A Study of Radioimmuno-double-antibody-assay of Human Growth Hormone in Infants and Children

Keiko Takeuchi

Department of Pediatrics, University of Tokyo, Tokyo, Japan
(Director ; Professor Tadao Takatsu)

Measurement of human growth hormone (HGH) in plasma has much significance in the study of growth and development of children. Since the radioimmunoassay using ^{131}I -tracer was introduced into the HGH determination in plasma by Hunter and Greenwood, it becomes easy to estimate the very Low level of HGH in plasma accurately. In radioimmunoassay of HGH are four different kinds of methods to separate the bound ^{131}I -labeled HGH from free ^{131}I -labeled HGH; that is, chromatoelectrophoresis, double antibody precipitation method, absorption method using ion exchange resin and salt-precipitation method using sodium sulfate. Among them, the double antibody precipitation method is thought to be the best one to determine the plasma HGH levels because of its simplicity, its good reproducibility of the results. It is the purpose of this paper to comment on the double antibody precipitation method and to elucidate the change of the plasma HGH levels in various ages using this method.

The results were as follows:

1. Labeling of HGH

HGH purified by Dr. M.S.Raben was iodinated with Na^{131}I using the method of Hunter and Greenwood and ^{131}I -labeled HGH of the high specific activity was obtained (about 150–200 mCi/mg). PH 8.6 was optimal PH of the reaction medium to obtain the best yield of ^{131}I -HGH.

2. Double antibody precipitation method

Rabbit anti-HGH serum was obtained ten days after the last of three weekly subcutaneous injections of 5 mg human growth hormone (Raben) emulsified in complete Freund's adjuvant. Guinea pig anti-rabbit γ -globulin serum was used as the second antibody. All dilutions except for human plasma and standard solution of HGH were made with 0.1% bovine serum albumin in a veronal buffer, 0.07M, PH 8.6.

The same HGH diluted with 0.5% bovine serum albumin in the same veronal buffer was used for the preparation of the standard curve according to the method of Schalch and Parker. The concentrations of standard solution were 0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 23.0 $\text{m}\mu\text{g/ml}$. 0.1 ml of ^{131}I -labeled HGH solution (0.2–0.6 $\text{m}\mu\text{g}$ of ^{131}I -HGH) was added to 0.5 ml of standard solution or diluted plasma (1:11). 0.25 ml of diluted anti-HGH serum was then added to each tube and the mixture was incubated at 4°C for seven days after the gently shaking the tube. At the end of the incubation period 0.1 ml of guinea pig anti-rabbit γ -globulin serum was added to the mixture and finally

0.1 ml of 1:20 normal rabbit serum was added as the carrier protein and incubated again at 4°C for 24 hours. The tubes were then centrifuged at 3,000 r.p.m. for ten minutes and the supernatants were discarded. The precipitates were counted by well type of scintillation counter and the percentage of ^{131}I -labeled HGH precipitated was calculated.

The recovery of this procedure was 53% to 153% (mean 104%) and the reproducibility of the result was 62% to 166% (mean 104%).

1) The effect of the concentration of ^{131}I -HGH solution

^{131}I -HGH solutions of three different concentrations were used to prepare the standard curve. It was possible to determine the smaller amount of HGH in plasma in the lowest concentration of ^{131}I -HGH.

2) The effect of the dilution of anti-HGH serum

While it was not possible to determine the smaller amount of HGH in plasma with the higher concentration of anti-HGH solution, it was not possible to determine the larger amount of HGH with the lower concentration of anti-HGH solution. The appropriate concentration was 40,000 fold to determine between 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of HGH.

3) The effect of the incubation time

Five days were required to reach the equilibrium of the first step of antigen-antibody reaction, especially in the lower concentration of HGH solution.

4) The effect of pH of the diluent

Two different kinds of solution were used as the diluent, phosphate buffer, 0.1 M, pH 7.2, and veronal buffer, 0.07 M, pH 8.6. The standard HGH solution and the human plasma were diluted with 0.5% bovine serum albumin, 5% human serum albumin, 1% human γ -globulin, 1:8 normal guinea pig serum and 1:8 hypopituitary patient's plasma in the phosphate buffer or the veronal buffer. While the standard curve in 1:8 hypopituitary patient's plasma was different from that in other solution when the phosphate buffer, 7.2, was used as the diluent, the standard curve in all solutions showed the same curve when the veronal buffer was used.

5) The effect of the dilution of the plasma

Since no good results had been obtained by using non-diluted plasma, some experiments were performed to determine how to dilute the plasma to be used in this method. It was shown that the plasma to be used should be diluted 6 to 50 times before adding the reaction mixture.

3. The basal levels of HGH in various ages

The plasma HGH levels were determined in the morning after 14 hours' overnight fasting in 95 normal infants, 66 normal children and 6 normal adults. They were very high in the first few days and decreased gradually to the same level of adults within the first month of life. It was shown that there was no significant difference in the plasma HGH levels at various ages and in both sexes.

(pp. 139~153)

成長ホルモンの Radioimmunoassay (二重抗体法) に 関 す る 研 究

特に、その測定法の基礎的検討と健康小児早朝空腹時値について

東京大学医学部小児科学教室 (指導：高津忠夫教授)

竹 内 恵 子

(昭和42年12月13日受付)

Schalch and Parker による二重抗体法を用いた radioimmunoassay により、小児の血漿成長ホルモンを測定した。11倍稀釈血漿0.1mlを用い、 $1.4\text{m}\mu\text{g/ml}$ まで測定可能であり、平均回収率105.5%で、再現性は良好であった。161名の小児、および、6名の成人の早朝空腹時血漿成長ホルモン値は、生後48時間以内は高く、その後、次第に減少して、1月以内に成人と同様の値に下降し、その後は、年齢、および、性に関係なく、ほぼ、同様の値をとつた。

第1章 緒 言

成長ホルモン (Human Growth Hormone, 以下 HGH と略す) は、小児の発育に不可欠なホルモンである¹⁾。1944年、Li & Evans²⁾ が、牛の脳下垂体より、純度の高い成長ホルモンを分離することに成功して以来、成長ホルモンの作用について、幾つかの研究が報告されているが、他の脳下垂体前葉ホルモンと異なり、target organ を持たないために、その分泌の有無を知ることは極めて困難で、成長ホルモンに関する研究は、近年に至る迄、かなりの立ち遅れを見せていた。

HGH は、生体にごく微量存在する蛋白質であり³⁾、直接測定することはむづかしい。従来、報告されている測定方法は、Bioassay としては、Greenspan 等⁴⁾の脛骨骨端軟骨幅増成法 Tibia test, Marx 等⁵⁾の体重増加法、及び、間接測定法として、Daughaday 等⁶⁾の血中 Sulfation factor の測定などであるが、いずれも精度、特異性などに問題があり、満足すべきものではない。しかし、1957年に、Knobil 等⁷⁾が、成長ホルモンには、強い種属特異性があるということを報告して以来、HGH に特異的な抗体を作り、抗原抗体反応を用いて測定する方法が考えられるようになって来た。Read⁸⁾⁹⁾等は、赤血球凝集阻止反応を用いた測定法を考案し、ごく少量の血清を用いて、血清中の HGH の測定を行つたが、nonspecific inhibitor の存在¹⁰⁾¹¹⁾のために、充分な結果が得られず、Dominguez 等¹²⁾が、血漿より HGH を粗抽出し、Read の方法を試みたが、やはり、nonspecific inhibitor を除去することが出来なかつた。一方、1956年に、Yalow & Berson¹³⁾ が、Insulin の測定法として、 ^{131}I -標識 Insulin を用いた抗原抗体反応による Radioimmunoassay を発表した¹⁴⁾が、この原理を応用して、glucagon¹⁴⁾、parathyroid hormone¹⁵⁾、ACTH¹⁶⁾、placental lactogen¹⁷⁾、TSH¹⁸⁾、vasopressin¹⁹⁾、FSH²⁰⁾、HCG²¹⁾、LH²¹⁾ などの、従来困難であつた蛋白ポリペプチド系ホルモンの測定が可能となり、HGH についても、 ^{131}I ²²⁾ 又は、 ^{125}I ²³⁾ を用いた Radioimmunoassay が報告されるようになった。

Radioimmunoassay では、抗体と結合した放射性ヨウ素標識 HGH を、抗体と結合しない放射性ヨウ素標識 HGH と分離する段階で、Hunter 等²²⁾、Glick 等²⁴⁾の chromatoelectrophoresis 法、Utiger 等²⁵⁾、Utiger²⁶⁾ Schalch 等²⁷⁾の double antibody 法、及び、Lazarus 等²⁸⁾の ion exchange resin 法の三法が用いられている。この三法の内、chromatoelectrophoresis 法と、double antibody 法が、多くの研究者により用いられているが、いずれがより良い測定法であるかについては、まだ、はつきりしていない。しかし、

chromatoelectrophoresis 法に比べて, double antibody 法では, 同時に多数の検体を処理することが出来, しかも, 簡単な器械ですむことから, 現在では, かなり広範囲の研究機関で用いられている²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾. 本邦でも, 入江等³²⁾, 岡田等³³⁾は, chromatoelectrophoresis 法, 辻等³⁴⁾は, double antibody 法により, それぞれ測定結果を報告しているが, 著者は, doable antibody 法を用い, 測定法の検討を行い, 年齢別正常小児早朝空腹時値を測定したので報告する.

第2章 測定方法

1. 試薬調製

1) ヒト成長ホルモン

ヒト脳下垂体より, M.S. Raben 博士により抽出された結晶ヒト成長ホルモンを用いた.

2) 放射性ヨウ素 (^{131}I) 標識 HGH の作製

試薬:

a) Na^{131}I 溶液

放射性同位元素協会, pH 8.0-10.0, 亜硫酸ナトリウム加, 放射化学的純度99.9%以上

b) pH 8.6 Veronal 緩衝液, 0.07M 及び 0.14M (以下, pH 8.6 0.07M V-B 又は, pH 8.6 0.14M V-B と略す)

c) 7mg/ml chloramin T 溶液 (溶媒: pH 8.6 0.07M V-B)

d) 4.8mg/ml Sodium metabisulfite 溶液 (溶媒: pH 8.6, 0.07M V-B)

e) 10mg/ml KI 溶液

f) 20mg/ml Crystalline Bovine Serum Albumin 溶液 (溶媒: pH 8.6, 0.07M V-B)

Crystalline Bovine Serum Albumin: Armour Co. Ltd., U.S.A.

g) Sephadex G-50 及び G-100

器具, 器械:

a) 蛋白分離用カラム, 2本

内径 10mm, 管長 25cm のガラス製円筒カラム, 円筒は二重とし, 外筒に流水を通して内筒を冷却することが出来るようにした. 各々に Sephadex G-50 1g 又は, Sephadex G-100 1g をつめ, Crystalline Bovine Serum Albumin 20mg (1ml) を加えた後, 約 25ml の pH 8.6, 0.07MV-B で飽和した物を使用まで氷冷,

b) Well-type Scintillation Counter

理化学研究所 Radiation counter Model RSC-2E4, 又は, Aloka Radiation counter Model DC-5

方法:

Greenwood 等³⁵⁾の方法に従った. 試薬は予め氷冷し, 反応は全て ice bath 中で行い, カラムにて分離の際は, 外筒に 0℃の水を流し, 冷却した.

Na^{131}I 溶液 15mCi に, 0.3ml pH 8.6, 0.14M V-B を混合し, 20 μg HGH (20mg/dl solution, 0.1ml) を加え, 充分混和, 次いで, Chloramin T 溶液 0.1ml を加え, ゆつくりと攪拌し, 60秒後に Sodium metabisulfite 溶液 0.2ml を加えて, 反応を停止させ, carrier として, KI 溶液 0.1ml を加えてヨウ素化を終了.

次に, 予め Crystalline Bovine Serum Albumin にて飽和した Sephadex G-50 カラムを用い, 上記の反応液を pH 8.6, 0.07MV-B にて溶出し, 4.0 から 4.5ml の部分に溶出された液を ^{131}I -標識 HGH (以下 ^{131}I -HGH と略す) として使用した (specific activity 150~200mCi/mg).

次に, 実際の測定にあたっては, ヨウ素化の際に生ずる damaged ^{131}I -HGH の影響を除くために, ^{131}I -HGH 0.2ml に 1.8ml の人血清を加え, 4℃, 24時間 incubate し, Sephadex G-100 のカラムで pH 8.6, 0.07M V-B にて溶出し, 4.0~4.5ml の部分に溶出された ^{131}I -HGH を用いた.

3) 抗ヒト成長ホルモンの作製

HGH 2mg を, Freund's adjuvant (ヤトロン社, U.S.A) と共に, 1.5~3 kg の家兎の背部皮下に7日間隔で3回注射し, 更に10日後, 1 mg の HGH を生理的食塩水 10ml に溶解して静注した. その後, 10日目に全採血し, 血清分離後, -20°C にて凍結保存した.

4) 抗家兎 γ -globulin モルモット血清の作製

健康家兎血清より, 硫酸塩析沈でん法によつて, γ -globulin を抽出, その10mgを Freund's adjuvant と共にモルモット背部皮下に7日間隔で4回注射し, さらに, 7日後, 5 mg を生理的食塩水 1 ml に溶解して, 腹腔内に注射した. その後さらに7日目に, 全採血し, 血清を分離して, -20°C にて凍結保存した³⁶⁾.

5) 検体採取, 並びに保存

肘静脈, 又は, 股静脈より, ヘパリン処理注射器にて採血. 直ちに, 血漿を分離し, 測定までに時間のかかる時は -20°C の deep freezer にて凍結保存した.

II 測定方法

1) 既知濃度 HGH 溶液による標準曲線の作製

Schalch and Parker²⁷⁾ 及び Utiger²⁸⁾ の方法に若干の改変を加えた. (図1)

Fig. 1. Method of radioimmuno-double-antibody assay for human growth hormone

で, 標準曲線を作製した. 尚. HGH 標準液以外の稀釈はすべて 0.1% Crystalline bovine serum albumin (溶媒: pH 8.6, 0.07M V-B) を用いた.

2) 検体の測定

血漿 0.1ml を 0.5% Crystalline bovine serum albumin 溶液 (溶媒: pH 8.6, 0.07M V-B) で11倍に稀釈し, その0.5mlをとり, 標準曲線作製の時と同様の操作を行つた. 又, 測定はすべて duplicate で行つた.

第3章 測定法に対する検討

I ^{131}I -HGH 作製に対する検討

1) pH の影響

Fig. 2. Effect of PH on iodination of GHG (modification of the method of Hunter & Greenwood)

Fig. 3. Purification of ^{131}I -GHG by Sephadex G-50

Fig. 4. Elution of purified ^{131}I -GHG through Sephadex G-100

GHG のヨウ素化により作製された ^{131}I -GHG を未反応の ^{131}I と分離 するために行つた Sephadex G-50 による Gel Filtration の結果を Fig. 3 に示めた。3.5ml~4.5ml の間、及び 7~10ml の間に溶出された部分に radioactivity の peak を生じたが、第一の peak は、GHG のみを流した時の peak に一致し、第二の peak は、 ^{131}I のみを流した時の peak に一致した。(但し、GHG のみを流した時の流出状況は、Beckmann 光電比色計で、蛋白濃度を測定することにより見た。)

この GHG のヨウ素化に際しての pH の影響を見るために、反応液の pH を 7.6, 8.0, 8.6, 9.0 に変化させ、 ^{131}I -GHG の収率及び ^{131}I -GHG と ^{131}I との分離の状態を調べた。但し、緩衝液は、すべて 0.07MV-B を用いた (Fig. 2)。この結果、pH 8.6, pH 9.0 の場合には、pH 7.6, pH 8.0 に比べて第一の peak が高く、しかも、pH 8.6 では、第一の peak と第二の peak が最もよく分離されていた。

次に、ヨウ素化に際して生じた damaged ^{131}I -GHG、及び、unstable ^{131}I -GHG を除去するために、Sephadex G-50 の Gel Filtration で 4.0~4.5 ml の間に流出した部分に、10 倍容の人血清を加え、

4℃24時間 incubate した後, Sephadex G-100 のカラムにて精製分離した (Fig. 4).

II 標準曲線に対する検討

1) 抗ヒト成長ホルモンの濃度変化による影響

抗ヒト成長ホルモンの濃度を 5000倍, 10000倍, 20000倍, 40000倍, 60000倍, 80000倍, 120000倍 に変化させ, 標準曲線に対する影響を見た (Fig. 5).

Fig. 5. Standard curve by various dilution of anti GHG

標準曲線の勾配は, 抗体の濃度が濃い程急峻だが, HGH の低濃度の部分の鑑別が出来ない. 抗体の濃度がうすくなるに従つて, 勾配は平坦となるが, 低濃度の鑑別が可能となる. 従つて, 勾配も急峻であり, しかも, 低濃度も鑑別出来る濃度としては40000倍が最も適当であつた.

2) ^{131}I -HGH の濃度による影響

添加する ^{131}I -HGH の量による 標準曲線の移動について調べるために, ^{131}I -HGH 溶液の濃度を200倍 (^{131}I -HGH として約 $2\text{m}\mu\text{g/ml}$), 5000倍 (約 $1\text{m}\mu\text{g/ml}$), 10000倍 (約 $0.5\text{m}\mu\text{g/ml}$) とし, それぞれ 0.1 ml ずつ加えた (Fig. 6). これによると, 10000倍と 5000倍では, ほとんど曲線に大きな変化はないが, Bの量が少なくなり, 特に, 低濃度の鑑別が悪かつた.

3) incubation time による影響

incubation time の長短による標準曲線の移動についてみるために, first step の incubation time を1日, 2日, 3日, 4日, 5日, 7日と変化させ, それぞれ標準曲線を作製した. second step はすべて同様に24時間づつとした (Fig. 7).

incubation time が長くなればなる程, Bの量は増し, 特に, HGH が低濃度の部分で著明であつた.

従つて, incubation time が長い程, 標準曲線の勾配は急峻となり, 精度は良好となつた. しかし, 5日と7日では, 標準曲線はほぼ一致し, 従つて, 少なくとも5日以上 incubation では, 抗原抗体反応が平衡に達していると考えられた.

4) 稀釈液による影響——特に, pH による相違について

Fig. 6. Standard curve of HGH by various concentration of ^{131}I -HGH

Fig. 7. Effect of incubation time on standard curve of HGH

標準液調製のための稀釈液として、0.5% Crystalline bovine serum albumin (CBA solution とする)以外に、5% human serum albumin 溶液 (HSA solution とする)、1% human γ -globulin 溶液 (HSG Solution) を用い、HGH を含まないか、又は、含んでも極めて少量と考えられる下垂体侏儒患者血漿 (CBA solution にて 8 倍に稀釈、HPI solution とする) にて稀釈した場合の標準曲線と比べた。

先づ、溶解液として、pH 7.4, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1M P-B とする) を用いた場合を Fig. 8 に示めた。これによると、HPI solution による標準曲線は、CBA solution による標準曲線にやや近いが、完全に一致せず、HSA solution 及び HSG solution による標準曲線とは明らかに離れた。次に、溶解

Fig. 8. Comparison of standard curve of HGH in various diluent

Fig. 9. Comparison of standard curve of HGH in various diluent

液として, pH 8.6, 0.07M V-B を用いた場合を Fig. 9 に示めた。これによると, HPI solution による標準曲線は, 他の三液による標準曲線と完全に一致した。

この点についてさらに究明するために, pH 7.4, 0.1M P-B にて溶解した CBA solution, pH 8.6, 0.07M V-B にて溶解した CBA solution, 及び, pH 8.6, 0.07V-B にて10倍に稀釈した正常モルモット血清にて, それぞれ抗ヒト成長ホルモンを稀釈し, 抗ヒト成長ホルモンの Titration curve を描き, pH 7.4, 0.1M P-B にて稀釈した HPI solution, 及び, pH 8.6, 0.07M V-B にて稀釈した HPI solution を用いた場合の Titration curve と比べてみた (Fig. 10)。これによると, pH 7.4 では CBA Solution と, HPI solution で

Fig. 10. Influence of PH on titration of anti-HGH serum

は Titration curve は一致せず, pH 8.6 では, CBA Solution, モルモット血清とも, HPI solution による Titration curve を完全に一致した。

又, 同時に, CBA solution を用いた場合, HGH-抗 HGH 結合体以外に, 最終沈でん物に混合してくる放射能を調べたが, pH 8.6, pH 7.4 共に, 5%以下であり, CBA solution 単独, 又は, CBA solution に carrier protein として用いた20倍稀釈正常家兎血清を加えたものでは, ^{131}I -HGH を沈でんさせる作用はないことが認められた (Table 1)。

Table 1. Effect of various factors on percentage of ^{131}I -HGH precipitated

pH	Anti-HGH	Diluent	Human Plasma	Normal Rabbit Plasma	T.C.A.	Incubation Time		Precipitate %
						1st. Step	2nd. Step	
8.6	1:300	+	—	—		30°C, 60'	4°C, 12 hrs.	89
	1:300	+	1:8	—		37°C, 60'	4°C, 12 hrs.	93
	—	+	—	—		4°C, 6 days	4°C, 2 days	3.7
	—	+	—	1:60000		4°C, 6 days	4°C, 2 days	4.1
	—	+	—	—		4°C, 6 days	4°C, 2 days	4.1
7.4	1:2400	+	—	—		37°C, 60'	4°C, 12 hrs.	85
	1:2400	+	1:8	—		37°C, 60'	4°C, 12 hrs.	85
	—	+	—	—		4°C, 6 days	4°C, 2 days	4.8
	—	+	—	1:60000		4°C, 6 days	4°C, 2 days	5.0
	—	+	—	—	+			92

Table 2. Precision of standard curve

HGH ($\mu\text{g/ml}$)	No.	B/F + B (Mean $\pm$ SD)	HGH from standard curve (Mean $\pm$ SD)	
0.06	6	$68.6 \pm 3.1\%$	$0.061 \pm 0.015 \mu\text{g/ml}$	$P < 0.01$
0.125	5	63.4 ± 2.6	0.126 ± 0.07	$P < 0.01$
0.25	4	56.5 ± 2.0	0.28 ± 0.03	$P < 0.01$
0.5	5	53.2 ± 1.4	0.42 ± 0.07	$P < 0.01$
1.0	4	66.5 ± 1.0	1.01 ± 0.01	$P < 0.01$
2.0	6	40.0 ± 1.2	2.20 ± 0.2	$P < 0.01$
4.0	3	35.5 ± 1.9	3.9 ± 0.3	$P < 0.01$
16.0	5	23.3 ± 1.5	17.0 ± 3.5	

Table 3. Recovery of added HGH from human plasma (1 : 11)

Plasma source		Amount of HGH added ($\mu\text{g/ml}$)	Endogenous HGH ($\mu\text{g/ml}$)	Total HGH recovered ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery (%)
Normal Adult	A	15.6	< 0.1	22.5	144
	B	15.6	< 0.1	21.5	138
	C	15.6	1.8	21.0	123
	D	15.6	1.4	21.0	126
	E	32.0	< 0.1	32.0	100
	E	16.0	< 0.1	18.0	112
	E	4.0	< 0.1	4.5	112
	F	15.6	0.2	24.0	153
	A	7.5	3.5	9.8	84
	B	0.9	0.25	1.3	115
Normal Child	B	1.8	0.25	2.3	115
	C	0.9	< 0.1	0.48	53
	C	1.8	< 0.1	1.3	72
	D	0.9	0.38	1.0	68
	D	1.8	0.38	1.5	62
	E	1.5	0.47	1.7	82
	E	3.0	0.47	3.3	94
	E	6.0	0.47	7.6	119
	F	1.5	< 0.1	1.55	103
	F	3.0	< 0.1	2.9	97
Child with hyperthyroidism	F	6.0	< 0.1	5.8	98
	G	1.5	0.92	2.9	133
	G	3.0	0.92	5.0	136
		7.5	2.4	12.0	128
Child with D.I.	A	2.3	0.8	1.5	70
	B	1.1	0.8	2.7	84
Child with pituitary dwarfism		2.3	0.5	3.4	128
Mean					105.5

従つて、少なくとも、抗ヒト成長ホルモンが10万倍以下の時は、pH 7.4, 0.1M P-B では、CBA solution と HPI solution では：抗ヒト成長ホルモンの Titer が異なり、pH 8.6, 0.07M V-B を用いた場合はTiter が等しいと考えることが出来る。

III 検体測定に関する検討

1) 精度

同一標準曲線にて、同一試料を3回から6回測定した時の実測値及び平均値±標準偏差を表に示した。これによると、16.9 μ g/ml では、標準偏差が大きく、信頼限界も大きいが、各々は1%以下の危険率で有為の差があり、少なくとも、0.125 μ g/ml まで鑑別出来ることがわかつた (Table 2)。

2) 回収率

人血漿に、既知濃度の HGH 溶液を加え、その回収率を見た。血漿としては、健康成人 A, B, C, D, E, F, 健康小児 A, P, C, D, E, F, G, 甲状腺機能亢進症患者、特発性尿崩症患者 A, B, 下垂体性侏儒症患者を用いた。

結果は Table 3 に示めすように、平均回収率105.5%であるが、個々の間にバラツキがあり、53% から153%にわたつていた。

3) 希釈効果

HGH を高濃度に含有する血漿を用いて、希釈効果を検討した。血漿としては、臍帯血、未熟児血漿、健康小児 insulin 負荷時の血漿 (insulin 負荷後60分のもの) を用いた。

結果は Fig. 11 の如くで、三者共、6倍から50倍の間で直線関係が認められた。

4) 再現性

19検体について、同一検体を2週間から、3ヶ月の間隔をおいて二度測定した。保存は -20°C deep freezer 中で行つた。結果は Fig. 12 に示めしたが、再現性は62%から166%にわり、平均104%であつた。従つて、3) で得られた回収率と考えあわせて、検体は少なくとも3ヶ月の保存に耐えられると考えられる。

5) 特異性——異種動物血清に対する反応

ニワトリ、ラット、犬、家兎、馬の血清について、同様の操作を行い、B/B+F (%) を計算した。B/B+F は、ニワトリ77.5%、ラット78.4%、犬、72.5%、家兎80.1%、馬79.7%であり、HGH を含まない脳下垂体性侏儒症患者血清の78.0%とほぼ一致した。従つて、これらの血清には、二重抗体法で ^{131}I -HGH を沈で

Fig. 11. Effect of dilution of plasma on plasma HGH concentration

Fig. 12. Reproducibility of radioimmunoassay of HGH

んさせるものはないことが証明された。

第4章 健康小児早朝空腹時値

I 対象, 及び, 検体採取

対象は, 都内某産院新生児室に入院中の成熟新生児, 都内及び近県の収容施設に収容中の健康な15才以下の小児及び若干の32才未満の病院職員, 計167名である。

乳児は, 6時間絶食とし, 朝5時から8時の間に採血し, 幼児以上は, 14時間絶食とし, 朝8時から10時の間に採血した。又, 覚醒後採血迄は出来るだけ就床しているようにつとめた。

採血はヘパリン処理注射器にて, 肘静脈又は股静脈より行い, 直ちに血漿を分離し, 測定迄に時間のかかる時は, -20°C の deep freezer にて凍結保存した。

Fig. 13. Plasma human growth hormone levels in normal subjects

Table 4. Plasma Human growth hormone levels in normal subjects

Age	male			female		
	No.	Range (mμg/ml)	Mean±S.D. (mμg/ml)	No.	Range (mμg/ml)	Mean±S.D. (mμg/ml)
~1day	10	10.0~100.0	52.4±27.1	12	12.0~102.5	57.1±28.0
~2days	10	12.5~120.0	62.3±30.6	12	10.7~140.0	40.9±69.1
~6days	8	7.5~40.0	24.8±15.8	7	18.7~100.0	40.4±28.0
~30days	3	15.0~34.0	27.5±8.9	5	10.0~33.2	20.4±7.9
~6mos.	4	2.7~17.6	9.5±5.3	10	2.7~28.6	10.2±8.7
~12mos.	9	2.7~28.6	11.4±7.7	5	1.3~19.3	8.4±6.3
~2yrs.	11	2.7~17.6	9.0±5.1	9	3.6~18.7	8.3±5.6
~5yrs.	6	2.7~12.1	8.8±3.3	4	4.2~13.2	7.3±3.5
~10yrs.	4	2.0~7.7	4.0±2.3	5	1.1~17.6	8.7±6.2
~15yrs.	21	1.8~20.8	6.4±5.8	6	1.0~5.2	2.4±1.3
Adult	4	2.2~4.4	3.0±0.8	2	2.7~9.2	5.9±3.2

(14 hours' over night fasting in the morning)

II 測定成績

測定成績は、Fig. 13, Table 4 に示した。これらを生後1日、2日、3日から6日、7日から30日、1カ月から6カ月、7カ月から12カ月、1才1カ月から2才、2才1カ月から5才、5才1カ月から10才、10才1カ月から15才、及び成人に分けると、生後1日、2日は極めて高く、その後次第に減少し、生後30日まででは約1/3に減少するが、その後はあまり大きな変動がなく、5才迄は各群の間に推計学的に有為の差がなかった ($p < 0.05$)。又、性別による差についても、5才迄は、男児と女児の間に大きな差は認められなかった。しかし、5才1カ月以後の群では、女児がそのまの値を保ちつづけるのに反して、男児はやや減少し、この傾向は、成人の場合と同様の傾向を示した。

第5章 考 按

I ^{131}I -HGH 作製について

HGH のヨウ素化の方法については、Yalow and Berson¹³⁾ が、Insulin で用いた nitrous acid で酸化し、 $^{131}\text{I}_2$ を chlorform で抽出する方法³⁸⁾、及び、Staub 等³⁹⁾ が、glucagon で用いた Y-joint を用いて反応時間を長くする方法などがあつたが、これらは、いずれも specific activity が低く、低濃度の HGH を鑑別するには不適当であつた。しかし、1963年、Greenwood 等³⁵⁾ が、酸化剤として Chloramin T を用いる方法を報告し、300mCi/mg という high specific activity の ^{131}I -HGH を得ることが出来るということが明らかになつてから、ほとんどの研究者が、この方法を採用するようになった。

Greenwood 等の方法では、2-4mCi の carrier-free Na^{131}I を用い、pH 7.5 リン酸緩衝液中で $5\mu\text{g}$ の HGH と反応させ、sephadex G-50 のカラムを用い、pH 8.6 Veronal 緩衝液で溶出し、未反応の ^{131}I と、蛋白に結合した ^{131}I -HGH とを分離させる方法である。著者は、この方法を用い HGH を標識したが、 Na^{131}I として、高価な Carrier-free Na^{131}I を用いずに、安価で入手し易い NaSO_3 添加 Na^{131}I (放射性同位元素協会) を用い、さらに、反応液の pH の変化による ^{131}I -HGH の収率について検討した。

pH の変化による ^{131}I -HGH の収率は、明らかに pH 7.6, 8.0 に比べて pH 8.6, 9.0 の方が良く、しかも、pH 8.6 で ^{131}I と ^{131}I -HGH は最もよく分離した。従つて、Greenwood 等も、溶出液として pH 8.6 Veronal 緩衝液を用いていることから、反応に際しても、pH 8.6 Veronal 緩衝液を用いることが適当と考えられる。この方法による specific activity は、150~200mCi/mg であり、Carrier-free の Na^{131}I を用いる他の研究者に比べて¹³⁾³⁵⁾³²⁾³³⁾²⁷⁾不良であるが、検体測定には充分満足すべき量と思われる。しかし、後に述べるように、標準曲線の感度、精度には、 ^{131}I -HGH の specific activity が非常に大きな影響を与えている。従つて、可能な限り、carrier-free の Na^{131}I を用いるべきであるし、又、最近報告されている ^{131}I に比べて半減期の長い ^{125}I を用いる方法は、反応時間の長い二重抗体法にとつて有効な手段であると想像される。

II 標準曲線に対する検討

緒言にも述べたように、Radioimmunoassay には、second step の遊離の ^{131}I -HGH と、抗体と結合した ^{131}I -HGH を分離する段階で、三つの異なる方法が考えられている。一つは、chromatoelectrophoresis であり、Hunter 等²²⁾、Glick 等²⁴⁾、によつて代表され、本邦でも、入江等、岡田等が報告している。他の一つは、Utiger 等、Schalch 等²⁷⁾、Hartog 等⁴⁰⁾、Cerasi 等⁴¹⁾、によつて報告されている double antibody 法であり、本邦でも、辻等が用いている。残る一つは、Resin を用いて分離する方法²⁸⁾であり、これは、あまり他の研究者に用いられていない。又、ごく最近の報告では、Grodsky & Forsham⁴²⁾ が、Sodium sulfate を用いて分離する方法を発表しているが、まだ詳細は報告されていない。前二法については、いずれが優れた方法であるかについてはまだ検討がなされていない。著者も、両法の測定成績の異同については検討していないが、Beck 等⁴³⁾は、同一検体を両法で測定し、同一の値を得たといつている。

二重抗体法では、Utiger²⁶⁾は、血漿から HGH を粗抽出し、それについて測定しているが、他の研究者はそのまの血漿を用いている。著者も抽出しないそのまの血漿を用い、満足すべき Recovery を得た。

しかし、希釈効果を調べてみると、最終濃度 6 倍希釈以下の高濃度血漿では、希釈効果は悪く、血漿中に抗体を結合した ^{131}I -HGH の沈でんを妨げる何物かの存在を疑わせるので、少なくとも、6 倍以上の希釈を必要とする。この血漿希釈は、他の研究者によってもなされており、Schalch 等は14倍、Hartog 等⁴⁰⁾は少なくとも7倍に希釈している。

二重抗体法では、標準曲線に影響を与える要素として、1) 抗ヒト成長ホルモンの濃度、2) ^{131}I -HGH の量、3) first step の incubation time の長短、4) 希釈液の pH が考えられる。

抗ヒト成長ホルモンの濃度では、抗体がうすくなるに従つて、標準曲線は左へ移動し、低濃度の HGH が鑑別できるが、曲線の勾配がなだらかとなり、精度が悪くなる。これは又、加える ^{131}I -HGH の量に関係し、抗体の量が一定で、 ^{131}I -HGH の量が多いと曲線の勾配はなだらかとなり、精度が悪くなる。従つて ^{131}I -HGH の量は出来るだけ少なくし、それに応じて、抗ヒト成長ホルモンの濃度をうすくすれば、標準曲線は、勾配が急峻のまま左へ移動し、低濃度の HGH を鑑別することが出来るようになる。このことは、又逆に、高濃度の HGH についてもいうことが出来、高濃度の HGH を充分鑑別するためには、より多い ^{131}I -HGH を必要とし、それに応じて、抗ヒト成長ホルモンの濃度を濃くすることが必要である。このため、辻等³⁴⁾は、低濃度の HGH を測定する場合と、高濃度の HGH を測定する場合で異なつた濃度の ^{131}I -HGH と、抗ヒト成長ホルモンを用い、2本の標準曲線をかいているが、著者は、血漿を11倍に希釈しているために、測定に際しては全体に低濃度になつていたので、一本の標準曲線で充分測定することが出来た。

次に、incubation time については、Cerasi 等⁴¹⁾は、18時間、Utiger 等は24時間という短い時間をとつていますが、Hartog 等⁴⁰⁾は、3日間 incubate し、しかも、HGH の濃度がうすく、抗ヒト成長ホルモンの希釈倍数が多い時は、6日間 incubate している。Glick 等²⁴⁾も、抗原抗体反応が平衡に達するためには、少なくとも5日間 incubate する必要があるといつていますが、著者の成績でも、HGH の高濃度の部分では、短時間の incubate で平衡に達しているが、低濃度の部分では少なくとも5日間 incubate する必要がある。しかし、Cerasi 等は、incubation time をあまり長くすると、変性した ^{131}I -HGH に対する選択的結合を生ずるおそれがあるといつている。

次に希釈液の pH による影響を見逃すことが出来ないが、今迄に、pH についての検討に関する報告は、著者が調べ得た範囲内では、見当たらない。多くの研究者は、Hunter 等²²⁾、Glick 等²⁴⁾の方法に従い、希釈液として、pH 8.6 Veronal 緩衝液にて希釈した Crystalline bovine serum albumin を使用している。著者は、この溶解液として、pH 8.6 Veronal 緩衝液の他に、Morgan 等⁴⁴⁾が、Insulin の Radioimmunoassay に用いた pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて両者の間に差が出るかどうかを検討した。この結果、pH 8.6 Veronal 緩衝液を用いた Crystalline bovine serum albumin 溶液による標準曲線は、脳下垂体性侏儒症患者血清で希釈した標準液でかいた標準曲線と一致し、しかも、他の human γ -globulin 溶液、human serum albumin 溶液、モルモット血清などで希釈した場合の標準曲線ともほとんど一致し、非特異的 inhibitor を認めなかつたが、pH 7.2 リン酸緩衝液にて溶解した Crystalline bovine serum albumin 溶液を用いた時の標準曲線は、脳下垂体性侏儒症患者血清にて希釈した場合の標準曲線とは一致せず、非特異的 inhibitor の存在が疑われた。このことは抗ヒト成長ホルモンの抗体価測定にても証明された。

Ⅲ 健康小児早期空腹時値について

成人の血漿中の HGH 値については、数々の報告があり、又、近年は男女の間に性差があり、女子にやや高い傾向があることが2—3報告されている⁴³⁾⁴⁵⁾。新生児をのぞく健康小児の血漿中 HGH 値については、赤血球凝集阻止反応を用いた測定法では、Giraord⁴⁶⁾、Read⁸⁾、諏訪³⁶⁾などの報告があるが、Radioimmunoassay を用いた報告では、Greenwood 等⁴⁷⁾、Hunter 等⁴⁸⁾、Utiger²⁶⁾、Beck 等⁴³⁾、Laron 等⁵⁰⁾、Cerasi 等⁴¹⁾、Root 等³¹⁾、入江等³²⁾の報告がある。しかし、年令的推移を調べた報告は、Greenwood 等、Cerasi 等の報告のみであり、さらに性別による差を見た報告は前者のみである。Greenwood 等⁴⁸⁾は、健康成人の値 $0.55 \pm 0.68 \mu\text{g/ml}$ (食後2—3時間、平均値 $\pm$ 標準偏差) に対して、小児の値は $10.83 \pm 11.6 \mu\text{g/ml}$ と高いが、各年令別には、あまり大きな差が認められず、ただ、思春期の女子に於て、やや高い傾向があると報

告しているが、Cerasi 等⁴¹⁾は、早朝空腹時では、小児、成人の間に有為の差なく、且つ、脳下垂体性侏儒症患者の値と一致するといっている。Beck 等⁴²⁾、Utiger²⁶⁾、Laron 等⁵¹⁾も、早朝空腹時では、小児と成人の間に大きな差はないとしており、全年令にわたつてはいないが、入江等³²⁾も、年令的差はないと報告している。著者の得た成績でも、生後1カ月以後では、年令によつてあまり大きな変動は見られず、性差では、5才から10才の女児に、やや男児より高い傾向を認めたのみで、あまり大きな差は認められなかつた。このことは、一見、年少小児に於ける成長に、成長ホルモンが関与していないという従来の意見⁵¹⁾を支持するように見えるが、血漿中の HGH 値は、日内変動にかなり大きな巾があり⁵⁰⁾⁵¹⁾、又、低血糖⁵²⁾、運動⁵³⁾⁵⁴⁾、或種のアミノ酸投与⁵⁵⁾⁵⁶⁾、その他の種々の条件により著しく高値をとることが知られており、又、この反応の強弱は、個人により異なり、又、或種の疾患では、全く HGH の増加を見ない⁵⁷⁾⁵⁸⁾ことから、Basal level としての早朝空腹時値は、少なくとも、この測定法で測定できる範囲では、各年令ともほぼ一定であり、下垂体予備能が異なるのではないかと予想され、事実、入江等⁵⁹⁾の報告では、経口ブドウ糖負荷により数時間後に上昇する血漿 HGH は、小児に於て成人よりかなり高値が認められるということは、この予想を支持するものといえる。しかし、一方、著者が小児に行なつた Insulin 負荷時の血漿成長ホルモンの変動状況では、例数は少ないが、あまり年令と相関がないように思われ⁶⁰⁾、又、Root 等³¹⁾も同様に、小児と成人で増加の程度はかわらないと報告しているので、この下垂体予備能と年令との関係については、今後の検討を待つべきであると思う。

又、著者は、新生児の HGH を測定し、著しい高値を得たが、この成績は Cornblath 等⁶¹⁾、Laron 等⁶²⁾の成績と一致した。何故、新生児期に HGH が高値をとるかという理由は不明だが、分娩によるストレス、低血糖などが原因になっているとも考えられる。このことについては、別報⁶³⁾で詳しく報告する。

第6章 総 括

血漿成長ホルモン (HGH) の放射免疫学的測定 (二重抗体法) に対して基礎的検討を加え、健康小児161名について早朝空腹時値を測定し、次の結果を得た。

1) ¹³¹I-labeled HGH の作製は、Dinabot 社製 Na¹³¹I (NaSO₃ 加) を用い、Greenwood の方法に従つたが、原法と異なり、pH 8.6 でヨウ素化を行つた場合に、最も良い収率を得た。(Specific activity=150~200mCi/mg)

2) 放射免疫学的測定は、Schalch and Parker, 及び、Utiger の方法に若干の改変を加えて用いたが、HGH 濃度が 0.125 μ g/ml から、16 μ g/ml の間で標準曲線を作製するためには、HGH 抗体を40000倍に稀釈し、¹³¹I-labeled HGH の濃度を 0.2~0.6 μ g/0.1ml とした時、最も良好な結果が得られた。

3) 一定量の ¹³¹I-labeled HGH を加えた被検血清と HGH 抗体との反応時間は、5日が適当であつた。

4) 稀釈効果は、血漿稀釈6倍から50倍の間で直線関係が認められた。

5) 11倍稀釈血漿で、少なくとも 0.125 μ g/ml 迄鑑別することが出来、平均回収率は、105.5% 再現性は平均104%であつた。

6) 年令別健康小児早朝空腹時値は、生直後で著しく高く、生後第1日男児 52.4 $\pm$ 27.1 μ g/ml、(平均値 $\pm$ 標準偏差、以下同じ)、女児 57.1 $\pm$ 28.0 μ g/ml、生後第2日男児 62.3 $\pm$ 30.6 μ g/ml 女児 40.9 $\pm$ 69.1 μ g/ml であつたが、その後、次第に減少し、生後1月以後は、年令により、又、性により大差なく、1才より2才では、男児9.0 $\pm$ 5.1、女児 8.3 $\pm$ 5.6 μ g/ml、5才より10才では、男児4.0 $\pm$ 2.3、女児 8.7 $\pm$ 6.2 μ g/ml、成人男子3.0 $\pm$ 0.8、女子 5.9 $\pm$ 3.2 μ g/ml であつた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤な御指導をたまわり、原稿を御校閲下さいました恩師高津忠夫教授に心からの謝意を表します。又研究に際して貴重な御助言を下さいました東大小児科諏訪誠三博士、五十嵐良雄博士、川戸英彦博士、及び実験に際して御協力下さいました長尾大博士、多田裕学士に心から感謝いたします。又、人成長ホルモンを抽出して下さいましたアメリカ Tufts 大学 M.S. Raben 博士、及びその入手に御協

力下さいました東大中尾内科鎮目講師に感謝いたします。又、検体採取に御協力いただいた都立八王子乳児院二木博士、沢田博士、茨城県立中央病院小児科岩田博士、都立築地産院小児科藤井博士、及び東大小児科小宮弘毅博士に感謝いたします。

本論文の要旨は、第39回日本内分泌学会総会で発表した。

References:

- 1) WILKINS, L. : The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence, 3rd ed. (1965), 25, C.C. Thomas, Illinois.
- 2) LI, C.H. and H.M. EVANS : Science, 99 : 183, (1944).
- 3) LI, C.H. : Human pituitary growth hormone. Report of the fiftyfourth Ross Conference on Pediatric Research, (1965), 64, Ross Laboratories, Ohio.
- 4) GREENSPAN, F.S., C.H. LI, M.E. SIMPSON and H.M. EVANS : Endocrinology, 45 : 455 (1949).
- 5) MARX, W., M.E. SIMPSON and H.M. EVANS : Endocrinology, 30 : 1, (1942).
- 6) DAUGHADAY, W.H., W.D. SALMON and F. ALEXANDER : J. Clin. Endocr., 19 : 743, (1959).
- 7) KNOBIL, E., R.C. WOLF, R.O. GREEP and A.E. WILHELM : Endocrinology, 60 : 160, (1957).
- 8) READ, C.H. and D.B. STONE : Am. J. Dis. Child., 96 : 538, (1958).
- 9) READ, C.H. : Clinical Endocrinology I. (ed. E.B. Astwood), 598 (1960), Gruni and Stratton, New York.
- 10) IRIE, M. and R.J. BARRETT : Endocrinology, 71 : 277, (1962).
- 11) KAPLAN, S.L. and M.M. GRUMBACH : J. Clin. Endocr., 22 : 1153, (1962).
- 12) DOMINGUEZ, J.M. and O.H. PEARSON : J. Clin. Endocr., 22 : 865, (1962).
- 13) YALOW, R.S. and S.A. BERSON : Nature (London), 184 : 1649, (1959).
- 14) UNGER, R.H., A.M. EISENTRAUT, M.S. Mc CALL, S. KELLER, H.C. LANG and L.L. MADISON : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 102 : 621, (1959).
- 15) BERSON, S.A., R.S., YALOW, G.D. AURBACH and J.J. POTTS : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 49 : 613, (1963).
- 16) YALOW, R.S., S.M. GLICK, J. ROTH and S.A. BERSON : J. Clin. Endocr., 24 : 1219, (1964).
- 17) BECK, P., M.L. PARKER and W.H. DAUGHADAY : J. Clin. Endocr., 25 : 1457, (1965).
- 18) ODELL, W.D., J.F. WILLER and W.E. PAUL : J. Clin. Endocr., 25 : 1179, (1965).
- 19) PERMUTT, M.A., C.W. PARKER and R.D. UTIGER : Endocrinology, 78 : 809, (1966).
- 20) MIDGLEY, A.R. : J. Clin. Endocr., 27 : 295, (1967).
- 21) BERSON, S.A., R. S. YALOW, S.M. GLICK and J. ROTH : Metabolism 13 : 1136, (1964).
- 22) HUNTER, W.M. and F.C. GREENWOOD : Biochem. J., 85 : 30, (1962).
- 23) MORGAN, C.R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Medc 121 : 63, (1966).
- 24) GLICK, S.M., J. ROTH, R.S. YALOW and S.A. BERSON : Nature, 199 : 784, (1963).
- 25) UTIGER, R.D., M.L. PARKER and W.H. DAUGHADAY : J. Clin. Invest., 41 : 254, (1962).
- 26) UTIGER, R.D. : J. Clin. Endocr., 24 : 60, (1964).
- 27) SCHALCH, D.S. and M.L. PARKER : Nature, 203 : 1141, (1964).
- 28) LAZARUS, L. and J.D. YOUNG : J. Clin. Endocr., 26 : 213, (1966).
- 29) QUABBE, H.J., E. SCHILLING and H. HELGE : J. Clin. Endocr., 26 : 1173, (1966).
- 30) STIMMLER, L. and G.A. BROWN : Aoch. Dis. Childh., 42 : 232, (1967).
- 31) ROOT, A.W., R.L. ROSEFIELD, A.M. BONGIOVANNI and W.R. EBERLEIN : Pediatrics, 39 : 844, (1967).
- 32) 入江 実, 佐久間真樹 : 日内分泌誌, 42 : 457, (1966).
- 33) 岡田義昭, 岩坪治雄, 大森清彦, 熊原雄一 : 日内分泌誌, 42 : 223, (1966).
- 34) 辻 昇三, 馬場茂明, 松岡 瑛, 小坂欣也, 藤沢義郎, 金子滋夫, 高石 務, 吉田昌子他 : 日内分泌誌, 42 : 1265, (1967).
- 35) GREENWOOD, F.C., W.M. HUNTER and J.S. GLOVER : Biochem. J., 89 : 114, (1963).
- 36) 諏訪瑛三 : 日内分泌誌, 38 : 1114, (1963).
- 37) 山村雄一, 石坂公成編 : 免疫化学, 第3版, (昭40), 471, 朝倉書店.
- 38) SALMON : Endocrinology, 70 : 459, (1962).
- 39) STAUB, A., V. SPRINGS and H.

- ELRICH : Int. J. Appl. Radiat. : 2 : 59, (1957). 40) HARTOG, M., M.A. GAAFER, B. MEISSER and R. FRASER : Brit. Med. J., 2 : 1229, (1964). 41) CERASI, E., L.D. CASA, R. LUFT and A. ROOVETE : Acta Endocr., 53 : 101, (1966). 42) COPINCHI, G., L.C. WEGIENKA, S. HANE and P.H. FORSHAM : Metabolism, 16 : 485, (1967). 43) BECK, P., M.L. PARKER and W.H. DAUGHADAY : J. Clin. Endocr., 26 : 463, (1966). 44) MORGAN, C.R., A. LAZAROW : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110 : 29, (1962). 45) UNGER, R.H., A.M. EISENTRAUT, L.L. MADISON and M.D. SIPERSTEIN : Nature, 205 : 804, (1965). 46) GIRARD, J., M. VEST and N. ROTH : Nature, 192 : 1051, (1961). 47) GREENWOOD, F.C., W.M. HUNTER and V.J. MARRIAN : Brit. Med. J., 1 : 25, (1964). 48) HUNTER, W.M. and W.M. RIGAL : J. Endocr., 34 : 147, (1966). 49) QUABBE, H.J., E. SCHILLING and H. HELGE : J. Clin. Endocr., 26 : 1173, (1966). 50) LARON, Z. and S. MANHEIMER : Israel J. Med. Sci., 2 : 115, (1966). 51) MARTIN, M.M. and L. WILKINS : J. Clin. Endocr., 18 : 679, (1958). 52) ROTH, J., S.M. GLICK, R.S. YALOW and S.A. BERSON : SciInce, 140 : 987, (1963). 53) GKEENWOOD, F.C. and J. LANDON : Nature, 210 : 540 (1966). 54) SCHALCH, D.S. : J. Lab. Clin. Med., 69 : 256, (1967). 55) RABINOWITZ, D., T.J. MERIMEE and J.A. BURGESS : J. Clin. Endocr., 28 : 1170, (1966). 56) KNOPF, R.F., J.W. CONN, S.S. FAJANS, J.G. FLOYD, E.M. GUNTSCHE and J.A. RULL : J. Clin. Endocr., 25 : 1140, (1965). 57) BURGESS, J.A., B.R. SMITH and T.J. MERIMEE : J. Clin. Endocr., 26 : 1257, (1966). 58) GREEN, O.C., R. FEFFERMAN, ann S. NAIR : J. Clin. Endocr., 27 : 1059, (1967). 59) 入江 実 : 座談会「成長ホルモンをめぐって」ホと臨, 15 : 512 (昭42) より. 60) 竹内恵子 : 日児誌, 72 : 426, (昭43). 61) CORNBLATH, M., M.L. PARKER, S.H. REISNER, A.E. FORBES and W.H. DAUGHADAY : J. Clin. Endocr., 25 : 209, (1965). 62) LARON, Z., S. MANNHEIMER, A. PERTZELAN and M. NITZAN : Israel J. Med. Sci., 2 : 770, (1966). 63) 竹内恵子 : 日新生児誌, 4 : 7, (昭43).