

成雄ラットにおける
ステロイドホルモンの代謝と
局所生合成

前田尚之

成雄ラットにおける
ステロイドホルモンの代謝と
局所生合成

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

博士論文

前田尚之

獣医生化学教室

指導教員 教授 横田 博

2013 年度

凡 例

ACN	Acetonitrile
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
ADS	Androstenedione
ALD	Aldosterone
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATP	Adenosine triphosphate
AW	Ammonia Water
CA	Citric acid
CCS	Corticosterone
CCS-d8	Corticosterone d8
CE	Collision Energy
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propanesulfonate
CID	Collision-Induced Dissociation
CRH	Corticotropin-releasing hormone
DCC	11-Doxycorticosterone
DDW	Distilled deionized water
DES	Diethylstilbestrol
DES-d8	Diethylstilbestrol d8
DES-G	DES-(β -D-glucuronide)
Dex	Dexamethasone
E1	Estrone
α E2	17 α -Estradiol
β E2	17 β -Estradiol
E2-d2	17 β -Estradiol d2

E2-3G	17 β E2-3(β -D-glucuronide)
E2-3S	17 β E2-3sulfate
E3	Estriol
ECL	Electrochemical luminescence
EDC	Endocrine disrupting chemical
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
ENVI	ENVI-Carb 250 mg
ER	Endoplasmic Reticulum
ER	Estrogen Receptor
ESI	Electric Spray Ionization
FA	Formic Acid
FDA	Food and Drug Administration
FWHM	Full Width at Half Maximum
GC	Gas Chromatography
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
Hex	n-Hexane
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal system
HPGN	17 α -Hydroxypregnenolone
HPGT	17 α -Hydroxyprogesterone
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase Conjugated Second Antibodies
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
17 β -HSD	17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
HTP	2-Hydrazino-4-(Trifluoromethyl)-Pyrimidine

IgG	Immunoglobulin G
LC	Liquid Chromatography
LH	Luteinizing hormone
LOD	Limited of Detection
LOQ	Limited of Quantification
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry
P450 17 α	17 α -Hydroxylase
P450 21 α	21 α -Hydroxylase
P450 11 β	11 β -Hydroxylase
P450arom	Aromatase
P450sc	Cytochrome P450 side chain cleavage
PBR	Peripheral benzodiazepine receptor
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Protein disulfide isomerase
PGN	Pregnenolone
PGN-G	Pregnenolone-3(β -D-glucuronide)
PGN-S	Pregnenolone-3sulfate
PGT	Progesterone
Q1	Quadrupole 1
q2	Collision cell
Q3	Quadrupole 3
RIA	Radioimmunoassay

RSD	Relative Standard Deviation
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
S/N	Signal/Noise
SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
StAR	Steroidogenic Acute Regulatory protein
TCDD	Tetrachlorodibenzo-p-dioxin
TEA	Triethylamine
TOF	Time of Flight
TS	Testosterone
TS-d3	Testosterone d3
TS-17G	TS-17(β -D-glucuronide)
UV	Ultra Violet
WAX	Weak anion exchange
WB	Western blotting

目次

緒言	1
第 I 章 LC-MS によるステロイドホルモンとその抱合体同時分析法の開発	
1. 序文	4
2. 材料と方法	
1) 標準物質並びに試薬	7
2) 抽出方法	8
3) 測定方法	9
3. 結果	12
4. 考察	23
5. 小括	26
第 II 章 成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体の定量	
1. 序文	27
2. 材料と方法	
1) 標準物質並びに試薬	29
2) 材料	29
3) 抽出方法	29
4) 測定方法	29
5) 筋肉、肝臓、精巣組織中ステロイドホルモンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体脱抱合試験	30
3. 結果	31
4. 考察	42
5. 小括	44
第 III 章 内分泌攪乱化学物質ジェチルスチルベストロールを投与した成雄ラット精巣 P450scc 発現抑制によるテストステロン合成阻害	
1. 序文	45
2. 材料と方法	
1) 標準物質並びに試薬	47
2) 材料	47
3) SDS-PAGE および Western Blotting 用サンプル調製	47
4) DES とそのグルクロン酸抱合体並びにステロイドホルモン調査	48
5) タンパク質定量	48

6) 一次元 Western Blotting	49
7) ミトコンドリア、サイトソル内遊離コレステロールの調査	49
8) mRNA の測定	50
9) コレステロールを基質とした精巣ミトコンドリア画分酵素反応試験	51
3. 結果	52
4. 考察	64
5. 小括	67
第IV章 成雄ラット精巣中コルチコステロン生合成の検出	
1. 序文	69
2. 材料と方法	
1) 副腎摘出ラットおよび疑似手術ラットのステロイドホルモン量の測定	71
2) 11 β -Hydroxylase、21 α -Hydroxylase の酵素活性測定	71
3) LC-MS/MS および LC-TOF MS による測定	72
3. 結果	73
4. 考察	85
5. 小括	88
総括	89
謝辞	94
引用文献	95

緒 言

ステロイドホルモンは内的要因や外的な刺激に対応して主に精巣、卵巣、副腎、性腺および末梢内分泌腺から分泌され、血液によって標的器官に運ばれ様々な生理作用を発現する。ステロイドホルモンは生理作用と構造からアンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドに分類されコレステロールから合成される。ステロイドホルモンの合成機序として、細胞内の遊離コレステロールがステロイド産生急性調節タンパク質 (Steroidogenic Acute Regulatory protein, StAR) や末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (Peripheral Benzodiazepine Receptor, PBR)などを介してミトコンドリア内膜へ運ばれる[37,74,90]。ミトコンドリア内膜に達したコレステロールは様々な酵素によって代謝されることで、ステロイドホルモンに合成される。これらの酵素は Cytochrome P450 と水酸化ステロイド脱水素酵素 (Hydroxysteroid Dehydrogenase, HSD)、還元酵素 (Reductase) に分類される。ミトコンドリア内膜のコレステロールはミトコンドリアに局在するコレステロール側鎖切断酵素である Cytochrome P450 side chain cleavage (P450sc) の酵素反応によってプレグネノロン (Pregnenolone, PGN) が合成される[73]。PGN は小胞体に存在する数種類の酵素によって代謝される。3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) はプロゲステロン (Progesterone, PGT) へ変換し [93]、17 α -Hydroxylase によって PGN と PGT を基質として 17 α -ヒドロキシプレグネノロン (17 α -Hydroxypregnenolone, HPGN) と 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17 α -Hydroxyprogesterone, HPGT) を合成する水酸化反応がある。次にこれらのステロイドは 17 α -Hydroxylase のリアーゼ活性により、それぞれデヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone, DHEA) とアンドロステンジオン (Androstenedione, ADS) が合成される。3 β -HSD は HPGN と DHEA をそれぞれ HPGT、ADS へと変換する活性を持っている。精巣ライディッヒ細胞では ADS が 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) の作用によりテストステロン

(Testosterone, TS)が合成されて分泌される。[28]、卵巣ではさらに Aromatase (P450arom)が作用して、性周期に応じてエストロゲンが合成される[38,104]。また ADS から P450arom によりエストロンが合成され 17 β -HSD によってエストラジオール(Estradiol, E2)が合成される経路もある[84]。

副腎では副腎皮質の 3 β -HSD によって合成された PGT は小胞体の 21 α -Hydroxylase(P450 21 α)やミトコンドリアの酵素 11 β -Hydroxylase (P450 11 β)によって代謝され、グルココルチコイドであるコルチコステロン (Corticosterone, CCS)やミネラルコルチコイドであるアルドステロン (Aldosterone, ALD) が合成される。げっ歯類の副腎から 17 α -Hydroxylase (P450 17 α)はいまだ発見されていないため、CCS が主な副腎皮質ホルモンである。ステロイドホルモンは標的器官において様々な生理作用を発現しており、微量の増減でも生体機能に大きな影響を与えるため、生合成の調節は重要である。精巣ライディッヒ細胞での TS 生合成には下垂体から分泌される黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone, LH)や濾胞刺激ホルモン(Follicle stimulating hormone, FSH)によって調節されている[2]。また、エストロゲンは卵巣においてアンドロゲンと同様に LH や FSH で調節されている[88]。副腎皮質ホルモンではグルココルチコイドは副腎皮質刺激ホルモン(Adrenocorticotropic hormone, ACTH)により調節される[104]。これらステロイドホルモンの生合成は視床下部 - 下垂体 - 生殖器または視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質、いわゆる HPA (Hypothalamic-pituitary-adrenal system)を介して脳によって制御されている[1,66]。視床下部にはアンドロゲンレセプターが存在し、血中 TS 濃度が上昇しすぎると視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH)の分泌が低下することで下垂体から LH と FSH の分泌が減少して精巣中ステロイドホルモン合成を低下させることで血中アンドロゲン濃度を調節している[114]。コルチコイドも同様に視床下部

のグルココルチコイドレセプターを介して血中 ACTH 濃度を低下させて調節している[61]。ステロイドホルモンの合成は、様々な酵素やタンパク質が関与しており、かつ、その存在量は微量であることから合成機序や生体内動向やその役割についてはいまだ解明されていないことが多い。

そこで本研究では、第 I 章で質量分析法による生体ステロイドホルモンとその抱合体ならびに代謝物の微量分析方法の開発を目的として、生体内に存在する微量ステロイドホルモンとその代謝物であるグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体の抽出方法を開発した。次に、第 II 章では第 I 章で開発した方法を用いて、ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を臓器別に調査した。また、抱合体はステロイドホルモンの輸送体であるという仮説を立てて、標的臓器での β グルクロニダーゼ、スルファターゼ活性を調査した。第 III 章では、第 I 章で開発した方法や第 II 章で得られた結果を基にして、内分泌攪乱化学物質ジエチルstilbestrol (Diethylstilbestrol, DES) を投与した成雄ラットの臓器中への移行調査を行った。DES は強いエストロゲン活性を有している報告があり[69]、性ホルモンの合成や分泌の恒常性を攪乱することが良く知られている。しかしその内分泌攪乱作用機序について、未だ充分には解明されていない。そこで、成雄ラット精巣毒性の初期段階である TS 低下機序解明を目的とした。さらに、第 IV 章ではラット脳内でのステロイドホルモンの合成報告[14]からステロイドホルモンは各臓器で合成されているのではないかと予想され、これまで報告のない成雄ラット精巣中における CCS 合成に関与する P450 酵素活性を調査した。

第 I 章 LC-MS によるステロイドホルモンとその抱合体同時分析法の開発

1. 序 文

ステロイドはステロイド核とよばれる三つの 6 員環と一つの 5 員環が繋がった構造が特徴である。ステロイド骨格そのものは脂溶性であるが、生体物質としては C-3 位がヒドロキシル化またはカルボニル基となったステロール類であり、水溶性の性質を有している。生体内でコレステロールからエストロゲン、アンドロゲン、コルチコイドが合成される。これら生体ステロイドホルモンの測定は、一般に血液内濃度を High Performance Liquid Chromatography-Ultra Violet (HPLC-UV)、Radioimmunoassay (RIA) や Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いて行なわれてきたが[3,75,88]、組織内に微量に含まれるステロイドホルモン濃度を正確に定量した報告は少ない。また、近年では Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) による測定が行われていたが[56,77]、より高感度による測定、選択性の高い分析が求められ、Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry (LC-APCI-MS) による分析から[111]、最近では、Electrospray ionization (ESI) によるイオン化方法を用いることで検出限界値 (Limited of Detection, LOD) がさらに低くなり、微量成分を同時に測定、定量することが可能となった[39,40]。また、2 台直列に接続された質量分析計 (タンデム質量分析計: Tandem mass spectrometer, MS/MS) による MS/MS 法として、四重極型質量分析計 (LC-MS/MS、Triple quadrupole mass spectrometer) を用いた MS (Q_1) で得られた MS スペクトラムのプリカーサーイオンを単離して、 q_2 内に充填されたアルゴンに衝突させる衝突誘起解離 (Collision-induced dissociation, CID) によって得られたフラグメントから、MS

(Q₃)でプロダクトイオンの質量を設定して測定する方法として開発された Selected Reaction Monitoring (SRM)により飛躍的に高感度でかつ選択的に測定することが可能となった。さらに、飛行時間型質量分析計 (Time of flight, TOF)を用いて、詳細な質量情報や高分解能によって得られた MS スペクトラムを解析することで、元素組成を決定することが可能となり、より目的化合物を決定する真度と精度が向上した。また、ステロイドホルモンの分析は誘導体試薬 Dansyl Chloride や 2-Hydrazino-4-(Trifluoromethyl)-Pyrimidine (HTP)等を用いて、ステロイドホルモンを誘導体化することで、さらに高感度で測定する方法が報告されている[10,124]。しかし、生体内のステロイドホルモン並びにそのグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を同時に分析するためには、誘導体化処理をすることなく、生体ステロイドホルモンとその抱合体を同時に抽出精製して正確に測定することが重要である。しかしながら、組織内の多成分同時分析において ESI のイオン化効率を妨げる夾雑成分の存在が微量分析の定量に影響を与えており、この夾雑成分を排除することが課題である。ステロイドホルモンとその抱合体の同時分析は、比較的夾雑成分の少ない河川の水質調査や尿などで分析されてきたが[22,23,55,88]、筋肉ならびに脂肪、または各臓器中からの抽出は生体由来の夾雑成分が LC-MS 測定における ESI プロブの詰まりなど、装置異常の原因となるため、直接 LC-MS 測定することは望ましくない。さらに生体由来の夾雑成分は精製を目的とした固相カラムの保持を妨げ、さらに LC-MS における ESI でのイオン化効率が抑制 (Suppression) 並びに増進 (Enhancement) することで、正確に真値を求めるための妨げとなっている[32,96]。夾雑成分の除去を目的とした固相カラムを用いた抽出は、血清、プラズマや胆汁などの定量報告はあるが[106,113,121,123]、さらに夾雑成分が多く含まれる臓器中から抽出して定量した報告は少ない。そこで本章では

LC-MS を用いて生体試料中のステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析する方法を検討した。

2. 材料と方法

2.1. 標準物質並びに試薬

本研究で使用した標準品は、テストステロン (TS)、アンドロステンジオン (ADS)、17 α -ヒドロキシプロゲステロン (HPGT)、プロゲステロン (PGT)、プレグネノロン (PGN)、11-デオキシコルチコステロン (DCC)、コルチコステロン (CCS)、エストロン (E1)、17 α -エストラジオール (α E2)、17 β -エストラジオール (β E2)、エストリオール (E3)、エストラジオール-3 グルクロン酸抱合体 (E2-3G)、テストステロン-17 グルクロン酸抱合体 (TS-17G)、エストラジオール-3 硫酸抱合体 (E2-3S)、内部標準物質としてテストステロン d3 (TS-d3)、17 β -エストラジオール d2 (E2-d2) を Sigma-Aldrich から購入した。コルチコステロン d8 (CCS-d8) は大塚製薬から購入した。各化合物をメタノール (MeOH) に溶解して 100 μ g/ml となるよう調製した。さらに、各化合物を 1 μ g/ml となるように混合して、適宜 MeOH で希釈して添加回収試験および検量線の作成に用いた。使用した試薬は、抽出工程でアセトニトリル (ACN)、MeOH、n-ヘキサン (Hex) は残留農薬分析用 (関東化学) を使用した。精製固相カラムの溶出溶媒として、トリエチルアミン (TEA)、クエン酸 (CA) (特級、和光純薬)、蟻酸 (FA) (特級、関東化学) を用いた。LC-MS 測定の溶媒は超純水として Milli-Q 水 (比抵抗値 18 M Ω ·cm 以上、TOC 値 5 ppb 以下、Millipore)、ACN (LC-MS grade, Thermo Fisher)、添加剤としてアンモニア水 (AW)、FA、酢酸 (LC-MS grade, Supelco) を用いた。精製固相カラムは Oasis WAX 150 mg (Weak anion exchange 150 mg, Waters) と Hybrid SPE Phospholipid 500 mg (HSP) および ENVI-Carb 250 mg (ENVI) (共に Supelco) を用いた。脱抱合酵素として、 β -グルクロニダーゼ (Type B-1) と スルファターゼ (Type H-1) は Sigma-Aldrich から購入した。

2.2. 抽出方法

抽出工程を図 1-1 に示した。各臓器を 15 ml 遠心管に採取して計量して（例、血液は 0.50 ml、精巣、肝臓は 1.00 g）、TS, E2, CCS の内部標準物質を 5 ng/ml 添加した。ACN を加えてバイオミキサー（BM-1, 日本精機社製）で 1 分間細切した。細切した試料は 8,000 rpm ($10,160 \times g$), 10min で遠心分離（高速冷却遠心分離機、7780 II, クボタ社製）して得られた上清を No.41 フィルター（Whatman）でろ過して集めた。この操作を 2 回繰り返して集めた上清に ACN 飽和 Hex を加え、シェーカー（SR-2_{DW}, TAITEC 社製）により激しく振とう混和した後、Hex 層と ACN 層が分離するまで静置し必要に応じて遠心分離した。分液ロートを用いて ACN 層を集め、0.3 ml の FA を添加した（最終濃度が 1 %）。その溶液を予め MeOH、1 % FA で洗浄した精製固相カラム 1（WAX）に負荷した。WAX を通液した溶液と WAX を 20 ml MeOH で洗浄した溶液を精製固相カラム 2（HSP）に負荷して得られた溶液と、MeOH : 2 % CA（9:1, v/v）を 5 ml 通液して得られた溶液をエバポレーター（BUCHI, EYELA）で濃縮乾固して 1 ml の ACN:水（4:6, v/v）に溶解し 2.0 μ m Ultra free-MC（Millipore）でタンパク質を除去したものをステロイドホルモン試料とした。一方、WAX に保持されたステロイドホルモン抱合体は MeOH : 10 mM TEA、9:1 を 5 ml 通液して集められた溶液をエバポレーターによって濃縮乾固した。10 mM 酢酸バッファー 10 ml に溶解して pH メーター（HORIBA）で pH4.5 に調整して、0.25 mg/ml β グルクロニダーゼ（B-1）またはスルファターゼ（H-1）を添加して 37 °C で 30 分間反応させた（図 1-2）。反応溶液は予め MeOH、10 mM 酢酸バッファーによって洗浄置換した ENVI に負荷してステロイドホルモンを保持させた。ステロイドホルモンは MeOH とジクロロメタン 5 ml によって溶出し集められ、エバポレーターで濃縮乾固して、0.2 ml のアセトニトリル:水（4:6, v/v）溶液に溶解した試料を抱合体由来のステロイドホルモンとした。

2.3. 測定方法

2.3.1. 分析機器

測定に用いた LC および MS は、定性には飛行時間型質量分析計 (LC; Nexera, 島津製作所、TOF MS; MicrOTOFQ II, Bruker Daltonics) を使用した。得られた MS スペクトラムは Data analysis (version 4.0, Bruker Daltonics) を用いて解析した。検出された化合物はタンデム四重極型質量分析計 (LC; Ultimate 3000, MS/MS; TSQ Quantum Ultra, Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、定量解析ソフト LCQuan 2.6 を用いて定量した。

2.3.2. 測定条件

分離カラムは L-column 2 (C_{18} 3 μm , 2.1 \times 150 mm, 化学物質評価研究機構) を使用した。カラム温度は 40 $^{\circ}\text{C}$ 、注入量は 10 μl 、移動相条件は LC-TOF MS で測定対象化合物がポジティブイオンでは、0.1 % FA (A) と 0.1 % FA 含有 ACN (B)、ネガティブイオンでは 0.03 % AW (A) と 0.03 % AW 含有 ACN (B) を用いて、流速 0.2 ml/min によるグラジエントで測定した。グラジエント条件は 95 % (A) : 5 % (B) から 3 分後に 60 % (A) : 40 % (B)、9 分後に 5 % (A) : 95 % (B)、2 分間保持した後、平衡化 4 分行い総測定時間 15 分間で行った。MS の測定条件として TOF は、MS 測定範囲は 50 ~ 1,000 m/z 、Capillary voltage は 4,500 V、Nebuliser gas は 1.6 bar、Dry gas は 8 L/min、Dry temperature は 180 $^{\circ}\text{C}$ に設定して測定した。10 mM 蟻酸ナトリウム / 2-プロパノール (1:1, v/v) を測定して、Na (NaCOOH)₁₋₁₄ で得られた MS スペクトラム 90.9766 ~ 974.8132 m/z を用いて質量補正して質量精度の誤差を 5 ppm 以下に設定した。LC-MS/MS は Q_1 による MS Scan によりプリカーサーイオンを決定後、Tube Lens の最適化を行い、次に Collision Energy (CE) を 10 から 80V まで測定してプロダクトイオンを生成し、最適な MS スペクト

ラムを選択して CE の最適化を行い、Selected Reaction Monitoring (SRM) を設定した (表 1-1)。N₂ ガスは Sheath gas を 50 units、Ion Sweep Gas を 10 units に設定し、Collision Gas は Collision Cell Pressure を 1.5 m Torr に設定した。Ion Spray はポジティブモードで 3,000 V、ネガティブモードでは -2,500 V に設定し、ポジティブモードとネガティブモードを交互に測定 (切り替え時間は 50 m sec) した。ガス温度は Vaporizer Temp 350 °C、Capillary Temp は 270 °C に設定した。Q₁、Q₃ の半値幅 (Full Width at Half Maximum, FWHM) は 0.7 m/z に設定し、夾雑成分による影響が認められた場合、Q₁ の FWHM を 0.2 m/z に変更して測定した。

2.3.3. Data analysis による真度判定

LC-TOF MS による測定で得られた MS スペクトラムは内部標準物質 (蟻酸ナトリウムまたは ESI-low concentration tuning mix, Agilent) を用いて質量補正した。ステロイドホルモンの質量を抽出して得られた質量は SigmaFitTM によって元素組成解析を行い、プリカーサーイオンの値とその化合物の組成式から計算して求められた理論値と比較することでステロイドホルモンを同定した [86,93]。

2.3.4. 検量線の作成

検量線は内部標準物質を一律 5 ng/ml、標準物質を 0.1, 0.5, 1.5, 10, 50, 100 ng/ml とし、標準物質と内部標準物質とのピーク面積の比を求め縦軸に面積比、横軸に濃度を設定して作成した。また、抱合体由来のステロイドホルモンの測定は標準添加法を用いて定量した [108]。

2.3.5. 回収試験並びに精度判定

開発した抽出方法の回収率と精度を求めるために添加回収試験を実施した。回収試験は成雄ラットの血液、精巣および肝臓を用いた。血液 0.50 ml、精巣と肝臓 1.00 g を採取して内部標準物質 TS,E2,CCS を 5.0 ng/ml 添加した。次に各標準物質を 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10 ng/ml 添加して抽出後、LC-MS/MS で測定した。得られた測定値を作成した検量線を用いて算出し、定量結果から回収率 (%)と相対標準偏差 (RSD %)を求めた[24]。

3. 結果

3.1. LC-MS を用いたステロイドホルモンとその抱合体の同時測定

プリカーサーイオンを単離して、アルゴンに衝突させて得られたフラグメントを選択して測定する SRM 法を用いて定量した。例として、TS におけるプロダクトイオンの生成 MS スペクトラムを図 1-3C に、最適 SRM 条件を設定して測定した MS クロマトグラムを図 1-3D に示した。同様に、各ステロイドホルモンとその抱合体の最適 SRM 条件を表 1-1 に示した。最適 SRM 条件を設定し、ポジティブモードで測定して得られた MS クロマトグラムを図 1-4 に、ネガティブモードで得られた MS クロマトグラムを図 1-5 に示した。

3.2. 抽出方法の検討

臓器中からのステロイドホルモンとその抱合体の同時分析の抽出は、夾雑物質の主成分であるリン脂質やタンパク質の除去と MS のイオン化効率の向上を目的として開発した。リン脂質の除去として Supelco 社製の HSP を選択した。HSP は選択性の高いルイス塩基の相互作用に基づきコーティングしたジルコニアイオンとリン脂質リン酸基で作用している[53]。このことにより、試料中からステロイドホルモンは HSP に保持されることなく溶出され、リン脂質のみを除去した。(図 1-6)。しかし、ステロイドホルモン抱合体が HSP に強力に保持していることが判明した。HSP からステロイドホルモン抱合体を溶出させる方法を検討してみたところ、溶出条件が整わず良好に回収できなかったことから、HSP に負荷させる前にステロイドホルモン抱合体を別の精製固相カラムに保持させて、かつ、ステロイドホルモンが保持されない固相カラムを検討した。その結果、Waters 社製の WAX はステロイドホルモン抱合体を保持させて、ステロイドホルモンは保持されないことがわかった。しかし、アンドロゲンである TS や ADS、エストロゲンである E1、E2、E3 は HSP に保持されなかったが、DCC、CCS などのコルチコイドは保持さ

れていた。そこで溶出条件を検討した結果、2 % CA を HSP に通液することで DCC、CCS が溶出し、良好に回収された。WAX に保持された抱合体は 10 mM TEA により別の容器に溶出し、エバポレーターで乾固された後、酢酸バッファーに溶解した。その溶液を β -グルクロニダーゼ、スルファターゼによって脱抱合して、ステロイドホルモンとして測定した。得られた定量値を各ステロイドホルモン抱合体量とした。

3.3. 目的化合物の同定

LC-MS/MS で測定して得られたステロイドホルモンの定性目的のため、LC-TOF MS を用いて測定した。得られた MS スペクトラムは Data analysis を用いて解析した。LC-TOF MS による測定は設定した質量範囲内のイオン化する化合物をフルスキャンで網羅的に検知することが可能なため、測定後に目的化合物の質量を抽出することができる。目的化合物は得られたプリカーサーイオンとその化合物の組成式から計算した理論値と同位体パターンを比較することで同定された (SigmaFitTM)。SigmaFitTM を用いたアルゴリズムはモノアイソトピックイオンから同位体ピークまでの距離やイオン強度を比較することで目的対象化合物を特定できる。この SigmaFitTM による δ 値が通常 0.05 以下であると、理論値で得られた組成式と同位体パターンが一致したと判断される[86]。例として精巢中から検出して同定した MS スペクトラムを図 1-3 に示した。精巢中から抽出測定した TS とプロトン付加した質量が検出された (図 1-3A)。TS の理論値による同位体パターン (図 1-3B) と比較するために、SigmaFitTM を用いて検討した。その結果、 δ 値は 0.01181 で質量誤差は 2 mDa と誤差範囲が小さいことから、TS と同定された。同様に、検出された全てのステロイドホルモンは SigmaFitTM を用いて同定した。

3.4. 添加回収試験

開発した方法を用いることで、ステロイドホルモンならびにその抱合体を同時に分析し、ESI 法におけるイオン化抑制を引き起こすとされる試料中のリン脂質を除去する固相カラム、HSPを使用することで定量限界値を低く設定することが可能となった。この方法を用いて成雄ラットの血液、精巣および肝臓における添加回収試験の結果を表 1-2 に示した。いずれの臓器においても無添加による調査を実施した結果、内在するステロイドホルモンが検出されたため、検出されたステロイドホルモンを定量して、添加したステロイドホルモンの定量値から検出された内在するステロイドホルモンの定量値を差し引いて回収率を求めた。その結果、血液、精巣と肝臓において TS とその前駆物質である ADS、HPGT、PGT 並びに DCC、CCS は 0.1 ng/g (肝臓は 1.0 ng/g) 添加で良好な回収結果が得られた (回収率 70~120 %、RSD 20 %以下)。また、PGN は脂溶性が高く ESI のイオン化効率が他の化合物より低いため 1.0 ng/g を定量限界値とした。各化合物の添加回収試験は n 数を 5 として、定量限界値相当とその 5 倍量、10 倍量の濃度で実施した結果、いずれの化合物でも良好に回収された。

表 1-1.ステロイドホルモンおよびその抱合体と内部標準物質の最適 SRM 設定

Analyte	Observed SRM ¹⁾ m/z ²⁾	Collision E ³⁾	T Lens ⁴⁾
Pregnenolone(PGN)	299.0>281.0	14	75
	299.0>97.1	5	75
Progesterone(PGT)	315.0> 97.0	23	77
	315.0>109.0	27	77
Hydroxyprogesterone(HPG)	331.0> 97.0	28	85
	331.0>109.0	28	85
Androstenedione(ADS)	287.0> 97.0	20	84
	287.0>109.0	23	84
Testosterone(TS)	289.0> 97.0	26	91
	289.0>109.0	25	91
DeoxyCorticosterone (DCC)	331.0 > 97.3	28	85
	331.0 > 109.2	28	85
Corticosterone (CCS)	347.0 > 105.2	42	82
	347.0 > 121.2	25	82
Estrone (E1)	269.0 > 145.1	-44	-81
	269.0 > 183.2	-45	-81
17 α -Estradiol (α -E2)	271.0 > 145.1	-43	-98
	271.0 > 183.1	-43	-98
17 β -Estradiol (β -E2)	271.0 > 145.1	-43	-98
	271.0 > 183.0	-43	-98
Estriol (E3)	287.0 > 145.0	-38	-79
	287.0> 171.0	-38	-79
TS-17(β -D-glucuronide) (TS-G)	463.0>341.0	-26	-91
	463.0>287.0	-33	-91
E2-3(β -D-glucuronide) (E2-G)	447.0>271.0	-40	-94
	447.0>325.0	-25	-94
E2-3sulfate (E2-S)	351.0>80.1	-50	-90
	351.0>145.0	-62	-90
TS d3(TS-d3)	292.0> 97.0	23	91
	292.0>109.0	25	91
17 β E2 d2(E2-d2)	273.0>147.0	-40	-104
	273.0>185.0	-43	-104
CCS d8 (CCS-d8)	355.0>100.4	33	126
	355.0>125.5	29	126

1) SRM (Selected Reaction Monitoring) 選択的反応モニタリング

2) m/z 質量 m と電荷 z の比

3) Collision E (Collision Energy) 衝突誘起解離 (Collision-induced

dissociation: CID) を行う時に衝突エネルギーを利用してイオンの解離を引き起こすためのエネルギー値

4) T Lens (Tube lens) ESI において生成したイオンを質量分析部に導入するための印加電圧値

5) d 体 内部標準物質として用いられるサロゲート物質

表 1-2. ステロイドホルモンおよびその抱合体の添加回収試験

steroids	added (ng/g)	Blood(0.50ml) ^a		Testis(1.00g) ^a		Liver(1.00g) ^a	
		Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Pregnenolone	10.0	93.3	18.5	98.3	7.9	86.7	3.5
	5.0	91.0	18.4	104.3	14.8	85.0	15.3
	1.0	85.9	15.7	91.6	19.4	99.3	9.8
Progesterone	10.0					90.7	10.9
	5.0	94.6	8.2	92.0	10.5	86.6	16.0
	1.0	90.1	6.4	97.7	16.5	107.1	15.3
	0.1	82.8	4.5	101.6	9.3		
17-Hydroxyprogesterone	10.0					72.4	4.3
	5.0	110.3	2.3	105.2	7.0	75.8	19.8
	1.0	86.0	9.4	89.4	10.4	89.7	6.7
Androstenedione	0.1	97.2	13.6	92.6	16.4		
	10					105.2	7.0
	5.0	113.6	6.4	86.0	4.5	89.4	10.4
	1.0	115.4	2.5	86.2	5.6	92.6	16.4
Testosterone	0.1	100.7	7.6	102.0	5.3		
	10.0					98.6	4.5
	5.0	106.8	5.2	80.5	4.7	88.0	9.1
	1.0	104.8	5.7	77.6	5.7	74.3	4.4
17 α -Estradiol	0.1	110.6	7.8	96.4	15.1		
	10.0					108.7	6.0
	5.0	91.9	14.1	108.0	1.0	89.7	20.5
	1.0	73.3	2.1	109.5	4.0	89.0	7.9
17 β -Estradiol	0.5	89.4	15.6	107.0	6.1		
	10.0					99.3	3.1
	5.0	99.3	3.1	105.7	0.7	73.3	2.1
	1.0	73.3	2.1	81.9	1.5	112.3	6.7
Corticosterone	0.5	112.3	6.7	96.9	18.4		
	10.0					101.3	4.0
	5.0	82.7	9.4	84.8	16.4	88.9	9.6
	1.0	80.7	4.3	100.6	13.9	104.3	2.9
11-Deoxycorticosterone	0.1	107.8	5.1	85.7	9.1		
	10.0					95.9	5.2
	5.0	78.6	7.4	116.9	1.7	97.6	2.0
	1.0	90.0	11.3	78.1	4.3	100.7	21.5
Testosterone-17- glucuronide	0.1	81.5	8.8	75.3	1.2		
	10.0					85.0	8.6
	5.0	91.8	18.8	85.0	2.6	95.4	16.4
	1.0	98.5	13.8	95.4	6.4	110.0	10.1
17 β - Estradiol-3- glucuronide	0.5	71.3	14.9	117.0	1.1		
	10.0					103.5	4.3
	5.0	90.7	10.9	102.7	2.3	97.8	4.0
	1.0	86.6	16.0	109.2	7.7	119.1	0.5
17 β -Estradiol-3-sulfate	0.5	107.1	15.3	79.1	12.3		
	10.0	90.3	17.1	106.4	1.4	70.2	6.5
	5.0	101.3	4.6	101.5	13.5	72.3	12.3
	1.0	82.3	13.2	91.3	12.5	71.2	15.3

RSD: Relative Standard Deviation

^a Data presented mean values of n=3-5

成雄ラット全血、精巣、肝臓組織にステロイドホルモンとその抱合体を添加して、開発した方法で抽出測定した回収率と相対標準偏差を示した。FDAで認可された値は回収率70~120%、RSDは25%以下でありその条件を満たしていた。

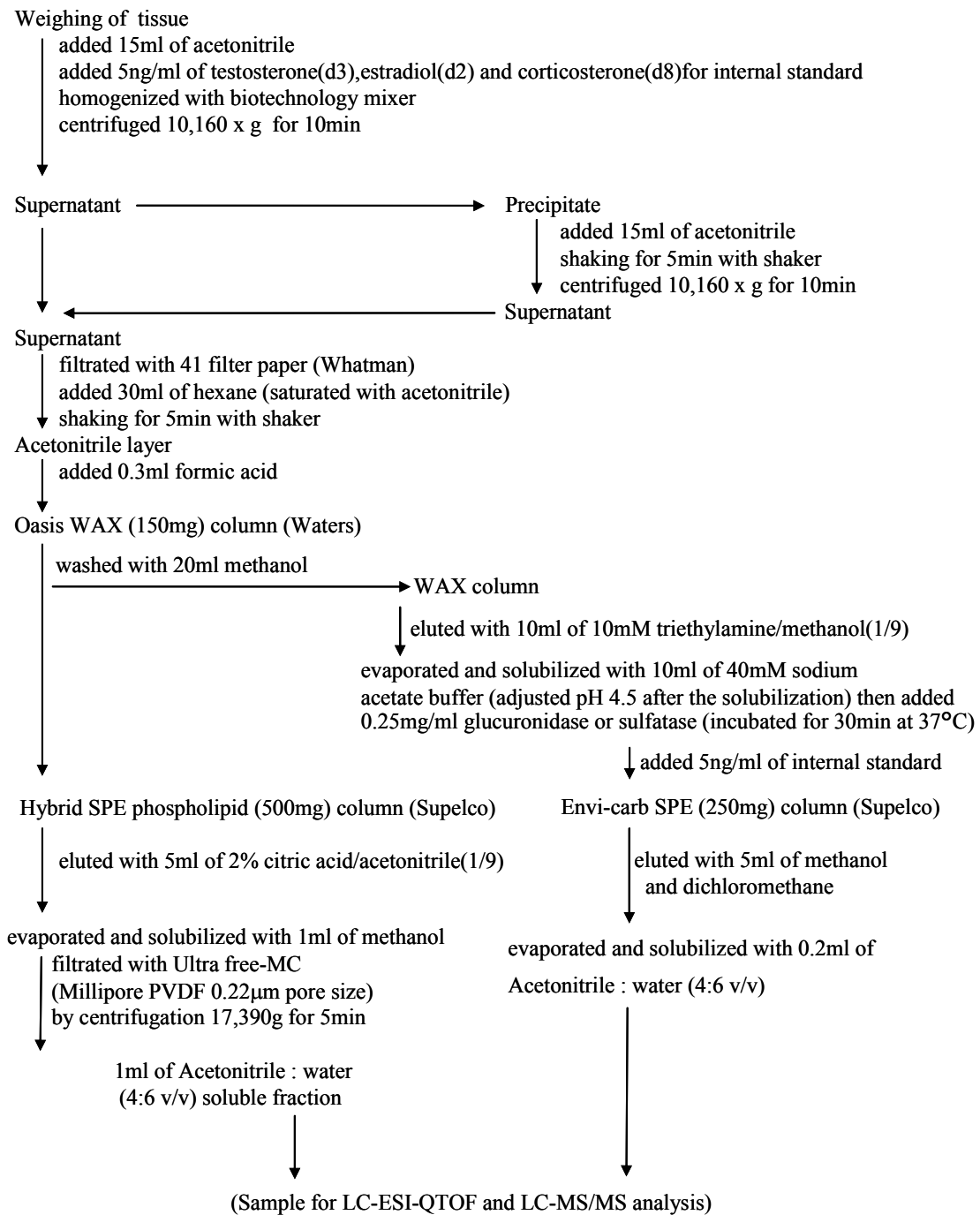
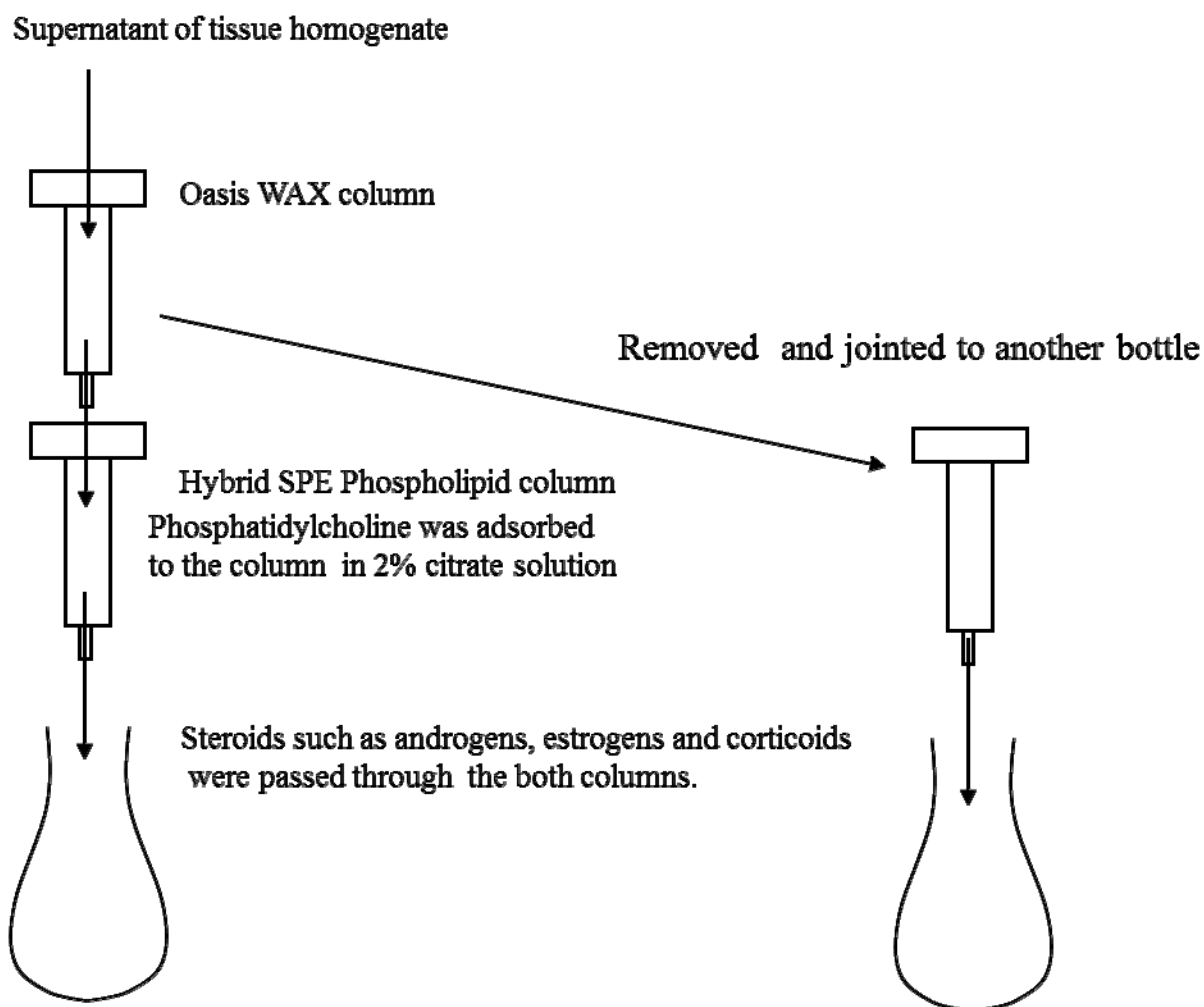


図 1-1. ステロイドホルモンとその抱合体の抽出方法

アセトニトリルによる抽出からヘキサンによる脱脂、WAX、HSP 固相カラムによる精製および β -グルクロニダーゼ、スルファターゼ酵素処理による脱抱合処理後 LC-MS 測定した。



Water soluble fractions such as glucuronide and sulfate conjugates were eluted with 10mM triethylamine / methanol solution (1/9), evaporated and solubilized with 10ml of 40mM sodium acetate buffer (adjusted pH 4.5 after the solubilization), then added 0.1ml of 2.5mg/ml glucuronidase or sulfatase, and incubated for 30min at 37°C

図 1-2. ステロイドホルモンとその抱合体の抽出方法

WAX カラムからステロイドホルモンとその抱合体を完全分離した後、WAX に保持した抱合体を溶出後、酵素処理してステロイドホルモンとして測定した結果をステロイドホルモン抱合体として定性、定量した。

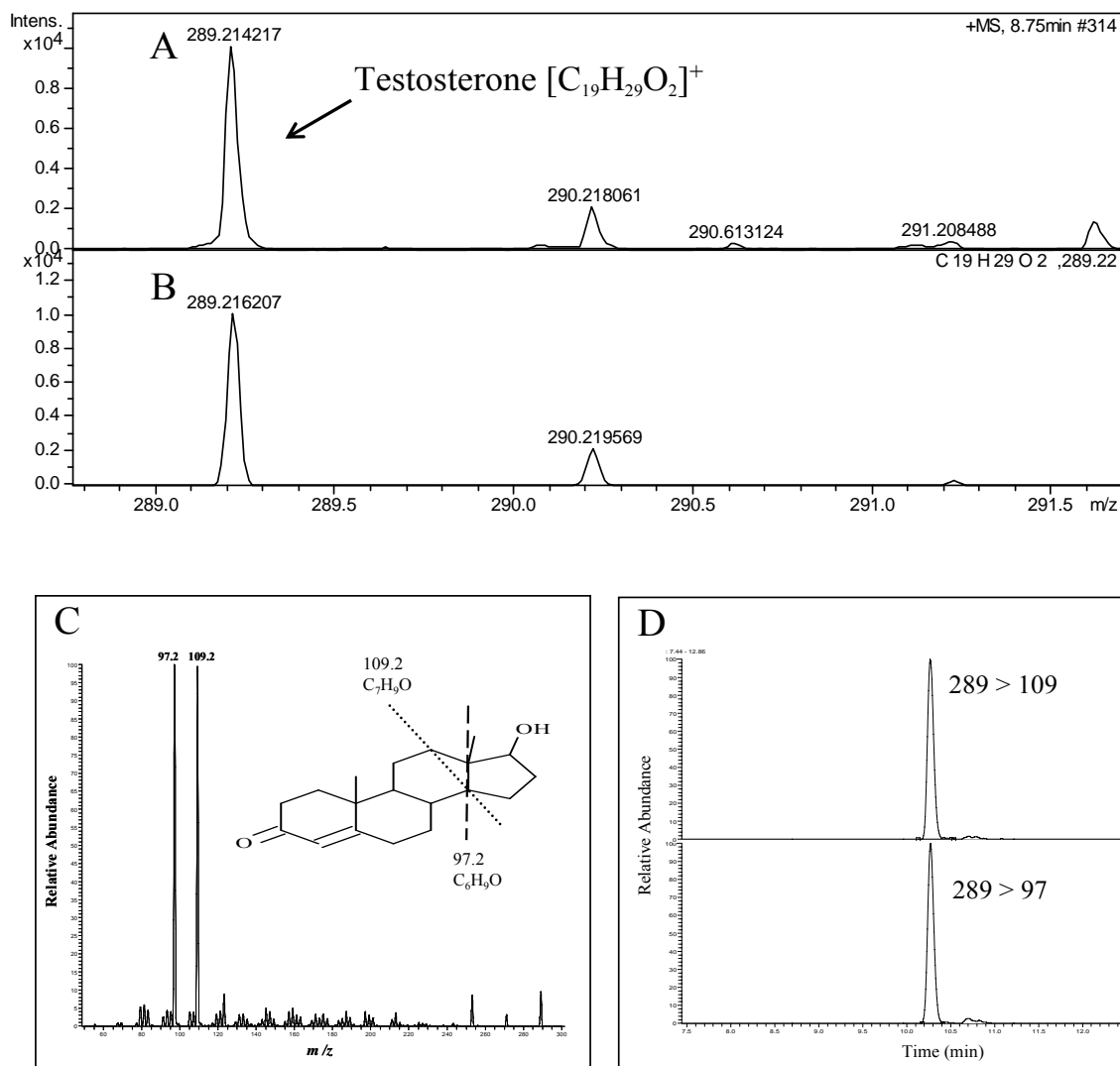


図 1-3. LC-TOF MS による定性と LC-MS/MS による SRM 法による定量

- A; 開発した方法を用いて成雄ラット精巢中から検出した TS を LC-TOF MS 測定した MS スペクトラムの同位体パターン。縦軸に強度、横軸に m/z 値を表わす。
- B; TS ($C_{19}H_{28}O_2 + H$) の理論値とその同位体パターン。
- C; TS のプリカーサーイオンから MS/MS によって得られたプロダクトイオンの MS スペクトラム。縦軸に強度、横軸に m/z 値を表わす。
- D; プリカーサーイオン、プロダクトイオンを選択して最適 SRM 条件を設定して LC-MS/MS 測定で得られた MS クロマトグラム。縦軸に相対強度、横軸に測定時間を表わす。

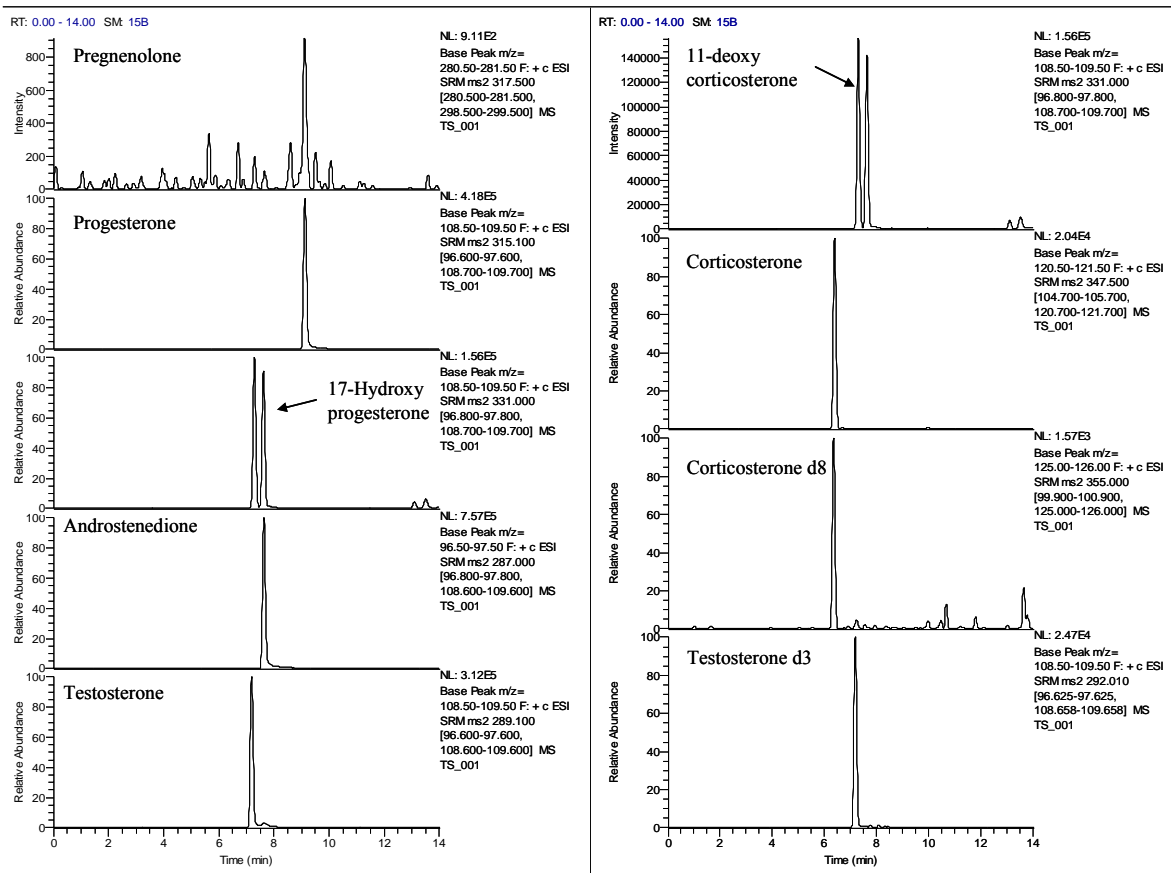


図 1-4. 設定した SRM で測定した MS クロマトグラム (Positive Mode) で測定

各ステロイドホルモンと内部標準物質であるサロゲート物質を 10 ng/ml となるよう調製した試料を LC-MS/MS によるポジティブモードで SRM 測定した MS クロマトグラムを示す。縦軸に相対強度、横軸に測定時間を示す。

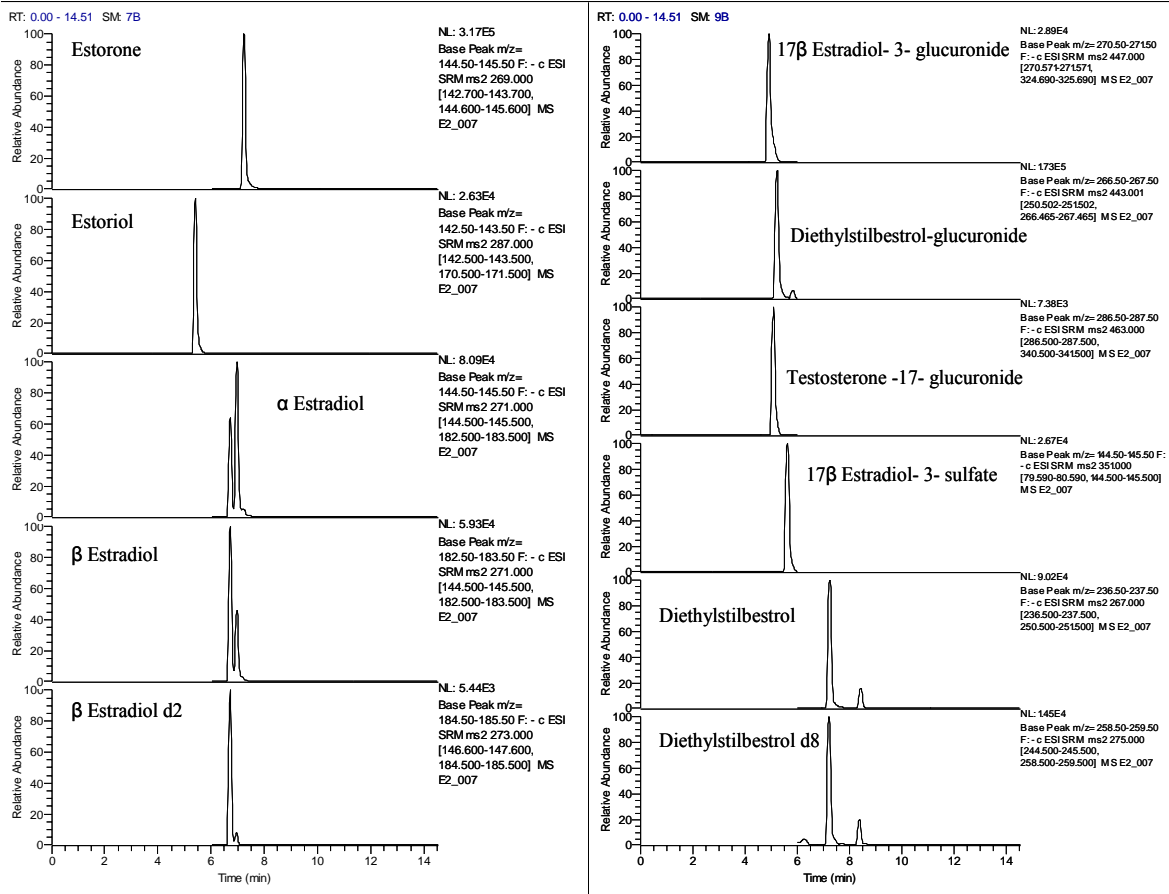


図 1-5. 設定した SRM で測定した MS クロマトグラム (Negative Mode) で測定
 各ステロイドホルモンとその抱合体ならびに内部標準物質を 10 ng/ml となる
 よう調製した試料を LC-MS/MS によるネガティブモードで SRM 測定した MS ク
 ロマトグラムを示す。縦軸に相対強度、横軸に測定時間を示す。

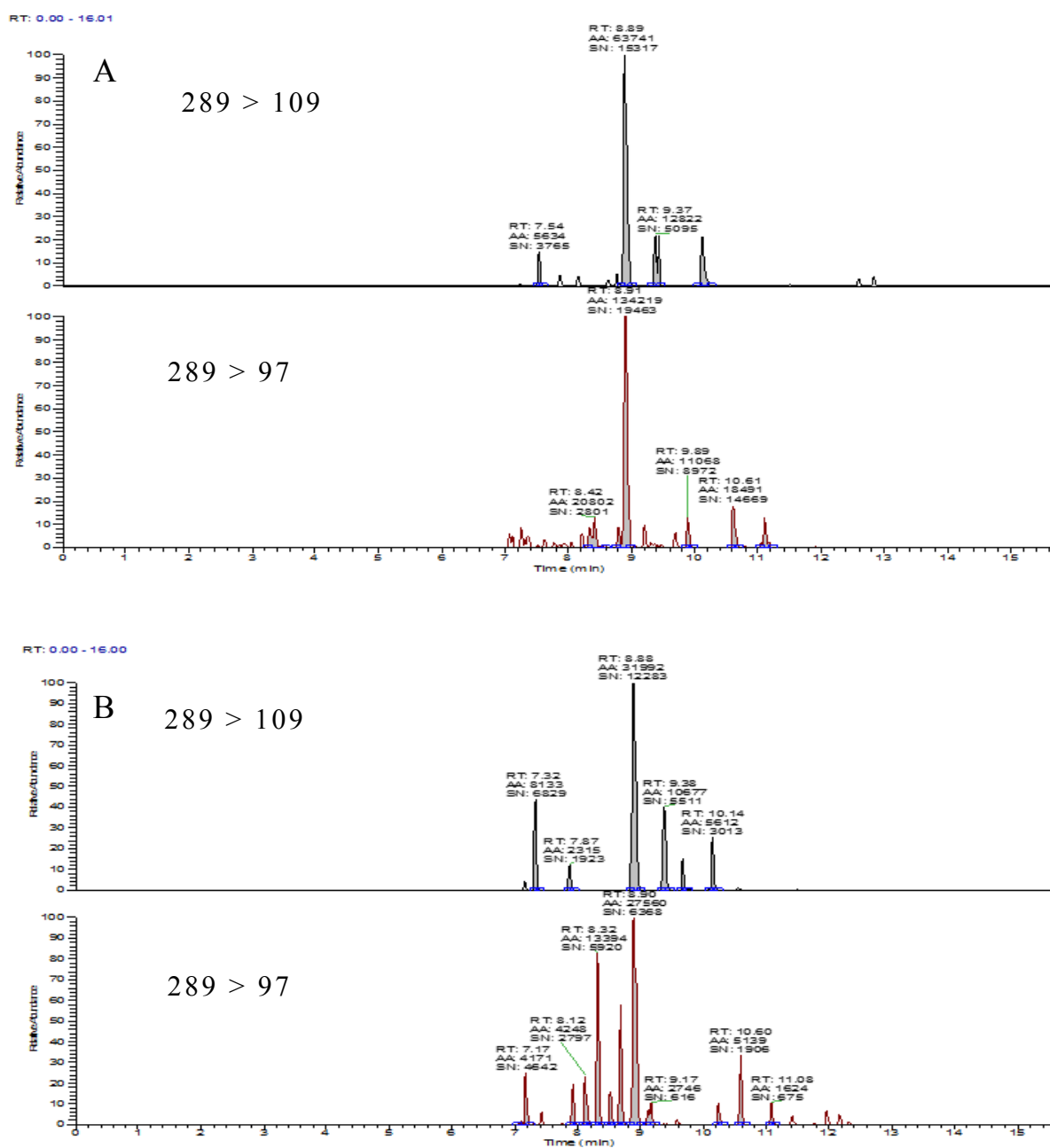


図 1-6. 固相カラム HSP 使用有無による MS クロマトグラムの比較

A; 固相カラム HSP を使用して測定した成雄ラット血液中 TS の MS クロマトグラム。

B; 固相カラム HSP を未使用で測定した成雄ラット血液中 TS の MS クロマトグラム。

縦軸に相対強度、横軸に測定時間を表わす。

RT; Retention Time, AA; Area, SN; Signal/noise

固相カラム使用により TS (RT=8.89~8.91) のピークが顕著となり S/N 比が向上した。

4. 考 察

LC-MS を用いたステロイドホルモンとその抱合体の同時分析は LC の分離はもちろん、イオン化効率を良好にするため、MS 測定条件の最適化や化合物ごとの条件設定が必要である。同時に測定する化合物によっては気体状のプロトンが付加した正イオン（ポジティブイオン）あるいは脱離した負イオン（ネガティブイオン）として検出されるため、正負を高速で切り替えて測定する。さらに微量に存在する場合は正負の切り替えに時間を要するため、正負をどちらかに固定して測定する場合もある。ステロイドホルモンでは C-3 位がカルボニル基をもつ化合物として、アンドロゲンやコルチコイドはポジティブイオンで検出され、複数のヒドロキシル基をもつエストロゲンやグルクロン酸抱合体、負の電荷を持つ硫酸抱合体はネガティブイオンで検出された。MS の特性上ネガティブイオンの感度はポジティブイオンより劣るため、今回測定したステロイドホルモンではネガティブイオンで検出されたエストロゲンやグルクロン酸抱合体の高感度検出を目的として、LC 移動層の添加剤を塩基性であるアンモニア水を用いることでイオン化は促進された。また、ステロイドホルモンはそれぞれ似たような構造をしているが、MS/MS によるプロダクトイオンを測定する SRM 法を用いることでより選択的に測定することが可能となった（表 1-1）。しかし、質量や組成式が同じでも立体構造が異なる構造異性体（DCC と HPGT など）がある。この場合、LC-TOF MS による精密質量組成解析や LC-MS/MS の SRM 条件も同じであることから、MS スペクトラムによる違いでは区別できないため LC による分離が必要となる。LC の分離条件としては LC カラムの種類、径や長さによって分離パターンが異なるため、目的化合物に合ったカラムを選択することが重要である。さらに、移動層の水と有機溶媒の種類や勾配条件、添加剤の種類によっても分離条件が変わるので検討する必要がある。以上のことから LC と MS の最適条件を設定することで微量分析が可能となった。

アンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドなどの生体ステロイドホルモンとその抱合体を同時に抽出測定することは、極性の違う化合物を同時に精製するため、精製工程を極性ごとに分離する必要がある。そこで極性とイオン結合の異なる精製固相カラムを組み合わせることで、異なる特性をもつ化合物の分離精製に成功した。河川の水質調査などの報告[55]ではステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析しているが、血液や臓器など夾雑成分が多い場合、生体由来の夾雑成分が固相カラムにステロイドホルモンやその抱合体より先に保持されてしまうことで、目的化合物の保持を妨げており、回収率低下に繋がっている。そこで夾雑成分の多い臓器中からの微量分析と高極性化合物である抱合体の分離を目的として固相カラムを検討した。抱合体の一つであるグルクロン酸抱合体はアニオン結合する性質があり、各種異なる特性を有した固相カラムを検討した結果、弱アニオンであるWAXが調査した全ての抱合体を保持することが分かった。さらに、WAXはアンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドを保持しないことも判明した。次に水溶性であるが骨格が脂溶性であるステロイドホルモンの高感度測定には夾雑成分の除去が求められる。そこで、ステロイドホルモンは保持されなかったWAXの負荷液を集めた後、HSPに通液した。その結果、ステロイドホルモンの検出限界値、回収率が飛躍的に向上した(図 1-6)。HSPはジルコニアによるルイス塩基によって、生体試料中の夾雑成分、主にリン脂質が選択的に保持される機能を有する固相カラムであり[53]、これらを除去できたことが回収率向上の要因であると考えられる。以上のことからステロイドホルモンとその抱合体を分離精製することができ、かつ生体試料中の微量分析が可能となった。LC-MSによる分析はRIAやELISAと比較して検出感度や精度が良好である[3,23]。また、直接目的化合物の質量を測定するため、選択的にかつ高感度で測定することが可能となった。

添加回収試験では各臓器ともアンドロゲン、エストロゲン並びに抱合体は良

好に回収されていた(表 1-2)。水や尿、プラズマ、血清からの生体ステロイドホルモンとその抱合体の同時分析はこれまで報告されている[55,105]。しかし、夾雑成分の多い血液や臓器中から直接抽出して測定した報告は、胆汁中から投与した薬物のグルクロン酸抱合体を固相カラムで精製し、LC-MS/MS で分析した報告はあるが[120]、ステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析している報告は少ない。以上のことから、開発した方法は生体内に微量に存在するステロイドホルモンやその抱合体を同時に定性定量できる方法であり、これまでRIA 等での感度および特異性の低い測定法に比べ、この手法は生体内の様々な微量ステロイドホルモンの変化や薬物の動態追跡やそれに伴う生体反応の調査に有用であると考えられる。

5. 小 括

ステロイドホルモンは生体内でコレステロールからアンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドとして合成される。生体内のステロイドホルモンは微量でもその効果は大きい。そのため生体反応を観察する指標として有用であるため、微量分析方法の開発が数多く報告されている。これら生体ステロイドホルモンの測定は、一般に血液内濃度を HPLC-UV、RIA、ELISA を用いて行なわれてきたが、組織内に微量に含まれているステロイドホルモン濃度を正確に定量した報告は少ない。しかし、LC-MS/MS の登場以来、急速に微量分析法の開発が進められ、近年では LC-TOF MS による精密質量や同位体パターンによる解析や LC-MS/MS による SRM 法により飛躍的に高感度でかつ選択的に測定することが可能となった。本章では、この LC-TOF MS と LC-MS/MS による SRM 法を用いたステロイドホルモンとその抱合体を微量測定できる LC-MS の条件を設定して、臓器中に多く存在する夾雑成分、いわゆるマトリックスを除去するため固相カラムを使用して精製する方法を開発した。今までは河川の水や尿、血清、プラズマ、胆汁での報告はあるが、この方法を用いることで、これまで報告の少ない臓器中からの微量ステロイドホルモンの定量が可能となった。さらに、HTP などの誘導体化処理も行わないことから、代謝物や抱合体の測定も同時に測定できるようになった。よって、本分析方法は臓器中から微量に存在するステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析することが可能となったことから、生体内の様々な微量ステロイドホルモンの変化や薬物の動態追跡やそれに伴う生体反応の調査に有用であると考えられる。

第Ⅱ章 成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体の定量

1. 序 文

一般に体内に取り込まれた薬物や毒物、生体内の老廃物は肝臓によって代謝されて尿中や胆汁中へ排泄される。これらは Cytochrome P450 による代謝反応を受けて、UDP-glucuronosyltransferase (UGT)などの抱合酵素によりグルタチオンやグルクロン酸などの親水性物質として抱合体を形成し、最終的には胆管あるいは血中を介して排泄されている[19,125]。生体内で合成されたステロイドホルモンに関しても同様のシステムによって排泄されている。主に生殖腺や副腎で合成されたステロイドホルモンは血液中の輸送タンパク質によって全身に運ばれているが[108]、ステロイドホルモン抱合体は排泄に関わっていると考えられており、ステロイドホルモンを抱合体として標的臓器へ輸送するという報告はない。血中ステロイドホルモン抱合体は、アンドロステンジオン(ADS)の前駆物質であるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)の硫酸抱合体(DHEA-S)が血中から高濃度で検出されており、血中DHEA-Sが高いほど生存率が高く、長寿になる傾向があるという報告がある[13]。脳においてはDHEAが高濃度で存在しており、副腎摘出においても脳内DHEAの減少が見られないという報告もある[16]。新生児ラット脳培養グリア細胞神経細胞内でのDHEA合成は報告されているが[127,128]、成熟ラット脳内では、合成酵素である 17α -hydroxylaseの局在、活性が不明なことから、これまで脳内でのDHEA、ADS、テストステロン(TS)、エストラジオール(E2)の合成は行われていないと考えられてきた[7,58,70,72]。海馬神経では内分泌ホルモンに加えて、脳で合成されたプレグネノロン(PGN)やプレグネノロン硫酸抱合体(PGN-S)の存在も報告されており[6,49,50,51]、近年、成雄ラット海馬において、 17α -hydroxylaseとP450 aromは錐体神経細胞、顆粒神経細胞に発現していることから、脳でのステロイドホルモン合成が見出されている[43]。

肝臓で抱合代謝を受けた代謝物は、嫌氣的細菌群の酵素類 (β -グルクロニダーゼ、

β -グルコシダーゼ、アゾ還元酵素)により、主に還元と加水分解を受け、脱抱合されて再び腸管から吸収される[86]。ビスフェノール A (BPA) のような E2 様内分泌攪乱物質が肝臓でグルクロン酸抱合体 (BPA-G) となり、その一部が胎盤を通過して脱抱合されていることが報告されている[84]。

そこで、第 I 章で開発したステロイドホルモンとその抱合体の高感度と高精度による微量同時分析法を用いて、本章ではこれまで報告が少なかった成雄ラットの臓器中のステロイドホルモンとその抱合体量を調査した。また、抱合体はステロイドホルモンの輸送体ではないかという仮説を立てて、標的臓器での β -グルクロニダーゼ、スルファターゼ活性を検討し、その役割を考察することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1. 標準物質並びに試薬

プレグネノロン硫酸抱合体 (PGN-S)、プレグネノロングルクロン酸抱合体 (PGN-G) は Sigma-Aldrich から購入した。その他は第 I 章に準ずる。

2.2. 材料

2.2.1. 供試動物

8 週齢の成雄ラットを用いた。系統は Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。供試動物はそれぞれ個別ゲージで自由飲水、自由摂食にて飼育した。動物実験は酪農学園大学実験動物委員会の指針に基づいて行った。

2.2.2. 各臓器の採取

1 週間馴化した 8~9 週齢の無処置成雄ラットを放血殺後 (血液を採取)、脳 (大脳、小脳、海馬、下垂体)、肝臓、腎臓、筋肉 (骨格筋)、精巣を摘出し、液体窒素で凍結保存した。また肝臓は 1.15 % KCl-10 mM EDTA で灌流し、臓器内血液を除去した。なおラットは本学動物実験委員会の規定する方法で飼養管理、安楽死処置をした。

2.3. 抽出方法

第 I 章に準ずる。

2.4. 測定方法

第 I 章に準ずる。

2.5. 筋肉、肝臓、精巣組織中ステロイドホルモンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱

合体脱抱合試験

2.5.1. 酵素反应用サンプルの調製

酵素活性測定に用いるサンプルは脳および筋肉を用いた。諸臓器を 3 倍量の 0.25 M スクロース溶液を加えホモジナイズ後、900 ×g、10 分間、4 °C で遠心分離し、その上清を 5,000 ×g、10 分間、4 °C で遠心分離した。得られた沈殿をミトコンドリア画分、上清を細胞質画分(含マイクロソーム画分)とした。それぞれの画分に終濃度 0.5 %になるよう、CHAPS を加えて膜成分を可溶化させた。ミトコンドリア画分および細胞質画分を用いて脱硫酸抱合反応試験および脱グルクロン酸抱合試験を行った。

2.5.2. 試験管内脱硫酸抱合酵素および脱グルクロン酸抱合酵素反応試験

2.0 ml チューブに、緩衝液 100 μl、DDW 740 μl、基質 20 μl、肝臓および骨格筋の細胞質画分液 40 μl を混合したものを反応液とした。脱硫酸抱合反応試験には緩衝液として 0.5 M リン酸緩衝液を使用し、基質は 3 mM PGN-S を用いた。また脱グルクロン酸抱合反応試験の場合は、緩衝液として 0.5 M 酢酸を用い、基質は 1 mM PGN-G および 1mM TS-G を用いた。反応液を 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートし、各時間で回収した反応液は採取後、100 °C、2 分間煮沸させて酵素反応を停止させた。その後、各時間の反応液中の PGN 濃度を LC-MS/MS および LC-TOF MS を用いて測定した。

3. 結果

3.1. 成雄ラット臓器中ステロイドホルモン量

採取した成雄ラットの各臓器を第 I 章で開発した方法で抽出測定して、各臓器中ステロイドホルモン量を表 2-1 に示した。TS と CCS は調査した臓器のうち、肝臓以外の全ての臓器から検出された。この二つのステロイドホルモンは生体内において、内分泌制御調節に重要な役割を担っていることが知られている。このステロイドホルモンの前駆物質として、プロゲステロン (PGT) とデオキシコルチコステロン (DCC) も血液や各臓器で検出されていた。この結果から、TS や CCS やその前駆物質が合成されている内分泌臓器から様々な標的組織に輸送されていることが示唆された。一方、肝臓においては PGN のみ検出されており、その他のステロイドホルモンは検出されなかった (図 2-1B)。しかし、PBS で灌流処置を実施しない肝臓から CCS が検出されたことから (図 2-1A)、肝臓で検出された CCS は血液由来と考えられる。また PGN はステロイド合成臓器である精巣や副腎だけでなく、肝臓や筋肉から高濃度で検出されたが、脳や血液からは検出限界以下であった。

3.2. 成雄ラット臓器中ステロイドホルモングルクロン酸抱合体、硫酸抱合体量

採取した成雄ラットの各臓器を第 I 章で開発した方法で抽出測定して、各臓器中ステロイドホルモンのグルクロン酸抱合体、硫酸抱合体量を表 2-2 に示した。PGN-G は調査した臓器全てから検出された。一方、硫酸抱合体はステロイド合成臓器である精巣と副腎においては定量限界値以下であった。腎臓では CCS、TS、PGN の両抱合体が検出されていることから、主に腎臓から抱合体として排出されていると考えられる。肝臓では PGN の抱合体のみ検出されており、コレステロールから PGN を合成した後、抱合体として血液によって標的臓器へ運ばれていると考えられる。

3.3. 試験管内脱硫酸抱合酵素および脱グルクロン酸抱合酵素反応試験

精巣、副腎および肝臓で合成されたステロイドホルモングルクロン酸抱合体は血液によって運搬されていることが予想された。標的臓器において脱抱合された後、ステロイドホルモンまたはその前駆物質から最終生成ステロイドホルモンの合成が行われていることが示唆された。そこで、標的臓器である脳、筋肉、精巣、代謝臓器である肝臓において脱抱合に関係する酵素、 β -グルクロニダーゼとスルファターゼ活性の有無を調査した。その結果、いずれの臓器においても PGN-S、PGN-G 基質による反応において、時間が経過すると共に PGN 量は増加した (図 2-2~6)。また、細胞質画分やミトコンドリア画分のいずれの画分においても硫酸抱合体は脱抱合されていた (図 2-2~4)。さらに、TS-G は脳でも脱抱合された (図 2-7)。よって、ステロイドホルモン硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体は標的臓器で脱抱合されることがわかった。

表 2-1. 成雄ラット臓器内ステロイドホルモン量

Steroids	Blood	Testis	Adrenal Glands	Liver	Kidney	Brain			Muscle
						Cerebrum	Cerebellum	Hippocampus	
Testosterone	5.4 ± 1.3	175.8 ± 41.8	0.105 ± 0.004	-	8.5 ± 1.5	9.1 ± 2.6	9.4 ± 2.5	1.17 ± 0.21	3.14 ± 0.90
Androstenedione	0.57 ± 0.16	45.6 ± 8.8	0.15 ± 0.02	-	6.1 ± 2.7	-	-	0.052 ± 0.015	0.88 ± 0.09
17-Hydroxyprogesterone	-	36.2 ± 9.5	-	-	-	-	-	-	-
Progesterone	2.21 ± 1.43	13.7 ± 5.3	28.5 ± 2.8 *a	-	10.1 ± 0.4	15.67 ± 5.40	4.4 ± 0.36	0.083 ± 0.043	0.45 ± 0.15
Pregnenolone	-	25.4 ± 2.5	4.99 ± 0.86 *a	304.2 ± 55.1	25.3 ± 4.4	-	-	-	216.2 ± 28.0
11-Deoxycorticosterone	20.4 ± 3.1	40.2 ± 17.8	17.2 ± 1.5 *a	-	30.4 ± 1.6	11.2 ± 5.9	18.8 ± 1.0	0.368 ± 0.07	14.4 ± 3.4
Corticosterone	140.3 ± 38.1	137.7 ± 24.1	38.2 ± 1.1 *a	-	414.7 ± 127.8	101.0 ± 6.6	92.7 ± 6.5	2.55 ± 0.62	57.0 ± 19.3

33

Data were shown as the means ± S.D. for 3-5 animals (p moles / ml or g of tissue weight). “*a” and “-” mean as “n moles /g” and “LOD”.

成雄ラット臓器内の TS と CCS およびその前駆物質濃度を示した。

表 2-2. 成雄ラット臓器内ステロイドホルモングルクロン酸抱合体および硫酸抱合体量

Glucuronide conjugates	Blood	Testis	Adrenal Glands	Liver	Kidney	Whole brain	Muscle
Testosterone	0.039 ± 0.009	0.023 ± 0.008	-	-	0.037 ± 0.020	0.024 ± 0.006	0.062 ± 0.005
Androstenedione	-	0.021 ± 0.005	-	-	-	-	-
17-Hydroxyprogesterone	-	0.052 ± 0.004	-	-	-	-	-
Progesterone	-	0.050 ± 0.012	4.39 ± 2.30	-	-	0.036 ± 0.012	-
Pregnenolone	4.39 ± 0.55	2.69 ± 1.42	5.71 ± 2.17	8.18 ± 3.81	9.83 ± 1.00	7.84 ± 0.46	6.99 ± 1.59
11-Deoxycorticosterone	-	-	4.55 ± 1.84	-	-	0.060 ± 0.028	-
Corticosterone	0.077 ± 0.007	0.021 ± 0.016	6.07 ± 3.19	-	0.063 ± 0.010	0.070 ± 0.054	0.028 ± 0.015
Sulfate conjugates	Blood	Testis	Adrenal Glands	Liver	Kidney	Whole brain	Muscle
Testosterone	0.068 ± 0.006	-	-	-	0.041 ± 0.018	0.015 ± 0.011	0.032 ± 0.002
Androstenedione	-	-	-	-	-	-	-
17-Hydroxyprogesterone	-	-	-	-	-	-	-
Progesterone	-	-	-	-	0.042 ± 0.006	0.013 ± 0.005	-
Pregnenolone	6.12 ± 0.42	-	-	17.95 ± 3.50	15.99 ± 5.98	10.91 ± 1.43	8.66 ± 0.73
11-Deoxycorticosterone	-	-	-	-	-	0.012 ± 0.004	-
Corticosterone	0.056 ± 0.002	-	-	-	0.067 ± 0.017	0.018 ± 0.008	0.036 ± 0.018

Data were shown as the means ± S.D. for 3-5 animals (p moles / ml or g of tissue weight). “-” mean as “LOD”.

成雄ラット臓器内の TS と CCS およびその前駆物質のグルクロン酸抱合体と硫酸抱合体濃度を示した。

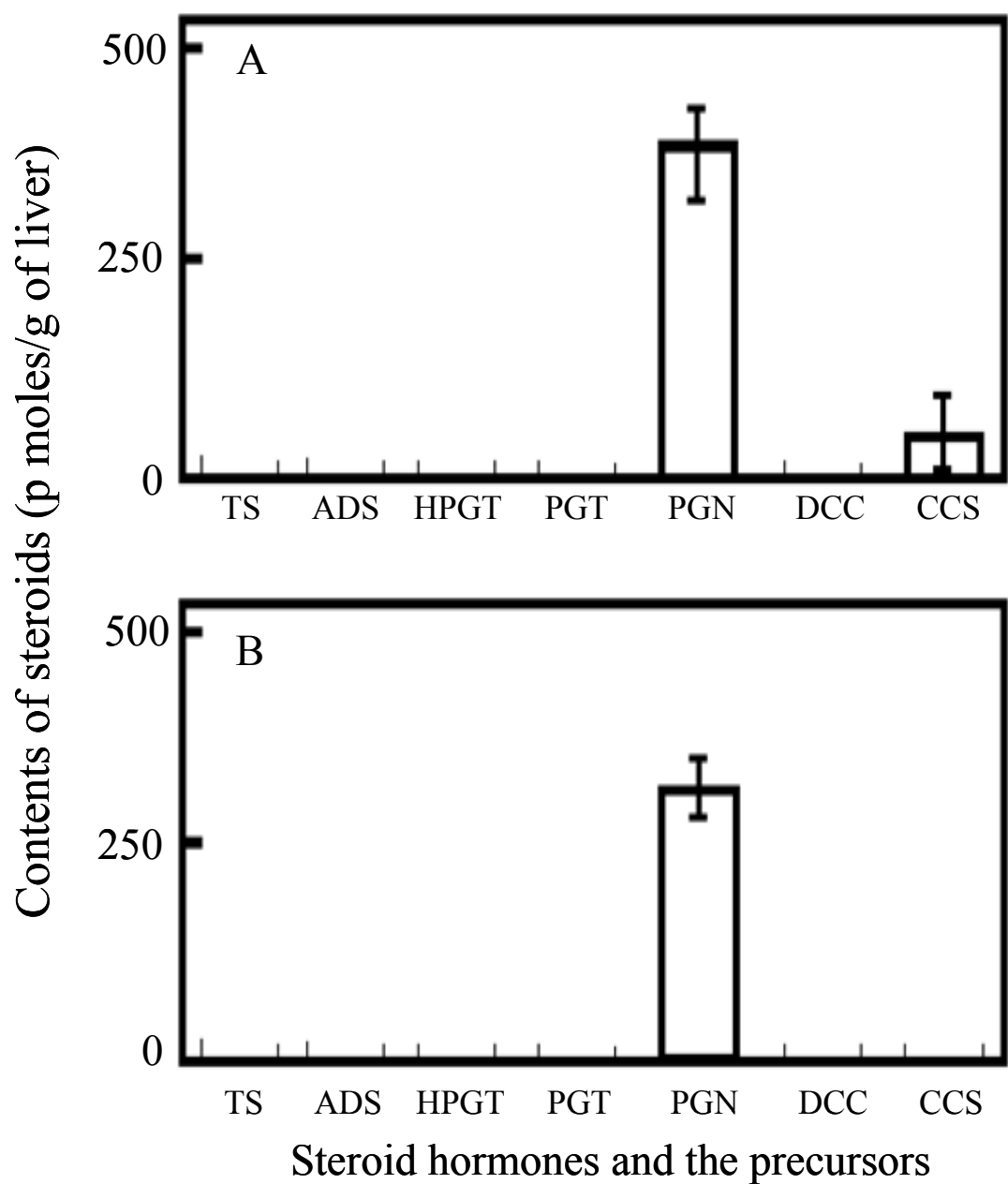


図 2-1. PBS 灌流処置の有無による成雄ラット肝臓中ステロイドホルモン量
 A; PBS 灌流処理無しでの肝臓中各ステロイドホルモン量。
 B; PBS 灌流処理した肝臓中各ステロイドホルモン量。

肝臓内で高い値を示す PGN は残留血液由来ではなく肝細胞内に存在していることが示された。

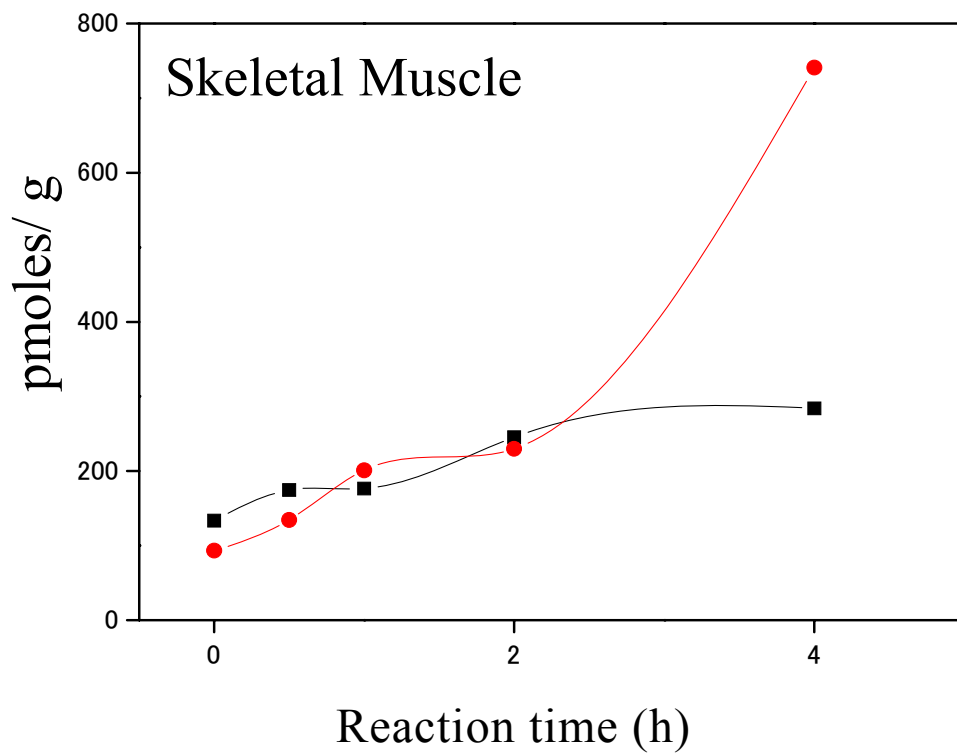


図 2-2. 筋肉ホモジネートによる脱 PGN 硫酸抱合体試験

- (■) 筋肉ホモジネート細胞質画分(含ミクロソーム画分)を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。
- (●) 筋肉ホモジネートミトコンドリア画分を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。

筋肉ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

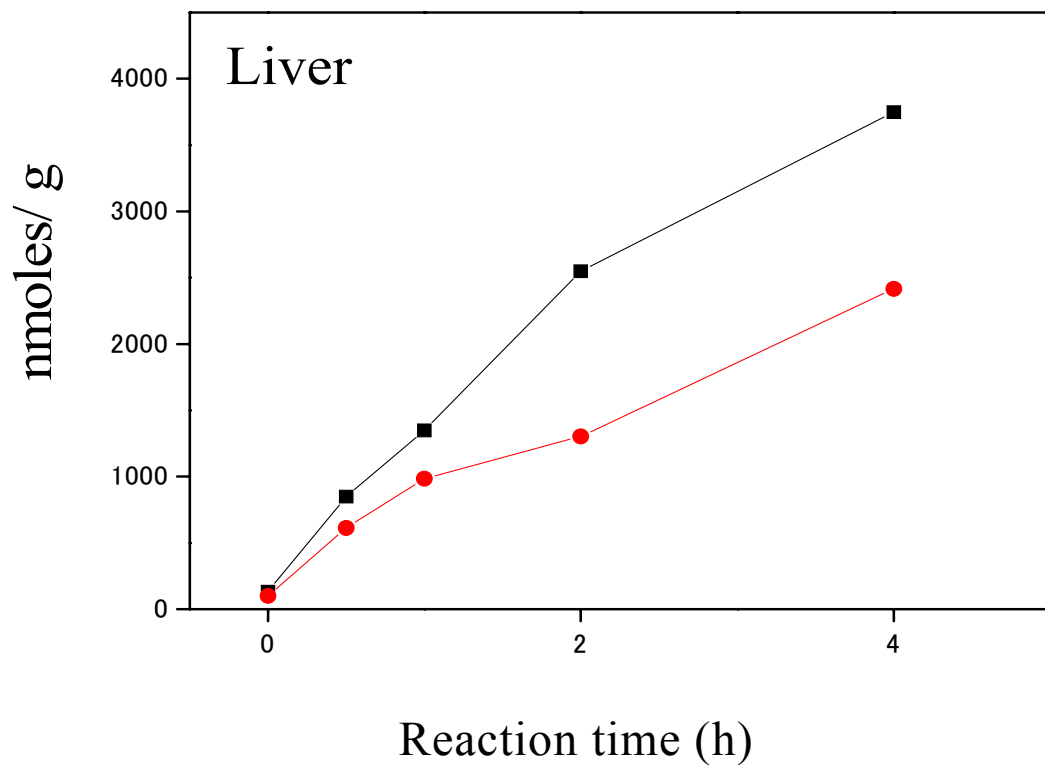


図 2-3. 肝臓ホモジネートによる脱 PGN 硫酸抱合体試験

- (■) 肝臓ホモジネート細胞質画分(含ミクロソーム画分)を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。
- (●) 肝臓ホモジネートミトコンドリア画分を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。

肝臓ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

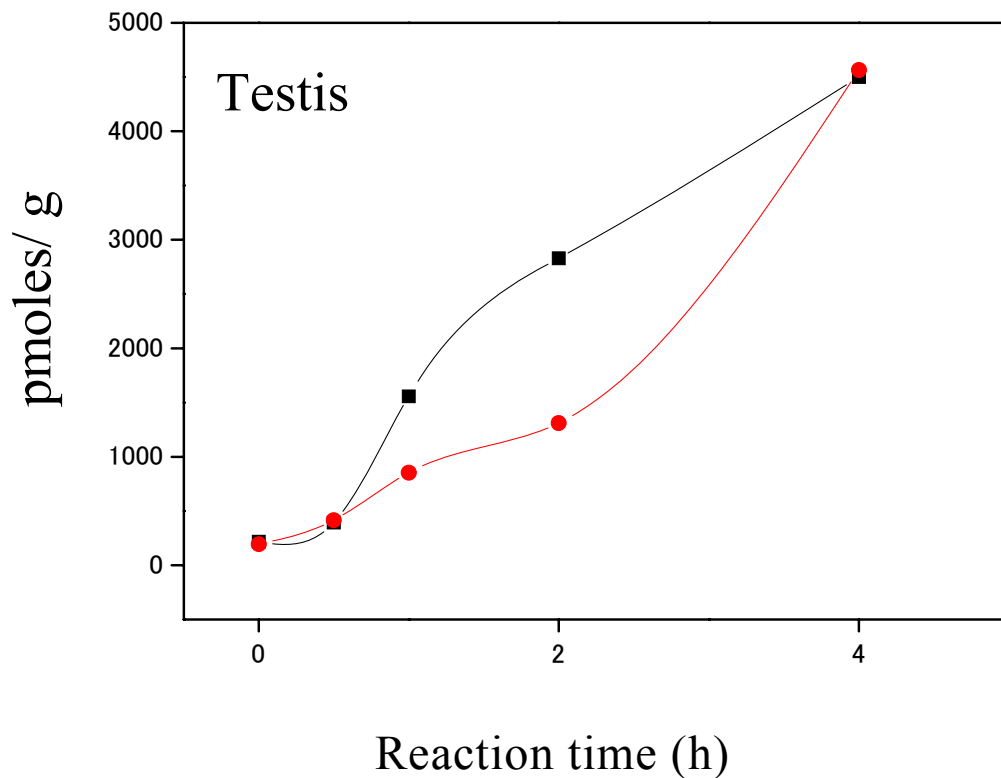


図 2-4. 精巣ホモジネートによる脱 PGN 硫酸抱合体試験

- (■) 精巣ホモジネート細胞質画分(含ミクロソーム画分)を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。
- (●) 精巣ホモジネートミトコンドリア画分を基質 3 mM PGN-S と 0、0.5、1、2、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。

精巣ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

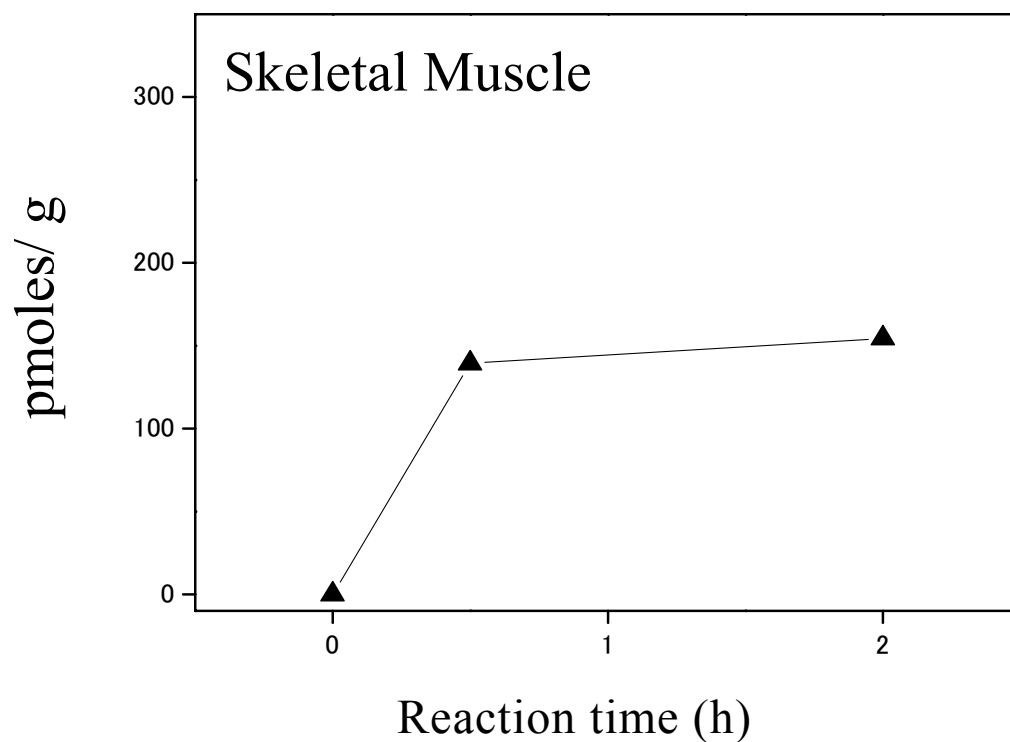


図 2-5. 筋肉ホモジネートによる脱 PGN グルクロン酸抱合体試験

- ▲ 筋肉ホモジネートを基質 1 mM PGN-G と 0、0.5、2 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。

筋肉ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

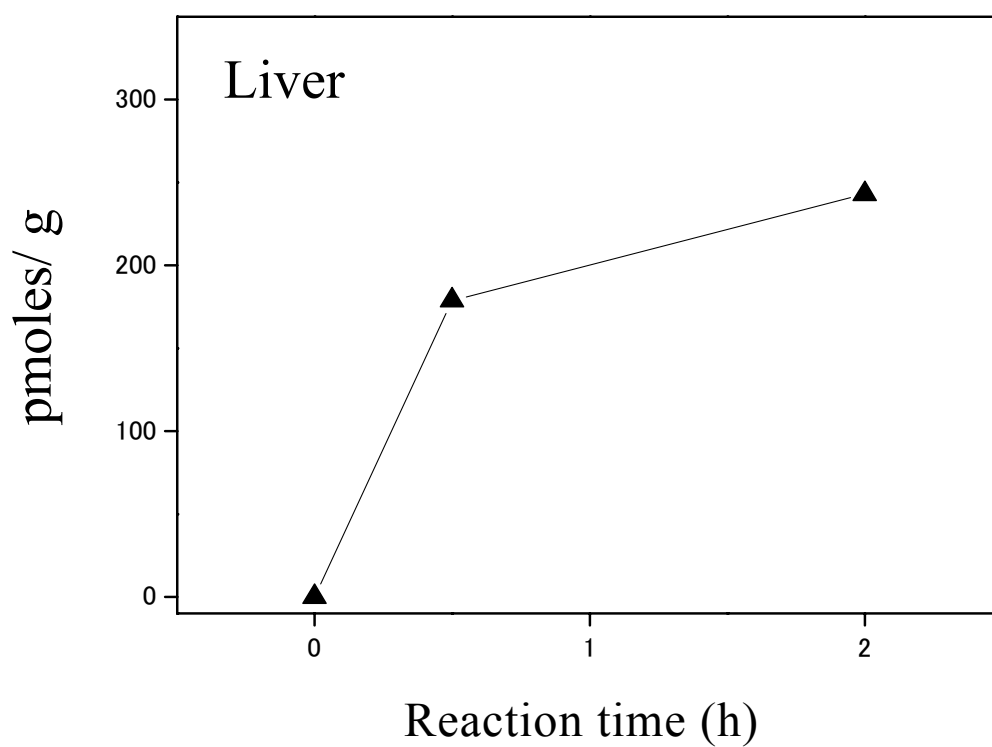


図 2-6. 肝臓ホモジネートによる脱 PGN グルクロン酸抱合体試験

- ▲ 肝臓ホモジネートを基質 1 mM PGN-G と 0、0.5、2 時間、37 °C でインキュベートして得られた PGN 量。

肝臓ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

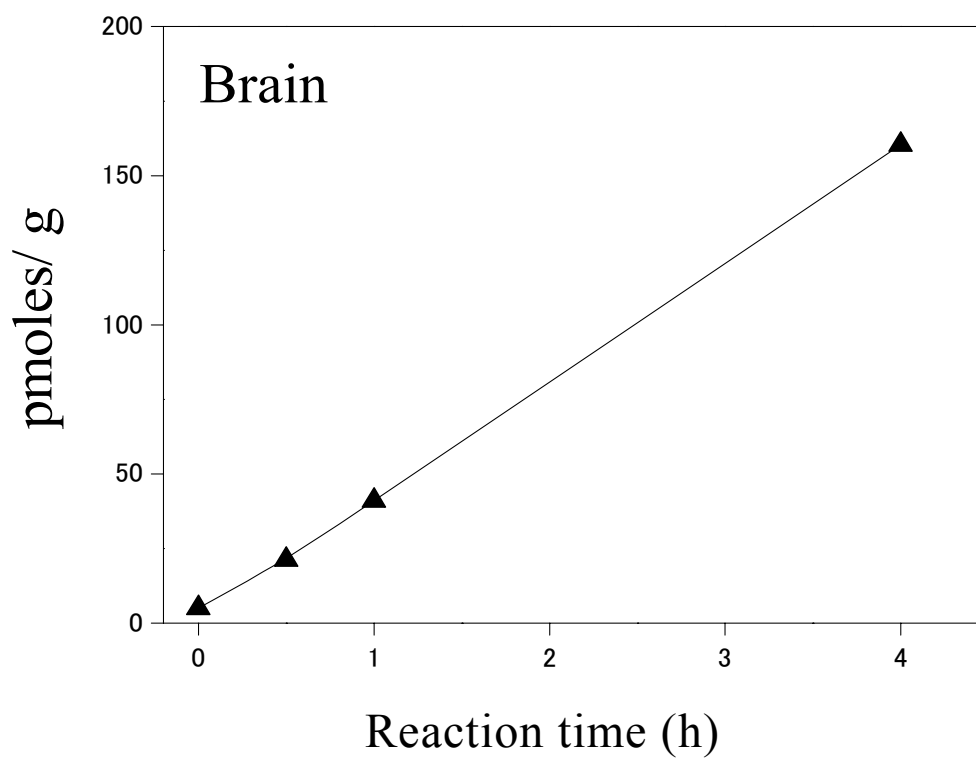


図 2-7. 脳ホモジネートによる脱 TS グルクロン酸抱合体試験

- ▲ 脳ホモジネートを基質 1 mM TS-G と 0、0.5、1、4 時間、37 °C でインキュベートして得られた TS 量。

脳ホモジネートにより経時的に脱抱合された。

4. 考 察

これまで、全てのステロイドホルモンは生殖腺および副腎によって合成され、血液を介して標的臓器へと運ばれ利用されていると考えられていた[107]。しかし、局所ステロイドホルモンの合成が脂肪組織、心血管系および脳のような多くの組織に起こることが最近報告されている。[111]。雄ラットのニューロンでは、有意な局在およびタンパク質発現が免疫組織化学的染色、ウエスタンブロット法およびRT-PCRによって、P450 17 β とP450aromの存在が報告されている [43]。よって、PGNから合成されたTSやE2までの合成に関与する酵素の存在が明らかとなった。E2産生は、ラットの海馬切片およびその培養細胞で実証されている[106]。今回、成雄ラット各臓器のADSやPGTのようなステロイド前駆物質を正確に定量することができ、海馬中のニューロステロイド生合成系の存在も確認できた（表2-2）。最近ではニューロステロイドグルクロニドがLC-MS分析によって、マウス脳で認められおり、*in vitro*で脳ホモジネートS-9画分を用いてのグルクロニド形成が確認されている[45]。

副腎において、PGTやDCCのグルクロン酸抱合体が他臓器より高濃度で検出された(表2-2)。脳での試験のように、副腎でもグルクロン酸抱合体が合成されていることが示唆された[45]。副腎で合成されるCCSのグルクロン酸抱合体は血液および各臓器で検出されており(表2-2)、グルクロン酸抱合体をグルクロニドトランスポーターとして標的細胞に送達し、後に脱抱合されてステロイドホルモンとして機能していると考えられる（図2-2~6）。これまで、ニューロステロイド硫酸抱合体はこれまで脳では発見されていなかった[60,62]。しかし、PGT、DCC、CCSおよびTSの硫酸抱合体は、非常に低濃度でありながら脳から検出されており(10~20 f moles/g)（表2-2）、これまで予想されていた報告と一致した[16,17]。また、主要なステロイドホルモンのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体が血液と腎臓で同程度検出されたため、血液によって腎臓に集められ、尿として排出されていると推察される。このことはE2硫酸抱合体としてステロイドホルモンを輸送して利用された後、排泄されるという報告を支持している[119]。主な

ステロイドホルモンを合成している精巣と副腎でそれぞれ、最終合成ステロイドホルモンであるTS、CCSとその前駆物質のグルクロン酸抱合体は検出されたが、硫酸抱合体は観察されなかった（表2-2）。また、標的臓器からは両方の抱合体が検出された。このことから、ほとんどのステロイドホルモンは輸送タンパク質によって運ばれているが[107]、ラット脳での硫酸抱合体を生成する酵素の存在が報告されていることから[102]、一部はグルクロン酸抱合体として各標的臓器に運ばれていると考えられる。運ばれてきたステロイドホルモン抱合体は組織内で脱抱合されて利用された後、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として再び再抱合されて血液によって運ばれ、腎臓から排出されていると考えられる。この抱合体としての輸送機序は未だ不明であるが、標的臓器である脳や筋肉において、局所的にステロイドホルモンの合成に関与していることも考えられ、生理的意味については非常に興味深い。さらに、グルクロン酸抱合や硫酸抱合反応は薬物やステロイドの極性を高め排泄しやすくするものと考えられてきたが本研究によって、ステロイドホルモンの体内輸送に関与している新たな生理的意義の可能性が判明した。

5. 小括

薬物や毒物、生体内の老廃物は肝臓によって代謝されて尿中や胆汁中へ排泄される。これらは Cytochrome P450 による代謝反応を受けて、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) などの抱合酵素により抱合体を形成し、胆管や血中を介して排泄される。これまで、ステロイドホルモンの抱合体は排泄に関わっていると考えられており、ステロイドホルモン抱合体として標的臓器へ輸送するという報告はない。成雄ラットの各臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を調査したところ、TS と CCS とその前駆物質は肝臓以外の全ての臓器から検出された。また、PGN はステロイドホルモンの合成臓器である精巣や副腎だけでなく、肝臓や筋肉から高濃度で検出された。しかし、脳や血液からは検出限界以下であった。PGN-G は調査した臓器全てから検出された。一方、硫酸抱合体はステロイド合成臓器である精巣と副腎においては定量限界値以下であった。肝臓では PGN の抱合体のみ検出されており、コレステロールから PGN を合成した後、抱合体として血液によって標的臓器へ運ばれていると考えられた。その標的臓器である脳、筋肉、精巣や代謝臓器である肝臓において脱抱合に関係する酵素、 β -グルクロニダーゼとスルファターゼ活性が確認され、ステロイドホルモン硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体は標的臓器で脱抱合された。

以上のことから、一部のステロイドホルモンはグルクロン酸抱合体として各標的臓器に運ばれており、脱抱合して使用された後、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として再び再抱合されて血液によって運ばれ、腎臓で排出されると推察された。

第Ⅲ章 内分泌攪乱化学物質 Diethylstilbestrol を投与 した成雄 ラット精巣 P450scc 発現抑制による Testosterone 合成阻害

1. 序 文

環境ホルモン物質は精子数を減らし精巣ステロイド産生不全を引き起こすことによる生殖機能低下が報告されている[68,80,107,119,125]。ジエチルstilbestrol (DES) は、哺乳動物の生殖器異常や不妊を引き起こす非ステロイド性合成エストロゲン物質である[69]。DES は、広くは男性の前立腺癌の治療に使用されてきており[48]、また、1940年代から1970年代初頭にかけてアメリカ、カナダ、ヨーロッパ諸国などで習慣性流産、切迫流産の治療、流産防止の目的で使用された。DES を使用した女性から生まれた女性が思春期以降に膣腺腫が起こることがわかり1971年に使用が禁止された[87]。また、男性においても精巣癌、尿道下裂、潜在精巣、精子数減少、精子受精能の減少が起こるといわれている[4,82,122]。DES はエストロゲン受容体(ER)に結合し、エストロゲンに依拠している男性生殖機能の変化を調べるために、広くモデルとして使用されている[20,42]。

DES の生体への影響の一つに、精巣毒性がある。DES を生体に投与することで、精巣ライディッチ細胞におけるテストステロン(TS)産生の低下や、精細胞のアポトーシス、精巣の萎縮などが起きることが知られている。実際、精巣のTS合成酵素は Estradiol-3-benzoate の投与で明らかに発現低下する[97]。DES による精巣毒性は ER を介したエストロゲン様作用と考えられているが、最終的な精巣毒性を示すまでの機序は明らかになっていない。また、エストロゲン胎生期と新生児期間の外因性エストロゲン曝露によって男性に繁殖障害が発生しており、胎児期および新生期での生殖制御に関係する ER を介した毒性が示唆される。DES は胎児・新生児の精巣におけるTS分泌を減少させる。しかし、

ER α -欠損マウスでは変化は見られないことから内因性エストロゲンが精巣に直接作用することによってステロイド産生 ER α が阻害され胎児および新生児の発達への影響が懸念される [21]。アンドロゲン産生が男性精巣の主要な機能の一つであり、エストロゲン活性を有する環境汚染物質および化学物質暴露による男性生殖器の発生および DES の生殖毒性を解明することが重要である。成人男性の有害な影響を及ぼす詳細な分子機構の検討は必要であり、精巣上体における精子数および運動パターンが正常でありながら、DES 投与により血漿 TS 濃度がほとんど検出限界値レベルに低下する。また、低い TS 濃度が続くことで精巣上体および精子生産障害を誘発することが大きな要因であると考えられる[67]。DES の有害な影響は、精巣の異常や血清 TS 濃度低下によることを明らかにした報告がある[63,67,95]。最近では DES がタンパク質の折りたたみに関係する Protein disulfide isomerase (PDI) の酸化修飾、精巣アポトーシスに関与している酵素活性、シャペロニンのアップレギュレーション、Thioredoxine-like-1 のダウンレギュレーション[59]、および肥満への影響[83]が報告されている。

そこで本章では、内分泌攪乱化学物質 DES を投与した成雄ラット精巣での機能障害を解明することを目的として、精巣における TS 合成に関与するコレステロール、ステロイドホルモンおよびタンパク質の量と発現を調査した。

2. 材料と方法

2.1. 標準物質並びに試薬

DES および DES の内部標準物質として DES-d8 は和光純薬から購入した。DES のグルクロン酸抱合体は Sigma-Aldrich より購入した。その他は第 I 章に準ずる。

2.2. 材料

2.2.1. 供試動物

第 II 章に準ずる。

2.2.2. DES 投与

7 週齢の SD 系雄ラットを 1 週間順化した後、実験に用いた。1 ml のオリーブオイルを隔日胃内強制投与した群を Control とし、オリーブオイルに DES を 0.1 mg/ml となるよう調製して胃内強制投与した群を DES 投与群とした。DES 投与群は単回投与群と 1 週間隔日投与群および 2 週間隔日投与群に分けた。単回投与群では 0.5 から 72 時間まで径時的にサンプリングを行い、隔日投与群では投与終了後にサンプリングを行った。なお、ラットは酪農学園大学動物実験委員会の規定にも基づき、飼養管理を行った。

2.2.3. 各臓器の採取

第 II 章に準ずる。

2.3. SDS-PAGE および Western Blotting 用サンプル調製

精巣重量を測定した後、4 倍量の 0.25 M Sucrose 溶液を加えホモジナイズし、900 ×g で 10 分間遠心分離して得られた上清をさらに 5,000 ×g で 10 分

間遠心分離した。その上清をマイクロゾーム・リソソーム・サイトゾル画分とし、沈殿に 1.15 % KCl-10 mM EDTA を 1 ml 加えたものをミトコンドリア画分とし、SDS-PAGE および Western Blotting (WB) に用いた。また、マイクロゾーム・リソソーム・サイトゾル画分、ミトコンドリア画分それぞれ 500 μ l に 2 % になるように CHAPS を加えたものを、遊離コレステロール測定に使用した。サンプルは使用時まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

2.4. DES とそのグルクロン酸抱合体並びにステロイドホルモンの調査

各臓器の DES とそのグルクロン酸抱合体ならびに各ステロイドホルモンの定性、定量は第 I 章で開発した抽出測定方法を用いた。DES はネガティブイオンモードによる測定によって、プロトン脱離分子 m/z 267 で感度良く検出された。次に Selected Reaction Monitoring (SRM) モードの測定条件について検討した。DES はプロトン脱離イオンとして衝突誘起解離 (CID) で得られた m/z 267 \rightarrow 251 を定量イオン、 m/z 267 \rightarrow 237 を確認イオンに採用した。同様に DES-d8 は m/z 275 \rightarrow 259 を定量イオンに m/z 275 \rightarrow 245 を確認イオンに採用した。また、DES ならびに DES-d8 の定量下限値は LC-MS/MS で 0.5 f moles/ml、LC-TOF MS で 10 f moles/ml とした。同様に DES のグルクロン酸抱合体は m/z 443 \rightarrow 267 を定量イオンに m/z 443 \rightarrow 251 を確認イオンに採用した。

2.5. タンパク質定量

Lowry の方法に基づいて行った。1 N NaOH で希釈したサンプル 200 μ l に反応混液 (2 % Na_2CO_3 :2 % $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$:1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ =100:1:1) を 2 ml 加えて、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、1N フェノール試薬を 200 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。吸光光度計を用い 650 nm の吸光値を測定し、ウシ血清アルブミンを用いて作成した検量線からサンプル中のタンパク質

濃度 (mg/ml) を算出した。

2.6. 一次元 Western Blotting

2.6.1. 電気泳動 (SDS-PAGE)

精巢中タンパク量が 15 μg となるように調製して、Sample Buffer 4 μl 、さらに DDW を加えて 20 μl に 100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間で固定した。サンプル液を 1 well にアプライし、ゲル 1 枚につき濃縮ゲル (4.5 %) は 500 V 10 mA、分離ゲル (12.5 %) は 500 V 20 mA で泳動を行い、Western Blotting (WB) に用いた。

2.6.2. Western Blotting

Peripheral benzodiazepine receptor (PBR, Abcam)、Steroidogenic acute regulatory protein (StAR, 神戸大学 星 信彦教授より提供)、Cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc, Millipore) のタンパク質の有無を調べるため WB を用いて調査した。セミドライブロッキング装置を用いて、ゲル 1 枚につき 500 mA、20 V、120 分間の条件でニトロセルロース膜上に転写した後、1.7 % スキムミルクで Over night ブロッキングした。一次抗体は 500 倍に希釈したヤギ抗 PBR 抗体、600 倍に希釈したウサギ抗 StAR 抗体、1,000 倍に希釈したウサギ抗 P450scc 抗体を用い、メンブランを 4 $^{\circ}\text{C}$ で 12 から 20 時間ゆっくり振盪反応させた後、洗浄用 PBS で 15 分間洗浄を 4 回行った。二次抗体は免疫染色用 PBS で 10,000 倍に希釈した HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体または 2,000 倍希釈した HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用い、室温で 60 分間反応させた後、洗浄用 PBS で 15 分間洗浄を 4 回行った。その後メンブランを ECL で発光させて、Ez-Capture II Image Saver 5 を用いて現像した。

2.7. ミトコンドリア、サイトソル内遊離コレステロールの調査

遊離総コレステロール量はコレステロールオキシダーゼを用いた E kit (和光純薬) を使用した。精巣内ミトコンドリアは重量の 4 倍量の 0.25 M スクロースを添加した後、900 ×g で 10 分間遠心分離した。この上清をさらに 5,000 ×g で 10 分間遠心分離した沈殿物をミトコンドリア画分とした。また、その上清をサイトソル分画として用いた。また組織内コレステロールの定量には 2 % CHAPS を含んだ 0.25 M スクロースを用いてミトコンドリア膜を破碎した。吸光度計を用い 600 nm の吸光値を測定した。

2.8. mRNA の測定

2.8.1. mRNA の抽出

mRNA の抽出は MagNA Pure LC mRNA Isolation Kit II (Tissue) を用いて行った。精巣組織をホモジネートチューブ (Lysing Matrix I) (MP-Biomedicals) (Q-Biogene) に入れ、Lysis Buffer を 300 μl 加えた。MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics) を用いて、6,000 rpm、50 秒間でホモジナイズし、室温で 30 分間静置した後、Capture Buffer を 600 μl 加え、17,000 g で 5 分間遠心分離し、その上清 880 μl を用い、MagNA Pure LC 350 (Roche Diagnostics) を使用して mRNA の抽出を行った。

2.8.2. cDNA の合成

抽出した mRNA を Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) のマニュアルに従い、Anchored-Oligo (dT) 18 Primer を用いて逆転写し、cDNA を合成した。

2.8.3. Real-time PCR (RT-PCR)

LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics)を使用し、TaqMan Probe 法により定量的 PCR を行った。方法は LightCycler TaqMan Master (Roche Diagnostics)および Universal ProbeLibrary (UPL) (Roche Diagnostics)のマニュアルに従った。PCR は 95 °C、10 分間インキュベートした後、95 °C、10 秒間、55 °C、20 秒間、72 °C、2 秒間 (検出)を 45 サイクル行った。解析には LightCycler Software Ver. 4.0 (Roche Diagnostics)を用いた。標的遺伝子をラット StAR、PBR、P450scc 内部標準遺伝子をラット β -アクチンとした。 β -アクチン cDNA plasmid を段階希釈して、それを標準物質として用いた。サンプルの β -アクチンの発現量に対する標的遺伝子の発現量の割合で定量した。使用した UPL および primer の配列を表 3-1 に示した。

2.9. コレステロールを基質とした精巢ミトコンドリア画分酵素反応試験

酵素活性を測定する反応液には、0.5M リン酸緩衝液 100 μ l、0.1 M $MgCl_2$ 50 μ l、NADPH 40 μ l、NADH 40 μ l、DDW 610 μ l、コレステロール (30 μ M) 20 μ l に精巢ミトコンドリア画分を 40 μ l 加えて、混合したものを用いた [114]。37°C で 0、0.5、1、2 時間インキュベートし、各時間での試験管内の PGN 濃度を LC-MS/MS および LC-TOF MS を使用し測定した。

3. 結果

1. 経口投与後各臓器 DES ならびに DES グルクロン酸抱合体の分布

0.1 mg DES を胃内強制投与した後、経時的（0.5~72 時間）に採取した各臓器中 DES 濃度を図 3-1 に示した。DES は投与後直ちに血液を介して全身に運ばれており、投与後 0.5 時間で調査した臓器全てから検出された。投与後 1 時間をピークに減少し、肝臓以外の臓器では投与後 6 時間で消失した。肝臓においても投与後 24 時間で消失した。DES のグルクロン酸抱合体が肝臓、腎臓から検出された。DES は血液によって代謝臓器である肝臓や腎臓に運ばれた後、グルクロン酸抱合体として排出されていることが示唆された。また、DES は肝臓以外では副腎と下垂体において、投与後 1 時間で高濃度検出された。

2. 1、2 週間 DES 0.1 mg 隔日投与した雄ラット血液と精巣中のテストステロンならびにその前駆物質

DES を隔日に 1、2 週間投与した隔日投与ラットにおける血液と精巣中の TS 濃度をコントロールラットと比較したところ（図 3-2）、DES 投与 1 週間で血液中から TS は消失していた（調査に使用した LC-MS/MS の検出限界値は 0.6 f moles/ml）。また、精巣では有意に減少していた。そこで、DES による TS の減少は TS を合成する前駆物質の合成阻害であると考え、コレステロールから合成されるプレグネノロン（PGN）からアンドロステンジオン（ADS）に至る TS 合成中間産物について調査を行った（図 3-3）。その結果、いずれの前駆物質も有意に減少していた。このことから、DES による TS の合成障害はコレステロール、またはコレステロールから PGN を合成するタンパク質 P450scc、コレステロールをミトコンドリアへ輸送するタンパク質 PBR、StAR の障害であると考え、細胞組織内コレステロール量と P450scc、PBR、StAR のタンパク質と mRNA の発現を調

査した。

3. ミトコンドリア、サイトソル組織内遊離コレステロール量

精巣ミトコンドリアおよびサイトソル分画に最終濃度が2%になるように界面活性剤 CHAPS を融解させて細胞膜を破壊し、細胞内成分を放出させた。遊離コレステロール量はE-テストワコーに従い測定した(図3-4)。その結果、DESを1、2週間投与してもミトコンドリアおよびサイトソル分画で有意差は見られなかった。

4. Western Blotting による StAR、PBR および P450scc 発現

DESによるTS合成障害の初期段階として、コレステロールをミトコンドリアへ輸送するタンパク質であるStAR、PBRとコレステロールからPGNを精製する酵素であるP450sccのタンパク質発現を調査するためにWBを行った(図3-5)。その結果、いずれのタンパク質においてもDES投与後2週間で消失していた。しかし、DES投与後1週間ではStAR、PBRは発現が確認されたが、P450sccは消失していた。このことから、DES投与による精巣中TS合成障害の初期反応として、精巣ミトコンドリア内P450scc障害によるPGN合成阻害が示唆された。

5. RT-PCR による P450scc の mRNA 発現量調査

1、2週間DES0.1mg/ml投与ラットP450sccと内部標準遺伝子であるラットβ-アクチンを用いて、定量的PCRを行った。各サンプルのβ-アクチンの発現量に対する標的遺伝子の発現量の割合で定量した結果、1、2週間DES投与によるP450sccの発現量に有意差は見られなかったが減少傾向を示した(図3-6)。

6. コレステロールを基質とした精巢ミトコンドリア画分酵素反応試験

コレステロールを基質とした精巢ミトコンドリア画分の経時的酵素反応して得られた PGN 量を図 3-7.1A に示した。コントロール群では時間が経つにつれて、PGN が合成された。図 3-7.2B に 10 ppb 濃度の PGN 標準物質を測定した時の MS クロマトグラム、図 3-7.2C にコントロールラットにおける酵素反応 2 時間後に測定した PGN の MS クロマトグラムを示した。また、LC-TOF MS を用いて確認したところ、PGN と同定された (図 3-7.2E)。しかし、DES0.1 mg/ml 投与 1 週間ラットでは PGN は検出されなかった (図 3-7.2D)。

表 3-1. RT-PCR に用いたプライマー

標的遺伝子	Accession No.	UPL (配列)		Primer
P450scc	NM_017286	#9(catacca)	F	acctattcegctttgcctt
			R	cacgatctcctccaacatcc
β-アクチン	NM_031144	#115(gaccaga)	F	ctaaggccaaccgtgaaaag
			R	gcctggatggctacgtaca

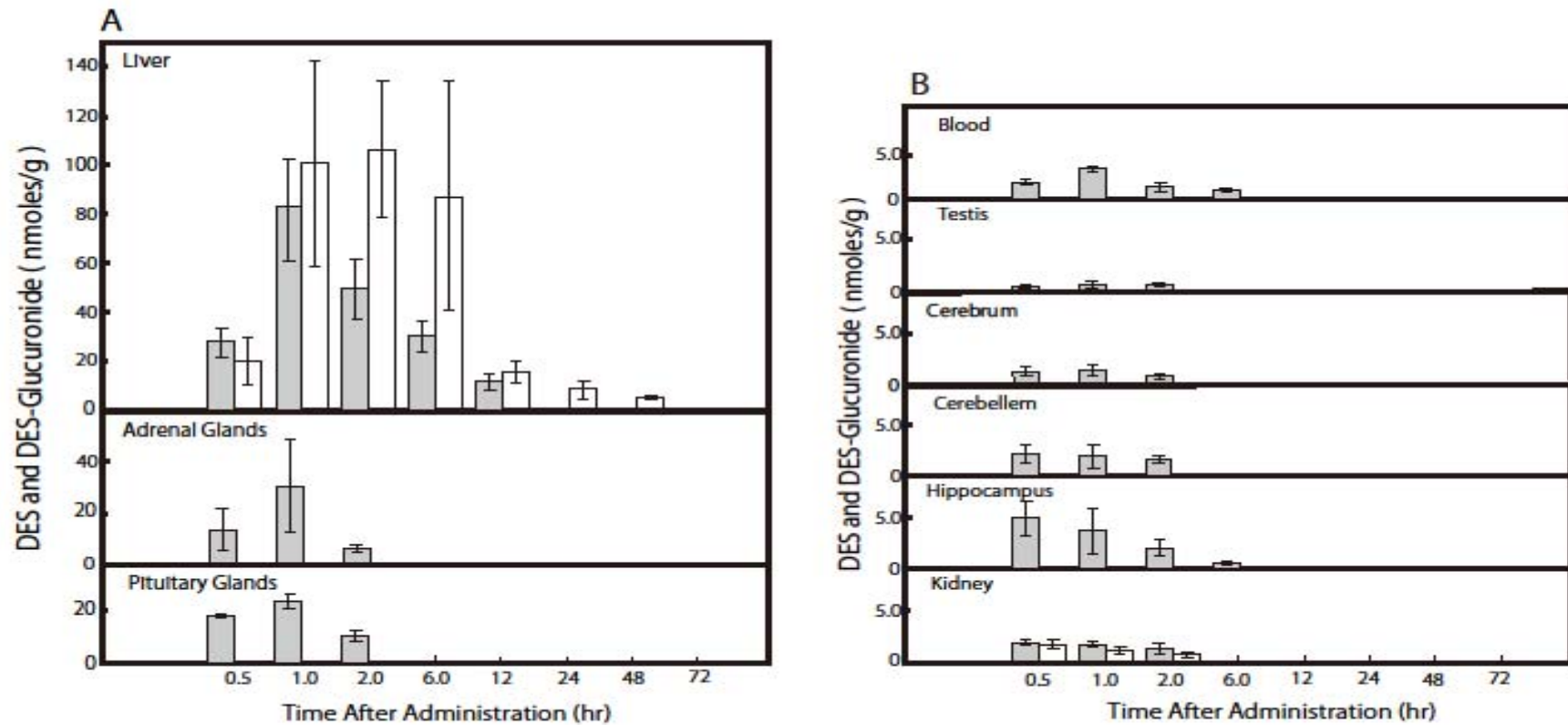


図 3-1. 0.1 mg DES 経口投与後各臓器 DES ならびに DES-G の分布

グレーが DES、白が DES-G を示す。DES 0.1 mg/ml を胃内強制投与後、0.5~72 時間まで経時的に採取して DES とそのグルクロン酸抱合体量を測定した。A; 肝臓、副腎、下垂体、B; 血液、精巣、大脳、小脳、海馬、腎臓における DES とそのグルクロン酸抱合体量を示す。投与後 0.5 時間で血液を介して全身に運ばれているが、副腎、下垂体から高濃度で検出された。

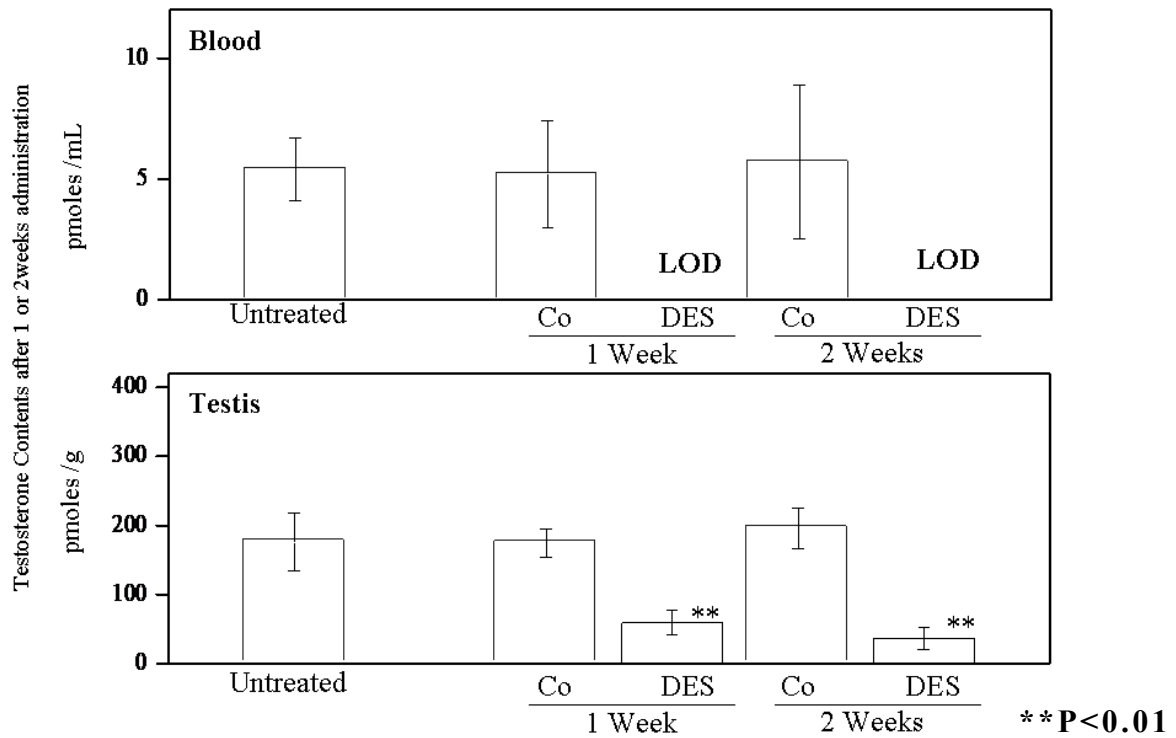


図 3-2. 1、2 週間 DES 0.1 mg 隔日投与雄ラット血液と精巣中 TS 量の調査

未処理の雄ラットを Untreated 群 (n=5)、オリーブオイルのみを 1、2 週間隔日投与した群をコントロール群 (n=5)、DES を 0.1 mg/ml 投与した群を DES 投与群 (n=5) と示す。**DES 投与群はコントロール群に比べて有意差 (P<0.01) を持って減少していた。

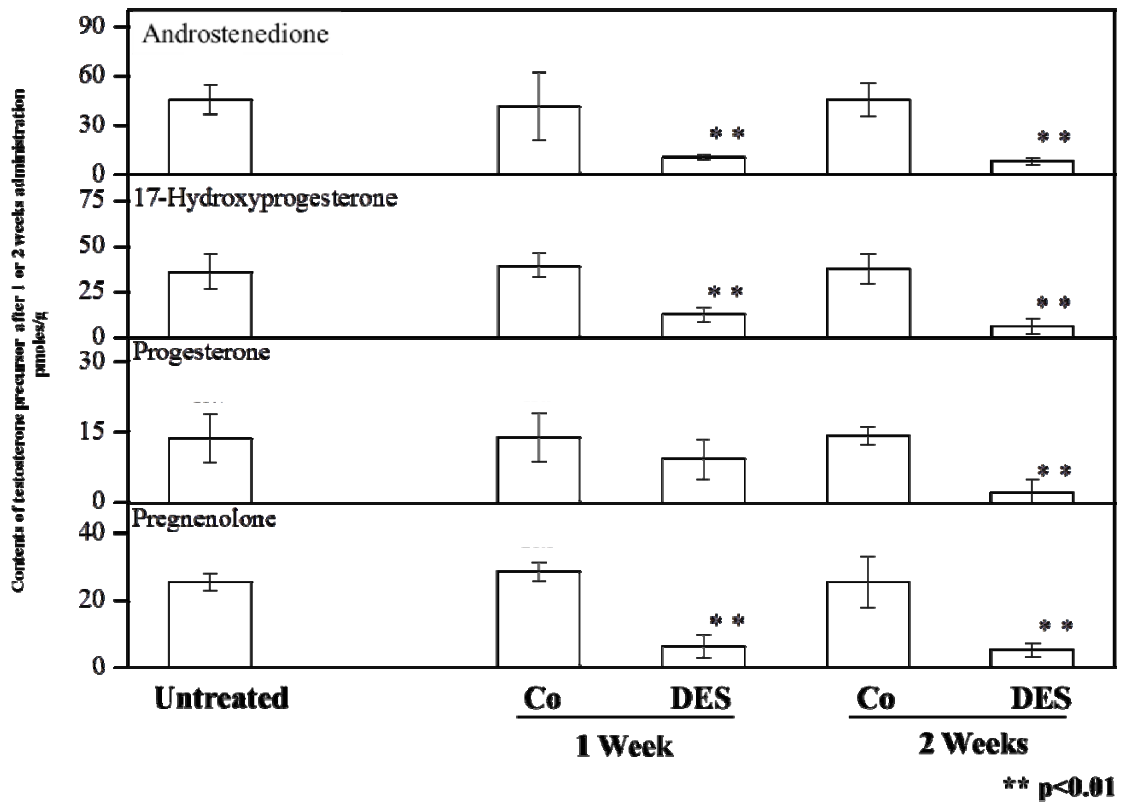


図 3-3. 1、2 週間 DES 隔日投与雄ラット精巢中の TS 合成中間産物量

未処理の雄ラットを Untreated 群 (n=5)、オリーブオイルのみを 1、2 週間隔日投与した群をコントロール群 (n=5)、DES を 0.1 mg/ml 投与した群を DES 投与群 (n=5) と示す。**DES 投与群はコントロール群に比べて有意差 (P<0.01) を持って減少していた。

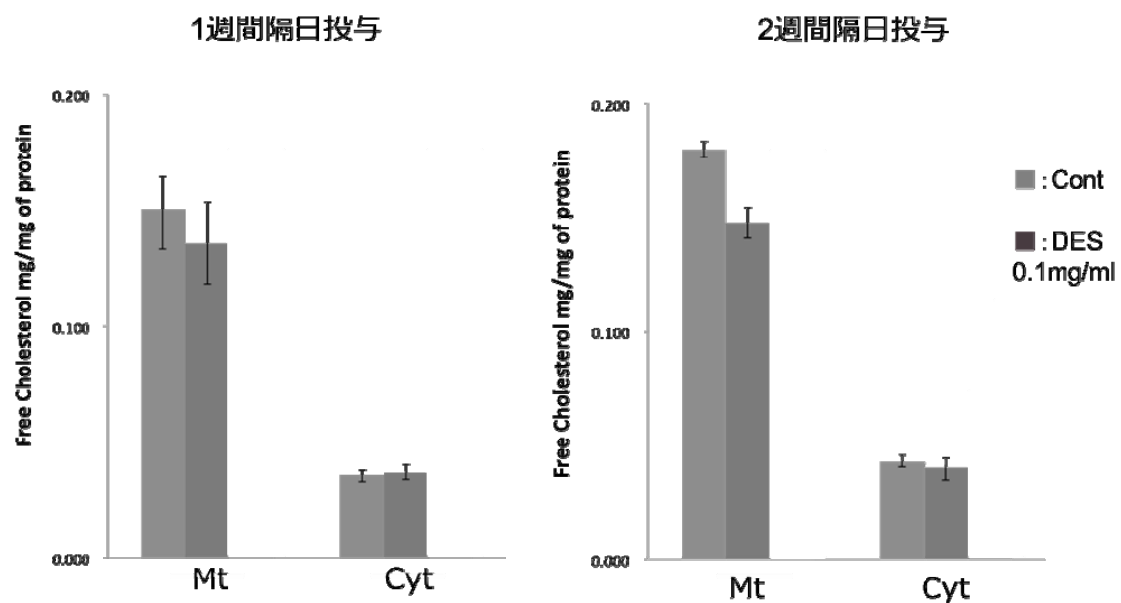


図 3-4. ミトコンドリア、サイトソル組織内遊離コレステロール量

DES1、2 週間隔日投与におけるミトコンドリア分画、サイトソル分画の遊離コレステロール濃度(蛋白質濃度を基準とした)。

コレステロール濃度を数値化し、蛋白質濃度との比で表した (mean ± S.D.) Cont は Control 群 (n=3)、DES は DES 0.1 mg/ml 投与群 (n=3)を示す。DES1、2 週間隔日投与のミトコンドリア分画、サイトソル分画のコレステロール濃度で有意差は見られなかった。

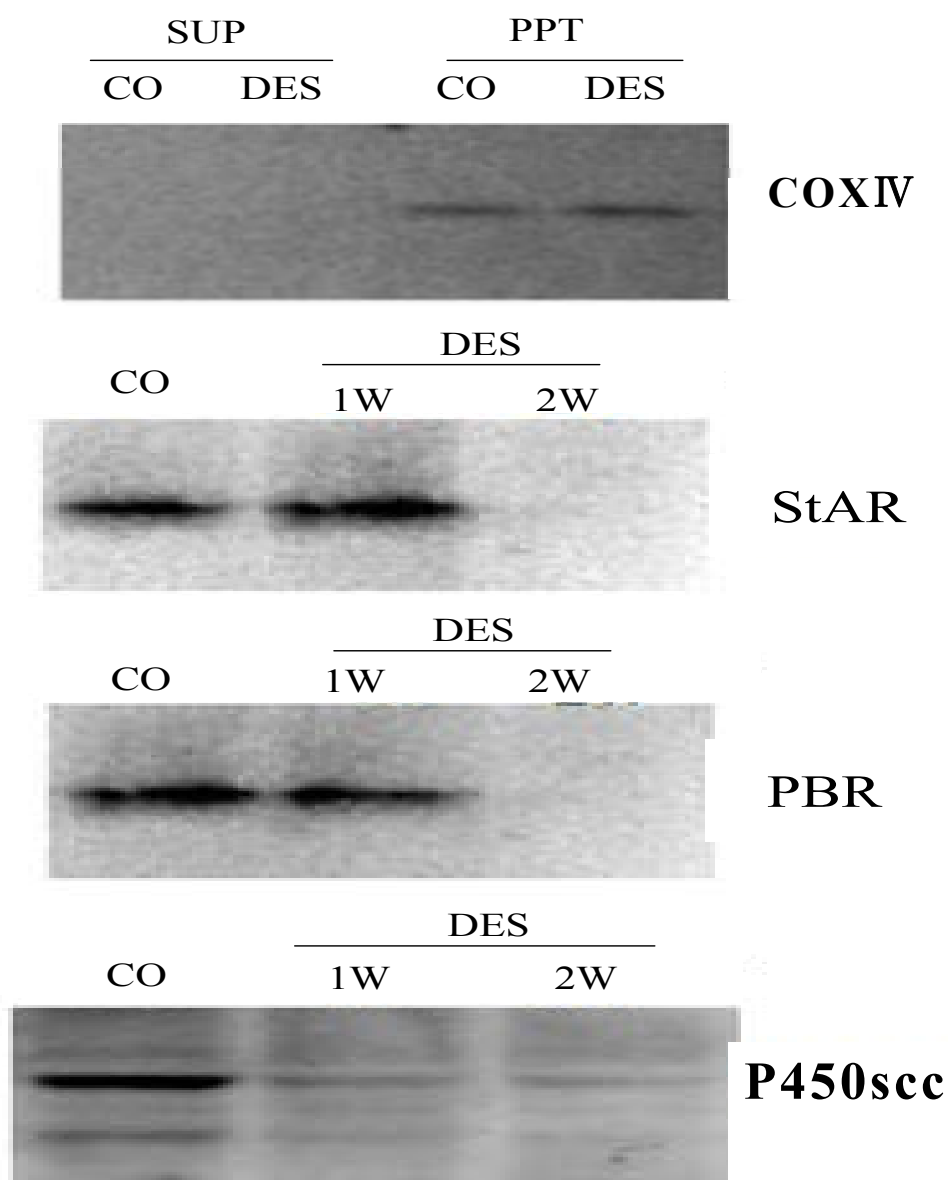


図 3-5. ウェスタンブロッティングによる StAR、PBR および P450scc 発現調査
 一次抗体にウサギ抗 StAR 抗体、ヤギ抗 PBR 抗体、ウサギ抗 P450scc 抗体、二次抗体に HRP 標準ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用いて WB を行った。
 DES 隔日投与後 2 週間で消失していたが、投与後 1 週間では P450scc のみ消失していた。

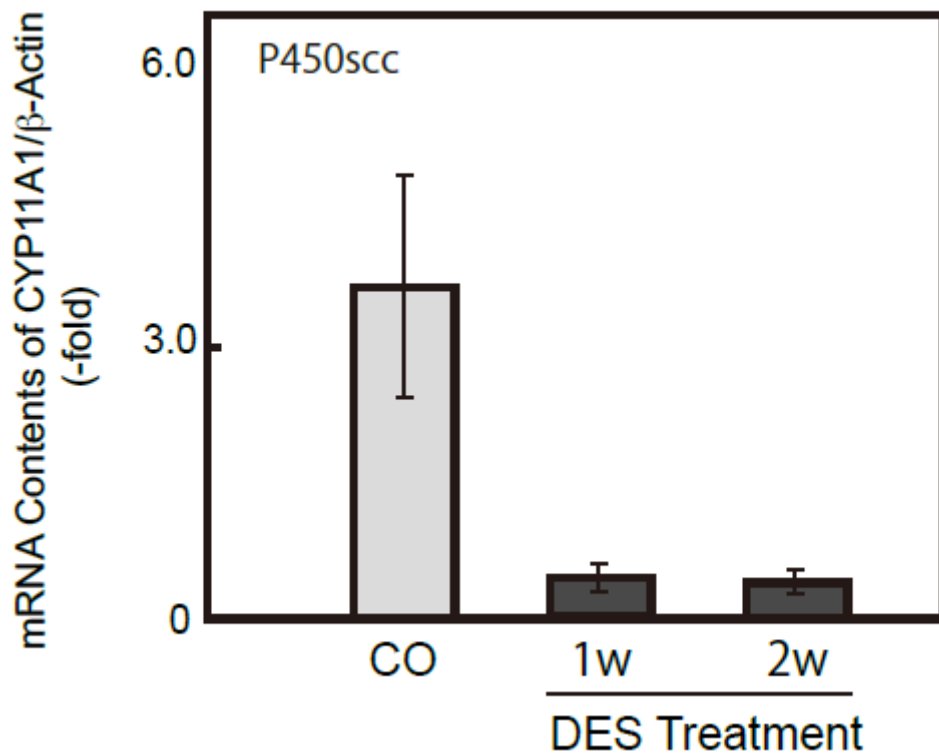


図 3-6. RT-PCR による P450scc の mRNA 発現量

β-アクチン発現量に対するコントロール群と DES 0.1 mg/ml 投与後 1、2 週間における P450scc の mRNA 発現量 (β-アクチンを基準とした)を示している。コントロール群との有意差は見られなかったが減少傾向を示した。

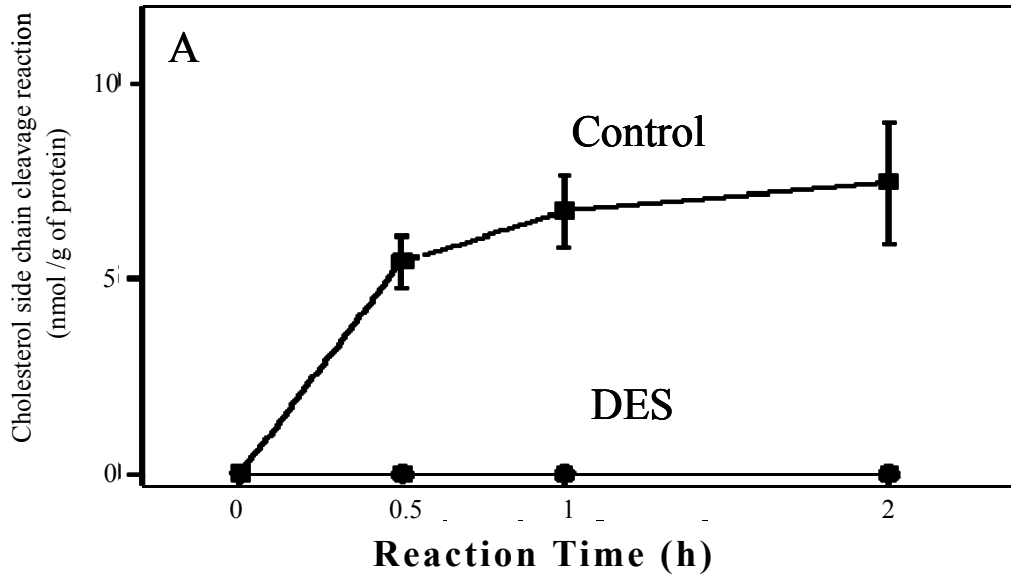


図 3-7.1 コレステロールを基質とした精巣ミトコンドリア画分を用いた
酵素反応試験

A; コレステロールを基質とした精巣ミトコンドリア画分を用いた経時的酵素反応結果。

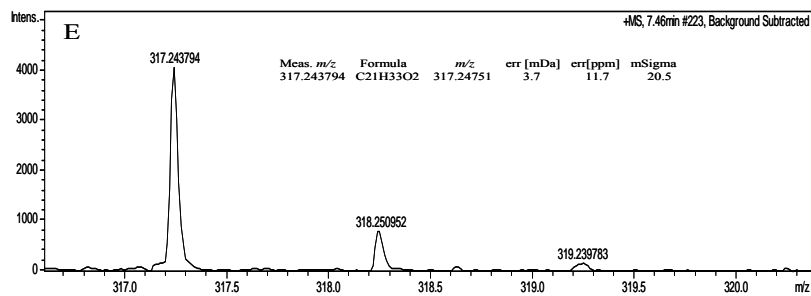
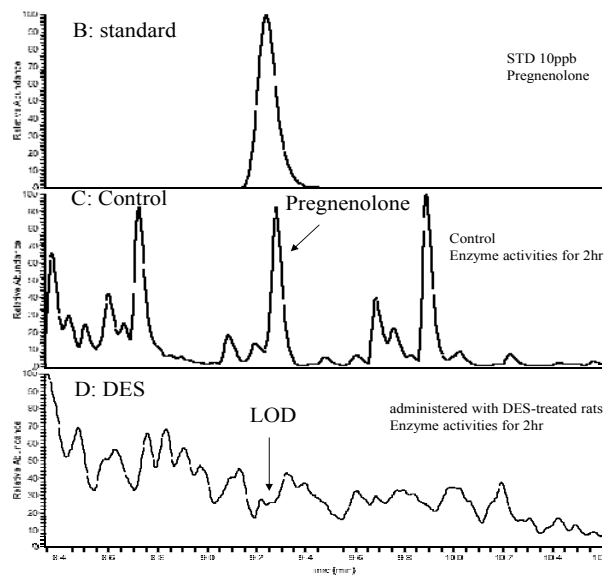


図 3-7.2 コレステロールを基質とした精巣ミトコンドリア画分を用いた酵素反応試験

B; PGN 標準物質 10 ppb 測定した時の MS クロマトグラム。

C; コントロールラットにおける酵素反応 2 時間後に測定した PGN の MS クロマトグラム。

D; DES 投与 1 週間ラットにおける MS クロマトグラム (PGN は検出限界以下を示した。)

E; LC-TOF MS 測定による PGN の MS スペクトラムと sigmaFitTM による検証を示す。3.7mDa の質量誤差、20.5mSigma 値を示し、PGN と同定された。

4. 考 察

内分泌攪乱化学物質 (Endocrine disrupting chemical, EDC)は非ゲノム膜である小胞体内の合成過程において生殖毒性を引き起こすことが知られている[80]。しかしながら、環境有害物質はいくつかの複数の経路および異なる機序により生殖系に影響を及ぼす可能性があるとして示唆されている[119]。例えば、酸化ストレスの増大は臨床的に80 %以上の不妊男性に観察されており、環境有害物質への長期曝露によって精巣細胞間の細胞結合破壊を引き起こし、この不妊男性の増加の主な要因となっている [119]。本研究では、男性生殖毒性を引き起こす内分泌攪乱物質であるDESの初期段階での機能障害を引き起こす機序を明確にすることにある。EDCに暴露された動物の精巣では、ADS形成の誘発[118] や精巣ミクロソームP450sの減少、TSの16 α -ヒドロキシ化の変化やステロイド産生酵素であるミトコンドリアP450sccの50 %が阻害される報告がある[33]。TCDDの単回投与では血漿中TSとジヒドロテストステロン濃度がそれぞれ90 %、75 %の減少がみられ、成熟雄ラットでは精囊および腹側前立腺重量が減少した[78]。生殖能力およびニューロン機能を媒介とするステロイド代謝に関するEDCの影響は、毒性機序を解明するためには非常に重要である。DESの投与量 (10~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を変えて妊娠ラットの雄胎児の血液および精巣中のTS濃度を調査したところ、投与量に依存して低下していた[34,35]。妊娠7~21 日のラットにおける、低濃度DES投与 (1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)による影響は、思春期の雄仔 (分娩後6 週目)の血漿中TS濃度がコントロール群と比べて抑えられていた[122]。低濃度DES投与によるステロイド産生の攪乱は、精子形成に関与するTS濃度が低くなることで、LH受容体のmRNAの発現を抑制している [52]。DES (0.1~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)投与における妊娠および授乳期の長期的な影響によって、胚の初期発生の時のStAR, P450sccおよびCerebellin-1前駆タンパク質の濃度が低下した[44]。また、1から15 週齢でのP450scc、3 α -HSDおよび

17 α -HydroxylaseのmRNA発現に変化が見られない時期に、DESに暴露された胎児ではLH受容体の発現を阻害し、精巣ステロイド産生に關与するLH受容体からStARまでの情報伝達経路が阻害されており、ライディッヒ細胞の発達を遅らせている[52]。精巣のライディッヒ細胞を培養中にDESを添加すると直接的にP450sccのmRNAの発現が抑制されていた[118]。DES投与後1週間の雄ラットでの精巣毒性に關して、TS合成阻害は初期段階の反応であり、ミトコンドリアでのステロイド産生（PGN）阻害はコレステロール側鎖切断反応を阻害すると考えられる（図3-5）。雄ラットにおけるDES投与による影響は精巣異常[20,21,97]や血清TS濃度の減少など、いくつかの報告で明らかにされてきた。しかし、その分子レベルでの機序解明はいまだ明らかにされていない。また、EDCによるPBR[8]、StAR[116]、P450scc[57]発現抑制に伴うステロイド産生の減少はこれまでも報告されてきた。合成ピレスロイド系殺虫剤ペルメリンは精巣ミトコンドリア内のPBR、StAR、P450sccをエンコードしてmRNAのダウンレギュレーションを引き起こし、男性生殖で潜在的に副作用の影響があるという報告がある。[126]。

本研究において、DES投与2週間でこれらの三つのタンパク質（PBR、StAR、P450scc）のダウンレギュレーションによって、精巣ステロイド産生の攪乱を報告した。また、P450sccはTS生合成において重要な調節タンパクであり、DES投与1週間で発現抑制されていることが判明した（図3-5）。P450sccはステロイドホルモン生成の最初の工程および律速酵素であることが知られている。転写因子であるステロイド産生ファクター1（SF-1）とP450sccの発現は、DES投与によって子宮内の胎児マウス[44]および新生ラット[81]で減少した。精巣における*Cyp11a1*の発現がSF-1結合部位変異マウスでは15%減少しておりSF-1が*Cyp11a1*に最も重要な転写因子である[102]。よって、P450sccの遺伝子エンコードが雄ラットにおけるエストロゲン様を引き起こす初期段階として、DESが胎仔

および新生仔でのSF-1を減少させると考えられる。また、精巣ステロイド産生不全におけるDESの初期標的はP450scc発現の抑止であり、精巣ステロイド産生における遅延および雄の生殖性能低下をもたらすと考えられる。

これまで多くの化学物質が原因とされた内分泌攪乱作用について、代表的な内分泌攪乱物質であるDESは、ホルモンバランスの乱れや脂質代謝障害による肥満が報告されており[83]、肥満の根本原因の一つに内分泌攪乱物質の暴露が懸念されている。DES投与1時間で下垂体と副腎において、他臓器に比べて高濃度でDESが検出していることから(図3-1)、ステロイドホルモン合成に関与する臓器でDESの直接的な影響が考えられる。さらに、最近明らかになりつつある局所(生殖器や副腎以外)でのステロイドホルモン合成への影響を明らかにする過程で、主合成臓器以外でのステロイドホルモンの合成やその役割、意義に関しても考察できると考えられる。

5. 小 括

DESは、非ステロイド性合成エストロゲンとして、かつては流産防止薬として使用されていた。現在は使用されていないがその毒性のメカニズムは不確定なままとなっており、内分泌攪乱物質のモデル物質として研究分野に用いられている。これまで、長期間高濃度のDESを投与した雄ラット精巣において、精巣組織の破壊、TSの減少などが観察された。ステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝には、ミトコンドリアへのコレステロール輸送調整タンパク質であるStARやステロイド合成組織のミトコンドリアに多く存在し、コレステロール輸送を調整するPBR、ミトコンドリア内膜に存在しコレステロールをPGNへ変換するP450sccが関与している。本研究では、精巣に対するDESの毒性の初期反応がミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝にあると考え、これらのタンパク質発現量、遺伝子発現量、ミトコンドリアへのコレステロール動態を調べた。SD系8週齢雄ラットを用いて、オリーブオイルのみ投与をControl群、オリーブオイルに溶かしたDESを0.1 mg/ml投与した群をDES投与群とし、1、2週間隔日胃内強制投与した。また、投与後経時的に各臓器を採取して、DESとそのグルクロン酸抱合体の分布を調査した。精巣のタンパク質発現の変化を解析するために、SDS-PAGE、WB、遺伝子発現の変化を解析するためにmRNA発現量を測定し、ミトコンドリアへのコレステロール輸送の定量的変化を調べるために遊離コレステロール濃度測定を行った。その結果、DESは投与後すぐに血液を介して全身に運搬されており、特に副腎と下垂体において高濃度で検出された。2週間DES投与した群では、ミトコンドリア分画の遊離コレステロール濃度の有意差が見られない時期に、PBR、StARとP450sccいずれのタンパク質においても顕著に減少しており、1週間投与ではP450sccのみで減少傾向が観察された。また、P450sccのmRNA発現に減少傾向がみられた。さらに、コレステロールを基質とした精巣ホモジネートによるPGN

合成確認試験では、1週間DES投与群でPGN合成は確認されなかった。

以上のことから、これまで多くの化学物質が原因とされた内分泌攪乱作用について、代表的な内分泌攪乱物質であるDESにおいては、精巣ミトコンドリア内のP450sccの発現抑制が原因となり、TS合成の抑制につながったと考察された。

第Ⅳ章 成雄ラット精巢中 Corticosterone 生合成の検出

1. 序 文

第Ⅱ章では成雄ラット各臓器中のステロイドホルモンとその抱合体を検出したことで、ステロイドホルモンは精巣や副腎で合成され、その一部はグルクロン酸抱合体として運ばれており、目標となる臓器で脱抱合して利用されていることがわかった。また、第Ⅲ章では Diethylstilbestrol 投与による精巣中ステロイドホルモン合成障害メカニズムが解明された。そこで、本章では主にテストステロン (TS) を合成している精巣でのステロイドホルモン合成機序を解明し、今まで報告されていない副腎皮質ホルモンであるコルチコステロン (CCS) 生合成を検出することを目的とした。

TS は、精巣のライディッヒ細胞、卵巣、胎盤、副腎で産生・分泌されており、雄性動物の発生分化期において中腎管から雄の生殖器の発育を促すとともに、成熟期では精子の形成と成熟に関与している。ラットにおける主要な合成経路はコレステロールから合成されており、順にプレグネノロン (PGN)、プロゲステロン (PGT)、 17α -ヒドロキシプロゲステロン (HPGT)、アンドロステンジオン (ADS)、TS と合成される。PGT から HPGT への反応は 17α -Hydroxylase、HPGT から ADS への反応は $17,20$ -Lyase、ADS から TS への反応は 17β -Hydroxysteroid dehydrogenase (17β -HSD) による酵素反応によって合成される。一方、副腎皮質ホルモンの一種である糖質コルチコイドは副腎で合成され、血糖値の上昇に関与しており、生体がストレスを感じた時に対応する防御反応として放出される。ラットにおける糖質コルチコイドは、ほとんどが CCS として合成されており、その合成経路はコレステロールから順に PGN、PGT、DCC、CCS と合成される。PGT から DCC への反応は小胞体に存在する 21α -Hydroxylase、DCC から CCS への反応はミトコンドリアに存在する

11 β -Hydroxylase によって行われる。CCS は精巣ライディッヒ細胞における TS の合成を調節している。CCS が欠乏すると、精巣における TS 合成に関わる様々な酵素の mRNA 発現や活性が低下し、TS 合成が抑制されるという報告がある[91,92]。しかしながら、CCS が過剰に存在すると、ライディッヒ細胞のアポトーシスが起こり、TS 合成が抑制される報告もある[5,9,47]。さらに、CCS が及ぼす影響は、脳にも及んでおり、海馬において CCS がシナプス可塑性を調節し、学習や記憶に関連している[65]。また Hypothalamic-pituitary-adrenal system (HPA) 軸に対し、遺伝子発現が関与した遅い反応と遺伝子発現が関与しない速い反応の両方において、負のフィードバック機構を担う重要な因子であり[31]、繰り返されるストレスによって引き起こされる CCS 過剰の状態は、生体に大きく影響している[11,25,98]。過剰な CCS には、脳の認識作用や適応行動、記憶の統合を脆弱化させることが指摘されている[31]。このように、CCS 濃度の増減で、精巣における TS 合成が正常に機能しないことがわかっており、CCS 濃度を一定に維持する必要があると考えられる[92]。

これまで、副腎以外の臓器における CCS の合成という点については、リンパ組織、小腸、皮膚、脳において、CCS の合成が明らかになっている[110]。また、海馬で CCS 合成酵素である 21 α -Hydroxylase と 11 β -Hydroxylase の遺伝子の存在と、組織切片における CCS の合成が確認されており[41]、精巣ライディッヒ細胞においても 11 β -Hydroxylase の存在が報告されている[117]。そこで、これまで不明であった雄ラット精巣中の 21 α -Hydroxylase の存在確認と精巣での CCS 生合成検出を目的とした。

2. 材料と方法

2.1. 副腎摘出ラットおよび疑似手術ラットのステロイドホルモン量の測定

ソムノペンチル (40 mg/kg) で麻酔後、背部最長筋を鈍性剥離し、副腎摘出群では両側副腎を摘出、疑似手術 (Sham operated) 群では副腎を目視後、腹腔内にアンピシリン (50 mg/kg) を滴下し、非吸収糸で筋層、結合組織、皮膚を縫合した後、レペタン (5 µg/kg) を皮下注射した。術後 3 日間はアンピシリン (50 mg/kg)、レペタン (5 µg/kg) を皮下注射した。術後 2 週間後に本学動物実験委員会の規定する方法で安楽死処置後に血液と精巣をサンプリングし、ステロイドホルモン量を LC-MS/MS および LC-TOF MS を使用し測定した。

2.2. 11β-Hydroxylase、21α-Hydroxylase の酵素活性測定

2.2.1. 精巣組織片およびホモジネートサンプルの調製

1 週間馴化した無処置ラットを、酪農学園大学動物実験委員会の規定する方法で安楽死処置後、精巣を摘出した。酵素活性測定に用いた精巣組織片は、サンプリング直後の精巣実質の一部を切り取ったものを使用した。精巣ホモジネートは、精巣を 4 倍量の 0.25 M スクロース溶液を加えホモジナイズ後、700 ×g、15 分間遠心分離し、その上清を 7,000 ×g、15 分間遠心分離した。得られた上清をマイクロゾーム画分、沈殿に 0.25 M スクロース溶液を加えたものをミトコンドリア画分とした。両画分ともに終濃度 0.5 % となるように CHAPS を加えて試料とした。

2.2.2. 精巣組織片を用いた酵素活性測定

酵素活性を測定する反応液には、0.5M リン酸緩衝液 100µl、0.1 M MgCl₂ 50µl、NADPH 40µl、NADH 40µl、DDW 610µl、基質として 30 µM PGT 20 µl を混合したものを用いた。反応液に無処置ラットの精巣組織片を加え、37 °C

で 0、1、2、4 時間 インキュベートし、各反応時間後の試験管に終濃度 0.5 % となるように CHAPS を加えホモジナイズした。各試験管内の DCC、CCS 濃度を LC-MS/MS および LC-TOF MS を使用し測定した。

2.2.3. 精巢ホモジネートを用いた酵素活性測定

酵素活性を測定する反応液には、0.5M リン酸緩衝液 100 μ l、0.1 M $MgCl_2$ 50 μ l、NADPH 40 μ l、NADH 40 μ l、DDW 610 μ l、基質 (30 μ M) 20 μ l を混合したものをを用いた。例として、PGT を基質とした試験管にはミトコンドリア画分とマイクロゾーム画分を各 40 μ l ずつ、DCC を基質とした試験管にはミトコンドリア画分のみを 40 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 0、0.5、1、2 時間、インキュベートし、各時間での試験管内の DCC、CCS、HPGT、ADS、TS 濃度を LC-MS/MS および LC-TOF MS で測定した[115]。

2.3. LC-MS/MS および LC-TOF MS による測定

2.3.1. 標準物質並びに試薬

第 I 章に準ずる。

2.3.2. LC-MS/MS および LC-TOF MS の測定方法

第 I 章に準ずる。

2.3.3. 酵素反応液中のステロイドホルモンとその中間産物の抽出

12,000 rpm、5 分間遠心分離後、上清 100 μ l と 10 ng/ml 内部標準物質 100 μ l を混和した。そこに 200 μ l アセトニトリル飽和ヘキサンを加え、混和後、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清を LC-MS/MS、LC-TOF MS で測定した。

3. 結 果

1. 精巣組織片を用いた酵素活性測定

細胞を破碎しない精巣組織片で PGT を基質として、酵素活性を測定したところ、経時的に DCC と CCS が合成された (図 4-1)。このことから、精巣組織片において、 11β -Hydroxylase と 21α -Hydroxylase 活性が確認された。

2. 精巣における 21α -Hydroxylase 活性と 17α -Hydroxylase 活性の比較

PGT を基質とした時、反応 4 時間後の DCC と HPGT の合成量を比較すると、DCC は HPGT の 1/20 量合成されていた (図 4-2)。つまり精巣において、CCS 合成経路である 21α -Hydroxylase 活性は、TS 合成経路である 17α -Hydroxylase 活性より、非常に低いことがわかった。

3. 精巣ホモジネートを用いた酵素活性測定

精巣ホモジネートと基質を反応させたところ、TS 合成 (図 4-3C) と、その合成過程物質である HPGT と ADS の合成 (図 4-3A,B) が確認された。PGT を基質として精巣ホモジネートと反応させたところ、経時的に DCC が合成された (図 4-3D)。このことから、精巣における 21α -Hydroxylase 活性が確認された。また、DCC を基質として精巣ホモジネートと反応させたところ、経時的に CCS が合成された (図 4-3E) このことから、精巣における 11β -Hydroxylase 活性が確認された。

4. LC-TOF MS による被検物質の定性

各標準物質を測定して得られた MS クロマトグラムを各標準物質の分子量を誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラムを図 4-4~8 の A に示した。酵素反応試験で用いた反応 2 時間後の試料を測定して同様の処理を行った MS クロ

マトグラムを図 4-4~8 の B に示した。標準物質を測定した時に検出した時間と同時間の MS クロマトグラムを図 4-4~8 の C に示した。また、標準物質の組成式から算出された理論値と同位体パターンを図 4-4~8 の D に示した。次に、第 I 章で述べた sigmaFit™ を用いて各標準物質の同位体パターンと比較し sigma 値を算出したところ、非常に高い一致であった (図 4-4~8)。よって検出された MS クロマトグラムは目的のステロイドホルモンであると同定された。

5. 副腎摘出ラットの血液並びに精巣中テストステロンとコルチコステロン量の調査

副腎摘出 2 週間後、疑似手術 2 週間後、無処置ラットの血液と精巣の TS と CCS 量を測定したところ、副腎摘出群では血液、精巣ともに CCS は激減したが、術後 2 週間経過しているにもかかわらず、無処置群に比べ血液中に 1/12 (~8%)、精巣中には 1/35 (~3%) 残存していた (表 4-1)。

6. 副腎摘出ラットの精巣中テストステロン、コルチコステロン前駆物質量の調査

副腎摘出 2 週間後における精巣中前駆物質を調査したところ、TS や CCS だけでなく、PGN を除く全ての前駆物質で大幅に減少していた (図 4-9)。この結果から副腎除去によって PGN から合成される PGT を生成する酵素 3 β -HSD の活性が抑制されていることがわかった。

表 4-1. 副腎摘出ラットの血液と精巢中 TS と CCS 量

	Blood			Testis		
	Control	Sham	AL	Control	Sham	AL
Testosterone	5.4 ± 1.3	2.21 ± 1.74	0.21 ± 0.15	175.8 ± 41.8	208.5 ± 61.0	32.2 ± 9.8
Corticosterone	140.3 ± 38.1	487.9 ± 328.1	11.3 ± 7.75	137.7 ± 24.1	92.3 ± 48.3	3.93 ± 1.4

(p moles/ml or g)

Control は無処置群 (n=6) のステロイドホルモン量。

Sham (疑似手術) は Sham operated 群 (n=3) の術後 2 週間のステロイドホルモン量。

AL (Adrenalectomized 副腎摘出) は副腎摘出群 (n=4) の術後 2 週間のステロイドホルモン量。

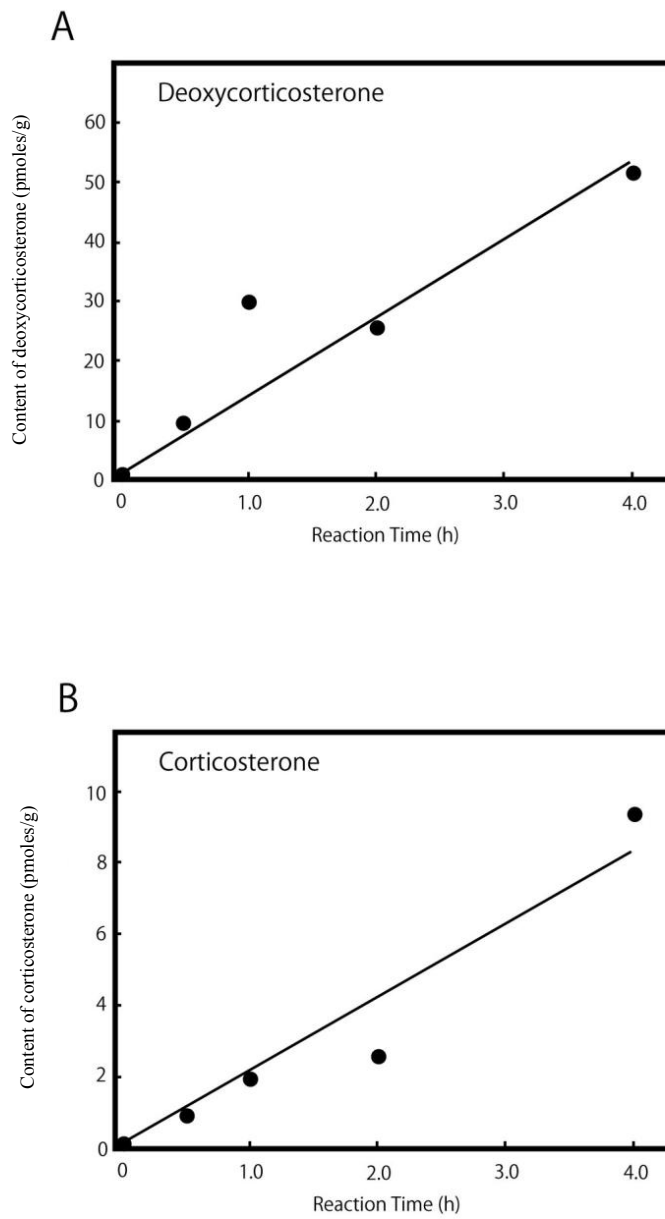


図 4-1. 精巣組織片を用いた酵素反応試験

A; PGT を基質とした精巣組織片反応による DCC 量。

B; PGT を基質とした精巣組織片反応による CCS 量。

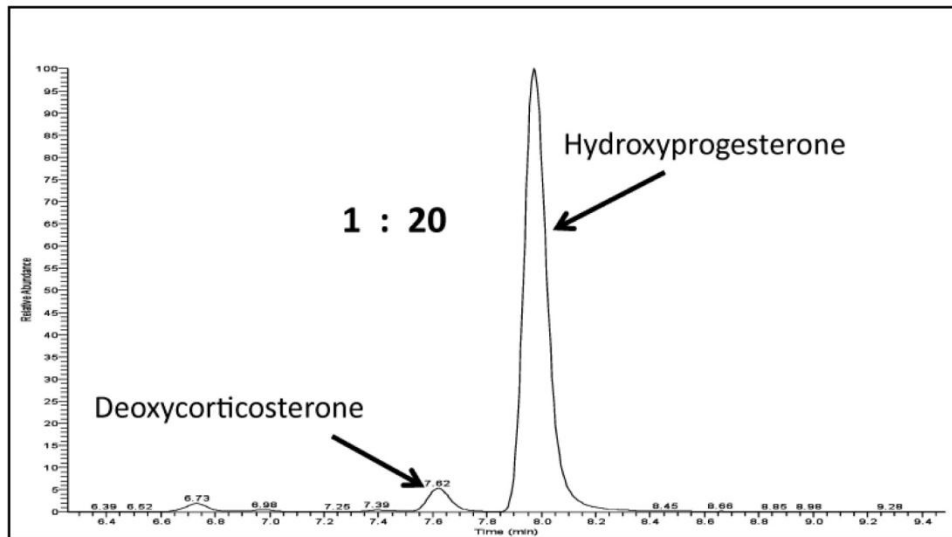


図 4-2. PGT 基質における精巣組織片 4 時間反応で生成された DCC と HPGT 合成量の比較

PGT を基質とした時、DCC の合成量と HPGT の合成量を比較すると、DCC は HPGT の 1/20 量合成されていた。

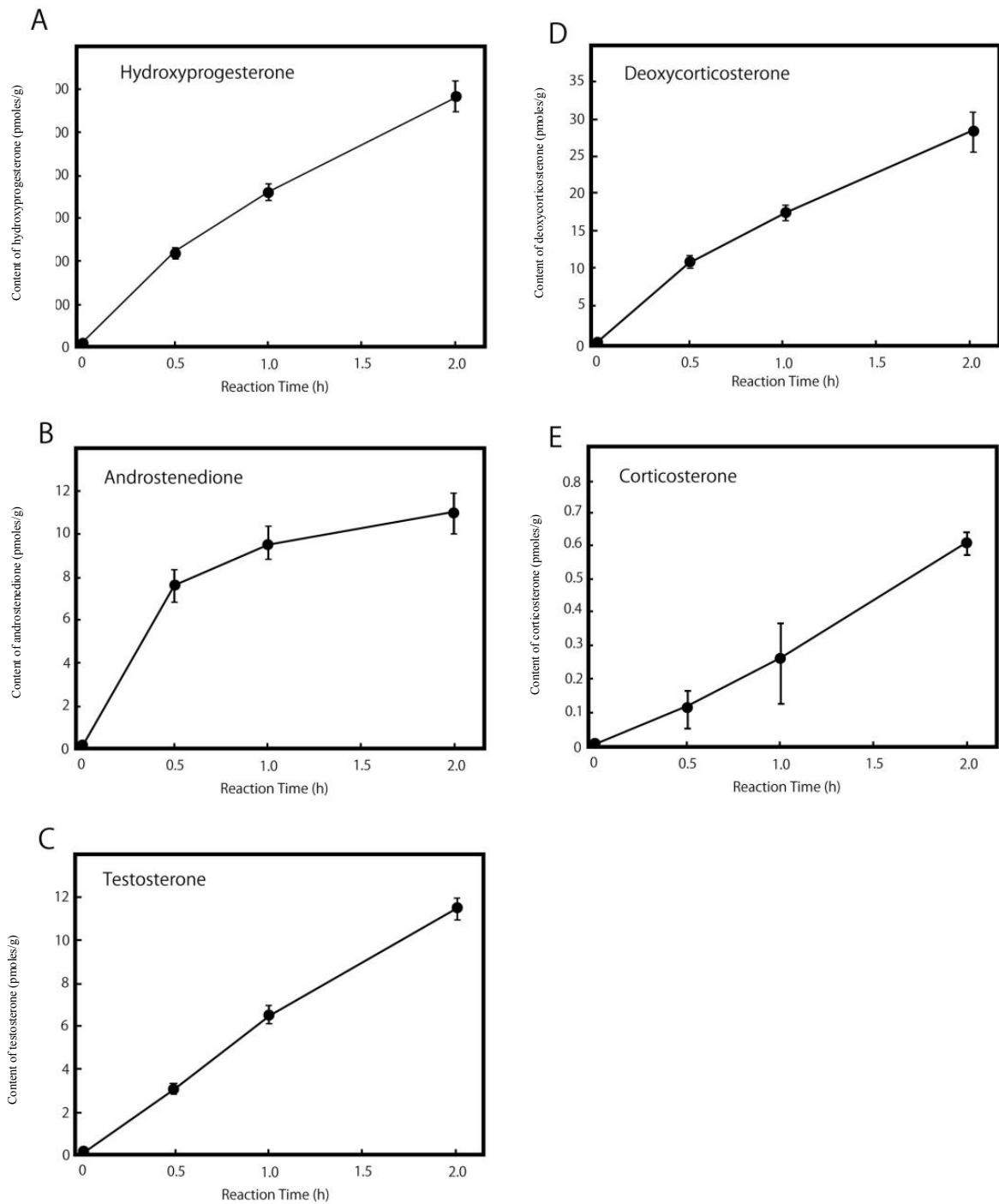


図 4-3. 精巣ホモジナイズを用いた酵素反応試験

- A; PGT を基質とした精巣ホモジネート反応による HPGT 量。
 B; HPGT を基質とした精巣ホモジナイズ反応による ADS 量。
 C; ADS を基質とした精巣ホモジナイズ反応による TS 量。
 D; PGT を基質とした精巣ホモジナイズ反応による DCC 量。
 E; DCC を基質とした精巣ホモジナイズ反応による CCS 量。

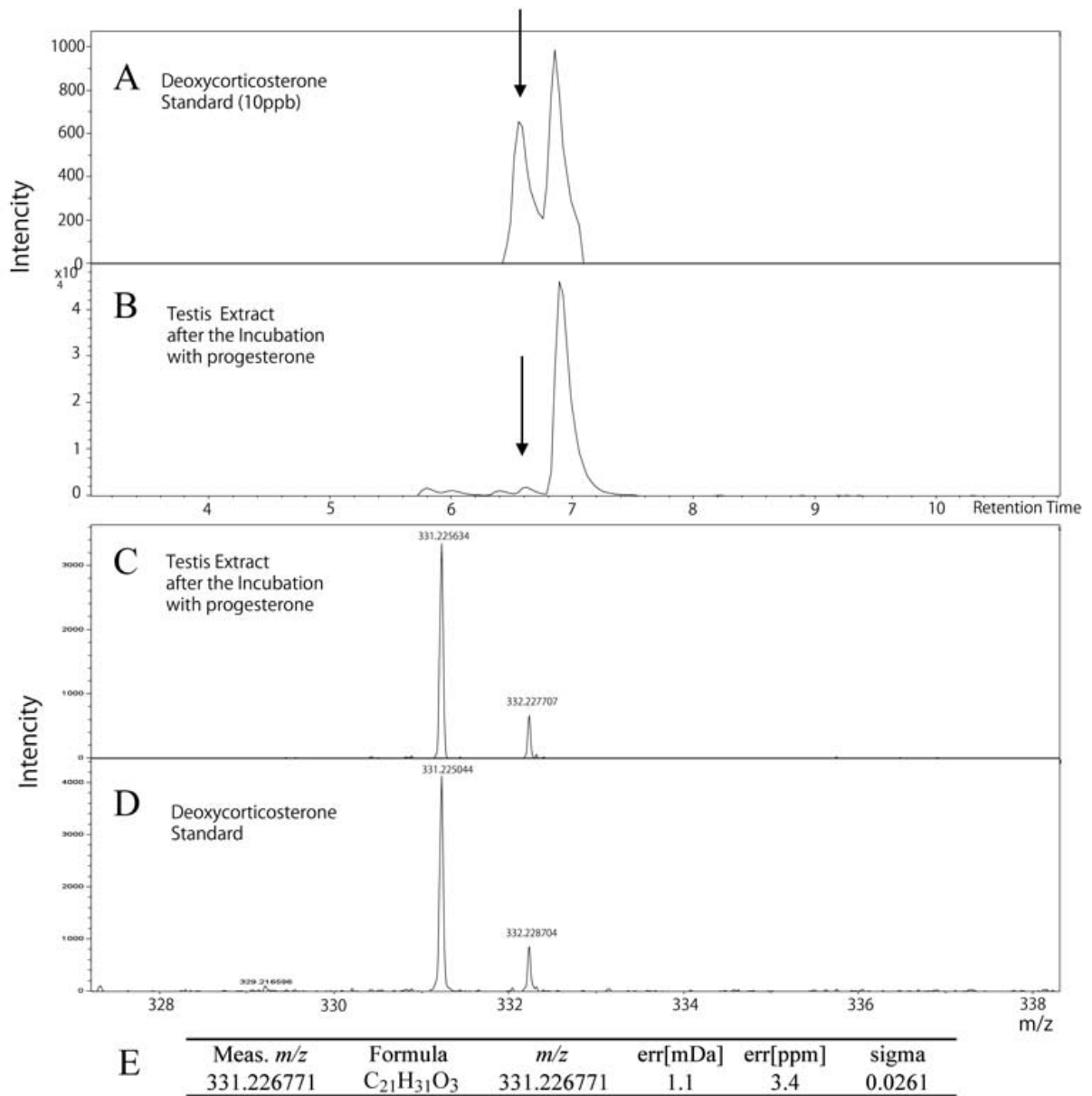


図 4-4. LC-TOF MS による被検物質の定性

PGTを基質とした精巢ホモジネート反応 2 時間後の試験管内における被検物質の定性。

A; DCC 標準物質を分子量誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラム。

B; 酵素反応液を DCC の分子量誤差 0.005Da で抽出した MS クロマトグラム。

C; B で得られた MS クロマトグラムから抽出した DCC の MS スペクトラム。

D; DCC の同位体パターンと理論値。

E; sigmaFitTM による検証結果。

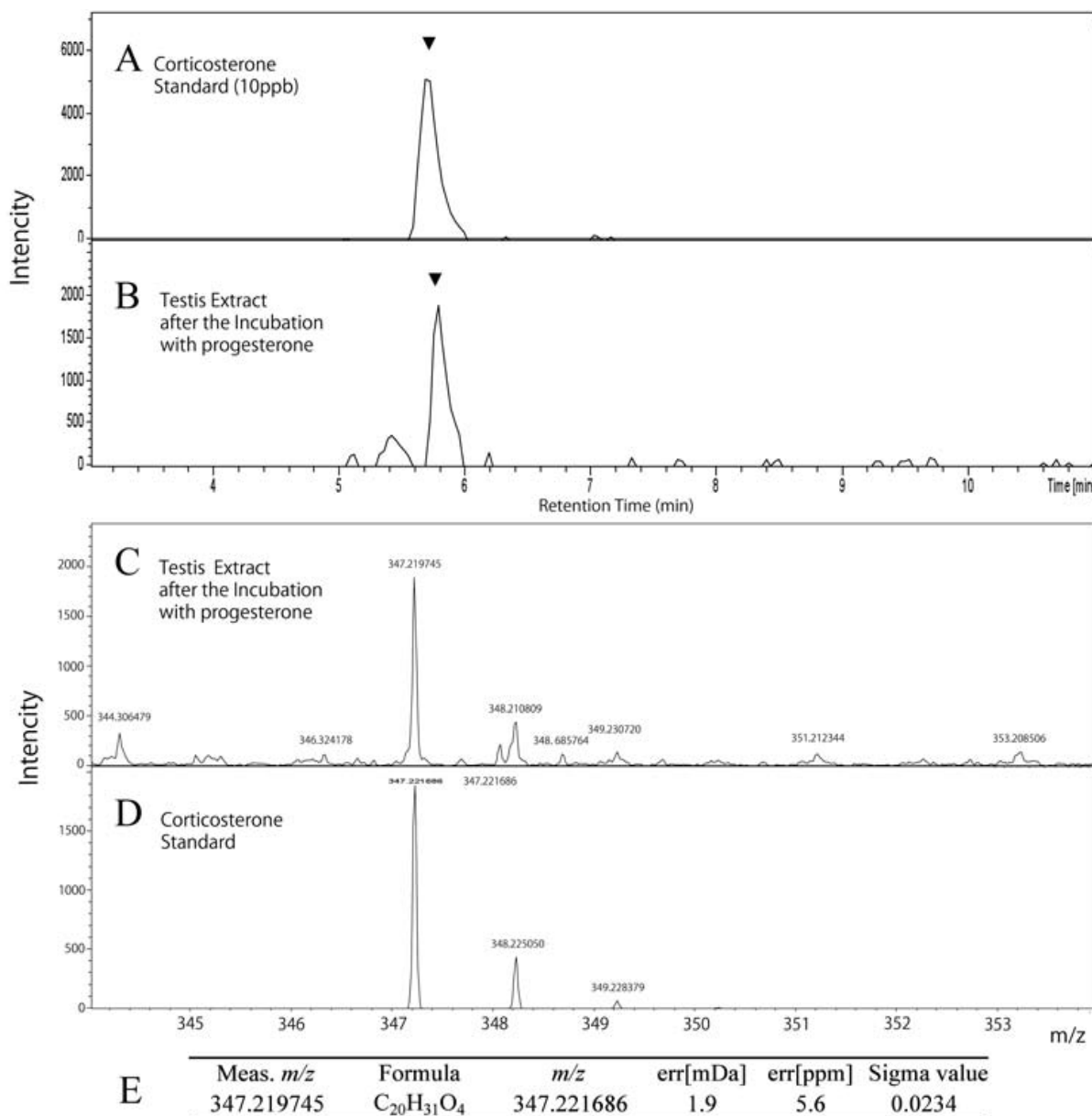


図 4-5. LC-TOF MS による被検物質の定性

DCC を基質とした精巣ホモジネート反応 2 時間後の試験管内における被検物質の定性。

A; CCS 標準物質を分子量誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラム。

B; 酵素反応液を CCS の分子量誤差 0.005Da で抽出した MS クロマトグラム。

C; B で得られた MS クロマトグラムから抽出した CCS の MS スペクトラム。

D; CCS の同位体パターンと理論値。

E; sigmaFitTM による検証結果。

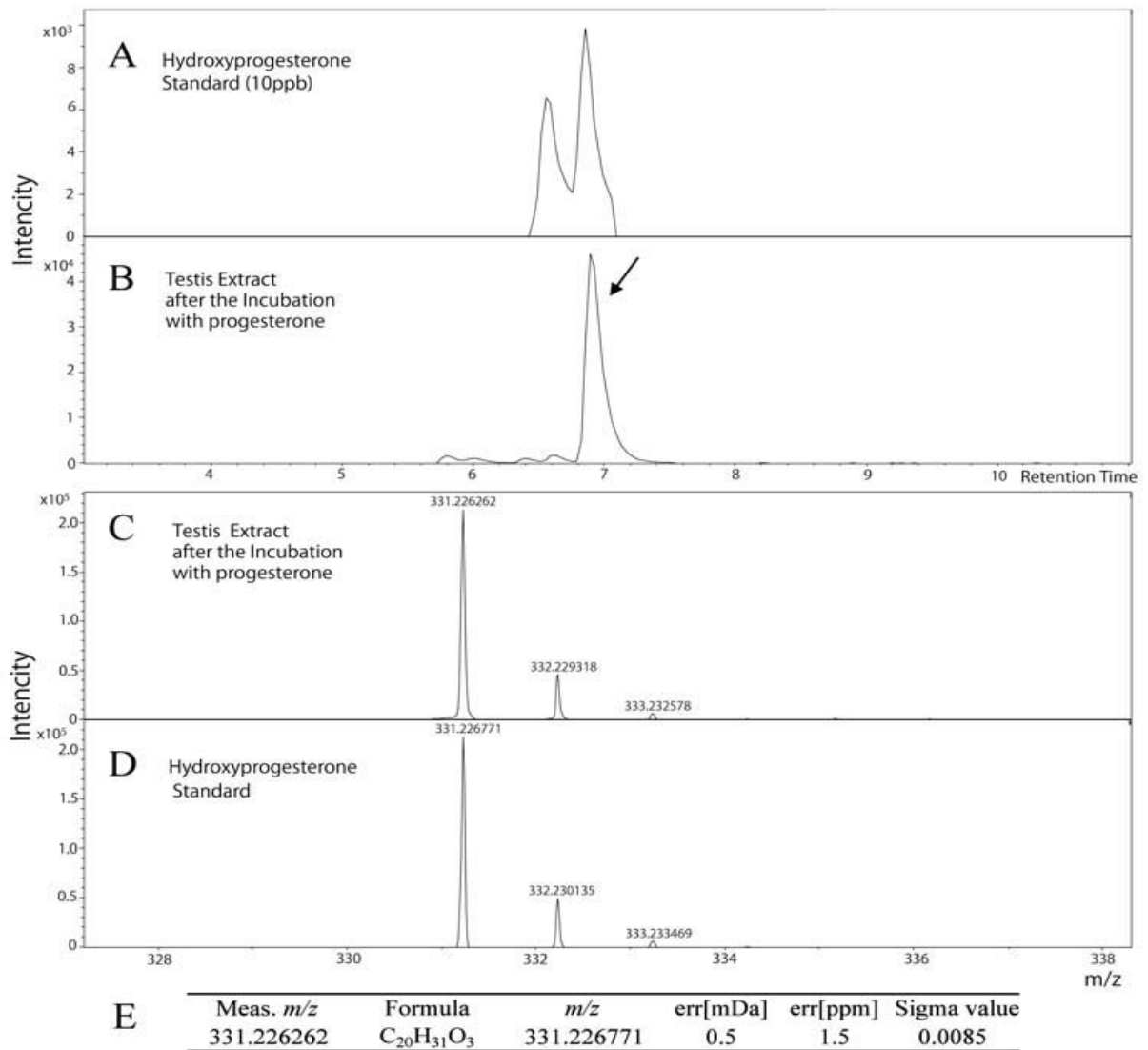


図 4-6. LC-TOF MS による被検物質の定性

PGT を基質とした精巣ホモジネート反応 2 時間後の試験管内における被検物質の定性。

A; HPGT 標準物質を分子量誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラム。

B; 酵素反応液を HPGT の分子量誤差 0.005Da で抽出した MS クロマトグラム。

C; B で得られた MS クロマトグラムから抽出した HPGT の MS スペクトラム。

D; HPGT の同位体パターンと理論値。

E; sigmaFitTM による検証結果。

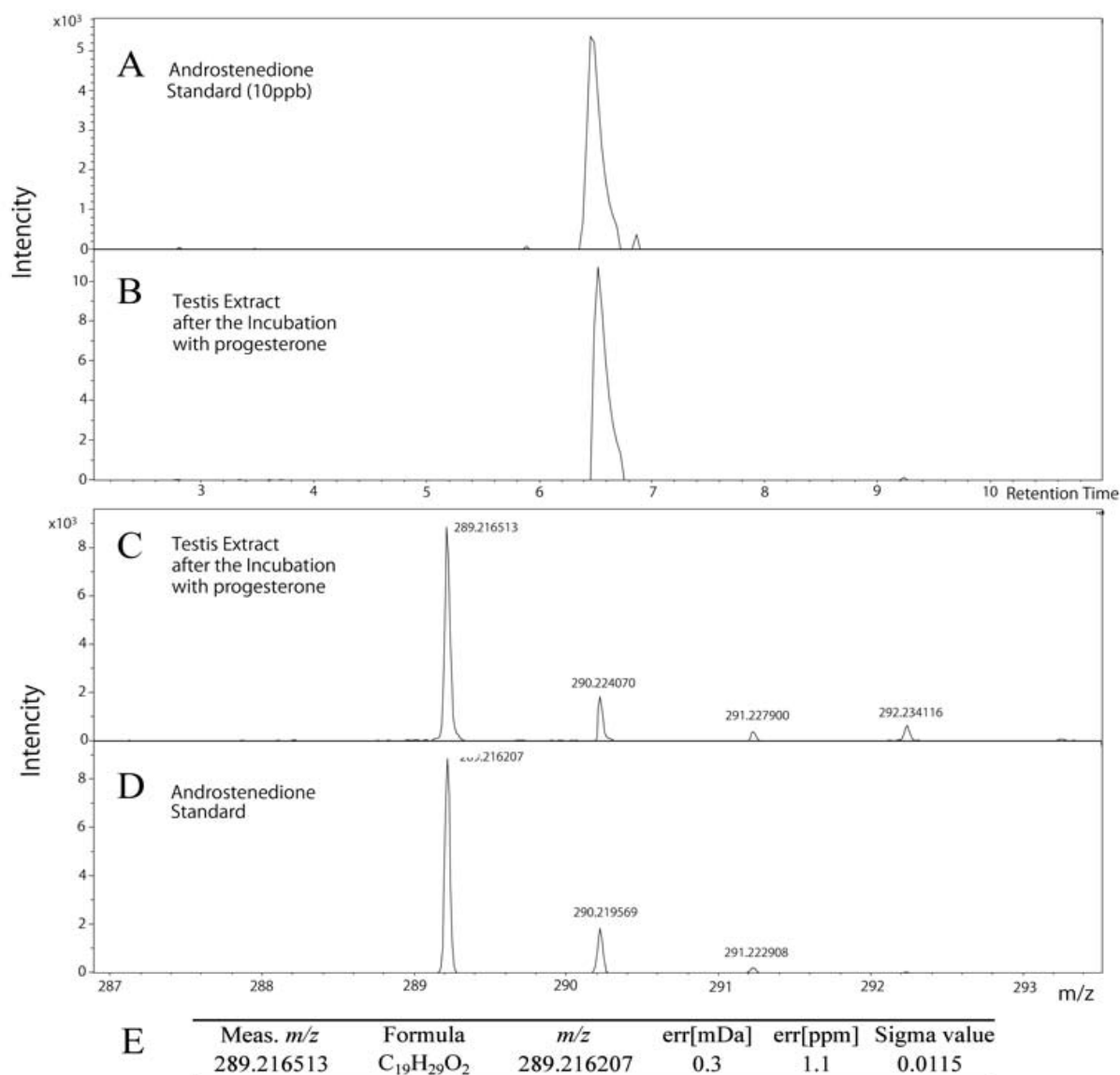


図 4-7. LC-TOF MS による被検物質の定性

HPGT を基質とした精巣ホモジネート反応 4 時間後の試験管内における被検物質の定性。

A; ADS 標準物質を分子量誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラム。

B; 酵素反応液を ADS の分子量誤差 0.005Da で抽出した MS クロマトグラム。

C; B で得られた MS クロマトグラムから抽出した ADS の MS スペクトラム。

D; ADS の同位体パターンと理論値。

E; sigmaFitTM による検証結果。

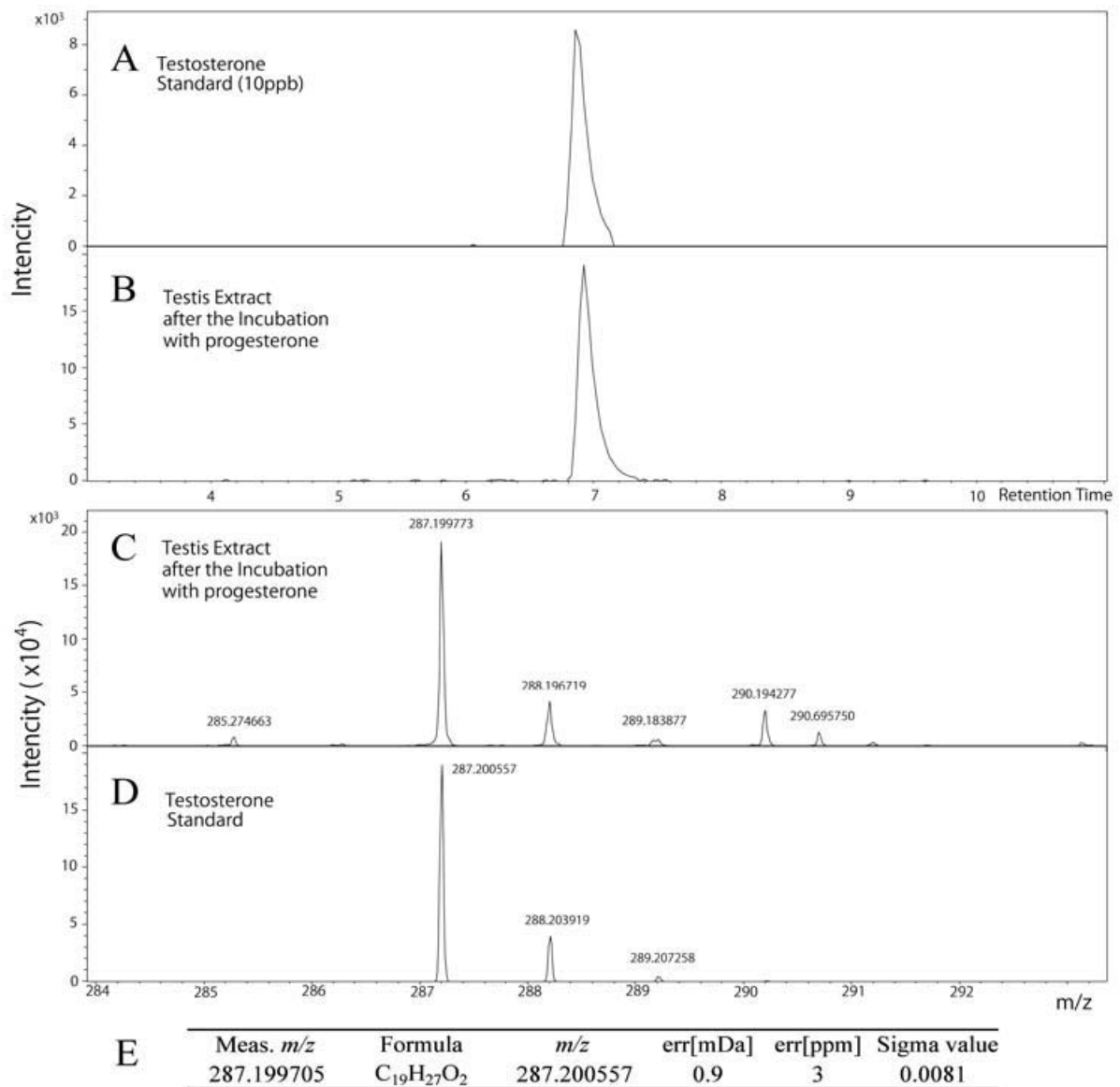


図 4-8. LC-TOF MS による被検物質の定性

ADS を基質とした精巣ホモジネート反応 4 時間後の試験管内における被検物質の定性。

A; TS 標準物質を分子量誤差 0.005 Da で抽出した MS クロマトグラム。

B; 酵素反応液を TS の分子量誤差 0.005Da で抽出した MS クロマトグラム。

C; B で得られた MS クロマトグラムから抽出した TS の MS スペクトラム。

D; TS の同位体パターンと理論値。

E; sigmaFitTM による検証結果。

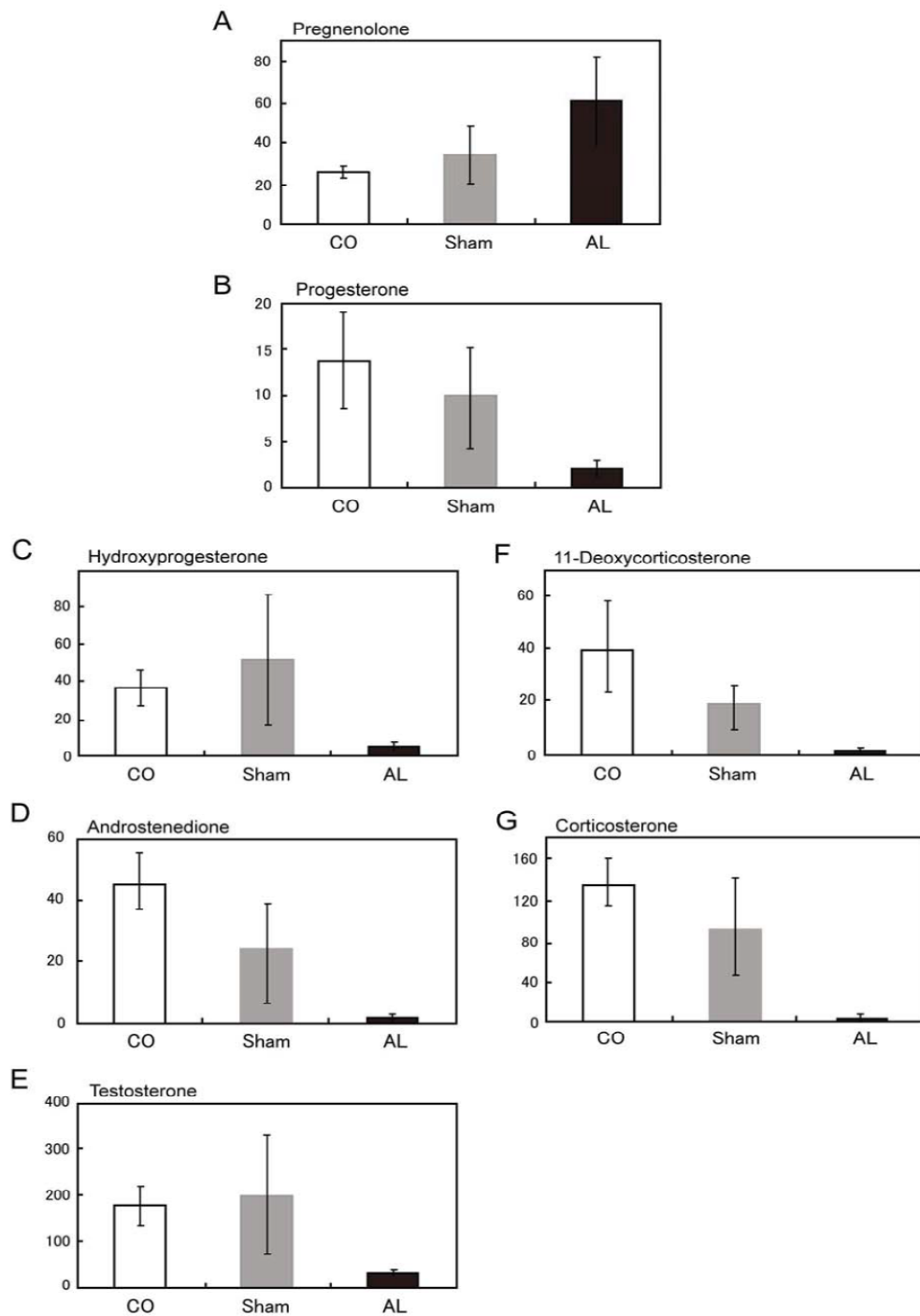


図.4-9. 副腎摘出ラット精巢中 TS と CCS とその中間物質

COは無処置群(n=6)のステロイドホルモン量、Sham(疑似手術)はShan operated 群(n=3)の術後2週間のステロイドホルモン量、AL(Adrenalectomized 副腎摘出)は副腎摘出群(n=4)の術後2週間のステロイドホルモン量。単位は pmoles/g。

4. 考 察

血液および精巣中の TS およびその前駆体は副腎を摘出した雄ラットでは減少しており、副腎コルチコステロイドが精巣ステロイド産生に対して主な役割を果たすと考えられる。これまで脳でのステロイド産生報告があるが[18,30]、ラットの副腎を摘出した場合でも、血液中だけでなく精巣からも CCS および DCC が僅かながら残存していた（表 4-1）。ステロイドホルモン合成を研究する上で、副腎皮質で合成された CCS と血液中のステロイドホルモン濃度を調査することで重要な情報が得られると考えられる。そこで、第 I 章で開発した方法を用いて、臓器中に含まれている種々のステロイドホルモンを正確に測定した。また、CCS とその前駆物質は成雄ラット精巣中から検出され、精巣の酵素活性を調べた結果、CCS の合成を確認した。この結果は副腎以外での別の組織で CCS が合成されていることを意味している。これまでに 11β -Hydroxylase の存在が脳[12,64]や精巣[117]で報告されており、それを裏付けている。さらに、*in vitro* や *in vitro assays* 試験によってラットの精巣中から DCC および CCS 生合成を確認した（図 4-1,3）。精巣での 11β -Hydroxylase の生理的機能は依然として解明されていないが、ストレス負荷時の 11β -HSD1 阻害によって生殖機能障害を引き起こし[36]、精巣ライディッヒ細胞における TS 産生がアルドステロン (ALD) によって誘導されることで、精巣の CCS 産生が副腎コルチコステロイドによって調節されている報告がある[27]。これまで、 21α -Hydroxylase は PGT から CCS 生合成過程の DCC を生成するが、 21α -Hydroxylase のタンパク質および mRNA は、精巣から検出されていない[71]。副腎以外での PGT のヒドロキシ化は、低い基質親和性を有する Cytochrome P450 である P450 2C19 および P450 3A4 から発現されるタンパク質によって合成されていることから[29]、 21α -Hydroxylase とは異なる P450 アイソフォームが介在していると考えられる[71]。

副腎で合成された後、血液によって運ばれた CCS とは異なり、標的組織内で合成される CCS の存在が明らかとなった。副腎で合成されたコルチコイドと比較して、標的組織内で合成されたステロイドホルモンは、受容体への結合活性 [99] や異なる調節因子をもった酵素 [79] によって合成されており、副腎コルチコイドの補足的な役割を担っていると考えられる。副腎の CCS は免疫抑制および抗炎症抑制作用に重要な役割を果たしているが、標的組織内で合成された CCS も同様の役割を果たしていると考えられ、副腎 CCS が血液によって運ばれてくるまでの組織損傷を防いでいると考えられる。よって、コルチコイドに幅広い役割があると考えられ、その役割の一つとして HPA 軸の機能調節を助けており、循環器系ホメオスタシスに大きく関与していると考えられる [100]。ステロイドの局所合成は、それぞれの組織の恒常性を維持する上で大変重要な役割があると考えられる。精巣での CCS 合成システムは無処置ラットの生産能力と比較して、潜在的な活性を有していると考えられる。また、精巣細胞内で合成された CCS は組織特異的反応により Paracrine または Autocrine として作用していると考えられる。合成副腎皮質ホルモンであるデキサメタゾン (Dex) は副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (Corticotropin-releasing hormone, CRH) 発現を抑制することで、下垂体 ACTH の分泌を減少させる [101]。精巣組織での CCS 合成によって、直接的に副腎コルチコイドや ACTH 濃度を減少させていると考えられ、精巣組織の CCS 合成による CRH および ACTH への効果は調節システムや生理機能を知る上で重要である。CCS は解糖およびグリコーゲン生成の調節のように細胞内において、様々な役割を果たしている。それは、精巣で合成された CCS は各細胞で必要とするエネルギー生産をコントロールしているのかもしれない。また、この制御機能により、細胞内 ATP や血中エピネフリン濃度に応じて、グリコーゲンホスホリラーゼを調節することによりエネルギー生産に重要な役割を果たしていると考えられる。

ライディッヒ細胞における TS の生合成は、LH によって決定される。しかしながら、TS 合成は心理的ストレスまたはクッシング症候群による糖質コルチコイドの過剰によって抑制される [15,76]。また、ストレス負荷による CCS 分泌の増加はライディッヒ細胞のアポトーシスを引き起こす報告がある[26,43]。解糖調節は周期的に精巣機能を維持するのに必要であり、精巣での CCS 生成は精子形成や代謝制御に関わっているのかもしれない。これまでわかってきた Endocrine としての役割に加えて新たな意義が判明するかもしれない。脳や精巣で自ら合成している CCS の生理的意味については非常に興味深い。

5. 小 括

CCS は生体にとって重要なステロイドホルモンであり、その働きについては盛んに研究されている。これまでにリンパ組織、小腸、皮膚または脳において、CCS の合成が明らかになっているが、精巣についてはあまり行われていない。これまでに、ラット精巣ライディッヒ細胞における 11β -Hydroxylase の存在と、その活性が報告されている。しかしながら精巣における 21α -Hydroxylase の存在はマウス胎子においてのみの報告にとどまり、成体においての精巣 21α -Hydroxylase の存在や、精巣での PGT から DCC への反応は確認されていなかった。本研究により、初めて成雄ラット精巣における 21α -Hydroxylase 活性が確認され、 21α -Hydroxylase に相当する遺伝子が存在することが明らかになった。今回の実験で、精巣において PGT から CCS が合成されることがわかった。精巣が CCS を合成する生理的意味については、様々なことが考察される。一つは、副腎が障害を受け CCS を合成できなくなった際、精巣中の CCS の急激な減少を防ぎ、精子や TS 合成を滞らせないようにするために、CCS を自己合成しているのではないかと考えられる。また、ストレスに敏感に反応する HPA 軸の影響を受けにくい、比較的安定な CCS 合成臓器として、日常的に CCS を合成しているのではないかと考えられる。精巣はステロイドホルモンの原料であるコレステロールや PGT までのステロイドホルモン合成酵素を備えている点から、都合が良いと考えられる。また、精巣組織での CCS 合成によって、直接的に副腎コルチコイドや ACTH 濃度を減少させていると考えられる。

CCS は抗ストレス作用だけでなく、脳や精巣においてに様々な働きをしていることが、最近報告されている。このように脳や精巣での CCS が重要な働きをしている臓器において、CCS 合成酵素を自ら備えている生理的意味については今後、非常に興味深いテーマである。

総 括

ステロイドホルモンは内的要因や外的な刺激に対応して主に精巣、卵巣、副腎、性腺および末梢内分泌腺から分泌され、血液によって標的器官に運ばれ様々な生理作用を発現するといわれている。ステロイドホルモンは生理作用と構造からアンドロゲン、エストロゲン、コルチコイドに分類されコレステロールから合成される。ステロイドホルモンの合成は、様々な酵素やタンパク質が関与しており、かつ、その存在量は微量であることから合成過程、生体内動態およびその役割については、いまだ解明されていないことが多い。そこで本研究では、ステロイドホルモンの代謝動態に及ぼす内分泌攪乱物質の影響を明らかにし、さらに局所生合成について検討し、ステロイドホルモンの本来的役割について考察した。第 I 章でステロイドホルモンとその代謝物である抱合体同時分析法の開発を目的として、生体組織内に存在する微量ステロイドホルモンやそのグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体の固相カラムを用いた抽出方法と LC-MS を用いた分析方法を開発した。第 II 章では第 I 章で開発した方法を用いて、成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を臓器別に調査し、ステロイドホルモンの体内動態について明らかにした。第 III 章では、内分泌攪乱化学物質ジェチルスチルベストロール (DES) を投与した成雄ラットの臓器中への移行調査を行い、これまで未解明であった成雄ラット精巣毒性の初期段階であるテストステロン (TS) 低下機序の一部を解明した。第 IV 章では、これまで報告のない成雄ラット精巣中でのコルチコステロン (CCS) 合成に関与する P450 酵素活性を調査した。

第 I 章では LC-MS によるステロイドホルモンとその抱合体同時分析法の開発を目的とした。生体内のステロイドホルモンは微量でもその効果は大きい。そのため生体反応を観察する指標として有用であるため、微量分析方法の開発が数多く報告されている。これら生体ステロイドホルモンの測定は、一般に血液内濃度を HPLC-UV、RIA、ELISA を用いて行なわれてきたが、組織内に微量に含まれているステロイドホルモン濃度を正確に定量した報告は少ない。しかし、LC-MS/MS の登場以来、急速

に微量分析法の開発が進められ、近年では LC-TOF MS による精密質量、同位体パターンによる解析および LC-MS/MS による Selected Reaction Monitoring (SRM) 法により飛躍的に高感度でかつ選択的に測定することが可能となった。また、生体内ステロイドホルモンとその抱合体をより微量測定するために臓器中に多く存在する夾雑成分、いわゆるマトリックスを除去するために、固相カラムを使用して精製する方法を開発した。今までは河川の水、尿、血清、プラズマおよび胆汁での報告はあるが、この方法を用いることで、これまで報告の少ない臓器中からの微量ステロイドホルモンの定量が可能となった。さらに、測定において誘導体化処理も行わないことから、代謝物や抱合体の測定も同時に測定することで、生体内の様々な微量ステロイドホルモンの変化を分析することが可能となった。

第 II 章では成雄ラット臓器中ステロイドホルモンとその抱合体の定量を目的とした。薬物や毒物、生体内の老廃物は肝臓によって代謝されて尿中や胆汁中へ排泄される。これらは Cytochrome P450 による代謝反応を受けて、UDP-glucuronosyltransferase (UGT) などの抱合酵素により抱合体を形成し、胆管を介して糞中に、血液を介して尿中に排泄される。これまで、ステロイドホルモンの抱合体は排泄に関わっていると考えられており、ステロイドホルモン抱合体として標的臓器へ輸送されるという報告はなかった。成雄ラットの各臓器中ステロイドホルモンとその抱合体を調査したところ、TS と CCS とその前駆物質は肝臓以外の全ての臓器から検出された。また、プレグネノロン (PGN) はステロイド合成臓器である精巣や副腎だけでなく、肝臓や筋肉から高濃度で検出されたが、脳や血液においては検出限界以下であった。プレグネノロン-グルクロン酸抱合体 (PGN-G) は、調査した臓器全てから検出された。一方、硫酸抱合体はステロイド合成臓器である精巣と副腎においては定量限界値以下であった。肝臓では PGN の抱合体のみ検出されており、コレステロールから PGN を合成した後、抱合体として血液によって標的臓器へ運ばれていた。その標的臓器である脳、筋肉、精巣、代謝臓器である肝臓において脱抱合に関係す

る酵素、 β -グルクロニダーゼとスルファターゼ活性が確認され、ステロイドホルモン硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体は標的臓器で脱抱合された。以上のことから、一部のステロイドホルモンはグルクロン酸抱合体として各標的臓器に運ばれており、脱抱合して使用された後、グルクロン酸抱合体、硫酸抱合体として再び再抱合されて血液によって運ばれ、腎臓で排出されると考えられる。

第III章では内分泌攪乱化学物質 DES を投与した成雄ラット精巣 P450scc 発現抑制による TS 合成阻害の解明を目的とした。DES は、非ステロイド性合成エストロゲンとして、かつては流産防止薬として使用されていた。現在は使用されていないがその毒性のメカニズムは不確定のままとなっており、内分泌攪乱物質のモデル物質として研究分野で用いられている。これまで、長期間高濃度の DES を投与した成雄ラット精巣において、精巣組織の破壊、TS の減少などが観察された。ステロイドホルモン合成の律速段階であるミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝には、ミトコンドリアへのコレステロール輸送調整タンパク質である StAR、ステロイド合成組織であるミトコンドリアに多く存在しコレステロール輸送を調整する PBR、およびミトコンドリア内に存在しコレステロールを PGN へ変換する P450scc が関与している。本章では、精巣に対する DES の毒性の初期反応がミトコンドリアへのコレステロール輸送およびその代謝にあると考え、これらのタンパク質発現量、遺伝子発現量、ミトコンドリアへのコレステロール動態を調べた。SD 系 8 週齢成雄ラットを用いて、オリーブオイルのみの投与を Control 群、オリーブオイルに溶かした DES を 0.1 mg/ml 投与した群を DES 投与群とし、1、2 週間隔日胃内強制投与した。また、投与後経時的に各臓器を採取して、DES とそのグルクロン酸抱合体の分布を調査した。精巣はタンパク質発現の変化を解析するために SDS-PAGE、WB、遺伝子発現の変化を解析するために mRNA 発現量測定、ミトコンドリアへのコレステロール輸送の定量的変化を調べるために、遊離コレステロール濃度の測定を行った。その結果、DES は投与後すぐに血液を介して全身に運搬されており、特に副腎と下垂体において高濃度で検出された。2 週間

DES 投与群では、ミトコンドリア分画の遊離コレステロール濃度が投与後 1、2 週間ともに有意差が見られない時期に、PBR、StAR および P450scc いずれのタンパク質においても顕著に減少しており、1 週間投与群では P450scc のみで減少傾向が観察された。また、P450scc の mRNA 発現に減少傾向がみられた。さらに、コレステロールを基質とした精巣ホモジネートによる PGN 合成確認試験では、1 週間 DES 投与群で PGN 合成は確認されなかった。以上のことから、DES 投与によって、精巣ミトコンドリア内の P450scc の発現抑制が原因となり、TS 合成の抑制につながると考察された。

第IV章では成雄ラット精巣中での CCS 生合成の検出を目的とした。CCS は生体にとって重要なステロイドホルモンであり、その働きについては盛んに研究されている。これまでにリンパ組織、小腸、皮膚、脳において、CCS の合成が明らかになっているが、精巣についてはあまり研究されていない。これまでに、ラット精巣ライディッヒ細胞における 11 β -Hydroxylase の存在と、その活性が報告されている。しかしながら、精巣における 21 α -Hydroxylase の存在はマウス胎子においてのみの報告にとどまり、成体においての精巣 21 α -Hydroxylase の存在や、精巣での PGT から DCC への反応は確認されていなかった。本研究により、初めて成雄ラット精巣における 21 α -Hydroxylase 活性が確認され、21 α -Hydroxylase に相当する遺伝子が存在することが明らかになった。今回の実験で、精巣において PGT から CCS が合成されることがわかった。精巣が CCS を合成する生理的意味については、様々なことが考察される。一つは、副腎が障害を受け CCS を合成できなくなった際、精巣中の CCS の急激な減少を防ぎ、精子や TS 合成を滞らせないようにするために CCS を自己合成しているのではないかと考えられる。また、ストレスに敏感に反応する HPA 軸の影響を受けにくい、比較的安定な CCS 合成臓器として、日常的に CCS を合成しているのではないかと考えられる。精巣はステロイドホルモンの原料であるコレステロールや PGT までのステロイドホルモン合成酵素を備えている点から、都合が良いと考えられ、精巣組織での CCS 合成によって直接的に副腎コルチコイドや ACTH 濃度を減少させていると考えられる。CCS は

抗ストレス作用だけでなく、脳や精巣において様々な働きをしていることが報告されており、CCS 合成酵素を自ら備えている生理的意味については今後、非常に興味深いテーマである。

本研究では第 I 章で開発した抽出法と質量分析法を用いることで、生体内微量ステロイドホルモンとその抱合体を同時に分析することが可能となった。この手法は様々な試験に応用することができる。投与した薬物の生体内動態を観察するだけでなく、投与した薬物による影響を観察する材料としてステロイドホルモンとその抱合体の調査に応用できる分析法である。第 II 章では、一部のステロイドホルモンは主たる合成臓器である精巣、副腎からグルクロン酸抱合体として、標的臓器へ血液を介して運ばれており、脱抱合されていることが予測された。第 III 章では内分泌攪乱化学物質 DES を投与した成雄ラット精巣 P450scc 発現抑制による TS 合成阻害を解明した。また、第 IV 章では副腎以外の臓器、精巣での CCS 合成を確認した。以上のことから、ステロイドホルモンの一部は抱合体として運ばれ、標的臓器で脱抱合されて利用されており、同時にステロイドホルモンを局所的に自ら合成することで、主たる生産臓器からの Endocrine だけでなく Paracrine、Autocrine として機能することで、基礎的な生命現象を維持していると考えられる。

各章で様々な知見をもたらした微量分析機器である質量分析計は、精度、感度、分解能が日進月歩で進化しており、近年のタンパク質、糖、脂肪の研究の発展に大きく貢献してきた。事実、本研究の成果は質量分析計による生体組織内微量ステロイドホルモンを正確に測定することが可能になったことによるものである。低分子化合物の微量分析においては、ステロイドホルモンやその代謝物のみならず、様々な化合物を同時に測定できることから、質量分析計は生化学基礎研究において有用な分析ツールであり、それぞれの特徴を活かした質量分析計を駆使することで、今後も生体内反応メカニズムの解明に大きく貢献すると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導ご鞭撻賜りました横田 博教授に心より深謝申し上げます。また、副査として論文をご精読頂きました加藤清雄教授、谷山弘行教授に心より深謝申し上げます。研究全般を通し全面協力して頂きました一般社団法人食肉科学技術研究所に感謝いたします。実験において、協力して頂いた食肉科学技術研究所の鈴木智和氏、田中絵美氏、榎 加奈恵氏、獣医生化学教室の生野聡子氏、獣医看護学類動物栄養学教室の宮庄 拓獣医学博士、歴代の獣医生化学教室各員に感謝いたします。また、数多くのご助言、サポートを頂いた食肉科学技術研究所の佐々木道夫氏、獣医生化学教室との縁を作って頂いた酪農学園大学獣医生化学教室前教授 湯浅 亮氏、前田博之獣医学博士に心より深謝申し上げます。そして、研究活動を支えてくれた家族に感謝いたします。

引用文献

1. Achermann JC, Jameson JL. 1999. Fertility and infertility: genetic contributions from the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. *Mol. Endocrinol.* **13**: 812–818.
2. Amory JK, Bremner WJ. 2003. Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development. *J. Steroid Biochem. Mol Biol.* **85**: 357–361.
3. Ann W. Hsing, Frank Z. Stanczyk, Alain Be' langer, Paul Schroeder,4 Lilly Chang, Roni T. Falk, and Thomas R. Fears. 2007. Reproducibility of Serum Sex Steroid Assays in Men by RIA and Mass Spectrometry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **16**: 1004–1008.
4. Atanassova N, McKinnell C, Williams K, Turner KJ, Fisher JS, Saunders PT, Millar MR, Sharpe RM. 2001. Age-, cell- and region-specific immunexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology.* **142**: 874–886.
5. Badrinarayanan R, Rengarajan S, Nithya P, Balasubramanian K. 2006. Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3 beta- and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochem Cell Biol.* **84**: 745–754.
6. Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, f or the nervous system. *Recent Prog. Horm. Res.* **52**:1-32.
7. Baulieu, E. E. & Robel, P. 1998. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 4089–4091.

8. Boujrad N, Vidic B, Gazouli M, Culty M, Papadopoulos V. 2000. The peroxisome proliferator perfluorodecanoic acid inhibits the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) expression and hormone-stimulated mitochondrial cholesterol transport and steroid formation in Leydig cells. *Endocrinology*. **141**: 3137–3148.
9. Chen Y, Wang Q, Wang FF, Gao HB, Zhang P. 2012. Stress induces glucocorticoid-mediated apoptosis of rat Leydig cells in vivo. *Stress*. **5**: 74–84.
10. C. Petucci, Lloyd T, Harris HA, Zhang X, Chennathukuzhi VM, Mekonnen B, Cai Y. 2010. Trace LC-MS/MS quantitation of 17 β -estradiol as a biomarker for selective estrogen receptor modulator activity in the rat brain. *j.mass.spectrom*. **45**: 65–67.
11. Christian LM, Graham JE, Padgett DA, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. 2006. Stress and Wound Healing. *Neuroimmunomodulation*. **13**: 337–346.
12. Clark CJ, Fraser R, Gómez-Sánchez CE, Connell JM, Davies E. 2000. Expression of 11 β -hydroxylase and aldosterone synthase genes in the rat brain. *J. Mol. Endocrinol*. **24**: 321–328.
13. Clow A, Thorn L, Evans P, Hucklebridge F. 2004. The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress*. **7**: 29–37.
14. Compagnone NA, Mellon SH. 2000. Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*. **21**: 1–56.
15. Contreras LN, Masini AM, Danna MM, Kral M, Bruno OD, Rossi MA, Andrada JA. 1996. Glucocorticoids: their role on gonadal function and LH secretion. *Minerva Endocrinol*. **21**: 43–46.
16. Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J. and Baulieu, E. E. 1981. Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**: 4704–4707.

17. Corpéchet, C., Synguelakis, M., Talha, S., Axelson, M., Sjövall, J., Vihko, R., Baulieu, E. E. and Robel, P. 1983. Pregnenolone and its sulfate ester in the rat brain. *Brain Res.* **270**: 119–125.
18. Croft AP, O'Callaghan MJ, Shaw SG, Connolly G, Jacquot C, Little HJ. 2008. Effects of minor laboratory procedures, adrenalectomy, social defeat or acute alcohol on regional brain concentrations of corticosterone. *Brain Res.* **1238**: 12–22.
19. Daidoji T, Inoue H, Kato S, Yokota H. 2003. Glucuronidation and excretion of nonylphenol in perfused rat liver. *Drug Metab. Dispos.* **31**: 993–998.
20. Dean, R. T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M. J. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* **324**: 1–18.
21. Delbès, G., Levacher, C., Duquenne, C., Racine, C., Pakarinen, P., Habert, R. 2005. Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology.* **146**: 2454–2461.
22. F.Buiarellia, F.Cocciolia, M.Merollea, B.Nerib and A.Terracciano. 2004. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification of natural androgen steroids and their conjugates in urine samples. *Analytica. Chimica. Acta.* **526**: 113–120.
23. Faupel–badger JM, Fuhrman BJ, Xu X, Falk RT, Keefer LK, Veenstra TD, Hoover RN, Ziegler RG. 2010. Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens. *Cancer Epidemiol Biomarkers prev.* **19**: 292–300.
24. FDA Draft Guidance. 2001. Bioanalytical methods validation for human studies.
25. Fleseriu M, Petersenn S. 2012. Medical management of Cushing's disease. *Pituitary.* **15**: 330–341.

26. Gao HB, Tong MH, Hu YQ, Guo QS, Ge R, Hardy MP. 2002. Glucocorticoid induces apoptosis in rat leydig cells. *Endocrinology*. **143**: 130–138.
27. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. 2005. Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol. Cell. Endocrinol.* **243**: 35–42.
28. Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S. 2004. Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet.* **7**: 34–39.
29. Gomes LG, Huang N, Agrawal V, Mendonça BB, Bachega TA, Miller WL. 2009. Extraadrenal 21-hydroxylation by CYP2C19 and CYP3A4: effect on 21-hydroxylase deficiency. *J. Clin. Endocrinol Metab.* **94**: 89–95.
30. Gomez-Sanchez EP, Ahmad N, Romero DG, Gomez-Sanchez CE. 2005. Is aldosterone synthesized within the rat brain? *Am J. Physiol. Endocrinol Metab.* **288**: E342–346.
31. Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. 2011. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J. Endocrinol.* **209**: 153–167.
32. Guan F, Uboh CE, Soma LR, Luo Y, Rudy J, Tobin T. 2005. Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt Technol. Biomed. Life Sci.* **829**: 56–68.
33. Haake-McMillan JM, Safe SH. 1991. Neonatal exposure to Aroclor 1254: effects on adult hepatic testosterone hydroxylase activities. *Xenobiotica.* **21**: 481–489.
34. Haavisto, T. E., Adamsson, N. A., Myllymäki, S. A., Toppari, J., Paranko, J. 2003.

- Effects of 4-tert-octylphenol, 4-tert-butylphenol, and diethylstilbestrol on prenatal testosterone surge in the rat. *Reprod. Toxicol.* **17**: 593–605.
35. Haavisto, T., Nurmela, K., Pohjanvirta, R., Huuskonen, H., El-Gehani, F., Paranko, J. 2001. Prenatal testosterone and luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol. Cell. Endocrinol.* **178**: 169–179.
36. Hardy MP, Gao HB, Dong Q, Ge R, Wang Q, Chai WR, Feng X, Sottas C. 2005. Stress hormone and male reproductive function. *Tissue Res.* **322**: 147–153.
37. Hauet T, Yao ZX, Bose HS, Wall CT, Han Z, Li W, Hales DB, Miller WL, Culty M, Papadopoulos V. 2005. Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. *Mol. Endocrinol.* **19**: 540–554.
38. Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS. 1988. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology.* **122**: 1426–1436.
39. Higashi.T, Nishio.T, Uchida,S, Shimada.K, Fukushi.M, Maeda.M. 2008. Simultaneous determination of 17 α -hydroxypregnenolone and 17 α -hydroxyl-progesterone in dried blood spots from low birth weight infants using LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **48**: 177–182.
40. Higashi.T,Ninomiya.Y,Shimada.K. 2008. Studies on neurosteroids: XX. Liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in rat brain and serum. *J. Chromatogr. Sci.* **46**: 653–658.

41. Higo S, Hojo Y, Ishii H, Komatsuzaki Y, Ooishi Y, Murakami G, Mukai H, Yamazaki T, Nakahara D, Barron A, Kimoto T, Kawato S. 2011. Endogenous Synthesis of Corticosteroids in the Hippocampus. *PLoS One*. **6**: e21631.
42. Hillered, L., Ernster, L. 1983. Respiratory activity of isolated rat brain mitochondria following in vitro exposure to oxygen radicals. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **3**: 207–214.
43. Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T., Mukai, H., Morrison, J. H., Janssen, W. G., Kominami, S., Harada, N., Kimoto, T. and Kawato, S. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **101**: 865–870.
44. Ikeda, Y., Tanaka, H., Esaki, M. 2008. Effects of gestational diethylstilbestrol treatment on male and female gonads during early embryonic development. *Endocrinology*. **149**: 3970–3979.
45. Kallonen, S. E., Tammimäki, A., Piepponen, P., Raattamaa, H., Ketola, R. A. and Kostianen, R. 2009 Discovery of neurosteroid glucuronides in mouse brain. *Anal. Chim. Acta*. **651**: 69–74.
46. Karina Del Punta, Eduardo H. Charreau, and Omar P. Pignataro. 1996. Nitric Oxide Inhibits Leydig Cell Steroidogenesis. *Endocrinology*. **137**: 5337–5343.
47. Kavitha TS, Parthasarathy C, Sivakumar R, Badrinarayanan R, Balasubramanian K. 2006. Effects of excess corticosterone on NADPH generating enzymes and glucose oxidation in Leydig cells of adult rats. *Hum. Exp. Toxicol.* **25**: 119–125.
48. Kawakami, J., Cowan, J. E., Elkin, E. P., Latini, D. M., DuChane, J., Carroll, P. R. 2006. Androgen-deprivation therapy as primary treatment for localized prostate cancer: data from Cancer of the Prostate Strategic Urologic Research Endeavor

- (CaPSURE). *Cancer*. **106**: 1708–1714.
49. Kawato S, Hojo Y, Kimoto T. 2002. Histological and metabolism analysis of P450 expression in the brain. *Methods Enzymol.* **357**: 241–249.
50. Kawato S, Yamada M, Kimoto T. 2003. Brain neurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: cell biophysical analysis of steroid signal transduction. *Adv. Biophys.* **37**: 1–48.
51. Kimoto T, Tsurugizawa T, Ohta Y, Makino J, Tamura Ho, Hojo Y, Takata N, Kawato S. 2001. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology*. **42**: 3578–3589.
52. Kobayashi, T., Shirai, M., Sakaue, M., Murakami, M., Ochiai, H., Arishima, K., Yamamoto, M. 2009. Effects of Maternal Exposure to Low Doses of DES on Testicular Steroidogenesis and Spermatogenesis in Male Rat Offspring. *J. Reprod. Dev.* **55**: 629–637.
53. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. 2011. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr* **25**: 199–217.
54. Kretz, O., Fester, L., Wehrenberg, U., Zhou, L., Brauckmann, S., Zhao, S., Prange-Kiel, J., Naumann, T., Jarry, H., Frotscher, M. and Rune, G. M. 2004. Hippocampal synapses depend on hippocampal estrogen synthesis. *J. Neuro. Sci.* **24**: 5913–5921.
55. Kumar V, Nakada N, Yasojima M, Yamashita N, Johnson AC, Tanaka H. 2009. Rapid determination of free and conjugated estrogen in different water matrices by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere.* **77**: 1440–1446.

56. Kwan TK, Trafford DJ, Makin HL, Mallet AI, Gower DB. 1992. GC-MS studies of 16-androstenes and other C19 steroids in human semen. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **43**: 549–556.
57. Lai KP, Wong MH, Wong CK. 2005. Inhibition of CYP450_{scc} expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. *J. Endocrinol.* **185**: 519–527.
58. Le Goascogne C, Sananès N, Gouézou M, Takemori S, Kominami S, Baulieu EE, Robel P. 1991. Immunoreactive cytochrome P-450(17 alpha) in rat and guinea-pig gonads, adrenal glands and brain. *J. Reprod. Fertil.* **93**: 609–622.
59. Li, Y., Okumura, K., Nomura, S., Maeda, N., Miyasho, T., Yokota, H. 2011. Oxidatively damaged proteins in the early stage of testicular toxicities in male rats by orally administered with a synthetic oestrogen, diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.* **31**: 26–34.
60. Liere, P., Pianos, A., Eychenne, B., Cambourg, A., Liu, S., Griffiths, W., Schumacher, M., Sjövall, J. and Baulieu, E. E. 2004. Novel lipoidal derivatives of pregnenolone and dehydroepiandrosterone and absence of their sulfated counterparts in rodent brain. *J. Lipid Res.* **45**: 2287–2302.
61. Lightman SL. 2008. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J. Neuroendocrinol.* **20**: 880–884.
62. Liu, S., Sjövall, J. and Griffiths, W. J. 2003. Neurosteroids in rat brain: extraction, isolation, and analysis by nanoscale liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* **75**: 5835–5846.
63. Ma, A., Yang, X., Wang, Z., Shi, D., Chen, Y. 2008. Adult exposure to diethylstilbestrol induces spermatogenic cell apoptosis in vivo through increased oxidative stress in male hamster. *Reprod. Toxicol.* **25**: 367–373.
64. MacKenzie SM, Clark CJ, Ingram MC, Lai M, Seckl J, Gomez-Sanchez CE, Fraser

- R, Connell JM, Davies E. 2000. Corticosteroid production by fetal rat hippocampal neurons. *Endocr. Res.* **26**: 531–535.
65. Maggio N, Segal M. 2010. Corticosteroid Regulation of Synaptic Plasticity in the Hippocampus. *ScientificWorldJournal.* **10**: 462–469.
66. Magiakou MA, Mastorakos G, Webster E, Chrousos GP. 1997. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **816**: 42–56.
67. Mansour, M. M., Machen, M. R., Tarleton. B. J., Wiley, A. A., Wower, J., Bartol, F. F., Goyal, H. O. 2001. Expression and molecular characterization of estrogen receptor alpha messenger RNA in male reproductive organs of adult goats. *Biol. Reprod.* **64**: 1432–1438.
68. Mathur, P. P. and D'Cruz, S. C. 2011. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian. J. Androl.* **13**: 585–591.
69. McLachlan JA, Newbold RR, Bullock BC. 1980. Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res.* **40**: 3988–3999.
70. Mellon SH, Deschepper CF. 1993. Neurosteroid biosynthesis: genes for adrenal steroidogenic enzymes are expressed in the brain. *Brain Res.* **629**: 283–292.
71. Mellon SH, Miller WL. 1989. Extraadrenal steroid 21-hydroxylation is not mediated by P450c21. *J. Clin. Invest.* **84**: 1497–1502.
72. Mensah-Nyagan AG, Do-Rego JL, Beaujean D, Luu-The V, Pelletier G, Vaudry H. 1999. Neurosteroids: expression of steroidogenic enzymes and regulation of steroid biosynthesis in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **51**: 63–81.
73. Miller WL. 1998. Early steps in androgen biosynthesis: from cholesterol to DHEA. *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab.* **12**: 67–81.

74. Miller WL. 2007. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim. Biophys. Acta.* **1771**: 663–676.
75. Ming Zhaoa, Sharyn D. Bakera, Xiaohua Yanb, Yiyu Zhaoa, William W. Wrightb, Barry R. Zirkinb, Jonathan P. Jarow. 2004. Simultaneous determination of steroid composition of human testicular fluid using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Steroids.* **69**: 721–726.
76. Monder C, Hardy MP, Blanchard RJ, Blanchard DC. 1994. Comparative aspects of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Testicular 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: development of a model for the mediation of Leydig cell function by corticosteroids. *Steroids.* **159**: 69–73.
77. Moneti G, Giovannini MG, Guarna A, Forti G, Salerno R, Magini A, Serio M. 1987. Determination of testosterone and its tissue metabolites (DHT and 3 alpha-diol) in human plasma and prostatic tissue by isotopic dilution mass spectrometry. *J. Steroid Biochem.* **27**: 53–59.
78. Moore RW, Potter CL, Theobald HM, Robinson JA, Peterson RE. 1985. Androgenic deficiency in male rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **79**: 99–111.
79. Mueller M, Atanasov A, Cima I, Corazza N, Schoonjans K, Brunner T. 2007. Differential regulation of glucocorticoid synthesis in murine intestinal epithelial versus adrenocortical cell lines. *Endocrinology.* **148**: 1445–1453.
80. Nadal, A., Ropero, A. B., Laribi, O., Maillet, M., Fuentes, E. and Soria, B. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**: 11603–11608.
81. Nagai, A., Ikeda, Y., Aso, T., Eto, K., Ikeda, M. A. 2003. Exposure of neonatal rats

- to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *J. Med. Dent. Sci.* **50**: 35–40.
82. National Research Council. 2000. Reproductive effects caused by diethylstilbestrol. In Knobil E ed. Hormonally active agents in the environment. *Washington DC:National Academy Press.* 399–406.
83. Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN. 2009. Environmental estrogens and obesity. *Mol. Cell Endocrinol.* **304**: 84–89.
84. Nishikawa.M, Iwano.H, Yanagisawa R, Koike.N, Inoue.H, Yokota.H. 2010. Placental Transfer of Conjugated Bisphenol A and Subsequent Reactivation in the Rat Fetus. *Environ. Health Perspect.* **118**:1196–1203.
85. Nokelainen P, Puranen T, Peltoketo H, Orava M, Vihko P, Vihko R. 1996. Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **236**:482–490.
86. Norin KE, Persson AK, Saxerholt H, Midtvedt T. 1991. Establishment of Lactobacillus and Bifidobacterium species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1850–1852.
87. Ojanperä, S., Pelander, A., Pelzing, M., Krebs, I., Vuori, E. and Ojanperä, I. 2006. Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/ time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**: 1161–1167.
88. Oscar J. Pozo, Koen Deventer, Peter Van Eenoo, and Frans T. Delbeke. 2008. Efficient Approach for the Comprehensive Detection of Unknown Anabolic Steroids and Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry. *Anal.Chem.* **80**:

1709–1720.

89. Palermo R. 2007. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod. Biomed. Online*. **15**: 326–337.
90. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M. 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**: 402–409.
91. Parthasarathy C, Balasubramanian K. 2008. Effects of corticosterone deficiency and its replacement on Leydig cell steroidogenesis. *J. Cell Biochem.* **104**: 1671–1683.
92. Parthasarathy C, Yuvaraj S, Ilangovan R, Janani P, Kanagaraj P, Balaganesh M, Natarajan B, Sittadjody S, Balasubramanian K. 2009. Differential response of Leydig cells in expressing 11 beta-HSD type 1 and cytochrome P450 aromatase in male rats subjected to corticosterone deficiency. *Mol. Cell Endocrinol.* **311**: 18–23.
93. Payne AH, Hales DB. 2004. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* **25**: 947–970.
94. Poletini, A., Gottardo, R., Pascali, J. P. and Tagliaro, F. 2008. Implementation and performance evaluation of a database of chemical formulas for the screening of pharmaco/ toxicologically relevant compounds in biological samples using electrospray ionization–time–of–flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**: 3050–3057.
95. Qiu, C. H., Ohe, M., Koibuchi, N., Matsuzaki, S. 2004. Apoptosis in the epididymal epithelium of adult male golden hamster exposed to diethylstilbestrol. *J. Histochem. Cytochem.* **52**: 187–192.

96. Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. 2010. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. **24**: 3103–3108.
97. Sakaue M, Ishimura R, Kurosawa S, Fukuzawa NH, Kurohmaru M, Hayashi Y, Tohyama C, Ohsako S. 2001. Administration of estradiol-3-benzoate down-regulates the expression of testicular steroidogenic enzyme genes for testosterone production in the adult rat. *J. Vet. Med. Science*. **64**: 107–113.
98. Scheuer DA. 2010. Regulation of the stress response in rats by central actions of glucocorticoids. *Exp. Physiol*. **95**: 26–31.
99. Schmidt KL, Malisch JL, Breuner CW, Soma KK. 2010. Corticosterone and cortisol binding sites in plasma, immune organs and brain of developing zebra finches: intracellular and intracellular and membrane-associated receptors. *Brain Behav. Immun*. **24**: 908–918.
100. Seckl JR. 1997. 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase in the brain: a novel regulator of glucocorticoid action? *Front Neuroendocrinol*. **18**: 49–99.
101. Sher L. 2006. Combined dexamethasone suppression-corticotropin-releasing hormone stimulation test in studies of depression, alcoholism, and suicidal behavior. *ScientificWorldJournal*. **6**: 1398–1404.
102. Shih, M. C., Chiu, Y. N., Hu, M. C., Guo, I. C. and Chung, B. C. 2011. Regulation of steroid production: analysis of Cyp11a1 promoter. *Mol. Cell Endocrinol*. **336**: 80–84.
103. Shimada.M, Yoshinari.K, Tanabe.E, Shimakawa.E, Kobashi.M, Nagata.K,

- Yamazoe Y. 2001. Identification of ST2A1 as a rat brain neurosteroid sulfotransferase mRNA. *Brain Research*. **920**: 222–225.
104. Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. 2002. Aromatase—a brief overview. *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 93–127.
105. Simpson ER, Waterman MR. 1983. Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61**: 692–707.
106. Singh RJ. 2008. Validation of a high throughput method for serum/plasma testosterone using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Steroids*. **73**: 1339–1344.
107. Siu, E. R., Mruk, D. D., Porto, C. S. and Cheng, C. Y. 2009. Cadmium-induced testicular injury. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **238**: 240–249.
108. Slaunwhite WR Jr, Sandberg AA. 1959. Transcortin: a corticosteroid-binding protein of plasma. *J. Clin. Invest.* **38**: 384–391.
109. Stüber, M. and Reemtsma, T. 2004. Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**: 910–916.
110. Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. 2011. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**: E11–24.
111. Tiia Kuuranne, Mikko Vahermo, Antti Leinonen, Risto Kostianen. 2000. Electrospray and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometric Behavior of Eight Anabolic Steroid Glucuronides. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **11**: 722–730.
112. Turgeon, J. L., Carr, M. C., Maki, P. M., Mendelsohn, M. E. and Wise, P. M. 2006. Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and

- brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr. Rev.* **27**: 575–605.
113. Turpeinen U, Linko S, Itkonen O, Hämäläinen E. 2008. Determination of testosterone in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **68**: 50–57.
114. van Poppel H, Nilsson S. 2008. Testosterone surge: rationale for gonadotropin–releasing hormone blockers? *Urology.* **71**: 1001–1006.
115. Wada, A. and Waterman, M. R. 1992. Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding. *J. Biol. Chem.* **267**: 22877–22882.
116. Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* **108**: 769–776.
117. Wang GM, Ge RS, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. 2002. Expression of 11beta-hydroxylase in rat Leydig cells. *Endocrinology.* **143**: 621–626.
118. Warita, K., Mitsuhashi, T., Sugawara, T., Tabuchi, Y., Tanida, T., Wang, Z. Y., Matsumoto, Y., Yokoyama, T., Kitagawa, H., Miki, T., Takeuchi, Y., Hoshi, N. 2010. Direct effects of diethylstilbestrol on the gene expression of the cholesterol side–chain cleavage enzyme (P450scc) in testicular Leydig cells. *Life Sci.* **87**: 281–285.
119. Wong, E. W. and Cheng, C. Y. 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* **32**: 290–299.
120. Wood, C. E. 2011. Fetal hypothalamus-pituitary-adrenal responses to estradiol sulfate. *Endocrinology.* **152**: 4966–4973.
121. Wu Y, Yang J, Ding L, Xu G, Qian Yun C, He J. 2009. Identification of the metabolites of ecabet bismuth in rat bile by liquid

- chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester,Eng)*. **15**: 531–539.
122. Yamamoto M, Shirai M, Sugita K, Nagai N, Miura Y, Mogi R, Yamamoto K, Tamura A, and Arishima K. 2003. Effect of maternal exposure to Diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. *The Journal of Toxicological Sciences*. **28**: 385–394.
123. Yamashita K, Miyashiro Y, Maekubo H, Okuyama M, Honma S, Takahashi M, Numazawa M. 2009. Development of highly sensitive quantification method for testosterone and dihydrotestosterone in human serum and prostate tissue by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *steroids*. **74**: 920–926.
124. Yan Weng, Fang Xie a, Li Xua, Dmitri Zagorevski, David C. Spink, Xinxin Ding. 2010. Analysis of testosterone and dihydrotestosterone in mouse tissues by liquid chromatography–electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem*. **402**: 121–128
125. Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J*. **340**: 405–409.
126. Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, Li C, Okamura A, Miyata M, Ueyama J, Lee CH, Kamijima M, Nakajima T. 2007. Permethrin may disrupt testosterone biosynthesis via mitochondrial membrane damage of Leydig cells in adult male mouse. *Endocrinology*. **148**: 3941–3949.
127. Zwain IH, Yen SS. 1999. Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism

in the brain. *Endocrinology*. **140**: 880–887.

128. Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. **140**: 3843–3852.