

遠心限外濾過法による Androgen の 血清蛋白結合に関する研究

特に, Dehydroepiandrosterone sodium sulfate の
正常婦人ならびに正常妊婦の血漿蛋白との結合について

金沢大学医学部産科婦人科学教室(主任 赤須文男教授)

石川 久夫

(昭和38年12月13日受付)

1934年 Butenandt ら¹⁾によつて尿中から, 1954年には Migeon ら²⁾によつて血中から分離された Dehydroepiandrosterone (DHA) は, 周知の如く, Androsterone, Etiocholanolone などと共に尿中および血中 17-Ketosteroids (17-KS) の主要な分画であり, 副腎皮質由来のステロイドホルモンと考えられている。即ち, Lieberman ら³⁾ (1953) は副腎皮質の機能亢進(例えば ACTH 投与による副腎皮質刺激)が常に DHA の多量排泄を伴うことなどから, DHA は副腎皮質に由来するものであろうと推測し, Pregnenolone をその前駆物質と考えた。しかし, 1957年 Plantin ら⁴⁾は手術によつて剔出した副腎腫瘍組織から DHA を抽出し, DHA が副腎より分泌されることを示唆した。さらに, Lombardo ら⁵⁾ (1959) は乳癌の精神病患者の副腎静脈血から, また, Bush ら⁶⁾ (1959) は多毛症の女子の副腎静脈血より DHA を抽出し, DHA は副腎皮質ホルモンの単なる排泄型ではなく, それ自体が副腎皮質より分泌されるステロイドであることが明らかとなった。

赤須はこの事実に注目し, DHA が副腎から分泌されている以上, 従来から推知されている Testosterone や Estrogen への前駆物質としての DHA の他に, DHA には何らかの生理的意義, 例えば全身的作用をもつものと考え, ことに, 天然の蛋白同化ステロイドとして, 異化ステロイドである Cortisol と拮抗調節的作用をなしているのではないかと想定している。

私もこの見地から, DHA の生理的意義に関する研究の一端として, 既報論文⁷⁾で Dehydroepiandroster-

one sodium sulfate (DHA・S) とウシ血清蛋白との結合率を遠心限外濾過法を用いて測定し, 蛋白濃度 6.8 g/dl, 温度 37.5°C, pH 7.4 の条件では 96~97%であることを報告した。

今回は, 正常婦人血漿, 正常妊婦血漿について, 前報と同様, 遠心限外濾過法を用いて DHA・S の蛋白結合状態を観察したのでその結果を記載する。

実験方法

1. 遠心限外濾過法

1) 遠心限外濾過装置

前報⁸⁾と同一の装置を使用したのでその詳細は省略する。また, 限外濾膜には, 良質の和紙を5%のコロジオン溶液に浸した後, 間隙 0.3 mm のスリットを通して3分間室温で乾燥させた, いわゆる標準和紙コロジオン膜⁹⁾を用いた。

2) 温度, pH の調節

前報⁷⁾に記載した方法により, 遠心操作中の温度を $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に, 試料(被検血漿)の pH を 7.3~7.5 に調節した。

3) 遠心限外濾過

回転半径 15 cm, 3,000 r.p.m. で20分間遠心した。

2. 血漿蛋白定量法, 血漿蛋白分画定量法

血漿蛋白総量は日立血清蛋白計を使用して測定し, 血漿蛋白分画値は濾紙電気泳動法¹⁰⁾にて測定した。なお, 私の正常値は, 血漿蛋白総量が 6.5~8.2 g/dl, アルブミン分画比は 47.9~55.5%である。

実験成績

[I] Dehydroepiandrosterone sodium sulfate

Studies on the Patterns of the Binding of Androgen with Serum Protein by the Method of Centrifugal Ultrafiltration, Especially of the Binding of Dehydroepiandrosterone Sodium Sulfate with Normal Non-Pregnant and Pregnant Women's Plasma Protein. Hisao Ishikawa, Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. F. Akasu), School of Medicine, Kanazawa University.

の正常婦人血漿蛋白との結合について

1943年 Rakoff ら¹¹⁾が妊婦血清の無蛋白濾液中に Estrogen が検出されないことから血清蛋白と結合した Estrogen 分画の存在を示唆して以来、血中のステロイドはすべて蛋白と結合していることが明らかとなつて来た。DHA もその例にもれず、血漿蛋白または血清蛋白と結合しているとされているが、その結合状態に関する研究報告は他のステロイドのそれに比して非常に少なく、2, 3 を数えるに過ぎない。

まず、Eik-Nes ら¹²⁾(1954)は水と5%血清アルブミン溶液に対する溶解度の差から、DHA が血清アルブミンと結合することを示唆し、Bongiovanni ら¹³⁾(1957)は透析法および塩析法で DHA の血漿蛋白結合率を測定してそれが50~100%であることを確かめ、Oertel ら¹⁴⁾(1958)も DHA の蛋白結合率を約25%と報告している。近年になつて、Chen ら¹⁵⁾(1961)は遠心限外濾過法を使用して、血漿ならびに5%のアルブミン溶液に³HでラベルされたDHAを添加してその蛋白結合率を測定しているが、DHAの結合に関与する蛋白分画はアルブミンであり、結合率は92~95%であつたと報じている。Puche ら¹⁶⁾(1962)も透析法によつてDHA・Sとウシ血清アルブミンとの結合を観察し、DHA・S濃度が55μg/dlの際の結合率を84%と報告し、さらにその結合の本態について、陰イオン化したDHA・Sとアルブミンのアルギニン基との間の電気的結合であると論じた。

先に私⁷⁾は遠心限外濾過法を用いてウシ血清蛋白(濃度6.8g/dl)とDHA・Sの結合状態に検討を加え、(1)ウシ血清蛋白とDHA・Sの結合率は蛋白濃度6.8g/dl, 37.5°C, pH 7.4では96~97%であること、(2)DHA・Sの濃度によつてDHA・Sの蛋白結合率は変化せずほぼ一定であり、また、蛋白濃度が減少するにつれて単位蛋白量当りのDHA・S結合量は急速に増加することから、DHA・Sの結合に関与する血清蛋白分画は主として大きな結合能力をもつたアルブミンと思われること、(3)DHA・Sの血清蛋白との結合に関する私の実験成績が Freundlich の吸着式にかなりよくあてはまることから、その結合は化学的な性質のものではなく主に物理的な吸着によるものと推測されることなどを報告した。

今回は前実験に引き続き、正常婦人の血漿について同様の実験を試みた。

実験材料および実験方法

1) 実験材料

血漿は血液銀行の婦人供血者および金沢大学医学部附属病院に勤務する看護婦からの提供を受けた。ヘパ

リンで内面をぬらした注射器で1人当り50mlずつ正中静脈から採血し、速やかに遠心して血漿を分離、実験に供するまで冷蔵庫に保存した。

2) 実験方法

A) DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼすDHA・S濃度の影響についての実験

各種濃度のDHA・Sを含む試料(被検血漿)を遠心して、濾球中のDHA・S量から試料中の拡散性DHA・S濃度を求めた。

a) 試料の調製

0.04%のDHA・S水溶液を順次蒸溜水で稀釈し、これに等量の血漿を混じてDHA・Sの終末濃度を80, 120, 160, 200μg/mlにした。これら試料の各50mlをpH補正後、4個の限外濾過管に分けて遠心した。

b) 遠心限外濾過

37.5±0.5°C, 3,000 r.p.m. で20分間遠心した。遠心後、4個の限外濾過管の無蛋白濾液を集め、蒸溜水を加えて全量を20mlにした。

c) 濾液中DHA・Sの定量

Solvolysisを応用した2 Step Hydrolysis¹⁷⁾によつて第1表の如く水解・抽出し、Zimmermann反応を用いて比色定量した。比色は分光光光度計(日立EPU 2型)を使用して、波長460, 520, 580 mμでの吸光度を測定し、Allenの補正式を用いて補正した。なお、拡散性DHA・S濃度はMcLeanら¹⁸⁾に従つて次式から血漿中の水分量を計算し、拡散性DHA・Sの濃度は水1g当りの量で表わした。

$$W = 99.0 - 0.75 \times P$$

W: 血漿 100 ml 中の水分量 (g)

P: 血漿蛋白濃度 (g/dl)

また、血漿中の非添加DHA・S量(blank)は0とみなした。

B) DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす血漿蛋白濃度の影響についての実験

DHA・S 100 mg をエタノール 100 ml に溶解させ、それを 10 ml 宛分割し、エタノールを蒸発乾固させた後、それぞれに血漿 50ml, 血漿 40 ml + 蒸溜水 10 ml, 血漿 25 ml + 蒸溜水 25 ml を加えて DHA・S 終末濃度が 200μg/ml, 蛋白濃度がそれぞれ 7.4, 5.9, 3.7 g/dl の試料を調製した。これについて実験A)と全く同様に、遠心・水解・抽出・発色の操作を加えた。

実験成績

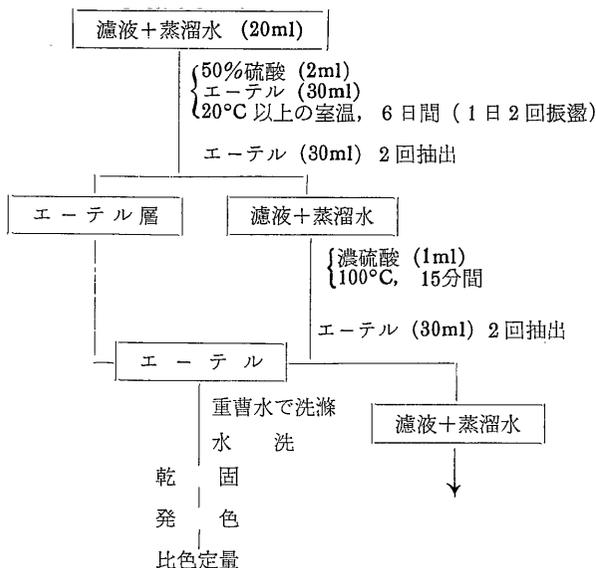
A) DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼすDHA・S濃度の影響についての実験成績

血漿蛋白濃度 3.1 g/dl (アルブミン分画比 47.2%), pH 7.3~7.5, 温度 37.5°C の条件で、血漿中 DHA・S

濃度と拡散性 DHA・S 濃度との関係を見ると、第 2 表の如く、DHA・S 終末濃度が 82.9, 124.3, 165.8, 207.2 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$ の際の拡散性 DHA・S 濃度はそれぞれ平均 5.8 ± 0.45 , 8.9 ± 0.69 , 10.5 ± 0.27 , $13.4 \pm 0.98 \mu\text{g/gH}_2\text{O}$ であつた。また、全 DHA・S 量に対する非拡散性 (結合型) DHA・S 量の分画比、即ち血漿蛋白結合率を求めると第 2 表および第 1 図に示される如く、DHA・S

終末濃度が 82.9, 124.3, 165.8, 207.2 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$ ではそれぞれ平均 93.0 ± 0.51 , 92.9 ± 0.53 , 93.7 ± 0.16 , $93.6 \pm 0.49\%$ と DHA・S 濃度と無関係にはば一定とみなすことができた。血漿蛋白 1 g 当り、および、アルブミン 1 g 当りの DHA・S 結合量を求めると、それぞれ平均 2.4 ± 0.01 , 5.2 ± 0.01 ; 3.7 ± 0.01 , 7.8 ± 0.01 ; 4.9 , 10.4 ± 0.01 ; 6.1 ± 0.01 , $12.9 \pm 0.01 \text{ mg}$ となり (第 2 表),

第 1 表 濾液中 DHA・S の定量法



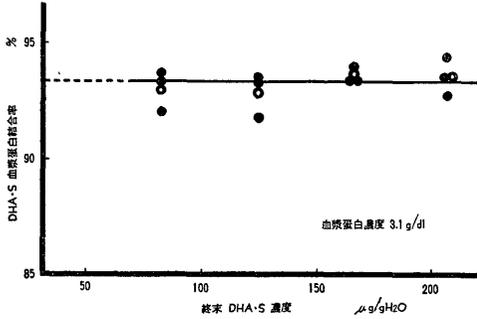
第 2 表 DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす DHA・S 濃度の影響 (アルブミン分画比 47.2%)

終末血漿蛋白濃度 g/dl	終末 DHA・S 濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	拡散性 DHA・S 濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	DHA・S 血漿蛋白結合率 %	DHA・S 血漿蛋白結合量 mg/g	DHA・S 血漿アルブミン結合量 mg/g
3.1	82.9	6.7	92.0	2.3	5.1
"	"	5.2	93.7	2.4	5.2
"	"	5.6	93.3	2.4	5.2
		5.8 ± 0.45	93.0 ± 0.51	2.4 ± 0.01	5.2 ± 0.01
3.1	124.3	8.4	93.3	3.7	7.8
"	"	8.1	93.5	3.7	7.8
"	"	10.3	91.8	3.6	7.7
		8.9 ± 0.69	92.9 ± 0.53	3.7 ± 0.01	7.8 ± 0.01
3.1	165.8	10.0	94.0	4.9	10.5
"	"	10.8	93.5	4.9	10.4
"	"	10.8	93.5	4.9	10.4
		10.5 ± 0.27	93.7 ± 0.16	4.9	10.4 ± 0.01
3.1	207.2	13.3	93.6	6.1	12.9
"	"	15.1	92.7	6.0	12.8
"	"	11.7	94.4	6.2	13.0
		13.4 ± 0.98	93.6 ± 0.49	6.1 ± 0.01	12.9 ± 0.01

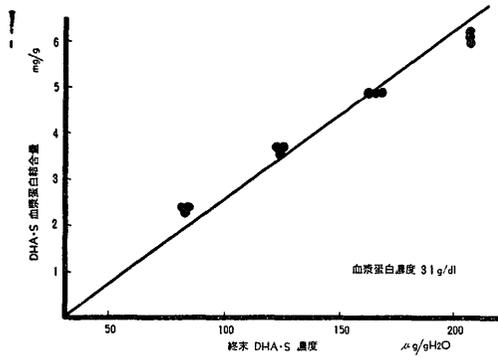
第2図にみられるように DHA・S 濃度の増加とほぼ比例的に増加している。

B) DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす血漿蛋白濃度の影響についての実験成績
 血漿蛋白濃度の変化が DHA・S-血漿蛋白結合に及

第1図 DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす DHA・S 濃度の影響



第2図 DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす DHA・S 濃度の影響

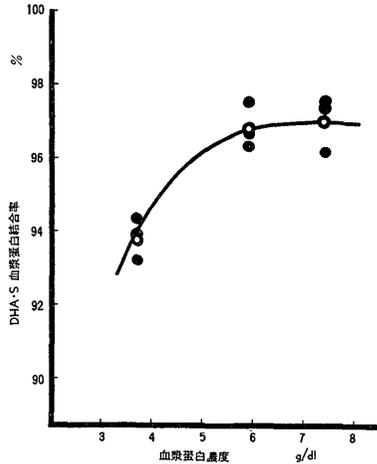


ぼした結果を第3表に示した。蛋白濃度が 3.7, 5.9, 7.4 g/dl と増加すると、拡散性 DHA・S 濃度は平均 12.9 ± 0.66 , 7.0 ± 0.43 , $6.3 \pm 0.94 \mu\text{g/gH}_2\text{O}$ と減少する。この時の蛋白結合率を図示すると第3図の如く、蛋白濃度 3.7g/dl では平均 $93.8 \pm 0.31\%$, 5.9 g/dl では平均 $96.8 \pm 0.20\%$, 7.4g/dl で $97.0 \pm 0.45\%$ と曲線的な変化をみせ、蛋白濃度 6.0 g/dl 以上では 97% 前後とほぼ一定であり、6.0 g/dl 以下では蛋白濃度の減少につれて急激に減少している。また、血漿蛋白あるいは血漿アルブミン 1 g 当りの DHA・S 結合量を求めると、それぞれ 5.1 , 11.5 ± 0.01 ; 3.3 , 7.6 ± 0.01 ; 2.6 , $5.9 \pm 0.01 \text{ mg}$ であった。

考按および小括

第4表に DHA の蛋白結合に関する諸家の報告をま

第3図 DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす血漿蛋白濃度の影響



第3表 DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす血漿蛋白濃度の影響 (アルブミン分画比 44.0%)

終末血漿蛋白濃度 g/dl	終末 DHA・S 濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	拡散性 DHA・S 濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	DHA・S 血漿蛋白結合率 %	DHA・S 血漿蛋白結合量 mg/g	DHA・S 血漿アルブミン結合量 mg/g
3.7	207.8	12.7	93.9	5.1	11.4
"	"	14.1	93.2	5.1	11.4
"	"	11.8	94.3	5.1	11.5
		12.9 ± 0.66	93.8 ± 0.31	5.1	11.5 ± 0.01
5.9	211.4	6.3	97.5	3.3	7.7
"	"	7.8	96.3	3.3	7.5
"	"	7.0	96.7	3.3	7.6
		7.0 ± 0.43	96.8 ± 0.20	3.3	7.6 ± 0.01
7.4	214.0	5.2	97.5	2.6	5.9
"	"	5.6	97.4	2.6	5.9
"	"	8.2	96.1	2.6	5.8
		6.3 ± 0.94	97.0 ± 0.45	2.6	5.9 ± 0.01

第4表 DHA の蛋白結合率に関する諸家の報告

	実験材料	実験方法	蛋白結合率
Bongiovanniら ¹³⁾ (1957)	人血漿 (DHA 経口投与後)	透析法	100%
		塩析法 (水酸化亜鉛)	93~65
		“ (トリクロル酢酸)	55
		“ (硫酸アンモン)	100
		pH 3.0, 50°C, 20分間放置	72
Chenら ¹⁵⁾ (1961)	5%アルブミン溶液 (DHA 添加量 100μg/dl) 以下	遠心限外濾過法 (pH 7.4, 37°C)	91
	人血漿 (DHA 添加量 100μg/dl) 以下	“	91前後
Pucheら ¹⁶⁾ (1962)	5%ウシアルブミン溶液	透析法 (pH 7.4, 5~6°C)	84
石川 ⁷⁾ (1963)	ウシ血清	遠心限外濾過法 (pH 7.4, 37.5°C)	96~97

とめて記載した。DHA の蛋白結合率について数値の不一致がみられるのは主として実験方法の相違によるものであろう。DHA と血漿蛋白 (恐らくはアルブミン) との結合は、Pucheら¹⁶⁾がアルブミンのアルギニン基との間の電気的結合と述べ、私⁷⁾が物理的な吸着と考えているように、恐らく単一の性質のものではなく、非常に強固に蛋白と結合しているものから極めて弱い力で蛋白に結びついているものまで種々の段階があると思われる。従つて、生理的な蛋白結合状態を観察するためには、血漿または血清の物理的・化学的性質を極力損なわぬようにすることが肝要であろう。この点、塩析法では血漿の性質に非生理的な変化をきたす可能性が大きく、Bongiovanniら¹³⁾の実験(第4表)で除蛋白剤の種類によつて結合率が55~100%と大きな変動を示しているのもこれが原因と思われる。透析法においても、多量の試料を必要とする他に、比較的長時間を要するため蛋白の変性をきたす恐れがある。前報⁷⁾と同様、今回の実験で私の使用した遠心限外濾過法は要する試料も極めて少量であり、遠心力の影響(軽微と考えられる)のみ除去すれば、血漿の性質を損なわずにDHA・Sを蛋白結合型と非結合型に分けることができると思う。pHの調節も脱出したCO₂を補う生理的な操作であり、また、温度の調節も極めて容易である。

ただ、限外濾液中のDHA・S定量に用いたZimmermann反応ではDHA・Sの微量測定が困難であるために、抽出過程で回収率のよい2 Step Hydrolysisを応用してもなお血漿に対して多量のDHA・Sを添加せねばならなかつた。即ち、DHA・Sの正常婦人血中濃度

はConradら¹⁹⁾によれば85~166 μg/dlとされているのに対して、本実験で用いた試料のDHA・S終末濃度は200 μg/mlであり、本実験の成績から生理的なDHA・S-蛋白結合状態を推察するためには、DHA・S濃度の影響をまず検討せねばならなかつた。私はDHA・S濃度を80~200 μg/mlの範囲で変化させて、それが蛋白結合に及ぼす影響を観察したが、前報⁷⁾の結果と同様に、DHA・S濃度の増加につれて蛋白1g当りのDHA・S結合量は比例的に増加し(第2図)、蛋白結合率には殆んど変化のないことを確かめた(第1図)。従つて、本実験の成績をもつて正常婦人の血中DHA・Sの生理的蛋白結合状態を推測することに大きな誤りはないと思われる。

前報⁷⁾では、DHA・Sを血清に添加する際に、直接血清に溶解させる方法はDHA・Sの水に対する比較的低い溶解性から完全に溶解しない危険性を考慮して、一たん水に溶解させ、このDHA・S水溶液と血清とを任意の比率で混合して蛋白結合率と蛋白濃度の関係を求め、両者の関係から正常蛋白濃度での結合率を推測した。今回はDHA・Sをエタノールに溶解させた後、エタノールを蒸発乾固、その残渣を種々の蛋白濃度の血漿に直接溶解させて、蛋白結合率と蛋白濃度との関係を求めた。その結果、蛋白濃度3.7 g/dlでの結合率は93.8%であり(第3表)、前実験(実験A)における蛋白濃度3.1 g/dl(DHA・S濃度200 μg/ml)の時の結合率93.6%(第2表)と同値で、直接DHA・Sを血漿に添加することによつて何ら実験成績に誤差を生じないことが明らかとなつた。

以上、pH 7.4, 温度 37.5°C の条件で正常婦人血漿

蛋白と DHA・S の結合率を測定し、次の結論を得た。

1) DHA・S の蛋白結合率は蛋白濃度が 6.0 g/dl 以上ではほぼ一定で 97% 前後であり、蛋白濃度が 6.0 g/dl 以下に低下すると急激に結合率は減少する。

2) DHA・S の蛋白結合率は DHA・S の濃度とはほぼ無関係と思われる。

3) 従つて、正常婦人の血中の DHA・S のうち約 97% が血漿蛋白 (恐らくアルブミン) と結合して存在するものと考えられる。

〔Ⅱ〕 Dehydroepiandrosterone sodium sulfate の正常妊婦血漿蛋白との結合について

妊娠によつて母体の下垂体・副腎・卵巣などの内分泌腺は形態的にも機能的にも著しい変化を示し、胎盤もまた、胎児循環の新陳代謝を司さる他に内分泌腺としての機能を営んでおり、肝などでの代謝あるいは血液性状の変化などとあいまつて、母体の内分泌動態は妊娠時に特異な様相を呈してくることは周知のところである。血中 Androgen についても同様に妊娠によつて特異な動態を示すものと考えられるが、その 2, 3 の報告を次述する。

Gardner ら²⁰⁾ (1954) は 33 名の正常男子および女子を対照にして妊娠末期の妊婦 30 名の血中 17-KS 値を測定し、正常男子および女子の血中 17-KS 値には大差なく平均 61 μ g/dl であつたのに対して、妊娠婦人のそれは 18 μ g/dl と著しく低値であつたと述べ、妊娠末期における母体の Androgen 産生が減少しているためと考えた。Migeon ら²¹⁾ (1955) も妊娠末期の妊婦血を検討し、Androsterone の量については対照と差はないが、DHA 値は対照に比して低かつたとしている。本邦では金井²²⁾ (1958) が同様の実験を試み、上述の報告とほぼ一致した結果を得ている。一方、千葉²³⁾ (1959) は生物学的測定法で血中 Androgen 量を測定し、正常妊婦の血中 Androgen は妊娠月数の増加に伴つて漸次増加し、9, 10 カ月で最高値を示し、分娩後には急激に減少して 1 週目で正常値に近づくと報告している。

このように、血中 Androgen は妊娠によつて著しい変化を呈し、ことに DHA 値は非妊時に比してむしろ減少するとされているが、その生物学的意義については全く不明であるといつてもよいと思われる。私は蛋白結合の面から妊婦血中における DHA の動態の一端を観察しようと試み、DHA・S と正常妊婦血漿蛋白との結合率を測定したのでその結果を報告する。

実験材料および実験方法

1) 実験材料

当科外来に通院している妊娠 8~10 カ月の妊婦の中から、その厚意により、妊娠中毒症その他の合併症を認めない症例のみを選んだ。対照としての非妊婦人は私の知人である健康婦人および当院に勤務している看護婦である。

採血には前実験と同様、凝血阻止剤にヘパリンを使用し、正中静脈から 1 人宛 20 ml または 40 ml を採血し、直ちに遠心して血漿を分離した。なお、1 人宛 20 ml 採血した場合には 2 人分の血漿を合わせて 1 検体とした。

2) 実験方法

大要は前実験と全く同様である。

a) 試料 (被検血漿) の調製

20ml の血漿に 0.04% の DHA・S 水溶液 20 ml を添加した (DHA・S 終末濃度 200 μ g/ml)。

b) 遠心限外濾過

pH 7.3~7.5, 温度 37.5 \pm 0.5 $^{\circ}$ C に調節して、3,000 r.p.m. で 20 分遠心した。

c) 濾液中 DHA・S の定量

水解・抽出 (2 Step Hydrolysis) 後、Zimmermann 反応で発色し、分光光度計にて比色定量した。

実験成績

正常妊婦血漿蛋白総量は対照非妊婦の 6 例平均 7.2 \pm 0.12 g/dl に比べて 6.8 \pm 0.21 g/dl と低値であり、アルブミン分画比も非妊婦の平均 50.6 \pm 1.01% に比較すると 42.6 \pm 0.40% と減少している (第 5, 6 表)。

終末濃度 200 μ g/ml における DHA・S の蛋白結合率は第 5, 6 表に示す如く、妊婦血漿では平均 94.1 \pm 0.15%, 非妊婦血漿 (対照) では平均 93.9 \pm 0.21% と差はないが、DHA・S の単位蛋白量当りの結合量を求めると、非妊婦血漿蛋白およびアルブミンに対する DHA・S 結合量が 5.2 \pm 0.02 mg/g および 10.3 \pm 0.42 mg/g であるのに比べて、妊婦血漿蛋白およびアルブミン 1 g 当りの結合量は 5.6 \pm 0.15 mg および 13.1 \pm 0.46 mg と増加していた。一方、個々の例についてその血漿蛋白濃度と DHA・S の蛋白結合率との関係を図示すると (第 4 図)、妊婦および非妊婦血漿ともに、蛋白濃度が減少するにつれて DHA・S の蛋白結合率も減少しているが、各蛋白濃度それぞれについて観察すると、妊婦例では対照例よりも一般に高い蛋白結合率を示している。血漿アルブミン濃度と DHA・S 蛋白結合率との関係についても全く同様の知見が得られた (第 5 図)。即ち、DHA・S の蛋白結合率を総括的に平均した場合には、妊婦血漿が非妊婦血漿に比して低蛋白であり蛋白濃度の減少につれて結合率が減少するため、94.1% および 93.9% と一見差がないように思われ

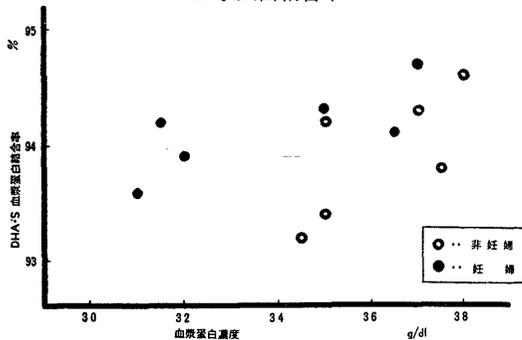
第5表 DHA・S の正常妊婦血漿蛋白との結合状態

氏名	年齢	妊娠月数	血漿蛋白総量 g/dl	アルブミン分画比 %	終末DHA・S濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	拡散性DHA・S濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	DHA・S血漿蛋白結合率 %	終末血漿蛋白濃度 g/100g H ₂ O	DHA・S血漿蛋白結合量 mg/g	DHA・S血漿アルブミン結合量 mg/g
1 那登子 木春	26	10	7.4	43.3	207.9	11.0	94.7	3.8	5.2	12.0
2 道美子 松妙	28	10	6.3	42.8	207.0	12.2	94.2	3.3	5.8	13.5
3 高登子 脇幹	24	8	6.4	42.0	207.0	12.8	93.9	3.4	5.7	13.5
4 忠く子 宮由子	28	9	7.3	44.2	207.6	12.2	94.1	3.7	5.3	12.0
5 吉京 瀬昌	28	10	6.2	41.5	206.9	13.2	93.6	3.2	6.1	14.7
6 香洋 東子	31	10	7.0	42.0	207.4	11.8	94.3	3.6	5.4	12.8
			6.8±0.21	42.6±0.40	/	12.2±0.31	94.1±0.15	/	5.6±0.15	13.1±0.46

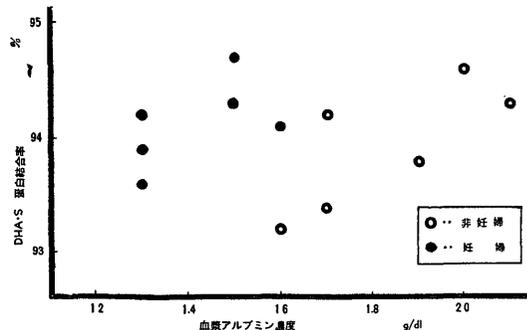
第6表 DHA・S の正常非妊婦（対照）血漿蛋白との結合状態

氏名	年齢	血漿蛋白総量 g/dl	アルブミン分画比 %	終末DHA・S濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	拡散性DHA・S濃度 $\mu\text{g/gH}_2\text{O}$	DHA・S血漿蛋白結合率 %	終末血漿蛋白濃度 g/100g H ₂ O	DHA・S血漿蛋白結合量 mg/g	DHA・S血漿アルブミン結合量 mg/g	
1 坂澄	39	6.9	46.2	207.4	14.1	93.2	3.6	5.3	11.4	
2 西不子 山富枝	26	7.0	49.8	207.4	13.8	93.4	3.6	5.3	10.6	
3 窪玉 中道	29	7.5	49.6	207.9	12.9	93.8	3.9	5.0	10.1	
4 田喜 亀敏	38	7.0	48.9	207.4	13.3	94.2	3.6	5.4	11.5	
5 永佐子	32	7.4	56.2	207.8	11.9	94.3	3.8	5.1	9.0	
6 西智	28	7.6	53.0	208.1	11.3	94.6	3.9	5.0	9.4	
			7.2±0.12	50.6±1.01	/	12.9±0.44	93.9±0.21	/	5.2±0.02	10.3±0.42

第4図 DHA・S の妊婦および非妊婦血漿蛋白結合率



第5図 DHA・S の妊婦および非妊婦血漿蛋白結合率



るが、各蛋白濃度について両者を比較すると、DHA・Sの蛋白結合率は非妊婦血漿よりも妊婦血漿において増加している。同様にして、血漿蛋白濃度およびアルブミン濃度とDHA・S蛋白結合量との関係を図示したのが第6、7図であり、共に、妊婦例において単位蛋白量当りのDHA・S結合量が大きであることを示している。

考按および小括

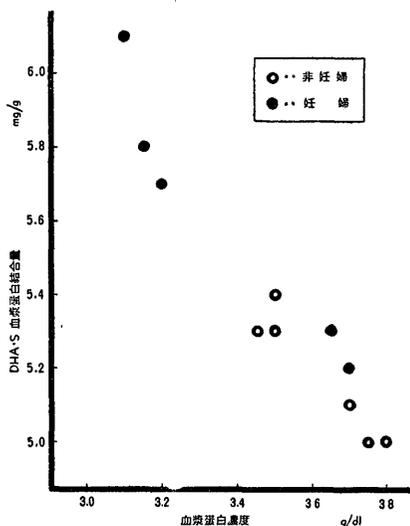
妊娠時の血漿蛋白あるいは血清蛋白の濃度、および、アルブミン分画比は一般に非妊時より減少してい

るとされており²⁴⁾²⁵⁾、私の実験成績でも正常妊婦の血漿は対照に比較して蛋白総量、アルブミン分画比ともに低値であった。

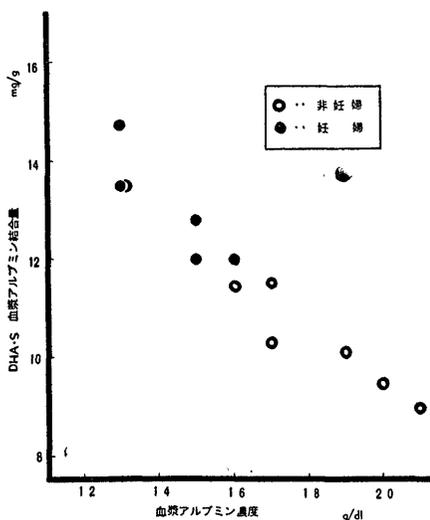
このように妊婦血漿では蛋白濃度が減少しており、むしろDHA・Sの蛋白結合率の減少が予想されたにもかかわらず、非妊婦血漿に比べて蛋白結合率がやや増加しているのが認められた(第5、6表)。さらに、個々の例についてその蛋白濃度と結合率との関係を比較検討すると(第4、5図)、DHA・Sの蛋白結合率が妊婦血漿では増加していることが明らかとなった。また、蛋白1gあたりのDHA・S結合量も非妊婦に比較して一般に増加していた。

妊婦血中のステロイドホルモンと蛋白との結合に関する研究報告は殆んどみあたらないといつてもいいが、Slaunwhiteら²⁶⁾(1959)は妊娠末期婦人の血漿について、Cortisolの蛋白結合率が增加しているのを透析法で確かめ、蛋白と結合したCortisolは生物学的に不活性であると論じ、妊婦では血中のCortisolが増加しているにもかかわらず副腎皮質機能亢進症状が現われないのは、生物学的に不活性の蛋白結合型Cortisolが多いためであると説いている。上述の如く、私は妊婦血中DHA・Sの蛋白結合率が増加しているのを認めたが、そのMechanismについては全く不明であり、DHA・Sの代謝経路の完全な解明を待つ他はない。また同時に、血中の他のステロイドならびにイオンによる影響、妊婦に特異な血液の物理・化学的性状の変化なども考慮に入れるべきであろう。一方、妊婦血におけるDHA・Sの蛋白結合率増加の意義についても全く不明であり、推測の域を超えない現状である。熊谷ら²⁷⁾(1959)はステロイドホルモンの蛋白結合の意義について考察し、1)難溶性のステロイドを蛋白と結合させることによつて生体全般に分散させる、2)血漿蛋白は活性ステロイドホルモンのPoolの場と考えられる、3)肝その他の臓器でのステロイドの代謝性非活性化を防ぐ、4)腎よりの活性ステロイドホルモンの排泄を防ぐ、5)過剰ステロイドの解毒および調節に役立つ、6)蛋白結合能の強弱に応じて合目的な組織分配を行なう、の6項目をあげている。私もステロイド-血漿蛋白結合の主な意義として、水に難溶性のステロイドが血漿蛋白と結合することによつて多量に身体各部へ運搬され、必要に応じて血漿蛋白結合型→血中遊離型→組織蛋白結合型と変化して、ステロイドが各組織へ分配・活用されるのではないかと推測している。従つて、妊娠時、血中DHA・Sが非妊時に比較して多量に蛋白と結合していることにより、母体各部へのDHA運搬が促進され、また、蛋白と結

第6図 DHA・Sの妊婦および非妊婦血漿蛋白結合量



第7図 DHA・Sの妊婦および非妊婦血漿アルブミン結合量



合したステロイドは一般に腎から排泄されないと考えられるので、DHA・S の排泄抑制にも役立つのではないかと思われる。

血中 17-KS 測定の際には、抽出に先だつて一般に塩析法による除蛋白操作が加えられるが、Puche ら¹⁰ (1962) は蛋白と結合している 17-KS もこの際共に除去される可能性について言及し、実際の血中 17-KS 値は測定値より高いのではないかと考えた。そして、除蛋白操作前に Na₂SO₄ を血漿に添加することによって蛋白結合型の 17-KS を遊離させてから抽出し、6 名について平均 208 μg/dl と他の報告値よりも高い血中 17-KS 値を得ている。先に述べたように、妊婦血中 DHA・S 量は非妊婦に比して一般に減少していると考え、妊婦副腎からの DHA 分泌の減少が推測されているが、あるいは、上述の如く妊婦血では蛋白結合型 DHA・S 量が増加し、遊離の DHA・S が減少しているために、除蛋白操作によってより多量の DHA・S が除去され、抽出される DHA・S 量が比較的少量であるのかも知れない。

以上、正常非妊婦人を対照に、正常妊婦について DHA・S の血漿蛋白との結合率を遠心限外濾過法で測定し、次の如き結論を得た。

- 1) DHA・S の正常妊婦血漿蛋白結合率は蛋白濃度 3.1~3.7 g/dl の範囲で平均 $94.1 \pm 0.15\%$ であり、対照に比べて増加している。
- 2) 正常妊婦血漿蛋白あるいは血漿アルブミン単位量当りの DHA・S 結合量は対照より大きい。
- 3) 妊娠時、蛋白と結合して存在する血中 DHA・S は非妊時よりも増加していると思われるが、その Mechanism、意義については不明であり、今後の究明に待ちたい。

総括および結論

婦人体内における DHA の生理的意義、および、妊娠時の血中 DHA の動態ならびにその意義について蛋白結合の面から検討を加える目的で、正常婦人、正常妊婦の血漿蛋白と DHA・S の結合状態を遠心限外濾過法によつて観察した。

まず、pH 7.4 に補正した正常婦人血漿を用いて、37.5°C の条件で DHA・S 濃度が DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす影響を、ついで、蛋白濃度が DHA・S-血漿蛋白結合に及ぼす影響を検討した。さらに正常婦人血漿を対照にして、DHA・S の正常妊婦血漿蛋白との結合率を測定した。

遠心限外濾過法によれば、血漿の物理・化学的性状を損ねることなく DHA・S を蛋白結合分画と非結合分

画とに分けることが可能であり、従つて、DHA・S-血漿蛋白の結合を最も生理的な状態で観察することができると思われる。ただ、DHA・S の定量に用いた Zimmermann 反応では微量測定が不可能であり、血漿に多量の DHA・S を添加したため、かなり高い DHA・S 終末濃度で実験を行なわなければならなかつた。今後、血中 DHA・S-蛋白結合の微妙な動態を観察するためには、微量測定可能な放射性同位元素の使用などもさらに必要であろうと思われる。

得られた結果は次の如くである。

- 1) 正常婦人の血中 DHA・S はその 97%前後が血漿蛋白と結合して存在し、妊娠によつてその結合率がさらに増加するものと思われる。
- 2) DHA・S-血漿蛋白結合率は DHA・S 濃度の変化によつて殆んど影響を受けない。
- 3) DHA・S-血漿蛋白結合率は蛋白濃度 6.0 g/dl 以上ではほぼ一定であり、蛋白濃度が 6.0 g/dl 以下に減少すると結合率も減少する。

終始御懇篤な御指導ならびに御校閲を賜つた恩師赤須教授に深く感謝すると共に、貴重な御助言、御支援を賜つた西田助教に感謝します。

文 献

- 1) Butenandt, A. & Dannenbaum, H. : Ztschr. f. physiol. Chem., 229, 192 (1934).
- 2) Migeon, C. J. & Plager, J. E. : J. Biol. Chem., 209, 767 (1954).
- 3) Lieberman, S. & Teich, S. : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 13, 1140 (1953).
- 4) Plantin, L. O., Diczfalussy, E. & Birke, G. : Nature, 179, 421 (1957).
- 5) Lombardo, M. E., McMorris, C. & Hudson, P. B. : Endocrinology, 65, 426 (1959).
- 6) Bush, I. E. & Mahesh, V. B. : J. Endocrinol., 18, 1 (1959).
- 7) 石川久夫 : 日内分泌誌, 39, 447 (1963).
- 8) 石川久夫 : 日内分泌誌, 39, 439 (1963).
- 9) 斎藤幸一郎・蓮村成子 : 日新医学, 46, 698 (1959).
- 10) 阿部正和 : 臨床検査, 5, 211 (1961).
- 11) Rakoff, A. E., Paschkis, K. E. & Cantarow, A. : Am. J. Obstet. & Gynecol., 46, 856 (1943).
- 12) Eik-Nes, K., Schellman, J. A., Lumry, R. & Samuels, L. T. : J. Biol. Chem., 206, 411 (1954).
- 13) Bongiovanni, A. M. & Eberlein, W. R. : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 17, 238 (1957).
- 14) Oertel, G. W. & Eik-Nes, K. : J. Biol.

- Chem., 232, 543 (1958). 15) **Chen, P. S. Jr., Mills, I. H. & Bartter, F. C.** : J. Endocrinol., 23, 129 (1961). 16) **Puche, R. C. & Nes, W. R.** : Endocrinology, 70, 857 (1962). 17) **松田春悦** : 日産婦誌, 15, 451 (1963). 18) **McLean, F. C. & Hastings, A. B.** : J. Biol. Chem., 108, 285 (1935). 19) **Conrad, S., Mahesh, V. & Herrmann, W.** : J. Clin. Invest., 40, 947 (1961). 20) **Gardner, L. I., Walton, R. L., Ellis, W. & Hughes, E. C.** : Proc. Soc. Exp. Biol., 86, 804 (1954). 21) **Migeon, C. J., Keller, A. R. & Holmstrom, E. G.** : Bull. Johns Hopk. Hosp., 97, 415 (1955). 22) **金井忠男** : 日産婦誌, 10, 997 (1958). 23) **千葉俊博** : 日産婦誌, 11, 1603 (1959). 24) **山本健三郎** : 日産婦誌, 12, 379 (1960). 25) **青木 勝** : 日産婦誌, 12, 1849 (1960). 26) **Slaunwhite, W. R. Jr. & Sandberg, A. A.** : J. Clin. Invest., 38, 384 (1959). 27) **熊谷 朗・武内 望** : 綜合臨床, 8, 1517 (1959).

Abstract

For the purpose of examining the obscure physiological functions of Dehydroepiandrosterone in women from the viewpoint of protein binding, studies were carried out on the binding of Dehydroepiandrosterone sodium sulfate (DHA·S) with normal non-pregnant and pregnant women's plasma protein by the method of centrifugal ultrafiltration.

Three series of experiments were performed.

1) The influences of DHA·S concentration upon the combination of DHA·S with plasma protein were examined at the temperature of 37.5°C, using normal women's plasma controlled to 7.4 in pH.

2) The influences of protein concentration upon the combination were examined under the similar conditions to those above-mentioned.

3) The binding percentage of DHA·S with normal pregnant women's plasma protein was measured in comparison with normal non-pregnant women's plasma.

The results obtained were as follows:

1) The rate of the protein-bound DHA·S to the total DHA·S in normal non-pregnant women's blood was about 97%, and this rate seemed to increase during pregnancy.

2) The binding percentage of DHA·S with plasma protein was not affected by the DHA·S concentration.

3) The binding percentage of DHA·S with plasma protein was nearly constant so long as protein concentration was above 6.0 g/dl, but it decreased as protein concentration descended below this value.