宿題報告(自由演題)

Steroid Hormone の代謝調節作用と
その妊娠成立・維持における意義

大阪大学微生物病研究所臨床研究部婦人科学教室

助教授 須 川 侑

共同研究者

森山 郁子, 田守 陳哉, 松本 精二, 森口 侯祇, 垣田 守彦
芝 茂樹, 島本 雅典, 西藤 守雄, 垣内ひろ子(実験補助)

本研究の目的

人類が長い進化の歴史を辿って来た間に、種属保存を目的として、生命維持と生殖の機構が生活の環境に適応しつつ分化を遂げた。そしてそこに各臓器による特異的な機能の分担が現われて来た。

こうした生体においては、機能面において合目的性をもった臓器相互の調和が必然的に要求され、今日その co-ordinator として神経性・内分泌性因子が認識されている。

しかしながら今日、生殖に関与する hormone, 殊に estrogen や progesterone の生物学的意義を眺めるとき、それが果す役割については未だ十分な理解がなされていない。このことは、夫々の hormone の作用機構について、殊に妊娠という場で解析的な研究が詳しくなされてないゆえと思われる。

この様な観点に立つて本研究は、生殖をめぐる steroid hormone の作用を以下の点におき実験的に観察すべく企てたものである。

I. 妊娠の成立に関するホルモンの作用意義。

II. 分娩に到るまでの妊娠維持機構におけるホルモンの関与。

III. 胎児・新生児の発育と機能分化におけるホルモンの意義。

すなわち妊娠時における母体の代謝性変移、あるいは性器における形態学的変化が現象的に認められるが、それを支配する hormone の作用機構を解析し、そこから生殖と機能分化における hormone の生物学的意義を考えてみようとしたものである。そしてそれが臨床面における hormone 適用の理論的基盤となることを期待したものである。

I. 子宮組織における Estrogen, Progesterone の生物学的作用に関する研究

1. Estrogen の子宮組織への濃縮機構(殊に Receptor Molecule の検討)

1) 去勢 rat に C^{14} -estradiol を投与し、その後の時間的経過における各臓器組織への分布を観察した結果、子宮組織においては他の組織と異なり、estradiol の分布は投与直後より60分にかけてむしろ増加し、その後の減少もゆるやかであった。

2) 同一条件での C^{14} -progesterone の分布は estradiol と異り、特に子宮への濃縮過程は認められなかったが、時間の経過に伴う分布の減少は他臓器組織に較べて緩徐であった。

3) 子宮組織蛋白質は、肝、腎、肺組織蛋白質に較べて、estradiol を結合する量が多かった。

4) 人子宮内膜組織の可溶性蛋白質において、特に estradiol を結合する分画の存在を認めた。

5) この分画は progesterone に対しては結合性を示さず、かなり estradiol に特異的なものと思われる。

6) 内膜細胞の癌化に伴い、可溶性蛋白質における estradiol 結合性は変化し、estradiol を特異的に結合する分画は消失していた。

2. RNA 合成に対する Estrogen, Progesterone の影響。

1) 去勢動物に投与した estrogen は、子宮内膜細胞の RNA 合成 rate を早期に上昇せしめ、3時間~6時間の間に最高に達した。

2) estrogen 投与後早期に新生される RNA の性格は、high molecular RNA, すなわち qRNA (多くは rRNA の precursor と mRNA) および rRNA である。そして低分子の RNA 合成はきわめて低い。

3) 家兎肝臓の DNA を template とし、 H^3 -labeled RNA の hybrid 形成に対する多量添加 unlabeled RNA の阻害を同一組織、異種組織において観察し、又 estrogen 単独投与子宮と estrogen, progesterone 投与群の子宮 RNA 間において検討してみた。その結果同一種類の RNA 間において unlabeled RNA の増量に伴い一定の competition curve が得られた。

4) labeled E-RNA-unlabeled E·P-RNA 間の co-

mpetition は labeled E-RNA-unlabeled E-RNA の実験系との間に変化は認められなかつた。しかし labeled E·P-RNA-unlabeled E-RNAの系においては unlabeled E·P-RNA との組合せに比べ competition は約10%低下を示した。

5) rabbit 肝DNAに対する labeled E-RNA の hybrid 形成は unlabeled E. coli-RNA, liver-RNA または human placenta-RNA により competition を受けなかつたが, unlabeled rabbit placenta-RNA によつては著明な competition を受けた。

6) 以上の結果より, estrogen 前処理下に progesterone を投与した場合, 子宮細胞において, estrogen とは別の gene locus がひらき, RNA-transcription が起る可能性を認めた。また胎盤のRNAと子宮のRNA間には質的にかんりの共通性が認められた。

3. Estrogen 作用に関するRNAの生物学的作用意義

1) estrogen で前処理した子宮組織より, RNA分画を分離し, それを他の去勢 rat 子宮腔内に注入した結果, 子宮組織は estrogen 処理時と同様の形態的变化を示した。

2) その際子宮組織の蛋白合成 rate, あるいは alkaline phosphatase 活性は有意に上昇を示した。

3) また, RNA 処理後の子宮内膜細胞に著明なDNA合成を認めた。

4) 妊娠子宮および胎盤組織より抽出したRNAも同様に子宮増殖作用を認めたが, 肝組織RNAにはその作用が認められない。

5) RNA 試料中の作用有効物質は, 高分子状態のRNAそれ自体であることが明らかとなつた。

6) 人の妊娠初期胎盤より分離抽出した高分子RNAは, 去勢 rat の子宮において著明な増殖性変化を示した。

7) 以上の結果より estrogen がもたらす子宮の増殖肥大は, RNA 合成により始まり, 生成された“estrogen dependent RNA”がその後の増殖支配を行うと結論される。

4. 子宮内膜細胞のDNA合成に対する Estrogen, Progesterone の律速作用

1) estradiol 投与後の去勢 rat 子宮内膜細胞におけるDNA合成を autoradiography により観察した。その結果内膜細胞, ことに上皮性細胞においては均一性をもつて反応を示し, estrogen 投与後24時間~30時間の間に約70%の細胞がDNA合成期に移行した。

2) estrogen の影響下における内膜細胞のDNA合成は, 間質細胞においては, 上皮細胞に比べ比較的早い時期に始まるが, 均一性に乏しく各時期にわたつて少数の細胞がDNA合成を行つていた。

3) estradiol 投与後24時間目に colchicine を投与し6時間目における内膜細胞の metaphase への移行を観察したが, 上皮細胞の殆んどがS-stageをへて metaphase へ移行していた。

4) estradiol 投与は子宮組織の thymidine kinase activity を著明に上昇せしめた。

5) estrogen 投与後30分して子宮組織を摘出し, 続いて24時間 organ culture を行い, *in vitro* におけるDNA合成を観察したが, 去勢対照に較べて明らかに多くのDNA合成期の細胞を認めた。このことから, estrogen が子宮組織に作用するごく初期においてすでに細胞増殖への initiation が起ることを裏付けた。

6) estrogen と同時に投与した progesterone は, 内膜細胞のDNA合成に対し強く抑制的に作用し, また thymidine kinase activity の上昇も抑制した。しかし, estradiol 処理後数時間して投与した progesterone は, DNA合成に対し特に影響を与えなかつた。

7) 家兎を用いた実験において, estradiol 投与時と, その後の progesterone 投与のDNA合成に対する効果を観察したが, estradiol 処理群の内膜細胞においてDNA合成が著明に誘導された。一方 McPhail scale の第Ⅲ期像においては, 内膜細胞のDNA合成は殆んど認められなかつたが, myometrium の細胞核においては H^3 -thymidine の uptake が認められ, progesterone に対する反応性が異なることを示している。

8) 正常月経周期の婦人において, 増殖期の内膜細胞は著明なDNA合成を行なつていながら, 分泌期内膜(月経周日18日目)には殆んどDNA合成は認められなかつた。

5. DNA合成に關与する蛋白性の制御因子

1) 去勢 rat に対し puromycin あるいは cycloheximide を投与して, 子宮組織の蛋白合成を block したとき, estrogen投与の有無にかかわらず, 内膜細胞ことに上皮性細胞はDNA合成を行つた。

2) puromycin 処理後の細胞のDNA合成は16時間後より初まり, 18時間目には上皮細胞の約90%がS-stageにあつた。しかしこれらの細胞は metaphase へ移行し得なかつた。

3) estradiol 処理あるいは U-RNA 処理後の内膜細胞のDNA合成は, thymidine kinase 活性の誘導を伴い, autoradiography によつても細胞核当りの grain count は多かつた。

しかし puromycin 処理群では labelling index は高かつたが grain count は少なく, また thymidine kinase 活性も低値であつた。

4) 蛋白合成をblockした条件下では, progesterone の内膜細胞のDNA合成に対する抑制効果は認め得なかつた。

5) 以上の実験成績から, 細胞の増殖と機能分化への分岐において, 或る種の蛋白質が重要な役割を果し, S-stage への移行を制御していると解釈する。そして progesterone はこの種の蛋白との共転により初めてその作用を発現するとの結論に達した。

6. Progesterone のDNA合成抑制作用とそれに関する Adrenaline の意義

1) 副腎摘除動物において, 子宮内膜細胞のDNA合成に対する progesterone の作用を観察した。その結果, 正常動物と異なり, progesterone のDNA合成抑制効果は全く認められなかつた。

2) 副腎摘出後 glucocorticoid を連日投与したのち同様実験を行ったが、この場合も progesterone は estrogen により促進された DNA 合成に対し、なんら抑制的な効果を発揮しなかつた。

3) しかし副摘後 adrenaline を投与して、前処理したときには、progesterone の DNA 合成抑制作用が認められた。

4) したがって progesterone が子宮内膜に分泌機能を発現させるとき、その作用機構は細胞の増殖と分化の方向を支配する特異蛋白質の effector として作用し、この蛋白質の生成或いは progesterone との共軛の場において adrenaline が重要な生物学的意義を有するものである。

7. 異常内膜における DNA 合成の観察

1) 実験動物において estradiol を14日間にわたり連続的に投与し、最終投与後24時間を中心とした各時期に H^3 -thymidine を precursor として子宮内膜細胞の DNA 合成を観察した結果、どの時期においても上皮性の細胞の DNA 合成は低下していた。この原因は、上皮細胞が life cycle の各時期に散らばっていることだけでは説明出来ず、むしろ連続的な増殖促進に対応する細胞単位での self control の機構によるものと考えたい。

2) “dysfunctional bleeding” と診断された婦人の内膜組織を採取し、その DNA 合成を観察した結果、正常内膜像のかなり均一性をもった pattern は認め難かつた。そして更年期出血の内膜においては、実験動物に認められた上皮細胞の DNA 合成の低下が認められる。

3) 組織標本の部位により DNA 合成の状態が異なることが認められたが、hormone 異常下におけるそれぞれの細胞の反応性の不統一が、細胞相互の認識性を崩し、それが組織の破綻につながるものと推測する。

4) 子宮内膜癌患者に 19-nortestosterone 投与を行い治療前後における癌細胞の DNA 合成を H^3 -thymidine を用いた autoradiography により gestagen に対する反応性を検討してみた。その結果癌細胞に於ける DNA 合成は各々の症例に於いて異つた response を示すことが認められた。このような各例における癌細胞の gestagen に対する反応の不均一性は、脱分化過程における hormone dependency を定める genome の変異によると解釈される。なお、gestagen に対する反応性の検討は、norluten 30mg/day 7日間投与後において充分行いうるものである。

8. Pool Amino 酸および Glucose の量的変化におよぼす Estrogen Progesterone の影響

1) 子宮組織における amino 酸あるいは glucose の uptake に対する投与 hormone の影響を *in vivo* および *in vitro* において観察した。

2) estradiol 投与により子宮組織の pool amino 酸量並びに glucose 含量は増加を示した。progesterone の投与は estrogen の促進効果に対し抑制的に作用した。

3) estrogen 投与後の摘出子宮組織について、*in vitro* における amino 酸および glucose の uptake を

観察したが、去勢 rat 子宮に較べ上昇を認めた。

4) 子宮の glucose uptake における estrogen の効果は、estrogen 投与後3時間目においてすでに著明に現われた。一方 amino 酸 uptake に対する効果は glucose に較べて遅れて発現し、18時間に去勢 rat 子宮と較べ著明な上昇を認めた。

5) 子宮組織での amino 酸 uptake 機序において energy 代謝の共軛を求める active transport の機構が関与する。そして *in vitro* に添加した estradiol は、去勢 rat 子宮組織の amino 酸 uptake を促進した。

6) 以上の結果から estradiol は子宮組織における (蛋白質の合成素材としての) pool amino 酸量を増加せしめると結論する。

9. 蛋白合成 Rate におよぼす Estrogen, Progesterone の影響

1) 去勢 rat に対し投与した estrogen 及び progesterone の子宮組織蛋白質合成におよぼす効果を hormone 投与後の各時期、および precursor を変えて検討してみた。

その結果 *in vivo*, *in vitro* の実験系において、ともに estradiol の蛋白合成促進効果と、それに対する progesterone の抑制効果を認めた。

2) estradiol 投与後の子宮組織においては投与後3時間目すでに有意の蛋白合成 rate の増加を認めた。そして18時間目においては、さらに強い合成 rate の上昇を認めた。

3) estradiol の早期効果は glucose を precursor として用いた実験よりも著明に認められた。

4) *in vivo* の実験において hormone 投与後の子宮組織蛋白質合成を各 subcellular 分画への C^{14} -precursor の incorporation について検討を行なつた結果、estradiol 投与群は microsome, soluble および mitochondria 分画における著明な促進効果を示しているが、progesterone 添加群においては、約25%の incorporation rate の低下を示し、estrogen の蛋白合成促進効果に対し拮抗的に働くことを認めた。

10. 子宮組織における Glucose の Amino 酸への転換における Hormone の影響

1) 子宮組織における glucose の amino 酸への転換過程における estradiol および progesterone の効果を検討した。

2) estradiol 投与後3時間の子宮組織において、glucose の amino 酸への転換速度は、去勢対照に較べて2倍以上に増加した。

3) progesterone は estrogen により促進された glucose の転換速度に対し抑制的に作用した。

11. 無細胞系蛋白合成による Hormone 作用の検討

1) estradiol による子宮組織の蛋白合成 rate の促進を、直接蛋白合成系において、検討を加えてみた。

2) estradiol 投与後、18時間の時期には子宮組織の ribosome 量が増加している。

3) amino 酸の活性化酵素は、estrogen 投与後、早い時期では、それ程著明に上昇はしなかつたが、18時間

目に活性増強が認められた。

4) ribosome の蛋白合成能は estrogen により上昇を示し、殊に microsomal protein においてみると著明な亢進が認められた。

5) ribosome における蛋白合成の activity は microsomal protein (あるいは polysome) の構成蛋白質により、かなりの制御を受けている。

6) 以上の結果より estrogen は子宮における蛋白合成系の各因子を賦活し、殊に *in vivo* において ribosome 上での translation activity に対する制御因子を解除し、それらが大きな原因となつて蛋白合成 rate を上昇せしめるものである。

12. 子宮組織 Ribosome の合成とその細胞内分布における Hormone の影響

1) estrogen は rRNA 合成を著明に促進し、progesterone は estrogen の促進効果に対し、抑制的に作用した。

2) 子宮組織の microsomal protein を sucrose density gradient により2つの分画に分け、各実験群における量的比を観察した結果、estrogen 投与時には light microsomal protein が圧倒的に多く progesterone を投与すると逆に heavy microsomal protein が増加した。

3) 妊娠子宮の microsomal protein は estrogen 投与群と progesterone 添加群の中間型の pattern を示した。

13. Progesterone による特殊蛋白の合成 (Avidin 生成に関する検討)

この実験は黄体期の人子宮内膜、また estrogen 及び progesterone 処理の家兎子宮内膜を用いて avidin の検出を免疫学的に試みたが、各実験例において avidin の存在は認められなかつた。

14. 子宮組織の DNA, 蛋白質合成に関する Histamine の関与

1) histamine を去勢 rat 子宮腔内に投与した結果、内膜上皮細胞の DNA 合成を誘起したが、蛋白合成に対してはそれ程著明な効果を現わさなかつた。

2) histamine 前処理家兎に progesterone 投与を行なつた時、progesterone 効果は認め得なかつた。

3) 以上の所見から histamine の子宮増殖作用は非特異的炎症効果として現われるもので、estrogen 作用と機構的に差異が存在するものと考えられる。そして estrogen 作用における histamine の意義は、子宮組織の estrogen に対する反応性の場で関与するものとの見解に達した。

15. 妊卵の着床における Gonadal Hormone の意義 (子宮内膜における培養細胞の生着、増殖と Hormone の影響)

1) 妊卵の着床機序の解明に向い、その一手段として妊卵側の因子を除外し、子宮側の因子の解析を行つた。その方法として幼若 hamster に hormone 投与を行い、各種の培養細胞を子宮腔内に注入しその後の生着を観察したのである。

2) estrogen と progesterone の併用投与群において、hamster と種属を異にする人由来の細胞、HeLa

cell, chick embryo など培養細胞のすべてが生着増殖し、子宮腔内において子宮壁と一部接合した腫瘤を形成した。

しかし estrogen 単独投与群では、完全に吸収消失され生着は認め得なかつた。

3) 子宮腔内の腫瘤は、注入培養細胞の増殖によつて構成されることを、T-antigen を marker とした蛍光抗体法、および H^3 -thymidine を用いた autoradiography により確認した。

4) hamster における異種細胞の生着増殖に必要な progesterone の量は、50 μ g/hamster/day 以上である。

5) hormone 投与を続けた場合、生着組織は100日以上生存することを認め、hormone 投与中止により比較的早期に reject される。

6) 以上の結果より着床機構に関し、子宮内膜の性格変化が絶対的な因子となり、それは hormone、ことに progesterone により支配を受ける。

16. 着床に伴う子宮内膜細胞の反応性

1) 注入細胞の子宮内膜への着床時に、それを契機として、分泌機能を発現している上皮性細胞に再び DNA 合成が誘起されることを認めた。

2) この結果は、着床が何らかの刺激として trigger となり、内膜における細胞の特異的反応として DNA 合成の促進が現われたものと解釈する。

17. 胎盤の Aging と絨毛細胞の性格変化に関する免疫学的検討

1) 妊娠維持機構に関し、免疫学的な観点に立つて胎盤と母体血清間の抗原抗体反応について検討を行つた。そして胎盤の母体側との接合部における反応を、mixed cell agglutination test により観察してみた。

2) 妊娠末期胎盤においては、絨毛細胞膜表面において母体血清との間に抗原抗体反応の成立を認めたが、妊娠初期絨毛には殆んどこの反応は認められなかつた。

18. 胎盤の Aging と細胞の性格変化に関する細胞生物学的研究

1) 妊娠各時期における人絨毛細胞の性格変化を、*in vitro* における組織再形成能において観察してみた。その結果、妊娠初期胎盤においては、絨毛細胞に特徴的な aggregate 形成を認めたが、胎盤の aging とともに、その形状に変化が現れ、末期胎盤においては単に不規則な細胞集合体としてしか認め得なかつた。

2) 人絨毛組織の ribosome について、その存在様式を sucrose の濃度勾配によつて検討してみたが、妊娠初期においては、light microsomal protein 分画に存在するものが圧倒的に多く、胎盤の aging と共に heavy microsomal protein として存在するものが増加した。

本編の総括

以上一連の研究は hormone と target 間の特異関連性の解明において数年前までいわゆる“biological”な問題であつたものを、分子の level で解析することが可能となつたことを確かめたものであるが、ここで再び biological な問題として hormone の作用意義を検討

してみる必要がある。すなわち冒頭において記述した生殖機構への hormone の関与である。

著者らは先ず子宮内膜における着床の場作りとして hormone の前処理を行い、実験動物と全く異種の細胞（培養細胞）を用い、子宮腔内への注入後の一定期間の経過において観察してみた。この条件は完全に妊卵側の因子を除外したものであるが、estrogen と progesterone hormone の併用処理群において、いずれの細胞においても全例生着増殖を認め得た。

なお着床部位として同じ hormone 条件下における動物の cheek pouch その他への注入実験から、子宮内膜以外では生着が認められず、子宮内膜組織の特殊性が明らかとされた。

この様な子宮内膜での着床準備は estrogen と progesterone の作用協調下に整えられるものであるが hormone 投与を続けている間は生着組織の生存が 100日以後まで認め得た。そして hormone 投与を中止したとき 2～3日後には完全に reject されてしまう。

以上の実験で判断されるごとく、1)着床の機序は全く内膜細胞の異種細胞に対する認識性の問題であり、免疫学的関与は少ない。2)生着組織の生存は子宮内膜との接合部における免疫寛容の条件付けによつて支配されている。

一方妊卵側の抗原性に関しては多くの検討が行なわれているが、分娩開始を免疫学的 rejection によつて説明する為には、絨毛細胞の膜表面での抗原抗体反応の成立が必要である。そこで mixed cell agglutination method により妊娠各時期に胎盤を用い、その絨毛組織表面と、それぞれの母体血清との間の免疫反応を検討してみた。その結果妊娠初期においては殆んど免疫反応は認められなかつたが、帝王切開により得た妊娠末期胎盤では、抗原抗体反応の成立を認め得た。この事実、胎盤の aging に伴い、絨毛細胞の膜抗原性が次第に亢まり、それに対応して母体血清の抗体価が上昇することを示している。

しかしながら、この免疫反応の出現が、分娩発来 of trigger となり得るか否かは結論し得ず、今後の検討に待ちたい。

なお gonadal hormone の作用機構において、かなり特殊な生物作用をもつ蛋白の生成並びに関与に関し考察して来たが、この研究がさらに深く掘り下げられてゆくとき、hormone-target の系から、細胞の増殖と分化とを規制する分子の作用意義が明らかとされ、それが発癌過程、あるいは癌細胞の性格解析に近づくものと思われる。

II. 妊娠個体における Steroid Hormone の代謝調整

1. 妊娠時における遊離 Amino 酸の動態とそれに関与する Steroid Hormone の作用

1) 妊婦の血清遊離 amino 酸値は、妊娠各期にわたり比較的low値を示した。

2) 分娩を境として褥婦の遊離 amino 酸値は急激に上昇した。

3) 妊娠中毒症患者の遊離 amino 酸値は、正常妊婦

に較べ高値を示す。

4) 産褥期における遊離 amino 酸値の上昇は、乳汁分泌とかなりの関連性を暗示せしめるものであつた。

5) 胎児（臍帯）血清の遊離 amino 酸値は、夫々の母体血清 amino 酸値に較べ例外なく高値を示す。

6) 去勢婦人を対象として空腹時の血清遊離 amino 酸値に対する投与 steroid hormone の影響を観察した結果、progesterone, estradiol, cortisone は共に減少をもたらした。

7) 同時に測定した血糖値の変動に関しては、progesterone 並びに cortisone は血清 amino 酸値の低下と関連し、逆に上昇を認めたが、estradiol は血糖値の変動に一定の傾向を示さなかつた。

8) 各種 steroid hormone の前処置を行つた動物に C^{14} -glycine を静脈内に注入して、その血糖への転換を観察したが、30分後の成績においてかなりの転換を認め得た。

9) すなわち cortisone 前処置群において C^{14} -glycine 投与後30分の血糖の specific activity は、対照群に較べて著明に上昇を示し、progesterone 及び hydroxy progesterone 投与群もほぼ同様の効果を認めた。

10) estradiol 前処置群においては、対照と較べ特に C^{14} -glycine の血糖への転換に影響が認められなかつた。

11) 正常妊婦尿中の遊離 amino 酸排泄値は非妊婦に較べ高値を示す。

12) 妊婦に $V.B_6$ を投与すると、全例において amino 酸排泄は減少し、非妊婦の値に近づいた。しかし非妊婦への $V.B_6$ 投与は、殆んど影響を示さなかつた。

13) $V.B_6$ 欠乏動物における尿中への amino 酸排泄は増加を示す。

14) 妊婦への $V.B_{1,2}$ 投与は、尿中 amino 酸値に特に影響を与えなかつた。

15) 一定条件において飼育せる rat の尿中 amino 酸排泄量を測定し、各種 steroid hormone を投与した結果、progesterone は軽度の減少を、estrogen は変化を示さず、glucocorticoid は著明な増加をもたらした。

16) 同時に測定した urea-N の値もほぼ同様で、progesterone では軽度の減少、estrogen は、ある程度の増加を、そして glucocorticoid は著明な増加をもたらした。

2. 蛋白代謝におよぼす Estrogen, Progesterone の影響

1) 幼若 rat における蛋白質 turn-over を観察した結果、血漿、肝組織蛋白質は速やかでその半減期は 4～5日である。筋組織においては 12～13日であつた。

2) progesterone 投与群においては、各組織蛋白質に筋組織蛋白質において turnover rate の促進を示し、その半減期を約 $1/2$ に短縮した。

3) estradiol 投与群においては、特に影響を示さなかつた。

4) 去勢婦人に estradiol 投与前後の血清 lipoprotein 含量を比較測定した結果、estradiol 投与後に有意

の増加を示した。

5) estradiol 投与により lipoprotein 量の増加は、 α_1 及び α_2 -lipoprotein の増加によるものである。

3. 妊娠時における母体肝酵素の活性変化 (特に Amino 酸代謝関連酵素について)

1) 妊娠母体の肝 serine dehydratase 活性は、同令、同体重の非妊娠雌性動物に較べ低値を示す。そしてその活性値は、幼若動物と同程度であった。

2) alloxan 投与により動物を糖尿状態としたとき、妊娠動物における serine dehydratase 活性の上昇率は、非妊娠動物よりも有意に高く、又活性値の比較においても高値を示した。

3) 妊娠動物の肝、腎組織における ornithine aminotransferase 活性は非妊娠対照に較べ高値を示す。そして胎盤組織においても有意の酵素活性を認めた。

4. 性器外組織における酵素活性におよぼす Gonadal Hormone の影響

1) L-ornithine aminotransferase の活性は腎組織において高値を示し、肝組織においては低値であった。

2) 腎 ornithine aminotransferase に著明な性差を認め、雌性 rat に投与した estradiol は、投与回数に比例して腎の本酵素活性の上昇をもたらした。しかし肝酵素活性には、ほとんど影響が現われなかった。

3) testosterone の連続投与による酵素活性の変動は、雌性 rat 腎組織において現れ、活性の低下をもたらした。

4) progesterone 投与も特に活性変動をもたらさなかったが、estradiol による誘導効果を抑制することもなかった。

5) hydrocortisone の連続投与により、肝の酵素活性は有意に上昇を示した。

6) androgen sterilized rat においては、同令の正常雌性 rat に較べ、その腎組織 ornithine aminotransferase 活性は20倍以上に上昇した。これは持続的に分泌される estrogen の効果によるものと考えられる。

7) glycine amidinotransferase 活性は、腎組織において高値を示し、肝組織の活性は低値であった。そして hormone 投与による酵素活性の変動は腎組織においてのみ著明に現れた。

8) testosterone 投与により、酵素活性は最も強く上昇を示したが、progesterone, hydrocortisone はわずかに活性の誘導効果を示し、estradiol は逆に低下をもたらした。

9) 本酵素活性の雌雄差は、それぞれの gonadal hormone の影響により、かなりの支配を受けている。

10) 各種条件下にある婦人の L P L 活性を測定した結果、妊娠時には特に活性の変動を認めず、癌悪液質患者に有意の上昇を認めた。

11) 去勢動物に estradiol を投与した際、比較的短時間において、血中 F F A は上昇を示し、また estradiol 投与後24時間目には L P L 活性の上昇を認めた。

12) progesterone の投与は、比較的速やかに血中 F F A の減少を認め、また投与後24時間目には L P L 活性

はわずかに低下を示した。

13) 以上の成績から妊娠個体の L P L 活性は、estrogen 及び progesterone によりかなりの調整を受けるものと結論する。

本編の総括

妊娠個体における代謝の研究は、過去多くの人により報告されているが、その結果は一般的に“代謝の亢進”という言葉で表現される。そしてその原因に関しては、生体の複雑な代謝を解析的な手段(単純化した系)で研究した業績に乏しく、したがって明確な解答を呈示され難いものであるが、本研究において観察した血清遊離 amino 酸の動態と尿中への amino 酸排泄に関し、次の二つが原因的支配を与えているとの結論に達した。すなわち

(1) 胎児発育による子宮内での旺盛な新生過程が、母体に対し栄養の剝脱を強いることと、それによる passive な母体の代謝性変移。

(2) 内分泌系の活動化に伴って起る active な代謝律速因子の作動。

この様な内部要因に支配を受けている妊娠個体は、外部要因、殊に nutritional な条件との間に均衡が保たれ難い状態にあることは充分考え得ることで、ここに生体の恒常性の破綻が生じ、合目的性に反した pathway を辿ることも当然生じ得る筈である。殊に amino 酸尿を取り上げたとき、それが妊娠個体の代謝異常の一断面を現わしているとの結論に達した実験成績は、本著以外にも histidine 尿発現の因子として別に報告した通りである (Sugawa & Tamori, 1967)。

ここで妊娠維持に直接関連する母体の代謝適応に estrogen 及び progesterone がいかに関与するのかをまとめてみる。

estrogen は代謝の性差に大きく関与し、特定の酵素活性に対し強い制御を与えている。それが例えば glycine amidinotransferase の活性調節を通して creatine の生成を支配し、筋運動における energy 代謝の性差として現われているものである。また脂質代謝においても強い影響を与え、女性の皮下脂肪沈着についても強い影響を与え、女性の皮下脂肪沈着に関与している。しかしこの研究の範囲においては、amino 酸蛋白質代謝に対する estrogen の効果は、それ程顕著には認められなかった。

一方 progesterone は amino 酸の糖質移行に関し、かなりの律速性を示し、glucocorticoid と同様の態度を示した。この事は C₂₁ 位の keto 結合が両 steroid に共通しており、steroid の構造と作用の面から注目されることと思う。また progesterone は蛋白質代謝において、組織蛋白の易動化をもたらし、それが妊娠時には胎児蛋白源の供給に合目的性をもつた代謝調節と考えられる。progesterone のこの作用は Evans & Nelson (1955) により報告された無蛋白食飼育下の妊娠動物において胎児の死亡吸収が起るが、この動物に progesterone を投与することにより、ほとんどの胎児を生存せ

しめ得ることに対する説明として根拠を与えたものである。

以上妊娠個体の複雑な代謝性変移の原因解析に向つて、我々は出来得る限りの検討を加えてみたが、妊娠時の代謝性変移は胎児の発育と分娩を目的とした合目的性の調整の上に成り立ち、その調節因子としての steroid hormone の意義が認められた。またそれぞれの steroid hormone は常に相加的或いは相乗的に作用するのではなく、生体内の恒常性維持の原則的な場で、互いに干渉作用を示すことが多いことを認めた。

III. 胎児、新生児の生長と機能分化における Steroid Hormone の意義

1. 無細胞系における胎児肝の蛋白合成能の検討

1) 妊娠 rat を用い、母体肝と胎仔肝におこる蛋白合成能を無細胞系において観察した。その結果胎仔肝においては母体に比べ約2倍の蛋白合成能を有することを認めた。

2) 胎仔肝における蛋白合成能の亢進の一つは、上清分画中の amino 酸活性化、並びにその polysome への transfer rate の促進に関与する因子が高い活性を示すことによる。

3) 他の一つは ribosome 側の因子であり、胎仔肝の ribosome は母体肝に比べ蛋白合成の場として、その capacity が大きいものである。

2. 胎児、新生児肝における Amino 酸代謝に関連する酵素活性と Steroid Hormone による影響

1) 胎仔肝、子宮及び胎盤組織の serine dehydratase 活性を測定した結果、胎仔肝においては母体肝に比べ低活性を認めるに過ぎなかつた。そして子宮及び胎盤組織には酵素活性は認められない。

2) 妊娠動物に alloxan を投与し糖尿状態としたとき、母体肝の酵素活性は著明に上昇を示したが、この条件下でも胎仔肝の酵素活性はなお低値であつた。

3) 新生児の酵素活性は、分娩を転機として数時間以内に急上昇を示し、母体の活性レベルの約4倍に達する。そして以後次第に低下し生後5日目頃より母体肝の活性値と同程度となつた。

4) 妊娠 rat の母体及び胎仔肝の tryptophan pyrrolase 活性を測定した結果、胎仔肝は母体肝に比しきわめて低活性であつた。

5) 母体肝酵素が基質及び hormone 投与により十分誘導される条件下においても、胎仔肝酵素活性は上昇を示さない。

6) estradiol 及び progesterone 投与は肝 tryptophan pyrrolase 活性に殆んど影響を与えない。

7) 人胎盤 extract 投与は rat 肝の tryptophan pyrrolase 活性を上昇せしめた。しかしその上昇効果は副腎剝出群において低下した。

8) glucocorticoid による酵素活性誘導に対し、胎盤 extract 投与は抑制的に作用した。そしてこの作用は肝組織 extract には認められなかつた。

9) 胎仔肝における arginase 活性は弱く、出生後次第に上昇を示す。

10) 胎仔肝、新生児肝 arginase は成熟肝 arginase と酵素蛋白の性状においてかなりの違いを認めた。

11) すなわち耐熱性において胎仔肝の arginase は容易に活性を失う。また胎仔肝酵素について CMC-column を用いた分画を行うとき、“素通り分画”の活性は認められない。

12) 胎仔期、新生児期における arginase は単に酵素蛋白の量的欠存によるものではなく、酵素蛋白として異つた性格を示すと結論される。

3. Tryptophan Pyrrolase (E.C. 1. 1. 3. 1. 12) 活性の推移と肝細胞の増殖性との関連性について

1) 肝葉部分切除後の残存肝において、切除後24時間の間に tryptophan pyrrolase 活性は低下を示し、それに比例して glucocorticoid の活性誘導効果の減弱が現われた。24時間以後の経過においては、酵素活性の漸増とともに、glucocorticoid の誘導効果も顕著に現われて来た。

2) 再生肝における tryptophan pyrrolase 活性の推移と、thymidine kinase 活性の変遷との間に一定の関連性、すなわち逆相関を認めた。

3) 胎仔肝における thymidine kinase 活性は、再生肝よりもさらに高く、成熟肝の約40倍の高活性を示した。また再生肝と異つて投与 glucocorticoid による抑制効果は殆んど認め得なかつた。

4) 新生児の発育過程に伴い、tryptophan pyrrolase 活性は13日目以後に発現し、同時に glucocorticoid による誘導形成が現われた。そして、thymidine kinase 活性は再生肝と同様 tryptophan pyrrolase 活性の推移と逆の相関を示し、また glucocorticoid 投与により新生児期の thymidine kinase 活性は低下を示した。

4. 肝成熟過程における Ribosome の性状変化

1) 肝組織を材料とし、その microsome fraction をさらに遠心法並びに density gradient により分画を行つた。そして heavy microsome と light microsome の2分画に分け、肝の成熟過程における画分画の量的比を検討した。

2) 胎仔肝においては light microsome が圧倒的に多く、出生後の発育過程に伴つて heavy microsome が増加し、生後18日目には heavy microsome が圧倒的に多い成熟肝型となつた。

3) 各分画の電子顕微鏡による観察から、heavy microsome 分画は endoplasmic reticulum に結合した polysome を多く含み、light microsome 分画においては ribosome が“free ribosome”として存在することが認められた。

4) 画分画における蛋白合成能を無細胞系で比較検討したが、light microsome の分画に高い活性を認めた。

5) 画分画をそれぞれ desoxycholate 処理を行つたとき、ribosome 一定量当りの蛋白合成能は上昇した。

6) polysome における蛋白合成の活性度は、それを構成する蛋白質により制御を受けている可能性を認めた。

7) 新生児に投与した glucocorticoid は microsome

の (density gradient を用いた sedimentation pattern による) 性格変化に直接影響を与えなかつた。

本編の総括

出生を境として、さらに成熟過程をとおして個体の発育を主として肝酵素活性の推移で眺めてみた。そして現象的にかなり共通した酵素活性変遷の pattern を認め得た。これを生体にとって合目的性をもつたものと認めるならば、Claude Bernard により発展させられた「生物は外界環境にしたがい、内部環境を homeostatic に維持する」「適応現象」という概念で説明されるものである。そして酵素活性の変化は、分子レベルの表現型として把え得るものであろう。

酵素を発生学的な立場で取扱うときは、基本的には genetical な場での検討が必要であり、それには一つの考え方の基盤として Jacob & Monod による微生物の分化に関する遺伝的調節機構のモデルを取上げねばならない。事実先天性の代謝異常 (例えば phenylketon 尿症等) も、酵素生成不全、すなわち、その遺伝子の欠存として理解されるものである。

また我々の研究課題として取り上げている hormone の作用機序においても、hormone の代謝調整因子としての作用が、酵素生成或いは活性の調整の場で検討されるとき、遺伝子レベルでの考察は欠かすことが出来ない。

胎児期における酵素活性の低値或いは欠如、又出生後の活性上昇或いは出現に関しては、以下の諸原因が考えられる。

(A) 酵素蛋白の生成不全

(1) gene level で mRNA 合成が行なわれない。
(2) 合成はされるが mRNA 或いは rRNA が “masked RNA” の型であつて機能的に蛋白合成の鋳型或いは合成の場となり得ない。

(3) polysome で peptide (subunit) の形成はあつても、それが高次構造として重合されない。

(4) preenzyme より活性型への転換不全

(B) 賦活因子の欠乏

(1) (A) の各過程における activator の欠如
(2) 酵素反応の場での activator の欠乏 (co-factor の欠存)

(C) 阻害因子の存在

(1) (A) の各過程における repressor の存在
(2) 酵素反応系における阻害 (feedback inhibition すなわち allosteric site における阻害等)。

(3) anti-enzyme の存在

(D) 酵素蛋白の性状差

主として isozyme の発育過程における変化として現われる酵素蛋白の物理的、化学的な性質変化。

(E) 中枢性支配

Shimazu (1962, 1967) により報告された自律神経中枢による酵素活性の制御。

以上考え得る原因を列記してみたがこれらの成因が単一で、或いは組合わされて制御をしているにしても、それがすべての酵素発生に共通した制御機構と認められるものではなく、それぞれ異つた成因或いは、組合せの下に control されるものであろう。

結 語

本研究は生体における steroid hormone の作用意義を、生殖に伴う個体の代謝性適応の場において検討すべく企てられたもので、古くより知られている現象的な“妊娠性の変化”をことに機能面において観察し、その原因論における hormone の作用機構をできうるかぎり探究したものである。

そして hormone が生体の “chemical messenger” であるとする概念は、この研究を進めてゆく基本的な見解であり、それに対する特定の臓器、組織或いは細胞の応答を、まずは物質の動きとして把えんとしたものである。したがつて実験はかなり解析的な方向に進んで行つたことは止むを得ないことと考える。

このような実験を通して得たものは、物質として扱つてきた核酸或いは蛋白質が、いかにも、細胞自体の性格を支配する特殊な生物作用をもつということである。

蛋白質のもつ生物学的な特異作用は、生化学の進歩とともに、“酵素”として認められ、それぞれの代謝過程において生体の合目的性に沿つて役割りを果している。しかし hormone 作用を細胞レベルで検討を行なつてゆくとき、たとえば或る種の酵素活性の誘導を認めても、それが細胞の反応の結果であり、また次の過程への mediator としての作用意義としてのみ理解されるもので、細胞自体の方向性を決定する因子として理解する根拠とはなり得ない。つまりわれわれの得た結論は、細胞増殖の inducer は何か? あるいは機能分化へ向わす trigger は何か? という問に対し、単に「ある種の蛋白質がその役割を担っている。」という概念論でしかあり得なかつた様に考える。

そして同じような事が全編の研究の連がりの中でも認識せざるを得なかつた。すなわち、解析的な実験により得たそれぞれの結果が、分子のもつ作用として妊卵の着床と妊娠維持の場で直接結びつく説明が成り立つまでに到らなかつた。

しかしながら、hormone の作用機序を分子或いは細胞のレベルで観察してきた過程において、特定の物質の特殊機能を把まえてその場での hormone 作用を検討するという考え方が次第に強まり、この考え方は今後の研究を続ける上に最も必要なものとして銘記された。そしてそれが内分泌学を発生学との関連において、また癌化機構ともつながりを持つた研究として、生物学の領域で重要な研究分野であることを確認し得た。

なお本研究の一部は、文部省科学研究費、および阪大微生物病研究会、大阪癌研究会よりの研究助成金によつて行なわれたものである。