

妊娠時の血中 Cortisol および Progesterone の動態 殊に日内変動および Episodic Secretion について

Dynamics of Serum Cortisol and Progesterone during Pregnancy, with Special Reference to the Circadian Variation and Episodic Secretion

昭和大学医学部産科婦人科学教室（主任 中山徹也教授）

大学院学生 目 時 信 之 Nobuyuki METOKI

概要 妊娠時の母体の副腎皮質機能および胎盤機能の指標としての血中 cortisol および progesterone を測定し、妊娠経過とともに両ホルモンの安静時値の推移、また従来研究の乏しい日内変動の有無に関する検討のほか、現在全く知見のない両ホルモンの episodic secretion の問題について検討を行った。この目的のために血清 cortisol の測定法として、Murphy (1963) による competitive protein binding assay (CPBA) に水、四塩化炭素分配による純化操作を加えた新しい cortisol の特異的な測定法を開発し応用した。

血中 progesterone の測定には妊娠モルモット血清を用いる CPBA を用いた。

1) 正常妊婦の末梢血中 cortisol は妊娠経過とともに漸増し、妊娠10ヵ月平均 $26.4\mu\text{g}/100\text{ml}$ で非妊婦の約 2.5倍であった。progesterone は妊娠初期には漸増し妊娠5ヵ月から急増し、妊娠10ヵ月では平均 $15.5\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

2) 午前9時から午後9時まで4時間毎に測定した妊婦血中 cortisol の時間的変動では、午前9時に高値を示し、午後9時に最低値を示し日内変動の存在が認められたが、血中 progesterone には日内変動を思わせる一定の傾向はみとめなかった。

3) episodic secretion の存在の有無を検討するめに、昼間20分毎に測定した妊婦血中 cortisol には律動的な変動がみとめられ、母体の副腎からの cortisol の episodic secretion の存在が推定された。同時に測定した、progesterone 値は1例においては軽度ながら cortisol とほぼ同様の変動をみとめたが、他の1例では著明な変動をみとめなかった。

緒 言

妊娠時における母体副腎皮質機能および胎盤機能の指標として血中 cortisol および progesterone の測定は基礎的、臨床的研究の上で極めて重要である。ことに最近これらのホルモンの安静時値のみならず、日内変動や episodic secretion による律動的な変動についても検討が必要となつてきている。これらの検討のためには従来のホルモン測定法では不適な点が多く、最近開発されつつある CPBA や radioimmunoassay が極めて有力な手段となつているが、本邦においては現在のところこの点の研究が極めて乏しく栃木、阿部らの安静時についての成績がみられる程度である。著者

はこの点に留意し、

1) 妊婦における血中 cortisol と progesterone の測定のために簡便で安定な CPBA、とくに cortisol については Murphy 法に水、四塩化炭素分配を加える新しい方法を開発し、また progesterone には妊娠モルモット血清を用いる方法を確立した。

2) これらを用いて血中 cortisol および progesterone の動態、ことにまだ不明の点が多いこれらの日内変動、episodic secretion の問題について検討を加え興味ある知見が得られたので報告する。

実験材料および方法

1. 実験対象

昭和大学附属病院産科婦人科を訪れた妊婦（90例）並に非妊婦（5例）を研究の対象とした。母体末梢血（90例）の採取は午前10時から午前12時の間に肘静脈から行い、遠心分離ののち血清を測定の日まで -20°C に凍結保存した。日内変動の検討の目的には午前9時から午後9時の間、4時間毎に計4回採血（11例）した。episodic secretionの検討は2例の妊娠（妊娠10カ月）について行つた。うち1例は午前10時から6時間30分にわたり、他1例は午後1時から7時間20分にわたり肘静脈に挿入したエラストー針から20毎に採血した。

2. 実験試薬

1) 放射性ステロイド

corticosterone-1, $2\text{-}^3\text{H}$ (specific activity 40ci/mM)および progesterone-1, $2\text{-}^3\text{H}$ (specific activity 50.3ci/mM) はN E N Cより入手し、使用前に薄層クロマトグラフィーにて純化した。

2) ステロイド純品

cortisol, progesterone, corticosterone, aldosterone, deoxycorticosterone などは Sigma 社製を用いた。

3) Dextran Coated Florisil

cortisol 用には60～100 Mesh の Florisil（和光純薬製）を洗滌後 150°C にて3時間活性化し、また progesterone 用には100～200 Mesh の Florisil を洗滌後、いずれも各20gに Dextran T_{70} (Pharmacia Co.) 20gを溶解した脱イオン水溶液120mlと混合し、室温で2時間振とうし濾過後 rotatory evaporator にて乾燥した。

4) 有機溶媒

n-Hexane, Ethanol, CCl_4 （いずれも和光純薬製）、Borate buffer (pH 7.8, 0.2M 武藤化学薬品) は特級を用いた。

5) C B Gおよび CBG-isotope solution の作成

C B G源としてはオス雑犬をネブタール麻酔下で頸動脈から採血し分離した血清に Florisil を加え、 37°C にて incubate し、内因性 cortisol を除去後 -20°C にて凍結保存した。使用直前にpH 7.8, 0.05M Borate buffer にて50倍稀釈し、これに1mlについて ^3H -corticosterone を3200cpm

加え2% CBG- ^3H -corticosterone solution を作成した。

progesterone binding protein (PBP) 源としては妊娠末期モルモット血清を Borate buffer で6千倍に稀釈して1mlにつき ^3H -progesterone を3,200cpm 加えて用いた。

3. 測定方法

A. 血中 cortisol の測定の概略は表1に示す如くである。すなわち cortisol 0, 2, 4, 8, 12, 20, 30ng あるいは血清0.02～0.1ml をエタノール1mlで抽出後、遠沈その0.5mlをとり窒素下で乾固する。これに25%エタノール1mlを加え5倍量の四塩化炭素で2回洗滌後、エタノール層の0.2mlをとり窒素下で乾固する。これに CBG-

表1 Competitive Protein Binding Assay for Serum Cortisol

1. Serum 0.02～0.1 ml Ethanol 1.0 ml	} Mix for 10 sec.
2. Centrifugation 10 min. at 4,000 rpm	
3. 0.5 ml of Supernatant evaporated	
4. Dissolved in 1.0 ml of 25 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	
5. Washed with 5 ml of CCl_4 , 2 times	
6. 0.2 ml of 25 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ evaporated	
7. 1.0 ml of CBG- ^3H -Corticosterone solution added and mixed for 10 sec.	
8. Incubated for 10 min. at 37°C and then for 20 min. at 4°C	
9. 40 mg of Dextran coated Florisil added and shaken for 60 sec.	
10. 0.5 ml of supernatant counted	

isotope solution を1ml加え 37°C にて10分間、次いで 4°C にて20分間 incubate した後、40mgの Dextran Coated Florisil を加えてB, Fの分離を行う。上清0.5mlを counting vial にとり10mlの Bray's solution を加え Aloka L.S.C.-651 型 Liquid Scintillation Counter で測定した。比較のため行つた Murphy 法によるC P B A の操作は上述の方法から四塩化炭素、25%エタノール分配を除いて行つた。

B. 血中 progesterone の C P B A

血中 progesterone は大沢らの妊娠モルモット血清中のPBPを用いる方法で測定した(表2)。但

表2 Competitive Protein Binding Assay for Serum Progesterone

1. Extracted 3 ml of Normal Hexane
2. Evaporated under the stream of N_2
3. Added 1 ml of PBP- 3H -Progesterone solution
4. Incubated for 10 min. at $40^\circ C$ & 15 min. at $4^\circ C$
5. Added 40mg of Dextran coated Florisil
6. Shaken for 1 min. at $4^\circ C$
7. 0.5 ml of supernatant counted

表3 Precision of Competitive Protein Binding Assay for Progesterone (ng/ml)

Sample No. 1	9.6 8.7 9.6 8.5 9.1 10.2	$\bar{x} = 9.3$ $S D = 0.6$ $C V = 6.3$
Sample No. 2	14.3 19.1 16.5 18.1 19.1 19.2	
Sample No. 3		
	130 126 117 114 110 120 114 122 128 114 113 128 126 127 127	$\bar{x} = 121.1$ $S D = 6.6$ $C V = 5.4$

し抽出の際にエーテルの代りに n-Hexane を用いた。これはエーテル (Squibb Co.) の Blank 値が Batch により時に大きい場合があつたためである。この方法における precision は変動係数 (coefficient of variation, CV) が 5.4%~10.1% とほぼ満足すべき値を示した (表3)。

実験成績

A. 血中 cortisol の C P B A の検討

1) Processed Standard Curve

本測定法には全て processed standard curve を用いた。図1の如く cortisol 0~30ng の間で安定で且つ再現性にとむ標準曲線が得られた。

2) 各種のステロイドの干渉度

C B G に結合性を示す各種のステロイドについて本法の全操作を行い、その inhibition curve を

図1 Processed Standard Curve for Cortisol

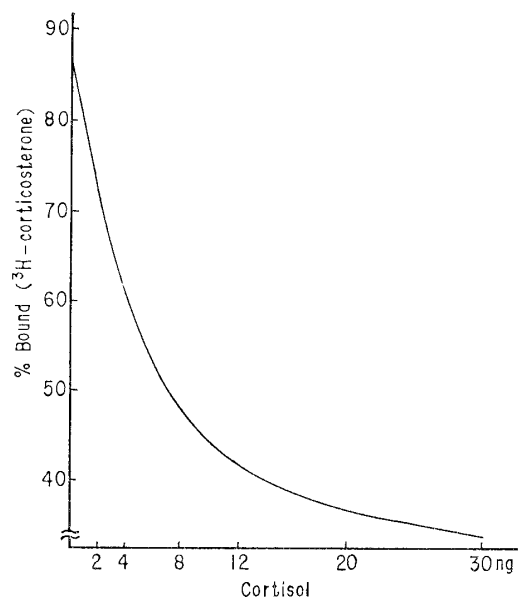
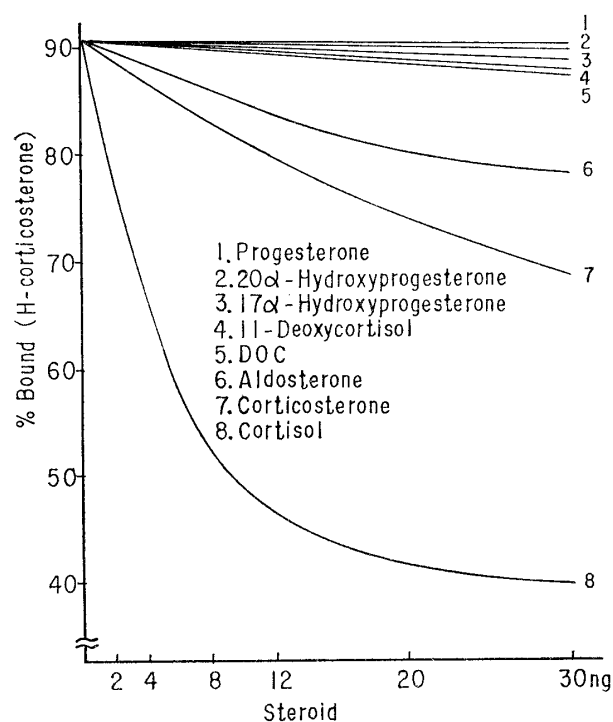


図2 Inhibition Curves for Selected Steroids



作成した。図2に示す如く cortisol に対し corticosterone は約10%, aldosterone は約5%関与してくるが、それ以外の DOC, 11-deoxycortisol, progesterone, 17α-hydroxyprogesterone などは殆んど 3H -corticosterone を displace しなかつた。

表 4 Precision of Competitive Protein Binding Assay for Cortisol ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)

	Sample No. 1		Sample No. 2	
late pregnancy	23.9	$\bar{x} = 23.9$ S D = 1.1 C V = 4.4	25.6	$\bar{x} = 27.4$ S D = 1.4 C V = 5.3
	22.8		27.8	
	25.6		26.7	
	23.3		29.4	
non-pregnancy	7.7	$\bar{x} = 7.9$ S D = 0.3 C V = 4.2	7.5	$\bar{x} = 8.0$ S D = 0.5 C V = 5.7
	8.5		7.8	
	7.7		8.7	
	7.8		7.8	

 $\bar{x}$: Mean

SD: Standard Deviation

CV: Coefficient of Variation

3) Accuracy

本測定法の全操作を行つた際の cortisol の回収率は平均75%であつた。

4) Precision

本測定法における precision は表 4 に示す如く C.V. が 4.2~ 5.7% であり 満足すべき値を示した。

5) Murphy 法との比較

表 5 は妊婦, 非妊婦の血中 cortisol を同一のサンプルについて Murphy 法と本法とで測定した成績を比較したものであるが, Murphy 法に比べて本測定法では血中 cortisol は低値を示す。

とくに妊娠末期では, 両者の差は極めて大きかつた。

表 5 Comparison between Murphy's method and Aurhor's

Sample	Serum Cortisol ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)	
	Murphy's	Aurhor's
1	42.9	25.9
2	31.6	23.9
3	38.7	23.9
4	19.3	11.5
5	17.8	14.7
6	17.1	13.9
7	11.4	7.8
8	11.1	7.8

B. 測定成績

1. 健康非妊婦末梢血中 cortisol 値

健康非妊婦 (20~25才) 5 例の血中 cortisol 値は 7.9~14.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, その平均値は 11.2 $\pm$ 2.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であつた。

2. 健康非妊婦の末梢血中 progesterone 値

健康非妊婦 9 例の血中 progesterone を測定した結果は, 月経第 5 周日平均 0.8ng/ml, 第 10 周日平均 0.4ng/ml, 第 15 周日平均 2.1ng/ml, 第 20 周日平均 11.1ng/ml, 第 25 周日平均 7.3ng/ml であり, 卵胞期に相当する時期には低値, 黄体期に相当する時期には高値を示した。

3. 正常妊婦における末梢血中 cortisol は表 6, 図 3 の如く妊娠の経過とともに漸増し, 妊娠

表 6 Serum Cortisol and Progesterone during the Course of Pregnancy ($\mu\text{g}/100\text{ml}$)

M	Cortisol			Progesterone		
	Range	Mean	S D	Range	Mean	S D
2	12.0~ 7.5	9.8	1.8	4.0~ 2.0	2.6	0.8
3	23.8~ 7.4	15.2	5.4	4.8~ 2.2	3.5	0.9
4	17.1~ 7.9	14.6	3.2	5.0~ 3.4	4.1	0.6
5	21.6~ 7.1	13.2	3.9	6.6~ 3.6	5.0	0.9
6	25.1~ 10.8	18.1	5.7	8.6~ 3.8	6.4	1.8
7	30.0~ 12.8	19.9	4.9	10.9~ 6.1	8.7	1.6
8	25.4~ 13.7	20.1	3.5	14.1~ 5.1	9.1	2.5
9	29.6~ 16.7	21.0	5.1	15.1~ 4.9	9.6	3.4
10	37.3~ 13.3	26.4	5.9	24.8~ 9.6	15.5	4.3

M: Month of Gestation

10 カ月では平均 26.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ であつて非妊婦の平均 11.2 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ に比べて約 2.5 倍の値を示した。血中 progesterone も表 6, 図 4 の如く妊娠の経過とともに増加し, ことに妊娠 5 カ月以後は急増して妊娠 10 カ月では 9.6~24.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$, 平均 15.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ を示した。

4. 妊娠時血中 cortisol, progesterone の日内変

図3 Serum Cortisol during the Course of Pregnancy

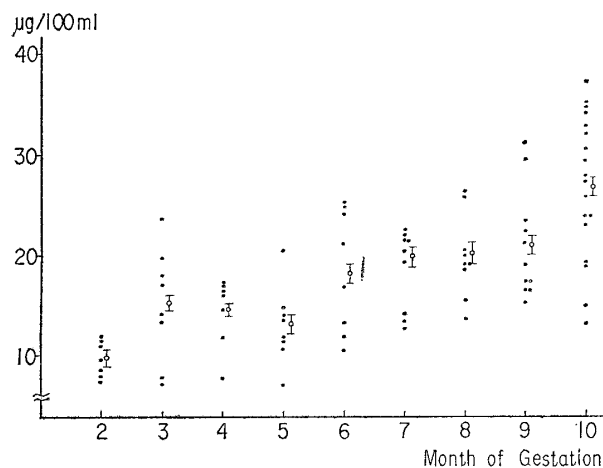


図4 Serum Progesterone during the Course of Pregnancy

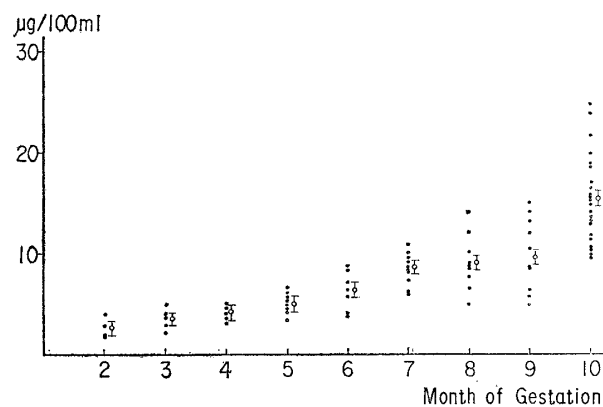


表7 Circadian Variation of Serum Cortisol and Progesterone during Pregnancy (μg/100 ml)

Sample No.	Cortisol				Progesterone			
	A.M.	P.M.	P.M.	P.M.	A.M.	P.M.	P.M.	P.M.
	9	1	5	9	9	1	5	9
1	35.0	21.9	27.7	17.5	11.8	13.0	14.3	17.3
2	13.3	15.8	12.9	13.7	15.6	15.3	14.5	16.1
3	34.3	27.1	27.9	24.1	15.1	13.5	12.4	14.5
4	19.2	12.9	12.9	10.2	13.2	13.8	12.4	14.0
5	34.8	27.1	30.0	21.7	24.8	26.6	23.0	25.5
6	32.1	27.7	26.7	24.1	15.8	14.5	16.3	16.5
7	15.0	15.8	14.2	14.6	20.0	22.4	21.6	23.6
8	27.7	31.8	24.2	16.7	13.0	15.0	14.8	17.3
9	22.9	17.9	17.3	15.0	13.6	12.4	12.0	14.8
10	37.3	34.6	33.7	31.7	19.0	15.4	20.3	20.0
11	19.0	15.9	13.1	10.4	17.0	18.5	16.6	22.4

図5 Circadian Variation of Serum Cortisol

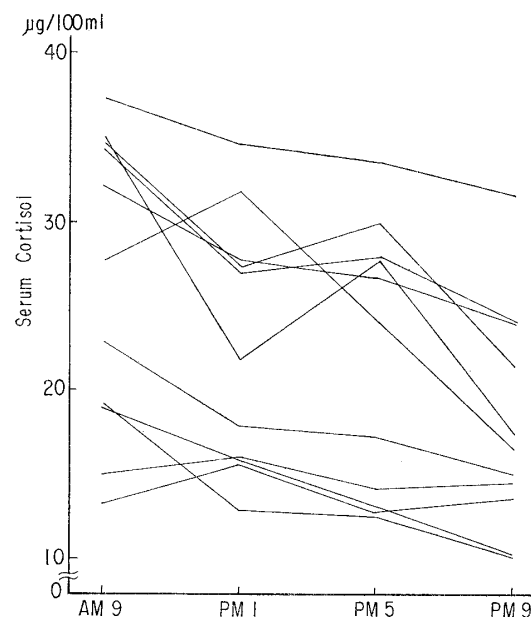
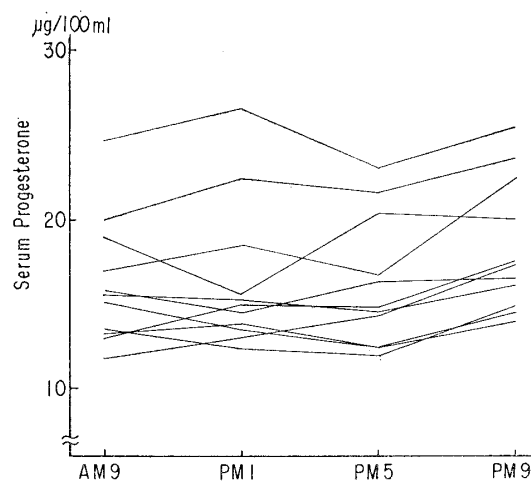


図6 Circadian Variation of Serum Progesterone



動について

正常妊娠10カ月の妊婦11例の血中 cortisol の日内変動は表7, 図5の如く最高37.3μg/100ml, 最低10.2μg/100mlであつてそのうち8例が午前9時に最高値を示し, 3例が午後1時に最高値を示した. なお午後9時には全例が最低値を示し, 午前が高く午後に低い傾向であつた. 血中 progesterone の日内変動については表7, 図6の如く一定の明らかな変化傾向はみとめられなかつた.

5. 20分毎に測定した血中 cortisol および

図7 Fluctuation of Serum Cortisol and Progesterone, Assessed by the Sequential Determination in 20 min. Intervals

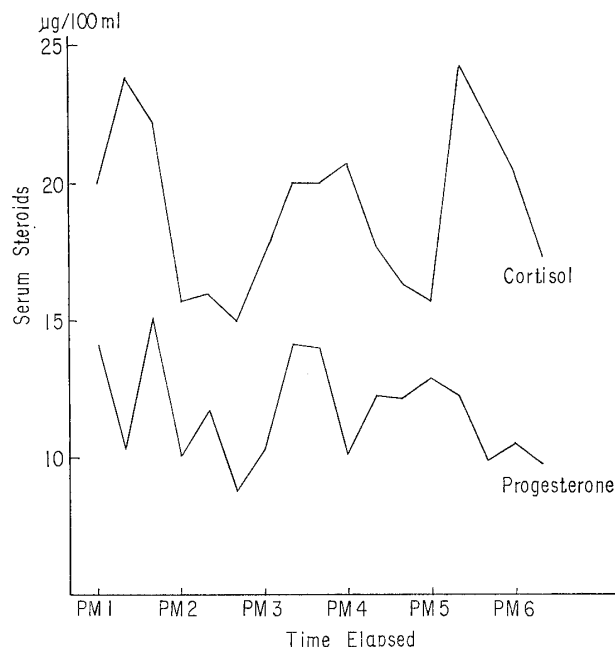
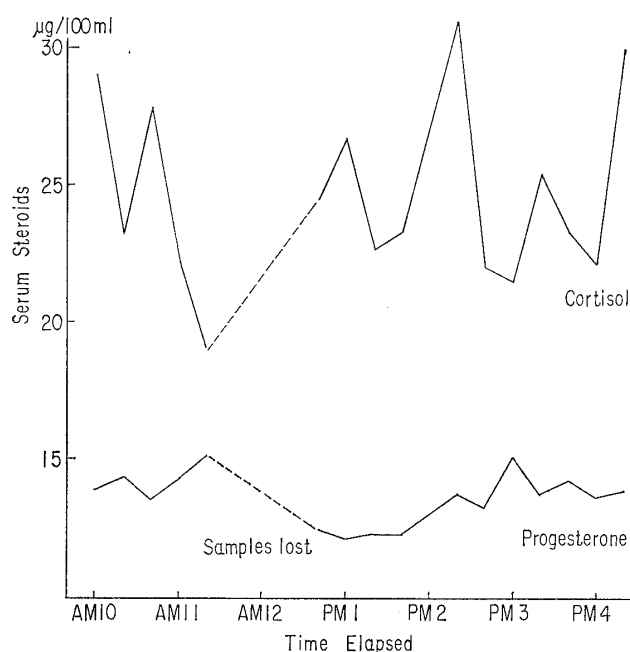


図8 Fluctuation of Serum Cortisol and Progesterone, Assessed by the Sequential Determination in 20 min. Intervals



progesterone の経時的変動 (episodic secretion の検討)

妊娠10カ月の正常妊婦2例について昼間におけ

る20分毎の経時的変動を検討した結果は図7, 8の如くである。第1例(図7)では血中 cortisol は1時間半~2時間の間隔で, 第2例(図8)は1時間~1時間半の間隔で著明な変動が認められた。血中 progesterone については第1例(図7)はやや cortisol と類似した変動が認められたが, 第2例(図8)では大きな変化は認められなかった。

考 案

妊娠経過中の血中 cortisol および progesterone の測定は, 妊婦の副腎皮質機能, 胎盤機能を分析する上で極めて重要であるが, この目的のためには簡便, 高感度, 少量の検体量で多数の検体を短時間に測定しうる C P B A や radioimmunoassay が必要である。特に最近注目をあびつつあるホルモンの episodic secretion の研究のためにはこれらの方法が必須と考えられる。本研究を行うにあたり, 血中 progesterone の測定法としては既に研究されている妊娠モルモット血清を用いる C P B A を検討し, その方法が極めて簡便で且つ安定していることを経験したのでこれを用いた。一方血中 cortisol の測定には一般に C B G を用いて total corticoids を測定する C P B A (Murphy 法) が用いられるがこの方法は純化操作を含まないために各種の corticoids および progestin が測定に影響し cortisol のみを検討することは不可能である。ことに妊娠末期の検体においては多量の progesterone による測定の障害を除く必要がある。cortisol の純化の目的のためには従来薄層クロマトグラフィー, ペーパークロマトグラフィー, あるいは石油エーテルによる前処置などが用いられてきたがこれらは安定性, 簡便性など必ずしも満足すべきものではなかった。

著者は Rudd らの血中 cortisol の蛍光測定法のさいの水, 四塩化炭素分配が cortisol と他のステロイドとの分離の上で簡便で且つ優れているところから, これを Murphy 法に応用して血中 cortisol の測定法を開発した。本測定法では C B G に結合する cortisol 以外のステロイドのうち corticosterone は約10%, aldosterone は約5%の関与で

あり、それ以外の DOC, 11-deoxycortisol, progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone などは殆んど完全に除かれる。ヒト血中に存在するステロイドのうちで cortisol の測定に阻害をおこすと考えられるものは corticosterone と progesterone である。血中の corticosterone は cortisol の数分の一の値であるから、本法を用いて cortisol を測定してもその値に關与する corticosterone は数%にすぎないと想定される。また progesterone は妊娠末期にはほぼ cortisol と同程度の値を示すが本法では分配操作によりほぼ完全に除去されるので殆んど影響がないものと考えられる。事実 Murphy 法による値と本測定法による値を比較すると、本法では低値を示し、ことに妊娠末期では両者の差は極めて大きかった。

従つて本測定法は妊娠時血中の cortisol を測定するのに簡便且つ優れた測定法であると考えられる。本法を用いて正常妊婦の血中 cortisol を測定した結果、妊娠経過とともに血中 cortisol は増加し非妊婦の約 2.5倍となり本邦での成績としては栃木 (1972) の報告と同様な成績を得た。血中 progesterone は妊娠末期 9.6~24.8 μ g/100ml であつて曾山ら (1972) の報告に比べてやや低値を示したが、阿部 (1971) の報告とはほぼ一致した。妊娠末期婦人の血中 cortisol の日内変動について検討した結果、一日4回の採血による血中 cortisol の値は午前9時に最も高く午後9時に最低値を示す例が多くみられ日内変動の存在がみとめられた。11例中3例については午前、午後で大きな変化をみとめなかつた。これは後述の如く cortisol の episodic secretion による可能性が考えられる。最近 cortisol の分泌調節機構として日内変動のほかに episodic secretion が存在し、これが種々の外因により変化することが注目されているが妊婦について検討をした成績はみられない。著者が血中 cortisol の20分毎の測定で episodic secretion の存在を検討した結果では血中 cortisol は昼間、1~2時間の間隔で Zig-Zag の大きな変動を示した。これは Weitzman (1971) が正常人において認めている変動と類似しており、従つ

て妊婦においても正常人と同様に下垂体-副腎皮質系に episodic secretion の存在することが示唆される。妊婦血中に証明される progesterone の大部分は胎盤において生成されたものと考えられており、4時間毎採血例で血中 progesterone は cortisol のような著明な日内変動は認められなかつた。このことは胎盤からの progesterone 分泌は副腎皮質からの cortisol 分泌にみられるような中枢性の調節をうけていないことを物語るものであると考えられる。

これまで胎盤からの progesterone の分泌に episodic secretion の型が存在するか否かは検討されていない。妊婦において20分毎に血中 progesterone を測定した結果では、1例は cortisol と類似した変動を示している如くであるが、cortisol ほど著明でなく、他例では大きな変動はみられなかつた。胎盤からの progesterone 分泌に episodic secretion が存在するか否かは極めて重要な問題であり、なお今後詳細な検討を必要とし、妊娠における内分泌動態、とくに母体副腎と胎盤の機能状態について新しい知見を得ることが期待される。

稿を終えるに当り御懇篤なる御指導、御校閲を賜つた中山徹也教授に衷心より謝意を表する。又終始御協力にあずかつた荒木日出之助助教授、教室研究員代永敦子学士、教室員各位並びに有力な直接の御助言と御協力を戴いた東京大学第三内科大沢伸昭博士、財団法人実験動物中央研究所生殖生理部各位に対し感謝の意を表する。

文 献

- 阿部 誠 (1971): 日産婦誌, 23: 1095.
- 川田 肇 (1970): 日内分泌誌, 45: 1614.
- 大沢伸昭 (1972): 産と婦, 39: 277.
- 曾山嘉夫他 (1972): 日産婦総会講演.
- 栃木秀麿 (1972): 日産婦誌, 24: 503.
- Beitins, I.Z. (1970): Steroids, 15: 765.
- Johansson, E.O.B. (1970): Acta. Endocr, Supple. 147: 188.
- Murphy, B.E.P. (1963): J. Clin. Endocr, 23: 293.
- Murphy, B.E.P. (1964): Nature, 201: 679.
- Murphy, B.E.P. (1967): J. Clin. Endocr, 27: 973.
- Neill, J.D. et al. (1967): J. Clin. Endocr, 27: 1167.
- Rudd, B.T. et al. (1963): J. of Endocr, 27: 317.
- Slauwhite, Jr., W.R. (1970): Acta Endocr, Supple. 147: 144.
- Weitzman, E.D. et al. (1971): J. Clin. Endocr, 33: 14.

(No. 2628 昭48・2・8受付)