イヌにおける血中コルチゾールおよびコルチコステロンの動態

稲葉 俊夫・新谷 聡¹⁾・森本 純司²⁾・清水 亮佑
蘭守 龍雄・三木 博³⁾

(大阪府立大学農学部家畜外科学教室 ¹⁾現所属：国立循環器病センター
²⁾奈良県立医科大学医学部 ³⁾東京都衛生局)

イヌにおいて、副腎皮質からは主としてコルチゾール (FK) が分泌され、コルチコステロン (BK) の分泌も行なわれていることが知られている¹⁻³⁾。また、11-デオキシコルチゾール、11-デオキシコルチコステロン、アルドステロンおよびその他のステロイドホルモンも分泌されているとする報告があるが、FK と BK に比べてこれらは非常に微量であるとされている^{4,5)}。FK と BK は下垂体からの ACTH の刺激に反応して放出され、さらに ACTH の放出は視床下部からの CRF により調節を受けていることがすでに明らかとなっている^{6,9)}。

また、FK と BK の分泌は種々の動物において、日内変動を示すことが知られている⁷⁾。すなわち、ヒトにおいて血中 FK は早朝高値を示し、真夜中近くに最低値を示す^{8,7)}。一方、夜行動物のラットでは、血中 BK 値は夕刻高値を、朝方低値を示すと報告されている⁷⁾。しかし、イヌにおいては、副腎皮質ホルモンの日内変動についてはいまだ十分に明らかではない⁸⁻¹²⁾。RIJNBK ら⁹⁾および ARCANGELI ら⁹⁾はイヌでコルチコイド値に日内変動がみられると報じ、RICHKIND ら¹⁰⁾の成績をみると、明瞭な日内変動は示されておらず、JOHNSTON ら¹¹⁾および TAKAHASHI ら¹²⁾は、イヌではヒトにみられる様な日内変動は、むしろ存在しないと主張している。

ヒトにおいては、FK は BK に比べて非常に大量に存在するために、副腎皮質機能を検討するためには、FK を測定すれば良いとされ、ラットでは逆に BK をもっ

ばら測定して同様の目的に用いている。一方、イヌでは、血中 FK 対 BK の比は報告者により様々であり、0.3 : 1 から 20 : 1 の範囲にも広がっており¹⁻⁴⁾、これらの報告されたコルチコイドの正常範囲はきわめて大きい。これは一つには測定の条件や方法が異なることに由来するのでないかと考えられる。それゆえ、イヌの副腎皮質機能を評価するためには、FK と BK の両者の正常時の動態をさらに多く検討する必要があると思われる。

今回、我々はこれらの点をふまえて、イヌにおける血中 FK と BK の日内変動の存在の有無について検討を行なった。

材料と方法

供試犬は体重 14.5~21.0 kg、年齢 2~3 年の雑種犬 (雄 3 頭、雌 5 頭) で、一般臨床検査によって正常と判断されたものを使用した。供試犬は個々のケージに、一定の明暗条件 (明 6 : 00~20 : 00、暗 20 : 00~6 : 00) 下で飼育した。血中の FK と BK の日内変動について検討するために、2 時間間隔で 24 時間、桡側皮静脈または頸静脈からヘパリン加血液として採取し、遠沈後血漿を分離し、測定まで -20°C に保存した。なお、採血開始時刻は各個体別に午前 (9, 12 時)、午後 (15, 16 時)、および真夜中 (0 時) とした。夜間の採血時には照明をつけ、実験犬をケージの外に連れ出したが、その取り扱いにはできるだけ静かにするように心掛け、ストレスをかけないように注意を払った。

血中の FK と BK の測定は、鳥居¹³⁾の報告した方法により、すべて 2 点測定によって実施した。すなわち、血漿 25~100 μ l をメチレンクロライドで抽出後、RUDD 法の変法¹⁴⁾による分配操作を加えて純化・分離を行ない、イヌ CBG を用いた competitive protein binding assay 法 (CPBA 法) により測定した。本法の最小検出量は 0.1 ng、また、精度は変位係数で 7.7~11.9% であった。

FK と BK の測定結果は一元配置法による分散分析

Diurnal variation of plasma cortisol and corticosterone in dogs.

INABA, Toshio, Satoshi NIIYA¹⁾, Junji MORIMOTO²⁾, Ryosuke SHIMIZU, Tatsuo IMORI & Hiroshi MIKI³⁾ (Department of Surgery and Obstetrics, School of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 591. Present address: ¹⁾National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka 565, ²⁾Nara Prefectural University of Medicine, Nara 634, ³⁾Metropolitan Hygiene Service Center, Tokyo 100)

Japan. J. Amin. Reprod., 29(2), 1983.

を行なった。また、2つの平均値の比較にはt検定を行ない、 $P<0.05$ のとき有意差ありと判定した。

成 績

図1に8頭のイヌの24時間内血中FKとBK値の動態を示した。血中FK値は鋸歯状の変動を示し、真夜中から明け方にかけて低値であり、8~9時に大きなピークを示す。そして、午後の時間帯には中等度の変動が認められた。一方、血中BK値には特徴的な変動のパターンは認められず、一日を通じて鋸歯状の細かい変動を示した。

Fig. 1. Twenty-four h patterns of plasma cortisol (●) and corticosterone (○) levels in 8 dogs (mean±SE, $n=3-4$).

Table 1. Overall mean (±SE) plasma concentrations of cortisol and corticosterone in 8 dogs

Corticoids (ng/ml)	14-h light period		10-h dark period
	morning 0600-1300 ($n=21$)	afternoon 1300-2000 ($n=21$)	2000-0600 ($n=37$)
Cortisol	20.3±3.2 ^{a)}	11.9±1.6	11.0±0.8
Corticosterone	5.0±0.4	4.2±0.5	4.6±0.6

^{a)} $P<0.05$ vs afternoon value. $P<0.001$ vs dark period value.

これらの血中FKとBK値を一元配置法による分散分析した結果を表1に示した。1日を午前(6~13時)、午後(13~20時)、夜間(20~6時)に3分割したとき、血中FK値において、95%の信頼限界で午前の値が他の2群よりも有意に高い値を示した、一方、血中BK値では、3群間に有意差は認められなかった。また、血中FKとBK値には雌雄間で差は認められなかった。

79 サンプルの平均値は FK: 14.4 ± 1.0 ng/ml, BK: 4.7 ± 0.3 ng/ml であった。また、79 サンプル中の95%は、FK: 36 ng/ml 以下を、BK: 10 ng/ml 以下の値を示した。

考 察

副腎皮質ホルモンは、外部からの刺激、個体に加わるストレス等により容易に変化を示すことから、副腎皮質ホルモンを指標とした臨床検査において、得られた成績を分析しようとする際、きわめて慎重な注意が払われねばならない。ストレス回避を主な目的として、たび重なる採血を静脈内留置針を通じて行なうような方法があるが、今回はこれによらず、あえて静脈内に毎回針を刺して採血を行なった。イヌの赤血球はコルチコイドを急速に、しかも多量に取り込むことが報告されている¹⁵⁾。したがって、採血後ただちに、血漿を分離した。

本実験成績より得たイヌの血中FKとBK値は、従来、radioimmunoassay 法またはCPBA 法により測定された正常犬の値としての範囲内に収まっている。また、血中FK: BKの比は、平均3:1を示し、これもほぼ同様であった¹⁻⁴⁾。

8頭のイヌの24時間血中FKとBK値(2時間間隔)では、8頭すべてについてFKおよびBKの鋸歯状の変動、いわゆるepisodicの変動パターンを認めた。HELLMAN ら¹⁶⁾は、正常のヒト末梢血中FKの24時間内の動態は、従来の様に4~6時間間隔で測定した時にはスムーズな増加と減少を示す日内変動が認められるにとどまるが、20分間隔で採血を行なった場合には、その動きはもはやスムーズな動きではなく、ジグザグ型を示すことを発見した。さらに、WEITZMAN ら¹⁷⁾も血中FKは持続的に分泌されるのではなく、episodicに分泌が行なわれていることを報告した。すなわち、その機構はストレスによるものではなく、中枢神経系の支配下に分泌と休止が比較的短時間内に行なわれていることを示したとも言える。一方、動物においては、アカゲザル¹⁸⁾、ウシ¹⁹⁾、ヒツジ¹⁰⁾、およびモルモット²⁰⁾において同様に血中FK値の日内変動に明らかなepisodicの変

動パターンが認められている。

本実験では、実験開始時にストレスが高くなることを考慮し¹²⁾、開始時間を種々に変化させたわけであるが、成績に示したように、イヌの血中 FK 値は午前 8~9 時に大きなピークを示し、それ以後、午後にかけては中等度の episode 的変動をくり返し、深夜から早朝にかけて低値を示す日内変動が認められた。また、血中 BK 値については特徴的と思われる変動パターンは認められなかった。このことに関して、RIJNBK ら⁹⁾は、6 頭のイヌの尿中 11β -ヒドロキシコルチコステロイドの日内変動はヒトにみられる様な明確なものではないとしながらも、8 時には最高値を、23 時には最低値を示し、イヌにも日内変動が一応は存在することを報じている。また、ARCANGELI ら⁹⁾は、用いた 12 頭のイヌについて、8 時に血中コルチコイドが高値を示し、16 時に低値を示すとしており、著者らおよび RIJNBK ら⁹⁾が得た成績と共通して 8 時に血中値のピークを認めている。

一方、JOHNSTON ら¹¹⁾は、イヌでは FK 値の日内変動は認められないと報じた。彼らは 6 頭の雑種犬(雄 3 頭、雌 3 頭)を使って、3 時間間隔で血中値を測定したわけであるが、特徴的な日内変動のパターンを認めていない。彼らの報告による血中 FK 値の平均は $13.5 \sim 25.4 \text{ ng/ml}$ で、著者らの得た値とはほぼ等しい範囲内にあるが、日内変動のパターンを認めなかったとする理由としては、3 時間間隔の採血がいくらか影響しているのかもしれない。この点に関して、TAKAHASHI ら¹²⁾は 10 頭のイヌ(雑種 7 頭、ビーグル 3 頭)を使って、30 分間隔で血中 FK 値を測定したが、個体差が大きく、特徴的な日内変動のパターンを認めていない。犬種による相異についてはまだ十分に検討がなされていない現状から、日内変動を認めなかったこれらの実験結果を無視することは避けるべきであろう。

以上、著者らの得たわずかな成績および文献の考察から、イヌにおいて血中 FK 値は 8~9 時をピークとする日内変動を示す個体が多いことがわかった。したがって、副腎皮質機能を調べる臨床検査においてはこの点について注意を払う必要があると考える。

要 約

雄 3 頭と雌 5 頭についてイヌの血中 FK と BK の日内変動の有無を調べる実験を行なった。すなわち、2 時間の間隔で採血を行ない、24 時間内の血中 FK および BK の測定を行なった。

その結果、血中 FK の平均値は $14.4 \pm 1.0 \text{ ng/ml}$ 、

BK は $4.7 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$ を示し、測定検体の 95% は FK: 36 ng/ml 以下、BK: 10 ng/ml 以下の値を示した。さらに、イヌの血中 FK と BK 値は、ヒトやウシ等では認められている episodic な変動パターンを一応示し、血中 FK 値は深夜から早朝では低く、8~9 時に大きなピークを示し、それ以後、午後にかけて中等度の値を示す、いわゆる日内変動が認められた。

以上の成績と文献によって示された諸報告より、イヌにおいては血中 FK 値に日内変動を示す個体が多いこと、および午前 8 時前後に FK 値のピークを示すものが多いらしいことがわかったので、副腎皮質機能を調べる臨床検査において、このことについて注意を払う必要があると考える。

(1982. 11. 4 受付)

文 献

- 1) ZAFFARONI, A. & R. B. BURTON: *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 1, 1953.
- 2) FARRELL, G. L. & B. LAMUS: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 89, 1955.
- 3) HECHTER, O., I. A. MACCHI, H. KORMAN, E. D. FRANK & H. A. FRANK: *Am. J. Physiol.*, **182**, 29, 1955.
- 4) FARRELL, G. L., E. W. RAUSHKOLB & P. C. ROYCE: *Am. J. Physiol.*, **182**, 269, 1955.
- 5) YATES, F. E. & J. URQUHART: *Physiol. Rev.*, **42**, 359, 1962.
- 6) GANONG, W. F., L. C. ALPERT & T. C. LEE: *New Engl. J. Med.*, **290**, 1006, 1974.
- 7) KRIEGER, D. T.: *Chronobiologia*, **1**, 95, 1974.
- 8) RIJNBK, A., P. J. DER KINDERN & J. H. H. THIJSEN: *J. Endocrinol.*, **41**, 387, 1968.
- 9) ARCANGELI, P., V. DIGIESI, G. MADEDDU & R. TOCCAFONDI: *Experientia*, **29**, 358, 1973.
- 10) RICHKIND, M. & L. E. EDQVIST: *Acta Vet. Scand.*, **14**, 745, 1973.
- 11) JOHNSTON, D. S. & E. C. MATHER: *Am. J. Vet. Res.*, **39**, 1766, 1978.
- 12) TAKAHASHI, Y., S. EBIHARA, Y. NAKAMURA & K. TAKAHASHI: *Endocrinology*, **109**, 262, 1981.
- 13) 鳥居(隆)・蘭守(龍): 本誌, **20**, 153, 1975.
- 14) 目時(信): 日産婦誌, **25**, 588, 1973.
- 15) PHILLIP, E. L. I. & S. F. MAROTTA: *Acta endocrinol.* (Kbh). **68**, 771, 1971.
- 16) HELLMAN, L., F. NAKADA, J. CURTI, E. D. WEITZMAN, J. KREAM, H. ROFFWARG, S. ELLMAN D. K. FUKUSHIMA & T. F. CALLAGHER: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **30**, 411, 1970.
- 17) WEITZMAN, E. D., D. FUKUSHIMA, C. NOGEIRE, H. ROFFWARG, T. F. GALLAGHER & L. HELLMAN: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 14, 1971.
- 18) SPIES, H. G., R. L. NORMAN & A. E. BUHL:

- Endocrinology*, **105**, 1361, 1979. **81**, 135, 1979.
19) FULKERSON, W. J. & B. Y. TANG: *J. Endocrinol.*, 20) GARRIS, D. R.: *Acta endocr.*, **90**, 692, 1979.

Summary

Plasma cortisol and corticosterone were measured by competitive protein binding assay in 8 normal dogs. Blood was collected from the dogs by venipuncture at intervals of 2 hours throughout 24 hours period.

Resting plasma cortisol concentrations averaged 14.4 ± 1.0 (SE) ng/ml and ranged from 3.3 to 43.4 ng/ml. Resting plasma corticosterone concentrations averaged 4.7 ± 0.3 (SE) ng/ml and ranged from 1.2 to 11.1 ng/ml. Of 79 plasma samples, 95% contained less than 36 ng of cortisol/ml amount and less than 10 ng of corticosterone/ml. Episodic blood cortisol and corticosterone patterns were obtained as reported in the human, monkey, and cow. Circadian rhythm of cortisol secretion was found with the acrophase around 8:00-9:00 AM and the trough around 5:00 AM, while daily variation of corticosterone was obscure.