

尿中総中性17-ケトステロイド測定法

干渉色素ならびに使用溶媒の検討

東京女子医科大学大学生化学学教室

教授 松村 義寛・藤野 滄子
マツ ムラ ヨシノ ヒロ フジノ サレイ

(受付 昭和38年11月26日)

緒言

副腎皮質から分泌されるステロイドホルモンについて多数の学問的研究が進むにつれて、各種疾患に対する尿中17ケトステロイド(Cyclopentano-perhydrophenanthren の基本骨格の第17番目の炭素原子に酸素をケトン型に結合している中性17オキソステロイドの通称名、以下 17-KS と省略)の臨床化学的測定が要求されるようになってきたが、それは未だに解決されない多くの問題をもっている。その中で最大の難点は抽出操作に始まる一連の測定技術に付随する非ケトン性クロモゲンの存在にあるといわれている。種々の媒体を用いたクロマトグラフ法、ポーラログラフ法、化学分割などが報ぜられている中で、一応正統方法として一般化しているのは、Girard 試薬¹⁾²⁾による妨害物質の除去である。しかしそれを検査室に応用するのは容易でない。一般に広く使用されている Zimmerman 反応³⁾の大きな変動の原因として、Cahen ら⁴⁾はこれらの色素による過大呈色および17位にケトン基のある同規定濃度の近似構造ステロイド自体の変化を述べている。Pincus⁵⁾はシス型とトランス型に彼の方法により分けている。櫻田⁶⁾らはホルマリンを加えて硫酸による加水分解を行なうと、干渉色素の発生が極度に抑制されるという。

Fraser⁷⁾ および Allen⁸⁾ は干渉色素に対する補正式を導入した。Talbot⁹⁾ および Engstrom ら¹⁰⁾は、Fraser の補正式で得た値は中性ケトン分割の測定値と一致することを確認したが、厳密にはアルコール性水酸化カリウム液を用いる Callow 法¹¹⁾以外には適用できず、他はやゝ高値になると報告¹²⁾されている。Fraser は 430m μ と 520m μ の吸光度から計算しているのに対して Allen は 460, 520, 580m μ の吸光度を用いている。尿クロモゲン(非ケトン分割)の標準はテストステロンが使用され、これらの方法はすべて発色後にエチルアルコールで一定濃度および量にうすめて測定する方法である。

これに反して発色液を希釈後、有機溶媒層に転溶する試みがなされている。これによると補正式は必要とされず、有機溶媒層には 17-KS のピンク色のみが移行し尿クロモゲンは水層に行くという。有機溶媒として Cahen に続いて Zimmerman¹³⁾, Pupert¹⁴⁾, Masuda¹⁵⁾, Werbin¹⁶⁾ たちはクロロホルムを用いた。最近 Peteron ら¹⁷⁾ はジクロロメタン(CH₂Cl₂)を使用すると真の 17-KS 値が得られ、Girard 分割、カラムクロマトグラフ法、干渉色素補正式などを必要としないという。他の利点としてクロロホルムよりも毒性の少ないことを強調しているが、桑田¹⁸⁾も麻酔作

Yoshihiro MATSUMURA & Reiko FUJINO (Department of Biochemistry, Tokyo Women's Medical College): Assay method of urinary total neutral 17-ketosteroids. — Especially on the interfering chromogenes and the influence of solvents.

用の点から約 $\frac{1}{3}$ であと述べている。

以上の点から次の二つのことを観察した。第一は Cahen らの方法を基礎にした時、尿色素にアルコールだけを加えた場合と、メタジニトロベンゼンを除いてアルカリだけを加えた場合のそれぞれの試料の盲験が、色調を異にして大きな差を生じるので、どちらが真の妨害物質であるか吸光度を追つてみた。しかし Girard の分割と比較しなかつたので、その差についてだけ示す。第二はクロロホルムとジクロロエタンを溶媒として使用した際の差を試料、標準の吸光度およびそれらの計算の結果から比較した。

実験方法

1. 試薬

- イ). 塩酸：純正化学特級濃塩酸をそのまま使用。
 ロ). エチルエーテル：昭和エーテル一級をそのまま使用。
 ハ). 2.5N NaOH：濃水酸化ナトリウム水溶液をうすめて使用。
 ニ). 10N. KOH：関東化学特級を50 g/dl になるように水に溶かし濃度既知の 0.1N HCl により補正する。暗所に保存。
 ホ). メタジニトロベンゼン：東京化成一級をそのまま使用。大体 2% になるように無水アルコールに溶かす。使用時作製し暗所に置く。
 ヘ). クロロホルム：小宗化学一級をそのまま使用。
 ト). ジクロロメタン：関東化学一級をそのまま使用。
 チ). アルコール：市販無水エチルアルコール 1 l につき AgNO_3 10 g, KOH 1 g を加え 5~6 時間沸騰水浴中に還流冷却器をつけて煮沸後、蒸留する。留出液について 0.4% になるようにメタフェニレンジアミンを加え暗所に 1 週間放置し時々振盪する。再び蒸留し留出液の吸光度を 200~320 $m\mu$ の範囲で測定し吸収のないことを確かめる。不純の場合 210~220 $m\mu$ の間及び 260~270 $m\mu$ の間に吸収が見られる。このような場合は更に精製を反覆する。80%アルコールは無水アルコールを水でうすめて作る。

リ). 水：イオン交換筒を通して脱イオンした水を全ガラスすりあわせ蒸溜装置を用いて KMnO_4 存在のもとに蒸留して使用。
 ス). 標準液：dehydroisoandrosterone acetate 東京化成 正確に 2 mg/dl の無水アルコール溶液を作り、使用時 10 倍又は 20 倍に無水アルコールで希釈する。暗所に保存

2. 使用器具

- イ). 光電光度計：日立 EPU-2A 型(アルコールその他純度検定用、常時必要でない) 日立 FPO-3 型 比色用。
 ロ). 除湿器
 ハ). 分液ロート 100ml.
 ニ). アスピレーター
 ホ). 遠心器 15ml 8 本掛け
 ヘ). 恒温槽、温度計、水浴
 ト). 試験管、遠心管などのガラス器具類
 チ). 暗室又は暗所

3. 実施

詳細な文献の比較、検討、取捨選擇は省略して方法だけを述べる。なお参考文献^{29)~36)} は終りに一括しておいた。

24時間尿 10ml (濃塩酸 5 ml 添加, 0~4°C に貯
 特級濃塩酸 3 ml) える
 ↓
 80~85°C 水浴に 10 分間後水冷, 分液ロート
 100ml に移し, 試験管を水 2 ml で 3 回洗
 い込む

エーテル 20ml 振盪 1 分間

↓
 尿層を捨てる

エーテル層
 2.5N NaOH 10ml } 振盪 1 分間

↓
 NaOH 層をすてる

エーテル層
 水 20ml } 振盪 1 分間

↓
 液層をすて、エーテル層を試験管に移し分
 液ロートを 5~10ml のエーテルで洗滌し
 て加える

蒸発乾固 (デシケーターで吸引)

↓

発色

{ 無水エタノール 0.2ml
 2 mg/dl メタジニトロベンゼン 0.2ml
 10N KOH 0.2ml

↓
 25°C, 25 分間 (暗室, 恒温槽内)

80%エタノール 2 ml
 クロロホルム 4 ml

↓
 10~20 秒振盪し, 遠心管に移し,
 3000r.p.m. 5 分間

比色

クロロホルム層, S_{55} フィルター

計算

$$\frac{\text{尿試料一尿ブランク}}{\text{標準液一ブランク}} \times 20 \times \frac{1 \text{ 日排泄尿量}}{10} = \mu\text{g/日}$$

20: 標準液 20 $\mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$

10: 定量に要した尿量 ml

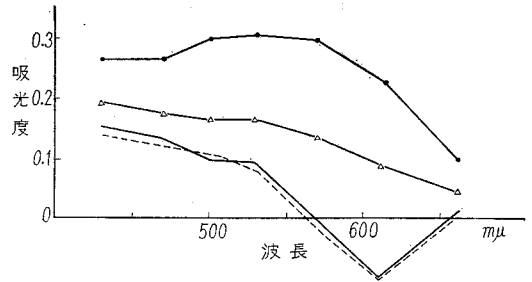
第 1 表

尿試料 試薬 (ml)	A	B	C	D (発色)	試薬盲験	標準液 (20 μ g)
	無水 エチルアルコール	0.4	0.4	0.2*	0.2	0.2
メタジニトロベンゼン	—	—	0.2	0.2	0.2	0.2
水酸化カリウム	—	0.2	—	0.2	0.2	0.2
蒸 溜 水	0.2	—	0.2	—	—	—

干渉色素について

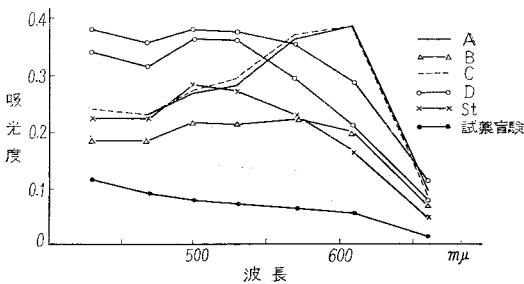
干渉尿色素が有機溶媒層に全く移行しないとすれば、試薬盲験だけで充分である。そこで同じ尿試料を用いた盲験で発色剤の組合わせを第1表の如く行ない、それぞれの吸光度を観察して第1, 2, 3図に示す。

第3図にみられるように、試薬盲験を差引いただけで 530m μ を中心とする山形の曲線となり、試料盲験 (A.B.C.) を差引くと逆にくだらかな坂道となる。水酸化カリウム液の入っていない試料 (A.C.) は 610m μ で非常に高い吸光度を示す。Rappaport ら¹⁹⁾が行なっているように試料盲験は不要かも知れない。しかし実際に試料盲験

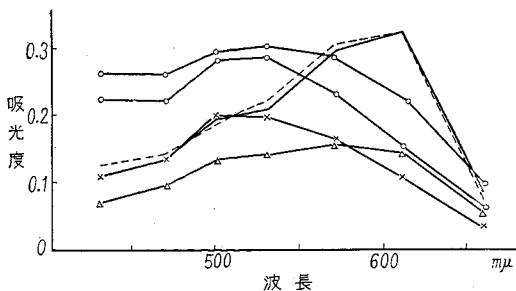


第3図 Dより各盲験を差引く

に着色があると比色定量の常識から差引かねばならないという不安を起す。試料盲験と試薬盲験との間にどの程度差が生じたかを第2表に示す。試料盲験 (B) を用い26例について尿量10ml および 5 ml で行なうと約77%の差があつた。差のない場合、すなわち 100%に近い時は試料および試薬盲験値がほぼ等しく、抽出時に無色の場合が多い。抽出時に着色がつよい程差が大きく、その原因は不明のクロモゲンとはいつても、尿酸塩の多い尿や総合ビタミン投与尿などが経験的に差を



第1図 各々の吸光度



第2図 試薬盲験を差引く

第 2 表

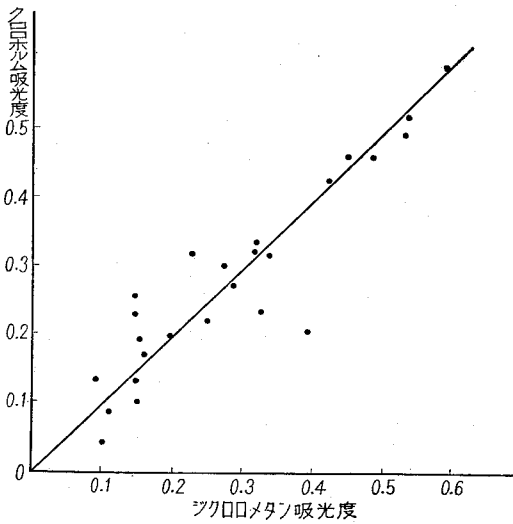
実験例	尿10ml 使用 mg/day			尿 5 ml 使用 mg/day		
	(試薬 盲験)	(試料 盲験)	%	(試薬 盲験)	(試料 盲験)	%
1	2.76	1.96	71.0	3.12	2.28	73.1
2	4.18	4.15	99.5	4.48	4.76	106.2
3	5.69	4.17	73.4	5.86	4.44	75.7
4	3.40	2.65	78.0	4.50	4.04	89.8
5	1.29	1.40	108.5	1.49	1.93	129.5
6	1.10	0.38	34.6	1.27	0.53	41.7
7	4.30	4.30	100.0	4.32	4.62	107.0
8	3.30	2.88	87.3	2.99	2.90	97.0
9	3.94	3.79	96.1	4.12	3.84	93.2
10	4.46	4.16	93.3	5.36	5.02	93.6

11	5.66	4.64	81.9	7.36	6.25	84.9
12	1.58	1.00	63.3	1.92	1.35	70.4
13	4.57	3.14	68.7	5.13	3.57	69.6
14	2.54	2.33	91.8	3.41	3.25	95.4
15	2.75	1.72	62.6	2.86	1.68	58.8
16	2.31	1.91	82.8	3.04	2.69	88.5
17	4.01	3.07	76.6	4.46	3.32	74.5
18	6.21	5.63	90.5	6.65	5.92	89.1
19	3.02	2.64	87.5	3.92	3.56	90.8
20	3.96	2.16	54.6	4.83	2.78	57.6
21	5.79	3.55	61.4	6.89	4.96	72.0
22	3.38	2.93	86.7	3.43	3.14	91.5
23	5.95	4.86	81.8	6.54	5.62	86.0
24	4.35	2.86	65.8	4.90	3.54	72.3
25	3.06	1.67	54.6	3.33	1.93	58.0
26	2.91	1.26	43.3	3.30	2.04	61.9
平均			76.0			77.7
			34.6~			41.7~
			108.5			129.5

示す。それらの化合物が抽出時、又は発色時に何らかの複合体を作るか、あるいはそのまま自体で発色するか、その機構については今後の研究をまたまなければならぬ。

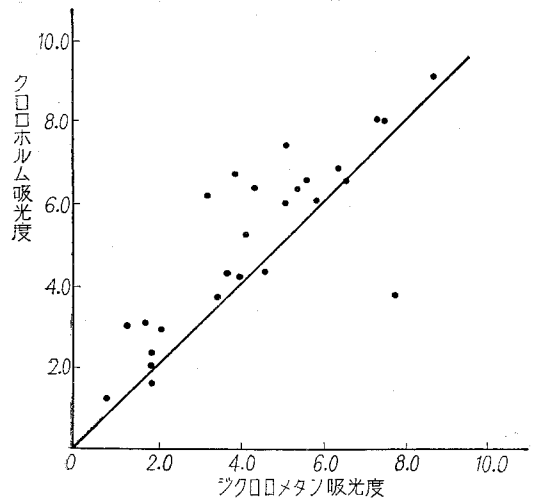
転溶溶媒について

Peterson ら¹⁷⁾の記述にもとづいてクロロホルムの代わりにジクロロメタンを用い両者を比較した。それぞれの吸光度（試料測定値—試料盲験）

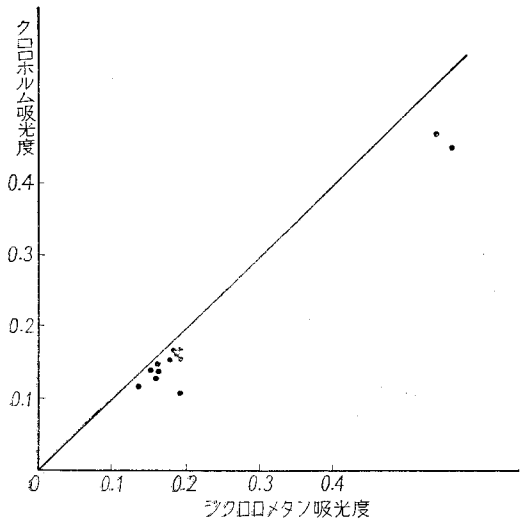


第4図 吸光度より $\gamma=0.910$

日排泄量 (mg/day), 標準液(200 μ g)の相関数係は0.910, 0.809, 0.988と非常に接近し、それを第4, 5, 6図に示す。これらの結果からクロロホルムとジクロロメタンの間に大差はない、桑田¹⁸⁾はクロロホルムはアルカリに安定でないとして述べている、ジクロロメタンについての記載はなく、危険性および麻酔性の点から粘膜の刺激がつよく長時間の溶剤吸入による人体の障害をさける方法を取るの望ましいので、転溶溶媒としてジクロロメタン使用は臨床検査に適すると思われる。



第5図 1日排泄量 mg/day $\gamma=0.809$



第6図 標準液20 μ g 吸光度 $\gamma=988$

結 論

尿中総 17-KS 測定時の尿試料に関する干渉色素および転溶溶媒について考察した。その結果試薬盲験と試料盲験との間に平均約77%の差が生じ、その差は尿自体の中にある成分によつて相当(35~130%)変動することがわかつた。転溶溶媒にクロロホルムとジクロロメタンの溶媒を用いた差異はあまりみられなかつた。

文 献

- 1) Girard A. and G. Sandulesco: *Helv. Chim. Acta.* 19 1095 (1936).
- 2) Tolbot, N.B., A.M. Butler, and E.A. Mac Lachlan: *J. Biol Chem.* 132 595 (1940).
- 3) Zimmermann, W.: *Z physiol Chem.* 233 257 (1935).
- 4) Cahen, R.L. and W.T. Salter: *J Biol Chem.* 152 489 (1944).
- 5) Pincus, G.: *J Clin Endocrinol.* 3 195(1943).
- 6) 櫻田良精編: 臨床検査指針による臨床検査法, 日本医師会, 南山堂 1961 (昭36).
- 7) Fraser, R.W. et al.: *J Clin Endocrinol.* 1 234 (1941).
- 8) Allen, W.M.: *J Clin Endocrinol* 10 71 (1950).
- 9) Talbot, N.B., R.A Berman, and E.A. Mac Lachlan: *J Biol Chem.* 143 211 (1942).
- 10) Engstrom, W.W. and H.L. Mason: *Endocrinology* 33 229 (1943).
- 11) Callow, N.H. and R.K. Callow: *Biochem J* 32 1312 (1938).
- 12) 西川光夫・竹本吉夫・会田正道: 臨床検査 4 (No. 5, 6) 273 (1960).
- 13) Zimmerman, W. and H.V. Anton: *Z physiol Chem.* 289 91 (1952).
- 14) Rupert, A.: *Z ges exptl Med.* 119 229 (1952).
- 15) Masuda, M. and H.C. Thuline: *J Clin Endocrinol Metab.* 13 581 (1953).
- 16) Werbin, H. and S. Ong: *Anal Chem.* 36 762 (1954).
- 17) Peterson, R.E. and C.E. Pierce: In "Lipids and the Steroid Hormones in Clinical Medicine" 1960 (F.W. Sunderman and F.W. Sunderman Jr. eds.) Lippincott, Philadelphia 158~161または Dorfman, R.I.: *Methods in Hormone Research*, vol I. 66 (1962) Acad. Press. New York and Londonより引用
- 18) 桑田 勉: 溶剤 東京 丸善 昭和17年版 160~190, 158~160頁
- 19) Rappaport, F., J. Fischl, and N. Pinto: *Clin Chem.* 6 16 (1960).
- 20) Klyne, W.: *The Chemistry of the Steroids* London Methuen & COLTD 1957
- 21) Callow, N.H.: *Lancet* II 565 (1936).
- 22) Holtoyff, A.E. and F.C. Koch: *J Biol Chem* 135 377 (1940).
- 23) 増田正和: 日新医学 38 546 (1951)
- 24) Zimmerman, W.: *Z physiol Chem* 245 47 (1945).
- 25) Dingemane, E.: *Biochem J.* 31 590 (1937).
- 26) Talbot, N.B.: *J Biol Chem.* 132 95 (1940). 136 365 (1940). 143 211 (1942).
- 27) Dreker, I.J., H. Alexander, G. Robert Scism, S. Stern, S. Pearson, T.H. McGavack: *J Clin Endocrinol.* 7 795 (1947). *J Clin Endocrinol & Metab.* 12 55 (1952).
- 28) 大野文俊: 内分泌のつどい 第3集 日内分泌誌 31 337 (1955).
- 29) 三宅 儀: 日内分泌誌 26 122 (1950~1951).
- 30) 黒川キミエ: 東女医大誌 29 1192 (1959).
- 31) 熊谷 朗・他: 内科 8 879 (1961).
- 32) Wilson, H.: *Endocrinology* 41 417 (1947). *Arch Biochem Biophys* 52 217 (1954).
- 33) Dorfman, R.I.: *Methods in Hormone Research* vol I. Chemical Determination, Acad. Press. New York (1962).
- 34) Corker, C.S., J.K. Norymberski, and Rosemarie Thow: *Biochem J.* 83 583 (1962)
- 35) Menini, E. and J.K. Norymberski: *Biochem J* 83 31 (1962).
- 36) Cook, R.P.: *Cholesterol.* Acad Press New York (1958).