Clinical Studies on the Secretion and Metabolism of Cortisol and Aldosterone

Part I. In Patients with Endocrine Disorders and Normal Subjects

Teruya YOSHIMI

2nd Division of Internal Medicine, Department of Medicine, Kyoto University

The studies on the secretion and metabolism of cortisol and aldosterone in humans were made by the use of radioactive steroid hormones. One to 3.0 μC of 7- H^3 -aldosterone, 7- H^3 -cortisol or 4- C^{14} -cortisol were injected intravenously into normal subjects and patients with various endocrine disorders. Urine was collected for 24 hours after the injection of radioactive hormones. The daily secretion rate of cortisol and aldosterone was calculated from the injected radioactivities and specific activities of these urinary metabolites. To determine the specific activity of urinary metabolite of aldosterone, urinary aldosterone released by acid hydrolysis was purified by the use of column chromatography (florisil) and paper chromatographies (chloroform formamide system, butylacetate formamide water system and benzene methanol water system). In the case of cortisol, tetrahydrocortisol hydrolyzed by bacterial β -glucuronidase was isolated by the same paper chromatographic systems as for aldosterone.

Heparinized blood samples were withdrawn at 10 to 30 minute intervals after the injection of radioactive hormones. The disappearance curves of labeled hormones were analysed mathematically and volumes of distribution space, metabolic clearance rate and speed of metabolism were calculated using two compartmental models of the human body as described by Tait et al.

The mean values of secretion and metabolism for cortisol in three cases of normal subjects were as follow:

The secretion rate of cortisol; 20.9 ± 3.7 mg/day, mean plasma concentration; 5.02 ± 0.62 mg/100 ml, speed of metabolism (K_2); 39.1 ± 1.6 units/day, volume of distribution space ($V_1 + V_2$); 14.0 ± 0.6 L, metabolic clearance rate (M_2); 415 ± 39.5 L/day, and miscible pool; 701.2 ± 98.6 μg .

The mean values of secretion and metabolism for aldosterone in normal men under sodium unrestricted diets were as follow: secretion rate; 128 ± 22 μg /day, mean plasma concentration; 0.0085 ± 0.0004 μg /100 ml, speed of metabolism; 57.6 ± 3.8 units/day, volume of distribution space; 34.5 ± 6.7 L, metabolic clearance rate; 1385 ± 158 L/day, and miscible pool; 2.94 ± 0.58 μg .

In patients with Cushing's syndrome, daily secretion rate, mean plasma concentration and miscible pool of cortisol were markedly increased, especially higher values

were obtained in the cases due to adrenal hyperplasia than those due to adrenal adenoma. The speed of metabolism and metabolic clearance rate of cortisol was lower than normal controls. Daily secretion rate of aldosterone was slightly increased in some cases of Cushing's syndrome.

In patients with Addison's disease, daily secretion rate, mean plasma concentration, and miscible pool of cortisol and aldosterone were markedly decreased or not detectable, while the speed of metabolism of these hormones was within normal range.

A patient with primary aldosteronism showed high values of daily secretion rate and mean plasma concentration of aldosterone. These values were reduced to normal range after the extirpation of adrenocortical adenoma, while the speed of metabolism of aldosterone in this case did not change by operation. (pp. 51~71)

Aldosterone および Cortisol の分泌と 代謝に関する臨床的研究

第1篇 正常人および各種内分泌疾患々者における Aldosterone および Cortisol の分泌と代謝に関する研究

京都大学医学部内科第2講座 (指導 三宅 儀教授)

吉 見 輝 也

(昭和40年1月6日受付)

第1章 緒 言

近年 H^3 又は C^{14} で標識した比活性度の高い副腎皮質ホルモンが製造されるようになり、これを用いて、副腎皮質機能を検査しようとする試みがさかんになつた。本法によれば、従来の化学的測定法を用いては知ることの出来なかつた副腎皮質ホルモンの生体内代謝の動態、すなわち Corticoids の代謝速度、Miscible space および Metabolic clearance rate 等を知り得るだけでなく、これら Hormone の1日分泌量、更に1日平均血漿濃度、Miscible pool 等を測定することも可能となつた。しかし、これらの放射性ステロイドホルモンも、最初は比活性度の高いものが得られず、又 Aldosterone の場合のように dl-型のため天然型と異つた代謝過程を経るものもあつて、満足の結果を得られない場合があつた。しかし1960年に比活性度の高い 7- H^3 -d-Aldosterone ($20\mu C/\mu g$) および 7- H^3 -Cortisol ($28\mu C/\mu g$) が製造され、臨床的にこれらを用いて Tracer 実験が可能になつた。著者は同年より、この2種類の放射性ステロイドを正常人および各種内分泌疾患患者に投与して、Aldosterone (以下「Aldo」と略す) および Cortisol (以下「F」と略す) の分泌と代謝につき研究を行なつたが、本篇では正常人および間脳下垂体副腎その他の疾患患者について現在までに得られた成績を報告する。

第2章 実験対象

正常人として、京都大学医学部内科第2講座研究室で研究に従事している成人男子のうち、肝、腎および副腎機能に異常を認めないもの4例、および京大内科中病舎に入院した患者のうち、肝、腎および副腎機能に異常を認めないもの1例を選んだ。

また、内分泌疾患患者として、1960年から1962年までの間に、主として京大内科中病舎に入院した患者のうち、クッシング症候群5例、アジソン病5例、原発性アルドステロン症3例、副腎性器症候群1例、肥胖症4例、汎下垂体機能低下症3例、頭蓋咽頭管腫、振顫麻痺、神経性食思不振症、renal tubular acidosis、胃潰瘍および異常色素沈着症各1例を対象とした。

第3章 測定試薬および測定装置

Chloroform : 試薬特級または試薬1級 Chloroform (以下「 $CHCl_3$ 」と略す) に1/5容 2-4 Dinitrophenylhydrazine 試薬を加え、3時間還溜後、再蒸溜して使用。

Methanol : 1000ml試薬特級 Methanol (以下「MtOH」と略す) に10% NaOH 5 cc および5g亜鉛末を加え、3時間還溜後再蒸溜して使用。

Ethanol : MtOH と同様に精製して使用。

Benzene : 試薬特級 Benzene を1/5容の特級濃硫酸で洗滌後, 炭酸ソーダで中和・水洗, 脱水後再蒸溜して使用.

Toluene : 試薬特級をそのまま使用.

Acetone : //

Butylacetate : //

t-Butanol : //

Ethyl acetate : 再蒸溜して使用.

無水硫酸ソーダ, 濃塩酸, 苛性ソーダ, 氷醋酸は試薬特級を使用した.

Blue tetrazolium : 東京化成製品.

Tetramethyl ammonium hydroxide 水溶液 : 東京化成製品.

Florisil (Mesh 60~100) : Floridin Co., Warren, Penn. (U.S.A.) 製.

Formamide : 試薬一級, 和光純薬製.

Isooctane : 試薬一級.

P.P.O., P.O.P.O.P. : Packard Instrument Co. 製.

Aldosterone-free : Ciba Foundation 提供の dl-Aldosterone-free.

Cortisol-free : Shering Co. 製.

Cortisone-free : //

Triamcinolone : 三共製薬提供.

Tetrahydrocortisone (THE) : USP Reference Standards.

Tetrahydrocortisol (THF) : //

Allo-tetrahydrocortisol (Allo-THF) : //

7- H^3 -d-Aldosterone ($20\mu\text{C}/\mu\text{g}$) : National Institute of Health の Endocrinology Section より提供された.

7- H^3 -Cortisol ($28\mu\text{C}/\mu\text{g}$) : //

4- C^{14} -Cortisol ($42.4\mu\text{C}/\text{mg}$) : //

Tetra hydroaldosterone : Dr. S. Ulick (Dep. of Med, Columbia Univ. New York) より提供された.

Whatman No. 1. Chromatography 用 paper : Benzene および MtOH (1 : 1) で48時間 Soxhlet 装置を用いて洗滌し使用した.

主な測定装置

○Tricarb-liquid Scintillation Spectrometer 314A (Packard 製)

○Beckmann 型 Spectrophotometer (島津製)

○Gasflow counter (Nuclear Chicago 製および Metro 製)

○Gasflow scanner (日本無線製)

○Rotatory flashevaporator (三田村製)

○Chromatography 用恒温室 (24°C)

○紫外線検査燈 (東芝製)

第4章 測定法

1. Aldosterone および Cortisol の1日分泌量の測定

A. 尿中 Aldosterone の測定

i) 水解および抽出

冷暗所に冷凍保存した24時間尿の半量について, 濃塩酸を加えながら, pH1.2に調整し, Cohen type⁸⁾の尿連続抽出装置を用いて, 尿の1/5量の CHCl_3 を4回交換しながら48時間連続抽出し, 最後にさらに1/5量

の新しい CHCl_3 で、尿を少しづつ交換しながら、手動振盪で Corticoids を抽出する。かくして得られた CHCl_3 抽出物は、先ず1/20量の 1/10 N-NaOH で1回洗滌し、次いで塩酸を1滴加えた1/20量の蒸留水で2回洗滌し、これら洗滌液から少量の CHCl_3 で Steroids を逆抽出して、これを先の CHCl_3 抽出液に加え、このすべての CHCl_3 抽出液の合計に無水芒硝を加えて脱水後、Rotatory flash evaporator を用いて 40°C 以下で減圧乾固する。この尿粗抽出物は更に、以下に述べる Chromatography (以下「Chromato」と略す) により単離純化する。

ii) Florisil column chromatography³⁾¹¹⁾

600°C 4時間、電気炉中で活性化した Florisil 2g で内径1cm、高さ10cmの Column を CHCl_3 を用いて作る。これに上述の尿粗抽出物を少量づつ合計10mlの CHCl_3 に溶解して吸着させ、次いで MtOH と CHCl_3 (1:99) 混合液25mlで展開し、この溶出液を捨て、続いて MtOH CHCl_3 (25:75) 混合液50mlで展開し、その溶出液を前述の方法で減圧乾固する。

iii) Paper chromatography

a) Chloroform-formamide 系 (Zaffaroni) Paper chromatography⁶⁾ (C-F 系 Paper Chromato.)

Whatman No. 1 Paper (18×46cm) を 30% Formamide acetone 液に浸し、暫時空気中で吊して、Acetone を蒸発させた後、他の濾紙ではさんで余分の Formamide を吸収除去する。この濾紙の Start line に沿って Column 後の乾固物の全量を少量づつの CHCl_3 に溶かして塗る。この start line の両側端に、Pilot として「F」、Cortisone 「E」および Sudan III の少量を塗る。この Paper を 24°C 恒温室におかれた「Chromato.」用タンク内で Formamide で飽和した CHCl_3 を移動相として約4時間展開する。両端の Sudan III が Paper の先端にきた時にこれを取り出し、 40°C の Air draft 中で約2～3時間充分乾燥させた後、Pilot として用いた Comp E. の紫外線吸収帯に相当した部分を上下5cm切りとり、下降式クロマト展開様式によつて 50% MtOH CHCl_3 で溶出し、この溶出液はそのまま真空 Desiccator 中で室温で乾固させる。

b) Butyl acetate-Formamide Water 系 (Mattox)²²⁾²³⁾ Paper chromatography (B.F.W. 系 Paper chromat.)

a) の Paper chromatography の場合と同様に 30% Formamide Acetone 溶液中に Whatman No. 1 Paper を浸し、前述の方法で余分の液を除いた後、これに a) 系溶出乾固物を start line に塗り、Formamide water で飽和した Butyl acetate で 6～8時間展開し Pilot として塗つた Isatin の黄色 Spot が、Paper の中央部位まで展開したところで展開を中止し、前回と同様に乾燥させ、Pilot として塗つた Triamcinolone に相当する部分を上下4cmの長さに切りとり、前述のように溶出乾固する。

c) Benzene Methanol Water 系⁷⁾ (Bush) の変系³⁰⁾ (Nowaczynski) (1000ml:550ml:450ml)

Paperchromatography

b) 系溶出乾固物を乾いた濾紙上の start line に塗り、これを固定相および移動相で飽和したタンク内に6時間吊したのち、移動相を注入して4時間展開する。タンクよりとり出した Paper は、そのまま室温で乾燥後、「F」の Spot の下端の1cm下より「E」の Spot の中点までに相当する部分を溶出する。

iv) 比色定量 (Nowaczynski 法)²⁹⁾³⁰⁾

上記の各種「Chromato.」により単離された「Aldo.」および同様の操作により Paper blank から溶出した減圧乾固物を 95% Ethanol 1.5ml に溶解し、これにそれぞれ 500mg% Blue tetrazolium Ethanol 溶液 0.25ml、および 10% Tetramethylammonium hydroxide 水溶液を 95% Ethanol で10倍にうすめたものを 0.25ml 加え、よく振盪したのち、 24°C 暗室に放置して発色せしめる。25分後、氷醋酸 1ml を加え、発色を停止し、これについて2時間以内に、島津製 Beckman D.U. 型 Spectro photometer で $510\text{m}\mu$ の波長の吸光度を測定し、その吸光度を dl-free 「Aldo.」を用いて作つた標準曲線と比較し、「尿中 Aldosterone」を定量する。

B) 尿中 Tetrahydrocortisol (THF) の定量

i) 水解および抽出²¹⁾

24時間尿の1/10量について、硫酸又は10% NaOHを滴下してpH6.4に調整し、これに1/10容の1Mol 磷酸緩衝液およびCHCl₃数滴を加え、更に細菌性β-Glucuronidaseを尿1cc当り50単位の割合で加える。この尿を37℃の恒温槽内で24時間水解し、1/2容の醋酸エチルで一度抽出後、再度尿1mlにつき25単位の酵素を加えて前回と同様に更に24時間水解する。この尿から前回と同様1/2容の醋酸エチルで2回手動振盪によりSteroidsを抽出し、これらの醋酸エチル抽出液を全部集めこれに1/20容の1/10N-NaOHを加え洗滌、次いで蒸留水で2回洗滌後、無水芒硝で脱水、乾固する。

ii) Paper chromatography

a) Chloroform-formamide 系 Paper chromatography⁶⁾

前述の「Aldo.」単離の場合と同様の操作に従つてi)で得られた尿抽出物を本系に展開する。展開時間は8時間とし、溶出部位は「F」のSpotの中心とStart lineの1/3に相当する部の上下4cm (THFのR_{THE}:0.34)の部分溶出する。

b) Butylacetate Formamide Water 系 Paper chromatography²²⁾

上記a)の溶出物を本系にて展開し、8時間後にPaperを取り出し乾燥後、「F」のSpotの中点より、展開方向の側へ約5cmを切り取り溶出する。

c) Bush B5 変系⁷⁾³⁰⁾

本系の展開時間は15時間、「F」のSpotの中心とStart lineの中間点を中心とする上下4cmを溶出する。

iii) 比色定量

上記3系のPaper「chromato.」を経て純化されたTHFは「Aldo.」の場合と同様にして、純品THFとBlue tetrazolium反応により定量する。

c) Aldosterone および Cortisol の1日分泌量の測定¹²⁾³⁸⁾

i) Aldosterone の1日分泌量の測定

7-H³-d-「Aldo.」(20μc/μg)の1~3μcを20mlの5%葡萄糖溶液にうすめて静注し、その注射時より24時間にわたり採尿する。この24時間尿の半量をpH6.4に調整し、1/2容のCHCl₃に尿を少しずつ加えて手動振盪により遊離型「Aldo.」代謝産物を除いた後、前述の尿中「Aldo.」定量法と同じ操作を用いて、酸水解分画中の3-oxo-conjugate分画に由来する遊離型「Aldo.」を単離する。この最後のPaperの溶出物を3mlの95% Ethanolに溶解し、そのうち1mlを用いてBlue tetrazolium反応により「Aldo.」を定量、別の1mlは乾固後、後述の方法によつて、その放射能を測定し、この尿中遊離型「Aldo.」の比活性度を求め、後述する式を用いて1日分泌量を測定する。

ii) Cortisol の1日分泌量の測定

7-H³-F (28μc/μg) 又は 4-C¹⁴-F (42.4μc/mg) の1~3μcを20mlの生理的食塩水に希釈して静注し、注射後の24時間尿について、前述の方法でTHFを単離し、このTHFの比活性度より後述の式を用いて「F」の1日分泌量を算出する。

iii) 1日分泌量の計算法

放射性Steroidを静注すると、これらは一定のSpaceに拡がるが、その大部分は時間とともに代謝されて尿中に排泄される。もし注射した放射性Steroidが、一定時間内に全部排泄されるならば、この尿中に排泄される代謝産物の一つを単離して、その比活性度を測定することにより、そのSteroidhormoneの1日分泌量を算出することが可能となる。静注した放射性Steroidの放射能は副腎静脈中に分泌される同種の非放射性Steroidによりうすめられる。従つて肝で代謝されて尿中に排泄されたその代謝産物の比活性度、そのSteroid hormoneの分泌量および注射した放射性Steroidの間には、Dilution methodの理論から次のような関係式が成立する³²⁾。

$$\left[\frac{I_i(f)}{I_0} - 1 \right] a = S$$

ただし I_i : 注射した Steroid の比活性度

I_0 : 尿中代謝産物の比活性度

$f = \frac{\text{静注した Steroid の分子量}}{\text{尿中代謝産物の分子量}}$

a : 静注した Steroid の量 (μg)

上式で a が S に比べて微量の場合は $S = \frac{a I_i(f)}{I_0}$ となり, 尿中代謝産物として, 遊離型「Aldo.」を単離し

てその比活性度を測定した場合は $f=1$ であるから $S = \frac{R}{I_0}$ (ただし $R = I_i a$: 静注した Steroid の放射能)

となる. また「F」の代謝産物として THF を測定した場合にも $f = \frac{362}{366} \approx 1$ でやはり上式が成立する. 分

泌された Steroid は Tait 等³⁸⁾によると, その移動と代謝の様相に 2 つまたは 5 つの Compartment が考えられるが, 実際には Two compartmental model を想定して, その代謝を追求するのが便利であり著者も本法に従って解析した.

Fig. 1 はその Model を示したものである. その際

R : 注射した Steroid の放射能

S_1 : Inner pool への分泌率

S_2 : Outer pool への分泌率

K_1 : Inner pool および Outer pool 相互間の移動

速度

K_2 : Inner pool での代謝速度

K_3 : Outer pool での代謝速度

X : Inner pool 中の放射性 Steroid の%

Z : Outer pool 中の放射性 Steroid の%

I : Inner pool 中の Steroid の量

Q : Outer pool 中の Steroid の量

とすると,

$$\frac{dx}{dt} = -\frac{K_2 x}{I} + \frac{-K_1' x}{I} + \frac{K_1'' Z}{Q}, \quad \frac{dz}{dt} = -\frac{K_3 Z}{Q} + \frac{-K_1'' Z}{Q} + \frac{K_1' x}{I}$$

の式が成立する. 平衡状態では $K_3 = S_2 + K_1' - K_1''$ であり Laumas 等¹⁷⁾¹⁸⁾によれば, Two compartmental model で解釈した Steroid の分泌量 (S) は

$$S = \frac{R}{I_0} \left[\frac{1 + [a_1 / (a_1 + a_2)] (S_2 / K_1)}{1 + [K_2 / (K_2 + K_3)] (S_2 / K_1)} \right]$$

ただし, a_1 : 尿中代謝産物の Inner pool からの排泄率

a_2 : 同じ代謝産物の Outer pool からの排泄率

の式が成立する. 今 K_3 が 0 (または $a_2 = 0$) 或いは $S_2 = 0$ の場合は $S = \frac{R}{I_0}$ となる. すなわち放射性 Steroid を注射しない Compartment で分泌と代謝の両方が行なわれることさえなければ $S = \frac{R}{I_0}$ は成立する. Aldosterone や Coatisol の場合にはこの条件を満足させる. 従つてこれらホルモンの分泌量を測定するには R は既知であるから I_0 を求めればよい.

iv) Liquid scintillation spectrometer による H^3 または C^{14} の放射能の測定

試料を Ethanol または Methanol chloroform に溶解してガラス Vials (Packard 社製) にうつし, 充分乾固した後, これに 0.2 ml の純 Ethanol を加えて再度試料を溶解する. これに Scintillation solution

Fig. 1. Two compartmental model for consideration of secretion rate, rate of metabolism and rate of transport of corticosteroids

(PPO 4g : POPOP 100mg : Toluene 1000ml) 10ml を加えて, Liquid scintillation spectrometer によりその放射能を測定する. Tritium の測定には高電圧 Tap 9 (1100V), C^{14} の測定には Tap 4 (990V) が適当で最も高い効率を示した. H^3 および C^{14} を同時に含んでいる試料の測定は Okita³¹⁾ の方法に従って Discriminator ratio method により測定した. すなわち photomultiplier の電圧を 1100, Discriminator を第 1 Channel 10~30, 第 2 Channel を 10~100 とし, 各 Channel の H^3 および C^{14} の計数効率を標準液を用いて測定する. またこれと同時に C^{14} と H^3 について, これら 2 つの Channel の cpm の比を求める. すなわち第 1 Channel の H^3 の cpm を H_1 , C^{14} の cpm を C_1 , 第 2 Channel の H^3 の cpm を H_2 , C^{14} の cpm を C_2 とし, 両者の比 $\frac{H_2}{H_1} = a$, $\frac{C_2}{C_1} = b$ とすると, C^{14} および H^3 を同時に含んでいる試料の各 Channel における cpm N_1 , N_2 は

$$N_1 = H_1 + C_1, \quad N_2 = H_2 + C_2$$

となり

$$H_1 = \frac{bN_1 - N_2}{b - a}, \quad H^3 \text{ dpm} = \frac{H_1}{\text{Channel 1 efficiency factor}}$$

$$C_2 = \frac{b(N_2 - aN_1)}{b - a}, \quad C^{14} \text{ dpm} = \frac{C_2}{\text{Channel 2 efficiency factor}}$$

の式を得るので, 実測値 N_1 , N_2 を代入して H^3 および C^{14} の放射能を算出することができる.

尿の中の全放射能の測定は, Flood 等¹²⁾の方法に従って Quenching correction を行なつて測定する. すなわち 24 時間尿の 1/4000 量を蒸留水で 0.5ml に希釈し, これに 5ml の純 Ethanol および 10ml の Scintillation solution を加え, Tricarb liquid scintillation spectrometer で測定する. また一方 Isotope を含まない同一人の前日尿の 1/4000 量について静注した同じ放射性 Steroid の 1/4000 量を添加し, この放射能測定値を用いて Quenching を補正する.

2. Aldosterone および Cortisol の平均血漿濃度の測定³⁸⁾

A) H^3 -Aldosterone の血漿減衰曲線

早朝空腹状態の患者について, Quenching の補正の目的で, 放射能を含まない全血約 10ml を採取しておく. 次いで $7\text{-H}^3\text{-[Aldo.]}$ の Ethanol 溶液 1ml (1~3 μ c) を 23ml の 5% 葡萄糖溶液に希釈し, そのうち約 3ml を Standard として保存した後, 正確に 20ml を患者の肘静脈に急速に注射する. 注射後逐時的に, すなわち 10分, 20分, 40分, 60分および 90分後に反対側の肘静脈より, Heparin 加注射筒内に 10ml ずつ計 5 回全血を採取する. 採血後は直ちに血漿を分離する. 放射性 Steroid 注射前に得た非放射性血漿の一定量 (5ml) には, 上述の Standard $H^3\text{-[Aldo.]}$ 溶液の一定量 (静注した放射能の 1/2000 量) を添加する. かくして得られた放射能を含む一定量 (5ml) の血漿試料 (6本) の各々に 20 μ g ずつの free-dl-[Aldo.] を加えてよく混和後, 6 倍量の CHCl_3 を 3 回交換しながら加えて手動振盪することにより, [Aldo.] を含む遊離分画を抽出する. この抽出物の合計を 1/20 容の 1/10N-NaOH で 1 回, 蒸留水で 2 回洗滌して色素を除き, 無水芒硝で脱水後, Rotatory flash evaporator で減圧乾固する. この乾固物を更に先述の C-F 系 Paper [chromato.] にて展開し, [Aldo.] の紫外線吸収帯を溶出し, これを更に Bush B₅ 変系 [chromato.] で純化し, [Aldo.] を単離する. かくして得られた Paper 溶出物のうち, その半量については Blue tetrazolium 反応により, [Aldo.] 量を比色定量し, 残りの半量については, Tricarb liquid scintillation spectrometer により放射能を測定する. これら比色定量値から, それぞれの試料について, 単離操作中の [Aldo.] の回収率を算出し, この回収率を補正して各血漿中に含まれている $H^3\text{-[Aldo.]}$ の dpm 値を算出する. 静注後の各時間の血漿 1000ml 中に含まれる遊離型 [Aldo.] としての H^3 放射能を, 投与量に対する百分率で表わした値を縦軸, 時間を横軸とする片対数グラフ上に plot して得られる曲線は, Fig. 2 に示されるように 2 相性で, 注射後 t 時間の血漿中放射能は, $X = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$ なる式で示される. すなわち血漿中放射能濃度は, 或る時間までは比較的急速に減衰し, その点を過ぎると減衰速度は緩徐となる. Teit 等の Two compartmental model によるとこの 2 つの曲線の交叉する点は, Inner space と Outer space の $H^3\text{-[Aldo.]}$ 濃

度が平衡点に達する点と考えられ、緩い勾配の曲線を縦軸の方向へ逆延長し、それが縦軸と交差する点は、上式の B を、また急な曲線が縦軸と交差する点は $A+B$ を示す。零時間から、上記平衡点までの間で、この縦軸に交わる 2 つの曲線の差を plot としてできる新しい曲線は $Ae^{-\alpha t}$ を示す。すなわち $X=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$ なる曲線は $Ae^{-\alpha t}$, $Be^{-\beta t}$ の 2 つの曲線に分けられる。この 2 つの曲線の勾配はそれぞれ α および β で、これらが縦軸と交わる点は、 A および B を示している。従つて血漿 H^3 -「Aldo.」の減衰状態は α , β , A および B の 4 つの Rate constants をもつて示すことができる。

B. 放射性 Cortisol の減衰曲線 (Fig.3)

$7\text{-H}^3\text{-F}$ または $4\text{-C}^{14}\text{-F}$ の $1\sim 3\mu\text{c}$ (1ml Ethanol 溶液) を 23ml の生理的食塩水に稀釈し、一部を Standard として残し、正確に 20ml を患者の肘静脈から注射し、逐時的に 10 分, 20 分, 40 分, 60 分および 120 分後に採血し、「Aldo.」の場合と同様に血漿の一定量を分離し、各血漿サンプルに Carrier として $20\mu\text{g}$ の free-「F」を加え、更に一定量の C^{14} または $\text{H}^3\text{-F}$ ($\text{H}^3\text{-F}$ を注射した場合は $\text{C}^{14}\text{-F}$ を、 $\text{C}^{14}\text{-F}$ を注射した場合は $\text{H}^3\text{-F}$) を加え CHCl_3 で Steroid を抽出し、洗滌乾固後 C-F 系 Paper 「Chromato.」で 8 時間、更に Bush B₅ 変系で 6 時間展開し Cortisol を単離し、その中の C^{14} および H^3 の放射能を測定し、添加した放射性「F」の放射能を用いて回収率を補正して、血漿 1000ml 中に含まれる「F」としての放射能を投与量の百分率で示し、その値を縦軸に、時間を横軸とする片対数グラフに plot し、 $X=Ae^{-\alpha t}+Be^{-\beta t}$ なる曲線の Rate constants A , B , α および β を「Aldo.」の場合と同様に求めることができる。

C. 1 日平均血漿濃度の算出

Tait 等の Two compartmental model に従つて Inner space の容積を V_1 , Outer space の容積を V_2 , Inner pool より Outer pool への移動速度を K_1 , 代謝の速度を K_2 とすると

$$K_2 = \frac{\alpha\beta(A+B)}{A\beta+B\alpha}, \quad V_1+V_2 = \frac{A\beta^2+B\alpha^2}{(A\beta+B\alpha)^2}, \quad K_1 = V_2(A\beta+B\alpha)$$

なる式が成立する。また代謝速度に関連して 24 時間内に代謝される Steroid 量を、それを含む Inner space の容積で示し、これを Metabolic clearance rate (M_2) と名付けると、Two compartmental model の理論から $M_2 = V_2 K_2$ となる。

また Steroid の 1 日分泌量を S , 1 日平均血漿濃度を C とすると、 $S = CM_2$ なので前述の方法で求めた S と上述の方法で得た M_2 とから、 C を求めることができる。また Miscible pool (P) は $P = C(V_1+V_2)$ で示すことができる。

3. Aldosterone および Cortisol の尿中代謝産物の分画の測定

放射性 Steroid の代謝産物を含む 24 時間尿の $1/10$ 量について、 $\text{pH} 6.4$ の状態で先づ同量の CHCl_3 で 2 回、手動振盪により、遊離型 Corticoid を抽出後 1mol 燐酸緩衝液を尿の $1/10$ 量加え、更に細菌性 $\beta\text{-glucuronidase}$ を尿 1ml につき 50 単位の割合で加え、 37°C で 24 時間水解する。24 時間後に 1 度、「Aldo.」の代謝産物には同量の CHCl_3 で、「F」代謝産物には同量の醋酸エチルで、Glucuronide から遊離する代謝産物を抽出した後再度 $\beta\text{-Glucuronidase}$ を加えて、更に 24 時間同様に水解し、前日と同様に Corticoids を抽出する。抽出後の尿は、塩酸を用いて $\text{pH} 1.2$ に調整し、室温で 48 時間加水分解を行なう。途中一度同量の CHCl_3 で Steroid を抽出する。かくして得られた遊離分画、Glucuronide (以下「Gluc.」と略す) を水解して得られる分画および酸水解によつて得られる分画を、各々 $1/10\text{N-NaOH}$ と蒸留水で洗滌後、無水芒硝で脱水し Rotatory flash evaporator で減圧乾固する。この各々の乾固物に 10ml の Ethanol を加えて溶解し、その $1/5$ 量を Counting vial にうつし、乾固後放射能を測定し、尿中の遊離分画 (Free), 酸水解分画および「Gluc.」分画に含まれる放射能の投与量に対する百分率を算出する。残りの $4/5$ は、乾固後更に C-F 系 Paper 「chromato.」に展開する。 $\text{C}^{14}\text{-F}$ の代謝産物の測定には、上記 Chromatogram を Gas flow chromatographic scanner を用いて、放射能の分布状態を Peak で示す。 $\beta\text{-Glucuronidase}$ で水解される「F」の代謝産物は C-F 系 Paper 「Chromato.」に展開すると、3 つの主要 Peak を得るが、その各々の面積を Planimeter で測定し、その値から尿中の THE, THF+Allo-THF の百分率および量を算出することができる。

Table 1. Secretion Rate (S), Mean Plasma Concentration (C), Metabolic Clearance Rate (M_2), Miscible Space ($V_1 + V_2$), Transport and Metabolism Rate (K_1 , K_2), and Miscible Pool of aldosterone in Patients with various endocrine Disorders and in Normal Controls.

Name	Age	Sex	Diagnosis	Na Intake (mEq/day)	S ($\mu\text{g/day}$)	C ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	$\frac{1000}{\beta}$ (min)	K_1 (units/day)	K_2 (units/day)	V_1 (L)	V_2 (L)	V (L)	$V_1 + V_2$ (L)	M_2 (L/day)	P (μg)
S. D.	30	F	Addison's Disease	259	64.8	.0044	27.5	15.3	49.9	29.4	5.8	50.0	35.2	1467	1.55
F. I.	38	F	Addison's Disease	207	12.0	.0005	42	47.6	46.3	41.7	27.0	100	68.7	2204	0.34
K. J.	24	M	Hypoadrenocorticism Hypokalemia	*	39.3	.0021	23.0	27.7	69.7	27.0	8.4	58.8	35.4	1882	0.74
K. H.	46	F	Addison's Disease	*	15.0										
I. A.	35	F	Primary Aldosteronism (Adenoma)	172	464.3	.0197	24.2	18.4	61.2	38.5	8.9	76.9	47.4	2356	9.34
			" (postadrenalectomy)	172	59.0	.0030	22.5	14.9	54.8	35.7	4.9	50.0	40.6	1957	1.21
I. M.	66	M	" (postadrenalectomy)	122	216.0										
T. K.	42	F	" (postadrenalectomy)	86	77.8	.0044	26.0	17.6	52.7	33.3	6.8	55.6	40.1	1755	1.76
H. G.	35	M	Cushing's Syndrome (Hyperplasia)	*	264.0	.0107	25.5	14.6	54.7	41.7	6.9	71.4	48.6	2281	5.20
K. M.	32	M	Cushing's Syndrome (Adenoma)	*	173.0	.0121	33.3	31.8	57.0	25.0	12.1	66.7	37.1	1425	4.49
K. U.	32	F	Cushing's Syndrome (Adenoma)	*	110.2										
Y. M.	16	F	Cushing's Syndrome (Hyperplasia)	*	163.6										
S. W.	50	F	Cushing's Syndrome	*	193.5										
M. S.	24	F	Adrenogenital Syndrome (Non-tumorous)	*	89.9	.0051	26.3	11.4	46.2	38.5	4.8	52.6	43.3	1779	2.21
T. S.	21	M	Pinealoma Simmond's Syndrome	*	535.1	.0341	37.0	19.8	40.7	38.5	11.5	71.4	50.0	1567	17.05
T. I.	48	M	Panhypopituitarism (posthypophysectomy)	*	562.9	.0274	36.0	25.9	49.2	41.7	17.5	10.2	59.2	2052	16.22
R. I.	52	M	Craniopharyngioma	259	484.8	.0241	20.0	19.9	68.3	29.4	5.6	50.0	35.0	2008	8.44
D. A.	53	M	Paralytic Agitans	172	130.0	.0168	57.5	33.9	34.2	22.7	14.7	55.6	37.4	776	7.28
S. M.	41	M	Potassium losing Nephritis (Renal tubular acidosis)		95.0	.0070	33.3	15.4	40.4	33.3	6.9	52.6	40.2	1345	2.81
K. K.	52	F	Gastric Ulcer	*	327.0										
T. Y.	30	M	Normal Control	*	101.8	.0089	30.0	23.1	59.9	19.2	7.2	52.6	26.4	1150	2.34
F. M.	43	M	Normal Control	*	130.5	.0086	39.5	37.5	60.7	25.0	17.8	90.9	42.8	1518	3.78
M. K.	30	M	Normal Control	*	117.6	.0079	27.5	13.5	52.3	28.6	5.7	55.6	34.3	1495	2.71
T. K.	37	M	Normal Control	*	162.0										
			Mean		128.0	.0085	32.3	24.7	57.6	24.3	10.2	66.4	34.5	1385	2.94
			S.D.		22.1	.0004	5.2	9.9	3.8	4.3	5.4	17.4	6.7	158.2	.58

* Unrestricted Diet

 $\frac{1000}{\beta}$: T1/2 of the latter part of the curve for the disappearance of H³-aldosterone V : Total apparent volume of miscible space

H³-F および H³-Aldo の代謝産物は C-F 系 Paper Chromato. に展開した後、その Chromatogram を 1 cm 間隔に切つて溶出し、それらに含まれる放射能を測定して、その Chromatogram の放射能の Peak をグラフに書き、各 Peak の放射能の量から THE, THF+Allo THF, 或いは Tetrahydroaldosterone (TH-Aldo) の百分率を算出し、前述の分泌量測定値から各分画の尿中排泄量をも計算することができる。

第5章 実験成績

正常人 4 例について、食塩制限をしない状態で「Aldo.」分泌量を測定算出した (Table 1), すなわち 101.8~162 μg/day (平均 128.0 ± 22.1), またそのうち 3 例について H³-「Aldo.」の血漿内放射能減衰曲線を作製し (Fig. 2), 代謝速度 K_2 , および Distribution space $V_1 + V_2$, Metabolic clearance rate M_2 を算出した。その結果, K_2 : 52.3~59.9 (平均 57.6 ± 3.6) units/day, $V_1 + V_2$: 26.4~42.8 (平均 34.5 ± 6.7) l, M_2 : 1150~1518 (平均 1385 ± 158.2) l/day, また平均血漿濃度 (C), および Miscible pool (P) は C : 0.0079~0.0089 (平均 0.0085 ± 0.0004) μg/100ml, P : 2.34~3.78 (平均 2.94 ± 0.58) μg であった。

副腎皮質機能低下症として、アジソン病患者 3 例, および低カリウム血症を伴つた ACTH 刺激試験反応不良患者の 1 例について「Aldo.」の分泌量を測定したが、12.0~64.8 μg/day という低値を示し、その 1 日平均血漿濃度も 0.0005~0.0044 μg/100ml と低値であつた。また代謝速度は一定の傾向を示さなかつた。

しかし分泌量および血漿濃度が著明に低値であつた 1 例では Distribution space が 68.7 l と増加し、したがつて Metabolic clearance rate も 2204 l/day と増加がみられた。

副腎皮質機能亢進症の一つである原発性アルドステロン症について検討した。その 1 例について治療前の「Aldo.」分泌量を測定したところ 454.3 μg/day と著増が見られた。平均血漿濃度も 0.0197 μg/100ml と増加を示したが、 K_2 は正常値であつた。また Distribution space が軽度増加しているため、 M_2 の増加が見られた。本症例は右副腎腺腫摘出術により治癒したが、術後「Aldo.」分泌量および血漿濃度は減少し、 K_2 , M_2 および V_1 は術前とほとんど変化しなかつた。クッシング症候群患者 5 例について「Aldo.」分泌量を測定し、うち 2 例について体内の代謝を観察した。クッシング症候群患者では「Aldo.」分泌量は一般に正常高値を示すが、両側副腎肥大による本症候群の 1 例では 246.0 μg/day と増加が見られ、本例では K_2 は正常であつたが、Distribution space が大で、 M_2 は増加していた。腺腫による本症候群の 1 例では「Aldo.」分泌量、血漿濃度が軽度増加したが、代謝速度はすべて正常範囲であつた。副腎性器症候群 (単純男性化型) の 1 例における「Aldo.」分泌量および平均血漿濃度はやや低値、代謝速度はやや減少したが、 V_1 は逆に軽度増加したが M_2 は僅かに増加した。脳腫瘍、下垂体間脳系疾患における「Aldo.」の分泌量および平均血漿濃度は、今回測定した症例に関してはいずれも著増を示した。これらの症例の一部には、食思不振、悪心等のため Na 摂取不十分のものもあつた。 K_2 は一定の傾向を示さないが、 V_1 は増加しているものが多く、 M_2 も増加している。振顫麻痺症の 1 例では肝機能障害を伴つていたため、分泌量は正常であつたが、血漿濃度は高く、代謝速度は遅延している。カリウム喪失性腎炎 (Renal tubular acidosis) の 1 例では「Aldo.」分泌の増加が見られず、軽度の K_2 の低下、 V_1 の増加以外に著変が見られていない。次に、正常人及び各種内分泌疾患々々について H³-Aldo. の尿中代謝産物を、前述の方法で各分画に分け、その放射能を投与量に

Fig. 2. The mean H³-Aldosterone Levels in the Plasma after intravenous Injection in Normal Men

Table 2. Secretion Rate (S), Mean Plasma Concentration (C), Metabolic Clearance Rate (M_2), Miscible Space ($V_1 + V_2$), Transport and Metabolism Rate (K_1 , K_2), and Miscible Pool of Cortisol in Patients with various endocrine Disorders and normal Controls

Name	Age	Sex	Diagnosis	S (mg/day)	C ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	$\frac{1000}{\beta}$ (min)	K_1 (unit/day)	K_2 (unit/day)	V_1 (L)	V_2 (L)	V (L)	$V_1 + V_2$ (L)	M_2 (L/day)	P (μg)
H. G.	35	M	Cushing's Syndrome (Hyperplasia)	80.3	44.8	73.0	20.0	25.6	7.0	3.8	16.7	10.8	179	4888.4
Y. M.	16	F	Cushing's Syndrome (Hyperplasia) % SU-8874 adm.	70.3 1.4	14.0	49.5	14.7	32.1	15.6	5.1	32.3	20.7	501	2898.0
K. M.	32	M	% Triparanol adm. Cushing's Syndrome (Adenoma)	63.3 43.5	12.0	90.0	35.2	20.0	16.7	10.6	33.3	27.3	334	3276.0
S. F.	58	F	Cushing's Syndrome (Adenoma)	53.8	36.1	101.0	20.4	16.4	9.1	4.4	16.7	13.5	149	4873.5
K. U.	32	F	Cushing's Syndrome (Adenoma) % SU-8874 adm.	60.7 1.4	15.3	76.0	19.1	29.0	13.7	8.9	43.5	22.6	397	3457.8
S. D.	30	F	Addison's Disease	1.2	0.9	90.0	10.8	15.2	8.3	2.2	12.5	10.5	126	94.6
K. O.	34	F	Addison's Disease	2.3	0.7	42.0	10.7	30.8	10.3	1.9	15.3	12.2	317	85.4
F. I.	38	F	Addison's Disease	1.1	0.4	49.0	15.1	41.1	6.1	2.6	20.8	8.7	251	34.8
N. F.	29	M	Abnormal Pigmentation	15.3	3.3	73.5	20.0	28.9	16.1	10.2	47.6	26.3	465	867.9
N. U.	18	F	Obesity	29.4	6.4	62	26.3	27.4	16.7	8.2	33.3	24.9	458	1593.6
M. T.	22	F	Obesity	18.5										
Y. O.	15	F	Obesity & Imbecility	8.4										
T. H.	14	M	Obesity & Imbecility	7.5										
E. O.	12	F	Anorexia nervosa	2.5	1.4	70	17.4	22.7	8.2	3.1	14.7	11.3	181	158.2
T. S.	21	M	Pinealoma Simmond's Disease	0.5	1.8	36	10.1	36.4	7.9	1.4	12.3	9.2	288	165.6
T. T.	20	F	Panhypopituitarism	5.8										
T. M.	31	M	Normal control	26.1	5.8	36	12.2	37.0	12.2	2.3	19.2	14.5	451	838.1
T. K.	37	M	Normal control	18.5	4.3	40.5	18.3	40.9	12.6	1.7	23.8	14.3	434	610.6
T. Y.	30	M	Normal control	18.0	5.0	44.5	23.8	39.5	9.1	4.0	20.8	13.1	360	655.0
			Mean	20.9	50.2	40.3	18.1	39.1	11.3	2.7	21.3	14.0	415	701.2
			S.D.	3.7	.62	3.5	4.7	1.6	1.6	1.0	1.9	.6	39.5	98.6

 $\frac{1000}{\beta}$: T1/2 of the latter part of the curve for the disappearance of labeled cortisol V : Total apparent volume of miscible space

Table 3. Urinary Metabolites of H³-Aldosterone ((%) Dose injected H³-Aldosterone)

Name	Age	Sex	Diagnosis	Free	pH 1.2 total	extrac- table as Ald.	Glucuro- nide as TH-Ald.	Urinary Aldoste- rone
T.K.	37	M	Normal Control	0.3	8.9	1.9	11.5	3.1
T.Y.	30	M	Normal Control	0.5	17.5	2.8	18.5	2.8
M.K.	30	M	Normal Control	0.7	13.5	2.0	24.2	2.3
F.M.	43	M	Normal Control	0.4	21.0	4.0	15.0	4.7
S.D.	30	F	Addison's Disease	0.4		2.5		1.6
F.I.	38	F	Addison's Disease	3.0	20.3	3.3	20.2	0.4
K.H.	46	F	Addison's Disease	0.7	10.5	2.0	11.3	0.3
K.J.	24	M	Hypoadrenocorticism, Hypokalemia	0.3	13.5	4.3	14.9	1.7
I.A.	35	F	Primary Aldosteronism (Adenoma)	0.4	13.0	3.1	25.0	14.6
			〃 Postadrenalectomy	0.5	20.0	2.4	12.3	1.4
I.M.	66	M	〃 Postadrenalectomy	0.2	16.5	3.9	22.6	8.5
T.K.	42	F	〃 Postadrenalectomy	1.6	19.7	7.7	10.2	6.0
H.G.	35	M	Cushing's Syndrome	0.4	13.0	3.2	8.6	7.8
K.M.	32	M	Cushing's Syndrome	3.2	11.3	1.8	13.6	3.2
K.U.	32	F	Cushing's Syndrome	1.0	8.2	3.8	10.5	4.2
Y.M.	16	F	Cushing's Syndrome	0.1	7.4	3.2	13.5	5.3
S.W.	50	F	Cushing's Syndrome	0.6	7.2	2.2	14.5	4.3
M.S.	24	F	Adrenogenital Syndrome	1.2	12.9	8.0	23.0	7.2
T.S.	21	M	Simmond's Disease	1.2	9.5	3.4	33.2	18.4
T.I.	48	M	Panhypopituitarism	2.0	18.5	1.4	20.9	8.2
R.I.	52	M	Craniopharyngioma	2.0	20.0	2.1	19.5	19.5
D.A.	53	M	Paralysis Agitans	0.5	10.5	5.2	20.3	1.9
S.M.	41	M	Potassium losing Nephritis (Renal tubular acidosis)	0.3	25.0	3.7	10.0	3.5
K.K.	52	F	Gastric Ulcer	0.3	18.5	1.9	16.3	5.1

対する百分率で示すと Table 3 の如くなる。正常人 4 例についてみると注射された H³-Aldo. は、その投与量の 0.3~0.7% が非結合型で、尿中に排泄されるが、残りの大部分は体内で代謝されて結合型となる。そのうち、酸水解で、遊離型の「Aldo.」を遊離するような代謝産物すなわち 3-oxo-conjugate は 1.9~4.0% であった。この外酸水解で遊離するが、その遊離してくる物質が、遊離型「Aldo.」とは異なるものもある。この遊離物が如何なる構造かは未定であるが、この代謝産物が 7~17% を示した「Gluc.」は 11.5~24.2 であったが、これは酵素水解により Tetrahydroaldosterone を遊離し、その主なものは Ulick 等⁴²⁾によつて証明された 3 α -Hydroxy-5 β -Pregnane isomer と考えられる。

H³-Aldo. の代謝産物は、その大部分が 24 時間内に排泄され、その主な代謝産物は上記の如くであるが、その残りの代謝産物が如何なる形で排泄されているのか不明の点が多い。このような尿中分画を、各種内分泌疾患について比較した。副腎機能低下症であるアジソン病の場合、その 1 例で遊離分画の増加がみられたが、本例では肝機能障害を合併しており代謝速度もやや遅延していた。しかし一般に副腎機能低下症で「Aldo.」分泌量が著明に減少している場合でも、その尿中代謝産物の分画には正常人に比べて著変が見られない。

機能亢進症である原発性アルドステロン症の 1 例における H³-「Aldo.」尿中分画も殆んど正常人と差がないが、術後分泌量の減少した時期には「Gluc.」分画の百分率に減少が見られた。クッシング症候群では「Gluc.」分画がやや減少している。副腎性器症候群の 1 例では 3-oxo-conjugate 分画の増加が見られ、2 次

的に「Aldo.」分泌量の増加を伴っていると考えられる間脳下垂体系疾患で、遊離分画の増加傾向が見られた。しかしながら、一般にこれらの変化は「Aldo.」分泌量の多少とは無関係のようでしたがつてそれぞれの疾患に特異な変化は認められなかつた。

健康成人3例の「F」1日分泌量は (Table 2) 18.0~26.1 (平均 20.9 ± 3.7) mg/day で、1日平均血漿濃度は $4.3 \sim 5.8$ (平均 5.02 ± 0.62) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であつた。また「Aldo.」の場合と同様に $\text{H}^3\text{-F}$ の血漿内減衰曲線を作製し (Fig. 3), 代謝速度 K_2 および Distribution space $V_1 + V_2$, Metabolic clearance rate M_2 を求めた。その値は K_2 : $37.0 \sim 40.9$ (平均 39.1 ± 1.6) units/day, $V_1 + V_2$: $13.1 \sim 14.5$ (平均 14.0 ± 0.6) l, M_2 : $360 \sim 451$ (平均 415 ± 39.51) l/day, また Miscible pool は $610.6 \sim 838.1$ (平均 701.2 ± 98.6) μg であつた。

副腎皮質機能亢進症であるクッシング症候群5例の「F」分泌量は $43.5 \sim 80.3\text{mg/day}$ といずれも著増を示した。特に副腎皮質肥大に基因するクッシング症候群

の場合には 80.3 , 70.3mg と高値を示したが、副腎腺腫の3例では 60.7 , 53.8 および 43.5mg/day と肥大の場合ほど高値をみなかつた。このうちで肥大1例、腺腫1例に SU-8874 3.6g を投与したがその投与中の「F」分泌量は著減した。しかし肥大の同じ例に Triparanol を投与したところ、「F」分泌量の減少は著明ではなかつた。クッシング症候群患者における「F」の平均血漿濃度は $12.0 \sim 44.8\mu\text{g}/100\text{ml}$ と増加しており、肥大2例の平均は $29.4\mu\text{g}/100\text{ml}$, 腺腫3例の平均は $21.1\mu\text{g}/100\text{ml}$ と肥大の方が高値を示している。クッシング症候群における「F」の代謝速度 K_2 値には減少する傾向が見られるが、 $V_1 + V_2$ の増加するものもあり、 M_2 には一定の傾向が見られなかつた。Miscible pool は一般に著増している。これに対し肥胖症の患者4例では「F」の分泌量の増加は見られず、そのうち1例の平均血漿濃度も著変なく、 $V_1 + V_2$ は増加したが、 M_2 には変化がなかつた。アジソン病の3例では、「F」分泌量は著明に減少し、したがって平均血漿濃度も低値を示したが、 M_2 は低下して代謝の遅延する傾向が見られた。Miscible pool も著減した。これに対し副腎不全のない異常色素沈着症の1例では、分泌量、血漿濃度が僅かに低下したが、代謝速度等には、正常人に比べて差が認められなかつた。間脳下垂体系疾患患者の「F」分泌量はアジソン病同様低値であつたが、平均血漿濃度はアジソン病ほど低値ではなかつた。また本症でも $V_1 + V_2$ は一般に小さく、また M_2 の減少する傾向が見られた。

尿中に排泄される $\text{H}^3\text{-F}$ の代謝産物の分画を正常人および各種内分泌疾患患者で比較した (Table 4)。正常人3例について $\text{H}^3\text{-F}$ を静注後24時間尿中に排泄される各分画の放射能は、中性尿より CHCl_3 で抽出される分画、すなわちいわゆる遊離分画中の放射能の百分率は $0.5 \sim 1.0$ (平均 0.7) %, pH1.2で酸水解後抽出される分画は $2.6 \sim 5.1$ (平均 3.6) %, $\beta\text{-Glucuronidase}$ で水解される分画すなわち「Gluc.」は $27.0 \sim 43.6$ (平均 33.9) %であり、この「Gluc.」を更に Paper「chromato.」に展開し THE および THF+Allo-THF を分離し、それぞれの放射能を測定すると THE は $13.2 \sim 22.3$ (平均 18.0) %, THF+Allo-THF は $10.0 \sim 17.0$ (平均 13.5) %であつた。この正常人の $\text{H}^3\text{-F}$ 尿中代謝産物の分画の百分率をクッシング症候群の患者のそれと比較すると、遊離分画が5例中3例に増加しており、酸水解分画は逆に減少している例が見られる。また「Gluc.」の総量の百分率は5例中2例に減少が見られる。この「Gluc.」のうち THF+Allo-THF の百分率はいずれも正常範囲内にあつたのに比べ THE 分画は全例に減少しており、特にその傾向は腺腫のある症例に見られた。したがって THE/THF 比はクッシング症候群の場合には減少する。この分画

Fig. 3. The mean $\text{H}^3\text{-Cortisol}$ Levels in the Plasma after intravenous Injection in Normal Men

Table 4. Urinary Metabolites of H³-Cortisol (% Dose injected H³-Cortisol)

Name	Age	Sex	Diagnosis	Free	pH 1.2 extractable	Glucur- onide	as THF + a THF	as THE
T.Y.	30	M	Normal Control	1.0	2.6	43.6	17.0	22.3
T.M.	31	M	Normal Control	0.5	3.2	37.4	13.4	18.5
Y.K.	37	M	Normal Control	0.7	5.1	27.0	10.0	13.2
H.G.	35	M	Cushing's Syndrome (Hyperplasia)	4.0	1.3	28.0	15.5	10.2
Y.M.	16	F	Cushing's Syndrome (Hyperplasia)	0.3	0.1	30.0	14.0	13.5
K.M.	32	M	Cushing's Syndrome (Adenoma)	3.2	0.8	18.5	10.2	7.3
S.F.	58	F	Cushing's Syndrome (Adenoma)	2.5	0.4	1.5	10.1	4.5
K.U.	32	F	Cushing's Syndrome (Adenoma)	0.2	3.2	29.0	16.3	9.5
S.D.	30	F	Addison's Disease	0.3	0.5	25.0		
F.I.	38	F	Addison's Disease	1.7	2.3	18.7	7.0	6.0
K.O.	34	F	Addison's Disease	0.7	1.3	38.5	13.5	21.0
N.F.	29	M	Abnormal Pigmentation	0.2	0.8	17.6		
M.U.	18	F	Simple Obesity	2.0	0.6	25.0		
M.T.	22	F	Simple Obesity	3.4	2.5	34.3		
Y.O.	15	F	Obesity & Imbecility	5.3	3.5	45.3	13.9	26.3
T.H.	14	M	Obesity & Imbecility	4.5	0.3	30.5	9.0	18.5
E.O.	12	F	Anorexia Nervosa	10.5	9.8	30.5	12.9	15.3
T.S.	37	M	Pinealoma, Simmond's Disease	5.5	3.2	25.3	14.3	8.6
T.T.	20	F	Panhypopituitarism	0.9	2.4	13.4	7.5	4.6

の百分率の値と1日分泌量を乗じた値、すなわち各尿中分画の定量値で比較すると当然ながら、クッシング症候群における尿中代謝産物は増加し、そのうちでも THE 分画の増加よりも THF 分画の増加が著明である。アジソン病の場合の H³-F 尿中代謝産物は正常人に比べると、3例中1例で遊離分画が増加して「Gluc.」の減少が見られるが、他の2例では正常人に比べて差が見られなかった。単純性肥胖症の患者では4例全例において遊離分画が著増しているが、「Gluc.」分画に差が見られず、クッシング症候群と異り、THE 分画の減少は見られない。したがって THE/THF 比はほぼ正常範囲であつた。また神経性食思不振症の1例で遊離分画の著増が見られ、汎下垂体機能低下症の2例において「Gluc.」分画の減少、特に THE 分画の減少が見られた。

第6章 考 按

尿中および血中 Steroids ならびにその代謝産物の測定については種々問題点があるが、まず尿中「Aldo.」定量法について述べると、蓄尿上の注意として尿の腐敗防止の意味で凍結するのが理想である。特に夏期高温時には細菌増殖による Steroid の破壊が問題となる。アルカリ性尿の場合には特にその程度が強いので、醋酸の添加等が推奨される²³⁾。また、紫外線に対し Steroids は不安定なので、暗所に蓄えることが望ましい。特に尿中代謝産物の分画の比率を測定する際には、結合型代謝産物が増殖した細菌酵素により水解される場合があるので注意を要する。

水解方法について著者は酸水解と酵素水解とを検討した。酸水解は、尿に濃塩酸を滴下し、試験紙によつて pH1.2 に調整した。

「Aldo.」の水解にあたつて一般に pH1.0~1.5 が用いられている。著者の成績では pH の値が低いほど水解の速度が速いが、pH1.0 以下になると水解によつて生じた遊離型「Aldo.」は非常に不安定で、そのためかえつて回収率は不良となる。したがって水解時間は尿の pH とも関係があり酸性度の弱いほど長時間の水解を要する。また酸度の強いほど頻回に溶媒を交換する必要がある。近年 Kliman 等¹⁶⁾は pH1.0 で水解すれば

最初の24時間で大部分が水解され、それ以上の水解はあまり回収率を増きないと報告している。著者の経験では水解の程度に試料による差があり、24時間の水解で不充分の場合もあるので、結果を一定させる意味からpH1.2, 48時間水解法を用いた。抽出に用いる溶媒としてはその安定性から Methylene dichloride が理想的であるが、費用等の関係から CHCl_3 を用いた。

アルカリ洗滌には NaOH または炭酸ソーダが用いられている。洗滌効果では前者の方が優れているが、Garst等¹⁴⁾によれば高温での NaOH 洗滌は、大量の「Aldo.」が破壊されると報告している。著者は1/20容の 1/10N- NaOH で数回振盪後、直ちに蒸溜水で洗滌し、できるだけ低温で行ない良好な結果を得た。なお逆抽出によつて回収される「Aldo.」量は全体の約3%程度であつた。

酵素水解には細菌性 β -Glucuronidase または臓器性 β -Glucuronidase が一般に広く使用されているが、その水解時間および使用する酵素の量にはまだ一定した基準がない。細菌性 β -Glucuronidase を使用する場合、酵素量は尿 1 ml につき50~300単位、水解時間は18~48時間との報告が多い。著者は $\text{H}^3\text{-F}$ を静注した正常人の24時間尿の一部について、細菌性 β -Glucuronidase 50単位/尿 1 ml を加え37°Cで24時間水解後、醋酸エチルで Steroids を抽出したのち、さらに25単位/尿 1 ml の酵素を加えて24時間水解し、醋酸エチルで前回と同様に抽出し、同様の操作をさらに24時間合計72時間行なつて、その各々に含まれる放射能を比較したところ、最初の24時間に水解される「Gluc.」は、第2日目の8倍、第3日目には3日間に水解される量の2%に相当する量が遊離することを知つた。しかし「Gluc.」の水解には試料による差があり、尿中に存在するこれら酵素の阻害物質の量および種類も不定で、したがつて適量の酵素量をきめることは困難で、なるべく充分量の酵素を加えない限り一定した結果が得られない。またこの酵素は非常に高価なことでもあり、試料により添加量が不充分な場合も考えられるが、上記の成績から、尿 1 ml につき75単位、48時間水解法を用いた。また酵素水解後溶媒として醋酸エチルを用いたが、これは CHCl_3 に比べて抽出効果がすぐれているため、特に THF に対する $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ の Partition coefficient は2:1で不良であるために、この場合には CHCl_3 による抽出は不適当であつた。しかし、「TH-aldo.」に対する Partition coefficient は CHCl_3 の方がすぐれているので、 CHCl_3 を使用することにした。

Column「chromato.」では Florisil column は Corticoids の或る種の群を分離すると同時に、尿の Steroids 以外の物質や色素を分離するために用いられる。すなわちこれらの不純物の大部分は最初の1% MtOH-CHCl_3 溶出液中に溶出され、「Aldo.」や 17-OHCS は後の25% MtOH-CHCl_3 溶出液中に溶出されるが、著者が $\text{H}^3\text{-F}$ や $\text{H}^3\text{-Aldo.}$ を用いてそれらの回収率をしらべたところ、90~96%と好成績を示した。Column の作製に当つて注意を要するのは Florisil の活性状態で、著者は600°C 4時間電気炉中で活性化したが、Desiccator に入れておけば1週間は Florisil の活性減退は見られなかつた。「Chromato.」展開中の温度の変化は Paper「chromato.」の場合ほど問題とならないが、夏期等高室温時は展開中に Florisil の間に気泡を生じ、これが吸着および脱着の障碍となり、回収率が減少する原因となるので注意を要する。

Paper「chromato.」については Neher等²⁷⁾によつて「Aldo.」の化学的定量法が導入されて以来、その後その改良法が次々と発表されて来た。これらの方法の主眼は要するに2つ以上の Paper または Column「Chmato.」を用いて「Aldo.」を単離するにある。Paper「chromato.」の条件としては、展開時間、分離性、展開至適温度、Capacity、Paper blank 等が問題となるが、遊離型「Aldo.」の分離は一般に Toluene-propyleneglycol, 「C-F」, 「B-F-W」, E_2B , Bush B_8 および Cyclohexane-dioxane ethanol water 等の Paper「chromato.」系のうち2~4系を適当に組合わせることにより可能となるが、著者は前述のように C-F 系, B-F-W 系および Bush B_8 変系の3系の Paper「chromato.」を組合わせることにした。

この3系の組合わせにより「Aldo.」は他の Corticoids から分離可能で、実際に妊婦尿から得た CHCl_3 抽出物を3系の Paper「Chromato.」で展開して「Aldo.」を分離し、その硫酸 Chromogen、燐酸 Chromogen および紫外線吸収曲線を純品「Aldo.」と比較して良好な成績を得ることができた。この3系の Paper「chromato.」はいずれも22~24°Cが至適展開温度であるため、同時に同じ恒温室内で展開することができ、展開時間が3~5時間と比較的短時間であること、また、「Aldo.」の単離だけでなく、「F」の代謝

産物の分離にもそのまま応用できること、また Bush B₅ 変系は固定相、移動相に用いる試薬の精製が比較的容易で、且つ Paper blank が小さく、最後の Paper「chromato.」系として非常に優れていること等の長所がある。この3系全体を通じての回収率は 7-H³-Aldo. を尿抽出物に加えて得た結果では81.7%, 5~10 μ gの非放射性 free-「Aldo.」を添加して得た結果では69.5~78.3%であった。

この回収率を左右する要素は、正確に Corticoids の Spot を Paper 上できめることにあるのは勿論であるが、さらにその Paper より Corticoids を溶出する方法も回収率に大いに影響する。Spot の決定には紫外線燈や Blue tetrazolium 反応を応用する方法があるが、Isotope を含んだ試料では Chromatographic scanning により放射能の Peak を求める方法が最も正確である。Paper から Corticoids を溶出する方法は種々試みられているが、Paper を充分乾燥したのち、適当な溶媒を用いて下降法で展開し溶出する方法が最も合理的で経済的と考えられる。

比色定量法としては著者は Nowaczynski 等^{29,30)}の方法にしたがつて Blue tetrazolium 反応を利用した。本法は Ethanol 中で 510m μ に最大吸光度を有する Formazane を作る反応として広く一般に利用されている反応ではあるが、必ずしも α -Ketol side chain を有する Corticoids のみに特異的な反応ではなく、したがつていくら Paper を洗滌し精製した試薬を用いてもなお Paper blank を零とすることはできない。著者の成績では Bush B₅ の Paper blank は 1 μ g/6cm² であった。これは尿中「Aldo.」の定量値を解釈する際に注意を要する点である。食塩制限をしない健康成人10例の尿中「Aldo.」排泄値は 2.1~10.1 μ g/day であった。したがつて 2 μ g/day 以下の排泄量は低値であるが、排泄量が少ない程測定誤差が大となり、事実上低値を示す場合には、尿中「Aldo.」を正確に定量することは困難である。

尿中「F」代謝産物の測定についてもいろいろな問題がある。尿中「F」代謝産物の多くは「Gluc.」の型で排泄され、「Aldo.」の場合の 3-oxo-conjugate に相当する被酸水解性代謝産物は非常に少ない。したがつて今日分離定量される尿中「F」の代謝産物は主としてその遊離型および「Gluc.」であり、Porter silber 反応を利用して 17-OHCS としての測定が「F」代謝産物の測定を代表する如き感を与えていたが、近年 Romanoff 等³³⁾により Paper「chromato.」を用いて「F」代謝産物をさらに細かく分離する方法が紹介された。著者は細菌性 β -Glucuronidase で水解後遊離する「F」の Tetrahydro 型代謝産物を醋酸エチルで抽出し「Aldo.」の単離に用いたと同じ3系の Paper「chromato.」で THF, THE を単離した。最初に用いた C-F 系 Paper「chromato.」では β -Glucuronidase で水解される「F」の代謝産物をおよそ3群に分離することができる。これらはいずれも遊離型「Aldo.」,「E」等比べて Polarity が強い。したがつて10時間以上展開する方が分離が良好となる。すなわち最も Polarity の強い Cortolone, Cortol 次いで THF, Allo-THF (Rf 0.11) および比較的 Polarity の弱い THE (Rf 0.28) の3群を分離することが可能である。Corticosterone の代謝産物は一般に「F」のそれよりも Polarity が弱く本系により分離可能である。第2の System である BFW 系では「Aldo.」の Tetrahydro 型代謝産物と「F」の Tetrahydro 型代謝産物とを分離可能で、「TH-aldo.」の方が Polarity が強い。しかしこの系では THE, THF, Allo-THF はほぼ同

Table 5. Rf. Values of Corticoids in various Paper Chromatographic Systems

	Chloroform- Formamide	E ₂ B	Buch B ₅	Bush C	Butylacetate Formamide water
Cortisone (E)	1.9	0.8	2.1	2.6	0.8
Hydrocortisone (F)	0.9	0.6	1.2	1.4	0.8
Aldosterone (Ald)	1.9	0.5	1.5	1.4	0.4
Tetrahydro-E	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Tetrahydro-F	0.3	0.9	0.6		1.0
Allo-Tetrahydro-F	0.3		0.8		1.0
Tetrahydro-Ald	1.0	0.9	1.0	1.2	0.4

じ Rf 値を示し、これらを単離することはできない。最後の系である Bush B₅ の変系では15~25時間展開すると第1系で不充分であつた THF と Allo-THF の分離が可能となる (Table 5)。

著者は最後の Paper を溶出して得た THF について Blue tetrazolium 反応を用いて定量したが Porter Silber 反応を用いて定量することも可能である。

Steroid hormone 分泌量の測定法は前述のように或る仮定の上に成立する。すなわち分泌量の計算法からも理解されるように静注された放射性 Steroid hormone は、体内から分泌された非放射性 Steroid hormone と全く同じ代謝をうけ、尿中に同じ型で、また同じ割合で排泄されるはずである。したがつて上述の仮定は次のような点を満足させるものでなければならない。

a) 静注される放射性 Steroid hormone は、副腎から分泌される Steroid hormone と化学的に同じ構造でなければならない。たとえば、Ulick⁴⁰⁾は L-「Aldo.」は生体内で分泌される d-「Aldo.」の場合と異り 3-oxo-conjugate や「TH-aldo.」には転換しないといつており、したがつて「Aldo.」の場合には使用する放射性「Aldo.」は d 型でなければならない。

b) 静注される放射性 Steroid hormone の量 (μg) はできるだけ少量が望ましく、その量がそのホルモンの分泌と代謝に影響するような場合には正常状態のホルモン分泌状態を正確に表わさない。したがつて比活性度のできるだけ高いものが望ましいが、著者の用いた 7-H³-「Aldo.」、7-H³-F および 4-C¹⁴-F はいずれもかなり高い Specific activity をもち満足すべきものといえる。

c) H³ および C¹⁴ で標識した化学構造上の位置が安定で、代謝経過中その他において分離したり、非放射性の H, C と交換されないものでなければならない。

d) 分泌量算出の基準となる尿中代謝産物は静注した放射性 Steroid hormone および体内から分泌されたこれと同じ Steroid hormone のみに由来する代謝産物でなければならない。他の Steroid hormone にも由来する如き代謝産物であつてはならない。

e) 測定に用いる尿の中には、注射した放射能の大部分が排泄されていなければならない。一般に「Aldo.」の場合、3-oxo-conjugate を単離して分泌量を算出するときは24時間尿から、また「Gluc.」を用いるときは48時間尿から抽出する必要があるといわれている³⁹⁾が、著者等の経験でも 3-oxo-conjugate の排泄は「Gluc.」に比べて早く、多くの場合24時間以内に大部分が排泄され「Gluc.」の排泄は腎疾患の場合にしばしば遅れる傾向が見られ、48時間或いはそれ以上の蓄尿が必要となる。また THE 或いは THF から分泌量を測定する場合、それら代謝産物の尿中排泄は「Aldo.」の場合よりも遅延しており、注射した放射能の大部分が、24時間尿中に排泄されない場合があり、このような場合も48時間尿について測定した方が適当と考えられる。しかしあまり長時間にわたつて採尿し、それを測定に用いることは、後述の条件すなわち採尿中の Steroid の分泌と代謝状態をなるべく一定に保つことが困難となり、また一方測定操作の点からも問題となるので、その点をも考慮しなければならない。

f) 採尿時間中は Steroid の分泌量、肝における代謝状態、Distribution space、腎機能等が恒常状態でなければならない。しかし実際には副腎からの Steroid hormone の分泌にはかなりの diurnal variation がある。この点は避けられないが、とにかく下垂体副腎皮質の分泌や、肝腎における Steroid hormone の代謝および排泄機能を変化させるような刺激を採尿期間中、およびその前日に加えることは望ましくない。

g) 分泌量算出式 $S = \frac{R}{I_0}$ が成立するためには、代謝が Inner pool と Outer pool の一方または両方で行なわれていても、Steroid hormone 分泌と放射性 Steroid hormone 注射が、同じ pool 中に行なわれさえすればよい¹⁸⁾。実際に「Aldo.」および「F」の場合には、これら分泌は血漿すなわち Inner pool 中に行なわれ、それらの代謝も肝臓すなわち Inner pool で行なわれる。また放射性「Aldo.」および「F」も血漿すなわち Inner pool 中に注射されるから、上式の成立に支障を来さない。

分泌量の測定には、上記の種々の条件が充たされることを必要とするが、正確な副腎機能検査法としての分泌量測定法は、単なる尿中代謝産物の絶対量の測定法に比べて内分泌学における画期的進歩を示すもので

ある。分泌量の測定には、Steroids の代謝産物を単離しなければならず、操作が複雑でかなりの費用、設備を必要とする難点はあるが、血漿濃度、代謝速度、Miscible pool 等 Steroidhormone の分泌と代謝の動態を同時に知ることができるのみならず、単なる尿中 Corticoids の絶対量測定と異り、肝腎等の副腎以外の因子の影響をうけることなく、Corticoids 定量の際に問題となる回収率は本法に関する限りそれと無関係に分泌量を算出するので、測定値の再現性は良好である。しかし Corticoids 定量の場合と同様、測定値が低値の場合はやはり測定誤差が大となり、特に比活性度算出の基となる定量値を Blue tetrazolium のような非特異的な反応を利用する場合は Paper blank を小さくすることに特に注意を要する。Ulick等⁴¹⁾は C¹⁴ 標識 Acetic anhydride を用いて Double isotope dilution derivative method を用いて Aldosterone 分泌量を測定し、微量の場合にも測定が可能であることを示している。

従来血漿中 Corticoids の測定には Porter Silber 反応を利用した 17-OHCS 値の測定、螢光反応による Corticosterone の測定等があり、「Aldo.」の定量には Peterson 等の Double isotope derivative method¹⁶⁾ 或いは Bojesen等⁵⁾ の I¹³¹ および S³⁵ を利用した方法等が試みられているが、これらの方法はすべて直接 Sample 中に含有される Corticoids を分離定量する方法である。一般に「F」の血中濃度は日中特に午前中に最も高く夜間は低くなると言われている。したがって直接法による血漿濃度の測定値は採血時間や患者の状態によつて変動するために、Steroid 活性の指標にするにはすぐれた方法とは云い難い。また末梢血中「Aldo.」濃度は非常に微量で Double isotope derivertive method を用いなければ、直接これを測定することはできないが、その場合でもかなり大量の血液を必要とするため、実用的な方法ではない。著者の用いた間接法では、同時に分泌量、Miscible pool、代謝速度等を比較することができ、また測定値が1日平均濃度を示すため、その値が安定しており、Steroid hormone の生体内における生物学的活性の指標としてすぐれたものと言える。しかしこの平均血漿濃度には、血漿蛋白と結合した Steroids も含まれているので、生物学的活性を有する非蛋白結合型 Steroids の濃度を知ることが理想的であるが、このためには同一患者から採取した血漿について、その Steroid の血漿蛋白結合能を測定する必要がある。

測定上最も問題となるのは、微量にしか含まれていない血漿中の放射性 Steroid を如何にして単離し正確に測定するかということであるが、測定を容易にする意味では、比活性度の高い Steroid ほど血漿中の放射能を高め得るので、現在では H³-Steroid を静注する方法が C¹⁴-Steroid を用いる方法よりも優れている。しかし C¹⁴ は H³ に比べて放射能の Energy が大で、測定効率も良好であり、Paper 上の Scanning も容易なので、将来比活性度の高い C¹⁴-Steroid ができるようになることが望まれる。採血はその回数が多いほど正確な血漿中減少曲線を得るわけであるが、少なくとも5回以上の採血を必要とする。すなわち Quenching を補正して投与した放射能の量をきめるために、放射性 Steroid を静注する前に1度、静注後 Inner pool と Outer pool の濃度が平衡状態に達する前に2回、その後2回、合計5回である。採血量は静注する Isotope の種類と放射能によつても異なるが、H³-Aldo. 2~3 μ c 静注の場合、全血1回量10ml以上を必要とする。C¹⁴ の場合は測定装置の効率がよいので、これより少量でも測定可能である。血漿中放射能は時間とともに急速に減衰するので、採血量を次第に多くする方法も考えられるが、試料の Quenching を一定にする意味で、等量ずつの血漿を対象にする方が合理的である。これらの血漿中の放射性 Steroid は単離して、放射能を測定するまでに或る程度失われ、しかもその回収率は必ずしも一定ではない。したがって試料中の放射能を正確に知るためには、各試料についてその単離操作中の回収率を測定してこれを補正する必要がある。そのために Carrier を添加したり、Double isotope method を応用する。測定操作が複雑になるほど、回収率も悪く再現性も乏しくなり、この回収率の補正を行わずに減衰曲線を求めることは不可能である。また血漿中の放射能は必ずしも静注した放射性 Steroid hormone の形で存在するとは限らず、一定時間を経た後ではそのホルモンの代謝産物の放射能が混入する。したがって注射後時間を経て採血した試料は「Chromato.」により注射したものと同じ形の放射性 Steroid を単離し、その放射能の減衰状態を測定するのでなければ無意味である。このようにして得た曲線は2相性となり、Steroid の代謝速度、および分布 Space を示しているが、この曲線を解析する際に、Single compartmental model で解析するか、Two compart-

mental model で解析するかでその値が異なる。すなわち Single compartmental model にしたがえば、血漿減衰曲線のうち $X = Be^{-\beta t}$ なる曲線が体内の代謝速度を示し $\frac{1000}{\beta}$ は放射性 Steroid の血漿中生物学的半減期 (分) であり、上記曲線が Y 軸と交叉する点の逆数すなわち $\frac{1}{B} = V$ が Steroid の分布 Space の大きさを示すことになる。しかし Two compartmental model の理論からみると $\frac{1000}{\beta}$ は放射性 Steroid の代謝速度のみに関係するものでない。すなわち Outer pool から Inner pool へ移行する放射性 Steroid があるために $X = Be^{-\beta t}$ なる曲線は実際の代謝のみによる減衰曲線よりも緩い勾配を示し、したがって V も実際の分布 Space の大きさよりも広くなっている。Tait 等³⁸⁾はこれを補正して実際の代謝速度を示す曲線を計算し、また Miscible space の容積を算出した。したがってこの Two compartmental model における Distribution space の容積 $V_1 + V_2$ 、および真の代謝速度 K_2 は、その計算式からも理解されるように A および α が大きい場合は B, β であらわした見かけ上の Space の大きさ V 、後半の曲線の減衰速度 β 、と比較しかなり異つた値を示すことになる。従来の報告には Single compartmental model による血漿減衰曲線の解析が多く見られるが正確な解析には Tait らのいう如く Two compartmental model を用いるべきものと思われる。

「Aldo.」分泌量を測定する方法には著者の方法のように 3-oxo-conjugate を用いる方法のほかに「TH-Aldo.」を用いる方法もあるが、理論的にはそのいずれを用いても同じ結果を得るはずである。現在までこれらの方法による正常人の Aldosterone 分泌量を測定した値が報告されてきたが、そのうち、3-oxo-conjugate を用いる方法による正常値として Ayres 等^{1,2)}は $170 \sim 190 \mu\text{g/day}$ 、Jones 等¹⁵⁾は 男子 $86 \sim 116$ (平均 96) $\mu\text{g/day}$ 、女子 $72 \sim 315$ (平均 192) $\mu\text{g/day}$ 、Tait 等³⁸⁾は 女子 $45 \sim 255$ (平均 128) $\mu\text{g/day}$ 、Flood 等¹²⁾は 女子で $50 \sim 118$ (平均 77) $\mu\text{g/day}$ 、Layne 等¹⁹⁾は $76 \pm 9.2 \mu\text{g/day}$ 、Siegenthaler 等³⁷⁾は $40 \sim 180$ (平均 107) $\mu\text{g/day}$ と報告し、ほぼ著者の成績と一致している。「Aldo.」の血漿濃度を測定するにはその濃度が非常に微量であるため、人体の末梢血中の「Aldo.」を直接測定することは非常に困難とされてきたが、Peterson 等によつて Double isotope dilution derivative method が応用され、その正常値として $0.04 \sim 0.08 \mu\text{g}/100\text{ml}$ が報告された³¹⁾。しかしこの値は後に訂正され、 $0.01 \mu\text{g}/100\text{ml}$ が妥当といつている^{38,39)}。また Bojesen 等も S^{35} および I^{131} を使用した Double isotope derivative method により人体末梢血漿中の「Aldo.」濃度を測定し⁶⁾、その正常値として $0.016 \sim 0.025 \mu\text{g}/100\text{ml}$ を報告している⁴⁾。また、Tait 等³⁸⁾は先述のように Two compartmental model にしたがって放射能の減衰曲線を解析し、Metabolic clearance rate と 1 日分泌量から「Aldo.」の 1 日平均血漿濃度を算出し、正常婦人 5 例の値として $0.0026 \sim 0.0149$ (平均 0.0077) $\mu\text{g}/100\text{ml}$ という値を報告した。本法による著者の成績もこの範囲内にあつた。Two compartmental model にしたがって Aldosterone の分布と代謝を観察した報告は現在 Tait 等と著者の報告以外に見られないが、先述の理由から本法が Single compartmental model よりも妥当であると考えられる。Tait 等の報告と著者の成績を比較すると、Tait の 5 例の正常女子では $K_2: 53.6 \sim 65.0$ (平均 60.0) units/day 、 $V_1 + V_2: 35.6 \sim 47.0$ (平均 40.6) l 、 $M_2: 1370 \sim 1810$ (平均 1620) l/day であり、著者の成績とほぼ類似している。

放射性「F」を投与してその尿中代謝産物の比活性度から「F」の 1 日分泌量を計算する試みは 1958 年 Cope 等⁹⁾によつて初めて行なわれたが、その後数多くの報告がなされている。その主なものをあげると、Cope 等⁹⁾は $4.9 \sim 27.9 \text{mg/day}$ (ただしこれは C^{14} -cortisol を経口投与しているのが妥当ではない)、Flood 等¹²⁾は $12.2 \sim 20.5 \text{mg}$ 、Peterson³²⁾は $11.0 \sim 16.9 \text{mg}$ 、Romanoff 等³⁴⁾は $15.9 \sim 31.1 \text{mg}$ 、Layne 等¹⁹⁾は $16.1 \pm 0.8 \text{mg}$ 、Ney 等³⁸⁾は $14 \sim 27 \text{mg}$ 、Mlynaryk 等³⁹⁾は $16.1 \pm 6.5 \text{mg}$ と報告し、著者の成績でも近似の値を得ている。Tait 等³⁸⁾は Cortisol についても Two compartmental model にしたがって解析し、 V_1 : 約 6l 、 $V_1 + V_2$: 約 13l 、 M_2 : 約 173l/day と報告している。その他には Two compartmental model にしたがって「F」の代謝を解析した報告はないが、Single compartmental model を用いた報告では Peterson³²⁾は、正常人に $4\text{-C}^{14}\text{-F}$ を静注し、その血漿中の $\text{C}^{14}\text{-F}$ の半減期として $80'$ 、Sandberg 等³⁶⁾は $90'$ 、Migeon 等^{24,25)}は $80'$ と報告している。

が、Sandberg, Migeon 等は血漿中のいわゆる遊離分画の放射能の半減期を測定し、「F」を単離してその放射能を測定していないので、 C^{14} -F の放射性代謝産物が途中から混入したものの半減期を測定することになり C^{14} -F の半減期とはいえない。著者の放射性「F」としての成績では $\frac{1000}{\beta}$ は 40.3' であつた。しかし前述のように「F」の真の代謝速度としては、Two Compartmental model によつて得られる K_2 の値を用いるべきである。この「F」と「Aldo.」の代謝を比較すると、「Aldo.」の代謝速度 (K_2) が、「F」のそれよりも速く、「Aldo.」の Distribution space (V_1+V_2) の容積は「F」のそれに比較して大である。また Metabolic clearance rate (M_2) も「Aldo.」の方が大である。このような V_1+V_2 および M_2 値に見られる差は「Aldo.」の血漿蛋白結合能の低いことに基因していると考えられ、血漿中の「Aldo.」が肝細胞内に移行する速度が増加していると解釈されている³⁹⁾。

Layne等¹⁹⁾は $7\text{-H}^3\text{-Aldo.}$ 静注後最初の24時間に排泄される尿中代謝産物を著者と同様に分離して、遊離分画 $0.40 \pm 0.18\%$, 3-oxo-conjugate $7.3 \pm 1.4\%$, 「Gluc.」 $36 \pm 4.1\%$ と報告し、また Coppage等¹⁰⁾は、遊離分画 $0.17 \sim 0.14\%$, 3-oxo-conjugate $8.7 \sim 9.8\%$, 「Gluc.」 $44 \sim 47\%$ と報告している。すなわち著者の成績に比べて 3-oxo-conjugate, 「Gluc.」ともやや高い値が得られている。一方 H^3 -F または C^{14} -F の尿中代謝産物は最初の24時間に排泄される全放射能は「Aldo.」よりも少ないとされているが、著者の成績では約85%で、そのうち遊離分画は $0.5 \sim 1.0$ で「Aldo.」よりも多く、逆に酸水解後抽出される分画は「Aldo.」に比べて著明に少ない。また一般に「F」の「Gluc.」分画は「Aldo.」の「Gluc.」よりも多く、「Aldo.」の「Gluc.」が2種類の TH-Aldo. からなるのに反し、「F」の「Gluc.」は THE, THF, Allo THF, Cortol および Cortolone¹³⁾³⁴⁾等からなっている。このような「Aldo.」と「F」の代謝の差は肝の酵素系の差に基因していると思われるが、その意義はまだ不明である。

以上のような正常人における「Aldo.」および「F」の分泌と代謝の様相が、種々の疾患で異なることは当然考えられるが、中でも分泌と最も関係ある疾患としては、副腎皮質および間脳下垂体系の疾患、「Aldo.」については腎その他の体液調節中枢等の障害も関係する。

また代謝の面では、その主役である肝臓の障害あるいは甲状腺疾患等がこれらホルモンの代謝に影響を及ぼす。

クッシング症候群の際の「F」の分泌増加は、従来尿中、血漿中の 17-OHCS 値の著増することから推定されてきたが、最近 Isotope dilution method を用いて、その分泌量の増加することが確かめられた^{28,43)}。著者の成績でも分泌量の増加が見られたが、このような分泌量の増加した状態で、「F」の代謝が如何に変るかは興味ある点であるが、前述のように K_2 は減少する傾向が見られた。一方アジソン病のような分泌量の減少した状態における「F」の代謝については、 C^{14} -F を静注しその血漿減少状態を追跡し、Sandberg等³⁶⁾は5例のアジソン病について C^{14} -F の遊離分画の半減期が正常人よりもやや短かつたと言っているが、著者の成績では C^{14} -F としての半減期は、肝障害を伴つた1例を除いてほぼ正常値に近い値を示した。すなわちアジソン病のような慢性に経過している副腎皮質不全状態では「F」の代謝速度と「F」の血漿濃度の減少との間にはあまり密接な関係が見られなかつた。しかしクッシング症候群のような血漿「F」濃度の増加した状態ではしばしばその代謝速度が遅れる傾向が見られ、また「F」を大量に負荷した時にも「F」の血漿濃度の減衰が追跡子量負荷時の減衰よりも遅れる。血漿濃度の増加せるときに代謝の遅れる理由についてはまだ不明で今後検討する必要がある。

なお、クッシング症候群の「Gluc.」分画は THE/THF 比が正常人と比べて著明に減少しているが、これは肝における 11β -hydroxysteroid dehydrogenase による「F」→「E」への反応が「F」の分泌増加に応じた反応の亢進を示さないためと考えられる。また「Aldo.」分泌量の増加した原発性アルドステロン症、あるいは「Aldo.」分泌量の低下しているアジソン病の場合に示されるように「Aldo.」の代謝速度は「Aldo.」の血漿濃度の増減とは無関係で、むしろやはり肝機能に関係が深い。このことは原発性アルドステロン患者で副腎腺腫摘出術により「Aldo.」分泌量および血漿濃度が著減したにもかかわらず、「Aldo.」の代謝速度

には著変が見られなかつたことから推測される。

肥胖症における「F」の分泌と代謝はクッシング症候群と比較するとき興味ある課題であるが、Mlynaryk等²⁶⁾は C^{14} -F を用いた Isotope dilution method により22例の肥胖症患者の「F」分泌量を測定し 23.9 ± 6.0 mg/day と彼等の正常値 16.1 ± 6.5 mg/day よりもやや高い値を報告し、正常状態では「F」分泌量が体重と平行すると述べているが、その代謝については追求していない。著者の成績では肥胖症は必ずしも「F」分泌量の増加を示さず、また $V_1 + V_2$ が増加し、 K_2 の低値を示したが、尿中代謝産物はクッシング症候群の場合のような THE/THF 比の低下は示さなかつた。間脳下垂体系疾患では「F」の分泌量が減少しその平均血漿濃度も低下しているが、Aldosterone 分泌量および平均血漿濃度の減少は見られず、むしろ減塩状態では増加するものが認められた。かかる疾患の「Aldo.」分泌量についてはまだよくわかつていないが、汎下垂体機能低下疾患の尿中「Aldo.」排泄量は減少しないといわれている²⁰⁾。またこれら患者に食塩制限をしても「Aldo.」排泄増加が見られない場合があると報告されている³⁵⁾。このように「Aldo.」分泌調節は「F」に比べてかなり複雑で不明の点が多く今後の研究が期待される。

総 括

H^3 -Aldosterone および H^3 -または C^{14} -Cortisol を用いて Aldosterone および Cortisol の分泌量、平均血漿濃度、代謝速度、Distribution space の容積、Metabolic clearance rate、Miscible pool および尿中代謝産物の分画を測定算出する方法を検討し、これらの方法を用いて正常人および各種内分泌疾患患者の Aldosterone と Cortisol の分泌代謝を研究した。

1) 正常人の食塩摂取制限をしない状態における Aldosterone 1日分泌量の平均は $128.0 \pm 22.1 \mu\text{g/day}$ で、1日平均血漿濃度の平均は、 $0.0085 \pm 0.0004 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 、代謝速度 K_2 は $57.6 \pm 3.8 \text{ units/day}$ 、miscible space の容積 $V_1 + V_2$ は $34.5 \pm 6.7\text{l}$ 、metabolic clearance rate M_2 は $1385 \pm 158.2\text{l/day}$ 、Miscible pool は $2.94 \pm 0.58 \mu\text{g}$ 、 H^3 -Aldosterone の尿中代謝産物では、遊離分画として投与量の 0.3~0.7%、3-oxo-Conjugate として 1.9~4.0%、Glucuronide として 11.5~24.2%が排泄されることを知った。

Cortisol の1日分泌量の平均は $20.9 \pm 3.7\text{mg}$ 、1日平均血漿濃度の平均は $5.02 \pm 0.62 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 、代謝速度 K_2 は $39.1 \pm 1.6 \text{ units/day}$ 、Miscible space の容積 $V_1 + V_2$ は $14.0 \pm 0.6\text{l}$ 、Metabolic clearance rate M_2 は $415 \pm 39.5\text{l/day}$ 、Miscible pool は $701.2 \pm 98.6 \mu\text{g}$ 、また放射性 Cortisol の尿中代謝産物の分画は遊離分画として 0.5~1.0%、酸水解分画として 2.6~5.1%、Glucuronide 分画として 27.0~43.6%、そのうち THF + Allo-THF が 10.0~17.0%、THE が 13.2~22.3%を示し、THE/THF 比は 1.31~1.36であつた。

2) クッシング症候群患者の Aldosterone 分泌量は平均 $177.3 \mu\text{g/day}$ と僅かに増加する傾向が見られた。1日平均血漿濃度、Miscible pool もやや増加したが、代謝速度は正常値を示した。また本疾患5例の Cortisol 分泌量は平均 61.7mg/day と著増し平均血漿濃度、Miscible pool も増加したが、代謝速度は減少する傾向が見られた。

3) アジソン病患者では Aldosterone、Cortisol とその分泌量、平均血漿濃度、Miscible pool は著減したが、代謝速度には正常人に比して一定の変化が見られなかつた。

4) 原発性アルドステロン症患者の Aldosterone 分泌量、平均血漿濃度、および Miscible pool は増加し、これらは腺腫の摘出により低値となつたが、Aldosterone の代謝速度は術前、術後とも正常範囲内であつた。

5) 間脳下垂体系疾患における Cortisol 分泌量平均血漿濃度は減少したが、Aldosterone の分泌量、血漿濃度の減少は見られず、食塩摂取減少状態では増加した。

6) 肥胖症患者の Cortisol 分泌量には正常人に比べて一定した変動が見られず、その代謝状態にも正常人と差が認められなかつた。

稿を終るに臨み御懇篤なる御指導を賜わり、御校閲を頂いた恩師三宅儀教授に深謝の意を表します。また常に御教示、御協力を賜つた河野剛講師に深く感謝致します。

なお、論文の要旨は、第33回および第34回日本内分泌学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) AYRES, P.J., O. GARROD, et al. : Ciba Found. Colloq. Endocr., 11 : 309, (1957).
- 2) AYRES, P.J., J. BARLOW, et al. : An International Symposium on Aldosterone (1958) 73, Churchill, London.
- 3) BAYLISS, R.I.S. and A.W. STEINBECK : Biochem. J., 54 : 523, (1953).
- 4) BOJESSEN, E. and H. DEGN : Abstr. 1st. International Congr. Endocr., Copenhagen, 1057 (1960).
- 5) BOJESSEN, E. and H. DEGN : Acta Endocr., 37 : 541, (1961).
- 6) BURTON, R.B., A. ZAFFARONI, and E.H. KEUTMAN : J. Biol. Chem., 188 : 763, (1951).
- 7) BUSH, I.E. : Biochem. J., 50 : 370, (1952).
- 8) COHEN, S. : J. Lab. & Clin. Med., 36 : 769, (1950).
- 9) COPE, C.C., and E. BLACK : Brit. Med. J., 5078 : 1020, (1958).
- 10) COPPAGE, W.S., D.P. ISLAND et al. : J. Clin. Invest., 41 : 1672, (1962).
- 11) EIK-NES, K., D.H. NELSON and J. L.T. SAMUELS : J. Clin. Endocr. & Metab., 13 : 1280, (1953).
- 12) FLOOD, C., D.S. LAYNE, et al. : Acta Endocr., 36 : 237, (1961).
- 13) FUKUSHIMA, D.K., H.L. BRADLOW, et al. : J. Biol. Chem., 235 : 2246, (1960).
- 14) GARST, J.B., N.P. SHUMWAY, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 20 : 1351, (1960).
- 15) JONES, K.M., R. LLOYD-JONES, et al. : Acta Endocr., 30 : 321, (1959).
- 16) KLIMAN, B., and R.E. PETERSON : J. Biol. Chem., 235 : 1639, (1960).
- 17) LAUMAS, K.R., J.F. TAIT, and S.A.S. TAIT : Acta Endocr., 38 : 265, (1961).
- 18) LAUMAS, K.R., J.F. TAIT, and S.A.S. TAIT : Acta Endocr., 38 : 469, (1961).
- 19) LAYNE, D.S., C.J. MEYER et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 22 : 107, (1962).
- 20) LIEBERMAN, A.H. and J.A. LUETSCHER, : J. Clin. Endocr. & Metab., 20 : 1004, (1960).
- 21) 万寿富雄 : Japanese Arch. Internal Med., 17 : 285, (1960).
- 22) MATTOX, V.R., and M.L. LEWBART : J. Clin. Endocr. & Metab., 19 : 1151, (1959).
- 23) MATTOX, V.R., and M.L. LEWBART : Arch. Biochem. & Biophys., 76 : 362, (1958).
- 24) MIGEON, C.J., A.A. SANDBERG, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 16 : 1137, (1956).
- 25) MIGEON, C.J., J. BERTRAND, and P.E. WALL : J. Clin. Invest., 36 : 1350, (1957).
- 26) MLYNARYK, P., R.R. GILLIES, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 22 : 587, (1962).
- 27) NEHER, R., and A. WETTSTEIN : J. Clin. Invest., 35 : 800, (1956).
- 28) NEY, R.L., W.S. COPPAGE, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 22 : 1057 (1962).
- 29) NOWACZYNSKI, W., M. GOLDNER, and J. GENEST : J. Lab. & Clin. Med., 45 : 818, (1955).
- 30) NOWACZYNSKI, W., E. KOIW and J. GENEST : Can. J. Biochem. Biophys., 35 : 425, (1957).
- 31) OKITA, G.T., J.J. KABARA, et al. : Nucleonics, 15 : 111, (1957).
- 32) PETERSON, R.E. : Recent Progr. Hormone Res., 15 : 231, (1959).
- 33) ROMANOFF, L.P., R.M. RODRIGUEZ, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 17 : 777, (1957).
- 34) ROMANOFF, L.P., C.W. MORRIS, et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 21 : 1413, (1961).
- 35) ROSS, E.J., W. VAN'T HOFF et al. : Am. J. Med., 28 : 229, (1960).
- 36) SANDBERG, A.A., and W.R. SLAUNWHITE : J. Clin. Endocr. & Metab., 18 : 662, (1958).
- 37) SIEGENTHALER, W.E., A. DOWDY et al. : J. Clin. Endocr. & Metab., 22 : 172, (1962).
- 38) TAIT, J.F., S.A.S. TAIT, et al. : J. Clin. Invest., 40 : 72, (1961).
- 39) TAIT, S.A.S., and J.F. TAIT : Methods in Hormone Research I (1962). 265, Academic Press, New York. より引用.
- 40) ULICK, S. : J. Biol. Chem., 236 : 680, (1961).
- 41) ULICK, S. J.H. LARAGH and S. LIEBERMAN : Trans. Ass. Amer. Physcns. 71 : 225, (1958).
- 42) ULICK, S. and K.K. VETTER : J. Biol. Chem., 237 : 3364, (1962).
- 43) WITT, D.E. and G.F. Jr. ROBSON : Clin. Chem. Acta, 7 : 664, (1962).