

# 担癌ラットにおけるステロイドの代謝に関する研究

## 第 2 編

### in vitro でのステロイドの代謝

岡山大学医学部第一外科教室 (主任: 田中早苗教授)

山 本 三 郎

〔昭和42年7月4日受稿〕

#### 第1章 緒 言

担癌動物で生合成される副腎皮質ホルモンは正常動物におけるそれとは異なっているであろうことは尿中に排泄されるステロイドホルモン量の差異から推察されるところであるが、尿中より測定されるステロイドホルモンには肝において代謝されたり、不活性化されたものが含有されていて、ステロイドホルモンの生合成に関する資料としては、はなはだ根拠が薄い。

私は第1編において cholesterol より steroid hormone 生合成について in vivo の実験を行ない、担癌ラットでは、コレステロールから副腎皮質ホルモンへの代謝は正常ラットの約2倍の代謝速度を示していることを見出したが本論文では、副腎ホモジネートを用いてコレステロールからコルチコステロイドへの生合成について in vitro の実験を行ない Walker carcinosarcoma を移植した Wistar 系ラット雄の副腎におけるコルチコステロイド合成の特異性について研究し、また正常ラットの腹腔内に ACTH を注入し、副腎が刺激された状態を作り、担癌ラットの副腎におけるコルチコステロイド産生の状態と比較検討した。

#### 第2章 実験方法

1) 実験動物 Wistar 系ラット雄、生後4ヶ月、平均体重150~200g に Walker carcinosarcoma 腫瘍を滅菌生理食塩液でホモジネートとし、背部筋膜に注入し、約10日後移植した腫瘍が拇指頭大になつたラットを担癌ラットとして使用した。又、正常ラット腹腔内に ACTH 5単位を注入し、2時間経過したラットを ACTH 刺激状態のラットとして使用した。

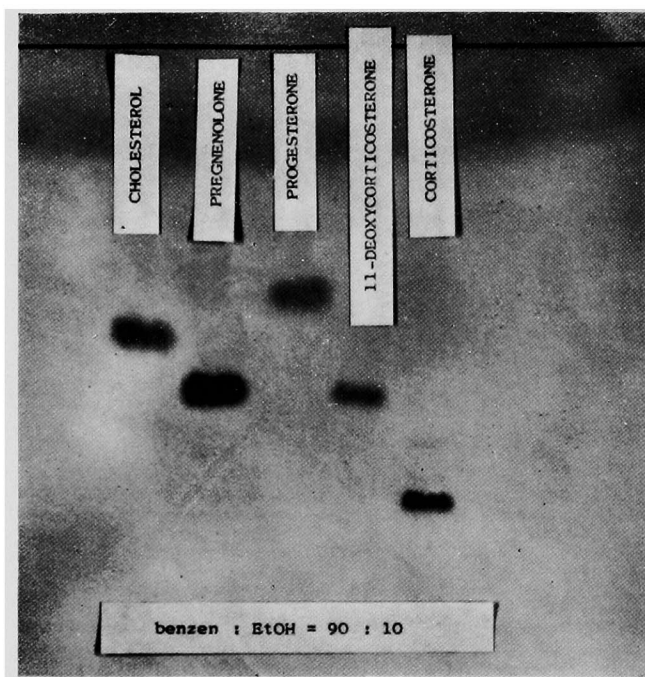
2) 実験材料  $^3\text{H}$ -cholesterol, specific activity 107 $\mu\text{C}/\text{mg}$  は住友化学原子力研究所にてトリチウムガス接触法にて合成された。cholesterol は和光純薬株式会社より購入、pregnenolone ( $\Delta^5$ -pregnen-3 $\beta$ -ol-20-one) progesterone ( $\Delta^4$ -pregnen-3, 20-dione) は東京化成工業株式会社より購入、11-deoxycorticosterone ( $\Delta^4$ -pregnen-21-ol-3, 20-dione) corticosterone ( $\Delta^4$ -pregnen-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dione) は、塩野義研究所より提供されたもの、TPNH (triphosphopyridine nucleotide reduced), NADPH, は Sigma chemical 社より購入、ACTH (corticotrophin) は第一化学薬品より購入、Kiesel Gel H nach Stahl は Merck 社より購入したものを使用した。その他の試薬は全て reagent grade のものを使用した。

3) 実験方法 一群にラット5匹を使用し断頭により死亡させた後、副腎を摘出し、すみやかに氷冷却下で0.154M KCl 溶液 0.5ml とガラスホモゲナイザーで副腎ホモジネートを作成し、0.05M tris buffer pH 7.4 1.0ml, NADPH 1mg,  $^3\text{H}$ -cholesterol, 200,000cpm, 0.1mg と共に TAIYO INCUBATOR M-1 型を使用し空気下で、37°C を保ち2時間 incubate した。

4) 抽出方法 incubate 終了後 dichloromethane 10ml で攪拌抽出を2回繰返したのち、estrogen を除去するため、0.1N NaOH 2ml で洗滌、ついで蒸溜水 2ml で洗滌した。dichloromethane を硫酸ナトリウムで脱水し、減圧乾固し、試料を精製した。

5) ステロイド分離法 incubate により産出されたコレステロールの代謝物質の分離は、cyclohexane, ethyl acetate, ethanol (45 : 45 : 10) の展開溶媒を用いた Kiesel Gel H 薄層クロマトグラフィーで行ない、純品を併用し、20cm の距離で展開分離した。R<sub>f</sub>=0.53~0.60までに pregnenolone と pro-

第 1 図



gesterone の展開部位を認め、 $R_f = 0.38 \sim 0.41$  に 11-deoxy corticosterone,  $R_f = 0.23 \sim 0.26$  に corticosterone の展開部位を認めた。これらの展開部位の薄層をけづり落し、薄層に含有されるステロイドを各々酢酸エチル 10ml で溶出した。次いで更に物質の分離を明確にするため、carrier として各試料に各々相当する純品 0.5mg を加え薄層上に帯状にスポットし、chloroform, ethanol (90:10) の溶媒系で再クロマトグラフィーを行なった。この展開分離により progesterone は  $R_f = 0.73 \sim 0.75$  に pregnenolone は  $R_f = 0.58 \sim 0.62$  に存在し両者は完全に分離された。又 11-deoxy corticosterone は  $R_f = 0.60 \sim 0.64$  に、corticosterone は  $R_f = 0.32 \sim 0.38$  に展開された。これらの薄層に紫外光線を照射して展開帯を明確にし、相当部位の薄層をけづり落し、ステロイドを抽出し、その中に含まれるアイソトープ含有量の測定を行なった。

6) 放射能測定法 PPO, POPOP 系を使用して Packard tri-carb scintillation counter で放射能を測定した。

### 第 3 章 実験成績

第 1 表は正常ラットの副腎、担癌ラットの副腎、ACTH 5 単位で前処置をしたラットの副腎を用い

て  $^3\text{H}$ -cholesterol を incubate した結果合成された pregnenolone, progesterone, 11-deoxy corticosterone, corticosterone に含まれる放射能を cpm で表わしたものである。

まず pregnenolone についてみると ACTH で前処置をしたラット群では正常ラット群に比較して約 2 倍の増量を示しており、担癌ラットでも軽度の増加がみられる。progesterone の量は三群とも少なく、中でも担癌ラット及び ACTH で処置したラットでは特に減少している。

11-deoxy corticosterone は ACTH 処置群では正常ラット群の約 4 倍増量しており、担癌ラットでも増加の傾向がある。corticosterone では三群間に差異は認められない。

第 2 表は第 1 報で行なった *in vivo* の実験で行なわれた方法で生成された  $^3\text{H}$ -cholesterol の代謝産物中 pregnenolone, prog-

第 1 表 正常ラット、担癌ラット及び、ACTH で処理したラットの副腎ホモジネートを用いて、 $^3\text{H}$ -cholesterol を incubate した際に、産生された 4 種の cholesterol metabolite の量を cpm/200mg 副腎で表わしている。

	正常ラット	担癌ラット	ACTH 処理ラット
pregnenolone	2138	2998	4078
progesterone	212	150	144
DOC	225	303	797
corticosterone	1443	1157	1736

第 2 表 正常ラットを用いた *in vivo* の実験で  $^3\text{H}$ -cholesterol を静注して 5 時間後、副腎に含有される 4 種の cholesterol metabolite の量を、cpm で表わし、その割合を *in vitro* の場合と比較している。

	in vivo		in vitro	
	cpm	%	cpm	%
pregnenolone	4252	(47.6)	2138	(53.2)
progesterone	781	(8.7)	212	(5.3)
DOC	1073	(11.9)	225	(5.6)
corticosterone	2845	(31.8)	1443	(35.9)

esterone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone の割合と、この *in vivo* の実験で生合成されたものとの割合を比較したものである。

#### 第4章 考 按

cholesterol から pregnenolone への代謝には 20 $\alpha$ -hydroxycholesterol, 20 $\alpha$ -22R-dihydroxycholesterol の中間代謝物質が見出されており<sup>11-14</sup>、20, 22-hydroxylase の作用により、cholesterol の側鎖が切断されて pregnenolone を生ずる。この cholesterol side chain cleaving enzyme は主として副腎の mitochondria に含まれていると言われている。pregnenolone から progesterone への代謝には主として副腎の microsome 中に存在する 3 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase と  $\Delta^5$ -hydroxy steroid isomerase が働く。progesterone から 11-deoxycorticosterone への代謝には 21-hydroxylase が、11-deoxycorticosterone から corticosterone への代謝には 11 $\beta$ -hydroxylase が働いており、これらの酵素はいずれも副腎の mitochondria に存在している。以上が cholesterol から corticosterone への代謝過程である。

この実験で cholesterol より代謝された pregnenolone, progesterone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone の量をみると、第1表に見られるごとく、正常ラット群、担癌ラット群、ACTH で処理したラット群、それぞれにおいて、progesterone, 11-deoxycorticosterone は比較的少なく、pregnenolone, corticosterone は比較的多く認められ、副腎において、21-hydroxylase の作用する代謝過程は速やかに行なわれることが分つた。

第2表には <sup>3</sup>H-cholesterol, (specific activity, 107 $\mu$ c/mg) 0.5mg を正常ラット血清 0.5ml 生理食塩液 0.5ml と混和し、emulsion の状態でラット尾静脈より注入して、5時間後に副腎を摘出し、その内に含有される <sup>3</sup>H-cholesterol より生合成された pregnenolone, progesterone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone の量をカウント数 (cpm) で表わしたもので、四物質の割合は 47.6 : 8.7 : 11.9 : 31.8 となっており、<sup>3</sup>H-cholesterol を副腎ホモジネートと incubate した本実験において生合成された上記四物質の割合は、53.2 : 5.3 : 5.6 : 35.9 であり、incubate したものであるが、progesterone, 11-deoxycorticosterone の割合がやや減少しているが、全体的に非常に類似した結果が出ており、副腎における cholesterol から corticosteroid への代謝は、本実験を用いてその生体

内での代謝過程を充分推測することができる。

ACTH を作用させた場合、副腎におけるコルチコイドの合成は増加すると言われているが、この実験で ACTH を *in vivo* の状態で作用させた副腎を用いて corticosteroidgenesis の様子を調べてみると、正常ラットと比較して、pregnenolone, progesterone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone の総生成量は、約 1.6 倍になつており、そのうち pregnenolone だけについてみると約 2 倍に、11-deoxycorticosterone では約 4 倍になつている。さて、ACTH の corticosteroidgenesis に対する作用機序であるが、これには種々の説があり、議論の多いところであるが、Stone や Hechter らは ACTH は副腎の mitochondria 内の NADPH の濃度を高め、cholesterol から pregnenolone への代謝を促進し、pregnenolone から corticosteroid への代謝には影響しないとしている<sup>51-9</sup>。又、Hall は ACTH を与えると細胞膜の透過性が高まり、cholesterol から生じた pregnenolone が細胞外へ通過しやすい状態になるため corticosteroid の増量を来すといっている<sup>101-15</sup>。いずれにせよ、ACTH は cholesterol から pregnenolone への代謝に関与して、それから先の代謝には作用しないという説が強い様であるが、この実験では pregnenolone の代謝量が約 2 倍の増量を示しているが、それ以上に 11-deoxycorticosterone は約 4 倍に増量しているので、pregnenolone 以下の corticosteroid 合成に対しても ACTH は影響を与えているのではないかと考えられる。

担癌ラットの副腎における cholesterol から corticosterone への代謝と正常ラットにおける代謝とを比較してみると、担癌ラットでは、pregnenolone の増加、progesterone の減少、11-deoxycorticosterone の増加、corticosterone の減少が認められる。又、ACTH を与えたラットの副腎を用いた場合にも pregnenolone の増加、progesterone の減少、11-deoxycorticosterone の増加、corticosterone は増加はしているが、pregnenolone, 11-deoxycorticosterone の増加率から比べると、非常に軽度のものである。以上の如く、担癌ラットにおける corticosteroidgenesis は ACTH を与えたラットにおける状態に一步近づいており、担癌動物では何らかの形で ACTH 刺激状態が持続しているのではないかと推察した。

#### 第5章 結 語

正常ラット、Walker carcinosarcoma 移植ラット

及び, ACTH を投与したラットの副腎を用いて,  $^3\text{H}$ -cholesterol と incubate し, cholesterol から corticosterone への代謝状態を調べ, 担癌ラットにおいては, pregnenolone, progesterone, 11-deoxycorticosterone, corticosterone の産生が, ACTH を与えたラットにおけるそれに一歩近づいていることを見出し, 担癌動物では何らかの形で ACTH 刺激状態が持続しているのではないかと推察した。

ついでこの *in vitro* の実験の結果が, 生体内で行なわれている corticosteroid の生合成の状態とよ

く一致すること, 及び ACTH の corticosteroidogenesis に対する作用機序について考察した。

稿を終るにあたり御指導, 御校閲を賜わつた田中早苗教授, 山本泰久講師に厚く謝意を表します。

本研究の要旨は第24回癌学会および第4回ステロイド研究会において発表した。

### 文 献

- 1) Kantsky, G. J., Boubouris, C. J., Becker, R. R. and King, C. G. *J. Biol. Chem.*, **233** : 1340, 1958.
- 2) Shimizu, K., Dorfman, R. I. and Gut, M. J. *Biol. Chem.*, **235** : PC 25, 1960.
- 3) Shimizu, K. et al *J. Biol. Chem.*, **236** : 695, 1961.
- 4) Koritz, S. B. *Biochim. Biophys. Acta*, **56** : 63, 1962.
- 5) Stone, D. S. and Hechter, O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **51** : 457, 1954.
- 6) George, I. M., Hagerman, D. D. and Vilee, C. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **60** : 407, 1962.
- 7) Haynes, R. C. and Berthet, L. *J. Biol. Chem.*, **225** : 115, 1957.
- 8) 中村益久, 木村徳次, 鈴木皓司: *生 化*, **35** : 25, 1963.
- 9) Haynes, R. C., Sutherland, E. W. and Rall, T. W. *Recent Progress in Hormone Research*, **16** : 121, 1960.
- 10) Hall, P. F. 内分泌学会東部々会口演, 1965年9月
- 11) Koritz, S. B. and Hall, P. F. *Biochim. Biophys. Acta*, **93** : 215, 1964.
- 12) Eik-Nes, K. B. *Physiol. Rev.*, **44** : 609, 1964.
- 13) Hechter, O. *Cancer Res.*, **17** : 512, 1957.
- 14) Luft, J. and Hechter, O. *J. Biophys. Biophys. Biochem. Cytol.* **3** : 615, 1957.
- 15) Nishikawa, M., Murone, I. and Sato, T. *Endocrinology*, **72** : 197, 1963.

## Steroid Metabolism in Walker Carcinoma Bearing Rat

### Part II. On Steroid Metabolism In Vitro

By

Saburo YAMAMOTO

The Department of Surgery, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Sanae Tanaka M. D.)

The studies were performed on  $^3\text{H}$ -cholesterol metabolism *in vitro* with rat adrenal glands from normal, bearing Walker carcinoma and treated with ACTH. The amount of  $^3\text{H}$ -cholesterol metabolites containing pregnenolone, progesterone, 11-deoxycorticosterone and corticosterone were determined and compared among these rat adrenals. The cholesterol metabolism in tumor bearing rat adrenal was similar to that of treated with ACTH. These facts suggested that tumor bearing rat adrenals were simulated with ACTH-like substance.