

臍帯血中 17-KS 分画に関する研究

岡山大学医学部産婦人科教室（主任：橋本 清教授）

大学院学生 鎌 田 昌 平

【昭和43年3月30日受稿】

緒 言

最近になって妊娠中のステロイド代謝を胎児-胎盤を一つの単位としてとらえる考え方がなされる様になった。従来胎児副腎の Foetal zone は活性でないと考えられていたが E. Bloch¹⁾, S. Solomon¹⁶⁾, D. B. Villee¹⁷⁾¹⁸⁾ 等による胎児副腎の Incubation 実験により Foetal zone が Adult zone と同じ様に Steroid 生合成の機能を持つている事が示された。一方⁴⁾ E. Diczfalusy 等は胎児副腎及び胎盤の Incubation 並びに灌流実験を基にして卓越した理論を導いた。すなわち彼等は妊婦尿中に大量に排泄されているエストリオールの合成に関して胎児副腎が強く関与している事を示した。

胎児副腎には 17, 20-Desmolase 及び 17-Hydroxylase は存在するが Aromatising enzyme system の存在は疑問視され又 $\Delta 5-3\beta$ ol-Dehydrogenase 及び Isomerase の活性はないと報告している。一方胎盤に於ては逆に、 $\Delta 5-3\beta$ ol-Dehydrogenase, Isomerase 及び Aromatising enzyme system の活性が強いが 17-Hydroxylase 及び 17, 20-Desmolase 活性がないと報告されている。しかし一方 E. Bloch¹⁾ 等は胎児副腎に $\Delta 5-3\beta$ ol-Dehydrogenase 及び Isomerase 活性は妊娠週より既に認められると反論している。Diczfalusy⁴⁾の理論は母体或は胎児より供給されたプレグネノロンが胎盤の $\Delta 5-3\beta$ ol-Dehydrogenase 及び Isomerase の作用によりプロゲステロンに合成されこれは妊娠維持に関与し更に $\Delta 5-3\beta$ ol-Dehydrogenase 及び Isomerase の作用を受けなかつたプレグネノロンは胎児副腎の 17-Hydroxylase 及び 17, 20-Desmolase の作用により DHA に合成される。DHA は胎児副腎の 16-Hydroxylase の作用により 16-OH-DHA になり、主として胎盤内でエストリオールに生合成される。臨床的にも ACTH の分泌能力がないと考えられる無脳児を有する母体尿中エストリオール値の低い事や子宮内胎児内死亡場合母体尿中エストリオール値が急激に低下する事は Diczfalusy

の理論からすれば容易に説明する事が出来る。

しかし胎児、胎盤及び母体を結ぶものは血液であり従つて unit が unit として存在する為には血液を介さなければならない。

胎児-胎盤系の最も重要なルートである臍帯血の分析は Eberlein⁷⁾ 等の報告を見るのみである。しかしこの報告はプール血でなされたものであり個々の症例について臍帯血中 17-KS 分画の測定例は優れた分離能を持つ微量測定法が開発されなまいまに未だ見られていない。

本研究に於いては個々の症例について臍帯血中 17 KS 5 分画を遊離型、結合型別に充分に測定し得る方法を開発しそれを用いて測定を行つた。更に母体血、母体尿及び新生児尿の分析を行つた。

分析したステロイド

- 1) 臍 帯 血 : 17-KS 5 分画
- 2) 母 体 血 : 17-KS 5 分画
- 3) 母 体 尿 : 17-KS 9 分画 及びエストロゲン 8 分画
- 4) 新生児尿 : 17-KGS, Total 17-KS, 17-KS 9 分画 及びエストロゲン分画

1) 2) 3) 及び 4) の 17-KS 及び Total 17-KS は個々の症例について測定し 4) の 17-KS 9 分画などエストロゲン分画はプール尿で測定した。

Androstandione	5 α or 5 β -androstan-3, 17-dione
$\Delta 4$ -Androtendione	Androst-4-en-3, 17-dione
Androsterone	3 α -hydroxy-5 α -androstan-17-one
Etiocolanolone	3 α -hydroxy-5 β -androstan-17-one
DHA	3 β -hydroxy-androst-5-en-17-one
11-Keto-Androsterone	3 α -hydroxy-5 α -androstan-11, 17-dione
11-Keto-Etiocolanolone	3 α -hydroxy-5 β -androstan-

	11, 17-dione
11-OH-Androsterone	3 α , 11 β -dihydroxy-5 α -androstane-17-one
11-OH-Etiocholanolone	3 α , 11 β -dihydroxy-5 β -androstane-17-one
Estrone	3-hydroxy-estra-1, 3, 5(10)-trien-17-one
Estradiol	Estra-1, 2, 5(10)-trien-3, 17 β -diol
Estriol	Estra-1, 3, 5(10)-trien-3, 16 α , 17 β -triol
16-Epi-Estriol	Estra-1, 3, 5(10)-trien-3, 16 β , 17 β -triol
Progesterone	Pregn-4-en-3, 17-dione
Pregnenolone	3 β -hydroxy-pregn-5-en-20-one

本論文に於て記載した Steroid の名称は上図に示す通りであり全て略語を用いた。

基 礎 編

第1章 臍帯血中及び母体血中 17-KS 分画測定法

血中 Steroid hormon の測定は比較的最近になつて行われるようになったがその歴史はやつと10年位である。血中 Steroid hormon の測定が尿中のものの測定に比して発達の遅れた理由は 1) 採血の最大の限界に含まれるステロイドが測定感度の最小限界に達しない場合が多い。 2) 血清中には Steroid 測定に干渉する多くの化学物質を含み、その除去には比較的複雑な精製過程を必要とする。 3) 脱蛋白の操作を必要とする。

以上の理由により従来から行われてきた単なる比色法では測定が困難であつたが最近では 1) については Microcell の使用、螢光比色法、アイソトープ法、ガスクロマトグラフィーによる分析など測定感度の高いものが使用されるようになった為 Total Steroid のみでなく分画測定も可能になつてきた。 2) 3) については徐々に改良法が考えられてきてほとんど現在では問題がなくなっている。

一方最近では従来血中の Steroid は遊離型で存在すると思われていたが主として硫酸結合の型で存在するものが多い事が明らかになり加水分解が大きなテーマとなりつつある。その他結合型にはグルクロン酸結合型及びリン酸結合型がある。これ等の加水分解は人工産物を作りやすく、又あまり緩慢な方

法では水解が充分に行われないのでよりよい成績を得るためいろいろな方法が工夫されている。血中 17-KS の分画測定に関しては Migeon¹¹⁾, Saier¹⁴⁾, Conrad²⁾, Oertel¹²⁾¹³⁾, Hermann³⁾, Kellie⁹⁾, Mc¹⁰⁾ Kenna, De Neve³⁾, Sandberg¹⁵⁾ 等の報告があり主として DHA が最も多いとされている。

ついで Androsterone が多いとされている。同じ立体異性体である Etiocholanolone は Kellie⁹⁾, De³⁾ Neve, ¹²⁾¹³⁾Oertel, ¹⁵⁾Sandberg により報告されているが量は甚しく少い。その他に Oertel¹²⁾¹³⁾ は 11-OH-Etiocholanolone を報告し Kellie⁹⁾ 及び Migeon¹¹⁾ は Δ^4 -Androstenedione 11-Keto-Etiocholanolone 11-OH-Androsterone について報告しているがこれ等は 1人より採取したものでなくプール血での検討であり臨牀的に個々の症例の多寡について論ずることは出来ない。

ここで示す血中 17-KS 分画測定法は著者の考案した新しい測定法で本法の特徴は 1) 脱蛋白操作を先行して行うことにより以後の抽出等の操作を容易にし硫酸結合の水解に用いた Transesterification の蛋白による干渉を除いた点 2) 硫酸結合の水解に酵素水解に次いで緩除で然も水解効率の優れた Transesterification を用いた点 3) 17-KS と極性がよく類似し分離が不可能とまで考えられている Pregnane series steroids (C₂₁ methyl) 特に Progesterone 及び Pregnenolone を 2 回の薄層クロマトグラフィーにより除いた点 4) 個々の症例につき測定した点である。

以下は本測定法を示す。

- 1) 臍帯血及び母体血の採取
- 2) 血清分離
- 3) 脱蛋白
- 4) ステロイド抽出
- 5) 脱脂
- 6) Florisil column chromatography
- 7) 一次薄層クロマトグラフィー
- 8) 二次薄層クロマトグラフィー
- 9) 発色測定

1) 分娩直後直ちに臍帯を切断し母体側より出る血液を予めヘパリン処理したポリエチレン製 200ml の遠沈管に採取しこれを臍帯血とした。一方母体血は肘静脈より採取し同様の容器に移した。

2) 採取した血液は直ちに 3000r. p. m で20分間遠沈して血漿を分離した。

3) 血漿にその 3 倍量の50%アセトン/メタノールを加えてよく振盪して遠沈し上清を採取した。この

Table. 1 Method for determination of 17-KS in cord (1)

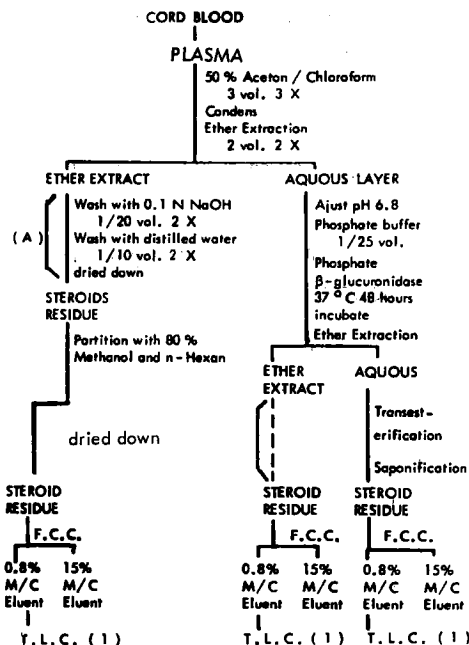
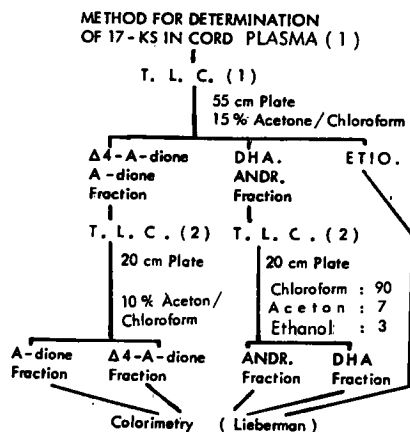


Table. 2



操作は計3回行つた。上清を中型ナスフラスコに集め 50°C にて減圧蒸溜して乾固した。

4) 採取血漿と同量の蒸留水を加え2倍量のエーテルにて2回抽出しエーテル層と液層(1)を分離した。エーテル層は 1/20 倍量の 0.1N NaOH にて2回洗滌し 1/10 倍量の蒸留水で2回洗滌し無水硫酸ソーダにて脱水し 40°C にて乾固した。

5) 80%メタノール 80ml 及び 80ml の n-ヘキサンにて分配を行い更に n-ヘキサン層は 40ml の 80%メタノールで逆抽出した。この80%メタノール層は 50°C にて減圧蒸溜して乾固した。

6) 内径 1 cm のカラムを使用し予試験の済んだフロリジールを使用してメタノール/クロロホルム系により 17-KS + C₂₁ methyl Pregnane series Steroid (2)を更に極性の高い分画より分離した。

7) (2)を 55cm のプレートを使用した薄層上に15%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開し

Table. 3 Rf values of neutral steroids on T. L. C. (55cm Plate)
System: 15% Acetone/Chloroform

	Rf Value
Androstanedione	0.79
Δ4-Androstenedione	0.72
Progesterone	0.76
Pregnenolone	0.60
Androsterone	0.60
D H A	0.57
Etiocolanolone	0.51

た。この展開により 17-KS 分画即ち Androstanedione, Δ4-Androstene-dione, Androsterone, DHA, 及び Etiocolanolone は分離するが Androstanedione 及び Δ4-Androstenedione には Progesterone が混入し Androsterone 及び DHA には Pregnenolone が混入する。然も Progesterone も Pregnenolone も 17-KS の発色である Zimmermann 発色に反応し DHA の 1/3~1/4 程度の発色を示す為 Progesterone 及び Pregnenolone を除去する必要がある。この為 55cm のプレートより Androstanedione, Δ4-Androstenedione Androsterone DHA 及び Etiocolanolone を各々かき取り Etiocolanolone を除く他の4種の 17-KS を二次薄層クロマトグラフィーに展開した。

8) Androstanedione 分画及び Δ4-Androstenedione 分画は Progesterone 除去の目的で 20cm のプレートを使用した薄層上に10%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開した。Androsterone 及び DHA 分画は Pregnenolone 除去の目的で 20cm プレートを使用した薄層上をクロロホルム:アセトン:エタノール=90:7:3を展開溶媒として展開した。尚 Etiocolanolone 分画は C₂₁ methyl Pregnane series Steroid の干渉がない為二次薄層には展開しなかつた。

Table. 4 Rf values of neutral steroids on T. L. C.

	System A	System B
Androstenedione	0.63	
Δ^4 -Androstenedione	0.47	0.66
Progesterone	0.57	0.81
Pregnenolone	0.44	0.63
Androsterone	0.52	0.50
D H A	0.33	0.45

System A : 10% Acetone/Chloroform

System B : Chloroform : Acetone : Ethanol
= 90 : 7 : 3

9) 以上一次及び二次薄層クロマトグラフィーによつて得られた Androstenedione, Δ^4 -Androstenedione, Androsterone, DHA 及び Etiocholanolone 分画を Zimmermann 発色の Lieberman 変法によるマイクロ法により定量した。

Lieberman 変法によるマイクロ法は 10ml の試験管に移し乾固した各分画とプランク 1 本及びスタンダードとして DHA 20 μ g を採り各々に 0.2ml の 1% メタデニトロベンゼンをよく管壁を洗う様にして加え更に同様にして 0.1ml の 5N 苛性カリを加え暗所で 30~60 分放置し 1ml の蒸溜水を加えて反応を停止する。1.5ml のテトラヒドロフランを加えて 30 秒間よく振盪すると発色物質はテトラヒドロフラン層に移行する。次いで 3,000 r. p. m. にて 5 分間遠沈してテトラヒドロフラン層を Micro-cell に移し分光光度計で 460m μ , 520m μ , 580m μ の 3 点を測定し Allen の補正を行い算出する方法である。

10) (1)は 0.2M の Phosphate buffer により pH を 6.8 にして Phosphate β -Glucuronidase を検体 25 ml につき 6,000 Fishman 単位加え 48 時間加水分解した。

ここで使用した phosphate β -Glucuronidase 仔牛の肝臓より抽出したもので一般にこの水解の為用いられる Acetate β -Glucuronidase を用いた phosphate β -Glucuronidase を用いた理由は次の操作で硫酸結合水解法として用いる Transesterification に対する干渉を少くする為である。Transesterification は Eberlein の報告した方法で硫酸結合型を特異的に加水分解し、その反応は酵素水解に似て緩徐であり steroid に変化を与える事が少く、収量のいい方法

であるが蛋白及び有機イオンに干渉される欠点を有している。この欠点を補う為、脱蛋白を先行して行い、 β -Glucuronidase 水解も有機の Acetate を用いず、無機の Phosphate を用いたのである。

Phosphate- β -Glucuronidase 水解後は 4) 6) 8) 9) を行つた。更に 4) より得た液戸は Transesterification 及び Saponification を行い 6) 7) 8) 9) を行つた。

Table. 5 Transesterification procedure

AQUOUS LAYER

Ajust PH 7.0 with H₂SO₄
Add 1% Methylgreen Solution
and gentle shaking
Chloroform extraction (2vol 2x)

CHOROFORM EXTRACT

dried down

STEROID RESIDUE

Add 3ml Glacial acetic acid
Add 0.1ml 7% Perchloric acid
70°~75°c 30min heat
Add 20ml Distilled water
Ether extraction (30ml, 20ml)

ETHER EXTRACT

wash with 0.2N HCl 5ml 1x
10% NaOH 10ml 1x
Distilled water 10ml 2x
Dehydrate with Na₂SO₄

STEROID RESIDUE

Table. 6 Saponification procedure

STEROID RESIDUE

Add 0.1ml Abs. Methanol
Distilled water 9ml
10% NaOH 1ml
37°c 15 min. incubate
Ether extraction (2vol. 2x)

ETHER EXTRACT

Dehydrate with Na₂SO₄
dried down

STEROID RESIDUE

第 2 節 本法による血中 17-KS 分画測定の回収率

1) 各 step での回収率

A) 脱蛋白操作

分離した血漿を 5ml ずつ 4本の試験管に採り 2本の血漿には DHA 純品 30 μ g を添加し各々に 15ml の 50%アセトン/クロロホルムを加えよく振盪して遠沈し上清を採取した。この操作を 3 回行い上清を完全に乾固して Zimmermann 発色をし Allen の補正を行いこの補正值を用いて次の式にて算出した。

$$\frac{\text{DHA 添加群} - \text{DHA 非添加群}}{\text{DHA 純品 } 30\mu\text{g}} \times 100 \dots \dots (1)$$

この結果は平行試験にて 78.5 %と 71.5%の成績を得た。

B) エーテル抽出：脱蛋白操作後乾固しこれに血漿と同量の蒸留水を加えよく振盪し均一化した液層を用いて行つた。DHA 純品添加は A) の如く行い 2 倍量のエーテル 2 回で抽出を行いこれを乾固して Zimmermann 発色をし A) …(1) の式により算出した。平行試験で行つた為結果は 100%と 100%の成績を得た。

C) アルカリ洗滌及び水洗操作：血漿を脱蛋白操作をしエーテル抽出し、このエーテル層を等量ずつ分割し A) と同様に DHA 純品添加群及び非添加群に分け 1/20 倍量の 0.1N 苛性ソーダにて 2 回洗滌し 1/10 倍量の蒸留水にて 2 回洗滌し乾固して Zimmermann 発色をし A) …(1) の式により算出した。

平行試験で行つた為結果は 100%と 98.2%の成績を得た。

D) 脱脂操作：血漿 5 ml ずつ 4本の試験管に採り各々脱蛋白→エーテル抽出→アルカリ洗滌、水洗後乾固しその中の 2 本に DHA 純品を添加し各々に 80%メタノールと n-ヘキサンの分配により脱脂した 80%メタノール層を減圧蒸溜して乾固して Zimmermann 発色をし A) …(1) の式により算出した。

平行試験で行つた為結果は 97.2%と 98.8%の成績を得た。

2) 全回収率

臍帯血 10ml に純品 50 μ g 添加した添加群と添加していない非添加群について全過程の操作を行い添加群—非添加群/純品 50 μ g \times 100 により算出した。尚 Androstenedione は不純物が混入している為検討出来なかつた。

以下一括して全回収率を示す。

A) Δ 4-Androstenedione : 36.3%

B) Androsterone : 62.7%

C) DHA : 59.6%

D) Etiocholanolone : 55.8%

Table. 7 Total recovery rate

Δ 4- Androstenedione	36.3 %
Androsterone	62.7 %
D H A	59.6 %
Etiocholanolone	55.8 %

第 3 節 臍帯血 17-KS 分画の同定

プールした臍帯血より 17-KS 分画を分離し各々についてガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー等を用いて同定に関する若干の検討を行つた。

1) Androstenedione : A) 相異なる 2 種類のシステムを有する薄層クロマトグラフィー (55cm のプレートを用い 15%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したものと、20cm のプレートを用い 10%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したもの) において純品と等しい R_f 値及び色調を有するスポットを認める事。

B) 1% SE-30 のカラムを使用したガスクロマトグラフィーにおいて純品と等しい相対保持時間を有する事。

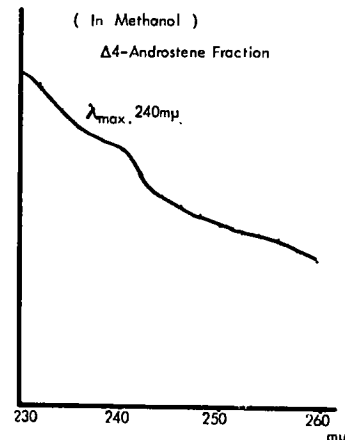
C) TLC 上に一致する検体よりのサンプルが Zimmermann 反応陽性である事。

2) Δ 4-Androstenedione

A) 相異なる種類のシステムを有する薄層クロマトグラフィー (55cm のプレートを用い 15%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したものと 20cm のプレートを用い 10%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したもの) において純品と等しい R_f 値及び色調を有するスポットを認める事。

B) メタノール内の最大吸収波長が 240m μ にある

Fig. 1 Absorption curve



事.

C) TLC 上に一致する検体よりのサンプルが Zimmermann 反応陽性である事.

3) Androsterone

A) 相異なる2種類のシステムを有する薄層クロマトグラフィー (55cm のプレートを用い15%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したものと20cm のプレートを使用しクロロホルム:アセトン:エタノール=90:7:3を展開溶媒として展開したもの) において純品と等しい R_f 値及び色調を有するスポットを認める事.

B) 相異なる2種類のカラムを有するガスクロマトグラフィー (1% SE-30 及び2% NGS)において純品と等しい相対保持時間を有する事.

C) TLC 上に一致する検体よりのサンプルが Zimmermann 反応陽性である事.

3) DHA

A) 相異なる2種類のシステムを有する薄層クロマトグラフィー (55cm のプレートを用いた15%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したものと20cm のプレートを使用しクロロホルム:アセ

トン:エタノール=90:7:3を展開溶媒として展開したもの) において純品と等しい R_f 及び色調を有する事.

Table. 8 R_{rt} on G. L. C.

1) Column: 1% SE 30

C. T.: 240°C

N₂: 30 cc/min, 3 kg

AIR: 0.6 l/min

H₂: 60 cc/min

	Pure steroid	Sample
A-dione	0.48	0.46
Andr.	0.40	0.41
DHA	0.42	0.43

2) Column: 0.7% NGS

C. T.: 215°C

N₂: 30 cc/min, 3 kg

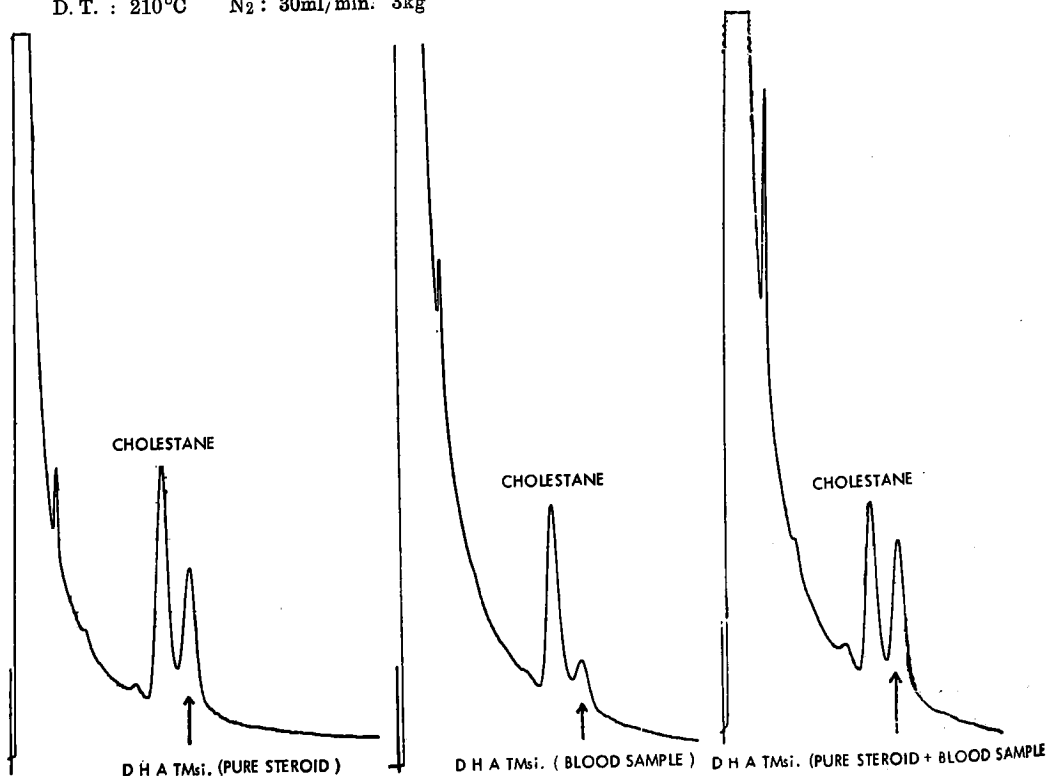
AIR: 0.6 l/min

H₂: 60 cc/min

	Pure steroid	Sample
Andr. TMSi	0.98	1.02
DHA. TMSi	1.40	1.40

Fig. 2 Identification of DHA on gasliquidchromatography

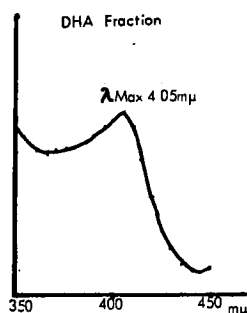
Column: 2% NGS C. T.: 220°C H₂: 80ml/min. S. C. T.: 220°C AIR: 0.6l/min.
D. T.: 210°C N₂: 30ml/min. 3kg



B) 相異なる 2 種類のカラムを有するガスクロマトグラフィー (1% SE-30 及び 2% NGS) において純品と等しい相対保持時間を有する事。

C) Oertel-Eiknes¹²⁾ 発色を行うと最大吸収波長が 405m μ にある事。

Fig. 3 Continuous absorption curve
(Eik-Nes Reaction)



D) TLC 上に一致するサンプルが Zimmermann 反応陽性である事。

5) Etiocholanolone

A) 相異なる 2 種類のシステムを有する薄層クロマトグラフィー (55cm のプレートを用い 15% アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開したもの及び 20cm のプレートを使用してクロロホルム:アセトン:エタノール 90:7:3 を展開溶媒として展開したもの) において純品と等しい R_f 値及び色調を有するスポットを認める事。

B) TLC 上に一致するサンプルが Zimmermann 反応陽性である事。

第 4 節 母体尿中 17-KS 9 分画測定法

臍帯血を採取した症例の中で 2 例につき、分娩前の母体尿を採取した。1 例は分娩前 2 日であり 1 例は分娩前 6 日であった。この尿について 17-KS 9 分画の測定を行った。

本法は当教室の吉田、鈴木により開発された方法で同一尿より 17-KS 9 分画, Corticoids 9 分画の測定が可能である。著者は母体尿及び新生児尿の分析には本法を用いた。

本法では加水分解は 3 段階水解法 (遊離型, β -Glucuronidase 水解及びソルボライシス) を用いている。以下は本法の概略を示す。

1) 採尿: 1 日尿を採取の尿量をメスシリンダーで正確に測定する。

2) 加水分解: pH 4.7 に調整の 1/25 倍量の 0.2M の酢酸緩衝液を加え自家製 β -Glucuronidase を尿 25

ml に対して 6,000 Fishman 単位及びペニシリン G を耳かき 1 ばい加え 37°C にて 48 時間イングベートする。尚イングベートをしはじめて 24 時間目に β -Glucuronidase を初回の半量を追加した。

3) 抽出: 酢酸エチルを用いて行つた。2/3 倍量で 2 回 1/3 倍量で 7 回行い分離した液層はソルボライシスを行つた。

4) 洗滌: 酢酸エチル層は 1/7 倍量の冷 2N 苛性ソーダで 2 回, 1/5 倍量の蒸留水にて 2 回洗滌し無水硫酸ソーダにて脱水し 50°C にて減圧蒸留して乾固した。

5) Column chromatography: 内径 1cm のカラムを使用し予試験の済んだ Florisil を用いてメタノール/クロロホルム系により 17-KS とコルチコイドを分離した。

6) 薄層クロマトグラフィー: 17-KS 分画をテストチューブに移し 55cm の薄層上を 15% アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開し 17-KS 9 分画を分離した。

7) 発色測定: Zimmermann 発色により 9 分画を測定し純品補正を加えて 1 日排泄量を算出した。

第 5 節 尿中エストロゲン 8 分画測定法

第 4 節で示した 2 例の母体尿についてエストロゲン 8 分画の測定を行つた。

本法の概略を示すと以下の通りである。

1) 採尿: 母体尿は 2 例につき採取し 1 例は分娩前 2 日目, 1 例は分娩前 6 日目であり 1 日尿を採取しメスシリンダーで尿量を正確に測定した。

2) 加水分解: 25ml の尿を遠沈管に濾過して採り pH 4.7 に調整し 1ml の 0.2M の酢酸緩衝液を加え更に 6,000 Fishman 単位の β -Glucuronidase 及びペニシリン G をを耳かき 1 ばい加えて 37°C にて 48 時間イングベートした。

イングベートはじめて 24 時間目に β -Glucuronidase を初回の半量追加した。

3) 抽水: エステルにより行い 40ml 1 回, 35ml で 1 回抽出した。

4) 洗滌及び濃縮: 7.7ml の蒸留水で 2 回洗滌し 45°C にて 2.5ml 位になる迄濃縮した。

5) 溶解: 20ml の 50% 石油エステル/ベンゼンを加えて溶解した。

6) 酸性 Steroid の抽出: 25ml の 1.6% 苛性ソーダにて抽出した。(1 回目 8ml, 2 回目 8ml, 3 回目 9ml)

7) メチル化: アルカリ抽出液に 0.45g 硼酸を

加え更に 0.5ml のデメチル硫酸を加え 37°C 30分間攪拌し室温に昼夜放置した。

8) ベンゼン抽出: 3.3 ml の 20%苛性ソーダ及び 0.83ml の 30%過酸化水素水を加え 5 分間放置し 15ml のベンゼンで 2 回抽出した。

9) 洗滌: 3ml の蒸留水で 3 回洗滌し無水硫酸ソーダを加えて脱水し 60°C にて減圧蒸留して乾固した。

10) 薄層クロマトグラフィー: 乾固したメチル化した酸性 Steroid をメタノールでテストチューブに移し 20cm の薄層上を 10%アセトン/クロロホルムを展開溶媒として展開してエストロゲン 8 分画を分離した。

11) 発色測定: Kober 発色の微量測定法により測定した。

この微量測定法は A) エストロゲン 8 分画, Est-rone methylether 純品 5 μ g 及びブランクの計 10 本を用意する。

B) ブランク, Estriol 分画, 16-epi-Estriol 分画には 0.8ml の Kober 試薬を 16-OH-Estradiol 分画, 16-OH-Estrone Estradiol 及び 2-Methoxy-Estrone 分画には 0.64ml のコーベル試薬を 16-Ox0-Estrone Estrone 分画及び Estronemethyl ether 純品には 0.7 ml の Kober 試薬を加え 100°C にて 20 分間保温する。

C) 10 分間氷冷後 B) で加えた Kober 試薬と同量の蒸留水を加える。

D) 冷暗所に 3 分間静置し振盪した後再び 3 分間静置する。

E) 各々に 0.8ml の 1.1.2.2.-テトラクロロエタン試薬を加え 30 秒間振盪する。

F) 2500r. p. m にて 3 分間遠沈する。

G) 下層のテトラクロロエタン試薬に移行したコーベル発色物を注射器で採取し Microcell に移し 510m μ , 540m μ , 570m μ , にて測定し純品補正を加えて 1 日排泄量を算出する。

臨 床 編

第 1 節 臍帯血中 17-KS 5 分画の測定

臍帯は生理、解剖学的に胎児と胎盤及び母体を結ぶ唯一のルートであり従つて臍帯を流れる臍帯血は胎児と胎盤及び母体の代謝中でも胎児—胎盤系の代謝を最も直接的に表現し

ている場所として考えられる。胎児—胎盤系の代謝を論ずる場合には臍帯血の分析がなされてなければいくらイングベシオンや灌流の実験の様な *in vitro* の実験により卓越した説を立てても *in vitro* にあてはめるにはよほど慎重でなければならない。胎児—胎盤系のステロイド代謝に関して Diczfalusy は卓越した理論を報告しているがこの理論の根拠はイングベシオンや灌流実験である。

一方臍帯血中ステロイドの分析は Eberlein が報告しているがこれはプール血での検討であり然も 17-KS に関しては硫酸結合型の Androsterone DHA 及び Etiocholanolone についての報告である。その他 Steroid 分画についての報告は全くない。著者は臍帯血中 17-KS 5 分画 (Androstanedione, Δ 4-Androstanedione Androsterone, DHA 及び Etiocholanolone) を個々の症例別に遊離型, β -Glucuronidase Hydrolysate, Transesterification Hydrolysate として抽出し測定した。

測定した症例数は 21 例である。

1) 遊離型: 測定した 21 例の臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100ml あたりの常均値及び標準偏差は次の通りである。

A) Androstanedione: 18.9 \pm 7.5 μ g/100ml

B) Δ 4-Androstanedione: 13.0 \pm 6.4 μ g/100ml

C) Androsterone: 11.4 \pm 5.7 μ g/100ml

D) DHA: 10.4 \pm 4.2 μ g/100ml

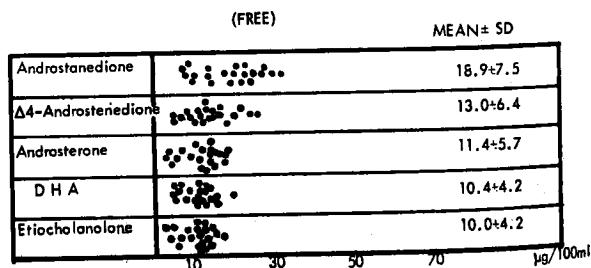
E) Etiocholanolone: 10.0 \pm 4.2 μ g/100ml

これ等の各々の分画の分布を図示すれば第 4 図の如くであり個々の症例でのばらつきは比較的少く Androstanedione 及び Δ 4-Androstanedione の両分画は他の 3 分画に比較するとやや大きいばらつきを示している。

2) β -Glucuronidase Hydrolysate

リン酸緩衝液で pH 6.8 にして示適 pH が 6.8 である phosphate β -Glucuronidase により加水分解

Fig. 4 17-KS Fractions in cord blood

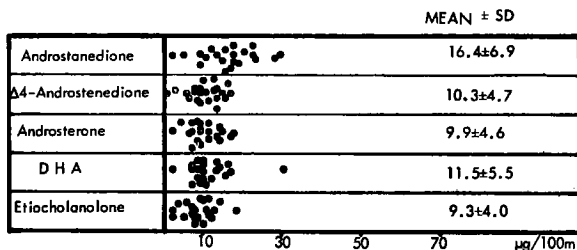


された 17-KS 分画であり測定した 21 例の臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100ml あたりの平均値及び標準偏差は次の通りである。

- A) Androstanedione : $16.4 \pm 6.9 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- B) $\Delta 4$ -Androstenedione : $10.3 \pm 4.7 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- C) Androsterone : $9.9 \pm 4.6 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- D) DHA : $11.5 \pm 5.5 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- E) Etiocholanolone : $9.3 \pm 4.0 \mu\text{g}/100\text{ml}$

これ等の各々の分画の分布を図示すれば第 5 図の如くであり各々の分画ではばらつきは遊離型より更に少くアンドロスタンダイオン分画が他の 4 分画に比較するとやや大きいばらつきを示している。

Fig. 5 17-KS Fractions in cord blood
(β -Glucuronidase hydrolysate)



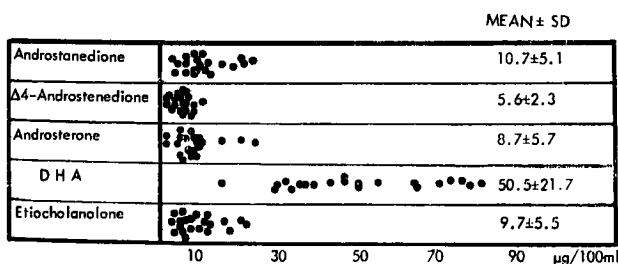
3) Transesterification Hydrolysate

Transesterification は Eberlein の考案した方法で硫酸結合の加水分解に用いられているが我々の検討では 1) 硫酸結合を特異的に水解する事 2) ステロイドの破壊及び変化を起りにくい事により硫酸結合加水分解酵素であるサルファターゼの入手困難な現在最も優れた方法と考えられる水解法である。

しかし Transesterification は蛋白により反応が阻害される為原法では少量の血清を多数の試験管に分注して行うものであるが著者は脱蛋白を先行して行う事により分注する事なく行う事が出来た。

測定した 21 例の臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100 ml あたりの平均値及び標準偏差は次の通りである。

Fig. 6 17-KS Fractions in cord blood
(Transesterification hydrolysate)



- A) Androstanedione : $10.7 \pm 5.1 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- B) $\Delta 4$ -Androstenedione : $5.6 \pm 2.3 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- C) Androsterone : $8.7 \pm 5.7 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- D) DHA : $50.5 \pm 21.7 \mu\text{g}/100\text{ml}$
- E) Etiocholanolone : $9.7 \pm 5.5 \mu\text{g}/100\text{ml}$

これ等の各々の分画の分布を図示すれば第 6 図の如くであり、DHA 分画が圧倒的に多く含まれているがばらつきも他の 4 分画に比較すると大きい。

4) 遊離型と結合型の和で見た 17-KS 分画遊離型、 β -Glucuronidase Hydrolysate 及び Transesterification Hydrolysate の和であり測定した 21 例の臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100ml あたりの平均値及び標準偏差は次の通りである。

- A) Androstanedione : $46.0 \pm 12.4 \mu\text{g}/100\text{ml}$

- B) $\Delta 4$ -Androstenedione : $29.7 \pm 9.3 \mu\text{g}/100\text{ml}$

- C) Androsterone : $30.2 \pm 8.1 \mu\text{g}/100\text{ml}$

- D) DHA : $73.1 \pm 24.2 \mu\text{g}/100\text{ml}$

- E) Etiocholanolone : $29.1 \pm 9.9 \mu\text{g}/100\text{ml}$

これ等各々の分画の分布を図示すれば第 7 図の如くであり、DHA 分画が圧倒的に

多く含まれているがばらつきも他の 4 分画に比較すると大きい。以上遊離型及び結合型に於ける各分画の平均値及び標準偏差は一括して第 8 表に示す。更に見方を変えて臍帯血中 17-KS 各分画の遊離型、 β -Glucuronidase Hydrolysate 及び Transesterification Hydrolysate の占める割合は第 9 表に示している。この表によれば各々の分画を 3 群に大別する事が出来る。

即ち Androstanedione 及び $\Delta 4$ -Androstenedione は遊離型及び β -Glucuronidase Hydrolysate として多く Androsterone 及び Etiocholanolone に遊離型、 β -Glucuronidase Hydrolysate 及び Transesterification Hydrolysate にほぼ均等に含まれている。

一方 DHA は殆んど Transesterification Hydrolysate として存在し遊離型及び β -Glucuronidase Hydrolysate としては少い。

第 2 節 同一症例より得た母体血及び臍帯血中 17-KS の測定値

同一症例より得た母体血及び臍帯血中の 17-KS 分画測定に関し

Fig. 7 17-KS Fractions in cord blood (Total)

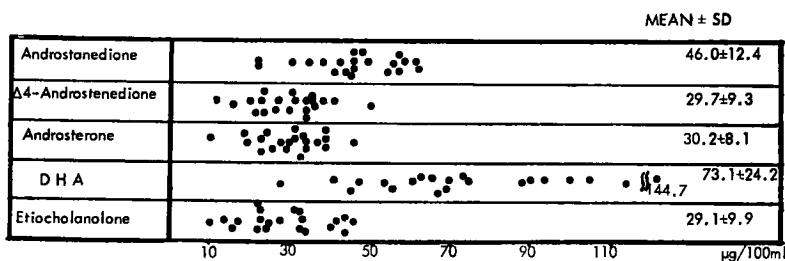


Table. 9 17-KS Fractions in cord blood

MEAN \pm SD

	Free	β -Glucuronidase Hydrolysate	Transesterification Hydrolysate	Total
Androstenedione	18.9 \pm 7.5	16.4 \pm 6.9	10.7 \pm 5.1	46.0 \pm 12.4
Δ 4-Androstenedione	13.0 \pm 6.4	10.3 \pm 4.7	5.6 \pm 2.3	29.7 \pm 9.3
Androsterone	11.4 \pm 5.7	9.9 \pm 4.6	8.7 \pm 5.7	30.2 \pm 8.1
D H A	10.4 \pm 4.2	11.5 \pm 5.5	50.5 \pm 21.7	73.1 \pm 24.2
Etiocholanolone	10.0 \pm 4.2	9.3 \pm 4.0	9.7 \pm 5.5	29.1 \pm 9.9

$\mu\text{g}/100\text{ml}$

Table. 10 17-KS Fractions in cord blood (Percentage of free and conjugate form)

	Free (%)	β -Glucuronidase Hydrolysate (%)	Transesterification Hydrolysate (%)	Total ($\mu\text{g} / 100\text{ml}$)
Androstenedione	41.1	35.6	23.3	46.0 \pm 12.4
Δ 4-Androstenedione	45.0	35.6	19.4	29.7 \pm 9.3
Androsterone	38.0	33.0	29.0	30.2 \pm 8.1
D H A	14.4	15.9	69.7	73.1 \pm 24.2
Etiocholanolone	34.5	32.1	33.4	29.1 \pm 9.9

$\mu\text{g} / 100\text{ml}$

ては未だ報告を見ない。最近 Incubation 実験や灌流実験を根拠にして胎児-胎盤系のステロイド代謝が論ぜられている。

Diczfalussy の理論によれば妊娠中のステロイド代謝の中心を胎児-胎盤系に求めており特に Estriol 生合成に関しては胎児-胎盤系がその全てであるかの印象を与えている。確かに胎盤は極めて重要な機能を有し妊娠中のステロイド代謝の指導的立場をとっている事は認めるとしても果して胎児-胎盤系が主であり母体-胎盤系は殆んどないと云う事には疑問がある。この問題の解決法として著者は胎児-胎盤系に関しては臍帯血を採取し母体因子としては母体血を採取して各々について 17-KS 5 分画を測定した。

更に分娩前の母体 1 日尿を採取しこの中に含まれる 17-KS 9 分画及びエストロゲン 8 分画の測定も

行つた。

症例 1) H. K. 27 才 para 2-1-1-1

分娩予定日 1968 年 1 月 25 日

分娩 1968 年 1 月 24 日

分娩に際し頸管の開大は順調であつたが長骨盤の為吸引分娩を行つている。

児は♀ 2800g アプガー指数 10 点

胎盤の所見では 重量 600g で白色硬塞(-) 石灰沈着(+)であつた。

分娩時診断 1) 妊娠 10 ヶ月第 1 後頭位経産婦

2) 長骨盤

以上の状態であり胎児-胎盤-母体機能は正常と考えられる症例である。

A) 母体血中並びに臍帯血中 17-KS 5 分画母体血及び臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100ml あたりの測定値は次の通りである。

a) 遊離型

i) Androstenedione

母体血 : 21.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 14.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ii) Δ^4 -Androstenedione母体血 : 11.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 12.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iii) Androsterone

母体血 : 12.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 3.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iv) DHA

母体血 : 13.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 12.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocholanolone

母体血 : 10.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 3.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ b) β -Glucuronidase Hydrolysate

i) Androstenedione

母体血 : 43.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 23.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ii) Δ^4 -Androstenedione母体血 : 8.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 13.3 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iii) Androsterone

母体血 : 9.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 9.3 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iv) DHA

母体血 : —

臍帯血 : 10.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocholanolone

母体血 : 3.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 6.3 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

c) Transesterification Hydrolysate

i) Androstenedione

母体血 : 19.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 19.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ ii) Δ^4 -Androstenedione母体血 : 3.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 5.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iii) Androsterone

母体血 : 6.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 16.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

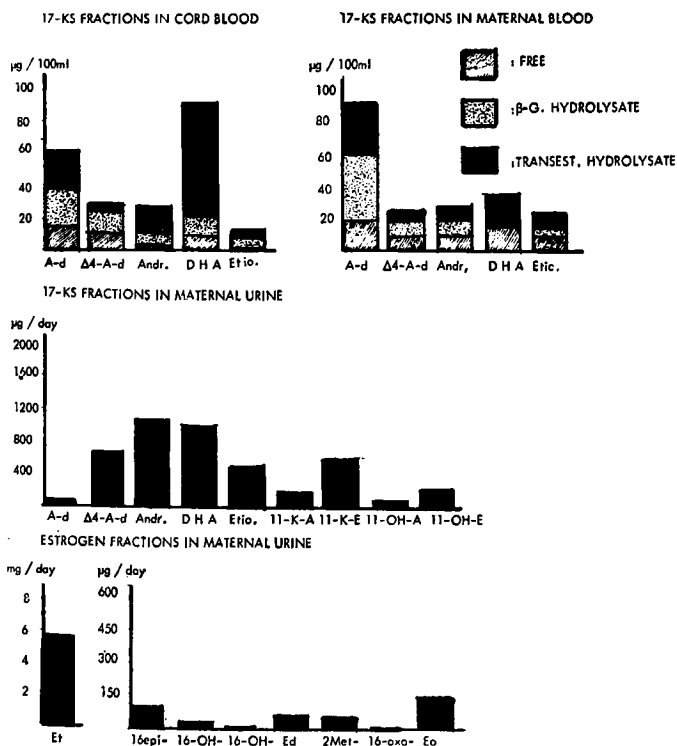
iv) DHA

母体血 : 24.2 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 65.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocholanolone

母体血 : 8.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 臍帯血 : 5.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

Fig. 8 Case (1) :



これ等の各々の分画を図示すれば第8図の如くであり3水解型の和で見ると母体血では Androstenedione 分画次いで DHA 分画が多く他の3分画は 20~30 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ にある。一方臍帯血では DHA 分画次いで Androstenedione 分画が多く Δ^4 -Androstenedione 分画及び Androsterone 分画は 30 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 程度ではほぼ等しく Etiocholanolone 分画は 15.5 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ と少ない。

母体尿中 17-KS 9分画及びエストロゲン8分画の測定結果は第9図及び第11表に示しているが 17-KS 分画に関しては Etiocholanolone がやや少ない以外は特異なパターンは示していない。一方エス

Table. 11 Case (1): 17-KS Fractions in cord blood, maternal blood and maternal urine

	Cord blood $\mu\text{g} / 100\text{ml}$	Maternal blood $\mu\text{g} / 100\text{ml}$	Maternal urine $\mu\text{g} / \text{day}$
Androstenedione	57.5	85.1	18.7
$\Delta 4$ -Androstenedione	31.9	24.2	655.5
Androsterone	31.7	28.0	1157.4
D H A	88.4	37.3	1111.3
Etiocolanolone	15.5	22.1	430.5
11-Keto-Andr.			182.4
11-Keto-Etio.			499.3
11-OH-Andr.			110.8
11-OH-Etio.			225.9

Estrogen fractions in maternal urine

	$\mu\text{g} / \text{day}$
Estriol	5699.4
16-epi-Et	83.9
16-OH-Ed	26.0
16-OH-Eo	8.3
Estradiol	42.2
2-Methoxy-Eo	36.8
16-oxo-Eo	7.7
Estrone	147.2

トロゲン 8 分画の測定では Estriol が圧倒的に多く 5699.4 $\mu\text{g}/\text{day}$ を示している。他の分画では Estrone 147.2 $\mu\text{g}/\text{day}$ 16-epi-Estriol 83.9 $\mu\text{g}/\text{day}$ Estradiol 42.2 $\mu\text{g}/\text{day}$ 2-methoxy-Estrone 36.8 $\mu\text{g}/\text{day}$ 16-OH-Estradiol 26.0 $\mu\text{g}/\text{day}$, 16-OH-Estrone 8.3 $\mu\text{g}/\text{day}$ 及び 16-oxo-Estrone が 7.7 $\mu\text{g}/\text{day}$ と少い。

症例 2) この症例では母体血の採取が出来なかつた為臍帯血中 17-KS 5 分画と母体尿中 17-KS 9 分画とエストロゲン 8 分画を測定した。

Y. M. 26才 para 1-0-1-1

分娩予定日 1968年1月10日

分娩 1968年1月14日

分娩に際し頸管の開大は順調であつたが骨盤出口の軽度の狭窄があつた為吸引分娩を行っている。児は 3200g, アプガー指数 9 点, 胎盤は 520g で色白硬塞(-), 石灰沈着(-)であつた。

分娩時診断 1) 妊娠10ヶ月第2後頭位経産婦

2) 軽度骨盤出口狭窄

以上であり症例 1 と同様に胎児-胎盤-母体機能は正常と考えられる症例である。

A) 臍帯血中 17-KS 分画

臍帯血中 17-KS 各分画の血漿 100ml あたりの測定値は次の通りである。

a) 遊離型

i) Androstandione : 14.3 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

ii) $\Delta 4$ -Androstenedione : 10.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iii) Androsterone : 8.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

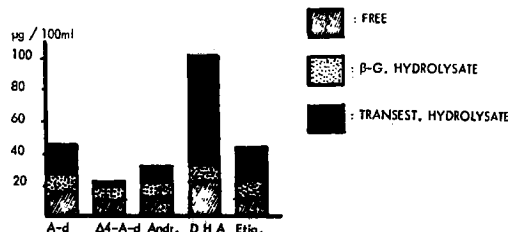
iv) DHA : 15.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocolanolone : 10.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

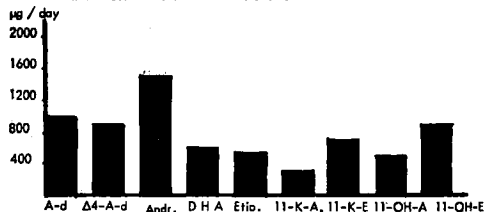
b) β -Glucuronidase Hydrolysate

Fig. 9 Case (2):

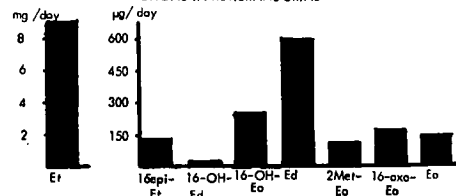
17-KS FRACTIONS IN CORD BLOOD



17-KS FRACTIONS IN MATERNAL URINE



ESTROGEN FRACTIONS IN MATERNAL URINE



i) Androstaneone : 9.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

ii) $\Delta 4$ -Androstenedione : 8.2 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iii) Androsterone : 8.2 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iv) DHA : 8.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocolanolone : 11.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

c) Transesterification Hydrolysate

i) Androstenedione : 21.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

ii) $\Delta 4$ -Androstenedione : 5.0 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

Table 12 Case (2): 17-KS Fractions in cord blood and maternal urine

	Cord blood $\mu\text{g} / 100\text{ml}$	Maternal urine $\mu\text{g} / \text{day}$
Androstenedione	45.3	1196.5
Δ^4 -Androstenedione	23.9	870.9
Androsterone	33.0	1533.4
DHA	101.4	652.5
Etiocolanolone	44.6	549.9
11-Keto-Andr.		321.5
11-Keto-Etio.		732.2
11-OH-Andr.		575.5
11-OH-Etio.		870.0

iii) Androsterone : 15.9 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

iv) DHA : 76.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

v) Etiocolanolone : 22.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$

これ等の各の分画を図示すれば第9図の如くであり3水解型の和で見るとDHA分画が多く次いでAndrostenedioneであるが症例1と異りこの症例ではEtiocolanoloneが多く44.6 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ である。

母体尿中 17-KS 9分画及びエストロゲン8分画の測定結果は第9図及び第12表に示しているが17-KS分画に関してはEtiocolanoloneがやや少い事は症例1とよく似ているがAndrosterone及び11-OXY-17-KSが多い点が異つたパターンを示している。一方エストロゲン8分画の測定では症例1に較べ概して高値を示しEstriolは9308.1 $\mu\text{g}/\text{day}$ 次いでEstradiolの601.2 $\mu\text{g}/\text{day}$, 16-OH-Estrone 247.8 $\mu\text{g}/\text{day}$, 16-oxo-Estrone 180.1 $\mu\text{g}/\text{day}$, 2-methoxy-Estrone 108.5 $\mu\text{g}/\text{day}$, 16-epi-Estriol 107.1 $\mu\text{g}/\text{day}$, 16-OH-Estradiolは28.0 $\mu\text{g}/\text{day}$ であつた。

第3節 新生児尿中 Total 17-KS 17-KGS 17-KS 及びエストロゲン分画の測定

著者は妊娠中のSteroid代謝を解明する目的で胎児-胎盤系に関しては臍帯血を母体に関しては母体血及び母体尿を選び主に17-KS分画に関して測定したが胎児内ではどのような代謝が行われているかに関しては胎児血の採取は事実上不可能であり検討出来なかつた。この問題に少しでもアプローチする為採取する事の可能な新生児尿を選びTotal 17-KS 17-KGS 17-KS 9分画及びエストロゲン分画の測定を行った。

新生児尿は生後1日目, 3日目, 5日目及び7日目に採取した。更に新生児副腎機能を見る目的で3

Estrogen fractions in maternal urine

	$\mu\text{g} / \text{day}$
Estriol	9308.1
16-epi-Et	107.1
16-OH-Ed	28.0
16-OH-Eo	247.8
Estradiol	601.2
2-Methoxy-Eo	108.5
16-oxo-Eo	180.1
Estrone	149.4

例の新生児に対してACTH-Z 10単位を3, 4, 5, 日目に負荷しTotal 17-KS 17-KGS 及びエストロゲン分画の反応を見た。

1) 17-KGS の経日的変動

17-KGSの最も著明な経日的変化は分娩1日目から3日目に至る変化でありこの変化により上昇群, 下降群, 不定群の3群に区別出来る。上昇群の分娩1日目の17-KGSの1日排泄値は548~193.9 μg であり下降群では316.9~379.4 μg であつた。又不定群では118.3~305.8 μg であつた。従つて1日目に高値をとる例では3日目は下降し1日目に低値をとるものは3日目は高値をとる傾向にあつた。更に17-KGSの経日的変動の大きい事が特徴的であつた。

2) Total 17-KS の経日的変動

17-KGSに関して検討した上記3群につきTotal 17-KSの経日的変動を追求した。

17-KGS上昇群に於けるTotal 17-KSの変化は一定の傾向を示さなかつた。一方17-KGS下降群でのTotal 17-KS値の変動は4例中3例は下降していたが1例は非定形的であつた。17-KGS不定群での

Fig. 10

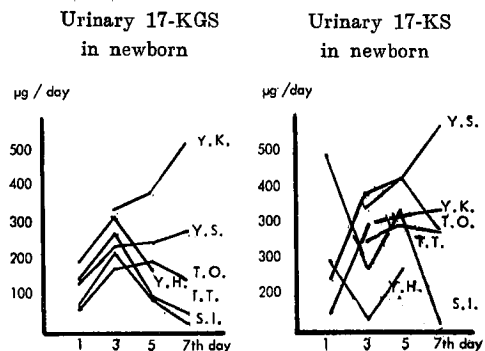


Fig. 11

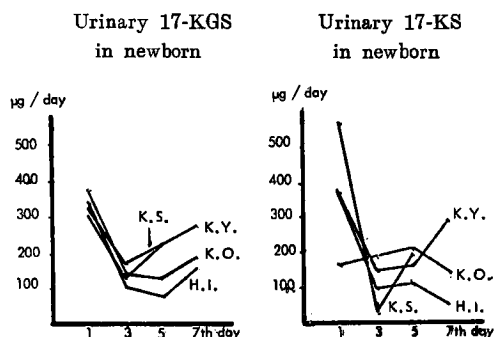
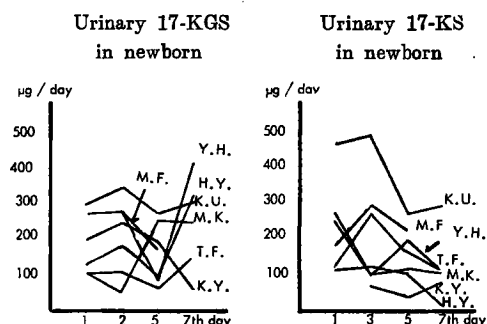


Fig. 12



Total 17-KS の変動は上昇しているもの 2 例，下降しているもの 2 例，非定形的な変動を示すものが 2 例であった。一方経日的変動は 17-KGS 場合と同様で変動の巾は大きかった。

更に分娩 3，4，5 日目に ACTH-Z 10 単位づつ筋注して 17-KGS 及び Total 17-KS 値の変動を測定したが 17-KGS も Total 17-KS もよく反応しており反応の最も強い日は 17-KGS では分娩 3 日目が 1 例，5 日目が 1 例，7 日目が 1 例であり Total 17-KS に関しては分娩 3 日目が 1 例，5 日目が 1 例，7 日目が 2 例であった。以上 ACTH-Z 筋注例は第 13 図に示す。

3) 17-KS 分画

大人の場合と比較すると Etiocholanolone 及び DHA が少く丁度更年期婦人様のパターンを示している外は特徴的な変化はない。

4) エストロゲン分画

エストロゲン分画の中で最も経日的変動を示しているのは Estriol である。Estriol は分娩後 1，3，5，7 日目と日の経過とともに急激な減少を示している。

一方 ACTH 負荷例では各分画とも中等度の反応を示した。

Fig. 13

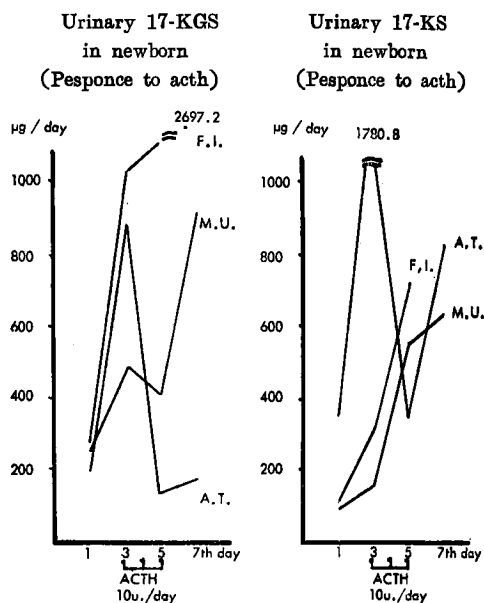


Fig. 14

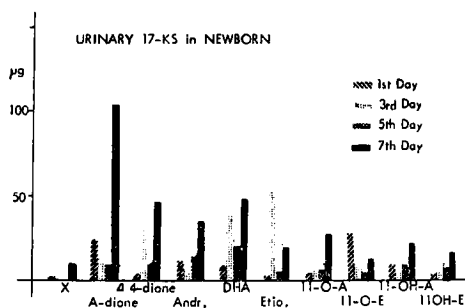
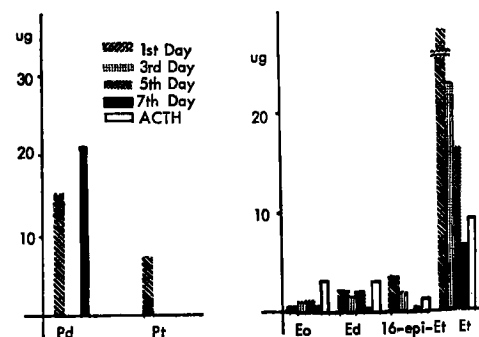


Fig. 15 Urinary pregnandiol, pregnantriol and estrogens in newborn



第 4 節 総括並びに考察

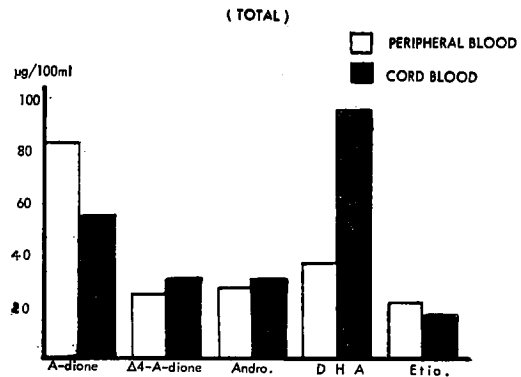
Diczfalussy が妊娠中のエストリオール合成に関しては胎児一胎盤系が最も重要なルートである事を報告して以来妊娠中のステロイド代謝を胎児一胎盤系を一つの単位としてとらえる考え方がなされる様に

なつてきた。Diczfalusy は Incubation 実験及び灌流実験で胎児には Sulphokinase, 17, 20-Desmolase, 11-Hydroxylase, 16-Hydroxylase 及び 17-Hydroxylase が存在し Aromatising enzyme system に関しては不明であるとし一方胎盤には Sulphatase, 3β -ol Dehydrogenase, Isomerase 及び Aromatising enzyme system が存在すると報告している。然も興味ある事は上記の酵素の中で胎児に存在するものは胎盤には存在せず胎盤に存在する酵素は胎児には存在しない事が示されている。即ち胎児と胎盤は1つの単位でありここに Foeto-Placental Unit の概念がはじまったのである。しかし Diczfalusy の示した胎児及び胎盤に於ける酵素活性については反論する人もあり例えば E. Bloch は胎児副腎には妊娠9週より Δ 5- 3β ol Dehydrogenase 及び Isomerase 活性が認められると云っている。

又胎児が分娩後胎盤から離れて自力で生活していく為には Corticoids が必要であると考えられるが Diczfalusy の示した胎児内酵素では Corticoids は合成出来ない。しかし一方酵素活性のないものが分娩機転により急激に活性を示す様になるとも考えられず Diczfalusy の示した胎児-胎盤での酵素活性は余り明瞭過ぎて疑問が残る。更に Diczfalusy の理論は Incubation 実験及び灌流実験を基にして導かれたものであり可能性を示しているに過ぎずこの理論を実証する為には血液中の Steroid を測定しなければならない。Eberlein は臍帯血中 Steroid の分析を行っているが硫酸結合型の DHA が多い事を示し Diczfalusy 理論を裏付けているがこれはプールした血液での結果であり個々の症例についての報告はない。更に同一症例について臍帯血、母体血及び母体尿中の Steroid を dynamic にとらえる事が必要なのではなかろうか。著者は臍帯血中 17-KS 5 分画を遊離型、 β -Glucuronidase Hydrolysate 及び Transesterification Hydrolysate に分けて分離測定した。臍帯血中 17-KS 分画の中で DHA が他の分画に較べて圧倒的に多かつたが主に Transesterification Hydrolysate として存在していた。しかしその他の分画も可成りの量含まれている事が分つた。Eberlein の臍帯血中 17-KS 分画の測定は硫酸結合型の Androsterone, DHA 及び Etiocholanolone であるが DHA に関しては著者とはほぼ等しい測定値であるが Androsterone 及び Etiocholanolone に関しては Eberlein 測定値は著者の測定値より低値で各々 $1.2\mu\text{g}/100\text{ml}$, $0.2\mu\text{g}/100\text{ml}$ である。しかし著者の検討し

た母体尿及び新生児尿の測定値より見ると Eberlein の測定値は余りにも低値の様に考える。母体血及び臍帯血同時測定例でみると Androstenedione は母体血に優位に多くこの解析は今の所不明である。 Δ 4-Androstenedione, Androsterone 及び Etiocholanolone は両血液間に殆んど差を認めない。この事は母体又

Fig. 16 17-KS Fractions in cord blood and maternal peripheral blood



一方 DHA に関しては臍帯血 $88.4\mu\text{g}/100\text{ml}$ に対し母体血では $37.3\mu\text{g}/\text{day}$ であり臍帯血中に優位に多い事が示され胎児-胎盤系に強い生合成能力がある事が分る。しかし母体血中にも相当量含まれており母体にも DHA 生合成能がある事が示されている。

母体尿中 17-KS 分画については Etiocholanolone が非妊娠成熟婦人尿に較べ低値を示している。Androsterone 及び DHA は大量に排泄されている。母体尿中エストロゲン分画については従来の報告通り Estriol が圧倒的に多い。

大人の 17-KS 分画について男女差を最もよく示す方法として Androsteron/Total 17-KS があるが臍帯血中 17-KS 分画についてこの比率を求めたが胎児の男女差との間には全く相関は認められなかつた。新生児尿中 17-KGS の経日的変動は上昇群、下降群、不定群に区別して検討したが臨床的所見との明らかな相関は認められなかつた。17-KGS 変動と Total 17-KS 変動は多少類似していた。又 17-KGS も Total 17-KS も経日的に大きな変動を示していたがこの原因は下垂体-副腎皮質系の Feedback 機構が未熟な為であると考えた。ACTH 負荷例で 17-KGS 及び Total 17-KS はよく反応しており新生児

副腎が活性である事が分つた。

新生児尿中 17-KS 分画では DHA 及び Etiochol-anolone が少く更年期婦人様のパターンを示し新生児の性腺機能が静止状態にある事を示している。新生児尿中エストロゲン分画中 Estriol は経日的に急激な減少を示し母体の影響の大である事を示していた。しかし ACTH を負荷すると中等度の反応を示し新生児副腎性の Estriol も存在する事を示していた。

Diczfalusy は Estriol の Precursor である DHA の生合成に関して Foeto-placental unit がその全てである様に報告しこの考え方が現在一般化しつつある。

しかし著者は母体血中にも DHA が相当量含まれている事²⁾新生児尿中の DHA が案外少い事³⁾Estriol は胎児に移行するの根拠に基いて妊娠末期になれば母体尿中に 10mg 前後も排泄される Estriol が胎児-胎盤系によるものであるとの考え方は間違っており Foeto-placentomaternal unit としてとらえる考え方を提唱する。そしてこの新しい概念に基いて代謝をとらえる為には臍帯血、母体血及び母体尿の分析が必要である。

更に個々の症例による臍帯血中 17-KS 各分画の全分画に対する比率を見ると各分画ともばらつきが少くこの事はこれ等分画間の代謝 Shift は個々の症例で余り変化のない事を示している。

Fig.17 Androstanedione/total 11-deoxy-17KS in cord blood

Mean \pm SD : 22.2 \pm 3.8

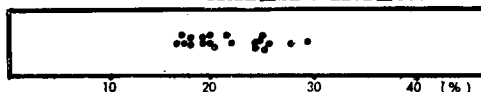


Fig.18 Δ^4 -Androstenedione/total 11-deoxy-17KS in cord blood

Mean \pm SD : 14.2 \pm 2.8

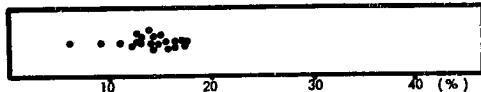


Fig.19 Androsteron/total 11-deoxy-17KS in cord blood

Mean \pm SD : 14.5 \pm 2.6

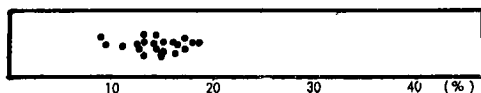


Fig.20 Etiocholanolone/Total 11-deoxy-17KS in cord blood

Mean \pm SD : 13.7 \pm 2.9

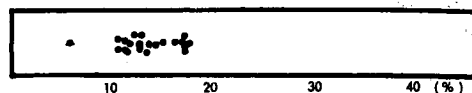
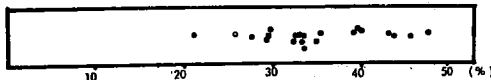


Fig.21 DHA/Total 11-deoxy-17KS in cord blood

Mean \pm SD : 34.3 \pm 7.4



結 語

臍帯血中 17-KS 5 分画、母体血中 17-KS 5 分画、母体尿中 17-KS 9 分画及びエストロゲン 8 分画、新生児尿中 17-KGS, Total 17-KS 17-KS 9 分画及びエストロゲン分画の測定の結果次の様な事が明らかになった。

1) 臍帯血中には DHA が Trnsesterification Hydrolysate として多く含まれているが他の 4 分画も可成り多く含まれている事。

2) 母体血及び臍帯血同時測定例では DHA が臍帯血に優位に多く胎児-胎盤系で確かに Active に DHA 生合成が行われている事。しかし他の 4 分画に関しては特異な代謝環境の見出せない事。

3) 母体尿中 17-KS 分画の中で Etiocholanolone は非妊成熟婦人に較べ低値であるが DHA は大量に排泄されている事。

4) 母体尿中には Estriol が大量に排泄されている事。

5) 新生児尿中 17-KGS 及び Total 17-KS の測定により新生児副腎は Steroid 生合成を行っている事。更に 17-KS 分画測定で性腺機能は静止状態にある事が分り DHA 排泄が案外少い事が分つた。エストロゲン分画測定では新生児副腎にエストロゲン生合成能のある事が明らかになった。

以上より Estriol 生合成は胎児-胎盤系で行われると云う Diczfalusy の理論には大きな疑問があり著者は胎児-胎盤-母体を 1 つの Unit として考える結論に達しこれを知る為には母体血、臍帯血、母体尿の測定をしなければならない。

稿を終るにあたり御指導御校閲を賜りました恩師橋本清教に深く感謝致します。又終始御教示を戴いた吉田俊彦講師に深く感謝致します。

文 献

- 1) Bloch, E., and Benirschke, K.: J. biol. Chem., 234, 1085, 1959
- 2) Conrad, S., Mahesh, V., and Herman, W.: J. Clin. Invest., 40, 947, 1961
- 3) De Neve, L., and Vermeulen, A.: J. Endocrin., 32, 295, 1964
- 4) Diczfalussy, E.: Acta obstet. gynec. scand. 41/Suppl. 45, 1962
- 5) Diczfalussy, E.: Fed. Proc., 22, 791, 1964
- 6) Diczfalussy, E., Cassmer, O., Alonso, C., and DE Mipuel, M.: Recent Progr. Hormone Res., 17, 147, 1961
- 7) Eberlein, W.R.: J. Clin. Endocr. 25, 1101, 1965
- 8) Hermann, W.L.: Gynaecologia 151, 156, 1961
- 9) Kellie, A.E. and Smith, E.R.: Biochem. J. 66, 490, 1957
- 10) Mc Kenna, J. and Norymberski, J.K.: J., Chem. Soc. 3889, 1957
- 11) Migeon, C.J., Keller, A.R., Laurence, B., and Shepard, T.H.: J. Clin. Endocrin. 17, 1051 1957
- 12) Oertel, G.W., and Eik-Nes, K.B.: Arch. Biochem. Biophys. 92, 150, 1961
- 13) Oertel, G.W., and Kaiser, E.: Clin. Chem. Acta 7, 221, 1962
- 14) Saier, E.L., Campbell, E., Strichler, H.S. and Grauer, R.C.: J. Clin. Endocrin. 19, 162, 1959
- 15) Sandberg, D.H., Ahmed, N., Zachmann, M., and Cleveland, W.W.: Steroids 6, 777, 1965
- 16) Solomon, S., Lanman, J.T., Lind, J., and Lieberman, S.: J. biol. Chem. 233, 1084, 1958
- 17) Villee, D.B., Engel, L.L. and Villee, C.A.: Endocrinology 65, 465, 1959
- 18) Villee, D.B., Engel, L.L., Loring, J.M., and Villee, C.A.: Endocrinology 69, 354, 1961

Study on 17-Ketosteroids in Umbilical Cord Blood

Shohei KAMADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan.

In recent years, new theory concerned upon the estriol biosynthesis in the pregnant was developed remarkably. Diczfalussy and others demonstrated that DHA from foetal adrenal was the main precursor of estriol in the pregnant. Their approaches for this problem were tried mainly with in vitro incubation and circulation studies. In this study, the approach was tried with the determination of steroids in cord blood, maternal blood, maternal urine and urine of newborn. Androstenedione, Δ^4 -androstenedione, DHA, androsterone and etiocholanolone in cord blood were determined by new method, which consisted of following procedure.

1) 3 α Hydrolysis (free steroid extraction, hydrolysis with β -glucuronidase in phosphate buffer and transesterification with methyl-green and acetic acid.

2) Florisil column chromatography.

3) Thin layer chromatography.

4) Colorimetry following Lieberman, colour development with modified zimmerman reaction.

The results of this determination were as following.

In two cases, five androgens in cord blood and maternal peripheral blood, eight fractions of estrogens and nine fractions of 17-Ketosteroids in maternal urine, were determined. Also nine fractions of 17-Ketosteroids and four fractions of estrogens were determined in pooled urine of newborn.

The results of these determination were as followings.

1) DHA level in cord blood was higher than that in maternal blood. But DHA level in maternal blood was considerably high. DHA in cord blood : $88.4 \mu\text{g}/100\text{ml}$, DHA in maternal blood : $37.3 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ It should be indicated that, thinking of maternal blood volume, maternal DHA is important for estriol biosynthesis.

2) Although DHA level in maternal urine was high, but DHA level in urine of newborn was low. Urinary DHA in mother : $1111.3 \mu\text{g}/\text{day}$, Urinary DHA in newborn : $10.0 \sim 50.0 \mu\text{g}/\text{day}$ By this results, it is difficult to think that all estriol should be the product of foetal DHA.

3) Urinary estriol in early post-natal days was relatively high and then decreased to 10 and less μg in seven days of newborn. This indicates that the stored estriol was excreted in post-natal days. By these results, it should be clear that estriol biosynthesis is done not only in foetoplacental unit, but also in maternalplacental unit. It is claimed that steroids metabolism in pregnancy, as was seen in estriol biosynthesis, must be examined not as foeto-placental unit but as foeto-placental-maternal relation.
