A Method for the Simultaneous Estimation of Urinary Testosterone and Epitestosterone

Masatoshi OKAMOTO,¹ Kiyoshi MORIYA,² Yoshihiko HORIUCHI¹
and Shinji ITOH²

Department of Second Internal Medicine¹, and Physiology², Hokkaido University
School of Medicine, Sapporo, Hokkaido, Japan
(Director : Professor Keimi Mashimo¹, M.D. and Professor Shinji Itoh², M.D.)

A quantitative gas-liquid chromatographic analysis of urinary testosterone and epitestosterone was established and excretion values of normal adult men at Furen, one of the coldest areas in Hokkaido, were determined by this method in January and July. The daily mean bulb temperature in this area was -10.5°C in January and $+17.9^{\circ}\text{C}$ in July.

The method of isolation of urinary testosterone and epitestosterone consisted of the following procedure: A 100 ml aliquot of the 24 hr. urine was incubated with β -glucuronidase (500 u/ml) for 72 hours at 37°C . $4\text{-}^{14}\text{C}$ -testosterone (7,000 cpm) and 1, 2- ^3H -epitestosterone (25,000 cpm) or 1, 2- ^3H -testosterone (90,000 cpm) were added prior to extraction with methylene chloride. The methylene chloride extract was washed with 1N NaOH, 0.1% acetic acid and water. Urinary extract was subjected to ascending thin-layer chromatography in benzene: ethylacetate (3:2). Testosterone reference zone was identified with ultraviolet light, and the corresponding area of the urinary extract was eluted. The dried residue was applied to a second thin-layer chromatography in chloroform: acetone (9:1). The corresponding area of the urinary extract to testosterone standard was acetylated with pyridine and acetic anhydride. Acetylated sample was applied to a third thin-layer chromatography in ether: chloroform (1:9). In a preliminary experiment, trimethyl-silylation was done with trimethylsilyl reagent and steroids. The final extract was dissolved in 2 ml of ethanol with 5 μg of progesterone internal standard for gas-liquid chromatography and a 0.2 ml of aliquot was counted for recovery on a liquid scintillation counter using 10 ml of PPO, POPOP mixture in toluene. The remaining extract was evaporated to dryness and the residue was applied to a gas-liquid chromatographic apparatus (Shimadzu model GC-4 AP, RID-2D) fitted with hydrogen flame detectors and arranged for temperature programming. The phase employed was 1.5% OV-1 on silyanized Schimalite W (80/100 mesh). In the preliminary experiment, 1.5% OV-17 was used. The separations were carried out by temperature programming at $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ with glass columns $3.5\text{m} \times 3.0\text{mm}$ i.d.. The starting temperature was 215°C . The injector and detector temperature were at 300°C .

The mean recovery of each radioactive steroid was as follows: 1, 2- ^3H -testosterone was 55.4% ($n=33$), $4\text{-}^{14}\text{C}$ -testosterone was 55.7% ($n=20$) and 1, 2- ^3H -epitestosterone

was 56.3% (n=4).

The mean recovery of each "cold" steroid was as follows: 10 μ g of testosterone and 10 μ g of epitestosterone with distilled water (100 ml) were 117% and 102%, respectively. 10 μ g of testosterone and 10 μ g epitestosterone with pooled urine (100 ml) were 103% and 103%, respectively. Calibration curve of standard testosterone acetate was linear when varying amounts from 0.05 to 5 μ g. The lower limit of detection was about 0.03 μ g. Standard testosterone TMSi, epitestosterone TMSi and testosterone acetate, epitestosterone acetate were separated by the OV-17 and OV-1 column. However, the peak of testosterone TMSi in urine sample was included unknown impurities on the OV-17 column compared with that of testosterone TMSi on the OV-1 column.

Clinical data was as follows: The mean urinary testosterone and epitestosterone excretion of 7 normal males in July were 80.6 μ g and 45.3 μ g respectively, and those of 11 normal males in January were 48.8 μ g and 22.8 μ g, respectively. The differences of testosterone and epitestosterone between the two seasons were statistically significant ($p < 0.05$).

(See pp. 908~917)

尿中 Testosterone 及び Epitestosterone の Gas-liquid Chromatography による 測定法並びにその排泄値の検討

北海道大学医学部内科学第一講座 (主任 真下啓明教授)

岡 本 正 敏, 堀 内 淑 彦

北海道大学医学部生理学第二講座 (主任 伊藤真次教授)

森 谷 潔, 伊 藤 真 次

(昭和45年3月28日受付)

尿中 Testosterone 及び Epitestosterone の Gasliquid Chromatography による分離定量法の検討を行なった。Steroid 誘導体と Column (OV-1, OV-17) との比較, 回収試験等を行なった。正常男子の1日平均排泄量は Testosterone $80.6\mu\text{g}$ (7月), $48.8\mu\text{g}$ (1月) 及び Epitestosterone $45.3\mu\text{g}$ (7月), $22.8\mu\text{g}$ (1月) であった。すなわち, Testosterone 及び Epitestosterone いずれも冬期の値は夏期の値にくらべて有意に減少していた。 ($P < 0.05$)

I 緒 言

従来, 性腺機能を知る指標の一つとして, Androgens の代謝物である 17-Ketosteroids (17KS) が広く用いられてきた。しかし, 17-KS には Androgen 作用を有しない Steroids が一部含まれており, 今日, 最も Androgen 作用が強いといわれている Testosterone の排泄量を知る目的には適しない。Schmidt & Starcevic¹⁾ は男子不妊症の診断に 17-KS, estrogen 及び Testosterone を測定し, Leydigcell insufficiency を確かめるには Testosterone 排泄量を測定するのが最もよいと述べている。

一方, DeNicola ら²⁾ は尿中 Testosterone 及び Epitosterone を測定し, Hirsute and Virilized female の診断には Epitestosterone の測定が診断的に有用であると報告した。1960年 Schubert & Wehrberger³⁾ によつて, 正常男子尿より, はじめて Testosterone が分離定量されて以来 Column chromatography (CC), Paper chromatography (PC), Thin-layer Chromatography (TLC), Glass fiber Chromatography などにより分離後, 比色法^{4)~10)}, UV法^{11)~12)}, 螢光法^{13)~15)}, Double isotope dilution derivative法¹⁶⁾ 及び Gas-liquid Chromatography (GLC)^{2)~17)~27)} によつて定量する種々の測定法が報告されている。我が国でも, 井林ら¹⁹⁾ 大室¹⁰⁾ 高橋ら²⁸⁾ のいくつかの尿中 Testosterone 測定に関する報告があるが, 我々の知る限りでは, Epitestosterone の報告はされていない。

我々は Radiogas-liquid Chromatograph 装置 (島津 GC4AP, RID) を用いて, 尿中 Testosterone 及び Epitestosterone の測定法の検討を試みた。更に, この方法を用い, 正常人男子の尿中 Testosterone 及び Epitestosterone 排泄量を7月 (夏期) 及び1月 (冬期) の2回にわたつて測定した。

II 実験対象及び方法

1 実験対象

北海道風連地方の健康成人男子を対象とし, 7月に7例, 1月に11例の24時間尿中に含まれる Testosterone 及び Epitestosterone を測定した。尚, 風連地方における1日平均温度は7月は $+17.9^{\circ}\text{C}$, 1月は

-10.5°Cであつた。

2 実験方法

(1) 採尿法

24時間尿を集め、測定前まで-20°Cにて凍結保存した。

(2) 加水分解及び抽出法

24時間尿のうち、100ccを共栓コルベンにとり、2 N 酢酸緩衝液10mlを加えて pH 5.0 とし、臓器性 β -glucuronidase (東京臓器 13,000U/cc) を原尿 1 ml 当り、500 u を加え、37°C にて72時間水解を行なつた。この水解尿に回収率を知る目的にて $4\text{-}^{14}\text{C}$ -Testosterone (7,000cpm, SA 22.1mC/mM) 又は $1\text{-}2\text{-}^3\text{H}$ -Testosterone (90,000cpm, SA 250mC/mM) を加えた。一部の実験では、 $1\text{-}2\text{-}^3\text{H}$ -Epitestosterone (25,000cpm, SA 0.096mC/mg) を加えた。これら放射性 Steroid を加えた後、この水解尿を塩化メチレン 150ml $\times$ 3 にて抽出、塩化メチレン層を 1N NaOH 50 ml $\times$ 1, 0.1% 酢酸 50 ml $\times$ 1 更に、水 50 ml $\times$ 1 で洗滌し、Flash evaporator にて減圧乾固した。

3) Thin-layer chromatography (TLC)

(a) 第1次 TLC

小試験管に移した残査物を予備純化する目的にて、第1次 TLC にかけた。展開溶媒には Ethylacetate: Benzene (2:3)²⁾²⁷⁾ を用いた。Thin-layer plate として Kiesel Gel HF254 を用い、Solvent front が原点より約15cm上昇するまで展開した。原則として、Plate の両端に Standard として、Testosterone (T) 及び Progesterone (P) を用い、中央の3点に尿よりの試料を Spot した。展開後は Plate を充分に乾燥した後、U-V lamp にてT部分に相当する画分 (Testosterone, Epitestosterone) をアセトン 5 ml にて抽出した。

(b) 第2次 TLC

アセトン抽出物を減圧乾固後、第2次 TLC にて、第1次 TLC 同様に展開、抽出した。展開溶媒として、Chloroform: Acetone (9:1)²⁸⁾を用いた。T部分に相当する画分は、アセトン抽出後、減圧乾固した。

(c) 第3次 TLC

下記(4)の如き Acetyl 化の操作で得られた試料を Ether: Chloroform (1:9)²⁸⁾ にて第1次 TLC 同様に展開、抽出した。

4) 誘導体の作製

(a) Acetyl 化

小試験管に移した試料乾固物に、Pyridine 0.3ml 及び無水酢酸 0.3ml を加え、1 晩放置により、Acetyl 化を行ない、溶媒除去後、上記 TLC にて Steroids の純化を行なつた。

(b) Trimethyl Silyl (TMSi) 化

小試験管に移した試料乾固物に Trimethyl Silyl ether 化剤 (Pyridine 10 容, Hexamethyldisilazane 2 容, Trimethyl chlorosilane 1 容を含む島津製品) 0.3mlを加えて、密栓し、20分間放置後、アセトン 2 ml を加えた。遠沈後、上澄液を蒸発乾固後、GLC 装置に注入した。

5) 放射能の測定 (回収率)

第3次 TLC 後の Testosterone acetate 及び Epitestosterone acetate に相当する画分のアセトン抽出液は減圧乾固後、エタノール 2ml (GLC の内部標準物質として Progesterone 5.0 μ g を含む) を加えて溶解し、その 0.2 ml を Counting Vial にとり、乾固後、Scintillator 10 ml (Toluene 1,000 ml, PPO 4g, Popop 100mg を含む) を加えて、Liquid Scintillation Counter (日本無線 Model LSC-502) にて測定した。Radioactive Steroid が単独の場合には、Single Channel を用い、 ^{14}C 及び ^3H を用いた場合は Double Channel を使用し、回収率を補正した。

6) Gas-liquid Chromatography (GLC)

残りの試料及び Progesterone を含むエタノール液 (1.8ml) を減圧乾固後、50 μ l の冷アセトンに溶解し、

その1/10量を GLC装置 (島津 GC4AP) に Hamilton Microsyringe を用いて注入した.

Column (a) 1.5% OV-1 on Silanized Schimalite W (80/100mesh) 3.5m×3.0mm Glass column

Column temp: 215→250°C Programming temp. 1°C/min

Detector, Injection temp.: 300°C

Carrier gas: N₂ (Radiogaschro 使用時: He)

Gasflow rate: N₂ (He) 40ml/min

H₂ 40ml/min

Chart speed: 5mm/min

(b) 1.5% OV-17 on silanized Schimalite W (80/100mesh) 2.0m×4.0mm Glass column

Column temp: 220→260°C Programming temp. 1°C/min

Detector, Injection temp.: 300°C

GLC 装置 (島津 GC-4C, 北大産婦人科所有)

7) 定量

抽出試料の GLC によつて得た Peak の面積は, 高さ, と, その半値幅より求めた. その定量は, 内部標準物質 (Progesterone) と Testosterone acetate 又は Epitestosterone acetate との面積比を用いて計算した.

III 実験成績

1) 放射性 Testosterone 及び Epitestosterone の回収率

原尿に 1-2-³H-Testosterone を加え, 第3次 TLC 終了までの回収率は, 33 Samples で平均 56.4% ± 13.0 (S.D.) であつた. 4-¹⁴C-Testosterone では 20 samples で平均 55.7% ± 14.4 (S.D.) であつた. 1-2-³H Epitestosterone では 4 Samples で平均 56.3% ± 12.9 (S.D.) であつた. 放射性 Steroid の違いによる回収率の差は認めなかつた.

2) “Cold” Testosterone 及び Epitestosterone の回収率及び再現性

蒸留水 100cc に Testosterone 及び Epitestosterone をそれぞれ 10 µg 加えて, 回収率実験を行なつた. GLC によつて得た平均回収率は Testosterone 117%, Epitestosterone 102% であつた. 又, 再現性については, Table 1 に示す如く, 4 回の実験で Testosterone 11.7 µg ± 0.9 (S.D.), Epitestosterone 10.2 µg ± 0.3 (S.D.) であつた.

一方, 原尿100mlに同様に Testosterone 及び Epitestosterone をそれぞれ 10 µg を加えて得られた回収

Table 1. Reproducibility and precision of testosterone and epitestosterone determinations

	No. of Exp.	Testosterone	Epitestosterone
1. Dist. water (100ml) added standards (10 µg of each)	1	11.1	10.6
	2	11.9	10.1
	3	11.3	10.0
	4	12.6	10.1
	Mean value ± s.d.	11.7 µg ± 0.9	10.2 µg ± 0.3
	Mean recovery	117%	102%
2. Urine (100ml) added standards (10 µg of each) minus urine blank	1	10.6	10.3
	2	9.9	10.3
	Mean value	10.3 µg	10.3 µg
	Mean recovery	103%	103%

率は、それぞれの原尿に含まれていた内因性 Testosterone 及び Epitestosterone を差引いて、2 回の実験で、いずれも平均で103%であつた。

3) 検量曲線及び精度

Testosterone 量と GLC によつて得られた Peak の面積との関係は、Fig. 1 の如くにはほぼ直線的であつ

Fig. 1. Calibration curve of testosterone acetate

Fig. 2. Gas chromatogram illustrating standard testosterone TMSi and epitestosterone TMSi. The stationary phase was 1.5% OV-17.

Fig. 3. Gas chromatogram illustrating standard testosterone TMSi and epitestosterone TMSi. The stationary phase was 1.5% OV-1.

Fig. 4. Gas chromatogram illustrating standard testosterone acetate and epitestosterone acetate. The stationary phase was 1.5% OV-1.

た. 我々の方法で約 $0.03\mu\text{g}$ まで測定可能であった.

4) 特異性

Testosterone 及び Epitestosterone の Acetyl 誘導体又は TMSi 誘導体の GLC による分離を OV-1 及び OV-17 で比較した. Fig. 2, 3, 及び 4 に示す如く, Standard Steroids の分離は OV-1 ではいずれも良好であり, OV-17 では, TMSi 誘導体はよく分離したが, Acetyl 誘導体は不十分であった. 特異性を調べるために, 同一尿 Sample について TMSi 又は Acetyl 誘導体と OV-1 又は OV-17 によつて得ら

Fig. 5. Gas chromatograms illustrating urinary testosterone TMSi and epitestosterone TMSi by the OV-17 and OV-1 column.

れた Testosterone 値と Epitestosterone 値が同一であるかどうか検討した. Fig. 5 に示す如く, TMSi 誘導体では OV-1 (Testosterone, $78.0\mu\text{g/day}$, Epitestosterone $73.0\mu\text{g/day}$) と OV-17 (Testosterone $281.5\mu\text{g/day}$, Epitestosterone $83.9\mu\text{g/day}$) では Testosterone 値に差を認めた. 特に OV-17 で示される Testosterone 値は OV-1 の3倍以上の値を示した. このため2回の TLC による予備純化による TMSi 誘導体は特異性の少ないことを示した. 一方, 3回の TLC による予備純化後の Acetyl 誘導体では, OV-17 では分離不十分であったが, OV-1 では Fig. 6 に示す如く充分に分離した. 尿より得られた値も OV-1 (Testosterone $43.5\mu\text{g/day}$, Epitestosterone $20.9\mu\text{g/day}$) と OV-17 (Testosterone 及び Epitestosterone $73.4\mu\text{g/day}$) とでは, ほぼ同値を示し, 特異性が充分にあることを示した.

5) 正常値

Fig. 6. Gas chromatogram illustrating urinary testosterone acetate and epitestosterone acetate by the OV-1 column.

Table 2. Seasonal variation of urinary testosterone and epitestosterone values in normal males

Season	No. of Exp.	Name	Age (J)	Testosterone ($\mu\text{g}/24\text{hr}$)	Epitestosterone ($\mu\text{g}/24\text{hr}$)
Summer	1	Nakai	39	53.0	40.5
	2	Terada	33	59.2	41.5
	3	Yanase	43	94.3	87.9
	4	Imai	28	87.3	24.6
	5	Shimizu	30	115.7	51.0
	6	Sato	35	99.5	35.9
	7	Kawakami	41	55.0	35.4
		Mean value	35.6*	80.6**	45.3***
		$\pm$ S. D.	± 5.5	± 24.6	± 20.4
		$\pm$ S. E.	± 2.1	± 9.3	± 7.7
Winter	1	Iwabana	34	9.6	4.8
	2	Nishimura	38	44.9	16.7
	3	Kanematsu	33	90.9	38.8
	4	Watanabe	28	68.0	29.8
	5	Nishio	45	34.6	0.0
	6	Miyata	25	93.4	42.1
	7	Shimizu	30	42.8	53.1
	8	Motose	35	6.0	1.9
	9	Kawakami	41	64.2	28.2
	10	Matsubara	37	15.8	13.3
	11	Yuasa	25	66.5	22.5
		Mean value	33.7*	48.8**	22.8***
		$\pm$ S. D.	± 6.3	± 30.6	± 17.4
		$\pm$ S. E.	± 1.9	± 9.3	± 5.3

* No significant statistically

** Significant statistically ($p < 0.05$)*** Significant statistically ($p < 0.05$)

我々の方法による正常健康男子の Testosterone 及び Epitestosterone の24時間排泄量を Table 2 に示した。冬期（1月）と夏期（7月）との排泄量は Testosterone 及び Epitestosterone いずれも有意な差を示し（ $P < 0.05$ ）夏期に多かった。

IV 考 按

1) 測定法の検討

β -Glucuronidase の水解条件に関しては、多少の差が認められるが（Table 3）Wegienka ら²⁵⁾は38℃ 72時間水解で充分であると報告しており、多くの報告者はこの条件で水解しているが、高橋ら²⁹⁾は少なくとも38℃ 96時間は必要であると報告している。例外として、Brooks ら¹⁷⁾は38℃ 24時間で水解を行なっている。抽出溶媒は、エーテル、塩化メチレン共に抽出率が高く、Testosterone 及び Epitesterone のみを目的とする場合には、引火性、値段などを考えて、塩化メチレン抽出で充分である。抽出液の洗滌、即ち、尿に含まれるフェノール性色素等の除去には、Aldosterone, Cortisol 代謝物等の測定の場合と異なり、アルカリにかなり安定で、1乃至2-NNaOH が用いられている。

Table 3.

Reporter	Urine volume	Incubation pH, β -glucuronidase	Radioactive steroid	Solvent	Purification	Derivative	GLC (column, phase) Temp. (column, detector, injection)
Futterweit	100ml	4.5, 500u/ml 37°C, 96hr	³ H-testosterone	Ether	TLC	A	3ft 1.9mm stainless steel 6.8% SE on Anakrom ABS 240°C, 330°C, 330°C
Korenman		400u/ml 37°C, 72hr					6ft 4mm, glass 1% SE 30 on polymer resin
Ibayashi	1/4	5.0, 500u/ml 37°C, 96hr	³ H-testosterone	Ether	TLC	A	150cm 4mm stainless steel 1.5% SE 30 on Anakrom A 216°C, 240°C, 240°C
Brooks	1/10(M) 1/4(F) 2/3(C)	4.5, 500u/ml 37°C, 24hr	¹⁴ C-testosterone	Ether	TLC	A	150cm stainless steel QF-1
Sandberg	1/10-1/5	4.6, 750u/ml 37°C, 72hr	³ H-testosterone		CC, PP	T	4ft 5mm, 6ft 6mm, glass 2% SE 30 on Gaschrom S 3% QF-1, 2% XE 60
Sparagana	1/12		³ H-, or ¹⁴ C-testosterone		TLC	A, CrO ₃	12ft 3% SE 30 on Gaschrom P 220°C, 220°C, 290°C
Wieland	200ml(M) 400ml(F)	5.0 37°C, 96hr	³ H-testosterone		TLC		16ft 1/4inch, stainless 2% SE 30 on Diaport S 6ft 4mm, glass 3% SE 30 on Diaport S
Ismail	50ml(M) 200ml(F)	0.15vol. k-HCL 100°C, 1hr		Ether	CC, PC	CrO ₃	150cm 4mm, glass 1% SE 30, 1% QF-1 on Gaschrom P
Vestergaard	100ml(M) 200ml(F)	4.7, 200u/ml 37°C, 72hr		Ether	CC	T	6ft 0.075inch, glass 2% XE 60 on Anakrom ABS 210°C, 210°C, 240°C
Wegienka	200-400ml	4.8, 500u/ml 37°C, 72hr	¹⁴ C-testosterone	Methylene dichloride	CC, TLC	A	91.4cm 3mm, glass 1% Neopentylglycol succinate on Anakrom ABS 220-230°C, 300°C, 220-250°C
McRoberts	100ml(M) 200ml(F) 300ml(C)	6.8, 10% sodium metaperiodate 1N NaOH 10ml 37°C, 1hr	³ H-testosterone- D-glucuronide	Ether	CC, TLC	T	6-8ft 5mm, glass 2% XE 60 on Gaschrom Q 225°C, 260°C, 280°C
Drosdowsky	35-300ml (M) 100-300ml (F)	4.7, 4000u/ml 60°C, 30min	³ H-testosterone	Ether or methylene dichloride	CC	A	150cm 2mm, glass 1% XE 60 on Gaschrom Q 12ft 4mm, glass
Ours	100ml (M)	5.0, 500u/ml 37°C, 72hr	³ H-testosterone ¹⁴ C-testosterone ³ H-epitestosterone	Methylene dichloride	TLC	A	1% OV-1, 1% OV-17 on Gaschrom P 210°C, 230°C, 215°C 1.5% OV-1 on Schimalite W 200-250°C, 300°C, 300°C 1°C/min programming

M : Male, F : Female, G : Child TLC : Thin-layer chromatography, CC : Column chromatography, PP : Paper chromatography
A : Acetyl, T : Trimethylsilyl, CrO₃ : Chromic oxidation

GLC が最も有効に使われるためには、目的とする Testosterone 及び Epitestosterone が出来る限り純化されることが必要であり、Table 3 に示す如く、報告者によつて、それぞれ一長一短があり、Testosterone 及び Epitestosterone を分離する場合に、GLC 装置に Sample を注入する前に PC 又は TLC によつて分離するか或いは GLC にて分離するかが問題となる。TLC による分離は Rf がいずれの展開溶媒でも Testosterone, Epitestosterone 共に近似値を示し、実際上は不可能であるが、PC による分離は可能である。しかし PC にて分離した場合には、Testosterone 及び Epitestosterone を別々に GLC 装置に注入しなければならない。時間の短縮等を考えれば TLC にて予備純化し、GLC にて Testosterone 及び Epitestosterone を分離するのが望ましい。

Testosterone 及び Epitestosterone を Acetyl 化又は TMSi 化した後、GLC にて分離するのが普通であるが、充填剤として、有極性液相 (OV-7, XE-60, QF-1 など) 及び無極性液相 (OV-1, SE-30 など) をどの様に選択するか、Carrier Gas の流量、温度条件をどのようにするか、予備純化を充分にするか等が GLC の特異性、精度を決定する重要な Point となる。高橋ら²⁹⁾は Acetyl 化後に TLC を行なつた場合には、SE 30 でも Testosterone の分離が充分であるが、操作に時間を要すると述べ、TMSi 化後の OV-17 による分離がよいと報告している。しかし、我々の実験では、Standard Testosterone 及び Epitestosterone を TMSi 化した後、OV-17 で分離すると、Fig. 2 に示す如く、完全に分離しているが、同一尿の Sample では OV-17 と OV-1 の二種の液相で比較すると、Fig. 5 に示す如く、OV-17 で得られた Testosterone は高値を示した。このことは、OV-17 では Testosterone に相当する Peak に不純物質の混入が考えられた。井林らは Acetyl 化後、SE 30 により、Testosterone を分離しているが、我々の実験では、Epitestosterone を同時に分離する際には SE 30 は適当でなかつた。いずれにせよ、GLC 装置の種類、充填剤及び液相の種類、濃度、Carrier gas の種類、流量、温度条件、誘導体の種類、加えて予備純化の程度が Testosterone 及び Epitestosterone として得られた Peak の特異性を決定する。このため、我々も、現在尚 TLC の溶媒の選択など不純物質の除去に努めている。又、我々は Radio-GLC 装置を用いて “hot” 及び “Cold” Steroids の同時測定を試みたが、装置につく分枝管等の問題があり、再現性にやや欠けたので、今回の実験では、回収率補正の手段として用いながつた。将来 Steroid の Secretion rate (Production rate) を測定する場合に Radio-GLC 装置は有用な手段になるものと思われる。

2) 男子正常値

Testosterone 及び Epitestosterone の代謝に関しては、現在尚不明の点が多いが、一般には、グルクロン酸抱合型が主で、遊離型と硫酸抱合型は少ないといわれている。DeNicola ら²⁾は Stein-Leventhal, hirsutism の女性で Testosterone 値より Epitestosterone 値の方が診断上有効であると報告している。

しかし、Wilson & Lipsett³⁰⁾の報告によると Epitestosterone の Production rate は $220 \mu\text{g}$ であり、Testosterone の 6.8mg に較べると非常に少なく、DeNicola ら²⁾の報告している正常男子の Epitestosterone 値平均 $166.4 \mu\text{g}$ は非常に高いように思われる。Table 4 に示した如く、我々の正常値を含め、多くの報告値は Wilson & Lipsett³⁰⁾の述べた Testosterone 値の $1/2$ 乃至 $1/3$ に Epitestosterone 値が位置している。Testosterone 値も Table 4 に示す如く、報告者によつて差が認められる。我が国の Ibayashi¹⁹⁾と大室¹⁰⁾の報告値は共に Epitestosterone についての記載はないが、非常に異なっており、これは Boston における Sparagana²⁰⁾と Lim¹³⁾の報告値の違いと同じく、測定法の違いであろうと推定される。我々の値と Ibayashi¹⁹⁾の値は共に GLC を用いているが、液相の違いがあり、Ibayashi らの Testosterone 値には Epitestosterone が含まれている可能性もあり、必ずしも比較出来ない。Vestergaard ら²¹⁾も正常値の差は Population によるものでなく、測定法の相違によるものであらうと述べている。我々の正常値は冬期と夏期に有意な差があるが ($P < 0.05$) 同一人について行なわれていないので、目下、同一人についても再検討中である。著者らの一人伊藤は風連地方の正常男子で冬に 17-KS が夏に較らべ、有意に低下することを報告しているが、季節によつて性ホルモンの分泌が変化することは非常に興味ある知見である。血中 Testosterone 及び Gonadotropin についても検討中であり、詳細は別紙にて報告する予定である。

Table 4. Urinary levels of testosterone and epitestosterone in normal males ($\mu\text{g}/24\text{hr}$)

Method	Reporter	No. of subject	Age (J)	Testosterone mean (Range)	Epitestosterone mean (Range)
Colorimetry	Vermeulen	12	18-60	40(15-90)	
	Voigt	5	18-35	54(32-69)	
	Rosner	5	17-24	151(113-193)	
		20	30-40	88(28-143)	
	Zurbrügg	3	30	64(42-79)	
	Morer-fargas	10	21-30	71.7	
		10	31-40	60.0	
		7	41-50	46.1	
	Schmidt	15	14-40	56.5	
		29	over 40	43	
	Ohmuro	15	16-32	49(20-90)	
UV Spectrophotometry	Camecho	5	23-34	72.5(46.1-106.0)	
	Schubert	9	18-44	34(10-75)	
Fluorometry	Lim	27	18-65	50(30-86)	68(31-110)
	Horn	16	20-40	45.5(5-79)	
	Hubl		20-30	65(42-139)	
Double isotope dilution	Dulmanis	11	21-68	208.8(38.8-382.7)	
Gas-liquid Chromatography	Brooks	5	10-56	69(1.8-120)	128(2-334)
	Futterweit	10	18-28	171(65-250)	
		8	30-35	89(45-150)	
		18	42-55	81(28-159)	
	Ibayashi	11	22-42	130.7(41-200)	16.4(0-52)
	Sparagana	9	20-48	148(59-202)	
	Vestergaard	15	18-47	37(20-65)	
	Cleveland	6	25-42	75(56-103)	
	DeNicola	12	17-46	58.1(17-173)	166.4(8.7-396)
	Ismail	20	21-63	51.7(40.064.5)	
	Wieland	6	16-64	56(34-89)	
	Wegienka	10	22-38	91.5(33.4-144.5)	
	McRoberts	11	16-42	61.3(9.7-109.7)	45.8(3.7-111.0)
	Drosdowsy	11	19-46	55.3(31.7-109.8)	34(10.0-72.6)
	Ours Summer	7	28-43	80.6(53.0-115.7)	45.3(24.6-87.9)
		11	25-45	48.8(6.0-93.4)	22.80(-53.1)

稿を終るにのぞみ, 第二内科教授真下啓明先生の御指導を感謝します。又 1-2-³H-Epitestosterone 及び Epitestosterone をお贈り下さいました Dr. N.L. McNiven (ウスター実験生物研究所) 及び Progesterone, Testosterone, Epitestosterone を提供して下さいました帝国臓器株式会社に感謝します。更に第一生理学教室土居勝彦先生には試料採取に尽力下さったことを感謝します。

文 献

- 1) Schmidt, H., and Z. Starcevic : Klin. Wschr., 43 : 1271 (1967).
- 2) DeNicola, A.F., I.R.

- Dorfman and E. Forchielli : Steroids, 7 : 351 (1966). 3) Schubert, K. and K. Wehrberger : Naturwissenschaften, 47 : 281 (1960). 4) Vermeulen, A. and J.C.M. Verplancke : Steroids, 2 : 453 (1963). 5) Voigt, K.D., U. Volkwein and J. Tamm : Klin. Wschr. 42 : 642 (1964). 6) Rosner, J.M., N.F. Conte, J.H. Briggs, P.Y. Chao, E.M. Sudman and P.H. Forsham : J. Clin. Endocr., 25 : 95 (1965). 7) Zurbügg, R.P., R.D.B. Jacobs and L.I. Gardner : J. Clin. Endocr. 25 : 315 (1965). 8) Morer-Fargas, F. and H. Nowakowski : Acta Endocr. 49 : 443 (1965). 9) Schmidt, H. : Acta Endocr. Suppl 128 58 : 1 (1968). 10) 大室 博 : 日泌尿会誌, 59 : 393, (1968). 11) Camacho, A.M. and C.J. Migeon : J. Clin. Endocr. 301 (1963). 12) Schubert, K. and Frankenberg, G. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 336, 91 (1964). 13) Lim, N.Y. and J.F. Dingman : J. Clin. Endocr. 25 : 563 (1965). 14) Horn, H., M. Statter and M. Finkelstein : Steroids, 7 : 118 (1966). 15) Hubl, W. and Schollberg, K. : Acta Endocr., 58 : 353 (1968). 16) Dulmanis, A., J.P. Coghlan, M. Wintour and B. Hudson : Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 42 : 385 (1964). 17) Brooks, R.V. : Steroids 4 : 117, (1964). 18) Futterweit, W., N.L. McNiven, L. Narcus, C. Lantos, M. Drosdowsky, and R.I. Dorfman : Steroids, 5 : 773, (1965). 19) Ibayashi, H., M. Nakamura, S. Murakawa, T. Uchikawa, T. Tanioka, and K. Nakao : Steroids, 3 : 559, (1964). 20) Sparagana, M., Steroids, 3 : 773, (1965). 21) Vestergaard, P., E. Raabo, and S. Wedso : Clin Chim Acta, 14 : 540, (1966). 22) Cleveland, W.W., N. Ahmad, D.H. Sandberg, and K. Savard, Steroids, 8 : 149, (1966). 23) Ismail, A.A.A., and R.A. Harkness, Biochem J. 99 : 717, (1966). 24) Wieland, R.G., D. Maynard, and G.J. Hamwi, Am J. Obstet Gynec, 94 : 806, (1966). 25) Wegienka, L.C., B.F. Bower, J. Shinsako, T.M. Elattar, S. Hane, N. Mimica, E. Demertze, J.E. Stutheit, and P.H. Forsham, Anal Biochem, 18 : 203, (1967). 26) McRoberts, J.W., A.D. Olson, and W.L. Herrmann, Clin Chem, 14 : 565, (1968). 27) Drosdowsy, M.A., T.T. Nguyen, J. Populu, and M.F. Jayle, Bull Soc Chim. Biol, 50 : 1723, (1968). 28) Tamm, J., U. Volkwein and Z. Starcevic : Acta Endoc. 53 : 61, (1966). 29) 高橋克幸, 平野睦男, 池田美子 : 日内分誌, 45 : 515, (1969). 30) Wilson, H. and M.B. Lipsett : J. Clin. Endocr, 26 : 902 (1966). 31) Itoh, S., T. Azuma, A. Kuroshima and K. Doi, J. Physiol. Soc. Japan, 39 : 51 (1967).