Radioimmunoassay of Plasma Aldosterone and its Clinical Application

Toshio OGIHARA, Toshihide YAMAMOTO and Yuichi KUMAHARA

Central Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

A radioimmunoassay for the determination of plasma aldosterone is described. An antibody against aldosterone 18, 21-disuccinate was supplied by the National Institutes of Health (Bethesda, Md. U.S.A.). One to 2 ml of plasma, with 10000 dpm ^3H -aldosterone added for recovery calculation, is extracted with dichloromethane. Purification is achieved by paper chromatography (Bush B_s descending system). After overnight incubation at 4°C, bound and free fractions are separated by dextran-coated charcoal. The average recovery after extraction and purification is greater than 75%. The antibody shows less than 0.6% cross-reactivity with other plasma corticoids. Nevertheless, aldosterone is undetectable in paper or water blank, plasma of patients after adrenalectomy and plasma enriched with excess cortisol and cortisone. In 10 normal subjects, the plasma aldosterone ranged 2.3–8.5 ng/dl (supine), 8.0–12.0 ng/dl (upright). In 13 patients with primary aldosteronism, it is ranged 16–130 ng/dl (supine). Technical problems concerning plasma aldosterone measurement by radioimmunoassay are discussed in detail. The clinical significance of measuring plasma aldosterone concentration in lieu of aldosterone secretory rate is discussed as well.

(See pp. 619~628)

血中アルドステロンの Radioimmunoassay とその臨床応用

大阪大学医学部附属病院中央臨床検査部

荻原 俊男, 山本 智英, 熊原 雄一

(昭和47年11月25日受付)

NIH 抗アルドステロン抗体を用いた, 血漿アルドステロンの Radioimmunoassay 法の検討を行い, 臨床応用の可能性を検討した. 血漿アルドステロンはジクロルメタンで抽出, Bush B₅による沝紙クロマトグラフィーで分離後 Radioimmunoassay を行つた. 本法による正常範囲は安静臥位 2.3~8.5ng/dl, 立位 8.0~12ng/dl であつた. 一方原発性アルドステロン症13例では 16~130ng/dl であり, 明らかな高値を示した. アルドステロン分泌率に対し, 血漿アルドステロン濃度測定の意味について考察を加えた.

I 緒 言

ステロイドホルモンの Radioimmunoassay (以下 RIA) は, Lieberman ら¹⁾によるステロイドをハプテンとする蛋白結合物に対する抗体を作成することに端を発し, さらに Abraham²⁾による 17 β -estradiol の RIA の成功に至つた.

アルドステロンについては, Mayes ら³⁾, Bayard ら⁴⁾により報告され, さらに福地ら⁵⁾, 伊東ら⁶⁾によつても報告されている. これらは Aldosterone 3-oxime 又は Aldosterone 18, 21-disuccinate に対する抗体を用いた血漿アルドステロンの RIA であり, Bayard らは分泌量測定にも応用している⁷⁾. 最近 Aldosterone- γ -lactone の RIA も報告されており⁸⁾, これは尿中アルドステロンの測定に利用されている. アルドステロンの RIA は今までの Double isotope derivative dilution 法⁹⁾に比べれば比較的容易となつたものの, 抗体が得にくいこと, 少くとも1回のクロマトグラフィーによる抽出を必要とするため, 普及するには至つていない. 我々は NIH より Aldosterone 18, 21-disuccinate 抗体を入手し, アルドステロンの RIA 法を検討し, これを用い血漿アルドステロンの測定を行い, その意義について考察を加えた.

II 材料及び方法

1. 試薬, 器具

メタノール, ベンゼン, ジクロルメタン, クロロフォルムは spectro grade 用いた. 結晶Dアルドステロンは Sigma 社のものを使用し, 島津微量天秤により計量し以下, 計量フラスコにより希釈を行い標準溶液を準備した. 標識アルドステロン (1, 2³H-Aldosterone) は Nuclear Chicago 社製で S.A. 50mCi/mM であり, Bush B₅系で精製, -20°Cで保存したものを使用した. Bovine Serum Albumin (以下 BSA) は Armour 社製 Fraction V を用いた. 沝紙クロマトグラフィーはあらかじめメタノールで2~3日間洗滌した Whatman No. 1 を用いて行つた. RIA, 抽出に用いるガラス器具は全て重クロム硫酸に一昼夜浸した後, 純水で洗滌, さらにメタノールで洗滌したものを使用した.

2. 血漿アルドステロン抽出

血漿 1 mlないし 2 mlに 2N-NaOH 0.05ml を加えた後, 純水 2 mlないし 3 mlを加える. さらに約 10,000 DPM の ³H-Aldosterone を回収率の指標として入れた. これを15mlのジクロルメタンで抽出, 0.1N-NaOH

2 mlで洗滌, さらに純水 2 mlで1回洗滌した後, ジクロロメタン層を正確に 10mlとり, 尖型試験管に入れた. これを蒸発乾固し, 0.1~0.2mlの 1:1 メタノール:クロロフォルム液で溶解, Bush B₅系 (ベンゼン:メタノール:水 2:1:1) でアルドステロンを分離した. 沄紙クロマトグラフィーは2時間飽和, 12時間展開する. イサチン色素を同時に1条併行させアルドステロン部位の推定に使った. すなわちイサチン相当部位の上下 5 cm, 合計10cmを切りとりさらにアクチグラム (Packard Radiochromatogram scanner Model 7201) にかける, アルドステロン部位を確認し, この部分 3 cmを切りとり, メタノール 3 mlに1時間浸し溶出した. 溶出液 3 mlの内, 0.5mlを Bray 溶液にて液体シンチレーションカウンター (Nuclear Chicago, Mark 1) で測定し回収率を算定した. 残り2.5mlの内 1 mlずつを2本の試験管にとり, 蒸発乾固し, 以下の測定に供した.

3. RIA

各試験管に標準アルドステロン (10pg/tube から 1000pg/tube まで各濃度) 又はサンプルを入れ蒸発乾固した後, 一定量の ³H-Aldosterone (約 10000DPM) を加えた. さらに標準曲線用試験管には, 被験血漿に先に添加した回収率補正用の ³H-Aldosterone の残量の平均値に相当する ³H-Aldosterone を加え, 標準曲線用試験管及びサンプルの各試験管に含まれる ³H-Aldosterone 量がほぼ等量になるようにした. 全試験管を蒸発乾固, 50万倍稀釈抗アルドステロン抗体を含む 1.5% BSA-硼酸緩衝液 pH8.0, 1 mlを加えた. 37°C 5分間 incubation, 次いで 4°C, 12時間の incubationを行なった. 抗原抗体結合型-非結合型分離 (B-F分離) は Dextran-coated charcoal液 (Dextran 70 250mg, Norit A neutral charcoal 250mgを硼酸緩衝液100mlに加えたもの) 1 mlを加え10秒間 Vortex mixer で振盪, 5分間 3000cpm で冷凍遠沈し, 上清0.5mlを Bray 溶液 10mlに入れ放射能を測定した. 計算は加えた総放射能(T)に対する抗体結合放射能(B)の比・B/T %で表わした. 各サンプルのアルドステロン濃度は次式で求められる.

(標準曲線より読み取った濃度 pg) $\times 3 \times \frac{15}{10} \times (1 / \text{抽出サンプルの ml}) \times (100 / \text{回収率}\%) = \text{pg/ml}$ 抽出過程及び RIA 法の概略を Fig. 1 に示した.

4. 血漿レニン活性測定

ダイナボット社製レニン活性測定用キットを用い, アンギオテンシン I の RIA¹⁰⁾ により測定した.

5. 対象

原発性アルドステロン症患者は, 手術確認例及び臨床的に診断確定されたものである. 正常対照群としては主としてドック入院患者で血圧正常で異常所見のないものである. 採血は安静臥位1時間後, 及び立位4時間の2点で行った.

III 結 果

1. RIA の条件

Bray 溶液を用いる放射能計数効率率は約 12%であり, サンプル間の消光の程度はほぼ一定している為,

Fig. 1. Procedure of plasma aldosterone measurement by radioimmunoassay

消光の補正は RIA における放射能測定時には行わなかった。

a) 硼酸緩衝液の蛋白濃度

BSA の濃度は Lot. ごとに最も理想的濃度を決めた。0.5 から 5.0g/dl の各段階の緩衝液を作成し、標準物質非添加時の B/T% (Bo %) を求め、これが最高となる濃度を以下の測定に用いた。Lot No. H37706 の結果は Fig. 2 に示す通りで、この場合には 1.5g/dl の濃度で最高の Bo % を示した。

b) 抗体希釈

抗体希釈を 10 万倍、25 万倍、50 万倍の 3 系列で RIA を行つた。Fig. 3 に示す如く、50 万倍希釈で最も感度の良い標準曲線が得られた。以後の測定は 50 万倍希釈抗体を用いて行つた。

c) ^3H -Aldosterone 量

RIA に加える総放射能の量を約 10,000DPM, 20,000DPM, 30,000DPM の 3 系列を用い、50 万倍希釈抗体で検討した結果、Fig. 4 に示す如く、約 10,000DPM で最も良好な標準曲線が描けた。b) 及び c) の条件により、最小測定感度は 10pg/tube であつた。

d) incubation の条件

incubation を以下の 3 方法で検討した。

Fig. 2. Optimal concentration of bovine serum albumin for radioimmunoassay

Fig. 3. Standard curve using different dilution of antibody

Fig. 4. Standard curve using different doses of tritiated aldosterone

Fig. 5. Standard curve under different incubation condition

i) 37°C20分後, 4°C 2時間, ii) 37°C 5分後, 4°C12時間, iii) 37°C40分後, 4°C12時間. i) の場合Fig. 5 に示す如く, ii) に比し全体に Bound を上昇させたが, 感度においては ii) とほぼ同様であつた. iii) の Bo は i) とほぼ同様であつたが感度は不良となつた.

e) B-F 分離

Dextran-coated charcoal (以下 DCC) による B-F 分離と Bayard ら⁴⁾の方法に準じた Florisil による分離とを比較した. DCC 法は Florisil 法に比し全体に Bound が高く, 最小測定感度はやや不良であつた. (Fig. 6)

f) 交叉反応

他のステロイドとの交叉性は Fig. 7 及び Table 1 に示す如くであり, Cortisol, Cortisone はその血中濃度から考えてこの程度の交叉でも抽出が必要である. Spironolactone とは 1 mg まで交叉性を示さなかつた.

2. 濾紙クロマトグラフィー

Fig. 8 に Bush B₅ 系で6時間展開した時の各種ステロイドの Rf 値を示した. なおイサチン色素の Rf はアルドステロンとほとんど一致していた. 実際の測定にあたつては Cortisol, Aldosterone, Cortisone の分離をよくするために12時間展開させることにより3者は互に3 cm 以上離れた. Fig. 9 に示す如く, イサチン相当部位を中心に10cm 程切り, アクチグラムによりアルドステロン部位を同定した. Fig. 10 はアクチグラムの一部である.

3. 回収率

濾紙クロマトグラフィー直前までの回収率は平均95%であつた. 濾紙クロマトグラフィー後, メタノール溶出までの抽出段階における最約的回収率は78%であつた.

Fig. 6. B-F separation, a comparison with DCC method and Florisil method

Fig. 7. Cross reactivity with other corticosteroids

4. ブランク値及び副腎摘除患者測定値

全過程を純水で行った場合の Water blank は感度以下であつた。両側副腎摘除症例及びアジソン病でコ

Table 1. Cross reactivity with other steroids

The % cross reaction was calculated as follows: If X represents the pg of aldosterone required to displace 50% of the ^3H -aldosterone bound to the antibody and Y equals the pg of steroid S required to displace 50% of ^3H -aldosterone bound to the antibody, then the % cross reaction of steroid S is $(X/Y) \times 100$.

Steroid	% cross reaction
18-hydroxycorticosterone	0.6
Cortisol	0.3
Corticosterone	0.1
Cortisone	0.08
Testosterone	0.08
Deoxycorticosterone	0.03
Progesterone	0.03
18-hydroxy DOC	0.003
DHEA	<0.001
Estradiol	<0.001
Spironolactone	<0.001

Fig. 8. Rf value of corticosteroids in Bush

B₅ paperchromatography

Bush B₅ Paper Chromatography

	Rf
Origin	
● 18OH CORTICOSTERONE	0.10
● CORTISOL(F)	0.20
● ALDOSTERONE	0.35
● CORTISONE(E)	0.41
● CORTICOSTERONE(B)	0.77
● DOC, SPIRONOLACTONE	1.00

sol 100ng, を添加した溶解液の測定値は感度以下であつた。またプール血清 (アルドステロン濃度 95 pg/ml) に Cortisone 20ng, Cortisol 100ng, を添加した場合の測定値は 90pg/ml であり, なんら影響がみられなかつた。

5) Accuracy

プール血清に既知量のアルドステロン 50pg, 100 pg, 200pg, 250pg, 500pg を添加して測定した場合の回収率は各々 100%, 96.9%, 93.5%, 96.0%, 97.6%であり Accuracy は $Y (\text{pg of Aldosterone measured}) = 0.965X (\text{Aldosterone expected}) - 2.75$

Fig. 9. Schema of paperchromatography

Fig. 10. Schema of actigram obtained by Bush B₅ paperchromatography

Linear Range 3K

Time Constant 3 seconds

Fig. 11. Study of accuracy

と良好な結果を示した。(Fig. 11)

6) Reproducibility, Variability

本測定法による再現性及び同一測定内の Variability は Table 2, 3 に示す如く, 良好な結果を示し, い

Table 3. Intra-assay variability

Sample	pg/ml		
No. 8	17.5	17.5	21.4
No. 9	100	127	120
No. 10	100	109	
No. 11	104	123	
No. 12	90	100	

Table 2. Reproducibility of assay

Sample	First assay (pg/ml)	Second assay (pg/ml)
No. 1	102	107
No. 2	550	570
No. 3	325	362
No. 4	285	296
No. 5	563	638
No. 6	21	18
No. 7	68	50

Fig. 12. Plasma aldosterone level in change of posture

Fig. 13. Plasma renin activity and aldosterone in normals and patients with primary aldosteronism

ずれも変動係数10%前後であつた。

7) 測定値

臥位より立位に体位を変換させ、1時間毎に測定した血漿アルドステロンの変化をみると、Fig. 12に示す例の如く、3、4時間で上昇の傾向を示した。我々は一般検査としては安静臥位1時間後及び立位負荷4時間の2点で測定している。

常食(食塩摂取量7~10g/日)下の健常人の正常値は臥位 23~85pg/ml ($51.1 \pm 18\text{pg/ml}$, mean $\pm$ S.D., 10例) 立位 80~120pg/ml ($102 \pm 13\text{pg/ml}$, 10例)であつた。一方原発性アルドステロン症患者13例では臥位 140~1570pg/ml, 立位 240~1170pg/ml の高値を示した。健常人及、原発性アルドステロン症患者の血漿レニン活性及びアルドステロン値の関係を Fig. 13 に示した。

原発性アルドステロン症で手術的に腺腫の確認された患者1例の副腎静脈血アルドステロン値は患側で 6750pg/ml, 対側 818pg/ml 末梢血では臥位 427pg/ml, 立位 695pg/ml であつた。Bartter 症候群の疑われた1例では臥位 270pg/ml, 立位 270pg/ml を示した。この症例にアンギオテンシンIIを点滴静注したときのアルドステロン値は前値 161pg/ml から 378pg/ml に上昇したが、ノルアドレナリンの静注では 166pg/ml と不変であつた。さらに本症例で3日前の無塩食と 80mg のフロセマイド投与したときのアルドステロン値は臥位 390pg/ml, 立位 831pg/ml と上昇した。1例の浮腫を併う心不全患者では 987pg/ml の高値を示した。

IV 考 按

NIH より入手した抗アルドステロン抗体(# 088)を用いた血漿アルドステロンの測定法の検討を行つた。アルドステロンの RIA 法は現在までのところ Mayes ら³⁾, Bayard ら⁴⁾, 福地ら⁵⁾, 伊東ら⁶⁾により報告されており、これらは Aldosterone 3-oxime 又は Aldosterone 18, 21-disuccinate に対する抗体を用いたものであり、我々の用いた NIN の抗体も Aldosterone 18, 21-disuccinate に対する抗体である。さらに最近 Aldosterone γ -lactone に対する抗体も報告されている。

本抗体は Cortisol, Cortisone と各々0.3, 0.08%の程度の交叉性を示すため、血漿よりアルドステロンを抽出後、RIA を行う必要がある。抽出には Silica gel column を用いるもの³⁾, 汚紙クロマトグラフィーを用いるもの⁴⁾等が報告されている。また後者にはアルドステロンの部位確認のため、³H-Aldosterone をトレーサーとして用いアクチグラムによるアルドステロンの同定を行うもの³⁾や、サンプルと平行して展開した標準アルドステロンの紫外吸収部位よりサンプルのアルドステロンの位置を推定する方法がある⁴⁾。我々は Bush B₆ 系を用い12時間展開分離し、メタノールによる抽出を行っているが、同一タンク内の各条におけるアルドステロン部位は必ずしも一定しない場合があるので、このためイサチン相当部位を 10cm 切り出し、さらにアクチグラムで同定する方法をとつている。この方法により各サンプルの回収率のバラツキを 10%以内におさえることができた。

RIA については加える放射能の寡多により標準曲線の位置は上下に変化する (Fig. 4)。従つて Mayes ら³⁾が行つてるようにサンプルに抽出以前に大量の ³H-Aldosterone を加えておき、この ³H-Aldosterone を RIA に利用する場合、サンプルのアルドステロンの抽出の回収率のバラツキにより RIA における総放射能の量が変化することになり、何んらかの補正が必要となる。我々の用いた方法では RIA 実施の際、サンプル、標準曲線共に 10,000DPM の ³H-Aldosterone を用い、さらに標準曲線の試験管には各サンプル残留している ³H-Aldosterone の平均量を加えることにより上記の補正の必要をなくしている。この場合 RIA に用いる総放射能の量がやや大量になる為、感度が若干低下するようである。

RIA の incubation の条件として Mayes ら³⁾は 4℃ 5時間、Bayard ら⁴⁾は 37℃ 20分、福地ら⁵⁾は 4℃ 16時間で行つており、伊東ら⁶⁾は 40℃ 5分後 6℃ 1時間の方法を報告している。メタノールに溶出されたアルドステロンを試験管で蒸発乾固を行つた後、抗体を含む緩衝液を加えた場合、37℃に加温することによりガラス壁に附着したアルドステロンの溶出が容易になると思われる¹¹⁾。しかし 37℃で 20分以上 incubate する

場合 RIA そのものの感受はかえつて低下するような結果を得たので我々は37°C 5分間で行なっている。

B-F分離に関しては飽和硫酸アンモニウムを用いるもの³⁾, Florisil を用いるもの⁴⁾, などのほか Sephadex G25 のカラムを用いる方法も報告されている¹²⁾。我々は Florisil, DCC 法の2者を検討した結果、いずれも満足すべき結果を得たが、DCC 法は Florisil 法に比しやや感度が低下するが、操作は非常に簡単である。

福地ら⁵⁾も述べているように微量のアルドステロンの測定には用いる器具の洗滌は極めて重要であり、不十分な洗滌ではブランク値が高くなる傾向がある。我々は使用するガラス器具はすべて重クロム硫酸により洗滌した後、メタノールによる洗滌を行つた。またクロマトグラフィーに用いる濾紙はあらかじめメタノールによる洗滌を行い用いた。このようにして Water Blank は感度以下であり、さらにコーチゾン補償療法を受けている副腎摘除及びアジソン病患者の測定値は感度以下であつた。さらに Cortisol, Cortisone を純水、プール血清に添加した場合も何んら影響がみられず、これらより本測定法ではアルドステロン以外の物質の影響はほとんどないことがわかる。

本測定法による最小測定感度は絶対量としては 10pg であり、1 ml の血漿サンプルより測定する場合には抽出操作のため約 30pg/ml であつた。

測定内又は測定間の変動、アルドステロン添加サンプルより求めた測定の正確度については満足すべき結果であつた。以上の結果から我々の用いている方法はアルドステロン測定法としての諸条件を満足していると考えられる。

普通食摂取を行つている健常者において本法を用いて測定した血漿アルドステロン値は臥位 $5.1 \pm 0.19 \text{ ng/dl}$ 、立位 $10.2 \pm 1.3 \text{ ng/dl}$ であり、これらの値は同じく RIA で測定された諸家の成績、すなわち Bayard ら 1.35 ± 1.05 、 $12.2 \pm 7.4 \text{ ng/dl}$ (各々臥位、立位)⁴⁾、Mayes ら 7.4 ± 4.2 , $13.3 \pm 8.9 \text{ ng/dl}$ ¹³⁾、福地ら $2.6 \sim 13.0 \text{ ng/dl}$ ⁵⁾ とほぼ同様であつた。

血漿アルドステロン濃度は体位、食塩摂取量で著しく変動する。また健常者においても減塩、フロセマイド負荷により $30 \sim 40 \text{ ng/dl}$ までの上昇がみられる。その他 Katz らにより女性における月経周期の黄体期では卵胞期より高値であることが報告されている¹¹⁾。またアルドステロンの血中濃度は必ずしも副腎よりの分泌率をそのまま反映するものでなく、主として肝によると考えられる metabolic clearance rate によつても変動するといわれている¹³⁾。しかし二つの異なる病的状態の比較の場合、以上に述べた本位、食塩摂取量、月経周期など一定の条件の下で血漿アルドステロン濃度の測定が行われるならば、血中濃度の測定により、副腎よりの分泌率を間接的に反映した量を測定しうるものと考えられる。

臨床応用の一つは原発性アルドステロン症の診断であるが、普通食摂取の条件下で採血された原発性アルドステロン症13例では $16 \sim 130 \text{ ng/dl}$ (安静臥位) であり、明らかに健常者との間に差異がみられた。次に左右の副腎静脈血中のアルドステロン濃度を測定することにより原発性アルドステロン症の部位決定あるいは両側過形成の診断に資すると考えられる¹⁴⁾。我々も1例手術前に左右副腎静脈血で測定、その濃度の左右差は手術所見と一致した。また Bartter 症候群における低カリウム血性アルカローシス、四肢マヒは高レニン血症による高アルドステロン症の結果と説明されているが、我々の経験した一例でも血漿アルドステロン $16 \sim 27 \text{ ng/dl}$ (臥位) の高値がみられた。

以上 RIA による血漿アルドステロン測定は分泌量測定の際のようにアイソトープを人体に投与することなく、少量の血漿サンプルからの測定が可能であり、これにより血中レベルの経時的測定も容易となつた。今後、本法を用いることにより、レニン-アンギオテンシン-アルドステロン系などの生理、病態生理に関する多くの有用な情報が得られることが期待される。

本論文の要旨は第19回臨床病理学会総会 (1972, 久留米) において発表した。レニン活性測定キットの提供をいただいたダイナボット社及び抗アルドステロン抗体の提供をいただいた NIH に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Lieberman, S., B.F. Erlanger, S.M. Beiser, and F. Agate : *Rec. Prog. Hormone Res.*, **15** : 165, (1959).
- 2) Abraham, G.T. : *J. Clin. Endocr.*, **29** : 866, (1969).
- 3) Mayes, D., S. Furuyama, D.C. Kem, and C.A. Nugent : *J. Clin. Endocr.*, **30** : 682, (1970).
- 4) Bayard, F., I.Z. Beitins, A. Kowarski, and C.J. Migeon : *J. Clin. Endocr.*, **31** : 1, (1970).
- 5) 福地総逸, 勝島一郎, 竹内孝彦 : ホルモンと臨床, **19** : 945, (1971).
- 6) Ito, T., J. Woo, R. Haning, and R. Horton : *J. Clin. Endocr.*, **34** : 106, (1972).
- 7) Bayard, F., I.Z. Beitins, A. Kowarski, and C.J. Migeon : *J. Clin. Endocr.*, **21** : 507, (1970).
- 8) Farmer, R.W., W.G. Roup, E.D. Pellizari, and L.F. Fabre Jr., *J. Clin. Endocr.*, **34** : 18, (1972).
- 9) Bayard, F., A. Kowarski, V.V. Weldon, and C.J. Migeon : *J. Lab. Clin. Med.*, **75** : 347, (1970).
- 10) 荻原俊男, 山本智英, 土井 啓, 熊原雄一 : 第10回 Radioimmunoassay 研究会発表 (昭和47年, 京都)
- 11) 荻原俊男, 山本智英, 未発表データ
- 12) 伊東貞三 : 最新医学, **27**~826, (1972).
- 13) Gray, C.H., and A.L. Bacharach : *Hormones in Blood*, Vol. II, 2nd ed. (1967), 414, Academic Press, London and New York.
- 14) Melby, J.C., Spark, R. F., Dale, S.L., Egdahl, and P.C. Kahn : *New Eng. J. Med.*, **277** : 1050, (1967).