

## 16 $\alpha$ -hydroxyestrone の RIA とその妊娠, 分娩時の動態

帝京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 荒井 清教授)

池 下 久 弥

### Studies on RIA of 16 $\alpha$ -hydroxyestrone and its Clinical Application

Hisaya IKESHITA

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

(Director : Prof. Kiyoshi Arai)

**概要** 16 $\alpha$ -hydroxyestrone (16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>) は, estriol にいたる重要な中間代謝産物である。しかし, 生体内の本ステロイドを測定する方法が確立されていなかったため, その動態は不明で, 臨床的意義も十分解明されていない。今回, 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> に特異的な radioimmunoassay (RIA) 法を開発してその実用性を検討し, 興味ある臨床データを得たのでここに報告する。

**方法** : 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-CME-BSA で, 家兎に免疫し抗血清を作った。16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H は, estrone-<sup>3</sup>H を NADPH 加胎児肝臓組織ホモジネートと incubate し生合成した。妊婦母体末梢血, 臍帯動脈血および羊水を検体として採取した。各々の, plasma および羊水上清に, トレーサーとして 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H を 1,000dpm 加えエーテル抽出後, TLC および LH-20 で分離, 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> の分画を集め, 回収率補正後, 残りで RIA を行つた。

**成績** : 妊婦母体末梢血中濃度は, 妊娠12週未満で  $0.98 \pm 0.07$  (平均値  $\pm$  S.E.) ng/ml, 妊娠12週から24週未満で  $2.42 \pm 0.30$  ng/ml, 妊娠24週から37週未満で  $4.76 \pm 0.42$  ng/ml, 妊娠37週以降  $5.49 \pm 0.98$  ng/ml であり妊娠12週未満に比し, 中期以降は有意に高値を示した。正常分娩中の母体末梢血値は, 分娩第1期  $5.48 \pm 0.59$  ng/ml, 分娩第2期  $4.63 \pm 0.53$  ng/ml であつた。また臍帯動脈血  $13.63 \pm 1.98$  ng/ml, 臍帯静脈血  $15.88 \pm 1.77$  ng/ml, 羊水  $8.44 \pm 1.85$  ng/ml であつた。胎児仮死例の本ステロイド値は, 母体末梢血分娩第1期  $4.60 \pm 0.96$  ng/ml, 同第2期  $4.65 \pm 1.14$  ng/ml, 臍帯動脈血  $6.75 \pm 1.37$  ng/ml, 臍帯静脈血  $7.52 \pm 1.46$  ng/ml, 羊水  $8.11 \pm 3.13$  ng/ml であつた。無脳児例では, 母体末梢血分娩第1期  $0.79 \pm 0.07$  ng/ml, 同第2期  $1.39 \pm 0.46$  ng/ml, 臍帯動脈血  $5.60 \pm 3.20$  ng/ml, 臍帯静脈血  $1.25 \pm 0.28$  ng/ml, 羊水  $0.58 \pm 0.04$  ng/ml であつた。臍帯動脈血中濃度は, 正常分娩例に比し, 胎児仮死例, 無脳児例で有意に低値を示した。16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> は胎児・胎盤側分泌が主で, 胎児予後を反映することが推察された。

**Synopsis** 16 $\alpha$ -hydroxyestrone (16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>) is an important intermediary metabolite in the biosynthetic pathway leading to estriol. No established routine method has been published to measure this steroid in the organism. A new RIA 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> method was developed and by using this method some interesting clinical data were obtained.

**Method** : Rabbits were immunized with 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-CME-BSA to produce its antiserum. 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H was synthesized by incubating estrone-<sup>3</sup>H with the human fetal liver preparation and NADPH. As samples, peripheral blood of pregnant women, umbilical artery blood (UA), umbilical vein blood (UV) and amniotic fluid were collected. To each sample, 1000 dpm of 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>H was added as a tracer, extracted with ether, and the extract was separated on TLC and LH-20. The 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> fraction was collected and used for RIA.

**Results** : The 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> levels (ng/ml) in peripheral maternal blood of normal gestation before 11 weeks, 12—23 weeks, 24—36 weeks and after 37 weeks were  $0.98 \pm 0.07$  (mean  $\pm$  S.E.),  $2.42 \pm 0.30$ ,  $4.76 \pm 0.42$  and  $5.49 \pm 0.98$ , respectively. A significant increase in the steroid titer was observed as gestational weeks advanced.

The steroid concentrations of the maternal blood during the 1st and 2nd stages of labor, those of UA, UV and amniotic fluid were  $5.48 \pm 0.59$ ,  $4.63 \pm 0.53$ ,  $13.63 \pm 1.98$ ,  $15.88 \pm 1.77$  and  $8.44 \pm 1.85$ , respectively, in normal delivery, whereas they were  $4.60 \pm 0.96$ ,  $4.65 \pm 1.14$ ,  $6.75 \pm 1.37$ ,  $7.52 \pm 1.46$ , and  $8.11 \pm 3.13$ , respectively, in cases with fetal distress. In anencephalic pregnancy, these values were  $0.79 \pm 0.07$ ,  $1.39 \pm 0.46$ ,  $5.60 \pm 3.20$ ,  $1.25 \pm 0.28$  and  $0.58 \pm 0.04$ , respectively. The 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> levels were significantly depressed in cases with fetal distress and anencephalus, as compared to the normal controls. The clinical significance of this steroid was

discussed.

**Key words:** 16 $\alpha$ -hydroxyestrone • Radioimmunoassay • Pregnancy • Labor

## 緒 言

胎児胎盤系において生合成、代謝されるステロイドホルモンの中で量的に最も多く、かつ胎児予後との相関があるとされている estriol ( $E_3$ ) を中心に、多数の研究発表がある。しかし、 $E_3$  の生理的意義については、必ずしもその全貌が明らかになつたとは言えない。Brown and Marrian<sup>8)</sup> は、estrone ( $E_1$ ) の16 $\alpha$  位の hydroxylation が、代謝の主経路の一つで、 $E_3$  にいたる中間代謝物質として、16 $\alpha$ -OH- $E_1$  を位置づけた。

ところで、妊娠中の  $E_3$  へのステロイド生合成経路はさらに複雑である。すなわち胎児副腎で作られた dehydroepiandrosterone (DHA) —sulfate は胎児肝臓の16 $\alpha$ -hydroxylase で16 $\alpha$ -OH-DHA-sulfate に転換され、さらにこれが胎盤で酵素水解を受けて16 $\alpha$ -OH-DHA となり、つぎに  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) と  $\Delta^4$ -5 isomerase により16 $\alpha$ -OH-androstenedione となる。これは aromatase によつて16 $\alpha$ -OH- $E_1$  となり、さらに17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase によつて最終産物である  $E_3$  が出来る。

さて、 $E_3$  がかりに終末代謝産物であつても、中間代謝物質に何らかの生理的意義を見出す可能性がある。事実、 $E_3$  の直前の中間代謝産物である16 $\alpha$ -OH- $E_1$  は、Fishman et al.<sup>10)</sup> の実験で向子宮作用が強いことが知られている。この16 $\alpha$ -OH- $E_1$  は、中間代謝産物として上記の通り重要な位置にあるが、特異的測定方法が確立されていなかったため、生体内の動態に関する研究は未だ少ない<sup>12)</sup>。今回、16 $\alpha$ -OH- $E_1$  の RIA 法を確立し、妊娠、分娩時の動態および他のステロイドとの相関を検討したので報告する。

## 対象および方法

### 1. 対象

妊娠5週より40週までの正常妊婦(148例)、正常経産分娩例(71例)、胎児仮死と診断され出産1分後 apgar's score が7点以下であつた新生児仮死例(31例)、および無脳児分娩例(3例)の母体末梢血、臍帯動静脈血および羊水を採取した。

### 2. 実験試薬ならびに器機

#### 1) 放射性ステロイド

2,4,6,7-<sup>3</sup>H- $E_1$  (Lot No 1227—095; s.a. 114.0 Ci/mmol)

1,2-<sup>3</sup>H-DHA (Lot No 500—147; s.a. 58.6 Ci/mmol)

2,4,6,7-<sup>3</sup>H- $E_3$  (Lot No 998—042; s.a. 85 Ci/mmol)

三者共に New England Nuclear 製

#### 2) 非放射性ステロイド

16 $\alpha$ -OH- $E_1$ : Steraloids 製

$E_1$ : Sigma Chemical Corp 製

16 $\alpha$ -OH-DHA: Sigma Chemical Corp 製

$E_3$ : Merck 製

#### 3) 試薬(有機溶媒類は特級を使用)

シクロヘキサン、n-ヘキサン、ベンゼン、メタノール、エチルエーテル、酢酸、酢酸エチル、クロロホルム、ピリジン、無水コハク酸、トルエン、ブROM 酢酸エチル、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ジアスターゼ、トリ-n-ブチルアミン、イソブチルクロロ蟻酸、エチレンジアミン—4—酢酸(EDTA)、NADPH: 関東化学製

プロペニールアセテート、メタクロロ過安息香酸: 半井化学薬品製

Bovine serum albumin; Crystalline fraction V (BSA): Sigma Chemical Corp 製

Bovine gamma globulin, fraction II: Miles Laboratory Incorporation 製

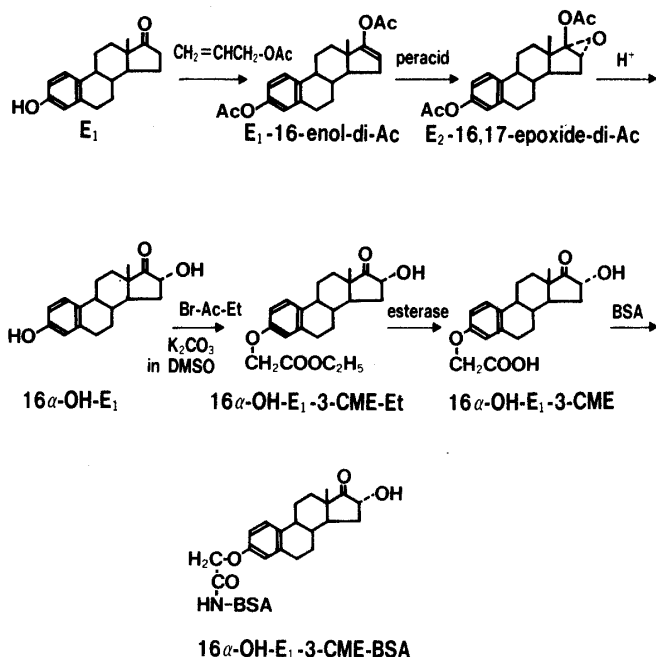
0.05M borate assay buffer: 0.05M borate buffer に、BSA を0.06%, bovine gamma globulin fraction II を0.05%の割合で加えて、pH8.0に調整した。

Complete Freund's adjuvant: Difco Laboratory 製

トルエンシンチレーター: POPOP 53mg, PPO 4.2g をトルエン1000ml に溶解した。

Sephadex LH-20: Pharmacia Fine Chemicals 製

#### 4) 器機

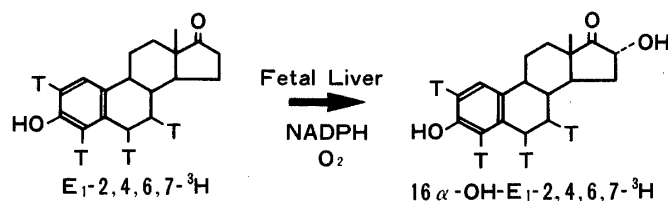
図1 Synthesis of the antigen for 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>

液体シンチレーションカウンター：ALOKA LSC-903型を使用し試料の測定は10分間行つた。<sup>3</sup>Hの測定効率48%で、back groundは25dpmであつた。

### 3. 抗原の合成と抗血清の作製

抗原の合成は、16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>が少量しか入手できなかったため、図1に示すごとくE<sub>1</sub>から合成した。すなわちE<sub>1</sub> 10gをプロペニールアセテート80mlに溶解、触媒として硫酸5滴を加えhot plate上で3時間加熱してE<sub>1</sub>-16-enol diacetateとし、シリカゲルクロマトで精製した。これをクロロホルムに溶かし、メタクロロ過安息香酸を加え、室温一夜反応後エーテル抽出して16,17-epoxideとし、さらにメタノール溶液中に希硫酸を加えて水解し16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>を得た。これをDMSOに溶かし、プロム酢酸エチルと反応させ16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-ethoxycarbonyl methyl etherを合成し、さらに酵素で水解して、16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-carboxymethyl ether(16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-CME)を得た。さらにこれをmixed anhydride法でBSAと結合させ16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-CME-BSAを作製し、これを抗体作製用抗原とした。

この16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-3-CME-BSA 1mgを生食0.5mlに溶かし、Complete Freund's adjuvant 1.5ml

図2 Synthesis of 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-2,4,6,7-<sup>3</sup>H

を加えて乳化したものを、家兎に月1回免疫して、5ヵ月後に最高力価の抗血清を得た。

この抗血清を0.05M borate assay bufferで1:20,000に希釈して用いた(希釈液は作製後冷蔵保存し、1週間以内に使用)。

4. 16 $\alpha$ -OH-DHAおよびE<sub>3</sub>の抗血清について  
16 $\alpha$ -OH-DHA-3-succinate-BSAおよびE<sub>3</sub>-6-carboxymethyloxime-BSAを抗原とした抗血清を用いた<sup>1)2)</sup>。

### 5. 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>Hの合成

図2に示すごとく16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>Hは、2,4,6,7-<sup>3</sup>H-E<sub>1</sub>を、胎児肝臓のマイクロゾーム分画とNADPHでincubateして生合成し、薄層クロマトグラフィーで分離精製した。なお、これは標準物質と混じて再結晶を反復、比放射能が一定であることを確認した。

### 6. 測定方法

#### 1) 検体

検体の血液および羊水は、採取後ただちにEDTAを加えて混和し、冷却遠沈してPlasmaないし上清を用いた。検体の0.05~1.0mlを用い、1ml以下の場合は水を加えて1mlとした。測定は必ずduplicateで行つた。

#### 2) 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>のRIA

##### i) 抽出と分離

検体に回収率算定のため16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>-<sup>3</sup>Hを1,000dpm添加し、5倍量のエチル・エーテルを加えて混和後、ドライアイス加アセトン液につけ、検体部分を凍結させエーテル層を別の試験管に移して水洗後窒素ガスで蒸発乾固させた。残渣をSephadex LH-20(溶媒系~n-ヘキサン:ベンゼン:メタノール=6:2:2)および薄層クロマトグラフィー(溶媒系~シクロヘキサン:酢酸エチル:酢酸=1:1:0.1)で分離後、16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>

分画を集めた。この半量を回収率算定用に供し、残り半量で RIA を行つた。

## ii) RIA

測定用試験管(7×50mm, ガラス, シリコン処理)に集めた上述の試料に,  $16\alpha$ -OH- $E_1$ - $^3H$  を 10,000dpm 加えた後, 溶媒を蒸発乾固し, これに抗血清液0.3ml を加えて Vortex 上で十分混和後室温で30分間 incubate した。次に飽和硫酸アンモニウム液0.3ml を加えて混和, 10分間放置後, 10分間 4℃, 800×g で遠心し Bound と Free に分離した。その上清(free fraction)を0.3ml とり, 10ml のトルエンシンチレーターを加えて十分混和後液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

## 7. $16\alpha$ -OH-DHA の RIA

$16\alpha$ -OH-DHA- $^3H$  の合成は $1,2$ - $^3H$ -DHA を胎児肝臓のマイクロゾーム分画と NADPH で incubate した後, 薄層クロマトグラフィーで分離精製した。なお, 標準物質と再結晶を反復, 比放射能が一定であることを確認した。回収率算定用に,  $16\alpha$ -OH-DHA- $^3H$  1,000dpm を資料に添加し, 5 倍量のエチル・エーテルを加えて十分混和後, ドライアイス加アセトン液につけ, 検体部分を凍結させエーテル層を別の試験管に移し, 水洗後蒸発乾固させた。残渣を薄層クロマトグラフィー(溶媒系〜シクロヘキサン:酢酸エチル:酢酸=1:1:0.1)で展開後,  $16\alpha$ -OH-DHA 部分を溶出し, 測定用試験管に集めた。その半量を回収率算定用に供し, 残り半量に $16\alpha$ -OH-DHA- $^3H$  を10,000dpm加え溶媒を蒸発乾固した。これに抗 $16\alpha$ -OH-DHA 血清を0.05M borate assay buffer( $16\alpha$ -OH- $E_1$ と同様)で, 20,000倍に希釈した液0.3ml を加えて Vortex 上で十分混和後室温で30分間 incubate した。次に, 飽和硫酸アンモニウム液0.3ml を加えて混和, 10分間放置後10分間遠心分離して, Bound と Free に分離した。その上清(free fraction) 0.3ml をとり, 10ml のトルエンシンチレーターを加えて放射能を測定した。

## 8. $E_3$ の RIA

検体(0.02~0.1ml)に, 回収率算定用の  $E_3$ - $^3H$  を1,000dpm 添加し, 2ml のエーテルで抽出後,

LH-20(溶媒系〜ベンゼン:メタノール=85:15)で  $E_3$  部分を分離し, RIA に供した。

## 9. 検定法

結果の有意差検定は Student t-test によつた。また, RIA の結果は Rodbard and Faden<sup>18)</sup>に従つて統計処理した。

## 結 果

### 1. 本法の感度, 特異性, および精度

抗血清は20,000倍希釈で, 0.05~1ng の範囲の  $16\alpha$ -OH- $E_1$  を測定出来た。

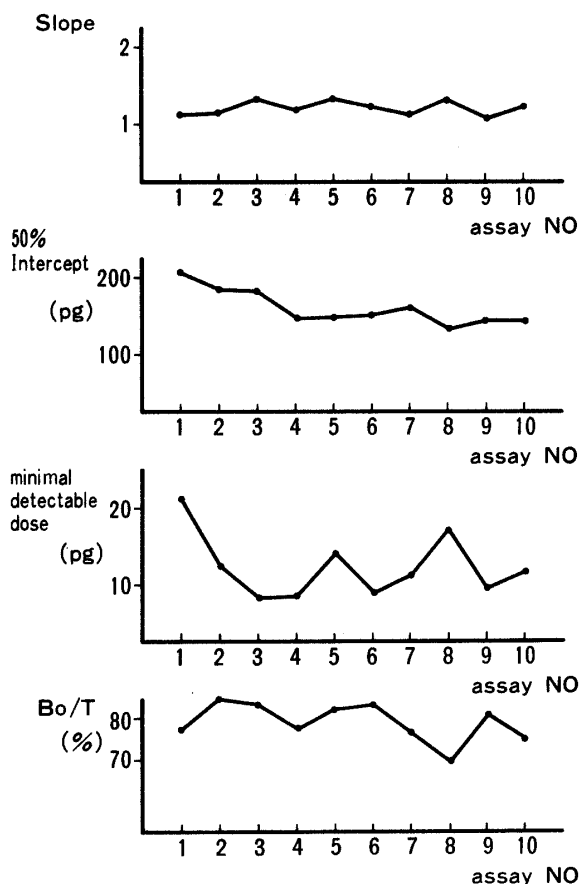
検出可能最低限界は $10.6 \pm 2.2$  (平均値±S.E.) pg であつた。

この抗血清に対する他のステロイドの交叉反応率をもとめると, 表1のごとくになつた。最も交叉反応率の高かつたのが  $E_1$  で3.4%, 次いで 17-epiestriol が3.0%であつた。また $16\alpha$ -OH- $E_1$  と C, D 環が類似する  $16\alpha$ -OH-androstenedione は 0.1%,  $16\alpha$ -OH-DHA は0.07%,  $16\alpha$ -OH-DHA-sulfate は0.08%とほとんど交叉反応は無く, 抗体の特異性がきわめてたかつた。

Water Blank 値は $27.33 \pm 6.16$  (平均値±S.E.)

表1 Cross reaction of various steroids with the antiserum against  $16\alpha$ -OH- $E_1$ -3-CME-BSA (dilution 1: 20,000)

| Compounds                                     | % Cross reaction |
|-----------------------------------------------|------------------|
| $16\alpha$ -OH-estrone                        | 100.0            |
| Estrone                                       | 3.4              |
| 17-Epiestriol                                 | 3.0              |
| 16-Ketoestradiol                              | 2.5              |
| Estriol                                       | 1.0              |
| Estradiol-17 $\beta$                          | 0.17             |
| $16\alpha$ -OH-testosterone                   | 0.15             |
| $16\alpha$ -OH-androstenedione                | 0.1              |
| $16\alpha$ -OH-dehydroepiandrosterone-sulfate | 0.08             |
| $16\alpha$ -OH-dehydroepiandrosterone         | 0.07             |
| $16\alpha$ -OH-progesterone                   | 0.05             |
| Estetrol                                      | <0.02            |
| 2-Methoxyestrone                              | <0.02            |
| Androst-4-ene-3, 17-dione                     | 0.01             |
| Progesterone                                  | <0.01            |
| Pregnenolone                                  | <0.01            |
| 17-OH-progesterone                            | <0.01            |
| 17-OH-pregnenolone                            | <0.01            |
| Cortisol                                      | <0.01            |
| Cholesterol                                   | <0.01            |

図3 Quality control chart for radioimmunoassay of 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>

pg, 500pg の16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>を1ml の蒸留水に加えた時の回収率が81.09 $\pm$ 4.7% (n=10), 測定内変動 (C.V.) は5.16% (n=10), 測定間変動 (C.V.) は

表2 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> levels during pregnancy (unconjugated)

| weeks of pregnancy          | 16 $\alpha$ -OH-E <sub>1</sub> (ng/ml) |
|-----------------------------|----------------------------------------|
| ~11w6D<br>(42 samples)      | 0.98 $\pm$ 0.07                        |
| 12w0D~23w6D<br>(37 samples) | 2.42 $\pm$ 0.30*                       |
| 24w0D~36w6D<br>(46 samples) | 4.76 $\pm$ 0.42*                       |
| 37w0D~<br>(23 samples)      | 5.49 $\pm$ 0.98*                       |

\*P<0.001 V.S.~11w6D

12.79% (n=10) であり、精度は満足すべきものであった。また、10本の標準曲線について、定量的検討を行った結果、満足すべき結果を得た (図3)。

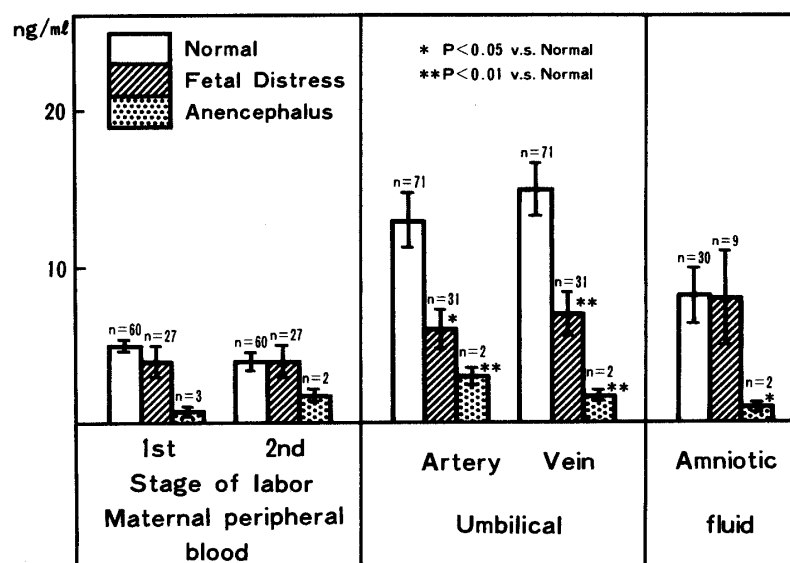
## 2. 妊婦末梢血中の16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>濃度

16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>値は妊娠中経時的に増加した。妊娠各時期に分けると妊娠12週未満で0.98 $\pm$ 0.07 (平均値 $\pm$ S.E.) ng/ml, 妊娠12週から24週未満で2.42 $\pm$ 0.30 ng/ml, 妊娠24週から37週未満で4.76 $\pm$ 0.42 ng/ml, 妊娠37週以降5.49 $\pm$ 0.98 ng/mlであった。妊娠12週未満に比し、中期以降は有意 (p<0.001) に高値を示した (表2)。

## 3. 分娩時の16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub>の濃度

### 1) 正常分娩例

図4に示すごとく母体末梢血中濃度は分娩第1期5.48 $\pm$ 0.59 ng/ml, 第2期4.63 $\pm$ 0.53 ng/mlで

図4 16 $\alpha$ -OH-E<sub>1</sub> levels during delivery (unconjugated)

あつた。また、臍帯動脈血は $13.63 \pm 1.98 \text{ ng/ml}$ 、臍帯静脈血は $15.88 \pm 1.77 \text{ ng/ml}$ 、そして羊水中の濃度は $8.44 \pm 1.85 \text{ ng/ml}$ であつた。

## 2) 胎児仮死例

上記のそれぞれの値を胎児仮死例についてみると、 $4.60 \pm 0.96 \text{ ng/ml}$ 、 $4.65 \pm 1.14 \text{ ng/ml}$ 、 $6.75 \pm 1.37 \text{ ng/ml}$ 、 $7.52 \pm 1.46 \text{ ng/ml}$  および  $8.11 \pm 3.13 \text{ ng/ml}$  であつた。

## 3) 無脳児例

同様に無脳児妊娠の母体血についてみると、分娩第1期 $0.79 \pm 0.07 \text{ ng/ml}$ 、第2期 $1.39 \pm 0.46 \text{ ng/ml}$ で、臍帯動脈血 $5.60 \pm 3.20 \text{ ng/ml}$ 、臍帯静脈血 $1.25 \pm 0.28 \text{ ng/ml}$ 、そして羊水 $0.58 \pm 0.04 \text{ ng/ml}$ であつた。

分娩第1, 2期母体末梢血値は、正常分娩例に比し、胎児仮死例、無脳児例とも有意差は無かつた。臍帯動静脈血中濃度は、正常分娩例に比し、胎児仮死例、無脳児例とも有意に(胎児仮死例臍帯動脈血 $=p<0.05$ 、胎児仮死例臍帯静脈血、無脳児例臍帯動静脈血 $=p<0.01$ )低値を示した。羊水中濃度は無脳児例が正常分娩例に比し、有意に( $p<0.05$ )低値を示した。

また無脳児例を除いたいずれの症例でも $16\alpha\text{-OH-E}_1$ 濃度は、母体末梢血より臍帯血および羊水中で高値を示した。

## 4. 他のステロイドとの相関

図5 Correlation between  $16\alpha\text{-OH-E}_1$  levels and  $16\alpha\text{-OH-DHA}$  levels in maternal blood (unconjugated)

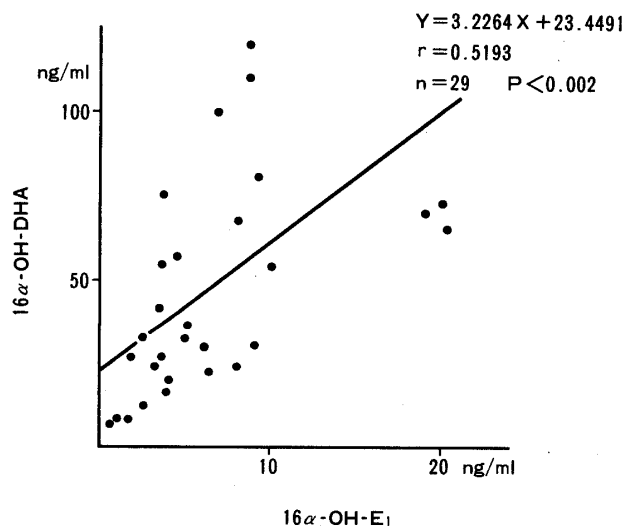
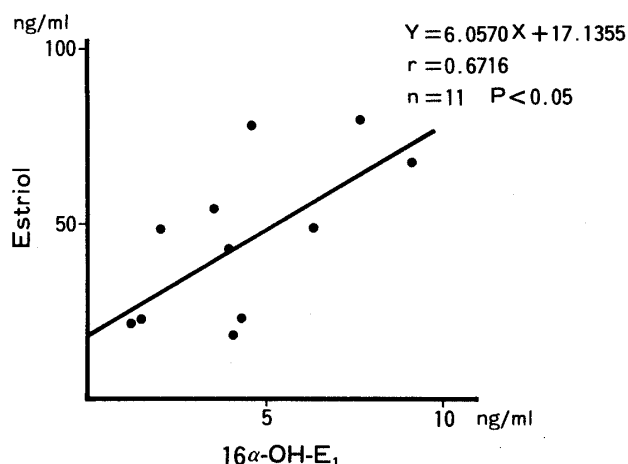


図6 Correlation between  $16\alpha\text{-OH-E}_1$  levels and  $\text{E}_3$  levels in umbilical blood (unconjugated)



## 1) $16\alpha\text{-OH-DHA}$

29例の妊婦で同一検体中の $16\alpha\text{-OH-DHA}$ 濃度を測定した。 $16\alpha\text{-OH-E}_1$ と $16\alpha\text{-OH-DHA}$ の血中濃度の相関関係を図5に示す。両者は $r=0.5193$ で有意に( $p<0.002$ )正の相関を示した。

## 2) $\text{E}_3$

同一検体中の遊離 $\text{E}_3$ を11例の臍帯血につき測定した。 $16\alpha\text{-OH-E}_1$ と $\text{E}_3$ 値の相関関係は $r=0.6716$ で、有意に( $p<0.05$ )正の相関を示した(図6)。

## 考 案

ステロイドホルモンの産生は、一般に非妊時に比し妊娠中著しく増量する。中でも estrogen の産生量が最も多く、 $\text{E}_3$ はその9割以上を占める。この $\text{E}_3$ の産生源は、主として胎児および胎盤であるが、その生合成経路のうち $\text{E}_3$ の直前の中間代謝物質が $16\alpha\text{-OH-E}_1$ である。このステロイドは測定方法が確立されていなかったため、生体内動向および臨床的意義は不明な点が多い。Lahita et al.<sup>14)</sup>は、systemic lupus erythematosus (SLE) 患者において $\text{E}_1$ の16-hydroxylationが上昇することを報告している。妊娠中は $16\alpha\text{-hydroxylase}$ 活性が胎児肝に強く、妊婦が産生する $16\alpha\text{-hydroxysteroid}$ のかかなりの部分は、ここで作られると考えられる。その $16\alpha\text{-hydroxysteroid}$ の中で、 $16\alpha\text{-OH-E}_1$ は胎盤組織ですみやかに $\text{E}_3$ に転換される<sup>17)</sup>。臍帯血中に高濃度で循環している $16\alpha\text{-OH-DHA}$ は $16\alpha\text{-OH-androstendione}$ 、 $16\alpha\text{-OH-E}_1$ を

経て  $E_3$  に転換される<sup>9)15)</sup>。ところが胎盤における反応が速いため、中間代謝産物を適確に把握し難い場合もあり、個々の物質の生理的意義解明を困難にする一因となっていた。

この16 $\alpha$ -OH- $E_1$ は16と17が $\alpha$ -ketol になつているため酸化され易く、とくにアルカリで不安定であることから、抗原の合成でアルカリ鹼化でなくてジアスターゼで酵素的にエチル基をはずして16 $\alpha$ -OH- $E_1$ -3-CME を作製した。またこのステロイドの測定には、加熱をさけアルカリ側にすることなく操作して16 $\alpha$ -OH- $E_1$ の分解を防いだ。

今回、我々が開発した16 $\alpha$ -OH- $E_1$ のRIAは、特異性、精度、感度、再現性何においても十分満足すべき結果を得た。

また、妊婦血などのサンプルをルチンに測定出来るシステムが確立され、臨床応用への道が開かれた。

この方法による妊婦末梢血の16 $\alpha$ -OH- $E_1$ は、妊娠初期から妊娠中期以降にかけて有意に増量することが判明し、本ステロイドの血中レベルが妊娠中、経時的に増加することが初めて証明された。

分娩時の測定結果において胎児仮死例では、正常分娩例に比し臍帯動静脈血中濃度が共に低値であつた。上田<sup>3)</sup>は、妊婦の尿中 estrogen/creatinine 比と血中  $E_3$  を測定した結果、apgar's score 6 点以下および出産体重2,500g 未満の症例の妊娠各時期における両者の値が平均値以下であることを示した。今回、16 $\alpha$ -OH- $E_1$ 濃度が胎児仮死例で、正常分娩例に比し母体末梢血では有意差を認めなかつたが、臍帯動静脈血において有意に低値を示し、胎児・胎盤系における本ステロイドの産生が低下したことを推定せしめた。

分娩中の胎児仮死は比較的急性に來ることが多く、血液の酸塩基平衡への影響が現われると同時に、副腎、肝など胎児臓器の低酸素血症による機能低下をも招くことが推定出来る。従つて、このような条件下にある児においては、副腎から分泌される DHA(-sulfate)、肝で産生される16 $\alpha$ -OH-DHA(-sulfate)などの減少を来し、ひいては血中16 $\alpha$ -OH- $E_1$ ないし  $E_3$  レベルの低下を招くことは十分考えられる。

胎児血中の16 $\alpha$ -OH-DHA および  $E_3$  が分娩経過中に増量し、それは胎児性 ACTH の分泌刺激によるものであらうとする報告<sup>5)6)</sup>がある。今回、16 $\alpha$ -OH-DHA および  $E_3$  を妊婦血および臍帯血の同一検体で測定し、いずれも16 $\alpha$ -OH- $E_1$ と有意の正の相関を認め、胎児・胎盤系の  $E_3$  生成経路の中で重要な中間代謝産物の動向が、密接に関係していることが示唆された。矢内原<sup>4)</sup>は16 $\alpha$ -hydroxysteroid が一般に、胎児側にきわめて高値であつたと報告しているが、本ステロイドも母体末梢血よりも胎児側が高く、胎児・胎盤系における産生、分泌の比重の大きいことを示している。

無脳児妊娠では、胎児の間脳～下垂体～副腎系の異常により、胎児副腎の萎縮が顕著で胎児血、母体血、母体尿の  $E_3$  値が低い。Nakayama et al.<sup>16)</sup> は、in vitro の実験で、無脳児胎盤が正常胎盤とほぼ同等のステロイド生合成能や酵素活性をもつとした。Tabei and Heinrichs<sup>20)</sup> は、無脳児の肝臓における DHA 代謝は、正常胎児とほとんど同じで、16 $\alpha$ -hydroxylation に差がないことを報告している。したがつて無脳児妊娠の  $E_3$  の低下は、胎盤あるいは胎児肝の機能障害では無く、胎児副腎の高度萎縮による  $E_3$  の前駆物質の分泌減少に起因している。今回の成績で無脳児妊娠の分娩時の16 $\alpha$ -OH- $E_1$ 値は正常例に比し著しく低値を示した。すなわち、本ステロイドもその生合成、分泌に際して、胎児下垂体副腎皮質系機能が大きく関与していることがわかる。

羊水中に含有されるステロイドは、大部分が胎児由来と考えられるが16 $\alpha$ -OH- $E_1$ 濃度も臍帯血のそれに近く、無脳児では著明な低値であつた。

また16 $\alpha$ -OH- $E_1$ および  $E_3$  が異常低値を示す妊婦で無脳児でない場合、まれに胎盤の sulfatase 欠損のことがある。胎盤に sulfatase が欠損した場合は  $E_3$  生合成過程の初段階でブロックされてしまう。この様な先天性異常症例は別として一般には、妊娠の進行に従つて胎児の16 $\alpha$ -OH-DHA の分泌が増加し、それに比例して  $E_3$  が多くなる。16 $\alpha$ -OH- $E_1$ は図5と図6に示す如く、16 $\alpha$ -OH-DHA や  $E_3$  と相関性を示し、 $E_3$  の生合成過程で16 $\alpha$ -OH- $E_1$ が重要な中間代謝産物であることを

示唆したが, Vega Ramos et al.<sup>21)</sup>も *in vitro* の実験で  $16\alpha$ -OH-testosterone を経る過程よりも,  $16\alpha$ -OH- $E_1$  を経る方が優位な経路であることを報告している. また Dell'Acqua et al.<sup>9)</sup>は,  $16\alpha$ -OH-testosterone の胎盤における  $E_3$  への転換が  $16\alpha$ -OH-DHA,  $16\alpha$ -OH-androstenedione よりもはるかに効率の悪いことを示した. 従つて,  $16\alpha$ -OH- $E_1$  を通る経路<sup>19)</sup>が主体をなすと考えられる.

なお胎盤の酵素は卵巣にくらべて非常に豊富で,  $16\alpha$ -OH-androstenedione も直ちに  $16\alpha$ -OH- $E_1$  となり17のケトンの還元が続いて行われて  $E_3$  になるが, 一部の  $16\alpha$ -OH- $E_1$  は母体に移行して母体肝臓で  $E_3$  になることが示唆されている.

この  $16\alpha$ -hydroxylase は主に肝臓のミクロゾームに存在し testosterone,  $\Delta^4$ -androstenedione,  $E_1$ , progesterone, DHA 等のステロイドの  $16\alpha$  位を水酸化することによつて, これらの活性を失活させ, 同時に排泄され易い型に変換させる酵素であり一種の解毒作用と考えられている. この様な酵素には  $16\alpha$ -hydroxylase の外に  $6\beta$ ,  $7\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $15\alpha$ , 18, 19, 21 の hydroxylase があるが, これらの酵素活性は動物の種によつて, また加齢や性差により異なる<sup>13)</sup>. なお原始的脊椎動物の肝臓には  $7\alpha$  の hydroxylase しかなく, 進化の過程で色々の hydroxylase を獲得してヒトの肝では  $6\alpha$ ,  $6\beta$ ,  $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $16\alpha$  などの多数の hydroxylase が証明されている<sup>7)</sup>. 一方, 胎児肝臓も成人と同じ様に種々の代謝酵素を持っているが  $16\alpha$ -hydroxylase 活性が強く, なかでも DHA を基質としたときは, この活性が最高を示すことが知られ<sup>15)</sup>, 胎児の加齢とともに漸増すると言われている<sup>11)</sup>.

#### ま と め

今回,  $16\alpha$ -OH- $E_1$  の RIA 法を開発し, 正常妊娠, 無脳児妊娠, 正常分娩, および胎児仮死例の分娩時の本ステロイド値を測定した. 従来,  $16\alpha$ -OH- $E_1$  はルチンの測定法が, 開発されていなかったためその生体内の動態および臨床的意義に関しあまり知られていなかったが, ここに本ステロイドの妊娠, 分娩時の動態の一端を初めて, 明らかにした.

本論文の要旨は, 第34回日本産科婦人科学会学術講演会(神戸), および第55回日本内分泌学会総会(東京)において発表した.

稿を終わるに臨み, 御指導, 御校閲を賜りました恩師荒井 清教授に深甚なる謝意を表します. また直接御指導いただいた神戸川明助教授に深謝いたしますと共に, 御協力下さいました大川とみ, 岡野秀子, 佐野由美子研究員ならびに教室員各位に深謝致します.

#### 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:  $16\alpha$ -OH-DHA ならびに  $16\alpha$ -OH-DHA-sulfate の Radioimmunoassay. ホルモンと臨床, 24: 245, 1976.
2. 牧野拓雄: 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. 日内分泌誌, 49: 629, 1973.
3. 上田隆則: 妊娠および分娩時の血中エストリオールならびに随時部分尿中エストロゲン・クレアチニン比(E/C)に関する臨床的研究. 日産婦誌, 29: 17, 1977.
4. 矢内原巧, 高山照雄, 高水松夫, 松橋一雄, 小島彬, 瀬尾文洋, 満川元一, 斉藤 裕, 眞井康博, 平戸久美子, 鈴木とも子, 金沢元美, 橋野正史, 千葉 博: 胎児-胎盤系ホルモンよりみた胎児情報. 産婦の世界, 32: 381, 1980.
5. Arai, K. and Yanaihara, T.: Steroid hormone changes in fetal blood during labor. Am. J. Obstet. Gynecol., 127: 879, 1977.
6. Arai, K., Yanaihara, T. and Okinaga, S.: Adrenocorticotrophic hormone in human fetal blood at delivery. Am. J. Obstet. Gynecol., 125: 1136, 1976.
7. Björkhem, I., Einarsson, K., Gustafsson, J.-Å. and Somell, A.: Metabolism of  $3\beta$ -hydroxy- $\Delta^5$ -and 3-oxo- $\Delta^4$ - $C_{19}$  and  $C_{21}$  steroids in human liver microsomes. Acta Endocrinol., 71: 569, 1972.
8. Brown, J.B. and Marrian, G.F.: The metabolic reduction of  $16\alpha$ -hydroxyoesterone to oestriol in man. J. Endocrin., 15: 307, 1957.
9. Dell'Acqua, S., Mancuso, S., Eriksson, G., Ruse, J.L., Solomon, S. and Diczfalussy, E.: Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. Acta Endocrinol., 55: 401, 1967.
10. Fishman, J. and Martucci, C.: Biological properties of  $16\alpha$ -hydroxyestrone: Implications in estrogen physiology and pathophysiology. J. Clin. Endocr. Metab., 51: 611, 1980.
11. Huhtaniemi, I.: Metabolism of pregnenolone

- and pregnenolone sulphate in human foetal liver tissue in vitro. *Acta Endocrinol.*, 76 : 525, 1974.
12. Ikegawa, S., Lahita, R. and Fishman, J. : Concentration of 16 $\alpha$ -hydroxyestrone in human plasma as measured by a specific RIA. *J. Steroid. Biochem.*, 18 : 329, 1983.
  13. Inano, H., Mori, K., Tamaoki, B. and Gustafsson, J.-Å. : In vitro metabolism of testosterone in hepatic tissue of a hagfish, *eptatretus burgeri*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 30 : 258, 1976.
  14. Lahita, R.G., Bradlow, H.L., Kunkel, H.G. and Fishman, J. : Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.*, 22 : 1195, 1979.
  15. Magendantz, H.G. and Ryan, K.J. : Isolation of an estriol precursor, 16 $\alpha$ -hydroxydehydroepiandrosterone, from human umbilical sera. *J. Clin. Endocr.*, 24 : 1155, 1964.
  16. Nakayama, T., Arai, K., Yanaihara, T., Tabei, T., Satoh, K. and Nagatomi, K. : Oestrogen metabolism in anencephalus. *Acta Endocrinol.*, 55 : 369, 1967.
  17. Reynolds, J.W., Mancuso, S., Wqvist, N. and Diczfalusy, E. : Studies on the aromatisation of neutral steroids in pregnant women. *Acta Endocrinol.*, 58 : 377, 1968.
  18. Rodbard, D. and Faden, V.B. : Radioimmunoassay data processing, Third Ed., Vols. 1. and 2. National Technical Information Service, Virginia, 1975.
  19. Schwuers, J., Govaerts-Videtsky, M., Wigvist, N. and Diczfalusy, E. : Metabolism of oestrone sulphate by the previable human foetus. *Acta Endocrinol.*, 50 : 597, 1965.
  20. Tabei, T. and Heinrichs, W.L. : Biosynthesis of 3 $\beta$ , 17 $\beta$ -dihydroxyandrost-5-en-16-one by hepatic microsomes from previable and anencephalic human foetuses. *Acta Endocrinol.*, 76 : 576, 1974.
  21. Vega Ramos, P., Ferreiros, H.P., Manson, M.E. and Menini, E. : Formation of oestriol from C<sub>19</sub>, 16-oxygenated steroids by microsomal preparations of human placenta. *Research on steroids*, 5 : 79, 1973.

(No. 5642 昭59・12・10受付)