

ウサギ子宮筋乳酸脱水素酵素アイソザイム パターンとその妊娠並びに性ホルモン投与による変動

日本医科大学附属第一病院産婦人科学教室(主任: 鈴木正勝教授)

日本医科大学第一生化学教室(指導: 宿谷良一教授)

大学院学生 野田 信之

概要 妊娠並びに性ホルモン投与によるウサギ子宮筋 LDH isozyme の変動を検討し, 以下の成績を得た.

1) ウサギ子宮筋のLDH比活性は妊娠に伴って増加し, 分娩を契機として減少復元する. この変化は子宮筋に特異的であり, DNA当りLDH比活性の変動から, 細胞内におけるLDH絶対量の増減による事が知られた. 2) この変化は寒天電気泳動による isozyme pattern 並びに analogue ratio の解析から, 主としてM型LDH量の増減による事が明らかとなった. 3) 去勢ウサギに estrogen を投与しても, 妊娠時と同様な変化がみられた. この estrogen 効果は actinomycin D 及び puromycin 投与によつて抑制された. 4) 上記の結果から妊娠に伴う子宮筋M型LDHの誘導における estrogen の役割及びM型LDH増量の生理的意義について若干の考察を行なった. 5) 妊娠による子宮筋の増大には細胞の増殖と肥大の両者が関係している事を推論した.

緒 言

乳酸脱水素酵素(EC. I.I.I. 27, L-lactate: NAD oxidoreductase) が電気泳動的に5種類の isozyme からなる事はよく知られている. これらの isozyme は物理化学的性状並びに触媒性を異にする2種類の subunit, すなわち H-subunit (心筋型) および M-subunit (骨格筋型) の組合せによつて, M_4 , M_3H , M_2H_2 , MH_3 , H_4 のような四量体を形成している(Kaplan et al., 1961, 1962, Markert and Ursprung, 1962).

これら5種類の isozyme の存在比は臓器組織により異なり(Fine et al., 1963), 心筋のような好氣的代謝を営む臓器では H-subunit を多く含むのに対し, 骨格筋のような嫌氣的代謝に適した臓器では M-subunit の含量が高い.

一方同一組織でも鶏胚の発育(Cahn et al., 1962)やカエルの変態(梶田ら1965)などでは発生分化の過程に応じてM型およびH型の存在比の変動する事が報告されている. 更に成熟した個体においても妊娠子宮のようにホルモンの影響をうけて, 特定の臓器LDHの H/M 比に変動の起こる事も知られている. Richterich et al., (1963) はヒト子宮筋を用いて妊娠によつてLDH活性が上昇

し, その際M型LDHが相対的に増加している事を明らかにした. Allen(1961) および Goodfriend et al., (1964) はそれぞれマウス, あるいはラットおよびウサギを用いて, estrogen 投与により妊娠時と同様子宮筋LDH活性の上昇と M-subunit の増加の起こる事を示した. しかしこれらの実験ではLDH活性を蛋白量当りの比活性で測定しているために, 活性上昇が細胞内LDHの新生増量によるものか, あるいは細胞内総蛋白量の減少による相対的増加に過ぎないのかを確定する事は出来ない.

著者はこの点に留意して, ウサギ子宮筋 LDH isozyme が妊娠並びに性ホルモン投与によつて, それぞれどのように変動するかを子宮重量, 蛋白量との関係, 特にDNA量との関連の下に詳細な検討を加えた. これらの事実とホルモンによるLDH誘導現象に対する蛋白質並びにRNA合成阻害剤の効果とを併せて考慮した結果, 妊娠子宮におけるLDH活性の増加は主として細胞内におけるM型 subunit の de novo 合成によるものであり, estrogen により特異的に誘導される事を知り得た. なお併せて妊娠による子宮の発育増大の原因についても検討を加え, それが細胞の増殖と肥

大の両者に起因する事を明らかにした。

実験材料

実験には体重 2600~4100gr の雌ウサギを用いた。去勢ウサギは両側卵巢摘出後 4 週以上経たものを実験に供した。Estrogen(estradiol benzoate) および progesterone (oopholmin luteum) は帝国臓器から購入した。Actinomycin D は Merk Sharp & Dohme社より寄贈を受けた。Puromycin は Nutritional Biochemicals Co. の製品を使用した。DPN, DPNH, deamino DPNH, phenazine methosulfate および nitro blue tetrazolium は Sigma 社より購入した。

実験方法

A) 酵素標品の調整：ウサギの耳静脈へ空気約 20 ml を注入して屠殺したのち、直ちに子宮筋、骨格筋、心筋を摘出する。子宮筋では内膜除去後、総重量測定、更に非妊娠例では体部と腔部、妊娠例では胎盤附着部、非附着部、腔部にわけて夫々の重量も測定した。以上の子宮各部組織並びに骨格筋、心筋など各種筋肉組織を細切し、直ちにイオン強度 0.1, pH 8.6 の冷ペロナル緩衝液に混合し、氷冷下にガラスホモジナイザーにかけ、20 % homogenate を調整した。これを 20 分、12,000 r.p.m. で冷凍遠沈し、上清を酵素液とした。

B) LDH 活性測定：Markert-Ursprung(1962) 法に従ったが、反応速度は DPNH の 340 m μ における吸光度が 90 秒間に減少する量を測定し、これを総 LDH 活性とした。但し DPNH の吸光度が 90 秒間に 1.00 減少する活性を 1 単位とした。この総 LDH 活性を湿重量 1 mg, 蛋白量 1 mg および DNA 量 1 mg 当りの LDH 比活性としてあらわした。また M 型, H 型を分別測定した場合はそれぞれの比活性を M 型比活性, H 型比活性と記載した。

C) 寒天電気泳動：電気泳動は Wieme (1959) の slide glass 法に従い、寒天ゲルに酵素液を 2~5 μ l 添加し、4 °C の冷室で 3.3mA/cm, 250~350 volt で 3 時間泳動した。泳動終了後、直ちに van der Helm (1962) の LDH 染色を行ない zymogram を作製した。

D) Analogue ratio と M 型 % : Analogue ratio は Kaplan et al., (1962) に従い次式より求めた。

Analogue ratio =
$$\frac{\text{low pyruvate での deamino DPNH 吸光度減少}}{\text{high pyruvate での DPNH 吸光度減少}}$$
 Fine et al., (1963) は各種動物の M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃, H₄ の analogue ratio を測定し、M 型 % と analogue ratio が比例関係にある事を報告している。著者はウサギ骨格筋および心筋の 20 % homogenate を電気泳動した後、pH 7.5, 0.1M リン酸緩衝液にて M₄ および H₄ isozyme を夫々抽出し、直ちに analogue ratio を測定し、M₄ = 0.50, H₄ = 3.10 を得た。これより M 型 % と analogue ratio が比例関係にあるものとして、nomogram を作製した。

蛋白質の定量は Lowry (1951) 法により、また DNA の定量は Schneider (1945) 法により測定した。

実験結果

A. 妊娠に伴う子宮筋 LDH isozyme

1. 非妊ウサギ子宮筋の LDH isozyme : 対照として、まず非妊ウサギの各種筋肉組織 LDH 比活性を調べたところ、表 1 の結果を得た。これより明らかな如く、湿重量当り、蛋白当り、DNA 当りのいずれについても子宮体部と子宮腔部の間に有意の差は認められなかった。更に図 1, 表 1 の如く isozyme pattern 並びに analogue ratio の解析によつても、isozyme の存在比は両者の間で有意の差はなかった。

2. 妊娠に伴う各種筋肉組織 LDH 比活性の変動：妊娠に伴う各種筋肉組織 LDH 比活性の変動について経時的に測定したところ、妊娠進行に伴つて骨格筋、心筋などでは対照と比べて LDH 比活性に有意の変化はみられなかったが、表 1 に示すように子宮筋では総重量、総蛋白量、総 DNA 量の増加と平行して、子宮各部位の単位湿重量当り、単位蛋白量当りおよび単位 DNA 量当りの LDH 比活性はいずれも著明に増加し、一連の正の相関が認められた。妊娠 30 日でこの変化は極大に達し、子宮筋総湿重量では非妊子宮の 4.2 倍、総蛋白量では 5.1 倍、総 DNA 量では 2.4 倍にそれ

表 1

	総重量	各重 部 位 量	蛋 白 量			DNA量		LDH比活性			Analogue ratio	M 型	M型LDH 比 活 性		H型LDH 比 活 性	
	g	g	$\mu\text{g}/\text{mg}$ W.W.	mg/mg DNA	総 蛋白 量 (mg)	$\mu\text{g}/\text{mg}$ W.W.	総 DNA 量 (mg)	unit/ mg W.W.	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA		%	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA
非妊	8.5	C 8.1	38.0	19.5	322	1.90	16.1	0.11	2.71	52.1	1.40	65	1.77	34.1	0.94	18.0
		P 0.4	36.3	18.1		1.88		0.10	2.73	52.8	1.40	65	1.79	34.5	0.94	18.3
妊娠 10日	14.3	C $\oplus$ 4.3	43.7		643			0.15	3.55		1.25	71	2.53		1.02	
		C $\ominus$ 9.6	46.0					0.18	5.38		1.20	73	3.93		1.45	
		P 0.4	40.5					0.15	3.63		1.20	73	2.65		0.98	
妊娠 20日	23.3	C $\oplus$ 6.5	42.0	32.1	1021	1.31	30.6	0.17	4.06	130.2	1.10	77	3.12	100.1	0.94	30.1
		C $\ominus$ 16.2	44.9	33.1		1.38		0.21	4.68	152.0	1.00	81	3.78	122.8	0.90	29.2
		P 0.6	36.5	32.9		1.11		0.15	4.11	135.0	1.00	81	3.32	109.1	0.79	25.9
妊娠 30日	35.5	C $\oplus$ 9.5	46.7	39.8	1637	1.17	38.0	0.27	5.79	230.6	0.90	85	4.90	195.1	0.89	35.5
		C $\ominus$ 25.3	46.3	44.6		1.04		0.30	6.48	270.9	0.88	86	5.55	231.9	0.94	39.0
		P 0.7	36.3	35.6		1.02		0.24	6.32	235.5	0.88	86	5.41	201.6	0.91	33.9
分娩 後 3日	19.4	C 18.8	45.0		869			0.24	5.33		1.00	81	4.31		1.02	
		P 0.6	42.6					0.21	4.69		1.00	81	3.79		0.90	
分娩 後 7日	13.2	C 12.8	43.7		571			0.21	4.50		1.20	73	3.29		1.21	
		P 0.4	40.0					0.15	3.75		1.20	73	2.74		1.01	
分娩 後 14日	10.9	C 10.6	40.5	21.9	439	1.85	20.1	0.12	2.96	64.8	1.33	68	2.01	44.0	0.86	20.8
		P 0.3	39.0	21.2		1.84		0.12	3.08	65.3	1.33	68	2.09	44.4	0.99	20.9

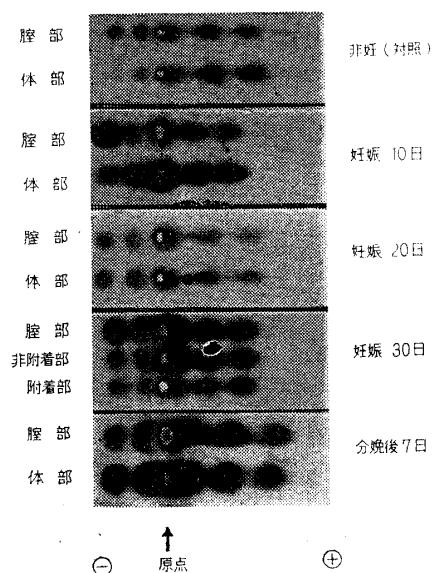
ぞれ増加した。それと同時に子宮各部位のLDH比活性は胎盤附着部、非附着部、腔部の順に、単位湿重量当りでは非妊子宮の2.6倍、2.9倍、2.4倍、単位蛋白量当りでは2.1倍、2.4倍、2.3倍に増加、更に単位DNA量当りでは、それぞれ4.4倍、5.2倍、4.5倍と顕著な増加を示したが、中でも非附着部は最も高い増加率を示した。単位DNA量当りの蛋白量も同様に胎盤附着部2.1

倍、非附着部2.3倍、腔部2.0倍に増加しているが、DNA当りのLDH比活性増加倍率の方が蛋白量の増加倍率に比べて、はるかに高い。以上の結果は妊娠に伴い子宮筋総湿重量が増加すると同時に子宮各部位の蛋白量並びにLDH活性の両者がDNAすなわち細胞当りに増加する事を示している。従つて蛋白量当りでLDH比活性を表わしても、それは細胞内LDH変動の指標としては妥

当性が少ない事、更にその増加する蛋白質の中でもLDH活性の増加が特に高い事、またこれらの増加率は子宮各部位では特に有意の差がない事等がわかる。なお妊娠によつてこのような増加を示したLDH比活性は分娩を契機として表1のように急速に減少し、分娩後14日では殆んど対照値に復元した。

3. 妊娠による子宮筋LDH isozyme pattern : 妊娠並びに分娩に伴うこのようなLDH比活性の変動がその isozyme pattern とどのような関連を示すかを確かめる為に、寒天電気泳動を行ない図

図 1



1の結果を得た。対照の isozyme pattern では体部、腔部共H型が多いのに対し、妊娠ウサギの isozyme pattern では胎盤附着部、非附着部、腔部共M型が増加しているのが明らかに認められる。しかしこの増加は分娩を契機として次第に減少し、分娩後14日では体部、腔部共に殆んど対照の isozyme pattern に復元した。以上の結果から妊娠による子宮筋LDH比活性の上昇並びに分娩後の下降の要因はM型LDH比活性の変動による事が定性的に知られる。

4. 妊娠時の子宮筋LDHの analogue ratioとM型% : 上記の変化を更に定量的に検討するため analogue ratio を測定し、これよりM型%の妊娠

に伴う推移並びに単位蛋白量およびDNA量当りのLDH比活性から妊娠に伴う子宮各部位のM型およびH型LDH比活性の変動を観察したところ、表1の結果を得た。すなわち妊娠の進行に伴い胎盤附着部、非附着部、腔部など子宮各部位のLDH比活性は単位蛋白量当り2.1~2.4倍、単位DNA量当り4.4~5.2倍に増加するが、この際M型LDHの相対的増加が著しく、妊娠30日では約86%に及んでいる。各妊娠日数におけるM型%より比活性中に占めるM型およびH型LDHの比活性を算出すると同表のようにM型LDH比活性では単位蛋白量当りで2.8~3.1倍、単位DNA量当りで5.7~6.8倍と両者とも増加を示す。これに対しH型LDH比活性では単位蛋白量当りにすれば殆んど有意の差が認められないのに、単位DNA量当りにすれば1.9~2.2倍とM型ほどではないが、明らかに増加している事が知られる。単位蛋白量当りの活性のみで判定する事の危険性がここにも明確に示されている。これらの結果から妊娠に伴うDNA当りLDH比活性の上昇はM型およびH型両者の活性増加によるものであるが、M型の増加倍率がH型に比し著しく高いため相対的にはM型の選択的増加の様相を呈しているものと解釈される。

しかし妊娠によつてこのような増加を示したM型LDH比活性は分娩を契機として減少し、分娩後14日では殆んど対照値に復元した。以上の結果から妊娠時の子宮筋LDH比活性の上昇並びに分娩後の下降は主としてM型LDH比活性の選択的増減に由来する事が確認された。

B. 性ホルモン投与による子宮筋LDH isozyme の変動

1. 去勢ウサギの子宮筋LDH isozyme : 子宮筋LDHに対する性ホルモンの効果をみるため、まず去勢ウサギの子宮について検討を行なった。表2に示す如く、去勢ウサギでは非妊ウサギに対して、子宮筋総湿重量0.2倍、総蛋白量0.17倍、総DNA量0.37倍に減少すると共に子宮各部位の単位DNA量当りの蛋白量並びにLDH比活性はそれぞれ体部では0.47倍並びに0.30倍、腔部では

1971年 2 月

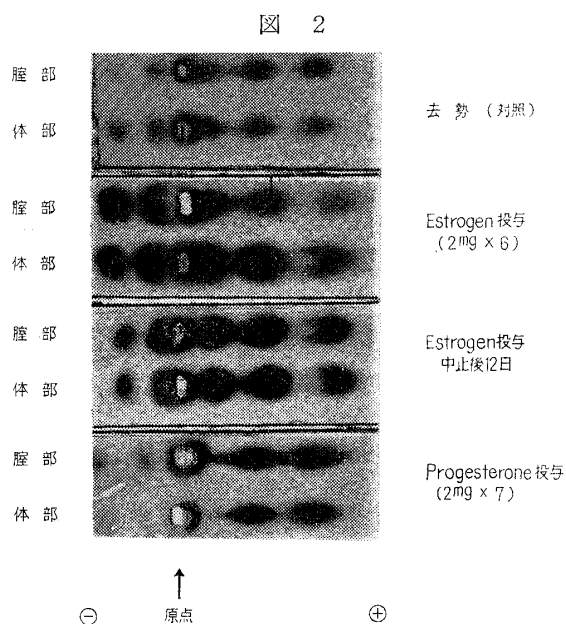
野 田

87

表 2

	総重量	各重 部 位 量	蛋 白 量			DNA量		LDH比活性			Analogue ratio	M 型	M型LDH 比 活 性		H型LDH 比 活 性	
	g	g	$\mu\text{g}/\text{mg}$ W.W.	mg/mg DNA	総 蛋 白 量 (mg)	$\mu\text{g}/\text{mg}$ W.W.	総 DNA 量 (mg)	unit/ mg W.W.	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA		%	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA	unit/ mg 蛋白	unit/ mg DNA
非妊	8.5	C 8.1	38.0	19.5	322	1.90	16.1	0.11	2.71	52.1	1.40	65	1.77	34.0	0.94	18.1
		P 0.4	36.3	18.7		1.88		0.10	2.73	52.8	1.40	65	1.79	34.5	0.94	18.3
去勢	1.7	C 1.5	31.6	9.2	55	3.44	6.0	0.05	1.93	15.6	1.63	57	0.96	8.8	0.75	6.8
		P 0.2	31.1	8.3		3.75		0.06	1.92	16.0	1.50	62	1.19	9.8	0.74	6.2
P. 2mg 7 日	1.9	C 1.7	39.0		73			0.08	1.92		1.50	62	1.18		0.74	
		P 0.2	35.0					0.08	2.14		1.50	62	1.32		0.82	
E. 2mg 1 日	4.7	C 4.4	44.5		209			0.12	2.69		1.30	69	1.86		0.83	
		P 0.3	41.0					0.12	2.95		1.30	69	2.04		0.91	
E. 2mg 3 日	6.3	C 6.0	38.0		239			0.15	3.94		1.20	73	2.88		1.06	
		P 0.3	36.3					0.15	4.13		1.20	73	3.02		1.11	
E. 2mg 4 日	7.4	C 7.0	48.5		355			0.18	3.71							
		P 0.4	43.2					0.18	4.16							
E. 2mg 5 日			54.0					0.24	4.44		1.00	81	3.59		0.85	
			43.5					0.21	4.83		0.90	85	4.10		0.73	
E. 2mg 6 日	12.4	C 12.0	50.0	33.7	619	1.66	20.5	0.27	5.40	162.2	0.90	85	4.06	137.5	0.74	24.7
		P 0.4	48.0	32.4		1.48		0.27	5.62	183.6	0.86	86	4.84	158.3	0.78	25.3
E. 2mg 7 日			51.0					0.24	4.70		1.00	81	3.80		0.90	
			43.8					0.21	4.80		0.90	85	4.07		0.73	
E. 投与 中止後 3 日	10.4	C 10.0	42.5		439			0.18	4.22		1.00	81	3.41		0.81	
		P 0.4	34.0					0.18	4.41		1.00	81	3.56		0.85	
E. 投与 中止後 7 日			44.5					0.18	4.03		1.20	73	2.25		0.83	
			35.0					0.15	4.28		1.20	73	2.43		0.90	
E. 投与 中止後 12 日	3.5	C 3.2	37.0	16.1	129	2.30	8.0	0.08	2.03	32.2	1.40	65	1.33	21.0	0.70	11.2
		P 0.3	35.0	15.9		2.20		0.08	2.14	34.1	1.40	65	1.40	22.3	0.74	11.8

0.46倍並びに0.30倍に減少を示した。この事から去勢によつて子宮筋では細胞当りの蛋白量並びにLDH活性が減少する事、又減少する蛋白質の中でもLDH活性は特異的に減少している事が知られる。更に図2、表2の isozyme pattern 並びに



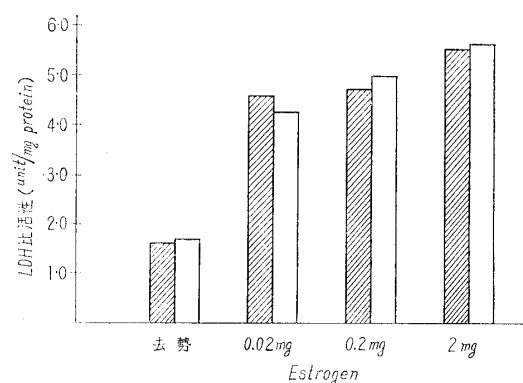
analogue ratio の解析から、去勢ウサギの子宮筋LDH比活性減少の要因がM型LDH比活性の選択的減少に由来する事が確認された。

2. 子宮筋LDH isozymeに及ぼすprogesteroneの効果：去勢ウサギに毎日 progesterone 2 mg 7日間筋肉内に連続投与し、最終投与後24時間目の子宮筋LDH isozymeについて検討したところ、表3の如く、LDH比活性では単位湿重量当りにも、また蛋白量当りにも、軽度の増加がみられた。しかし図2、表2に示す如く、isozyme pattern 並びに analogue ratio の解析を行なつた結果、対照の去勢ウサギと比較して isozyme の存在比に変動は認められなかつた。

3. 子宮筋LDH isozymeに及ぼすestrogenの効果

a. Estrogen投与に伴う子宮筋LDH比活性の変動：子宮筋LDH比活性とestrogen投与量との関係を求めるため、去勢ウサギにestrogen 0.02 mg, 0.2mg, および2 mgをそれぞれ筋肉内に6日

図 3



間連続投与し、最終投与後24時間目の子宮筋LDH比活性 (unit/mg. prot.) を測定したところ、図3のように活性は estrogen の投与量と共に増加し、2 mg投与時にはほぼ極大になる事を知つた。次に estrogenによる子宮筋LDH比活性の時間的変動を追求し、表3の結果を得た。毎日 estrogen を2 mg筋肉内に連続投与してゆくと、投与日数の増加に伴い子宮筋総湿重量、総蛋白量は増加するが、それと同時に体部、腔部など子宮各部位のLDH比活性もそれぞれ著明に増加し、6日間連続投与時に極大を示し、妊娠30日と比肩すべき水準に到達した。この時点では対照の去勢ウサギに比し、子宮筋総湿重量 7.1倍、総蛋白量11.3倍、総DNA量 3.4倍にそれぞれ増加し、単位DNA量当りの蛋白量並びにLDH比活性は体部で 3.8倍並びに10.5倍、腔部で 3.9倍並びに11.3倍の増加率を示した。しかし estrogen によつてこのような上昇を示したLDH比活性は estrogen を7日目で中止すると急速に減少し、投与中止後12日目では非妊レベル以下となり、対照値に復元する傾向を示した。以上の結果から estrogen 投与によつて子宮各部位の蛋白量並びにLDH活性がDNA当り、すなわち細胞当りに増加する事、その増加する蛋白質の中でもLDH比活性の相対的増加率ははるかに高く、特異的に上昇するなど正常妊娠と同様の現象をたどる事が判明した。

b. Estrogen投与による子宮筋LDH isozyme pattern の変動：Estrogen投与によるLDH比活性の増加がその isozyme pattern とどのような関

連を示すかを確かめるために、寒天電気泳動を行ない図 2 の結果を得た。対照の isozyme pattern では体部、腔部共 H 型が多いのに対し、LDH 比活性が極大を示した estrogen 2mg 連続 6 回投与ウサギの isozyme pattern では体部、腔部共 M 型が相対的に増加しているのが認められる。しかしこの増加は estrogen 投与中止を契機として減少し、投与中止後 12 日目ではほぼ対照の isozyme pattern に復元する傾向を示した。以上の結果から、estrogen 投与並びに投与中止後における子宮筋 LDH 比活性の上昇並びに下降の要因は正常妊娠と同様 M 型 LDH 比活性の増減に由来する事が定性的に推定される。

c. Estrogen 投与による子宮筋 LDH の analogue ratio と M 型% : Analogue ratio の分析から M 型% を算出し、LDH 比活性との相関から estrogen 投与に伴う子宮各部位の M 型および H 型 LDH 比活性の変動を観察したところ、表 2 の如く、正常妊娠と同様の経過をたどる事が確認された。すなわち estrogen 投与に伴ない体部、腔部など子宮各部位の H 型 LDH 比活性は単位蛋白量当りでは対照のそれと比較して有意の変化はみられなかつたが、単位 DNA 量当りでは 3.7~4.1 倍に増加している。これに対し M 型 LDH 比活性は極大時で単位蛋白量当り 4.2~4.9 倍、単位 DNA 量当りで 15.6~16.1 倍と共に著明な増加を示した。しかし estrogen を 7 日目で中止すると、

その後 M 型 LDH の占める割合並びに比活性は減少を示し、投与中止後 12 日目には非妊レベル以下となり、ほぼ対照値に復元した。以上の結果から estrogen 投与に伴う子宮筋 LDH 比活性の上昇並びに投与中止後の下降の要因は正常妊娠と同様 M 型 LDH 比活性の選択的増減に由来する事が知られる。

d. Estrogen による子宮筋 LDH の誘導現象に対する actinomycin D および puromycin の効果：上記のような子宮筋 LDH の estrogen による比活性上昇が酵素分子自身に対する賦活作用または阻害剤の除去などによる酵素触媒能の上昇によるものなのか、あるいはまた酵素量の絶対的増加による誘導現象なのかを検討するために、RNA 並びに蛋白合成の特異的阻害剤である actinomycin D および puromycin をこの系に加えてその効果を検討した。本実験では estrogen, actinomycin D, puromycin はすべて腹腔内に投与した。1 日投与量はそれぞれ 2 mg, 0.7mg/kg 体重, 25mg/kg 体重で投与回数は 2 回である。第 2 回目投与は第 1 回目投与後 24 時間目であり、第 2 回投与後 12 時間目に実験に供した。結果は表 3 に示す如く、estrogen を与えない群では actinomycin D の有無に拘らず LDH 比活性に有意の変化はみられなかつたが、estrogen 投与群では actinomycin D あるいは puromycin を同時投与する事により LDH 比活性並びに M 型の占める割合および M 型 L

表 3

Antibiotics	Estrogen	子 宮 各 部 位	L D H 比 活 性	Analogue ratio	M 型	M 型 LDH 比 活 性	H 型 LDH 比 活 性
			unit/mg 蛋白		%	unit/mg 蛋白	unit/mg 蛋白
—	—	体 部	1.71	1.63	57	0.96	0.75
		腔 部	1.93	1.50	62	1.19	0.74
Actinomycin D	—	体 部	1.50	1.66	56	0.84	0.66
		腔 部	1.17	1.75	52	0.61	0.56
—	2 mg	体 部	3.01	1.10	77	2.31	0.70
		腔 部	3.76	1.00	81	3.04	0.72
Actinomycin D	2 mg	体 部	2.04	1.20	73	1.49	0.65
		腔 部	2.31	1.33	68	1.57	0.74
Puromycin	2 mg	体 部	2.28	1.40	65	1.49	0.79
		腔 部	2.50	1.50	62	1.54	0.96

DH比活性の増加は抑制された。なおH型LDH比活性はすべての例において、対照と有意の差が認められなかつた。これらの結果から、estrogenによるM型LDH比活性の選択的増加は酵素産生量の増加に由来する誘導現象であり、単なる酵素触媒能の上昇によるものではない事が明らかであり、妊娠によるM型LDHの比活性増加もestrogenによる誘導現象である事が推定される。

考 案

上述の実験は妊娠並びに性ホルモン投与による子宮筋LDH isozymeの特異的変動を主として観察したものであるが、同時に得られた子宮筋の湿重量、蛋白量およびDNA量の変動に関する知見から、まず子宮増大機構の基本的な問題について若干の検討を加えたい。妊娠並びに性ホルモン投与によつて子宮が発育増大し、これに伴つて総湿重量が増加する事はよく知られている。このように重量が増加する要因に関しては次の2説があげられる。ひとつは蛋白量、水分量の増加に由来する細胞自体の肥大と間質の浮腫状拡大を支持するものであり(Saenger, 1887, 横山, 1967), 他のひとつは細胞の分裂増殖を支持するものである(Stieve, 1929, 吉田, 1935, 中村, 1956)。しかし子宮筋細胞の形態的特性から直接これを定量的に証明する決定的報告はみあたらない。

著者の実験成績では、妊娠並びにestrogen投与により子宮筋に特異的な顕著な変動、すなわち子宮筋総湿重量の増加と共に単位DNA量当りの蛋白量増加が確認された。同種生物の体細胞中に含まれるDNA量が一定である事はよく知られている。従つてこのDNA当りの蛋白量増加は細胞当りの蛋白量増加、すなわち細胞肥大を示すものであり、これが妊娠による子宮増大のひとつの要因である事を示唆する。

一方単位湿重量当りのDNA量から総DNA量を算出し対照のそれと比較検討すれば、これより対照に対する細胞増殖の有無を推定する事ができる。著者の実験成績では、非妊子宮の総DNA量は16.1mgであり、妊娠によつて増加し、妊娠30日では38.0mgに増加した。現在ウサギ体細胞のDN

A含量については5.3~8.7 $\mu\text{g}/\text{cell}$ であると報告されている(Sober, 1968)。その平均値6.8 $\mu\text{g}/\text{cell}$ をとり、子宮にあてはめれば非妊子宮の細胞数は約 5.6×10^9 個であり、妊娠によつて約2.4倍の 13.4×10^9 個に増加したものと計算される。

Estrogen投与によつても同様の細胞増殖がみられるが、これらの変化が分娩並びにestrogen投与の中止により急速に復元する事から、estrogenは子宮細胞の肥大にとどまらず、増殖すなわち細胞分裂をも調節しているものと考えられる。去勢ウサギの子宮筋総DNA量が非妊時の約 $1/3$ に減少する事もこの推論をよく裏付けている。しかしこれらの増減する細胞の種類については、これが平滑筋細胞の増殖によるものなのか、結合組織細胞の増殖によるものなのか、あるいは両者によるものなのかは現在の結果から判断する事はできない。

Richterich et al., (1963)はヒト子宮筋を用いて、妊娠時にはLDH活性が高く、殊にM型が定性的に増加する事を報告し、本邦では前山(1969)らもこれを確認している。著者はウサギを用いて妊娠に伴う各種筋肉組織LDH比活性の変動を検討し、骨格筋、心筋等ではLDH比活性に有意の変化はみられなかつたが、子宮筋のLDH比活性は前述した如く、細胞当りに増加する蛋白質の中でも特異的に増加する事、更にisozyme pattern並びにanalogue ratioの解析から、この増加が主としてM型LDH比活性の選択的増加による事などを確認した。M型LDHが骨格筋その他嫌氣的代謝に適した臓器に多量に含まれ、高濃度のpyruvate存在下でも高い活性を保持する事はよく知られている。この事から考えて、非妊子宮筋に比して妊娠子宮筋のM型LDH含有量が高い事は妊娠子宮筋には陣痛時における長時間にわたる持続的な筋収縮に際しても活発に嫌氣的解糖を行なう能力のある事を示すもので、筋収縮の力源ATPを供給する上で極めて合目的な事と思われる。妊娠による子宮筋LDH比活性、殊にM型LDH比活性が細胞内で選択的に増加する事は、子

宮筋が形態学的には平滑筋でありながら、機能的には骨格筋型へ変化する事を示唆する。この事は妊娠に伴う子宮の増大が非妊子宮筋細胞の増殖肥大による単なる量的増大ではなく、妊娠する事によつて子宮筋細胞がLDHのM型化すなわち蛋白パターンを異にした細胞へ質的に転換する事を意味しており、分子レベルでの分化現象であるとも考えられる。

妊娠子宮筋の状態変化がestrogen, progesteroneなどの性ホルモンによつて調節されている事はよく知られている(Csapo, 1956)。上記のような子宮筋の妊娠による分子レベルでの変動が性ホルモンとどのような相関関係にあるかを究明するため、著者は性ホルモン投与によるウサギ子宮筋LDH isozymeの変動について検討した。子宮筋LDHの活性と性ホルモンの相関については、すでにAllen(1961)およびGoodfriend et al., (1964)がそれぞれマウスあるいはラットおよびウサギを用いて、性ホルモン投与による子宮筋LDH isozymeの変動を検討し、progesterone投与ではLDH活性は軽度上昇するが、H/M比は不変で、質的变化がない事、一方estrogen投与では蛋白当りのLDH比活性が特異的に上昇し、殊にM型が増加すると報告している。著者のウサギを用いた実験成績でも、progesterone投与ではLDH比活性は軽度の増加を示したが、isozymeの存在比は不変でGoodfriend et al., (1964)の報告と一致した。従つてprogesteroneはM型およびH型LDHの平行的増加に関係していると推定される。これに対して、estrogen投与ではLDH比活性はDNA当り、すなわち細胞当りに増加する事、更にisozyme pattern並びにanalogue ratioの解析から、この増加はM型LDH比活性の選択的増加に由来する事など正常妊娠と全く同様の現象をたどる事が確認された。

EstrogenによるこのようなM型LDH比活性の増加機構について、Goodfriend et al., (1964)はラットを用いてestrogenによるM型LDH比活性の選択的増加がactinomycin Dの同時投与によつて抑制される事から、estrogenはその標的臓

器の遺伝子に働き、M型LDHの新合成を誘導し、その臓器の代謝調節を行なうと推論している。著者のウサギを用いた実験でも、estrogenによるM型LDH比活性の選択的増加はラットと同様RNA合成阻害剤のactinomycin Dにより抑制されると同時に蛋白合成阻害剤のpuromycin投与によつても抑制される事から、この増加がM型LDH新合成による量的増加に由来する事を更に確定的にした。これらの結果からestrogenは直接的または間接的にinducerとしてM型LDHの構造遺伝子を活性化する事が推定される。最近子宮にはestrogenに対するreceptor protein(Jensen et al., 1968)が存在し、これがestrogenの細胞核への輸送に関与している事や、estrogenの働らきで産生される非ヒストン性の酸性クロマチン蛋白質がクロマチン依存性のRNA合成過程に対するヒストンの阻害効果を抑制する(Teng and Hamilton, 1968)など、estrogenの遺伝子レベルでの作用を裏付ける知見が累積されつつあり、今後の展開が注目される。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わった恩師鈴木正勝教授、宿谷良一教授に心から厚く御礼申し上げます。又終始直接の御指導を戴いた梶田昭彦助教授に深甚の感謝を捧げます。又種々の御教示を戴いた三井武助教授、菊池三郎講師に感謝の意を表します。

図および表の説明

図1. 妊娠による子宮筋LDH isozyme patternの変動

図2. 性ホルモン投与による子宮筋LDH isozyme patternの変動

図3. Estrogen投与量と子宮筋LDH比活性

表1. 妊娠時の子宮筋LDH比活性、同analogue ratio並びにM型%の変動

(注) W.W.: 湿重量, P: 腔部, C: 体部,

C⊕: 同胎盤附着部,

C⊖: 同胎盤非附着部を示す。

表2. 性ホルモン投与による子宮筋LDH比活性、同analogue ratio並びにM型%の変動。

(注) P.: Progesterone, E.: Estrogen,

C.: 体部, P.: 腔部,

W.W. : 湿重量を示す.

表3. Actinomycin Dおよび puromycin の子宮筋LDH誘導に及ぼす効果.

文 献

梶田昭彦, 谷口和利, 宿谷良一 (1965) : 生化学, 37, 670.

前山昌男 (1969) : 日本産科婦人科学会雑誌, 21, 868.

中村敬愛 (1956) : 解剖誌, 31, 6.

横山幸生 (1967) : 日産婦誌, 19, 231.

吉田幸一 (1935) : 愛知医誌, 42, 161.

Allen, J.M. (1961): Ann. N.Y. Acad. Sci., 94, 937.

Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. and Zwilling, E. (1962): Science, 136, 962.

Csapo, A. (1956): Am. J. Anat., 98, 273.

Dishe, Z. (1930): Mikrochemie, 8, 4.

Fine, I.H., Kaplan, N.O. and Kuftinec, D. (1963): Biochemistry, 2, 116.

Goodfriend, T.L. and Kaplan, N.O. (1964): J. Biol. Chem., 239, 130.

Jensen, E.V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W.E., Jungblut, P.W. and Desombre, E.R. (1968): Proc. Natl. Acad. Sci., 59, 632.

Kaplan, N.O. and Cahn, R.D. (1962): Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 2123.

Kaplan, N.O. and Ciotti, M. M. (1961): Ann, N.Y. Acad. Sci., 94, 701.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): J. Biol. Chem., 193, 265.

Markert, C.C. and Ursprung, H. (1962): Development. Biol., 5, 363.

Richterich, R., Schafroth, P. and Aebi, H. (1963): Clin. Chim. Acta, 8, 178.

Saenger, M. (1887): 日本産婦人科全書, 25, 14, 1955より引用.

Schneider, W.C. (1945): J. Biol. Chem., 161, 293.

Sober, H.A. (1968): Handbook of Biochemistry, Chemical Rubber Co., Cleveland.

Stieve, H. (1929): Z. Mikr.- Anat. Forsch., 17, 371.

Teng, C.S. and Hamilton, T.H. (1968): Proc. Natl. Acad. Sci. 60, 1410.

Van der Helm, H.J., Zondag, H.A., Hartog, P.H. and van der Kool, M.W. (1962): Clin. Chim. Acta, 7, 124.

Wieme, R.J. (1959): Clin. Chim. Acta, 4, 317. (No. 2361 昭45・5・4 受付)