

犬におけるCortisolの代謝に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kishida, Shigeru メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00018977

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



犬における Cortisol の代謝に関する研究

金沢大学医学部内科学第3講座 (主任: 服部絢一教授)

金沢大学医学部内科学第3講座 (指導: 宮保進助教授)

岸 田 繁

(昭和50年6月6日受付)

本論文の要旨は昭和47年第20回日本内分泌学会東部々会総会, 昭和48年第46回日本内分泌学会総会, 第21回日本内分泌学会東部々会総会において報告した。

Cortisol の代謝に関しては, すすでにおびたしい知見が集積されヒト^{1)~7)}, ラット^{8)~11)}, マウス¹²⁾¹³⁾, イヌ^{14)~16)}, ウシ¹⁷⁾, モルモット¹⁸⁾などの *in vitro* 及び *in vivo* 実験にて主な cortisol 代謝産物が分離同定されている。これらにほぼ共通な代謝様式としては, まず Δ^4 -reductase 及び $3\alpha, 3\beta$ -dehydrogenase によるA環の還元, 11β -dehydrogenase, $20\alpha, \beta$ -dehydrogenase による C-11 位, C-20 位の還元, $6\alpha, \beta$ -hydroxylase による C-6 位の Hydroxylation 及び側鎖の酸化的離脱をうけ, さらにこれらの代謝産物はその大部分が glucuronyltransferase によりグルクロン酸抱合を, 一部は sulfokinase により硫酸抱合をうけて腎あるいは消化管に排泄されることが明らかにされている¹⁹⁾。しかし詳細な点になるとその知識は決して充分ではなく, 従来もっとも系統的に研究されてきたヒトにおいてさえ, 放射性 cortisol を投与して尿中に回収される代謝産物のうち既知のものは60%に過ぎないとされ²⁰⁾, 最近においても Kornelらの硫酸抱合型代謝産物の同定²¹⁾, Bradlowらの carboxylic acid 型代謝産物の発見²²⁾ などが報告されており, これらの新しい代謝経路の意義も今後の問題である。

従来 steroid 代謝の研究は主として肝を用いた *in vitro* での incubation 実験と尿中代謝産物分析による *in vivo* 代謝の検討が主であった。もちろん肝は steroid 代謝抱合において中心的役割をはたしているが, それ以外の組織も種々の程度において steroid 代謝能を有しており^{23)~26)}, 更に *in vitro* の条件は生理的とはおよそかけはなれており, その結果より *in vivo* での代謝を定量的な意味で推定することは難しい。一方尿中 steroid の分析は代謝の最終過程

を見ることはできるが, 外因性に投与され, あるいは内因性に分泌した cortisol が体外に排泄されるまでの過程がどのようになっているかは窺うことができない。その意味で血中および臓器中の代謝産物の分析は重要であるが, 今までは詳細な定量的研究はほとんど見られていない。

今1つの問題は steroid 代謝の種属差である。犬副腎はラット, ウサギと異なりヒトと同じく cortisol を主として分泌する点より従来 Human Endocrinology の実験モデルとして広く用いられてきた。しかしはたして産生するホルモンが同一でもその処理が同一か否かは従来検討されていない。

本研究ではこれらの点を解明すべく犬に放射性 cortisol 投与一定時間後の血中および肝における代謝産物を分離, 同定, 定量を行い若干の成績を得たので報告する。

本論文で使用する慣用名, 略号は以下に示す通りである。

Cortisol(F); cortisone(E); 20α -dihydrocortisol (20α -DHF); $11\beta, 17\alpha, 20\alpha, 21$ -tetrahydroxy-4-pregnen-3-one; 20β -dihydrocortisol(20β -DHF); $11\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$ -tetrahydroxy-4-pregnen-3-one; 20α -dihydrocortisone(20α -DHE); $17\alpha, 20\alpha, 21$ -trihydroxy-4-pregnen-3, 11-dione; 20β -dihydrocortisone(20β -DHE); $17\alpha, 20\beta, 21$ -trihydroxy-4-pregnen-3, 11-dione; 6β -hydroxycortisol(6β -OH-F); $6\beta, 11\beta, 17\alpha, 21$ -tetrahydroxy-4-pregnen-3, 20-dione; 6β -hydroxycortisone(6β -OH-E); $6\beta, 17\alpha, 21$ -trihydroxy-4-pregnen-3, 11, 20-trione; 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisol(6β -OH- 20β -DHF); $6\beta, 11\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$

Studies on Metabolism of Cortisol in the Dog. Shigeru Kishida, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. K. Hattori, Chief of Laboratory: Ass. Prof. S. Miyabo) School of Medicine, Kanazawa University.

-pentahydroxy-4-pregnen-3-one; 6 β -hydroxy-20 α -dihydrocortisol(6 β -OH-20 α -DHF): 6 β , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pentahydroxy-4-pregnen-3-one; 6 β -hydroxy-20 α -dihydrocortisone(6 β -OH-20 α -DHE): 6 β , 17 α , 20 α , 21-tetrahydroxy-4-pregnen-3, 11-dione; 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone(6 β -OH-20 β -DHE): 6 β , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxy-4-pregnen-3, 11-dione; tetrahydrocortisol(THF): 3 α , 11 β , 17 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnene-20-one; tetrahydrocortisone(THE): 3 α , 17 α , 21-trihydroxy-5 β -pregnane-11, 20-dione; cortol-20 α : 5 β -pregnane-3 α , 11 β , 17 α , 20 α , 21-pentol; cortol-20 β : 5 β -pregnane-3 α , 11 β , 17 α , 20 β , 21-pentol; cortolone-20 α : 3 α , 17 α , 20 α , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-11-one; cortolone-20 β : 3 α , 17 α , 20 β , 21-tetrahydroxy-5 β -pregnan-11-one; 11 β -hydroxy-aetiocholanolone(11-OH-Etio): 3 α , 11 β -dihydroxy-5 β -androstan-17-one; 11 β -hydroxy-androstenedione(11OH-AD): 11 β -hydroxy-4-androstene-3, 17-dione; 11-oxo-aetiocholanolone(11-oxo-Etio): 3 α -hydroxy-5 β -androstane-11, 17-dione; 6 β , 11 β -dihydroxy-androstenedione(6, 11-diOH-AD): 6 β , 11 β -dihydroxy-4-androstene-3, 17-dione; 5 β -hydroxy-adrenosterone(6 β -OH-Adreno): 6 β -hydroxy-4-androstene-3, 11, 17-trione.

実験材料と方法

実験材料

I. Cortisol-1,2-³H (S.A. 40-60 Ci/mmole) New England Nuclear Co. より購入し, 使用前に Bush B₅ の paper chromatography にて純化し使用した.

II. 標品 steroid

6 β -hydroxycortisol(6 β -OH-F) は Dr. S. Bernstein (Lederle Laboratories) の好意により, また一部は Lederle Laboratories より購入した. これ以外の steroids は Sigma Chemical Co. より購入した. 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol(6 β -OH-DHF), 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone(6 β -OH-DHE) はそれぞれ 6 β -OH-F, 6 β -hydroxycortisone(6 β -OH-E) の C-20 ketone を Bradlow ら²⁷⁾ の方法にて sodium borohydride で還元して作製し, 20 α と20 β の異性体は 5% boric acid に impregnate した濾紙を Franz²⁸⁾ の Y にて展開分離した.

III. 実験装置

放射能測定は Beckmann Liquid Scintillation

Spectrometer により測定した. Scintillation Solution は 2 種を用い, System 1 (dimethyl-POPOP 0.25g, PPO 5g, toluene 1,000ml) は alcohol 溶液の資料測定に, System 2 (POPOP 0.3g, PPO 11g, Naphthalene 450g, methanol 160ml, ethylene glycol 40ml, *p*-dioxane 2,500ml) は水溶液の資料測定に使用した. radiochromatography の scanning には Aloka Model TRM-1B を用いた.

実験方法

2頭の体重 5~6 kg の成犬を筋注用 Ketalar (50 mg/kg) にて麻酔後, Cortisol-1, 2-³H 5 mci を少量の ethanol に溶解, 生理食塩水にて 20ml としこれを股静脈より急速に静注, 150分後に股動脈よりヘパリン加注射器にて採血, 脱血死せしめ肝を取り出した. 血液は平均 469ml, 肝は平均 272g であった. 血液は直ちに遠心分離を行い, 血漿は肝とともに次の操作まで -20°C にて保存した.

I. 抽出

抽出方法は図 1 に示すごとくである. 血漿は methanol, 四塩化炭素にて除蛋白抽出を行い, 蛋白は *n*-butanol で再抽出し合わせて乾固した後, 75% methanol に溶解し *n*-hexane と四塩化炭素で洗浄し乾固した. 残渣を水に溶解し ethyl acetate で遊離型代謝産物を抽出した. また肝は homogenate とした後, acetone-ethanol (1:1) で除蛋白抽出し, 蛋白は *n*-butanol で再抽出を行い合わせて乾固した. その後の操作は血漿と同様に行った.

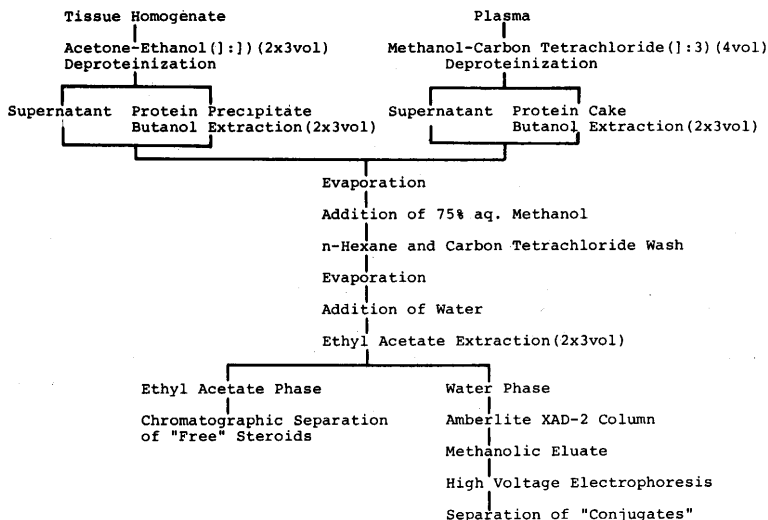
II. 遊離型代謝産物の分離

分離に用いた paper chromatography の system は表 1 に示すごとくである. すべて Bush type の system であるが, 5% boric acid で impregnate した濾紙で行うことにより glycerol type の側鎖を有する steroid の分離は非常に良好であった. Sample を apply した濾紙は chromatography タンクの中で 3 時間 equilibration した後展開した. 実際の遊離型代謝産物の分離は図 2 に示す方法にて行った. まず Bush Bp system で展開し, 得られた各 peak を methanol と 85% methanol にて濾紙より溶出し順次各種の system で展開分離した. その際濾紙の片側に pilot として合成 steroid 標品を点じ, 同時に展開し radiochromatogram の scanning より得られた peak の移動度を標準品のそれと比較した.

III. 抱合型代謝産物の分離

遊離型代謝産物を抽出後, 水層に残った抱合型代謝産物は Bradlow の方法²⁹⁾により Amberlite XA

Fig. 1. Extraction and separation procedures

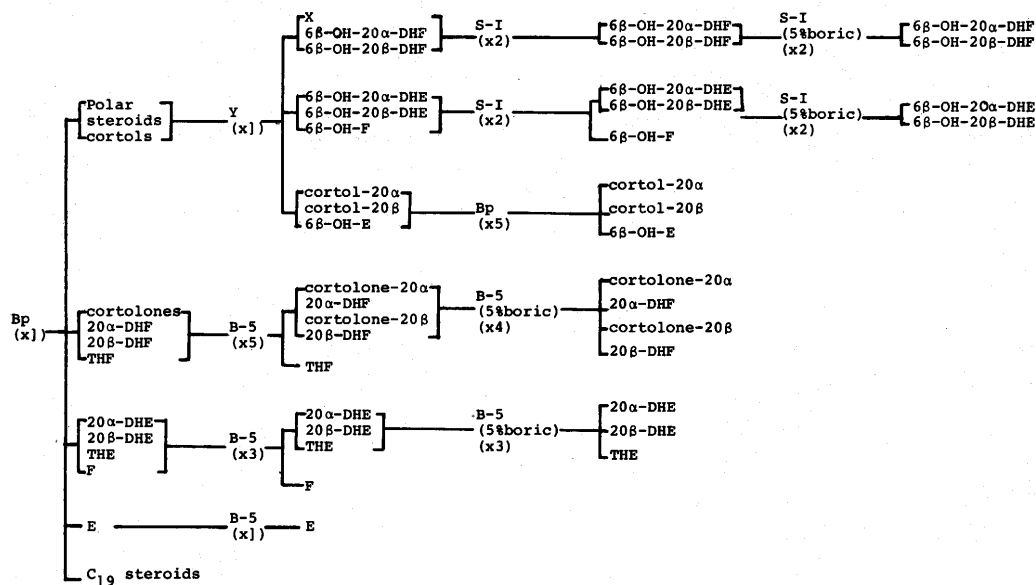


Numbers in parentheses indicate the volume of solvent used :
 e. g. (2×3vol)=extraction twice with three volumes of solvents.

Table 1. Paper chromatographic systems

System designation	Solvents (proportions by volume)
Y	ethyl acetate/chloroform/methanol/water (25:75:50:50)
S-I (5% boric)	benzene/ethyl acetate/methanol/water (50:40:50:50) (same as S-I) before application, paper was dipped in 5% boric acid and dried in hood.
B _P	benzene/chloroform/methanol/water (50/50/50/50)
B-5 (5% boric)	benzene/methanol/water (1,000:525:475) (same as B-5) before application, paper was dipped in 5% boric acid and dried in hood.
SL ₁₀	toluene/tert-butanol/methanol/0.02 M boric buffer (pH 9.0) (170:40:30:100) (paper preimpregnated in the boric buffer and dried)
B-1	petroleum ether/toluene/methanol/water (25:25:35:15)
B-3	petroleum ether/benzene/methanol/water (33:17:40:10)

Fig. 2. Paper chromatographic separation of cortisol metabolites



For designation of chromatographic systems, see Table 1; numbers in parentheses indicate the length of the run, e. q. (×3)=3times single length run. For steroid abbreviation and nomenclature see footnote in the text.

D-2 columnにて抽出した。すなわち水40mlを20gのAmberlite XAD-2をつめたcolumnに点じ水80mlで洗浄し150mlのmethanolにて溶出した。回収率は常に85%以上であった。次にKornelの方法³⁰⁾に準じ高圧濾紙電気泳動にてグルクロン酸抱合と硫酸抱合を分離した。すなわちAmberlite XAD-2 columnよりのmethanol溶出液を乾固し、これを少量の*n*-butanol:70% methanol(1:3)に溶解してWatman 3 MM濾紙にapplyし、pyridine酢酸緩衝液pH2.2で1,000~1,500V 2時間の泳動を行うとグルクロン酸抱合は原点近くに、硫酸抱合はより陽極側に移動し分離された。グルクロン酸抱合は濾紙より溶出後これをpH6.4で再泳動するとpH2.2泳動時よりもより陽極側へ移動し、きれいに分離された。この際陰極側へ移動する極く小さなpeakがみられたが、この代謝産物についてはこれ以上の検討は行わなかった。

1. グルクロン酸抱合型代謝産物の分離

電気泳動的に分離したグルクロン酸抱合分画は濾紙より75% methanol:*n*-butanol(3:1)およびmethanolで溶出後乾固し、その残渣を水に溶解し

酢酸緩衝液でpH4.5に調製しβ-glucuronidase(東京臓器1,300u/ml)2mlを加え36時間、37.5°Cにてふ置し水解した。遊離したsteroidはethyl acetateにて抽出し、各種paper chromatographyのsystemにて遊離型代謝産物と同様の方法で個々の代謝産物にまで分離した。

2. 硫酸抱合型代謝産物の分離

第1回の電気泳動にて分離した硫酸抱合型分画は、2頭を合わせてpH2.2で再泳動を行い純化し75% methanol:*n*-butanol(3:1)とmethanolで溶出したが量的に少ないため血漿と肝を合わせて乾固後、Kornelの方法³¹⁾に従ってsolvolysisを行った。すなわち残渣を水3滴にて溶解、ethanol 4ml, equilibrated ethyl acetate 20mlを加え37.5°C 18時間のふ置後アンモニア水で中和して乾固した。なおethyl acetateのequilibrationは分液ロートに50mlのethyl acetate, 5mlの20% NaCl溶液を加え50%硫酸にてpH1.0とすることにより作製した。乾固した残渣は先に述べた方法にて、Amberlite XAD-2 columnで脱塩しmethanol溶出液を乾固した。遊離したsteroidは遊離型代謝産物と同

様一連の paper chromatography で分離した。

IV. 遊離型及びグルクロン酸抱合型代謝産物の同定
各種 paper chromatography にて分離した steroid は、それぞれの一部を放射能測定に供した後、chromatography 上同一の steroid を pool し適当な system で再 chromatography 後 reverse isotope dilution 法により同定を行った。その方法は Berliner および Salhanick³²⁾ に準じ、放射性 steroid 代謝産物に相当する非放射性標準 steroid (0.3~0.9 μ M) を carrier として加え、再度適当な system で chromatography し scanning 後 peak を溶出。その 1/10 量を放射能測定にあて、1/10~1/20 量を化学的に 240m μ 紫外線吸収、blue tetrazolium 反応、Zimmerman 反応などで定量し duplicate で specific activity (DPM/ μ M) を求め、残りは periodate 酸化 (glycerol 型側鎖をもつもの)、bithmthate 酸化 (dihydroacetone 型側鎖をもつもの) などの derivative formation を行い、再度適当な system (B-1 または B-3) で chromatography を行い 予期される移動度の単一の peak が生じ、その溶出部について求めた specific activity が derivative formation の前後において

不変であることをもって同定した。個々の steroid についての詳細は表 2 に示すごとくである。なお 5 α と 5 β の分離および C-19 代謝産物の分離同定は行わなかった。

結 果

表 3 に示すごとく血漿、肝より抽出された cortisol 代謝産物は血漿で遊離型 30.2%, 20.8%, グルクロン酸抱合型 60.6, 71.3%, 硫酸抱合型 9.2, 7.9% であり、肝では遊離型 56.1, 49.2%, グルクロン酸抱合型 42.1, 46.2%, 硫酸抱合型 1.8, 4.6% であった。血漿、肝ともに類似の値を示したが、肝において遊離型の占める割合が多くグルクロン酸抱合型とはほぼ等しかった。硫酸抱合型は血漿、肝ともに数%とわずかであった。個々の代謝産物を比較すると表 4 のごとくである。遊離型では血漿、肝いずれにおいても β -cortolone が最も多く、次いで β -cortol であり、両者ではほぼ遊離型放射活性の 40~50% を占める。その他少量ではあるが tetrahydro 型代謝産物 (tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone) および 20 β -dihydrocortisol, cortisol, cortisone など A 環非還元代謝産物が同定された。遊離型では血漿と肝の間に大

Table 2. Identification of steroid moieties of individually separated cortisol metabolites

Posturated Steroid	Chromatography with carrier (2)	Specific activity d. p. m. / μ mol	Chemical reaction applied	Derivative formed (1)	Chromatography of derivative (2)	Specific activity d. p. m. / μ mol
X	Y(5% boric)(X1)	—*	KIO ₄ oxid.	—*	B-5(X1)	—*
6 β -OH-20 β -DHF	S-1(5%boric)(X2)	1180	KIO ₄ oxid.	6, 11-diOH-AD	B-5(X1)	1156
6 β -OH-20 β -DHE	S-1(5% boric)(X1)	786	KIO ₄ oxid.	6-OH-Adreno	B-5(X1)	751
Cortol-20 α	SL ₁₀ (X3)	2650	KIO ₄ oxid.	11-OH-Etio	B-3(X2)	2531
Cortol-20 β	SL ₁₀ (X3)	5967	KIO ₄ oxid.	11-OH-Etio	B-3(X2)	5711
Cortolone-20 α	B-5(5% boric)(X4)	976	KIO ₄ oxid.	11-oxo-Etio	B-3(X1)	991
Cortolone-20 β	B-5(5% boric)(X4)	3712	KIO ₄ oxid.	11-oxo-Etio	B-3(X1)	3694
THF	B-5(X5)	1815	NaBiO ₃ oxid.	11-OH-Etio	B-3(X1)	1804
THE	B-5(X3)	526	NaBiO ₃ oxid.	11-oxo-Etio	B-3(X1)	537
20 β -DHF	B-5(5% boric)(X2)	2011	KIO ₄ oxid.	11-OH-AD	B-3(X1)	2037
F	B-5(X3)	986	NaBiO ₃ oxid.	11-OH-AD	B-3(X1)	962
E	B-5(X1)	712	NaBiO ₃ oxid.	11-oxo-AD	B-3(X1)	681

(1) For steroid abbreviations and nomenclature see footnote in the text.

(2) For designation of chromatographic system, see Table 1 : number in parentheses indicate the length of run, e. g., (×3)=3 times single length run.

* Carrier not available for determination of specific activity.

Table 3. Radioactivity of free and conjugated steroid fractions in dog plasma and liver⁽¹⁾

	Free ⁽²⁾		Conjugates ⁽³⁾ Glucuronide		Sulfate
Plasma	30.2		60.6		9.2
	20.8		71.3		7.9
Liver	56.1		42.1		1.8
	49.2		46.2		4.6

(1) Results are expressed as per cent of total radioactivity in plasma or liver.

(2) Radioactivity recovered by ethyl acetate extraction.

(3) Radioactivity after separation of conjugates by means of high voltage electrophoresis.

Table 4. Free and glucuronide conjugated metabolites of cortisol-1,2-³H in dog plasma and liver⁽¹⁾

Steroids ⁽²⁾	Plasma				Liver			
	Free		Glucuronide		Free		Glucuronide	
X ₁ ⁽³⁾	1.5	1.8	8.6	4.3	1.7	1.2	11.3	7.2
X ₂ ⁽³⁾	7.8	12.8	13.6	7.8	10.1	9.3	18.0	10.4
6 β -OH-20 β -DHF	3.0	10.6	3.0	1.5	6.5	5.5	4.8	1.3
6 β -OH-20 β -DHE	1.3	2.0	1.5	0.6	1.2	1.5	1.8	1.0
6 β -OH-F (?) ⁽³⁾	1.0	2.6	—	—	1.0	1.1	0.5	0.5
α -cortol	2.2	1.6	11.6	11.7	2.9	2.3	2.9	3.5
β -cortol ⁽⁴⁾	16.0	13.9	37.5	50.6	14.2	19.4	19.4	34.9
α -cortolone	8.5	4.6	0.9	1.6	8.8	6.2	14.1	1.0
β -cortolone ⁽⁴⁾	25.4	23.3	15.0	8.5	22.5	31.5	18.6	17.8
20 α -DHF (?) ⁽³⁾	1.4	1.0	—	—	1.0	0.5	—	—
20 β -DHF	9.1	4.9	—	—	4.0	2.5	—	0.2
20 β -DHE (?) ⁽³⁾	4.2	2.0	—	—	2.0	1.5	—	—
THF	6.5	6.7	3.1	3.9	4.9	2.3	5.9	15.4
THE	—	—	2.1	2.5	—	—	1.0	2.5
F _K	3.8	2.2	—	—	6.2	2.5	—	1.5
E _K	2.3	1.9	—	—	3.9	1.6	—	1.0
C ₁₉ Steroids ⁽⁵⁾	6.0	6.0	3.1	7.0	9.1	11.1	1.7	1.8
X ₃	—	2.1	—	—	—	—	—	—

(1) Results are expressed as per cent of radioactivity recovered in free and glucuronide fractions.

(2) For steroid abbreviations and nomenclature see footnote in the text.

(3) X₁, X₂, X₃, (?) : unidentified metabolites.

(4) Separation of 5 α - and 5 β -epimers was not carried out.

(5) No further separation was not carried out.

きな差はなかった。また C-19 steroid は血漿で6.0%、肝で9.1, 11.1%みられた。しかしその分離同定は行わなかった。特に興味のある点は chromatogram上 6β -hydroxycortisol より更に極性の高い代謝産物が血漿で13.6, 27.2%, 肝で19.5, 17.5%と大量にみられたことである。その中の2つは 6β -hydroxycortisol および 6β -hydroxycortisone より自家合成した標品により 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisol および 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisone と同定されたが、最も極性の高かつ大量に存するものについては標品がなく同定が不可能であった。しかしその移動度 (system Y において Rf 0.15, 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisol は Rf 0.33, 6β -hydroxycortisol は Rf 0.56) よりみて恐らく A 環も還元された形、すなわち 6β -hydroxycortol 又は 6β -hydroxycortolone ではないかと推定される。

一方グルクロン酸抱合においても cortol, cortolone が主要な代謝産物であり tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone は少量しか見出せない点は遊離型と同様である。遊離型で見出された A 環非還元代謝産物 (20β -dihydrocortisol, cortisol, cortisone) はグルクロン酸抱合では、血漿には全く見出されず、肝において極くわずかに見出されたのみであった。又 6β -hydroxy- 20β -dihydro 型代謝産物は血漿で26.7, 14.2%, 肝で35.9, 19.9%に存した。血漿と肝の比較では α - および β -cortol が肝よりも血漿に多い以外大きな差はなかった。

遊離型とグルクロン酸抱合型では、先に述べたごとく血漿、肝ともに A 環非還元代謝産物がグルクロン酸抱合型にほとんどみられないこと、血漿において cortol がグルクロン酸抱合に多いことが両者の間の相違であった。

硫酸抱合型は量的に少く、すべての sample を pool して分析しても完全な同定ができなかったが、paper chromatographyでの分離結果を示したのが表5である。 20 -dihydrocortisol が17.5%と比較的多く見られた以外、遊離型およびグルクロン酸抱合型と大差は認めなかった。

これを要約すると、血漿と肝、遊離型と抱合型を問わず、個々の代謝産物では cortol, cortolone, 20 -dihydrocortisol など glycerol 型側鎖を有する代謝産物が多く、tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone など tetrahydro 型代謝産物が比較的少量であったこと、および 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisol, 6β -hydroxy- 20β -dihydrocortisone, 6β

Table 5. Sulfate conjugated metabolites of cortisol-1, 2- ^3H ⁽¹⁾

Steroids ⁽²⁾	% CPM
X	6.6
6β -OH- 20β -DHF	8.4
6β -OH- 20β -DHE	3.4
cortols	19.4
cortolones	22.8
THF	5.1
THE	1.3
20 -DHF	17.5
20β -DHE	2.0
cortisol	1.9
cortisone	1.8
C ₁₉ steroids	9.8

(1) Sulfate fractions from 2 plasma and 2 liver specimens were pooled and analyzed.

Results are expressed as per cent of total sulfate radioactivity.

(2) For steroids abbreviations and nomenclature see footnote in the text.

-hydroxycortol(one) など極性の高い代謝産物が多く見られたことが特徴であった。

考 按

cortisol の metabolic pathway については今までも in vivo, in vitro について多数の研究があるが、血漿、臓器中の代謝産物の全スペクトルを明らかにしたものは本研究が初めてである。ただし本研究は tracer 量の放射性 cortisol 注射後150分という一時点で行われており、いわば代謝の一時相を示すもので、各代謝産物の生成、排泄の動的な動きについては又別の実験が必要であらう。

犬の血漿中 cortisol 代謝産物のうち遊離型は30%以下であり、抱合型は70%以上を占めその大部分はグルクロン酸抱合であった。Kornel ら³³⁾はヒトに放射性 cortisol を投与し、同じく150分後には遊離型45%、グルクロン酸抱合型42%、硫酸抱合型8%、未知の抱合型5%と報告しているが、これと比較すれば犬はヒトに比して抱合機転時にグルクロン酸抱合機転が

活潑であると考えられる。硫酸抱合型 cortisol 代謝産物のヒト血中での存在は Miyabo³⁴⁾ により初めて確定されたが、本研究において、犬の血中においてもほぼ同じ%を有することが明らかとなった。

一方肝において血漿に比して遊離型が多くグルクロン酸抱合が少い結果は一見意外に思われる。従来ヒトを含めて各種の動物において cortisol 代謝産物のグルクロン酸抱合は主として肝においてA環の還元されたものを基質として C-3 位において行われるとされてきた。犬についても著者らの *in vitro* の実験結果²⁶⁾ や Gold¹⁵⁾ の肝摘出犬における尿中 cortisol 代謝産物の研究からそのことが裏づけられている。従って本研究の結果は一旦肝で生成されたグルクロン酸抱合型代謝産物は極めてすみやかに血中に遊出されるためであろうと考えられる。又当然のことながら血漿中、および肝において 20 β -dihydrocortisol や cortisol, cortisone などA環非還元のもの一部は肝で、又他は肝外性にも生産されるが、もっぱら遊離型として存し、グルクロン酸抱合型はほとんど見当らない。

個々の代謝産物の分析で注目されるのは、血漿、肝の遊離型、抱合型いずれを問わず cortol および cortolone の様なA環および C-20 位の両方が還元を受けたものが量的にも最大を占めることである。血中において遊離型 cortol, cortolone が高い%で存することは今まで知られていなかったことで、その結果よりA環の還元されたものの少なくとも一部はそのまま血中に放出されるものと考えられる。しかし尿の分析¹⁴⁾ ではA環還元型はすべてグルクロン酸抱合をうけて排泄されているので、一旦血中に出たこれら代謝産物も最終的には肝に再摂取されグルクロン酸抱合をうけるものと考えられる。

また側鎖の構造より見ると遊離型、グルクロン酸抱合、硫酸抱合いずれの分画でも cortol, cortolone, 20-dihydrocortisol, 20-dihydrocortisone など C-20 位の還元された glycerol type のものがそれぞれに対応する α -ketol type の側鎖の代謝産物 (tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone, cortisol および cortisone) より多いことがわかる。このことは犬においては C-20 の還元が極めて活潑に行われていることを示唆する。事実犬の尿についての Gold の成績¹⁴⁾ でも cortol, cortolone がグルクロン酸抱合の60%を占め、tetrahydro 型は40%であり、今回の血漿、肝における成績と一致する。C-20 の還元は著者らの犬諸組織の *in vitro* の実験でも明らかにされたごとく肝以外の組織でも活発に行われ

るので *in vivo* で見られたこの旺盛な C-20 の還元が肝内性、肝外性いずれが主力であるかは今後の検討を要する。これに反してヒトの尿中 cortisol 代謝産物の検討では Fukushima⁵⁾, Romanoff⁶⁾ は tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone が45%, cortol, cortolone が25%であったとしており、ヒトと犬では異った結果を示している。ただし近年 Wortmann³⁵⁾ はヒトの開腹手術の際門脈より放射性 cortisol を注入し、肝静脈血中の代謝産物を分析しているが、これによると遊離型では cortisol, cortisone よりその 20-dihydro 型が、又抱合型では tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone より cortol, cortolone の方が多いという結果で、これは前述のヒト尿中代謝産物の結果と矛盾した成績である。その理由は不明であり、麻酔や手術時の血流分布の変化も考えられるが、又 Wortmann の成績は肝の還流時間がせいぜい20分までの成績であり、あるいはヒト肝の C-20 hydroxy steroid dehydrogenase は cortisol に対しての affinity は強いが capacity は小さく、量的には glycerol 型代謝産物の生成は限られたものなのかも知れない。

本研究では又 6 β -hydroxycortisol よりも極性の高い代謝産物を、遊離、グルクロン酸抱合、硫酸抱合の各分画にそれぞれ相当量見出し、その中で 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol および 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone についてこれを同定した。同様の代謝産物はすでに著者らが cortisol を犬の肝、副腎と incubation することにより生成同定している²⁶⁾。極めて極性の高い cortisol 代謝産物として 6 β -hydroxycortisol が1954年 Burstein³⁶⁾ によってモルモットおよび正常ヒト尿中からはじめて見出されたが、その後新生児尿³⁷⁾、妊婦尿³⁸⁾、羊水³⁹⁾、Cushing 症候群患者尿⁴⁰⁾ から相ついで証明された。さらに1964年 Lambert⁴¹⁾ は 6 β -hydroxycortisol よりさらに極性の高い代謝産物として 6 β -hydroxycortisol および 6 β -hydroxycortisone の 20 β (および α)-dihydro 型代謝産物を羊水より分離同定し、続いて妊婦尿⁴²⁾、Cushing 症候群患者尿⁴³⁾ からも見出されてきた。これらの代謝産物は極めて水溶性が高く、従って従来もっぱら尿中に遊離型として存在すると考えられてきた。しかし本研究では 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol および 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone はいずれも遊離型のみでなく、グルクロン酸抱合型、硫酸抱合型として血中に初めて見出されており極めて重要な知見と考えられる。これら代謝産物の由来について Dixon⁴⁴⁾⁴⁵⁾ は放射性 6 β -

hydroxycortisol および 20 β -dihydrocortisol をヒトに静注して得られた結果より 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol は 6 β -hydroxycortisol の C-20 の還元および 20 β -dihydrocortisol の 6 β -hydroxylation の2つの代謝経路のあることを示した。しかしヒトにおいては 6 β -hydroxycortisol は常在の成分であり 6 β -hydroxy-20 β -dihydro 型代謝産物はこれより量的に少ないのに反し、犬においては 6 β -hydroxycortisol は著者の血中、肝臓中の代謝産物の成績においても、Goldの犬尿中代謝産物の分析においてもほとんど見出し得ず、6 β -hydroxy-20 β -dihydro 型が圧倒的に多いことからみて、むしろ20 β -dihydrocortisol の 6 β -hydroxylation が主要経路ではないかと考えられる。ただ一旦生成された 6 β -hydroxycortisol が極めてすみやかに 20 β -hydroxylation を受ける可能性も全く否定はできず、今後この点を追求していく予定である。

この様な極性の高い cortisol 代謝産物の生理的意義については今日よく判っていない。従来 6 β -hydroxycortisol の排泄が新生児や肝疾患々者、estrogen 処置などA環還元、グルクロン酸抱合の低下のある場合⁴⁶⁾⁴⁷⁾、モルモットの様にグルクロン酸抱合のほとんどない動物の尿⁴⁸⁾に多いことから、cortisol の主要代謝経路であるA環還元とこれに続く抱合という過程が障害された場合の代償的な経路と考えられていた。しかしこの点については異議もあり⁴⁹⁾、本研究でも示すごとく、これら代謝産物は抱合型としても相当量存在し得ることから、何か未知の生理的意義がある可能性も否定できない。

なおこれら極性の高い cortisol 代謝産物の中で、最も極性の高いものについては chromatography 上単一の放射性 peak として分離しているが、標準品がないため同定については現在検討中である。しかし paper chromatography の移動度や誘導体の検討から恐らく 6 β -hydroxycortisol または 6 β -hydroxycortisone ではないかと推定している。いずれにせよまだ報告のない代謝産物であるが、A環が還元された 6 β -hydroxy 型 steroid についても最近 Daniltescu-Goldinbergら⁴⁹⁾が放射性 cortisol と 6 β -hydroxycortisol を投与した新生児尿より 6 β -hydroxy-tetrahydrocortisol と考えられる物質を見出しており充分その可能性もあると考えられる。

以上犬における cortisol 代謝の様相をみると従来ヒトについて報告されてきたものと可成り量的には異っており、犬においてはヒトに比較して C-20 位還元、C-6 位の hydroxylation が活潑であり、また

グルクロン酸抱合機転も旺盛であると思われる。McCormick ら⁵⁰⁾は犬に放射性 cortisol を constant infusion し、主要臓器および全体の Metabolic clearance rate を計算した結果ヒトにおいて報告されたものより大きいことを認めているが、このことは著者の成績と一致する。彼等はこの様な種属差の原因の1つとして、犬においては cortisol binding globulin 濃度が低いこと⁵¹⁾をあげているが、果してそがれだけで説明できるか否か更に検討を要する。いずれにせよこの様な種属差の存在は、犬を Human Endocrinology のモデル動物として使用する際充分考慮すべき問題であると言える。

結 語

cortisol-1, 2-³H を犬に静注し150分後の血漿、肝における遊離型、グルクロン酸抱合型、硫酸抱合型代謝産物を各種 paper chromatography および高圧濾紙電気泳動にて分離し同定を行い、次の結果を得た。

1. 血漿では遊離型30.2, 20.8%, グルクロン酸抱合型60.6, 71.3%, 硫酸抱合型9.2, 7.9%であった。肝では遊離型56.1, 49.2%, グルクロン酸抱合型42.1, 46.2%, 硫酸抱合型1.8, 4.6%であり、血漿に比し遊離型の占める割合が多いのが特徴的であった。

2. 個々の代謝産物をみると血漿、肝ではその構成に大きな差はなかった。また遊離型、グルクロン酸抱合型のいずれにおいても cortisol, cortisone が最大の%を占めた。

3. これに反し tetrahydrocortisol, tetrahydrocortisone は比較的少かった。

4. A環非還元の代謝産物は遊離型および硫酸抱合型に少量見出されたが、いずれにおいても C-20 還元型 (20 β -dihydrocortisol, 20 β -dihydrocortisone) が C-20-keto 型 (cortisol, cortisone) より多かった。

5. これらの事実は犬における活潑な C-20 位還元能の存在を示すものと考えられる。

6. 遊離型、グルクロン酸抱合型、硫酸抱合型のいずれにおいても極性の高い代謝産物が可成りの%を占めた。その中の2つは 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol および 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone と同定された。最も極性の高い代謝産物は未同定であるが、恐らくそれらのA環還元型と考えられる。

7. これらの結果は従来ヒトで知られた cortisol の代謝と量的には大分異っており、種属特異性があると考えられる。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った服部絢一教授、ならびに本研究に対し直接の御指導を賜った宮保進助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) **Burstein, S., Savard, K. & Dorfman, R. I.** : *Endocrinology*, **53**, 88 (1953).
- 2) **Kemp, A. D., Kappas, A., Salamon, I. I., Hering, F. & Gallager, T. F.** : *J. Biol. Chem.*, **210**, 123 (1954).
- 3) **Fukushima, D. K., Leeds, N. S., Bradlow, H. L., Kritchvsky, T. H., Stoken, M. B. & Gallager, T. F.** : *J. Biol. Chem.*, **212**, 449, (1955).
- 4) **Peterson, R. E., Pierce, C. E. & Kliman, B.** : *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 614 (1957).
- 5) **Fukushima, D. K., Bradlow, H. L., Hellman, L., Zumoff, B. & Gallager, T. F.** : *J. Biol. Chem.*, **235**, 2246 (1960).
- 6) **Romanoff, L. P., Morris, C. W., Welch, P., Rodriguez, R. M. & Pincus, G.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 1413 (1961).
- 7) **Gold, N. I.** : *Clin. Invest.*, **41**, 1871 (1962).
- 8) **Abelson, D., Ulrich, F. & Long, N. H.** : *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **89**, 386 (1955).
- 9) **Caspi, E. & Hechter, O.** : *Arch. Biochem. Biophys.*, **61**, 299 (1956).
- 10) **Hubener, H. J., Fukushima, D. K. & Gallager, T. F.** : *J. Biol. Chem.*, **220**, 499 (1956).
- 11) **Ulrich, F.** : *Biochem. J.*, **68**, 361 (1958).
- 12) **Dougherty, T. F., Brown, H. E. & Berliner, D. L.** : *Endocrinology*, **62**, 455 (1958).
- 13) **Berliner, D. L. & Dougherty, T. F.** : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 3 (1958).
- 14) **Gold, N. I.** : *J. Biol. Chem.*, **236**, 1924 (1961).
- 15) **Gold, N. I.** : *J. Biol. Chem.*, **236**, 1930 (1961).
- 16) **Axelrod, L. R. & Miller, L. L.** : *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 373 (1956).
- 17) **Ganis, F. M., Axelrod, L. R. & Miller, L. L.** : *J. Biol. Chem.*, **218**, 841 (1956).
- 18) **Burstein, S. & Dorfman, R. I.** : *J. Biol. Chem.*, **213**, 581 (1955).
- 19) **Dorfman, R. I. & Unger, F.** : *Metabolism of Steroid hormones*, p382, New York and London, Academic Press, 1956.
- 20) **Zumoff, B., Bradlow, H. L., Gallager, T. F. & Hellman, L.** : *J. Clin. Invest.*, **46**, 1735 (1967).
- 21) **Kornel, L., Miyabo, S. & Takeda, R.** : *Steroidlogia*, **2**, 197 (1971).
- 22) **Bradlow, H. L., Zumoff, B., Monder, C., Lee, H. J. & Hellman, L.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **37**, 811 (1973).
- 23) **Berliner, D. L., Grosser, B. I. & Dougherty, T. F.** : *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 81 (1958).
- 24) **Karl, H. J., Ralsh, L. & Engelhardt, E.** : *Horm. Metab. Res.*, **1**, 95 (1969).
- 25) **Grosser, B. I. & Krowas, S. T.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **31**, 589 (1970).
- 26) **Miyabo, S., Kishida, S. & Hisada, T.** : *J. Steroid Biochem.*, **4**, 567 (1973).
- 27) **Bradlow, H. L., Fukushima, D. K., Zumoff, B., Hellman, L. & Gallager, T. F.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **22**, 748 (1962).
- 28) **Franz, A. G., Katz, F. H. & Jailer, J. W.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **21**, 1290 (1961).
- 29) **Bradlow, H. L.** : *Steroids*, **11**, 265 (1968).
- 30) **Kornel, L.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **24**, 956 (1964).
- 31) **Kornel, L.** : *Biochemistry*, **4**, 444 (1965).
- 32) **Berliner, D. L. & Salhanick, H. A.** : *Anal. Chem.*, **28**, 1608 (1956).
- 33) **Kornel, L., Moore, J. T. & Noyes, I.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **30**, 40 (1970).
- 34) **Miyabo, S. & Kornel, L.** : *J. Steroid Biochem.*, **5**, 233 (1974).
- 35) **Wortmann, W., Touchstone, J. C., Knapstein, P., Dick, G. & Mappes, G.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33**, 597 (1971).
- 36) **Burstein, S., Dorfman, R. I. & Nadel, E. M.** : *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 307 (1954).
- 37) **Ulstrom, R. A., Colle, E., Burley, J. & Gunville, R.** : *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **20**, 1080 (1960).
- 38) **Franz, A. G., Katz, F. H. & Jailer, J. W.** : *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**, 41 (1960).
- 39) **Lambert, M. & Pennington, G. W.** : *Nature*, **197**, 391 (1963).
- 40) **Gray, C. H., Greenaway, J. M., Holness,**

- N. J. & Shaw, D. A. : J. Clin. Endocrinol. Metab., 24, 199 (1962).
- 41) Lambert, M. & Pennington, G. W. : Nature, 203, 656 (1964).
- 42) Dixon, W. R. & Pennington, G. W. : J. Endocrinol., 34, 281 (1966).
- 43) Ghosh, P. C. & Pennington, G. W. : Steroids, 14, 369 (1969).
- 44) Dixon, R. & Pennington, G. W. : Steroids, 13, 529 (1969).
- 45) Dixon, R. & Pennington, G. W. : Steroids, 12, 423 (1968).
- 46) Wallace, E. Z. & Carter, A. C. : J. Clin. Invest., 39, 601 (1960).
- 47) Katz, F. H., Lipman, M. M., Frantz, A. G. & Jailer, J. W. : J. Clin. Endocrinol. Metab., 22, 71 (1962).
- 48) Nadel, E. M., Young, B. G. & Hilgar, A. G. : Am. J. Physiol., 196, 273 (1959).
- 49) Danillescú-Goldiberg, D., Branchaud, C., Arato, J. & Giroud, C. J. P. : Steroids Lipids Res., 4, 351 (1973).
- 50) McCormick, J. R., Herman, A. H., Lien, W. M. & Egdahl, R. H. : Endocrinology, 94, 17 (1974).
- 51) Daughaday, W. H. : Arch. Intern. Med., 101, 286 (1958).

Abstract

This study was carried out to obtain a total spectrum of cortisol metabolites in the dog. Two and a half hours after i.v. administration of a tracer dose of cortisol-1,2-³H to two dogs, the blood was withdrawn and the liver was removed. The plasma and liver homogenates were deproteinized and free metabolites were extracted with ethyl acetate. The conjugated metabolites were extracted with Amberlite XAD-2 column chromatography and separated into glucuronide and sulfate conjugates by means of high voltage electrophoresis. Glucuronide conjugates were hydrolyzed by β -glucuronidase and sulfate conjugates were cleaved by solvolysis. The free metabolites and the steroid liberated from conjugates were subjected to several consecutive paper chromatographies to separate them into individual steroids and identified by reverse isotope dilution techniques.

The results showed that free metabolites constituted 20 to 30 % of total plasma radioactivity, glucuronide conjugates 60 to 70 % and sulfate conjugates 8 to 9 %, while in the liver free metabolites constituted 50 to 60 % of total radioactivity, glucuronide conjugates 40 to 50 % and sulfate conjugates 2 to 5 %. Ring A reduced steroids with glycerol side chain such as cortols and cortolones were the most abundant metabolites in all fractions (50 to 70 % radioactivity). All fractions contained substantial amount (20 to 40 %) of 6 β -hydroxy-20-reduced metabolites such as 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisol, 6 β -hydroxy-20 β -dihydrocortisone and probably 6-hydroxylated derivatives of cortol(one)s. Tetrahydrocortisol and tetrahydrocortisone represented only 5 % in plasma and 10 % in the liver. Compared with the results on cortisol metabolites in the human obtained by other researchers the results seemed to indicate that reduction at C-20 ketone and hydroxylation at C-6 occurred more actively in the dog than in the human.
