血清 Thyroglobulin の Radioimmunoassay による測定とその臨床応用

大阪大学第2内科 (指導: 西川光夫教授)

岸 野 文一郎

A Radioimmunoassay for the Measurement of Thyroglobulin in Human Serum and its Application to Clinical Study

Bunichiro KISHINO

The second Department of Internal Medicine
Osaka University Medical School
(Prof. Mitsuo Nishikawa, Director)

A sensitive and specific double antibody radioimmunoassay for the measurement of serum thyroglobulin (Tg) has been developed. The minimum detectable concentration of Tg was 5.0 ng/ml. Coefficients of within and between assay variation were 2.4% and 12.0%, respectively. The mean recovery of Tg added to normal serum was 102.9%; and T_4 , T_3 , DIT and MIT did not crossreact in this assay system. Dilution curves of normal thyroid extract, tumor extract and patient's serum were shown to be parallel with the standard Tg preparation.

The mean serum Tg level in normal males and females was 42.8 ± 5.3 ng/ml (mean $\pm$ SE) (N=29) and 117.1 ± 20.9 ng/ml (N=20), respectively. There was a significant difference between male and female groups ($p < 0.001$). The mean serum Tg level was 365.0 ± 69 ng/ml in 19 hyperthyroid patients with Graves' disease and 248.1 ± 35.8 ng/ml in 21 patients who were in a euthyroid state from the treatment with antithyroid drugs, showing statistically no significant difference. However, 8 patients in permanent remission showed definitely low Tg values, 83.6 ± 16.2 ng/ml. The mean serum Tg level was 210.1 ± 57.6 ng/ml in 6 patients with chronic thyroiditis without auto-anti Tg and 525.1 ± 207.5 ng/ml in 5 patients with thyroid adenoma.

The effect of total thyroidectomy on the serum TSH and Tg was studied in a patient (M. T.) with pulmonary metastases from thyroid follicular adenocarcinoma. The serum TSH level rose progressively to hypothyroid levels during nine days after thyroidectomy; the value was $45.7 \mu\text{U/ml}$ on the 9th day after the thyroidectomy. The serum Tg level in this case was 4 925 ng/ml before surgery. After a transient fluctuation caused by the operation, the serum Tg level in the patient increased progressively during 3~9 days after surgery with a concomitant increase in serum TSH; the levels at the 3rd, 6th and 9th day after surgery

were 5,825 ng/ml, 7,910 ng/ml and 11,190 ng/ml, respectively. The suppression of endogenous TSH secretion with treatment of T_3 60 μ g/day was followed by a gradual fall in serum Tg levels, decreasing to 630 ng/ml at the 114th day.

Bovine TSH was administered to this patient at the 114th day, so as to study the effect of exogenous TSH on serum Tg. Serum Tg reached a maximal peak at the 24 hr. after bovine TSH injection. The maximal increase of serum Tg above baseline was 221%. Despite complete removal of the thyroid gland, the increase in serum Tg after thyroidal stimulation with endogenous and exogenous TSH was observed in the patient. In addition, the increase in serum Tg after bovine TSH injection was also observed in two patients with differentiated thyroid carcinoma who underwent a total thyroidectomy and had only metastatic tissue. These results indicate that the elevated serum Tg was released from metastatic tissue by TSH.

The present study demonstrates direct evidence that metastatic tissue from thyroid carcinomas is responsive to TSH. The measurement of TSH responsive serum Tg in patients after thyroidectomy may lead to finding the presence of metastases from differentiated thyroid carcinomas. Furthermore, it seems possible to determine the effect of thyroid hormone therapy on the regrowth of metastatic tissue by the presence or absence of TSH-responsive increase of serum Tg.

I. 緒 言

Thyroglobulin (Tg) は甲状腺において合成される蛋白の大部分を占め、その蛋白内のチロジン基のヨード化により甲状腺ホルモンの合成が行われる。正常者における血中 Tg の存在は1962年に Tg 様物質として指摘されているが、⁽⁷⁾ Tg としての同定と定量は近年の Radioimmunoassay (RIA) の開発により可能となった⁽¹³⁾⁽¹⁹⁾。しかし、正常者及び各甲状腺疾患患者の血中 Tg の存在については、不明な点が多い。また TSH を含む甲状腺刺激物質に対する甲状腺の反応として、receptor-adenyl cyclase 系及び甲状腺ホルモンの合成・分泌の面からの分析は数多くなされている。しかし甲状腺ホルモンの合成の場を提供している Tg についての検索は数少ない⁽¹⁸⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾。そのため、著者は二抗体法による血清 Tg の Radioimmunoassay (RIA) を開発し、正常者及び甲状腺疾患患者の血清 Tg の測定を試み、更に刺激物質に対する甲状腺の反応を血清 Tg の動態を指標として、Tg の面から検索を加え、その臨床応用についても検討した。

II. 材 料 と 方 法

1) 臨床対象

正常者は内分泌疾患を認めない者を対象とし、男性29例の年齢別は10代2、20代9、30代6、40代7、50代2、60代2、70代1であり、女性20例は10代2、20代9、30代4、40代4、50代1であった。各甲状腺疾患患者は、阪大病院第2内科外来及び入院患者で、臨床的及び機能検査、組織検査により診断の確定した者を対象とした。

2) 抗原 (Tg) の精製

Tg は、バセドウ病或は甲状腺分化癌のため手術を受けた甲状腺より Van Herle 等の方法⁽¹⁹⁾により精製した。緩衝液は0.0035M リン酸、0.15M NaCl, pH 7.0 (PBS) を使用した。精製した Tg (Tg 4) は、超遠心分析 (UCA-IA, 日立) で19Sの単一の peak を得、また免疫電気泳動法⁽¹⁰⁾で Tg 自己抗体陽性の橋本病

患者血清 (anti-Tg serum) と inter α の領域に単一の沈降線を形成し、抗人全血清 (anti-WHS) とは沈降線を形成しなかった。(図1) 蛋白濃度は、Lowry 等の方法⁽¹⁰⁾で測定した。

3) 抗体 (anti-Tg) の作製

Tg の抗体は精製 Tg を用い家兎に免疫し作製した。即ち、Tg (5 mg/ml) と complete Freund's adjuvant との等量を乳濁液にし、家兎背筋に注射、その後2週間毎に3回追加免疫し抗 Tg 血清を得た。他症例のバセドウ病、正常部及び甲状腺分化癌の各々甲状腺より上記方法で精製した Tg とこの抗 Tg 血清を用い、Ouchterlony 拡散法⁽¹²⁾を施行したが、各々の沈降線は完全に融合した。抗原及び抗体、被検血清は -20°C で凍結保存した。

4) 抗原 (Tg) の標識

Greenwood 等の方法⁽⁶⁾に準じた。Sephadex G-200による column chromatography で標識 Tg と未反応の ^{131}I (または ^{125}I) を分離した。分離後、標識 Tg 分画に ovalbumin と anti-ovalbumin 血清 (Mil Ls) を加え、 4°C 、一夜放置後遠心分離し、上清を Tg RIA に使用した。specific radioactivity は約 $100\mu\text{ci}/\mu\text{g}$ であった。

Fig. 1. Immunoelectrophoretic patterns

5) Tg RIA 操作法

12.5×75mmのガラス試験管内で以下の如く行った。

①標準 Tg (0~1,000ng/ml) または被検血清200 μl

稀釈液は1% bovine albumin (Sigma) を使用した。

② ^{131}I (または ^{125}I) Tg 200 μl

標識 Tg は、0.05M EDTA, PBS, pH7.0で約15,000cpmに稀釈し用いた。

③Anti-Tg 家兎血清100 μl

Anti-Tg 血清の稀釈は、cold Tg 無添加時に約50%の ^{131}I -Tg との結合を示す80,000倍稀釈 (最終560,000稀釈) を使用した。

④PBS 200 μl

⑤First incubation

混和後、 4°C 5日間 incubation した。

⑥0.7%正常家兎血清 (Pentex) 100 μl

⑦第2抗体200 μ l

現在使用している抗家兎 γ グロブリンヤギ血清(医学生物学研究所)の稀釈は、1:8が良好な沈降が得られる。

⑧Second incubation

混和し、一夜4℃で放置後、1,000xg、4℃、30分遠心し上清を分離、沈降物の放射能を測定した。

標準曲線の測定は triplicate、被検血清は duplicate で行った。被検血清の Tg 自己抗体の存在は、この Tg 測定系に影響⁽¹⁹⁾を及ぼすためサイロイドテスト(富士臓器)を行い、Tg 自己抗体陰性の血清を使用した。

6) 血清 TSH 及び T₄ RIA

HTSH キット第一及びリアマット T₄ キット(第一ラジオアイソトープ研究所)を使用した。

Table 1. Changes in the binding activity of ¹³¹I-thyroglobulin after iodination

after iodination	% radioactivity bound*	nonspecific binding
2 days	60.4%	6.8%
7 days	34.7%	5.7%
14 days	14.9%	3.3%

*First antibody 1:4.2 x 10⁵

Fig. 2. Effect of different incubation times after addition of first antibody

III. 結 果

1) Tg RIA の検討

表1に示すように標識後の ^{125}I -Tgは、Tg抗体との結合能が急速に低下を示す。first incubation 時間の検討を行ったが、図2に示す如く Anti-Tg と ^{125}I -Tg の結合は経時的に変化する。この結果より first incubation 時間は、至適な結合を示す5日間4℃で行った。

図3は、Tg RIA の標準曲線を示している。この測定系でのTg測定感度は、抗体の最終稀釈560,000倍を使用した時5 ng/ml であった。標準曲線測定時の変動係数は平均2.4%を示した。同一血清、3種3回での inter-assay の変動係数は、表2に示す如く平均12.0%の値を得た。回収率は表3の如く、血清20.8 ng/ml の検体に Tg 40 ng/ml, 100 ng/ml の添加で平均102.9%であった。T₄、T₃、MIT のTg 測定系に及ぼす影響を検討したのが表4である。T₄、T₃の高濃度で回収率の悪い傾向があるが、高濃度のT₄、T₃溶液はアルカリ性に傾いているためと考えられる。表に示していないがDITも、この測定系に影響が認められなかった。

頸部リンパ節及び肺転移を認める甲状腺腺癌患者(M.T.)の手術時(甲状腺全摘及びリンパ節廓清術)得られた正常部甲状腺、癌部、転移リンパ節組織よりの抽出液とその血清の稀釈曲線を描いた。(図4)その各々の稀釈曲線は、Tg 標準曲線と良好な平行関係を示した。

Fig. 3. Standard curve for the radioimmunoassay of thyroglobulin

Table 2. Inter-assay variance for the radioimmunoassay of thyroglobulin

Assay	Subject 1	Subject 2	Subject 3
1	142.7	42.9	180.6
2	164.0	42.0	192.2
3	113.0	40.0	268.6
C. v.	14.7%	2.9%	18.3%

ng/ml

Table 3. Thyroglobulin recovery

Initial	Added	Final	Recovery
	Tg ng/ml	ng/ml	%
Serum 1	-	20.8	-
Serum 1	40	60.8	100
Serum 1	100	125.8	105.8

Table 4. Effect of MIT, T₃ and T₄ on radioimmunoassay of thyroglobulin

Initial Thyroglobulin	Added	Final	Recovery
ng/ml	ng/ml	ng/ml	%
50	—	51.4	102.8
50	200 MIT	54.6	109.2
50	10,000 MIT	56.0	112.0
50	200 T ₃	57.6	115.2
50	2,000 T ₃	38.0	76.0
40	200 T ₄	46.5	116.2
40	2,000 T ₄	36.7	91.8

Fig. 4. Dilution curves of several biological fluids in a single patient (M T) with a follicular thyroid carcinoma

2) 正常者及び甲状腺疾患々者の血清 Tg 値

正常者の血清 Tg は図5に示すように、男性 $42.8 \pm 5.3 \text{ ng/ml}$ (Mean $\pm$ SE)(29例)、女性 $117.1 \pm 20.9 \text{ ng/ml}$ (20例)であり、女性が男性に比べ有意 ($p < 0.001$) に高い結果を得た。甲状腺機能亢進状態を呈する未治療バセドウ病の血清 Tg は、 $365.0 \pm 69.0 \text{ ng/ml}$ (19例)であり、正常女性と比較し有意 ($p < 0.01$) に高い。抗甲状腺剤治療により甲状腺機能の正常化後、3ヶ月以上経過したバセドウ病の血清 Tg は、 $248.1 \pm 35.8 \text{ ng/ml}$ (21例)であり、未治療群と比べ低下の傾向はあるが、有意差は認められなかった。しかし、一年以上に亘り寛解中のバセドウ病8例の血清 Tg は、 $83.6 \pm 16.2 \text{ ng/ml}$ であり、未治療群と比較し有意差 ($p < 0.001$) を認めた。サイロイドテスト陰性であり、乾燥甲状腺未服用中の橋本病(6例)の平均は、 $210.1 \pm 57.6 \text{ ng/ml}$ 、甲状腺腫5例の平均血清 Tg 値は $525.1 \pm 207.5 \text{ ng/ml}$ と高値であった。Sheehan 症候群4例中2例の血清 Tg は 5 ng/ml 以下であった。

Fig. 5. Serum thyroglobulin levels

図6は、バセドウ病同一症例の治療効果による血清 Tg の変動を比較した10症例(男4例、女6例)である。血清 Tg は、未治療時 $229.7 \pm 26.8 \text{ ng/ml}$ 、甲状腺機能正常化後 $229.8 \pm 32.4 \text{ ng/ml}$ と、両者間に有意差を認めなかった。この時の血清 T₄値は、未治療時 $18.8 \pm 0.9 \mu\text{g/dl}$ 、正常化時 $8.5 \pm 0.4 \mu\text{g/dl}$ であった。

3) TSHに対する甲状腺分化癌組織の反応性

血清 Tg 値、 $4,925 \text{ ng/ml}$ を非常に高値を示す転移病巣を持った前記の甲状腺癌患者(M.T.)の、血清 Tg と TSH の変動を手術前後で経時的に測定した。図7に示す如く、術後3時間の血清 Tg は、 $7,495 \text{ ng/ml}$ と一過性に上昇を示し、Torriganani 等⁽¹⁷⁾、池窪⁽²²⁾の指摘と一致した。以後減少し、術後2日目には $4,200 \text{ ng/ml}$ となる。しかし、3日目には、血清 Tg は $5,825 \text{ ng/ml}$ と上昇をきたし、この時血清 TSH も $23.5 \mu\text{U/ml}$ (術前の血清 TSH は $3.0 \mu\text{U/ml}$)と上昇を認めた。更に、血清 TSH は、術後6日: $35.8 \mu\text{U/ml}$ 、9日

Fig. 6. Effect of the treatment of hyperthyroidism on serum thyroglobulin levels in patients with Graves' Disease

Fig. 7. Changes in serum thyroglobulin and TSH levels in athyreotic subject with pulmonary metastases from thyroid follicular adenocarcinoma

: $45.7 \mu\text{U/ml}$ と増加し、その上昇度に並行して血清 Tg も $7,910 \text{ ng/ml}$, $11,190 \text{ ng/ml}$ と著明な上昇が招来された。この患者 (M.T.) は甲状腺全摘及び転移リンパ節の完全な廓清を受け、甲状腺癌は肺転移病巣のみに存在する状態である。従ってこの血清 TSH 上昇に伴い増加した血清 Tg の起源は、甲状腺癌肺転移病巣が考えられ、しかもこの転移病巣は、TSH 反応性を持っていると云える。術後12日目より $\text{T}_3 60 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与による補償療法を開始した。 T_3 投与により内因性 TSH が抑制されると共に、血清 Tg も漸減した。即ち、

術後29日目は TSH $2.9\mu\text{U}/\text{ml}$, Tg $2,875\text{ng}/\text{ml}$, 71日目 TSH $3.0\mu\text{U}/\text{ml}$, Tg $1,680\text{ng}/\text{ml}$, 126日目 TSH $1.6\mu\text{U}/\text{ml}$, Tg $630\text{ng}/\text{ml}$ である。術後126日目 (T_3 投与後114日目)に bovine TSH 10 I.U. を注射し, 外因性 TSH に対する血清 Tg の変動を観察した。(図7挿入図) TSH 投与後24時間目に血清 Tg は, 最大値 $1,390\text{ng}/\text{ml}$ に達し, 以後48時間目 $1,130\text{ng}/\text{ml}$, 72時間目 $900\text{ng}/\text{ml}$ とゆるやかに減少した。図8は, bovine TSH 10 I.U. 注射に対する血清 Tg の変動を見たものである。点線で示した2例は正常健康者であるが, 血清 Tg は TSH 注射後漸増して48時間後に最高値に達する。太い実線で示した T.M. と Y.U. の2例は, 甲状腺乳頭腺癌のため甲状腺全摘術を受け, 現在, 頸部リンパ節にのみ転移を認める患者であり, 更に細い実線で示す M.T. 例は図7挿入図に示した例で, $\frac{1}{100}$ の縮尺で描いている。これら3例は甲状腺の完全な摘出後であり, 血清 Tg の起源としては, 癌転移病巣のみの例である。3症例中, Y.U. 例は正常者と同じく, 48時間後に血清 Tg が最大に達する。しかし, T.M. 例と M.T. 例の2例では, 外因性 TSH に反応し血清 Tg が最高値に達する時間は, TSH 注射後24時間と正常者に見られる48時間後より早いことが注目される。特に T.M. 例は, T_3 $75\mu\text{g}/\text{日}$ の投与を受け, 内因性 TSH の分泌は完全に抑制されている状態であり, TSH 注射前の血清 Tg は $5\text{ng}/\text{ml}$ 以下であった。

Fig. 8. Effect of bovine TSH on serum thyroglobulin levels in normals and athyreotic subjects with metastases of thyroid adenocarcinoma

IV. 考 案

ヒト血清 Tg の二抗体法による RIA については, 既に Roitt 等⁽¹³⁾, Van Herle 等⁽¹⁹⁾ の報告がある。彼らの方法では, 標準曲線作製に際して Tg の稀釈液, 或は被検血清の稀釈液に 10% ヤギ血清を使用している。しかし, ヤギ血清中の Tg の存在が不明であり, ヤギ Tg とヒト Tg のこの Tg 測定系における交叉性が確認されていない問題がある。著者の測定系では, 稀釈液に 1% アルブミン溶液を使用しているのので, この点に

関しては問題がない。標識後、標識 Tg と Tg 抗体との結合能が、非特異的結合能の増加なく急速に低下する原因は不明であるが、Tg 蛋白の不安定さと、Tg の分子量が66万と高分子であることが関係していると思われる。しかし、結合能の低下する標識後7日、14日目であっても、Tg 抗体の稀釈度を減ずることにより良好な標準曲線が得られる。この Tg 測定系の特異性については、T₄、T₃、DIT、MIT とも交叉性が見られなかったこと、甲状腺腫瘍腺癌の各組織よりの抽出液、血清及び正常血清の稀釈曲線が、Tg 標準曲線と平行関係を認めたこと等より証明されたであろう。

正常者の血清 Tg 値に有意の男女差を認めたことは、バセドウ病、橋本病の発病率が女性に圧倒的に高い事実と照合すると興味深い。女性の血清 Tg 値が高い原因は不明である。血清 Tg の男女差は Torrigiani 等⁽¹⁷⁾、Van Herle 等⁽¹⁸⁾ も報告している。正常者の血清 Tg の平均値については、ニューギニア⁽²⁰⁾ > 著者の結果 > イギリス⁽¹⁷⁾ > アメリカ⁽¹⁹⁾ の順である。使用した抗 Tg 血清の差も考えられるが、ニューギニアとアメリカの報告は同一研究室の結果である。民族差、環境差があるようである。

バセドウ病の血清 Tg は他の報告者⁽¹⁷⁾⁽¹⁹⁾⁽²²⁾ と同様に、正常者に比べ有意の高値を認めた。しかし、同一症例による未治療時と治療により甲状腺機能正常化後3カ月以上経過した時点での観察では、正常化後も依然として未治療時と同様に血清 Tg の高値を認めた。寛解中のバセドウ病の血清 Tg 値に、推計学的に有意の低下を認めたが、8例共治療前後の血清 Tg 値が測定できていないため、結論は現在観察中の同一症例による追跡結果を待ちたい。これらの結果は、バセドウ病患者の血中甲状腺刺激物質⁽¹⁾⁽¹¹⁾⁽¹⁴⁾ に対する甲状腺の反応として、甲状腺ホルモンの合成・分泌系以外に、Tg の合成・分泌も関与していることを示唆する。事実、Van Herle 等⁽²¹⁾ はバセドウ病血清の IgG-LATS をラットに投与し、血清 Tg の増加を認めたことを報告している。

甲状腺腫瘍腺癌患者の手術後、血清 TSH 及び Tg を経時的に観察し興味ある結果を得た。術後3日目より内因性 TSH 上昇に一致し血清 Tg の増加を認め、T₃ 投与による内因性 TSH 分泌の抑制により血清 Tg は徐々に低下し、T₃ 投与前値と比較し約95%の低下を示した。更に、外因性 TSH 投与に対しても血清 Tg の増加を認めた。内因性・外因性 TSH による血清 Tg の上昇は Uller 等⁽¹⁸⁾ も報告しているが、著者の結果は、甲状腺全摘後甲状腺癌が肺転移病巣のみに存在する症例においてである。従って、内因性・外因性 TSH に反応し、上昇した血清 Tg は肺転移組織より血中に遊離、出現したものと考えられる。この TSH に対する甲状腺癌細胞の反応性は、甲状腺乳頭腺癌患者で甲状腺全摘後、頸部リンパ節転移のみを有する2症例においても観察された。これらの観察結果は、甲状腺癌組織における TSH 反応性 Tg の存在を示した最初の報告である。Herschman 等⁽⁸⁾ によれば、ウシ TSH 10 I.U. の注射によりヒト血中のウシ TSH は2～4時間後最大値に達し、8～10時間後には半減する。ウシ TSH 投与48時間後に、正常者の血清 Tg は最大値に達す。この結果は Uller 等⁽¹⁸⁾ の報告と一致する。しかし甲状腺分化癌の転移病巣のみを有する癌患者では、2例に TSH 投与後の血清 Tg の最大上昇は24時間目と早い。この差異は不明であるが、正常者と癌患者では、TSH に反応し上昇する血清 Tg が同一分子の Tg であるか、またバセドウ病で高値をとる血清 Tg との比較検討も必要であろう。

TSH に対する甲状腺分化癌の反応性については、radioreceptor assay を使った Ichikawa 等の報告⁽⁹⁾、放射性ヨードを使用した取り込み、有機化を分析した報告⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾、adenyl cyclase での結果⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽¹⁹⁾ 等種々報告されているが、一致した結果は出ていない。これらの方法と比較して、Tg の変動を観察する方法はより直接的な方法であろう。著者のこれまでの結果では、甲状腺分化癌は TSH 反応性が存在するといえるし、臨床的に観察される甲状腺分化癌の TSH 依存性を証明する理論的な根拠の一つとなるであろう。TSH 反応性を血清 Tg の変動を指標として見ることは、甲状腺癌患者で甲状腺全摘後転移病巣を有する症例において、甲状腺ホルモン療法に適否を判断する上で有力な方法であり、また甲状腺全摘後の転移病巣の有無を検索する新しい方法としても有用である。但し一方では、癌細胞の異質性と、その産生する Tg の異質性を考慮に入れる必要があるであろう。

V. 結 論

- 1) 2抗体法による血清 Tg RIA を開発した。
- 2) 正常者血清 Tg 値に男女の有意差を認めた。
- 3) 未治療バセドウ病血清 Tg 値は、正常者に比し有意に高値をとる。治療による甲状腺機能正常化後も、血清 Tg 値は不変であった。
- 4) 甲状腺分化癌症例（転移病巣のみを有する甲状腺全摘者）において、内因性・外因性 TSH に反応する血清 Tg の上昇を認めた。

稿を終るに臨み終始御指導と御校閲を頂いた恩師西川光夫教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Adams, D.D. and Kennedy, T.H.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 27: 173, 1967.
- 2) DeGroot, L.: Acta Endocrinol. Panam., 1: 27, 1970.
- 3) De Rubertis, F., Yamashita, K., Dekker, A., Larsen, P.R. and Field, J.B.: J. Clin. Invest., 51: 1109, 1972.
- 4) Field, J.B., Larsen, P.R., Yamashita, K., Mashiter, K. and Dekker, A.: J. Clin. Invest., 52: 2404, 1973.
- 5) Field, J.B., Larsen, P.R., Kotani, M., Kariya, T., Kerins, M. and Bloom, G.: Thyroid Research Amsterdam, Excerpta Medica, 1976. W3E X 89, No. 378, 1975, 551.
- 6) Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S.: Biochem. J., 89: 114, 1963.
- 7) Hjort, T. and Pedersen, G.T.: Lancet, 2: 259, 1962.
- 8) Hershman, J.M. and Edwards, C.L.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 34: 814, 1972.
- 9) Ichikawa, Y., Saito, E., Abe, Y., Homma, M., Muraki, T. and Ito, K.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 42: 395, 1976.
- 10) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.A. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem., 193: 265, 1951.
- 11) Onaya, T., Kotani, T., Yamada, T. and Ochi, Y.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 36: 859, 1973.
- 12) Ouchterlony, O.: Progr. Allergy, 6: 30, 1962.
- 13) Roitt, I.M. and Torrigiani, G.: Endocrinology, 81: 421, 1967.
- 14) Shishiba, Y., Shimizu, T., Yoshimura, S. and Shizume, K.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 36: 517, 1973.
- 15) Schorr, I., Hinshaw, H.T., Cooper, M.A., Mahaffee, D. and Ney, R.L.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 34: 447, 1972.
- 16) Scheidegger, J.J.: Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 7: 103, 1955.
- 17) Torrigiani, G., Doniach, D. and Roitt, I.M.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 29: 305, 1969.
- 18) Uller, R.P., Van Herle, A.J. and Chopra, I.J.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 37: 741, 1973.
- 19) Van Herle, A.J., Uller, R.P., Matthews, N.L. and Brown, J.: J. Clin. Invest., 52: 1320, 1973.
- 20) Van Herle, A.J., Chopra, I.J., Hershman, J.M. and Hornabrook, R.W.: J. Clin. Endocrinol. Metab., 43: 512, 1976.
- 21) Van Herle, A.J., Klandorf, H. and Uller, R.P.: J. Clin. Invest., 56: 1073, 1975.
- 22) 池窪勝治: 日本内分泌学会雑誌, 51: 825, 1975.