

## 《使用経験》

## C ペプチドラジオイムノアッセイ法の基礎的臨床的検討

板津 武晴\* 柴田 温三\* 富田 明夫\*  
 内藤 敬子\*\* 奥田 剛\*\*\*

## はじめに

1967 年 Steiner ら<sup>1)</sup>によりインスリン前駆物質としてプロインスリンが発見され、その一次構造が明らかにされた<sup>2, 3)</sup>。プロインスリンは脾  $\beta$  細胞内でインスリンと C ペプチド(連結ペプチド)に分解されるが、成熟した分泌顆粒中にはインスリンと C ペプチドが等モルの割合で含まれることが報告された<sup>4, 5)</sup>。また、in vivo の実験でも、インスリン分泌刺戟によりインスリンと C ペプチドが等モルに脾  $\beta$  細胞から血流に放出されることが報告された<sup>2, 6)</sup>。プロインスリンの C ペプチド部分のアミノ酸構成には種属特異性が強いため<sup>6)</sup>、Melani らはヒト脾より抽出した C ペプチドを<sup>7)</sup>、兼子・矢内原らは合成ペプチドを<sup>8)</sup>抗原として抗ヒト C ペプチド抗血清を作成し、ヒト C ペプチドの radioimmunoassay (RIA) を確立した。最近、第一ラジオアイソトープ研究所でそのキットが開発された。我々は、本キットの基礎的検討を行うと共に臨床的検討を行ったので報告する。

## 1. Kit の内容及び測定手技

## 1) 試薬の調製

①緩衝液 (リン酸緩衝剤を 100 ml の蒸留水に

溶解する)。② C ペプチド抗血清 (蒸留水 100 ml に溶解する)。③ヨウ化 C ペプチド (<sup>125</sup>I) 約 2  $\mu$ Ci を緩衝液 10 ml で溶解する。④標準 C ペプチド (蒸留水 2 ml に溶解し、50 ng/ml の溶液を調製し、これを緩衝液で 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.195 ng/dl の各濃度に稀釀して C ペプチド標準液として用いる)。⑤家兔  $\gamma$  グロブリン抗血清 (緩衝液 10 ml に溶解する)。

## 2) 測定手技

10 × 70 mm の栓付きプラスチックチューブに標準 C ペプチド液または血清サンプル 0.2 ml, 緩衝液 0.5 ml, C ペプチド抗血清 0.1 ml ヨウ化 C ペプチド (<sup>125</sup>I) 溶液 0.1 ml を加え、4°C 下 2 日間インキュベートする。その後、家兔  $\gamma$  グロブリン抗血清 0.1 ml を加えてさらに 4°C 下 1 日間インキュベートする。インキュベート終了後、2,000 g で 30 分間遠沈し、上清を吸引除去した後沈澱物の比放射能をウェル・タイプシンチレーションカウンターで測定する。標識 C ペプチドの総放射能 (T) に対する各沈澱物の比放射能 (B) の % を計算し、標準曲線を描き、各検体の C ペプチド値 (以下 CPR 値と略す) を読む。

## 2. 血清サンプル

空腹時採血し、遠沈により血清分離後測定まで -20°C にて冷凍保存した。

## 3. 脾ホルモンの抽出

脾ラ氏島の過形成を伴う脾組織の一部を、手術により摘出された直後 -20°C にて冷凍保存しておき、ホモゲナイズに供した。抽出は Davoren<sup>10)</sup>, Kenny<sup>11)</sup> の方法を modify した Melani<sup>12)</sup> らの方

\* 名古屋大学医学部第 1 内科

\*\* 名古屋第二日赤内科

\*\*\* 名古屋第二日赤内分泌検査科

受付：51 年 6 月 18 日

最終稿受付：51 年 11 月 11 日

別刷請求先：名古屋市昭和区鶴舞町 65 (〒464)

名古屋大学医学部附属病院第 1 内科教室

板 津 武 晴

法に従って、酸アルコールにて粗抽出したものをリン酸緩衝液(0.5 M, pH 7.5)に溶解した。この一部を Sephadex G-50 (1×40 cm) のカラムを用いてゲル汎過し、1 M 酢酸で溶出した。

#### 4. インスリン測定(以下 IRI と略す)

インスリン測定は、固相法による Phadebas Insulin Test により行った<sup>9)</sup>。

### 成 績

#### 1. 基礎的検討

- 標準曲線と他のペプチドホルモンとの交叉性(Fig. 1)。

3重測定時の各 C ペプチド標準液における B/T(%) は近似した値を示し、それぞれの変異係数は 0.8~4.1% の間の値となり、良好な再現性を認めた。また、図に示すごとく、ブタインスリン、牛豚グルカゴン(Lilly 社製)に対する交叉性は認められなかった。

- ヒト臍抽出液の proinsulin-like component との交叉性(Fig. 2)。

多発性インスリノーマ患者の正常と思われた臍組織の一部を抽出、ゲル汎過した時の各フラクションにおける IRI, CPR 値を示している。上段の単一なピークを示すインスリン分画に対して、下段の CPR 分画では 2 つのピークを認めるが、最初のピークはいわゆるプロインスリンに相当する

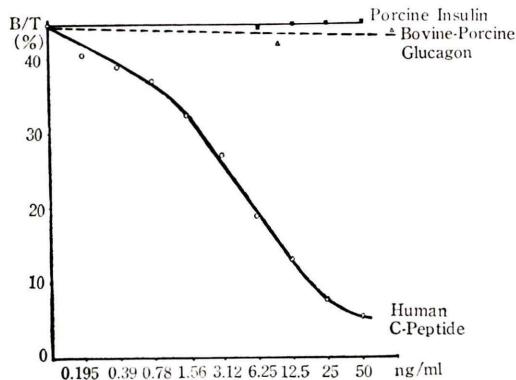


Fig. 1 Standard curve and cross-reactivity to porcine insulin and bovine-porcine glucagon.

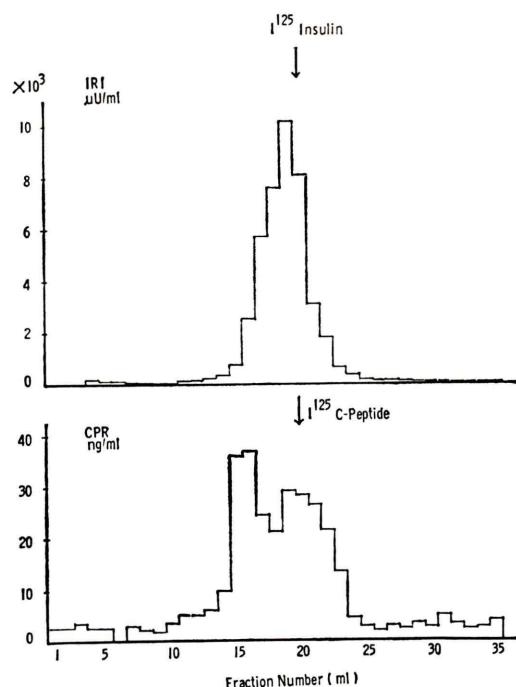


Fig. 2 Gel filtration of the pancreatic extract eluted by 1M acetic acid through Sephadex G-50 (1×40 cm). The upper panel shows the fraction of IRI with a single peak and the lower panel shows that of CPR with two peaks.  $I^{125}$  Insulin and  $I^{125}$  C-Peptide were used as markers of insulin and C-Peptide, respectively.

ピーク(proinsulin-like component)と考えられる。この CPR 分画の最初のピークに相当するフラクションの IRI 値は、全体の 23% であるのに対し、CPR 分画全体でみると約 43.1% を占める。CPR 分画の第 2 のピークは、インスリンのピークより後方に分布した。

#### 3) 再現性

A-D の 4 検体をそれぞれ 5 重測定し、本法における同一キット内における再現性を検討したのが Fig. 3 (A) である。各変異係数(C.V. と略す)は、2.6~11.5% の範囲にあり CPR 値の低い血清では若干のバラツキが認められたが、平均 5.1% と良好な再現性を示した。また、Fig. 3 (B) は、キット間の再現性の検討を示すが、同一の 25 検体について異った測定係列でしかも 3 ヶ月以上経

## A. Intraassay

| Sera | Assayed Values      | $M \pm SD$ (ng/ml) | C.V. (%) |
|------|---------------------|--------------------|----------|
| (A)  | 8.4 8.8 8.2 8.8 8.6 | $8.5 \pm 0.2$      | 2.6      |
| (B)  | 4.9 5.4 5.6 5.4 5.6 | $5.4 \pm 0.2$      | 4.6      |
| (C)  | 5.7 6.4 6.2 6.0 6.9 | $6.2 \pm 0.4$      | 7.2      |
| (D)  | 2.4 1.9 2.6 2.2 2.2 | $2.3 \pm 0.3$      | 11.5     |
|      |                     | Mean 5.1           |          |

## B. Interassay

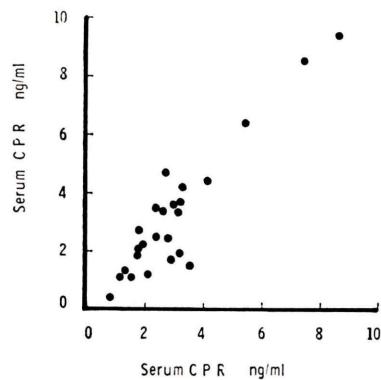


Fig. 3 Reproducibility

Data of the intrassay (A) show little variability between the values obtained by the same assay system (Mean value of C.V. = 5.1%).

Data of the interassay (B) show a good correlation between the values obtained by the different assay systems ( $N=25$ ,  $r=0.93$ ,  $P<0.01$ ).

た後に再測定した結果を比較したものである。相関係数 ( $r$ ) 0.93 とほぼ満足すべき再現性が得られたが、若干のサンプルではやや差が認められた。なお図には示さないが  $^{125}\text{I}$ -Cペプチドの製造後 3週間以上経たものの中に、抗Cペプチド抗血清との結合率 (B/T %) 並びに Cペプチド標準液による displacement の不良となる場合があり、みかけ上高値となる傾向が認められた。

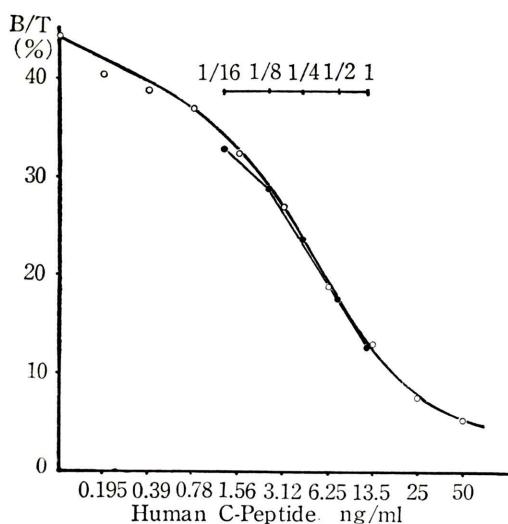
## 4) 回収率

高 CPR 血清、中等度 CPR 上昇血清、低 CPR 血清を用い、既知濃度の Cペプチド標準液をさらに添加して、測定した時の回収率をみたのが、Table 1 である。Cペプチド標準液を添加した時の CPR 値と各血清のみの CPR 値の差を添加した Cペプチド標準液の濃度で割って回収率を算出した。中等度上昇と低 CPR 値の血清における回収率は、各々平均 107%, 105% であり、高濃度、または低濃度の Cペプチド標準液のいずれの添加によっても同様であった。これに対し、高 CPR 値血清の場合には平均 136% と必ずしも良好な回収率が得られず、特にインスリン抗体の存在が疑われた血清で高 CPR 値 (6.2 ng/ml) を示したものでは、Cペプチド標準液 1.56 ng/ml, 6.25 ng/ml

Table 1 Recovery of C-Peptide added to sera.

| Samples              | Original Value (ng/ml) | Added C-Peptide (ng/ml) | Assayed Value (ng/ml) | Recovery (%) |
|----------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------|
| A. Low CPR Sera      | 0.85                   | 1.56                    | 2.57                  | 110          |
|                      | 0.87                   | 1.56                    | 2.70                  | 117          |
|                      | 0.85                   | 6.25                    | 7.20                  | 102          |
|                      | 0.87                   | 6.25                    | 6.60                  | 92           |
| B. Moderate CPR Sera | 2.40                   | 0.78                    | 3.30                  | 115          |
|                      | 3.20                   | 1.56                    | 4.90                  | 109          |
|                      | 2.40                   | 3.12                    | 5.70                  | 105          |
|                      | 2.90                   | 3.12                    | 6.10                  | 102          |
|                      | 3.20                   | 6.25                    | 10.00                 | 108          |
|                      | 3.10                   | 12.50                   | 16.00                 | 103          |
| C. High CPR Sera     | 5.50                   | 3.12                    | 10.20                 | 150          |
|                      | 6.60                   | 3.12                    | 11.00                 | 141          |
|                      | 5.50                   | 12.5                    | 17.70                 | 98           |
|                      | 6.60                   | 12.5                    | 26.00                 | 155          |

A. Mean value of recovery in the case of using the lower CPR sera is 105%. B. Mean value of recovery in the case of using the moderate CPR sera is 107%. C. Mean value of recovery in the case of using the high CPR sera is 136%.

**Fig. 4** Dilution Curve

The open circle shows the standard curve and the closed circle shows the dilution curve.

を添加した時の回収率は、各々 243%, 180% であった。

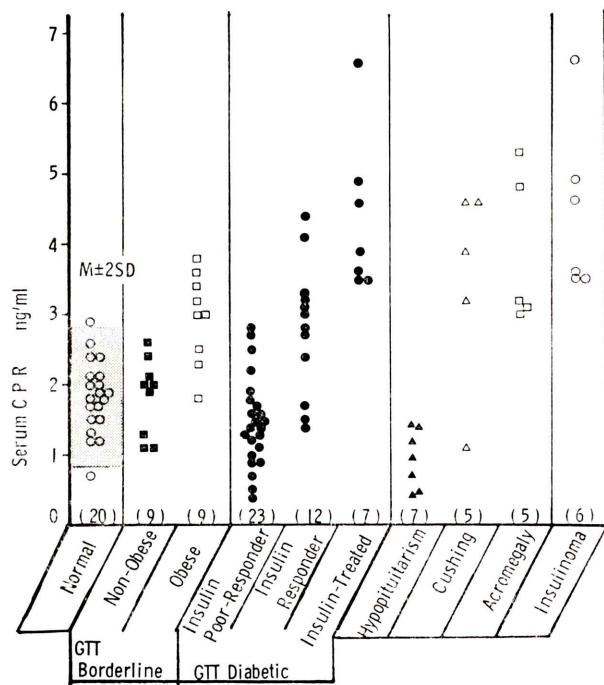
### 5) 稀釀曲線

高 CPR 値を示した血清を 2 倍から 16 倍稀釀した際の B/T (%) の変化を標準曲線のそれと対比したのが Fig. 4 である。図のごとく稀釀曲線は、緩衝液で作製した標準曲線と平行しており、内因性 CPR の変動を適確に示すと考えられる。

## 2. 臨床的検討

### 1) 空腹時の血中 CPR 値 (Fig. 5)

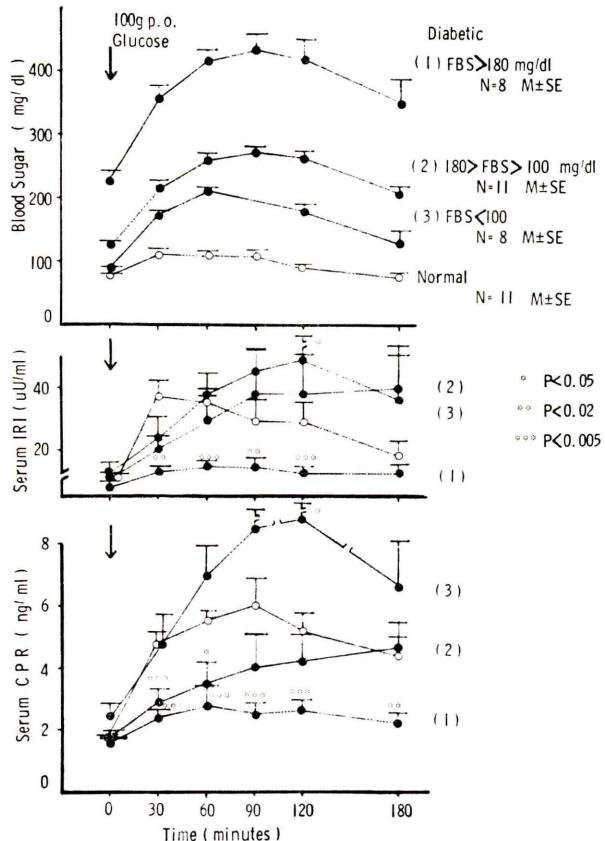
正常人 20 例における空腹時血中 CPR 値の平均 ( $\pm SD$ ) は、 $1.8 \pm 0.5$  であった。耐糖能曲線が境界型を示した単純性肥満患者では、平均  $2.9 \text{ ng/ml}$  と比較的高値であった。成人発症の糖尿病患者の中、糖経口負荷時の IRI 反応が良好であったものの平均値は、 $2.8 \text{ ng/ml}$ 、クッシング症候群では平均  $3.5 \text{ ng/ml}$ 、末端肥大症では平均  $3.9 \text{ ng/ml}$  と



**Fig. 5** Fasting levels of serum CPR in normal subjects and patients with various endocrine diseases. The shaded area shows the normal range of the serum CPR levels. ( $M \pm 2 SD: 1.8 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ )

いずれも高値を示したのに対し、糖経口負荷時の IRI 反応が不良であった糖尿病患者では平均  $1.47 \text{ ng/ml}$ 、下垂体機能低下症では平均  $0.95 \text{ ng/ml}$  といずれも低く、インスリン分泌低下を示唆する結果であった。インスリン長期治療によりインスリン抗体の存在が想定される糖尿病患者 7 例では、平均  $4.3 \text{ ng/ml}$  と高値を示すものが多かった。また、2 例のインスリノーマ患者では空腹時の平均値  $5.1 \text{ ng/ml}$  と高値を認めた。

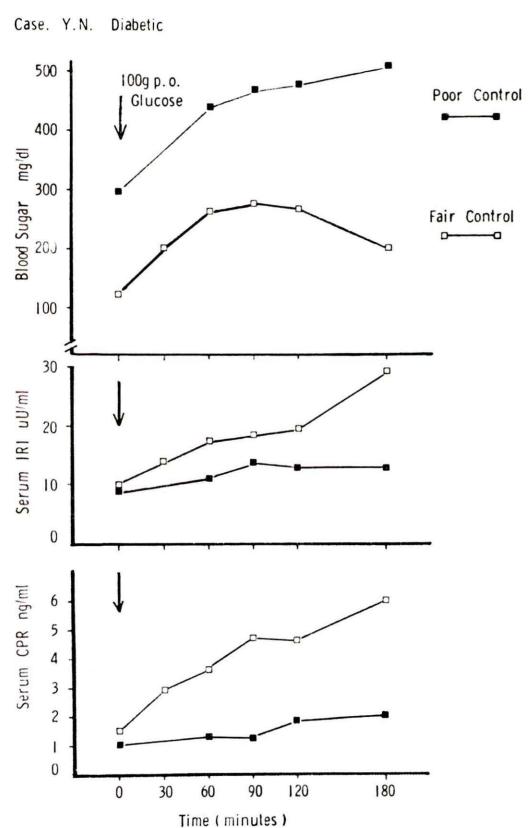
## 2) 100 g 糖経口負荷 (100 g OGTT と略) 時の血



**Fig. 6** Changes of blood sugar, serum IRI and serum CPR levels in 100g OGTT in normal subjects and diabetic patients. Levels of fasting blood sugar (FBS) are above  $180 \text{ mg/dl}$  in (1) group, from  $180$  to  $100 \text{ mg/dl}$  in (2) group and below  $100 \text{ mg/dl}$  in (3) group. Significant differences from normal: \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.02$ , \*\*\* $P<0.005$ .

## 中 CPR 値の変動 (Fig. 6)

正常人 11 例の血中 IRI 値の変動は、糖負荷 30 分後 peak に達し、180 分で前値に復したのに対し、血中 CPR 値は 30 分で急速な上昇を示し、90 分で平均  $6.0 \text{ ng/ml}$  と peak を示し、180 分でも高値を持続する反応を示した。図のごとく、糖尿病患者を空腹時血糖値が  $180 \text{ mg/dl}$  以上であるものを便宜上 (1) 群、 $180 \text{ mg/dl}$  から  $100 \text{ mg/dl}$  の間にあるものを (2) 群、 $100 \text{ mg/dl}$  以下のものを (3) 群と分けて検討した。耐糖能曲線は、明らかに



**Fig. 7** Comparison of CPR responses in 100g OGTT before (closed square) and after treatment with diet (open square) in a patient with diabetes mellitus.

(1)>(2)>(3)の順に重症、中等度、軽度となっている。これらのIRI反応をみると、(2)(3)群で比較的正常人のそれと同様のレベルに達するが、いずれも遅延しており、(1)群では殆んど反応がみられず低値を保っている。一方、血中CPR値は、糖負荷後30分、60分の初期では低く、(1)(2)群に対し、(3)群はIRI反応と異り正常人と同様な反応を示し、60分以後では明らかな上昇を示した。このように糖尿病患者において状態によっては、糖負荷時のIRI反応とCPR反応とは必ずしも平行せず、解離することがしばしば認められる。

### 3) 糖尿病に対する治療によるCPR反応の変化

Fig. 7は、食餌療法により治療効果を認めた1例であり、Fig. 8は、インスリン長期治療中の5例の結果を未治療患者のそれと対比したものであ

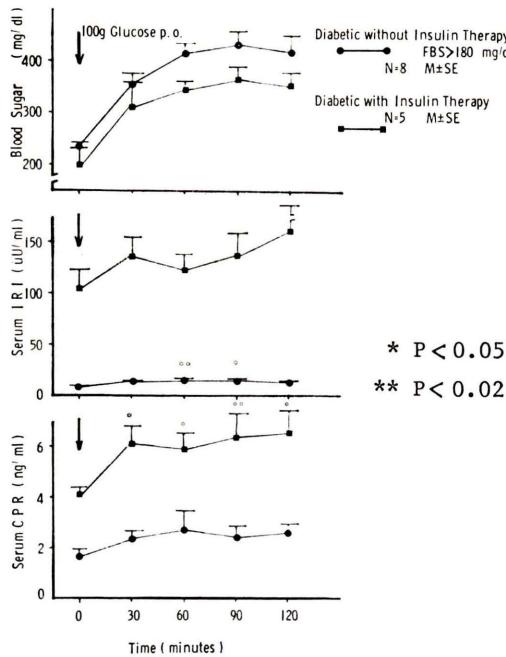


Fig. 8 Changes of blood sugar, serum IRI and serum CPR levels in 100g OGTT in diabetic patients with or without insulin therapy.

The closed circle shows the diabetic patients without insulin therapy. The closed square shows the diabetic patients with insulin therapy. Significant differences from the initial value: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ .

る。いずれも、糖負荷後の反応がIRIで認めがたい場合にもCPRにおいて明らかに認められている。このことは、治療による糖尿病患者の内因性インスリン分泌能の改善を知る示標として、CPR反応が有用であることを示唆する。

### 4) 肥満患者におけるCPR反応

インスリン分泌低下を伴う糖尿病患者と異り、しばしばインスリン過剰分泌を認めるとされている肥満患者のOGTTにおけるCPR反応を検討したのが、Fig. 9である。6人のいずれも耐糖能は境界型を示したが、最下段に示すCPR反応は正常人と比べわずかに前値と120分値において有意に高いがほぼ同様であった。一方、中段に示す

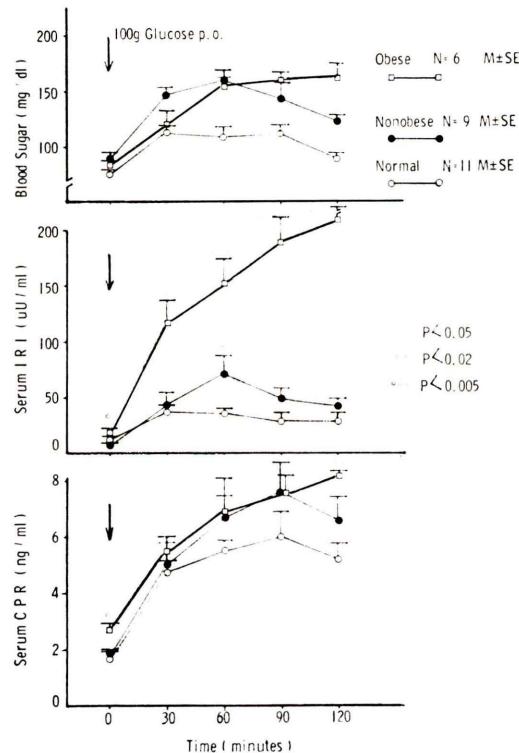


Fig. 9 Changes of blood sugar, serum IRI and serum CPR levels in 100g OGTT in borderline subjects with or without obesity.

The open square shows the obese subjects and the closed circle shows the non-obese subjects. The open circle shows the normal subjects. Significant differences from normal: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.005$ .

IRI 値は、正常人、境界型耐糖能を示す非肥満者に比し著しい高値となっている。また、Fig. 10 に示すごとく、糖負荷 30 分における前値からの差を IRI, CPR について比較し、その相関をみると、耐糖能曲線が正常型、境界型そして糖尿病型を示した 42 例（肥満者 6 人を除く）では、相関係数 ( $\gamma$ ) 0.664 と正の相関が認められた。一方、肥満患者 6 人は、この相関関係から逸脱した範囲に分布し、その相関は明らかでない、肥満患者での高 IRI 反応が高 CPR 反応を必ずしも伴っていないことがわかる。

### 5) インスリン負荷時の血中 CPR 値 (Fig. 11)

レギュラーインスリン 0.1 U/kg 静脈内投与による低血糖における血中 CPR 値の変動を同時に観察し得た結果である。正常者を含む諸内分泌疾患患者 13 例の平均を（黒四角）で示すと、血糖はインスリン投与 20 分後に前値の 50% 以下を示し、30 分以降漸次再上昇したのに伴って、血中 CPR も同様に下降し、40 分で前値の 50% 以下となり 60 分においても大部分 50% 前後で明らかな再上昇を認めない。外科的に摘除される前後に検査し得た 1 例のインスリノーマをみると、術前で

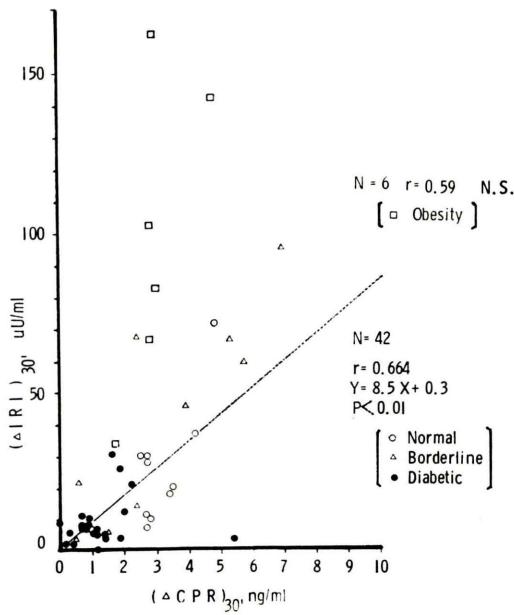


Fig. 10 Correlation between IRI and CPR at 30 minutes after glucose load.

There is a significant correlation in normal subjects (open circle), borderline subjects (triangle) and diabetic (closed circle):  $r=0.664$ ,  $P<0.01$ . There is no correlation in the obese subjects (open square):  $r=0.59$ .

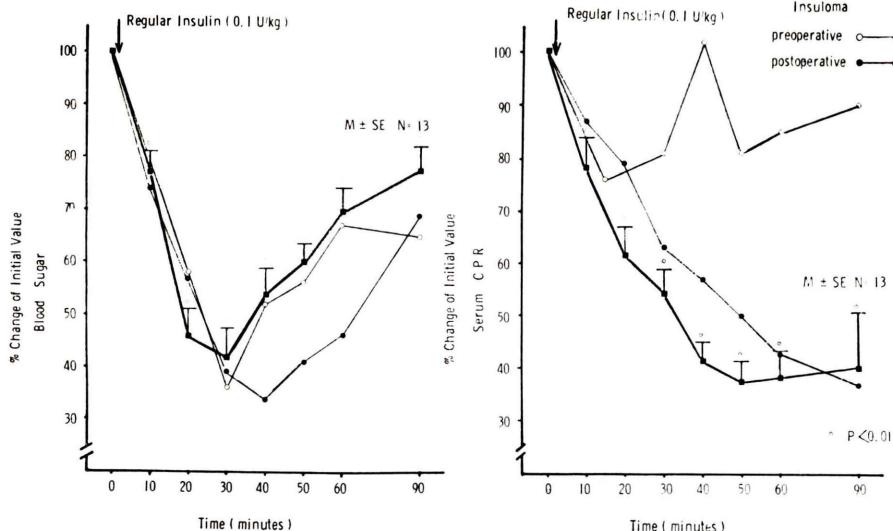


Fig. 11 Effect of insulin-induced hypoglycemia on blood sugar and serum CPR levels. The closed square shows patients with various endocrine diseases, while the circle shows a patient with insuloma before (open circle) or after surgical operation of islet cell tumors (closed circle).

は CPR の最低値が前値の 76%を示したに過ぎないが、術後はじめて 50% 以下を示した。本法による CPR の変動をみるとことが、インスリノーマの診断にも有用となることが示唆された。

### 考 按

本キットによる C ペプチドの測定を基礎的に検討したが、再現性、回収率も満足できる結果が得られ、交叉性、稀釈曲線の成績は、血中におけるヒト C ペプチドを良く反映すると考えられる。製造後早期に使用すれば、本キットの  $^{125}\text{I}$ -C ペプチドの不安定性もなく、キット間の再現性も良好であった。インスリン治療糖尿病患者において高 CPR 値を認め、これらの血清を用いた場合の回収率が異常であったことは、インスリン抗体そのものよりも、抗体と結合するプロインスリンまたは類似ペプチドの存在<sup>5, 16)</sup>がこの測定系の中で影響したと考えられる。プロインスリンに対する抗体産生を報告する諸家<sup>13, 14)</sup>もあるが、堀野らはインスリン抗体を認める血清の 39% にプロインスリン特異抗体を認めたが、その抗体価と空腹時血中 CPR 値とは必ずしも相関しないとしている<sup>15)</sup>。Block らは、高 CPR 値の原因はインスリン抗体に結合した内因性プロインスリンによるとしている<sup>16, 17)</sup>。これらの患者を除けば、空腹時の血中 CPR 値は、IRI 値とのモル比において高い結果が得られた。兼子らは、主としてインスリンと C ペプチドの代謝の差によると推論している<sup>18)</sup>。Rubenstein らはプロインスリンがインスリンに比べ肝での分解が少ないことを示し<sup>19)</sup>、Katz らはプロインスリンと C ペプチドの代謝の 50% 以上を腎が行うと報告した<sup>20)</sup>。豊田らは、腎不全患者における血中 CPR 高値を報告し<sup>21)</sup>、腎機能障害の程度によっては考慮される必要があるとした。インスリノーマでの高 CPR 値は、過剰分泌されるプロインスリンによると考えられるが、この点については、Melani らの報告がある<sup>22)</sup>。

次に、糖尿病患者における OGTT 時の IRI は、低下または遅延反応を示し、一見インスリン分泌低下を想わせるが、CPR 測定により正常人以上

に高反応を示す軽症患者群を他のより重症な群から区別できることを認めた。また、薬物治療や食餌療法中、インスリン分泌能の回復を認めることから、CPR 測定が治療効果判定に有用と考えられる。このことは、Block らがすでに指摘している<sup>17)</sup>。

境界型の耐糖能曲線と高 IRI 反応を示す肥満者では、CPR 反応は有意に高値を示さないことから、この高 IRI 値はインスリン代謝（とくに肝での）の低下によるものと推定される。我々の成績では、なお空腹時と 120 分の CPR 値の平均が正常人に比し有意に高いこと、そして CPR/IRI のモル比は空腹時平均 4 に対して糖負荷後 30 分以後において平均 1 前後となることから、過剰分泌も伴うものと考えられる。

外来性インスリン投与による内因性インスリン分泌抑制に関しては、従来の IRI 測定に影響しないとされるカツオインスリンを用いた報告<sup>23, 24)</sup>やブタインスリン投与時の CPR 反応をみる最近の報告<sup>25, 26)</sup>がなされている。Horwitz らは、これらインスリン投与時の CPR 抑制が、正常人でみられるのに反し、インスリノーマでは認めないとから、インスリノーマの診断に適用できるかもしれないとして報告したが、特に高 IRI 血症を示さないインスリノーマの診断には、有用な方法と思われる。

### ま と め

ヒト C ペプチド「第一」キットについて基礎的並びに臨床的検討を行い、以下の知見を得た。

- (1) 本法による C ペプチド測定は、再現性、回収率、稀釈曲線において満足すべき結果を得た。本法は、従来の IRI 測定に比し、proinsulin-like component の算定にもより適確であることが示唆された。
- (2) 正常人の空腹時血中 CPR 値の平均 ( $\pm \text{SD}$ ) は、 $1.8 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$  で、その IRI 値のモル比は高い。インスリン抗体の存在が疑われるインスリン治療患者やインスリノーマの症例を除く諸内分泌疾患においてもモル比は同様に高かった。
- (3) C ペプチド測定は、糖尿病患者の病態把握並

びに治療経過において内因性インスリン分泌動態を知る上で臨床的に有用である。

- (4) 肥満患者にみられる GTT 時の高 IRI 反応は必ずしも CPR 高反応を伴わない。
- (5) インスリン低血糖時にみられる血中 CPR 値の減少は、低血糖に伴う胰 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌抑制によると考えられる。この CPR 抑制が認め難いという点でインスリノーマの診断に有用な方法と考えられる。

謝辞：ヒトペプチドキット「第一」を提供していただいた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝します。  
本論文要旨は、第13回糖尿病中部地方会にて報告した。

#### 文 献

- 1) Steiner DF & PE Oyer: Proc Nat Acad Sci USA **57**: 473, 1967
- 2) Steiner DF, PE Oyer, S Terris, et al: J Biol Chem **246**: 1365, 1971
- 3) Oyer PE, S Cho, JD Peterson, et al: J Biol Chem **246**: 1375, 1971
- 4) Kemmler W, JD Peterson and DF Steiner: J Biol Chem **246**: 6786, 1971
- 5) Clark JL & DF Steiner: Proc Nat Acad Sci USA **62**: 278, 1969
- 6) Rubenstein AH, JL Clark F Melani, et al: Nature **224**: 697, 1969
- 7) Melani F, AH Rubenstein, AH Oyer, et al: Proc Nat Acad Sci USA **67**: 148, 1970
- 8) Kaneko T, H Oka, M Munemura, et al: Endocrinol Jap **21**: 141, 1974
- 9) 板津武晴, 伊藤光泰: 核医学 **13**: 23, 1976
- 10) Davoren PR: Biochim Biophys Acta **63**: 150, 1960
- 11) Kenny SJ: JCEM **15**: 1089, 1955
- 12) Melani F, AH Rubenstein, and DF Steiner: JCI **49**: 497, 1970
- 13) Kumar D, and LV Miller: Diabetes **22**: 361, 1973
- 14) Anderson OO: Acta Endocrinol **73**: 304, 1973
- 15) 堀野正治, 尾山秀樹, 中島行正他: 最新医学 **30**: 1932, 1975
- 16) Block MB, ME Mako, DF Steiner, et al: Diabetes **21**: 1013, 1972
- 17) Block MB, RL Rosenfield, ME Mako, et al: New Eng J Med **288**: 1144, 1973
- 18) 兼子俊男: 代謝 **10**: 1288, 1973
- 19) Rubenstein AH, LA Pottenger, M Mako, et al: J Clin Invest **51**: 912, 1972
- 20) Katz AI, and AH Rubenstein: J Clin Invest **52**: 1113, 1973
- 21) 豊田隆謙, 阿部寛治, 工藤幹彦他: ホルモンと臨床 **23**: 89, 1975
- 22) Melani F, WG Ryan, AH Rubenstein, et al: New Eng J Med **283**: 713, 1970
- 23) Sando H, Y Kanazawa, and T Kuzuya: Amer J Physiol **218**: 1357, 1970
- 24) Turner R, and PC Johnson: Lancet **1**: 1483, 1973
- 25) Horwitz DL, AH Rubenstein, C Reynolds, et al: Horm Metab Res **7**: 449, 1975
- 26) 島 健二, 沢崎憲夫, 森下寿々枝他: 日本内分泌学会西部部会総会 (Suppl. 52) 1975
- 27) Horwitz DL, and AH Rubenstein: Lancet **2**: 1021, 1974