

WALKER CARCINOMA 移植 RAT における Δ^4 -CHOLESTENONE-4-C¹⁴ の代謝

第 1 編

肝ホモジネートによる Δ^4 -Cholestenone-4-C¹⁴ の代謝

岡山大学医学部附属病院第一外科教室 (主任教授: 田中早苗)

會 沢 禎

(昭和 43 年 3 月 4 日受稿)

第 1 章 緒 言

Δ^4 -Cholestenone は、生体内に微量存在し、cholesterol metabolism の中間代謝産物として重要視されてきた。すなわち (1) cholesterol より胆汁酸への代謝過程における中間産物であるとするもの¹⁾, (2) cholestanol および coprostanol など中性ステロールへの代謝の中間産物であるとするもの²⁾ などである。

(1) の胆汁酸への中間代謝産物であるとする考えは、現在なお確認されていないが、(2) の cholestanol および coprostanol など中性ステロールへの中間代謝産物であるという考えは Bloch らによつて確かめられている^{3),4)}。

近年、ステロイドの生化学について多大の関心がよせられ、急速の進歩をとげ、さらに癌とステロイドの関係についても、多くの興味ある事実が報告されている⁵⁾。

一般に生体内で重要な影響をおよぼすステロイドは C₄~C₅ 位の 2 重結合, C₃ 位にケトン基が存在し、その飽和および水酸化は不活性化につながる。私は Δ^4 -cholestenone-4-C¹⁴ をもちい、その代謝を研究し C₄~C₅ 位の 2 重結合, C₃ 位のケトン基の動向を追求し、あわせてその担癌体における変化を検討した。

第 2 章 実験方法

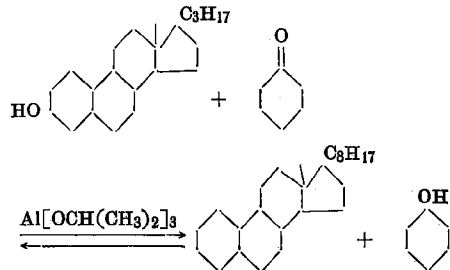
第 1 節 実験動物

Wistar系ラット雄100~120grの肝を用いた。担癌体としては同系ラットの背部皮下に、Walker Carcinoma を移植し、2週間後に腫瘍が拇指頭大にはつきり確認できたものを用いた。実験前、24時間は

絶食とした。

第 2 節 実験材料

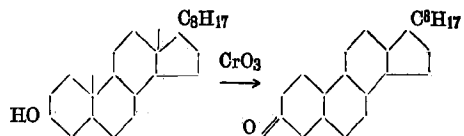
1) Δ^4 -cholestenone: Roy Teranishi⁶⁾ の方法によつて cholesterol を酸化して合成し、メタノール再結晶ののち、アルミナカラムクロマトグラフィーにより精製した。すなわち、



の反応形式に従つて合成した。なお、融点は 79.2~80.0°C であり薄層クロマトグラフィーにより単一スポットであることをたしかめた。

2) Δ^4 -cholestenone-4-C¹⁴: cholesterol-4-C¹⁴, 0.5mc は、第一化学薬品株式会社より購入した。0.5mci に carrier cholesterol を加えて、50gr とし、それを上記 1) と同様の方法によつて合成、精製した。精製 Δ^4 -cholestenone-4-C¹⁴ の specific activity 0.01 μ c/mg であつた。融点は 79.3~80.0°C で、薄層および Autoradiogram によつて単一スポットであることを確かめた。

3) cholestanone: Bruce の方法⁷⁾によつて cholestanol を酸化して合成し alumina column によつて精製した。すなわち、



の反応形式に従つて合成した。融点128.5~129.0°C

4) cholestanol: 塩野義製薬株式会社研究所にて cholesteryl bromide を還元する方法により合成, 提供されたものを alumina column によつて精製した。融点141~142°C

5) Kiesel gel, digitonin, alumina は Merck より購入, その他の試薬はすべて和光製試薬特級をもちいた。

第3節 実験方法

1) インクバート→(試料作成): 正常および担癌ラットを断頭し, 充分放血させ, 開腹, 門脈より生理的食塩水により肝を灌流したのち肝を摘出, ただちに nicotinamid 0.028 M, magnesium chloride 0.007 M, sucrose 0.126 M, potassium phosphate buffer 0.044 M, pH 7.4 の溶媒にて 10% homogenate を作成, その 60 ml に Δ^4 -cholestenone-4-Cl₄ 5 mg, ATP-2-Na 20 mg, cytochrome-C 5 mg を混合, 37.5°C, 100% O₂ flow のもとに Incubator 中で1分間120回振盪しながら5時間 incubate した。それをエタノール: エーテル: クロロホルム, 6: 3: 1 にて3時間 reflux して抽出, ロータリーエバポレーターによつて1/3に濃縮, 分液ロート中にて石油エーテルと分配により再抽出し, 減圧下で蒸発乾固させ, クロロホルム: ヘキサン (1: 1) 1 ml にて溶解させ, 試料とした。

2) 薄層クロマトグラフィ: Merck 製 Kiesel gel G を使用し, 厚さ 500 μ , 20 cm \times 20 cm の薄層を作成, 110°C, 30分間加熱活性化し, 前述の試料をマイクロシリンジにて一定量づつ (普通10 μ l~20 μ l を使用) 薄層板下縁から 2.5 cm の位置に点状にスポットした。展開溶媒としてシクロヘキサン: 酢酸エチル, 9: 1 およびクロロホルム: メタノール, 98: 2 を用い, 10度傾斜にて 12 cm 展開し分離した。

3) オートラジオグラム: 展開分離した薄層に富士ノンスクリーニングタイプ No. 100 のフィルムを密着させ, 約30~60日間乾燥冷暗所に保存のち現象した。薄層板は5%リンモリブデン酸-エタノール溶液を約 3 ml 一様に噴霧し, 150°C, 10分間加熱して発色した。

4) ¹⁴C 放射能測定: さらに同一プレートにつきオートラジオグラム上のスポットに担当する部位, およびコレステロールエステルが存在すると考えられる部位, すなわち A では Rf 0.4 以上, B では Rf 0.85 以上の薄層をけずり落し, トルエン: メタノール, 1: 1 の溶媒 3 ml にて抽出 POPOP (0.3 g/l)-

PPO (5 g/l)-toluene 溶液を加え 20 ml とし, Packard Tri-carb liquide scintillation spectrophotometer にて ¹⁴C の放射能を測定した。

5) 3 β sterol 分離精製: 残りの試料を再び減圧乾固させ, 95%エタノール 2 ml にて溶解し, その内 0.2 ml はそのまま放射能を測定して全体の放射能算定に利用した。残りの 1.8 ml に carrier として 5 mg づつの cholestenone, cholestanone, cholestanol を加え, 1% digitonin-ethanol 溶液 (90% ethanol) を沈澱が生じなくなるまで混入, 24時間冷所保存ののち, 再びその上清に 1% digitonin-ethanol 溶液を混入し, 24時間同様に保存し digitonin precipitation を完全にした。

沈澱物はエーテルにて3回洗滌し, デシケーター中で乾燥したのち秤量, 冷ピリジン数倍量にて digitonide を溶解し, エーテルにて 3 β sterol を抽出, 再び薄層およびメタノール再結晶にて分離精製しその 1 mg の放射能を測定した。

6) Δ^4 -cholestenone および cholestanone の分離精製: 上記の上清を N₂ ガスにて蒸発乾固させ, エーテルにて抽出, 薄層クロマトグラムおよびメタノール再結晶にて分離精製後秤量し, その各 1 mg の放射能を測定した。

第3章 実験成績

第1節 cholestenone, cholestanone, cholestanol の分離:

図1は, シクロヘキサン: 酢酸エチル (9: 1) の展開溶媒にて展開分離した時の autoradiogram およびその発色薄層で左が担癌ラット, 右が正常ラットのものである。

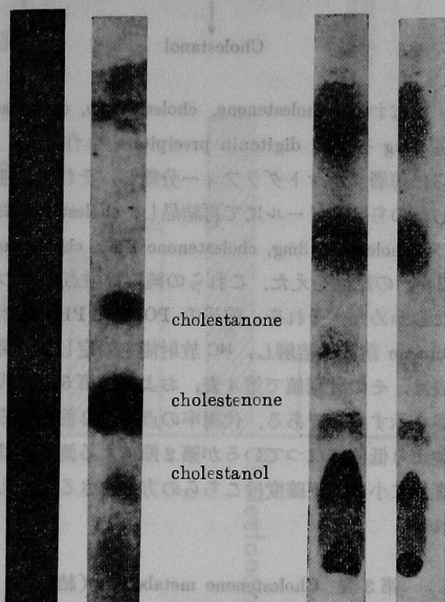
写真にみられるごとく担癌, 正常ともに, 上4つのスポットが認められた。すなわち, 原点, Rf 0.12, Rf 0.21, Rf 0.39 の4スポットである。発色した薄層上では Rf 0.39 のスポットは単一スポットでなく, Rf 0.30~0.41 の比較的大きなスポットのなかに含まれている。しかし, 純品による試験で Rf 0.12 は cholesterol および cholestanol, Rf 0.21 は cholestenone, Rf 0.39 は cholestanone と一致した。

図2は, 展開溶媒をクロロホルム: メタノール 98: 2 にて, 展開分離した時の autoradiogram およびその発色薄層で, 左が担癌体, 右が正常体のものである。この場合も autoradiogram 上4つのスポットを認めた。すなわち原点 Rf 0.5, Rf 0.71, Rf 0.83 の4スポットである。発色した薄層上では, やはり

図1 Cholestanone metabolites の

Autoradiogram と Thin Layer Chromatogram
(左) (右)

Autoradiogram Thin Layer Chromatogram



正常

担癌

担癌

正常

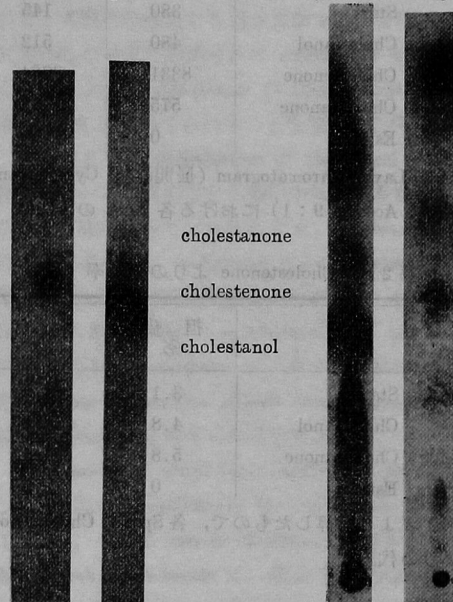
Cyclohexane : Ethyl Acetate

9 : 1

図2 Cholestenone metabolites の

Autoradiogram と Thin Layer Chromatogram
(左) (右)

Autoradiogram Thin Layer Chromatogram



正常

担癌

担癌

正常

Chloroform : Methanol

98 : 2

Rf 0.83 のスポットは明瞭に出ていない。薄層上 Rf 0.5 は cholesterol および cholestanol, Rf 0.71 は cholestenone, Rf 0.83 は cholestanone であることをたしかめた。原点にとどまる物質については不明であるが胆汁酸および steroid hormone などが考えられる。

ついで、正常、担癌を比較してみると、担癌体において、Rf 0.12, Rf 0.39 のスポットの陰影は正常に比較し、一般に濃く、Rf 0.12 のスポットでは、その陰影の差は著しかった。さらに、図1, 2を通じて ester のあると考えられる部位、すなわち図1においては Rf 0.40 以上、図2においては Rf 0.85 以上にオートラジオグラム上何ら陰影を認めなかった。

以上のことにより cholestenone は cholestanone を通じて cholestanol にかわり、そのエステル化はおこなわれないものと考えられ、また、正常および担癌体での代謝を比較してみると、正常肝では、cholestanone は、すみやかに cholestanol に移行し cholestanone の存在はごくわずかしら認められないのに

反して、担癌体では、cholestanone より cholestanol への移行がおそく、cholestanone の存在が比較的多量に認められる。

第2節 ^{14}C 放射能測定

上記各スポットにおける放射能を数値的に表現し、担癌、正常における cholestenone 代謝に定量的検討を加えるため Packard Tri-carb liquide scintillation spectrophotometer による計測をおこなった。

すなわち、上記薄層を各スポットごとに、けずり落し、toluene-methanol (1 : 1), 3 ml にて抽出の後、PPO (5g/l), POPOP (0.3g/l) を含む toluene 溶液を加え 20ml とし、各スポットの ^{14}C 放射能測定をした。第1表はその数値である。第2表および、第3図は、第1表の数値より計算した、cholestenone より代謝された cholestanone, cholestanol の代謝率を示したものである。このように担癌体においては約1.5倍の代謝率を示し、特に cholestanone だけにかぎるならば、約3倍の代謝率を示している。

第3節 digitonin precipitation および dilution method による物質の同定

第1表 Cholestenone の代謝 (薄層)

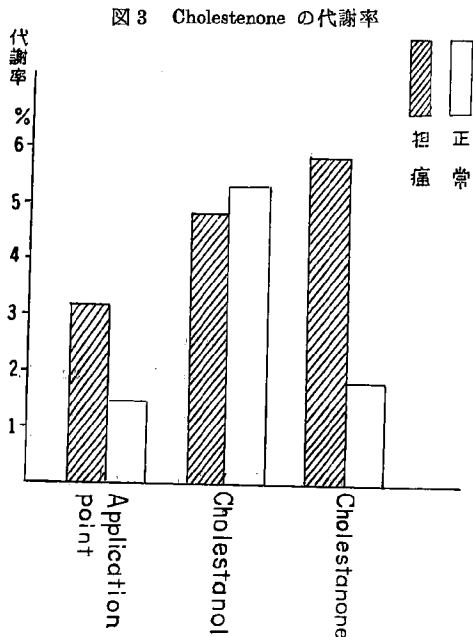
	担 癌 cpm	正 常 cpm
Start	380	145
Cholestanol	480	512
Cholestenone	8331	8964
Cholestanone	575	182
Ester	0	0

Thin Layer Chromatogram (展開溶媒 Cyclohexane: Ethyl Acetate 9:1) における各 Spot の ^{14}C 値

第2表 Cholestenone より代謝率 (薄層)

	担 癌 %	正 常 %
Start	3.1	1.5
Cholestanol	4.8	5.2
Cholestanone	5.8	1.9
Ester	0	0

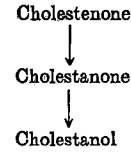
第1表より計算したもので、各 Spot の Cholestenone より代謝率



第2表の Histogram

以上の事実により Chaikoff⁸⁾ のいつたごとく cholestenone の代謝について第4図のごとき代謝経路を考えたのであるが、さらに正確を期するため本実験をおこなった。

図4 代謝経路



すなわち, cholestenone, cholestanone, cholestanol 各 5 mg を加え digitonin precipitate を作成し, さらに薄層クロマトグラフィー分離し, それを再抽出したのちメタノールにて再結晶し, cholestanol および, cholesterol 3mg, cholestenone 2mg, cholestanone 2mg の結晶をえた。これらの純度は融点によつてたしかめた。それを, 前述の POPOP, PPO を含む, toluene 溶液に溶解し, ^{14}C 放射能を測定した。第3表は, その計測値で第4表, および, 第5図は代謝率を示すものである。代謝率の点で第2節による実験より低値になつてゐるが第2節による測定値はあまりに小さく正確度はこちらの方がまさると考えられる。

第3表 Cholestenone metabolites (結晶)

	担 癌 cpm	正 常 cpm
Cholestanol	1368	1550
Cholestanone	2388	535

試料に Carrier として Cholestanol, Cholestanone 各 5 mg を加え, Digitonin precipitation および Thin Layer Chromatography, Recrystallization によつてえた Cholestanol, Cholestanone 各 1 mg の ^{14}C 放射能測定値

第4表 Cholestenone metabolites の代謝率 (結晶)

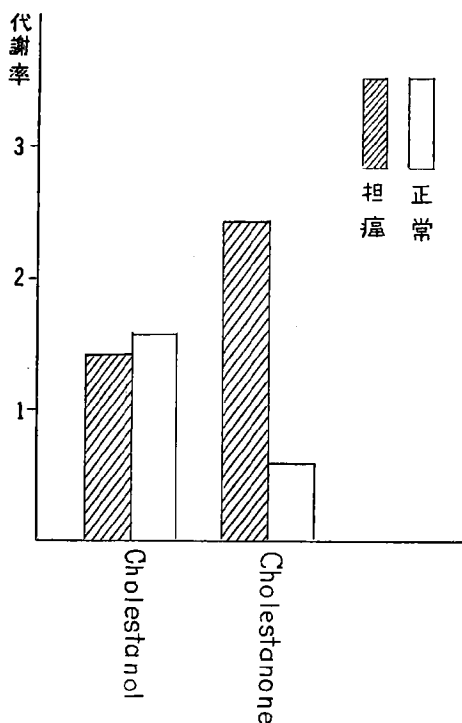
	担 癌 %	正 常 %
Cholestanol	1.37	1.55
Cholestanone	2.39	0.53

第3表より計算したもので, Cholestenone より Cholestanol および Cholestanone への代謝率

第4章 考 按

cholestenone は生体内で微量認められ⁹⁾ 糞の中には, かなりの量で存在し¹⁰⁾, また cholesterol 代謝の重要な中間代謝産物であると考えられてきた¹²⁾³⁾, cholesterol の代謝は現在 3 つの経路が知られてい

図5 結晶化 Cholestenone metabolites の代謝率



第4表の Histogram

る。1つは胆汁酸生成への道であり、2つは cholestanol および coprostanol など中性ステロールへの過程、3つには steroid hormone 生合成への経路である。最後の steroid hormone については cholestenone の中間代謝産物としての存在は現在否定されている¹¹⁾。しかし胆汁酸生成および、中性ステロールへの catabolism の過程において cholestenone の存在は現在なお、問題のある所である。すなわち、胆汁酸への代謝過程においては、古くは Rosenheim および Webster¹⁾ の報告があり cholesterol \rightarrow cholestanone \rightarrow bile acid の経路を想定しているが、最近では Staple^ら¹²⁾ はなるほど cholestenone は cholesterol よりすみやかに、bile acid に変化するが、実際には cholesterol より bile acid が生成される過程において cholestenone の存在を見出すことはできず C_{27} -ketone で double bonds を2つ以上もつ cholestenone 様物質を考えるべきだとしている。

2番目の cholestanol および coprostanol への経路については Bloch および Anker⁴⁾ がラットを 3H で標識された、cholestenone で飼育し、組織内の cholestanol が cholestenone より代謝されることをた

しかめ、また cholesterol にはならないことを確認した。ついで Rosenfield, Helman らは cholesterol-4- C^{14} および cholesterol-3- C^{14} (Δ^5 -cholesten-3-one を重水素化アルミニウム-リチウムで還元してえられた) の混合物をあて重水素が3位、5位、6位に分布した2重に標識された coprostanol を単離することによって coprostanol が cholestenone をへて cholesterol よりつくられることを確認した^{13), 14), 15)}。

以上のように cholestenone が cholesterol より飽和ステロールへ異化される時の中間代謝産物であることは、確認されていたけれども、cholestenone よりさらにどうして cholestanol および coprostanol に変化するかについては未だ不明であった。しかし、1955年 F.M. Harold, I. L. Chaikoff ら⁸⁾ は、正常ラットの肝 homogenate に Δ^4 -cholestenone-4- C^{14} を incubate し alumina column chromatography にて cholestanone と考えられる物質を見出した。

cholestanone は ethyl ether: hexane 5:95 で溶出したものの中に radioactive な一つの peak がみられること、それに carrier cholestanone を加え、一部を tetrahydrocarbazole に、残余を 2-bromocholestanone に変化させ specific activity がなお80%存在することから確認された。さらに cholestanone-4- C^{14} が肝 homogenate により、すみやかに cholestanol-4- C^{14} に変化することもたしかめられた。これらのことから Chaikoff らは cholesterol, cholestenone, cholestanone, cholestanol という代謝経路を考え、新たに cholestanone を、その中間代謝産物としてつけ加えた⁷⁾。しかしなお、cholestanone は生体内で見出されておらず、Chaikoff ら以外は cholestanone の存在を確認したものもなく、その中間代謝産物としての存在は、はつきり決定化されるに至っていない。私は、今回の実験において autoradiogram 上に明瞭なスポットとして cholestanone をとらえたことを確信する。

すなわち、薄層上2つの異なつた展開溶媒にて cholestanone と同一の Rf を示し dilution method にてもなお、specific activity は同一の値を示し、digitonin precipitation にて沈澱しない。この3つの事実により autoradiogram 上の Rf 0.39 (図1) Rf 0.83 (図2) のスポットを cholestanone と決定した。

cholestenone の ester 化については Rf 上 cholesterol ester に相当する部位、図1では、Rf 0.4 以上、図2では、Rf 0.85 以上に autoradiogram 上ス

ポットを見出さず、また、カウント値にも反応を示さないことにより cholestenone よりの ester 形成はないと想定した。

これらの事実により私は cholestenone の代謝について Chaikoff らがのべている cholestenone, cholestanone, cholestanol にいたる経路を支持し、さらに、その ester 化はおこなわれないと考える。

近年 steroid についての研究は著しく進歩し cholesterol より steroid hormone 生合成経路は、ほぼその全容が明らかにされているが hormone としての生体内での活性は C₃ 位のケトン基、および Δ₄ の 2 重結合の存在が必須の条件となつている。さらにその不活性化は Δ₄ の 2 重結合の飽和化、C₃ 位のケトン基の水酸化が同時におこなわれるといわれているが飽和型の C₃ 位ケトン型の steroid は終末産物として尿中に微量に見出される 1, 2 の例外的物質以外、現在まで殆んど知られていない¹⁶⁾。しかし、この実験結果によれば cholestenone はまず Δ₄ の 2 重結合が飽和され cholestanone になり、ついで C₃ 位ケトン基が水酸化され cholestanol となるものと考えられる。すなわち Δ₄ の 2 重結合の飽和化、および C₃ 位のケトン基の水酸化は、同時におこなわれるのではなく、まず、Δ₄ の 2 重結合の飽和化がおこなわれて、飽和型ケトステロイドを生じ、それがさらに、水酸化されると考えることが出来る。よつて steroid hormone 代謝過程にて飽和型の C₃ 位ケトンタイプの中間代謝産物がさらに多く存在しうるのでなかろうかと考える。

特に担癌体では、その様な物質の増量を考え、担癌体における steroid hormone 代謝異常の一因をになうものではないかと想像する。

つぎに正常体と担癌体を比較してみると、一般に担癌体では脂質代謝に大きな変化が存在するが¹⁷⁾¹⁸⁾ cholesterol に関しては腫瘍組織内では free cholesterol の含有比は増量し、その ester 型は著明に減少して

おり、cholestanol でも同様のことが観察されているが¹⁷⁾¹⁸⁾、一方腫瘍組織内では酢酸より cholesterol の生合成が、非常に減少していることが知られている¹⁹⁾。この結果より腫瘍細胞が産生する cholesterol は極めて少なく大部分は、他の組織より腫瘍細胞内に運ばれたもので、またその異化作用は非常におそいものであらうと考えられている。また、cholesterol が体内のすべての細胞に含まれ、特に腫瘍細胞に多量含まれてあるという事実は cholesterol およびその誘導体に発癌性因子の存在を想像させる。実際に Fieser²⁰⁾ は Δ⁵-cholestenone が発癌性をもつことを見出している。しかしむしろ、腫瘍組織は膜にとみ、その膜構成成分として cholesterol の存在、あるいは、エネルギー源としての取りこまれたものとするのが妥当であらう。

第 5 章 結 語

Δ⁴-cholestenone-4-C¹⁴ を正常および、Walker Carcinoma 移植ラットの肝 homogenate と incubate し、その metabolism を研究した。その結果、3つの結論を得た。

- 1) cholestenone は cholestanone をへて cholestanol に移行する。
- 2) cholestenone は ester 化されない。
- 3) 担癌体においては、その metabolism は一般に亢進を示し、正常体の約 1.8 倍の代謝率を示す。さらに cholestanone は担癌体において、約 1.5 倍も多く認められ、それは cholestanone より cholestanol への移行にさいし、何らかの阻害因子の存在が考えられる。

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

(この論文の要旨は、第 37 回日本生化学総会において発表した)

文 献

- 1) Rosenheim, O., & Webster, I. A., Nature, 136, 474 (1935)
- 2) Weinhouse, S., Arch. Path., 35, 438 (1943)
- 3) Bloch, K., Circulation 1, 214 (1950)
- 4) Anker, H. S., & Bloch, K., J. Biol. Chem., 178, 971 (1949)
- 5) 腫瘍生化学 朝倉書店 東京 (1965)
- 6) Teranishi, R., Org. Syntheses, 35, 43 (1955)
- 7) Bruce, W. F., Org. Syntheses, 2, 139 (1943)
- 8) Harold, F. M., Abraham, S., & Chaikoff, I. L., J. Biol. Chem., 221, 435 (1956)
- 9) Page, I. H., and Menschick, W., Natur Wissens Chaften, 18, 585 (1930)
- 10) Rosenheim, O., and Webster, T. A., Biochem. T., 37, 513 (1943)
- 11) Raggatt, P. R., Dean, P. D. G., & Whitehouse, M.

- W., *Biochem. J.*, 96, 2 (1965)
- 12) Stenenson, E., Staple, E., *Arch Biochem. Biophys.*, 97, 485 (1962)
- 13) Rosenfield, R. S., Fukushima, D. K., Hellman, L., Gallagher, T. F., *J. Biol. Chem.*, 211, 301 (1954)
- 14) Rosenfield, R. S., Hellman, L., Gallagher, T. F., *J. Biol. Chem.*, 222, 321 (1956)
- 15) Rosenfield, R. S., Hellman, L., *J. Biol. Chem.*, 233, 1089 (1964)
- 16) 三宅儀, 山本清, *内分泌学* II, P1025 (1964)
- 17) Shinseki, K., Nurusue, M., Yamamoto, Y., *Acta Med. Okayama.*, 20, 29 (1965)
- 18) Yamamoto, Y., Tanaka, S., *Gann*, 58, 147 (1967)
- 19) Gore, I. Y., Popjak, G., *Biochem. J.*, 84, 93 (1962)
- 20) Fieser, L. F., Green, T. W., Bischoff, F., Lopez, L., and Rapp. T. T., *Am. Soc.*, 77, 3928 (1955)

Δ^4 -Cholestenone Metabolism in Rat Liver Transplanted
with Walker Carcinoma
Part 1. Δ^4 -Cholestenone metabolism in liver
homogenate of tumor-bearing rat

By

Tadashi Aizawa

(Department of Surgery, Okayama University Medical School)
(Director S. Tanaka)

Δ^4 -Cholestenone-4- C^{14} metabolism in male Wister rat was studied. Δ^4 -Cholestenone was not esterified, was metabolized to cholestanone, and then cholestanol. This passway was investigated on thin layer chromatography and radioautogram. In tumor-bearing rat, the metabolism observed about 1.8 times than that of normal, and cholestanone was metabolized 1.5 times greater than in normal.
