Metabolism of 17α -Ethynyl Estradiol and 17β -Estradiol in Vivo

Yoshitaka HIGASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine,
Kyoto, Japan (Director : Professor Gen-ichi Tokuda)

Estrogens are frequently used for clinical purposes. Estradiol (ED- 17β), which is a natural estrogen, however, is inactive when administered orally.

The activation of orally administered ED- 17β has been supposed to take place in the liver. Ethynyl estradiol- 17α (EED- 17α) which is a synthetic estrogen is effective in both oral and subcutaneous administration.

This study was undertaken to investigate the metabolic differences between ED- 17β and EED- 17α in rabbit.

^3H -EED- 17α was orally or subcutaneously administered in a large or a small dose. ^{14}C -ED- 17β was administered in a large or a small dose.

After the administration, urine samples were pooled every 24 hours and estimated by counting in the liquid scintillation spectrometer. In the small doses, administration of ED- 17β , about 97% of radioactivity was found to be excreted in the urine during a 2-day period. When administered in a large amount, however, excreted radioactivity was only 20.1%. In the ^3H -EED- 17α administration, urinary excretion of radioactivity tended to be delayed compared with ^{14}C -ED- 17β . No remarkable difference in the excretion of radioactivity was observed regardless of mode of administration. The urine sample was extracted with chloroform to give free fraction of excreted radioactivity. The urine was then incubated with β -glucuronidase for 36 hours and extracted with chloroform (glucuronide fraction). Residual urine was extracted with ethyl acetate at pH 1 after saturation with ammonium sulfate. The organic extract was incubated for 36 hours. After incubation, organic extract was washed with 8% NaHCO_3 water. (solvolysis fraction)

Finally, washings were hydrolyzed with HCl in the boiling water bath and extracted with ethyl acetate (hot acid hydrolysis fraction). With ^3H -EED- 17α , most of the radioactivity appeared in the sulfate fraction. ^{14}C -ED- 17β administration resulted in high levels of radioactivity in the free and glucuronide fraction.

The extract of each fraction was subjected to partition chromatography on alumina column. Elution was carried out by the stepwise addition of increasing concentration of methanol in benzene. Three peaks of radioactivity, A, B and C were shown in the glucuronide fraction of ^{14}C -ED- 17β .

Radioactive peak B, which was highly eluted in 0.5% methanolbenzene, was similar to ED- 17α on paper chromatography, thin layer chromatography (TLC) and gas liquid chromatography (GLC). Constant specific activity was obtained on recrystallization with authentic ED- 17α .

In solvolysis fraction, however, peak B disappeared from the distribution pattern and radioactivity was present mainly in 50% methanol-water fraction. Because of its ethyl acetate soluble nature, this radioactive material is most likely 17α -ED- 17β -N-acetyl glucosamine conjugate.

Peak A which eluted in 0.3% M.B. was identical with that of authentic estrone. In large-dose administration, the ratio of radioactivity incorporated into estrone fraction was higher than in small-dose administration.

Peak C corresponded to estriol in the column chromatographic behavior was eluted with 5% methanol in benzene. This material which had identical Rf. value with authentic estriol on paper chromatography was eluted and subjected to TLC. Radioactive spot was not identical with estriol, but with 16, 17-epi-estriol. However, the absolute amount was too small for further study.

On large-dose administration of ^3H -EED- 17α , the radioactivity was eluted mainly with 0.3% methanol in benzene as EED- 17α .

The sulfuric acid chromogen spectra and ultra violet absorption spectra of this peak were identical with those of authentic EED- 17α . Following addition of unlabelled EED- 17α to the isolated radioactive fraction, recrystallization was done from ethanol water and constant specific activity was obtained with authentic EED- 17α .

In small-dose administration of ^3H -EED- 17α , main radioactive peak was less polar than EED- 17α fraction, even though eluted with 0.3% methanol in benzene. This material was also discovered in large dose administration. It was not identical with authentic EED- 17α on sulfuric acid chromogen spectra and in retention time on GLC. It is thought from the chromatographic character that this material is likely 2-methoxy ethynyl estradiol. However, absolute amount was too small for further study.

It is indicated that 17-side chain splitting may not occur in vivo from the fact that there is no detectable ED- 17α in EED- 17α administration. This might explain the fact that EED- 17α is more active than the other estrogens by oral route. (pp. 1153~1167)

ウサギにおける 17β -estradiol および 17α -ethynyl-estradiol の代謝に関する研究

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任 徳田源市教授)

東 義 隆

(昭和43年4月2日受付)

^3H -ethynyl estradiol- 17α (EED) および ^{14}C -estradiol- 17β (ED) をウサギに投与し、その尿中代謝産物について検討した。その結果、1) 尿中排泄型は ED では glucuronide が、EED では sulfate が多い。2) ED の主要代謝産物は ED- 17α で、estrone のほかに少量の epi-estriol を認めた。EED 投与時のそれは結合型 EED であり、 17α -ethynyl 基の splitting はおこらない。また少量の 2-methoxy ethynyl estradiol 産生の可能性がある。

〔I〕 緒 言

婦人科領域で、性 steroid は非常にしばしば使用されており、とくに estrogen は progestin の数分の一の量、すなわち μg . 単位の量で十分な効果をあらわすものである。しかしながら、経口投与ではその効果が著しく減少してしまうために最近までその使用にあたっては、もっぱら経皮投与のみにたよってきた。

これは肝で不活性化されるためであると考えられており、Biskind, G.R.¹⁾ は estrone の pellet をラットの脾内に移植したとき、estrogen 作用が現われないことを報告しているし、また Talbot²⁾ はラットを使つて四塩化炭素による肝障害をおこしたとき、estrogen は代謝されず不活性化がおこらないために過剰となり、子宮に浮しゅうをおこすことを報告している。

同様に肝障害時には、ヒトでも女性乳房、睪丸い縮、体毛脱落などの hyperestrogenismus²⁸⁾ の症状が現われてくることが知られている。

このような理由から、estrogen 剤の使用は、もっぱら経皮投与のみにたよってきたが、その効果を持続させるためには、すくなくとも2、3日に一度の注射が要求され、患者に苦痛を与えるため、肝を通らない経路、たとえば舌下錠や、またときには depot 効果をあらわすものとして、pellet の形で皮下に移植するような方法も試みられてきた。

一方、Inhoffen などは1938年、 17α -ethynyl-estradiol (以下 EED と略す) を合成したが、本剤は経口投与でも著明な estrogen 作用を現わすことが明らかにされ、最近にいたつて、臨床的にも経口投与 estrogen 剤として、ひろく使用されるようになった。

現在、臨床的に使用されている経口 estrogen 剤としては EED- 17α とその 3-methyl ether²⁾ がある。

このような estrogen 剤開発の歴史的背景を考えると、EED の体内での代謝を 17β -estradiol (以下 ED- 17β と略す) のそれと比較検討することは、EED が経口投与によつても活性をしめす理由を知る点からも非常に興味ぶかい問題であると考えられる。

本実験では、実験動物としてウサギを用いたが、これは本実験で分析に十分な量の estrogen の代謝産物を得るためには、大量の投与が必要であり、他方、estrogen 大量投与はその毒性のため、ヒト、ラットでは不適当と考えられるためである。ウサギでの natural estrogen の代謝について、いくつかの報告がみられるが、後述のように研究者によつて意見の一致をみない点も多いので、この点についても同時に検討した。

〔II〕 実験方法

(1) 実験対象および材料摂取

体重 2 kg. 前後の正常雌ウサギを対象とした, England, Amersham, Radiochemical center より入手した ^{14}C -ED- 17β を数回の paper chromatography (後述) により, 純化したのち, 下記の量の ED- 17β の標準品とともに, propylene glycol に加温溶解し, ウサギ皮下に投与した. なお, 対象により添加する ED- 17β 標準品の量は 200mg., 5mg., 5 μg . の3種類とした. ^3H -EED は Radiochemical center より入手の ^3H -ED を ethynyl 化したもののほか Wilzbach 法⁴⁾ により EED に ^3H を標識したものをを用いた. 標識後, ethanol 中に溶解, 蒸発をくりかえし, labile ^3H を除去した. alumina column chromatography (後述) を行ない, 使用前にはさらにこの ^3H -EED を thin layer chromatography (後述) または paper chromatography で純化, sesame oil に溶解し, 経口または経皮投与した. なお, 添加した標準品 EED は 200mg. または 5 μg . の2種類にわけた. estrogen 負荷時より蓄尿を開始し, 24時間単位で採取し, ろ過後, 氷結保存した. 原則として7日間, 採尿を継続した.

(2) 加水分解および抽出方法

対象により異なるが, 第1, 2日または第1, 2, 3日尿の全量を使用した. これらのろ過尿を, まず同量の CHCl_3 で2回抽出し, CHCl_3 抽出液に1/10量の 8% NaHCO_3 液を加えて2回, ついで1/10量の水で3回洗浄し, 脱水後, 蒸発乾固し free 分画とした.

free 分画抽出後の水層は conc. H_2SO_4 にて pH 5.0 に修正し, 東京臓器製 β -glucuronidase (300units/ml) を加え, 37°C で36時間放置した. それを同量の CHCl_3 で2回抽出し, CHCl_3 抽出液を前回と同じ要領で洗浄し, 脱水後, 蒸発乾固したものを glucuronide 分画とした.

glucuronide 分画抽出後の水層を conc. H_2SO_4 で pH 1 に修正し, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え (60g/100ml), 同量の ethyl acetate で2回抽出した. 抽出 EtOAc を 37°C で36時間放置した. それを 8% NaHCO_3 液および水で洗浄し, 脱水後, 蒸発乾固し solvolysis 分画とした.

洗浄に用いた 8% NaHCO_3 液および水を conc. H_2SO_4 にて pH 1.0 に修正したのち conc. HCl を加え (15% vol./urine), 100°C 温浴中で, 約30分間加熱水解⁵⁾⁻⁸⁾した. 同量の EtOAc で2回抽出し, 8% NaHCO_3 液および水で洗浄, 脱水後, 蒸発乾固し hot acid hydrolysis 分画として保存した.

以上をまとめると Table 1 のごとくであるが, 従来より1回の操作による水解方法として, 酸加熱水解がひろく用いられており, これは簡便である反面 step hydrolysis の場合の60~70%の収量を得るにすぎず, 後述の実験成績のように水解処理中に metabolite が破壊される場合には, この方法は適当ではない, これについて多少検討を加えてみた. 以下, ^3H -EED 投与尿を使つての実験成績である.

○ β -glucuronidase による水解

free steroid を CHCl_3 で除去した尿に Sigma Chemical 製 β -glucuronidase (200units/ml) を加え, 37°C で24時間放置すると結合型 steroid のうち, 約26%が水解され, さらに同様の方法で第2回目の水解を行ない, 2.9%の steroid を回収できた. すなわち第1回目の水解で β -glucuronidase による水解はほとんど行なわれているといえる.

○結合型 steroid の EtOAc への移行率.

free steroid を除去した尿に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加え (60g/100ml), pH 1~6 の範囲で EtOAc への radioactivity の移行率をみると, pH 1.0 では90%を抽出できるが, pH 3.0 では 77%, pH 6.2 では20%と急激に減少する. pH 1.0 で得た EtOAc を 37°C で36時間放置し solvolysis を行なつた結果, 54.3%を free steroid として回収することができた. (Fig. 1)

○ NaHCO_3 による洗浄.

前述のごとくして得た free, glucuronide, solvolysis 分画として抽出した solvent を, その1/10容量の 8% NaHCO_3 液で2回, 水で3回洗浄し, 洗浄液への radioactivity の移行について検討したが, 本法で

Table 1. Extraction of ED-17 β or EED-17 α metabolites in urine Fig. 1. Ethyl acetate extractable radioactivities from (NH₄)₂SO₄ saturated urine in different pH

はほとんど radioactivity の損失のないことがわかった。(Table 2)

(3) 分離¹¹⁾

phenol 分画と neutral 分画とを次の方法で分離した。free, glucuronide, solvolysis および hot acid hydrolysis 分画をそれぞれ toluol 100ml に溶解し, 1N NaOH で3回抽出した。toluol を水で3回洗浄し, その洗浄水と抽出 NaOH を conc. H₂SO₄ で pH 1 に修正し, 同量の EtOAc で3回抽出した。それをさらに水で3回洗浄し, 脱水後, 蒸発乾固した。

なおその際, 有機溶媒から NaOH への phenolic steroid の移行について検討した結果, ethyl ether

Table 2. Loss of radioactivities during the washing with NaHCO₃

	Solvent	Loss of radioactivities
Free Fr.	CHCl ₃	5.1 %
Glucuronide Fr.	CHCl ₃	0.2 %
Sulfate Fr.	CH ₃ COOC ₂ H ₅	0 %

からの回収は不良であるが, toluol からの回収は良好であった。

(4) 尿中 **estrogen** の分画.

alumina column chromatography を用いた. 内径10mm. のクロマト管に Merck 社製の Brockmann alumina (標準品) 6g. を充てんし, それぞれの試料を約 2 ml の benzene に溶解し, alumina に吸着させた. 対象により多少異なるが, 通常, benzene, 0.1% methanol-benzene (M.B.), 0.3% M.B., 0.5% M.B., 1% M.B., 5% M.B., 30% M.B. の順で, おおの 100ml を使用し, drop count 型の automatic fraction collector を用いて, 10ml ずつ 70 本の分画に分離した¹²⁾.

(5) 定性ならびに定量.

i) **paper chromatography**¹³⁾.

試料を東洋ろ紙 NO 51A に吸着させ, 次の system で展開した.

○benzene ligroin-methanol water system (130 : 70 : 80 : 20) = B.L.M.-A system

○benzene ligroin-methanol water system (70 : 130 : 80 : 20) = B.L.M.-B system

○formamide chloroform system.

なお spot は 1% K_3FeCN_6 , $FeCl_3$ の等量混合液を用いる Burton et al 法¹³⁾による発色法や actigraph, liquid scintillation spectrometer による radioactivity の存在部位より検出し, 標準品の steroid と照合した.

ii) **thin layer chromatography (TLC)**.¹⁴⁾

Merck 社製 Kieselgel G 30g に水60mlを加え, 乳ばち中でよく混和し, 清しきしたガラス板に0.25mm. の厚さに引きのばした. 乾燥器中で約 2 時間活性化したのち, その plate に試料を spot し, 次の溶媒で展開した.

○benzene - acetone system (80 : 20)

○water saturated n-heptane - ethyl acetate - ethanol system (80 : 15 : 5)

○cyclohexane - ethylacetate system (50 : 50)

なお, spot の検出は硫酸を噴霧後, 加熱することにより行ない, その Rf 値と呈色性を標準品の steroid と照合した¹⁵⁾¹⁶⁾. また plate を小区域に分画し, その部分の radioactivity を ethanol で溶出し蒸発後, scintillator を加えて測定した¹⁷⁾.

iii) **gas liquid chromatography. (GLC)**.

水素炎イオン化ディテクターをつけた島津 GC-113 型 gas chromatograph を使用した. column には SE-30, 15% chromosorb W 150cm を用い, column 温度220°Cで分離を行なった.

iv) **再結晶**

ある metabolite に予想される steroid の標準品を carrier として加え, ethanol water を溶媒に数度再結晶を行なった. その各行程において上清および結晶の一部をとり, それぞれについて, 後述のように硫酸で発色した際の吸光度と liquid scintillation spectrometer によつて測定した radioactivity の比を求めて, それが一定になるかどうかを検討した.

なお, 吸光度は硫酸を加えて 1 時間後, ED では 430, 450, 470m μ ., EED では 520, 540, 560m μ . の 3 点を測定し, Allen の補正¹⁸⁾を行なった.

v) **sulfuric acid chromogen spectrum (SA spectrum)**¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾

試料を濃硫酸に溶解し, 室温で 1 時間放置後, 日立 EPU 2 型分光光度計で吸収スペクトルを 210~600 m μ . にわたり測定した.

vi) **alcohol sulfuric acid chromogen spectrum (ASA spectrum)**

試料を ethanol-sulfuric acid (1 : 2) の溶液で溶解し, SA spectrum と同様に吸収スペクトルを測定した.

vii) **ultra violet absorption spectrum (UV spectrum)**²²⁾²³⁾

試料を ethanol に溶解し、その吸収スペクトルを 210~400m μ にわたって測定した。

(6) **radioactivity** の測定

i) **actigraph**

Nuclear Chicago Model C 100 B Actigraph II を用いて、paper strip の scanning を行なった。なお、³H 測定の際には windowless の状態で行なった。

ii) **liquid scintillation spectrometer** による測定。

本実験での radioactivity の測定は、主として Packard 社製 Tricarb 314 A. liquid scintillation spectrometer を使用した。測定バイアルにとつた試料を完全に蒸発乾固し、次の scintillator 10ml に溶解し、いわゆる均一法²⁴⁾で測定した。

toluol
P.P.O. 4g/L. solvent.
P.O.P.O.P. 0.1g/L. solvent.

なお、水性試料の場合は、その0.5mlに、次の混合溶媒を10ml加えて測定した。

toluol - ethylcelosolve - dioxane (1:1:1)
P.P.O. 4g/L. solvent.
P.O.P.O.P. 0.1g/L. solvent.
naphthalene 75g/L. solvent.

測定時に問題となる fluorescence quenching は内部標準法²⁵⁾により補正した。

〔III〕 実 験 成 績

(1) **ED 投与時の尿中 metabolites** について。

i) 尿中への radioactivity の排せつは、大量投与例では1, 2日間で投与量の20.1%であるのにはんし、少量投与例では1, 2日間に投与量の大部分が排せつされてしまう。(Fig. 2) step hydrolysis による radioactivity の尿中分布は大量、少量投与とも、主として glucuronide 分画にみられるが、少量投与では大量投与にくらべ glucuronide 分画が少なく、solvolysis 分画のしめる率が高いようである。(Table 3)

ii) 水解して得た各々の分画について、alumina column chromatography を行なった。

a) 少量投与 free および glucuronide 分画

ED-17 α (0.5% M.B.) 部分に大量の radioactivity をもつ compound が溶出されたほか、EO (0.3%

Fig. 2. Urinary excretion of radioactivities after administration of ¹⁴C-ED-17 β

Table 3. Urinary distribution of radioactivities after administration of ^{14}C -ED- 17β

Fraction \ Method	Subcutaneous administration		
	200mg	5mg	5 μg
Free and glucuronide	70	75	46%
Solvolysis	10	8	29
Hot acid hydrolysis	4	2	6

Fig. 3. Elution pattern of ED- 17β metabolites in free and glucuronide fraction from alumina column (subcutaneously, 5 μg administration) Fig. 4. Elution pattern of ED- 17β metabolites in free and glucuronide fraction from alumina column. (Subcutaneously, 200mg administration)

M.B.), ET (5% M.B.) 部分にも少量の radioactivity が溶出された。(Fig. 3)

b) 大量投与 free および glucuronide 分画少量投与時と同様に ED- 17α 部分にいちばん大きな peak を持った3つの peak がみられた。しかし、少量投与時にくらべ EO 部分への radioactivity の incorporation が著明であつた。(Fig. 4)

c) solvolysis 分画。

大量投与、少量投与とも EO および ET 部分に少量の radioactivity を認めたが、ED- 17α 分画にも、free, glucuronide の場合とは異なつて、溶出された radioactivity はごくわずかであつた。そして 50% methanol-water によつて、はじめて大量の radioactivity が溶出された。この部分をさらに β -glucuronidase で加水分解し、ふたたび alumina column で展開した結果、ED- 17α 分画に radioactivity の大部分が溶出された。(Fig. 5)

d) hot acid hydrolysis 分画。

ED- 17α に相当する radioactivity のほかに、0.1% M.B. 後半より 0.3% M.B. 部分に溶出される大量の radioactivity を認めたが、ED- 17α を同じ条件で酸加熱水解を行なつた結果、まったく同じ radioactivity の peak を得た。その結果この peak は水解過程における ED- 17α の分解産物であると考えられる。(Fig. 6)

iii) 定性試験

a) ED- 17α 分画。

alumina column chromatography で得た ED- 17α 分画について、さらに paper chromatography (B. L.M.-A system) を行なつた。(Table 4)

Fig. 5. Elution pattern of ED-17 β metabolites solvolysis fraction from alumina column
(—before and ...after rehydrolysis with β -glucuronidase)

Fig. 6. Elution pattern of ED-17 β metabolites in hot acid hydrolysis fraction from alumina column

Table 4. Paper chromatography of EO, ED-17 α and ET fraction from alumina column

EO Fr.	Authentic EO	0.12 Rf. value	System B.L.M.-B
	Metabolite 1	0.12	
ED-17 α Fr.	Authentic ED-17 α	0.52	B.L.M.-A
	Metabolite	0.52	
ET Fr.	Authentic ET	0.06	Formamide chloroform
	Metabolite 1	0.06	
	Authentic ED-17 α	0.6	
	Metabolite 2	0.6	

Fig. 7. TLC of EO, ED-17 α and ET fraction from alumina column

呈色性および actigraph で steroid の検出を行なった結果, その Rf 値は標準品の ED-17 α に一致した. TLC (water saturated n-heptane, ethyl acetate, ethanol system) 中でも, ED-17 α に一致した spot を得た. (Fig. 7)

さらに、大量投与で得た ED-17 α の結晶の融点は224~226°C⁴⁴⁾で標準品のそれと一致し、少量投与の ED-17 α に標準品の ED-17 α を carrier として加えて行なつた再結晶ででも、ほぼ一定の specific activity を得、この分画が ED-17 α であることを確認した。

b) EO 分画.

EO 分画から、paper chromatography (B.L.M.-B system) により混在している ED-17 α を分離した。その結果、発色法および actigraph のどちらででも、標準品の EO に一致する Rf 0.12 の spot を認めた。(Table 4)

TLC (cyclohexane-ethyl acetate system) によつても EO に一致する spot を得た。(Fig. 7)

ただ、paper chromatography で、solvent front 近くに位置する不明の radioactive steroid を認めたが、これについては少量のため、十分な定性試験は行なえなかつた。

c) ET 分画.

formamide chloroform system で paper chromatography を行なつた。その結果、actigraph で Rf 値0.06と0.6の2つの peak を得た。(Table 4)

Rf 値0.6の peak は標準品の ED-17 α に一致し、column chromatography の際、ED-17 α 分画に溶出しきれずに残り、estriol 分画に溶出された ED-17 α と思われる。

Rf 値0.06の peak は標準品の estriol に一致するが、この metabolite は TLC (water-saturated n-heptane, ethyl acetate, ethanol system) で展開した結果、radioactivity 測定にて明らかになつた spot の位置は 16 β epi-estriol と estriol の中間に位し、Lisboa, B.P.¹⁵⁾ によれば、これは 16, 17 epi-estriol に相当する。(Fig. 7)

しかし、得られた steroid が少量のため、これ以上の検討は行なつていない。なお、TLC で estriol に相当する radioactive spot は認められなかつた。

(2) EED 投与時の尿中 metabolites について.

i) 尿中への radioactive substance の排せつは対象により異なるが、第1日もしくは第2日目に最も多く認められ、以降階段状に次第に減少し、7日間で投与量の26~65%が尿中に排せつされる。(Fig. 8)

その排せつ状況についてみると、経口投与と経皮投与、あるいは大量投与と少量投与など、投与方法のちがいにより大きな相違がおこると思われなかつた。

これらの尿について、各々 step hydrolysis を行なつた結果、少量投与の場合には radioactivity は solvolysis 分画に最も多く存在した。(Table 5) このことは前述の ED では、glucuronide 分画に radioactivity が集中して存在していたことと比較して興味ぶかい。

ii) 水解により得た各々の分画について、alumina column chromatography を行なつたが、その結果、次のような成績を得た。

Fig. 8. Urinary excretion of radioactivities after administration of ³H-EED-17

Table 5. Urinary distribution of radioactivities after administration of ^3H -EED-17 α .

Fraction \ Method	Oral	Subcutaneous	Oral
	200mg	5 μg	5 μg
Free and glucuronide	7.8	1.6	2.3%
	64.6	12.2	10.1
Solvolysis	15.7	38.1	51.8
Hot acid hydrolysis	1.8	24.8	16.9

a) 経皮少量投与例.

○ glucuronide 分画.

0.3% M.B. 後半より 0.5% M.B. にかけて, 最も多量の radioactivity が溶出され, これを peak A とした. 0.3% M.B. で溶出され, peak A に非常に近接してはいるが, それよりやや極性の弱い peak を認め, これを peak B とした.

peak A および Peak B のほかに, 1% M.B. および 5% M.B. にも少量の radioactive steroid が溶出され, これらをそれぞれ peak C および peak D と名づけた. (Fig. 9)

○ free 分画.

peak A のほかに, 小さな peak B, peak C および peak D が認められた.

○ solvolysis 分画.

この分画には peak B と小さな peak D が認められたが, peak A に相当する部位には radioactivity の溶出は認められなかった. (Fig. 10)

Fig. 9. Elution pattern of EED metabolites in glucuronide fraction (subcutaneously, 5 μg administration.) Fig. 10. Elution pattern of EED metabolites in solvolysis fraction from alumina column (subcutaneously, 5 μg administration.)

○ hot acid hydrolysis 分画.

solvolysis 分画と同様, peak B が最も大きく, peak A に相当する部位には radioactivity の溶出は認められなかった.

b) 経口大量投与例.

○ free および glucuronide 分画.

radioactivity を測定した結果, 0.3% M.B. 後半に溶出される peak A を認めた. 同一試料の一部を濃硫酸で発色し, 525m μ で吸光度を測定したが, その溶出 pattern は radioactivity の測定により得られ

たものと同じであつた。(Fig. 11)

○ hot acid hydrolysis 分画.

これは経皮少量投与時の glucuronide 分画に似ており, peak A のほかに peak B の部分にも比較的多量の radioactivity が溶出された. そのほか, free および glucuronide 分画, hot acid hydrolysis 分画にも, peak C および peak D が認められた. しかし, その radioactivity の量はわずかであつた.(Fig. 12)

Fig. 11. Elution pattern of EED metabolites in glucuronide fraction from alumina column (orally, 200mg administration)

Fig. 12. Elution pattern of EED metabolites in acid hydrolyss fraction from alumina column (orally, 200mg administration)

c) 経口少量投与例.

○ glucuronide 分画

a) および b) の溶出 pattern を比較するとき, 投与量によつて, その metabolite に大きな相違のあることにきずき, 経口少量投与時の glucuronide 分画のほかに, non-radioactive の EED 経皮大量投与で得た glucuronide 分画を加え, この2つを同時に1つの alumina column chromatography で分離を行なつた.

その結果, radioactivity の測定により, peak B 部分に, また濃硫酸発色による吸光度の測定では peak A に相当して peak を持った溶出 pattern を得た.(Fig. 13)

なお濃硫酸による発色のさい, peak B の分画に濃硫酸を加えると, ただちに鮮紅色に発色したが, 1時間後測定時にはまったく退色してしまつた. EED 大量投与時の metabolite と思われるが, これについてはちに述べる.

Fig. 13. Elution pattern of EED metabolites in glucuronide fraction from alumina column

Fig. 14. Sulfuric acid chromogen spectra

Fig. 15. GLC of 'peak A.' isolated from urine of rabbit administered EED

○ solvolysis 分画.

peak B に相当する部分に radioactivity が溶出された.

○ hot acid hydrolysis 分画.

peak B のほかに, peak D が認められた.

iii) 定性試験

a) peak 分画.

経口大量投与で得た peak A について, SA spectrum を測定した結果, 280, 360, 460, 520 $m\mu$ に吸収の peak をしめし, 標準品の EED spectrum と比較すると吸収の peak は完全に一致した. (Fig. 14), ASA chromogen spectrum や, UV spectrum によつても標準品の EED と一致して, 280 $m\mu$ に吸収の peak を認めた. なお, GLC (Fig. 15), TLC および paper chromatography (B.L.M.-A. system) でも, その retention time および Rf 値は EED に一致した.

標準品の EED を加えて行なつた再結晶でも, ほぼ一定の specific activity を得た. これらの結果, この物質は EED であることが確認された.

b) peak B 分画.

経皮少量投与で得た peak B について, さらに paper chromatography (B.L.M. -A. system) を行なつた. その Rf 値は0.64で, EED とはまったく異なる radioactive steroid であることが明らかになった.

これは少量投与時のみならず, 大量投与のさいにも EED の metabolite として産生されるようであるが, peak A (=EED) に比べれば非常に少量であつて, これ以上の定性試験は行ない得なかつた.

c) peak C および peak D 分画.

大量投与時の peak C および peak D について, GLC を行なつたが, その retention time は EED に一致し, SA および ASA spectrum でも EED に一致する吸光度をしめした. これらの peak は EED 分画に溶出しきれずに残り, これらの分画に溶出された EED が多く含まれているのではないかと推定される.

〔IV〕 総括ならびに考案

estrogen の代謝については, 数多くの報告があるが, いまだその全ぼうは明らかでない. estrogen の生

体内での合成自体が、他の steroid とはかなり異なつた複雑な過程を持つており、estrogen の代謝をさらに複雑にしているからであろう。Biskind や Talbot らの実験でみられるように、ヒトおよびケツ歯類で、肝臓がその代謝にかんし主役を演じていることは、いまさら述べるまでもない。

肝臓における estrogen 代謝機序²⁸⁾は破壊、不活性化など肝臓組織中の酵素作用による化学的な代謝と胆汁中への排せつ²⁹⁾による物理的な代謝の2つに大別できる。

肝臓での不活性化には、主として2つの方向があるとされており、1つは glucuron 酸や硫酸と結合する水溶性エステルの生成で、他の1つは作用の弱い他の estrogen への転換である。

また、物理的に胆汁中に排せつされた estrogen は一部は尿中にそのまま排せつされ、一部は肝を中心とした腸肝循環²⁷⁾に乗つて、じよじよに肝臓での酵素的破壊をうけるものと思われる。

estrogen について、最もよく知られている代謝経路は $ED \rightleftharpoons EO \rightarrow ET$ であるが、Dohan²⁸⁾ らは肝疾患時に尿中へ排せつされる ET がかえつて増加する場合があることを報告し、胆汁中への estrogen の排せつ減少が hyperestrogenismus と関連を持つていよう述べている。

このような意味からも、まず ED および EED の尿中排せつ状況について調べてみることは興味ぶかい。本実験の結果は Fig. 2, 8. のように2日間の尿中排せつ率は $5\mu\text{g}$. 投与の場合、投与量にたいし ED 97%, EED 28% となり、EED の方が排せつがながびくようである。

これら尿中 metabolite は解毒または不活性化機構として、種々の抱合をうけて存在しているが、これについて検討を加えてみた。その抱合形式を知るために、尿を加水分解することなく抽出し得たものを free 分画、 β -glucuronidase で水解したものを glucuronide 分画、solvolysis 後、抽出し得たものを solvolysis 分画、酸水解によつて抽出したものを acid hydrolysis 分画として radioactivity の distribution を調べたわけである。その結果は Table 3. および5にみられるように、これら2つの steroid には大きな相違があり、ED は glucuronide 分画に多く排せつされ、大量投与をのぞいて EED の場合は solvolysis 分画に多く排せつされている。

しかも、ED の場合、あとで述べるように solvolysis 分画にはじめて抽出し得た steroid もグルクロン酸抱合をしていたことが考えられるため、ED の metabolite ほとんどが glucuronide として存在したと思われる。

このことは EED が経口投与で活性であることと関連して、かなり重要な所見ではないかと思われる。すなわち steroid の抱合ということが、不活性化機構として重要であることは前にも述べたが、そのなかでも硫酸抱合をうけた steroid は、そのかなりの量が体内でふたたび free steroid となり、その活性をしめすのではないかと考えられはじめて²⁹⁾。

その代謝についても、sulfate のままで steroid の各位置での代謝がおこり、そののち free steroid が生ずることなども知られてきている³⁰⁾。estrogen について、現在まで直接これを実験した報告はみられないが、estrone sulfate は臨床的にも利用されており、経口投与でも皮下投与の1/10程度の効果を持つていることが知られている。

Steinetz³¹⁾ らはラットに 17α -ethynyl-estradiol-3-cyclopentyl ether (以下 EECPE と略す) および EED を投与して、胆汁および血清中の metabolites について検討している。それによると、どちらの場合も胆汁中 metabolites は、主として生物学的効果の弱い glucuronide であるのにはんして、血清中には EECPE では free steroid が、また EED では sulfate conjugate が多く存在していると報告している。

一方、ED がウサギ体内でうける構造上の変化についてみると、Heard³²⁾、Fish および Dorfman³³⁾、Pearlman,³⁴⁾ Layne³⁵⁾ らは EO あるいは ED がウサギ体内で、主として ED- 17α に変化すると報告している。本実験で得た ED- 17β の尿中 metabolite は、前述のように paper chromatography, TLC, GLC, alumina column chromatography などで標準品の ED- 17α に一致し、SA spectrum, ASA spectrum, 融点などで、いずれも標準品の ED- 17α に一致していた。

一方、酸水解で得た分画の column chromatography を行なつた場合、ED- 17α 以外にいくつかの rad-

ioactive peak がみられたが, ED-17 α を同様に酸加熱処理すると同じ pattern が得られることから, この分画中に存在した metabolite も, そのほとんどが ED-17 α の人工産物であると思われる。

solvolysis の操作ののち得られた分画では, alumina column chromatography にさいいて, 50% methanol-water で, はじめて溶出される大量の metabolite が認められた。しかし, これをさらに β -glucuronidase で処理すると ED-17 α が得られたこと, および 17 α -ED-17 β -N-acetyl-glucosamine conjugate が chloroform には難溶であるが, ethyl acetate に易溶であることから, Layne³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾ のいう 17 α -ED-17 β -N-acetyl-glucosamine であろうと思われる。すなわち, ED-17 β の metabolite は, そのほとんどが glucuronide として尿中に存在したことになる。

次に尿中 EO にかんして検討した結果, ED-17 α の場合と同様の定性試験を行なつて, その存在を確認したが, このことは ED-17 β から ED-17 α への中間体として EO が存在することを思わせる。

これら estrogen の estriol への代謝については, 研究者により意見が対立するところであるが, Pincus³⁸⁾, Pearlman⁴⁴⁾ は EO 投与のウサギの尿中に estriol を認めている。Heard³²⁾, Fish および Dorfman³³⁾ らはいずれも否定的であるが, 松田³⁹⁾ は 17-epi-estriol への転換を認めたと報告している。

しかし, 今回の実験では 17-epi-estriol への転換は明らかではなく, TLC にて 16, 17-epi-estriol に一致した radioactive steroid を得た。しかし, このものは非常に少量しか得られず, それ以上の定性試験は行なえなかつた。

一方, EED については, そのほとんどが直接 conjugation をうけて排せつされることが明らかになつた。すなわち alumina column chromatography 上, 0.3% M.B. で溶出される部分について, ED の場合と同様の定性試験を施行した結果, EED の標準品と一致する成績が得られた。ED の場合と同じく, 酸加熱水解後の分画には, いくつかの radioactive peak がみられたが, EED 標準品を同じ条件で酸加熱処理をした分画の alumina column でも, 同様の pattern が得られ, EED 以外の大部分の radioactivity は水解処理中に生じた人工産物であると思われる。ただ, ウサギによつて少量の EED を投与した場合, EED よりやや極性の弱い metabolite が大量に得られる場合があつた。しかし, 大量投与をおこなつても, 定性試験に充分量の本物質を得ることができなかつたので, 現在なお, その正確な構造式は不明であるが, chromatography での性質から, いまのところ, 2-methoxy-EED のようなものではないかと考えている。King⁴⁰⁾ はラットの肝 slice と EED とを incubate して, 2-methoxy-EED を得たと報告している。

そして, 本実験で ED-17 α を分離できなかつたが, これは EED の 17 α -side chain の splitting が生体内でおこらないことをしめしている。このような 17 α -ethynyl 基は, 他の steroid の場合も splitting がおこらないと報告されている⁴¹⁾⁴²⁾。

Williams および Layne⁴³⁾ はヒトに EECPE を経口投与して, その尿中 metabolite について検討しているが, そのおもな metabolite は EED であつて, その他に得られた3つの metabolite もすべて, 17 α -ethynyl group を持つままであることを報告している。このことから, EECPE の場合にもエーテル結合の切断と cyclopentyl fragment の degradation はおこるが, 17 α -ethynyl 基の splitting はおこらないと思われる。そして前に述べた抱合の問題とは別に, このことによつて, EED は natural estrogen に比べて生体内での不活性化からまもられているということもできる。

すなわち, ED-17 α は ED-17 β の 1/40~1/120 しか estrogen 活性⁴⁴⁾⁴⁵⁾ を持つておらず, ED-17 β から EO をへて ED-17 α への代謝は不活性化機構として重要である。

しかしながら, EED では 17 α -ethynyl 基の splitting がおこらないために 17 α -ol 体にはなり得ない。また, ヒトでは ED-17 β $\rightleftharpoons$ EO $\rightarrow$ ET が重要な estrogen の不活性化機構となつているが, 17 β -ol が直接, 16位の水酸化を受けることはない⁴⁶⁾。EED の場合, 17 α -ethynyl 基は splitting をうけないので, 17 α -ethynyl-estriol になるような不活性化機構はヒトの場合も存在し得ないと思われる。

今回の実験では, alumina column chromatography の 5% M.B. で溶出される極性の強い構造不明の metabolite を認めたが, この分画には溶出しきれなかつた EED の一部が溶出される。そして, ほんらい

この分画が溶出される metabolite は量的に少ないことが明らかで、それゆえ、このものと EED の不活性とを結びつけて考えることは困難である。

〔V〕 結 語

ED-17 β , EED-17 α をウサギに投与してその尿中代謝産物を検索し、比較検討した。その結果を簡単にまとめてみると

- (1) ウサギにおいて、ED-17 β の主要代謝産物は ED-17 α で、EO のほかに少量の epi-estriol ができる。
- (2) EED 投与時の主要尿中排せつ物は結合型 EED である。また、2-methoxy EED が産生されている可能性がある。
- (3) ED-17 β に比べて EED の排せつは、ややながびくようである。
- (4) 尿中排せつ型は、ED-17 β では glucuronide が、EED では sulfate が多い。
- (5) EED の 17 α -ethynyl 基の splitting はおこらない。

なお、本論文の要旨は第38回および39回日本内分泌学会総会、第14回日本内分泌学会西日本地方部会で発表した。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜った徳田教授に深謝する。本研究の直接の指導者として、終始御指導下さった岡田弘二講師ならびに研究室諸兄に深謝する。

参 考 文 献

- 1) BISKIND, G.R. : Proc. Soc. exp. Biol., 47 : 266, (1941).
- 2) TALBOT, N.B. : Endocrinology, 25 : 601, (1939).
- 3) GUAL, C., C. BECERRA, E. RICE-WRAY and J.W. GOLDZIEHER : Amer. J. Obstet. Gynec., 97 : 443, (1967).
- 4) WILZBACH, K.E. : J. Amer. Chem. Soc., 79 : 1013, (1957).
- 5) KATZMAN, P.A., R.F. STRAW, H.J. BUEHLER and E.A. DOISY : Recent Progr. Hormone Res., 9 : 45, (1954).
- 6) PINCUS, G. : J. clin. Endocr., 5 : 291, (1945).
- 7) COHEN, S.L. and G.F. MARRIAN : Biochem. J., 29 : 1577, (1935).
- 8) SMITH, G.V.S. and O. W. SMITH : Amer. J. Physiol., 112 : 340, (1935).
- 9) LEVY, G.A., A.J. HAY and C.A. MARSH : Biochem. J., 65 : 203, (1957).
- 10) 志田圭三 : 日本臨床, 20巻 : 660, (1962).
- 11) COHEN, S.L. and G.F. MARRIAN : Biochem. J., 28 : 1603, (1934).
- 12) STIMMEL, B.F. : J. biol. Chem., 162 : 99, (1946).
- 13) BURTON, R.B., A. ZAFFALONI and E.H. KEUTMANN : J. biol. Chem., 188 : 763, (1951).
- 14) 神戸川明 : 内分泌と代謝, 3 : 244, (1962).
- 15) LISBOA, B.P. and E. DICZFALUSY : Acta endocr., 40 : 60, (1962).
- 16) LISBOA, B.P. and E. DICZFALUSY : Acta endocr., 43 : 545, (1963).
- 17) SIEGEL, E.T. and R.I. DORFMAN : Steroids, 1 : 409, (1963).
- 18) ALLEN, W.M. : J. clin. Endocr., 10 : 71, (1950).
- 19) UMBERGER, E.J. and J.M. CURTIS : J. biol. Chem., 178 : 275, (1949).
- 20) GOLDZIEHER, J.W., J.M. BODENCHUK and P. NOLAN : J. biol. Chem., 199 : 621, (1952).
- 21) MARRIAN, G.F. : Biochem. J., 24 : 435, (1930).
- 22) FRIEDGOOD, H.B. and J.B. GARST : Recent Progr. Hormone Res., 2 : 31, (1948).
- 23) DORFMAN, L. : Chem. Rev., 53 : 47, (1953).
- 24) 岩倉哲男 : 化学の領域, 18巻 : 407, (1964).
- 25) BELL, C.G., Jr. and F.N. HAYES : Liquid Scintillation Counting, (1958), 94, Pergamon Press, London.
- 26) ALBERT, S., R.D.H. HEARD, C.P. LEBLOND and J. SAFFRAN : J. biol. Chem., 177 : 247, (1949).
- 27) TWOMBLY, G.H., L. McCLINTOCK and M. ENGELMAN : Amer. J. Obstet. Gynec., 56 : 260, (1948).
- 28) DOHAN, F.C., E.M. RICHARDSON, L.W. BLUEMLE and P. GZÖRGY : J. clin. Invest., 31 : 481, (1952).
- 29) SIITERI, P.K. and P.G. MacDONALD : Steroids, 2 : 713,

- (1963). 30) BURSTEIN, S. and R.I. DORFMAN : *Acta endocr.*, 40 : 188 (1962). 31) STEINETZ, B.G., A. MELI, T. GIANNINA and V.L. BEACH : *Proc. Soc. exp. Biol.*, 124 : 1283, (1967). 32) HEARD, R.D.H., W.S. BAULD and M.M. HOFFMAN : *J. biol. Chem.*, 141 : 709, (1941). 33) FISH, W.R. and R.I. DORFMAN : *J. biol. Chem.*, 143 : 15, (1942). 34) PEARLMAN, W.H. and M.R.J. PEARLMAN : *Arch.Biochem.*, 4 : 97, (1944). 35) LAYNE, D.S., N.A. SHETH and R.Y. KIRDANI : *J. biol. Chem.*, 239 : 3221, (1964). 36) JIRKU, H. and D.S. LAYNE : *Biochemistry*, 14 : 2126, (1965). 37) LAYNE, D.S. : *Endocrinology*, 76 : 600, (1965). 38) PINGUS, G. and P.A. ZAHL : *J. gen. Physiol.*, 20 : 879, (1931). 39) 松田明信 : 日内泌誌, 40 : 115, (1964). 40) KING, R.J.B. : *Biochem. J.*, 79 : 361, (1961). 41) 徳田源市, 岡田弘二 : ホと臨, 12 : 677, (1964). 42) 石原貞尚 : 日内泌誌, 42 : 55, (1966). 43) WILLIAMS, K.I.H. and D.S. LAYNE : *Steroids*, 9 : 275. (1967). 44) WHITMAN, B., O. WINTERSTEINER and E. SCHWENK : *J. biol. Chem.*, 118 : 789, (1937). 45) HIRSCHMANN, H. and O. WINTERSTEINER : *J. biol. Chem.*, 122 : 303, (1937). 46) FISHMAN, J., H.L. BRADLOW, B. ZUMOFF, L. HELLMAN and T.F. GALLAGHER : *Acta endocr.*, 37 : 57, (1961).