

黄体退縮周辺期における偽妊娠ウサギ子宮・卵巣による Prostaglandins (PGs) の産生と $\text{PGF}_{2\alpha}$ の 作用機構に関する研究

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

河 合 康 夫

In vitro Production of Prostaglandins by the Uterine and Ovarian Tissues of Pseudopregnant Rabbits in Luteolysis and Mechanism of Luteolysis Induced by $\text{PGF}_{2\alpha}$

Yasuo KAWAI

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo
(Director: Prof. Shoichi Sakamoto)

概要 内因性 prostaglandin (PG) $\text{F}_{2\alpha}$ が黄体機能調節に関与していることが既報されているが、他の PGs の関与及びその作用機構については明らかではない。

1. 黄体退縮周辺期の偽妊娠ウサギ子宮及び卵巣による PGs の産生とその部位について検討した。

a. 子宮組織による PGs の産生

PGF の産生は黄体末期に子宮内膜で著明に高い ($p < 0.001$)。6 keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ の産生は黄体中期・末期に子宮筋で高い ($p < 0.01$)。PGF の産生は有意な変化はみられなかった。

b. 卵巣組織による PGs の産生

PGF の産生は卵巣では低く黄体退縮期でも低値のままであり、子宮内膜、子宮筋の PGF 産生量との間に有意の差 ($p < 0.001$) が認められた。6 keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ の産生は、偽妊娠17日目まで黄体に比べ、黄体以外の卵巣組織 (間質) での産生が有意に高かった ($p < 0.02$)。

2. $\text{PGF}_{2\alpha}$ の作用機構について検討した。

偽妊娠ウサギ16日目の黄体に high affinity: $K_d = 1.1 \times 10^{-8} \text{M}$, $B_{\max} : 286.3 \text{ f mol/mg protein}$ と low affinity; $K_d = 1.0 \times 10^{-7} \text{M}$, $B_{\max} : 1258.3 \text{ f mol/mg protein}$ の2つの population を有する $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor が存在することが明らかとなった。

以上の実験結果から、偽妊娠ウサギの黄体退縮機構は、黄体退縮時子宮内膜より $\text{PGF}_{2\alpha}$ が急激かつ著明に産生され、それが黄体細胞の $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor に作用して黄体退縮をおこすという一連の機構によることが明らかになった。

Synopsis Six hours' incubation with the uterine and ovarian tissues of pseudopregnant rabbits was carried out to compare their abilities to produce prostaglandins (PGs) at the various stages of pseudopregnancy. In the endometrial tissue, significant increase in PGF production was observed near luteolysis ($p < 0.001$). 6-Keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ production by the myometrium was also shown to increase on mid and late phase ($p < 0.01$). PGE production increased slightly, but no significant difference was found. The corpus luteum and the remaining ovarian tissue were shown to have the low activity of PGF production at any stages of pseudopregnancy. 6-Keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ production by the remaining ovarian tissue was significantly higher than by the corpus luteum ($p < 0.02$). The results strongly suggest that the endometrium is the main site of $\text{PGF}_{2\alpha}$ production causing luteolysis in the pseudopregnant rabbit.

In order to investigate the mechanism of luteolysis induced by $\text{PGF}_{2\alpha}$, the $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor in the corpus luteum of the pseudopregnant rabbit was characterized. $\text{PGF}_{2\alpha}$ binding to the corpus luteum was demonstrated to be specific. Scatchard analysis of $\text{PGF}_{2\alpha}$ specific binding in the 16th day corpus luteum revealed the existence of two population of receptors.

Key words: Pseudopregnant rabbit · Prostaglandin F_{2α} · 6-Keto PGF_{1α} · Prostaglandin E · Prostaglandin F_{2α} receptor

緒 言

女性において性周期が形成される基本的機構は、卵巣の周期的変化であり、特に黄体機能の存続する期間が動物種によつてそれぞれ一定であることが重要な因子とされている。黄体の機能は生殖現象の根本に直接関与しているからその機能調節因子の解明は極めて重要である。これまで黄体刺激因子と、退縮因子が考えられ近年 prostaglandin (PG) F_{2α} が黄体退縮作用をもつとして注目されながら、その作用機構には不明な部分も少なくない。黄体退縮時子宮での PGF_{2α} の産生増加について既報されているが²⁵⁾、他の PGs 産生についての報告は殆どない。

本研究では、黄体退縮周辺での偽妊娠ウサギ子宮及び卵巣による PGs の産生とその部位、及び PGF_{2α} の作用機構について解明することを目的として以下の実験を行つた。

実験材料と方法

1. 実験動物

3—4 カ月齢、体重約3kg の日本白色雌ウサギを実験に用いた。個別に cage で飼育し、水分と飼料を自由に摂取させた。

2. 試薬及び抗体

human chorionic gonadotropin (hCG) (持田製薬), estradiol-17β (日本シエーリング), TC199(大五栄養化学), Millipore filter(pore size 0.2μm, Millipore Corporation, U.S.A.). 有機溶媒、化学試薬は市販の特級のものを使用した。

標識 PGs は以下のものを使用した。

PGF_{2α}, [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H(N)]-: specific activity 150Ci/m mol, lot number 932—238 (New England Nuclear)

PGE₁, [5, 6-³H(N)]-: specific activity 89.5 Ci/m mol, lot number 932—229 (New England Nuclear)

6-keto PGF_{1α}, [5, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H(N)]-: specific activity 100.0Ci/m mol, lot number 1118—181 (New England Nuclear)

PGE₁, PGF_{2α} の抗体は、木下らが作製したもの

を用いた¹²⁾。しかし PGE₁ の抗体は PGE₂ に対して、PGF_{2α} の抗体は PGF_{1α} に対して交叉反応を示した。

6-keto PGF_{1α} の抗体は、以下のように作製した。小野薬品より提供された 1 ml saline に溶解した 6-keto PGF_{1α}-bovine serum albumin conjugate を 1 ml の Freund complete adjuvant と emulsify させ、成熟ウサギに抗原 1 mg を 2 週間毎に 8 回皮下注射し、booster 注射 2 週間後に血清を採取した。6-keto PGF_{1α} の抗血清の交叉反応は、PGE₁: 24.2%, 13, 14-dihydro 6-keto PGF_{1α}: 2.3%, PGE₂: 1.6%, PGF_{2α}: 0.3%, 13, 14-dihydro-15-keto PGF_{1α}, PGA₂, PGB₂ とは 0.04% 以下であつた¹⁾。

3. 実験方法

a. 偽妊娠ウサギ子宮及び卵巣による産生能を検討するために、子宮内膜と子宮筋、黄体とそれ以外の卵巣組織の incubation 実験を行つた。

雌ウサギ55羽にごま油0.2ml に溶解した estradiol-17β 50μg を皮下注射し、3 日後に 1 ml 生理食塩水に溶解した hCG 100i.u. を静注射し、排卵を起こさせ、偽妊娠ウサギを作成した。hCG 投与日を偽妊娠 0 日とした。偽妊娠ウサギ黄体の life span を末梢血 progesterone 値によつて調べると、17日間であつた²⁵⁾。

偽妊娠ウサギの偽妊娠5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22日目に5羽ずつ開腹し、子宮、卵巣を摘出した。摘出した子宮を medium で洗い、血液を除去した。はさみで子宮内膜と子宮筋を分離し、子宮内膜と子宮筋は1×1×1 mm の大きさに細切し、細切片をそれぞれ80mg ずつ triplicate にて、滅菌試験管に入れ、3ml の medium を添加し、37°C, 95%O₂+5%CO₂ 下で30分間 preincubation を行い、medium を取り替えた後6時間 incubation を行つた。黄体とそれ以外の卵巣組織は、1×1×1 mm に細切し、それぞれ50mg ずつ triplicate にて、2 ml の medium を添加し、子宮組織と同じように incubation を行つた。incubation に用いた medium は、

TC199 20ml
HEPES (Sigma) 0.4766g
7% NaHCO₃ 0.1ml/aqua 200ml

で1N NaOHによりpHを7.3に調製し, Millipore filterで滅菌して用いた. incubation終了後各mediumを3,000r.p.m., 10分間遠心し, 上清を-20℃に凍結保存し, PGF_{2α}, 6-keto PGF_{1α}, PGE₁の測定に供した.

b. PGF_{2α}の黄体での作用機構を知るために, 偽妊娠ウサギ黄体にPGF_{2α}のreceptorが存在するかどうかを調べた.

偽妊娠16日目のウサギ5羽を開腹し, 黄体を採取し, 4℃, 0.01M Tris-HCl buffer (0.15M NaCl, 10⁻⁴M indomethacin添加, pH 7.5)で洗浄し, 10倍量のTris-HCl buffer中で細切した. 次いでPotter-Elvehjem homogenizerでhomogenizeし, 600×g 10分間遠心し, 上清をさらに100,000×g, 60分間遠心し, 沈査を取り出し, この沈査に30倍 (ml/g corpora lutea)のTris-HCl bufferを加えPotter-Elvehjem homogenizerでresuspendしたものを, binding assayに用いた. PGF_{2α}結合部位の特性は, Scatchard分析²⁶⁾によって検討した.

4. 測定方法

a. PGE, PGFの測定: 既報のKinoshita et al.¹²⁾の方法によつた. PGE₁の抗体はPGE₂に対して, PGF_{2α}の抗体は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であつた.

b. 6-keto PGF_{1α}の測定¹⁾: 培養液400μlを10μl 0.1N HClで酸性化 (pH 3.0) した後, 2ml 酢酸エチルによる抽出を2回行い, 1ml H₂Oで2回洗い, 蒸発乾固し, TLC (silica gel, Mallinckrodt 100 Mesh)で分離精製した. TLCのsolvent systemはEtOAc: HOAc: isooctane: H₂O (110: 20: 30: 100)のorganic phaseを用いた. Rf値はPGF_{2α}: 0.49, PGE₁: 0.60, 6-keto PGF_{1α}: 0.29であつた. 0.1ml assay buffer (0.05M Tris buffer (pH 7.5)に0.1% gelatinを含む)に溶かしたsample及び標準6-keto PGF_{1α} (10pg~10ng)に, 0.1ml ³H-6-keto PGF_{1α} (7,000dpm),

我々が作製した6-keto PGF_{1α}の抗血清0.1mlを加えて4℃, 24時間incubationした. その後0.1ml dextran coated charcoal (Dextran T70 0.5gとNorit A 5gを100ml assay bufferに混和したもの)を加え, 遊離及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. 測定感度は50pg, 回収率は62±8%, accuracy, precisionも満足すべきものであつた. (CV≒7%) PGE₁との交叉反応が24.2%と大きい, TLCによつて6-keto PGF_{1α}とPGE₁は分離可能である (Rf; 6-keto PGF_{1α}: 0.29, PGE₁: 0.60)ので, 抗体のPGE₁との交叉反応が大きくても測定には全く影響がない.

c. PGF_{2α} receptoassay: 黄体の100,000×g resuspended particulate fraction 500μlを試験管 (13×95mm)に移し, [5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15-³H (N)] PGF_{2α} 0.05μCi/333 f moles/10μl EtOHを加え, さらにPGF_{2α} 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0, 10, 40ng, 4μg/10μl EtOHずつをそれぞれの試験管に加え, またPGF_{2α}結合の特異性の検討のためにPGF_{2α}の代わりにPGF_{1α}, PGE₁, PGA₁, PGB₁を添加した. 23℃, 24時間incubateし, incubation後, 試験管を氷水中におき, Millipore filterでfreeとboundを分離した.

Millipore filterによる分離方法²⁴⁾は, 以下のように行つた. incubationを行つた各々の試験管にTris-HCl bufferを1.0ml加え, これをMillipore filterで汙過し, さらに試験管を0.5ml bufferで2回洗浄し汉過した. 各々のfilterをさらに5.0mlのbufferで洗浄した. 各々のfilterを10.0ml Instagel (Packard Instrument Co. Inc.)を入れscintillation vialに移し, Aloka LSC 653 automatic three channel liquid scintillation spectrometerによりcountした.

d. 組織蛋白量は, 組織80mgを4℃ 1mlの生理食塩水中でhomogenizeし, Lowry法¹⁴⁾で測定した.

測定結果の推計学的処理は, Student's t testにより行つた.

実験結果

1. 偽妊娠ウサギ子宮及び卵巣による PGs 産生能

偽妊娠ウサギ子宮及び卵巣の偽妊娠各時期における PGs の産生とその部位を検討するために、子宮内膜と子宮筋及び黄体とその残りの組織の incubation 実験を行った。

偽妊娠19日目の子宮内膜での PGF の産生の time course を調べると図1のようになり、6 時間で PGF の産生が plateau となった。従つて30 分間 preincubation 後、6 時間 incubation を行い、PGs の産生能を比較した。

各組織による PGs の 6 時間 incubation 時の産生量を ng/mg protein/6hrs で表わし、表1, 2 に示す。各組織の蛋白含有量 (mean±S.D.) は、子宮内膜41.62±4.91mg/g wet tissue, 子宮筋52.52±2.19mg/g wet tissue であり、黄体54.02±4.35mg/g wet tissue, 黄体以外の卵巣組織56.13±6.54mg/g wet tissue であった。子宮内膜が他の組織と比べ蛋白含有量が低かった (p<0.001)。

PG 生合成酵素は蛋白質であり、各組織の PG 産生能を比較するためには、蛋白量当りの産生量を用いた方が合理的と思われるので、本研究では PG 産生量は単位蛋白量あたりについて検討した。

a. 子宮組織による PGs の産生 (表1)

図1 Time course of PGF accumulation in the medium during incubation of pseudopregnant rabbit endometrium

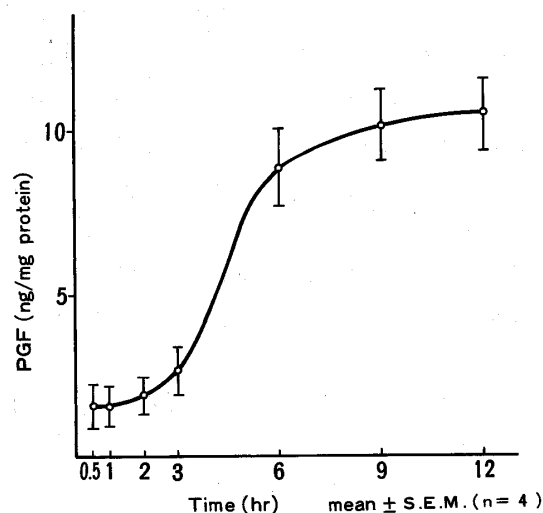


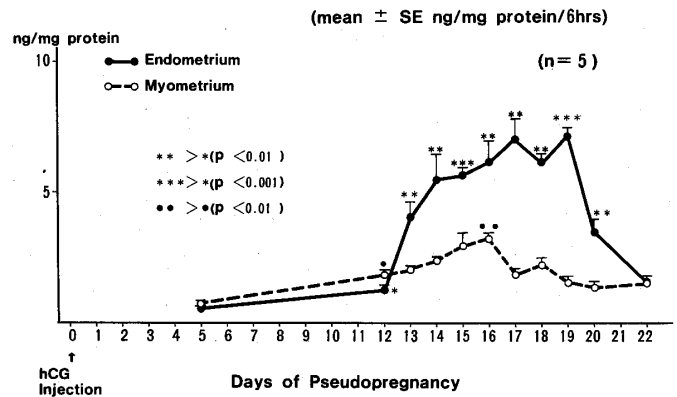
表1 In vitro PG production by the uterine tissues of pseudopregnant rabbits (mean±SE ng/mg protein/6 hrs) (n=5)

PG	Tissue	Days of pseudopregnancy										
		5	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22
PGF	Endometrium	0.54±0.05	1.28±0.17	4.08±0.56	5.42±0.95	5.67±0.24	6.12±0.84	7.01±0.73	6.15±0.34	7.19±0.29	3.50±0.44	1.68±0.17
	Myometrium	0.72±0.08	1.88±0.18	2.07±0.05	2.39±0.14	2.96±0.42	3.22±0.21	1.92±0.15	2.24±0.23	1.55±0.11	1.38±0.25	1.56±0.24
6-keto PGF _{1α}	Endometrium	1.78±0.88	2.05±0.68	3.33±0.47	7.64±0.65	5.72±0.44	8.31±0.93	5.64±0.23	6.64±1.12	4.85±0.82	5.05±1.04	0.98±0.36
	Myometrium	2.91±1.31	16.54±1.43	18.48±2.81	14.60±1.70	17.02±1.93	19.25±2.76	14.61±2.11	16.95±3.12	17.33±3.65	16.47±3.12	11.26±2.14
PGE	Endometrium	0.38±0.11	1.29±0.21	2.66±0.60	2.40±0.52	2.53±0.49	2.15±0.51	2.81±0.54	2.54±0.26	2.92±0.66	1.42±0.54	0.35±0.21
	Myometrium	0.51±0.28	1.65±0.41	2.41±0.46	3.36±0.29	2.72±0.27	2.70±0.89	2.66±0.62	3.79±0.70	3.89±0.92	3.09±0.88	1.12±0.48

表2 In vitro PG production by the ovarian tissues of pseudopregnant rabbits
(mean $\pm$ SE ng/mg protein/6 hrs) (n=5)

PG	Tissue	Days of pseudopregnancy										
		5	12	13	14	15	16	17	18	19	20	22
PGF	Corpus Luteum	0.43±0.02	0.16±0.01	0.17±0.04	0.14±0.01	0.41±0.09	0.33±0.01	0.31±0.01	0.61±0.15	0.77±0.05	0.67±0.20	1.74±0.38
	The Remaining Tissue	0.53±0.09	0.36±0.08	0.56±0.07	0.64±0.15	1.10±0.21	0.47±0.14	0.73±0.16	0.75±0.15	1.11±0.14	0.80±0.12	0.78±0.06
6-keto PGF _{1α}	Corpus Luteum	1.14±0.27	1.24±0.38	1.14±0.35	0.96±0.17	1.54±0.09	1.25±0.51	1.64±0.18	2.62±0.05	1.64±0.51	2.41±0.44	1.93±0.46
	The Remaining Tissue	4.48±0.68	4.17±0.72	6.09±0.58	6.65±0.71	5.17±0.64	5.10±0.23	5.84±0.46	4.86±0.84	5.63±1.13	4.97±0.84	2.31±0.56
PGE	Corpus Luteum	0.17±0.09	0.23±0.06	0.89±0.21	0.91±0.32	0.62±0.18	0.53±0.08	0.42±0.17	0.39±0.08	0.41±0.05	0.55±0.08	0.32±0.06
	The Remaining Tissue	0.22±0.06	0.86±0.10	1.43±0.20	1.74±0.32	1.68±0.21	1.80±0.26	2.12±0.43	1.60±0.34	0.93±0.17	1.15±0.02	0.59±0.08

図2 In vitro PGF production by the uterine tissues of pseudopregnant rabbits



PGF の産生 (mean $\pm$ S.E. ng/mg protein/6 hrs) は偽妊娠 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 日の子宮内膜 (各偽妊娠日について n=5) でそれぞれ 0.54 $\pm$ 0.05, 1.28 $\pm$ 0.17, 4.08 $\pm$ 0.56, 5.42 $\pm$ 0.95, 5.67 $\pm$ 0.24, 6.12 $\pm$ 0.84, 7.01 $\pm$ 0.73, 6.15 $\pm$ 0.34, 7.19 $\pm$ 0.29, 3.50 $\pm$ 0.44, 1.68 $\pm$ 0.17 であった。偽妊娠 12 日以前の値と比べ、13 日目には有意な増加 ($p < 0.01$) が起こり、19 日目には最高となり ($p < 0.001$)、20 日目まで増加が認められた ($p < 0.01$) (図 2)。

子宮筋 (各偽妊娠日について n=5) では、偽妊娠 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 日でそれぞれ、0.72 $\pm$ 0.08, 1.88 $\pm$ 0.18, 2.07 $\pm$ 0.05, 2.39 $\pm$ 0.14, 2.96 $\pm$ 0.42, 3.22 $\pm$ 0.21, 1.92 $\pm$ 0.15, 2.24 $\pm$ 0.23, 1.55 $\pm$ 0.11, 1.38 $\pm$ 0.25, 1.56 $\pm$ 0.24 であった。偽妊娠 5, 12 日目に比べ 16 日目にやや増加したにすぎない ($p < 0.01$)。偽妊娠 19 日目の子宮内膜と子宮筋との PGF の産生量を比較すると、子宮内膜の方が 4.6 倍産生が高い ($p < 0.001$)。

PGF の産生は黄体末期に子宮内膜で著明に高まることからわかる。

6-keto PGF_{1 α} の産生 (mean $\pm$ S.E. ng/mg protein/6hrs) は、子宮内膜 (各偽妊娠日について n=5) で偽妊娠 5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22 日でそれぞれ、1.78 $\pm$ 0.88, 2.05 $\pm$ 0.68, 3.33 $\pm$ 0.47, 7.64 $\pm$ 0.65, 5.72 $\pm$ 0.44, 8.31 $\pm$ 0.93, 5.64 $\pm$ 0.23, 6.64 $\pm$ 1.12, 4.85 $\pm$ 0.82, 5.05 $\pm$ 1.04, 0.98 $\pm$ 0.36 であった。偽妊娠 12 日以前の値と比べ、14 日より 20 日まで有意な増加 ($p < 0.01$) を示し

た。

子宮筋（各偽妊娠日についてn=5）では、偽妊娠5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22日でそれぞれ、 2.91 ± 1.31 , 16.54 ± 1.43 , 18.48 ± 2.81 , 14.60 ± 1.70 , 17.02 ± 1.93 , 19.25 ± 2.76 , 14.61 ± 2.11 , 16.95 ± 3.12 , 17.33 ± 3.65 , 16.47 ± 3.12 , 11.26 ± 2.14 であった。偽妊娠5日の値と比べ、12日より20日まで著増した($p < 0.001$)。偽妊娠16日目の6-keto PGF₁αの産生を子宮内膜と子宮筋とで比較すると、子宮筋の方が2.3倍高い($p < 0.01$)。

6-keto PGF₁αは、黄体中期・末期に子宮筋で多く産生されることが判る。

PGEの産生(mean±S.E. ng/mg protein/6 hrs)は、子宮内膜(n=5ずつ)偽妊娠5, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22日でそれぞれ 0.38 ± 0.11 , 1.29 ± 0.21 , 2.66 ± 0.60 , 2.40 ± 0.52 , 2.53 ± 0.49 , 2.15 ± 0.51 , 2.81 ± 0.54 , 2.54 ± 0.26 , 2.92 ± 0.66 , 1.42 ± 0.54 , 0.35 ± 0.21 、子宮筋で(n=5ずつ)で 0.51 ± 0.28 , 1.65 ± 0.41 , 2.41 ± 0.46 , 3.36 ± 0.29 , 2.72 ± 0.27 , 2.70 ± 0.89 , 2.66 ± 0.62 , 3.79 ± 0.70 , 3.89 ± 0.92 , 3.09 ± 0.88 , 1.12 ± 0.48 で、黄体末期にやや上昇したものの、偽妊娠12日目の値と比べ有意な変化はみられなかった。

子宮でのPGsの産生を比較すると、偽妊娠16日目の子宮内膜ではPGF及び6-keto PGF₁αの産生がPGEに比べ有意に高く($p < 0.01$, $p < 0.001$) (図3)、子宮筋では6-keto PGF₁αの産生がPGF, PGEに比べ有意に高い($p < 0.01$, $p < 0.001$)の

図3 In vitro PG production by the endometrium of pseudopregnant rabbits

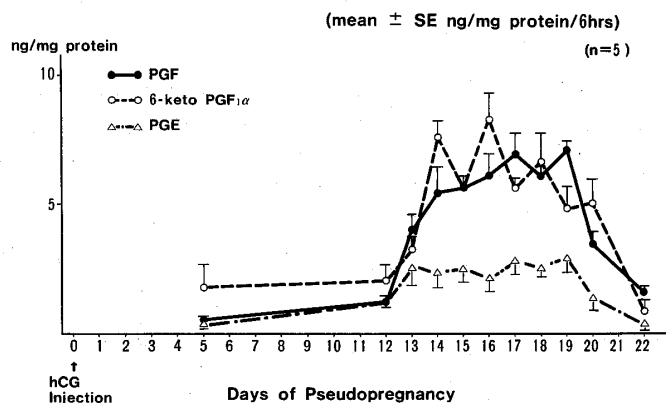


図4 In vitro PG production by the myometrium of pseudopregnant rabbits

(mean ± SE ng/mg protein/6hrs)

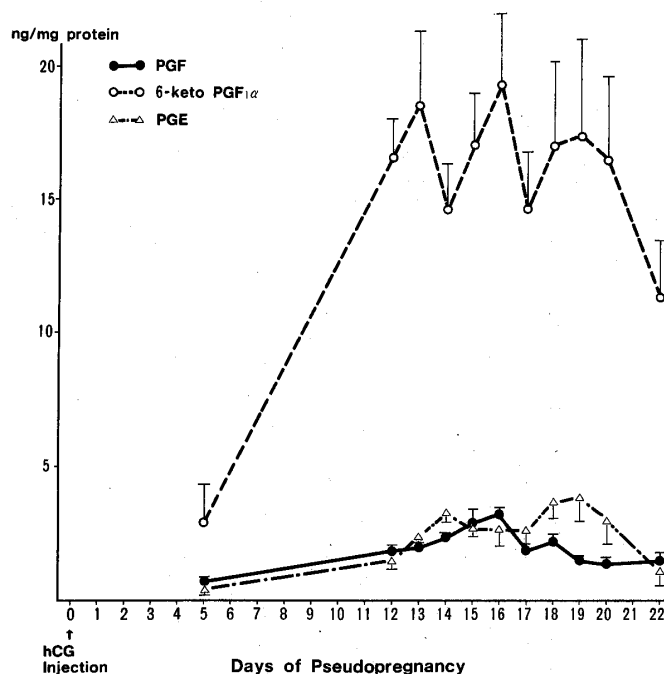
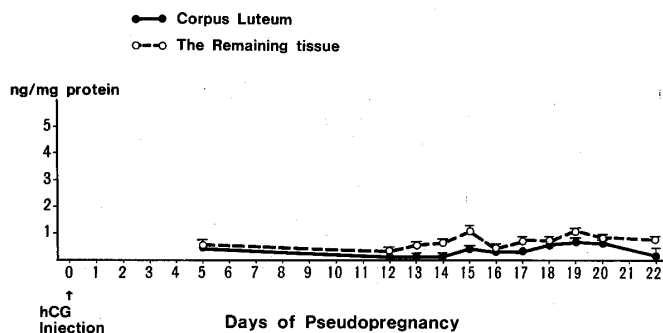


図5 In vitro PGF production by the ovarian tissues of pseudopregnant rabbits

(mean ± SE ng/mg protein/6hrs)

(n=5)



が特徴的である (図4)。

b. 卵巣組織によるPGsの産生 (表2)

偽妊娠5日目での卵巣におけるPGFの産生量は、子宮組織と同じように低い。13日目以後になると子宮とくに子宮内膜でのPGFの産生が著増するのとは異なつて、卵巣での産生は依然低値のままであり、子宮内膜と卵巣での産生量の間有意の差が認められるようになる($p < 0.001$) (図5)。

6-keto PGF₁αの産生は、偽妊娠17日目まで黄体

図6 In vitro 6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ production by the ovarian tissues of pseudopregnant rabbits
(mean $\pm$ SE ng/mg protein/6hrs)

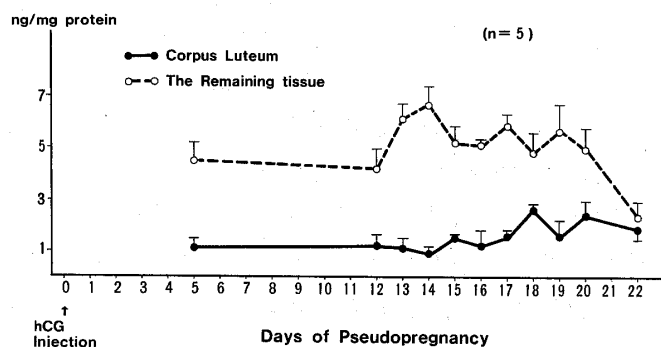
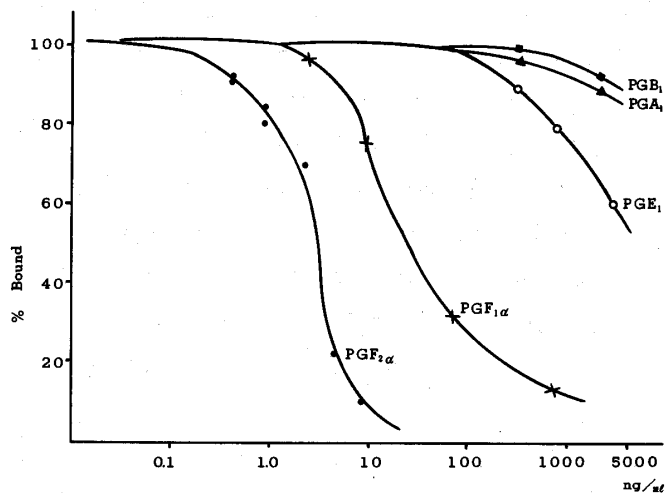


図7 Specificity of ^3H - $\text{PGF}_{2\alpha}$ binding to the corpora lutea of pseudopregnant rabbits



に比べて、黄体以外の卵巢組織（間質）での産生が有意に多く、約3—6倍であつた。しかし子宮内膜と比べると、その産生能は1/3にすぎない(図6)。

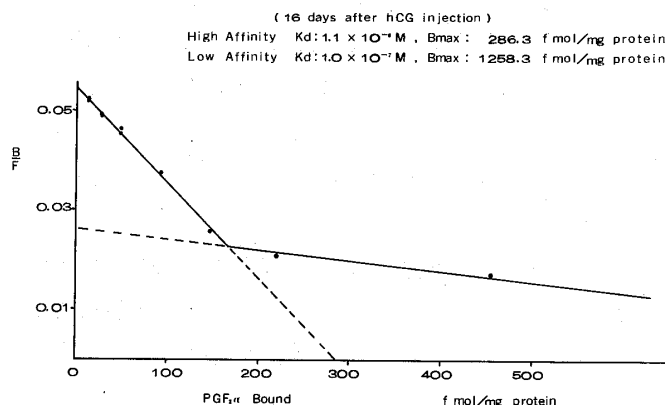
PGEの産生は、卵巢でも低値であつた。黄体期の卵巢でのPGsの産生は、PGF, PGEともに低く6-keto $\text{PGF}_{1\alpha}$ が最も多いことが特徴である。

2. 偽妊娠ウサギ黄体の $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor

偽妊娠16日目のウサギ黄体における $\text{PGF}_{2\alpha}$ の特異的結合の存在を調べるために各種PGsの $\text{PGF}_{2\alpha}$ の結合に対する50%結合阻害能を receptor assay で検討すると $\text{PGF}_{2\alpha}$: 2.5ng, $\text{PGF}_{1\alpha}$: 88ng, PGE_1 : 4μg, PGA_1 , PGB_1 $\gg$ 5μg であり ^3H - $\text{PGF}_{2\alpha}$ の binding が $\text{PGF}_{2\alpha}$ によつて特異的に阻害された(図7)。

これは黄体に $\text{PGF}_{2\alpha}$ の receptor の存在を示唆

図8 Scatchard analysis with $\text{PGF}_{2\alpha}$ specific binding to the corpora lutea of pseudopregnant rabbits



するものである。

次に $\text{PGF}_{2\alpha}$ receptor の性質を知るため Scatchard 分析を行うと, high affinity: $K_d=1.1 \times 10^{-8}\text{M}$, $B_{\max}=286.3 \text{ f mole/mg protein}$ と low affinity: $K_d=1.0 \times 10^{-7}\text{M}$, $B_{\max}: 1258.3 \text{ f mol/mg protein}$ の2つの population を有する receptor が存在することがわかつた(図8)。

考 案

子宮内膜, 子宮筋, 黄体, 間質組織によるPGs産生を検討するため, incubation を行い, incubation medium 中のPGs量を測定した。

組織で産生されたPGは, 組織内に蓄積されず, 直ちに遊離されること¹⁸⁾から, incubation medium 中に遊離したPGの量が, 組織の産生能を表わすと考えてよい。またPGは, 組織の機械的刺激や傷害により速やかに産生, 遊離される⁸⁾¹³⁾¹⁸⁾ため, incubation のための組織処理の影響を除くため, preincubation を施行後, incubation を行つた。

子宮内膜のPGFの産生能は偽妊娠13日目より有意に上昇し19日目に最高となつた。子宮筋でのPGFの産生も増加したが, 内膜の方が有意に産生量が多かつた。

以上のことより黄体末期にPGFが子宮内膜より主に産生されて黄体退縮をおこすことが明らかとなつた。

Poyser²³⁾は, モルモットの子宮を homogenize し, incubation 実験を行つた結果, 発情周期末期

に、子宮の PGF の産生能が増加することを報告した。Fenwick et al.⁷⁾は、偽妊娠成熟ラット子宮を homogenize し、incubation 実験を行つたところ、PGF と D の産生は PGE よりも多く、PGF と D の産生と E の産生の比率は黄体退縮に近づくにつれて上昇したという。このようにモルモット、ラットでも PGF が黄体末期に上昇することが報告されている。

卵巣で黄体退縮期に PGF の産生は見られなかった。このことは、排卵期には、卵胞で PGE, F, prostacyclin が産生されて、排卵現象に関与している¹⁾にもかかわらず、黄体退縮には卵巣自身が PGF を産生して関与するのではないということを示している。

実験過程に於て、6-keto PGF_{1α} が子宮筋において黄体中期及び末期に著明に産生されることが及び黄体以外の組織（間質）にも産生が見られることが明らかとなつたが、これは甚だ興味深い知見と考えられる。近年 prostaglandin の一種である prostacyclin が血管内皮細胞で産生されることが発見され、その血小板凝集阻止作用及び血管拡張作用が血液凝固機構の面から注目されている⁴⁾¹⁶⁾。prostacyclin は不安定な物質であり、中性の緩衝液中で 37℃ で半減期 10 分で分解し、6-keto PGF_{1α} に変換する⁹⁾。それ故本研究では、6-keto PGF_{1α} を測定し、その変化を prostacyclin の産生変化と見なすことにした。prostacyclin は血管内皮細胞以外の器官組織すなわち卵胞¹⁾、子宮筋²⁾¹⁷⁾²⁷⁾でも多量に産生されると報告されている。偽妊娠子宮筋での PGs の産生は、6-keto PGF_{1α} が一番多かつたが、この事実はラット²³⁾²⁷⁾の報告と一致する。黄体以外の組織（間質）で 6-keto PGF_{1α} の産生が多かつたことは、間質で産生された prostacyclin が黄体の血流を調節している可能性があり興味深い。偽妊娠子宮筋の prostacyclin 産生の意義は不明であるが、prostacyclin が卵胞の顆粒膜細胞の cyclic AMP 産生を増加させること、血管拡張作用を持つこと、さらに最近ウシ黄体の in vitro, in vivo 実験¹⁵⁾によつて luteotropic 作用が報告されたことから考えると、偽妊娠子宮筋より産生された prostacyclin が、黄体機

能調節に種々の意味で関与する可能性は十分にあると言えよう。ウサギにおいては、子宮内膜で PGF 及び prostacyclin が、子宮筋で prostacyclin が産生され、部位によつて産生の違いがみられたが、これはラット⁵⁾⁶⁾、ヒト²⁾での報告と一致する。しかし偽妊娠時期による産生量の変化について調べた報告は本研究が初めてである。

PGE は、黄体末期に子宮内膜、子宮筋とともに軽度産生が増加したが、有意の変化ではなかつた。PGE は黄体刺激作用をもつと言われ、事実 PGE₂ は in vitro で LH と同様ウシ黄体での progesterone 合成を促進し、また cyclic AMP 産生を増加する。さらに PG 合成酵素阻害剤を加え LH を作用させたときでも、cyclic AMP が上昇するから、PGE と LH はそれぞれ独立に adenylylate cyclase に働くらしい²⁹⁾。PGE の子宮での産生能は、PGF_{2α}、6-keto PGF_{1α} に比べて少ないので、生理的に黄体機能調節に果たす役割は、PGF_{2α}、6-keto PGF_{1α} と比べると小さいと思われる。

本研究から、黄体末期子宮内膜で PGF 及び 6-keto PGF_{1α} が、子宮筋で 6-keto PGF_{1α} が著増し、それらが殊に PGF_{2α} が子宮性退行因子となつて黄体に働いて黄体退縮が起こることが明らかになつた。しかし、このように黄体に PGF_{2α} が働くには、黄体細胞に PGF_{2α} receptor が存在すれば、作用機構の説明は一層明確になる。そこで、PGF_{2α} receptor の存在について検討したところ、偽妊娠 16 日目の黄体に high と low affinity の 2 つの population を持つ receptor が存在することが明らかになり、著者の仮説の理論付けが可能になつた。これまでウシ¹⁰⁾²¹⁾、ヒツジ¹⁹⁾、ヒト²⁰⁾、ラット²⁸⁾の黄体で PGF_{2α} receptor の存在が証明されている。kimball et al.¹⁰⁾はウシ黄体に PGF_{2α} receptor を見出し Kd=2.1×10⁻⁸M でその特異的結合は主として 9α-OH 基が重要で、5,6-cis 二重結合がそれに次ぐと報告した。Powell et al.²¹⁾はウシ黄体の細胞分画では PGF_{2α} receptor は Kd=2.8×10⁻⁸M で、23℃ では安定だが、37℃ では急速に不活化され、最適の pH は 6.3 で、その特異的結合は LH や FSH では阻害されなかつたと報告している。ヒツジ黄体細胞の PGF_{2α} receptor

も Powell et al.により報告されており, $K_d = 1.0 \times 10^{-7} M$ であるといわれている¹⁹⁾. ヒト黄体細胞の $PGF_{2\alpha}$ receptor は, Powell et al.によると²⁰⁾, 月経周期20日頃の黄体では, $K_d = 5.5 \times 10^{-8} M$, $5.0 \times 10^{-7} M$ の high と low の2種類の結合部位が存在していることが示されている. また妊娠8週の黄体では, $K_d = 1.2 \times 10^{-7} M$ である. ラット黄体にも²⁸⁾, $K_d = 4.7 \times 10^{-9} M$, $4 \times 10^{-7} M$ の2種類の結合部位が存在することが報告されている.

これまでウサギ黄体の $PGF_{2\alpha}$ receptor の存在についての報告はない. 本研究によつて, ウサギもまたウシ, ヒツジ等の動物と同じような K_d 値を有し, ヒト, ラットのように high と low の2種類の結合部位が存在することを明らかにすることが出来た.

$PGF_{2\alpha}$ receptor の局在については, Powell et al.によれば²²⁾, ウシ黄体細胞では, 細胞膜の標識酵素である5-nucleotidase の存在する分面, 即ち細胞膜に存在することが, 明らかにされている.

さらに Wright et al.²⁸⁾は ferritin- $PGF_{2\alpha}$ conjugate を用いて, 電顕的に $PGF_{2\alpha}$ receptor が細胞膜に存在することを証明している.

以上, 本研究から偽妊娠ウサギの黄体退縮機構は, 黄体退縮時子宮内膜より $PGF_{2\alpha}$ が急激かつ著明に産生され, それが黄体細胞の $PGF_{2\alpha}$ receptor に作用して, 黄体退縮をおこすという一連の機構によることが明らかになった.

稿を終るにあたり, 御懇切なる御指導と御校閲を賜わ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直接御指導いただいた佐藤和雄教授に心から感謝いたします. 本論文の一部は, 第54回日本内分泌学会総会で発表した.

文 献

- 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: Prostaglandin と排卵. 日内分泌誌, 56: 1559, 1980.
- Abel, M.H. and Kelly, R.W.: Differential production of prostaglandins within the human uterus. Prostaglandins, 18: 821, 1979.
- Anderson, L.L., Bland, K.P. and Melampy, R.M.: Comparative aspects of uterine-luteal relationships. Recent. Prog. Horm. Res., 25: 57, 1969.
- Bunting, A., Grylewski, R., Moncada, S. and Vane, J.R.: Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. Prostaglandins, 12: 897, 1976.
- Campos, G.A., Liggins, G.C. and Seamark, R.F.: Differential production of PGF and 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ by the rat endometrium and myometrium in response oxytocin, catecholamines and calcium ionophore. Prostaglandins, 20: 297, 1980.
- Dowing, I. and Williams, K.I.: Differential prostaglandin production by microsomal fractions of rat pregnant uterus. Br. J. Pharmacol., 61: 158, 1977.
- Fenwick, L., Jones, R.L., Naylor, B., Poyster, N.L. and Wilson, N.H.: Production of prostaglandins by the pseudopregnant rat uterus, in vitro, and the effect of tamoxifen with the identification of 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$ as a major product. Br. J. Pharmacol., 59: 191, 1977.
- Gr  en, K.: Determination of prostaglandins in body fluids and tissues. Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl., 87: 759, 1979.
- Johnson, R.A., Morton, D.R., Kinner, J.H., Gorman, R.R., McGuire, J.C., Sum, F.F., Whitiaker, N., Bunting, S., Salmon, J., Moncada, S. and Vane, J.R.: The chemical structure of prostaglandin X (Prostacyclin). Prostaglandins, 12: 915, 1976.
- Kimball, F.A. and Lauderdale, J.W.: Prostaglandin E_1 and $F_{2\alpha}$ specific binding in bovine corpora lutea: Comparison with luteolytic effects. Prostaglandins, 10: 313, 1975.
- Kindahl, H., Granstr  m, E., Edqvist, L.E. and Eneroth, P.: Prostaglandin levels in peripheral plasma during the reproductive cycle. Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 2, ed. B. Samuelsson and R. Paoletti, 667, Raven Press, New York, 1976.
- Kinoshita, K., Satoh, K. and Sakamoto, S.: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and E_1 in plasma and amniotic fluid during human pregnancy and labour. Endocrinol. Jpn., 24: 155, 1977.
- Liggins, G.C., Campoo, G.A. and Roberts, C.H.: Production rates of prostaglandin F, 6-keto $PGF_{1\alpha}$ and thromboxane B_2 by perfused human endmetrium. Prostaglandins, 19: 461, 1980.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.C. and Rondall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265,

- 1951.
15. *Milvae, R.A. and Hansel, W.* : The effects of prostacyclin (PGI₂) and 6-keto PGF_{1α} on bovine plasma progesterone and LH concentrations. *Prostaglandins*, 20 : 641, 1980.
 16. *Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J.R.* : An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263 : 663, 1976.
 17. *Omini, C., Folco, G.C., Pasargiklian, R. and Berti, F.* : Prostacyclin (PGI₂) in pregnant human uterus. *Prostaglandins*, 17 : 113, 1979.
 18. *Piper, P.J. and Vane, J.R.* : The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 180 : 363, 1971.
 19. *Powell, W.S., Hammarström, S. and Samuelsson, B.* : Prostaglandin F_{2α} receptor in ovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.*, 41 : 103, 1974.
 20. *Powell, W.S., Hammarström, S. and Samuelsson, B.* : Prostaglandin F_{2α} receptor in human corpora lutea. *Lancet*, 1 : 1120, 1974.
 21. *Powell, W.S., Hammarström, S. and Samuelsson, B.* : Occurrence and properties of a prostaglandin F_{2α} receptor in bovine corpora lutea. *Eur. J. Biochem.*, 56 : 73, 1975.
 22. *Powell, W.S., Hammarström, S. and Samuelsson, B.* : Localization of a prostaglandin F_{2α} receptor in bovine corpus luteum plasma membrane. *Eur. J. Biochem.*, 61 : 605, 1976.
 23. *Poyser, N.L.* : Production of prostaglandins by the guinea pig uterus. *J. Endocrinol.*, 54 : 147, 1972.
 24. *Rao C.V.* : Characterization of prostaglandin receptors in the bovine corpus luteum cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 249 : 7203, 1974.
 25. *Satoh, K., Kawai, Y., Mitsuhashi, N., Kinoshita, K. and Sakamoto, S.* : Prostaglandin F_{2α} metabolites in plasma and urine during pseudo-pregnancy in the rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 138 : 748, 1980.
 26. *Scatchard, G.* : The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 15 : 660, 1949.
 27. *Williams, K.I., Dembinska-Kiec, A., Zmuda, A. and Gryglewski, R.J.* : Prostacyclin formation by myometrial and decidual fractions of the pregnant rat uterus. *Prostaglandins*, 15 : 343, 1978.
 28. *Wright, K., Luborsky-Moore, J.L. and Behrman, H.R.* : Specific binding of prostaglandin F_{2α} to membranes of rat corpora lutea. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 13 : 25, 1979.
 29. *Zor, U., Bauminger, S., Lamprecht, S.A., Koch, Y., Chobsieng, P. and Lindner, H.R.* : Stimulation of cyclic AMP production in the rat ovary by luteinizing hormone : Independence of prostaglandin mediation. *Prostaglandins*, 4 : 499, 1973.

(No. 5020 昭57・1・12受付)