

〈原 著〉

## Equilibrium dialysis を用いた血中遊離型 (蛋白非結合型) cortisol 動態の検討

橋 本 浩 三\* 浅 岡 克 司\*\* 大 藤 真\*\*

### はじめに

血中 cortisol は、一部は特異的結合蛋白である corticosteroid binding globulin(CBG)と結合しており、一部は albumin と結合している。また一部はこれらの蛋白と結合せず、遊離型(蛋白非結合型) cortisol として存在している。生理的活性を有するのはこの蛋白非結合型 cortisol (non protein-bound cortisol) であるとされている<sup>1)~6)</sup>。この遊離型 cortisol を簡単な平衡透析を利用した方法で測定し、その動態につき多少の知見を得たので報告する。また合成エストロゲン製剤である diethylstilbestrol (DES) の遊離型 cortisol の変動に及ぼす影響についても検討したので報告する。

### 方 法

#### 1) 血中蛋白非結合型 cortisol、および蛋白非結合パーセントの測定

方法は Doe<sup>7)</sup> らの方法を多少修飾して行った。即ち、1.1ml の plasma に 10μl の <sup>14</sup>C-cortisol (0.002Ci, 0.014μg) を加え、37°C 溫浴にて 1 時間、<sup>14</sup>C-cortisol と血漿 cortisol とを平衡させたのち、その 1 ml を用いて 0.05M phosphate buffer (pH 7.4) 1.5ml に対して平衡透析を行った。また <sup>14</sup>C-cortisol の同量を透析外液に最初

より入れておいて、平衡透析を行いながら、血漿 cortisol との平衡を同時に進行する方法も比較検討した。透析チューブには細い Visking tube (8/32", Visking 社) を用い、これを二つ折りにして、あらかじめ 1.5ml の透析外液を加えた 1 × 7 cm 程度の試験管を入れた。チューブの両端より sample を 0.5ml ずつ入れた後、両端を試験管の外側に折り曲げ、充分封をした。平衡透析は 37°C 溫浴にて 16 時間振とうしながら行った。試験管はパラフィルム、ゴムキャップ等で充分封をし、チューブ内外の液の蒸発を防いだ。透析後、チューブ外液 1ml とチューブ内液 0.2ml に含まれる <sup>14</sup>C-cortisol を液体シンチレーションカウンターにて測定し、次の式により蛋白非結合パーセント、および遊離型 cortisol を算出した。

$$\frac{\text{外液の } ^{14}\text{C}-\text{cortisol 濃度 (dpm/ml)}}{\text{内液の } ^{14}\text{C}-\text{cortisol 濃度 (dpm/ml)}} \times 100$$

= 蛋白非結合パーセント (%unbound)

蛋白非結合率 × 血漿コーチゾール

= 遊離型コーチゾール (μg/dl)

血漿 cortisol の測定は、cortisol を特異的に測定する Clark ら<sup>18)</sup>の酸化法による硫酸蛍光法によった。

#### 2) diethylstilbestrol の遊離型 cortisol に及ぼす影響

健康人有志に diethylstilbestrol (DES) 7.5 mg/日を 3 日内服させ、その後 cortisol の蛋白非結合パーセント及び遊離型 cortisol を測定し、その影響について検討した。また DES を 4 日内服後に rapid ACTH test ( $\alpha^{1-24}$  ACTH 0.25mg 静注) を行い、その際の遊離型 cortisol,

\*岡山大学医学部中央検査部

\*\*岡山大学医学部第三内科

受付：49年 1月 7日

別刷請求先：岡山市鹿田町 2-5-1 (〒 700)

岡山大学医学部中央検査部

橋本 浩三

albumin 結合型 cortisol, CBG 結合型 cortisol の変動を正常群と比較した。

albumin 結合型 cortisol の算出は血漿を60°Cで30分処理して、そのCBG活性をなくしたもの用い、やはり37°Cで平衡透析を行い、その時の非結合パーセント、結合パーセントより次の式により求めた。

$$\frac{\text{結合パーセント}}{\text{非結合パーセント}} \times \text{遊離型 cortisol}$$

= albumin 結合型 cortisol ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )

これは Pearson<sup>8)</sup> らの報告のごとく、albumin 結合型 cortisol と遊離型 cortisol の比は血漿中 cortisol の量と無関係に一定であることより導いた式である。CBG 結合型 cortisol は total cortisol より遊離型、及び albumin 結合型 cortisol を引いて算出した。

## 結果

### 1) 測定法の検討

透析は  $^{14}\text{C}$ -cortisol をチューブ内に入れた場合でも外液に入れた場合でも、10時間を過ぎるとほぼ平衡に達していたが、十分を期すために16時間行った。

Table 1 Effect of volume outside the dialysis tube on the percentage of unbound cortisol (inside; 1.0ml plasma)

outside the dialysis tube (buffer)	1.0ml	1.5ml	2.0ml	4.0ml
% unbound	6.7	5.9	6.6	4.0
	6.2	6.4	5.9	5.4
	6.4	6.2	5.0	3.6
	6.5	6.3	5.5	4.2
Mean	6.5	6.4	5.8	4.3
SD	0.2	0.3	0.7	0.8

表1に示すごとく、 $^{14}\text{C}$ -cortisol を内液に入れた場合、血漿 cortisol 1 ml に対し、外液が 2 ml 以上になると蛋白非結合パーセントは低値を示す傾向を認め、測定の誤差も大きくなる傾向を認めた。また透析外液に  $^{14}\text{C}$ -cortisol を入れた場合には、外液が 2 ml 以上になると非結合パーセント

が高くなる傾向を認めた。したがって血漿 1 ml に対し、外液 1.5 ml の割合に限定して測定を行った。

Table 2 The percentage of unbound cortisol when  $^{14}\text{C}$ -cortisol was added inside the dialysis tube or outside the tube, and its reproducibility

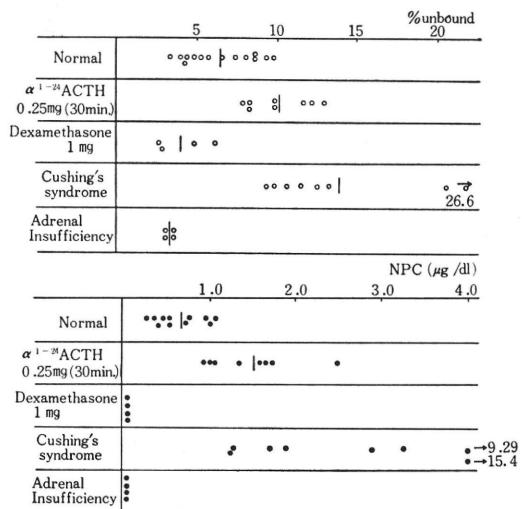
$^{14}\text{C}$ -cortisol	inside the dialysis tube	outside the dialysis tube
% unbond	6.8	6.2
	6.7	6.4
	6.4	6.6
	6.3	6.4
	6.3	5.9
	6.4	6.4
	5.8	6.2
	6.5	6.3
	6.8	
	6.6	
Mean	6.4	6.3
SD	0.3	0.2
CV(%)	4.7	3.3

(inside; 1.0ml plasma)  
(outside; 1.5ml buffer)

表2はこうして測定した際、 $^{14}\text{C}$ -cortisol を血漿に加えた場合と、外液に加えた場合での非結合パーセントの相違、およびそれらの再現性を示している。それらは  $6.4 \pm 0.3\%$  および  $6.3 \pm 0.2\%$  と再現性は良好で、両者の間にはほとんど差異は認められなかった。以上より外液に  $^{14}\text{C}$ -cortisol を加えるほうがより簡便なので、この方法を主として用いた。

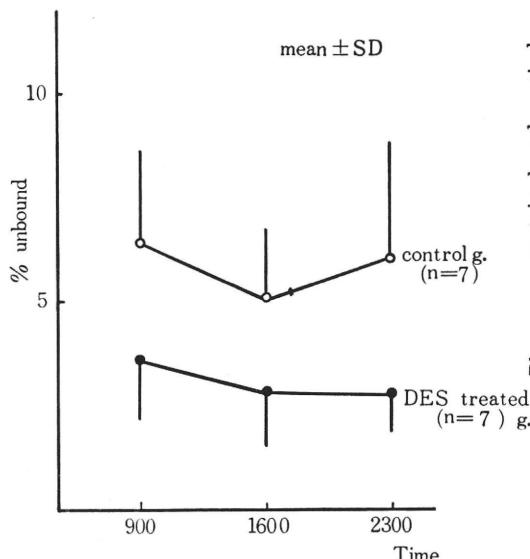
### 2) 正常人、および cortisol 分泌増加状態、分泌減少状態における遊離型 cortisol (図1)

正常人14名の非結合パーセントは  $6.6 \pm 2.2\%$  ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) であり、11名で測定した遊離型 cortisol は  $0.63 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{dl}$  ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) であった。合成 ACTH 0.25mg 静注後30分には非結合パーセントは平均 10.2% と上昇を認め、遊離型 cortisol も平均  $1.49 \mu\text{g}/\text{dl}$  と増加を認めた。また前夜 dexamethasone 1mg 服用後、翌朝 9 時の血漿では非結合パーセントは平均 4.2% と減少を

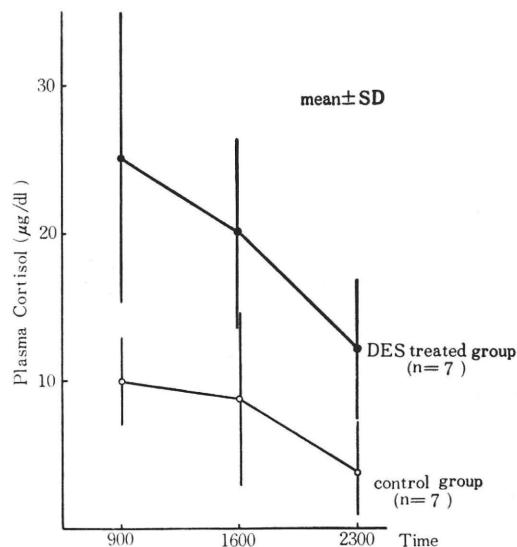


**Fig. 1** The percentage of unbound cortisol and levels of non protein-bound cortisol in normal subjects and patients with hypophysial adrenocortical disorders.

認め、遊離型 cortisol はほとんど 0 に近い値を示した。また cortisol 分泌亢進症である Cushing 症候群 8 名では非結合パーセントは 8.8 %～26.6 %、平均 14.2 % と上昇を認めた。また遊離型 co-

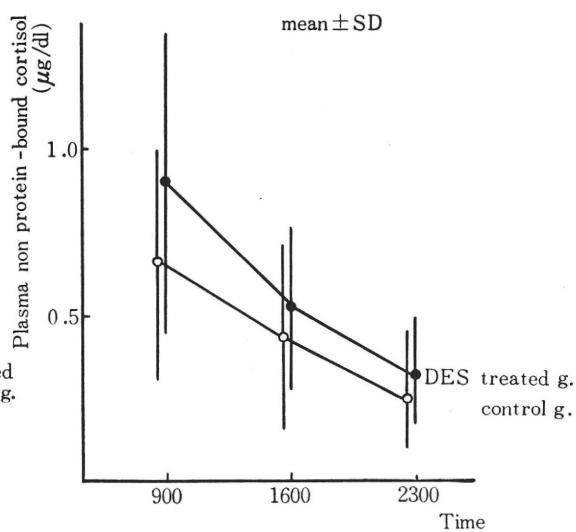


**Fig. 3** Effect of diethylstilbestrol on the percentage of unbound cortisol and levels of non protein-bound cortisol ( $37^{\circ}\text{C}$ )



**Fig. 2** Effect of diethylstilbestrol (7.5mg × 3 day) on plasma total cortisol (37°C)

cortisol は  $1.23\mu\text{g}/\text{dl} \sim 15.4\mu\text{g}/\text{dl}$ 、平均  $4.61\mu\text{g}/\text{dl}$  といずれも高値を示した。cortisol 分泌低下状態にある副腎不全患者 4 名では非結合パーセントは平均  $3.4\%$  と減少傾向を認め、遊離型 cortisol はほとんど 0 に近い値を示した。



**Fig. 3** Effect of diethylstilbestrol on the percentage of unbound cortisol and levels of non protein-bound cortisol ( $37^{\circ}\text{C}$ )

3) diethylstilbestrol の遊離型 cortisol に  
およぼす影響

合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES) 7.5mg を 3 日間内服後の血漿 cortisol は図 2 のごとく 2 倍以上に上昇している。図 3 にその場合の非結合パーセントと遊離型 cortisol の値を示している。対照群の 7 名では、非結合パーセントは午前 9 時が平均 6.4%，午後 4 時が 5.1%，午後 11 時が 6.0% と時間による変化はあまりなかった。遊離型 cortisol は午前 9 時が  $0.66 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{dl}$ ，午後 4 時が  $0.42 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{dl}$ ，午後 11 時が  $0.23 \pm 0.22 \mu\text{g}/\text{dl}$  と夜になるほど低いという日内変動を認めた。また DES 投与群 7 名では、非結合パーセントは午前 9 時、午後 4 時、午後 11 時の平均値が 3.6%，2.8%，2.7% といずれも低下傾向を認めた。遊離型 cortisol の値は  $0.89 \pm 0.46 \mu\text{g}/\text{dl}$ ， $0.52 \pm 0.25 \mu\text{g}/\text{dl}$ ， $0.31 \pm 0.20 \mu\text{g}/\text{dl}$  となり、対照群との間に有意の差を認めず、また対照群と同様に日内変動が認められた。

図 4 には rapid ACTH 試験の際の血漿コーチ

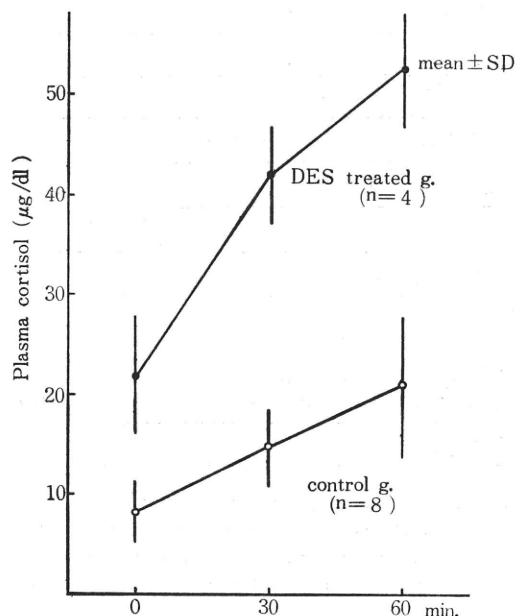


Fig. 4 Effect of diethylstilbestrol ( $7.5\text{mg} \times 4$  day) on plasma cortisol in Rapid ACTH Test

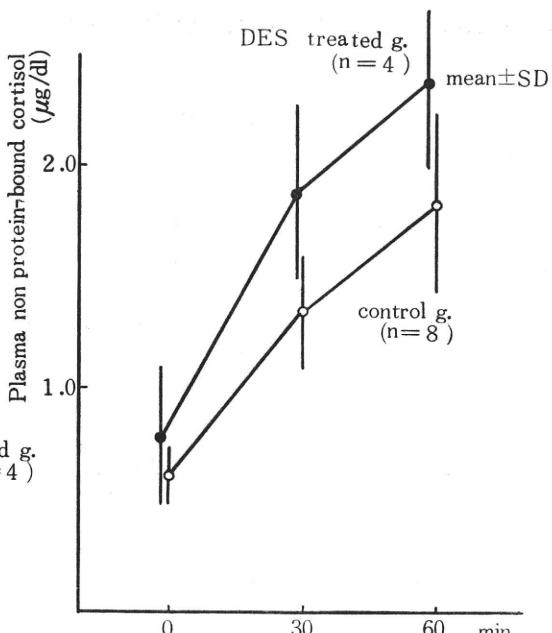
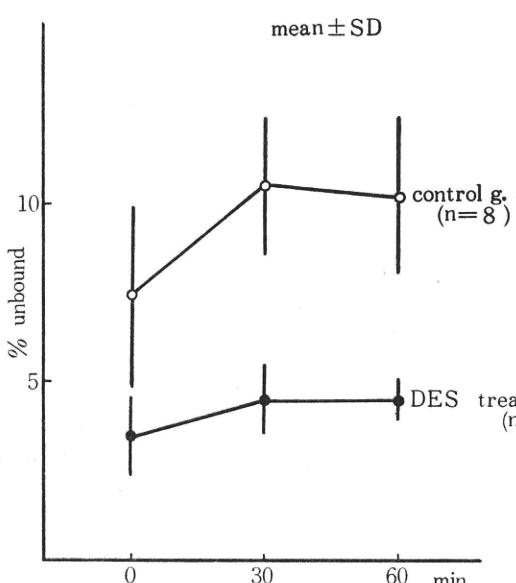


Fig. 5 Effect of diethylstilbestrol on the percentage of unbound cortisol and levels of non protein-bound cortisol ( $37^\circ\text{C}$ )

ゾールの反応を示しているが、対照群に比して DES 投与群では、ACTH 投与30分後、60分後には血漿 cortisol は2.5倍以上と有意の上昇を示している。この際の cortisol の非結合パーセントと遊離型 cortisol の変動を図5に示している。対照群では前値に対し、30分、60分で非結合パーセントは有意ではないが増加傾向を示し、DES 投与群では明らかではない。また遊離型 cortisol は、対照群で前値が  $0.61 \pm 0.17 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、30分が  $1.34 \pm 0.27 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、60分が  $1.83 \pm 0.41 \mu\text{g}/\text{dl}$  と時間とともに上昇している。DES 投与群では前値  $0.78 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、30分が  $1.88 \pm 0.4 \mu\text{g}/\text{dl}$ 、60分が  $2.37 \pm 0.39 \mu\text{g}/\text{dl}$  と、やはり時間とともに上昇しており、対照群との間に30分で有意の上昇を認めた。

対照群5名とDES投与群4名のrapid ACTH 試験の際の血清を  $60^\circ\text{C}$  にて30分処理したもの用いて  $37^\circ\text{C}$  で平衡透析し、前記の方法により albumin 結合型 cortisol, CBG 結合型 cortisol を求めた結果を表3、及び図6に示している。これによると、DES投与群ではCBG結合型cortisol の上昇が対照群に比し有意に増加しており、この増加は著明である。また ACTH 負荷後30分、60分では遊離型 cortisol にも DES 投与群で対照群に比し上昇傾向を認め、また albumin 結合型 cortisol は DES 投与群で対照群に比し有意に上昇していた。

Table 3 Total cortisol, nonprotein-bound cortisol, albumin-bound cortisol and CBG-bound cortisol in Rapid ACTH Test ( $37^\circ\text{C}$ )

subject	minutes	%unbound	CBG-inactivated plasma		plasma cortisol ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) at $37^\circ\text{C}$			
			%unbound	%bound %unbound	total	NPC	albumine-bound	CBG-bound
<b>(a) control group</b>								
1	0	4.9	25.8	2.88	9.6	0.42	1.21	7.97
	30	8.2	27.8	2.60	18.7	1.53	3.98	13.19
	60	8.6	26.8	2.73	23.1	1.99	5.43	15.68
2	0	10.3	29.6	2.38	7.5	0.77	1.83	4.90
	30	11.8	29.1	2.44	14.5	1.71	4.17	8.62
	60	13.2	35.9	1.79	16.6	2.19	3.92	10.49
3	0	5.8	27.5	2.64	8.8	0.51	1.35	6.94
	30	10.0	30.5	2.28	10.1	1.04	2.30	6.79
	60	9.4	30.1	2.32	16.6	1.54	3.57	11.49
4	0	8.1	33.7	1.97	6.2	0.50	0.99	4.71
	30	12.2	33.1	2.02	8.6	1.04	2.10	5.46
	60	7.4	36.7	1.73	14.2	1.05	1.82	11.33
5	0	6.7	35.8	1.79	12.9	0.86	1.54	10.50
	30	10.0	31.3	2.20	17.8	1.58	3.48	12.74
	60	8.9	31.2	2.21	19.3	1.93	4.27	13.10
<b>(b) DES treated group</b>								
1	0	4.8	23.4	3.28	19.7	0.95	3.12	15.63
	30	4.3	26.0	2.85	35.8	1.54	4.39	29.87
	60	5.2	23.2	3.31	52.7	2.74	9.07	40.89
2	0	4.0	25.6	2.91	27.3	1.10	3.20	23.00
	30	5.6	26.5	2.77	42.8	2.40	6.65	33.75
	60	4.3	23.9	3.18	61.1	2.62	8.33	50.15
3	0	2.8	26.7	2.75	25.4	0.71	1.95	22.74
	30	4.9	27.6	2.62	40.9	2.00	5.24	33.66
	60	4.0	25.6	2.90	47.0	1.88	5.45	39.67
4	0	2.4	28.3	2.53	14.6	0.35	0.89	13.36
	30	3.3	27.3	2.66	48.0	1.58	4.20	42.22
	60	4.5	29.4	2.40	50.0	2.25	5.40	42.35

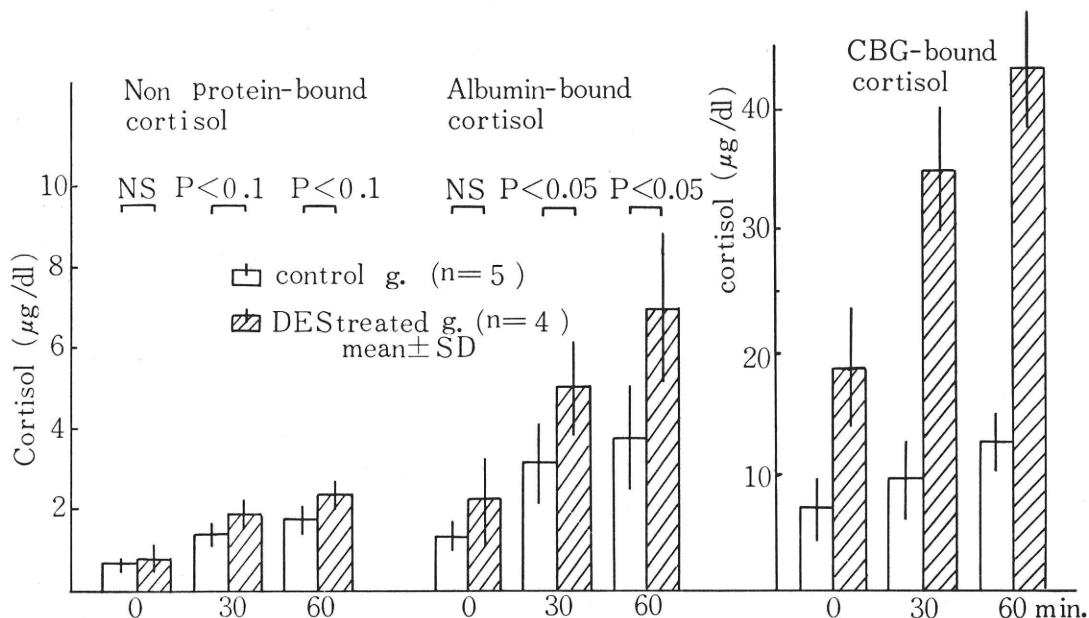


Fig. 6 Non protein-bound cortisol, Albumin-bound cortisol and CBG-bound cortisol at 37°C in Rapid ACTH Test

### 考 案

遊離型 cortisol の測定は電気泳動を利用した方法<sup>4)</sup>、ultrafiltration<sup>2),3),8),9)</sup>を利用した方法、gelfiltration<sup>11)</sup>を用いた方法、平衡透析を利用した方法が行われている。電気泳動を利用した方法では精度が悪く、ultrafiltrationを利用した方法では血液量が多量必要であり、また特定の装置を必要とする欠点があった。平衡透析による場合は、従来の報告では透析を行う前にトレーサーとしての<sup>14</sup>C-cortisolと内因性のcortisolをまず平衡状態にしておいたのちに平衡透析を行う方法が行われているが、今回は透析外液に最初より<sup>14</sup>C-cortisolを加え、平衡透析を行いつつ<sup>14</sup>C-cortisolと内因性cortisolの平衡を行なう方法も行ったが、いずれの場合も16時間の透析で十分平衡に達した。平衡透析を用いて遊離型cortisolを測定する場合には、透析外液による血漿の希釈の問題、トレーサーとして加える微量のcortisolが内因性cortisolの濃度に影響を及ぼす問題等が存在する。血漿の浸透圧が外液より高いと血漿が希釈

される可能性があるが、我々の測定した条件ではこの点はあまり問題にならなかった。妹尾<sup>13)</sup>らは外液に dextran を加えて浸透圧を血漿浸透圧と同程度にして良好な結果を得たと報告している。また外液量が血漿量の2倍以上になると非結合パーセントの値に影響がみられたが、1.5倍以下では問題はなかった。またトレーサーとして加えたcortisolは血漿 cortisol 値の低い場合には問題がある。しかしこの点はトレーサーを用いる場合、避けられない問題であり、また今回用いた<sup>14</sup>C-cortisolの量はトレーサーとして最少量であり、実際それほど大きい誤差を生じるとは考えられない。

今回の測定において、正常人の非結合パーセントは  $6.6 \pm 2.2\%$  で、Mills ら<sup>3)</sup>の  $8.3 \pm 0.87\%$  ( $\text{mean} \pm \text{SE}$ )、Plager<sup>9)</sup> らの  $11.5\%$  ( $\text{mean}$ ) De Moor<sup>10)</sup> らの  $8.3\%$  ( $\text{mean}$ )、Rosenthal<sup>12)</sup> らの  $8.5 \pm 0.6\%$  ( $\text{mean} \pm \text{SE}$ ) に比して多少低いが、Doe<sup>7)</sup> らの  $7.3 \pm 1.1\%$  ( $\text{mean} \pm \text{SD}$ ) とは近い値を示した。Doe ら以外は ultrafiltration を用いており、この場合は測定の性質上、非結合パーセン

ントが高めに出るものと考えられる。また遊離型 cortisol は朝 9 時の値が  $0.63 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{dl}$  で、Marshall<sup>11)</sup> らの  $0.68 \pm 0.47 \mu\text{g}/\text{dl}$  (mean  $\pm$  SD) とよく一致していたが、Plager<sup>9)</sup> らの  $1.25 \mu\text{g}/\text{dl}$  (mean), De Moor<sup>10)</sup> らの男性  $1.07 \pm 0.35 \mu\text{g}/\text{dl}$ , 女性  $1.33 \pm 0.65 \mu\text{g}/\text{dl}$  (mean  $\pm$  SD), Doe<sup>7)</sup> らの男性  $1.27 \pm 0.51 \mu\text{g}/\text{dl}$ , 女性  $1.40 \pm 0.40 \mu\text{g}/\text{dl}$  (mean  $\pm$  SD) に比較すると低い値を示している。これは非結合パーセントが低いことのほかに、我々は血漿 cortisol の測定を cortisol に特異性の高い酸化法による硫酸螢光法<sup>18)</sup>により行っているため、血漿 cortisol の正常値 ( $4.0 \sim 14.5 \mu\text{g}/\text{dl}$ ) が従来の報告より多少低いことにもよると考えられる。

ACTH 静注後には非結合パーセントは上昇傾向を認め、dexamethasone 負荷後は低下傾向を認めた。Cushing 症候群では非結合パーセントが 20% 以上のものも存在し、これは血漿 cortisol レベルの上昇に伴うものと考えられるが、結合蛋白の減少の可能性も否定し得ない。dexamethasone 負荷や副腎不全症の場合には生体にとっては、非結合パーセントや遊離型 cortisol の上昇が合目的であるが、そのようになる機序は存在しないようである。

estrogen<sup>3),14),15)</sup> 投与や妊婦<sup>1),15)</sup> の場合には血中 cortisol の上昇があり、これは CBG の増加によるとされている。estrogen 投与や妊婦の場合の遊離型 cortisol に関しては変化なしとする報告と、上昇するという報告がみられる。

Mills<sup>3)</sup> らや Peterson<sup>2)</sup> らは ultrafiltration により遊離型 cortisol を測定し、estrogen 投与の際には非結合パーセントが減少するため、遊離型 cortisol には有意の上昇を認めなかつたとしている。また De Moor<sup>10)</sup> らも血液透析時に in vivo で plasma ultrafiltrate を得ることにより遊離型 cortisol を測定し、同様の結果を報告している。これに対し Plager ら<sup>9)</sup> は estrogen 投与によっても非結合パーセントは減少せず、遊離型 cortisol は平均に  $1.1 \mu\text{g}/\text{dl}$  から  $4.0 \mu\text{g}/\text{dl}$  と増加しているとしている。Doe<sup>7)</sup> らは estrogen 投与

の際に、午前 9 時には遊離型 cortisol の有意の増加があるが、午後 9 時にはこの増加が認められないとしている。また、妊娠時には午後 9 時にも遊離型 cortisol の有意の上昇があり、これが妊娠時にみられる Cushing 様症状の原因だとしている。Rosenthal<sup>12)</sup> らはやはり妊娠時には時期が進むにしたがい、遊離型 cortisol も増加するとしている。今回の実験では DES 7.5mg, 3 日間投与により血漿 cortisol は有意に上昇していたが、非結合パーセントは減少しており、結局遊離型 cortisol は午前 9 時、午後 4 時、午後 11 時ともに对照群との間に有意の差を認め得なかった。今回使用した DES 7.5mg は量としては多いが、投与期間が短い点には問題があるかも知れない。しかし、従来の報告や今回の実験を総合してみると、estrogen 投与の際には遊離型 cortisol は必ずしも有意ではないが、いずれも上昇傾向を示しており、このことからすると、CBG の増加のみで estrogen 投与の際の血漿 cortisol の上昇を説明できない。Doe らの報告のごとく、estrogen 投与により下垂体副腎皮質系の negative feedback 機構のセットポイントに変化が起こる可能性も否定し得ない。

また rapid ACTH 試験において DES 7.5mg, 4 日間投与群において、血漿 cortisol は対照群に比べて過剰の上昇を示した。この過剰の上昇にも、estrogen による corticosteroid binding capacity の増加や、cortisol の肝臓での代謝の遅延が関与しているとされている。今回の実験ではいずれの群でも遊離型 cortisol は ACTH 静注後 30 分、60 分と前値に比べて上昇する傾向を示している。また、DES 投与群では対照群に比べて、遊離型 cortisol は上昇傾向を示した。DES 投与群では、CBG 結合型 cortisol のみでなく、albumin 結合型 cortisol も上昇しており、やはり CBG の増加のみでは ACTH 負荷後の cortisol の過剰上昇を説明し得ない。肝臓での cortisol 代謝の遅延も一因と考えられるが、そのほかに estrogen が副腎に直接働いて、ACTH の効果を増強させる可能性 (ACTH に対する副腎の感

受性の増大) も考えられる。この点に関しては Kittay<sup>16)</sup>が動物実験でその可能性を示しており、我々<sup>17)</sup>も同様の結果を得ている。しかし estrogen 投与の際に cortisol 1日分泌量の増大はないとする報告が多く、この副腎の感受性の増大は、視床下部下垂体レベルで打ち消されることが考えられる。今回は人体において、estrogen の投与が副腎の ACTH に対する感受性を増大させているという直接の証明はなし得なかった。

### 結語

細い Visking tube を用いた簡単な平衡透析により遊離型(蛋白非結合型)cortisol を測定し、満足すべき結果を得た。透析外液にトレーサー量の <sup>14</sup>C-cortisol を加える方法により、方法をより簡易化した。午前9時の血漿 cortisol の蛋白非結合パーセントは  $6.6 \pm 2.2\%$  であり、遊離型 cortisol の値は  $0.63 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{dl}$  であった。また遊離型 cortisol は cortisol 分泌亢進状態では上昇し、分泌減少状態では低下していた。合成 estrogen である diethylstibestrol 7.5mg、3日間投与群では、血漿の総 cortisol は対照群に比べて、上昇していたが、非結合パーセントが低下しており、遊離型 cortisol は対照群に比べて、上昇傾向は認めたが有意ではなかった。非結合パーセントには日内変動は認められなかったが、遊離型 cortisol は総 cortisol と同様、日内変動を示した。また rapid ACTH test において、DES 投与群では総 cortisol は対照群に比べて過剰に上昇しており、遊離型 cortisol にも上昇傾向を認めた。また CBG 結合型 cortisol の上昇が最も大きかったが、albumin 結合型 cortisol も対照群に比べて上昇しており、CBG の増加のみが、rapid ACTH test における総 cortisol の過度の上昇の原因ではないことが示された。

### 文 献

- 1) Slaunwhite, W.R., Jr., and Sandberg, A. A. : J. Clin. Invest., **38** : 384, 1959.
- 2) Peterson, R.E., Nokes, G., Chen, P.S. and Black, R.L. : J. Clin. Endocr., **20** : 495, 1960.
- 3) Mills, I.H., Schedl, H.P. Chen, P.S. and Bartter, F.C. : J. Clin. Endocr., **20** : 515, 1960.
- 4) Doe, R.P., Zinneman, H.H., Flink, E.B. and Ulstrom, R.A. : J. Clin. Endocr., **20** : 1484, 1960.
- 5) Sandberg, A.A. and Slaunwhite, W.R., Jr., : J. Clin. Invest., **42** : 51, 1963.
- 6) Slaunwhite, W.R., Jr., Lockie, G.N., Black, N. and Sandberg, A.A. : Science, **135** : 1062, 1962.
- 7) Doe, R.P., Dickinson, P., Zinneman, H.H. and Seal, U.S. : J. Clin. Endocr., **29** : 757, 1969.
- 8) Pearson, J., Keane, P.M. and Walker, W. H.C. : Nature, **216** : 1334, 1967.
- 9) Plager, J.E., Schmidt, K.G. and Staubitz, W.J. : J. Clin. Invest., **43** : 1066, 1964.
- 10) De Moor, P., Verberckmoes, R. and Heyns, W. : J. Clin. Endocr., **28** : 313, 1968.
- 11) Marshall, J.C., Anderson, D.C., Burke, C. W., Galvao-Teles, A. and Fraser, T.R. : J. Endocr., **53** : 261, 1972.
- 12) Rosenthal, H.E., Slaunwhite, W.R., Jr., and Sandberg, A.A. : J. Clin. Endocr., **29** : 352, 1969.
- 13) 妹尾久雄、新美光朗、松井信夫、有吉寛：日内分泌誌、**49** : 232, 1973.
- 14) Murphy, B.P. and Pattee, C.J. : J. Clin. Endocr., **23** : 459, 1963.
- 15) Doe, R.P., Fernandez, R. and Seal, U.S. : J. Clin. Endocr., **24** : 1029, 1964.
- 16) Kitay, J.I. : Endocrinology, **73** : 253, 1963.
- 17) 橋本浩三、浅岡克司、森正彦、小川紀雄、大藤真：日内分泌誌、**49** : 228, 1973.
- 18) Clark, B.R. and Rubin, R.T. : Anal. Biochem., **29** : 31, 1969.

## Summary

### Studies on Non Protein-Bound Cortisol with Equilibrium Dialysis

Kozo HASHIMOTO

*Department of Clinical Laboratory, Okayama University Hospital, Okayama*

Katsushi ASAOKA and Tadashi OFUJI

*The Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Okayama University*

Dynamics of non protein-bound cortisol were investigated with simple equilibrium dialysis. One ml plasma was pipetted into a Visking tube with a diameter of 8/32" and dialyzed to equilibrium in a glass tube containing 1.5 ml phosphate buffer at 37°C for 16 hours. Tracer dose of  $^{14}\text{C}$ -cortisol ( $0.002\mu\text{Ci}$ ,  $0.014\mu\text{g}$ ) was added inside or outside a cellophane tube.

Following results were obtained.

1) Same percentage of unbound cortisol was obtained regardless of whether  $^{14}\text{C}$ -cortisol was added inside or outside the tube.

2) Unbound percentage of plasma cortisol in 14 normal subjects was  $6.6 \pm 2.2(\text{SD})\%$  and non protein-bound cortisol was  $0.63 \pm 0.28(\text{SD})\mu\text{g/dl}$ .

3) Non protein-bound cortisol was increased after injection of  $\alpha^{1-24}\text{ACTH}$ , decreased after administration of dexamethasone, increased in patients with Cushing's syndrome and decreased in patients with

adrenal insufficiency.

4) In patients treated with 7.5 mg diethylstilbestrol (DES : synthetic estrogen) for 3 days, plasma total cortisol was higher than in control group, whereas unbound percentage was decreased.

5) Diurnal variation of unbound percentage of cortisol was not found, but similar variation to total cortisol was found in non protein-bound cortisol.

6) In rapid ACTH test, increase of total cortisol was greater in DES treated group than in control group. Non protein-bound cortisol was also increased in DES treated group. Increase of corticosteroid binding globulin-bound cortisol (CBG) was most significant, although albumin-bound cortisol was also increased in DES treated group. So that, not only increase of CBG but any other factors appear to be concerned in significant increase of total cortisol at rapid ACTH test in DES treated group.