

月経発来機序に関する研究

名古屋大学医学部産科婦人科学教室（主任：友田 豊教授）

松川良治 蜷川映己

Studies on the Mechanism of the Onset of Menstruation

Ryoji MATSUKAWA and Terumi NINAGAWA

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

(Director : Prof. Yutaka Tomoda)

概要 Prostaglandins (以下 PGs) が、排卵現象、月経発来等、性機能に深く関りあっていることが示唆されている。しかしながら、月経発来機序の中で、ホルモン消退から月経発来の間に介在する機序については不明な点が多い。そこで、月経発来のあるヒト子宮内膜における PGs 生合成、PG-receptor、PGs の局在を検討することによって、月経発来の中で PGs の果たす役割の解明を試みた。

まず第1に、月経発来の場合であるヒト子宮内膜中のPGs濃度を測定すると、 PGE_1 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 共に黄体期に高値であった。特に、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 値は黄体期末期に高値であった。

次に PGs 生合成における酵素活性として, PG-synthetase, phospholipase A の測定を行なった。それぞれ, 黄体期末期に活性が高まっていた。PGs 効果発現の一端を担うと考えられる PG-receptor 量は, ヒト性周期の中で大きな変化はなかつたが, 卵胞期にやや高値であつた。

以上より、月経癸来と PGs には深い関りあいがあるものと考えられる。

Synopsis It has recently been demonstrated that prostaglandins (PGs) play roles in human reproduction, especially in ovulation and menstruation.

The purpose of this study is to elucidate the mechanism of the action of PGs upon the onset of menstruation.

By measuring the concentration of PGs in human endometrium from the women with normal menstrual cycles, PGF_{2α} was present in large amounts in late luteal phase.

The activity of PG-synthetase and phospholipase A, which are key enzymes of PG-biosynthesis, also increased in late luteal phase.

PG-receptor which is thought to be important to biological action of PGs showed no remarkable change throughout human menstrual cycle.

These studies clarify the possibility that there is apparent correlation between the onset of menstruation and PGs.

Key words: Prostaglandins • Menstruation • Human endometrium

緒 言

Prostaglandins (PGs) は、精液中に子宮筋収縮作用物質のあることからその存在が明らかとなり (1930年), Von Euler によつて PGs と命名された (1935年). その後の研究により, PGs は生体内の諸臓器に存在し, また, その作用は多岐にわたることが指摘されてきた.

生殖の場においても、PGs は間脳下垂体系に働いて、LH 放出に作用すること、また、排卵現象にも関与すること等が明らかになってきた。

月経発来との関係では、PGs は動物において強い luteolytic action を持つことがわかつているが¹⁹⁾、ヒトにおいては luteolytic action の存在は明らかではない。さらに、ホルモンの消退と消退性出血との間に介在する機序についても、未だ明らかではない。

しかし、PGs の子宮腔内投与により月経を発生しうること⁶⁾、末梢血中の PGs の変動^{7,24)}、PGs のもつ子宮収縮ないしは血管の収縮作用¹⁰⁾を考えると、月経発生機序に PGs が関与するものと推

察される。

PGs が局所で産生され、局所で作用する点から、性周期の変動に伴う子宮内膜中の PGs 合成の動態を把握すると共に、子宮における PG receptor の変動を検討することによって、月経発来の中で PGs の果たす役割の解明を試みた。

研究対象及び研究方法

1. 研究対象

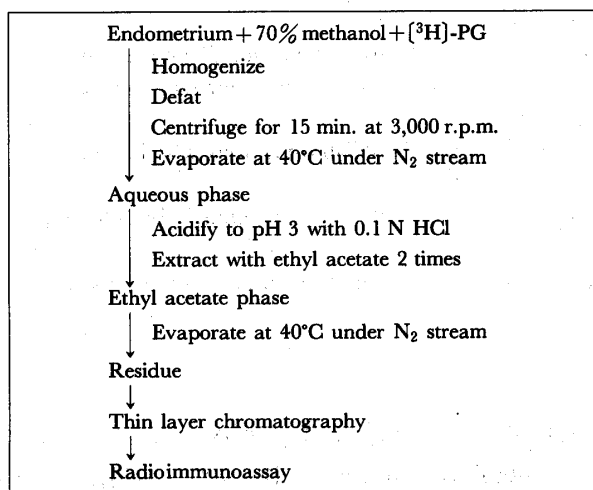
正常月経周期を有する婦人の子宮内膜を使用した。子宮摘出術により得た子宮の子宮内膜は、採取後生食水で血液成分を洗い、 -80°C に保存した。一部は dating のため組織標本作製に供した。

2. 研究方法

1) 子宮内膜中 PGs 濃度の測定

子宮内膜を Polytron homogenizer で homogenize し、 -15°C 、70% methanol 液にて脱脂肪した。その後、methanol を N_2 gas で蒸発させ、水層を pH 3 として、ethyl acetate で PGs を抽出した。homogenize された組織はデシケーターに

表1 Prostaglandins の抽出、測定方法



て乾燥させ、その dry weight を測定した。分離は Thin layer chromatography (以下 T.L.C.) を用い、solvent system として、ethyl acetate : acetone : acetic acid = 90 : 10 : 1 を使用した (表1)。

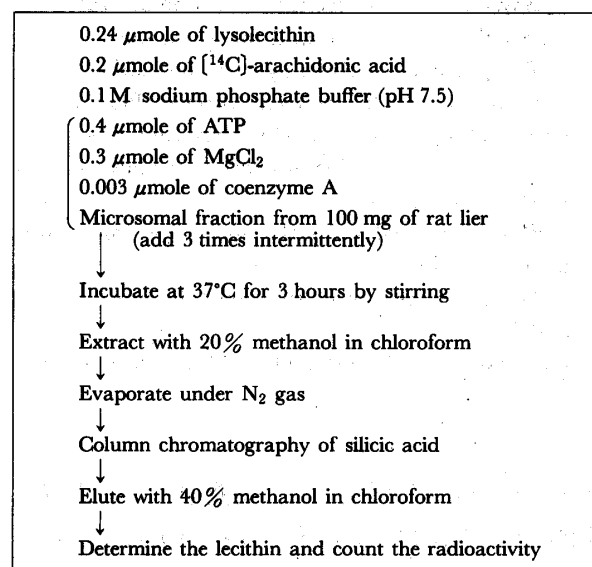
PGs の Radioimmunoassay (以下 R.I.A.) 法に使用した抗体は、mixed anhydride 法で作製した抗原を家兎に免疫して作製した。抗体価の測定

は、抗体を稀釈した上で、 $[^3\text{H}]$ -PGs を加えて incubate し、結合率50%の部分までとした。PGF_{2α} に対する抗体の抗体価は、約8,000倍であり、他の PGs とは殆ど cross せず specific な抗体であった。一方、PGE₁ に対する抗体の抗体価は、約4,000倍であり、PGE₂ と約15%の cross を認めたが、他の PGs とは殆ど cross しなかつた。抽出、純化した試料に $[^3\text{H}]$ -PG 0.1ml (10⁴cpm)、抗体0.1ml を加え、 4°C にて1時間 incubate した。γ-globulin 0.1ml (1.5mg/ml)、50%硫酸0.3ml を加えて結合型、非結合型の分離を行ない、上清の放射能活性を測定した。

2) 子宮内膜中 phospholipase A 活性の測定

まず、基質として磷脂質($[^{14}\text{C}]$ -lecithin)を作製した。sodium phosphate buffer に $[^{14}\text{C}]$ -arachidonic acid, lysolecithin ATP, MgCl_2 , Co A, ラット肝の microsome を入れ、 37°C にて3時間 incubate し、methanol, chloroform で抽出後、ケイ酸カラムで分離し、 $[^{14}\text{C}]$ -lecithin を得た (表2)。

表2 $[^{14}\text{C}]$ -lecithin の作製法



phospholipase A は、子宮内膜を、0.02M の phosphate buffer で homogenize し、 -2°C 、1 万 G、30分の遠心分離により得た enzyme source (表3) と、 $[^{14}\text{C}]$ -lecithin 及び triton X-100を含んだ sodium acetate buffer とで incubate し、Dole's reagent で反応をとめ、heptane で抽出し、

表3 酵素液の作製法

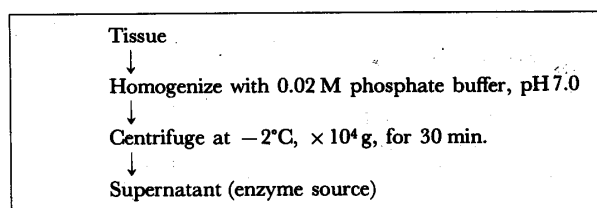
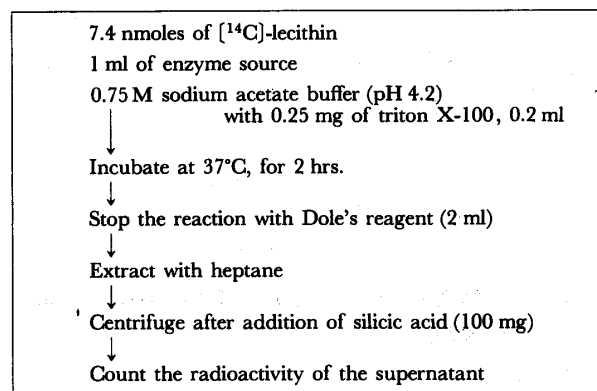


表4 Phospholipase 活性の測定法



silicic acidを加えて遠心分離し, [¹⁴C]-arachidonic acid を測定し phospholipase A の活性をみた(表4).

3) 子宮内膜中 PG-synthetase 活性の測定

tris-HCl-buffer に [¹⁴C]-arachidonic acid, arachidonic acid (50 nmoles), hemoglobin, glutathione, L-tryptophane を入れ, 1ml とした中に, 十分 mince した内膜400mg を加え, 24°Cにて1時間 incubate した. incubate 後ただちに PGs を抽出し, T.L.C. にて分離した. solvent system として, diisopropyl ether:ethyl acetate:acetic acid=80:20:3を使用した(表5).

4) 子宮内膜中 PG-receptor 量の測定

子宮内膜に phosphate buffer を加え, homogenize し, 2万Gにて遠心分離後, その沈渣を洗浄した. 得られた沈渣に [³H]-PG, 可変量の PG 及び buffer を加えた懸濁液を, 30°Cにて1時間 incubate し, 2万G, 30分の遠心分離後, 沈渣の放射能活性を測定した(表6). その値より, PG 量と bound/unbound を計算し, 5個の点を図表上に描き, この5点を結んで Scatchard plot を描き, この曲線を2本の直線に解析した. そし

表5 PG-synthetase 活性の測定法

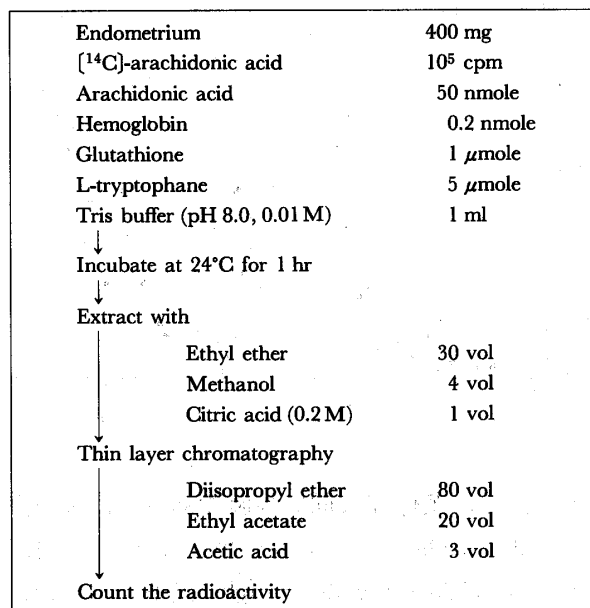
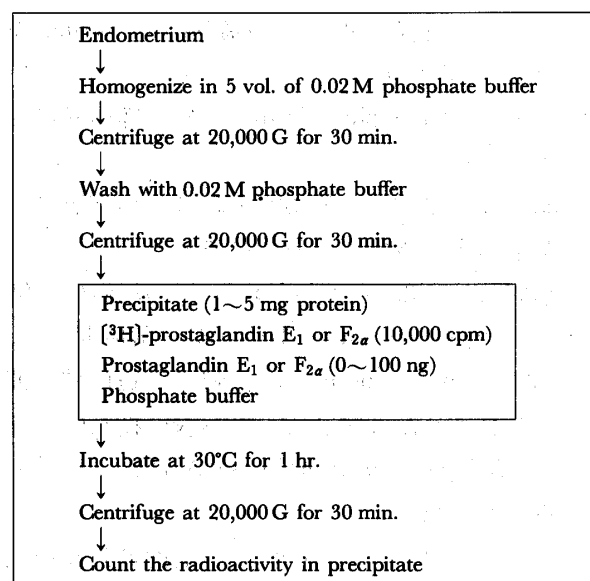


表6 PG-receptor 量の測定法



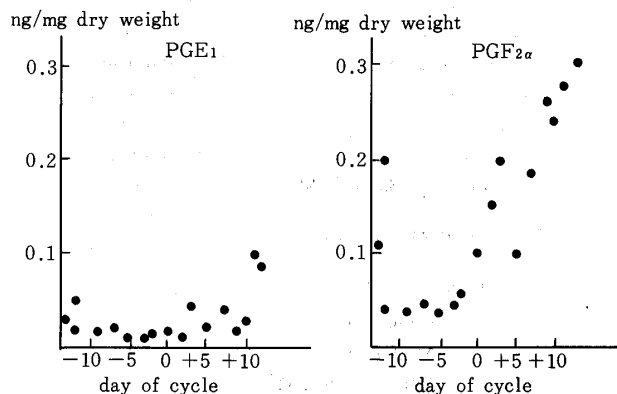
て, 特異的結合部位数を fmoles で計算し, これを receptor 量とした. 成績は mg protein あたりに換算して図示した. 蛋白測定にはビュレット法を用いた.

研究成績

1. 子宮内膜中 PGs濃度の月経周期による変動
ヒト月経周期における子宮内膜中 PGE₁, 及び PGF_{2α} 値の測定成績を図1に示す.

PGF_{2α} 値は, 黄体期に100~500pg/mg dry we-

図1 月経周期における子宮内膜中 prostaglandins 濃度の変動



ight で、特に黄体期末期に高値であつた。卵胞期では、30~200pg/mg dry weight であつた。月経中の2例が100pg/mg dry weight 以上であつた。PGE₁ 値は、黄体期末期に、約100pg/mg dry weight であつたほかは、50pg/mg dry weight 以下であつた。なお、月経周期は、組織学的に dating をし、○を ovulation として土何日で示した。

2. 子宮内膜中 phospholipase A 活性の月経周期による変動

1 unit は、37°C、2時間に1nmole の基質量の変化を触媒する酵素量として計算した。

卵胞期における phospholipase A の活性は、60~115μunits/mg protein であつたが、黄体期では、101~600μunits/mg protein で、特に、黄体期末期に活性が高まつた(図2)。gestagen 投与中の婦人では、卵胞期の phospholipase A 活性と比較して高値であつた。

3. 子宮内膜中 PG-synthetase 活性の月経周期による変動

PG synthetase 活性は、arachidonic acid から PGs への conversion rate で示した。図3に示す如く、卵胞期の conversion rate は、0.2%~0.75% であつた。黄体期の conversion rate は、0.53%~1.1% であつた。

4. 子宮内膜中 PG-receptor 量の月経周期による変動

PGE₁ receptor 量は、卵胞期では1例を除いて、27~60 fmoles/mg protein であつた。黄体

図2 月経周期における子宮内膜中 phospholipase A 活性の変動

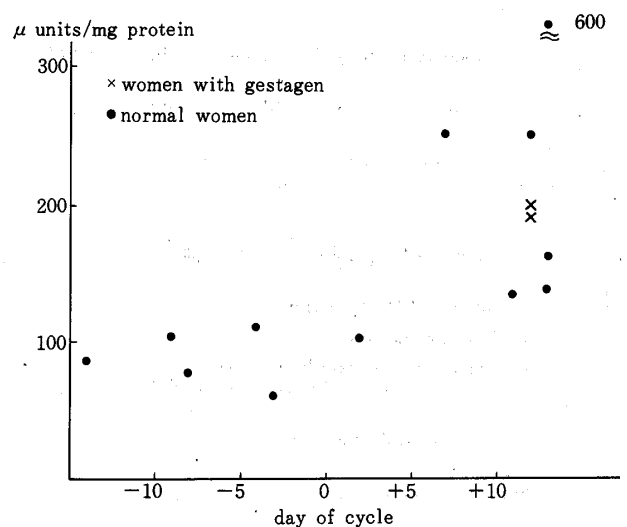


図3 月経周期における子宮内膜中 PG-synthetase 活性の変動

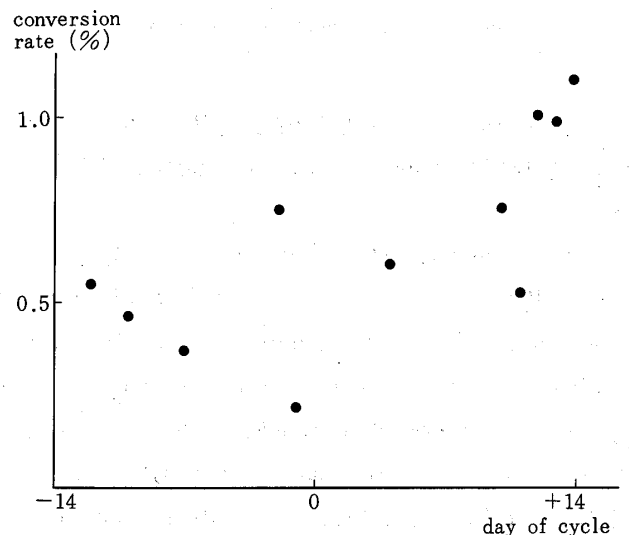
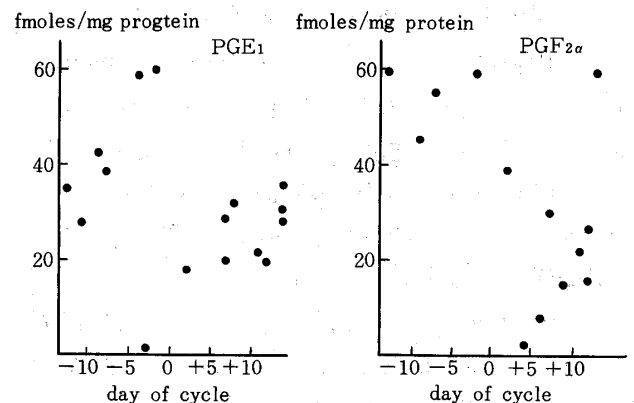


図4 月経周期における子宮内膜中 PG-receptor 量の変動



期では, 18~35 fmoles/mg protein であつた. 一方, $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor 量は, 卵胞期では46~60 fmoles/mg protein であつた. 黄体期では, 1例を除いて, 40 fmoles/mg protein 以下であつた(図4).

PGE_1 receptor 及び $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor の association constant (K_a) は, ともに 10^8M^{-1} order で, affinity の高い receptor であつた.

考 案

PGs の測定, 特に R.I.A. に関しては, 1970年以來多くの検討がなされてきた. Levin et al.¹⁷⁾, Caldwell et al.⁹⁾ は, carbodiimide 法により PGs を BSA と結合させ抗体を作製し, R.I.A. を施行した. しかし, われわれは mixed anhydride 法により, より specific な抗体を得ることができた.

測定法の開発とともに, ヒト月経周期における末梢血中 PGs の変動が検討されてきた⁷⁾²⁴⁾が, PGs は局所で産生され, 局所で作用する点から, 月経周期における子宮内膜中の PGs 値の測定が意義あるものとされてきた. Downie et al.¹²⁾ は, bioassay と Gaschromatographic mass spectrometry (以下 Gas-mass) で, Green et al.¹⁴⁾ は Gas-Mass で, Levitt et al.¹⁸⁾ は R.I.A. にて月経周期における子宮内膜中の PGs 濃度を測定し, PGE , PGF 共に卵胞期より黄体期に高値を示すことを報告した. われわれの開発した R.I.A. 法にて測定した結果は, Downie et al., Green et al. の値と比較して, 特に黄体期末期に $\text{PGF}_{2\alpha}$ 値がより高値を示した.

PGs 産生が, 一体何によつて regulate されているかを調べるために, PGs 生合成の周期的変動を検討した.

PGs の前駆物質である arachidonic acid 等の不飽和脂肪酸は, 細胞内では主として磷脂質に結合して存在している. このエステル結合を, phospholipase A が切断し, 切断された arachidonic acid 等の不飽和脂肪酸は, PG-synthetase の作用により PGs となる. そこで, まず phospholipase A 活性を測定した. この時使用した基質は [^{14}C]-lecithin で, Robertson et al.²³⁾, Gatt¹³⁾ の方法にて作製したものである. 伊藤³⁾は, 黄体期子宮

内膜中の phospholipase A は有意に増加したと報告している. われわれの実験結果でも, 黄体期, 特に末期の子宮内膜中の phospholipase A は有意に増加した. gestagen を投与した子宮内膜中の phospholipase A は, 卵胞期の子宮内膜と比較すると活性が高かつた.

次に phospholipase A の作用により切断された arachidonic acid から PGs に変換する時に作用する PG synthetase の活性を検討した.

Miyamoto et al.²⁰⁾ の方法で arachidonic acid から PGs への conversion rate を測定した. 黄体期, 特に末期に PGs への高い conversion rate を認めた. 測定した PGs は主に PGE であり, 組織中で PGE から PGF へも変換し, 局所に作用していると考えられる. すなわち, PGs 生合成に作用する酵素活性が高まつたことにより, PGs 濃度が高値になつたと考えられる.

さらに, PGs 効果発現機序の一端を担うと考えられる PG-receptor 量の変動を検討した.

家兎子宮筋内 PG-receptor の局在は広島¹⁾により明らかとなつた. 動物の黄体中に, それぞれ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 及び PGE_1 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ の receptor があることは Powell et al.²²⁾, Kimball et al.¹⁶⁾ によつて報告された. Wakeling et al.²⁵⁾ は, ヒト子宮筋内 PGE_1 及び $\text{PGF}_{2\alpha}$ の receptor を報告した. われわれは, PG-receptor は主に cell membrane に存在するものとして, 子宮内膜中 PGE_1 及び $\text{PGF}_{2\alpha}$ の receptor 量を測定したが, 共に黄体期では卵胞期と比較して低値であつた. これは, 黄体期に入り, PGs 生合成が盛んとなり, PGs 濃度が増えた結果, 特に $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor が occupy され, まだ occupy されていない receptor を測定したと推察されるが, 子宮内膜中の PG-receptor の意義については今後の検討が必要と思われる.

PGs の局在については, 蛍光抗体法にて, 井村ら²⁾が動物の腎臓で, Ogra et al.²¹⁾ がヒトの卵管で報告している. われわれは, 既に報告した通り⁵⁾, 黄体期末期の子宮内膜腺のまわり及び血管周囲に強い蛍光を認めた.

ヒトの子宮内膜は estrogen, progesterone の性ス

テロイドホルモンの作用下にある。われわれは、PGsの生合成が月経周期に伴ない変動することから、ステロイドホルモンに dependent であると推察した。Jordan et al.¹⁵⁾は、ヒト子宮静脈血中 estradiol と子宮内膜中の PGF 濃度とは相関すると報告した。

Blatchley et al.⁸⁾はモルモットで、Castracane et al.¹⁰⁾はラットで estrogen+progesterone により PGs 生合成は高まると報告した。

われわれは、ラットを用いたモデル実験により、ステロイドホルモンと PGs 生合成について検討した結果、estrogen+progesterone が、PGs 濃度、酵素活性及び receptor 量に強い影響をもっていることを明らかにした⁴⁾。

一方、PGF_{2α}には、子宮筋収縮作用と共に強い血管収縮作用があり¹⁰⁾、基底動脈やらせん動脈の vasoconstriction を起こし、月経発来の一因となることが推察される。

以上より、PGsは月経発来機序の一端に深く関与しているものと考えられる。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師友田 豊教授に深甚の謝意を表します。

なお、本論文の要旨は、第22回日本不妊学会、第31回日本産科婦人科学会学術講演会、第7回アジア産科婦人科学会において発表した。

文 献

1. 広島敏彦: Prostaglandin Receptor に関する研究。日産婦誌, 28: 575, 1976.
2. 井村優, 黒田満彦: Prostaglandin の腎内局在。日本臨床, 32: 182, 1974.
3. 伊藤昌春: 性周期における人, 並びにラット子宮組織中の phospholipase A 活性に関する研究。日産婦誌, 30: 330, 1978.
4. 松川良治, 蜷川映己, 吉尾 豪, 菅 整一, 友田 豊: 第23回日本不妊学会, 第31回日本産科婦人科学会学術講演会にて発表。東京, 1979.
5. 蜷川映己, 太田正博, 井元宣胤, 松川良治: プロスタグランディン。ホと臨, 24: 47, 1976.
6. 蜷川映己, 太田正博, 広島敏彦, 富田悦充, 伊藤暁二: 月経遅延に対するプロスタグランディン F_{2α} の子宮腔内投与の効果について。産婦の世界, 28: 165, 1976.
7. 富田悦充: Prostaglandins の Radioimmunoassay について。日産婦誌, 28: 583, 1976.
8. Blatchley, F.R. and Poyser, N.L.: The effect of estrogen and progesterone on the release of prostaglandins from the uterus of the ovariectomized guinea-pig. J. Reprod. Fert., 40: 205, 1974.
9. Caldwell, B.V., Burstein, S., Brock, W.A. and Speroff, L.: Radioimmunoassay of the F prostaglandins. J. Clin. Endocr. Metab., 33: 171, 1971.
10. Castracane, V.D. and Jordan, V.C.: The effect of estrogen and progesterone on uterine prostaglandin biosynthesis in the ovariectomized rat. Biol. Reprod., 13: 587, 1975.
11. Cseply, J. and Csapo, A.I.: The effect of prostaglandin F_{2α} on the small arteries of the omentum uteri in the rat. Prostaglandins, 1: 235, 1972.
12. Downie, J., Poyser, N.L. and Wunderlich, M.: Levels of prostaglandins in human endometrium during the normal menstrual cycle. J. Physiol., 236: 465, 1974.
13. Gatt, S.: Purification and properties of phospholipase A₁ from rat and calf brain. Biochim. Biophys. Acta., 159: 304, 1968.
14. Green, K. and Hagenfeldt, K.: Prostaglandins in the human endometrium. Am. J. Obstet. Gynecol., 122: 611, 1975.
15. Jordan, V.C. and Pokoly, T.B.: Steroid and prostaglandin relations during the menstrual cycle. Obstet. Gynecol., 49: 449, 1977.
16. Kimball, F.A. and Lauderdale, J.W.: Prostaglandin E₁ and F_{2α} specific binding in bovine corpora lutea: Comparison with luteolytic effects. Prostaglandins, 10: 313, 1975.
17. Levin, L. and Van Vunakis, H.: Antigenic activity of prostaglandins. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41: 1171, 1970.
18. Levitt, M.J., Tobon, H. and Josimovich, J.B.: Prostaglandin content of human endometrium. Fertil. Steril., 26: 296, 1975.
19. McCracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K. and Samuelsson, B.: Prostaglandin F_{2α} identified as a luteolytic hormone in sheep. Nature. New Biol., 238: 129, 1972.
20. Miyamoto, T., Yamamoto, S. and Hayaishi, O.: Prostaglandin synthetase system—resolution into oxygenase and isomerase components. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 71: 3645, 1974.
21. Ogra, S.S., Kirton, K.T., Tomasi, T.B. and Lippes, J.: Prostaglandins in the human fallopian tube. Fertil. Steril., 25: 250, 1974.
22. Powell, W.S., Hammarström, S. and Samuelsson, B.

- B.*: Prostaglandin F receptor in ovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.*, 41: 103, 1974.
23. *Robertson, A.F. and Lands, W.E.M.*: Positional specificities in phospholipid hydrolyses. *Biochemistry.*, 1: 804, 1962.
24. *Van Orden, D.E., Swanson, J.A., Clancey, C.J. and Farley, D.B.*: Plasma prostaglandins in the normal menstrual cycle. *Obstet. Gynecol.*, 50: 639, 1977.
25. *Wakeling, A.E. and Wyngarden, L.J.*: Prostaglandin receptors in the human, monkey and hamster uterus. *Endocrinology.* 95: 55, 1974.
(No. 4627 昭54・11・20受付)
-