

家兎子宮内膜に於ける炭酸脱水酵素の研究

東京大学医学部産科婦人科学教室(主任 小林隆教授)

辻 啓

概要 哺乳類の雌性器に於ける carbonic anhydrase (C.A.) の生物学的作用は動物の種により或は異つてゐるのではないかと推測される。私はこの点を更に解明せんと、先づ第一段階として家兎子宮内膜 C.A. につき種々検討を加え、又実際の応用も試みた。Philpot & philpot の三宅変法(colorimetric method)を用いて子宮内膜 C.A. を測定した。その結果1) gestagen 投与により家兎子宮内膜に生ずる C.A. の活性度(Eu/g)を y とし、子宮内膜の progestational proliferation を Mc Phail scale で表わして x とすると、 $y \div 35.5 x$ なる比例関係が存在する事が判つた。2) Clauberg 法及び Corner Allen 法により家兎に投与した gestagen の対数投与量と子宮内膜 C.A. 活性上昇とは、直線比例関係をなし、各種 gestagen の用量反応直線はほぼ平行性を有するところから、4-point assay を応用して、数種の代表的な gestagen の黄体ホルモン作用の力価を経口投与の場合、皮下投与の場合、及び経口投与力価につき各々比較検討した、而してこの検定法が実用的に優れている事を実証した。又実験方法として Corner Allen 法よりも Clauberg 法の方が精度の高い事が C.A. 法によつても判明した。3) 家兎子宮内膜 C.A. 法により estrogen の progesterone 抑制作用及び助長作用を検討し、estrogen の対数投与量と、C.A. 活性で表わした progesterone 抑制並びに助長作用とが、一次的な連続直線関係なる事を新たに認めた。而も estrogen の種類によつて抑制作用では明らかな相違を認め estradiol は estriol の 5.8倍となつたが、助長作用では有意の差を認めなかつた。又この事柄より estrogen の progesterone 抑制作用の新検定法として C.A. 法を実用し得る事を実証した。又同法は、estrogen の progesterone 助長効果に於ける progesterone 対 estrogen の最適混合比を求めるのに有力な手段なる事を見出した。4) C.A. の特異的抑制剤なる Diamox を主として経口投与する事により、progesterone により家兎子宮内膜に生じた C.A. 活性の抑制と同時に、progestational proliferation の抑制も可能な事を発見し、家兎子宮内膜に於ける C.A. の生物学的意義として、著者の仮定した progesterone $\rightarrow$ C.A. $\rightarrow$ progestational proliferation なる過程を初めて証明し得た。5) 印度で経口避妊薬として臨床的にも使用されていると云う“Matar Dal”(meta-xylo-hydroquinon)が、家兎子宮内膜に於いて progesterone により生ずる C.A. 及び progestational proliferation を抑制する傾向を持つ事を認めた。故に概物質に避妊効果があるとするれば、子宮内膜の C.A. を抑制する事により卵の着床を阻碍するのではないかと考えられる。

緒 言

Meldrum & Roughton¹⁾ が1933年に赤血球中に炭酸脱水酵素 carbonic anhydrase(以下 C.A. と略す)を発見して以来、哺乳動物の組織内に於ける C.A. の分布が研究され、腎、胃粘膜、脾、中軸神経等に C.A. が存在する事が Goor Van²⁾ により報告された。その他、唾液腺³⁾、眼の毛様体⁴⁾、汗腺⁵⁾等にも C.A. が存在し細胞内に、而も大部分は分泌性のある細胞内に存して、それぞれの生理的作用に関与していると言う。Keilin & Mann⁶⁾は C.A. を純化し Zn-protein 化合物なる事を明ら

かにした。

性器に於ける C.A. の研究は、1950年代になり Lutwak-Mann^{7,8)} が、胚胞液(blast cyst fluid)の生化学的研究の途上に於いて、偶然妊娠家兎の子宮内膜に C.A. を発見したのに端を発し、以来急速に哺乳動物の雌性器に於ける C.A. の研究が盛んとなつた。即ち、Lutwak-Mann⁹⁾、Pincus¹⁰⁾、Böving¹¹⁾、Miyake¹²⁾、等により主として家兎及び、ラットの子宮について研究がなされて来た。それらによると、子宮内膜、胎盤、卵管等に C.A. が存在するが、その存在分布や、ホルモン、妊娠、性

周期等との関係は動物の種により可成り異つていようであり、或は性器に於ける C.A の生物学的作用も、各々異つていのではないかと推測される。著者はこの点を更に解明せんと考え先ず第一段階として家兎子宮内膜 C.A について研究し、その実際的应用も試み、幾つかの新知見を得たのでそれらにつき述べ度いと思う。

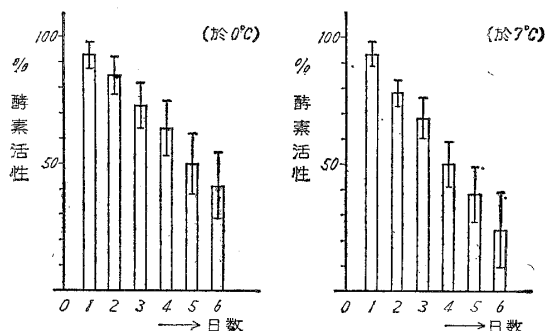
実験材料及び方法

炭酸脱水酵素抽出液作製法

家兎を頸動脈切断により完全に汚血屠殺し、子宮を摘出し、更に子宮内膜を摘除し、その内膜組織を冷生食水にて洗滌し、残存血球を除去する。直ちに内膜組織に約10倍量の蒸留水を加えてホモゲナイズし、その溶液を1500回転/分で15分間遠沈し、その上澄を採取して酵素抽出液とする。この場合出来るだけ血液成分を除く事が必要である。何故ならば血液自体が極めて高い C.A 活性を示すからである。

C.A 抽出液は可成り安定で 0°C に保たれるならば、数日間はその活性度が減じないと云われる¹⁰⁾が、著者の実験では、第1図に示す如く、日時の経過と共に、活性

第1図 炭酸脱水酵素抽出液の安定性



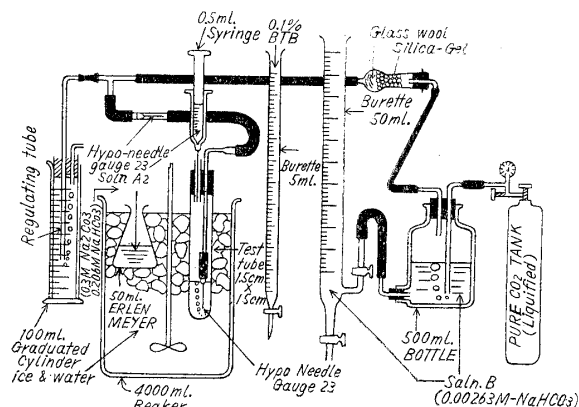
の低下が明らかであるので、採取当日、又は少なくとも翌日迄には活性の測定を行つた。なお、保存温度が高い程、C.A の安定性の悪い事は第1図からも判る。

炭酸脱水酵素測定法

C.A 測定法としては、著者の採用した、①比色法 (colorimetric method) の他に②検圧法 (manometric method¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾及び③電極法 (electric method¹⁶⁾)がある。最近 Ogawa & Pincus¹⁷⁾は検圧法により鋭敏な C.A 検定が出来ると発表しているが、著者は実験開始以来のデータに一慣性を持たせる為に最初より採用した。比色法のみで実験を続けた。比色法は Brinkman¹⁸⁾¹⁹⁾によつて始められ、Philpot & Philpot²⁰⁾が改良したものであり、更に Miyake 等が多少改良を加えてい

る。即ち Philpot & Philpot の Miyake²¹⁾変法であり装置を示すと第2図の如くなる。その原理を簡単に説

第2図 炭酸脱水酵素活性度測定装置 (Philpot & philpot の Miyake 変法)



明すると、図の試験管内に、 Na_2CO_3 に NaHCO_3 の少量を混じて作った $\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$ の緩衝溶液を入れ、緩衝系の間中なる pH 10.5 になるようにする。然る後に、その溶液を通して一定の速度で CO_2 を泡立てる。試験管内では、

$\text{CO}_2 + \text{CO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{HCO}_3$ なる反応が起つて pH は下降して来る。指示薬として B.T.B. (bromo thymol blue) を用い、end point を pH 7 とすると反応は長く緩衝された勾配の緩慢な反応カーブから始まつて、急峻なカーブの部で終り、溶液が初めて青色から黄緑色に急変する事により、end point を正確に測定出来る。pH 10.5 から pH 7 に変化するには一定の時間を要するが、若し、C.A がこの反応系に存在するならば、この反応を触媒して反応時間を短縮させる訳である。

故に検体よりの C.A 抽出液を、この溶液中に入れるならば、反応時間の短縮から検体中に含まれる C.A の活性度を計算出来る。

即ち、原材料 (子宮内膜) の wet tissue 1 gr 中に含まれる酵素単位 (Eu/g) は次のようにして計算される。

$$\text{Eu/g} = \frac{1000}{\text{C.V}} \times \frac{1}{2}$$

但し C: C.A 抽出液の濃度 (mg/ml)

V: 反応時間を 65~75 秒から 25~30 秒に短縮するに要した抽出液量 (ml)。

実験成績

1. Gestagen の家兎子宮内膜炭酸脱水酵素に及ぼす影響

Lutwak-Mann⁹⁾は、家兎に progesteron を投与す

昭和38年9月1日

辻

1003—3

ると投与量に平行して、子宮内膜の C.A 活性が上昇する事を発見し、更に Pincus & Miyake¹⁰⁾ は Clauberg 家兎に gestagen を投与して、子宮内膜に生ずる C.A 活性度と投与 gestagen の対数投与量とが或範囲内で比例的直線関係をなす事を認めた。而してこの現象が gestagen の bioassay に利用し得るものとして最近脚光を浴びて来たのである。

著者は独自の見地より、家兎子宮内膜 C.A と gestagen の関係を検討し、更に実際的に応用し、種々の新知見を得たので報告する。

1) 家兎子宮内膜炭酸脱水酵素の gestagen に対する特異性.

gestagen 投与により家兎子宮内膜 C.A 活性は上昇するが、他臓器、例えば腎の C.A 活性等に影響を及ぼすか否かを検討した。即ち対照群として、estrogen 前処置のみの Clauberg 家兎を用い、他の群は Clauberg 家兎に gestagen として 6 α -methyl-17 α -hydroxyprogesterone acetate (MPA) 1mg を5日間分割経口投与したものをを用いた。最終投与後22~26時間で汚血屠殺して、子宮内膜、副腎、肝、胃粘膜、脳、の C.A 活性を測定した。即ち第1表に示す如く、子宮内膜だけが、

第1表 Clauberg 家兎各臓器炭酸脱水酵素活性

臓器名	対照群(4匹)Eu/g	MPA 0.1mg(3匹)Eu/g 皮下投与群
子宮内膜	12.3 $\pm$ 2.1	184.0 $\pm$ 24.7
腎	115.0 $\pm$ 4.3	120.2 $\pm$ 8.3
副腎	21.2 $\pm$ 8.3	22.4 $\pm$ 10.7
肝	58.4 $\pm$ 7.8	60.7 $\pm$ 11.2
胃粘膜	166.5 $\pm$ 21.5	157.2 $\pm$ 29.3
脳	40.8 $\pm$ 5.6	44.1 $\pm$ 8.3

gestagen に反応して著名な活性上昇を示した。

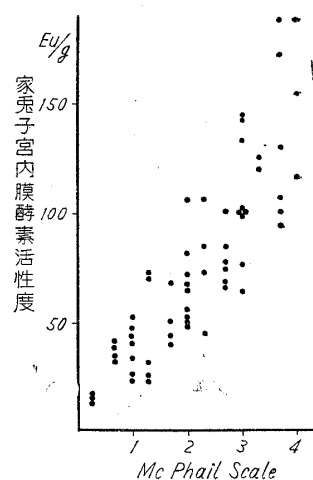
故に gestagen による C.A 活性上昇作用は、家兎子宮内膜に特異的なものと云えよう。

2) Mc Phail scale と Clauberg 家兎子宮内膜炭酸脱水酵素との関係.

Clauberg 家兎に種々の量の gestagen を連続5日間分割皮下、或は経口投与し、最終投与後22~26時間で汚血屠殺して、一方の子宮角の子宮内膜 C.A 活性を測定し、他方の子宮角の子宮内膜の progestational proliferation を組織学的に検討し、Mc Phail scale で表わした。

子宮内膜 C.A 活性と progestational proliferation との関係を図示すると第3図の如くなる。各データの中 Mc Phail scale の1,2,3,及び3.7に対応する C.A

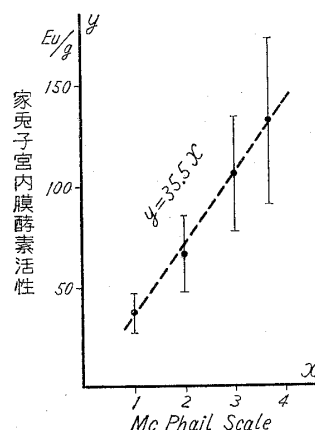
第3図



第2表 Clauberg 家兎子宮内膜に於ける炭酸脱水酵素と Mc Phail Scale との関係

例数	Mc Phail Scale	子宮内膜 C.A Eu/g
7	1	37.3 $\pm$ 10.8
9	2	66.0 $\pm$ 18.5
9	3	105.7 $\pm$ 29.2
6	3.7	132.3 $\pm$ 42.3

第4図 Clauberg 家兎子宮内膜に於ける炭酸脱水酵素と Mc phail Scale との関係



活性値を選んで表示すると第2表の如くなる。これを図示すると第4図のようになる。即ち座標上の4点を結ぶと原点を通る直線となり、C.A 活性を y, Mc Phail scale を X, とすると $Y = 35.5X$ なる関係のある事が判った。故に gestagen を投与して家兎子宮内膜に生ずる C.A 活性度と、子宮内膜 progestational proliferation とは或範囲で比例関係にある事が明らかである。但し、

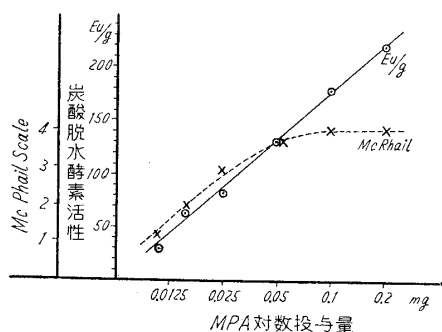
こゝでデータとして Mc Phail scale の maximum なる 4 に対応する C.A 値を取らずに 3.7 に対応すると C.A 値を取つたのは Mc Phail scale の maximum 以上に相当する C.A 値も皆 4 に含まれるからである。

この点を更に検討する為に種々の量の MPA を皮下投与した場合の子宮内膜 C.A と Mc Phail scale との関係を示すと第 3 表の如くなる。これを図示すると第 5 図の如くなる。即ち progestational proliferation は

第 3 表 MPA 皮下投与による Clauberg 家兎子宮内膜変化

例数	MPA投与量 mg	子宮内膜酵素 E_{415}	Mc Phail Scale
3	0.01	30.2 ± 5.6	1.3
3	0.015	65.0 ± 8.5	2.0
3	0.025	82.5 ± 7.3	3.0
4	0.05	132.0 ± 11.1	3.7
3	0.10	184.0 ± 24.7	4.0
2	0.20	221.0 ± 28.1	4.0

第 5 図 MPA 皮下投与による Clauberg 家兎子宮内膜変化



gestagen の投与量が或程度以上になると maximum になって、それ以上の反応を示さないが、C.A は更により広範な反応を示す事が判る。故に gestagen の bioassay には C.A がより融通性を持ち、組織学的な bioassay よりも精度に於いて秀れているとも云えよう。

3) 各種合成 gestagen の家兎子宮内膜炭酸脱水素による力価比較

子宮内膜 C.A の実際的应用の一端として Pincus & Miyake¹⁰⁾が各種 gestagen の黄体ホルモン作用を、Clauberg 家兎子宮内膜 C.A 測定により比較検討したが、本邦では当教室が最初にこの方法を採用し、研究結果を、いち速く第33回日本内分泌学会総会に於いて発表した。その後数種の新 gestagen につき検討を重ね、又 gestagen の皮下投与、及び経口と皮下投与の比較についても新知見を得たので併せ述べる事とする。

経口投与黄体ホルモン作用の比較

各種経口 gestagen の中、代表的な数種につきその経

口黄体ホルモン作用の強さを C.A 法により比較検討した。比較に用いた gestagen は次の 7 種類である。

① 17 α -hydroxyprogesterone acetate (PA と略す)
商品名: Prodox.

② 6 α -methyl-17 α -hydroxyprogesterone acetate (MPA と略す), 商品名 Provera.

③ 6 α -21-dimethylethisterone (DIM と略す), 商品名: Secrosterone

④ 17 α -ethinyl-19-nortestosterone (E19NT と略す), 商品名: Norluten

⑤ 17 α -methyl-19-nortestosterone (M19NT と略す), 商品名: Lutenin

⑥ 17 α -allyl-17 β -hydroxyestrene (ALHE と略す), 商品名: Gestanon.

⑦ 17 α -ethinyl-17 β -hydroxyestrene (EHE と略す)
商品名: Lynaesterol

一つのグループにつき平均 4 匹の Clauberg 家兎を使用し、一種の gestagen 検定につき、4~6 グループを必要とする。各グループに少量から大量まで、各々異つた量の gestagen を経口投与する。投与 gestagen は水溶液或は水性懸濁液とし、ネラトンカテーテルで胃内注入法により、5 日間連続分割経口投与した。最終投与後 20~28 時間で済血屠殺し、子宮内膜 C.A 活性度を測定した。

以上の如くして各種経口 gestagen の用量反応曲線を求めたが、その各々が直線をなす座標上の各 2 点に対応する投与量及び C.A 活性度を示すと第 4 表の如くなる。

第 4 表 Gestagen 経口投与と家兎子宮内膜酵素活性 (Clauberg 法)

Gestagenの種類	例数	投与量 mg	子宮内膜酵素活性 %
PA	4	1.0	31.5 ± 9.1
	5	8.0	90.5 ± 8.6
E19NT	4	0.8	56.7 ± 7.2
	4	3.2	97.1 ± 18.5
M19NT	4	0.8	40.7 ± 6.1
	4	3.2	81.2 ± 9.7
MPA	4	0.05	53.7 ± 3.6
	4	0.2	105.5 ± 10.0
DIM	4	0.8	60.0 ± 5.2
	5	3.2	102.0 ± 12.8
ALHE	4	0.8	19.5 ± 3.6
	4	3.2	50.0 ± 7.8
EHE	3	2.4	39.4 ± 5.9
	4	9.6	66.7 ± 12.1

これを図示すると第 6 図の如くなる。而して、各々の gestagen の用量反応直線の平行性は推計学的に有意であつた。従つて 4-point assay²²⁾ 法を応用して、PA を

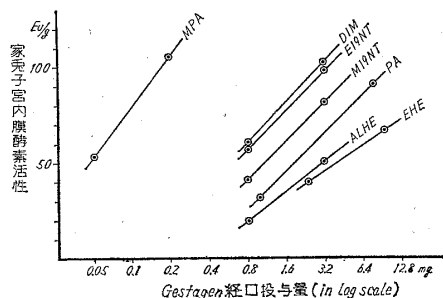
昭和38年9月1日

辻

1005—5

standard とし、他の gestagen の力価を計算すると第5表の如くなる。即ち経口黄体ホルモン作用の強いものから、MPA, DIM, E19NT, M19NT, PA, ALHE, EHE, の順となった。

第6図 各種 Gestagen 経口投与と家兎子宮内膜酵素活性 (Clausberg 法)



第5表 経口黄体ホルモン作用の強さ (4-Point assay)

Gestagen の種類	力価
PA *	1.0
MPA	51.3
DIM	3.24
E19NT	2.75
M19NT	1.76
ALHE	0.46
EHE	0.44

(※Standard)

皮下投与黄体ホルモン作用の比較

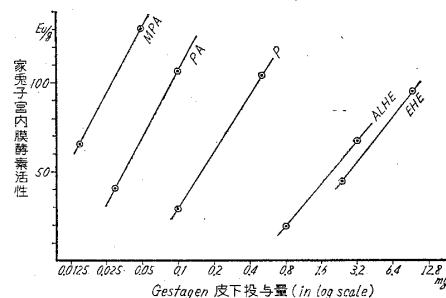
経口投与では黄体ホルモン作用はないが、皮下投与では可成り強力な黄体ホルモン作用を有する Progesterone (P)を standard として、PA, MPA, ALHE, EHE の皮下投与による黄体ホルモン作用を比較検討して見た。

Clausberg 家兎に sesame oil に溶した種々の量の gestagen を5日間連続分割皮下投与し、最終投与後20

第6表 Gestagen 皮下投与と家兎子宮内膜酵素活性 (Clausberg 法)

Gestagenの種類	例数	投与量mg	子宮内膜酵素活性Eg%
P.	4	0.1	29.0 ± 3.5
	5	0.5	103.4 ± 12.8
PA	4	0.03	40.1 ± 5.3
	4	0.1	105.6 ± 14.7
MPA	4	0.015	65.0 ± 7.9
	3	0.05	130.2 ± 16.4
ALHE	4	0.8	19.2 ± 2.8
	4	3.2	66.7 ± 7.4
EHE	3	2.4	44.2 ± 5.8
	4	9.6	94.5 ± 8.6

第7図 Gestagen 皮下投与と家兎子宮内膜酵素活性 (Clausberg 法)



第7表 皮下投与黄体ホルモン作用の強さ (4-Point assay)

Gestagen の種類	力価
P *	1.0
MPA	17.3
PA	4.76
ALHE	0.08
EHE	0.05

(※Standard)

～28時間で汚血屠殺し子宮内膜 C.A 活性を測定した。

各 gestagen の用量反応直線上の2点に対応する投与量及び C.A 活性度を示すと第6表の如くなる。これを図に表わすと第7図の如くなる。各々の用量反応直線の平行性は推計学的に有意であり、従つて 4-Point assay により各々の力価を比較すると第7表の如くなる。即ち、皮下投与黄体ホルモン作用の強さは、MPA が最も強く、PA, P, ALHE, EHE, の順となった。

経口投与対皮下投与黄体ホルモン作用の比較

広い層の婦人に手軽に用いられるものとして、経口 gestagen の意義は深いものがあるが、経口剤としての重要性は、経口的な力価もさる事ながら、皮下投与と経口投与の力価の比も考慮されるべきであろう。即ち経口投与の力価の値の高いもの程、或意味では経口 gestagen の名に相応しいものと云えよう。以上の観点から、PA, MPA, ALHE, EHE, について、経口対皮下投与の力価の比を 4-Point assay により、経口投与を standard として比較計算した。

その結果を示すと第8表の如くなる。即ち、経口投与力価の低いものから並べると、EHE, ALHE, MPA, PA, の順となる事が判つた。

従来 gestagen の bioassay 法としては Mc Phail²³⁾ 法 Robson²⁴⁾ 法, G/M ratio²⁵⁾ 法等の如く、gestagen 投与により Clausberg 家兎子宮内膜に生ずる progestational proliferation の組織学的判断が広く採用されて

第8表 黄体ホルモン作用の経口投与に対する皮下投与の強さ (4-Point assay)

Gestagenの種類	投与法	例数	投与量 μg	子宮内膜 E_2/g 酵素活性 μg	力価
PA	経口	4	1.6	31.6 ± 9.1	1
		5	8.0	90.6 ± 8.6	
	皮下	4	0.03	40.1 ± 5.3	73.8
		4	0.1	103.6 ± 14.7	
MPA	経口	4	0.05	53.7 ± 3.6	1
		4	0.2	105.5 ± 10.0	
	皮下	4	0.015	65.0 ± 7.9	5.63
		3	0.05	130.2 ± 16.4	
ALHE	経口	4	3.2	50.0 ± 7.8	1
		4	12.8	81.3 ± 14.8	
	皮下	4	3.2	66.7 ± 7.4	22.1
		4	12.8	104.2 ± 11.3	
EHE	経口	3	2.4	39.4 ± 5.9	1
		4	9.6	66.7 ± 12.1	
	皮下	3	2.4	44.2 ± 5.8	17.9
		4	9.6	94.5 ± 8.6	

(註: 経口投与をStandardとする)

来たが、観察者の主観に判断が左右される事が多く、特に初心者には正確な評価を期待し難いと言う欠点があった。然るに上記に示した gestagen の力価比較計算法及び結果より判る如く子宮内膜 C.A 法による gestagen の bioassay は、4-point assay を応用する事により、組織学的 bioassay と比較して極めて精度が高く、実験者の主観に左右される事がなく、又数理的に表現出来ると云う利点があり秀れた bioassay 法として広く実用に供し得る事が判った。

4) 炭酸脱水酵素の Corner Allen 法への応用

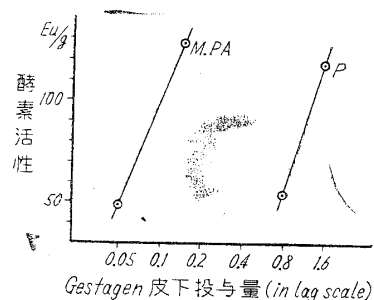
Pincus & Miyake は Clauberg²⁶⁾ 法に C.A を応用して gestagen の bioassay を考案したが、著者はそれを Corner Allen²⁷⁾ 法に応用して見た。

Corner Allen 法に従い2週間以上隔離した黄体のない2500 g前後の成熟家兎を去勢し直ちに gestagen として progesterone (P) 或は MPA を5日間分割皮下投与した。最終投与後22~26時間目に汚血屠殺して子宮内膜 C.A を測定した。対照として、去勢時、片側の子宮角を切除し、その子宮内膜 C.A を測定して置いた。P 及び MPA による用量反応曲線は各々或範囲内で、ほぼ平行な直線をなす事が判った。即ち、この直線部分に相当する各々の測定値を第9表に示す。図示すると第8図の如くなる。4-point assay を用いPを standa-

第9表 Corner Allen 法による Gestagen 投与と家兎子宮内膜炭酸脱水酵素

投与 gestagen	例数	投与量 mg	酵素活性 $\mu\text{g/g}$
MPA	4	0.15	128.0 ± 16.2
	4	0.05	49.5 ± 5.3
P	4	1.60	118.5 ± 13.3
	4	0.80	55.2 ± 8.0
対 照	5	—	14.2 ± 2.6

第8図 Corner Allen 法による Gestagen 投与と家兎子宮内膜炭酸脱水酵素



rd として各々の黄体ホルモン作用を比較計算すると、 $\frac{\text{MPA}}{\text{P}} = \frac{13.3}{1}$ となる。Clauberg 法の時とは前述の如く $\frac{\text{MPA}}{\text{P}} = \frac{17.3}{1}$ であつたので比較の精度としては Clauberg 法の方が優つていと云えよう。然しながら Corner Allen 法によつても C.A による gestagen の bioassay が可能な事が、この実験で初めて立証出来た事になる。

2. 家兎子宮内膜炭酸脱水酵素による estrogen の progesterone 抑制及び助長作用の検討

Lutwak-Mann²⁸⁾ は estrogen は単独では家兎子宮内膜の C.A に影響を与えないが、gestagen と共に投与すると、gestagen の C.A 上昇作用を抑制する事を発見した。又 Miyake & Pincus²¹⁾ は種々の estrogen の C.A 上昇抑制作用は、estrogen の種類には無関係であると述べている。著者もこの点に関し検討を行つたが、多少異つた結果を得た。更に新たな試みとして、estrogen の progesterone 助長作用についても検討し、興味ある知見を得たので報告する。

Clauberg 家兎に progesterone 0.2mg を5日間分割連続皮下投与と同時に種々の量の estrogen を同じく5日間分割連続皮下投与し、最終投与後22~26時間で汚血屠殺し子宮内膜酵素活性を測定した。estrogen としては estradiol 及び estriol を用いた。

測定結果を示すと第10表の如くなり、図示すると第9図の様になる。即ち、或量以上の estrogen は progesterone の子宮内膜 C.A 上昇作用を抑制するが、極く少量の estrogen は逆に progesterone の作用を助長する事が判る。而もこの相反する両作用は半対数座標の上で連続的な直線関係をなす事は興味深い。

家兎子宮内膜に於いて progesterone による progestational proliferation を estrogen が抑制する事は courier²⁹⁾ により述べられており、又 progesteron に

著者は, progesterone 投与と同時に, C.A の特異的抑制剤なる Diamox を併せ投与して見て, その結果, 若し C.A が抑制されると共に proliferation が同時に抑制されるならば②の過程を取る事が証明されると考えた. 但し, Diamox はその性質上体外に速かに排泄されるので, 出来るだけ血中濃度を保たせる為には, 静注は不可であり, 皮下投与, 更に経口分割投与を試みるのが極めて重要な点であると考えた. 以上の見地より実験を行ない, 興味ある新知見を得たので, 次に述べる.

Clauberg 家兎に progesterone 0.5mg又は 1.0mgを 5日間分割連続皮下投与し, 同時に種々の量の Diamox を, 皮下投与の場合には1日1回, 経口投与の場合には1日2回朝夕に分け, 連続5日間分割投与した. 最終投与後22~26時間で汚血屠殺して, 子宮内膜 C.A 活性, 及び progestational proliferation (Mc Pheail scale にて表わす) を測定した.

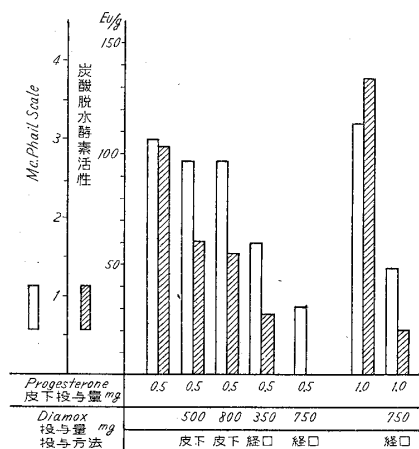
実験結果を示すと第11表の如くなり, これを図に示すと第11図の様になる. 即ち Diamox は皮下投与によつ

第11表 Clauberg 家兎子宮内膜に於ける Diamox 投与による酵素及び Progestational proliferation の抑制

例数	孕投与量	Diamox投与量	投与法	酵素活性度	Mc Phail
※ 5	0.5 mg	—	—	103.4 ± 12.8	2.94
3	0.5	500 mg	皮下	60.8 ± 11.2	2.70
3	0.5	800 mg	皮下	55.2 ± 8.4	2.70
5	0.5	350 mg	経口	27.6 ± 4.3	1.70
5	0.5	750 mg	経口	0	0.87
5	1.0 mg	—	—	134.2 ± 17.3	3.21
5	1.0	750 mg	経口	20.0 ± 5.5	1.37

(※ 対照群)

第11図 Clauberg 家兎子宮内膜に於ける Diamox 投与による酵素及び Proliferation 抑制



ては, 余り progestational proliferation の抑制を認めないが, 5日間朝夕分割による経口投与によれば, 特

に総量 750mgという大量の場合には完全な C.A 抑制と同時に明らかな proliferation の抑制を認めた. 以上の結果より仮説②の過程を取る事が実証された. 即ち, 家兎子宮内膜に progesterone が作用すると, C.A 活性が高まり, C.A の触媒する新陳代謝により progestational proliferation が生じて来るものと断定出来る.

但し, この代謝過程に関与する, C.A 以外の, 他酵素も恐らく存在するのではないかと推測されるが, 以上の実験結果より家兎子宮内膜に於ける C.A の生物学的意義の一端が解明されたものと信ずる.

2) “Matar Dal” (Meta-xylo-hydroquinon)

投与による家兎子宮内膜炭酸脱水酵素の抑制.

近来 Sanyal^{36) 37) 38) 39)}により印度の野生の豆 “Matar Dal” の動物実験的な避妊作用が発表され, その有効成分が meta-xylo-hydroquinon (MXHQ) であると報告されている. 更に彼は印度の多数の婦人にMXHQを服用せしめ, 臨床的な避妊効果も得たと報告している. 而して, その作用機序は progesterone の子宮内膜に対する末梢作用を抑制し, 受精卵の着床を阻害するにあると云う. 一方, Böving¹¹⁾によると家兎子宮内膜 C.A は受精卵の着床に必要な欠くべからざる役割を持つと云う. 故に彼の理論からすれば, 卵着床期の子宮内膜 C.A を抑制すれば, 受精卵の着床は阻害され, 避妊効果が得られる訳である.

著者は Sanyal の報告に Böving の説を適用して, MXHQの避妊効果は, 或は, 子宮内膜 C.A 抑制作用にあるのではないかと推論し, MXHQの家兎子宮内膜に対する作用を検討してみた.

Clauberg 家兎に progesterone 0.5mgを 5日間分割連続皮下投与し, 同時にMXHQを 5日間分割連続皮下又は経口投与した. 最終投与後22~26時間で汚血屠殺し, 子宮内膜 C.A 及び progestational proliferation を測定した.

第12表に示す如く, MXHQには C.A 抑制作用及び progestational proliferation 抑制作用のある事が認め

第12表 “Matar Dal” (MXHQ) の家兎子宮内膜に及ぼす影響

例数	孕投与量	MXHQ投与量	投与法	酵素活性度	McPhail
※ 5	0.5 mg	—	—	103.4 ± 12.8	2.94
5	0.5 mg	100 mg	皮下	59.8 ± 8.4	1.7
5	0.5 mg	250 mg	経口	80.7 ± 11.6	2.0

(※ 対照群)

昭和38年9月1日

辻

1009—9

られた。但し、Diamox の場合とは逆に経口投与よりも、むしろ皮下投与の方が抑制作用が強いようである。或はMXHQは体外への排泄が遅く、腸管からの吸収が悪いかも知らない。兎も角も以上の結果より、家兎に関する限り“Matar Dal”に避妊作用があるとすれば、子宮内膜 C.A 抑制作用が大なる因子をなしているのではないかと考えられる。

考 按

1) 家兎子宮内膜に於ける炭酸脱水酵素の生物学的作用と gestagen の力価検定への応用に関して：

家兎子宮内膜 C.A と gestagen との関係を種々の観点から検討したが、C.A 活性は明らかに gestagen の作用により特異的に支配される事が判り、又 gestagen 投与により家兎子宮内膜に生ずる progestational proliferation は、その形成過程が今日迄不明であつたが、一つには C.A を触媒とする代謝過程により達成される事が著者の行つた Diamox の連続経口分割投与による C.A 及び proliferation の抑制実験により、初めて明らかにされた。故に gestagen の bioassay として従来用いられていた progestational proliferation の検定に代つて、子宮内膜 C.A 活性を測定するのは合理的である。又著者の実験により、 $Y \div 35.5X$ (y: C.A 活性度, x: Mc Phailscale) なる結果が得られ両者の比例関係が確かめられたが、C.A 法は gestagen に対する反応範囲の広い事、4-point assay を利用する事により、数理的にも精度の高い事、実験者の主観に結果が左右されない事、等から見て秀れた検定法と云う事が出来る。

次に C.A により、各種 gestagen の力価を比較した場合、その比はあく迄も相対的なものと考えられる。例えば経口投与の場合 C.A 法では MPA は、PA の 51.3 倍となつたが Mc Phail 法ではそれ程の差は認められない、即ち C.A 法では gestagen の力価の差がはつきりと表われる。換言すれば、C.A 法の方が Mc Phail 法よりも鋭敏である。又同様な理由で Corner Allen 法よりも Mc Phail 法が鋭敏と云えよう。以上の如く家兎子宮内膜により gestagen の bioassay を行なう場合、力価の倍数のみで、その gestagen の力価を判断するのは危険であつて、力価の順がむしろ参考となるのではなからうか。実際臨床的に MPA が PH の 50 倍も強力であるとは考えられない。

(2) 家兎子宮内膜炭酸脱水酵素法による estrogen の progesterone 抑制及び助長作用の検討並びにその実

際的応用に関して：

著者の実験により、子宮内膜 C.A 活性と、estrogen の対数投与量で表わしたところの、estrogen の progesterone 抑制及び助長作用とが、一次的な連続的直線関係となる事が初めて判つた。而も抑制作用では estrogen の種により差が認められ、estrogen 作用の強い estrogen が抑制作用も亦強い事が明らかとなつたが、理論的にも納得出来る所である。而して 4-point assay を用いる事により C.A 法を各種 estrogen の progesterone 抑制作用の力価検定法として使用し得る事を実証した。

更に子宮内膜に於いて progesterone に反応して上昇する C.A 活性を、微量の estrogen が逆に助長すると云う新事実が判つた。この estrogen の progesterone 助長作用に関しては estrogen の種により有意の差異は認められなかつた。而して第 9 図より判る如く、家兎子宮内膜に於いて 0.2mg の progesterone を最大に助長する最適 estrogen 量は 0.025~0.0025 μ g であり、progesterone 量の $\frac{1}{10,000} \sim \frac{1}{100,000}$ に相当する極めて微量なる事、又最適量の範囲が可成り広い事が判つた。

従来 progesterone-estrogen の最適混合比率に関しては、家兎に於いて progesterone の流産防止作用を助長する estrogen の微量混合が知られており、その比率は $\frac{\text{estrogen}}{\text{progesterone}} = \frac{1}{750}$ 又は $\frac{1}{1600}$ とされているが、實際上この量的比率を決めるのは困難とされていた⁴⁰⁾。然るに著者が行つた C.A 法によれば最適混合比が合理的に決定出来るのではないかとと思われる。但し、この最適比は家兎に関して云える事であり、ヒトに臨床的に用いる最適比は $\frac{\text{estrogen}}{\text{progesterone}} \div \frac{1}{10}$ が広く採用されて居り、恐らく動物の種により、最適混合比も異つて来るものと考えられる。

(3) 炭酸脱水酵素抑制剤投与による避妊効果に関して：

Böving¹¹⁾³⁴⁾ は、家兎に於いて受精卵の着床に子宮内膜 C.A が必要不可欠の役割を演じている事を示唆している。即ち家兎子宮内膜に於いて、progesterone $\rightarrow$ C.A $\rightarrow$ 重炭酸塩の変転 $\rightarrow$ アルカリ増加 $\rightarrow$ 卵着床なる現象が起ると仮定している。即ち交尾後 8 日目に家兎子宮内膜 C.A は最高値に達し、その時は丁度 blast cyst の着床期に相当し、blast cyst から重炭酸塩が着床部を通過して母体へ移行すると云う。C.A はその時子宮内膜で行なわれる。

$2\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_3^{--} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ なる反応を触媒して、重炭酸塩より CO_2 を放出さす事により炭酸塩を生ぜしめ、局所のアルカリ性を高め以つて trophoblast の粘着、侵入を容易ならしめると云う。かかる機序により blast cyst の着床を C.A が助けるものと Böving は推論している。

この説が正しければ、C.A 抑制剤を投与して卵着床を阻害し、避妊効果が得られるものと考えられる。しかし、Diamox 或は sulfanilamid 等の C.A 抑制剤を主として静注により家兎に投与し、避妊或は中絶を行わんとした2, 3の試みはすべて失敗したとの報告がある⁹⁾。この点に関し著者は Diamox の投与法が問題ではないかと考える。何故ならば Diamox は循環血中から速かに体外に排泄される傾向を持つからであり、C.A を長期に亙り完全に抑制する方法、或は薬剤が見出されない限りこの試みは成功しないのではなからうか。先に述べた如く、著者は Diamox の分割経口投与により、progestational proliferation の生成を抑制する事に成功したが、これは明らかに C.A を抑制する効果が或程度持続的に得られたものと思う。故に Diamox の分割経口投与法(朝、夕分割)を長期に亙り続けるならば或は家兎に於ける避妊効果が得られるかも知れぬ。

又以上と関連して興味深いのは、“Matar Dal”(MXHQ)に、家兎子宮内膜の C.A 及び progestational proliferation を抑制する傾向のある事が、著者の実験により判明した事である。即ちMXHQには、持続的な C.A 抑制作用があるものと考えられる。故に Sanyal の云う如く“Matar Dal”に避妊作用が確かにあるとすれば家兎に関する限り、或は子宮内膜 C.A 抑制作用が避妊効果の大なる因子をなしているものと推測出来るよう。

然しながら、以上の事柄に関して結論を出すには、今後多くの検討が必要と思われる。

以上、家兎子宮内膜の C.A に関して、検討を加え、幾つかの新知見を得る事が出来た。而してそれにより、家兎雌性器に於ける C.A の存在につき、凡その展望を可能ならしめたものと思う。なお、著者は、更に基礎的研究として、ラットの性器 C.A 及び臨床的研究として、ヒト女性器 C.A 並びに臍帯血 C.A 等に関して検討し、悉かの成果を収めているので、それらについて近く報告する予定である。

稿を終るに当り、御指導、御校閲を賜った恩師小林教授に深甚な謝意を表すと共に、御助言、御協力を賜った

古畑先生、荒井先生その他教室員各位に深謝致します。

(なお本文の一部は昭和35年4月、第33回日本内分泌学会総会に於いて、又本文要旨は昭和38年4月第15回日本産科婦人科学会総会に於いて発表した。)

文 献

- 1) Meldrum, N.U. & Roughton, F.J.W.: J. Physiol. 80 : 113, 1933. —2) Goor, H. Van: Enzymologia, 13 : 75, 1949. —3) Takanosuke Mori & Hayata Iwasaki: Igakuto Seibutsugaku 29, 112, 1953. —4) B. Becker & M.A. Constant: Am. J. Ophthalmol. 42 : 406, 1956. —5) Braun Falco & Ratkjens: Klin. Wochsthr. 33 : 826, 1955. —6) Keilin, D. & Mann, T.: Biochem. J. 34 : 1163, 1940. —7) Lutwak-Mann, C.: J. Endocrinol. 11 : X, 1954. a. —8) Lutwak-Mann, C. & Laser, H.: Nature. 173 : 268, 1954. —9) Lutwak-Mann, C.: J. Endocrinol. 13 : 26, 1955. —10) Pincus, G. & T. Miyake: J. Endocrinol. 61 : 528, 1957. —11) Böving, B.G.: Endocrinology of Reproduction. 205, 1954. —12) Miyake, T. & G. Pincus: J. Endocrinol. 65 : 64, 1959. —13) Meldrum, N.U. & Roughton, F.J.W.: J. Physiol. 80 : 113, 1933. —14) Scott, D.A. & Mendiv, J.R.: J. Biol. Chem. 139 : 661, 1941. —15) Hadgson, T.H.: Brit. J. Exper. Path. 17 : 75, 1936. —16) Wilber, K. & Anderson, N.G.: J. Biol. Chem. 176 : 147, 1948. —17) Y. Ogawa & G. Pincus: Endocrinol. 67 : 551, 1960. —18) Brinkman, R. Margaria, R. & Roughton, F.J.W.: Phil. Trans. A. 232 : 65, 1933. —19) Brinkman, R.: J. Physiol. 80 : 171, 1934. —20) Philpot, E.T. & Philpot, J.L.: Biochem. J. 30 : 219, 1936. —21) Miyake, T. & G. Pincus: Endocrinol. 63 : 816, 1958. —22) Burn: Biological Standardization, 2nd Edition, Oxford Medical Publication. —23) Mc Phail, M.K.: J. Physiol. 83 : 145, 1935. —24) Robson, J.M.: Recent Advances in Sex and Reproductive Physiology. London: Churchill. —25) Pincus, G. & N. T. Werthessen: Am. J. Physiol. 120 : 1, 1937. —26) Clauberg: Klin. Wschr. 14 : 1601, 1935. —27) Corner a. Allen: Am. J. Physiol. 86 : 74, 1928. —28) Lutwak-Mann & Adams: J. Endocrin. 15 : 43, 1957. —29) Courrier, R.: Vitamins and Hormones, 8 : 179, 1950. —30) Höber, R.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 49 : 87, 1942. —31) Mann, J. & Keilin, D.: Nature. 146 : 164, 1946. —32) Roblin, R.O. & Clapp, J.W.: Am. J. Chem. Soc. 72 : 4890, 1950. —33) Miller, W.H., Dessent, A.M. & Roblin, R.O.: J. Am. Chem. Soc. 72 : 4893, 1950. —34) Böving, B.G., in Lloyd: Endocrinology of Reproduction, Academic Press, New York, 205, 1959. —35) 辻: 医学の歩み, 31巻 : 13号, 727頁. 昭和34年. —36) Sanyal, S.N.: Calcutta Medical Journal. 48 : 399, 1951. —37) Sanyal, S.N.: Calcutta Medical Journal. 49 : 343, 1952. —38) Sanyal, S.N. & Ganguly, A.L.: Calcutta Medical Journal, 50 : 409, 1953. —39) Sanyal, S.N.: Internal Med. Abstr. 7 Rev. 18 : 27, 1955. —40) 赤須: 産婦人科とホルモン療法, 金原出版 : 100頁, 1956.

(No. 1612 昭38・4・22受付)