報 文

ウシ血清アルブミンを担体とするステロイドホルモン及び
その誘導体の液膜輸送挙動の解析

渡辺 貞夫・谷 孝之・渡辺 重信・妹尾 学

神奈川県衛生研究所 (〒241 横浜市旭区中尾町 52-2)

東京大学生産技術研究所 (〒106 東京都港区六本木7-22-1)

Analysis of Transport Behavior of Steroid Hormones and
Their Derivatives facilitated by Bovine Serum Albumin
through a Liquid Membrane

Sadao WATANABE, Takayuki TANI, Shigenobu WATANABE, and Manabu SENŌ

*Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

(52-2, Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama-shi, 〒241)

**Institute of Industrial Science, University of Tokyo

(7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo, 〒106)

The transport behavior of steroid hormones and their derivatives was investigated in a liquid membrane system with bovine serum albumin (BSA) as a carrier separating a hexane source phase (I) and a hexane receiving phase (II). The rate constant of hormone uptake from the hexane phase (I) to the water phase was designated as k_1 and the rate constant of release from the water phase to the hexane phase (II) as k_2 . Positive correlations were found between k_1 and the water/hexane partition coefficient of the hormone, while inverse correlations were noted between k_2 and the partition coefficient with and without added BSA. For lower partition coefficients, hormone uptake from the hexane phase (I) was rate-determining in the transport process, while release of the hormone from the water became so with increase in the partition coefficient. Transport behavior through the water membrane was governed primarily by partition coefficients between the water/hexane phases. For hormones, whose partition coefficients were less than 0.02, transport was accelerated by the addition of BSA. For hormones with partition coefficients over 0.02, the rate of transport lessened on addition of BSA.

1 緒 言

血しょう(漿)中のアルブミンは、遊離脂肪酸¹⁾、コレステロール、ステロイドホルモン²⁾などを結合して親水性タンパク質複合体を形成し、これらの輸送及び代謝に重要な役割を果たしている。著者らは、アルブミンの輸送特性を明らかにするために水-ヘキサン2相系で構成される液膜系で、ステロイドホルモン³⁾、カルバメート系農薬⁴⁾について、ウシ血清アルブミン(BSA)を担体とする液膜輸送実験を行い、ホルモンにおいてまた農薬においても水-ヘキサン2相系への分配係数が、この系での輸送挙動を支配する最も重要な要因であり、分配係数が低い場合に、BSAが添加されると輸送が促進されることを報告した。今回、ステロイドホルモン誘導体を加

えて、分配係数と輸送挙動との関連性についてさらに検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

BSAはシグマ社製(フラクション V A-8022, 純度96~99%)を使用した。アンドロステロン及びデヒドロイソアンドロステロンは和光純薬(株)製、エチニルエストラジオールは東京化成(株)製を、その他のステロイドホルモン及びその誘導体はすべてシグマ社製で、これらの主要なものの構造式をFig. 1に示した。

2.2 分析機器及び測定条件

試料中のホルモン濃度は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定した。使用機種は(株)島津製作

Hormone	Skeleton	R _I	R _{II}
β -Estradiol	A	-H	-H
β -Estradiol 3-benzoate	A	-COC ₆ H ₅	-H
β -Estradiol dipropionate	A	-COC ₂ H ₅	-COC ₂ H ₅
Testosterone	B	-H	-
Testosterone acetate	B	-COCH ₃	-
Testosterone propionate	B	-COC ₂ H ₅	-
Testosterone benzoate	B	-COC ₆ H ₅	-
Testosterone heptanoate	B	-CO(CH ₂) ₅ CH ₃	-
Progesterone	C	-CH ₃	-H
Corticosterone	C	-CH ₂ OH	-OH
Deoxycorticosterone	C	-CH ₂ OH	-H

Fig.-1 Structures of steroid hormones and their derivatives used.

所製 LC-4 A〔紫外分光光度系 (UV) 検出器 LPD-2 AS 及び蛍光検出器 RF-500 LC 付き〕で、 α -及び β -エストラジオール、及びエチニルエストラジオールは蛍光検出器 (Ex 285 nm, Em 305 nm), プロゲステロン及びテストステロンは UV 240 nm, アンドロステロン及びデヒドロイソアンドロステロンは UV 295 nm で、その他のホルモンは UV 230 nm で測定した。測定条件は、既報⁵⁾に準じ、カラムは LiChrospher 100, RP-18 (4.0 × 250 mm) を使用し、移動相はアセトニトリル : 水 (65 : 35, vol/vol) で溶離した。

2・3 輸送実験

輸送実験は、既報^{3), 4)}で使用した装置、すなわち Fig.-2 に示したような二重円筒型のガラス容器を用いた。内管の断面積 (S_1) は外管と内管で囲まれたドーナツ形の断面積 (S_2) の 1/2 である。実験は、1/15 M リン酸緩衝液 (0.012 M KH_2PO_4 及び 0.055 M Na_2HPO_4 , pH は 7.4 に調整) に溶解した 1% BSA 水溶液 100 mL を容器に入れ、その上に内管内にホルモンを溶かしたヘキサン 20 mL [ヘキサン原相 (I)] を加え、内管と外管の間には、ヘキサン 40 mL [ヘキサン受相 (II)] を加え、25℃定温条件下で下部をスターラーで一定速度でかくはんしながら、ステロイドホルモンの輸送実験を行った。ヘキサン原相中のホルモン濃度は原則として 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ としたが、ヘキサンへの溶解性の悪いものについてはより低い濃度で行った。スターラーのかくはんは水-ヘキサン界面が波打つ程度に行い、BSA 水溶液、及び BSA を加えないリン酸緩衝液についても同一条件下で同時に行い、定時的にヘキサン相 (I) 及び (II) から一定量を採取し、HPLC でホルモン濃度を

Fig.-2 Liquid membrane apparatus for BSA-facilitated transport of steroid hormone.

測定した。ヘキサン相 (I) 及び (II) 中のホルモン濃度を経時的にグラフに描き、グラフよりホルモン移行速度を求めた。

3 結果及び考察

3・1 ホルモンの BSA に対する親和性

水相中でのホルモン-BSA の結合性を評価するために、既法⁵⁾のように水-ヘキサン 2 相系へのホルモン分配係数 P (水相中のホルモン濃度/ヘキサン相中の濃度)

の変化から、結合係数 K (BSA 結合型ホルモン濃度/遊離型ホルモン濃度) を求める方法を用いた。すなわち、水相として BSA を含まないリン酸緩衝液を用いたとき、及び BSA を加えたときの分配係数をそれぞれ P^0 及び P とすると、結合係数 K は

$$K = (P/P^0) - 1 \quad (1)$$

として求められる。ただし、この式は P^0 が一定値をもつ濃度範囲内で成立する。200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度 (ヘキサンにこの濃度で溶解しないホルモンについては、液膜輸送で用いたのと同じ濃度) でステロイドホルモンを溶解したヘキサン溶液 10 mL と 1% あるいは 3% BSA 水溶液 50 mL の間で分配平衡に達した時、ヘキサン相のホルモン濃度の測定から分配係数 P を求めた。なお、分配係数が低い場合には水相をベンゼンで振とう抽出し、分離したベンゼン相のホルモン濃度から分配係数を求めた。求めた P^0 及び P の値から、式 (1) を用いて

結合係数 K を求め、その結果を Table-1 に示した。

テストステロンの水/ヘキサン分配係数は 0.27 で、ステロイド骨格の C-17 位のヒドロキシル基がアセテート、プロピオネート、ベンゾエート、ヘプタノエートと置換された誘導体においては、より疎水基への置換によりこの順に分配係数は低下した。一方、結合係数はアセテート、プロピオネートの順に増大するが、ベンゾエート、ヘプタノエートでは逆に低下した。テストステロンの C-17 位にメチル基あるいはエチニル基が付加した 17 α -メチルテストステロン及び 17 α -エチニルテストステロンの分配係数は、それぞれ 0.089 及び 0.098 とテストステロンに比べてかなり低下したが、結合係数にはそれほどの変化は認められなかった。 β -エストラジオールの分配係数は 1.31 で、C-3位のヒドロキシル基がベンゾエートに置換されると分配係数は極度に低下し、C-3 及び C-17 位がいずれもプロピオネートに置換され

Table-1 Partition coefficients and binding coefficients of steroid hormones and their derivatives and transport behavior of them across liquid membrane by BSA carrier.

	Initial hormone concentration in hexane ($\mu\text{g/mL}$)	Partition coefficient* ¹ $P^0 = [S]_w/[S]_h$		Binding coefficient $K = [S]_b/[S]_f$		Transport behavior* ²
				1% BSA	3% BSA	
α -Estradiol	5.9	0.91	$(42 \times 10^{-4})^{*3}$	7.1	23	E
β -Estradiol	3.4	1.31	(52×10^{-4})	7.3	27	E
β -Estradiol 3-benzoate	50	1.1×10^{-4}	(-)	71	290	P
β -Estradiol dipropionate	200	0.4×10^{-4}	(-)	1.0	3.5	P
Ethynylestradiol	32.3	0.51	(76×10^{-4})	38	110	E
Testosterone	200	0.27	(6.2×10^{-4})	2.9	9.5	T
Testosterone acetate	200	10×10^{-4}	(3×10^{-6})	9.0	37	P
Testosterone propionate	200	2.3×10^{-4}	(-)	43	116	P
Testosterone benzoate	100	0.57×10^{-4}	(-)	16	33	P
Testosterone heptanoate	200	0.36×10^{-4}	(-)	0.9	2.3	P
17 α -Methyl testosterone	200	0.089	(7.2×10^{-4})	3.6	11	T
17 α -Ethynyl testosterone	2.0	0.098	(4.6×10^{-4})	3.6	8.8	T
Androsterone	200	0.017	(2.0×10^{-4})	5.9	28	A
Dehydroisoandrosterone	200	0.050	(4.6×10^{-4})	6.1	33	T
Progesterone	200	0.0041	(1×10^{-4})	4.9	14	P
Corticosterone	1.4	18.0	(0.0125)	0.3	2.1	- ^{*4}
Deoxycorticosterone	100	0.11	(13×10^{-4})	3.6	6.5	T

$[S]_w$, total concentration of hormone in water phase; $[S]_h$, total concentration in hexane phase;

$[S]_b$, concentration of BSA-bound form in water phase; $[S]_f$, concentration of free form in water phase

* 1 Partition coefficients were measured between 50 mL of a phosphate buffer (no BSA) and 10 mL of hexane.

* 2 Transport behavior shown in Fig.-6

* 3 () is the value of partition coefficient of hormone between the water/1-octanol and the value was not obtained for two derivatives of β -estradiol and three derivatives of testosterone because of the extremely low value.

* 4 A measurement was impossible because corticosterone showed a high partition into water and a low solubility in hexane.

た β -エストラジオールジプロピオネートでは、さらに分配係数は低下した。疎水性のベンゾエートに置換されることにより、結合係数は増大するが、さらに疎水性の β -エストラジオールジプロピオネート〔一般的な疎水性の指標である水/1-オクタノール分配係数が極めて低く、測定不能 (Table-1) であったため、ここでは水/ヘキサン分配係数で疎水性を評価した〕は逆に結合係数は低下した。BSA に対する親和性は、疎水性と関連することが phenothiazine 誘導体⁶⁾、disopyramido 誘

導体⁷⁾、スルホニル尿素系薬物⁸⁾で認められている。本研究でもテストステロン及び β -エストラジオール誘導体では、疎水性の増加によりはじめ BSA に対する親和性は増すが、さらに疎水性が増すと逆に減少する傾向が認められた。これは生成した会合体の安定性が水溶液中では逆に低下し、その結果として親和性が低下するのではないかと考えられる。プロゲステロンの分配係数は 0.0041 であるが、C-21 位のメチル基の水素がヒドロキシル基に置換されたデオキシコルチコステロンでは、親

Fig.-3 Transport behavior of β -estradiol (β -E), β -estradiol 3-benzoate (E-b) and β -estradiol dipropionate (E-p).

Fig.-4 Transport behavior of testosterone (T), testosterone acetate (T-a), testosterone propionate (T-p), testosterone benzoate (T-b) and testosterone heptanoate (T-h).

Fig.-5 Transport behavior of progesterone (P) and deoxycorticosterone (D).

水性が増し分配係数は0.113と増大し、さらにC-11位にヒドロキシル基が付加したコルチコステロンでは、さらに分配係数が18.0へと増大した。一方、結合係数は逆にこの順で低下した。

3.2 BSAを担体とするホルモンの輸送

水液膜を通しての輸送挙動のいくつかの例 Fig.-3～Fig.-5に示した。 β -エストラジオール (Fig.-3) 及びテストステロン (Fig.-4) の場合、ヒドロキシル基がより疎水性の基に置換された誘導体においては、ヘキサン相 (I) から水相へのホルモン移行速度が低下した。このことは、BSA を含まないリン酸緩衝液においても、またBSA が添加された場合にも同様であった。Fig.-5に示したプロゲステロンとデオキシコルチコステロンの分子上の違いは、C-21 位のメチル基の水素がヒドロキシル基に置換しただけであるが、輸送挙動は大きく変動した。

著者らが行った6種類のステロイドホルモン (α -エストラジオール、エチニルエストラジオール、テストステロン、アンドロステロン、デヒドロイソアンドロステロン及びプロゲステロン) の液膜輸送の実験結果は、主として Fig.-6 に示したプロゲステロン (P 型とよぶ) アンドロステロン (A 型)、テストステロン (T 型) 及びエチニルエストラジオール (E 型) の4つの型で表せる³⁾。ヘキサン相 (I)、(II) 及び水相中のホルモン濃度をそれぞれ $[S]_h^I$ 、 $[S]_h^{II}$ 及び $[S]_w$ 、ヘキサン相 (I) から水相へのホルモン移行 (取り込み) 速度定数を k_1 、水相からヘキサン相 (II) への移行 (放出) 速度定数を k_2 と定義すると、Fig.-7 で示したヘキサン原相 (I) から水相をへてヘキサン受相 (II) へのホルモン輸送は

$$-d[S]_h^I/dt = k_1[S]_h^I \quad (2)$$

$$d[S]_h^{II}/dt = k_2[S]_w \quad (3)$$

式 (2) 及び式 (3) で表される。6種類ホルモンの輸送実験結果について解析処理をした。すなわち、Fig.-2 で示した装置で、 S_1 (8.9 cm²) 及び S_2 (17.8 cm²) から、 $-d[S]_h^I/dt$ 及び $d[S]_h^{II}/dt$ を mol/cm²/s で表すことにより、求めた k_1 及び k_2 を Table-2 に示した。ホルモンの水/ヘキサン2相間の分配係数と k_1 の間に正の相関 (リン酸緩衝液 $r=0.99$, 1% BSA 水溶液 $r=0.96$) が、 k_2 に対して負の相関 (リン酸緩衝液 $r=-0.91$, 1% BSA 水溶液 $r=-0.91$) が認められた。

分配係数の低いプロゲステロン ($P^0=0.0041$) の場合、コントロール (リン酸緩衝液) に比べ BSA の添加により k_1 段階が加速され、かつホルモン輸送 ($d[S]_h^{II}/dt$) が促進される。アンドロステロン ($P^0=0.017$) の場合、BSA の添加は k_1 段階を加速するが、ホルモン輸送量はほとんど変化しない。さらに、分配係数の高いテストステロン (0.265) の場合、BSA の添加は k_1 段階を加速するが、ホルモン輸送量はコントロールに比べ低下する。最も分配係数の高いエチニルエストラジオール (0.51) の場合、BSA の添加は k_1 段階に変化は生ぜず、一方ホルモン輸送量は低下する。本実験でステロイドホルモン及びその誘導体で得られた輸送実験結果を、前述の4つの型 (P, A, T, E 型) で表して Table 1 に示した。

液膜を介してのホルモン輸送が BSA の添加により促進されるかどうかをみるために、ホルモン輸送比 T [1%水溶液膜を通しての輸送によるヘキサン相 (II) のホルモン増加量/BSA を含まないリン酸緩衝液膜を通して

Fig.-6 Transport behavior of steroid hormones.

Table-2 Transport rate constants of steroid hormone.

		Transport rate constant	
		$k_1(\text{cm/s})^*$	$k_2(\text{cm/s})^*$
α -Estradiol	(phosphate buffer)	7.4×10^{-4}	1.4×10^{-5}
	(1% BSA solution)	7.4×10^{-4}	0.2×10^{-5}
Ethynylestradiol	(phosphate buffer)	3.6×10^{-4}	2.0×10^{-5}
	(1% BSA solution)	3.6×10^{-4}	5.6×10^{-7}
Progesterone	(phosphate buffer)	2.0×10^{-6}	5.5×10^{-4}
	(1% BSA solution)	4.6×10^{-6}	1.9×10^{-4}
Androsterone	(phosphate buffer)	1.1×10^{-5}	1.0×10^{-4}
	(1% BSA solution)	2.6×10^{-5}	0.4×10^{-4}
Dehydroisoandro-sterone	(phosphate buffer)	4.2×10^{-5}	8.8×10^{-5}
	(1% BSA solution)	11×10^{-5}	2.1×10^{-5}
Testosterone	(phosphate buffer)	1.5×10^{-4}	9.6×10^{-5}
	(1% BSA solution)	2.0×10^{-4}	3.8×10^{-5}

k_1 and k_2 are the transport rate constant of hormone from the hexane source phase (I) to the water phase and from the water phase to the hexane receiving phase (II), respectively.

の輸送によるホルモン増加量]を求め、結果を分配係数に対して表すと、分配係数 0.0041 以下のホルモンの輸送挙動は P 型を示し、分配係数 0.017 のアンドロステロンの輸送挙動は A 型、分配係数が 0.05 以上 0.27 以下のホルモンは T 型、分配係数 0.51 以上では E 型を示した (Fig.-8)。すなわち、BSA の添加は、分配係数が 0.02 以上の場合にホルモン輸送を抑制し、0.02 以下の場合にホルモン輸送が促進された。輸送比 T は分配係数の低下とともに大きくなるが、テストステロンプロピオネート (分配係数 2.3×10^{-4}) の場合を極大として逆に低下した。そこで、BSA の添加により輸送の促進されるホルモンについて、輸送比を BSA-ホルモン結合係

Fig.-7 Scheme of transport process.

数に対してプロットした結果、両者の間に正の相関($r=0.89$)が認められた (Fig.-9)。

この系での輸送挙動を支配する要因は、水-ヘキサン 2 相系への分配係数であり、分配係数が低い場合には $k_1 < k_2$ で (Table-2)、取り込みの k_1 段階が律速となり、BSA が添加されると k_1 段階を加速し、ホルモン輸送が促進される。また、BSA-ホルモン結合係数が高い

Fig.-9 Relationship between the transport ratio and the binding coefficient of hormones.

Fig.-8 Relationship between the partition coefficient and the transport ratio of hormones.

ほど、輸送を促進する。分配係数が高い場合には $k_1 > k_2$ となり、放出の k_2 段階が律速となり、BSA の添加は水相中でのホルモン-BSA 結合のため大きく k_2 値を低下させ逆にホルモン輸送を阻害する。なお、本研究の実験条件下におけるホルモン輸送の動力学的な解析については、現在定量的な議論を進めている。

4 総 括

液膜法により BSA を担体とする 6 種類のステロイドホルモンの輸送実験結果³⁾ のより詳細な解析を行い、これらのホルモンの誘導体を含めて液膜法による輸送挙動について検討した。ヘキサン原相 (I) から水溶液膜相、及び水溶液膜相からヘキサン受相 (II) のホルモン移行速度定数を k_1 及び k_2 とすると、分配係数が低い場合に取り込みの k_1 段階が律速となり、高い場合に放出の k_2 段階が律速となる。この系での輸送挙動を支配する最も重要な要因はホルモンの水/ヘキサン 2 相間の分配係数であり、分配係数が 0.02 以下の場合に、BSA の添加によりホルモン輸送の促進され、分配係数が 0.02 以上になるとホルモン輸送は BSA の添加により逆に抑制された、促進型の輸送挙動を示すホルモンの場合に、

ホルモン-BSA 結合係数と輸送比 T [1% BSA 水溶液膜を通しての輸送によるヘキサン相 (II) のホルモン増加量/BSA を含まないリン酸緩衝液膜を通しての輸送によるホルモン増加量] の間に正の相関が認められた。

[平成 2 年(1990 年) 3 月 16 日受理]

文 献

- 1) V.P. Dole, *J. Clin. Invest.*, **35**, 150 (1956)
- 2) 日本生化学会編, "生化学データブック [I]", 東京化学同人, 東京, (1979) p.1371
- 3) 渡辺貞夫, 谷 孝之, 渡辺重信, 妹尾 学, 薬誌, **109**, 12 (1989)
- 4) 渡辺貞夫, 谷 孝之, 渡辺重信, 妹尾 学, 油化学, **38**, 421 (1989)
- 5) 渡辺貞夫, 谷 孝之, 渡辺重信, 妹尾 学, 油化学, **38**, 710 (1989)
- 6) J. Krieglstein, W. Meiler, J. Staab, *Biochem. Pharm.*, **21**, 985 (1972)
- 7) Y.W. Chien, H.J. Lambert, T.K. Lin, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 961 (1975)
- 8) 後藤 茂, 吉富博則, 岸 征恵, 薬誌, **97**, 1219 (1977)