

岡山医学会雑誌

第84巻9, 10合併号(第934, 935号)

昭和47年10月30日発行

男子肝疾患患者における尿中 Estrogen 排泄値について

第一編

健康男子における尿中 Estrogen 測定法の検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

福島 功

[昭和47年9月19日受稿]

緒言

Estrogen 測定法には生物学的測定法 (Vaginal-smear法, 子宮重量法), 物理学的測定法 (Ultraviolet absorption spectrophotometry, infrared absorption spectrophotometry, gas chromatography) 放射化学的測定法 (isotopic dilution technique), 酵素系反応を指標とした生物化学的測定法, および化学的測定法があり, 現在は化学的測定法が主に用いられている。

妊娠時や特殊な内分泌疾患時を除き, 尿中に排泄される estrogen は微量であり, 混在する尿不純色素による発色障害や比色干渉等により, 化学的定量は容易でない。化学的定量法には蛍光法と比色法があり, 前者には硫酸を用いるものと磷酸を用いるものがあるが, いずれも感度が非常によく $0.005 \mu\text{g}$ の estrone が測定可能である^{1, 2)} しかし, この方法には多くの問題点があり^{3, 4)} 特に反応の特異性に疑問点が残されているため Borth⁵⁾ の Criteria を満足し感度および特異性に優れている比色法が現在広く行なわれている。比色法は Kober⁶⁾ 以来多数の改

変がなされ, Brown⁷⁾ の methylation による phase change purification と Bauld⁸⁾ の saponification step を加え, Brown ら⁹⁾ により完成された。しかしながら, この方法においても, 尿不純色素による発色障害や比色干渉等があり, 微量定量にはなお十分ではない。Ittrich¹¹⁾ はこの尿不純色素による干渉を除く目的で, chloroform containing p-nitrophenol で Kober color を特異的に抽出する方法を発表し, Salokangas & Bulbrook¹⁰⁾ は tetrachlorethane containing p-nitrophenol で抽出し, より良い結果を得た。尿不純色素は肝障害患者尿, 特に黄疸尿に多く認められるが, 加水分解の方法によっても残留の程度が異なってくる。現在, 加水分解法として酸加熱水解法が多く用いられているが, Brown & Blair¹¹⁾ の指摘するごとく, この方法でも estrogen の破壊する可能性は大きく, また発色, 比色測定の際に多くの干渉物質をつくる傾向がある。Solvolysis^{12) 13) 14) 15)} および酵素水解法^{14) 16) 17) 18)} はこれらの欠点を除くことができ, 現在最良の方法と考えられる。また solvolysis は estrogen sulfate を特異的に水解するが, β -glucuronidase (β -G) による水解法

では estrogen glucuronide を特異的に水解するので、これらの方法を併用すれば estrogen を抱合型別に測定することが可能であると考えられる。

そこで著者は酸加熱水解法、 β -G による酵素水解法と solvolysis における水解条件を再検討し、ついで微量比色定量法に検討を加え、その結果健康成人男子の尿中 estrogen 排泄量を estrone (E_1), estradiol-17 β (E_2), estriol (E_3) の3分面について分別測定した。

I. Estrogen conjugates の加水分解法について

1 対象

岡山大学医学部産婦人科に入院した正常妊娠末期(9~10ヶ月)の妊婦尿を2倍に希釈した尿。

2 試薬および器具

β -G は Bernfeld らの方法¹⁹⁾ に準じて屠殺直後の仔牛の肝臓を用いて、精製過程の第二段階まで精製し、褐色ビンに入れて冷蔵庫に保存した。精製した β -G 活性は塚元氏法²⁰⁾ で測定すると 90,000 units/ml であった。Kober 試薬は Hydroquinone (富士写真工業製) 2 gm を 65 v/v % H_2SO_4 に溶解し褐色ビンに保存した。標準 estrogen および estrogen-3-methylether は Steraroids Inc. (U. S. A.) より購入した。Alumina は Aluminium oxide standardized for chromatographic absorption analysis according to Brockman (Merk, Germany), Penicilline G-K は武田薬品工業製、その他の試薬

Table 1 Effect of Incubation Time on Yields of Estrogen-methyl-ethers from Estrogens

Each 20 μ g of estrogen dissolved in 50ml of 1.6% NaOH solution, to this 0.9g of boric acid and 1ml of $(CH_3)_2SO_4$ added, stirred by a magnetic stirrer at 37°C.

(average values in three experiments)

Incubation time (minute)	5	10	15	20	30
Estrogen derivatives (%)					
Estrone-methyl-ether	71.5	83.5	97.0	96.0	93.0
Estradiol-17 β -methyl-ether	74.0	88.0	92.0	93.0	91.0
Estriol-methyl-ether	75.0	91.0	98.0	97.0	98.0

はすべて市販特級品を使用した。水はイオン交換樹脂で脱イオン化後、さらに再蒸溜したものをを用いた。Column は内径0.5cm, 長さ約20cmで、上部に約25ccの球形部を作製し加圧ができるようにしたものを使用。比色には日立分光光度計 (EPU-2A型) を用いた。

3 測定方法

Table 2 のように Brown 法²¹⁾ を一部改変して測定した。このうち、とくに methylation の条件について検討した。すなわち、Brown 法²¹⁾ では 37°C で dimethyl sulfate 1 ml を 2 回加えて強く振盪させて反応させ、1 夜放置しているが、著者は dimethyl sulfate 1 ml を 1 回加え、37°C に加温し magnetic stirrer で振盪混和させた。結果は Table 1 に示したように、15 分間振盪で 92~98% が反応して estrogen-3-methylether となり、1 夜放置してもほとんど変化がなく、15 分間の反応時間で十分と考えられた。これは神戸川ら²¹⁾ の報告とも一致している。

Alumina column chromatography は alumina 2 gm を水飽和 benzene で湿性に充填した column を用いた。この column に estrogen-3-methylether 数 100 μ g の結晶を apply した際、10cmHg の加圧下での各 fraction 溶出に必要な溶媒および溶出量は E_1 -3-methyl-ether の溶出には 0.1% ethanol-benzene 12ml, E_2 -3-methylether には 1% ethanol benzene 13ml, E_3 -methylether には 10% ethanol-benzene 10ml が必要であった。

発色は Kober 反応により行ない、light-path 1 cm のセルで分光光度計を用いて 480, 515, 550m μ の 3 波長で吸光度を測定した後、Allen の補正²²⁾ を行なった。standard として estrogen-3-methylether の 20 μ g を同時に測定して尿中 estrogen 量を算出した。つぎに検討対象にはつぎの 4 つの加水分解法を選んだ。

- 1) 酸加熱水解法: conc. HCl 15ml を尿 10ml に加えて沸騰水中で加熱し継続的に水解率を測定した。
- 2) β -G による酵素水解法: 尿 10ml に 0.2M acetate buffer を加えて pH 4.7 に調製後、防腐の目的で penicilline G-K を約 2,000 単位加えた。 β -G の濃度による水解率の変化を水解時間および水解温度について検討した。
- 3) Solvolysis: NaCl 2 gm を加えた尿 10ml に 50% H_2SO_4 および ethyl-ether 15ml を加え 37°C で 1 日 2 回振盪し free estrogen を ether 層に抽出し H_2SO_4 の濃度による水解率を継続的に測定した。

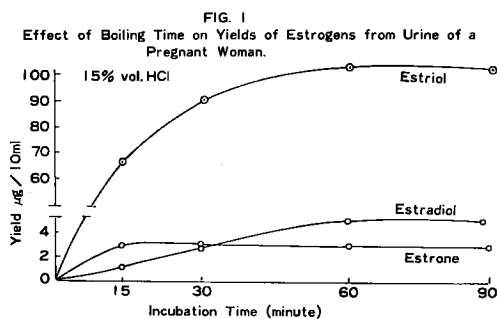
Table 2 Chemical Determination of Estrogens in Pregnancy Urine

Urine 10ml
Extracted with 2 x 15ml of ether after hydrolysis.
— Aqueous phase discarded.
Ether extracts combined.
Ether washed with 2 x 3 ml of 5% NaHCO ₃ solution.
— Aqueous phase discarded.
Ether washed with 3 x 3 ml of water.
— Aqueous phase discarded.
Ether dehydrated with a spoon of Na ₂ SO ₄ and evaporated to dryness.
Dry residue dissolved in 10ml of benzene and 10ml of petroleum ether.
Extracted with 2 x 25ml of 1.6% NaOH solution.
— Organic phase discarded.
1.6% NaOH solution extracts combined to this 0.9g of H ₃ BO ₃ dissolved, then 1 ml of (CH ₃) ₂ SO ₄ added and mixed by a magnetic stirrer at 37°C. After it cooled in ice water, added 10ml of 20% NaOH and 2.5ml of 30% H ₂ O ₂ .
Extracted with 2 x 15ml of benzene.
— Aqueous phase discarded.
Benzene extracts combined and washed 3 x 5 ml of water.
— Aqueous phase discarded.
Benzene dehydrated with a spoon of Na ₂ SO ₄ and evaporated to dryness. Dry residue fractionated by alumina column chromatography to 3 estrogens of estrone, estradiol and estriol.
Colorimetry (Kober reaction)

4) 2 段水解法: β-G による酵素水解と solvolysis を用いた 2 段水解と酸加熱水解とを比較した.

4 実験結果

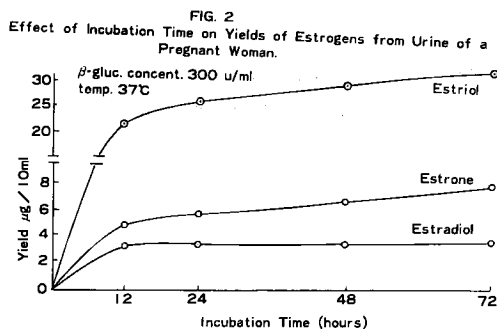
1) 酸加熱水解法 (Fig. 1)



沸騰水中での加熱時間は15分から90分まで経時的に水解率をみるとE₁は15分ですでに大部分水解されているがE₂およびE₃は60分以上しなければ水解は完全とならなかった.

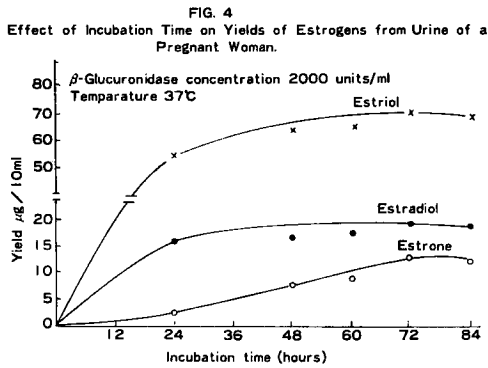
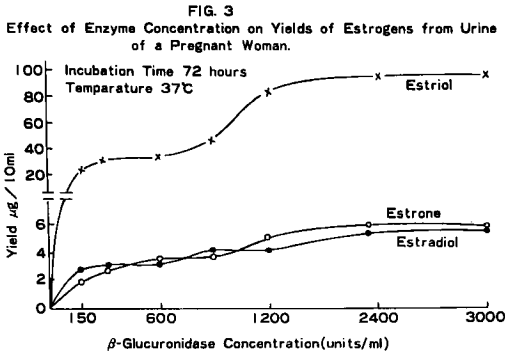
2) β-G による酵素水解法

a) 水解温度37°C, 酵素濃度 300units/ml で72時間まで経時的に水解率を示したのが Fig. 2 である尿中 estrogen は3分画ともこの条件では72時間以上の水解時間を要すると考えられた.



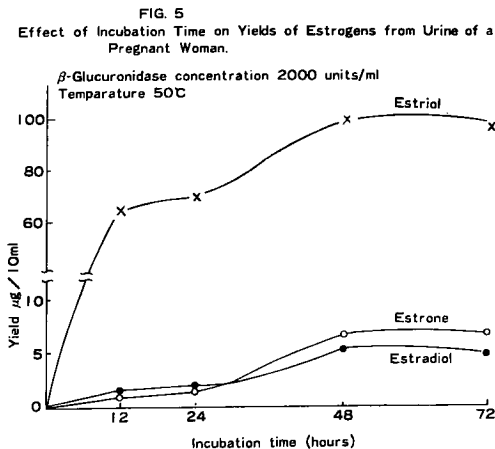
b) 水解温度37°C, 水解時間を72時間に固定し, 酵素濃度を 150units/ml から 3000units/ml まで変えて水解率をみたのが Fig. 3 である. この結果より 2,000units/ml の濃度で各 estrogen とも最高値に達した.

c) 水解温度37°C, 酵素濃度 2,000units/ml として水解時間を24時間から84時間まで経時的に抽出した成績は Fig. 4 である. やはり b) で得られた



結果と同じ72時間で最高収量が得られた。

d) 水解温度を50℃に上げて、酵素濃度を2,000 units/mlとして経時的に12時間から72時間まで水解率をみたのが Fig. 5 である。水解温度を高くすると水解時間は短縮し48時間で完了した。



以上のことから β -G 水解の最適条件は β -G 濃度 2,000 units/ml で水解温度37℃の時は72時間, 50℃の時は48時間の水解時間が必要であると結論された。しかし同一尿について水解温度を37℃と50℃を比較すると Table 3 に示すように50℃の方が各 estrogen とともに水解率の結果がよかった。

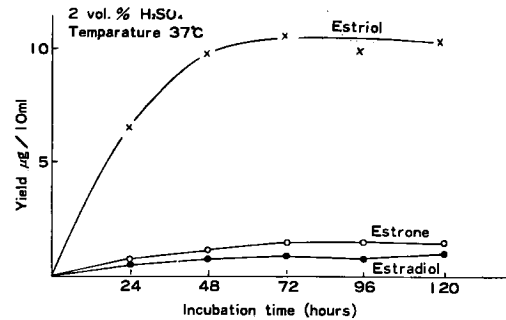
Table 3 Comparison of Urinary Estrogens Hydrolyzed by β -Glucuronidase at 37°C for 78 hours and at 50°C for 48 hours.

Condition	Yields of Estrogens (μ g/10ml)			
	Estrone	Estradiol	Estriol	Total
37°C 78 hours	6.1	5.1	90.5	101.7
50°C 48 hours	7.0	5.4	100.1	112.5

3) Solvolysis (Fig. 6)

0.5, 1.0, 2.0v/v% H_2SO_4 濃度について経時的に水解率を測定すると 0.5~1.0v/v% H_2SO_4 濃度では96時間以上の水解時間を必要としたが, 2.0 v/v% H_2SO_4 濃度では48~72時間を要した。

FIG. 6
Effect of Solvolysis on Yields of Estrogens from Urine of a Pregnant Woman.



4) 2段水解法 (Table 4)

β -G による第一段水解は前述の最適条件である β -G 濃度 2,000units/ml, 水解温度37℃で72時間 incubate し, 第二段水解の solvolysis は 2v/v% H_2SO_4 濃度, 37℃で72時間継時抽出を行なった結果と酸加熱水解 (15v/v% HCl 濃度で沸騰水中で60分加熱) との結果を同一尿について比較した。総 estrogen 量では両者ともほぼ等しいが E_1 と E_2 分面では2段水解法における収量が多く, E_3 では solvolysis における収量が多かった。

Table 4 Comparison of Yields of Estrogens by Hot Acid Hydrolysis and Two Step Hydrolysis in Pregnancy Urine.

Method of Hydrolysis	Yields of Estrogens ($\mu\text{g}/10\text{ml}$)			
	Estrone	Estradiol	Estriol	Total
Hot Acid	4.7	5.0	97.5	107.2
Two Step	5.3	6.9	94.8	106.4
First (β -G)	4.0	5.4	76.1	85.1
Second (Solvolyis)	1.3	1.5	18.7	21.5

II 微量比色定量法について

1 試薬および器具

Tetrachlorethane 試薬は市販特級 p-nitrophenol 2gm を tetrachlorethane に溶解し 100 ml として褐色ビンに入れて保存した。Micro-cell は light path

Table 5 Chemical Determination of Estrogens in Male Urine

Urine 100~200ml

Extracted with 2 x 100~200ml of ether two step hydrolysis

— Aqueous phase discarded

Ether extracts combined

Ether washed with 50~100ml of 8% NaHCO₃ solution

— Aqueous phase discarded

Ether washed 7.5ml of 8% NaOH and 60ml of 8% NaHCO₃ solution

— Aqueous phase discarded

Ether washed with 10ml of water

— Aqueous phase discarded

Ether dehydrated with a few spoon of Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Dry residue dissolved in 50ml of benzene.

Extracted with 2 x 25ml of 1% NaOH solution

— Organic phase discarded

1N NaOH solution extracts combined and boiled in a water bath for 30 minutes. After it cooled in ice water, extracted with 2 x 25ml of ether

Aqueous phase discarded

Ether extracts combined and washed with 5ml of water

— Aqueous phase discarded

Extracted with 2 x 25ml of 1.6% NaOH solution

— Organic phase discarded

1.6% NaOH solution extracts combined and dissolved 0.9gm of H₃BO₃, after that added 1ml of (CH₃)₂SO₄ and mixed by a magnetic stirrer at 37°C for 15 minutes. After it cooled in ice water, added 10ml of 20% NaOH and 2.5ml of 30% H₂O₂.

Extracted with 2 x 25ml of benzene

— Aqueous phase discarded

Benzene dehydrated with a spoon of Na₂SO₄ and evaporated to dryness. Dry residue fractionated by alumina column chromatography.

Table 5 Colorimetry

(Modified SALOKANGAS' micro-method)

Estrogen-methyl-ether fraction evaporated to dryness

1. 1.5ml of KOBER reagent added to the dry residue and boiled in water bath for 20 minutes after that it cooled in ice water for 10 minutes.
2. 0.5ml of water added.
3. It boiled in water bath for 5 minutes and cooled.
4. 1.5ml of water added.
5. 1.5ml of tetrachlorethane reagent added and mixed by a mixer, then centrifuged for 10 minutes at 1,500 r. p. m. Aqueous layer was removed by suction.
6. The tetrachlorethane phase was measured by a spectrophotometer with a micro-cell at wave-length of 508, 539 and 570m μ , respectively.
7. ALLEN's correction was done and estrogens in 24 hours urine were calculated. (Standard estrogen: 1 μg of estrone-methyl-ether, estradiol-methyl-ether and estriol-3-methyl-ether respectively)

5 cm, capacity 0.6ccのものを日立マイクロセル附属装置 (M-1型) を日立分光光度計 (EPU-2A型) に付けて使用した. その他の試薬および器具は前項で用いたものと同じである.

2 対象

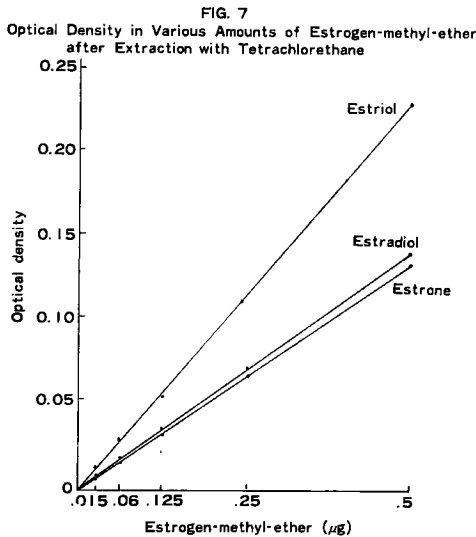
岡山大学医学部第一内科に勤務する29才の健康な男子の尿である.

3 実験方法 (Table 5)

尿50mlまたは100mlを前項で得られた最適条件の2段階水解後 Brown の神戸川変法の一つであるE法²¹⁾で行ない, alumina column chromatography で estrogen を3分画とした. 発色, 比色定量は Salokangas & Bulbrook の方法¹⁰⁾ を若干改変して測定した.

4 実験結果

1) 3つの estrogen-methyl-ether の純品を Table 5 に示した方法で Kober 発色後 tetra-chlorethane 試薬に抽出して比色測定すると Fig. 7 のごとく 0.015 μ gまで正確に測定可能であった.



2) Table 6 に回収率, 精度, 感度を示した. 成人男子尿50mlを2段階水解法で加水分解後0.5~1.0 μ gの標準 estrogen-methylether を加え測定した. 回収率は E_2 が 65.1%と低かったが混在する尿不純色素の干渉のためであると考えられる. 測定誤差は 3.0~3.7%で少なかった. また感度は E_1 0.52 μ g/24h., E_2 0.42 μ g/24h., E_3 0.5 μ g/24h. であり良好な結果であった.

Table 6 Accuracy

It was tested by adding 0.5~1.0 μ g of the reference standard preparations to 50ml of male urine samples after 2 step hydrolysis. percentage recoveries (\pm standard deviation)

Estrone	76.7 \pm 3.7%
Estradiol-17 β	65.1 \pm 3.0%
Estriol	82.8 \pm 3.5%

(10 experiments)

Precision

Duplicate analyses of 50ml of male urine samples by the method involving 2 step hydrolysis.

Estrone (μ g)		Estradiol-17 β (μ g)		Estriol (μ g)	
0.81	0.79	0.65	0.65	0.82	0.78
0.70	0.75	0.66	0.62	0.79	0.82
0.40	0.40	0.34	0.33	0.40	0.43
0.39	0.36	0.30	0.34	0.40	0.44

Sensitivity

μ g/24 hours

Estrone	0.26-0.52
Estradiol-17 β	0.21-0.42
Estriol	0.25-0.50

III. 健康男子における尿中 estrogen 排泄値

1 対象および採尿法

対象は24才から35才までの健康な学生と当教室の勤務医11名および60才から70才までの岡山市内某病院に入院していた内分泌疾患を有しない軽症結核患者4名である. 採尿は toluene 約5mlを防腐の目的で蓄尿ビンに入れ午前8時から翌日午前8時までの24時間尿を正確に採取し, 尿量の少ない場合は水で1,500mlになるように希釈し, これ以上の尿量があれば全尿を正確に測定後ポリエチレン製容器に入れ4 $^{\circ}$ Cに貯蔵した.

2 測定方法はTable 5に従った.

3 測定結果 (Table 7)

老年者では E_3 がやゝ低値で E_2 がやゝ高値であり, 総 estrogen 量はやゝ低値であった. また $E_3/(E_1+$

Table 7 Excreted Estrogens in the Urine of Healthy Men

Age	No. of cases		E ₁ μg/day	E ₂ μg/day	E ₃ μg/day	Total μg/day	E ₃ /(E ₁ +E ₂)
24~35	11	mean	1.7	1.7	3.5	7.0	1.2
		s. d	0.5	0.7	0.6	1.0	0.6
60~70	4	mean	1.3	2.5	2.6	6.4	0.7
		s. d	0.4	0.4	1.1	1.2	0.2

E₂) はかなり低値となったが $p < 0.05$ で若年者との間に有意差はなかった。

考 按

1. Estrogen conjugates の加水分解法について

尿中estrogen は大部分が抱合型で存在しており²⁵⁾ この抱合型の主要なものは estrogen glucuronide と estrogen sulfate である。^{23) 24) 25)} しかし estriol-3-sulfate-16 (17?) glucuronide という double conjugate も新生児尿中に発見されている²⁶⁾ これらの estrogen conjugates は加水分解を行わなければ化学的に定量することは困難であるため、いろいろな加水分解法が行なわれている。

酸加熱加水分解法には HCl や H₂SO₄ が使用され、これらの酸の濃度と煮沸時間が異なる多くの変法があるが、加水分解に要する時間が短かくてよいことと、安価であることが特徴である。古典的 estrogen である E₁, E₂ および E₃ は酸や加熱に対して安定な物質であるが、主要な metabolite である 2-hydroxyestrone は容易に破壊される²⁷⁾ しかし古典的estrogenのうち特にE₂には尿中では酸加熱水解によって若干の分解が起ることが指摘されている^{11) 28)} この損失は尿を希釈することによって防ぐことができる¹¹⁾ Glucose の存在では E₁, E₂, E₃ のすべての分画で回収率が減少し、Hobkirk²⁹⁾ によると 2% glucose 尿では酵素水解に比較して 70~80% が破壊され、10倍希釈尿として酸加熱水解した場合はほとんど分解されなかったと報告した。Glucose は一種の aldehyde で estrogen の phenol ring と反応し bakelite 様物質をつくる可能性を Brown は指摘し¹¹⁾ Dodson は glucose の carbonyl 基と estrogen の官能基 (aromatic ring) との縮合で、水に可溶性の物質を生ずる可能性もあると述べた³⁰⁾ 著者は HCl による酸加熱水解法を検討し 15% HCl 濃度で 100℃, 60分 incubation すればよいという Marrian ら³¹⁾ や Brown ら¹¹⁾ と同様の結果を得た。

酵素による加水分解法は酸加熱水解法でおこる

estrogen の破壊を防ぐために行なわれ、Katzman ら³²⁾ や Beer & Gallagher¹⁶⁾ は β-G を用いてよい結果を報告している。酵素には glucuronide を離す β-G と sulfate を離す phenol sulfatase があるが、その起源によって至適 pH が異なっている。Patella vulgata より抽出された酵素には β-G と sulfatase の両者を含み、estrogen conjugates の加水分解には最適であるが我国では入手しがたい。β-G による加水分解では酵素の至適 pH, 濃度, 水解時間および温度が重要である。Beer & Gallagher¹⁶⁾ は牛の肝より抽出した β-G 300units/ml で 120 時間、Straw ら³³⁾ は 100~200units/ml で細菌 (E. coli) 性 β-G で 24 時間、Brown ら¹¹⁾ は patella vulgata から得られた β-G 600units/ml で 96 時間が必要であったと報告している。Hobkirk²⁹⁾ はこれらの起源の異なる β-G を比較して、肝性 β-G が E₃-glucuronide を水解するのに最も多量を必要とすることを指摘した。

著者は肝性 β-G を使用して追試し、水解時間を短縮して 72 時間にした場合、37℃ で 2,000units/ml の高濃度を必要とし、さらに 50℃ にすれば 48 時間で最高収量が得られた。50℃ にした方が収量が多いことは尿が弱酸性であり、温度が高いため glucuronide 以外の sulfate や他の conjugate も水解されたことを示すものであろう。β-G の inhibitor として saccharolactone が最も強い inhibitor である³⁴⁾ が、他に Beling³⁴⁾ は尿中のある種の塩も inhibitor であるとしており、今後明らかにされるべき問題である。

Burstein & Lieberman³⁵⁾ は、pH 1, 38℃, 24 時間の ether 連続抽出または継時抽出で solvolysis を行なうと、estrogen sulfate は他の glucuronide に影響されることなく水解されると報告しているが、著者は Fig. 6 のごとく 2% H₂SO₄ で 48~72 時間継時抽出を必要とした。

酵素水解と solvolysis による 2 段水解法と酸加熱水解法を比較すると Table 4 に示すように E₂ 分画が酸加熱水解法において低値であった。これは

Brown³¹⁾ や Boscott ら²⁰⁾ の云うごとく加熱と強酸の影響で E_2 が若干破壊されたことと、尿中不純物が多く生成され比色干渉を起したことが考えられる。

2 段水解法においては E_3 の収量が少ないように見えるが、総 estrogen 値は 2 つの方法ではほぼ等しいことから、酸加熱水解法では E_1 , E_2 分画の一部が E_3 分画と同じ極性のものとなり溶出されたとの可能性も考えられる。

2 微量比色定量法について

男子尿中 estrogen は非常に微量であり Brown 法では尿中不純色素を十分除去することが難かしく、微量測定には適さない。この欠点を除くために Ittrich¹¹⁾ は Kober chromogen を chloroform containing p-nitrophenol で特異的に抽出し測定したが褪色が速く不安定であった。Tetrachlorethane containing p-nitrophenol で Kober chromogen を抽出する Salokangas & Bulbrook の方法¹⁰⁾ は Ittrich の方法¹¹⁾ に比べて褪色が遅く安定であるため、著者はこの方法を若干改変して微量測定を行なった。その結果 24 時間尿で 0.5 μg まで正確に測定可能であり Salokangas & Bulbrook¹⁰⁾ の報告と一致した。また測定操作は煩雑であるが大量の尿を必要とせず 50 ml の尿で十分測定できる優れた方法である。

3 健康男子における尿中 estrogen 排泄値について

Table 8 に男子の尿中 estrogen 排泄値の報告例を示した。古典的 estrogen の中で E_2 はどの報告でも最低であったが E_1 と E_3 はどちらが多いかは報告者によって異なっている。Diczfalusy & Lauritzen³⁶⁾ や正司ら³⁷⁾ は $E_3 > E_1$, Bersohn & Oelofse³⁹⁾ や⁴³⁾ は $E_1 > E_3$ であったと云っている。Gallagher¹⁸⁾ は男性の estrogen 代謝の示標としては E_3 より E_1 を重視している。 E_3 は肝での代謝遅延あるいは阻害

により低くなる可能性も考えられる。正常男子についての著者の成績では $E_3 > E_1$ であった。なお、著者の成績では E_2 が比較的多かったが、これは水解法の改良によるものと思われる。estrogen 排泄量は小児では低く⁴⁰⁾ 成人になると増加し、老人になると減少するという報告が多い³⁷⁾ ⁴¹⁾ ⁴²⁾ 著者の成績でも、老人での減少傾向を認めた。この減少は副腎や睾丸機能の低下に基因すると考えられる。

結 論

尿中 estrogen 測定法のうち、各種加水分解法および Salokangas & Bulbrook による微量比色定量法について検討を行ない、2 段水解法(酵素水解と solvolysis)で水解後微量比色定量法を併用して、正常男子 15 名について尿中 estrogen を測定し、次の結果を得た。

- 1) 酸加熱水解法では 15% HCl 濃度で 100°C, 60 分加熱で尿中 estrogen 値は最高であった。
- 2) β -G による酵素水解法では、2,000 units/ml 濃度で 37°C では 72 時間、50°C では 48 時間で水解が完全となりよい結果が得られた。
- 3) Solvolysis では 2% H_2SO_4 濃度、37°C ether 継時抽出法で 72 時間を必要とした。
- 4) 酸加熱水解法と 2 段水解法(β -G による酵素水解法と solvolysis)を比較すると総 estrogen ではほぼ等しい結果であったが、酸加熱水解法では他の方法に比べて E_2 の減少がみられた。
- 5) Salokangas & Bulbrook 法を若干改変した微量比色定量法では純品 estrogen で 0.015 μg まで測定可能であった。
- 6) 微量比色定量法による平均回収率は E_1 76.7%, E_2 65.1%, E_3 82.8% であり測定限界は 0.5 $\mu\text{g/day}$ であった。

Table 8 Urinary Estrogens in Normal Male Subjects

Reporter	No. of Cases	Age	Urinary Estrogens ($\mu\text{g/day}$)			
			Estrone	Estradiol	Estriol	Total
Ginsburg & Brown (1961) ³⁸⁾	24	18~55	5.1 \pm 1.4	1.3 \pm 0.7	4.7 \pm 2.7	10~20
Preedy (1961) ²⁾	29	23~45	4.1	1.0 <	2.84	
Bersohn & Oelofse (1957) ³⁹⁾	21	Bantu	5.5		3.5	
(1958) ⁴³⁾	20	White	6.3		6.0	
Jull et al (1964) ⁴⁰⁾	6	17	2.5	1.4	3.6	
大村ら (1964) ⁴⁴⁾						

- a) 24~35才の健康男子の尿中 estrogen 値は11例で E_1 $1.7 \pm 0.5 \mu\text{g/day}$ (平均値 \pm 標準偏差), E_2 $1.7 \pm 0.7 \mu\text{g/day}$, E_3 $3.5 \pm 0.6 \mu\text{g/day}$, 総量 $7.0 \pm 1.0 \mu\text{g/day}$ であった。
- b) 60~70才の健康男子では E_1 $1.3 \pm 0.4 \mu\text{g/day}$, E_2 $2.5 \pm 0.4 \mu\text{g/day}$, E_3 $2.6 \pm 1.1 \mu\text{g/day}$, 総量 $6.4 \pm 1.2 \mu\text{g/day}$ であった。

稿を終るに当り、御指導を賜わった有正修道博士に深謝いたします。

本論文の要旨および一部は第14回日本内分泌学会西日本地方会と第40回日本内分泌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Ittrich, G.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **312**: 1, 1958.
- 2) Preedy, J. R. K. & Aitken, E. H.: J. Biol. Chem. **236**: 1300, 1961.
- 3) Bauld, W. S. & Greenway, R. M.: Methods of Biochemical Analyses 5: (Ed. Glick, D.) New York. p. 337, 1957.
- 4) Diczfalusy, E.: Acta Endocr. **12**: (Suppl. 12), 12, 1953.
- 5) Borth, R.: Ciba Found. Colloquia on Endocrinol. **29**: 489, 1952.
- 6) Kober, S.: Biochem. Z. **239**: 209, 1931.
- 7) Brown, J. B.: Biochem. J. **60**: 185, 1955.
- 8) Bauld, W. S.: Biochem. J. **68**: 488, 1956.
- 9) Brown, J. B., Bulbrook, R. D. & Greenwood, F. C.: J. Endocr. **16**: 49, 1957.
- 10) Salokangas, R. A. A. & Bulbrook, R. D.: J. Endocr. **22**: 47, 1961.
- 11) Brown, J. B. & Blair, H. A. F.: J. Endocr. **17**: 411, 1958.
- 12) Slaunwhite, W. R. Jr. & Sandberg, A. A.: Arch. Biochem. Biophys. **63**: 478, 1956.
- 13) Hagopian, M. & Levy, L. K.: Biochem. et Biophys. Acta, **30**: 641, 1958.
- 14) Migeon, C. J., Wall, P. E. & Bertrand, J.: J. Clin. Invest. **38**: 619, 1959.
- 15) Beer, C. T. & Gallagher, T. F.: J. Biol. Chem. **214**: 335, 1955.
- 16) Beer, C. T. & Gallagher, T. F.: J. Biol. Chem. **214**: 351, 1955.
- 17) Dancis, J., Money, W. L., Condon, G. P. & Levitz, M.: J. Clin. Invest. **37**: 1373, 1958.
- 18) Gallagher, T. F., Kraychy, S., Fishman, J., Brown, J. B. & Marrian, G. F.: J. Biol. Chem. **233**: 1093, 1958.
- 19) Bernfeld, P. & Fishman, W. H.: J. Biol. Chem. **202**: 763, 1953.
- 20) Kato, K., Yoshida, K., Tsukamoto, H., Nobunaga, M., Masuya, T. & Sawada, T.: Chem. Pharmac. Bull. **8**: 239, 1960.
- 21) 神戸川 明, 細井 稔: 内分泌と代謝 **3**: 215, 1959.
- 22) Allen, W. M.: J. Clin. Endocr. **10**: 71, 1950.
- 23) Sandberg, A. A., Slaunwhite, W. R. Jr. & Antoniades, H. N.: Recent Prog. Hormone Res. **13**: 209, 1957.
- 24) Purdy, R. R., Engel, L. L. & Oncley, J. L.: Federation Proc. **18**: 305, 1959.
- 25) Cohen, S. L., Marrian, G. F. & Odell, A. D.: Biochem. J. **30**: 2250, 1936.
- 26) Troen, P., Nilsson, B., Wiqvist, N. & Diczfalusy, E.: Acta Endocr. **38**: 361, 1961.
- 27) Fishman, J.: J. Clin. Endocr. **23**: 207, 1963.
- 28) Boscott, R. J.: Nature **164**: 140, 1949.
- 29) Hobkirk, R., Alheim, A. & Bugge, S.: J. Clin. Endocr. **19**: 1325, 1959.
- 30) Dodson, R. M.: Estrogen Assays in Clinical Medicine (Ed. Paulsen, C. A.), University of Washington Press, Seattle, p. 8, 1965.
- 31) Marrian, G. F. & Bauld, W. S.: Acta Endocr. **7**: 240, 1951.
- 32) Katzman, P. A., Straw, R. F., Buhler, H. J. & Doisy, E. A.: Recent Prog. Hormone Res. **9**: 45, 1954.
- 33) Straw, R. F., Katzman, P. A. & Doisy, E. A.: Endocrinology **57**: 87, 1955.

- 34) Beling, C. G.: Acta Endocr. **43**: (Suppl. 79.), 56, 1963.
- 35) Burstein, S. & Lieberman, S.; J. Biol. Chem. **233**: 331, 1958.
- 36) Diczfalusy, E. & Lauritzen, C.: Oestrogene beim Menschen, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, p. 373, 1961.
- 37) 正司武夫, 石神襄次, 原信二: 日内泌誌, **41**: 460, 1965.
- 38) Ginsburg, J. & Brown, J. B.: Lancet **2**: 1274, 1961.
- 39) Bersohn, J. & Oelofse, P. J.: South African M. J. **31**: 1172, 1957.
- 40) Jull, J. W. & Dossett, J. A.: Brit. Med. J. **2**: 797, 1964.
- 41) Bulbrook, R. D., Franks, L. M. & Greenwood, F. C.: Acta Endocr. **31**: 481, 1959.
- 42) 原信二, 定延和夫: 産婦人科治療 **8**: 293, 1964.
- 43) Bersohn, J. & Oelofse, P. J.: South African M. J. **32**: 979, 1958.
- 44) 大村順一, 田坂純雄, 大森弘之, 松村陽右: 日泌学会誌 **55**: 786, 1964.

Urinary Estrogens in Male Patients with Liver Diseases

1. Studies on Method for the Estimation of Estrogens in Normal Male Subjects

By

Isao Fukushima

The First Department of Internal Medicine Okayama University
Medical School (Director: Prof. K. Kosaka)

In an attempt to establish optimal conditions for the hydrolysis of estrogen conjugates in urine with Brown's method, the study was made of the hot acid hydrolysis, enzyme (β -glucuronidase) hydrolysis and solvolysis. The modification of the micro-method according to Salokangas & Bulbrook was reinvestigated. urinary estrogens in fifteen normal male subjects were measured with some modified micro-method involving two step hydrolysis (β -glucuronidase hydrolysis and solvolysis). The following results were obtained.

1. Optimal conditions for the hot acid hydrolysis were in 15v/v % HCL concentration at 100 °C for 60 minutes incubation. For β -glucuronidase hydrolysis, those were in 2,000 units per ml enzyme concentration at 37 °C for 72 hours incubation and at 50 °C, incubation time was 48 hours. Optimal incubation time for the solvolysis was 72 hours at 37 °C in 2 % H₂SO₄ concentration with continuous ether extraction.

2. Compared with the hot acid hydrolysis and two step hydrolysis involving β -glucuronidase hydrolysis and solvolysis, quantities in total estrogens were mostly equal but estradiol fraction in the hot acid hydrolysis diminished little.

3. With the modified micro-method according to Salokangas & Bulbrook, the smallest amounts of pure estrogen could be estimated to 0.015 μ g and the mean ratios of recovery in this procedure were as follows; estrone 76.7%, estradiol 65.1%, estriol 82.8%. By this method, it was possible to determine urinary estrogens until 0.5 μ g per day.

4. Urinary estrogens in eleven normal male subjects with 24 to 35 years old were as follows; estrone 1.7 \pm 0.5 μ g per day (mean \pm standard deviation), estradiol 1.7 \pm 0.7, estriol 3.5 \pm 0.6, total estrogen 7.0 \pm 1.0, and in fourth with 60 to 70 years old, estrone 1.3 \pm 0.4 μ g per day, estradiol 2.5 \pm 0.4, estriol 2.6 \pm 1.1, total estrogen 6.4 \pm 1.2.