Estrogenによるヒト血清corticosteroid-binding globulin (CBG) の上昇反応と estrogen threshold について.

山形大学医学部産科婦人科学教室

川 越 慎之助, 広 井 正 彦

Effects of Several Estrogenic Compounds
on Serum Corticosteroid-binding Globulin (CBG)
and the Estrogen Thresholds for Increasing CBG

Shinnosuke KAWAGOE, Masahiko HIROI

Department of Obstetrics and Gynecology
Yamagata University School of Medicine
Yamagata

The effects of several estrogen substances — alone, or in combination with norgestrel — on serum CBG in humans are reported in this paper. CBG was measured by a modified charcoal adsorption technique.

Daily oral doses of Premarin, from 0.3 to 2.5mg, were given to healthy postmenopausal women for 14 days. Dose-dependent increases in CBG-BC were observed. Ovral, which contains ethinylestradiol and norgestrel, also induced significant increases in the levels of CBG-BC. Similar results were seen with Lo Ovral, but it had less influence than Ovral. When given alone, daily for 21 days, norgestrel had no effect on CBG-BC. The maximum rise of serum CBG-BC was found after 10 days of the daily doses of Ovral, and then the levels remained quite constant during the period of treatment. Exogenous estrogens of other types also caused increases in CBG-BC. The response of CBG to exogenous estrogens is of use in comparing the estrogen potencies of the compounds.

CBG-BC levels remained constant throughout the menstrual cycle in five normal women despite fluctuating levels of estradiol which reached peaks of 190~430 pg/ml. In pregnant women and in HMG-treated women, however, serum levels of CBG-BC increased beginning when estradiol levels were greater than 1 ng/ml.

緒 言

種々の estrogenic compounds が経口避妊薬として、あるいは卵巣摘出婦人や更年期婦人に対する補充療法として臨床に広く用いられているが、こうした estrogenic compounds は静脈血栓症をはじめとしたいくつかの副作用の発生と深い関連があることが知られている。²⁾¹³⁾そして、この様な副作用発生の危険性は

多分に薬物の estrogen potencies と関係があると考えられている。

従来より、各種 estrogenic compounds の estrogen potencies については、主としてマウスの子宮重量の変化などを指標とした動物実験によって行われてきたが、³⁾ 動物で得た成績がそのまま estrogen potencies という点で直接ヒトに適合し得るか否かは疑問である。従って、ヒトでは endometrial volume の変化など標的臓器の反応から推定する方法もあるが、^{6) 11)} 必ずしも優れた方法とはいえない。

一方、steroid 結合蛋白の一つであるヒト血清中 corticosteroid-binding globulin (CBG) が estrogen に反応して上昇し、^{4) 7) 21) 22)} しかも、CBG の増加反応は estrogen の投与量に比例することから、^{21) 22)} この反応を parameter として各種経口避妊薬の total estrogenicity をヒトにおいて比較しようとの試みもある。著者らも新しく開発した CBG 簡易測定法¹⁰⁾ を応用して、estrogenic compounds 投与の際の血清 CBG 値の変化を検討し、さらに内因性 estrogen の変化と CBG 上昇反応との関連について検討した。

研究材料および方法

(1) CBG 測定法.

血清 CBG の測定は charcoal adsorption method により行い、CBG の cortisol-binding capacity (CBG-BC) で表現した。

測定法は、まず被験血清に dextran-coated charcoal を加えて、45℃で30分間 incubation を行い、遠沈して血清中の steroids を吸着、除去した。次いで、この steroid free の血清に既知量の³H-cortisol を加えて incubation を行い、CBG の binding sites を飽和した。遊離の cortisol は再度 dextran-coated charcoal を用いて 4℃で incubate して除去し、CBG と結合した cortisol 量を算出する。また、CBG 以外の蛋白（とくに albumin）と非特異的に結合した cortisol は、60℃で30分間加熱して CBG を不活化した血清を用いて測定したが、測定方法の詳細については別に報告した。¹⁰⁾

(2) 研究対象.

a) estrogenic compounds 投与群.

Dose-response curve を検討する為に、閉経婦人 3 名（閉経後 5 年以上経過、年齢 55-62 才）に種々量の conjugated estrogen (Premarin) を 14 日間連日午前 9 時に内服させた。1 クール終了後少なくとも 4 週間の休薬期間をおき、Premarin の量を増加あるいは減少して再度内服を開始し、これを 4 クール繰り返し続けた。採血は薬剤投与期間中は隔日に午前 9 時に行い、さらに、投与開始前および終了後にもそれぞれ少なくとも 2 日間行った。

正常月経周期を示す健康婦人 9 名（25-40 才）で、少なくとも 3 ヶ月間はホルモン剤などの薬物投与を受けていないことを確認の上、周期 5 日目より Ovral (ethinylestradiol (EE) 50 µg + norgestrel 0.5mg, Wyeth Lab.), Lo Ovral (EE 30 µg + norgestrel 0.3 mg, Wyeth Lab.), norgestrel 0.5 mg などそれぞれ 3 名づつに 5 日間内服させた。与薬は午前 9 時に行い、採血も同時刻に与薬中止後の 5 日間を含めて計 10 日間連日施行したが、与薬開始第一日目には午前 9 時から午後 9 時までの 12 時間を 2 時間々隔で行った。さらに、Ovral あるいは norgestrel (0.5mg) の単独を 21 日間投与し、7 日間休薬後再びこれを繰り返して、この間毎日午前 9 時から 10 時の間に採血を行った。

他に、Premarin 2.5mg, Lo Ovral, Ovral, Ortho Novum 1/50 (mestranol 50 µg + norethindrone 1mg, Ortho Pharmaceutical Co.), Ortho Novum 1/80 (mestranol 80 µg + norethindrone 1mg, Ortho Pharmaceutical Co.), diethylstilbestrol (DES) 1 mg を閉経婦人に 2 週間投与して採血を隔日に行い、CBG-BC を測定した。

b) 正常月経周期婦人.

正常排卵性周期を有する婦人5名(22—35才)より月経開始第1日目から次周期第1日まで連日午前中に採血し, CBG-BCを測定すると共にLH, estradiol をradioimmunoassay¹⁷⁾で測定した.

c) HMG投与群および妊娠症例.

無月経患者の6名にHMG 150—225 IU (Pergonal, Cutter Labo.) を数日間投与し, 投与期間ならびに終了後2—3日目まで毎日採血を行い, CBG-BCとestradiol を測定した. また, 妊娠6, 8, 10, 12, 14および16週の婦人それぞれ5名づつから採血して前記同様にCBG-BCとestradiol を測定し, 両者の因果関係を検討した.

なお, いずれの検体も血清を分離して測定の日まで-20℃に凍結保存した.

Fig. 1. The relationship between the increases in CBG-BC and the dose of estrogen administered orally for 14 days.

実験成績.

(1) Premarin とCBG-BC のdose-response relationship.

Premarin 投与量とCBG-BC 値との関係をFig.1に示した. Premarin 投与量の増加に伴ってCBG-BC も上昇し, その上昇分, すなわち投与前値とCBG-BC の最大上昇値の差を比較すると, Fig.1にみる様にPremarin 投与量が2倍になると CBG-BC 上昇値もおおよそ2倍になるといった様に, Premarin 0.3—2.5mgの投与範囲内に於いてはdose-response の関係が認められた.

(2) Ethinylestradiol とnorgestrel によるCBG-BC の変化.

Ethinylestradiol (EE) とnorgestrel との混合製剤であるOvral, Lo Ovral および norgestrel の単独投与によるCBG-BC の変化を示したのがFig.2である.

EE 50 μg を含有するOvral 服用症例では, 初回服用の12時間後から, また, EE 30 μg 含有のLo Ovral では24時間後にCBG-BC が上昇しはじめた. ピーク値と投与前値との差は前者で18.8 μg %, 後者では12.7 μg %であった. 一方, norgestrel 0.5mgの単独ではCBG-BC に変化が認められなかった.

Fig. 2. Mean changes in CBG-BC during normal menstrual cycle and in women treated with Ovral, Lo Ovral and norgestrel daily for 5 days.

Fig. 3. CBG-BC in a woman using Ovral daily for 21 days and mean changes in CBG-BC in 5 women during normal menstrual cycle. The star-dots represent CBG-BC in a woman before and after taking norgestrel alone daily for 21 days.

Fig. 3はOvral をさらに長期に (21日間) 連続服用した症例に於けるCBG-BC の変化を示したものである。CBG-BC は投与開始の翌日には既に上昇しており, 服用開始後10日目にはほぼ maximum となって, その後の服用期間中はおよそ一定の値を持続した。そして, 服用中止後の3日目頃から徐々に低下しはじめるが, 7日後には未だ投与前値まで戻らない。Norgestrel (0.5mg/day) のみでは長期間投与によっても CBG-BC に変化はなく, このことはCBG はestrogen に反応して上昇するが, progestins には反応しないことを示唆している。

Fig. 4. Increases in CBG-BC in women taking various hormonal preparations.

Fig. 5. CBG-BC and estradiol levels in the serum of 5 women during a normal menstrual cycle.

(3) 各種のestrogenic compounds 服用によるCBG-BC値上昇の比較.

Fig.4は種々のestrogenic compounds を少くとも2週間以上服用している婦人のCBG-BC上昇値を示している。Lo Ovral ではCBG-BCの増加が13.7 μ g%であるのに対し、DES 1mgでは31.3 μ g%の上昇がみられた。そして、1mgDES, Ortho Novum 1/80, Ovral, Ortho Novum 1/50, 2.5mgPremarin, Lo Ovral の順でCBG-BCの増加が大きく、DES投与時のCBG-BC値増加分を100%とすると、それぞれ70.9, 63.9, 58.1, 45.7, 43.8%となる。前記の如く、estrogenの強さとCBG-BCの上昇反応とはほぼ比例関係にあることから、この成績は、投与量は異なるが、それぞれの投与量における各物質のestrogen potenciesの差を示しているといえる。

(4) 正常月経周期中の血中 estradiol とCBG-BCの変化.

5例の婦人の月経周期中におけるCBG-BCとestradiolの変化をFig.5に示した。Estradiolは大きく変動し、排卵前期のピーク値が190~430pg/mlと上昇しているにも拘らず、CBG-BC値は周期を通じてほぼ一定である。

(5) HMG投与および妊娠初期に於ける血中 estradiol とCBG-BCの変化.

HMG投与群6名のうち(Clomid + HMG療法を行った1症例を含む)、CBG-BCに変化のみられなかった4例では、estradiolは最高で420~950 pg/mlであったが、CBG-BCの上昇した2例についてみると、estradiolは1,000 pg/ml以上であった(Fig. 6)。

Fig. 6. CBG-BC and estradiol levels in the serum of amenorrheic women during HMG therapy.

Fig. 7. Parallel increase in CBG-BC and estradiol in serum during early pregnancy.

また、妊娠例では Fig.7 に示す如く、妊娠8週目までは CBG-BC は非妊婦にくらべて有意の増加はみられなかったが、この時期ではいずれの症例も estradiol 値は1.000pg/ml 以下であった。妊娠10週目には CBG-BC は有意の増加を示し、この時期の estradiol は1.000pg/ml 以上を示していた。以後は estradiol の漸増につれて CBG-BC も上昇した。

以上の様に、正常月経周期、HMG 投与ならびに妊娠初期に於ける estradiol と CBG-BC の変化をみた成績から、内因性 estradiol が1.000pg/ml 以上になると CBG が上昇してくると思われる。

考 案

各種合成ステロイド、あるいはエストロゲン製剤の estrogen potencies の検討は、従来、動物を用いた bioassay によって行われてきた。³⁾ しかしながら、吸収、代謝、排泄等の過程で、あるいは target organ に於ける receptor などに関しては種属間で異なることも考えられ、動物実験で得られた成績がどの程度ヒトにも適用し得るかは疑問である。また、この目的の為の parameter としてよく利用される uterine growth などは estrogen 以外のホルモンによっても促進され、estrogen に特異的とはいえない。ヒトでは vaginal smear に対する影響や、¹²⁾ endometrial volume の変化などを指標とする方法も利用されてきたが、^{6) 11)} 余り一般的ではない。

一方、Daughaday ら⁵⁾ や Sandberg ら¹⁹⁾ によってその存在が発見されたヒト血中 CBG は、妊娠中^{4) 8) 23)} や estrogen 投与時^{4) 7) 21) 22)} に著明に上昇することが知られている。そして、Premarin 投与と CBG-BC 値との間でみられた様に、estrogen による CBG の反応は、いったん estrogen threshold に達すれば投与 estrogen 量に比例して増加し、dose-response の関係にあることが示されている^{21) 22)}。しかも、norgestrel (0.5mg daily) の長期投与でも CBG-BC は変化しなかったが、この化合物は Barbosa ら¹⁾ によって証明されている様に、estrogen 活性を有していない為であり、progestins が CBG 値に影響しないことを示している。Sandberg ら²⁰⁾ によっても CBG は estrogen 以外のホルモンには反応しないことが報告されており、これは progestins や androgen によっても影響を受ける testosterone-estrogen-binding globulin (TeB-G) とは異なる点である。²⁵⁾

Schwartz ら²¹⁾は 19-norsteroid 系物質 (norgestrel 1 mg, norethindrone 10mg, norethindrone acetate 5 mg, norethynodrel 10mg) について CBG 値に及ぼす影響を検討しているが, norethynodrel を除いて CBG 値は対照群と差が認められないことから, この投与量では, 前三者は estrogen としての活性が極めて弱いか, あるいは欠如するものと解釈している. 一方, norethynodrel 投与では CBG が上昇することから, この物質は estrogenic properties を有すると考えられている. Drill⁹⁾も norethynodrel は強力な pro-estrogen であることを動物やヒトで種々の biological parameter を用いて証明しているし, Jones ら¹⁴⁾も去勢ラットの vaginal keratinization を指標とした時に, EE の約2.1%の estrogen potency を有すると報告している.

Combination pills に広く応用されている EE と mestranol とでは, 従来の gonadotropin 分泌抑制作用の点や,¹⁰⁾ vaginal cytology の面からみて,²⁴⁾ 両者に著明な potencies の差異はないといわれてきていた. しかしながら, これら両物質による CBG-BC の反応を比較した場合, EE 50 µg を含有している Ovral で, mestranol 50 µg を含有する Ortho Novum よりも CBG-BC がより高く上昇し, このことは EE が mestranol にくらべて estrogen potencies が高いことを示しているものといえる. Schwartz ら²¹⁾も両者による CBG 上昇率から比較した時に, mestranol は EE の約64%の estrogen potencies しか示さないといい, Chih-al ら³⁾はマウスの子宮重量法で検討した時に, 67%の活性であること, vaginal keratinization を用いた成績では,¹⁴⁾約52%であることを報告している. また, ヒトでは estrogen の標的組織である endometrium の変化を指標とした場合に, mestranol は EE の約半分の作用力しか示さなかったといわれている.⁶⁾この様に, 活性の評価は parameter とした組織あるいは器官, さらには種属間によって多少の相違がみられるが, CBG の反応もヒトに於いて直接的に estrogen potencies を示す優れた指標となり得る.

Estrogen 投与と CBG-BC 上昇反応の時間的關係については, Ovral では投与後12時間目から CBG-BC は上昇し, Lo Ovral ではこれより遅れて24時間後に上昇するのが認められた. このように, 反応開始の時期も投与 estrogen 量によって異なってくる. そして, 10日後には maximum level に達し, その後投与期間中はほぼ constant な値を維持する. 一方, Musa ら¹⁸⁾の報告では, 1日5mgの DES 連続投与の際, 14日目では maximum に達し, 1年後に於いてもほぼ同一の値であったという. また, 投与開始後7日目の CBG 上昇率は maximum の67%であったと報告している.

CBG はこうした外因性 estrogen に対してだけではなく, 例えば妊娠中の様に内因性 estrogen の増加にも反応して上昇してくる. しかし, 排卵性月経周期に於いては, estrogen が排卵期ならびに黄体期で著明に増加しているにも拘らず, CBG-BC の上昇は伴ってこない. このことは月経周期中にみられる estrogen peak 値が未だ CBG 上昇を起こすだけの threshold level に達していない為と考えられる. 一方, HMG 投与例や妊娠初期の例で, estradiol と CBG-BC を同時に測定した成績では, estradiol が 1 ng/ml 以上になった例に於いてのみ CBG-BC の増加が認められており, estradiol の threshold は 1 ng/ml 付近にあることが考えられる. しかし, ここで問題となるのは, CBG は estriol には反応しないといわれているが,¹⁵⁾ estrogen にも反応することから, total estrogen としての threshold level をさらに検討してみなければならないことである. ただ, estrogen としての生物活性が最も強いといわれている estradiol がいずれの例でも 1 ng/ml 以上となつてはじめて CBG-BC が上昇してくるという事実は興味深い.

要 約

Dextran-coated charcoal による adsorption method を応用して, 生理的状态あるいは種々の estrogenic compounds を投与した際のヒト血清 CBG-BC 値を測定した.

閉経後婦人に種々量の conjugated estrogen (Premarin) を連日14日間投与することで CBG-BC は増加し, Premarin と CBG-BC 上昇値との間に dose-response の關係が認められた.

Ovral の連続投与では, 投与開始の12時間後から CBG-BC は上昇しはじめ, 10日後に maximum に達し, その後の投与期間中はほぼ plateau となった. しかし, norgestrel (0.5 mg) 単独では長期投与にも拘らず CBG-BC に変化は認められず, progestins は血清 CBG に影響を及ぼさないことが示された.

また, diethylstilbestrol (DES), combined oral contraceptives 服用症例の CBG-BC を比較した. DES (1 mg) 服用例の CBG-BC 上昇値を100%とした時, Ortho Novum 1/80は70.9%, 1/50は58.1%, Ovral 63.9%, Lo Ovral 43.8%, Premarin (2.5 mg) 45.7%の上昇値を示し, CBG はヒトに於いて estrogen potencies を検定する為の指標となることが示唆された.

正常月経周期婦人では血中 estradiol が著明に変動し, 排卵期のピーク値が190—430 pg /ml となるにも拘らず CBG-BC は周期を通じてほぼ一定である. しかし, HMG 投与例や妊娠初期の婦人では estradiol が 1 ng/ml に増加すると CBG-BC が上昇するのが認められた.

本論文の要旨は1977年3月, 24th annual meeting of The Society for Gynecologic Investigation, Tuscon, Ariz., U. S. A. で発表された.

ご指導下さった Dr. Robert M. Nakamura および Dr. Donald E. Moore には心から感謝致します.

文 献

- 1) Barbosa, J., Seal, U.S. & Doe, R.P.: Anti-estrogens and plasma proteins. II. Contraceptive drugs and gestagens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36: 706—714, 1973.
- 2) Carvalho, A.C.A., Vaillancourt, R.A., Cabral, R.B., Lees, R.S. & Colman, R.W.: Coagulation abnormalities in women taking oral contraceptives. *JAMA*, 237: 875—878, 1977.
- 3) Chihal, H.J.W., Pepler, R.D. & Dickey, R.P.: Estrogen potency of oral contraceptive pills. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 121: 75—83, 1975.
- 4) Daughaday, W.H., Adler, R.E., Mariz, I.K. & Rasinski, D.C.: Measurement of the binding capacity of corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 22: 704—710, 1962.
- 5) Daughaday, W.H. & Kozak, I.: Binding of corticosteroids by plasma proteins. III. The binding of corticosteroid and related hormones by human plasma and plasma protein fractions as measured by equilibrium dialysis. *J. Clin. Invest.*, 37: 511—518, 1958.
- 6) Delforge, J.P. & Ferin, J.: A histometric study of two estrogens: Ethinyl-estradiol and its 3-methyl-ether derivative (mestranol); Their comparative effect upon the growth of the human endometrium. *Contraception*, 1: 57—72, 1970.
- 7) DeMoor, P., Steeno, O., Brosens, I. & Hendrikx, A.: Data on transcortin activity in human plasma as studied by gel filtration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 26: 71—78, 1966.
- 8) Doe, R.P., Fernandez, R. & Seal, U.S.: Measurement of corticosteroid-binding globulin in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 24: 1029—1039, 1964.
- 9) Drill, V.A.: *Oral Contraceptives*, McGraw-Hill, New York, 1966.
- 10) Franchimont, P., Legros, J.J. & Meurice, J.: Effect of several estrogens on serum gonadotropin levels in postmenopausal women. *Horm. Metab. Res.*, 4: 288—292, 1972.
- 11) Goldzieher, J.W., Maqueo, M., Chenault, C.B. & Woutersz, T.B.: Comparative studies of the ethinyl estrogens used in oral contraceptives. I. Endometrial response. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 122: 615—618, 1975.
- 12) Gray, L.A.: Clinical study of a new type of estrogenic preparation for oral use. *J. Clin. Endocrinol.*

- Metab., 3: 92–94, 1943. 13) Inman, W.H.W., Vessey, M.P., Westerholm, B. & Engelund, A.: Thromboembolic disease and the steroidal content of oral contraceptives; A report to the committee on safety of drugs. Brit. Med. J., 2: 203–209, 1970.
- 14) Jones, R.C. & Edgren, R.A.: The effects of various steroids on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril., 24: 284–291, 1973. 15) Katz, F.H. & Kappas, A.: The effects of estradiol and estriol on plasma levels of cortisol and thyroid hormone-binding globulins and on aldosterone and cortisol secretion rates in man. J. Clin. Invest., 46: 1768–1771, 1967.
- 16) 川越慎之助, 広井正彦: Corticosteroid-binding globulin (CBG) の新しい簡易測定法と正常ヒト血清 CBG 値. 日内分泌会誌, 54: 1–10, 1978. 17) Mishell, D.R. Jr., Nakamura, R.M., Crosignani, P.G., Stone, S., Kharma, K., Nagata, Y. & Thorneycroft, I.H.: Serum gonadotropin and steroid patterns during the normal menstrual cycle. Am. J. Obstet. Gynecol., 111: 60–65, 1971.
- 18) Musa, B.U., Seal, U.S. & Doe, R.P.: Elevation of certain plasma proteins in man following estrogen administration; A dose-response relationship. J. Clin. Endocrinol. Metab., 25: 1163–1166, 1965.
- 19) Sandberg, A.A., Slaunwhite, W.R. Jr. & Antoniades, H.N.: The binding of steroids and steroid conjugates to human plasma proteins. Rec. Progr. Hormone Res., 13: 209–260, 1957. 20) Sandberg, A.A., Rosenthal, H., Schneider, S.L. & Slaunwhite, W.R. Jr.: Protein-steroid interactions and their role in the transport and metabolism of steroids. In Steroid Dynamics (ed. G. Pincus et al), 1–35, Academic Press, New York, 1966.
- 21) Schwartz, U. & Hammerstein, J.: The estrogenic potency of various contraceptive steroids as determined by their effects on transcortin-binding capacity. Acta Endocrinol., 76: 159–171, 1974. 22) Seal, U.S. & Doe, R.P.: The role of corticosteroid-binding globulin in mammalian pregnancy. Excerpta Med. Intern. Congr. Series, No. 132: 697–706, 1967.
- 23) Slaunwhite, W.R. Jr. & Sandberg, A.A.: Transcortin; A corticosteroid-binding protein of plasma. J. Clin. Invest., 38: 384–391, 1959.
- 24) Teter, J. & Stupnicki, R.: A comparative study of the estrogenic potential of two synthetic estrogens (mestranol and ethinylestradiol). Acta Cytol., 15: 167–170, 1971.
- 25) Van Kammen, E., Thijssen, J.H.H., Rademaker, B. & Schwarz, F.: The influence of hormonal contraceptives on sex hormone binding globulin (SHBG) capacity. Contraception, 11: 53–59, 1975.