b) MAD caused more marked improvement in muscle strength in patients with progressive muscular dystrophies when administered as an adjunct to amino acid treatment compared with patients treated with other types of treatment.

c) MAD caused the decrease in the urinary excretion of urea in patients suffering from various diseases e.g. malnutrition, muscular atrophies, nephrotic syndrome, addison's disease and ulcerative colitis. Serum level of cholesterol was often found to be decreased in these cases.

Studies of Long Acting Sex Hormones

I. Comparison of Effectiveness of Long Acting Male Sex Hormones

By

Minoru HOSOI, Joji YAMADA and Akira KAMBEGAWA

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Manufacturing Co.)

Long acting sex hormones, namely testosterone heptanoate, testosterone cyclopentylpropionate, testosterone phenylpropionate and testosterone isobutyrate, corresponding to 5mg. of free testosterone were injected only once into castrated male rats and the effectiveness of these hormones were compared each other. The weights of seminal vesicle, prostate gland, penis and bulbocavernosus muscle, and the fructose contents of seminal vesicle and prostate glands were determined weekly for the eight weeks to be compared each other. The result were as follows :

1) The greatest effects were obtained with testosterone heptanoate and testosterone cyclopentylpropionate on the 4th week, with testosterone phenylpropionate on the 3rd week and testosterone isobutyrate on the 2nd week.

2) As to the weight of sexual gland, fructose content, and durability of male sex hormones, the activity of these hormones are in the following order. Testosterone heptanoate>Testosterone cyclopentylpropionate>Testosterone phenylpropionate>Testosterone isobutyrate.

Studies of Long Acting Sex Hormones

II. Comparison of Effectiveness of Long Acting Male Sex Hormones

By

Minoru HOSOI, Akira KAMBEGAWA and Masaaki Tarutani

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Manufacturing Co.)

1) For comparative experiments of the effectiveness of long acting male sex hormones. Each 100mg. of testosterone propionate, testosterone heptanoate, testosterone cyclopentylpropionate, testosterone isobutyrate and testosterone undecylate was dissolved in oil and injected into normal male rabbits subcutaneously and 17-ketosteroids and steroid alcohol in urine were determined and these results were compared.

持 続 性 性 ホ ル モ ン の 研 究

第I報 持続性男性ホルモンの効力比較

帝国臓器製薬株式会社 研究部

細 井 稔
山 田 稔 治
神 戸 川 明

緒 言

Testosterone が1935年発見され相次いで合成されてから今日まで多数のこのエステル類が知られて居る。Miescher¹⁾⁻³⁾等は1936年以来 testosterone の脂肪酸エステルの一連の研究に於いてエステルを作る脂肪酸の炭素が酸や酢酸の様に少いものは効力の発現が早く、重量当りの単位は高いが持続性は少い。更にプロピオン酸、酪酸、吉草酸等のエステルになると次第に重量当りの効力は低下するが持続性が増す事を知った。この傾向はパルミチン酸やステアリン酸等の高級エステルになると更に著明である。この事は estrogen に於いても同様の傾向が見られた。近年持続性ホルモンの要望により従来の Miescher 等の研究が再検討され1952年 Junkmann⁴⁾は testosterone enanthate (或は testosterone heptanoate (以下略してT.H.))は従来の testosterone のエステル中では最も持続性ある事を認めた。即ち彼は酢酸、プロピオン酸、酪酸、N-吉草酸、カプロン酸、ヘプタン酸、オクタン酸等の testosterone の各エステル20mgを去勢雄ラットに皮下注射し、その精囊重量を比較した結果 N-吉草酸エステルまでのエステルでは最大効果は第2週かそれ以前に現われるがこれより高次エステルでは第3週が最大値を示し、[以後の持続性も比較的長く、T.H. が最も良かった。1951年 Sakamoto⁵⁾は testosterone- β -cyclopentyl propionate (T.C.P.)を合成し、Lloyd⁶⁾は臨床実験を行い、Otto 及び Kuizenga⁷⁾等は去勢雄ラットに本品5mgの油溶液1回注射は testosterone propionate (T.P.) 25mg 1回注射に比較し24日、30日目では精囊、前立腺共に遙かに良好であつたと発表して居る。一方1951年英国では Hewett⁸⁾が testosterone- β -phenylpropionate (T.P.P.)を作り、Dekansky⁹⁾は本品が良好な持続性エステルであると発表して居る。即ちT.P., T.P.P. 各2.5mgを去勢雄ラットに注射した結果精囊では3.2倍、前立腺で4.8倍の持続効力を認めた。Hamburger¹⁰⁾は健康正常男子に T.H., T.C.P.の油溶と testosterone furanate 及び testosterone-iso-butyrate (T.I.B.) の microcrystal の水性 suspension を注射し、17-Ketosteroid の排泄よりみて T.I.B.-suspension で20日間の持続を認めた。以上の様に強力と云われる持続性ホルモンは殆んど T.P.と比較した Bioassay のみで T.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. を同時に比較した Bioassay の報告は殊んど見当らぬので、今回これ等エステルを同時に去勢雄ラットに投与し副性腺に対する比較を行い、更に男性作用の生化学的判定とし Mann¹¹⁾⁻¹³⁾, Landau¹⁴⁾により提唱されて居る副性器即ち精囊と前立腺のフラクトース定量を併せて行つたので報告する。使用した検体は1表に示す testosterone 及び T.P.以外のT.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. の4検体を使用した。

第1表 Testosterone の Ester の種類

R = H.....Testosterone (T.)
	R = CO.CH ₂ CH ₃T.-propionate (T.P.)
	R = CO.(CH ₂) ₅ CH ₃T.-enanthate (H.T.) (heptanoate)
	R = CO.CH ₂ CH ₂ - T.- β -cyclopentyl-propionate (T.C.P.)
	R = CO.CH ₂ CH ₂ - T.- β -phenyl-propionate (T.P.P.)
	R = CO.CH(CH ₃) ₂T.-isobutyrate (T.I.B.)

実験方法

実験動物及び飼育条件

ウイスター系雄ラット体重60gを去勢し21日目に検体を投与した。飼育条件としてはオリエンタル固型飼料に野菜を与え、水は給水瓶より随時与えた。飼育温度は22°C, 湿度65%の一定条件にした。

検体及び実験方法

T.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. を何れも遊離のT.に換算して5mg相当量即ち T.H.は6.95mg, T.C.P.は7.15mg, T.P.P.は7.25mg, T.I.B.は6.0mgを0.2ccのゴマ油に溶かし去勢後21日目にラットの背部皮下に1回注射し同時に油のみの対照をとり、注射後7日間隔で第1週より第8週迄毎週一検体につき5匹づつ屠殺し、精囊、

前立腺、球海綿体筋、陰茎の重量をトーション秤で手早く秤量し、更に精囊と前立腺を一緒にしてフラクトースを定量した。

フラクトース測定法

測定操作法は第2表に示す。即ち精囊と前立腺を小型硝子乳鉢中で手早く均等に磨りつぶす。この時少量の海砂を加えると早く粥状になる。これに全体の重量が2gとなる様に蒸留水を加え試験管に移す。試験管の内容物に2%硫酸亜鉛と0.1N-NaOH各1ccを加え沸騰水中で1分加熱し凝固した蛋白を濾紙で濾し、この濾液2ccを次の様な比色操作を行う。一方標準品とし純フラクトース5r, 10r, 20r含有の1cc水溶液に2%硫酸亜鉛と0.1N-NaOH 1ccを加え検体と同時に加熱し、これ等検体及び標準品2ccに0.1%レゾルシンアル

第2表 フラクトース測定法	
標準品	組 織
フラクトース5, 10, 20r 蒸留水 1 cc溶液	秤量↓ 乳鉢中海砂と磨砕全体が 2 gとなる様加水試験管 に移す
↓	↓
2% ZnSO ₄ 0.5cc 0.1N-NaOH 0.5cc 加う 100°C 1分加熱	磨 砕 液 2% ZnSO ₄ 1 ccと 0.1 N-NaOH 1 cc加う 100°C 1分加熱 濾過 (除蛋白)
↓	↓
0.1%レゾルシンアルコール液 2 cc 30% HCl 6cc 80°C 9分加熱 490mμ 比色測定	濾 液 2 cc ↓ 橙赤発色

第1図 持続性男性ホルモンの効力比較

フラクトースの吸収曲線

フラクトースの検量線 $\lambda 490m\mu$

コール液 2ccと30% HCl 6ccを加え、80°Cの湯浴中で9分加熱すると橙赤色に呈色する。この色調は490m μ に最大吸収があり、(第1図)この波長で測定した標準曲線は原点を通る直線性を示すのでこの検量線より検体

第3表 持続性男性ホルモンエステル類の去勢雄ラットに対す効力比較

検 体	週	体 重 (g)	精 囊 (mg)	前立腺 (mg)	陰 茎 (mg)	球海綿体 筋 (mg)	フラクトース 合 計 (r)	フ ラ ク ト ース 組 織 1mg 当 り (r)
Testosterone- heptanoate (T.H.)	1	176	276	192	137	497	55	0.117
	2	205	470	366	183	716	108	0.108
	3	199	518	498	192	852	80	0.078
	* 4	207	*910	*792	*246	*1117	*251	*0.147
	5	206	799	634	205	990	243	0.117
	6	208	672	630	228	1084	183	0.140
	7	225	574	628	235	1075	126	0.091
	8	198	372	421	216	868	110	0.155
Testosterone- cyclopentyl- propionate (T.C.P.)	1	185	246	175	134	449	55	0.131
	2	210	523	470	206	796	87	0.087
	3	213	453	450	190	765	73	0.081
	* 4	222	*675	*643	213	*1004	*240	*0.182
	5	204	564	537	213	952	163	0.147
	6	218	634	642	223	922	161	0.124
	7	211	528	552	*241	980	126	0.116
	8	205	502	450	218	812	115	0.091
Testosterone-phenyl propionate (T.P.P.)	1	196	310	191	144	485	65	0.129
	2	204	512	411	190	706	65	0.070
	* 3	200	*619	*558	209	*920	*228	*0.194
	4	207	522	486	198	828	191	0.144
	5	212	359	364	190	765	104	0.094
	6	204	388	455	*213	898	83	0.098
	7	208	369	437	206	820	45	0.042
	8	232	111	181	169	514	34	0.150
Testosterone- isobutyrate (T.I.B.)	1	196	306	165	145	546	77	0.124
	* 2	204	*326	*294	*160	*630	*81	*0.172
	3	200	148	236	152	492	47	0.122
	4	207	150	160	139	454	48	0.153
	5	212	119	190	144	423	41	0.132
	6	204	60	90	138	345	19	0.129
	7	208	63	93	132	342	19	0.120
	8	232	83	134	157	422	18	0.083
去 勢 対 照	1	172	16	19	105	291	0	0
	2	188	19	23	83	191	0	0
	3	183	21	31	126	274	0	0
	4	193	16	30	68	183	0	0
	5	202	28	35	133	188	0	0
	6	225	23	33	82	173	0	0
	7	202	18	32	76	200	0	0

中のフラクトースが算出出来る。

実験成績

以上の成績を次の3表に示す。更に3表より性腺重量とフラクトース含量の最大を示す週と standard error を要約したのが第4表である。即ち精囊, 前立腺, 球海綿体筋重量及びフラクトース含量の最大値は何れも各検体に於いて一致し, T.H., T.C.P. は第4週が最高, T.P.P. は第3週, T.I.B. は第2週に最大を示し, T.H., T.C.P. が最も持続性に於いても効力の強さに於いても優れて居る。但し陰茎重量では最大効果を示す週が必ずしも前記の諸性腺やフラクトース含量の極大とは一致せず遅れて最大を示す場合が T.C.P., T.P.P. 等で認められた。3表, 4表, 2図~6図に示す様に精囊重量ではラット5匹の平均値ではT.H. (最大4週) > T.C.P. (最大4週) > T.P.P. (最大3週) > T.I.B. (最大2週) > 去勢対照で夫々910mg, 675mg, 619mg, 326mg,

第4表 指続性男性ホルモン諸エステル of 去勢雄ラットの
性腺重量及びフラクトース含量に及ぼす効果
平均値と標準誤差 (各5匹の平均)

検 体	最 大 効 果 週	性 腺 重 量 (mg)				フラクトース γ (前立腺+精囊)
		精 囊	前 立 腺	陰 茎	球海綿体筋	
T.H.	4	910 $\pm$ 141	792 $\pm$ 135	246 $\pm$ 13	1117 $\pm$ 103	251 $\pm$ 15
T.C.P.	4	675 $\pm$ 117	643 $\pm$ 133	213 $\pm$ 21	1004 $\pm$ 157	240 $\pm$ 32
T.P.P.	3	619 $\pm$ 98	558 $\pm$ 72	209 $\pm$ 10	920 $\pm$ 125	228 $\pm$ 20
T.I.B.	2	326 $\pm$ 78	294 $\pm$ 38	160 $\pm$ 33	630 $\pm$ 155	81 $\pm$ 11
去勢対照		28 $\pm$ 6.4	35 $\pm$ 3	133 $\pm$ 28	188 $\pm$ 51	0

第2図 持続性男性ホルモン諸エステル of 去勢ラット精囊に及ぼす効力比較
Testosterone 5mg 相当量1回注射

第3図 持続性男性ホルモン諸エステル的去勢ラット前立腺に対する効力比較
Testosterone 5mg 相当量1回注射

第4図 去勢雄ラットの陰茎に対する比較

第5図 去勢雄ラットの球海綿体筋に対する比較

第5表 各最大効果に於ける平均値の差の検定

検 体	精 囊	前 立 腺	陰 茎	球海綿体筋	フラクトース
T.H. : T.C.P.	t = 2.6*	t = 1.5	t = 2.6*	t = 1.8	t = 0.6
T.C.P. : T.P.P.	0.7	0.3	0.3	0.8	0.6
T.P.P. : T.I.B.	4.5**	8.0**	2.8*	2.9*	13.0**

 $\phi = 8 \quad t_{0.05} = 2.306 \quad t_{0.01} = 3.355$

第6表 各最大効果に於ける平均値の信頼限界(P.=0.05)

検 体	精 囊 (mg)	前 立 腺 (mg)	陰 茎 (mg)	球海綿体筋 (mg)	フルクトース (γ)
T.H.	910 ± 194.4	792 ± 160	245 ± 18.5	1117 ± 134.6	251 ± 20.5
T.C.P.	675 ± 161	643 ± 175	214 ± 28.4	1004 ± 215.6	240 ± 45.5
T.P.P.	619 ± 120.6	558 ± 99.4	209 ± 14.8	920 ± 172.6	228 ± 27.8
T.I.B.	326 ± 108	294 ± 52.7	160 ± 45.5	630 ± 214.5	81 ± 15
去勢対照	2.8 ± 8.9	35 ± 4.1	133 ± 38.8	188 ± 61	0

28mgであり, 前立腺では 792mg, 643mg, 558mg, 294mg, 35mg, 陰茎では 246mg, 213mg, 209mg, 160mg, 133mg, 球海綿体筋では1117mg, 1004mg, 920mg, 630mg, 188mg, フラクトース含量は251mg, 240mg, 228mg, 81mg, 0mg を示した. 以上実験より各検体の最大値を示す週に於ける重量とフラクトース含量の平均値の差をt検定した. 即ち5表に示す様に精囊ではT.H.とT.C.P.は有意差($P < 0.05$)あり, T.C.P.とT.P.P.は有意差なし, T.P.P.とT.I.B.は高度に有意($P < 0.01$)であった. 前立腺ではT.P.P.と

第6図 持続性男性ホルモン諸エステル剤の去勢ラットの精囊+前立腺中フラクトースに対する効力比較

T.I.B.は高度に有意($P < 0.01$)で球海綿体筋、フラクトースの比較でも同様であつた。更に各最大効果に於ける平均値の信頼限界を6表に示す。即ちこれ等よりみて大体 T.H. が何れの場合も最も秀れ、以下T.C.P., T.P.P., T.I.B. の順に効力低下が見られた。

考 按

持続性ステロイドホルモン剤については多数のエステル類やペレット又は suspension 等が知られて居る。男性ホルモンの持続剤にも T.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. 其の他 T.-undecylate, T.-pelargonate や最近細井等¹⁶⁾が見出したジカルボン酸類の ditestosterone ester の一連のものに強力な持続性を認めた。持続性の作用機序に関しては注射部位より流血中に入つたホルモンが肝臓の酵素作用に対する破壊の差異によると考え

られ、遊離の testosterone や炭素数の少い脂肪酸エステルは比較的効力一過性である。長鎖脂肪酸に持続性のおこるのはこの為とする考え方があつた。更に酵素的反応のみならず余分のホルモンが胆汁中へ overflow しこれが腸肝循環回路にのる事により持続を示すと云う小林教授の説¹⁶⁾やchlorotrianisene(T.A.C.E.)の様に脂肪内蓄積説¹⁷⁾又は注射部位の吸収量や時間の差異等が考えられて居るが未だ確定した証明は無い様である。持続性男性ホルモン剤の効力比較に関しては従来T.P.とT.H., T.P.とT.C.P. 又は T.P.とT.P.P.と云う様にT.P.に対し個々単独に異つた研究者により異つた条件で比較された Bioassay が大部分で、これ等 depot 剤を同時に比較した Bioassay が無い。臨床的には男性作用の比較となるのは主として尿中 17-ketosterid でその他の試験法は誤差が多く心理的な要因が可なり入るので信頼性が薄いがこの方面の比較でもこれ等を同時に比較した報告も殆んどない。性腺中のフラクトースについては Mann¹⁸⁾によればこのものが精虫の栄養源であり嫌氣的条件下で乳酸に代謝される事で活動エネルギーを得て居るとされて居る。又 Ortiz¹⁹⁾はクエン酸が精囊や精液中に存し、これの増減を測定する事により男性作用効果の生化学的測定とし利用出来るとして居る。今回著者は特に持続性ありとされて居る T.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. を同時に去勢雄ラットに皮下注射し精囊重量、精囊+前立腺中フラクトース含量測定を行い、これ等の結果を分析しT.H.>T.C.P.>T.P.P.>T.I.B.の効力順位である事を確認した。

結 論

1. 去勢雄ラットに T.H., T.C.P., T.P.P., T.I.B. 等夫々遊離 testosterone 換算で 5mg を 1 回注射し、8 週迄毎週 1 回解剖し精囊、前立腺、陰茎、球海綿体筋の重量と、精囊+前立腺中のフラクトース含量を測定比較した。

2. その結果 T.H., T.C.P. は第 4 週、T.P.P. は第 3 週、T.I.B. は第 2 週目に最大効果を示した。

3. 性腺重量、フラクトース含量、持続性よりみて効力順位は T.H.>T.C.P.>T.P.P.>T.I.B. であつた。

終りにのぞみ本実験を許可された社長山口栄一博士、研究部長新延信吉博士に厚く御礼申し上げます。また種々御助言下さつた東京医科歯科大学志田圭三博士に深謝し、実験に協力された飯塚和雄、三木徳太郎、福島慶子の三君に感謝します。

文 献

- 1) Miescher, K. : Biochem. J. **30**, 1977 (1936).
- 2) Miescher, K. : Biochem. J. **32**, 141, 725, 1273 (1938).
- 3) Miescher, K. : Hoppe Seyler Zeit. **294**, 39 (1937).
- 4) Junkman, K. : Arch. Exp. Path & Pharm, **215**, 86 (1952).
- 5) Sakamoto, W. : Proc. Soc. Exp. Biol & Med. **76**, 406 (1951).
- 6) Lloyd, C.W. : J. Clin. Endoc. **11**, 724 (1951).
- 7) Otto, A.C. : J. Clin. Endoc. **12**, 15 (1952).
- 8) Hewett, C.L. : Personal communication.
- 9) Dekansky, J. : Brit. J. Pharm. **8**, 27 (1953).
- 10) Hamburger, C. : Acta. Endoc. **22**, 379 (1956).
- 11) Mann, T. : Lancet. **446**, 20 (1948).
- 12) Mann, T. : Biochem. J. **46**, 440 (1950).
- 13) Mann, T. : Physiol. Rev. **31**, 27 (1950).
- 14) Landau, R. : J. Clin. Endoc. **11**, 1411 (1951).
- 15) 細井, 山田 : 近日発表.
- 16) 小林隆 : 第 8 回日産婦総会宿題報告, 昭和 31 年.
- 17) Greenblatt, R.B. : Amer. J. Obst & Gynec. **63**, 1361 (1952).
- 18) Mann, T. : Recent Progress Hormone Research XII. 353 (1956).
- 19) Ortiz, E. : Endoc. **59**, 479 (1956).