6 β -Hydroxycortisol Excretion in Human Urine

1. Determination of Urinary 6 β -Hydroxycortisol in Normal Subjects

Satoshi YAMADA

Second Division, Department of Medicine, Kyoto University School of Medicine,
Kyoto, Japan. (Director : Professor Masaichi Fukase)

6 β -Hydroxycortisol is a major unconjugated metabolite of cortisol in human urine. It has been proved that it is formed largely in the liver and secreted directly from the adrenal cortex only in small amounts. Conney has indicated that the measurement of the urinary excretion of 6 β -hydroxycortisol provides a useful index of the activity of liver microsomal hydroxylases in man.

It is the purpose of this report to describe a method, modified from the technique of Frantz et al., for the determination of 6 β -hydroxycortisol in urine and to present the normal levels of urinary 6 β -hydroxycortisol excretion. Its excretion under several conditions and following administration of certain drugs will be reported separately.

Modifications of the method of Frantz et al. are as follows: Before extraction 100 ml of the urine sample and the equal volume of ethyl acetate were warmed to about 30°C separately. Emulsion formation did not occur entirely during the extraction procedure by this additional simple manipulation. The solvent system S-I (benzene: ethyl acetate: methanol: water 6: 4: 5: 5) and S-II (benzene: ethyl acetate: methanol: water 8: 2: 5: 5) were used for the paper chromatographic separation of 6 β -hydroxycortisol. In each system, a 30 cm run, requiring 2 hours, was carried out after equilibration for 1.5 hours. Considerable amounts of the urinary pigments, that had the same chromatographic mobility as urinary 6 β -hydroxycortisol in the system Y (chloroform: ethyl acetate: methanol: water 75: 25: 50: 50) and disturbed the observation of the ultraviolet-absorbing band of the steroid under a 254 m μ light, were removed in the system S-I. The urinary 6 β -hydroxycortisol was subjected to the second paper chromatography in which the system S-II was used. 6 β -Hydroxycortisol was purified sufficiently from the urinary pigments and other nonsteroidal substances to yield a sharply defined cobalt-blue band on the paper chromatogram under a ultraviolet light following the second chromatographic separation. The normal levels of urinary 6 β -hydroxycortisol ranged from 152 to 593 μ g/24 hr with a mean $\pm$ SD of 363 ± 102 μ g/24 hr in 13 males, ages 24 to 38, ranged from 316 to 434 μ g/24 hr with a mean $\pm$ SD of 386 ± 36 μ g/24 hr in 8 males, ages 40 to 60, ranged from 225 to 633 μ g/24 hr with a mean $\pm$ SD of 429 ± 125 μ g/24 hr in 9 females, ages 16 to 33, and ranged from 243 to 690 μ g/24 hr with a mean $\pm$ SD of 448 ± 152 μ g/24 hr in 7 females, ages 40 to 60. The levels of urinary 6 β -hydroxycortisol in normal females appeared to be slightly higher than those in normal males. However, most values were within the range of 200–500 μ g/24 hr in both normal males and females.

(See pp. 788~798)

尿中 6β -Hydroxycortisol に関する研究

第一編 尿中 6β -Hydroxycortisol 測定法の検討および尿中

6β -Hydroxycortisol の正常値について

京都大学医学部内科学第二教室（指導 深瀬政市教授）

山 田 秩

（昭和48年1月9日）

Frantz らの尿中 6β -hydroxycortisol 測定法の検討とその正常値の測定を行つた。抽出は彼らの方法に準じて行つたが、 γ 紙クロマトの溶媒系としてベンゼン：酢酸エチル：メタノール：水 6：4：5：5 および 8：2：5：5 を使用した。抽出時に頻発するエマルジョン形成を液温を約30°Cに維持することにより確実に阻止し、彼らの溶媒系Yより著者の2系のほうが 6β -hydroxycortisol の良好な分離をもたらしすことを確かめた。正常値は男女とも 200~500 μ g/24hr の範囲内にあることを見出した。

I. 緒 言

尿中 6β -hydroxycortisol (6β -OH-F) は尿中に遊離型で排泄される cortisol の主要代謝産物のひとつである。

6β -OH-F は1954年に Burstein ら¹⁾ によつてモルモットの尿中からはじめて分離同定された新しいステロイドである。同年彼らは 6β -OH-F が正常人の尿中にも存在することを確認した²⁾。

6β -OH-F は極性の高い物質であるために有機溶媒に極めて抽出されにくい。しかし1961年に Frantz ら³⁾ によつて無水硫酸ナトリウムを使用する塩析抽出法が開発され、尿中および血中 6β -OH-F の定量的な測定が可能になった。

著者は Frantz らの尿中 6β -OH-F 測定法の検討およびその改良と正常人の尿中 6β -OH-F の測定を目的として実験をおこなつた。

II. 実 験 材 料

1. 実験対象

内分泌機能および肝機能にとくに異常を認めない男子21例（24~66才）、女子16例（16~50才）の24時間尿について尿中 6β -OH-F 排泄量を測定した。採尿は午前7時または9時から翌朝午前7時または9時まで24時間おこなつた。尿は直ちに測定に使用しない場合には-20°C以下に凍結して保存した。

2. 試 薬

試薬はすべて特級を使用した。ただし Porter-Silber 反応を行うさいのみには精密分析用エタノールを使用した。

3. クロマトグラフィー用 γ 紙

Whatman No. 3MM を使用した。

展開用の脚は 3×30cm を4本とした。

γ 紙の洗浄はメタノール：水9：1溶液で一昼夜行つた。

III. 実験方法

1. 6β -OH-F-4- 14 C の作製⁴⁾

雌成熟モルモットの腹腔内に、あらかじめ濾紙クロマトグラフィー (溶媒系 B₃)⁶⁾ によつて精製した cortisol-4- 14 C (30.3mC/mM) の 1.5~2 μ C を少量のエタノールに溶かし、生理食塩水で稀釈して注射した。20 時間採尿して全尿中の 6β -OH-F-4- 14 C を以下に述べる方法で分離した。この方法によつて約 2000cpm/ μ g の 6β -OH-F-4- 14 C をえることが可能であつた。

2. 抽出

24時間尿中の 100ml または 200ml を使用した。尿に氷酢酸を滴下して pH 4.5 とし、回収率を求めるために約 2000cpm の 6β -OH-F-4- 14 C を加えた。塩析を行うために無水硫酸ナトリウムを 20w/v % 加え、約 37°C で加温しながら攪拌して完全に溶解させた。被検尿と同量の酢酸エチルで 1 回抽出した。エマルジョン形成をさけるために抽出のさいの液温を 25~30°C に保つた。

酢酸エチル抽出液の洗浄は 15w/v% の無水硫酸ナトリウムを加えた 1N-NaOH で 2 回 (抽出液の 1/20 容を使用)、15w/v% の無水硫酸ナトリウムを加えた 0.5% 酢酸で 1 回 (抽出液の 1/20 容を使用)、抽出液の 1/100 容の蒸溜水で 1 回行った。

洗浄した抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水したのち、東洋濾紙 No. 5 B で濾過した。

3. 尿中総遊離型 17-OHCS の測定

抽出液を rotary flash evaporator で減圧乾固し、えられた残渣を小型ナス型フラスコに移した。残渣の溶解は 5~10ml の酢酸エチル:メタノール 1:1 溶液で 2 回、ついで 5~10ml のメタノールで 1 回行った。小型フラスコの溶液を濾過した空気の小気流のもとで再び減圧乾固した。えられた残渣を 10ml の精密分析用エタノールに溶解した。2 本の試験管にその溶液を各 1ml とり、これを Reddy-Jenkin-Thorn 法の岩井変法⁵⁾によつて Porter-Silber 反応を行つて発色させ、島津バックマン型分光光度計で波長 410m μ で測定した。

4. クロマトグラフィー

Bush⁶⁾の方法による descending chromatography を行つた。

溶媒系はつぎの 2 系を使用した。

S-I ベンゼン:酢酸エチル:メタノール:水 6:4:5:5

S-II ベンゼン:酢酸エチル:メタノール:水 8:2:5:5

尿中総遊離型 17-OHCS 測定後に残つた 8ml のエタノール溶液を再び減圧乾固し、残渣を少量のメチレンクロライド:メタノール 1:1 溶液に溶かして展開用濾紙に塗布し、S-I で 30cm 展開した。 6β -OH-F は原点より 13cm の部位を占めたのでその部分をメタノール:水 1:1 溶液で溶出した。溶出は descending chromatography で行つた。溶出する濾紙片はガラス製のピンで接続した。

溶出液を乾固してえた残渣を再び展開用濾紙に塗布して S-II で 30cm 展開した。 6β -OH-F は原点より 4cm の部位を占めた。 6β -OH-F を Porter-Silber 反応によつて測定するためにその部分を溶出した。

濾紙上の 6β -OH-F の確認は 254m μ の紫外線ランプを使用して行つた。S-I および S-II において尿中 6β -OH-F は紫外吸収帯として濾紙上に見出された。平行する脚で同時に展開された 6β -OH-F 純品の紫外吸収帯と尿中 6β -OH-F のそれとが一致した部位を占めることを確認してその部分の溶出を行つた。

S-I および S-II は 1.5 時間の平衡を行つたのち、2 時間で 30cm 展開された。

5. 6β -OH-F の測定

S-II からの溶出液を乾固し、残渣を 2.5ml の精密分析用エタノールに溶かした。2 本の試験管にその溶液の各 1ml をとつて尿中総遊離型 17-OHCS 測定のさいと同様に測定した。測定値を回収率で補正して尿中 6β -OH-F の値とした。

6. 回収率

尿中 6 β -OH-F 測定後に残った溶液から 0.3ml を count 測定用 vial にとり, 0.4% PPO および 0.01 % dimethyl POPOP を含むトルエン 5ml を加えて Packard Tricarb liquid scintillation spectrometer で溶液中の 6 β -OH-F-4-¹⁴C の count を測定した。はじめに加えた 6 β -OH-F-4-¹⁴C の 1/10 量の count を同時に測定して両者から回収率をもとめた。

また 6 β -OH-F 純品 100 μ g を蒸留水 100ml に加えて水溶液からの 6 β -OH-F 純品の回収率をもとめた。

IV. 実験成績

1. 抽出について

尿に 20w/v% の無水硫酸ナトリウムを加えて塩析によって尿中 6 β -OH-F を抽出するさいの最大の難点は, 抽出中にしばしばエマルジョンが形成されることである。エマルジョンは液温が 22~23°C 以下のときに確実に形成されることを見出した。そこで尿および酢酸エチルをあらかじめ 25~30°C に加温し, その温度を維持しながら抽出を行った。この操作を加えると尿と同量の酢酸エチル (原法は 2 倍量または 4 倍量を使用) で抽出しても全くエマルジョンの形成をみないことが確認された。

抽出のさいの尿の pH については 6.4 と 4.5 を比較した。pH 6.4 では同時に抽出されてくる尿色素が pH 4.5 の場合よりかなり少なかった。しかし 6 β -OH-F は pH 4.5 においてより安定と考えられるので pH 4.5 を採用した。

洗浄用アルカリの濃度については 1/10 N-NaOH と 1 N-NaOH を比較した。1/10 N-NaOH では十分に尿色素が除去されず, 展開用汚紙に塗布するさいに除去されなかつた尿色素がタール状になって著しい困難が生じた。したがって 1N-NaOH を採用した。

抽出の段階における回収率を pH 4.5 または pH 6.4 で抽出して 1/10 N-NaOH で洗浄した場合, および pH 4.5 で抽出して 1N-NaOH で洗浄した場合について比較した。前者の回収率は 90~95%, 後者のそれは 75~80% であった。

2. クロマトグラフィーの溶媒系について

尿中 6 β -OH-F を汚紙クロマトグラフィーで分離するために使用されるいくつかの溶媒系について検討をおこなった。

- ① クロロホルム: フォルムアמיד⁷⁾ (20時間展開)
- ② メチレンクロライド: エチレングリコール⁸⁾ (20時間展開)
- (① および ② は Zaffaroni type)
- ③ クロロホルム: 酢酸エチル: メタノール: 水 75: 25: 50: 50³⁾ (Y)
- ④ ⁹⁾ {ベンゼン: メタノール: 水 2: 1: 1⁹⁾ (B₅)
クロロホルム: 酢酸エチル: メタノール: 水 75: 25: 50: 50 (Y)
- ⑤ {ベンゼン: 酢酸エチル: メタノール: 水 6: 4: 5: 5 (S-I)
ベンゼン: 酢酸エチル: メタノール: 水 8: 2: 5: 5 (S-II)
- (③, ④ および ⑤ は Bush type)

Fig. 1 は ① および ② の radiochromatogram を示したものである。① では 6 β -OH-F を含む遊離型ステロイドが約 2cm しか移動していない。② では 6 β -OH-F が 3~4cm の部位を占め, 6 β -OH-F より less polar なステロイドが 10cm 以下に移動している。しかし 6 β -OH-F より more polar なステロイドと 6 β -OH-F との分離が不十分であり, ① および ② の溶媒系では 6 β -OH-F を十分に分離することが不可能であった。

Fig. 2 は ③ の radiochromatogram である。

Frantz らのこの溶媒系 Y では明らかに 6 β -OH-F が単一の peak をなしているとみなしてよいと考えられる。しかしこの溶媒系を用いて実際に展開した汚紙を 254m μ の紫外線で scanning を行くと 6 β -OH-F の部位に広く分布する尿色素のために 6 β -OH-F の紫外吸収を肉眼で認めることは極めて困難であった。

Fig. 1

Fig. 2

そこで④の組合せを用いてあらかじめ溶媒系 B₅ で尿色素の一部と less polar なステロイドを除去したのちに濾紙の原点に止っている 6β-OH-F を含むステロイドを溶出して、それをさらに溶媒系 Y で展開してみた。Fig. 3 はその radiochromatogram である。しかしこの組合せによつてもなお溶媒系 Y で 6β-OH-F と同じ部位を占める尿色素が多く、6β-OH-F の紫外吸収を認めることは困難であつた。また後述 (第二編) のごとく溶媒系 B₅ では除去されないメトピロンや cyclandelate のような薬物の代謝産物が溶媒系 Y で 6β-OH-F と全く同じ部位を占めて強い紫外吸収を示すために、この方法ではそのような非ステロイド物質と 6β-OH-F を分離することが不可能であつた。

著者はそこでベンゼン：酢酸エチル：メタノール：水¹⁰⁾の溶媒系を選び、メタノール：水の比を一定にし

Fig. 3

て (1:1) ベンゼン:酢酸エチルの比率を種々に変えて新しい溶媒系の開発を試みた. その結果⑤の組合せによつてほぼ満足すべき 6β -OH-F の分離がえられることを見出した. Fig. 4 は⑤の2系 (S-I および S-II) によつて展開してえた radiochromatogram である.

S-I では 20-OH- 6β -OH-F が 3cm を占めるので (溶媒系Yでは 6cm) 6β -OH-F より more polar なステロイドと 6β -OH-F との分離がよく, また 6β -OH-F と同じ部位を占める尿色素が著明に減少するため濾紙上で 6β -OH-F の紫外吸収を認めることが可能であつた. しかし溶媒系Yの場合と同様にメトピロンな

Fig. 4

どの代謝産物が S-I においても 6β -OH-F と全く同じ部位を占めた。

このような物質を除去するために S-I から溶出した 6β -OH-F をさらに S-II を用いて展開した。S-II によつて 6β -OH-F は尿色素も含めた非ステロイド物質からほぼ完全に分離され、沱紙上において鮮明な紫外吸収帯として容易に見出されるようになった。したがつて尿中 6β -OH-F の分離精製のために⑤の溶媒系を採用した。

3. 溶出について

展開沱紙片からの 6β -OH-F の溶出はガラス製カスガイ型ピンを用いて沱紙片を接続して行つた。この方法によつて約 5 時間で完全に溶出されたが、多くは一夜放置して溶出した。溶出がほぼ完全に行われたことは、 6β -OH-F 溶出後の沱紙片をさらに継続して長時間別の容器に溶出し、それを Porter-Silber 反応で測定した場合にその値がほぼ 0 であつたことから確かめられた。

従来沱紙片の接続にはクリップまたはホッチキスを慣用してきたが、この方法ではステロイドが Porter-Silber 反応陰性の金属錯化合物を形成して測定誤差の原因となる可能性があり、それを避けるためにガラス製のピンを使用した。

4. 回収率について

6β -OH-F 純品を水溶液から抽出したさいの回収率は 60.0~69.4% であつた。しかし 6β -OH-F- $4\text{-}^{14}\text{C}$ を内部標準として求めた回収率は 40~70% とばらつきを示した。

6β -OH-F- $4\text{-}^{14}\text{C}$ は 1ml のエタノール溶液として加えられるので、尿中に 1ml のエタノールを加えた場合と加えない場合について比較してみたが、両者の尿中 6β -OH-F の測定値は 5% の誤差範囲内で一致した。

5. 再現性について

尿中総遊離型 17-OHCS の値を同一尿の 3 検体について比較すると 10% 以内でよく一致した。

また日をおいて同じ尿を再検しても 10% 以内で一致した。

補正しない尿中 6β -OH-F の実測値についても同様の比較を行つたが、いずれも 10% の範囲内でよく一致した。

6β -OH-F の再現性は、 6β -OH-F の溶出が完全に行われることのほかに、試料の展開沱紙への塗布が定量的に行われたか否かによつても大きく左右されるのでこの点について検討した。

Fig. 5 Chromogenicity of authentic 6β -OH-F, cortisol, THE and THF in Porter-Silber reaction.

塗布しおわつたのちの容器中に残存する試料の有無を調べるために容器に 2.5 ml の精密分析用エタノールを加え、よく容器内を洗つたのちその洗液について Porter-Silber 反応によって測定を行つたが、その値はほぼ 0 であつた。

6. 6β -OH-F の発色性について

6β -OH-F 純品について測定した 6β -OH-F の吸光係数は 100 ± 3.3 であつた。 6β -OH-F は cortisol と同程度の発色性を有することが認められた。

Fig. 5 は 6β -OH-F, THE, THF および cortisol の Porter-Silber 反応による発色性を比較したものである。

7. 尿中 6β -OH-F の同定

尿中から分離された 6β -OH-F を 6β -OH-F 純品と比較してつぎの点で一致した所見をえることができた。

- 1) Porter-Silber 反応で $410m\mu$ に最大吸収を有する発色を示した。(Fig. 6)
- 2) 濾紙上でブルーテトラゾリウム反応によつて青紫色を呈した。
- 3) 濾紙上で $365m\mu$ で soda fluorescence を認めることができた。
- 4) 濾紙上で $254m\mu$ で紫外吸収を示した。
- 5) 硫酸中で $475m\mu$ で励起され、 $525m\mu$ の螢光を発生した。(Fig. 7)
- 6) 硫酸中での紫外吸収曲線が 240 (240), 274 (270), 346 (340), 390 (390), 475 (475) $m\mu$ で peak を示した。(括弧内には 6β -OH-F 純品についてえられた値を示した。)(Fig. 8)
- 7) エタノール中で $240m\mu$ で紫外吸収を示した。
- 8) ①, ②, ③, ④ および ⑤ の溶媒系を使用した濾紙クロマトグラフィーにおいて同一の Rf を示した。以上のことから尿中 6β -OH-F が 6β -OH-F 純品と同一物質であると結論した。

8. 尿中 6β -OH-F の正常値

正常男子 21 例, 女子 16 例についての尿中 6β -OH-F, 尿中総遊離型 17-OHCS, および尿中 6β -OH-F の尿

Fig. 6 Absorption spectra of authentic 6β -OH-F and urinary 6β -OH-F in Porter-Silber reaction (60°C, 30min.)

Fig. 7 Activation spectra and fluorescence spectra

中総遊離型 17-OHCS に対する百分率を Table 1 に示した。

男女とも39才以下および40才以上の2群に分けてそれぞれの平均値を比較した。

尿中 6β-OH-F は39才以下および40才以上のいずれにおいても女子のほうが高い傾向を示した。年代別では男女とも40才以上の方が多少高い傾向を示した。

Fig. 8 Absorption spectra in concentrated sulfuric acid

尿中総遊離型 17-OHCS においても一般に女子のほうがやや高めの値を示した。しかし年代別では 6β-OH-F の場合とは逆に39才以下のほうが多少高値を示した。

6 β -OH-F の総遊離型 17-OHCS に対する百分率は39才以下男子が最低値を示し、40才以上女子が最高値

Table 1. Urinary 6 β -OH-F and total free 17-OHCS excretion in normal subjects, and percentage of 6 β -OH-F to total free 17-OHCS.

Male				Female			
Age	6 β -OH-F (μ g/24hr)	total free 17-OHCS (μ g/24hr)	6 β -OH-F total free 17-OHCS (%)	Age	6 β -OH-F (μ g/24hr)	total free 17-OHCS (μ g/24hr)	6 β -OH-F total free 17-OHCS (%)
24	493	846	58.3	16	278	345	76.5
27	244	544	45.0	19	394	841	46.8
29	461	952	48.4	22	425	896	47.8
29	576	1142	50.4	22	429	708	60.6
29	373	759	49.1	23	597	820	72.8
29	342	765	45.0	23	225	440	51.1
30	152	233	65.2	25	394	852	46.2
31	593	1171	50.6	29	486	805	60.4
33	263	357	73.6	33	633	876	72.2
35	391	837	46.7				
35	317	524	60.5				
36	200	334	60.0				
38	310	560	55.4				
Mean ±SD	363±102.3	694±288.0	54.5±8.3		429±124.7	731±189.3	59.3±11.5
40	397	712	55.8	40	334	387	86.3
45	373	621	60.1	42	690	1148	60.1
49	316	466	67.8	45	562	870	64.5
55	350	624	56.1	48	351	536	65.5
57	421	746	56.1	49	588	755	78.0
65	434	714	60.8	49	370	467	79.2
65	384	604	63.6	60	243	386	63.0
66	413	681	60.7				
Mean ±SD	386±36.1	646±83.4	60.2±3.9		448±151.9	650±265.3	70.9±9.3

を示した。39才以下女子および40才以上男子はほぼ同じ値をとつた。年代別では40才以上のほうが高く、男女別では両群とも女子のほうが高値を示した。

V. 考 按

6 β -OH-F の測定について Frantz ら³⁾の方法の画期的な点は、無水硫酸ナトリウムによる塩析を加えることによつて尿中 6 β -OH-F の定量的抽出を可能にしたこと、新しい溶媒系 Y および Z (ベンゼン:3級ブチルアルコール:水 70:43:86)によつて濾紙クロマトグラフィーによる 6 β -OH-F の分離を可能にしたことの2点である。しかし彼らは抽出のさいに極めて形成されやすいエマルジョンの問題を十分に解決していない。Dixon ら⁹⁾は Bradosol (界面活性剤)を加えてエマルジョンの形成を抑えている。しかし著者はなにも加えずに単に抽出中の液温を25~30℃に保つことだけでエマルジョンの形成を完全に阻止しうることを見

出した。

溶媒系YおよびZがすぐれたものであることはそれらが広汎に使用されていることから明らかである。しかし 6β -OH-F と同じ部位を濾紙上において占める尿色素および他の非ステロイド物質が、 6β -OH-F による紫外吸収の観察を著しく妨げるほど多いために溶媒系Yでは 6β -OH-F の分離精製がなお不十分である。溶媒系Zの検討は各ステロイドの Rf が溶媒系Yとほぼ同じであるために行わなかった。

他の溶媒系としては Ulstrom ら¹¹⁾ のベンゼン:n-ブタノール:メタノール:水 10:1:3:3, Burstein ら¹²⁾ のベンゼン:酢酸エチル:メタノール:水 3:1:1:2, Dixon ら⁹⁾ のベンゼン:酢酸エチル:メタノール:水 7:3:10:10がときに使用されるが、これらは展開に長時間を要するため、同定または比放射能測定などの目的で 6β -OH-F を分離精製するためには有効な方法であつても、日常的な 6β -OH-F 測定のためには適切な方法ではない。

そこで著者は1.5時間で平衡に達し、2時間で30cm 展開されるS-IおよびS-IIの2系を使用した。

S-Iでは 6β -OH-F より more polar なステロイドと 6β -OH-F との分離がよく、また尿色素と 6β -OH-F との分離がよい。S-IIではS-Iで 6β -OH-F と同じ部位を占めた非ステロイド物質を十分に 6β -OH-F から分離することが可能であつた。S-IIは長時間の over-run にも耐えるので 6β -OH-F より less polar なステロイドと 6β -OH-F とを十分に分離することが可能であつた。

尿中 6β -OH-F の正常値は一般に女子がやや高値を示すことが、Katz ら⁴⁾ および山路¹³⁾ らによつて報告されている。著者の測定値においても同様の傾向が認められた。Katz らはこれを女子における estrogen の優位性にもとづくものとしたが、山路らは老年者女子においても若年者女子と同じ level の値をとることから estrogen の影響のみでは説明しがたいとしている。

著者の場合も40才以上女子と39才以下女子との間に差を認めなかつたので、やはり estrogen のみによつて女子がやや高めの値をとるとは考えにくい。

個々の 6β -OH-F の値をみると男女とも一定範囲内ではばらつき、男女別または年代別によつて特定の傾向を示すことはないので、それぞれの平均値を比較して有意差を論ずることはあまり意味のないことと考えられる。

尿中 6β -OH-F が男女とも39才以下および40才以上において同じ level の値をとることは、尿中総 17-OHCS が年令とともに減少することと比較すると興味ある事実である。したがつて50才以上男女の副腎皮質機能判定のさいには尿中 6β -OH-F もある程度考慮に入れる必要があると考えられる。Fukushima ら¹⁴⁾ が指摘しているように副腎からの cortisol の分泌量は (THF+THE+ 6β -OH-F) が最もよく反映すると考えられるからである。

尿中総遊離型 17-OHCS の測定は Frantz らは行つていない。しかし再現性がよいので尿中 6β -OH-F を予測する目的で行つた。尿中総遊離型 17-OHCS は従来の遊離型 17-OHCS より2~3倍の高値を示した。前者に 6β -OH-F などの polar なステロイドが含まれるためである。クロロホルムで抽出を行うこれまでの尿中遊離型 17-OHCS には 6β -OH-F がほとんど含まれていない。したがつて 6β -OH-F を含む「尿中総遊離型 17-OHCS」のほうが遊離型 17-OHCS としてより真の値に近いと考えられる。

総遊離型 17-OHCS の平均値においても女子のほうがやや高値を示した。また年代別では40才以上のほうが低値をとつたが、この点に関しては尿中総 17-OHCS の示す傾向と一致した。

6β -OH-F の総遊離型 17-OHCS に対する比率は男女とも40才以上で高く、39才以下で低かつた。

これは 6β -OH-F が年令によつてあまり変動しないのに総遊離型 17-OHCS が39才以下で高く、40才以上で低いことによるものである。したがつて総遊離型 17-OHCS から 6β -OH-F を予測するさいには両者の間にあまりよい平行関係のえられないことを考慮に入れるべきである。

尿中 6β -OH-F は、cortisol の遊離型代謝産物のうちで Porter-Silber 反応によつて比較的容易に測定しうる尿中ステロイドとしてはもつとも多量に存在するので、遊離型ステロイドの量的変化をみるための重要な指標となりうる。そこで著者はまず Frantz らの尿中 6β -OH-F 測定法を検討してより正確な測定値がよ

り容易にえられるように若干の修正を加え、その方法によつて正常値を測定したが、なお測定法に改善すべき点の多々あることも認めている。

VI. 結 語

尿中 6 β -OH-F 抽出のさいにしばしばおこるエマルジョンの形成を、抽出中の液温を25~30°Cに保つことによつて確実に阻止することができたので、尿中 6 β -OH-F の抽出が容易になった。

S-I および S-II の溶媒系を使用することによつて尿中 6 β -OH-F を短時間に分離精製することが可能になった。この方法によつて濾紙上で 6 β -OH-F の紫外吸収を肉眼で容易に確認することが可能になった。

尿中 6 β -OH-F の正常値は女子でやや高めの印象をうけたが、全般的には年令または性に関係なく一定範囲内の値を示した。

尿中総遊離型 17-OHCS は男女とも39才以下で高い傾向を示した。

6 β -OH-F の総遊離型 17-OHCS に対する比率は男女とも39才以下で低く、40才以上で高い傾向を示した。

稿を終えるに当つて御懇篤なる御指導を賜つた深瀬政市教授および細部にわたる御指示を仰いだ岩井一義講師に深く感謝します。

文 献

- 1) Burstein, S., R.I. Dorfman, and E.M. Nadel : Fed. Proc., 13 : 188, (1954).
- 2) Burstein, S., R.I. Dorfman, and E.M. Nadel : Arch. Biochem. & Biophys., 53 : 307, (1954).
- 3) Frantz, A.G., F.H. Katz, and J.W. Jailer : J. Clin. Endocr., 21 : 1290, (1961).
- 4) Katz, F.H., M.M. Lipman, A.G. Grantz, and J.W. Jailer : J. Clin. Endocr., 22 : 71, (1962).
- 5) 岩井一義 : 臨床化学分析—ホルモン—, 東京化学同人, 東京, (1969).
- 6) Bush, I.E. : Biochem. J., 50 : 370, (1952).
- 7) Nadel, E.M., S. Burstein, and R.I. Dorfman : Arch. Biochem. & Biophys., 61 : 144, (1956).
- 8) Touchstone, J.C., and M.R. Horwitz : analytical Biochem., 6 : 316, (1963).
- 9) Dixon, W.R., and G.W. Pennington : J. Endocrin., 34 : 281, (1966).
- 10) Bledsoe, T., D.P. Island, R.L. Ney, and G.W. Liddle : J. Clin. Endocr., 24 : 1303, (1964).
- 11) Ulstrom, R.A., E. Colle, J. Burley, and R.J. Gunville : J. Clin. Endocr., 20 : 1080, (1960).
- 12) Burstein, S., H.L. Kimball, E.L. Klaiber, and Marcel Gut : J. Clin. Endocr., 27 : 491, (1967).
- 13) 本橋賢二, 山路 徹, 谷岡達男, 大沢仲昭, 井林 博, 中尾喜久 : 日本老年医学会雑誌, 6 : 202, (1969).
- 14) Fukushima, D.K., H.L. Bradlow, and L. Hellman : J. Clin. Endocr., 32 : 192, (1971).