

排卵時家兎卵巢中 cathepsin B₁ 活性に およぼすインドメサシンの影響

京都大学医学部婦人科学産科学教室

本橋 亨 岡村 均 森川 博史
万井 正章 西村 敏雄

Effects of Indomethacin on Rabbit Ovarian Cathepsin B₁ Activity during Ovulation

Toru MOTOHASHI, Hitoshi OKAMURA, Hiroshi MORIKAWA,
Masaaki MAN-I and Toshio NISHIMURA

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

概要 hCG 投与をうけた家兎において卵胞壁中の cathepsin B₁ が排卵に向けて時間的に特徴的なパターンを示しつつ変化することを報告した既報において、排卵時の卵胞破裂への本酵素の直接的な関与が明らかにされたが、今回は本酵素活性発現過程における prostaglandins (PGs) の関与につき検討した。すなわち成熟雌家兎に、生理食塩水に溶解した hCG 100iu を耳静脈より投与し、直後に同じ注射針より磷酸緩衝液に溶解したインドメサシン60mg を投与した。その後6～20時間に至る間に開腹により卵巣を摘出し 0.1% Triton X-100 加磷酸緩衝液中にてホモジナイズ後3,000 g, 10分間遠心した上清中の cathepsin B₁ 活性を BANA を基質として測定した。その結果、投与6時間から9時間の間は hCG のみ投与の対照群において観察されたと同様の活性上昇がみられたが、9時間以降では対照群でみられた排卵前の急激な活性低下は認められず、投与後17時間に至るまで活性値は高値を持続した。又組織学的にも排卵は認められなかつた。以上の結果は PGs の排卵機構への関与が cathepsin B₁ 活性によるコラーゲン分解作用を介しているものと解釈される。以上、家兎において排卵過程における cathepsin B₁ 活性の時間的変化を報告した最初の報告である前報に引き続き、本酵素活性発現に対する PGs の関与を示す最初の報告である。

Synopsis Sixty mg of indomethacin in phosphate buffer solution was administered concomitantly with 100 iu of hCG to mature virgin Japanese domestic female rabbits in order to examine how prostaglandins (PGs) take part in the enzymatic process in ovulation.

Animals were sacrificed at several time points after injection and ovaries were dissected and homogenized in phosphate buffer pH 5.6 containing 0.1% Triton X-100. Supernatant of 3,000 g, 10 min centrifugation was assayed of cathepsin B₁ activity using BANA as the substrate.

The enzymatic activity was increased rapidly during the time period of 6 to 9 hour after the injection showing the similar change to that observed in the previously reported control group treated by 100 iu of hCG only.

However, in the subsequent time period, the preovulatory drop of the enzymatic activity which had been observed in the control animals was missing in the indomethacin-treated animals.

These data supports the idea that PGs have an essential role on ovulation suggesting that they take part in the ovulatory mechanism through activating the cathepsin B₁ to digest the collagen substances in the follicular wall.

Key words: Ovulation•Prostaglandins•Collagen•Proteolytic enzymes•Follicles

緒 言

排卵現象をめぐる内分泌学的環境については近年の各種ホルモン分析法の進歩により詳細な研究

が行なわれ、殊に間脳下垂体性腺系における内分泌学的な排卵のコントロール機構についてはかなり詳細に判明してきているが、下垂体からの LH

サージによる排卵刺激にひき続き卵巣内においていかなる物質が、卵胞の各構成組織を介していかなる変化を来して卵胞破裂に至るかという一連の卵巣レベルでの排卵メカニズムについてはいまだ解明されるべき点が多く残されている現状である。

排卵現象発現機構に卵胞における蛋白分解酵素の関与を示唆した Rondel⁸⁾, Espey⁶⁾ の指摘以来、家兎およびヒト卵巣におけるコラーゲン分解酵素活性に関する我々の報告^{1) 4)}を含め、近年次第にその詳細が明らかになりつつある。殊に我々は卵胞壁細胞中の lysosome に含まれる酸性蛋白融解酵素である cathepsin B₁ 活性が家兎卵巣中で排卵に向けて時間的に特徴的なパターンを示しつつ変化し、本酵素が卵胞破裂機構に直接的に関与していることを既に報告した¹⁾。一方、PG 合成阻害剤である indomethacin 投与をうけた家兎で hCG 投与後の排卵が抑制されることを⁷⁾、また hCG 投与後の家兎卵胞液中 PG が排卵現象に密接に関連した pattern を示しつつ変動するという報告¹⁰⁾ などから PG の排卵現象への関与は強く示唆される場所である。そこで我々は hCG 投与後 indomethacin 投与を行い排卵を抑制した家兎の卵巣中 cathepsin B₁ 活性の変動を時間的に検討し、PG の「排卵酵素」活性への関与につき検討を加えてみた。

実験方法および材料

1) 実験動物および薬剤投与方法ならびに試料の採取：日本動物株式会社より購入した体重 3kg 前後の成熟処女家兎を用い、耳静脈より生理食塩水 1ml に溶解した hCG 100単位を投与し、引続いて同じ針より 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 7.6) 1ml に懸濁したインドメサシン 50mg を注入投与した。投与後 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17 および 20 時間目にネンブタール麻酔下に開腹し左右卵巣を摘出した。

2) 酵素試料液の作成：摘出卵巣はただちにメスにて長軸方向に平行におよそ半切し、半分を組織標本作成に用い、残りの半分を酵素活性測定用とし湿重量を測定した。秤量を終った卵巣組織は

30mg/ml の割合で 0.1% Triton X-100 加 0.1M 磷酸緩衝液 (pH 5.6) 中にてテフロンホモジナイザーによりホモジナイズし、3,000 g にて 10 分間冷却遠心した上清を酵素源として使用した。

3) 酵素活性の測定：合成基質 α -N-benzoyl-DL-arginine 2-naphthylamide HCl (BANA) を基質とし反応生成物である 2-naphthylamine を Fast Garnet GBC に結合させ発生した淡紅色を n-butanol にて抽出し 520nm における吸光度を測定する Barrett の方法⁴⁾ を一部修正して岡崎らが報告した方法³⁾ により測定した。測定操作ならびに試料および試薬量は図 1 に示した通りである。使用試薬のうち BANA は Sigma 社より p-CMB および Fast Garnet GBC は和光純薬より購入したものを、また cysteamine は東京化成工業製を使用した。

図 1 Cathepsin B₁ 活性の測定操作手順
および使用試薬量

	(ml)
0.1M phosphate buffer pH 5.6 c 1mM EDTA	0.45
0.6M cysteamine	0.002
ENZYME	0.05
Water	0.10
(preincubation 5 min)	
4% BANA·HCl in DMSO (substrate)	0.015
(incubation 5-15 min, 37°C)	
coupling reagent	0.6
{ 10mM pCMB in EDTA-PBS 6% Fast Garnet GBC in 4% Brij 35 }	
(10 min at room temperature)	
butanol	1.2
(centrifugation)	
spectrophotometry OD 520	

BANA·HCl: α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide-HCl
DMSO : Dimethylsulphoxide
pCMB : parachloromercuribenzoate

4) 至適 pH の検討：0.25M 蔗糖溶液中にてホモジナイズし 3,000 g, 10 分間遠心した上清を試料とし、assay mixture 中の緩衝液の pH を変えて、それに伴う酵素活性の変化を検討した。

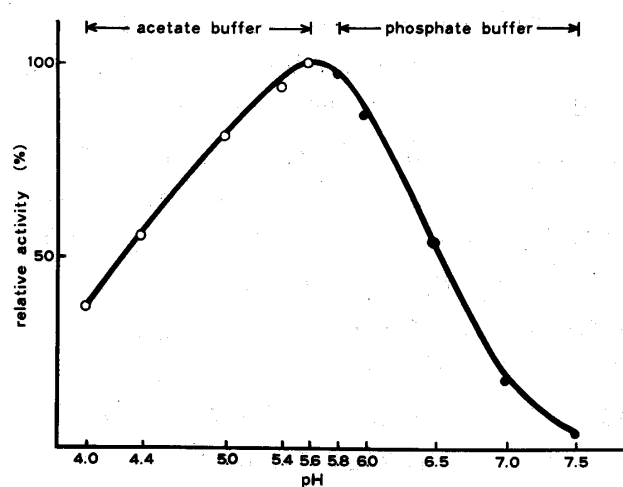
実験成績

1) 卵巣の組織学的所見：hCG のみの投与を

うけた家兎は投与後約11時間にて排卵を来すが、今回の実験において hCG 投与直後にインドメサシン投与を受けた家兎は hCG 投与後20時間にいたつても肉眼的にもまた組織学的にも排卵像は認められなかつた。

2) 至適 pH: 酢酸緩衝液および 磷酸緩衝液を使用し pH 4.0より pH 7.5に至る間の pH による本酵素活性の変化は図2に示す通りで、pH 5.6

図2 家兎卵巢ホモジネート中の cathepsin B₁ 活性の pH による変動



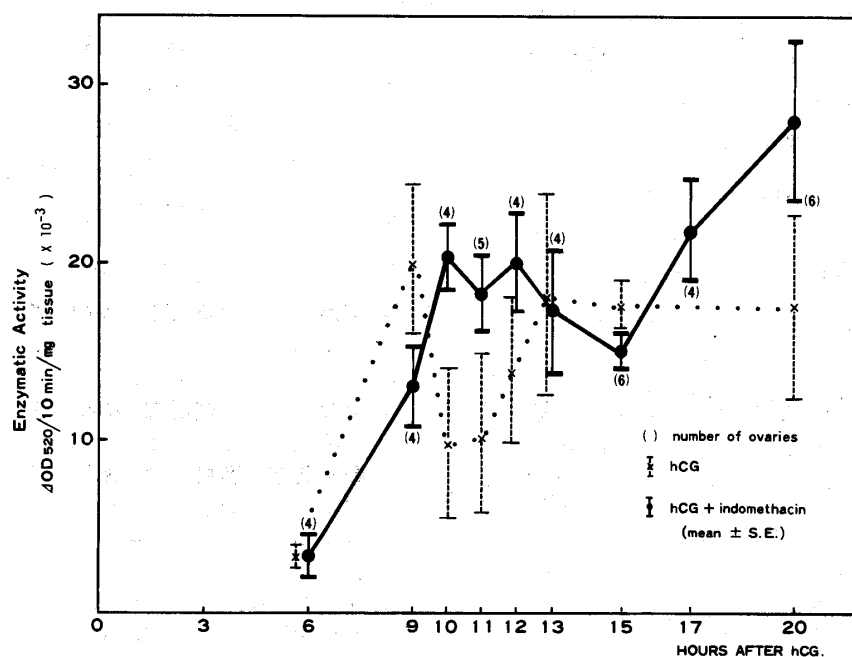
付近にて最も高い活性が得られた。

3) 卵巢中 cathepsin B₁ 活性の変化: hCG+インドメサシン投与後の 卵巢中 cathepsin B₁ 活性の時間的変動は表1に示した通りであつた。表中左欄は投与後卵巢摘出までの時間を示し中欄の数字は摘出卵巢1mg (湿重量) 当り10分間の吸光度変化により表示した酵素活性を示し、右欄はそれらの平均値および標準誤差ならびに検体数を示している。図3は表1をグラフに表示したもので、

表1 hCG・インドメサシン同時投与家兎 卵巢中 cathepsin B₁ 活性の時間的変動

hrs.	OD ₅₂₀ /10 min/mg tissue (×10 ⁻³)				mean±S.E.M. (N)
6	1.7	1.4	3.8	6.7	3.4±1.2 (4)
9	8.5	10.0	16.2	17.3	13.0±2.2 (4)
10	17.7	18.7	18.7	25.9	20.3±1.9 (4)
11	13.3	13.8	19.3	20.7	18.2±2.1 (5)
	24.0				
12	13.3	18.7	21.4	26.7	20.0±2.8 (4)
13	11.6	13.3	16.7	27.1	17.2±3.5 (4)
15	13.3	13.3	13.3	15.0	15.0±1.0 (6)
	15.5	9.4			
17	13.3	23.3	23.7	26.7	21.8±2.9 (4)
20	14.5	23.1	24.0	24.3	27.9±4.4 (6)
	39.3	42.3			

図3 hCG・インドメサシン同時投与家兎卵巢中 cathepsin B₁ 活性の時間的変動 (実線)
(点線のグラフは hCG のみ投与を行つた対照群における変動を示す)



図中には参考のために既に発表¹⁾した対照群, すなわち hCG のみ投与後の卵巣中本酵素活性の変動を点線にて併せて表示した. 図中実線のグラフにみられるように酵素活性は hCG・インドメサシン同時投与後, 6時間までは対照群と同様低値を示し, 以後急激に活性の増加を来した. ところがその後は対照群において観察された排卵時付近の活性減少を来すことなく, 10時間目にてプラトーに達し, 以後15時間目に至るまではほぼ同様のレベルを維持した後17時間目以後更に増加傾向を示した.

考 察

排卵現象に伴う一連の卵胞組織の変化を組織学的にみると, 卵胞の成熟に伴い卵胞壁中にみられる fibroblast 中に lysosome が増加し次第に multivesicular body の形態をとるに至るようになる. これと併行して外莖膜細胞層に密に配列するコラーゲン線維は次第に粗となり遂に卵胞頂部の破裂が観察される²⁾⁶⁾. 我々は既報¹⁾の如く, この一連の変化に伴い lysosomal enzyme である cathepsin B₁ 活性が卵胞破裂直前に急激に低下することを認め, 排卵に伴う卵胞壁中のコラーゲン分解への本酵素の直接的な関与を示唆したが, このたび PG 合成阻害剤であるインドメサシン投与により排卵を抑制した家兎においては先の対照実験においてみられたような cathepsin B₁ の特徴的な活性低下は認められなかった. この結果からコラーゲン分解酵素が卵胞破裂機序においてその役割を果たすためには PGs が本質的に必要なことが示された.

Lysosome に対する PGs の作用については, rat 肝, 脾, 腎および黄体の lysosome に対し PGF_{2α} が in vitro でこれを labilize することが報告されている¹⁰⁾. 一方 hCG 投与後の家兎卵胞中の PGs の変動は Yang et al. (1974)¹¹⁾によれば, PGE, PGF 共に hCG 投与により排卵時に向けて次第に増加し PGF は排卵後急速に減少する. また排卵に至らない卵胞においては両者共排卵卵胞における値の半分に留まることが報告されている. これらのことから考えてみ

ると今回の実験群においてはインドメサシンによる PGF の合成抑制により, hCG 投与後次第に卵胞壁中 lysosome 中に増加してきた cathepsin B₁ は release されることなく蓄積し, その結果として卵胞破裂は起らず, 図3実線のグラフにみられるように卵巣中 cathepsin B₁ 活性高値が持続するに至つたと解することができる. 従つてこの考え方に従えば, hCG のみの投与を行つた既報の対照群 (即ち排卵群) においては図3の点線のグラフの如く hCG 刺激により卵胞壁 lysosome 中の cathepsin B₁ は6時間目以後急速に増加するが, ほぼ同時に増加を来す PGF による labilization をうけて周囲のコラーゲンの分解に消費され, その結果が酵素活性の低下となつて観察されたと説明される. また投与9時間目の時点においてインドメサシン同時投与群の酵素活性が対照群に比し有意に低いという結果は, rat の顆粒膜細胞において PGE が同様に卵胞壁の破裂に関与するとされるプラスミン活性化物質の合成を促進するとする報告⁹⁾より類推すれば, PGF が cathepsin B₁ の合成促進に作用していることを示しているとも考えられる. この PGE の lysosomal enzyme 合成促進作用は, PGE によりヒト子宮頂部の伸展性が増加するという報告⁵⁾からも示唆されるところである.

結 論

今回の実験結果から家兎における卵胞破裂機構には cathepsin B₁ が排卵酵素として関与していることが裏付けられ, 更にその作用発現には PGs の関与することが示唆された.

文 献

1. 本橋 亨, 岡崎武志, 岡村 均, 森川博史: 排卵時家兎卵巣中の諸酵素活性. 特に cathepsin B₁ について. 日産婦誌, 28: 1374, 1976.
2. 岡村 均, 岡崎武志, 本橋 亨: 排卵時卵胞壁の機能と形態. 産婦進歩, 27: 371, 1975.
3. 岡崎武志, 岡村 均, 本橋 亨, 森川博史: 排卵時ラット卵巣中の諸酵素特性—特に cathepsin B₁ について—. 日不妊誌, 21: 422, 1976.
4. Barrett, A.J.: A new assay of cathepsin B₁ and other thiol proteinases., Anal. Biochem., 47: 280, 1972.

5. *Conrad, J.T. and Ueland, K.*: Reduction of the stretch modulus of human cervical tissue by prostaglandin E_2 . *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 126: 218, 1976.
6. *Espey, L.L.*: Decomposition of connective tissue in rabbit ovarian follicles by multivesicular structures of luteal fibroblasts. *Endocrinology*, 88: 437, 1971.
7. *O'Grady, J.P., Caldwell, B.V., Auletta, F.J. and Speroff, L.*: The effects of an inhibitor of prostaglandin synthesis (indomethacin) on ovulation, pregnancy and pseudopregnancy in the rabbit. *Prostaglandin*, 1: 97, 1972.
8. *Rondell, P.*: Follicular processes in ovulation. *Federation Proc.*, 29: 1875, 1970.
9. *Strickland, S. and Beers, W.H.*: Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. In vitro response of granulosa cells to gonadotropins, cyclic nucleotides, and prostaglandins. *J.B.C.*, 251: 5694, 1976.
10. *Weiner, R. and Kaley, G.*: Lysosomal enzyme release from luteinized rat ovaries by prostaglandin F_{2a} . *J. Reprod. Fert.*, 44: 571, 1975.
11. *Yang, N.S.T., Marsh, J.M. and LeMaire, W.J.*: Post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit Graafian follicles. *Prostaglandins*, 6: 37, 1974.

(No. 4364 昭53・5・2 受付)