

Title	副腎皮質髓質機能基礎的研究(I)
Sub Title	Fundamental studies on functional relationship between adrenal cortex and medulla
Author	永瀬, 恵子(Nagase, Keiko) 中村, 悦郎(Nakamura, Etsuro)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1968
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.13 (1968.) ,p.10- 18
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000013-0010

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

副腎皮質髓質機能基礎的研究 (I)

永瀬恵子, 中村悦郎

Fundamental studies on functional relationship between adrenal cortex and medulla Keiko NAGASE and Etsuro NAKAMURA

In order to make clear the relationship between adrenal cortex and medulla, the adrenal levels of corticosterone, ascorbic acid and catecholamine were estimated after the injections of progesterone, corticosterone, ACTH or ascorbic acid onto the normal untreated rats. And the following results were obtained.

1. No remarkable differences were observed between the lowering effects of ACTH, progesterone, corticosterone and control solutions on the adrenal catecholamine level, but the recovering from the lowering was prompt in the animals injected with corticosterone.
2. The ascorbic acid levels were not affected so much in the case of progesterone or corticosterone treatments as by ACTH injection.
3. The content of corticosterone was increased by progesterone, ascorbic acid or ACTH but there were some differences of the appearance or the duration in their effects.

序

生命現象に重要な副腎系ホルモンの各種研究は従来広範に行なわれてきているが、構造上および発生学的起原を異にしている皮質・髓質間の機能上の相関関係については明らかにされていない点が多い。

なお髓質ホルモンである catecholamine (CA) は生体内での濃度が低く、また構造、化学、生理学的にも類似した不安定な物質の混合体であるため、定量上の感度、特異性、再現性に多くの問題点を有し今後の研究を残している。これら問題点を吟味しつつ副腎の皮質と髓質の相関性をみるため、次の事項について観察した。

第1章 CA 定量法^{1~8)}並びにその検討について

CA の定量には、生物検定法および ED 法 (エチレンジアミン法)、THI 法 (トリハイドロキシインドール法) 等の螢光法、Gas chromatography 法、螢光吸収法、電子顕微鏡法等が行なわれている。ここでは THI 法を用いた。

- 1) 武貞昌志：生化学, **32**, 475 (1960).
- 2) 今泉・佐野：日本内分泌学雑誌, **33**, 932 (1958).
- 3) 佐野 馨：日本内分泌学雑誌, **35**, 86 (1959).
- 4) 佐野 馨：日本薬理学雑誌, **55**, 188 (1959).
- 5) A.H.Anton & D.F.Sayer：J.Pharmacol. & Exp. Therap., **138**, 360 (1962).
- 6) H.Weil-Malherbe, A.D.Bone：Biochem. J., **51**, 311 (1952).
- 7) U.S.v.Euler, I.Floding：Acta physiol. scand., **33**, Suppl., 118, 45 (1955).
- 8) N.Kirschner, M.Goodall：J. Biol. Chem., **226**, 207 (1957).

CAは3,4位に2個の phenol 性 -OH を持つ phenylamine すなわち catechol 核を有する化合物である。Phenol 性 -OH は不飽和結合部に付き酸性を示し、かつ FeCl_3 等で呈色を示す。故に CA も苛性アルカリに可溶で FeCl_3 等で微酸性～中性時緑色、アルカリ側で赤色を呈する。Catechol 核は polyphenol であるため酸化を受け易く CA も大気中特にアルカリ性溶液中において容易に自然酸化を受け、 $\text{CA} \rightarrow \text{erythrine} \rightarrow \text{trihydroxyindole} \rightarrow \text{chrome} \rightarrow \text{lutine (enol form)} \rightleftharpoons \text{keto form} \rightarrow \text{melanine}$ なる過程をへる。THI 法はこの酸化反応を利用したもので、アルカリ性で ascorbic acid を添加すれば melanine への移行を停止し、比較的安定化した lutine の蛍光を定量することができる。

抽出液からの CA の吸着に抽出回収率、除塩操作の煩雑、および CA の損失防止等の点からアルミナを用いた場合、その時間的影響を検討してみた結果、当日におけるアルミナ吸着 Adrenaline (Ad) 量は $163.9 \pm 58.9 \mu\text{g/g}$ で一定低温室 (5°C) 放置後においては $206.2 \pm 61.4 \mu\text{g/g}$ と値が高くなった。(表1)

これは直後のものに比べ 12 時間低温室保存の方が吸着が充分行なわれるためと考えられる。

(表 1) アルミナへの経時的 Ad 吸着能

	温 度	吸着 Ad 量 ($\mu\text{g/g}$)
吸 着 直 後	25°C	163.9 ± 58.9
12 時 間 後	5°C	206.2 ± 61.4

溶液中のアルミナ分離は冷凍遠沈にて行なったが、高回転数を要し、残余の浮遊のアルミナ量でその後のカラム通過時間に著しい差をみた。なお 9,000 G で分離はほぼ可能であった。また $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ で発色し蛍光測定までの経時的検討については、直後よりわずかずつの蛍光量減少がみられ 30 分以内測定が限度であることを知ったが、発色直後の量を測定することが理想と思われる(図1)。

なお CA の分離定量の能率化と時間的単縮による安定性を検討する意味で T. L. C.⁹⁻¹³⁾ を用いる方法をも検討してみた。吸着剤として緩衝化シリカゲルとセルローズ (アビセル SF 旭化成製) を用い nor-adrenaline (NA), Ad, dopa, dopamine (DA) をスポットし、indicator として 0.1% iodo-chloroform による発色および $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ -ED reagent (potassium ferricyanide 0.1g, ethylene diamine 5ml, ethanol 45ml を water 50ml に溶解) による蛍光を蛍光検出器 (Nikko Sekiei Works 製) で波長 2537\AA で肉眼的観察をして Rf 値を測定し、次の条件下にて検討した。検出濃度は、単独時では各々の $0.5 \mu\text{g}$ を、また混液では Ad+NA で各 $0.01 \mu\text{g}$ Ad, NA, D, DA の混液で、各 $0.01 \mu\text{g}$ を用いた。吸着剤としてはセルローズの方が

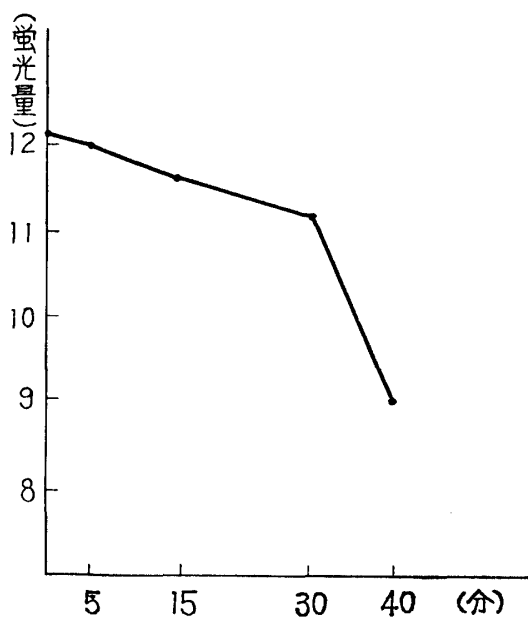
9) W.O.James : Nature, **161**, 851 (1948).

10) Pergman Press Ltd : Biochem. Pharm., **14** (1964).

11) E.G. Mc Geer, M.C. Robberson, & P.L. Mc Geer : Canadian J. Biochem. Physiol., **39**, 605 (1961).

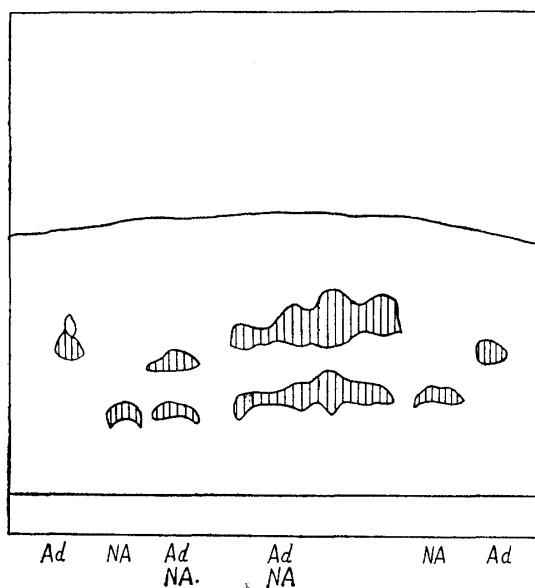
12) U.S. Von Euler, I. Orwen : Acta Physiol. Scand., **39**, 605 (1961).

13) U.S. Von Euler, U. Hamberg : Acta Physiol. Scand., **19**, 74 (1949).



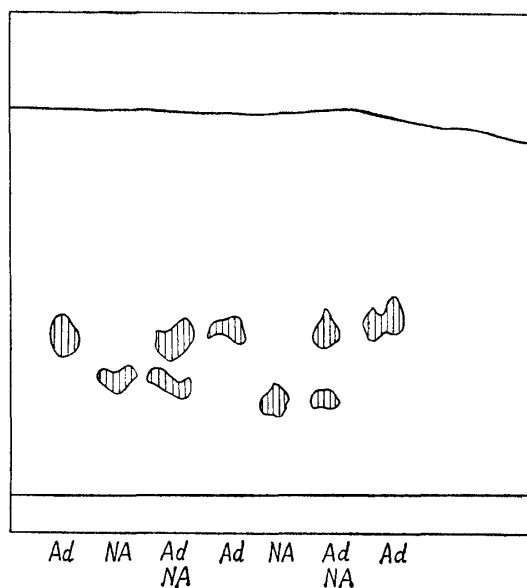
(図 1) 発色 1 μg NA の経時的螢光量変化

プレートの作製が難しく展開時間も長くかかるが、テーリングはより少ない結果が得られた。Rf 値については両者ともに大差はなかった。展開溶媒は phenol (P) : water (W) (75 : 25) が最もテーリングも少なく、Ad, NA 分離能が良いが、NA と D の分離が困難なと展開に長時間を要する欠点がある。また methanol (M) : butanol (B) : benzene (Be) : W, あるいは Bu : W : acetic acid (A) の方が、P : W よりもテーリングが著しかった。Rf 値、テーリングにつ



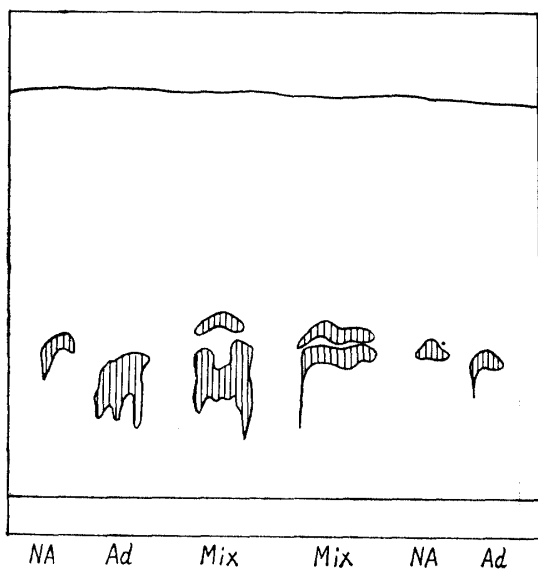
(図 2)

吸着剤：シリカゲル
 展開溶媒：P : W (75 : 25)
 温度：33°C



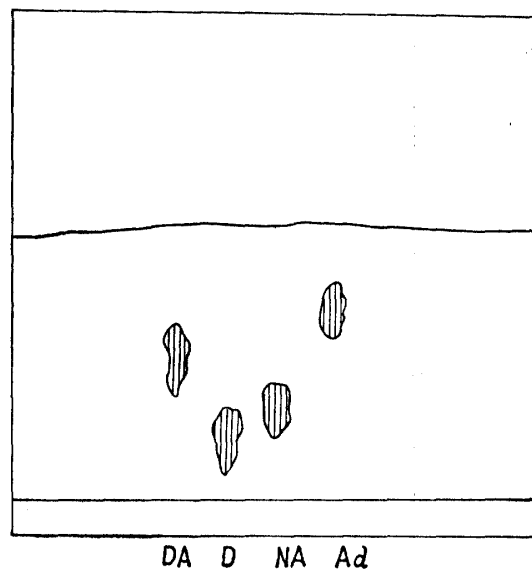
(図 3)

吸着剤：シリカゲル
 展開溶媒：P : W (70 : 30)
 温度：28°C



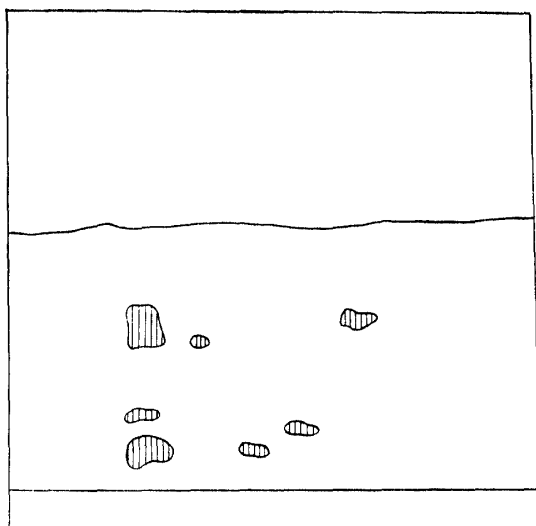
(図 4)

吸着剤：シリカゲル
展開溶媒：Bu : W : A (10 : 4 : 1)
温度：23°C



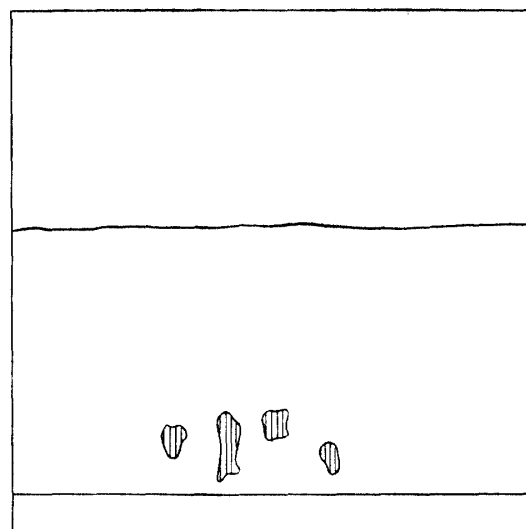
(図 5)

吸着剤：セルローズ
展開溶媒：P : W (75 : 25)
温度：15°C



(図 6)

吸着剤：セルローズ
展開溶媒：P : W (75 : 25)
温度：20°C



(図 7)

吸着剤：セルローズ
展開溶媒：M : Bu : Be : W (4 : 3 : 2 : 1)
温度：15°C

(表 2) 各条件下の thine layer chromatography による CA の分類

吸着剤	展 開 溶 媒	温度 (°C)	indicator	
シリカゲル	P : W (88 : 12)	28	I	わずかに分離はするが定量の為の、かきとり不能
"	P : W (75 : 25)	33	I	Rf 値 A : 0.50~0.56, NA : 0.30~0.37
"	P : W (70 : 30)	28	I	Rf 値 A : 0.39~0.48, NA : 0.23~0.30
"	Bu : W : A (5 : 1 : 4)	28	I	わずかに分離はするが、定量の為のかきとり不能
"	Bu : W : A (10 : 6 : 2.5)	28	I	重なつてしまいまつたく分離しない
"	Bu : W : A (10 : 4 : 1)	23	I	Rf 値 A : 0.28~0.38, NA : 0.36~0.42(テーリング著しい)
セルローズ	P : W (75 : 25)	23	I	Rf 値 A : 0.51~0.58, NA : 0.17~0.20
"	P : W (75 : 25)	23	I	Rf 値 A : 0.48~0.55, NA : 0.19~0.22
"	P : W (75 : 25)	15	II	Rf 値 A : 0.59, NA : 0.25, DA : 0.48, D : 0.20
"	P : W (75 : 25)	20	II	Rf 値 A : 0.68, NA : 0.25, DA : 0.58, D : 0.17 4種の混合液は3つにきり分離されなかつた
"	M : Bu : Be : W (4 : 3 : 2 : 1)	15	II	Rf 値 A : 0.14, NA : 0.28, DA : 0.20, D : 0.17

indicator I. 0.1% iodo-chloroform
II. $K_4[Fe(CN)_6]$ -ED reagent

P : phenol A : acetic acid
W : water Be : benzene
Bu : butanol M : methanol

いても、まだセルローズではこれ自身の蛍光と多くの検討すべき問題は残っているが分離定量は可能であると考えられる。

第 2 章 Progesterone, Compd. B, ACTH, Ascorbic acid 投与のラット副腎中 CA, Ascorbic acid, Compd. B 含量におよぼす影響

実 験 方 法

24°C±1°C, 湿度 55% の恒温室内にて日本クレア製 CE-2 固型飼糧および水を与え飼育した体重約 250g の雄性 Wister 系ラットを用い、各 1 動物当り progesterone, Compd. B は 1mg, ACTH は 2 IU, Ascorbic acid (V. C) は 2mg を注射し一定時間後断頭して副腎を摘出した。CA の定量には副腎に 1N-H₂SO₄ : EtOH sol. (1 : 39) 1ml を加え homogenate し、酸性 EtOH

(EtOH : H₂O : H₂SO₄ = 39 : 10 : 1) 15ml で1時間抽出後, 9000G 5分間冷凍遠沈し, 上清にアルミナを 0.5g 加え, 一夜 5°C の冷凍室に保存したものを 0.5N-NaOH にて pH 8.4~8.5 に調整する. 9000G 10分冷凍遠沈してアルミナを除き, 0.2 MHAc で溶出後 NaHCO₃ で pH 6.5 とし, 5°C の低温室内にて amberlite IRC-50 を用い分離する. 吸着 CA を 1N-HCl 7ml で溶出し THI 法を行ない Turner 蛍光光度計 (一次フィルター BHG max. 365m μ , 二次フィルター B 540 max. 520~660m μ) を用いて測定した. 標準物質には国立衛生試験所標準品酒石酸水素エピレナミンおよび同じく酒石酸水素ノルエピレナミンを用いた. なお対照として薬物の溶媒を注射したものについて同一の操作を行なった. すなわち progesterone あるいは Compd. B では propylene glycol を, ACTH では phenol 25mg/5ml, glycerin 125mg/ml, HCl の同一容量の混液を用いた.

Ascorbic acid は Roe 等^{14~20)} の方法によって total V.C (ascorbic acid, dehydro ascorbic acid, diketogulonic acid) を測定した. なお V.C は標準品として国立衛生試験所標準品のアスコルビン酸標準品を用いた.

Corticosterone^{21~45)} の定量は Guillemin 等の方法で抽出分離し, Silber & Busch 等の方法

- 14) J.H.Roe, M.J.Oesterling and M.B.Mills : Method of Biochem. Anal., **1**, 127 (1954).
- 15) J.H.Roe, M.B.Mills, M.J.Oesterling : J. Biol. Chem., **174**, 201 (1948).
- 16) 笹野伸昭 : ホルモンと臨床, **12**, 96 (1964).
- 17) G.Sayers, A.White, C.N.H. Long : J. Biol. Chem., **149**, 425 (1943).
- 18) J.H.Roe, C.A.Kuether : Science, **95**, 77 (1942).
- 19) J.H.Roe, C.A.Kuether : J. Biol. Chem., **147**, 399 (1943).
- 20) J.H.Roe & M.J.Oesterling : J. Biol. Chem., **152**, 511 (1944).
- 21) L.F.Fieser, M.Fieser : Steroids (1959).
- 22) A.White, P.Handler, E.L.Smith & D.Stetten : Principles of Biochemistry (1954).
- 23) 山松, 堀他訳 : ホワイト生化学II (1967).
- 24) R.Guillemin, G.W.Clayton, H.S.Lipscomb, and J.D.Smith : J. Lab. Clin. & Med., **53**, 830 (1959).
- 25) R.H.Silber, R.D.Bush and R.Oslapas : Clin. Chem., **4**, 278 (1958).
- 26) 井村, 松山, 松倉 : 代謝, **4**, no. 4, 4 (1967).
- 27) 梅原, 佐藤 : ステロイドホルモン I (1967).
- 28) 吉利, 石川, 真下 : 臨床薬理学大系第 12 巻 (1967).
- 29) R.H.Silber, C.C.Porter : J. Biol. Chem., **210**, 923 (1954).
- 30) M.L.Sweat : J. Clin. End. & Metab., **15**, 1043 (1955).
- 31) B.Lewis : J. Clin. Path., **10**, 148 (1957).
- 32) C.J.O.R.Morris, D.C.Williams : Biochem. J., **54**, 470 (1953).
- 33) P.K.Bondy, D.Abelson, J.Scheuer, T.K.L.Tseu, V.Upton : J. Biol. Chem., **224**, 47 (1957).
- 34) J.Van der Vies : Acta. Endocrinol., **38**, 399 (1961).
- 35) H.Braunsberg, V.H.T. James : Analyt. Biochem., **1**, 452 (1960).
- 36) C.P.Stewart, F.Albert-Recht, L.M.Osman : Clin. Chem. Acta., **6**, 696 (1961).
- 37) P.De Moor, O.Steen, M.Raskin, A.Hendriks : Acta. Endocrinol., **33**, 297 (1960).
- 38) J.Mc.Laughlin, T.J.Kamiechi, I.Gray : Analyt. Chem., **30**, 1517 (1958).
- 39) H.Braunsberg, V.H.T. James : J. Clin. Endocrinol. & Metab., **21**, 1146 (1961).
- 40) N.Zenker, D.E.Bernstein : J. Biol. Chem., **231**, 695 (1958).
- 41) K.Eik-Nes, D.H.Nelson, L.T.Samuels : J. Clin. Endocrinol. & Metab., **13**, 1280 (1953).
- 42) D.H.Nelson, L.T.Samuels : J. Clin. Endocrinol. & Metab., **12**, 519 (1952).
- 43) R.H.Silber, R.D.Busch : J. Clin. Endocrinol. & Metab., **16**, 1333 (1956).
- 44) C.C.Porter, R.H.Silber : J. Biol. Chem., **185**, 201 (1950).
- 45) J.Vander Vies : J. Acta. Endocrinol., **30**, 523 (1959).

に従い硫酸蛍光法により Turner の蛍光光度計を用いて定量を行なった。

実 験 結 果

1) Progesterone, Compd. B, ACTH 投与ラット副腎 CA 含量におよぼす影響

CA の生合成並びに不活化の代謝過程はそのほとんどが解明されてきたが存在様式を含めた代謝調節作用との関連において多くの問題点が残っている。髓質、皮質機能関連の一端としてラットに各薬物を投与し副腎中の Ad 含量の変化を観察した。

薬物無投与ラットの副腎中 Ad 含量は $608 \pm 38.7 \mu\text{g/g}$ (平均値 \pm S.D.) であったが対照として溶媒 propylene glycol 0.25ml 皮下注射後、1 時間後では $274 \pm 38 \mu\text{g/g}$ 、3 時間後には $383.0 \pm 131.0 \mu\text{g/g}$ に減じた。progesterone 1mg/animal を注射した場合 1 時間後には $206.5 \pm 50 \mu\text{g/g}$ に、3 時間後には $427.7 \pm 5.6 \mu\text{g/g}$ に減じた。Compd. B の 1mg/animal 投与時でも 1 時間後には $174 \pm 23 \mu\text{g/g}$ と著明に減じ、3 時間後には $459 \pm 110 \mu\text{g/g}$ に快復してきていた。(表 3)

これらの変化は何れも対照の propylene glycol の場合と有意な変化ではなかった。なお ACTH 2IU/animal 投与時においては 15 分後 $630.0 \pm 97.3 \mu\text{g/g}$ 、30 分後には $524.0 \pm 38.7 \mu\text{g/g}$ 、1 時間後では $380.5 \pm 133.7 \mu\text{g/g}$ で有意な差はなかった。

(表 3) Progesterone, Compd. B, ACTH 投与ラット副腎中の Ad 含量

薬 物	Ad 量 ($\mu\text{g/g}$)	0 min.	15 min.	30 min.	1 hr.	3 hrs.
無 投 与		608.0 ± 38.7				
Propylene glycol					274.0 ± 75.2	383.0 ± 131.0
Progesterone					206.5 ± 50.0	427.2 ± 85.2
Compd. B					173.9 ± 23.0	459.0 ± 110.0
ACTH			630.0 ± 97.3	524.0 ± 38.7	380.5 ± 133.7	

2) Progesterone, Compd. B, ACTH 投与ラット副腎 Ascorbic acid 値におよぼす影響

髓質中の Ad と皮質の Compd. B との関連をみるのが目的で、副腎中に多量に存在する V.C がこれらに何らかの影響をおよぼしているのではないかと考え、progesterone, Compd. B, ACTH を投与して副腎中の V.C の変化を観察した。

progesterone 投与時では 1 時間後 $394.0 \pm 33.0 \text{mg}/100\text{g}$ 、3 時間後では $320.0 \pm 31.3 \text{mg}/100\text{g}$ 、とやや減少を示し、なおこれは対照の propylene glycol 注射値とは有意な差は認められなかった。Compd. B 投与では 1 時間後 $285.0 \pm 17.0 \text{mg}/100\text{g}$ 、と対照値よりも減少を示し、3 時間後では $425.0 \pm 16.0 \text{mg}/100\text{g}$ と逆に増加を示した。ACTH 注射の場合は、対照の溶媒

(表 4) Progesterone, Compd. B, ACTH 投与ラット副腎中 V.C 含量

薬 物	V.C 量 (mg/100g)	0 min.	15 min.	30 min.	1 hr.	3 hrs.
	無 投 与		441.0 ± 38.0			
Propylene glycol					350.0 ± 37.8	325.0 ± 12.1
Progesterone					394.0 ± 33.0	320.0 ± 31.3
Compd. B					285.0 ± 17.0	425.0 ± 16.0
ACTH solvent			354.0 ± 75.0	363.0 ± 59.4	394.0 ± 85.9	
ACTH			260.0 ± 48.3	271.0 ± 4.7	233.0 ± 8.5	

(表 5) Progesterone, ACTH, V.C 投与ラット副腎中 Corticosterone 含量

	Corticosterone ($\mu\text{g/g}$)			
	0 min.	1 hr.	3 hrs.	
Propylenglycol	31.3 ± 3.2	61.0 ± 12.4	24.7 ± 3.5	
Progesterone	31.3 ± 3.2	47.0 ± 11.7	34.6 ± 7.4	
	0 min.	15 min.	30 min.	1 hr.
Solvent	31.3 ± 3.2	54.7 ± 10.2	23.4 ± 4.6	27.3 ± 9.0
ACTH	31.3 ± 3.2	65.0 ± 29.3	51.6 ± 8.8	25.4 ± 3.5
	0 min.	30 min.	1 hr.	2 hrs.
Physiological salt solution	31.3 ± 3.2	33.1 ± 19.2	Missed	17.5 ± 11.1
V.C	31.3 ± 3.2	26.8 ± 6.8	37.6 ± 3.6	41.8 ± 16.9

注射でも減少を来たし、30分、1時間と経時的にわずかながら回復の傾向を示しているが、ACTHでは1時間後において、なお著明に減少したままに留まった。(表4)

3) Progesterone, ACTH, Ascorbic acid 投与ラット副腎 Corticosterone 含量におよぼす影響

Progesterone, ACTH, V.C を投与した場合のラット副腎中の corticosterone 量の変化を経

時的に測定した。

progesterone 投与1時間後は $47.0 \pm 11.7 \mu\text{g/g}$ と増加を示しているが、対照の propylene glycol のみの投与時にも $61.0 \pm 12.4 \mu\text{g/g}$ と著明な増加を示している。ACTH では15分後既に増加を示した後、1時間後減少を示したが、増加の程度は対照溶媒注射時よりは著明であった。V.C 投与時では30分後に軽度の減少傾向を示した後、逆に僅かではあるが増加の傾向を示した。対照の生理食塩水注射では明確な増減は認められなかった。(表5)

総 括

副腎髄質—皮質相関機能を知る一端として CA, Compd. B, および Compd. B の前駆体である progesterone, あるいは副腎中に多量に含まれる V.C を用いて観察した。

まず無処置ラットの副腎 CA 含量は progesterone, Compd. B, ACTH を投与しても対照溶媒注射に比較して著明な変化はない。3時間後に溶媒注射群が依然として低値を示しているのに反し、Compd. B の場合に快復を示したのは、おそらくこれ等の注射が全例共ストレスとして働くが、Compd. B の場合のみには、下垂体腺葉よりの ACTH 分泌抑制を介する作用によるものとも考えられる。このことは progesterone を注射後1時間目においては、Compd. B 含量の増加があり、また V.C 含量が対照あるいは薬物投与時においても減少を示したことと一致する。

副腎 Compd. B 値は progesterone 投与で1時間後わずかに上昇しているが propylene glycol 群よりは軽度である。その後3時間では快復を示す。V.C 投与時ではやや遅れて増加を示す。ACTH 投与では明らかに皮質を刺激して Compd. B の産生をうながし短時間のうちに上昇をみ、後1時間で快復したが、本実験では脳下垂体摘出を行わない動物を用いたためか、その作用の持続は短時間であった。

本実験は、第一段階の予備的なものであり本実験に得られた現象の結論は次回の下垂体摘出による結果を待たねばならない。