〔シンポジウム〕

2-vi. 甲状腺ホルモンの薄層クロマトグラフィー*

桜 田 俊 郎**

I. 緒 言

甲状腺ホルモンの TLC については、1963 年に Schneider¹⁾ ら及び Hollingsworth²⁾ らが、また 1965 年には、Gries³⁾ らが報告している。しかしながら彼らの方法では、iodotyrosine と indothyronine を同時にかつ明瞭に分離するまでにはいたっていない¹⁾。また展開時間が長く、TLC の利点を生かしていない^{2,3)}。しかも三者とも、血中に存在する無機ヨードについては分離を試みていない¹⁻³⁾。

我々は、彼らとは全く別個に、無機ヨードを含む、人の血中ヨード化合物の分離・定性法を考案し、すでに昨年来、日本生化学会東北部会及び日本内分泌学会総会において報告して来たが⁴⁻⁷⁾、更にその後、その定量化についても基礎実験を行ない、ほぼ満足すべき結果を得たので、さきの定性法にあわせて報告する。

II. 実験方法ならびに実験結果

1. TLC によるヨード化合物純品の分離

標準試料としては、Nutritional Biochemical Corporation (U.S.A.) 製の 3-monoiodotyrosine (MIT), 3,5-diiodo-L-tyrosine (DIT), 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T_3) 及び L-thyroxine (T_4) を ethanol-2N ammonia (1:1) に 1 mM になる様に溶解し、無機ヨード (I^-) は 100 $\mu\text{g/ml}$ になる様に再蒸留水に溶き、密栓して氷室保存し、必要にさいして、ヨード化合物は ethanol-2N ammonia (1:1) に、無機ヨードは再蒸留水に希釈して使用した。

吸着剤には Kieselguhr G (Merck 製) を用いた。すなわちこれに 10% 塩酸を加えて攪拌しながら、約 1 時間煮沸したのちに吸引ろ過し、これを更に 2 回繰返し、次いで残った Kieselguhr G に再蒸留水を注ぎながら吸引ろ過し、pH 試験紙で中性になったことを確かめてから、100°C で 12 時間乾燥させて保存した。この塩酸による洗滌操作は、後に行なうヨード定量に用いる亜砒酸・セリウム系の反応を塩酸可溶性物質が妨害するので、これをあらかじめ除去するために行なったものである。

薄層の作成には、以上の様な処理をした Kieselguhr G の 50 g を用い、これに再蒸留水 75 cc を加えて乳鉢中で良く攪拌して、Desaga 社製の applicator の中へ移した。この際、binder は塩酸による洗滌操作によりすでに除去してあるので、急いで applicator に移す必要はなく、攪拌の際に生じやすい小水泡がなくなるまで充分に攪拌して、これにより均一な薄層を得ることが出来る。

使用したガラス板は、20×10 cm 及び 20×5 cm で、重クロム酸カリウム液、次いで再蒸留水で洗って乾燥させたのち保存したものである。

薄層の厚さは、経験的に 0.75 mm とし、一晚室温に放置して乾燥したのち、辺縁から 5 mm だけ薄層を除去し、水蒸気飽和のガラス容器中に保存し、使用時にとり出した。

実験に用いられた純品のうち、有機ヨード化合物及びそれらの混合物は 1 m μ mole を、無機ヨードは 0.5 μg をそれぞれドライヤーで乾かしながら spot した。

展開溶媒は、32°C に保った chloroform 70 cc と n-butanol 40 cc 及び濃 ammonia 10 cc を振盪混和し、32°C で 12 時間放置した下層を用いた。これを 22×23×7 cm の展開槽の中に入れ、更に同じ槽に濃 ammonia を入れたビーカーを入れて、スリ合わせのガラスで槽にふたをした。なお、chloroform と n-butanol は、どちらも特級品をさらに精製したものである。

展開溶媒で展開槽の中が飽和するには、約 20 分を要した。また、展開槽は 32°C の恒温箱中に置いた。展開は 32°C のもとで、上昇法で行ない、展開距離は 18 cm、展開時間は約 45 分であった。展開後の発色は、Gmelin の ferrichloride ferricyanide arsenic acid 法⁸⁾ によった。この方法によれば、ヨード化合物は黄色地に青緑色の spot として呈色する。

以上の条件で、ヨード化合物を展開したところ、図 1 のごとく、solvent front から origin にむけて、 I^- , T_3 , T_4 , MIT 及び DIT の順に互に明瞭に分離され、tailing はみられず、Rf 値は、 I^- 0.81, MIT 0.16, DIT 0.09, T_3 0.57 及び T_4 0.36 であった。

* Analysis of thyroid hormones by thin layer chromatography

** Toshiro Sakurada 東北大学医学部鳥飼内科

図1 ヨード化合物の純品のTLC

I⁻無機ヨード, M 3-monoiodotyrosine, D 3,5-diiodo-*l*-tyrosine, T₃ 3,5,3'-triiodo-*l*-thyronine, T₄ *l*-thyroxine 及び MX 各純品の混合液

吸着剤 Kieselguhr G (Merck), 溶媒系 *n*-butanol-chloroform (4:7)-ammonia 飽和 (ammonia 蒸気中)-32°C

また検出上の感度についても、ペーパーフロマトグラフィでは、たとえば T₄ では、0.2 μg が限界である⁹⁾ に対し、我々の方法では、0.08 μg でも充分に確認することが出来た。

2. 人血中よりの甲状腺ホルモンの抽出及び分離

抽出方法は、Block 法の田中氏による変法^{9,10)} によった。

その概略をのべると、人の血漿 20ml に 1mg の methylthiouracil を投入し、1N 硫酸で pH を 2~4 とした。次いで、3 倍量の *n*-butanol を加え、振盪後遠沈し、上清の *n*-butanol 層を別々の容器に分離し、さらに沈渣には 2 倍量の *n*-butanol を加え、ガラス棒で攪拌後遠沈して上清を分離した。同じ操作を更に 1 回行ない、この 3 回の抽出により得られた上清の *n*-butanol 層を集め、これに 1N ammonia を加えて、pH 8-9 としたのち、減圧乾燥器で、約半量になるまで濃縮した。この時、硫酸アンモニウムその他の塩類が沈澱して来るのでこれらを浚別

し、浚液を 1ml 以下に減圧濃縮後 20ml の *n*-butanol-chloroform (1:3) に溶解し、浚液から 30ml の 1N ammonia で 3 回逆抽出した、抽出の都度遠心して ammonia 層を分離し、これらを集めて減圧乾固し、残渣を 0.4ml の ethanol-2N ammonia (9:1) にとかし、薄層に 10~20 μl ずつ spot した。

なお、以上の操作に使用したガラス器具はいずれもあらかじめシリコーン処理をしたものである。

順序として、まず純品を血清に混入して抽出操作を行ない、これを薄層に展開してその呈色状態を見た。

正常人の血漿 20ml に、純品試料として有機ヨード化合物は各々 1 μmole を、また無機ヨードは 100 μg を加え、その後抽出し展開したところ、純品溶液について行なった場合と同様に、明瞭に分離した spot を得ることが出来た。

このようにして得た呈色物質が、果して甲状腺ホルモンの相当しているか否かを確かめるために、甲状腺機能亢進症患者に、治療量の ¹³¹I を服用せしめて 24 時間後に採血し、その血漿より上記の如く、*n*-butanol 抽出を

図2 治療量の ¹³¹I を服用した甲状腺機能亢進症患者の血漿より抽出したヨード化合物の TLC のラジオオートグラム

感光した spot は、上から I⁻, T₃ 及び T₄ に相当する。

行なった。この抽出物にさらにヨード化合物の純品溶液を加えて展開し発色させた後、ガラス板と同じ大きさのX-線フィルムを合わせ、ラジオオートグラムを作成した。その結果、図2の如く、呈色部分に一致して感光していることが認められ、呈色した spot が明らかにヨード化合物に相当することが確かめられた。

3. TLC 上における純品の回収率

回収率の検討に当っては Abbott 社製の ^{131}I を標識した T_4 , T_3 , DIT 及び MIT を使用し、放射能は well type の scintillation counter で測定した。

まず、これらの ^{131}I -標識ヨード化合物の純度を薄層に展開して調べたところ、入手直後で MIT 89%, DIT 94%, T_3 87% および T_4 86% であり、従来報告されているペーパークロマトグラフィーによる値⁹⁾ とほぼ一致した。

次に展開操作及びドライヤーによる乾燥操作は、いずれもヨード化合物の損失をまねかないことを確かめた。

さらに、これらの ^{131}I -標識ヨード化合物を単に薄層に spot しただけの場合、及びこれらを展開した場合のおのおのにつき、ヨード化合物の発色部分の薄層をスパーテルで注意深くかきとり、これに 2N 塩酸飽和 *n*-butanol の 30 ml を加え、39°C で 2 時間加温した後、振盪、遠沈することにより、各ヨード化合物を抽出した。これを減圧乾固した後、2N 塩酸-ethanol (1:9) の 4 ml に溶きその回収率を調べたところ MIT 92%, DIT 93%, T_3 90% 及び T_4 92% と満足すべき結果を得た。

4. 純品の定量

まず、 T_3 及び T_4 の 2N ammonia-ethanol (1:1) 溶液を用い、これらの 0.2~3.0 μmole を展開し、この際同時にその両側に展開した guiding spot を目印にして、スパーテルで注意深くかきとった。これに、30 ml の 2N 塩酸飽和 *n*-butanol を加えて 39°C で 2 時間加温した後、振盪、遠沈して得た上清を減圧乾固し、次いでこれを 2N 塩酸-ethanol (1:9) の 4 ml に溶解し、さらに 7N・硫酸の 2 ml と再蒸留水 3 ml を加え、この 4 ml を Leitz 製光電比色計用セルにとり、0.1 N・亜硫酸ソーダを 0.5 ml 加えて、39°C の恒温槽中で 10 分間加温した。その後、同じく 39°C に温めた 0.02N 硫酸アンモニウム・第 2 セリウム液 (Fredrick Smith 社製, U.S.A.) の 1 ml を加え、39°C 15 分後の透過率をフィルター 415 μ で測定した。透過率から求めた吸光度を片対数グラフの縦軸にとり、 T_4 及び T_3 の量を横軸にとると図 3, 4 のごとく、両者の間に直線関係が成立することが認められた。

以上の成績から、TLC によるヨード化合物の定量は可能であると考えられた。

図3 吸光度と T_4 量の関係

図4 吸光度と T_3 量の関係

5. 血漿中よりのヨード化合物の抽出率

^{131}I 標識ヨード化合物を血漿に加えて、最初は、前述の Block 法の田中氏による変法^{9,10)} で抽出を試みた。しかし、結果は表1の如くで、その最終の抽出率は必ずし

表1 血漿添加 ^{131}I -標識ヨード化合物の抽出率(%)
(Block 法の田中氏による変法による)

抽出操作	純品	MIT	DIT	T_3	T_4
3 倍量 <i>n</i> -BuOH 抽出		65	84	82	80
同上 + 2 倍量 <i>n</i> -BuOH 抽出		88	94	88	84
同上 + 2 倍量 <i>n</i> -BuOH 抽出		92	97	90	90
<i>n</i> -BuOH- CHCl_3 溶解・汙過		50	57	60	60
1N NH_4OH 逆抽出		44	46	54	53
同上 + 1N NH_4OH 逆抽出		46	49	55	56
同上 + 1N NH_4OH 逆抽出		46	49	55	56
EtOH-2N NH_4OH 溶解		41	42	52	39

も良好とはいえなかった。そこで抽出操作のどの段階における損失が多いかを吟味した。その結果、アルカリ性にした *n*-butanol 抽出液を濃縮して、2 度目に汙過する際に、大量のヨード化合物が汙紙に吸着されることが判明した。このことは、汙紙の方をも count することによって明らかとなった。そこで 2 度目の濃縮に際し、1 ml にまで濃縮されるのをまたず、約 3 ml になったところで汙過することにした。その結果、塩類はこの程度の濃縮でも充分に汙過出来ることが確かめられた。また、1N ammonia での逆抽出は、2 回で充分であることも確かめられた。

また抽出率は、表2に示すごとく、MIT及びDITに

表2 血漿添加¹³¹I-標識ヨード化合物の抽出率(%)
(Block法の田中氏による変法による)

抽出操作	純品 Carrier		MIT		DIT		T ₃		T ₄	
	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり	なし	あり
3倍量 n-BuOH 抽出	66	70	81	84	83	83	81	84		
同上+2倍量 n-BuOH 抽出	85	86	96	97	89	92	87	87		
同上+2倍量 n-BuOH 抽出	87	88	97	98	92	98	90	94		
n-BuOH-CHCl ₃ 溶解 戸過	83	85	76	78	84	94	90	90		
IN・NH ₄ OH 逆抽出	75	77	74	73	74	85	70	83		
同上+IN・NH ₄ OH 逆抽出	81	82	76	77	78	93	77	87		
EtOH-2N・NH ₄ OH 溶解	75	77	62	65	73	79	63	65		

関して従来の報告よりも良好な成績を示し、T₃及びT₄に関しても、ほぼ満足するにたる成績が得られた。

III. 結 語

1. 我々の考案した無機ヨードを含む甲状腺ホルモンのTLCによる分離、定性法について述べた。
2. Kieselguhr G (Merck) には、甲状腺ホルモンの定量試験に用いられる、亜砒酸・セリウム系の反応を妨害する物質があるので、あらかじめ10%塩酸により洗滌して、これを除去する必要があることを述べた。
3. TLCによる甲状腺ホルモンの回収率は、約92%であることを確かめた。

4. 人血漿よりの甲状腺ホルモンの抽出法について検討し、MIT 75% 及び DIT 62% と上昇させ、T₃ 及び T₄ についても、ほぼ満足すべき率を得た。

5. セリウム・亜砒酸反応系を応用して、TLC による甲状腺ホルモンの定量が可能なることを確かめた。

終りに、本シンポジウムに参加の機会を与えられた三輪清三会長、又、御指導をいただいた、恩師、鳥飼竜生教授に心から感謝する。尚、実験に関し御助言をいただいた東北大学・薬学部、奥井誠一教授に感謝する。

協同研究者：斉藤慎太郎、石垣十一郎、長沢純一郎

文 献

- 1) Schneider, G & Schneider, L. : Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **332**, 316, 1963
- 2) Hollingsworth, D. R., Dillard, M. & Bondy, P. K. : J. Lab. clin. Med., **62**, 346, 1963
- 3) Gries, G., Pfeffer, K. H. & Zappi, E. J. : Klin. Wschr., **43**, 515, 1965
- 4) 桜田俊郎, 鳥飼竜生 : 生化学, **36**, 212, 1964
- 5) 桜田俊郎, 斉藤慎太郎, 石垣十一郎 : 日内分泌誌, **40**, 566, 1964
- 6) 桜田俊郎, 斉藤慎太郎, 石垣十一郎, 長沢純一郎 : 日内分泌誌, **41**, 381, 1965
- 7) Sakurada, T. : Tohoku J. exp. Med., **85**, 365, 1965
- 8) Gmelin, R. & Virtanan, A. I. : Acta chem. scand., **13**, 1469, 1959
- 9) 田中 茂 : ホルモンと臨床 **10**, 57, 1962
- 10) Block, R. J., Werner, S. C., and Mandl, R. H. : Arch. Biochem. & Biophys., **73**, 9, 1958