

ヒト病的甲状腺組織における α -naphthyl acetate esterase 活性

— 特に zymogram 分析について —

川崎医科大学 内分泌外科
(指導：妹尾亘明教授)

岡 村 泰 彦

(昭和61年2月26日受付)

α -Naphthyl Acetate Esterase Activities in Diseased Human Thyroid Glands

— Zymogram Analyses —

Yasuhiko Okamura

Division of Endocrine Surgery, Department of Surgery
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 26, 1986)

甲状腺濾胞上皮細胞の agarose 等電点分画泳動を行い, lysosomal enzyme のうちの
一つとしてよく知られている α -naphthyl acetate esterase (ANA-esterase) の酵素電
気泳動像 (zymogram) から, ヒト正常および病的甲状腺組織を比較検討した.

1. 正常ならびに病的甲状腺のいずれにおいても, pI 5.5~8.0 領域に 11本の band が
検出され, pI 6.2 以下の 2 band を除く個々の band の活性強度は各疾患により異なった.
2. 正常甲状腺および機能正常の腺腫様甲状腺腫の zymogram は densitometric
scanning により釣鐘状の pattern をしめた.
3. バセドウ病, 過機能性腺腫様甲状腺腫および濾胞腺腫の zymogram は band III
から X まで全体的に酵素活性が高く台形に近い pattern をしめた.
4. 先天性甲状腺ホルモン合成障害および悪性リンパ腫では各 band がわずかに認めら
れる程度の伏せ皿状の pattern をしめた.
5. 甲状腺癌および橋本病では pI 7.4~7.8 の band X の活性が特異的に高い pattern
をしめた. 癌では二次元電気泳動での分子量約 190K の spot が band X の活性を特異
的に高くした原因と考えられ, 組織型による差は認められなかった.

Esterases are among the most important lysosomal enzymes in thyroid follicular cells, although their physiochemical characteristics are not well known. In the present investigation, the zymogram patterns of α -naphthyl acetate esterase (ANA-esterase), which is a non-specific esterase found in normal and pathological human thyroid follicular cells, were analyzed utilizing agarose isoelectric

focusing (agarose IEF). ANA-esterase activities in the extracts were separated into eleven bands ranging from pI 5.5 to 8.0. When compared with the zymogram patterns of normal thyroid tissue, those of the specimens obtained from patients with thyroid disorders showed peculiar patterns which differed with the type of disorder. Significant differences in the patterns were observed between normal thyroid and hyperthyroidism, including Basedow's disease and Plummer's disease, between adenoma and adenomatous goiter, and between anaplastic carcinoma and malignant lymphoma. Such zymograms might, therefore, be of value in the differential diagnosis of thyroid disorders.

Key Words ① α -Naphthyl acetate esterase ② Zymogram ③ Isoelectric focusing

はじめに

甲状腺ホルモンの合成、代謝には lysosomal enzyme が不可欠であり、lysosomal enzyme に属する、脂肪族と芳香族 ester を加水分解する酵素、esterase には、比較的機能が明らかである esterase 群と、まだその酵素の働きの全貌が把握されていない non-specific esterase がある。Gomori¹⁾ (1952) がこの non-specific esterase について、酵素組織化学的検索により、器官特異性を有することを示唆して以来、動物の各臓器での non-specific esterase の多数の研究報告がある。^{2)~11)} また、近年血球において、Li ら¹²⁾ (1973)、Radzun ら¹³⁾ (1980)、Yourno ら¹⁴⁾ (1984) は組織の cell line により本酵素の酵素電気泳動像 (zymogram) が異なることを報告し、注目を集めつつある。

そこで本研究では、agarose 等電点分画泳動を行い、甲状腺濾胞上皮細胞における non-specific esterase のうちの α -naphthyl acetate esterase (ANA-esterase) の zymogram がヒト正常と比較して病的甲状腺組織でどのような特異性をしめすかを検索し、甲状腺疾患の鑑別診断の一助となりうるか否かという視点から検討した。

1. 材料と方法

実験方法の概要は **Figure 1** にしめた。

1) 材料

手術によって得られたバセドウ病 (7例)、先天性甲状腺ホルモン合成障害 (2例)、腺腫様甲状腺腫 (10例)、濾胞腺腫 (2例)、乳頭癌 (8例)、未分化癌 (3例)、悪性リンパ腫 (5例) および橋本病 (3例) の甲状腺組織と、対照としては甲状腺以外の頸部疾患手術時に得られた正常甲状腺 (8例) を使用した。また正常肝および血球も比較の対照として加えた。組織学的検索はすべての材料について行った。

2) 試料の調整

採取した組織はただちに 4°C で試料調整を行った。採取した組織に 2 倍量の生理的食塩水を加え、解剖用の剪刀を用いて細切し、Polytron homogenizer (PT-10ST) にてホモジナイズし (10秒×3)、超遠心分離後 (10,000 rpm. 20分間 4°C)、その上清を試料とした。試料中の蛋白量の測定は Abbe-3L Refractometer (Bausch & Lomb Optical Co.) を用い、蛋白濃度は 3% W/V に調整し、実験に用いるまで -18°C で冷凍保存した。

3) 分析

a. 酵素化学的分析 (**Fig. 1-I**)

① agarose 等電点分画泳動 (IEF)

手技は Jacyzyn ら¹⁵⁾ および、佐野¹⁶⁾ の方法に多少の改良を加えた。

gel の作成: Agarose IEF (Pharmacia) 1%, sorbitol 12% の溶液内に carrier Ampholine 1818-101 (pH 3.5~9.5, LKB) 15% を加え、ホットプレート上に置いた Gel Bond

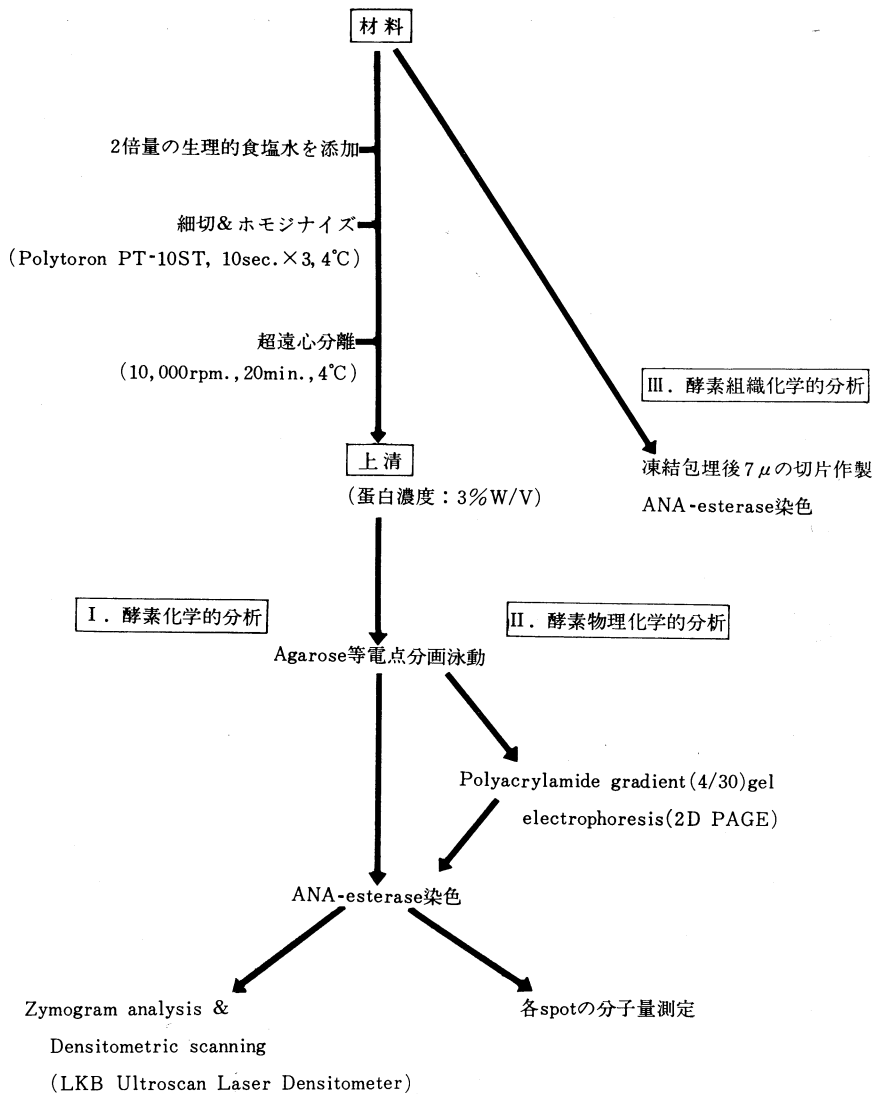


Fig. 1. Methods of the study

(FMC Corp.) の上に注ぎ gel を作成した。

泳動：LKB 2103 Power Supply と LKB 2117 Multiphor 電気泳動装置を使用した。電極液は陽極に 0.5M 酢酸，陰極に 0.5M 水酸化ナトリウムを用いた。あらかじめ泳動槽を 10°C に冷却しておき，1 検体ごとに 3% W/V の試料 20 μ l を 1 枚のサンプル濾紙に含ませて gel 上にのせた。泳動条件は定電力 [(1/2 \times gel の幅 cm)W] で，設定電圧 100V，設定電流 5 mA，20 分間の予備泳動を行った後，サンプル濾紙を取り除き，設定電圧 1500V，設定電流

20 mA で電圧が 850V になるまで約 1.5 時間本泳動を行った。

結果の比較を容易とするため，同一条件で同時に 3 つのサンプルを泳動した。

② 酵素染色

α -Naphthyl Acetate Esterase Kit No. 90-A1 (Sigma) の手技に準じ，若干の改良を加えた。

固定：泳動後の gel を 10% 中性ホルマリン液を用い 1 時間固定を行った後，再蒸留水で水洗した。

染色：再蒸留水 45 ml に Trizmal TM 7.6 Buffer Concentrate (Sigma) 5 ml を加えた溶液を、恒温槽であらかじめ 37°C に保ち、Fast Blue RR Salt (Sigma) 25 mg を加えた。完全に溶解した後 α -Naphthyl Acetate (Aldrich) 20 mg を Ethylen Glycol Mono-methyl Ether (Sigma) 2 ml で溶解した液を加えて30秒攪拌した。上記の染色液にすばやく gel を浸し、37°C、60~80分間反応させた。反応後再蒸留水で水洗し、室温で乾燥した。

乾燥後 LKB 2202 UltraScan Laser Densitometer で scanning を行い観察した。

b. 酵素物理化学的分析 (Fig. 1-II)

次いで物理化学的にその酵素活性を測定するため、agarose IEF 後 4~30% の密度勾配

polyacrylamide gel (Pharmacia) 二次元電気泳動 (2D PAGE) にて各 band を展開した。gel の端に既知の分子量 marker (HMW カリブレーションキット, Pharmacia) を同時に泳動し、それより band を構成する各 spot の分子量を算出した。

c. 酵素組織化学的分析 (Fig. 1-III)

採取した組織を凍結包埋し、cryo-cut (American Optical Co.) で 7 μ の切片を作製し、10% 中性ホルマリンで固定後、 α -naphthyl acetate を基質とし発色反応を行った。

2. 結 果

1) 酵素化学的分析

バセドウ病、腺腫様甲状腺腫および乳頭癌と

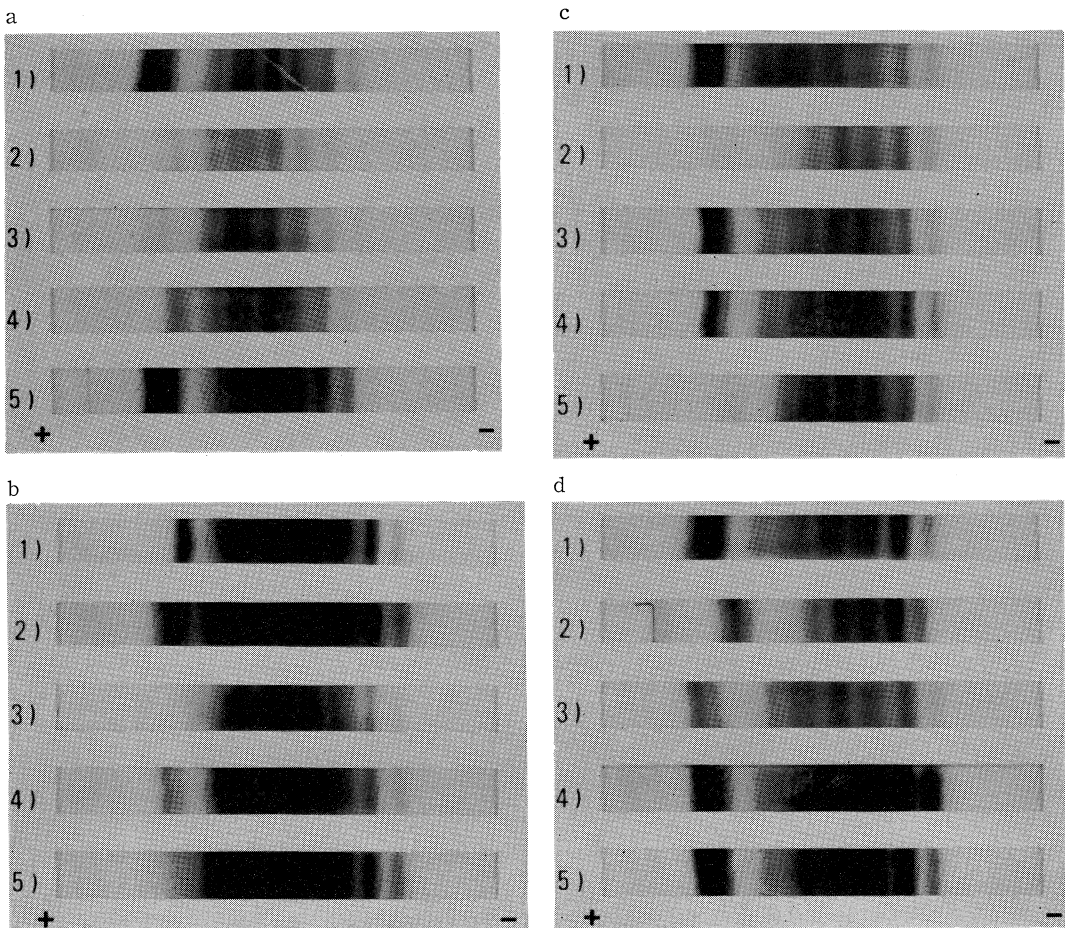


Fig. 2. Zymograms of agarose IEF

a. normal thyroid tissue b. Basedow's disease c. adenomatous goiter
d. papillary carcinoma of thyroid

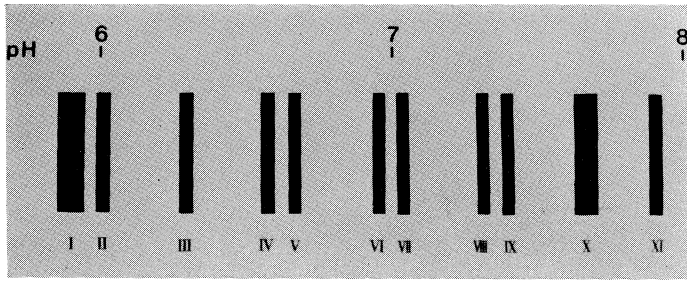


Fig. 3. Scheme of agarose IEF
ANA-esterase activities were separated into eleven bands

対照の正常甲状腺の zymogram を各 5 例ずつ **Figure 2** にしめた。 **Figure 3** は agarose IEF による酵素化学的分析結果より得た zymogram を模式化したもので、正常ならびに病的甲状腺のいずれも、pI 5.5~8.0 領域に 11本の band が検出された。なお band I と II, IV と V, VI と VII, VIII と IX は分離されず 1本の band として現れることもあった。pI 6.2以下の band I, II は症例によってばらつきがあり、

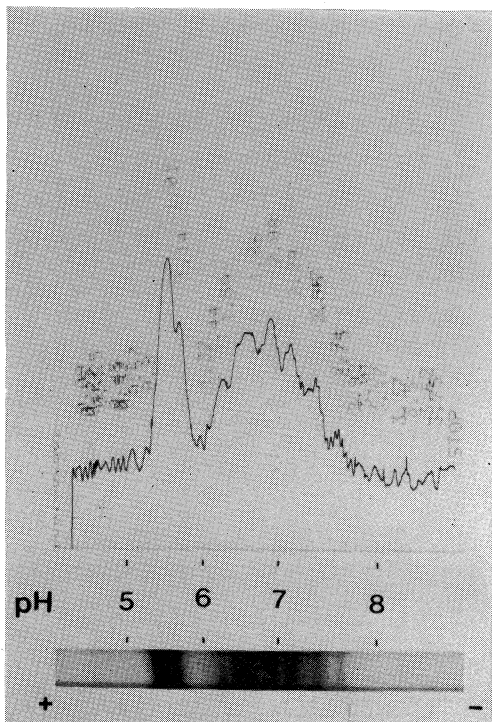


Fig. 4. Zymogram and its densitometric scanning pattern of normal thyroid tissue

また疾患による特徴も認められなかったので、本実験では比較検討の対象から除外した。これに対し band III から XI までには、各疾患により異なった zymogram をしめた。

なお densitometric scanning pattern においては、peak の高さはその band の

染色性の強度すなわち酵素活性強度を表しており、図 (**Figs. 4~13**) の各 peak 点にしめた数値は scan 開始時より peak までの時間をしめた。

a. 正常甲状腺：

zymogram は pI 7.0 近傍の band IV から IX の酵素活性が高く、densitometric scanning pattern の peak を結ぶと左右がほぼ対称形の釣鐘状を呈した (**Fig. 4**)。

b. バセドウ病：

正常に比べて band III から X まで全体的に酵素活性が高く、特に pI 6.2~7.0 の band IV から VII の活性が高く、三角形というよりもむしろ台形に近い pattern をしめた (**Fig. 5**)。

Figure 2 の b. 5 の症例は抗甲状腺剤の使用が不可能で、ステロイド剤とルゴール液の不完全な前処置で甲状腺機能が高いまま手術を行ったが、他のバセドウ病はすべて抗甲状腺剤とルゴール液で機能正常域になった後手術を行った症例である。しかしその両者の zymogram には有意の差が認められなかった。

c. 先天性甲状腺ホルモン合成障害：

各 band はわずかに認められるものの、その酵素活性はすべて明らかに正常甲状腺のそれよりも低く、伏せ皿状の pattern をしめた (**Fig. 6**)。

d. 腺腫様甲状腺腫：

① 血中甲状腺機能正常の本症では各 band の酵素活性の高さにおいても、pattern においても正常とほぼ等しい釣鐘状を呈した (**Fig. 7**)。

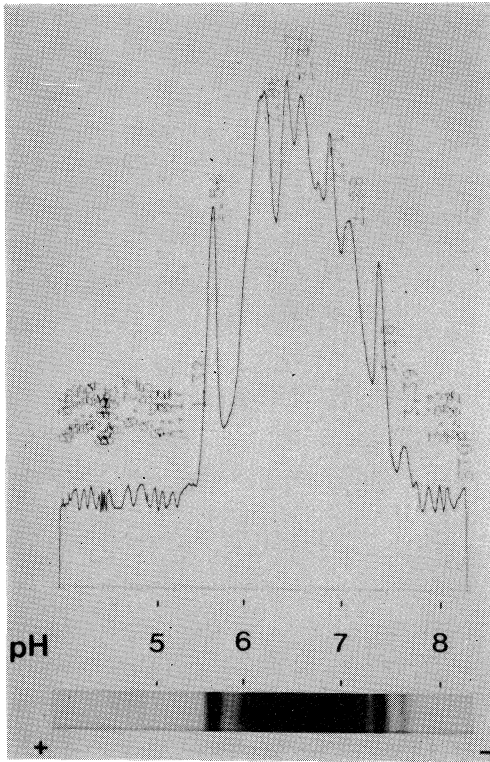


Fig. 5. Zymogram and its densitometric scanning pattern of Basedow's disease

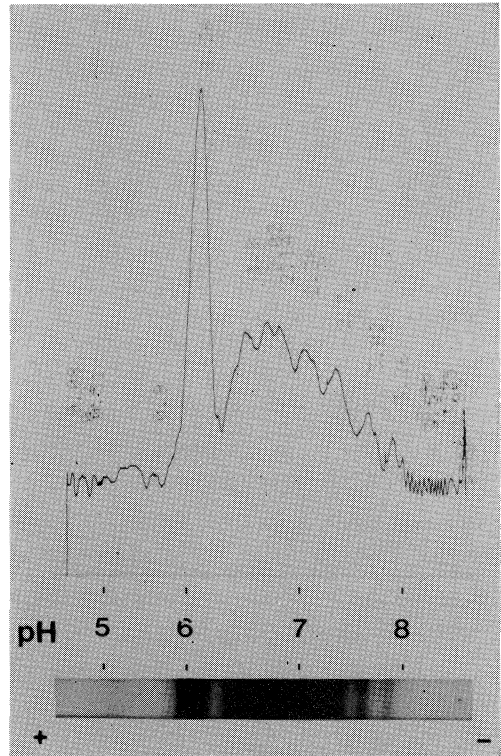


Fig. 7. Zymogram and its densitometric scanning pattern of adenomatous goiter

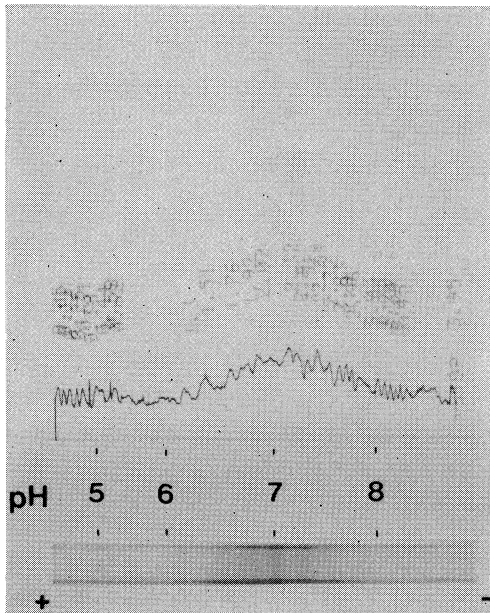


Fig. 6. Zymogram and its densitometric scanning pattern of congenital hypothyroidism due to disturbance of hormonal synthesis

② 過機能性腺腫様甲状腺腫では血中甲状腺機能正常の腺腫様甲状腺腫とは異なった pattern を呈し、むしろバセドウ病のそれと類似しており、band III から X の活性が高かった (Fig. 8).

e. 濾胞腺腫:

血中甲状腺機能正常の本症の zymogram はバセドウ病と類似し、band III から X まで全体的に酵素活性の高い pattern を呈したが、酵素活性の高さはバセドウ病よりやや低かった (Fig. 9).

f. 甲状腺癌:

乳頭癌では、矢印でしめした pI 7.4~7.8 の band X の活性が特異的に高く、band IX から IV へとしだいに活性が低くなり、したがって左右対称形とはならず、先端が右側、すなわちアルカリ側に傾いた山型を呈した (Fig. 10). 一方甲状腺癌の各組織型と対比すると、Figure 2 の d. 5 の症例は乳頭状増殖の部位がわずかに

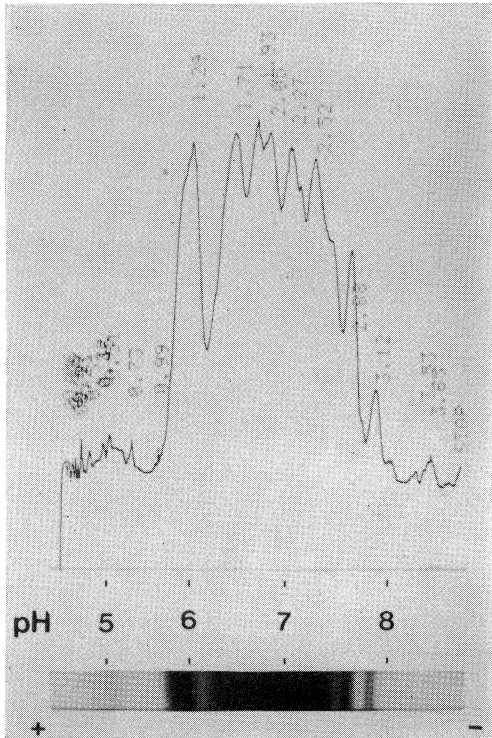


Fig. 8. Zymogram and its densitometric scanning pattern of hyperfunctioning adenomatous goiter

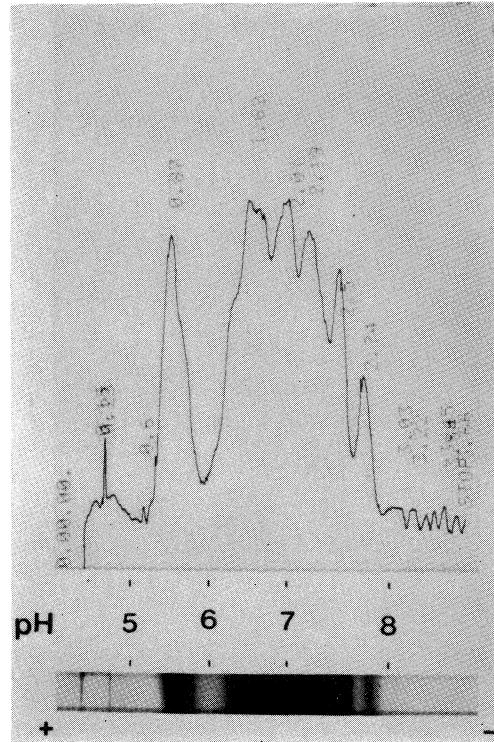


Fig. 9. Zymogram and its densitometric scanning pattern of adenoma

存在しほとんど濾胞状構造を呈す分化型乳頭癌であるが、zymogram はほとんどが乳頭状増殖をしめす他の乳頭癌と一致した。また未分化癌も、乳頭癌と類似の pattern を呈し、大差は認められなかった (**Fig. 11**)。

g. 悪性リンパ腫：

先天性甲状腺ホルモン合成障害と同様に酵素活性が極端に低く、pI 7.0~8.0でわずかに band が認められ、同じく伏せ皿状を呈したが、その中心はややアルカリ側へ偏位した pattern をしめた (**Fig. 12**)。

h. 橋本病：

血中甲状腺機能正常の橋本病は、band III から IX までは正常および癌と一見類似の pattern を呈したが、band X の酵素活性が癌ほど高くなく、正常より高かった (**Fig. 13**)。

2) 酵素物理化学的分析

正常甲状腺 (3 例)、パセドウ病 (2 例) およ

び乳頭癌 (2 例) に二次元電気泳動を行った。

Figure 14, Figure 15 (模式図) にしめたように一次元 zymogram の 11本の band は、分子量 87K から 455K の範囲に約 18 の spot として認められた。分子量約 190K の spot は乳頭癌にのみ認められた。また、一次元 zymogram で比較検討から除外した band I, II を構成する spot は、他の spot と明らかに離れて存在した。

3) 酵素組織化学的分析

Figure 16 に正常甲状腺および乳頭癌の ANA-esterase 染色光顕像をしめた。どちらも酵素活性は濾胞上皮細胞の胞体に局限して顆粒状に検出されたが、疾患による差異は明らかでなかった。

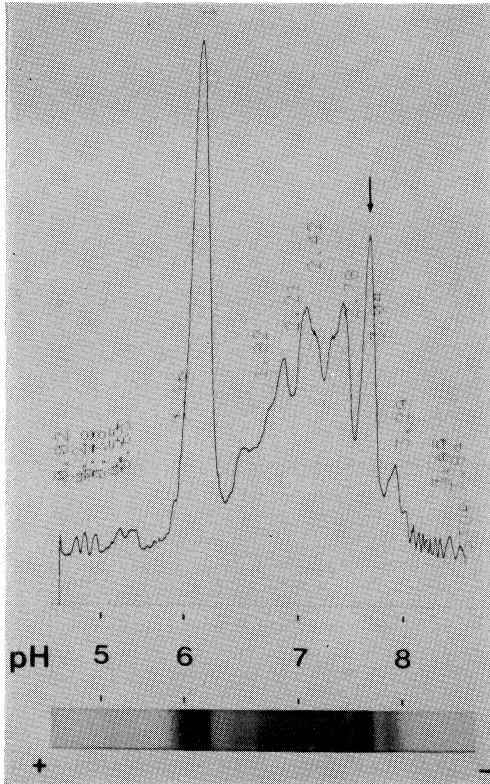


Fig. 10. Zymogram and its densitometric scanning pattern of papillary carcinoma

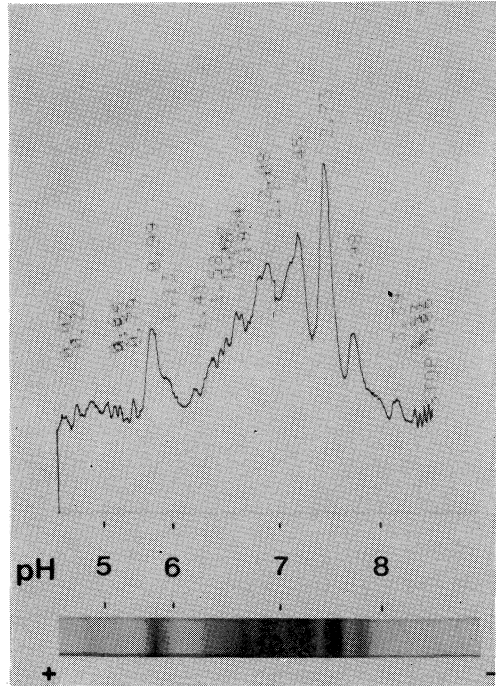


Fig. 11. Zymogram and its densitometric scanning pattern of anaplastic carcinoma

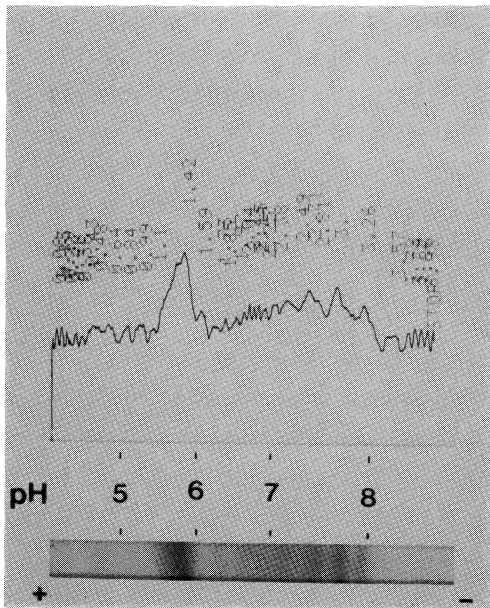


Fig. 12. Zymogram and its densitometric scanning pattern of malignant lymphoma of thyroid

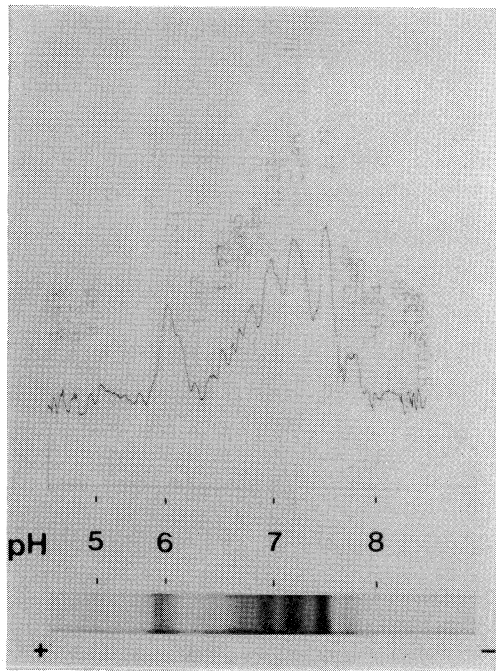


Fig. 13. Zymogram and its densitometric scanning pattern of Hashimoto's thyroiditis

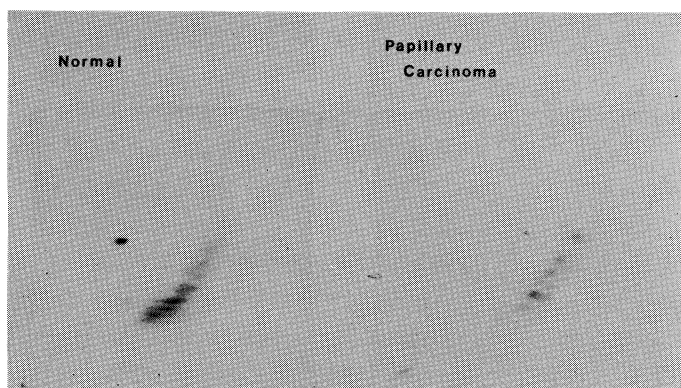


Fig. 14. Two dimensional electrophoretogram of normal thyroid tissue and papillary carcinoma

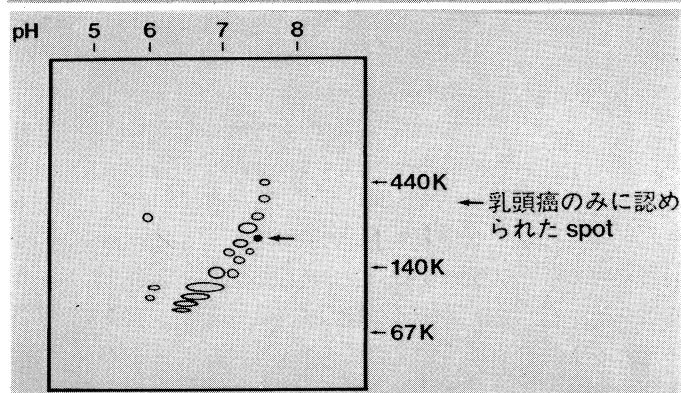


Fig. 15. Scheme of Fig. 14

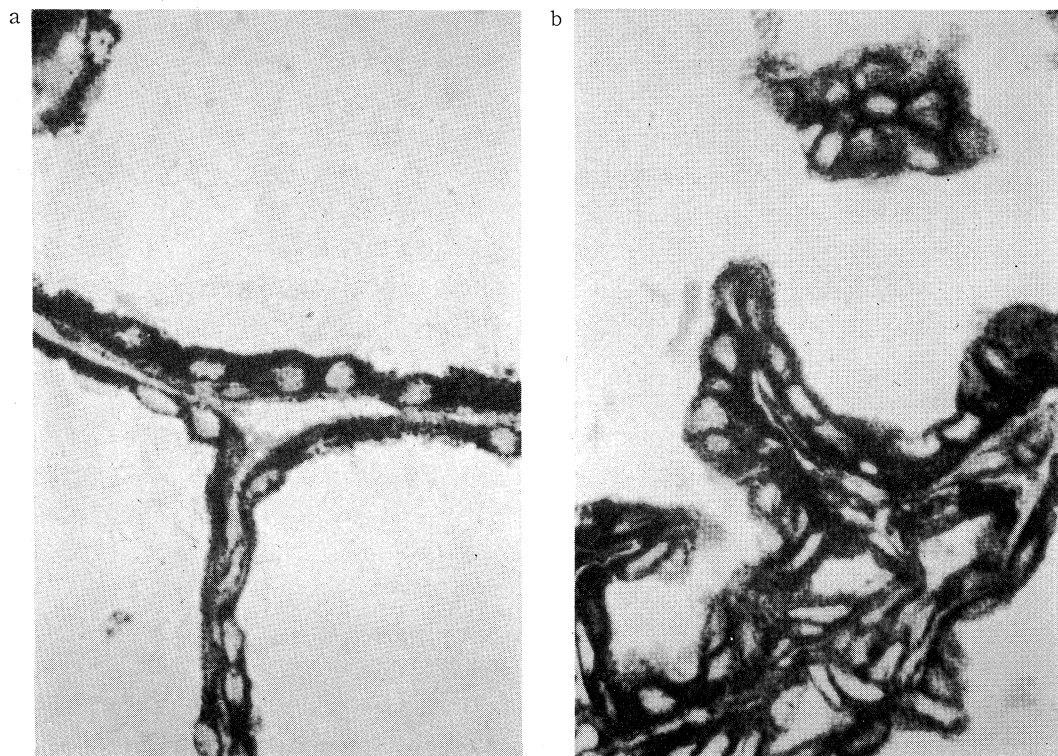


Fig. 16. Histochemical findings of ANA-esterase ($\times 800$)
 a. normal thyroid tissue b. papillary carcinoma

3. 考 案

甲状腺ホルモンの合成過程において、その働きが生化学的に明らかにされている酵素として、甲状腺刺激ホルモン (TSH) 受容に関与する adenylate cyclase, 血中ヨードの濾胞細胞内への能動輸送に重要な役割をもつ Na^+ , K^+ -ATPase, またサイログロブリン内のチロシン基への無機ヨードの組み込み過程に必要な甲状腺 peroxidase や NAD(P)H oxidase などがある。¹⁷⁾ しかしながら non-specific esterase の様に甲状腺濾胞上皮細胞の lysosomal enzyme のひとつであると考えられているにもかかわらず、本来の基質が不明確であるため、その働きが把握し得ない一群の esterase がある。³⁾

non-specific esterase については近年、血液疾患の cell line 特有の zymogram やその臨床応用の報告が多く、白血病の鑑別診断にも利用されている。^{12)~14), 18)~21)} その他 Gouillet⁹⁾ の細菌族の純型同定に、石原¹⁰⁾ の神経原性疾患と筋原性疾患の鑑別診断など応用範囲が広い。しかし甲状腺の non-specific esterase についての研究は極めて少ない。^{22)~25)}

酵素組織化学的検索では酵素の局在は証明し得るものの、酵素活性の化学的相違は判定し難く、疾患による詳細な特徴は明らかでなかった。しかし zymogram ではその densitometric scanning pattern を読むことにより、酵素活性部位の等電点とその強度を容易に比較し検討することができた。

non-specific esterase の基質として α -naphthyl acetate を選んだのは、それが多数の carboxylic ester 加水分解酵素によって加水分解され、他の基質による esterase を広く網羅することができる考えたからである。^{3), 26)}

酵素化学的分析で正常および病的甲状腺のいずれも同じ等電点上に ANA-esterase activity をしめす band が出現したこと、酵素組織化学の反応が濾胞上皮細胞に限局して観察されたことと考え合わせると、この 11本の band は cell line が同じ甲状腺濾胞上皮細胞特有の

zymogram であろうと考えることができた。

band I, II は 2D PAGE により、他の band と異なったアイソザイムであろうと考えられ、二次元の分析結果とも、本研究の比較検討の対象より除外するのが妥当と考えられた。

前述したごとく α -naphthyl acetate の特性として、ANA-esterase が多数の esterase を反映していることは明らかである。しかし個々の band あるいは spot が個々の酵素と一致するか否かは疑問であり、むしろ等電点分画や密度勾配電気泳動により分離されているが、多数の esterase がオーバーラップしたものと考えられる。²⁵⁾

zymogram が各疾患により異なることについての解釈は、多くの因子が加わっているため極めて困難であるが、基本的にはその疾患の甲状腺組織自体の機能の面、すなわちホルモン合成および分泌能等と、形態生物学的な面、すなわち増殖が腫瘍性か否かという二つの面が関与しているであろう。

機能の面からみると、正常甲状腺組織に比べ、バセドウ病においては band 全体の酵素活性が高く台形状の pattern をしめし、先天性甲状腺ホルモン合成障害では逆に全 band の酵素活性が著しく低く、伏せ皿状の zymogram を呈したことから、機能と酵素活性とのあいだに相関があることは明らかである。機能正常の腺腫様甲状腺腫は正常とほぼ同じ zymogram をしめすのに対し、一例ではあるが、過機能性腺腫様甲状腺腫ではバセドウ病と同様の酵素活性の高い pattern をしめしたこともこの事実を裏づけるであろう。バセドウ病で、甲状腺機能が高いままの手術例と機能正常域の手術例における zymogram には差異が認められなかった。すなわち ANA-esterase は末梢血中の甲状腺ホルモン量とは相関しなかった。この点について考えてみると、抗甲状腺剤は甲状腺でのホルモン合成を抑制するが、分泌の段階では影響を及ぼさないことから、²⁸⁾ ANA-esterase は甲状腺ホルモン合成能とは少なくとも関係ないことが推察される。一方分泌能からみた場合、ANA-esterase は末梢血中の甲状腺ホルモ

ン量と相関しなかった点から、血中へ甲状腺ホルモンを分泌させるサイログロブリン加水分解酵素と全く同一のものとは考えにくい。ANA-esterase は未知の甲状腺機能亢進因子の影響が関与しているのかも分からない。今後さらに解明が必要である。

形態生物学的面からみると、腺腫様甲状腺腫の zymogram は正常甲状腺と同様の釣鐘状の pattern をしめたが、腺腫様甲状腺腫の増殖病変は腫瘍性ではなく、過形成であることをしめしており、興味深い所見である。一方過機能性腺腫様甲状腺腫の zymogram はバセドウ病と同一であり、過形成性状よりも機能面が優先していると考えられた。

これに反し癌の zymogram は正常と全く異なり、pI 7.4~7.8 の band X の酵素活性が極めて高い特異的な pattern を呈した。そしてこの band X は乳頭癌、未分化癌のいずれにおいてもみられ、組織型と関係はないように考えられた。癌におけるこの特異性 pattern は 2D PAGE での分子量約 190 K の spot が band X の活性を特異的に高くしたためであった。この特異的酵素、band X は Mizukami ら²⁵⁾ が乳頭癌にのみ認められた pI 9.0 の band と同一のものである可能性が高い。しかし著者は前述のように未分化癌にも認めており、癌に共通する特異所見ではないかと考えた。

2例の濾胞腺腫における zymogram はバセドウ病と同一 pattern であるが活性の強さがやや弱い所見をしめた。この活性の強さの差異がどのような意味を有するかは不明であるが、機能面および形態生物学的面から考えると良性腫瘍性状によるのかも分からない。腺腫様甲状腺腫を比較考察すると、単なる過形成では zymogram は正常 pattern をしめすのに対し、過機能性型ではバセドウ病と同一 pattern となりまた活性の強さも同じとなった。すなわ

ち、活性の強さは形態面よりも機能面が優先しているのかも分からない。濾胞腺腫ではこの因子と全く関係がないので、この所見はこれ以外の因子によるものであろう。著者は経験していないが、過機能性腺腫の zymogram の活性強度がバセドウ病と全く同一であればこの推察の可能性をあたえるであろう。濾胞腺腫の zymogram についてはなお検討を要する。

悪性リンパ腫は癌とは全く異なる pattern をしめし、各 band の酵素活性は低く先天性甲状腺ホルモン合成障害の症例の pattern と類似していた。しかしホルモン合成障害の症例ではそのホルモン産生能力の低下を主として反映したためと考えられるが、悪性リンパ腫の場合は甲状腺組織内の大部分がリンパ球系腫瘍細胞に置換されているため、異なった cell line の zymogram が描画された可能性が高い。いずれにしても未分化癌と悪性リンパ腫の組織学的鑑別診断はときに困難であり、zymogram により鑑別できればその価値は大きい。

橋本病では酵素活性の高さにおいて多少の差があるが、甲状腺癌と同様の zymogram をしめし、この pattern は経験した3例とも同一であった。橋本病における zymogram の特性がどうして癌に近いかなお検討を必要とするが、悪性リンパ腫とは相違する pattern をしめすので鑑別には有用である。

本論文の要旨は1984年11月、第57回日本内分泌学会秋季学術大会、1985年9月、第22回岡山内分泌同好会において発表した。

稿を終えるにあたり御指導、校閲いただいた川崎医科大学内分泌外科妹尾亘明教授、直接御指導、校閲いただいた同原田種一教授に謹んで深謝致します。また研究に御協力いただいた同解剖学教室と本研究に貴重な標本を御提供下さった隈病院隈寛二先生、松塚文夫先生、伊藤病院伊藤国彦先生、東海大学医学部第二外科三富利夫教授、生越喬二先生に厚く感謝致します。

文 献

- 1) Gomori, G.: The histochemistry of esterase. *Int. Rev. Cytol.* 1: 323—335, 1952
- 2) Deimling, O. V. and Madreiter, H.: Esterase II. A new method for the electron micro-

- scopical demonstration of a nonspecific esterase in animal tissues. *Histochemie* 29: 83-96, 1972
- 3) Deimling, O. V. and Böcking, A.: Esterases in histochemistry and ultrahistochemistry. *Histochem. J.* 8: 215-252, 1976
 - 4) Böcking, A., GroBarth, C. and Deimling, O. V.: Esterase XXIII. Electron microscopical demonstration of non-specific esterases in the jejunum of the mouse (*Mus musc.*) with two quinoline derivatives. *Histochemistry* 50: 65-76, 1976
 - 5) Inoue, M., Morikawa, M., Tsuboi, M., Ito, Y. and Sugiura, M.: Comparative study of human intestinal and hepatic esterase as related to enzymatic properties and hydrolizing activity for ester-type drugs. *Jap. J. Pharmacol.* 30: 529-535, 1980
 - 6) Deimling, O. V., Schupp, P. and Otto, J.: Esterase-16 (Es-16). Characterization, polymorphism, and linkage to chromosome 3 of a kidney esterase locus of the house mouse. *Biochem. Genet.* 19: 1091-1099, 1981
 - 7) DeLooze, S. M., Ronai, A. and Deimling, O. V.: Organ specific expression of esterase-6 in the house mouse, *Mus musculus*. *Histochemistry* 74: 553-561, 1982
 - 8) Kirkeby, S. and Moe, D.: Hydrolyses of α -naphthyl acetate, β -naphthyl acetate, and acetyl-DL-phenylalanine- β -naphthyl ester. *Acta Histochem.* 72: 225-231, 1983
 - 9) Gouillet, P. and Picard, B.: Distinctive electrophoretic and isoelectric focusing patterns of esterase from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *J. gen. Microbiol.* 130: 1471-1480, 1984
 - 10) 石原傳幸: 神経筋疾患生検筋における nonspecific esterase 染色の意義. *臨床神経* 24: 248-255, 1984
 - 11) 津田富康, 青木隆幸, 水城まさみ, 稲吉鉦三, 岡嶋 透: 実験的肺肉芽腫の発生と治癒における macrophage associated nonspecific esterases 活性の経時的動態. *日胸疾会誌* 22: 363-369, 1984
 - 12) Li, C. Y., Lam, K. W. and Yam, L. T.: Esterases in human leukocytes. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 1-12, 1973
 - 13) Radzun, H. J., Parwaresch, M. R., Kulenkampff, C., Staudinger, M. and Stein, H.: Lysosomal acid esterase. Activity and isoenzymes in separated normal human blood cell. *Blood* 55: 891-897, 1980
 - 14) Yourno, J., Walsh, J., Kornatowski, G., O'Connor, D. and Kumar, S. A.: Nonspecific esterases of leukemia cell line. Evidence for activation of myeloid-associated zymogens in HL-60 by phorbol esters. *Blood* 63: 238-241, 1984
 - 15) Jacyszyn, K. and Laursen, T.: A method for determination of the heterogeneity of γ -glutamyl-transpeptidase. *Clin. Chim. Acta* 19: 345-352, 1968
 - 16) 佐野紀代子: 薄層アガロースゲル等電点電気泳動. 体液蛋白と血清酵素アイソザイム分析. *臨検* 26: 1192-1200, 1982
 - 17) 松原藤継: 甲状腺濾胞細胞の形態と機能. 酵素組織化学的所見を中心に. *臨病理* 33: 406-420, 1985
 - 18) Kulenkampff, J., Janossy, G. and Greaves, M. F.: Acid esterase in human lymphoid cell and leukaemic blasts. A marker for T lymphocytes. *Br. J. Haematol.* 36: 231-240, 1977
 - 19) Pinkus, G. S., Hargreaves, H. K., Mcleod, J. A., Nadler, L. M., Rosenthal, D. S. and Said, J. W.: α -Naphthyl acetate esterase activity. A cytochemical marker for T lymphocytes. Correlation with immunologic studies of normal tissues, lymphocytic leukemias, non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, and other lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol.* 97: 17-42, 1979
 - 20) Freemont, A. J. and Davies, J. S.: Acid esterase activity in lymphocytes and other cells.

A comparison of six α -naphthyl based substrates. *Med. Lab. Sci.* 39: 405—407, 1982

- 21) Rhenen, D. J. V., Jalink, W. and Huijgens, P. C.: Esterase staining in monocytes. *J. Clin. Pathol.* 36: 236—237, 1983
- 22) Lindsay, S. and Arico, I. M.: Enzyme histochemistry of the human thyroid gland. *Arch. Pathol.* 75: 627—647, 1962
- 23) Wollman, S. H., Spicer, S. S. and Burstone, M. S.: Localization of esterase and acid phosphatase in granules and colloid droplets in rat thyroid epithelium. *J. Cell Biol.* 21: 191—201, 1964
- 24) Šmejkalová, E. and Šmejkal, V.: Cytochemical study of non-specific esterase, acid and alkaline phosphatase in the human thyroid neoplasms. *Acta Histochem.* 46: 74—78, 1973
- 25) Mizukami, Y. and Matsubara, F.: Isoelectric focusing patterns of α -naphthyl acetate esterase in tissues of human thyroid. *Acta Histochem. Cytochem.* 15: 710—713, 1982
- 26) Yoshimura, Y., Morishita, M., Mori, M. and Kawakatsu, K.: Zymograms and histochemistry of non-specific esterase in the salivary glands. *Histochemie* 18: 302—313, 1969
- 27) Green, W. L.: Mechanisms of action of antithyroid compounds. *The Thyroid*, ed. by Werner, S. H. and Ingbar, S. H. New York, Harper and Row Publishers. 1971, pp. 41—51