Radioimmunoassay of Plasma Cortisol

Takuo MAKINO and Akira KAMBEGAWA

Pharmacological Research Department, Teikoku Hormone, Mfg., Co. Ltd.
Shimosakunobe, Kawasaki, Japan

A radioimmunoassay for the determination of plasma cortisol is described. The antiserum against cortisol was produced by the immunization of rabbits with cortisol-21-BSA synthesized from cortisol via hemisuccinate derivative. The antiserum obtained had high affinity and high specificity for cortisol. 0.002 ml of plasma diluted with water was used for the assay. After 1,000 dpm of tritiated cortisol was added to compensate for procedural losses, the sample was extracted with ether. The dried extract was applied to microcolumn of Sephadex LH-20 and eluted with benzene-methanol (85:15). A 1/2 aliquot of the eluate was used for measuring recovery of the added tracer, and what remained added with 10,000 dpm of the tritiated cortisol was incubated with the antiserum in a dilution of the borate buffer (pH 8.0) containing 0.06% BSA and 0.05% bovine gamma globulin. The free and bound steroids were separated by 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, and tritium activity in the supernatant was counted. The results determined by this method were satisfactory. Furthermore, we investigated both the No Chromatographic method and the Direct method in which plasma was directly incubated with the antiserum without extraction. These simplified methods were in good correlation with the Chromatographic method in the normal subjects. (See pp. 1297~1305)

Radioimmunoassay による血中 Cortisol の測定

帝国臓器製薬薬理研究部

牧 野 拓 雄, 神 戸 川 明

(昭和48年7月17日受付)

Cortisol-21-hemisuccinate-BSA を合成して家兎に免疫し, cortisol に対する抗血清を作製後, これを用いて radioimmunoassay (RIA) による血漿中 cortisol の測定法について検討した. 血漿 cortisol はエーテル抽出後 Sephadex LH-20 カラムクロマトにより純化して RIA を行ない満足すべき成績を得たが, クロマトを省略した方法, さらに抽出も省略して抗血清と反応させる方法を健康人の血漿を用いて検討した結果では, いずれも簡易測定法としての有用性が示唆された.

I 緒 言

従来, 血中 corticoid の測定には cortisol や corticosterone 等の 11-OHCS を硫酸螢光法によつて測定する方法が一般的であるが, cortisol そのものを定量するためには double isotope derivative method のような煩雑な測定法によらねばならず, 臨床応用への隘路となつていた. その後 Murphy¹⁾によつて開発された competitive protein binding assay (CPBA) により比較的容易に測定が可能となつたが, cortisol と結合する corticosteroid binding globulin (CBG) の特異性などに問題点が残されていた.

一方, Abraham²⁾によつて発表された estradiol-17 β の RIA は1970年代に入ると他のステロイドホルモンの分野にも応用され, 特異性に優れた, 高力価の抗血清の作成により血中ステロイドの微量測定はめざましい進歩をとげつつあるが, cortisol の RIA については, いまだその報告も極めて少ない.

今回われわれは cortisol に対する抗血清を作製, RIA による血中 cortisol の測定およびその簡易化についての考察を行なつたので報告する.

II 実 験 材 料

a 試薬・装置

1) Cortisol-1, 2-³H (45Ci/mM) : The Radiochemical Center. 随時 Sephadex LH-20 (benzene : methanol=85 : 15) にて精製を行なう.

2) bovine serum albumin crystalline (BSA) fraction V, complete Freund's adjuvant, bovine gamma globulin fraction II, dioxane scintillator は既報³⁾にしたがう. その他の試薬はすべて特級を使用する.

3) 抗血清希釈液 : 0.05M borate buffer (pH 8.0) に BSA を 0.06%, bovine gamma globulin を 0.05% の割合で溶解したもの.

4) クロマトカラム : Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals) を benzene : methanol (85 : 15) の溶媒で1晩膨じゆんさせ, 減圧して空気泡を除き, 径7 mm のカラムにその2 ml をつめ, 新しく調整した同じ溶媒を5 ml 以上流してのち使用する. なお, カラムは interchangeable な2 ml のツベルクリン注射筒にて代用出来る.

5) 液体シンチレーションカウンター : Aloka LSC-651

b 抗原の合成

cortisol 1.2g と succinic anhydride 1.2g を pyridine 16ml に溶かして一晩放置後、水 20ml を冷やしながらかえ、次いで 4N-HCl を滴下して生じた沈殿をとり acetone にて再結晶を行なつて cortisol-21-hemisuccinate 1.18g を得る (同定: NMR, IR, m.p.). これを Erlanger ら⁴⁾⁵⁾の方法にしたがつて BSA を結合させ cortisol-21-hemisuccinate-BSA 2.2g を得た.

c 抗血清の作製

抗原 1mg に注射用生理食塩水 0.5ml および complete Freund's adjuvant 0.5ml を加えてエマルジョンとし、5羽の成熟家兎 (Newzealand White 種, 雄, 約 2.5kg) の背部皮下4ヶ所以上に分けて最初の1ヶ月は2回、以後は月1回の間隔で注射を行なつた. 採血は注射後10日目より行ない、血清を分離して deep freezer にて保存した. cortisol に対する抗体の産生はすべての家兎において認められ、最も力価の上昇した一羽については投与3ヶ月で20,000倍、4ヶ月で40,000倍まで抗血清の稀釈が可能であつたが、以後11ヶ月まで力価の変動はみられなかつた. なお、Abraham らの方法⁶⁾により求めた本抗血清の association constant (K) は 1.06×10^9 /mole であつた.

III 測定方法

1) 抽出・精製

回収率を補正するための cortisol-³H 1,000dpm を添加してあるスピッツ遠沈管に被検血漿を入れる. 血漿量は通常 0.002ml を用い、水で稀釈して 0.2ml とする. (血漿 0.1ml に水を加えて 10ml とし、その 0.2ml を用いる). これに5倍量のエーテルを加えて振盪後、下層を捨て、水 0.2ml を加えて振り、上清を他の試験管にとり、窒素ガススプレーにて乾固する. これを Sephadex LH-20 のクロマトカラムに benzene : methanol (85 : 15) の溶媒 0.1ml で添加し、さらに 0.1ml で試験管を洗つてカラムに加えてのち、同じ溶媒を流して cortisol fraction を採取する.

Fig. 1. Elution pattern of steroids by the microcolumn chromatography.

- elution peak 1 progesterone
 2 androst-4-ene-3, 17-dione, desoxycorticosterone
 3 pregnenolone, 20 α -dihydroprogesterone
 4 DHEA, 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone
 5 11-dehydrocorticosterone, 11-deoxycortisol
 6 estrone, corticosterone
 7 cortisone, aldosterone, 17 α -hydroxypregnenolone
 8 estradiol-17 β ,
 9 estriol

このクロマト法による主なステロイドの elution pattern は Fig. 1 に示すごとくで, cortisol は他の corticoid と分離が可能であり, かつ, 再現性はきわめて良好で, 通常, 吸着後 2.4ml により prewash を行ない, さらに 1.4ml を溶出させて cortisol fraction として採取する. 採取液の 1/2 量は ^3H 量を測定して最初に加えたものとの比から回収率を求め, 残りについて RIA を行なう.

2) RIA

標準曲線作製用としてスピッツに加えた cortisol の純品 0~500pg とクロマトにより採取した RIA fraction とに cortisol- ^3H 10,000dpm を加えて乾固し, 稀釈抗血清 0.25ml を加え 30分放置後, 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25ml を加えて混和し 10分後に 3,000rpm にて 10分間遠沈を行なうが, 以上の操作はすべて室温において可能である. ついで上清 0.2ml を counting vial に入れ dioxane scintillator 12ml を加えて放射能(P)を測定し, 下の(1)式から cortisol- ^3H の結合率(B)を求める. 同時に作製した標準曲線を用いて検体の結合率からステロイド量(M)を求め, (2)式により血漿中 cortisol 濃度(S)を算出する.

$$B(\%) = (A - P) \times \frac{0.5}{0.2} \times \frac{100}{A} \quad (1)$$

$$S(\text{ng/ml}) = (M - a) \times \frac{100}{\text{回収率}(\%)} \times \frac{2 \times 10^3}{V} \quad (2)$$

A : assay に用いた ^3H dpm

a : water blank 値 (水を用いて検体と同様操作を行なって求めた値)

V : 被検血漿量

IV 実験成績

1) 標準曲線

本実験に用いた 40,000 倍稀釈の抗血清により作製した標準曲線は Fig. 2 に示すごとくで 0pg における結合率は $89.6 \pm 0.47\%$ (mean $\pm$ S.D. 以下同様), 500pg においては $12.1 \pm 2.23\%$ で, 横軸のステロイド量を対数目盛で表わすと 0~500pg の範囲内においてはほぼ直線に近いものが得られた. また, 95%信頼限界において 0pg と区別し得る最小ステロイド量は 5pg であることから, この標準曲線から求められる感度(sensitivity)は 5pg であるといえる.

2) 精度および再現性

既知量の cortisol を血漿および水に加えて全測定操作を行ない回収率を補正して測定値を求め, 本測定法の accuracy を検討した結果は, Table 1 に示すごとくほぼ満足すべきものであつた.

また, 被検血漿を duplicate に測定して求めた precision は within (intra-) assay variance が 13.7% (range 14.0~128ng/ml, N=22), between (inter-) assay variance が 17.8% (range 7.8~99.0ng/ml, N=7) であった.

2例の男子血漿を各 5 回反復測定して求めた本測定法の再現性(reproducibility)は $47.3 \pm 7.92\text{ng/ml}$ C.V. (coefficient of variation) 16.6% および $65.1 \pm 12.4\text{ng/ml}$, C.V. 19.1% であった.

3) 回収率および水盲検値

被検血漿に加えた cortisol- ^3H の全測定操作を通じての回収率は $65.8 \pm 6.11\%$ (N=55) であった.

また, 本測定法の water blank 値は $6.97 \pm 3.93\text{pg/sample}$ (N=22) であった.

4) Specificity

本抗血清の各種ステロイドに対する交叉反応の検定は cortisol- ^3H とそれぞれのステロイドを用いて反応曲線を作製し, 50%結合率を示す cortisol 量とそれぞれのステロイド量との比により % cross reaction を求めた. この結果は Table 2 に示すごとくで, cortisol の本抗血清に対する affinity を 100 とすると 17 α -hydroxyprogesterone が 92.3 と大きく交叉したが cortisone の 28.1 を除いては他の主な corticoid は 2~4 程度で androgen, estrogen はいずれも 1 以下であつた. なお合成 corticoid の prednisolone は 10.9% の

Fig. 2. Standard curve for cortisol (each point represents the mean of 5 determinations $\pm$ S.D.)

Table 1. Accuracy of the Chromatographic method.

sample	steroid added (pg)	steroid quantified				regression equation
		mean (pg)	standard deviation	standard error	coefficient of variation (%)	
water 0.1ml	0	3.75	2.98	1.49	79.4	$Y = 0.990X + 3.45$
	20	24.2	4.34	2.17	17.9	
	50	60.7	12.0	6.01	19.7	
	100	99.0	18.2	9.14	18.3	
	200	192	20.0	10.0	10.4	
	500	502	16.7	8.30	3.32	
male plasma 0.002ml	0	42.7	10.9	5.47	25.5	$Y = 0.884X + 45.8$
	20	61.7	9.59	4.79	15.5	
	50	98.0	10.5	5.27	10.7	
	100	136	21.6	10.8	15.8	
	200	217	27.3	13.6	12.5	
	500	489	27.7	13.8	5.66	

Number of determination : 4 X=steroid added Y=steroid quantified

Table 2. Cross reaction with the antiserum against cortisol-21-BSA (dilution 1 : 40000)

compounds	% cross reaction
cortisol	100
17 α -hydroxyprogesterone	92.3
cortisone	28.1
11-desoxycortisol	4.55
20 α -dihydroprogesterone	3.82
aldosterone	2.88
corticosterone	2.87
11-desoxycorticosterone	2.64
progesterone	2.42
11-dehydrocorticosterone	0.92
5 α -pregnanedione	0.10
tetrahydrocortisol	0.08
pregnenolone	<0.04
5 β -pregnanediol	<0.04
pregnanetriol	<0.04
cholesterol	<0.04
testosterone	1.00
dehydroepiandrosterone	0.21
androst-4-ene-3, 17-dione	0.08
5 α -dihydrotestosterone	<0.04
androsterone	<0.04
estrone	1.17
estradiol-17 β	0.40
estriol	1.25
chlormadinone acetate	<0.08
prednisolone	10.9
triamcinolone	<0.20

交叉率を示した。

5) 本測定法と蛍光法との比較

血中の cortisol, corticosterone 等の 11-hydroxy-corticosteroids (11-OHCS) を測定する蛍光法⁷⁾と本測定法との相関関係は同一血漿の両者による測定値 (n=18) により比較して検討した。この結果、蛍光法においては、 $164 \pm 37.4 \text{ ng/ml}$ (range 103~230 ng/ml), 本測定法においては $75.6 \pm 25.1 \text{ ng/ml}$ (range 38.9~137 ng/ml) であり、蛍光法は本測定法の約 2 倍の高値を示した。

6) 測定値

本法による末梢血中 cortisol 値 (採血時間不定) は正常成人男子 $63.5 \pm 21.9 \text{ ng/ml}$ (n=31), 正常成人女子 $95.5 \pm 32.7 \text{ ng/ml}$ (n=14), 妊娠40週の婦人 $259 \pm 87.4 \text{ ng/ml}$ (n=4), 健康人3例の朝から夕方までの日内変動は Fig. 3 に示すごとくである。

V 簡易測定法の検討

1) No Chromato 法

既述の Chromato 法からクロマトによる cortisol の純化、精製を省略した測定法について検討した。すなわち、被検血漿のエーテル抽出物を乾固してのち、ただちにメタノール 0.4 ml を加え 0.2 ml は回収率補正のための counting に供し、残りの 0.2 ml について assay を行なう。本法の精度は良好であり、さらに within assay variance 16.3% (n=31), between assay variance 19.3% (n=10), 回収率 $76.0 \pm 4.4\%$ (n=70), water blank $3.8 \pm 4.4 \text{ pg/}$

Fig. 3. Diurnal variation of plasma cortisol.

sample であった。本法と Chromato 法との相関関係は正常男子および正常女子の血漿 (N=20) について両者の測定法によりその測定値を比較した。この結果, Chromato 法 (x) による測定値は $64.9 \pm 25.5 \text{ ng/ml}$, No Chromato 法 (y) によるそれは $79.5 \pm 40.2 \text{ ng/ml}$ で, 両者間には Fig. 4 に示すごとく良好な相関関係が

Fig. 4. Comparison of plasma cortisol values between with and without chromatography.

認められるものの, y と x との差の x に対する割合 $\left(\frac{y-x}{x} \times 100 \right)$ は $19.5 \pm 36.5\%$ であり, これの平均値の95%信頼限界における範囲は $36.6 \sim 2.38\%$ であった。また, 対応する2群の平均値の比較 (paired comparison 法) では y は x に対し有意の差が認められた ($p < 0.05$)。

2) Direct 法

吉見ら⁸⁾の報告にほぼ準拠して被検血漿からの有機溶媒抽出を省略して抗血清と反応させ測定する方法について検討した。

すなわち, 水で10倍に稀釈した被検血漿0.01ml (血漿として0.001ml) をマイクロシリンジで採取し, これに cortisol- ^3H 10,000dpm を含むメタノール 0.01ml を加えて混和し, 稀釈抗血清 0.49ml を加えて30分間室温放置後, 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.49ml を加え10分放置, 遠沈して上清 0.4ml をとり, dioxane scintillator により放射能を測定, (1) 式によつて結合率を求める。同時に水 0.01ml を用いて検体と同様に操作して求めた標準曲線により被検血漿中の cortisol 濃度を求めるが, 本法においては回収率の補正を行なう

必要はない。なお、本法における抗血清の稀釈倍数は高く、他の方法においては40,000倍稀釈の抗血清が本法においては70,000倍稀釈が適当であつた。

男子の血漿を用いて検討した本法の精度は Table 3 のごとく良好であつた。なお precision は within assay variance 16.9% (n=33), between assay variance 23.6% (n=13), water blank は $0.66 \pm 1.58 \text{ pg/sample}$ で満足すべきものであつた。本法と Chromato 法の相関関係は No Chromato 法におけるそれと同様な方法で検討したが、Chromato 法(x)による測定値は $79.1 \pm 27.0 \text{ ng/ml}$, Direct 法(y)によるそれは 80.2

Table 3. Accuracy of the direct method

sample	steroid added (pg)	steroid quantified				regression equation
		mean (pg)	standard deviation	standard error	coefficient of variation (%)	
male plasma 0.001ml	0	114	10.6	5.31	10.8	$Y = 1.07X + 111$
	20	130	8.95	4.47	14.5	
	50	167	9.94	4.97	16.8	
	100	214	12.6	6.30	17.0	
	200	329	13.7	6.85	24.0	

Number of determination : 4

X=steroid added Y=steroid quantified

Fig. 5. Comparison of plasma cortisol values between Chromatographic and Direct method.

±35.8ng/ml で両者間には Fig. 5 に示すごとく良好な相関関係が認められた。また、Y と X の差の X に対する割合は $16.2 \pm 41.6\%$ であり、この平均値の95%信頼限界における範囲は $34.2 \sim 1.75\%$ であった。また、対応する2群の平均値の比較では Y と X に有意の差は認められなかった ($p < 0.05$)。

VI 考 察

cortisol の RIA は cortisol-21-hemisuccinate-BSA を抗原として抗血清を作製し、測定する方法が既に報告されているが⁸⁾⁹⁾、この抗原は cortisol の21位の水酸基を BSA 結合部位として用いるためにこの部位の特性が失われ、これによる抗血清は cortisol 以外の C_{21} ステロイドにもある程度の affinity を示し、Ruder ら⁹⁾は 11-desoxycortisol, 21-desoxycortisol が cortisol と同程度の cross reactivity を示したと報告しており、われわれの作製した抗血清も 17 α -hydroxyprogesterone が高い交叉反応を示している。しかし CBG においては cortisol にほぼ匹敵する affinity を corticosterone, 11-desoxycortisol, 17 α -hydroxyprogesterone, progesterone, 21-desoxycortisol などが示し、それ以外の corticoid も cortisol と transcortin の結合部位に競合することが報告されている¹⁰⁾¹¹⁾。したがって CBG は抗 cortisol 血清よりも cortisol に対する特異性が低いといえる。

一方、本抗血清は既述のごとく cortisol に対して $K = 1.06 \times 10^9$ l/mole と高い binding affinity を示しており Ruder らのそれは 2×10^9 l/mole と報告されている。これに対して CBG においては human¹²⁾ が 5.2×10^8 (4°C) と 2.4×10^7 (37°C), rabbit¹³⁾ が 9.0×10^8 (4°C) と 4.7×10^7 (37°C) といわれ、cortisol 抗体は CBG に比較して約10~100倍のKを有する。

標準曲線においても useful range がわれわれの方法で 20~500pg と約25倍を有するのに対して CBG assay では通常 2~8ng と約4倍にすぎない。

以上のことからこれら抗血清は CBG に比較すると cortisol に対する特異性と親和性、感度、測定範囲などの点で優れており、cortisol assay の結合蛋白としては前進したものといえよう。

本抗血清を用いて血中 cortisol を測定する際にはクロマトによりこのものを分離・精製して assay を行なうのが理想的ではあるが、可能なかぎり測定法を簡易化することはその測定の臨床的応用を広く可能にするための必要条件の一つである。そのため、特異性の高い抗血清を用いることによりクロマトを省略して血中ステロイドを測定する方法が estradiol-17 β ¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, estriol¹⁴⁾, progesterone¹⁴⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ について検討されて良好な成績が得られており、さらに Wu ら²⁰⁾により被検血漿にメタノールを加えて蛋白を沈でんさせ、その上清について直接 RIA を行う方法も報告されている。

われわれの作製した抗血清も比較的 cortisol に対する特異性を有していること、感度が優れていること、cortisol はその血中濃度がきわめて高く被検血漿量が少量で良いことなどの理由により、クロマトによる血中 cortisol の分離・精製を省略した No Chromato 法、さらには吉見らによつて報告された、血漿中の CBG をメタノールを加えて失活させ、これに直接、抗血清を加えて RIA を行なう Direct 法の可能性が考えられた。したがって正常男子および女子の血漿を用いてこれらの方法について検討した結果では Chromato 法に比較していずれも測定値はやや高値を示す傾向が認められるものの臨床応用における簡易法としての有用性が示唆された。特に Direct 法は血漿からの有機溶媒抽出を省略できること、回収率を補正する必要がないことなど簡易測定法としては好適であるといえよう。

しかし Table 4 に示すごとく、前立腺癌患者に chlormadinone acetate (6-chloro-6-dehydro-17 α -acetoxyprogesterone) を連日100mg 3ヶ月間経口投与した際の簡易法により求めた投与間中の血中 cortisol 値は Chromato 法により求めたそれに比較して明らかに高値を示した。Chlormadinone acetate そのものは抗 cortisol 血清と交叉反応を示さないが、この薬物は本抗血清に強い交叉反応を示す 17 α -hydroxyprogesterone の誘導体であることを考えると、その血中代謝物のなかに抗血清と親和性を有するものが存在し、それに起因すると考えられる。このことは、ある種の薬物を投与した際にはそのもの、またはその代謝物の cortisol 値に及ぼす影響を考慮に入れる必要のあることを示唆しており、corticoid 製剤投与時、さらには下垂体-副

Table 4. Comparison of plasma cortisol values among three determination methods during administration of Chlormadinone acetate (100mg/day) for three months

name (age)	No.	method		
		Chromato	No Chromato	Direct
A.H. (62)	3	74.7±23.0	104 ±15.9	115 ±18.7
T.N. (77)	4	62.9±23.9	98.2±40.5	109 ±53.3
S.O. (73)	3	8.16±5.75	32.5±26.8	36.4±49.5
Y.K. (54)	2	49.4±14.9	110 ±19.7	98.6±16.1
total		49.9±31.4	85.4±41.1	91.0±49.2

ng/ml (mean±S.D.)

Chlormadinone acetate : 6-chloro-6-dehydro-17 α -acetoxyprogesterone

腎皮質系疾患，抑制試験時などにおいて本抗血清による cortisol の測定を行なう際にはクロマトによる純化が要求されるであろう。

簡易法におけるこれら問題点を解決するためにも 今後はより特異性の高い抗血清の作製が望まれ，特に cortisol の構造活性部位であるA環の 4¹-3-keto と 11 β , 17 α , 21位の水酸基を intact な状態におく抗原の合成およびその抗血清の作製が期待される。

稿を終るにあたり，御校閲を賜った帝国臓器製薬薬理研究部長鈴木竜太博士に感謝致します。また，適切な御示唆を賜った日大産婦人科高木繁夫教授，吉田孝雄講師ならびに京大第二内科吉見輝也博士に感謝致します。

また，chlormadinone acetate 投与患者の血漿を御提供頂いた群馬大学泌尿器科志田圭三教授，島崎淳助教授に感謝致します。

文 献

- 1) Murphy, B.E.P., W. Engelberg and C.J. Pattee : J. Clin. Endocr., **23** : 293, (1963).
- 2) Abraham, G.E. : J. Clin. Endocr., **29** : 866, (1969).
- 3) 牧野拓雄 : 日内分秘誌, **49** : 629, (1973).
- 4) Erlanger, B.F., F. Borek, S.M. Beiser and S. Lieberman : J. Biol. Chem., **228** : 713, (1957).
- 5) Erlanger, B.F., F. Borek, S.M. Beiser and S. Lieberman : J. Biol. Chem., **234** : 1090, (1959).
- 6) Abraham, G.E. and W.D. Odell : Immunologic methods in steroid determination, ed. by Peron, F.G. and Caldwell, B.V., Appleton-Century-Crofts, p. 87 (1970).
- 7) DeMoor, P., O. Steeno, M. Raskin and A. Heudriks : Acta Endocrin., **33** : 297, (1960).
- 8) 吉見輝也，遠藤治郎，立花清司 : 第48回日内分秘学会総会 (1973).
- 9) Ruder, H.J., R.L. Guy and M.B. Lipsett : J. Clin. Endocrinol. Metab., **35** : 219, (1972).
- 10) Sandber, A.A., H. Rosenthal : Steroid Dynamics, ed. by Pincus, G., et al., Academic Press, p. 1 (1966).
- 11) Seal, V.S. and R.P. Doe : Steroid Dynamics, ed. by Pincus, G., et al., Academic Press, p. 63 (1966).
- 12) Muldoon, T.G. and U. Westphal : J. Biol. Chem., **242** : 5636, (1967).
- 13) Chader, G.J. and U. Westphal : J. Biol. Chem., **243** : 928, 1968.
- 14) 牧野拓雄 : 投稿中.
- 15) Exley, D., M.W. Johnson and P.D.G. Dean : Steroids, **18** : 605, (1971).
- 16) Cameron, E.H.D. and D.A. Jones : Steroids, **20** : 737, (1972).
- 17) Spieler, J.M., R.L. Webb, R.J. Saldarini and J.A. Coppola : Steroids, **19** : 751, (1972).
- 18) deVilla, G.O., K. Roberts, W.G. Wiest, G. Mikhail and G. Flickinger : J. Clin. Endocrinol. Metab., **35** : 458, (1972).
- 19) Kutas, M., A. Chung, D. Bartos and A. Castro : Steroids, **20** : 697, (1972).
- 20) Wu, C.H., L.E. Lundy and S.G. Lee : Am. J. Obstet. Gynecol., **115** : 169, (1973).