

血漿中フォルマリン生成コルチコイズ 測定に関する一、二の検討

金沢大学医学部日置内科教室(主任 日置教授)

笠 島 宗 夫

Muneo Kasashima

(昭和28年10月26日受附)

緒 論

尿中フォルマリン生成コルチコイズの測定に関しては従来相当多数の報告を見るが、血漿内のそれに関しては未だ甚だ研究に乏しい。僅かに Corcoran & Page 並びに Appel & Hansen 等が血漿をアルコールにより除蛋白し、その濾液について適当なる抽出操作を施し測定に従事している。尤も還元法により血漿中ヘモコルチコイズを測定しているものはかなりその報告を見るが、それとて夫々の研究者により測定の対象たる分割の導き方を種々異にし、又還元の方法が相違している。尤も研究の進歩は或いはクロマトグラフの適用、或いは紫外線、赤外

線吸収曲線の解析等により更に活性物質と目される各コンパウンドの証明に迄及んで倦む所を知らないが、これら研究に関しては暫らく措くとして、前記諸法による孰れの成績が宜く副腎機能の活、不活を反映せしむるかにつき吟味を要する点が決して寡くない。

著者は本報において血漿中フォルマリン生成コルチコイズ (F. C.) の測定に関し、先ず抽出方法から吟味を始めその知見を集録したが、なお傍々三塩化醋酸除蛋白濾液について、健常者と本態性高血圧者との F. C. 含量を比較するところがあつたので今その成績を記する。

実 験

I. 各除蛋白法による F. C. 抽出上の比較

実験方法

a. 除蛋白

除蛋白剤としては次の如きものを用いた。

1. 5%三塩化醋酸
2. エタノール 脱アルデヒドを行う。即ちアルコール 11 に対し 50% NaOH 5 c.c. 亜鉛末 5g を加え 30分還流冷却器を附して煮沸する。かくてアセトアルデヒドをアルコールへ還元し、後蒸溜する。
3. タングステン酸試薬 Folin & Wu に従い次の如く調製す。

i. $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10%の水溶液を 0.1N HCl でフェノールフタレン中性とす。

ii. $\frac{\text{N}}{12} \text{H}_2\text{SO}_4$

使用に際し i を 1 容、ii を 8 容混和する。

以上の試薬を用い除蛋白せんとするには、各試薬 4 容量中に血漿 1 容を滴々充分混和する。

4. 水酸化亜鉛試薬 Somogyi 法によつた。即ち、

i. 10% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水溶液

ii. 0.5N NaOH

使用に際しては血漿 1 容に水 3 容を加えて i, ii 各 0.5 容宛を加える。

次いで遠心により上清と沈澱を分ち、上清は傾斜により分離して一旦これを濾過する。又沈澱には少量の同一除蛋白試薬を加えてよく混和、ヌッチエにて濾液を採取、これを前濾液に合する。なおエタノール除蛋白濾液については 40°C にて減圧濃縮し、殆んどアルコール分を餾去する。

次に各除蛋白液（血漿 20c.c. に相当する）に飽和塩化バリウムを4滴加え氷室に一夜放置し、翌朝バリウムによる沈澱物を遠心により除去す。但し三塩化醋酸濾液に塩化バリウム液を滴下しても沈澱を生ぜしめ得ず、塩化バリウムを加えなくても後の操作に支障を來すことがない。

b. 抽出

孰れも透明なる上清液につき各回等量のクロロホルムで3回振盪し、抽出液を得る。これに使用するクロロホルムは予め $\frac{1}{10}$ 容の $\frac{N}{10}$ KMnO₄ で5分間振盪すること2回、次いで $\frac{N}{10}$ NaOH, Aq. dest. で各々2回宛洗滌、後蒸溜してアルデヒドを除く。次に抽出液全部を合して40°Cにて減圧乾固、後毎回ベンゼン3c.c. を使用して3回抽出、ベンゼン抽出液の全部を減圧乾固、少量のベンゼン（計2c.c.）にて可溶物を定量的に共栓小遠心管（内容15c.c.）に移し、5c.c. の蒸溜水にて5分振盪抽出すること2回、ベンゼン、水の境界面は遠心により明瞭ならしめることを得た。

c. 酸化

前記水分割4c.c. を採り、これに0.15M H₂SO₄ に溶解した0.01M KIO₄ 溶液2c.c. を加え室温に45分放置、酸化せしめ、後6% SnCl₂ の塩酸溶液（予め濃塩酸で加熱溶解し、後水で10倍に稀釈する）1c.c. を加え酸化を停止せしめる。

d. 蒸溜

次いで酸化終了後の溶液を総ガラス製小蒸溜器に移す。酸化を行わしめた試験管は5M H₂SO₄ 3c.c. を用いて洗滌、洗滌液を前記蒸溜器に投じて後加熱、発生せるフォルマリンを直接クロモトロブ酸試薬（クロモトロブ酸75mgを水5.6c.c. に溶解し、濃硫酸17.6c.c. を氷水中にて冷しながら加う）3c.c. の中へ蒸溜捕捉し、全量6c.c. となるに至る。

e. 呈色

沸騰せる湯浴中にて30分間加熱す。

f. 測定

日立光電比色計にてフィルター G, セルの厚さ10mm のものを使用測定す。

g. 計算

予めウトロロビン純品を用いて一定のフォルマリン量(γ/c.c.)に対する標準曲線を得、発生せるフォルマリン量を測定、これに下記の如き計算を行つてF. C. 量とした。

$$\text{光電計示度} \times \frac{100}{7.6} \times \frac{100\text{c.c.}}{\text{使用血漿量c.c.}} \times \frac{10}{4}$$

実験成績

本実験を施行するに際し夫々の抽出法を試むるために大量の血液を必要とした。即ち高血圧症患者を選定し、その瀉血液150~200c.c. を以て検査材料に宛てることとした。而してこれら患者3名における夫々の除蛋白濾液中フォルマリン生成コルチコイズ量に関し、次の如き成績を得た。

第 1 表

除蛋白法	人血漿 No.1	人血漿 No.2	人血漿 No.3
三塩化醋酸法	632γ/dl	414γ/dl	112γ/dl
アルコール法	880 "	1328 "	292 "
タングステン酸法	0	0	0
水酸化亜鉛法	0	0	0

即ちタングステン酸法並びに水酸化亜鉛法による除蛋白に際しては、その濾液中に何ら F. C. の移行を認め得ないが、三塩化醋酸法においては当該濾液中に上記物質の存在を認め得る。但しアルコール法による時は更に著しく多量の F. C. を抽出し得るを以て、Corcoran, & Page の行える如く血漿中 F. C. 全量を測定するには酒精除蛋白法を以て最も適当と認める。

アルコール除蛋白法の際には当然血漿中の水分を混入するを以て、後目的とする F. C. の抽出操作を行うに当つては、水に頗る溶け易い F. C. の処理には十分なる注意を払うべきであると考えられる。

一方タングステン酸法、或いは水酸化亜鉛法による除蛋白濾液が F. C. をその中に含有しないということは、これを逆に沈澱せる蛋白分割より F. C. をアルコール等により抽出する途が存することを意味し、將來その事実を利用することも出来るというものである。

II. 血漿蛋白等に結合せる血漿中 F. C. について

前項実験により血漿中 F. C. は除蛋白法を異にするに従つて水性分割中に移行する場合もあり、然らざる場合もあることが知られたが、

然らば F. C. が夫々の沈澱試薬により蛋白と共に沈澱せしめられるものか、或いは本来血漿蛋白等と多いか少ないか結合状態に存し、特定の沈澱試薬によりその結合が解けるものであろうか、這般の消息を明らかにしない。よつて次に血漿の透析を行い、非透析分について夫々三塩化醋酸、エタノールによる抽出を試み、その含有する F. C. 量を比較検討した。

実験方法

血漿夫々 20 c.c. 宛をセロハンにて一重に包み流水中に一晝夜浸漬し、後蒸留水中に移して時々攪拌を行い、又蒸留水を新たに取換えて6時間更に透析を続行した。

F. C. 含量の測定は前記に準じこれを行つた。

実験成績

検査材料としては前項の如く瀉血に際し得たる高血圧患者血漿を使用した。

斯くて非透析物質に結合せる含量として次の如き成績が得られた。

第 2 表

抽出法	人血漿 No.1	人血漿 No.2
三塩化醋酸法	225 γ /dl	223 γ /dl
エタノール法	807 "	405 "

以上成績によれば血漿中 F. C. は非透析割分に比較的密に結合して流血中を循環しているのではないかということが考えられる。而してその結合を解離せしむるにはエタノールが最もその目的に添い得るものの如く、三塩化醋酸による時は少なく共その全部を抽出することは困難のようである。文献を顧みるに Zarrow & Neher はエストロゲンは略々 65%、プロゲステロンは10%蛋白と結合していると記している。なお本実験において透析割分中に或いは存したコルチコイドの量を知ることが出来なかつたが、今前項の人血漿中 F. C. 量に関する成績を省みる時、殆んどその全部に近いものが結合状態に存するのではないかと考えられる。孰れ次の機会にこの点を明らかにする。

附、本態性高血圧症患者血漿の三塩化醋酸除蛋白濾液中 F. C. 量について

上述の結果によれば血漿中 F. C. の抽出にはアルコールを以てすることが最も適當であるかの如く考えられるが、偶々著者は以上吟味を行える際に多数の高血圧症患者につき血漿中 F. C. 測定を三塩化醋酸除蛋白濾液について試みた成績があるのでこれを附記する。血漿中蛋白その他と結合せる F. C. はその全部が三塩化醋酸除蛋白濾液中に移行するものでなく、その一部に過ぎないことは前述の如くであるが、若しも三塩化醋酸に移行する分割が等しく F. C. 生成コルチコイズに属する物質の中でもその特定のものであるとするならば、その増減に関する成績は意義なしとすることが出来ない。

実験方法

採血の際には注射筒に予め10%銜酸ソーダ溶液を採血量の $\frac{1}{10}$ 容量入れた。以後の操作は第1項実験に記載せるが如くである。採血の時間は晝食前午前11時前後を選んだ。

実験成績

測定成績を第3表に一括表示する。

第3表 健常者並に本態性高血圧患者血漿中 F. C. 含量

番号	性	年齢	病名	血圧	F.C. γ /dl
1	♂	21	健	128~74	66
2	♀	27	"	115~63	116
3	"	28	"	137~76	65
4	♂	66	本態性高血圧症	190~100	174
5	"	54		"	230~110
6	"	50	"	230~120	131
7	"	39	"	180~90	106
8	"	58	"	200~80	87
9	"	56	"	210~110	82
10	"	48	"	210~110	51
11	♀	39	"	160~100	740
12	"	38	"	205~115	338
13	"	64	"	252~125	153
14	"	49	"	186~100	145
15	"	42	"	208~110	128
16	"	59	"	162~108	69

以上より高血圧者の全部においてではないが、その比較的多数に健康者におけるよりも三塩化醋酸濾液中 F. C. 量が增量しているものがあることが窺われる。尤も健康人例も更に多く測定することを要し、事実增量せるものがあるとしてもその如何なる意義を有するものかに

関しては將來の解明に俟たねばならぬ。而も独り三塩化醋酸濾液中の F. C. 測定を行うに止まらず、血漿中全 F. C. の消長を知る要があるが、これに関して孰れ稿を改めて、これが追求を試みたい。

結

著者は血漿中フォルマリン生成コルチコイズの測定に関し、二の吟味を行うと共に、高血圧症患者血漿の三塩化醋酸濾液中 F. C. 量測定を行い次の如き成績を得た。

1) 血漿中 F. C. 測定を行うに際しアルコール除蛋白法による時は最も大なる値を得る。三塩化醋酸除蛋白法による時はその一部を抽出するに過ぎない。又タングステン酸、並びに水酸化亜鉛除蛋白濾液中には F. C. の移行を殆ん

論

ど認め得ない。

2) 透析によるに血漿中 F. C. は非透析部に多く結合せるものの如くである。

3) 本態性高血圧症患者について、血漿三塩化醋酸除蛋白濾液中 F. C. 量を測定し、これを健康者のそれと比較せるに、前者において屢々 F. C. の增量を証し得た。

拙筆するに臨み恩師日置教授の御懇篤なる御指導、御校閲を心より深謝する。

文

- 1) Corcoran, A. C. & J. H. Page : J. Labor. Clin. Med., 33, 1326, 1948.
- 2) W. H. Daughaday, H. Jaffe & R. H. Williams : J. Clin. Endocri., 8, 166, 1948 ; 8, 244, 1948.
- 3) W. Appel & K. J.

献

- Hansen : Z. f. d. gesammte exp. Med., 119, 426, 1952. 4) S. Burstein : Endocri. 50, 412, 1952. 5) M. X. Zarrow & G. M. Neher : J. Clin. Endocri. Metab., 13, 203, 1953.