

初期妊娠ラット黄体微細構造への clomiphene citrate の効果

京都大学医学部婦人科学産科学教室

岡村 均 岡崎 武志
森川 博史 西村 敏雄Effect of Clomiphene Citrate on Corpora Lutea of Pregnant Rat
An Ultrastructural Study

Hitoshi OKAMURA, Takeshi OKAZAKI, Hiroshi MORIKAWA and Toshio NISHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kyoto University, Kyoto

概要 排卵誘発剤として広く使用される clomiphene citrate のラット妊娠黄体への作用を、黄体細胞の酵素組織化学的、電子顕微鏡的検索により検討し、これを黄体細胞中のステロイド代謝関連諸酵素活性の変化と比較するとともに clomiphene citrate による微細構造の変化を他の luteolytic agents によるそれと比較検討した。

Wistar 系雌性成熟ラット27匹を用い妊娠第7日目から clomiphene citrate を1回3 mg/kg あるいは6 mg/kg の量で12時間ごとに連続3ないし5回筋注投与し最終投与後15あるいは63時間で開腹し妊卵着床部位を観察するとともに黄体を採取した。

clomiphene citrate 6mg/kg 5回投与群では15匹全例で流産像が観察されたが、組織化学的には黄体組織に著変はみられなかった。微細構造上では、この群の黄体細胞には脂肪滴の蓄積や SER の著明な減少といった luteolysis に特徴的な所見はみられないが、microbody 様の membranous structures が Mit に近接して観察され、初期の luteolysis を示していると考えられた。これは酵素学的に示されたごく初期の luteolysis という結果とよく一致している。

clomiphene citrate 3mg/kg 3回投与群では流産はみられず、黄体細胞の微細構造でも対照群と流産群との移行像を示している。

clomiphene citrate による mild luteolysis の際に電子密度の低い脂肪滴の蓄積はみられず、microbody 様 membranous structures が観察されるという結果は他の luteolytic agents による luteolysis の場合にはみられない。従つて、clomiphene citrate による luteolysis は他の luteolytic agents によるものと発現機序あるいは発現速度が異なると考えられる。

Synopsis It was recently suggested that clomiphene citrate (clomid) had luteolytic properties in the rat as well as in human. In this study, its effect on histochemistry and ultrastructure of corpora lutea of the early pregnant rats are investigated.

With 27 pregnant Wistar-strain rats, clomid is injected intramuscularly twice daily three to five consecutive times at the dose of 3–6 mg/kg/time, beginning on day 7 of pregnancy. At laparotomy 15 or 63 hrs after the last injection, implantation sites are observed for fetal absorption. Pieces of corpora lutea are stained for G6PDH, 3 β -HSD and neutral lipids or processed for electronmicroscopy.

Administration of clomid induced abortions in all rats treated five consecutive times at the dose of 6 mg/kg and examined 63 hrs after the last injection. Histochemically, no definite differences of 3 β -HSD and G6PDH activities as well as the content of Sudan III-reactive droplets are observed among clomid-treated and control groups. Electronmicrographs of lutein cells from clomid-treated rats (6 mg/kg, 5 times) demonstrated indented nuclei, decreased microvillous protrusions of cellular membrane and abundant microbody-like membranous structures closely related to mitochondrial membrane. This membranous structure is characteristic for clomid-induced luteolysis and has never been observed in luteolysis by other chemicals such as prostaglandin F 2α , cyanoketone and aminoglutethimide.

Clomid is demonstrated ultrastructurally to have a mild luteolytic property in pregnant rats, probably mediated by elevated levels of estrogens secreted from the ovary.

緒 言

排卵誘発剤として広く使用されている clomiphene citrate が、ラットおよびヒト妊娠黄体に対して luteolytic な作用をもつ可能性が近年示唆されている (Chatterjee et al., 1974; Hammerstein, 1973). この clomiphene citrate の黄体に対する作用については、本剤の投与を受けた初期妊娠ラットの黄体中の各種ステロイド代謝関連酵素の変化を測定する方法により、その mild な luteolytic action がすでに認められている (岡崎他, 1975). 本稿ではこの酵素学的に観察された clomiphene citrate による mild な luteolysis の際の黄体細胞を電子顕微鏡により検討し、微細構造上の luteolysis を確認するとともに、その変化を作用機序の異なる luteolytic agents である prostaglandin F_{2α} (Okamura et al., 1972), cyanoketone (岡村他, 1974), neuraminidase (岡村他, 1975), aminoglutethimide (岡村他, 1976) を投与した場合のラット初期妊娠黄体の変化と比較検討した.

実験材料および方法

Wistar 系雌性成熟ラット (体重 240—270gm) 27匹を用い、vaginal plug 中に sperm を確認した翌日を妊娠第1日とした。妊娠第7日目から12時間毎に連続3および5回、生理食塩水中に 3.0 mg/ml の割合で溶解した clomiphene citrate (塩野義製薬提供) を1回 6 mg/kg 筋注投与した。最終投与後15あるいは63時間で開腹し、妊卵着床部位を観察記録するとともに、卵巣から新鮮な黄体を核出し、一部は凍結切片を作製して Sudan III 脂肪染色, 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) の染色を行い (岡村他, 1972), 残りは mince した。この mince した黄体組織を 6.25% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4) にて2時間固定し, overnight washing 後さらに 1% osmium tetroxide solution にて2時間固定した。この試料は uranyl acetate solution にて en bloc 染色後, 上昇エタノール系列および propylene oxide にて脱水し Epon 812に包埋した。超薄切片は Porter-Blum 2B ultramicrotome

を用いてガラスナイフで作製し, lead citrate solution による染色ののち, Hitachi HU-11D にて加速電圧75KV で観察した。

実験結果

対照群8匹の妊卵着床部位には全く異常が認められず, clomiphene citrate 3 mg/kg 3回投与後15時間で開腹した4匹においても妊卵着床部位の異常はみられなかったが, clomiphene citrate 6 mg/kg 5回投与後63時間で開腹した15匹では全例に流産像が認められた。

clomiphene citrate 投与非流産群および流産群ともその黄体組織の Sudan III 脂肪染色, 3β-HSD 染色, G6PDH 染色には対照群黄体との間に著明な差は認められなかった。ただ, clomiphene citrate 投与群においてはその卵巣中に黄体組織の他によく発達した多数の follicles が認められ, しかもこれら follicles の内葉膜細胞層に 3β-HSD, G6PDH の活性が強くみられた (写真1)。

clomiphene citrate 投与流産群の黄体細胞は, 微細構造上, 脂肪滴の顕著な蓄積は認められず, smooth endoplasmic reticulum (SER) の減少も殆どみられない (写真2, 3)。しかし, 黄体細胞の核は緊満性をかけ, Golgi 装置も著明でなく (写真2), 細胞膜の microvillous protrusion も減少して細胞間隙に collagen fiber が認められる (写真3)。clomiphene citrate 投与流産群黄体細胞に最も特徴的な変化は, microbody 様の小さな membranous structures が SER や mitochondria (Mit) に近接して認められる点である (写真4, 5)。この membranous structures は Mit の膜から連続して生じている場合が多く観察される (写真6, 7)。Mit の matrix 内にもこの membranous structures は時々みられるが, 一方では小顆粒の蓄積もみられている (写真4)。Mit は大小不同で, その形態も円形, 長円形, 長桿状あるいは cup-shaped と多様であり, その cristae も lamellar, multi-lamellar になつているもの (写真4, 5), あるいは tubular のまま保たれているものと種々である (写真6, 7)。lysosomes は細胞質内に分散した primary type のものがみられ

写真1 clomiphene citrate 6mg/kg 5回投与後妊娠ラット卵巢中の G6PDH 活性を示す。
黄体にもみられるが卵胞の莢膜層に強く認められる。16×

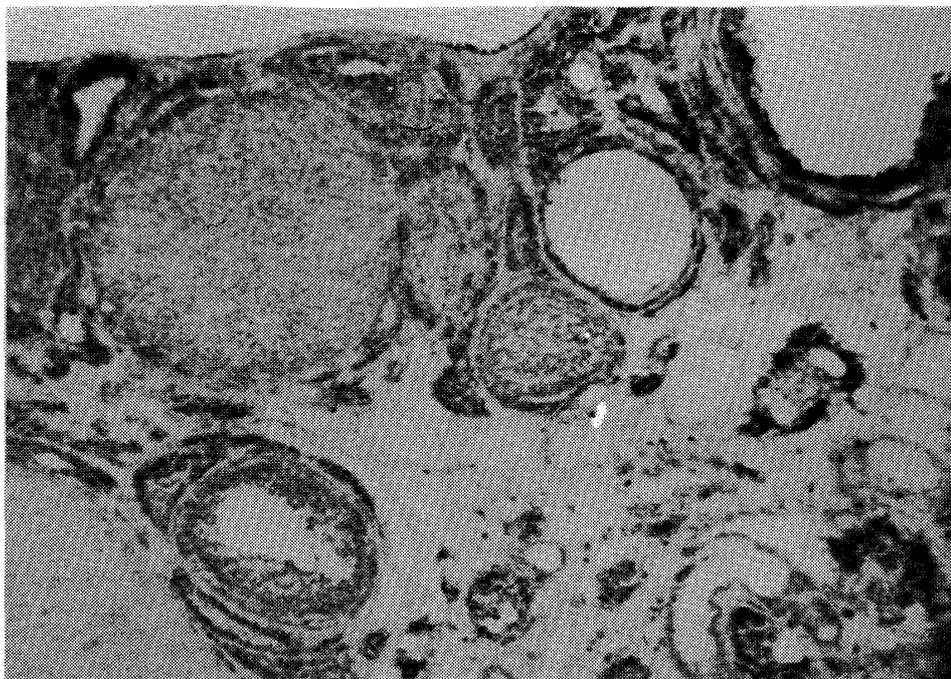


写真2 clomiphene citrate 6mg/kg 5回投与後妊娠ラットの黄体細胞は、核(N)は緊満でなく、
Golgi 装置も著明ではないが、脂肪滴の蓄積はみられず、SER の減少も著明ではない。
mit は大小不同で種々の形態を示している。5,400×

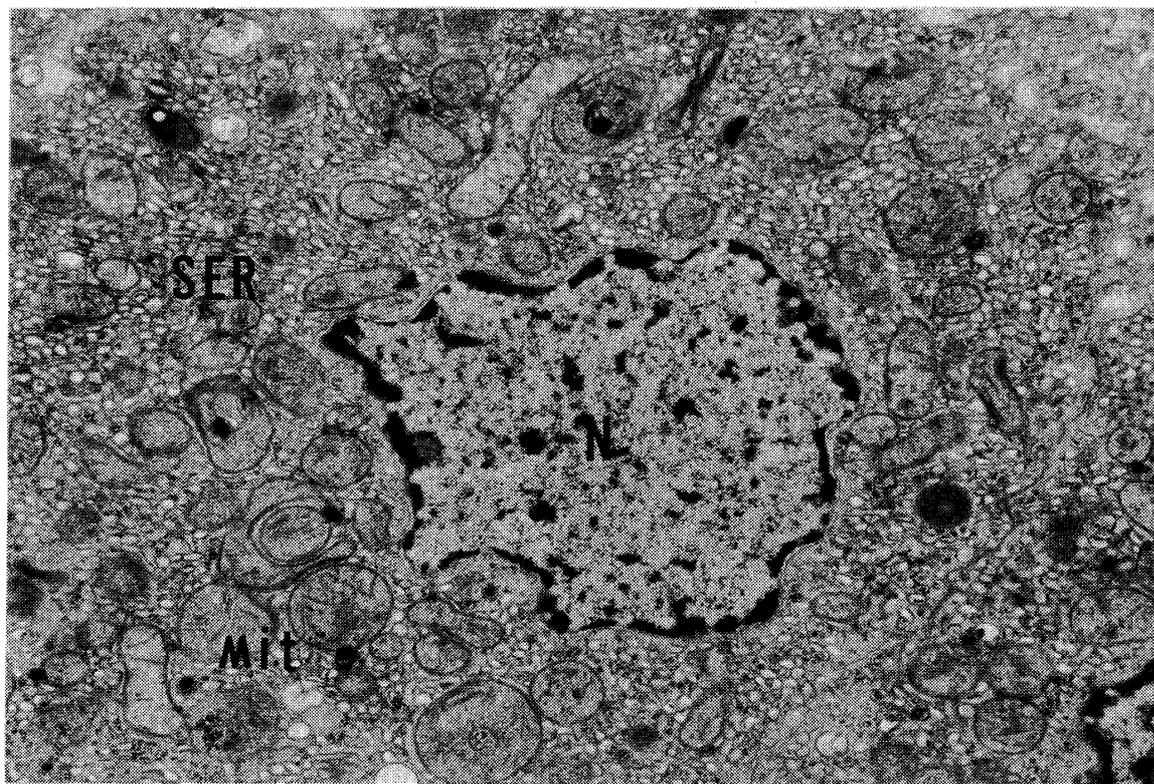


写真3 clomiphene citrate 投与群黄体細胞の細胞膜には microvillous protrusion (mv) が減少しており、細胞間隙に collagen fiber (CO) が認められる。7,000×

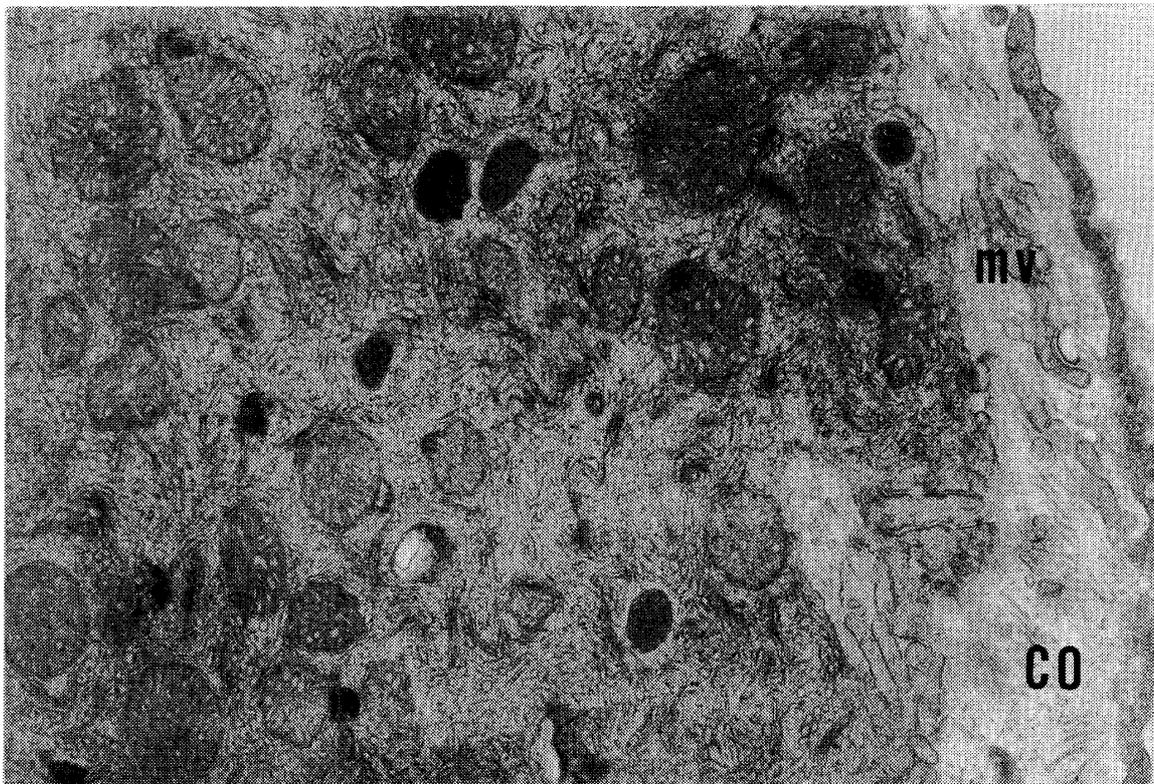


写真4 clomiphene citrate 投与群黄体細胞中にみられる microbody 様の membranous structures を細い矢印で示す。mit の cristae は tubular や lamellar で多様であり、時に matrix 内に小顆粒も観察される (太い矢印)。7,000×

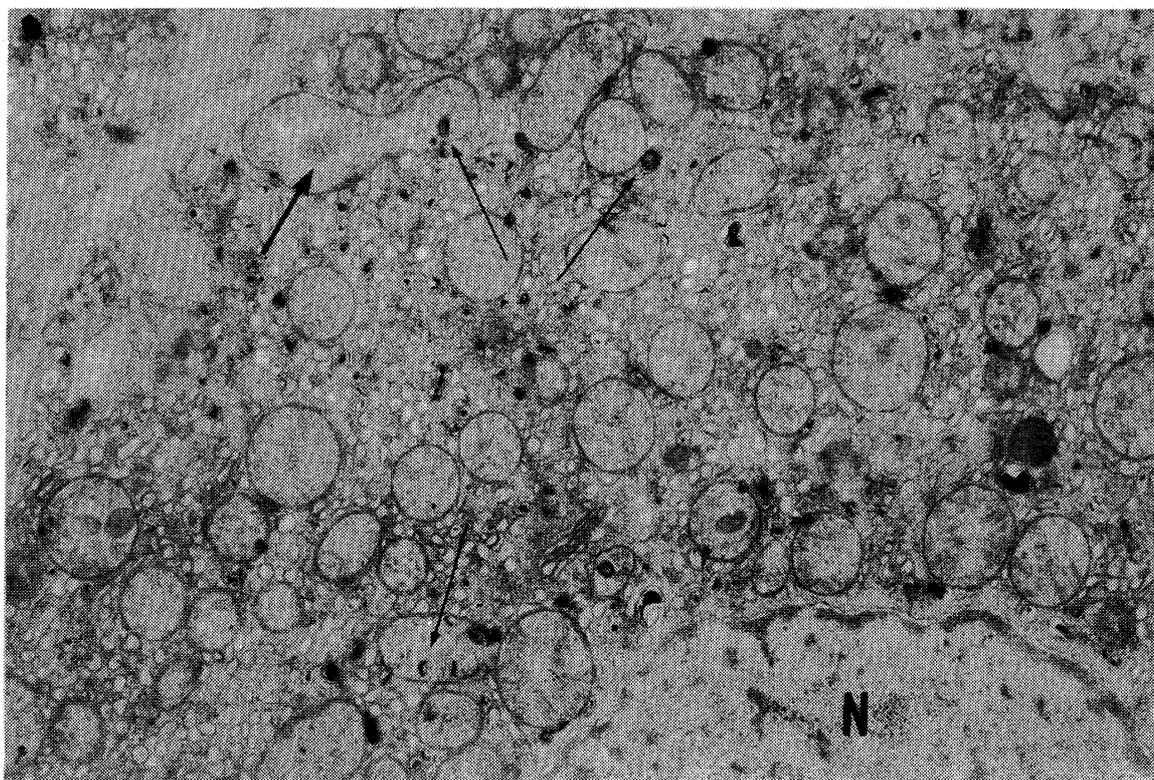


写真5 microbody 様 structures が SER や mit に近接してみられる. 11,000×

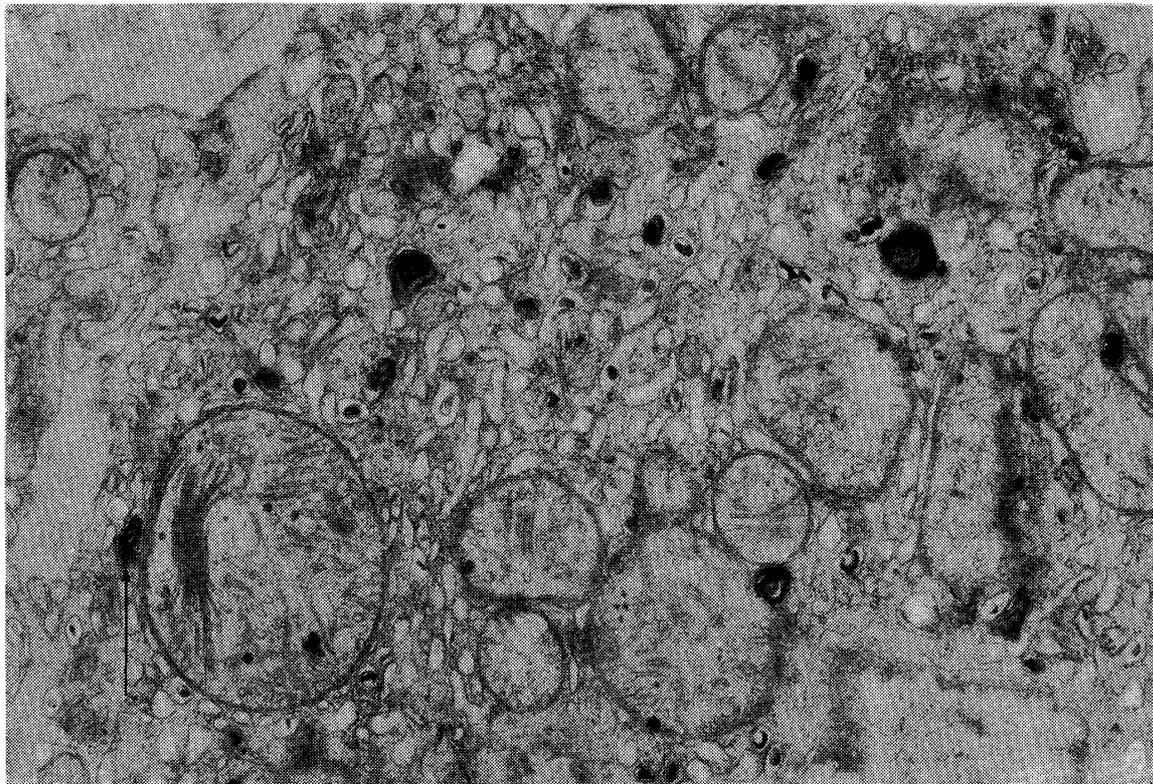


写真6 この microbody 様構造は mit の膜から連続して生じているように見える場合が多い. mit の cristae は tubular である. 8,600×

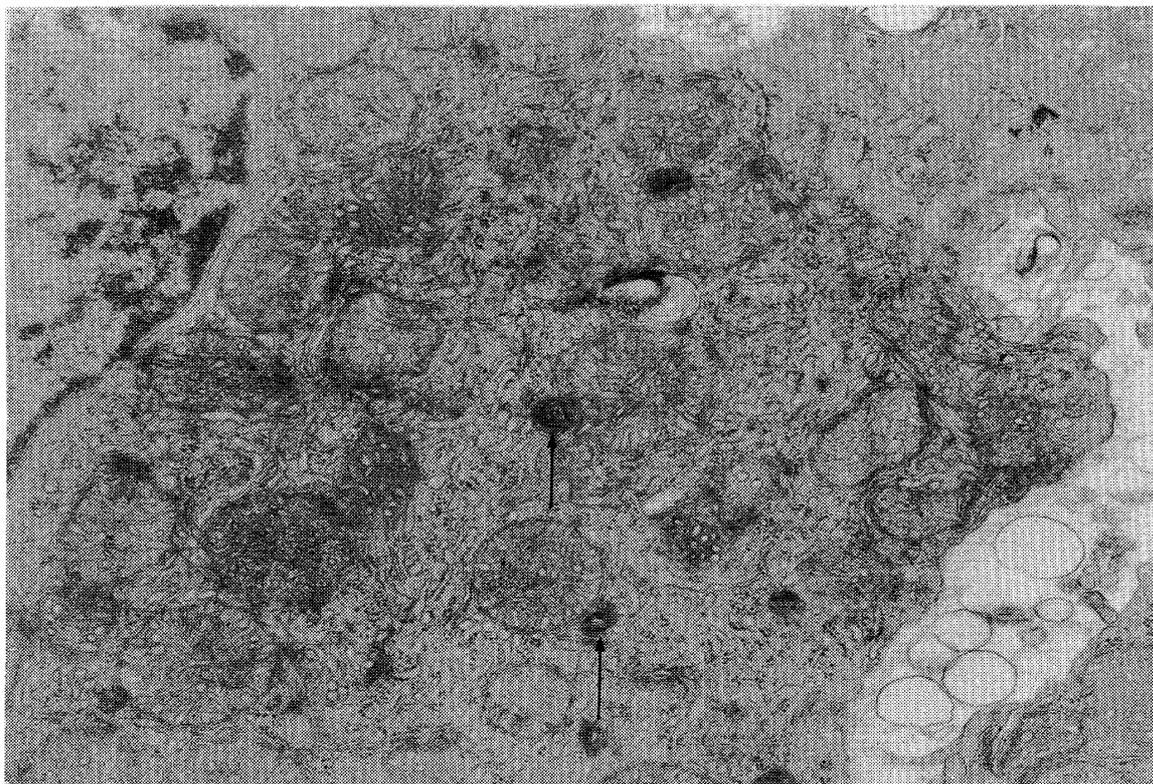


写真7 microbody 様構造の強拡大. 15,900×

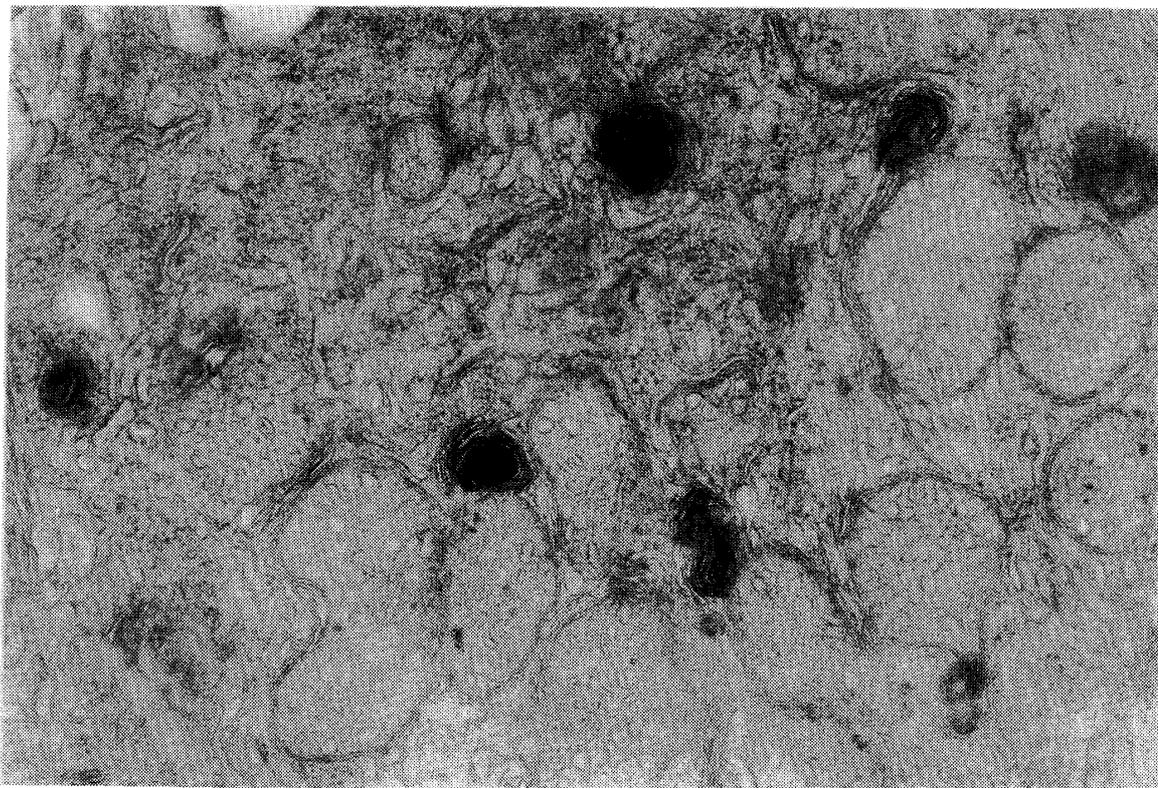


写真8 clomiphene citrate 3mg/kg 3回投与群ラット妊娠黄体細胞は、よく発達した Golgi 装置 (G), 豊富な SER, tubular cristae をもった種々の形態の mit, microvillous protrusion に富んだ細胞膜といったこの時期の妊娠黄体細胞と同様の構造を示している. 7,000×

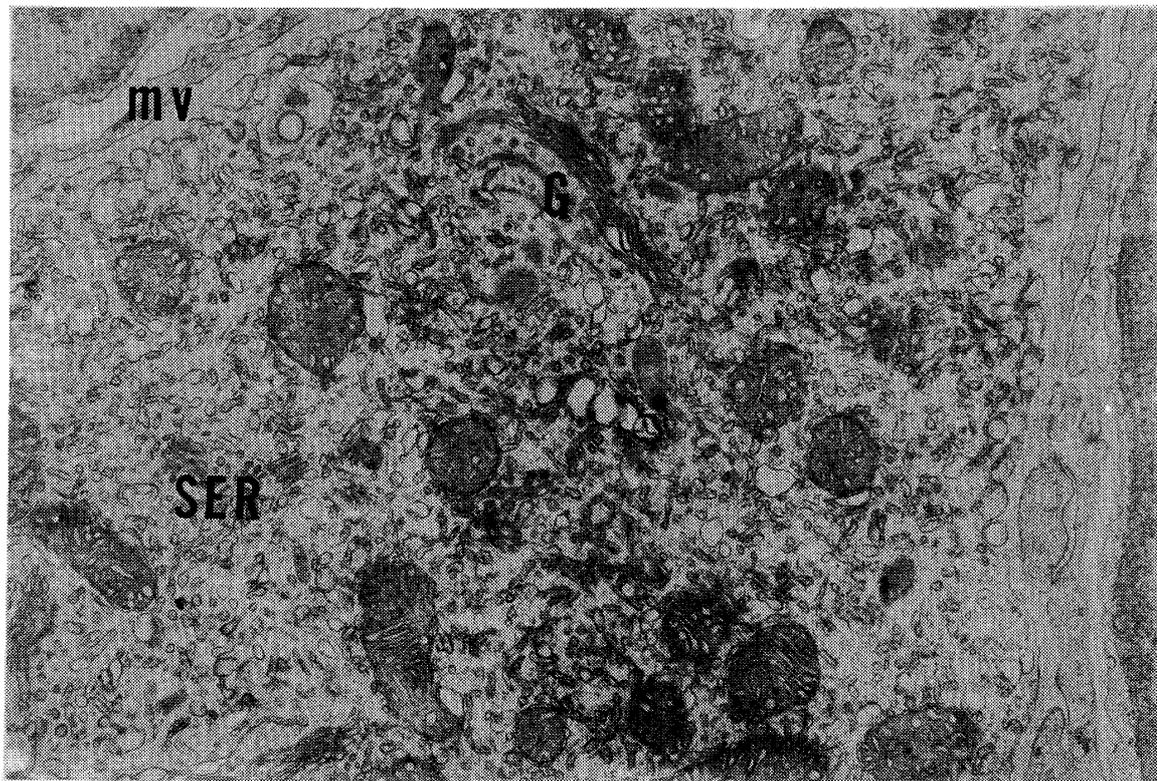
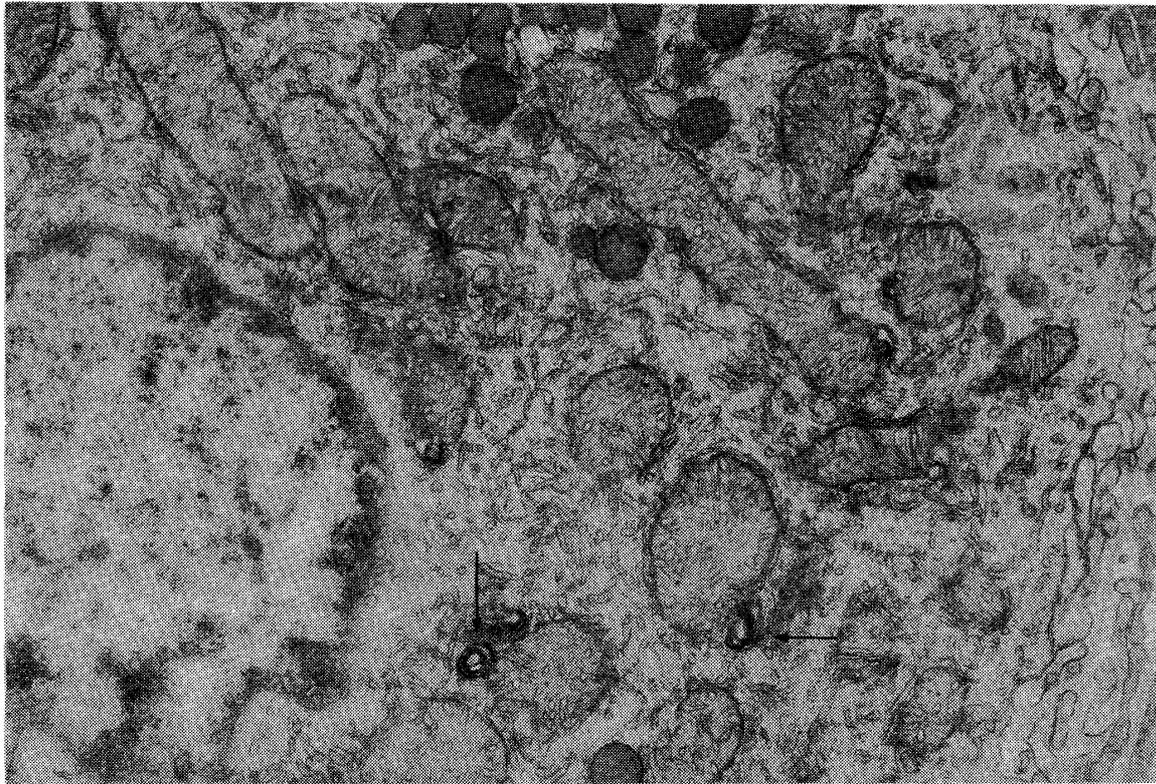


写真9 clomiphene citrate 3mg/kg 3回投与群黄体細胞中にみられる microbody 様 membranous structures を示す. 7,000×



るが、細胞周辺へ移動した secondary lysosomes はあまりみられない (写真2, 3). clomiphene citrate 投与非流産群 (3 mg/kg 3回投与群) の黄体細胞は対照群と 6 mg/kg 5回投与群との間の移行像を示しているようである. すなわち、脂肪滴の蓄積はなく、SER はよく発達しており、核は緊満で Golgi 装置も著明にみられ細胞膜は microvillous protrusion をもち、Mit も tubular cristae をもつた大小種々の形態のものがみられる (写真8). このような点では対照群に近いが、一方では microbody 様の membranous structures が数は少ないが Mit の膜に接してみられ (写真9)、これは流産群の特徴を示しているといえる.

考 案

clomiphene citrate 6 mg/kg 5回投与群では15匹全例で流産像が観察されたが、組織化学的に検索された妊娠黄体には著変は認められなかつた. 黄体細胞の電子顕微鏡的観察では、その核は緊満性をかき、Golgi 装置も著明でなく、細胞膜の

microvillous protrusion も減少しており、また mitochondria の初期の degeneration を示唆すると考えられる membranous structures も出現するといった steroid 産生能の機能低下を意味する所見が認められた. しかし、luteolysis に際して特徴的な所見である多数の脂肪滴の蓄積と smooth endoplasmic reticulum の減少は観察されなかつた. この超微形態学的結果はごく初期の luteolysis を意味する像と考えられ、同じ黄体中の 20α -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は全く検出されないかあるいは非常に低値であるが malic enzyme および ATP citrate lyase 活性が対照群の70%に低下しているという酵素学的に示された初期の luteolytic な変化 (岡崎他, 1975) とよく一致している. この clomiphene citrate の luteolytic な作用は流産のみとめられない程度の投与量でも酵素学的にも超微形態学的にも軽度とその傾向がみとめられている.

clomiphene citrate による mild luteolysis の

際に黄体細胞に観察される微細構造上の変化を他の luteolytic agents による変化と比較してみると、clomiphene citrate に最も特徴的な変化は黄体細胞中への多数の脂肪滴の蓄積がみられないという点である。steroid 合成に関与する各種酵素の阻害剤を投与することにより妊娠初期ラットに同じように luteolysis を起した場合、すなわち、prostaglandin F_{2α} により、cholesterol esterase and ester synthetase 活性を阻害 (Behrman et al., 1971) した場合 (Okamura et al., 1972), aminoglutethimide により cholesterol side-chain cleavage enzyme 活性を阻害した場合 (岡村他, 1975), cyanoketone により 3β-hydroxysteroid dehydrogenase 活性を阻害した場合 (岡村他, 1974) など、いずれの場合も luteolysis に際して電子密度の低い cholesterol に富むと考えられる脂肪滴の多数の蓄積が黄体細胞中に観察される。従つて、clomiphene citrate による luteolysis に際して脂肪滴が認められないのは、clomiphene citrate の作用機序が前述のような直接 steroid 合成に関与している酵素系を阻害するというものではなく、G6PDH, malic enzyme, ATP citrate lyase などの活性を緩徐に低下させることによるという可能性を示唆している。しかし、aminoglutethimide や PGF_{2α} により luteolysis を起した場合でも脂肪滴の多数の蓄積と同時に malic enzyme 活性の低下も認められる (岡崎, 1975) ので、脂肪滴の蓄積は単に luteolysis の速度と程度に関連しているだけであつて luteolysis の発現機序に直接関係していないとも考えられる。clomiphene citrate による luteolysis に特徴的なもう1つの微細構造上の所見は mitochondria 膜にみられる microbody 様の membranous structures である。PGF_{2α}, cyanoketone, neuraminidase などによる luteolysis の場合には mitochondria のこのような変化は全くみられない。aminoglutethimide の場合には mitochondria 内への小顆粒の蓄積、membranous structures あるいは vacuolization の出現はみられるが、mitochondria 内に限局しており、clomiphene citrate の場合のような mito-

chondria 膜に接した microbody 様構造としては認められていない。この mitochondria 膜の microbody 様構造はやはりこの膜の機能障害を意味するものと解釈されるので、aminoglutethimide により mitochondria に局在する cholesterol side-chain cleavage enzyme を阻害した場合 mitochondria 内部に変性像がみられることとあわせ考えて、clomiphene citrate による mitochondria 膜の変化は本物質による mitochondria 膜に局在する酵素系の障害を示唆しているとも考えられる。

clomiphene citrate による luteolysis の作用機序については明らかでないが、その antiestrogenic な作用を黄体で発現して少量の estrogen の luteotrophic 作用を阻害するという黄体への直接作用により、あるいは clomiphene citrate 投与により卵巣に顕著にみとめられるようになる成熟卵胞から合成分泌される estrogen を介して (岡崎他, 1975, 麻生他未発表) 内因性 PGF_{2α} による luteolysis を賦活させる (Hixon et al., 1975) という間接作用により mild な luteolytic action を発現する可能性が考えられる。

このように、ラット初期妊娠黄体では酵素学的にも超微形態学的にも clomiphene citrate の mild な luteolytic action が観察されたわけであるが、酵素学的結果と微細構造上の観察結果は、これまで他の luteolytic agents による luteolysis の際にものべてきたように、よく一致して luteolysis の程度を示しており、従つて黄体細胞自体をこのように多方面から検索することは初期の luteolytic change をとらえる上で実に有効な手段といえる。

文 献

- 麻生武志, 岡村 均, 森川博史: 未発表。
 岡崎武志, 岡村 均, 本橋 亨, 余語郁夫(1975):
 日産婦誌, 27, 981.
 岡崎武志 (1975): 日内分泌誌, 51, 813.
 岡村 均, 吉田吉信 (1973): 日産婦誌, 25, 767.
 岡村 均, 吉田吉信 (1975): 日産婦誌, 26, 113.
 岡村 均, Gasic, G.J. (1975): 日不妊誌, 20, 37.
 岡村 均, 岡崎武志, 森川博史, 吉田吉信(1976):
 日産婦誌, 28, 394.

Behrman, H.R., MacDonald, G.J. and Greep, R.O.
(1971): *Lipid*, 6, 791.

Chatterjee, A., Gupta, T. and Sengupta, K. (1974):
Acta Endocr. (Kobenhavn), 75, 173.

Hammerstein, J. (1973): In T. Hasegawa, M.
Hayashi, F.J.G. Ebling and I.W. Henderson
(Editors), *Proceedings of the VII World Congress*

on Fertility and Sterility, *Excerpta Medica*,
Amsterdam, P. 640.

Hixon, J.H., Gengenbach, D.R. and Hansel, W. (1975):
Biol. Reprod., 13, 126.

Okamura, H., Yang, S.-L., Wright, K.H. and Wallach,
E.E. (1972): *Fertil. Steril.*, 23, 475.

(No. 4045 昭51・9・13受付)