Studies on the Inactivation of Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH)

Part 2. Distributions in vivo of ^{131}I -labeled ACTH, ^3H -labeled ACTH and unlabeled natural ACTH in Rats

Hitoshi MATSUYAMA

Second Division, Department of Internal Medicine, Kyoto University School of Medicine,
Kyoto, Japan (Director : Professor Masaichi Fukase, M.D.)

The distributions of ACTH to various organs of rats were studied at several time intervals after the intravenous injection of ^{131}I -labeled ACTH, ^3H -labeled ACTH and unlabeled native ACTH, respectively. A native ACTH was labeled with ^{131}I by the method of Greenwood and Hunter. This ^{131}I -labeled ACTH preparation had no steroidogenic activity. ^3H -ACTH was prepared by exposing a native ACTH to ^3H gas and by purifying it using gel filtration. This ^3H -ACTH preparation retained about 20% of the steroidogenic activity. Radioactivity of ^{131}I -ACTH in the samples was measured by a well type scintillation counter after being dissolved by heating in a solution of 30% of KOH. Radioactivity of ^3H -ACTH in the samples was determined by the method of hyamine hydroxyde using the Tri-Carb liquid scintillation spectrometer. Bioassay was performed by a modification of the method of Lipscomb and Nelson after extracting the tissues using the glacial acetic acid method of Payne et al.

1) Shortly after the administration of ^{131}I -ACTH, most of the radioactivity was detected in the kidney, with the peak value of 42% of the administered dose, 6 minutes after the injection. However, the distribution of radioactivity was very little in the adrenal gland throughout the time after the injection.

2) After the intravenous injection of ^3H -ACTH, the TCA precipitable radioactivity was found most markedly in the kidney, followed by the liver, although it was only at the level of 0.3% of the administered dose in the adrenal gland.

3) In the levels of the subcellular fractions of the kidney and liver from rats 2 or 6 minutes after the injection of ^3H -ACTH, the TCA precipitable radioactivity was found most predominantly in the mitochondrial fraction, followed by the microsomal fraction, and least in the supernatant fraction when compared at the same dry weight. In the supernatant fraction of the adrenal gland, however, there was almost the same amount of the TCA precipitable radioactivity as in the sediments.

4) Six minutes after the injection of 5 mU of USP Reference Standard ACTH in rats, the biological activity had recovered 13.3% of the administered dose only from the extract of the kidney, although it could not be detected in the extracts of the liver and the adrenal gland.

These results demonstrate that kidney is the main site for distribution of exogenous ACTH.

(See pp. 173~180)

ACTH の非活性化に関する研究

第二編 外因性 ACTH の生体内における分布に関する研究

京都大学医学部内科第二講座 (指導 深瀬政市教授)

松 山 均

(昭和43年10月8日受付)

ACTH の生体内における代謝を研究する一つの方法として ACTH の生体内における分布について検討した。 ^{131}I または ^3H 標識 ACTH を白鼠に投与すると放射能は生体内のほとんどあらゆる臓器に分布するが、腎臓に最も多く集まり、肝臓がこれにつぎ、副腎への分布は意外に少なかった。また標識していない天然 ACTH を投与した場合にも腎臓のみから ACTH の生物学的活性が検出された。これらの事実から ACTH は腎臓に最も多く集まるものと推測される。

1 緒 言

ACTH の研究は近年めざましい進歩をとげつつあるが、生体内における ACTH の代謝に関しては極めて知見が乏しいのが現状である。血中に分泌された内因性 ACTH^{1)~3)}、あるいは外から投与された外因性 ACTH^{4)~8)}が極めて速やかに血中から消失することはすでに幾人かの研究者によつて報告されている。この事実は ACTH が生体内で血中あるいは臓器内で速やかに代謝されることを示唆しているものである。しかし著者がすでに第一編⁹⁾で報告したごとく、ACTH は確かに血漿中で非活性化されるが、その程度は新鮮血漿中では非常に僅かである。従つて生体内の ACTH 代謝のメカニズムとしては血液中における非活性化が主要なものであるとは考え難く、組織による ACTH の摂取ないしは非活性化が重要な役割を果たしているものと推察される。

そこで著者は ACTH の生体内における代謝を研究するために、 ^{131}I -ACTH あるいは ^3H -ACTH を白鼠に注射し、諸臓器への分布の状態を観察した。また天然 ACTH を静注してその各臓器への分布を生物学的活性により測定し、ACTH の作用機序や生体内における代謝を解明する上に若干の知見を得たので報告する。

2 実験材料および方法

実験材料

実験動物：実験開始時体重 150-200g の Wistar 系雄白鼠を使用した。実験に供した白鼠は少なくとも実験の2週間前から Oriental 固型飼料 M.F. と水道水を与え、 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の恒温室中で飼育した。

ACTH 製剤： ^{131}I -ACTH は highly purified human ACTH (Li) を Greenwood ら¹⁰⁾の方法に従つて ^{131}I により標識することにより作製した。この ^{131}I -ACTH の specific activity は 15mc/mg であった。しかしこの ACTH の生物学的活性を Guillemin ら¹¹⁾の方法の変法によつて測定したところ、 ^{131}I の標識により生物学的活性は失われていることが認められた。

^3H -ACTH は highly purified porcine ACTH (Organon) にトリチウムガスを照射して作製し、Sephadex-G 25 のカラムを2回通して精製した。このようにして得られた ^3H -ACTH は標準 ACTH の約20%の生物学的活性を保持していた。またその放射能の少なくとも89%はトリクロール酢酸 (以下 TCA

と省略)で沈降することが認められた。さらにこれを Sephadex-G75 のカラムを通し精製し、変性 ACTH を除去したのち実験に使用した。

Intact の天然 ACTH としては USP 標準 ACTH (第2国際単位)を使用した。

ACTH 溶解液: 生理的食塩水に 0.01N となるように HCl を加え、さらに gelatin を 0.2% の割合に加えたものを使用した。

実験方法

内因性 ACTH の影響を除去する目的で実験開始 2～4 時間前に外聴道法¹²⁾により下垂体を摘出した白鼠を使用した。またできるだけ生理的条件下に近い状態で検討するため ACTH の投与量は測定限界を考え併せ、最少限度にとどめた。次の 4 種類の実験をおこなった。

1) 溶解液で一定濃度に希釈した ^{131}I -ACTH ($0.025\mu\text{g}$, $0.375\mu\text{C}$) をオーロパンソーダで麻酔した白鼠の股静脈に急速に注射した。注射後 0.5, 2, 6 および 20 分の各時間に腹部大動脈より採血し致死せしめた。ついで速やかに腎臓、肝臓、副腎、甲状腺を摘出し、その重量を測定した。摘出した各臓器および血液を 30% 苛性カリ溶液中でホモジナイズした後加温溶解し、その放射能を well type scintillation counter で測定した。

2) ^3H -ACTH (生物学的活性約 1.0mU, 放射能 $120 \times 10^4\text{cpm}$) を麻酔した白鼠に静注し、実験 1 に述べたと同様に 0.5, 2, 6 および 20 分の各時間に血液、腎臓、肝臓、副腎、甲状腺を採取した。臓器の重量を測定した後、Vaughan ら¹³⁾の方法に従って血液および組織を 10% TCA (血液のみ 20% TCA) 中でホモジナイズし、蛋白を沈澱せしめ、ethanol-ether (1/1), ついで ether で洗浄して TCA を除去した。乾燥組織粉末 2～10mg を counting vial に採り、1.0M methanolic hyamine hydroxide 1ml を加え、60℃で 1～2 時間加温溶解し、scintillator として toluene 中に PPO (2, 5-diphenyloxazole) 0.4%, POPOP (1, 4-bis-2-(5-phenyloxazolyl) benzene) 0.01% の割合で加えたもの 10ml を加え、Tri-Carb scintillation counter でその放射能を測定した。なお本法では組織を hyamine で加温溶解すると組織によつて種々の程度の color quenching がみられるため、試料測定後再び各試料に一定量の internal standard を加えて quenching を補正した¹³⁾。さらに各組織固有の phosphorescence 現象¹⁴⁾がみられるので対照として無処置白鼠の各臓器を同様の方法で操作した後測定し、これを補正した。

3) ^3H -ACTH (生物学的活性約 1.0mU, 放射能 $120 \times 10^4\text{cpm}$) を麻酔した白鼠に静注し、2 分および 6 分の各時間に腎臓、肝臓、副腎を摘出した。Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) 中で各臓器の 10% のホモジネートを作製し、超遠心分離器により腎臓、肝臓は 900G 10 分で核分画をおとしたのち 5000G 20 分でミトコンドリア、105,000G 60 分でマイクロソーム、105,000G 120 分で上清の 3 分画に分け、また副腎は 105,000G 120 分で沈澱、上清の 2 画に分けた。ついで各分画に 10% TCA を加え以下実験 2 で述べた操作を行なつて、その放射能を測定し ^3H -ACTH の細胞内局在を追究した。

4) Intact の天然 ACTH 5.0mU を静注し、6 分後に断頭により屠殺し、ただちに腎臓、肝臓および副腎を摘出し、各臓器の重量を測定した。3 匹の白鼠の各臓器を pool した後 Payne ら¹⁵⁾の水酢酸法に従つて ACTH を抽出した。ただし副腎のみ容量が少ないため上述の ACTH 溶解液 (実験材料の項参照) 中でホモジナイズした後遠沈し、上清を採取した。各抽出物の生物学的活性は下垂体摘除白鼠の副腎静脈血中 corticosterone を指標とする Lipscomb and Nelson の方法¹⁶⁾の変法を用いて測定した。

3 実験成績

1 ^{131}I -ACTH の生体内における分布

Fig. 1 に示すごとく ^{131}I -ACTH は注射後短時間で腎臓に圧倒的に多く集まり、注射後 6 分には注射量の 42%, 20 分後には約 30% の放射能が認められた。ついで肝臓に約 10% 集まつたが、副腎には注射後いずれの時間にもごく僅かの放射能を検出したのみであつた。甲状腺には時間の経過とともに放射能が増加し、 ^{131}I -ACTH から無機 ^{131}I への転換がうかがわれた。血中の放射能は全血量を測定することが不可能なため

Fig. 1. Distribution of radioactivity in hypophysectomized rats after the intravenous injection of ^{131}I -ACTH

Fig. 2. Distribution of TCA precipitable radioactivity in hypophysectomized rats after the intravenous injection of ^3H -ACTH

Table 1. Distribution of TCA precipitable radioactivity in hypophysectomized rats after the intravenous injection of ^3H -ACTH

Organs	Time in minutes after injection of $\text{H}^3\text{-ACTH}$			
	0.5	2	6	20
	cpm per mg dry weight			
Kidney	363	927	1852	1533
Liver	161	306	462	245
Adrenal	206	338	192	153
Thyroid	55	22	22	19
Blood	2563	3705	2871	1470

1.0mlあたりの放射能で表わしたが、注射後20分における血中の放射能は注射後30秒の放射能の約1/5に減少した。

2 ^3H -ACTH の生体内における分布

Fig. 2 に示すごとく ^3H -ACTH 注射後の TCA 沈降性放射能は腎臓に最も多く分布し、6分後には注射量の42%、20分後には33%が認められ、腎臓に関しては ^{131}I -ACTH の場合とほぼ同様の分布を示した。ついで肝臓には臓器全体としてはかなり多く分布した。しかし単位重量あたりの TCA 沈降性放射能は Table 1 に示すごとく腎臓に比し、その分布ははるかに少なかった。また副腎への分布は ^3H -ACTH が生物学的活性を有しているにもかかわらず意外に少なく、注射後2分で最も多かつたが、その分布率は注射量の0.3%にすぎなかつた。しかし ^3H -ACTH の分布率を ^{131}I -ACTH のそれと比較してみると副腎では10倍であつたが、血中では TCA 沈降性放射能は ^{131}I -ACTH の場合とほぼ同様の速度で減衰した。

Table 2. Distribution of TCA precipitable radioactivity to the subcellular fractions of hypophysectomized rat tissues after the intravenous injection of ^3H -ACTH

Tissues	Time in minutes	cpm per mg dry weight		
		Mitochondrial F.	Microsomal F.	Supernatant F.
Kidney	2	1491	722	333
		3672	623	442
	6	1886	665	406
		6320	1195	937
Liver	2	1092	558	460
		903	1229	107
	6	1147	1271	103
		2944	1026	143
Adrenal	2	Sediment		200
		222		
		150		
	6	292		128
		129		
		86		

Table 3. Distribution of biological activity in hypophysectomized rats 6 minutes after the intravenous injection of 5mU of native ACTH

Organs	ACTH activity recovered	% ACTH activity recovered
Kidney	0.48mU	13.3
Liver	Not detectable	0
Adrenal	Not detectable	0

Recovery rate 72.2%

3 生体内投与 ^3H -ACTH の各細胞分画への分布

Table 2 に示すごとく単位重量あたりでは腎臓、肝臓の各細胞ともに TCA 沈降性放射能は各時間とも上清よりもミトコンドリア分画、ついでマイクロソーム分画に多く認められた。副腎では上清、沈渣との間に差は殆んどなかった。

4 天然 ACTH の生体内における生物学的活性の分布

Table 3 に示すごとく天然 ACTH 静注後 6 分で摘出した腎臓の抽出物中には、注射量の約 9.6% の ACTH 活性が検出された。この際の臓器よりの ACTH 抽出操作の回収率は ^{131}I -ACTH を用いて検討したところ 72.2% であつたので、これを補正すると注射量の 13.3% の生物学的活性を腎臓から検出したことになる。しかしながら肝臓、副腎の抽出物中の生物学的活性はいずれも測定不能であつた。

4 考 按

内因性あるいは外因性 ACTH はともに生体内では極めて速やかに代謝され、血中での ACTH の半減

期は動物¹⁾²⁾⁵⁾、ヒト^{3)4)6)~8)}とともに極めて短いとされている。すなわち Meakin ら⁶⁾が天然 ACTH をヒトに静注した成績では生物学的活性の半減期は4~18分であり、また Yalow ら³⁾が免疫学的測定法で検討した内因性 ACTH の半減期は10~15分程度であつた。教室の松倉⁸⁾が免疫学的測定法で検討した外因性 ACTH の半減期は約14分であつた。

いつばう Richards ら¹⁷⁾は白鼠に白鼠自体の ACTH を静注し、生体内での分布を検討した結果、ACTH は注射後速やかに血中から消失し、主に腎臓に集まり、その他の臓器には殆んど集まらない事実を報告した。この事実はその後の研究者^{18)~21)}によつて確認されたが、実験条件によつて詳細な点ではかなり異つた成績が報告されている。とくにこれらの実験^{17)~19)21)}では極めて非生理的な大量の ACTH が投与されている点で問題が残る。また ¹³¹I-ACTH, ³H-ACTH など化学的に修飾をうけた標識 ACTH の生体内における分布や代謝が天然 ACTH のそれと等しいか否かも明らかでない。そこで著者は ¹³¹I-ACTH, ³H-ACTH のみでなく天然 ACTH の生体内での分布についても検討し、それらの成績から総合的に ACTH の生体内における分布について検討を加えた。

まず ¹³¹I-ACTH, ³H-ACTH をそれぞれ白鼠に静注して各臓器への放射能の分布を検討した結果では注射後短時間に腎臓に圧倒的に多く分布し、¹³¹I-ACTH, ³H-ACTH とともに注射後6分では注射量の約42%程度、注射後20分では30%程度の放射能の分布を認めた。肝臓への分布は単位重量あたりでは少なかったが、重量が多いため全体としては腎臓について多くの放射能が検出された。この場合には ³H-ACTH と ¹³¹I-ACTH とで分布率が若干の相違が認められたが、これについては後に改めて論ずる予定である。ACTH の標的器官である副腎への分布は極めて少なく、¹³¹I-ACTH を注射した場合にはいずれの時間においても放射能の有意な分布は認められなかつた。これは ACTH が ¹³¹I で標識することにより生物学的活性を失つたことが原因ではないかと推測される。しかし生物学的活性を保有している ³H-ACTH の副腎への分布も意外に少なく、最も多く放射能が検出された注射後2分ですら、その分布率は注射量の0.3%に過ぎなかつた。

以上の成績は ¹³¹I-ACTH を用いて検討した Cats ら¹⁹⁾、³H-ACTH を用いた Nishizawa ら²¹⁾の報告とはほぼ一致するものであるが、¹³¹I-ACTH を注射して30秒~4分の間には副腎にも多く集まつたとしている Sonenberg ら¹⁸⁾の報告とは一致しない。しかし Sonenberg ら¹⁸⁾は極めて crude な ACTH 製剤を用いており、¹³¹I による標識により生物学的活性が失われたか否かも検討していないので、その成績の信頼性に関しては多分に疑問が残される。従つて著者の成績や Nishizawa ら²¹⁾の成績のごとく ACTH の副腎への分布は比較的少ないものと考えるべきであろう。その理由は現在なお明らかでないが次の可能性が考えられる。すなわち (1) ACTH は極めて微量でも副腎に充分な反応を起こさせる。(2) ACTH は副腎の細胞に結合しないしは摂取されることなく、作用したのち再び副腎を出ていく、などの可能性である。動物において副腎を摘出していても ACTH の半減期には影響がみられないという事実¹⁾²⁾¹⁷⁾も ACTH の代謝に副腎が殆んど関与していないことを示唆するものと推測される。

以上の成績から ACTH は腎臓に最も多く集まり、ついで肝臓に多く集まるものと結論される。それでは ACTH は腎臓、肝臓の細胞内のどの部分に多く検出されるであろうか。著者が ³H-ACTH を用いて検討したところでは、腎臓、肝臓の各細胞ともに上清分画よりもミトコンドリア分画、ついでマイクロソーム分画に多くの TCA 沈降性放射能が検出された。Nishizawa ら²¹⁾は ³H-ACTH の in vitro での副腎の細胞分画への分布を検討し、上清に最も多くの放射能を認めたと報告している。この報告と著者の成績の相違は in vitro と in vivo という実験条件の差よりも測定上の問題であると思われる。すなわち Nishizawa らは全体を燃焼 (combustion) して得た全放射能を測定しており、すでに分解された ³H-ACTH も含まれているが、著者は TCA 沈降性放射能のみを測定しているからである。

一般に ³H-ACTH はかなりの程度に生物学的活性を保有しており、生体内での代謝の研究には ¹³¹I-ACTH より有用であると考えられる²¹⁾。しかし現在用いている ³H-ACTH は random labeling であり、³H が ACTH のどの部分についているかは不明で、極めて簡単に置換され遊離する可能性も考えられる。

いま一つの難点は ^3H -ACTH が組織のような蛋白質中に含まれている場合には測定が必ずしも容易でないことである。著者は組織のホモジネートを TCA で沈降させた後、その一定量を hyamine hydroxide に溶かし、scintillator を加えて測定するいわゆる hyamine hydroxide 法¹³⁾を用いた。この方法は操作が簡単で、多数の試料の測定には適している。しかし組織の TCA 沈降物を hyamine hydroxide に溶かすと着色する場合が多いので放射能の測定に際し color quenching がおこり、従つてこれを補正する必要がある。またある種の組織には、その組織固有の phosphorescence 現象¹⁴⁾が認められるのでこれも補正する必要がある。Vaughan ら¹⁵⁾は TCA 沈降物が 10mg 以内の場合には信頼出来る測定が可能であるとしているが、著者の経験でもこの範囲内では概ね妥当な成績が得られるものと考えられる。しかし肝臓のごとく単位重量あたりの放射能が比較的少なく、組織重量が多い場合にはかなりの誤差を生ずる可能性がある。 ^{131}I -ACTH を用いた場合と ^3H を用いた場合とで、肝臓に分布した放射能の全量にある程度の差を生じた原因の一つとして、このような測定上の問題を考慮する必要がある。Jacobson ら²²⁾は組織を 650°C で完全に燃焼 (combustion) したのち測定する方法を考案している。この方法は大量の試料中の放射能の測定に適しており、quenching も少ないという利点がある。しかしかなり複雑な装置を必要とするのが難点である。

以上のごとく ^{131}I または ^3H で標識した ACTH を用い、ACTH の生体内分布を検索する方法には、若干の問題が残されている。そこで著者は天然 ACTH を用い、できるだけ生理的条件下に近い量を注射して生体内における生物学的活性の分布を測定した。その結果注射後 6 分の腎臓の抽出物には注射量の 13.3% の活性を認めたが、その他の臓器の抽出物には活性を証明できなかった。この成績は Richards ら¹⁷⁾ が白鼠 ACTH を用いて行つた実験の成績と一致するものである。しかしストレスに反応して増量する内因性 ACTH は腎臓からはごく僅かしか検出できなかったとする Gold ら²⁰⁾の報告とは一致しない。その理由はなお明らかでないが、ACTH の量の相違やその他の実験条件の相違を考慮する必要がある。外因性 ACTH の生体内分布を検討する場合には出来るだけ生理的条件下に近い量を用いるのが望ましいが、現在の生物学的測定法の感度に限界があり、今回の実験では 5mU を投与せざるを得なかった。しかし ^{131}I -ACTH または ^3H -ACTH の場合にはそれぞれ 0.025 μg , 1mU と比較的生理的な量を投与しているが、この場合にも腎臓に最も多く分布しており、天然 ACTH の実験と一致するものと考えられる。

以上 ^{131}I -ACTH, ^3H -ACTH, 天然 ACTH のいずれを用いた実験でも、ACTH は最も多く腎臓に分布することが明らかとされた。このことは ACTH が腎臓で何らかの作用をしているのか、もしくは代謝あるいは排泄されるかのいずれかと考えられる。ACTH は副腎以外の臓器組織にも種々の作用をおよぼすことが知られている。腎臓に対する作用としては ACTH が腎臓における erythropoietin あるいは renin の産生を促進するという考え方²³⁾もあるが、なお一般に認められるまでは到っていない。従つて ACTH は腎臓に集まり、ここで代謝あるいは排泄されるものとするのが妥当であろう。今回の実験では ACTH の尿中への排泄については検討していないが、Cats ら²⁴⁾は ^{131}I -ACTH を投与した場合の尿中への排泄は極めて僅かであるとし、かつ排泄された放射能はすでに ACTH とは考え難いと報告している。またホルモンを適量の蛍光物質で標識し、これを静注した成績²⁵⁾では、ACTH をはじめ下垂体前葉ホルモンはすべて糸球体で濾過されたのち再吸収され、近位尿細管に集まり、数日後に尿中に出現することから、尿中に排泄されたホルモンは腎臓での分解産物であろうと推測される。いつばうヒトにおいて尿中 ACTH を測定した成績²⁶⁾では、一日推定分泌量の 1/1000 以下が排泄されているものと推定される。このような事実から腎臓に集まつた ACTH は腎臓より排泄されるのではなく、ここで代謝されると考えるべきであろう。この問題については第 3 編²⁷⁾で詳述する。

5 結 語

^{131}I -ACTH あるいは ^3H -ACTH を白鼠に静注した場合の生体諸臓器への放射能の分布および ^3H -ACTH の各組織の細胞分画のレベルでの分布の状態を経時的に観察した。さらに天然 ACTH を白鼠に静注し、一時点における各臓器への生物学的活性の分布についても併せて検討した。

1 ^{131}I -ACTH は注射後短時間に腎臓に圧倒的に多く分布し、注射後6分では注射量の42%が腎臓に認められた。副腎には殆んど放射能を証明できなかつた。

2 ^3H -ACTH を静注した場合の TCA 沈降性放射能は腎臓に最も多く分布した。その分布率は ^{131}I -ACTH の場合とはほぼ同程度であり、ついで肝臓に多かつた。副腎への分布は意外に少なく注射後2分で最も多かつたが、その分布率は注射量の約0.3%にすぎなかつた。

3 ^3H -ACTH の腎臓、肝臓の各細胞分画への分布を検討したところ、TCA 沈降性放射能は単位重量あたりでは注射後2分、6分の各時間ともに上清分画よりもミトコンドリア分画、ついでマイクロソーム分画に多く認められた。注射後6分の副腎では上清、沈渣ともにほぼ同程度の放射能を認めた。

4 Intact の天然 ACTH を注射した場合、腎臓の抽出物にのみ注射後6分で注射量の約13.3%の生物学的活性を認めたが、その他の臓器の抽出物には活性を証明できなかつた。

稿を終るにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた恩師深瀬政市教授、三宅儀前教授に衷心より謝意を捧げます。また本研究に終始御援助、御指導を賜わつた井村裕夫講師に心からの謝意を表します。なお御協力いただいた教室松倉茂、佐古伊康両博士、桜井英雄学士に感謝します。また ^3H -ACTH 作製に御協力いただいた第一化学工業株式会社アイソトープ課の各位に謝意を表します。

なお本論文の一部は第14、15回日本内分泌学会西日本地方会において発表した。

文 献

- 1) GEMZELL, C.A., D.C. VANDYKE, C.A. TOBIAS and H.M. EVANS : Endocrinology, 49 : 325, (1951).
- 2) SYDNOR, K.L. and G. SAYERS : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 83 : 729, (1953).
- 3) YALOW, R.S., S.M. GLICK, J. ROTH and S.A. BERSON : J. Clin. Endocr., 14 : 1219, (1964).
- 4) SAYERS, G., T.W. BURNS, F.H. TYLER, B.V. JAGER, T.B. SCHWARTZ, E.L. SMITH, L.T. SAMUELS and H.W. DAVENPORT : J. Clin. Endocr., 9 : 593, (1949).
- 5) GREENSPAN, F.S., C.H. LI and H.M. EVANS : Endocrinology, 46 : 261, (1950).
- 6) MEAKIN, J.W., J.E. BETHUNE, R.H. DESPOINTES and D.H. NELSON : J. Clin. Endocr., 19 : 1491, (1959).
- 7) WOLF, R.L., M. MENDLOWITZ, L.J. SOFFER, J. ROBOZ and S.E. GITLOW : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 119 : 244, (1965).
- 8) 松倉 茂 : 日内分泌会誌, 43 : 527, (1967).
- 9) 松山 均 : 45 : 161 日内分泌会誌, (1969).
- 10) GREENWOOD, F.C., W.M. HUNTER, and J.S. GLOVER : Biochem. J., 89 : 114, (1963).
- 11) GUILLEMIN, R., G.W. CLAYTON, J.D. SMITH and H.S. LIPSCOMB : Endocrinology, 63 : 349, (1958).
- 12) 田中 明 : 塩野義研年報, 5 : 678, (1955).
- 13) VAUGHAN, M., D. STEINBERG and J. LOGAN : Science, 126 : 446, (1957).
- 14) HERBERG, R.J. : Science, 128 : 199, (1958).
- 15) PAYNE, R.W., M.S. RABEN and E.B. ASTWOOD : J. Biol. Chem., 187 : 719, (1950).
- 16) LIPSCOMB, H.S. and D.H. NELSON : Endocrinology, 71 : 13, (1962).
- 17) RICHARDS, J.B. and G. SAYERS : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 77 : 87, (1951).
- 18) SONENBERG, M., A.S. KESTON and W.L. MONEY : Endocrinology, 48 : 148, (1951).
- 19) CATS, A. and A.A.H. KASSENAR : Acta Endocr., 24 : 35, (1957).
- 20) GOLD, E.M., E.E. VAN BRUNT, A.D. DAILY, A.T. BORYCZKA and W.F. GANONG : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 112 : 626, (1963).
- 21) NISHIZAWA, E.E., R.B. BILLIAR, J. KARR and K.B. EIK-NES : Canad. J. Biochem., 43 : 1489, (1965).
- 22) JACOBSON, H.I., G.N. GUPTA, C. FERNANDEZ, S. HENNIX and E.V. JENSEN : Arch. Biochem. Biophys., 86 : 89, (1960).
- 23) HAUGER-KLEVEENE, J.H. : Ann. Int. Med., 66 : 1024, (1967).
- 24) CATS, A., J. MEYER and A.A.H. KASSENAR : Acta Endocr., 31 : 419, (1959).
- 25) VILAR, O., B. ALVAREZ, O. DAVIDSON and R.E.

- MANCINI : J. Histochem. & Cytochem., 12 : 621, (1964). 26) IBAYASHI, H., T. FUJITA, K. MOTOHASHI, S. YOSHIDA, N. OHSAWA, S. MURAKAWA, T. YOKOTA and S. OKINAKA : J. Clin. Endocr., 21 : 140, (1961). 27) 松山 均 : 日内分泌会誌, 45 : 179, (1969).