

副腎皮質ホルモンの胆道排泄について

金沢大学医学部第二内科教室(主任日置教授)

金 田 善 三

(昭和31年1月16日受附)

On the Excretion of the Adrenocortical
Hormone through the Bile Duct.

Zenzo Kaneda

*The 2nd Clinic of Internal Medicine, Faculty
of Medicine, Kanazawa University*

(Director : Prof. Dr. M. Heki)

緒 論

副腎において生成分泌された皮質ホルモンの運命については、その一部が明かにせられているだけで、なお明瞭を欠く点が甚だ少なくない。

現在その最もよく研究せられているところのものは、尿中に排泄せられる代謝産物についてであろう。本代謝産物に関しては凡そ二つの方面に向つて考察せられている。その一つは corticosteroid としての化学的構造に大なる変改をうけないものであつて、ホルモン自身も亦これに属する。しかしホルモンそれ自身の排泄量が極めて微々たることは既に知られているところであり、教室の柴山¹⁾、竹田²⁾等はこれに関する詳細の報告を嘗て行つた。その量は高々1日50γ前後に止まるが、外に遊離 17-hydroxycorticoids として正常には2~300γになんなんとする物質の排泄のあることが知られている。而してこれら以外に比較的大量の排泄を見るものは Bagget et al³⁾ の報告以来明かにされた還元されたホルモンの glucuronidate である。その量は測定の日最も正確と信ぜられる方法によつて (Glenn and Nelson⁴⁾)、日本人では男子1日3~4~5mg 女子 2~3mg (教室本田測定⁵⁾) ばかりである。

一方 corticosteroids の 17-ketosteroids への途は、後者の総量が正常健常人の1日尿中に約10mg前後に上るけれども、corticosterone, hydrocortisone を前階物質とする限り 17-ketosteroid 中の 11-ketoetiocholanolone, 11-hydroxyandrosterone が主としてこれに関係するのであつて、その量は1日高々1~2mgに止まるとせられる。

かくて今生体に cortisone 乃至 hydrocortisone を負荷した場合、尿中にはそれが reduced 17-hydroxycorticoids 総量の増加となつて現われると同時に上記 17-ketosteroid の排泄増加として証明せられる。しかし既に従来⁶⁾の研究者が指摘したようにこれら物質の排泄量を以てして負荷せられた皮質ホルモンの運命を到底悉く説明することが出来ない。負荷せられた皮質ホルモンの血中からの迅速なる消失を当該物質の組織吸着に一部求めんとした業績⁶⁾もあるが、これとても量的に尿中排泄量の不足を解決するに決して充分でない。そのことは皮質ホルモン含有液に生体組織片を投入した場合の成績について見るも明かであつて、生体組織では就中肝が皮質ホルモンを最も旺んに分解又は変化することが知られているが、組織に固定せられるホルモン

の量は比較的僅少であり、又成程 polarity の高い還元物質への変化は多少追求せられないでないが、17-ketosteroids への分解過程すらこれを追うに甚だ不明瞭である。

いい換えれば肝組織中において未だ吾々に知られない分解過程が別途に行われていることになる。

それは兎に角として今一つ皮質ホルモンの胆道への排泄については従来これを明かにした研究成績は甚だ寡ない。ただ一つ最近 Wyngaarden et al⁷⁾ により動物につき C¹⁴ labeled のホルモンを使用してこの間の消息を明かにした業

蹟が報告されており、その成績は頗る参考に値する。しかしそれにしても具体的に皮質ホルモンが如何なる形体に変化を遂げたか、これに関して述ぶるところは甚だ少ない。

著者は本報告において或いは人胆汁を用い、又或いはマウスを使用して之に hydrocortisone 乃至 corticosterone を投与した後の消化管内排泄状況を極力明かにせんと欲した。その得たるところは未だ必ずしも充分なりといえないが、今後かかる方面の研究に対する橋頭堡を些かなりとこれによつて築き得たとすれば、著者の本懐これに過ぎることはない。

実 験

〔I〕 マウスに hydrocortisone 又は corticosterone を負荷せる場合、その消化管内運命について。

a) マウスに hydrocortisone 200γ を皮注せる場合 (蛍光 corticoid 測定による追跡)。

体重 20g 前後のマウスに hydrocortisone 200γ を皮下注射して、消化管中に出現した蛍光 corticoid の総量と、残余の体全部に存した蛍光 corticoid 総量を比較検討せんと欲し、次の実験を試みた。

実験方法

試薬

1) クロロホルム、2-4-dinitrophenylhydrazine から再蒸溜する。即ち市販クロロホルムに 1/5 容量の D. N.P. 試薬溶液 (5% 塩酸溶液 100cc 中 2-4-dinitrophenylhydrazine 50mg を溶解する) を加え数時間還流冷却器を附し煮沸、後冷却する。次いでクロロホルム層を分離し、無水芒硝にて脱水後蒸溜を 2 回行う。

2) アルコール。局方アルコールを 2 回蒸溜精製する。

3) 石油エーテル。約 1/10 容の硫酸を加え振盪し、硫酸の着色しなくなる迄繰返す。後水洗し蒸溜する。40°C~60°C の部分を探る。

4) 1/10N 苛性ソーダ溶液。特級苛性ソーダ粒を使用する。

5) 塩酸。試薬特級。

6) 醋酸緩衝液。0.2mol 醋酸、0.2mol 醋酸ソーダ

等量液。pH. 4.5。

7) 醋酸。

8) β-glucuronidase. Peter Bernfeld and William H. Fishman⁸⁾ に従い牛肝より自製す。1cc 中 3300 Fishman 単位の力価を含有した。その盲検値は 1cc を使用しても甚だ僅少であり、その使用量より見ても亦問題として探るに足らない。

9) 1% 及び 4% アルコール含有クロロホルム。

10) Celite。第一製薬製。

11) 磷酸。特級 85%。

12) 蒸溜水。再蒸溜水を用う。

主なる実験器具

1) 総ガラス製の真空蒸溜装置。附短柄及び長柄コルベン。

2) 共栓付遠心管。

3) 硝子管柱。column chromatography 用の硝子管としては内径 5mm、長さ 80mm もので上部に内径 25mm の膨隆球状部を有するものを作成、その上端を摺合せとし、これに二連球連結用の硝子小管を付属せしめる。又上記管柱の下部も摺合せとし、これに長さ 3.5cm の活栓付硝子小管の上端を嵌入せしめ得るが如くした。

試獣の処理

先ず遊離型蛍光 corticoid 測定には次の如く 2 様の処理を試獣に試みた。

その第 1 は体重 20g 前後の雄性マウスを撲殺、開腹の上、胆嚢及び腸管を体部より取外し、後者についてはその内容を共に、或いは各別に集め、胆嚢及び腸内

壁を水(10cc)にて洗滌, よく乳鉢内にて磨碎, 攪拌する。一方残り体部及び先に洗滌して残つた腸管, 胆嚢をこれに合せ, ミキサーに投入し, 水 30cc を加えて攪拌, 挫碎する。斯くて夫々の懸濁液を倍容量のクロロホルムにて抽出すること 2 回, クロロホルム層を探り, 少量の 1/10N 苛性ソーダには洗滌し, 洗滌に用いた苛性ソーダは少量のクロロホルムにて再抽出の上, これを前者に合し, 全クロロホルムを 50°C 以上の温浴中にて減圧乾固する。次いで乾固物を全量 2.1cc のアルコールに溶解し, 共栓付遠心管中に移し, これに 0.9cc の水を加えて 70% アルコール (3cc) 溶液とする。これを石油エーテル 1cc と振盪後遠心し石油エーテル層を捨てる。この石油エーテル洗滌操作を繰返すこと 3 回の後, 残りの 70% アルコール溶液を減圧の下に乾固し, クロロホルム 5cc に溶解, その 1cc を探つて蛍光 corticoid 測定に供した。

又試獣の第 2 の処理としては上記同様処理せるマウス消化管内容+水 10cc, 残余の体部+水 30cc の水溶液に, 夫々アルコール 21cc, 70cc を加え 70% アルコール溶液として攪拌, 抽出し, 遠心管に収めて遠心, 上澄のアルコール分を探る。遠心管内容には更に少量の 70% アルコールを加え, 攪拌して遠心, 上澄を前のアルコールに合してアルコール懸濁液を得, アルコールを注意して 50°C 以下で減圧蒸溜, 水溶液のみとなりたる處で蒸溜を止め, これを定量的にクロロホルムで抽出, クロロホルム層を乾固し, 70% アルコール・石油エーテルの分配 chromatography に付すること上述の如くした。此方は下記抱合型 corticoid 抽出のために毎常探られた方法であつた。

次いで抱合型 corticoid の測定には上記の如く試獣を第 2 の方法によつて処理し, 最初アルコールを比較的低温で蒸散せしめ, 水溶液のみとなつた處で蒸溜を止め, これをクロロホルムにて抽出, 上記の如く遊離型を抽出した後の水を 2 分して, 一方は濃塩酸等量にて約 15 分振盪, 一方は Streptomycin の一小刀尖を投入してから約 1/10 量の 醋酸緩衝液及び醋酸を用いて pH. 4.5~4.8 となし, β -glucuronidase を 1cc あたり約 300 Fishman 単位混和して 48°C, 15 時間の温浴中に保存, 何れも後これを定量的にクロロホルムにて抽出, 70% アルコールにて溶解, 石油エーテルにて洗滌, アルコールを減圧乾固の上クロロホルムに溶解, 下記 70% chromatography の材料を宛てた。

蛍光 corticoid 測定法

1) column による Cpd. B, Cpd. F 劃分の作成。

前記 column chromatography 用硝子管の下端と接合すべき活栓部の上断端を小濾紙片で蔽いて後, 硝子管に接合, 輪ゴムにて両者を緊縛す。次いで column 上端より celite 100mg を純アルコール約 1cc を用い, 二連球にて送気加圧して流し込み充填する。後加圧しつつ今度はクロロホルム 4cc を用いて管内をよく洗い出し, 最後に上述試料のクロロホルム溶液 1cc を流し, 再びクロロホルム 3cc を通した後, 最初 1% アルコール含有クロロホルム 1cc を流し反応管に受け, 更に 4% アルコール含有クロロホルム 1cc を流し反応管に受ける。

前者には Cpd. B (corticosterone)-like substance, 后者には Cpd. F (hydrocortisone)-like substance が含有せられる。何れも減圧の下に乾固して比蛍光に供する。

2) 比蛍光。

上記反応管内乾固被検体に 85% 磷酸 4cc を加えよく混和して後, 沸騰水中にて 25 分間加熱, 後氷水中にて急冷し, hydrocortisone 2 γ を標準として島津分光光度計 QB-50 蛍光装置にて比蛍光する。光源はタングステン燈で, 一次フィルターは K-7 (450m μ), 二次フィルターは YA-3 (520m μ 以上) である。

3) 計算

被検体中蛍光 corticoid (fluorogenic corticoid) は次式により算出せられる。

$$F.C. = 2\gamma \times \frac{A}{100} \times x$$

A : 検体の比蛍光度。

x : 比検体全量に対する測定材料の量的補正。

なお corticosterone は hydrocortisone に比し蛍光発生度が 1/2 であるので算出せられた値の中 Cpd. B like substance に属する値は 2 倍して記載する。

盲蛍光は使用クロロホルム少量にして取るに足らざることを確認し得たので略した。

実験成績

先ず第 1 表は試獣 No. 1 の体部につき, その細粒懸濁液クロロホルム抽出液を Cpd. B, F 各分割に分離, 所謂蛍光 corticoid 含量を測定したものである。

又第 2, 3 表は No. 2, No. 3 の夫々体部, 消化管内容の細粒アルコール抽出液につき, 前述の如くして先ず遊離 corticoid を分離, その残

留液に塩酸処理又は酵素処理を行つて後のクロロホルム抽出物についてこれまた Cpd. B, F 各分割に夫々分ち 螢光 corticoid を測定した値である。

第 1 表

No.1, 17g.		free γ
体 部	B	4.6
	F	6.8
		11.4

第 2 表

No.2, 22g.		free γ	HCl 処理 γ
体 部	B	3.4	6.6
	F	2.0	10.4
		5.4	17.0
消化管内容	B	6.4	8.8
	F	6.1	13.7
		12.5	22.5

第 3 表

No.3, 20g.		free γ	β -glucuronidase 処理 γ
体 部	B	4.2	2.8
	F	6.0	1.6
		10.2	4.4
消化管内容	B	1.6	4.4
	F	4.0	3.8
		5.6	8.2

以上の成績の示す如く、正常マウスにおいては体部、消化管内容ともに遊離型 Cpd. B 様物質の量は高々 6.4 γ の域を出ず、Cpd. F 様物質は 6.8 γ を超えなかつたに拘らず、抱合型として塩酸水解の処理を行つた部分は何れも高値を示し、Cpd. B 様物質は体部、消化管内容において、夫々 6.6 γ , 8.8 γ , Cpd. F 様物質は夫々 10.4 γ , 13.7 γ , 合計体部 17.0 γ , 消化管内容は 22.5 γ であつた。しかるに β -glucuronidase により処理を行つたものでは Cpd. B, F 様物質合せて体部 4.4 γ , 消化管内容 8.2 γ という低値であることを認めた。塩酸処理を行つた場合に Cpd. B 様物質より Cpd. F 様物質の方が高値

であることも銘記する要がある。

ここにおいて Cpd. F を負荷した場合は如何なる値を示したであろうか。

hydrocortisone はその 200 γ 含有アルコール溶液を背部皮下に注射した。試獣撲殺は注射後 1 時間とし、その間に脱糞した糞便は消化管内容に合した。

第 4 表は第 1 の抽出法に従い、試獣 No.4 に Cpd. F を負荷 1 時間後に細挫した懸濁液から直接クロロホルム抽出を行い、遊離型の Cpd. B, F 様各物質を分離測定したものであり、第 5 表には試獣 No.5 に Cpd. F を同量負荷 1 時間後、第 2 の抽出法に従つて一旦試料のアルコール抽出を行いたる後アルコールを蒸発せしめ、ここに得た水溶液よりあらためてクロロホルム抽出物を得、型の如く遊離型を測定した値を掲げた。而うして第 6, 7 表には試獣 No.6, No.7 に Cpd. F を同量負荷して 1 時間後に試獣を撲殺、同じく遊離型 corticoid を分離、残留液に塩酸処理又は酵素処理を行つて再びクロロホルムにて抽出、アルコール・石油エーテル分配 chromatography に付したる後 Cpd. B, F 様物質を夫々分つて測定した成績を掲げた。

第 4 表

No.4, 19g. Cpd.F200 γ 負荷後 1hr.		free γ
体 部	B	5.2
	F	1.7
		6.9
消化管内容	B	6.4
	F	5.5
		11.9

第 5 表

No.5, 14g. Cpd.F200 γ 負荷後 1hr.		free γ
体 部	B	5.8
	F	5.7
		11.5
消化管内容	B	11.2
	F	7.0
		18.2

第 6 表

No.6, 22g Cpd. F200 γ 負荷後 1hr.		free γ	HCl処理 γ	β -glucuronidase 処 理 γ
体 部	B	2.0	8.6	2.0
	F	5.0	11.7	2.4
		7.0	20.3	4.4
消化管内容	B	15.4	23.4	
	F	14.7	33.3	
		30.1	56.7	

第 7 表

No.7, 22g. Cpd. F200 γ 負荷後 1hr.		free γ	HCl処理 γ	β -glucuronidase 処 理 γ
体 部	B	5.8	6.2	2.4
	F	2.7	6.9	2.3
		8.5	13.1	4.7
消化管内容	B	8.4	6.2	2.4
	F	6.8	9.5	1.6
		15.2	15.7	4.0

以上の成績によれば Cpd. F 200 γ を負荷して試験 No.4, No.5, No.7 に見るが如く、何れも未処置のものに比し遊離型螢光 corticoid の著明な増量を証しなかつた。又 β -glucuronidase 処理により得られた値も試験 No.6, No.7 成績に見る如く未処置の試験 No.3 にこれを比較して Cpd. B, F 様物質の何ら増量を示さなかつたに拘らず、独り胆嚢の著しく膨大せる No.6 例において消化管内容から遊離型総計 30.1 γ (Cpd. B 様物質 15.4 γ , Cpd. F 様物質 14.7 γ)、塩酸処理を受けたる総計 56.7 γ (Cpd. B 様物質 23.4 γ , Cpd. F 様物質 33.3 γ) という高値を示した。而もここで塩酸処理を受けた 56.7 γ なる値の中 33.3 γ が Cpd. F 様物質として占められていたことが目立つた。

そこで或る試験において試料の塩酸処理を行つて分離した螢光物質が著しく増加し、しかし他の試験において同一の結果が得られなかつたことは胆嚢内容がやがて糞便に混入する場合、前者中に排泄せられた螢光物質が失われるのではなからうかという、疑問に関して次の実験を試みた。

即ち同じくマウスに上記同様にて Cpd. F

200 γ を負荷し 1 時間後撲殺開腹の上、得たるマウスの消化管内容を、胆嚢内胆汁と小腸の流動性乃至半流動性の内容と合したものと、大腸中の有形便と負荷後撲殺迄に排便された糞便を合したものとに分けて、前記第 2 法により遊離型と遊離型抽出後の試料を塩酸処理にて得た抱合型について、Cpd. B 様物質及び Cpd. F 様物質を分けて測定せるに次の (第 8 表) 結果を得た。

第 8 表

No.8, 20g. Cpd. F200 γ 負荷後 1hr.		free γ	HCl処理 γ
胆嚢及び小腸内容	B	7.2	4.6
	F	3.2	4.3
		10.4	8.9
大腸内容	B	2.8	9.0
	F	3.0	6.5
		5.8	15.5
消化管内容 総計	B	10.0	13.6
	F	6.2	10.8
		16.2	24.4

即ちその消化管内容総計において遊離型 16.2 γ 、塩酸処理によるものは 24.4 γ であり、前に掲げた No.7 例の夫々 15.2 γ , 15.7 γ と略々大

差なき値を示したが、この際大腸内容の値が遊離型 5.8 γ (中 Cpd. B 様物質 2.8 γ , Cpd. F 様物質 3.0 γ)、塩酸処理によるもの総計 15.5 γ (中 Cpd. B 様物質 9.0 γ , Cpd. F 様物質 6.5 γ) で、胆嚢内胆汁 (この例ではあまり採取出来なかつた) に小腸の半流動性内容を合せたものの遊離型 10.4 γ (中 Cpd. B 様物質 7.2 γ , Cpd. F 様物質 3.2 γ)、塩酸処理による分は 8.9 γ (中 Cpd. B 様物質 4.6 γ , Cpd. F 様物質 4.3 γ) であり、格別大腸中にて吸収若しくは破壊せられる模様もなく、このようなことでは上述の成績の場合々々における相違を未だ説明するに充分でない。

b) マウスに corticosterone 200 γ を皮注せる場合 (同じく螢光 corticoid 測定による追跡)。

前記試験には負荷物として hydrocortisone を用いたが、周知の如く人体では主として本物質の末梢血液中運行を見るときは、ことにラッテにおいては全く趣を異にし、corticosterone を主体とすることは先人⁹⁾の教えるところである。従つてマウスにおける実情は未だ確められ

ていないが、同じ齧歯類なるが故に一応このことを考慮して、本項には corticosterone を負荷することとした。

実験方法

試薬

前記の通り。

試獣の処理

負荷の方法は前と同じく、但し corticosterone 200 γ 皮注し、試獣の解剖はこれ亦 1 時間後に行つた。

即ち試獣 No.9 を上記の如く処置し撲殺、試料のアルコール抽出を行いたる後、アルコールを蒸散せしめ、ここに得た水溶液よりあらためてクロロホルム抽出物を得、型の如く遊離型を分離し、残留液に塩酸処理又は酵素処理を行つて再びクロロホルム抽出、溶媒を乾固せる後、アルコール・石油エーテル分配 chromatography に付し、次いで Cpd. B, Cpd. F 各分割を分離、螢光 corticoid を測定す。

螢光 corticoid 測定法

前述の如し。

実験成績

成績を第 9 表に示す。

第 9 表

No.9, 22g. Cpd. B200 γ 負荷後 1hr.		fsee γ	HCl 処理 γ	β -glucuronidase 処 理 γ
体 部	B	2.2	7.0	3.6
	F	3.9	8.2	2.1
消 化 管 内 容	B	10.4	24.4	4.2
	F	7.9	58.0	3.4
		6.1	15.2	5.7
		18.3	82.4	7.6

この時も剖検に際し胆嚢の胆汁を以て充満せることを見たが、体部、消化管内容の遊離型螢光 corticoid は夫々 6.1 γ , 13.8 γ であり、これを未処置のものに比し後者の僅かに増量せるを認めたに過ぎなかつた。而うして β -glucuronidase 処理を経たものも体部 5.7 γ , 消化管内容 7.6 γ で何れも比較的低い値であつたに拘らず、塩酸処理を受けたものでは体部並びに消化管内容夫々 15.2 γ , 82.4 γ なる値を示し、螢光 corticoid, 特に Cpd. F 様物質の著しい高い値を証したの

である。

即ち Cpd. B を負荷しても Cpd. B 様物質の増量というより、Cpd. F 様物質に顕著なる増加を見たということは、宛も前回 Cpd. F を負荷した例において試獣と同様の成績を得た訳である。而うしてこの No.9 例も No.6 例と同じく胆嚢の大いなる膨隆を認めしめたことは特に銘記すべきであり、たとい Cpd. B そのものを負荷せしめても、胆汁の排泄が充分でなかつたような場合には、このような排泄の増加が認め

られなかつたかも知れぬ。

小括

以上蛍光法によつて測定を行つたころのものは、はじめから生体内にこれを見出し、或いは負荷せられた Cpd. F なり Cpd. B なりが測定中の人工操作により変化しないものということをも前提として考察を加へんとした実験である。

遊離型としては Cpd. F 分割乃至 Cpd. B 分割に Cpd. F, Cpd. B, その他何ものがあつても操作中に變改を蒙ることは少なかつたであろう。同様なことは β -glucuronidase 処理によつても大體いわれる。にも拘らず少なくとも投与せられた大量の Cpd. F 又は Cpd. B が体内においても消化管中にも殆んど見出されなかつたということは、投与物質が体内において非蛍光性の他の物質に変化したか、或いは glucuronide 以外の抱合型物質として排泄されたのであろう。

しかるに被検試料を塩酸にて処理して後抽出せる場合、果然腸内容物に蛍光物質の甚だ増量が認められる場合のあることを知つた。

而もかく増量せる物質は立派に corticosteroid を測定する分割中に見られたのであるから、恐らく与えられた Cpd. F 或いは Cpd. B, 又はその代謝産物に属したとみる他はない。

この結果は Wyngaarden et al がラッテにおいて(モルモットでは態度を異にす) C^{14} labeled hydrocortisone を皮下注射せる際、第1日にその60%内外を糞中に証したい成績に大體一致する。而も彼等の排泄せられた C labeled hydrocortisone 代謝産物の内訳中、胆汁内容でも糞中でもその30%内外が塩酸処理抽出物中に見出さ

れ glucuronidase 処理では2~5%にこれを見出したに過ぎないという成績と傾向を等しくする。但し Wyngaarden et al の実験では塩酸処理と同時にこれに加熱処理を施しているので、著者の加熱処理を施さなかつた場合と異なり、より大なる破壊を來したであろうから、實際は塩酸処理により抽出せられ得る物質は彼等の検出した量よりも、遙かに上廻るべきであろうことが推察されてよい。異なる点はただ糞便内容とし C^{14} labeled hydrocortisone 代謝産物の行方を追跡せる場合、遊離型として約その50%内外を検出していることであるが、吾々の場合遊離型はそれ程に達しなかつた。

さてしかしかくの如く消化管中に増量をみた物質が、投与せられた Cpd. F 又は Cpd. B それ自身であつたことは直ちに考え難い。それは Cpd. F を投与して消化管内に増量せる場合、Cpd. F 分割, Cpd. B 分割双方にその増加が認められたことは、或いは Cpd. B を投与して Cpd. B 分割の増加も存したが Cpd. F 分割の増加が却つて大であつたこと等からも凡そ推察がつく。

しからば Cpd. F 乃至 Cpd. B の相互間における移行が存したのであろうかというに、事情はより甚だ複雑であるに相違ないが、今これを論ずるに先立つて、吾々はかかる濃塩酸処理によつて(例え加熱しなくても)諸 corticoid が如何なる影響を蒙るかについて特にこれを知る必要がある。而してその一端を示すものは次の成績である。

即ち第10表には hydrocortisone, corticosterone, tetrahydrohydrocortisone 及び塩酸処理後

第10表 諸 corticosteroid 及びそれらの塩酸処理後の蛍光発生度

Corticosteroid 名	hydrocortisone	corticosterone	tetrahydrohydrocortisone
蛍光発生度	100%	49%	35%
蛍光発生度 (塩酸処理後)	34%	42%	31%

註：塩酸処理としては濃塩酸を上記 corticosteroids (25 γ) 溶液に等量に加へ15分間振盪処理し、クロロホルムにて抽出、その適量を乾固の上磷酸により螢光を發せしめ、hydrocortisone 2 γ に対する比螢光度を求め、上記百分率を算出した。

のそれら諸 corticosteroid を hydrocortisone に対する比蛍光度によつて示したが、何れの物質と雖も約30~40%でしかない。

処がここに一考を要することは corticosterone の hydrocortisone に対する比蛍光度が吾々の測定法では略々49%, tetrahydrohydrocortisone のそれが35%でしかないのであるから、この程度の塩酸処理そのものでは両者の変化が殆んどないことを意味し、hydrocortisone のみ抵抗性が弱いことが窺われる。

従つて上述の結果、もし仮に排泄物質が hydrocortisone であつたすれば塩酸処理後の値はその排泄量の一部を示すものであつて、その実はこれに幾倍かするものが排泄されたことになる。唯それにして同様に塩酸処理を施して、而も負荷動物としかざるものとの間に著差を認めなかつた場合があるので、かかる際に負荷した corticoid が消化管中に排泄されたとするは難く、例えば蛍光度を異にするか、或いは全然蛍光を發することのない或種の代謝産物に変化して、その排泄がみられているということを考慮せざるを得なくなり、即ち單に蛍光法のみによらず、その他の測定法をもつてこれを詳細に知ることが望ましい。そこで著者は次項におけるごとく検索を進めるところがあつた。

c) マウスに hydrocortisone 200γ を皮注せる場合 (corticosteroid の Porter 法¹⁰⁾, formalin 發生法¹¹⁾による追跡)。

今投与せる hydrocortisone の代謝産物としては従来の文献に鑑み種々のものが想定せられる。少なくともその一つは還元生成機体であつて、これについては dihydro F, tetrahydro F 更に進んで pregnane-17-20-21 triol 属物質が考えられ、又酸化酵素の影響をうけた例えば 17-ketosteroids 類がある。それらの悉くをかかると小動物について追究することは容易でないが、試みに Porter 法 (17-OH corticosteroid 測定法), formalin 發生法を前記蛍光測定法と同時に実施して次の成績を得た。

因みに Porter によるときは 17-hydroxy-20

keto-corticoids の消長を知ることが出来るが、Cpd. B like substance についてはこれが消長を知ることが出来ない。

一方しかし formalin 發生法によるときは、20-keto-20methyl corticosteroids を除く 17-hydroxycorticoids のすべて、Cpd. B, pregnane 20-21-diol corticoids 総量を知ることが出来る。従つて hydrocortisone の直接還元生成機体は凡てこれに入るであらう。

実験方法

試薬

抽出用並びに螢光 corticoid 測定用試薬はすべて前述の通り。

Porter 反応用試薬

1) n-ブタノール¹²⁾。市販のブタノールを蒸溜して、117°C~118°C の溜分を探り、その 1/10 容の10% 亜硫酸ソーダ液を加えて一晝夜以上室温に放置する。その後蒸溜水、1%硫酸、蒸溜水の順に洗滌して蒸溜し、初めに溜出する水分を分けて 118°C 以下の溜分を集め、これに少量の蒸溜水に溶解した硝酸銀及びその3倍量の苛性ソーダを加えて還流冷却器を附して1時間沸騰せしめて放冷、後蒸溜水にて洗滌、再び蒸溜して、同様に 118°C 以下の溜分を集める。次にこれの0.2容のフェニールヒドラジン硫酸試薬を加えて60°C で30分以上加熱後一晝夜以上放置する。これを蒸溜水で洗つて硫酸を除去し、無水炭酸ソーダ結晶を加えて脱水、分溜して沸点 117°C~118°C の部分を集める。

2) 硫酸試薬。蒸溜水 190cc に濃硫酸 310cc を加える。

3) フェニールヒドラジン硫酸試薬。前記硫酸試薬 10cc に再結晶により精製せる塩酸フェニールヒドラジン 16mg を溶解せしめる。

なお試薬は実験に臨みその都度調製する。

formaldehydogenic corticoid 測定用試薬

1) 過沃度酸試薬。0.25mol 硫酸 100cc に過沃度酸加里 690mg を溶解せしめる。

2) 塩化錫試薬。塩化錫 280mg を 2cc の濃塩酸に加熱溶解し、冷却後蒸溜水 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(1,8 dihydroxynaphthalene sulfonic acid) 150mg を蒸溜水 2cc に溶解し、濃硫酸を加えて 50cc とする。使用に

臨んでは作製する。

5) アルコール。脱アルデヒドする。

試獣の処理

試料の採取処理。螢光 corticoid 測定法については前述の如くなるを以てこれを略する。

Porter 法

実施

試料のアルコール乾固物を 4.0cc の n-butanol に溶解、これを 2 本の試験管に等分し、一方にはフェニールヒドラジン硫酸試薬 3cc を加え、他方には硫酸試薬を加える。前者を sample A、後者を sample B とする。又別に溶媒として使用した n-ブタノール 2cc 宛を入れた試験管の一方にはフェニールヒドラジン試薬 3cc を加え、これを blank A とし、一方には硫酸試薬 3cc を加え、これを blank B とする。

以上の試験管を 60°C の温浴中に入れ 30 分間加温し、後直ちに流水中に冷却する。

測定

Beckmann 分光光度計 QB 50 にて反応液を 3cc の液槽に移したものにつき 390m μ 、410m μ 、430m μ における夫々の吸光度-log T を読む。

計算

$$\text{Sample A} - \text{Sample B} = a$$

$$\text{Blank A} - \text{Blank B} = b$$

として (a-b) の 390m μ 、410m μ 、430m μ における値を求める。

而うして同様操作を経て作成された hydrocortisone による吸光度曲線より 410m μ におけるフェニールヒドラジンとの反応物質量を γ/dl にて求める。吸光係数は 80 であつた。

formaldehydogenic corticoid 測定法

実施

乾固せる被検体エキスに 2 滴宛のアルコールを滴下

溶解し、水 4cc を加えてよく混和する。これに過沃度酸試薬 0.5cc を加えてよく混じ、25°C にて 30 分間酸化を行わしめ、塩化錫試薬 0.5cc を加えて酸化を止める。

以上の反応液を小蒸溜フラスコに移し、酸化に用いた容器を 3mol 硫酸 1cc にて洗い、蒸溜フラスコに投じて合する。他方蒸溜受けの小目盛附試験管にはクロモトローブ酸試薬 3cc を容れ、全量 7cc となる迄蒸溜を進める。これを沸騰せる重湯煎に 30 分間収めて発色せしめる。反応終了後直ちに冷却する。

測定

比色に際しては日立製光電比色計を用い、フィルターは YB (570m μ)、セルは液層 10mm のものを使用した。

而して別に hydrocortisone にて作成された標準曲線より、吸光係数 242 が求められ、これにより試料中の formaldehydogenic corticoid の値が求められる。

実験成績

先ず主として Porter 法により負荷せる corticoid の追跡をなした場合を第 11 表成績とする。

即ち試獣に hydrocortisone 200 γ を皮注して消化管内容に塩酸処理後の螢光物質を、比較的少量に検出したことは前項の結果と全く同一であつた。その場合 Cpd. F 分割のそれが比較的多かつたが、Cpd. B 分割も可成り増加していた。唯異なる成績としては未だ体内にこれ迄にない稍多量の Cpd. B 分割物質を保存していたことが知られる。Cpd. B 分割が大體 Cpd. B 様物質を含有するものとして Porter 反応を与えないことは当然であるが、Cpd. F 分割では何分全量といつても夫々余りにも少量なので仮

第 11 表

No.10, 25g.		free γ		HCl 処理 γ		β -glucuronidase 処理 γ	
		螢光法	Porter 法	螢光法	Porter 法	螢光法	Porter 法
Cpd. F200 γ 負荷後 1hr	B	16.2	(-)	3.3	(-)	7.5	(-)
	F	1.3	(-)	3.0	(-)	1.6	(-)
体 部		17.5		6.3		9.1	
	B	9.2	(-)	18.0	(-)	1.5	(-)
消化管内容	F	4.2	(-)	22.4	(-)	1.1	(-)
		13.4		40.4		2.6	

に Cpd. F そのものが存したとしても、到底 Porter 反応にかかる可くもなかつた。唯消化管内排泄分で塩酸処理によりその増量を見た22.4%という物質は、もしそれが塩酸処理により未だ完全に侵されることのなかつた Cpd. F であつたとすれば、当然本反応陽性であるべきであるが、このことを見なかつたことは排泄せられ

たものが主に代謝終末産物に属したことを物語るものに外ならない。

次に Cpd. B, F 両分割につきその formalin 生成量よりこれを corticoids として表わせるに、正常マウスにおいて第12表の如き結果を得、所謂螢光 corticoid として見たよりも遙かに高い F.C. 値が随処に得られた。

第 12 表

No.11, 15g.		free γ		HCl 処理 γ		β -glucuronidase処理 γ	
		螢光法	formalin法	螢光法	formalin法	螢光法	formalin法
体 部	B	3.6	24.2	6.1	80.6	0.8	21.2
	F	4.3	30.5	2.3	54.0	0.7	18.2
消化管内容	B	2.2	13.3	1.8	45.4	0.8	20.0
	F	3.2	13.6	2.5	26.6	0.7	18.2

なおここで塩酸処理により formaldehydogenic corticoids たる、例えば hydrocortisone, corticosterone, tetrahydrohydrocortisone が如何なる影

響を被むるかを formalin 発生法により検討するに、次の第13表に示す如くであつた。

第13表 諸 corticoid の塩酸処理後の F.C. 收得量

Corticoid 名	hydrocortisone	corticosterone	tetrahydrohydrocortisone
conc. HCl 等量にて15分振盪後收得	32%	82%	75%

即ち hydrocortisone が最も抵抗が弱く30%内外に減少、corticosterone, tetrahydrohydrocortisone はなお80%内外に反応する。

扱而うして今健康マウスに Cpd. F 200 γ 皮下注射せる場合、1時間目の分析成績を螢光 corticoids について見るに、負荷した管の Cpd. F は体部にも消化管内容にも既にこれを見ることを得なかつたのであるが、これは今迄にも遭遇した事実で一旦頗る奇異な感を抱かしめるものであつた。所がかように所謂 F.C. 量を追究することによつて、はじめてその実体を幾分補足し得た如くである。ということは第14表の例に見られるように、体部遊離並びに塩酸処理の Cpd. B, F 分割抽出物中の formalin 生成物質が甚だ増量していたことであつて、これは螢光

発生物質としては既にその存在を認めしめなかつたが formalin を発生する物質に変化して未だ体中に残存することを示したものに外ならない。ただ formalin 発生量からこれを corticoid になおして得た値は第12表における、正常マウス体部の夫々該当する F.C. 量を差引いてみても負荷せる量を甚だ凌駕していたが、解釈に苦しむところである。これは後刻詳細に検討すべきであらう。

なお又この際増加の率は Cpd. F 分割におけるよりも Cpd. B 分割において著しかつたことは一応記憶すべきであらう。

そこでこの増量が偶々一試獣における偶発現象でないことを認めるために著者は第3の実験として同様 Cpd. F 負荷後さらに長時間、即ち

第 14 表

No.12, 15g.		free γ		HCl 処理 γ		β -glucuronidase処理 γ	
Cpd. F200 γ 負荷後 1hr		蛍光法	formalin 法	蛍光法	formalin 法	蛍光法	formalin 法
体 部	B	10.8	432.0	5.4	347.0	0.8	48.0
	F	44.8	131.0	4.1	109.0	3.8	18.2
消化管内容	B	2.7	13.6	2.5	63.5	0.8	18.2
	F	5.9	18.8	5.0	30.1	0.7	18.2

24時間後に動物を解剖して分析を行った。

その結果は第15表に示す如く体内には最早蛍光物質としても, formalin 発生物質としても何ら負荷物質の残存することを認めなかつたし,

同じく第15表, 又第16表に示す如く, 両表の成績を通じて尿, 消化管内容等についてみても何ら負荷せるに足る同上物質の存在を認めなかつたのである。

第 15 表

No.13, 18g.		free γ		HCl 処理 γ		β -glucuronidase処理 γ	
Cpd. F200 γ 負荷後 24hr		蛍光法	formalin 法	蛍光法	formalin 法	蛍光法	formalin 法
体 部	B	4.1	27.2	10.1	76.0	3.2	24.2
	F	5.2	33.3	5.4	54.4	2.3	18.2
消化管内容	B	4.1	13.1	6.5	12.0	1.8	12.0
	F	4.2	6.0	7.9	18.2	2.2	14.8
尿	B	4.3	4.5	3.1	3.2	1.8	9.0
	F	5.6	7.6	2.0	6.1	2.0	14.4

第 16 表

No.14, 15g.		free γ			HCl 処理 γ			β -grucuronidase処理 γ		
Cpd. F200 γ 負荷後 24hr.		蛍光法	formalin 法	Porter 法	蛍光法	formalin 法	Porter 法	蛍光法	formalin 法	Porter 法
消化管内容	B	1.8	6.1		2.6	10.9		1.8	7.2	
	F	2.0	9.1	(-)	4.2	29.0	(-)	1.8	24.2	(-)
尿	B	4.3	3.0		3.6	6.1		1.8	6.1	
	F	5.8	9.1	(-)	2.0	8.4	(-)	3.0	14.5	(-)

小括

以上を要するに, マウスに皮質ホルモン, 即ちここでは hydrocortisone を負荷してその行方を探索せるに, 負荷後暫時間の中に原物質は変化し, 多くのものは formalin 生成 corticoid として暫時身体内に残留するようになり, (一部は

消化管内にその排出を見た場合もあるが) やがて身体内において可成り深い破壊を受くるものと推測せられる。

〔II〕 人胆汁中 corticosteroid の排泄について。

a) column chromatography による人胆汁中

の螢光 Cpd. B 様物質, Cpd. F 様物質の分離測定。

吾々は未だ人胆汁中に corticosteroid の如何様に排泄せられるかを知ることは甚だ少ないが, column ultramicrochromatography による所謂 Cpd. B 様物質, Cpd. F 様物質を分離す法を人胆汁に適用して如何なる結果が得られる方かを最初に求めた。

実験方法

試薬, 実験器具

前に同じ。

胆汁の処理

各種の疾患につき十二指腸ゾンデにより採取せられた所謂 B 胆汁を試料とす。即ち朝は絶食とし十二指腸ゾンデを嚙下せしめ, A 胆汁流出後, 25%硫酸マグネシア溶液を注入し流出する B 胆汁を集め, その 2cc をとり 5 倍量のクロロホルムにて 2 回抽出する。

クロロホルム抽出後の残つた胆汁を 2 分し, 一方は等量の濃塩酸にて振盪すること 15 分間, 一方は醋酸緩衝液にて pH. 4.5~4.8 にし β -glucuronidase 300 Fishman 単位を投入混和して 48°C に 15 時間保存する, この 2 様の処理を行つた後, 夫々 5 倍量のクロロ

ホルムで 2 回抽出した。

次いでクロロホルムを夫々 1/10N 苛性ソーダ溶液にて洗滌 (洗滌を行つた苛性ソーダ液はこれを再び少量のクロロホルムで抽出, 前のクロロホルムに合する), 50°C 以下にて減圧乾固する。乾固物は再び 5cc のクロロホルムに溶解, 共栓遠心管に移して再び乾固し, これをアルコール 0.7cc に溶解, 水 0.3cc を加えて 70% アルコール溶液とし, 更に石油エーテル 1cc を加えて振盪, 遠心分離して石油エーテル層を除く。斯くアルコール溶液を石油エーテルにて洗滌すること前後 3, アルコール層を完全に乾固してクロロホルムに再び溶解し, column を通し, 既知の如く Cpd. B 様物質, Cpd. F 様物質を分離測定す。なお corticosterone は hydrocortisone に比し螢光発生度は $\frac{1}{2}$ であるので測定値中 Cpd. B 物質に属する値は一応これを 2 倍して表わしたことは今迄の通りである。

実験成績

先ず第 17, 18 表に主として遊離型物質を, 第 19, 20, 21 表に遊離型と遊離型抽出後の胆汁を塩酸処理を行つて得た Cpd. B 様物質及び Cpd. F 様物質の値を, 第 22 表に同上遊離型と酵素処理を経て得たそれらの値を掲げる。

第 17 表

小寺, 25歳, ♂, 蕁麻疹		
Cpd.	反応管 番号	free
		γ /dl
B	1	0.0
	2	0.4
	3	7.2
	4	4.0
	5	3.2
	計	14.8
F	6	1.2
	7	8.0
	8	5.2
	9	2.4
	10	0.0
	計	16.8
	総計	31.6

第 18 表

中川, 23歳, ♀, 胆嚢炎		
Cpd.	反応管 番号	free
		γ /dl
B	1	2.4
	2	9.6
	3	9.6
	4	5.6
	5	4.8
	計	32.0
F	6	2.0
	7	22.4
	8	11.6
	9	11.6
	10	5.2
	計	52.8
	総計	84.8

第 19 表

永野, 39歳, ♀, 流行性肝炎			
Cpd.	反応管 番号	free	HCl 処理
		γ /dl	γ /dl
B	1	0.0	110.0
	2	4.0	124.0
	3	4.0	240.0
	4	1.0	190.0
	5	0.0	134.0
	計	9.0	798.0
F	6	0.0	40.0
	7	11.0	127.0
	8	29.0	215.0
	9	9.0	100.0
	10	3.0	65.0
	計	52.0	547.0
	総計	61.0	134.5

第 20 表

木村, 25歳, ♂, 胆嚢炎			
Cpd.	反応管 番号	free	HCl 処理
		γ/dl	γ/dl
B	1	0.0	52.0
	2	8.0	324.0
	3	28.0	600.0
	4	20.0	306.0
	5	8.0	104.0
	計	64.0	1386.0
F	6	2.0	34.0
	7	29.0	143.0
	8	49.0	333.0
	9	10.0	153.0
	10	3.0	55.0
	計	93.0	718.0
	総計	157.0	2104.0

第 21 表

梶川, 21歳, ♂, 胆嚢炎			
Cpd.	反応管 番号	free	HCl 処理
		γ/dl	γ/dl
B	1	22.0	338.0
	2	32.0	408.0
	3	48.0	312.0
	4	32.0	104.0
	5	20.0	24.0
	計	154.0	1186.0
F	6	24.0	0.0
	7	60.0	50.0
	8	21.0	133.0
	9	7.0	25.0
	10	4.0	12.0
	計	116.0	220.0
	総計	270.0	1406.0

第 22 表

小寺, 25歳, ♂, 蕁麻疹			
Cpd.	反応管 番号	free	β-glucuronidase 処理
		γ/dl	γ/dl
B	1	0.0	2.0
	2	24.0	16.0
	3	8.0	94.0
	4	2.0	46.0
	5	0.0	32.0
	計	34.0	190.0
F	6	5.0	0.0
	7	8.0	16.0
	8	43.0	117.0
	9	5.0	43.0
	10	0.0	34.0
	計	61.0	210.0
	総計	95.0	400.0

即ち各種患者 B 胆汁中には何れも γ /dl に換算し、遊離型 Cpd. B 様物質として夫々 9.0 γ , 14.8 γ , 32.0 γ , 34.0 γ , 64.0 γ , 154.0 γ /dl なる値が得られ、一定はしなかつたが梶川例の 154.0 γ /dl が最大であつた。又 Cpd. F 様物質としては夫々 16.8 γ , 52.0 γ , 52.8 γ , 61.0 γ , 93.0 γ , 116.0 γ /dl なる値が得られ、最後のものがその最も大なるものに属した。

しかるに遊離型物質抽出後塩酸処理により得られた値は Cpd. B 様物質永野例 798.0 γ /dl, 梶川例 1186.0 γ /dl, 木村例 1386.0 γ /dl, Cpd. F 様物質夫々 547.0 γ , 220 γ , 718.0 γ /dl で、Cpd. B, F 様物質総計において夫々 1345.0 γ , 1406.0 γ , 2104.0 γ /dl という遊離型に比し甚だ高い値が得られた。

而して β -glucuronidase 処理による値は小寺例に示されたが、この場合 Cpd. B 様物質は 190.0 γ /dl, Cpd. F 様物質は 210.0 γ /dl で、塩酸処理によるものよりは遙かに低い値を示すに過ぎなかつた。

b) paper chromatography による人胆汁 Cpd. F 抽出分割の解析。

以上人胆汁より抽出して、血液中螢光 corticoid 測定の場合におけるように Cpd. B 様物質, Cpd. F 様物質を分離し、夫々の値を得たが、果して如何なる corticoid に属するや否やに関し、主として Cpd. F 分割につき次のように paper chromatography による実験を進めた。

実験方法

試薬その他

前記のもの外に次のものを追加する。

- 1) ベンゼン. 約 1/10 容の硫酸を加え振盪し、硫酸の着色しなくなるまで繰返す。後水洗して蒸溜する。
- 2) プロピレングライコール。
- 3) トルエン。
- 4) 東洋濾紙 No.50。

抽出

人の B 胆汁約 50cc を用い、これを等量のクロロホルムにて振盪抽出すること 2 回、苛性ソーダにて洗滌、洗滌液はクロロホルムにて再抽出し前と合する。抽出後胆汁は塩酸処理 (等量の塩酸にて 15 分振盪)、又は酵素処理 (醋酸緩衝液及び醋酸にて pH. 4.5~4.8 としたのち β -glucuronidase を 300 Fishman 単位/cc の割に入れ、48°C, 15 時間保存) 後同上要領にてクロロホルム抽出を行う。クロロホルムは減圧乾固してペン

ゼン 3cc に転溶，等量の石油エーテルを加えて後，6cc の水にて 3 回抽出する。

これを等量のクロロホルムにて振盪抽出すること 3 回，クロロホルムを同一試験管にて乾固した。

chromatography

前記最後の乾固物をアルコール約 0.2cc に溶解し，毛細管ピペットにて予め準備された濾紙の原点に少量宛全量を添付する。濾紙は東洋濾紙 No.50 を幅 6mm に切つたもので，一端より 30cm の処を原点と定める。試料添付直前に濾紙をプロピレングリコールに浸し，余分は他の乾燥した濾紙に吸い取る。溶媒はプロピレングリコール飽和トルエンを用い，下行法にて 48 時間展開せしめた。しかる後濾紙を乾燥し，暗室にて印画紙を密着せしめ，240m μ の波長を有する紫外線を約 50cm の短距離を置いて投射すること 3 分程度，撮影を完了，現像，定着を行つた。なお paper chromatography 実施に当つてはその都度 Cpd.F 25 γ ，Cpd.E 25 γ の標準液を添付した濾紙を対照に置き試料に対すると同様の操作を併行して行つた。

斯くて得た写真像を参照し濾紙を適當間隔に切断し，夫々アルコール 3.5 cc を用いて 48 時間溶出し次の如く検索を進めた。

i) 紫外外部吸収曲線

濾紙溶出を行つた 3.5cc のアルコールに測定時各試験管洗滌に用いた 0.5 cc のアルコールを加えて全量 4cc とし，島津製 Beckmann 分光々度計 QB 50 により紫外外部吸収曲線を作成した。

ii) 螢光物質の測定

前 4cc のアルコール中 0.1cc を乾固，磷酸を加え，加熱することにより発生した螢光を測定した。詳細は前述の通りである。

iii) フェニールヒドラジンとの反応物質の測定

残余のアルコールを減圧乾固して実施する。詳細は前述の通りである。

実験成績

前節に chromatography により Cpd.B 様物質，Cpd.F 様物質分離測定を一応実施せる木村例に

つき，別に胆汁 40cc を採り前記方法に従い Cpd.F 分割の paper chromatogram を作成，溶出して諸検査を行つた成績を次に述べる。

paper chromatogram 写真図 (第 1 図)

遊離型抽出物の Cpd.F 分割を以てせる chromatogram においても，亦塩酸処理抽出の Cpd.F 分割 chromatogram にもこの場合は何れも紫外外部吸収帯を認めなかつた。

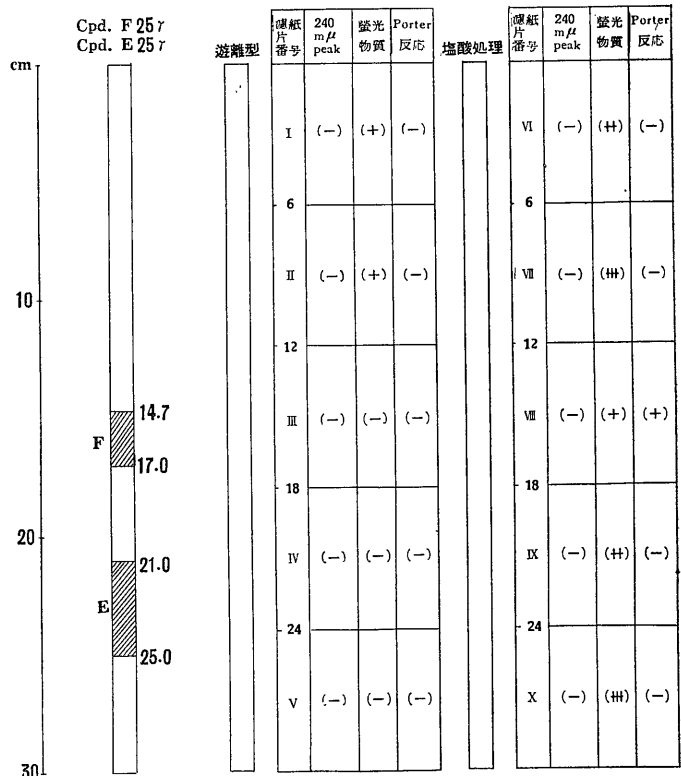
chromatogram 切片の紫外外部吸収曲線

遊離型抽出物質並びに塩酸処理抽出物質 Cpd.F 分割を展開せる紙片を第 1 図の如く等間隔に寸断し，これがアルコール溶液の紫外外部吸収曲線を作成したが，その何れにも 240m μ に peak を認めしめるものはなかつた。

各濾紙片溶出液中の螢光物質検索

各濾紙片アルコール溶出液について，比螢光

第 1 図 人胆汁 (木村例) の paper chromatogram.



註：算用数字は原点よりの距離を示す。

度を測定し、但しこれを人胆汁試料 10cc 中に 換算して第23表成績を得た。

第23表 人胆汁 (木村例) の蛍光物質

濾紙片番号	I	II	III	IV	V	計
γ /dl	16.2	3.0	0.0	0.0	0.0	19.2
濾紙片番号	VI	VII	VIII	IX	X	計
γ /dl	99.0	180.0	36.0	66.0	207.0	588.0

これを要するに遊離型蛍光物質の殆んどは Cpd. E, F よりはるかに polarity の高いものであることが明かにされた。しかし塩酸処理後の抽出 F 分割では全紙面に亘り可成り平等に蛍光物質の分布せることが知られた。

アルコール抽出液中の 17-OH corticosteroid の検索。

著者は別途、紫外部吸収曲線作成後の各アルコール溶液について Porter 反応を施行したところ I, II, III, IV では全然呈色反応の出現を見ず、V, VI, VII, IX, X で 17OH corticosteroid に特有な $410m\mu$ に peak を有する曲線は得られなかつたが、ただ VIII において特有の peak を $410m\mu$ に認めた。即ち未だ確実にこれをいう訳にもいかないが、塩酸処理抽出液の一部に僅かながら Cpd. F に相当する物質が排泄されたのではなからうかと思われる。

Cpd. F はこの塩酸処理で可成り破壊されることは前述の通りだから、或いは可成りにその排泄が証せられるものであつたかも知れない。

小括

以上要するに人胆汁においても corticoid 測定を対象とする検体の抽出物中に Cpd. F 様物質, Cpd. B 様物質を少量ながら検出する。而うしてこれよりも遙かに大量に塩酸水解をうける Cpd. F 様物質, Cpd. B 様物質が同じく存する。

しかし glucuronidase 酵素分解による同上物質の量は塩酸水解のものに比し遙かに少量である。

この事実は前項にマウス消化管内容についてこれを経験せると全く類似するものがある。

しかるに被検人胆汁の一例について遊離型

Cpd. F 分割、並びに塩酸処理後抽出 Cpd. F 分割を作製、paper chromatography による展開を試みたところ、前者遊離型蛍光物質としてはその大部分が原点に近く實際量としては Cpd. F 相当 6.5 γ 存するのみで、その殆んどが極性の高い物質からなつていたことを意味し、従つて紫外部吸収において何ら特徴を示さず、更に Porter 反応陰性であつたことはその物質が 4-pregnane-11 β , 17 α , 20 β , 21-tetrol-3one (FR), pregnane-3 β , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol (AR) の類 (Sweat¹³) ではなかつたであろうかということをおもひするものがある。

次いで塩酸処理により抽出出来た Cpd. F 分割においては蛍光 corticoids として、全量約 230 γ 存し、それはかなり紙面に平等に相当吸着されていたに拘らず紫外部吸収を示さなかつたことは、少なくとも d^4 3keto-corticoid そのままの状態に排泄されることが殆んどなかつたと見るべきであるが、ただ VIII 物質のみ Porter 反応を示し Rf が Cpd. F に一致していたので、これだけは確かに本物質の排泄が少量乍ら存したとみるべきではなからうか。(写真法により認むべき紫外部吸収帯を示さなかつたことは、蛍光 corticoid としての量が示す通り量的に少なかつたことで説明出来ないでない)。

〔Ⅲ〕皮質ホルモン製剤を負荷せる場合の人胆汁排泄物に関する検討

A) CORTONE (cortisone acetate, Merck-生理的食塩水懸濁液) 使用例について。

症例、稲葉、22歳、♂、原田氏病、連日コト 100mg 筋注治療中。

注射当日は午前 6 時、9 時に 50mg 宛計 100

mg 筋注，第2回注射後4時間のB胆汁60ccを得た。

a) column chromatography による Cpd. B 様物質，Cpd. F 様物質の分離測定。

実験の方法は前述の如くである。但しこの場合，値の大なるべきを予期して column 注入前試料のクロロホルム溶液を10倍量に稀釈して行つた。

実験成績

第24表に見られる如く稲葉例はコートン投与により先ず著しい遊離型蛍光物質の増量を見た。即ち Cpd. B 様物質 1648.0γ，Cpd. F 様物

第 24 表

稲葉，22歳，♂，原田氏病				
Cpd.	反応管番号	free	HCl 処理	β-glucuronidase 処理
		γ/dl	γ/dl	γ/dl
B	1	100.0	400.0	100.0
	2	952.0	520.0	320.0
	3	364.0	3036.0	300.0
	4	150.0	2445.0	200.0
	5	82.0	1368.0	200.0
	計	1648.0	7760.0	1120.0
F	6	90.0	450.0	20.0
	7	476.0	4534.0	141.0
	8	89.0	1034.0	334.0
	9	44.0	1043.0	116.0
	10	17.0	513.0	113.0
	計	716.0	7574.0	744.0
総計		2364.0	15334.0	1864.0

質の 716.0γ 計 2364.0γ/dl であり，ホルモンを負荷せざるものの，高々 300γ/dl なりしに比すれば驚くべき高値であり，更に塩酸処理を経た値の Cpd. B 様物質 7760.0γ，Cpd. F 様物質 7574.0γ 計 15334.0γ/dl は更にその数倍に達する高値であることは頗る注目すべきであつた。而うして酵素処理によるものも Cpd. B 様物質 1120.0γ，Cpd. F 様物質 744.0γ 計 1864.0γ/dl で，これまた著明な増量を来した。

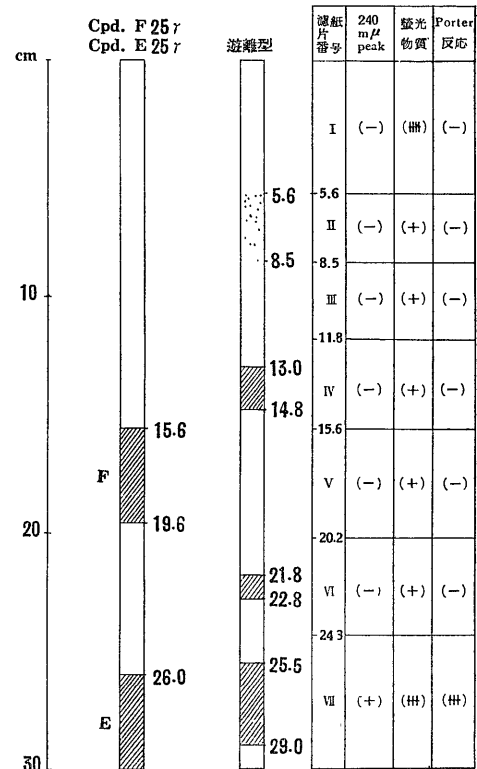
b) paper chromatography による解析。

前記稲葉氏胆汁 50cc より上記の如く抽出せるものにつき，paper chromatography を施行して分光光学的解析を進めた。

実験成績

paper chromatogram 写真図 (第2図)

第2図 CORTONE 負荷 (稲葉例) の胆汁 paper chromatogram.



註：算用数字は原点よりの距離を示す。

本例においては対照としての Cpd. F, E の spot 位置と較べて Cpd. F より稍々上方，即ち原点より 13.0~14.8cm の間に 1コ，Cpd. F, Cpd. E の中間部，即ち原点より 21.8~22.8cm の間に 1コ及び略々 E に一致して 25.5~29.6 cm の間に 1コ の紫外部吸収帯出現を見た。

chromatogram 切片の紫外部吸収曲線

第2図の如く切断した濾紙片のアルコール溶出液より紫外部吸収曲線を作製したが，I, II... VI においては 240mμ に peak を証せず，VII

においてその11倍稀釈液より 240m μ と 270m μ に peak を有する二峰性の 曲線を得た。

各濾紙片溶出液中の 螢光物質検索

各濾紙片アルコール溶出液について、比螢光度を測定し、但しこれを胆汁 100cc 中に換算して第25表成績を得た。

第25表 CORTONE 負荷 (稻葉例) の 螢光物質

濾紙片番号	I	II	III	IV	V	VI	VII	計
γ /dl	540.0	7.2	4.5	11.6	4.9	2.6	120.0	700.8

即ちこれによつて螢光を發生する物質は前項例においてもそうであつたように殆んどが原点に近く存し、これに次いで Cpd.E 相当の部位に少許これを認めたことが分明する。

アルコール抽出液中の 17-OH corticosteroid の検索

更に前紫外部吸収曲線作製後のアルコール溶液 (但し VII においては全量の $\frac{1}{11}$ を使用した) を用いて Porter 反応を行えるに独り VII 部に 17-OH corticosteroid 特有の 410m μ に peak を有する呈色を得た。これは hydrocortisone に換算

して 115 γ /dl であり。ここに比較的僅少なながら Cpd.E の排泄が行われたのでなからうかと思われる。

症例、得田、25歳、♀、肺結核

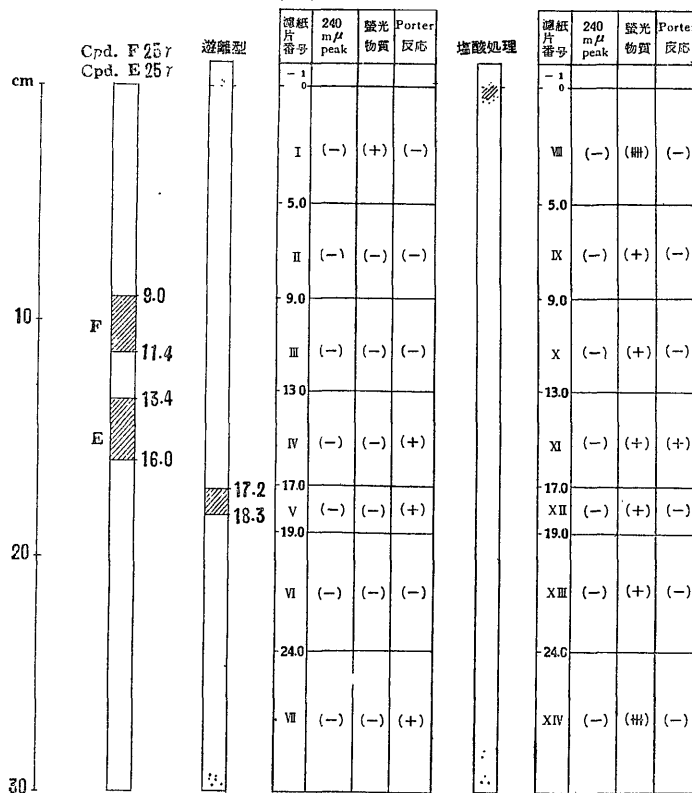
検査当日は午前6時コートン 30mg を筋注、6時間後の B 胆汁 50cc を得た。これにより遊離型及び遊離型抽出後塩酸処理を経たものに分けて paper chromatography による解析を試みた。

実験成績

paper chromatogram 写真図 (第3図)

本例においては遊離型は対照としての Cpd.

第3図 CORTONE 負荷 (得田例) の胆汁 paper chromatogram.



註：算用数字は原点よりの距離を示す。

E, Cpd.E の spot 位置に較べて Cpd.E より稍々下方, 即ち原点より 17.2~18.3cm の間に紫外外部吸収帯出現を見た. 塩酸処理によるものは原点附近にこれを認めるのみであった.

chromatogram 切片の紫外外部吸収曲線

第3図の如く切断した濾紙片のアルコール抽出液より紫外外部吸収曲線を作製したが, 遊離型抽出物展開濾紙片溶出液 (I, II……VII), 塩酸抽

出物展開濾紙片溶出液 (VIII, IX……XIV) の何れよりも 240m μ に著明な peak を有するものを認めなかつた.

各濾紙片溶出液中の螢光物質検索

各濾紙片アルコール抽出液について, 比螢光度を測定し, 但しこれを胆汁 100cc 中に換算して第26表成績を得た.

即ち表の如く遊離型添付の濾紙片ではその原

第26表 CORTONE 負荷 (得田例) の螢光物質

濾紙片番号	I	II	III	IV	V	VI	VII	計
γ /dl	24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	24.0
濾紙片番号	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	計
γ /dl	296.0	36.0	17.6	12.8	12.8	19.2	132.0	527.2

点を含む I より, 塩酸処理によるものは各切片より, 特に原点を含む VIII より及び XIV より大量の螢光物質が証明せられた.

アルコール抽出液中の 17-OH corticosteroid I の検索

遊離型添付の濾紙片アルコール抽出液 I, II……VII 中 IV, V, VII において, 塩酸処理のそれら VIII, IX……XIV 中では XI において 410m μ に peak を証した.

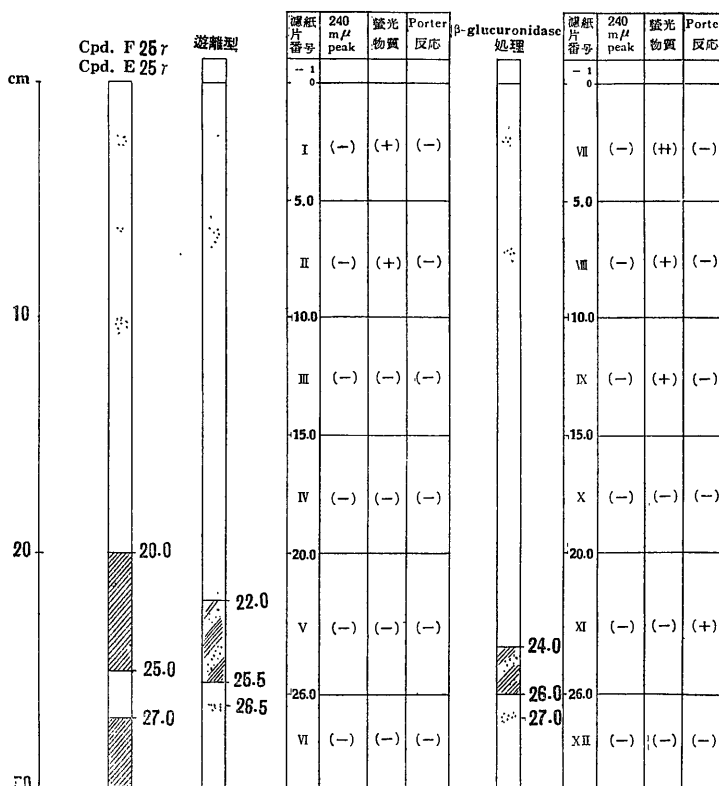
B) CORTRIL (hydrocortisone, Pfizer 錠剤) 使用例について.

症例, 中盛, 29歳, ♀, 肺結核

当日は午前6時に CORTRIL 50mg を服用, 6時間後の B胆汁 40cc を得た.

これを前記方法に従い遊離型と遊離型抽出後 β -glucuronidase 処理を行つたものに分けて paper chromatography に

第4図 CORTRIL 負荷 (中盛例) の胆汁 paper chromatogram.



註: 算用数字は原点よりの距離を示す.

よる解析を試みた。

実験成績

paper chromatogram 写真図 (第4図)。

本例においては対照の Cpd. F, Cpd. E がやや下降過ぎた感があるが、遊離型、 β -glucuronidase 処理の両者共に Cpd. F 相当部位、即ち前者は原点より 22~22.5cm、後者は 24~26cm の間に不明瞭であるが紫外部吸収帯出現を見た。

chromatogram 切片の紫外部吸収曲線

第4図の如く切断した濾紙片のアルコール溶出液より紫外部吸収曲線を作製したが、遊離型抽出物展開濾紙片溶出液 (I, II……VI), β -glu-

curonidase 処理後の抽出物展開濾紙片 (VII, VIII……XII) の何れよりも 240m μ に著明な peak を有するものを認めなかつた。

各濾紙片溶出液中の蛍光物質検索

各濾紙片アルコール溶出液について、比蛍光を測定し、但しこれを胆汁 100cc 中に換算して第27表成績を得た。

即ち表の如く遊離型添付の濾紙片ではその原点を含む I, 続く II より、 β -glucuronidase 処理によるものは VII, VIII……X より蛍光物質が証明せられた。

アルコール抽出液中の 17-OH corticosteroid

第27表 CORTRIL 負荷 (中盛例) の蛍光物質

濾紙片番号	I	II	III	IV	V	VI	計
γ /dl	21.0	7.2	0.0	0.0	0.0	0.0	28.2
濾紙片番号	VII	VIII	IX	X	XI	XII	計
γ /dl	93.6	36.0	28.8	0.0	0.0	0.0	194.4

の検索遊離型添付の濾紙片アルコール溶出液 I, II……VI 中には 410m μ に peak を有するものは認められず、 β -glucuronidase 処理による VII, VIII……XII 中の IX にのみこれを証した。

小括

以上種々の量の cortisone 乃至 hydrocortisone を投与した場合、その恐らく代謝生物が胆汁中に出現することは、胆汁中蛍光 corticoids の排泄が甚だ顕著の増加をみることによつて推察せ

られ、しかもこれが F 分割 paper chromatogram において Cpd. F より polarity の甚だ高いものに存するらしいことは、何一つ今迄の成績に矛盾するところがなかつた。

但し特にこれら corticoids を負荷せる場合、僅かながらその一部が胆汁中にあらわれるらしいことは、前項未処置の胆汁を分析したときと異なるところであつた。

総括及び考按

副腎において分泌せられる皮質ホルモンの排泄路が尿中へ主とするか、胆汁中にこれを主とするかについては、Wyngaarden et al が自験したように動物の種によつて必ずしも同一でないらしいが、如上の実験からことにその分泌が充進せる場合胆汁中へも一部排泄を見ること、しかも塩酸処理により比較的容易に水解を蒙る代謝産物としてこれを検出すること、胆汁中において既に極性の甚だ高い還元成績体に変化して

いることが窺われた。しかしこの場合使用した試獣マウスでは毎常胆汁中にその排泄を証した訳でなく、寧ろ大部分は一時還元の甚だ進んだ所謂 formaldehydogenic corticoids として暫時体内に残留し、漸て深く破壊されることに至つたことが排泄物全量を分析することによつて知られた。

而うして人体実験においてはやや趣を異にし皮質ホルモンを負荷すれば勿論、負荷せざる場

合も酸水解物質としてその代謝産物の排泄に見るものの如く、しかもこの代謝産物は概ね還元により進んだ物質に属したものの如くである。但し殊に皮質ホルモンを負荷せる場合にはその一部分がそのまま胆汁中に排泄された場合もあるようであった。

かくて代謝産物として人胆汁内に排泄せられる一日量は尿中に排泄せられる代謝終末 corticoids 量に比して甚だ少なくないようであるが、Wyngaarden et al がモルモット成績でこれを示すように仮りに再吸収が行われるとすれば、皮質ホルモン分泌量の幾許がそれ自体乃至

還元成績体として消化管中に排泄せられ後吸収せられるか、これは本実験の示す範囲外にあつて未だ詳細を明かにしない。

なお又皮質ホルモン製剤を負荷して後その一部が胆汁内に殊に酸分解物質として現われることを容認するとして、その増量が試料の所謂 Cpd. F, Cpd. B 分割にとともに認められ、而も一般に後者に却つて著しいことについてもこの研究では未だ一切明瞭を欠くが、Cpd. F 又は E よりの degradation に関する複雑な実相はこれも他日詳細に解明せられなければならぬ。

結 論

人に皮質ホルモン製剤を負荷し、その代謝産物の少なからざる量が殊に酸水解物質として胆汁内に出現すること、しかも概ねはその恐らく還元成績体に属することを示唆した。

マウスにありては負荷後、同じく消化管内容に酸水解 corticoids の増量を見る場合もあつた

が、それは毎常の現象ではなく、大部分は暫時間体内に formalin 生成代謝産物として残留せる後漸時破壊に導かれるようであることを示した。

擱筆するに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師日置教授に深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) 柴山：十全医学会雑誌，57，693，1955.
- 2) 柴山・竹田：内分泌，2，2，169，1955.
- 3) B. Baggett, R. A. Kinsella and E. A. Doisy：J. Biol. Chem.，203，1003，1953.
- 4) E. M. Gleen and D. H. Nelson：J. Clin. Endocrinol. & Met.，13，911，1953.
- 5) 本田：内分泌，印刷中.
- 6) M. E. Levin, W. H. Gaughaday & R. Bremer：J. Lab. & Clin. Med.，45，833，1955.
- 7) J. B. Wyngaarden, R. E. Peterson and A. Wolff：J. Biol. Chem.，212，963，1955.
- 8) P. Bernfeled and W. H. Fishman：J. Biol. Chem.，202，757，1953.
- 9) I. E. Bush：Biochem. J.，50，370，1952.
- 10) R. H. Silber and C. C. Porter：J. Biol. Chem.，210，923，1954.
- 11) 金田・竹田：織田：日新医学，41，609，1954.
- 12) 佐々木・間・吉村・森永・鳥居：内分泌，1，3，383，1954.
- 13) M. L. Sweat：J. Clin. Endocrinol. & Met.，15，1043，1955.
- 14) R. Klein, C. Papadatos, J. Fortunato and Camilla Byer：J. Clin. Endocrinol. & Met.，15，215，1955.
- 15) 織田：内分泌，2，5，465，1955.
- 16) 竹田：未発表.