

〔原著〕 ウシ副腎皮質のアラキドン酸リポキシゲナーゼ 代謝産物のステロイド合成調節機構 における役割

大 村 昌 夫*

(平成4年5月29日受付, 平成4年7月2日受理)

要 旨

近年, 内因性生理活性物質として注目されているアラキドン酸リポキシゲナーゼ代謝産物のウシ副腎皮質束状層細胞での役割について検討を行った。ウシ副腎皮質束状層細胞とアラキドン酸を反応させ, アラキドン酸代謝産物を液体高速クロマトグラフィー (HPLC) で分離精製し, ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) を行ったところ, 5-, および 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid, leukotriene B₄, 11, 14, 15-trihydroxyeicosatrienoic acid がアラキドン酸より生成されることから, ウシ副腎皮質束状層細胞に5-, および15-リポキシゲナーゼ代謝経路の存在することが判明した。つぎにこれらのリポキシゲナーゼ代謝産物がステロイド産生にどの様に関与するかについて, リポキシゲナーゼ阻害剤である nordihydroguaiaretic acid (NDGA) とTZI-41127を用いて ACTH刺激下でのステロイド産生を検討した。これら阻害剤は直接マイクロゾームの21-ヒドロキシラーゼ活性に影響を与えないが, 遊離細胞系で21-ヒドロキシラーゼが関与する17 α -ヒドロキシprogesteroneから11-デオキシcortisolへの変換を抑制することから, アラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物が21-ヒドロキシラーゼ活性の新たな調節因子として作用する可能性が考えられ, 副腎皮質ステロイド産生機構でのアラキドン酸代謝産物の関与をはじめて明らかにした。

Key words: アラキドン酸, リポキシゲナーゼ代謝産物, 副腎皮質細胞, ステロイド合成

略語一覧: HETE; hydroxyeicosatetraenoic acid, ACTH: adrenocorticotrophic hormone,

HPLC: high performance liquid chromatography

I. はじめに

多価不飽和脂肪酸の一種であるアラキドン酸 (AA) はサイクロオキシゲナーゼ (CO) 経路, リポキシゲナーゼ (LO) 経路およびエポキシゲナーゼ (EO) 経路によりそれぞれ代謝され, 種々の生理活性物質を生ずることがよく知られている。これら一連のアラキドン酸代謝産物はエイコサノイドとも呼ばれ, 種々の細胞機能に密接に関わっていることが明らかにされつつある。アラキドン酸代謝産物のうち特に LO 代謝産物は各種の内分

泌細胞においてホルモンの合成, 分泌等の多彩な生理活性をもつことが明らかにされ, 細胞内情報伝達物質の1つとして注目されている¹⁻⁷⁾。平井らはラット副腎皮質細胞に AA の5-LO 代謝経路が存在し, このうち5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) が ACTH によるcortisol産生に重要な働きをしていることを報告している⁸⁾。一方, ラットはヒトなどの霊長類と異なりcortisol産生動物 (B動物) であり, ヒトなどのcortisol産生動物 (F動物) とはステロイドホルモン産生機構に差異があり, 当然のこ

* 千葉大学医学部内科学第二講座

Masao OMURA: The Role of Lipoyxygenase Metabolites of Arachidonic Acid on ACTH-stimulated Steroidogenesis in Bovine Adrenocortical Cells.

The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 260.

Received May 29, 1992, Accepted July 2, 1992.

とながらその調節機構も異なると考えられている。そこで私は副腎ステロイド産生機構の検討に広く用いられ、またヒトと同様にコルチゾールを産生するウシ副腎をもちいて、ウシ副腎にはどのようなアラキドン酸の LO 系代謝産物が存在するのか、さらには副腎皮質ステロイド産生機構にどのように関わっているかについて検討を行ったので報告する。

II. 材料および方法

1. 試薬

[14 C] アラキドン酸 (AA) および [3 H] 17 α -ヒドロキシprogesterone は New England Nuclear 社 (米国) より購入した。非放射性の AA はクリタ工業より購入した。5-HPETE はジャガイモの5-リポキシゲナーゼ (5-LO) を用いて清水らの方法により調製した⁹⁾。Leukotriene B₄ (LTB₄) は小野薬品工業の宮本積博士より提供をうけ、LTB₄の特異的抗体は Wellcome Research Laboratory (英国) の JA. Salmon 博士より提供をうけた。リポキシゲナーゼ阻害剤である TZI-41127 は帝国臓器製薬より提供をうけた。Nordihydroguaiaretic acid (NDGA), コラゲナーゼタイプ I, デオキシリボスクレアーゼタイプ I, ウシ血清アルブミン (BSA), N-methyl-N-nitrosoguanidine, soybean lipoxygenase, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form (NADPH) は Sigma 社 (米国) より購入した。3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) は Aldrich 社 (米国) より購入した。N, O-Bis (trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にもちいる各種溶媒は和光純薬より購入した。合成 ACTH は第一製薬より、またアンギオテンシン II は蛋白研究所より購入した。トロンボキサン B₂, プロスタグランジン E₂ は Cayman Chemicals 社 (米国) より、パーコールは Pharmacia 社 (瑞典) より購入した。コルチゾール, アルドステロン, progesterone, 17 α -ヒドロキシprogesterone, 11-デオキシコルチゾールおよび cAMP は市販の RIA キットを用いて測定した。[14 C] 15-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE) は大豆リポキシゲナーゼをもちいて生合成し¹⁰⁾, 11, 14, 15-trihydroxyeicosa-5, 8, 12-trienoic acid (11, 14, 15-THET) は Weiss らの方法¹¹⁾でラットの肝臓をもちいて生合成した。

2. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞の調製

雌のホルスタイン種ウシの副腎を屠場から入手し、屠殺後30分以内に細胞の調製を開始した。副腎髄質を除去した後、スライサーを用いて副腎皮質束状層を分離採取

し、コラゲナーゼタイプ I 0.5%, デオキシリボスクレアーゼタイプ I 0.05mg/ml を含む Eagle's minimal essential medium 中で 5% CO₂, 95% O₂の混合ガス下 37°C で 20 分間酵素処理を行った。さらに 0%, 40%, 64%のパーコール溶液の非連続勾配遠心法を用いて細胞を分離精製し、0.2%グルコース, 0.1% BSA を含む Krebs-Ringer-bicarbonate (KRBGA) buffer に浮遊し、遊離ウシ副腎皮質束状層細胞浮遊液とした。以上の方法で作成した遊離ウシ副腎皮質束状層細胞の純度は光顕上 95%以上であった。さらにこれらの細胞のステロイド産生能について特異抗体を用いたラジオイムノアッセイで検討したところ、ACTH およびアンギオテンシン II の刺激により濃度依存性にコルチゾール及び 17 α -ヒドロキシprogesterone の産生増加が認められたが、アルドステロン産生は測定感度以下であったことより、本法で調製した束状層細胞浮遊液中には球状層細胞の混入がないことは明らかである。

3. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾーム分画の調製

前述の方法にて副腎皮質束状層を分離採取し、0.5% sucrose, 0.1mM EDTA を含む 10mM Tris, HCl buffer 中でホモジナイズし、既報¹²⁾のごとく超遠心法にて得られた 105,000 $\times$ G の沈渣をマイクロゾーム分画とした。

4. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞のステロイドおよび cAMP 産生能の検討

遊離ウシ副腎皮質束状層細胞液 (2 $\times$ 10⁶細胞/ml) を 5% CO₂, 95% 空気中で各種 LO 阻害剤とともに 15 分間プレインキュベーションした後、ACTH を添加し 60 分間反応を行い、上清中のコルチゾール, アルドステロン, 11-デオキシコルチゾール, 17 α -ヒドロキシprogesterone, progesterone をラジオイムノアッセイで測定した。また cAMP の測定においては、1mM の IBMX を含む KRBGA に浮遊した副腎皮質束状層細胞を 15 分間プレインキュベーションした後、ACTH を添加し 30 分間反応を行い、超音波処理で細胞を破碎後、溶液中の cAMP をラジオイムノアッセイで測定した。

5. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞でのアラキドン酸の代謝

遊離ウシ副腎皮質束状層細胞 (5 $\times$ 10⁶細胞/400ml) に [14 C] アラキドン酸 (40 μ Ci, 20 μ mol) を添加し、5% CO₂, 95% 空気中で 15 分間インキュベーションした後、メタノールを加えて反応を停止し、Analytichem International 社 (米国) 製 octadecyl (ODS) ミニカラムにてアラキドン酸代謝産物を抽出した。

6. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾーム分画での [^{14}C] 15-HPETE の代謝

遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾーム分画に [^{14}C] 15-HPETE (0.5 μCi , 200nmol) を添加し25°C で30分間反応させた後にメタノールを加えて反応を停止し, [^{14}C] 15-HPETE の代謝産物を上記の方法にて抽出した。ケトコナゾールを用いる実験では, 各濃度のケトコナゾールで10分間前処置を行った後に [^{14}C] 15-HPETE を添加した。

7. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞でのアラキドン酸代謝産物の同定

抽出したアラキドン酸代謝産物は, さらに野村化学株式会社製の ODS カラム (Develosil, 5 μM , 4.6mm $\times$ 150mm) を装着した日本分光工業株式会社製 Tri roter V型高速液体クロマトグラム装置を用い30°C の定温下で分離精製を行い, 溶出液中の紫外吸収を日本分光株式会社製 MULTI-320 Multi-channel UV detector を用いて分析した。各種 HETE の分離精製に用いた移動相 (1) は, アセトニトリル/メタノール/水/酢酸, 18:58:24:0.01であり, 15-HETE, 11-HETE, 12+8-HETE, 9-HETE そして5-HETE の溶出時間は各々11.5分, 12.4, 13.3, 14.8, 15.5分であった。LTB₄ の分離精製に用いた移動相 (2) は, アセトニトリル/メタノール/水/酢酸, 31:31:38:0.01であり, LTB₄ の溶出時間は14.5分であった。11, 14, 15-THET の分離精製に用いた移動相 (3) は, アセトニトリル/メタノール/水/酢酸, 27.5:27.5:45:0.01であり, 11, 14, 15-THET の溶出時間は12.7分であった。逆相 HPLC で分離精製を行った15-HETE, 5-HETE および11, 14, 15-THET はさらに野村化学株式会社製のシリカカラム (Develosil, 5 μM , 4.2mm $\times$ 250mm) を装着した順相 HPLC を用いて精製を行った。15-HETE と5-HETE の精製に使用した移動相 (4) は, n-ヘキサン/イソプロピルアルコール/酢酸, 98.5:1.5:0.05であり, 15-HETE と5-HETE の溶出時間は各々9分, 32分であった。LTB₄ のメチルエステルの精製に使用した移動相 (5) は, n-ヘキサン/イソプロピルアルコール/酢酸, 87:13:0.01であり, 溶出時間は9.8分であった。11, 14, 15-THET のメチルエステルの精製に使用した移動相 (6) は, イソオクタン/酢酸エチル/エタノール/酢酸, 75:20:5:1であり, 溶出時間は15.5分であった。

8. ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)

HPLC で分離精製を行った15-HETE, 5-HETE, 11, 14, 15-THET のメチルエステル化合物をさらにトリメ

チルシリル化した後, その構造を1.5% OV101カラムを装着した Hitachi M-80 GC/MS を用いて分析した。カラムの温度条件は, 200°C を6分間維持した後, 1分間に5°C ずつ温度を上昇させ250°C で維持した。電子衝撃は70eV で行った。

9. ラジオイムノアッセイによる LTB₄ の測定

アラキドン酸 (2 μmol) と遊離ウシ副腎皮質束状層細胞 (2.5 $\times 10^6$ 細胞/ml) を37°C, 15分間反応させた。抽出したアラキドン酸代謝産物を移動相 (2) を用いて HPLC で分離し10秒ごとに溶出液を分取し, その各々の分画中の LTB₄ の免疫活性を Salmon の方法¹³⁾を用いてラジオイムノアッセイで測定した。

10. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞での5-, および15-HETE の測定

遊離ウシ副腎皮質束状層細胞 (1.0 $\times 10^6$ 細胞/ml) を5% CO₂, 95%空気中で各種濃度の LO 阻害剤とともに15分間プレインキュベーションした後, [^{14}C] アラキドン酸を添加し15分間インキュベーションした。メタノールを加えて, 反応を停止し Analytichem International 社製 octadecyl: (ODS) ミニカラムにてアラキドン酸代謝産物を抽出した。さらに野村化学株式会社製の ODS カラムを装着した日本分光工業株式会社製 Tri roter V 型高速液体クロマトグラム装置で移動相 (1) を用い, 30°C の定温下で分離を行い, 溶出液中の放射活性を Beckman 171 radioisotope detector で測定し, 各ピークの放射活性と全放射活性の比を算出し, アラキドン酸代謝産物への変換率とした。

11. ウシ副腎皮質束状層細胞 マイクロゾーム 分画の 21-ハイドロキシラーゼ活性

前述の方法にて調製したウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾーム分画を4.4 $\times 10^{-4}\text{M}$ の NADPH を含む0.2M リン酸緩衝液に浮遊し (蛋白量0.4mg/ml) 各種濃度の NDGA あるいは TZI-41127で5分間前処置したのち [^3H] 17 α -ハイドロキシプロゲステロン (25nmol 0.1 μCi) と4分間反応させ塩化メチレンを加えて反応を停止した。塩化メチレンでステロイドを抽出し, クロロホルム:酢酸エチル (80:20, v/v) の溶媒を用いた薄層クロマトグラフィーで分離し, 11-デオキシコルチゾール分画の放射活性と全放射活性を測定し 17 α -ハイドロキシプロゲステロンから11-デオキシコルチゾールへの変換率をもとめ, 21-ハイドロキシラーゼ活性とした。

III. 結 果

1. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞における [^{14}C] アラキドン酸の代謝

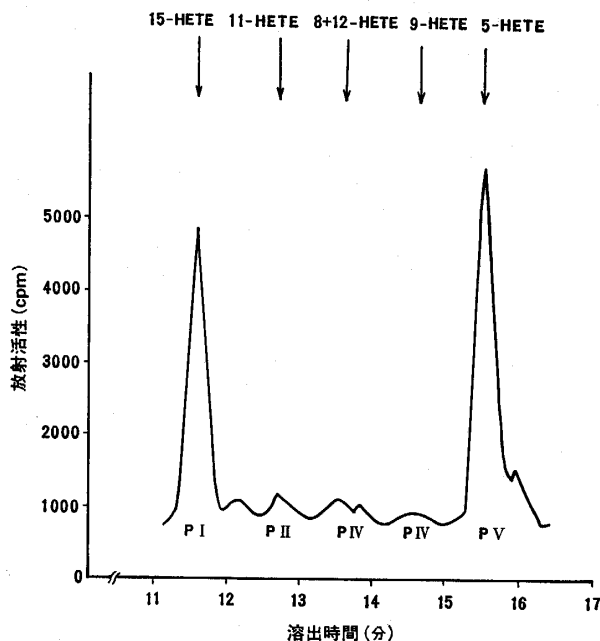


図 1. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞で $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸より生成されたリポキシゲナーゼ代謝産物のラジオクロマトグラム

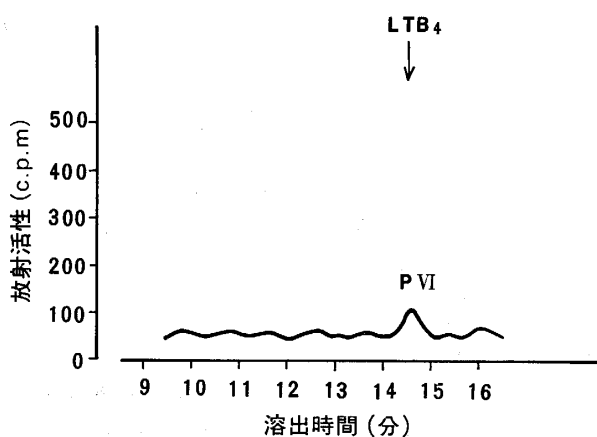


図 2. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞で生成されたアラキドン酸代謝産物のラジオクロマトグラム

移動相 (1) を用いた HPLC 分析では図 1 に示すような 2 つの大きな放射活性ピーク I, V と 3 つの小さな放射活性ピーク II, III, IV が認められた。ピーク I から V の溶出時間はそれぞれ標品 15-, 11-, 8+12-, 9-, そして 5-HETE の溶出時間と一致した。ピーク II, III, IV は煮沸した細胞と $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を反応させたときのピークの大きさと大差がないため、ピーク I と V に注目し、溶媒 (4) を用いた順相 HPLC でさらに精製し、紫外線吸収を分析した。ピーク I と V はそれぞれ標品の 15- および 5-HETE の溶出時間と一致した単一のピークを形成し、235nm に最大の紫外線吸収を示し、共役ジエン結合の存在が考えられた。

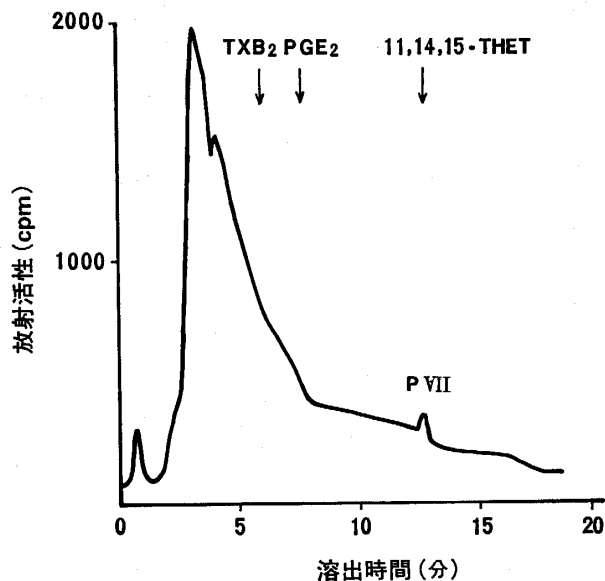


図 3. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞で生成されたアラキドン酸代謝産物のラジオクロマトグラム

移動相 (2) を用いた HPLC 分析では、図 2 に示すように小さな放射活性ピーク VI が認められ、その溶出時間は標品の LTB_4 と一致した。分取したピーク VI をメチルエステル化し移動相 (5) を用いた順相 HPLC でさらに分離精製を行ったところメチルエステル化した標品 LTB_4 の溶出時間と一致した単一の小さなピークを形成した。

移動相 (3) を用いた HPLC 分析では、図 3 に示すように小さな放射活性ピーク VII が認められ、その溶出時間は標品の 11, 14, 15-THET と一致した。分取したピーク VII をメチルエステル化し移動相 (6) を用いた順相 HPLC でさらに分離精製を行ったところメチルエステル化した標品 11, 14, 15-THET の溶出時間と一致した単一の小さなピークを形成した。

2. GC/MS 分析

ピーク I のメチルエステルをトリメチルシリル化し GC/MS を用いて分析したところ図 4-A に示すように質量数 406, 391, 335, 316, 255, 173 のプロミネントイオンが得られた。この質量スペクトラムは標品の 15-HETE の質量スペクトラムと一致したことから、ピーク I を 15-HETE と同定した。

ピーク V のメチルエステルをトリメチルシリル化し GC/MS を用いて分析したところ図 4-B に示すように質量数 406, 391, 305, 203 のプロミネントイオンが得られた。この質量スペクトラムは標品の 5-HETE の質量スペクトラムと一致したことから、ピーク V を 5-HETE と同定した。

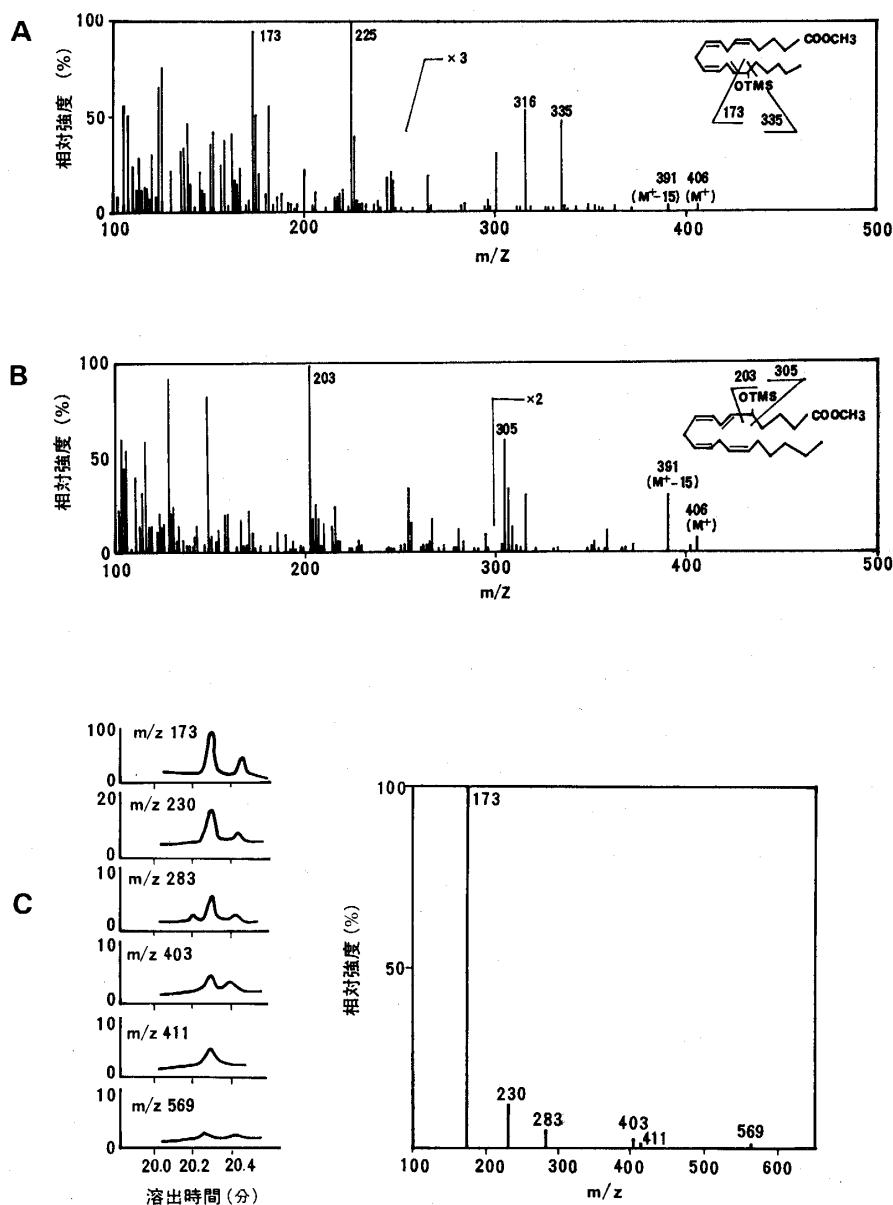


図 4. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞で生成されたアラキドン酸代謝産物の質量スペクトラム

A: ピーク I の質量スペクトラム

B: ピーク V の質量スペクトラム

C: ピーク VII の選択的イオン検出法での質量スペクトラム

ピーク VI のメチルエステルをトリメチルシリル化し GC/MS を用いて分析したがサンプル量が少なく質量スペクトラムを得ることができなかった。

ピーク VII は生成量が少ないために VII のメチルエステルをトリメチルシリル化したのち選択的イオン検出法を用いた GC/MS で分析したところ図 4-C に示すように質量数 569, 411, 403, 283, 230, 173 のプロミネントイオンがえられた。この質量スペクトラムはラット肝マイクロゾームと 15-HPETE を反応させて得られた標品の 11, 14, -THET の質量スペクトラムと一致したことから, VII

を 11, 14, 15-THET と同定した。

3. ラジオイムノアッセイによる LTB_4 の測定

移動相 (2) を用いて分離した各分画の LTB_4 の免疫活性をラジオイムノアッセイを用いて測定したところ図 5 に示すごとく大きなピークと 3 つの小さなピークが得られた。大きなピークは標品の LTB_4 の溶出時間と一致し, LTB_4 と同定された。大きなピークの前の 2 つの小さなピークの溶出時間は標品の LTB_4 の 2 つの 6-トランス異性体の溶出時間と一致し, LTB_4 の 6-トランス異性体と同定された。大きなピークの後の小さなピーク

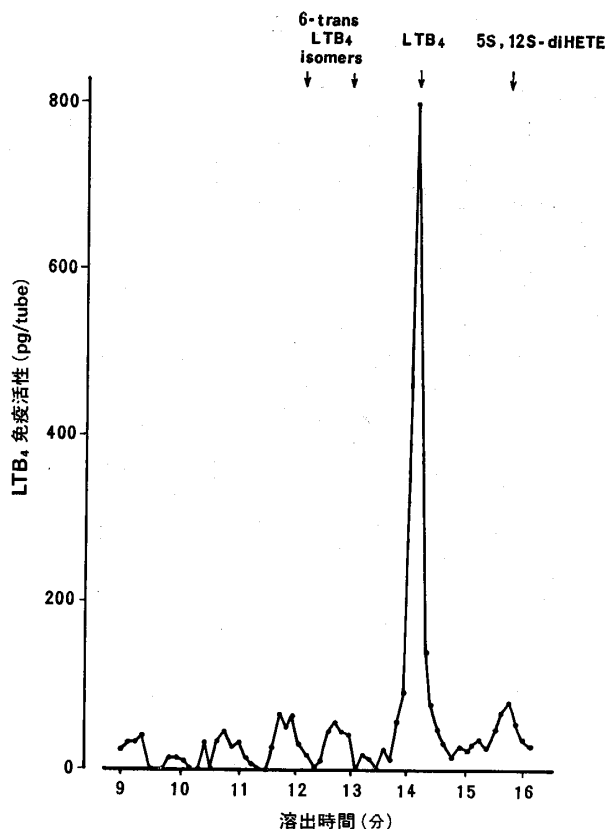


図 5. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞で生成されたアラキドン酸代謝産物の LTB_4 免疫活性の溶出パターン

の溶出時間は標品の $5s, 12s\text{-diHETE}$ の溶出時間と一致し、 $5s, 12s\text{-diHETE}$ と同定された。

4. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームでの $[^{14}\text{C}]$ 15-HPETE の代謝

移動相 (3) を用いた逆相 HPLC 分析で、図 6 に示すような 1 つの大きなピーク 1 と 2 つの小さなピーク 2 および 3 が認められ、大きなピーク 1 の溶出時間は標品 11, 14, 15-THET の溶出時間と一致した。この分画を分取しメチルエステルとした後、さらに移動相 (6) を用いた順相 HPLC で分離精製を行いトリメチルシリル化し GC/MS で分析したところ、図 7 に示すように質

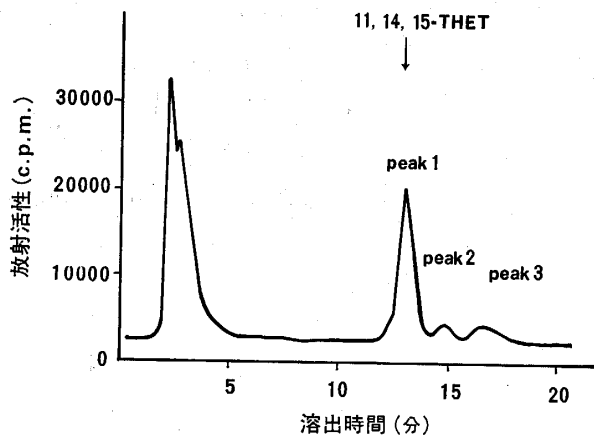


図 6. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームで生成されたアラキドン酸代謝産物のラジオクロマトグラム

量数 569, 479, 403, 283, 275, 230, 173 のプロモネン トイオンがえられ、標品 11, 14, 15-THET のマス スペクトラムと一致したためピーク 1 を 11, 14, 15-THET と同定した。

またウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームをケトコ ナゾールで前処置した後に $[^{14}\text{C}]$ 15-HPETE を添加 し反応を行い、生成された代謝産物を移動相 (3) を用 いた逆相 HPLC で分離し得られたピーク 1 の放射活 性を測定したところ、11, 14, 15-THET の生成は図 8 に示すように濃度依存性に抑制された。

5. NDGA および TZI-41127 のウシ副腎皮質束状層細胞におけるアラキドン酸代謝におよぼす効果

図 9 に示すように NDGA および TZI-41127 は濃度依 存性にウシ副腎皮質束状層細胞におけるアラキドン酸 から 5-HETE および 15-HETE の産生を有意に抑制し た。

6. NDGA および TZI-41127 のウシ副腎皮質束状層細胞における cAMP およびステロイド生成に及ぼす効果

図 10 に示すように NDGA および TZI-41127 はウシ副 腎皮質束状層細胞において濃度依存性に ACTH 刺激

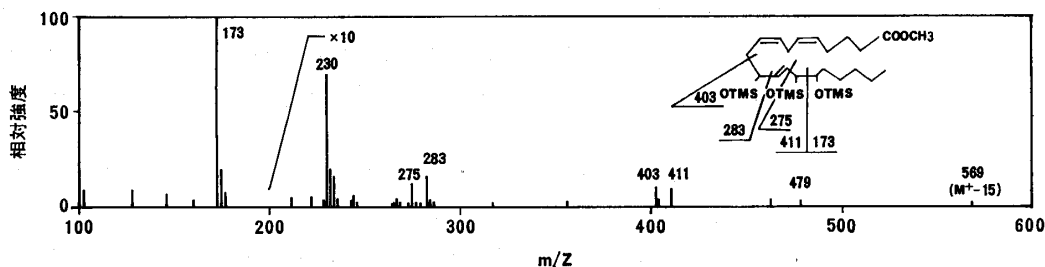


図 7. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームで生成されたアラキドン酸代謝産物ピーク 1 の質量スペクトラム

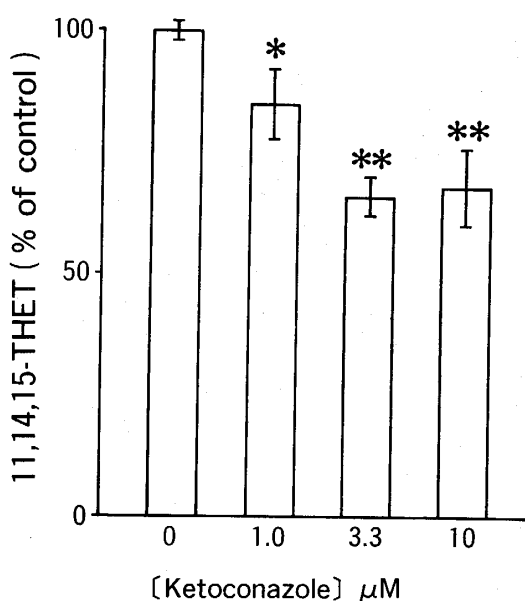


図 8. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームでの11, 14, 15-THET 生成にたいするケトコナゾールの効果
コントロールに対する比較: * $p < 0.05$
** $p < 0.01$

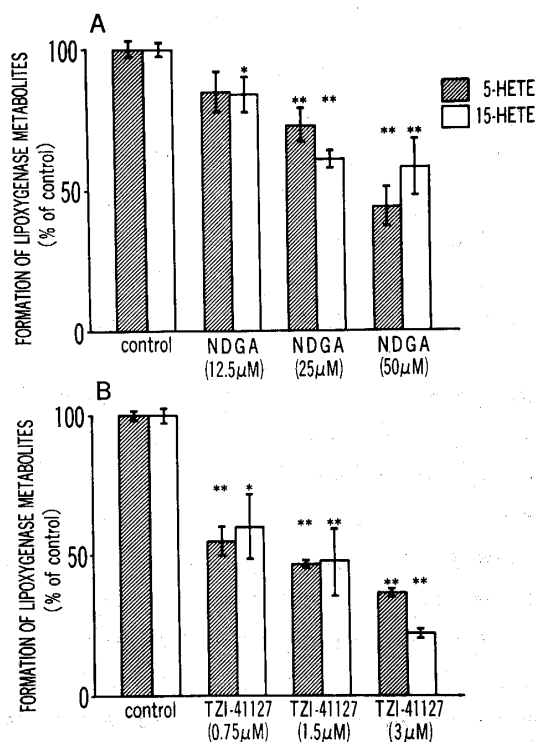


図 9. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞での5-, および15-HETE 生成に対する NDGA (A) と TZI-41127 (B) の効果
コントロールに対する比較: * $p < 0.05$
** $p < 0.01$

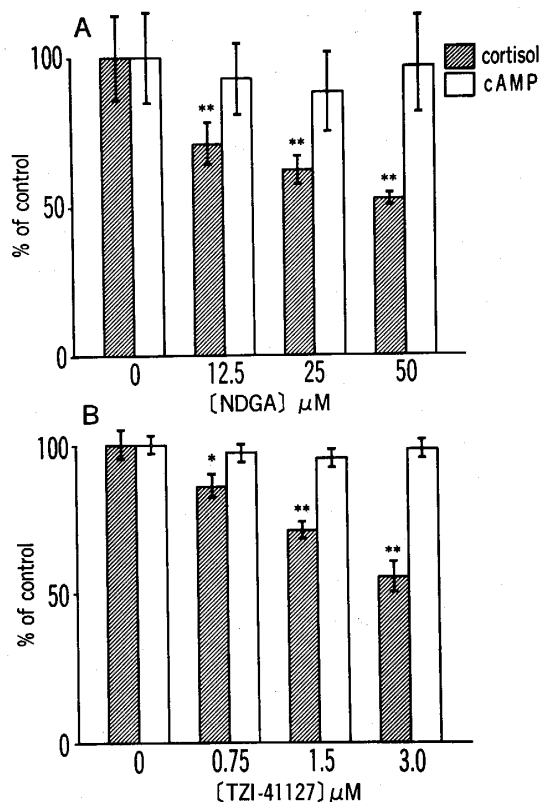


図 10. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞での ACTH 刺激時のコルチゾールおよび c-AMP 産生におよぼす NDGA (A) と TZI-41127 (B) の効果
コントロールに対する比較: * $p < 0.05$
** $p < 0.01$

によるコルチゾールの産生を cAMP 産生に影響をあたえることなく抑制した。ステロイド生合成の初期段階の代謝産物であるプロゲステロンの ACTH 刺激下での産生量は、コルチゾールとは逆に図11-Aに示すように、NDGA およびTZI-41127の前処置により濃度依存性に増加した。また、プロゲステロンからコルチゾール産生に至る一連の中間代謝産物のうち、11-デオキシコルチゾールの前駆体である17 α -ヒドロキシプロゲステロンの ACTH 刺激時の生成には有意の変化は見られなかった(図11-B)が、11-デオキシコルチゾールの産生は有意に低下した(図11-C)。

7. NDGA および ZI-41127のウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームの21-ヒドロキシラーゼ活性におよぼす効果

ウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームを NDGA および TZI-41127で前処置を行い21-ヒドロキシラーゼ活性を in vitro で測定したが、ウシ副腎皮質束状層細胞の遊離細胞系で ACTH 刺激によるコルチゾール産生を抑制する濃度までこれらリポキシゲナーゼ阻害剤を増加させても21-ヒドロキシラーゼ活性の有意な変化は

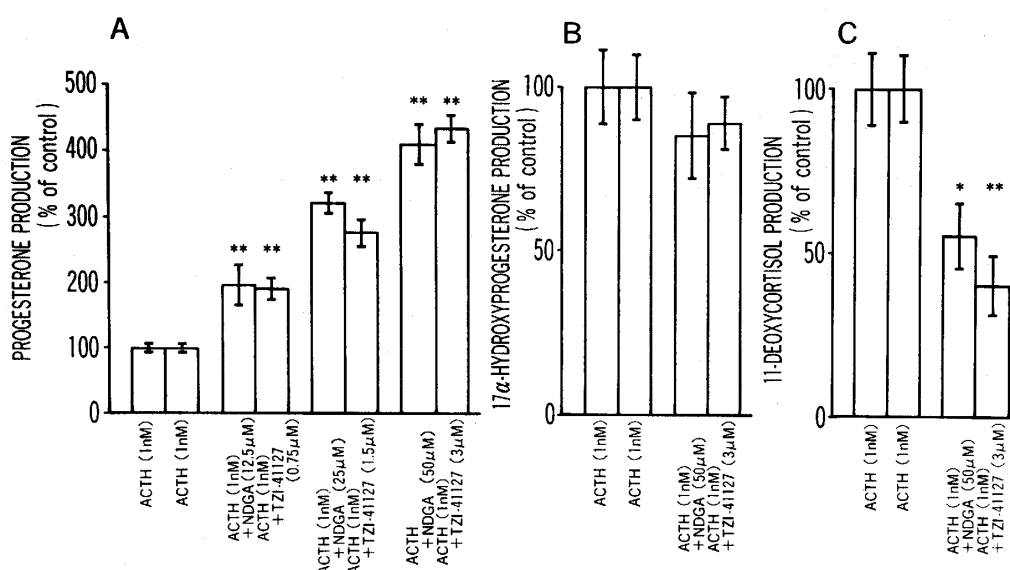


図 11. 遊離ウシ副腎皮質束状層細胞での ACTH 刺激時のプロゲステロン (A), 17 α -ヒドロキシプロゲステロン (B), および 11-デオキシコルチゾール 産生におよぼす NDGA と TZI-41127 の効果
コントロールに対する比較: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

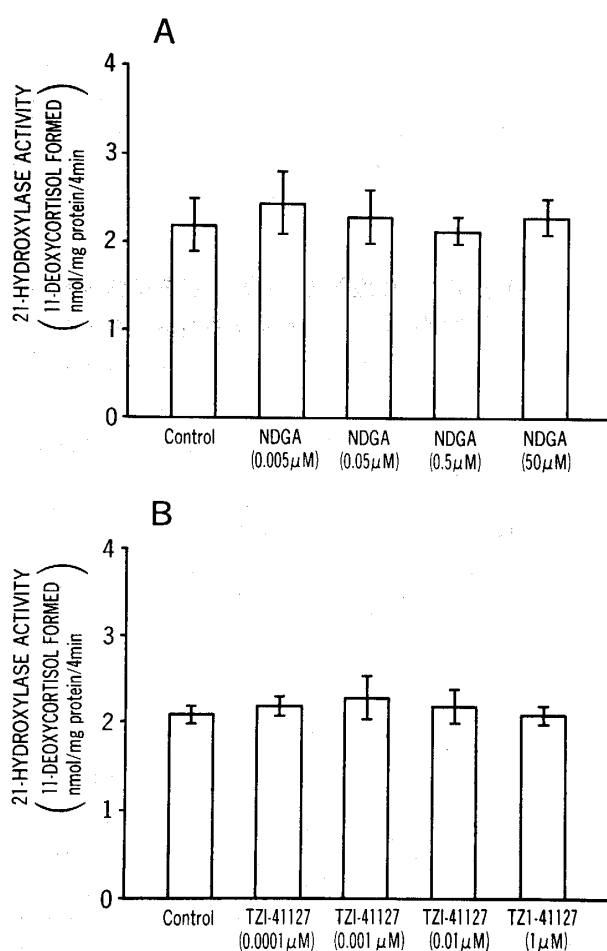


図 12. ウシ副腎皮質束状層マイクロゾームの21-ヒドロキシラーゼ活性におよぼす NDGA (A) と TZI-41127 (B) の効果

認められなかった (図 12)。

IV. 考 察

はじめにウシ副腎皮質細胞に存在するリポキシゲナーゼ代謝産物の同定を目的として, [^{14}C] アラキドン酸をウシ副腎皮質束状層細胞に添加し, 生成されたアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物を逆相, および順相の2つの異なる系を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離した。分離された代謝産物について, 紫外線測定装置で紫外線吸収パターンを, また放射感知装置で放射活性を測定した。さらにガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC/MS) を用いてこれら代謝産物の同定を行ったところ, アラキドン酸のモノヒドロオキシ酸である5-HETE と15-HETE がウシ副腎皮質細胞で生成されることが判明した。しかし5-および15-HETE は非酵素反応であるアラキドン酸の酸化反応, たとえば自己酸化等によっても生成される可能性があるため¹⁴⁾, アラキドン酸を煮沸した副腎皮質細胞と反応させコントロールとしたが, 5-および15-HETE の産生は測定感度以下の生成量であり, これらの代謝産物が非酵素的に産生された可能性は少ないと考えられた。またこれらの代謝産物が副腎皮質細胞浮遊液中の他の細胞たとえば白血球¹⁵⁾, 赤血球¹⁶⁾, および血小板¹⁷⁾等により生成された可能性については, ウシ副腎皮質束状層細胞を調製するさいにパーコールによる非連続密度勾配法を用い細胞を分離精製していること, さらに浮遊細胞の純度を

光学顕微鏡を用いて検討し、赤血球、白血球、血小板の混入がないことを確認していること、さらにウシの血液と $[^{14}\text{C}]$ アラキドン酸を反応させた実験でアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物が生成されなかったことから否定的と考えられた。したがってウシ副腎細胞には5-および15-の2つのリポキシゲナーゼ代謝経路が存在する可能性が示唆されたのでさらに検討を加えた。

つぎにアラキドン酸とウシ副腎皮質細胞浮遊液を反応させ、その代謝産物を HPLC 法と LTB_4 のラジオイムノアッセイにより分析したところ、5-リポキシゲナーゼ系の代謝産物の一種であるロイコトリエン B_4 (LTB_4) が産生されることが明らかになった。 LTB_4 は 5-HPETE から不安定な中間代謝産物である LTA_4 を介して生合成されることはすでに諸家により明らかにされている⁹⁾。今回の成績はウシ副腎細胞では5-HPETE 由来の二種類の代謝産物、すなわち5-HETE と LTB_4 が産生されることを示しており、ウシ副腎皮質細胞に5-リポキシゲナーゼ代謝経路が存在することがはじめて明らかとなった。

さらに HPLC と GC/MS を用いた検討により、ウシ副腎皮質細胞でアラキドン酸から11, 14, 15-THET が産生されることが明らかになった。11, 14, 15-THET はアラキドン酸の15-リポキシゲナーゼ代謝産物のひとつで、15-HPETE を経ておもにマイクロゾームで産生されることが明らかにされている¹⁰⁾。そこでウシ副腎皮質束状層細胞のマイクロゾームと15-HPETE を反応させたところ、11, 14, 15-THET の生成が認められた。さらに、この反応はチトクローム P-450 の阻害剤であるケトコナゾールにより濃度依存性に抑制された。したがって、11, 14, 15-THET はウシ副腎皮質束状層細胞マイクロゾームのチトクローム P-450 により15-HPETE から産生されるものと考えられた。すでに述べたように、15-HETE と11, 14, 15-HETE はともに15-HPETE から生合成されることから、ウシ副腎皮質束状層細胞には5-リポキシゲナーゼ代謝経路に加えて、15-リポキシゲナーゼ代謝経路も存在することが明らかとなった。

つぎに、ウシ副腎皮質束状層細胞に存在が明らかにされた5-および15-リポキシゲナーゼ代謝産物がステロイド生合成にどのように関与しているかについて検討を行った。今回の検討ではこの目的のために、非特異的なリポキシゲナーゼ阻害剤として広く用いられている NDGA とリポキシナーゼの阻害剤として最近開発された TZI-41127¹⁸⁾ の2つの構造のまったく異なる阻害剤を用いて実験を行った。NDGA と TZI-41127 はウシ

副腎皮質束状層細胞におけるアラキドン酸からの5-および15-HETE 生成をいずれも濃度依存性に抑制し、NDGA と TZI-41127 はウシ副腎皮質束状層細胞においてリポキシゲナーゼ阻害剤として作用することが判明した。そこで、これらのリポキシゲナーゼ阻害剤で前処理したウシ副腎皮質束状層細胞を ACTH で刺激したところ、ACTH による cAMP 産生増加は全く影響を受けないにもかかわらず、ACTH 刺激によるコルチゾール産生はリポキシゲナーゼ阻害剤の前処理により濃度依存性に抑制された。この成績はリポキシゲナーゼ代謝産物が cAMP 産生以降のステップで ACTH 刺激によるコルチゾール産生に関与する可能性を示唆するものである。

つぎにアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物がステロイド合成経路のどのステップに関与するかを明らかにする目的で、ACTH 刺激時の各種ステロイドホルモンの産生に及ぼすリポキシゲナーゼ阻害剤の影響について検討した。上記の2種類のリポキシゲナーゼ阻害剤で前処置した副腎皮質細胞を ACTH で刺激し、コルチゾール産生経路のステロイドホルモン中間代謝産物を測定した。コルチゾール産生経路の比較的初期の産物であるプロゲステロンの産生はリポキシゲナーゼ阻害剤処理によりコルチゾールとは逆に濃度依存性に増加し、 17α -ヒドロキシプロゲステロンは不変であった。一方11-デオキシコルチゾールはコルチゾールと同様にリポキシゲナーゼ阻害剤により産生が低下した。この成績はリポキシゲナーゼ阻害剤の前処置により 17α -ヒドロキシプロゲステロンから11-デオキシコルチゾールへの転換が障害された可能性を示唆するものである。副腎皮質束状層細胞における 17α -ヒドロキシプロゲステロンから11-デオキシコルチゾールへの転換はマイクロゾームにある21-ヒドロキシラーゼにより行われることが知られている。そこでウシ副腎皮質マイクロゾームを用いてリポキシゲナーゼ阻害剤自身の作用を検討したが、リポキシゲナーゼ阻害剤は 17α -ヒドロキシプロゲステロンから11-デオキシコルチゾールへの転換には何等影響を与えなかった。したがって、リポキシゲナーゼ阻害剤は ACTH 刺激下での cAMP 産生の抑制を介さずに21-ヒドロキシラーゼ活性を抑制したことより、21-ヒドロキシラーゼ調節にリポキシゲナーゼ代謝産物が直接関与する可能性が強く示唆され、今回の成績はアラキドン酸のリポキシゲナーゼ代謝産物が21-ヒドロキシラーゼ活性の新たな調節因子として作用する可能性を示したものであり、ACTH の作用機構を解明する上で重要な知見と考えられた。

謝 辞

終わりに御指導御校閲頂きました吉田尚教授に深謝いたします。また御指導頂きました田村泰助教授、平井愛山博士に感謝いたします。

この論文は学位審査論文である。

SUMMARY

[¹⁴C] arachidonic acid was added into culture medium of bovine adrenal fasciculata cells. Metabolites were separated and purified by a reverse and straight-phase high performance liquid chromatography. 5-and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE), leukotriene B₄ and 11, 14, 15-trihydroxyeicosatrienoic acid were identified in bovine adrenal fasciculata cells. Lipoxygenase inhibitors, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and TZI-41127, which inhibit the formation of 5- and 15-HETE from arachidonic acid in bovine adrenocortical cells, suppressed ACTH-stimulated cortisol production without any suppression of ACTH-stimulated cAMP formation. NDGA and TZI-41127 also suppressed the ACTH-stimulated 11-deoxycortisol production, although the progesterone production was enhanced. These lipoxygenase inhibitors showed no direct inhibition of microsomal 21-hydroxylase activity, which converted 17 α -hydroxyprogesterone to 11-deoxycortisol.

The present results suggest that lipoxygenase metabolites of arachidonic acid may be involved in ACTH-stimulated steroidogenesis in bovine adrenal fasciculata cells by regulating 21-hydroxylase activity.

文 献

- 1) Metz S, VanRollins M, Strife R, Fujimoto W and Robertson R P: Lipoxygenase pathway in islet endocrine cells: Oxidative metabolism of arachidonic acid promotes insulin release. *J Clin Invest* **71**: 1191-1205, 1983
- 2) Metz SA: Glucose increase the synthesis of lipoxygenase-mediated metabolites of arachidonic acid in intact islets. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 198-202, 1985.
- 3) Dix CJ, Habberfield AD, Sullivan MHF and Cooke BA: Inhibition of steroid production in Leydig cells by non-steroidal antiinflammatory and related compounds: evidence for the involvement of lipoxygenase products in steroidogenesis. *Biochem J* **219**: 529-537, 1984.
- 4) Naor Z, Kiesel L, Vanderhoek JY and Catt KJ: Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone: Role of lipoxygenase products of arachidonic acid in luteinizing hormone release. *J Steroid Biochem* **23**: 711-717, 1985.
- 5) Nadler JL, Natarajan R and Stern N: Specific action of the lipoxygenase pathway in mediating angiotensin II induced aldosterone synthesis in isolated adrenal glomerulosa cells. *J Clin Invest* **80**: 1763-1769, 1987.
- 6) Natarajan R, Stern N, Hsueh W, Do Y, and Nadler J: Role of the lipoxygenase pathway in angiotensin II-mediated aldosterone biosynthesis in human adrenal glomerulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* **67**: 584-591, 1988.
- 7) Sakai K, Fafeur V, Normand BV and Dray F: 12-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HPETE) and 15-HPETE stimulate melatonin synthesis in rat pineals. *Prostaglandins* **35**: 969-976, 1988.
- 8) Hirai A, Tahara K, Tamura Y, Saito H, Terana T and Yoshida S: Involvement of 5-lipoxygenase metabolites in ACTH-stimulated corticosteroidogenesis in rat adrenal glands. *Prostaglandins* **30**: 749-767, 1985.
- 9) Shimizu T, Randmark O and Samuelsson B: Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A₄ synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad USA* **81**: 689-674, 1984.
- 10) Wong P. Y-K, Hughes R and Lam B. Lipoxene: a new group of trihydroxypentaenes of eicosapentaenoic acid derived from porcine leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **126**: 763-772, 1985.
- 11) Weiss RH, Arnold JL and Estabrook RW: Transformation of arachidonic acid hydroperoxide into epoxyhydroxy and trihydroxy fatty acids by liver microsomal cytochrome P-450. *Arch Biochem Biophys* **252**: 334-338, 1987.
- 12) Nishimura M, Hirai A, Omura M, Tamura Y and Yoshida S: Arachidonic acid metabolites by cytochrome P-450 dependent monooxygenase pathway in bovine adrenal fasciculata cells: *Prostaglandins* **38**: 413-430, 1989.
- 13) Salmon JA, Simmons PM, Palmer RMJ: A radioimmunoassay for leukotriene B₄. *Prostaglandins* **24**: 225-235, 1982.
- 14) Capdevila J, Marnett LJ, Chacos N, Prough RA and Estabrook RW: Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyeicosatetraenoic acids. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 767-770, 1982.
- 15) Borgeat P, Hamberg M and Samuelsson B: Transformation of arachidonic acid and ho-

mo- γ -linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem **251**: 7816-7820, 1976.

- 16) Bryant RW, Bailey JM, Schewe T and Rapoport M: Positional specificity of a reticulocyte lipoxygenase. J Biol Chem **257**: 6050-6055, 1982.
- 17) Oudinet J, Sraer J, Bens M and Ardaillou R: Influence of polymorphonuclear leukocytes

on the metabolism of arachidonate in human platelets. Thromb Haemost **60**: 59-62, 1988.

- 18) Hagiwara M, Mikami T, Iwamura S, Miyazawa K, Kobayashi M and Miyasaka K: Effect of TZI-41127, a novel selective 5-lipoxygenase inhibitor on A23187-induced pleurisy in rats. European J Pharmacol **199**: 69-75, 1991.

1日1回投与可能な抗不安薬

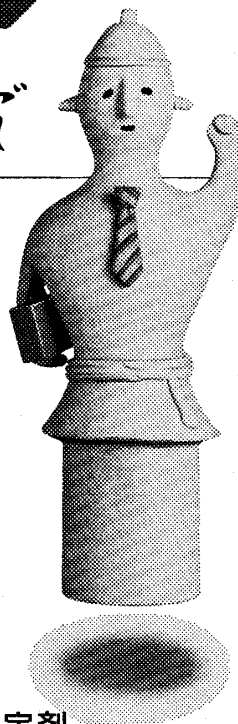
MEILAXで

リラックス

メイラックスは
特に不安・抑うつ・睡眠障害
に対して有効な
ベンゾジアゼピン系薬剤です

特 性

- 1 1日1回投与が可能です
- 2 抗不安作用と運動系機能抑制作用の分離性に優れています
- 3 神経症に確かな効果を発揮します
- 4 自律神経失調症など各種心身症における多彩な愁訴を早期に改善します
- 5 副作用が少なく使いやすい抗不安薬です



新発売
健保適用

持続性心身安定剤

⑤ 要指 **メイラックス錠** 1mg 2mg

MEILAX® Tablets

ロフラゼパ酸エチル

効能・効果

- 神経症における不安・緊張・抑うつ・睡眠障害
- 心身症（胃・十二指腸潰瘍、慢性胃炎、過敏性腸症候群、自律神経失調症）における不安・緊張・抑うつ・睡眠障害

用法・用量

通常、成人には、ロフラゼパ酸エチルとして2mgを1日1～2回に分割経口投与する。なお、年齢、症状に応じて適宜増減する。

使用上の注意

1. 次の患者には投与しないこと
(1)急性狭隅角緑内障のある患者
(2)重症筋無力症のある患者
2. 次の患者には慎重に投与すること
(1)心障害、肝障害、腎障害のある患者
(2)脳に器質的障害のある患者（作用が強くあらわれる）
(3)乳児・幼児・小児
(4)高齢者（運動失調が起こり易い）
(5)衰弱患者

3. 副作用

(1)依存性

大量連用により、まれに薬物依存を生じることがあるので、観察を十分に行い、用量をこえないよう慎重に投与すること。また、大量投与又は連用中における投与量の急激な減少ないし投与の中止により、まれに痙攣発作、ときにせん妄、振戦、不眠、不安、幻覚、妄想等の禁断症状があらわれることがあるので、投与を中止する場合には徐々に減量するなど慎重に行うこと。

※その他の使用上の注意などの詳細は、添付文書をご覧ください。

(資料請求先)

製造販売元



明治製薬株式会社
104 東京都中央区京橋2-4-16
TEL: 03(272)6511

技術導入・販売提携

明治サノフィ薬品株式会社
103 東京都中央区日本橋富町7-13