

《ノート》

# Radioimmunoassay による血中 Thyrotropin-Releasing Hormone 濃度の測定

Radioimmunoassay of Thyrotropin-Releasing Hormone in Human Plasma

石原 睦夫\* 石飛 和幸\* 原田 義道\*

Mutsuo ISHIHARA\*, Kazuyuki ISHITOBI\* and Yoshimichi HARADA\*

\*Department of Medicine, Tottori University School of Medicine, Yonago

## I. はじめに

1969 年 thyrotropin-releasing hormone (TRH) が単離合成され, pyroglutamyl-histidyl-proline-amide である<sup>1)</sup>ことが明らかにされたが, この合成 TRH を用いて下垂体—甲状腺系疾患のみならず, うつ病<sup>2-4)</sup>, 腎不全<sup>5)</sup>, 肝硬変<sup>6)</sup> などにおける病態生理学的研究ならびにうつ病患者<sup>7,8)</sup>, 脊髄小脳変性症患者<sup>9-11)</sup>における TRH の治療的応用など, 幅広い研究が進められている。

一方, 生体試料中の TRH 濃度の測定には, 従来種々の bioassay が試みられていたが, 感度と精度が悪く, 操作も煩雑で, 臨床応用には多くの問題が認められた。1972 年, Bassiri と Utiger<sup>12)</sup> は合成 TRH の特異抗体を作製し, はじめて radioimmunoassay (RIA) による TRH の測定を可能とし, 本邦においても 1974 年以来多数の研究者<sup>13-20)</sup> が RIA により immunoreactive TRH (IR-TRH) を測定し, 生体試料中の濃度について報告している。

著者らも Bassiri と Utiger の方法<sup>12)</sup>に準じ, 抗 TRH 抗体を作成し, 血漿中の IR-TRH を測定す

る RIA system の開発を試み, 正常者ならびに各種の内分泌疾患患者における分泌動態を追究したので報告する。

## II. 実験材料

合成 TRH (L - pyroglutamyl - histidyl - proline-amide), 各種 TRH 誘導体および LH-RH は田辺製薬より, FOY-007 (gabexate mesilate) は小野薬品より提供された標品を用いた。標識用 <sup>125</sup>I は The radiochemical centre (5 mCi/ml) 製を, benzidine dihydrochloride は Sigma 社製を, chloramine-T は半井化学薬品社製を, Sephadex G-10 は Pharmacia 社製を, 牛血清アルブミン (BSA) は第一化学薬品社製をそれぞれ用いた。

## III. 実験方法

1) TRH-bis-diazotized-benzidine-BSA (TRH-BDB-BSA) conjugate 作製: Bassiri と Utiger の方法<sup>12)</sup>に準じて行なった。即ち 0.23 g の benzidine dihydrochloride を 45 g の 0.2 N 塩酸に溶解し, これに 5 ml の再蒸留水に溶解した 0.175 g の硝酸ナトリウムを加え, 60 分間氷冷中で攪拌しながら反応させ, BDB を作製した。30 ml の BDB を 10 ml の 0.16 M borate, 0.15 M NaCl buffer (pH 9) で溶解した TRH 10 mg と BSA 100 mg に加え,

**Key words:** radioimmunoassay, thyrotropin-releasing hormone

\* 鳥取大学医学部第3内科

受付: 54年10月22日

最終稿受付: 55年1月28日

別刷請求先: 米子市西町 36-1 (☎683)

鳥取大学医学部第3内科

石原 睦夫

0°C で攪拌しながら 120 分間反応させた。この反応物をイオン交換水に対して3日間、さらに 0.15 M NaCl に対して 24 時間いずれも 4°C で透析し、TRH-BDB-BSA conjugate を得た。

2) 抗 TRH 抗体の作成: TRH-BDB-BSA conjugate 1.0 ml と Freund's complete adjuvant 1.0 ml を混じ、4 週間ごとに家兎 foot pads に免疫し、4 か月後に抗 TRH 抗体を得た。

3) TRH の標識および精製:  $^{125}\text{I}$ -TRH の作製は Greenwood<sup>21)</sup> らの方法に準じ、chloramine-T 法で作成した。すなわち  $^{125}\text{I}$  0.5  $\mu\text{g}$  と TRH 5  $\mu\text{g}$  を chloramine-T 25  $\mu\text{g}$  で 30 秒間反応させ、 $^{125}\text{I}$  を TRH に標識した。 $^{125}\text{I}$ -TRH の精製には Sephadex G-10 column (1  $\times$  15 cm) を用い、0.5% BSA, 0.01 M phosphate, 0.15 M NaCl buffer で溶出し 1.0 ml/ ずつ分画採取した。

4) TRH free 血漿の作成: 凍結保存された健康成人血漿 1.0 ml に activated charcoal (Norit A) 30 mg を加え、24時間室温で攪拌した後12,000 rpm で 30 分間遠沈し、上澄を採取した。この操作を再度くり返した後、濾過した血漿を TRH free 血漿とした。

5) 血漿 TRH の抽出: 血液 6 ml をあらかじめヘパリン塗布した注射器に採取し、ただちにFOY-007 0.3 ml とよく混和し、4°C 低温下で血漿を分離した。血漿 3.0 ml に 10 ml の冷酢酸酸性メタノールを加え混和後、遠沈した上澄をガラス試験管に移し、室温で減圧乾燥させた。測定時 0.5 ml の 0.5% BSA, 0.01 M phosphate, 0.15 M NaCl buffer (pH 7.5) にて溶解し、その 0.1 ml を測定に供した。

6) 測定方法: プラスチック試験管 (15  $\times$  80 mm) に標準溶液 (8 pg から 1,000 pg) 0.1 ml および TRH free 血漿 0.1 ml または検体 0.1 ml をそれぞれ加え、次に全試験管に 0.1% gelatin, 0.01 M phosphate, 0.15 M NaCl buffer (pH 7.5) で希釈した抗 TRH 抗体 (最終稀釈度, 7,000 倍) 0.1 ml および  $^{125}\text{I}$ -TRH 0.1 ml (10,000 cpm/tube 相当) を加えた。全試験管の液量を 0.9 ml に調整し、0°C, 24 時間静置後、同 buffer で 20 倍に希釈した抗家

兎  $\gamma$ -globulin 山羊血清 0.1 ml/ を加え、さらに 24 時間放置した後、3,000 rpm にて 30 分間遠沈し、free form (F) と bound form (B) に分離した。B の比放射能を well-type  $\gamma$ -scintillation counter で測定し、全カウントに対する B カウントの比 B/T から該当する IR-TRH 量 (pg/tube) を算出し、これを 1.67 倍して理論上の血漿 IR-TRH 濃度 (pg/ml) を求めた。

#### IV. 対 象

対象は鳥取大学医学部第3内科の医師、研究員など健康成人22例、ならびに当科外来および入院患者のうち臨床症状および臨床検査所見から診断した甲状腺機能亢進症患者7例、原発性甲状腺機能低下症患者6例および特発性下垂体性こびと症患者33例の計68例である。

#### V. 成 績

1)  $^{125}\text{I}$ -TRH の精製: 前述の方法で得た  $^{125}\text{I}$ -TRH を Sephadex G-10 column でゲル濾過し、Fig. 1 に示したごとく二峰性の radioactivity を得た。Fraction (Fr) 別に抗 TRH 抗体との immunoreactivity をみると、両峰の谷間の部分 (Fr 9) が最も良く、この immunoreactivity を 100% とすれば Fr 8 は 84%, Fr 7 は 56%, Fr 5 は 12%, Fr 11 は 43% で、以後の実験には Fr 9 および Fr 8 を  $^{125}\text{I}$ -TRH として用いた。

2) 抗体の特異性: 抗 TRH 抗体と各種 TRH analogues, 各種下垂体ホルモンおよび LH-RH との免疫学的交叉反応性を Table 1 に示した。抗 TRH 抗体と TRH との反応性を 100% とすると、L-Aze<sup>3</sup>-TRH とは 10%, DL-Aze<sup>3</sup>-TRH とは 5% の交叉性を認めたが、他には明らかな交叉性を認めなかった。

3) 標準曲線: TRH free 血漿を添加した標準曲線と、添加しない標準曲線を比較し Fig. 2 に示した。TRH free 血漿の添加により、TRH 標準溶液との用量反応相関性は増し、本研究では TRH free 血漿を添加し、標準曲線を作成した。濃度 0 と 16 pg/ml の B/T% に有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めたこ

とにより、本法の測定感度 16 pg/ml を得た。

4) 回収率: TRH free 血漿に 0 pg/ml から 317 pg/ml の TRH を添加し、ヒト血漿と同様に抽出

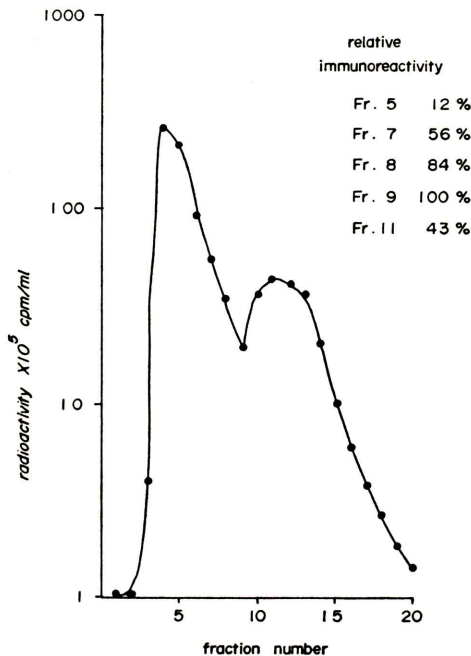


Fig. 1 Result of purification of  $^{125}\text{I}$ -TRH on  $1 \times 15$  cm column of Sephadex G-10, using 0.5% BSA, 0.01 M phosphate and 0.15 M NaCl buffer, pH 7.5.

Table 1 Cross-reactivity of various compounds with anti-TRH serum

compound	% cross-reactivity
TRH	100.0
L-Aze <sup>3</sup> -TRH	10.0
DL-Aze <sup>3</sup> -TRH	5.0
Pyro-His-Pro-OH	5.0
H-Glu-His-OH	0.1
H-Glu-His-Pro-OH	0.1
D-Aze <sup>3</sup> -TRH	<0.01
H-His-Glu-Pro-OH	<0.01
Pro-His-OH	<0.01
LH-RH	<0.01
hTSH	<0.01
hGH	<0.01
hLH	<0.01
hFSL	<0.01
hProlactin	<0.01
thyroxine	<0.01

し測定した IR-TRH 値と、その回収さるべき TRH の理論値を比較した成績を Table 2 に示した。

TRH 5~50 pg/ml の添加では 147~458%, 79~317 pg/ml の添加では 52~89% であった (N=5)

5) 再現性: Intra-assay の変動係数は IR-TRH 濃度が 34 pg/ml, 75 pg/ml および 140 pg/ml のとき、それぞれ 24%, 20% および 11% を得た。また、inter-assay の変動係数は IR-TRH 濃度が 39 pg/ml, 76 pg/ml および 192 pg/ml のとき、それぞれ 28%, 15% および 40% を得た (N=5)

6) 健常成人, 甲状腺機能亢進症, 原発性甲状腺機能低下症および下垂体性こびと症における血中 IR-TRH 値 (Fig. 3): 血中 IR-TRH 値は健常成人 22 例の 87 pg/ml 以下, 平均  $43.3 \pm 25.2$  pg/ml に比べ, 甲状腺機能亢進症患者 7 例は 36 pg/ml

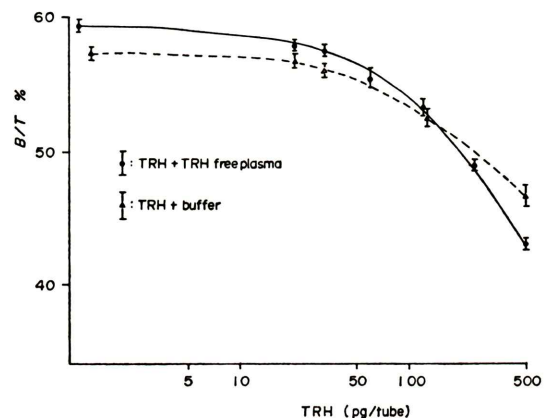


Fig. 2 Standard curve with Extract of TRH-free plasma (closed circle) or with buffer (open triangle)

Table 2 Recoveries of added synthetic-TRH after extraction from TRH-free human plasma.

TRH Added pg/ml	Measured IR-TRH pg/ml	Recovery ratio %
0	$14.3 \pm 13.2$	
5	$15.2 \pm 12.2$	$318 \pm 276$
9	$39.0 \pm 10.6$	$444 \pm 118$
19	$50.3 \pm 11.6$	$458 \pm 83$
38	$56.0 \pm 8.2$	$147 \pm 21$
79	$70.3 \pm 8.0$	$89 \pm 10$
158	$115.2 \pm 23.8$	$73 \pm 15$
317	$165.8 \pm 44.3$	$52 \pm 14$



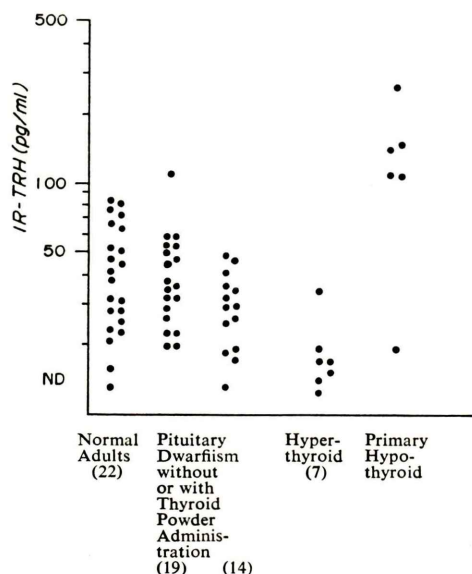


Fig. 3 Results of assays of extracts of human plasma. (cases).

以下、平均  $18.0 \pm 9.8$  pg/ml で、健常成人に比べ有意の低値を得た ( $P < 0.02$ )。これに対し原発性甲状腺機能低下症患者 6 例の血中 IR-TRH 値は、1 例が 18 pg/ml の正常下限値を示した他は、107 pg/ml から 265 pg/ml と高値を示し、平均値は  $131.2 \pm 73.4$  pg/ml の高値であった ( $P < 0.001$ )。特発性下垂体性こびと症未治療患者 19 例の血中 IR-TRH 値は、20 pg/ml より 109 pg/ml の範囲に分布し、平均値は  $42.9 \pm 21.2$  pg/ml と健常成人に比べ有意差を認めなかった。特発性下垂体性こびと症患者のうち、甲状腺末服用患者 14 例の血中 IR-TRH 値は、感度以下から 51 pg/ml、平均  $29.1 \pm 12.7$  pg/ml であり、本症未治療患者例 ( $P = 0.05$ ) および健常成人 ( $P < 0.01$ ) に比べ、いずれも有意の低値を得た。

## VI. 考 察

1972 年 Bassiri と Utiger<sup>12)</sup> は TRH を BDB-BSA と結合させた conjugate を家兎に免疫し、TRH に特異的な抗体を作製し、100 pg/ml の TRH を測定可能な RIA を報告した。著者らは彼らの方法に準じ作製した抗体を用いて、TRH の末梢血中動態を検討可能な RIA の開発を試みた。

得られた抗体は TRH に特異的に結合し、TRH の主要代謝産物の一つである Glu-His-Pro-OH<sup>22)</sup>をはじめ LH-RH, TSH および thyroxine などのホルモンとの免疫学的交叉性はほとんど認めず (Table 1), TRH に対してきわめて特異性が高いことが知られた。

TRH は Greenwood ら<sup>21)</sup> の方法に準じて  $^{125}\text{I}$  で標識し Sephadex G-10 で精製した。Gamma-spectrogram には 2 つの放射ピークが得られ、その谷の部分が抗 TRH 抗体と最も良く結合した (Fig. 1)。この成績は Bassiri と Utiger<sup>12)</sup>, Virkkunen ら<sup>23)</sup>, Saito ら<sup>19)</sup> の第 1 のピークに、高い結合を示した成績と一致し、May と Donabedian<sup>24)</sup> の第 2 のピークに最も高い immunoreactivity を認めた報告と異なる。この差は明らかではないが、精製条件による差が推察される。 $^{125}\text{I}$ -TRH は凍結保存により 1 か月間安定であったが、用時再精製すればさらに長期間有効なことが推察された。

末梢血中の TRH 濃度の測定にあたり、RIA 系に及ぼす非特異的影響を除外するため、charcoal 処理を行なった TRH free 血漿を標準曲線に添加した。Oliver ら<sup>25)</sup> は血漿 1.0 ml に 30 mg の activated charcoal を加えれば、TRH はほぼ完全に吸着されると報告している。Saito ら<sup>19)</sup> は血漿 1.0 ml に activated charcoal 50 mg を添加して、99% 以上の TRH を回収している。著者らは Saito らの方法<sup>19)</sup> に準じて操作したことにより、ほぼ TRH を含まない血漿を作製し得たと考える。TRH free 血漿抽出物を添加したとき、添加しなかったときの標準曲線が若干ずれており (Fig. 2)、血漿 TRH 濃度の測定にあたっては非特異的因子を除外することが必要なことが示唆された。

ヒトに TRH 500  $\mu\text{g}$  を静注したとき、血中 TRH 濃度は 1~3 分後に 360~560 ng/ml の頂値を示し、その後急速に低下するが、この半減期は 3~7 分であるといわれる<sup>16)</sup>。ヒト血清に TRH を添加し、37°C または 20°C で 1 時間放置したときの TRH の回収率はそれぞれ 92%~32%<sup>29)</sup> および 35%~50%<sup>19)</sup> と低い。ヒト血清による TRH 不活性化の程度は、Bassiri と Utiger<sup>26)</sup> が既に指摘したごと

く、体液の条件に近い 37°C, pH 7.0 で最大で time dependency を示す<sup>28)</sup>が、このことは血中のタンパク分解酵素などの作用によるもので enzyme system が関与している可能性が強い。このため、ヒト血中 TRH 測定にあたり種々の抽出法が開発されているが、Saito<sup>19)</sup> らの FOY-007, May<sup>24)</sup> の BAL (British-anti-Lewisite) あるいは満間ら<sup>28)</sup> の 8-hydroxyquinoline sulfate を加え、氷水中に保存する方法が代表的で、著者らも FOY-007 の添加により酵素活性の阻害を試みた。著者らの assay system では回収率が TRH 濃度により異なるため、TRH が高濃度に含まれる原発性甲状腺機能低下症患者血液や、下垂体門脈血液などの検体と低濃度の健常成人血漿などの検体との抽出方法を区別する必要があるかもしれない。また、ヒト血漿から TRH を抽出するためには、通常 4 倍以上のメタノールを用いれば、95% 以上を回収できるといわれる<sup>19,27,28)</sup>。そこでたとえば、TRH free 血漿に低濃度から高濃度までそれぞれの濃度の TRH を添加し、検体と同様に抽出作製して標準曲線を作成すれば、より真の血漿中 TRH 値に近い値を求めうる可能性があるといえる。本 assay system の最小検出感度は 16 pg/ml で、諸家の報告した成績 4<sup>19)</sup> ~ 100<sup>12)</sup> pg/ml とほぼ同様の成績と考えられた。

健常成人における血中 IR-TRH 値は、用いた assay system により異なり、満間らの 1,600 pg/ml 以下 (1974 年)<sup>15)</sup>、60 pg/ml 以下 (1975 年)<sup>27)</sup>、Oliver<sup>25)</sup> の 19.8±3.1 (7~33) pg/ml、Saito<sup>19)</sup>、<sup>30)</sup> の 19 pg/ml 以下のごとくである。著者らの IR-TRH 値は 87 pg/ml 以下で満間らの 1975 年<sup>27)</sup> の成績と一致している。このことは、本 RIA system の特に用いた抗体の力価が低く、特異性に若干の問題が残されたことを示唆している。

原発性甲状腺機能低下症患者は 2,000~8,000 pg/ml<sup>15)</sup>、40~400 pg/ml<sup>27)</sup> などの高値が記載されているが、著者らの 6 例においても、5 例が 107 pg/ml から 265 pg/ml の高値を示し、1 例が 18 pg/ml の正常下限値であった。甲状腺摘出ラットで視床下部 TRH 含量が減少し<sup>32)</sup>、TRH synthetase の上

昇がみられない<sup>31)</sup>結果と一致し、本症における TRH の病態を追究する上で重要な示唆を与えるものと思われる。

下垂体前葉機能低下症における甲状腺機能低下症例の TRH 値は、低値<sup>15)</sup>および高値<sup>30)</sup>を示す症例が含まれることが明らかにされつつある。著者らは未治療の下垂体性こびと症の 1 例で、IR-TRH 値が 109 pg/ml と軽度高値を得たが、下垂体性こびと症の中には血中 TSH 基礎値が軽度高値を示す症例<sup>33)</sup>が経験される。

甲状腺機能亢進症における IR-TRH 値は、測定感度以下のものが多い<sup>15,27,30)</sup>といえるが、著者らは平均 18.0±9.8 pg/ml の低値を得た。甲状腺末服用中の下垂体性こびと症における IR-TRH 値は、平均 29.1±12.7 pg/ml と、同様に低値であった。

以上、著者らの開発した末梢血漿中 TRH の RIA system は、TRH のヒトにおける病態生理学的意義を研究する上で、有用な方法の一つであることが示唆された。

## VII. ま と め

1) TRH を BDB-BSA と結合した conjugate で家兎を免疫し作製した抗 TRH 抗体を用いて、ヒト末梢血中 TRH を測定した。

2) 抗 TRH 抗体は TRH と特異的に結合し、最小検出感度は 16 pg/tube で、回収率及び再現性には、今後さらに改善する必要があると示唆された。

3) 本法で測定した血漿中 IR-TRH 値は、健常成人 22 例で 87 pg/ml 以下、平均 43.3±25.2 pg/ml、甲状腺機能亢進症患者 11 例で 36 pg/ml 以下、平均 18.0±9.8 pg/ml、原発性甲状腺機能低下症患者 6 例で 18~265 pg/ml、平均 131.2±73.4 pg/ml、未治療の下垂体性こびと症患者 19 例で 20~109 pg/ml、平均 42.9±21.2 pg/ml、甲状腺末服用中の下垂体性こびと症患者 14 例で 51 pg/ml 以下、平均 29.1±12.7 pg/ml を得た。

4) 末梢血中 TRH 濃度の測定は、TRH 分泌動態を知るうえに重要な意義を有し、視床下部—下垂体—甲状腺系の機能ならびに病態生理の解明に有用な方法である。



稿を終わるにあたり、懇切なご指導をいただいた徳島大学医学部中央検査部、斎藤史郎教授に深謝致しますとともに、適切なご助言とご校閲をいただいた同部、大島一洋講師に心から感謝致します。

本研究の一部は、厚生省特定疾患、間脳下垂体機能障害調査研究の研究費によったことを付記し、感謝致します。

## 文 献

- 1) Folker K, Enzmann F, Boler J et al: Discovery of modification of the synthetic tripeptide-sequence of the thyrotropin releasing hormone having activity. *Biochem Biophys Res Commun* 37: 123-126, 1969
- 2) Takahashi S, Kondo H, Yoshimura M, Ochi Y: Thyrotropin responses to TRH in depressive illness: Relation to clinical subtypes and prolonged duration of depressive episode. *Folia Psychiatrica et Neurologica Japonica* 28: 355-365, 1974
- 3) Maeda K, Kato Y, Ohgo S, et al: Growth hormone and prolactin release after injection of thyrotropin-releasing hormone in patients with depression. *J Clin Endocrinol Metab* 40: 501-505, 1975
- 4) 挾間秀文, 船越士郎, 井上寛, 他: TRH テストによる躁うつ病の病態に関する研究. *臨床精神医学* 5: 115-121, 1976
- 5) Lim VS, Kathpalia SC, Frohman LA: Hyperprolactinemia and impaired pituitary response to suppression and stimulation in chronic renal failure: Reversal after transplantation. *J Clin Endocrinol Metab* 48: 101-106, 1976
- 6) Panerai AE, Salerno F, Manneschi M, et al: Growth hormone and prolactin response to thyrotropin-releasing hormone in patients with severe liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 134-140, 1977
- 7) Kastin A, Ehrensing RH, Schalch DS, Anderson MS: Improvement in mental depression with decreased thyrotropin response after administration of thyrotropin-releasing hormone. *Lancet* 2: 740-742, 1972
- 8) Prange AJ, Wilson IC, Lara PP, et al: Effects of thyrotropin-releasing hormone in depression. *Lancet* 2: 999-1002, 1972
- 9) 祖父江逸郎: 視床下部ホルモンと中枢神経機能との新しい接点—TRH と運動失調との関連をめぐって. *臨床神経* 17: 791-799, 1977
- 10) 小長谷正明, 室賀辰夫, 足立皓岑, 他: 脊髄小脳変性症に対する新しい治療法の試み—Thyrotropin Releasing Hormone による動心動揺の検討. *医学のあゆみ* 100: 939-941, 1977
- 11) 祖父江逸郎, 高柳哲也, 満間照典, 他: 脊髄小脳変性症の運動失調に対する TRH の影響. *日本医事新報* 2841: 26-29, 1978
- 12) Bassiri RM, Utiger RD: The preparation and specificity of antibody to thyrotropin releasing hormone. *Endocrinology* 90: 722-727, 1972
- 13) 満間照典, 広岡良文, 鰐部春松, 仁瓶禮之: TRH の radioimmunoassay について. *日内分泌誌* 50: 841, 1974
- 14) 満間照典, 広岡良文, 仁瓶禮之: TRH radioimmunoassay による尿中 TRH の測定. *日内分泌誌* 50: 1005-1014, 1974
- 15) 満間照典, 広岡良文, 仁瓶禮之: TRH radioimmunoassay. *核医学* 11: 356, 1974
- 16) 斎藤史郎, 撫佐公孝, 山本鈴代, 大島一洋: TRH のラジオイムノアッセイ. *医学のあゆみ* 90: 957-959, 1974
- 17) 内海正文, 立岩 誠, 日下孝明, 他: ラジオイムノアッセイによる TRH の測定. *医学のあゆみ* 93: 101-103, 1975
- 18) 桜田俊郎, 山口 徹, 吉田克己, 他: Thyrotropin releasing hormone (TRH) の radioimmunoassay. *日内会誌* 64: 70, 1975
- 19) Saito S, Musa K, Yamamoto S, et al: Radioimmunoassay of thyrotropin releasing hormone in plasma and urine. *Endocrinol Japon* 22: 303-309, 1975
- 20) 八谷 孝, 吉村 学, 宮崎忠芳, 他: *日内分泌誌* 51: 317, 1975
- 21) Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS: The preparation of  $^{131}\text{I}$ -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89: 114-123, 1963
- 22) 佐久間真理, 中里文枝, 木村真喜子, 他: Thyrotropin releasing hormone (TRH) の生体内運命に関する研究. *日内分泌誌* 49: 1186-1197, 1973
- 23) Virkkunen P, Leppaluoto J, Rana J, Lybeck H: Preparation of  $^{125}\text{I}$ -labelled thyrotropin-releasing hormone. *Horm Metab Res* 5: 58, 1972
- 24) May P, Donabedian RK: A sensitive radioimmunoassay for thyrotropin releasing hormone. *Clinica Chimica Acta* 46: 371-376, 1973
- 25) Oliver C, Charvet JP, Codaccioni J, Vague J: *J Clin Endocrinol Metab* 39: 406-409, 1974
- 26) Bassiri R, Utiger RD: Serum inactivation of the immunological and biological activity of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 91: 657-664, 1972
- 27) 満間照典, 広岡良文, 仁瓶禮之: TRH radioimmunoassay—血清による TRH immunoreactivity 不活性化に及ぼす諸因子の検討について—. *日内分泌誌* 51: 316, 1975
- 28) 満間照典, 広岡良文, 仁瓶禮之: Thyrotropin releasing hormone (TRH) radioimmunoassay 法に於

- ける血中値に及ぼす諸因子の検討。日内分泌誌 **51**: 793-802, 1975
- 29) 山内一征, 鰐部春松, 今井幸宏, 他: 人血漿による TRH の不活性化。日内分泌誌 **53**: 308, 1977
- 30) 撫佐公孝, 山本鈴代, 大島一洋, 斎藤史郎: 日内分泌誌 **51**: 318, 1975
- 31) Reichlin S, Martin JB, Mitnick M, et al: The hypothalamus in pituitary-thyroid regulation. *Rec Prog Horm Res* **28**: 229-286, 1972
- 32) 内海正文, 立岩 誠, 日下孝明, 他: TRH の radio-immunoassay—各種条件下のラット視床下部 TRH の変動について。日内分泌誌 **51**: 318, 1975
- 33) 石原睦夫, 和田勝祥, 石飛和幸, 原田義道: 甲状腺機能低下を伴った下垂体性こびと症の 8 例—GH と甲状腺機能の関係について—。ホと臨床 **23**: 1113-1117, 1975