ヒト胎児におけるエストロゲンの 代謝・拮合に関する研究

京都府立医科大学産婦人科教室

(主任 岡田 弘二教授)

塚 本 克 美

The Metabolism and Conjugation of Estrogens in the Human Fetus

Katsumi TSUKAMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology,

Kyoto Prefectural University of Medicine,

Kyoto 602, Japan

(Director: Professor Hiroji Okada)

Although several studies have been reported on the synthesis of steroids in the fetus, the metabolism and conjugation of estrogens in the fetus is not completely known.

In this study serum levels of estetrol (E_4), estetrol-glucosiduronate (E_4 -G), estriol (E_3) and estriol-16-glucosiduronate (E_3 -16-G) were measured by R.I.A. in maternal peripheral vein blood (MPV), umbilical artery blood (UA) and umbilical vein blood (UV) at delivery.

The same steroids were also measured in various fetal organs (liver, kidney, intestine, adrenal, lung and placenta) in the second-trimester.

After $4\text{-}^{14}\text{C-E}_2$, $4\text{-}^{14}\text{C-E}_3$ and $6, 9\text{ (n)}\text{-}^3\text{H-E}_4$ were incubated with homogenates of various human fetal organs, the metabolites were analyzed with an authentic sample.

$15, 15\text{-D}_2\text{-estradiol-17}\beta$ ($d_2\text{-E}_2$) was incubated with human second-trimester fetal liver and the metabolites were analyzed with GC-MS.

It was concluded that: 1) E_3 -16-G was higher in UA and UV than in MPV, suggesting active glucosiduronation in the fetus. 2) Higher levels of E_4 and E_4 -G in UA and UV than in MPV suggest the production of E_3 and E_3 -16-G in the fetus. 3) Levels of E_4 and E_4 -G were higher than those of E_3 and E_3 -16-G in various fetal organs in the second-trimester. 4) E_4 and E_4 -G were especially high in fetal liver and intestine, and E_3 and E_3 -16-G were high in fetal kidney, liver and intestine. 5) The level of E_3 -16-G was higher than that of E_3 in these organs. 6) The second-trimester fetal liver conjugated E_2 , E_3 and E_4 to each glucosiduronate. 7) The second-trimester fetal kidney conjugated E_2 and E_4 to each sulfate, but E_3 to E_3 -16-G. 8) 15-Hydroxylation of $d_2\text{-E}_2$ was demonstrated in the incubation with homogenate of second human fetal liver. 9) The active glucosiduronation of E_3 in the fetus was thought to inactivate a large amount of E_3 transported from the placenta.

I. 緒 言

代表的な胎児・胎盤機能検査として, estriol ($=E_3$ ヒト血中・尿中では大部分が estriol-16-glucosiduronate $=E_3-16-G$ の形で存在している²⁰⁾) の測定が日常臨床で頻用されている。

ヒト胎児副腎皮質で dehydroepiandrosterone sulfate (DHA-S) が産生され, 胎児肝で 16α 位の水酸化を受け胎盤へ移送される。あるいは DHA-S のままで胎盤へ移送され, エストロゲンの前駆体となる。これらのうち胎児内における DHA-S の産生, 16α 位の水酸化は従来, 胎児・胎盤機能のうちの胎児機能を反映しており, 以降のエストロゲンへの代謝・拮合は, 胎盤あるいは母体機能を反映していると考えられてきた。一方, 胎児は妊娠により産生された大量のエストロゲンにさらされているが, これに対応して, ヒト胎児肝・腎・腸等におけるエストロゲンの拮合が報告されている^{4) 5) 20)}。

更に, ヒト胎児における独特の代謝として estetrol ($=E_4$) への代謝が知られている。本研究では, ヒト胎児の大量のエストロゲンに対する独自の代謝・拮合を明らかにする目的で, ヒト胎児各臓器における各種非拮合型並びに拮合型エストロゲンの分布をはじめ, ステロイドホルモンの代謝・拮合につき検討した。

II. 材 料

非放射性ステロイドは Sigma (米国) の estrone (E_1), estradiol- 17β (E_2), estradiol-17-glucosiduronate (E_2-17-G), estriol (E_3), estriol-16-glucosiduronate (E_3-16-G), Steraroid (米国) 16-ketoesradiol を用いた。

放射性エストロゲンは Amersham (英国) の $4-^{14}C$ -Oestriol (S.A.52 mCi/m mol), 6, 9, (n)- 3H -Oestriol- 16α -(β -D-glucuronide) (S.A.30 Ci/m mol), $4-^{14}C$ -Oestradiol- 17β (S.A.55.7 Ci/m mol), 6, 9 (n)- 3H -Oestetrol (S.A.40 Ci/m mol) を用いた。

安定同位体の MeOD, D_2O は Amersham (英国) より入手した。

E_2 と E_3 の R.I.A. kit は C.I.S. (フランス原子庁, ミドリ十字) を用いた。

E_3-16-G , E_2-17-G の抗体は東北大学薬学部薬品分析化学教室南原利夫教授の御好意により提供を受けた。 E_4 の抗体は E_4-3CMO -BSA を抗原とする帝国臓器製であった。

水解酵素^{11) 21)}として, Arylsulfatase 246000 unit/g (英国, Sigma), β -glucuronidase 13000 unit/ml (日本, 東京臓器化学), 酵素拮抗阻害剤^{11) 21)}として, D-Sacchro-1, 4, -lactone (日本, 半井化学) を使用した。

カラムクロマトグラフィーは Pharmacia Fine Chemical (スウェーデン) の DEAE Sephadex A-25 を蒸留水にて膨潤脱気後, $0.9\text{ cm} \times 60\text{ cm}$ のカラム管につめて, 一晚静置したものを使用した^{11) 21)}。

有機溶媒は, 試薬特級を使用した。

妊娠37~40週の妊婦20名から分娩時母体末梢血, 臍帯動脈血, 同静脈血を採血し, 遠心分離後, 血清を -20°C にて凍結保存した。

胎児の肝・腎・副腎・小腸・肺及び胎盤組織は, 妊娠14~23週の中期中絶症例のうち, 胎児に内分泌学的に異常がないと思われる症例から採取した。

III. 実験方法

1. 分娩時母体末梢血 (MPV)・臍帯動脈血 (UA)・臍帯静脈血 (UV) の E_3 , E_3 -16G, E_4 , E_4 -G の測定法

前述の如くに集めた血清を解凍し, E_3 の主たる拮合型である E_3 -16-G は既報の酵素水解を必要としない direct R.I.A. にて測定^{3) 19) 24)}を行なった。又, E_3 は市販の E_3 -R.I.A. キットを使用した。 E_4 , E_4 -G は Den らの方法⁵⁾による R.I.A. にて測定した。

2. ヒト胎児臓器での内因性 E_3 , E_3 -16-G, E_4 , E_4 -G の測定法

採取した臓器組織各々約 1g を氷水中にて 0.1 M PH 7.4 phosphate buffer (P.B.S.) 2.0 ml を加え, ガラスホモゲナイザーにてホモゲナイズした。

5 倍量の ethanol を加え, 1700 G, 10 分間遠沈後, 上清を採取し, 同操作を 3 回くり返し, 集めたものを試料とした。この試料を蒸発乾固後, P.B.S. に再溶解し, E_3 , E_3 -16-G, E_4 , E_4 -G を前述と同様の R.I.A. にて測定した。

尚, 測定したエストロゲンは湿重量当りに換算して比較を行なった。

3. ヒト胎児臓器における E_2 , E_3 , E_4 の拮合代謝実験法

① インキュベーション

ヒト胎児肝・腎・副腎と各種エストロゲンをインキュベートした。

各臓器組織約 1g に 0.1 M PH 7.4 P.B.S. 5.0 ml を加えて, ガラスホモゲナイザーで氷水中で冷却しながら, ホモゲナイズした。このホモジネートを少量の Propylene glycol に溶解した ^{14}C - E_2 (1 μCi), ^{14}C - E_3 -E (1 μCi) 又は ^3H - E_4 (3 μCi) に加え, さらに 0.1 M P.B.S. に溶解させた UDP GA 2.0 mg を各々に添加して, 空気を気相として 37°C, 60 分間振盪させながらインキュベートした。

約 5 倍量の ethanol を加えて反応を停止させ, 1700 G, 10 分間の遠沈により上清を採取, 同操作を 3 回くり返し集めた上清を抽出液とした。

② 代謝物の分離法

抽出液を蒸発・濃縮後, 食塩濃度勾配による DEAE Sephadex A-25 カラムクロマトグラフィーにて溶出させた^{10) 14) 27)}。

非拮合型エストロゲンは最初の蒸留水による溶出部分, 即ち non-charge 領域に出現し, glucosiduronate は 0.1 M 食塩濃度付近に, sulfate は 0.6 M 食塩濃度付近に出現した¹¹⁾。

③ 酵素水解法

Glucosiduronates 領域に出現したピークは 0.1 M PH 5.0 acetate buffer に再溶解させ, 3 等分して, ひとつには β -glucuronidase 7500 unit を加え, ひとつには β -glucuronidase 7500 unit とその拮抗阻害剤である D-Sacchro-1, 4-lactone を 10^{-2} M/L となるように加え, 残りのひとつには何も加えない対照とした。

Sulfates 領域に出現したピークも同様の buffer に再溶解させ, 2 等分し, ひとつには sulfatase を加え, 他方は対照として何も加えなかった。

各々 37°C, 48 時間インキュベートしたのち, ethyle acetate で抽出し, 水洗・芒硝にて脱水したのち放射能を測定した。

④ 薄層クロマトグラフィー

酵素水解後, 抽出物は T.L.C. (DC-Fertigplatten kieselgel 60, Merck) に, 2 組のシステムで展開させた。

システム(1) benzene : acetone = 1 : 1

システム(2) chloroform : ethyle acetate = 1 : 4

試料と同時に標準エストロゲンも展開させ、ヨード発色¹⁷⁾によりその位置を決定して、Rf値を算出した。展開後はT.L.C.板上のシリカゲルを0.5 cm 間隔に削り落し、放射能を測定して、代謝物のRf値を決定した。

Fig. 1. Schema of synthesis of 15, 15-D₂-estradiol-17β.

4. 妊娠中期ヒト胎児肝における E₂-17β 安定同位体の代謝

① 15, 15-D₂-E₂-17β (d₂-E₂) の作成

概要を Fig. 1 で示した。

16-ketoestradiol (0.7 g) (Steraroid) を MeOD (6 ml), D₂O (0.6 ml) (Amersham) 及び K₂C O₃ (0.1 g) と共に、20 時間加熱還流する¹⁵⁾。減圧下に溶媒を留去し、残渣に MeOD (6 ml) 及び D₂O (0.6 ml) を加え、再び、20 時間加熱還流する。減圧下に、溶媒を留去後、水を加え、ついで 10% HCL で中和する。有機物を Et-OAc で抽出し、有機層を水洗後、芒硝で乾燥させる。溶媒を留去すると結晶性残渣が得られる。精製することなく次の反応の材料とした。

d₃-16-ketoestradiol (0.7 g) を MeOH (50 ml) に溶解させ、これに NaBH₄ (0.2 g) を冷却下に少しづつ加える。反応液を室温 1 時間攪拌後、水にあげ、ついで 10% HCL で中和する。

有機物を Et-OAc で抽出し、有機層を水洗後、芒硝で乾燥させる。溶媒を留去して得られた結晶性残渣に MeOH (20 ml) 及び 10% NaOH (2 ml) を加え、20 時間加熱還流する¹⁵⁾。反応液を水中にあげ、10% HCL で中和した後、析出した結晶を濾取し、乾燥すると d₃-triol が得られた。この結晶は少量の estriol を含む 16-epiestradiol であることを薄層クロマトグラフィー (T.L.C.) にて確認した。

MS は M⁺ (291) を示し、d₃-triol が主成分であった。

得られた粗結晶 (0.5 g) を無水の pyridine hydrochloride (0.5 g) と共に 200℃ にて 3 時間反応させる²³⁾。反応液を冷却後、水を加え、析出した結晶を濾取し、乾燥させた。この結晶は原料のトリオールと目的物からなる混合物であることを T.L.C. にて確認した。

この分離精製を分取 T.L.C. (Merch G F 254 展開溶媒: CHCL₃: MeCO₃ = 19: 1) にて目的物を 166 mg 得た。さらに、原料 147 mg を回収した。MS は M⁺ (272) を示し、d₂-estrone あることを確認した。

d_2 -estrone (150 mg) を MeOH (60 mg) に溶解させ、冷却下に NaBH_4 (50 mg) を少しずつ加える。室温にて、1時間攪拌した後、水中にあげ、ついで10% HCL で中和する。有機物を Et-OAc で抽出し、有機層を水洗後、芒硝にて乾燥させる。溶媒を留去して得られた結晶を分取 T.L.C. (前述の条件) で精製し、さらに、アセトン・ヘキサン混合液から再結晶して、130 mg のプリズム状結晶を得た。

融 点 176.4 ~ 177.4°C d % を以下の様に決定した。

d_0 : 0%

d_1 : 4%

d_2 : 89%

d_3 : 7%

② 分析機器

Gass Chromatography (GC) は GC 7 A (島津製作所) を使い、カラムは 3mm × 2m のガラスカラムに 3% OV-17, chromosorb W 80/100 メッシュを用い 60 ml/min, He gass を carrier gass として、カラム温度 240°C, 注入口温度 300°C にて測定した。

Gass chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) は GC-MS 6020 (島津製作所) を使い IBM の Scap 1123 にてコンピュータ分析を行なった。

分析条件はカラムは 3mm × 2m ガラスカラムに 3% OV-17, chromosorb W 80/100 メッシュに 30 ml/min の He gass を carrier として用い、カラム温度 240°C, 注入口温度 300°C, セパレーター温度 340°C, イオン源温度 280°C, イオン加速電圧 2.33 KeV で行なった。試料はアセトンに溶解させ、HFBA (半井化学) を用い、HFBA : acetone = 1 : 4, 30分間室温にて反応させる²⁵⁾ アシル化誘導体にして注入した。

③ インキュベーションと分析

5 MG ヒト胎児の肝組織約 3g に Krebs-Ringer phosphate buffer (PH 7.4) 15ml を加え、氷水中にてガラスホモゲナイザーでホモゲナイズし、4°C, 800 G, 15分間遠沈し、上清を得た。(蛋白量 8.2g/100 ml)

Methanol に溶解させた d_2 -E₂, E₂ を各々 1.0 mg ずつ別々にとり、少量の propylene glycol を添加して N₂-gass にて methanol を蒸発させた。対照として、propylene glycol のみのものを準備し、各々に肝ホモジネートの上清 4.0 ml を加え、Krebs-Ringer phosphate buffer (PH 7.4) に溶解させた NADPH 2.0 mg を添加し、CO₂ : O₂ = 5 : 95 を気相、120分振盪させながらインキュベートした。

Methanol を加え反応を停止させ、遠沈抽出、同操作をくり返し、集めた methanol 相を濃縮させ、50% methanol 液に調整した。これに、等量の n-hexane を加え、よく混和させて脱脂肪を行なった。この methanol 相を N₂-gass にて乾固、水に再溶解後、methylene chloride で抽出、これを遊離型とした。水洗後、芒硝にて脱水し、acetone に再溶解させ HFBA と反応させ、アシル化誘導体²⁵⁾ として GC ないし GC-MS に注入した。

抱合ステロイドは methylene chloride 抽出残渣を N₂-gas でほぼ乾固させ、0.1 M PH 5.0 acetate buffer 2.0 ml に再溶解させ 7500 unit の β -glucuronidase を添加して 60°C, 60分間の酵素水解を行ない、methylene chloride にて抽出したものをアシル化誘導体²⁵⁾ にかえて、GC ないし、GC-MS に注入した。

IV. 結 果

1. 分娩時 MPV, UA, UV の E_3 , E_3 -16-G, E_4 , E_4 -G の測定

Fig. 2 は分娩時 MPV, UA, UV での E_4 及び E_4 -G の濃度を比較したものである。

E_4 , E_4 -G はともに UA, UV では MPV よりも高い傾向を示し、胎児側での産生を示していると思われる。Fig. 3 は分娩時の E_3 及び E_3 -16-G の濃度である。非拮合型 E_3 は UV で UA より高く、胎盤での産生を反映していると考えられる。

E_3 -16-G は UV では MPV よりも高く、UA, UV ではほぼ同じレベルを示し、胎児側での拮合の可能性を示している。

妊娠末期の母体末梢血中では E_4 , E_4 -G は、 E_3 , E_3 -16-G に比して量的には約 1/10 程度しか存在せず、 E_3 , E_3 -16-G が圧倒的に多く存在した。

2. ヒト胎児各臓器での内因性 E_3 , E_3 -16-G, E_4 , E_4 -G の測定

Fig. 4 は妊娠週数別にみた胎児各組織での湿重量あたりの内因性 E_4 , E_4 -G, E_3 , E_3 -16-G 濃度を示したものである。

各週数を通じて、 E_4 , E_4 -G が比較的多く存在する。 E_3 は少ないが、その拮合型の E_3 -16-G は肝・腎・小腸にかなり多く存在することがわかった。

胎児肝においては、 E_4 , E_4 -G は大量に存在するが、これに比して、 E_3 , E_3 -16-G は少ない。

胎児腎では、 E_4 , E_4 -G はほとんど内在せず、 E_3 , E_3 -16-G が主たるものであることがわかる。さらに、肝より拮合型である E_3 -16-G が多いことがわかる。

小腸では肝と同様に E_4 , E_4 -G が大量に存在するし、週数とともに増加する傾向がみられた。 E_3 についても大量の拮合型がみられた。

副腎・肺においては、 E_4 , E_4 -G, E_3 , E_3 -16-G はほとんど存在しなかった。

Fig. 2. Serum levels of E_4 and E_4 -G in maternal peripheral vein (MPV), umbilical vein (UV), and umbilical artery (UA) at delivery.

Fig. 3. Serum levels of E_3 and E_3-16-G in MPV, UV and UA at delivery.

Fig. 4. Levels of E_4 , E_4-G , E_3 and E_3-16-G in fetal organs at various gestational week.

Fig. 5. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $4\text{-}^{14}\text{C}\text{-E}_3$ in the homogenate of 5 MG kidney after 1 hour incubation.

Fig. 6. Identification of the extract of P-II (Fig. 5) with standard $^3\text{H}\text{-E}_3\text{-16-G}$ on DEAE Sephadex A-25 column chromatography. (fetal kidney- E_3)

Fig. 7. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $^3\text{H-E}_4$ in the homogenate of 5 MG kidney after 1 hour incubation.

3. ヒト胎児臓器における E_2 , E_3 , E_4 の代謝拮合

① ヒト胎児の腎における E_3 の拮合

Fig. 5は5 MGのヒト胎児腎ホモジネートと $^{14}\text{C-E}_3$ ($1\mu\text{Ci}$)とをインキュベートしたのちDEAE Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーにより、その代謝物を溶出したものである。

Glucosiduronates領域にピークII (P-II) が出現した。このP-IIは β -glucuronidaseにて77.6%, 酵素拮抗阻害剤では13.0%, 対照では10.9%と加水分解され, glucosiduronateと考えられた。得られたaglyconeをシステム(1), (2)のT.L.C.に展開すると, Rf値は各々標準 E_3 と一致した。

さらに, P-IIと $^3\text{H-E}_3$ -16-Gとを混ぜ, 再度DEAE Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーで溶出させると ^3H , ^{14}C のピークの一致をみた (Fig. 6)。このことから, ヒト胎児の腎ホモジネートと E_3 とのインキュベートした結果, その拮合代謝物は E_3 -16-Gと考えられた。

② ヒト胎児の腎における E_4 の拮合

5 MGの胎児腎ホモジネートと $^3\text{H-E}_4$ ($3\mu\text{Ci}$)とをインキュベートし, 前述のクロマトグラフィーにて溶出させたものが, Fig. 7である。

Glucosiduronates領域にピークIII (P-III), sulfates領域にピークV (P-V) がみられる。

P-IIIは β -glucuronidaseにて83%, 酵素拮抗阻害剤では25%, 対照では20%であった。Aglyconeはシステム(1), (2)のT.L.C.で標準 E_4 とRf値が一致した。

P-Vはsulfataseにて75%, 対照では37%が加水分解され, そのaglyconeはT.L.C.で標準 E_4 とRf値が一致した。

Fig. 8. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $4\text{-}^{14}\text{C-E}_2$ in the homogenate of 5 MG kidney after 1 hour incubation.

Fig. 9. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $4\text{-}^{14}\text{C-E}_3$ in the homogenate of 5 MG liver after 1 hour incubation.

以上より、妊娠中期胎児腎ホモジネートと E_4 のインキュベーションによる代謝物は、 E_4 -G, E_4 -Sであった。なお、量的には E_4 -Sがやや多くあった。

③ ヒト胎児の腎における E_2 の拵合

5 MGの胎児腎ホモジネートと ^{14}C - E_2 とをインキュベートし、前述のクロマトグラフィーに溶出させたものが、Fig. 8である。

Sulfates領域にP-III, P-IVのふたつのピークがみられた。それぞれsulfataseにて91.2% (対照65.2%), 91.8% (対照69.9%)と加水分解されて、sulfateと考えられた。

加水分解後のaglyconeを前述のシステム(1), (2)のT.L.C.にて展開して、標準 E_1 , E_2 とRf値が一致した。それぞれ E_1 -S, E_2 -Sと考えられた。

④ ヒト胎児の肝における E_3 の拵合

Fig. 9は5 MGのヒト胎児肝ホモジネートと ^{14}C - E_3 とをインキュベートし、前述のクロマトグラフィーに溶出したものである。

Glucosiduronates領域にひとつのピークII (P-II)がみられる。このP-IIは β -glucuronidaseにて87%, 酵素拮抗阻害剤では13%, 対照では8%と水解された。加水分解後のaglyconeをふたつのシステムのT.L.C.にて展開させ、各々標準 E_3 とRf値が一致した。

Fig. 10はP-IIと ^3H - E_3 -16-Gを混合させ、再度DEAE Sephadex A-25カラムクロマトグラフィーで溶出させたもので、 ^3H と ^{14}C のピークの一致をみせた。

以上から、妊娠中期のヒト胎児肝ホモジネートと E_3 とをインキュベートした結果、その拵合代謝物は E_3 -16-Gと考えた。

Fig. 10. Identification of the extract from P-II (Fig. 9) with standard ^3H - E_3 -16-G on DEAE Sephadex A-25 column chromatography. (fetal liver- E_3)

Fig. 11. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $^3\text{H-E}_4$ in the homogenate of 5 MG liver after 1 hour incubation.

⑤ ヒト胎児の肝における E_4 の拮合

5 MG ヒト胎児肝ホモジネートと $^3\text{H-E}_4$ を同様にインキュベートしたのち、その代謝物を前述のクロマトグラフィーで溶出させたものが Fig. 11 である。

Glucosiduronates 領域にピーク III (P-III) と sulfates 領域にピーク IV (P-IV) がみられる。 β -glucuronidase で P-III は 93%, 拮抗阻害剤で 15%, 対照では 12% と水解され glucosiduronate と考えられた。

P-IV は sulfatase により 73% が水解され, sulfate と考えられた。各々の aglycone をシステム (1), (2) の T.L.C. で展開し, 各々標準 E_4 と Rf 値が一致した。

以上から, 妊娠中期のヒト胎児肝のホモジネートと E_4 の拮合代謝物は $\text{E}_4\text{-G}$, $\text{E}_4\text{-S}$ と考えられた。なお, 量的には $\text{E}_4\text{-G} > \text{E}_4\text{-S}$ であった。

⑥ ヒト胎児の肝における E_2 の拮合

5 MG ヒト胎児肝ホモジネートと $^{14}\text{C-E}_2$ とのインキュベーションでは Fig. 12 のように glucosiduronates 領域に比較的大きなピーク II (P-II), sulfates 領域にいくつかのピークが出現した。P-II は β -glucuronidase で 92%, 拮抗阻害剤では 20%, 対照では 11% と水解され, glucosiduronate と考えられた。

水解後の aglycone は同様のシステムで展開して, 標準 E_2 との Rf 値の一致をみた。以上から P-II は $\text{E}_2\text{-G}$ と考えた。

Fig. 12. Elution pattern from DEAE Sephadex A-25 column chromatography of labeled metabolites of $4\text{-}^{14}\text{C-E}_2$ in the homogenate of 5 MG liver after 1 hour incubation.

Sulfates 領域のピークのうち、ピークⅣ (P-Ⅳ) は sulfatase にて 2%, 対照では 33% と加水分解され、sulfate と考えられた。その aglycone を同様の T.L.C. にて展開させ、標準 E_2 と Rf 値が一致して、この代謝物は $\text{E}_2\text{-S}$ と考えた。

以上から、妊娠中期のヒト胎児肝のホモジネートと E_2 のインキュベーション後の代謝物は $\text{E}_2\text{-G}$ 、 $\text{E}_2\text{-S}$ と考えられた。しかも、量的には glucosiduronate が主体であった。

⑦ ヒト胎児の副腎における E_3 、 E_4 、 E_2 の抱合

5 MG ヒト胎児副腎ホモジネートと $^{14}\text{C-E}_3$ とをインキュベートし、その代謝物を前述のクロマトグラフィーに溶出させたが、 E_3 以外の代謝物はほとんどみられなかった。 E_4 、 E_2 との胎児副腎ホモジネートのインキュベーションでも同様にみられなかった。

4. ヒト胎児における $\text{E}_2\text{-}17\beta$ 安定同位体の代謝

ヒト胎児肝と $\text{d}_2\text{-E}_2$ あるいは通常の E_2 とをインキュベートした時の遊離型の代謝物の mass chromatography である (Fig. 13)。

標準の E_1 、 E_2 の HFBA 誘導体の分子イオン (m/e) はそれぞれ 466、664 である。

右の図は通常の E_2 とインキュベートした結果である。分子イオン数 664 の E_2 誘導体を示すピークと 466 の E_1 誘導体を示すピークがみられる。左の図は $\text{d}_2\text{-E}_2$ とインキュベートした結果である。664 + 2 = 666 と 15 位を diuterium 標識した E_2 誘導体と考えられるピークがみられる。さらに 466 + 2 = 468 と 15 位を diuterium 標識した E_1 誘導体と考えられるピークがみとめられた。

Fig. 13. Mass chromatogram of metabolites after incubation of E_2 or d_2 - E_2 with 5 MG human fetal liver.

Fig. 14. Mass spectrogram of metabolites after incubation E_2 or d_2 - E_2 with 5 MG human fetal liver.

Fig. 14はFig. 13で2.3分近辺の短い保持時間に出現した d_2 - E_2 ないし E_2 と考えられたピークのそれぞれのmass spectrogramである。両者のspectrogramは極似しており、上段は分子イオン数 $664 + 2 = 666$ の d_2 - E_2 誘導体、下段は664の E_2 誘導体を示すspectrogramである。

Fig. 15はFig. 13の4.5分付近に出現した、 d_2 - E_1 、 E_1 と考えられたピークでのそれぞれのmass spectrogramである。両者のspectrogramは相似し、下段は分子イオン数466の E_1 誘導体、上段は $466 + 2 = 468$ の d_2 - E_1 の誘導体である。

それぞれインキュベーションにより、 $E_2 \rightleftharpoons E_1$ 、 d_2 - $E_2 \rightleftharpoons d_2$ - E_1 の変化がおこったことがわかる。

Fig. 16は 15α OH- E_1 の産生の有無を検討した拮合型の代謝物を水解後に分析したmass chromatogramである。

Fig. 15. Mass spectrometry of metabolites after incubation of E_2 or d_2 - E_2 with 5 MG human fetal liver.

Fig. 16. Mass fragmentogram of metabolites after incubation with 5 MG fetal liver.

標準 15α OH- E_1 の HFBA 誘導体の理論的分子イオン数は 679 であり $15d, 15\alpha$ OH- E_1 の分子イオン数は $679 + 1 = 680$ である。

よって、各々の代謝物の mass chromatogram で、分子イオン数 678, 679, 680, 681 について検討した。右端の control にはみられないが、中央の通常の E_2 とのインキュベートでは 679 に、左端の d_2 - E_2 とのインキュベートでは 680 に、2.0 分とほぼ同じ保持時間にピークがみられた。それぞれ 15α OH- E_1 , $15d, 15\alpha$ OH- E_1 の生成が考えられた。

Fig. 17. Mass spectrogram of metabolites after incubation of E_2 or d_2 - E_2 with 5 MG human fetal liver.

Fig. 17はFig. 16でのそれぞれのピークでのmass chromatogramである。両者はよく相似しており、下段では679の分子イオンがみられた。上段では $679 + 1 = 680$ の分子イオンがみられた。

15位のふたつの位置のdiuteriumのうち、ひとつが水酸化され、 $15d, 15\alpha$ OH- E_1 と変化したと考えられた。

V. 考 案

分娩時のMPV, UA, UV, の非拮合・拮合型のエストロゲン濃度の比較検討では E_4 , E_4 -Gとともに母体側に比して胎児側で高値を示し、胎児側での産生が示された。

E_3 はUVで最も高く、胎盤側での産生を反映している。

E_3 の拮合型である E_3 -16-Gは母体側より胎児側で高値で、かつUA, UVではほぼ同じレベルを示し、胎児側での拮合の可能性を示した。

E_3 の産生について、胎盤には 16α -Hydroxylaseがないので、母体側・胎児側から 16α -hydroxyandrogenの供給をうけ、胎盤で E_3 が形成される経路(neutral pathway)^{2) 19) 21)} 胎児副腎由来のDHA-Sが胎盤でsulfatase, 3β -HBD, aromataseにより、 E_1 , E_2 に変わり、胎児肝で E_3 になる経路(phenolic pathway)^{2) 19) 21)}とが存在するが、今回のin vivoの量的な検討から、非拮合型 E_3 の産生ではneutral pathwayが主であること、又、 E_4 , E_4 -Gの産生が胎児側で起っていることが示された。

胎児でのglucuronyl transferaseの存在に関し今回、direct R.I.A.による E_3 -16-Gの測定により^{19) 20) 26)}, in vivoで胎児側での E_3 の E_3 -16-Gへの拮合が行なわれている可能性をはじめて明らかにした。即ち、胎児側において、 E_4 の産生、 E_3 の拮合をはじめ、積極的なエストロゲンの代謝・拮合が存在することが示された。

妊娠中期ヒト胎児臓器での内因性エストロゲンの分布については、Diczfaulsky^{4) 5)}は非拮合型 E_3 は胎盤につづいて、大腸、肝臓、腎臓、小腸の順にみられ、各々、13.0, 3.0, 1.5, $0\mu\text{g}/100\text{g.w. tissue}$ であり、その拮合型は主として E_3 -3-sulfateと考えているが、大腸、小腸、肝臓、腎臓、胎盤の順に各々、39.1, 43.8, 27.0, 14.6, $9.4\mu\text{g}/\text{g.w. tissue}$ であったとの報告があるに過ぎない。

Table 1. A schema of conjugation and metabolism of estrogens in fetal organs in second trimester.

Homogenate of organ	Metabolites after incubation
5 MG fetal liver	$E_2 \xrightarrow{\quad} G$
	$\searrow$ $E_1 - S, E_2 - S \quad (G > S)$
	$E_3 \xrightarrow{\quad} E_3 - 16 - G$
	$E_4 \xrightarrow{\quad} E_4 - G$
5 MG fetal kidney	$\searrow$ $E_4 - S \quad (G > S)$
	$E_2 \xrightarrow{\quad} E_1 - S, E_2 - S$
	$E_3 \xrightarrow{\quad} E_3 - 16 - G$
	$E_4 \xrightarrow{\quad} E_4 - G$
5 MG fetal adrenal gland	$\searrow$ $E_4 - S \quad (G < S)$
	$E_2 \quad \text{-----}$

	$E_3 \quad \text{-----}$

	$E_4 \quad \text{-----}$

Table 2. A schema of conjugate of E_2 in liver and kidney of fetus at second trimester.

homogenate of organe	metabolites after incubation
5 MG fetal liver	$E_2 \xrightarrow{\quad} G$
	$\searrow$ $E_2 - S, E_1 - S$
10 MG fetal liver	$E_2 \xrightarrow{\quad} G, \text{polyconjugates}$
	$\searrow$ $E_2 - S (E_1 - S)$
adult liver	$E_2 \xrightarrow{\quad} G$
	$\searrow$ $E_2 - S, E_1 - S$
5 MG fetal kidney	$E_2 \xrightarrow{\quad} E_2 - S, E_1 - S$
	$\searrow$ $E_2 - S, E_1 - S$
10 MG fetal kidney	$E_2 \xrightarrow{\quad} G$
	$\searrow$ $E_2 - S, E_1 - S$
adult kidney	$E_2 \xrightarrow{\quad} E_2 - 17 - G$

今回、 E_3 、 E_3 -16-Gと E_4 、 E_4 -Gについて、胎児の内因性エストロゲン濃度をはじめて量的に示し、その分布について述べる事ができた。ヒト胎児の臓器組織には、内因性の E_4 、 E_4 -Gはその分布に偏在性がみられた。しかも、 E_3 、 E_3 -16-Gに比して、大量に存在し、エストロゲン代謝の中心は E_4 であることがわかった。

臓器別では肝に E_4 が大量に内在するが、 E_3 はほとんど存在しない。腎では E_3 が主体であり、肝に比して、その拮合型 E_3 -16-Gが多く存在した。胎盤から大量に流されてくる E_3 を胎児腎を中心として拮合処理されていると考えられた。小腸では肝と同様に E_4 が大量に存在し、週数とともに増加する傾向がみられた。これは腸肝循環の成立による肝からの流出、又は腸管自体の酵素的変遷による可能を示すと考えられた。

Table. 1はヒト胎児の肝・腎・副腎と E_2 、 E_3 、 E_4 とのインキュベーションで産生された代謝物を図式化したものである。

副腎ではほとんど拮合をおこさないが、肝では E_2 、 E_3 、 E_4 に対して、glucosiduronationが大きく働き、腎では E_2 、 E_4 に対してsulfurylationが大きく働くが E_3 に対してはglucosiduronationが強く働いた。すなわち、 E_3 はもっぱら腎・肝により E_3 -16-Gへと拮合されている。これは成人における E_3 の拮合代謝形式と同様であった⁹⁾¹⁴⁾。

一方、 E_2 及び E_4 は妊娠中期の胎児肝では、主にglucosiduronate、腎ではsulfateへと拮合された。即ち、 E_4 は E_2 に似た代謝を受けることがわかった。

ところで、 E_2 の拮合に関して、山本らは²⁰⁾、妊娠10ヶ月の胎児組織と E_2 とのインキュベーション実験で、腎・肝のいずれにおいても、sulfateへの拮合を報告している。本庄らは¹¹⁾、成人の腎では、 E_2 はもっぱらglucosiduronate(E_2 -17-G)へと拮合される。又、ヒト腎での E_2 -17-Gの拮合・分泌・排泄は他の動物には認められず、ヒトに特異的であると述べている¹¹⁾¹²⁾。しかし、成人の肝では E_2 に対してsulfurylationが主である。

以上から、 E_2 の拮合において、胎児期中期以降、発育に伴ない肝ではglucosiduronation $\Rightarrow$ sulfurylation、腎ではsulfurylation $\Rightarrow$ glucosiduronationへと逆転変遷することが推定された(Table. 2)。

妊娠中期の胎児においては、 E_2 、 E_3 、 E_4 に対しては、かなりglucosiduronation能が大きいことがわかった。

胎児におけるエストロゲンの代謝を15,15- D_2 - E_2 -17 β を使用して検討し、 E_1 に代謝されるものの他に15 α OH- E_1 への代謝を認めた。

15 α OH- E_2 を代謝物として見出し得なかったが、代謝率がかなり早い可能性が考えられた。

従来、放射性 E_2 を無脳児に投与し、 E_4 の生成を見出したとか、妊婦尿・新生児尿の抽出物から酵素並びに酸水解をくり返して、 E_4 を分離したとかの報告しか、15位の水酸化の証明はなされていない。しかし、今回diuteriumを使うことにより、簡単にin vitroでこの水酸化を証明することができた。

胎児期のみにみられる E_4 の産生、代謝、即ち15 α -hydroxylationは妊娠時大量に存在するエストロゲンに対する胎児のいまひとつの対応、処理能である可能性が考えられた。

以上、胎児におけるエストロゲン代謝・拮合を検討し、考えられていた以上に、広汎・活発に行なわれていることが明らかになった。

今後、臨床上、胎児胎盤機能検査として、エストリオールを測定する場合、これらの胎児による活発なる代謝・拮合を考慮に入れて判定せねばならない。

VI. 結 語

ヒト胎児における非拮合型・拮合型エストロゲンの生体内分布並びにその拮合・代謝について検討して、次のことが明らかになった。

- 1) 分娩時, UA, UVではMPVより E_4 , E_4 -Gは高く, 胎児側での E_4 の産生, 又, E_3 -16-GはMPVよりUA, UVの方が高い傾向がみられ, 胎児側での E_3 の拮合が示された。
- 2) 胎児臓器での内因性エストロゲンのうち E_4 , E_4 -Gは肝を中心とする偏在性がみられ, 量的には E_3 , E_3 -16-Gに比して, 比較的大量に存在した。腎では E_4 , E_4 -Gは少なく E_3 -16-Gが多く存在した。
- 3) 胎児の臓器組織での拮合能の検討では, 副腎ではほとんど拮合をおこさないが, 肝では E_2 , E_3 , E_4 に対してglucosiduronationが大きく働いた。腎では E_2 , E_4 に対して, sulfurylationが大きく働くが E_3 に対してはglucosiduronationが強く働いた。成長に伴う拮合能の質的変遷が推定された。
- 4) 安定同位体並びにGC-MSを使ってヒト胎児肝でのエストロゲンの15位水酸化を証明した。

本論文の要旨は, 第61回近畿産婦人科学会学術集会(昭和54年9月, 於西宮), 第52回日本内分泌学会秋季大会(昭和54年10月, 於東京), 第53回日本内分泌学会総会(昭和55年5月, 於横浜), 第63回近畿産婦人科学会学術集会(昭和55年11月, 於京都), 第33回日本産婦人科学会総会学術集会(昭和56年5月, 於新潟), 第66回近畿産婦人科学会学術集会(昭和57年5月, 於奈良)において, 発表した。

最後に, 御指導御校閲賜った恩師岡田弘二教授, 並びに本庄英雄講師に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Bole, E., Wqvist, N. and Diczfalusy, E.: Metabolism of Dehydroepiandrosterone and Dehydroepiandrosterone Sulfate by the Human Foetus at Midpregnancy. *Acta Endocrinol.*, 52: 583-597, 1966.
- 2) Dell Acqua, S., Mancuso, S., Eriksson, G., Ruse, J.L., Solomon, S. and Diczfalusy, E.: Studies on the Aromatisation of Neutral steroids in pregnancy woman. 6. Aromatisation of 16α -hydroxylated C-19 steroids by mid term placentas perfused in situ. *Acta Endocrinol.*, 55: 401-414, 1967.
- 3) Den, K., Matsumoto, H., Fujii, K., Yoshida, T. and Takagi, S.: A radioimmunoassay of plasma unconjugated and conjugated estetrol. *Steroids*, 30: 521-529, 1977.
- 4) Diczfalusy, E., Cassmer, O., Alonso, C. and Miquel, M.: Oestrogens metabolism in the human foetus. *Acta Endocrinologica*, 37: 353-375, or 516-528, 1961.
- 5) Diczfalusy, E., Cassmer, O., Alonso, C. and Miquel, M.: Oestrogens metabolism in Human Foetus. -III- Nature of the conjugated oestrogen formed by the foetus. *Acta Endocrinologica*, 38: 31-49, 1961.
- 6) Goebelsmann, U., Erksson, G., Diczfalusy, E., Levitz, M. and Condon, G.P.: Rate of oestriol-3-sulfate and oestriol-16-glucosiduronate in the intact fetoplacental unit at mid-pregnancy. *Acta Endocrinologica*, 53: 391-400, 1966.
- 7) Hagen, A.A.: Formation of 15α -Hydroxyestriol from $4\text{-}^{14}\text{C}$ - 17β -estradiol and 6, 7, $\text{-}^3\text{H}$ -estriol by an-

- cephalic fetus. *J. Clin. Endocrinol.*, 30: 763–768, 1970.
- 8) Haynes, R.C., Mikhail, G., Eriksson, G., Wiquist, N. and Diczfalussy, E.: Oestradiol Metabolism in the previable human foetus and in the foeto-placental unit. *Acta Endocrinologica*, 45: 297–320, 1964.
- 9) Hobkirk, R., Green, R.N., Nilsen, M. and Jennings, B.A.: Formation of Estrogen Glucosiduronates by Human Kidney Homogenates. *Can. J. Biochem.*, 52: 9–13, 1974.
- 10) Hobkirk, R., Mellor, J.D. and Nilsen, M.: In vitro Metabolism of 17β -Estradiol by Human Liver Tissue. *Can. J. Biochem.*, 53: 903–906, 1975.
- 11) Honjo, H., Barua, N., Osawa, Y., Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A.: Studies on Phenolic Steroids in Human Subjects. XX. In vivo Conjugation and Metabolism of Estradiol- 17β in the Human Kidney. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43: 1294–1300, 1976.
- 12) 本庄英雄, 山本幸雄, 山元貴雄, 加藤英子, 大坪一夫, 大嶋一也, 山本 宝, 石原政茅, 岡田弘二: エストロゲンの抱合と代謝—特に腎の役割について—. *ホと臨*, 12: 1335–1360, 1977.
- 13) Honjo, H., Omori, K., Yamamoto, T., Otsubo, K., Sacai, C., Tsukamoto, K., Fujii, M., Yamaki, J., Okada, H., Numazawa, M. and Nambara, T.: Estriol and the kidney in pregnancy. *Asia Oceania J. Obstet. Gynecol.*, 7: 341–348, 1981.
- 14) Kirdani R.Y., Sampson, D., Murphy, G.P. and Sandberg, A.A.: Studies on Phenolic Steroids in Human Subjects. XVI. Role of Kidney in the Disposition of Estriol. *J. Clin. Endocrinol.*, 34: 546–557, 1972.
- 15) Leed, N.S., Fukushima, D.K. and Gallaher, T.F.: Studies of Steroid Ring D Epoxides of Enol Acetates; A new synthesis of estriol and of androstane- 3α , 16α , 17β -triol. *J. Am. Chem. Soc.*, 76: 2948– , 1954.
- 16) Mancuso, S., Benagiano, G., Dell Acqua, S., Shapiro, M., Wiquist, N. and Diczfalussy, E.: Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. 4. Aromatisation and hydroxylation products formed by previable fetuses perfused with androstenedione and testosterone. *Acta Endocrinol.*, 57: 208–227, 1968.
- 17) Matthews, J.S., Pereda, V.A.L. and Aguilera, P.A.: Steroids; CCXV the Quantitative Analysis of Steroids by Thin — Layer Chromatography. *J. Chromatog.*, 9: 331–338, 1962.
- 18) Nakayama, T., Arai, K., Tabei, T., Yanaihara, T., Satoh, K. and Fujita, Y.: Biosynthesis of estrogens in vitro perfusion of the human placenta. *Endocrinol., Japon.*, 14: 251–258, 1967.
- 19) Nambara, T., Numazawa, M., Tanaka, T. and Ohkubo, T.: Preparation of specific antisera to estriol-16-glucuronide by immunization with steroid attached to protein through positions in Ring-A. *J. Pharm. Dyn.*, 1: 55–61, 1978.
- 20) 大森研二: 妊娠初期胎児絨毛における Estriol-16-Glucosiduronate (E_3-16-G) の動態とその測定意義. *日本内分泌誌*, 58: 689–705, 1982.
- 21) Ryan, K.J.: Metabolism of C-16 oxygenated steroids by Human Placenta: the Formation of Estriol. *J. Biol. Chem.*, 234: 2006–2008, 1959.
- 22) Schwiers, J., Govaerts-Videtsky, M., Wiquist, N. and Diczfalussy, E.: Metabolism of estrone sulfate by the previable human foetus. *Acta Endocrinol. (kbh)*, 50: 597–610, 1965.
- 23) Sheehan, J.C., Erman, W.F. and Cruickhank, P.A.: The Formation of Five- and Six-membered Rings by the Acyloin Condensation. V. A Novel Conversion of 16-Ketoestradiol-3-methyl Ether to Estrone. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 147–148, 1957.
- 24) 塚本克美: 外因性 DHA-S, E_1 -S 投与時の妊婦血中, 尿中エストロゲンの推移, 京都府立医科大学雑誌. (Vol. 93, No. 9 掲載予定)

25) Wotiz, H.H., Charransol, G. and Smith, I.N.: Gass chromatographic analysis of free and total plasma estrogens as the Heptafluorobutyrate, 115-130, Ed, by Plovans, F., Surace, M. and Livisia, M., G.C determination of Hormonal Steroids, Academic Press. New York & London, 1967.

26) 山元貴雄：妊娠における Estriol-16-glucosiduronate (E_3-16-G) の動態に関する研究。日産婦誌, 31: 625-633, 1967.

27) 山本 宝, 坂井千秋, 大森 研二, 大坪一夫, 本庄英雄, 岡田弘二：エストロゲンの抱合・代謝における 胎児特異性, 産婦人科の世界, 30: 1222-1227, 1978.

28) Zucconi, G., Lisboa, B.P., Simonitish, E., Roth, L., Hagen, A.A. and Diczfalusy, E.: Isolation of 15α -hydroxy-estriol from pregnancy urine and from the urine of new born infants. Acta Endocrinol., 56: 413-423, 1967.

(受付日：59. 4. 4)