薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
113 (11) 781-791 (1993)

ラットにおける Levonorgestrel の胆汁中代謝物

湊 宏一,^{*,a} 竹川恵弘,^b 小泉直之,^b 塚本國雄,^a 本間誠次郎^a
帝国臓器製薬株式会社代謝研究部,^a 有機化学研究部^b

Biliary Metabolites of Levonorgestrel in Rats

Kouichi MINATO,^{*,a} Shigehiro TAKEGAWA,^b Naoyuki KOIZUMI,^b
Kunio TSUKAMOTO^a and Seijirou HONMA^a

*Teikoku Hormone Co., Ltd., Pharmacokinetics Research Department,^a
and Organic Chemistry Research Department,^b 1604, Shimosakunobe,
Takatsu-ku, Kawasaki, Kanagawa 213, Japan*

(Received April 21, 1993)

The metabolism of levonorgestrel (LNG) in the bile following oral administration of the drug was examined in female rat. 1) Within 48 h after administration of ¹⁴C-labelled LNG (LNG-¹⁴C), 67–82% of the radioactivity was excreted into the bile. 2) Almost all the metabolites in the bile were conjugated with glucuronic acid or sulfuric acid and only a small amount of the unchanged compound was found. 3) After treatment of these metabolites in the bile with β -glucuronidase and arylsulfatase, more than ten aglycones were detected on TLC. Three main aglycones, M1, M2 and M3, were isolated. They accounted for 68.0, 0.8 and 11.5% of the radioactivity excreted into the bile, respectively. 4) The structures of M1 and M2 were assumed to be 13-ethyl-18, 19-dinor-5 α , 17 β -pregn-20-yne-3 α , 17-diol and 13-ethyl-18, 19-dinor-5 β , 17 β -pregn-20-yne-3 α , 17-diol, respectively, by NMR and LC/MS analyses, and confirmed by direct comparison with respective authentic samples. M3 was assigned to be 13-ethyl-18, 19-dinor-5 α , 17 β -pregn-20-yne-3 α , 16 β , 17-triol by NMR, LC/MS and GC/MS analyses and acetonide derivation. 5) Isolation of the glucuronide metabolite, M4, from the bile, was achieved by column chromatography using Amberlite XAD-2 and Sephadex LH-20. Hydrolysis of this compound with β -glucuronidase released M1 and glucuronic acid. After M4 was converted to an acetylated-methyl ester derivative, the definite structural assignment of M4 was established to be M1-3-O-yl glucuronic acid by NMR analysis. The NOE effect and the value of the corresponding coupling constant of the anomeric proton showed that the glucoside moiety was in the beta configuration.

These findings suggested that LNG was predominantly converted to 5 α -reduced metabolites and that the 5 β -metabolite accounted for less than 1% of the total metabolites in female rats. These metabolites were excreted as glucuronides into the bile.

Keywords—levonorgestrel; metabolism; female rat; oral administration; *in vivo*

緒 言

Levonorgestrel (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -pregn-4-en-20-yn-3-one, LNG, I) は、強いプロゲステロン作用を有する合成ステロイド剤であり、ethinylestradiol (19-nor-17 α -pregna-1,3,5(10)-trien-20-yne-3,17-diol, EE) との合剤で経口避妊薬として広く用いられている。このことから LNG の代謝について、ヒト及びサル尿及び血中代謝物は詳細に検討されている。¹⁻⁵⁾ 一方、毒性あるいは薬理作用の検討に用いられているラットでは、経口投与された LNG-¹⁴C の放射活性のほとんどが胆汁を介して排泄され、腸肝循環を受けながら糞中へ排泄されることが知られている。⁶⁾ しかし、その代謝についてはほとんど検討されていない。

今回、ラットにおける LNG の体内動態をさらに詳細に解明する目的で主排泄経路の胆汁中及び尿中代謝物の検索を試み、胆汁中主代謝物の化学構造を明らかにし、ヒト及びサルとの代謝経路に違いが認められたので報告する。

実 験 の 部

1. 核磁気共鳴 (NMR) スペクトル 日立 R-90H 又は JEOL JNM-GSX500 型を用い、試料を CDCl₃ に溶解し、tetramethylsilane を内部標準として測定した。

2. 質量 (MS) スペクトル 島津 GCMS-QP1000 型測定装置を用いて測定した。イオン化電圧 70 eV、イオン化加速電圧 3 kV で測定した。

3. 融点測定 Mettler FPI 融点測定器を用いて測定し、未補正である。

4. 液体クロマトグラフィー質量スペクトル (LC/MS) 日立 M-2000 型測定装置を用い、遊離型代謝物については、カラムとして YMC-A312 (150×6.0 mm, 山村化学) を、移動相として acetonitrile-H₂O (45:55, v/v) を流速 1.0 ml/min で用いた。また抱合型代謝物については、カラムとして Capcell pak C18 (250×4.6 mm, 資生堂) を、移動相として 0.03 M 酢酸アンモニウム-methanol (35:65, v/v) を流速 1.0 ml/min で用いた。MS イオン化モードは大気圧イオン化法、霧化温度は 250°C、脱溶媒室温度 390°C 及びドリフト電圧 99 V で測定した。

5. ガスクロマトグラフィー質量スペクトル (GC/MS) 日立 M-80 型測定装置を用い、イオン化電圧 20 eV、イオン化加速電圧 3 kV で測定した。カラムとして 2% OV-1 1 m を、カラム温度 220°C で、キャリアガスはヘリウムを流速 30 ml/min で用いた。

6. 放射能の測定 放射能の測定は、アロカ LSC-3500 型測定装置を用い、試料の一定量をバイアル瓶にとり、INSTA-GEL (Packard) 10 ml を加えて測定した。試料中のクエンチングは、¹³⁷Cs を用いた外部線源標準法により補正した。

7. 化合物 LNG は Gedeon Richter 社製 (mp 203—206°C) を、[ethinyl-¹⁴C] LNG (LNG-¹⁴C) は Amersham 社製を使用した。その比放射能は 1665 MBq/mmol で、放射化学的純度は chloroform-ethanol (96:4, v/v) を展開溶媒とした順相用薄層クロマトグラフィー (TLC) で 98% 以上であった。

8. 試薬及び材料 測定用及び各種クロマトグラフィー用の溶媒は、市販の試薬特級品を使用した。TLC には Kieselgel 60F₂₅₄ (Merk) と逆相用薄層クロマトグラフィー (RP-TLC) には RP-18F₂₅₄S (Merk) を、カラムクロマトグラフィーには Wakogel C-200 (和光純薬工業) を使用した。また Bond Elut C18 (Varian) 及び Amberlite XAD-2 (Rohm & Haas) は市販品を使用した。 β -Glucuronidase (calf liver) は、東京臓器製を、 β -glucuronidase-arylsulfatase (Helixpomatia) はベーリンガーマンハイム山之内製を用いた。

9. 合成標品 13-Ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-5 α ,17 α -pregn-20-yn-3-one (5 α -DHLNG, II), 13-ethyl-18,19-dinor-5 α ,17 α -pregn-20-yne-3 α ,17-diol (3 α ,5 α -THLNG, IV a), 13-ethyl-18,19-dinor-

Fig. 1. Synthetic Routes for IV and V

5 α ,17 α -pregn-20-yne-3 β ,17-diol (3 β ,5 α -THLNG, IVb), 13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-5 β , 17 α -pregn-20-yn-3-one (5 β -DHLNG, III), 13-ethyl-18,19-dinor-5 β ,17 α -pregn-20-yne-3 α , 17-diol (3 α , 5 β -THLNG, Va) 及び 13-ethyl-18,19-dinor-5 β ,17 α -pregn-20-yne-3 β ,17-diol (3 β ,5 β -THLNG, Vb) を合成した。

これら合成標品の合成経路を Fig. 1, その物理化学的性質を Table I に示した。

(1) 3 α ,5 α -THLNG 及び 3 β ,5 α -THLNG の合成——リチウム 150 mg の液体アンモニア 100 ml の溶液を激しく攪拌しながら LNG 1 g の dioxane 24 ml の溶液を 20 秒かけて加え、直ちに NH₄Cl 2 g を加えた。反応混合物を室温にもどしアンモニアを留去した後、生成物を ethyl acetate で抽出した。有機層を水で洗浄し、無水 MgSO₄ で乾燥後、減圧留去した。⁷⁾ 得られた結晶を acetone-hexane から再結晶し mp 234—239°C の 5 α -DHLNG (800 mg, 79%) を得た。Anal. Calcd C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Found: C, 80.40; H, 9.79. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.99 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃), 2.58 (1H, s, C $\equiv$ CH). MS m/z : 314 (M⁺), 299, 296, 285, 271.

次に、5 α -DHLNG 300 mg の chloroform 7.5 ml 及び methanol 7.5 ml の溶液に NaBH₄ 75 mg を加え、10 分間攪拌した。水で希釈したのち 5% HCl を加えて弱酸性とし、生成物を ethyl acetate で抽出した。有機層を 5% Na₂CO₃ 及び水で洗浄し、無水 MgSO₄ で乾燥後、減圧留去した。粗生成物を benzene-ether (7:3, v/v) を展開溶媒とする TLC により精製し、3 α ,5 α -THLNG (39 mg, 13%) を低極性異性体として得た。mp 148—149°C (ether-hexane), Anal. Calcd C₂₁H₃₂O₂: C, 79.70; H, 10.19. Found: C, 79.74; H, 10.39. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.97 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃), 2.58 (1H, s, C $\equiv$ CH), 4.08 (1H, m, $W_{1/2}=7$ Hz, 3 β -H). MS m/z : 316 (M⁺), 301, 298, 287, 273, 269.

また 3 β ,5 α -THLNG (180 mg, 60%) を高極性異性体として得た。mp 104—109°C (acetone-hexane), ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.97 (3H, t, $J=7$ Hz, CH₃), 2.57 (1H, s, C $\equiv$ CH), 3.58 (1H, m, $W_{1/2}=23$ Hz, 3 α -H). MS m/z : 316 (M⁺), 301, 298, 287, 273, 269. HRMS Calcd C₂₁H₃₂O₂ (M⁺) m/z : 316.2402. Found: 316.2397.

(2) 3 α ,5 β -THLNG 及び 3 β ,5 β -THLNG の合成——LNG 100 mg の THF 2.1 ml の溶液に、

TABLE I. TLC, HPLC and ¹H-NMR Data for Authentic Samples

Compound	TLC		HPLC ^{c)}	¹ H-NMR (CDCl ₃)
	Alumina ^{a)}	Silicagel ^{b)}		
3 α ,5 α -THLNG (13-ethyl-18,19-dinor-5 α ,17 α -pregn-20-yne-3 α ,17-diol)
<i>R</i> _f : 0.38 (ref ^{d)} : 0.30)	<i>R</i> _f : 0.52	RT: 35.5	δ : 0.97 (t, <i>J</i> =7 Hz, CH ₃) 2.58 (s, C $\equiv$ CH) 4.08 (m, <i>W</i> _{1/2} =7 Hz, 3 β -H)
3 α ,5 β -THLNG (13-ethyl-18,19-dinor-5 β ,17 α -pregn-20-yne-3 α ,17-diol)
<i>R</i> _f : 0.21 (ref ^{d)} : 0.16)	<i>R</i> _f : 0.43	RT: 30.9	δ : 0.97 (t, <i>J</i> =7 Hz, CH ₃) 2.61 (s, C $\equiv$ CH) 3.62 (m, <i>W</i> _{1/2} =23 Hz, 3 β -H)
3 β ,5 α -THLNG (13-ethyl-18,19-dinor-5 α ,17 α -pregn-20-yne-3 β ,17-diol)
<i>R</i> _f : 0.33 (ref ^{d)} : 0.25)	<i>R</i> _f : 0.46	RT: 21.6	δ : 0.97 (t, <i>J</i> =7 Hz, CH ₃) 2.57 (s, C $\equiv$ CH) 3.58 (m, <i>W</i> _{1/2} =23 Hz, 3 α -H)
3 β ,5 β -THLNG (13-ethyl-18,19-dinor-5 β ,17 α -pregn-20-yne-3 β ,17-diol)
<i>R</i> _f : 0.47 (ref ^{d)} : 0.36)	<i>R</i> _f : 0.53	RT: 23.0	δ : 0.98 (t, <i>J</i> =7 Hz, CH ₃) 2.59 (s, C $\equiv$ CH) 4.12 (m, <i>W</i> _{1/2} =7 Hz, 3 α -H)

a) Merk (No. 5727); developing solvent, benzene-EtOH (99 : 1). b) Merk (No. 5715); developing solvent, chloroform-acetone (9 : 1). c) Column, ODS (YMC-A312); temperature, 40°C; mobile phase, acetonitrile-H₂O (45 : 55); flow rate, 1.0 ml/min. d) D. C. Dejongh *et al.*, *Steroids*, **11**, 649 (1968).

水素化トリ-*n*-ブチルスズ 0.17 ml 及びアゾビスイソブチロニトリル 11 mg を加え、2 時間還流した。⁸⁾ 溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し hexane, chloroform 及び chloroform-acetone (19 : 1, v/v) で溶出した。Chloroform-acetone (19 : 1, v/v) 溶出部を、chloroform-acetone (100 : 1, v/v) を展開溶媒とする TLC で精製し、acetone-hexane から再結晶し mp 195—196°C の 5 β -DHLNG (17 mg, 17%) を得た。Anal. Calcd C₂₁H₃₀O₂: C, 80.21; H, 9.62. Found: C, 80.16; H, 9.80. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 1.00 (3H, t, *J*=7 Hz, CH₃), 2.61 (1H, s, C $\equiv$ CH). MS *m/z*: 314 (M⁺), 299, 296, 285, 271.

次に 5 β -DHLNG 300 mg を 5 α -DHLNG と同様に還元し、得られた粗生成物を benzene-ether (7 : 3, v/v) を展開溶媒とする TLC により精製し、3 α ,5 β -THLNG (238 mg, 79%) を高極性異性体として得た。mp 183—184°C (acetone-hexane), Anal. Calcd C₂₁H₃₂O₂: C, 79.70; H, 10.19. Found: C, 79.40; H, 10.33. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.97 (3H, t, *J*=7 Hz, CH₃), 2.61 (1H, s, C $\equiv$ CH), 3.62 (1H, m, *W*_{1/2}=23 Hz, 3 β -H). MS *m/z*: 316 (M⁺), 301, 298, 287, 280, 273, 269.

また 3 β ,5 β -THLNG (46 mg, 15%) を低極性異性体として得た. mp 131—132°C (acetone-hexane), $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.98 (3H, t, $J=7$ Hz, CH_3), 2.59 (1H, s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.12 (1H, m, $W_{1/2}=7$ Hz, 3 α -H). MS m/z : 316 (M^+), 301, 298, 287, 273, 269. HRMS Calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (M^+) m/z : 316.2402. Found: 316.2394.

10. 実験動物及び投与, 試料採取方法 体重約 250 g の Wistar 系雌性ラット (17 週齢, 日本エスエルシー) 11 匹を薬物投与前 24 時間絶食して用いた. 常法に従って胆管にカニューレを施したラットに, 非標識化合物で適宜希釈した LNG- ^{14}C 30 mg/kg (約 5.6 MBq/kg) を 12 時間毎に 3 回経口投与した. 最終投与後 24 時間まで胆汁を採取した.

11. 胆汁中代謝物の検索 Chart 1 に示す方法に従って代謝産物を検索した.

採取した胆汁 250 ml を pH 4—5 に調整後, あらかじめ調製した Amberlite XAD-2 樹脂カラム (4 $\times$ 45 cm) に吸着させ, 常法通り水 400 ml で洗浄後, methanol 700 ml で溶出し放射能画分を抽出した. 溶媒留去して得られた放射能画分 1.26 g を 0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) 20 ml に溶解後, β -glucuronidase 65000 units 及び arylsulfatase 16000 units を添加し, 37°C で

Chart 1

Fig. 2. Chemical Structures of LNG and Its Metabolites

Fig. 3. Autoradiograms of TLC of Bile (I), Amberlite XAD-2 Extract (II) and Bond Elut C18 60% CH_3CN Fraction (III)

14 時間インキュベートした。反応終了後、反応液を Bond Elut C18 (60 ml) に吸着させ、ついでカラムを水及び 30% acetonitrile 各 60 ml で順次洗浄後、60% acetonitrile 60 ml で溶出した。未処理胆汁、Amberlite XAD-2 抽出液及び Bond Elut C18 の 60% acetonitrile 溶出液の一部を、TLC プレートに塗布した後、chloroform-acetone (9 : 1, v/v) 混液で 2 度展開した。TLC プレートを風乾後、X-ray film (Konica X-Ray film) に 12 時間密着させてオートラジオグラムを作成し、放射能を検出した (Fig. 3)。

12. 胆汁中代謝物の抽出分離 (1) 遊離型代謝物——Chart 1 に示す方法に従って代謝産物を抽出分離した。

Bond Elut C18 の 60% acetonitrile 溶出液を溶媒留去後、油状物 231 mg を胆汁中放射能に対して 78% の収率で得た。これを chloroform 30 ml に溶解し、水 10 ml で 3 回洗浄後 chloroform 層を得、溶媒留去して残渣 222 mg を得た。これを分取用 TLC プレートに塗布し chloroform-acetone (9 : 1, v/v) 混液で 2 度展開した。展開後、TLC オートラジオグラムにより検出されたスポット (A, B 及び C) 部分のシリカゲルをかきとり、ethyl acetate で溶出後、代謝物のアグリコン M1, M2 及び M3 をそれぞれ 3.3, 1.4 及び 2.1 mg 得た。これらを機器分析に供した。

(2) 抱合型代謝物——Chart 2 に示す方法に従って代謝物を抽出分離した。

Amberlite XAD-2 抽出物 1.54 g を、Sephadex LH-20 カラム (4×65 cm) に適用し 20% methanol で溶出後、放射能の主フラクション (1740—2340 ml) を胆汁中放射能に対して 54.4% の

Chart 2

Fig. 4. Autoradiogram of RPTLC of Sephadex LH-20 Extract after Treatment with Amberlite XAD-2

収率で得た。この粗精製物 200 mg を逆相 TLC プレートに塗布し、0.3 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5)-acetonitrile (1 : 2, v/v) 混液で展開した。TLC オートラジオグラムにより検出された主スポット (D) 部分のシリカゲルをかき取り methanol で溶出後、抱合型代謝物 M4 70 mg を得た (Fig. 4)。これを機器分析に供した。

13. 胆汁中代謝物の誘導体化 M3 の TMS 化は、M3 0.05 mg を TMSBA (東京化成工業) 100 μ l に溶解し、60°C で 1 時間、ついで室温で一晩放置し、N₂ 気流下溶媒留去後、GC/MS に付した。またアセトナイド化は、M3 0.7 mg を acetone 1 ml に溶解し *p*-トルエンスルホン酸 1 mg を加えて室温で 24 時間放置した。次に benzene 5 ml を加え、5% NaHCO₃ 4 ml、水 6 ml で順次 2 回洗浄し benzene 層を無水 Na₂SO₄ で脱水、溶媒留去後、アセトナイド誘導体 1 mg を得た。

M4 を誘導体化するため、M4 20 mg を methanol に溶解し酢酸酸性とした後、ジアゾメタンを加え室温で 20 分放置した。放置後、酢酸を加え反応を終了させ溶媒留去し、次いで真空乾燥後、ピリジン及び無水酢酸それぞれ 500 μ l を加えて室温で一晩放置後、N₂ 気流下溶媒留去した。この混合物を chloroform を展開溶媒とする TLC により精製しアセチル-メチルエステル誘導体 13.1 mg を得た。

結 果

1. 胆汁中代謝物の検索

LNG-¹⁴C をあらかじめ胆管カニューレを施したラットに経口投与した時、最終投与後 24 時間までに得られた胆汁中への排泄率は、投与量の 67.0—81.7% を占めた。Fig. 3 に示したように、胆汁中の放射能は大部分が原点にとどまることから、LNG は胆汁中に水溶性代謝物として排泄されたものと考えられた。また β -glucuronidase 及び arylsulfatase 処理すると TLC 上に放射能の主なスポット A、B 及び C (それぞれアグリコン M1、M2 及び M3 と称する) が認められ、M1、M2 及び M3 の総胆汁中排泄放射能に対する割合は、それぞれ 68.2、0.8 及び 11.5% であり、いずれも抱合型代謝物が酵素水解された遊離型代謝物と推定された。

2. 代謝物のアグリコン M1 の解析

M1 の MS は m/z 316 に分子イオンを与え未変化体より 4 質量増加した。また M1 の ¹H-NMR スペクトルは、2.58 ppm に 17 α 位のエチニルのプロトンに由来するシグナルが、4.08 ppm に 3 β 位のプロトン由来のシグナルが半値幅 7 Hz でマルチプレットに観察された (Fig. 5)。このことから A 環の α,β -不飽和ケトンの還元された代謝物であることが考えられた。¹H-NMR 及び MS の結果より、M1 は 3 $\alpha,5\alpha$ -THLNG と推定され、合成標品との TLC による R_f 値及び LC/MS による保持時間 (t_R 35.0 min) とスペクトルパターンが完全に一致したことより同定した。

3. 代謝物のアグリコン M2 の構造解析

M2 の MS は M1 と同様に m/z 316 に分子イオンを与え、また ¹H-NMR スペクトルは 2.60 ppm に 17 α 位のエチニルのプロトンに由

Fig. 5. ¹H-NMR (90 MHz) Spectrum of M1 Isolated from Female Rat Bile

来するシグナルが、3.62 ppm に 3β 位のプロトン由来のシグナルが半値幅 23 Hz でマルチプレットに観察された。この結果から M2 は A 環の α,β -不飽和ケトンの還元された代謝物であり M1 の 5 位の立体異性体であると考えられ、 $3\alpha,5\beta$ -THLNG と推定された。M2 は合成標品との TLC による R_f 値及び LC/MS による保持時間 (t_R 29.7 min) とスペクトルパターンが完全に一致したことより同定した。

4. 代謝物のアグリコン M3 の構造解析

M3 の MS は m/z 332 に分子イオンを与え、M1 及び M2 と比較して 16 質量増加した。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは 2.58 ppm に 17α 位のエチニルのプロトンに由来するシグナルが、 3β 位のプロトン由来のシグナルが 3.97 ppm に半値幅 7 Hz でマルチプレットに観察された。また M3 を LC/MS に供した結果、 m/z 315, 297 及び 279 に $(M+1-\text{H}_2\text{O})^+$, $(M+1-2\text{H}_2\text{O})^+$ 及び $(M+1-3\text{H}_2\text{O})^+$ に相当するフラグメントイオンを与え、保持時間は M1 及び M2 に対し 10 min と短く (Table I), TLC の R_f 値も小さいこと (Fig. 3) から M1 及び M2 と比して極性の高い代謝物であると考えられた。また M3 の TMS 誘導体の MS の結果、 m/z 548 に分子イオンを与え、Siesenwine ら⁹⁾及び Diekman ら¹⁰⁾が指摘するように m/z 129 に A 環及び m/z 228 に D 環由来のフラグメントイオンをそれぞれ与えた (Fig. 6)。このことから M3 は $3\alpha,5\alpha$ -THLNG がさらに 1ヶ所水酸化を受けたものであり、その位置は 16 位であると推定された。また M3 をアセトナイド化すると、MS において m/z 372 に分子イオンが観察された。その誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで 1.33 及び 1.50 ppm にアセトナイド由来のシグナルが観察された。このアセトナイド誘導体の生成の結果から 16 位水酸基の立体配置は β 配置であることが確認され、M3 の構造は 16β -hydroxy- $3\alpha,5\alpha$ -THLNG であると推定された。

Fig. 6. Mass Spectrum of M3 TMS Derivative Isolated from Female Rat Bile

Fig. 7. ^1H -NMR (500 MHz) Spectrum of M4 Methyl-acetyl Derivative Isolated from Female Rat Bile

5. 抱合型代謝物 M4 の構造解析

抱合型代謝物 M4 は β -glucuronidase 処理後 TLC を行った結果, M4 のスポットが完全に消失し M1 と同様の R_f 値及び硫酸で黄褐色を呈するスポット, D-グルクロン酸と同様の R_f 値及びナフトレゾルシノールで青色を呈するスポットが認められた. また LC/MS の結果 m/z 510 に $(\text{M}+\text{NH}_4)^+$ のイオンが認められた. この結果から M4 は M1 の水酸基の 1 つがグルクロン酸抱合を受けたものと考えられた. 次に常法に従ってジアゾメタンによりメチル化後, 無水酢酸-ピリジンでアセチル化した. この誘導体の ^1H -NMR スペクトルでは 3.74 ppm にメチル基由来のシグナルが, 2.01, 2.02 及び 2.04 ppm にアセチル基由来のシグナルが, 3.99 ppm に 3β 位プロトン由来のシグナルが半値幅 7 Hz で M1 と同様に認められた. これらの結果よりアセチル基はグルクロン酸部分のみに導入されているものと考えられた. ステロイド部分の水酸基でアセチル化をうけるのは 3α 位のみであるから,¹¹⁾ グルクロン酸は 3α 位の水酸基に結合していると結論された. また M4 の 500 MHz- ^1H -NMR スペクトルでは 4.59 ppm にアノメリックプロトン ($1'\text{-H}$) に相当するシグナルがダブルレットで, 結合定数は 7.8 Hz で観察された. また $1'\text{-H}$ と $2'\text{-H}$ には NOE (nuclear Overhauser effect) が観察されず, $1'\text{-H}$ と $5'\text{-H}$ に NOE が観察された. このことからグルクロン酸の結合様式は, β -結合であることが Fischer らの報告¹²⁾と一致し, 明らかとなった (Fig. 7). これらより M4 は $3\alpha, 5\alpha\text{-THLNG } 3\alpha\text{-(}\beta\text{-D-glucuronide)}$ であると推察された.

考 察

LNG はヒト及びサルにおいて尿中へ 30—50% 排泄されるが,^{2,3,13)} ラットでは尿中への排泄は極めて少なく 10% 程度でほとんどが胆汁を介して糞中へ排泄される.⁶⁾ LNG の生体内運命について, ヒト, サル及びウサギ等ではよく検討されているが,^{2,3,13,14)} ラットでは下垂体における代謝が最近報告¹⁵⁾された程度で, 主排泄経路である胆汁及び糞中への排泄について今日までほとんど検討されていない.

LNG- ^{14}C 投与後ラット胆汁中へ排泄された代謝物のほとんどが抱合体であった. 酵素水解すると 10 種以上の代謝物が TLC で確認され (Fig. 3), その中で主な代謝物について構造解析を行っ

た. 主代謝物のアグリコンとして得られた M1 は $3\alpha,5\alpha$ -THLNG であり, M2 は $3\alpha,5\beta$ -THLNG であった. しかし, M2 の存在量は極めて少なかった. ヒト及びサル尿中の主代謝物は $3\alpha(\beta),5\beta$ -THLNG で, ラットの主代謝物の $3\alpha,5\alpha$ -THLNG は極めて少ない.^{2,8,13)} また Khan ら¹⁶⁾ はウサギ肝でもヒトと同様に $3\alpha(\beta),5\beta$ -THLNG が主で, 5α 還元体はほとんど生成されなかったと報告している. ラット胆汁中に排泄された $3\alpha,5\alpha$ -THLNG は 3 位水酸基に β -D-グルクロン酸抱合していることが酵素水解及びアセチル化反応等で判明した. グルクロン酸とステロイド及び薬物との結合様式については NMR でよく検討されており, Fischer ら,¹²⁾ Honma ら¹⁷⁾ の報告とも一致していた. $3\alpha,5\beta$ -THLNG もグルクロン酸により抱合を受け尿中に排泄されると報告されているが,¹³⁾ グルクロン酸の結合位置は 3 位あるいは 17 位水酸基のいずれか, 未だ明らかにされていない. このように LNG の 5 位の還元的代謝についてはラットで 5α 体が優位の代謝を受けるが, ヒト, サル及びウサギ等では 5β 体へ還元され,^{2,8,13,14)} ヒトを含め動物間で大きな違いが認められた. 同様に, 構造の類似した 19-ノルステロイドである norethindrone¹⁸⁾ や metandienone (17α -methyl-androsta-1,4-diene-17-ol-3-one)¹⁹⁾ もヒトでは 5β 還元代謝物のみ検出され, 5α 体は検出されていない. この 4 位の二重結合の還元はステロイドの構造特異性によるのではなく, 主代謝臓器である肝の 5α -及び 5β -reductase 活性の違いが動物差に現れたと推察される. ラット肝では C_{10} ステロイドの 5α -reductase が 5β -reductase の 10 倍以上活性が高く,²⁰⁾ ヒトでは逆に 5β 還元が優位であると C_{21} ステロイドで報告²¹⁾ されている. ステロイドの 4 位二重結合の還元代謝に関与する酵素として NADPH-依存性 4^4 - 5α 及び 4^4 - 5β -reductase がそれぞれラット肝ミクロゾームと細胞質画分に存在することが知られている.²¹⁾ また肝の 5α -reductase の活性には種差や性差が認められ,^{22,23)} 特に雌性ラットでは雄性ラットの 10 倍も活性が高く, この酵素は下垂体のホルモンにより調節されていることも Gustafsson ら²⁴⁾ によって報告されている.

Norgestrel (d,l -Ng) の酸化的代謝としてヒト, サル及びウサギ等で確認されているのは 1β , 2α , 6 , 16α 及び 16β 水酸化化合物である.^{2,3,9,13)} その中で 16β 位の水酸化代謝物が最も多く, 16α 体は少ない. 逆に内因性ステロイドの estrogen²⁵⁾ や testosterone²⁷⁾ では 16α 体が圧倒的に多いのと大きく異なっていた. この 16 位水酸化の立体選択性について levonorgestrel (d -Ng) では 16β 水酸化体がウサギでは優位であるが, そのエナンチオマーである l 体では 16α 水酸化体が主であると報告されている.¹⁶⁾ しかし, Siesenwine はサルではヒトと逆に LNG では 16β 水酸化体が少なく, 逆に l 体が多いと報告している.²⁾ 近年 dehydro-epi-androsterone-sulfate の 16α 水酸化酵素がヒト胎児より単離され, その構造が明らかとなった.²⁷⁾

ラット及びヒトでの LNG の主代謝物である $3\alpha,5\alpha$ -THLNG 及び $3\alpha,5\beta$ -THLNG ではホルモン作用がほとんどないことから,^{15,28)} 不活性代謝物として排泄されと考えられる.

Fig. 3 において B, C 間に検出された R_f 値 0.31 のアグリコンは精製不十分で同定には至らなかった.

以上まとめると, ラットにおける LNG の主代謝経路は, 4^4 - 5α -reductase で還元されたのち 3α -hydroxysteroid dehydrogenase でさらに還元され $3\alpha,5\alpha$ -THLNG となったのちグルクロン酸抱合体となるものである. しかしヒト及びサルでは 4^4 - 5β -reductase で還元されたのち 3α -hydroxysteroid dehydrogenase で $3\alpha,5\beta$ -THLNG となる. このことから LNG の代謝においてヒトとラットの間に明らかな種差が認められた. これはヒトとラットの間に 4^4 - 5α 及び 4^4 - 5β -reductase の量比に差があるためと思われる.

謝辞 500 MHz- 1 H-NMR 測定に際し, 御協力を頂きました東レリサーチセンターに深謝いたします.

引用文献

- 1) S. F. Siesenwine, H. B. Kimmel, A. L. Liu, H. W. Ruelius, *Drug Metab. Dispos.*, **3**, 180 (1975).
- 2) S. F. Siesenwine, H. B. Kimmel, A. L. Liu, H. W. Ruelius, *Drug Metab. Dispos.*, **2**, 65 (1973).
- 3) S. F. Siesenwine, H. B. Kimmel, A. L. Liu, H. W. Ruelius, *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 1 (1979).
- 4) S. F. Siesenwine, A. L. Liu, H. B. Kimmel, H. W. Ruelius, *Acta Endocrin.*, **76**, 789 (1974).
- 5) S. F. Siesenwine, H. B. Kimmel, A. L. Liu, H. W. Ruelius, *Contraception*, **12**, 339 (1975).
- 6) 塚本國雄, 岩村 敏, 藤方 明, 落合浩之, 湊 宏一, 矢後長敬, *薬理と治療*, **20**, 2107 (1992).
- 7) A. Bowers, H. J. Ringold, E. Denot, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 6115 (1958).
- 8) H. Laurent, P. Esperling, G. Baude, *Liebigs Ann. Chem.*, **1983**, 1996.
- 9) S. F. Siesenwine, H. B. Kimmel, A. L. Liu, H. W. Ruelius, *Acta Endocrin.*, **73**, 91 (1973).
- 10) J. Diekman, C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **32**, 1005 (1967).
- 11) F. Sondheimer, Y. Klibansky, *Tetrahedron*, **5**, 15 (1959).
- 12) B. Fischer, A. Nudelman, M. Ruse, J. Herzig, H. E. Gettlieb, *J. Org. Chem.*, **49**, 4988 (1984).
- 13) E. Gerhard, W. Hecher, H. Hitze, B. Nieuweboer, O. Bellmann, *Acta Endocrin.*, **68**, 219 (1971).
- 14) S. Kamyab, P. Littleton, K. Fotherby, *J. Endocr.*, **39**, 423 (1967).
- 15) A. E. Lemus, F. Vilchis, R. Damsky, B. A. Chavez, G. A. Gacia, I. Grillasca, G. Perez-Palacios, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 881 (1992).
- 16) F. S. Khan, K. Fotherby, *J. Steroid Biochem.*, **19**, 1169 (1983).
- 17) K. Honma, K. Nakajima, J. Uematsu, A. Hamada, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 394 (1976).
- 18) F. Z. Stanczyk, S. Roy, *Contraception*, **42**, 67 (1990).
- 19) W. Schanzer, H. Geyer, M. Donike, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **38**, 441 (1991).
- 20) E. Forchielli, S. Ramachandran, H. J. Ringold, *Steroid*, **1**, 157 (1963).
- 21) A. F. Clark, "Steroid Biochemistry," vol. I, ed. by CRC Press, Boca Raton, Fla., 1979, p. 4.
- 22) D. C. Swinney, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 859 (1990).
- 23) V. Graef, S. W. Golf, M. Tuschen, *J. Steroid Biochem.*, **14**, 883 (1980).
- 24) J-A. Gustafsson, M. Ingelman-Sundberg, A. Stenberg, T. Hokfelt, *Endocrinology*, **98**, 922 (1976).
- 25) G. Pincus, K. V. Thimann, "The Hormones," ed. by Academic Press, New York, 1948, p. 380.
- 26) E. T. Morgan, C. MacGeoch, J-A. Gustafsson, *J. Biol. Chem.*, **260**, 11895 (1985).
- 27) M. Kitada, T. Kamataki, K. Itahashi, T. Rikihisa, Y. Kanakubo, *J. Biol. Chem.*, **262**, 13534 (1987).
- 28) 太田昌宏, 岡田真美, 布施朗子, 高橋洋夫, 帝国臓器製薬(株)社内資料, 1991.