

胎児肝組織の 16α -hydroxylase 活性に及ぼす 各種ステロイドの影響

帝京大学医学部産科婦人科学教室

矢内原 巧 郡山とも子 佐藤 直樹
吉田 信隆 沖永 荘一 荒井 清

Inhibition of 16α -hydroxylation by Steroids in Human Fetal Liver

Takumi YANAIHARA, Tomoko KORIYAMA, Naoki SATOH,
Nobutaka YOSHIDA, Shoichi OKINAGA and Kiyoshi ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology University of Teikyo School of Medicine, Tokyo

概要 胎児一胎盤系での Estriol (E_3) 生成機構に於て、胎児肝臓の果たす役割は、明らかにされているが、それがどのような調節機序の下におかれているかは不明である。近年、ステロイド自体によるステロイド産生調節が注目されている。そこで妊娠中期中絶胎児の肝臓を用い、*in vitro* にて、 E_3 及びその他のステロイドが、胎児肝 16α -hydroxylase 活性に及ぼす影響について検討を行ない、次の結果を得た。

1) 胎児肝臓のミンス又は、ホモジネートの 800g 上清を用い、 ^{14}C -Dehydroepiandrosterone (DHA) 及び ^{14}C -Pregnenolone (P_5) を基質としてインキュベートした場合、生成された主なる放射性代謝物は、各々 16α OH-DHA, 16α OH- P_5 であった。

2) この実験系に、各種濃度の E_3 を添加してみると、明らかに 16α -hydroxylase 活性は、阻害を受けた。即ち、DHA から 16α OH-DHA への転換は、 $8 \times 10^{-6}\text{M}$ の E_3 の添加によつて、対照群の転換率を 100%とした場合、83.6%と有意に低下し、Lineweaver-Burk の plot によるその阻害パターンは、拮抗型であった。又、同様に P_5 から 16α OH- P_5 への転換も、阻害を受け、その阻害パターンは、拮抗型であった。

3) E_3 -conjugate である E_3 -3-sulfate, E_3 -16, 17-disulfate を同様に、この実験系に添加しても、何ら影響が見られなかった。

以上の成績より、胎児一胎盤系での E_3 生成に重要な役割を担っている胎児肝臓の 16α -hydroxylase 活性が、臍帯血中に大量に存在する E_3 によつて影響を受ける事が示された。この事は、胎児臓器が、ステロイド自身によるステロイド生合成の自律的調節を行なっている可能性を示唆するものである。

Synopsis The effect of estriol on 16α -hydroxylase activity in fetal liver was studied in an *in vitro* incubation experiment. The 800 g supernatant of liver homogenates from human fetuses aborted at midgestation were incubated with $4\text{-}^{14}\text{C}$ -dehydroepiandrosterone and $4\text{-}^{14}\text{C}$ -pregnenolone. 16α -hydroxydehydroepiandrosterone and 16α -hydroxypregnenolone were isolated and identified as the major metabolites from dehydroepiandrosterone and pregnenolone, respectively. With an addition of increasing amounts of estriol, formation of 16α -hydroxylated compounds was progressively inhibited. From the kinetics of the inhibition studies, estriol seemed to function as a competitive inhibitor to 16α -hydroxylase, when either dehydroepiandrosterone or pregnenolone was a substrate. Estriol conjugates at the same concentration, however, showed no effect.

These data indicate for the first time that estriol added *in vitro* has an inhibitory effect on 16α -hydroxylase in fetal liver. The possibility of enzyme regulation by steroids as a mechanism for control of fetal steroid hormone production is discussed.

緒 言

妊娠中、大量に産生される E_3 の生成機序に関しては、胎盤のみならず胎児が積極的に参与している事が明らかにされてきた (Diczfalusy 1964,

中山 1965)。即ち、胎児副腎より分泌される DHA 及びその硫酸抱合型が、胎児臓器で 16α -hydroxylation を受け、更に胎盤で aromatize され E_3 が生成される。この E_3 の生成上必要な 16α -hydro-

xylation が、胎盤では行なわれず、胎児側に依存しており、胎児肝臓がその重要な役割を果たしている事が、Engel et al.(1962), Bolté et al.(1966) により証明されている。然し、これら一連のステロイド生合成が、如何なる調節機序のもとに行なわれているかについては、未だ不明の点が多く、特に trophic hormone の control 外におかれていると考えられる胎児肝臓におけるステロイド生成調節に関しては報告を見ない。1964年, Koritz & Hall は bovine adrenal cortex を用いた *in vitro* incubation で, P_5 が cholesterol から 20α -hydroxycholesterol への転換を、強く抑制する事を報告し、又、ラット (Notation & Ungar, 1968), ヒト (Yanaiharu & Troen, 1972) 睪丸, ウシ卵巣 (Ichii et al., 1963) 等のステロイド生成組織に於ても同様、ステロイド自体によるステロイド生成調節作用が証明されている。そこで、妊娠中の E_3 生成にとって、重要な役割を担っている胎児肝臓の 16α -hydroxylase 活性を検討し、更に、本酵素活性が、臍帯血中に大量に存在する E_3 やその他のステロイドによつて影響を受けるか否かを検索するため、以下述べる実験を行なつた。

実験材料ならびに実験方法

1) 標準物質

[$4\text{-}^{14}\text{C}$]DHA(S.A. 58.8mCi/m mole, NEC-206), [$4\text{-}^{14}\text{C}$] P_5 (S.A. 55.7mCi/m mole, NEC-375) は、あらかじめ薄層クロマトグラフィー (T.L.C.) によつて純化した後用いた。DHA, P_5 , 16α OH-DHA, 16α OH- P_5 , 5-androstene- 3β , 16α , 17β -triol (Δ^5 A-triol), cortisol は、Merck, Ikapharm, Steraloids 社より購入し、 E_3 -3-sulfate, E_3 -16, 17-disulfate は、帝国臓器森博士, Dr. D.S. Layne (Ottawa, Canada) より供与を受けたものを使用した。これらの非放射性標準ステロイドは、使用前に T.L.C. にて純度を確認した。

2) 胎児肝組織

妊娠5カ月及び6カ月中絶した胎児肝臓の10g 或は35.3g をミンスにし、各々2倍 v/w の0.25 M sucrose (pH=7.4) を加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした後、800g, 4°C

で20分間遠沈した上清を用いた (cell-free homogenate)。5カ月の胎児肝臓の一部は、そのままミンスにて使用した。

3) インキュベーション

Cell-free homogenate は Krebs-bicarbonate-glucose medium (K.B.G. medium) にて5倍に希釈したものの1 ml, ミンスにした組織50mg は2 ml の K.B.G. medium を加え、37°C, $O_2 : CO_2 = 95 : 5$ の条件下でインキュベーションを行なつた。補酵素として、NAD, NADPH₂ を各々0.2 μ mole 加えた。基質には $4\text{-}^{14}\text{C}$ -DHA 0.2 μ Ci (5~80n moles) 及び $4\text{-}^{14}\text{C}$ - P_5 0.2 μ Ci (4~4(n moles)) を各々加え、必要に応じ種々の濃度の E_3 やその他の標準物質を加えた。インキュベーション終了後、5 ml のエタノールを加えて、反応を停止せしめた。

4) 抽出、分離、純化及び同定

インキュベーション終了後、ミンス組織を用いた実験では、ホモジナイズし、3,000r.p.m. で4°C, 15分間遠沈、又、cell-free homogenate を用いた実験では、そのまま同様に遠沈し、その上清を N_2 ガスで蒸発乾固させ、70%メタノール5 ml に溶解、-20°Cで24時間放置後、3,000 r.p.m., -20°Cで30分間2回遠沈し、脱リピッドを行なつた。上清を蒸発乾固し、これに水1 ml, 水飽和ジクロールメタン5 ml を加えて溶液分配を行なつた。ジクロールメタンの層は、 N_2 ガスで蒸発乾固した後、展開溶媒 Benzene-methanol (90:10) を用いた T.L.C. によつて、各ステロイド分画に分離した。T.L.C. 上の放射性スポットの検出には、T.L.C. scanner (Aloka JTC-201型) を使用し、非放射性標準ステロイドの検出は、硫酸発色法を用いた。その他、Bush B_3 system (ligroin-benzene-methanol-water=667:333:800:200) を用いたペーパークロマトグラフィー (P.P.C.) も行なつた。抽出からこの T.L.C., P.P.C. 操作までの放射性ステロイドの回収率は、約70%で、回収率による補正は行なわなかつた。尚、水の層は、その一部の放射能を測定し、抱合化の有無を検索した。精製分離した各代謝物の一

部は, Pyridine-Acetic anhydride (1 : 1, v/v) を加え, 室温で一晩放置して, acetate 誘導体を作った. 各誘導体は T.L.C. 上の Rf. 値を標準物質と比較して, 同一物質であるかどうかを確認した. 又, 各放射性代謝物の一部に約10mg の標準ステロイド結晶を加え, 再結晶を繰り返して, Axelrod et al. (1965) の報告した方法と規準にもとずいて, specific activity が一定になるかどうかの検討を行なった. 放射能の測定には counting vial 中に資料と共に10ml の scintillator (4g ppo, 100mg popop/1,000ml toluene) を加え, 液体シンチレーションカウンター (Packard Tri-Carb, Model 3,330) で放射能を測定した. 尚, 以下述べる実験結果は, n mole/flask で表わした.

実験成績

1) 胎児肝臓の 16α -hydroxylase

5カ月の胎児肝臓の cell-free homogenate を $0.2\mu\text{Ci}$ (6.9n mole) の $4\text{-}^{14}\text{C-DHA}$ を基質として, インキュベーションした時の結果を図1に示した. 放射性代謝物は主として, $16\alpha\text{OH-DHA}$ であり, わずかに 4^5A-triol の生成がみられた.

図1 Formation of $16\alpha\text{OH-DHA}$ from DHA in fetal liver preparation

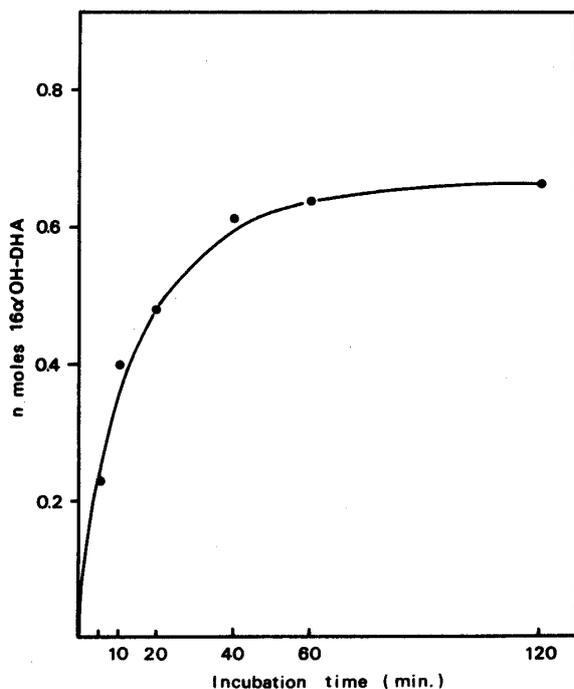
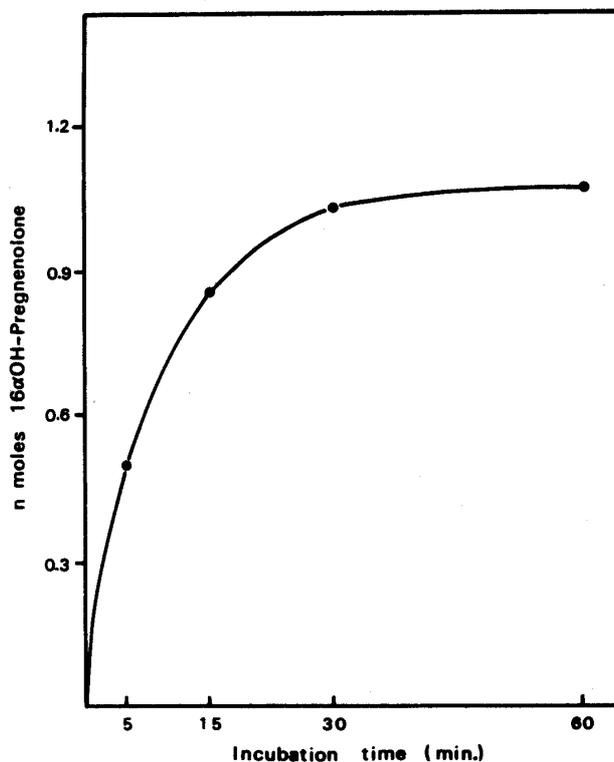


図2 Formation of $16\alpha\text{OH-Pregnenolone}$ from Pregnenolone in fetal liver preparation



$16\alpha\text{OH-DHA}$ の生成は, 時間と共に増量したが, 40分以降は, ほぼプラトーに達した. 同様に6カ月の胎児肝臓の cell-free homogenate を $0.2\mu\text{Ci}$ (3.5n mole) の $4\text{-}^{14}\text{C-P}_5$ とインキュベートした時の結果を示したのが図2である. 放射性代謝物は, 主として $16\alpha\text{OH-P}_5$ であり, 時間と共に増量したが, 30分以降は, ほぼプラトーに達した. 尚, 本実験条件下では, DHA, P_5 を基質とした場合, 水の分画中の放射能は, ごくわずかであった. これら生成された放射性 $16\alpha\text{OH-DHA}$, 及び $16\alpha\text{OH-P}_5$ の各々の fraction は, P.P.C., アセチル化後の T.L.C. でも単一ピークを示し, 標準物質と同一の Rf. 値を示した. これらの放射性代謝物の同定は, 標準物質を加えた後, 再結晶法によつて行なった. 表1は, 各段階における specific activity を示し, 放射性代謝物が, $16\alpha\text{OH-DHA}$, 及び $16\alpha\text{OH-P}_5$ である事が示された.

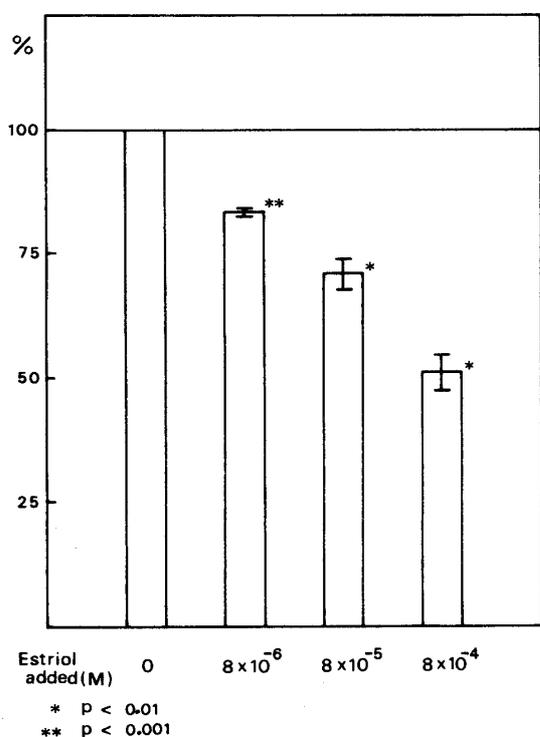
2) 胎児肝臓 16α -hydroxylase に及ぼす E_3 の影響

50mg の胎児肝臓ミンスを $4\text{-}^{14}\text{C-DHA}$ (9.5n

表1 Radiochemical purity of ^{14}C - $16\alpha\text{OH}$ -DHA and ^{14}C - $16\alpha\text{OH}$ -Pregnenolone derived from incubation of fetal liver

	Specific activity (dpm/mg)	
	$16\alpha\text{OH}$ -DHA	$16\alpha\text{OH}$ -Pregnenolone
Original mixture	2,516	2,035
Crystallization		
X-1	2,556	1,774
X-2	2,423	1,568
X-3	2,509	1,560
ML	2,486	1,567

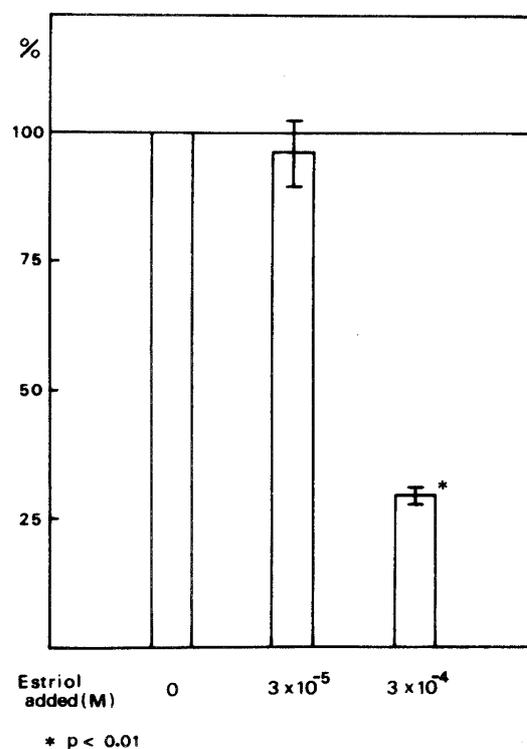
図3 Inhibitory effect of Estriol on $16\alpha\text{OH}$ -DHA formation from DHA by fetal liver



mole/flask) と共に, 5分間インキュベートした時の代謝物は, $16\alpha\text{OH}$ -DHA であつたが, インキュベーションメディウム中に, 各濃度の E_3 を加えた場合, DHA より $16\alpha\text{OH}$ -DHA への生成は, 著しく阻害された. 即ち, 対照群の $16\alpha\text{OH}$ -DHA 生成は, $4.16 \pm 0.31 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$) であり, $8 \times 10^{-6} \text{ M}$ の E_3 の添加で $16\alpha\text{OH}$ -DHA の生成は $3.48 \pm 0.03 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$) と低下し, 添加する E_3 を $8 \times 10^{-5} \text{ M}$, $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ と増量するにつれて, その生成は各々, $2.95 \pm 0.18 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$), $2.12 \pm 0.19 \text{ n mole/}$

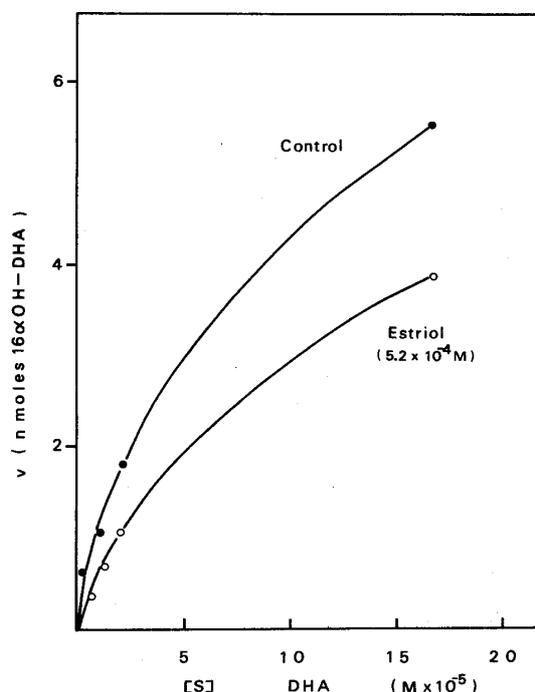
flask ($\text{m} \pm \text{S.D.}$) となつた. 図3は, 対照群の転換率を100%とした場合の E_3 添加による $16\alpha\text{OH}$ -DHA の生成を示すが, $8 \times 10^{-6} \text{ M}$ の E_3 の添加で 83.6% ($P < 0.001$), $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ で 70.9% ($P < 0.01$), $8 \times 10^{-4} \text{ M}$ で 50.8% ($P < 0.01$) と, その生成は有意に阻害された. 同様に, cell-free homogenate を $4\text{-}^{14}\text{C}\text{-P}_5$ ($24.8 \text{ n mole/flask}$) を基質として, 15分間インキュベートした時の代謝物は, $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ であつた. インキュベーションメディウム中に, 各濃度の E_3 を加えた場合, P_5 よ

図4 Inhibitory effect of Estriol on $16\alpha\text{OH}$ -Pregnenolone formation from Pregnenolone by fetal liver



り $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ への生成は漸次阻止された. 即ち, 対照群の $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ の生成は, $7.64 \pm 0.17 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$) であり, $3 \times 10^{-5} \text{ M}$, $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ の E_3 の添加で $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ の生成は, 各々 $7.37 \pm 0.70 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$), $2.28 \pm 0.17 \text{ n mole/flask}$ ($\text{m} \pm \text{S.D.}$) となつた. 図4は, 対照群の転換率を100とした場合の E_3 添加による $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ の生成を示すが, $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ の E_3 の添加によつて, $16\alpha\text{OH}\text{-P}_5$ の生成は 29.8% と有意に低下した

図5 Effect of Estriol and substrate concentration on conversion of DHA to $16\alpha\text{OH-DHA}$ in fetal liver



($P < 0.01$).

3) E_3 による胎児肝臓 16α -hydroxylase 活性の阻害作用

5カ月胎児肝臓の cell-free homogenate を用いた実験で図5に示すように基質である DHA の濃度を $0.5 \times 10^{-5} \text{M}$ から $20 \times 10^{-5} \text{M}$ まで漸次増した場合、 $16\alpha\text{OH-DHA}$ の産生量も漸増するが、 E_3 によつて明らかに阻害を受けた。基質、及び生成物の逆数をそれぞれ横軸縦軸とした Lineweaver-Burk の plot によれば、 K_m 値は $5.5 \times 10^{-5} \text{M}$ で、その阻害パターンは、competitive である事が判つた(図6)。同様に6カ月胎児肝臓の cell-free homogenate を用いた実験で、基質である P_5 の濃度を $0.3 \times 10^{-5} \text{M}$ から $4 \times 10^{-5} \text{M}$ まで漸次増した場合、図7に示した様に $16\alpha\text{OH-P}_5$ の産生量も漸増し、この 16α -hydroxylase 活性は、 E_3 によつて阻害を受けた。この結果を Lineweaver-Burk の plot でみると、 K_m 値は $3.1 \times 10^{-5} \text{M}$ で、その阻害パターンは、competitive であつた(図8)。

4) その他のステロイドによる影響

DHA 及び P_5 を基質とし、 E_3 以外の各種ステ

図6 Effect of Estriol and substrate concentration on conversion of DHA to $16\alpha\text{OH-DHA}$ in fetal liver

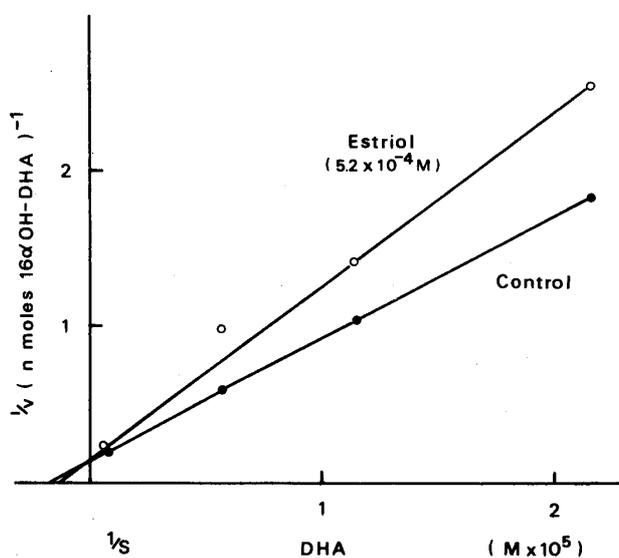
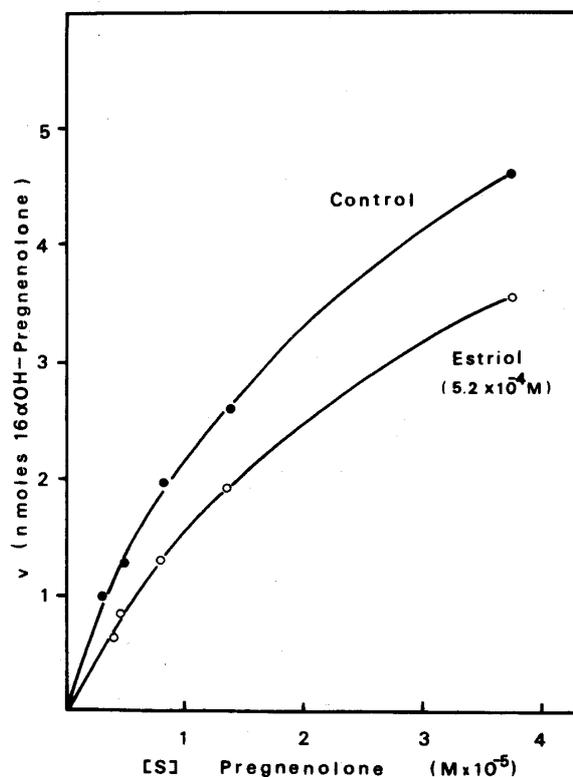


図7 Effect of Estriol and substrate concentration on conversion of Pregnenolone to $16\alpha\text{OH-Pregnenolone}$ in fetal liver



ロイドを添加し、肝臓の 16α -hydroxylase 活性に及ぼす影響を検討した結果を表2に示す。臍帯血中、新生児尿中にみられ、胎児性ステロイドの代

図8 Effect of Estriol and substrate concentration on conversion of Pregnenolone to 16 α OH-Pregnenolone in fetal liver

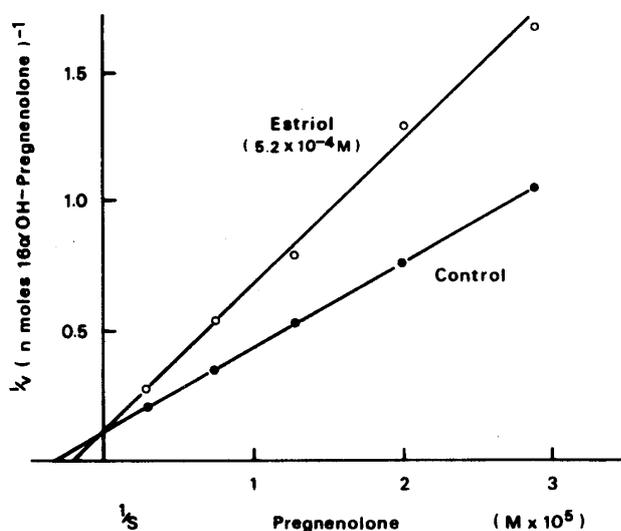


表2 Effect of various steroids on 16 α -hydroxylation in fetal liver

Compound added	Relative amount of formed		Type of inhibition
	16 α OH-DHA	16 α OH-Pregnenolone	
Control	100.0	100.0	
Estriol	62.0	40.0	competitive
Estriol-3-S	99.6	102.4	
Estriol-16, 17-diS	92.7	96.7	
Androstenetriol	67.9	55.4	
Cortisol	100.6	47.3	

表3 Effect of Estriol-3-sulfate on 16 α OH-DHA formation from DHA by fetal liver

Concentration of Estriol-3-sulfate [M]	Relative amount of 16 α OH-DHA formed (%) [mean \pm S.E.]
0	100
8.67×10^{-6}	93.0 ± 7.2
8.67×10^{-5}	97.2 ± 1.1
5.20×10^{-4}	99.6 ± 3.0
8.67×10^{-4}	93.7 ± 2.7

謝物の一つである Δ^5 A-triol は, E_3 同様阻害作用を示した (図9, 10). 一方, E_3 の抱合型である E_3 -3-sulfate (表3), E_3 -16,17-disulfate は 8.7 乃至 $5.4 \times 10^{-4} M$ の添加でも, 本実験条件下では全く影響を与えなかつた. cortisol の添加では, 基質を P_5 にした場合に E_3 と同様16 α -hydroxylase

図9 Effect of 5-Androstene-3 β , 16 α , 17 β -triol on conversion of DHA to 16 α OH-DHA in fetal liver

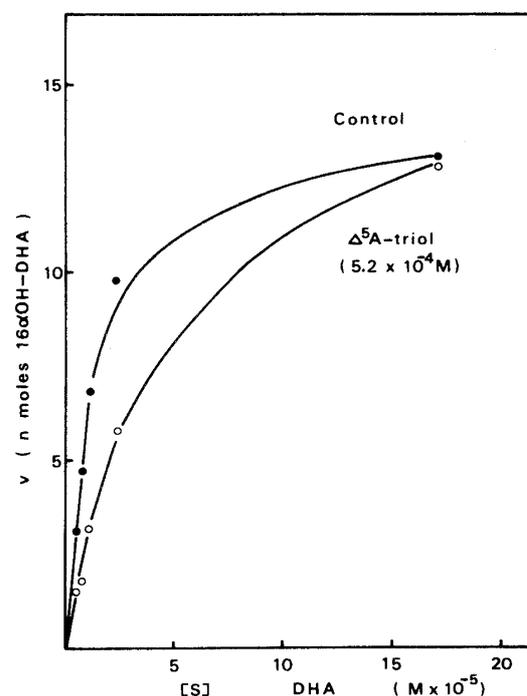
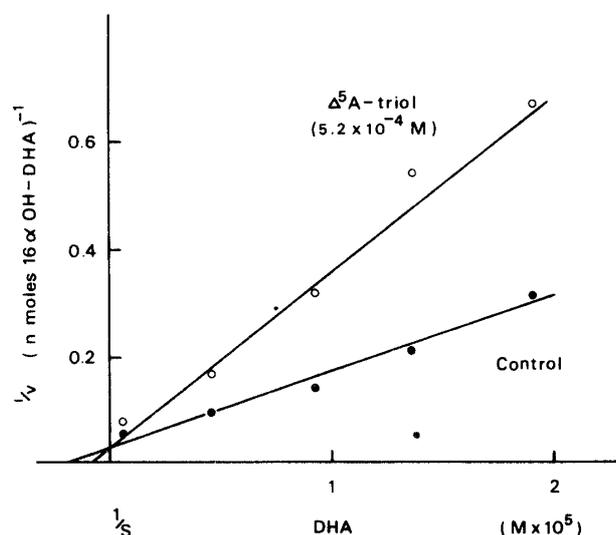


図10 Effect of 5-Androstene-3 β , 16 α , 17 β -triol and substrate concentration on conversion of DHA to 16 α OH-DHA in fetal liver



活性を阻害したが, DHA より16 α OH-DHA への転換には影響を与えなかつた.

考案

胎児一胎盤系に於けるステロイド生成で, 胎児肝臓が示す16 α -hydroxylation については, Slaunwhite et al. (1965), Heinrichs et al. (1966),

Reynolds (1966), 中山ら (1966), Matsumoto et al. (1968) の報告がある. 本実験に於ても, 図 1, 2 に示す如く, 胎児肝臓組織の cell-free homogenate 及び ミンスインキュベーションで, 臍帯血中に大量に存在する DHA, P₅ を基質とした場合, 短時間のうちに, 能率的に 16 α OH-steroid に転換する事が示された. 妊娠中の E₃ 生成機構は, 次第に明らかにされてきたが, その調節機序に関する知見は未だ少ない. 胎児副腎皮質が, 胎児下垂体前葉の ACTH によつて刺激され DHA-S 等の E₃ 前駆物質の産生分泌を亢進させるという報告 (Arai et al., 1972) がなされているが, 最近これら trophic hormone による調節作用以外に, 末梢系ステロイド自体によるステロイド生成調節機序が注目されている. 胎盤組織を用いた *in vitro* 実験で, Wiener & Allen (1967) は, 3 β HSD, Δ_5 - Δ_4 isomerase が 20 α -Dihydroprogesterone によつて, 又, 20 α -reductase が Estrogen によつて抑制されるとし, Townsley et al. (1970, 1975) は, sulfatase 活性及び 3 β HSD 活性が, その代謝産物及び各種内因性ステロイドによつて抑制される事を報告している. 胎児肝臓で, これらステロイド自体の酵素活性に及ぼす影響についての報告は見当らない. 臍帯血中に高濃度に E₃ が存在する事はよく知られた事実であるが, 胎児肝臓のミンス及び cell-free homogenate を用いた *in vitro* の実験で, DHA から 16 α OH-DHA への転換が 10⁻⁶M の E₃ により有意に抑制される事がわかつた. 又, P₅ を基質とした cell-free homogenate のインキュベーションでも, 16 α OH-P₅ の生成は, E₃ の添加で有意に抑制された. DHA, P₅ に対する 16 α -hydroxylase の Km 値は, 各々 5.5 \times 10⁻⁵M, 3.1 \times 10⁻⁵M であり, 又, その阻害パターンは, 各々 competitive であつた. E₃ 以外の他のステロイドによる 16 α -hydroxylase 活性に及ぼす影響を, 同一条件下で検討したが, E₃ の抱合型である E₃-3-sulfate, E₃-16,17-disulfate は全く阻害作用を示さなかつた. この事は, E₃ の遊離型と抱合型が, 胎児肝臓の 16 α -hydroxylase に対して異なる影響を与える事を示し, 興味深い.

Δ^5 A-triol は, 臍帯血中 (Laatikainen et al., 1973), 新生児尿中 (Reynolds, 1966), 羊水中 (Schindler & Siiteri, 1968) にみられる胎児胎盤系ステロイドの1つであるが, E₃ 同様 16 α -hydroxylase 活性に対して阻害作用を示した. Δ^5 A-triol は, ¹⁴C-DHA を基質とした胎児肝臓の灌流実験に於て, 肝組織中に多量に証明され (高山, 1975), 又, 胎児胎盤系での E₃ 前駆物質の1つとして注目されている (Dell'acqua et al., 1967) 事と考えると, 胎児肝臓 16 α -hydroxylase に胎児自体の生成物が影響を及ぼす事を示唆するものとして興味深い. 添加ステロイドとして cortisol を用いた場合, P₅ より 16 α OH-P₅ の生成は著しく阻害されたが, 同一条件下では DHA より 16 α OH-DHA への転換には何ら影響を及ぼさなかつた. この事は, 阻害物質と基質, 阻害物質と酵素の異なる関連を示唆するものと考えられる.

以上の結果は, 胎児臓器が, ステロイド自身によるステロイド生合成の自律的調節を行なつている可能性を示唆するものである. 然し, 生理的濃度の問題, 遊離型及び抱合型の持つ意義, 又その阻害形式等, 今後更に検討を要する問題を多く残していると思われる.

稿を終るに臨み, 本研究に貴重な御助言を頂きました東京医科歯科大学泌尿器科講師, 大島博幸博士に感謝いたします. 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48回日本内分泌学会総会にて発表した.

文 献

- 中山徹也 (1965): 第17回日産婦学会総会宿題報告要旨, p. 39.
 中山徹也, 荒井 清, 矢内原 巧, 田部井 徹, 永富敬二, 佐藤和雄 (1966): 産婦世界, 18, 248.
 高山照雄 (1975): 日産婦誌, 27, 455.
 Arai, K., Kuwabara, Y. and Okinaga, S. (1972): Am. J. Obstet. Gynecol., 113, 316.
 Axelrod, L.R., Matthijssen, C., Goldzieher, J.W. and Pulliam, J.E. (1965): Acta. Endocrinol., 49, Suppl. 99, 30.
 Bolté, E., Wqvist, N. and Diczfalusy, E. (1966): Acta. Endocrinol., (Kbh) 52, 583.
 Dell'Acqua, S., Mancuso, S., Wqvist, N., Ruse, J.L., Solomon, S. and Diczfalusy, E. (1967): Acta. Endocrinol., 55, 389.

- Diczfalusy, E.* (1964): Federation Proceedings., 23, 791.
- Engel, L.L., Baggett, B. and Halla, M.* (1962): Endocrinol., 70, 907.
- Heinrichs, W.L., Feder, H.H. and Colás, A.* (1966): Steroids., 7, 91.
- Ichii, S., Forchielli, E. and Dorfman, R.I.* (1963): Steroids., 2, 631.
- Koritz, S.B. and Hall, P.F.* (1964): Biochemistry., 3, 1298.
- Laatikainen, T., Peltonen, J. and Nylander, P.* (1973): Steroids., 21, 347.
- Matsumoto, K., Endo, H., Yamane, G., Kurachi, K. and Uozumi, T.* (1968): Endocrinol. Japon., 15, 189.
- Notation, A.D. and Ungar, F.* (1968): Can. J. Biochem., 46, 1185.
- Reynolds, J.W.* (1966a): J. Clin. Endocrinol., 26, 1251.
- Reynolds, J.W.* (1966b): Steroids., 8, 719.
- Schindler, A.E. and Siiteri, P.K.* (1968): J. Clin. Endocrinol., 28, 1189.
- Slaunwhite, W.R., Karsay, M.A., Hollmer, A., Sandberg, A.A. and Niswander, K.* (1965): Steroids. 5, Suppl. 2, 211.
- Townsley, J.D., Scheel, D.A. and Rubin, E.J.* (1970): J. Clin. Endocrinol., 31, 670.
- Townsley, J.D.* (1975): Acta. Endocrinol., 79, 740.
- Wiener, M. and Allen, S.H.G.* (1967): Steroids., 9, 567.
- Yanaihara, T. and Troen, P.* (1972): J. Clin. Endocrinol. Metab., 34, 968.

(No. 4000 昭51・5・17受付)