— 講 演 —

Estrogens の新しい Bioassay と Anti-estrogen について

C.W. Emmens

(シドニー大学家畜生理学教授)

1. Estrogens の微量検定法

私どもの研究室で最近行つて来ました新しい Estrogen の Bioassay とこれを応用して究明した Anti-estrogen についてお話いたします。

普通, Estrogen の Bioassay には去勢鼠を用い Estrogen を投与し陰垢変化を以て assay します。微量 Assay としては Estrogen を直接陰内に入れて, 陰上皮の反応を+或は一の如くに, すなわち All or nothing 方式で判定し陽性百分率より検定しているのが従来の方法であります。投与方法は皮下注射の場合ですと Estrogen の油溶液として用いますが, 陰内投与の場合には Estrogen を蒸留水, 或は生理的食塩液, 或は propylene glycol などの適当な溶媒にとかけて注入するのが普通です。皮下注射と陰内投与の場合, 反応の現われる時期は多少ちがつて来ますが, 上皮細胞の反応の様子は兩者の間で殆んど差がありません。この陰内投与法はある種の Estrogen では皮下注射の百倍も或は千倍も鋭敏であります。

私がこれから述べます Assay はこの陰内投与によつたものであります。従前, 陰上皮の Estrogen に対する反応として角化上皮の出現が使われていますが, 私どもは角化反応よりもさらに早期に起る陰上皮の反応を用いれば, より一層迅速に, 正確且つ鋭敏度の優れた Assay が可能であろうと考えました。私どもはこの目的にそのものとして (1) 陰上皮細胞の分裂能の増加, 或は (2) 陰上皮細胞呼吸能の増加が Estrogen 反応の指標になるであろうと考えて追究いたしました。

(1) 陰上皮の mitosis 増加を指標とした Assay

まず上皮の mitosis 数の増加に基礎をおく Assay⁽¹⁾ について述べます。

術式を述べますと, 可検 Estrogen を 0.1 ml の水に溶かし, 去勢マウスの陰内に直接注入し, 24 時間後に

《Special lecture》On new bioassays of estrogen and their application for anti-estrogen study. (1959)

EMMENS, C. W. (Prof. of Vet. Physiol, Univ. of Sidney) *Jap. J. Animal Reprod.* 7 (1).

剖検します。なお剖検の7時間前に colchicine の 0.1 mg を皮下注射して mitosis を停止させ蓄積させる処置をします。各動物につき陰組織の連続切片標本を作り, そのうちより5切片について上皮細胞の mitosis の数を算えます。

Fig. 1 に Assay の至適条件を知るために行つた実験の一つをかかげました。estrone 10^{-5} μ g 程度で mitosis 数の増加が得られ, 投与後の時間経過に伴う mitosis 数の変化は投与量にかかわらず 24 時間前後が最高になります。従つて私どもは投与後 24 時間を以て測定することに決めました。

Fig. 1 Effect of oestrone on mitotic rate of the vaginal epithelium 16-36 hrs. after single injection.

Fig. 2 はこの Assay の Dose-response curve でありまして estrone 4×10^{-6} ~ 1×10^{-4} μ g の量の間では直線の関係が得られます。なお, mitosis 数ばかりでなく上皮細胞の層の厚さも投与後 24 時間が最も厚くなり, 投与量と層の厚さは比例しますが, mitosis 数増加ほど顕著ではありません。その他, この Assay 確立のための色々の条件を検討しましたがここには省略いたします。

次にこの Assay の特異性に就てであります。従来色々の hormone 或は Vitamin A などが陰上皮角化作用を抑制することが知られております。そこでこれ等の

Fig. 2 The relationship of response (mean number of arrested mitoses per field) to log dose of oestrone ($10^{-5} \mu\text{g}$), 24 hr. after administration of the hormone. The vertical lines through the observations indicate plus & minus one standard error of the mean. The errors vary since more animals were used on the linear segment of the curve than elsewhere.

物質が mitosis 反応にどう影響するかを調べました。progesterone, testosterone, cortisone, hydrocortisone, Vitamin A をためしましたが、いずれも 5000:1 の範囲まででは、Estrogen に対する mitosis 反応の Dose-response curve に何等の影響も与えませんでした。従つてこれ等の物質は角化反応の如き二次的の反応には影響しますが、mitosis の如き上皮細胞の一次的 (本質的) 反応にはなんら影響しないと云えます。

更に私どもは estrone, estradiol, estriol の他 3 種の合成発情物質について、この Assay を用いて生物学的力価を比較しました。意外だつたのですが、成績は各物質とも分子量について反応を比較しますと、みな殆んど同じ力価を示すことを知りました。

以上のような検討より私どもは mitosis 反応を応用した Assay が角化反応を用いた Assay に比較して、特異的で且つ鋭敏なことを知りました。この Assay では動物を殺さなくてはならない不利はありますが、反応が非常に早く得られること、鋭敏度は約 10 倍、正確度は 4 倍に上ることを考慮しますと極めて優れた Assay で特に、他の Steroid hormone などによって反応が影響されませんから血中、尿中の Estrogen を直接測定する微量検査法として利用価値の高いことを確信します。

(2) 腔細胞の呼吸能に基礎をおく Assay

Estrogen に対する腔上皮細胞の mitosis 増加が非常に早期に起こることを知りましたので、これに関連して細胞組織代謝にも何等かの変化が起こるであろうと推定しました。そこで色々試みましたが、仲々うまくゆかず失敗を重ねましたが、遂に Triphenyl tetrazolium (以下と TZ 略す) を使つて目的を達することが出来ました。この TZ は酸化、或は還元された状態で呈色の異なる物質であります。

Assay の術式を申しますと、この Assay では使う動物、Estrogen の投与方法など、先の mitosis 反応利用の Assay と同様ですが、mitosis を調べるものではありませんから colchicine の投与はしません。代りに剖検する 30 分前に 0.5 mg の TZ を 0.02 ml の水に溶解して腔内に投与します。屠殺後直ちに腔を剔出し、よく水洗して過剰の TZ を洗い流します。TZ は細胞呼吸によつて還元されて formazan の形で細胞内に定着されて残ります。従つて、この定着した formazan を腔組織から抽出します。抽出は腔片を 1 ml のエタノール-4 塩化エタン (3:1 v/v) 混合液に入れて行います。溶出した formazan 量を分光光電比色計で波長 500 mμ を以て定量し、腔組織細胞の TZ 還元能を測定するのであります。この際 formazan 濃度と Optical density は直線関係を示します。Fig. 3 はこの標準直線であります。

Fig. 3 Relation between tetrazolium reduction (% formazan) and optical density at 500 mμ.

Fig. 4 Effect of time on the response to oestrone in the tetrazolium test. (Top line=10 µg; bottom line=control)

Fig. 4 に estrone 10^{-4} µg を腔内投与した去勢マウスの腔組織の TZ 還元量の増加を示しました。上の線が Estrogen 投与群で、下は Control 群であります。Estrogen 投与後の時間経過と反応度合の関係を検討した実験で、mitosis 反応の場合と同じく 24 時間後が一番良好な成績でしたので、以後この条件を用いることにしました。しかし 6 時間後のものでもすでに統計的に有意な反応が得られます。すなわち TZ 還元——細胞呼吸能の変化が極めて早期におこる変化と云うことがわかります。

Fig. 5 Effect of dose of tetrazolium on colour development.

Fig. 5 に示したものは TZ の量を検討した成績で、色々の量の TZ を用いた場合の生成する formazan 量を調べたものです。剖検は estrone 投与後 24 時間、estro-

ne は 1×10^{-4} と 4×10^{-6} µg の 2 つの量で追究しました。結果として TZ 濃度は 0.5mg が適当だと云うことを示しております。

Fig. 6 Effect of oestrone on colour development 0-70 minutes after tetrazolium treatments.

Fig. 6 には TZ を腔内に注入する時期を検討したもので TZ を投与してから 20~30 分後に屠殺するのが最も効果的で従って 30 分と云う条件を決定した次第です。

さて次に、この Assay に於ても先に述べた腔上皮角化反応を抑制する物質について検査しました。しかし成績は mitosis 反応の場合と同じで、何等 Estrogen に対する反応は阻害されませんでした。更にまた、estrone と estradiol の生物学的力価をこの Assay で比較しましたが、両者殆んど差異のないことを示しました。

以上腔上皮の mitosis 反応利用の Assay と腔の組織呼吸即ち TZ 還元を利用した Assay の 2 つをお話ししました。

両者とも Estrogen に特異的で非常に鋭敏且つ迅速で、しかも容易に実施出来る利点をそなえております。多少詳細にわたってお話しましたが、それは検定法として新しいからと云うばかりでなく次にお話する Anti-estrogen の研究に於てこの Assay が問題を提起する鍵になったからであります。

2. Anti-estrogen について

Estrogen 作用を抑制する物質として、例えば Androgen は Anti-estrogen 作用を表わしますが、それ自体として Androgen 作用を表わす大量でないこの作用は見られません。この様な物質よりも、私どもは、むしろそれ自体としては何等生物学的作用を表わさない量的レベルに於て Estrogen 作用を抑制する物質の存在に興味をひかれます。今迄にも、Estrogen に近縁な物質で、

それ自体は生物学的力価の極めて弱いか、或はまったくこれを欠く化合物が、より強い Estrogens の作用を抑制するであろうと云うことが推測されておりました。しかし実際にこの現象については極く最近まで証明されておりませんでした。

BÁRÁNY *et al.* (1955)²⁾ は di-p-hydroxy phenyl alkane 系列の二三の化合物が Estrogen 処理の去勢ラットの腔上皮増殖或は角化を抑制することを報じました。しかし、それには非常に大量を要し (2.5 mg 程度) ますので、先の推定を実証する適例であるとは云えません。

その後この種の研究は見られておりませんが、1958年に私ども EMMENS & COX (1958)³⁾ が dimethylstilboestrol (以下 DMS と略す) が強力な Anti-estrogen 作用を示すことを報じ、これと偶然時を同じくして、米国の LERNER *et al.* (1958)⁴⁾ が私どもの物質と構造上類似性ある MER 25 (1-(p-diethyl-aminoethoxyphenyl)-1-phenyl-2-p-anisyl-ethanol) なる物質の Anti-estrogen 作用を報じました。

なおまた、これら合成発情物質に近縁な化合物以外に、天然 Estrogen の類似化合物、すなわち Steroid の中にも Anti-estrogen 作用をもつものが報告されております。顕著なものとしては、19 nortestosterone 系列のもので、17-ethyl-19-nortestosterone, 17-methyl-19-nortestosterone 及び 17-ethinyl-19-nortestosterone などが強い Anti-estrogen 作用をもつと云われております。

これから私は、私どもの見出した DMS 及びこれに端を発して得られた 4:4'-stilbenediol 誘導体の Anti-estrogen 作用を中心に、MER 25 或は steroid 性の Anti-estrogen を比較して話を進めたいと存じます。

まず、それでは角化反応を基礎に於いた Assay で調べた成績から申上ります。

私 (EMMENS; 1942)⁵⁾ はかつて Estrogens を “true estrogen” と “pro-estrogen” (その分子自体は Estrogen 作用をもたず、その metabolite が Estrogen 作用をもつ化合物) に分類しましたが、DMS はこの意味に於て pro-estrogen に属します。すなわち DMS は皮下注射で 25 μ g, 腔内投与で 50 μ g で角化反応を表わします。ところが、この DMS の 0.02~0.2 μ g 程度で天然 Estrogen たる, estradiol 或は estrone の角化作用を阻止し、また、2 μ g 程度で diethylstilboestrol の作用も抑制します。しかし、この Anti-estrogen 作用は Estrogen と Inhibitor (DMS) を同時に腔内投与したときのみに現われます。Estrogen と Inhibitor 両者の投与ル

ートの各組合せを調べましたが、両者を皮下注射した場合、或は Estrogen を皮下、Inhibitor を腔内投与の場合、或は Estrogen 腔内、Inhibitor の皮下注射した場合にはいずれも Anti-estrogen 作用は得られず、また両者腔内投与の場合でも、投与時間が2時間以上前後にずれた場合は殆んど抑制作用は見られませんでした。

私どもは DMS の如き合成物質が合成発情物質例えば diethylstilboestrol (以下 DES と略す) を抑制するばかりでなく、かえつて天然 Estrogen の作用をより強く抑制するのにおどろきました。

次で私どもは DMS の成績に力を与えて、これと同系列の化合物すなわち alkyl-stilboestrol

即ち上の $\alpha=\alpha'$ の炭素が種々のアルキル基におきかわった化合物について Anti-estrogen 作用を追究しました⁵⁾。成績の概要を表示しましたが、表には夫々について、Estrogen 作用力価 (皮下投与と腔内投与) と Anti-estrogen 作用力価を Median effective dose (M. E. D.) を以て示しました。

Talle 1. Summary of nature and effects of stilboestrols

Substance (alkyl-stilboe- strol)	Approx. M. E. D. (μ g)		S/L ratio	Approx. M. E. D. for inhibition (μ g)
	s. c.	i. v.		
Methyl	1200	1000	1.2	>20
Ethyl	500	>650	<1.0	>0.2 <2.0
n-Propyl	500	>650	<1.0	>0.2 <2.0
Dimethyl	25	50	0.5	Ca. 0.2
Methylethyl	1.2	3.0	0.4	No inhibition
Methyl-n-propyl	0.5	1.0	0.5	No inhibition
Di-n-propyl	1.5	0.003	500*	No inhibition

* true oestrogen; i. v.: intravaginal; s. c.: subcutaneous.

この内で DES の如くそれ自体強い合成発情物質が、その微量では Anti-estrogenic であることがわかります。なお表中 di-n-propylstilboestrol は true estrogen がありますが、他の総ては pro-estrogen に属することは表中の S/L 比から明かであります。

Anti-estrogen 作用についてはアルキル基の炭素数が多くなると作用が減弱し消失する如くであります。例外的に表にはのせませんでした。Butylstilboestrol には強い Anti-estrogenic 作用がありました。

私どもはこの他 DMS の diacetate と -methyl ethers について Anti-estrogen 作用を調べましたが、結果は

DMS-mono-methyl ether, -dimethylether (Cis & Trans) では作用が消失しますが, DMS-diacetate には強い Anti-estrogen 作用がありました。且つ興味深いのはこの際 trans 型の -diacetate の方が Cis 型に比べてはるかに強い作用を示しました。この -diacetate が活性であることは恐らく容易に加水分解されて遊離の DMS が出来るからと思われます。

なお butylstilboestrol では Meso 型が Racemi 型より強い作用をもつておりました。

次に私も LERNER *et al.* の MER 25 について去勢マウスを用い角化反応を目安に Anti-estrogen 作用を調べました。先の DMS の場合と同じく, MER 25 と Estrogen 両者の投与ルート of 各組合せについて検討しました。確かに MER 25 は皮下投与である程度の Anti-estrogen 作用を表わしますが, あまり芳しい成績ではありません。投与量 1 mg でやつと抑制作用があるかどうかと云つた程度でありました。LERNER *et al.* はラットと兎で MER 25 の強い Anti-estrogen 作用を証しているのでありますから, 私どもがマウスで行つた実験での余りパットしない成績は恐らく著しく種属間の差異のあることを示すと思われます。

次に, 19 nor-steroid 系の Anti-estrogen について調べました。これも, 去勢マウスの角化反応が指標で, やはり Inhibitor と Estrogen の各投与ルート (皮下と腔内) の総ての組合せについて検討しました。調べた 19 nor-testosterone 系の数種の化合物はともに強い Anti-estrogen 作用を示し, とくに 17-methyl-19 nortestosterone は DMS と同程度の力価を示しました。ところで, これらの Steroid 系のものは DMS 系のものと異なり投与ルートの如何にかかわらず強い Anti-estrogen 作用を示しました。

なお, これらステロイド系物質は Anti-estrogen 作用のみならず, 黄体ホルモン作用, 男性ホルモン作用, 抗排卵作用とともに保有しますから, Anti-estrogen として使用する場合この点は常に留意しなくてはなりません。この点では DMS 系とか MER 25 のような合成物質には副次的生物作用がありませんからより優れていると云えましょう。

扱て次に, 先にお話した新しい Assay 即ち, mitosis 反応と TZ 還元反応を用いた場合のこれらの Anti-estrogen の成績を述べます。

Fig. 7 は mitosis 反応でみた DMS の Anti-estrogen 作用で 0.5 μ g で oestrone の作用を強く抑制しております。

また, butylstilboestrol もやはり強い Anti-estrogen

Fig. 7 Inhibition of mitotic response to oestrone by DMS (dimethylstilboestrol)

作用を示し, Meso 型が Racemi 型より強い作用を示しました。

MER 25 はこの反応でみても 1 mg で部分的抑制作用が認められる程度で殆んど抑制作用はないと云えます。

TZ 反応で見た場合も DMS が最も強い Anti-estrogen 作用を示し, butylstilboestrol も同様の Anti-estrogen 作用を示しました。

Fig. 8 に TZ 還元反応でみた DMS の Anti-estrogen 作用を示しました。

さてこの様に新しい Assay で見ても, DMS 系の合成物質は強い Anti-estrogen 作用を示します。ところが

Fig. 8 Inhibition of the tetrazolium reduction response to oestrone by DMS.

19-nor-steroid 系の Inhibitor を新しい Assay で調べてみましたが、全然無効でありました。すなわち、どの steroid も mitosis 反応でも、TZ 還元でも Estrogen の作用を抑制出来ないのであります。

我々はここに、二つの type の Anti-estrogen を認めることが出来ました。すなわちその一つは、DMS 系或は MER 25 の如き合成物質で、角化反応ばかりでなく mitosis 反応 TZ 還元反応に於ても Anti-estrogen となるものと、もう一つは steroid 系のものの如く角化反応のみに於て Anti-estrogen である二つグループになります。腫上皮の mitosis 反応とか TZ 還元反応（細胞代謝に関連）の如き反応は estrogen の反応として本質的な且つ早期におこるもので、角化反応はこれに引続き起る二次的の反応と云えます。

私どもは、従つてこの前者に属する Inhibitor の方がより重要な意義をもつものと思つております。これは Competitive Inhibitor で、Estrogen の作用する細胞の Receptor に DMS の如きものの分子自体が入つて、Estrogen が働けないようにしてしまつて抑制効果を表わすものと推定しております。これに反して steroid 系のものは Estrogen 投与後 1～2 日後に生ずる変化に関連して抑制効果を表すと推定されます。

EDGLEN *et al.* は 19 nor-steroid の Anti-estrogen 作用は白血球の移動の mechanism に関連し抑制効果を発するであろうと述べておりますが、私どももそういつたことが関係していると想像しております。

最後に、将来の問題であります、Anti-estrogen 特

に DMS 系のものの重要性和その応用面について一言つけくわえて終りといたします。それは恐らく三つあると存じます。（1）本日お話ししたのもその例であります、Estrogen の作用機構を分析する有効な手段となる。（2）臨床的に、家畜に於て発情を抑える目的或は人に於ける Estrogen 産生腫瘍の Estrogen 作用の抑制に使用（3）最も重要なものとして、受精に対して抑制的に働く可能性がありまして従つて卵著床機構解明の有効な手段となり、ひいては有効な contra-ception 手段確立に貢献すると云う面であります。

最後の面については我々はまだこの席上でお話出来るほど明かな成績を持つておりませんが、仲々有望な成績が得られつつあるのでそう確信する次第であります。ありがとうございます。

（本稿は Emmens 教授が一昨秋来日されたおり東大農学部講堂に於て本研究会のためになされた講演の要旨であります。種々な理由より今日まで掲載ができませんでしたことをおわび致します。なお文責は係にあります。）

文 献

- 1) MARTIN, L. & P. J. CLARINGBOLD: *Nature* **181**, 620, 1958. 2) BÁRÁNY, E., MORSING, P., MÜLLER, W., STALLBERG, G. & E. STENHAGEN: *Acta Soc. Med.* **60**, 68, 1955. 3) EMMENS, C. W. & R. I. COX: *J. Endocrinol.* **17**, 265, 1958. 4) LERNER, L. J.: *Fed. Proc.* **17**, 388, 1958. 5) EMMENS, C. W.: *J. Endocrinol.* **3**, 168, 1942. 6) EMMENS, C. W., R. I. COX & L. MARTIN: *J. Endocrinol.* **18**, 372, 1957.