Metabolism and Inactivation of Progesterone

Hirohiko TAKE

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan
(Director professor : Gen-ichi Tokuda, M.D.)

Recently, many synthetic progestins were reported to be useful for clinical purposes. And many of these drugs are effective in both oral and subcutaneous administration. Progesterone, which is natural progestin, however, is inactive when administered orally. The inactivation of orally administered progesterone has been supposed to be due to the ring A reduction of progesterone in the liver. But the metabolism of orally administered progesterone has not yet been well analyzed.

In this experiment, metabolism of progesterone was studied in three groups of Clauberg rabbits.

1. ³H-Progesterone was administered subcutaneously.
2. ³H-Progesterone was administered orally.
3. ³H-Progesterone subcutaneously and ¹⁴C-progesterone orally were administered.

After extraction of free steroid with chloroform (free fraction), the urine was hydrolyzed with β -glucuronidase and extracted with chloroform (glucuronide fraction). The urine was further hydrolyzed with HCl on the boiling water bath and extracted with chloroform (sulfate fraction). These chloroform extracts were washed with NaOH and water, and evaporated. The extracts were combined and the combined extract was adsorbed on alumina with benzene and eluted stepwise with different concentrations of methanol in benzene. Each 10 ml effluent was collected and the radioactivity was counted.

In this experiment the following results were obtained.

1. No marked difference in the distribution of excreted radioactivities in each of free, glucuronide and sulfate fraction between Group 1 and 2 was observed.
2. In Group 3, similar ³H/¹⁴C ratio was observed in each of free, glucuronide and sulfate fraction.
3. Column chromatography revealed three radioactive peaks. The elution pattern of radioactivities from the column in Group 1 was similar to that in Group 2.
4. In Group 3, no marked difference in the ³H/¹⁴C ratio of the three radioactive peaks was observed.
5. One of the urinary metabolite was identified as 20 α -hydroxypregn-4-ene-3-one by paper chromatography, acetylation, deacetylation, chromic acid oxidation and recrystallization.
6. 20 α -hydroxypregn-4-ene-3-one was excreted in urine as glucuronide and the radioactivities were counted as 3–4% of the administered doses.
7. In Group 3, urinary excretion of ¹⁴C was faster than that of ³H.

8. Experiment with blood, after administration of radioactive progesterone, revealed that the ratio of radioactivities incorporated into free fraction to the conjugated fraction was 23 times greater in Group 1 than in Group 2.

These results indicate that, in the Claiborn rabbit, the glucuronidation of C-20 reduced metabolite of progesterone, in addition to the ring A reduction, plays a significant role in the inactivation of progesterone in vivo.

(pp. 494~504)

Progesterone の代謝と不活性化に関する研究

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任 徳田源市教授)

武 博 彦

(昭和41年10月29日受付)

第1章 緒 言

Rozenkranz¹⁾ (1950)により黄体ホルモンの合成が完成されて以来、各種の合成 progestin が次々に作られ臨床面で広く応用されるようになった。特に近年経口避妊という新しい分野の研究において、あらためてこれら steroid の経口の効果とう面に強い関心もたれ研究されているが、どんな psogestin でも経口投与で有効とはいえず、経口投与によりほとんど効果があらわれないものもある。一方これら各種 steroid の progestational activity を測定するためには、従来より子宮粘膜の反応性を指標とする Corner & Allen 法²⁾, Clauberg 法³⁾, McPhail 法⁴⁾, Hooker Foebes 法⁵⁾等があり、また Lutwakmann⁶⁾(1955)は子宮粘膜中に Carbonic Anhydrase が存在することを確認したが、その activity を測定する方法が検討され、これの測定に Philpot & Philpot 法⁷⁾や Miyake & Pincus 法⁸⁾⁹⁾が用いられている。

内因性 progestin である progesterone の代謝については、Marrian¹⁰⁾ (1929)が妊婦尿より pregnane-3 α , 20 α -diol を分離して以来、progesterone は体内で Δ^4 -3-ketone と C-20-ketone の還元を受け尿中に排泄されると考えられ、progesterone の代謝還元物としての pregnanediol が尿より抽出されることは多くの報告がある。Engel¹¹⁾ (1941)は progesterone を家兎の皮下および門脈静脈に注射して、その生物学的活性を Clauberg 反応で観察した結果、後者の場合が弱く、また脾内に注射しても同様に弱いことを報告しており、このような実験から progesterone が肝において不活性化されることはかなり古くからわかつていた。そして progesterone の 20-ketone 還元体は明らかな progestational effect をもっているの、このような経口投与時の progesterone が肝で不活性化されるのは、A-ring の2重結合の還元が原因であると考えられている¹²⁾。しかしここで A-ring の還元のみが progesterone の不活性化にあずかっているのかどうかを progesterone の生体内での代謝の問題とともにあらためて考えてみることは今後の各種合成 progestin の研究の上に有意義であると考えられる。幸いにも近年 isotope 標識化合物の導入により種々の steroid の生体内代謝に関する研究が進んで来たので、著者も radioactive progesterone を家兎に投与し、経皮経口両投与方法時の progesterone 代謝の相異を検討したところ、興味ある結果が得られたので、その成績を報告するとともに、若干の考察をこころみた。

第2章 全編を通じての実験方法

I. 採尿方法

a. 持続導尿による方法

雌家兎の尿道は陰入口より深く、陰の前壁に開口しており、導尿に際し、陰入口よりネラトンカテーテル (No. 4) を挿入しても、尿道内に挿入することはむずかしい。とかく子宮頸管を経て子宮内に入り勝ちになる。そこで恥骨の際で開腹し、膀胱をあらわし、指を膀胱後壁に沿って入れ、陰入口より挿入したカテーテルの先を誘導しながら尿道を経て膀胱内に導くようにした。挿入後カテーテルが自然抜去することを防ぐために陰入口に絹糸をもつて結きつ固定し、あわせて尿が漏れないようにした。持続導尿された家兎は、Fig. 1 のように特製のカゴに入れて自由に動けないように板で囲み、カテーテルを通つて出て来る尿を一定時間ごとに採取し、尿は直ちにろ過して氷結保存した。

Fig. 1. Method of urine collection by indwelling catheter

Fig. 2. Method of urine collection by metabolic cage

b. metabolic cage を用いる方法

Fig. 2 に示すような特製の cage を作製して、糞と尿とが混ざらないようにして採尿した。採尿時間は24時間を単位に5日間採取した。

II. 採血方法

頸動脈よりできるだけ全血を採取し、採取後速やかに2500r.p.m. 20分間遠心器にかけて血清を分離して氷結保存した。

III. 水解および抽出方法

尿中 steroid は遊離型その他、glucuronide, sulfate 等の結合型で存在し、遊離型はそのまま抽出測定できるが、結合型は水解によつて遊離型として抽出測定しなければならない。progesterone の metabolite の水解は普通酸水解が行なわれるが、酸水解の場合には、glucuronide も sulfate も同時に水解されるので選択的にこれを抽出することはできない。β-glucuronidase を用いた酵素水解を行なえば最初 glucuronide だけを水解することができる。

Pregnanediol の抽出に際して、一般に用いられる抽出溶媒は Toluene であるが、Toluene では極性の強い steroid が抽出されにくく、すべての metabolite を抽出するために chloroform を抽出溶媒として用いた。

先ず尿または血清を pH 4.5 に醋酸で調整し、これに pH 4.5 の Acetate Buffer を 1/10 量加え、倍量の chloroform で 3 回抽出した。なお emulsion ができた場合は遠心分離し、chloroform 層を合わせて free fraction とした。残った水層に β-glucuronidase (600unit/ml) を加え、penicillin 2 万単位を混入し 37°C 24 時間 incubate した。

これを倍量の chloroform で 3 回抽出分離し、chloroform 層を合わせて glucuronide fraction とした。水層にさらに conc. HCl 15% v/v 加えて、100°C 30 分間温浴上で加熱し、急冷後倍量の chloroform で 3 回抽出分離し、chloroform 層を合わせて sulfate fraction とした。なお各抽出 chloroform 層は 1/10 量の N/10 NaOH で 2 回、蒸留水で 3 回洗滌後、芒硝により脱水し、蒸発乾固した。

IV. Column chromatography

Steroid の column chromatography の吸着剤には Silica-Gel, Florisil, Alumina およびイオン交換樹脂等が用いられている。Alumina は corticoid のような steroid を一部分解すると言われているが、progesterone metabolite の場合はこのような分解がおこらず、分離能が非常にすぐれているので、本実験では Alumina を用いた。すなわち、Brockmann Alumina (standardiziert) 6 g をクロマト管 (内径 1 cm) に充填し、benzene で steroid を吸着したのち、溶出溶媒として Benzene, 0.1% methanol-benzene (M-B) 0.3% M-B, 0.5% M-B, 1% M-B, 5% M-B, 30% M-B, methanol 各 100ml を用いて steroid を溶出した。溶出

液は fraction collector を用いて 10ml ずつを分画採取した。

V. radioactivity の測定

Radioactivity の測定には Packard Tri-Carb Model 314A の liquid scintillation spectrometer を使用した。有機溶媒中の試料の測定をするときは、測定びんに試料をとり完全に蒸発乾固してから下記の溶媒 A を 10ml 加え、よく溶解してから測定した。Blank は溶媒 A 10ml を測定びんにとり使用した。また水性試料を測定するときは、その 0.5ml を測定びんにとり下記溶媒 B を 10ml 加え、よく混ぜてから測定した。この場合 Blank は測定びんに蒸留水 0.5ml とり溶媒 B の 10ml と共に使用した。なお steroid の精製の進んでいない段階では、色素による quenching がおこるため補正を必要とした。これには一定 count 数 (測定試料の count 数と同程度の count 数のあるもの) の ^3H あるいは ^{14}C をその試料および Blank に添加して測定し補正した。

溶媒 A

Toluene	1,000ml
P.P.O.	4g
P.O.P.O.P.	0.1g

溶媒 B

Toluene	330ml	} + {	P.P.O.	4g
Dioxan	330ml		P.O.P.O.P	0.1g
Ethylcellesolve	330ml		Naphthalen	75g

^3H , ^{14}C の 2 重標識トレーサーを用いたときは Discriminator ratio 法により次式のように計算を行なった¹³⁾。

$$^3\text{H}, ^{14}\text{C} \text{ の標準試料の window 1, window 2, における discriminator ratio } \frac{C_2}{C_1} = b \cdots \textcircled{1}, \quad \frac{H_2}{H_1} = a \cdots \textcircled{2}$$

を求め、実際測定された試料の window 1, 2 における計数値を N_1 , N_2 とすると、Fig. 3 の原理図より $N_1 = H_1 + C_1 \cdots \textcircled{3}$ $N_2 = H_2 + C_2 \cdots \textcircled{4}$ となり、 $\textcircled{1}\textcircled{2}\textcircled{3}\textcircled{4}$ の式より

$$H_1 = \frac{bN_1 - N_2}{b - a}, \quad C_2 = \frac{b(N_2 - aN_1)}{b - a}$$

なる式ができる。

H_1 , H_2 は window 1, 2 における ^3H の計数値であり、 C_1 , C_2 は window 1, 2 における ^{14}C の計数値である。本測定するときには、光電子増倍管にあたえる高電圧および 2 組の window をいずれの window 内にも ^3H , ^{14}C の両方のかなりのパルスがはいるように設定する必要がある。

VI. 20α -hydroxypregn-4-en-3-one の合成

Progesterone から 20α -hydroxypregn-4-en-3-one を合成するのは、ほぼ Thomas¹⁴⁾ の方法によつた。すなわち 1 ml の methanol

に progesterone (100mg) を溶解し、これに pyrrolidine (0.1ml) を加えて、 N_2 -gas 下で 100°C 温浴上で 2 時間加熱後急冷すると、crystal (3-N-pyrrolidine enamine) ができる。これを ice-cold Methanol で数回洗滌してから蒸発乾固し、Ether (15ml) に溶かして lithium aluminum hydride (60mg) を加えて 1 時間よく混合する。混合が終了してからこれに注意深く Acetate buffer (1.6ml の醋酸と 1.6g の醋酸ナトリウムを 22ml の 10% aq. methanol に溶解したもの) を加え、Ether を分離蒸発後、残った methanolic solution を 100°C の温浴上で 6 時間 reflux し、これを chloroform で抽出脱水乾固した。得られた steroid は paper

Fig. 3. Discriminator ratio method

chromatography (Benzene : Ligroin : Methanol : water = 70 : 130 : 160 : 40) を用い下行法で展開すると、2つの紫外吸収帯がみられる。原点に近い方の吸収帯が 20α -hydroxypregn-4-en-3-one で、遠い方は 20β -epimer である。paper より各吸収帯を methanol で溶出し、rechromatography をして精製した。

第3章 経皮投与 progesterone の代謝

実験方法：生物学的活性をしらべる時と同様の方法で家兎に progesterone を投与した。すなわち progesterone が充分働く状態にするため、まず estrogen priming をおこなった。体重 1 kg の雌家兎に estradiol $5\mu\text{g}$ を 6 日間皮下注射し、その翌日 ^3H -progesterone ($4\mu\text{C}$ in 1 ml sesame oil) を大腿部皮下に注射し、前述 b の方法で 24 時間尿を 5 日間採取した。なお使用した注射器および試料びんは methanol で充分洗い残った count 数を測定し、投与量の補正を行なった。採取した尿は前述 III の方法で加水分解し抽出した後、Alumina Column chromatography で分画した。また測定は前述 V の liquid scintillation spectrometer で行なった。

実験成績：この尿中 metabolite の elution pattern を図で示すと Fig. 4 のようになり、それぞれ著明な peak を最初から I, II, III と名づけた。これらの溶出部位はそれぞれ I : 20α -hydroxypregn-4-en-3-one II : pregnane-3 α , 20α -diol, III : pregnane-3 α -6 α - 20α -triol に一致した。

これらのうち 20α -hydroxypregn-4-en-3-one の定性試験結果をまとめてみると Fig. 5 および Table 2 のよ

Fig. 4. Elution pattern of progesterone metabolites from alumina column (Subcutaneous administration)

Fig. 5. Identification of 20α -hydroxypregn-4-en-3-one on paper chromatogram

A : 20β -hydroxypregn-4-en-3-one standard.
B : 20α -hydroxypregn-4-en-3-one standard.
C : metabolite (elution pattern I) in rabbit urine
D : acetylated C
E : deacetylated D
F : oxydized E
G : progesterone standard.

Table 1. The percent distribution of radioactivity in the urine after subcutaneous administration of radioactive progesterone

Experiment No.	1	2	3	4
Fraction				
Free and glucuronide	36	50	41	7
Sulfate	7	16	10	34
Acidic	37	15	32	30
Unextractable	20	19	17	11

Table 2. UV absorption spectra & sulfalic acid chromogen spectra of progesterone & its metabolite

	Maximum absorption	
	MeOH	H ₂ SO ₄
B	240 m μ	290 m μ
C	240	290
F	240	291
G	240	291

うになる。すなわち peak 1 は acetic anhydride pyridine で容易に acetyl 化され、deacetyl 化することにより元の steroid にもどるが、他方クロム酸で酸化することにより paper chromatogram 上 progesterone に一致する spot が得られ、この steroid の紫外線吸収 spectrum, sulfuric acid chromogen spectrum などどれも progesterone に一致した。他方 spot は MeOH 中で Δ^4 -3-ketone 構造に特有な $240m\mu$ に一致する吸収 peak を示しており、したがってクロム酸で酸化された OH 基は C_{20} -OH であることになる。すなわち peak I は 20α -hydroxypregn-4-en-3-one であることが明らかになった。

尿中に排泄された metabolite の free, glucuronide, sulfate, acidic 等の各 fraction における radioactivity をみると Table 1 に示すように本実験の抽出過程では投与量の 25~40% が acidic および unextractable fraction に移行し、steroid の回収量を減少させているが、40% 近くは free および glucuronide fraction に得られ、15% 近くが sulfate fraction に得られた。また尿中に排泄された 20α -hydroxypregn-4-en-3-one は計算上投与量の 2.6~3.7% であった。

第4章 経口投与 progesterone の代謝

実験方法：経皮投与の時と同様 estrogen priming を行なった Clauberg 家兎に 3H -progesterone ($4\mu c$ in 1ml sesame oil) を経口投与した。すなわち臨床未熟児の保育に使用する鼻腔栄養用カテーテル管を家兎の口腔より胃内に挿入して投与した。なお投与後使用した注射器、ビニール管および試料びんに残った試料は methanol で充分洗い、一括して count 数を測定し投与量の補正を行なった。採取した尿は経皮投与の場合と同様の方法により加水分解、抽出、Alumina Column Chromatography の操作を行なった。測定も同様 liquid scintillation spectrometer を用いた。

実験成績：尿中 metabolite の elution pattern を図で示すと Fig. 6 のようになり、この尿中 metabolite の free, glucuronide, sulfate, acidic 等の各 fraction の radioactivity の分布をみると Table 3 のように、どれも経皮投与の成績とあまり変化はみられなかつた。また尿中に排泄された 20α -hydroxypregn-4-en-3-one は前章と同様に同定され投与量に対して 3.3~3.7% が排泄され経皮投与のそれとあまり変らなかつた。Hoffman¹⁵⁾ (1942) は家兎に Fischer¹⁶⁾ (1953) は人に progesterone を経皮および経口投与したとき、尿中 pregnanediol への代謝に量的な差異は認めなかつたと言っている。しかしここで家兎の場合 20α -hydroxypregn-4-en-3-one が尿中に排出されるから従来より言われているように、経口投与によつて不活性化すなわち A-ring の還元が増加するのであれば、この 20-ol 体の尿中への排泄が経口投与では著明に減少していなければならないはずである。しかし本実験ではこの 20-ol 体の尿中排泄量にも経口経皮両投与方法で差は認められなかつた。しかし同一家兎を用いた実験ではないのでその判定は必ずしも容易ではない。そこで次に同一家兎を用いて経口経皮両投与方法を行なった。

Fig. 6. Elution pattern of progesterone metabolite from alumina column (Oral administration)

Table 3. The percent distribution of radioactivity in the urine after oral administration of radioactive progesterone

Experiment No	1	2	3	4
Fraction				
Free and glucuronide	59	47	65	56
Sulfate	14	13	8	14
Acidic	16	25	21	21
Unextractable	11	15	6	4

第5章 経口経皮同時投与 progesterone の代謝

実験方法: estrogen priming をした Clauberg 家兎に ^3H -progesterone ($1\mu\text{C}$ in 1ml sesame oil) を経皮投与し、同時に ^{14}C -progesterone ($1\mu\text{C}$ in 1ml sesame oil) を経口投与して前述 a の方法で持続導尿により 2～3 時間ごとに 48～72 時間採尿し加水分解、抽出測定の方法は前章と同様に行なつた。

実験成績: 尿中 metabolite の elution pattern および尿中 metabolite の free, glucuronide, sulfate, および acidic の各 fraction における radioactivity の分布をそれぞれ Fig. 7, Table 1, 3 の No. 4 に示した。同一家兎に経皮経口同時投与を行なつても metabolite の elution pattern や各 fraction の radioactivity の分布は、単独投与例とほぼ同様の成績が得られた。また尿中に排泄された 20α -hydroxypregn-4-en-3-one を前章と同様に同定し、その尿中排泄率をみると投与量の 3.3% が経皮投与で、4.8% が経口投与で得られた。このように metabolite の pattern は同様であつても、metabolite の排泄速度が両投与方法にどのような相異があるかをみるために、前述の実験と同様経皮経口同時投与で 1～3 時間ごとに得た尿の radioactivity を測定してこれを図に示すと Fig. 8 のようになり、経口投与の場合は投与後速やかにその radioactivity は上昇し、投与後 3～4 時間で peak となり、その後急速に減少の傾向がみられたが、一方経皮投与の場合その peak は経口投与にくらべてやや遅れ、4～6 時間後となり、その上昇および減少の curve は経口投与に比較してかなりゆるやかであつた。すなわち経口投与ではその尿中への排泄が経皮投与に比較して速いと言える。言い換えると尿中排泄の態度は血漿中の radioactivity の濃度を主として反映するものであるから、その血中濃度の状態が両投与方法において相異しているはずであるから、次の実験でこれを検討した。

Fig. 7. Elution pattern of progesterone metabolite from alumina column (Simultaneous administration)

Fig. 8. Urinary excretion of radioactive material after simultaneous administration of ^3H -progesterone (Subcutaneously) and ^{14}C -progesterone (Orally) (% of administered dosis)

第6章 progesterone の経口および経皮投与時の血中 radioactivity

実験方法: estrogen priming をした Clauberg 家兎に ^{14}C -progesterone ($2.5\mu\text{C}$ in 1ml sesame oil) を経口および経皮投与して、投与後 4 時間目に頸動脈および心より穿刺により速やかに全血を採取し、血清を分離して加水分解抽出後、その血中 metabolite の radioactivity を測定した。

実験成績: Progesterone 投与後の血中の free, glucuronide, および sulfate 各 fraction の radioactivity の分布をみると Table 4 に示すよ

Table 4. Plasma radioactivity after administration of ^{14}C -progesterone subcutaneously or orally

	Subcutaneous administration	Oral administration
Free (f)	1570 C.P.M.	425 C.P.M.
Glucuronide (g)	1489	9600
Sulfate (s)	2435	24000
$\frac{f}{f+g+s} \times 100$	29 %	1.3 %

うに、経皮投与の場合血中 free steroid の占める radioactivity は、経口投与の場合の約23倍の割合であつた。このことは経口投与された progesterone は腸より吸収され門脈を経て肝で inactivate されるために systemic circulation にはいる free steroid が少なくなり、一方 conjugate metabolite が高値となつて現われるものと考えられる。

第7章 静注および経口分割投与 progesterone の代謝

実験方法：estrogen priming をした Claubesg 家兔にプロルトン静注用(Schering 社製)のprogesterone 1 mgを連続5日間耳静脈より静注して total 5mg 投与後、翌日開腹して子宮を取り出した。その生物学的活性の判定には後述の McPhail 法および Carbonic anhydrase activity (CAA) の判定⁷⁾⁸⁾⁹⁾によつた。

また progesterone 1mg を estrogen priming をした Clauberg 家兔に6時間ごとに連続3日間経口投与して、同様子宮粘膜に対する生物学的効果をみた。

実験成績：静注投与例では経口投与例と同様にその生物学的効果は認められなかつた。これは一面、静注投与は経口投与と同様に排泄が速やかなた

め target organ に達して、それに作用するだけの hormone level を維持できないのではないかと考えられるので、次に分割経口投与を行なつて、ある程度の血中濃度が経皮投与の場合と同様保持することができ、平等な hormone level が保てるようにこころみたが、Table 5にその成績をみるように、その生物学的効果は対照として行なつた経皮投与1日1/3mg・3日間連続投与例にはるかにおよばなかつた。このことより両投与方法による排泄速度の相異と生物学的効果との間に、なんら相互関係は認められなかつたことになる。

Table 5. Bioassay of progesterone

	Method of administration			C.A.A (Eu/g)	McPhail
	Daily dose	Duration days	Total dose mg		
Oral	1 mg × 4	3	12.0	60	+
Subcut	$\frac{1}{3}$ mg × 1	3	1.0	100	+++
Oral	10mg × 1	5	50.0	70	+

第8章 progesterone および related compound の生物学的活性

実験方法：

Carbonic anhydrase activity (CAA)

体重700~1,200gの幼若家兔に estrogen priming として estradiol を1日1回連続6日間大腿皮下に注射、続いて各種 steroid を1日1回連続5日間経皮または経口投与した。投与終了の翌日頸動脈切断放血後、開腹して子宮を摘出した。次に子宮角より約1cmの部分幅約5mmに輪切り、10% Formalin 液に固定して、後述の McPhail assay に供した。残りの子宮は小剪刀で縦に切開した後、冷生食水で軽く3回洗い、ろ紙上に切開した子宮をのせて過剰の水分を吸収させ、小鋭匙をもつて粘膜を搔爬して、得られた粘膜を torsion balance で計量し、重量の10倍量の蒸留水と共に氷浴中で potter の homogenizer で磨碎した。homogenate は1500r.p.m, 15分間遠沈してその上清の抽出液を2, 4, 8, 16…および3, 6, 12, 24…の2系列の倍数希釈液として測定は Philpot & Philpot⁷⁾の変法平清水¹⁷⁾の方法で行なつた。

McPhail⁴⁾ Assay

前述の切除した子宮片を10% Formalin で固定し、パラフィン包埋5μの切片として、hematoxylin-eosin 染色した後、その子宮粘膜の proliferation pattern を検鏡した。そして腺は発達し腺腔を形成しているが粘膜表層に限られ、深部の間質におよんでいないものを(+), さらに腺の数と深さが増し、腺の増殖は主として対子宮間膜側にあるものを(++), 腺増殖は一樣に粘膜に拡がり、腺は深さを増して間質の深部にまで侵入し、間質の減少がみられるものを(+++), 腺増殖が高度で間質を貫ぬいて筋層近くにまで侵入し、粘膜裏がわずかに保存され、粘膜は破れてみえるものを(++++)と表現した。

6-dehydro-progesterone の合成

ほぼ Agnelle & Laubach¹⁸⁾の方法に従って行なった。すなわち progesterone (1.0g) に第3 Butanol 70ml および chloranil 1.7g を加え、N₂ gas 中5時間 100°C 温浴上で reflux し、急冷後 300ml の蒸留水を加え methylene chloride 30ml で3回抽出し、抽出液に petroleum ether 150ml を加えて2% sodium hydrosulphite 15ml で3回、1N-NaOH 20ml で5回、蒸留水20ml で5回洗滌後、芒硝で脱水し蒸発乾固した。これを alumina 22g, 内径1.9cm のクロマト管で alumina column chromatography を行なった。溶出方法は、抽出物を hexane-benzene (1:1) で吸着したのち、同液100ml を、ついで benzene 300ml, 0.1% methanol-benzene 100ml, 最後に methanol 50ml で溶出した。なお溶出液は10ml を1 fraction として fraction collector を用いて分画採取した。各溶出液を蒸発させ、methanol を用いて結晶させると benzene 溶出開始後4本目から24本目までの試験管底に結晶の析出が認められた。これを一括して集め methanol で再結晶を数回行なうと、白色の結晶物が得られた。この結晶の methanol 中での紫外線吸収 spectrum をみると、Fig. 9 のように 285m μ で peak を示す 6-dehydropregesterone が得られた。

実験成績：実験に用いた steroid は progesterone および 6-dehydropregesterone であり、それぞれ経皮経口投与した時の progestational activity を C.A.A. および McPhail assay で行なった成績を示すと Table 6 のようになり、経口投与例では progesterone に生物学的活性が認められないように 6-dehydropregesterone も同様に生物学的活性を認めることができなかった。

6-dehydropregesterone は $\Delta^{4,6}$ の double bond を持つており、progesterone のように A-ring の還元が起こり難いのに経口投与で不活性を示しているのは、他に別の route で不活性化されるものと考えられる。

実際 6-dehydropregesterone を投与された家兎尿中 metabolite は A-ring が還元されていないという結果を得ている¹⁹⁾。

Fig. 9. Ultraviolet absorption spectrum of 6-Dehydropregesterone.

Table 6. Bioassay of progestins

	Method of administration		C.A.A. (average Eu/g)	McPhail
		Dose (mg)		
Progesterone	S.C	1	100	++
		2	120	+++
	P.O	4	30	—
		8	40	—
		10	50	+
		50	50	+
6-dehydropregesterone	S.C	2	120	+++
	P.O	4	40	+
		10	50	+
		50	60	+
Control			20	—

S.C: subcutaneous administration
P.O: oral administration

第9章 総括ならびに考按

Progesterone は生体内で Δ^4 -3ketone と C-20 ketone の還元体に代謝されると考えられ, pregnanediol が progesterone の代謝産物であることが Venning & Browne (1937²⁰), 1938²¹) により報告されている. そしてこの pregnanediol に至る代謝過程には pregnane-3, 20-dione および allopregnan-3, 20-dione が飽和 diol への中間代謝産物であると考えられている. すなわちこれらのものを生体に投与すると, 尿中に 5α および 5β 型の diol が排泄される. また Zander 等²²) (1958) は人間の胎盤, 黄体および破裂前の卵胞中にさらに 2 種の中間代謝物のあることを報告した. すなわち Δ^4 -pregnen-20 α -ol-3-one およびその 20 β -epimer である. その化学的構造より両異性体は progesterone の直接の代謝産物であると考えられ, Hooker-Forbes 法および Clauberg 法により pro-gestational activity をもつ progestin とみなされた. そこでこの progesterone の代謝過程を図に示すと Fig. 10 のようになる.

Fig. 10. Metabolite of progesterone

生体内における progesterone に関する研究は比較的早くから実験され報告されている. 緒言でも述べたように Engel¹¹) (1941) は progesterone を皮下および門脈静脈に注射した家兔の Clauberg 反応では, 後者の場合が弱く, 脾内に注射してもその活性が弱下することから progesterone は主として肝において不活性化されるものであると報告した. Masson & Hoffman²³) (1945) も家兔で子宮粘膜の変化を起こすのに経口投与では皮下注射用量の400倍以上の progesterone を必要とするが, 肝切除をしておけば, 肝切除をしなかつたものの50倍以上も progesterone の用量を減ずることができたと報告している. また Riegel 等²⁴) (1950) によるとマウスおよびラットに ^{14}C -progesterone を投与した実験で, その放射性物質は肝において最大となり, 胆汁にはこばれ腸管に出て糞便中に現われる. また胆道の通過障害では尿中に大量に現われることから胆汁排泄の存在が明らかにされた. その他 in vivo における progesterone の肝における不活性化に関する実験は多く²⁵), progesterone の不活性化ならびに構造上の変化が肝で行なわれることは確実である.

しかし一方 in vitro における実験報告は比較的少ないが, 石塚²⁶) (1957) は progesterone と肝 homogenate との incubation 実験および肝の灌流実験において pregnane-3 α -ol-20-one, pregnane-3 α ,20 α -diol を単離し, Dorfman 等の述べている progesterone $\rightarrow$ pregnanediol $\rightarrow$ pregnanolone $\rightarrow$ pregnanediol の代謝過程を認めている. また Bryson & Sweat²⁷) (1963) は progesterone-4- C^{14} を人の分泌期子宮粘膜と incubate して 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one, pregnanediol, allopregnanediol, 6 β -hydroxyprogesterone, pregnane-20 α -ol-3-one, unidentified dihydroxy compound の6つの代謝産物を得たと報告している. そして Taylor²⁸) (1955) は家兔肝との incubation 実験で, progesterone は 3 α -hydroxy-5 β -pregnan-20-one および 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one に転換されたと報告している.

これら progesterone の pregnanediol にいたる代謝のうち肝における最初の metabolic reaction は, A-ring の還元であると考えられて来た. われわれの教室でも tritium labelled progesterone を家兔肝 slice と incubate して得られた metabolite の主なものが, pregnanediol であることを認めている. 一方 6-dehydropregesterone はこれを家兔に投与した場合, 尿中に2つの大きな metabolite がみられるがこれらはどれも Δ^4 -diene-3-one steroid であつた. これは Δ^6 の2重結合の導入が A-ring の還元性を低下させ

たとえられるが、この steroid は経皮投与で明らかな progestational effect を示したにかかわらず、経口投与したときその効果は認められなかった。このことから考えると、progesterone の経口投与による不活性化も必ずしも A-ring の還元だけでは説明できない。そこでこのような progesterone の不活性化の原因を経口および経皮投与について先ず吸収排泄の面で比較検討してみると、実験成績で示したように、経口投与で排泄速度が速く子宮粘膜において作用する時間が短いことがわかつたので、1日4回分割経口投与することにより作用時間が長くなることを期待したが、予想に反してその効果はなく、単なる progesterone の吸収排泄の面からのみでは両投与方法による効力差を説明できなかった。

さて従来より progesterone が人体に投与されると、主として pregnanediol complex として尿中に排泄され、 Δ^4 -3-ketone steroid としてはほとんど排泄されることが知られているが、家兎では C_{20} reduced product である 20α -hydroxypregn-4-en-3-one が一部尿中に排泄され、特に neutral ketonic metabolite の主体となつてることが報告されている²⁹⁾。すなわち A-ring の還元を受けていない型で尿中に排泄されているわけである。そこで家兎に progesterone を経口投与してその尿中に排泄された 20-ol 体を測定し、経皮投与の場合と比較することで、経口投与時に特に強い Δ^4 -3-ketone の還元が起こるかどうかをしらべてみた。本実験では尿中に排泄された metabolite の状態を glucuronide, sulfate, acidic, 等の各 fraction について両投与方法を比較したが、著明な相異は認められず、また 20-ol 体の測定値と Thomas 等の行なつた progesterone の代謝実験成績とから、家兎体内で行なわれた progesterone の 20-ol 体への転換率を算出していても Table 7 に示すようにどの投与方法でも

30~40%と著明な差がみられなかつた。ここでこの 20-ol 体は経皮投与による Bioassay で progesterone の約1/2~1/3の活性を示すことが知られている。したがって50mgの progesterone を経口投与した場合、その15mgは体内に 20-ol 体として存在することになり、20-ol 体の存在のみからでも経皮投与 progesterone の5~7 mgの活性を示さなければならないことになる。しかし事実は1 mgの経皮投与 progesterone の効果にも及ばない実験結果を得た。これはすなわちFig. 11に示すように progesterone の不活性化は、A-ring の還元による不活性化とさらに progesterone の 20-ol 体の形成に引き続いて起こる glucuronide 形成という2つの方法による不活性化を受け、この glucuronide の deconjugation が起こりにくいと考えられることによりはじめて説明できるように思われる。この仮定を裏付ける意味で ^{14}C -progesterone を家兎に経皮経口両投与をして、そのときの血中 free および glucuronide, sulfate, の各 fraction に対する radioactivity の incorporation をみた。投与後4時間目で free fraction が経皮投与で経口投与の約23倍の値を示し、経口投与例では大量の conjugated metabolite が血中にみられた。

以上いくつかの実験を考え合わせてみると、家兎における progesterone の不活性化は、古くから信じられて来た A-ring の還元のみでなく、20-ketone の還元を引き続いて起こる glucuronide 形成が一つの大

Table 7. Calculated conversion rate of progesterone to 20α -hydroxypregn-4-en-3-one (in vivo)

Experiment No.	1	2	3
Method of administration			
Subcutaneous	26	37	33
Oral	33	37	48

%

Fig. 11. Inactivation of progesterone

きな要因を成していることがわかる。このような不活性化機構が、直接人体に当てはまるかどうかについては、本実験からのみではうかがい得ないが、少なくとも新しく合成された progestin 剤が経口投与でも有効か否かを決定するのは、本実験で使用したような Clauberg 家兎に経口投与して定めるものであり、したがって各種合成 progestin 剤の不活性化の問題を考えるにあたっては、このような 20-ketone の還元を引き続いて起こる glucuronide 形成をみのがすことができないと考えられる。

第10章 結 語

Progesterone を経口投与したときの不活性化の原因は、progesterone が肝でその A-ring が還元されるためであるとされてきた。本実験ではこの不活性化の原因をさらに明らかにする目的で、radioactive progesterone を家兎に経口投与して経皮投与の場合とその代謝の相異を検討し、次のような結果を得た。

- (1) 尿中 radioactivity の free, glucuronide, sulfate などへの分布、および metabolite の pattern には両投与方法に著明な変化がみられなかった。
- (2) 尿中への排泄速度は、経口投与の方が速い傾向がみられたが、経口分割投与での Bioassay の効果は、経皮投与のそれにはるかに及ばなかった。
- (3) 投与された progesterone は、どの投与方法でも約 3～4% が尿中に 20-ol 体として排泄された。
- (4) Progesterone 投与後 4 時間目の血中 free steroid は経皮投与例では経口投与例の約 23 倍の値を示していた。
- (5) 20-ol 体の glucuronide formation が経口投与 progesterone の不活性化の原因として、A-ring の還元と共に重要な意義があると考えられる。

本論文の要旨は、徳田教授の第13回日本内分泌学会東部部会総会特別講演の一部に発表され、第13回日本内分泌学会西日本地方会において発表した。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜わった徳田教授に深く感謝するとともに、終始御指導下さった当教室岡田講師をはじめ研究室諸兄に感謝する。

文 献

- 1) ROSENKRANZ, G. et al : J. Amer. Chem. Soc., 72 : 4077, (1950).
- 2) CORNER, G.W. and W.M. ALLEN : Amer. J. Physiol., 88 : 340, (1929).
- 3) CLAUBERG, C. : Zbl. Gynäk., 54 : 2757, (1930).
- 4) McPHAIL, M.K. : J. Physiol. (Lond), 83 : 145, (1934).
- 5) HOOKER-FOEBES : Endocrinology, 111 : 44, 158 (1947).
- 6) LUTWAKMANN, C. : J. Endocr., 13 : 26, (1955).
- 7) PHILPOT, F.J. and J.L. PHILPOT : Biochem. J., 30 : 219 (1936).
- 8) PINCUS, G. and J. MIYAKE : Endocrinology, 61 : 5, 528, (1957).
- 9) MIYAKE, J. and G. PINCUS : Endocrinology, 63 : 6, 816 (1958).
- 10) MARRIAN, G.F. : Biochem. J., 23 : 1090, (1929).
- 11) ENGEL, L.L. : J. Biol. Chem., 137 : 205, (1941).
- 12) PEALMAN, W.H. et al. : The hormones, New York, 1 : 407, (1948).
- 13) 岩倉哲男 : 化学の領域, 18 : 5, 407, (1963).
- 14) THOMAS, G.H. : Biochem. J., 83 : 450, (1962).
- 15) HOFFMAN, M.M. and J.S.L. BROWNE : Fed. Proc., 1 : 41, (1942).
- 16) FISCHER, R.H. and S.P. McCOLGAN : J. Clin. Endocr., 13 : 1043, (1953).
- 17) 平清水大五郎 : 京都医大誌, 70 : 1, 212, (1961).
- 18) AGNELLE, E.J. and G.D. LAUBACH : J. Amer. Chem. Soc., 79 : 1257, (1957).
- 19) 岡田弘二他 : 未発表.
- 20) VENNING, E.H. and J.B. BROWN : J. Biol. Chem., 119 : 173, (1937).
- 21) VENNING, E.H. and J.B. BROWN : J. Biol. Chem., 126 : 595, (1938).
- 22) ZANDER, J. et al : J. Clin. Endocr., 18 : 337, (1958).
- 23) MASSON, G. and M.M. HOFFMANN : Endocrinology, 37 : 111, (1945).
- 24) RIEGEL, B. et al : Endocrinology, 37 : 311, (1950).
- 25) LEBLOND, C.P. : Am. J. Med. Sci., 204 : 566, (1942).
- 26) ISHI ZUKA, N. : Med. J. Osaka. Univ., 7 : 953, (1957).
- 27) BRYSON, M.J. and M.L. SWEAT : Fed. Proc., 22 : 469, (1963).
- 28) TAYLOR, W. : Biochem. J., 60 : 380, (1955).
- 29) COOKE, A.M. et al. : J. Endocr., 27 : 299, (1963).