Hexestrol dicaprylate の代謝及び作用に関する研究

Ⅲ. Hexestrol dicaprylate のマウス精巣における
androgen 生成に及ぼす影響

稲葉俊夫・清水亮佑・蘭守龍雄

(大阪府立大学農学部 家畜外科学教室)

植物油に溶かした hexestrol dicaprylate (以下 H_3) を 1 回筋肉注射するだけで、雄のニワトリ及びイヌの造精機能を数カ月から 1 年余も停止させることをわれわれは実験してきた¹⁻³⁾。またニワトリに筋注したときの H_3 の代謝と体内の残留を [^{14}C] と [3H] 標識の H_3 を用いた実験によって検討し、 H_3 が体内で容易に hexestrol (H_6) に転換すること、及び H_3 が体脂肪組織の中に比較的長い間残留することを明らかにした⁴⁾。

さらに H_3 の 1 回筋注によって雄イヌの精巣内⁵⁾と、精巣静脈血及び末梢血中⁶⁾の androgen(s) が注射後 2~3 日間にきわめて低値に激減し、これが注射量に応じて 60 日以上持続することを示した。

今回は H_3 を 1 回筋注したマウスの精巣内における androgen 合成系の変化を酵素組織化学的及び生化学的方法を用いて検討した。

材料と方法

1. 実験動物: 25°C の環境下で飼育した 60 日令の dd 系雄マウスを用いた。これらに 100, 500, 2,500 μg の H_3 (0.2 ml のゴマ油に溶解) を 1 回筋肉内注射し、対照のマウスには等量のゴマ油のみを筋注した。

これらのマウスを 30 日, 60 日, 90 日目にそれぞれ断頭して殺し、実験に供した。

2. 検索材料: マウスを屠殺したのち、ただちに精巣と副生殖器官の一部をとり出して秤量し、次に精巣と精巣上体に含まれる精子数をしらべた。

3. 酵素組織化学的検索法: 摘出した精巣をただちに -20°C で凍結後、クリオスタット内でマイクロームを用いて標本作製を行い、これをスライドガラスに伸展して

室温で風乾し、未固定のまま反応液に浸漬した。条件をそろえるために実験と対照の両群を同一反応瓶を使って同時反応させた。

glucose-6-phosphate dehydrogenase (以下 G6PDH) の反応は NACHLAS *et al.*⁷⁾ の方法に従った。すなわち、基質として Sigma 社製の G6PDH disodium 塩を用い、NADP を補酵素として 37°C, 30 分間のインキュベーションを行った。また、17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (以下 17 β SDH) の反応は testosterone を基質として BJERSING⁸⁾ の方法に従い、37°C, 120 分のインキュベーションを行った。3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (以下 3 β SDH) の反応については WATTENBERG⁹⁾ の方法を用いた。すなわち基質に dehydroepiandrosterone (以下 DHA) を用い NAD を補酵素としてインキュベーションは 37°C, 60 分間とした。

各反応ごとに基質を含まない反応液を調製して標本を作り、反応を検討する対照とした。インキュベーション終了後は蒸留水で洗い、10% ホルマリン水で 10 分間固定を行った。

4. 試薬類: [$4-^{14}C$] progesterone (55 mCi/mmol) は New England Nuclear Co., Boston, Mass., U.S.A. から入手し、実験前に TLC (silica gel HF 254, benzene 9/methanol 1) により精製した。その他のステロイド化合物はすべて Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A. から得、一般試薬類は分析用、または試薬特級品を用いた。

5. インキュベーションの方法: H_3 筋注後 30 日目に摘出した 2 匹のマウス精巣は 1 mM EDTA を含む 0.25 M sucrose を加えてホモジナイズした。[$4-^{14}C$] progesterone (1.8 nmol, 0.1 μ Ci) を 2 $\times$ 10 cm の各試験管にとり各々 0.02 ml の ethanol に溶解し、これらの管に 0.5 ml の補酵素加緩衝液を加えた。この補酵素液 0.5 ml は 0.3 M sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.06 M nicotinamid, 2 mM MgCl₂ と 1 mg の NADPH よりなる。これらを入れた各試験管にさら

Metabolism and effects of hexestrol dicaprylate in male animals. III. Effect of hexestrol dicaprylate on biosynthesis of androgen in mouse testis.

INABA, Toshio, Ryosuke SHIMIZU & Tatsuo IMORI (Department of Surgery and Obstetrics, School of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka, 591)

に 20 mg の精巣組織を含むホモジネート (0.5 ml) を加え、全量を 1.0 ml とした。

このように調製した試料を 37°C の温浴中で振盪しながら 30 分間インキュベーションした。インキュベーションが終了した時点でただちに 0.1 ml の 1 N・HCl で酸性とし、3.0 ml の ethylether を加えて反応を停止させた。

6. ステロイド類 (代謝産物) の分析と同定: インキュベーションを終わった上記の混合液に表 7 に掲げた 12 の中性ステロイドの 5~50 μ g を加えて、それぞれキャリアーとした。この混合液からのステロイド代謝産物の抽出は ethylether 4/chloroform 1 の混合溶媒によった。

さらにこれらの抽出物中からステロイド代謝物を精製、分離するために 3 種の TLC を用いた。これら TLC の溶媒系には (A) benzene 9/methanol 1, (B) benzene 3/ethylacetate 1, (C) ethylacetate 1/cyclohexane 1 を使用した。

TLC 上のキャリア・ステロイド類のスポットは 253 m μ の UV ランプの照射により、また標識代謝産物のスポットは X 線フィルムを用いたオートラジオグラフィ法によった。これらの両スポットを毎回対照して照合を計った。[4-¹⁴C] を含む試料の比放射能はシンチレーション・カウンター (Aloka Model LSC-602) によって測定した。

その結果、TLC (A) によって次の 5 通りの領域を先ず分離した。(1) allopregnanedione, (2) androstanedione + progesterone + 4-androstenedione, (3) allopregnanolones (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one + 3 β -hydroxy-5 α -pregnan-20-one) + androsterone + 5 α -dihydrotestosterone, (4) epiandrosterone + 17 α -hydroxyprogesterone + testosterone, (5) androstanediols (5 α -androstane-3 α , 17 β -diol + 5 α -androstane-3 β , 17 β -diol) + allopregnanediols (5 α -pregnan-3 α , 17 β -diol-20-one + 5 α -pregnan-3 β , 17 β -diol-20-one)

これらの (A) 上の各スポットを溶出したのち、さらに TLC (B) と (C) に再展開して次に示す 5 通りの分離を行った。

(1) allopregnanedione [(B) より], (2) androstanedione, progesterone, 4-androstenedione [(B) より], (3) allopregnanolones, androsterone, 5 α -dihydrotestosterone [アセチル化ののち (C) より], (4) epiandrosterone, 17 α -hydroxyprogesterone, testosterone (アセチル化ののち (B) より], (5) androstanediols, allopregnanediols [アセチル化ののち (C) へ。さらに水解し、次に酸化せしめて (B) より]。

このように各々のインキュベイトから分離したフラクションに対して、それぞれに該当すべきステロイド試薬を一定量加えたのち、これらの比放射能がほぼ一定になるまで再結晶をくり返し、ステロイド代謝産物の純度を算出した。本実験では同定を行うための規準として、順次 3 回の再結晶物の比放射能が $\pm 5\%$ 以内に落着いた時に同定を行なったものとした。このようにして、最終クロマトグラムで得られた [¹⁴C] Progesterone 由来のステロイド代謝物の転換率 (percent conversion) を近似的に算出した。

結 果

生殖器官の発育と造精能の変化

H_s を筋注したマウスの生体重、及び精巣、精巣上体、精囊の各重量変化と精巣、精巣上体に含まれる精子数の変化を表 1, 2, 3 に示した。H_s 100 μ g 筋注例では対照例とほとんど変化がなく、精子数の減数が認められる程度であったが、500 または 2,500 μ g 筋注例では明らかに生殖器官の重量は有意に減少し、精子は発見できなかった。このような状態は筋注後 90 日間持続した。

精巣内における酵素活性

マウス精巣内における 3 つの脱水素酵素活性に対する H_s 投与の影響を検討した成績を表 4, 5, 6 に示した。G6PDH 活性は対照群では精巣全域にわたって強かった

Table 1. Effects of H_s on development of reproductive organs, and on spermatogenesis in 90-day old mice (on the day after H_s treatment)

H _s (μ g)	No. of mice	Body weight (g)	Testes (mg)	Epididymides (mg)	Seminal vesicle (mg)	Sperm No. ($\equiv \equiv + \pm -$)
0	4	31.9 $\pm$ 3.3	266 $\pm$ 13	99 $\pm$ 20	110 $\pm$ 25	$\equiv$
100	5	31.7 $\pm$ 2.9	248 $\pm$ 60	94 $\pm$ 13	101 $\pm$ 7	+
500	5	25.1 $\pm$ 1.9	169 $\pm$ 75	57 $\pm$ 24	45 $\pm$ 22	-
2,500	5	34.8 $\pm$ 2.4	115 $\pm$ 40	47 $\pm$ 6	34 $\pm$ 13	-

* Mean value $\pm$ S. D.

Table 2. Effects of H_8 on development of reproductive organs, and on spermatogenesis in 120-day old mice (on the 60th day after H_8 treatment)

H_8 (μg)	No. of mice	Body weight (g)	Testes (mg)	Epididymides (mg)	Seminal vesicle (mg)	Sperm No. ($\# \# + \pm -$)
0	4	32.5 ± 4.1	272 ± 32	109 ± 12	114 ± 15	$\#$
100	5	37.3 ± 2.4	268 ± 37	115 ± 13	134 ± 27	+
500	5	34.9 ± 3.5	207 ± 53	84 ± 20	75 ± 32	—
2,500	5	32.8 ± 2.3	116 ± 43	46 ± 2	37 ± 2	—

* Mean value $\pm$ S. D.**Table 3.** Effects of H_8 on development of reproductive organs, and on spermatogenesis in 150-day old mice (on the 90th day after H_8 treatment)

H_8 (μg)	No. of mice	Body weight (g)	Testes (mg)	Epididymides (mg)	Seminal vesicle (mg)	Sperm No. ($\# \# + \pm -$)
0	5	41.0 ± 5.6	285 ± 30	105 ± 13	124 ± 15	$\#$
100	5	32.5 ± 5.3	239 ± 73	83 ± 17	95 ± 15	$\#$
500	5	27.6 ± 3.6	172 ± 56	50 ± 13	46 ± 20	—
2,500	5	32.0 ± 1.9	189 ± 87	51 ± 21	43 ± 38	—

* Mean value $\pm$ S. D.**Table 4.** Effects of H_8 on three enzymes of mouse testis in the 30th day after H_8 treatment

Enzymes	H_8 (μg)							
	0		100		500		2,500	
	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules
G6PDH	$\#$	+	$\#$	+	$\#$	+	$\#$	+
17 β SDH	$\#$	$\pm$	$\#$	$\pm$	+	—	$\pm$	—
3 β SDH	$\#$	+	$\#$	+	$\#$	—	$\#$	+

G6PDH: Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

17 β SDH: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase.3 β SDH: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase.**Table 5.** Effects of H_8 on three enzymes of mouse testis in the 60th day after H_8 treatment

Enzymes	H_8 (μg)							
	0		100		500		2,500	
	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules	Interstitial	Tubules
G6PDH	$\#$	+	$\#$	+	$\#$	+	$\#$	+
17 β SDH	$\#$	—	$\#$	—	$\#$	—	+	—
3 β SDH	$\#$	$\pm$	$\#$	$\pm$	$\#$	$\pm$	$\#$	—

See the footnote of Table 4.

Table 6. Effects of H_3 on three enzymes of mouse testis in the 90th day after H_3 treatment

Enzymes	H_3 (μg)							
	0		100		500		2,500	
	Interstitialum	Tubules	Interstitialum	Tubules	Interstitialum	Tubules	Interstitialum	Tubules
G6PDH	卅	±	卅	±	卅	±	卅	±
17 β SDH	卅	±	+	—	±	—	±	—
3 β SDH	卅	±	卅	±	卅	±	卅	±

See the footnote of Table 4.

Table 7. Percentage conversion of ^{14}C -progesterone incubated with 20 mg testicular homogenates* of the H_3 treated male mice

	μg (H_3) 0	100	500	2,500	no tissue
Progesterone (unchanged)	**1.8%	2.0%	39.2%	64.8%	92.2%
Allopregnanedione	<0.1	<0.2	<0.2	0.3	0.0
Allopregnanolones	0.1	0.0	0.7	0.2	0.0
Allopregnanediols	0.0	0.1	0.0	0.0	<0.1
17 α -hydroxyprogesterone	1.4	1.7	20.3	7.9	<0.1
4-Androstenedione	8.3	8.5	6.2	5.4	<1.2
Testosterone	66.9	57.9	12.4	3.7	<0.1
Androstenedione	0.3	0.3	1.2	0.7	<0.5
Dihydrotestosterone	0.1	0.1	0.3	0.2	0.0
Androsterone	0.1	0.1	0.8	0.8	0.0
Epiandrosterone	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Androstenediols	0.4	0.7	0.1	0.1	0.0
(5 α -reduced C_{19} steroids)	(0.9)	(1.2)	(2.3)	(1.7)	

*Testes were removed on the 30th day post H_3 injection.

**Percentage shows the mean of two samples.

が、とくに精細管部より間質部に強い活性を示した。これと各 H_3 投与群との間にほとんど差は認められなかった。17 β -SDH の活性は間質部で中等度に認められたが、 H_3 500 と 2,500 μg 投与群、とくに後者では顕著に活性の低下が現れた。

3 β -SDH は間質でその活性が高かったが、 H_3 投与による影響はほとんど認められなかった。

精巣における progesterone の代謝

H_3 を筋注した各 2 匹のマウス精巣のホモジネイト各々 20 mg と共にインキュベーションを行った時の [^{14}C] progesterone からの代謝物とその転換率 (percent conversion の平均値) を表 7 に示した。

対照群では [^{14}C] progesterone はほとんど消失して逆に [^{14}C] の各 4-androsterone と testosterone が高い数値を示した。100 μg 筋注例での変化は対照例とほとんど大きな差を示さなかったが、500 と 2,500 μg 筋注例、とくに後者では [^{14}C] progesterone は多くが残ったままとなり、また [^{14}C] testosterone の数値は対照

に比べて激減を示した。

考 察

H_3 は持続性効果をもつ estrogen であるが、腔スメア法で検討したとき、その活性はかなり弱く発現する¹⁰⁾。

われわれの過去の実験例の中には雄イヌに対する 2 mg/kg の 1 回筋肉注射で造精機能を 1 年余にわたって一時的に停止させたものが含まれていたが、いずれも H_3 投与後、精巣の萎縮、精子の消失に加えて、副生殖器官組織にも一時的に退行変化が見られ、投与後 2~3 日以内に精巣中と血中の androgen 値がきわめて低値に激減し、この状態が数カ月間持続する事実、及び精子形成の回復直前に血中 androgen 値の回復が明らかに先行する状態をも把握しえた。

今回マウス精巣を用いた実験でもほぼ同様の現象が観察できたことになるが、マウスの造精機能を一時停止させ、数カ月間これを持続せしめる H_3 の量はイヌの 0.5 mg/kg よりも遙かに多くを必要とし、ニワトリ (20 mg/

kg) に近い 17 mg/kg 前後であることがわかった。

さて、造精機能の支配に主役を演ずるのは FSH であり、androgen は補助的役割をもつとの考え方が 1970 年頃までは持たれていたが、STEINBERGER ら (1971)¹¹⁾ の研究はこれを修正して androgen は meiotic division の完成に不可欠であり、FSH は spermatid の成熟に主として関与するとの位置づけを行った。すなわち androgen の十分な分泌なくしては若い spermatid の形成は不可能であることを意味している。われわれは過去の実験で、androgen の急激な分泌抑制に続いて精巣内の精子が先ず消失し、少し時間がたつと、精娘細胞群にまで変性が現れたのちに一部の精娘細胞の消失が起こること、及び最後には精祖細胞までやや扁平化して核が偏在する影響を受けることを観察した⁸⁾。

これらの観察は不十分ながら、STEINBERGER らの報告結果に一部同調する要素をもっている。

われわれの今回の *in vitro* 実験での酵素組織化学的及び生化学的検討から、H₃ 投与により androgen(s) の生産が阻害される実態をかなり明らかにしたものと考える。

さきに TAMAOKI & SHIKITA¹²⁾ はラット精巣において、また ELLIS¹³⁾ はマウス精巣において testosterone の生産にはそれぞれ 4th-passway が主流をなしていると報告した。

本実験でも progesterone を基質に用いたが、実験中の 3 β -SDH 活性についての検討から、H₃ 投与がこの酵素活性にほとんど大きな影響を与えているとは見えないので、pregnenolone から progesterone への移行にはあまり問題はないものと推測している。

表 7 の対照例と H₃ 投与例の比較について、4-androstenedione と testosterone の比が、対照で約 8/67 を示したのに対し、100 μ g 投与で 9/58、500 μ g 例で 6/12、2,500 μ g の投与例では 5/4 と逆転を示している。このように H₃ の投与量が増加するに従って 4-androstenedione から testosterone への転換が明らかに減少しているのは 17 β -SDH 活性が阻害を受けていることを示唆するものであろう。

また 500 μ g 投与例に見られるように、testosterone の生産が 100 μ g 投与の場合との比較でも激減を示して

いるにもかかわらず、17-OH-progesterone の数値がかなり高い。このことは C₁₇₋₂₀ lyase 活性が 500 μ g 投与段階ですでに強い抑制を受けていると解してよいと思われる。

その他、5 α 還元の C₂₁ ステロイド群の数値が少量にとどまったことと、同じく 5 α 還元 of C₁₉ ステロイド群のそれも対照に比べてやや増加の傾向が見られたにすぎない。従って、H₃ 投与がこの方向への代謝をうながしたと見られるような証拠はえられなかった。

終わりに、酵素組織化学的検索法に関して終始ご懇篤なご指導を賜った教室の中間実徳博士に衷心から謝意を表します。

(1977.12. 23 受付)

文 献

- 1) 永田(正)・清水(亮)・野村(紘): 日本不妊学会誌 12, 239, 1966.
- 2) 蘭守(龍)・清水(亮)・野村(紘)・桜田(豊): 第 67 回日本獣医学会講演 1969.
- 3) IMORI, T., R. SHIMIZU, S. NAKAMA, K. NOMURA, S. NIHYA, T. SAKURADA, & H. MIYATA: VIII World Congress on Fertil. & Steril., *Excerpta medica* No. 234 a, p. 7, 1971.
- 4) 蘭守(龍)・中間(実): 家畜繁殖誌 13, 26, 1967.
- 5) 蘭守(龍)・清水(亮)・中間(実)・新谷(聡) 宮田(秀): 第 71 回日本獣医学会講演 (日獣学誌 33, p. 154), 1971.
- 6) 稲葉(俊)・清水(亮)・蘭守(龍): 第 81 回日本獣医学会講演 (要旨集 p. 197, 376), 1976.
- 7) NACHLAS, M. M., D. G. WALKER, & A. M. SELIGMAN: *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 29, 1958.
- 8) BJERSING, L.: *Histochemie* 10, 295, 1958.
- 9) WATTENBERG, L. M.: *J. Histochem. Cytochem.* 6, 225, 1958.
- 10) ONO, H., T. MIURA, T. MIZOGUCHI & T. IMAMICHI: *Jap. J. Vet. Sci.* 39, 437, 1977.
- 11) STEINBERGER, E.: *Physiol. Review* 51, 1, 1971.
- 12) TAMAOKI, B. & M. SHIKITA: *Steroid Dynamics*, ed. by PINCUS, J., T. NAKAO & J. F. TAIT, p. 493, Academic Press, Inc., N. Y., 1966.
- 13) ELLIS, L. G. & D. L. BERLINER: *Endocrinology* 76, 591, 1965.

Summary

The effect of Hexestrol dicaprylate (H_s) on the biosynthesis of androgen in mouse testis was investigated by histochemical and biochemical procedures.

Mice of 60 days old were injected (i.m.) with 100, 500, and 2,500 μ g of H_s dissolved in 0.2ml sesame oil. After 30, 60, and 90 days, each testis was removed and studied on three oxidative enzymes by histochemical procedures.

Each 20mg of testis removed on the 30th day after H_s injection was incubated with [4- 14 C] progesterone (1.8 nmol/0.1 μ Ci) and NADPH.

Radioactive metabolites were then separated by thin layer chromatographies and identified with the method of derivative formation and recrystallization to a constant specific activity.

Weights of the testes and accessory organs were significantly reduced in H_s treated mice. The activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase seemed not to be affected by H_s treatment in both interstitial and tubular elements. The activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, however, was reduced in H_s treated animals. Less testosterone was synthesized by testes obtained from the mice treated with 500 and 2,500 μ g of H_s . The decreased testosterone synthetic activity in these mice seemed to have been brought by the decreased activity of C₁₇₋₂₀ lyase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. By a very high dose of H_s , 17 α -hydroxylase activity also seemed to be reduced considerably.