New Method of Determination of Urinary Neutral Four Grouped
Steroid Glucuronide (11-Deoxy-C₁₉ Steroid, 11-Deoxy-C₂₁
Steroid, 11-Oxy-C₁₉ Steroid, 11-Oxy-C₂₁ Steroid) and
Three Grouped Steroid Glucuronide (11-Deoxy-Neutral
Steroid, 5 β -Pregnan-3 α , 20 α -Diol, 11-Oxy-Neutral
Steroid) by Gas-Liquid Chromatography

Chapter II The Clinical Study

Nobuo KUBO

Department of Obstetrics and Gynecology Okayama University Medical School,
Okayama, Japan. (Professor : Kiyoshi Hashimoto)

With the gaschromatographic technique which is described in Chapter I, four grouped neutral steroid glucuronide and three grouped neutral steroid glucuronide were determined in each twenty cases of normal female follicular phase and luteal phase, normal male and castrated female respectively, and in sixteen cases with endocrinopathy. As the dynamic test, the responses to ACTH-Z, SU-4885 and dexamethasone were examined in two cases with endocrinopathy.

As a result, the mean values and standard deviations of four groups were as follows:

No. of cases			I	II	III	IV
Normal female follic. phase	20	Mean	26.7	14.7	6.9	51.7%
		S.D.	8.6	5.1	5.9	11.1
Normal female secre. phase	20	Mean	18.8	33.6	10.6	37.0
		S.D.	6.0	9.2	6.5	9.4
Normal male	20	Mean	30.0	18.1	6.1	45.7
		S.D.	10.8	7.6	6.4	10.8
Castrated female	20	Mean	29.1	12.0	11.1	47.9
		S.D.	17.9	10.0	6.7	18.8

(I=11-deoxy-C₁₉ steroid, II=11-deoxy-C₂₁ steroid, III=11-oxy-C₁₉ steroid, IV=11-oxy-C₂₁ steroid). Normal male and normal female follicular phase showed the same pattern on scattergram in four fractions. In these two, 11-oxy-C₂₁ steroid was most eminent and 11-deoxy-C₁₉ steroid, 11-deoxy-C₂₁ steroid and 11-oxy-C₁₉ steroid followed it, in this order. In the cases of normal female luteal phase, the order was reversed in 11-deoxy-C₂₁ steroid and 11-deoxy-C₁₉ steroid, and this resulted from increased excretion of pregnandiol (5 β -pregnan-3 α , 20 α -diol). In the cases of castrated females, the pattern of four fraction was the same as the males and normal female follicular phase, but it showed a broader dispersion than these two.

The mean values and standard deviations of three grouped method were as follows:

	No. of cases		I	II	III
Normal female	20	Mean	39.4	10.1	50.4%
prol. phase		S.D.	7.6	4.1	9.5
Normal female	20	Mean	36.4	26.0	37.6
secr. phase		S.D.	10.3	10.6	11.8
Normal male	20	Mean	46.2	5.1	48.7
		S.D.	8.3	2.5	8.7
Castrated female	20	Mean	36.6	12.0	51.3
		S.D.	21.5	7.2	24.6

(I=11-deoxy neutral steroid, II=Pregnandiol, III=11-oxy-neutral steroids) The second fraction (pregnandiol) was remarkably increased in luteal phase and in pregnancy. This three-grouped method would be usable as a simple method of determination of pregnandiol. Eleven oxygenation rate was calculated dividing fraction III by fraction I, and the mean values and standard deviations were as follows:

	Normal femal prol. phase	Normal female secr. phase	Normal male	Castrated female
No. of cases	20	20	20	20
Mean	1.35	1.17	1.12	2.40
S.D.	0.49	0.63	0.40	1.97

In the cases with endocrinopathy, a high eleven oxygenation rate was shown in the cases with Simmonds' disease, Cushing's syndrome and male eunuchoidism, and a relatively low rate was shown in the cases with hypoadrenocortism. After administration of SU-4885, 11-deoxy-C₂₁ steroid in four-grouped method and 11-deoxy-neutral steroids in three-grouped method increased remarkably. After administration of ACTH-Z, 11-oxy-C₂₁ steroids in fourgrouped method and 11-oxy-neutral steroid in three-grouped method increased contrary. By suppressing adrenals with dexamethasone, relative decrease of 11-oxy-C₂₁ steroid and 11-oxy-neutral steroid was shown.

It was concluded that this method was rapid and simple for determinating neutral steroid glucuronid: one is able to easily determine the ratio of C₁₉ steroid and C₂₁ steroid, and 11-oxygenation rate of neutral steroid glucuronide in clinical course.

(pp. 1180~1188)

Gas-Liquid-Chromatography を応用した, 尿中中性 Steroid Glucuronide の 4 分画 (11-deoxy-C₁₉ Steroid, 11-deoxy-C₂₁ Steroid, 11-oxy-C₁₉ Steroid, 11-oxy-C₂₁ Steroid), 並びに 3 分画 (11-deoxy-neutral Steroid, Pregnanediol, 11-oxy-neutral Steroid) 測定に関する研究

第 2 編 臨 床 編

岡山大学医学部産婦人科教室 (主任 橋本 清教授)

久 保 信 夫

(昭和43年 6 月17日受付)

第一編で確立した新測定法を用いて, 正常尿80検体を測定して本法に於ける正常パターンを確立した. 又異常尿16検体を測定して, 正常尿とは異なる興味あるパターンを得た.

又 SU-4885, ACTH-Z, Dexamethasone を投与した 6 例の尿については, 夫々理論と一致する分画比の変動が見られ, 本法の正確, 鋭敏な事が証明された.

第 1 章 緒 言

基礎編で確立した尿中中性 Steroid を, I : 11-deoxy-C₁₉ Steroid, II : 11-deoxy-C₂₁ Steroid, III : 11-oxy-C₁₉ Steroid, IV : 11-oxy-C₂₁ Steroid の 4 Group に分ける 4 分画測定法と, Acetate に於ける IAc : 11-deoxy-neutral Steroid, IIAC : Pd., IIIAC : 11-oxy-neutral Steroid の 3 Group に分ける 3 分画測定法を用いて, 正常尿80例, 異常尿22例を測定した.

正常尿に於いて推計学的処理を行ない本法の正常パターンを確定した. 又異常尿は正常尿の棄却限界と比較した. Acetate の IAc 分画を IIIAC 分画と比較する事により, 11-Oxygenation rate を求めた. 又更にそれ等により本法の臨床的意義について述べて見よう. GLC 条件はカラム温度を Free : 210°C, Acetate : 230°C とし, ディテクター温度 : 210°C とした. カラムは島津製 QF-1 で 225×0.4cm のものを使用した. キャリヤガスは窒素を用い 3kg/cm² の圧で, 30ml/min の速度で流した.

尚本論文中に述べられる Steroid は次の様に省略した.

9-Fluoro-16 α -Methyl-11 β , 17 α , 21-Trihydroxy-Pregn-1, 4-dien-3, 20-dione	: Dexamethasone
3 β -Hydroxy-Pregn-5-en-20-one	: Pregnenolone
3 β , 17 α -Dihydroxy-Pregn-5-en-20-one	: 17-OH-Pregnenolone
3 β -Hydroxy-Androst-5-en-17-one	: DHA
Pregn-4-ene-3, 20-dione	: Progesterone
17 α -Hydroxy-Pregn-4-en-3, 20-dione	: 17-OH-Progesterone
Androst-4-en-3, 17-dione	: Δ^4 -Androstenedione

3 α -Hydroxy-5 β -Androstan-17-one	: Etio.
3 α -Hydroxy-5 α -Androstan-17-one	: Andr.
5 β -Pregnan-3 α , 20 α -diol	: Pd.
5 β -Pregnan-3 α , 17 α , 20 α -triol	: Pt.
17 α , 21-Dihydroxy-Pregn-4-en-3, 20-dione	: S.
11 β , 17 α , 21-Trihydroxy-Pregn-4-en-3, 20-dione	: F.
17 α , 21-Dihydroxy-Pregn-4-en-3, 11, 20-trione	: E.
3 α , 17 α , 21-Trihydroxy-5 β -Pregnan-20-one	: THS
3 α , 11 β , 17 α , 21-Tetrahydroxy-5 β -Pregnan-20-one	: THF
3 α , 17 α , 21-Trihydroxy-5 β -pregnan-11, 20-dione	: THE
5 β -Pregnan-3 α , 17 α , 20, 21-tetrol	: 11-deoxy Cortol
5 β -Pregnan-3 α , 11 β , 17 α , 20, 21-pentol	: Cortol
3 α , 17 α , 20, 21-Tetrahydroxy-5 β -Pregnan-11-one	: Cortolone
11 β -Hydroxy-Androst-4-en-3, 17-dione	: 11-OH-4 ⁴ -Andr.
Androst-4-en-3, 11, 17-trione	: 11-oxo-4 ⁴ -Andr.
3 α , 11 β -Dihydroxy-5 β -Androstan-17-one	: 11-OH-Etio.
3 α , 11 β -Dihydroxy-5 α -Androstan-17-one	: 11-OH-Andr.
3 α -Hydroxy-5 β -Androstan-11, 17-dione	: 11-oxo-Etio.
3 α -Hydroxy-5 α -Androstan-11, 17-dione	: 11-oxy-Andr.

第2章 実験材料

正常群	計60例
正常婦人卵胞期尿	: 20例
正常婦人黄体期尿	: 20例
正常男子尿	: 20例
去勢婦人尿	計20例

20才から35才迄の健康婦人で基礎体温2相性、又は既に子供を生んだ事のある月経周期の正常婦人（主に家庭の主婦、看護婦）の卵胞期尿、黄体期尿各20例、27才から34才迄の健康男子尿（主に医師）20例の計60例を正常群とした。又当教室で子宮頸癌で広汎性子宮全剔除術を受け、術後2週間を経た28才から59才迄の婦人の尿を去勢婦人尿として取扱つた。

異常群	計16例
各種内分泌疾患尿	: 11例
妊婦尿 妊娠6週	: 3例
妊娠18週	: 1例
妊娠30週	: 1例
各種薬物負荷群	計6例
SU-4885 投与例	: 2例
(1日3g. 6回分服)	
ACTH 投与例	: 2例
(ACTH-Z 1日20単位筋注)	
Dexamethasone 投与例	: 2例
(1日2mg 4回分服)	

第3章 実験成績

第1節 正常群

第1項 4分画並びに3分画法

Fig. 1~Fig. 4 は正常婦人卵胞期尿, 同黄体期尿, 正常男子尿, 去勢婦人尿各 20例宛の 4 分画百分比並びに 3 分画百分比の Scattergram と平均値, 並びに 5% の危険率での信頼限界を図示したものである. Table 1 は各 20 例を推計学的処理した平均値, 信頼限界, 棄却限界, 標準偏差である.

Fig. 1. Scattergram of Table 1, normal female proliferative phase

Fig. 3. Scattergram of Table 1, normal male

See foot-notes in Fig. 1.

Fig. 2. Scattergram of Table 1, normal female secretory phase

See foot-notes in Fig. 1

Fig. 4. Scattergram of Table 1, castrated female

See foot-notes in Fig. 1

Table 1. Percentage of each 4 fractions and 3 fractions in normal group

	No. of case		4 Fractions method				3 Fractions method		
			I	II	III	IV	IAC	IIAc	IIIAc
nor. ♀ prol. ph.	20	M. (%)	26.7	14.7	6.9	51.7	39.4	10.1	50.4
		C.L. ±	4.0	2.4	2.8	5.2	3.6	1.9	4.5
		R.L. ±	18.3	11.0	12.8	23.8	16.5	8.7	20.6
		S.D. ±	8.6	5.1	5.9	11.1	7.6	4.1	9.5
nor. ♀ secre. ph.	20	M. (%)	18.8	33.6	10.6	37.0	36.4	26.0	37.6
		C.L. ±	2.8	4.3	3.1	4.4	4.8	5.0	5.5
		R.L. ±	12.8	19.7	14.2	20.2	22.0	22.8	25.4
		S.D. ±	6.0	9.2	6.5	9.4	10.3	10.6	11.8
nor. ♂	20	M. (%)	30.0	18.1	6.1	45.7	46.2	5.1	48.7
		C.L. ±	5.0	3.5	3.0	5.1	3.8	1.2	4.1
		R.L. ±	22.9	16.0	13.7	23.4	17.4	5.5	18.8
		S.D. ±	10.8	7.6	6.4	10.8	8.3	2.5	8.7
cast. ♀	20	M. (%)	29.1	12.0	11.1	47.9	36.6	12.0	51.3
		C.L. ±	8.4	4.7	3.1	8.8	10.0	3.4	11.5
		R.L. ±	38.5	21.5	14.2	40.3	45.8	15.6	52.7
		S.D. ±	17.9	10.0	6.7	18.8	21.5	7.2	24.6

M : Mean

C.L. : Confidential Limit

R.L. : Reject Limit

S.D. : Standard Deviation See foot-notes in Fig. 1

去勢婦人を除いては各群共バラツキが少なく、各群毎に全例同じ様な分画比を示した。卵胞期と黄体期を比較すると、4分画法ではPd.を含むⅡ分画が後者に増加して、卵胞期ではⅣ>Ⅰ>Ⅱ>Ⅲの順であるのに対し、黄体期ではⅣ>Ⅱ>Ⅰ>Ⅲの順となり、Ⅰ分画とⅡ分画の順序が逆転している。故に月経前のパターンを見ればその人の排卵の有無を推定出来る。その他 11-oxy-C₁₉ Steroid は黄体期に少し比率が高い様である。3分画法においてもIIAc分画即ちPd.が黄体期に増加している。

正常男子尿は卵胞期尿とはほぼ類似のパターンを示すが、IIAc分画の低下が見られた。

去勢婦人尿も平均値のパターンとしては、卵胞期尿、男子尿と同様であるが、この様に大きいバラツキを示した。

第2項 11-Oxygenation rate

Fig. 5は3分画測定法を利用して、11-oxy-neutral Steroidの面積を11-deoxy-neutral Steroidの面積で割った11-Oxygenation rateである。正常各

Fig. 5. 11-Oxygenation rate of normal group

Table 2. 11-Oxygenation rate of normal group

	nor. ♀ prol. ph.	nor. ♀ secre. ph.	nor. ♂	cast. ♀
No. of case	20	20	20	20
M.	1.35	1.17	1.12	2.40
C.L.	0.22	0.30	0.19	0.92
R.L.	1.00	1.37	0.87	4.21
S.D.	0.49	0.63	0.40	1.97

See foot-notes in Fig. 1.

群の Scattergram とその平均値, 並びに 5% の危険率での信頼限界を示した. Table 2 は推計学的処理を行なった平均値, 信頼限界, 棄却限界, 標準偏差の値である. バラツキの大きい去勢婦人尿を除けば, 各群の平均値は 1.35, 1.17, 1.12 で大差がなかった. 4 分画測定法では Pd. の為卵胞期尿と黄体期尿で著差を認めたが, Pd. を除いたこの 11-Oxygenation rate ではこの様に大差はない.

第2節 異常群

Table 3. Percentage of 4 fractions and 3 fractions in abnormal group

	4 Fractions method				3 Fractions method		
	I	II	III	IV	IAC	IIAC	IIIAc
H.D. 28y Sheehan's disease	14.6	8.5	7.6	69.1	26.3	28.4	45.2
T.H. 38y Simmonds' disease	21.1	5.5	2.6	70.8	17.4	4.3	78.3
K.O. 24y Hypoadrenocortism	14.3	38.1	20.6	25.4	52.2	13.6	34.0
K.T. 38y Addison's disease	29.2	15.4	7.7	47.7	37.6	19.4	43.0
M.M. 22y Cushing's disease	22.5	10.4	0.7	66.4	31.2	3.7	65.0
M.M. 34y Simple obesity	14.9	37.0	17.6	30.3	35.1	21.4	43.4
M.O. 26y Stein-leventhal syndrome	31.2	8.7	10.0	50.0	50.7	2.0	47.3
Reject limit of normal female proliferative phase	26.7 ± 18.3	14.7 ± 11.0	6.9 ± 12.8	51.7 ± 23.8	39.4 ± 16.5	10.1 ± 8.7	50.4 ± 20.6
S.K. 23y Pregnancy, 6W	13.4	34.5	10.8	41.4	24.6	35.1	40.4
K.K. 21y do.	11.2	31.2	32.2	25.5	26.7	42.6	30.7
A.Y. 23y do.	25.9	46.2	0.9	26.8	36.6	32.7	30.5
K.K. 21y Pregnancy, 18W	5.5	85.2	0	9.2	14.5	81.8	3.6
S.W. 38y Pregnancy, 30W	0	41.4	57.8	0.8	8.2	91.8	0
Reject limit of normal female secretory phase	18.8 ± 12.8	33.6 ± 19.7	10.6 ± 14.2	37.0 ± 20.2	36.4 ± 22.0	26.0 ± 22.8	37.6 ± 25.4
R.S. 23y Eunuchoidism	15.2	13.6	13.1	58.1	35.3	7.4	57.4
M.Y. 32y Susp. of hypoadrenocortism	36.4	19.3	7.7	36.4	57.6	2.9	39.4
Reject limit of normal male	30.0 ± 22.9	18.1 ± 16.0	6.1 ± 13.7	45.7 ± 23.4	46.2 ± 17.4	5.1 ± 5.5	48.7 ± 18.8
M.M. 1.5y Adrenogenital syndrome	39.0	16.2	3.9	40.9	36.8	4.5	58.6
M.N. 14y Susp. of hypopituitarism	36.5	9.2	10.4	43.8	40.6	9.2	50.2

See foot-notes in Fig. 1

第1項 4分画並びに3分画法

Table 3 は各種内分泌疾患11例と妊婦尿5例の4分画法と3分画法の分画比を示したものである。

Sheehan 氏病, Simmonds 氏病, Hypoadrenocorticism, Addison 氏病, Cushing 氏病, Simple obesity, Stein-Leventhal 症候群の7例はすべて無月経患者の為正常婦人卵胞期の棄却限界と比較した。妊婦例は正常黄体期の棄却限界と比較している。Eunuchoidism と Suspicious of Hypoadrenocorticism の症例は男性患者で正常男子の棄却限界と比較した。Adrenogenital Syndrome と Suspicious of Hypopituitarism は小児科の患者で、小児の正常値が判らないので分画比のみを記入している。

Sheehan 氏病, Simmonds 氏病は共に下垂体が障害される疾患であるが、共にIV分画即ち 11-oxy-C₂₁-Steroid の増加が見られた。Hypoadrenocorticism では著明なIV分画の低下が見られる。Addison 氏病は1日の排泄量は全体的に低下しているが、分画比としては正常パターンを示す。Cushing 氏病はIV分画, IIIAc 分画が高く、11-oxy-group の増加が見られる。Simple obesity の症例は Cushing 氏病の疑いで諸検査の結果 Cushing 氏病が否定された例であるが、このパターンから見ても Cushing 氏病とは逆に 11-oxy-group の低下が見られる。Stein-Leventhal Syndrome の一例では IAc 分画の増加が見られた。妊娠尿ではすべて IIAC 分画が増加している。その増加度は妊娠末期になる程著明である。Eunuchoidism では 11-deoxy-group の低下が見られ性腺系の低下があるものと考えられる。Suspicious of Hypoadrenocorticism では 11-oxy-group の低下が見られる。

第2項 11-Oxygenation rate

Fig. 6 は異常群16例の 11-Oxygenation rate である。Simmonds 氏病では著明に増加、Cushing 氏病は

Fig. 6. 11-Oxygenation rate of abnormal group

比較的高く、Hypoadrenocorticism では比較的低値を示す。妊婦例では妊娠の経過と共に低下している。これは胎盤が Steroid 代謝に及ぼす影響によるものと考えられる。

第3節 各種薬物負荷群

第1項 4分画並びに3分画法

前述の Cushing 氏病と Hypoadrenocorticism の2症例に、SU 4885, ACTH-Z, Dexamethasone を投与して分画比の変動を見た所 Fig. 7 に示す様であった。SU 投与ではII分画 IAC 分画が増加して 11-Oxygenation が強く阻害されているのが判る^{1)~5)}。ACTH-Z 投与ではIV分画, IIIAC 分画が高くこれは ACTH によって 11-Oxygenation が亢進したものと考えられる。この事は ACTH の Steroid 生合成に

Fig. 7. Change of fraction rate, after the administration of SU-4885, ACTH-Z and dexamethasone

See foot-notes in Fig. 1

Fig. 8. Change of 11-oxygenation rate, after the administration of SU-4885, ACTH-Z and dexamethasone

Table 4. Determinated steroids by each 2 methods in relation of metabolic pathway

See foot-notes in Fig. 1

対する作用から考えて興味がある。Dexamethasone 投与では ACTH-Z とは逆にⅣ分画 ⅢAC 分画が低下しており、これは Dexamethasone により下垂体抑制がおこり、ACTH の分泌が減少した為と考えられる。

第2項 11-Oxygenation rate

前項と同様な薬物負荷により、11-Oxygenation rate は Fig. 8 の様に変動した。SU で低下し、ACTH-Z で上昇し、Dexamethasone で再び低下している。この事も前項の4分画並びに3分画法の結果を裏付けている。

第4章 考 按

本法は従来の報告に見られる様に単一の Steroid の定量法でなく、尿中中性 Steroid を4分画又は3分画に分けた Group 別測定法であり、簡単に尿中中性 Steroid の大体の趨勢を知る事が出来る。この測定範囲を人体内 Steroid 主要代謝経路について見るならば、Table 4 の様に尿中に出る終末代謝産物をすべて捕えており、これが従来の 17-OHCS, 17-KGS, 17-KS 比色法と異なる本法の特徴である。

正常尿に於ける分画比は卵胞期尿、黄体期尿で夫々一定の傾向を示した。異常尿に於いては明らかに正常尿と異なるパターンを示し、特に SU-4885, ACTH-Z, Dexamethasone 投与によつて人工的に起した Steroid 代謝の Shift の異常に対して、本法が鋭敏且つ忠実に反応している事は、本法の優秀性を証明するものである。

11-Oxygenation rate は異常尿も正常尿もあまり大差を示さなかつた。この様に Glucocorticoid 作用に関連を持ち、生命維持に重要なものは少々の事では変わらないのであらうと考えられる。しかしこれも薬物投与による人工的な代謝異常に対しては忠実に反応している。

4分画と3分画を比較した時、後者は Acetate なので、Gaschromatogram の面積に Acetyl 基のシグナルが加わり、必ずしもⅠ分画+Ⅱ分画=ⅠAC分画+ⅡAC分画、Ⅲ分画+Ⅳ分画=ⅢAC分画と言う訳にはいかなかつた。

第5章 結 論

基礎編で確立した新測定法を用いて、正常婦人、正常男子、去勢婦人計80例を測定し、本法の正常パターンを確立した。

4分画測定法では

- ① 正常婦人卵胞期と正常男子は類似のパターンを示す。
- ② 卵胞期ではⅠ分画が優位、黄体期ではⅡ分画が優位となり、これより黄体機能を知る事が出来る。
- ③ 去勢婦人は平均では卵胞期、男子と類似のパターンを示すが、その値のバラツキが大きく、個々の症例においても必ずしも同一パターンを示すとは限らなかつた。

3分画測定法では

- ① Pd. 分画が黄体期で増加、男子で低下を示す以外は類似のパターンを示した。
- ② 11-Oxygenation rate は卵胞期、黄体期、男子ではほぼ同様の値を示し、去勢婦人は平均値に於いて約2倍の値を示すが、個々の症例に於いてバラツキが大きかった。異常例に於いては、Simmonds 氏病では著明に高値を示し、Cushing 氏病、Eunuchoidism では比較的高値を示した。Hypoadrenocorticism では比較的低下を示した。妊娠例では末期になる程低下した。又薬物負荷群6例については、本法の正確且つ鋭敏な事を証明した。

これ等の測定法は臨床上重大な意義を有する11位の官能基を中心とした代謝の Shiftを知る有意義な測定法であると考えられる。

稿を終るにあたり御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師橋本清教授に深く感謝すると共に、終始御親切な御指導、有益な御助言を載いた本教室故吉田俊彦講師に心から御礼申し上げますと共に、御冥福をお祈り致

します.

尚本論文の要旨は第38回日本内分泌学会総会, 及び第12回同会西日本地方会した.

文 献

- 1) LIDDLE, G.W. : Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 18 : 906, (1958) 2)
- LIDDLE, G.W. : Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 19 : 875, (1958) 3)
- JENKINS, J.S. : Endocrinology, 64 : 572, (1959) 4) 屋形稔 : ホルモンと臨床, 8 : 447, (1960).
- 5) 屋形稔 : ホルモンと臨床, 11 : 576, (1963).