エストロゲンの抱合と代謝

II. in vivo, 犬腎における estrone の抱合と代謝

京都府立医科大学産婦人科教室

大 嶋 一 也, 山 元 貴 雄, 山 本 宝
大 坪 一 夫, 本 庄 英 雄, 岡 田 弘 二

島津製作所分析センター

村 田 武

Conjugation and Metabolism of Estrogen II. In vivo conjugation and metabolism of estrone in the dog kidney

**Kazuya OSHIMA, Takao YAMAMOTO, Takara YAMAMOTO,
Kazuo OTSUBO, Hideo HONJO and Hiroji OKADA
with Takashi MURATA***

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine
(Director: Professor Hiroji Okada, M.D.)

*Shimazu Seisakusho, Ltd.
Analytical Application Laboratory

Labeled estrone (E_1) or conjugated E_1 was injected into one of the renal arteries of dogs, and urine was collected separately from each ureter via ureterostomy at various time intervals over a period of 7h. In some cases, the differently labeled E_1 or conjugated E_1 was injected into a peripheral vein simultaneously with the injection into a renal artery. The urinary metabolites were analyzed by DEAE Sephadex A-25 column chromatography, Amberlite XAD-2 resin column chromatography and enzyme hydrolysis. Identification of aglycones were made by TLC. Non-labeled metabolites were analyzed with GC-mass spectrometry.

When $[6, 7-^3H]E_1$ was injected into one of the renal arteries and $[4-^{14}C]E_1$ was injected into a peripheral vein simultaneously, the cumulative excretion of 3H in the urine from both sides was 1.6%, and that of ^{14}C was 14.2% in 7h. (Fig. 1) 3H was excreted equally from both kidneys similar to ^{14}C . ^{14}C labeled metabolites were excreted about nine times greater than 3H labeled metabolites. Formation of glucosiduronate was not detectable in the early period (Fig. 2), but appeared in the late period. (Fig. 3) The major metabolites in the urine of the late period were identified as E_1 -glucosiduronate (E_1 -G),

estradiol-17 α -G (E_2 -17 α -G), E_2 -17 β -G, keto E_2 -17 β -G, metoxy E_1 -G, E_1 -sulfate (E_1 -S), E_2 -17 α -S and E_2 -17 β -S. These results show that E_1 is not conjugated in the dog kidney primary but conjugated and metabolized during general circulation and excreted in the urine in the late interval. When [4- 14 C] E_1 was injected into one of the renal arteries and [6, 7- 3 H] E_1 was injected into a peripheral vein, the cumulative excretion of 3 H in the urine from both sides was 2.0%, and that of 14 C was 15.9% in 7h. (Fig. 4) Here also 14 C was excreted equally from both kidneys similar to 3 H.

Following the injection of [2, 4, 6, 7- 3 H] E_1 and [4- 14 C] E_1 into one of the renal arteries, the cumulative excretion of 3 H was 18.6%, and 14 C was 13.7% in the urine from both sides. (Fig. 5) In this experiment using [2, 4, 6, 7- 3 H] E_1 , the amount of excreted 3 H was also the same as that of 14 C. These results show that some metabolism at the 6, 7 position of E_1 occurs during the general circulation.

When [6, 7- 3 H] E_1 -S and [4- 14 C] E_1 were injected into one of the renal arteries, 3 H was rapidly excreted in the injected-side urine in the early period. (Fig. 7) Large amounts of [6, 7- 3 H] E_1 -S and 3 H labeled glucosiduronate were excreted in the urine from the injected-side kidney in the initial 10 min. following the injection. (Fig. 8) The analysis of the metabolites in the early interval showed that 3 H- E_1 -S was converted to 3 H- E_1 -G and 3 H- E_2 -S in small amounts in the kidney. In the experiment with the injection of [6, 7- 3 H] E_1 -G into one of the renal arteries and [4- 14 C] E_1 into a peripheral vein, the most rapid excretion of 3 H- E_1 -G through the kidney was shown. (Fig. 9)

I. 緒 言

最近, 内因性抱合型エストロゲンが direct radioimmunoassay, GC-mass spectrometry 等により測定されつつある. 近い将来, 抱合型エストロゲンの測定によって, 疾病の診断, 治療, 予後の推測, 等が可能となる時がくるであろう. しかし, 現在, 人血中での主な抱合型エストロゲンと考えられる E_1 -S の生理的役割すらほとんど知られておらず, その解明の為に抱合型エストロゲンの生体内運命を明らかにする事は非常に重要であると考えられる. エストロゲンの代謝が肝で行なわれることは既に知られていたが, kir-dani 等⁽¹⁵⁾が腎における代謝, 抱合を報告して以来, 腎の働きが注目されてきた. 腎における E_2 -17G の形成が人に特異的であり,⁽¹³⁾人以外では排泄されない.⁽⁹⁾又, 注射された estriol (E_3) は人とヒヒの場合はほとんどが estriol-16 glucosiduronate (E_3 -16G) に抱合され尿中に排泄される.^(12, 13)しかし, 犬,⁽¹⁰⁾羊,⁽²¹⁾モルモット,⁽³¹⁾ラット,⁽²⁸⁾マウス,⁽¹⁶⁾では E_3 -16G の形成はほとんどみられない. この様に E_2 , E_3 の腎での代謝抱合様式が動物の種により異なることは系統発生的に一致し, 進化論的に興味深い.^(14, 16)そこで私たちは E_1 , 及び抱合型 E_1 の代謝, 抱合を in vivo 犬腎を用いて検討した.

今回の実験は以下の論理にもとづいて行なった.⁽¹²⁾すなわち, 標識エストロゲンを一側腎動脈に注射し, あらかじめ設置した尿管瘻から経時的に分腎尿を採取し, 代謝物を分析する. もし注射したエストロゲンが一次的に当該腎で代謝, 抱合され尿中へ排泄されたならば, その部分は時間早期に注射側の腎から非注射側に比べより大量排泄されると思われる. 又, 注射したエストロゲンの一部は腎を通過して全身循環に入り, 肝等で代謝, 抱合され一定時間後, 左右腎より均等に排泄されると考えられる. 経時的に排泄された分腎尿中の代謝物をこの様に分析することによって in vivo における腎のエストロゲンの代謝, 抱合を究明することができると考えられる.

II. 実験材料および方法

〔A〕材料

[6, 7-³H] E₁ (S. A. 53 Ci/mmol), [4-¹⁴C] E₁ (S. A. 55.7 mCi/mmol), [6, 7-³H] E₁-S (S. A. 47.9 Ci/mmol), [2, 4, 6, 7-³H] E₁ (S. A. 98.5 Ci/mmol) は New England Nuclear 社製を使用した。

[6, 7-³H] E₁-G (S. A. 3.99 Ci/mmol) は Sáat and Slaunwhite の方法⁽⁸⁾により合成した。

非放射性エストロゲンとして E₁, E₂, E₂-17α, E₃, E₁-G, E₁-S, そして D-saccharic acid 1,4-lactone は Sigma chemical 社製 (米国) で, sulfatase (activity 31000 units/gm, solid) も Sigma chemical 社製, β-glucuronidase (12000 units/ml) は東京臓器化学 KK (東京) を用いた。また有機溶媒 (和光純薬工業 KK) は全て特級を使用した。

〔B〕実験方法

雌成犬 (約 10 kg) を ketamine hydrochloride (動物用ケタラール, 三共 KK) および diazepam (セルシン 武田薬品 KK) の麻酔下で開腹し, 両側尿管にカテーテルを挿入し, 尿管瘻を設置した。次いで左右両側の腎動脈を十分露出した。腎動脈注入操作時, しばしば局所神経反射により腎機能が一次的に低下し, 無尿となるが, この局所反射を遮断する為, lidocaine chloride (1% キシロカイン, 藤沢薬品 KK) を局所に填霧した。両側尿管瘻より左右等しく尿が滴下するのを確認した後, 一側腎動脈より, あるいは同時に末梢静脈に, 少量のエタノールを含んだ生食 2-3 ml に溶解した各種放射性 E₁, あるいは抱合型 E₁ を注射した。異種標識 E₁, 又は抱合型 E₁ を同時に注射するときは等モルに調整した。注射後, 尿は 7 時間迄経時的に採取し, NH₄OH にて PH 9 に調整して分析時まで 4℃ で保存した。各実験における注射部位等を Table 1 にまとめた。

Table 1. Protocol of urinary metabolic studies in dogs following the injection of various estrone or conjugated estrone.

	injected site	
	renal artery	peripheral vein
No. 1	[6, 7- ³ H] E ₁	[4- ¹⁴ C] E ₁
No. 2	[4- ¹⁴ C] E ₁	[6, 7- ³ H] E ₁
No. 3	[2, 4, 6, 7- ³ H] E ₁ , [4- ¹⁴ C] E ₁	
No. 4	[2, 4, 6, 7- ³ H] E ₁ , [4- ¹⁴ C] E ₁	
No. 5	[6, 7- ³ H] E ₁ -S, [4- ¹⁴ C] E ₁	
No. 6	[6, 7- ³ H] E ₁ -S	
No. 7	[6, 7- ³ H] E ₁ -G, [4- ¹⁴ C] E ₁	
No. 8	E ₁ -1mg	

2) 排泄量の測定

経時的に採取した尿の容量を測定, その一部分に Dioxane scintillator 10ml (toluene 333ml, dioxane 333ml, cellosolve 333ml, DPO 4 g POPOP 100 mg naphthalen 75 g を均等に混ぜ調整) を加え Packard 社製の Tricarb scintillation spectrometer, Model 3255 で放射能を測定した。

2) 代謝物の分離と同定

尿中代謝物は DEAE sephadex A-25 column chromatography によって分離した。各々のピークを酵素

水解 (β -glucuronidase, sulfatase) の後, その aglycone を薄層 chromatography (以下 TLC) 上に展開し, 分析した.

(a) DEAE Sephadex A-25 column chromatography

カラムは内径0.9cm, 高さ60cmのガラス製のものを使用した. DEAE sephadex A-25 (Pharmacia Fine chemical 社製, スウェーデン) は蒸留水に溶かした後, 55cmの高さにまでカラムに充填し, 一晚放置後, 実験に使用した. 溶出は蒸留水100ml, 0-0.2Mの直線食塩濃度勾配800mlを用いて順に行なった. Rectangular Balance-operated fraction collector Type SF160 K (東洋製作所) によって10mlのfractionに分画採取した. 蒸留水で溶出した部分に non-charge 代謝物が, 0.1M近辺に glucosiduronate, 0.6M近辺に, sulfate が, 更に高濃度領域に polyconjugate が出現する.

(b) Amberlite XAD-2 resin column chromatography

内径1.5cm, 高さ50cmのガラス製カラムに Amberlite XAD-2 (ローム, アンド, ハース社製, 米国) を 100ml (bed volume は50ml) 充填し, 試料をのせた後 3 bed volume の蒸留水で洗浄後, メタノール 5 bed volume でステロイドを溶出した.

(c) 酵素水解

酵素水解は DEAE sephadex A-25 column chromatography 上の glucosiduronate 領域および sulfate 領域のピークについて行なった. 先ず glucosiduronate 領域に出現したピークは各々ほぼ完全に乾固させた後, 0.1M acetate buffer (PH 5) 45ml に溶解し, 3 等分し, 一つには buffer 1 ml あたり 500 units の β -glucuronidase を加え, 一つは β -glucuronidase とその inhibitor である D-saccharic acid 1, 4-lactone (5×10^{-2} M) を加え, 残りの一つは β -glucuronidase, D-saccharic acid 1, 4-lactone を加えない対照とした. 各々, 37°C, 48時間 incubation した. その後, 各々を NH_4OH で PH 7 に調整し, buffer と等量の酢酸エチルで 3 回抽出, 放射能を測定した. 又, sulfate 領域に出現したピークも同様にほとんど乾固後, 0.1M acetate buffer 30ml を加え, 2 等分した後, 一方には sulfatase を加え, 片方には sulfatase を加えない対照とした. 37°C, 36時間 incubation の後, NH_4OH で PH 7 に調整した後, 等量の酢酸エチルで 3 回抽出, 放射能を測定した. 抽出物は以下の TLC で展開した.

(d) T L C

主に次の 2 つの system で展開した. system I (chloroform: ethylether = 20:80), system II (acetone: benzene = 50:50) 同時に数種の標準エストロゲンを展開した. ヨード発色 (ガラス器の中にヨード結晶を置き, ヨード蒸気をみだし, その中へ薄層プレートを入れ発色) により標準エストロゲンの Rf を定め, これと放射性代謝物の Rf と比較した.

(e) GC-mass spectrometry による分析

雌成犬右腎動脈にプロピレングリコール 1 cc に溶解した非標識 E_1 1 mg を注射し, 両側尿管より経時的に尿を採取した. 右側尿 (1-7 時間迄) は Amberlite XAD 2 resin column chromatography にてメタノールでステロイドを溶出した後, その試料を 10% メタノール溶液とし, DEAE sephadex A-25 column chromatography によって再度溶出, glucosiduronate 分画を集め β -glucuronidase にて酵素水解を行い, エーテルで抽出し dry up した試料を GC-mass spectrometry (GCMS-9000, 島津製作所) で分析同定した. 測定条件は gas chromatograph では column の長さ 2 m, 直径 2.6mm のガラスカラムに 1.5% OV-17 の充填剤を用いた. He carrier gas 42ml/min atm, column 温度 260°C から 300°C の昇温分析を行なった. 質量分析計では電子電圧 20 eV, トラップ電流 60 μA , 加速電圧 3.5KV, イオン源温度 290°C で行なった. 質量分析計に PAC 300 DG を接続して測定の interval 6 秒, 算量の測定範囲を m/e 200 $\rightarrow$ m/e 570 として走査時間 6.5 分から 40 分迄のリテンションタイムで行なった. 試料は BSA 80 μl と Tri-Sil 20 μl を加え, 50-60°C で 10 分間加熱のち 3 μl を注入, 分析した.

Fig. 1. Cumulative excretion of radioactivities in the urine from female dog following the injection of $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ into the right renal artery and $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into a peripheral vein.

Fig. 2. Elution pattern after DEAE-Sephadex A-25 column chromatography of the 0~30 min. urine collection from right ureter after the injection of $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ into the right renal artery and $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into a peripheral vein.

III. 結 果

1) $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ を一側腎動脈に, $[4-^{14}\text{C}]E_1$ を末梢静脈に同時に注射した際の尿中への放射能排泄パターンとその尿中代謝物の分析 (No. 1 犬)

Fig 1は雌成犬右腎動脈に $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ ($12.8\mu\text{Ci}$, 1.1×10^{-4} m mol), 末梢静脈に $[4-^{14}\text{C}]E_1$ ($6.2\mu\text{Ci}$, 1.1×10^{-4} m mol)を同時に注射したときの放射能の投与量に対する尿中累積排泄率を示している。7時間迄の総排泄率は ^{14}C は14.2%, ^3H は1.6%と ^{14}C は ^3H に比べて9倍の排泄がみられた。

Fig. 3. Elution pattern after DEAE-Sephadex A-25 column chromatography of the 5~7 hour urine collection from right ureter after the injection of $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ into the right renal artery and $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into a peripheral vein.

Table 2. Hydrolysis with β -glucuronidase and sulfatase of the peaks on DEAE-Sephadex A-25 column chromatography.

		PERCENT YIELD OF HYDROLYSIS
FRACTION NO. 40-65	HYDROLYSIS WITH β -GLUCURONIDASE	96%
	INHIBITION BY SACCHARIC ACID 1,4-LACTONE	66%
	CONTROL	16%
FRACTION NO. 89-100	HYDROLYSIS WITH SULFATASE	98%
	CONTROL	3%

又、左右の腎よりの排泄率は各時間においてほとんど差はみられなかった。Fig 2 は 0-30 分迄の注射側の尿を DEAE Sephadex A-25 column chromatography で溶出したパターンを示している。これでは ^3H 、 ^{14}C のピークは aglycone が出現する non-charge 領域にのみ一致してみられる。Fig 3 は全身での代謝の結果を現わすと考えられる 5-7 時間の注射側尿を同様に溶出したパターンを示している。aglycone のピークは非常に小さくなり glucosiduronate 及び sulfate と思われる領域に ^{14}C の大きなピークと ^3H の小さなピークが認められた。Fig 3 でみられる fraction を集め 40-65 の glucosiduronate と思われる fraction を集め β -glucuronidase で、又、fraction No 89-100 の sulfate と思われる fraction を sulfatase にて加水分解した結果が Table 2 である。これより各々 glucosiduronate 及び sulfate であると考えられた。 β -glucuronidase にて加水分解し得られた aglycone を TLC (system I, II) にて展開したところ標準 E_1 と (system I で Rf 値 0.5, system II で Rf 値 0.62) 一致した。又、sulfatase にて加水分解し得られた aglyc-

one を同様に TLC (system I, II) にて展開すると $E_2-17\alpha$ (Rf 0.44, 0.6), $E_2-17\beta$ (Rf 0.41, 0.57) 及び少量の E_1 (Rf 0.53, 0.66) が同定された。

2) $[4-^{14}\text{C}] E_1$ を腎動脈に, $[6, 7-^3\text{H}] E_1$ を末梢静脈に注射した際の尿中への放射能排泄パターン (No 2, 犬)

先の実験とは反対に $[4-^{14}\text{C}] E_1$ ($6.2\mu\text{Ci}$, $1.1 \times 10^{-4} \text{ m mol}$) を雌成犬左腎動脈へ, $[6, 7-^3\text{H}] E_1$ ($121.8\mu\text{Ci}$, $1.1 \times 10^{-4} \text{ m mol}$) を末梢静脈へ同時に注射したときの放射能の累積排泄率を表わしている。(Fig 4) 左右差は同様にあまりなく, 7 時間迄の総排泄率は ^{14}C は 15.9%, ^3H は 2.0% であった。投与する E_1 の標識を入れ換えても ^3H の排泄は 1~2% と少量であり, ^{14}C の排泄も 14~16% とほぼ近以していた。すなわち同じ E_1 でありながら ^3H ラベルの場合は腎動脈, 末梢静脈のどちらに投与しても ^{14}C ラベルの E_1 に比べその尿中への排泄が非常に少ないことが明らかとなった。更に Fig 1, 4, より投与後, 1 時間以内の早期には, ^{14}C の排泄はそれ以後に比べ急速で $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ 比が大きくなっている。これらの事実より E_1 の 6, 7 位が投与後, 全身循環してなんらかの代謝を受けたために尿中への排泄が極度に少なくなった可能性が考えられる。 ^{14}C E_1 の場合はステロイド核自身が代謝を受けることはない為, ヒトにおける E_1 の排泄と大差ない値が得られていると考えられる。これらの結果より, ヒトとは異なり, 犬腎での一次的な抱合は認められず, 大部分の E_1 は全身循環中, 肝等で抱合, 代謝を受け E_1-G , E_2-S , E_1-S となりその後, 腎より排泄されていることが明らかとなった。

Fig. 4. Cumulative excretion of radioactivities in the urine from female dog following the injection of $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into the left renal artery and $[6, 7-^3\text{H}]E_1$ into a peripheral vein.

(3) $[2, 4, 6, 7-^3\text{H}] E_1$ と $[4-^{14}\text{C}] E_1$ を一側腎動脈に注射した際の尿中の放射能の排泄パターンとその尿中代謝物の分析 (No 3, 犬)

6, 7 位の代謝を更にはっきりとさせる為, 雌成犬左腎動脈に $[2, 4, 6, 7-^3\text{H}] E_1$ ($22.4\mu\text{Ci}$, $9.3 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) と $[4-^{14}\text{C}] E_1$ ($5.2\mu\text{Ci}$, $9.3 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) を混ぜ合わせ注射した。Fig 5 はその経時累積排泄率を示している。7 時間迄の排泄率を比べると注射側の ^3H 以外はほぼ同様の排泄パターンを示した。 $[6, 7-^3\text{H}] E_1$ 注射時に比べて著しく異なる排泄パターンを示している。7 時間迄の総排泄率は ^3H 18.6%, ^{14}C 13.7% である。2, 4 位の標識を加えることによって ^3H の排泄率が ^{14}C 以上となり, 大部分の 2, 4 位は保存され, 6, 7 位のみが代謝を受けていることが示唆された。この 5-10 分迄の注射側の尿を DEAE sephadex A-25 column chromatography にて溶出したパターンが Fig 6 である。non-charge 領域に 2 つのピーク P 1, P 2, がみられる。P 1 は ^3H のみからなり P 2 は ^3H と ^{14}C を含み, その $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ 比は注射した比とほぼ同じであった。P 2 は酢酸エチルで抽出することができ, TLC (system I, II)

にて E_1 と同定した。P I は Amberlite XAD 2 resin column chromatography で溶出すると最初の水 fraction で溶出された。放射性水を含んでいると考えられた。更にこの水分画を in vacuo で evaporation すると蒸発した成分に ^3H が移動し ^3H ラベルの水であることが示された。Fig 5 で注射側, 早期の ^3H の排泄率が高いのはこの P I の影響によるものと思われた。なお No. 4 の犬では $[2, 4, 6, 7-^3\text{H}] E_1$ ($11.8 \mu\text{Ci}$, $4.8 \times 10^{-5} \text{ m mol}$), と $[4-^{14}\text{C}] E_1$ ($2.7 \mu\text{Ci}$, $4.8 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) を末梢静脈へ注射した。5 時間迄の排泄ですでに ^3H 30.9%, ^{14}C 31.6% で $[6, 7-^3\text{H}] E_1$ に比べ ^3H が大量排泄された。すなわち人, ヒトに示されなかった E_1 の 6, 7 位の代謝が犬でおこる事が明らかとなった。

Fig. 5. Cumulative excretion of radioactivities in the urine from female dog following the injection of $[2, 4, 6, 7-^3\text{H}] E_1$ and $[4-^{14}\text{C}] E_1$ into the renal artery.

Fig. 6. Elution pattern after chromatography on DEAE-Sephadex A-25 of the 5 to 10 min. urine from the left ureter after the injection of $[2, 4, 6, 7-^3\text{H}] E_1$ and $[4-^{14}\text{C}] E_1$ into the left renal artery.

Fig. 7. Cumulative excretion of radioactivities in the urine from female dog following the injection of $[6, 7-^3\text{H}]E_1\text{-S}$ and $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into the right renal artery.

Fig. 8. Elution pattern after chromatography on DEAE-Sephadex A-25 of the 5 to 10 min. urine from the right ureter after the injection of $[6, 7-^3\text{H}]E_1\text{-S}$ and $[4-^{14}\text{C}]E_1$ into the right renal artery.

(4) 腎動脈に $[6, 7-^3\text{H}]E_1\text{-S}$ と $[4-^{14}\text{C}]E_1$ の混合物を注射した際の尿中への放射能の排泄パターンとその尿中代謝物の分析 (No. 5, 犬)

抱合型 E_1 の犬腎における代謝物を検討する為, $[6, 7-^3\text{H}]E_1\text{-S}$ ($4.8\mu\text{Ci}$, $2.0 \times 10^{-5} \text{ m mol}$), $[4-^{14}\text{C}]E_1$ ($1.1\mu\text{Ci}$, $2.0 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) を雌成犬右腎動脈に混注した。Fig 7 はその尿中累積排泄率を示している。注射側の ^3H の排泄率は 3.9% (30分), 9.9% (7時間), ^{14}C は 0.4% (30分), 7.0% (7時

間), であり, 反対側の ^3H は1.6% (30分), 7.5% (7時間), ^{14}C は0.3% (30分) 6.6% (7時間)であった. 30分迄の注射側の ^3H の排泄量は ^{14}C に比して約10倍量であり, E_1-S は E_1 と異なり, 犬腎で一次的に β 過排泄されていることを示唆している. 注射側の5-10分迄の尿を DEAE sephadex A-25 column chromatography で溶出すると $^3\text{H}-\text{E}_1-\text{S}$ が溶出される他, E_1 を腎動脈に注射した場合と異なり, 時間早期に ^3H ラベルだけの glucosiduronate のピークが認められた. (Fig 8) 即ち, E_1-S は一次的に β 過排泄されるとともに, 腎において, E_1 投与ではおこらなかった glucosiduronation が E_1-S から生ずることが示された. No. 6 の犬では1側腎動脈に E_1-S ($4.6\mu\text{Ci}$, $9.8 \times 10^{-8} \text{ m mol}$) を注射したがその排泄量は7時間で, 注射側10.2%, 反対側10.0%と同じく大量排泄された.

Fig. 9. Cumulative excretion of radioactivities in the urine from female dog following the injection of $[6, 7-^3\text{H}]\text{E}_1-\text{G}$ and $[4-^{14}\text{C}]\text{E}_1$ into the left renal artery.

(5) 腎動脈に $[6, 7-^3\text{H}]\text{E}_1-\text{G}$ と $[4-^{14}\text{C}]\text{E}_1$ を混合し注射した際の尿中への放射能の排泄パターンとその尿中代謝物の分析 (No. 7, 犬)

雌成犬左腎動脈に $[6, 7-^3\text{H}]\text{E}_1-\text{G}$ ($10\mu\text{Ci}$ $4.5 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) $[4-^{14}\text{C}]\text{E}_1$ ($2.5\mu\text{Ci}$, $4.5 \times 10^{-5} \text{ m mol}$) を混注した. 注射側の ^3H の排泄率 (Fig 9) は27.6% (30分) 42% (7時間), ^{14}C は2.1% (30分), 7.4% (7時間) で反対側の ^3H は3.7% (30分), 12.8% (7時間), ^{14}C は0.9% (30分), 7.6% (7時間) であった. 30分迄の注射側の ^3H の排泄は ^{14}C の約13倍, 先に示した E_1-S よりも更に容易に腎より β 過排泄される事が示唆された. 実際 DEAE sephadex A-25 column chromatography にて注射早期の尿を溶出すると $^3\text{H}\text{E}_1-\text{G}$ のピークのみが出現した. 時間を経過した7時間迄の尿の溶出パターンは, 注射した比に一致した ^3H と ^{14}C のピークが glucosiduronate 及び sulfate 領域にみられた. 以上のことより E_1-G は当該腎より直ちに β 過排泄される事, E_1-G は全身循環中, 加水分解, 代謝されて E_1 と同一運命をたどることが示された.

(6) GC-mass spectrometry による尿中代謝物の分析, 同定, (No. 8, 犬)

E_1 1mg を腎動脈に注射し経時的に採取した. 注射側 (右), 1-7時間の尿を集め DEAE sephadex A-25 column chromatography にて溶出, glucosiduronate 領域を β -glucuronidase で加水分解後, aglycone を GC-mass spectrometry で分析した. Fig 10はその mass chromatogram で $\text{E}_2-17\alpha$, E_2 , E_1 , keto-estra-diol (16-keto estradiol の異性体), 2-methoxyestrone の異性体, 等が定性された.

IV 考 察

estrogen の代謝, 抱合が主として肝で行なわれる事はよく知られていたが kirdani 等⁽¹⁵⁾ は腎の役割に注目し, 人及びヒヒの腎臓が, in vitro, in vivo において E_3 の 16glucosiduronation を行なうことを明らかにした. Hobkirk 等⁽¹⁰⁾ は非妊婦人に E_2 を静注し, 静注後 10 分以内にその尿中代謝物の中に E_2-17G が多量存在することを示した. 又, 彼等^(11, 20) は人腎のホモジネート及びスライスと $^3H-E_2$ とを incubation し, E_2-17G , E_1-S 等が形成されることを明らかにした. これらの実験結果より in vivo における estrogen の代謝, 抱合に腎が一次的な働きをすることが示唆された^(24, 34). Honjo⁽¹²⁾ 等はヒヒ腎動脈に直接放射性 E_1 を注射し, その尿中代謝物を経時的に分析することにより時間早期 (5-15 分) に E_1-G が注射側の腎から大量排泄されることを示し, ヒヒ腎が E_1 の glucosiduronation 抱合に重要な役割を演じている可能性を明らかにした. しかし, 今回の実験により, 犬腎においては E_1 が一次的に glucosiduronation をうけないことが明らかとなった. 時間を経て, 全身循環し, 肝等による抱合, 代謝により glucosiduronate, 及び sulfate となり次いで腎より排泄されることも明らかとなった. kirdani 等⁽¹⁶⁾ も犬腎のホモジネートに sulfuryl transferase は存在するが glucuronyl transferase は存在しないことを明らかにしており我々は in vivo においてそれを証明した. 日本猿では, 同様の方法で腎での glucosiduronation が少量認められ⁽²⁵⁾, 人, ヒヒ, 日本猿までは腎で一次的に glucosiduronation をうけることがわかっている. この抱合能の違いは動物の進化に一致していると考えられる.

[6, 7- 3H] E_1 注射後の 3H の回収率の低さより 6, 7 位がなんらかの代謝をうけることを示唆したが 2, 6 β , 7 α , 15 α , 16 α 位は hydroxylation をうけることはよく知られた事実で Mueller 等⁽²²⁾ も NADPH の存在のもとに mouse liver microsome は E_2 を一次的に hydroxylation し, 6 β hydroxyestrone に転換させること, 又, human liver microsome でも E_2 が主に 6 β -hydroxyestradiol に, 少量が 6 α hydroxyestradiol に代謝されることを報告している.⁽⁵⁾ 7 位の代謝についても Lisboa 等⁽¹⁷⁾ が詳述している. 犬尿の glucosiduronate と思われるピークを集め酵素水解した aglycone を GC-mass spectrometry にて分析したところ何位かは不明であるが ketoestradiol が同定され (Fig 10) ておりこれは 6, 7 位が水酸化を受けた後, 更に d-hydrogenase の作用によって ketoestradiol になったものと考えられる. この様な 6, 7 位の代謝は犬では E_1 のみならず E_2 でも生ずる⁽²³⁾ が, 内因性 estrogen としては存在しない E_3 では認めていない.⁽²²⁾ 又, 人, ヒヒでもその様な報告はみられないし, 日本猿でも否定的⁽²⁶⁾で, 犬に特異な反応であると思われる.

Fig. 10. Mass chromatogram of the metabolites.

Collins⁽³⁾は犬に E_1 を注射すると plasma 中の主要産物として E_1-G と少量の $E_2-17\beta-3G$, E_1-S としてわずかの $E_2-17\alpha-3G$ を同定している. 今回, E_1 投与による犬尿の分析の結果, $E_2-17\beta-S$, $E_2-17\alpha-S$, E_1-S , E_1-G が主たる代謝物であることが明らかとなった. Robinson 等⁽²⁹⁾は E_1 をメス鶏に注射して, その尿を分析したところ約40%が sulfate の形でみい出され, 各々, $E_2-17\alpha-S$, $E_2-17\beta-S$, がその主な排泄型で次に $E_2-17\beta-G$, $E_2-17\alpha-G$ が少量認められたと報告している. これは犬に於ける尿中代謝物と非常に類似している. 又, 人では E_1 投与による尿中代謝物は E_1-S が大部分であり他に 2-methoxyestrone sulfate が多いと報告されている⁽⁷⁾が, 今回 GC-mass spectrometry により犬では 2-methoxy estrone の異性体が少量同定された.

人血中では E_1-S が主な抱合型 estrogen で^(18, 19, 26, 27) あるが犬血中では主に E_1-G である⁽³⁾ことを思えばこれも又種属による違いが明瞭で進化論的に興味深いことである. E_1-S を腎動脈に注射して時間早期の尿に glucosiduronate を証明したことより犬腎では E_1-S から直接 E_1-G に代謝される部分と E_1-S のまま腎を素通りして排泄される部分があることが明らかとなった. Fishman 等⁽⁶⁾は $^{14}C-E_1$ と $^3H-E_1-S$ を人に注射し, $^3H-E_1-S$ からの方が $^{14}C-E_1$ からよりも代謝産物がより早く出現すると報告している. 日本猿では投与された E_1-S は E_1 そして E_1-G となる事を報告したが, 犬では E_1-S より E_1-G へ直接行くことをみだが, ここでも種による抱合の違いが認められた.

E_1-G は犬血中の主要産物であり, 最も容易に犬腎より排泄された. (Fig 8) 人, ヒヒでは 16-hydroxylation の能力をもっており, 内因性エストロゲンの主たる尿中代謝物は E_3-16G ⁽⁵⁾である. 今回, E_1 投与において E_3 , ならびに E_3-16G は認められなかった. E_1-G を犬に注射すると E_1-G とともに主な代謝物として $E_2-17\beta-3G$ と少量の $E_2-17\alpha-3G$ が認められる.⁽⁴⁾ in vitro の実験で rat 肝は E_1-G の ketone 基を環元する specific dehydrogenase の存在することが報告されている⁽²⁾. in vivo, 人でも E_1-G と $E_2-17\beta-3G$ の相互転換が報告されている^(8, 23). これらの事実は E_1-G から glucosiduronate がはづれないまま直接 $E_2-17\beta-3G$, $E_2-17\alpha-3G$ に転換される可能性を示している. 更に Breckwoldt 等⁽¹⁾は Rhesus monkey の腎のスライスと E_1 を incubation し E_2 から E_1 への転換が行なわれることを明らかにした. Honjo 等⁽¹²⁾も in vivo では E_2 から E_1 , E_2-3G から E_1-G へ直接転換すると報告している. 犬尿中に E_2-S が同定されたが, 文献的にも人を含めて各動物で血中に E_2-S の存在がほとんど報告されていないことを考えると, 血中の E_1-S が腎で E_2-S に大部分転換されて排泄された可能性は大きい.

Fig. 11. A presumptive pathway of metabolism and conjugation of estrone.

以上の文献的考察と今回の実験結果より E_1 の犬における代謝、抱合の pathway は Fig 11 の様に考えられる。すなわち投与された E_1 は全身循環中、肝等で E_1-G と E_1-S に抱合され、 E_1-G が更に少量の $E_2-17\beta-3G$ 、 $E_2-17\alpha-3G$ に転換される。腎において E_1-S は大部分 $E_2-17\beta-3S$ 、 $E_2-17\alpha-3S$ に転換されて尿中に排泄されるが、一部分 E_1-S のままで、又、直接 E_1-G に転換されて排泄される。 $E_2-17\beta-3G$ 、 $E_2-17\alpha-3G$ は尿中ではわずかししか見い出せなかった。このことは腎で再度 E_1-G に代謝されたと理解できる。又、 $E_2-17\beta-3G$ を腎動脈に注射すると部分的に E_1-G へ転換され、 E_2-3G とともに排泄されることを山本⁽³³⁾も報告している。

これらのことから E_1 投与で E_1-S とともに E_1-G が尿中に多く排泄されることが考えられる。

V 結 語

1. E_1 は犬腎で一次的に抱合されない。
2. E_1 は全身循環中、 E_1-G 、 E_1-S へ抱合、代謝され、その後腎より尿中へ排泄される。
3. E_1 の 6, 7 位は全身循環中に代謝を受ける。
4. E_1-S は腎よりただちに尿へ排泄される。又、 E_1-S は腎で一次的に glucosiduronation をうけ E_1-G として排泄される。更に E_1-S は一部分 E_2-S に腎で転換、排泄された。
5. E_1-G は犬腎より最もたやすく尿へ排泄される。
6. 犬尿中の E_1 の代謝物は E_1-G 、 $E_2-17\alpha-G$ 、 $E_2-17\beta-G$ 、ketoestradiol-G、methoxyestrone-G、 E_1-S 、 $E_2-17\alpha-S$ 、 $E_2-17\beta-S$ であった。

尚、本論文の要旨は第24回日本内分泌学会西部総会（昭和51年9月、岡山）、第50回日本内分泌学会総会（昭和52年5月、福岡）において発表した。

文 献

- 1) Breckwoldt, M.A., Trantwein and Lisboa, B.P.: Metabolism of estrone-¹⁴C by the rhesus monkey in vitro condition, J. steroid Biochem., 5: 321, 1974.
- 2) Collins, D.C., Robinson, H.D., Howard, C.M. and Preedy, J.R.K.: Metabolism of arterial plasma estrogens by the splanchnic organs of the dog in vivo, J. clin. invest., 49: 2324-2335, 1970.
- 3) Collins, D.C.: Identification of conjugated estrogen metabolites in dog plasma following administration of estrone 6, 7-³H, Steroids, 18: 3, 341-358, 1971.
- 4) Collins, D.C. and Preedy, J.R.K.: Identification of some plasma metabolites of 6, 7-³H estrone glucuronide in male dog, Steroid, 25: 3, 427-439, 1975.
- 5) Einarsson, K., Gustafsson, J. Å., Thomasihre and Sundberg, M.I.: Specific metabolic pathways of steroid sulfates in human liver microsomes, J. Clin. Endocrinol. Metab., 43: 56-63, 1976.
- 6) Fishman, J. and Hellman, L.: Comparative fate of estrone and estrone sulfate in man, Clin. Endocrinol. Metab., 36: 160-164, 1973.
- 7) Hobkirk, R., Nilsen, M. and Blahney, P.B.: Conjugation of urinary phenolic steroids in the nonpregnant human female with particular reference to estrone sulfate, J. Clin. Endocrinol., 29: 328-337, 1969.
- 8) Hobkirk, R. and Nielsen, M.: Metabolism of estrone-3-glucosiduronate and 17 β -estradiol-3-glucosiduronate in the human female (1), Steroid, 15: 649-669, 1970.
- 9) Hobkirk, R. and Nielsen, M.: Metabolism of 17 β -estradiol, 17 β -estradiol-3-glucosiduronate and 17 β -estradiol-17-glucosiduronate by the

- normal human female, *J. Clin. Endocrinol.*, 32: 779–785, 1971. 10) Hobkirk, R. and Nielsen, M.: Early urinary conjugated metabolites of intravenously injected [6, 7-³H]-Estradiol-17 β in the human subject, *J. Steroid Biochem.*, 5: 15–20, 1974.
- 11) Hobkirk, R., Green, R.N., Nielsen, M. and Jennings, B.A.: Formation of estrogen glucosiduronates by human kidney homogenates, *Can. J. Biochem.*, 52: 9–14, 1974.
- 12) Honjo, H., Ishihara, M., Osawa, Y., Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A.: In vivo and in vitro. Conjugation and metabolism of estrogens by the baboon kidney, *Endocrinol.*, 99: 1054–1062, 1976. 13) Honjo, H., Barua, N., Osawa, Y., Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A.: Studies on phenolic steroids in human subjects. XX. In vivo conjugation and metabolism of estradiol-17 β in the human kidney, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43: 1294–1300, 1976.
- 14) 本庄英雄, 山本幸雄, 山元貴雄, 加藤英子, 大坪一夫, 大嶋一也, 山本宝, 石原政芳, 岡田弘二: エストロゲンの抱合と代謝—特に腎の役割について—, ホルモンと臨床, 25: 1355–1360, 1977. 15) Kirdani, R.Y., Sampson, D., Murphy, G.P. and Sandberg, A.A.: Studies on phenolic steroids in human subjects. XVI., Role of the kidney in the disposition of estriol, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 34: 546–557, 1972.
- 16) Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A.: The fate of estriol in dogs, *Steroids*, 23: 667–686, 1974. 17) Lisboa, R., Knuppen and Breuer, H.: Metabolism of 7 substituted phenolic steroids in rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 97: 557–563, 1965.
- 18) Longcope, C.: The metabolism of estrone sulfate in normal males, *J. Clin. Endocr.*, 34: 113–122, 1972. 19) Loriaux, D.L., Kuder, H.J. and Lipsett, M.B.: The measurement of estrone sulfate in plasma steroid, 18: 463–472, 1971.
- 20) Mellor, J. D. and Hobkirk, R.: In vitro synthesis of estrogen glucuronides and sulfates by human renal tissue, *Can. J. Biochem.*, 53: 779–783, 1975. 21) Miyazaki, T., Peric Gollia, L., Slaunwhite, Jr. W.R. and Sandberg, A.A.: Estriol metabolism in sheep: Excretion of biliary and urinary conjugates, *Endocrinology*, 90: 516–524, 1972.
- 22) Mueller, G.C. and Rumney, G.: Formation of 6 β -Hydroxy and 6-keto derivatives of estradiol-16-C¹⁴ by mouse liver microsomes; *J. Am. Chem. Soc.* 79:1004–1005, 1957.
- 23) Musey, P.I., Green, R.N. and Hobkirk, R.: The role of an enterohepatic system in the metabolism of 17 β estradiol-17 glucosiduronate in the human female, *Clin. Res.*, 18: 721, 1970 (abstract). 24) Nagatomi, K., Osawa, Y., Kirdani, R.Y. and Sandberg, A.A.: Studies on phenolic steroids in human subjects. XVII.: The kidney and fate of 15 α -hydroxy estrogens, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 37: 887–900, 1973.
- 25) 大嶋一也, 本庄英雄, 山元貴雄, 山本宝, 石原政芳, 岡田弘二: In vivo 条件下, 日本猿, 犬の腎における estrone の抱合と代謝, 日本内分泌学会雑誌, 53: 4, 401, 1977. 26) Purdy, R.H., Engel, L.L. and Oncley, J.L.: The chemical nature of some human plasma estrogens, *Fed. Proc.*, 18: 305, 1959.
- 27) Purdy, R.H., Engel, L.L. and Oncley, J.L.: The characterization of estrone sulfate from human plasma, *J. Biol. Chem.*, 236: 1043–1050, 1961.
- 28) Rao, G.S. and Breuer: Partial purification and kinetic properties of a solbule estrogen glucuronyl-transferase from pig intestine, *J. Biol. Chem.*, 244: 5521–5527, 1967.
- 29) Robinson, A.R., Henneberry, G.O. and Common, R.H.: Steroid estrogen conjugates

- of Hen's urine: Identification of radioactive estrone- β -glucuronide, estradiol-17 β -3- β glucuronide, estradiol-17 α -3- β glucuronide, estrone sulfate, estradiol-17 β -3 sulfate and estradiol-17 α -3 sulfate as metabolites of injected [14 C] estrone, *Biochemica et Biophysica Acta*, 326: 93-102, 1973.
- 30) Saat, Y.A. and Slaunwhite, W.R.: Biosynthesis of estrone and estradiol 3-glucosiduronates, *Steroid*, 13: 545-558, 1969.
- 31) Sandberg, A.A., Kirdani, R.Y., Back, N. Weyman, P. and Slaunwhite, Jr. W.R. : Biliary excretion and enterohepatic circulation of estrone and estriol in rodents, *Amer. J. Physiol.*, 213: 1138-1142, 1967.
- 32) 山元貴雄, 本庄英雄, 山本 宝, 大嶋一也, 石原政芳, 岡田弘二: In vivo 犬腸における estriol の抱合と代謝, 産婦人科の進歩, vol 29: No. 4, 408, 1977.
- 33) 山本 宝, 本庄英雄, 大嶋一也, 山元貴雄, 石原政芳, 岡田弘二: in vivo 犬腎での estradiol の抱合と代謝, 産婦人科の進歩, vol 29, No. 4, 407-408, 1977.
- 34) Yamamoto, Y., Ishihara, M., Kirdani, R.Y., Osawa, Y. and Sandberg, A.A.: Studies of phenolic steroids in human subjects. XIX. Renal conjugation of 15 α hydroxy estradiol-3-sulfate, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 43: 144-151, 1976.