

胎児胎盤系における 16α -hydroxy-DHA および 16α -hydroxypregnenolone の生成とその動態

昭和大学医学部産科婦人科学教室

後藤 田 祐 宏 平 戸 久 美 子

矢 内 原 巧 中 山 徹 也

帝国臓器製薬株式会社

神 戸 川 明

A Study of 16α OH-DHA and 16α OH-Pregnenolone in Feto-Placental Unit

Yuko GOTHODA, Kumiko HIRATO, Takumi YANAIHARA and Tetsuya NAKAYAMA

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

Akira KANBEGAWA

Teikoku Hormone Mfg. Co, Kawasaki

概要 妊娠中に増量する 16α -hydroxy- Δ^5 steroids のうち, 16α -hydroxydehydroepiandrosterone (16α -OH-DHA) 及び 16α -hydroxypregnenolone (16α -OH- P_5) の血中動態並びに胎児胎盤系におけるそれらの代謝動態を検討した。

1. 新規物質 16α -OH-DHA-7 (O-carboxymethyl)-oxime-BSA を合成し, それを家兎に免疫して抗 16α -OH-DHA 血清を得て, RIA による 16α -OH-DHA の測定に供した。

2. 正常男女, 正常妊娠各時期, 異常妊娠, 正常分娩, 異常分娩の各血中値を測定して次の成績を得た。① 両ステロイド値とも妊娠経過に伴って有意に漸増する。② 正常分娩例では, 両ステロイド値とも臍帯動脈血中値は, 臍帯静脈血中値に比し, 有意に高かった。③ fetal distress 例では, 臍帯動脈血中 16α -OH-DHA 値, 母体末梢血中 16α -OH- P_5 値は, 正常例のそれに比し, 有意に低値を示した。④ 無脳児妊娠例及び子宮内胎児死亡例では, 母体末梢血中値及び臍帯動静脈血中値は, 正常分娩例に比し, 各値とも著しく低値を示した。⑤ 胎盤性 sulfatase 欠損症では, 16α -OH-DHA 値は, 母体末梢血中値及び臍帯動静脈血中値とも極めて高値を示し, 16α -OH- P_5 値も明らかに高値であつた。⑥ 正常妊娠における両ステロイドの母体末梢血中値はお互いによく相関するが, 無脳児妊娠例では正常に比し低値で, 且つ両ステロイド間に相関が認められなかつた。

3. 胎児副腎及び胎盤の培養実験において, 胎児副腎では, P_5 を基質とした場合には DHA が產生され, 16α -OH- P_5 を基質とした場合には他のステロイドへの転換が認められなかつた。一方胎盤では $P_5 \rightarrow$ Progesterone, 16α -OH- $P_5 \rightarrow 16\alpha$ -OH-Progesterone の転換が認められ, それ以外のステロイドへの転換は認められなかつた。

以上によりこれら2種の 16α -OH- Δ^5 steroids は, 共に胎児源のステロイドであることが証明された。更に主要内分泌臓器である胎児副腎では 16α -OH- P_5 は 16α -OH-DHA に転換されないことから, 両 16α -OH ステロイドの血中動態は胎児胎盤機能検査において異なつた意義を有することが示唆された。

Synopsis Serum levels of total 16α -hydroxydehydroepiandrosterone (16α -OH-DHA) and 16α -hydroxypregnenolone (16α -OH- P_5) which are considered to be a fetal origin have not been well documented. Radioimmunoassays using specific antisera against 16α -OH-DHA-7-CMO-BSA and 16α -OH- P_5 -3-succinate-BSA were developed and serum concentrations of these steroids in normal men and women, maternal peripheral vein (MV) during pregnancy, umbilical artery and umbilical vein at delivery were measured. Labeled 16α -hydroxylated steroids were synthesized by microbiological method. The concentrations of 16α -OH- Δ^5 -steroids were increased as pregnancy progresses. Both steroid levels in cord serum were statistically higher than those in MV. In the case of intrauterine fetal death and anencephalic pregnancy, significantly low levels of both steroids in MV and cord blood were found. On the other hand, pregnancy with placental

sulfatase deficiency, showed high levels both in MV and cord vein. It is interesting to note that in normal pregnancy, maternal 16 α -OH-DHA levels correlated well with that of 16 α -OH-P₅. However, in pregnancy with anencephalic fetus, there was no correlation between the levels of two steroids. From the results of *in vitro* experiment using placental tissue, 16 α -OH-progesterone was formed from labeled 16 α -OH-P₅, whereas no metabolite was noticed when fetal adrenal tissue was used.

From these *in vitro* and *in vivo* studies, a significance of the measuring of serum 16 α -OH-DHA and 16 α -OH-P₅ during pregnancy is discussed.

Key words: 16 α -OH-DHA • 16 α -OH-Pregnenolone • Pregnancy • Placenta

緒 言

妊娠中に増量するステロイドホルモンのうち 16 α -hydroxydehydroepiandrosterone (16 α -OH-DHA) に関しては、胎盤性 estriol の前駆物質として、胎児副腎及び肝臓で生成されていることはよく知られている。従つてその血中動態は胎児副腎及び肝臓機能の指標として estriol と共に臨床上においても注目されている³⁾⁵⁾。この 16 α -OH-DHA 測定法として、Colás et al.¹¹⁾, Magendantz et al.¹⁵⁾, Arai et al.¹⁰⁾, 松橋⁵⁾, 古屋ら¹⁾, 春山³⁾らの報告があるが蛍光法及び gas chromatography 法は感度や精度に限界があり、また従来の RIA 法も抗体の特異性に問題がある。そこで我々は、16 α -OH-DHA に特異的な抗体を作成するため、新規物質 16 α -OH-DHA-7 (0-carboxymethyl)-oxime-BSA を合成し、それを家兎に免疫して得た抗体を用いた 16 α -OH-DHA の RIA 法を新たに開発し、妊娠中の血中動態を検討した。

16 α -OH- Δ^5 steroids のうち、胎児副腎-肝臓で生成されると考えられる 16 α -hydroxypregne-

none (16 α -OH-P₅) についても、その血中動態及び代謝に関する報告は極めて少なく、Laatikainen et al.¹⁴⁾, Shindler et al.¹⁹⁾, Shibusawa et al.¹⁸⁾, 春山³⁾らの血中動態に関する報告はあるが、その意義に関しては不明の点が多い。そこで 16 α -OH-DHA とあわせて 16 α -OH-P₅ の胎児-母体系での血中動態を検討し、更に胎児胎盤系での代謝動態を、放射性 16 α -OH-P₅ を基質とした胎児副腎及び胎盤との培養実験により検討した。

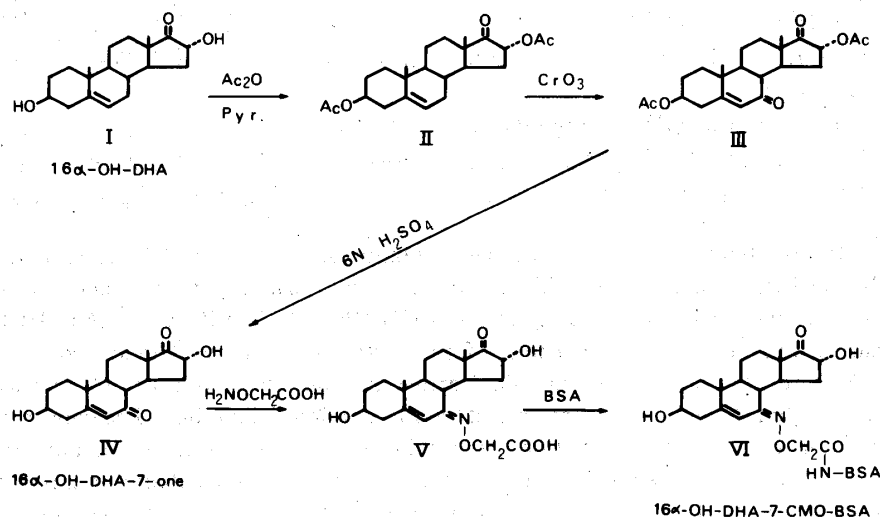
実験方法

I. 抗ステロイド血清

1) 16 α -OH-DHA-7 (0-carboxymethyl)-oxime-BSA の合成

合成法の概要は図 1 に示した。まず、16 α -OH-DHA (I) 148mg を無水酢酸・ピリジン混液でアセチル化して 16 α -OH-DHA-3, 16-diacetate (II) を得た後、クロム酸酸化することにより、154mg の 16 α -OH-DHA, 16-diacetate-7-one (III) を単離し得た。本物質は UV(+), blue tetrazolium (B. T.) (-), mass spectra 及び NMR より 7-oxe 体

図 1 Synthesis of 16 α -OH-DHA-7-CMO-BSA



であることを確認した。これを希硫酸にて脱アセチル化し、純化してUV(+), B.T.(+), m.p.=221–223°C, IR, NMR, で確認した新規物質 16α -OH-DHA-7-one (IV) の結晶37.7mgを得た。次いでこれをメタノール溶液中で carboxymethylamine と反応させ¹⁶⁾, 16α -OH-DHA-7-(0-carboxymethyl)-oxime (V) 32mg, m.p.=190–193°Cを得た。本物質を炭酸無水物法にてBSAと結合させ¹²⁾, 純化し, 16α -OH-DHA-7-(0-carboxymethyl)-oxime BSA(VI) 107mgを得た。

2) 抗血清の作成

New Zealand 白兎に 16α -OH-DHA-7-(0-carboxymethyl)-oxime BSA (VI) 1mgを生食0.5mlとcomplete freunds adjuvant 0.5mlで乳濁したものを2～3週間の間隔で7回注射し, 4カ月目にBuster injection後, 10日目に採血した。

3) 抗 16α -OH- P_5 -3-succinate-BSA

P_5 の抗血清は 16α -OH- P_5 -3-succinate-BSAを用いたが, その詳細については既に報告がある¹⁸⁾。

II. 放射性ステロイド

NET-479, dehydroepiandrosterone, [$1,2$ - 3 H(N)] 58.6 Ci/m mol, NET-039, pregnenolone, [7 - 3 H(N)] 17.2 Ci/m mol, NET-121, dehydroepiandrosterone-7- 3 H(N) sulfate ammonium salt 30 Ci/m mol, NET-206 dehydroepiandrosterone-4- 14 C 57.5m Ci/m molは, 各々New England Nuclear社製のものを使用した。放射性 16α -OH-steroidsの作成は, streptomyces roseochromogenus(NRRL, B-1233)を用いて微生物変換法で行い, 各種クロマトにより純化・精製した¹⁶⁾。

III. 血中ステロイド値の測定

対象とした正常男子・女子及び正常妊娠例, 無脳児妊娠例(33～36週), 子宮内胎児死亡例(30～38週), 胎盤性 sulfatase 欠損症例(37～41週) fetal distress例より採血し, 血液サンプルは遠心分離して, 血清成分を得, 回収率補正用の 3 H steroids 1000cpmを加え, エタノールにて除蛋白した。これを窒素ガスにて蒸発乾固後, solvolysisを行い, 遊離型ステロイドとして抽出し, 次いで Benzen : Methanol=95 : 5を液相とした Sephadex

LH-20 column chromatographyにより 16α -OH-DHA及び 16α -OH- P_5 分画を分離し, RIAに供した。RIAは牧野の変法⁴⁾に従った。

IV. 培養実験

正常分娩後の胎盤及び中期中絶児より得た副腎を対象とした。胎盤は2倍量の0.25M, 副腎は0.33M蔗糖溶液でhomogenate後, 800g, 20分間遠沈した上清を酵素源とし, Tris buffer(pH=7.4)で37°C, O_2 : CO_2 =95 : 5の条件下で培養した。 14 C標識ステロイド(14 C- P_5 , 14 C- 16α -OH- P_5)0.05 μ Ci 2 μ gを基質とし, 0.4 μ molのNADとNADPH, 1 mg ATPを補酵素として添加し, 培養時間は2時間とした。5 mlのエタノールを加えて反応を停止させ, 更に蒸発乾固後, 水と酢酸エチルによる分配法で遊離型ステロイドを抽出した。 16α -OH- P_5 の場合には, ethylacetate : n-hexane : acetic acid=15 : 4 : 1を液相とする薄層クロマトグラフィー(T.L.C.)で, また P_5 の場合は, $CHCl_3$: ether=9 : 1のT.L.C.で代謝生成物の分離を行なった。放射性代謝物質の同定は再結晶法によった。

実験成績

I. 測定法に関する検討

1) 抗血清の特異性(表1, 2)

表1, 2に示す如く, 抗 16α -OH-DHA血清は, Δ^5 -androstene-3, 17diol, Δ^5 -androstene 3, 16, 17-triol, DHA, 16-keto- Δ^5 -androstenediolとは約10～50%の交叉反応を示すが, 16α -OH-testosterone, 16α -OH-4 androstene-3, 17-dione, estrogen, cortisol等とは交叉反応を示さなかつた。また抗 16α -OH- P_5 血清は, 16α -OH-progesterone, 17α -OH-progesterone, Pregnenolone等とは2～5%の交叉反応を示す以外, 他のステロイドとは殆ど交叉反応を示さなかつた。

2) Sephadex LH-20 column chromatographyの溶出パターン(図2)

Benzen : MeOH=95 : 5を液相とした場合の溶出パターンを図2に示した。 16α -OH-DHAは, 6～7 ml部分の合計2mlをpoolして得た。本システムにより, DHA, Δ^5 -androstetriol, pregnenolone分画とは分離できたが, Δ^5 -androstenediol,

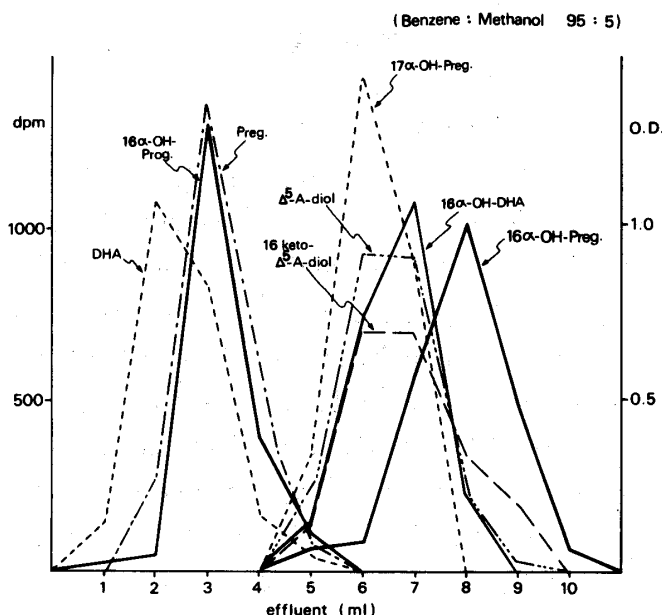
表1 Cross reaction with antiserum against 16 α -OH-DHA-7 (0-carboxymethyl) oxime-BSA

Steroids	Cross reaction (%)
16 α -OH-DHA	100
Δ^5 -Androstenetriol	53.25
Δ^5 -Androstenediol	32.50
DHA	22.25
16-keto- Δ^5 -Androstenediol	10.75
16 α -OH-Testosterone	3.50
16 α -OH- Δ^4 -Androstenedione	3.00
Δ^4 -Androstenedione	<0.10
Pregnenolone	<0.10
17 α -OH-Pregnenolone	<0.10
Progesterone	<0.10
17 α -OH-Progesterone	<0.10
Cortisol	<0.10
Cortisone	<0.10
Estrone	<0.10
Estradiol	<0.10
Estriol	<0.10
16-epi-Estriol	<0.10

表2 Cross reaction with antiserum against 16 α -OH-Pregnenolone-3-succinate-BSA

Steroids	Cross reaction (%)
16 α -OH-Pregnenolone	100
16 α -OH-Progesterone	5.00
17 α -OH-Progesterone	3.25
Pregnenolone	2.00
Δ^5 -Androstenediol	1.50
Cortisol	1.50
16 α -OH-DHA	1.33
Pregnenolone-sulfate	1.00
17 α -OH-Pregnenolone	1.00
16-epi-Estriol	1.00
16-keto- Δ^5 -Androstenediol	0.90
Estrone	0.90
16 α -OH- Δ^4 -Androstenedione	0.55
Δ^5 -Androstenediol	0.45
DHA-sulfate	<0.10
DHA	<0.10
Progesterone	<0.10
Cortisone	<0.10
16 α -OH-Testosterone	<0.10
Δ^4 -Androstenedione	<0.10
Estradiol	<0.10
Estriol	<0.10

図2 Elution pattern of steroids in sephadex LH-20 column



16keto- Δ^5 -androstenediol 分画の混入は除去できなかった。16 α -OH-P₅に関しては、8～9 ml 部分の合計 2 ml を pool した。本システムにより16 α -OH-P₅抗血清と交叉する16 α -OH-progesterone 等のステロイド分画は除去できた。

表3 Accuracy of the method as determined by recovery experiments

Steroid added (ng)	No.	mean $\pm$ SD (ng)	C.V. (%)	Recovery (%)
16 α -OH-DHA				
50	4	57.4 $\pm$ 3.8	6.52	115.3
100	5	100.8 $\pm$ 9.9	9.90	100.4
500	5	366.8 $\pm$ 49.1	13.39	73.4
16 α -OH-pregnenolone				
10	5	10.9 $\pm$ 0.6	5.12	109.0
100	6	102.4 $\pm$ 5.2	5.06	102.4
500	5	518.3 $\pm$ 32.2	6.21	103.6

3) solvolysis における回収率

^3H -DHA-S 又は ^3H -P₅-S を用いた solvolysis の回収実験での回収率は、各々 $86.58 \pm 8.17\%$ 、 $88.64 \pm 9.84\%$ (Mean $\pm$ S.D.) とほぼ一定であった。よって、測定値については加水分解による回収率補正は行なわなかった。

4) 精度 (表3)

蒸留水 1 ml に 50ng, 100ng, 及び 500ng の標準 16 α -OH-DHA あるいは 16 α -OH-P₅ を添加し、抽

表 4 Total 16 α -OH-steroid levels in peripheral blood

	16 α OH-DHA mean $\pm$ SD (n)	16 α OH-pregnenolone mean $\pm$ SD (n)
Non pregnant women	87.02 $\pm$ 33.09 (8)	7.59 $\pm$ 1.79(8)
Men	98.01 $\pm$ 39.15 (6)	6.67 $\pm$ 2.75(6)
Pregnancy I (~15W)	115.97 $\pm$ 14.47 (8)	16.97 $\pm$ 11.68(8)
Pregnancy II (16~27W)	130.73 $\pm$ 15.00 (8)	28.31 $\pm$ 13.94(8)
Pregnancy III (28~ W)	206.14 $\pm$ 41.90 (6)	35.62 $\pm$ 14.90(6)

Figures are expressed as ng/ml

Statistically significant

1) 16 α OH-DHA

p<0.05 non pregnant women vs pregnancy I

p<0.001 pregnancy I vs pregnancy III

p<0.001 pregnancy II vs pregnancy III

2) 16 α OH-pregnenolone

p<0.05 non pregnant women vs pregnancy I

p<0.05 pregnancy I vs pregnancy III

表 5 Total 16 α -OH-steroid levels in maternal and umbilical blood

	Maternal vein Mean $\pm$ SD (n)	Umbilical artery Mean $\pm$ SD (n)	Umbilical vein Mean $\pm$ SD (n)
16 α OH-DHA			
1) Normal delivery	195 $\pm$ 61(9)	2,820 $\pm$ 701(9)	2,075 $\pm$ 715(9)
2) Fetal distress	190 $\pm$ 15(4)	1,980 $\pm$ 713(4)*	2,468 $\pm$ 345(3)**
3) Anencephaly	139 $\pm$ 42(8)*	445 $\pm$ 262(2)***	395 $\pm$ 147(3)***
4) Intra-uterine fetal death	155 $\pm$ 46(9)**		
5) Placental sulfatase deficiency	374 $\pm$ 130(3)*		17,426 $\pm$ 20,710(3)
16 α OH-pregnenolone			
1) Normal delivery	48.6 $\pm$ 17.3(9)	635.5 $\pm$ 158.7(9)	469.7 $\pm$ 124.6(9)
2) Fetal distress	30.1 $\pm$ 8.2 (5)***	541.0 $\pm$ 138.9(5)*	470.5 $\pm$ 198.7(5)
3) Anencephaly	27.8 $\pm$ 7.9(7)**	116.9 $\pm$ 33.3(2)***	75.0 $\pm$ 37.0(4)***
4) Intra-uterine fetal death	18.9 $\pm$ 8.6(10)***		
5) Placental sulfatase deficiency	268 $\pm$ 223 (2)	1,564 (1)	1,293 $\pm$ 392(2)*

Figures are expressed as ng/ml

Statistically significant: * p<0.05 vs normal delivery

** p<0.01 "

*** p<0.001 "

Weeks of gestation 1) 38~42, 2) 38~41, 3) 33~36, 4) 30~38, 5) 37~39

出分離操作を行って RIA 法で測定して精度を検した(表 3). 16 α -OH-DHA では500ng 添加時の変動係数が, 13.4%とやや高値を示したが, 他は変動係数及び回収率は満足すべき成績であった. Water blank 値は, 16 α -OH-DHA では100pg/ml 以下, 16 α -OH-P_sでは50pg/ml 以下と低値であった.

II. 母体-胎児系の血中16 α OH-DHA 値及び16 α OH-P_s値(表 4, 5)

1) 正常妊婦血中ステロイド値

表 4 の如く, 対照の正常男子と黄体期女子との血中ステロイド値には有意差はなく, 妊娠により

両ステロイド値は明らかに上昇する. 16 α -OH-DHA 値は非妊娠時(87.02 $\pm$ 33.09ng/ml)に比べ, 妊娠前期では有意の増加を認め(p<0.05), 妊娠の進行とともに上昇して, 末期には206.14 $\pm$ 41.90 ng/ml に達し, 妊娠前期と後期, 並びに妊娠中期と後期との間にも有意の増加を認めた(p<0.001). また, 16 α -OH-P_sも非妊娠時の7.59 $\pm$ 1.79ng/ml に比べて妊娠末期には35.62 $\pm$ 14.90 ng/ml と著増し, 非妊娠時と妊娠前期, 妊娠前期と後期との間に有意の増加を認めた(p<0.05). 即ち, 母体血中16 α -OH-DHA 値及び16 α -OH-P_s値は, 共に妊娠経過に従って推計学的に明らかに

増量する。

2) 正常胎児並びに母体血中ステロイド値

正常分娩例9例における、母体末梢血・臍帯動脈血・臍帯静脈血中値を表5に示した。両ステロイド共、母体血に比べて胎児血では10倍以上の高値を示し、且つ臍帯動脈血中値が臍帯静脈血中値に比し有意の高値を示し ($p < 0.05$)、両ステロイドが胎児に由来することが示唆された。

3) 異常妊娠・分娩例の母体並びに胎児血中ステロイド値

① 血中ステロイド値

正常分娩例との比較を表5に示した。i) fetal distress 例 (Apgar score 7以下) では、母体末梢血中値及び臍帯動脈血中値とも低値傾向を示し、臍帯動脈血中16 α -OH-DHA 値、母体末梢血中及び臍帯動脈血中16 α -OH-P₅値は正常例に比し有意の低値を示した ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。しかし、臍帯静脈血中16 α -OH-DHA 値は逆に、正常例に比し有意に高値であり、16 α -OH-P₅値には差は認められなかった。ii) 無脳児妊娠例では、各値共著明な有意の低値を示した。iii) 子宮内胎児死亡例では、母体末梢血中16 α -OH-DHA 及び16 α -OH-P₅値は正常例に比べ、有意に低値を示し ($p < 0.01$, $p < 0.001$)、両ステロイドの産生源が主として胎児であることが示唆された。iv) 胎児性

sulfatase 欠損症では、16 α -OH-DHA 値は、母体末梢血中値及び臍帯動脈血中値とも極端な高値を示し、16 α -OH-P₅値も明らかに高値であつた。

② 母体末梢血中16 α -OH-DHA 値と16 α -OH-P₅値との相関

無脳児妊娠例における両ステロイド値の相関を正常例を対照として図3に示した。正常妊娠例においては両ステロイド値に有意の正の相関がみられたが (相関係数 $r = 0.8846$, $p < 0.001$)、無脳児妊娠例においては両ステロイドは共に低値ではあつたが両者の間に相関は認められず ($r = 0.0099$)、16 α -OH-DHA 値が同様の低値でも16 α -OH-P₅値は、症例により低値からかなりの高値を示している。このことは両16 α -OH-steroids の生成機構が異なることを暗示している。

III. 胎児副腎並びに胎盤の培養実験 (図4)

1) ¹⁴C-P₅を基質とした場合、図4左カラムの如く、胎児副腎では17 α -OH-P₅, DHA の生成が認められ、強い17 α -hydroxylase, C₁₇₋₂₀ lyase 活性の存在が示された。一方胎盤では、P₅からは progesterone (P₄) のみが生成され、他の代謝物は殆ど認められず、17 α -hydroxylase 及び C₁₇₋₂₀ lyase の欠損と強力な Δ^5 -3 β -hydroxylase 活性の存在が示された。

2) ¹⁴C-16 α -OH-P₅を基質とした場合、図4右

図3 Correlation of steroid levels in maternal blood

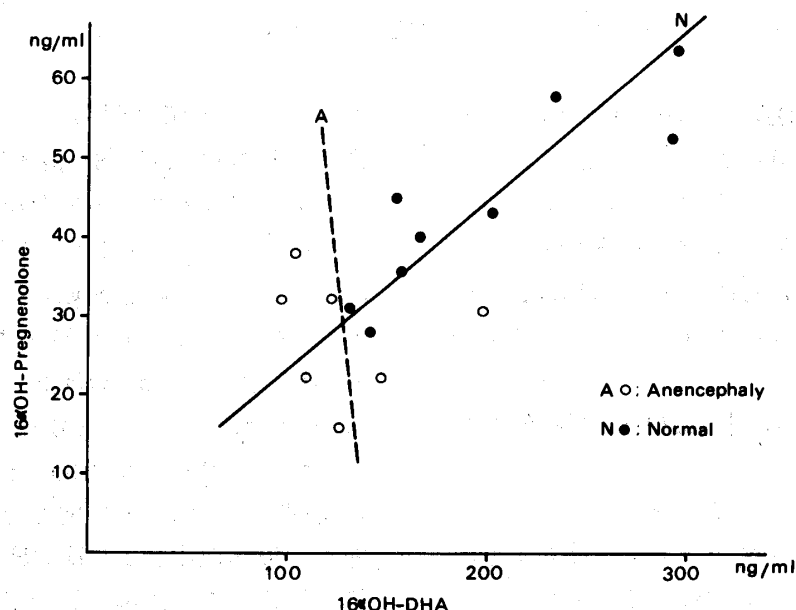


図4 Conversion of Pregnenolone and 16α -OH-Pregnenolone in placenta and fetal adrenal

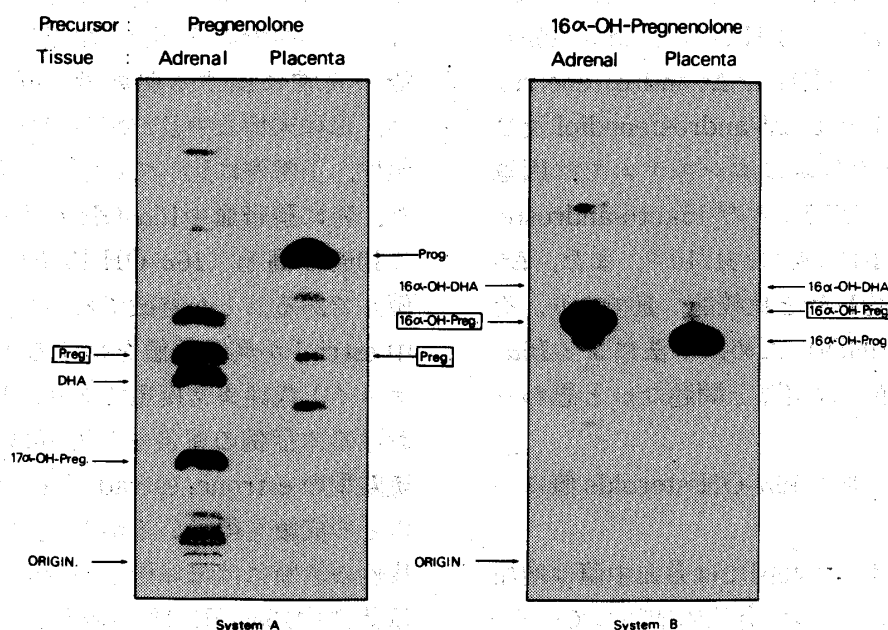


表6 Radiochemical purity of the metabolites from Pregnenolone and 16α -OH-Pregnenolone in human placenta

Metabolites	Original	Crystallization			
		X-1	X-2	X-3	ML
Progesterone	664.7	630.2	634.6	629.4	626.7
16α -OH-Progesterone	714.2	705.7	709.3	709.2	703.3

Specific activities are determined as dpm/mg

カラムの如く, P_5 を基質とした場合と異なり, 胎児副腎では 16α -OH-DHA等には代謝されず, 殆ど 16α -OH- P_5 のままの形であった。一方胎盤では, すみやかな 16α -OH- P_4 への転換が認められた。

これらの生成された放射性代謝物の同定は, 標準物質を加えての再結晶法により確認した。表6は胎盤での代謝物である P_4 及び 16α -OH- P_4 の成績で, 各段階における specific activity は一致している。

以上の成績は, 胎児血中に著増する 16α -OH- P_5 (胎児肝に主に由来する) は同じく著増する 16α -OH-DHA の precursor とはなり得ないことを示唆しており, 母体血中両ステロイドには生成機構上相違があることを示している。

考 案

妊娠経過に従って分娩に至るまで estriol の分泌は著しく増加してゆく。この産生源はいうまでもなく胎児胎盤系であり, この estriol の動態は, 胎児胎盤機能を反映することから, 一般臨床に広く用いられている。一方, 胎盤性 estriol の前駆物質と目される 16α -OH-steroids は, 主に胎児で産生されることが知られており, その値は estriol とは別に, 胎児自体のステロイド生成機能を表わすものと考えられているが, その詳細については不明の点が多い。

1) 新しい 16α -OH-DHA の測定法について

今回我々は, 新たに新規物質 16α -OH-DHA-7 (O-carboxymethyl) -oxime-BSA を合成し, 16α -OH-DHA の RIA 測定用の抗血清を作成した。

本抗血清は妊娠性の androgen と約10~50%の交叉反応を示すため、純化・分離操作が必要となる。我々の用いた Sephadex LH-20 column chromatography により、DHA, Δ^5 -androstetriol は分離できるが、16keto- Δ^5 -androstenediol 及び Δ^5 -androstenediol の分離は本システムでは困難であつた。しかし、臍帯血中の 16keto-androstenediol は 16 α -OH-DHA の約1/10¹⁴⁾、また、 Δ^5 -androstenediol も約1/4²⁾と比較的少量であり、その交叉反応も比較的弱いから、本法による16 α -OH-DHA の測定値には実際上問題ないと思われる。

2) 妊婦及び胎児血中16 α -OH-steroids 値について

対象の非妊婦に比べて妊婦では各血中値は増加し、更に妊娠の進行に伴って有意に増加している。このことはこれらのステロイドの主なる基源が、いずれも母体側ではなく、妊娠と共に成長発育する胎児側で産生されていることを暗示している。

i) 異常妊娠例のうち、胎児異常に属する無脳児妊娠例では両ステロイド値は母体末梢血中値及び臍帯動脈血中値とも著しく低値を示し、特に臍帯血中 16 α -OH-steroids 値の著明な低値は、本症では胎児副腎の萎縮により両ステロイドの前駆物質の供給が断たれていることを暗示している。また、子宮内胎児死亡例での母体末梢血中両ステロイド値も明らかに低く、特に16 α -OH-P₅値は正常例の1/3程に著減しており、推計学的有意差がある。しかしながら、無脳児妊娠例及び子宮内胎児死亡例においても、非妊時の両ステロイドより高値であり、母体の関与も否定できない。今回の子宮内胎児死亡例における胎児の死亡時期が不明であることから、死亡日数とステロイド値との関連は明確でない。ii) fetal distress 例において、16 α -OH-DHA 値及び16 α -OH-P₅値は、正常例に比し臍帯動脈血中値は有意に低値を示した。このことは臍帯動脈血中のこれらのステロイドの胎児側における産生が低下することを意味する。一方今回の実験において、臍帯静脈血中の16 α -OH-DHA 値が正常例に比し有意な高値を示したが、このことは子宮一胎盤血流量の減少か、胎盤機能低下等によ

つて、本ステロイドが estriol 等に転換されずに臍帯静脈血中に還流されるとも考えられるが、その詳細は不明である。iii) 胎児付属物である胎盤機能の異常に属する胎盤性 sulfatase 欠損症例では、母体末梢血中及び臍帯静脈血中両ステロイド値は、正常例に比べていずれも異常な高値を示した。特に臍帯血中16 α -OH-DHA 値は正常例のほぼ10倍の高値(16 α -OH-P₅値は約2~3倍の高値)であることが特徴であつた。本症例は母体尿中 estriol が異常低値を呈する極めて稀な胎盤ステロイド代謝異常疾患であり、我々は既に本邦における本症例の報告をし⁸⁾、母体血中抱合型及び遊離型の estrone, estradiol, estriol 共に低値であるとの成績を得ているが⁹⁾、更に本実験により、本症例の診断には母体尿中 estriol 測定とあわせて、母体血中16 α -OH- Δ^5 -steroids 値の定量が有用であることが示された。なお、本症ではこれらステロイド以外に16 β -OH-DHA 16keto- Δ^5 -androstenediol, Δ^5 -androstetriol 等の Δ^5 -steroids の母体末梢血中値も高値であることが報告されている²⁰⁾²¹⁾。

3) 妊娠時の両16 α -OH-steroids の生成機構について

i) 母体末梢血中における16 α -OH-DHA 値と16 α -OH-P₅値との相関を求めると、正常妊娠では両値の間に有意な相関が認められたが、胎児副腎の萎縮した無脳児妊娠例においては相関がなかつたとの成績は、この両ステロイドの生成に胎児副腎が関与していること及びその生成機序に違いがあることを暗示している。

ii) In vitro における胎児副腎及び胎盤の培養実験で、P₅を基質とした場合には、胎児副腎では17 α -hydroxylase, C₁₇₋₂₀ lyase 活性によつてDHA が産生されたのに対し、16 α -OH-P₅を基質とした場合には、他のステロイドへの転換が認められなかつた。16 α -OH-P₅は主にP₅を前駆物質として胎児肝で生成されるが⁹⁾、その16 α -OH-P₅は胎児副腎で酵素活性を受けることなく、胎盤に移行されるものと考えられる。一方胎盤においては、P₅及び16 α -OH-P₅は3 β -HSD 活性を受けて、P₄及び16 α -OH-P₄に転換されるが、その他の代謝物質

は認められなかつた。なお、 16α -OH-DHA 及び DHA を基質とした場合には、胎盤では 3β -HSD, aromatizing enzyme 活性を受けて効率よく estrogen に転換されることが報告されている。

iii) 両 16α -OH-steroids の precursor としての P_5 は主に胎児副腎で作られることが知られており、妊娠中に著増する母体血中両ステロイド値が、無脳児妊娠例や子宮内胎児死亡例では共に著減するとの今回の成績は両 16α -OH-steroids の precursor は主に胎児に由来することを暗示している。一方上述 i) の如く、両 16α -OH-steroids 値は無脳児妊婦血中ではいずれも著減するが、正常妊婦では母体血中両 16α -OH-steroids 値には正の相関があるのに無脳児妊娠例では相関がなく、 16α -OH-DHA が同様の低値でも 16α -OH- P_5 値は症例により高或いは低値を示すこの成績は、 16α -OH- P_5 の precursor である P_5 の origin に関しては胎児副腎以外に母体副腎も考慮にいれる必要のあることを推測させる。更に、ii) の如く胎児一副腎系では 16α -OH- P_5 は 16α -OH-DHA の precursor とはなり難く、母体血中両ステロイドの生成機構が異なるとの成績並びに i) の成績とを考えると、母体血中両ステロイド値が胎盤機能の指標となり得ることは確かであるが、測定値の細かい意味付けに関しては全く同一の基準では処理できないことを示している。

なお両 16α -OH-steroids のうち、 16α -OH-DHA が胎盤性 estriol の主要 precursor としての意義をもつことは知られているが、 16α -OH- P_5 の生理的意義に関しては、今回は胎盤で容易に 16α -OH- P_4 に転換されるとの成績が得られているだけであつて、今後の検討を要する。

本論文要旨は、第49回、第50回日本内分泌学会総会、第6回アジアオセアニア内分泌学会にて発表した。

文 献

1. 古屋清英, 沢田昌夫, 吉田孝雄, 高木繁夫, 神戸川明, 山下春雄, 黒沢雄一郎, 内藤 敦: 16α -OH-DHA ならびに 16α -OH-DHA-sulfate の Radioimmunoassay. ホと臨, 24: 245, 1976.
2. 平戸久美子, 樋口和海, 郡山とも子, 矢内原巧, 中山徹也, 神戸川明: 妊娠中における Δ^5 -androstenediol とその意義. 第51回日本内分泌学会総合講演 (未発表).

3. 春山 登: 胎児・新生児の血中 16α -hydroxy steroids 動態に関する研究. 日産婦誌, 32: 653, 1980.
4. 牧野拓雄: 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. 日内分泌誌, 49: 629, 1973.
5. 松橋一雄: DHEA-17-oxime-BSA 抗体による妊婦血中 16α -OH-DHEA の Radioimmunoassay. 日産婦誌, 27: 1205, 1975.
6. 桜井 洋, 樋口和海, 鈴木とも子, 平戸久美子, 松橋一雄, 矢内原巧, 中山徹也, 飯田 貢: ヒト胎盤における 16α -OH-steroids の代謝—steroid 生成酵素の基質特異性について. 日産婦誌, 31: 1771, 1979.
7. 瀬尾文洋, 鈴木秀宣, 上原一浩, 矢内原巧, 中山徹也: 妊娠中の血中遊離型および抱合型 estrogen の動態. 日産婦誌, 32: 1089, 1980.
8. 矢内原巧, 高山照雄, 斉藤 裕, 平戸久美子, 中山徹也, 福島安義, 堀口雅子, 石原 力, 高橋亨正, 田部井徹: 胎盤性 sulfatase 欠損症の二例. 日産婦誌, 31: 361, 1979.
9. 矢内原巧, 郡山とも子, 佐藤直樹, 吉田信隆, 沖永荘一, 荒井 清: 胎児肝組織の 16α -hydroxylase 活性に及ぼす各種ステロイドの影響. 日産婦誌, 29: 1, 1977.
10. Arai, K., Kuwabara, Y., Kihara, K., Okinaga, S. and Sakamoto, S.: Steroid hormone levels in human fetal blood during delivery. Am. J. Obstet. Gynecol., 114: 812, 1972.
11. Colás, A., Heinrichs, W.L. and Tatum H.J.: Pettenkofer chromogens in the maternal and fetal circulations: Detection of 3β , 16α -dehydroxyandrost-5-en-17-one in the umbilical cord blood. Steroids, 3: 417, 1964.
12. Erlanger, B.F., Borlk, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S.: Steroid-Protein conjugates. I preparation and characterization of conjugates of human serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem., 228: 712, 1959.
13. Iida, M., Matsushashi, K. and Nakayama, T.: Microbial oxidation of dehydroepiandrosterone and related compounds. Zeitschrift Alleg. Mikrobiologie, 15: 181, 1975.
14. Laatikainen, T., Peltonen, J. and Nylander, P.: Determination of estriol, estriol sulfate, progesterone and neutral steroids mousand disulfates in umbilical cord blood plasma. Steroids, 21: 347, 1973.
15. Magendantz, H.G. and Ryan, K.J.: Isolation of an estriol precursor, 16 -hydroxydehydroepiandrosterone, from human umbilical sera. J.Clin. Endocr., 24: 1155, 1964.
16. Rosenfeld, R.S., Reosenberg, B., Kream, J. and

- Hellman, L.* : Preparation of some C₁₉ steroid-protein conjugates. *Steroids*, 21 : 723, 1973.
17. *Ryan, K.J.* : Metabolism of C-16-oxygenated steroids by human placenta : the formation of estriol. *J. Biol. Chem.*, 234 : 2006, 1959.
18. *Shibusawa, H., Sano, Y., Yamamoto, T., Kanbe-gawa, A., Ohkawa, T., Satoh, N., Okinaga, S. and Arai, K.* : A radioimmunoassay of serum 16-hydroxy pregnenolone with specific antiserum. *Endocrinologica Japonica*, 25 : 185, 1978.
19. *Shindler, A.E. and Sparke, H.* : Steroids in umbilical cord plasma from normal term deliveries. *Endokrinologie*, 65 : 1, 1975.
20. *Tabei, T. and Heinrichs, W.L.* : Diagnosis of placental sulfatase deficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 124 : 409, 1976.
21. *Taylor, N.F. and Schackleton, C.H.L.* : Gas chromatographic steroid analysis for diagnosis of placental sulfatase deficiency : A study of nine patients. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 49 : 78, 1979.

(No. 4976 昭56・10・8 受付)