イヌ膵および消化管D細胞からのホルモン分泌に対する システアミンの作用

筑波大学 臨床医学系 内科

川 井 紘 一

The Effect of Cysteamine on Canine Splanchnic D-Cells

Koichi KAWAI

Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba,
Ibaraki-ken, Japan

It has recently been reported that the oral administration of cysteamine causes a depletion of somatostatin content in various tissues of the rat concomitant with duodenal ulcer. Producing somatostatin deficient animals is important for understanding the role of somatostatin in the homeostasis of ingested nutrients. The present experiment was designed to investigate the acute and chronic effects of cysteamine on canine splanchnic D-cells.

When 2 g of cysteamine was administered to normal mongrel dogs, it caused a bloody stool. However, somatostatin-like immunoreactivity (SLI) levels in the peripheral vein did not change although the insulin, glucagon and glucose levels increased. In isolated perfused canine pancreases, cysteamine ($10\ \mu\text{M} \sim 10\ \text{mM}$) showed no specific effect on the somatostatin secretion. The chronic effect of cysteamine on the canine D-cells was studied by using dogs to which cysteamine was administered 3 times (2 g, P.O., every 10 days) at least 4 weeks before the experiment (cysteamine dogs). Hormone secretions from the perfused pancreases isolated from the cysteamine dogs were normal. The increases in somatostatin-14 levels in the pancreaticoduodenal vein, short gastric vein and gastroepiploic vein in response to the intragastric administration of 1N HCl were also normal. The SLI contents and the characteristics in molecular size of tissue extracts from the cysteamine dogs were similar to those of normal dogs. Thus, it is concluded that cysteamine has no specific effect on canine splanchnic D-cells.

緒 言

システアミン ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) をラットに投与すると十二指腸潰瘍が生ずるが¹³⁾, この潰瘍はソマトスタチンを予め投与しておくとは発生しないと報告されている¹²⁾。このことよりシステアミンにソマトスタチンの分泌を抑制する作用があり, その結果胃壁からのガストリンや塩酸分泌が亢進し十二指腸潰瘍が発生するとも推論される。実験的にもシステアミンをラットに投与すると胃や十

二指腸のソマトスタチン含量が減少することが報告されている¹⁰。以上の報告より、システアミンがD細胞に対し、その分泌抑制ないし細胞障害という点で比較的特異な親和性をもつことが期待される。すなわち、アロキサンやストレプトゾチンがB細胞を破壊しインスリン欠乏動物をつくり得るように、システアミンがソマトスタチン欠乏動物をつくれるか否か興味のもたれるところである。

そこでイヌを使いシステアミンの膵臓および消化管D細胞への作用を、急性投与および慢性投与後のソマトスタチン分泌という面から検討した。

実験材料および方法

イヌへのシステアミン投与とその前後での経時的採血

一晚絶食にした雑種雄成犬(25kg前後)に蒸留水で溶かしたシステアミン(β -mercaptoethylamine Hydrochloride, Sigma)を経口(胃ゾンデにより)ないし静脈より投与し、その前後で下腿の静脈より経時的に採血した。採血した血液は予め血液1 mlあたり6 mg EDTAと500 KIU トラジロールを含むように用意した試験管にすみやかに移し、冷却遠心により血漿を分離、ホルモン定量時まで -20°C に保存した。

イヌ腹腔内静脈からの血液採取

一晚絶食にした雑種雄成犬(25kg前後、既にシステアミン2 gを10日に1度、3回経口投与され、最終投与後4週間以上(平均5週を経たもの;以下システアミン犬)をネンブタール麻酔下に開腹し、膵十二指腸静脈(膵臓からの血液採取を目的とする)、短胃静脈(胃底部)、胃大網静脈(胃前庭部)にシリコンチューブを置いた¹⁰。チューブ挿入後1時間待ち、前採血、次に200 mlの1N塩酸を胃腔内に投与した後、経時的に上記三ヶ所の静脈より採血した。採血した血液は上記の方法にて血漿を分離し、ホルモン定量、ゲルクロマトグラフィーに供した。

イヌ摘出膵灌流実験

Iversen-Milesの方法⁵⁾に準じ、一晚絶食にした雑種成犬(正常およびシステアミン犬)より膵を摘出し、灌流した。摘出膵標本は約10cmの十二指腸を残したもので、生理的食塩水中に浮置し 37°C に保った。灌流法はnon-recirculating systemであり、腹腔動脈より灌流液を注入し、門脈より灌流液を採取した。基本灌流液には4%デキストランT70(Pharmacia)、0.2%牛血清アルブミン(Sigma)、5 mM ビルビン酸、フマル酸、グルタミン酸を含む Krebs-Ringer bicarbonate bufferを用い、これに実験の目的に従い、ブドウ糖、アルギニンを加えた。灌流液は0.5% O_2 - 5% CO_2 を通気し、pHを約7.4に維持した。灌流速度はperistaltic pump (Harvard Apparatus Co. USA)により18 ml/minとし、2 mlのEDTA-ベンザミジン(0.03 M/0.3 M)を含む試験管に1分毎に採液し、ホルモン定量まで -20°C に保存した。

実験は40分間の予備灌流後に開始し、15分間の基礎分泌を見た後、システアミン水溶液を側枝より syringe type の infusion pump (Harvard Apparatus Co.) で注入した。

臓器からのソマトスタチン抽出

正常雑犬およびシステアミン犬をネンブタール麻酔下に開腹し、KC1を投与し屠殺した直後に胃・膵・十二指腸・上部空腸を摘出、ドライアイスで凍結し保存した。この臓器を5倍量の2 M酢酸で煮沸後 Polytron (Brinkmann) で5分間 homogenize した。遠心により上清部分を集め凍結乾燥し、それを0.05 M リン酸緩衝液に溶かした(Polytronでhomogenizeし、不溶部分は遠心にて除

いた)。次に10 N NaOHでpHを7.4前後に合わせ、1時間放置後再び遠心して不溶物を除き、これをソマトスタチン定量及びゲルクロマトグラフィーに供するため保存した²⁾。

ゲルクロマトグラフィー

Bio-Gel P-10 (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いカラムサイズは 1.5×35 cm とした。溶出液には0.1%牛血清アルブミン, 0.25% EDTA, 100 KIU/ml トラジロールを含む50mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い, 4°C ・流速0.1 ml/minで溶出した。カラムはBlue Dextran 2000 (Pharmacia), インスリン, グルカゴン, ソマトスタチンにより calibrate した。

ホルモン定量

インスリン, グルカゴン, ソマトスタチンは各々 Yalow & Berson の報告³⁾, Faloona らの報告³⁾, Harris らの報告⁴⁾による radioimmunoassay を用いて測定した。以下その測定値をそれぞれ IRI, IRG, SLI として表現した。血中ブドウ糖濃度 (GLC) は glucose-oxidase 法にて測定した。

推計学的検定

有意差検定には分散分析を用い, Newman-Keuls の方法により, 5%の信頼水準をもって有意差ありとした。尚, 文中の結果は平均値±標準誤差として示してある。

Fig. 1. Changes in hormone levels of normal dogs by oral cysteamine administration (2 g, P.O.). Mean $\pm$ SEM, N=5, ⊙; $p < 0.05$ vs. baseline values.

Fig. 2. Changes in hormone levels of normal dogs by intravenous cysteamine administration.

Mean $\pm$ SEM, N=5, $\odot$; $p < 0.05$ vs. baseline values.

結 果

1) イヌにシステアミンを投与した際の急性効果

システアミンがD細胞に対し特異的な急性傷害作用を示すか否かを、正常雑犬にシステアミンを経口および静脈内投与した際のホルモン分泌、摘出イヌ灌流臓からのホルモン分泌に対するシステアミン投与の影響という面から検討した。

a) 経口投与実験

一晚絶食にした成犬にシステアミン 2 g を胃腔内に投与した際のホルモン分泌の変動を調べたのが図 1 である。得られた血漿を抽出操作なしに直接 SLI 測定系に加えて測った SLI 値には有意な変化は生じなかった。一方、同時に測定した IRG および血糖レベルは投与後 30 分より、IRI レベルは投与後 60 分より有意な上昇を示し、2 時間の実験時間中、この上昇は持続した。イヌの状態を観察したところ、投与 5 分後頃より、体動、唾液分泌の増加、嘔気の症状が見られ、さらに嘔吐するものもあった。また実験中あるいは実験後に粘血便を排泄するものが多数見られたが、粘血便の排泄は一過性で 2・3 日で回復した。

b) 静脈内投与実験

成犬に約 2 g のシステアミンを静脈内投与した実験結果が図 2 である。図 1 と同様 SLI レベルには変化が見られなかったが、IRG・IRI・血糖レベルはシステアミンを 2 mg/kg/min の速度で投与した際に上昇した。また投与中経口投与時に生じたと同様な症状が見られた。

Fig. 3. Effect of cysteamine on hormone secretion from isolated perfused canine pancreas. The basal perfusate contains 100 mg/dl glucose and 10 mM arginine.

Fig. 4. Hormone secretion from the perfused pancreas isolated from a cysteamine dog. The basal perfusate contains 50 mg/dl glucose.

c) イヌ摘出膵灌流実験

摘出灌流膵に10 μ M から10mM までのシステアミンを添加し、ホルモン分泌へのシステアミンの直接的作用を調べた(図3)。システアミン投与中止によりSLIレベルが上昇することから、SLI分泌は1mM システアミンにより、やや抑制されることが考えられた。IRIについては100 μ M で同様な抑制傾向が見られた。1mM システアミン投与により、IRI・IRGとも徐々に増加、投与中止後はさらに反跳的な分泌増加(rebound)がみられた。10mM でもIRI・IRG・SLIレベルの変化が見られているが、この量のシステアミン投与は膵を著しく膨化させ、静脈側への灌流液回収量の一過性減少、灌流圧の上昇が見られたことより、血管収縮作用ないしは非特異的变化が考えられた。

2) イヌにシステアミンを投与した際の長期効果

ストレプトゾトシンやアロキサンが長期にわたりB細胞を傷害するのと同様にシステアミンがD細胞に対し長期にわたりその傷害作用を示すか否かを知るため、システアミン犬(経口的に2gのシステアミンを10日に1回計3回投与し、最終投与から4週以上経た犬)を用い以下の実験を行なった。尚、この投与によりイヌの一般的健康状態、さらには末梢血血液像の変化は見られなかった。

a) 摘出膵灌流実験

システアミン投与犬の膵を摘出し灌流、ブドウ糖およびアルギニンを投与した際のホルモン分泌の変化を調べた(図4)。ソマトスタチン、インスリン分泌はブドウ糖濃度の増加、10mM アルギニン投与により刺激された。一方、グルカゴン分泌はブドウ糖濃度の増加により抑制され、10mM アルギニン投与により刺激された。

Fig. 5. Somatostatin-like immunoreactivity (SLI) in pancreaticoduodenal (—●—), short gastric (---●---) and gastroepiploic vein (----●----) in response to intragastric administration of 1N HCl into anesthetized cysteamine dogs.

N=3, Mean $\pm$ SEM. ● ; $P < 0.05$ vs. baseline values.

Fig. 6. Elution profiles of SLI in the gastropiploic, short gastric and pancreaticoduodenal vein plasma before and after intragastric administration of HCl in anesthetized cysteamine dogs. Plasma was applied to Bio-Gel P-10 column (1.5 × 35 cm) and eluted with 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.1% bovine serum albumin, 0.25% EDTA and 100 KIU/ml Trasylol.

b) 選択的静脈血採血

正常犬では塩酸を胃腔内に投与すると膵、胃前庭部、胃底部D細胞からのソマトスタチン分泌が増加すると報告されている¹⁰⁾。そこでシステアミン投与犬のD細胞機能を知るため膵十二指腸静脈(膵)、胃大網静脈(胃前庭部)、短胃底静脈(胃底部)から血液を採取し、塩酸投与後にソマトスタチン濃度が増加するか否かを調べた(図5)。抽出操作なしに直接測定したSLI活性はいずれの静脈血中でも1N塩酸200ml投与10分目から著明な増加を示し、投与40分後においても有意な増加を示した。この増加したSLIあるいは塩酸投与前のSLI活性物質の分子量について、Bio-Gel P-10カラムを用いて検討した(図6)。塩酸投与前の基礎値についてはいずれの静脈血中にもvoid volumeの位置とソマトスタチン-14の位置にSLI活性が存在した。ソマトスタチン-14の全SLI活性に対する割合を計算すると、胃大網静脈血で25%、短胃静脈血で80%、膵十二指腸静脈血で44%であった。一方塩酸刺激時に増加するのは主にソマトスタチン-14のみであったが短胃静脈血と膵十二指腸静脈血中ではグルカゴンよりやや大分子の位置に、小さなSLI活性が見られた。尚、活性の回収率はいずれの静脈血でも変わらず約65%(63.7±8.1)であった。

c) 臓器内ソマトスタチン含量

システアミン投与犬より胃・十二指腸・膵臓・上部空腸を摘出し、そのソマトスタチン含量を測定した(表1)。湿重量あたりのSLI含量は高い方から、胃前庭部、膵、胃底部、十二指腸、空腸の順であった。胃、膵では個体差が強かったが、正常犬から摘出した臓器のSLI含量と比較して、

Table 1. SLI content in various tissues of cysteamine-dogs and a normal dog.

	SLI content (ng/g wet tissue)			Mean±SEM	normal dog
	ctsteamine dogs Expt.1	dogs Expt.2	dogs Expt.3		
Stomach					
fundus	113.1	162.0	129.1	134.7± 14.4	144.2
antrum	866.7	814.9	386.2	689.3±152.3	591.3
Duodenum	94.8	107.3	95.0	99.6± 3.4	101.1
Jejunum	52.5	89.2	85.5	75.7± 11.7	52.3
Pancreas	145.9	492.2	239.9	292.9±103.6	317.5

Fig. 7. Elution profiles of SLI extracted from the antrum, pancreas and jejunum of a cysteamine dog. The experimental conditions are described in Fig. 6.

システアミン投与犬でSLI量の低下があるとは認められなかった。このSLIの分子構成を図6と同様Bio-Gel P-10カラムで検索した(図7)。図6でも示されたと同様void volumeの位置(ピーク1)グルカゴンよりやや早く溶出される位置(ピーク2)および合成ソマトスタチン-14の溶出部位に一致する位置(ピーク3)の三つのSLI活性が見られた。その割合は各臓器抽出液により異なり、胃前庭部ではピーク2が殆んど見られなかったが、膵抽出物中にはvoid volumeの位置にくる活性(ピーク1)と同程度の活性が見られ、各SLI活性の割合を計算するとピーク1 6.9%, ピーク2 10.1%, ピーク3 83.0%であった。一方上部空腸からの抽出物中ではピーク3よりもピーク2の方が大きく、各SLI活性の割合はピーク1 10.9%, ピーク2 65.6%, ピーク3 23.5%であった。尚、SLI活性のカラム操作による回収率は約85% (85.8 ± 14.2) であった。

考 察

今回の実験はソマトスタチンの生理的役割を明確にするため、犬にソマトスタチン分泌不全状態をつくることにあった。システアミン2g (80mg/kg)を経口あるいは静脈内投与した場合、イヌは嘔吐、唾液分泌の増加等の症状を示したあと、粘血性の下痢を2日程排泄した。このことからシステアミンが消化管に傷害を与えたことは確実であるが、投与後2時間にわたり測定した血中ソマトスタチン値には変動が見られなかった。空腹時の静脈血中のソマトスタチン-14の濃度は20pg/ml以下と報告されている¹⁰⁾。今回の実験では空腹時を基礎値としているため、ソマトスタチン-14の減少はあっても全SLI活性としてはその変動をとらえることが出来なかったとも考えられる。しかし、イヌの摘出膵灌流系で10 μ M~10mMまでのシステアミンを投与した際、D細胞からのソマトスタチン分泌に対する特異的な抑制が見られず、膵が高濃度のシステアミン投与により膨化したことは、この物質の一般的細胞傷害作用を考えさせるものである。胃と膵のD細胞を含め、生体内に広く分布するD細胞の基本的性質に違いが報告されてないことを考えると、今回の結果はSzabo¹⁰⁾がラットを用いて報告したシステアミン(35mg/100g体重)を経口投与した際に生ずる胃潰瘍の原因は、システアミンにD細胞からのソマトスタチン分泌を特異的に阻害する作用があり、そのためガストリン分泌が亢進し、胃潰瘍が発生したとする推論に疑問を抱かせるものである。ラットの実験に較べ投与したシステアミンの量は体重あたりでは約4分の1であったが、高濃度では膵灌流実験からも示されるように、より一般的な細胞傷害を生ずることが予想される。今回の実験では一過性の下血であったのに対し、ラットでより重篤な潰瘍を生じた理由がここにもあるように思われる。尚、システアミン投与後にIRG・IRI・血糖の上昇が見られたが、これは出血を伴うストレスに対する反応と考えられる⁶⁾。

次にシステアミン投与がD細胞に対し、ある期間を経て傷害作用を示すか否か、あるいはシステアミンがD細胞を傷害するとすれば長期にわたりその作用が持続するかを知るため、10日に1度、2gのシステアミンを3回経口投与した後、4~5週経たイヌ(システアミン犬)を用いた実験を行ったが、胃および膵臓のD細胞はホルモン分泌、ホルモン合成の両面から見ても傷害されてないことが、摘出膵灌流実験(図4)、選択的静脈血採血とそのSLI活性の分子構成をみた実験(図5、6)さらには臓器内ソマトスタチン含量とその分子構成をみた実験(表1、図7)より示された。即ち、システアミン犬の摘出灌流膵実験では、そのホルモン基礎分泌レベル、ブドウ糖、アルギニンに対するホルモン分泌動態にPattonら⁸⁾が正常犬で報告した結果と較べ違いが見られなかった。また、胃腔内に塩酸を投与した後の血中SLI濃度の増加についてもSchusdziarraらの報告¹⁰⁾と同程

度の増加が見られたし、この増加した SLI 活性の分子形態についての結果も Schusdziarra らの報告¹¹⁾と一致するものであった。イヌの臓器内ソマトスタチン含量については田畑らの報告¹⁹⁾がある。今回の結果は正常対照群も含めそれより低く目に出ているが、含量の臓器別相対順位には変りがないこと、Arimura ら¹⁾や Patel ら⁷⁾のラットの臓器別ソマトスタチン含量とほぼ一致することから、特に D 細胞の傷害を示唆するものとは考えていない。胃・膵では実験毎にかなり含量の差が見られたが、田畑らの報告によるとこれらの臓器では臓器内部位によりかなりソマトスタチン含量に違いが見られることから、摘出部位を厳密に一定にできなかったことによると思われる。

臓器より抽出した SLI 活性の分子形態については、Conlon ら²⁾や Trent & Weir¹⁰⁾の報告にもあるように void volume の位置 (ピーク 1), グルカゴンの溶出位置とはほぼ同様な位置 (分子量 3000–3500, ピーク 2) と合成ソマトスタチン-14 と一致する位置 (分子量 1600, ピーク 3) の三つの部分に SLI 活性が見られた。その相対比、特にピーク 2 と 3 の量比が臓器により異っていることが知られているが、今回の実験でも胃では殆んど SLI 活性がピーク 3 であり、一方上部空腸ではピーク 2 の方が多いという結果が得られ、Trent & Weir¹⁰⁾のラットでの実験結果と一致した。尚、ピーク 2 についてはその溶出位置が Trent & Weir¹⁰⁾の報告でも calibulation に用いたグルカゴンよりも大分子の位置にあるが、ソマトスタチンのプロホルモンであるソマトスタチン-28⁹⁾に間違いなくと思われる。

結 語

ソマトスタチンの生理的役割を知るうえでソマトスタチン欠乏状態をつくることは意義ある実験と考えられる。そこで最近ラット胃壁 D 細胞からのソマトスタチン分泌を抑制しラットに胃潰瘍をひきおこすと報告されたシステアミンを用い、そのイヌ膵臓および消化管 D 細胞傷害作用を検討した。システアミン 2 g の経口あるいは静脈内投与は急性の下血をひきおこしたが、末梢血中 SLI 濃度の変動は認められなかった。また、システアミンは摘出灌流臓からのソマトスタチン分泌に対しても特異的障害作用を示さなかった。さらにシステアミン 2 g を 3 回経口投与した後約 1 ヶ月を経たイヌより摘出した膵灌流実験、胃腔内塩酸投与後の膵十二指腸静脈・胃大網静脈・短胃静脈血中 SLI 濃度の増加度と増加した SLI 活性の分子形態や、臓器 SLI 含量とその分子形態を検索した実験からも、これらのイヌで D 細胞が障害されているという証拠は得られなかった。以上の結果よりシステアミンにはイヌ D 細胞に対する特異的傷害作用はないものと考えられる。

本研究はテキサス大学 Roger H. Unger 教授の研究室で行ったものである。本研究を支えた Unger 教授、並びに校閲を頂いた山下亀次郎助教授に深謝します。

文 献

- 1) Arimura, A., Sato, H., Dupont, A., Nishi, N. and Schally, A.V.: Somatostatin: Abundance of immunoreactive hormone in rat stomach and pancreas. *Science*, 189: 1007–1009, 1975.
- 2) Conlon, J.M., Zyznar, E., Vale, W. and Unger, R.H.: Multiple forms of somatostatin-like immunoreactivity in canine pancreas. *FEBS Lett.*, 94: 327–330, 1978.
- 3) Faloon, C.R. and Unger, R.H.: Glucagon. 317–330, Ed. by B.M. Jaffe and H.R. Behrman, *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, Academic Press, New York, 1974.
- 4) Harris, V., Conlon, J.M., Srikant, C.B., McCorkle, K., Schusdziarra, V., Ipp, E. and

- Unger, R.H.: Measurements of somatostatin-like immunoreactivity in plasma. *Clin. Chem. Acta*, 87: 275–283, 1978.
- 5) Iversen, J. and Miles, D.W.: Evidence for feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. *Diabetes*, 20: 1–9, 1971.
- 6) Lindsey, C.A., Faloon, G.R. and Unger, R.H.: Plasma glucagon levels during rapid exsanguination with and without adrenergic blockade. *Diabetes*, 24: 313–316, 1975.
- 7) Patel, Y.C. and Reichlin, S.: Somatostatin in hypothalamus, extrahypothalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinology*, 102: 523–530, 1978.
- 8) Patton, G.S., Ipp, E., Dobbs, R.E., Vale, W., Orci, L. and Unger, R.H.: Studies of pancreatic immunoreactive somatostatin (IRS) release. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74: 2140–2143, 1977.
- 9) Pradyrol, L., Jörnvall, H., Mutt, V. and Ribet, A.: N-terminally extended somatostatin: The primary structure of somatostatin-28. *FEBS Lett.*, 109: 55–58, 1980.
- 10) Schusdziarra, V., Harris, V., Conlon, J.M., Arimura, A. and Unger, R.H.: Pancreatic and gastric somatostatin release in response to intragastric and intraduodenal nutrients and HCl in the dog. *J. Clin. Invest.*, 62: 509–518, 1978.
- 11) Schusdziarra, V., Zyznar, E., Rouiller, D., Harris, V. and Unger, R.H.: Free somatostatin in the circulation: Amounts and molecular sizes of somatostatin-like immunoreactivity in portal, aortic, and vena caval plasma of fasting and meal-stimulating dogs. *Endocrinology*, 107: 1572–1576, 1980.
- 12) Schwedes, U., Usadel, K. and Szabo, S.: Somatostatin prevents cysteamine-induced duodenal ulcer. *Eur. J. Pharmacol.*, 44: 195–196, 1977.
- 13) Selye, H. and Szabo, S.: An experimental model for the production of perforating duodenal ulcers by cysteamine the rat. *Nature*, 244: 458–459, 1973.
- 14) Szabo, S. and Reichlin, S.: Somatostatin in rat tissues is depleted by cysteamine administration. *Endocrinology*, 109: 2255–2257, 1981.
- 15) Tabata, M., Shima, K., Tanaka, R., Ota, T., Tanaka, A., Shimomura, Y., Sawazaki, N. and Kumahara, Y.: The tissue distribution of immunoreactive somatostatin in different species: With special reference to gastrointestinal somatostatin. *Folia endocrinol. Jap.*, 56: 662–670, 1980.
- 16) Trent, D.F. and Weir, G.C.: Heterogeneity of somatostatin-like peptides in rat brain, pancreas, and gastrointestinal tract. *Endocrinology*, 108: 2033–2038, 1981.
- 17) Yalow, R.S. and Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, 39: 1157–1175, 1960. (受付日: 57. 11. 29)