は sterin 核を持たぬ hexestrol, diethylstilbestrol でも此の様な活性化作用が認められる事は sterin 核の存在のみに活性化を歸する事も無理である。又 benzol 核に近い pyridin 核を持つ aminocordin が 150% の活性化を示したのに対し同じ核を有する nicotinamide では此作用が見られなかつた事及 estradiol, hexestrol, diethylstilbestrol, testosterone, progesterone, MAD 等の如く各々化学構造式並に生理作用の異つた hormones に依つて活性化作用を示す事は此等 hormones の生物学的特異作用や構造式の差異に依つては直ちに説明する事は困難である。

次に hormones の作用部位に就てであるが、之に関して Case & Dickens⁽⁷⁾ ('48) は白鼠肝臓を用いて研究し、1, (4'-hydroxy-phenyl) 2-phenylethane が琥珀酸酸化酵素系全体の酵素作用を阻害すると同時に cytochrome oxidase 及び琥珀酸脱水素酵素を夫々阻害するのに対し、4,4'-dihydroxy-stilbene は琥珀酸酸化酵素系全体を阻害する丈に止まり、cytochrome oxidase や琥珀酸脱水素酵素の作用に影響せぬ事から、此作用部位は cytochrome oxidase の前段階にある未知の部位に存するのであらうと推論している。又 Gordan 等⁽¹⁰⁾ ('51) は白鼠脳を用い琥珀酸脱水素酵素に及ぼす stilbestrol の阻害が methylene blue で防止出来るが、glucose を基質に選んだ実験では不可能であつた事から stilbestrol の侵襲点は cytochrome 系より前の flavo-

proteinより先にあるとしている。最近 Ball & Wolff⁹⁾ ('57) が thyroxin の添加に依つて琥珀酸酸化作用を著しく活性化した事を述べ之は琥珀酸脱水素酵素の有力な阻害物であるオキザロ酢酸の形成が thyroxin により防止される爲であるとした。本実験でも活性化作用部位は琥珀酸脱水素酵素とは考えられず (§ 5. 1.), 又 Cytochrome oxidase とも考えられない (§ 5. 2, 3). 兩者でないとするは Case & Dickens の述べる様に未知の段階の Slater factor に在るのかも知れないし又 Ball 等の述べる様に琥珀酸脱水素酵素を阻害する物質例えば林檎酸, オキザロ酢酸の産生を阻害する爲に2次的に此酵素系を活性化するのもかも知れない。又 Claude⁸⁾ ('49), Swanson & Artom³⁵⁾ ('50), Sumner³⁴⁾ ('52), Tulpule & Williams⁴⁰⁾ ('55) は mitochondria 中に高濃度の lipid 物質を認め酵素活性に何等かの関係があるものとしているので, hexestrol が琥珀酸酸化酵素系に結びついている lipid を融解する爲に, 其酸化が活性化されるのでは無いかという点で § 6, 1 の実験を行つたが結果は否定的であつた。更に本来の酵素が蛋白質に mask されており此蛋白質の分解が活性化作用の本態であるのではないかと云う可能性も同じく2の実験で否定出来る (§ 6).

以上の様に此活性化現象の機序の解明は容易でないが引続き之を検討する爲に酵素調製法を種々に変化して活性化の見える区分に就て行つた実験は § 9 で明かな様に pH 5.8 として得られた沈澱では hexestrol による著しい活性化作用が認められるのに反し, pH 5.2 の酵素では此様な作用が認められない事は後者の場合には酵素の琥珀酸酸化酵素系の活性が既に充分現れている爲, 之に hexestrol を添加しても其れ以上の活性化が認められなかったのではないかと信じている。又 2500 × g, 10000 × g での沈澱区分では hexestrol による著しい活性化作用を有するのに 20000 × g, 及 25000 × g での沈澱部分には此の様な作用を示さなくなつた事は活性化の促進される因子が細胞構造と相当強固に結合しているものである事を暗示する。更に此事に就て詳しく追求する目的で酵素抽出用緩衝液, 調製酵素溶解用緩衝液, 活性測定用緩衝液等の種類及濃度に就て検討を加えた。此問題に就ては既に Slater³⁰⁾ ('49) が調製時の緩衝液, 金属イオンの影響を研究し, Bonner⁵⁾ ('50) は測定用緩衝液に就て実験し, 磷酸緩衝液を使用すると炭酸緩衝液の場合に比して5倍以上の酸素吸収量を認め, 更に磷酸緩衝液に globin を添加すれば其活性は尚一層強くなると述べている。Altmann¹⁾ ('53) も又磷酸緩衝液に Vesene を附加すると同様の現象がみられるのみならず酵素中の重金属イオンに依つても影響され Ca^{++} , Al^{+++} , Cr^{+++} では有意差を認めないが Cu^{++} , Zn^{++} 等では可成りの活性化を認めると

報告した。Kearney 等¹⁸⁾ ('55) も此等に就て実験し, 彼女¹⁹⁾ ('57) は牛心筋の琥珀酸脱水素酵素の活性化物質として磷酸をあげているし, 又一定時間, 一定温度に保つ事に依つても活性化を増加する事を述べている。

本実験は琥珀酸酸化酵素系に就て行つたものであるが, 此場合には蔗糖溶液, Tris 緩衝液を使用すると琥珀酸酸化作用は最も強いにも拘らず hexestrol の影響は寧ろ阻害的である。之は hexestrol により活性化を受けべき因子が之等の緩衝液では既に十分活用し盡されている故にそれ以上 hexestrol による活性化が見られず, 見かけ上僅かに阻止作用を示すのではないかと考えられる。他方磷酸緩衝液を用いて hexestrol を添加すれば上に反して hexestrol の活性化作用が見られる。但し磷酸の濃度と活性化作用の間には平行関係は認められなかつた。hexestrol の活性化が最も顯著に現れたのは M/40 塩化加里—炭酸重曹緩衝液を用いた場合で, 此時は対照の酸素吸収量が非常に少いにも拘らず hexestrol の活性化作用が約 700 倍に及ぶ酸素吸収量として認められたのは恐らく此緩衝液中では hexestrol を添加しない場合には, 活性化を受ける因子が極めて活用されにくい状態にある爲かもしれない (§ 10).

最後に摘出直後の心臓から調製した酵素では hexestrol 添加による活性化作用が認められるが一定時間放置した酵素では此様な作用が消失する事及肝臓では常に hexestrol に依り阻止作用を認める事等は一應次の假定に或程度の示唆を與えるものと考え (§ 7). 即ち屠殺直後の心臓か? 調製した酵素中には本来の琥珀酸酸化酵素の前段階として存する物質——假にプロ酵素と呼ぶ——があり, 之を hexestrol が速かに本来の酵素に変化させ得るものであるのかも知れない。従つて hexestrol は此假定的なプロ酵素が所謂活性型酵素に変化する過程を促進する事により琥珀酸酸化酵素系の活性化を惹起し, 既に活性型酵素となつたもの例えば肝臓その他の組織中の酵素に対しては却て阻害作用を示すと考えれば一應今迄の実験成績を説明するに足りると思ふ。併し現在に至る迄プロ酵素そのものを証明していないので此点の詳細は尚将来の研究に俟つべきものであると信じる。

第5章 結 論

第1編に引続き牛心臓筋肉を用い琥珀酸酸化酵素系に及す性 steroids 及合成発情物質の影響をみた処, 之等物質が著しく其酵素作用を高め特に hexestrol により著明に促進されたのでその作用機序に就て検討した。

(1) 琥珀酸酸化酵素系の活性化は性 steroids 及合成発情物質に依つて現れるが, hexestrol に最も著しい事を認めた。(2) hexestrol に依る活性化作用は終末濃度 $1.5 \times 10^{-3} \text{M}$ から $2 \times 10^{-5} \text{M}$ の実験範囲で 2×10^{-4}

M添加により最も強く認められ、之より低濃度では殆ど影響なく、又 2×10^{-3} M の如き高濃度では却て阻害作用を認めた。(3) 此活性化作用は動物の種類に関係なく心筋にのみ特異的であつた。(4) hexestrol に依る活性化作用に似た現象が sodium cholate, aminocordin 等でも認められたが、digitalis 配糖体、nicotinamide には此様な作用を認めなかつた。(5) hexestrol による琥珀酸酸化酵素系の活性化作用は琥珀酸脱水素酵素及 cytochrome oxidase のいずれの部位でもない。(6) 牛心筋中の lipase, protease に対して hexestrol は何等の影響も與えなかつた。(7) hexestrol による活性化作用は屠殺直後の牛心筋より調製した酵素に最も強く時間の経過と共に低下し72時間では却て阻害作用を示した。此様な傾向は調製酵素を長時間放置した場合及屠殺後時間を経た牛心筋より調製した酵素にも認められた。(8) 上述の経過を人為的に短時間に実験し、即屠殺直後の牛心筋より調製した hexestrol による活性化作用を認める酵素でも40°C恒温槽に60分以上置けば hexestrol 添加による活性化作用は消失する。(9) 本活性化作用は酵素調製状態により異り、粗酵素液及 pH 5.8 の沈澱区分に著しく、pH 5.2 の沈澱区分では消失する。又2500 × g, 10000 × g の遠心分離区分で上記の活性化作用が認められるが、20000 × g の沈澱区分では此様な作用は示さなかつた。(10) 酵素抽出用緩衝液として M/40 炭酸一重曹緩衝液を、調製酵素溶解用及び活性測定用緩衝液として M/40 塩化加里—炭酸一重曹緩衝液を用いた場合には hexestrol 添加による活性化作用が最も強く約 364% ~ 675% に達している。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を頂きました大阪大学薬学部生化学教室上原教授並びに部長足立博士に心から深謝致しますと共に種々御助言を賜った大阪大学医学部生理学教室久保教授に感謝致します。

又熱心に御協力下さった生化学教室菅野学兄及び生化学教室員の皆様に感謝致します。

主要文献

- 1) Altmann et al.: Nature, 171; 77 (1953). —
- 2) 荒川: 日産婦誌, 10; 331 (1958). — 3) Ball et al.: J.B.C., 224; 1083 (1957). — 4) Batteli & Stern: Bioch. Z., 30; 171 (1910). — 5) Bonner: Nature, 165; 757 (1950). — 6) Burris: In "Ma-

nometric" Techniques & Tissue Metabolism" (1949). — 7) Case & Dickens: Bioch. J. 43; 481 (1948). — 8) Claude: Advances in Protein Chem., 5; 423 (1949). — 9) Green: Bioch. J., 30; 629 (1936). — 10) Gordan et al.: Annals of the N.Y. academy of science, 54; 531 (1951). — 11) Gordon & Villee: J.B.C., 216; 203, 215 (1955). — 12) Gordon & Villee: Endoc., 58; 150 (1956). — 13) Hagerman & Villee: J.B.C., 203; 425 (1953). — 14) Hochster & Quastel: Nature, 164; 865 (1949). — 15) Kalman: Endocrin., 52; 73 (1953). — 16) 桂: Endoc., Jap., 1; 109 (1954). — 17) 河田: 日産婦誌, 6; 1333 (1954). — 18) Kearney et al.: Arch. Bioch. & Bioph., 55; 579 (1955). — 19) Kearney: J.B.C., 229; 363 (1957). — 20) Kyank: Zentbl. f. Gynäk., 79; 1633 (1957). — 21) Loeser: Arch. Gynäk., 148; 118 (1932). — 22) McShan et al.: Arch. Bioch. 15; 9 (1947). — 23) Meyer & McShan: Recent Prog. in Hormone Reseach, 5; 465 (1950). — 24) Meyer & McShan: Arch. Bioch. 9; 165 (1953). — 25) 荻原: 標準生化学実験, 1; 217 (1953). — 26) 奥貫: 標準生化学実験, 1; 395 (1953). — 27) Page: Obst. & Gynec. Sur. 3; 615 (1948). — 28) Rona & Lasnitzki: Bioch. Z. 152; 199 (1924). — 29) 斎藤: 日産婦誌, 9; 709 (1957). — 30) Slater Bioch. J. 45; 1 (1949). — 31) Slater: Bioch. J., 46; 495 (1950). — 32) 外山 他: 日産婦東京会報, 5; 15 (1956). — 33) 住谷: 日産婦誌, 8; 439 (1956). — 34) Sumner: The Enzyme 2; 321 (1952). — 35) Swanson & Artom: J.B.C., 187; 281 (1950). — 36) Szent-György: Bioch. Z., 150; 195 (1924). — 37) Thunberg: Skand. Arch. Physi., 22; 430 (1909). — 38) Thunberg: Skand. Arch. Physi., 24; 23 (1910). 25; 37 (1911). — 39) 強口 他: 日産婦誌, 11; 45 (1959). — 40) Tulpule & Williams: J.B.C., 217; 229 (1955). — 41) 植田 他: 8; 137 (1956). — 42) 上原 他: 9; 296 (1955). — 43) Van Slyke: J.B.C., 12; 275 (1912). — 44) Villee: J.B.C., 205; 113 (1953). — 45) Villee & Hagerman: J.B.C., 205; 873 (1953). — 46) Villee: J. B.C., 215; 171 (1955). — 47) Ville & Gordon: Bull. Soc. Chim. belg., 65; 186 (1956). — 48) Villee: Fertil. & Steril., 8; 156 (1957). — 49) Wang & Hellman: Bull. Johns Hopk. Hosp. 73; 31 (1941). — 50) Wight & Burk: Federa. Proc., 8; 265 (1949). — 51) Wislocki & Dempsey: Endoc., 38; 40 (1946).

(特別掲載 No. 1058 昭34・6・5 受付)