

高血圧症患者血漿中に増量せる 水・脂溶性分割の解析

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

安 川 榮 一

Eiichi Yasukawa

(昭和30年2月19日受付)

緒 言

前報¹⁾²⁾において著者は本態性高血圧症患者血漿のアルコール除蛋白濾液を一旦乾燥し、アセトンに転溶、燐脂質除去を行い、更にクロロホルムに收容し、これより水抽出を行える分割中の過ヨード酸によるフォルマリン生成量並びに還元量が健康者のそれに比し頗る増加せることを報じた。この際既知の水溶性コルチコイドの如きは同じくフォルマリン生成物質に属し、同時に還元力を有するが、前記の抽出においてなおクロロホルム中に存在して、水に移行することが殆んどない。而して量的には前記クロロホルム水抽出液中のフォルマリン生成量並びに還元量は、これを仮にコルチコイズに換算する場合、健康者血漿中において既に眞のコルチコイズ分割におけるその量に比し甚だ多量であ

る。

然らば本態性高血圧症患者血漿中において増量せる物質の本態は一体何であろうか。又これより先に健康者血漿に関し当該分割中に移行する物質に何が存するかということが究明せられねばならぬ。これに関する研究は目下日月等によつて進められているが、僅かにその一端として著者が解析を進めた所では、下に説明せる如く、フォルマリン生成物質と還元性物質とは夫々異なるものが存し、後者も亦単一でなく、数種より成ることが窺われ、従つて高血圧患者において増量せるものは、フォルマリン生成物質並びに還元性物質の両者共に属することが知られた。以下その次第を述べる。

実 験

A) 血漿クロロホルムエキス・水抽出分割の作製

〔試 薬〕

1) アルコール 局方アルコールを脱アルデヒドする。即ちアルコール1立につき50%苛性曹達溶液5cc及び亜鉛末5gを加え1/2時間還流冷却器を附して煮沸後、蒸溜する。

2) アセトン 純品。

3) 塩化マグネシウム アルコール飽和溶液。

4) クロロホルム 1級クロロホルムを1/5量のN/10過マンガン酸加里溶液にて洗滌すること3回、後蒸溜

水で数回洗滌、蒸溜、芒硝で脱水する。

〔実 施〕

健康人並びに高血圧患者肘静脈より採取せる血液20ccに3.8%チトラート1ccを加え遠心して血漿を分離する。上記血漿10ccを40ccのアルコール中に滴下、良く混じて後遠心し、上清を分ち、沈渣物に10ccのアルコールを加え、攪拌、濾過して濾液を前記上清に合する。同抽出液を約50°Cで減圧蒸溜し、その乾固物をアセトン約15ccにより抽出し、これに飽和塩化マグネシウム液10滴滴下混和し、0°C、30分放置後遠心して上清を取り、減圧蒸溜する。次いで残渣をクロ

ロホルムに溶解，芒硝にて脱水する。このクロロホルム抽出液を共栓付遠心管に收容し，蒸留水 5cc，2回加えてよく振盪，目的のクロロホルム・水エキス分劃を得る。

B) 前記エキスに関するクロマトグラフィー [I]

実験方法

1) クロマトグラフィー

[試薬]

1) アルコール 局方アルコールを脱アルデヒドする。即ちアルコール 1 立につき 50%苛性曹達溶液 5cc 及び亜鉛末 5g を加え 1/2 時間還流冷却器を附して煮沸後，蒸溜する。

2) クロロホルム 精製は実験 A) 試薬 4) と同様。

3) アルミナ 武田社製クロマトグラフ用活性アルミナ。

[器具]

1) クロマト用ガラス円柱 径 8mm，長さ 15cm。

2) 二連球 加圧に用いる。

[実施]

血漿 10cc より作成した前記水エキス 10cc につき 予めその一部を採り，同エキスのフォルマリン生成物質総量並びに還元物質総量を予め測定する。然る後残余を 50°C にて真空蒸溜，乾燥し（但しそのまま煮沸するも測定には殆んど影響せず，改めてアルコール 1cc に溶解する。次いでアルコールで湿したアルミナ 4g を收容せるガラス円柱へ前記アルコール溶液を注入する。以後下記溶媒をその順序に 4cc ずつ前溶媒の略々流出した頃に注入，二連球にて僅かに加圧し流下せしめた。

- (1) アルコール
- (2) 5%クロロホルム・アルコール
- (3) 同上
- (4) 10%クロロホルム・アルコール
- (5) 同上
- (6) 同上
- (7) 20%クロロホルム・アルコール
- (8) 同上
- (9) 同上
- (10) クロロホルム

即ち上記溶出液を夫々 10本の試験管に收容し，そのいずれについてもフォルマリン生成能並びに還元力を測定した。

斯くて溶出を終りたる後，アルミナを掻き出して，これが水エキスを作成，本エキスについても亦そのフォルマリン生成能，並びに還元能を定量した。

2) フォルマリン生成物質測定方法

[試薬]

1) 過ヨード酸試薬 過沃度加里 690mg を 0.25 mol 硫酸 100cc に溶解せしめる。

2) 塩化錫試薬 塩化錫 280mg を 2.0cc の発煙塩酸にて加温溶解，蒸留水 8cc を加える。

3) 3mol 硫酸。

4) クロモトロブ酸試薬 クロモトロブ酸 150mg を蒸留水 2cc に溶解し，濃硫酸を加えて 50cc とする。

[実施]

上述の各エキスを煮沸乾固し，水 4cc に溶解せしめたる後，過沃度酸試薬 0.5cc を加え，30分間 25±1°C の水浴中に保ち酸化を行い，塩化錫試薬 0.5cc を加えて酸化を止めた後小蒸溜フラスコに移す。酸化に用いた試験管を 3mol 硫酸 0.5cc，蒸留水 0.5cc にて洗い，蒸溜フラスコに投ずる。他方目盛付試験管にクロモトロブ試薬 3cc を容れた所へ蒸溜をし，7cc 逆行う。次いでこの試験管を 100°C の重湯煎に 30分収め，冷却後比色計にて測定する。フィルターは YB (570 mμ) キョベットは 7cc 用。標準液としては Hydrocortisone (Merck) を用い，吸光係数 242 を得た。而して血漿 100cc 中のフォルマリン生成物質 (F.S.) 量の算出は次式によつた。

$$F.S. (\gamma/dl) = K \times A \times a \times 10 \times c$$

K : 吸光係数 (242)

A : 測定液の吸光度

a : 測定液の補正 (一部採取による)

c : 血液に加えたチトラートの補正

3) 還元性物質測定方法

[試薬]

1) 50%アルコール

2) 2%炭酸ソーダ水溶液

3) 0.2%フェリチアン加里液

4) 塩化第二鉄試薬 3%錯酸水溶液に塩化第二鉄 0.2%含有する。

[実施]

上述の各エキスを煮沸乾固し，50%アルコール 1cc に溶解せしめ，0.2%フェリチアン加里液，2%炭酸ソーダ夫々 0.5cc 加え，重湯煎中の 10分間加熱，急冷後塩化第二鉄試薬 0.5cc を加え，15分間 20±1°C 放置後全量 7cc とし，発生した伯林青を比色定量する。こ

の場合フィルターはR, セルは7ccのものを使用した。標準液としては Hydrocortisone (Merck) を用い、吸吸係数 80 を得た。血漿 100cc 中の還元物質(R.S.) 算定は次式によつた。

$$R.S. (\gamma/dl) = K \times A \times a \times 10 \times c$$

- K : 吸光係数 (80)
 A : 測定液の吸光度
 a : 測定液の補正 (一部採取による)
 c : 血液に加えたチトラートの補正

実験成績

健康人 4 例, 本態性高血圧症患者 4 例につき実験を行い, 表 I, 表 II に見る如き成績を得た。

先ずフォルマリン生成物質 (F.S.) について見るに, 健康人血漿ではクロロホルム・アルコールにて溶出し得るものは皆無, 高血圧者血漿ではその或者において全フォルマリン生成物質量の 10% 許りを検出し得た。而うして最後にアルミナを水で洗滌した抽出液中に殆んどその全量を検出し得た。

クロロホルム・アルコール 溶出液中に何らその移行を見なかつた場合でも, クロマト施行後幾分の損失が見られたことは余分の操作が加わつた, ためであろう。

なお本実験成績において, 健康人血漿, 高血圧者のそれとに関し F.S. 総量を比較するに, 健康人では 640, 752 γ /dl なる値が得られたに比し, 後者では夫々 1050, 1580 γ /dl なる値を示し, 明らかにその増量を見ることは著者の前報に記載するに全く一致する。

次いで還元物質 (R.S.) について見るに, これはフォルマリン生成物質と全く対蹠的關係を示し, その大部分はクロロホルム・アルコール溶出割合に見られる。即ち健康人 1), 2), 高血圧患者 1), 2) における如く, クロマトグラム作製前の値が夫々 220, 650, 945, 592 γ /dl なるに対し, 溶出分全量として夫々 105, 480, 650, 480 γ /dl なる値が得られ, 10~20% 内外の還元物質がアルミナ柱に残る如くである。

而も溶出に際し, 前記の如くこれを 10 割分に分つて観察する所では, その健康人と高血圧患者を問わず 3 若しくは 4 の夫々別種の物質より成るが如くである。なお還元物質総量を健康人と高血圧患者とに分つて比較するに, 後者において稍々増量を示すことはこれ又著者の前報に記載することに合致する。例えば健康人の夫々 220, 650, 215, 510 γ /dl は, 高血圧患者の 945, 592, 755, 629 γ /dl に比し, その値は明らかに低い。しかし乍ら高血圧患者におけるその増量は上記に分たれたる 3 乃至 4 物質の何れか特定の分割に相当するが如き關係は未だ認められない。

C) 前記水エキスに関するクロマトグラフィー〔II〕

溶出方法を変更して次の如くにも試みた。夫々の溶出物に関する測定法は前述と異なることなきを以てこれを繰返し記載することを止める。

実験方法

同じく血漿 10cc より作製せられた水エキスを一旦蒸発乾固して, アルコール 1cc に收容しクロマト柱を通す (径 8mm のガラス柱にアルミナ 2g を充填し, 予めアルコールにて湿す)。斯くて該物質をアルミナに吸着せしめたる後, 先ずアルコール 30cc, 次いで 30cc の 5% メタノール・クロロホルムにて溶出し, 最後に水 30 乃至 50cc を以て何回も洗滌を行つた。而して夫々の溶出物につきフォルマリン生成能及び還元能を測定した。

実験成績

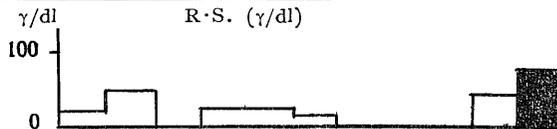
本態性高血圧症患者 2 例につき実験を行い, 第 III 表に見るが如き成績を得た。

先ずフォルマリン生成物質 (F.S.) についてはクロマトグラフィー〔I〕と同様水抽出分に大量の F.S. の出現を見る。即ちクロマトグラム作製前夫々 1108, 1033 γ /dl なるに対し, 水性エキス中には夫々 856, 831 γ /dl で全量の略 80% の高率に達した。而してアルコール, 5% メタノール・クロロホルム 溶出分には夫々僅少の F.S. を見るのみであつた。

第I表 健康人血漿中脂溶性分割のクロマトグラフィー (I)

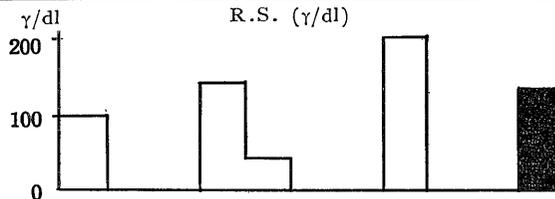
1) M. K. ♀ 33歳

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマトグラム 作製前総量
R.S. γ /dl	20	50	0	25	25	15	0	0	0	40	70	175	220
F.S. γ /dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	539	539	640



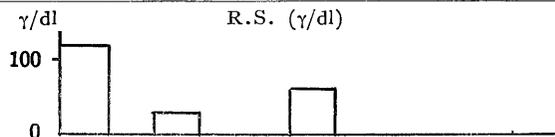
2) E. I. ♂ 44歳

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマトグラム 作製前総量
R.S. γ /dl	100	0	0	140	40	0	0	200	0	0	83	563	650
F.S. γ /dl	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	720	720	752



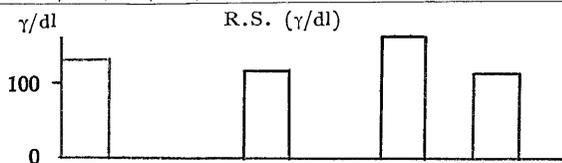
3) S. I. ♀ 24歳

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマトグラム 作製前総量
R.S. γ /dl	120	0	30	0	0	65	0	0	0	0	/	215	/



4) T. K. ♂ 34歳

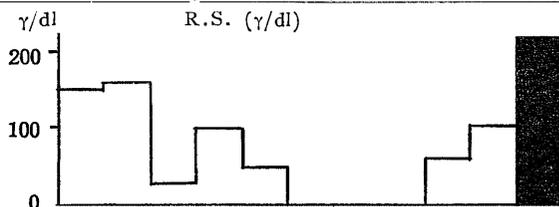
分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマトグラム 作製前総量
R.S. γ /dl	130	0	0	0	110	0	0	160	0	110	/	510	/



第II表 高血圧患者血漿中水脂溶性分割のクロマトグラフィー (I)

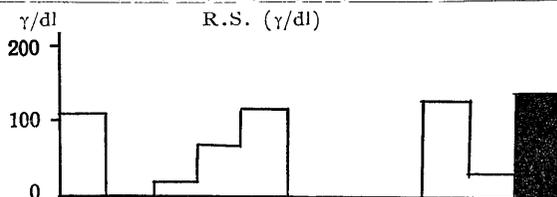
1) K. T. ♀ 51歳 血圧 max. 240 mmHg~min. 100 mmHg

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマト前総量
R.S. γ /dl	150	160	30	100	50	0	0	0	60	100	220	870	945
F.S. γ /dl	80	20	0	0	0	0	0	0	0	0	840	940	1050



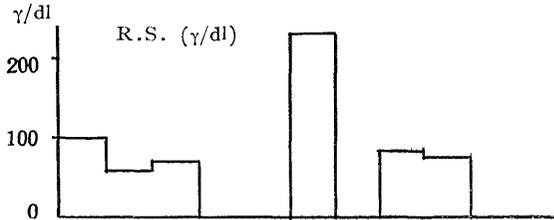
2) H. O. ♂ 64歳 血圧 max. 210 mmHg~min. 100 mmHg

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマト前総量
R.S. γ dl	110	0	20	70	120	0	0	0	120	30	140	620	592
F.S. γ /dl	60	0	0	60	0	0	0	0	40	0	1310	1470	1580



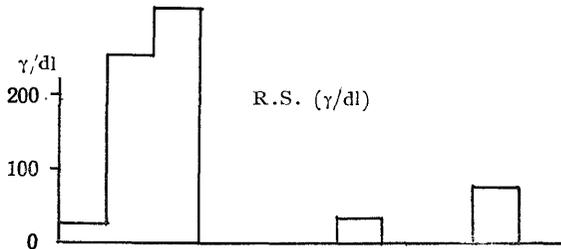
3) K. K. ♀ 51歳 血圧 max. 200 mmHg~min. 130 mmHg

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマト前総量
R.S. γ /dl	100	60	70	0	0	240	0	78	75	0	/	629	/



4) K. T. ♂ 42歳 血圧 max. 185 mmHg~min. 95 mmHg

分割 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	水	計	クロマト前総量
R.S. γ /dl	25	250	310	0	0	0	35	0	0	75	/	755	/



又還元物質量について見るに、総量夫々 465, 516 γ /dl 中アルコール溶出分には 315, 384 γ /dl とその%を上廻る量を回収した。而して5%メタノール・クロロホルム 溶出分にはこれを見ること皆無、漸く最後に水を以て夫々 150, 132 γ /dl を回収し、全量の約1/3に達した

斯くて本溶出法においても又大部分の還元物質をフォルマリン生成物質と引き離すことができ、最後にクロマト柱を水を以て充分に洗滌を行える際、その中にフォルマリン生成物質の略々全量を収め得た。但し後者中に全還元物質の約1/3がなお存したので、フォルマリン生成物質がなお且つ還元力を有するものか、或いはこれ

又幾つかの物質に分たれるものか、その点は未だ定かにし得ない。

D) 分光化学的検討

以上の如く目標とする水・脂溶性分割のクロマトグラム作製により更にそれが幾らかの物質に分かれることが明らかになったので、次いで夫々の溶出液につき行つた紫外部における吸収曲線を検討する。但しこれらはB項記載健康人の1例、高血圧者の1例、並びにC項記載高血圧者2例につき、或いはクロマトグラム作製前の、又或いはクロマトグラム作製後の溶出液について、夫々のフォルマリン生成能、還元能を測定するに先立つて吸収曲線作製を行つたもの

である。分光光度計は島津製 QB-50 型光電分光光度計を用いた。

実験成績

便宜上クロロホルム・水抽出分割 (血漿 10cc より作製を乾固, 再びアルコール (2.0cc) に收容したる後, これをアルミナ柱 (径 8mm, アルミナ 2g) を通して吸着せしめ, 先ず最初にアルコール (30cc) をもつて溶出し, 次いで 5%メタノール・クロロホルム (20cc) をもつて処理, 最後にアルミナに吸着せられたものを水に溶解せしめたる夫々について紫外部の吸収を検討せるに, 第 IV 図 a) b) 共に示すように, 最初のアルコール溶出液に, 恰もコルチコイズにおける如く $240m\mu$ にピークを有する吸収曲線が得られたることは特筆に値する。メタノール・クロロホルム溶出液中に何ら還元性を示すもの

はなく, 且つフォルマリン生成も殆んど行われなかつたことは, C) 項クロマトグラフィー (II) (III表) に示す如くであるが, 又この分割には何ら紫外部吸収を示すものはなかつた。而うして最後の水抽出液の吸収曲線にもこれという特別な特徴が存しなかつた。

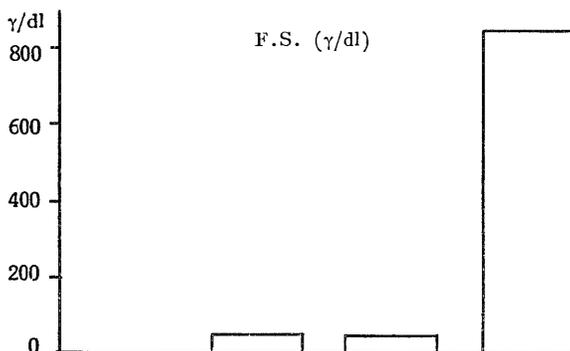
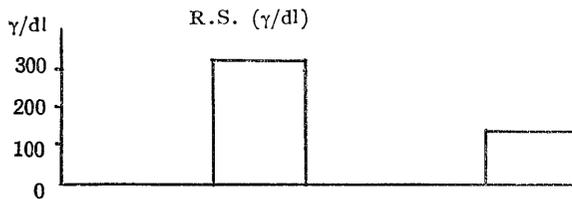
アルコール溶出分割に還元性物質の大半が移行することは, これ又 C) 項に示せる如くであるが, これと $240m\mu$ にピークを示すものが同一物質に属するかどうかは更に次の成績において検討せらるべきである。

即ち第 V 図 a), b) は同様にしてアルミナ柱に吸着せしめたクロロホルム・水分割を最初アルコール, 次いで 5%クロロホルム・アルコール, 更に 10%, 20%クロロホルム・アルコール, 最後にクロロホルムで溶出した 10 分割について

第 III 表 高血圧患者血漿中水・脂溶性分割のクロマトグラフィー (II)

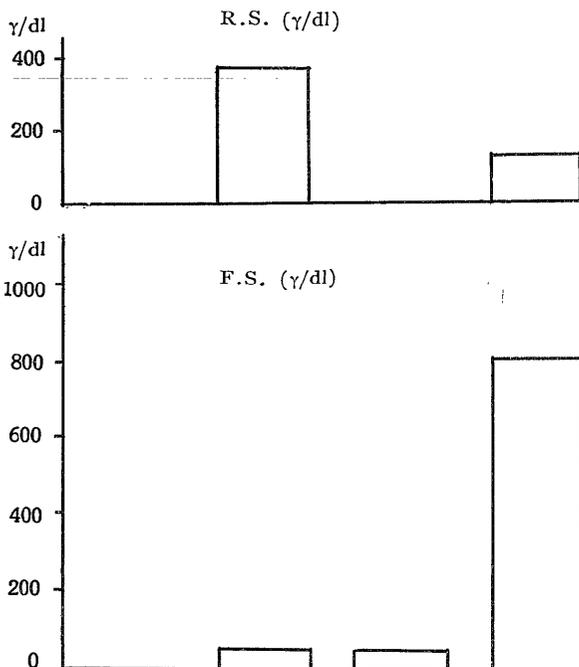
1) K. Y. ♀ 43歳 血圧 max. 190 mmHg~min. 130 mmHg.

分割 物質(γ /dl)	アル コール	5%メタノール・ クロロホルム	水	計	クロマト前総量
R. S.	315	0	150	465	480
F. S.	50	50	856	956	1108



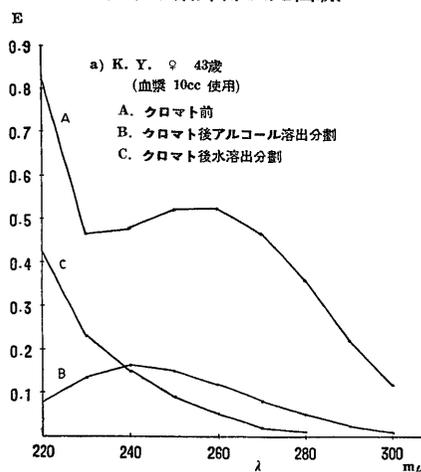
2) I. T. ♀ 55歳 血圧 max. 180 mmHg~min. 110mmHg

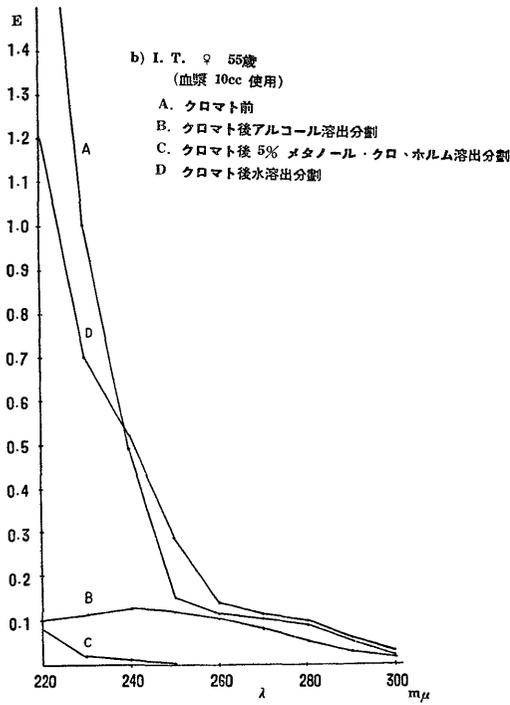
分割 物質(γ/dl)	アル コール	5%メタノール・ クロロホルム	水	計	クロマト前総量
R. S.	384	0	132	516	565
F. S.	45	45	831	921	1033



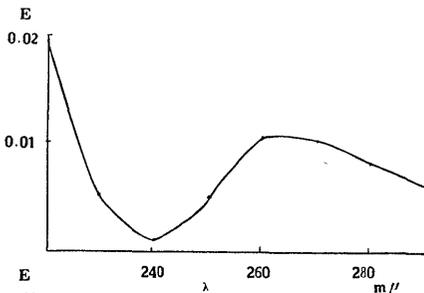
の夫々の紫外外部吸収曲線であるが、今各分割の還元量と 240m μ におけるピークの有無、及びその吸光量とは必ずしも一致せず、即ち同波長にピークを有する物質は何ら還元性を呈することを要しないことがここに示されている。兎も角本実験においても、10分割の何れかに240m μ にピークを示すものがあつたことは前実験同様で、これを要するに、クロロホルム・水抽出液中のフォルマリン生成物質が何に属するやは未だ明瞭でないが、少なくとも還元性物質と上の如く行動を共にするものの中に、或いはコルチコイズと何らかの関係を有するものがありはしないかということが考慮せられるのである。

第IV図 高血圧患者血漿中水・脂溶性分割のクロマトグラフィー前後における紫外外部吸光曲線

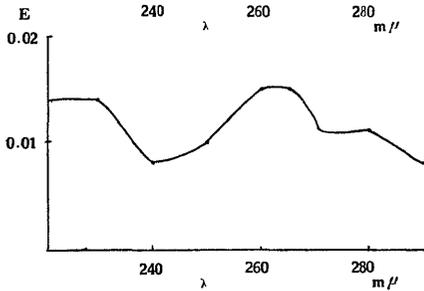




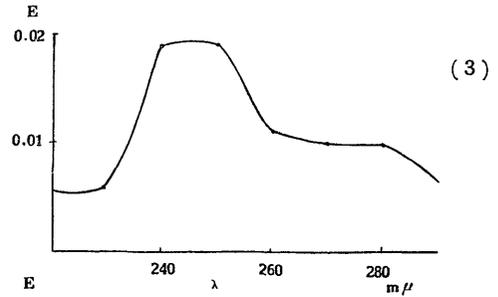
第V図 (a) 健常者(E. I. ♂ 44歳)
血漿中水・脂溶性分割のクロマト
グラフィー・クロロホルム・アルコ
ール溶出10分割の紫外部吸光曲線



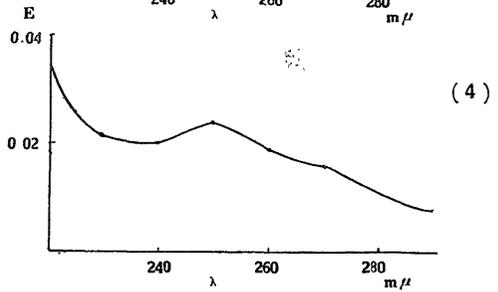
(1)



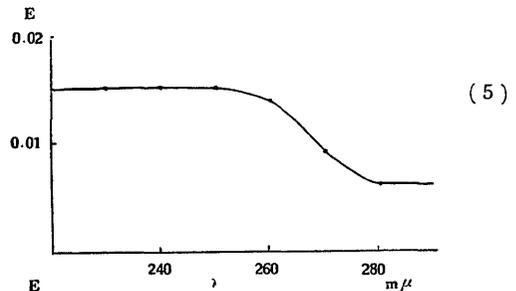
(2)



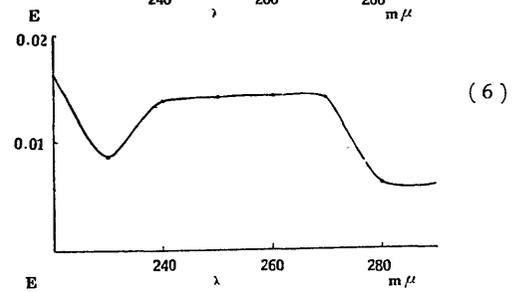
(3)



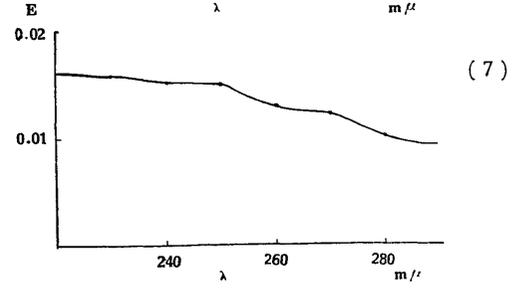
(4)



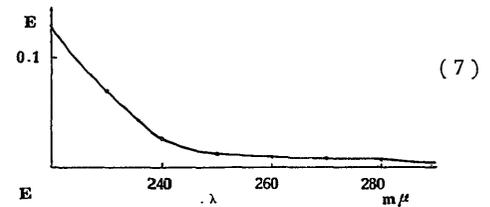
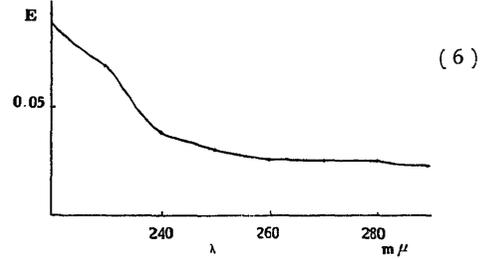
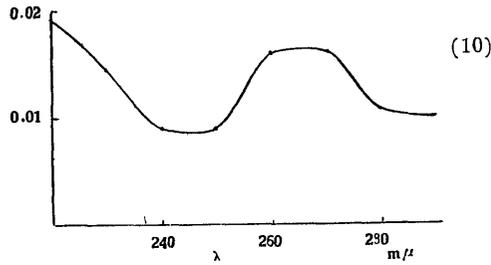
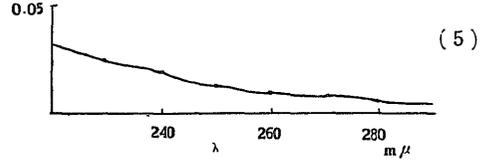
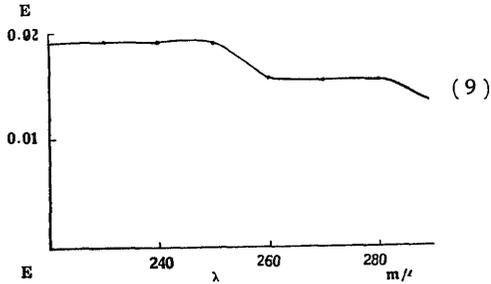
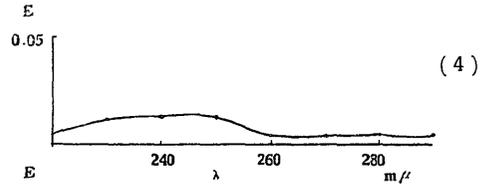
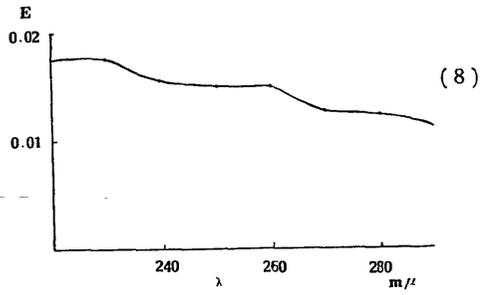
(5)



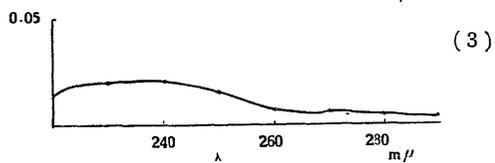
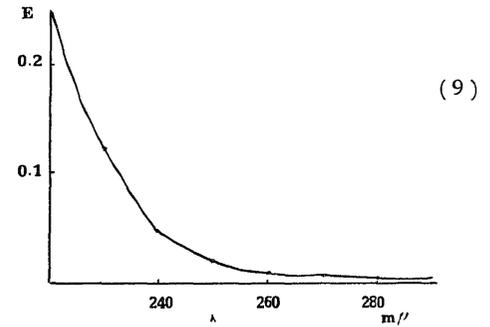
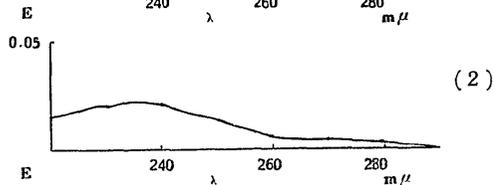
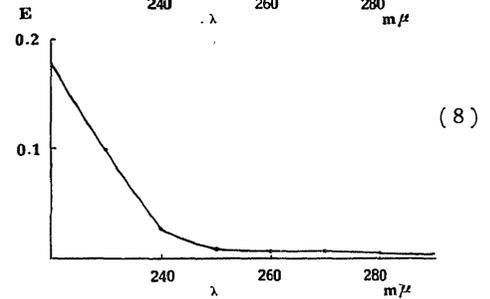
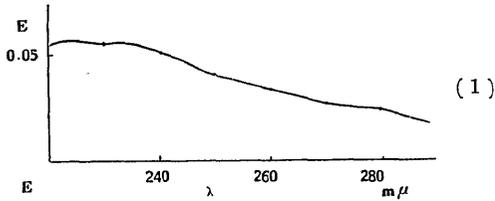
(6)

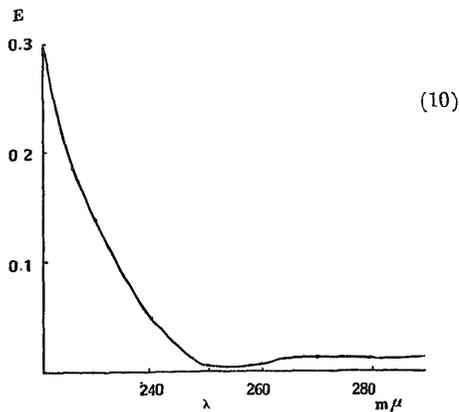


(7)



第V図 (b) 高血圧患者(K.T. ♀. 51歳)
血漿中水・脂溶性分割のクロマトグ
ラフイークロロホルム・アルコ
ール溶出10分割の紫外外部吸光曲線





総 括

本態性高血圧症の眞因は勿論今日謎に包まれているが、末梢血管の牽縮を伴うこと、体液学的には Na の停滞を来すこと等が確定せる事実として知られている。後者の鉱質代謝異常に関しては近来所謂ミネラルコルチコイズとの関係が注目せられ、一方過剰の DOCA 投与が実験的に高血圧を招来する所から、本症と副腎皮質との関係は一応無視し能わざるもの如く考えられている。著者はミネラルコルチコイズに関する検索を進めた訳でないが、先に血漿の所謂ヘモコルチコイズ測定に従事し、該当分割の作成と同時に、これが操作過程中に得られるクロロホルム・水抽出分割中酸化によりフォルマリンを生成する物質の量及び還元物質量を測定し、健康人よりも非常に増量せることを報告した。而うして当初目的としたヘモコルチコイズには健康人との間には何らの懸隔を見出さな

結

1. 血漿のアルコール抽出乾燥エキスを一、二の段階を経てクロロホルムに收容し、これより水抽出を行える場合、水エキス中に移行する所謂フォルマリン生成物質乃至還元物質は酸化アルミナ使用のクロマトグラフィーによつて大体相互に分離せられる。いい換えればこの場合は特定物質の両面の性質を示すものでなくて、夫

文

- 1) 安川栄一： 十全医学会雑誌, 56, 193, 1954.
- 2) 安川栄一： 十全医学会雑誌, 56, 722, 1954.

つた。又その後竹田³⁾、織田⁴⁾による研究は、本症患者において血漿中ヒドロコルチゾンの濃度の決して高まりもせねば、又左程低下をも来していないことを明らかにした。

さて然らばその増量を見たクロロホルム・水エキス中のフォルマリン生成能及び還元能は同一物質の楯の両面を見たに過ぎないか、或いは夫々別種の物質に属するのか、これらの件に関し本報告は大体両者夫々別種の物質に属することを明らかにした。而もその還元能を有する物質たるや単一のものでなく恐らく二、三種存することが判明したが、フォルマリン生成物質についてはこれらの点が未だ明らかではない。

又フォルマリン生成物質と共に全還元能保有物質の約三分の一がこれに伴うので、この還元能はフォルマリン生成物質の一部によつて発揮せらるるものか、或いはフォルマリン生成物質の属性に帰せしめるべきものか、或いは又全然別種の物質に属せしめらるべきものか、未だ明らかになし得ないが、兎に角本態性高血圧症において著者の増量を証した所のものは、決して単一でなく、数種の還元性物質の総和であり、加えてフォルマリン生成物質の増加でもあることがここに判明したのである。増量せるフォルマリン生成物質の同定に関しては検討中であるが、還元能を呈する物質の中に光化学的に 240 mμ にピークを示すものがあることは、クロロホルム・水エキス中と雖も、何らかの型のコルチコイズが保有せられているのではなかろうかということが予想せられ、これ又甚だ注目すべきである。

論

々別種の物質に属することが判明した。

2. 而うして本態性高血圧症患者血漿においては、前記水エキス中上述両種の物質夫々の増量を証するものである。

稿を終るに当り、終始御懇切なる御指導と御校閲を辱うした恩師日置教授に深甚の謝意を捧げる。

献

- 3) 竹田亮祐： 内分泌, I, 498, 1954.
- 4) 織田邦夫： 日新医学, 42, 87, 1955.