イムノラジオメトリックアッセイによる ヒト成長ホルモンの高感度測定法とその臨床応用

京都大学医学部第二内科学教室

島 津 章, 服 部 尚 樹, 田 濃 勉,

Hossein Assadian, 井 村 裕 夫

Clinical Application of a Sensitive Immunoradiometric
Assay for Human Growth Hormone

**Akira SHIMATSU, Naoki HATTORI, Tsutomu TANOH,
Hossein ASSADIAN and Hiroo IMURA**

Second Division, Department of Internal Medicine,
Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto 606, Japan

A sensitive immunoradiometric assay (IRMA) for human growth hormone (GH) using monoclonal antibodies was evaluated for clinical application. The detection limit of GH in serum was 0.05 ng/ml using 0.1 ml of serum. The specificity and assay precision were satisfactory. GH levels in serum determined by the IRMA were well correlated to those determined by the sensitive enzyme immunoassay or the commercial radioimmunoassay. Most of the basal GH levels in serum from normal adult subjects were detectable; mean values in male and female were 0.21 and 0.65 ng/ml, respectively. Serum GH levels decreased to less than 1(0.5) ng/ml after oral glucose loading in normal subjects. Postoperative acromegalic patients were classified into two groups according to their GH responses to glucose. In group 1, GH levels were suppressed less than 1ng/ml, suggesting normal GH dynamics. On the other hand, in group 2, GH levels remained elevated above 1ng/ml, and postinhibitory rebound rise in serum GH after dopamine infusion was observed, suggesting the presence of residual adenoma tissues. Determination by sensitive IRMA of GH responses during oral glucose loading is useful for evaluating the activity of postoperative acromegaly.

緒 言

ヒト成長ホルモン (GH) の測定は, GH 分泌異常症の診断や治療の指針に必須である。従来, その血中濃度の測定にはラジオイムノアッセイ (RIA)²²⁾が用いられてきた。しかし, 測定に時間を要し操作手技がやや煩雑で感度も必ずしも良くないため, より簡便で迅速な高感度の測定法の開発普及が望まれていた。最近, 特異性の高いモノクローナル抗体の作成が可能となり, 固相を用い

るイムノラジオメトリックアッセイ (IRMA)¹⁵⁾による安定性の高い鋭敏な測定系が開発された。今回、第一ラジオアイソトープ研究所により提供をうけた GH 測定用キット (D-9111) の基礎的検討および臨床応用を行ない、低濃度域における血中 GH 測定の意義について検討した。

方法および対象

1. GH 測定法

本測定法の原理は、two-site IRMA であり GH の認識部位が異なるマウスモノクローナル抗体をビーズ固相と¹²⁵I 標識に用いている。標準品は、WHO GH 66/217により検定され、コントロール血清として2種類のヒト血清(凍結乾燥品)が添付されている。測定は、標準品ならびに各検体について2本ずつ二重測定で行なった。操作方法は、トレイに標準 GH 試薬または検体100 μ l と¹²⁵I 標識 GH 抗体100 μ l および GH 抗体ビーズ試薬1個を加え室温 (25℃) で3時間振盪インキュベーション後、溶液を吸引除去、蒸留水2ml で3回洗浄し、ビーズを測定用試験管に移し替え、計数率を測定した。

本測定法の基礎的検討

1) 標準曲線と最小測定濃度: 最小濃度である0.1 ng/ml 標準試薬を0 ng/ml 標準試薬で倍々希釈して0.05, 0.025 ng/ml の濃度を作成し、6重測定した。0 ng/ml 標準のカウント (Bo) との有意差検定により最小測定濃度を求めた。

2) 精度再現性試験: 測定内誤差は、3種類の異なる濃度の患者血清検体を計6回繰り返し二重測定し、その平均値 $\pm$ SD より変動計数 (%CV) を求めた。また、測定間誤差は、4種類の患者血清検体とキットのコントロール血清2種類を各々7回の異なった測定時に二重測定し %CV 値を求めた。

3) 希釈試験: 濃度の異なる5種類の患者血清を0 ng/ml 標準試薬で倍々希釈し、希釈曲線を求めた。

4) 添加回収試験: 3種類の患者血清に種々の濃度の GH 標準液を1:1に添加した試薬を使用して、回収率を算定した。

5) 交叉試験: 下垂体ホルモン (TSH, LH, FSH, PRL) を測定系に添加し抗体の特異性を検討した。20K GH (日本ロシュ研究所)¹⁶⁾についても交叉反応性を検討した。

6) 既存の GH 測定法との比較: 1 ng/ml 以上の血清 GH 値を示す381検体についてダイナボット社の GH 測定 RIA キットを用いて測定し、本測定法による値と比較した。また、2 ng/ml 以下の血清 GH を示す98検体について既報の超高感度酵素免疫測定法 (EIA)¹⁰⁾を用いて測定し、本測定法による値と比較検討した。

2. 対象

正常成人男性27例、女性31例(年齢20-67歳)ならびに視床下部下垂体機能障害患者53例を対象とした。患者の内訳は、Sheehan 症候群、頭蓋咽頭腫・胚芽腫などによる視床下部性下垂体機能低下症ならびに先端巨大症であった。

下垂体機能低下症患者10例において、インスリン負荷 (0.05-0.1u/kg 体重) および GHRH 負荷 (100 μ g) を施行した。先端巨大症患者9例において、下垂体腺腫摘除術の前後に経口ブドウ糖負荷 (75g) およびドーパミン負荷 (2 μ g/kg 体重/分; 120分間持続静注) を施行した。いずれも早朝空腹時、安静状態にて肘静脈に留置針を挿入し、採血ならびに静注は接続した三方活栓に

よった。採血後、遠心分離し血清を測定まで -20°C に保存した。

3. 統計処理

血清 GH の測定実測値は、ほぼ対数正規分布を示すため対数変換を行い平均値・標準偏差を算出した。有意差検定には Student's *t* test を用いた。相関の検討には、回帰分析を用い最小二乗法により回帰直線を求めた。

結 果

1. GH 測定法の基礎的検討

1) 標準曲線と測定感度 (Fig. 1): 8回の異なった測定時に得られた標準曲線の平均値 $\pm$ SD を Fig.1に示した。0.1 ng/ml から50 ng/ml の範囲で良好な用量反応曲線が得られた。測定範囲内の5点におけるそれぞれの変動計数は8.4%以下であった。

0.025 ng/ml の濃度のカウント値と0.05 ng/ml および0 ng/ml 標準のカウント値との間に有意差 ($p < 0.001$) が認められたが、低濃度領域のガンマ・カウンターの計測値の再現性を考慮して、最小測定感度を0.05 ng/ml においた。

2) 精度再現性試験 (Table 1): 測定内誤差および測定間誤差の変動係数はそれぞれ 2.0-8.9%, 1.6-9.4%であった。

3) 希釈試験 (Fig. 2): 患者血清を希釈し希釈曲線を求めたところ、ほぼ直線性が示され十分な平行性が得られた。

4) 添加回収試験 (Table 2): 添加回収率は最大値 116.0%, 最小値 92.0%であり、平均値は 102.8 ± 8.0 (SD) %であった。

Fig. 1 Standard curve of GH by sensitive immunoradiometric assay (IRMA) and cross-reactivity of 20K GH. Each point is the mean ($\pm$ SD) of 8 determinations.

Table 1 The intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) for the samples with different GH levels.

Intra-assay

Sample	no.	Mean $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)
1	6	17.8 $\pm$ 0.4	2.4
2	6	5.81 $\pm$ 0.12	2.0
3	6	0.12 $\pm$ 0.01	8.9

Inter-assay

Sample	no.	Mean $\pm$ SD (ng/ml)	CV (%)
1	7	17.2 $\pm$ 1.6	9.4
2	7	6.17 $\pm$ 0.27	4.4
3	7	0.12 $\pm$ 0.01	8.8
4	7	28.1 $\pm$ 0.45	1.6
A	7	1.89 $\pm$ 0.13	7.0
B	7	33.9 $\pm$ 2.1	6.2

Fig. 2 Effect of dilution of the serum samples on GH estimates.

Table 2 Recoveries of the standard GH added to serum.

Sample	Added GH (ng/ml)	Measured GH (ng/ml)	Recovered GH (ng/ml)	Recovery (%)
I	0	3.29	-	-
	0.25	3.52	0.23	92.0
	1.25	4.46	1.17	93.6
	6.25	9.18	5.88	94.1
	25.0	30.5	27.2	109.0
II	0	0.08	-	-
	0.25	0.37	0.29	116.0
	1.25	1.37	1.29	103.2
	6.25	6.44	6.36	101.8
	25.0	26.3	26.2	105.0
III	0	1.69	-	-
	0.25	1.98	0.29	116.0
	1.25	2.91	1.22	97.6
	6.25	8.07	6.36	101.8
	25.0	27.5	25.8	103.2

102.8±8.0
(mean±SD)

5) 交叉試験：本測定系は、TSH (0.1-50 μ U/ml), LH (1-50 mIU/ml), FSH (1-50 mU/ml), および PRL (1-100 ng/ml) と交叉性を認めなかった。20K GH に対しても、10 μ g/ml までの範囲内で交叉反応性は認められなかった (Fig.1)。

6) 既存の GH 測定法との比較 (Fig.3)：1 ng/ml 以上の血清 GH 値を示す381検体についてダイナボット社の GH 測定 RIA キットによる測定値と比較した成績を Fig.3b に示した。両者の間には $\log Y=0.949 \log X+0.064$ の回帰式が得られ、相関係数 $r=0.979$ ($p<0.001$) ときわめて良好な正の相関係数が認められた。2 ng/ml 以下の血清 GH 値を示す98検体について EIA による測定値と比較したところ、両者の間にも $r=0.940$ ($p<0.001$) の正の相関が得られた (Fig.3a)。

2. 臨床的検討

1) 基礎血清 GH 値 (Fig.4)：正常成人の基礎血清 GH 値は、測定感度以下から5.37 ng/ml に幅広く分布した。男女別では、男性の平均値 (平均値±SD の範囲) は0.21 (0.07-0.65) ng/ml, 女性は、0.65 (0.18-2.35) ng/ml であり、女性の方が有意 ($p<0.001$) の高値を示した。

基礎血清 GH 値は、下垂体性小人症を含む下垂体機能低下症において約1/3の症例で感度以下であり、平均値は0.08 (0.05-0.15) ng/ml と明らかに低値であった。未治療先端巨大症では、全例高値 (7.6-119 ng/ml) であり、治療後大部分の症例で正常値となった。

2) 下垂体機能低下症におけるインスリン負荷および GHRH 負荷に対する血清 GH の反応 (Fig.5)：正常成人におけるインスリンおよび GHRH に対する血清 GH 反応の頂値の平均値は、それぞれ13.1 (6.21-27.5) ng/ml, 14.4 (6.33-32.9) ng/ml であった。

Fig. 3 Correlation between GH levels determined by IRMA and those by sensitive enzyme immunoassay (EIA; a) or by the commercial radioimmunoassay (RIA; b). Highly significant ($p < 0.001$) positive correlation was obtained.

Fig. 4 Basal GH levels in serum of normal subjects, patients with hypopituitarism and acromegaly before and after therapy.

下垂体機能低下症10例中5例において、インスリン低血糖に対し基礎値の50%以上の増加反応(頂値の平均0.46 ng/ml)が認められた(Fig.5a)。一方、GHRH 負荷に対して Sheehan 症候群の1例を除いて全例で明らかな増加反応を認めた(Fig.5b)。しかし、その頂値の平均は2.55 (1.03-6.33) ng/ml であり正常人と比較して低値であった。

3) 正常人および先端巨大症における経口糖負荷およびドーパミン負荷に対する血清 GH の反応(Figs.6 and 7): 正常人において、血清 GH は糖負荷後60分以内に低下し(底値の平均0.07 ng/ml), 120-180分後に増加反応が認められた(Fig.6a)。未治療先端巨大症において GH 基礎値は高く糖負荷によりほとんど変化しなかった(Fig.6b)。

正常人において、ドーパミン持続注入中に血清 GH は軽度増加する傾向を示し、注入中止後の増加反応は認められなかった(Fig.7a)。一方、先端巨大症の多くで注入開始後血清 GH は低下し、注入中止後に反跳的増加を認めた(Fig.7b)。

下垂体腺腫摘除後の先端巨大症において、GH 基礎値は明らかに低下したが、経口糖負荷に

Fig. 5 Serum GH responses to insulin (a) or GHRH (b) in patients with hypopituitarism. Shaded areas indicate the mean ($\pm$ SD) of GH responses in six normal subjects.

Fig. 6 Serum GH responses to oral glucose loading in normal subjects (a) and patients with acromegaly before (b) and after (c) transsphenoidal surgery.

より血清 GH が正常に抑制される群 (case 4-9) と抑制されない群 (case 1-3) に区別された (Fig. 6c)。抑制群の底値の平均は0.15 (0.07-0.32) ng/ml であった。GH 非抑制群においては、ドーパミン注入時の GH 低下反応および注入後の反跳的増加反応が残存していた。GH 抑制群では、注入中に血清 GH の増加を認め注入中止後の増加反応は明らかでなかった (Fig. 7c)。抑制群の GH 基礎値の平均は0.77 (0.37-1.57) ng/ml であり、非抑制群の3.25 (2.23-4.74) ng/ml と比較して低値であった。

Fig. 7 Serum GH responses to dopamine infusion in normal subjects (a) and patients with acromegaly before (b) and after (c) transsphenoidal surgery. Bars indicate the period of dopamine infusion ($2 \mu\text{g/kg BW/min}$ for 120min).

考 察

今回検討を加えた D-9111 は、GH に対するモノクローナル抗体を利用した IRMA の原理に基づく高感度 GH 測定キットである。現在繁用されている RIA による GH 測定法は、抗原・抗体の結合や B/F 分離に時間を要するため測定時間が 2-4日間と長く、遠心分離などの操作を含み測定手技がやや煩雑であった。それと比較して、本測定法は1段階のインキュベーションで済み遠心分離の必要がなく、インキュベーションも室温で3時間であることから、所要時間が短く簡便性に優れている。また、添加回収、希釈試験、再現性試験の結果から精度、正確度、再現性ともに良好な成績が得られた。特異性についても、他の下垂体ホルモンと交差せず通常の中濃度に関しては十分と考えられた。

本測定法の測定範囲は0.1-50 ng/ml であり最小測定濃度は0.05 ng/ml と考えられた。RIA による測定法の感度 (0.5-1.0 ng/ml) と比較して約10倍高感度であったが、EIA を用いた GH 測定法⁷⁾¹⁰⁾(測定感度0.0015 ng/ml) には劣っていた。Boots-Celltech 社の IRMA による GH 測定法 (SUCROSEP)¹³⁾²¹⁾の測定感度は、本法とはほぼ同程度であった。本測定法により、正常成人の基礎血清 GH 値が少数例を除いて検出可能であり、ほぼ満足できる感度と考えられる。2 ng/ml 以下の血清 GH 値を示す98検体および1 ng/ml以上の381検体について本測定法と EIA およ

びダイナボット社の RIA キットと比較したところ、きわめて高い相関が得られた。したがって測定値についても低・中・高濃度のいずれも十分信頼できると結論される。

本測定法は、20K GH との交差反応を全く認めなかった。ヒト流血中には20K GH 以外にもいろいろな GH variants が存在する⁴⁾と報告されている。使っているモノクローナル抗体やポリクローナル抗体の GH variants などに対する特異性の違いにより GH の測定値が異なる可能性³⁾が指摘されており、注意を要する。

本測定法の臨床応用の1つとして、基礎血清 GH 値を測定した。正常成人の早朝安静時の血清 GH 値は、平均男性 0.21 ng/ml 女性 0.65 ng/ml であり、男性の約半数、女性の約20%が 0.2 ng/ml 以下の値を示した。この結果は、EIA による Hashida らの報告⁹⁾とよく一致した。また女性の方が男性より GH 基礎値が高く、随時血中 GH 値や24時間平均血中 GH 値が女性において高いとする RIA の報告⁶⁾¹²⁾とも一致した。性周期に伴う変動などの詳細な検討が必要である。

下垂体機能低下症の基礎血清 GH 値は低値を示した。しかし個々の例において正常人と重なりを認め、正常人で血中 GH が著明な日内変動を示すことから、基礎値の1回測定のみで下垂体機能低下症を鑑別することは困難であった。視床下部性下垂体機能低下症においてインスリン低血糖後の GH 増加は抑制されたが GHRH 負荷後 GH は軽度増加反応を示した。一方 Sheehan 症候群では EIA による報告⁹⁾¹⁴⁾と同様、増加反応は認められなかった。したがって、本測定法により低濃度域における GH 分泌動態が観察でき、視床下部障害の診断に有用であると考えられる。

糖負荷により GH 分泌が抑制されること¹⁷⁾はよく知られている。正常人において糖負荷時 GH は RIA 法で 2.5 ng/ml 以下¹⁹⁾、2.0 ng/ml 以下¹⁸⁾、1.0 ng/ml 以下¹⁵⁾に抑制されると報告されている。今回の正常対象群では全例 0.5 ng/ml 以下に抑制された。EIA による多数例 (79例) の検討¹¹⁾では76例において GH が 0.65 ng/ml 以下に抑制され、糖負荷時の GH 値が 1 ng/ml 以上の例は1例のみであった。

未治療先端巨大症において糖負荷により GH は抑制されないが、手術後9例中6例で正常範囲に抑制された。この抑制群において術前に認められた TRH に対する増加反応の消失、血中 IGF-1 値の正常化が認められた。最近さらに生理的 GH 分泌動態を検討し、これらの抑制群において日中の GH 底値はきわめて低く大きなパルス状分泌が回復していることを見出した (服部、島津: 未発表データ)。活動性先端巨大症でみられるドーパミン負荷による GH 抑制²⁾およびドーパミン注入中止後の反跳的增加²⁰⁾が術後も引き続き認められる例では、糖負荷による GH 分泌の抑制が認められなかった。したがって、経口糖負荷による GH 分泌の抑制は術後における先端巨大症の治療効果判定に有用であると考えられる。

結 語

IRMA によるヒト成長ホルモン (GH) の高感度測定法の基礎的検討と臨床応用を試みた。本測定法の最小検出感度は 0.05 ng/ml であり、特異性、再現性、精度、正確度についていずれも満足すべき成績が得られた。測定時間が短く操作の簡便性に優れていた。本測定法により低濃度域における GH 分泌動態の観察が可能となった。経口糖負荷による GH 分泌の抑制底値が明らかになり、先端巨大症の治療効果判定に応用できる可能性が示された。以上の成績から、本測定法は視床下部下垂体機能障害の病態診断に有用であると結論される。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励(A) 63770849, 01770856ならびに平成元年度成長科学協会研究補助金によった。

文 献

- 1) Arafah, D.M., Brodkey, J.S., Kaufman, B., Velasco, M., Manni, A. and Pearson, O.H.: Transsphenoidal microsurgery in the treatment of acromegaly and gigantism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 578—585, 1980.
- 2) Cammanni, F., Massara, L., Rosatello, A. and Molinatti, G.M.: Effect of dopamine on plasma growth hormone and prolactin levels in normal and acromegalic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 465—473, 1977.
- 3) Celniker, A.C., Chen, A.B., Wert, R.M.Jr. and Sherman, B.M.: Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 63: 469—476, 1989.
- 4) Chawla, R.K., Parks, J.S. and Rudman, D.: Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects. *Annu. Rev. Med.*, 34: 519—547, 1983.
- 5) Earll, J.M., Sparks, L.C. and Forsham, P.H.: Glucose suppression of serum growth hormone in the diagnosis of acromegaly. *J. Amer. Med. Ass.*, 201: 628—630, 1967.
- 6) Frants, A.G. and Rabkin, M.T.: Effects of estrogen and sex difference on secretion of human growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 25: 1470—1480, 1965.
- 7) Hashida, S., Nakagawa, K., Yoshitake, S., Imagawa, H., Ishikawa, E., Endo, Y., Ohtaki, S., Ichioka, Y. and Nakajima, K.: A highly sensitive sandwich enzyme immunoassay of human growth hormone in serum using affinity-purified anti-human growth hormone Fab'-horseradish peroxidase conjugate. *Anal. Lett.*, 16(B1): 31—44, 1983.
- 8) Hashida, S., Nakagawa, K., Imagawa, M., Inoue, S., Yoshitake, S., Ishikawa, E., Endo, Y., Ohtaki, S., Ichioka, Y. and Nakajima, K.: Use of inorganic salts to minimize serum interference in a sandwich enzyme immunoassay for human growth hormone using Fab'-horseradish peroxidase conjugate. *Clin. Chim. Acta.*, 135: 263—273, 1983.
- 9) Hashida, S., Ishikawa, E., Kato, Y., Imura, H., Mohri, Z. and Murakami, Y.: Human growth hormone (hGH) in urine and its correlation to serum hGH examined by a highly sensitive sandwich enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta.*, 162: 229—235, 1987.
- 10) 服部尚樹, 加藤 譲, 村上宣男, 越山裕行, 井上達秀, 井村裕夫, : 超高感度の酵素抗体法(EIA)による尿中ヒト成長ホルモン(hGH)測定に関する基礎的検討. *日内分泌会誌*, 64: 78—92, 1988.
- 11) Hattori, N., Shimatsu, A., Kato, Y., Koshiyama, H., Ishikawa, Y., Assadian, H., Tanoh, T., Nagao, M. and Imura, H.: Growth hormone responses to oral glucose loading measured by highly sensitive enzyme immunoassay in normal subjects and patients with glucose intolerance and acromegaly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 70: 771—776, 1990.
- 12) Ho, K.Y., Evans, W.S., Blizzard, R.M., Veldhuis, J.D., Kaiser, D.L. and Thorner, M.O.: Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: Importance of endogenous estradiol concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 64: 51—58, 1987.

- 13) 入江 実, 伊原利和, 清水隆之, 戸金隆三, 武田成正, 井上和子: 高感度 GH 測定 (IRMA 法) の臨床的応用. 厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班, 昭和 60 年度総括研究事業報告書, p.218-221, 1986.
- 14) 加藤 譲, 服部尚樹, 宗宮 基, 橋田誠一, 石川栄治, 毛利善一, 村上義昭: 高感度成長ホルモン (GH) 測定と臨床応用. ホルモンと臨床, 35: 699-705, 1987.
- 15) Miles, L.E.M. and Hales, L.N.: Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature*, 219: 186-189, 1968.
- 16) Miyamoto, C., Kim, D.H., Nakashima, K. and Furuichi, Y.: Production of a 20k human growth hormone in *E. coli* cells. *Endocrinol. Jap.*, 34 (Supple): 155, 1987.
- 17) Roth, J., Glick, S.M., Yallow, R.S. and Berson, S.A.: Secretion of human growth hormone: physiologic and experimental modification. *Metabolism*, 12: 577-579, 1963.
- 18) Schuster, L.D., Bantle, J.P., Oppenheimer, J.H. and Seljeskog, E.L.: Acromegaly: reassessment of the long term therapeutic effectiveness of transsphenoidal pituitary surgery. *Ann. Intern. Med.*, 95: 172-174, 1981.
- 19) Serri, O., Somma, M. and Comtois, R.: Acromegaly: biochemical assessment of cure after long term follow-up of transsphenoidal selective adenomectomy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61: 1185-1189, 1985.
- 20) 島津 章, 加藤 譲, 井村裕夫: 下垂体ホルモン機能検査法, 景山直樹, 井村裕夫編, 下垂体腺腫, 医学書院, 東京, 1986, p.104-124.
- 21) 高野加寿恵, 鎮目和夫, 肥塚直美, 浅川久美子, 田中 泉, 堀川玲子: 高感度 hGH 測定法 (IRMA) を用いた GH 分泌能試験の検討. 厚生省特定疾患間脳下垂体機能障害調査研究班, 昭和60年度総括研究事業報告書, p.213-217, 1986.
- 22) Utiger, R.D., Parker, M.L. and Daughaday, W.H.: Studies on human growth hormone. 1. A radioimmunoassay for human growth hormone. *J. Clin. Invest.*, 41: 254-261, 1962.
- (受付日: '90. 2. 20 特掲)