Studies on the Biosynthesis of Steroid Hormones

Satoru OTA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine
(Director : Prof. Gen-ichi Tokuda, M.D.)

Corticosteroid biosynthesis in the different cellular zones of beef adrenal cortex was studied in vitro.

Various substrates including acetate, cholesterol, pregnenolone, progesterone, desoxycorticosterone, and desoxycortisol were incubated separately with homogenates of fasciculata-reticularis tissue and with slices of glomerulosa tissue.

Although the following sequences were demonstrated in the adrenal cortex, the results of this experiment indicate the absence of 17α -hydroxylase in the zona glomerulosa and the absence of 18 -hydroxylase in the zona fasciculata and zona reticularis.

Incubation of acetate or cholesterol with homogenates or slices of adrenal cortex, however, did not lead to the increase of corticosteroid.

In addition, the incubation of adrenal cortex without substrate resulted in the formation of considerable cortisol and corticosterone, while no cholesterol-route intermediates were detectable in the adrenal homogenates. When the dializate of the adrenal cortex against buffer was lyophilized and incubated with adrenal homogenates, it caused a remarkable increase in the production of corticosteroids. This may be due to the conversion of the dialyzed precursors to corticosteroids, though these precursors have not yet been isolated.

17α -hydroxylase activities were also demonstrated in the homogenates of HCG-treated-rat testis and in the slices of normal adult human ovaries. These tissues were incubated with 3H -Progesterone and the formation of 17α -hydroxyprogesterone- 3H was clearly demonstrated.

The incubation of full term human placenta with 3H -Progesterone, however, did not result in the formation of neither 17α -hydroxyprogesterone nor phenolic steroids.

From these results, it was suggested that, in human placenta, there is a dominant pathway by which dehydroepiandrosterone is formed from cholesterol, not through progesterone, but possibly by the direct cleavage of the side chain C-17 and C-20; and dehydroepiandrosterone thus produced in turn converts into Δ^4 -androstene-3, 17-dione and testosterone, and then to estrogens.

(pp. 842~862)

Steroid hormone 生合成に関する研究

京都府立医科大学産婦人科学教室（主任 徳田源市教授）

太 田 智

（昭和38年5月7日受付）

目 次

第1編 Corticosteroid 産生に関する問題	第6章 総括, 考按ならびに結論
第1章 緒言	第2編 Androgen, Estrogen産生に関する問題
第2章 Corticosteroid の定性定量法	第1章 緒言
第3章 牛副腎皮質組織における Corticosteroid 産生実験	第2章 牛副腎皮質組織と Pregnenolone, Progesterone 添加培養実験
第4章 牛副腎皮質組織と各種Corticosteroid intermediate添加培養実験	第3章 卵巣, 睪丸および胎盤組織と ^3H -Progesterone 添加培養実験
第5章 牛副腎皮質組織中の Corticosteroid precursor に関する実験	第4章 総括, 考按ならびに結論

第1編 Corticosteroid 産生に関する問題

第1章 緒 言

副腎皮質より分泌されるホルモン, すなわち Corticosteroid の研究は, 古くから多くの学者によりなされたが, 1937年 Reichstein ら, Kendall が一部の Corticosteroid を結晶の形で取り出すことに成功して以来, 急速に進歩し, ついに1952年に Simpson,²⁾ Tait³⁾ らにより, また, Neher, Wettstein, Reichstein⁴⁾ らにより強力な mineral corticoid である Aldosterone が発見されるに至った。そして現在までのところ副腎皮質より抽出されたステロイドは40種以上にのぼり, そのうち副腎皮質より分泌される活性 Corticosteroid は Cortisol, Corticosterone, 17-hydroxy-11-desoxycorticosterone, Cortisone, 11-desoxy-corticosterone, Aldosterone の6種であるとされている。一方, 副腎皮質における Corticosteroid の生合成経路に関しては Hechter^{5)~7)} らにより詳細な研究がなされ, 一見完成されたかに見えた。かれらによると Cholesterol が重要な intermediate (中間代謝物) であるとみているが, Cholesterol がこれらの生合成の intermediate として必ずしも必要でないとの報告もあり, また Heard らは $\text{CH}_3^{14}\text{C}-\text{OONa}$ を静脈投与した妊馬尿中には ^{14}C -estrogen を分離しえたが⁸⁾, Cholesterol-4- ^{14}C 投与例では, 尿中に ^{14}C を検出しなかつたと述べており, また ^{14}C -acetate による培養実験⁹⁾で, ^{14}C -Cortisol, ^{14}C -Corticosterone のような Corticosteroid をえたが, ^{14}C -cholesterol には転化しないという結果をえて Cholesterol を経ない Corticosteroid 生成経路の存在する可能性をも考えられている。徳田ら¹⁰⁾も最近この non-cholesterol の問題に関する詳細な綜説を発表した。また, 副腎皮質の形態学的, 組織学的構造の細胞層と分泌されるホルモンとの関係については, 今日まで escalator theory や皮質2元論¹¹⁾が提唱されたが, いずれも確定的でなく現在に至っている。

このように, 副腎皮質において行なわれる Corticosteroid の産生経路およびその構造と機能との相関については, なお不明の点が多く, これらを解明するために, 今回次のような培養実験をこころみ, これらの問題について検討を加えた。

第2章 Corticosteroid の抽出, 分離, 定性および定量法

incubation mixture よりの Corticosteroid の抽出には, chloroform を用い, methanol と petroleum ether の分配により脂肪, 色素などを除去し, column, paper-chromatography を系統的に用い, 各々の Corticosteroid を分離, 出来るだけ特異的な反応を組合わすことにより定性定量した.

なお比色計は, Bausch & Lomb社製および日立製作所製日立 EPU-24型分光光度計を用いた.

第1節 抽出

incubation mixture を Fig. 1 の方法で抽出を行なつた. すなわち, suspending media を遠心沈澱し上清と沈澱を分離, 沈澱をさらに水で2回抽出し, 先の上清と合わせ chloroform で抽出した. 水洗後, chloroform を減圧蒸溜し, 60% methanol-petroleum ether で分配し, 脂肪を除去し, methanol を蒸発せしめたのち, その水層を chloroform で再び抽出し, これを減圧蒸発乾固し粗抽出物を得た.

Fig. 1. Extraction of incubation mixture

第2節 Steroid の分離法

粗抽出物よりの Steroid の分離は column chromatography および paper chromatography を系統的に組合わせ用いた.

第1項 Column chromatography

精製活性化した florisil (5gm) を用い, chloroform にて直径1 cm, 高さ7 cmの florisil column を作り, 上述の減圧蒸溜粗抽出物を5 cc chloroform に溶解し, これに注入し吸着せしめる. 次に chloroform 5cc, 1% methanol chloroform 25cc, 次いで 25% methanol chloroform 50cc で連続溶出し, 25% methanol chloroform 分画を集め, 減圧蒸溜し, 次の paper chromatography に使用する. また, 直ちに

定性定量反応を行ない Corticosteroid 量を測定する。なお、第4章の実験にはこの column chromatography を省略した。

第2項 Paper chromatography

溶媒系としては Bush法¹³⁾の benzene-methanol-water (1000 : 500 : 500) system (B_s system), ligroine-methanol-water (1000 : 800 : 200) system (B_a system), ligroine-benzene-methanol-water (667 : 333 : 800 : 200) system (B_j system) を用いた。Whatman No. 1 および東洋濾紙 No. 51の濾紙を使用し、前処置せずに下層を固定相、上層を移動相として、25°Cで2～3時間展開し、これを風乾し、各 band を切りとり methanol および chloroform で溶出蒸発乾固し、次の Steroid の定性定量反応に供した。

第3節 Steroid の定性定量法

次の各種定性定量反応を組み合わせることにより各 Corticosteroid 量を測定した。

第1項 Paper Chromatography 上Rf値の比較

Paper chromatography 上同時に展開した標準 Steroid と、そのRf値を比較する。

第2項 紫外線吸収写真および吸収スペクトル

Δ^4 -3-Ketosteroid の確認に用いる。

第3項 硫酸 Chromogen spectrum¹³⁾

吸収 spectrum は各 Steroid により特有であり、標準 Steroid と比較する。

第4項 沃度カリ溶液による呈色反応¹⁴⁾

Paper chromatography 上、 Δ^4 -3-Ketosteroid の存在を呈色反応により確認する。

第5項 Porter-Silber chromogen 反応¹⁵⁾

Phenylhydrazine hydrochloride が、17, 21-dihydroxy-20-Keto steroid に特異的に反応し呈色する。

第6項 Blue tetrazolium 反応¹⁶⁾

20, 21 α -Ketol side chain に対する反応で、アルカリ溶液中で Blue tetrazolium が還元されて紅紫色を呈す。

第7項 INAH 反応^{17), 18)}

Δ^4 -3-Ketosteroid が isonicotinic acid hydrazide と反応し淡黄色を呈す。

第8項 Zimmermann 反応¹⁹⁾

C¹⁷ の-CO基がアルカリ溶液中で m-dinitrobenzene と反応して呈色する反応で、17-Ketosteroid の定性定量に用いる。

第3章 牛副腎皮質組織における Corticosteroid 産生実験

副腎皮質組織中に存在する Corticosteroid precursor から Corticosteroid が産生されることは Vestling および Lata²⁰⁾ により発表された。これら endogenous precursor より Corticosteroid が産生されるためには、組織中の酵素の存在とともに各種の cofactor を必要とし、これらに関する報告は数多くあるが、Corticosteroid 産生に及ぼすこれら cofactor の濃度および時間的变化などを検討しようとして次のような実験を行なった。

第1節 実験方法

牛副腎を屠畜場で採取後、直ちにドライアイスと共に魔法瓶に詰めて冷却しながら実験室に運び実験に供した。牛副腎の capsule stripping を行なつて、束、網状層組織を同量の 0.25M sucrose phosphate buffer solution (pH 7.0) または Krebs-Ringer phosphate buffer solution (pH 7.4) で homogenize したのち 800 × g で5分間遠心沈澱し、その上清に sodium fumarate (0.005M), nicotin amide (0.005M) を加えた。また sucrose phosphate buffer solution を用いた際は Mg SO₄ (0.005M) を添加調製した。

次いで37°Cで基質を加えないで培養し、前章の方法にて Corticosteroid を抽出し、florisil による column chromatography を行ない、25% methanol chloroform 分画を Blue tetrazolium 反応、INAH 反応およ

び Porter-Silber chromogen 反応にて定量した。標準としては Cortisol を用いた。

また一方, paper chromatography により Corticosteroid を分離確認した。

第2節 実験成績

第1項 ATP, DPNH およびその両者の影響

上記皮質束網状層組織の homogenate 2cc を37℃で30分間空気流通下で振とう培養した。まず ATP (adenosin triphosphate) 単独の濃度変化に対する Corticosteroid 産生におよぼす影響をみると, ATP の効果は Fig. 2 のように1.5mM迄漸増する結果をえた。また DPNH (reduced diphosphopyridine nucleotide) 単独添加の場合の効果は0.5mM迄急速に上昇するが, 以後漸増する。また0.25mM濃度の ATP 存在下における DPNH の濃度変化をみると, DPNH 単独添加の場合とほぼ平行関係を示した。

第2項 培養時間の影響

5mM sodium fumarate, 5mM nicotin amide, 1mM ATP, 0.25mM DPNH の各 cofactor を含有せる

Fig. 2. Effect of ATP, DPNH and their combination on biosynthesis of corticosteroid

Fig. 3. Effect of incubation period on biosynthesis of corticosteroid

上記皮質束網状層組織の homogenate 4cc を37°C で空気を通じて振とう培養した。基質を添加せずに Corticosteroid 産生量に対する培養の時間的変化をみると Fig. 3 に示すようで、45分前後では最高値に達することが認められた。一方このような生成 steroid を florisol による column chromatography および paper Chromatography で分離したところ Fig. 4 のように、主として Corticosterone および Cortisol であることをみた。

以上の実験で基質を加えない場合でも、副腎皮質中に Corticosterone または Cortisol になる何らかの Corticosteroid precursor が存在し、副腎組織中の酵素の存在下に ATP, DPNH などの各 cofactor の添加で、比較的短時間の培養で Corticosteroid C の産生が証明された。

第4章 牛副腎皮質組織と各種 Corticosteroid intermediate 添加培養実験

副腎皮質における Corticosteroid の生合成に関しては Hechter, Heard, Reichstein らの実験があり、いずれも最終産物は Cortisol, Corticosterone, Aldosterone であることが認められている。一方 Swann²¹⁾ は動物の脳下垂体摘出により、副腎皮質における組織上の変化は、束網状層の萎縮であり、球状層においてはほとんど変化のないことをみている。O'Donnell²²⁾ らは ACTH (Adrenocorticotrophic hormone) の注射により、尿中 17-hydroxy corticoid の増加をみると同時に、束網状層は急速に反応し幅が広がるが、球状層には変化が認められなかったと報告している。また slice の培養実験では Ayres は球状層組織の培養実験で Aldosterone の産生が認められたのに反し、束網状層組織の同実験では認められなかったと報告している。このように副腎皮質における Corticosteroid 産生は各層により Corticosteroid の種類が異なり、Hechter²³⁾ が想像したような Corticosteroid 産生の各経路が、各層で各々独立に行なわれているのであるか、あるいは副腎中の血流にそつて、すなわち外層で DOC (11-desoxycorticosterone), Sub S (17-hydroxy 11-desoxycorticosterone) などが、さらに内層に進んで、束状層ないし網状層組織で Cortisol, Corticosterone が産生されるもの²⁴⁾であるかについては、現在なお解明されていない問題である。

そこで、本実験では牛副腎の capsule stripping を行なつて、球状層組織と束網状層組織とに出来るだけ分離し、それぞれに対して基質 (Corticosteroid intermediate) を添加培養し、産生される Corticosteroid を分離、定性定量することにより検討を加えた。

第1節 実験方法

牛副腎の capsule stripping を行なつて、皮質組織を球状層と束網状層とに分け、前者は slice に、後者は homogenate にして培養実験に供した。incubation medium には cofactor として 5mM sodium fumarate, 5mM nicotin amide, 1mM ATP, 0.5mM DPNH を含有する Krebs-Ringer phosphate buffer solution (pH. 7.4) を用いた。この incubation medium 10cc 中に上記組織5gおよび基質として Acetate

Fig. 4. Paper chromatograph of incubation mixture, B₅ system
zona fasciculata-reticularis

または Corticosteroid intermediate とみなされる steroid を 0.2cc の propylen glycol に溶解し、200cc の培養容器に入れ、37℃で2時間、空気流通下に振とう培養した。対照としては同条件にて基質を添加せず培養した。各々の Corticosteroid の抽出、分離、定量は第2章で述べた方法により行なつた。

第2節 実験成績

第1項 Acetate 添加培養實驗

牛副腎皮質の球状層，束網状層組

織5gをそれぞれ slice および homogenate し、各々を前述の cofactor を含有した incubation media 10cc 中で Acetate 20mg. を添加培養した。対照としては Acetate を添加せず培養抽出し、ligroine-methanol-water system および benzene-methanol-water system で paper chromatography を行ない Fig. 6 のような結果を得た。球状層、束網状層共、基質なしに行なつた培養成績と比較し、明らかな変化を認めない。なお普通文字で書いてあるのは paper chromatography 上明らかなスポットを認めなかつたもの、ゴチック字は明らかにスポットを認めた印である。最初の () 内の数値は、基質を添加することなく培養したときの値であり、次の () 内に steroid 産生増加の程度を一、±、+、++、+++ の5段階に分け表現した。

第2項 Cholesterol⁻添加培養実験

前項と同じ方法にて Cholesterol 20mg. を添加培養した実験結果は Fig. 7 に示すようである。球状層、束網状層共測定結果は軽度の産生増加を認めたが、Cortisol の産生増加は著明ではなかつた。また Corticosterone も同じように明らかな産生増加をみなかつた。この incubation medium では Cholesterol より Corticosteroid への転換は、はつきり確認しえなかつた。

第3項 Pregnenolone 添加培養実験

球状層, 束網状層に Pregnenolone 1mg. を添加培養した結果は Fig. 8 に示すようで, 束網状層では Corticosterone, Cortisol とも対照に比較し明らかに増量している. 球状層では Corticosterone の明かな

Fig. 6. Biosynthesis of corticosteroid from acetate

Fig. 7. Biosynthesis of corticosteroid from cholesterol

Fig. 8. Biosynthesis of corticosteroid from pregnenolone

産生増加を認めるのに反し, Cortisol の産生増加は著明ではなかった。また ligroine-methanol-water system で展開したものでは, 球状層の方では Progesterone および DOC のスポットが認められた。以上より, 束網状層では Pregnenolone より Progesterone, DOC という経路を経て, Corticosterone が産生される可能性を十分認めた。一方 Cortisol も著明に産生される。球状層では Pregnenolone より Progesterone, DOC を経て Corticosterone の産生が明らかにみられるに反し, Cortisol の産生は, それほどはつきりしたものは認められなかった。ある程度 Cortisol のスポットが現われたが, これは capsule stripping にする際に, 束網状層の細胞が球状層に混入したために Cortisol が産生されたものであるかも知れない。

第4項 Progesterone 添加培養実験

Progesterone 1mg. を添加培養すると, 束網状層においては Corticosterone, Cortisol いずれも著明な産生増加をみた。一方球状層では Corticosterone のスポットが大量認められるに反し, Cortisol のスポットは非常に少なく, この層では Pregnenolone 添加培養実験と同じように Progesterone から Cortisol への代謝経路は認められなかった。したがって Prog. → DOC → Corticosterone の代謝経路が, 球状, 束網状の双方すなわち全層において認められるが, Prog → Sub S → Cortisol の代謝経路は束網状層では認められるが, 球状層では認められなかった。

第5項 DOC (11-desoxy corticosterone)

添加培養実験

DOC 1mg. の添加培養実験では Corticosterone は球状層でも束網状層でも著明に産生されるが, Cortisol のスポットは認められず DOC → Cortisol の代謝経路の存在は認められなかった。

球状層に DOC を添加培養する際 ATP の濃度が低い場合に Δ^4 -Androstenedione と Progesterone の間に Δ^4 -3-Ketosteroid のスポットを認めた。

ATP の濃度を高くすると, このスポットは消失した。この Δ^4 -3-Ketosteroid は DOC → Corticosterone への代謝経路の中間産物か DOC → Aldosterone, Corticosterone への代謝産物であるかは不明である。また束網状層では, このようなスポットは現われなかった。

Fig. 9. Biosynthesis of corticosteroid from progesterone

Fig. 10. Biosynthesis of corticosteroid from 11-desoxycorticosterone

Fig. 11. Biosynthesis of corticosteroid from 17α-hydroxy progesterone

Fig. 12. Biosynthesis of corticosteroid from 17-hydroxy-11-desoxy corticosterone

第6項 17 α -hydroxy progesterone 添加培養実験

17 α -hydroxy-progesterone を添加せる場合は束網状層で Cortisol が著明に増加しているにかかわらず, Corticosterone の増加は見られず, また球状層では Cortisol がやや増加しているように見えるが, これは束網状層の contaminate が起こつたためであると考えられる.

第7項 Sub S. (17-hydroxy-11-desoxy corticosterone) 添加培養実験

17 α -hydroxy progesterone を添加培養した場合と同様 Sub. S. を添加培養した際には, 束網状層のみで Cortisol への転換を認めた.

第5章 牛副腎皮質組織中の Corticosteroid precursor に関する実験

Corticosteroid の生合成については Cholesterol が重要な intermediate (中間代謝産物) とみなされているが, また Cholesterol を経ない経路の存在する可能性も Hechter ら²⁵⁾, Heard⁶⁾ らにより古くから間接的に考えられており, 現在なお明らかでない. そこで副腎皮質中に存在する Steroid precursor を検索することにより, non-cholesterol route の intermediate をえようと考え, 次のような培養実験を試み検討した.

第1節 実験方法

牛副腎皮質中に存在する corticosteroid intermediate の抽出は Fig. 13 のようである. まず牛副腎皮質束網状層を同重量の水で homogenize し, 800 $\times$ g, 5分間遠心沈澱し, その上清を 100 $^{\circ}$ C の水槽中で10分間加熱濾過する. また 5 $^{\circ}$ C で24時間セロファン膜 (No. 350) で透析したもの, それぞれを Krebs-Ringer phosphate buffer solution (pH. 7.4), または 0.25M sucrose phosphate buffer solution (pH. 7.0) に補正し, それぞれ boild P (BP) および dialized P (DP) と名づけた. また, セロファン膜で透析したものを, さらに lyophilize したものを lyophilized P (LP), また boild P から chloroform 可溶性物質を抽出した残りの chloroform 不溶性のものを chloroform unsoluble boild P (CUBP) と名づけた. 一方 Corticosteroid 生合成の反応系としては第3章で得た酵素系, すなわち, 牛副腎束網状層組織を Krebs-Ringer phosphate buffer solution または 0.25M sucrose phosphate buffer solution で homogenize したのち500 $\times$ g, 5分間遠心沈澱し, その上清 (E と名づける) を用い, sodium fumarate (5mM), nicotinamide (5mM), MgSO₄ (5mM), ATP (1mM), DPNH (0.5mM) の各 Cofactor を加えた. そして, 先に述べた P 物質と共に37 $^{\circ}$ C で30分間空気流通下に振とう培養した.

Fig. 13. Intermediate of corticosteroids

第2節 実験成績

第1項 Boild P 添加培養実験

上記 E 5cc に boild P10cc を加え sodium fumarate, nicotinamide, ATP, DPNH 等の存在下に培養抽出した。Corticosteroid の分離, 定量には florisil による column chromatography を行ない, 25% methanol chloroform fraction を減圧蒸発乾固し, Porter-Silber chromogen 反応, Blue-tetrazolium 反応, INAH 反応を行なった。Fig. 14 に示すように boild P のかわりに sucrose phosphate buffer solution 10cc を加えて培養した対照に比較し, 各反応値とも Corticosteroid の産生増加が認められた。(Cortisol equivalent として表現)

homogenize した副腎皮質組織を100℃で10分間煮沸, ろ過することにより除蛋白, 酵素の不活性化, 除去した残りの熱に安定なる物質の添加培養により Corticosteroid の産生増加をみた。

第2項 Dialized P 添加培養実験

E1ccに dialized P3cc を添加, 各種の cofactor 存在下に培養した結果は Fig. 15 に示すように, 対照に比較し, Corticosteroid (Cortisol equivalent) の産生増加が認められた。さらに dialized P の量を変化すると Fig. 16 のように dialized P 量増加とともに Corticosteroid の産生増加が認められた。この事実は dialysis により除蛋白, 除酵素した残りの物質中に Corticosteroid の産生増加をもたらす何らかの物質の存在が想像される。

Fig. 14. Effect of boild P on biosynthesis of corticosteroid

Fig. 15. Effect of dialized P on biosynthesis of corticosteroid

Fig. 16. Effect of dialized P on biosynthesis of corticosteroid

第3項 Lyophilized P 添加培養実験

dialyzed P 15cc 相当量をさらに lyophilize したものを加えた培養実験では, Fig. 17 に示すように Corticosteroid 産生増加の効果はさらに大になるのを認めた. この実験成績より, この物質が低温にも安定な物質であることがわかる.

第4項 Chloroform unsoluble boild P (CUBP) 添加培養実験

E 1cc に chloroform unsoluble boild P (2cc) を加えて培養した実験でも, Corticosteroid の産生増加を認めた. すなわち, boild P 中の steroideal 物質を chloroform で除去した残りの物質でも, 活性を示すことが認められた.

Fig. 17. Effect of lyophilized P on biosynthesis of corticosteroid

Fig. 18. Effect of chloroform unsoluble boild P on biosynthesis of corticosteroid

第6章 総括, 考按ならびに結論

副腎皮質の形態学的, 組織学的構造については1886年 Arnold²⁶⁾ が皮質を球状層, 束状層および網状層の3層に区別して以来, 今日に至っている. 一方, 副腎皮質の構造と機能との相関関係については, 副腎皮質の分泌層を球状層のみとする escalator または cell migration theory が提唱されたが, その後, Deane一派²⁷⁾により皮質2元論が提唱されるに至った. すなわち, Swann²⁾ はラット脳下垂体摘出を行なったところ, 球状層はほとんど変化しないことをみた. また Deane²⁷⁾²⁸⁾ も同様の所見をラット, 犬, モルモット等に認め, ACTH の支配を受けているのは, 束状層で, 糖質 Corticosteroid が分泌され, 球状層は下垂体の支配を受けない自律的な層で, 鉱質 Corticosteroid を分泌するとした. 一方, Ayres は球状層より Aldosterone が, 束状層より Cortisol, Corticosterone が分泌されることは確実であるとしている.

牛副腎皮質組織と各種 Corticosteroid intermediate の添加培養を行なった本実験では, 球状層組織において Corticosterone の産生は認められ, Aldosterone はその spot を認めるのみで substrate を変えても産生量に増減はなかった. また Cortisol の産生は認められなかった. これに反し, 束状層組織では Corticosterone, Cortisol の産生がともに認められたが, Aldosterone の産生は認められず, したがって, 全層に 3 β -dehydrogenase, 21-11-hydroxylase の活性が存在するが, 18-hydroxylase 活性は球状層のみに, また, 17 α -hydroxylase の活性は束状層のみに存在すると考えられる. このことより, Aldosterone は球状層よ

り, Cortisol は束網状層より, また Corticosterone は全層より分泌されるものと考えられる. なお, この際 Cholesterol corticosteroidogenic sequence の各段階において TPNH が cofactor として必要⁽³⁰⁻³⁴⁾で, ただ 3β -ol-dehydrogenase のみは DPN を必要とする⁽³⁾ことが知られている. 本実験で用いた DPNH は pyridine nucleotide transhydrogenase の作用を受けて TPNH となり利用されたと考えられ, また ATP の効果は Kornberg⁽³⁵⁾ が認めたように $ATP + DPN \rightarrow TPN$ の反応を介して利用されたと考えられる. 一方, Hechter の Cholesterol corticosteroidogenic sequence によると, Cholesterol が重要な intermediate と目されているが, Acetate および Cholesterol の添加培養を行なった本実験では球および束網状層共に Corticosteroid の著明な産生増加を認めなかった. このことについては ACTH の欠如と言うことが関係しているかも知れず, 基質として加えた Cholesterol が, endogenous cholesterol の metabolic pool に十分はいりえなかったかも知れないことも考慮する必要がある. しかし, さらに Cholesterol を経ないで Corticosterone, Cortisol が産生される可能性も十分考えられる. すなわち, Hechter⁽²⁵⁾らは, 牛副腎灌流実験で, ^{14}C -acetate を基質として灌流したところ, 産生された Cortisol, Corticosterone の specific activity に比較し, 組織中の free Cholesterol, ester Cholesterol や血中 Cholesterol のそれが非常に少ないことを観察している. また, Stone & Hechter⁽³⁶⁾ が ^{14}C -Cholesterol を基質として行なった牛副腎灌流実験では ACTH の投与により, 産生された Corticosteroid の specific activity は19倍も増加するのに比較して, Corticosteroid の産生量は5倍弱しか増加しないことをみている. また ^{14}C -acetate を基質とせる同様の灌流実験では Corticosteroid の specific activity は1.5倍しか示さなかったこと等より, Acetate から Corticosteroid への代謝経路に non-cholesterol route のあることが推定される. また Heard らも Sodium-acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ ⁽⁸⁾ を静脈投与した妊馬尿中に estrogen の specific activity を認めたが, Cholesterol の specific activity は Estrone の1/5にも達しないのをみており, また Cholesterol- $4\text{-}^{14}\text{C}$ 投与例⁽⁹⁾では, 尿中に ^{14}C を検出しなかったこと, ^{14}C -acetate による培養実験⁽⁹⁾で中性 Corticosteroid に specific activity をみだが, ^{14}C -Cholesterol には転化しないと云う結果を得ている. 一方, non-cholesterol route を検討する目的で, 副腎皮質中に存在する intermediate の検討を行なったところ, boiling または dialysis により蛋白を分離した残りの熱に比較的安定な物質で, lyophilize により変化せず, また chloroform ですでに存在する steroidal 物質を除去しても Corticosteroid 産生に活性を示す物質が副腎皮質中にすでに存在することが判明した. boiling に安定で dialysis により容易に透析される物質は酵素でないことは明らかであるが, これが基質として Corticosteroid 産生に関与しているものであるか, あるいは cofactor として関与しているものであるかについては不明である. 十分量の DPNH, ATP の存在下において, 本物質を加えることにより Corticosteroid の生成量が約2倍にまで増加したことは, 本物質が cofactor としてより基質として作用したことを考えさせられる. chloroform で steroidal 物質を除去しても, なお一部活性を示すところより考察すれば, この物質は基質としてのみでなく, cofactor としても一部関与していると考えた方が妥当であるかも知れない. いずれにしても, この物質の分析をすることにより, non-cholesterol route の存在の解明の助けとなるのではないかと考える.

第2編 Androgen, Estrogen 産生に関する問題

第1章 緒 言

Steroid hormone の生合成経路については Fig. 19. に示すような経路が現在のところ, Dorfman らにより推定されており, これらの経路のうち Pregnenolone, Progesterone を通る各経路については徳田⁽⁷⁾らが各種内分泌臓器の培養実験で, また Cholesterol を経ない何らかの経路の存在の可能性については, 前編において述べたが, これらの各 step があらゆる内分泌臓器で同じように証明しうるのでなく, Corticosteroid への経路は副腎で, また Androgen への経路は睾丸および卵巢で, Androgen から Estrogen への経

Fig. 19. Biosynthesis sequence of corticosteroid, androgen and estrogen

路は胎盤で証明可能である。

副腎の培養実験では Pregnenolone, Progesterone より比較的容易に Corticosterone, Cortisol が産生され、睾丸でも同様 Δ^4 -Androstenedione, Testosterone が産生される。また卵巢では、Pregnenolone, Progesterone から estrogen が得られるに比較して、胎盤では estrogen の産生が非常に困難であることと、副腎、睾丸、卵巢では Progesterone を経てそれぞれ Corticosteroid, androgen, estrogen が分泌されるにかかわらず、Progesterone が分泌されず、胎盤の場合にのみ estrogen 生合成の中間代謝産物と考えられる Progesterone が estrogen とともに分泌されることは古くより実験的根拠^{33)~43)}もあり、一般に認められているが、このことの理由に関する実験成績は現在までのところあまりない。このことに関連して近年胎盤における Corticosteroid の産生の可能性が認められる実験成績^{33)~43)~49)}が次々と発表され、DeCourcy,⁴⁴⁾ Stearns⁴⁵⁾ は胎盤における Corticosterone, Cortisol の産生の可能性を主張しているが、Baulieu,⁴⁸⁾ 松葉⁴⁹⁾ は 17-OHCS の産生はないと結論し、胎盤中の 17 α -hydroxylase の存在を否定している。このように、胎盤における 17 α -hydroxylase の存在が胎盤での Progesterone, estrogen の同時分泌に関係するのではないかとの想定のもとに、各種内分泌臓器に Pregnenolone または Progesterone の添加培養実験を行ない興味ある知見を得た。

第2章 牛副腎皮質組織と Pregnenolone, Progesterone 添加培養実験

第1節 実験方法

前編第4章において行なつたと同様の実験すなわち、牛副腎皮質球状層は slice に、束網状層は homogenate にして sodium fumarate (5mM), nicotin amide (5mM), ATP (1mM), DPNH (0.5mM) を含有した 10cc Krebs-Ringer phosphate buffer solution (pH. 7.4) に上記組織 5g と 0.2cc propylen glycol に溶解した Pregnenolone または Progesterone を加えて2時間振とう培養した。

第2節 実験成績

第1項 Pregnenolone 添加培養実験

球状層組織および束網状層組織に Pregnenolone を加えて培養した粗抽出物をそれぞれ benzene-methanol-water system で paper chromatography を行ない Fig. 20. のような結果を得た。すなわち、球状層では Corticosterone の Rf に一致せる紫外線吸収帯を、また束網状層では大量の Δ^4 -3-Ketosteroid を得、その Rf 値は、Corticosterone, Cortisol のそれに一致した。この solvent front の部分をさらに ligroin-methanol-water system で展開を行ない、Fig. 21 のような成績を得た。共に Progesterone のスポットはほとんど認められなかつた。

第2項 Progesterone 添加培養実験

Progesterone を添加培養せる際の benzene-methanol-water system による paper chromatography は Fig. 22. のようで Pregnenolone を添加した時と同様、束網状層で大量の Corticosterone, Cortisol の産生が認められた。

このように副腎皮質束網状層組織では C¹⁷, C³¹, C¹¹ 位の hydroxylation が次々に行なわれる成績を得

Fig. 20. Paper chromatograph of corticosteroid produced by pregnenolone incubation
B₅ system

た。したがって、本実験では副腎における 17α -hydroxylase, 21 -hydroxylase, 11β -hydroxylase の存在を証明するものである。

第3章 卵巢, 睪丸および胎盤組織の ^3H -Progesterone 添加培養実験

第1節 実験方法

Androgen および estrogen の生合成を行なう卵巢, 睪丸および胎盤を ^3H -Progesterone を基質として Fig. 23, 24 のような条件で培養および抽出した。なお, incubation medium 中には nicotin amide, Mg SO_4 , sodium fumarate, ATP, DPNH を加えた。

第2節 実験成績

第1項 人卵巢と ^3H -Progesterone 添加培養実験

正常月経周期の子宮筋腫患者で, 増殖期に手術した際に得た卵巢5gを slice にし, 30cc の incubation medium と共に培養を行なった。粗抽出物について ligroin-methanol-water system により展開を行なった場合の actigraph は Fig. 25のようであり paper chromatography 上, pilot の Testosterone よりやや polar な位置に peak が認められた。この peak の部分のみを溶出し50 γ の Testosterone および pyridine-acetic anhydride (1:1) を加え, 室温にて一昼夜放置し, acetylation を行ない, このものについてふたたび,

ligroin-methanol-water system を用い paper chromatography を行なつたところ Fig. 26 に示すように pilot の 17-hydroxy progesterone に一致して紫外部吸収帯を, また acetyl 化された testosterone acetate は solvent front に紫外部吸収帯を認めた. この actigraph が Fig. 27 に示すようで, pilot の 17-hydroxy progesterone に一致して peak を認め, testosterone acetate 部には peak が認められなかつた. この 17-hydroxy progesterone 部は Fig. 28 に示すように benzen-ligroin-methanol-water system でも 17-

Fig. 21. Paper chromatograph of corticosteroid produced by pregnenolone incubation B_a system

Fig. 22. Paper chromatograph of corticosteroid produced by progesterone incubation B_s system, zona fasciculata-reticularis

Fig. 23. Method of incubation

{ human ovary slice 5g in 30cc Krebs-Ringer phosphate buffer solution pH 7.4
 { rat testis slice 5g in 10cc Krebs-Ringer phosphate buffer solution pH 7.4
 { human placenta minced tissue 20g in 30cc Krebs-Ringer phosphate buffer solution pH 7.4
 or in 0.25M sucrose phosphate buffer solution pH 7.0

← ^3H -progesterone $7 \times 10^6\text{c}/100\text{sec}/10\text{cc}$ medium
 37°C, 3hr. incubation
 gas phase air

extracted with acetone

Fig. 24. Purification of neutral steroid

hydroxy progesterone に一致した peak を得た。その sulfuric acid chromogen spectrum は $290\text{m}\mu$, $430\text{m}\mu$ に吸収の peak を示し、また ultraviolet absorption spectrum でも $240\text{m}\mu$ に peak を示し standard 17-hydroxy progesterone のそれと完全に一致した。かくて Fig. 25 において Testosterone より極性の大きい部に peak を示した物質が 17-hydroxy progesterone であると同定した。

第2項 白鼠辜丸と ^3H -Progesterone 添加培養実験

Human chorionic gonadotropin 投与 (投与量 1日300U 7日間) を受けた Wister 系白鼠辜丸2.5gを slice とし、incubation medium と共に同様の実験を行なった。粗抽出物について ligroin-methanol-water system で展開した actigraph は Fig. 30. のようで、Testosterone および 17-hydroxy progesterone の部

Fig. 25. Actigraph of corticosteroid produced by ^3H -progesterone incubation with ovary

B_a system

分にpeakが認められた。この部を pyridine-acetic anhydride (1:1) で acetyl 化し、再び ligroin-methanol-water system で展開した actigraph は Fig. 31. のようになり、17-hydroxy progesterone に一致して peak を認めると共に、Testosterone acetate 部に軽度の peak を認めた。この 17-hydroxy progesterone の産生は ultraviolet absorption spectrum および sulfuric acid chromogen spectrum で確認した。

第3項 人胎盤と ^3H -Progesterone 添加培養実験

正常妊娠10ヶ月で狭骨盤のために帝王切開術を行なった際に得た人胎盤組織 20g を 30cc の incubation medium と共に培養した。胎盤では incubation medium として Krebs-Ringer phosphate buffer solution および 0.25M sucrose phosphate buffer solution の両者を用いたが、共に Progesterone 部に添加せる ^3H -Progesterone の peak を認めるのみで、他の部に peak は認められなかった。Fig. 32. は sucrose phosphate buffer solution で培養し、ligroin-methanol-water system で展開した actigraph である。17-hydroxy progesterone の産生を認めることが分来なかった。また天津の方法で抽出した phenolic fraction の ligroin-benzen-methanol-water system による展開の actigraph にも何ら

Fig. 26. Paper chromatograph of 17-hydroxy progesterone and testosterone acetate after acetylation by pyridine-acetic anhydride B_a system

Fig. 27. Actigraph of 17-hydroxy progesterone and testosterone acetate after acetylation by pyridine-acetic anhydride B_a system

Fig. 28. Actigraph of 17-hydroxy progesterone and testosterone acetate after acylation by pyridine-acetic anhydride B_2 system

Fig. 29. Sulfuric acid chromogen spectrum and ultraviolet absorption spectrum of 17-hydroxyprogesterone produced by 3H -progesterone incubation with human ovary

Fig. 30. Actigraph of corticosteroid produced by 3H -progesterone incubation with rat testis B_2 system

Fig. 31. Actigraph of 17-hydroxy progesterone and testosterone acetate after acetylation by pyridine-acetic anhydride.

B_a system

Fig. 32. Actigraph of corticosteroid produced by ³H-progesterone incubation with human placenta.

B_a system

の peak も認めなかつた。

以上のようにして、卵巣および睾丸では、17 α -hydroxylase の存在を明らかに証明し得たに反し、胎盤中には 17 α -hydroxylase の存在する所見は得られなかつた。

第4章 総括、考按ならびに結論

卵巣から estrogen が分泌されることは以前より明白な事実と考えられているが、その生合成に関しては Testosterone および他の androgen を人に投与した場合、estrogen 様作用のある物質が排泄^{50)~55)}され、それが Estrone, Estradiol, Estriol である⁵⁶⁾ことがわかり、19-carbon steroid から phenolic estrogen に変換される可能性が示された。

Baggett & Engel⁵⁷⁾ は人卵巣と Testosterone-3-¹⁴C の培養実験で ¹⁴C-estradiol-17 β の産生を認め、これを実証した。

一方、睾丸における androgen の生合成に関しては radioactive な Progesterone と睾丸組織との培養実験により、Lynn,⁵⁸⁾⁵⁹⁾ Slaunwhite & Samuels⁶⁰⁾ は白鼠、牛、豚などの睾丸で progesterone→17-hydroxy progesterone→androstenedione→testosterone の生合成経路を認め、androgen 生合成の主経路であると主張しており、また Viscelli⁶¹⁾ ら、Savard⁶²⁾ らも人卵巣において同様の生合成経路を認めている。

成人の睪丸中には少量の Estrone および Estradiol が Goldzieher⁶³⁾ らにより認められ, Zondek⁶⁴⁾⁶⁵⁾ により Stallion 睪丸組織中には相当量の estrogenic activity の存在するのを認め Beall⁶⁶⁾ は Estrone, Estradiol を分離した. Nyman⁶⁷⁾ らは sodium acetate-1-¹⁴C の Stallion の灌流実験で, 睪丸組織および血清中に radioactive Estrone および Estradiol を検出し, 睪丸組織でも estrogen が産生されることを認めた.

Solomon⁶⁸⁾ らは牛卵巢で androgen の前駆物質である Progesterone より 17 α -hydroxyprogesterone, Δ^4 -androstenedione への転換を認め, 卵巢においても Cholesterol $\rightarrow$ progesterone $\rightarrow$ 17 α -hydroxy progesterone $\rightarrow$ androstenedione (testosterone) $\rightarrow$ estradiol の生合成経路の存在を考えた. Kase⁶⁹⁾ らは人卵巢homogenate と 7-³H-progesterone および ¹⁴C-17 α -hydroxy progesterone との培養実験で, Testosterone, Androstenedione を分離し, Warren⁷⁰⁾ らも, 人卵巢と Progesterone-4-¹⁴C との培養実験で, estrogen の中間代謝産物と考えられる 17 α -hydroxy progesterone, Androstenedione を分離した. これに反し Lanthier and Sandor は Pregnenolone との培養実験で, Progesterone, 17 α -hydroxy progesterone の産生を証明したが, Δ^4 -androstenedione は認められなかつたと報告している. しかし最近 Ryan⁷¹⁾⁷²⁾⁷³⁾ らは人卵巢における estrogen 生合成の系統的研究を行ない, この経路の存在する可能性を十分実証しようような data を発表している. また Short⁷⁴⁾ は卵胞液および黄体組織よりの Steroid の抽出実験より卵巢の Steroid 生合成に関して “two cell type” 説を唱えている.

胎盤においては progesterone および estrogen が同時に分泌されていることは明白なことである. Progesterone の生合成については Samuels⁷⁵⁾ らは白鼠胎盤で Nissum & Robson⁷⁶⁾ は牛胎盤で Pregnenolone と共に培養し, 主要産物として Progesetone を得て Δ^5 -Pregnenolone $\rightarrow$ Progesterone なる経路を確認した. 人胎盤では Pearlman⁷⁹⁾ らにより同様の経路が確認された. 一方 estrogen の生合成に関しては Heard & O'Donnell⁸⁰⁾ により radioactive Cholesterol を妊馬に投与したところ尿中に radioactive Estrone が排泄されるという報告があり, その後, in vitro でも Meyer,⁸¹⁾ Longchamps⁸²⁾ らは人胎盤で androgen から phenolic estrogen への aromatization が起こることを認め, Ryan⁸³⁾ らも猿胎盤で, 同様の成績を得ており, 胎盤においても卵巢, 睪丸における同様の cholesterol $\rightarrow$ pregnenolone $\rightarrow$ progesterone $\rightarrow$ Δ^4 -androstenedione $\rightarrow$ estrone なる生合成経路の存在が想像されるが, 一方人胎盤の培養実験で Ryan⁸⁴⁾ は Δ^4 -androstenedione, Testosterone, Dehydroepiandrosterone のような androgenic steroid から Estrone への変換を認めたが Progesterone, 17 α -hydroxy progesterone および adrenal steroid (pregnenolone, 17 α -hydroxy pregnenolone, cortisol 等) から estrogen への変換は認めることが出来なかつたと報告している. また, 胎盤における Corticosteroid 産生の可能性に関する研究においては古くは妊娠中における glucocorticosteroid の尿中排泄の著明な増加は副腎皮質機能の亢進と共に, 胎児副腎および胎盤における Corticosteroid 産生に由来すると Venning⁸⁵⁾ は報告したが, 彼女⁸⁶⁾は胎盤抽出物に副腎皮質作用を liver glycogen deposition test ではこれを証明することが出来なかつた. その後 Johnson⁸⁷⁾ ら, Damian らは glucocorticosteroid 作用のあることを証明した. また DeCourcy⁴⁴⁾ ら, Stämmler も胎盤抽出物に cortisol, cortisone と同一の Rf 値を有する steroid を分離し, 胎盤における Corticosteroid 産生の可能性を主張した. また Little & Rossi⁸⁸⁾ は人胎盤での培養実験で Porter-Silber chromogen 反応物質としての 17-hydroxy corticosteroid の生合成を, そしてその後, Little & Shaw⁸⁹⁾ は Progesterone-4-¹⁴C との培養実験で 17-hydroxy progesterone の産生を人胎盤の soluble fraction に認めた. これに対し Baulier⁴⁸⁾ らは Addison 氏病患者の妊娠例についての研究結果では, 胎盤における 17-hydroxy corticosteroid の産生を認めなかつた. Cohen⁹⁰⁾ らは Cushing's syndrom のため, 副腎摘除を行なつた妊娠婦人の尿中 Cortisol, Cortisone, Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortisone を測定した結果, 胎盤, 胎児副腎より 17-hydroxy corticosteroid の産生が認められるような結果を得ることは出来なかつた. 松葉⁴⁹⁾ も犬妊娠子宮での Progesterone 灌流実験および胎盤絨毛と Progesterone の培養では 17-hydroxy corticosteroid の増加が認められなかつたと報告し, これらと DeCourcy らの間には胎盤における 17 α -hydroxylase の存否をめぐって完全に相入れない逆の結果である.

私が行なつた ³H-Progesterone と人胎盤組織との培養実験では 17-hydroxy progesterone および pheno-

lic estrogen の産生を証明し得なかつた。ただ、この際用いたかかる actigraph 法で明らかな peak を得るためには相当量の radioactivity を必要とするために胎盤における 17α -hydroxylase の存在を早急に否定することは出来ないが、この酵素の存在が他の臓器に比してはるかに少ないことは明らかである。胎盤には 17α -hydroxylase がなく、睾丸や卵巣で行なわれる estrogen 生合成経路が、胎盤では存在しないのではないかと言う可能性の証拠を提供するものである。副腎皮質では Cholesterol corticosteroidgenic sequence において Pregnenolone, Progesterone は Corticosteroid 産生への中間産物であり、終末産物ではなく血中への分泌は起らない。胎盤でも同様に Progesterone が estrogen 産生への中間産物であるならば、血中への分泌がないのが当然である。ところが胎盤では Progesterone および estrogen が分泌されており、共に終末産物であると考えられる。このことと 17α -hydroxylase の存在の可能性が少ないであろうことと考え合わせれば、胎盤における estrogen の産生は Burstein & Dorfman⁹⁾ が adrenal adenoma の virilized woman で想像したように Pregnenolone, Progesterone を経ずして Cholesterol より直接 19-carbon steroid すなわち Dehydroepiandrosterone を経て産生されるか Acetate または他の物質より産生される新しい経路が存在するのではないかと考えられる。

稿を終るに当たり、終始御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜わった恩師、徳田源市教授に深謝するとともに、貴重な御助言、御鞭撻を賜わった教室諸学兄、ことに岡田弘二博士に深く感謝する。なお、本論文の要旨は第34回、第35回日本内分泌学会総会、第10回日本内分泌学会西日本地方会において発表した。

参 考 文 献

- 1) STEIGER, M. and T. REICHSTEIN : Nature, 139 : 925, (1937).
- 2) TAIT, J.F. et al : Lancet, 269 : 122, (1952).
- 3) TAIT, J.F. et al : Nature, 169 : 795, (1952).
- 4) SIMPSON, S.A. et al : Experientia, 10 : 132, (1954).
- 5) HECHTER, O. and G. PINCUS : Physiol. Review., 34 : 459, (1954).
- 6) HAYANO, M. et al : Recent Progress in Hormone Research, 12 : 79, (1956).
- 7) HAYANO, et al : Rec. Prog. Horm. Res., 12 : 118, (1956).
- 8) HEARD, R.D.H. et al : Rec. Prog. Horm. Res., 9 : 383, (1954).
- 9) HEARD, R.D.H. & V.J. O'DONNELL : Endocrinol., 54 : 209, (1954).
- 10) 徳田源市, 岡田弘二 : 日本臨床, 20 : 2364, (1962).
- 11) DEANE, H. W. & R.O. GREEP : Endocrinol., 40 : 417, (1947).
- 12) BUSH, J.E. : Biochem. J., 50 : 370, (1952).
- 13) ZAFFARONI, A. : Rec. Prog. Horm. Res., 8 : 51, (1953).
- 14) BURTON, R.B., A. ZAFFARONI and E.H. KEUTMANN : J. Biol. Chem., 188 : 763, (1951).
- 15) PORTER C.C. & R. H. SILBER : J. Biol. Chem., 185 : 201, (1950).
- 16) NOWACZYNSKI, W.J. et al : Can. J. Biochem. Physiol., 35 : 425, (1957).
- 17) WEICHSELBAUM, J.E. & H.W. MARGRAF : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17 : 959, (1957).
- 18) SOMMERVILLE, I.F. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17 : 317, (1957).
- 19) ZIMMERMANN, W. : Z. Physiol. Chemie., 233 : 257, (1935).
- 20) VESTLING, C.S. & G.F. LATA : Science, 113 : 582, (1951).
- 21) SWANN, H.G. : Physiol. Rev., 20 : 493, (1940).
- 22) O'DONNELL, W.M., S. FAJANS & J.G. WEINBAUM : A.M.A. Arch. Int. Med., 88 : 28, (1951).
- 23) HECHTER, O. : Cholesterol, 309 : Academic Press, (1958).
- 24) 赤須文男 : 第7回日本産科婦人科学会総会, 宿題報告, (1955).
- 25) HECHTER, O., M.M. SOLOMON, A. ZAFFARONI & G. PINCUS : Arch. Biochem. Biophys., 46 : 201, (1953).
- 26) ARNOLD, J. : Virchows Arch., 35 : 64, (1866).
- 27) GREEP, R.O. & H.W. DEANE : Endocrinol., 40 : 417, (1947).
- 28) DEANE, H.W. & R.O. GREEP : Am. J. Anat., 79 : 117, (1946).
- 29) SAMUELS, L.T. et al : Science, 113 : 490, (1951).
- 30) RYAN, K.J. & L.L. ENGEL : J. Am. Chem. Soc., 78 : 2654, (1956).
- 31) SWEAT, M.L. & M.D. LIPSCOMB : J. Am. Chem. Soc., 77 : 5185, (1955).
- 32) SWEAT, M.L. : Fed. Proc., 15 : 369, (1956).
- 33) GRANT, J.K. &

- K. MONGKOLKUL : *Biochem. J.*, 69 : 36p, (1958). 34) GRANT, J.K. : *Biochem. J.*, 64 : 559, (1956). 35) KARNBERG, A. : *J. Biol. Chem.*, 182 : 805, (1950). 36) STONE, D. & O. HECHTER : *Arch. Biochem. Biophys.*, 51 : 457, (1954). 37) 徳田源市 : 第34回日本内分泌学会総会発表, (1961).
- 38) SALHANICK, H.A. et al : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 16 : 1120, (1956). 39) ZANDER, J. : *Klin. Wshr.*, 33 : 697, (1955). 40) ZANDER, J. : *Nature*, 174 : 406, (1954). 41) 前山昌男 : *日産婦誌*, 5 : 1243, (1953). 42) BROWNE et al : *Am. J. Obst.*, 38 : 927, (1939). 43) 石塚直隆 : *日産婦誌*, 9 : 907, (1957). 44) DECOURCY, G. et al : *Nature*, 170 : 494, (1952).
- 45) JOHNSON, R.H. & W.J. HAINES : *Science*, 116 : 456, (1952). 46) 鈴木基一 : *日産婦誌*, 10 : 1679, (1958). 47) 滝川秀夫 : *日産婦誌*, 10 : 1659, (1958). 48) BAULIER, E.E. et al : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 16 : 690, (1956). 49) 松葉三千夫 : *最新医学*, 12 : 1170, (1957). 50) STEINACH, E. & H. KUN : *Lancet*, 2 : 845, (1937). 51) CALLOW, N.H., R.K. CALLOW & C.W. EMMENS : *J. Endocrinol.*, 1 : 99, (1939). 52) DORFMAN, R.I. & J.B. HAMILTON : *Endocrinol.*, 25 : 33, (1939). 53) HOSKINS, W.H., J.R. COFFMAN, F.C. KOCH & A.T. KEUYON : *Endocrinol.*, 24 : 702, (1939). 54) NATHANSON, I.T. & L.E. TOWNE : *Endocrinol.*, 25 : 754, (1939). 55) FOSS, G.L. : *Lancet*, 1 : 502, (1939). 56) NATHANSON, I.T. et al : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 12 : 1172, (1952). 57) BAGGETT, B. & L.L. ENGEL : *J. Biol. Chem.*, 221 : 931, (1956). 58) LYNN, W.S. Jr. : *Fed. Proc.*, 15 : 305, (1956). 59) LYNN, W.S. Jr. & R.H. BROWN : *J. Biol. Chem.*, 232 : 1015, (1958). 60) SLAUNWHITE, W.R. Jr. & L.T. SAMUELS : *J. Biol. Chem.*, 220 : 341, (1956). 61) VISCELLI, T.A., M.E. LOMBARDO & P.B. HUDSON : *Fed. Proc.*, 16 : 335, (1957). 62) SAVARD, K. et al : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 16 : 1629, (1956). 63) GOLDZIEHER, J.W. & I.S. ROBERTS : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 12 : 143, (1952). 64) ZONDEK, B. : *Nature*, 133 : 209, (1934). 65) ZONDEK, B. : *Nature*, 133 : 494, (1934). 66) BEALL, D. : *Biochem. J.*, 34 : 1293, (1940). 67) NYMAN, M.A., J. GEIGER & J.W. GOLDZIEHER : *J. Biol. Chem.*, 234 : 16, (1959). 68) SOLOMON, S., R.V. WIELE & S. LIEBERMAN : *J. Am. Chem. Soc.*, 78 : 5453, (1956). 69) KASE, N., E. FORCHIELLI & R.I. DORFMAN : *Acta Endocrinol.*, 37 : 19, (1961). 70) WARREN, J.C. & H.A. SALHANANICK : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 21 : 1218, (1961). 71) RYAN, K.J. & O.W. SMITH : *J. Biol. Chem.*, 236 : 705, (1961). 72) RYAN, K.J. & O.W. SMITH : *J. Biol. Chem.*, 236 : 710, (1961). 73) RYAN, K.J. & O.W. SMITH : *J. Biol. Chem.*, 236 : 2204, (1961). 74) RYAN, K.J. & O.W. SMITH : *J. Biol. Chem.*, 236 : 2207, (1961). 75) SMITH, O.W. & K.J. RYAN : *Endocrinol.*, 69 : 970, (1961). 76) SHORT, R.U. : *J. Endocrinol.*, 24 : 59, (1962). 77) SAMUELS, L.T. et al : *Science*, 113 : 490, (1950). 78) NISSUM, J.A. & J.M. ROBSON : *J. Endocrinol.*, 8 : 329, (1952). 79) PEARLMAN, W.H., E. CERCESE & M. THOMAS : *J. Biol. Chem.*, 208 : 231, (1954). 80) HEARD, R.D.H. & V.I. O'DONNELL : *Endocrinol.*, 54 : 209, (1954). 81) MEYER, A.S. : *Biochem. et Biophys. Acta.*, 17 : 44, (1955). 82) LONGCHAMPT, J.E. et al : *Endocrinol.*, 66 : 416, (1960). 83) RYAN, K.J., K. BENISSCHEKE & O.W. SMITH : *Endocrinol.*, 69 : 613, (1961). 84) RYAN, K.J. : *J. Biol. Chem.*, 234 : 268, (1959). 85) VENNING, E.H. : *Endocrinol.*, 39 : 203, (1946). 86) VENNING, E.H. et al : *Endocrinol.*, 45 : 430, (1949). 87) JOHNSON, R.H. & W.J. HAINES : *Science*, 116 : 456, (1952). 88) LITTLE, B. & E. ROSSI : *Endocrinol.*, 61 : 109, (1957). 89) LITTLE, B. & A. SHAW : *Acta Endocrinol.*, 36 : 455, (1961). 90) COHEN, M. et al : *J. Clin. Endocrinol. and Metab.*, 18 : 1076, (1958). 91) BURSTEIN, S. & R.I. DORFMAN : *Acta Endocrinol.*, 40 : 188, (1962).