ヒト副腎遊離細胞におけるステロイド産生に及ぼす カルシウムの影響

名古屋大学医学部第2外科 (主任: 近藤達平 教授)

加 古 健

Effect of Calcium on Steroidogenesis in Isolated Human Adrenal Cells

Takeshi KAKO

Second Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine, Nagaya, Japan
(Director: Professor Tatsuhei Kondo)

Isolated adrenal cells were obtained surgically from patients with primary aldosteronism, breast cancer, or Cushing's syndrome. They were prepared by the modification of Sayers method, and incubated at 37°C for 2 hours under 95% O₂-5% CO₂, in the medium of calcium-free Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 0.2% glucose and 0.5% bovine serum albumin, to which various doses of calcium, ACTH, dibutyryl cyclic AMP or cycloheximide were added. Steroid production was measured by the method of Silber et al.

In isolated normal adrenocortical cells, 11-OHCS was produced by calcium alone in the absence of ACTH or dibutyryl cyclic AMP, while it was not produced by ACTH alone without calcium. 11-OHCS production by ACTH was decreased in the high concentration of calcium (10.16 mM, 12.70 mM). Cycloheximide partially blocked an increase in 11-OHCS synthesis induced by calcium. These data suggest that adenyl cyclase of human adrenocortical cells may be stimulated by calcium alone, supporting the notion that calcium is a second messenger.

The ratio of 11-OHCS production by calcium alone to that by dibutyryl cyclic AMP was higher in adenoma cells than in normal cells. This may account for the character of autonomic steroid production in adrenocortical adenoma cells.

I. 緒 言

副腎皮質におけるステロイド産生に Ca⁺⁺ が関与していることは、1953年に初めて Birmingham 等¹⁾により報告され、その後 Peron²⁾, Koritz^{3,4)} 等により更に詳しく Ca⁺⁺ の作用機序が研究された。一方1958年 Sutherland 等⁵⁾が cyclic AMP を発見後、1959年に Haynes 等^{6,7)}は、cyclic AMP が ACTH の副腎に対する作用の仲だちをしていることを結論づけ、1963年から1965年にかけて Ferguson⁸⁾, Farese⁹⁾, Garren¹⁰⁾ 等により副腎におけるステロイド産生に 蛋白合成が関与しており、蛋白合成阻害が ACTH あるいは cyclic AMP の効果を抑制することが報告された。ここに至り1965年には Sutherland により、first messenger で

あるホルモンが細胞膜に作用して cyclic AMP の産生を促進し、この cyclic AMP が種々ホルモンの作用を発現するという cyclic AMP-second messenger 説が提唱された¹¹⁾。しかし副腎皮質における cyclic AMP のステロイド産生機序に関する定説は未だない。一方 Ca^{++} のステロイド産生に対する役割も多くの研究がなされ、1970年 Rasmussen¹²⁾は cyclic AMP が関与するホルモン作用のほとんどに Ca^{++} が必要とされることを、又 Lefkowitz¹³⁾は ACTH による adenylyl cyclase の活性化に Ca^{++} が関与していることを報告した。又 Farese¹⁴⁾は Ca^{++} のみではステロイド産生がないことから、cyclic AMP を介する調節蛋白がステロイド産生に重要であるとしている。そこでヒト副腎で Ca^{++} がステロイド産生にどのように関与しているかを検討する目的で、ヒト正常副腎、クッシング症候群を示した過形成副腎および腺腫組織の遊離細胞を作り、 Ca^{++} 、ACTH、dibutyl cyclic AMP (以下 db-cAMP) 及び cycloheximide を単独あるいは併用して共に incubate し、その時のステロイド産生量を測定し比較検討した。

II. 実験の材料及び方法

材料. 正常副腎は末期乳癌患者で卵巣副腎切除術の適応となつた3例の副腎、及び原発性アルドステロン症の手術により得られた1例の副腎の正常部分を使用した。使用した副腎の残存部で光顕的に異常を認めなかつた。腺腫はクッシング症候群を示した30才の女性から得られ、重量は13gmありその一部を実験に使用した。この患者は分娩後体重の増加を来し、約1年後には無月経となり、易疲労感、高血圧、バッファローハンプ、中心性肥満、満月様顔貌等が著明となつた。内分泌機能検査では、尿中 17-OHCS 23.4-30.2 mg/day (正常値 3.0-10.0mg/day)、17-KS 4.2-5.9 mg/day (正常値 ♀ 3.4-9.0mg/day) であり、metopirone 試験、dexamethasone 抑制試験では反応がなかつた。しかし ACTH 試験では 17-OHCS 58.4-95.6mg/day、17-KS 7.9-9.9mg/day と反応を見た。選択的副腎静脈撮影で左副腎腺腫が確認され手術が施行された。過形成副腎はクッシング症候群を示した25才の女性から得られた。この患者は17才で二次性徴なく、22才頃より肥満、にきびが著明となり、その後満月様顔貌、バッファローハンプ、皮膚伸展線が著明となつた。内分泌機能検査では、尿中 17-OHCS 13.6-16.2mg/day、17-KS 8.8-9.5mg/day、ACTH 試験で 17-OHCS 32.0-35.4mg/day、17-KS 8.5-14.4mg/day、metopirone 試験で 17-OHCS 39.8-56.8 mg/day、17-KS 14.4-23.6 mg/day と反応があり、dexamethasone 2mg では抑制されず8mgで抑制された。ACTH は CIBA より提供を受けた合成 β^{1-39} corticotropin、db-cAMP は Boehringer 社製、cycloheximide は SIGMA 社製の市販品を使用した。ガラス器具は全てシリコナイズして使用した。

遊離細胞の作製. 遊離細胞の作製の大部分は Sayers 等¹⁵⁾の方法に準じた。手術で得られた組織の一部を粟粒大の細片にし、0.25% trypsin (Worthington Biochemical Corporation)、0.3% bovine serum albumin、0.2% glucose を含む Krebs-Ringer bicarbonate buffer 20 ml を入れた 100ml 広口ビンに入れ、 O_2 95%、 CO_2 5% の混合ガス下で37℃ 20分間 glass paddle で 500rpm にてかくはんしながら incubate した。遊離細胞を含む液はピペットで他のフラスコに移し、4℃に保存し incubation は6回、約2時間くり返した。4℃に保存された約120mlの遊離細胞を含む液を、4℃で45分間 100×g で遠沈し、上清は捨て、得られた沈渣を Ca^{++} を含まない Krebs-Ringer buffer 約60ml に再浮遊させ、これを約20分間室温で preincubate 後、再度4℃で30分間 100×g で遠沈した。得られた沈渣を 0.1% Lima bean trypsin inhibitor (Worthington Chemical Corporation)、0.5% BSA、0.2% glucose を含む各種 Ca^{++} 濃度の Krebs-Ringer buffer で遊離細胞浮遊液にした。

ステロイド産生の為の incubation. 作成された各種 Ca^{++} 濃度の遊離細胞浮遊液を各 0.9 ml ずつ、10 ml テフロンビーカーに入れ、約10分間の preincubation 後、ACTH あるいは他の試薬を 0.1 ml ずつ加え、 O_2 95%、 CO_2 5% の混合ガス下37℃にて2時間 shaker (60 oscillations/min) 上で incubate した。

産生されたステロイドの測定. 11-OHCS は Silber 等¹⁶⁾の方法に準じて測定した。各テフロンビーカーに methylene chloride を 6.0 ml 加え30秒間激しく振盪後、2500 rpm で5分間遠沈した。上層は吸引除去し、下層の methylene chloride を 4.0 ml 他の試験管に移し、これに 4.0 ml の H_2SO_4 ・EtOH (65:35 v/v)

を加え30秒間激しく振盪後、室温で1時間静置した。その後上層の methylene chloride を吸引除去し、硫酸層の蛍光強度を日立 204 Fluorescence Spectrophotometer で測定した。

III. 結 果

1. 正常副腎組織の遊離細胞における 11-OHCS の産生を観察した結果、Fig. 1 に示すように Ca^{++} 濃度 7.62mM で ACTH による産生は dose-response を示した。これと同種の細胞で Fig. 2 に示すように、各種 Ca^{++} 濃度における、 Ca^{++} のみによる、及び ACTH 800 pg/ml 負荷時の 11-OHCS の産生を観察した。 Ca^{++} のみによる 11-OHCS の産生があり、 Ca^{++} 2.54 mM と Ca^{++} 無添加の場合に産生量の間に有意な差があつた ($P < 0.05$)。又各 Ca^{++} 濃度で dose-response を示し、 $\lambda = 0.309$ であつた。次に ACTH を負荷したときは、 Ca^{++} がなければ 11-OHCS の産生はなく、 Ca^{++} 2.54 mM で急激に産生を増した。

2. 別の正常副腎組織の遊離細胞により、11-OHCS の産生に及ぼす db-cAMP の影響をも加えて観察した。Fig. 3 に示すように、この遊離細胞も又 Ca^{++} 濃度 7.62 mM で ACTH に dose-response を示した。これと同種の細胞で Fig. 4 に示すように、 Ca^{++} のみによる産生及び ACTH の影響は結果 1. と同様であつた。db-cAMP 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を負荷したときは Ca^{++} 無添加でも 11-OHCS の産生があつた。又 Ca^{++} が加えられると産生量は著明に増加した。

3. 次に同じく、更に別の正常副腎組織の遊離細胞を使用し、 Ca^{++} 濃度が更に増したときの 11-OHCS の産生を 2 例につき観察した。Fig. 5, 6 に示す通りである。結果 1, 2. に加えて更に次の 2 点が観察された。すなわち db-cAMP による 11-OHCS の産生は Ca^{++} 高濃度でも抑制を受けなかつた。ACTH による 11-OHCS の産生は Ca^{++} 高濃度では抑制される傾向を示した。

4. 過形成副腎の遊離細胞による 11-OHCS 産生に対する Ca^{++} の影響を結果 3. と同様の条件

Fig. 1. Steroidogenesis in isolated normal adrenal cells obtained from a woman with breast cancer aged 60 years in response to ACTH at the calcium concentration 7.62 mM. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

△—△ : with ACTH (800 pg/ml).
●—● : without ACTH.

Fig. 2. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in the same specimen as described in Fig. 1. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

で観察した。Fig. 7 に示すように、正常副腎の場合と大差はなかつた。しかし ACTH 負荷時、 Ca^{++} 高濃度でも 11-OHCS の産生が抑制される傾向がなく、又 ACTH による 11-OHCS 産生の頂値が、db-cAMP によるそれに比しわずかであつた。

5. 腺腫の遊離細胞における 11-OHCS の産生に対する Ca^{++} の影響をやはり結果 3. と同じ条件で観察

Fig. 3. Steroidogenesis in isolated normal adrenal cells obtained from a man with primary aldosteronism aged 26 years in response to ACTH at the calcium concentration 7.62 mM. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Fig. 4. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in the same specimen as described in Fig. 3. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Fig. 5. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in isolated normal adrenal cells obtained from a woman with breast cancer aged 47 years. The marks are the same as described in Fig. 4. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Fig. 6. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in isolated normal adrenal cells obtained from a woman with breast cancer aged 66 years. The marks are the same as described in Fig. 4. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Fig. 7. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in isolated hyperfunctioning adrenal cells obtained from a woman with Cushing's syndrome due to hyperplasia aged 25 years. The marks are the same as described in Fig. 4. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Fig. 8. Effect of calcium concentrations on 11-OHCS production in isolated hyperfunctioning adrenal cells obtained from a woman with Cushing's syndrome due to adrenocortical adenoma aged 30 years. The marks are the same as described in Fig. 4. Vertical bar indicates mean $\pm$ SD.

Table 1. Steroidogenic response to calcium, ACTH, and db-cAMP in presence or absence of cycloheximide in normal and hyperfunctioning adrenal cells. Additions were ACTH, 800 pg; db-cAMP, 250 μ g; cycloheximide, 1 μ mole.

Experiment	Addition	11-OHCS μ g/ml	
		cycloheximide (-)	cycloheximide (+)
normal	Ca ⁺⁺ 0 mM	0.212 $\pm$ 0.002	0.213 $\pm$ 0.004
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM	0.383 $\pm$ 0.010	0.285 $\pm$ 0.000
hyperplasia	Ca ⁺⁺ 0 mM	0.165 $\pm$ 0.013	0.177 $\pm$ 0.001
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM	0.254 $\pm$ 0.000	0.203 $\pm$ 0.010
	Ca ⁺⁺ 0 mM+db-cAMP	0.274 $\pm$ 0.014	0.174 $\pm$ 0.006
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM+db-cAMP	0.670 $\pm$ 0.014	0.212 $\pm$ 0.003
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM+ACTH	0.381 $\pm$ 0.027	0.230 $\pm$ 0.008
adenoma	Ca ⁺⁺ 0 mM	0.90 $\pm$ 0.02	
	Ca ⁺⁺ 2.54 mM	1.83 $\pm$ 0.12	0.91 $\pm$ 0.03
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM	1.40 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.00
	Ca ⁺⁺ 12.70 mM	1.50 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.01
	Ca ⁺⁺ 0 mM+db-cAMP	1.18 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.02
	Ca ⁺⁺ 7.62 mM+ACTH	2.49 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.04

Mean $\pm$ SD.

し、Fig. 8 に示した、 Ca^{++} のみによる 11-OHCS 産生は Ca^{++} 2.54 mM で頂値を示し、それより高濃度では、産生は明らかに減少し、正常と異ったパターンを示した。又 ACTH あるいは db-cAMP による 11-OHCS の産生も、やはり Ca^{++} 2.54 mM で頂値を示し、高濃度では抑制を受けた。

6, 各種組織の遊離細胞による 11-OHCS の産生が cycloheximide $1 \mu\text{M}$ でどのような影響をうけるかを観察し Table 1 に示した。正常副腎の場合、 Ca^{++} のみによる 11-OHCS の産生は、部分的にのみ抑制を受けた。過形成副腎では、 Ca^{++} のみによる 11-OHCS 産生は、正常副腎と同様、完全な抑制は受けなかった。又 ACTH あるいは db-cAMP を負荷したときの 11-OHCS 産生の抑制され方も Ca^{++} のみの場合とほぼ同じであつた。腺腫では、 Ca^{++} 無添加の control と全く同値を示し、11-OHCS の産生はほぼ完全に抑制された。

IV. 考 察

Farese は1971年にラット副腎切片を使い、 Ca^{++} のみではステロイド産生がないことを報告し、ステロイドは ACTH あるいは cyclic AMP の存在下においてのみ産生されるとのべている¹⁴⁾。しかし Fig. 2, 4, 5, 6 に示すように、ヒト副腎遊離細胞では Ca^{++} のみにより 11-OHCS が産生されている。又 Table 1 に示したように、11-OHCS の産生は cycloheximide で部分的にしか抑制されなかつた。このことは、 Ca^{++} のみによる 11-OHCS 産生が蛋白を介することが必要な部分（恐らくは adenylyl cyclase の活性化を介する）と、それ以後の 21, 11¹⁷⁾, 18¹⁸⁾ 位水酸化反応の促進による部分との和であろうと考えられる。又 ACTH がレセプターと結合すると Ca^{++} が細胞内に取り込まれること¹⁹⁾, adenylyl cyclase の活性化は Ca^{++} の存在下においてのみ行なわれること¹³⁾は、すでに報告されている。又 Fig. 2, 4, 5, 6 に示したように、ACTH のみでは 11-OHCS の産生はない。以上を考え合わせると、ヒト副腎で Ca^{++} のみによる 11-OHCS 産生があることは、adenylyl cyclase の活性化は ACTH の直接的作用によるものではなく、ACTH はレセプターと結合して Ca^{++} の細胞内取り込みをますことが本来の作用ではないかということを推察させる。

それでは ACTH のない状態で、 Ca^{++} が細胞内に入り込むのはどのような機序によると考え得るか。尾形²⁰⁾によれば、 Ca^{++} は細胞膜内外に $1:10^4$ の濃度勾配があり、これは受動的な Ca^{++} の細胞内流入に対して細胞膜自体に抵抗があること、更に細胞膜に Ca^{++} を細胞内から細胞外へと能動的に汲み出すポンプがあることにより可能となつている。ヒト副腎遊離細胞の場合、 Ca^{++} が以上の機序に抗して、恐らく受動的に濃度勾配により細胞内に少量ながら入り込むと考えられる。又 trypsin を使用した為に、細胞膜の Ca^{++} 透過性に変化を来している可能性もある。

いづれにしても、 Ca^{++} の細胞内への入り方はともかく、 Ca^{++} のみでステロイドが産生された点に重要性がある。Rasmussen によれば、cyclic AMP が second messenger として働いていることが明らかなホルモン作用の殆んどは、 Ca^{++} 依存性であつた¹²⁾。そこで Ca^{++} と cyclic AMP は相互作用で second messenger としての機能を営んでいるとする考え方もあるが、 Ca^{++} のみでステロイド産生があり、しかもその産生に蛋白合成を介さない部分もあることから考えると、むしろ Ca^{++} が adenylyl cyclase を活性化し、更に細胞内のステロイド産生機構の各ステップを促進させた為と考えたい。又藤井、奥田¹⁷⁾により、Fat cell ghost の adenylyl cyclase は Ca^{++} のみで活性化されるという事実も報告されている。

では cyclic AMP のみ (Ca^{++} 無添加) によるステロイド産生 (Fig. 5, 6) は、どのような機序によると考えられるか。これは cyclic AMP がミトコンドリアの膜透過性に変化を来し²¹⁾、内部に存在する pregnenolone を外に出し、以後の代謝が、細胞内で cyclic AMP により有効に遊離、移動を来した $\text{Ca}^{++22)$ により促進される為か、あるいは cyclic AMP が糖代謝を賦活し増加した NADPH が細胞内 Ca^{++} の存在下にステロイド産生を来した¹⁷⁾為と考えられないだろうか。Leier¹⁹⁾によれば、db-cAMP には Ca^{++} を細胞内に取り込む作用はないので、db-cAMP によるステロイド産生が Ca^{++} 存在下で増加するのは、 Ca^{++} のみによるステロイド産生と同じ機序で細胞内に入った Ca^{++} が db-cAMP と共に効果を発現すると考えられる。

ヒト正常副腎遊離細胞で ACTH による 11-OHCS 産生が高濃度 Ca^{++} では抑制される傾向 (Fig. 5, 6) にあるのは、高濃度 cyclic AMP の pregnenolone $\rightarrow$ progesterone 転換抑制作用²³⁾、あるいは高濃度 Ca^{++} が ACTH とレセプターの結合を阻害する作用²⁴⁾の為かと想像される。

過形成副腎遊離細胞の場合、正常の場合の 11-OHCS 産生パターンと異なる点は、1) ACTH による 11-OHCS 産生が Ca^{++} 高濃度でも抑制される傾向がない、2) ACTH による 11-OHCS の産生が db-cAMP による産生を大きく下まわることである。最近ホルモンレセプターの量の調節機構として、ホルモン自身がそのホルモンのレセプターの量を調節する²⁵⁾ことが明らかにされて来ている。血中 ACTH レベルが高い時期があつたと思われる過形成によるクッシング症候群において、その細胞の ACTH のレセプターが量的に減少している可能性はあるであろう。このことが過形成性副腎細胞に対する ACTH 作用を減じているのかもしれない。しかし臨床過形成副腎が ACTH に良く反応することとは、表面的には相反する現象である。過形成性副腎 1 例の傾向で結論は出し得ないが、過形成と正常副腎の代謝上の差の解明の端緒となる可能性もあると考え、今後の検討を要すると考えている。

腺腫の場合は正常副腎の 11-OHCS 産生パターンと非常に異つている。 Ca^{++} のみによる産生が、正常より低濃度の Ca^{++} で頂値を取り、しかも db-cAMP による産生量との比でみると (Fig. 9)、正常、過形成の場合よりはるかに多い。これは、腺腫では Ca^{++} の細胞膜透過性が他よりたかまつている為と考えられる。更に又、このことが腺腫の自立性ステロイド産生と関連があるのではないかと推察される。しかし Schorr and Ney 等²⁶⁾はラット副腎癌で、癌化した細胞のレセプターに特異性がなくなっていることから、これが腫瘍の自立性の原因であると推論している。又井村、松倉等²⁷⁾はヒト副腎皮質腺腫の切片を使い、cyclic AMP 濃度の増加を伴わないステロイド産生があること、およびホルモンへの膜レセプターの多様性のないことを報告している。今回使用された腺腫では cycloheximide によりステロイド産生は殆んど抑制され (Table 1)、これは cyclic AMP を介するステロイド産生であつたことを示唆する。ACTH, db-cAMP による腺腫細胞の 11-OHCS 産生は、 Ca^{++} 2.54 mM より高濃度では抑制を受けているが、これはやはり、adenyl cyclase の活性化を介して増量した高濃度の cyclic AMP が pregnenolone $\rightarrow$ progesterone 転換を抑制した為であろうか。

トリプシンによるレセプター²⁸⁾あるいは細胞膜の変化が各種副腎組織に差がある為、 Ca^{++} の膜透過性を変化させた可能性もある。しかし、正常、過形成副腎、腺腫いずれにおいても、 Ca^{++} のみでステロイド産生があり、しかも恐らくは、直接 Ca^{++} による adenylyl cyclase の活性化も介した産生であること等から考えると、これらの結果は Ca^{++} が second messenger であろうとする説¹⁶⁾を支持するものである。

V. 結 語

ヒト正常副腎、クッシング症候群を示した過形成副腎、および腺腫の遊離細胞を作成し Ca^{++} 濃度を中心に、そのステロイド産生を観察し、以下の想定をした。

1. ヒト副腎皮質の遊離細胞では Ca^{++} のみによりステロイドが産生された。更にこれは、恐らく adenylyl cyclase の活性化を介するものと思われる。したがって cyclic AMP よりむしろ Ca^{++} を ACTH の second

Fig. 9. Ratio of 11-OHCS production by calcium alone to that by db-cAMP in normal and hyperfunctioning adrenal cells.

messenger であろうとする説を支持するものである。

2. 腺腫の自立性ステロイド産生は、その細胞膜の Ca^{++} 透過性が正常副腎と異っていることと関連があると思われる。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜った恩師近藤達平教授に深謝するとともに、御指導、御鞭撻をいただいた余語弘講師、山岡透助手、渡辺晃祥医学士をはじめとする教室の内分泌研究室の諸兄に感謝いたします。

本論文の要旨は第21回日本内分泌学会西部部会総会および第47回日本内分泌学会総会にて報告した。

文 献

- 1) Birmingham, M.K., F.H. Elliot, and P.H.L. Valere : *Endocrinology*, 53 : 687, (1953). 2)
- Peron, F.G. and S.B. Koritz : *J. Biol. Chem.*, 233 : 256, (1958). 3) Koritz, S.B. and F.G. Peron : *J. Biol. Chem.*, 234 : 3122, (1959). 4) Peron, F.G. and S.B. Koritz : *J. Biol. Chem.*, 235 : 1625, (1960). 5) Sutherland, E.W. and T.W. Rall : *J. Biol. Chem.*, 232 : 1077, (1958).
- 6) Haynes, R.C. Jr. : *J. Biol. Chem.*, 233 : 1220, (1958). 7) Haynes, R.C. Jr., E.W. Sutherland and T.W. Rall : *Recent Progr. Hormone Research*, 16 : 121, (1960). 8) Ferguson, J.J. Jr. : *J. Biol. Chem.*, 238 : 2754, (1963). 9) Farese, R.V. : *Biochim. Biophys. Acta*, 87 : 699, (1964).
- 10) Garren, L.D., R.L. Ney and W.W. Davis : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 53 : 1443, (1965). 11) Sutherland, E.W., I. Fyfe and R.W. Butcher : *Recent Progr. Hormone Research*, 21 : 623, (1965).
- 12) Rasmussen, H. : *Science*, 170 : 404, (1970). 13) Lefkowitz, R.J., J. Roth and I. Pastan : *Nature*, 228 : 864, (1970). 14) Farese, R.V. : *Endocrinology*, 89 : 1057, (1971). 15) Sayers, G., R.L. Swallow and N.D. Giordano : *Endocrinology*, 88 : 1063, (1971). 16) Silber, R.H., R.D. Busch and R. Oslapas : *Clinical Chemistry*, 4 : 278, (1958).
- 17) 奥田拓道, 藤井節郎 : *綜合臨牀*, 23 : 1283, (1974). 18) Peron, F.G., F. Guerva and J.L. McCarthy : *Biochim. Biophys. Acta*, 110 : 277, (1965). 19) Leier, D.J. and R.A. Jungmann : *Program of the 52nd Meeting of the Endocrine Society U.S.A.*, p. 85, (1970). 20) 尾形悦郎 : 代謝, 臨時増刊号, No. 1 : 493, (1974).
- 21) Koritz, S.B. : *Functions of the Adrenal Cortex*, Vol. 1, p. 27, (1968). 22) Rasmussen, H. and A. Tenenhouse : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 59 : 1364, (1968).
- 23) Berger, G.M.B. : *Nature*, 232 : 474, (1971). 24) Lefkowitz, R.J., J. Roth and I. Pastan : *Nature*, 228 : 864, (1970). 25) 山本慧, 大沢仲昭 : *日内分泌会誌*, 50(2) : 338, (1974). 26) Schorr, I. and R.L. Ney : *J. Clin. Invest.*, 50 : 1295, (1971). 27) 松倉茂, 垣田照雄, 宮本義勝, 平田緒喜雄, 坂本 登, 井村裕夫 : *綜合臨牀*, 23 : 1142, (1974). 28) Kono, T. : *J. Biolog. Chems.*, 244 : 5777, (1969).