Metabolism of 17α -Ethinyl-Estrenol in Rabbit

Hiroshi YAMAMOTO

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

It has been indicated that 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol shows biological effects very similar to 17α -ethynyl-19-nortestosterone. The conversion of the former to the latter was reported in vitro with rabbit liver homogenate. In this experiment, the conversion was studied in vivo with rabbit.

Urine collection was made for 4 days after injection of ^3H - 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol which was prepared from the cold compound by Wilzbach's method. About 15% of the administered radioactivity was excreted in the first day urine and about 35% during 5 days. Almost all the radioactivities were present in the urine in the conjugated form and was extracted by glucuronidase hydrolysis or solvolysis. The extracted materials were separated on alumina column. The stepwise elution of the radioactivity was carried out successively with benzene, 0.1% methanol in benzene, 0.3% methanol in benzene, 0.5% methanol in benzene, 1.0% methanol in benzene, 5% methanol in benzene and finally with 30% methanol in benzene. Four radioactive peaks named A, B, C and D were eluted from the column with benzene, 0.1% methanol in benzene, 0.3% methanol in benzene and 5% methanol in benzene respectively. The radioactive peak B was eluted in similar fashion as 17α -ethynyl-19-nor- 5α -androstane- 17β -ol-3-one from the column and the R_f value on TLC in benzene acetone (4:1) system was also identical with the reference compound. R_f value on paper chromatography, color reaction on paper, retention time in G.L.C., sulfuric acid chromogen spectrum and several chemical reactivities also indicated the identity of this compound with 17α -ethynyl-19-nor- 5α -androstane- 17β -ol-3-one. Peak C was identical in the same criteria with 17α -ethynyl- 5β -19-norandrostane- 3α , 17β -diol. The compound was easily acetylated with acetic anhydride-pyridine at room temperature, indicating the presence of primary or secondary hydroxy group. The oxidized product of peak C with aqueous chromic acid was identified as 17α -ethynyl- 5β -19-norandrostane- 17β -ol-3-one from the chromatographic mobilities and several color reactions. Chemical structures of radioactive peak A and D were not well determined. However, several reactivities of peak D were very similar to that obtained from the rabbit injected with 17α -ethynyl-19-nortestosterone indicating that the radioactive peak D was a metabolite of the latter compound. All these data indicated that 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol was first metabolized in vivo to 17α -ethynyl-19-nortestosterone and then underwent further metabolism. In the next section, the metabolite in the blood after intravenous administration of 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol was examined. The blood was collected from the

femoral artery for about 60 minutes following injection. Free steroid was extracted with chloroform. The extract was chromatographed on paper in benzene-ligroin-methanol-water system. Three radioactive peaks were observed on paper. The first radioactive peak was identified as 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol from the chromatographic mobilities and color reactions. The second radioactive peak was identified as 17α -ethynyl-19-nortestosterone from the chromatographic mobilities. The third radioactive peak was identified as an identical metabolite with radioactive peak D in the experiment with urinary metabolites. Experiment with the metabolite in blood clearly indicated the conversion of 17α -ethynyl-4-estrene- 17β -ol to 17α -ethynyl-19-nortestosterone in vivo.

(pp. 1309~1319)

Table 7. The effect of gonaeotropins on the ovarian L-LAP activity of hypophysectomized immature rats
The numbers in brackets refer to the one of normal 3 weeks aged rats treated with same gonadotropin

	Control I hypophysectomy 5th day	A group at the time of 48hr. after the injection			Control 2 hypophysectomy 7th day	B group at the time of 96hr. after the injection		
		PMS 30 I.U.	HCG 50 I.U.	PMS 30 I.U. and HCG 50 I.U.		PMS 30 I.U.	HCG 50 I.U.	PMS 30 I.U. and HCG 50 I.U.
No. of rats	4	4	5	5	3	3	4	4
body weight (gm.)	69.0	63.0	60.0	60.0	60.0	60.0	59.0	50.0
ovary weight (mg.)	13.30	13.3 (19.5)	6.2 (15.4)	15.1 (22.5)	3.2	28.0 (46.5)	5.2 (19.3)	27.5 (43.8)
L-LAP activity per one rat ovary (U.)	No.1 0.034 No.2 0.036 No.3 0.035 No.4 0.039 No.5 died	No.6 0.179 No.7 0.182 No.8 0.162 No.9 0.176 No.10 died	No.11 0.097 No.12 0.091 No.13 0.103 No.14 0.086 No.15 0.093	No.16 0.149 No.17 0.132 No.18 0.140 No.19 0.157 No.20 0.162	No.1 0.049 No.2 0.055 No.3 0.052 No.4 died No.5 died	No.6 0.301 No.7 0.276 No.8 0.290 No.9 died No.10 died	No.11 0.089 No.12 0.076 No.13 0.091 No.14 0.088 No.15 died	No.16 0.334 No.17 0.331 No.18 0.297 No.19 0.338 No.20 died
M.V.	0.036	0.172(0.122)	0.094(0.080)	0.148(0.132)	0.052	0.289(0.410)	0.086(0.185)	0.325(0.303)
ratio to the one of Control I	100	480	260	410	—	—	—	—
ratio to the one of Control 2	—	—	—	—	100	560	170	630
ratio to the one of normal rats treated with the same gonadotropin	—	1.4	1.2	1.1	—	0.7	0.5	1.1
ratio to corresponding one of A group	—	—	—	—	1.5	1.7	0.9	2.2
per 100gm. wet weight of ovary (U.)	600	650	760	490	810	520	830	590
L-LAP Isozyme I (%)	59	49	64	56	83	79	80	55
Isozyme II	41	51	36	44	17	21	20	45
Isozyme III	0	0	0	0	0	0	0	0
ratio of Isozyme I Isozyme II	1.4	1.0	1.8	1.3	5.1	3.8	4.0	1.3

Table 8. The effect of gonadotropins on the ovarian L-CAP activity of hypophysectomized immature rats
The numbers in brackets refer to the one of normal 3 weeks aged rats treated with same gonadotropin

	Control I hypophysectomy 5th day	A group at the time of 48hr. after the operation			Control 2 hypophysectomy 7th day	B group at the time of 96hr. after the injection		
		PMS 30 I.U.	HCG 50 I.U.	PMS 30 I.U. and HCG 50 I.U.		PMS 30 I.U.	HCG 50 I.U.	PMS 30 I.U. and HCG 50 I.U.
No. of rats	4	4	5	5	3	3	4	4
body weight (gm.)	69.0	63.0	60.0	60.0	60.0	60.0	59.0	50.0
ovary weight (mg.)	3.0	13.3 (19.3)	6.2 (13.1)	15.1 (27.3)	3.2	28.0 (48.5)	5.2 (24.3)	27.5 (54.1)
L-CAP activity per one rat ovary (U.)	No.1 0.24×10^{-2} No.2 0.20×10^{-2} No.3 0.17×10^{-2} No.4 0.23×10^{-2} No.5 died	No.6 0.95×10^{-2} No.7 0.87×10^{-2} No.8 0.93×10^{-2} No.9 0.87×10^{-2} No.10 died	No.11 0.73×10^{-2} No.12 0.77×10^{-2} No.13 0.61×10^{-2} No.14 0.67×10^{-2} No.15 0.62×10^{-2}	No.16 0.82×10^{-2} No.17 0.73×10^{-2} No.18 0.79×10^{-2} No.19 0.85×10^{-2} No.20 0.71×10^{-2}	No.1 0.40×10^{-2} No.2 0.51×10^{-2} No.3 0.47×10^{-2} No.4 died No.5 died	No.6 0.53×10^{-2} No.7 0.46×10^{-2} No.8 0.57×10^{-2} No.9 died No.10 died	No.11 0.31×10^{-2} No.12 0.43×10^{-2} No.13 0.35×10^{-2} No.14 0.39×10^{-2} No.15 died	No.16 0.52×10^{-2} No.17 0.61×10^{-2} No.18 0.57×10^{-2} No.19 0.50×10^{-2} No.20 died
M.V.	0.21×10^{-2}	0.91×10^{-2} (0.95×10^{-2})	0.68×10^{-2} (0.67×10^{-2})	0.79×10^{-2} (1.08×10^{-2})	0.46×10^{-2}	0.52×10^{-2} (2.14×10^{-2})	0.37×10^{-2} (0.88×10^{-2})	0.55×10^{-2} (2.31×10^{-2})
ratio to the one of Control I	100	430	320	380	—	—	—	—
ratio to the one of Control 2	—	—	—	—	100	110	81	120
ratio to the one of normal rats treated with the same gonadotropin	—	1.0	1.0	0.7	—	0.2	0.4	0.2
ratio to corresponding one of A group	—	—	—	—	2.2	0.6	0.6	0.7
per 100gm. wet weight of ovary (U.)	35	34 (25)	55 (26)	26 (20)	72	9.3 (22)	36 (18)	10 (21)
ratio of L-LAP/L-CAP	18	19	14	19	11	56	23	59

17 α -ethynyl-estrenol の代謝に関する研究

京都府立医科大学産婦人科教室 (主任 徳田源市教授)

山 本 浩

(昭和43年7月3日受付)

³H-17 α -ethynyl-4-estrene-17 β -ol をウサギに経皮投与し、尿中代謝産物の検索を行なうと同時に、静脈内投与して血中代謝産物についても検討した。尿中代謝産物は全て3位に酸素をもつたものであり、17 α -ethynyl-4-estrene-17 β -ol-3-one を投与した時の尿中代謝産物に一致した。血中遊離形代謝産物として 17 α -ethynyl-4-estrene-17 β -ol-3-one を認めた。

I 緒 言

近年自然に体内で産生されるステロイドホルモンについての研究は著しく進歩したが、他方ステロイド薬剤については十分な研究が進められてはいない。これらのステロイド薬剤は単に内因性ステロイドよりその作用が強力であるとしてだけ考えられており、このような考え方で臨床上に応用されているような場合さえも見うけられる。しかし内因性のステロイドにくらべて構造上種々の変化が加えられている合成ステロイドが、内因性ステロイドと全く同じ作用だけしか持っていないと考えるのは当をえていないことは容易に想像される。徳田教授¹⁾は1964年の日本産科婦人科学会の特別講演において、合成黄体ホルモン剤の中には黄体ホルモン作用の他に卵胞ホルモン作用をも同時に合わせ持つ合成ステロイドがいくつかあることを指摘している。そしてこれを estrogenic progestin と名付け卵胞ホルモン作用を示さない non-estrogenic progestin と区別して臨床的に応用する必要があることを強調した。

17 α -ethynyl-estrenol²⁾ は代表的な estrogenic progestin の一つであるが、このような卵胞ホルモン作用の一部はこのステロイドが生体内で ethynyl estradiol に変化することによることがわれわれの教室の成績から明らかにされた³⁾⁴⁾。しかし他方このステロイドは 3-deoxo-compound でありこれが ethynyl-estradiol に変化するためには3位に酸素が導入されねばならない。われわれ⁵⁾はさきにウサギ肝と ethynyl-estrenol との incubation 実験で ethynyl-estrenol が 17 α -ethynyl-19-nortestosterone に転化することを認めており、村田⁶⁾はヒトにこのステロイドを投与した際の尿中代謝産物を検討している。一般に黄体ホルモン作用はウサギに検体を投与した際の子宮粘膜の示す反応から検定されており、ウサギにおける本ステロイドの代謝は興味深いものであると考えられる。そこで今回本剤をウサギに投与し尿中に 17 α -ethynyl-19-nortestosterone 投与の場合と同じ代謝産物が排泄されるかどうか、また排泄されるならばその全代謝産物中にしめる割合がどれほどであるかを少しでも知ることができないかと考えて、ethynyl-estrenol を tritium で標識してウサギに投与し、尿中代謝産物の検索を試みた。

II 実験方法

(1) Radioactivity の測定⁷⁾

ステロイドの乾燥試料は 2,5-diphenyloxazole (P.P.O.) (4g/L), 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl) benzene (P.O.P.O.P.) (0.1g/L) を含有する toluene 10ml に溶解し、Packard 社製 liquid Scintillation spectrometer により測定した。また尿などの水性試料は P.P.O. (4g/L), P.O.P.O.P. (0.1g/L), naphthalene

(75g/L) を含む dioxane, toluene, ethylenglycol-mono-ethylether の等量混合液 10ml に試料 0.5ml を混和して測定した。なお quenching の補正は内部標準法によった。

(2) **Radioactive steroid の調製**

結晶の ethynyl-estrenol を Wilzbach 法⁸⁾ により標識した。

(3) **Paper chromatography**

既報の装置⁹⁾を用いて Bush type の paper chromatography を行なった。用いた system は ligroin-80% methanol 系 (LM), benzene-ligroin-methanol-water (70:130:160:40) 系 (BLM) および benzene-methanol-water (200:100:100) 系 (BM) の3種でろ紙は東洋ろ紙 No. 51を用いた。

Δ^4 -3-ketosteroid の検出は主として紫外線下で螢光を発することを利用して行なったが、他のステロイドについては Zimmermann 試薬¹⁰⁾ Antimony trichloride試薬¹¹⁾¹²⁾を用いた。Zimmermann 試薬は 2%-dinitrobenzene ethanol 溶液 1 容に 2.5% KOH 1 容を混和したものを使用し、Antimony trichloride 試薬としては, SbCl_3 の chloroform 飽和溶液を用い paper の発色はこれらを spray で paper 上に噴霧し hair dryer で加温して行なった。

(4) **Thin layer chromatography (T.L.C.)**

矢沢科学器械 K.K の applicator を使用し, Merk 社製 Silicagel G 30g を水 60ml に懸濁し 250 μ の厚さに引きのばし, 100°C 1 時間活性化したものを使用した。

paper 上のステロイドの検出は主として濃硫酸の噴霧により行なったが、ときには paper chromatography と同様の検出法も行なった。

(5) **Gas liquid chromatography (G.L.C.)**

島津 GC-1B gas chromatography に SE-30 のカラムを装着しカラム温度は 220°C とした。試料は少量のアセトンに溶解したハミルトンシリンジにより約 1 μ l を注入した。試料の注入の直前および直後に標準試料を注入して retention time の比較を行なった。

(6) **紫外線吸収スペクトル (UV スペクトル) および硫酸クロモーゲンスペクトル (SA スペクトル)**

UV スペクトルは methanol にステロイドを溶解して、また SA スペクトルは硫酸に溶解して室温 2 時間放置後に日立 EPU 2 型分光光度計を使用して 200m μ から 300m μ ないし 600m μ までの吸収スペクトルを測定した。

(7) **アセチル化¹³⁾**

ステロイドを 0.4ml の pyridine に溶解し 0.2ml の無水醋酸を加えて 1 夜放置後 ethyl acetate に溶解し, 1N Na_2CO_3 および水で洗浄後脱水蒸発乾固した。

(8) **Saponification¹⁴⁾**

0.067N NaOH in 80% methanol に acetoxy-steroid を溶解し, 24 時間室温放置後(7)と同様の方法により抽出した。

(9) **3-ketone の還元¹⁵⁾**

ステロイドを 3 ml の dioxane に溶解し, NaBH_4 30mg を 0.1ml の水に溶解したものを加えて 1 時間放置後水 20ml を加えさらに 25% 醋酸を発泡が止むまで加えたのち, methylene chloride で抽出 1/10N NaOH および水で洗滌し蒸発乾固した。

(10) **ウサギ尿中代謝産物抽出法**

尿を醋酸で pH5.0 に調整後同量のクロロホルムで 2 回抽出し, クロロホルムは 1/10 量 1/10N NaOH で 2 回, 水で 3 回洗滌して遊離分画とした。遊離ステロイドを抽出した後の尿は 1/10 M phosphate buffer を 1/10 量加え, β -glucuronidase を尿 1 ml につき 300 単位加えて 37°C 48 時間放置した。glucuronidase 水解をした尿は遊離分画と同様抽出洗滌し glucuronide 分画とした。残りの尿は硫酸で pH2.0 とし, 100ml につき 60g の硫酸を加えて同量の ethyl acetate で 2 回抽出後抽出液を 37°C 24 時間放置, solvolysis を行なった。これを 1/10 量 1N NaOH で 1 回, 1/10N NaOH で 2 回洗滌後 3 回水洗を行なって solvolysis 分

Table 1.

画とした。洗滌液の一部はこれを塩酸で pH7.0 に調整後さらに1/10量の塩酸を加えて 100°C 30分加水分解し、遊離分画の抽出のときに行なつたと同様の洗滌操作を行ない acid hydrolysis 分画とした。(Table 1)

III 実験成績

体重1.5kgのメスウサギ背部皮下に ³H-ethynyl-estrenol 20 μ C(5mg) を propylene glycol に溶解して注射した。尿は既報の装置¹⁶⁾を用いて糞と分離採取し、その逐日的尿中排泄量を測定した。結果はFig. 1のようである。すなわち第1日目に投与量の約15%が排泄され、その後漸次減少するが第5日目に至つてもなお投与量の3%が排泄される。次に最初の4日間の尿を集めて free, glucuronide, solvolysis, および acid hydrolysis の各分画に分離し、各部分への radioactivity の移行を調べた結果は Table 2 のようであり、遊離ステロイドとしてはほとんど排泄されず、glucuronidase 水解または solvolysis 水解によつて radioactivity が回収できた。すなわちこれら分解産物は、glucuronide または sulfate となつて尿中に排泄され

Fig. 1 Daily excretion of radioactivities in urine after ³H-EEL administration

Table 2 Distribution of radioactivity in urine of rabbit administered ^3H -17 α -ethynyl-estrenol

	radioactivity (%)
free+glucuronide	42.6
solvolysis	12.5
hot acid hydrolysis	27.3
unextractable	17.6

methanol benzene, および methanol の各 100ml を使用し, stepwise に溶出を行なった. その結果は Fig. 2 に示すように各溶出液ごとにそれぞれ radioactivity のピークが認められたが特に benzene, 0.1% methanol benzene, 0.3% methanol benzene および 5.0% methanol benzene, で溶出された radioactivity は大きかった. solvolysis により得られた代謝産物の前記同様の alumina column chromatography は Fig. 3 のように glucuronide の場合とほとんど変化がみられなかった. そこでこれら 4 つのピークを, free, glucuronide, solvolized, の各部分別に合わせてそれぞれピーク A,B,C,D と名づけた.

他方約 1.5kg のウサギに 1 日 100mg の cold ethynyl-estrenol を 3 日間連続投与し, 最初の 5 日間の尿を合わせて同様に水解抽出し, column chromatography で分離後その A,B,C,D 各部分を前記抽出物と合わせた.

ピーク B の定性試験

ピーク B を benzene-acetone (4 : 1) を展開溶媒とする silicagel G T.L.C. を行なった結果は Fig. 4 のようであり, 17 α -ethynyl-19-nor-5 α -androstane-17 β -ol-3-one と同じ Rf 値の spot が硫酸噴霧によつて得られた. そして T.L.C. の各部分をかき取り, Toluene scintillator を加えて radioactivity を測定したところ, この各部分に一致して radioactivity のピークが認められた. 一方 ligroin-80% methanol 系 paper chromatography で展開した結果も同様であり, antimony trichloride で発色して検出された spot の Rf 値は 17 α -ethynyl-5 α -19-norandrostane-17 β -ol-3-one に一致し, その部分に radioactivity のピークが認められた. また paper chromatography 上この spot は Zimmermann 反応陽性であり, 3-Ketone の存在が認められた. この SA スペクトルは Fig. 5 のようであり, 標準品の 17 α -ethynyl-5 α -19-norandrostane-17 β -ol-3-one と一致した. SE 30 の column を用いた G.L.C. でも retention time は一致した. 以上のこ

るものと思われた. 遊離ステロイドは少量のため glucuronide 部分と合せて alumina column chromatography を行なった. column は直径 1cm で, alumina は Brockman alumina 6g を使用し, 溶出液は benzene, 0.1% methanol benzene, 0.3% methanol benzene, 0.5% methanol benzene, 1.0% methanol benzene, 2.0% methanol benzene, 5.0% methanol benzene, 30.0% me-

Fig. 2 Elution pattern of ^3H -EEL metabolites from alumina column (free+glucuronide) Fig. 3 Elution pattern of ^3H -EEL metabolites from aluminacolumn (sulfate)

Fig.4 Thin layer chromatography of urinary 17 α -ethynyl-19-nor-5 α -androstande-17 β -ol-3-one

A: authentic 17 α -ethynyl-19-nortestosterone
 B: authentic 17 α -ethynyl-19-nor-5 α -androstande-17 β -ol-3-one
 C: urinary extract

Fig.6 Thin layer chromatography of urinary 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstande-3 α , 17 β -diol

A: authentic 17 α -ethynyl-19-nortestosterone
 B: authentic 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstande-3 α , 17 β -diol
 C: urinary 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstande-3 α , 17 β -diol
 D: authentic 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstande-17 β -ol-3-one
 E: oxidized C

Fig.8 Chemical reaction used for identification of 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstahe-3 α , 17 β -diol Fig.5 Sulfuric acid chromogen spectrum of 17 α -ethynyl-19-norandrostande-17 β -ol-3-one Fig.7 Sulfuric acid chromogen spectrum of 17 α -ethynyl-19-nor-5 β -androstande-3 α , 17 β -diol

とからこの代謝産物は 17 α -ethynyl-5 α -19-norandrostane-17 β -ol-3-one であろうと考えられた。

ピーク C の定性試験

このものを benzene-acetone (4 : 1) の silicagel G T.L.C. を行なつた成績は Fig.6 のようであり、この部分に一致して radioactivity のピークが認められた。この部分を benzene-ligroin-80% methanol 系 paper chromatography で展開した結果 antimony trichloride で黄色に発色する spot が得られ、この部分に radioactivity のピークが認められた。このものの SA スペクトルは Fig.7 に示すように標準品の 17 α -ethynyl-5 β -19-norandrostane-17 β -ol-3-one を NaBH₄ で還元して得た 17 α -ethynyl-5 β -19-norandrostane-3 α , 17 β -diol の SA スペクトルと一致した。

一方このピーク B は無水醋酸と pyridin で容易

に室温で acetyl 化され, benzene-ligroin-80% methanol 系 paper chromatography では solvent front 近くまで展開された. またこのものをクロム酸酸化して ligroin-80% methanol paper chromatography で展開すると, その Rf 値は 17α -ethynyl- 5β -19-norandrostane- 17β -ol-3-one のそれに一致し, Zimmermann 反応陽性で SA スペクトルも標準品のそれと一致した (Fig. 8). SE30 column を用いた G.L.C. でもその retention time の一致がみられた. 以上の成績を総合しこのものは 17α -ethynyl- 5β -19-norandrostane- 3α , 17β -diol であると考えられた.

ピーク A の定性試験

ピーク A は前述の alumina column chromatography では最も初めの部分に溶出されたためこれを更に溶出系をかえて rechromatography を行なつた. すなわち petroleum-ether : benzene (5 : 1), petroleum ether : benzene (2 : 1), petroleum ether : benzene (1 : 1), petroleum ether : benzene (1 : 2), および benzene の各 100ml で徐々に溶出した. その結果この代謝産物は petroleum ether : benzene (1 : 2) の後半から benzene 分画にかけて溶出された. 本系では ethynyl-estrenol そのものは petroleum ether : benzene (1 : 1) で溶出されるのでピーク A は大部分は ethynyl-estrenol ではなくその変化したものであることがわかるが, このものはウサギによつて排泄量が多いものからほとんど見られないものまでさまざまであるので, これ以上の定性試験は行なっていない. しかしこのものは 17α -ethynyl-19-nortestosterone 投与では認められないため, おそらく 3-deoxo 代謝産物であると思われ興味深い. (Fig. 9)

ピーク D について

ピーク D は alumina column chromatography で 5.0% methanol-benzene で溶出されたが, まず rechromatography により純化した. すなわち benzene, 1.0% methanol-benzene, 2.0% methanol-benzene, 3.0% methanol-benzene, 5.0% methanol-benzene および 30.0% methanol-benzene で溶出した. その結果は Fig. 10 のようであり, radioactivity の大部分は 2.0% methanol-benzene で溶出された. このものは column chromatography ではほぼ一つのピークとなり溶出されたが, これを SE-30 用いた G.L.C. で調べた結果この中には少なくとも 2 種の steroid が含まれることが予想され, さらに Bush B₆ 系 paper chromatography で展開した結果, この中には 3~4 個の放射性代謝産物が存在することが明らかになった. このものを acetyl 化して alumina column chromatography を行なうとほとんどすべてが容易に acetyl 化されることがわかつた. すなわちこれらの代謝産物はステロイドのどこかの場所が水酸化を受けたことが考えられた. なお 17α -ethynyl-19-nortestosterone を投与した場合にも尿中代謝産物としてこの分画に存在するものがありこの場合も paper chromatography で 3~4 個のものがみられるので peak D もおそら

Fig. 9 Rechromatography of fraction A in urinary extract on alumina column

Fig. 10 Rechromatography of fraction D in urinary extract on alumina column

Fig. 12 Paper chromatography of fraction III in blood extract after intravenous injection of ^3H -EEL Fig. 11 Paper chromatography of blood extract after intravenous injection of ^3H -EEL Fig. 13 Paper chromatography of fraction II in blood extract after intravenous injection of ^3H -EEL

く 17 α -ethynyl-19-nortestosterone の場合と同じ代謝産物であると思われる。しかしこれら個々のものについてはこれ以上の定性試験を行なっていない。

血中 ethynyl-estrenol の代謝産物について

cold ethynyl-estrenol で薄めていない ^3H -ethynyl-estrenol 約 15 μC (50 μg) を Ethanol 4ml および 5%ブドウ糖 6 ml に溶解してウサギ耳静脈より注入し、注射後30分より股動脈から血液を採取した。採血はリンゲル氏液を耳静脈から点滴静注しながら行ない、ウサギが死亡するまで続けた。死亡するまでの時間は約60分で、採取し得た血液量は約 100ml であった。血液抽出物を直接 benzene-ligroin-methanol-water 系 paper chromatography で分離した結果は Fig. 11 のようであり solvent front 近くに大きな radioactivity のある部分が展開されたほか、原点および Rf 値 0.5 附近にも radioactivity のピークが認められた。solvent front にまで展開された部分の一部をさらに ligroin-80% methanol 系 paper chromatography で展開した結果は Fig. 12 のようであり progesterone よりさらに早く展開され、おそらく投与した ethynyl-estrenol そのものであると考えられたためこれ以上の定性試験は行なっていない。次に Rf 値 0.4 附近に得られた radioactive な代謝産物に cold の 17 α -ethynyl-19-nortestosterone を加え同 system で rechromatography を行ない paper を 1 cm ごとに切断してそれぞれ methanol で溶出し、paper chromatography 上の各部分の 240m μ における吸収と radioactivity とを比較した。その結果は Fig. 13 のようであり UV 吸収性のピークとは良く一致し、この radioactive な steroid は 17 α -ethynyl-19-nortestosterone であると思われる。またこれよりやや極性の強い代謝物はその Rf 値から考えるとおそらく尿中代謝産物のピーク D に一致するものと思われる。

一方 17 α -ethynyl-19-nortestosterone や 17 α -ethynyl-estrenol は検体を直接子宮腔内に注入して黄体ホルモン作用を検定する Hooker-Forbes 法¹⁷⁾や McGinty 法¹⁸⁾では黄体ホルモン作用を示さないが、皮下投与

で検定する McPhail 法¹⁹⁾や皮下投与後子宮粘膜内炭酸脱水酵素活性を測定する法²⁰⁾ではこれら2つのステロイドはどれも黄体ホルモン作用を示すことが知られている。教室松吉²¹⁾は 17α -ethynyl-19-nortestosterone をウサギに経口投与し、血中にいくつかの例で McGinty test 陽性物質の出て来ることを報告している。そこで本実験ではさらにこの点を 17α -ethynyl-estrenol について検討する目的でこのステロイドを直接静脈内に投与して血中ステロイドの生物学的活性を McGinty test で測定した。

大量のステロイドを静注するために種々の溶媒についてまず検討を試みたが、そのうちもつとも大量のステロイドを有効に静注することの出来たのは次のものである。すなわち 17α -ethynyl-estrenol 56mg を 0.5 ml の ethanol および Tween 80.0ml に溶解し、リンゲル氏液 8.0ml を加えてウサギ耳静脈より約7分間で注入した。採血は血中代謝産物抽出の場合と同様に股動脈より行ない free steroid を chloroform で抽出して 1/10N NaOH で2回、水で3回洗滌して蒸発乾固した。次いでこの抽出物を benzene-acetone (4:1) の silicagel G T.L.C. で展開し、 17α -ethynyl-19-nortestosterone とほぼ同程度に展開される部分、それより早く展開される部分、および遅く展開される部分の3分画に分けて松吉の行なつたと同様の方法で McGinty test を行なつた。しかしその結果本 test で明らかに黄体ホルモン作用を持つものは認められなかった。しかし本 test で T.L.C. で 17α -ethynyl-19-nortestosterone より極性の強い部分を子宮内に注入することによりウサギ子宮内膜腺様構造の増加するのが認められた。しかもこの場合この部分には硫酸噴霧で青色に呈色する部分が含まれている。さきに松吉は 17α -ethynyl-19-nortestosterone を経口投与した場合やはりこの部分に McGinty test 陽性物質の存在を認めているがこの部分をさらに paper chromatography で分画することにより活性物質の検出が不可能になつたと述べている。

IV 考 按 (Fig. 14)

本実験で明らかにし得たウサギにおける 17α -ethynyl-estrenol の尿中代謝産物は 17α -ethynyl-19-nor-5 α -androstane-17 β -ol-3-one および 17α -ethynyl-19-nor-5 β -androstane-3 α , 17 β -diol である。これら両者はどちらもヒト⁶⁾やウサギ²²⁾について 17α -ethynyl-19-nortestosterone の尿中代謝産物として知られており、本実験で得られたこれら代謝産物が 17α -ethynyl-19-nortestosterone を中間体として生体内で作られるであろうことが当然考えられる。このような代謝のうち 17α -ethynyl-19-nortestosterone から以後の代謝は内因性ステロイドである testosterone の場合と同様であり、testosterone も生体内で Δ^4 -double bond の還元、3-Ketone の還元などを受け尿中に排泄されることが知られている²³⁾。ただ testosterone の場合 17α -hydroxyl 基の酸化も受けるが 17α -ethynyl-17 β -ol 化合物では ethynyl 基の離断は生体内では起こりえ

Fig. 14 Metabolism of 17α -Substituted estrenol

ず、17-Ketosteroid に変化することはない。このことは本実験で尿中に代謝産物としての 17-Ketosteroid を認めなかつたことから明らかである。今回の実験で尿中に認めた 17 α -ethynyl-19-nor-5 α -androstan-17 β -ol-3-one は paper chromatography 上では 17-Ketosteroid とよく似た Zimmermann chromogen として見られるが試験管内で発色するとその呈色は非常にすみやかに起こると同時に退色も早く 17-Ketosteroid の場合に発色が maximum になる発色45分後では、17-Ketosteroid の Zimmermann chromogen の吸収 maximum があらわれる 520m μ における吸収スペクトルのピークは全く消失する²⁴⁾。以上のように ethynyl 基の離断は生体内で起こらないと見られている²⁵⁾がネズミについても同様のことが Breuer²⁶⁾ により報告され、この場合 ethynyl 基の vinyl 基への酸化も起こらないと思われておりまた 17 α 位に ethynyl 基を持つたステロイド投与で尿中 17-Ketosteroid 値に変化のないことも報告されている²⁴⁾。17 α 位に methyl 基のある場合も同様であり 17 α -methyl-19-nor-testosterone¹⁵⁾ や 17 α -methyl-testosterone²⁷⁾ は生体内で Δ^4 -double bond の還元、3-Ketone の還元を受けるが、17 α -methyl-17 β -ol 構造は変化しないと報告されている。さて一方 Δ^4 -double bond が還元される場合 5 位の H が β 位にはいる場合と α 位にはいる場合とが考えられ、事実ヒト、ウサギ、ネズミなどで各種 5 α -steroid や 5 β -steroid が現われることが報告されている²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾。しかしあるステロイドが 5 α -steroid として多く排泄されるか、あるいは 5 β -steroid として排泄されるかは動物、性、投与ステロイドによりそれぞれ異なっており必ずしも一定していない³²⁾³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾。また 3-Ketone の還元も同様に 3 α -OH 体と 3 β -OH 体を作り得るが一般に 3 α -OH 体が尿中には多く認められており³⁷⁾³⁸⁾ 本実験でも 3 α -OH 体の尿中排泄を認めたわけである。

さて本実験では以上述べたように 17 α -ethynyl-estrenol を投与し尿中に 17 α -ethynyl-19-nor-testosterone 投与の場合と同じ代謝産物を得たわけであるが尿中には 17 α -ethynyl-19-nortestosterone そのものは認め得なかつた。一方さきにのべたように 17 α -ethynyl-estrenol は合成黄体ホルモン剤であり、ウサギに投与した場合その子宮粘膜に黄体ホルモンに特有の変化をあらわしてくるが、このような黄体ホルモン作用にはステロイドの Δ^4 -3-Ketone 構造が密接な関係を持つていと見られ、事実 progesterone も Δ^4 -double bond の還元や 3-Ketone の還元を受けた場合には黄体ホルモン作用を失うことが知られている³⁹⁾ 逆に Δ^4 -3-Ketone 構造の変化を生体内で受けにくいようなステロイドたとえば 6-methyl-compound や 6-chloro-compound, Δ^4 -3-Keto progesterone, retroprogesterone などは黄体ホルモン作用の強いことが知られている⁴⁰⁾。それにもかかわらず 3-deoxo-steroid である ethynyl-estrenol 投与で尿中には Δ^4 -double bond の還元された代謝産物しか得られずなお構造不明の代謝物が尿中に存在したとはいえ free form のステロイドとしてはほとんど存在しなかつたことは、本剤の生物学的活性を理解するうえに血中 free form の代謝産物がどのようなものであるかを調べる必要があると考えられる。このような意味で血中 free form の代謝産物の検出を次に試みたわけであるが、本剤の経口投与や経皮投与ではその血中への移行が徐々に進むため十分な代謝物を回収し得なかつたので、本剤を静脈内に直接注入してその代謝物の検出を行なったわけである。その結果 17 α -ethynyl-19-nortestosterone が血中より free steroid として回収されたが、本実験の成績からはこの 17 α -ethynyl-estrenol から 17 α -ethynyl-19-nor-testosterone への代謝はそれほど急速には起こらないで徐々に進行するのではないかと考えられた。すなわち本剤静注後約30分より血液の回収を行なったがなお大部分は ethynyl-estrenol そのものであり、一部は 17 α -ethynyl-19-nortestosterone よりさらに極性の強いステロイドとして回収された。しかしこれらの血中代謝産物を直接ウサギ子宮腔内に注入してその生物学的活性を調べた結果はどの場合も陰性の結果しか得られなかつたのである。ところが 17 α -ethynyl-estrenol や 17 α -ethynyl-19-nortestosterone はこれを皮下または経口投与するとどちらも黄体ホルモン作用を示すことが知られており、このような実験成績の相違を現在のところ都合良く説明することができない。またこれらのステロイドを皮下投与した場合もウサギ子宮粘膜の反応は progesterone の場合に比較して非常に弱いものであるのに、一般にこのような estrene 系ステロイドの黄体ホルモン作用が progesterone のそれより強力であるといわれているのは、progesterone が経口投与した場合ほとんど不活性であるのに対して estrene 系ステロイドでは経口投与でも活性を示すからにはほかならない。

したがって 17α -ethynyl-19-nortestosterone の場合に体内で特に活性物質に変化すると考えなくとも例えば 17α -ethynyl-19-nortestosterone そのものが活性型ステロイドであると考えても説明は可能である。すなわちこの場合その子宮内膜に対する反応性はそれのもっている卵胞ホルモン作用、男性ホルモン作用などによつて修飾されるために子宮内直接注入によつてはこの黄体ホルモン作用が打ち消されて明らかな黄体ホルモン作用を現わすことができず同様に progesterone と同じような黄体ホルモン作用を示す物質をその代謝産物の中に求めることは困難なのではなかろうか。

ただこれまでの実験では結合形のステロイドについては行なっていないのでその代謝速度については今後さらに検討を加えねばならないが 17α -ethynyl-19-nortestosterone-sulfate について McGinty test を行なつてもその生物学的活性は認められていない。しかし同様の考えから本実験で認めた 17α -ethynyl-estrenol が 17α -ethynyl-19-nortestosterone に変化することも黄体ホルモン活性からみて活性化とは無関係であると決定するには、その生成物である 17α -ethynyl-nortestosterone がさきに述べたような意味での黄体ホルモン作用をもつステロイドであるだけに早計であろう。すなわち3位にはたらく酵素は少なくとも内因性ステロイドのすべてに共通したものであり、酸素原子の性格上これが標的臓器または組織での蛋白との結合に何らかの関係を持つていることは想像にかたくない。したがってわれわれは現在のところ 17α -ethynyl-estrenol から 17α -ethynyl-19-nortestosterone への代謝は一応生物学的活性化であると考えている。この点を明らかにするためには生体内で3位に酸素の入らない 3-deoxo-steroid が出現しその生物学的活性が明らかにされた時にはじめて明らかにされるであろう。

さて最後に 17α -ethynyl-estrenol から 17α -ethynyl-19-nortestosterone への生体内での転換率の問題が残されている。今回の実験のみからこの生体内での転換率を明らかにすることはできなかったが今回の実験で 17α -ethynyl-19-nortestosterone の代謝産物とは異なつたものとしてはウサギによつてその量が大きく異なり、ほとんど認められなかつたものから、多いものでは尿中より抽出可能であつた代謝物の約30%を占めるものまで種々であつた。一方 17α -ethynyl-19-nor-5 β -androsterane-3 α , 17 β -diol としての回収量は 17α -ethynyl-19-nortestosterone 投与の場合とほぼ同程度であつた²²⁾ことを考え合わせて 17α -ethynyl-estrenol は少なくともその70%以上が生体内で 17α -ethynyl-19-nortestosterone に変化すると考えられた。

以上ウサギについて 17α -ethynyl-estrenol の代謝を検討しその大部分が 17α -ethynyl-19-nortestosterone に変化することを認めたがこの代謝は *in vitro* の実験⁵⁾からも明らかなおそらく肝がその主役を受け持つていると考えられる。肝での代謝はさらに Δ^4 -double bond の還元 3-Ketone の還元なども進行するが、血中ステロイドの実験成績から考えて少なくともその一部は 17α -ethynyl-19-nortestosterone のまま一般循環血中に放出されることが明らかになつた。一般に経口投与時のステロイドの不活性化は肝で行なわれているとされており progesterone はウサギにおいて1mgの注射で十分な活性が得られるが、経口投与では50mgでも黄体ホルモン作用を示さない¹⁶⁾。他方 cortisol の経口投与では血中に free cortisol の著増が見られ⁴¹⁾、cortisol の生物学的効果は経口、経皮投与で著差を認めないといわれている⁴²⁾。このように肝通過によるステロイドの不活性化はステロイドによりその様子が非常に異なつており、 17α -ethynyl-estrenol はその経口、経皮両投与方法による生物学的活性の差から progesterone と cortisol のほぼ中間に位するような代謝を肝で受けると考えられるが、このことは本剤の経口投与で有効であることに結びついて重要であろう。また今回尿中に認めた 17α -ethynyl-19-norandrosterane-17 β -ol-3-one は男性ホルモン作用、同化ホルモン作用を持つていることが知られており⁴³⁾、またヒトでは 17α -ethynyl-estradiol のように卵胞ホルモン作用を持つたステロイドに生体内で変化することも確かめられている⁴⁾ので、本剤の示す種々の生物学的効果は少なくとも一部はこれら代謝産物によるものであることが明らかであると同時に、これら各種の代謝産物の効果が相互に干渉し合つて本剤の特徴ある生物学的効果をもたらしているといえる。

稿を終わるにあたり、御指導と御校閲を賜つた徳田教授に深く感謝すると共に、終始御指導下さつた当教室岡田講師をはじめ研究室諸兄に感謝する。

参 考 文 献

- 1) 徳田源市 : 第16回日本産科婦人科学会特別講演要旨. 2) WINTER, M.S. DE et al : Chem. and Ind., 905, (1959).
- 3) OKADA, H. et al : Acta endocr. (Kbh), 46, 31, (1964).
- 4) 石原貞尚 : 日内泌誌, 42, 55, (1966).
- 5) 岡田弘二, 他 : 日内泌誌, 40, 1095, (1964).
- 6) 村田修吾 : 日内泌誌, 43, 1083, (1968).
- 7) FLOOD, C.D.S. et al : Acta endocr. (Kbh) 36, 237, (1961).
- 8) WILZBACH, K.E. : J. Amer. chem. Soc. 79, 1013, (1957).
- 9) 岡田弘二, 他 : ホルモンと臨床, 10, 692, (1962).
- 10) ZIMMERMANN, W. : Z. phys. chem., 233, 257, (1953).
- 11) GOLAB, J. et al : J. Chromatog., 9, 312, (1962).
- 12) NEHER, R. et al : Helv.chem. Acta, 34, 2778, (1951).
- 13) BUSH, I.E. : The chromatography of steroids, Oxford : Pergamon press, (1964).
- 14) BUSH, I.E., et al : Biochemistry, 67 : 687, (1957).
- 15) OKADA, H. et al : Acta endocr. (Kbh), 46, 40, (1964).
- 16) 武 博彦 : 日内泌誌, 43, 439, (1967).
- 17) HOOKER, C.W. & FORBES, T.R. : Endocrinol. 41, 158, (1947).
- 18) McGINTY, D.A. et al : Endocrinol. 24, 839, (1939).
- 19) McPHAIL, M.K. : J. Physiol., 83, 145, (1934).
- 20) PINCUS, G. et al : Endocrinol. 61, 528, (1957).
- 21) 松吉吉三郎 : 日内泌誌, 43, 97, (1967).
- 22) 岡田弘二 : 産婦の世界, 19, 1069, (1967).
- 23) DORFMAN, R.I. : Rec. Prog. Horm. Res. 9, 5, (1954).
- 24) 岡田弘二 : 第5回日本産科婦人科学会内分泌懇話会, (1967).
- 25) KLOPPER, A. et al : Acta endocr. (Kbh), 100 : 96 (1965),
- 26) BREUER, H. : Int. J. Fertil., 9 : 181, (1964).
- 27) QUINCEY, R.V. & GRAY, C.H. : J. Endocr, 37, 37, (1967).
- 28) SHNEIDER, J.J. : J. biol. chem., 199 : 235, (1952).
- 29) TOMKINS G. : J. Amer. chem. Soc., 76, 3100.
- 30) FORCHIELLI, E. et al : J. biol. chem., 215, 713, (1954).
- 31) FORCHIELLI, E. et al : J. biol. chem., 223, 443, (1956).
- 32) SAVARD, K.S. et al : J. biol. chem., 202, 717, (1953).
- 33) BRANDLOW, H.L. : J. biol. chem., 229, 505, (1957).
- 34) DORFMAN, R.I. : J. clin. Endocr. 14, 318, (1954).
- 35) DORFMAN, R.I. : Rec. Prog. Horm. Res., 9, 5, (1954).
- 36) BROOKS, R.V. : J. clin. Endocr., 21 : 277, (1960).
- 37) TAYLOR, W. : Biochem. J. 60 : 380, (1955).
- 38) RUBIN, B.L. : J. biol. chem., 277, 917, (1957).
- 39) FIESER, L. & FIESER, M. : Steroids, Reinhold Pub. Co. N.Y. (1959).
- 40) 徳田源市, 岡田弘二 : ホルモンと臨床, 12 : 677, (1964).
- 41) 水谷不二夫 : 日産婦誌, 19, 1435, (1967).
- 42) 田坂定孝 : 臨床内分泌学, 中外医学社, (1961).
- 43) BOWERS, A. et al : J. Amer. Chem. Soc., 79, 4556, (1957).