

# Measurement of 18-Hydroxycortisol by Gas Chromatography Equipped with Single Ion Monitoring; Establishment of the Method and its Clinical Application

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8435">http://hdl.handle.net/2297/8435</a>

## 18-Hydroxycortisol のガスクロマトグラフィ/ シングルイオンモニタリングによる測定法の 確立とその臨床的意義の検討

金沢大学医学部内科学第二講座 (主任: 竹田亮祐教授)

井 城 一 弘

(平成5年2月10日受付)

コルチゾル (cortisol, F) の18位水酸化により生成される 18-hydroxycortisol (18-OH-F) は, 1982年, Chu, Ulick らにより, 原発性アルドステロン症患者の尿中より初めて単離同定された副腎皮質ステロイドである。しかし, 未だ本ステロイドの簡便な測定法はなく, 18-OH-F の生成過程や調節因子, および病態診断上の意義に関しては不明の点が多い。今回著者は, 尿中 18-OH-F のより正確な定量を行うため, ガスクロマトグラフィ/シングルイオンモニタリング (gas chromatography/single ion monitoring, GC/SIM) による測定法を確立し, 高速液体クロマトグラフィーラジオイムノアッセイ (high performance liquid chromatography-radioimmunoassay, HPLC-RIA) による測定と比較検討した。更に, 18-OH-F の分泌の調節因子を明らかにする目的で健常者を対象に塩分制限, およびフロセミド立位負荷を行い, レニン-アンジオテンシン系を賦活した場合の 18-OH-F の変動をアルドステロン, 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) 動態と比較検討した。一方, 原発性アルドステロン症のサブタイプの鑑別に 18-OH-F がマーカーステロイドとなりうる可能性を調べるため, アルドステロン産生腺腫および特発性アルドステロン症患者を対象に 18-OH-F, 18-OH-B, アルドステロン排泄量を測定した。その結果, GC/SIM による 18-OH-F 測定において, 検量線は 2.65nmol から 80.0nmol の範囲で良好な直線性が得られた。測定内誤差は 6% で, 測定間誤差は 11% であった。最小感度は 2.65nmol/50ml 尿であった。健常者における塩分制限により, 尿中 18-OH-F, 18-OH-B, aldosterone (aldo) 排泄は, すべて有意に増加した。この増加は 3 種のコルチコステロイドでほぼ同等であった。健常者におけるフロセミド立位負荷においては, 血中 18-OH-F, aldo は有意に増加したが, 尿中 18-OH-F は有意の変動を示さなかった。この理由としてフロセミド立位負荷によるレニン-アンジオテンシン系への刺激効果の持続が短い為, 18-OH-F の 24 時間排泄量に反映されないものと考えられた。少なくとも血中 18-OH-F, aldo が平行して上昇した成績から, 健常人において 18-OH-F 分泌はレニン-アンジオテンシン系の支配下にあると考えられた。尿中アルドステロン排泄は, アルドステロン産生腺腫において特発性アルドステロン症よりも高値であったが, 有意な差ではなかった。一方, 尿中 18-OH-F, 18-OH-B 排泄量はアルドステロン産生腺腫において特発性アルドステロン症よりも有意に高値であり, 尿中 18-OH-F 排泄量測定は尿中 18-OH-B 排泄量測定と共に, アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症との鑑別に有用と考えられた。

**Key words** aldosterone-producing adenoma, gas chromatography/single ion monitoring, 18-hydroxycorticosterone, 18-hydroxycortisol, high performance liquid chromatography-radioimmunoassay, idiopathic hyperaldosteronism

18-hydroxycortisol (18-OH-F) は, 原発性アルドステロン症患者の尿中に大量に排泄される物質として 1982 年に Chu, Ulick らにより初めて単離同定された<sup>1)</sup>。その後, 副腎腺腫細胞の培養実験により, 18-OH-F は, cortisol (F) を基質として最終的に 18-oxo-F に代謝される事が確認された<sup>2,3)</sup>。18-OH-F の分泌調節因子としては, 副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) が重要な役割を果たしている事が確認されている<sup>4-6)</sup>。一方, 塩分制限では 18-OH-F 分泌が亢進するが, 外因性アンジオテンシン II の投与では 18-OH-F の反応は見られないと報告されている<sup>3,7-9)</sup>。18-OH-F の生物学的活性は, ミネラ

ルコルチコイド活性, グルコルチコイド活性共にほとんどなく, 18-oxo-F についても, ミネラルコルチコイド活性は aldosterone (aldo) の 0.6%, グルコルチコイド活性は F の 3.8% と極めて弱い事が, Gomez-Sanchez らによって確認された<sup>10)</sup>。これらの成績は原発性アルドステロン症の病態成立に 18-OH-F 増加の関与が乏しい事を示唆している。

しかしながら, 近年, アルドステロン産生腺腫の他, デキサメサゾン反応性アルドステロン症 (dexamethasone-suppressible-hyperaldosteronism, DSH) において 18-OH-F の産生亢進が認められ, 本ステロイドは DSH に特異的ステロイドではない

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotrophic hormone; aldo, aldosterone; B, corticosterone; DSA, dexamethasone-suppressible hyperaldosteronism; F, cortisol; GC/SIM, gas chromatography/single ion monitoring; HPLC-RIA, high performance liquid chromatography-radioimmunoassay; 6 $\beta$ -OH-F,

かとの見解が報ぜられている<sup>138)</sup>。一方、特発性アルドステロン症は、原発性アルドステロン症のうち約20-35%を占めるとされているが、両者の術前における鑑別診断は、必ずしも容易でなく、従来、各種既知ステロイドの分泌動態の特性を見いだそうとする試みがなされている。それらの中で特発性アルドステロン症における 18-OH-F 産生量は、アルドステロン産生腺腫や DSH と異なり、正常者と同等であると報告され<sup>39)-12)</sup>、原発性アルドステロン症のサブタイプの鑑別診断のマーカーとして、18-OH-F 測定の有用性が注目されている<sup>39)-11)13)14)</sup>。

以上の知見をふまえ、著者は先ず、尿中 18-OH-F のより正確な定量をおこなうため、ガスクロマトグラフィ/シングルイオンモニタリング (gas chromatography/single ion monitoring, GC/SIM) による測定法を確立し、従来の高速液体クロマトグラフィ-ラジオイムノアッセイ (high performance liquid chromatography, HPLC-RIA) 法<sup>7)15)16)</sup> による測定値と比較検討した。次いで、実験 (I) としてレニン-アンジオテンシン系の 18-OH-F 分泌におよぼす影響を明らかにするため、健康者を対象とし、塩分制限試験、およびフロセミド立位負荷を行った際の 18-OH-F の変動を検討した。

次に、実験 (II) として、原発性アルドステロン症の腺腫と過形成との鑑別診断における 18-OH-F の意義を明らかにする目的で、本症患者を対象に尿中 18-OH-F 並びに尿中 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) を測定し、比較検討した。

#### 対象及び方法

##### 1. 測定法

##### 1. GC/SIM による測定法

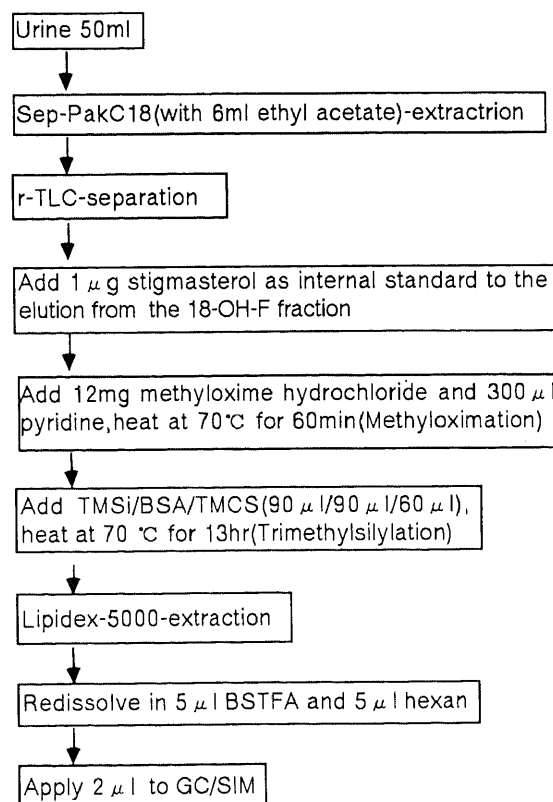
##### 1) 尿中 18-OH-F 測定 (図 1)

あらかじめ、5ml のメタノール、10ml の蒸留水を通しておいた Sep-Pak C18 (Waters, Massachusetts, USA)<sup>17)</sup> に尿 50ml を注入した。10ml の蒸留水にてカラムを洗浄後、6ml の酢酸エチル (Ethyl acetate) にて遊離ステロイド分画を抽出した。

酢酸エチル抽出液を窒素ガスの吹きつけにて乾固後、500 $\mu$ l の酢酸エチルにて再溶解した。18-OH-F と 6 $\beta$ -hydroxycortisol (6 $\beta$ -OH-F) とを分離するため、抽出液をイサチンと共に逆層薄層クロマトグラフィプレート (Reversed phase thin layer chromatography, r-TLC) (Whatmann, Maidstone, 英国) に添加した。r-TLC の展開液にはメタノール/水、7/3 (v/v) を用い、室温にて展開した。イサチンを基準とした 18-OH-F の Rf 値は 0.83 であり、6 $\beta$ -OH-F の Rf 値は 1.13 であった。18-OH-F 分画を採取し、3ml の 0.2% トリエチルアミン-エタノールに入れ、30 分間攪拌した。攪拌後 2.4ml を分取し、試料に内部標準物質 (internal standard, I. S.) としてステグマステロール (和光純薬工業、大阪)、1 $\mu$ g を加えた。

窒素ガス乾固後、第一段階目の誘導体化<sup>18)-23)</sup> としてステロイドのケト基のメトキシム化を行うため、12mg の *o*-メチルヒドロキシルアミン塩酸 (和光純薬工業) と 300 $\mu$ l のピリジン (和光純薬工業) を加え、70 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱した。その後、窒素ガス乾固にてピリジンを除いた。乾固物に 2ml の酢酸エチルと 1ml の飽和食塩水を加え、酢酸エチル層にステロイド分画を移行させ、飽和食塩水層には過剰のメチルヒドロキシルアミン

塩酸を溶かした。次に第 2 段階目の誘導体化のため、酢酸エチル層を分取し、窒素乾固後、90 $\mu$ l の N-トリメチルシリルイミダゾール (N-Trimethylsilylimidazole, TMSi) (和光純薬工業)、90 $\mu$ l の N, O-ビス (トリメチルシリル) アセタミド (N, O-Bis(trimethylsilyl) acetamide, BSA) (和光純薬工業)、60 $\mu$ l のトリメチルクロシラン (Trimethylchlorosilane, TMCS) (和光純薬工業) を加え、70 $^{\circ}$ C で 13 時間加熱した。誘導体化処置後、過剰の誘導体化剤を除くため、反応液を Lipdex 5000 カラム (Sigma, St. Louis, USA)<sup>24)</sup> に通して、2ml のヘキサン/ピリジン/ヘキサメチルジシラザン (和光純薬工業)、98/1/1 (v/v) を用い溶出した。溶出液を窒素ガスにて乾固後、10 $\mu$ l のヘキサン/N, O-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセタミド (N, O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA)、1/1 (v/v) にて再溶解し、うち 2 $\mu$ l を GC/SIM に注入した。GC/SIM 測定は、GC/MS-QP2000 (島津製作所、京都) を用いて行った。測定条件として、キャピラリーカラムは、長さ 16m、内径 0.2mm、膜厚 0.33 $\mu$ m の Ultra 1 (Hewlett Packard, California, USA) を使用した。注入温度は、300 $^{\circ}$ C とした。カラム温度は、初期温度 80 $^{\circ}$ C を 6 分間保持し、200 $^{\circ}$ C まで 20 $^{\circ}$ C/分にて昇温し、200 $^{\circ}$ C まで



r-TLC; reversed phased thin layer chromatography  
 TMSi; N-Trimethylsilylimidazole  
 BSA; N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamide  
 TMCS; Trimethylchlorosilane  
 BSTFA; N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide

Fig. 1. The assay procedure by GC/SIM for urinary 18-OH-F.

6 $\beta$ -hydroxycortisol; 18-OH-F, 18-hydroxycortisol; 18-OH-B, 18-hydroxycorticosterone; r-TLC, reversed phase thin layer chromatography

ら320℃まで10℃/分にて昇温した。器機条件は、イオン化電流300mcA, イオン化電圧70eV, 加速電圧3KV, キャリアーガス(ヘリウム)0.6Kg/cm<sup>2</sup>にてE.I.で測定した。モニタリングイオンは、感度および特異性を考慮して、18-OH-Fに対しては693(M-31), スチグマステロールに対して484(M<sup>+</sup>)を用いた。18-OH-F値は、検量線上で693および484のピーク高の比より求めた。

## 2. HPLC-RIAによる測定法

### 1) 尿中18-OH-Fの測定(図2)

尿0.5mlに2000dpmの<sup>3</sup>H-18-OH-Fおよび100μlの5%の炭酸水素ナトリウム溶液を加え、4mlの酢酸エチルにて抽出後、窒素ガスで乾固し、乾固物をエタノールに再溶解した。その後HPLCに注入した。HPLCシステムはLKB(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いて行った。カラムは4.5cm×35cm, 5μmODSカラム(Backman, California, USA)を使用し、温度調節器CTO6A(島津製作所)により25℃に設定した。

溶媒系は、水/アセトニトリル/メタノール, 72/23/3(v/v)で、流量は2ml/分に設定した。18-OH-Fの保持時間は21分であった。18-OH-F分画を分取した後、特異抗体にてRIAを行った。抗18-OH-F抗体、<sup>3</sup>H-18-OH-FはGomez-Sanchez博士(South Florida 医科大学, USA)より供与を受けた。

### 2) 血中18-OH-Fの測定

血漿2mlに2000dpmの<sup>3</sup>H-18-OH-Fを加えた後、Sep-PakC18に通し、メタノールにて抽出した。その後、尿中18-OH-Fと同様の方法にて、HPLC分離後RIAを行った。

### 3) 尿中18-OH-Bの測定

尿5mlに2000dpmの<sup>3</sup>H-18-OH-Bを加えた後、Sep-Pak-C18に通し、メタノールで抽出した。その後HPLC分離を行った。18-OH-Bの保持時間は27分であった。18-OH-Bの分画を分取後、特異的な抗体を用いRIAを行った。抗18-OH-B抗体、<sup>3</sup>H-18-OH-BはVecsei博士(Heidelberg 大学, Germany)より供与を受けた。

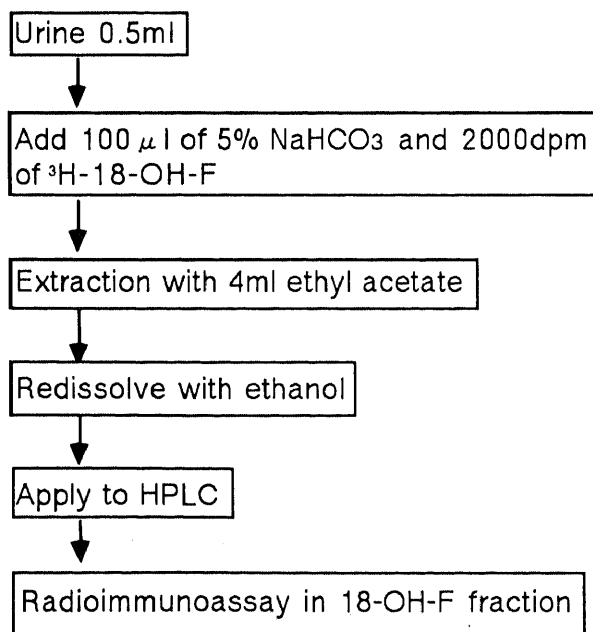


Fig. 2. The assay procedure by HPLC-RIA for urinary 18-OH-F.

### 4) 尿中aldoの測定

尿1mlを用い、既報の如く<sup>25)</sup>、塩酸にてpH1に調整し水溶解後、RIAキット(第一製薬, 東京)にて測定した。

### 5) 血漿レニン活性(plasma renin activity, PRA)の測定

Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)-2Na入採血管にて採血後4℃にて冷却遠心後、血漿を分離する。血漿に変換酵素とアンジオテンシンナーゼ阻害剤を加え、37℃で2~3時間水浴におき、新たに産生されたアンジオテンシンIをRIAキット(ダイナボット, 東京)で測定し、その単位時間の生成量をレニン活性値とした。

## II. 原発性アルドステロン症における尿中18-OH-F排泄量の検討

対象は25名の原発性アルドステロン症患者で、16名がアルドステロン産生腺腫(男性9名, 女性7名, 35-72才), 9名が特発性アルドステロン症(男性4名, 女性5名, 32-68才)であった。高血圧, 低カリウム血症, 低レニン血症, アルドステロン産生過剰の特徴的な生化学異常より原発性アルドステロン症と診断された。

グルココルチコイド反応性アルドステロン症の除外のため、デキサメサゾン2mg/日, 2週間投与を行った。デキサメサゾン投与により血清アルドステロン値, 血清カリウム値, または血

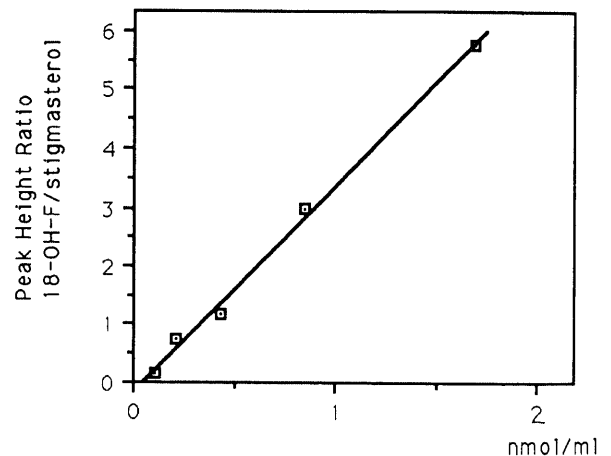


Fig. 3. Calibration curve for the determination of urinary 18-OH-F. The horizontal axis indicates the urinary 18-OH-F concentration. The vertical axis indicates the peak height ratio (18-OH-F/internal standard).

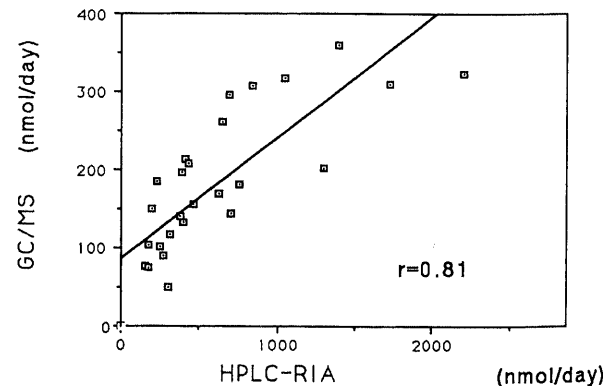


Fig. 4. Correlation between GC/SIM and HPLC-RIA in the measurement of urinary 18-OH-F.

圧が正常化しなければ、グルココルチコイド反応性アルドステロン症を除外した。

副腎静脈サンプリングにおいて両側副腎静脈の血清アルドステロン値が高く、CT スキャンにおいて充実性の腺腫像を認めない場合、特発性アルドステロン症と診断した。

2種の原発性アルドステロン症サブタイプにおける生化学データは、血清カリウム値(アルドステロン産生腺腫,  $2.7 \pm 0.2 \text{ mmol/l}$ ; 特発性アルドステロン症,  $2.9 \pm 0.3 \text{ mmol/l}$ )、血清レニン活性(アルドステロン産生腺腫,  $0.081 \pm 0.011 \text{ ng/l/s}$ ; 特

発性アルドステロン症,  $0.089 \pm 0.031 \text{ ng/l/s}$ )、血清アルドステロン濃度(アルドステロン産生腺腫,  $1410 \pm 270 \text{ pmol/l}$ ; 特発性アルドステロン症,  $896 \pm 350 \text{ pmol/l}$ )であり、それぞれ両者間に有意差を認めなかった。

精査中、患者は、ナトリウム 180mmol、カリウム 60mmol を含む常食を摂り、薬物は少なくとも3週間前より中止した。又、タバコ、アルコールも控えさせた。

### Ⅲ. 塩分制限による尿中 18-OH-F 排泄の変動の検討

5名の正常者に対し、通常食 (NaCl 180mmol, K60mmol 含

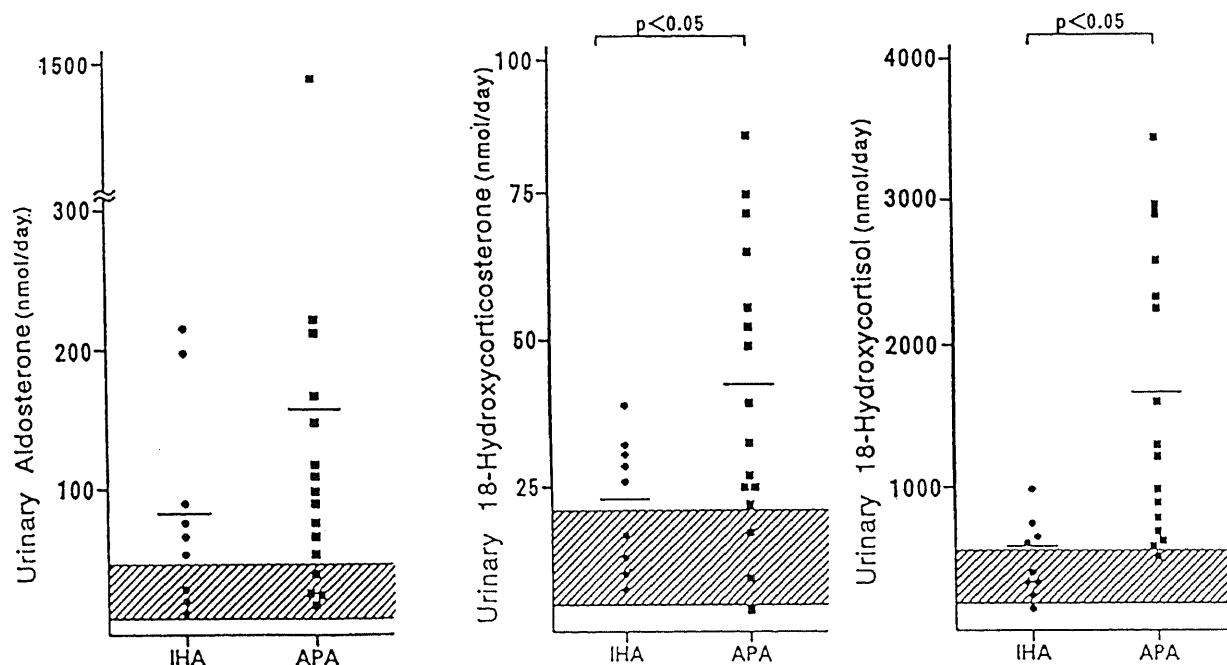


Fig. 5. Urinary excretion of aldosterone, 18-hydroxycorticosterone and 18-hydroxycortisol in patients with aldosterone producing adenoma (APA) (N=16) and idiopathic hyperaldosteronism (IHA) (N=9). There was no significant difference in aldosterone values between patients with APA and IHA. The values of both 18-hydroxycortisol and 18-hydroxycorticosterone were significantly greater in patients with APA than in those with IHA. The shaded area indicates the range of normal control values. The horizontal bars indicate the mean.

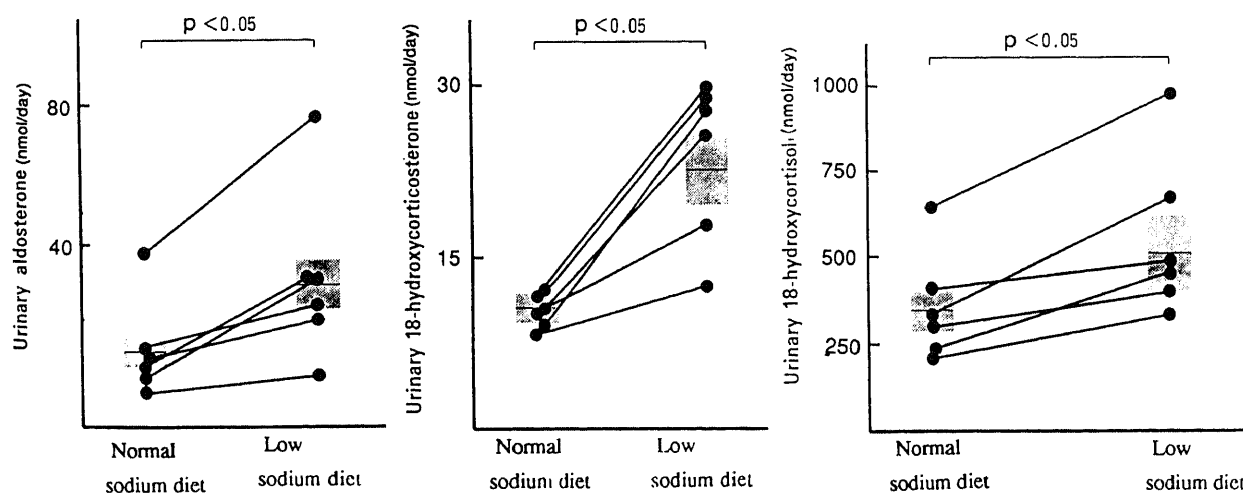


Fig. 6. Effect of sodium restriction on the urinary excretion of aldosterone (aldo), 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B), and 18-hydroxycortisol (18-OH-F) in normal subjects. Sodium restriction was achieved by 4 days of low sodium diet (48mEq/day of sodium) after normal diet (180mEq/day of sodium). Three corticosteroids increased significantly after low sodium diet. Shaded area with horizontal bar indicates the mean  $\pm$  SE.

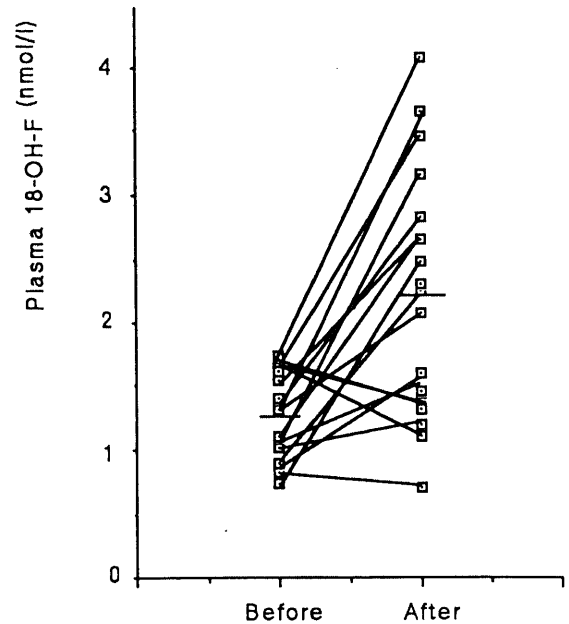
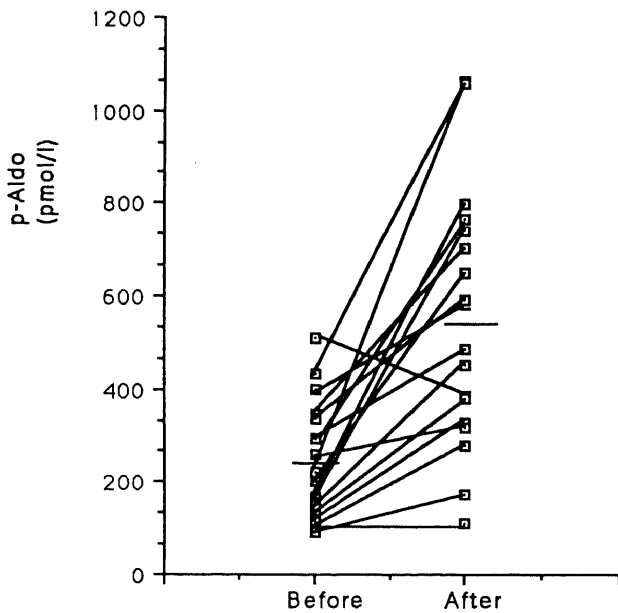


Fig. 7. The effect of furosemide administration on the plasma level of aldosterone and 18-hydroxycortisol (18-OH-F).

有)と制塩食摂取4日目(NaCl 48mmol, K60mmol含有)での尿中 18-OH-F, 18-OH-B, Aldo の各排泄量を比較検討した。

#### Ⅳ. フロセマイド立位負荷時の 18-OH-F 分泌変動の検討

内分泌学的疾患を有せず、高血圧、重篤な肝および腎機能障害を認めない入院患者16名(男8名, 女10名, 平均年齢54才)を対象にフロセマイド 80mg 内服, 4時間立位を行い, その前後で血, 尿中 18-OH-F, 血漿アルドステロンを測定した。尿中 18-OH-F 測定のための尿は, フロセマイド内服前の24時間尿, および内服後の24時間尿の各々 50ml を用いた。

#### Ⅴ. 統計処理

測定値はいつも平均値±標準誤差で示した。平均値の有意差検定は Wilcoxon-t-検定を用い, 危険率5%以下で有意差ありと判定した。

### 成 績

#### Ⅰ. 最小測定感度及び精度再現性

尿中 18-OH-F の GC/SIM による測定では, 最小感度は 2.65nmol/50ml 尿であった。検量線では, 標品 18-OH-F 2.65 nmol から 80.0nmol の間で良好な直線性が得られた(図3)。また, 測定内誤差は6%, 測定間誤差は11%であり, 再現性も満足できる成績であった。

18-OH-F の HPLC-RIA による測定では, 最小感度は 0.13 pmol/tube であった。測定内誤差は9%, 測定間誤差は13%であった。

#### Ⅱ. GC/SIM, HPLC-RIA 両測定法による尿中 18-OH-F 値の比較

同一尿検体を用い, GC/SIM, HPLC-RIA 両測定法にて 18-OH-F 値を求めた。その結果, 両者による測定値は相関係数  $r = 0.81$  と良好な相関を示した。しかし, 各検体についての値をみると, GC/SIM 測定値の方が HPLC-RIA 測定値に比べ低い傾向を示した(図4)。

#### Ⅲ. 原発性アルドステロン症における尿中 18-OH-F 排泄量の検討

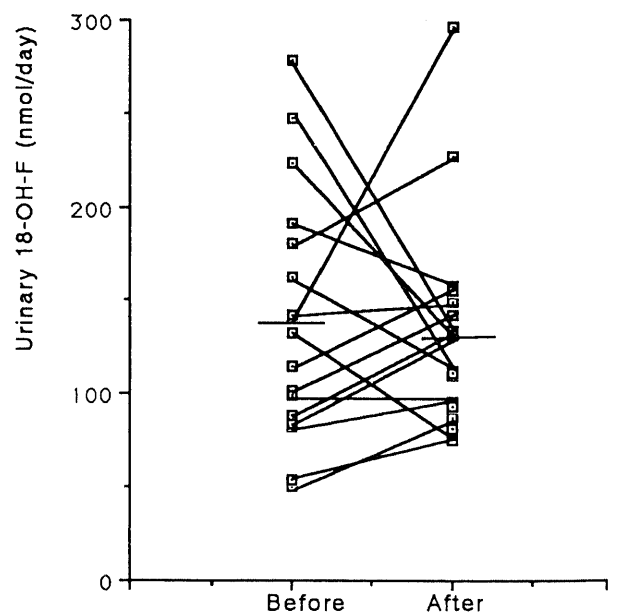


Fig. 8. The effect of furosemide administration on urinary excretion of 18-hydroxycortisol (18-OH-F).

尿中 Aldo 排泄量は, 特発性アルドステロン症では  $86 \pm 25$  nmol/日であり, アルドステロン産生腺腫では  $161 \pm 78$  nmol/日であった。両者間に有意差は認めなかった。

尿中 18-OH-B 排泄量は, 特発性アルドステロン症では  $19 \pm 3.3$  nmol/日であり, アルドステロン産生腺腫では  $39 \pm 5.2$  nmol/日であった。アルドステロン産生腺腫において有意に高値であった。尿中 18-OH-F 排泄量は, 特発性アルドステロン症では  $541 \pm 93$  nmol/日であり, アルドステロン産生腺腫では  $1660 \pm 318$  nmol/日と, 後者において有意に高値であった(図5)。

#### Ⅳ. 塩分制限による尿中 18-OH-F 排泄の変動の検討

塩分制限により尿中ナトリウム排泄は  $170 \pm 53$  mEq/日より

48±4.7mEq/日へと減少し、血漿レニン活性は0.7±0.2ng/ml/hr から3.2±1.0ng/ml/hr へと上昇した。尿中 aldo 排泄量は、塩分制限により20.5±9.2nmol/日より40.0±15.0nmol/日へと有意な増加を示した。同様に、尿中 18-OH-B 排泄量は、7.2±2.8nmol/日より15.5±6.1nmol/日へと有意な増加を示した。

尿中 18-OH-F 排泄量は、塩分制限により508±77nmol/日より1013±413nmol/日へと有意な増加を示した(図6)。

#### V. フロセマイド立位負荷時の 18-OH-F 分泌変動の検討

フロセマイド立位負荷により、血中 aldo は244.0±30.4 pmol/l から546.6±64.6pmol/l へと有意な増加を示した。同様に血中 18-OH-F は1.39±0.14nmol/l から2.18±0.23nmol/l へと有意な増加を示した(図7)。尿中 18-OH-F 排泄量は、負荷前で137.5±15.4nmol/l、負荷後で128.8±13.4nmol/l であり、有意な変動を認めなかった(図8)。

## 考 察

1982年 Chu と Ulick らは、原発性アルドステロン症患者の遊離ステロイド分画を GC/MS 分析中、未知のピークを見いだした。このピーク分画を単離分析し、その構造は、11β, 17α, 18, 21-tetrahydroxy-4-pregnene-3, 20-dione; 18-hydroxycortisol (18-OH-F) であると同定した<sup>1)</sup>。さらに、アルドステロン産生腺腫組織スライスを <sup>3</sup>H-F を添加して試験管内において培養した結果、大量の <sup>3</sup>H-18-OH-F の産生が確認された。しかし、<sup>3</sup>H-corticosterone (<sup>3</sup>H-B) を添加した場合は、<sup>3</sup>H-18-OH-F 生成は認めなかった。以上の成績から 18-OH-F は F の末梢代謝産物ではなく、副腎皮質より分泌されるステロイドである事、また、F を基質として生成される事が示された<sup>2)</sup>。

副腎球状層は、17位水酸化活性を欠くため、この層で生成されるステロイドは 17-deoxysteroid 即ち、corticosterone (B), 18-OH-B, aldo である。一方、17位水酸化酵素が発現される束状層では、球状層に認められる18位水酸化活性を欠如しているため、束状層で生成される主要ステロイドは F である。18-OH-F は、17位、18位に水酸基を有し、両層の性格を有するところから、ハイブリッドステロイドと呼称され、副腎内における 18-OH-F 産生部位として、以下の2つの可能性が想定されている。1つは、球状層と束状層との間に位置し、両層の機能的性格として17位水酸化酵素と18位水酸化酵素の両方を有している細胞群からなる移行帯 (transitional zone) で生成される可能性である<sup>20)~29)</sup>。今1つは、束状層で生成された F が血中に放出され副腎への再灌流の際、球状層を通過し、ここで18位の水酸化が起こり、18-OH-F を生成する可能性である。副腎内血流は外側から内側へ向かういわゆる向心性循環を形成しているため、束状層で生成された F は隣接する球状層に直接流入し得ない。Davis ら<sup>20)</sup> は、再灌流説の妥当性を検討するため、正常人に、高用量の F、および低用量 F を8時間注入実験を行い、18-OH-F の産生量を調べた。その結果、高用量の F を注入した場合、18-OH-F の産生量の増加は認められたが、低用量では認められなかった。従って彼らの成績からは、再灌流説は否定的と考えられ、18-OH-F は移行帯で生成されるとする説が正しいのではないかと想定される。

18-OH-F が、原発性アルドステロン症患者で多量に分泌されている事に加え、原発性アルドステロン症において、アルカローシス、低カリウム血症、高血圧の程度がアルドステロン分

泌量に必ずしも比例しない事実が以前より指摘され、相加的なミネラルコルチコイドとしての 18-OH-F の意義が注目されていた。ところが、腎組織を用いた Gomez-Sanchez らの検討では、18-OH-F のミネラルコルチコイド受容体への結合能はアルドステロンの0.13%であり、グルココルチコイド受容体への結合能はデキサメサゾンの0.1%であった。また、ミネラルコルチコイド活性、グルココルチコイド活性は測定感度以下であった<sup>6)</sup>。以下の成績より、これらハイブリッドステロイドの生物学的活性は極めて低く、原発性アルドステロン症の病態に関与する可能性は少ないと考えられる。

18-OH-F の代謝に関し、副腎において 18-OH-F は 18-oxo-F に変換されるが<sup>20)</sup>、この経路は 18-OH-B が aldo に変換されるのと同様の機序によると解される。

原発性アルドステロン症患者において 18-OH-F と共に 18-oxo-F 分泌も亢進している事実より、18-oxo-F の生物学的活性にも興味を持たれた。上述した 18-OH-F と同様の実験系で検討された結果、18-oxo-F のミネラルコルチコイド受容体への結合能は aldo の8.1%であり、グルココルチコイド受容体への結合能はデキサメサゾンの0.2%であった。ミネラルコルチコイド活性は aldo の0.6%、グルココルチコイド活性はデキサメサゾンの1.06%、F の3.8%であり<sup>7)</sup>、いづれも、18-OH-F と、ほぼ同等の結合能を示しており、活性の差は結合能によるものではないと考えられた。

今回、著者は各種疾患における 18-OH-F 産生量、また 18-OH-F の調節因子を調べ、本ステロイドの臨床的意義を検討するため、GC/SIM による測定法を確立した。一部尿検体においては HPLC-RIA, GC/SIM の両方法により測定し、両測定法の比較検討を行った。両方法による測定値の相関係数は  $r = 0.81$  であったが、GC/SIM による測定値は HPLC-RIA の測定値よりも低い傾向を示した。GC/SIM による測定では、保持時間と特徴的なイオンの質量数の組合せにより、特異性が保証されている。一方、RIA による測定では、用いる抗体が必ずしも 18-OH-F に特異的でないため、HPLC にて分離後においても一部交差反応のため過大評価する可能性があると考えられる。

最小感度は、GC/SIM では 2.65nmol/50ml 尿であるのに対し、HPLC-RIA では 0.13pmol/tube であり、感度に関しては HPLC-RIA の方が圧倒的に優れている。GC/SIM 分析においては、ガスクロマトグラフィを行う必要があるため 18-OH-F を熱安定性を持ち、かつキャピラリーカラムに吸着しない誘導体に変換させる必要がある。従来よりステロイド GC/MS 分析の誘導体化には、ケト基に対してメトオキシ化、水酸基に対してトリメチルシリル化が行われており<sup>19)~24)</sup>、著者もその2段階の誘導体化を用いた。しかし、18-OH-F を初めとして、18位に水酸基を有するステロイドはこれらの前処置に対し十分な安定性をとれず<sup>20)</sup>、キャピラリーカラムが長くなればなる程、感度が低下する傾向が認められた。測定に耐えうる感度を得るためキャピラリーカラムは 16m と短いものを使用した。しかし一方、短いキャピラリーカラムを使用すると、分離能が落ち、異性体でそのマスフラグメントが近似している 6β-OH-F と、18-OH-F の保持時間が極めて近くなった。そこで 18-OH-F 測定値の過大評価を避けるため、6β-OH-F と 18-OH-F との分離目的に、GC/SIM 分析前に TLC を行わざるを得なかった。

GC/SIM の測定値と HPLC-RIA の測定値との間に差異を生じた原因としていくつかの可能性が考えられる。第1に、前述

したようにRIAにおいては一部他のステロイドとの交差反応があり、HPLC-RIAでは過大評価する可能性である。18-OH-Fは標品を水、メタノール等に溶かすと、図9に示すように free C-18 alcohol, 20, 18-hemiketal form と2種の状態をとりうる。数個の尿検体を調べ、20, 18-hemiketal-form が含まれていない事を確認できたため、GC/SIMによる18-OH-F測定は free C-18 alcohol に特異的なイオンを選択して行った。しかし、一部症例において20, 18-hemiketal form が存在し、GC/SIMによる測定にかからないため、過小評価した可能性が第2に考えられる。

各種の高血圧疾患についてのこれまでの検討では、アルドステロン産生腺腫の他、デキサメサゾン反応性アルドステロン症において18-OH-F産生の亢進が確認されている<sup>13)31)32)</sup>。一方、特発性アルドステロン症、本態性高血圧症における18-OH-F産生量は正常者と同等であると報告されている<sup>33)~34)</sup>。

原発性アルドステロン症の亜系診断のうち、アルドステロン産生腺腫と過形成の鑑別には、画像、検査結果が曖昧な症例では副腎静脈サンプリング、立位負荷をはじめ種々のアルドステロン分泌刺激に対する反応性が参考になされてきた。しかし、どの検査を用いても単一の検査で、正確な鑑別診断はできない。

本研究において、著者は原発性アルドステロン症のサブタイプの鑑別に際し、尿中18-OH-B、尿中18-OH-Fが、マーカーとして有用か否かにつき検討を行った。その結果、尿中18-OH-B、尿中18-OH-F共に、特発性アルドステロン症に比べ、アルドステロン産生腺腫において有意に高値を示すことが明らかになり、検討症例に関する限り、尿中18-OH-Fの鑑別能力は尿中18-OH-Bと同等であった。正常者、患者共に尿中18-OH-F排泄量は18-OH-Bより多く、正常者においては約50倍の値であったので、18-OH-Fの方が鑑別のマーカーとしてより有用と考えられる。しかし、尿中18-OH-F、18-OH-B排泄量は、腺腫と過形成との間においてオーバーラップするレベルがある。しかも、一部の腺腫症例において、18-OH-F、あるいは18-OH-B排泄量が正常域を示すことがあるので、尿中18-OH-Fや18-OH-Bの排泄量が正常であっても腺腫の可能性を全く否定することはできない。

18位水酸化の指標として、Fの代謝産物の総量に対する18-OH-Fの比はより良い鑑別のマーカーとなり得ると、最近Ironyら<sup>35)</sup>は報告している。

18-OH-F分泌の調節因子を検討するため、Corrie, Gomez-Sanchezらは正常者においてACTH投与、デキサメサゾン投

与を行った。18-OH-F産生量はACTH投与にて有意に増加し、デキサメサゾン投与にて有意に減少した。また血中18-OH-F値は血中F値と平行した日内変動を示した。

さらに、尿中18-OH-F排泄量は尿中Fや18-oxo-F排泄量とそれぞれ有意の( $r=0.36$ ;  $p<0.01$ ), ( $r=0.42$ ;  $p<0.01$ )の相関を示した。しかし、尿中18-OH-F排泄量と尿中aldo( $r=0.36$ ;  $p=0.15942$ )との相関は認められなかった。これらの結果は、18-OH-F分泌調節が主としてACTHに依存である事を示している。

一方、Gomez-Sanchezは正常者において塩分制限、アンジオテンシンII投与を行った際の18-OH-F分泌の変動を検討したところ、塩分制限においては18-OH-F分泌は増加したが、アンジオテンシンII投与にては18-OH-Fは変動なかった<sup>9)</sup>。そこで、この矛盾した成績を明らかにするため、著者は18-OH-F分泌に影響を及ぼす塩分制限時の尿中18-OH-F、18-OH-B排泄およびaldo排泄の反応を検討し、さらに、フロセミド立位負荷を行い、血中18-OH-F、aldoの変動と共に尿中18-OH-F排泄量の変動についても検討を加えた。塩分制限に対しては、尿中18-OH-F、18-OH-Bおよびaldo排泄はいずれも増加し、その反応性は3種のステロイドで同等であった。また、フロセミド立位負荷では血中18-OH-Fとaldoは共に増加した。しかし、反応性は血中aldoの方が強かった。尿中18-OH-F排泄は変動を示さなかったが、この原因としてフロセミド立位負荷は長時間の持続刺激でなく、24時間尿中排泄量の増加として反映されるほどの影響を与えなかったものと考えられた。これらの結果は、フロセミド立位負荷はアルドステロン分泌への影響に比べると弱いが、18-OH-F分泌をも賦活しうること、すなわち18-OH-F分泌がレニン-アンジオテンシン系支配下にある事を示している。

最近、Ironyら<sup>35)</sup>はアルドステロン産生腺腫および特発性アルドステロン症いずれの診断基準をも満たさない原発性アルドステロン症の存在を報告している。彼らが経験した154例の原発性アルドステロン症のうち12例がこのカテゴリーに該当した。うち8例は結節性過形成を示したが、アルドステロンの分泌動態は腺腫と同様の症例であった。残りの4例は片側性の腫瘍を有するが、アルドステロンの分泌動態は特発性アルドステロン症と同様の症例群であった。彼らは前者を原発性副腎過形成、後者をレニン反応性アルドステロン産生腺腫と名付けている。レニン反応性アルドステロン産生腺腫は、レニン不応性アルドステロン産生腺腫と同様に腫瘍側副腎摘出にて治療または症状の改善が期待できる。原発性副腎過形成も副腎全摘により治療または症状の改善を認める。特発性アルドステロン症は副腎全摘あるいは全摘にては症状の改善を認めない<sup>35)36)</sup>とされているのに対して、腺腫や原発性副腎過形成においては手術治療が有効であり、鑑別診断の重要性が強調されている。18-OH-F分泌量は、特発性アルドステロン症やレニン反応性アルドステロン産生腺腫では正常者とほぼ同等の値を示すが、レニン不応性アルドステロン産生腺腫、原発性副腎過形成では分泌亢進が、鑑別上有力な情報を与える。

アルドステロン産生腺腫において18-OH-F産生が亢進している機序は十分に解明されていない。1つの仮説としてアルドステロン産生腺腫においては、求心性の副腎内血流の乱れが起こり、シャント血流を介して隣接する球状層で生成されたFが腺腫内に直接流入する可能性が提唱されている。この仮説によ

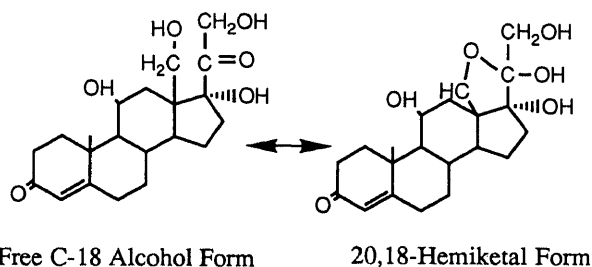


Fig. 9. Chemical structures of 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 18, 21-tetrahydroxy-4-pregnene-3, 20-dione (18-OH-F). 18-OH-F exists as the free C-18 alcohol in equilibrium with the 20, 18-hemiketal form.



ると、腺腫内でFが18位水酸化<sup>37)</sup>を受け多量の18-OH-Fが産生される。最近、腺腫内には $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase<sup>38)</sup>、17 $\alpha$ -hydroxylase<sup>39)</sup>、11 $\beta$ -hydroxylase<sup>40)41)</sup>などの酵素活性に加え、P-450 17 $\alpha$ mRNA、11 $\beta$ mRNA<sup>42)</sup>の存在も証明されており、Fは腺腫内で直接産生されうるとされている。

## 結 論

尿中18-OH-FのGC/SIMによる測定法を確立し、HPLC-RIAによる測定と比較検討を行った。

また、18-OH-Fの分泌動態を明かにするため、正常者において塩分制限およびフロセミド立位負荷を行い、18-OH-F、18-OH-Bおよびaldoの変動を検討した。更に18-OH-Fの臨床的意義を明かにするため、アルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症患者における尿中18-OH-F、18-OH-B、aldo排泄量を測定し、以下の結論を得た。

1. GC/SIMによる18-OH-F測定の検量線は2.65nmolから80.0nmolの範囲で良好な直線性を示した。本方法による測定内誤差は6%で、測定間誤差は11%であり、精度再現性も満足できる結果であった。最小感度は2.65nmol/50ml尿であり、HPLC-RIAの方が優れていた。

2. 正常者において塩分制限により尿中18-OH-F、18-OH-B、aldoは、すべて有意に増加した。フロセミド立位負荷に対して、血中18-OH-F、aldoは有意に増加したが、尿中18-OH-Fは有意の増加を示さなかった。尿中18-OH-Fの増加を認めなかった理由は、フロセミド立位負荷によるレニン-アンジオテンシン系への刺激持続時間が十分でなく、24時間排泄量に影響を及ぼすに至らなかったためと考えられた。血中18-OH-F反応がaldoと平行している点から、このステロイドの生成分泌はレニン-アンジオテンシン系支配下にあるとみなされた。

3. 尿中アルドステロン排泄は、アルドステロン産生腺腫において、特発性アルドステロン症よりも高値であったが、有意な差ではなかった。一方、18-OH-F、18-OH-B排泄量は、アルドステロン産生腺腫において、特発性アルドステロン症よりも有意に高値であった。

以上の成績から、著者は尿中18-OH-Fの測定は、尿中18-OH-Bと共にアルドステロン産生腺腫と特発性アルドステロン症を鑑別する上で有用な手段であると結論した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました竹田亮祐教授に深謝致します。また終始直接御指導、御鞭撻頂いた宮森勇講師、研究に御協力頂きました第2内科内分泌、高血圧グループ、および教室員の皆様にも感謝致します。さらにステロイド標品を御提供いただいた Gomez-Sanchez 教授 (South Florida 医科大学, USA)、ガスクロマトグラフィ/マススペクトロメトリーの操作につき貴重な御助言を頂きました I. Blair 教授 (Vanderberg 大学, USA)、金沢医科大学人類遺伝総合研究所生化学部門の松本勇教授ならびに教室員の皆様に深く感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は第65回日本内分泌学会秋期学術大会において発表した。

## 文 献

- 1) Chu, M. D. & Ulick, S.: Isolation and identification of 18-hydroxycortisol from the urine on patient with primary aldosteronism. *J. Biol. Chem.*, **257**, 2218-2224 (1982).
- 2) Ulick, S., Chu, M. D. & Land, M.: Biosynthesis of 18-oxocortisol by aldo-sterone producing adrenal tissue. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5498-5502 (1983).
- 3) Ulick, S. & Chu, M.: Hypersecretion of a new corticosteroid, 18-hydroxy-cortisol in two types of adrenocortical hypertension. *Clin. Exp. Hypertens. Part A Theory Pract.* **4**, 1771-1777 (1982).
- 4) Corrie, J. E. T., Edwards, C. R. W., Jones, D. B., Padfield, P. L. & Budd, P. D.: Factors affecting the secretion of 18-hydroxycortisol, a novel steroid of relevance to Conn's syndrome. *Clin. Endocrinol.* **23**, 579-586 (1985).
- 5) Gomez Sanchez, C. E., Upcavage, R. J., Zager, P. G., Foecking, M. F., Holland, O. B. & Ganguly, A.: Urinary 18-hydroxycortisol and its relationship to the excretion of other adrenal steroids. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **65**, 310-314 (1987).
- 6) Gomez-Sanchez, E. P., Gomez-Sanchez, C. E., Smith, J. S., Ferris, M. W. & Foecking, M.: Receptor binding and biological activity of 18-hydroxycortisol. *Endocrinology*, **115**, 462-466 (1984).
- 7) Gomez-Sanchez, C. E., Gomez-Sanchez, E. P., Smith, J. S., Ferris, M. W. & Foecking, M.: Receptor binding and biological activity of 18-oxocortisol. *Endocrinology*, **116**, 6-10 (1985).
- 8) Ulick, S., Chan, C. K., Gill, J. R., Gutkin, J. M., Letcher, L., Mantero, F. & New, M. I.: Defective fasciculata zone function as the mechanism of glucocorticoid-remediable aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **71**, 1151-1157 (1990).
- 9) Hamlet, S. M., Gordon, R. D., Gomez-Sanchez, C. E., Tunny, T. J. & Klemm, S. A.: Adrenal transitional zone steroids, 18-oxo and 18-hydroxycortisol, useful in the diagnosis of primary aldosteronism, are ACTH-dependent. *Clin. Exp. Pharmacol. & Physiol.*, **15**, 317-322 (1988).
- 10) Miyamori, I., Takeda, Y., Takasaki, H., Itoh, Y., Iki, K. & Takeda, R.: Determination of urinary 18-hydroxycortisol in the diagnosis of primary aldo-steronism. *J. Endocrinol. Invest.*, **15**, 19-24 (1992).
- 11) Takeda, Y., Miyamori, I., Iki, K., Takeda, R. & Vecsei, P.: Urinary excretion of 19-nor-aldosterone, 18, 19-dihydroxycorticosterone and 18-hydroxy-19-norcorticosterone in patients with aldo-sterone producing adenoma or idiopathic hyperaldosteronism. *Acta Endocrinol.*, **126**, 484-488 (1992).
- 12) Gomez-Sanchez, C. E., Gomez-Sanchez, E. P. & Holland, O. B.: Role of 18-hydroxylated cortisol in hypertension. *J. Steroid Biochem.*, **27**, 971-975 (1987).
- 13) Mantero, F., Armanini, D., Bionan, A., Bascaro, M., Carpere, G., Fallo, F., Opocher, G., Rocco, S., Scaroni, C. & Sonino, N.: New aspects of mineralocorticoid hypertension. *Horm. Res.*, **34**, 175-180 (1990).
- 14) Gomez-Sanchez, C. E., Montgomery, M., Ganguly, A., Holland, O. B., Gomez-Sanchez, E. P., Grim, C. E. & Weinberger, M. H.: Elevated urinary 18-oxocortisol in glucocorticoid-suppressible aldosteronism. *J. Clin. Endocrinol.*

- & *Metab.*, **59**, 1022-1024 (1984).
- 15) Corrie, J. E. T., Edwards, C. R. W. & Budd, P. S.: A radioimmunoassay for 18-hydroxycortisol in plasma and urine. *Clin. Chem.*, **31**, 849-852 (1985).
- 16) Gomez-Sanchez, C. E., Uribe, L., Ferris, M. W., Foecking, M. F. & Gomez-Sanchez, E. P.: The production of a monoclonal antibody to 18-hydroxycortisol and other 18-hydroxylated steroids. *Steroids*, **49**, 335-340 (1987).
- 17) Shackleton, C. H. L. & Whitney, J. D.: Use of Sep-Pak cartridge for urinary steroid extraction: evaluation of the method for use prior to gas chromatographic analysis. *Chem. Acta*, **107**, 231-243 (1980).
- 18) Thenot, J-P. & Horning, E. C.: Mo-TMS derivatives of human urinary steroids for GC and GC-MS studies. *Anal. Lett.*, **5**, 21-33 (1972).
- 19) Shackleton, C. H. L. & Honour, J. W.: Simultaneous estimation of urinary steroids by semi-automated gas chromatography. Investigation of neonatal infants and children with abnormal steroid synthesis. *Clinica. Chem. Acta*, **69**, 267-283 (1976).
- 20) Ulick, S., Chan, C. K., Rao, K. N., Edassery, J. & Mantero, C.: A new form of the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *J. Steroid Biochem.*, **32**, 209-212 (1989).
- 21) 養和田 滋: 副腎腫瘍及び先天性副腎皮質過形成患者における尿中ステロイドホルモンの分析—グラスキャピラリーカラムガスクロマトグラフィを用いた多種同時測定法による検討—. *日泌尿会誌*, **76**, 1530-1541 (1985).
- 22) 野崎 豊, 加藤精彦, 篠塚 徹, 藤本昌敏, 大山健司, 市村一義: Gas chromatography (GC)/Mass spectrometry (MS) による血中副腎ステロイド測定法の確立. *日内分泌会誌*, **61**, 1167-1175 (1985).
- 23) Miyazaki, H., Ishibashi, M., Itoh, M. & Yamashita, K.: Diethylsilyl ether and diethylsiliconide derivatives in gas chromatography mass spectrometry of hydroxylated steroids. *Biomed. mass spectrom.*, **11**, 377-382 (1984).
- 24) Axelsson, M. & Sjoval, J.: Separation and computerized gas chromatography-mass spectrometry of unconjugated neutral steroids in plasma. *J. Steroid Biochem.*, **5**, 733-738 (1974).
- 25) Vecsei, P., Penke, B. & Joumaah, A. J.: Radioimmunoassay of free aldosterone and its 18-oxo-glucuronide in human urine. *Experientia*, **28**, 622-624 (1972).
- 26) Gomez-Sanchez, C. E., Clore, J. N., Estep, H. L. & Watlington, C. O.: Effect of chronic adrenocorticotropin stimulation on the excretion of 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **67**, 322-326 (1988).
- 27) Cornell, J. M. C., Kenyon, C. J., Corrie, J. E. T. & Fraser, R.: Dexamethasone-suppressible hyperaldosteronism. Adrenal transitional cell hyperplasia? *Hypertension*, **8**, 669-676 (1986).
- 28) Gomez-Sanchez, C. E.: 18-hydroxycortisol and 18-oxocortisol, steroids from the transitional zone. *Endocr. Res.*, **10**, 609-615 (1985).
- 29) Davis, J. R. E., Burt, D., Corrie, J. E. T., Edwards, C. R. W. & Sheppard, M. C.: Dexamethasone-suppressible hyperaldosteronism: Studies on overproduction of 18-hydroxycortisol in three affected family members. *Clin. Endocrinol.*, **29**, 297-308 (1988).
- 30) Shackleton, C. H. L. & Honour, J. W.: Identification and measurement of 18-hydroxycorticosterone metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Steroid Biochem.*, **8**, 199-203 (1977).
- 31) Gordon, R. D., Klemm, S. A., Tunny, T. J. & Stowasser, M.: Primary aldosteronism: hypertension with a genetic basis. *Lancet*, **340**, 159-161 (1992).
- 32) Lifton, R. P., Dluhy, R. G., Powers, M., Rich, G. M., Cook, S., Ulick, S. & Lalouel, J-M.: A chimaeric  $11\beta$ -hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*, **355**, 262-265 (1992).
- 33) Irony, I., Kater, C. E., Biglieri, E. G. & Shackleton, C. H. L.: Correctable subsets of primary aldosteronism. Primary adrenal hyperplasia and renin responsive adenoma. *Am. J. Hypertens.*, **3**, 576-582 (1990).
- 34) Gordon, R. D., Gomez-Sanchez, C. E., Hamlet, S. M., Tunny, T. J. & Klemm, S. A.: Angiotensin-responsive aldosterone-producing adenoma masquerades as idiopathic hyperaldosteronism (IHA: adrenal hyperplasia) or low-renin essential hypertension. *J. Hypertens.*, **5**, 5103-5106 (1987).
- 35) Biglieri, E. G., Schambelan, M., Slaton, P. E., Jr. & Stockigt, J. R.: The intercurrent hypertension of primary aldosteronism. *Circ. Res.*, **26/27**, 1195-1202 (1970).
- 36) Baer, L., Sommer, S. C., Krakoff, L. R.: Pseudoprietary aldosteronism: An entity distinct from true aldosteronism. *Circ. Res.*, **26/27**, 203-209 (1970).
- 37) Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Toda, K., Yokoyama, Y., Miyahara, K., Miura, S., Ohnishi, T., Ichikawa, Y., Nakao, K., Imura, H., Ulick, S. & Shizuta, Y.: Role of steroid  $11\beta$ -hydroxylase and steroid  $18$ -hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 1458-1462 (1992).
- 38) Sasamoto, H., Mason, J. I., Sansano, N. & Nagura, H.: Immunolocalization of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in human adrenal cortex and its disorders. *Endocr. Pathol.*, **20**, 113 (1989).
- 39) Sasano, H., Mason, J. I. & Sasano, N.: Immunohistochemical study of cytochrome P-450  $17\alpha$ -hydroxylase in human adrenocortical disorders. *Hum. Pathol.*, **20**, 113 (1989).
- 40) Takasaki, H., Miyamori, I., Nagai, K., Takeda, R., Mochizuki, H. & Katagiri, M.: Cytochrome P-450 activities in aldosteronoma tissues in primary aldosteronism. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 533 (1991).
- 41) Mornet, E., Dupout, J., Vitek, A. & White, P. C.: Characterization of two genes encoding human steroid  $11\beta$ -hydroxylase (P-450  $11\beta$ ). *J. Biol. Chem.*, **264**, 20961-20967 (1989).

- 42) Ogo, A., Haji, M., Ohashi, M. & Nawata, H. :  
Expression of cytochrome P-450 mRNA in steroidgenesis of  
adrenocortical adenoma from patients with primary aldoste-  
ronism. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **76**, 7 (1991).

**Measurement of 18-Hydroxycortisol by Gas Chromatography Equipped with Single Ion Monitoring; Establishment of the Method and its Clinical Application** Kazuhiro Iki, Department of Internal medicine (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **102**, 238—247 (1993)

**Key words** 18-hydroxycortisol, 18-hydroxycorticosterone, gas chromatography/single ion monitoring, high performance liquid chromatography-radioimmunoassay, aldosterone-producing adenoma, idiopathic hyperaldosteronism

#### Abstract

18-hydroxycortisol (18-OH-F), produced in vivo by hydroxylation at the carbon 18 position of cortisol, is a unique corticosteroid, which was first isolated and identified by Chu and Ulick in 1982, in the urine of patients with primary aldosteronism. The pathway in the biosynthesis of 18-OH-F, its regulatory factors and usefulness of the differential diagnosis for the subtypes of hypermineralocorticoidism have not been established yet. In the present paper, to quantify urinary 18-OH-F correctly, the author has first, investigated the measurement by gas chromatography/single ion monitoring (GC/SIM), in comparison with the measurement by high performance liquid chromatography combined with radioimmunoassay (HPLC-RIA). Next, to clarify the regulatory factors of 18-OH-F, the effect of renin-angiotensin system on the excretion of this particular steroid, 18-OH-F, aldosterone (aldo), 18-hydroxycorticosterone (18-OH-B) were determined under the condition of low sodium diet, and after oral administration of 80 mg of furosemide, followed by 4hr of upright posture. To further study the usefulness of 18-OH-F as a marker steroid for differential diagnosis of the subsets of primary aldosteronism, urinary excretion of 18-OH-F, 18-OH-B, as well as aldosterone were measured in patients with an aldosterone-producing adenoma and those with idiopathic hyperaldosteronism. The calibration curve for the measurement of 18-OH-F by GC/SIM showed good linearity between 2.65 nmol and 80.0 nmol. The coefficients of intra-assay and inter-assay variation in the GC/SIM method were 6%, 11%, respectively. The sensitivity of the GC/SIM was 2.65 nmol/50ml of urine, which was less than the sensitivity of the HPLC-RIA method. In normal subjects under low sodium intake, the urinary 18-OH-F, 18-OH-B, aldosterone were significantly increased. The magnitude of response to low sodium intake was nearly identical for all the three corticosteroids. In normal subjects oral administration of 80 mg of furosemide, followed by 4hr of upright posture induced a significant increase in the plasma levels of 18-OH-F and aldo. However, the urinary excretion of 18-OH-F did not change, and the reason for this discrepant finding is assumed to be that the stimulatory effect by furosemide-upright posture test was not enough to influence daily excretion of 18-OH-F. At least, from the data of parallel changes in plasma aldo and 18-OH-F, 18-OH-F was thought to be under the regulation of renin-angiotensin system. Urinary aldo excretion was higher in aldosterone-producing adenoma, compared with patients with idiopathic hyperaldosteronism, but not significantly. On the other hand, urinary excretions of 18-OH-F and 18-OH-B were significantly higher in aldosterone-producing adenoma ( $39 \pm 5.2$  nmol/day,  $1660 \pm 318$  nmol/day) compared with idiopathic hyperaldosteronism ( $19 \pm 3.3$  nmol/day,  $541 \pm 93$  nmol/day). In conclusion, urinary 18-OH-F and 18-OH-B concentrations were useful markers to distinguish aldosterone-producing adenoma from idiopathic hyperaldosteronism.