

胎児ヘモグロビンの酸素平衡機能に対する 有機リン酸塩の効果

大阪大学医学部産科婦人科学教室(主任:足高善雄教授)

清水 克彦

概要 胎児血と成人血の酸素親和性の差を究明する目的で成人ヘモグロビン(HbA)と胎児ヘモグロビン(HbF)の酸素平衡機能に対する2,3-ジホスホグリセリン酸(DPG)およびアデノシン3リン酸(ATP)の作用を比較検討した。

- 1) リン酸塩を含まない溶液では HbA のほうが HbF より酸素親和性が高い。
- 2) これらの溶液に DPG または ATP を加えると、いずれも著しい酸素親和性の低下が認められたが、HbF は HbA よりもその程度が小さかった。
- 3) 血球内の生理的濃度に相当する $2 \times 10^{-3} \text{M}$ の DPG を加えると、HbF のほうが HbA よりも酸素親和性が高くなり、またこれらの値は HbA, HbF とも血球の場合の酸素親和性とよく一致した。
- 4) ヘモグロビンと DPG および ATP の結合定数を求めると pH 7.0, 7.4, 7.8 においてつねに HbF のほうが HbA より小さく、HbF とこれら有機リン酸塩との結合が HbA より弱いことが明らかとなった。
- 5) 上記成績から胎児血が成人血より酸素親和性が高いのは、HbF が HbA とくらべて DPG, ATP などの有機リン酸塩によるアロステリック阻害作用を受けにくいことによるものであると結論した。

まえがき

胎盤におけるガス交換の機構を解明することは産科生理学における重要な課題の一つである。この目的のためには母児血液の酸素平衡機能がまず明らかにされなければならない。

この問題を最初にとり扱ったのは Haselhorst & Stromberger¹²⁾ で、かれらは母児血液の酸素分圧、酸素飽和度を酸素平衡曲線とともに測定し、酸素飽和度は両血液間で差が認められないのに対し、酸素分圧は胎児動脈血よりも母体静脈血の方がつねに高いことを見いだした。したがって胎児は母体よりも酸素分圧の低い状態にあり、胎盤における母体から胎児への酸素供給は、分圧差による物理的拡散によつて行なわれると考えられた。胎盤におけるガス拡散の機作に関しては、Wulf²⁶⁾, Bartel⁵⁾ の総説に詳しく述べられている。

上記現象を酸素平衡機能からみると、胎児血が母体血よりも酸素親和性が高いことを意味する。この事実はその後多くの研究者¹⁾¹⁸⁾¹⁴⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾により確認され、また他の動物についても同じことが

実証されている。そしてこの現象は子宮内の低酸素環境に対する胎児の側からの生物学的適応現象であると考えられてきた。

一方、胎児血中には成人ヘモグロビン(HbA)とはアルカリに対する抵抗性の異なつた別種のヘモグロビン胎児ヘモグロビン(HbF)が存在することが、Brinkman ら⁹⁾と Haurowitz¹³⁾ らによつて明らかにされた。さらに、ヘモグロビン分子のサブユニット構成は HbA では $\alpha_2\beta_2$ であるのに対し HbF では $\alpha_2\gamma_2$ である。 β 鎖と γ 鎖はともに146個のアミノ酸から構成されている点については同一であるが、一次構造上39個所でアミノ酸置換が認められている。HbFの物理化学的性質、臨床的観察などについては Kleihauer¹⁷⁾ の総説がある。

前述の胎児血と成人血の酸素親和性の差の原因として、従来から HbF と HbA の分子としての酸素親和性の差が考えられてきたが、近年になつてヘモグロビンが存在する血球内環境の差を重視する説が提出された。すなわち、Leibson ら¹⁸⁾ は胎児血に含まれている HbF の分子としての酸

素親和性が Hb A のそれより高いことがそのまま全血の酸素親和性の差に反映していると考えた。ところがその後 McCarthy¹⁹⁾ Haurowitz¹⁸⁾らは溶血液で比較すると、血球浮遊液の場合と逆に成人溶血液のほうが胎児溶血液よりも酸素親和性が高くなることを発見した。また Allen¹⁾らはこれらの溶血液を同じ媒質に対して透析すると Hb A と Hb F の酸素親和性が全く等しくなることを認めた。これらの成績から、胎児血と成人血の酸素親和性の差は、Hb A と Hb F の分子としての機能のちがいによるものではなく、ヘモグロビンのおかれている血球内環境、すなわち血球膜の性質、血球内 pH、および透析性成分などが胎児血球と成人血球で異なるためであろうと考えられた。

他方、最近 Benesch⁷⁾⁸⁾らは赤血球中に多量に存在する 2, 3-ジホスホグリセリン酸 (DPG) アデノシン 3 リン酸 (ATP) などの有機リン酸塩が Hb A の酸素親和性を著しく低下させることを見だし、とくに赤血球中の有機リン酸塩の 50% をしめる DPG がヘモグロビンと酸素の結合に関するアロステリック阻害剤となつていゝことを明らかにした。また成人血と胎児血の DPG 含量については、Zipursky ら²⁸⁾ Schröter & Winter²⁴⁾によると両者の間に有意の差が認められない。

以上の見地から、著者は胎児血と成人血の酸素親和性の差を究明する目的で、Hb A と Hb F の酸素平衡機能に対する DPG および ATP の作用を比較検討した。

実験材料と方法

Hb A は次の方法で作製した。成人静脈血を 0.9% NaCl で 3～5 回洗滌、遠沈し、赤血球のみを集め、1～1.5 容の脱イオン水を加えて溶血した後、12000 g、15 分間遠沈した上清部分を採取する。ふつう溶血に用いるトルエンは、ヘモグロビンの変性を少なくするため用いなかた。次にこの溶血液を Benesch ら⁸⁾の方法にしたがい処理した。すなわち 0.1M NaCl で平衡させたセファデックス G25 カラムを通し、血球中に含まれ

ているリン酸塩を除去した後、目的とする pH の 0.01M トリス塩酸緩衝液で平衡させたセファデックス G50 カラムを通したものを Hb A 溶液として用いた。

Hb F の単離は次のように行なつた。臍帯血からさつきと同じ方法で得た Hb A と Hb F の混合溶血液を Zade-Oppen²⁷⁾の方法に準じて処理した。すなわち 0.04M NaCl を含む 0.05M リン酸緩衝液で平衡させた CM セファデックス カラムに混合溶血液を吸着させ、食塩の濃度勾配を用いてこの溶血液から Hb F と Hb A を単離した。単離した Hb F 分画はさらにさきと同条件のセファデックス G50 カラムを通し、これを Hb F 溶液として用いた。

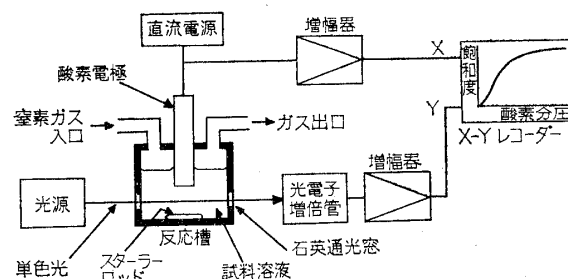
上記から明らかなように使用したヘモグロビン溶液の溶媒は 0.01M トリス塩酸緩衝液で pH は 7.0, 7.4, 7.8 の 3 種類とし、濃度はシアノメトヘモグロビン法により定量し $1.5 \times 10^{-5} \text{M}$ に統一した。なおヘモグロビン溶液はすべて採血後一週間以内のものを用いた。

無機リンの定量は Ames & Dubin²⁾の方法により、DPG の定量は Bartlett⁶⁾の方法で行なつた。その結果上記の方法で得た Hb A, Hb F の溶液には測定誤差以内のリン酸塩しか含まれていないことを確認した。

DPG は、Calbiochem 社製、cyclohexylammonium 塩を Dowex 50X 8 型樹脂で H 型に転換した後所定の pH に調整して用いた。ATP は Sigma 社 99% disodium 塩を使用した。セファデックスなどの他の試薬はいずれも特級品を用いた。

酸素平衡曲線の作製は図 1 に示す今井ら¹⁶⁾の自

図 1 酸素平衡曲線自動記録装置



動記録装置によつた。反応槽にヘモグロビン溶液を6~7 cc入れ、攪拌しながら高純度窒素（日本酸素製，99.999%）を送気して、徐々に脱酸素化を行なつた。この過程中、溶液の酸素分圧（ pO_2 ）はクラーク型酸素電極より得た出力を大倉電機製 AM-2001型直流電圧計によつて増巾し記録した、酸素電極の較正は、空気を送気したときの出力を（大気圧 $\times 0.21$ —水蒸気圧）とし、反応の最終点の出力を酸素分圧0として行なつた。一方同時に酸素飽和度を測定した。すなわち、Hitachi Perkin-Elmer 139分光光度計により、ヘモグロビン溶液を大気と平衡させたときの560 $m\mu$ における透過度ならびに酸素飽和度を100%として、脱酸素化による透過度の減少を記録し、最終点を酸素飽和度0と定めた。上記酸素分圧と酸素飽和度の2つのアナログ出力をRiken-Denshi製、F-32型XYレコーダーのX軸およびY軸にそれぞれ接続し自動記録した。反応槽の温度はタカラサーミスタ STM-01-3型温度計とサーモジュールを組み合わせた自動温度制御装置によつて制御し、25 $\pm 0.2^\circ C$ に保持した。測定終了後、溶液中のメトヘモグロビン量は Evelyn & Malloy¹⁰⁾法で測定したが、全試料について8%以内であつた。

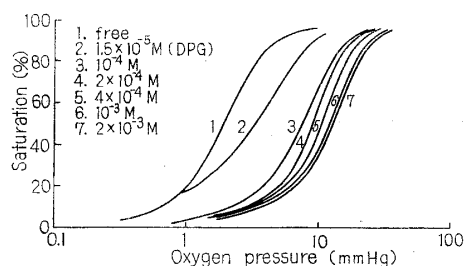
実験成績

A. DPG添加による酸素平衡曲線の変化

リン酸塩をまったく含まない Hb A 溶液に DPG を段階的に加えていつたときの酸素平衡曲線を図2に示した。縦軸には酸素飽和度（ sO_2 ）を、横軸には酸素分圧（ pO_2 ）の対数をとつてある。これから明らかなように、添加 DPG 量の増

図2 HbA の酸素平衡機能に対する DPG の効果

Hb 濃度 $1.5 \times 10^{-5} M$
0.01M トリス塩酸緩衝液
pH 7.4 25 $^\circ C$



加にともない曲線は右方へ移動する。この現象はすでに Benesch ら⁸⁾によつて示されているとおりである。いま曲線の位置（酸素親和性）の指標として、酸素飽和度が50%に達するのに必要な酸素分圧、 P_{50} を用いると、リン酸塩を全く含まない場合には pH 7.4 で $\log P_{50}$ が 0.304 であるのに対し、 $2 \times 10^{-3} M$ の DPG 存在下では $\log P_{50}$ は 1.11 となる。

一方酸素平衡曲線の形は、曲線2を除き、DPG の存在に無関係である。Hill の式

$$\log \frac{sO_2}{100-sO_2} = n \log pO_2 + \log K \quad (1)$$

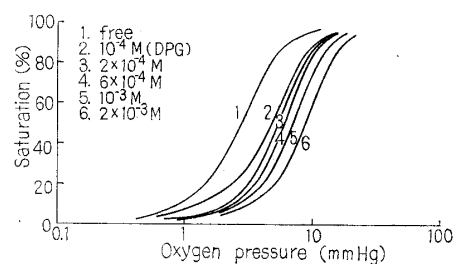
(Kは定数)

から曲線のS字状性を規定するn値を求めると2.4から2.9の範囲であつた。

Hb F について同様の実験を行なつた結果を示すと図3のようである。

図3 HbF の酸素平衡曲線に対する DPG の効果

Hb 濃度 $1.5 \times 10^{-5} M$
0.01M トリス塩酸緩衝液
pH 7.4 25 $^\circ C$

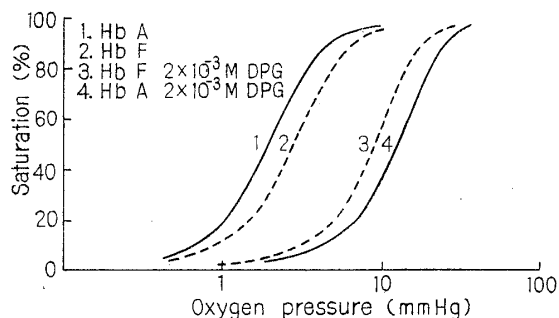


すなわち、Hb F に対する DPG の効果は定性的には Hb A に対するものと同じで、n 値には変化を与えず（2.3~2.8）、曲線の位置のみを右偏させる。ただしその程度は Hb A より明らかに小さく、pH 7.4 における $\log P_{50}$ の値はリン酸塩を含まない場合 0.45、 $2 \times 10^{-3} M$ の DPG 存在下で 0.96 であつた。

この点をより明確にするために、DPG の共存する場合としない場合について Hb A と Hb F の酸素平衡曲線を比較したのが図4である。

まず DPG の存在しない場合には Hb A のほうが Hb F より酸素親和性が高く、前述の Mc Carthy¹⁹⁾の成績と一致した。これに $2 \times 10^{-3} M$ の DPG を添加すると、Hb A では曲線1.から曲線4.ま

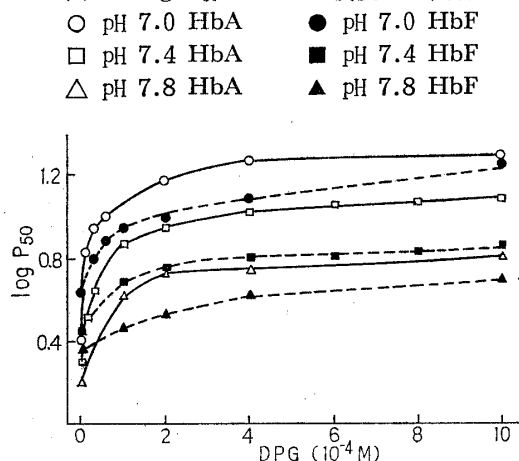
図4 HbA と HbF の酸素平衡曲線に対するDPG効果の比較



で移動するのに対し、Hb F では曲線2.から曲線3.までの変化にとどまった。曲線の移動度を $\Delta \log P_{50}$ で示すと、Hb A では0.81, Hb F では0.41となり Hb A の半分にすぎない。

B. DPG効果とpH

次にDPGの酸素親和性減少効果とpHとの関係を示したのが図5の成績である。まずDPGが存

図5 $\log P_{50}$ と DPG濃度との関係

在しない場合には、いずれのpHにおいても Hb A のほうが Hb F より $\log P_{50}$ が小さい(酸素親和性が高い、表1参照)が、DPG添加による $\log P_{50}$ の増加度は Hb A のほうが大であるため、曲線は途中で交差し、 10^{-4} M以上のDPG存在下では、どのpHにおいても Hb A のほうが Hb F より酸素親和性が低くなることが認められる。また、Hb A, Hb FともにpHが高くなるほどDPGの作用が著明でなくなり、両者の交点も右へ移動する。

C. 全血の酸素親和性との比較

以上の成績から、胎児血と成人血の酸素親和性の差は、Hb Aと Hb F のDPGによる酸素親和性減少度の差異に基因すると考えられるので、次に赤血球内の生理的濃度に相当する 2×10^{-3} MのDPG共存下の酸素親和性を全血のそれと比較した。ただし全血の値は Hellegger & Schrufer¹⁴⁾の式と Astrup ら⁴⁾の温度係数の値から換算したものである。結果は表1に示すように両者間にはかなり良い一致がみられる。

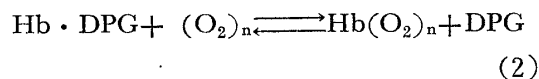
表1 全血とヘモグロビン溶液の酸素親和性($\log P_{50}$)の比較

	pH	DPGなし	2×10^{-3} M DPG	全血 pH 7.4 25°C
Hb A	7.0	0.40	1.30	1.28
	7.4	0.30	1.11	1.10
	7.8	0.21	1.07	0.98
Hb F	7.0	0.63	1.30	1.22
	7.4	0.45	0.96	0.98
	7.8	0.36	0.81	0.74

また表1の値から $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ で示される Bohr 効果の程度を計算すると、DPGを含まない場合には Hb A で0.22, Hb F では0.35, 2×10^{-3} M DPG共存下では Hb A 0.29, Hb F 0.62となり、いずれの場合でも Hb F のほうが Hb A より大であつた。なお、ヘム間相互作用の指標である n 値は、前述のようにDPG共存の有無にかかわらず Hb A と Hb F で有意の差は認められない。

D. DPGとヘモグロビンの結合定数

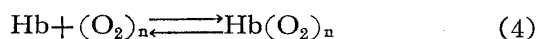
図5の成績から、DPGの結合定数は Hb A と Hb F で異なると推測されるので、次にその算出を試みた。いま Benesch ら⁸⁾にしたがつて、デオキシヘモグロビン (Hb) が酸素と結合する際に Hb に結合していたDPGが離れると考えると、この反応は一般に



と書け、平衡定数を K_s とすると、

$$K_s = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n][\text{DPG}]}{[\text{Hb} \cdot \text{DPG}][\text{O}_2]^n} \quad (3)$$

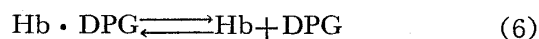
となる。DPGが共存しないとき反応(2)は



となり、平衡定数 K_1 は単純な Hill の式

$$K_1 = \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)_n]}{[\text{Hb}] \cdot [\text{O}_2]^n} \quad (5)$$

で表現される。一方、Hb と DPG の結合は



で表わされ、その平衡定数（解離定数） K_2 は

$$K_2 = \frac{[\text{Hb}][\text{DPG}]}{[\text{Hb} \cdot \text{DPG}]} \quad (7)$$

となる。これらの式から明らかなように、三つの平衡定数の間には、

$$\log K_1 + \log K_2 = \log K_3 \quad (8)$$

という関係が成立する。また、DPG の共存しない場合とする場合の P_{50} を、それぞれ P_{50}^* , P_{50}° で表わすと、上記の関係から、

$$\log K_2 = \log [\text{DPG}] - n(\log P_{50}^* - \log P_{50}^{\circ}) \quad (9)$$

が導かれ、これから K_2 の値を算出することができる。そこで実測値 ($n = 2.3 \sim 2.9$) から得た n の平均値を 2.7 として、式 (9) により全実験例について $\log K_2$ の値を算出し、その平均値をまとめたのが表 2 である。ただし表 2 では $-\log K_2$ すなわち結合定数として示してある。これから明

表 2 Hb A, Hb F と DPG の結合定数
($-\log K_2$) 25°C

pH	7.0	7.4	7.8
Hb A	5.5	5.2	4.9
Hb F	4.6	4.3	4.0

らかなように Hb A, Hb F とともに結合定数は pH とともに小さくなり、またどの pH においても Hb F の結合定数は Hb A のその約 $1/10$ である。

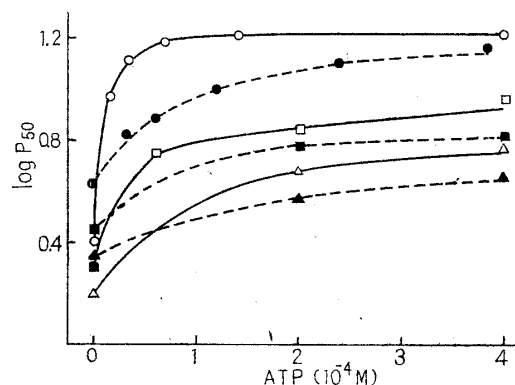
E. ATP の作用

次に DPG 同様赤血球内に多量に存在し、かつ酸素親和性を著明に減少させる作用が知られている ATP について同様の実験を行なった。

図 6 に示したように、ATP の作用は DPG のそれとほとんど同一であつた。すなわち、ATP 添加によつて Hb A, Hb F とともに酸素親和性が減少するが、その程度は Hb A のほうが遙かに大で、 $\log P_{50}$ に対して ATP 濃度をプロットした

図 6 $\log P_{50}$ と ATP 濃度との関係

○ HbA pH 7.0 ● HbF pH 7.0
□ HbA pH 7.4 ■ HbF pH 7.4
△ HbA pH 7.8 ▲ HbF pH 7.8



曲線は途中で交差し 10^{-4}M 以上の ATP 存在下では Hb F のほうが Hb A よりも高い酸素親和性を示した。

表 3 Hb A, Hb F と ATP の結合定数
($-\log K_2$) 25°C

pH	7.0	7.4	7.8
Hb A	5.8	5.0	4.7
Hb F	4.9	4.4	4.2

性を示した。ATP の n 値および Bohr 効果に対する作用も DPG のそれと同様であつた。表 3 は前述の方法でヘモグロビンと ATP との結合定数を求めたものである。表 2 との比較から結合定数は DPG についての値はほとんど等しいことがわかる。

考案と結論

1943 年以来¹⁹⁾、全血ないし赤血球浮遊液で比較すると胎児血のほうが成人血よりも明らかに酸素親和性が高いが、溶血液で比べるとこの関係が逆転し、Hb F 溶液のほうが Hb A 溶液よりも酸素親和性が低くなる事実が知られ、酸素親和性を規定する赤血球内環境因子の重要性が指摘されてきたが、その実体については全く明らかにされていなかった。

ところが最近 Benesch²⁰⁾ らは DPG のヘモグロビンに対するアロステリック阻害効果発現に関連してこの問題に対するきわめて興味ある事実を示

した。すなわち、鳥類の赤血球には有機リン酸塩としてイノシトールヘキサリン酸 (IHP) が多量に存在しているが、この濃度がニワトリの血液の酸素親和性の孵化後減少経過と一致して増加することを指摘した。この事実はアロステリック阻害剤としての IHP の濃度が前述の環境因子であることを示唆するもので注目される。しかしながら成人血と胎児血の DPG 含量については有意の差がないと報告されており²⁴⁾²⁸⁾、著者の予備実験においても確認されている。したがって、人間の場合にはアロステリック阻害剤の濃度差で、前述の全血と溶血液での酸素親和性の差を説明することはできない。

そこで著者は第2の可能として、同一濃度の DPG が存在しても、Hb A と Hb F とでは DPG による酸素親和性の減少度が異なるのではないかと考え、上記の実験を行なった。その結果、図2～6の成績が明確に示すように、まず第1にリン酸を全く含まない場合には Hb A のほうが pH 7.0～7.8 の範囲において Hb F より酸素親和性が高いことが確認された。第2、Hb F の酸素親和性も DPG および ATP 添加により減少するが、その程度は Hb A よりも遙かに小さく、 10^{-4} M 以上の DPG または ATP 共存下では逆に Hb F のほうが Hb A より酸素親和性が大になることが明らかになった。この二つの事実は胎児溶血液と成人溶血液の酸素親和性についての従来の成績の不一致を明快に説明するものである。すなわち、溶血条件により溶血液中の有機リン酸塩濃度は異なるから、その酸素親和性は有機リン酸塩濃度によつて図5、6の曲線上の任意の点をとるわけであり、リン酸塩の最終濃度を規定しない限り、異なつた条件の溶血液について酸素親和性を比較することは無意味である。また、無機リン酸塩も弱いながら DPG と同様の効果があるから、これらの影響も考慮する必要がある。

次に上記の Hb A と Hb F の有機リン酸塩に対する態度の差異が全血の酸素親和性にどのように反映しているかを検討した。図4および表1に示されたように、赤血球内生理的濃度の DPG

共存下では Hb F のほうが Hb A より明らかに酸素親和性が高く、かつこれらの値は同条件について経験式から求められる成人血および胎児血についての値とよく一致した。Hb A についてこのような一致がみられることはすでに Benesch⁸⁾ らによつて報告されている。ただし、赤血球内には ATP も DPG の約 $1/10$ 量存在しているから、真の赤血球内環境を考える場合にはこのことを考慮に入れねばならない。なお酸素平衡曲線の S 字状性、すなわちヘム間相互作用を規定する Hill 式の n 値は有機リン酸塩の共存にかかわらず 2.3～2.9 の値を示し両者の間に有意の差が認められなかつた。Bohr 効果は pH 7.0～7.8 の間においてつねに Hb A よりも Hb F のほうが大きいことが明らかにされたが、有機リン酸塩の Bohr 効果に対する作用については目下示差適定法で検索中である。

第3に Hb F と Hb A の有機リン酸塩に対する親和性の差を定量的に表現するために、それぞれの結合定数を求め、表2、および表3の結果を得た。すなわち、DPG と ATP の Hb F および Hb A に対する結合定数はほぼ同じで、ともに Hb A に対する親和性のほうが全 pH において10倍近く高く、このことが両ヘモグロビンの有機リン酸塩に対する態度の差異の原因となつていることが明確にされた。Hb A について pH 7.0 で得られた結合定数 $-\log K_2$ は Benesch ら⁸⁾ が直接結合実験で求めた値、4.7 より大きい、この差は用いた溶液のイオン強度の差に基因するものと考えられる。

したがって、成人血と胎児血の酸素親和性の差は Hb A と Hb F の分子としての酸素親和性の差異に基因するものではなく、両ヘモグロビンに対するリン酸塩のアロステリック阻害効果の差にあることが結論される。

以上のことを比較生理学的に考えると非常に興味がある。すでに述べたように鳥類では有機リン酸塩の赤血球内濃度によつて全血の酸素親和性が規定されていることを示す成績が発表されており、他方ウサギでは溶血液ないし透析したヘモグロビン溶液で比較しても Hb F のほうが Hb A

より酸素親和性が高く、全血の酸素親和性をそのまま反映していることが明らかにされている²⁵⁾。

したがって上述の結論は一応人間についてのみ妥当するものであつて、他の動物についてはそれぞれ別個の機作が存在する可能性があると考えられる。Rapoport & Guest²²⁾ が各種動物の赤血球内諸種有機リン酸塩の濃度を測定した報告、ならびにHill & Wolvekamp¹⁵⁾ が諸種動物について赤血球浮遊液と溶血液の酸素平衡機能を比較した成績はこの可能性をつよく示唆している。

稿を終るに臨み終始御指導、御校閲を賜った恩師足高善雄教授、直接御指導下さった大阪大学医学部第1生理学教室中馬一郎教授、亘弘助教授、志賀健博士、および実験装置の作成に御助力をいただいた本学基礎工学部小谷研究室今井清博学士、医学部中央研究室黒田正男氏に深く感謝の念をささげます。

文 献

- 1) Allen, D.W., Wyman, J.Jr. and Smith, C.A. (1953): J. Biol. Chem., 203 : 81.—2) Ames, B.M. and Dubin, D.T. (1960): J. Biol. Chem., 235 : 769.—3) Antonini, E., Wyman, J.Jr., Brunori, M., Fronticelli, C., Bucci, E., Reichlin, M. and Rossi-Fanel li, A. (1964): Arch. Biochem. Biophys., 108 : 569.—4) Astrup, P., Engel, K., Severinghaus, J.W. and Munsen, E. (1965): Scand. J. Clin. Lab. Invest., 17 : 515.—5) Bartel, H. (1963): Arch. Gynäk., 198 : 29.—6) Bartlett, R. (1958): J. Biol. Chem., 234 : 469.—7) Benesch, R. and Benesch, R.E. (1967): Biochem. Biophys. Res. Comm., 26 : 162.—8) Benesch, R., Benesch, R.E. Yu, C.I. (1968): Proc. Natl. Acad. Sci., 59 : 526.—9) Brinkman, R., Wildschut, A. and Wittermans, A. (1964): J. Physiol., 80 : 377.—10) Evelyn, K.A. and Malloy, H.T. (1938): J. Biol. Chem., 126 : 655.—11) Hall, F.G. (1934): J. Physiol., 83 : 222.—12) Haselhorst, G. and Stromberger, K. (1935): Z. Gynäk., 100 : 48. | 13) Haurowitz, F. (1935): Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 232 : 125.—14) Hellegers, A.E. & Schrufer, J.J.P. (1961): Am. J. Obst. & Gynec., 81 : 377.—15) Hill, R. and Wolvekamp, H.P. (1936): Proc. Roy. Soc. B., 120 : 484.—16) Imai, K., Morimoto, H., Kotani, M., Watari, H., Hirata, W. and Kuroda, M.: in preparation.—17) Kleihauer, E. (1966): Arch. Kinderheilkunde, Beihefte, 53.—18) Leibson, R.G., Likhnitzky, I.I. Sax, M.G. (1936): J. Physiol., 87 : 97.—19) McCarthy, E.F. (1943): J. Physiol., 102 : 55.—20) Necktman, C.M. and Huisma, T.H.J. (1965): Clin. Chim. Acta. 10 : 160.—21) Oshima, M., Taylor, T.G. and Williams, A. (1963): Biochem. J., 92 : 42.—22) Rapoport, S. and Guest, G.H. (1941): J. Biol. Chem., 138 : 269.—23) Schröder, W.A., Schelton, J.R., Schelton, J.B., Cormick, J. and Jones, R.T. (1963): Biochemistry, 2 : 992.—24) Schroter, W. and Winter, P. (1967): Klin. Wschr., 45 : 255.—25) Tyuma, I., Enoki, Y. and Morikawa, S. (1964): Jap. J. Physiol., 14 : 573.—26) Wulf, H. (1962): Z. Geburts. Gynäk., 158 : 117.—27) Zade-Oppen, A. M.M. (1963): Scand. J. Clin. Lab. Invest., 15 : 491.—28) Zippursky, A., LaRue, T. and Israels, G. (1960): Can. J. Biochem. Physiol., 38 : 727.

(No. 2231 昭44・3・3 受付)