

血漿および尿中遊離 Cortisol と 11-deoxycortisol の radioimmunoassay (RIA) による下垂体副腎皮質機能の診断

東京女子医科大学内科学教室 (主任: 鎮目和夫教授)

大学院学生 小 田 桐 恵 美
オ タ キリ エ ミ

(受付 昭和50年3月10日)

Use of Radioimmunoassay of Cortisol and Deoxycortisol in Plasma and Urine for the Diagnosis of the Pituitary Adrenocortical Axis.

Emi ODAGIRI, M.D.

Department of Internal Medicine (Director: Prof. Kazuo SHIZUME)

Tokyo Women's Medical College

Radioimmunoassay (RIA) of cortisol (F) and 11-deoxycortisol (S) in plasma and urine were developed and these methods were applied for the diagnosis of pituitary-adrenocortical disorders.

In order to prepare antibodies against F and S, F-21-hemisuccinate bovine serum albumin (BSA) and S-3-O-carboxymethylloxime (S-3-O)-BSA were synthesized according to the method of Erlanger et al.

After extracting F and S from plasma and urine samples with methylene chloride, aliquots were used directly for RIA in routine analysis.

A small Sephadex LH-20-column (0.8 × 8 cm) was used to separate F and S for further purification when necessary.

Mean plasma F level at 9 a.m. was $14.6 \pm 9.8 \mu\text{g/dl}$ and plasma S was not detectable in normal subjects.

Mean urinary excretions of free F and S were 50.2 ± 94.0 and $1.5 \pm 5.2 \mu\text{g/24 hr}$ respectively in normal subjects at rest.

As urinary free F excretion increased 6 to 80 folds in Cushing's syndrome compared with normal subjects, measurement of urinary free F excretion was of great diagnostic value for hypercortisolism.

The author established a new ACTH test which uses measurement of urinary free F as indicator.

In normal subjects, the mean urinary free F in 3 hour period increased from 28.1 ± 22.4 to $117.0 \pm 70.2 \mu\text{g}$, and from 33.2 ± 29.8 to $218.1 \pm 14.8 \mu\text{g}$ after intravenous injections of GIy^1 -ACTH amide 0.35 mg and β^{1-24} ACTH 0.25 mg respectively.

However it did not increase in patients with hypopituitarism, Addison disease and in patients who were treated with a large amount of prednisolone for a long period. These results correlated well with

plasma F responses to ACTH.

A rapid metyrapone test was established giving 1.5 g of metyrapone orally as a single dose early in the morning and drawing blood before administration and every 2 hours after metyrapone administration until 6 hours.

In normal subjects and Cushing's syndrome due to bilateral adrenocortical hyperplasia, the mean plasma F level decreased after 2 hours, then began to increase and reached the control level after 6 hours. On the contrary in the patient with Cushing's syndrome due to adrenal adenoma, plasma F level decreased gradually throughout 6 hours of studies. Plasma S level increased gradually until 6 hours in the normal subjects. In the patients with Cushing's syndrome due to adrenocortical hyperplasia, hyperresponse of plasma S was observed, while a low response was seen in patients with Cushing's syndrome due to adrenal adenoma.

In the standard metyrapone test, half a gram of metyrapone was given orally every 4 hours for 2 days. 24 hour urine was collected for 4 days, before, after and during 2 days of metyrapone administration. Urinary 17-OHCS, free F and free S excretions were measured. In patients with Cushing's syndrome due to adrenocortical hyperplasia, urinary free F decreased during metyrapone administration, but returned to high level on the day after cessation of metyrapone administration. On the contrary, in patients with Cushing's syndrome due to adrenal adenoma, urinary free F decreased during and after cessation of metyrapone administration. The increase of urinary free S remained within normal limit in patients with Cushing's syndrome due to hyperplasia, while low in patients with Cushing's syndrome due to adrenal adenoma.

Thus, the measurement of plasma F and S levels in the rapid metyrapone test and urinary excretions of free F and S in the standard metyrapone test were considered to be of great value for differential diagnosis in various Cushing's syndromes.

内容目次

I. 緒言

II. 方法

- 1) 抗血清
- 2) 抗原
- 3) 血漿および尿中遊離 F, S の測定法
 - a) 抽出, 精製
 - b) radioimmunoassay(RIA)

III. 結果

1. base line (基礎値)
 - a) 血漿 cortisol(F)
 - b) 尿中遊離 cortisol(F)
 - c) 血漿 11-deoxycortisol(S)
 - d) 尿中遊離 11-deoxycortisol(S)
2. ACTH試験
 - a) ACTH試験における尿中遊離 F の反応
 - b) ACTH試験における血漿 F の反応

3. Metopirone 試験

- a) ラピッド Metopirone 試験
- b) 標準 Metopirone 試験

IV. 考察

- V. 結語
- 文献

I. 緒言

われわれは Erlanger¹⁾らの方法に基づいて作製したステロイドと蛋白質との縮合物をウサギに注射して作った抗血清を用いて, 血漿 cortisol (以下 F) と F の前駆物質である 11-deoxycortisol (以下 S), また尿中遊離 F および S の R I A を確立し, 正常者ならびに諸疾患においてこれらのホルモンを測定した. さらに, 下垂体副腎皮質疾患について, 基礎値ならびに ACTH 試験や Metopirone 試験を行なった際の, 血中, 尿中のこれら

のホルモンの反応をしらべ、副腎皮質予備能、下垂体ACTH系予備能の診断の確立を旨とした。特にCushing症候群のMetopirone試験における血中、尿中のF,SはCushing症候群の病因により興味ある変動を示し、鑑別診断に極めて有効であった。

II. 方法

1) 抗血清

F,Sの抗血清は、Erlanger¹⁾らの方法に準じて各々cortisol-21-hemisuccinate-bovine serum albumin (BSA), 11-deoxycortisol-3-oxime-BSAをウサギに注射して作製したもの²⁾を用いた。前者は10,000倍、後者は500倍に希釈して使用した。これらの抗血清の特異性を検討したところ、表1に示したように、cortisol-21-hemisuccinate抗

表1 F-21-Suc 抗体および S-3-O 抗体の特異性

ステロイド	交叉率%	
	Cortisol-21-Suc 抗体	Deoxycortisol-3-Oxime抗体
Cortisol (F)	100.0	<0.01
Deoxycortisol (S)	52.9	100.0
Deoxycorticosterone (DOC)	12.8	40.9
Corticosterone (B)	18.0	16.0
Aldosterone (Ald)	4.2	20.3
THF*	<0.01	<0.01
THS**	<0.01	<0.01
THE***	<0.01	<0.01

* tetrahydrocortisol

** tetrahydrodeoxycortisol

*** tetrahydrocortisone

体は、Sとの交叉は52.9%だったが、deoxycorticosterone (DOC), corticosterone (B)とはそれぞれ12.8%, 18%と低く、THF, THS, THEとの交叉は0.01%以下であった。一方、11-deoxycortisol-3-oxime抗体はFとの交叉は0.01%以下と低く、DOCと40.9%, Bと16%, aldosterone (Ald)と20.3%交叉したが、THF, THS, THEとは交叉しなかつた。

2) 抗原

Fは $1,2\text{-}^3\text{H-F}$ (New England Nuclea社, 比放射能45 Ci/mM), Sは $1,2\text{-}^3\text{H-S}$ (New England Nuclea社, 比放射能35 Ci/mM)を薄層クロマトグラフィー(Kodak6060, 展開液ベンゼン:メタノール=85:15)にて純化したものを使用した。

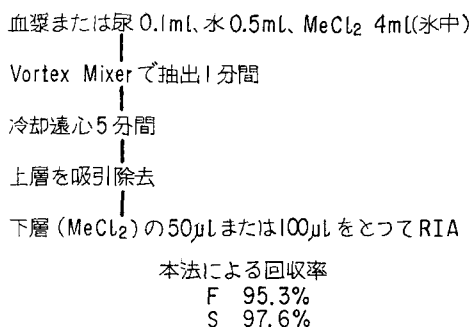


図1. 血漿および尿中F, Sの抽出法

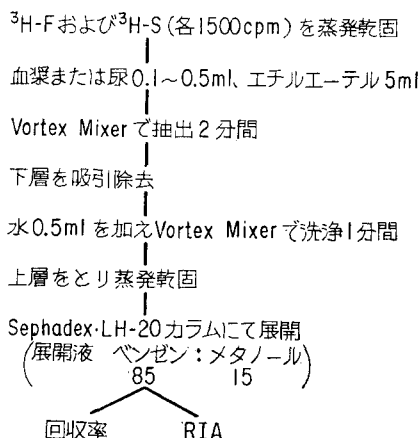


図2 血漿および尿中F, Sの抽出と Sephadex LH-20カラムによる純化

3) 血漿および尿中遊離F,Sの測定

a) 抽出, 精製

血漿および尿中遊離F,Sの抽出は図1に示すごとく、試料100μl(高値が予想される場合には25~50μl)に水0.5mlを加え、氷中で4mlのジクロロメタンで1回抽出した。本法における回収率はF:95.3%, S:97.6%であった。ルーチンの抽出は上記の方法によつたが、これら抗血清は特異性に多少の問題があるので、必要に応じて以下のごとく精製も行なつた。すなわち図2に示すごとく、まず抽出管に回収率補正のため $^3\text{H-F}$ および $^3\text{H-S}$ (各1,500cpm)を加え、蒸発乾固した後、血漿または尿を0.1~0.5ml加え、エチルエーテル5mlにて抽出し、水0.5mlで洗浄し、エーテル層を蒸発乾固した後、展開液(ベンゼン:メタノール=85:15)0.1mlに溶出して、Sephadex LH-20カラムにて展開した。なお Sephadex LH-20 カラムは、Sephadex LH-20 をベ

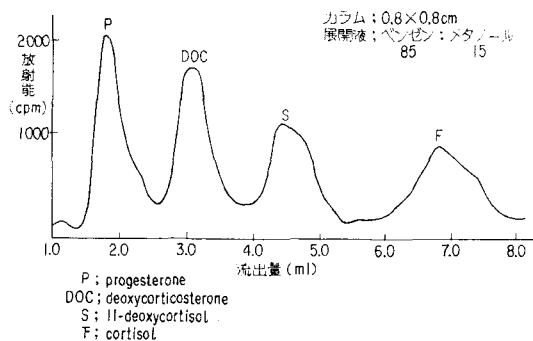


図3. Sephadex LH-20 カラムによるステロイドホルモンの分離

ンゼン:メタノール85:15にて一晩膨潤させ、内径8mmのマイクロカラムに使用直前に8cmの高さにつめ、同溶媒で数回洗浄した後使用した。Sephadex LH-20 カラムによるステロイドホルモンの分離は図3に示すごとくで、progesterone (P), DOC, S, F の順に溶出された。S分画として4.0ml~5.4ml (1.4ml), F分画として6.2ml~8.0ml (1.8ml) をとり、各々半量は回収率の補正に、残りの一部をRIAに使用した。

b) RIA

ルーチンの抽出法の場合には、抽出液50または100 μ lを用い、Sephadex LH-20 カラムによる抽出法の場合には、FのRIAにはF分画の20~50 μ l, SのRIAにはS分画の20~700 μ lの溶出液を用いた。これらの溶出液に2,000~3,000cpm/50 μ lの 3 H-Fまたは 3 H-Sを

加え蒸発乾固した後、抗血清250 μ l (標準希釈液は0.05 M borate buffer pH 8.0 50mlにBSAを0.2%の割合で溶解し、さらに10%ヒト γ -グロブリン (h- γ G) 300 μ lを加えたもの)を加え、室温で90分間 incubate した。bound (B) と free (F) の分離には飽和硫酸250 μ lを加え、室温に10分間放置した後、上清 (F) 200 μ l をとり、液体シンチレーター10ml (組成はトルエン500ml, メタノール10ml, PPO 2.5g)を加え、count F/T (total) を求めた。このようにして得られたFおよびSの標準曲線を図4に示した。

III. 結果

1. 基礎値

a) 血漿 F: 図5に示したように、正常者52例における早朝空腹時の基礎値は14.6 \pm 9.8 μ g/dl (mean \pm 2SD以下同様)であり、Cushing症候群6例 (副腎皮質過形成4例, 副腎腺腫2例) 中5例で高値、1例で正常上界であつたが、この1例は副腎皮質過形成例であり、日内変動は消失していた。異所性ACTH産生腫瘍 (大腸の腺癌) の1例では85.5 μ g/dlと著明な高値を示し、Addison病8例、Sheehan 症候群4例では著明な低値を示した。下垂体性小人症は12例中4例 (1/3) で低値であり、このうちラビッド Metopirone 試験を行なつた10例中4例でACTH系予備能低下が確認された。末端肥大症4例、神経性食思不振症3例、性器發育不全3例では正常値であり、ステロ

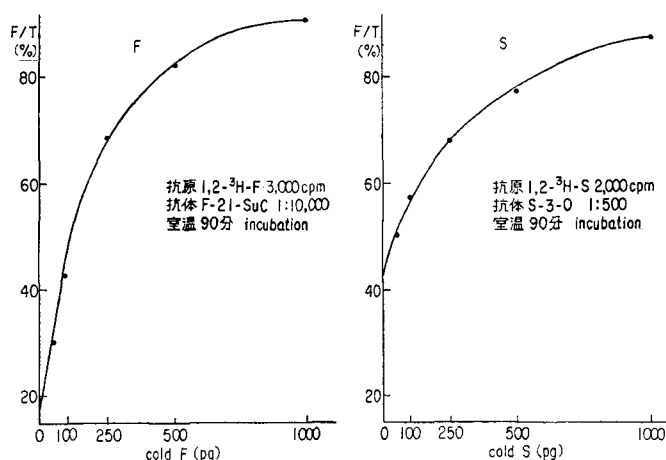


図4. FおよびSの標準曲線

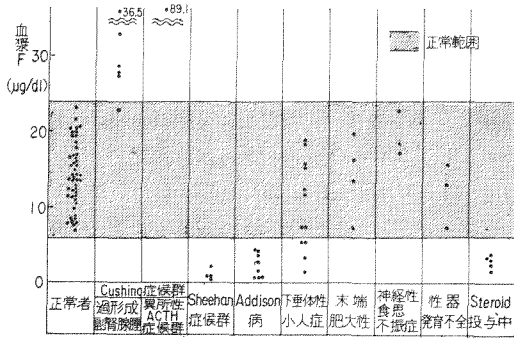


図5. 正常者および諸種疾患における血漿 F (µg/dl)

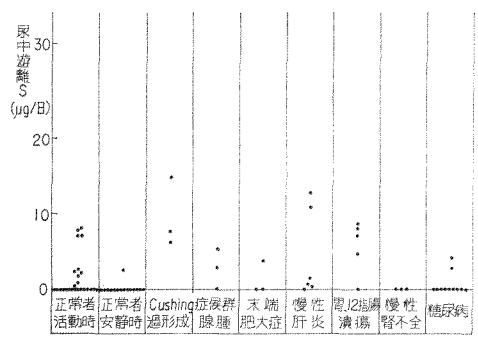


図7 正常者および諸種疾患における尿中遊離 S (µg/日)

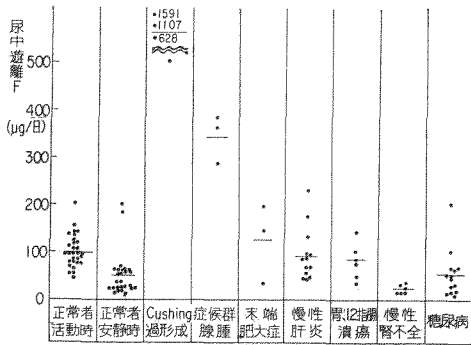


図6. 正常者および諸種疾患における尿中遊離 F (µg/日)

イド投与中の5例では低値であった。

b) 尿中遊離 F: 図6に示したように、24時間尿中遊離 F の基礎値は、正常活動者29例では99.3 ± 69.8 µg/日と正常安静者26例の50.2 ± 94.0 µg/日より明らかに高値を示した。副腎皮質過形成による Cushing 症候群4例では平均 823.0 µg/日と著明な高値を示し、副腎腺腫による3例でも平均 340.3 µg/日と高く、異所性 ACTH 産生腫瘍1例では、4,395.9 µg/日と異常高値を示した。慢性肝炎13例、胃、12指腸潰瘍6例はでは安静時にさかかわらずそれぞれ93.2 ± 104.4 µg/日、83.7 ± 1.6 µg/日と正常安静者に比べやや高い値を示した。慢性腎不全6例では23.7 ± 20.0 µg/日と低く、糖尿病14例では54.7 ± 100.8 µg/日と正常安静者に有意の差はみられなかった。

c) 血漿 S: 基礎値は正常者ならびに他疾患で、測定感度以下であったが、異所性 ACTH 産生腫

瘍では 3.3 µg/dl であった。

d) 尿中遊離 S: 図7に示したように、正常安静者15例中14例で検出不能であったが、1例で 2.8 µg/日を示した。正常活動者25例中約2/3の例で検出不能であったが、残り1/3の基礎値は 1.5 ± 5.2 µg/日であった。Cushing症候群では6例中5例で検出可能で、尿中遊離 F と同様、副腎皮質過形成によるものが副腎腺腫によるものよりやや高い値を示し、各々平均 9.5 µg/日、2.8 µg/日であった。慢性肝炎6例、胃、12指腸潰瘍5例中4例では安静時にもかかわらず、各々 4.3 ± 11.8 µg/日、5.8 ± 7.2 µg/日と高値を示した。慢性腎不全、糖尿病では、ほとんど検出不能であった。

2. ACTH 試験

検査法は Gly¹-ACTH(1-18)amide (以下 1-18 ACTH) 0.35mg または β¹⁻²⁴ ACTH (以下 1-24 ACTH) 0.25mg を1回静注し、前後の3時間尿 (正常者は6時間尿まで) および同時に30分おきに 180分まで経時的に採血した血漿中の F を測定し、両者の相関をしらべた。

a) ACTH 試験における尿中遊離 F の反応

1-18 ACTH 試験では正常者15例の3時間尿中遊離 F の負荷前値は 28.1 ± 22.4 µg で、負荷後3時間尿では 117.0 ± 70.2 µg と平均 4.2倍の増加を示したが、6時間後には 19.4 ± 13.6 µg と負荷前値より低下した。下垂体副腎皮質機能低下症6例では、前値 2.3 ± 3.4 µg と低く、負荷後も 2.6 ± 5.6 µg と無反応であった。ステロイド長期投

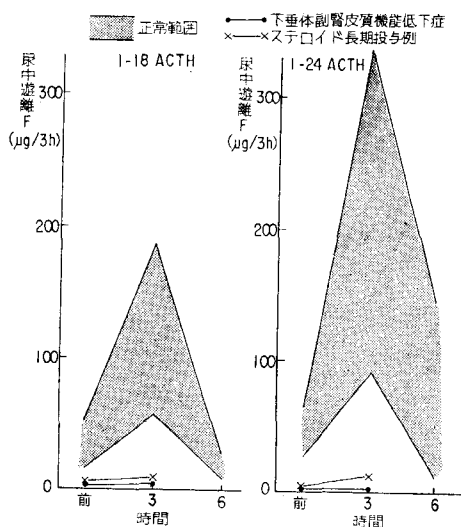


図8 ACTH試験における尿中遊離Fの反応 ($\mu\text{g}/3\text{h}$)

与例5例では、負荷前値 $4.5 \pm 4.6 \mu\text{g}$ と低かつたが、負荷後 $6.0 \pm 2.4 \mu\text{g}$ と低反応に止まつた。

1-24 ACTH試験では、正常者9例の負荷前の3時間尿中遊離Fは $33.2 \pm 29.8 \mu\text{g}$ で、負荷後 $218.1 \pm 148.2 \mu\text{g}$ と平均6.3倍の増加を示し、6時間後でも $66.6 \pm 102.8 \mu\text{g}$ と負荷前値より高値を示した。下垂体副腎皮質機能低下症4例では、前値 $1.2 \pm 1.4 \mu\text{g}$ と低く、負荷後も $2.2 \pm 2.0 \mu\text{g}$ と無反応であつた。ステロイド長期投与例5

例では、前値 $5.0 \pm 5.0 \mu\text{g}$ と低く、負荷後も $11.9 \pm 6.4 \mu\text{g}$ と低反応であつた。

b) ACTH試験における血漿Fの反応

1-18 ACTH試験では正常者15例の血漿Fの前値は $16.6 \pm 6.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、peak値は負荷後60分に認められ $32.5 \pm 6.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、平均2.0倍の増加を示した。下垂体副腎皮質機能低下症6例では、前値 $1.6 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、負荷後60分でも $1.8 \pm 2.6 \mu\text{g}/\text{dl}$ と無反応。ステロイド長期投与例5例の前値は $2.0 \pm 1.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ で、負荷後60分のpeak値は $5.0 \pm 5.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ と低反応に止つた。

1-24 ACTH試験では正常者9例の負荷前値は $13.3 \pm 4.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、peak値は120分に認められ $36.3 \pm 14.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、平均2.7倍の増加を示した。下垂体副腎皮質機能低下症4例では前値 $1.5 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、負荷後120分でも $1.8 \pm 1.2 \mu\text{g}/\text{dl}$ と無反応。ステロイド長期投与例5例の前値は $2.1 \pm 2.0 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、負荷後120分のpeak値も $8.4 \pm 8.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ と低反応であつた。

3. Metopirone 試験

a) ラピッド Metopirone 試験

方法は早朝空腹時に前値を採血後、スナックと共に Metopirone 1.5 g, アルミゲル 1.0 g を経口投与し、2, 4, 6時間後に採血し、血漿Fお

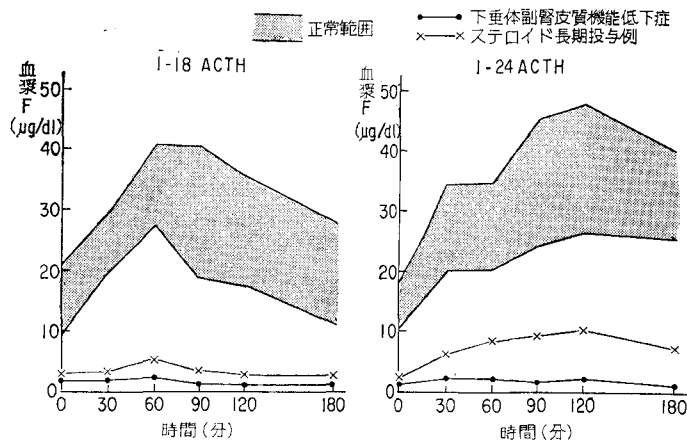


図9. ACTH試験における血漿Fの反応 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)

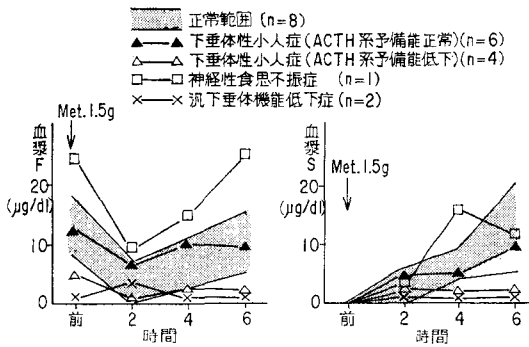


図10. 間脳下垂体疾患のラビット Met. 試験における血漿 F および S の反応

および S を測定した。正常者 8 例における血漿 F, S の反応は図10の shadow に示した。まず正常者の血漿 F の負荷前値は $14.1 \pm 11.2 \mu\text{g/dl}$ であり、Metopirone 投与 2 時間後は $4.2 \pm 4.8 \mu\text{g/dl}$ に下降し、4 時間後 $5.8 \pm 6.0 \mu\text{g/dl}$ 、6 時間後 $10.0 \pm 6.8 \mu\text{g/dl}$ と徐々に上昇した。一方、血漿 S は前値は測定感度以下であったが、Metopirone 投与後 2 時間目に $3.2 \pm 3.6 \mu\text{g/dl}$ 、4 時間後 $7.3 \pm 3.6 \mu\text{g/dl}$ 、6 時間後 $9.3 \pm 9.8 \mu\text{g/dl}$ と徐々に上昇した。間脳下垂体疾患のラビット Metopirone 試験の結果を図10に示した。下垂体性小人症10例中4例、汎下垂体機能低下症2例で低反応であった。神経性食思不振症1例では、血漿 F は高反応であ

つたが、血漿 S はほぼ正常反応であった。

Cushing 症候群におけるラビット Metopirone 試験時の血漿 F および S の反応は Cushing 症候群の病因により異なつた反応態度を示した。まず Sephadex LH-20 カラムを用いなかつた場合の測定法での結果を図11に示した。すなわち副腎皮質過形成による Cushing 症候群 4 例では、まず血漿 F の前値は平均 $27.7 \mu\text{g/dl}$ と高く、Metopirone 負荷 2 時間後に $10.2 \mu\text{g/dl}$ 、4 時間後 $15.3 \mu\text{g/dl}$ 、6 時間後 $22.9 \mu\text{g/dl}$ と前値は高値であったが、正常者と同様に 4 時間以降は反応性増加のパターンを示した。一方、血漿 S は前値は測定感度以下であったが、2 時間後に平均 $8.7 \mu\text{g/dl}$ 、4 時間後に $19.7 \mu\text{g/dl}$ 、6 時間後に $20.4 \mu\text{g/dl}$ と徐々に上昇した。副腎腺腫による Cushing 症候群 3 例では、血漿 F は前値 $28.7 \mu\text{g/dl}$ と高かつたが、Metopirone 投与後 2 時間目に $15.6 \mu\text{g/dl}$ 、4 時間後、 $9.4 \mu\text{g/dl}$ 、6 時間後 $10.2 \mu\text{g/dl}$ と、4 時間以降の反応性増加はみられなかつた。血漿 S は前値測定感度以下であり、2、4、6 時間後も各々 1.0、0.9、2.1 $\mu\text{g/dl}$ と正常に比して殆ど反応はみられなかつた。異所性 ACTH 症候群 1 例では、血漿 F は前値 $89.1 \mu\text{g/dl}$ と著明に高く、2、4、6 時間と徐々に下降し、副腎腺腫と同様のパターンを示したが、血漿 S は前値 $3.3 \mu\text{g/dl}$ と高く、2、4、時

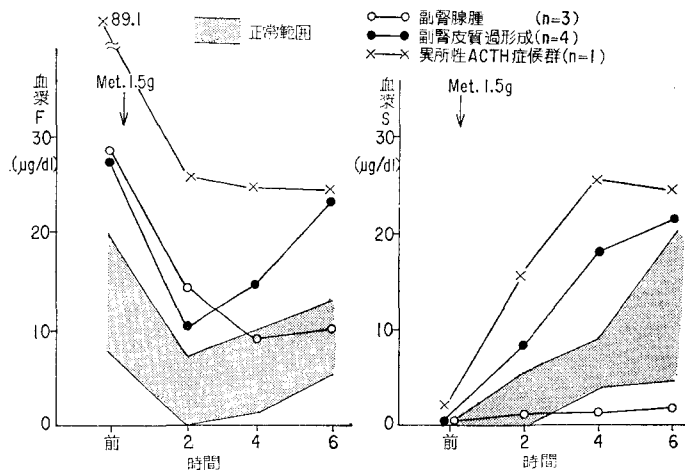


図11. Cushing 症候群のラビット Metopirone 試験における血漿 F および S の反応 (カラム前)

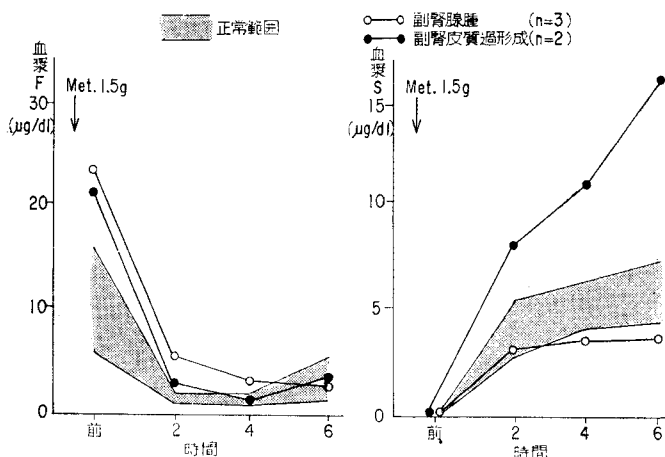


図12 Cushing 症候群のラビッド Metopirone 試験における血漿 F および S の反応 (カラム後)

間と上昇し、6時間後も $24.5\mu\text{g/dl}$ と依然高く副腎皮質過形成と同様のパターンを示した。

一方、これらの検体を Sephadex LH-20カラムによる精製を行なった場合の結果を図12に示した。まず正常者4例の血漿Fの前値は $9.6\pm 8.2\mu\text{g/dl}$ で、Metopirone投与後2時目に $1.3\pm 0.6\mu\text{g/dl}$ に下降し、4時間目 $1.5\pm 1.0\mu\text{g/dl}$ 、6時間目 $3.8\pm 3.4\mu\text{g/dl}$ とわずかに上昇したが、カラムを用いなかつた場合より低値であり、この差は一部はF抗体とSとの交叉反応によるものと考えられた。一方、血漿Sは前値 $167.7\pm 114.2\text{ng/dl}$ であり、Metopirone投与後2時間目に $4.2\pm 2.4\mu\text{g/dl}$ 、4、6時間後に各々 $5.0\pm 2.0\mu\text{g/dl}$ 、 $5.5\pm 2.4\mu\text{g/dl}$ と徐々に増加し、カラムを用いなかつた場合と同様のパターンを示した。副腎皮質過形成によるCushing症候群2例の血漿Fの前値は平均 $20.3\mu\text{g/dl}$ と高く、2、4時間と下降し、6時間後に $2.9\mu\text{g/dl}$ とわずかに上昇し、正常者と同様のパターンを示した。血漿Sは前値平均 232.7ng/dl であり、2、4、6時間と急増し、カラムを用いなかつた場合と同様のパターンを示した。一方、副腎腺腫によるCushing症候群3例の血漿Fの前値は $24.4\mu\text{g/dl}$ と高かつたが、Metopirone投与後、2、4、6時間と徐々に下降

した。血漿Sは前値平均 439.3ng/dl であつたが、2時間後に $2.9\mu\text{g/dl}$ とやや増加するも、4、6時間と低反応にとどまつた。

b) 標準 Metopirone 試験

方法は Metopirone 1日3gを6分割で経口投与2日間行ない、投与中および投与前後の24時間の尿中17-OHCS、尿中遊離F、Sを測定した。

正常者における尿中ホルモンの反応を図13のshadowに示した。正常者3例の尿中17-OHCSは、前値 $4.3\pm 2.3\text{mg/m}^2/\text{日}$ で、Metopirone投与1、2日と増加し、投与中止後やや下降した。尿中遊離Fは前値 $82.3\pm 28.4\mu\text{g}/\text{日}$ で、Metopirone投与1日目は $74.3\pm 43.6\mu\text{g}/\text{日}$ と下降したが、2日目に $110.3\pm 56.8\mu\text{g}/\text{日}$ と上昇し、投与中止後は $189.0\pm 139.6\mu\text{g}/\text{日}$ とさらに上昇した。一方、尿中遊離Sは前値 $3.0\pm 8.6\mu\text{g}/\text{日}$ であつたが、Metopirone投与1、2日と各々 $24.3\pm 16.8\mu\text{g}/\text{日}$ 、 $72.1\pm 70.0\mu\text{g}/\text{日}$ と上昇し、投与中止後 $17.0\pm 13.2\mu\text{g}/\text{日}$ に下降した。

副腎皮質過形成によるCushing症候群5例では、尿中17-OHCSは前値 $11.6\pm 13.2\text{mg/m}^2/\text{日}$ と高値を示したが、Metopirone投与後のパターンは正常者と同様、投与1、2日目と上昇し、投与後下降した。尿中遊離Fは前値平均 $861.4\mu\text{g}/\text{日}$ と高

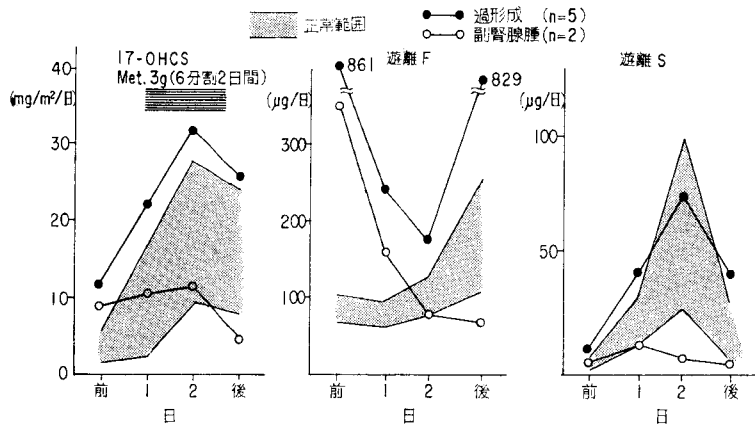


図13. Cushing 症候群の標準 Metopirone 試験における尿中ホルモンの反応 (カラム前)

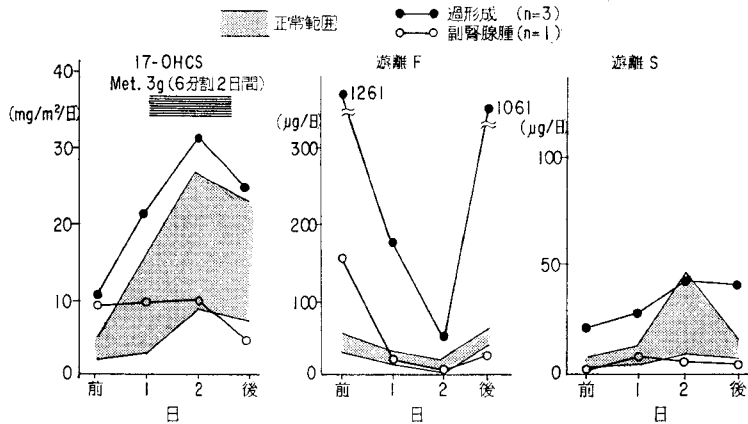


図14 Cushing 症候群の標準 Metopirone 試験における尿中ホルモンの反応 (カラム後)

く、Metopirone 投与1, 2日と徐々に下降したが、投与中止後は829.3 μ g/日とほぼ前値の高値に復した。一方、尿中遊離Sは前値平均18.4 μ g/日と正常よりやや高く、Metopirone投与1, 2日と上昇したが、正常反応であり、投与中止後38.0 μ g/日とやや高値を示した。

副腎腺腫によるCushing 症候群2例の尿中17-OHCSの前値は平均9.5mg/m²/日と高かったがMetopirone投与1, 2日目と無反応であり、投与後は6.1mg/m²/日と前値以下に下降した。尿中遊離Fの前値は平均363.6/日と高かったが、Metopirone投与後1, 2日と下降し、投与中止後も74.7 μ g/日とさらに下降した。尿中遊離Sの前値は平均

14.8 μ g/日と正常よりやや高く、Metopirone投与1, 2日目と無反応であり、中止後は7.7 μ g/日と前値より下降した。

これらの検体をSephadex LH-20カラムを用いて精製を行なった場合の測定結果を図14に示した。正常者3例の尿中遊離Fは前値44.5 \pm 27.6 μ g/日であり、Metopirone投与1日目14.4 \pm 11.4 μ g/日と下降し、2日目は10.3 \pm 7.4 μ g/日とさらに下降するが、中止後は44.6 \pm 16.2 μ g/日と上昇。尿中遊離Sは前値5.5 \pm 1.4 μ g/日であり、Metopirone投与1, 2日目と各々7.7 \pm 13.6 μ g/日、29.8 \pm 40.0 μ g/日に上昇し、投与中止後は14.3 \pm 15.0 μ g/日と下降した。

副腎皮質過形成による Cushing 症候群 3 例では尿中遊離 F は前値平均 1260.6 $\mu\text{g}/\text{日}$ と高く、Metopirone 投与 1, 2 日と下降したが、中止後は 1061.0 $\mu\text{g}/\text{日}$ とほぼ前値の高値に復し、カラムを用いながつた場合の測定と同様の結果が得られた。一方、尿中遊離 S は前値平均 22.0 $\mu\text{g}/\text{日}$ と高く、Metopirone 投与 1, 2 日と上昇し、中止後も 43.1 $\mu\text{g}/\text{日}$ と依然高値であつた。

副腎腺腫による Cushing 症候群 1 例では、尿中遊離 F は前値 149.6 $\mu\text{g}/\text{日}$ であり、Metopirone 投与 1, 2 日と下降し、中止後わずかに上昇するが、低反応にとどまつた。尿中遊離 S は前値 2.1 $\mu\text{g}/\text{日}$ と低く、Metopirone 投与 1 日目に 6.5 $\mu\text{g}/\text{日}$ とわずかに上昇するが、2 日目、投与中止後は下降した。

IV. 考 察

従来、F や S の測定法としては、比色法、蛍光比色法³⁾⁴⁾⁵⁾や competitive protein binding assay (CPBA)⁶⁾などが広く用いられてきたが、最近になりステロイドの測定にも R I A が応用され、より簡便迅速に血中、尿中値の測定が可能になりつつある。

cortisol-21-hemisuccinate-BSA を用いて抗体を作製し、血中、尿中の F の R I A を行なつた試みは報告がいくつかなされている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。われわれの用いた抗体は、S とは 52.9%とやや高い交叉率を示したが、D O C, B との交叉率は低く、血中、尿中での S, D O C, B のレベルを考えると、ルーチンの測定には 1 回抽出後直接 R I A が可能と思われた。しかし、負荷試験の際には S, D O C などが上昇する場合があります、測定の正確を期するためにはジクロルメタン抽出後、Sephadex LH-20 カラムによる純化が必要と思われた。Ruder⁷⁾らの抗体は S, 21-deoxycortisol などと 100%の交叉を示し、B, D O C などとも高い交叉を示した。彼らは血漿では、ジクロルメタンによる 1 回抽出で、尿ではステロイド以外の阻害因子を考慮してジクロルメタン抽出後、薄層クロマトグラフィー (T L C) にて純化して測定した。われわれ

も T L C を用いて検討したが、前後で測定成績に大差を認めず、T L C を用いるとブランク値が高くなることがあるので、ルーチンの測定には T L C による純化を省略した。Sephadex LH-20 カラムによるステロイドホルモンの分離、純化法は Newsome¹⁰⁾, 牧野⁸⁾らによつて行なわれているが、Newsome らは 1.0 \times 20~22cm の比較的長いカラムを用いて抽出した後 C P B A により、牧野らは 0.7 \times 2.0cm のマイクロカラムにより抽出した後、R I A により試料を測定し満足すべき結果を得た。

血漿 F は Cushing 症候群、異所性 A C T H 産生腫瘍では高く、Sheehan 症候群、Addison 病、ステロイド長期投与群では低く、疾患の病態をよく反映していた。しかし血漿 F には日内変動があり、しかも episodic に副腎から分泌されていることは Hellmann¹¹⁾ らにより報告され広く認められていることであり、1 回みの血漿 F の測定では時に診断を誤る可能性がある。また妊婦や¹²⁾¹³⁾estrogen 治療¹⁴⁾を行なつている患者では、血漿 F は C B G の増加のため異常高値を示すことはよく知られているが、このような状態では F の turn over rate はむしろ低下しており、副腎は機能亢進状態とはいえない。このような状態では尿中遊離 F は正常という報告が多く¹⁵⁾、血中値より尿中遊離値の方が副腎皮質機能をよく反映していると思われる。

尿中遊離 F は血漿遊離 F の直接の指標とされており、副腎皮質機能亢進状態では著明に増加しているので、17-OHCS, 17-KS, 17-KGS より副腎皮質機能亢進状態⁸⁾をよく反映することは 1959 年 Cope¹⁶⁾らにより報告されている。しかし尿中遊離 F の定量は手技が繁雑であり、長い間臨床応用されなかつたが、Murphy⁶⁾, Hsu¹⁷⁾らにより C P B A が開発され、比較的容易に測定が可能となつた。われわれは Ruder⁷⁾らの方法に準じて R I A により尿中遊離 F を極めて簡便、迅速に測定する方法を確立した。われわれの R I A による尿中遊離 F の測定成績は、正常安静者では 50.2 \pm 94.0 $\mu\text{g}/\text{日}$

表2 ACTH試験における尿中遊離ならびに血漿 Cortisol の増加量からみた判定基準

	前 値		1—18ACTH		1—24ACTH	
	尿中遊離 Cortisol ($\mu\text{g}/3\text{h}$)	血 漿 Cortisol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	尿中遊離 Cortisol ($\mu\text{g}/3\text{h}$)	血 漿 Cortisol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	尿中遊離 Cortisol ($\mu\text{g}/3\text{h}$)	血 漿 Cortisol ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
正 常 者	17.0~50.5 ($\pm 2\text{SD}$)	6~24 ($\pm 2\text{SD}$)	40以上	8以上	60以上	10以上
下垂体副腎皮質例 機能低下例	0.4~4.3	0.5~2.3	0~1.9	0~2.3	0.1~1.7	0~1.1
ステロイド 長期投与例	1.1~6.1	1.2~3.2	0~3.7	0.5~5.3	2.7~12.5	4.6~11.2

であり、Ruderらの $43 \pm 15 \mu\text{g}/\text{日}$ 、Murphyらの $0 \sim 108 \mu\text{g}/\text{日}$ （男子 $41 \pm 30 \mu\text{g}/\text{日}$ 、女子 $56 \pm 33 \mu\text{g}/\text{日}$ ）とよく一致した値が得られた。われわれの測定では、正常活動者は安静時にくらべ約2倍、胃、12指腸潰瘍では安静時にもかかわらず $83.7 \pm 71.6 \mu\text{g}/\text{日}$ と高い値が得られたのは、stressによる副腎皮質刺激状態を反映しているものと考えられた。また慢性肝炎では、 $93.2 \pm 104.4 \mu\text{g}/\text{日}$ と高値を示したのは、肝障害による血漿Fのグルクロン酸飽和型への転換の減少によるものと考えられた。Murphy¹⁸⁾によるとCushing症候群の尿中17-OHCSは正常者の約3倍ぐらの上昇を示したにすぎないが、尿中遊離Fは約8倍に増加していたと報告しており、われわれの経験したCushing症候群7例でも、尿中17-OHCSは正常の2~3倍であったのに対し、尿中遊離Fは6~80倍にも増加していた。さらに、われわれの経験したCushing症候群の1例は、血漿Fの日内変動は消失していたが、基礎値は正常であり、尿中遊離Fの測定で $710.3 \sim 1236.3 \mu\text{g}/\text{日}$ と異常高値を示したことがCushing症候群の診断を確実なものとした。Rosner¹⁹⁾らも軽度の副腎皮質機能亢進症状を示したCushing症候群の1例では、尿中17-OHCSは正常上昇であったが、尿中遊離Fは明らかに上昇していたと報告している。このように尿中遊離Fは、副腎皮質機能亢進状態を極めて鋭敏に反映するため、尿中17-OHCSより優れたparameterであるといえよう。われわれはこの点に着目して尿中遊離Fを指標としたACTH試験を試み、従来行なわれている血中コルチコイドを指標とした方法と比較検討した。われわれのACTH試験の結果を表2に示

した。正常者の負荷前の3時間尿中遊離Fは $17.0 \sim 50.5 \mu\text{g}$ であり、24時間尿中遊離Fよりかなり高値であるのは、採尿時間が $6 \sim 9 \text{ a.m.}$ という血漿Fの日内変動の高い時間帯のためと考えられた。1—18ACTH負荷後、正常者の尿中遊離Fは $40 \mu\text{g}$ 以上の増加を示したが、血漿Fは60分のpeak値でも平均 $8 \mu\text{g}/\text{dl}$ の増加に止まった。一方、1—24ACTH負荷後では、正常者の尿中遊離Fは $60 \mu\text{g}$ 以上の増加を示したのに対し、血漿Fは90分におけるpeak値でも $10 \mu\text{g}/\text{dl}$ の増加を示したのに止まった。下垂体副腎皮質機能低下症では、尿中遊離Fは前値 $0.4 \sim 4.3 \mu\text{g}$ と低値で1—18ACTH、1—24ACTH負荷後無反応であり、血漿Fも両試験で無反応であった。ステロイド長期投与例では尿中遊離Fは前値 $1.1 \sim 6.1 \mu\text{g}$ と低値であり、1—18ACTH、1—24ACTH負荷でわずかに尿中遊離Fは増加反応が認められたが、増加量は1—24ACTHの方が高かった。同じ傾向は血漿Fを指標とした際にも認められた。1—18ACTHと1—24ACTHに対する反応の差は、合成ACTH製剤の非活性化の速度の差と考えられ、一般にACTHの短鎖のものは早く非活性化される²⁰⁾といわれている。

尿中遊離Fを指標としたACTH試験の報告はないが、Kolanowski²¹⁾らは β^{1-24} ACTH 0.25mg を 500ml の5% glucoseにとかし、正常者16例に8時間にわたり点滴静注して、検査前、中、後の24時間尿をあつめ、尿中遊離FをCPBAにより測定した。それによると検査前の尿中遊離Fは $33.9 \pm 3.3 \mu\text{g}/24\text{hr}$ であったが、ACTH負荷中は $1316.7 \pm 120.6 \mu\text{g}/24\text{hr}$ と著明に増加し、検査

後は $21.4 \pm 3.7 \mu\text{g}/24\text{hr}$ に下降したと報告している。尿中遊離 F を指標とした A C T H 試験は蓄尿という手間はあがあるが、採血の必要がなく簡便であることと、血漿 F の場合と異なり一定時間の積分としての副腎皮質予備能を知ることができるなどの利点があり、今後さらに広い臨床応用が望まれる。

一方、11-deoxycortisol-3-oxime-BSA を用いて抗体を作製し、血漿 S の R I A を行なう試みは、阪本²²⁾らにより報告されているが、尿中遊離 S の R I A の報告はない。われわれの用いた抗体は、血中に大量に存在する F との交叉はほとんどなかったが、DOC, B, aldosterone と各々 40.9, 16.0, 20.3% の交叉を示したため、負荷試験の際には Sephadex LH-20 カラムによる純化を試みた。阪本らの作製した抗体は特異性が高く 17-OH-progesterone, DOC と 3.7%, B と 4.8% の交叉を示すのみで他は 1% 以下であり、Metopirone 投与後の血漿は抽出後直接 R I A が可能であつたと報告している。さらに Mahajan²³⁾ らは 11-deoxycortisol-21-hemisuccinate-BSA を用いて抗体を作製し、血漿 S の R I A を行ない報告している。この抗原は S の 21 位に B S A が結合しているので、この部の特異性が失われ、作製した抗血清は特異性が低下する可能性が考えられる。

血漿 S の基礎値は、試料を 0.1 ml 抽出して測定したわれわれの成績では、大部分の例で測定感度以下であつたが、異所性 A C T H 産生腫瘍の 1 例では $3.3 \mu\text{g}/\text{dl}$ と高値を示した。阪本ら²²⁾ は、血漿 0.1 ~ 1 ml を用いて Sephadex LH-20 カラムにて抽出後 R I A を行なつたところ、血漿 S の正常値は $49.7 \pm 19.8 \text{ng}/\text{dl}$ であつたと報告している。血漿 S の基礎値は 11 β -hydroxylase deficiency の患者で上昇がみられ診断的意義があるが、血漿 S の測定の臨床的意義は後述する Metopirone 試験における下垂体 A C T H 予備能診断にあるといえる。

一方、尿中遊離 S は試料を 0.1 ml 用いたわれわれの測定では、正常安静者の大部分の例で検出不能であり、正常活動者では $1.5 \pm 5.2 \mu\text{g}/\text{日}$ であ

つたが、安静者と活動者のこの差は不明である。尿中遊離 S の測定は Dässler²⁴⁾, Kolanowski²¹⁾ らにより報告されているのみである。特に Kolanowski はジクロロメタン抽出後、薄層クロマトグラフィにて純化して C P B A により測定したところ、正常者の尿中遊離 S は $0.07 \sim 0.85 \mu\text{g}/24\text{hr}$ であり、平均 $0.31 \pm 0.05 \mu\text{g}/24\text{hr}$ であつたと報告している。

Metopirone は副腎皮質での 11 β -hydroxylase の抑制剤であり、下垂体 A C T H 予備能を知る Metopirone 試験として広く臨床応用されている。検査方法は Liddle²⁵⁾ らにより最初に報告されたごとく Metopirone 3 ~ 4.5 g 1 日 6 分割経口投与し、投与前、中、後の尿中 17-OHCS を指標とする方法が一般的であるが、17-KGS, 11-DOCS²⁶⁾ などを指標とする方法もある。最近では血漿 S²³⁾²⁷⁾, 血漿 A C T H²⁸⁾²⁹⁾ を指標とする方法もあり、投与法も 3 g 2 日間経口投与や single dose test²⁷⁾ といわれる Metopirone 2.0 ~ 3.0 g を真夜中に 1 回投与する方法などがあり、一定していない。

われわれの行なつたラピッド Metopirone 試験は早朝に Metopirone 1.5 g を経口投与する single dose test である。正常者と副腎皮質過形成による Cushing 症候群における血漿 F は、Metopirone 投与後 2 時間目に最低を示し、その後徐々に上昇した。一方、副腎腺腫による Cushing 症候群では、Metopirone 投与後、血漿 F は 2, 4, 6 時間と下降をつづけた。一方、血漿 S は、正常者と副腎皮質過形成による Cushing 症候群では Metopirone 投与後、2, 4, 6 時間と上昇し、特に後者では過大反応を示した。一方、副腎腺腫による Cushing 症候群では、血漿 S は低いし無反応であつた。これらの検体を Sephadex LH-20 カラムによる純化を行なつたところ、血漿 F は正常者および過形成例では、純化前にくらべ、4, 6 時間後の rebound の上昇は少なくなつたが、反応の型は本質的には同様であつた。これに対して腺腫例では、カラム前と同様に、4, 6 時間も減少をつづけた。血漿 S の反応型は正常者、過形成例、腺腫

例ともに本質的に不変であつた。したがつてカラム使用前の Metopirone 投与血漿の F の反応性増加は一部は F 抗体の S との交叉によるものと考えられた。このように Metopirone 投与後の血漿 F, S の反応性は Cushing 症候群の病因により異なつた反応態度を示したので、ラピッド Metopirone 試験は Cushing 症候群の鑑別診断に有効な方法と思われた。われわれは Metopirone を早朝 1 回経口投与したが、Jubiz²⁸⁾ らは Metopirone 投与による血漿 A C T H の反応性には、circadian variation があり Metopirone を夜中に投与した方が朝に投与した場合より血漿 A C T H の反応性は大きく、血漿 F も同様の傾向がみられたと報告している。しかし、この際の血漿 S の反応性には Metopirone 投与時間による差がみられなかつたとしている。さらに Metopirone は消化器症状、血圧低下、めまい、などの副作用が強いことが知られており、検査は医師の管理下で行なうことが望ましく、外来にて行なえる本法はその点すぐれた方法といえよう。

Cushing 症候群の病因の違いによる Metopirone に対する反応性の差は、標準 Metopirone 試験ではさらに判然としている。正常者と副腎皮質過形成による Cushing 症候群では、尿中遊離 F は Metopirone 投与 1, 2 日と下降するが、投与中止後は rebound がみられたのに対し、腺腫例では中止後の rebound はみられなかつた。尿中遊離 S は過形成例では正常反応であつたが、腺腫例では無反応であつた。正常者と過形成例の Metopirone 中止後の尿中遊離 F の上昇は、Metopirone の副腎での 11 β -hydroxylation 阻害作用が低下ないし消失した後も過剰に分泌された A C T H が副腎を刺激して F を過剰に産生した結果と考えられるが、Metopirone には肝での enzyme system を阻害するという報告もあり³⁰⁾、F のグルクロン酸飽合型への転換の減少に伴なう血漿遊離 F の増加が尿中遊離 F の増加の一因となつていることも考えられる。このようないわゆる標準 Metopirone 試験を行ない尿中遊離 F, S を測定した報告は、Kolanowski²¹⁾ らにみられるのみである。彼らは、正常

者に Metopirone 750mg を 4 時間毎、48 時間経口投与し、Metopirone 投与前、中、後の 24 時間尿をジクロロメタンにて抽出した後、薄層クロマトグラフィーにて分離抽出し、尿中遊離 F, S を C P B A にて測定している。それによると尿中遊離 F は、前値 $35.6 \pm 8.4 \mu\text{g}/24\text{hr}$ から Metopirone 投与 1, 2 日と下降したが、投与後は前値の 2 倍に上昇した。一方、尿中遊離 S は前値 $0.55 \pm 0.15 \mu\text{g}/24\text{hr}$ から Metopirone 投与 1, 2 日と徐々に上昇したが、投与後は下降し、われわれの正常者例とよく一致した成績を報告している。Metopirone 投与中は血漿 S は上昇しているにもかかわらず、尿中遊離 S は総量で遊離 F よりはるかに低いのは、S の metabolic clearance rate が F より早いためと考えられる。Gold³¹⁾ らは 100mg の S を 0.9% 500ml の生理食塩水にて 30 分間注入し、S と F の血中での half life をみたところ、正常者では F は 96 分であつたのに対し、S は 42 分と短かく、一方、同時に測定したグルクロン酸飽合型は S では F の 5 倍にも達していた。このことは S は F よりはるかに早く、グルクロン酸型に転換してゆくことを意味し、尿中での遊離 S が Metopirone 試験の際、著明に増加しないことの説明となろう。

V. 結 語

血漿および尿中遊離 cortisol (F) と 11-deoxycortisol (S) の radioimmunoassay を確立し、臨床応用を図つた。

1) 尿中遊離 F の基礎値は正常安静者では $50.2 \pm 94.0 \mu\text{g}/\text{日}$ であり、正常活動者は安静者の約 2 倍を示した。胃、12 指腸潰瘍、慢性肝炎などでは、安静時にもかかわらず高値を示した。Cushing 症候群では尿中遊離 F は平均 $823.0 \mu\text{g}/\text{日}$ であり、正常静者の 6~80 倍に増加しており、診断に極めて有用であつた。また血漿 F の正常者の基礎値は $14.6 \pm 9.8 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、Cushing 症候群では $24 \mu\text{g}/\text{dl}$ 以上の高値、Addison 病、ステロイド長期投与例では低値を示し、診断に有用であつた。

2) 尿中遊離 F を指標とした A C T H 試験を行ない、従来行なわれている血漿 F を指標とした A

C T H試験と比較検討した。Gly¹-ACTH (1—18) amide 0.35mg 静注負荷時の正常者における尿中遊離 F は、前値28.1±22.4 μ g から負荷後 117.0±70.2 μ g と 4.2倍に上昇し、血漿 F は 16.6±6.8 μ g/dl から 32.5±6.4 μ g/dl と 2.0倍の増加を示した。下垂体副腎皮質機能低下症、ステロイド長期投与例では、尿中遊離 F、血漿 F は各々無反応、低反応に止まった。 β^{1-24} ACTH 0.25mg 静注負荷時の正常者における尿中遊離 F は、前値33.2±29.8 μ g から負荷後、218.1±148.2 μ g と 6.3倍、血漿 F は 13.3±4.8 μ g/dl から 36.3±14.0 μ g/dl と 2.7倍の増加を示した。下垂体副腎皮質機能低下症、ステロイド長期投与例では、尿中遊離 F、血漿 F は 1—18 A C T H 負荷時と同様各々無反応、低反応に止まった。尿中遊離 F を指標とした A C T H 試験は簡便であり、しかも一定時間の積分としての副腎皮質機能を知ることができるという利点があり、広く臨床応用がのぞまれる。

3) ラピッド Metopirone 試験および標準 Metopirone 試験を行ない、血漿 F, S, 尿中遊離 F, S を測定し、下垂体 A C T H 予備能の診断を目ざした。ラピッド Metopirone 試験における血漿 F は、正常者と副腎皮質過形成による Cushing 症候群では、Metopirone 投与後 2 時間で最低値を示したが、4, 6 時間と rebound の上昇を示した。一方、副腎腺腫による Cushing 症候群では、Metopirone 投与後、血漿 F は 2, 4, 6 時間後も下降をつづけた。血漿 S は正常者と過形成例では 2, 4, 6 時間と徐々に増加したが、腺腫例では無反応であった。

標準 Metopirone 試験では、尿中遊離 F は正常者と過形成例では Metopirone 投与後 1, 2 日と下降したが、投与中止後は rebound の上昇を示した。一方、腺腫例では尿中遊離 F は Metopirone 投与中低下したが、中止後の rebound はみられなかつた。尿中遊離 S は正常者と過形成例では Metopirone 投与 1, 2 日と増加し、中止後は下降したが、腺腫例では無反応であった。このように、ラピッド Metopirone 試験および標準 Metopirone 試験における血漿 F, S, 尿中遊離 F, S の反応

は、Cushing 症候群の病因により異なつた反応態度を示したので、鑑別診断上有用であつた。

本論文をご校閲頂きました鎮目和夫教授に深謝致します。

終始、ご指導賜わりかつご校閲頂きました出村博助教授および共同研究者各位に感謝致します。

本研究は第47回(1974年)日本内分泌学会総会にて口演発表した。

文 献

- 1) Erlanger, B.F., F. Borek, S.M., Beiser and S. Liebermann: J Biol Chem 234 1090 (1959)
- 2) 出村 博: 日内分泌誌 49 127 (1973)
- 3) Porter, C.C. and R.H. Silber: J Biol Chem 185 201 (1950)
- 4) Norymberski, J.K. et al.: Lancet 1 1276 (1953)
- 5) DeMoor, P. and O. Steeno: J Endocr 28 59 (1963)
- 6) Murphy, B.E., W. Engelberg. and C.J. Pattee: J Clin Endocrinol Metab 23 293 (1963)
- 7) Ruder, H.J., R.L. Guy and M.B. Lipsett: J Clin Endocrinol Metab 35 219 (1972)
- 8) 牧野拓雄: 日内分泌誌 49 1297 (1973)
- 9) 吉見輝也・遠藤治郎・立花清司: 日内分泌誌 49 325 (1973)
- 10) Newsome, H.H., A.S. Clements and E.H. Borum: J Clin Endocr 34 473 (1972)
- 11) Hellman, L.F., F. Nakada, J. Curti, E.D. Weitzman, J. Kream, H. Roffwarg, S. Ellman, D.K. Fusushima and T.F. Gallagher: J Clin Endocrinol Metab 30 411 (1970)
- 12) Migeon, C.J., J. Bertrand and P.E. Wall: J Clin Invest 36 1350 (1957)
- 13) Cohen, M., M. Stiefel, W.J. Reddy and J.C. Laidlan: J Clin Endocr 18 1076 (1958)
- 14) Mills, I.H., H.P. Schedl, P.S. Chen and F.C. Bartter: J Clin Endocr 20 515 (1960)
- 15) Grant, S.D., F. Pavlatos and P.H. Horsham: J Clin Endocr 25 1057 (1965)
- 16) Cope, C.L. and E.G. Black: Brit Med J 2 117 (1959)
- 17) Hsu, T.H. and T. Bledsoe: J Clin Endocr 30 443 (1970)
- 18) Murphy, B.E.: J Clin Endocrinol Metab 28 343 (1968)

- 19) **Rosner, J.M., J.J. Cos, E.D. Biglieri:** J Clin Endocr **23** 820 (1963)
 - 20) 田中 明・小田口州宏・古川隆善: 最近医学 25 474 (1969)
 - 21) **Kolanowski, J.:** J Steroid Biochem **5** 55 (1974)
 - 22) 阪本 登・松倉 茂・井村裕夫: 日内分泌誌 50 199 (1974)
 - 23) **Mahazan, D.K., J.D. Wahlen, F.H. Tyler and C.D. West:** Steroids **20** 609 (1972)
 - 24) **Dässler, C.G.:** Acta Endocr **61** 198 (1969)
 - 25) **Liddle, G.W., H.L. Estep, J.S. Kendall:** J Clin Endocr **19** 875 (1959)
 - 26) **Henke, W.J.:** J Clin Endocr **20** 1527 (1960)
 - 27) **Jubiz, W., A.W. Meikle, C.D. West and F.H. Tyler:** Arch Intern Med **125** 472 (1970)
 - 28) **Jubiz, W., S. Matsukura, A.W. Meikle, G. Harada, C.D. West and F.H. Tyler:** Arch Intern Med **125** 468 (1970)
 - 29) **Donald, R.A., E.A. Espiner and D.W. Beaven:** J Endocr **52** 517 (1972)
 - 30) **Szeberényi, S. and S. Garantini:** Biochem pharmacol **18** 927 (1969)
 - 31) **Gold, E.M.:** Proc Soc Exp Biol Med **103** 829 (1960)
-