Norethindrone の Estrogen Receptor および Progesterone Receptor との相互作用

京都府立医科大学産婦人科学教室

玉舎 輝彦, 石原 貞尚, 本山 敏彦
二岡 清昇, 古田 典夫, 岡田 弘二

Interaction of Norethindrone on Estrogen and Progesterone Receptors in the Rabbit Uterine Cytosol

Teruhiko TAMAYA, Sadanao ISHIHARA, Toshihiko MOTOYAMA
Suminori NIOKA, Norio FURUTA and Hiroji OKADA

The Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto, Japan

Norethindrone (ENT), which is a representative in estrane series of progestogen, is not only strongly progestational but also estrogenic and in some cases, antiestrogenic.

To understand progestational effect and antiestrogenic effect, the interactions of ENT on estrogen and progestogen receptors were studied in the uterine cytosol of white female rabbit. The $274,200 \times G$ supernatant of uterine homogenate was used as cytosol. 3H -Estradiol, 3H -Progesterone, 3H -ENT or cold ENT were incubated with uterine cytosol at $4^\circ C$ for 2 hours.

Results are as follows:

1. Sucrose gradient centrifugation [$5 \sim 20\%$ linear and $40,000$ rpm ($159,200 \times G$) for 16 hours at $4^\circ C$]:

ENT was bound to estrogen 8S receptor in immature rabbit uterus (Fig. 2 & 3), and to progestogen 8S receptor in estrogen primed rabbit uterus (Fig. 5).

2. Kinetic study, determined by dextran coated charcoal (0.001% dextran and 0.1% charcoal): (1) In the uterine cytosol of immature rabbit, 3H -estradiol-receptor binding was observed with $K_d = 3.6 \times 10^{-9} M$ and it was revealed that ENT was a competitive inhibitor to this binding with $K_i = 2.6 \times 10^{-6} M$, as in Fig. 6. (2) 8S component, obtained by centrifugation of uterine cytosol (Fig. 1) in estrogen primed rabbit, binds 3H -progesterone with $K_d = 8.1 \times 10^{-10} M$ and B_m (maximal binding sites) $= 5.0 \times 10^{-8} M/mg$ of protein, and ENT was a competitive inhibitor in this binding with $K_i = 2.3 \times 10^{-9} M$ (Fig. 7 & 8). 3H -ENT-8S binding was demonstrated with $K_d = 1.1 \times 10^{-9} M$ and $B_m = 8.7 \times 10^{-8} M/mg$ of cytosol protein (Fig. 8).

These results indicate: (a) ENT is bound to both estrogen and progestogen receptors in 8S macromolecules of uterine cytosol, (b) competitive inhibition of ENT to these

bindings indicated that ENT is bound to these receptors at the steroid binding sites where estradiol and progesterone bind to, (c) ENT has much more affinity to progesterone receptor ($K_i \approx 2.3 \times 10^{-9} \text{M}$) than to estrogen receptor ($K_i \approx 2.6 \times 10^{-6} \text{M}$), (d) while ENT is bound to progesterone and estrogen receptors at the same time, Bm of ENT ($8.7 \times 10^{-8} \text{M/mg}$ of cytosol protein) is more than Bm of progesterone ($5.0 \times 10^{-9} \text{M/mg}$ of cytosol protein), and Kd of ENT ($1.1 \times 10^{-9} \text{M}$) was less than K_i of ENT ($2.3 \times 10^{-9} \text{M}$) in the binding to progesterone-receptor.

Biologically, while ENT is bound to progesterone-receptor with high affinity and to estrogen receptor with low affinity, ENT is actually progestational in low dose and antiestrogenic in high dose but the anti-estrogenicity seems to be incomplete in vivo as ENT may be metabolized to a potent estrogenic compound, ethinyl estradiol.

緒 言

Estrane 系 progestogen に代表される norethindrone (以下 ENT と略す) は生物学的には強力な黄体ホルモン活性³⁾¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁹⁾を有し、同時にエストロゲン効果⁸⁾¹⁰⁾¹⁵⁾¹⁶⁾や抗エストロゲン効果⁸⁾¹⁸⁾などをも示すことが知られている。

そして雌ウサギ子宮 cytoplasm には estrogen receptor⁶⁾, および progesterone receptor⁵⁾²²⁾が存在し、生物学的にステロイドホルモンの効果が発現するためにはまずこれら receptor と結合する必要がある。

そこで ENT の効果の内黄体ホルモン活性と抗エストロゲン効果の出現に際し, ENT がこれら両 receptor へどのように結合し相互作用をするかを検討した。

実 験 方 法

1. ウサギ子宮 cytosol の調整法

実験動物はその目的により、成熟雌ウサギ (生後 4 カ月以内、体重 2 kg まで) の両側卵巢を摘出し 4 週間以上経たものまたは未熟雌ウサギ (生後 2 カ月以内、体重 1 kg まで) を用いた。Priming は estradiol- 17β 50 μg を 0.1 ml のゴマ油に溶解し皮下に連日注射した。ウサギ子宮 cytosol の調整はウサギを断頭屠殺、子宮を摘出しこれを 4°C の cold room で細切し buffer A (0.01 M Tris, 1.5 mM EDTA, pH 7.4) を子宮湿重量の 3 倍 (w/v) 加えて、テフロンホモゲナイザー (間隔 0.13~0.20 mm) でホモゲナイズ (3 ストローク) して 800×G で 10 分遠心、上清を日立高速遠心器 55 P-2 型, RPS-55-T ローターを用い、4°C, 274, 200×G (max.) で 1 時間遠心し、上清を子宮 cytosol とした。

2. 放射性ステロイド

17β -Estradiol-6, 7- H^3 (比放射能 35 Ci/mM), Progesterone-1, 2- H^3 (比放射能 47.8 Ci/mM) および 19-nor-17 α -ethynyl-testosterone- H^3 (Norethindrone- H^3 , 比放射能 20 Ci/mM) は New England Nuclear 社製を使用した。

3. 放射能の測定

Dioxane scintillator (dioxane, toluene, ethylene glycol monomethyl ether 等量混合液に DPO 4 g/l, POPOP 0.1 g/l, naphthalene 75 g/l を加えた液) 10 ml を加えるか場合により, methanol 3.0 ml と toluene scintillator (DPO 4 g/l, POPOP 0.1 g/l in toluene) 10 ml を加えて, Packard 3375 液体シンチレーションカウンタで測定した。

4. 蛋白量の測定

Cytosol の蛋白量の測定は Biuret 反応¹¹⁾ を用い発色後 $552.5 \text{ m}\mu$ で、また場合により銅 Folin 法⁷⁾ により発色後 $750 \text{ m}\mu$ で島津製 Spectronic 20, Baush & Lomb により吸光度を測定した。なお蛋白量は牛血清アルブミン (Armour 社製) による標準曲線より算出した。

5. 蔗糖密度勾配遠心

日立 DGK-U 型密度勾配作成装置により buffer A に溶解した蔗糖密度が 5~20% の linear gradient になるように作成し、合計 4.5 ml とした。これに 4°C で子宮 cytosol と各種ステロイドとを 2 時間インキュベートした試料 0.4 ml を重層した。55 P-2 型日立超遠心器でローターは RPS-55-T を用い、 4°C で 40,000 rpm [$159, 200 \times G$ (max.)] 16 時間遠心した。使用したチューブはポリエチレン (日立 cat. No. 325497) で遠心後チューブの底に 19 ゲージ針を刺入して滴下させ、10 滴を 1 分画 (約 0.14 ml) として分画採取し、Dioxane scintillator 10 ml を加えて放射能の測定をおこなった。

子宮 cytosol 0.4 ml のみを蔗糖密度勾配遠心をおこない、Fig. 1 に示すようにフラクションナンバー 10 より 19 を 8S 分画として採取した。

Fig. 1. The relation of 8S and 5S components, determined by 5~20% sucrose linear gradient centrifugation.

6. Scatchard plot

遊離型および結合型ステロイドの分離には 0.001% dextran (Dextran grade C, BDH Biochemicals 社製), 0.1% Norite A (American Norite 社製), 0.25 M sucrose in buffer A を用いた。

子宮 cytosol 0.5 ml (この場合に限り子宮湿重量の 9 倍の buffer A を加え cytosol の調整をした) もしくは 8S 分画 1.4 ml に対し 3 倍の buffer A を加え、その 0.5 ml と各種濃度のステロイド (^3H -estradiol の場合は $5.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ より $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ まで、 ^3H -progesterone の場合は $6.2 \times 10^{-10} \text{ M}$ より $6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ まで、 ^3H -norethindrone の場合は $6.7 \times 10^{-10} \text{ M}$ より $6.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ まで) とを 4°C で 2 時間インキュベートし、この試料に 0.5 ml の dextran coated charcoal を加え十分攪拌後 30 分静置した後、 $800 \times G$

で10分遠心し上清 0.2 ml に methanol 3.0 ml を加え攪拌後 toluene scintillator 10 ml を加え放射能を測定した。結合型と遊離型とに分けて両者の関係を scatchard plot²⁰⁾ を作成し検討した。

拮抗的阻害の場合、阻害剤により得る見かけの解離定数 $K_p = K_d (1 + i/K_i)$ で i は阻害剤濃度、 K_i は阻害物質定数である。

実験結果

1. 蔗糖密度勾配遠心法による検討

(i) Estrogen receptor に対する ENT の結合

Fig. 2 に示したように未熟ウサギ子宮 cytosol と ^3H -estradiol ($5.0 \times 10^{-9} \text{ M}$) を2時間インキュベートし超遠心し分画したもので ^3H -estradiol と特異的に結合する 8S 高分子が存在し [Fig. 2 の (1)], この結合形は非放射性 ENT ($7.6 \times 10^{-7} \text{ M}$) を同時にインキュベートすると, ^3H -estradiol の 8S 結合形はわずかに減少する。[Fig. 2 の (2)]

Fig. 2. The effect of cold norethindrone binding [$7.6 \times 10^{-7} \text{ M}$, (2):] on ^3H -estradiol-receptor binding [$5.0 \times 10^{-9} \text{ M}$, (1): —] in the uterine cytosol of immature rabbit, determined by 5~20 sucrose linear gradient centrifugation.

一方 Fig. 3 に示したように未熟ウサギ子宮 cytosol と ^3H -ENT ($4.6 \times 10^{-9} \text{ M}$) とを2時間インキュベートし超遠心分画すると ^3H -ENT と 8S 高分子との結合形が存在し、またわずかに 5S 付近にも結合形が存在する。

(ii) Progesterone receptor に対する ENT の結合

Fig. 4 に示したように去勢成熟ウサギ cytosol と ^3H -progesterone ($6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$) とを2時間インキュベートし超遠心分画すると ^3H -progesterone-5S 結合形のみが存在する。これは progesterone に特異的な結合ではない。

Fig. 3. The pattern of ^3H -norethindrone-receptor binding ($4.6 \times 10^{-9} \text{ M}$) in the uterine cytosol of immature rabbit, determined by 5~20% sucrose linear gradient centrifugation.

Fig. 4. The pattern of ^3H -progesterone-receptor binding ($6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -progesterone) in the uterine cytosol of immature rabbit, determined by 5~20% sucrose linear gradient centrifugation.

同様に Fig. 5 に示すように estrogen を 7 日間 priming した未熟ウサギ子宮 cytosol において, (1) の ^3H -progesterone ($6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$) とインキュベートすると特異的に結合する 8S 結合形が出現し, また (2) の ^3H -ENT ($6.7 \times 10^{-9} \text{ M}$) とインキュベートすると 8S 結合形が存在する。

一方 Fig. 5 の (3) に示したように ^3H -progesterone ($6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$) と非放射性 ENT ($3.4 \times 10^{-7} \text{ M}$) とを同時にインキュベートすると ^3H -progesterone と 8S との結合形はほぼ完全に消出し, 5S 結合形と遊離分画の増加が示された。これは progesterone も ENT も同一 8S 高分子に結合していることがわかる。

2. 反応速度論的検討

(i) Estrogen-receptor 結合に対しての阻害剤としての ENT

未熟ウサギ子宮 cytosol をもちいて実験をおこなった。実験方法 6 で述べられたように結合形と遊離形とを dextran coated charcoal により分け scatchard plot を作成した。

Fig. 6 の (1) で示されたように ^3H -estradiol-receptor 結合は $K_d = 3.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ で, 非放射性 ENT ($i = 6.7 \times 10^{-6} \text{ M}$) は Fig. 6 の (2) で示されたように, この結合に拮抗的阻害を示しその $K_i = 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ で親和性は低い。

(ii) Progesterone-receptor 結合に対しての阻害剤としての ENT

Estrogen priming を 7 日間おこなった未熟ウサギ子宮 cytosol を蔗糖密度勾配遠心し分画した 8S 成分をもちいた。同様に Scatchard plot を作成し Fig. 7 の (1) では ^3H -progesterone-receptor 結合は $K_d = 8.1 \times 10^{-10} \text{ M}$ を示し, 非放射性 ENT ($i = 13.4 \times 10^{-9} \text{ M}$) は Fig. 7 の (2) で示されたように, この拮抗的阻害を示しその $K_i = 2.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ で親和性は強い。

(iii) 8S 分画に対する ^3H -progesterone および ^3H -ENT の結合能

(ii) と同じようにして得た 8S 分画をもちい ^3H -progesterone および ^3H -ENT の固有の K_d および

Fig. 5. The sedimentation pattern of (1) ^3H -progesterone-receptor binding ($6.2 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -progesterone), and (2) ^3H -norethindrone-receptor binding ($6.7 \times 10^{-9} \text{ M}$ ^3H -norethindrone) and the effect of (3) cold norethindrone ($3.4 \times 10^{-7} \text{ M}$) on ^3H -progesterone-receptor binding in the uterine cytosol of estrogen primed rabbit, and determined by 5~20% sucrose linear gradient centrifugation.

Fig. 6. Scatchard plot.

The effect of cold norethindrone ($6.7 \times 10^{-6} \text{ M}$) on ^3H -estradiol-receptor binding in the uterine cytosol of immature rabbit, and determined with dextran coated charcoal.

(1): ^3H -estradiol-receptor binding with $K_d = 3.6 \times 10^{-9} \text{ M}$.

(2): Competitive inhibition of cold norethindrone with $K_i = 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Bm (maximal binding sites) を求めた。

Fig. 8 の (1) に示すように ^3H -progesterone-receptor 結合の $K_d = 8.1 \times 10^{-10} \text{ M}$, $B_m = 5.0 \times 10^{-8} \text{ M/mg}$ of cytosol protein で、一方 Fig. 8 の (2) に示すように ^3H -ENT は $K_d = 1.1 \times 10^{-9} \text{ M}$, $B_m = 8.7 \times 10^{-8} \text{ M/mg}$ of cytosol protein であった。

^3H -ENT は estrogen receptor と同時に結合するから K_d は progesterone receptor に対する K_i よ

Fig. 7. Scatchard plot. The effect of cold norethindrone (13.4×10^{-9} M) on ^3H -progesterone-receptor binding, with 8S component from the uterine cytosol of estrogen primed rabbit and determined by dextran coated charcoal assay.

(1): ^3H -progesterone-receptor binding with $K_d = 8.1 \times 10^{-10}$ M.

(2): Competitive inhibition of cold norethindrone with $K_i = 2.3 \times 10^{-9}$ M.

Fig. 8. Scatchard plot of ^3H -progesterone-receptor or ^3H -norethindrone-receptor binding, with 8S component from the uterine cytosol of estrogen primed rabbit and determined by dextran coated charcoal assay.

(1): ^3H -progesterone-receptor binding with $K_d = 8.1 \times 10^{-10}$ M and maximal binding sites $= 5.0 \times 10^{-8}$ M/mg of cytosol protein.

(2): ^3H -norethindrone-receptor binding with $K_d = 1.1 \times 10^{-9}$ M and maximal binding sites $= 8.7 \times 10^{-8}$ M/mg of cytosol protein.

り低く、つまり親和性は少し高くなり、またprogesteroneのBmよりも少し高い。

考 案

Estrane系 progestogenであるENTは強力な経口黄体ホルモン剤であり、経口避妊薬¹²⁾や婦人科領域の治療面に広く利用されて来た。構造上 17α -hydroxyprogesterone誘導体によく似ているが全く別個のもので、どちらかというとなandrogenに似ている。

そして生物学的には多面的効果を発揮し、エストロゲン効果を持つのはethynyl estradiolに一部代謝されるため⁴⁾¹³⁾、また投与量が多くなるとandrogenicやanabolicな効果が出現し、おそらくENTが代謝されてこの効果を発揮するものと思われ、臨床経験では女性胎児の男性化²³⁾やhirsutism, acne, 著しい

体重増加など¹²⁾ が知られている。

そして ENT は抗エストロゲン効果があり⁸⁾¹⁸⁾, この性質がその黄体ホルモン活性とともに臨床応用として子宮内膜癌の治療¹⁸⁾ に望まれた。

このように ENT の多面的効果の内, おそらく receptor を介すると思われる面をここでは雌ウサギ子宮におけるステロイドホルモン receptor を用い分子生物学的に検討した。

まず ENT の抗エストロゲン効果について, ラット子宮へ ENT の前投与により ^3H -estradiol の取り込みの減少が認められている¹²⁾²⁴⁾。そして ENT は estrogen receptor に対して $K_i \approx 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ を示し親和性は大変低い, ENT が相当量あると生物学的効果として ENT が estrogen receptor の binding site を専有することによりエストロゲン効果を receptor level で阻害するものと考えられる。このためには ENT が代謝され ethynyl estradiol の効果が出現する以上に ENT が存在する必要がある。

そして ENT が estrogen receptor に結合することによりエストロゲン効果を引き起こさないことは抗エストロゲン剤 nafoxidine は estrogen receptor と結合し核内に取り込まれ長時間核に retention するが, 新たに receptor が合成されないため²⁾ か, cytoplasm において ENT-estrogen receptor 複合体の核内移行がないため⁹⁾ か, estrogen receptor に結合することによって一連の順次反応によって抗エストロゲン効果となることも考えられる。また ENT が posttranscriptional にはたらい, 例えば estradiol が ribosomes から polysomes への形成にはたらく¹⁴⁾ 所へ, ENT がはたらい抗エストロゲン効果を発揮する可能性も考えられる。

同じ progestogen でも pregnane 系の progestogen は estrogen receptor への結合部位および親和性へは全く変化させないことが知られている⁹⁾²⁴⁾。また Kordelaar ら²⁵⁾ によると estrane 系の progestogen の内でも ethinodiol diacetate がもっとも強く estrogen receptor に拮抗的阻害がおこり, ついで norethindrel, lynestrenol, norethindrone の順となり norgestrel はほとんど不活性と報告されている。興味のあることには著者ら²¹⁾ が既に発表した estrane 系の progestogen の progestogen receptor への親和性とは全く逆になっている。

一方 ENT の黄体ホルモン活性は ENT が progestogen receptor と結合することにより発揮するものと考えられる。そして ENT は progestogen receptor に対して阻害物質定数 $K_i \approx 2.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ を示し大変親和性が強く, 他の progestogen の内でもっとも強い²¹⁾。

このように ENT は progestogen receptor にそのままの型で結合し生物学的効果を示すものと思われるが, ENT はウサギでは Clauberg test で経口¹⁹⁾, 筋注¹⁶⁾, 皮下注¹⁷⁾ では活性であり, McGinty intra-uterine test¹⁹⁾ では不活性で, pregnancy maintenance test¹⁶⁾¹⁷⁾ は不活性など複雑な面を有している。

Priming したウサギ子宮 cytosol には progestogen receptor や estrogen receptor が存在し, 低電解質下には特異的な 8S 高分子として分離できる²²⁾。そして 5S などの非特異的な分画を除いた 8S 分画のみを用いて検討した場合 (Fig. 7, 8), ENT は estrogen receptor および progestogen receptor に結合するため, ENT の $K_d \approx 1.1 \times 10^{-9} \text{ M}$ であり, progestogen receptor への $K_i \approx 2.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ や, estrogen receptor への $K_i \approx 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ より親和性は強く, また ENT の結合部位数が, $B_m \approx 8.7 \times 10^{-8} \text{ M/mg of cytosol protein}$ であり, progesterone の $B_m \approx 5.0 \times 10^{-8} \text{ M/mg of cytosol protein}$ より多くなる。

このように ENT の生物学的効果を receptor レベルで検討したところでは同時に progestogen receptor と estrogen receptor に結合し, 黄体ホルモン活性と抗エストロゲン効果を示すと考えられる。

結 語

Estrane 系 progestogen である norethindrone (ENT) は強力な黄体ホルモン活性を有し, またエストロゲン効果や抗エストロゲン効果をも示す。この ENT の黄体ホルモン活性と抗エストロゲン効果をウサギ子宮 cytosol にある estrogen および progestogen receptor への ENT の相互作用の面から検討した。

1. 蔗糖密度勾配遠心法では estrogen および progesterone receptor である 8S に ENT は結合する。そして ^3H -estradiol-8S に対しては少しの結合阻害をおこし、 ^3H -progesterone-8S に対しては強く結合阻害をおこす。

2. 反応速度論的検討では a) 未熟ウサギ子宮 cytosol において ^3H -estradiol-receptor 結合は $K_d = 3.6 \times 10^{-9} \text{ M}$ で ENT は $K_i = 2.6 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、拮抗的阻害を示した。b) 一方 estrogen で priming した未熟ウサギ子宮 cytosol を蔗糖密度勾配遠心により分画して得た 8S 成分を用い Scatchard plot を作成すると、 ^3H -progesterone-8S 結合は、 $K_d = 8.1 \times 10^{-10} \text{ M}$ で ENT は $K_i = 2.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ で拮抗的阻害を示した。また ^3H -progesterone は $B_m = 5.0 \times 10^{-8} \text{ M/mg of cytosol protein}$ で、 ^3H -ENT-8S 結合は、 $K_d = 1.1 \times 10^{-9} \text{ M}$, $B_m = 8.7 \times 10^{-8} \text{ M/mg of cytosol protein}$ であった。

以上の結果から ENT は estrogen および progesterone receptor である 8S 高分子に結合し、拮抗的阻害を示すことから結合部位は同じであり、親和性は progesterone receptor にははるかに強い。そして ENT は progesterone の結合部位数より多いのは estrogen receptor にも同時に結合するためである。したがって ENT は progesterone receptor へは強い親和性で結合するため黄体ホルモン作用は少ない量で発揮するが、抗エストロゲン効果は ENT が ethynyl estradiol に代謝されてエストロゲン効果が発揮されることから完全な抗エストロゲン効果を抑制するにはいたらないと考えられる。

尚本論文の要旨は第22回日本内分泌学会西部部会総会において発表した。

文 献

- 1) Banerjee, R.C., Brazeau, Jr., P., Saucier, R. and Husain, S.M.: Effects of norethindrone (17-ethynyl-17 β -hydroxy-4-estren-3-one) and norgestrel (dl-13 β -ethyl-17-ethynyl-17 β -hydroxy-4-gonen-3-one) on the tissue distribution of ^3H -estradiol-17 β in ovariectomized rats. *Steroids*, 21: 133-145, 1973.
- 2) Clark, J.H., Anderson, J.N. and Peck, Jr., E.J.: Estrogen receptor-anti-estrogen complex: Atypical binding by uterine nuclei and effects on uterine growth. *Steroids*, 22: 707-718, 1973.
- 3) Djerassi, C., Miramontes, L., Rosenkranz, G. and Sondheimer, F.: *Steroids*. LIV. Synthesis of 19-nor-17 α -ethynyltestosterone and 19-nor-17 α -methyltestosterone. *J. Amer. chem. Soc.*, 76: 4092-4094, 1954.
- 4) 石原貞尚: 合成 progestin の aromatization に関する実験的研究. *日内分泌誌*, 42: 55-68, 1966.
- 5) 石原貞尚, 玉舎輝彦, 岡田弘二: ウサギおよびラット子宮の progesterone receptor. *日内分泌誌*, 49: 1254-1260, 1973.
- 6) 北嶋正智: エストロゲン, 抗エストロゲン剤の作用機構に関する研究. *日産婦誌*, 27: 121-130, 1975.
- 7) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 8) 溝口 直: 各種合成 progestin の estrogenic activity および anti-estrogenic activity に関する研究. *日内分泌誌*, 43: 842-857, 1967.
- 9) Martin, J.E., Philpott, J., Chatkoff, M., Young, R. and Pauerstein, C.J.: Effect of progesterone on estrogen receptors in the rabbit uterus. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 121: 180-186, 1975.
- 10) McGinty, D.A. and Djerassi, C.: Some chemical and biological properties of 19-nor-17 α -ethynyl testosterone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 71: 500-515, 1958.
- 11) Mehl, J.W.: The Biuret reaction of proteins in the presence of ethylene glycol. *J. biol. Chem.*, 157: 173-180, 1944.
- 12) Nelson, J.H.: Clinical evaluation of side effects of current oral contraceptives. *J. Reprod. Med.*, 6: 43-48, 1971.
- 13) Okada, H., Amatsu, M., Ishihara, S. and Tokuda, G.: Conversion of some synthetic progestins to oestrogen. *Acta Endocr. (Kbh.)*, 46: 31-36, 1964.
- 14) Palmiter, R.D., Christensen, A.K. and Schimke, R.T.: Organization of polysomes from pre-existing ribosomes in chick oviduct by a secondary administration of either estradiol or progesterone. *J. biol.*

- Chem., 245: 833-845, 1970. 15) Paulsen, C.A., Leach, R.B., Lanman, J., Goldston, N., Maddock, W.O. and Heller, C.G.: Inherent estrogenicity of norethindrone and norethynodrel: Comparison with other synthetic progestins and progesterone. J. clin. Endocr., 22: 1033-1039, 1962. 16) Pincus, G., Chang, M.C., Hafez, E.S.E., Zarrow, M.X. and Merrill, A.: Studies of the biological activity of certain 19-nor steroids in female animals. Endocrinology, 59: 695-707, 1956. 17) Pincus, G., Chang, M.C., Hafez, E.S.E., Zarrow, M.X. and Merrill, A.: Steroids on reproductive processes in animals. Science, 124: 890-891, 1956. 18) Rudel, H. W., Lebberz, T., Maqueo-Topete, M., Martinez-Manautou, J. and Bessler, S.: Assay of the anti-oestrogenic effects of progestogens in women. J. Reprod. Fertil., 13: 199-203, 1967. 19) Saunders, F.J., Edgren, R.A. and Drill, V.A.: On the progestational activity of 17 α -ethynyl-17-hydroxy-5(10)-estrone-3-one(norethynodrel). Endocrinology, 60: 804-805, 1957. 20) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. N.Y. Acad. Sci. Annals., 51: 660-672, 1949. 21) 玉舎輝彦, 石原貞尚, 岡田弘二: Progesterone レセプターと合成黄体ホルモン剤 norethindrone (ENT) との相互作用 —特にステロイド側の結合部位について—. 日内泌誌, 51: 358, 1975. 22) 玉舎輝彦: Progesterone receptor に関する研究—特に estrogen priming との関連性について—. 日産婦誌, 27: 439-446, 1975. 23) Venning, G.R.: The problem of human foetal abnormalities with special reference to sex hormones. 94-104. Ed. by J.M. Robson, F.M. Sullivan and R.L. Smith, Embryopathic Activity of Drugs, J. & A. Churchill, Ltd., London, 1965. 24) Van Kordelaar, J.M.G., Broekman, M.M.M. and van Rossum, J.M.: Interaction of contraceptive progestins and related compounds with the oestrogen receptor Part I: Effect on [3 H] oestradiol distribution pattern in the ovariectomized rat. Acta Endocr. (Kbh.), 78: 145-164, 1975. 25) Van Kordelaar, J.M.G., Vermorken, A.J.M., de Weerd, C.J.M. and Rossum, J.M.: Interaction of contraceptive progestins and related compounds with the oestrogen receptor Part II: Effect on [3 H] oestradiol binding to the rat uterine receptor *in vitro*. Acta Endocr. (Kbh.), 78: 165-179, 1975.