

排卵周辺期における卵胞の Prostaglandin 生合成とその意義

—Indomethacin による排卵抑制と卵胞の Incubation—

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

三 橋 直 樹

Studies on the Mechanism and the Significance of

Prostaglandin Biosynthesis by the Ovary

—Ovulation Block by the Indomethacin and Incubation of the Follicle—

Naoki MITSUHASHI

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

(Director: Prof. Shoichi Sakamoto)

概要 排卵現象における prostaglandins (PGs) の関与をラット, 豚, ヒトにおいて検討し以下の結果を得た。

1) 幼若ラット過排卵は indomethacin で dose dependent に抑制され, これは PGs を投与することにより回復する。

2) 幼若ラット卵巣中の PGE, PGF, 豚卵胞液中の PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α} は排卵時に増加する。

3) 幼若ラット卵胞を器官培養すると培養液中に PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α} が産生され, この産生は hCG により促進され, actinomycin D, puromycin で抑制される。

4) 豚, ヒトの卵胞を incubate すると PGs の産生が認められ, この産生は hCG により促進される。

Synopsis The involvement of prostaglandins (PGs) in the process of ovulation was studied.

1) The superovulation of immature rat was blocked by indomethacin dose dependently and which was reversed by the administration of PGs.

2) Preovulatory increase of PGs was observed in the ovaries of rats and follicular fluid of gilts.

3) Immature rat follicle synthesised PGE, PGF, and 6ketoPGF_{1α} in organ culture. This synthesis was activated by hCG and suppressed by actinomycin D and puromycin.

4) Production of PGs by gilt and human follicles was observed and which was activated by hCG.

Key words: Ovulation • Indomethacin • Prostaglandin • hCG • Organ culture.

緒 言

女性の生殖生理で最も重要な排卵現象には極めて複雑な機構が関与しており, 卵巣においては中枢からの gonadotropin の刺激により, 卵胞および卵の成熟, 卵の排出そして黄体化に至る一連の局所的变化が観察される。近年 prostaglandin (PG) の生合成阻害剤である indomethacin の投与によつてラット⁴⁾¹³⁾, 家兎⁷⁾などで排卵が抑制され, また排卵が近づくとつれて卵胞液中の PG が増加する²⁾¹⁰⁾という成績から, 排卵特に卵胞の破裂に PG が関係していることが明らかになり

つつある。本研究では PG と排卵現象の関係を知るため, 排卵にともなう卵巣での PG の産生とその調節機構をラット, 豚, ヒトの卵巣を用い, それらの卵胞の器官培養, incubation 実験によつて検討したので報告する。

実験方法

I. 測定法

A. PGE, PGF の測定は特異的な抗体を用いた既報⁹⁾の radioimmunoassay (RIA) によつた。PGE₁ 抗体は PGE₂ に対して, PGF_{2α} 抗体は PGF_{1α} に対して交叉反応を示すので測定結果は PGE,

PGFとして表現した。感度はPGE: 10pg, PGF: 100pgであった。

B. 6ketoPGF_{1α} の測定

6ketoPGF_{1α} の抗体: 小野薬品から提供された 6ketoPGF_{1α} bovine serum albumine conjugate に Freund の complete adjuvant を加え emulsify し, 家兎に皮下注射し抗体を作製した。cross reaction は PGE₁: 24.2%, PGE₂: 3.0%, 13, 14 dihydro 6ketoPGF_{1α}: 2.3% PGF_{2α}: 0.6% で, PGA₂, PGB₂ は0.04%以下であった。

サンプルの分離ならびに精製: 培養液200μl を 0.1N HCl で pH3.0に acidify し, 2ml ethylacetate で2回抽出した。1ml 蒸留水で2回洗い中和した後, silica gel の thin layer chromatography (TLC) によつて分離精製した。solvent system は ethylacetate: acetic acid: isooctane/water (110: 20: 30/100) の organic layer である。Rf 値は PGF_{2α}: 0.49, PGE₁, E₂: 0.60, 6ketoPGF_{1α}: 0.29 であつた。それ故 6ketoPGF_{1α} の抗体は他の PGs と交叉反応を示したが TLC によつて分離できたので交叉反応は問題とならない。Silica gel より 6ketoPGF_{1α} を ethylacetate で抽出, 蒸発乾固した。

RIA: 残渣を一定量の assay buffer (0.05M Tris buffer pH7.5に0.1% gelatin を加えたもの) に溶かしそのうちの0.1ml および5, 8, 9, 11, 12, 14, 15, ³H-6keto PGF_{1α} (100Ci/mmol), 0.1ml 6keto PGF_{1α} 抗体 (1:1,200) を加え 4°C, 24時間 incubate した。Incubation 終了後0.1ml dextran coated charcoal (Dextran T70 0.5g, Norit A 5g を100ml assay buffer に加えたもの) で bound と free を分離し, 上清をカウントした。測定感度は 50pg, 添加した回収用の ³H-6keto PGF_{1α} の回収率は62±8%で, accuracy, precision も満足すべきものであつた。

C. progesterone の測定は帝国臓器より提供された抗体を用い, PGと同様に dextran coated charcoal bound と free を分離し, RIA を行つた。

II. 動物実験法

A. Wistar 系幼若雌ラット (25日齢) (約50g)

に PMS 10iu/0.2ml, 48時間後に hCG 30iu/0.2 ml を皮下注射し過排卵 (super ovulation)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%に起こつた。PMS 投与のみでも排卵は起こるが, PMS 投与64時間以後でも25%の排卵率にすぎない。それ故 PMS 投与のみでも LH surge が起こり排卵はするが, 少なくとも PMS 投与60時間まで (hCG 投与後12時間に相当する) は, 内因性 LH の影響はほとんどないと考えてよいであろう。

B. 誘発排卵の indomethacin による抑制実験

Wistar 系幼若雌ラット (3匹ずつ) をAと同様に処置し, hCG 投与と同時に腹腔内に indomethacin 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 8.0mg を投与した。その後24時間で卵管内の卵の数を数えた。

C. Indomethacin による排卵抑制と PGs 拮抗実験

C-1 Wistar 系幼若雌ラット (3匹ずつ) をAと同様に処置し, hCG 投与と同時に腹腔内に0.5mg indomethacin を投与した。その後3時間で PGE₂ と PGF_{2α} をそれぞれ0.4mg/rat, 0.8mg/rat ずつ単独投与し, hCG 投与24時間で排卵数を数えた。

C-2 Wistar 系幼若雌ラット (3匹ずつ) をAと同様に処置し, 同時に indomethacin 0.05, 0.5, 5.0mg を腹腔内に投与した。その後3時間で PGE₂ (0.4mg)+PGF_{2α} (0.4mg) を同時に皮下注射し, hCG 投与後24時間で排卵数を数えた。

D. 卵巣, 卵胞内 PG 量と hCG による刺激の検討

D-1 Wistar 系幼若雌ラット (実験各群4匹ずつ) に PMS 10iu のみを投与し, その後0, 12, 24, 30, 42, 48, 52, 56, 60, 64, 68時間後に卵巣を剔出した。また他の一群では PMS 10iu, 48時間後に hCG 30iu を皮下投与し, その後4, 8, 12, 16, 20時間後に卵巣を剔出した。これら両群の卵巣含有 PGE, PGF を測定した。

D-2 幼若雌豚 (large Yorkshire 種, 7カ月齢, 体重70~90kg) に PMS 12iu/kg, 72時間後に hCG 6iu/kg を筋注し, hCG 投与後0, 1, 4, 8, 18,

32, 36時間後卵胞液を採取し, その中の PGE, F, 6ketoPGF_{1α} の濃度を測定した. 但し豚1頭につき卵胞3コからえた卵胞液中の PG 値を1頭の値とし, 各2頭の平均をもつて卵胞液中の PG 値とした.

Ⅲ. 器官培養および incubation 実験

A. ラット卵胞の器官培養

28日齢の Wistar 系幼若雌ラットに PMS 10iu/0.2ml を皮下注射し, 48時間後に卵巣を剔出, 実顕微鏡下で無菌的に卵胞を取り出した. また PMS 投与後48時間で hCG 40iu/0.2ml を腹腔内に投与し, 1時間後に卵胞を採取した. このようにして得た卵胞を Lindner et al.¹¹⁾の方法により Falcon organ culture dish を用い1ml の培養液中で, 1 dish に 5~10個の卵胞をのせ 95% air+5% CO₂, 37°C の条件下で一定時間培養した. 培養液組成は,

DDW	90ml
Medium 199	10
FCS (GIBCO)	25
7% ジューソニン	0.75
Kanamycin	0.05 (1g/5ml)/126ml

である. 培養開始時に hCG その他の薬剤を培養液に添加した. incubation 終了後各 medium を 3,000r.p.m., 10分間遠心し, 上清を凍結保存し, 測定に供した.

B. 豚卵胞の incubation 実験

2頭の幼若雌豚 (large Yorkshire, 7カ月齢, 体重70~90kg) に PMS 12iu/kg を筋注し, それぞれ24時間および72時間後に屠殺した. 直ちに卵巣を採取し滅菌シャーレに入れ, 4°C に保存し実験室まで約2時間で移送した. 卵巣から卵胞を剔出し, 滅菌試験管に入れ 2ml の medium を添加し 0, 6, 12, 24時間 37°C で incubate した.

Incubation に用いた medium は

Medium 199	20ml
HEPES (Sigma)	0.4766g
7% ジューソニン	0.1ml/aqua 200ml

1N NaOH で pH を 7.3 に調整し, millipore filter で滅菌して用いた. Incubation は medium に hCG

10iu/ml 加えたものと加えないもので行つた. 各条件ごとに3個の卵胞を incubate し, 測定値はその平均で示した.

C. ヒト卵胞の incubation 実験

東京大産婦人科に子宮筋腫手術のため入院した4人の患者から卵胞を採取した. 手術時卵巣剔出後直ちに 4°C の medium に卵巣を入れ, 無菌的に卵胞を取り出した. 用いた medium は豚卵胞の incubation に用いたものと同じものを用いた. Incubation は滅菌試験管に 2ml の medium を入れ 37°C で一定時間行つた.

実験成績

I. Indomethacin と排卵

A. Indomethacin による排卵抑制効果

表1に示すように, 動物実験Bの結果 indomethacin 8mg/rat 投与群では, hCG 投与24時間で全例のラットに排卵は認められなかつた. 5mg/rat 以下の投与群でも大部分のラットに排卵は認められたものの, 対照群の排卵数 24.9 ± 0.3 に比べ, すべての群で有意 ($p < 0.01$) に排卵数が少なかつた.

表1 Indomethacin による排卵抑制

Treatment	No.	No. rats ovulated	ova (Mean $\pm$ SD)
Control	9	9	24.9 ± 9.3
Indomethacin			
0.05 mg/rat	3	3	16.7 ± 4.5
0.5 mg/rat	3	3	3.0 ± 1.0
1 mg/rat	3	2	3.0 ± 3.0
5 mg/rat	4	3	1.5 ± 1.7
8 mg/rat	3	0	0

B. PGs の排卵回復作用

表2に示すように, 動物実験C-1の結果, indomethacin 0.5mg のみの投与群では対照群の排卵数 31.3 ± 2.5 に比し, 1.3 ± 1.5 と著明に減少していた. 卵巣重量は対照群も indomethacin 投与群も差は見られない. Indomethacin 投与後 PGs を E₂, F_{2α} それぞれ単独に投与した群では排卵数が多少増加しているように見えるが, バラツキが大きく必ずしも PGs によつて indomethacin の排卵抑制が回復したとはいえなかつた.

表2 Indomethacin による幼若ラット排卵抑制の PGs による回復効果

Treatment	No.	No. rats ovulated	ova (Mean±SD)	weight ovary (mg)
Control	3	3	31.3±2.5	41.2±6.4
Indomethacin 0.5 mg/rat	3	2	1.3±1.5	41.2±10.6
Indomethacin 0.5 mg/rat + PGE ₂ 0.4 mg/rat	3	2	5.3±6.8	
+ PGE ₂ 0.8 mg/rat	3	3	8.3±3.1	
+ PGE _{2α} 0.4 mg/rat	3	1	7.7±13.3	
+ PGF _{2α} 0.8 mg/rat	3	3	5.0±3.6	

次に C-2 のように indomethacin の量を0.05, 0.5, 5.0mg と変え PGE₂, F_{2α} をそれぞれ0.4mg ずつ同時に投与すると, 表3に示されるように indomethacin 0.5, 5.0mg 投与群では C-1と同様に PGs による排卵数の増加は見られなかつた。しかし indomethacin 0.05mg 投与群についてみれば, PGE₂ (0.4mg)+PGF_{2α} (0.4mg) を投与することで有意に (p<0.025) 排卵数が増加し, PG による回復効果が認められた。

表3 Indomethacin による幼若ラット排卵抑制の PGs による回復効果

Treatment	No.	No. rats ovulated	ova (Mean±SD)
Control	4	4	29.2±9.2 ⁺⁺
Indomethacin 0.05 mg/rat	3	3	16.7±4.5 ⁺⁺
+PGs (PGE ₂ 0.4 mg/rat) (PGF _{2α} 0.4 mg/rat)	3	3	37.0±18.7 ^{**}
Indomethacin 0.5 mg/rat	3	3	3.0±1.0
+PGs	3	3	5.7±4.0
Indomethacin 5 mg/rat	4	3	1.5±1.7
+PGs	3	3	1.3±2.3

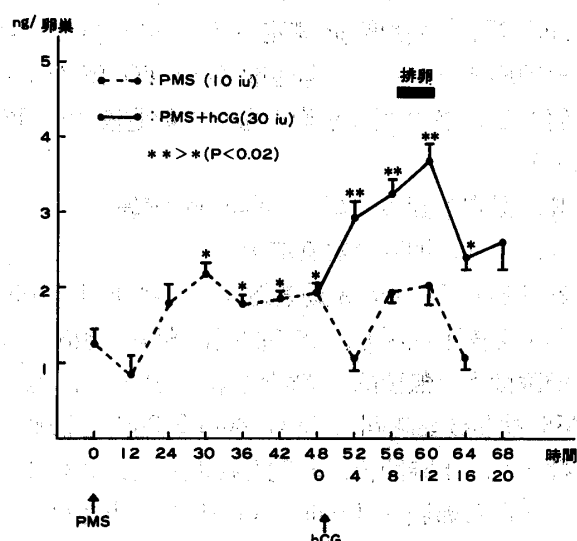
^{**}>^{*} (P<0.025) ⁺⁺>⁺ (P<0.05)

II. 卵胞による PG の生合成

A. in vivo 実験

ラット: 動物実験 D-1でえられた卵巣内の PGE の変化を図1に示してある。PMS (10iu) のみの投与では, PGE 値は投与後64時間まで約2ng/ovary のほぼ一定した値を維持しているのが認め

図1 幼若ラット過排卵時卵巣内 PGE 含量



られた。しかし PMS 投与後 hCG (30iu) を投与すると, 投与4時間後には 2.94 ± 0.58 ng/ovary, 8時間後には 3.25 ± 1.06 , 12時間後には 3.69 ± 1.07 のように hCG 投与前の値に比べて有意に (p<0.02) しかも急激に, 排卵の時期に一致した増加が見られた。PGF の卵巣含有量の変化は, PMS 投与後 2.58 ± 0.3 ng/ov. (12時間後), 1.93 ± 0.25 (24時間後) であつたが, hCG を投与すると 8.76 ± 2.98 (hCG 投与後12時間), 5.35 ± 0.92 (16時間後) のように PGE と同様に hCG 投与で有意に (p<0.05) PGF の含有量が増加した (図2)。

豚: 動物実験 D-2でえられた豚卵胞液中の PGE,

図2 幼若ラット過排卵時の卵巣内 PGF 含量

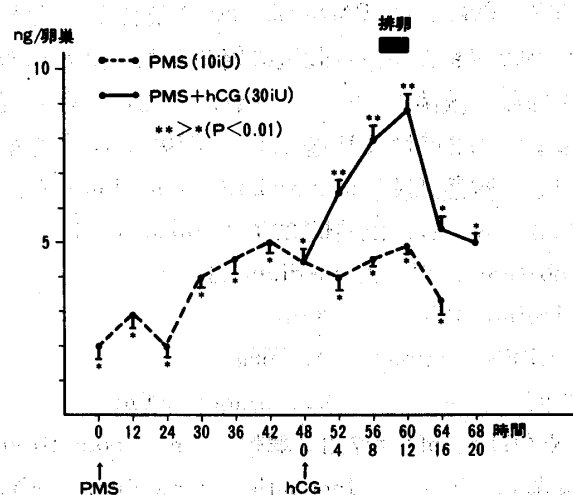
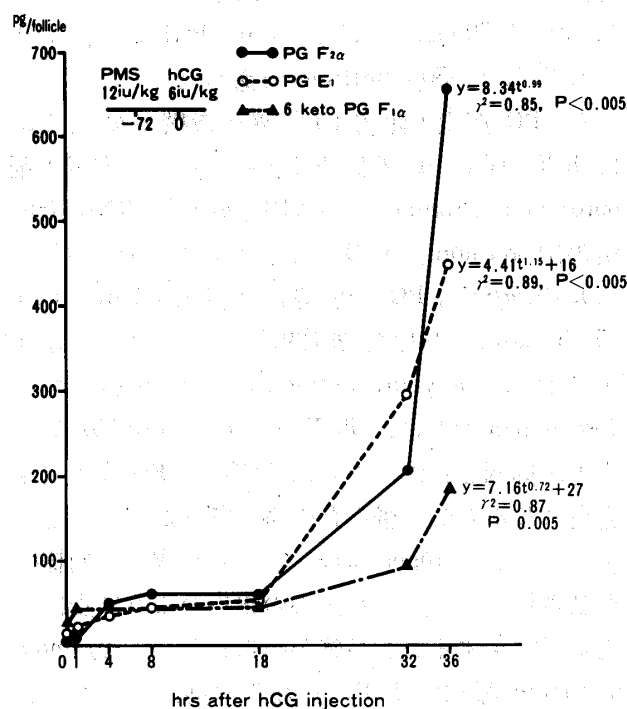


図3 豚卵胞液中 PG 濃度



F, 6ketoPGF_{1α} の濃度 (pg/follicle) の増加を図3に示す。(幼若雌豚の PMS-hCG 投与による過排卵は hCG 投与後32時間で16%, 42時間で85%の卵胞に認められた。) PGE 値は PMS 投与72時間後 (hCG 投与0時間) 16 (pg/follicle 以下同じ) hCG 投与1時間後23, 4時間後36, 8時間後44, 18時間後56, 32時間後296, 36時間後450と排卵に近づくにつれ急激に増加し, その増加曲線は $y = 4.41t^{1.15} + 16$ ($r^2 = 0.89, p < 0.005$) (y : pg/follicle), (t : hCG 投与後時間) に一致する相関曲線がえられた。PGF_{2α} 値は PMS 投与72時間後 (hCG 投与0時間) < 8 (pg/follicle 以下同じ), hCG 投与1時間後8, 4時間後50, 8時間後60, 18時間後60, 32時間後207, 36時間後658と排卵に近づくにつれ増加し, その増加曲線は $y = 8.34t^{0.99}$ ($r^2 = 0.85, p < 0.005$) に一致する相関曲線がえられた。6ketoPGF_{1α} 値は PMS 投与72時間後 (hCG 投与0時間) 27.2 (pg/follicle 以下同じ), hCG 投与後1時間46.5, 8時間後45, 18時間後47, 32時間後96, 36時間後187.5と排卵近くに増加し, その増加曲線は $y = 7.16t^{0.72} + 27$ ($r^2 = 0.87, p < 0.005$) に一致する相関曲線がえら

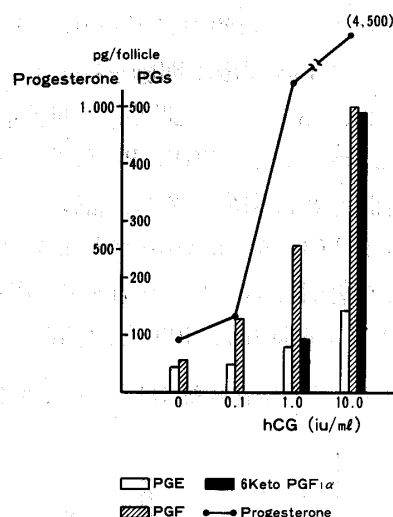
れた。

B. in vitro 実験

ラット :

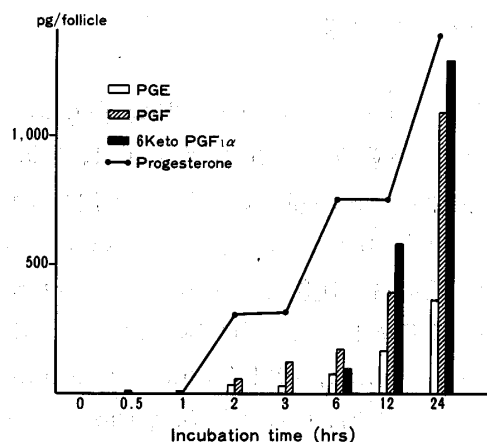
a. hCG dose dependence : PMS 投与48時間後の卵胞で, 培養液中に hCG を0, 0.1, 1.0, 10.0 iu/ml 添加し, 6時間培養した。図4に示すように PGE, PGF, 6keto PGF_{1α}, progesterone の産生が hCG 添加量に比例して増加した。PGE (pg/follicle 以下同じ) は hCG 添加によつて46(0iu/ml), 50(0.1iu/ml), 79(1.0iu/ml), 143(10iu/ml), PGFはそれぞれ57, 131, 257, 500pg/follicle, 6keto PGF_{1α} は0, 0, 94, 488pg/follicle であつた。progesterone もそれぞれ185, 262, 1,085, 4,500pg/follicle と著明に増加した。

図4 ラット卵胞器官培養 (hCG 添加6時間培養)



b. time course (in vitro hCG 添加) : PMS 投与48時間後の卵胞をhCG 10iu/ml 含む培養液中で0, 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24時間培養した。結果は図5に示すように PGs, progesterone とともに時間の経過と共に産生が増加した。PGE (pg/follicle) は1.0 (0時間), 9.0 (0.5時間), 7.0 (1時間), 36 (2時間), 30 (3時間), 80 (6時間), 170 (12時間), 370 (24時間) と増加した。PGF は2時間後から認められ60 (2時間), 125 (3時間), 175 (6時間), 400 (12時間), 1,100 (24時間) pg/follicle であつた。6ketoPGF_{1α} は6時間後より認められ, 99 (6時間), 590 (12時間), 1,300

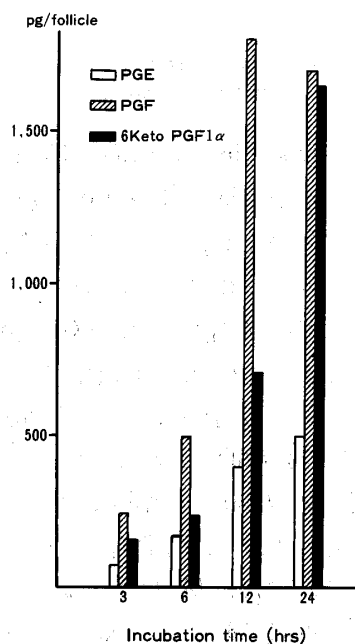
図5 ラット卵胞器官培養 (hCG 10iu/ml 添加)



(24時間) pg/follicle であった。Progesterone も2時間後から認められ、24時間で1,400pg/follicleと増加した。

c. time course (in vivo hCG 投与): PMS 投与48時間後にラット腹腔内に40iu/0.2ml の hCG を投与し、その1時間後に卵胞を採取した。この卵胞を3時間、6時間、12時間、24時間培養した。図6に示すように PGE, PGF, 6keto PGF_{1α} の産生が時間と共に増加するのが認められ、しかもこの産生は hCG を in vitro で培養液中に添加したものより著明であった。すなわち PGE は75 (3時間), 170 (6時間), 400 (12時間), 500 (24

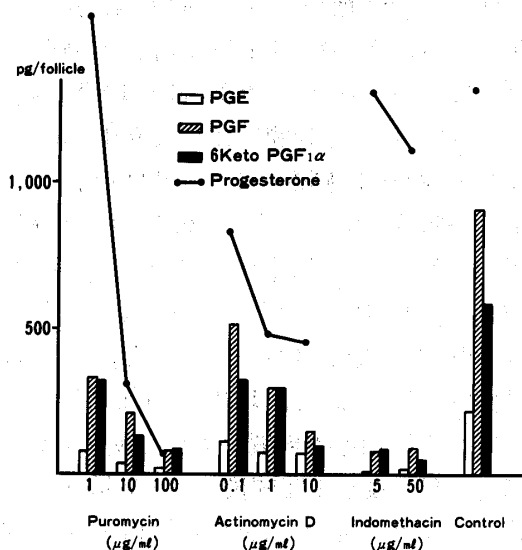
図6 ラット卵胞器官培養 (hCG in vivo 投与)



時間) pg/follicle で、PGF はそれぞれ245, 500, 1,800, 1,700pg/follicle, 6keto PGF_{1α} は、160, 242, 715, 1,650pg/follicle であった。

d. PG 産生の阻害: PG 産生機構を知るために hCG 10iu/ml 添加と同時に蛋白合成阻害剤 puromycin (Sigma) (1,10,100 μg/ml), RNA 合成阻害剤 actinomycin D (日本メルク万有) (0.1, 1.0, 10 μg/ml), PG 合成酵素阻害剤 indomethacin (5, 50 μg/ml) を加え12時間培養した。図7に示すように puromycin, actinomycin D 添加群では dose dependent に、PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α} の産生が抑制された。これは hCG の PG 産生効果発現になんらかの蛋白合成系の関与があることを示している。progesterone の産生も PG と同様に抑制されており、これまでの報告のように蛋白合成系が関与することが確かめられた。一方 indomethacin 添加では PG の産生は抑制されたが、progesterone 産生は抑制されなかつた。

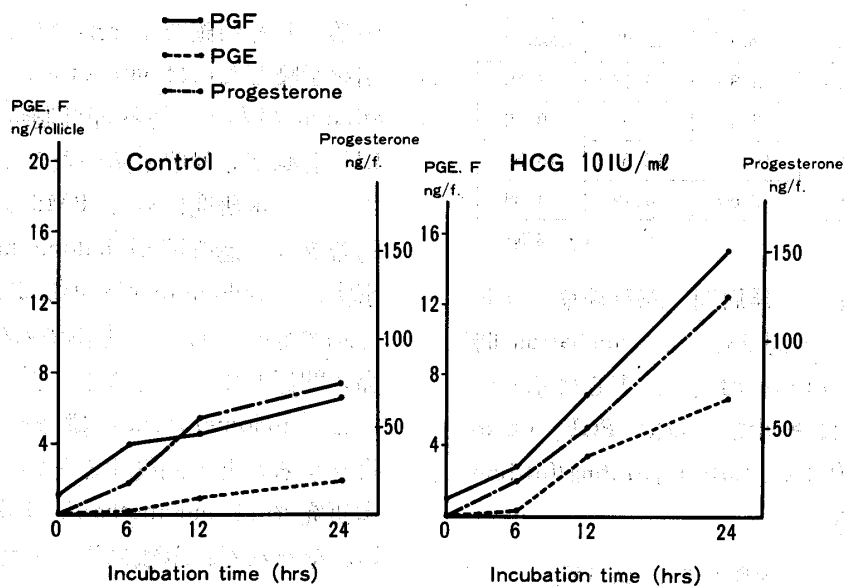
図7 ラット卵胞器官培養 (PG 合成阻害)



豚:

a. PMS 投与24時間後の卵胞: PMS 投与24時間後に得た卵胞を hCG 10iu/ml 含む medium と含まない medium で incubation した。結果を図8に示した。medium に hCG を含むものも含まないものも PGE, PGF, progesterone 共に時間経過と共に増加するが、その産生は medium に

図8 豚卵胞 incubation (PMS 投与24h)



hCG を加えた方が大きい。hCG 無添加では PGE (ng/follicle) は0.032 (0時間), 0.18 (6時間), 0.97 (12時間), 1.91 (24時間), PGF (ng/follicle) はそれぞれ1.15, 4.0, 4.6, 6.7, progesterone (ng/follicle) は0.16, 18.4, 55.2, 75.0である。これに対し medium に hCG を加えたものでは, PGE 0.02, 0.38, 3.39, 6.69ng/follicle, PGF 1.05, 2.80, 6.90, 15.15ng/follicle, progesterone 3.0, 20.1, 52.0, 124.2ng/follicle であり, hCG のPG 産生促進が認められる。

b. PMS 投与72時間後の卵胞: PMS 投与72時間後の卵胞では hCG の PG 産生促進効果がますます明らかとなった。図9に示したように, medium に hCG を加えないと, PGE (ng/follicle) は1.0 (0時間), 1.22 (6時間), 2.13 (12時間), 4.0 (24時間) であり, PGF (ng/follicle) は1.25, 3.1, 4.7, 7.13, progesterone (ng/follicle) は0.24, 1.17, 19.0, 31.7であつた。これに対し medium に hCG を加えたものでは PGE (ng/follicle) 0.08, 1.58, 6.85, 10.8, PGF (ng/follicle) 1.32, 3.65, 15.3, 23.6, progesterone (ng/follicle) 0.54, 3.8, 28.4, 42.6であつた。

ヒト:

a. 症例1: 45歳, 月経周期 (30日周期) の11日目に卵巣を剔除した。結果は表4に示した。

図9 豚卵胞 incubation (PMS 投与72h)

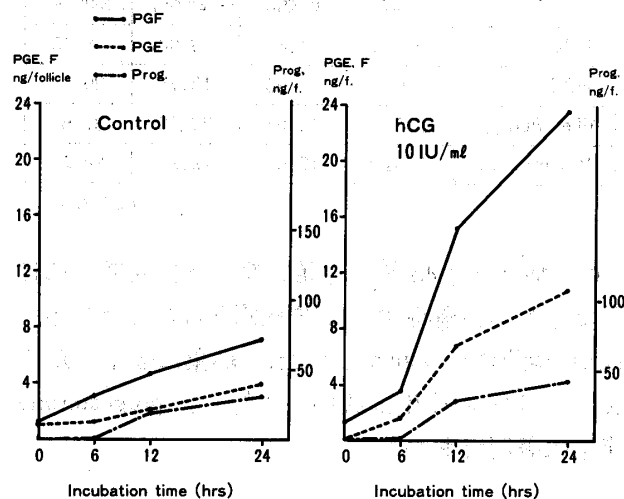


表4 症例1 月経周期第11日 (30~45日型)

	0時間	6時間	12時間	24時間
PGE ₁	0.75	0.75	1.24	2.50
PGF _{2α}	2.10	2.55	3.40	5.48
6ketoPGF _{1α}	n.d.	1.782	2.25	3.82
Progesterone	2.76	6.9	40.7	73.8

(ng/卵胞)

PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α} がヒト卵巣でも産生されることがわかる。

b. 症例2: 44歳, 月経周期 (28日周期) 14日目, 排卵直前と思われる。結果は表5に示した。PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α} 共に大量に産生される。

表5 症例2 月経周期第14日(20~28日型)

	0時間	6時間	12時間	24時間
PGE ₁	0.75	3.30	3.75	4.10
PGF _{2α}	1.425	6.45	7.62	9.65
6ketoPGF _{1α}	n.d.	10.45	12.5	16.5
Progesterone	3.48	3.60	4.12	4.38

(ng/卵胞)

c. 症例3: 46歳, 月経周期(28日周期) 15日目であり排卵直前と思われる. incubation 時 medium に hCG 10iu/ml 加えた. 表6に示したように PG の産生は著明で, 特に PGF, 6keto PGF_{1α} は24時間で20.15ng/follicle, 37.6ng/follicle と大量に産生される.

表6 症例3 月経周期第15日(28日型)
(10iu/ml hCG 添加)

	0時間	6時間	12時間	24時間
PGE ₁	0.525	1.80	3.00	5.15
PGF _{2α}	1.65	7.95	13.75	20.15
6ketoPGF _{1α}	2.25	15.65	22.55	37.6
Progesterone	2.31	12.0	19.9	28.5

(ng/卵胞)

d. 症例4: 45歳, 月経周期(28日周期) 10日目であるが手術時すでに排卵が認められたため, 残った卵胞を incubate した. 結果は表7に示すように PG の産生は低いのに対し, progesterone 産生は著明であつた.

表7 症例4 月経周期第10日(28日型)

	0時間	6時間	12時間	24時間
PGE ₁	0.45	0.60	0.76	2.45
PGF _{2α}	n.d.	1.20	1.60	2.36
6ketoPGF _{1α}	n.d.	n.d.	1.705	2.64
Progesterone	5.55	61.5	89.5	152.5

(ng/卵胞)

考 案

PG の生合成阻害剤である indomethacin が dose dependent に幼若ラットの superovulation を抑制することを明らかにした. これまで報告されているマウス¹⁵⁾, ラット⁴⁾¹³⁾, 家兎の排卵抑制は主として LH surge による自然排卵の抑制をみたもの

で, indomethacin の作用部位が中枢か卵巣レベルか必ずしも明確ではなかつた. 卵巣レベルでの抑制を示唆したのは Sato et al.¹⁶⁾ の実験で, 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かつたことにもとづいている. 本研究に於て PMS および hCG による幼若ラット過排卵が indomethacin で抑制された事実は, indomethacin の卵巣に対する直接作用を示すものであり, 卵巣で産生される PGs が排卵に関係していると考えてよい結果と思われる.

この indomethacin の排卵抑制は PGE, PGF を投与することで回復するという報告¹⁶⁾があるが, 本研究では indomethacin 0.5mg 投与後 PGE₂, F_{2α} をそれぞれ単独に投与しても排卵は回復しなかつた. Indomethacin を0.05mg/rat に減らすと排卵数は対照の半分に有意に減少し, 完全には抑制されなかつたものの, PGE₂ (0.4mg) と PGF_{2α} (0.4mg) を同時に投与するとほとんど完全に排卵数は回復した. しかし indomethacin 0.5mg, 5.0 mg/rat ではほとんど回復しないことから PGE, F を一緒に投与したための効果というよりは, indomethacin の量が少なかつたため PG の回復効果が明らかになつたと解釈すべきであろう.

本研究から PMS, hCG 処置した幼若雌ラット卵巣で排卵時 PGE, F の産生増加が認められた. また幼若雌豚を PMS, hCG で同様に処置した場合も卵胞液中に PGE, F, 6ketoPGF_{1α} の排卵に一致した増加が起こることが示された. ラット卵巣で明らかのように, PMS のみの投与では PGs の産生増加はみられないことから, この PGs の増加は hCG による変化によつて起こると考えられる. また幼若豚卵胞液中の PGs の産生は hCG 投与18時間まではほとんど変化がないが, その後急増している. これは hCG 投与から PG 産生増加までに lag time のあることを示唆している. LeMaire et al.¹⁰⁾ は家兎の卵胞内の PGE, F を測定し, hCG 投与後9時間後に PGE は15倍, PGF は60倍に増加すると報告した. Yang et al.¹⁷⁾ は hCG 投与後48時間まで測定し, PGF は排卵後ただちに減少するが, PGE は排卵後も数

時間増加し、ついで減少することを、また排卵の起こらなかつた卵胞内の PG 量は低値であることを観察している。LeMaire et al. は規則的な性周期をもつラットで各時期の卵胞内の PG を測定し、排卵直前に PGE, F ともに最高値を示し、以後急激に減少することをみた。Ainsworth et al.²⁾ は発情前の仔豚に PMS (400iu) と hCG (200iu) を同時に投与し、その後卵胞液を採取し PGF を測定し、排卵直前に急激に上昇することを報告している。

このようにラット、家兎、豚で排卵近くになると卵胞液中に PGE, F が増加することは間違いないようであるが、6ketoPGF_{1α} が排卵に伴つて増加する事実はこれまで全く報告されてはいない。PGI₂ は不安定な物質で、中性の buffer 中で 22°C、半減期 10 分で、6ketoPGF_{1α} に変換する⁸⁾。従つて 6ketoPGF_{1α} の変化を以て PGI₂ の変化と同義とみなしてよいと思われる。排卵期の PGI₂ の増加は成熟卵胞の代謝に関係して血流をさかんにすることにつながるのかもしれないが、詳細は不明である。卵胞を用いた器官培養または incubation 実験でラット、豚、ヒトの卵胞では in vitro でも PGs (PGE, PGF, 6ketoPGF_{1α}) の産生が in situ で起こり、それが hCG によつて dose dependent に促進されることを明らかにした。

ラット卵胞の器官培養で hCG により PG の産生が促進され、それに 2 時間の lag time のあることを示した。これは、Clark et al.⁶⁾ が家兎を用いてやはり hCG 投与から PG 産生増加までに約 3 時間の lag time が必要であると述べているのと同じ傾向といえよう。Yang et al.¹⁷⁾ も家兎を用い、やはり hCG に PG 産生促進効果のあることを示している。

豚卵胞の incubation では、PMS 投与 24 時間後のものより、72 時間後のものの方が hCG による PGs 産生効果が著明である。これは PMS による priming time の長い方が hCG の作用を受け易いことを示しており、PG 産生もまた steroid と同様 LH (hCG) の効果発現には FSH の priming が必要なことを示唆するものである。

Indomethacin は PG 合成阻害剤として強力かつ特異的であり、本研究もそれを確認した。また indomethacin によつて progesterone 産生がほとんど抑制されなかつたことは O'Grady et al.¹²⁾ の報告のように in vivo での indomethacin による排卵抑制で progesterone の産生が抑えられないことと一致する。また puromycin, actinomycin D は in vivo で投与しても排卵を抑制し³⁾¹⁴⁾、progesterone 産生も抑えるといわれ、in vitro でも hCG による黄体からの progesterone 産生を著明に阻害するというが、そのことは本研究の器官培養実験でも確認された。

本研究の器官培養で PGE, F の産生も progesterone と同様に両物質によつて dose dependent に抑えられている。hCG 投与から PG 産生まで lag time のあることを考え合わせると、hCG は何らかの形で蛋白合成を促進して PG を産生させるらしいことをがわかる。それが progesterone 産生のように cyclic AMP を介するかどうかは不明である。しかし子宮での PG 産生が estrogen 添加により増加する¹⁾ 事実もみられるので、steroid の産生阻害による PG 生成障害の可能性も考えてみる必要がある。ただ aminoglutethimide をラット卵胞の器官培養に添加し steroid 産生を抑えても、hCG による PG 産生増加は変化しない⁹⁾ という報告もあるので、steroid を介する可能性は否定してよいと思う。TSH が甲状腺で PG を産生する際に phospholipase A₂ の活性化を経るように、卵胞での PG 産生増加も phospholipase A₂ の活性化の結果かもしれないが、甲状腺での TSH による PG 産生増加は非常に速いので、卵胞におけるそれとは機構が異なると考えるべきであろう。恐らく卵巣では PG 合成酵素などの酵素系の活性化が起こる可能性のほうが強いと思われる。

稿を終るにあたり、御懇切なる御指導と御校閲を賜った恩師坂元正一教授に深甚なる感謝の意を表するとともに御指導、御助言をいただいた佐藤和雄助教授に心から感謝いたします。

文 献

1. 森 憲正 : Prostaglandins の生合成と代謝. 日産婦誌, 26 : 709, 1974.
2. Ainsworth, L., Baker, R.D. and Armstrong, D.T.: Preovulatory changes in follicular fluid prostaglandin F levels in swine. Prostaglandins, 9: 915, 1975.
3. Anderson, J.W. and Yatvin, M.B.: Metabolic and ultrastructural changes in the ovarian follicles in response to pituitary stimulation. J. Cell Biol., 46: 491, 1970.
4. Armstrong, D.T. and Grinwich, D.L.: Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Prostaglandins, 1: 21, 1972.
5. Bauminger, S., Lieberman, M.E. and Lindner, H.R.: Steroid-independent effect of gonadotropins on prostaglandin synthesis in rat graafian follicles in vitro. Prostaglandins, 9: 753, 1975.
6. Clark, M.P., Marsh, J.M. and LeMaire, W.J.: The role of protein synthesis in the stimulation by LH of prostaglandin accumulation in rat preovulatory follicles in vitro. Prostaglandins, 12: 209, 1976.
7. Grinwich, D.L., Kennedy, T.G. and Armstrong, D.T.: Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of luteinizing hormone in rabbits with indomethacin. Prostaglandins, 1: 89, 1972.
8. Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinder, J.H., Gorman, R.R., McGuire, J.C. and Sun, F.F.: The chemical structure of prostaglandin X (prostacyclin). Prostaglandins, 12: 915, 1976.
9. Kinoshita, K., Satoh, K. and Sakamoto, S.: Prostaglandin F₂ and E₁ in plasma and amniotic fluid during human pregnancy and labour. Endocrinol. Jap., 24: 155, 1977.
10. LeMaire, W.J., Yang, N.S.T., Behrman, H.R. and Marsh, J.M.: Preovulatory changes in the concentration of prostaglandins in rabbit graafian follicles. Prostaglandins, 3: 367, 1973.
11. Lindner, H.R., Tsafiriri, A., Lieberman, M.E., Zor, U., Koch, Y., Bauminger, S. and Barnea, A.: Gonadotropin action on cultured graafian follicles: Induction of maturation division of the mammalian oocyte and differentiation of the luteal cell. Recent Progress in Hormone Research., Academic Press., New York, 1974.
12. 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. Prostaglandins, 1: 97, 1972.
13. Orczyk, G.P. and Behrman, H.R.: Ovulation blockade by aspirin or indomethacin-in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotropin secretion. Prostaglandins, 1: 3, 1972.
14. Pool, W.R. and Lipner, H.: Inhibition of ovulation by antibiotics. Endocrinol., 79: 858, 1966.
15. 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 swine. Fert. Steril., 25: 636, 1974.
16. Sato, T., Taya, K., Jyujō, T. and Igarashi, M.: Ovulation block by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis. J. Reprod. Fert., 39: 33, 1974.
17. 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. 4781 昭55・10・3 受付)