Studies on Cortisol Secretion Rate, Especially on the Validity of the Method and on the Normal Range for Japanese Adults

Ichiro KATSUSHIMA

2nd Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan

(Director : Professor Tatsuo Torikai, M.D.)

Details of a procedure for estimating cortisol secretion rate (CSR) were presented and the validity of this method was investigated. Using this method, CSR in normal subjects, in subjects under stress and in patients with adrenocortical dysfunctions were estimated.

1) After an intravenous administration of a tracer dose of cortisol-1,2-³H, 24-hr. urine was collected. Two major urinary metabolites of cortisol, tetrahydrocortisol (THF) and tetrahydrocortisone (THE), were purified paper-chromatographically and their specific activities were determined by liquid scintillation counting and Porter-Silber method. The estimated value of CSR was calculated by dividing total administered radioactivity by the specific activity of THF or THE.

For purifying both THF and THE, ethylene dichloride-formamide system was used as the first paper chromatography. In the next step, Bush B_s system was used for purifying THF, and E2B system or Bush B_s system for purifying THE.

2) When E2B system was used as the second paper chromatography for purifying THE, two values of CSR, which were independently calculated from the specific activity of THF and from that of THE, did not agree with each other.

In order to find which value reflects more actual cortisol secretion rate, known amounts of cortisol were given to the patients with hypoadrenocorticism, and apparent CSR were estimated. The estimated values agreed with the doses administered when calculation was made from the specific activity of THF, while they showed much smaller values with calculation from that of THE. This fact suggested that cortisol metabolite or metabolites, not Porter-Silber chromogenic, contaminated THE. When Bush B_s system was substituted for E2B system as the second paper chromatography for purifying THE, the values of CSR calculated from the specific activity of THE approached the values from THF.

3) The value of CSR calculated from the specific activity of THF was 14.6 ± 3.3 (S.D.) mg/day in 10 resting normal subjects, and was 13.7 ± 3.2 mg/day in 10 lightly working normal subjects. There was no significant difference between the two groups. A slightly higher value, 17.8 ± 5.0 mg/day, was obtained from 8 heavy muscle laborers.

4) The value of CSR in 10 resting and 10 lightly working normal subjects, 14.1 ± 3.2 mg/day, agreed with the smallest normal value that was previously presented by

foreign investigators. This may be due to the smaller body size of Japanese people than that of foreign people.

At the same time, CSR in subjects under stress and in patients with adrenocortical hyper- and hypofunctions were studied. From these data, it was finally justified to adopt 7.8~20.5 mg/day as the normal range.

In addition, CSR per kg of body weight and per m² of body surface area were also evaluated. The adopted normal ranges were 145~358 $\mu\text{g/kg/day}$ and 5.3~12.6 mg/m²/day. (pp. 1232~1247)

Cortisol 分泌量に関する検討

とくに測定法並びに正常範囲について

東北大学医学部鳥飼内科 (持導: 鳥飼龍生教授)

勝 島 一 郎

(昭和41年10月13日受付)

第1章 緒 言

Cortisol 代謝産物の尿中排泄量によつて副腎からの cortisol 分泌量を推測する手段として、尿中17-OHCS や尿中 17-KGS が測定されている。これらの方法にはそれぞれの利点も認められるが、回収率や特異性が当然問題となりうる。又もしこれら測定法に伴う誤差を僅少にとどめ得たとしても、分泌された cortisol の何%がこれらの steroids に変換されるかは、体内における cortisol 代謝の様相の個体差に左右されるため、単なる安静時の測定により副腎皮質機能を推測することは多分の危険を伴うと考えられる。

これに対し isotope dilution method による cortisol 分泌量の測定は、原理的に回収率、体内代謝、あるいは特異性によつて起る問題を一挙に解消せしめうと思われ、もし正確に実施されるなら、副腎皮質機能の究極的な指標の一つとなりうると考えられる。

しかし従来の cortisol 分泌量に関する報告によれば、後述するように、同じ民族あるいは同じ地域住民における測定の結果でも、報告者によりかなりの隔りがみとめられる。それにも拘らず、測定法の精度に関し

ての研究が殆んどみられないのは不思議に思われる。著者は、測定法の上で系統的誤差を生じうる多くの技術的問題のあることを予想して、これに関する検討を行なつて来た。今回はその結果これまでに得られた最終的な測定法を、測定法の精度に関して行つた検討とともに報告する。又この方法を用いて本邦健康成人20例における分泌量を測定し、その値をストレス時における値及び副腎皮質機能異常症例における値と対比することにより、正常範囲を設定した。その結果を併せて報告する。

第2章 実験対象および実験方法

I 実験対象

安静時の cortisol 分泌量を測定するための正常対照例としては、鳥飼内科に入院中の軽症成人患者のうち、肝・および腎機能に異常なく、内分泌学的にも異常の認められない男子5例および女子5例を選んだ。

軽労働負荷時の分泌量測定のための正常例としては、某炭鉱従業員中、坑外で軽労働に従事していた成人男子10例を対象とした。

重労働時の分泌量測定のための正常例は、同じく某炭鉱従業員で、気温28~33℃、湿度75~92%という高温高湿下の坑内で、午後2時から10時迄採炭に従事していた成人男子8例である。

諸疾患患者としては計25例を対象とした。その内訳は、Cushing 症候群3例、甲状腺機能亢進症6例、単純性肥満症3例、進行性麻痺(発熱療法中)1例、脊椎分離症(持続骨盤牽引中)1例、Addison 病5例、諸種の原因による汎下垂体機能低下症5例及び潰瘍性大腸炎(ACTH-Z 40単位1日2回筋注13日目)1例である。

II 実験方法

重労働中の正常例の場合は、午後2時の入坑直前に排尿させ、放射性 cortisol を静注し、以後容量21のポ

リエチレンタンクを携帯せしめて24時間蓄尿させた, その他の被験例の場合は, 原則として午前9時と11時の間に最後の排尿を行なわせ, 直ちに放射性 cortisol を静注し, 24時間室温で蓄尿させた.

蓄尿容器には予め dihydrostreptomycin sulfate 0.5g 及び水性 penicillin 10万単位を加え, 蓄尿終了後直ちに操作に入らぬ場合は, 容量500ccのポリエチレンタンクに入れ, -20°C の deep freezer 又は dry ice で凍結保存した.

cortisol 分泌量は Cope and Black²³⁾ にしたがひ, 24時間尿中の cortisol 代謝産物の比放射能から算出した(第3章). 体表面積は DuBois-Boothby-Sandiford によつた.

III 特 例

この他に第3章VII及び第4章Iにおいては, その項に記載した実験対象および実験方法によつて実験を行なつた.

第3章 Cortisol 分泌量測定法

概略を Fig. 1 に示した.

I 放射性 cortisol 注射液の調整法

Series 1 の注射液

Radiochemical Centre (英国 Amersham) より入手した cortisol-1,2- ^3H 500 μC (比放射能 6.1 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$) の benzene-methanol 溶液を, acetone-dry ice で凍結せしめた後開封し, methanol^{註1}をもつて減圧乾固用の容器に移し, 45°C で乾固し, E2B¹⁾ 及び Bush B₅ system²⁾で精製した. Bush B₅ system の paper chromatogram は scanning により放射能の分布を調べ, main peak 相当部分を切りとつた. 紙片の下部をV字型に cut し, 上部中央を水平に差し出した針に突き刺して吊し, ビューレットより滴下する pure ethanol をもつて溶出し, 50cc に稀釈した. こうして精製された carrier-free の cortisol-1, 2- ^3H の ethanol 溶液は, ツペリクリン用注射器をもつて1 ccづつ滅菌 ampoule に分注し, 窒素ガスとともに封入した. この series の ampoule の内容は約2.2 μC であり, ばらつきは2%程度であつた. これを -20°C の deep freezer に貯え, 6カ月以内に使用した.

Series 2 の注射液

New England Nuclear Corporation (Boston) より入手した cortisol-1,2- ^3H 1 mC (比放射能 2 $\mu\text{C}/\mu\text{g}$) を series 1 の方法で乾固し, 未精製のまま pure ethanol 100 cc に溶解し, 1 ccづつ ampoule につに分注し, 同様に封入した. この series の ampoule の内容は約5.7 μC であつた. これを $+4^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫に貯え, 1年以内に使用した.

II 放射性 cortisol の投与法

20cc用の注射器に約21ccの生理的食塩水を吸引し, 放射性 cortisol (通常は1 ampoule, 分泌量が高値を示すと予想された場合には2 ampoule)を吸引し, 注射液を何回か ampoule 内に出し入れして, 完全に放射能を収容するよう努めた. 次で2~3 ccの空気を吸引した後5~6回注射器を倒立させて内容を混和し,

註1: 試薬は, 特記したものを除き, すべて関東化学製特級をそのまま使用した.

Fig. 1. Method of CSR (Cortisol Secretion Rate) estimation

空気を排除した。内容の数滴を棄て、ついで正確に20ccを残して余分を glass stoppered tube に取り分け、残り20ccを実験対象例に静注した。

glass stoppered tube から正確に1cc (投与量の1/20) を counting vial (Packard 社) に移し、Bray⁸⁾の処方による scintillator 10cc を加えて総量を11ccとし、liquid scintillation counting に供した。

III 24時間尿中 tetrahydrocortisol (THF) 及び tetrahydrocortisone (THE) の分離精製法

尿検体として一般には24時間尿の200ccを用いたが、症例によつては100~2000ccを用いた。このように用いる尿量に幅があるのは、症例により推定される分泌量や尿量に差があるため、最後の比色に際し適当量の steroid を得んがためである。

これを等容の ethyl acetate で1回 pre-extract した後、尿量100ccにつき dihydrostreptomycin sulfate 0.1g, 0.3mol phosphate buffer (pH 6.8) 15cc, chloroform 数cc及び細菌性 β -glucuronidase (Sigma 社) 5000単位を加え、pHを6.8に調整し、38°Cで18時間 incubate した。

ついで等容の ethyl acetate で2回抽出し、前後の抽出液を別々の分液漏斗に入れたまま、前者の洗滌液を後者で逆抽出すると同時に後者を洗滌する形で、1/10容量の1/10N NaOH および蒸留水で2回づつ洗滌した後両者を併せ、45°Cで減圧乾固した。

次に内径1cmの column に 100 mesh の silica gel (Mallinckrodt 社) 2.5gを chloroform 湿式に充填し、crude extract を chloroform に溶解して吸着させた。ついで1% acetone in chloroform 50cc、その後50% acetone in chloroform 100cc で加圧溶出した。2度目の溶出液を減圧乾固し、ethylene dichloride-formamide system³⁾⁴⁾ (25°C) により18~24時間展開した²⁾。

paper chromatogram は45°Cの温風により乾燥させた後、中央3mm幅の細長い紙片を切り出し、blue tetrazolium (第一化学) で発色させ、この両側3cm幅の紙片は 4 π paper strip scanner (日本無線医理学研究所) により放射能の分布を調べ、両者を指標として³⁾ THF+ATHF (allotetrahydrocortisol) および THE 相当の2つの band を切りとり、両分画を別々に溶出し乾固した。

ついで両分画は chloroform 25cc で溶解して別々の遠沈管に移し、尚管壁に附着する残渣は各々蒸留水 5ccで溶解して遠沈管内の chloroform と併せ、両相の液体分配により、次の paper chromatography で tailing の原因となる残余 formamide を水層に移行させて除去した⁵⁾¹⁰⁾。水層は更に chloroform 25cc で抽出し、前後の chloroform を併せて減圧乾固した。

こうして得られた formamide-free の THF+ATHF 分画は、Bush B₅ system¹¹⁾ (28°C) により5時間~1晩平衡させた後24時間展開して、THF から ATHF⁶⁾及び cortolones⁷⁾を分離した。又 THE 分画はE2B system¹²⁾で展開するか、或は Bush B₅ system (28°C) により1晩平衡させた後8時間展開した。

これら final paper chromatogram は 1st paper chromatogram の場合に準じて THF 或は THE 相当の band を mark した上、乾燥状態で比色当日迄保存した。

IV 投与全放射能、THF 及び THE の比放射能の決定、並びに cortisol 分泌量の算出

final paper chromatogram の THF 及び THE 相当の band を溶出乾固し、これを ethanol に溶解

註2: chromatography 用 paper としては、すべて Watman No. 1 濾紙を未洗滌のまま使用した。routine work用に用いたものの寸法は、大きさ 6.3 cm×57 cm, paper 上端から下降部上端迄 8 cm, 下降部上端から starting line 迄 6 cm であり、下端をV字型に cut して使用した。

chromatography 用タンクとしては、内径30cm, 高さ60cmの標本瓶を、縦横ともに60cm, 高さ105cmの木箱の底面より30cmの高さに設けたスノコ上に置いて使用した。

恒温を維持するため、本箱の底面に thermostat に接続した60Wヒヨコ電球 (旭光電機工業K.K., 品川) 6箇を取付け、木箱を毛布でおおって使用した。

註3: THF 及び THE の一方又は双方が微量と予測される場合は、reference steroids を同時展開した。

註4: ヒヨコ電球の点滅とは無関係に、常時木箱の中で扇風機を回転させ、木箱内で立体的にも均一の温度が得られるようにした²⁹⁾。

註5: 28°Cで1晩飽和させた後、ヒヨコ電球の電源を開放し、室温で4時間展開した。

したが、その量は、final paper chromatogram 中央幅 3 mm に切りとつた紙片の blue tetrazolium 発色の程度から凡その steroid 量を推定し、それに従つて 5~20cc とした、しかし通常は 5 cc とした。その 1.5cc づつを counting vial, Porter-Silber 反応に供する sample A 及び B の 2 本の試験管、計 3 者に分注した。

Liquid scintillation counting

counting vial には更に PPO および POPOP (いずれも Packard 社) を溶解した toluene^{註6} 9.5cc を加えて総量を 11cc とし、本章 II で作製した投与全放射能の 1/20 を含む検体と set にして、3 channel automatic liquid scintillation counter (Nuclear Chicago 社) により各 channel の cpm を求め、discriminator ratio 法により quenching を補正して (Fig. 2), 各検体の含む dpm を算出した^{註7}。

計数効率 は Bray の scintillator 組成の場合約 11 %, steroid の ethanol 溶液と混和した toluene を溶媒とする場合約 25 % で、同種の scintillator 組成では各検体の quenching に殆んど差は認められなかった。又同量の cortisol-1,2-³H を上述 2 種の異なる scintillator 組成で計数し、discriminator ratio 法により quenching correction を行なつたところ、殆んど同一の dpm が得られた。

Porter-Silber 反応

sample A 及び B は、Table 1 に記載した実験条件で、常に対応する標準 steroid 溶液を対照として操作比色し、それぞれ steroid 含量 (mg) を求めた。

分泌量の算出

THF 及び THE の放射能 (dpm) を、それぞれの重量 (mg) で除して各々の比放射能 (dpm/mg) を求め、Fig. 1 に示した式に従つて分泌量を算出した。

V THF 及び THE 標準物質の純度に関する検討

著者が Porter-Silber 反応に際して標準物質として使用した THF 及び THE は、いずれも Merck Sharp & Dohme 社より贈られたもので、THE は良質のものであるが、THF は約 3.5 % の more polar compound を含むとされた⁹⁾。岡本¹⁰⁾によれば、D.K. Fukushima より贈られた THF と ATHF は同一の Porter-Silber chromogenicity を有したといわれる。著者は岡本より贈られたこの ATHF, Zori 社 (Israel) の ATHF 及び Upjohn 社より贈られた THE を、上述の標準物質とともに Table 1 の方法により発色させたところ、THF 標準物質は両 ATHF と、又 THE 標準物質は Upjohn 社の THE と、殆んど同一の chromogenicity を有した。

Fig. 2. Quenching correction curve for ³H (Nuclear Chicago 3 channel liquid scintillation counter)

註6 : PPO (2,5-diphenyloxazole) 及び POPOP[1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzene] は、counting vial 内での最終濃度が 1000cc 中それぞれ 4.0 g 及び 0.1 g となるように、予め toluene に溶解しておいた。

註7 : 殊に高温高湿時には quenching correction curve が shift することが認められたので、使用の少なくとも 2 時間前から room cooler を作動させ、同時に liquid scintillation counter の warming-up を行なつた。又一連の測定の前後において quenching correction curve を作製し、測定中に shift のほとんどないことを確認した。

Table 1. Porter-Silber chromogenicity of THF and THE experimental conditions :

Reagents : Sulfuric acid-water solution : conc. $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{Water}=56/44(\text{V/V})$
 Phenylhydrazine-sulfuric acid reagent : 92 mg phenylhydrazine sulfate in 100cc sulfuric acid-water solution

Quantities

of reagents : Sample A : steroid in 1.5cc ethanol+3cc phenylhydrazine-sulfuric acid reagent
 Sample B : the same quantity of steroid as sample A in 1.5cc ethanol+3cc sulfuric acid-water solution

Blank a : 1.5cc ethanol+3cc phenylhydrazine-sulfuric acid reagent

Blank b : 1.5cc ethanol+3cc sulfuric acid-water solution

Incubation : At 60°C for 30min.

Colorimetry : Optical density of sample A was read in reference to blank a (A-a) and of sample B in reference to blank b (B-b) at $410\text{m}\mu$ by Beckman-DB spectrophotometer.

Calculation : Optical density=(A-a)-(B-b)

Result :

Steroid	THF*	THE	THF*/THE
Mean $\pm$ S.D.	9.10 $\pm$ 0.45	11.48 $\pm$ 0.62	79.5 $\pm$ 7.6%

Unit : Optical density/mg steroid in sample A

No. of

experiment : 6

* This substance was stated to contain about 3.5% of more polar compound.

著者の標準物質の Porter-Silber chromogenicity を Table 1 に示した.

VI 投与した放射性 cortisol の radiopurity に関する検討

本章 I により作製した series 2 の注射液を, $+4^\circ\text{C}$ の冷蔵庫に 1 年間保存した後開封し, 減圧乾固用のガラス容器に移し, acetone-dry ice で冷脚した trap を媒介として真空ポンプで吸引し, 固形相と ethanol 相に分離した. liquid scintillation counting の結果, ethanol 相の全放射能は固形相のそれの 0.2% にすぎなかつた. したがって tritium が保存中に steroid 核から離脱することはほとんどないと考えられた.

次に固形層に E2B 及び Bush B₅ system で精製した carrier cortisol を加え, 一部を取り分け, 残りを E2B system で展開した. paper strip scanner で scan した結果 cortisol の main peak の他に, origin 及び solvent front に接してそれぞれ小さな perk を認め, これら peak に挟まれた部分にも若干の放射能を認めた. それぞれの部分を出して liquid scintillation counting を行なつたところ, main peak への放射能の配分は 91.0% であつた.

一方 main peak の cortisol の一部を更に Bush B₅ system で精製し, 全精製過程の前後における cortisol の比放射能を測定比較すると, 精製後の比放射能は精製前のその 102.6% という値を得た. したがって, この場合の放射性 cortisol の radiopurity はほぼ 100% であり, 前述の 91.0% という数字は E2B system の回収率を表現しているものと判断した.

本章 I に明らかなように, すべて被験例に投与した放射性 cortisol は, ここに分析したものよりも radiopurity が高いと考えられ

Table 2. Ratios of specific activities (%) of THF and THE of 2nd 24hr urine to those of 1st 24hr urine after administration of cortisol-1,2-³H in an Addisonian patient maintained on various doses of cortisol

Dose of cortisol mg/day	THF	THE*
80	2.1	2.3
60	2.2	15.6
40	2.9	1.9

* Purified by E2B system.

Above experiments were performed to examine if 24hr period of urine collection suffices.

る条件で使用した。

VII 24時間採尿の妥当性に関する検討

分泌量測定に際して、24時間という採尿期間間が妥当か否かを検討するため、Table 2 に示したように Addison 病患者を3段階の一定量 cortisol で維持(80, 60, 40 mg/day, いずれも1日2回に分服)し、放射性 cortisol 投与当日および翌日の各24時間尿の THF 及び THE の比放射能を測定比較した。

1日60mgの cortisol で維持した場合、放射性 cortisol 投与翌日尿の THE の比放射能は、当日尿の THE の比放射能の15.6%という無視出来ない値を示したが、1日80mgおよび1日40mgで維持した場合は、ともに3%以下にとどまつた。

Flood ら¹⁵⁾によれば、正常5例に tracer dose の cortisol-4-¹⁴C を投与した場合、投与放射能の56~66%、平均62%が当日尿の glucuronide fraction として、又0.6~1.7%、平均1.1%が翌日尿の glucuronide fraction として排泄されたといわれる。

このことも含めて判断すれば、15.6%という1例は例外的なものと考えられる。したがって、24時間採尿は完璧とはいえないが、そのことにより生ずる測定値の誤差は、一般に数%以下にとどまるものと考えられた。

第4章 実験結果並びに考按

I 測定法全体としての信頼性に関する検討

健常者及び諸疾患患者における cortisol 分泌量を測定した。この場合 THE の精製に、まず E2B system を用いることとした。その結果は、THF から算出された分泌量と、THE から算出された分泌量は一般に一致せず、後者は前者の 87 ± 20 (S.D.)%に分布していた(Table 3)。

Table 3. Comparison between values of CSR calculated from THF and those from THE (The former were assumed to be 100%) and also comparison of these values in apparent CSR to doses of cortisol administered to patients with hypoadrenocorticism (The doses of cortisol were assumed be 100%).

Metabolite from which CSR calculated		THF	THE	
Final paper chromatography system		Bush B ₅	E2B	Bush B ₅
CSR of normal subjects & patients	n = 62	100	87 ± 20	
Apparent CSR in hypoadrenocorticism (Dose of cortisol=100)	n = 9	99 ± 26*	62 ± 27	
CSR of patients	n = 7	100		95 ± 2**

When Bush B₅ system was used as the second paper chromatography for purifying both THF and THE, the values of CSR calculated from THE approached those from THF, yet small discrepancy (5 ± 2%) remained.

Greater S.D. in apparent CSR* than in ordinary CSR** was ascribed to non-steady state induced by intermittent cortisol administration.

両者のいずれがより真の分泌量を反映するかを検討するため、一定量の cortisol (1日20~160mg, 1~4回に分服)により維持されている hypoadrenocorticism の症例について見かけの分泌量を測定した。THF から算出された分泌量は平均値としては cortisol 投与量を反映したが、THE から算出された分泌量は、明らかに投与量より低い値を示した(Table 3)。つまり THE の比放射能が大きすぎる事が判明した。

この原因としては cortisol の metabolite でありながら Porter-Silber chromogenic でない物質が THE を contaminate していることが考えられた。そこで THE の精製に、此度は E2B system の代りに Bush

Table 4. Specific activities (dpm/ug) of THF and THE of 24hr urine of 3 patients administered with corticosterone-1,2-³H

Paper chromatography systems	Case	3		39		Primary aldosteronism	
	Administered dose dpm	6.5 × 10 ⁶		21.0 × 10 ⁶ *		13.0 × 10 ⁶	
	Metabolites	THF	THE	THF	THE	THF	THE
Toluene-propylene glycol							
Ethylene dichloride-formamide							
E2B		7	80	≐ 0	348		
Bush B ₅				≐ 0	237	45	205
Cyclohexane-benzene-methanol-water (2:2:2:1)				≐ 0	254		

* Purified by E2B and Bush B₅ system.

As the cause of the fact that CSR calculated from THF is a little larger (5±2%) than those from THE, it was suspected that corticosterone was converted to THF, giving rise to dilution of radioactivity of THF.

But the above data suggest that corticosterone is converted to THE, but almost not to THF.

B₅ system を用いてみたところ、両 metabolite からの算出値は遙かにより一致を示すようになった (Table 3). しかしなお 5±2(S.D.)%の差を残した.

この差の原因となりうる事項としては、THF 及び THE 両標準物質の純度の相違、paper chromatography 上の問題、及び放射性 cortisol と内因性 cortisol の代謝の相違の3つが考えられる. S.D.±2% という値は、比放射能決定時の統計的誤差で充分に説明しうると思われる小さな値であり、したがって差の5%という値は再現性の高い比較的確実な値と考えられる. このような特長をもつものとして、上述3つの可能性のうち、THF 及びTHE 両標準物質の純度の相違を第1にあげることが出来る. THF 標準物質が約3.5%の不純物を含むことが既に表明されており、この不純物がPorter-Silber chromogenic でないと仮定して補正を行なえばこの差が更に縮小されることから、同じことが暗示される. しかし他の2つの可能性が完全に否定されたわけではない.

THF から算出された分泌量が幾分なりと高値を示したことの原因として、C-21 corticoids のうちでは cortisol の次に分泌量の多い corticosterone が、THFと分離しにくい Porter-Silber chromogen に代謝され排泄されて、THF の放射能を稀釈することが想定される.

この可能性を検討するため、計3例に corticosterone-1, 2-³H を静注し、24時間尿中の THF 及びTHE の比放射能を測定した (Table 4). この結果は想定とは逆に、THF 分画にはほとんど放射能が認められず、

Table 5. Specific activities of THF, ATHF and THE of 24hr urine of 2 Addisonian patients orally administered with cortisol of definite specific activity (136dpm/μg=100%)

Case	Specific activity (dpm/μg)		
	THF	ATHF	THE*
43	150 (110%)	142 (104%)	123 (90%)
47	169 (124%)		150 (110%)

* Purified by Bush B₅ system.

It was also suspected that cortisol-1,2-³H was more easily dehydrogenated at carbon-11 than ordinary cortisol, resulting in higher specific activities of THE than those of THF.

But the above data suggest there may be no such probability.

Therefore, it was considered that standard THF the author used in colorimetry may contain about 5% of non Porter-Silber chromogenic impurity.

In any way, the discrepancy is so small that it may not invalidate the present method.

The above data also suggest there is no probability that tritium is released from steroid nucleus either during in vivo metabolism or during in vitro experimental procedure.

むしろ THE 分画に全例でかなりの放射能が認められ、内 1 例では精製を重ねることによりほぼ constant specific activity に到達するのが認められた。このことから corticosterone がむしろ THE に変換されることが示唆された。

一方、cortisol-1, 2-³H が内因性 cortisol よりも 11-dehydrogenation を受けやすく、その結果 THE の比放射能が大きくなるのではないかという想定も成り立つ。

このことを検討するため、cortisol-1, 2-³H と通常の cortisol (1 例につき約 50mg) を混和し、2 例の Addison 病患者に 1 回に内服させて、24 時間尿中の THF 及び THE の比放射能を測定した (Table 5)。しかしその結果は、想定とは逆に、2 例とも THF の比放射能がわずかに大きい値を示した。(尚この場合に、各 metabolite の比放射能が投与 cortisol のそれとほぼ一致したことから、体内の代謝過程或は排泄後の実験操作中に於ても、tritium が steroid 核から離脱することはほとんどないと推定される。)

したがって以上 2 つの想定は、5 % 差の明快な説明とはなり得ないように思われる。結局 THF 標準物質には 5 % 程度の non Porter-Silber chromogenic な不純物が含まれていることが疑われる。

見かけの分泌量の実験において、THF から算出された分泌量は、投与 cortisol 量の 99 ± 26 % であつた (Table 3)。この成績からは、この場合の測定法全体としての系統的誤差が、あつたとしてもあまり大きくはないと推定出来るだけで、測定値の統計的誤差が 26 % とあまりに大きいため、目的とした系統的誤差を正確に見積ることは出来なかつた。

しかし両 metabolite の比放射能から算出された分泌量が 5 ± 2 % という僅少の差で一致していることから、両 metabolite にはもはや THE を E2B system で精製した場合に見られたような contamination はあり得ないと判断される。又、その他の系統的誤差の原因となりうる事項については、これ迄に述べた如くすべて一応の検討を終つており、いずれも大きな系統的誤差の原因とはなり得ないと推定或は判断されるので、測定法全体としてみた場合にも、大きな系統的誤差はないと考えられる。

次に測定法全体としての統計的誤差について考察してみたい。

THE の精製に Bush B₅ system を用いることとして cortisol 分泌量を測定した場合、THF から算出した値と THE から算出した値との差の統計的誤差が S.D. ± 2 % と小さかつたことは、与えられた尿検体に関しては、THF 及び THE の比放射能の測定が高度の再現性をもつて行なわれていることを示すものと解される。しかし測定法全体としてみた場合には、この他にも二、三の統計的誤差を生じうる要因が存在する、即ち、投与全放射能の評価に関連する事項として、20 cc 注射器の目盛の正確さや quenching correction curve の微細な shift などが誤差の原因となり得る。又、尿検体中の THF 及び THE の比放射能を予め規制する事項として、蓄尿の正確さが問題となり、又もし正確に蓄尿されたとしても、24 時間中に標識された THF や THE を完全に排泄しきれない度合が、症例によりいくぶん相違するであろうことも統計的誤差の原因となりうる。しかし、いずれにせよこれらの事項による影響がそう大きいとは考えられない。

これに反し、見かけの分泌量の測定の場合に、統計的誤差が 26 % と非常に大き

Table 6. CSR* of 10 resting normal adults

Case	Sex	Age	CSR		
			mg/day	μg/kg/day	mg/m ² /day
1	M	27	18.6	330	11.4
2	F	22	17.6	348	12.0
3	M	33	17.2	269	9.6
4	F	38	17.2	337	11.7
5	M	32	15.6	293	9.5
6	F	20	14.1	266	9.5
7	M	62	12.5	219	7.7
8	F	23	12.1	212	7.7
9	M	29	10.4	211	6.9
10	F	20	10.3	228	7.3
Mean			14.56	271.3	9.33
S. D.			3.28	53.7	1.90

* Calculated from specific activity of THF.

かつたことの原因としては、1回20mg以上というかなり大量の cortisol が一時に吸収されたため、定常状態が破壊されて、cortisol の代謝が linear に行なわれなかつたからであろうと考えられる。ほぼ定常状態下を実施される一般の分泌量測定に際しこのように大きい統計的誤差が起りえないことは、正常対照20例の cortisol 分泌量が 14.12 ± 3.17 (S.D.) mg/day (Table 9)であり、この場合の S.D. の平均値に対する割合は22.4%で、26%よりもむしろ小であつたことから明らかである。もし測定法に伴う統計的誤差が S.D.22.4%以上であると仮定すれば、正常対照20例の cortisol の真の分泌量はほとんど同一 (14.12 mg/day) でなければならないことになるが、これはこの群で cortisol 分泌量が後述するように体重及び体表面積と一応正の相関を示したことなどと矛盾する。

II 健康成人における cortisol 分泌量

以下、cortisol 分泌量の算出は THF の比放射能によつた。

本邦健康成人28例における cortisol 分泌量を、単位体重あるいは単位体表面積あたりの値とともに、Table 6, 7, 8 並びに Fig. 3 に示した。

その中で、重労働時の分泌量 (Table 8) は、平均値としては軽労働時 (Table 7) に比しいくぶん上昇していたが、測定値の大半は軽労働時のその分布範囲内にあつた (Fig. 3)。一方軽労働時 (Table 7) と安静時の正常対照例 (Table 6) とでは分泌量に有意の差がなかつたので、これらを併せた20例を正常対照例とした。

正常対照20例における cortisol 分泌量の度数分布を Fig. 4 に示したが、ほぼ正規分布をとるものと解される。この群において、分泌量は体重及び体表面積と、ともにそれぞれ $r = +0.326$ の相関を示した。この群の分泌量の絶対値、並びに単位体重あたり及び単位体表面積あたりの分泌量の分布範囲を、平均値、S.D. および平均値 ± 2 S.D. の範囲とともに Table 9 に示した。Fig. 5 にはこの中の分泌量の絶対値の分布範囲と平均値を欧米諸彦の報告^{11)~23)}と対比して示した。

これによると、同じ米国内でも、平均値にはだいたい 14 mg/day から 24 mg/day 迄のばらつきが認められる^{11)~18)}が、著者の平均値はそれらの中で最も小さい値と一致した。この成績は、cortisol 分泌量が体重及び体表面積と正の相関を示すことから考えて、当然予測されるところである。

Table 7. CSR* of 10 light muscle workers

Case	Sex	Age	CSR		
			mg/day	$\mu\text{g/kg/day}$	mg/m ² /day
11	M	46	18.2	246	9.8
12	M	46	16.5	316	10.8
13	M	31	16.2	242	9.2
14	M	48	15.7	245	9.2
15	M	45	14.9	271	10.1
16	M	45	13.6	219	8.6
17	M	46	12.4	230	8.3
18	M	41	10.8	223	7.6
19	M	36	9.6	165	5.7
20	M	42	8.8	154	5.7
Mean			13.67	231.1	8.50
S. D.			3.17	47.0	1.73

* Calculated from specific activity of THF.

Table 8. CSR* of 8 heavy muscle laborers of a coal mine under high temperature (28~33°C) and humidity (75~92%)

Case	Sex	Age	CSR		
			mg/day	$\mu\text{g/kg/day}$	mg/m ² /day
21	M	33	26.8	463	17.2
22	M	31	21.0	339	13.1
23	M	38	19.1	354	12.7
24	M	41	17.8	255	10.1
25	M	51	17.7	322	11.7
26	M	46	16.5	289	10.7
27	M	39	12.4	191	7.2
28	M	44	10.8	171	6.2
Mean			17.76	298.0	11.11
S. D.			4.97	94.2	3.47

* Calculated from specific activity of THF.

Fig. 3. CSR of normal adults

Fig. 4. Frequency distribution of CSR of 20 normal controls

Table 9. CSR* of 20 Normal controls (10 resting normal adults+10 light muscle workers)

	Absolute value mg/day	Per kg of body weight $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$	Per m^2 of body surface area $\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$
Range	8.8~18.6	154~348	5.7~12.0
Mean	14.12	251.2	8.92
S. D.	3.17	53.2	1.82
Mean $\pm$ 2S.D.	7.8~20.5	145~358	5.3~12.6

* Calculated from specific activity of THF.

Fig. 5. Means and ranges of distribution of CSR in normal subjects reported by previous authors

Table 10. Reported means of CSR per kg of body weight and per m² of body surface area of normal subjects

Source	Sex & no. of cases	Country	CSR		
			Absolute value mg/day	Per kg of body weight $\mu\text{g/kg/day}$	Per m ² of body surface area mg/m ² /day
Mlynaryk et al(21)	12	Canada	16.1	214	8.5
Migeon et al (12)	M 15 F 15	U.S.A.	20.97 17.46		11.3
Karl & Raith (22)	18	Germany	15.8	286	10.03
Mikata et al (26)	7	Japan	13.1	238	
The author	M 15 F 5	Japan	14.1	251	8.9

Mlynaryk ら²¹⁾及び Karl and Raith²²⁾は、Table 10 に示すごとく、健常者における単位体重及び単位体表面積あたりの cortisol 分泌量を報告しているが、著者の平均値は彼等の平均値の中間に入つた。又本邦諸家の報告^{7)24)~26)}と比較すると (Fig. 6), 著者の平均値は岡本⁷⁾、井林・村川²⁴⁾、及び三方ら²⁶⁾のそれと 1 mg/day 以内の差で一致した。

Ⅲ 本邦成人における cortisol 分泌量の正常範囲

一般に正常範囲は、正常者の測定値の大多数を含み、異常者になるだけ多く除外するように選定すべきものと思われる。

Fig. 6 及び Table 9 に明らかなように、著者の正常対照20例における cortisol 分泌量の測定値は 8.8mg/day から 18.6 mg/day の間に分布しているので、これをそのまま正常範囲とすると、平均値では著者と一致をみた岡本⁷⁾の正常 4 例中の最高値 20.0 mg/day、及び同じく井林・村川²⁴⁾の正常 4 例中の最高値 19.4 mg/day を異常と判定することになる。しかしこの 2 例は幸うじて著者の平均値 ± 2 S.D. の範囲 (Table 9) に含まれた。そこで著者はこの範囲、つまり 7.8 mg/day から 20.5 mg/day までを一応正常範囲と仮定し、これが研究や臨床診断上の応用に耐えうるか否かを、正常対照例、重労働時、あるいは Table 11 に示すようなストレス下の症例並びに原発性あるいは続発性に副腎皮質機能の異常を来している症例について測定して得た値と対比して検討した (Fig. 7)。単位体重あたり及び単位体表面積あたりの分泌量についても、分泌量の絶対値の場合と同様にして検討した (Fig. 8 および 9)。

まず正常対照20例の cortisol 分泌量は、いずれの場合にも全例、仮定された正常範囲に含まれた (Fig. 7)。

正常上界の妥当性に関する議論として (Fig. 7), まず副腎過形成による Cushing 症候群 3 例は、軽症のものも含めて、いずれも明らかな高値を示した。甲状腺機能亢進症では cortisol 分泌の亢進することが知られているが⁷⁾²⁷⁾²⁸⁾、6 例中 1 例が正常上界にあつただけで、他は高値を示した。単純性肥満症でも cortisol 分泌の亢進が報ぜられている¹³⁾¹⁷⁾²¹⁾²²⁾が、その 3 例はいずれも正常上界付近の値を示した。又ストレス下にあつた例として、チフスワクチン静注により 41.9℃に達する発熱を呈した進行性麻痺の症例及び脊椎分離症で持続骨盤牽引中の患者につき測定したが、共に僅かの高値を示すにとどまつた。

以上の検討からは、20.5 mg/day という正常上界は、高すぎることはあつても低すぎることはないと考え

Fig. 6. Reported means and ranges of distribution of CSR in normal Japanese adults

Table 11. CSR* of subjects under stress and of patients having primary or secondary adrenocortical hyper- and hypofunction

Disease or condition		Case	Sex	Age	CSR		
					mg/day	$\mu\text{g/kg/day}$	$\text{mg/m}^2/\text{day}$
Cushing's syndrome		29	M	47	54.6	834	30.7
		30	F	25	49.1	792	30.9
		//	//	26	45.4	727	28.5
		31	F	23	31.0	525	18.2
Hyperthyroidism		32	F	32	36.9	749	25.3
		33	F	38	35.5	722	24.5
		34	F	26	34.1	726	24.4
		35	F	45	30.6	764	23.5
		36	F	34	22.2	462	15.8
		37	F	35	20.2	400	14.2
Simple obesity		38	F	21	21.5	287	12.4
		39	M	17	21.2	184	9.5
		40	M	55	20.2	255	11.2
During fever therapy (Progressive paralysis)		41	M	47	21.9	353	13.4
During continuous pelvic extension (Spondylolysis)		42	M	20	21.5	391	13.7
Addison's disease		43	F	22	7.9	162	5.7
		44	F	49	3.8	75	2.6
		45	F	49	3.7	80	2.5
		46	F	42	3.4	84	2.7
		47	F	42	1.6	42	1.2
Addison's disease 3rd day of ACTH-Z 40U. intramuscular administration		43	F	22	9.4	187	6.6
		44	F	49	3.7	74	2.6
		46	F	46	4.1	104	3.3
		47	F	42	2.7	71	2.1
Panhypopituitarism	Simmonds' disease	48 //	F //	20 //	7.4 7.3	152 149	5.0 4.9
	Ectopic pinealoma	49	M	15	2.8	71	2.2
	Craniopharyngioma	50	F	16	2.6	86	2.5
	Sheehan's syndrome	51 52	F F	37 56	1.3 0.7	28 12	0.9 0.4
13th day of ACTH-Z 40U. $\times$ 2 intramuscular administration (Colitis ulcerosa)		55	M	40	250.0	4740	166.0

* Calculated from specific activity of THF

られる。実際的には岡本⁷⁾の正常4例中の最高値 20.0 mg/day をもつて正常上界とすることに矛盾はないように思われた。

重労働時の分泌量は、平均値でみると幾分の増加を示したが、大半は正常範囲内にあつた。このことは、職業として継続することが可能な程度の労働によるストレスの大半は、cortisol 分泌量測定によつては識別しえないことを示すものと解される。

次に、著者の仮に設定した正常範囲 7.8~20.5 mg/day における正常下界の妥当性に関して考察してみた。

まず著者の Addison 病5例中4例は明らかな低値を示した。しかし肥満し、色素沈着以外にはつきりし

Fig. 7. CSR of normal subjects, of those under stress and of patients with primary or secondary adrenocortical hyper- and hypofunction

Dotted lines indicate the mean $\pm$ 2 S.D. of CSR in 20 normal controls, which may be justified as the normal range if one compares CSR in normal controls and those in subjects under stress or with various adrenocortical dysfunctions.

Two patients (one with Addison's disease and the other with Simmonds' disease) who had CSR of lower limit of normal did not require glucocorticoid substitution.

It should be noted that most of heavy muscle laborers had normal values of CSR.

Fig. 8. CSR of normal subjects, of those under stress and of patients with primary or secondary adrenocortical hyper- and hypofunction

Dotted lines indicate the mean $\pm$ 2 S.D. of CSR per kg of body weight in 20 normal controls, which may be justified as the normal range.

When viewed from the point of CSR per kg of body weight, cortisol hypersecretion in hyperthyroidism was most evident.

Further, simple obesity had CSR falling entirely within the normal range while Cushing's syndrome invariably showed elevated value, suggesting this criterion may have greater diagnostical value in differentiating these two clinical entities.

Fig. 9. CSR of normal subjects, of those under stress and of patients with primary or secondary adrenocortical hyper- and hypotunction

Dotted lines indicate the mean $\pm$ 2 S.D. of CSR per m² of body surface area in 20 normal controls, which may be justified as the normal range.

When viewed from the point of CSR per m² of body surface area, simple obesity assumed rather high normal values.

た症状のない partial Addison's disease の 1 例 (症例 43) では, 7.9 mg/day と正常下界値を示した. Sheehan 症候群 2 例, 並びに異所性 pinealoma 及び craniopharyngioma による汎下垂機能低下症各 1 例では明らかな低値を示した. しかし尿崩症, 無月経及び粘膜水腫を伴い, SU 4885 に対する反応は低下していたが glucocorticoid の置換療法は必要でなかった Simmonds 症の 1 例 (症例 48) は, 7.3 及び 7.4 mg/day と正常下界より僅かに低い値を示した. この症例及び前述の partial Addison's disease の症例は, cortisol 分泌量の正常下界をこの辺に設定するのが妥当であることを示唆しているように思われる.

以上の検討からは, 実際上 8 mg/day をもつて正常下界とすることに矛盾はないと思われた. 又, Cushing 症候群がいずれも明らかな高値を示したのにひきかえ, Addison 症や Simmonds 病が正常下界値をとりうることは, 臨床診断上留意すべきことと思われた.

単位体重あたり及び単位体表面積あたりの分泌量についても, 絶対値の場合と同様に検討した結果 (Fig. 8 及び 9), 甲状腺機能亢進症における cortisol 過剰分泌は, 単位体重あたりの分泌量による場合に, 最も判然と正常範囲から区別されることが明らかとなった (Fig. 8).

又同じく単位体重あたりの分泌量による場合, 単純性肥満症は全く正常範囲内に入り, Cushing 症候群は依然として高値を示すことから, これによる比較検討が両者の鑑別に有用と考えられた (Fig. 8). 単位体表面積あたりの分泌量による場合には, 単純性肥満症はどちらかといえば正常範囲内の高値を示した (Fig. 9). その他の面に関しては, 単位体重あたりの値でも, 単位体表面積あたりの値でも, cortisol 分泌量の絶対値の場合とほぼ同程度の診断学的価値を有するものと認められる. 従つて以上三者いずれの場合にも, 平均値 $\pm$ 2 S.D. の範囲を正常範囲として採用することが妥当と考えられる.

第 5 章 結 語

Isotope dilution method による cortisol 分泌量測定の方法を提示し, その信頼性について検討した. 又この方法を用いて正常対照例, 重労働などのストレス下の被験例, 並びに副腎皮質機能異常を有する諸疾患例につき分泌量を測定し, それらの成績を対比して正常範囲を設定した.

1) cortisol-1, 2-³H を静注し, 24時間尿の一部を β -glucuronidase で水解し, ethyl acetate 抽出及び silica gel column により得た crude extract から, ethylene dichloride-formamide system により THF と THE を分離し, 更に THF は Bush B₅ system で, 又 THE は E2B system 或は Bush B₅ system で精製し, liquid scintillation counting と Porter-Silber 反応により各々の比放射能を求め, cortisol 分泌量を算出した。

2) THE の精製に E2B system を用いた場合, THE から算出した分泌量は THF から算出した分泌量の $87 \pm 20\%$ で両者に一致をみながつたが, Bush B₅ system を用いた場合は $95 \pm 2\%$ で両者はほぼ一致した。

3) 一定量 cortisol 内服中の hypoadrenocorticism 例につき見かけの分泌量を測定した結果, THF から算出した分泌量は投与 cortisol 量の $99 \pm 26\%$ で, 平均としては投与量に一致したが, 統計的誤差が大きいため, 測定法全体としての系統的誤差を算出することは出来なかつた。この原因は断続的な cortisol 投与により, cortisol 代謝面での定常状態が破壊されたためと考えられた。このように大きい統計的誤差は, ほぼ定常状態下に行なわれる一般の分泌量測定に際しては起り得ないと判断された。

4) THF から算出した分泌量 (mg/day) は, 安静時の正常10例では 14.6 ± 3.3 , 軽労働時の正常10例では 13.7 ± 3.2 で, 両者間に有意差がなかつた。某炭鉱坑内の高温高湿環境下で採炭に従事する重労働者 8 例では 17.5 ± 5.0 で, 平均値としては軽労働時のそれに比しやや高い値を示したが各測定値の大半は軽労働時のその分布範囲内にあつた。以上の成績から安静時及び軽労働時各10例を併せた計20例をもつて正常対照とすることとした。これら正常対照20例における cortisol 分泌量の値は 14.1 ± 3.2 mg/day, 単位体重あたりでは 251 ± 53 μ g/kg/day, 単位体表面積あたりでは 8.9 ± 1.8 mg/m²/day であつた。上記分泌量は本邦でこれまでに報告された値の大部分と一致し, 又単位体重及び単位体表面積あたりの値は欧米諸国で報告された値と一致した。

5) 上記の各々の値について平均値 ± 2 S.D. を正常範囲とした場合, 正常対照20例はいずれの場合にも全例この範囲内に含まれた。cortisol 分泌量では Cushing 症候群全 3 例は明らかな高値を, 甲状腺機能亢進症全 6 例は正常上界より Cushing 症候群に匹敵する値を, 又単純性肥満症全 3 例はいずれも正常上界付近の値を示した。重労働時の被験例の大半は正常範囲内に含まれた。(即ち職業として継続可能な程度の労働によるストレスの大半は, cortisol 分泌量測定によつては識別しえないものと解される。)

一方 Addison 病 5 例中 4 例は明らかな低値を示したが, partial Addison's disease の 1 例は正常下界値を示した。又諸種の原因による汎下垂体機能低下症 5 例中 4 例は明らかな低値を示したが, glucocorticoid 置換療法を必要としなかつた Simmonds 病 1 例は正常下界値を示した。

6) 単位体重あたり及び単位体表面積あたりの値についても同様に検討した結果, 単位体重あたりの値の場合, 単純性肥満症は全く正常範囲に含まれ, Cushing 症候群が依然として高値を示したことは, この値による比較が両者の鑑別に有用なことを意味するものと思われた。その他の面に関してはこれらの値はいずれも分泌量の絶対値とはほぼ同程度の診断的価値を有するものと認められ, 結局いずれの場合にも平均値 ± 2 S.D. の範囲を正常範囲とすることが妥当と考えられた。

尚, 本論文の要旨は第13回日本内分泌学会東部会総会において発表した。

終りにのぞみ, 御指導を賜つた三浦清博士, 福地総逸博士, 並びに御校閲を賜つた鳥飼龍生教授に深謝致します。

文 献

- 1) EBERLEIN, W.R. and BONGIOVANNI, A.M. : Arch. Biochem. Biophys., 50 : 90, (1955).
- 2) BUSH, I.E. : Biochem. J., 50 : 370, (1952).
- 3) BURTON, R.B. et al : J. Biol. Chem., 188 : 763, (1951).
- 4) ULICK, S. et al : Transact. Ass. Amer. Physicians, 71 : 225, (1958).
- 5) 堀内淑彦他 : ホルモンと臨牀, 12 : 507, (1964).
- 6) BUSH, I.E. and WILLOUGHTY, M. : Biochem. J., 67 : 689, (1957).
- 7) OKAMOTO, M. : Endocrinol. Japon., 10 : 159, (1963).
- 8) BRAY,

- G.A. : Anal. Biochem., 1 : 279, (1960). 9) MEZEY, K.C. : Sugahara, I. (日本メルク万有K.K. 学術部) への Memo, (1962). 10) 岡本正敏 : 著者への私信, (1963). 11) ROMANOFF, L.P. et al : J. Clin. Endocr., 21 : 1413, (1961). 12) MIGEON, C.J. et al : Metabolism, 12 : 718, (1963). 13) BIGLIERI, E.J. et al : J. Clin. Invest., 42 : 516, (1963). 14) NEY, R.L. et al : J. Clin. Endocr., 22 : 1057, (1962). 15) FLOOD, C. et al : Acta Endocrinol., 36 : 237, (1961). 16) LAYNE, D.S. et al : J. Clin. Endocr., 22 : 107, (1962). 17) STEINGART, D.E. et al : Metabolism, 12 : 484, (1963). 18) PETERSON, R.E. : J. Clin. Invest., 39 : 320 (1960). 19) VERMEULEN, A. and VAN DER STRAETEN, M. : J. Clin. Endocr., 23 : 574, (1963). 20) MONCLOA, F. and PRETELL, E. : J Clin. Endocr., 24 : 915; (1964). 21) MLYNARYK, P. et al : J. Clin. Endocr., 22 : 587, (1962). 22) KARL, H. J. and RAITH, L. : Klin. Wochenschrift, 43 : 863, (1965). 23) COPE, C.L. and BLACK, E. : Brit. Med. J., 1(No. 5078) : 1020, (1958). 24) 井林博 : 代謝, 1 : 259, (1964). 25) 吉見輝也 : 日内分泌誌, 41 : 51, (1965). 26) 三方一沢他 : 日内分泌誌, 41 : 285, (1965). 17) PETERSON, R.E. : J. Clin. Invest., 37 : 736, (1958). 28) HELLMAN, L. et al : J. Clin. Endocr., 21 : 1231, (1961). 29) BUSH, I.E. : The Chromatography of Steroids, (1961), 175, Pergamon Press, Oxford.