合(II)をしている。グロブリンではI, IIの他にステロイドの $C_3=O$ あるいは $C_{17}=O$ とグロブリンのペプチック結合の $-NH$ との間にステロイド $>C_3=O \leftarrow HN-C=O$ 蛋白型結合(III)あるいはステロイド $>C_{17}=O \leftarrow HN-C=O$ 蛋白型結合(IV)も存在する。すなわちアルブミンとの結合ではエストロン, アンドロステロン, デハイドロエピアンドロステロンはI型, テストステロン, コルチゾン, ハイドロコルチゾン, Δ_1 -デハイドロコルチゾン, Δ_1 -デハイドロハイドロコルチゾンはII型, メチルアンドロステジオール, エチニルエストラジオール, エストラジオール, エストリオールはI型およびII型の結合をしている。グロブリンとの結合ではメチルアンドロステジオール, エチニルエストラジオール, エストラジオール, エストリオールではI型およびII型, エストロン, アンドロステロン, デハイドロエピアンドロステロンではI型およびIV型, プロゲステロン, デスオキシコルチコステロンではIII型, テストステロン, コルチゾン, ハイドロコルチゾン, Δ_1 -デハイドロコルチゾン, Δ_1 -デハイドロハイドロコルチゾンではII型およびIII型の結合をしている。その結合量はアルブミン1 mol に対してステロイド1~3 mol, グロブリン1 mol に対してステロイド6~9 mol である。

群馬大学医学部内分泌研究所

UDC 577.17 : 547.92 + 547.96 : 615-092.25

172. 滝川決男：ステロイドホルモンと血清蛋白の関係(第8報*)

蛋白結合ステロイドの生物学的性質

Hiroo Takikawa : Interaction of Steroidal Hormones with Serum Proteins. VIII.
Biological Properties of Protein-bound Steroids.

(Endocrinological Laboratories, School of Medicine, Gumma University**)

Testosterone and estrone were each incubated with bovine serum albumin or globulin in a phosphate buffer (pH 8.0) and biological action of the steroid-serum protein complex so obtained was examined. Testosterone-globulin complex has the action of increasing the weight of seminal vesicle and prostate gland of mice, in about the same degree as that by crystalline testosterone, but the action of testosterone-albumin complex was somewhat weaker. Estrone-albumin complex showed about the same effect on rat vaginal smear as that of crystalline estrone but that of estrone-globulin complex was slow in the appearance of effect. Incubation of these complexes with bovine liver homogenate in phosphate buffer rapidly liberated the steroid from testosterone-albumin and estrone-globulin complexes, resulting in liberation of 50% of testosterone and 90% of estrone 8 hours later. This liberation was comparatively slower in testosterone-globulin and estrone-albumin complexes, resulting in liberation of 18% of testosterone and 44% of estrone after 8 hours.

(Received September 18, 1957)

Roberts¹⁾ はヒトの循環血液中の estrogen は血漿中のリポ蛋白と結合しているとし、著者の研究室の岡田²⁾ は家兎にテストステロンおよびデスオキシコルチコステロンの結晶浮遊液を注射してその血清から α, β グロブリンに結合したステロイドを検出し、また牛血清のCohn-VI 分画から β グロブリンに結合した androgen を抽出した。その抽出物の浮紙電気泳動像もペーパークロマトグラムの展開像もこの *in vitro* の実験から得られた血清グロブリン結合物質とよく一致している³⁾ ので生体内にも同様な結合が存在することが考えられる。そこでテストステロン, エストロンのアルブミンおよびグロブリン結合物質⁴⁾ について生物学的試験を行いその効果

* 第7報：本誌 79, 794(1959).

** Iwagami, Maebashi, Gumma-ken.

1) S. Roberts, C.M. Szego : Endocrinology 39, 183(1946); 41, 322(1947).

2) H. Okada : Endocrinol. Japon. 2, 130(1956).

3) H. Okada : Ibid. 4, 136(1957).

4) 滝川：本誌 78, 1274, 1280(1958).

を比較し、また肝組織による影響をしらべた。

精囊、前立腺重量⁵⁾ におよぼす効果 実験動物として生後 30 日に去勢して去勢後 40 日を経過した雄マウス 30 匹を各群 5 匹宛、A, A', B, C, C', D の 6 群に分けて A 群にはテストステロン・グロブリン結合試料の生理食塩水溶液 50 mg/cc を毎回 0.1 cc, A' 群にはテストステロン・アルブミン結合試料の生理食塩水溶液 64.3 mg/cc を毎回 0.2 cc, B 群には結晶テストステロンの生理食塩水浮遊液 0.63 mg/cc を 0.1 cc, C 群には対照牛血清グロブリンの生理食塩水溶液 50 mg/cc を 0.1 cc, C' 群には対照牛血清アルブミンの生理食塩水溶液 64.3 mg/cc を 0.2 cc, D 群には対照生理食塩水 0.1 cc を 1 日 1 回 10 日間連続して皮下注射した。各試料中のテストステロン結合量はアルブミン 4.9 mg/g, グロブリン 12.6 mg/g (第 7 報¹⁰⁾ Table I) であるから結晶テストステロン量および各注射試料中のテストステロン量は等しくなるよう調整されている。最終回の注射終了後 24 時間して殺し、精囊および前立腺を剔出し、Bouin 液で 24 時間固定してから 70% エタノールで 2 回洗浄し 2 枚の濾紙に挿んで 5 分間乾燥して torsion balance で速かに秤量した。実験結果は Fig. 1 に示した。

Fig. 1. Prostate Test for Serum Protein-bound Testosterone

- (A)(A') Protein-bound testosterone injection
(B) Crystalline testosterone injection
(C)(C') Control protein injection
(D) Control physiol. sal. injection

膣脂垢試験⁶⁾ 実験動物として正常性周期をもつ成熟雌ラッテを使用し卵巣剔除後 30 日間飼育してその間に膣脂垢をしらべ発情像を示さないもののみ 18 匹を選び各群 3 匹宛 A, A', B, C, C', D の 6 群に分けた。A 群にはエストロン・グロブリン結合試料の生理食塩水溶液 10 mg/cc を, A' 群にはエストロン・アルブミン結合試料の生理食塩水溶液 10.3 mg/cc を, B 群には結晶エストロンの生理食塩水浮遊液 0.15 mg/cc を, C 群には

Table I. Vaginal Smear Test for Serum Protein-bound Estrone

Time after injection (hrs.)	48	54	60	66	72	78	84
Injection							
Globulin-bound estrone inject. (A)	±	±	+	+	+	+	+
	—	—	+	+	+	+	—
Albumin-bound estrone inject. (A')	±	+	+	+	+	±	—
	—	±	+	+	+	±	—
Crystalline estrone inject. (B)	—	±	+	+	+	+	+
	±	±	+	+	+	—	—
	—	+	+	+	+	±	—
Control globulin inject. (C)	—	—	—	—	—	±	—
	—	—	—	—	±	—	—
Control albumin inject. (C')	—	—	—	±	—	—	—
	—	—	—	—	±	—	—
Control physiol. sal. inject. (D)	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—

5) V. Korenchevsky, M. Dennison : Biochem. J. **29**, 1720(1935).

6) E. Allen, E. A. Doisy : J. Am. Med. Assoc. **81**, 819(1923).

対照牛血清グロブリンの生理食塩水溶液 10 mg/cc を、C' 群には対照牛血清アルブミンの生理食塩水溶液 10.3 mg/cc を、D 群には対照生理食塩水を各 0.1 cc 宛 1 日 1 回 2 日間皮下注射した。各試料中のエストロン結合量はアルブミン 14.5 mg/g, グロブリン 15.3 mg/g (第7報¹⁰⁾ Table I) であるから結晶エストロン量および各注射試料中のエストロン量は等しくなるよう調整されている。注射終了後 48 時間から 6 時間の間隔で陰脂垢をスポイトで採取し、Thoma 血球算定板上に塗布し乾燥してからメタノールで固定し、Giemsa 液で染色して顕微鏡像をしらべた。判定は視野中の角化、上皮細胞数を算定して角化細胞数が 50% 以下のものを (-), 50% を (±), 50% 以上のものを (+) とした。実験結果は Table I に示した。

肝組織による実験 屠殺直後の新鮮な牛肝臓をリンゲル液で灌流して出来るだけ血液を除いた組織の一部に 0.01M 磷酸塩緩衝液 (pH 8.00) を加えて 10% ホモジネートをつくり、その 0.1 cc 宛を 4 本のキューベットに採りさらに上記緩衝液を加えて全量を 10 cc として各々にテストステロン・アルブミン結合物質 64.3 mg/cc, グロブリン結合物質 25.0 mg/cc, エストロン・アルブミン結合物質 25.8 mg/cc, グロブリン結合物質 25.0 mg/cc の各濃度に溶解した。別にホモジネートを加えない各試料 1 本宛を対照として磷酸塩緩衝液 0.1 cc 宛を加えて濃度が試料と等しくなるように調整して、絶えず振盪しながら $36.0 \pm 0.2^\circ$ に incubate した。incubate 後 1, 2, 3, 4, 6, 8 時間に各試料 1 cc を採りエーテル・クロロフォルムで抽出して遊離ステロイドを比色定量した。Fig. 2 にその吸光度と時間の関係を示した。ステロイドの定量はテストステロンは 0.1% *m*-ジニトロベンゼン・3N 苛性カリ・エタノール溶液による Zimmerman⁷⁾ 法, エストロンはフェノール・硫酸混液による Kober⁸⁾ 法で行った。各ステロイドの標準結晶で測定した検量線を Fig. 3 に示した。

Fig. 2. Increase of Free Steroid during Incubation with Liver Homogenate

- (1) Estrone-globulin
- (2) Estrone-globulin control
- (3) Testosterone-globulin
- (4) Testosterone-globulin control
- (5) Testosterone-albumin
- (6) Estrone-albumin
- (7) Testosterone-albumin control
- (8) Estrone-albumin control

Fig. 3. Calibration Curves for Testosterone and Estrone

testosterone : Zimmerman reaction
estrone : Kober reaction

実験結果および考察 各試料および対照中のステロイド量は等しくなるよう調製されているからマウスの精囊、前立腺重量に対する実験結果 (Fig. 1) からその効果を比較すると、テストステロン・アルブミン結合物質は

7) W. Ziemmerman : Z. Physiol. Chem. **233**, 257(1935); **245**, 47(1936).

8) S. Kober : Biochem. Z. **239**, 209(1931); Biochem. J. **32**, 357(1939).

テストステロン結晶よりもやや作用が弱い、グロブリン結合物質ではほとんど同程度の効果がみられた。

ラットの陰脂肪試験 (Table I) の結果ではエストロン・アルブミン結合物質には結晶エストロンとはほぼ同様な効果がみられたが、グロブリン結合物質では作用発現までの時間がやや遅いようである。対照食塩水注射群 (D) は全例とも陰性であつたが対照アルブミンおよびグロブリン注射群 (C, C') には疑陽性を示すものがあつた。これは恐らく原血清中残存する estrogen によるものではないかと考えられる。

牛肝臓ホモジネートとの incubation の実験結果 (Fig. 2) では、テストステロン・アルブミン結合物質 (5) およびエストロン・グロブリン結合物質 (1) からは急速にステロイドが遊離するが、テストステロン・グロブリン結合物質 (3) およびエストロン・アルブミン結合物質 (6) では比較相緩徐であつた。このことは第6報⁹⁾ および第7報¹⁰⁾ に報告したようにステロイドの種類によりアルブミン、グロブリンとの結合様式が異なっていることと考え合わせると興味あることのように思える。各ステロイドの遊離量は Fig. 3 の検量線から算出すると 8 時間 incubate したテストステロン・アルブミン結合物質 (5) ではテストステロン 0.16 mg/cc に相当し、エストロン・グロブリン結合物質 (1) ではエストロン 0.30 mg/cc に相当する。各ステロイドの結合量はテストステロン 4.9 mg/g, エストロン 15.32 mg/g であるから (第7報¹⁰⁾, Table I) この値から換算すると各試料中の全ステロイド量はテストステロン 4.9×0.0643 で 0.32 mg/cc, エストロン 15.32×0.025 で 0.38 mg/cc となり、テストステロン・アルブミン試料では全結合量の 50% が、エストロン・グロブリン試料では約 90% が解離したことになる。これに反してテストステロン・グロブリン結合物質 (3) では遊離テストステロン量の 8 時間値は 0.06 mg/cc に相当し全結合量の 18%, エストロン・アルブミン結合物質 (6) では 0.17 mg/cc で 44% が解離したに過ぎない。

ステロイドホルモンと血清蛋白の生体内での結合および解離については Szego^{11,12)}, Heard¹³⁾ 等がエストロン-16-C¹⁴ による実験で指摘しているように酵素系が触媒的に作用しているものと考えられ、この結合物質が肝臓組織との incubation で解離することから少なくとも解離の機構には酵素系が関係あるものと考察される。また第1報、第4報¹⁴⁾ に報告したようにコルチコイドがグロブリン特に α, β 分屑に多く結合すること、ステロイドと結合した α, β グロブリンは電気泳動易効度が低下して β, γ 分屑と重なり見かけ上の α 分屑比が減少して γ 分屑比が増加することは、ラットにコルチゾン, ACTH を投与した際に Sprague¹⁵⁾, Winter¹⁶⁾ 等が認めた *in vivo* の実験結果と一致しているので、この結合物質はそのまの型ではホルモンとして非活性態であるが、生体内で結合が切れることにより活性化してホルモン作用を発現するものと考えられ、ステロイドホルモンの循環型そのものであるとはいえないまでも、それに近い型態のものであると推論される。

終りに臨み本研究を通じて種々御援助を頂いた東京大学伊藤四十二教授に厚く謝意を表する。

群馬大学医学部内分泌研究所

9) 第6報: 本誌 78, 1296(1958).

10) 第7報: 本誌 79, 794(1959).

11) C.M. Szego, S. Roberts: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 61, 161(1946).

12) C.M. Szego: Endocrinology 25, 669(1953).

13) S.D.H. Heard, J.R. Jameson, S. Solomon: J. Am. Chem. Soc. 73, 4975(1951).

14) 第1報: 本誌 78, 1269; 第4報: 本誌 78, 1286(1958).

15) R.G. Sprague, M.H. Power, et al.: Arch. Int. Med. 85, 199(1950).

16) C.A. Winter, R.H. Silber, H.C. Stoerk: Endocrinology 47, 60(1950).