

排卵における Prostaglandin (PG) の意義

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

呉 道 明

Significance of Prostaglandins (PGs) in Ovulation

Taoming Wu

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo

(Director: Prof. Shoichi Sakamoto)

概要 prostaglandin (PG) の排卵への関与を明らかにするため PG 生合成酵素 (cyclooxygenase) の阻害剤である indomethacin, mefenamic acid および cyclooxygenase の抗血清を用いて幼若ラット, 幼若豚の過排卵を抑制することを試みた。

1) indomethacin は幼若ラット, 幼若豚の過排卵を 1mg/kg で30%, 10mg/kg で80~100%と dose-dependent に抑制した。

2) mefenamic acid も cyclooxygenase に対する ID_{50} に比例した量で indomethacin と同様幼若豚の過排卵を抑制した。

3) 牛精嚢腺より cyclooxygenase を抽出精製し, それを抗原として家兎に投与し, cyclooxygenase に特異的な抗体を作製した。

4) cyclooxygenase の抗血清 0.1, 0.2, 0.4ml を投与し, dose-dependent に幼若ラットの過排卵を抑制した。しかし progesterone 産生には影響がなかった。

5) cyclooxygenase 抗血清による卵胞細胞内 cyclooxygenase 活性阻害を検討するため, 抗血清を *in vivo* に幼若ラット投与し卵胞を剔出し培養を行い, indomethacin と同様に cyclooxygenase 活性を阻害するが, progesterone 生成には影響しないことを確認した。

6) cyclooxygenase 抗血清を培養液に添加し幼若ラット卵胞を培養したが, cyclooxygenase 活性の阻害は認められなかった。

以上より各種の方法で PG 産生を抑え, その結果排卵が抑制されることを確認し, PG が排卵に必須の因子であることを証明した。更に本研究の条件下では progesterone 産生は阻害されず, 排卵と steroidogenesis を分離出来ることを示し今後の排卵機構研究の新しい方法論に関する示唆を得た。

Synopsis In order to investigate involvement of prostaglandins (PGs) in ovulation, it was examined whether inhibitors of cyclooxygenase, such as indomethacin and mefenamic acid, and the antiserum to cyclooxygenase were able to inhibit superovulation in immature female rats and gilts. Indomethacin and mefenamic acid were dose-dependently effective in inhibition of superovulation in the two animals. The antiserum to cyclooxygenase was raised in rabbits using the solubilized cyclooxygenase extracted and purified from bovine seminal vesicle as antigen. The *in vivo* administration of the antiserum inhibited superovulation in female rats dose-dependently at the doses of 0.1, 0.2 and 0.4 ml but did not influence production of progesterone. Inhibition of cyclooxygenase in the follicular cells by the antiserum with no effect on steroidogenesis was observed in organ culture of the follicles excised from the rats primed with PMS and the antiserum. On the contrary, no inhibition of cyclooxygenase was detected in case of the addition of the antiserum to the culture medium. The present study showed PG is one of the indispensable factors in ovulation as steroids are.

Key words: Antiserum to cyclooxygenase•Indomethacin•Mefenamic acid

緒 言

精液中から発見されたことが示すように多彩な作用をもつ prostaglandin (PG) は, 生殖生理に深く関っている。PG の排卵への関与は, Orczyk

and Behrman²³⁾ や Armstrong and Grinwich⁶⁾ による生合成阻害剤の indomethacin 等を用いた排卵抑制実験から明らかにされた。しかしこれらは, LH-surge による自然排卵を抑制する意図の

もとに行われた実験で indomethacin は中枢に働いて gonadotropin 分泌を抑え、その結果排卵が阻害されたと考えられた。一方 O'Gray et al.²²⁾ は家兎に交尾後 8 時間に indomethacin を投与すると、排卵は抑えられるが黄体は形成され、progesterone 分泌も十分起こることを観察し、indomethacin は卵胞に直接働いて排卵を阻害することを指摘した。その後 Sato et al.²⁵⁾ は、indomethacin 投与による排卵抑制時、ラット血中 FSH, LH を測定し対照と差がないことを示し、また Armstrong et al.⁷⁾ は、家兎の卵胞内に直接 indomethacin を投与し、全身投与で無効であつた量で排卵を抑えることを見出し、それらの成績から indomethacin の卵胞への直接作用が明らかになつた。

他方 hCG 投与による家兎の排卵時¹⁵⁾、またラット¹⁶⁾の性周期の各時期において卵胞内の PGE₁, F を測定した成績によると、排卵直前に PG 値は最高を示し、PG が排卵に強く関与していることが更に明白となつた。それ故 indomethacin 投与による排卵抑制は indomethacin が卵胞に働き卵胞内の PG 産生が阻害され、その結果排卵が抑えられたと考えることが出来る。しかし indomethacin は強力な PG 生合成酵素の阻害剤であるが、それだけではなく他の多くの酵素に対する阻害作用も知られている。それ故 indomethacin の排卵抑制作用を一元論的に PG 産生阻害だけと結論することは早計で、他の方法および薬剤で PG 産生を抑制しそれによつても indomethacin と同様の結果がえられるかどうか検討する必要がある。そのため本論文では indomethacin による幼若ラット、幼若豚の過排卵抑制を再検討し、また PG 産生阻害剤 mefenamic acid および PG 生合成酵素 (cyclooxygenase) の抗血清の投与を行い、indomethacin の効果と比較検討したので報告する。

実験方法

1. 測定法

a) PGE₁, F_{2α} の測定¹³⁾

一定量の培養液を 0.1N HCl で酸性化 (pH 3.0) した後、2ml 醋酸エチルにて 2 回抽出し、

1ml H₂O にて 2 回洗浄し、蒸発乾固の後、silicic acid column chromatography (silicic acid: 1.0g) にて分離精製した。展開溶媒は benzene-ethyl acetate-methanol (60:40:0.5), benzene-ethyl acetate-methanol (60:40:3.5), benzene-ethyl acetate-methanol (60:40:10) で第 2 の溶媒で PGE が第 3 で PGF が溶出された。0.1ml assay buffer (0.05M Tris buffer (pH 7.5) に 0.1% gelatin を含む) に溶かした試料および標準 PGE₁ または F_{2α} (10pg~10ng) に、それぞれ ³H-PGE₁ または ³H-PGF_{2α} (約 7,000dpm), PGE₁ または PGF_{2α} 抗血清 0.1ml を添加し、4℃, 24時間培養した。その後 0.1ml dextran coated charcoal 懸濁液 (Dextran T 70:0.5g および Norit A: 5g を 100ml assay buffer に混和したもの) を加え、遊離および結合型を遠心によつて分離し、上清の一部の放射能を測定した。抗体の交叉反応は、PGE₁ 抗血清: PGE₁: 100%, E₂: 6.2%, F_{1α}: 3.8%, F_{2α}, A₁, A₂, B₁: ÷ 0%, PGF_{2α} 抗血清: PGF_{2α}: 100%, E₁: 19.2%, F_{1α}: 14.7%, A₂: 0.39%, A₁: 0.03%であつた。PGE₁ 抗血清は PGE₂ に対して、PGF_{2α} 抗血清は PGF_{1α} に対してかなり交叉反応を示すので、測定結果は PGE, F として表現した。測定感度は PGE: 10pg, PG F: 100pg, 回収率は 75%, 精度 (CV=8%) も満足すべきものであつた。

b) progesterone の測定

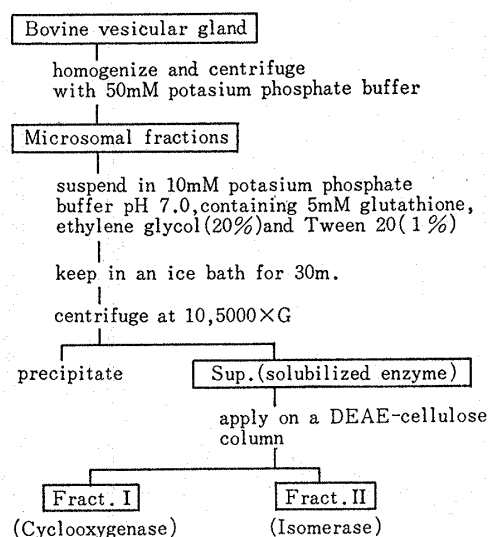
一定量の試料よりエーテルにて抽出後、Sephadex LH 20 を用いた column chromatography (solvent system: hexane: benzene: MeOH=80:10:10) で progesterone を分離し、帝国臓器より提供された抗血清²⁾を用い、dextran coated charcoal で遊離と結合型を分離し、RIA を行つた。

2. PG 生合成酵素 (cyclooxygenase) の抗血清清作製法

a) 可溶性 cyclooxygenase の精製

牛精囊腺を 20mM phosphate buffer (pH 7.4) 中でホモジナイズし、78,500×g にて 90 分間遠心し、マイクロソーム分画をえた。次いで 2% Tween 20 を含む上記 buffer を加え 0℃, 30 分

図1 Cyclooxygenase の精製過程



間放置, $78,500 \times g$, 120分間遠心し上清を“solubilized enzyme”とした. この上清を DEAE-cellulose column に添加, 0.2% Tween 20 を含む上記 buffer にて可溶化 cyclooxygenase を溶出した. 溶出液は限外濾過にて濃縮し, electrofocusing を行い更に精製し, 抗体作製のための抗原, 即ち可溶化精製 cyclooxygenase として用いた¹⁸⁾¹⁹⁾ (図1). 精製可溶化 cyclooxygenase の活性は 2.4units/mg 蛋白 (1unit は 24°C 1分間に $1\mu\text{mol}$ の PGG_1 または H_1 を産生する酵素活性を示す) であった.

b) 抗血清作製

この可溶化 cyclooxygenase (1mg/ml) を抗原として Freund complete adjuvant (1ml) と emulsion 化し, 家兎に筋注, 次いで1カ月後に2週間間隔で2回0.25mg 抗原を booster injection し, 2週間後に採血し抗血清として用いた. 家兎よりえられた抗血清は Ouchterlony 二重拡散法で精製された cyclooxygenase と沈降反応を行い特異性を検定した.

3. 動物実験法

実験1) Wistar 系雌幼若ラット (25日齢) (約 50g) (3匹ずつ) に PMS (pregnant mare's serum gonadotropin) (帝国臓器) $10\text{iU}/0.2\text{ml}/\text{匹}$, 48時間後に hCG (human chorionic gonadotropin) (持田製薬) $30\text{iU}/0.2\text{ml}/\text{匹}$ を皮下注射し過排卵を誘

発した. (排卵は hCG 投与後8時間では起きなかつたが, 12時間後で85%, 16時間以後では100%で起こった). hCG 投与と同時に腹腔内に indomethacin (メルク万有) 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 8.0mg を投与し, 24時間後に卵管内の卵を数え, 血中 progesterone を測定した.

実験2) 幼若雌豚 (Large Yorkshire 種, 7カ月齢, 体重70~90kg) (計22頭) に PMS $12\text{iU}/\text{kg}$, 72時間後に hCG $6\text{iU}/\text{kg}$ を筋注し過排卵を誘発した (hCG 投与32時間後16%の卵胞に, 42時間後に85%の卵胞に, 72時間後に85%の卵胞に排卵が認められた). hCG 投与24時間後に indomethacin (生食 20ml に懸濁) をそれぞれ 0, 0.76, 2.53, 7.6mg/kg 投与, または mefenamic acid (パークデービス・三共) (propylene glycol に溶解し, 生食に懸濁) をそれぞれ 0, 10, 30, 100mg/kg 投与し, hCG 投与72時間後に開腹し, 排卵数を調べ, 血中 progesterone を測定した. 排卵率は各2頭の両側卵巣の排卵数および未排卵数の総計数に対する排卵卵胞 (stigma を有する卵胞) の%をもつて表わした.

実験3) Wistar 系幼若ラットで実験1)と同様に過排卵を起こし, hCG 投与と同時に cyclooxygenase 抗血清 $0.1\text{ml}/\text{匹} \times 1$ 回, 0.2×1 , 0.4×1 , 0.4×2 (hCG 投与3時間後に第2回投与) (4匹ずつ), または正常家兎血清 (NRS) $0.1\text{ml}/\text{匹} \times 1$ 回, 0.2×1 , 0.4×1 , 0.4×2 (cyclooxygenase 抗血清と同様に2回投与) を静脈内投与し, 24時間後に開腹し, 排卵数と血中 progesterone を測定した.

4. 卵胞培養実験法

a) cyclooxygenase 抗血清 in vivo 投与

Wistar 系幼若ラットを実験1)と同様に処置し, hCG 投与と同時にそれぞれ2匹ずつに生食 0.4ml/匹, 正常家兎血清 (NRS) $0.4\text{ml}/\text{匹}$, cyclooxygenase 抗血清 $0.4\text{ml}/\text{匹}$ を静注, また indomethacin $8\text{mg}/\text{匹}$ を腹腔内に投与し, 6時間後に卵巣を剔出, 実体顕微鏡下で無菌的に卵巣1コより同じ大きさの卵胞2コずつを取り出した. それら卵胞を任意に2コずつ選び対にし培養液 1ml,

(Medium 199 (10倍濃縮) 10ml, 7% NaHCO_3 水溶液 0.75ml, HEPES (Sigma) 0.4766g/蒸留水 200ml, pH 7.3) 中で Falcon organ culture dish を用い, 空气中 37°C の条件下で 6 時間 quadricate に培養を行つた^{3) 29)}. 培養後培養液中の PGE, F, progesterone 量を RIA にて測定した.

b) cyclooxygenase 抗血清 in vitro 添加

Wistar 系幼若ラットを実験1)と同様に処置し, hCG 投与後 1 時間で 卵巣を剔出, 卵胞を採取した. in vivo 投与と同様に Falcon organ culture dish に卵胞を 4 コずつ並べ, 1ml 培養液に 生食 (0.05ml), NRS (0.05ml), cyclooxygenase 抗血清 (0.05ml), indomethacin ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) をそれぞれ添加し, 空气中 37°C の条件下で 12 時間 duplicate に培養を行つた. 培養後培養液中の PGE, F, progesterone を RIA にて測定した.

成 績

I. prostaglandin 生合成阻害剤投与実験

1) indomethacin による排卵抑制

ラット: 実験1)のように indomethacin 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 8.0mg/匹を幼若雌ラットに投与し排卵数を調べると対照 24.9 ± 9.3 枚/匹 (mean $\pm$ SD) (indomethacin 投与ラット数: 9, 排卵したラット数: 9) に対してそれぞれ 16.7 ± 4.5 枚/匹 (3, 3), 3.0 ± 1.0 (3, 3), 3.0 ± 3.0 (3, 3), 1.5 ± 1.7 (3, 3), 0 (3, 0) と dose-dependent に有意に ($p < 0.001$) 排卵が抑制された (図2).

血中 progesterone 値 (hCG 投与 24 時間後) は, 対照 $32.5\text{ng}/\text{ml}$ であり, indomethacin 投与群ではそれぞれ $34.2\text{ng}/\text{ml}$ (indomethacin: $0.05\text{mg}/\text{匹}$ 投与), 35.1 (0.5), 33.4 (1.0), 31.4 (5.0), 35.6 (8.0) で indomethacin の黄体による progesterone 産生への影響は認められなかつた.

豚: 実験2)のように 幼若雌豚に indomethacin 0, 0.76, 2.53, $7.6\text{mg}/\text{kg}$ を投与すると排卵率はそれぞれ 58% (排卵卵胞数/総卵胞数: 25/43), 39% (16/41), 13% (9/68), 0% (0/49) であつた (図3). indomethacin 投与で 卵胞は著明に腫大し, $7.6\text{mg}/\text{kg}$ 投与時の卵巣の大きさは平均値で $59 \times 44 \times 40\text{mm}$, 卵胞液量は $0.67\text{ml}/\text{卵胞}$ であつ

図2 Indomethacin による幼若ラット過排卵の抑制

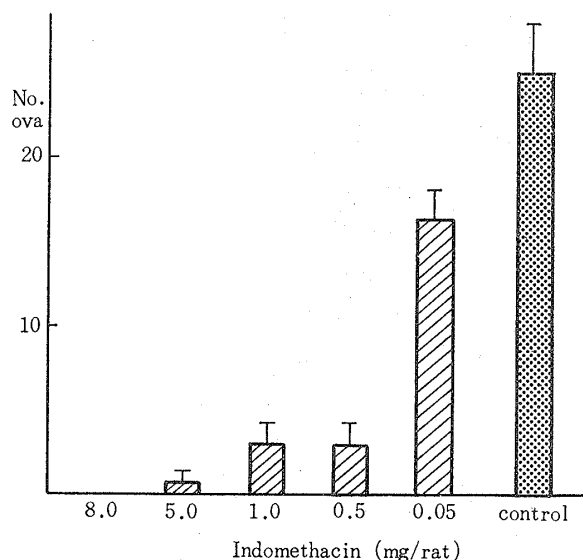
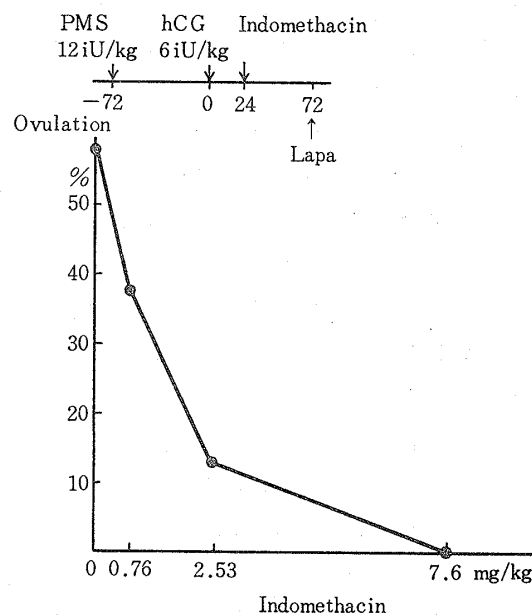


図3 Indomethacin による幼若豚過排卵の抑制



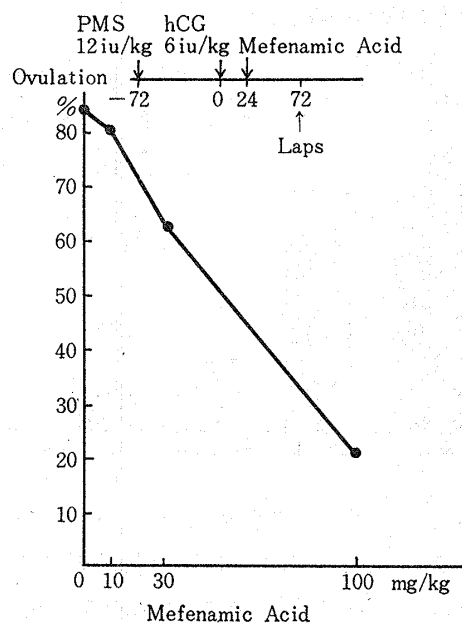
た. 対照群の卵巣の大きさは $27 \times 20 \times 18\text{mm}$ であつた.

血中 progesterone 値は, 対照 $7.81 \pm 2.72\text{ng}/\text{ml}$ (mean $\pm$ SD) (5 匹) で indomethacin 投与群ではそれぞれ $8.18 \pm 1.72\text{ng}/\text{ml}$ (2 匹, $0.76\text{mg}/\text{kg}$), 9.45 ± 2.31 (2, 2.53), 7.07 ± 2.95 (5, 7.6) で, 対照と投与群に差は認められなかつた.

2) mfenamic acid による排卵抑制

豚: 実験2)のように indomethacin と同様な PG 生合成阻害剤である mfenamic acid を 0, 10,

図4 Mefenamic acid による幼若豚過排卵の抑制



30, 100mg/kg 投与すると dose-dependent に排卵が抑制され, 排卵率はそれぞれ84.6% (11/13), 80.9% (17/21), 63.1% (12/19), 21.7% (10/46)であつた (図4).

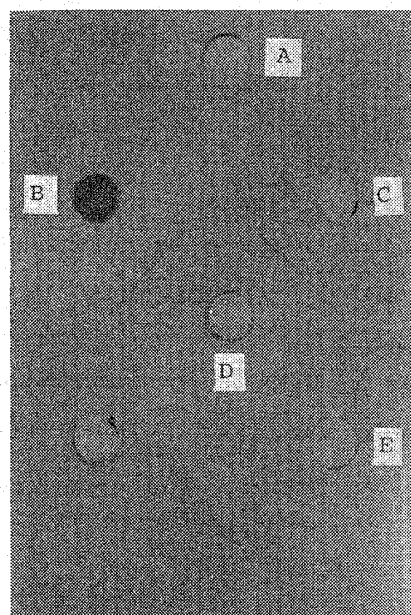
血中 progesterone 値は, 対照 2.0ng/ml で, mefenamic acid 投与群ではそれぞれ4.4ng/ml (10 mg/kg), 3.2 (30), 4.3 (100) で indomethacin と同様対照と投与群では差はなかつた.

II. cyclooxygenase 抗血清投与実験

1) 抗血清の特異性

図5は cyclooxygenase 抗血清に対する精製された cyclooxygenase と牛精囊腺マイクロソーム

図5 Ouchterlony 免疫二重拡散法による cyclooxygenase 抗血清の検索



- A: 正常家兎血清
- B: 牛精囊腺より抽出精製した可溶性 cyclooxygenase
- C: 牛精囊腺の可溶性粗 cyclooxygenase 分画
- D: cyclooxygenase 抗血清
- E: 精製 cyclooxygenase と抗血清を前もって混合した後 well に添加したもの

を Tween 20 で可溶化した cyclooxygenase 分画との免疫沈降線が示されている. 一本の沈降線がそれぞれの可溶性酵素との間に認められ, 更にそれらが互に融合している. また対照の正常家兎血清 (NRS) と2種の可溶性酵素との間には沈降線が認められない. また精製 cyclooxygenase と抗

表1 Cyclooxygenase 抗血清 (anti-C) による幼若ラット過排卵の抑制

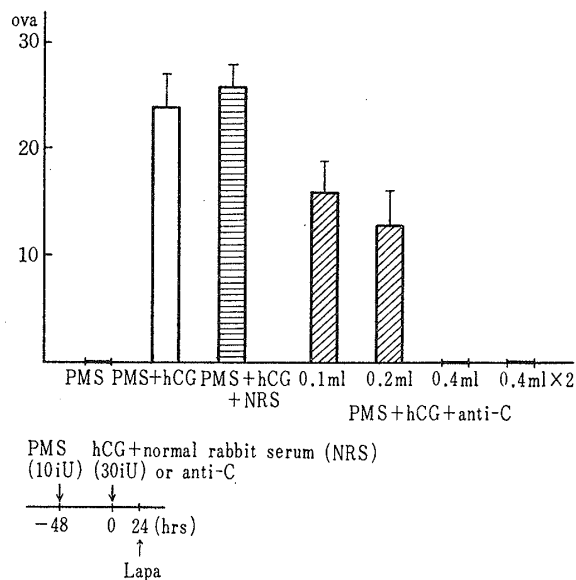
	ラット数	卵巣重量 (mg)	排卵数 (M±SD)	プロジェステロン (ng/ml)
PMS	6	58.3±15.3	0	13.0
PMS+hCG	6	65.2± 7.6	24.2±3.3	31.8
PMS+hCG +NRS				
0.1 ml	3	63.3± 9.1	25.8±1.6	
0.2 ml	3	58.3± 9.1	26.0±2.0	
0.4 ml	3	63.2± 8.6	26.5±4.7	
0.4 ml×2	3	85.8± 7.2	26.7±4.7	
PMS+hCG +anti-C				
0.1 ml	4	94.0± 5.1	15.9±2.9	33.8
0.2 ml	4	73.8±14.3	13.3±3.5	40.7
0.4 ml	4	66.5±15.1	0	39.3
0.4 ml×2	4	76.5±10.6	0	36.8

血清を前もって混合した後 well に添加した場合は、未精製の可溶化 cyclooxygenase との間に沈降線は見られなかつた。それらの結果は本研究で作製した cyclooxygenase 抗血清が cyclooxygenase に特異的に反応することを示している。

2) 排卵抑制

実験3のように hCG 投与と同時に cyclooxygenase 抗血清0.1, 0.2, 0.4, 0.4ml×2回静脈内投与し、24時間後に排卵数を調べた。表1に示すように正常家兎血清 (NRS) 投与の対照に比し抗血清投与群では有意に ($p<0.001$) dose-dependent に排卵が抑制された (図6)。しかし卵巣重量に

図6 Cyclooxygenase 抗血清 (anti-C) による幼若ラット過排卵の抑制 (排卵数mean±SD)



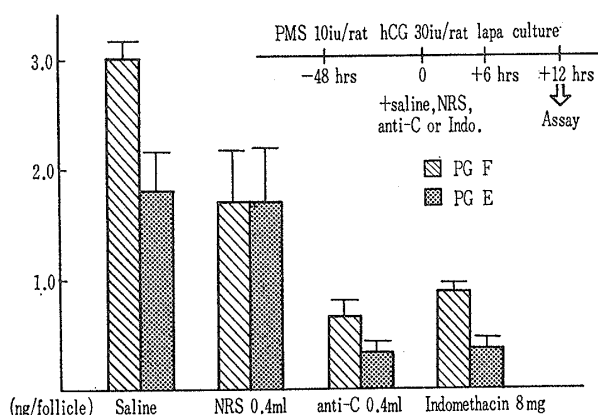
は差が見られなかつた。またその時点での血中 progesterone 値も PMS+hCG 投与の対照群の 31.8ng/ml に比べてほとんど差が認められず (表1), 対照群と同じように黄体化が起こつたことを示していた。

3) 卵胞による PGs, progesterone 産生

(a) cyclooxygenase 抗血清 in vivo 投与

卵胞培養実験に述べたように生食: 0.4ml/匹, 正常家兎血清 (NRS): 0.4ml/匹, cyclooxygenase 抗血清: 0.4ml/匹, indomethacin: 8mg/匹を hCG と同時に幼若雌ラット (PMS 投与48時間後) に投与し、卵胞を取り出し6時間培養を行うと、

図7 ラット卵胞培養実験 (cyclooxygenase 抗血清 (anti-C) in vivo投与)



培養液中への PGF の産生量 (mean±SD) (ng/卵胞) は、生食: 3.0 ± 0.16 (卵胞数: 8コ), NRS: 1.7 ± 0.47 (8), cyclooxygenase 抗血清: 0.66 ± 0.13 (8), indomethacin: 0.88 ± 0.08 (8), PGE (mean±SD) (ng/卵胞) はそれぞれ 1.8 ± 0.36 (8), 1.7 ± 0.51 (8), 0.33 ± 0.08 (8), 0.34 ± 0.11 (8) で対照 (生食, NRS 投与群) に比べ cyclooxygenase 抗血清, indomethacin 投与群では有意に ($p<0.001$) PGs の産生が抑えられた (図7)。しかし培養液中の progesterone 産生量 (mean±SD) (ng/卵胞) はそれぞれ 1.4 ± 0.2 , 1.7 ± 0.7 , 1.2 ± 0.15 , 1.6 ± 0.17 で全例で差が認められず, cyclooxygenase 抗血清, indomethacin 共に steroidogenesis には影響しないことが明らかになった。

(b) cyclooxygenase 抗血清 in vitro 添加

表2に培養液に cyclooxygenase 抗血清を添加した場合の PGE, F, progesterone の産生量を示してある。in vivo で抗血清を投与したときと異

表2 ラット卵胞培養実験 (cyclooxygenase 抗血清 (anti-C) in vitro 添加 (n=8))

	添加量	PGE (ng/卵胞)	PGF (ng/卵胞)	Progesterone (ng/卵胞)
生理食塩水	0.05 ml	0.45 ± 0.04	1.8 ± 0.21	2.5 ± 0.4
正常家兎血清 (NRS)	0.05 ml	0.56 ± 0.06	2.0 ± 0.30	2.8 ± 0.5
Anti-C	0.05 ml	0.48 ± 0.03	2.3 ± 0.41	2.4 ± 0.4
Indomethacin	5 µg/ml	0.03 ± 0.02	0.2 ± 0.1	2.6 ± 0.6

なり, cyclooxygenase 抗血清添加のものは, 対照の生食, NRS 添加のものと PGE₂ 産生について平均 0.45~0.56ng/卵胞 でほとんど差が見られなかった. それに反し indomethacin 添加では PGE₂, F の産生が約 1/10 に減少しており, in vivo 投与と同様に PG 産生が阻害された. progesterone 産生については 2.4~2.8ng/卵胞 の産生量がみられ全例差がなく steroidogenesis に影響のなかったことが示されている.

考 案

PMS および hCG 投与による幼若ラット, 幼若豚の過排卵が PG 生合成阻害剤である mefenamic acid, PG 生合成酵素 cyclooxygenase の抗血清によつて indomethacin と同じように抑制されることを明らかにした. これまで indomethacin による排卵抑制はラット^{3) 4) 6) 23)}, マウス²⁶⁾, 家兎^{7) 22)}, 豚¹⁾などで報告されているが, 種属間の indomethacin の作用について比較したものはない. indomethacin の幼若ラット, 幼若豚の過排卵の抑制作用を体重当りの投与量で比較するとラットの投与量 0.05mg/匹は 1mg/kg に相当し, 豚での 0.76mg/kg と equivalent である. またラットで 0.5mg/匹は 10mg/kg で, 豚の 7.6mg/kg の投与量に匹敵する. これらの投与量による排卵抑制率を対照に対する % で表わすとラットでは 30% (0.05mg/匹), 88% (0.5mg/匹) で, 豚では 33% (0.76mg/匹), 100% (7.6mg/匹) となり, indomethacin の幼若ラット, 幼若豚での排卵抑制効果はほとんど同等であることがわかる. indomethacin の cyclooxygenase 阻害作用は組織によつて異なるといわれているが, それは各組織の cyclooxygenase の indomethacin に対する感受性の差というよりむしろ組織内への取り込みの差によると考えられる. それ故本研究の結果から両種の卵巣への indomethacin の取り込みはほとんど差がないといえる.

幼若豚の過排卵を indomethacin と同じ cyclooxygenase 阻害剤である mefenamic acid の投与量をそれに比例した量に増量すると indomethacin と同じような排卵抑制効果がみられた. このこと

は indomethacin の排卵抑制は cyclooxygenase 阻害作用に基づくものであることの傍証となろう. indomethacin と cyclooxygenase 抗血清の cyclooxygenase 阻害作用を比較することは本研究から必ずしも容易ではないが, 幼若ラット過排卵抑制率から抗血清 0.1ml/匹と indomethacin 0.05mg/匹, 0.4ml/匹と 0.5mg/匹のように効果は equivalent と考えられる.

indomethacin は cyclooxygenase の強力な阻害剤であるだけでなく, 他の酵素の阻害作用も持っていることが知られている. Flower and Vane¹⁰⁾によると, その ID₅₀ は cyclooxygenase : 0.17~38μM, PG-15OH dehydrogenase : 15~1,000μM, phosphodiesterase : 28μM, DOPA decarboxylase : 100μM, oxidative phosphorylation : 250μM, histidine decarboxylase : 400μM, collagenase : 3,500μM と報告されている. 更に最近では cyclic AMP dependent protein kinase (ID₅₀ : 0.017~0.048μM)¹²⁾ や ornithine decarboxylase (ID₅₀ : 500μM)²⁴⁾ も阻害されることが明らかになった. これら総ての酵素が排卵に関係するわけではないが, これだけの酵素が多少とも阻害されれば排卵に何らかの影響が出ることが予想され, 特に indomethacin 大量投与では toxic な作用によつて排卵が抑えられるであろう. 佐藤ら³⁾は幼若ラット過排卵を 0.05mg/匹の indomethacin で抑制したときは PGE₂ (0.4mg/匹) および PGF_{2α} (0.4mg/匹) を同時に投与することで排卵を完全に回復出来たが, それ以上の量の indomethacin 投与では排卵の回復は見られなかったと報告している. これは indomethacin の作用が cyclooxygenase 阻害だけでなく toxic にも働いていることを示している. 現在卵巣構成細胞に対する LH の作用はそれら細胞の adenylate cyclase の活性化とその結果増加する cyclic AMP による細胞内 cyclic AMP dependent protein kinase の活性化, それに続く steroidogenesis の亢進という一連の機構が考えられている¹⁴⁾. indomethacin による cyclic AMP dependent protein kinase の阻害は, 家兎の空腸粘膜から精製された protein kinase を用い

た報告であるが、もし同じように卵胞の同酵素も indomethacin によつて阻害されるとすると卵胞での steroidogenesis が障害され、その結果排卵が起こらなくなることも予想される。またその ID_{50} が cyclooxygenase の ID_{50} の1/10でむしろそれが主たる原因と考えざるをえないかもしれない。しかし in vivo, in vitro に indomethacin を投与した場合でも progesterone 産生は対照と全く同じであることから、卵胞では indomethacin による cyclic AMP dependent protein kinase の阻害はほとんど起きないといえる。卵巣内 ornithine decarboxylase は polyamine 生合成の律速酵素といわれ、LH によつて活性化される¹⁴⁾。それ故本酵素の阻害は排卵抑制を起す可能性が考えられる。以上のことから indomethacin の排卵抑制作用が cyclooxygenase 阻害のみによるか必ずしも結論出来ない。

それを明らかにするために mefenamic acid および cyclooxygenase 抗血清を用いて幼若ラット過排卵を抑制することを試み、indomethacin と同等の結果をえた。mefenamic acid は indomethacin とは構造の異なる化合物でそれ故 cyclooxygenase 阻害作用は共通でも他の酵素への作用は必ずしも一致するとはいえない。それ故両者とも排卵抑制作用をもつことが明らかになったのは、その共通の作用によるわけで cyclooxygenase 阻害により PG 産生が抑えられ、その結果排卵が抑制されたといえる。これは排卵現象に PG が関与し必須の作用をしていることを示している。

本研究で明らかにされた cyclooxygenase 抗血清の投与による幼若ラット過排卵の抑制は、PG が排卵機構に関与していることを更に直接的に証明したと考えられる。Armstrong et al.⁷⁾ は家兎の LH による誘発排卵を卵胞内へ $PGF_{2\alpha}$ の抗血清を直接注入することによつて抑制出来たと報告している。しかし cyclooxygenase 抗血清で排卵を抑制出来たとの報告はない。cyclooxygenase は PG の前駆物質(arachidonic acid など)から PG G, H などの endoperoxide を生合成する酵素で、PG G, H が更に変化を受けて PGE, F などに転換され

る。それ故どの PG が排卵に関係するかを識別することは出来ないが、その抗血清によつて PG family が排卵を抑えることを証明することは出来る。Smith and Wilkin²⁷⁾ は cyclooxygenase 抗血清を家兎で作製し、腎での cyclooxygenase の局在を immunohistochemical に証明したと報告している。また cyclooxygenase の RIA を開発したとの報告もみられる²⁸⁾。本研究で作製した抗血清と報告されたものとは特異性に関してはほとんど差はないが、本研究では抗体価について検討していないので抗体価について比較するのは困難である。

血液または細胞外液中に存在する物質をその抗体で中和することは必ずしも困難とは思われないが、マイクロソームなど細胞内器官に存在する酵素をその抗体と反応させるためには、 γ -globulin のような巨大蛋白分子が細胞内に入らなければならない。一般にそのような蛋白分子は plasma membrane を通過しにくいと考えられるが、これまで progesterone, estrogen 産生に必須の Δ^5 - 3β OH steroid dehydrogenase をラットに投与し、active immunization を行い妊娠中絶⁸⁾や黄体の progesterone 産生を抑制したとの報告がある⁹⁾。これらの成績では同酵素をラットに投与6~7週後に性周期がみだれ、酵素活性も著明に低下することが明らかにされている。これは酵素の抗体が細胞内に入り酵素と complex を作ったことを示している。また抗 ribonucleoprotein IgG 抗体がヒト末梢血中の mononuclear cell に入ることを蛍光抗体法で証明した報告もある⁵⁾。本研究で cyclooxygenase 抗血清投与で排卵が抑えられたのはこれらの成績と同じように抗体が細胞内に入り作用したことを示している。

本研究で cyclooxygenase 抗血清による排卵抑制が抗体と酵素の complex 形成による中和作用であるのかを確かめるため、抗血清投与後卵胞による PG 産生を in vitro で検討した。その結果、抗血清をラットに投与した場合は卵胞による PG 産生が indomethacin 投与と同じように抑えられた。しかし培養液に抗血清を添加したときは、PG 産生抑

制効果は見られなかつた。白血球に抗体が入つたとの成績⁵⁾もあるが、白血球と卵胞構成細胞とは性質が異なり抗体の細胞内への侵入も別の機構を想定しなければならないであろう。それ故 in vivo 投与の場合は血管系の存在を無視出来ず、特に卵胞のような一種の器官の場合は重要な意味をもつと考えられる。そのことは in vitro 添加で抗血清が作用を現わさなかつたことで明らかであろう。

本研究において種々の実験条件下での progesterone 値が測定されたが、いかなる条件でも対照と同じ値で PG 生合成阻害によつて steroidogenesis が影響を受けたとの結果はえられなかつた。Mori et al.²⁰⁾²¹⁾はラットに progesterone の抗体および testosterone の抗体を投与することにより排卵を抑制することに成功している。その成績から排卵現象に steroid 産生が必要であることを示しているが、本研究から steroid 産生が起こつても排卵が抑えられるので、PGは排卵機序において steroid 以外の必須の排卵促進因子として作用していることを推測させる。即ち排卵には steroid と PG の両物質が必須因子として働くことが明らかになつたといえる。これまで排卵と steroidogenesis は表裏一体と考えられ、steroidogenesis があれば排卵は必ず起るとの考えが通説となつていた。しかし本研究から卵の排出と steroidogenesis とを分離出来ることが示された。これは排卵機構の研究に新たな方法論的方向を与えるもので、臨床的に問題となる黄体化無排卵卵胞⁴⁾¹¹⁾¹⁷⁾の病態の解明への手掛りをも与えるものと思う。

稿を終るに臨み、御懇切なる御指導御校閲を賜つた坂元正一教授に感謝するとともに、直接御指導御助言を戴いた佐藤和雄助教授に心から感謝の意を表します。

文 献

1. 河合康夫, 佐藤和雄, 三橋直樹, 榊原賢一郎, 呉 道明, 木下勝之, 坂元正一, 山田 豊: Prostaglandin と排卵. 日内分泌誌, 56: 1559, 1980.
2. 向井久晴, 吉田孝雄, 高木繁夫: Progesterone の radioimmunoassay. 最新医学, 30: 799, 1975.
3. 佐藤和雄, 三橋直樹, 福岡秀興, 柴田治郎, 中林正雄, 河合康夫, 安水洗彦, 金子義晴, 木下

勝之, 坂元正一: 排卵における prostaglandin および線溶系の意義. 産と婦, 44: 1559, 1977.

4. 佐藤和雄: 排卵におけるプロスタグランディンの意義. 日産婦誌, 31: 975, 1979.
5. Alarcon-Segovia, D., Ruiz-Arguelles, A. and Eugenia Fishbein: Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. Nature, 271: 67, 1978.
6. Armstrong, D.T. and Grinwich, D.L.: Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandins biosynthesis. Prostaglandins, 1: 21, 1972.
7. Armstrong, D.T., Grinwich, D.L., Moon, Y.S. and Zamecnik, J.: Inhibition of ovulation in rabbits by intrafollicular injection of indomethacin and prostaglandin F antiserum. Life Sciences, 14: 129, 1974.
8. Badawy, S. and Laurence, K.A.: Biologic effects following active immunization with Δ^5 - 3β hydroxysteroid dehydrogenase. Fertil. Steril., 26: 1198, 1975.
9. Badawy, S., O'Leary, W.M. and Laurence, K.A.: Immunologic impairment of Δ^5 - 3β hydroxysteroid dehydrogenase and its effect on ovarian function: The use of a purified enzyme. Adv. Exp. Med. Biology, 112: 83, 1979.
10. Flower, R.J. and Vane, J.R.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis. Biochem. Pharmacol., 23: 1439, 1974.
11. Jewelewicz, R.: Management of infertility resulting from anovulation. Am. J. Ob. Gyn., 122: 909, 1975.
12. Kantor, H.S. and Hampton, M.: Indomethacin in submicromolar concentrations inhibits cyclic AMP-dependent protein kinase. Nature, 276: 841, 1978.
13. Kinoshita, K., Satoh, K. and Sakamoto, S.: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_1 in plasma and amniotic fluid during human pregnancy and labor. Endocrinol. Japon, 24: 155, 1977.
14. Lamprecht, S.A., Zor, U., Tsafiriri, A. and Lindner, H.R.: Action of prostaglandin E_2 and of luteinizing hormone on ovarian adenylate cyclase, protein kinase and ornithine decarboxylase activity during postnatal development and maturity in the rat. J. Endocr., 57: 217, 1973.
15. LeMaire, W.J., Yang, N.S.T., Behrman, H.H. and Marsh, J.M.: Post ovulatory changes in

- the concentration of prostaglandins in rabbit graafian follicles. *Prostaglandins*, 6: 37, 1974.
16. *LeMaire, W.J., Lindner, R. and Marsh, J.M.*: Pre and post ovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rat graafian follicles. *Prostaglandins*, 9: 221, 1975.
 17. *Marik, J. and Hulka, J.*: Luteinized unruptured follicle syndrome: A subtle cause of infertility. *Fertil. Steril.*, 29: 270, 1978.
 18. *Miyamoto, T., Yamamoto, S. and Hayaishi, O.*: Prostaglandin synthetase System—Resolution into oxygenase and isomerase components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71: 3645, 1974.
 19. *Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S. and Hayaishi, O.*: Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. *J. Biol. Chem.*, 251: 2629, 1976.
 20. *Mori, T., Suzuki, A., Nishimura, T. and Kambe-gawa, A.*: Inhibition of ovulation in immature rats by antiprogesterone antiserum. *J. Endocr.*, 73: 185, 1977.
 21. *Mori, T., Suzuki, A., Nishimura, T. and Kambe-gawa, A.*: Evidence for androgen participation in induced ovulation in immature rats. *Endocrinology*, 101: 623, 1977.
 22. *O'Gray, 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. *Prostaglandins*, 1: 97, 1972.
 23. *Orczyk, G.P. and Behrman, H.R.*: Ovulation blockade by aspirin and indomethacin—In vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotrophin secretion. *Prostaglandins*, 1: 3, 1972.
 24. *Osterman, J., Demers, L.M. and Hammond, J.M.*: Indomethacin blocks gonadotropin stimulation of ovarian ornithine decarboxylase activity by inhibiting protein synthesis. *Prostaglandins*, 17: 269, 1979.
 25. *Sato, T., Taya, K., Jyujō, T. and Igarashi, M.*: Ovulation block by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: A study of its site of action in rats. *J. Reprod. Fert.*, 39: 33, 1974.
 26. *Saksena, S.K., Lau, I.F. and Shaikh, A.A.*: Cyclic changes in the uterine tissue content of F-prostaglandins and the role of prostaglandins in ovulation in mice. *Fert. Steril.*, 25: 636, 1974.
 27. *Smith, W.L. and Wilkin, G.P.*: Immunochemistry of prostaglandin endoperoxide-forming cyclooxygenases: The detection of the cyclooxygenases in rat, rabbit, and guinea pig kidneys by immunofluorescence. *Prostaglandins*, 13: 873, 1977.
 28. *Tai, H.H., Tai, C.L. and Smith, W.L.*: A radioimmunoassay for fatty acid cyclooxygenase. *Fed. Proc.*, 39: 323, 1980.
 29. *Tsafiriri, A., Lindner, H.R., Zor, U. and Lamprecht, S.A.*: In vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cyclic AMP and prostaglandin E₂. *J. Reprod. Fert.*, 31: 39, 1972.

(特別掲載 No. 4807 昭和55・11・10受付)