

尿中ステロイドホルモンの酵素系を中心とした簡易測定に関する研究

岡山大学医学部産婦人科教室 (主任：橋本 清教授)

副手 小西 秀信

〔昭和47年12月8日受稿〕

緒言

従来ステロイドホルモンの分類は男性女性ホルモン、コルチコイドといったように、睾丸、卵巣および副腎などの主要産生臓器を中心におこなわれてきた。しかしステロイドの生合成が単一臓器のみでなく、複数のステロイド産生臓器が関与しており、酵素系を中心として代謝がおこなわれていることが明らかになってきた。ステロイドの生合成は、その産生臓器細胞のミトコンドリアおよびマイクロゾーム分画に局在する諸酵素によっておこなわれており、これらの酵素系は副腎、卵巣睾丸および胎盤などに広く存在している。したがってステロイド生合成に関しては、臓器別でなく、各酵素系を中心として再編成する必要があろう。1968年、吉田¹⁾はステロイドホルモン生合成が主に不可逆性であることに立脚して、ステロイド代謝過程における酵素の仕事 (Enzyme Work) および酵素のパターン (Enzyme Pattern) という新しい概念を提唱した。

彼は尿中のステロイドホルモンを38分画にわたって詳細に測定し、それぞれ酵素の仕事および酵素パターンを算出し、内分泌疾患の追求に意義を求めた。しかしこの個々の分画測定による方法は、多数の熟練した研究者が長期間を費してやっと得られる測定法であり、卓越した理論であっても、この方法を臨床面で直接応用することは極めてむずかしい。

そこでこの方法を簡易化する目的で各々のステロイドを分画群としてとらえ、酵素系を中心として再編成し、17-Hydroxylase, 21-Hydroxylase, 11-Hydroxylase, Desmolase について各々酵素の仕事およびパターンを算出する新しい方法を考案した。この新簡易測定法で正常成熟婦人の月経周期尿ならびに妊娠初期、中期および後期の尿について測定し、それぞれ検討を加えた。

本論文において使用したステロイドの名称は次のように省略した。

17-KS : 17-Ketosteroids

17-KGS : 17-Ketogenic Steroids

17-OHCS : Porter-Silber Chromogen

Pregnanediol : 5β -Pregnane-3 α , 20 α -diol

Pregnane triol : 5β -Pregnane-3 α , 17 α , 20- α -triol

Testosterone : Androst-4-ene-17 α -ol-3-one

DHA : Androst-5-ene-3 β , 16 α -diol-17-one

16 α -OH-DHA : Androst-5-ene-3 β , 16 α -diol-17-one

Progesterone : Pregn-4-ene-3, 20, dione

Estriol : Estra-1, 3, 5 (10)-trien-3 β , 16 α , 17 β -triol

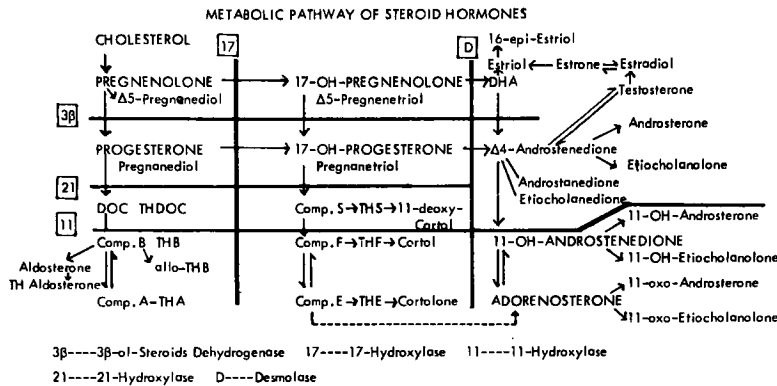
Estrogen : A-ring Phenol C 18 steroids

第1章 簡易測定法の意義

第1節 酵素の仕事およびパターンという概念

酵素の仕事とはステロイドの代謝が不可逆性で、かつステロイド母核が分解されずに尿中に排泄されることから、第1表に示すように、たとえば17-Hydroxylaseの仕事とは17-Hydroxylationをうけたことのあるすべてのステロイドの総和、すなわち [17] の縦線より右側のステロイド全体の値である。この24時間尿値は、17-Hydroxylaseの24時間の仕事 (Enzyme Work) と考えられる。同様に Desmolaseの仕事とは [21] の縦線より右側のステロイド全体であり、21-Hydroxylaseの仕事とは [21] 横線より下方全体、11-Hydroxylaseの仕事とは [11] 横線より下方のステロイド全体であり、各々ステロイド生合成に関与する酵素系の24時間の仕事は判定できる。また総ステロイドに対するこれら酵素の仕事の比を酵素パターン (Enzyme Pattern) と提唱し、酵素活性の指

第1表



標とした。

第2節 簡易測定値と分画測定値との相関について

ステロイド関連酵素の仕事という見地から、第2表

第2表

A NEW SIMPLE METHOD FOR DETERMINATION OF ENZYME PATTERN AND ENZYME WORK (KONISHI)

DESMOLATED STEROIDS : 17-KETOSTEROIDS (17-KS)

17-HYDROXYLATED STEROIDS : 17-KS + 17-KGS

11-HYDROXYLATED STEROIDS : 11-OXY-17-KS + 11-OXY-17-KGS

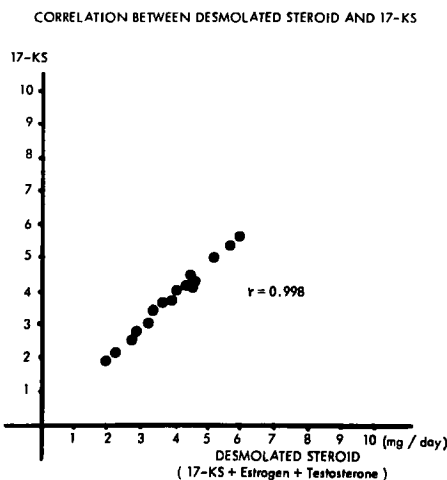
21-HYDROXYLATED STEROIDS : TOTAL MINERALO. + 17-KGS - PREGNANTRIOL

TOTAL STEROIDS : 17-KS + 17-KGS + TOTAL MINERALO. + PREGNANDIOL

(TOTAL MINERALO. : BLUE TETRAZOLIUM CHROM. - 17-OHCS)

(CORTOL COMPOUNDS : 17-KGS - 17-OHCS - PREGNANTRIOL)

第1図



表に示すように簡易測定値を算出し、各分画値の総和と算出した簡易測定値との相関性について、非妊娠成熟婦人16例につき検討を加えた。

(1) Desmolated Steroids

Desmolated Steroids は17-KS に Estrogen および Testosterone を加えたものであるが、17-KS に比し Estrogen および

Testosterone は極めて微量であり、Desmolated Steroids の5%以内にあり17-KS のみとの相関係数は0.998となり、非妊娠時では、Desmolated Steroids すなわち17-KS そのものであるといえる。(第1図)

(2) 17-Hydroxylated Steroids

17-Hydroxylated Steroids は17-KGS に Desmolated Steroids を加えたものであるが、これも Estrogen および Testosterone の影響は極めて少く、17-Hydroxylated Steroids のうち2%以内であり17-KGS + 17-KS との相関係数は0.999であった。(第2図)

(3) 11-Hydroxylated Steroids

11-Hydroxylated Steroids は11-oxy-17-KGS + 11-oxy-17-KS + 11-oxy-Mineralocorticoids であるが11-oxy-Mineralocorticoids を除外した場合との相関係数は0.992であった。(第3図)

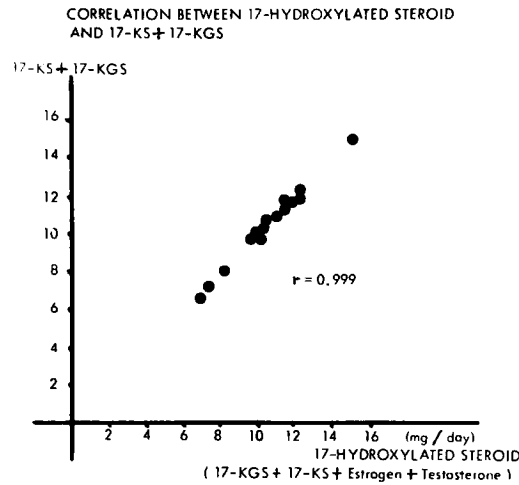
(4) 21-Hydroxylated Steroids

17-OHCS + Cortol Compounds + Total Mineralocorticoids が21-Hydroxylated Steroids であるが17-KGS + Total Mineralocorticoids - Pregnanetriol との相関係数は0.984であった。すなわち C 21-methyl-17 α -hydroxy-Steroids を無視しても充分であるといえる。(第4図)

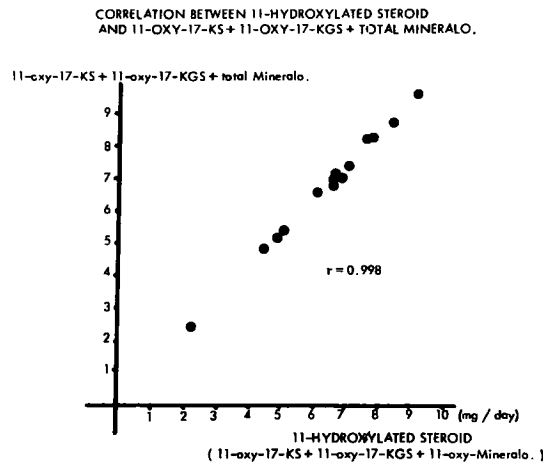
(5) Total Steroids

Total Steroids は17-KGS + 17-KS + Total Mineralocorticoids + Estrogen + Testosterone とみなされるが Estrogen および Testosterone は前述のように非妊娠時では Total Steroids にほとんど影響を与えなかった。(第5図)

第2図



第3図



以上(1)から(5)までをまとめてみると、第2表のように算出される。すなわち酵素系を中心とした尿中ステロイド測定には17-KGS および17-KS の2分画測定法、17-OHCS, Bluetetrazolium Chromogen, Pregnanediol および Pregnanetriol の6項目を測定すれば、ほぼ満足すべき酵素の仕事およびパターンが算出される。

第2章 実験方法

第1節 試薬

(1) ステロイド純品

Hydrocortisone : Schering A. G. Berlin より入手

DHA : 帝国臓器製薬より入手

DOC : 塩野義研究所より入手

Pregnanediol : 帝国臓器製薬より入手

Pregnanetriol : 帝国臓器製薬より入手

(2) 有機溶媒

Ethylacetate : 特級 Ethylacetate に濃炭酸ソーダ溶液を加えて遊離炭酸を中和し、下層の水溶液を除き、50%塩化カルシウム溶液を加え振盪静置して下層の Ethanol と塩化カルシウムの結合物を含む水溶液を除去し、無水炭酸カリで乾固し、精溜したものを用いた。

Ether : 硫酸第1鉄の0.5% V/W 2%硫酸水溶液 1/10 Vol. を1級 Ether に加えて振盪後下層をす

てる。2回行って後、1/10 Vol. の純水で3回洗滌し、PH 4.4~4.6に調整後、芒硝にて脱水蒸溜したものをを用いた。

Benzene : 1級 Benzene 8 Vol. に対して1級硫酸 1 Vol. を加えて3回洗滌し、その後 1/10 Vol.

1 N-NaOH を加えて
2回洗滌後、1/10 Vol.
の純水で3回水洗し、
塩化カルシウムで脱水、
蒸溜したものをを用いた。

Ethanol :
Methanol :
Chloroform :
Toluene :
これらはいずれも和
光純薬製特級のもの
を用いた。

(3) 試薬

β -Glucuronidase :
Fishman の方法で屠
殺直後の仔牛肝臓よ
り自家抽出 Step 11
まで精製したものを
を用いた。

H₂SO₄ :

HCl :
Acetic acid
NaCl :
NaOH :

これらはいずれも和光純薬製
特級のものをを用いた。

Sodium sulfate, anhydrous : 和光純薬製 1級
Sodium metaperiodate : キシダ化学製
Sodium borohydrate : Merck 社製
Florisil : 100~200 mesh のもので和光純薬製
Blue tetrazolium : 東京化成工業製
Tetraethylammouium hydroxide : 東京化成工
業製

1% meta-dinitrobenzene : 再結晶により精製
したものを

(4) 器械器具

Column : Florisil Column には内径 1 cm のも
を使用, Alumina Column には内径 0.75 cm のもの
を使用した。

Spectrophotometer : 124型日立ダブルビーム分
光光度計にて比色した。

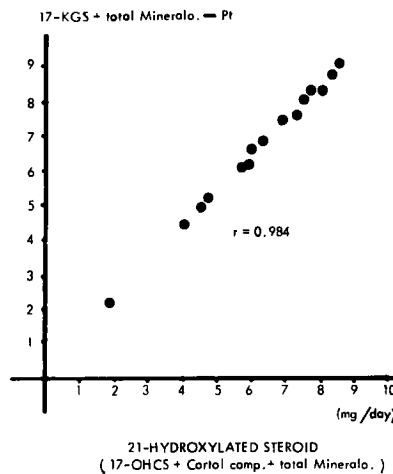
第2節 実験方法

測定方法の概要は第3表に示す通りである。採尿
方法は、Toluene, 5 mlを入れた 2ml容量の Poly-
ethylene 容器に24時間尿を正確に蓄尿させ、可及的
速やかに実験に供した。

(1) β -Glucuronidase 加水分解

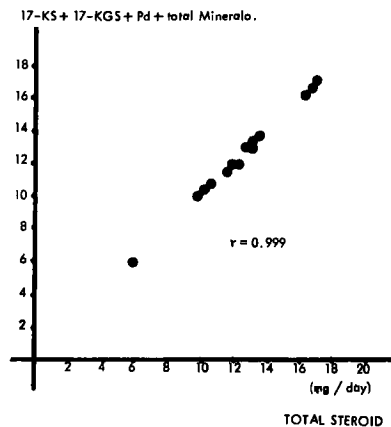
第4図

CORRELATION BETWEEN 21-HYDROXYLATED STEROID
AND 17-KGS + TOTAL MINERALO. ⇒ PREGNANETRIOL



第5図

CORRELATION BETWEEN TOTAL STEROID AND 17-KS + 17-KGS
+ PREGNANEDIOL + TOTAL MINERALO..



β -Glucuronidase は Fishman の方法で屠殺直
後の仔牛肝臓より自家精製したものをを用いた。正確
に蓄尿した24時間尿のうち170 mlを採り濾紙にて濾
過した後、5倍 Acetic acid によって PH 4.7に調
整、0.2 M Acetic Buffer を 8ml 加えた後、 β -
Glucuronidase, 40800 Fishman Unit および Peni-
cillin G を耳かき 4 杯加えて、37°C 48時間 incubate
した。途中24時間目に、 β -Glucuronidase を 20400
Fishman Unit 追加した。

(2) 抽出および洗滌

Ethylacetate 140 ml で 2 回、70 ml で 3 回抽出した
後、cold 2 N-NaOH, 2 ml. で 2 回アルカリ洗滌
した。洗滌した NaOH 層は Ethylacetate で逆抽出
してすてた。次いで蒸溜水で 2 回洗滌、同様に逆抽
出していずれも中性化したことを確かめて芒硝で脱
水後、N₂ ガス下で 60°C に保温しながら減圧蒸溜乾固
した。Solvolysis は β -Glucuronidase 水解後 Eth-
ylacetate にて抽出してすんだ尿層を 34 g の NaOH
で飽和して、50% H₂SO₄ 17 ml と 5 倍の Formalin
3.4 ml を加えて、Ether 170 ml 追加し密栓した。室温

に静置し、1日2回定時に15秒間振盪しながら4日間くり返した。その後 Ether 170mlで2回抽出、純水21mlで2回水洗して中性になったことを確かめ、芒硝で脱水後、1ℓ容量のナスフラスコにとり、45℃にて蒸溜乾固する。このようにして得られたβ-Glucuronidase Hydrolysate と Solvolysits とを次の Chromatography により分離した。

(3) 分離方法 Florisil Column Chromatography

Florisil 3.0 g を内径1cmの Column に Chloroform にて湿性に詰め、先に得られた Steroid Residue を Chloroform 4ml × 3回で吸着させ、Chloroform 10ml で prewash し 0.8% Methanol / Chloroform 75ml で C₁₉ Steroids を溶出した。なお純品検定により Pregnanediol は 0.8% Methanol / Chloroform に Pregnanetriol は 15% Methanol / Chloroform にて溶出された。また Methanol / Chloroform の濃度と量は予試験にて決定した。分離した Steroids は各々蒸溜乾固した。0.8% Methanol / Chloroform から得られた Steroids Residue は Ethanol にて3等分し、各々 Pregnanediol および 17-KS 2分画用に使用した。15% Methanol / Chloroform から得られた Residue は、Ethanol 6ml にて6等分し、各々 17-KGS 2分画、17-OHCS, Blue tetrazolium Chromogen および Pregnanetriol 測定用に分配し、各々 N₂ ガス下で減圧蒸溜乾固した。

(a) 17-KS 2分画法

Alumina Column Chromatography にて分離した。まず、0.8% Methanol / Chloroform から得た Steroid Residue 3等分のうち1本を4% Mater alumina に Benzene にて湿性に吸着後、あらかじめ予試験で定めた 0.15% Ethanol / Benzene, 28ml, にて 11-deoxy-17-KS を溶出し蒸溜乾固した。DHA の純品 50μg を Standard として Zimmerman 発色させた。すなわち 0.4ml の 1% Metadinitrobenzen と 0.2ml の 8 N-KOH とを加えて振盪後暗室に1時間静置した。さらに Ethanol 4ml を加えて比色計で λ 460-520-580 mμ の3点測定をおこない Allen の補正式にて算出した。

(b) 17-KGS 2分画法

Few-神戸川直接法により測定した。まず 1 N-NaOH 滴下により PH > 8 とし、10% NaBH₄ / 0.1 N-NaOH 溶液 0.5ml で還元し、37℃で4時間以上静置、水冷後 25% 酢酸 0.5ml で、PH 4.5~7 として 10% NaI₂ 加えて、37℃の暗所で1時間放置後 40%

NaOH 0.25ml でアルカリ性にする。抽出は 50ml 容量の分液漏斗に入れて Ether で2回抽出後、蒸溜水 5ml で2回洗滌し、芒硝にて脱水後蒸溜乾固した。

2分画法は Alumina Column Chromatography でおこない、まず 6% Water Alumina, 1 g を用いて内径 0.75cm の Column に Benzene で湿性に詰め Benzene 5ml で吸着した後、0.5% Ethanol / Benzene 18ml で 11-deoxy-17-KGS を溶出し、2% Ethanol / Benzene によって 11-oxy-17-KGS を溶出し、蒸溜乾固後、17-KS と同様に Zimmerman 発色しておこなった。

(c) 17-OHCS

Hydrocortisone を Standard として Porter-Silber 反応の神戸川変法により発色し、λ 370 - 410 - 450 mμ の3点測定をおこない、Allen の補正式および Zimmerman の発色により算出した。

(d) Blue tetrazolium Chromogen

15% Methanol / Chloroform により溶出した Steroids Residue に Ethanol 3ml および 0.25% Blue Tetrazolium Solution を加えて室温で20分間放置、さらに 10% Tetraethylammoniumhydroxids 1 ml を加えて室温で15分間放置、1ml の Acid alcohol を追加して DOC の純品 50μg を Standard として λ 440-560-620 mμ の3点測定後 Allen の補正によって算出した。

(e) Pregnanediol および Pregnanetriol

(3) であらかじめ用意した Pregnanediol および Pregnanetriol 用検体を Ethanol にて混合して N₂ ガス下で乾固し、一次カラムとして内径 0.75cm のカラムにアルミナ 2.0 g を充填し、水飽和ベンゼン 5ml で吸着、1.2% Ethanol / Benzene 10ml で Prewash 後 2% Ethanol / Benzene 10ml で Pregnanediol を溶出し、更に 4% Ethanol / Benzene 10ml で Prewash し、6% Ethanol / Benzene 18 ml により Pregnanetriol 分画を溶出、蒸溜乾固した後 conc. H₂ SO₄ 4ml を加えて室温に1時間放置し、λ 380-420-460 mμ の3点測定をおこない Allen の補正をおこなった。一次の Alumina Column Chromatography で分離した Pregnanediol 分画は、無水 Acetic acid および無水 Pyridin の混合液 0.2ml 加え、100℃で1時間加熱する方法でアセチル化し、乾固した後二次 Alumina Column Chromatography によってさらに精製した。すなわち、0.75cm の内径を有する Column に Alumina 3 g を Petroleum-ether 4 ml で湿性につめ、Petroleum-ether 4 ml

で吸着後, 30% Ethanol/Petroleum 18mlでPrewashし, 0.5% Ethanol/Benzene 16mlを採取し, 蒸溜乾固した後0.1% Sodium sulfate/conc. H₂SO₄ 4 ml加え, 100℃で5分間加熱後, 氷水中で1時間放置した. λ 380-420-460 mμで測定し, Allen 補正式により算出した.

第3章 実験成績

第1節 月経周期と酵素の仕事およびパターンについて

女性の月経周期尿における変動を追求するため, 27才 Para 2 -0 -2の正常成熟婦人に2~3日毎に24時間尿を正確に採尿せしめ, 前述の尿中ステロイドを6項目にわたって測定し, 各々酵素の仕事およびパターンを算出した. また増殖期, 排卵期, 分泌期の変動をみるために, 増殖期は月経第1, 4, 7日目の3日間, 排卵期前後は10, 13, 14日目の3日間, 分泌期は17, 19, 21, 23日の4日間の各々平均値を求めた.

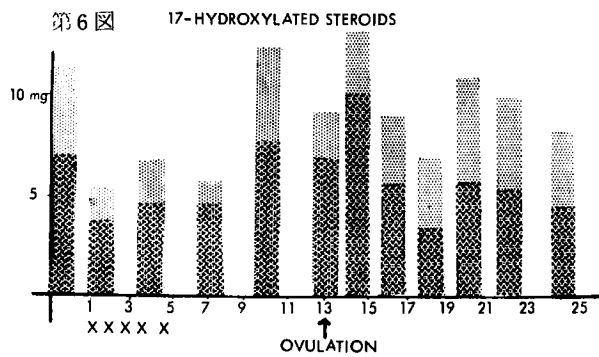
(第4表)

(A) 月経周期と酵素の仕事

(1) 17-Hydroxylated Steroids

増殖期 4381μg

- 排卵前後 8460μg
- 分泌期 5086μg (第6図)
- (2) 21-Hydroxylated Steroids
- 増殖期 3914μg
- 排卵前後 6686μg
- 分泌期 5298μg (第7図)
- (3) 11-Hydroxylated Steroids
- 増殖期 3479μg
- 排卵前後 6330μg
- 分泌期 2079μg (第8図)
- (4) Desmolated Steroids
- 増殖期 1234μg

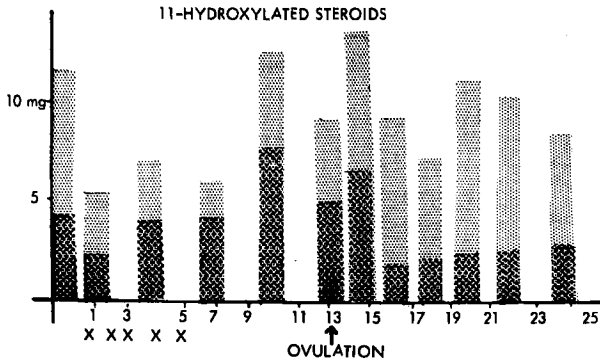


URINARY STEROIDS DURING THE NORMAL MENSTRUAL CYCLE

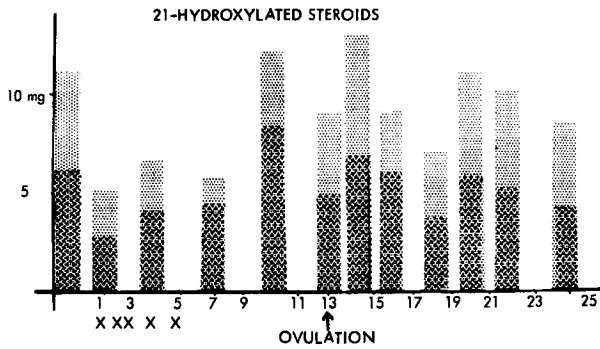
第4表

Urinary Steroids	Bluetetra-zolium Chrom.	11-deoxy-17-OHCS	17-OHCS	11-deoxy-17-KS	Pregnane-diol	Pregnane-triol			
Menst. Cycle									
Premenst.	5610	1860	5319	3709	1277	1544	2315	942	
1	3093	851	2392	2407	267	1240	1391	750	147
4	4849	1114	3369	3379	151	1235	1444	710	347
7	4780	928	3879	3638	209	618	867	452	160
10	7833	1658	4353	3722	249	2021	3488	353	129
13	4983	2695	3715	3568	1467	2114	3162	542	211
14	6380	2536	4899	4073	1078	4335	5572	559	402
16	4554	1162	3714	1835	1237	1469	1985	600	394
18	3295	3453	2199	1307	261	748	1285	1477	372
20	4721	1927	3553	1909	272	537	2171	2332	638
22	4349	2875	3275	1727	346	924	2161	2530	491
25	4461	400	2891	2787	402	976	883	2122	440
		2489				740	1623		

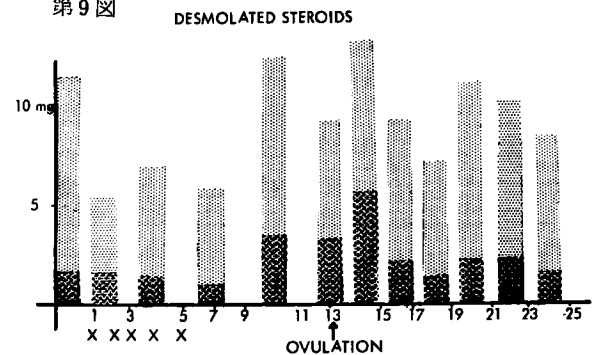
第7図



第8図



第9図



排卵前後 4084 μ g
 分泌期 2534 μ g (第9図)
 (5) Total Steroids
 増殖期 5781 μ g
 排卵前後 11515 μ g
 分泌期 9046 μ g (第10図)

以上の測定結果より Total Steroids は排卵前後に8.9mg~13.4mgとやゝ高値となり、増殖期では5.2mg~6.7mgと低値で、分泌期は6.9mg~11.0mgとやゝ

低値であった。(1)~(4)までの各酵素の仕事量も Total Steroids とほぼ平行した変化を示し、排卵前後で高値となり増殖期は低値、分泌期ではやゝ低値であった。(第5表)

(B) 月経周期と酵素パターン

- (1) Pattern of 17-Hydroxylase (Ratio to total Steroids)
 増殖期67.7% 排卵前後76.6% 分泌期64.9% (第10図)
- (2) Pattern of 21-Hydroxylase
 増殖期67.7% 排卵前後56.1% 分泌期48.4% (第11図)
- (3) Pattern of 11-Hydroxylase
 増殖期58.3% 排卵前後57.3% 分泌期26.5% (第12図)
- (4) Pattern of Desmolase
 増殖期20.9% 排卵前後37.0% 分泌期24.1% (第13図)

以上の測定結果より 17-Hydroxylase のパターンは排卵前後にやゝ増加しているが、全周期を通じてほぼ一定のパターンを示した。11-, 21-Hydroxylase のパターンではいずれも月経周期第7日目にピークがあり、前後はゆるやかな曲線を描いて下降していた。Desmolase のパターンは、排卵前後にやゝ増加の傾向がみられた。

第2節 妊娠と酵素の仕事およびパターンについて

被検者は妊娠初期、中期および後期の正常妊婦で、年齢は21~28才、妊娠月数は6週から37週までの12例である。このうち妊娠初期(6W~10W)5例、中期(16W~21W)4例、後期(36W~37W)3例である。(第6表、第7表)

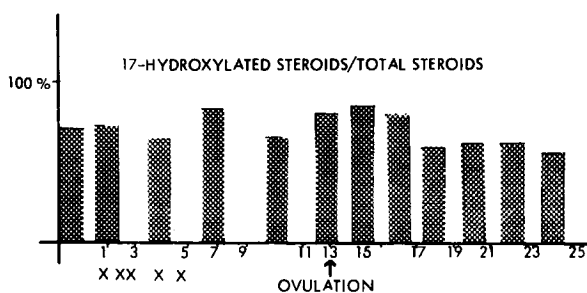
- (1) 17-Hydroxylated Steroids
 初期 7236 μ g 中期 7321 μ g 後期 5145 μ g
- (2) 21-Hydroxylated Steroids
 初期 5131 μ g 中期 6353 μ g 後期 5706 μ g
- (3) 11-Hydroxylated Steroids
 初期 2520 μ g 中期 2537 μ g 後期 2501 μ g
- (4) Desmolated Steroids
 初期 3921 μ g 中期 3827 μ g 後期 1555 μ g
- (5) Total Steroids

第5表

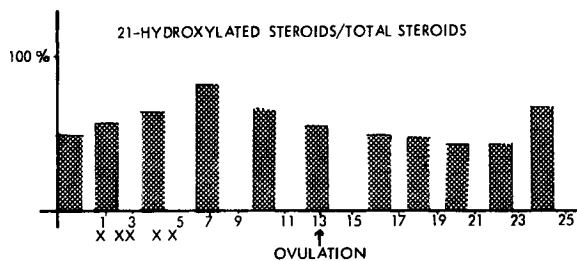
 ENZYME WORKS DURING THE NORMAL
 MENSTRUAL CYCLE

Enzyme Work Menst. Cycle	Total Steroids	17-Hydroxylated Steroids	21-Hydroxylated Steroids	11-Hydroxylated Steroids	Desmolated Steroids
Premenstr.	11370	6863	6278	4017	1544
1	5219	3783	2931	2393	1391
4	6693	4513	4192	3944	1444
7	5701	4746	4620	4101	867
10	12305	7841	8335	7642	3488
13	8864	6907	4919	4882	3192
14	13377	10471	6804	6455	5572
16	9018	5699	6039	1617	1985
18	6945	3484	3815	1906	1285
20	11068	5724	5927	2344	2171
22	10564	5436	5406	2450	2161
25	8310	4514	4125	2712	1623

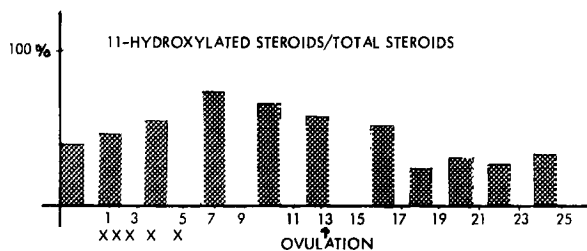
第10図



第11図



第12図



初期14959 μ g中期20951 μ g後期37216 μ g

以上の測定結果より 17-Hydroxylated Steroids および Desmolated Steroids は、妊娠初期、中期では変わらず、後期にやゝ低下した。21-Hydroxylated Steroids および 11-Hydroxylated Steroids は妊娠経過中、特に変化はみられなかった。Total Steroids は妊娠後半になるにしたがって著明に増加した。(第14図)

(B) 妊娠と酵素パターン

(1) Pattern of 17-Hydroxylase

初期48.6% 中期35.8% 後期15.1%

(2) Pattern of 21-Hydroxylase

初期35.0% 中期27.6% 後期24.5%

(第15図)

(3) Pattern of 11-Hydroxylase

初期10.1% 中期 7.5% 後期 6.8%

(4) Pattern of Desmolase

初期22.8% 中期 7.5% 後期 6.8%

(第16図)

この測定結果より、妊娠中の酵素パターンは、いずれも後半期になるにしたがって、低下してきた。この原因は Total Steroids の増加の大部分が Pregnane-diol の急増によるものであり、各酵素パターンの低下は、この Pregnane-diol の急増による比較的低下とみなすことができる。

第6表

URINARY STEROIDS DURING PREGNANCY

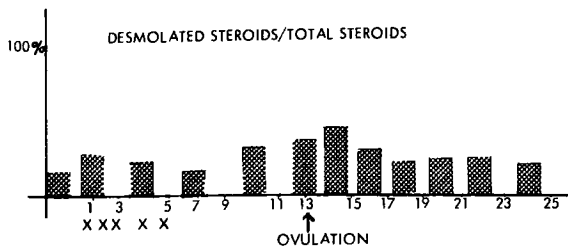
Urinary Steroids	Bluetetra-zolium Chrom.	11-deoxy-17-KGS	17-OHCS	11-deoxy-17-KS	Pregnane-diol	Pregnane-triol
Gest. Weeks						
6W	5294	2751 1502	4253	3030	3159 3736	4545 1492
9W	4738	3814 444	4258	2990	2994 3202	8570 596
9W	5177	3732 428	4160	2640	1471 1645	4122 498
9W	6655	1580 1604	3184	4204	4083 4718	4075 979
10W	5318	2021 1218	3239	2509	3114 3784	6493 744
16W	9082	3907 1809	5716	5084	5751 7008	12706 1036
20W	5585	3499 729	4228	5292	1225 1796	8175 1330
20W	4079	3308 454	3762	3031	960 1440	7504 920
21W	8498	3310 497	3807	2587	973 1529	14994 1510
36W	7285	1050 2148	3198	4500	1139 1178	28370 1477
36W	6906	2366 2242	4608	2812	1709 2187	30401 2005
37W	6829	2063 2393	4456	3666	1104 1308	25901 1705

第7表

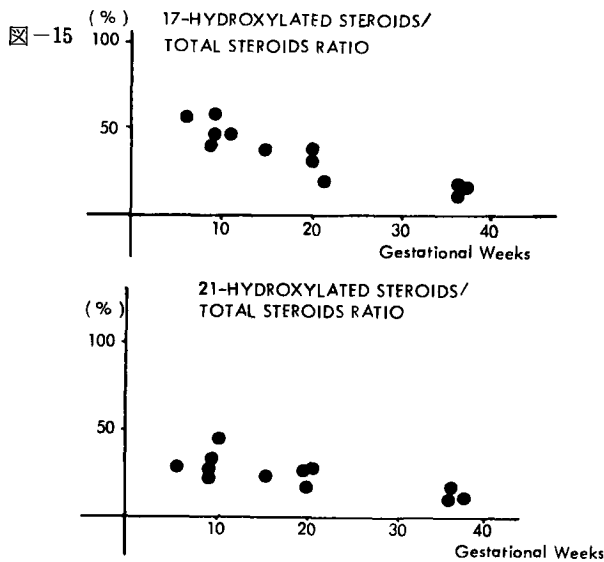
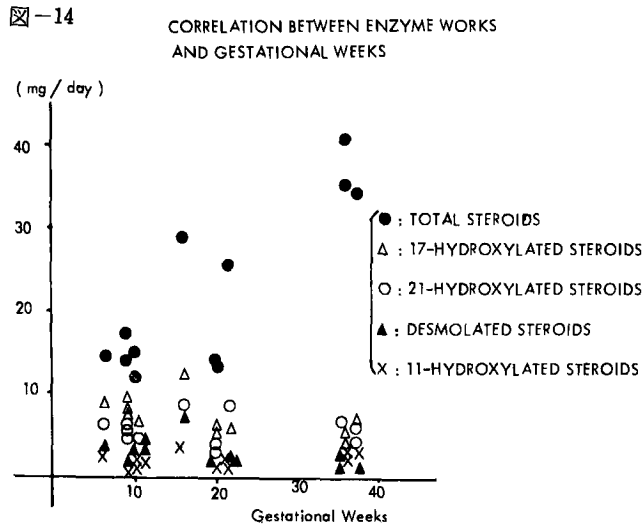
ENZYME WORKS DURING PREGNANCY

Enzyme Work	Total Steroids	17-Hydroxylated steroids	21-Hydroxylated steroids	11-Hydroxylated Steroids	Desmolated Steroids
Gest. Weeks					
6W	14798	7989	5088	2079	3736
9W	17778	7460	5410	652	3202
9W	14428	7902	4656	2319	4718
9W	15325	7023	4304	1818	3784
10W	12464	5805	6199	602	1645
16W	29428	12724	8678	3066	7008
20W	14382	6024	3081	1300	1796
20W	13754	5202	3890	934	1440
21W	26241	5336	8208	1053	1529
36W	35531	4376	4506	2187	1178
36W	41290	6795	6697	2720	2178
37W	34828	5764	5914	2597	1308

第4章 考案



吉田等^{51, 61}は、24時間尿中に排泄されるステロイドホルモン38分画を測定し、ステロイド代謝に関与する酵素を中心にこれを再編成して、酵素の仕事およびパターンといった全く新しい概念を提唱し、尿中ステロイドホルモンの測定の意義に



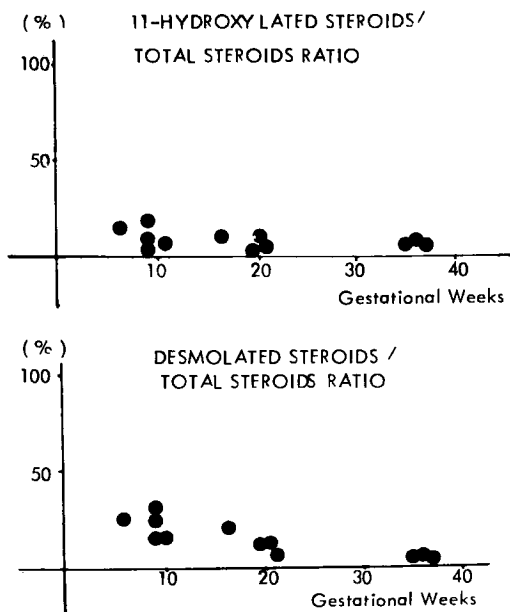
関して画期的な報告をし、注目を集めたが、これは非常に卓越した理論であり、臨床的にも極めて有用であると考えられた。しかし尿中のステロイドホルモン38分画を測定することは、長時間の日数と労力を必要とするため、さらに追求した報告はみられない。著者は、この理論を臨床面に応用できるよう、すなわち比較的短期間で測定できる方法を考案した。吉田⁶⁾による38分画測定値をもとにした酵素の仕事とパターンと著者の考案した簡易測定による酵素の仕事とパターンとの間には、極めて高い正の相関関係が成立した。従って簡易測定による酵素の仕事とパターンは充分に臨床面に応用され得ることが実証

された。吉田⁶⁾の報告した女性正常月経周期の酵素(すなわち 17-Hydroxylase, 21-Hydroxylase, 11-Hydroxylase, Desmolase をさす)の仕事とパターンの変動と、簡易測定によるその変動は、よく類似したものであり、すなわち総ステロイドの変動は、両者とも排卵周辺でピークを形成し、増殖期は低く、分泌期ではやゝ高い値を示していた。

17-Hydroxylated Steroids および Desmolated Steroids も総ステロイドの変動とよく似た値を示していた。換言すると、総ステロイド量の変動すれば、酵素の仕事もそれにつれて変動し、各酵素の仕事量を総ステロイドで割った値、すなわち酵素パターンは、ほぼ一定しており、変動が僅少であることも一致した。しかしながら、正常月経周期における酵素のパターンでも、11-Hydroxylase および 21-Hydroxylase については増殖期の中間にピークを形成し、これは不明のメカニズムによって、この時期に Glucocorticoids の産生が、他のステロイドに比し優位になっていると推察される。一方 Desmolase のパターンは、排卵周辺でピークを形成しており、この時期に生体の Androgenicity も高まっていると考えることができ、田中⁴⁾の報告と一致している。これらのことより考えると、正常成熟婦人のステロイド関連酵素の作用には、余力があり、ある程度のリズム

をもち周期活動に対処しているものと考えられる。次いで、妊婦においてこれらのステロイド関連酵素の仕事とパターンについて論ずるためには、Feto-Placental Unit で産生および代謝されるステロイドと共に、それに関連した酵素を考慮しなければならない。妊娠時には、Estrogen 特に Estriol と Progesterone の産生と代謝が特徴的であり、Estriol は胎児副腎および胎児肝臓で Pregnenolone より DHA を経て 16α -OH-DHA となりこれが胎盤による Aromatization により、Estriol となり尿中に排泄される。一方 Progesterone も胎盤の $\Delta 5-3\beta$ -ol-Steroid Dehydrogenase および Isomerase

第16図



の作用により、Pregnenolone を前駆物質として Progesterone が産生され、尿中には Pregnanediol として排泄されるが、前述のごとくこれらは Feto-Placental Unit で産生されるものであり、妊娠経過とともにこれらの酵素活性は高まり、尿中 Estriol および Pregnanediol の増量としてあらわれる。しかしながら、Feto-Placental Unit で産生されるステロイドの main Metabolite である尿中 Estriol および Pregnanediol を除いて考えた酵素のパターンは、妊娠性変化にほとんど影響されず、一定のパターンを示し、このことは、母体は Fetus および Placenta に Estriol および Progesterone の前駆物質を大量に与えながら、自からの代謝は、非妊娠時とさほど相違のない環境を有していることが示唆される。鎌田²⁾等は17-KS の測定意義は Desmolase 活性の反映であると報告しているが、著者の実験でも妊娠母体と Desmolase 活性とは無関係のようであり、特に増加傾向は認められなかった。同様に17-Hydroxylase, 21-Hydroxylase および11-Hydroxylase のパターンも妊娠母体では増加せず、むしろ Pregnanediol 増加による各パターンの比較的低下がみられ、これら酵素の仕事量およびパターンは、妊娠によって乱されないことを証明している。

第5章 結 語

(1) 尿中ステロイドホルモンの代謝過程から、その

関連酵素の仕事およびパターンという概念でその簡易測定法を考案した。

(2) 簡易測定には17-KS および17-KGS 2分画測定, 17-OHCS, Blue tetrazolium Chromogen, Pregnanetriol および Pregnanediol の6項目を測定し、関連酵素の仕事とパターンを算出した。この方法は、吉田等の38分画測定による方法と比較して、ほぼ満足すべき結果を得、臨床的にも応用できることを実証した。

(3) 月経周期における酵素の仕事では、17-, 21-, 11-Hydroxylated Steroids, Desmolated Steroids とともに排卵前後で高く、増殖期では低く、分泌期ではやや高い傾向を示した。

(4) 月経周期における酵素パターンでは、11-, 21-Hydroxylase のパターンはいずれも増殖期の中間にピークがあり、Desmolase のパターンでは排卵前後にやや増加した。

17-Hydroxylase のパターンでは、大きな変動はみられなかった。

(5) 妊娠時における酵素の仕事では Desmolated Steroids および17-Hydroxylated Steroids は、妊娠後期にやや低下したが、11-, 21-Hydroxylated Steroids では、妊娠による変動はみられなかった。

(6) 妊娠時における酵素パターンでは、妊娠後期の Pregnanediol の急増のため、これらの酵素パターンは、いずれも比較的低下する傾向がみられた。しかし Pregnanediol および Estriol など Feto-Placental Unit で産生、代謝されるステロイドを除外すれば、母体本来のステロイド関連酵素系は乱されることなく、ほぼ安定した酵素の仕事量およびパターンを示した。

(7) 今後、この簡易測定法により、主に内分泌疾患を中心とした病因の追求にも充分役立つ方法であることを確信する。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師橋本清教授に深く感謝致します。また終始御指導、御教示を頂いた(故)吉田俊彦講師、鎌田昌平講師に深く感謝致します。

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) 鎌田昌平, 伊藤裕, 相良祐輔, 小西秀信, 秋本
暁久: ホルモンと臨床, 19: 960, 1971 | 4) 田中英夫: 岡山医学会誌, 83: 1, 1971 |
| 2) 鎌田昌平, 小西秀信, 秋本暁久: ホルモンと臨
床, 19: 935, 1971 | 5) 吉田俊彦: 臨床病理, 16: 896, 1968 |
| 3) 柴田育男: 日本内分泌学会誌, 45: 899, 1969 | 6) 吉田俊彦, 鎌田昌平, 伊藤裕, 相良祐輔, 小西
秀信, 秋本暁久: ホルモンと臨床, 19: 722,
1971 |

A Simple Method of Estimating Urinary Steroid Hormones

Centering Around the Enzyme Group

Hidenobu Konishi

Department of Obstetrics and Gynecology Okayama University Medical School

Okayama, Japan

(Director : Prof. Kiyoshi Hashimoto)

β -glucuronidase, hydrolysate and solvolysate as the main enzyme group in the urinary hormones of steroids were measured and the enzyme work and the enzyme pattern as proposed by Yoshida of our laboratory were studied. The results are summarized as follows.

1. From the metabolic processes of urinary steroid hormones a simple method of estimating urinary steroid hormones was devised on the basis of the concept of the related enzyme work and enzyme patterns.

2. For the simple estimation two fractions, 17-KS and 17-KGS, as well as 17-OHCS, blue tetrazolium chromogen, pregnanetriol and pregnanediol to the total of 8 fractions were measured, and the work of related enzymes and the enzyme patterns were calculated subsequently. This method, when compared with the method of estimating 38 fractions, is found to attain fairly satisfactory results and it has been demonstrated to be applicable in clinical practice.

3. As for the enzyme work during the menstrual cycle 17-, 21-, 11-hydroxylated steroids and desmolated steroids all tended to be high before and after ovulation, low at the proliferation stage, and somewhat high at the secretory stage.

4. As for the enzyme patterns during the menstrual cycle, the patterns of 11- and 21-hydroxylase both showed their peak in the middle of the proliferation stage, and by the desmolase pattern it increased somewhat before and after the ovulation. In the 17-hydroxylase pattern there could be observed no appreciable change.

5. As for the enzyme work during pregnancy the work of desmolated steroids and 17-hydroxylated steroids decreased in the third trimester of pregnancy, but the work of 11- and 21-hydroxylated steroids did not show any change due to pregnancy.

6. Regarding the enzyme pattern during pregnancy due to an acute increase of pregnanediol in the third trimester there could be observed a tendency of relative decrease in all these enzyme patterns. However, excepting those steroids produced and metabolized by feto-placental units such as pregnanediol and estriol, all the steroids-related enzyme group of maternal origin showed practically stabilized enzyme work and pattern without any disturbance.

7. It is safe to say that this simple method of estimating steroid hormones in urine would serve sufficiently in the elucidation of pathogenesis, especially of the endocrinal diseases in future.