

ヒトの正常および病的副腎組織における  
プレグネノロンから  $\Delta^{16}\text{-C}_{19}$  ステロイドの生成

( $\Delta^{16}\text{-C}_{19}$  ステロイド/副腎)

仲田富士徳, 小原ひろみ\*, 常角 幸恵

化学教室

\*鳥取大学医学部 ステロイド医学研究施設 生化学部門

Biosynthesis of  $\Delta^{16}\text{-C}_{19}$  Steroids from Pregnenolone  
by Human Normal and Abnormal Adrenal Tissues

( $\Delta^{16}\text{-C}_{19}$  steroid/adrenal)

Fujinori NAKADA, Hiromi KOHARA\*, and Sachie TSUNEZUMI

*Department of Chemistry*

*\*Division of Biochemistry, Institute of Steroid Research, Tottori  
University School of Medicine*

(Received October 20, 1978)

To study the formation of 16-unsaturated  $\text{C}_{19}$  steroids from pregnenolone by human adrenal *in vitro*, normal and abnormal adrenal tissues were incubated with  $^3\text{H}$ - or  $^{14}\text{C}$ -labelled pregnenolone and the metabolites were analyzed.

1) Normal tissue was obtained from a 51 year-old woman with pyonephrosis, and the tissue was found to have produced androst-16-en- $3\beta$ -ol, in addition to cortisol and many other steroids which are well known to be biosynthesized. 2) The tissue obtained from a 19 year-old woman with Cushing's syndrome metabolized pregnenolone mainly to 11-hydroxysteroids, and to several other compounds in small quantities. Dehydroepiandrosterone and androst-16-ene derivatives were not produced in detectable quantities. 3) Adenoma tissues were obtained from a 5 year-old boy with Child-Hercules and a 44 year-old woman with virilism. The former's tissue produced androst-16-en- $3\beta$ -ol

while the latter's androsta-5,16-dien-3 $\beta$ -ol. Neither 11-hydroxy-steroids nor dehydroepiandrosterone was formed by the latter tissue in detectable quantities.

## 緒 言

$\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドについては幾つかの報告があり、Gower のこれについての総説<sup>1)</sup>もある。ヒトでのこのステロイドの生成については Stylianou ら<sup>2)</sup>は肝ホモジネートとテストステロンとのインキュベーション実験でアンドロスター-4,16-ジエン-3-オンを、Bickner ら<sup>3)</sup>は女性化疾患患者から得られた睪丸組織と、放射性プレグネノロンおよびプロゲステロンとのインキュベーション実験で、それぞれアンドロスター-5,16-ジエン-3 $\beta$ -オールおよびアンドロスター-4,16-ジエン-3-オンが生成されたと報告している。ヒトの副腎での  $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成については、Brooksbank ら<sup>4)</sup>によりこのステロイドが尿中に見出され、排泄されるアンドロスター-16-エン-3 $\alpha$ -オールの量が ACTH の投与により増加したとのかれらの報告<sup>5)</sup>がある。また Gower ら<sup>6)</sup>は男性化をともなった女性の副腎がん組織と、プレグネノロンおよびプロゲステロンとの実験から、アンドロスター-5,16-ジエン-3 $\beta$ -オールおよびアンドロスター-4,16-ジエン-3-オンの生成を報告している。

著者ら<sup>7)</sup>も多毛と月経異常を主訴とする女性患者の副腎がん組織とプレグネノロン-<sup>3</sup>H との実験からアンドロスター-5,16-ジエン-3 $\beta$ -オールの生成を報告した。さきに著者<sup>8)</sup>は腎がんの患者から得られ、肉眼的に病変の侵襲の認められない副腎組織と、プレグネノロン-<sup>14</sup>C とをインキュベーションした実験から、放射性のアンドロスター-16-エン-3 $\beta$ -オールの生成を報告した。このステロイドがヒト副腎組織で生成されたという報告は1例の実験ではあったが最初のものであった。

今回、膿腎症の患者より得られ、肉眼的に病変の侵襲の認められない組織について実験を行ない、このステロイドの生成を確認した。また、クッシング症および男性化をともなった副腎過形成患者より得られた組織についても実験を行ない、生成物を分析したので報告する。

## 実験材料および実験方法

**副腎組織**；実験に使用した副腎組織は膿腎症51才女性，クッシング症19才女性，副腎過形成による性早熟をともなった5才男児，および男性化をともなった44才女性の4例の患者から手術によって得られた。このうち膿腎症の患者から得られた組織は肉眼的には病変の侵襲は認められず正常であった。新鮮な組織は速やかに氷冷し実験に供した。

**ステロイド**；プレグネノロン- $^{14}\text{C}$  およびプレグネノロン- $^3\text{H}$  は The Radiochemical Centre (Amersham) より購入した。ステロイド化合物の標品は鳥取大学医学部ステロイド医学研究施設生化学部門所蔵のものおよび同研究施設生理学部門より供与された標品を使用した。

**インキュベーション**；副腎組織は摘出後速やかに氷冷し，遅くとも1時間以内に実験に供した。氷冷下に細切した組織は，0.2%のグルコースを含むKrebs-Ringer phosphate 緩衝液，pH 7.4 中で放射性プレグネノロンと37°Cで2時間，空気中でインキュベートした。実験に使用した組織，メジウム量，放射性プレグネノロンについて表1を掲げた。反応終了後，反応液に3倍量のジクロルメタンとメタノールの混液（3：1）を加えて反応を停止させ，一夜氷室中に置いた後ステロイドを抽出した。

TABLE I.

Patient	Disease	Sex	Age	Wt. of adrenal incubated (mg)	V. of buffer solution (ml)	Labelled pregnenolone (cpm)	( $\mu\text{g}$ )
M K	Pyonephrosis	Female	51	300	2.0	$^{14}\text{C}$ $1.2 \times 10^6$	8.3
Y I	Cushing's syndrome	Female	19	500	2.0	$^3\text{H}$ $3.2 \times 10^6$	11.5
H H	Child-Hercules	Male	5	1,250	5.0	$^3\text{H}$ $1.6 \times 10^6$	20.2
M T	Adrenal virilism	Female	44	500	2.0	$^{14}\text{C}$ $2.7 \times 10^6$	18.0

*Human normal (from MK) and abnormal adrenal slices were incubated with  $^3\text{H}$ - or  $^{14}\text{C}$ -labelled pregnenolone in Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) for 2hr at 37°C.*

**ステロイドの抽出**；氷室中に一夜置いた反応液は、20～25 ml のジクロルメタンで3回抽出し、抽出液を合して少量の水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後溶媒を留去し、残渣を遊離形ステロイド画分とした。ジクロルメタン抽出後の残渣に10～15 ml の n-ブタノールを加えて一夜氷室中に置いた後濾過し、濾液から n-ブタノールを除去した残留物を抱合形画分としたが、この分画については放射能を測定したのみで分析は行わなかった。

**放射能の測定**；放射能の測定には TRI-CARB 液体シンチレーションスペクトロメーター Model 3002 (Packard) を使用し、シンチレーターとしては PPO (2, 5-diphenyloxazol) 4g と POPOP (1,4-di[5-phenyloxazolyl]-benzene) 100mg をトルエンに溶解し 1 l とした液 10 ml を用いた。

**ステロイドの分離同定**；遊離形分画中のステロイドの分離は薄層クロマトグラフィー (TLC) によった。薄層には Kiesel gel G<sub>254</sub> (Merk 社) をガラス板に塗布し、加熱活性化して使用した。展開溶媒にはジクロルメタンとエタノールの混液 (96 : 4) を使用し、TLC 上の各放射能のゾーンは分別し、アセトンで抽出した。TLC を繰返して十分分離した後、アセチル化できるステロイドについては無水酢酸とピリジンで常法によりアセチル化し、ベンゼンと酢酸エチルの混液 (2 : 1)、ジクロルメタンとエーテルの混液 (9 : 1)、あるいはジクロルメタンとベンゼンの混液で TLC を行ない、とくに  $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドについては二次元の TLC によって分離した。各ステロイドに相当する放射能のゾーンからの抽出物の一部に、相当するステロイド、あるいはそのアセテートの標品を加えて再結晶し、TLC 上の位置および再結晶法による比放射能から同定を行なった。

## 実 験 結 果

反応液から抽出によって回収された放射能は90～95%であった。抽出された放射能に対する遊離形画分の割合は、正常例で94.4%、クッシング症例で92.4%、過形成例のうち男児例で90.2%、女性例で95.5%であった。

遊離形画分中の各ステロイドの生成は表2のようであった。

TABLE II. *Metabolism of  $^3\text{H}$ - or  $^{14}\text{C}$ - Labelled Pregnenolone by Human Normal and Abnormal Adrenal Slices. Amount (%) of Free Metabolites*

Steroid	Tissue			
	Normal	Cushing's syndrome	Child -Helcules	Virilism
Cortisol	6.6	36.6	2.9	—
Cortisone	—	3.5	—	—
Corticosterone	0.4	7.0	1.4	—
11-Deoxycortisol	4.1	—	9.8	3.9
$\Delta^5$ -Pregnene-3, 17, 20-triol	—	—	—	17.5
17-OH-Pregnenolone	8.7	4.5	6.2	7.1
17-OH-Progesterone	4.3	—	36.3	8.1
Progesterone	2.1	1.5	5.9	4.3
Dehydroepiandrosterone	4.3	—	1.1	—
Androstene-3, 17-dione	6.4	4.6	2.8	6.0
Androst-16-en-3 $\beta$ -ol	2.2	—	1.1	—
Androsta-5, 16-dien-3 $\beta$ -ol	—	—	—	0.8
11-OH-Androstene-3, 17-dione	1.2	17.2	3.9	—
Pregnenolone (as starting material)	44.3	5.0	23.0	21.1
Total	84.6	79.9	94.4	68.8

正常組織例では出発物質のプレグネノロンは44.3%残存しており、主生成物はコルチゾール6.6%、17-ヒドロキシプレグネノロン8.7%、アンドロステンジオン6.6%などであり、デヒドロエピアンドロステロンも4.3%の生成がみられた。副腎におけるこれらのステロイドの生成はよく知られているが、その他にアンドロスト-16-エン-3 $\beta$ -オールが2.2%見出された。

クッシング症の例では出発物質のプレグネノロンは、殆んど代謝されて僅かに5%が残っていた。主生成物質はコルチゾール36.6%で11-ヒドロキシ-アンドロステンジオンの17.2%がこれに次ぎ、コルチコステロン7.0%、アンドロステンジオン4.6%の生成もみられたが正常の副腎では生成されるデヒドロエピアンドロステロンは見出されなかった。

また、 $\Delta^{16}$ - $C_{19}$ -ステロイドの生成は確認されなかった。

副腎過形成のうち、5才男児の例ではコルチゾールの生成は少なく、主生成物質は17-ヒドロキシprogesteron 36.3%であり、11-デオキシコルチゾール9.8%、17-ヒドロキシpregnenolon 6.2%、progesteron 5.9%などが生成され、デヒドロエピandrosteronも僅かに(1.1%)見出された。44才女性の組織では11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドの生成は全く見出されず、この酵素系の欠如が見られた。主生成物は $\Delta^5$ -pregnenon-3 $\beta$ ,17,20 $\alpha$ -トリオール17.5%で17-ヒドロキシpregnenolon 7.1%、17-ヒドロキシprogesteron 8.1%がこれに次いでおり、androstenjion 6.0%も見出されたが、デヒドロエピandrosteronの生成は確認されなかった。

この過形成の2例とも、TLCを繰返すことのための放射能の逸失で、再結晶法による同定までには到らなかったが、二次元TLCにより前者の場合はandrosteron-16-en-3 $\beta$ -オール、後者ではandrosteron-5,16-jien-3 $\beta$ -オールの標品に一致して放射能のピークが見出され、精製の工程で失われた放射能の損失を補正した生成量は1.1%と0.8%であった。

## 考 察

Milner ら<sup>9)</sup>は副腎組織と放射性pregnenolonとのインキュベーション実験で、生成されるステロイドのパターンに影響を与える主要な因子は、インキュベーションの時間であったと報告している。

本実験の正常例において、主なステロイドの生成比は、Milner らの同じような実験の結果と比較して、コルチゾールは約 $\frac{1}{4}$ であり、デヒドロエピandrosteronはほぼ等しく、またandrostenjionや11-デオキシコルチゾールは4倍の値を示した。このことはこの組織の酵素系のうちで11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドを生成する酵素の活性がMilner ら<sup>9)</sup>の報告や、既報の著者の実験<sup>8)</sup>に使用した組織に較べ低いと推測される。しかし副腎での産生がよく知られているステロイドはすべて産生しており、pregnenolon代謝の酵素系にとくに異常があるとは考え難く、また肉眼的にも病変の侵襲は認められず正常であると考えられた。androsteron-16-en-3 $\beta$ -オールの2.2%の生

成が認められたが、これは既報<sup>8)</sup>の成績と一致した値である。ヒトにおける $\Delta^{16}-C_{19}$ ステロイドの生理的意義は明らかではなく、またヒト副腎からこのステロイドが分泌されているという直接の証明はない。このような *in vitro* の実験結果を直接生体内の反応にあてはめることはできないけれども、健康な女性の尿中にアンドロスト-16-エン-3 $\alpha$ -オール、アンドロスタ-4,16-ジエン-3 $\beta$ -オールなどの $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドが見出されており<sup>10)</sup>、これらのステロイドがACTHの投与によって増加する<sup>5)</sup>、ということからも正常なヒト副腎で $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドが生合成され分泌されているものと考えられる。

クッシング症の患者から得られた組織についての実験ではコルチゾール、コルチゾン、11 $\beta$ -ヒドロキシアンドロステンジオンなどの11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドが、生成物質の大部分を占めており、11 $\beta$ -水酸化酵素の活性の亢進が認められる成績である。 $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成は確認されなかった。Brooksbankら<sup>10)</sup>はクッシング症患者の尿中にアンドロスト-16-エン-3 $\alpha$ -オールが排泄され、術後排泄量が減少したと報告している。このことを考慮すれば、本実験でも少量の $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成を否定することはできないが、確認することはできなかった。

$\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイド生成のための基質については、ヒト肝組織とテストステロンとのインキュベーションからアンドロスタ-4,16-ジエン-3-オンの生成の報告<sup>2)</sup>、ウシ副腎組織とデヒドロエピアンドロステロンアセテートとから、アンドロスト-16-エン-3 $\alpha$ -オールの生成 Gower<sup>11)</sup>、ラット睪丸組織とデヒドロエピアンドロステロンとの実験でアドロスタ-4,16-ジエン-3-オンの生成 Gower<sup>12)</sup> などの報告がある。一方ヒト副腎のがん組織ではプレグネノロンやプロゲステロンは $\Delta^{16}-C_{19}$ ステロイド生成の基質となりえたがデヒドロエピアンドロステロンからは生成されなかった<sup>5)</sup>、また女性化症患者の睪丸組織でもテストステロンからは生成されなかった<sup>3)</sup>、と報告されている。

Gowerら<sup>13)</sup>、Ahmadら<sup>14)</sup>はブタ副腎および睪丸組織と種々のステロイドとのインキュベーション実験で、プレグネノロン、プロゲステロンからは $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドが生成されたが、デヒドロエピアンドロステロンからは殆んど生成されず、また17-ヒドロキシプレグネノロン、17-ヒドロキシプロ

ゲステロンからは全く生成されなかったと報告している。

本実験のクッシング症の場合にも、基質であるプレグネノロンの速やかな17-ヒドロキシ化のために、 $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドへ殆んど転換されなかったか、転換されても微量のために、その生成を確認するに到らなかったものと考えられる。

男性ホルモン異常症と診断された副腎過形成の、5才男児の組織ではコルチゾール、コルチコステロンなど少量の11-ヒドロキシ体の生成が認められ、この酵素系の活性はいくらか残存していたが、44才女性の組織ではこれらのステロイドの生成は全く認められなかった。このことはクッシング症の組織における、この酵素系の活性の亢進とは対称的で、過形成組織について知られている知見と合致している。

$\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成については、前者の組織ではアンドロスト-16-エン-3 $\beta$ -オールを、また後者の組織ではアンドロスタ-5,16-ジエン-3 $\beta$ -オールの標品に一致して、薄層上に放射能のピークが認められた。病的副腎組織での $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成については、Gowerら<sup>5)</sup>の副腎がん組織での実験の報告があるが、過形成例については殆んど見当らない。本報告の過形成の2例がそれぞれ異った $\Delta^{16}$ -ステロイドを生成した理由は明らかでない。

## 結 語

ヒト副腎組織と放射性プレグネノロンとをインキュベーションして、その遊離形生成物質を分析し、次のような結果が得られた。

1. 正常組織では副腎での生成が知られているステロイドの他に、アンドロスト-16-エン-3 $\beta$ -オールの生成がみられた。
2. クッシング症の患者の組織ではコルチゾール、11 $\beta$ -ヒドロキシアンドロステンジオンなどの11 $\beta$ -ヒドロキシ体が、生成物質のうちの大部分を占めていたが $\Delta^{16}-C_{19}$ -ステロイドの生成は確認されなかった。
3. 副腎過形成の2例のうち、1例は、11 $\beta$ -ヒドロキシ体の生成は僅かで、他の1例ではこの生成は全く認められなかったが、2例とも $\Delta^{16}-C_{19}$ -ス



テロイドの生成が認められ、前者の例ではアンドロスト-16-エン-3 $\beta$ -オールであり後者ではアンドロスタ-5,16-ジエン-3 $\beta$ -オールであった。

本論文の要旨の一部は第23回日本内分泌学会西部部会総会で報告した。

本研究をご指導いただいた鳥取大学医学部ステロイド医学研究施設生化学部門清水久太郎教授に厚くお礼を申し上げますとともに、ステロイド標品の幾つかを供与していただいた同研究施設生理学部門一井昭五教授、また組織を提供していただいた同医学部泌尿器科後藤甫教授、竹中生昌助教授、ならびに第3内科原田義道教授、引田亨講師に深謝致します。

## 引用文献

- 1) Gower, D. B. (1972) 16-Unsaturated C<sub>19</sub> steroids a review of their chemistry, biochemistry and possible physiological role. *J. Steroid Biochem.* **3**, 45-103.
- 2) Stylianou, M., Forchielli, E., Tummillio, M. and Dorfman, R. I. (1961) Metabolism in vitro of 4-<sup>14</sup>C-testosterone by human liver homogenate. *J. biol. Chem.* **236**, 692-694
- 3) Bicknell, D. C. and Gower, D. B. (1971) Studies of C<sub>19</sub> 16-unsaturated steroid excretion and formation in cases of testicular feminization. *J. Endocr.* **49**, i-ii
- 4) Brooksbank, B. W. L. and Gower, D. B. (1970) The estimation of 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androst-16-ene and other C<sub>19</sub>- $\Delta$ <sup>16</sup>-steroids in urine by gas-liquid chromatography. *Acta Endocr.* **63**, 79-90
- 5) Brooksbank, B. W. L. (1962) Urinary excretion of androst-16-en-3 $\alpha$ -ol levels in normal subjects, and effects of treatment with trophic hormones. *J. Endocr.* **24**, 435-444
- 6) Gower, D. B. and Stern, M. I. (1969) Steroid excretion and biosynthesis, with special reference to androst-16-enes, in woman with a virilizing adrenocortical carcinoma. *Acta Endocr.* **60**, 265-275
- 7) 引田 亨, 石飛和幸, 二宮哲博, 山下正樹, 松本行雄, 熊井三治, 原田義道, 生駒義人, 中村和夫, 仲田富士徳 (1977). 副腎皮質癌. 日本臨床 **35**, 秋季増刊号 704-705
- 8) Nakada, F. (1973) Biosynthesis of androst-16-en-3 $\beta$ -ol from pregnenolone-<sup>14</sup>C by human adrenocortical tissue. *Yonago Acta med.* **17**, 227-230

- 9) Milner, A. G. and Mills, I. H. (1970) Patterns of steroid biosynthesis by human adrenals incubated *in vitro* with [ $7\alpha$ - $^3\text{H}$ ] pregnenolone: changes with (a) gestational age, (b) incubation period and (c) weight of incubation tissue. *J. Endocr.* **47**, 369-378
- 10) Gower, D. B., Daly, J. R., Snodgrass, G. J. A. I. and Stern, M. I. (1970) steroid excretion and biosynthesis with special reference to  $\text{C}_{19}$ - $\Delta^{16}$ -steroid in an infant with a Virilizing adrenocortical carcinoma. *J. Endocr.* **63**, 79-90
- 11) Gower, D. B. (1963) Biosynthesis of androst-16-en- $3\alpha$ -ol from dehydroepiandrosterone by adrenocortical slices. *J. Endocr.* **26**, 173-174
- 12) Gower, D. B. (1966) A kinetic study of the *in vitro* metabolism of  $4$ - $^{14}\text{C}$ -dehydroepiandrosterone by rat testis tissue. *Steroids* **8**, 511-526
- 13) Gower, D. B. and Ahmad, N. (1967) Studies on the biosynthesis of 16-dehydro steroids. The metabolism of [ $4$ - $^{14}\text{C}$ ] pregnenolone by boar adrenal and testis tissue *in vitro*. *biochem. J.* **104**, 550-556
- 14) Ahmad, N. and Gower, D. B. (1968) The biosynthesis of some androst-16-enes from  $\text{C}_{21}$  and  $\text{C}_{19}$  steroids in boar testicular and adrenal tissue. *Biochem. J.* **108**, 233-241