Experimental Studies on the Mechanism of the Adrenocortical Suppression by Steroid Treatment

Hirosuke HOSHINO

The Second Department of Internal Medicine, Tokyo Medical and Dental University,
School of Medicine, Tokyo, Japan. (Director : Professor Shigeyoshi Ohbuchi. M.D.)

Recently, steroidhormones are used for the treatment of various diseases in large doses and for a long period.

The problem of suppression of adrenocortical function in these cases required increasing attention to it as an iatrogenic disorder.

Investigation of the mechanism of adrenocortical suppression under the long term steroid treatment was contemplated with the expectation that this study will be beneficial to devise the clinical methods of prevention of adrenocortical suppression in these clinical cases.

Materials and Methods

Adult male rabbits were divided into four groups: an intact normal group, prednisolone treated group (1.5 mg/kg of body weight daily for four weeks), group of rabbits received two weeks loading of ACTH (10 international units, daily) and group received four days loading of ACTH (20 international units, daily).

After these treatments, the amount of adrenal DNA and RNA components and mononucleotides were measured. Namely, two hours after intramuscular injection of four millicuries of ^{32}P -orthophosphate, adrenal DNA and RNA were extracted by Schmidt-Thannhauser's method and the amounts were measured by Burton's method or Schneider's method respectively.

The method of separation of mononucleotides (UMP, GMP, CMP and AMP) was employed according to Katz's method, and furthermore A3'P and A5'P fractions were separated by paperchromatography and radioactivities of each fraction were measured with a paperscanner.

Results

There was no significant difference in the amonut of adrenal DNA among the four groups.

The RNA content of the adrenal glands was decreased in prednisolone treated group. On the contrary, increase in the specific activities of ^{32}P -incorporation into the adrenal RNA and nucleotides (especially into A3'P) of this group was observed.

The RNA content of the adrenal glands was increased in both groups of two-week and

four-day ACTH administration.

The specific activities of ^{32}P -incorporation into the adrenal RNA was increased by four-day administration of ACTH. But, the specific activities into RNA appeared to be decreased by two-week administration of ACTH.

On the other hand, in the group of two-week ACTH administration, the decrease in A3'P specific activity and increase in A5'P specific activity were observed. In the group of four-day ACTH administration, the increases in both A3'P and A5'P specific activities were shown.

Discussion and conclusion

It has been suggested from the data of decrease in RNA content and increase in RNA specific activity in prednisolone treated group, that the rate of adrenal RNA synthesis and the turnover rate of adrenal RNA were increased in the corticosteroid treated adrenal, and that the rate of breakdown of adrenal RNA is accelerated by inhibition of ACTH secretion.

Then, from the data of decrease in A5'P specific activity, it has been thought that the precursor of RNA was suppressed in the RNA synthesis by the decrease in ACTH secretion or by direct action of predonisolone to adrenal gland.

In the next, from the data of the difference of the incorporation of ^{33}P -orthophosphate between the group of two-week and four-day ACTH administration, it is suggested that ACTH act upon the synthesis and degradation of adrenal PNA, and the endogenous corticosteroid increased by ACTH is connected with degradation of adrenal RNA.

The action of ACTH to the adrenal RNA would rather concern with the inhibition of RNA degradation than with the rate of synthesis. (pp. 781~793)

副腎皮質機能不全に関する実験的研究

—合成ステロイドホルモンあるいは ACTH 短期ならびに
長期使用時のウサギ副腎の変動について—

東京医科歯科大学医学部内科学第2講座（指導 大淵重敬教授）

星 野 弘 弼

（昭和43年1月19日受付）

ウサギを用いてプレドニゾロン長期大量投与群と ACTH 長期及び短期投与群をつくり、その副腎内 RNA えの変動を、 ^{32}P の副腎内 RNA えの取り込み、モノヌクレオチドの分画、とくにアデニール酸 (A3P) の比放射能等を、正常群のそれと比較し、副腎機能低下時に、 ^{32}P -RNA 比放射能の増加を認め、又核酸前駆物質の合成障害を認めた。ACTH 使用群では、短期、長期群に ^{32}P -RNA 比放射能の差異を認め、RNA 分解の抑制を認めた。

緒 言

Hench や Kendal により¹⁾、関節リウマチに対して、コルチゾンが使用され、劇的な効果が示されて以来、各種副腎皮質ホルモンが多くの疾患に用いられ、すぐれた治療効果があげられてきた。一方それに伴って、それらの副腎皮質ホルモン投与によるいろいろな副作用が認められ、それに対する対策も数多くおこなわれてきている。しかし、その中でも、特に問題となるのは、副腎皮質ホルモン長期投与によつてもたらされる副腎皮質機能不全であろう。副腎皮質ホルモン投与時に副腎皮質機能低下が何故発生するかに関しては、視床下部—脳下垂体—副腎皮質の間の negative feedback mechanism によつて一応は説明されている^{2)~14)}。即ち、外来性の合成ステロイドホルモンの長期投与が、視床下部 (CRF)—脳下垂体前葉 (ACTH) の分泌を抑制し、その結果副腎皮質機能不全が発生すると考えられている。ところで ACTH の副腎皮質に対する作用としては、1957年 Haynes および Berthet による副腎皮質フォスホリラーゼ活性化説があり¹⁵⁾¹⁶⁾、ホルモンの作用機序として、酵素化学的に説明した興味あるものであるが、その説に対しては、その後、多くの賛成論¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、反対論^{20)~24)}が続出し、議論の的となつている。しかし、この時点においてはまだ ACTH が副腎内核酸や蛋白質に及ぼす影響に関しては何等ふれていない。

一方、副腎皮質ホルモン大量投与時の副腎皮質萎縮を形態学的変化からながめたものとして、1951年 O'Donnel の報告がある²⁵⁾。彼は副腎重量の低下及び副腎皮質層、特に束状帯の変性萎縮を指摘している。Winter はコルチゾン投与により、ラットにおける副腎重量の著減を報告している²⁶⁾、その後 Salassa も剖検例について、コルチゾン使用患者の副腎重量の減少を報告している²⁷⁾。このように、副腎皮質ホルモン投与時に副腎皮質が萎縮を来している際に、ACTH 分泌が抑制されていることに関しては、Farrel を初め多くの報告がみられ³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、いずれも外来性副腎皮質ホルモンが、ACTH の分泌を抑制し、副腎皮質萎縮を招来するものと考えられている。しかし1964年、笹野は、副腎皮質ホルモン療法による副腎皮質萎縮がリポイドの減少を伴う変性萎縮ではあるが、選択的萎縮から汎皮質萎縮まで色々の形をとり、下垂体前葉機能不全時における副腎萎縮とは異なることを報告し、前者の場合、副腎皮質ホルモンによる副腎皮質への直接的組織障害が加わるためであろうとのべている²⁸⁾。以上のような研究から、副腎におけるステロイドホルモン合成に対する ACTH の作用機序、ACTH 不足による副腎萎縮、副腎皮質ホルモン投与時の副腎萎

縮に対する形態的相違については一応の説明がなされているが、さらに根本的な問題として、副腎皮質ホルモン投与時にみられる副腎皮質機能の不全と、副腎皮質の組織学的な萎縮との関係を説明するものは与えられていない。これらの問題の解決の糸口としては、副腎における核酸及び蛋白合成の関与を考慮せざるを得ない。

副腎の核酸合成、蛋白合成に関する研究は主に、ACTH の作用機序との関連に始まり、1962年、Ferguson の報告以来²⁹⁾³⁰⁾、in vivo, in vitro とともに多くの報告がみられる^{31)~38)}。一般には、ACTH 投与による直接的な副腎皮質ホルモン産生増加に対しては、新しい RNA 合成を介さないとされている。一方、ACTH 長期投与に際して副腎肥大に関しては、1965年に Imrie の研究が注目されている³⁹⁾。すなわち ACTH 長期投与により副腎内 RNA 量及び RNA 濃度の増加を認め、同時に副腎内 RNA に摂取される ³²P の比放射能が低下していることから ACTH の作用機序として、副腎内 RNA の分解抑制を報告している。

他方副腎皮質ホルモン投与時における副腎の核酸合成や蛋白合成に関する研究は比較的少ない。わずかに、副腎皮質ホルモン投与時の副腎 RNA 量及びその濃度が、正常人のそれよりも著明に低下していることを、1964年 Bransame が報告しているが⁴⁰⁾、副腎萎縮の状態における RNA 合成及び分解の動態にふれた文献はみられない。このような考え方から副腎萎縮の発生が、いかなる機序によつておこるかを解明するためには、まず副腎皮質機能低下時における副腎内 RNA の動態が、いかなる状態にあるかを知る必要があり、それが ACTH 作用の不足ということのみで解明しうるかどうかを検討しなければならない。さらに、1967年、一井がのべているように⁴¹⁾、³H-コルチコステロンを腹腔内に与えた場合、肝臓、腎臓について副腎内における比放射能が高いことを考え合わせ、投与した副腎皮質ホルモンの副腎に対する直接的影響が、存在するかどうか問題とされねばならない。

そこで副腎皮質機能低下時における RNA の動態をさぐることに意味あるものと考え、正常群および ACTH 長期あるいは短期投与群と比較を行ないながら、家兎に副腎皮質ホルモンを長期大量に投与した際の副腎内 RNA 量及び濃度の変動を追求し、さらに ³²P-orthophosphate を用いての RNA 比放射能測定のみならず、副腎内 RNA から、アデニール酸を取り出し、アデノシン-3 磷酸及びアデノシン-5 磷酸に分けてそれぞれの比放射能を求めることにより、副腎皮質ホルモン大量投与による副腎皮質機能低下時の RNA 合成、及び、核酸前駆物質の合成に関して追求した結果 2、3 の知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物および実験群

実験開始時、1.9~2.1kg. の雄家兎を用い、以下の4群を作製した。これらの家兎は、同一条件下に飼育をおこなった。

- a) 正常群：前記条件の家兎を他の実験群とともに、4週間飼育した。飼料に関しては制限を加えず充分に与えた。
- b) ACTH 長期投与群：一匹当り ACTH-Z (オルガノン・第一) 10単位を2週間連日筋注した。
- c) ACTH 短期投与群：一匹当り ACTH-Z 20単位を4日間筋注し、4日目注射後4時間のものを使用した。
- d) 副腎皮質ホルモン長期投与群：プレドニゾロン (アーマー) を生理食塩水にて1mg/cc. の割合に溶解し、これを一匹当り一日1.5mg/kg ずつ同じく4週間連日筋注した。これらの処置を施した各群について以下の実験を行なった。

2. 副腎内 DNA 量、RNA 量および蛋白量の比較

正常群、ACTH 長期投与群、副腎皮質ホルモン長期投与群の3群の家兎について、それぞれネブタール2.5~3.0ccの耳静脈注射により麻酔後開腹して両側副腎を摘出した。その重量を、トーション・バランスにて測定後、テフロンホモジナイザーを用いて、五倍量の水とともにホモジネートとし直ちに氷冷し、これを Schmidt-Thannhauser の方法に従い⁴²⁾、RNA 分画、DNA 分画及び蛋白分画に分離した。すなわ

ち、前記の20%ホモジネートに 10% TCA 5cc. を加えて遠沈しこれを3回くりかえした。次に、この沈澱物を1ccの水に溶解し、4ccのエタノールで2回、また5ccのエタノール・エーテル(1:1)で2回洗滌して、リン脂質を除去した。この沈澱物100mg当り1ccの 1N・KOH を加え、37°Cで18時間インキュベーション後、6N・塩酸で中和し、さらに 20% TCA を加えてその終濃度が5%となるように、調整した。これを遠沈し、その上清と、さらに沈澱物を再度 5% TCA にて洗滌、遠沈したものの上清を加えて RNA 分画として使用した。次に、その沈澱物に 5% TCA 5cc. を加えて溶解し、95°Cで15分煮沸後遠沈し、さらに沈澱物を 5% TCA で洗い、その上清を DNA 分画とした。而してそのその残りの沈澱物を蛋白分画とした。なお、RNA の測定には、Schneider 法⁴³⁾⁴⁴⁾を用い、また、DNA 量は Burton 法⁴⁵⁾によつて測定し、蛋白量測定は、Lowry 法の変法⁴⁶⁾でおこなつた。純品としては、RNA (シグマ) および DNA (シグマ) を用い、また蛋白はアルブミン溶解液を用いた。

3. ³²P 筋注2時間後における副腎内放射能の測定

2. と同じ3群について ³²p として carrier-free [³²P] orthophosphate (Radiochemical Center) を用い、これを生理食塩水で 2.0mc./cc. の割に稀釈して、一匹当りその 2cc (4mc.) を筋注した。注射後2時間たつてから、前期の方法と同様に、ネンブータルで麻酔後開腹して副腎をとりだし、副腎重量測定後、蒸留水にて20%ホモジネートを作り、その 1cc を試料皿にとつて乾燥後 2 π -Gasflow counter にて放射能を測定し、総放射能および比放射能を算出した。なお、その放射能は半対数表による半減期グラフにより補正してある。

4. ³²P 筋注2時間後における副腎 RNA の比放射能の測定

前期3群のほかに、ACTH 短期投与群を加えた4群について、前実験の際と全く同様に ³²P-orthophosphate 4mc. ずつ筋注し、同様に副腎摘出後 Schmidt-Thannhauser 法にて RNA 分画を抽出し、さらに Schneider 法にて測定した。また RNA 分画の ³²p 放射能は、RNA 分画 2cc を乾燥後、2 π -Gasflow counter にて測定し、やはり半対数表による半減期グラフにより補正後 RNA 内総放射能および比放射能を算出した。

5. ³²P 筋注2時間後の副腎 RNA よりのモノヌクレオチド、特に A3'P 及び A5'P の比放射能測定

各群の作成は、上記と同じ4群であるが、今回は、一匹当り 5mc. の ³²p を筋注した。注射後2時間後副腎をとり出し、各群毎に副腎を集めて、1群が 1gm. になるように調整した。これを水にて10倍ホモジネートとして 1N・KOH 10cc. を加え、37°Cで18時間インキュベーションを行なつた。その後 11N・過クロール酸で中和後、遠沈して上清をとり、これを 70% PCA にて終濃度 0.5N となるように調整し、これを、1N・KOH にて中和遠沈後、上清を取り出し、冷凍乾燥を行なつた。乾燥凍結後、5ccの水に溶かし、遠沈してその上清をヌクレオチドとして使用した。このヌクレオチド調整後、これを Katz の方法に従つて⁴⁷⁾、Dowex 50-H⁺ カラム (内径0.9×5cm, 200~400メッシュ, 4times cross-linked) を用いて、UMP, GMP および AMP+CMP の各分画に分離し、更に Dowex-1-formate カラム (内径0.9×3cm, 200~400メッシュ, 8times cross-linked) を用いて CMP と AMP を分離した。なお、Dowex-1-formate type の作製は、Potter の方法に従つて行なつた⁴⁸⁾。次に、溶出された AMP 30cc. を Katz の記載の如く、試料1ccあたり3mgの charcoal を用いて吸着させ、これをグラスフィルターを用いて1%アンモニア・50%エタノール 5cc に溶出した。これをエバポレーターにて40°Cで減圧乾固し、少量のエタノールに溶いてペーパークロマトグラフに展開した。ペーパーは東洋濾紙 NO. 51A を用い、展開液は、イソ酪酸:アンモニア:水=66:66:1:33を用い、下降法で30時間展開した⁴⁹⁾。なお純品には、A'3P と A5'P をそれぞれ 50 μ g ずつ伴走させ、紫外線検出計で各スポットを確認した後、それぞれを紫外線スキャナー及びペーパースキャナーで測定し、ヌクレオチド量及び ³²p 放射能を計測した。なお UMP, GMP, CMP の各モノヌクレオチドについても Schneider 法で RNA 量を測定し、2 π -Gas-flow counter で ³²p 放射能を測定して、それぞれを比較、検討した。

なを紫外線スキャナーは DENSICORD, Recording Electrophoresis Densitometer PHOTOVOLT,

CORP, N.Y. city, 一方ペーパースカンナーは PACKARD の Radiochromatogram Scannar, model 7200 (Illinois) を、用いた。

実験成績

1) 各群における家兔副腎重量, DNA 量, RNA 量及び蛋白量の比較

まず副腎重量に関しては Table 1 の如く, ACTH 長期使用群では有意差をもつて正常群より高く ($P <$

Table 1. Adrenal weight DNA, RNA and protein content in each group

Group	Normal	Prednisolone	ACTH 2 Weeks
Adrenal weight (mg.)	256±21 (9)*	185±13 (9)	315±29 (5)
DNA Content (μg.)	920±195 (4)	695±130 (4)	914±203 (5)
DNA concentration (μg./mg.)	3.1±0.7 (4)	3.0±0.8 (4)	2.9±0.7 (5)
RNA Content (μg.)	1800±170 (13)	1200±120 (10)	2700±260 (5)
RNA concentration (μg./mg.)	7.3±0.4 (13)	6.0±0.4 (10)	8.4±0.5 (5)
Total proein (μg.)	14800±1900 (4)	8300±600 (4)	17780±2,100 (4)

Table 1. Ten i.u. of zinc-stabilized ACTH were injected intramuscularly into the rabbits of ACTH group for two weeks and 3mg of prednisolone subcutaneously into the rabbits of prednisolone group for four weeks. The each pair of adrenal obtained from each rabbit was homogenized in one ml of water per 100mg wet weight of sample. Schmidt-Thannhauser's method was employed for the fractionation of RNA, DNA and protein. For the measurement of RNA, DNA and protein, Schneider's method, Burton's method, and Lowry's method were used respectively. Results were shown by mean standard error with tested number of rabbits cited in parenthesis.

0.05), プレドニゾロン群は正常群より有意差をもつて低値であつた。 ($P < 0.02$)

DNA 量に於ては, プレドニゾロン群では, 正常群と比較して低値であつたが推計学的に有意ではなかつた。また副腎重量に対する濃度についても両者に有意差を認めなかつた。

RNA 量に関しては, プレドニゾロン群では正常群より有意差をもつて低値であり ($P < 0.01$) 一方 ACTH 長期投与群では, 有意差をもつて高値であつた ($P < 0.01$)。

RNA 濃度に関しては, プレドニゾロン群は正常群より低値ではあつたが有意ではなく ($P < 0.1$) 一方 ACTH 長期投与群では高値を示しているが有意差があるとはいへなかつた ($0.3 < P < 0.2$)。

次に蛋白量では, プレドニゾロン群は有意差を示し低値であつた ($P < 0.05$) これらの成績のうち, 特に有意差を示した副腎重量, RNA 量及び RNA 濃度を Fig. 1 に図示した。

2) 副腎内 ^{32}P -orthophosphate の取り込み

ACTH 長期投与群, プレドニゾロン群, 正常群 3 群における ^{32}P -orthophosphate の副腎内取り込みの比放射能は Fig. 2 および Table 2 に示す如くプレドニゾロン群が一番高く, 正常群と比較して有意の差 ($P < 0.01$) を示していた。一方 ACTH 長期投与群は, 正常群よりむしろ低値を示したが有意とはいへなかつた ($P < 0.1$)。

3) 各群における副腎内 RNA への ^{32}P の取り込み

ACTH 短期使用群を加えた 4 群のそれぞれの副腎内 RNA 量, RNA への ^{32}P の比放射能を Fig. 3 および Table 3 示した。正常群と比較して ACTH 長期投与群では, その比放射能は低値であり, ($P < 0.02$), 一方 ACTH 短期使用群, プレドニゾロン長期使用群では, 正常群と比して有意差をもつてその比放射能は高値であつた ($P < 0.01$)。なお ACTH 短期投与群の方が, プレドニゾロン長期使用よりも高値であつた。

Fig. 1. Adrenal weight, RNA content in each group

Fig. 2. ^{32}P -Incorporation into adrenal gland in each group Fig. 3. Specific activity of ^{32}P -incorporation into adrenal RNA

Table 2. ^{32}P -incorporation into the adrenals in each group

Group	Normal	Prednisolone	ACTH (2Weeks)
Adrenal weight (mg.)	233±34(3)*	194±45(3)	347±45(3)
Total radioactivity of adrenal (cpm.)	584000±113000(3)	7262000±154000(3)	892000±159000(3)
Specific activity (cpm./mg.)	2880±420(3)	4000±610(3)	2530±270(3)

Table 2. Four mc of ^{32}P -orthophosphate was injected intramuscularly to each rabbit of three groups. After two hrs. animals were killed and each pair of adrenal were homogenized in distilled water to make 20% of homogenates. Duplicate 1ml portions of homogenote aliquots were dried and the radioactivity was measured with 2π -gas flow counter.

Table 3. ^{32}P -incorporation into the adrenal RNA in each group

Group	Normal	Prednisolone	ACTH	
			4 Days	2 Weeks
Total RNA ($\mu\text{g.}$)	1600±210(5)*	1100±70(5)	2400±230(5)	2700±260(5)
Specific activity of RNA (cpm./ $\mu\text{g.}$)	15±2(5)	30±3(5)	37±4(5)	10±1(5)

Table 3. Four mc of ^{32}P -orthophosphate was injected intramuscularly to each rabbit of four groups. After two hours, the animals were killed and RNA fraction of each pair of adrenals were analysed by Schmidt-Thannhauser's method.

Table 4. ^{32}P -incorporation into the adrenal A3P and A5P in each group

Group		Normal	Prednisolone	ACTH	
				4 Days	2 Weeks
A3P	Total Weight ($\mu\text{g.}$)	95	83	250	213
	Radioactivity (cpm.)	150	220	2000	520
	Specific activity (cpm./ $\mu\text{g.}$)	1.6	2.7	8.0	2.5
A5P	Total weight ($\mu\text{g.}$)	38	17	66	114
	Radioactivity (cpm.)	420	120	1900	5630
	Specific activity (cpm./ $\mu\text{g.}$)	11.1	7.3	28.9	42.0
Specific activity of A3P					
		0.14	0.34	0.28	0.07
Specific activity of A5P					

Table 4. Five mc of ^{32}P -orthophosphate was injected intramuscularly, to each rabbit of four groups, each group consisted of five rabbits. After two hours, five pairs of adrenals of each group were gathered and one gm equivalent of adrenals of each group were analyzed into UMP, GMP, CMP and AMP fractions by Katz's method. Further AMP was fractionated into A3P and A5P by paperchromatography. Radioactivities and UV densities of each fraction were determined by a paper scanner and a densicord recording electrophoresis.

が、その差に関しては、有意を認めなかつた ($P<0.2$)。プレドニゾン群に於て、RNA 量の減少は、前回の実験と同じく有意差をもつて ($P<0.01$) 低値であつたにも拘らず、正常群に比し、副腎内 RNA 比放射能の増加が明らかになつたこと、および、ACTH の投与期間によつてその RNA への比放射能が著明

Fig. 4. UV scanning and paper scanning of adrenal AMP fraction in each group.

UV densities and radioactivities were determined using densicord recording electrophoresis densitometer and packed radiochromatogram scanner.

*CM : scanning speed one (centimeter/minute)

な差異を示す点について、その機序を検討するため次の実験を行なった。

4) 副腎 RNA よりの A3'P 及び A5'P への P³² の取り込み

Table 4 に正常群、プレドニゾロン群、ACTH 短期群、および ACTH 長期群の4群の副腎における A5'P, A3'P 量と放射能およびそれぞれの比放射能を示した。また Fig. 4 に、ペーパークロマトグラフィによる、A3'P および A5'P の変化を、ペーパースキャンナーおよび U.V スキャンナーにて表わしたものを示した。

ペーパースキャンナーに於て各4群に比較してみると、ACTH 長期投与群では、A3'P 放射能が低値で、A5'P 放射能が著明に増加している。次に ACTH 短期使用群では、その取り込みは、A3'P, A5'P はほぼ同程度であり、その取り込み値、放射能は、正常群に比べて高値であつた。正常群では、絶対値は低いが A3'P と A5'P の比率については ACTH 長期使用群と同じ傾向であつて、A5'P 放射能が高く、A3'P 放射能は低値であつた。またプレドニゾロン群では、それとは逆に、A5'P 放射能値は低く、A3'P 放射能値が高かつた。一方 U.V スキャンナーにおいてはいずれも A3'P 値が高い値を示しているが、プレドニゾロン群において、特に A5'P 値が低いことがみられた。

Table 4 にそれぞれの群における A3'P, A5'P への取り込みを表示したが、この際、回収率の問題があるため A3'P, A5'P 量や ³²P 放射能の絶対値ではなく、A3'P 比放射能、A5'P 比放射能及び A3'P 比放射能/A5'P 比放射能について比較検討した。A3'P 比放射能については、プレドニゾロン群では正常群よりも高値を示した。一方、ACTH 短期使用群はさらに著明な高値を示した。ACTH 長期使用群ではそれに反し A3'P 比放射能は比較的lowかつた。

A5'P 比放射能は、プレドニゾロン群では正常群より低く、ACTH 短期使用群では高値を示し、さらに ACTH 長期使用群では一層それが著明であつた。

これを、それぞれ A3'P 比放射能/A5'P 比放射能にて比較してみるとプレドニゾロン群が最も高く、次

Fig. 5. Specific activity of ^{32}P -incorporation into adrenal A3'P and A5'P

に ACTH 短期使用群, 正常群, ACTH 長期使用群の順にて低下傾向を示した。これらの関係は Fig. 5 に示した通りである。

5) 各群における GMP, CMP への取り込み測定

Table 5 および Fig. 6 に正常群, プレドニゾロン群, および ACTH 長期群の GMP, CMP 比放射能を示した。

GMP に関しては, プレドニゾロン群では, 正常群よりその比放射能は著明に高かった。一方, ACTH 長期使用群では, 正常群と比較し低値であつた。

CMP に関しても同傾向ではあつたが, GMP の場合ほど著明な変動はなかつた。

Table 5. ^{32}P -incorporation into the adrenal GMP and CMP in each group

Group		Normal	Prednisolone	ACTH (4 Days)
GMP	Total weight ($\mu\text{g.}$)	135	269	419
	Total radioactivity (cpm.)	12700	61800	20200
	Specific activity (cpm./ $\mu\text{g.}$)	94	300	48
CMP	Total weight ($\mu\text{g.}$)	123	150	230
	Total radioactivity (cpm.)	21900	31700	32600
	Specific activity (cpm./ $\mu\text{g.}$)	178	212	142

Table 5. The same experimental procedures as described in the former tables were employed as for the analysis of mononucleotide, and the mononucleotide was also analyzed by Katz's method. Content of mononucleotide was measured by Schneider's method. The radioactivities of mononucleotides were counted by 2π -gas flow counter.

Fig. 6. ^{32}P -incorporation into adrenal GMP
& CMP in each group

考 察

1) 副腎皮質機能低下時における核酸とくに、RNAの変動に関して

1963年, Bransome が, 副腎皮質機能低下時のヒト副腎 RNA の測定を行ない, 大量の合成ステロイドホルモンの長期使用により, 副腎内 RNA 量及び濃度の低下を報告している⁴⁰⁾. 今回われわれの成績においても同様に, 合成ステロイドホルモンの長期使用群は正常群と比較して有意差をもつて副腎内 RNA の量及び濃度の低下を認めた. しかし, Bransome の成績と比較した場合, その減少率が少い点に関しては, ヒトとウサギの種属差やまた使用量等による差異も当然考えられる. また, 福田が報告しているようにウサギが, 副腎時においてもヒトやイス, ネズミ等に比して寿命が長く, またショックに対する抵抗力の比較においても抵抗性が強いとすれば, ウサギの副腎臓器特異性も考えなければなら

ない⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾. ともかく, 外的因子の影響が比較的ではあるが少いといわれるウサギの副腎において, 合成ステロイドホルモンの長期使用した場合, 副腎内 RNA 量及び濃度の有意な低下を認めたことは, 副腎における機能低下さらに萎縮と, RNA との間に関連が深いことを考えさせる.

このような合成ステロイドホルモンの長期使用時の副腎内 RNA 濃度及び量の低下が, RNA 合成障害によるものかどうかを, 追求するために, ^{32}P -orthophosphate による RNA への取り込みを調べたところ, 正常群と比して有意差をもつて高値であることを認めた. 従来副腎皮質機能低下時における RNA への ^{32}P の取り込み実験に関しては, あまり報告がないが, RNA 量及び濃度の低下にも拘らず, 副腎内 RNA 比放射能の増加があつたということが, はたして, 純粹の RNA 自身の比放射能の増加を意味するものであるかどうかをさらに, 検討するために, モノヌクレオチドの分離による A3P A5P それぞれの比放射能を検討した訳である.

すなわち, A3P, A5P の分離, 比放射能の追求に関しては, Heideberger および Potter の報告によれば, RNA をアルカリ分解した場合, 90% 以上が, 2', 3' モノヌクレオチドとして切られ, A3P は, 合成された RNA を表わすものであるという点を考慮したのである⁵³⁾. その結果, プレドニゾロン長期投与群の A3P 比放射能は, 正常群よりも高値であり, この点より少くとも副腎皮質機能低下時において, RNA 合成は障害されておらず, RNA 合成は保持されているといえる成績であつた. なを ^{32}P の副腎内 RNA への取り込みに関する経時的変動は, ラットではあるが, Nicholls により報告されており, 正常ラットの副腎では, 3時間に最高値を示すことがべられている⁵⁹⁾⁶⁰⁾. またわれわれの実験でも, ^{32}P の副腎内 RNA への取り込みの経時的変動に関しては, 2時間半値が最高値を示しており, このことからプレドニゾロン群の副腎内 RNA 比放射能が正常群のそれより高値であつたことは, RNA 合成の亢進も考慮しなければならないと思われた.

RNA 比放射能の測定において, われわれは, 初め Schmidt-Thannhauser の方法にて RNA 分画を取り出し, 燐の測定によらず, Schmneider 法にてその比放射能を求めた. その点, Davidson の報告の如く⁵⁴⁾, RNA 内への ^{32}P の取り込みが75%とすれば, その比放射能は純粹に RNA 比放射能とは, いえないしまった Schmidt の方法にては RNA 分画には汚染の可能性も考えられるので, Katz の方法によるモノヌクレオチドの分離調整により, GMP, CMP の比放射能についても各群に於て求めたが, その結果は Schmidt

の方法と同じ傾向を得た。なお、UMP 比放射能の測定も行なつたが、カラムの分離時、UMP 分画には一部無機の燐や燐脂質が大量にまざり信頼度が低いため割愛した。一般的に外来性合成ステロイドホルモンの長期使用による副腎皮質機能低下の発生は、視床下部、下垂例—副腎皮質を介する negative feed back による ACTH 分泌の低下によるものとされ、副腎内核酸、とくに RNA への ACTH の及ぼす影響に関する多くの文献がある。今回われわれは、ACTH 使用群も合せて実験を行ない、ACTH 使用が RNA の変動に対してどのように作用するかも検討し、それと副腎皮質機能低下群との比較により、副腎皮質機能低下時の RNA 変動の機序の解明を試みたのである。

2) ACTH の副腎内 RNA に及ぼす影響

ACTH の副腎内 RNA に対する実験は、1962年、Ferguson に始まり²⁹⁾³⁰⁾、その幾多数の報告がみられるが、一般に、ACTH の使用により副腎内 RNA 量及び濃度の増加が、いわれている³⁷⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁵⁵⁾。しかし、³²p や ¹⁴C-アミノ酸等の使用による RNA 内への取り込みに関しては色々の報告があり、in vivo の実験においては、(主にラットであるが)副腎内 RNA への取り込みは増加を示しており、in vitro の実験では、むしろ ACTH の添加により、その取り込みは抑制されている³⁴⁾⁵⁰⁾。この点に関して、1967年、Ferguson が in vitro における副腎内 ¹⁴C-uridine の取り込み抑制は、ACTH の作用によるものではなく、ACTH により分泌されたコルチコステロンの作用によるものであろうとのべている。この面に関する報告は morrow の文献にも認められる⁵⁸⁾。

一方、ACTH の in vivo での実験にて、副腎内 RNA への ³²p の取り込みの増加を報告した文献があるが、1965年、Imrie は、³²p を用いて ACTH の使用により副腎内 RNA への取り込みは低下すると共に、RNA 量の増加を報告し、その作用機序として、ACTH は RNA の分解を抑制すること、また RNA ase の活性抑制が、主な作用点であろうとのべている⁵⁹⁾。この点に関して Nicholls が ACTH 注射後16時間では、副腎内 RNA への ³²p の取り込みは増加を示すが⁵⁹⁾、8日間 ACTH 使用後では ³²p の取り込みはむしろ低下することを報告している⁶⁰⁾。われわれは副腎内 RNA 合成や分解に関して、ACTH には長期及び短期にてその作用が異なるかをみる目的で ACTH 短期使用群と長期使用群とに分け、それぞれの副腎内 RNA への取り込みを比較したところ、両者においてその取り込みに著明な差異があることを認めた。ACTH と ³²p を同日に注射した短期群では ³²p 副腎内比放射能は著明に高く、A3P 比放射能も高値であつた。それに対し、長期群では副腎内 RNA 比放射能は低値であり、A3P 比放射能も著明に低値を示した。この点より Imrie の報告の如く、ACTH 長期使用の時点においては副腎内において、あまり RNA 合成は著明でなく、むしろ RNA の分解抑制が、ACTH の作用点の主体とも考えられる。しかし、ACTH の短期使用後での副腎内 RNA への作用を考えてみると、副腎内 RNA 量の増加および A3P 比放射能の増加が認められ、短期作用として、ACTH が RNA 合成に関与しているとも考えられる。Ferguson や Morrow のいう ACTH により分泌されたコルチコステロンの影響を考えると、A3P 比放射能の低下が考えられるわけであるが、in vivo, in vitro での実験条件の違い、また ACTH の副腎内濃度の差異もあり、比較することは困難であろう。しかし両群において、A5P 比放射能の著明な増加をみた点から、核酸素材の合成に ACTH が作用することは考えられると思う。なお、ペプチドホルモンは投与後数秒にてその作用を発現するとされているが、一般に、m-RNA その他の RNA 合成をとおして、特異的蛋白ないしは酵素の合成を介してその作用を発現するとは考え難いとされている。しかし、特異的蛋白ないし酵素合成を介しての ACTH の作用をのべている文献もまたみられる⁶¹⁾⁶²⁾。この点は実験日にも ACTH を使用した ACTH 短期群に影響する可能性も考慮しなければならない。

3) 副腎皮質機能低下時の変動の RNA 機序について

長期にわたる ACTH の作用を考えた場合、その作用の主体は、Imrie の報告の如く RNA の分解抑制にありまた今回の実験より核酸素材の合成促進にもあるとすれば、副腎皮質機能低下時の RNA 比放射能の増加、A3P 比放射能の増加、A5P 比放射能の低下および RNA 量や濃度の低下は、合成ステロイドホルモン長期使用による ACTH 分泌抑制にもとづく RNA 分解の促進及び核酸前駆物質合成素材の障害に

より説明可能と思われる。

一方正常群に比し A3P 比放射能の増加は、副腎機能低下時に於ても、RNA 合成は保持されており、前にも述べた様に、ACTH が抑制されても、副腎内において一部 RNA の合成がおこなわれていると考えてもよいと思う。さらに、A5P 量の低下および A5P 比放射能の低下はこの核酸素材の低下が副腎内 RNA 量の低下や機能低下と関連深いものとも考えられる。総括的に、副腎機能低下時における RNA 分画比放射能の増加は、RNA 合成に障害がなく、それに反して、副腎内 RNA 量の低下は、ACTH 分泌低下による RNA 分解の亢進によるものと考えたいが、今後の実験によつて、たしかめていきたい。又、一井が1967年に ^3H -コルチコステロンを用いて、白ネズミ副腎内への取り込みを追求し、肝、腎について副腎内比放射能が高いことを報告しており、また笹野の報告の如く、コルチコステロイド長期投与により副腎萎縮が、下垂体機能不全時の副腎萎縮と異なることを考えた場合、単に副腎皮質機能低下時の RNA の変動は、ACTH の分泌低下によるものではなく、外来性ステロイドホルモンまた内因性ステロイドホルモンの副腎に対する直接的影響も当然考えなければならないと思う。今後、下垂体摘出時のステロイド大量投与が副腎内の RNA 対してどのような作用を与えるを等追求したいと考えている。

結 語

われわれは実験的にウサギを用いて合成ステロイドホルモン(プレドニゾロン)長期大量投与群と ACTH 長期投与群及び短期使用群をつくり、その副腎内 RNA 成分の変動を、正常群のそれと比較して次の結果を得た。

1) 合成ステロイドホルモン長期大量投与群では正常群に比較して、副腎内 RNA 量及び濃度の低下を認めた。一方 ACTH 長期投与群では RNA 量及び濃度は増加していた。

2) ^{32}p 筋注2時間後の副腎内 RNA 比放射能は合成ステロイドホルモン大量投与群においては正常群より有意に増加し、ACTH 長期投与群では低下していた。他方、ACTH 短期投与群は逆に著明な増加を示した。

3) さらに ^{32}p 筋注後2時間の副腎内 RNA より AMP を取り出し、さらに A3P、A5P に分画して正常群と比較した成績では、合成ステロイドホルモン投与群では、A3P 比放射能の増加及び A5P 比放射能の低下を認め、ACTH 短期使用群では、A3P 比放射能及び A5P 比放射能の増加を認めた。とくに A5P 比放射能の増加は著明であつた。A3P 比放射能/A5P 比放射能においてはプレドニゾロン群が最も高く、ACTH 短期使用群も正常群より高値であつた。なお、ACTH 長期使用群では A5P 比放射能の著明な増加を認め、A3P 比放射能は低値であつた。

4) ACTH 短期使用群と、長期使用群との比較において RNA 量および副腎重量については著明な変動を認めなかつた。 ^{32}p の RNA 比放射能に関しては著明な差異を認めた。すなわち長期使用群では RNA 内比放射能の低下を認め、短期使用群では、逆に高値を示し、また A3P 比放射能についても両者に明らかな差異を認めた。ACTH 群では、その使用期間、注射量、注射後副摘までの時間等によりかなりの差異があることを知つた。

現在における副腎内 RNA に対する ACTH の作用機序としては、副腎内 RNA の分解抑制がその主作用と考えられるが、なを合成面にも関与している事も考慮しなければならないと思う。

以上より合成ステロイドホルモン長期大量投与群における RNA 比放射能とくに A3P 比放射能の増加は、副腎皮質機能低下時において副腎内 RNA 合成は、障害されておらず、RNA 量及び濃度の低下は ACTH 分泌低下にもとづく、RNA 分解の亢進によるものであらうと考えたい。

一方 A5P 比放射能の低下は、RNA 量及び濃度の低下とともに RNA 合成素材、RNA 前駆物質の産生低下、合成抑制を意味すると思われる。今後われわれは、さらに合成ステロイドホルモンまたは内因性ホルモンが副腎に対してどのような作用をもっているのかまた ACTH が副腎内 RNA 対してその分解を抑制するのみならず、RNA 合成面に対してどのような作用をもつかなど究明していきたいと考えている。

本論文の要旨は、第40回日本生化学会総会(昭和42年11月3日)において発表した。

終りに臨み終始御指導を賜わり、また御校閲を載いた恩師大淵重敬教授並びに大貫稔講師及び大塚英司博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) HENCH, P.S. et al. : Proc. Staff. Meet. Mayo Clinic, 24 : 181, (1949)
- 2) HARRIS, G.W. : Neural control of the pituitary Gland. (1955), London.
- 3) BERTHUNE, J.E., D.H. NELSON and G.W. THORN : J. Clin. Invest., 37 : 1701, (1957)
- 4) CLAYTON, B.E. : Proc. Roy. Soc. Med., 51 : 558, (1958)
- 5) SYNDR, K.L. and G. SAYERS : Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., 79 : 432, (1952)
- 6) FARRELL, G.L. and G. LAQUER : Endocrinology, 56 : 471, (1955)
- 7) HOLUB, D.A., J.W. JAILER, J.I. KITAY and A.G. FRANTZ : J. Clin. Endocr., 19 : 1540, (1959)
- 8) HOLUB, D.A., J.I. KITAY and J.W. JAILER : J. Clin. Invest. 38 : 291, (1959)
- 9) PARIS, J. : Proc. Mayo Clinic, 36 : 305, (1961)
- 10) ROBINSON, B.H.B., D. MATTINGLY and C.L. COPE : Brit. Med. J., 1 : 1579, (1962)
- 11) MARKS, L.J., R. CHUTE and R.L. SALLADE : New England J. Med., 264 : 10, (1961)
- 12) BRODISH, A and C.H.N. LONG : Endocrinology, 71 : 298, (1962)
- 13) BRODISH, A : Program of the 47th meeting of the endocrine society, (1965), p. 21.
- 14) VERNIKOS-DANELIS, J. : Endocrinology, 76 : 122, (1965). Endocrinology, 76 : 240, (1965)
- 15) HAYNES, R.C. and L. BERTHET : J. Biol. Chem., 225 : 115, (1957)
- 16) HAYNES, R.C., E.W. SUTHERLAND and T.W. RALL : Recent. Progr. Hormone Res., 16 : 121, (1960)
- 17) IMURA, H., S. MATSUKURA, H. MATSUYAMA, T. SETSUDA and T. MIYAKE : Endocrinology, 76 : 933, (1965)
- 18) GREENBERG, L.J. and D. GLICK : Federation Proc., 20 : 178, (1961)
- 19) NOBLE, N.L. and E. PAPAGEORGE : Endocrinology, 73 : 640, (1955)
- 20) VANCE, V.K., E. GIRARD and G.F. CHAHILL : Endocrinology, 71 : 113, (1962)
- 21) WEAVER, G. and B.R. LANDAU : Endocrinology, 73 : 640, (1963)
- 22) YAGO, N., S. KOBAYASHI, M. MORISAKI, S. ICHII and M. MATSUDA : STEROIDS, 2 : 175, (1963)
- 23) KOBAYASHI, S., S. YAGO and M. MATSUDA : Steroids, 2 : 167, (1963)
- 24) KORITZ, S.B. and F.G. PÉRON : J. Biol. Chem, 230 : 343, (1958)
- 25) O'DONNELL, W.H., S.S. FAJANS and J.G. WEINBAUM. : A.M.A. Arch. Int. Med. 28 : 88, (1951)
- 26) WINTER, C.A. et al. : Endocrinology, 47 : 60, (1950)
- 27) SALASSA, R.M., W.A. BENNETT, F.R. KEATING and R.G. SPRAGUE : J.A.M.A. 152 : 1509, (1953)
- 28) 笹野伸昭, 綿貫 勤, 他 : 最新医学, 215 : 552, (1964)
- 29) FERGUSON, J.J. : Biochem. Biophys. Acta, 57 : 617, (1962)
- 30) FERGUSON, J.J. : J. Biol. Chem., 238 : 2754, (1963)
- 31) KORITZ, S.B., F.G. PÉRON and R.I. DORFMAN : J. Biol. Chem., 226 : 643, (1957)
- 32) HALKERSTON, I.D., M. FEINSTEIN and O. HECHTER : Endocrinology, 74 : 649, (1964)
- 33) HALKERSTON, I.D. : Endocrinology, 76 : 801, (1965)
- 34) FERGUSON, J.J. : Biochem. Biophys. Acta, 87 : 348, (1964)
- 35) BRANSAME, E.D., Jr. and W.J. REDDY : Endocrinology, 73 : 540, (1963)
- 36) BRANSOME, E.D. and W.J. REDDY : Endocrinology, 74 : 495, (1964)
- 37) FARESE, R.V. : Endocrinology, 74 : 579, (1964)
- 38) FARESE, R.V. : Endocrinology, 76 : 795, (1965)
- 39) IMRIE, R.C., T.R. RAMAIAH, F. ANTONI and W.C. HUTCHINSON : J. Endocrin., 32 : 303, (1965)
- 40) BRANSAME, E.D., Jr. and W.J. REDDY : Metabolism, 12 : 27, (1963)
- 41) 一井昭五 : 代謝, 14 : 62, (1967).
- 42) SCHMIDT, C. and S.J. THANNHAUSER : J. Biol. Chem. 161 : 83, (1945)
- 43) ENZYMOLOGY : vol. III, p. 680.

- 44) HUTCHINSON, W.C., E.D. DOWNIE and H.N. MUNRO : *Biochem. Biophys. Acta.* 55 : 561, (1962) 45) BURTON, K. : *Biochem. J.* : 62 : 315, (1956) 46) LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A., FARR and R.J. RANDRALL : *J. Biol. Chem.* 193 : 265, (1951) 47) S. KATZ and D.G. Comb : *J. Biol. Chem.* 238 : 3065, (1963) 48) HURBERT, B., H. SCHMITZ, A.F. BRUMM and V.R. POTTER : *J. Biol. Chem.*, 299 : 23, (1954) 49) RICHARD, J.B. : *Paperchromatography and paper electrophoresis*, 2nd. ed. (1958), 287, Academic Press Inc., New York. 50) FUKUDA, T and S. AKIYAMA : *Jap. J. Physiol.*, 13 : 486, (1963) 51) FUKUDA, T : *Jap. J. Physiol.*, 13 : 155, (1963) 52) 和田篤郎 : 生理学大系, 内分泌の生理学, vol 8, 副腎皮質, p.309, (1965). 53) HEIDERBERGER, C., E. HARBERS, K.C. LEIBMAN, Y. TAKAGI and V.R. POTTER : *Biochem. Biophys. Acta*, 20 : 445, (1956) 54) DAVIDSON, J.N. and R.M.S. SMELLIE : *Biochem. J.*, 52 : 599, (1952) 55) FARESE, R.V. and W.J. REDDY : *Biochem. Biophys. Acta*, 76 : 145, (1963) 56) FARESE, R.V. : *Endocrinology*, 78 : 125, (1966) 57) FERGUSON, J.J., Jr., Y. MORITA and L. MENDELSON : *Endocrinology*, 80 : 521, (1967) 58) MOROW, L.B., G. N. BURROW and P.J. MULROW : *Endocrinology*, 80 : 883, (1967) 59) NICHOLLS, D., F.C. HE AGY and R.J. ROSSITER : *Endocrinology*, 58 : 587, (1955) 60) NICHOLLS, D., F.C. HEAGY and R.J. ROSSITER : *Canad. J. Biochem.* 34 : 543, (1955) 61) FARESE, R.V. : *Endocrinology*, 77 : 128, (1965) 62) FARESE, R.V. : *Endocrinology*, 78 : 929, (1966)