

いて

(岡山・御津町立金川病院)

岸本 廉夫, 秋本 昶久

占部 清, 相良 祐輔

目的: 我々は, 妊卵に対して直接的環境を形成し, その着床, 維持に関与する子宮内膜の機能を知る1つの指標として cAMP に着目し検討している. 今回は, 子宮腔液中 cAMP 濃度, 子宮内膜中 cAMP 濃度及び内膜組織中の cAMP の経日的局在性について検討した.

方法: ① 子宮腔液は, 生理食塩水を用いての洗浄液を試料とし, 子宮内膜は1カキ搔爬にて採取したものを試料として, それぞれ R.I.A. 法にて cAMP 濃度を測定した. ② ヒト子宮内膜採取後, 直ちに $3.2 \times 10^{-2} \text{M}$ theophylline にて, 37°C , 5分間 incubation し, 凍結切片を作製した. 蛍光抗体染色は Wedner らの方法に準じて行なった.

成績: 正常周期分泌期子宮腔液中 cAMP は, 排卵期 $5.8 \pm 2.1 \text{pM/ml}$ で以後経日的に増加し, 排卵後8日目 $24.6 \pm 5.3 \text{pM/ml}$ と peak を形成し, 以後漸減した. 又, 正常周期分泌期内膜中 cAMP は排卵後増加し, 排卵後8日目に $3.70 \pm 1.17 \text{pM/mg, w.w.}$ の peak を示し, 以後漸減しており, 子宮腔液中 cAMP と全く同じ経日的変動を示した. 次に, cAMP の経日的な局在性を検討すると, 排卵期では, 間質に比較し腺上皮優位に蛍光が認められ, 特に腺上皮においては腺腔側に濃く染まっていた. その後排卵2日目頃より, 間質, 腺上皮とも蛍光の増強が認められ始め, 排卵後8日目には間質, 腺上皮蛍光とも著明に増強し, 両者の蛍光の強さは同程度となつた. 又, 腺腔蛍光も強く認められた. 排卵後12日目以後では, 明らかに間質優位で腺上皮及び腺腔には蛍光は全く認められず, 間質のみ反応することが示された.

結論: 以上より, 正常月経周期分泌期においては, 子宮腔液中及び内膜中 cAMP は排卵後8日目に最高濃度となる経日的変動を示し, しかも, その変動は局在性の変化を伴うことが明らかとなり, cAMP による子宮内膜機能解析の可能性が示唆された.

質問

(熊本大) 宮崎 康二

蛍光抗体染色において, free の cAMP 流出の可能性はどうですか. protein kinase の regulatory subunit と結合した形の cAMP の染色も含めて教えて下さい.

回答

(岡山・御津町立金川病院) 岸本 廉夫

組織中 cAMP を tgal として見ている. 現在, 組織内遊離 cAMP と蛋白結合 cAMP を分けて蛍光染色す

る方法は極めて難しいと考えております.

質問

(三重大学) 松本 隆史

① 使用された抗血清の他の nucleotides との R.B.A はどの程度のものでしょうか.

② 組織内 c-AMP 濃度と局在 (特に late luteal phase) ではある程度相関があるとお考えですか.

③ c-GMP の検討を行なわれた御経験がありますか.

回答

(岡山・御津町立金川病院) 岸本 廉夫

① テオフィリン無処理, cAMP 吸着抗 cAMP 血清等を使用した対照試験では蛍光を認め得なかつたことより, 蛍光は cAMP に特異的なものと考えられる.

② 腺細胞では cAMP は消失するが, 間質においては強い蛍光が認められる. この結果は, 子宮腔液中, 内膜中 cAMP 動態を説明するものと考えられる.

③ cGMP については検討していない.

161. ヒト子宮内膜における cyclic AMP 依存性および非依存性 protein kinase の存在とその性質

(熊本大) 宮崎 康二, 前山 昌男

これまでヒト子宮内膜における protein kinase (PK) の存在は報告されていない. 今回, ヒト子宮内膜の細胞上清分画に存在する PK を部分精製し, その性質を調べた.

成績: DEAE セルロースカラム, 等電点焦点法, ゲル濾過法により, 少なくとも4つの酵素が分離できた. DEAE セルロースカラムの 0.1M NaCl で溶出される位置に (P1) (1) ヒストンを基質とする等電点 5.46 の cAMP 依存性酵素 (2) プロタミンを基質とする等電点 5.46 の cAMP 非依存性の酵素があり, 0.2M NaCl で溶出される位置に (P2及び P3) (3) ヒストン・プロタミンを基質とする等電点 5.32 の cAMP 依存性の酵素 (4) ヒストン・プロタミン・ホスビチン・カゼインを基質とする等電点 4.66 の cAMP 非依存性酵素があつた. 次に P1・P2・P3の酵素についてその性質を調べた. (1) 環状ヌクレオチド効果: 各ピーク共に cAMP > cIMP > cGMP の順に効果があつた. (1) 金属イオン効果: 各ピーク共に, Co^{2+} ・ Mg^{2+} ・ Mn^{2+} が効果的だつた. (3) 基質特異性: P1・P2では, ヒストン分画, プロタミンが効果があつたが, これと異なり P3はホスビチン・カゼインの活性が高かつた. (4) cAMP に対する K_m 値: $\text{P1} = 2.51 \times 10^{-9} \text{M}$, $\text{P2} = 3.69 \times 10^{-9} \text{M}$ (5) ATP に対する K_m 値: cAMP 存在下及び非存在下で, $2.6 \times 10^{-6} \text{M}$ から $3.7 \times 10^{-6} \text{M}$ で, ピークによる

差はなかつた。これらの結果は、ヒト子宮内膜にcAMP依存性及び非依存性の多様なPKが存在する事を示している。又、ステロイドホルモンの標的器官において、cAMP系酵素が何らかの機能的役割を演じている可能性を示唆している。

質問 (京都府立医大) 岡田 弘二

① 内膜の protein kinase 活性は月経周期に伴う変動を示しますか。

回答 (熊本大) 宮崎 康二

① 性周期に伴う活性の変動はあるようでありますが、詳細については後日発表させていただきます。

162. ヒト月経周期における、子宮内膜中 PGs 濃度及び PG receptor 濃度の変動について

(名古屋大)

松川 良治, 邨瀬 愛彦, 菅 整一
吉尾 豪, 井元 宜胤, 太田 正博
嶋川 映己, 友田 豊

研究目的: 月経発来機序の中で、ホルモン消退から月経発来の際に介在する機序については、不明な点が多い。我々は、Prostaglandins (以下 PGs) が月経発来に関与する役割をもつものと考え、月経発来の際であるヒト子宮内膜中の PGs 濃度、PGs 生合成などを検索した。又、PGs 濃度及び PGs 生合成は、ステロイドホルモンにより如何に影響されるかも明らかにしたいと考えた。さらに、月経発来機序を明らかにする目的で、PG効果発現機序の一端を担うと考えられる PG receptor を測定し、月経周期における変動を検討した。

方法: ① PGs の測定は RIA により行なつた。② PGs 生合成は基質の変換率を測定した。③ PG receptor は、2 万 G にて遠心した沈渣と、放射性及び非放射性 PGs との incubation を行ない、遠心後、沈渣の放射能活性より、Scatchard plot を描き算出した。

① PGF_{2α} 濃度は、卵胞期に40~200pg/mg dry weight, 黄体期に、100~500pg/mg, D.W. であつた。一方、PGE₁ 濃度は、卵胞期に20~60pg/mg D.W. 黄体期に20~100pg/mg D.W. であつた。② phospholipase 活

性、PG-synthetase 活性は、黄体期に上昇を認めた。③ PGF_{2α} receptor は、卵胞期に、40~70fmol/mg protein であつたが、黄体期では卵胞期より低濃度であつた。一方、PGE₁ receptor は、月経周期において余り変動はなく、18~60fmol/mg protein であつた。一方、ラットを使つたモデル実験において、ステロイドホルモン投与によつて、PGs 生合成、PGs 濃度、PG receptor 濃度の上昇が認められた。

質問 (京都府立医大) 岡田 弘二

① PG receptor は estrogen や progesterone の影響をうけますか。あるとすれば、両者の作用機序はどうですか。

回答 (名古屋大) 嶋川 映己

岡田先生の質問に対して

E₂ による PG レセプターの増加は、直接的なもの、Progesterone による PG-レセプターの増加は、PG synthesis の増加による二次的なものではないかと考えておりますが、今後さらに検討を進めたいと考えております。

質問 (大阪医大) 渡辺 克一

① 測定された内膜上の PGs は細胞中に含有されているとお考えでしょうか。

質問 (京都府立医大) 中田 好則

ヒト月経周期における子宮内膜中 PG 濃度の変動は、例えば、月経困難症、黄体機能不全例など含めての検討であるか。

回答 (名古屋大) 松川 良治

1) receptor は、主として membrane にあり、それを測定した。一方、microsomal fraction についても検討して、receptor の存在を認めている。

2) 正常月経周期を有する婦人の子宮内膜を使つて実験を行なつた。今後、各疾患を有する婦人の子宮内膜における、PG receptor についても検討したい。

3) 実験動物でのモデル実験は、Estrogen, progesterone, それぞれ、PG receptor に影響を及ぼす。