Studies on the determination of chemocorticoids

1. Determination of conjugated chemocorticoids with β glucuronidase

By

Akira KUMAGAI, Masaaki OTOMO, Saburo YANO and Nozomu TAKEUCHI

IIIrd department of Internal Medicine, Osaka University

Koichiro YAGURA

The institute of microbiological disease, Osaka University

Determination of conjugated chemocorticoids has developed and its clinical significance has been observed. It is reported in this paper the hydrolysis of conjugated formaldehydogenic chemocorticoids in blood and urine with spleen β -glucuronidase which prepared by Fishman's method.

For urinary conjugated chemocorticoids, the method which investigated by Cohen is advisable, but the problem has been remained obscure in the enzymatic hydrolysis. We researched the chemical equilibrium and devised the incubation method. That is to say, after extracting of free from with chloroform, β -glucuronidase was added to the remaining fluid which was brought to pH 5.0 with acetate buffer. Then 10 ml. of chloroform was added and incubated 40 hrs. at 38°C. For the incubation time, the flask was shaken several times in order to extracting the hydrolyzed free steroids to chloroform, and β -glucuronidase was supplied three times. Under this condition the hydrolyzed chemocorticoids was twice of these obtained without adding chloroform as much.

For conjugated chemocorticoids in blood, Bongiovanni reported the method of estimation of conjugated 17-hydroxycorticosteroids, but the method of formaldehydogenic chemocorticoids has not been reported. The results obtained by our method conjugated formaldehydogenic chemocorticoids was about two times of free form.

By these methods, it is estimated formaldehydogenic chemocorticoids in the patient with heart failure and revealed that the conjugates was less in the patient with liver dysfunction than with normal liver.

Pineal Body and Metabolism

4. The Effect of Pineal Extract upon the Experimental Diabetes

By

Midori IWAMIYA

Department of Biochemistry, Tottori University School of Medicine, Yonago

(Director: Prof. Dr. K. Yamasaki)

1. It was found that the initial hyperglycemia resulted from the intravenous administration of alloxan (150 mg/kg) in the rabbit previously treated by the pineal extract was more intense than in the normal rabbit and, accordingly, the succeeding hypoglycemia was so much suppressed that no hypoglycemic shock was observed.

On the contrary, the rabbits previously treated by the pineal extract showed the final hyperglycemia 48 hours after the intravenous administration of alloxan and they suffered from more severe diabetes which was insensitive to the insulin than the control.

2. While the pineal extract showed a lowering effect of the fasting blood sugar level in the normal rabbit (3. report), such an action was not observed in the dithizone-diabetic rabbit.

3. The enhancing effect of the pineal extract of the adrenalin-hyperglycemia reported previously (3. report) was not observed in the dithizone-diabetic rabbit.

松 果 体 と 代 謝

4. 実験的糖尿病に及ぼす松果体エキスの影響

鳥取大学医学部生化学教室 (主任 山崎三省教授)

岩 宮 緑

著者ら^{1),2)} はさきにウシ松果体の生理的食塩水エキス (松エキス) の糖代謝に及ぼす影響を追求し該エキスが下垂体前葉ホルモン就中成長ホルモンの分泌を促す作用のあることを推論した。

1937年 Young は犬に下垂体前葉エキスを連続投与して持続的糖尿を起させて、下垂体前葉中に *diabetogenic hormone* の存在を認め、爾來糖代謝に関与する内分泌臓器群相互の関連が注目され、複雑な糖尿病の病理も腓ランゲルハンス島 (ラ氏島) の β 細胞に対する抗インシュリン性ホルモン 臓器群の 平衡関係として理解されるに至っている。そして仮令抗インシュリン性ホルモン 臓器群に機能亢進がある場合でも、その程度が軽微であるならばインシュリンの分泌がそれに相応して促進される故、血糖値は正常範囲を逸脱せず、従つてかかる機能の亢進の有無を見出すことは困難であろう。然るに今糖尿病試薬によつて「ラ」氏島の β 細胞を破壊して置き、その上に抗インシュリン性ホルモン 臓器群を何らかの手段により機能亢進の状態に導いた場合には、それ等の機能亢進のない場合よりも一層重篤な糖尿病の発病が期待されるであろう。

斯る見地より本報文に於ては、松エキスを投与して下垂体前葉の機能を亢進せしめたと推定される家兎²⁾ に、アロキサンを投与して糖尿病発病の経過を追求し、更に該糖尿家兎にインシュリンを投与してインシュリンに対する感受性を調べた。一方ジチゾン糖尿家兎を用いて松エキスの血糖に及ぼす作用並びにアドレナリン過血糖に及ぼす作用についても検討した。

実 験 方 法

松エキスは前報¹⁾ と同一方法によつて作製した。

アロキサン投与実験には体重 1.5~2.0kg の家兎を使用し、アロキサン (alloxan monohydrate, 和光純薬) を被験、対照両群何れも 16 時間絶食後に 150mg/kg ずつを 5% 生理的食塩水溶液として家兎耳静脈内に急速に注射し、注射後 5 時間以後に食餌をとらせた。

インシュリン並びにアドレナリンの投与実験は予め 16 時間絶食せしめた家兎の空腹時血糖を測定した後、インシュリン (清水製薬製) は 3i 単位/kg を、アドレナリンは 0.1mg/kg を皮下注射して血糖値を測定した。これらホルモンの投与量は実験開始期の体重より算定し、実験中の体重の変動は無視した。

ジチゾン (dithizone 武田化学) は炭酸リチウム飽和溶液に溶かし、100mg/kg ずつを家兎 (16 時間絶食) の耳静脈内に注入した³⁾。

血糖は Hagedorn-Jensen 法により、尿糖は Bertland 法により定量し、尿糖の定性は Benedict 法によつた。

実 験 成 績

A) 松エキス投与とアロキサン糖尿家兎

松エキスを健康家兎 (1.75kg ~ 1.95kg) に毎日 1 コ分ずつ 5 日間耳静脈より注入し、注射終了の翌日アロキサン 150mg/kg ずつを耳静脈内に注入した。その成績は第 1 図に示した。即ち松エキス前処置群 7 例中 4 例は高血糖を来して重症の糖尿病を発病し、アロキサン投与後 4~6 日目に斃死し、残りの 3 例中 2 例は一過性糖尿病を、他の 1 例は 8 日以上継続する中等度の糖尿病を発病した。

第1圖 松エキス前処置とアロキサン糖尿病発症

対照群よりも著明であり、且つ持続する傾向が見られた。

2) 低血糖 初期過血糖に次いで起る低血糖は、被験群に於ては著明でなく、低血糖と云い得るものは7例中3例に過ぎず、しかも低血糖性痙攣の発来を見たものは1例もなく、僅かに不安状態を示した1例も20%ブドウ糖10cc 1回の静注で救えた。これに反して対照群に於ては、5例中3例に於て低血糖性痙攣の発来を認め、内2例はブドウ糖の静注により危急をまぬがれたが、残りの1例は遂に斃死した。又一般に松エキス処置群には初期過血糖の持続が見られ、且つ低血糖は時間的に遅れて現われた。

3) 持続的過血糖 低血糖の後に来る持続的過血糖は対照群に於ては従来の報告の通りアロキサン投与24時間後から現われたが、被験群に於ては1日遅れて(48時間後)見られるものが多かった。被験、対照両群の高血糖の程度を比較するに48時間目に於て、被験群は153.8~484.0mg%, 平均328.7mg%, を示したのに対し、対照群は144.4~392.2mg%, 平均244.0mg%, 72時間目に於ては被験群は176.8~707.6mg%, 平均406.7mg%, を示したのに対し、対照群は126.9~390.8mg%, 平均230.4mg%の血糖値を示し、明かに松エキス投与群が対照群に比べて著明な高血糖をあらわして重症糖尿病を発病した。

4) 尿糖の排泄状況 著明な糖尿を認めたのは対照群に於ては5例中2例(最高排泄量1日当り14.4g)に過ぎなかつたが、被験群に於ては7例中6例(最高排泄量1日当り3.4g~19.4g)であつた。

B) 松エキスで前処置したアロキサン糖尿家兎のインシュリンに対する態度

一方松エキスで前処置しない対照群に於ては、5例中1例は低血糖性痙攣によつて斃死し、2例は中等度の糖尿病を、他の1例は一過性の糖尿病を発病し、残りの1例は軽度の血糖上昇を見たに過ぎなかつた。次に松エキス前処置群及び対照群がアロキサン投与に際して示した症状並びに血糖曲線の相違について述べよう。

1) 初期過血糖 初期過血糖は被験群7例中6例に認められ、アロキサン投与後2時間目の血糖値の平均は217.6mg%であつた。対照群でも初期過血糖は5例中4例に認められたが、何れも微弱でアロキサン投与2時間後の値は平均144.6mg%に過ぎなかつた。そしてアロキサン投与後5時間目に於ても尚初期高血糖の持続を見たものは、被験群に於ては7例中5例であつたが、対照群に於ては5例中僅かに2例に過ぎなかつた。即ち被験群では初期高血糖は

第2図 松エキス前処置アロキサン糖尿家兎のインシュリン (イ) 血糖曲線

C) ジチゾン糖尿家兎と松エキス

ジチゾン (100mg/kg) 投与後第2～5日目に松エキス3コ分を1回皮下に注射して空腹時血糖に及ぼす影響を調べた実験成績は第1表の如くで、4例中極く軽度の低血糖を認めた1例を除いては松エキスの皮下注射により僅かながら血糖の上昇を認めた。即ち正常家兎に於て見られたような松エキスの血糖降下作用¹⁾は殆ど認められなかった。

第1表 ジチゾン糖尿家兎の空腹時血糖に及ぼす松エキス (3コ分) の影響

家兎 番号	性	体重	血 糖 値 (mg%) 及 び そ の 増 減 率 (%)						
			松エキ ス投与 前	松 エ キ ス 投 与 後 (時)					
				0.5	1	2	3	4	5
101	♂	2.60	263.4	265.6(+0.8)	278.4(+5.6)	278.4(+5.6)	299.0(+13.5)	288.2(+9.4)	256.8(-2.5)
103	♂	2.25	227.0	—	232.8(+2.5)	237.0(+4.4)	230.6(+1.5)	228.6(+0.7)	218.8(-3.6)
104	♂	2.35	212.4	—	228.4(+7.5)	227.0(+6.8)	228.4(+7.5)	220.8(+3.9)	210.2(-1.0)
109	♂	2.50	156.0	—	143.8(-7.9)	140.4(-10.0)	140.4(-10.0)	140.4(-10.0)	153.8(-1.4)
平均値	mg%		214.7	—	220.85	220.7	224.6	219.5	209.9
	%		0	—	+1.93	+1.7	+3.13	+1.0	-2.13

ジチゾン糖尿家兎 (中毒第2日目) に松エキスを連続投与 (皮下) し、その血糖に及ぼす影響を前実験同様に空腹時血糖について追求し、第2表の如き成績を得た。即ち松エキスの連続投与 (8コ～20コ分) によつてジチゾンによる高血糖は一定の影響を受けるものの如く、エキス投与後1時間までは血糖は概ね更に高くなり、それ以後は比較的低い値となり、その程度は連続投与の回数を重ねるに従つていよいよ著明であつた。

第2表 ジチゾン糖尿家兎の松エキシ投与血糖曲線（3コ分皮下注）に
及ぼす松エキシ連続注射（皮下）の影響

松エキシ 3コ分皮下 注前ま での松エ キシ投与 総計	血 糖 値 (mg%) 及 び そ の 増 減 率 (%)						
	松エキシ 投 与 前	松 エ キ シ 投 与 後 (時)					
		0.5	1	2	3	4	5
0	263.4	265.6(+0.8)	278.4(+5.6)	278.4(+5.6)	299.0(+13.5)	288.2(+9.4)	256.8(-2.5)
8コ	251.1	263.9(+5.0)	268.3(+6.8)	251.1 (0)	244.7(-2.6)	249.1(-1.0)	236.1(-6.0)
14コ	256.2	279.8(+9.2)	275.6(+7.5)	258.4 (0)	249.8(-2.5)	239.2(-6.7)	225.2(-12.1)
20コ	149.1	177.5(+19.0)	181.3(+21.5)	149.1 (0)	115.7(-22.4)	88.2(-50.8)	91.9(-48.4)

D) ジチゾン糖尿家兎に及ぼす松エキシ加アドレナリンの影響.

ジチゾン投与後3日目に0.1mg/kgのアドレナリンを皮下に注射してアドレナリン過血糖曲線を描き対照とし、3日後に同量のアドレナリンと同時に松エキシ3コ分を皮下に注射して、松エキシのアドレナリン過血糖に及ぼす影響を見たのに、アドレナリン過血糖は正常家兎に較べてジチゾン糖尿家兎に於ては一般に著しくなく、且つ松エキシをアドレナリンと同時に投与しても、正常家兎に見られた如き、アドレナリン過血糖の著しい増強は認められなかつた²⁾ (第3表).

第3表 ジチゾン糖尿家兎に及ぼす松エキシ加アドレナリンの影響

家兎 番号	性	体重	実 験 時 期	血 糖 値 (mg%) 及 び そ の 増 減 率 (%)				
				前	松エキシ及びアドレナリン投与後(時)			
					1	2	3	4
105	♂	2.2	松エキシ投与前	128.4	160.8(+25.2)	174.2(+35.6)	184.6(+43.7)	131.8(+2.6)
			松エキシ投与時	152.3	195.3(+28.2)	208.3(+36.7)	191.1(+25.4)	170.1(+11.6)
106	♂	2.1	松エキシ投与前	110.9	124.2(+11.9)	131.8(+18.8)	128.4(+15.7)	99.4(-10.4)
			松エキシ投与時	119.9	142.5(+18.8)	137.1(+14.3)	117.7(-1.9)	112.3(-6.4)
108	♂	2.4	松エキシ投与前	203.8	288.0(+41.3)	282.3(+38.5)	279.6(+37.2)	245.0(+20.2)
			松エキシ投与時	212.4	298.4(+40.4)	295.6(+39.1)	291.2(+37.0)	260.8(+22.7)
平均 値			松エキシ投与前	147.7	191.0(+26.1)	196.1(+30.9)	197.5(+32.2)	158.7(+4.1)
			松エキシ投与時	161.5	212.1(+29.1)	213.7(+30.0)	200.0(+20.2)	181.1(+9.3)

考 按

アロキサン投与による初期過血糖の成因に関する学説として副腎刺激説、肝臓刺激説並びにインシュリン分泌停止説の三つを挙げることが出来る³⁾。小坂⁴⁾は最近初期過血糖の出現には下垂体並びに副腎皮質の存在が不可欠であるが、更に髄質の存在が必要であり、且つアロキサンによる肝からの糖原の誘出も考慮せねば説明出来ないとしている。

さきに著者等²⁾は松エキシにアドレナリン過血糖を増強せしめる作用のあることを見出し、斯る松エキシの作用は松エキシ投与により惹起せられた下垂体の機能昂進による肝のアドレナリンに対する感受性の昂進に基因するものであろうと推論した。従つて上述のように松エキシ前処置群にアロキサンを投与して、その際初期過血糖の増強が認められた事実は恐らくアロキサン及び松エキシの投与が下垂体に協同的に作用して

機能昂進を来した結果と見るべきであろう。

初期過血糖後に発来する低血糖の原因については従来インシュリン過剰分泌説、肝糖原の消耗説の二説が行われている²⁾。岡本ら²⁾は糖尿病試薬(アロキサン, ジチゾン, オキシソ等)で前処置した場合には、次の糖尿病試薬の投与に際して低血糖の出現を見ず、且つ低血糖の出現時期がラ氏島 β 細胞の破壊の行われている時期に相当することなどから、Goldnerらのインシュリン過剰分泌説を支持している。果して然りとすれば、下垂体前葉、就中最も抗インシュリン性作用の強いといわれる成長ホルモンの分泌が昂つていると推定される松エキスで前処置した家兎²⁾に於て、アロキサン低血糖が著明でなかつたことも首肯出来よう。

アロキサン投与による持続的過血糖の成因については今日諸学者の一致した意見によると、ラ氏島 β 細胞の破壊によつてインシュリンの産生が消失したためであるという。河崎⁵⁾は抗インシュリン性ホルモンと考えられるプレホルモン、チラジン、インテレニンを投与し、投与終了の翌日に糖尿病試薬を与えて糖尿病の発病が促進されるのを見ている。そしてこれらの抗インシュリン性ホルモンの投与に際してラ氏島 β 細胞の増数とラ氏島 β 細胞の著明な増量が見られることから、このようなホルモンで前処置した動物の糖尿病発病促進の主なる機転として垂鉛量の増加したラ氏島 β 細胞が垂鉛結合剤である糖尿病試薬とより多く結合し、その結果障害が強度に現われるためと説明している。しかしながら長浜⁶⁾(1952) Ishii⁷⁾(1951)らによると、下垂体剔出或は副腎剔出動物ではアロキサン投与による持続的過血糖が発現しないから、アロキサンによる糖尿病の発病には β 細胞の機能の脱落のみならず、更に之に伴う下垂体副腎系、所謂、抗インシュリン性ホルモン臓器群の相対的機能昂進が不可欠の要因であると考えねばなるまい。

松エキス前処置家兎群に於ては対照群に較べて重症な糖尿病の発病が見られたのであるが、このことは松エキス投与によつて抗インシュリン性ホルモン臓器群殊に下垂体の機能昂進によるものと推定出来、殊に松エキス前処置糖尿病家兎に於てインシュリン投与に対して抵抗を示したこともこの推定を更に裏づけるものであろう。

松エキスは正常家兎の空腹時血糖をやゝ低下せしめこそすれ、上昇せしめることはない¹⁾が、ジチゾン糖尿病を発病せしめた家兎に於ては、その際の過血糖が軽度なものを除いて、松エキスの投与により血糖が多少とも上昇した。併しジチゾン糖尿病の血糖値が比較的低い家兎に松エキスを投与した場合或はジチゾン糖尿家兎に松エキスを連続投与した場合に於て正常動物に松エキスを投与した時と同等か、或はそれ以上に血糖の低下を見たが、実際 P. Engel, W. Bergmann ら⁸⁾も松エキスに糖尿病の過血糖を低下せしめる作用のあることを報じている。前述のように抗インシュリン性作用を有する松エキスにこのような血糖降下作用のあることは如何に説明すべきであろうか著者はこの事を次のように説明したい。即ちラ氏島 β 細胞が健全か、又は糖尿病試薬中毒による障害が甚しくなくて、その障害からの回復が著しい場合には、松エキス投与により下垂体前葉から抗インシュリン性ホルモンが分泌され、之が β 細胞を刺戟してインシュリンの分泌を促し、多少ながら血糖値の低下を来すものであると、そして一方 β 細胞の破壊が甚しい時にはこのような反応は認められず、むしろ血糖値の若干の増加が見られるものと考えることが出来よう。河崎⁵⁾がプレホルモン、チラジン或はインテレニンで前処置した場合には糖尿病試薬による糖尿家兎の血糖値が、正常動物の場合よりも明かに高い値を示すことを認め、為田⁹⁾が副腎皮質製剤の投与は健康犬では血糖を低下せしめるが、アロキサン糖尿犬では僅かに上昇すると報じているが、著者の上述の実験成績と類似の成績と見ることが出来よう。

ジチゾン糖尿家兎に於ては正常家兎に於て認められた松エキスのアドレナリン過血糖増強作用は認められなかつた。このことは佐藤¹⁰⁾がアロキサン糖尿家兎に於て24時間絶食時肝糖原量は正常家兎に較べて特に増減はないが、肝糖原生成能力の高度の減弱を認めていることから推して、斯る実験的糖尿病動物に於てはアドレナリンに反応して誘出し得る肝糖原量が減少している為めであると想像される。

結 論

- 1、松エキスで前処置した家兎はアロキサン(150mg/kg)の静脈注射によつて正常家兎に較べて高度の

初期過血糖を示し、且つ次いで起る低血糖は微弱で低血糖性ショックの発来を見なかつた。しかもアロキサソ投与後48時間を経て初めて高血糖症をあらわし、且つ対照群に比して重症でしかもインシュリンに鈍感な糖尿病を発病した。

2. ジチゾン糖尿家兎に松エキスを投与すると、正常家兎に於て認められた血糖の降下は見られず、むしろ上昇の傾向を示した。

3. ジチゾン糖尿家兎に於ては正常家兎に於て認められた松エキスのアドレナリン過血糖の増強作用は認められなかつた。

擧筆するに当り終始御懇篤な御指導並びに御校閲の労を賜わつた恩師山崎三省教授に衷心より謝意を捧げる。

実験に用いたウシ松果体は塩野義製薬株式会社研究所峰下鉄雄博士の御好意によるものでここに附記して謝意を表する。

尚本研究は文部省科学研究費（助成金）に負うところが大きい。ここに記して謝意を表する。

文 献

- 1) 岩宮緑：日内分泌誌. **32**, 476, 1956.
- 2) 岩宮緑：日内分泌誌. **32**, 483, 1956.
- 3) 岡本耕造：糖尿病の実験病理学，日本医書，1951.
- 4) 小坂樹徳：東京医学雑誌. **59**, 267, 278, 1952.
- 5) 河崎与一郎：兵庫県立医科大学紀要. **2**, 635, 1951.
- 6) 長浜真徳：日内分泌誌. **28**, 279, 1952.
- 7) Ishii, T.: J. of Biochem. **33**, 37, 1951.
- 8) Engel, P., Bergmann, W.: Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch. **4**, 564, 1952.
- 9) 為田清：日本薬理学雑誌. **46**, 233, 1951.
- 10) 佐藤幸男：東北医誌. **50**, 252, 1954.