

胎児胎盤系由来の 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate に関する研究 —妊娠中毒の防御物質と推定されるアンチオキシダント—

高梨香織

Studies on 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate Derived from Fetoplacental Unit: The Antioxidant as a Potential Defense Substance Against Preeclampsia

Kaori TAKANASHI

Laboratory of Pharmaceutical Analysis, Hokkaido College of Pharmacy,
7-1 Katsuraoka-cho, Otaru 047-0264, Japan

(Received January 31, 2003)

The antioxidant 2-hydroxyestradiol 17-sulfate (2-OH-E₂-17-S) was found to be present in the placenta and to prevent the onset of preeclampsia. From experiments using rats, 2-OH-E₂-17-S was confirmed to be a highly functional compound with stronger antioxidant activity than α -tocopherol and to sustain its antioxidant activity. 2-OH-E₂-17-S was confirmed to be produced in the placenta from its precursor, estradiol 17-sulfate (E₂-17-S), which is derived from fetal testosterone sulfate (TS). Since the fetal adrenal gland has been shown to convert testosterone (T) into TS, the following metabolic pathway may exist during pregnancy: T→TS→E₂-17-S→2-OH-E₂-17-S. This fetoplacental pathway may contribute to the maintenance of healthy pregnancy. Details and the experimental outline of these discoveries are reported in this review.

Key words—estradiol 17-sulfate; 2-hydroxyestradiol 17-sulfate; antioxidant; preeclampsia

1. はじめに

妊娠中毒症は妊娠 20 週から産褥期までの期間に高血圧、蛋白尿、浮腫などの症状を呈する疾患で、今でも周産期死亡や妊産婦死亡の原因となっている。¹⁾同症発症の原因は、ともに胎盤由来の過酸化脂質と抗酸化物質（アンチオキシダント）の量的バランスの崩壊により過剰となった過酸化脂質による血管内皮細胞傷害とされている。^{2,3)}この内因性アンチオキシダントとしてスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、 α -トコフェロール (α -Toc) などが想定されてきた⁴⁻⁶⁾が、いずれも妊娠期特有のものではないことから積極的に支持されていない。⁷⁾これに対し、強い抗酸化作用を有する 2-hydroxyestradiol (2-OH-E₂) 又は 2-hydroxyestrone (2-OH-E₁) が候補に挙げられている^{8,9)}が、その低い血中濃度¹⁰⁾ゆえに作用が説

明できないまま現在に至っている。一方、著者は 2-hydroxyestradiol 17-sulfate (2-OH-E₂-17-S) を有力候補と想定し、その検討を行ってきた。

現在、2-OH-E₂-17-S が妊娠期のアンチオキシダントであることが明確になりつつも、唯一のものであるかいは断定できないという状況にある。しかし、一連の研究を通じて筆者らは、妊娠期の 2-OH-E₂-17-S の産生には胎児胎盤系の生合成経路が関与することをほぼ明らかにした。以下、そこに至った経緯について概説する。

2. ヒト尿中 Estradiol 17-Sulfate の検出 (研究の発端)

エストロゲン代謝の特徴として抱合形式の多種多様性が挙げられる。抱合基の種類、抱合部位、それらの組み合わせによる多彩性に加え、エストロゲン独特の抱合例は枚挙にいとまがない。¹¹⁻¹⁶⁾しかし、この種の抱合に関する膨大な資料の中にあって、estradiol (E₂) の単純な抱合体である estradiol 17-sulfate (E₂-17-S) の生成はニワトリ、¹⁷⁾ラット¹⁸⁾での *in vitro* 実験を除き事例がない。ヒトでの報告がないことに奇異を感じ、その存否の確認を試みた。

北海道薬科大学薬品分析学研究室 (〒047-0264 小樽市桂岡町 7-1)

e-mail: kaori-kt@hokuyakudai.ac.jp

*本総説は、平成 14 年度日本薬学会北海道支部奨励招待講演の受賞を記念して記述したものである。

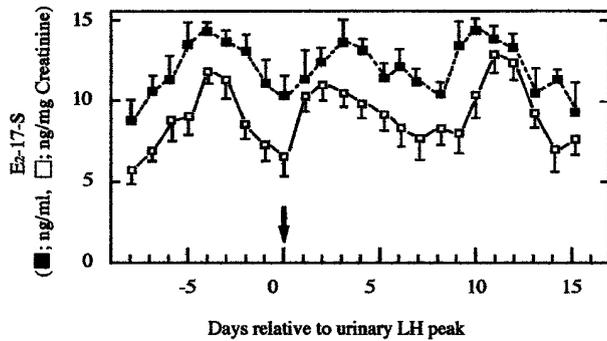


Fig. 1. Urinary Estradiol 17-Sulfate (E_2 -17-S) Levels throughout the Menstrual Cycle

The results are mean \pm SD for nine adult women and are synchronized with the urinary LH peak shown by the arrow (0 day).

抗 E_2 -17-S 抗体によるラジオイムノアッセー (RIA) 法¹⁹⁾を用いてヒト尿を調べたところ、それまでヒトを含め実験動物にもその存在が知られていなかった E_2 -17-S が初めて検出、確認された。²⁰⁾ その値 (平均値) は成人男子では 8.2 ng/ml (5.7 ng/mg creatinine), 同女子では 12.1 ng/ml (9.8 ng/mg creatinine) であった。興味あることは、月経周期における尿中 E_2 -17-S 量が黄体形成ホルモン (LH) のピークを基点としたその前後 3—4 日と月経開始数日前とに合計 3 つのピークを持つ、3 峰性の排泄パターンを示すことであった (Fig. 1)。この結果は、 E_2 -17-S は単なる排泄型抱合体ではなく、何らかの生理的役割を持つことを意味し、特に妊娠との関連性に興味を抱かせるものであった。

3. 妊婦尿及び血中 Estradiol 17-Sulfate の検出とその測定

妊娠時、 E_2 -17-S は何らかの生理的機能を果たしているものと推定され、そこでその尿中排泄量及び血清中濃度の測定を RIA¹⁹⁾ により試みた。その結果、 E_2 -17-S は妊婦尿²¹⁾ 及び血中²²⁾ に間違いなく存在すること、かつ妊娠の進行とともにその濃度は上昇することが分かった (Figs. 2, 3)。

妊娠 7, 8, 9 及び 10 ヶ月の E_2 -17-S 値はそれぞれ、 15.0 ± 2.3 (mean \pm SE, $n=38$), 17.0 ± 2.2 ($n=36$), 23.5 ± 2.4 ($n=42$) 及び 41.1 ± 4.7 ($n=54$) ng/ml であった。妊婦尿中 E_2 -17-S 値は妊娠初期 (—18 週) では非妊娠時の範囲内であるが、20 週を過ぎると徐々に増加し、妊娠 10 ヶ月での値は非妊娠時の 5—10 倍高値であった。しかし、分娩後は急減し、8 及び 24 時間後ではそれぞれ 7.0 ± 0.9 ($n=10$), 5.8

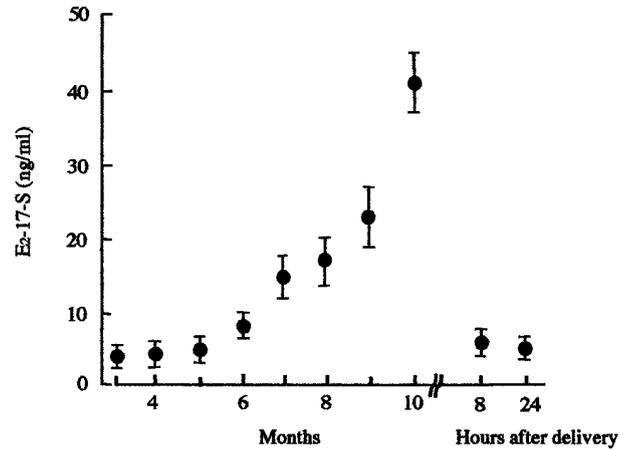


Fig. 2. Urinary Estradiol 17-Sulfate Levels during Pregnancy and after Delivery

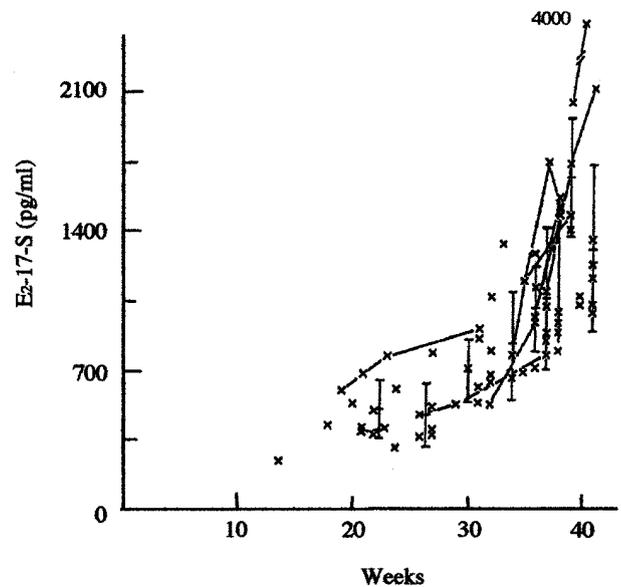


Fig. 3. Serum Estradiol 17-Sulfate Levels in Peripheral Venous Blood of Pregnant Women

The calculated values are by month for 6—9 months and by week from the tenth month of gestation. Each solid line connects samples from same person. Mean \pm SD, $n=66$.

± 0.6 ($n=10$) ng/ml であった。

妊婦血中 E_2 -17-S も妊娠 20 週頃から増加し始め、妊娠 6, 7, 8, 9 及び 10 ヶ月の値はそれぞれ、 431 ± 129 (mean \pm SD, $n=8$), 404 ± 141 ($n=8$), 597 ± 138 ($n=6$), 717 ± 234 ($n=11$) 及び 1040 ± 333 ($n=22$) pg/ml であった。また、分娩後は尿同様に急減し、8 時間後には 600 pg/ml にまで減少した。これらの結果から、 E_2 -17-S が妊娠の (健常) 維持に関わっている可能性が考えられ、次の実験を行った。

分娩時における臍動・静脈血中の E_2 -17-S 量を測

定し、分娩直後の母体末梢静脈血中のそれと比較した。²³⁾ 臍動・静脈血中 E₂-17-S 値 (mean ± SD) はそれぞれ 1450 ± 490 (n = 14) 及び 1510 ± 640 (n = 13) pg/ml と得られ、一方、母体末梢血中の E₂-17-S 値は 1220 ± 540 (n = 14) pg/ml であった。母体血中濃度と臍帯血中のそれとの有意差は認められなかったが、母体血中濃度の方が低い傾向にあることと、分娩後に急減することから、妊娠期の E₂-17-S は主に胎盤由来であると推測された。

4. 妊娠期 Estradiol 17-Sulfate の起源

E₂-17-S の前駆体としては E₂ が真っ先に思い浮かぶが、胎盤はその 17 位硫酸抱合能を持たない²⁴⁾ ので否定される。筆者は、胎児副腎が testosterone (T) から testosterone sulfate (TS) への変換能を持つことを見出した Adams の報告²⁵⁾ に注目し、妊娠期の TS が E₂-17-S の前駆体になり得ると推定した。ヒト胎盤での TS の芳香環化 (aromatization) は既に Cheatum らにより否定されている²⁶⁾ が、分析法の面で十分に検討されているとは言えない。再検討の余地があると思われる、ヒト胎盤ミクロゾーム (Ms) による TS の芳香環化を①ラジオ TLC 法、②HPLC 法、③GC-MS 法、④逆アイソトープ希釈法、⑤³H-水生成法、⑥阻害実験などで分析した。その結果、TS の E₂-17-S への変換が立証された。²⁷⁾ TS の芳香環化のみかけの K_m 及び V_{max} 値 (³H-水生成法) を testosterone のものと合わせて Table 1 に示した。両者の代謝効率 (V_{max}/K_m) を比較すると、T に比べ TS の芳香環化能は低いが、妊娠時には T のほとんどは TS として存在する²⁸⁾ ことを考えると、胎盤での E₂-17-S 生成はかなり高い割合で行われていると推定される。

以上の結果は、妊娠期に産生量が著増するにもかかわらず、その生理的意義が不明であった TS の合目的性は E₂-17-S の前駆体であること、及び妊娠期、T → TS → E₂-17-S という代謝系が胎児胎盤系で機能

していることを示している。このことは、妊娠期における E₂-17-S の役割は何かという新たな問題を提起した。

同時期、本庄らは、妊娠末期の妊婦血中 E₂-17-S と過酸化脂質量を比較し、両者は負の相関関係にあることを見出した。²³⁾ これは E₂-17-S がアンチオキシダントとして妊娠の健常化に関わっている可能性を示唆するものであった。しかし、後述するように E₂-17-S 自体は抗酸化能は弱く、アンチオキシダントとして直接作用するとは考えにくい。筆者は、E₂-17-S はラット肝 Ms によりその 2 位水酸化体に変換されること、²⁹⁾ 及びヒト妊娠期に胎盤で estrone (E₁) 及び E₂ がそれぞれ抗酸化作用の強い 2-OH-E₁³⁰⁾ や 2-OH-E₂ に代謝されること³¹⁾ から、ヒト妊娠期の E₂-17-S は胎盤で 2-hydroxyestradiol 17-sulfate (2-OH-E₂-17-S) に変換され、これが抗酸化作用を呈していると推測した。事実ならば、妊娠期 E₂-17-S から 2-OH-E₂-17-S への変換が生じていることになる。

5. 妊婦尿及び血中 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate の検出と測定

2-OH-E₂-17-S が妊婦尿及び血中にも存在することが予想されたので、健常妊娠、妊娠中毒症又は妊娠性高血圧症 (PIH) 妊婦の尿及び血中濃度を RIA²⁷⁾ によって測定した。

5-1. 妊婦尿中 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate 値

予想通り、尿中に 2-OH-E₂-17-S が検出され、測定できた。健常及び妊娠中毒症妊婦での結果を Fig. 4 に示した。³³⁾

健常妊婦の妊娠第 1, 第 2 及び第 3 三ヵ月期における尿中 2-OH-E₂-17-S 量はそれぞれ、2.0 ± 0.6 mean ± SD, n = 13), 5.3 ± 1.3 (n = 21) 及び 15.3 ± 2.0 (n = 54) µg/mg creatinine であった。第 3 期の 2-OH-E₂-17-S 量は第 1 及び第 2 三ヵ月期と比べてそれぞれ 7 倍及び 3 倍高く、同期の E₂-17-S 値と比べると約 370 倍も高値であったことから、妊娠末期 2-OH-E₂-17-S は大量に必要とされることが推測された。一方、妊娠中毒症の場合の第 3 三ヵ月期の平均値は 3.9 ± 1.9 µg/mg creatinine (n = 12) で、健常妊娠の場合の約 1/4 と低く、2-OH-E₂-17-S の不足が同症と関係深いことが示唆された。分娩後 (2—24 時間) その値は 0.15 µg/mg creatinine (n = 10) 以下にまで減少した。

Table 1. Comparison of Apparent K_m, V_{max} Values and V_{max}/K_m (Metabolic Efficiency) of the Aromatization of Testosterone (T) and Testosterone Sulfate (TS) by Human Placental Microsomes

Substrate	K _m (µM)	V _{max} (nmol/mg protein/30 min)	V _{max} /K _m
T	1.0	1.3	1.3
TS	37.4	0.1	0.0027

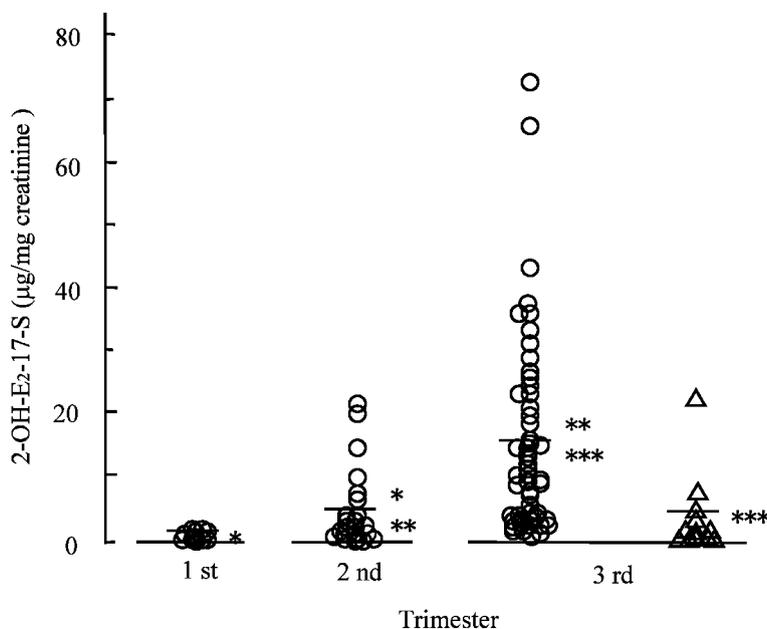


Fig. 4. Urinary 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate (2-OH-E₂-17-S) Concentrations during Pregnancy and the Comparison in the Third Trimester between Healthy Pregnancy and Preeclampsia

○: healthy pregnant women, △: preeclamptic women. Horizontal bars indicate the mean urinary 2-OH-E₂-17-S concentrations for each group. *: $p < 0.05$, comparison between the first and second trimesters, **: $p < 0.01$, comparison between the second and third trimesters, ***: $p < 0.01$, comparison between healthy pregnancy and preeclampsia in the third trimester.

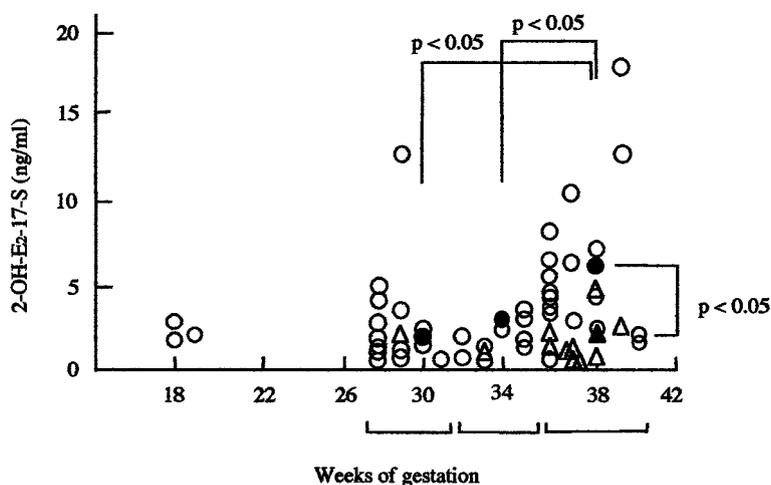


Fig. 5. Serum 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate Levels in Peripheral Blood of Normal Pregnant Women (○: $n=56$) and Pregnant Women with PIH (△: $n=9$)

Closed circles (●) and triangle (▲) show mean values of the serum levels of 2-OH-E₂-17-S at 28–31, 32–35 and 36–40 weeks of normal gestation, and 36–40 weeks of PIH, respectively.

5-2. 妊婦血中 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate の意味 2-OH-E₂-17-S は妊婦血中にも検出され、妊娠の進行とともにその濃度に増加の傾向が見られた (Fig. 5).³⁴⁾ 28–31 週, 32–35 週及び 36–40 週における血中 2-OH-E₂-17-S 値はそれぞれ, 1.72 ± 0.34 (mean \pm SD, $n=10$), 3.08 ± 0.44 ($n=21$) 及び 6.74 ± 1.24 ($n=17$) ng/ml であった。妊娠末期にお

けるその濃度は同時期での血中 E₂-17-S 値の約 7 倍高かった。一方, PIH 妊婦における 36–40 週のそれは 1.70 ± 0.47 ($n=7$) ng/ml で, 健常妊娠より約 75% も低値であった。健常妊娠と PIH 妊婦間の血中値の大きな差は, 妊娠の健常化に 2-OH-E₂-17-S が関わっていることを示唆する。

5-3. 妊娠期 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate の産

生部位 E₂-17-S の 2 位水酸化の生起部位を知る手掛かりとして臍帯血中 2-OH-E₂-17-S 濃度を測定し、母体血中のそれと比較した。³⁴⁾ その結果、母体末梢血、臍動・静脈血中の 2-OH-E₂-17-S 濃度はそれぞれ 2.93±0.90 (mean±SE, n=8), 9.27±1.57 (n=8) 及び 6.48±1.40 (n=8) ng/ml と得られ、臍動・静脈血中 2-OH-E₂-17-S レベルが母体血中のそれより高いことから、2-OH-E₂-17-S の産生は胎児と胎盤の共同作業によると推定された。

6. 胎盤の Estradiol 17-Sulfate 2 位水酸化能

妊娠期、E₂-17-S の 2 位水酸化の生起が明らかになった。2-OH-E₂-17-S の産生部位は、妊婦尿及び血中値が分娩とともに急減し、直ちに妊娠初期の値に戻ることに、及び臍帯血中 2-OH-E₂-17-S 濃度が母体末梢血中のそれより高いことから母体ではなく、胎児と胎盤が主であると考えられた。そこで、ヒト胎盤 Ms による E₂-17-S から 2-OH-E₂-17-S への変換能を調べた。³⁵⁾

E₂-17-S を、NADPH 産生系下ヒト胎盤 Ms と反応させ、反応物を HPLC 分析した。その結果、4-

hydroxyestradiol 17-sulfate (4-OH-E₂-17-S) をわずかに伴って 2-OH-E₂-17-S の酵素的生成が確認された。

E₂-17-S の 2 及び 4 位水酸化のみかけの K_m 及び V_{max} 値は Table 2 に示した通りである。参考として Juchau らによる E₂ の 2 及び 4 位水酸化の両パラメータ³⁶⁾も並記した。注目すべきは、代謝効率の比較より、E₂-17-S はヒト胎盤 Ms のエストロゲン 2 又は 4 位水酸化酵素に対して E₂ よりも適した基質と言えることである。E₂-17-S の 2 位水酸化の代謝効率 5.4 は E₂ の 0.07 に対して約 80 倍も高い。4 位水酸化についても同様の傾向が認められ、E₂ の 0.04 に対して E₂-17-S は 0.4 と約 10 倍高かった。一般に、P450 は抱合型よりも遊離型ステロイドに対して高い反応性を示すので、この結果は極めてユニークと言える。同じ傾向は精製したラット肝 P450 による E₂ と E₂-17-S 代謝の比較でも観察された³⁷⁾ので、E₂-17-S は phase I 反応酵素に対して親和性の高い基質であると言えよう。

今回明らかになった事実は、ヒト妊娠期、胎児胎

Table 2. Comparison of Apparent K_m, V_{max} Values and Metabolic Efficiency of Human Placental Microsomal 2- and 4-Hydroxylations between Estradiol 17-Sulfate (E₂-17-S) and Estradiol (E₂)

Substrate	Hydroxylation	K _m (μ M)	V _{max} (pmol/mg protein/10 min)	V _{max} /K _m
E ₂ -17-S	2	44.0	236	5.4
	4	360	140	0.4
E ₂ ¹⁾	2	125	9.1	0.07
	4	125	4.5	0.04

1) Citation from the results by Juchau *et al.*³⁶⁾

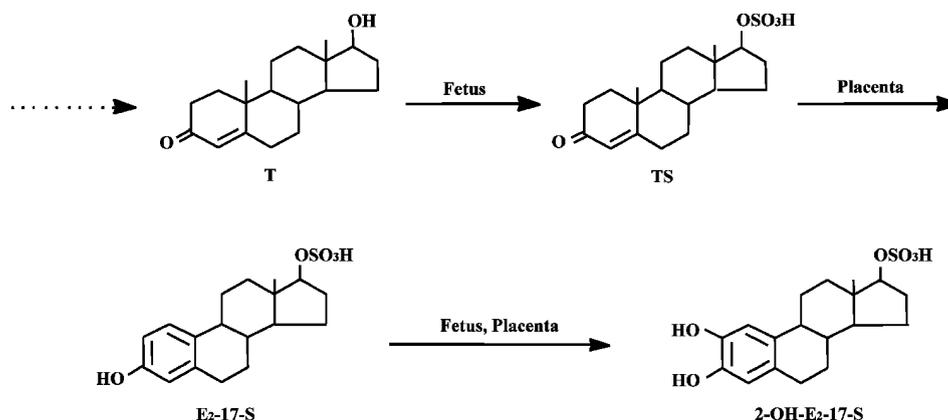


Chart 1. Metabolic Pathway for the Formation of 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate during Pregnancy

T: testosterone, TS: testosterone sulfate.

盤系の共同作業による一連の代謝経路 (T→TS→E₂-17-S→2-OH-E₂-17-S, Chart 1) が存在すると言うことで、この経路の合目的性はオキシダントの攻撃から免れるために胎児自らが胎盤の力を借りてアンチオキシダント産生のために営む作業と捉えられよう。

7. Estradiol 17-Sulfate 及びその代謝物の抗酸化能

妊娠期における E₂-17-S から 2-OH-E₂-17-S への変換経路の存在が明らかになった。課題として代謝物の抗酸化能の検証が残されていた。そこでラット肝 Ms 脂質過酸化に対する 2- 及び 4-OH-E₂-17-S の抗酸化能を調べ、遊離型カテコールエストロゲンと関連する類似ステロイドの抗酸化能を比較した。³⁸⁾

7-1. 脂質過酸化に対するエストロゲンの抗酸化作用 ラット肝 Ms の脂質過酸化に対するエストロゲン類と α -トコフェロール (α -Toc) の抗酸化効果をチオバルビツール酸 (TBA) 法³⁹⁾を用いて調べ、その結果を Table 3 に示した。参考までに、用いたエストロゲンの構造式を Fig. 6 にまとめて示した。エストロゲン無添加時の TBA 値を 100% とし、各種エストロゲンが TBA 値を 50% 阻害する時の濃度 (IC₅₀, μ M) で示した。

NADPH 及び AsA の両依存系において 2-OH-E₂ 及び 4-hydroxyestradiol (4-OH-E₂) は最も強い抑制効果を示し、これは中野らの報告⁸⁾と一致するものであった。一方、2-OH-E₂-17-S 及び 4-OH-E₂-17-S は遊離型に比べてその効果は弱いものの、AsA 依存系では α -Toc につぎ、NADPH 依存系では α -Toc よりかなり強い抗酸化能を有することが分かった。Estrone (E₁) や E₂ は AsA 依存系では作用が低いが、NADPH 依存系では比較的強い効果を示した。E₁ や E₂ などの遊離型フェノール類は、NADPH 依存系で一部がカテコールエストロゲンに変換されたことによる効果と考えられる。Estradiol (E₂) は AsA 依存系で若干作用は認められたが、両系での抗酸化能は低かった。E₃ は極性が高いためカテコール体へ変換されにくく、そのため NADPH 依存系で作用が認められなかったものと思われる。このような傾向は、E₃ と同様に極性の高い B 環水酸化体 (6 α -, 6 β - 及び 7 α -OH-E₂) の場合にも観察された。2-methoxyestradiol (2-MeO-E₂), 4-methoxyestradiol (4-MeO-E₂) は NADPH 依存系では α -Toc より強く、AsA 依存系では同程度の抑制効果を示した。

Table 3. IC₅₀ Values of α -Tocopherol and Various Estrogens on Microsomal NADPH- and AsA-Dependent Lipid Peroxidation in Rat Liver¹⁾

Compound ³⁾	IC ₅₀ (μ M) ²⁾	
	NADPH-dependent	AsA-dependent
α -Toc	63	2.7
2-OH-E ₂	2.2	1.3
4-OH-E ₂	2.1	0.5
2-OH-E ₂ -17-S	2.2	6.6
4-OH-E ₂ -17-S	6.5	7.9
E ₁	2.2	32
E ₂	6.6	10
E ₃	100	56
E ₂ -17-S	> 100	> 100
E ₂ -3-S	49	> 100
E ₁ -S	44	> 100
6 α -OH-E ₂	> 100	> 100
6 β -OH-E ₂	> 100	> 100
7 α -OH-E ₂	> 100	> 100
2-MeO-E ₂	6.2	2.0
4-MeO-E ₂	14	8.3
2-MeO-E ₂ -17-S	67	30
4-MeO-E ₂ -17-S	38	21

1) The results were obtained by TBA method.

2) Mean values (n=5).

3) α -Toc: α -Tocopherol, E₁: estrone, E₂: estradiol, E₃: estradiol, 2-OH-E₂: 2-hydroxyestradiol, 4-OH-E₂: 4-hydroxyestradiol, 2-MeO-E₂: 2-methoxyestradiol, 4-MeO-E₂: 4-methoxyestradiol, 6 α -OH-E₂: 6 α -OH-E₂: 6 α -hydroxyestradiol, 6 β -OH-E₂: 6 β -hydroxyestradiol, 7 α -OH-E₂: 7 α -hydroxyestradiol, E₂-17-S: estradiol 17-sulfate, 2-OH-E₂-17-S: 2-hydroxyestradiol 17-sulfate, 4-OH-E₂-17-S: 4-hydroxyestradiol 17-sulfate, 2-MeO-E₂-17-S: 2-methoxyestradiol 17-sulfate, 4-MeO-E₂-17-S: 4-methoxyestradiol 17-sulfate, E₂-3-S: estradiol 3-sulfate, E₁-S: estrone sulfate.

NADPH 依存系では、脱 O-メチル化により一部カテコール体に変換されるのでそれによる効果が考えられる。2-methoxyestradiol 17-sulfate (2-MeO-E₂-17-S), 4-methoxyestradiol 17-sulfate (4-MeO-E₂-17-S) は両依存系においてほぼ等しい抗酸化作用を示した。3 位抱合型の estradiol 3-sulfate (E₂-3-S) 及び estrone sulfate (E₁-S) は AsA 依存系では全く作用は認められなかったが、NADPH 依存系では α -Toc と同程度の抑制効果を示した。これは、NADPH 依存系において、3 位抱合基が加水分解され、生成したフェノールの一部がカテコール体へ変換されたことによると考えられる。

これらの結果から、NADPH 依存系で認められたエストロゲンの抗酸化作用には、その代謝物による影響があると考えられる。このことは次の実験が

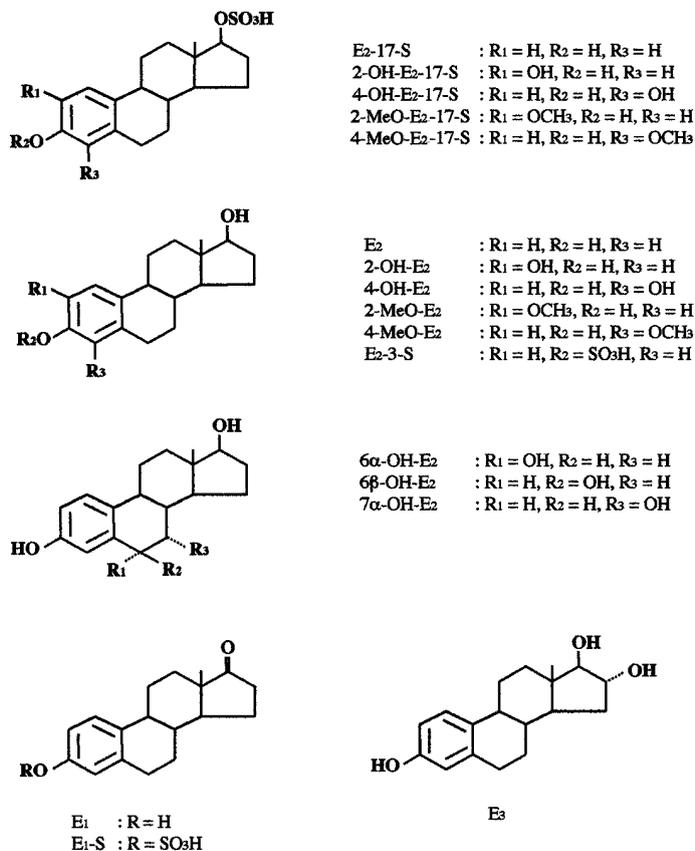


Fig. 6. Chemical Structures of Estrogens Used in This Study

Table 4. Yields of the Main By-Products Formed from Various Estrogens in NADPH (a)- and AsA (b)-Dependent Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes

Estrogen	By-products or steroids recovered and their yields (%)											
	E ₁		2-OH-E ₁		E ₂		2-OH-E ₂		2-MeO-E ₂		2-OH-E ₂ -17-S	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
E ₂	—	—	—	—	87	97	12	0.2	—	—	—	—
E ₂ -17-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.1	<0.01
2-MeO-E ₂	—	—	—	—	—	—	2.6	0.2	92	96	—	—
2-MeO-E ₂ -17-S	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	0.5
E ₁ -S	84	90	0.4	0.1	10	0.5	—	—	—	—	—	—
E ₂ -3-S	5.0	5.0	—	—	85	91	0.6	0.05	—	—	—	—

Incubation conditions: estrogen concentration: 25 μ M, incubation time: 30 min ($n=3$).

Each value represents mean value, —: not detected.

ら支持された。

7-2. インキュベーションによる副生物の確認
ステロイドが示した抗酸化作用にはインキュベーション中に酵素的あるいは非酵素的に生成したカテコール体による可能性が考えられたので、確認のためフェノール又はグアヤコール型ステロイドを

NADPH 及び AsA 依存系でインキュベーションし、生成物を HPLC 測定した。得られた結果を Table 4 に示した。

NADPH 依存系では、E₂ の約 12% が 2-OH-E₂ に変換され、E₂-17-S からその 2 位カテコールが約 0.1% 生じた。グアヤコール体の脱 O-メチル化も認

められ、2-MeO-E₂ の 2-OH-E₂ への変換は約 2.6%、2-MeO-E₂-17-S のそれは約 0.5%であった。3 位硫酸根の脱離とそれに続く生成フェノールからのカテコール体への変換も観察された。E₁-S から E₂ の、E₂-3-S から E₁ の生成はそれぞれ約 10%及び約 5%であった。これに対して 17 位硫酸根の脱離は認められず、このことから酸化反応は、17 位硫酸根が保持されたまま進行することが分かった。NADPH 系に比べて副生成物の量は低いものの、同様な傾向は AsA 依存系でも認められたが、副生成物の量は NADPH 依存系でのその 1/2—1/10 倍であった。このことから、遊離型フェノールの抗酸化作用にはカテコール体への変換が必要であると言える。このことは、Ruiz-Larrea らが E₂ の抗酸化能を検討した時、NADPH 存在時のみ作用が認められたこと⁴⁰⁾からも分かる。

7-3. 各種エストロゲンの抗酸化作用 TBA 法は簡便ではあるが夾雑物による影響の大きいことが知られている。⁴¹⁾ そこで、 α -Toc と同等あるいはそれ以上の抑制効果を示した 11 種のエストロゲン及び E₂-17-S について NADPH 依存系脂質過酸化に対する阻害効果をヘモグロビン—メチレンブルー法⁴²⁾で測定し、得られた結果を Table 5 に示した。

4-OH-E₂ が最も作用が強く、これに 2-OH-E₂、2-MeO-E₂ 及び E₂ が続き、いずれも α -Toc より強い効果を示した。2- 及び 4-OH-E₂-17-S も α -Toc の 2

—5 倍の作用が認められた。

2-OH-E₂-17-S の抗酸化効果は 2-OH-E₂ に比べて若干劣るものの、 α -Toc より強い作用を示すことが分かった。

8. 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate の血中動態と抗酸化能

妊娠中毒を防御する内因性アンチオキシダントとして 2-OH-E₂-17-S を想定する上で解決すべき問題がいくつか残っている。はたして 2-OH-E₂-17-S は *in vivo* で抗酸化能を効果的に発揮できるのか？血中濃度が著しく低いと言われる 2-OH-E₂¹⁰⁾ は抗酸化機構にどのように関与しているのか？これらを解決するため 2-OH-E₂ 及び 2-OH-E₂-17-S 処理ラットの肝 Ms の抗酸化能を調べた。

8-1. 脂質過酸化に対する両カテコール投与の効果 2-OH-E₂ 又は 2-OH-E₂-17-S をラットに投与し、肝 Ms の NADPH 又は AsA 依存系脂質過酸化に対する影響を調べた。

Figure 7 は、ステロイド非投与（コントロール）群の肝 Ms の過酸化脂質量を 100%とし、横軸に投与後の時間、縦軸に過酸化脂質量をプロットしたものである。NADPH 及び AsA 依存系において 2-OH-E₂ と 2-OH-E₂-17-S はともに投与量に比例して脂質過酸化を抑制しているが、抑制効果の発現型式と持続性に明らかな違いが見られる。

投与後 2 時間における 2-OH-E₂ の抗酸化能は、いずれの投与量でも 2-OH-E₂-17-S の約 2 倍を示したが、これは *in vitro* での比約 1.8 倍³⁸⁾にほぼ等しく、*in vitro* での抗酸化能が *in vivo* で再現されている。しかし、投与後 5 時間では両者の抗酸化能はほぼ等しくなり、12 時間後では完全に逆転した。このことから、2-OH-E₂ と 2-OH-E₂-17-S の抗酸化能は発現形式で異なるものと考えられる。すなわち、前者は速効的に、後者は遅効的に抗酸化能を発揮すると言える。

8-2. 血中ステロイドの測定 過酸化抑制作用の持続性に差が生じた原因の 1 つとして、両カテコールの血中からの消失速度が関与していると推定された。確認のため、カテコール投与ラットの血中カテコール及びそれらの O-メチル化代謝物を一定時間ごとに定量した。

Figure 8(A) は 2-OH-E₂ 350 nmol/100 g 体重投与群における投与後 15 分での血中ステロイド画分の

Table 5. IC₅₀ Values of α -Tocopherol and Various Estrogens on Rat Liver Microsomal NADPH-Lipid Peroxidation¹⁾

Compound	IC ₅₀ (μ M) ²⁾
4-OH-E ₂	0.7
2-OH-E ₂	1.2
2-MeO-E ₂	1.3
E ₂	1.7
2-OH-E ₂ -17-S	2.2
4-MeO-E ₂	4.8
4-OH-E ₂ -17-S	5.3
E ₁	8.4
α -Toc	10
E ₁ -S	15
2-MeO-E ₂ -17-S	18
4-MeO-E ₂ -17-S	26
E ₂ -17-S	49

1) The results were obtained from hemoglobin—methylenblue method.

2) Mean values (n=3).

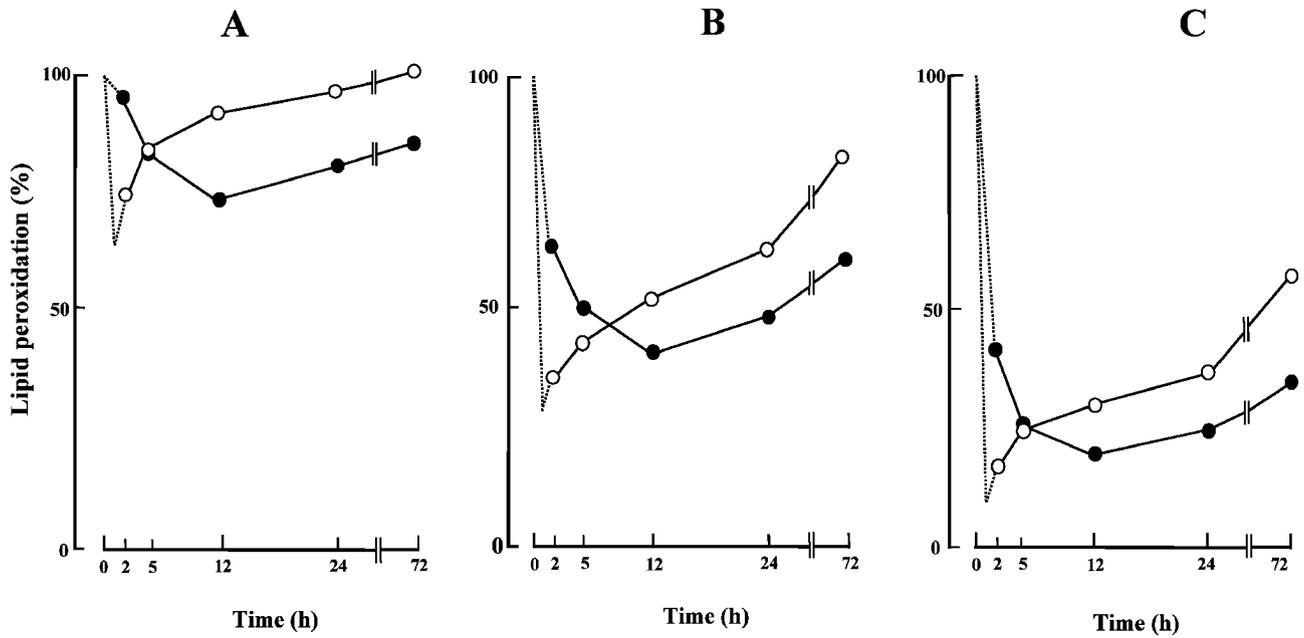


Fig. 7. Time Course of the Inhibitory Effect of 2-Hydroxyestradiol (○) and 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate (●) on NADPH-Dependent Lipid Peroxidation in the Presence of Rat Liver Microsomes

The dose of catechol administered was 200 (A), 275 (B) and 350 (C) nmol per 100 g body weight. Each point expresses mean value ($n=4$).

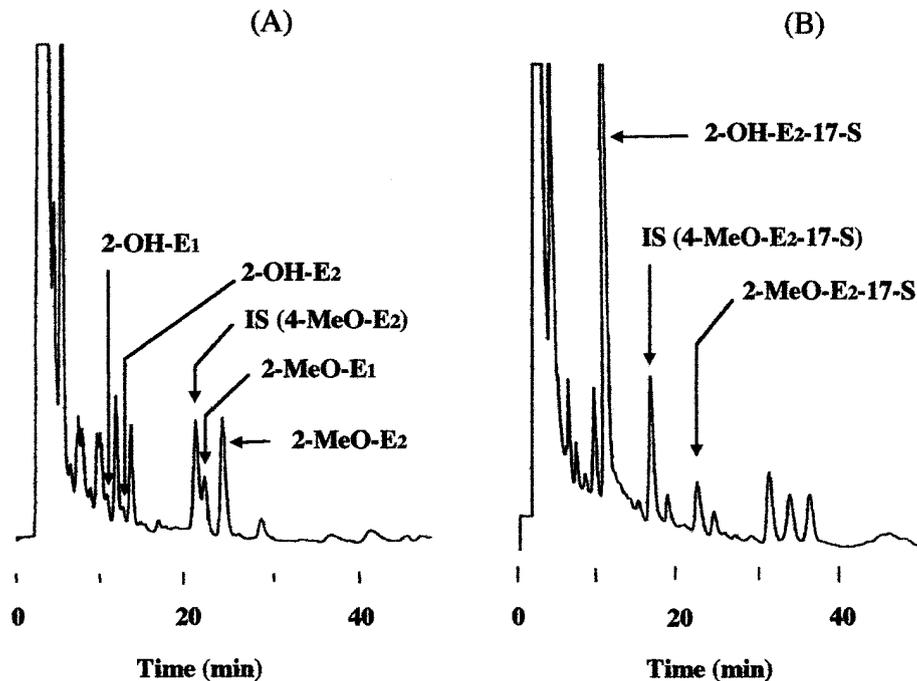


Fig. 8. HPLC Chromatograms of Plasma Steroid Fractions at 15 min after Injection of 2-Hydroxyestradiol (A) and 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate (B)

The injected amount of both catechols was 350 nmol per 100 g body weight. Mobile phase: (A): 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ buffer solution (pH 3.0)-methanol, 45 : 55 (v/v), (B): 0.5% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ buffer solution (pH 3.0)-methanol, 55 : 45 (v/v).

HPLCである。保持時間 (t_R) 約 12 及び約 24 分のピークは、それぞれ 2-OH-E₂ 及び 2-MeO-E₂ であり、また、約 11 分及び約 22 分のピークは、それ

ぞれ 2-OH-E₁ 及び 2-methoxyestrone (2-MeO-E₁) と確認され、これらのピークはいずれも投与 1 時間後には血中から消失した。

Figure 8 (B)は、2-OH-E₂-17-S 投与ラットの血中ステロイド画分の HPLC である。T_R 約 10 分の大きなピークは非投与群では検出されず、投与と同時に血中出现し、時間とともに減少、投与後 5 時間で消失した。このピークは 2-OH-E₂-17-S で、約 21 分のピークは 2-MeO-E₂-17-S と確認された。このことは、2-OH-E₂ の血中からの消失時間は 2-OH-E₂-17-S のそれに比べて著しく短いことを示している。

2-OH-E₂ と 2-MeO-E₂ 及び 2-OH-E₂-17-S と 2-MeO-E₂-17-S の血中量の比はそれぞれ 1 : 8 及び 4 : 1 であり (Fig. 9)、この違いは、両カテコールの赤血球膜に対する透過性の差が影響していると考えられる。2-OH-E₂ は赤血球膜を容易に通過できるので、赤血球内 COMT により 2-MeO-E₂ に変換される⁴³⁾が、一方の 2-OH-E₂-17-S は膜透過性が低いため赤血球内に入り難く、それゆえ *O*-メチル化はほとんど進行しない。両カテコールの血中消失速度に大きな差が生じた理由である。このことは、ラットにおける 2-OH-E₂-17-S の代謝クリアランス MCR' (650 ml/h)⁴⁴⁾ と 2-OH-E₂ についての MCR (8300 ml/h)⁴⁵⁾ を対比することによっても説明される。両分子の極性の差は、両者の組織移行時においても同様に発揮されるものと思われる。

8-3. 血中カテコール及びグアヤコールエストロゲン量の変動 両カテコールの脂質過酸化抑制作用に見られた持続性の差には、両者の血中からの消

失時間が関与すると考えられ、そこで投与後のそれらの血中量を経時的に測定し、結果を Fig. 9 に示した。

2-OH-E₂ の場合 (A)、投与後 15 分で既に血中 2-OH-E₂ は微量しか認められなかったが、その *O*-メチル化体 2-MeO-E₂ 及び 2-MeO-E₁ の血中量は投与量に比例して増え、2-MeO-E₂ は 2-OH-E₂ の 5—6 倍、2-MeO-E₁ は 2-OH-E₂ の約 2 倍高かった。しかし、投与 60 分後にはいずれも血中から完全に消失した。

一方、2-OH-E₂-17-S の場合 (B)、投与後 15 分では血中 2-OH-E₂-17-S は投与量に比例して現れ、その *O*-メチル化体 2-MeO-E₂-17-S も同様に測定された。投与後 15 分での血中 2-OH-E₂-17-S 量は同時間での血中 2-OH-E₂ 量の約 20 倍も高かった。2-OH-E₂-17-S 及び 2-MeO-E₂-17-S は投与後 1 及び 2 時間でも投与量に比例して測定されたが、5 時間後には血中から完全に消失した。

Figure 9 より両カテコールの血中半減期 ($t_{1/2}$) を求めると、2-OH-E₂-17-S は約 80 分であったのに対し、2-OH-E₂ のそれはあまりにも短すぎて測定困難であり、その値は河野らが報告している⁴⁶⁾ ように恐らく数分以内と考えられた。

8-4. 肝サイトゾール及びミクロゾーム画分のステロイド 2-OH-E₂ 及び 2-OH-E₂-17-S の Ms 脂質過酸化に対する効果が、肝に取り込まれるカテコール体によるか否かを調べるため、以下の実験を

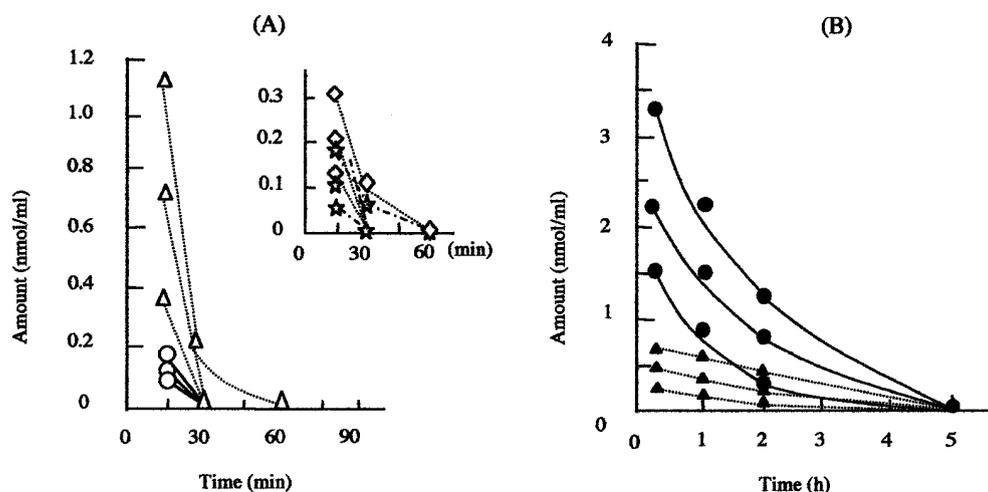


Fig. 9. Plasma Estrogen Amounts after Injection of 2-Hydroxyestradiol (A) and 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate (B)

Open circle (○), open triangle (△), closed circle (●) and closed triangle (▲) show 2-OH-E₂, 2-MeO-E₂, 2-OH-E₂-17-S and 2-MeO-E₂-17-S. The small graph in A shows the amounts of 2-OH-E₁ (☆) and 2-MeO-E₁ (◇). The upper, middle and lower curves represent the injected amounts, 350, 275 and 200 nmol per 100 g body weight.

行った。

まず可溶化した Ms からの両カテコールの回収実験を行った。添加量の多寡 (0.1, 1.0 及び 5.0 nmol/ml) に関わらず、いずれもほぼ定量的に回収された。

ついで、両カテコールを各々体重 100 g 当り 350 nmol 投与し、15 分後のサイトゾール (Cyt) 及び可溶化 Ms のステロイド画分を HPLC に付した。2-OH-E₂ 投与の Cyt 画分では 2-MeO-E₂, 2-OH-E₁ 及び 2-MeO-E₁ が検出され、そのうち 2-MeO-E₁ が一番多く、2-OH-E₁ 及び 2-MeO-E₂ はそれぞれ 2-MeO-E₁ の約 3 分の 1 及び 10 分の 1 であった。しかし、2-OH-E₂ は検出されなかった。一方、Ms 画分中には 2-MeO-E₁ しか検出されなかった。これに対し 2-OH-E₂-17-S 投与の場合は、両画分とも 2-MeO-E₂-17-S しか検出されなかった。

両カテコール投与後 2 時間における Cyt 及び Ms 画分中の各ステロイドについても同様に調べた。2-OH-E₂ 投与の場合、残存カテコールは検出されず、わずかに 2-MeO-E₁ だけが認められた。2-OH-E₂-17-S 投与ではステロイドのピークは検出されなかった。

このことから、投与カテコール体による抗酸化作用はそれらの肝 Ms 残存に基づくという可能性は否定された。

9. 2-Hydroxyestradiol 17-Sulfate は唯一の胎盤性アンチオキシダントか?

そのユニークな生合成経路 (Chart 1) と α -Toc 以上の抗酸化作用のゆえに、2-OH-E₂-17-S は胎盤性アンチオキシダントと想定されたが、はたして単独でその作用を発揮できるのであろうか? 現時点で筆者は妊娠期の抗酸化には 2-OH-E₂ や 2-OH-E₁ のような遊離型カテコールエストロゲンも関わっていると推定している。遊離型カテコールは血中輸送中、COMT により O-メチル化されるのでその血中量は極めて低濃度であるが、¹⁰⁾ 一部は血管細胞膜内には存在できるはずである。一方、2-OH-E₂-17-S は極性基を有するので細胞膜内へ侵入することはできない。⁴⁴⁾ それゆえ、膜内で生じる過酸化脂質の分解に関わる redox-cycling においては 2-OH-E₂ (又は 2-OH-E₁) が関与し、2-OH-E₂-17-S はそれを代行できないと考えられる。遊離型カテコールは肝 Ms、赤血球、血管などの膜の内側に、一方、2-OH-E₂-

17-S はその外側 (表面) に局在し、両者の共同による膜内部から膜外部への電子伝達があたかもビタミン C と E の共同作業^{47,48)} のように行われるのではないだろうか。2-OH-E₂-17-S はその役割を巧みに発揮できる構造を持つ機能性の高い分子と言えよう。

10. おわりに

妊娠期、T の phase II 反応生成物 TS を前駆体とする一連の phase I 反応 (芳香環化、2 位水酸化) が生起するというユニークな代謝系の存在が明らかとなった。胎児胎盤系のこの経路 (Chart 1) は、妊娠の健常化に必要とされるアンチオキシダントとして極めて機能的な分子 2-OH-E₂-17-S の産生を目的とするもので、妊娠期特有の代謝経路と言えよう。なお、ラットを用いての実験で見られた O-メチル化の事実⁴⁹⁾ とヒト胎盤の COMT 活性が高いこと^{50,51)} から、妊娠期には 2-OH-E₂-17-S の O-メチル化経路も存在することが推測され、COMT 活性と妊娠中毒症の関連性に興味を持たれる。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費補助金 (4857300, 3807154, 7857113)、日本科学協会 (笹川科学研究, 1993 年) 並びに秋山記念生命科学振興財団 (1998 年) の助成により行われたものである。本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました北海道薬科大学 吉沢逸雄教授に深謝致します。本研究を遂行するにあたり、丁寧なご指導を賜りました京都府立医科大学医学部産婦人科教室 本庄英雄教授、北海道薬科大学 渡辺一弘講師に感謝申し上げます。ヒト体液試料などの収集に便宜を計っていただきました、北海道大学医学部産婦人科教室 藤本征一郎 (前) 教授、桜木範明教授、京都府立医科大学医学部産婦人科教室 田中一範講師、柏木知宏博士、羽田産婦人科医院 羽田克巳博士に深謝致します。本研究の一部に御協力いただいた佐藤隆司、鎌田摩樹、本間貴史、小山内康徳、京恭弘の各修士に感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Eguchi K., Segawa T., Asagiri K., *Obstet. Gynecol. Ther.*, **81**, 365-369 (2000).
- 2) Tanaka A., Morikawa H., Yamazaki M., Motizuki M., *Folia Endocrinol. Jpn.*, **72**, 85-

- 94 (1996).
- 3) Hubel C. A., Roberts J. M., Taylor R. N., Musci T. J., Rogers G. M., McLaughlin M. K., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **161**, 1025–1034 (1989).
 - 4) Takehara Y., Yoshioka T., Sasaki J., *Acta Med. Okayama*, **44**, 103–111 (1990).
 - 5) Sekiba K., Yoshioka T., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **135**, 368–371 (1979).
 - 6) Yoshioka T., Ando M., Taniguchi K., Yamazaki F., Motoyama H., *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, **42**, 1634–1640 (1990).
 - 7) Wang Y., Walsh S. W., *J. Soc. Gynecol. Invest.*, **3**, 179–184 (1996).
 - 8) Nakano M., Sugioka K., Naito I., Takekoshi S., Niki E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 919–924 (1987).
 - 9) Komura S., Ohishi N., Yagi K., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **786**, 419–429 (1996).
 - 10) Kono S., Merriam G. R., Brandon D. D., Loriaux D. L., Lipsett M. B., Fujino T., *J. Steroid Biochem.*, **19**, 627–633 (1983).
 - 11) Williamson D.G., Collins D.S., Layne D.S., Conrow R.B., Bernstein S., *Biochemistry*, **8**, 4299–4304 (1969).
 - 12) Williamson D. G., Layne D. S., *J. Biol. Chem.*, **247**, 3286–3288 (1972).
 - 13) Jellinck P. H., Hahn E. F., Norton B. I., Fishman J., *Endocrinology*, **115**, 1850–1856 (1984).
 - 14) Brooks S. C., Horn L., Jackson J., Loud A. V., Horwitz J. P., *Biochem. Biophys. Acta*, **74**, 569–572 (1963).
 - 15) Nambara T., Numazawa M., *Chem. Pharm. Bull.*, **17**, 1200–1205 (1969).
 - 16) Layne D. S., Labow R. S., Paquet A., Williamson D. G., *Biochemistry*, **15**, 1268–1270 (1976).
 - 17) Payne A. H., Mason M., *Biochem. Biophys. Acta*, **71**, 719–724 (1963).
 - 18) Baker S. J., Common R. H., *Steroids*, **32**, 95–107 (1978).
 - 19) Yoshizawa I., Kameyama M., Watanabe K., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1885–1890 (1984).
 - 20) Watanabe K., Takanashi K., Yoshizawa I., *Steroids*, **52**, 123–136 (1988).
 - 21) Takanashi K., Yoshizawa I., *Jpn. J. Clin. Chem.*, **21**, 26–29 (1992).
 - 22) Yoshizawa I., Takanashi K., Watanabe K., Satoh T., Honjo H., Tanaka K., Sakuragi N., Fujimoto S., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **41**, 567–570 (1992).
 - 23) Honjo H., Tanaka K., Yasuda J., Ohno Y., Kitawaki J., Naitoh K., Ogino Y., Yamamoto T., Okada H., Watanabe K., Yoshizawa I., *Acta Endocrinol.*, **126**, 303–307 (1992).
 - 24) Mikhail G., Wiquist N., Diczfalusy E., *Acta Endocrinol.*, **42**, 519–532 (1963).
 - 25) Adams J. B., *Biochem. Biophys. Acta*, **82**, 572–580 (1964).
 - 26) Cheatum S. G., Diebold J. C., Warren J. C., *J. Clin. Endocr.*, **28**, 916–918 (1968).
 - 27) Satoh T., Watanabe K., Takanashi K., Itoh S., Takagi H., Yoshizawa I., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **15**, 427–436 (1992).
 - 28) Saez J. M., Saez S., Migeon C. J., *Steroids*, **9**, 1–14 (1967).
 - 29) Watanabe K., Yoshizawa I., *J. Chromatogr.*, **337**, 114–120 (1985).
 - 30) Berg F. D., Kuss E., *Acta Endocrinol.*, **115**, 272–274 (1987).
 - 31) Barnea E. R., MacLusky N. J., Purdy R., Naftolin F., *J. Steroid Biochem.*, **31**, 253–255 (1988).
 - 32) Yoshizawa I., Kameyama M., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 679–684 (1985).
 - 33) Takanashi K., Honma T., Kashiwagi T., Honjo H., Yoshizawa I., *Clin. Chem.*, **46**, 373–378 (2000).
 - 34) Kashiwagi T., Yasuda J., Yamamoto T., Honjo H., Takanashi K., Yoshizawa I., *Endocrine J.*, **46**, 453–458 (1999).
 - 35) Takanashi K., Watanabe K., Yoshizawa I., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 217–219 (1993).
 - 36) Juchau M. R., Namkung M. J., Chao S. T., *Drug Metab. Dispos.*, **10**, 220–224 (1982).
 - 37) Watanabe K., Takanashi K., Imaoka S., Funae Y., Kawano S., Inoue K., Kamataki T., Takagi H., Yoshizawa I., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **38**, 737–743 (1991).
 - 38) Takanashi K., Watanabe K., Yoshizawa I., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1120–1125 (1995).
 - 39) Buege J. A., Aust S. D., *Methods Enzymol.*, **52**, 302–310 (1978).
 - 40) Ruiz-Larrea M. B., Leal A. M., Liza M., Lacort M., Groot H., *Steroids*, **59**, 383–388 (1994).
 - 41) Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K., *J. Lipid Res.*,

- 19, 1053–1057 (1978).
- 42) Ohishi N., Ohkawa H., Miike A., Takano T., Yagi K., *Biochem. Int.*, **10**, 205–211 (1985).
- 43) Merriam G. R., Brandon D. D., Kono S., Davis S. E., Loriaux D. L., Lipsett M. B., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1211–1213 (1980).
- 44) Watanabe K., Takanashi K., Yoshizawa I., *J. Steroid Biochem.*, **33**, 823–827 (1985).
- 45) Ball P., Emons G., Kayser H., Teichmann J., *Endocrinology*, **113**, 1781–1783 (1983).
- 46) Kono S., Merriam G. R., Brandon D. D., Loriaux D. L., Lipsett M. B., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **54**, 150–154 (1982).
- 47) Sigeoka S., *J. Active Oxygens Free Rad.*, **2**, 148–155 (1991).
- 48) Niki E., “Vitamin E—Its Usefulness in Health and in Curing Diseases,” ed. by Mino M., Nakamura H., Diplock A. T., Kayden H. J., Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo/S. Karger, Basel, 1993, pp. 23–30.
- 49) Yoshizawa I., Nakagawa A., Kamiya E., Itoh S., Ogiso T., *J. Pharm. Dyn.*, **3**, 317–319 (1980).
- 50) Bueba J. V., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **57**, 213–216 (1979).
- 51) Saarikoski S., *Br. J. Obstet. Gynaec.*, **90**, 525–527 (1983).