

絨毛性ゴナドトロピンの免疫学的測定法 — 特に Radioimmunoassay による絨毛 性疾患の予後判定に関する研究

大阪大学医学部産科婦人科学教室(主任:足高善雄教授)

松 尾 健

概要 絨毛性疾患の予後の追跡ならびに治癒の判定についての検討を行なうため、正常妊娠時と絨毛性疾患の際のHCGの免疫学的異同および Bioassay と Immunoassay の相関性について検討を加え、さらにHCGの微量定量法として Radioimmunoassay を導入し、種々の症例における血清中HCGの動態を追跡して次の結果を得た。

- 1) ゲル内沈降反応, Radioautography, および Radioimmunoassay の dose response curve において正常妊婦と絨毛性腫瘍患者のHCGの間には免疫学的差異は認められなかった。
- 2) 尿および血清中HCGの Bioassay と Immunoassay による測定値間には高い正の相関が認められたが、尿中HCGの半定量的測定の結果、絨毛性疾患群は正常妊娠群に比して Immunoassay 値がやゝ高く、血清中HCGの定量的測定の結果は Immunoassay に比して Bioassay が高い測定値を示した。
- 3) 胞状奇胎娩出後順調にHCGが下降した症例においても、その remission curve は正常産褥時に比してはるかにゆるやかであった。
- 4) 胞状奇胎の予後追跡中に HCG-LH 境界域の測定値が持続した症例では estrogen の投与が臨床上有用な予後鑑別法であった。
- 5) 絨毛性疾患58例の予後追跡の結果、complete remission のHCG定量に関する基準は 100IU/L が適当であると考えられる。

緒 言

わが国における絨毛性腫瘍の発生頻度は欧米に比較して著しく高く、しかも絨毛上皮腫の予後は手術療法および化学療法の進歩にもかかわらず、今日なお不良である。その原因として本腫瘍の急速な進展性と、肺・脳など主要臓器への血行性転移が挙げられている。したがって絨毛性疾患の予後においては、悪性化の早期発見と早期治療の必要性が特に強調される。幸い絨毛性疾患は絨毛細胞自身が絨毛性ゴナドトロピン: Human chorionic gonadotropin (HCG) を産生する特性をもっているため、これを Index とする経過観察が行なわれ、従来は尿中HCGの測定には Friedman 反応などの生物学的測定法: Bioassay がもつとも広く利用されてきた。しかし Bioassay は動物使用に関連した繁雑さの故に、臨床上定量測

定を頻回に行なうことはほとんど不可能であった。Wide et al(1960)はHCGの抗原性を免疫学的に測定する血球凝集阻止反応: Hemagglutination inhibition reaction (HAIR)を開発し、その結果HCGの半定量的測定が容易になつたが、谷沢他(1964), Lewis et al(1964)は絨毛性疾患のHCGと正常妊娠時のHCGの間には抗原性に差のないことを証明し、HAIRが絨毛性疾患のHCG測定に広く応用できることを示唆した。その後著者らは多数の絨毛性疾患の症例をFriedman反応とHAIRの両法により観察を続け、その間に一定の相関を認めることができた。

しかしながらこれらいずれの方法によつても、感度の点で必ずしも十分にHCGの remission を追跡し得ないことを知り、さらに Wilde et al (1965)により開発されたHCGの微量定量法で

あるRadioimmunoassayに種々の検討を加え、臨床検査法としての諸条件を確立した後、絨毛性疾患管理の領域に新しいtoolとして本法を導入することを試みた。その結果従来の測定方法の感度以下における低単位HCGの動態をも比較的正確に追跡することが可能となり、絨毛性疾患の管理上有意義と考えられる若干の知見を得たので報告する

実験材料および方法

A) HCGの測定法

1) 生物学的測定法 (Bioassay: BA)

(イ) Friedman 家兎排卵反応 (FR)

原法にしたがつて、被検尿は生理的食塩水で稀釈して半定量的測定を行なった。

(ロ) 垂別幼若ラット腹側前立腺重量法 (VPW)

生後21日目、体重30～40gのSprague-Dawley系雄ラットをもちいてGreep(1941)、三宅(1961)変法に準じてHCGの生物学的定量測定を行なった。HCG標準品はRadioimmunoassayの際の標準HCGと同一の、部分精製HCGを使用した。

2) 免疫学的測定法 (Immunoassay: IA)

(イ) 寒天ゲル内沈降反応

妊娠各期の正常妊婦5例の血清、胞状奇胎患者2例の尿および血清、ならびに絨毛上皮腫患者2例の尿および血清をそれぞれ混合後ethanol沈澱法によつてHCGの粗抽出を行ない、妊婦血清、絨毛上皮腫患者の尿および血清抽出物は5mg/ml、胞状奇胎患者の尿および血清抽出物は2mg/mlの生理的食塩水に溶解後、標準HCGと同時にOuchterlony法によつて寒天ゲル内沈降反応を行なった。また各抗原溝には約10 μ Ciの¹²⁵I-HCGを加えておき、24時間後に沈降線があらわれて後、4℃生理的食塩水で48時間洗滌、乾燥後X線フィルムを密着させ6時間露出し、現像した。

(ロ) 血球凝集阻止反応 (HAIR)

Wide et al (1960)、谷沢 (1965) の方法によつて教室において routine に実施しているHCG感作タンニン酸処理ヒツジ赤血球凝集阻止反応によつて尿中HCGの半定量的測定を行なった。

(ハ) Radioimmunoassay (RIA)

i) 抗原HCGの精製

妊婦尿より抽出した2,000～3,000IU/mgの市販部分精製HCGをethanol濃度40～60%のisoelectric precipitationおよびDEAE-celluloseによるcolumn chromatographyにより精製し、8,000～6,000IU/mgの精製HCGを調製した

ii) HCGの¹²⁵Iによる標識

Greenwood et al (1963) の原法にしたがつて、¹²⁵Iによる上記精製HCGの標識を行ない、Sephadex G-50 (fine) によるgel filtrationによつて標識HCGと遊離iodineを分離した。標識HCGのspecific activityは100～200mCi/mgであつた。標識HCGはBSAを20mg/mlの割合に加え、0.1mlづつ分割後-20℃に凍結保存し、使用直前に融解、稀釈を行なった。

iii) 抗血清の調製

抗HCG血清 (モルモット) の調製: 上記精製HCG 2,000 IUをcomplete Freund's adjuvantと等量混合後皮内注射を行ない、2週間ごとに5回注射後、隔日に1,000 IUのbooster injectionを2回行ない、最終注射後1週間目に採血した。抗血清は垂別婦人尿カオリン抽出蛋白または小児尿蛋白100mg/mlを加えて吸収後、-20℃に凍結保存した。血球凝集反応による抗体価は1:6,400であつた。

抗モルモット γ -globulin血清 (家兎) の調製: 市販モルモット γ -globulinを抗原とし、HCGと同様の方法で家兎を免疫した。抗原総量50mgを使用した。

iv) 測定手技

実際の測定手技は表1に示すように、15mm×88mmのplastic tube中で¹²⁵I-HCG 0.1ml (約200 μ g)、標準HCGまたは被検血清 0.4ml 抗HCG血清 0.1ml およびEDTA 0.1mlを混合し、first incubationを4℃で3～4日間行なう。次いで抗モルモット γ -globulin血清 0.3mlを加えsecond incubationを12～24時間行なつた後、3,000rpm、30分間遠沈後上清を捨て、4℃生理的食塩水で沈澱を1回洗滌し、再遠沈した後沈澱

表1 Radioimmunoassay実施方法

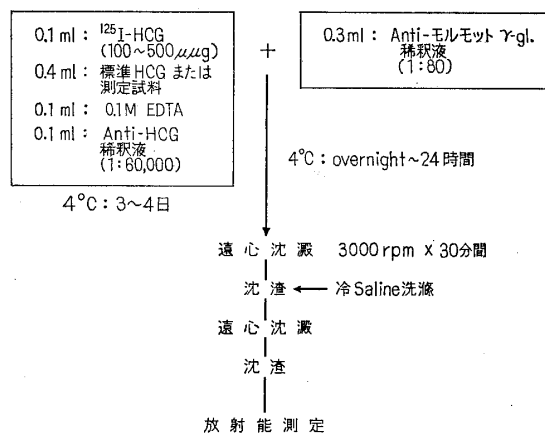
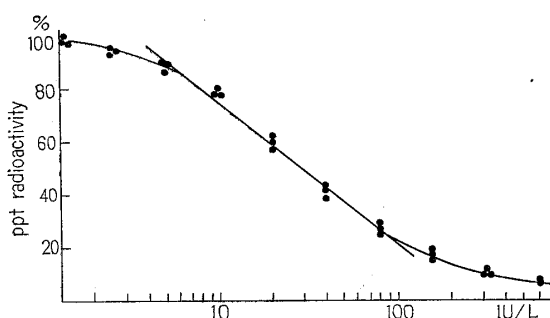


図1 標準曲線



の放射能を automatic well-type gamma detector で測定した。本法における稀釈液はすべて 1% BSA を含む pH 7.5, 0.05M phosphate, 0.15M NaCl 溶液をもちいた。標準HCGは Bioassay により IU を定めた HCG 部分精製品の 1.22~312.5IU/L 濃度の倍数稀釈系列を作製し、毎回の測定時に標準曲線を作製した。測定値の計算は谷沢他 (1967), (1968) の方法で行なった。

v) 標準曲線

上述の方法によつて標準HCGをもちいて画いた標準曲線を図1に示した。横軸に加えた cold HCG 濃度の対数値をとり、縦軸に沈澱放射能 (%) をとると 8~80IU/L 濃度の範囲で dose response curve は直線関係を示した。slope は -53.0, 精度 (λ) < 0.02 であつた。

B) 実験対象

阪大病院外来および入院患者で臨床的に絨毛性疾患と診断された症例ならびに正常妊産婦を対象とした。被検尿は早期尿または全尿の一部を採取

し、測定まで -20°C で凍結保存した。被検血清は原則として空腹時に採血し、血清分離後 -20°C で凍結保存した。測定試料は採取後 1 週間以内に測定に供した。

実験成績

A) 絨毛性疾患のHCGに関する基礎的検討

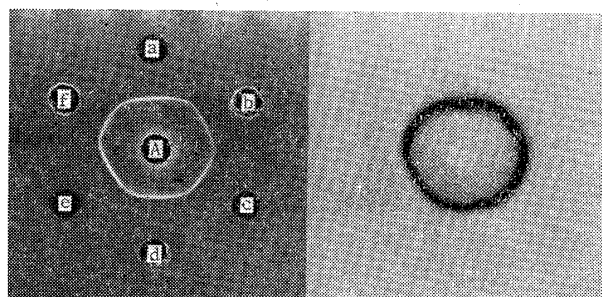
1) HCGの抗原性について

(イ) ゲル内沈降反応による検討

粗抽出を行なった正常妊娠、胎状奇胎および絨毛上皮腫患者のHCGと吸収抗HCG血清の間の沈降線は図2(a)に示したように1本に連つた。Radioautogram においても図2(b)のように連つた1本の沈降線に一致してX線フィルムの感光が見られた。

図 2

(a) Ouchterlony plate (b) Radioautogram



- a: 標準HCG (妊婦尿)
- b: 妊婦血清
- c: 胎状奇胎患者尿
- d: 同上血清
- e: 絨毛上皮腫患者尿
- f: 同上血清
- A: 吸収抗HCG血清

(ロ) RIAによる検討

正常妊婦(妊娠3カ月および10カ月), 胎状奇胎患者(胎状奇胎および破壊性奇胎), 絨毛上皮腫患者のおの2例の血清の倍数稀釈系列についてRIAを行ない, dose response curve を標準曲線と比較した。図3に示したように, 全例について curve の傾斜は標準曲線とよく一致した。

2) I A と B A によるHCG測定値の相関性について

(イ) 尿中HCGのHAIRおよびFRによる半定量測定値の相関性

図3 血清中HCGのDose response curve

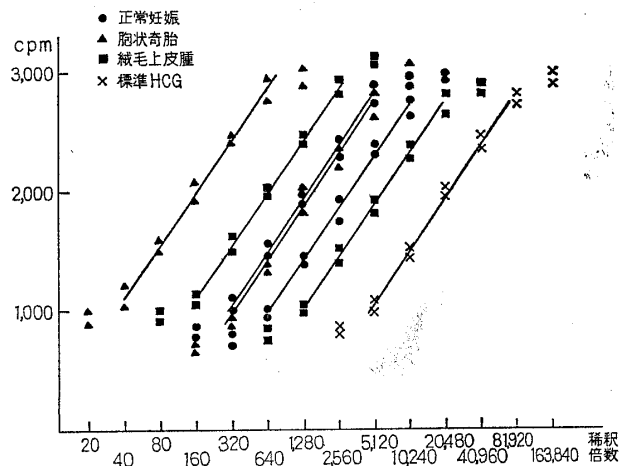
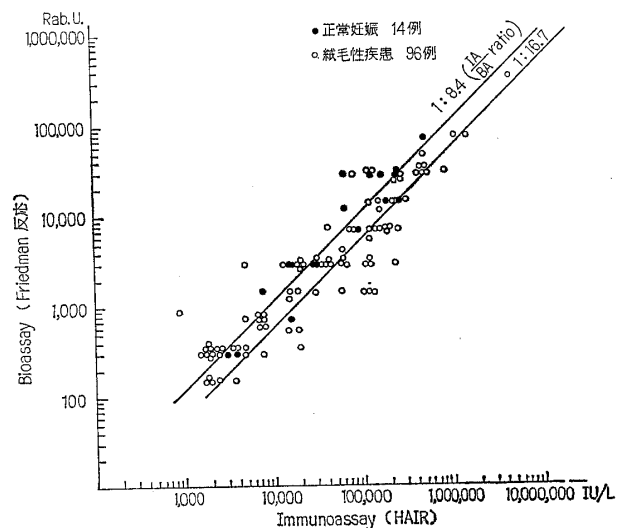


図4 HAIRとFriedman反応による尿中HCG測定値の相関

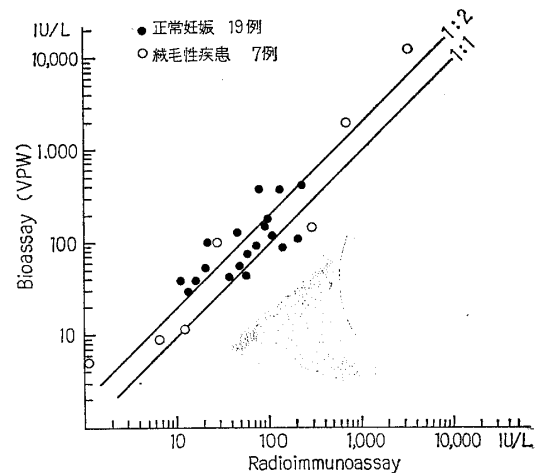


両測定法とも測定値として陽性→陰性への移行の中央値をとった。図4に示す通り、正常妊婦尿14例についてのIA/BA ratio (IU/Rab.U) は 8.4 ± 1.3 (S.E.M) であった。絨毛性疾患96例についての同ratioは 16.7 ± 1.6 (S.E.M) であった。この2群におけるIA/BA ratioの平均値の差は推計学的に5%の危険率で有意差と認められた。

(ロ) 血清中HCGのRIAおよびVPWによる定量測定値の相関性

図5に示す通り、正常妊婦血清19例についてのBA/RIA ratio (IU/IU) は 2.02 ± 0.26 (S.E.M)

図5 BioassayとRadioimmunoassayによる同一試料の測定値



であり、絨毛性疾患7例についての同ratioは 2.38 ± 0.59 (S.E.M) であった。この2群におけるBA/RIA ratioの平均値の差は有意とは認められなかった。

B) 臨床成績

1) 胎状奇胎娩出後の血清中HCGの消失

図6は奇胎娩出後HCGが順調に下降消失した1例であり、娩出後22日目に測定値は50IU/Lに下降した。HCG測定値の対数変換を行なうと、同図のように5日目以後尿および血清中HCGはほぼ直線状に下降し、その傾斜 α ($\log$ [測定値の減少]/日) は0.16であった。

図6 症例1

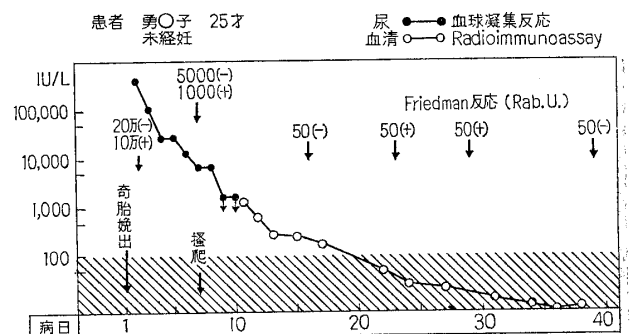


図7はMethotrexate (MTX) による予防的治療を行なった症例であるが、血清中HCGはほぼ直線状に下降し25日目に100IU/Lとなった。この間の α は0.17であった。

図7 症例2

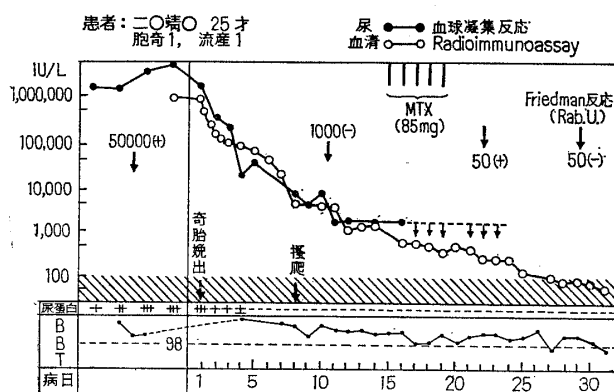


図9 症例4

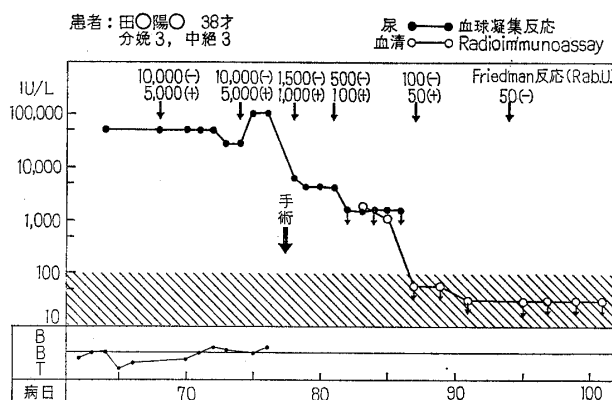


図8 症例3

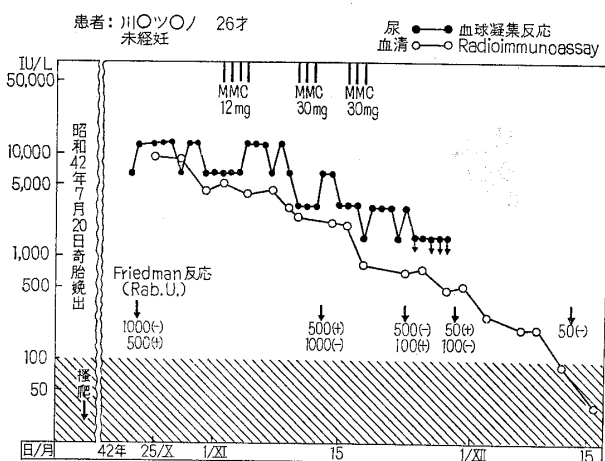


図10 症例5

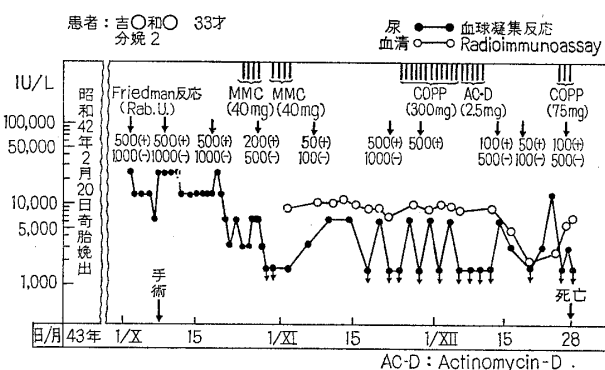
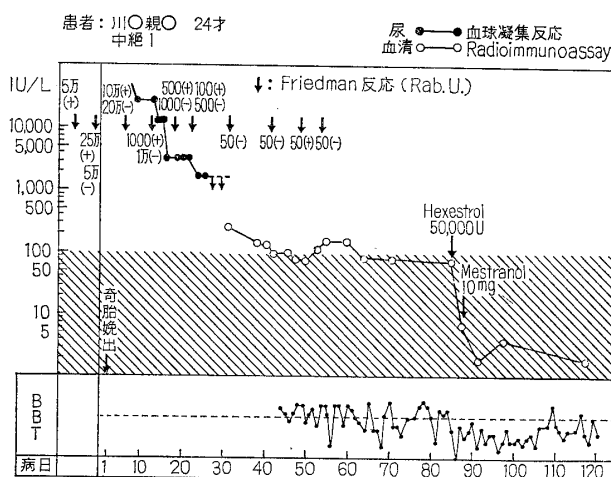


図11 症例6



2) 破壊性奇胎および絨毛上皮腫症例の血清中HCG

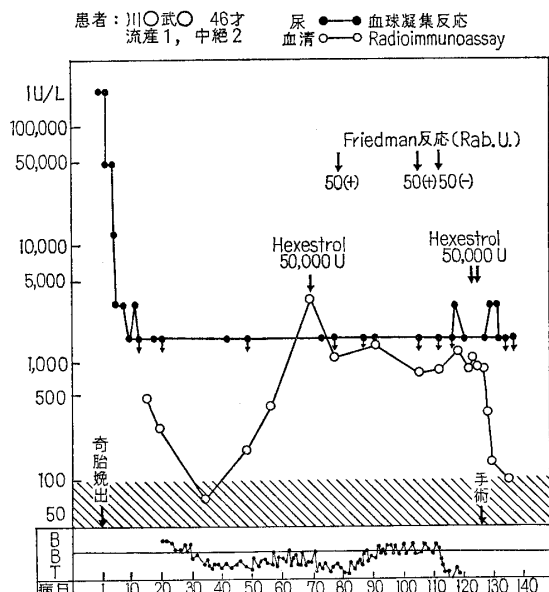
図8は Mitomycin (MMC) 72mg投与による化学療法で治癒した症例を示し, 図9は手術によつて治癒した症例を示した. 後者の病理組織像は破壊性奇胎であつた. 図10は肺および脳転移のため死亡した絨毛上皮腫患者の1例を示した. 11月中旬より一般状態の悪化とともにHAIRによる尿中HCG測定値は変動がきわめてはげしく, しばしば1,600IU/Lに調製したHAIRの測定感度以下となつたが, 血清中HCG測定値は8,000~11,000IU/Lの間では一定した値を示した.

3) 低単位測定値持続例

図11は胎状奇胎の予後追跡中に100IU/L程度の測定値が持続した症例であり, estrogen (Hexestrol 50,000単位)注射後測定値は急速に下降し,

その予後は良好であつた. 図12は一時下降したHCGの値が再び上昇傾向を示したのでestrogenの注射を行なつたが, HCGはなお1,000IU/L程度の値が持続した症例であり, pelvic angiographyでarterio-venous shuntを認め, 開腹手術により子宮前壁に小豆大の病巣の存在を確認し

図12 症例7



た。病理組織像は絨毛組織遺残であつた。

4) R I Aによる絨毛性疾患予後追跡の遠隔成績

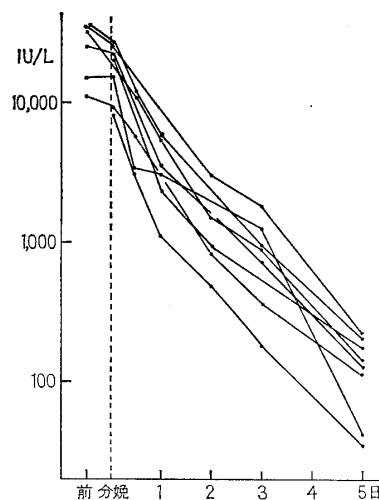
昭和41年8月より昭和44年6月まで本教室において胎状奇胎娩出後または絨毛性疾患治療後，R I Aによつて測定値が100IU/L以下に下降したことを確認した症例は58例であり，これらの症例についてその後延べ549検体の測定を行なつて予後を追跡したが，測定値が再び100IU/L以上に上昇してきた検体は，低単位測定値持続例2例の100～200IU/Lの測定値を除けば，図12に示した症例7の第33病日の1検体のみであつた。

疾患別症例数と追跡検体数を表2に示した。なお同期間中の絨毛性腫瘍による死亡例は3例であり，いずれも絨毛上皮腫でHCGの値は下降しないまま死の転帰をとつた。

表2 疾患別症例数と追跡検体数

疾患名	症例数	検体数
胎状奇胎	30	166
破壊性奇胎	8	75
絨毛上皮腫	6	84
組織分類不明	12	180
絨毛組織遺残	2	44
計	58	549

図13 産褥時の血清中HCG



5) 正常産褥時における血清中HCGの動態

図13は正常分娩後の褥婦における胎盤娩出後の血清中HCG消失状態を示した。全例ともほぼ直線状に下降し， α は0.52～0.38であつた。

考 案

A) 絨毛性腫瘍患者のHCGの抗原性について
絨毛性腫瘍患者のHCGをI Aによつて測定する際は，通常抗原および標準HCGとして正常妊婦尿から抽出精製したHCGが使用される。先に谷沢他(1964)はゲル内沈降反応および生物学的活性の中和実験から両HCGの抗原性に差のないことを報告しているが，今回ゲル内沈降反応と同時に標識HCGをもちいたRadioautographyにおいても沈降線は1本に連なることが証明された。さらに著者はR I Aをもちいて正常妊娠・胎状奇胎・絨毛上皮腫のHCGが標識HCGと抗体の結合に対し異なつたcompetitionの態度を示すのではないかとの疑点について検討を加えたが，図3のように各種HCGの間には全く平行関係が認められ，したがつて抗原性に差がないものとしてR I Aを絨毛性腫瘍の際のHCG測定に応用し得ることを知つた。

B) I AとB Aによる測定値の相関性について

HAIRは実用性の点からも尿中HCG測定に広く利用され，すでに免疫学的妊娠診断試薬として市販されるようになった。教室においても独自

に調製した HAIR system をもちいて HCG の半定量的測定を routin に実施してきた。そこでこれまでの FR および HAIR の同一試料についての測定値の相関性を数多くの例数をもとに解析したところ、非常に高い正の相関（危険率 1% 以下）が認められた。この値は Wide et al (1962) が 24 例について報告した成績ともよく一致した。この際正常妊娠群と絨毛性疾患群の BA/IA ratio を比較すると有意差が認められたが、その原因については Hamashige et al (1964) も指摘しているように HAIR 系はなお純粋な HCG のみの system ではないため、絨毛性疾患の際には正常妊娠に比して比較的多く含まれているようなある種の蛋白質を同時に測定している可能性も考えられ、また被検尿における変性の問題も考慮されなければならない。

次に血清中 HCG の RIA および VPW による測定値の相関性を検討したが、HAIR の場合と比較すれば RIA はより純化された抗原抗体系をもちいた定量法であり、一方 VPW も LH 定量法としては特異性の高い方法とされている。同一血清試料を両法で測定した結果も非常に高い正の相関（危険率 1% 以下）を示したが、BA 値がこのように常に一定比率で高い値を示す原因としては、標準 HCG が抽出精製の過程あるいは保存期間中に、一部分が生物学的に失活し抗原活性基のみが残るような変性を受けた場合、この HCG を標準にして native な試料を測定すると、IA 値がより低く算出される可能性がある。また標準 HCG に HCG のもつ生物学的活性を阻害する物質が含まれる場合、あるいは標準 HCG に RIA における沈降反応を nonspecific に阻害する物質が含まれる場合、さらに測定試料側にこの逆の変化の起こった場合などが可能性として考えられるが、その主な原因については今後の検討にまたねばならない。

C) 胎状奇胎娩出後の HCG remission

胎状奇胎流産後は絨毛上皮腫を続発することがしばしばあり、その周到な管理を行なうことにより悪性化の予防あるいは早期発見・早期治療を行

なうことが治療の実際には重要な課題となつていゝる。図 6・7 は胎状奇胎娩出後正常な経過により完全治癒に至つた症例であるが、FR および HAIR の測定感度以下になつた後も血清中 HCG はゆるやかに下降し、さらに 10 日～2 週間を経てはじめて 100IU/L 以下になつた。この結果から 1,000IU/L から 100IU/L への下降にかなりの日数を要し、RIA によればこの低単位の期間の remission が正確に追跡できることを知つた。一方著者らは、HCG の血清からの消失状態を把握しておけば、HCG 産生源が完全に除去された場合の理論的な remission curve がわかり、これと比較することにより胎状奇胎娩出後の予後をある程度推定できる可能性があるとの考えのもとに胎盤娩出後の時間と血清中 HCG 量との関係について検討した。その結果 remission curve は測定値の対数変換を行なうと Rizkallah et al (1969) も報告しているように直線的下降を示した。しかしその傾斜は産褥時の方が急峻であり、胎状奇胎流産後の場合にはたとえ予後の良好な例であつても HCG の消失が遅延していることを知つた。その原因については今後検討を加えたい。

D) 絨毛性疾患の予後判定について

これまでわが国では FR 50 家兎単位が絨毛性腫瘍の完全治癒の判定基準とされてきた。しかしこの値は多くの研究者によつて指適されているように、HCG の完全な remission を示すものではなく再び HCG が上昇し悪性化をたどる症例もしばしば経験された。一方下垂体性 LH が HCG と免疫学的に交叉反応を示すことは Wide et al (1961) によつて報告され、その後 Midgley et al (1965)、足高他 (1966)、Odell et al (1965)、Aono et al (1967) によつて HCG の RIA 系をもちいて LH を測定できることが報告された。血清中 LH レベルについては諸家により多少測定値が異なるが、排卵期のピーク、あるいは閉経期において 50IU/L (HCG equivalent) 前後の値を示すものとされている。著者はこうした成績をもとに、一応 100IU/L を HCG-LH の境界域と考え、これ以上の値を示す場合は HCG として処理すべきであると

の考えのもとに多数例について予後の追跡を行なった。その結果、現在まで著者が観察した成績からは測定値が一たん 100IU/L 以下に下降し、再び上昇した例は僅かに1症例の1検体のみであったので、絨毛性腫瘍の complete remission としての基準は、HCGの定量に関しては100IU/Lをとることが適当であり、予後の判定により役立つであろうと考えている。

E) 低単位測定値持続例について

胞状奇胎娩出後の予後追跡中2例の低単位測定値持続例に遭遇した。いずれも正常婦人のLHピーク以上の測定値であり、またこの値が連日続いているため、下垂体からの生理的なLH分泌とは考え難いが、絨毛性腫瘍患者は長期間異常なHormone環境下にあつたため、下垂体からの高単位のLH分泌が続いているとの可能性も否定できない。そこでLHへのfeedback作用を期待してestrogen投与試験を行なったところ、2例とも測定値は急速に下降した。いずれも投与後に消褪性出血を認めているので、子宮内膜に残存した微小な病巣が剝離流出したという可能性も考えられるが、測定値の下降は消褪性出血の発来以前から認められるので、やはりestrogenによる下垂体性LHの抑制と考えた方が妥当であろうと考えている。1,000IU/L前後のHCG測定値が続いた症例ではestrogen投与後もHCGは依然としてLHレベルよりもはるかに高い値を持続した。したがって著者らのestrogen投与法は臨床上鑑別診断にきわめて有用な方法であると考えている。Midgley et al(1967)の報告によればSephadex G-100によるゲル濾過の溶出態度からLHとHCGを鑑別できるとしており、われわれも追試確認しているので、この問題についてはさらに基礎的な検討を加えたい。

結 論

HCGの測定法として従来のFriedman反応などのBioassayとImmunoassayの関係について検討し、さらにHCGの微量定量法としてRadioimmunoassayを導入して、絨毛性疾患の治療経過の管理、特に予後の追跡および治癒の判定につ

いての検討を行なつて次の結果を得た。

(1) 正常妊婦ならびに絨毛性腫瘍患者の尿および血清から粗抽出したHCGと抗HCGの間の沈降線は1本に連り、その沈降線に一致してフィルム上に標識HCGによる感光が認められた。また正常妊婦および絨毛性腫瘍患者の血清によるRadioimmunoassayのdose response curveは、正常妊婦尿から抽出した標準HCGによるcurveと平行した。

(2) 尿中HCGのHemmagglutination inhibition reactionおよびFriedman反応による半定量測定値は高い正の相関を示したがIA/BA ratioは正常妊娠群では 8.4 ± 1.3 、絨毛性疾患群では 16.7 ± 1.6 であり、絨毛性疾患群のImmunoassay値が相対的にやや高い値を示した。

(3) 血清中HCGのRadioimmunoassayおよび垂剝ラット腹側前立腺重量法による定量測定値も高い正の相関を示したが、BA/IA ratioは 2.3 ± 1.72 となりBioassayが高い測定値を示した。正常妊娠群と絨毛性疾患群の間に有意差は認められなかつた。

(4) 正常産褥時の血清中HCGは測定値を対数変換するとほぼ直線状に下降し、 α は $0.52 \sim 0.38$ であつた。奇胎娩出後順調にHCGが下降した症例において、HCGはほぼ直線状に下降したが、その傾斜は正常産褥時に比してはるかにゆるやかであつた。

(5) 胞状奇胎の予後追跡中100IU/L前後の測定値が持続した症例ではestrogen投与後測定値は急速に下降し、本法は臨床的な予後鑑別法として有用な方法であつた。

(6) 胞状奇胎娩出後および絨毛性疾患の治療後、測定値がHCG-LH境界域と考えられる100IU/L以下に下降した58症例について、延べ549検体による予後の追跡を行なったが、1症例の1検体を除いて再び測定値の上昇を認めなかつた。したがって絨毛性腫瘍のcomplete remissionとして、HCGの定量に関する基準は100IU/Lが適当であると考えられる。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わ

1969年11月

松 尾

1341

つた恩師足高善雄教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究の実施にあたり終始御指導御鞭撻いただいた教室の谷沢修講師をはじめ御助言御援助いただいた教室員各位に衷心より感謝致します。

なお精製HCGを提供された帝国臓器研究室松島早苗博士およびラット垂別御協力いただいたシオノギ製薬三宅研究室糸賀氏に感謝致します。

本論文の一部要旨は昭和42年度日本産科婦人科学会北陸近畿連合会、第41回日本内分泌学会総会および第21回日本産科婦人科学会総会において発表した。

(本研究費の一部は文部省科学研究費によつたことを附記します。)

文 献

- 足高善雄, 谷沢 修 (1966): 産婦治療, 13: 565.
 三宅 有 (1961): 日内分泌誌, 37: 576.
 谷沢 修, 磯島晋三 (1964): 日内分泌誌, 39: 908.
 谷沢 修 (1965): 日産婦誌, 17: 145.
 谷沢 修 (1967): 阪大医誌, 19: 105.
 谷沢 修, 松尾 健, 三井 磐, (1968): 医学のあゆみ, 67: 448.
 Aono, T., Goldstein, D.P., Taymor, M.L. and Dolch, K. (1967): Am. J. Obst. & Gynec., 98: 996.

- Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963): Biochem. J., 89: 114.
 Greep, R.O., Van Dyke, H.B. and Chow, B.F. (1941): Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 46: 644.
 Hamashige, S. and Arquilla, R. (1964): J. Clin. Invest., 43: 1163.
 Lewis, J., Dray, S., Genuth, S. and Schwartz, H.S. (1964): J. Clin. Endocr., 24: 197.
 Midgley, A.R., Jr. and Ram, J.S. (1965): Fed. Meeting.
 Midgley, A.R., Jr. and Jaffe, R.B. (1967): Nature., 213: 733.
 Odell, W.D., Wilber, J.F. and Paul, W.E. (1965): J. Clin. Endocr., 25: 1179.
 Rizkallah, T., Gurside, E. and Vande Wiele, R.L. (1969): J. Clin. Endocr., 29: 92.
 Wide, L. and Gemzell, C. (1960): Acta Endocr. (Kbh.), 35: 261.
 Wide, L., Roos, P. and Gemzell, C. (1961): Acta Endocr. (Kbh.), 37: 445.
 Wide, L. (1962): Acta Endocr., 41: Suppl. 70.
 Wilde, C.E., Orr, A.H. and Bagshawe, K.D. (1965): Nature., 205: 191.

(No. 2260 昭44・7・7 受付)