Osaka University Knowledge Archive

Title	寒天免疫電気泳動法による131I-トリヨードサイロニン及び131I-サイロキシン結合蛋白の研究
Author(s)	川波, 寿
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1967, 27(9), p. 1179-1193
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20642
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

寒天免疫電気泳動法による ^{131}I-トリヨードサイロニン及び ^{131}I-サイロキシン結合蛋白の研究

九州大学医学部放射線科学教室（指導　入江英雄教授）
大学院学生　川　波　寿

（昭和42年3月13日受付）

A Study of ^{131}I-L-triiodothyronine and ^{131}I-L-Thyroxin Binding Protein Employing Autoradiography of Immunoelectrophoretic Patterns

By

Hisashi Kawanami

Department of Radiology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka
(Director: Prof. Dr. Hideo Irie)

Circulating thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) are attached to the specific globulin characterized by an electrophoretic mobility intermediate between alpha-1 and alpha-2 globulin. This globulin is called the thyroxine binding globulin or protein (TBG or TBP). The purpose of this study was to examine the protein binding of ^{131}I-labeled-T3 and ^{131}I-labeled-T4 by autoradiography superimposed on immunoelectrophoresis. This method was used here with three thyroid function tests in 5 patients to determine what differences existed between T4 and T3.

Materials and Methods.

Materials: Sera of 51 patients who received the thyroid function tests was employed. ^{131}I-L-T3 was added to the sera in the ratio 1:3 and permitted to stand for 20 minutes to 24 hours at room temperature.

Methods: Immunoelectrophoresis was carried out in 1.0% ion agar in 0.05 M veronal buffer pH 8.6 at 5 volts/cm for 60 minutes. Antibody diffusion was maintained for 48 hours. Slides were washed free of unreactive protein, dried and stained with Sudan black 10B and PAS separately. Slides were in contact with the X-ray film for 24 hours.

Results:

Four or five black arcs were visualized by autoradiography in the sera of euthyroids. They were identified as alpha-2-lipoprotein, alpha-1-glycoprotein, alpha-1-lipoprotein, albumin and prealbumin. In 51 cases these black arcs were observed.

About the sera of 15 hyperthyroids the black arcs of alpha-1-glycoprotein were not visualized in 6 cases (60%). In 27 euthyroids they were visualized in 9 (22%). They were prominently visualized in all 5 hypothyroids. Other black arcs in the autoradiogram did not differ between hyperthyroids and hypothyroids. ^{131}I-thyroxine was more affinitive for alpha-1-glycoprotein than ^{131}I-T3 but less affinitive for alpha-1-lipo-protein and alpha-2-lipoprotein than ^{131}I-T3.

Conclusion:

1) In the autoradiogram of the immunoelectrophoretic pattern the second black arc seems to correspond with alpha-1-glycoprotein.

2) So-called TBG or TBP consists of alpha-1-lipoprotein, alpha-2-lipoprotein and alpha-1-glycoprotein.

3) ^{131}I-T3 is bound to alpha-2-lipoprotein, alpha-1-glycoprotein, alpha-1-lipoprotein, albumin and prealbumin.

4) The black aro of alpha-1-glycoprotein in the autoradiogram of hypothyroidism is more prominent than that of hyperthyroidism.

5) ^{131}I-T4 is more affinitive for alpha-1-glycoprotein than ^{131}I-T3 but less affinitive for alpha-1 and alpha-2-lipoprotein.

目　次

1. まえがき
2. 文献について
3. 実験方法
　1) 概　要
　2) 方　法
　　(A) 寒天免疫電気泳動
　　(B) 水洗，乾燥
　　(C) オートラジオグラム作成
　　(D) 黒化沈降線の同定
　　a) 染色法による同定
　　イ) アミドブラック染色
　　ロ) 脂肪染色法
　　ハ) 糖蛋白染色法
　　b) 特異抗血清による同定
　　(E) ^{131}I-トリヨードサイロニンと^{131}I-サイロキシンの結合の相違に関する検討
4. 実験結果
5. 臨床的応用について
　1) 甲状腺機能と各黒化沈降線の出現の傾向について
　2) トリオソルブ摂取率とα_1-糖蛋白黒化沈降線の出現について
　3) ^{131}I-摂取率と糖蛋白黒化沈降線出現について
6. 考　察
　1) プレアルブミンとの結合について
　2) アルブミンとの結合について
　3) α_1-糖蛋白との結合について
　4) リポ蛋白との結合について
7. むすび

1. まえがき

最近種々のホルモンが血中に流出され，末梢まで運搬されるまでの運搬体としてホルモン結合蛋白が重要視されるようになつてきており[1]，中でも甲状腺ホルモン，インシュリン[2]，ステロイドホルモン[3]，性ホルモン等についての結合蛋白の研究は盛んになつてきている．このうちで甲状腺ホルモン結合蛋白は^{131}Iを用いて比較的よく研究されていて，その結合蛋白は Thyroxine-Binding-Protein 及び Triiodothyronine-Binding-Protein 共に略してＴＢＰ)，或いは Thyroxine-Binding-Globulin 及び Triiodothynonine-Binding-Globulin（共に略してＴＢＧ）と呼ばれている．このＴＢＰ又はＴＢＧ（以下ＴＢＰ総括する）は α_1-α_2グロブリン分画中のものであつて，糖蛋白の一種とされているが，一方 in vitro で甲状腺ホルモンと結合するリポ蛋白もやはり α_1-α_2 グロブリン分画中に存在するので，一体どの結合蛋白が甲状腺機能を反映しているのかを明らかにしたいと考えた．又従来，１つのものとされていた．ＴＢＰの概念について寒天免疫電気泳動法とオートラジオグラフを用いて検討し，^{131}I-Thyroxin (^{131}I-T_4) と^{131}I-Triiodothyronine (^{131}I-T_3) の結合傾向の相違についても検討を加えた．

更に51例の甲状腺機能検査を受けた患者の血清について，オートラジオグラフに出現する黒化沈降線と甲状腺機能との関係について，検討を加えた．

2. 文献について

甲状腺結合蛋白を最初に明らかにしたのは1952年 Gordon 及び Pitt-Rivers である．即ちBarbital buffer, pH8.6を用いて，濾紙電気泳動法によつて血中サイロキシン結合蛋白の存在を明らかにした[4]．続いて Deiss[5] 及び Winzler[6] 等はこの甲状腺ホルモン結合蛋白が濾紙電気泳動において α_1-と α_2-グロブリンと中間の移動度を示す inter-α-Globulin であることを認め，^{131}I を患者に経口的に投与し，24～48時間後の血清の蛋白分画中の ^{131}I の分布状態をしらべて，その80～90%は inter-α-Globulin 中にあり，残りはアルブミンと結合していることを認めた．そしてこの甲状腺ホルモン結合蛋白を Thyroxine-Binding-Protein (TBP) 又は Thyroxine-Binding-Globulin (TBG) と名付けた．そして甲状腺機能の相違によつてＴＢＰの量が変動することを認めた．

さらに，Robbins[7] 等は ^{131}I-T_4 を in vitro で患者の血清に加えて，同様に濾紙電気泳動を行い，やはり ^{131}I-T_4 結合蛋白が inter-α-Globulin 中に存在する事を認めた．なおこの場合，^{131}I-T_4 の濃度が非常に高い場合に β-及び γ-Globulin領域にも少量の ^{131}I-T_4 結合蛋白が存在することを認めたが，これらは後程，"Reverse-flow" 濾紙電気泳動によつて，人工産物であることが分り，濾紙によつて吸着されたものであるとされた．次に ^{131}I を経口的に投与した場合の ^{131}I-T_4 結合蛋白の時間的推移を分析する為，三宅[8] は濾紙よりもグロブリン分画の分離のよい澱粉ゲル電気泳動法を用いて，^{131}I 治療後の血清の各蛋白分画中の ^{131}I 分布を検討し，比較的早期には ^{131}I は主として，アルブミン分画中に見られるが，漸次 inter-α-Globulin に移行し，その Radioactivity は T_4 又は T_3 結合蛋白によるものであることを証明した．同様な方法で鳥取等[9]は PB-^{131}I の大部分は α_2-グロブリン分画中に含まれることを確めた．然も ^{131}I 内服後，7時間では ^{131}I は各血清分画中に広く分布しているけれども24時間目では α_2-グロブリンに集つていることを認めた．

1953年に K.Schmid[10] は正常人血清から得られる Fraction Ⅳ及びⅤから，さらに超遠心法で分離された3つの α_2-グロブリンに相当する成分を得て，これらはZn-α_2-糖蛋白，Ba-α_2-糖蛋白等のα_2-糖蛋白であることを認めた．これらの α_2-糖蛋白については，Robbins 等[11]は ^{131}I 投与後の患者血清を pH 8.6 バルビタール緩衝液の濾液の濾紙電気泳動法で得られる所謂 inter-α-Globulin 分画中のＴＢＰにその沈降係数からも類似しているとし，Mehl[12] 等の述べた M-2 Protein にも類似していることを認めた．一方 Tata[13] は Cohn Fraction Ⅳ-9及び全血清よりＴＢＰの精製を行い，これが糖質を多く含み，低脂質のものであることを証明し，さらに沈降係数 3.5Ｓで α_1-糖蛋白に類似していることを認めた．

Ingbar[14]は1958年でベロナール緩衝液(pH 8.6, 0.1M) では ^{131}I-T_4 が濾紙電気泳動法でinter-α-Globulin とアルブミンに結合するが Tris buffer (pH 8.6, 0.5M) では主に inter-α-Globulin とプレアルブミンに結合することを認め，これを Thyroxine-Binding-Prealbumin(TBPA) と命名した．このＴＢＰＡについて Tata[13] トリプトフアンが少いＴＢＧと区別している．しかしＴＢＰＡの存在について，疑問視する人達もいるわけで，Hamalsky[15] 等は Tris buffer が T_4 と蛋白の結合に影響を与えると述べているし，一方 Barbital がＴＢＰＡと T_4 との結合を阻害するのだと述べる人もいる．田中等[16]も本来 T_4 はプレアルブミンに結合するものでないと述べている．即ち，T_4 の側鎖であるアラニン基をプロピル基又は酢酸基に代えたものは Barbital buffer を用いてもプレアルブミンに結合するということや，Tris buffer のpHを 8.6から 7.6にすると T_4 はアルブミンとＴＢＧにのみ結合する事実から[17]，緩衝液によつて T_4 とプレアルブミンの結合傾向が全く異なるものとしている．このようなわけでＴＢＰＡの生理的意義が疑問視されていたが，分離能のすぐれた蛋白質の吸着の少い寒天電気泳動法[18]を用いると，種々の緩衝液でも，T_4 はＴＢＰＡに結合し[19]，更らに，T_4 のＴＢＰＡへの結合を阻害する薬剤をヒトに投与すると，ＰＢＩの低下を来すこと等[20]から，ＴＢＰＡは T_4 の輸送に関与していると考えられるに至つた．最近 Oppen-

heimer 等[21]はこのＴＢＰＡを Cellulose Column と澱粉ゲルを用いて精製し，免疫学的に純粋なものを得て，これまでに分離されていたプレアルブミンの性状と一致していることを認めたことから，一層ＴＢＰＡの存在を明らかにした．

Triiodothyronine は Thyroxine に比べて，生体中の割合は５～10％でその生理的作用は殆ど変らないが，ＴＢＰとの結合能は T_4 に比べてそれほど強くなく，ＴＢＰＡとは殆ど結合しないと云われている[22]．田中等[23]や Parrow[24] も T_3 はＴＢＰＡに殆ど結合しないと述べている．Tata[25] 等は T_4 のＴＢＧに対する結合力に比べて T_3 は約70％でありＴＢＰＡとは全く結合しないと述べている．

ＴＢＰの T_4 又は T_3 に対する結合能は甲状腺の機能によつて変動があり，Silversterin[26] は正常機能で 20.7± 4.8γ/dl，亢進症で 17.1± 5.0γ/dl，低下症で24.3± 4.6γ/dlとしている．しかもＴＢＰの結合能は重症ネフローゼ[27]，アンドログン治療中[28]，重症肝疾患[29]，転移を伴う重症悪性腫瘍[28]において，減少するとされている．又田中[30]はＴＢＰが先天的に欠損している症例を報告している．一方妊娠およびエストロゲン治療中では血中ＴＢＰは増加するとされている[31)~33]．

Hamalsky[27)34] 等は Triosorb Resin Sponge Uptake 値の変動をみて，妊娠後３週間から７週間後にＴＢＰの増加がおこり，その後は妊娠の全期間中を通じてＴＢＰは増加し，産後１～２週間で元に戻るとしている．そこで妊娠のＰＢＩの高値はエストロゲンの増加によるＴＢＰの増加であることが分る[35]．

更にＴＢＰを検討する場合には甲状腺ホルモンのＴＢＰの結合を阻害する物質があるということを注意しておく必要がある．それらの物質は Salicylate[36)39], Penicillin G[37], CO_2 畜積[38] Butazoline[39] 等である．即ち Salcylate は T_4 のプレアルブミンとの結合を抑制し，Diphenyl-hydantoinは T_4 の inter-α-Globulin との結合を抑制する．Penicillin G は T_4 のプレアルブミンとの結合を抑制し，CO_2 畜積や Butazoline は T_4 のＴＢＰの結合に影響を及ぼす様である．

1953年に Graber および Williams[40)41]，は電気泳動と寒天ゲル内沈降反応を組み合わせて，血清蛋白質の細分化に成功したが，この免疫電気泳動法を用いると，従来の濾紙電気泳動や澱粉電気泳動で分離される α_1-α_2 グロブリン分画は orusomucoid, α_1-glycoprotein, α_1-lipoprotein, haptoglobin, ceruloplasmin, α_1-macroglobulin, α_2-lipoprotein 等の他多数の蛋白成分が同定されている．そこで濾紙電気泳動における inter-αglobulin 中のＴＢＰが免疫電気泳動法で如何なる成分の沈降線に相当するかは興味ある所である．

Munker[43]等は ^{131}I-T_4 及び ^{131}I-T_3 をヒト血清に混ぜ免疫電気泳動を行い更にオートラジオグラムを行つて，^{131}I-T_4 及び ^{131}I-T_3 が α_2-リポ蛋白，α_1-リポ蛋白，リポアルブミンに結合すると述べており，Lohss 及び Kallee[44] はやはり，^{131}I-T_4 を in vitro で血清に0.22μg/ml の割合で混ぜ，兎の全人抗血清を用いて，免疫電気泳動を行つた．そしてそのオートラジオグラムに出現する黒化沈降線を少くとも３つ以上の成分の上に認めた．即ちアルブミン，α_1-リポ蛋白，α_2-リポ蛋白，であつた．しかし両者とも Robbins等の述べる糖蛋白と云われているＴＢＰとの関係はまだあきらかでない．リポ蛋白が本来糖分を含まないことと合わせて，ＴＰＢが低脂質で糖分に富んでいると云われている[13]ことからリポ蛋白と従来から知られているＴＢＰとは明らかに別の成分と思われる．

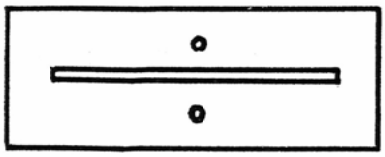
3.　実験方法

1）概要：被検血清と ^{131}I-Triiodothyronine（150μc/ml）を試験管内で混合し，これを試料として寒天免疫電気泳動を行い，水洗乾燥後，Ｘ線フイルムでオートラジオグラムを行つた．Ｘ線フイルムに出現した黒化沈降線を同定するため，特殊染色法及び特異抗血清を用いた．さらに約50人の甲状腺機能検査被検者に対して上記の方法で黒化沈降線の出現の具合を検討した．^{131}I-Thyroxine と ^{131}I-Triiodothyronine の黒化沈降線の出現の相違についても若干の検討を加えた．

2）方法

（A）寒天免疫電気泳動．

Fig. 1 Serum of patients was poured into each well and anti human whole serum into groove.



被検血清と ^{131}I-Triiodothyronine (^{131}I-T_3)（約150μc/ml）を3：1の割合に混合したものを試料として使用した．支持体に Oxoid の Ionagar No. 2寒天を用いた．緩衝液として次の処方のものを電極槽に用いた．

即ち
- Veronal ソーダ　17 g
- 1 N-塩酸　23ml
- 水　1 l

pH 8.6　$\mu = 0.1$

寒天板用にはこれを$^1/_2$に蒸留水で稀釈した．装置は Elema. の寒天電気泳動装置を用いて，泳動条件は5 volts/cm，で約60分間泳動した．泳動後，直ちに Fig. 1の溝の中に抗全人血清馬血清*を流し込み，拡散反応をおこす．

B）水洗，乾燥：48時間，室温でシヤーレの中で拡散反応をおこし，沈降線が充分出現してから，生理的食塩水で余分な血清を洗い，さらに24～48時間程，充分に水洗した．その後孵卵器で約37℃の温度で乾燥させた．

*抗血清は阪大微生物病研究会の抗人血清馬血清を用いた．

（C）オートラジオグラム

乾燥後，X線フイルムが化学反応をおこさないように標本をサランラップにつつみ，フイルムカセッテにてX線フイルムと密着させ24時間，暗室に放置して現像した．

（D）黒化沈降線同定について．

甲状腺機能正常者の血清では4本ないし，5本の黒化沈降線がオートラジオグラムに出現するので，その黒化沈降線がどの血清蛋白質に相当するかを同定するために，特殊染色法および特異抗血清を用いた．

（a）染色法による同定

（イ）アミドブラック10B染色法．

抗全人血清で拡散反応をおこした全ての蛋白質を染色するため，次の処方によるアミドブラック10Bで染色して後，2％酢酸溶液で脱色した．

即ち
- アミドブラック10B　6 g
- メタノール　450ml.
- 氷酢酸　100ml.
- 水　450ml.

（ロ）リポ蛋白染色法．

一方，他の免疫電気泳動後の標本について脂肪染色を行つた．染色の処方は，

- ズダンブラックB　0.1 g
- 55％エタノール　100ml.

であつて，2時間染色後，45％エタノールで脱色した．

（ハ）糖蛋白染色法．

さらに，他の標本に対し，糖蛋白染色を行つた．即ち，

1）95％，エタノール中に10分間標本をつける．

2）
- 過ヨード酸（50％）　2.5ml
- $^1/_5$M酢酸ソーダ　25ml.
- 蒸留水　250ml.

3）0.001N塩酸で洗う．

4）ヨードカリ水溶液につける．

5）Schiff 試薬中で充分発色させる．

6）$Na_2S_2O_6 \cdot 2H_2O$を 0.1N塩酸で洗う．

b）特異抗血清による同定

オートラジオグラムに出現する黒化沈降線がリポ蛋白及び糖蛋白であることが推定されたので Fig. 2の様な方法で標本の免疫電気泳動を行つた．なお，特異抗血清には各々，抗 α_1-リポ蛋白血清，抗 α_2-リポ蛋白血清，抗 α_1-acid Glyco-

Fig. 2 Specific anti-serum was pourd into upper groove and anti-human whole serum was poured into lower groove.

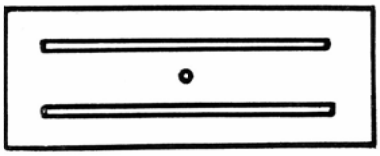
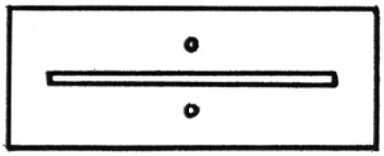


Fig. 3 The compound of ^{131}I-T3 and serum is poured into upper well and the compoud of ^{131}I-T_4 and serum into lower well.



protein血清，抗マクログロブリン血清を用いた．そこで各々の黒化沈降線とどれに相当するかを検討した．

E）^{131}I-T_4 と ^{131}I-T_3 とではどのような各種蛋白との結合に相違がみられるかを同様な免疫電気泳動とオートラジオグラムによつて検討した．即ち Fig. 3に示すように人血清と ^{131}I-T_4 及び ^{131}I-T_3を別々に同じ割合に加えたものを資料として，寒天板の下と上で泳動し，その中間に抗全人血清をおいて，拡散反応をおこした．甲状腺機能亢進症，低下症，正常人の血清について，この方法で検討した．

4. 実験結果

甲状腺機能正常者の血清ではオートラジオグラムに4本ないし5本の黒化沈降線があらわれる．即ちFig. 4の如く抗人全血清で免疫電気泳動後，標本をアミドブラック10Bで染色されたものは

Fig. 4 After immunoelectrophoresis was carried out, the slide was stained with amido-black 10 B.

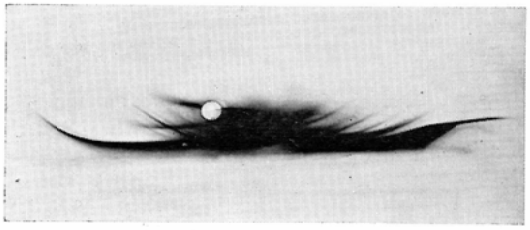


Fig. 5 Four ^{131}I-T3 black arcs were obtained in all autoradiograms of the slides.

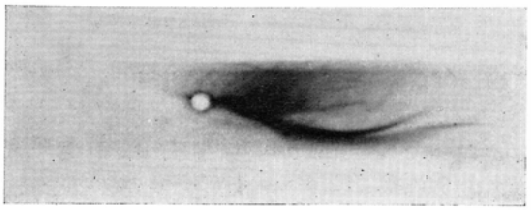


Fig. 6 Pattern of four radioactive sickles in autoradiograms.

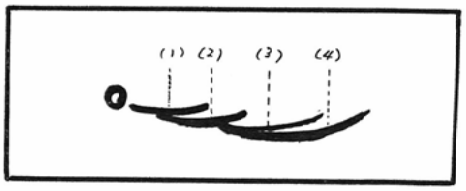


Fig. 7 Immunoelectrophoretic pattern was stained with Sudan black 10B.

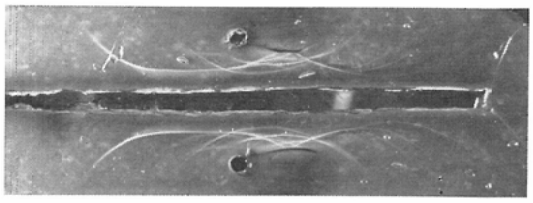


Fig. 8 ^{131}I-T3 was bound to alpha-1-lipoprotein and alpha-2-lipoprotein.

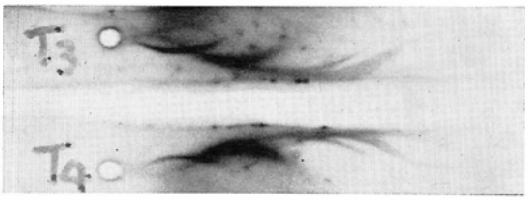


Fig. 5の如く4本の黒化沈降線があらわれたFig. 5のシエーマをあらわしたFig. 6での原点より最も遠い4番目の沈降線はその移動度および沈降線の太さからみてアルブミンであることが分つた．

又，原点から最も近い1番目の沈降線と3番目の沈降線は Sudan Black10Bで染色されたことから各々 α_2-リポ蛋白であり，α_1-リポ蛋白であることが分つた．(Fig. 7及び Fig. 8)．

この事の証明のために，抗 α_1-リポ蛋白血清及び抗 α_2-リポ蛋白血清を用いて，免疫電気泳動とオートラジオグラムを行うと，それぞれ，Fig. 9，Fig.10，Fig.11，Fig.12のように α_1-リポ蛋白と α_2-リポ蛋白が ^{131}I-T_3 と結合していることがさらに証明されたわけである．

Fig. 6に於けるシエーマで，原点より2番目に近い沈降線について，これがFig.13における糖蛋

Fig. 9 Upper immunoelectrophoretic pattern was obtained with anti-alpha-2-lipoprotein serum and lower was pattern obtained with antihuman whole serum.

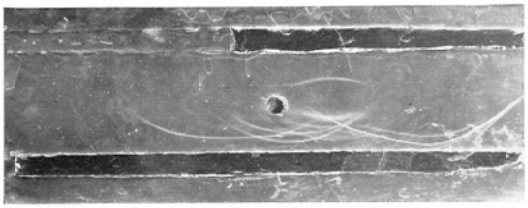


Fig. 10 Upper radioactive sickle in this autoradiogram is made by traces of alpha-2-lipoprotein. Therefore (1) sickle in the fig. 6 corresponds to alpha-2-lipoprotein.

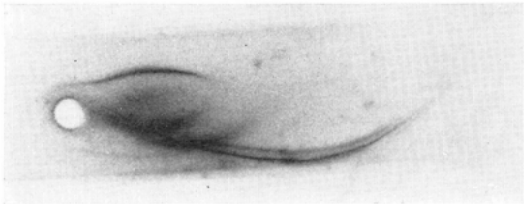


Fig. 11 Upper immunoelectrophoretic pattern was obtained with antialpha-1-lipoprotein serum and lower was obtained with antihuman whole serum.

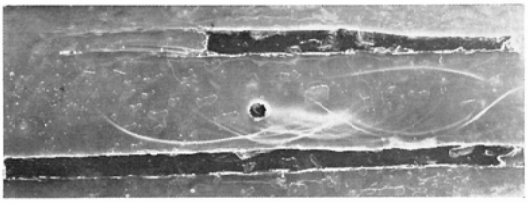
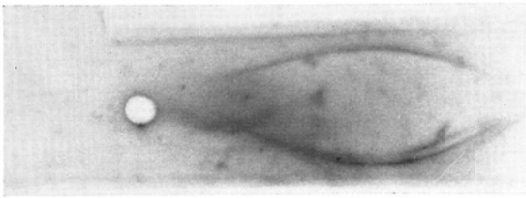


Fig. 12 The upper radioactive sickle in this autoradiogram is made by traces of alpha-1-lipoprotein. Therefore (3) sickle in the fig. 6 corresponds to alpha-1-lipoprotein.



白染色（ＰＡＳ染色）の沈降線と一致していることから，糖蛋白であることが分つた．α_1-α_2 分画にある糖蛋白は10種類近く存在するが，著者はその移動度や沈降線の太さ等からそのうち，

Fig. 13 After immunoelectrophoresis was carried out, the slide was stained with PAS.

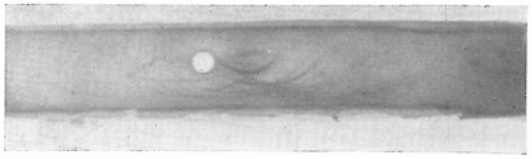


Fig. 14 Autoradiogram of the slide. (3) radioactive sickle in the fig. 6 corresponds to alpha-1-glycoprotein.

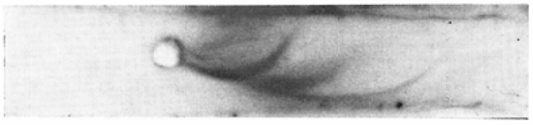


Fig. 15 Upper immunolectrophoretic pattern was obtained with anti-alpha-1-acid glycoprotein.

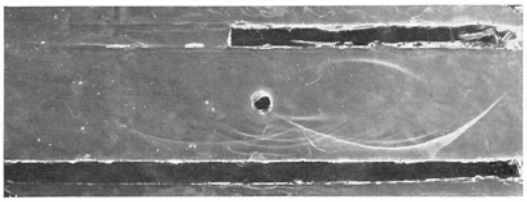
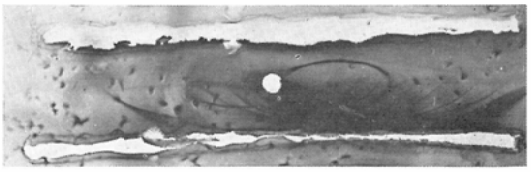


Fig. 16 Autoradiogram of the slide. (Fig. 15)

Fig. 17 Upper immunoelectretic pattern was obtained with antialpha-2-macroglobulin and anti-human whole serum.



α_2-Acid-Glycoprotein, α_1-糖蛋白，α_2-マクログロブリンが考えられる．そこで α_1-Acid-Glycoprotein 及び α_2-マクログロブリンに対する特異抗血清をそれぞれ Fig.15，Fig.17の如く上の溝に流し

Fig. 18　Autoradiogram of the slide. (Fig. 17)

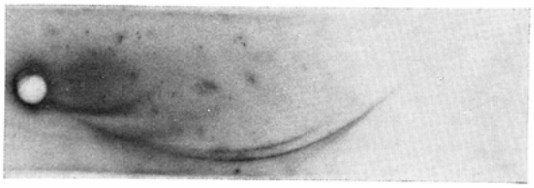


Fig. 19　Autoradiogram of immunoelectrophoresis of serum in a patient with hyperthyroidism.

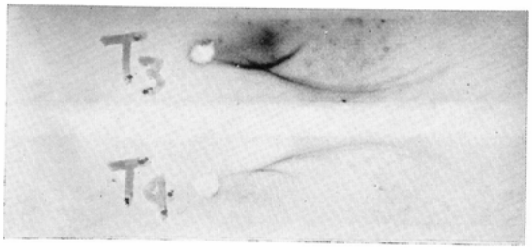


Fig. 20　Autoradiogram of immunoelectrophoresis of serum in a patient with of euthyroidism.

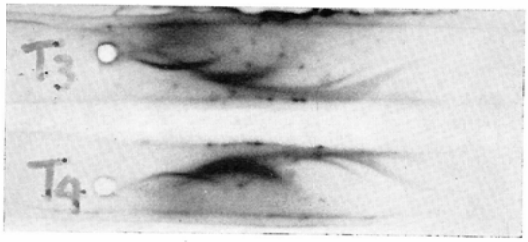


Fig. 21　Autoradiogram of immunoelectrophoresis by means of the serum in a patient with hypothyroidism.

て免疫泳動を行い，Fig.16，Fig.18の如くオートラジオグラムを行つた所，そのいずれも黒化をみず，この事から少くとも2番目の沈降線は α_1-Acid-Glycoprotein や α_2-マクログロブリンでない事が分つた．又現在の所，α_1-糖蛋白に対する抗血清が作成されていないので，同じ方法で確かめることは出来ないが，移動度からみて α_1-糖蛋白と推定される．^{131}I-T_4 と ^{131}I-T_3 ではどのような各種蛋白との結合に相違がみられるかをFig. 3の如く，検討した．Fig.19，Fig.20，Fig.21から明らかなように ^{131}I-T_4 はいずれも ^{131}I-T_3 に比べてアルブミンよりも移動度の速い，プレアルブミンにも結合していることが分つた．又，原点より2番目に遠い黒化沈降線，即ち α_1-糖蛋白は甲状腺機能亢進症と低下症とは明らかな相違がみられ，機能亢進症になるにつれて外部から加えられた ^{131}I-T_4 及び ^{131}-IT_3 との結合力は弱いことが分つた．しかも ^{131}I-T_4 の方が ^{131}-T_3 よりも結合力が強いことを知つた．一方原点に最も近い α_1-リポ蛋白，3番目に遠い α_2-リポ蛋白についてはいずれも ^{131}I-T_3 は ^{131}I-T_4 よりも強く結合していることが分つた．アルブミンについては ^{131}I-T_4 と ^{131}-T_3 の結合力について有意の差は認められなかつた．

5.　臨床的応用

1)　甲状腺機能と各黒化沈降線の出現傾向について，Fig.18に示すように原点から近い方から各々，α_2-リポ蛋白，α_1-糖蛋白，α_2-リポ蛋白，アルブミン，プレアルブミンの黒化沈降線の出現の傾向について51例の甲状腺機能検査を受けた患者の血清について，検討した．

Table 1.　Appearance rate of radioactive sickles of alpha-2-lipoprotein

	Total No. of cases	No. of cases with sickle apperance	percentage
Hyperthyroidism	15	15	100%
Hyperthyroidism during therapy	4	4	100%
Euthyroidism	27	27	100%
Hypothyroidism	5	5	100%

α_2-リポ蛋白との結合はTable 1の通り，すべての症例について黒化沈降線の出現を認め，甲状腺機能の違いによる差は認められなかつた．

α_1-糖蛋白についてみると Table 2に示す通りである．明らかに甲状腺機能亢進症と低下症とは差がみられた．即ち外部から血清に加えられた

Table 2. Appearance rate of radioactive sickles by alpha-glycoprotein

	Total No. of cases	No. of cases with sickle apperance	percentage
Hyperthyroidism	15	5	33.3%
Hyperthyroidism on therapy	4	3	75 %
Euthyroidism	27	21	78 %
Hypothyroidism	5	5	100 %

Table 3. Apperance rate of radioactive sickles by alpha-1-lipoprotein

	Total No. of cases	No. of cases with sickle apperance	percentage
Hyperthyroidism	15	14	93.5%
Hyperthyroidism on thearpy	4	4	100.0%
Euthyroidism	27	24	89.0%
Hypothyroieism	5	5	100.0%

Table 4. Apperance rate of radioactive sickles by albumin

	Total No. of cases	No. of cases with sickle apperance	percentage
Hyperthroidism	15	15	100%
Hyperthyroidism on therapy	4	4	100%
Euthyroidism	27	27	100%
Hypothyroidim	5	5	100%

^{131}I-T_3 は低下症の α_1-糖蛋白にいずれも濃く出現し，しかも5例とも 100%にその黒化沈降線の出現をみたのに対し，亢進症では沈降線の出現は低下症に比べてはるかに薄く，又その出現度も15例中5例と低いものであつた．そこで従来云われていたＴＢＰは原点より2番目に（Fig. 6）に近い所に出現する α_1-糖蛋白が大部分を含めている事が推察出来る．

α_1-リポ蛋白の黒化沈降線の出現についてはTable 3に示す通りである．α_2-リポ蛋白と同じく甲状腺機能の相違による出現度の差はみられず殆ど 100%に近く出現している．

アルブミンと^{131}I-T_3との結合についてはTable. 4に示す通りである．即ち全ての症例において黒化沈降線の出現をみた．アルブミンには α_1-糖蛋白に飽和結合した残りの ^{131}I-T_3 が結合するものと思われる．

Table 5. Apperance rate of radioactive sickles by prealbumin

	Total No. of cases	No. of cases with sickle apperance	percentage
Hyperthyroidism	15	3	20 %
Hyperthyroidism on therapy	4	2	50 %
Euthyroidim	27	4	14.8%
Hypothyroidism	5	1	20 %

プレアルブミンについては Table 5に示す通りである．甲状腺機能による ^{131}I-T_3 との結合をあらわす黒化沈降線の出現の差があると殆んど云えないが，全般的に20%程度に黒化沈降線の出現をみる．唯プレアルブミンは正常な人血清で必ずしも現われるとは限らないのでこの表からあまり大きな意味を求めることは出来ないと思う．

以上述べたように，α_2-リポ蛋白，α_1-リポ蛋白，アルブミン，プレアルブミンはその黒化沈降線の出現の傾向は甲状腺機能状態の差によつて殆んど差がみられなかつたが，しかし α_1-糖蛋白では甲状腺機能亢進症と低下症との間に明らかな差がみられた．即ち甲状腺機能が高くなるにつれてその黒化沈降線の出現度が低下し，反対に，甲状腺機能低下症では 100%に出現し，しかもその出現状態は高濃度にあらわれていた．即ち，この蛋白が従来から述べられていたＴＢＰと思われるゆえんである．

2） トリオソルプ値と α_1-糖蛋白黒化沈降線の出現について．

最近よく用いられている甲状腺機能検査の一つであり，しかも Resin Sponge によつて，間接的に ^{131}I-T_3 とＴＢＡの結合力を表わすトリオソルプ値と原点より2番目に近くあらわれた．α_1-糖蛋白黒化沈降線について検討（Fig. 6）することは興味あることと思われる．Table 6に示すようにトリオソルプ値が50%以上の血清では殆んどが

Table 6. Correlation between triosorb resin sponge uptake and apperance of radioactive sickles by alpha-glycoprotein

Triosorb uptake	No. of cases with sickle apperance	No. of cases with sickle non apperance
～ 50%	1	5
50 ～ 40%	3	5
40 ～ 30%	22	6
30 ～	6	0

Table 7. Correlation between ^{131}I-uptake and apperance of radioactive sickles by alpha-1-glycoprotein

^{131}I-uptake (%)	No. of cases with sickle apperance	No. of cases with sickle non apperance
～ 40%	1	4
40 ～ 30%	1	2
30 ～ 20%	8	3
20 ～ 10%	12	3
10 ～ 5%	4	3
5%～	9	1

黒化沈降線の出現をみず，反対に30%以下の血清では6例とも全例について濃く黒化し，出現していることが分つた．即ち α_1-糖蛋白と ^{131}I-T_3 の結合能がトリオソルブ値に大いに影響しているものと思われる．

3) Na^{131}I 経口投与による甲状腺摂取率 (^{131}I-Uptake) と α-糖蛋白黒化沈降線の出現について，

Table 7に示す通り，大体 ^{131}I-Uptake 値が高い程，出現度は低く，反対に Uptake 値が低い程出現度は高くなつていることが分つた．即ち5%以下と低い人は10人中9人の90%は沈降線の出現をみており，逆に40%以上の高い人は5人中1人しか出現していない．

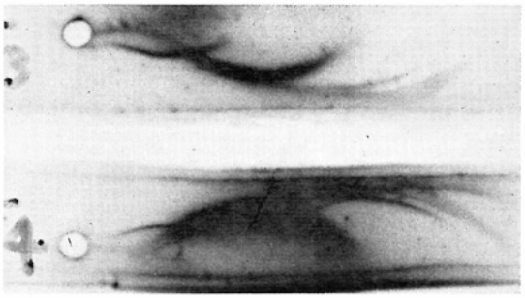
6. 考　察

甲状腺ホルモン結合蛋白の直接的な測定法はTBPが血清中に極くわずかしか存在しないために，困難なものであり，外部から ^{131}I-T_4 又は ^{131}I-T_3を血清中に添加して，TBPの Binding site を飽和して，間接的にTBPの測定がなされている．このような "Saturation Method" で測定されたTBGの正常値は約20μg/dlである[45)46)47)]．一方飽和された余分の T_4 又は T_3 はプレアルブミン，アルブミンに結合するが，その結合能についての報告ではそれぞれTBPAは120μg/dl から230μg/dl[48)49)]であり，アルブミンは 1,000μg/dl[50)] 以上とされている．T_3 は T_4 に比べてTBP，アルブミン，プレアルブミンに対し，その結合力は弱いとされて[15)]いるので上記の T_4 結合能よりT_3 結合能は低くなるものと思われる．しかし著者の実験の結果の如く，リポ蛋白にも T_4 及び T_3 が結合することが判明しているにもかかわらず，その結合能はまだ明らかでない．それどころか濾紙電気泳動や澱粉電気泳動であらわされてきた inter-α-Globulin に属するTBPはこの α_1-リポ蛋白，α_2-リポ蛋白も含めて表現してきたように思われる．著者の実験ではリポ蛋白は甲状腺機能によつてその結合能は少くとも黒化沈降線の出現の傾向からみて，有意の差はみられなかつた．そしてTBPは第2章で記述したように糖蛋白であるとされてきたが，それが α_1-糖蛋白であるか又 α_2-糖蛋白であるか或いはその他の α-糖蛋白であるかは現在までの分析法では明らかにされていない．しかし免疫電気泳動法とオートラジオグラム法による分析では少くとも原点より2番目に近く出現した黒化沈降線は α_1-糖蛋白と思われ，その出現の傾向が甲状腺機能をよく反映している所から，この沈降線こそTBPの主役を果す蛋白であると考えた．著者はそこで濾紙電気泳動法や澱粉電気泳動法等に比べて更に詳しく個々の蛋白についてみることの出来る免疫電気泳動法を用いて in vitro で^{131}I-T_3 又は^{131}I-T_4 が結合した各血清蛋白分画，即ちプレアルブミン，アルブミン，α_1-リポ蛋白，α_1-糖蛋白，α_2-ポ蛋白についての実験結果より次の諸点に関して考察を行つた．

1) プレアルブミンとの結合について．

プレアルブミンは量が微量で拡散が早いため，通常の濾紙電気泳動では認められないが，寒天ゲル，澱粉ゲルを支持体にした泳動では認めることが出来る[52)]．免疫電気泳動法では二成分が認められ，ρ_1 及び ρ_2 分画と命名される[40)]．ρ_1 はtryptophan-rich-prealbumin[53)] と呼ばれ，トリプトファ

Fig. 22 Black are farthest from the well seems to correspond to location of prealbumin.



ンや多糖体の含量が多い蛋白である．他は ρ_2-リポ蛋白であり[40]，リポアルブミンとも呼ばれるが，易動度が不安定で血清の保存期間によつて変化すると云われている．T_4 との結合は Buffer によつてその結合能は異り，一定の値が得られていない．T_3 は殆ど結合しないと云われている[54)55)56)57)58)]．然し，T_4 と T_3 を同じ条件のオートラジオグラムでみると明らかに T_3 で T_4 と同じようにプレアルブミンと結合していることを認め，51人の症例中では10人の血清に T_3 とプレアルブミンの結合を認めた．しかし甲状腺機能による差はみられず，いずれも20%前後であつた．(Fig.22)

2） アルブミンとの結合について

アルブミンは血清蛋白の50%以上をしめており，全て肝臓で生成される[59)60)]．従つて肝障害，両生肝，肝腫瘍[61)62)]などで大きく変動するとされているが，甲状腺機能亢進症においては血中アルブミン値は低下するとされ，^{131}I 治療によつて再び正常値に戻るとされている[9)]．アルブミンの機能は未だ不明の点が多いが，ホルモン，電解質，ビタミン等の運搬にあずかるとされ，甲状腺ホルモンも運搬される．この甲状腺ホルモンの運搬に関しては in vitro[63)64)] でも in vivo[65)] でも証明されており，Thyroxin との結合は非常に強く，1,000μg/dl[50)] にも及ぶとされている．Triiodothyronineは T_4 に比べてその結合力は劣るとされている．51人の患者血清を免疫電気泳動後，オートラジオグラムを行つてみると，51人全例について黒化沈降線が得られ，甲状腺機能の差によらずにT_3アルブミンに結合することが認められた．しかし緩衝液によつてその結合の程度が一定しない様に，まだ問題が残つている様である[66)]．

3） α_1-糖蛋白との結合について．

ＴＢＰが inter-α-Globulin に含まれていることが認められて以後[4)]，1954年に Robbins[11)] Schmid[10)]は分離したが Zn-α_2-Glycoprotain 及び，Ba-α_2-Glycoprotein が沈降係数その他から，ＴＢＰと姿似しているが，Tata[13)] は1961年に Cobn-Fraction Ⅳ-9 より種々の分析法を用いて，沈降係数 3.5Sの α_1-糖蛋白に似た蛋白を得ている．そしてＴＢＰの成分が糖分に富み，脂肪，トリプトファンの含量が少いとしているので，いずれにしても，糖蛋白であることは確かである．

α_1-α_2 画の糖蛋白では Orsomucoid, α_1-Glycogrotesn, Cernloplasmin, Haptoglobin, α_2-Macroplobulin, Ba-α_2-Glycoprotein,Zn-α_2 Glycoprotein Acidic-α_2-Glycoprotein 等が現在まで分つている[42)]．この中，Ceruloplasmin や Haptoglobin はその作用機序や沈降係数の違い等より，ＴＢＰとは明らかに別個のものであり，又 Macroglobin と Orsomucoid はその特異抗血清を用いてのオートラジオグラムで黒化沈降線の出現をみなかつたのでこれらもＴＢＰとの別個のものと思われる．著者の免疫電気泳動法による黒化沈降線の位置からみるとα_1-糖蛋白と思われ，Tata[13)] の述べている所に一致する様に思う．

更にこの原点より２番目に近く出現する．黒化沈降線の（Fig. 6）出現度は甲状腺機能の違いによつて明らかに差がみられている．即ちTable 4 に示す如く，甲状腺機能亢進症は15例中５例にのみ黒化沈降線の出現をみており，一方甲状腺機能低下症は５例中５例とも出現しており，Fig. 23, Fig.24, Fig.25に示す如く，その程度の差も違うものと思われる．又 Table 6 に示す如く，トリオ

Fig. 23 Autoradiogram of immunoelectrophoretic pattern in a patient with euthyroidism.

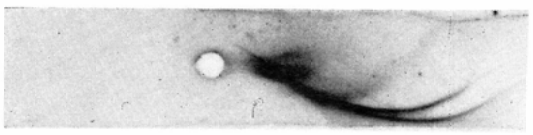


Fig. 24 Autoradiogram of immunoelectrophoretic pattern in a patient with hypothyroidism.

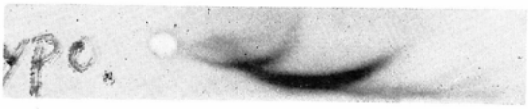
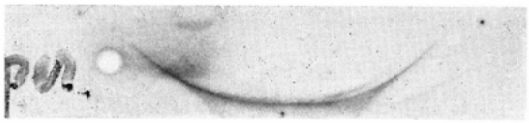


Fig. 25 Autoradiogram of immunoelectrophoretic pattern in a patent with hyperthyroidism.



ソルブ値で50%以上は黒化沈降線の出現が6例中わずか1例であるのに対して，30%以下では6例中全例において出現している．

^{131}Iの摂取率との関係でもTable 7に示す如く40%以上は出現度は5人中1人であるが，5%以下の低い摂取率の人の血清ではその黒化沈降線の出現度が10人中9人と多くなつている．以上のことからでも分るように，この黒化沈降線はまず，従来から述べられているＴＢＰを示す沈降線と思つてよいと思われる．

4)　リポ蛋白との結合について．

α_1-リポ蛋白はρ_2 リポ蛋白とか，リポアルブミンとも呼ばれ，これらが完全に同一なものかは未だ疑問とされている．易動度は ρ_1 とアルブミンの中間であつて，これらは血清の新鮮度，蛋白濃度が関係しているようである．即ち，新鮮な血清では易動度がおそくなり，リポアルブミンとなるようである[67]．しかし谷内[42]はρ_2-リポ蛋白分画，リポアルブミンと呼ばれる分画は認め難いとしており，著者のズダン・ブラックＢ染色法でも50例の症例の血清について認め難いようであつた．

α_1-リポ蛋白甲状腺機能亢進症ではやや上昇し，機能低下症ではやや下降することが報告されているが，悪性腫瘍や肝疾患，ネフローゼ等では低下の傾向があり，糖尿病では上昇する様である[68]．

Munkner[43] やF. Lohes[44] 等も述べたように，α_1-リポ蛋白が T_4 及び T_3 に結合するのは確かであり，著者も免疫電気泳動後のオートラジオグラムに出現する黒化沈降線がズダンブラックＢ肪肪染色法にてもその沈降線が一致し，又抗 α_1-リポ蛋白血清を用いた沈降線に一致する黒化沈降線が得られることから，確かに α_1-リポ蛋白と T_3 とは結合していることが分る．51例の血清の中では，57例（92.1%）に黒化沈降線の出現をみており，又甲状腺機能の違いによつても出現度に差は認められず，黒化の程度の差もないようである．^{131}I-T_4 と ^{131}I-T_3 を in vitro でそれぞれ同量に添加した血清を用いて，免疫電気泳動を行い，オートラジオグラムに出現する沈降線の差をみると，T_3 の方が T_4 よりも強く結合していることが認められた．

α_2-リポ蛋白は濾紙電気泳動では β-リポ蛋白と呼ばれているもので超遠心分析では低比重リポ蛋白（比重 1,063以下）のものである．ネフローゼや閉塞性黄疸の場合著しい上昇を認めるが，甲状腺機能低下ではやや上昇し，亢進症では殆んど変化しないようである[68)69]，免疫電気泳動法では α_2-リポ蛋白が T_3 及び T_4 に結合することが認められており，著者も51例中全例において α_1-リポ蛋白の部分に ^{131}I-T_3 は ^{131}I-T_4 による黒化沈降線の出現を認めた．しかも沈降線の黒化の程度も差を認めないようであつた．しかし ^{131}I-T_4 と ^{131}I-T_3の外部から同量加えて，そのとり込みの相違をみると ^{131}I-T_3 の方がより多く ^{131}I-T_4 より α_2-リポ蛋白に結合していることが認められた．以上の事より α_1-リポ蛋白も α_2-リポ蛋白もともに T_4 及び T_3 に結合することが認められた．リポ蛋白が生体内でも甲状腺ホルモンの運搬体として作動することが考えられるが，一方甲状腺機能によつてその結合程度に差を認めない所から果してＴＢＰの如く直接細胞に働きホルモン活性作用があるかどうかはまだ疑問とする所である．

7.　むすび

甲状腺機能検査に際し問題となる甲状腺ホルモン結合蛋白（ＴＢＰ，アルブミン，プレアブミン，リポ蛋白等）について従来の濾紙電気泳動法に代つて更に詳しく分析出来る，免疫電気泳動法とオートラジオグフフを用いて検討し次の如き結果を得た．

1)　ＴＢＰは原点より2番目に近い黒化沈降線として現れる α-糖蛋白の一種である事を認め，

それはその移動度からみて α_1-糖蛋白であろうと推定した.

2) TBPは従来一つの α-糖蛋白であるとされていたが, その中に α_1-リポ蛋白, α_1-糖蛋白, α_2-リポ蛋白を含む事が分つた.

3) ^{131}I-T_4 及び ^{131}I-T_3 はプレアルブミン, アルブミン, α_1-リポ蛋白, α_1-糖蛋白, α_2-リポ蛋白に結合するが, T_4 の方が T_3よりプレアルブミン及び α_1-糖蛋白に強く結合し, α_1-リポ蛋白, α_2-リポ蛋白にはより弱く結合することを知つた.

4) ^{131}I-T_3 のTBPへの結合状態を51人の臨床例について検討した結果, プレアルブミン, アルブミン, α_1 及び α_2 リポ蛋白には機能による有意の差は認められなかつたが, α_1-糖蛋白は機能低下者では高濃度に結合しているが亢進者のそれには僅かに結合しているに過ぎない事が分つた.

稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師入江英雄教授に対し深甚なる謝意を表すると共に, 御指導及び御助言をいたゞいた前田辰夫助教授, 広島赤十字病院放射線科部長松浦啓一先生, 広島原爆病院放射線科副部長鴛海良彦先生, 九大第三内科福田勉先生に感謝の意を表します.

本論文の要旨は, 第六回日本核医学会総会 (1966年11月) において発表し, 第26回日本医学放射線学会総会 (1967年4月) において発表予定である.

文　献

1) 鳥塚莞爾, 河野剛, 浜田哲, 川瀬満雄, 中塚一夫: Hormone binding proteins 最新医学 vol. 20, 1607, 昭和40年.
2) Prout, T.E., Odak, V.V., Lockwood, D.H. and Dendrig, G.: The insulin carrying protein of normal human serum: Diabetes, 12, 144, 1963.
3) Daughday, W.H.: Binding of corticosteroids by plasma proteins: J. Clin. Invest., 35, 1428, 1956.
4) Gordon, A.H., Gross, S., D. O'Connor & Pitt-Rivdrs: Nature of the circulating thyroid hormone plasma protein complex: Nature 169, 19, 1952.
5) Deiss, W.P., Albright, E.C. & Larson, F.C.: A study of the nature of the circulating thyroid hormone in euthyroid and hyperthyroid subjects by use of paper electrophoresis: J. Clin. Invest. 31, 1000, 1952.
6) Wizler, R.J. & Notrica, S.R.: Association of thyroxine with plasma proteins: Fed. Proc. 11.312, 1952.
7) Robbins, J.: A method for determig the thyroxine binding capacity of serum protein: J. Arch. Biochem. Biophys. 63, 461, 1956.
8) 三宅儀: 甲状腺の疾患, 日本内科学会雑誌, 53, 5号 507, 1964.
9) 鳥取広治, 吉川元之: 第3回日本アイソトープ会議, 放射性ヨウ素の血清タンパク分屑について.
10) K. Schmid: Isolation and characterization of glycoproteins from human plasma. Journal of the American Chemical Society vol. 75, 2532, 1953.
11) J. Robbins, Mary, L. Peterman & Rall, J.E.: Electrophoresis of the thyroxin binding protein of serum at pH 4.5: J. Biol. Chem. 212, 403, 1955.
12) Mehl, J.W., Golden, F. & Winzler, R. J.: Mucoproteins of human plasma Electrophoretic demonstration of mucoproteins in serum at pH 4.5: Proc. Soc. Exp. Biol and Med. 72, 110, 1949.
13) Tata, J.R.: Nature of thyroxine binding globulin in heuman serum: Nature, 18, 573, 1961.
14) Ingbar, S.H.: Further studies on the plasma protein thyroid hormone complex: Endocrinology 66, 780, 1958.
15) Hamalsky, M.W., Stein, M., Fischer, D.B. & Freedberg, A.S.: Further studies on the factors affecting the plasma protein thyroid hormone complex: Endocrinology 68, 662, 1961.
16) 田中茂: 甲状腺ホルモン及び流血中ホルモンと臨床, vol. 10, 57, 1962.
17) Ingbar, S.H. and N. Freinkel: Regulation of the peripheral metabolism of the thyroid hormones: Recent progr. hormone res. 16, 353, 1960.
18) Wieme, R.T.: An inproved technique of agar gel electrophoresis on microscopic slides: Clim. Chim. Acta. 4, 317, 1959.
19) A. Parrow: The plasma protein binding of triiodothyronine and its relation to the uptake of ^{131}I-labelled triiodothyronine by human erythrocytes in vitro: Scandinav. J. Clin. & Lab. Investgation 192, 14, 1962.
20) Woeber, K.A. and Ingbar, S.H.: The effects of noncalorigenic congrners of salicylate on the peripheral metabolism of thyroxine J.

Clin. Invest. 43, 931, 1964.
21) Oppenheime, J.H., Surks, M.I., Smith, J.C. & Squef, R.: Isolation and characterization of human thyroxine binding prealbumin J. Biol. Chem. 240, 173, 1965.
22) Ingbar. S.H.: Prealbumin thyroxin binding protein of human plasma: Endocrinogy 63, 25, 1958.
23) Tanaka Sigeru and Paul. Starr: the binding of thyroxine analogues by huma serum protein: Acta Endocrinologica 31, 161, 1959.
24) Parrow, A.: The plasma protein biding of tritiodothyronine and its relation to the uptake of ^{131}I-Labelled triiodothyronine by human erythrocytes in vitro: Scandinav. J. Clin. & Lab. Investgation 192, 14, 1962.
25) Tata, J.R., Widnell, C.C. & Gratzer, W.B.: A systematic study of factors affecting the binding of thyroxine and released and related substances to serum proteins: Clin. Chim Acta 6, 597, 1961.
26) Silverstein, J.N., Schwartz, H.L., Feldman, E.B., Kydd, D.M. & Carter, A.C.: Correoation of the red blood cell uptake of ^{131}I-1-triiodothyronine and thyroxine binding globulin capacity in man: J. Clin. Endocrinol 22, 1002, 1962.
27) Hamalsky, M.W., Stein, M. & Freedberg, A.D.: The thyroid hormone plasma protein complex in man II A new in vitro method for study of "uptake" of labeled hormonal components by human erythrocytes: J. Clin. Endocrinol. 17, 33, 1957.
28) Yen, W.: In vitro studies of thyroid function with erythrocyte uptake of ^{131}I-labeled triiodothyronine: Acta. Endo. Supple 76, 1963.
29) Hamalsky, M.W. and Freedberg, A.S.: The thyroid gland.: New. Engl. J. Med. 262, 129, 1960.
30) Sigeru Tanaka. and Starr, P.: A euthyroid man without thyroxine binding globilin: J. Clin. Endocrinol. 19, 485, 1959.
31) Dowling, J.T., Freinkel, N. & Ingbar, S.H Thyroxine-binding by sera of pregnant women, newborn, infants and women with spontaneus abortion: J, Clin. Invest. 35, 1263, 1956.
32) Robbins, J.: Thyroxine-binding capacity of serum in pregnancy: Fed. Proc. 65, 150, 1956.
33) Robbins, J. and Nelson, J.H.: Thyroxine binding by serum protein in pregnancy and in the new born: J. Clin. Invest. 37, 153, 1958.
34) Hamolsky, M.w., Golodetz, A. & Freedberg, A.S.: The plasma protein thyroid hormone complex in man further studies on the use of the in vitro red blood cell uptake of thyroid function: J. Clin. Endocrinol 19, 103, 1959.
35) 植田：第15回産科学会宿題報告，1958.（昭和38年4月大阪）
36) Wolff, J., Standaert & Rall, J.E.: Thyroxine diplacement from serum proteins and depression of serum protein bound iodine by certain drugs: J. Clin. Invest. 40, 1373, 1961.
37) Surks, M.I. and Oppenheimer, J.H.: Effect of penicillin on thyroxine binding by plasma proteins: Endocrinology 72, 567, 1963.
38) Hamolsky, M.W., Stein, M., Fischer, D.B. and Freedberg, A.S.: Futher studies of factors affecting the plasma pritein-thyroid hormone complex: Endocrinolgy 68, 662, 1961.
39) Goolden, A.W.: The effect of salicylate on the uptake of ^{131}I-triiodothyronine by the red dells: Lancet 2, 936, 1962.
40) Grabar P. & Williams, C. A.: Méthode permettant l'étude conjugé des üropriétés électrophorétiques et immunochinique d'un métange de protéines application au sérum saguin: Bioch. Biophys. Acta10, 193, 1953.
41) Grabar, P. & Williams, C. A.: Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélange de substances antigéniques: Bioch. Biophys. Acta 17, 65, 1955.
42) 谷内昭：免疫電気泳動法と臨床—とくにαおよびβ-globulin 領域の分析知見を中心に—最新医学，19（4），792，1964.
43) T. Munkner, N. Lang and K.H. Gillich: in Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung Urban 4 Schwarzenberg München 377, 1960.
44) F. Lohss & E. Kallee: Immunological detection of the binding of ^{59}Fe ascorbinate, ^{131}I-thyroxine and ^{131}I-insulin to serum proteins: Prot. Biol. Fluids 8th. Colloquium 142, 1961.
45) Beierwaltes, W.H. & Robbins, J.: Familial increase in the thyroxine-binding sites in serum alpha globulin: J. Clin. Invest. 38, 1683, 1959.
46) Blumberg, B.S. & Robbins, J.: Thyroid-serum protein complexes single dimension gel and paper electrophoresis studies: Endocrinology 67, 368, 1960.
47) Ingbar, S.H.: Part 2 Transport ann Meta-

bolism of thyroid hormones with the proteins of human plasma: Ann. New York Acad. Sc. 86, 440, 1960.

48) Myant, N.B. and Osorio, C.: Paper electrophoresis of thoyroxine in tris-maleate buffer: J. Physiol. 152, 601, 1960.

49) Oppenheimer, J.H., Squef, R., Surks, M.I. and Hauer, H.: Binding of thyroxine by serum proteins evaluated by equilibrium dialysis and electrophoretic techniques alterations in nonthyroidal illness: J. Clin. Invest. 42, 1769, 1963.

50) Robbins, J. and Rall, J. E.: Thyroxin-binding capacity of serum, in normal man: J. Clin. Invest. 34, 1324, 1955.

51) Tabachnick, M. and Giorgio, N.A.: Thyroxine-protein interations 2. The binding of thyroxine and its analogues to human serum albumin: Jr. Arch. Biochem. Biophys. 105, 563, 1964.

52) Schultze, H.E., Schönenberger, M. & Schwich, G.: Über ein Präalbuminn des menschliche serums, (A prealbumin of human serum): Biochem. Z. 328, 267, 1956.

53) Ingbar, S. H.: Prealbumin: Athyroxine-binding protein of human plasma: Endocrinology 63, 256, 1958.

54) O. Smithies: Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults: Biohem. Jour. 61, 629, 1955.

55) Deiss, W.P., Albright, E.C. and Larson, F.C.: Comparison of in vitro serum protein binding of thyroxine and triiodothyronine: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 84, 513, 1953.

56) Pigledine, W.S., Pitt-Rivers, R. and Stanbury, J.B.: Nature and transport of the iodinated substances of the blood of normal subjects and of patients with thyroid disease: J. Clin. Endocr. Met. 15, 724, 1957.

57) Freinkel, N., Ingbar, S.H. and Dowling, J.T.: The influence of extracellular thyroxine-binding protein upon the accumuration of thyroxine by tissue slices: J. Clin. Inuest. 36, 25, 1957.

58) Hamalsky, M.W., Fisher, D.B. and Freedberg, A.S.: Further studies on the plasma protein thyroid hormone complex: Endocrinology 66, 780, 1960.

59) Miller, L.L. and Bale, W.F.: Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globuline by the liver: J. Exper. Med. 99, 125, 1954.

60) Peters, T.Jr.: A serum albumin precursor in cytoplasmic particles: J. Biol. Chem. 229, 657, 1957.

61) 水野義晴，安賀昇，沢田憲志，松本一郎，岩崎雅行，萱嶋良治：アルブミンの代謝—肝硬変を中心として—：最新医学(331), vol. 20, 1965年.

62) 平山千里：血漿タンパク質—新しい知見を中心に—内科, vol. 15 (6), 1004, 1965年.

63) Albright, E.C., Larson, F.C. & Deiss, W.P.: Thyroxine binding capacity of serum alpha globlin in hypothyroid and hyperthyroid subjects: J. Chm. Invest. 34, 44, 1955.

64) Freinkel, N., Dowling, J.T. & Ingbar, S.H.: The interaction of throxine with plasma proteins: Localization of tlyroxine binding protein in Cohn fractions of plasma: J. Clin. Invest. 34, 1698, 1955.

65) Horst, W.: Neue Ergebnisse der Anwendung von Join Diagnostik und Therapie von Schilddrüsen Erkrankungen: Strahlentherapie 94, 169, 1954.

66) Blumberg, B.S., Farer, L., Rall, J.E. & Robbins, J.: Thyroxine-serum protein complex two dimension gel and paper electrophoresis studies Endocrinology 68, 25, 1961.

67) Hirschfeld, J.: Characterization of precipitation components in normal human sera obtained by an immunoelectrophoretic technique Acta Path. et microbiol. Scand. 49, 255, 1960.

68) 平山千里，福田勉，吉川東陽，古賀俊逸：代謝 vol. 1, No. 8, 572, 1964.

69) Betsuyaku, T., Ono, I., Morita, Mr, Anzai, T., Tagawa, S., Asano, H. & Higashi, H.: Immunoelectrophoretic studies of serum protein subfraction-on alpha globulin fraction-: Sapporo Med. J. 22, 269, 1962.