UDC 577.176.52

288. 和田俊洋：ステロイド系ホルモンの誘導体の研究 (第9報*) 17 α -Hydroxy-progesterone のアシル化がその黄体ホルモン作用におよぼす影響

Shun-yo Wada : Studies on the Derivatives of Steroidal Hormones. IX.
Influence of Acylation of 17 α -Hydroxyprogesterone on
Progestational Activity.

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.**)

In 1954, Junkmann¹⁾ found that in spite of the fact that 17 α -hydroxyprogesterone (I) had almost no progestational activity, its ester showed such activity, but why such activity should appear by acylation had remained obscure to date. The present writer had revealed in the preceding paper of this series⁵⁾ that acylation of 17 α -OH in (I) had rendered 20-CO inactive and resistant to reduction. It was assumed that, if CO group in 20-position of (I), having free OH in 17 α -position, is more easily reduced in the body than that of progesterone (II), then this might be the reason why (I) does not show progestational activity. Attempt was therefore made to prove this by reduction of (I) and (II) under the same conditions and to determine the amount of unreacted material from the ultraviolet absorbancy coefficient of 20-CO, but the measurement of 20-CO was difficult due to the strong effect of the absorption of α,β -unsaturated ketone. Therefore, 17 α -hydroxypregnenolone (V) and pregnenolone (VI), which are in the same relationship with respect to the 17-position as (I) and (II), were reduced with sodium borohydride under identical conditions and it was proved that (V) is more easily reduced than (VI), as had been assumed. (I) and its caproate (IV) were administered to normal female rabbit and determination of pregnanetriol (III) excreted in the urine suggested that hydrolysis of (IV) *in vivo* hardly took place and that (IV) has progestational activity in the state of an ester.

(Received August 20, 1959)

androgen および estrogen のエステルがそのホルモン作用を発揮するのはこれらが生体内で徐々に水解され OH 基が遊離することによつてはじめて活性を生じるものと一般に考えられてきた。

1954 年 Junkmann¹⁾ は, 17 α -hydroxyprogesterone (I) が注射および経口投与では黄体ホルモン作用が殆んど無いにも拘わらず (progesterone (II) の約 1/4 の活性をもつという²⁾) (I) をアシル化すると当該作用を示すようになることを明らかにした。また Zarrow 等³⁾ は (I) をハツカネズミを用いて Hooker-Forbes 法で生物試験をし (II) の 60 倍の効力があることを認めたが、ハツカネズミの子宮組織像は家兎や人間と異なり (家兎と人間は類似している)⁴⁾、家兎では Hooker-Forbes 法で試験しても (I) は効果を示さなかつた²⁾ ので、(I) がエステルになつて黄体ホルモン作用を示すようになる作用機序については今日まで不明のままである。

著者は化学反応性の研究からこの問題を明らかにするための示唆を得ることができたと考えるのでこれについての研究結果を報告する。(I) をアシル化すると 20 位 CO 基は不活性になり還元されにくくなることは前報⁵⁾ で明らかにしたところであり、(I) のエステルの体内での水解の難易はこれを投与した動物の尿中 5 β -pregnane-3 α ,17 α ,20 α -triol (III) の量を調べることにより推測し得る筈である。

Bonginiovanni 等⁶⁾ によると人間に (I) を投与すると尿中に (III) が排泄されるが、Langeckel⁷⁾ および

* 第8報：本誌 79, 1419(1959).

** Shimosakunobe, Kawasaki-shi, Kanagawa-ken.

1) K. Junkmann : Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **223**, 244(1954).

2) H. A. Salhanick, et al. : J. Clin. Endocrinol. and Metabolism **17**, 667(1957).

3) M. X. Zarrow, et al. : Ibid. **17**, 658(1957).

4) C. W. Hooker : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **45**, 270(1940).

5) 和田：本誌 **79**, 684(1959).

6) A. M. Bonginiovanni, et al. : J. Clin. Endocrinol. and Metabolism **14**, 409(1954).

7) H. Langeckel : Arch. exptl. Pathol. Pharmacol. **225**, 309(1955).

Kimbel 等⁹⁾ は (I) の caproate (IV) を人間およびダイコクネズミに投与した場合には (III) は尿中に排泄されないことを明らかにしている。しかるに、松岡⁹⁾ は (IV) を妊婦および健康男子に投与し、投与後 8 日間の尿より (III) を結晶として単離している。Langeckel および Kimbel 等の結果と松岡の報告とは相反するもので、著者は家兎を使用してまずこの点を確かめることとした。

(I) および (IV) を正常成熟雌家兎に筋肉内注射し、尿中の (III) および 17-ketosteroid の含量を測定し (但し (III) の含量は過ヨウ素酸々化によつて得られる acetaldehyde 値より逆算して得た推定値であるから、17,20-diol 型側鎖を持つステロイドはすべて (III) として測定されている)、つぎのような結果を得た。すなわち Table I に示すごとく (I) を投与すると (III) の排泄量は投与後 48 時間で最高値に達し、以後急速に減少する。つぎに (I) の投与後 8 日目に (IV) を投与したところ (III) の排泄量は増加することなく引続いて減少する。そこで投与した (IV) が体内にそのまま残存しているかということが疑われたが、その点は Kimbel 等⁹⁾ の実験から否定される。すなわち彼らは 4 位の炭素を ¹⁴C で標識した (IV) をダイコクネズミに投与したところ、投与後尿中の ¹⁴C 含量は 4 日目に、また糞中では 3 日目にそれぞれ最高に達し以後急速に減少して 8 日目以後は血中、尿中および糞中ともに殆んど検出されない量にまで減じ、注射部位からも 2 日目以後は殆んど検出し得なかつた。また (IV) を投与することにより卵巣からの progesterone (II) の分泌が高まるためにあたかも (IV) に黄体ホルモン活性があるかのごとく見られるのではないかという疑問に対しては Davis 等¹⁰⁾ が去勢婦人に (IV) を投与して当該作用を示すことを知りこれを否定している。

上記の著者の実験結果および Langeckel, Kimbel 等の報告より考えて、(IV) を投与しても (III) としては尿中に殆んど排泄されないことは明らかで、このことは著者の前報⁵⁾ の結論—17 位 OH 基をアシル化したものは遊離のものに比し 20 位 CO 基が還元され難い—からも推測されることである。すなわち (IV) は生体内で (I) となつてから黄体ホルモン作用を発揮するのではなく、エステルのまま効力を発揮するものと想像される。

なお、著者は (I) を投与すると尿中に (III) が排泄されてくる事実より (I) が黄体ホルモン作用を殆んど示さないのは生体内でその 20 位 CO 基が (IV) は勿論、progesterone (II) の 20 位 CO 基よりも還元され易いためではないかと考えた。すなわち、(I) の 17 位の -CO-CH₃ 側鎖は 17 位を支点として自由回転できるため、17 α 位 OH 基の水素原子は 20 位 CO 基の酸素原子と水素結合しキレート環を作っている¹¹⁾ ため、20 位 CO 基は分極性が大きくしたがって容易に還元され活性を失うものと推論される。

この仮定を確かめるため、以下の実験を行なつた。まず (I) と (II) を同一条件で還元し 20 位 CO 基の紫外外部吸光係数から未反応物質を定量しようと考えたが、Fig. 5 に示すごとく α, β -不飽和ケトンの吸収の影響が強過ぎて 20 位 CO 基の測定が困難であるため、やむを得ず 17 位が (I) および (II) と同じ関係にある 17 α -hydroxypregnenolone (V) と pregnenolone (VI) をそれらの代りに使用しこれを NaBH₄ とエタノール中同一条件にて還元し、反応物をそれぞれの 20 位 CO 基の紫外外部吸収の吸収極大における吸光度により定量した。その結果、(V) は 82.5% も還元されるに反し、(VI) は 17.5% が還元されるのみであることを知つた。このことは著者の上記の推論の正しいことを証明するものである。

17 α 位 OH 基をアシル化すると、水素結合は切れ、前報⁵⁾ で述べたごとく 17 α 位置換基の立体障害を受けて (IV) の 20 位 CO 基は (II) のそれよりさらに還元され難くなり progesterone よりさらに持続性のある活性を示すものと思う。

また 20 位 CO 基の紫外外部吸収の極大が Fig. 3 に示すごとく (VI) は 285 m μ にあり、その 17 α 位に OH 基を置換した (V) は 295 m μ にあるが、(V) の 3,17-diacetate (VII) は再び 285 m μ に吸収極大を示すようになることより、20 位 CO 基の酸素が (V) では水素結合を生じるため α 側へ向き、(VI) と (VII) では立体障害の関係で β 側に、すなわち 18 位 CH₃ 基と同方向に向いているものと考えられる。

なお、上記の (I) および (IV) を投与した動物の尿の一部分について、17-ketosteroid の測定を行なつた。その結果は 17-ketosteroid 含量には有意の差がないが、(I) の投与後、48 時間の尿中には投与前と比較し、

8) K. H. Kimbel, *et al.*: *Acta Endocrinol.* **28**, 502(1958).

9) 松岡: 日本内分泌学会雑誌 **34**, 1179(1959).

10) M. E. Davis, G. L. Wied: *J. Clin. Endocrinol. and Metabolism* **15**, 923(1955).

11) R. N. Jones, *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 2820(1952).

dehydroepiandrosterone と androsterone と推定されるフラクションの中間のフラクションおよび etiocholanolone と推定されるフラクションがやや増加し、時日の経過にしたがい減少すること、(IV) を投与した際には etiocholanolone と推定されるフラクションは殆んど増加が認められないことを知った。この事実については機会を得て究明したい。

本研究の発表を許可された帝国臓器製薬株式会社社長山口栄一博士、御指導を賜わった東京大学理学部漆原義之教授、鶴見化学研究所長中馬一操博士ならびに当研究部長新延信吉博士に深謝する。なお実験に協力された研究員神戸川 明氏に厚くお礼を申し述べる。

実 験 の 部

尿中の (III) および 17-ketosteroid の定量

実験材料 正常成熟雌家兎 (体重 2.3~2.5 kg) 5 匹を 1 匹ずつ採尿飼育箱に入れ、一定飼料 (オカラ、固形飼料、フスマ、ルーサンミール、無機塩の混合物) で飼育、各 1 匹ずつに (I) の 24 mg をゴマ油に溶解して筋肉注射し、8 日目にさらに各 1 匹ずつ (IV) の 33.1 mg をゴマ油溶液として筋肉注射した。そのおのおのについて時間毎に採尿し合わせてその一部を測定に使用。

Acetaldehyde 量の測定 標準品として (III) の代りに 5-prgnene-3 β ,17 α ,20 β -triol¹²⁾ を使用し、他の操作法は Cox¹³⁾ 法に準じて acetaldehyde 量を測定し、下記の補正式にて補正、acetaldehyde 量より (III) の含量を 48 を換算し、

$$\text{補正值} = E_{570 \text{ m}\mu} - \frac{E_{520 \text{ m}\mu} + E_{620 \text{ m}\mu}}{2}$$

10 cc 中の含量を 48 時間尿量に換算、1 匹の 48 時間尿の含量にし、Table I に示した。(IV) 投与後も (III) が排泄されてきているが、当然 (I) 投与の影響が及んでいるものと考えられ、また 10 cc 中 1.0 γ 以下の測定値は吸光度の読みの誤差範囲に入る。

Table I. Pregnanetriol (III) in the Urine of 5 Female Rabbits after the Injection of (I) and (IV)

Treatment	Time after injection (hr.)	Volume of 48 hr. Urine (cc./rabbit)	(III) in 48 hr. Urine (γ /rabbit)
(I) 24 mg.	0~48	260	2477
	48~96	120	1950
	96~144	482	1184
	144~192	266	669
(IV) 33.1 mg.	0~48	450	250
	48~96	282	50
	96~144	370	29
	144~192	254	18

17-Keto steroid の測定 48 時間尿を集め遠心分離で不溶物を除きその 200 cc に conc H₂SO₄ 20 cc, ホルマリン 5 倍希釈液 4 cc を加え、蒸気浴中で 15 分間加熱、冷後、Et₂O 300 cc, 次いで 200 cc で抽出、抽出液を合し、10% NaOH 50 cc で 2 回、つぎに、水で充分洗浄後、Na₂SO₄ 乾燥、Et₂O を留去、得たる残渣を MeOH に溶かし 10 cc とする。この 0.5 cc を乾固し、これに *m*-dinitrobenzene 0.4 cc, 8N KOH 水溶液 0.2 cc を加え、暗所で 1 時間 incubate, 80% EtOH 4 cc で希釈、ただちに Beckman Model DU Spectrophotometer で 460, 520, 580 m μ の吸光係数を測り Allen の補正式で補正。

Fig. 1.

17-Ketosteroids in the 48 hr. Urine of 5 Female Rabbits after Injection of 17 α -Hydroxyprogesterone and 17 α -Hydroxyprogesterone Caproate

———— 17-Ketosteroid
----- Volume of Urine

12) 和田：本誌 **79**, 982(1959).

13) R. I. Cox, G. F. Marrian: Biochem. J. **54**, 353(1953).

上記 MeOH の残液を乾固，ベンゼンに溶解，アルミナでカラムクロマトグラフィーを行ない，ベンゼン・EtOH 混液で展開，得られたフラクションを上記の如く *m*-dinitrobenzene および KOH で発色し測定した結果を1匹の48時間尿中の含量に換算し Fig. 1, 2 に示す。

Fig. 2. Column Chromatography of 17-Ketosteroids in Female Rabbit Urine

(V) および (VI) の NaBH_4 による還元 (V) および (VI) のそれぞれ 1 g を別の容器に秤取, それぞれについて EtOH 80 cc, NaBH_4 100 mg, 水 1 cc を加え攪拌しながら室温 (31°) に 2 時間放置後, AcOH 含有の水水中に注入, 析出物を濾取, 水洗, 乾燥, (V) より mp $169\sim 178^\circ$ の白色性粉末 1.0 g を得, (VI) より mp $188\sim 210^\circ$ の白色粉末 1.0 g を得.

検量線の作製 (V), (VI) の各試料を種々の濃度の EtOH 溶液とし, Beckman Model DU Spectrophotometer を使用し, (V) は $295\text{ m}\mu$, (VI) は $285\text{ m}\mu$ で測定 (Fig. 4). 吸光係数と濃度は, 直線関係を示すので定量が可能である. (VI) は吸光係数の関係で $1\sim 0.025\%$ を測定, (V) は溶解度の関係で 0.2% 以上の濃度の溶液は測定困難であつた.

Fig. 3.
Ultraviolet Absorption Spectra
(in EtOH)

Fig. 4.
Calibration Curves

Fig. 5.
Ultraviolet Absorption Spectrum
of Progesterone (in EtOH)

還元物の定量 上記の還元で得た粉末を精製することなく, 均等によく混和し, それぞれ 10 mg を秤取, 10 cc の EtOH を加え, 各原料の紫外部の吸収極大にて吸光係数を測定し, Fig. 4 の検量線により未反応物の含量を求めた.