

## 両側卵巢・副腎摘出成熟ラットにおける $\Delta^4$ -Androstenedione の Aromatization 活性に関する研究

岡野有希子

著者が新しく提唱した閉経婦人特発性高エストロゲン症における血清 estrone (以下  $E_1$ ) 高値及び健全閉経婦人への ACTH の投与による血清  $E_1$ , estradiol ( $E_2$ ) 値の増加が認められたことより, それらの生成機序を明らかにする目的で, 卵巢・副腎摘出成熟ラットに  $\Delta^4$ -androstenedione (A) 0.05 mg 腹腔内投与し, RIA で血清  $E_1$ ,  $E_2$  値を測定した. 血清値は, 対照群 (n=13) では,  $E_1$  83.0 $\pm$ 32.8 pg/ml (mean $\pm$ SD, 以下同様),  $E_2$  110.6 $\pm$ 30.5 pg/ml で, 両側卵巢・副腎摘出群 (n=8) では,  $E_1$  29.3 $\pm$ 19.8 pg/ml,  $E_2$  36.8 $\pm$ 19.5 pg/ml で, 両側卵巢・副腎摘出 A 投与群 (n=17) では,  $E_1$  42.2 $\pm$ 12.9 pg/ml,  $E_2$  51.4 $\pm$ 12.7 pg/ml であった.

以上から両側卵巢・副腎摘出成熟ラットでは, 卵巢・副腎以外の末梢組織で A より  $E_1$ ,  $E_2$  がほぼ等量転換生成されることが確認された.

これらの成績は, 末梢で aromatization を通して転換生成されるのは, 主として  $E_1$  であって末梢で転換生成される  $E_2$  はわずかで, ほとんど血清  $E_2$  値に関与しないと指摘されている成績とは合致しないものであった.

また, 末梢における  $E_2$  の生成について以下の二つの経路すなわち (1) A $\rightarrow$  $E_1$  及び A $\rightarrow$ T $\rightarrow$  $E_2$  (2) A $\rightarrow$  $E_1$  $\rightarrow$  $E_2$  が考えられるが, 今回の検索では血中 testosterone の測定が行われていないので, どちらの経路が実際に作動しているかは決定できなかった.

これらの成績は, さらにヒトでのより詳細な研究が望まれるが, 末梢において A の aromatization により,  $E_1$  のみならず  $E_2$  も相当量転換生成されるという成績は, 閉経婦人特発性高エストロゲン症での血清  $E_1$  高値及び健全閉経婦人への ACTH 刺激によってみられる  $E_1$ ,  $E_2$  高値の生成機序を解明する上で, 重要な知見と考えられる.

(平成元年10月27日採用)

### Aromatization of $\Delta^4$ -Androstenedione in Adult Oophorectomized Adrenalectomized Rats

Yukiko Okano

To clarify the mechanisms of biosynthesis involved in higher serum levels of estrone ( $E_1$ ) in patients with postmenopausal idiopathic hyperestrogenism, a condition newly proposed by author, and in higher serum levels of  $E_1$  and estradiol ( $E_2$ ) induced by ACTH administration in healthy postmenopausal women,

川崎医科大学 産婦人科  
(指導: 小川重男教授)  
〒701-01 倉敷市松島 577

Department of Obstetrics and Gynecology (Director:  
Prof. Shigeo Ogawa), Kawasaki Medical School: 577  
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

the aromatization activity of  $\Delta^4$ -androstenedione (A) in the peripheral tissues was studied. Adult oophorectomized, adrenalectomized rats ( $n=17$ ) were given 0.05 mg of A intraperitoneally and the serum levels of  $E_1$  and  $E_2$  were determined 90 minutes after administration by radioimmunoassays.

The serum levels of  $E_1$  and  $E_2$  in control rats ( $n=13$ ) were  $83.3 \pm 32.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) and  $110.6 \pm 30.5$  pg/ml (mean  $\pm$  SD), respectively, while in the oophorectomized, adrenalectomized rats ( $n=8$ ), they were  $29.3 \pm 19.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) and  $36.8 \pm 19.5$  pg/ml (mean  $\pm$  SD). The levels in oophorectomized, adrenalectomized rats with A administration were  $42.2 \pm 12.9$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) and  $51.4 \pm 12.7$  pg/ml (mean  $\pm$  SD).

These findings indicated that serum  $E_1$  and  $E_2$  were evidently biosynthesized through conversions from serum A in other peripheral tissues more than in the ovaries and the adrenal cortex. The amounts of  $E_1$  and  $E_2$  biosynthesized were almost equal. The obtained data were in the consistent with the data in human's indicating that the main product biosynthesized through aromatization in the periphery was  $E_1$  and  $E_2$  biosynthesized through aromatization in the periphery contributed to serum level of  $E_2$  a little.

There are generally considered to be two possible pathways for the biosynthesis of  $E_2$  in the periphery; (1)  $A \rightarrow E_1$  and  $A \rightarrow T \rightarrow E_2$  (2)  $A \rightarrow E_1 \rightarrow E_2$ . Which of these pathways actually plays a role in the biosynthesis of  $E_2$  could not be decided in this experiment because the serum level of testosterone was not determined.

Evidence of the biosynthesis of not only serum  $E_1$ , but also of serum  $E_2$  in moderate amounts through aromatization of A in the periphery might provide important clues for analysis of the mechanisms of biosynthesis of higher serum levels of  $E_1$  in postmenopausal idiopathic hyperestrogenism and of  $E_1$  and  $E_2$  induced by ACTH in healthy postmenopausal women. Therefore, further detailed studies in the human should be carried out. (Accepted on October 27, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(4): 602-608, 1989

**Key Words** ① Aromatization of  $\Delta^4$ -androstenedione ② Estrogen  
③ Oophorectomized adrenalectomized rats

## はじめに

閉経後5年以上が経過しているながら, hyperestrogenism の状態を示す症例がまれではあるが確実に存在することを認め, 著者<sup>1), 2)</sup>は, これらを閉経婦人特発性高 estrogen 症と呼ぶことを提唱し報告したが, その報告において同時に閉経後5年以上経過した健康婦人への ACTH 投与で, 著明な血中 estrone (以下  $E_1$  と略), estradiol (以下  $E_2$  と略) の増加を認

めたことより, これら estrogen の生成機序として, 1) 副腎皮質より直接 estrogen の生成増加, 2) 副腎皮質より androgen の生成増加と末梢での estrogen への転換生成増加のいずれかが関与している可能性を述べた. この解明には卵巣・副腎摘出症例において末梢での androgen より estrogen への転換生成についての検索が必要と考えられるが, これについての報告は少なくわずかに West ら<sup>3)</sup>が乳癌患者で両側性腺, 副腎皮質摘出患者に testosterone

propionate を投与したところ尿中に投与前は認められなかった  $E_1$ ,  $E_2$  が証明されたとの報告と MacDonald ら<sup>4)</sup> が同様に両側性腺、副腎皮質摘出例へ  $^{14}C$ - $4^4$ -androstenedione (以下  $4^4$ -A と略) を投与し血中  $E_1$  の転換生成をみたとする報告のみであり、その詳細は不明の点が多い。以上より閉経婦人特発性高 estrogen 症及び閉経健康婦人の ACTH 投与による血中  $E_1$  値,  $E_2$  値増加の機序を検索する目的で両側卵巢・副腎摘出ラットに  $4^4$ -androstenedione を投与し、血中  $E_1$ ,  $E_2$  の転換生成につき検索したので報告する。

### 実験材料及び方法

1) 対象としてクローズドコロニー, Wistar 系雌ラット (8~10週齢, Charles River Japan Inc.) を用いて、一定照明 (8:00~20:00), 飼育温度  $22 \pm 1^\circ C$ , 湿度 60% の条件下に本学動物飼育センターにおいて飼育した。

8週齢雌ラット 180~200 g を麻酔下に両側卵巢を摘出し、7日後に再度麻酔下にて両側副腎摘出を行い、さらに7日後に、 $4^4$ -A 0.05 mg 腹腔内投与し、その後90分に麻酔下に開腹、下大動脈より採血を行い、血清分離後  $E_1$ ,  $E_2$  を RIA で測定した。両側卵巢は恥骨結合上 1 cm の位置で横切開し、腹腔に至り摘出し、両側副腎は、脊柱より肋骨弓下より 1 cm ずつ外下方の位置で Grollman<sup>5)</sup> の方法に従って摘出した。また臓器摘出後は生理的食塩水に cefatrizine (CFT) 30 mg/kg/匹/日連日投与ないし ciprofloxacin (CPFX) 50 mg/kg/匹/日連日投与を行った。術後の飲水は、すべて生理的食塩水とし、低体温、脱水に留意した。

副腎摘出後ラットには corticosterone (4-Pregnene-11 $\beta$ , 21-dio-3, 20-dione) [Sigma 社製] を 10% エチルアルコールを含む 1.15 mol の生理的食塩水に溶解し、0.1~0.2 mg 1日腹腔内投与を行った。

$4^4$ -A ( $4^4$ -androst-3, 17-dione) は、和光純薬より購入、シリカゲル薄層クロマトグラフ (Kodak 製) で (ベンゼン: 酢酸エチル 3:2)

および (サイクロヘキサン: 酢酸エチル 8:5) の 2系の展開液で展開し、それぞれ単一のスポットであることを確認後、10% エチルアルコールを含む 1.15 mol の生理的食塩水に溶解し、0.05 mg 腹腔内投与した。

臓器摘出、採血時の麻酔にはラットをエーテル吸入下、ネンブタール (1 ml に 50 mg の pentobarbital を含む) を 0.1 ml/100 g 体重腹腔内投与を行って実施した。

また採血は、一定時間 AM 10:00~PM 2:00 に行った。さらに剖検を行い副々腎のないことを確認した。

### 2) radioimmunoassay

(1)  $E_1$  の測定は、Wien 社製 RIA set を用いてその  $^3H$  specific activity は、105 ci/mmol,  $E_1$  結合は 50~60%, 交叉反応性は  $E_1$ -3-sulfate は 19%,  $E_1$ -1-methyl は  $<1\%$ ,  $E_2$ -17 $\beta$  は  $<0.7\%$ , estriol は  $<0.15\%$ , estriol 3 $\beta$ -glucuronide は  $<1.5\%$ , であった。(2)  $E_2$  の測定は、第一ラジオアイソトープ研究所社製  $^{125}I$ -Estradiol RIA キットを用い、その specific activity は 451.5 ci/mmol, 交叉反応性は、 $E_1$  は 4.5%, estriol は 1.0%, testosterone は 1.8% であった。

### 3) 体重測定と腔 smear 検索

各処置ごと、また経過中定期的に体重測定及び腔 smear を採取した。腔 smear は Papanicolaou 染色を行い、estrogen 高値である発情前期の動物は検索から除外した。

実験に使用した動物は同一動物で  $E_1$ ,  $E_2$  の測定を行ったが、その数は対照群 13 匹、両側卵巢摘出群 7 匹、両側卵巢・副腎摘出群 8 匹、両側卵巢・副腎摘出  $4^4$ -A 投与群 17 匹であった。

## 結 果

血清  $E_1$ ,  $E_2$  値をそれぞれ対照群 ( $n=13$ ) では、 $83.0 \pm 32.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD),  $110.6 \pm 30.5$  pg/ml (mean  $\pm$  SD), 両側卵巢摘出群 ( $n=7$ ) では、 $38.3 \pm 29.2$  pg/ml (mean  $\pm$  SD),  $75.5 \pm 11.7$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) であり、両側

卵巢・副腎摘出群 (n=8) では,  $29.3 \pm 19.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD),  $36.8 \pm 19.5$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) であった (Figs. 1, 2).

血清  $E_1$  値は, 対照群と両側卵巢摘出群は, 摘出により  $P < 0.005$  で有意に低下をみたが, 両側卵巢摘出群と両側卵巢・副腎摘出群では後者で低下したが有意差はなかった. 血清  $E_2$  は, 対照群と両側卵巢摘出群で  $P < 0.05$  で有意に低下し, さらに両側卵巢摘出群と両側卵巢・副腎摘出群とは  $P < 0.005$  で有意に低下した.

両側卵巢・副腎摘出  $\Delta^4$ -A 投与群では血清  $E_1$  値は  $42.2 \pm 12.9$  pg/ml で, 両側卵巢・副腎摘出群に対し  $P < 0.0025$  で有意の増加を認めた. 両側卵巢・副腎摘出  $\Delta^4$ -A 投与群では血清  $E_2$  値は  $51.4 \pm 12.7$  pg/ml で両側卵巢・副腎摘出群に対し  $P < 0.01$  で有意の増加を認めた.

術前後の動物の体重の変化は,  $-10\% \sim +20\%$  であった.

腔 smear は, 対照群での採血時の所見では

Estrus 9 匹, Metestrus 3 匹, Diestrus 1 匹で, 当然ながら両側卵巢・副腎摘出群の smear は全例 Diestrus であった. また両側卵巢・副腎摘出  $\Delta^4$ -A 投与群の腔 smear は 17 例中 5 例において, Estrus の所見を示した.

### 考 察

血清  $E_1$  は, 対照群  $83.0 \pm 32.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD 以下同様) で, 両側卵巢摘出群では,  $38.3 \pm 29.2$  pg/ml と低下し, その低下は有意 ( $P < 0.005$ ) であり, さらに両側卵巢摘出に加えて両側副腎摘出を行うと  $29.3 \pm 19.8$  pg/ml と低下したが, これと両側卵巢摘出群の  $E_1$  値とは有意差はなかった. これらの成績からは, 成熟雌ラットでは, その血清  $E_1$  値へは卵巢よりの生成の関与が大であること, それに対する副腎の関与は比較的少ないことが示唆され, また両側卵巢・副腎摘出の状態でも血清中に  $E_1$  が  $29.3 \pm 19.8$  pg/ml 存在することが示されている.

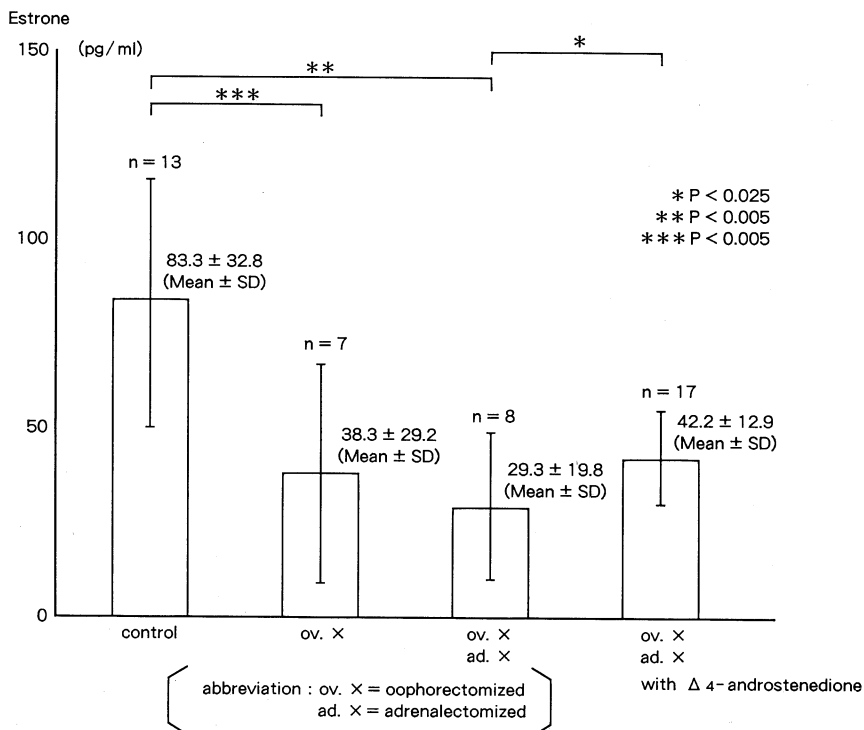


Fig. 1. Serum levels of estrone of adult female rat groups in experiment

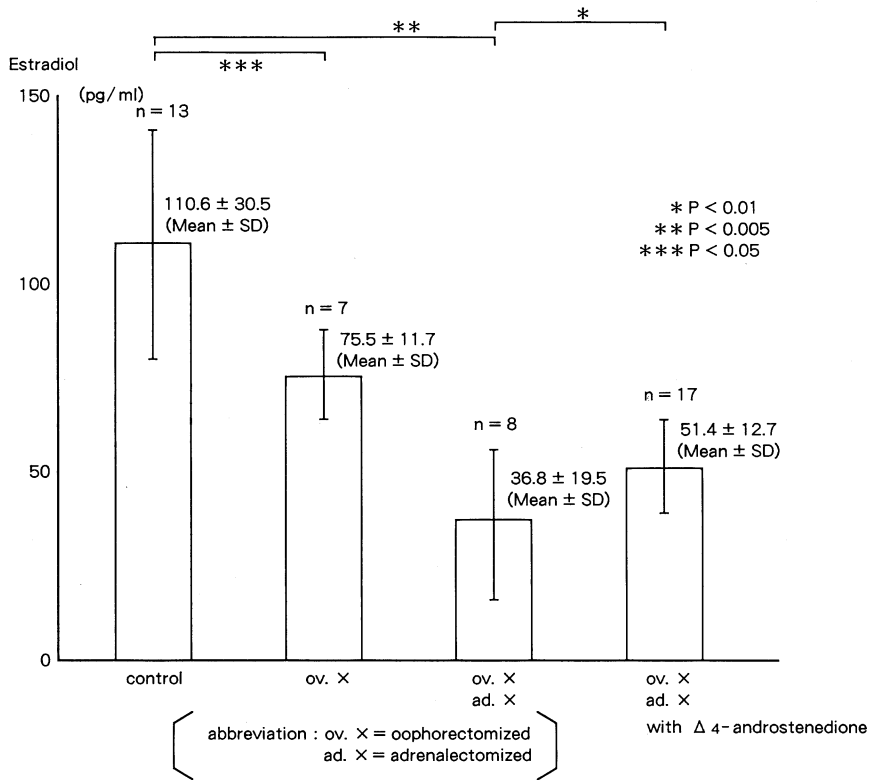


Fig. 2. Serum levels of estradiol of adult female rat groups in experiment

血清  $E_2$  値は、対照群  $110.6 \pm 30.5$  pg/ml で、両側卵巢摘出群では、 $75.5 \pm 11.7$  pg/ml と低下し、その低下は有意 ( $P < 0.05$ ) であり、さらに両側卵巢摘出に加えて両側副腎摘出を行うと  $36.8 \pm 19.5$  pg/ml と有意 ( $P < 0.005$ ) に低下した。これより成熟雌ラットでは、その血清  $E_2$  値へは卵巢より生成の関与、副腎より生成の関与が大であることを示唆されている。ヒトにおいては、一般に卵巢よりの生成は、 $E_2$  が主であり、 $E_1$  は末梢で  $C_{19}$  ステロイドより転換生成されるとされているが、本検索での成熟雌ラットでは卵巢は血清  $E_2$  とともに血清  $E_1$  値への関与が大である成績が示されたが、その原因は動物の差によるものか、また他の因子によるものかは不明であった。また血清  $E_2$  値に対して副腎の関与が大であることが示唆された成績が注目された。血清  $E_1$  の場合と同様、血清  $E_2$  は、両側卵巢摘出の状態でも  $36.8 \pm 19.5$

pg/ml 存在することが認められた。

両側卵巢・副腎摘出後の血清  $E_1$  値、 $E_2$  値についてはその生成部位、生成機序は全く不明で今後の課題であろう。

上述したとおり、血清  $E_1$  値、 $E_2$  値への卵巢・副腎の関与、両側卵巢・副腎摘出群での相当量の血清  $E_1$  値、 $E_2$  値の残存はなお検討すべきであるとは考えられたが、本検索で採用した実験方法が、両側卵巢・副腎摘出動物モデルとして妥当であると判断された。

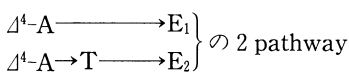
両側卵巢・副腎摘出群に対する  $\Delta^4$ -A 腹腔内投与後 90 分での血清  $E_1$ 、 $E_2$  値は、それぞれ  $42.2 \pm 12.9$  pg/ml、 $51.4 \pm 12.7$  pg/ml で両側卵巢・副腎摘出群の  $E_1$  値、 $E_2$  値とそれぞれ有意 ( $P < 0.025$ ,  $P < 0.01$ ) に増加した。この成績は明らかに卵巢、副腎の存在なしに  $\Delta^4$ -A より  $E_1$ 、 $E_2$  が転換生成されたことを示すものである。

ヒトにおいては、 $C_{19}$  ステロイドより末梢において estrogen が転換生成されることは以前より広く受け入れられているが、それらの報告を検討すると  $\Delta^4$ -A より  $E_1$  の転換生成が Longcope ら<sup>6)</sup> (1969), Grodin ら<sup>7)</sup> (1973), Siiteri ら<sup>8)</sup> (1973), Aiman ら<sup>9)</sup> (1977), MacDonald ら<sup>10)</sup> (1978) により報告されているのがほとんどで、その他の pathway での末梢  $E_1$ ,  $E_2$  転換生成の報告は少ない。

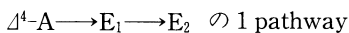
$\Delta^4$ -A より  $E_2$  への転換生成については、Siiteri ら<sup>8)</sup> は、 $\Delta^4$ -A の注射により  $E_1$  が生成されているが、ときに  $E_2$  生成が見られるし、Smuk ら<sup>11)</sup> (1977) は、in vitro でヒト肝組織を  $\Delta^4$ -A を基質として incubate し、 $E_2$  の生成が認められたとし、Naftolin ら<sup>12)</sup> (1975) は、胎児脳組織の incubation で  $E_2$  の生成が見られたとしている。また末梢での  $\Delta^4$ -A より testosterone の転換生成は、Vermeulen ら<sup>13)</sup> (1976), Aiman ら<sup>9)</sup> により報告され、末梢での testosterone より  $E_2$  への転換生成は、見られるのが  $\Delta^4$ -A よりの  $E_1$  への転換に比べると著明に少ないと述べており、in vitro では Mancuso ら<sup>14)</sup> (1965) がヒト胎児肝灌流で  $E_2$  の生成をみとめている。

また Ackerman ら<sup>15)</sup> (1981) は、fibrovascular stromal cell を培養し、 $E_1$  よりの  $E_2$  への転換生成を認めたと報告している。

以上の成績から考察すると本検索で得られた卵巢、副腎以外での末梢での  $\Delta^4$ -A よりの  $E_1$ ,  $E_2$  転換生成は、



または、



のいずれかの代謝経路により転換生成されたものと考えられる。

本検索の結果からは、卵巢・副腎以外の部位で  $\Delta^4$ -A より確実に  $E_1$ ,  $E_2$  が転換されその生

成量もほぼ等しいが、 $E_1$  の生成に続いて  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase により  $E_2$  が生成したのか、 $\Delta^4$ -A より testosterone を経て  $E_2$  が生成したのかは、testosterone の測定が行われていないので今後さらに検索されるべきであると思われる。

## 結 語

閉経婦人特発性高 estrogen 症、健康閉経婦人に ACTH を投与したときに見られる血中 estrone, estradiol 高値の機序を検索する目的で、両側卵巢・副腎摘出成熟雌ラットを使用し、 $\Delta^4$ -androstenedione 投与し、血清 estrone, estradiol を測定し、以下の結果を得た。

1) 血清 estrone, estradiol は、両側卵巢摘出により低下し、両側副腎摘出でさらに低下し、血清値はそれぞれ  $29.3 \pm 19.8$  pg/ml (mean  $\pm$  SD),  $36.8 \pm 19.5$  pg/ml (mean  $\pm$  SD) となり、 $\Delta^4$ -androstenedione 0.05 mg 腹腔内投与して90分後には血清値は、それぞれ  $42.2 \pm 12.9$  pg/ml,  $51.4 \pm 12.7$  pg/ml とそれぞれ有意 ( $P < 0.025$ ,  $P < 0.01$ ) に増加した。これより成熟雌ラットにおいては、卵巢・副腎以外の末梢で  $\Delta^4$ -androstenedione より estrone と estradiol がほぼ等しい量で確実に転換生成されたことが認められた。

2) この末梢での estradiol の転換生成は、 $\Delta^4$ -androstenedione より testosterone を経て転換生成したものであるかは本検索では不明であった。

以上の成績は、著者の提唱する閉経婦人特発性高 estrogen 症、健康閉経婦人への ACTH 投与時の血清 estrone, estradiol 値の増加の機序の解明に重要と考えられた。

稿を終るにあたり本研究の御指導、御校閲をいただいた川崎医科大学産婦人科学教室 小川重男教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Okano, Y.: Idiopathic hyperestrogenism in postmenopausal women. *Kawasaki med. J.* 15 (in press)
- 2) 岡野有希子, 小川重男: 閉経婦人の特発性 hyperestrogenism. *産と婦* 56 : 925—929, 1989
- 3) West, C. D., Dawats, B. L., Sarro, S. D. and Pearson, C. H.: Conversion of testosterone to estrogen in castrated adrenalectomized human females. *J. biol. Chem.* 218 : 409—418, 1956
- 4) MacDonald, P. C., Rombaut, R. P. and Siiteri, P. K.: Plasma precursors of estrogen. I. Extent of conversion of plasma  $\Delta^4$ -androstenedione to estrone in normal males and non-pregnant normal, castrated, and adrenalectomized females. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 27 : 1103—1111, 1967
- 5) Grollman, A.: Biological assay of adrenal cortical activity. *Endocrinology* 29 : 855—861, 1941
- 6) Longcope, C., Kato, T. and Horton, R.: Conversion of blood androgens to estrogens in normal adult men and women. *J. clin. Invest.* 48 : 2191—2201, 1969
- 7) Grodin, J. M., Siiteri, P. K. and MacDonald, P. C.: Source of estrogen production in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130 : 448—455, 1978
- 8) Siiteri, P. K. and MacDonald, P. C.: Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. *In Handbook of physiology*, ed. by Greep, R.O. and Astwood, E.B. Washington D.C., American Physiology Society. 1973, pp. 615—629
- 9) Aiman, J., Nalic, R. H., Jacobs, A., Porter, J. C., Edman, C. D., Vellios, F. and MacDonald, P. C.: The origin of androgen and estrogen in a virilized postmenopausal woman with bilateral benign cystic teratomas. *Obstet. Gynecol.* 49 : 695—704, 1977
- 10) MacDonald, P. C., Edman, C. D., Hemsell, D. L., Porter, J. C. and Siiteri, P. K.: Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 130 : 448—455, 1978
- 11) Smuk, M. and Schwerts, J.: Aromatization of androstenedione by human adult liver in vitro. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 45 : 1009—1012, 1977
- 12) Naftolin, F., Ryan, K. J., Davis, I. J., Reddy, V. V., Flores, F., Petro, Z. and Kuhn, M.: The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent. Prog. Horm. Res.* 31 : 295—319, 1975
- 13) Vermeulen, A.: The hormonal activity of the postmenopausal ovary. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 42 : 247—253, 1976
- 14) Mancuso, S., Dell'Acqua, S., Eriksson, G., Wiquist, N. and Deczfalusy, E.: Aromatization of androstenedione and testosterone by the human fetus. *Steroids* 5 : 183—197, 1965
- 15) Ackerman, G. E., Smith, M. E., Mendelson, C. R., MacDonald, P. C. and Simpson, E. R.: Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 53 : 412—417, 1981