

胎児副腎におけるステロイド生合成 —Acetate からのステロイド生合成とそれに 及ぼす ACTH の効果について—

Biosynthesis of Steroids in Human Fetal Adrenal Glands —Steroid Formation from Acetate and Stimulatory Effect of ACTH—

帝京大学医学部産科婦人科学教室

矢内原 巧 Takumi YANAIHARA 平戸久美子 Kumiko HIRATO
佐藤直樹 Naoki SATOH 吉田信隆 Nobutaka YOSHIDA
沖永荘一 Shoichi OKINAGA 荒井清 Kiyoshi ARAI

概要 妊娠中期中絶児副腎における *de novo* のステロイド生合成並びにそれに及ぼす ACTH の効果について検討した。

(実験) 副腎を mince にし2分して ACTH 添加群・非添加群とに分け、それぞれ sodium acetate-1-¹⁴C で incubate した。抽出液は薄層クロマトグラフィーなどにより分離・精製した。同定はアセチル化誘導体の生成及び再結晶法を用いた。

(結果及び考案) acetate より大量の遊離型 cholesterol さらに抱合型ステロイドとして pregnenolonesulfate (以下 P_s-S と略す) DHA-S が証明され、又わずかではあるが遊離型の P_s, DHA と cholesterol-S, 16 α -OH-DHA-S が同定された。acetate から胎児副腎組織で 16 α -OH-DHA-S が生合成された報告は無い。acetate から cholesterol-S, P_s-S, DHA-S への転換率は ACTH 添加により明らかに亢進され、ACTH のステロイド生合成における刺激効果が示された。

緒 言

妊娠中、母体尿及び母体末梢血並びに臍帯血中に多量のステロイドホルモンが証明されたが、近年それらの生成に胎児が積極的に参与している事が明らかとなつてきた。特に、estrogen の産生源は胎児胎盤系であり、胎児副腎が極度に萎縮している無脳児妊娠で母体尿中 (Frandsen & Stake-mann, 1961), 血中 (Nakayama et al., 1967, Yanaihara, 1968) の estrogen 値が極度に低下している事から、胎児副腎が胎盤で生成される estrogen の前駆物質を分泌していることは明らかである。

この胎児副腎におけるステロイド産生の調節が、胎児自身の ACTH によることも荒井 (1975) により明らかにされてきたが、胎児副腎のステロ

イド生成能及び ACTH のステロイド生合成に及ぼす刺激効果の詳細については不明の点が多い。

Arai et al. (1972) は、妊娠中期の子宮内胎児に直接 ACTH を投与すると、母体尿中 estrone estradiol estriol のいずれもが有意に増加する事を報告した。今回我々は、放射性酢酸ナトリウムを用いて胎児副腎が *in vitro* で *de novo* にステロイドホルモン産生を行う事、さらに ACTH がステロイド生合成の面にどのような影響を与えるかを検討する為以下述べる実験を行つた。

実験材料及び方法

I. 実験材料

2例の妊娠中期中絶児 (20~22週) よりただちに摘出した副腎組織を用いた。操作はすべて 4℃

で行い、まず皮膜を除去しフラスコ中で mince にした後秤量して incubation に供した。

II. 標準物質

cholesterol-7-³H (NET-030, S.A.=10Ci/mM), pregnenolone-7-³H (以下 P₅-³H と略す, NET-076, S.A.=11.5Ci/mM), dehydroepiandrosterone-7-³H (以下 DHA-³H と略す, NET-033, S.A.=10 Ci/mM), Δ^4 -androstenedione-1,2-³H (以下 Δ^4 -A-dione-³H と略す, NET-081, S.A.=45.9 Ci/mM) P₅-sulfate ammonium salt-7-³H (以下 P₅-S-³H と略す, NET-167, S.A.=25 Ci/mM), DHA-S-7-³H (NET-121, S.A.=21 Ci/mM) は New England Nuclear より購入し、使用直前に thin-layer chromatography (以下 TLC と略す) によつて純化・精製した。Sodium acetate-1-¹⁴C (NEC-084, S.A.=2.0mCi/mM) は培養液に直接溶解しこれを基質として用いた。

非放射性ステロイドは Sigma co. Steraloid co. より購入し、その純度はあらかじめ TLC により確認して用いた。

TLC 上の標準物質の検出には Δ^4 -3-keto steroids は 254m μ 波長の紫外線ランプを、他のステロイドは硫酸発色法を用いた。

III. Incubation

Incubation I; 副腎組織はそれぞれ 650mg ず

つに 2 分してフラスコに入れ 20I.U. ACTH (Ac-ther-Z 40IU/vial 東京田辺製薬) 添加群・非添加群とを作り、3 ml Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4) 内で 37°C 95% O₂, 5% CO₂ 条件下で 6 時間 incubate した。

Incubation II; 組織をそれぞれ 200mg ずつに 2 分し I と同様 10 時間 incubate した。

IV. 抽出・分離・純化及び同定

Incubation はフラスコに過剰のエタノールを添加して反応を停止させ Potter の homogenizer でホモジナイズし抽出後、遠沈して除蛋白を行った。回収率補正用としてそれぞれ 300,000dpm の cholesterol, P₅, DHA, Δ^4 -A-dione, P₅-S, DHA-S の tritiated steroids を加えた。エタノール抽出液は窒素ガス下で蒸発乾固し、70% メタノールで溶解、-20°C で一晩放置後 -20°C にて冷却遠沈、脱リピッドを行った。放射性代謝物質の抽出・分離の概要を図 1 に示した。即ち、水とジクロロメタンとの分配により遊離型ステロイドを抽出し、さらに水層から n-butanol で抱合型ステロイドの抽出を行った。遊離型ステロイドは表 1 に示した system を用いた TLC で分離した。抱合型ステロイドは TLC-B により遊離型ステロイド並びに acetate などの混入を除外して solvolysis (Burstein & Lieberman, 1958) を行った。抱合型分

図 1 Methods of extraction, separation and identification

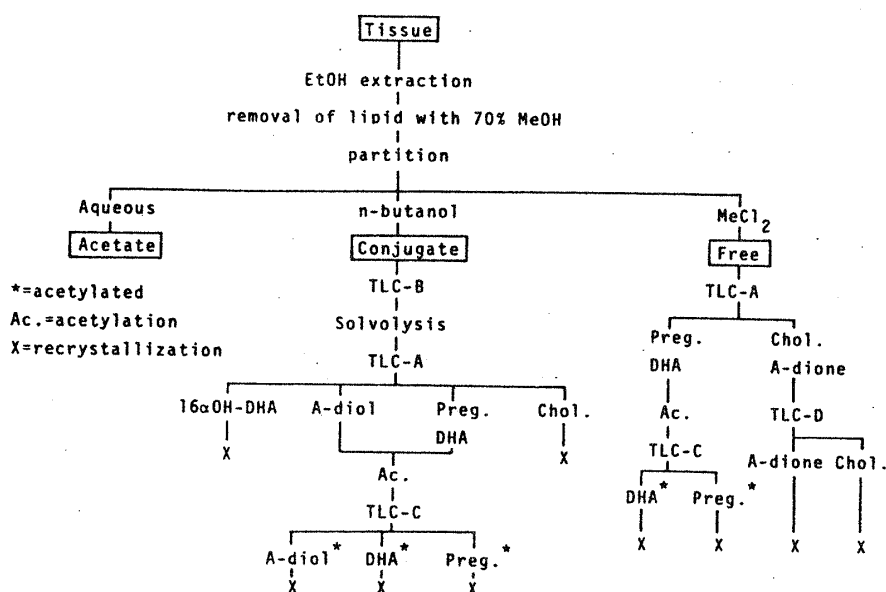


表1 Solvent system of TLC

TLC-A	chloroform : ether	(9 : 1)
TLC-B	ether : methanol	(4 : 1)
TLC-C	benzene : ethylacetate	(95 : 5)
TLC-D	n-hexane : ethylacetate	(4 : 1)

画は、加水分解後、酢酸エチルにて抽出し、以下遊離型ステロイドと同様分離した。分離された代謝物は必要に応じて無水酢酸・ピリジンによりアセチル化後 TLC で分離した。各放射性代謝物質の同定は、再結晶法 (Axelrod et al., 1965) を用いた。生合生物質への転換率は、抽出前に加えた tritiated steroids により回収率を補正してから計算した。尚 cholesterol-S, 16 α -OH-DHA-S に関しては tritium 標識標準物質による回収率の補正はしなかつた。

V. 放射能の測定

放射性代謝物質は 10ml のトルエンシンチレーター (PPO: 40mg, POPOP: 0.5mg) を加え Packard Tri-Carb 液体シンチレーションカウンタ Model 3330 により測定した。TLC 上の放射性スポットの検出には autoradiography (Tamaoki et al., 1966) 及び Aloka TLC scanner Model JTC-201 を用いた。

結 果

本実験における抽出・分離・純化操作後あらかじめ加えた tritium 標準物質の回収率は 36~72% であつた。

Incubation I において単離された各代謝物を表 2 に示した。遊離型ステロイドとしては cholesterol 抱合型としては P₅-S, DHA-S の生成が認められ他に少量の cholesterol-S, 16 α -OH-DHA-S が生成された。これらの代謝産物の内 cholesterol, P₅-S, DHA-S の生成は ACTH 添加群においていずれも亢進しており、非添加群における転換率を 100 とすると ACTH 添加群ではそれぞれ 271, 282, 447 であつた。

Incubation II の結果を表 3 に示した。主生成物は I と同様 cholesterol であり、比較的多量の DHA-S の生成が認められた。又抱合型以外にも

表2 Conversion of ¹⁴C-Acetate in fetal adrenal tissue

Metabolites	Control	ACTH added
Acetate (substrate)	60,629.20	59,542.60
Free	80.18	172.33
Cholesterol	58.64	159.17
Unknown	21.54	13.16
Conjugate	68.45	204.16
Cholesterol-sulfate	1.74	4.51
Pregnenolone-sulfate	6.46	18.19
DHA-sulfate	26.09	116.56
16 α -OH-DHA-sulfate	0.77	2.21

Figures are expressed as dpm $\times 10^4$

表3 Conversion of ¹⁴C-Acetate in fetal adrenal tissue

Metabolites	Control	ACTH added
Acetate (substrate)	48,814.10	44,194.9
Free	231.79	186.65
Cholesterol	229.09	182.31
Pregnenolone	1.22	1.89
DHA	0.94	1.50
Androstenedione *	0.54	0.95
Conjugate	24.56	28.02
Pregnenolone-sulfate	6.17	6.74
DHA-sulfate	18.40	21.28

Figures are expressed as dpm $\times 10^4$

* not recrystallized

少量ではあるが、遊離型ステロイドとして P₅, DHA が生成された。P₅, DHA, 4^A-A-dione, DHA-S への転換は、ACTH 非添加群を 100 とすると、添加群でそれぞれ 155, 160, 176, 116 でわずかながら増加傾向を示した。

これら単離された放射性ステロイドは、標準物質を加え溶媒を変えて再結晶をくり返し、その radiochemical な purity を検討した。その結果 specific activity は crystal, mother liquid と一致し表 4 に示すごとく各ステロイドが acetate より *de novo* に生合成されたことが証明された。

特に 16 α -OH-DHA-S 分画は solvolysis 後その一部分を取りアセチル化し benzene: methanol = 95:5 の溶媒システムによる TLC で放射性単一ピークを示し (R_f = 0.65) 同様な方法でアセチル化した標準物質と R_f 値が一致した。尚 これらの

表4 Radiochemical purity of ^{14}C -labeled steroids derived from incubation of fetal adrenal tissue with ^{14}C -Acetate

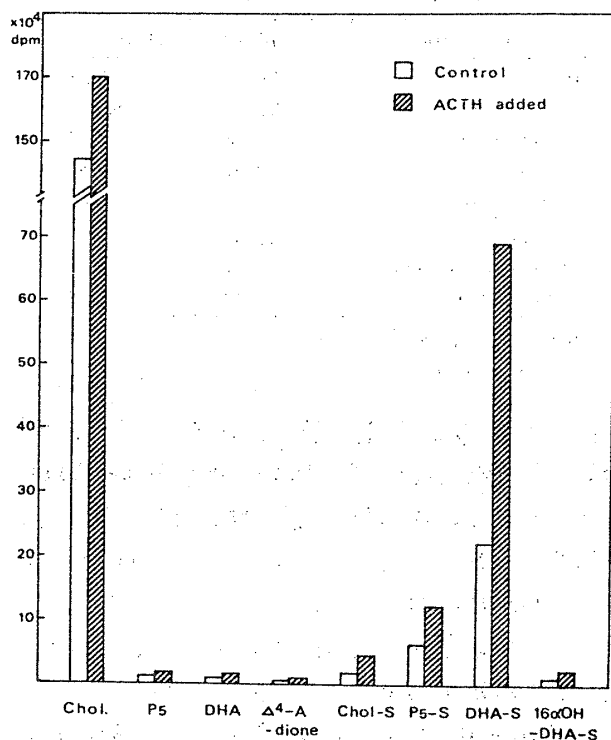
Substance	Original	Crystallization				
		X-1	X-2	X-3	X-4	ML
Cholesterol	679.7	689.3	695.5	653.3	—	679.9
Pregnenolone	1,178.8	1,030.7	1,028.1	984.0	—	961.9
DHA *	1,048.4	1,032.2	1,129.1	1,011.0	—	1,062.4
Cholesterol-S**	380.0	302.2	196.8	200.0	—	201.7
Pregnenolone-S***	616.7	573.0	534.4	572.0	—	556.9
DHA-S***	1,063.0	1,024.0	982.0	1,129.0	—	1,112.0
16 α -OH-DHA-S**	1,833.0	1,287.0	794.0	788.0	800.0	791.0

* Recrystallized as acetate

** Recrystallized after solvolysis

*** Recrystallized as acetate form after solvolysis

Specific activities expressed as dpm/mg

図2 Effect of ACTH on conversion of ^{14}C -Acetate in human fetal adrenal tissue

分離操作において Δ^5 -Androstene-3 α , 17 β -diol, Δ^5 -Androstene-3 α , 16 α , 17 β -triol, 16 α -OH-P₅, 17 α -OH-P₅, 21-OH-P₅, cortisol 等と、本物質は R_f 値を異にした。acetate を基質とした本実験においては cortisol, cortisone などの glucocorticoid 及び progesterone の生成は全く認められなかった。

Incubation I 及び II の実験結果をまとめて図 2

に示す。ACTH 添加により各ステロイド産生が増加しており、特に cholesterol-S, P₅-S, PHA-S の産生が明らかに亢進された。

考 案

Bloch & Benirschke (1959) は胎児副腎 slice の incubation で acetate-1- ^{14}C より DHA, Δ^4 -A-dione, 11 β -OH- Δ^4 -A-dione, P₅, cholesterol 及び cortisol が生合成される事を報告した。又 Jaffe et al. (1968) は同様に胎児副腎 slice incubation で sodium acetate-2- ^{14}C から 17 α -OH-P₅-S, DHA-S, 16 α -OH-DHA-S 等の抱合型ステロイドが生合成された事を報告している。

本実験において我々は acetate より遊離ステロイドとしては、大量の cholesterol と P₅, DHA 又抱合型ステロイドとしては cholesterol-S, P₅-S, DHA-S, 16 α -OH-DHA-S が生成され、さらにこれらの生成が ACTH 添加によつて促進される事を証明した。Incubation I・II 共に主生成物は cholesterol であり、又同定されたステロイドがいずれも Δ^5 -3 β -ol steroids でかつほとんどが主として抱合型であつた事は、胎児副腎におけるステロイド産生分泌の実態を示すものとして興味深い。臍動脈血中にも、これらのステロイドが高濃度に証明されており (Simmer et al., 1964, Easterling et al., 1966), 又、胎児副腎組織内にも存在すること (Matsumoto et al., 1968, Huhtaniemi et al., 1970) などから胎児副腎でこれらステロイドが相

当量分泌される可能性が示された。即ち、妊娠中大量に増加するステロイドホルモンないしその前駆物質は単に母体側に由来、又は母体 cholesterol に依存するのみならず、胎児副腎で *de novo* に合成され然も胎児下垂体の ACTH の調節下にあることが推察できる。今回の成績では glucocorticoid 及び progesterone の生成が認められず、主な代謝産物が Δ^5 系 C_{19} ステロイドであつた事からも、妊娠中における estrogen 前駆物質供給源としての胎児副腎の役割を更に意義づけるものとして興味がある。

胎児副腎の 16α -hydroxylation 能についての報告は少なく Vilee et al. (1961) は progesterone より 17α -OH-progesterone へ Nakayama et al. (1967) は DHA より 16α -OH-DHA への転換を証明した。 16α -OH-DHA-S は P_5 -S を基質とした場合の代謝産物として Pérez-Palacios et al. (1968) が報告しているが、今回我々は初めて acetate から生成されることを証明した。 16α -OH-DHA-S が *de novo* に胎児副腎で生合成されたとの報告は未だ無い。

今回の実験結果では acetate から各ステロイドへの転換率は cholesterol への転換に比し低かつたが、胎児副腎組織中の cholesterol が多い事から、中間代謝産物としての放射性 cholesterol の specific activity が下つた為と考えられる。

ACTH のステロイド産生促進効果については、牛・モルモット副腎を用いた *in vitro* の研究より cholesterol C_{20-22} desmolase 活性を高める (Billar & Eik-Nes, 1965, Stone & Hechter, 1954) といわれている。Milner & Vilee (1970) は胎児副腎組織で 11-deoxycortisol から cortisol に至る 11β -hydroxylase, Progesterone から 11-deoxycortisol に至る 17α , 21 -hydroxylase 活性が ACTH によつて高められるとし、一方、Bloch & Benirschke (1960) は ACTH 添加により acetate から cholesterol の生成は変わらないが DHA, cortisol の生成はそれぞれ 30—40%, 70—90% 増加したと報告している。今回我々は、更に遊離型では DHA のみならず P_5 及び新たに DHA-S, P_5 -S, 16α -

OH-DHA-S 等の硫酸抱合型ステロイドも ACTH 添加によつてその合成が促進される事を明らかにした。本研究結果から ACTH の作用部位に関して推定することは困難である。しかし ACTH は中期胎児副腎に対しても胎盤性 estrogen の前駆物質である C_{19} ステロイドの産生を促進している事は、先に発表した臨床実験と対比すると誠に興味深い。

稿を終るに臨み本研究に貴重な御助言を賜りました放射線医学研究所 玉置文一博士に感謝致します。尚本研究の一部は第27回日本産科婦人科学会総会シンポジウム及び第23回日本内分泌学会東部部会総会で発表しました。

文 献

- 荒井 清 (1975) : 日産婦誌, 27, 638.
 Arai, K., Kuwabara, Y. and Okinaga, S. (1972): Am. J. Obstet. Gynec. 113, 316.
 Axelrod, L.R., Matthijssen, C., Goldzieher, J.V. and Pulliam, J.E. (1965): Acta Endocrinol. (Kbh) 49, Suppl. 99.
 Billar, R.B. and Eik-Nes, K.B. (1965): Biochem. Biophys. Acta., 104, 503.
 Bloch, E. and Benirschke, K. (1959): J. Biol. Chem., 234, 1085.
 Bloch, E. and Benirschke, K. (1960): Acta. Endocrinol. (Kbh) 51, Suppl. 691.
 Bloch, E. and Benirschke, K. (1962): The Human Adrenal Cortex, 589: E. and S. Livingstone LTD. Edimburgh and London.
 Burstein, S. and Lieberman, S. (1958): J. Biol. Chem., 233, 331.
 Easterling, W.E., Simmer, H., Dignam, W.J., Frankland, M.W. and Naftolin, F. (1966): Steroids, 8, 157.
 Frandsen, V.A. and Stakemann, G. (1961): Acta. Endocrinol., 38, 383.
 Huhtaniemi, I., Luukkainen, T. and Vihko, R. (1970): Acta. Endocrinol., 64, 273.
 Jaffe, R.B., Pérez-Palacios, G., Lamont, K.G. and Givner, M.L. (1968): J. Clin. Endocr., 28, 1671.
 Matsumoto, K., Endo, H., Yamane, G., Kurachi, K. and Uozumi, T. (1968): Endocrinol. Japan., 15, 189.
 Milner, A.J. and Vilee, D.B. (1970): Endocrinology, 87, 596.
 Nakayama, T., Arai, K., Yanaihara, T., Tabei, T., Satoh, K. and Nagatomi, K. (1967): Acta. Endocrinol. (Kbh) 55, 369.
 Nakayama, T., Arai, K., Yanaihara, T., Satoh, K.,

- Nagatomi, K., Tabei, T. and Fujita, Y.* (1968):
Endocrinol. Japan., 15, 135.
- Pérez-Palacios, G., Pérez, A.E., and Jaffe, R.B.* (1968):
J. Clin. Endocr., 28, 19.
- Simmer, H.H., Eastering, W.E., Jr. Pion, R. and
Dignam, W.J.* (1964): Steroids, 4, 125.
- Stone, D. and Hechter, O.* (1954): Arch. Biochem.
Biophys., 51, 457.
- Tamaoki, B., Sikita, M. in Pincus, G., Nakao, T. and
Tait, J.F.* (1966): Steroid Dynamics 493:
Academic Press, New York.
- Villee, D.B., Engel, L.L., Loring, J.M. and Villee,
C.A.* (1961): Endocrinology, 69, 354.
- Yanaihara, T.* (1968): J. Jap. Obstet. Gynec. Soc.,
15, 279.

(No. 3099 昭 51・5・17受付)