

# 人絨毛性 Gonadotropin の Radioimmunoassay に関する研究

## — 妊娠ならびに絨毛性疾患の HCG 動態 —

山口大学医学部産科婦人科学教室 (主任：藤生太郎教授)

大学院学生 加 藤 紘

**概要** 二重抗体法によりHCGの Radioimmunoassay を行つたが、その感度は10mIU/ml 以上であつた。また Assay に対するHGH, HTSH, ACTH及び Prolactin の影響は軽微であり、他の非特異的反応も殆んど認められなかつた。この Radioimmunoassay を妊婦及び絨毛性疾患患者のHCG測定に応用し次の結果を得た。

1) 妊婦血中及び尿中のHCG量は 9~12週目に peak を示した後速やかに減少し、21週目より40週目にかけて再び漸増した。また羊水中のHCG量は、妊娠前期において高値を示す例が多かつた。

2) 分娩時母体血、臍帯静脈血及び羊水中のHCG量を測定し、母体血と臍帯静脈血のHCG量に相関関係を認めた ( $\gamma=0.80$ )。また新生児血中のHCGは生後16時間目で半減した。これらの成績より臍帯静脈血中のHCGは母体または胎盤由来のものと思われる。

3) 切迫流産患者の血中HCG量に対する尿中HCG量の割合は $0.44 \pm 0.01$ となり、正常妊婦の値 $0.80 \pm 0.12$ より低値であつた。

4) 絨毛性疾患患者の血中HCG量を測定し、Follow up に利用した。経過良好な例では、絨毛上皮腫では子宮単純全摘出術後4週間に、また胎状奇胎では子宮内容除去術後3週間に正常 Gonadotropin level に下降した。

### 緒 言

Radioimmunoassay (以下RIAと略す)はInsulinの測定法としてBerson (1960)らが始めた方法であるが、Wilde (1965)がこれをHuman Chorionic Gonadotropin (以下HCGと略す)の測定に応用して以来、低単位HCGの定量に欠かすことのできないものとなつている。その後技術的にも多くの改良が加えられて測定法としては確立された感があるが、実際に測定を行なうにあつては注意を要する点が多い。

この度HCGのRIAを行なうにあたり、種々のParameterを検討し、このRIAを妊婦ならびに絨毛性疾患患者の血中および尿中HCG測定に応用したので報告する。

### 実験材料及び方法

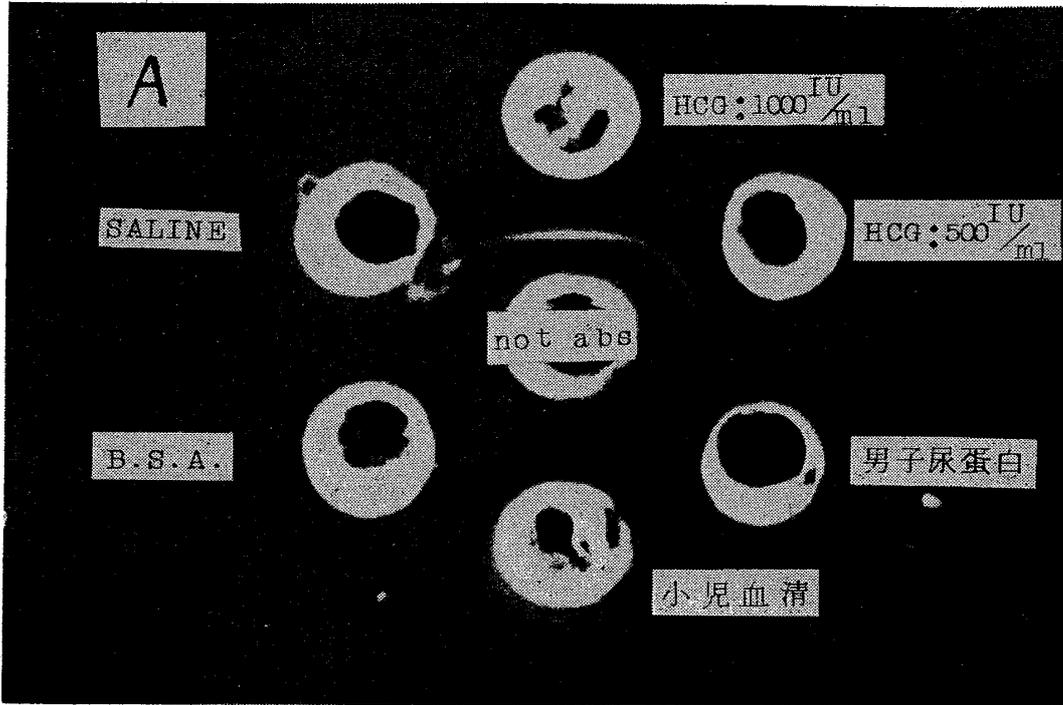
HCG: 抗HCG血清作製の為の動物免疫およびIodinationには、部分精製HCG-T<sup>21</sup>および

HCG-Y<sup>22</sup>を用いた。AssayのStandardには市販HCG (Pregnyl: Organon)を使用した。

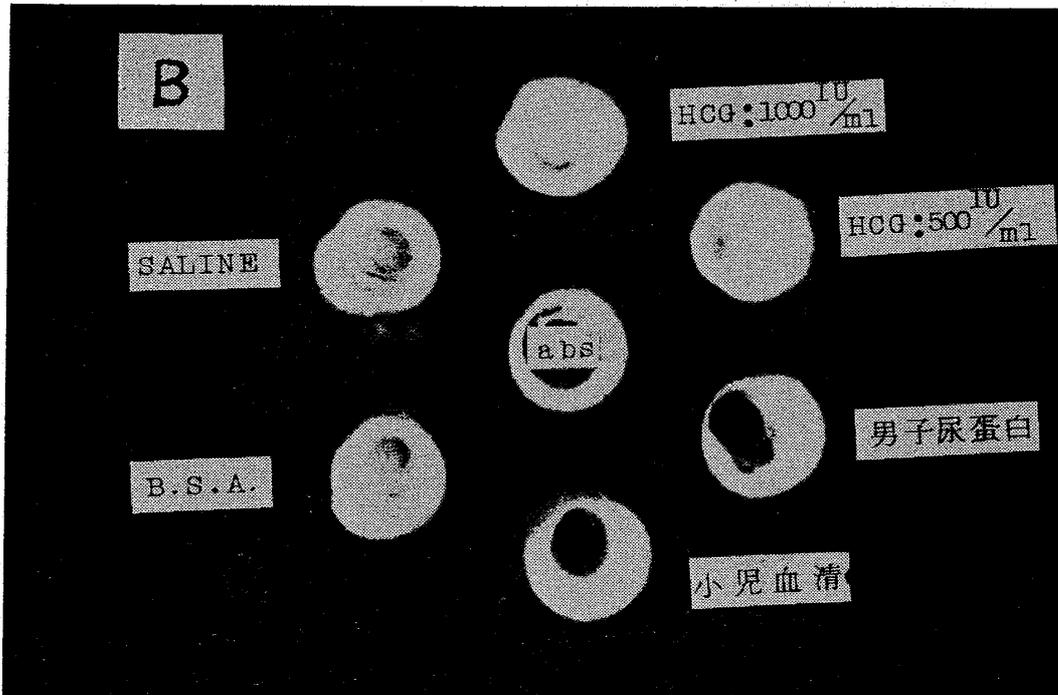
Guinea-pig gamma-Globulin (GP- $\gamma$ G): 正常モルモット血清より硫酸安門法を用いて調整した。

抗HCG血清, Guinea-pig: HCG-Tを生理食塩水に溶解し、同量の Freund's complete Adjuvand (Difco) とhomogenizeし、モルモット一匹あたりHCG 1mgとなるよう皮下注射した。最終免疫より2週間後に心臓穿刺により採血した。得られた抗血清については、Ouchterlony法を用いて抗体の存在を確認した。更に男子尿蛋白 (Albert B Fraction, 2mg/抗血清1ml), 小児血清 (0.1ml/抗血清1ml) で夾雑蛋白の吸収を行なつた上で、前述のOuchterlony法を行なつた。抗血清は、0.05M Phosphate Buffered Saline (0.05M P B S) pH 7.4で1:100に稀釈し、

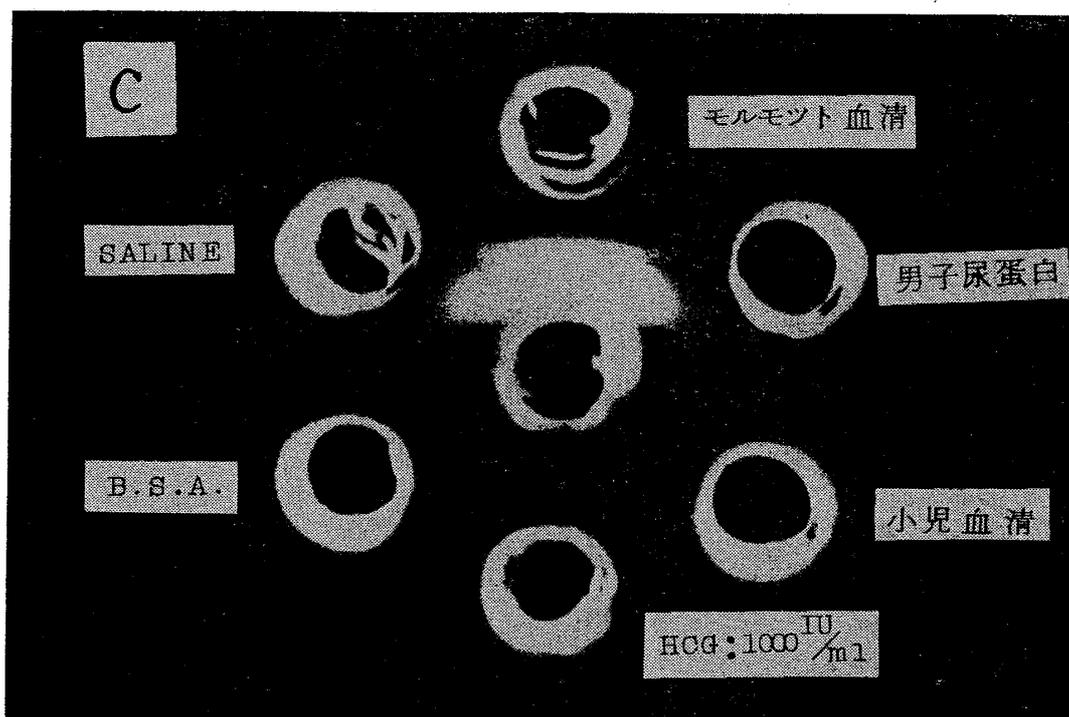
図1 Precipitin lines on Ouchterlony plates  
 A. Center well: anti-HCG serum, Guinea-pig. Not absorbed.



B. Center well: anti-HCG serum, Guinea-pig. Absorbed by urinary protein and children's serum.



## C. Center well: anti-Guinea-pig gamma globulin serum, Rabbit.



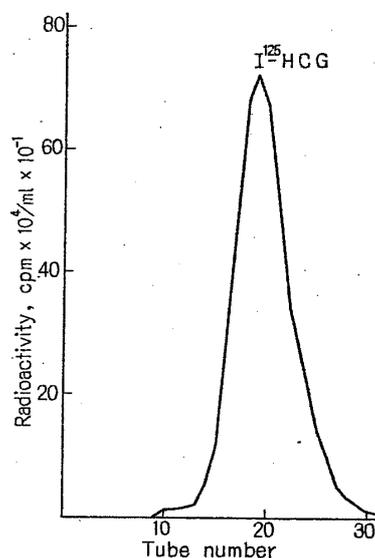
50~100 $\mu$ l ずつ分注して-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

抗 GP- $\gamma$ G 血清, 家兎: GP- $\gamma$ G を Freund's Complete Adjuvant と homogenize し, 雄家兎の大腿部皮下に 2 mg/羽の割合で 3 週間毎に 3 回注射した。最終免疫より 1 カ月後に同量を皮下注射し, 更に 2 週間後に心臓穿刺により採血した。抗血清は 1~2 ml ずつ分注し, -20 $^{\circ}$ Cにて保存した。

抗 HCG 血清, 抗 GP- $\gamma$ G 血清を Ouchterlony 法により検討した, 未処理の抗 HCG 血清は, HCG, 男子尿蛋白, 小児血清との間に沈降線を生じたが, 男子尿蛋白, 小児血清で吸収した後は, HCG との間にのみ沈降線を生じた (図 1 A, B) 抗 GP- $\gamma$ G 血清では, HCG, 男子尿蛋白, 小児血清, 牛血清アルブミン (B.S.A.注<sup>3</sup>) との間に沈降線を認めなかった (図 1 C)。

Iodination: Greenwood (1963) らの方法に従って, NaI<sup>125</sup>注<sup>4</sup>を用いて HCG の Iodination を行なった。得られた I<sup>125</sup>-HCG の Specific Activity は約 100mC/mg であつた。I<sup>125</sup>-HCG は

図 2 Purification of <sup>125</sup>I-HCG on sephadex G-200

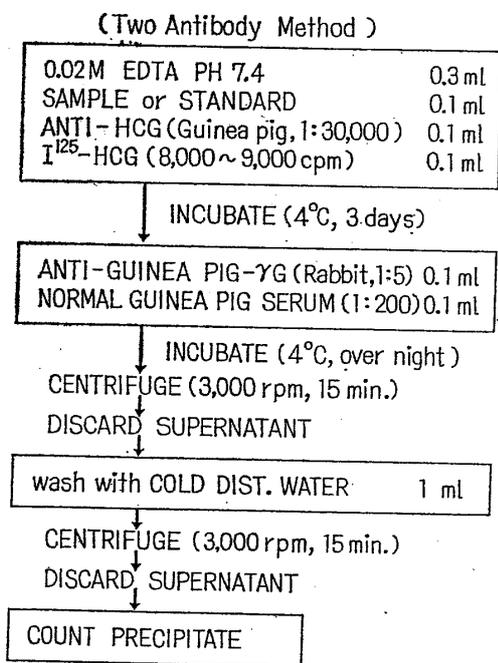


更に Sephadex G-200 Column (1.8 $\times$ 35cm) にて精製した (図 2)。精製 I<sup>125</sup>-HCG は 5% B S A-0.05M, P B S で約 100,000cpm/100 $\mu$ l に稀釈し, 小試験管に分注して-20 $^{\circ}$ Cにて凍結保存したが, これらの I<sup>125</sup>-HCG は Iodination 後約 8

週間の使用に耐え得た。なお, Sephadex G-200 による精製直後の  $I^{125}$ -HCG の Immunological Activity は88~93%であった。

Radioimmunoassay: Assay はMorgan (1962) らの方法 (二重抗体法) に従って行なつた。Assay の概要は 図3 に示す如くである。測定値は, Radioactivity (total) に対する Radioactivity (precipitate) の%を計算し, Assay 毎に作製する標準曲線より算出した。Radioactivity は, 日本無線医理学研究所製の Automatic gamma counter (Model AIL-IB) を用いて測定した。

図3 Radioimmunoassay of HCG



実験成績

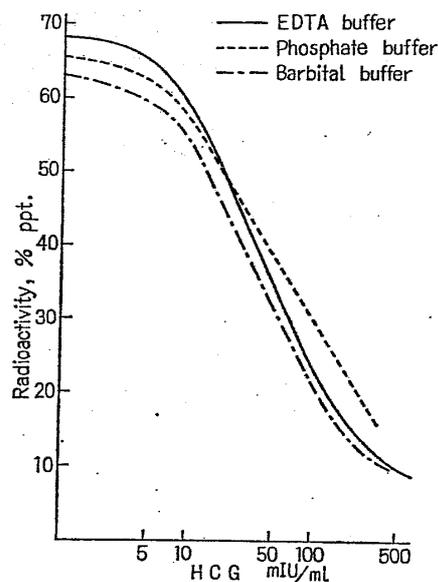
1) Parameter

HCG のRIA にあつては, 各研究者が各々異つた抗血清,  $I^{125}$ -HCG を使用しているため, 新たにRIAを行なう場合には, そのParameter の検討が必要である。

②. 緩衝液

EDTA-Buffer, Phosphate-Buffer, Barbital Buffer を Assay に使用した場合の標準曲線は 図4 に示した通りである。EDTA-Buffer を使用した場合に鋭敏な曲線が得られた。更に, 数種類の試

図4 Effect of buffer



料を用いて行なつた回収試験の成績からみても EDTA-Buffer が最適と考えられたので, 以後の Assay にはこれを使用した。

③. 抗血清濃度

抗HCG血清: 一定量の  $I^{125}$ -HCG (10,000 cpm) に対する抗HCG血清の結合率を調べてみると, 抗血清を稀釈するにつれて Precipitable radioactivity は減少したが, 一方測定感度は逆に上昇した (図5)。Assay には抗血清を 1:30,000~1:35,000 に稀釈して用いた。

図5 Dilution of first antiserum

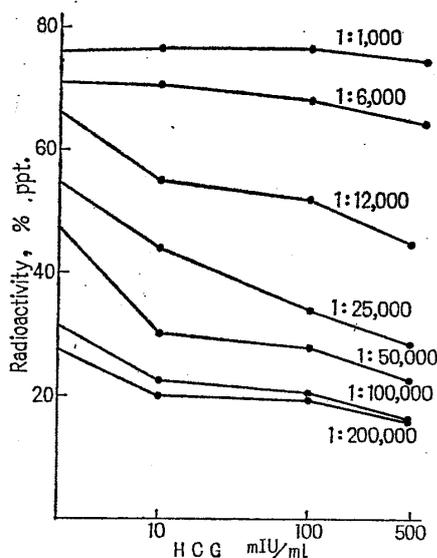
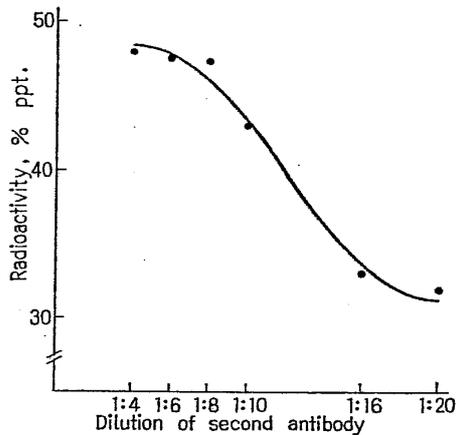


図6 Dilution of second antiserum



抗 GP- $\gamma$ G 血清：抗 GP- $\gamma$ G 血清の稀釈による Precipitable radioactivity の変化は 図6に示した如くである。Assay には 1 : 4 ~ 1 : 5 に稀釈した抗血清を用いた。

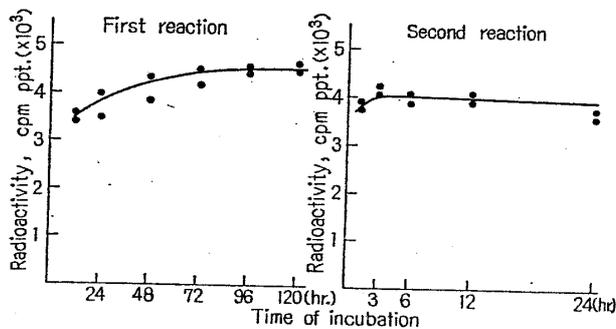
㊦. Incubation 時間

First Reaction, Second Reaction の時間を変えて, Precipitable Radioactivity の変化を調べた。Second Reaction を 12時間と一定にして, First Reaction を 12, 24, 48, 72, 96, 120時間としたときの Precipitable Radioactivity は時間の増加と共に増加し, 72時間以後は略々 Plateau に達した。一方 First Reaction を 72時間と一定にした場合, Second Reaction が 6時間を起えると Precipitable Radioactivity は略々 Plateau に達した(図7)。以上の成績より First Reaction を 72時間, Second Reaction を over night とした。

㊧. 標準曲線

Pregnyl (Organon), Primogonyl (日本 Sche-

図7 Effect of time on antibody reaction



ring) を各々 Standard として同時に Assay した場合の標準曲線を 図8に示した。図に見られる如く, Pregnyl を使用しても Primogonyl を使用しても, 得られる標準曲線は略々同一であつた。著者は Pregnyl を Standard として用いているが, その標準曲線は 図9の如く 10 ~ 250 mIU/ml の間で直線性を示した。

㊨. 再現性

再現性を調べるために, Within-assay varia-

図8 Standard dose response curve of pregnyl and primogonyl

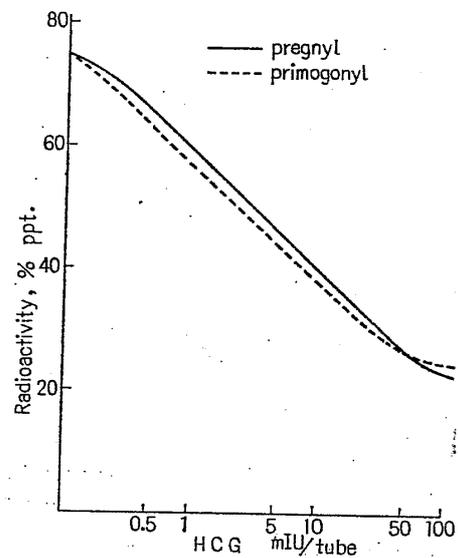
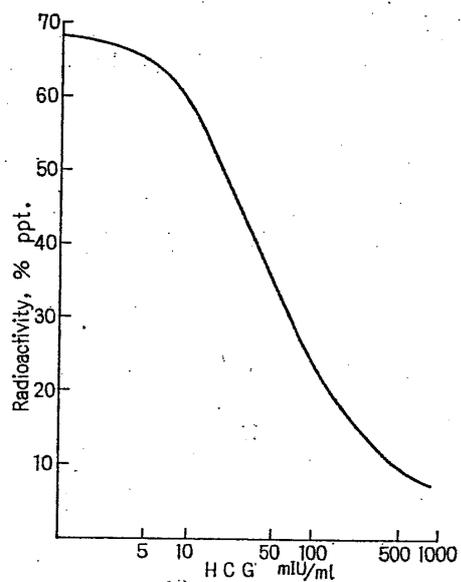


図9 Standard dose-response curve of HCG

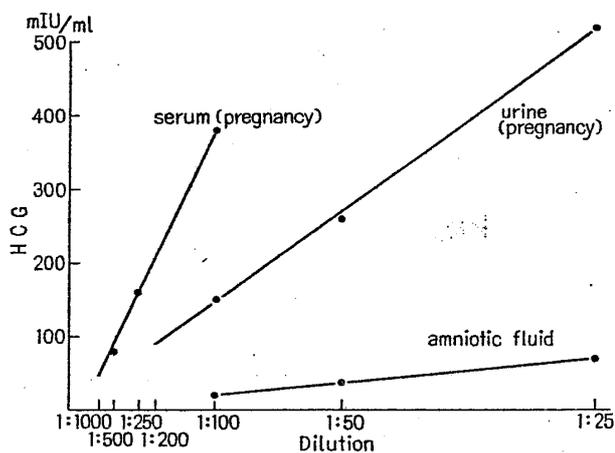


bility および Between-assay variability (Rodbard, 1968, 吉原, 1970) を算出した. 試料として, 妊婦血清を約 100mIU/ml : HCG濃度に稀釈したものを Pool しておいて使用した. Within-assay variability  $90.6 \pm 3.32$ mIU/ml, Between-assay variability  $92.4 \pm 4.31$ mIU/ml であった.

## 2) 稀釈試験

妊婦尿, 妊婦血清および羊水を稀釈して測定した場合の HCG 測定値は図10の如くである. 各試料においてその測定値は直線的に変化しており, この反応における non-specific Inhibitor の存在はほとんど無視できることを示唆している.

図10 Dilutional Effects



## 3) 回収試験

男子尿, 小児血清, 妊婦尿, 妊婦血清および羊水に Standard HCG を加えた場合の回収率は, 表1に示す如く97~105%であった.

## 4) 交叉反応の検討

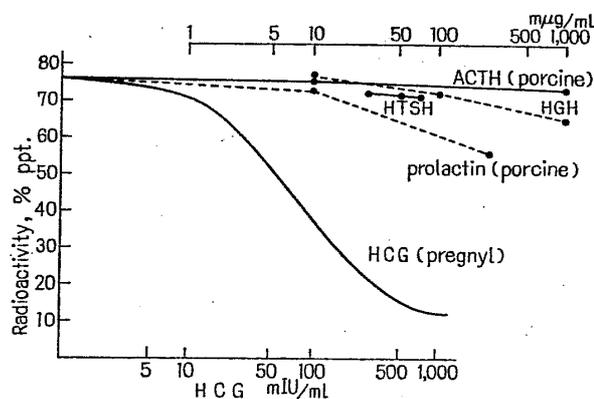
入手可能であった数種の Pituitary Hormone-HTSH, HGH, ACTH (Porcine), Prolactin (Porcine) —の Assay におよぼす影響を検討した (図11).

Prolactin, HGH, HTSH を大量に加えると, Precipitable radioactivity が減少した. すなわち, これらの Hormone が試料中に混在すると抗血清と Cross Reaction を起こし, HCG として測定されることを示している. しかし, 実際に臨床

表1 Recovery of HCG

Sample	Dilution	HCG added	HCG assayed	% recovery
urine (man)	1:1	mIU/0ml	mIU/ml 8	97
	1:1	100	105	
serum (children)	1:1	0	3	102
	1:1	100	105	
amniotic fluid	1:1	0	46	104
	1:1	100	150	
urine (pregnancy)	1:200	0	105	98
	1:200	50	154	
serum (pregnancy)	1:2000	0	4.5	105
	1:2000	100	110	

図11 Cross reaction



的にみられる濃度を考慮して, Prolactin 10IU/ml, HTSH 100m $\mu$ g/ml, HGH 100m $\mu$ g/ml までの濃度であれば, これらの Hormone は測定値にあまり影響をおよぼさない. 特に正常の状態ではこれらの Hormone の濃度は極めて低いので, その HCG Assay におよぼす影響はほとんどないものと考えられる. ACTHは大量に加えてもほとんど Cross Reaction は認められなかった.

## 5) 妊婦血中, 尿中および羊水中の HCG

妊婦血中, 尿中および羊水中の HCG 量の妊娠経過に伴う変動は表2の如くである. 妊娠9~12週目に血中平均  $106,000 \pm 23,300$ mIU/ml, 尿中平均  $61,000 \pm 32,000$ mIU/ml/g creatinine と peak を示した後減少し, 20週目より40週目にかけて再び漸増する2峰性の動きを示した. 羊水中の HCG は, 妊娠前期で平均  $6,970 \pm 5,220$

表2 HCG activity of serum, urine and amniotic fluid during pregnancy

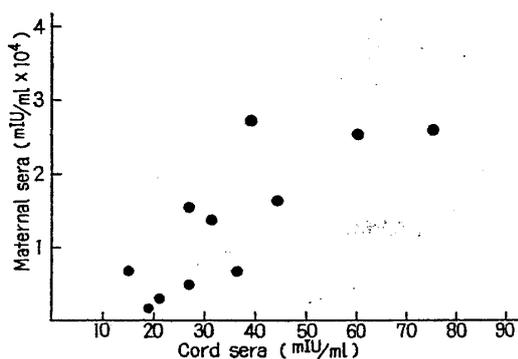
Monthes of gestation	No. of cases	HCG mIU/ml serum	HCG mIU/ml/g. creatinine urine	No. of cases	HCG mIU/ml amniotic fluid
2	6	31,500±24,000	27,500± 6,720	5	6,970± 5,220
3	11	106,000±23,300	61,000±32,000		
4	10	47,400±14,800	24,000± 9,280		
5	9	15,700± 6,930	8,530± 2,740	6	767± 179
6	10	17,100±10,500	9,800± 8,480		
7	11	23,400±12,500	17,200± 4,600		
8	12	28,900±18,200	12,000± 8,720	10	627± 362
9	10	26,400±18,700	18,700±14,800		
10	10	28,500±24,100	14,200± 9,390		

mIU/ml と他の期間に比して高値を示したが、妊娠前期では羊水中のHCG量の個体差が大きく、一定の結論を導き難いものであった。

6) 分娩時母体血中、臍帯静脈血中および羊水中のHCG

分娩第3期における母体血中HCG量は平均22,400± 8,510mIU/ml, 臍帯静脈血中では平均50.0±22.4mIU/ml, 羊水中では平均627± 362 mIU/mlであった。臍帯静脈血と母体血のHCG量には、図12に示した如く相関関係が認められた ( $\gamma=0.80$ )。これに対して、羊水中のHCG量と母体血または臍帯静脈血中のHCG量との間には相関関係は認められなかつた ( $\gamma=0.03$ )。

図12 Relationship of HCG activity between maternal and cord sera at delivery

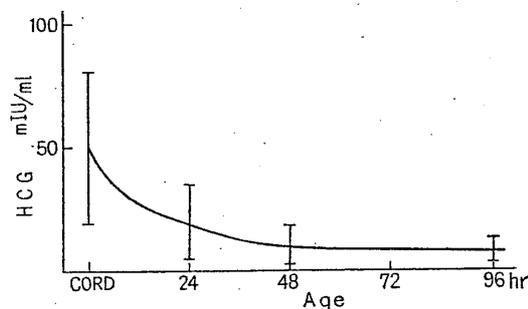


7) 新生児血中HCGの変動

新生児血中HCG量の変動は図13に示した。生後24時間目には生下時の $\frac{1}{2}$ 以下の値にまで減少し、以後も時間の経過と共に徐々に下降した。

8) 切迫流産患者のHCG排泄率

図13 Plasma HCG levels of new born babies



妊娠前期における切迫流産患者について、尿中へのHCG排泄率

$$\left( \frac{\text{尿中 HCG mIU/ml/g creatinine}}{\text{血中 HCG mIU/ml}} \right)$$

は平均0.44±0.01となり、正常妊娠平均0.80±0.12に比して低値を示した(図14)。また切迫流産の症状軽快後2~3カ月経た妊婦においても、そのHCG排泄率は平均0.38±0.09と正常化しなかつた。

図14. Rate of urinary HCG concentration to serum HCG concentration at normal pregnancy and threatend abortion

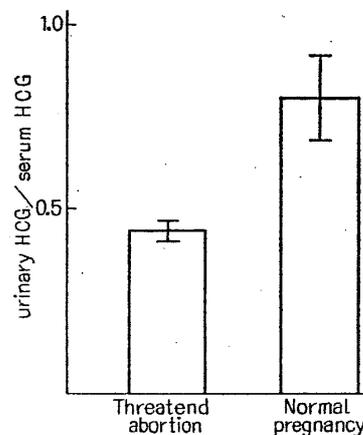


図15. Hormonal remission of HCG

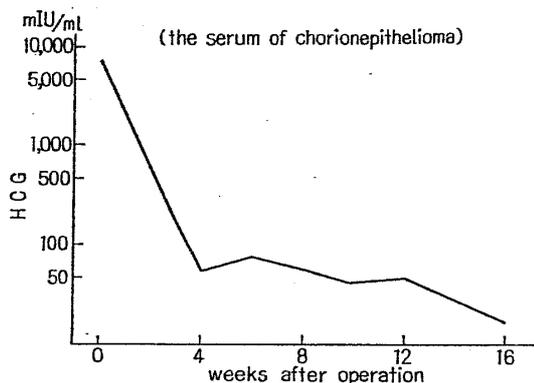
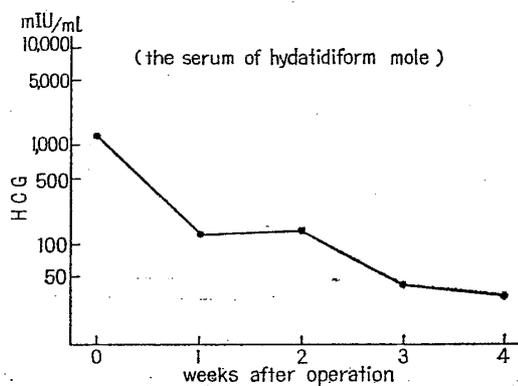


図16. Hormonal remission of HCG



つた。

### 9) 絨毛性疾患患者のHCG

絨毛上皮腫で子宮単純全摘出術を行なった婦人の血中HCG値の経日的変化を図15に示した。術後4週間目で正常の Gonadotropin level まで下降した。図16は胎状奇胎にて子宮内容除去を行なった例である。

### 考案

HCGのRIAを行なう際、一番問題となり検討を要する点は、labeled HCGの純度、Immunological Radioactivity (I.R.) および抗HCG血清の Specificity である。現在のところ標準的な labeled HCG または抗HCG血清が市販されていないので、各研究者が各々自家製のものを作製使用している状態であるが、この labeled HCG、抗HCG血清の性質によつてRIAの特異性が決定されるといっても過言ではない。

著者は  $I^{125}$ -HCG 作製に HCG-T (生物活性 5,340IU/mg) を用いた。  $I^{125}$ -HCG をまず Se-

phadex G-100 Column で速やかに Free- $I^{125}$  より分離したが、この時の I.R. は78%であつた。これを更に Sephadex G-200 Column を通して精製するとその I.R. は88%に上昇した。Iodination の条件の良い場合には、精製された  $I^{125}$ -HCG の I.R. は93%に達した。

Midgrey (1966) は、10,000~12,000IU/mg の HCG を用いて I.R.  $91.1 \pm 0.7\%$  の  $I^{125}$ -HCG を作製し、良好な結果を得たと述べている。Iodination に用いる HCG は、できるだけ純粋なものを使用するように努めるべきであるが、5,300 IU/mg 程度の HCG を iodinate しても、充分使用に耐え得るものが得られた。東條 (1968) らは、 $I^{125}$ -HCG を Sephadex G-200 Column で精製する必要はないと述べているが、Touber ら (1963) が  $I^{125}$ -HGH の場合に述べている如く “aggregated or damaged  $I^{125}$ -HCG” が多くなる場合もあり得るし、著者の成績でも Sephadex G-200 で再濾過することにより I.R. の上昇が認められた。Gel filtration など  $I^{125}$ -HCG の精製を行なった方が良好な成績が得られるものと考えられる。

Assay に対する他の Hormone の影響は、Odell et al (1968) が HLH の RIA で HTSH の Cross Reaction を報告している如く、充分検討されなければならない問題である。特に HCG ではその精製が完全でない為、ある程度の Cross Reaction は避けられないものである。著者の場合も、軽微ながら HGH, HTSH, Prolactin の影響が認められた。 $I^{125}$ -HCG の精製および抗HCG血清の夾雑蛋白吸収を充分に行なうことにより、Assay の感度を高め非特異的な反応を最小限にとどめるよう努力すべきである。

HCG の免疫活性と生物活性の関係について Midgrey (1966) らは HCG 分子の反応 Site の違いであろうと述べており、一般に Immunoassay 値と Bioassay 値が良く相関するという報告が多い。しかし谷沢 (1970) ら、Wide (1962) らは、熱処理によつて生物活性のみを弱めることができたと報告しているし、高橋ら (1970) は生物活

性と免疫活性の分離に成功したと報告しているの  
で、条件によつては Immunoassay 値と Bioassay  
値が一致しない可能性は充分に考えられる。従つ  
て R I A を行なうにあつては、その得られた測  
定値はあくまで免疫活性を表わしているのであつ  
て、Bioassay とは違つた方向から H C G をとら  
えたものであることを忘れてはならない。

妊婦の血中および尿中 H C G 量の変化につい  
ては、McCarthy (1964), Brody (1962), Aono  
(1968), Faïman (1963) らの報告があり、いず  
れも妊娠3カ月目に peak を示し、中期より後期  
にかけて漸増する傾向を述べている。著者の測定  
した結果も大体同様の傾向を示した。羊水中の H  
C G 量について脇田ら(1964)は妊娠経過中あまり  
変動しないと述べており、Grosignani et al (1969)  
は妊娠末期で平均  $0.39 \pm 0.28$  IU/ml であつたと  
報告している。著者の場合は未だ例数が充分では  
ないが、妊娠前期において高値を示す例が多かつ  
た。妊娠前期において羊水中の H C G 値の個体差  
が大きくなる原因の一つに、母体血の混入が考え  
られる。妊娠前期では母体血の H C G 量が羊水に  
比して著るしく多く、少量でも母体血が試料に混  
入すると測定値が高くなる。経腹壁的に羊水穿刺  
を行なつた場合でも、採取した羊水に母体血が混  
入する可能性があるので、できれば試料に潜血反  
応検査を行ない、充分に検討してから Assay に  
供すべきである。

切迫流産患者について、McCarthy (1964),  
Brody et al (1962) はその血中 H C G 量が減少す  
ると報告しているが、尿中への H C G 排泄状態を  
述べたものはみあたらない。異常妊娠と腎臓との  
関係について、Hunter et al (1961) は子宮筋の  
低酸素症により胎盤より腎臓に変化を起こす物  
質が分泌されると述べている。また Vrettos et al  
(1967) は、Albino mice に H C G を注射して腎臓  
の基底膜に変化を起こし得たと報告している。従  
つて妊娠、特に異常妊娠の場合、腎機能に変化の  
起こる可能性は強いものと思われる。ここに述べ  
た H C G 排泄率が腎機能変化によつて変動したも  
のか、または他の因子によるものか未だ不明であ

るが、切迫流産の病態生理の一端を示唆するもの  
として興味深く、更に検討を続けている。

分娩時の母体血、臍帯血および羊水の H C G 量  
について、東条ら (1968) は母体血中平均  $11,570$   
IU/l, 臍帯血中平均  $48$  IU/l, 羊水中平均  $331$  IU/l  
と報告しており、谷沢 (1967) は母体血中平均  
 $11.5 \pm 1.5$  IU/ml, 臍帯血中平均  $0.025 \pm 0.0042$   
IU/ml と述べている。また Grosignani (1969) は  
羊水と母体血の H C G 量にある程度の相関関係を  
認めている。著者は母体血と臍帯静脈血の H C G  
量の間に関係を認めたが ( $\gamma = 0.80$ ), 羊水と  
母体血または臍帯静脈血の H C G 量には相関関係  
を認めなかつた ( $\gamma = 0.03$ )。この臍帯静脈血中の  
H C G が胎盤由来のものであるか、または児の下  
垂体性 Gonadotropin であるかを調べる一手段  
として新生児血中 H C G 量の生後変化を検討した  
ところ、生後16時間で生下時の半量にまで減少し  
た。Midgrey et al (1968), Yen et al (1968) は  
H C G の血中半減期を調べ、各々 8.9 時間および  
37 時間、11 時間および 23 時間の two component  
の減少をみせると報告している。新生児血中 H C  
G が生後16時間で半減したこと、および母体血と  
臍帯静脈血中の H C G 量が相関関係にあることよ  
り、臍帯血中の H C G は胎盤または母体血由来の  
ものと考えられる。

絨毛性疾患患者の Follow up に R I A を利用  
した報告は極めて多く、Friedman 反応, Hema-  
gglutination Inhibition Reaction (HTAR) など  
で測定できなくなつた低単位 H C G の測定に R I  
A は不可欠の手段とさえいわれている。また最近  
では、絨毛上皮腫より分泌される H C G は F S H  
作用が強いとの報告もあるので、将来は F S H の  
R I A を併用して、絨毛上皮腫の早期発見、鑑別  
を行なうことも可能であろう。

## 結 論

1) 二重抗体法により H C G の R I A を行ない、その Parameter を検討した。Assay の感度は  $10$  mIU/ml 以上であり、HGH, HTSH, ACTH, Prolactin 等の影響は軽微であつた。

2) 妊娠血中および尿中の H C G 量は 9 ~ 12 週

目に peak を示した後速やかに減少し、21週目より40週目にかけて再び漸増した。また羊水中のHCG量は、妊娠前期において高値を示す例が多かった。

3) 分娩時母体血、臍帯血および羊水中のHCG量を測定し、母体血と臍帯静脈血のHCG量に相関関係を認めた ( $r=0.80$ )。また新生児血中HCG量は生後16時間目で半減した。これらの成績より臍帯静脈血中HCGはその大部分が母体または胎盤由来のものと推論した。

4) 切迫流産患者のHCG尿中排泄率は $0.44 \pm 0.01$ となり、正常妊婦の値 $0.80 \pm 0.12$ より低値であった。

5) 絨毛性疾患患者の血中HCG量を経日的に測定した結果、経過良好な例では、絨毛上皮腫では術後4週間で、また胞状奇胎では術後3週間で正常 Gonadotropin level に下降した。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜わった恩師藤生太郎教授に深く謝意を表すると共に、種々御教示を頂いた鳥越正助教授に厚く感謝致します。また終始御助言、御指導を賜わった本学第3内科柴田進教授、数々の技術的御指導と共にHGH、HTSHの提供を頂いた本学第3内科堀野正治講師に心から感謝致します。更に、精製HCGの提供を頂いた、帝国臓器KK松島早苗博士に深謝致します。

本論文の要旨は、昭和45年7月第23回日本産科婦人科学会中国四国合同地方部会（広島市）の席上で発表した。

注1：帝国臓器KK松島早苗博士より提供された。  
生物活性5340IU/mg.

注2：市販HCG (Pregnyl: Organon) をDEAE-Sephadex A-50, Biol-gel P-60 を用いて精製した。免疫活性4700IU/mg.

注3：Armour & Co. 製

注4：ダイナボットRI研究所製。

## 文 献

- 谷沢 修 (1967) : 阪大医誌, 19 : 105.  
 谷沢 修 (1970) : 日産婦総会宿題報告別刷.  
 高橋久寿, 香山浩二, 磯島晋三, 足立春雄 (1970) :  
 日本内科内分泌学会誌, 43 : 1370.  
 東條伸平 (1968) : 日産婦総会宿題報告別刷.  
 吉原暉文 (1970) 日本内分泌学会誌, 46 : 273.  
 脇田達也 (1964) : 四国医誌, 20 : 131.  
 Aono, T., Goldstein, D.P., Taymor, M.L. and Dolch, K. (1967): Am. J. obst. & gynec., 98: 996.  
 Brody, S. and Carlström, G. (1962): J. Clin. endocr., 22: 564.  
 Berson, S.A. and Yalow, R.S. (1960): Biochem. J., 91: 43.  
 Faiman, C., Ryam, R.J., Zwirek, S.J. and Rubin, M. (1968): J. Clin. endocr., 28: 1323.  
 Greenwood, F.C., Hinter, W.M. and Glover, J.S. (1963): Biochem. J., 89: 114.  
 Grosignani, P.G., and Polvani, F. (1969): J. obst. & gynec. Brit. Cwlth., 76: 424.  
 Hunter, C.A. Jr. and Howard, W.F. (1961): Am. J. obst. & gynec., 81: 441.  
 Morgan, C.R. and Lazarow, A. (1962): Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 110: 29.  
 Midgrey, A.R., Jr. (1966): Endocr. 79: 10.  
 Midgrey, A.R. Jr. and Jaffe, R.B. (1968): 28: 1712.  
 McCarthy, C., Pennington, G.W., and Crawford, W.S. (1964): J. obst. & gynec. Brit. Cwlth., 71: 86.  
 Odell, W.D., Parlow, A.F., Cargille, C.M. and Ross, G.T. (1968): J. clin. invest., 47: 2551.  
 Rodbard, D., Rayford, P.L., Cooper, J.A. and Ross, G.T. (1968): J. Clin. endocr., 28: 1412.  
 Toubert, J.L. and Maingey, D. (1963): Lancet., 29: 1403.  
 Vrettos, A.S. and Patsourakos, B. (1967): J. obst. & gynec. Brit. Cwlth., 74: 586.  
 Wilde, C.E., Orr, A.H. and Bagshawe K.D. (1965): Nature, 205: 191.  
 Wide, A. (1962): Acta endocr. Suppl., 70: 66.  
 Yen, S.S.C., Lierena, O. and Little, B. (1968): J. Clin. endocr., 28: 1763.  
 (特別掲載 No. 2400 昭45・10・5 受付)