

岡山医学会雑誌

第80巻7～8号(第884, 885号)

昭和43年8月30日発行

612.82:547.92

脳におけるコルチコイド代謝

岡山大学医学部神経精神医学教室(主任:奥村二吉教授)

菊井茂

(昭和43年5月18日受稿)

緒言

精神分裂病の理解と治療に対して払われてきた過去の多くの努力にも拘らず、いぜんとしてその原因は不明である。分裂病の臨床型が便宜的に分けられている如く、あるものは治癒し又あるものはたえず進行する。非定型分裂病と呼ばれる一群はその身体的、生物化学的な実証と平行して、精神症状の変動を現わし精神障害の起因究明に僅かな拠り処を提供している。Pincus や Hoagland¹⁾の精神分裂病に対する内分泌的研究は、停滞していた分裂病の研究に一つの道標を与えた。彼らは種々の身体的、心理的ストレス、ACTH 負荷を分裂病患者に与えて副腎皮質機能の変化を検討し、17-KS、17-OHCS などを指標として、精神疾患の全く新しい身体的な根拠を明らかにしようとしている。

それから略20年間の追試が多くの研究者によつて行われた結果、分裂病に見られる尿、血中コルチコイド像は分裂病に特有な所見を示すというよりもむしろ、情動に関係する生体の非特異的反応の様式、つまりホメオスタシスの見地から理解すべきものではないかとする見解が多くなつた。

われわれも⁵⁻⁹⁾ 今迄にうつ病及び分裂病患者の急性期、慢性期、ロボトミーを施行された者などの尿中、血中、リコール中のステロイドを測定し、次いで正常人、脳器質疾患患者の値と比較し、精神興奮

とその時のステロイド様式との関係について考察した。又、視床下部を中心とするホルモン分泌神経の仮説機構を想定し¹⁰⁾、そして精神興奮と関係ある主たるものは Cortisol や Corticosterone の様な 17-OHCS 分画のものではなくて、17-KS 分画のものではないかと考えるに至つた。このことは其后分裂病患者に C¹⁴-Cortisol や H³-Corticosterone を使用した成績からも一層確からしく思われる¹¹⁾。

コルチコステロイドと精神興奮の問題に入る前にコルチコステロイドが脳血液関門を通過するかどうかと云う問題がある上に、脳は肝、腎や結合組織などと異つて代謝器官でないため、脳でのコルチコイド代謝を適確にとらえる事がまた困難な仕事である。ことに *in vivo* の複雑な代謝を直接覗くことは不可能であつて、この点にわれわれの行く手に一つの限界があるが、しかし若し脳が少しでもコルチコイドを代謝すれば、それは脳という特殊器官であるが故に精神活動の上に直接間接大きな影響を持つことは当然である。私は今迄の経験から精神興奮に深い関係があると考えられる 17-KS 分画の主要なる前駆物質でもあり、生物活動の強い Testosterone を用いてこの問題に対する研究をすすめることにした。

実験の前提

In vivo における脳のコルチコイド代謝をみる前提として外来性コルチコイドが脳に入るか否かを知

るのが順序であるので、われわれは Corticosterone を用いて所謂 Infusion Test を行つた。この詳細については後日共同研究者によつて発表される予定であるが¹¹⁾、in vitro の私の実験について記述する前にその大略に触れておくことにする。

慢性分裂病患者に 1, 2- H^3 Corticosterone 20~40 μ c と精製 Corticosterone 90mg を純エタノールに溶かし次いで 5%ブドウ糖液に混じ、45分かけて肘静脈より点滴注入する。時間経過に従つて血液、リコール、尿を採取し Van der Vies の方法に従つてコルチコイドを抽出する。抽出されたサンプルは薄層クロマトグラフィー及び放射能測定に供する。その結果によると腰椎穿刺で得られたリコール中に放射能を見るのは、点滴開始後30分以後であり、その最大ピークは 120 分時であつた。また血中放射能の最大時は点滴終了直後の60分時であつた。血液リコール間放射能の比は最大 4.5 : 1 である。その放射能を有する Corticosterone 代謝物の分離同定は目下薄層クロマトラジオグラフィー法を用いて進行中であるが、結局血中コルチコイドレベルに比較しうるリコール中コルチコイドレベルを証明することができた。従つて外来性コルチコイドが脳に入ると一応考えられるので次の実験を進めることとした。

試 料

脳試料の調製

1) 成熟どんりゆう系ラッテ (体重平均 300g) を

断頭屠殺後直ちに全脳を取り出し、生理的食塩水中で洗い髄膜、血管を取り除く。秤量後 10 倍量の $1/15M$ 燐酸緩衝液 (pH 7.4) あるいは Gcossler¹²⁾ 緩衝液を加え、テフロン軸ガラス管ホモジナイザーにて氷冷ホモジナイズする。Gcossler¹²⁾ 緩衝液組成は表 1 の通りで K 成分が多い。

表 1 Gcossler 緩衝液組成

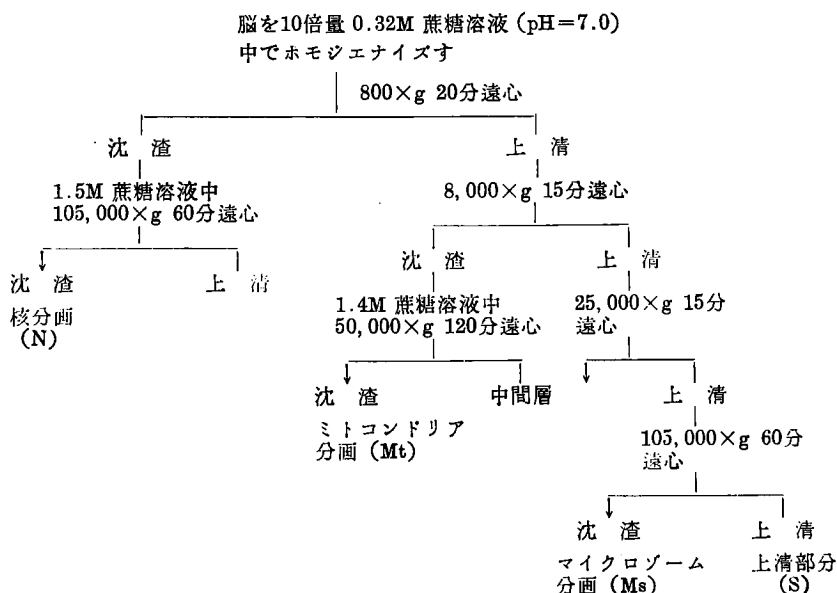
127	mM	NaCl	pH = 7.4
5.1	mM	KCl	
2.6	mM	MgSO ₄	
70	mM	K ₂ HPO ₄	
12.5	mM	NaH ₂ PO ₄	

2) 細胞内成分を分離するためには久保田 KR-6P 遠心機及び日立 40P 超遠心機を用いた。先ず脳を終脳と小脳を除く終脳以外の部分に分け、夫々図 1 の段階を経て処理する¹³⁾。得られた成分すなわち核分画 (N)、ミトコンドリア分画 (Mt)、マイクロゾーム分画 (Ms)、は $1/15M$ 燐酸緩衝液にとかず。上清部分 (S) はその 9ml 中 5ml をとり同量の $1/15M$ 燐酸緩衝液を加え pH 7.4 にする。

3) ヒト脳試料の調製

脳外科手術時に犠牲にされた正常部大脳前頭葉を直ちに冷凍して持ち帰り、血液、血管等を冷生食水で取り除き、白質灰白質を分離せず適量を切り取つて秤量し 10 倍位の $1/15M$ 燐酸緩衝液と共にホモ

図 1 ラッテ細胞内成分の分離



ジェナイズした。

基質テストステロン

[4-C¹⁴] Testosterone (S. A. 22.2 mc/mM: GAL-BIOCHEM U. S. A) はそのままでは薄層クロマトグラフィーにて15位のスポットに分れるので, Testosterone の結晶(第一化学薬品)をキャリアとし薄層クロマトグラフィーを用いて精製する。

Co-factor

Chamberlainら³⁷⁾の実験を参考とし NAD, NADP に Nicotinamide を加えて用いた。

実験方法

1) インクベーション

試験管に [4-C¹⁴] Testosterone 0.1 μ c 及び Testosterone 0.2mg を含むエタノール溶液 0.02ml を取り, 脳ホモジネート 2ml (脳湿重量 200mg を含む) あるいは脳細胞内成分 2ml (脳湿重量 1g 中に含まれるもの) を加え, 更に Co-factor として NAD 0.5 mg, NADP 0.5mg 及び Nicotinamide 10mg を加えた。

対照としては脳ホモジネートを 80°C 20分温浴非活性化したものを用いた。

試験管を 37°C の恒温槽に入れ大気中で1時間振盪した後取り出し, 直ちにクロロホルム, エーテル (3:1) 混合溶媒 10ml を加えて振盪の反応を止めた。

2) 抽出物及び精製

上記試験管内容を 50ml 容共栓付遠沈管に移して遠心分離し, 下層を更に2回同様に処理し上層(クロロホルム・エーテル層)を別の共栓付試験管に集める。(この層に放射能はすべて移行する。)次いでこれに水 10ml を加えて洗い遠心分離してクロロホルム・エーテル層をフラスコに取り, 少量の無水硫酸ソーダを入れ脱水後梨形コルベンに移しフラッシュエバポレーターにかけ浴温 50°C で蒸発させた。得られた粗抽出物を適量(約10ml)のクロロホルムにとかしフロリシルカラムに注ぎ, 次いで i) クロロホルム 20ml ii) 2%メタノール・クロロホルム液 25ml iii) 25%メタノール・クロロホルム液45ml の順序で洗い分割採取し 50°C N₂ ガス下で蒸発乾燥させた。各分画乾固物を少量(3ml)の25%メタノール・クロロホルム溶液にとかしこれを正確に3等分し, その一部を放射能測定用, 一部を薄層クロマトグラフィーの発色観察及びガスクロマトグラフィー用, 残りの一部を薄層クロマト・ラジオオー

トグラフィー用にあてた。

3) 薄層クロマトグラフィー

シリカゲルG薄層(厚さ約 250 μ 110°C 1時間加熱活性化)に上記抽出物分画の1部を蒸発濃縮せしめて付け 15cm 迄展開した。展開系としてはクロロホルム分画抽出物及び2%メタノール・クロロホルム分画抽出物には 17-KS 分画を分離するのに適しているクロロホルム-メタノール-アセトン90:3:7の展開相を用い, また25%メタノール・クロロホルム分画抽出物には 17-OHCS 分画を分離するのに適しているクロロホルム-エタノール-水90:10:1の展開相を用いた。なお 15cm 展開で分離困難な部分に対してはクロロホルム-アセトン85:15の展開相で 55cm 展開を行った。

展開後通気中にて自然乾燥せしめ, 次いで硫酸(精密分析用, 和光純薬)を N₂ ガスにて加圧噴霧し加温発色させる。出現したスポットはそのままあるいは暗室にて UV ライト下で観察した。その際純品のステロイド標本を同一薄層上に展開し R_f 値及び色調を比較した。

また一部分を発色しそのスポットに相当する R_f 値の他の部分を掻き取り, 抽出し, ガスクロマトグラフィーで定性試験を行った。

4) ガスクロマトグラフィー

テストステロン代謝物の確認は2% Neopentylglycolsuccinate (NGS) カラムを用いたガスクロマトグラフィーでも行った。

5) ラジオオートグラフィー

抽出物分画の一部分を薄層クロマトグラムに展開し乾燥後, 富士レ線フィルム(industrial, 100, Fine Grain; Nonscreen Type)で覆い感光させ, 低温乾燥条件下1ヶ月後取り出して現像(レンドールにて10分)定着, 水洗, 乾燥した。

次いで薄層プレートから, フィルムに感光した部位のシリカゲルを正確に掻き取り25%メタノール・クロロホルム 3ml で2回抽出し放射能測定を行った。

6) 放射能測定

抽出物分画の最後の一部分及びラジオオートグラフィーで感光した部分の抽出液をそれぞれカウント用バイアルにとり N₂ ガス下に完全に蒸発乾固せしめ0.01% 1,4-bis-2(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl) Benzene 及び 0.4% 2,5-Diphenyloxazole Toluene 溶液 10ml を加え, Packard Tri-carb liquid-scintillation spectrometer Model 3363 (Gain 6%, Window 50-

1000) を用いて放射能を測定した。

実験成績(一)

脳質による Testosterone 代謝物を抽出し更に精製するためにフロリシルカラムにかけ 1) クロロホルム 2) 2%メタノール・クロロホルム 3) 25%メタノール・クロロホルムの順に流して流出物を分画採集する。その各分画の一定量を液体シンチレーションカウンターで放射能を測定するためにとり、残りを薄層クロマトグラフィー硫酸発色用及び薄層クロマトラジオグラフィー用に当てる。

1) クロロホルム分画には極少量 100 c/5min. 程度のカウント数が現われるが薄層クロマトラジオグラフィーでは全く感光しない。

2) 25%メタノール・クロロホルム分画には6000 c/5min. 程度のカウント量がみられる。薄層クロマトグラフィー展開後硫酸発色を行うと Testosterone に相当するスポットのみが一つ現われ、薄層クロマトラジオグラフィー感光スポットにも一致する。即ち Testosterone は極く僅かに25%分画にも流出する。然し結局予想されたことではあるが、Testosterone 代謝物はこれらの2つの分画ではその量は微量で問題にならない。さて最後に

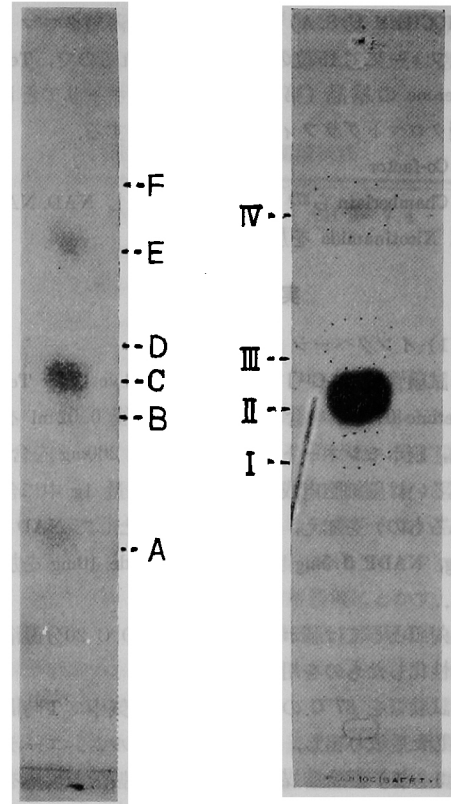
3) 2%メタノール・クロロホルム分画を 15cm 薄層に展開し硫酸発色させて出現する主要なるスポットを図2左に示す。このうちEは Cholesterol でAと共に脳質に固有に存在する成分と考えられる。図2右は図2左と同様の方法で展開された薄層を用いてのラジオオートグラフィーである。スポット B, C, D, F はそれぞれスポット I, II, III, IV と完全に一致する。

スポット I, III は未確定物質でその同定はガスクロマトグラフィーを用いて目下検討中であるが、前者は Etiocholanediol 或は 11-keto-Etiocholanolone, 11-OH-Etiocholanolone の如きものであろうと考えられ、後者はまだ如何なるものか予想できない。スポット II は Testosterone で純品と共に確認した。スポット IV は Δ^4 -Androstene-3, 17-dione (Δ^4 -A) とそれに重なる物質である。その確認のため次の事を行った。

i) 市販の Δ^4 -A を純化して同時に薄層上に展開し比較証明した。

ii) スポット IV を薄層より搔取り抽出したものに Δ^4 -A の純品を加えて再度薄層クロマトラジオグラフィーを行い、硫酸発色により現われたスポットと

図2 テストステロン代謝物の薄層クロマトグラフィー硫酸発色(左)及び薄層クロマトラジオグラフィー(右)



展開系クロロホルム-アセトン-メタノール 90:7:3, 展開距離 15cm.

フィルムに感光したスポットが一致した。

iii) スポット IV を抽出しガスクロマトグラフィーにかけ Δ^4 -A の純品と比較した。

これらの方法によりスポット IV は (Δ^4 -A+x) 一但し X は未検の Δ^4 -A と重なる物質一であることを確認した。(Δ^4 -A+X) の確認操作は実験成績(三)で詳述する。

表2はラッテ脳の $1/16$ M 磷酸緩衝液ホモジネートによる放射性・テストステロン代謝生成物を示す。即ち実験1, 2の結果である。原点総カウント量の代謝生成物を薄層にスポットし展開してえたスポット I, II, III, IV と其他の部分合計したものが総クロマトカウントであり、各スポットカウントの総クロマトカウントに対する百分率がスポット・クロマトカウント比であり、更に総クロマトカウントの原点総カウントに対する百分率が回収率となる。

対照には各実験ともラッテ脳を 80°C, 30分加熱不

表 2 ラット脳によるテストステロン代謝

実験 1

試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV (Δ^4 -A+x)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率 %	T-(Δ^4 -A+x) 変換率 %
1	原試料	スポットカウント c/5min.	1696	153625	2178	5886	4918	171303	190217	90.05	2.05
		スポット・クロマト カウント比 %	0.99	91.43	1.27	3.43	2.88				
2	原試料	"	2782	143464	1686	6379	5462	159773	178944	90.78	2.61
		"	1.74	89.79	1.05	3.99	3.43				
3	原試料 -Co-factor	"	875	128358	1371	4457	4983	140044	189543	73.88	1.80
		"	0.62	91.66	0.97	3.81	3.58				
4	対 照	"	771	182586	1769	2647	3243	191016	216801	88.16	—
		"	0.40	95.58	0.92	1.38	1.72				

実験 2

5	原試料	スポットカウント c/5min.	459	113912	2440	3426	3072	123309	143089	86.17	2.27
		スポット・クロマト カウント比 %	0.37	92.38	1.97	2.77	2.51				
6	原試料 -T. キ ャリアー	"	469	150583	799	2027	1583	155461	176640	88.00	0.84
		"	0.30	96.85	0.51	1.34	1.00				
7	原試料 -T. キ ャリアー	"	651	171586	1086	2502	1956	177788	198368	89.12	0.91
		"	0.36	96.61	0.60	1.41	1.02				
8	原試料 (T. 1/5)	"	120	29783	332	370	546	31151	33259	93.66	0.68
		"	0.38	95.60	1.66	1.18	1.18				
9	原試料 (T. 1/5) -Co-factor	"	—	29597	262	215	859	30933	33121	93.39	0.19
		"	—	95.67	0.84	0.69	2.80				
10	対 照	"	377	158781	889	819	1266	162130	197923	81.91	—
		"	0.23	97.93	0.54	0.50	0.80				

原試料：ラット脳 10 倍， $1/16$ M 磷酸バッファー-ホモジネート 2 ml. [4-C^{14}] Testosterone 0.1 μc 及び Testosterone 0.2mg. Co-factor; NAD 0.5mg, NADP 0.5mg, Nicotinamide 10mg. 37°C 60分インクベート。

表 3 ラット脳及びヒト脳によるテストステロン代謝

実験 3

試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV (Δ^4 -A+x)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率 %	T-(Δ^4 -A+x) 変換率 %
1	原試料 (ラッ テ脳)	スポットカウント c/5min.	488	165479	1370	2818	3015	173170	202256	85.61	1.21
		スポット・クロマト カウント比 %	0.28	95.55	0.79	1.62	1.76				
2	対 照	"	506	205862	4246	876	1690	213180	230347	92.54	—
		"	0.23	96.89	1.99	0.41	0.48				

実 験 4

3	原試料 (人脳)	スポットカウ ント c/5min.	—	99303	—	1320	2976	103599	108340	95.61	0.64
		スポット・クロマト カウント 比%	—	95.91	—	1.26	2.83				
4	対 照	"	—	87486	—	564	2902	90952	96073	94.66	—
		"	—	96.17	—	0.62	3.21				

原試料：ラット脳及びヒト脳10倍，Grosser バッファーホモジネート 2ml. [4-C¹⁴] Testosterone 0.1 μ C 及び Testosterone 0.2mg. Co-factor; NAD 0.5mg, NADP 0.5mg, Nicotinamide 10mg. 37°C 60分インクベート.

表 4 ラット脳細胞内成分によるテストステロン代謝

実 験 5

試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV (Δ^4 A+x)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率%	T-(Δ^4 A+x)変換率%
1	PN	スポットカウ ント c/5min.	2086	184486	835	3495	5436	196338	252755	77.68	0.23
		スポット・クロマト カウント 比%	1.06	93.93	0.42	1.78	2.78				
2	PMt	"	2572	204932	1960	4716	8095	222275	273416	76.23	0.57
		"	1.15	92.19	0.88	2.12	3.66				
3	PMs	"	1487	193751	885	3616	5750	205489	269537	76.23	0.20
		"	0.72	94.28	0.42	1.75	2.83				
4	PS	"	4445	195099	1193	3707	8099	212543	269537	78.85	0.19*
		"	2.09	91.79	0.56	1.74	3.82				
5	MN	"	2073	185007	801	3447	5350	196678	257442	76.39	0.20
		"	1.05	94.06	0.40	1.75	2.74				
6	MMt	"	1562	209442	1387	3297	6202	221890	281890	78.71	—
		"	0.70	94.25	0.62	1.47	2.96				
7	MMs	"	1960	177553	1636	3940	6389	190988	236387	80.79	0.51
		"	1.02	92.97	0.85	2.06	3.10				
8	MS	"	2258	159398	1219	3640	6967	173482	268635	64.57	0.54*
		"	1.30	91.88	0.70	2.09	4.03				
9	対 照 (P-バッ ファー)	"	2894	280229	2155	4731	14827	304036	373964	81.30	—
		"	0.95	92.16	0.70	1.55	4.64				
10	PN -Co-factor	"	1738	167155	1143	2934	5105	178075	240642	73.96	0.09
		"	0.97	93.87	0.65	1.64	2.86				

原試料：ラット脳細胞内成分（脳湿重量 1g 中に含まれる）1/15M 磷酸バッファー・サスペンション 2ml. [4-C¹⁴] Testosterone 0.1 μ C 及び Testosterone 0.2mg. Co-factor; NAD 0.5mg, NADP 0.5mg, Nicotinamide 10mg. 37°C 60分インクベート.

* 上清部分 9ml 中 5ml を用いた.

活性化したものをを用いた。この場合も Testosterone は極く僅かながら夫々の代謝物に変化する。従つて スポットIV($\Delta^4\text{-A+X}$)のスポット・クロマトカウント比において、各試験管の値から対照のスポット・クロマトカウント比の値を減じたものが T-($\Delta^4\text{-A+X}$) 変換率%となる。未確認物質 スポット I, III は今回の実験法の精度の範囲では、対照との間に殆んど差が認められなかつた。スポット II は Testosterone(T) で基質は 90~95% 以上も代謝されずにそのまま留る事になる。結局 ($\Delta^4\text{-A+X}$) は明らか

に脳質の酵素作用により代謝生成されたものであり、その T-($\Delta^4\text{-A+X}$) 変換率は 2.05, 2.61, 更には 2.27% 平均 2.46% になり Co-factor を加えなかつた場合は 1.80% に減少する。次いで基質が [4-C^{14}] Testosterone, キャリヤー共に $1/5$ 量, 即ち Testosterone として 40 μg の時は 0.68%, この場合も Co-factor を除けば 0.19% と著しく減少する。更に基質が [4-C^{14}] Testosterone のみでキャリヤーを加えず, 即ち Testosterone としては極く微量で 0.1 μg 位の時は 0.84, 0.91% となつた。

表 5 ラット脳細胞内成分によるテストステロン代謝

実験 6

試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV ($\Delta^4\text{-A+x}$)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率 %	T-($\Delta^4\text{-A+x}$) 変換率 %
1	PN	スポットカウント c/5min.	803	154167	941	1475	1725	159111	203047	78.36	0.37
		スポット・クロマトカウント比 %	0.51	96.89	0.59	0.93	1.08				
2	PMt	"	840	153622	1339	1673	1937	159411	211207	75.48	0.49
		"	0.53	96.36	0.87	1.05	1.19				
3	PMs	"	819	137664	1323	1284	2000	143090	199912	71.57	0.34
		"	0.57	96.20	0.92	0.90	1.41				
4	PS	"	785	166210	1625	1560	2102	172282	203907	84.49	0.34*
		"	0.45	96.47	0.94	0.90	1.24				
5	MN	"	595	123992	849	924	1201	127591	191131	66.74	0.17
		"	0.47	97.20	0.67	0.73	0.93				
6	MMt	"	1050	183285	1425	1542	1690	188992	220201	85.82	0.26
		"	0.50	96.98	0.75	0.82	0.95				
7	MMs	"	1421	171729	1068	1584	1696	177498	206081	86.61	0.34
		"	0.81	96.74	0.60	0.90	0.95				
8	MS	"	468	146893	1047	1598	1335	151141	180314	83.82	0.50*
		"	0.31	97.19	0.69	1.06	0.75				
9	対照 (P-バッファー)	"	681	127889	1742	757	1439	132508	189791	69.81	—
		"	0.51	96.51	1.31	0.56	1.11				
10	PN-Co-factor	"	365	117497	1322	742	1177	121103	163050	74.27	0.05
		"	0.30	97.02	1.09	0.61	0.98				

原試料：ラット脳細胞内成分（脳湿重量 1g 中に含まれる） $1/15$ M 磷酸バッファー・サスペンション 2ml, [4-C^{14}] Testosterone 0.1 μc 及び Testosterone 0.2 mg, Co-factor; NAD 0.5 mg, NADP 0.5 mg, Nicotinamide 10 mg, 37°C 60分インクベート。

* 上清部分 9ml 中 5ml を用いた。

表3はラッテ脳、ヒト脳のGrosser緩衝液ホモジネートによる放射性・テストステロン代謝生成物で実験3,4の結果である。Grosser緩衝液は表1の如くカリウム成分が多く、より細胞内環境に近いものであるが、この場合T-(Δ^4 -A+X)変換率はラッテ脳で1.21%, ヒト脳で0.64%と低率であつたので今後はこの緩衝液は使用しないことにした。

実験成績(二)

表4, 表5は実験5, 6の結果でラッテ脳細胞内成分による放射性・テストステロン代謝生成物である。Pは終脳, Mは終脳以外の間脳, 脳幹など, Nは核分画, Mtはミトコドリア分画, Msはマイクロゾーム分画, Sは上清部分を意味する。T-(Δ^4 -A

+X)変換率は終脳ではPN:0.23, 0.37 平均0.30%。PMt: 0.57, 0.49 平均0.53%。PMs: 0.20, 0.34 平均0.27%。PS:0.19, 0.34 平均0.28%。終脳以外の部分ではMN:0.20, 0.17 平均0.19%。MMt: 0.26%。MMs: 0.51, 0.34 平均0.42%。MS: 0.54, 0.50 平均0.52%である。但し上清部分は図1の方法で得られた9ml中5mlを用いてインクベートした値である。T-(Δ^4 -A+X)変換率は各細胞内成分において著しい差はないが、幾分終脳ミトコドリア分画(PMt)に高く、又上清部分は一部をのみ用いてインクベートしているので全体にするとかなり高く0.5%以上になるとみられる。T-(Δ^4 -A+X)変換率は全脳ホモジネートを用いた場合に比べて細胞内成分を用いた場合は、各分画を

表6 ヒト脳によるテストステロン代謝

実験7

試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV (Δ^4 -A+x)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率 %	T-(Δ^4 -A+x)変換率%
1	原試料	スポットカウント c/5min.	659	121899	710	1761	2063	127092	153164	82.97	1.03
		スポット・クロマトカウント比 %	0.51	95.91	0.55	1.38	1.65				
2	"	"	632	123489	507	2514	2322	129464	164643	78.63	1.59
		"	0.48	95.38	0.39	1.94	1.81				
3	"	"	668	128263	596	2720	2540	134787	168483	80.00	1.66
		"	0.49	95.16	0.44	2.01	1.90				
4	"	"	752	117415	349	4781	2681	125978	175463	71.79	3.43
		"	0.59	93.24	0.27	3.78	1.12				
5	"	"	366	144468	448	2892	1348	149522	185407	80.64	1.58
		"	0.24	96.61	0.29	1.93	0.93				
6	原試料-Co-factor	"	511	139171	497	1340	2209	143728	176917	81.24	0.58
		"	0.35	96.82	0.34	0.93	1.56				
7	原試料-Co-factor	"	528	147113	782	1215	1839	151477	186316	81.30	0.47
		"	0.34	97.11	0.51	0.82	1.22				
8	原試料-Co-factor	"	838	146363	798	1230	1187	150416	166566	96.30	0.46
		"	0.55	97.30	0.53	0.81	0.81				
9	対照	"	733	125628	750	450	2544	130505	166358	78.44	—
		"	0.56	96.26	0.57	0.35	2.26				

原試料: ヒト脳 10倍. $1/15M$ 磷酸バッファーホモジネート 2ml. [$4-C^{14}$] Testosterone $0.1\mu c$ 及び Testosterone $0.2mg$. Co-factor; NAD $0.5mg$, NADP $0.5mg$, Nicotinamide $10mg$. $37^\circ C$ 60分インクベート。

総計したとしてもかなり低値にでるのは、分離の過程で酵素活性が相当失われるものと考えられる。終脳核分画を用いた場合も Co-factor 加えないと T-($\Delta^4\text{-A}+\text{X}$) 変換率は 0.05, 0.09%に低下する。

最後に表 6, 表 7 は実験 7, 8, 9 の結果でヒト脳 $1/15\text{M}$ 磷酸緩衝液ホモジネートによる放射性・テストステロン代謝生成物を示す。T-($\Delta^4\text{-A}+\text{X}$) 変

換率は 1.03, 1.59, 1.66, 3.43, 1.58, 2.00, 3.47, 1.80, 2.73, 2.21, 1.85, 3.28, 2.47, 2.96 最小 1.03%, 最大 3.47%, 平均 $2.29 \pm 0.73\%$ である。この値はラット 2.46% に比べやや低い。ヒト脳の場合も Co-factor を除くと 0.58, 0.47, 0.46 平均 0.50% と $1/4$ に低下する。Co-factor を除いたラットの場合は 1.80% であつたからヒト脳の場合は Co-factor

表 7 ヒト脳によるテストステロン代謝

実験 8

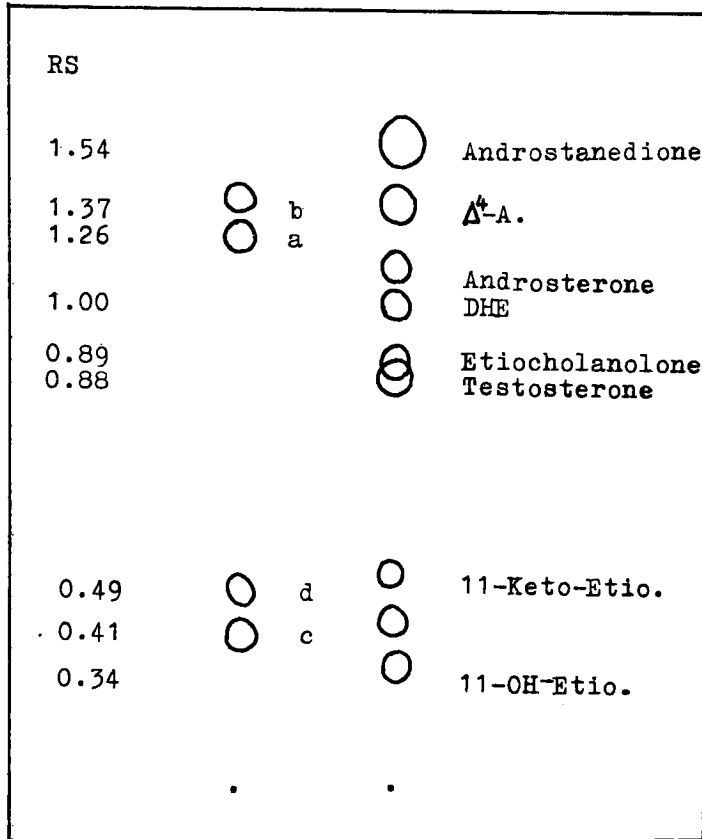
試料別	試料の条件	カウント比	スポット I	スポット II (T)	スポット III	スポット IV ($\Delta^4\text{-A}+\text{x}$)	他の部分	総クロマトカウント	原点総カウント	回収率 %	T-($\Delta^4\text{-A}+\text{x}$) 変換率 %
1	原試料	スポットカウント c/5min.	590	196149	1351	4879	3821	206790	242909	85.13	2.00
		スポット・クロマトカウント比 %	0.28	94.85	0.65	2.35	1.87				
2	"	"	1562	229014	1531	9474	6194	247739	272193	91.01	3.47
		"	0.61	92.84	0.62	3.82	2.11				
3	"	"	1007	198017	1778	4524	4577	209903	250940	83.64	1.80
		"	0.47	94.38	0.84	2.15	2.16				
4	"	"	1214	175964	1779	5852	4647	189456	239269	79.18	2.73
		"	0.64	94.33	0.93	3.08	1.01				
5	"	"	591	104516	911	2853	2291	111162	137866	80.68	2.21
		"	0.53	94.02	0.81	2.56	2.08				
6	"	"	1064	177226	1782	4136	3119	187327	220919	84.79	1.85
		"	0.56	94.60	0.95	2.20	1.69				
7	対照	"	667	213957	1644	784	1740	218792	267935	81.65	—
		"	0.29	97.79	0.75	0.35	0.89				

実験 9

8	原試料	スポットカウント c/5min.	667	107501	1103	5236	5103	119610	163017	73.37	3.28
		スポット・クロマトカウント比 %	0.56	90.71	0.92	4.38	3.43				
9	"	"	450	93888	752	3644	3074	101808	113510	89.69	2.47
		"	0.44	92.22	0.73	3.57	3.04				
10	"	"	—	86638	—	3886	5119	95643	114694	83.38	2.96
		"	—	90.58	—	4.06	5.36				
11	対照	"	406	109507	1295	1261	1958	114427	123807	92.42	—
		"	0.35	95.69	1.13	1.10	1.73				

原試料：ヒト脳 10倍。 $1/15\text{M}$ 磷酸バッファーホモジネート 2 ml. $[4\text{-C}^{14}]$ Testosterone $0.1\mu\text{c}$ 及び Testosterone 0.2 mg. Co-factor ; NAD 0.5mg, NADP 0.5mg, Nicotinamide 10mg. 37°C 60分インクベート。

図 3 テストステロン代謝物(左)及び標準ステロイド(右)の薄層クロマトグラフィーと Rs 値



クロロホルム-アセトン 85:15, 55cm,

の存否に影響を受けやすいと云う結果である。

実験成績 (三)

(Δ^4 -A+X) の精製展開について

20cm×20cm の薄層, クロロホルム-アセトン-メタノール90:7:3の展開相で15cm展開して得られたスポットIVを(Δ^4 -A+X)としたのは, Δ^4 -Aの他に何か重っている可能性について検討を残すためであった。このスポットはクロロホルム-アセトン85:15の展開相で55cm展開することによつて2つのスポットに分れる。図3の右側のスポットはDehydroepiandrosterone (DHEA)を中心とする標準品を展開したもので、数値はDHEAのRfを1.0とした時の各標準物質のRsである。図左のスポットの原点に近い方(a)はRs1.26速い方(b)はRs1.37で、(b)が Δ^4 -Aと一致し(a)はDihydrotestosteroneと一致する。

これを更に2%NGSガスクロマトグラフィーに

かけると図4の様に3つのピークが得られる。表8はこの条件で展開を行ったガスクロマトグラフィーの比較保持時間(Relative Retention Time)でピーク1は標準コレスタンのもの、ピーク2のRRTは1.28でDihydrotestosteroneと一致する。ピーク3のRRTは1.8で11-OH-Etiocholanoloneに近いmore polarのものであろうと思われる。

実験成績 (四)

Testosteroneより原点に近い図2のスポットI或はそれより更に極性の強い物質の存在を確かめる為に、フロリシルカラムの2%メタノール・クロロホルム分画の一部分を採り、これを展開相クロロホルム-アセトン85:15, 展開距離55cmの薄層クロマトグラフィーを行うと図3の通りDHEAのRsを1.00としRs0.41(c)と0.49(d)の2つのスポットが得られる。これは11-OH-Etiocholanoloneと11-Keto-Etiocholanolone或はその中間に展開されるべき物質と思

図 4 テストステロン代謝物の2% NGS ガスクロマトグラフィー

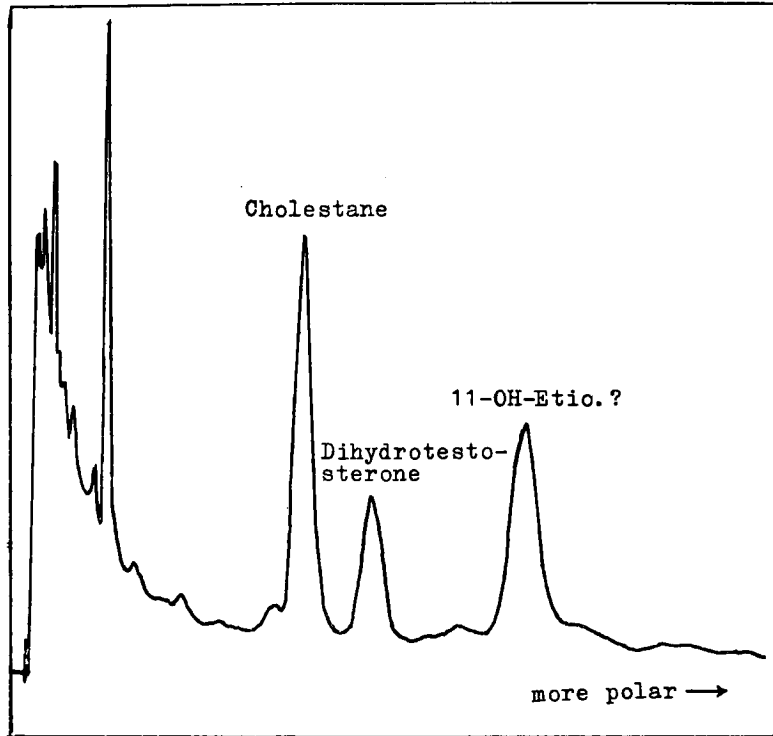


表 8 2% NGS ガスクロマトグラフィーによる標準ステロイドの RRT 及びその試料中に於ける有無

標準ステロイド	RRT	試料
Pregnandiol	0.79	(-)
Androsterone	0.96	(-)
Etiocholanolone	1.22	(-)
Dihydrotestosterone	1.28	(+)
11-OH-Androsterone	1.34	(-)
11-OH-Etiocholanolone	1.63	(+)
11-Keto-Androsterone	2.89	(-)
11-Keto-Etiocholanolone	3.37	(-)

C. T.: 235°C N₂: 35ml/3Kg
 S. C. T.: 260°C H₂: 80ml
 D. T.: 230°C Air: 0.8l

われる。然し Testosterone Rs 0.88 のすぐ下の原点寄りにラジオオートグラフィーで認められたスポット I は現われて来ない。又この部分を2% NGS ガスクロマトグラフィーで分離してみると、RRT が 11-OH-Etiocholanolone に近いものが現われた、55cm 展開の薄層クロマトグラフィーと一致しないが全部をつき合せてみて、11-Keto-Etiocholanolone, 11-OH-

Androsterone, 11-OH-Etiocholanolone などがこの部分に現われている可能性を示唆している。何れも現段階では未確定と云わざるを得ない。

総括並びに考察

精神機能と内分泌の関係は精神医学の領域では古くから注目されていたが、Selye¹⁴⁾ が精神的、身体的ストレスに対する脳下垂体副腎系の反応に言及して以来改めて人々の注意を惹くに至った。1950年前后には Hoagland, Pincus らが初めて分裂病患者の副腎機能の低下を指摘し、これに対する賛否両側の意見¹⁵⁾⁻¹⁸⁾ が相継いで発表された。然し結局精神疾患に特有なものではなくて、情動に対する生体の非特異的な反応にすぎないという見解が有力になった。これらについては Persky¹⁹⁾ の不安患者に対するもの、草間²⁰⁾の神経症患者の血中 17-OHCS に関するもの、最近には諸治ら²¹⁾、小林²²⁾の分裂病者、うつ病者の血中尿中 17-OHCS の日内変動の研究がある。

さてわれわれの教室でも高坂らが精神病患者の各状態像における尿、血液、リコール中のコルチコイドを詳細に測定し、次いで視床下部、下垂体腫瘍

患者について、近年はロボットミーを行つた患者に ACTH, メコリールを注射しこの種のストレスに対する反応をみた。その結果特に注目すべきは 17-KS に就いてであつた。即ち

i) うつ病も分裂病も尿中 17-KS は正常人より少いが、情動の変化の著しいうつ病の場合に最も少く、急性期を脱すると増加する。

ii) 分裂病の場合尿中 17-KS は急性期に減少し慢性期に増加していくが、尿中 17-OHCS は 17-KS 値の様な急な降下を示さず上昇も徐徐で 17-KS 分画との動きは平行しない。

iii) Craniopharyngioma などで視床下部の大きく破壊されている場合などでは尿中 17-KS, 17-OHCS 何れも極めて少く、下垂体腫瘍で前葉機能が亢進していると考えられる場合には逆に著明に増加している。

iv) メタコリンを注射すると尿、血中 17-KS は急に低下しやがて旧に復し、17-OHCS の低下は 17-KS 程急ではなく回復も又徐々である。17-KS は急なストレスに反応し、17-OHCS は緩徐な反応態度をとる。

v) ロボットミーを受けた患者の尿中 17-KS は高値であり、ACTH を筋注すると対照例に比べて更に著しく増加する。

これらの結果から高坂は前頭葉、間脳、脳幹、脳下垂体、副腎の関係を思索し、精神興奮とホルモン分泌神経支配の仮説図を示し、精神興奮に際しての 17-KS の分泌機構にも言及した。

ステロイド化学の飛躍的進歩に従つて 17-KS に属する物質として多くのものが見出され、男子の場合尿 17-KS の 67%, 女子では 80% が副腎皮質からの Androgen に由来するものと云われ²³⁾、直接副腎から分泌されるものとして、副腎静脈血中から Androstenedione, Androsterone, Dehydroepiandrosterone, 11 β -Hydroxyandrostenedione などが発見され²⁴⁾、又副腎における Testosterone の生成分泌も略確認されており²⁵⁾、これらは ACTH で刺戟した際一層はつきりしてくる。従つて副腎皮質 Androgen 分泌も脳下垂体との関連において行われている。そして 17-OHCS に属するステロイドとは異つた分泌動向を示すことはすでに述べた通りである。しかしこれらの 17-KS に属する Androgen も血中に極微量に存する Testosterone に比べると、蛋白同化作用は別としても性作用、向精神作用などは遙かに弱いと考えられている。従つて生体の態勢或は生活反応

に対する Testosterone の果す役割を知ることは非常に重要であり、殊にステロイドホルモンが脳血液関門を通過して血中より脳中に移行するという事実があれば、脳質による Testosterone 代謝を追求することは理論的にも意義のあることである。私はまず *in vitro* の方法によつて検索をすすめることにした。

Testosterone の *in vitro* における代謝実験は、Samuels²⁶⁾ が各種動物の肝組織切片を用いて行いその方法を確立し、反応の主役を演ずる酸化酵素を想定し、次いでこの酵素を雄仔牛の肝から抽出した。その後人、動物の各種臓器、腫瘍組織などを用いても試みられ、初期における Wotiz²⁷⁾ らの一連の実験は有名である。Testosterone は肝のみでなくその標的臓器である人前立腺組織片²⁸⁾でも積極的に代謝され、主として Δ^4 -Androstene-3, 17-dione になる。更に各種の人組織片即ち子宮、小腸、平滑筋、皮膚、乳腺（正常及び癌）或いは膀胱などでも同様であつた。

1960年頃からは所謂 isotope dilution technique が導入され微量の C¹⁴ で標識された Testosterone を基質として各種臓器とインクベートしたり、あるいは動物に注射し一定時間して屠殺、各種臓器をとり出しその中に含まれる Testosterone の代謝物が検索された。前者では Stylianou²⁹⁾³⁰⁾ によるラット睾丸、人肝ホモジネートを用いての実験、Chang³¹⁾ による人副腎ホモジネート、Farnworth ら、Chamberlain らの人前立腺ホモジネートあるいは細胞内成分を用いての実験、Smith³²⁾ によるマウスの正常及び腫瘍乳腺組織切片を用いての実験などがあり、後者では Elattar³³⁾³⁴⁾ らのラットを用いての実験がある。そして Testosterone の主要代謝物として Δ^4 -Androstenedione, Dihydrotestosterone の他に minor metabolite として下記の物質が次々と発見され、その反応にあずかる酵素が検討された。すなわち代謝物としては Androstenediol (3 α or 3 β , 17 β), Etiocholanediol (3 α , 17 β), Etiocholanolone, 16 α -Hydroxytestosterone, Δ^4 -16-Androstadien-3-one, Δ^{16} -Androstene-3 β -ol, Adrenosterone, 11 β -Hydroxytestosterone, 11 β -Hydroxy- Δ^4 -Androstenedione などであり、酵素としては 5 α & 5 β reductase, 3 α & 3 β hydroxysteroid dehydrogenase, 11 β hydroxysteroid dehydrogenase などである。

さて近年になつてわれわれと略時を同じくして、Sholiton³⁵⁾ らがラット脳ホモジネート及び細胞内成

分を用いて Testosterone の代謝実験を行った。彼らは以前から *in vitro* において肝切片による Cortisol 次いで Testosterone の代謝実験を行い、添加した Diphenylhydantoin が A 環還元を増強することに関心を示し、更には Cortisol 或いは Cortisone を基質として脳ホモジネートとインクベートし³⁶⁾上記薬物は効なきことを認めた後、彼は脳質に Testosterone を作用させることを試みた。Testosterone が動物の情動とか反射運動に影響を及ぼすという事実のもとに、脳において Testosterone が積極的に代謝されるのではないかという考えを持ったもので、精神科医である私の考えと同じ立場から出発したものの様である。

実験成績についてわれわれの場合と比較すると、彼らは放射性・テストステロン代謝生成物をペーパークロマトグラフィーにて分離し(イソオクタン-メタノール-水 10:8:2)、放射性を有する極性の強いピーク1つと弱いピーク1つを得た。前者は引続き別の展開系にて3個の異性体 Androstenediol (3 β , 17 β 及び 3 α , 17 β) Etiocholane diol (3 α , 17 β) を推定した。後者の極性の弱い方が主たるピークであつてリグロイン-メタノール-水10:3:7の展開系を用いてこれが、Iso-androsteroneであることを確認し、更に分析化学的操作を加えて同定している。

われわれは薄層クロマトグラフィーにてクロロホルム-メタノール-アセトン90:3:7の展開系を用いた。分離は極めて良く、純品との対比において Rf 値、硫酸発色による色調で Δ^4 -Androstenedione と確認し、更に 20cm 薄層クロマトグラフィーでは Δ^4 -Androstenedione と重なっているが 55cm 薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーで Δ^4 -Androstenedione とは別に main product として Dihydrotestosterone があることを認めた。Sholiton らの極性の強い代謝物に相当するものとしてわれわれも微量ながらスポット(スポットI)を見出したが、これはガスクロマトグラフィーで Etiocholane diol 或は 11-Keto-etiocholane, 11-Hydroxyetiocholane 或は Δ^5 -Androstane diol の如きものと推測している。

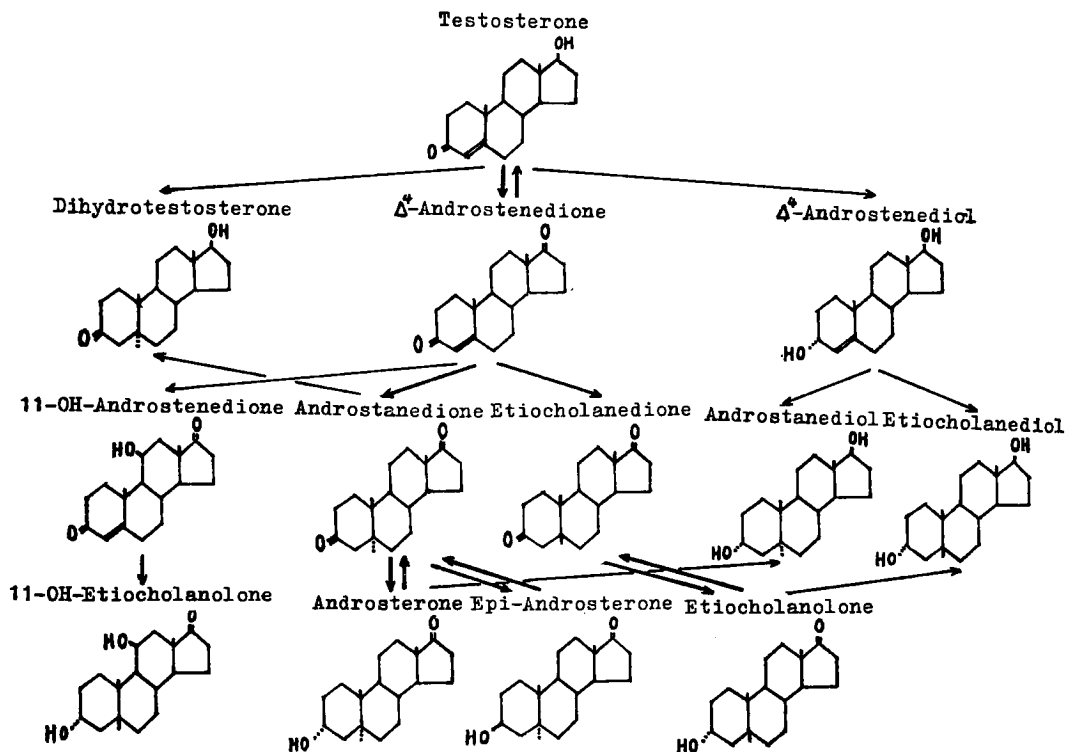
脳ホモジネートを用いた時の代謝生成物の親物質に対する変換率は Δ^4 -Androstenedione + Dihydrotestosterone についてはラット脳で平均 2.46%, ヒト脳で平均 2.29 \pm 0.73% である。これに相当する Sholiton らの極性の弱い物質即ち Iso-androsterone

では雄ラット脳で平均 6.7 \pm 3.1%, 雌で平均 6.2 \pm 2.8% と値が高い。彼らの場合はわれわれの用いた Co-factor の代わりに、より複雑な NADPH generating system を加え、medium を 95% O₂, 5% CO₂ とし Dubnoff shaker を用いて5時間の長きに亘りインクベートした。そのため反応が活発に行われ、代謝の段階は Δ^4 -Androstenedione を通りこして Iso-androsterone が最終的に生成されたと想像できない事もない。彼らの極性の強い物質の変換率も雄で平均 2.9 \pm 0.78%, 雌で平均 2.5 \pm 0.75% とかなり高い。われわれの場合スポットIは極僅かで 0.2% 程度で有意の値となし得なかつた。これはスポットIIIでも同様である。

ステロイドの *in vitro* における代謝実験で、代謝率は当然のこと乍ら諸種の条件に左右される。古くは Wotiz²⁷⁾ が詳細な実験を行つている如く基質に対する組織の量、緩衝液の質と量、基質の濃度、反応時間などが関係する。特に問題になるのは組織の量でわれわれのラット脳の場合 Δ^4 -Androstenedione + Dihydrotestosterone 変換率は基質の Testosterone 量が 200 μ g から 40 μ g と 1/5 に減ざると 2.46% から 0.68% に低下し、更に 0.1 μ g 程度に減量すると 0.84% 或いは 0.91% にいずれも低下した。前述の Sholiton らの場合はラット脳に Testosterone 2.5 μ g を加えた実験であり、Chamberlain³⁷⁾ らの人前立腺ホモジネートの実験では Co-factor として NAD, NADP を用いて行われ、加えられた Testosterone 140 μ g の時代謝率は最高 7%, 14 μ g の時最高 35% であり、0.7 μ g の時は殆ど 100% 代謝された上に始めて極性の強い代謝物が出現したと報告している。

Δ^4 -Androstenedione は図5に示すごとく Testosterone を含む Androgen 代謝経絡の中心に位置する物質であり、Testosterone の *in vitro* の代謝実験において最初に発見されたものである。前立腺、肝、副腎を用いた実験でも major metabolite であるが、反応は先に進んで minor metabolite としてかずかずのものが見出されそれぞれかなりの比率に達している。睾丸を用いた実験ではもはや Δ^4 -Androstenedione は認められていないし、Testosterone を動物に注射して後取出された前立腺、肝からも Δ^4 -Androstenedione は認められない。更に基質として放射性 Δ^4 -Androstenedione を用いた場合³⁸⁾、筋組織で極少量が逆行性の酵素作用にて Testosterone を生ずるほかは、反応が速に先に進行することが確か

図 5 テストステロンの代謝経路



められている。

Dihydrotestosterone はやはり major metabolite として、人前立腺肥大症の組織を用いての実験でのみ認められ³⁷⁾³⁹⁾ Δ^4 -Androstenedione をこえる変換率である。われわれの成績からも脳は代謝臓器でも内分泌臓器でも又標的臓器でもないため Testosterone の代謝は他の臓器に比して低調であると考えられる。然し potency の側から考えると量の少ないこと必ずしも意味少ないということにはあたらない。

細胞内成分を用いた実験では酵素の局在を検索したのであるが、われわれの場合 Testosterone を Δ^4 -Androstenedione と Dihydrotestosterone に変換する酵素即ち 17β -hydroxysteroid dehydrogenase と 5α reductase は各細胞分画に認められたが、終脳ミトコンドリア分画に最も多く上清部分にもかなり多い成績を得た。Chamberlain³⁷⁾ らも人前立腺の細胞分画を用いて実験し、 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は殆んがミトコンドリアに、又 5α reductase は主として上清部分、幾らかはマイクロゾームにも認められると報告している。そして上清部分には更に他の酵素が存在しこれらがわれわれのスポット I 及び III の物質を生成する酵素である。しかしわれわれ

はこの二つの物質の生成は極微量のため有意のものと見なし得なかつたことは前述した。Sholiton らのラット脳の分画の場合では³⁶⁾酵素を細別せず極性の弱い代謝物 (Iso-androsterone) はマイクロゾーム分画でのみ、又極性の強いものはマイクロゾームと可溶部分の両方で生成されると簡単に述べている。

同じ hydroxysteroid dehydrogenase でもラット脳細胞内成分による Cortisol の代謝実験⁴⁰⁾ で 11β -hydroxysteroid dehydrogenase は核分画に最も多く、ミトコンドリア、マイクロゾーム分画にも多く、上清部分には殆んど認められていない。又ラット腎⁴¹⁾ では核分画に最も多く、マイクロゾームにはその半分位、ミトコンドリア、上清部分には非常に少ないが、更に別の酵素 20 -hydroxysteroid dehydrogenase は核分画にもマイクロゾーム分画にも同じ位存在すると云われている。細胞内成分を完全に分離するのはかなり難しく、又その過程において酵素の破壊とか細胞内粒子からの成分遊出も考えられ微量物質の定量にはテクニックそのものの中に限界因子がある。われわれも各分画を一応電子顕微鏡で確かめたが或程度の混在が疑われた。そのためわれわれの酵素の各分画への分散を考慮の上、上記の諸家の成績

と比較考察し、 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, 5α reductase はミトコンドリア, 上清以外の細胞内成分にも広く存在するものと思われる。

Co-factor についてはわれわれの実験では 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, 5α -reductase 作用が主たるもので、NAD, NADP により増強された。すなわち Δ^4 -Androstenedione + Dihydrotestosterone 変換率は平均値でラット脳で1.8%から2.46%に、ヒト脳で0.5%から $2.29 \pm 0.73\%$ になった。しかし 3α - & 3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 5α & 5β -reductase などはむしろ NADPH を要するとも云われている。ラット脳とヒト脳の比較はヒト脳の方が少々低い代謝率を示し、Co-factor の影響もヒト脳の方が明瞭であるかの如き成績であるが、この点については今後の追試がまつれる。

最後に Testosterone を主体とする Androgen の向精神作用について触れてみる。去勢によつて女性化した生体に Testosterone を与えることによつて男性性格を取戻したり、Klinefelter 症候群の患者に Testosterone 製剤を治療として用いることも周知の通りである。Testosterone はこれを加えることによつて細胞の蛋白合成を促進させることが明らかにされており、Kochakian⁴²⁾ らは Androgen 作用の本質は蛋白合成或は酵素形成に役立つ塩基性細胞質中に入る RNA 合成部分にあると云う。脳細胞における蛋白合成の促進を直接証明した者はないが、生来性の睾丸の發育不全は精神薄弱その他の精神障害を起すことは良く知られている。甲状腺機能低下、脳下垂体・副腎皮質系機能低下に対する刺激効果、あるいは又老年期、慢性肝疾患などに伴ううつ状態の治療に用いられるのもその神経活動促進効果が期待されるためであり、一般的に云えば Testosterone は大量では脳下垂体機能を抑制し、少量では却つて刺激すると云われている⁴³⁾。実際には Testosterone の Androgen 作用が有効なのか、蛋白同化作用が良いのか分らないが、Androgen 作用は Testosterone の $1/60$ 程度と低い精神刺激作用のある Dehydroepiandrosterone が好んで使用されている。Dehydroepiandrosterone は Δ^4 -Androstenedione を経て Testosterone に、それから Dihydrotestosterone になるし、又 Δ^4 -Androstenedione は Androstenedione を経て終末産物 Androsterone になるので、Testosterone そのものを与えた時とは作用の面が単一でない。殊に脳では脳以外の組織での生物活性の高低をそのまま承認することもできない。又 Δ^4 -Androstenedione は

Estrone を経て Estradiol にも転換するので作用機序は更に複雑である。然し脳に加えられた Testosterone はその僅か3%程度が Δ^4 -Androstenedione, Dihydrotestosterone になり、 Δ^4 -Androstenedione から Estrone の方に行くとしてもその中の更に小部分に相当することになる。それらの転換関係と脳の部分との化学的相互関係は今日まだ全くわかつていないので、これらに就いて研究をすすめて行くのが今後の課題となるであろう。

結 語

どんりゆう系ラット脳及びヒト脳ホモジネート或いはラット脳細胞内成分に、基質として [4-C^{14}] Testosterone 及び Testosterone を Co-factor と共に加えインクベートし、生成された代謝物を抽出分離し、放射能を測定してその変換率を算出した。

1) 代謝生成物は薄層クロマトグラフィーで4つの主要なスポットとして表れ、原点に近い方から I, II, III, IV とすると、II は Testosterone, I, III は目下確認を急いでいるが夫々 I は 11-OH-Etiocholanolone の如きもの、III はまだいかなるものか予想できない。IV が主要代謝物で Δ^4 -Androstenedione, Dihydrotestosterone である。

2) 基質のテストステロンは90~95%以上代謝されずにそのまま残る。

3) Δ^4 -Androstenedione, Dihydrotestosterone への変換率はラット脳で平均2.46%, ヒト脳で平均 $2.29 \pm 0.73\%$ であり、Co-factor を加えないと著しく低下し夫々1.8%及び0.5%となる。

4) スポット I, III の未確定代謝物の変換率は夫々僅か0.2%程度でその値は有意のものとなし得なかつた。

5) Δ^4 -Androstenedione, Dihydrotestosterone 生成にあずかる酵素 (17β -hydroxysteroid dehydrogenase 及び 5α -reductase) はラットの細胞内成分のいずれの分画にも認められたが、終脳ミトコンドリア分画に最も多く、上清部分にもかなり多くて Testosterone からの変換率は夫々最高0.5%程度である。

(本研究は文部省科学研究費の援助による。)

(本論文の要旨は第65回日本精神神経学会総会において発表した。)

御校閲を賜つた奥村二吉教授に深く感謝しますとともに終始御指導をいただいた高坂睦年助教に心

から御礼申し上げます。

また、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーによる分析について御助力下さった当大学

産婦人科吉田俊彦講師、伊藤裕講師、鎌田昌平医学士に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Pincus, G. et al: *Psychosom. Med.*, 11: 74 (1949)
- 2) Pincus, G. et Hoagland, H.: *Am. J. Psychiatr.*, 106: 641, (I) (1950)
- 3) *Ibid*, 106: 660, (II) (1950)
- 4) Hoagland, H. et Pincus, G.: *A. M. A. Arch. Neurol. Psychiatr.*, 69: 470 (1953)
- 5) 小林: 岡山医誌, 74: 649 (1962)
- 6) 辻: 岡山医誌, 75: 431 (1963)
- 7) 高坂: 精神経誌, 65: 109 (1963)
- 8) 出宮: 岡山医誌, 79: 619 (1967)
- 9) 長尾: 日内分泌誌, 41: 96 (1966)
- 10) 高坂: 精神経誌, 69: 962 (1967)
- 11) 藤原: 未発表
- 12) Grosser, B. I.: *J. Neurochem.*, 13: 475 (1966)
- 13) 植村他: 神経進歩, 7: 763 (1963)
- 14) Selye, H.: "The Stress" *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1936—1950
- 15) Hemphill, R. E. et al: "ACTH in Psychiatry" *International Congress for Psychiatry, Paris.* (1950)
- 16) Reiss, M. et al: *J. Clin. & Exp. Psychopathol.*, 12: 171 (1951)
- 17) Bliss, E. L. et al: *J. Clin. Endocrinol.*, 11: 46 (1951)
- 18) Altschule, M. D. et al: *A. M. A. Arch. Neurol. Psychiatr.*, 67: 228 (1952)
- 19) Persky, H. et al: *A. M. A. Arch. Neurol. Psychiatr.*, 76: 549 (1956)
- 20) 草間: 日内科誌, 52: 9, 1052 (1963)
- 21) 諸治他: 精神経誌, 68: 1421 (1966)
- 22) 小林: 精神経誌, 69: 584 (1967)
- 23) Lipsett, M. B. et al: *J. Clin. Endocrinol. & Metabol.*, 25: 1027 (1965)
- 24) Short, R. V.: *Biochem. Soc. Symposia*, No. 18, p. 59 (1960)
- 25) Baulieu, E. E. et Robel, P.: *Steroid*, 2: 111 (1963)
- 26) Samuels, L. T.: *J. Biol. Chem.*, 168: 471 (1947)
- 27) Wotiz, H. H. et Lemon, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 206: 525 (1954)
- 28) Wotiz, H. H. et al: *J. Biol. Chem.*, 209: 437 (1954)
- 29) Stylianou, M. et al: *J. Biol. Chem.*, 236: 692 (1961)
- 30) *Ibid*, 236: 1318 (1961)
- 31) Chang, E. et al: *J. Biol. Chem.*, 238: 913 (1963)
- 32) Smith, J. A. et al: *J. Endocrinol.*, 35: 281 (1966)
- 33) Elattar, T. et al: *Acta Endocr. (Kbh.)* 45: 437 (1964)
- 34) *Ibid*, 45: 527 (1964)
- 35) Sholiton, L. J. et al: *Steroid*, 8: 265 (1966)
- 36) Sholiton, L. J. et al: *Metabolism*, 14: 1122 (1965)
- 37) Chamberlain, J. et al: *Biochem. J.*, 99: 610 (1966)
- 38) Thomas, P. Z. et Dorfman, R. I.: *J. Biol. Chem.*, 239: 762 (1964)
- 39) Farnworth, W. E. et Brown, J. R.: *J. A. M. A.*, 183: 436 (1963)
- 40) Peterson, N. A. et al: *J. Neurochem.*, 12: 273 (1964)
- 41) Mahesh, V. B. et Ulrich, F.: *J. Biol. Chem.*, 235: 356 (1960)
- 42) Kochakian, C. D. et Harrison, D. G.: *Endocrinol.*, 70: 99 (1962)
- 43) 高坂: 日本精神医学全書, 5: 288 (1965)

Brain Metabolism on Steroid Hormones

By

Shigeru KIKUI, M. D.

Department of Neuro-psychiatry Okayama University Medical School Okayama, Japan
(Supervised by Dr. Mutsutoshi Kohsaka, M. D., Associate Professor)

By the clinical studies on steroid hormones in endogenous mental diseases so far carried out, we have found that it is the steroids belonging to 17-KS rather than 17-OHCS which are associated with the mental excitation. In view of this, we attempted a study about the brain metabolism on testosterone which is an important precursor of 17-KS with a strong biological activity. The materials used were the brain of Donryu rats and human beings. Each of these brain tissues was homogenized in ten-fold volumes of 1/15 M phosphate buffer solution. Then, taking 2 ml of the brain phosphate buffer homogenate or 2 ml each of 1/15 M phosphate buffer suspension of the supernatant containing nuclear, mitochondrial or microsomal fraction, prepared from 1 g rat brain, the incubation was conducted in the air at 37°C for 60 minutes after adding 0.1 μ c [4-C¹⁴] testosterone, 0.2 mg cold testosterone, 0.5 mg each of NAD and NADP as cofactor, and 10 mg nicotinamide. Then, metabolites were extracted, applied on the florisol column, and 2% methanol-chloroform fraction was collected and dried. For the control groups the brain tissues inactivated by heating were employed. Each of the specimens thus obtained was applied on the Silicagel-G thin layer chromatography (TLC), and metabolites were isolated and identified by the 2% NGS gas chromatography. After the TLC-autoradiography the portions that coincided with the radioactive spots was taken and each of these chromatograms was applied to the liquid scintillation counter and the percentage of the conversion of metabolites was calculated from respective radioactivity.

1) Both from the rat brain and the human brain on the TLC (chloroform-acetone-methanol, 90:7:3, developed for 15 cm) there are seen four principal spots, and designating these spots as I, II, III and IV starting from the original point of application, the spot II is testosterone, proving that 90-95% or more of testosterone added has not been metabolized.

2) The spots I and III are minor metabolites, of which I is the substance like 11-OH-Etio-cholanolone, and III is an unknown substance. The conversion rate of each is only about 0.2%, proving to be of no significant value.

3) The spot IV is a major metabolite, and on the further TLC (chloroform-acetone, 85:15, developed for 55 cm) it separated itself into two spots, each of which has been identified to be Δ^4 -androstene-3,17-dione and dihydrotestosterone. The conversion rate of the two together is 2.46% with the rat brain and 2.29 ± 0.73 % with the human brain in average, and without addition of cofactors it is decreased to 1.80% and 0.5% respectively.

4) The activity of the enzymes responsible for the major metabolite formation, namely, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 5 α -reductase, is detectable in every fraction of the rat brain, but it is highest in the telencephalon mitochondrial and fairly high in the supernatant fraction, and the conversion rate from testosterone is about 0.5% in each case.

After all, since the brain is not a metabolic organ nor a target organ, the metabolism of testosterone is extremely low, nonetheless, looking it from the aspect of its potency, we cannot rule out its significance.

A further problem which we have to solve will be the role played by the hormones responsible for mental excitation, by investigating the correlation of the brain site to the metabolism of steroids including testosterone.