

分娩発来に関する基礎的研究 —羊水および胎児の分娩発来への関与—

秋田大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 真木正博教授)

高 橋 裕

A Basic Study on the Initiation of Human Parturition —Contribution of Amniotic Fluid and Fetus to the Initiation of Human Parturition—

Hiromu TAKAHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Akita University School of Medicine, Akita
(Director: Prof. Masahiro Maki)

概要 早産治療の基礎となるべき分娩発来のメカニズムを解明する目的で、羊水と胎児が陣痛発来にどのようにかかわっているかを Prostaglandins (PGs) 産生系から検討した。

羊水中 phosphatidylinositol (PI), 羊水中 phospholipase C (PLase C) 活性, 羊膜中 PLase C 活性, 新生児尿中 PLase C 活性を測定し次の結果を得た。

(1) 羊水中 PI は妊娠30週頃から増加しはじめ、妊娠36週ないし37週をピークとして以降漸減傾向にあった。

(2) 羊水中に PLase C 活性を見出し、これを測定したところ、活性は妊娠30週以前ではほとんど認められないが、その後の妊娠経過とともに増加した。妊娠40週の活性を仮に100%とすると、妊娠19週では21.8%, 32週では68.6%, 36週では93.2%であり、妊娠36週頃までは増加する傾向にあるが、40週との間に大きな変化は見られなかった。

(3) 羊膜組織の105,000×g 上清分画での PLase C 活性は羊水の約43倍であった。

(4) 羊水中 PLase C 活性の起源を胎児尿に求めて新生児尿を検索したところ、新生児尿にも強い PLase C 活性が認められた。正期羊水、羊膜、新生児尿における PLase C 活性を比較すると、羊水の活性に比べ羊膜ではその約43倍、新生児尿では約58倍であった。

(5) 新生児尿中の PLase C の分子量はおよそ33,000と推定された。

(6) 計算上、胎児尿中の PLase C により、羊水中に十分な量のアラキドン酸が産生されていると考えられた。

以上から、羊水中 PI の減少は PGs 産生のための消費によるものと考えられ、妊娠36週頃から羊水中で分娩発来への準備状態ともとれる変化が観察された。

従つて、胎児は肺から PI を羊水中へ分泌し、尿中に PLase C を放出し羊水中でアラキドン酸を産生することにより陣痛発来の一部に関与していると考えられた。

Synopsis In order to clarify the mechanism of initiation of human parturition, the relationship of amniotic fluid and fetus to prostaglandin synthesis was investigated. Phosphatidylinositol (PI) in amniotic fluid and phospholipase C (PLase C) activity in amniotic fluid, amnion tissue and neonatal urine were measured. The results are as follows.

1) PI in amniotic fluid began to increase from around 30 to 36 or 37 weeks of gestation, and then gradually decreased toward term.

2) PLase C activity in amniotic fluid was demonstrated. The activity was low before 30 weeks of gestation, but gradually increased toward term.

3) PLase C activity in 105,000×g supernate of amnion tissue homogenate was 43 fold higher than that in amniotic fluid.

4) High PLase C activity was demonstrated in neonatal urine, which was 58 fold higher than that in amniotic fluid.

5) The molecular weight of PLase C from neonatal urine was estimated to be 33,000 daltons.

6) PLase C activity in neonatal urine has enough activity to produce arachidonic acid in amniotic fluid. It was concluded that the fetus relates to the onset of labor by producing arachidonic acid in amniotic fluid as a result of the reaction between PI from the lung and PLase C from the urine.

Key words: Initiation of human parturition • Phosphatidylinositol • Phospholipase C • Amniotic fluid • Neonatal urine

緒 言

近年、周産期医療技術の進歩により周産期死亡率の低下をみているが、不幸な転帰をとる未熟児は少なくない。従つて、産科ではこうした未熟児を出生させないために早産管理を行なっているが、治療の内容は対症的なものであるにすぎない。そのため、分娩発来のメカニズムを解明し陣痛発来そのものを根本的に抑制できるならば、より効果的に未熟児の出生を防止できるものと考えられる。

1934年に von Euler²⁸⁾によつて抽出された Prostaglandins (PGs) の薬理作用が明らかにされてから、今日までに PGs の分娩発来における重要性が明らかにされてきている。また、さらに PGs の前駆物質であるアラキドン酸代謝についても明らかにされつつあり、リン脂質—アラキドン酸—PGs 産生系に関する知見が得られてきている²⁾³⁾。

今回、羊水と胎児とが分娩発来にどのようにかわつているかを PGs 産生系から見る目的で、アラキドン酸遊離に関する phospholipase C (PLase C) 活性とその基質である phosphatidylinositol (PI) を測定し検討を加えた。

方 法

1. 羊水中 phosphatidylinositol (PI) の測定

羊水は正常妊婦を対象とし分娩時に人工破膜を行なうか、あるいは産科的適応に基づく羊水穿刺を行ない採取した。混濁羊水や血性羊水は対象から除き、 -20°C 以下に凍結保存するか、そのまま実験に供与した。

PI の分離は Alexandros et al.⁵⁾ の変法による thin layer chromatography (TLC) で行なつた。スタンダードとして Sigma 社の

sphingomyelin (bovine brain), L- α -phosphatidylcholine (bovine brain), L- α -phosphatidylinositol (soy bean), L- α -phosphatidyl-

L-serine (bovine brain), L- α -phosphatidylethanolamine (egg yolk), L- α -phosphatidyl-DL-glycerol (egg lecithin) を使用した。TLC plate は Merck 社の TLC plate silicagel 60, 20cm $\times$ 20 cm, layer thickness 0.25mm を使用した。

試料である羊水を100 $\times$ g で10分間遠心し、その上清1ml をとり、これに Folch 液 (chloroform/methanol=2:1, v/v) 3ml を加え10秒間振盪した。その後さらに1,500 $\times$ g で5分間遠心した後 chloroform 層を全量採取し、N₂ 気流下に乾固した。これを少量の chloroform に溶かし全量を TLC plate へうつした。発色はヨード蒸気を用いて行なつた。PI はスタンダードの R_f 値より同定した。

次に、発色させた TLC plate を SHIMAZU, dual wave length TLC scanner CS-910 にかけて densitometric trace を得た。測定条件は reflection 方式で reference 760nm, sample 360 nm の二波長ジグザグスキャンとし、chart speed は 20mm/min. とした。得られた densitometric trace を各リン脂質成分ごとに切り取り、その紙片重量から各成分の比率を求めた。この組成比と、別に過塩素酸—硫酸ヒドラジン法¹⁾によつて測定した総リン脂質の値とから PI を半定量した。

2. Phospholipase C (PLase C) 活性測定

(i) 基質の作製

PLase C 活性の測定は、小野薬品中央研究所の方法に準じ RI を用いた enzyme assay により行なつた。基質は L- α -phosphatidyl [2-³H] inositol (9.3Ci/m mol) (Amersham) に L- α -phosphatidylinositol (Sigma 社) を加え、図1に示す手順で作製した。

(ii) 羊水中 PLase C 活性測定

羊水を100 $\times$ g で10分間遠心後、その上清を250 μ l とり enzyme source とした。これを37 $^{\circ}\text{C}$ で3分間 preincubate したのち、基質140 μ l (0.05 μ Ci,

L- α -phosphatidyl [2- 3 H] inositol (β -arachidonic, α -stearoyl) (Amersham)	: 5 μ Ci
↓	
L- α -phosphatidylinositol from soybean (Sigma)	: 4 mg
↓	
Evaporation at room temp.	
↓	
100mM Tris-Maleate buffer pH 6.5	: 5 ml
↓	
1M KCl	: 1 ml
↓	
H ₂ O	: 2 ml
↓	
50mM Sodium deoxycholate	: 1 ml
↓	
Sonicated at 0°C for 15 sec. x3	
↓	
H ₂ O	: 8 ml
↓	
Substrate Solution (0.045 μ mol. ; 0.05 μ Ci/140 μ l)	

図1 Preparation of substrate for phospholipase C assay (100 samples)

0.045 μ mol)を加え混和し、37°Cの振盪槽で反応させた。chloroform/methanol (1:1, v/v)溶液2mlを加え混和し氷水中へ入れ、さらに10mM EGTA 100 μ lを加えることにより反応を止め、0.1N HCl 100 μ lを加え混和したのち1,500 $\times$ gで5分間遠心した。分離した上層(メタノール層)から1mlとりACS II (Amersham)を10ml加えALOKA LSC 700で1分間カウントした。なお、測定はduplicateで行なった。

(iii) 羊膜中 PLase C 活性測定

正期正常妊娠で陣痛発来後の羊膜(2.21g)を氷上でミンチにしたのち、S-T-M液(0.25M sucrose, 0.05M Tris HCl pH 7.5, 0.05M MgCl₂) 6mlを加え、polytron (Kinematica, GmbH), テフロンホモジナイザーにより氷水中で磨砕をくり返しホモジネートを得た。これを700 $\times$ gで10分間遠心し、さらにその上清を105,000 $\times$ gで60分間遠心し得られた上清をenzyme sourceとした。

基質140 μ lと105,000 $\times$ g上清250 μ lとを混和し37°Cで3分間preincubateしたのち、50mM CaCl₂ 10 μ lを加え反応を開始させた。以下の操作は前述のとおりである。

(iv) 新生児尿中 PLase C 活性測定

Apgar score 8点以上で生後6日目以内の正常成熟新生児から得た尿を-20°C以下に凍結し実験まで保存した。

新生児尿を1,500 $\times$ gで10分間遠心したのち、その上清250 μ lをとりenzyme sourceとした。これにbuffer A (10mM HEPES NaOH pH 7.3, containing 1mM EGTA) 500 μ lを加え、よく混和し氷水中においた。enzyme assayは(iii)と同様に行なつたが、chloroform/methanol (1:1, v/v)溶液を3mlとした。

3. 新生児尿中 PLase C の部分精製

新生児尿の採取、保存は前述のとおりである。なお、以下の操作はすべて4°C以下で行なつた。

PLase C活性の測定は羊水中PLase C活性の測定と同様の方法で行なつたが、enzyme sourceを50 μ lとし、50mM CaCl₂ 10 μ lを加え、chloroform/methanol (1:1, v/v)溶液を1mlとした。また遠心後のメタノール層から500 μ lとり、加えるACS IIは5mlとした。

解凍した尿を900 $\times$ gで10分間遠心し、得られた上清は3,180mlであつた。これに固形の硫酸アンモニウムを加え(50%飽和)溶解させたのち10,000 $\times$ gで5分間遠心し沈渣を得た。得られた沈渣をbuffer Aに溶解したのち、同bufferを透析外液として一昼夜透析した。透析後、DEAE sephacel (Pharmacia)を充填したcolumn (2.5 cm $\times$ 22cm)に添加し、その後buffer Aを流し0.10M, および0.15M KClによりstep wise elutionを行なつた。なお、fraction volumeは5mlでflow rateは100ml/hr.とした。このようにして得られた各分画のPLase Cの活性を前述の方法で測定した(図2)。これらの分画のうち活性の認められた分画を集めvisking tubeに入れ、polyethyleneglycol (Sigma)の乾燥粉末を用い抽出液を約2.5mlに濃縮した。この濃縮液2.5mlをSephadex G-100 (Pharmacia)を充填したcolumn (2.8cm $\times$ 50cm)を用い、flow rate 0.39ml/min., fraction volume 5mlの条件でゲルろ過した。得られた各分画のPLase C活性を前述の方法で測定した(図3)。なお、蛋白の定量はBradford⁶⁾氏

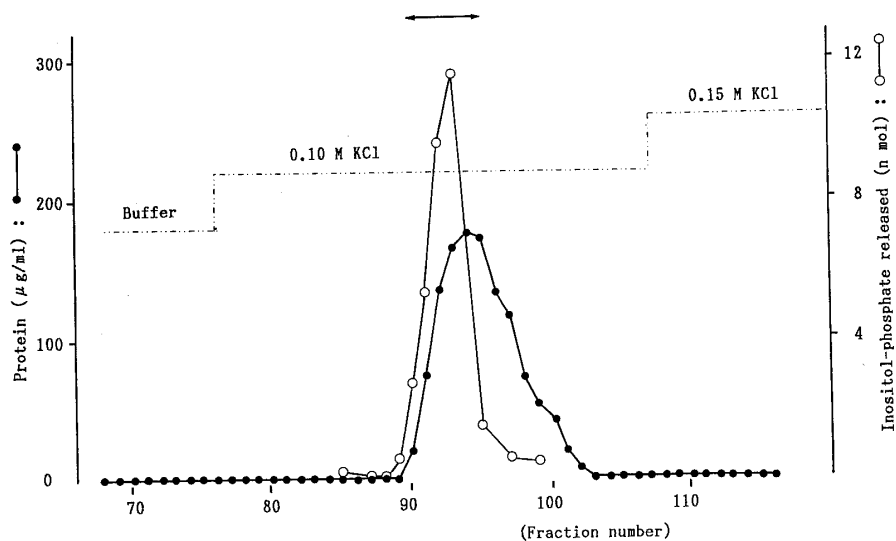


図2 DEAE-cellulose column chromatography of phospholipase C in neonatal urine

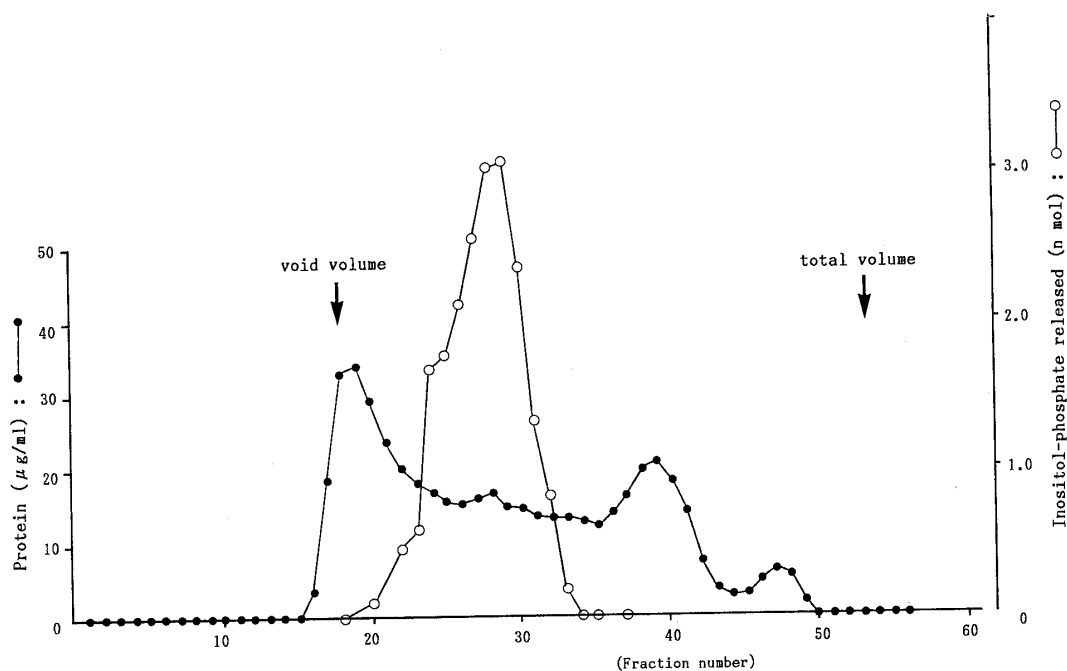


図3 Sephadex G-100 gel chromatography of phospholipase C in neonatal urine

法によった。

分子量マーカーとして Sigma 社の human albumin (M.W.=68,000), ov albumin (M.W.=45,000), soybean trypsin inhibitor (M.W.=20,100) を用い, void volume と total volume はそれぞれ blue dextran 2,000 (Pharmacia), DNP-phenylalanine (Sigma) により決定した。

成 績

(1) 羊水中 PI は妊娠30週以前では低値である

が, 妊娠30週を過ぎる頃から上昇しはじめ, 妊娠36週ないし37週でピークとなり, 以降漸減傾向にあった(図4)。

(2) 妊娠中期から末期にかけての羊水中 PLase C 活性のおおまかな推移を見る目的で, 羊水を妊娠19週から30週, 31週から36週, 37週から42週の3グループに分け活性を測定した。すると妊娠30週以前ではほとんど活性が見られないが, 妊娠週数が増すにつれて活性も強くなる傾向が見

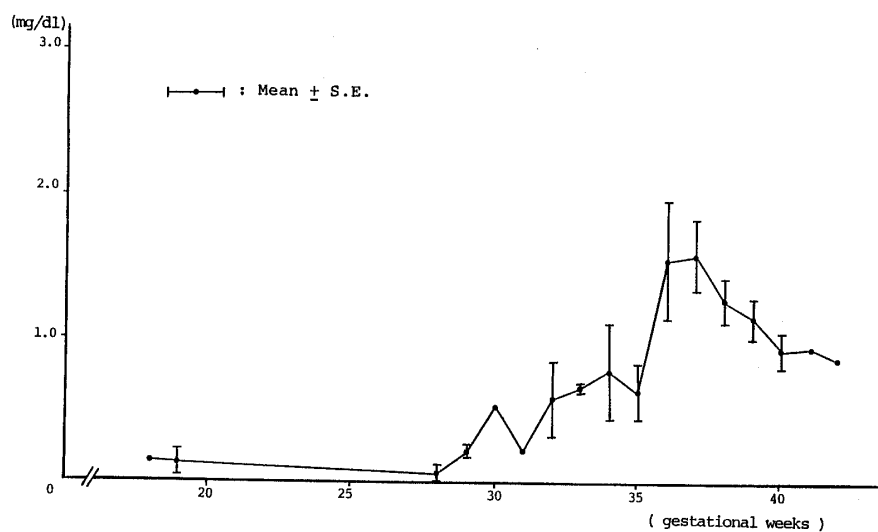


図4 The content of phosphatidylinositol in amniotic fluid during normal pregnancies

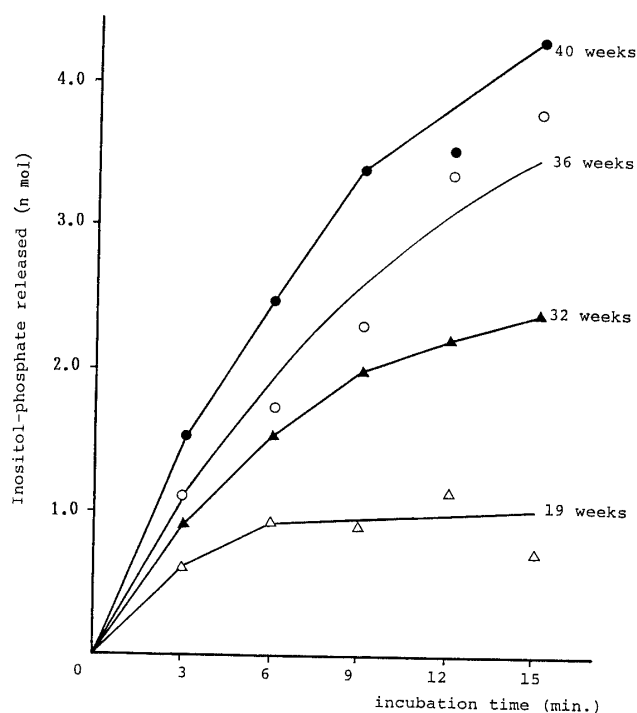


図5 Phospholipase C activity in amniotic fluid of various weeks of gestation

られた。そこで妊娠19週、32週、36週、40週の羊水を用いて反応時間15分まで3分毎に活性をduplicateで測定した(図5)。

比活性の妊娠経過に伴う変化は妊娠19週から40週まで、それぞれ0.13, 0.40, 0.55, 0.58 n mol/mg・protein/min. で、妊娠36週までは比活性が増加しているが、妊娠36週と40週の間ではさほど変

表1 Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in amniotic fluid of various weeks of gestation

gest. weeks	n mol/min.	total protein(mg)	n mol/mg・protein/min.
40	0.51	0.875	0.58
36	0.37	0.675	0.55
32	0.31	0.775	0.40
19	0.21	1.625	0.13

化が見られなかった(表1, 図6)。なお、今回の羊水中 PLase C 活性の測定にあたって、pH や Ca イオン濃度の調整は行なわなかったが、実際の反応系の pH は6.6から6.8で、Ca イオンは0.75から1.52mM の範囲であった。

羊膜の105,000×g 上清を用いて反応時間60分までの PLase C 活性を測定したところ、図7に示すように強い活性が認められた。比活性は25.1 n mol/mg・protein/min. と羊水に比べてかなり強く、その約43倍であった。

新生児尿の1,500×g 上清には強い PLase C 活性が存在し、比活性は33.3 n mol/mg・protein/min. であった(図8)。

PLase C 活性を正期羊水、羊膜、新生児尿で比較すると、それぞれの比活性は0.58, 25.1, 33.3 n mol/mg・protein/min. であり、新生児尿中の PLase C 活性が最も高かった。

(3) 新生児尿を900×g で10分間遠心した上清

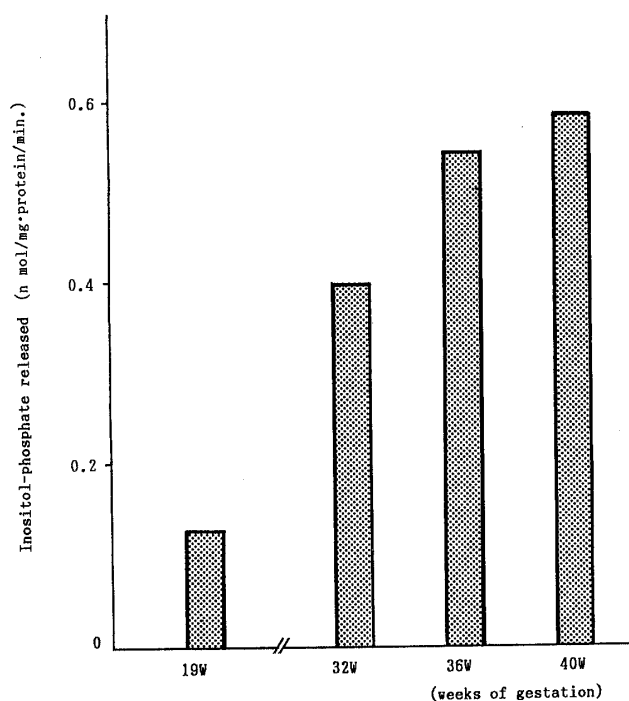


図6 Phospholipase C activity in amniotic fluid of various weeks of gestation

3,180ml を用いて塩析, 脱塩し得られた蛋白溶解液を DEAE cellulose column chromatography につけ, KCl で step wise elution を行なつたところ, 図2に示すように0.10M 分画に PLase C 活性のピークが見られた。そこで, 矢印で示した分

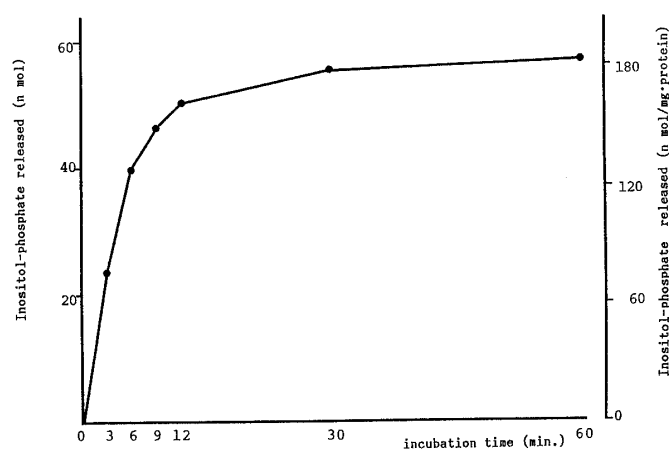


図7 Phospholipase C activity in the 105,000×g supernatant fraction of amnion

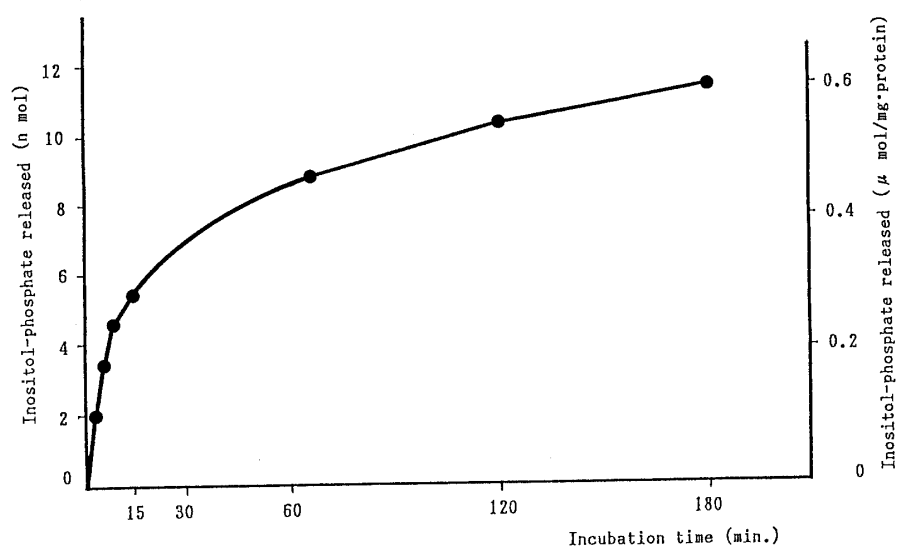


図8 Phospholipase C activity in urine

表2 Partial purification of phospholipase C in neonatal urine

Step	Total protein (mg)	Total activity (μ mol/hr.)	Specific activity (μ mol/mg·protein/hr.)	Yield (%)
Supernatant of 900×g	378.4	156.2	0.413	100.0
50% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate	91.3	9.77	0.107	6.3
DEAE-Cellulose	5.6	4.06	0.725	2.6
Sephadex G-100	0.7	1.87	2.668	1.2

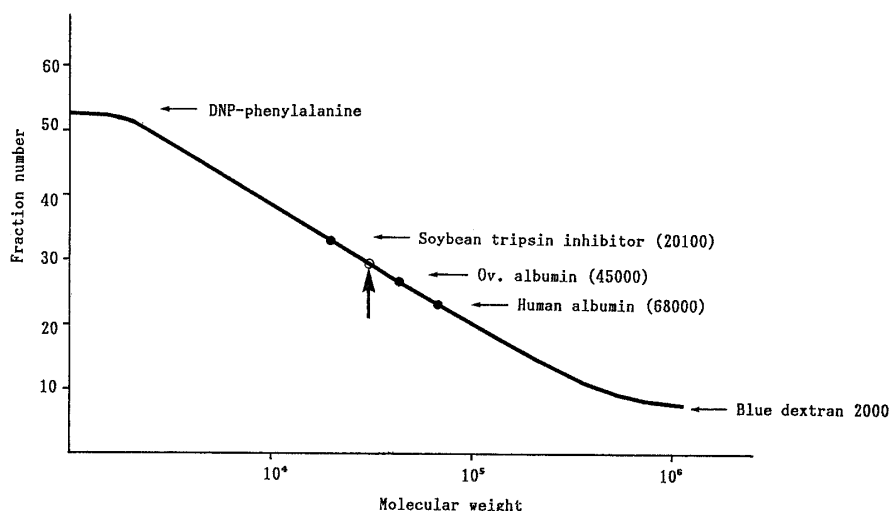


図9 Relationship between fraction number and molecular weight

画を濃縮し、さらに Sephadex G-100を用いてゲルろ過を行なったところ、図3に示すように分画番号29 (elution volume 145ml) をピークとして PLase C 活性が認められた。

各分子量マーカーの現れる分画番号と分子量の対数との関係を図9に示した。この図から新生児尿中の PLase C の分子量はおよそ33,000と推定された。

今回の実験では、新生児尿約3l から PLase C の部分精製を開始したが、その間の活性の回収率は表2に示すとおりであった。Sephadex G-100により最終的に回収された活性は1.2%で、比活性は $2.67 \mu \text{mol/mg} \cdot \text{protein/hr.}$ であった。

考 案

(1) 羊水中 PI の変動について

羊水中リン脂質の由来については Giudicelli et al.⁸⁾の以下の報告がある。すなわち、新生児の tracheal fluid と amniotic fluid のリン脂質を比較した研究で、tracheal fluid の方が amniotic fluid の約3倍多く含まれており、しかもどちらもその組成に差がないことから、羊水中のリン脂質の起源を胎児肺と考えたものである。

羊水中のリン脂質の中でもとりわけ胎児肺成熟に関係するものとして phosphatidylcholine (PC), phosphatidylglycerol (PG), PI の3者が着目されているが、PI の変動と PC および PG の変動とは大きく異なる¹⁰⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。PI は妊娠30週頃か

ら羊水中に現れて、36週ないし37週でピークになり以降減少傾向をとるが、PG は35週頃から、そして PC は30週頃から増加しはじめ以降分娩まで増加しつづける。なぜ肺成熟の指標であるといわれる PI が妊娠36週ないし37週から減少しはじめるのだろうか。それについて Kulvoich et al.¹⁷⁾は次のように考察している。すなわち、肺胞の形態発達と肺成熟を考えると、円柱状もしくは円筒状な形態から肺胞が球状に変化する過程で respiratory epithelium からの分泌が PI から PG へと変化し、そのため PI は妊娠36週頃から減少し PG は妊娠35週頃から増加すると考察している。しかし、一方では十分な PG があれば RDS (respiratory distress syndrome) の発症はないが、PG が無くとも RDS が発症しない場合がある¹⁰⁾とか、PI 濃度と RDS 発症とは相関しないという報告²⁶⁾もあり、PI の減少を肺成熟の面からどうとらえるかは難しい問題である。

一方、PI をその特徴的な脂肪酸組成から見ると1位の位置に主にステアリン酸を、そして2位の位置に主にアラキドン酸を含有している。しかも、PI が生合成される過程でアラキドン酸を PI に濃縮させるような形で、アシル結合させる系が存在し、アラキドン酸に富んだ PI が形成されている。これは、アラキドン酸が Prostaglandins (PGs) の前駆物質であることから、アラキドン酸の貯蔵される場として PI が重要な役割を果たしている

のではないかと考えられている⁴⁾。

このような観点から見ると、妊娠36週ないし37週まで増加しそれ以降減少していくPIの変化と、羊水中PGF_{2α}濃度が妊娠36週頃から増加しはじめ分娩に至るとするSalmon et al.²²⁾の報告とは興味深い関連があると考えられる。すなわち、羊水中PIはPGs産生のために消費され減少するのではないかと考えられた。

以上から、PIが分解されることにより、アラキドン酸さらにはPGsが産生されていく可能性が考えられ、また、このようなアラキドン酸産生に不可欠であるPI分解酵素、すなわちphospholipase A₂あるいはphospholipase C活性が羊水中に存在する可能性が示唆された。

(2) 羊水中PLase C活性について

PGsと分娩開始とは密接な関係があるとされており、妊婦血中、羊水中、子宮筋、羊膜、脱落膜などにおけるPGs産生についての報告がいくつかなされている¹²⁾¹³⁾²⁰⁾²³⁾。また同様にPGsの前駆物質であるアラキドン酸についても研究され、妊娠中期の治療的流産を目的に羊膜腔中にアラキドン酸を注入することで、ほぼ自然に近い形の分娩にいたらしめたというMacDonald et al.¹⁸⁾の報告が、分娩発来とアラキドン酸とのかわかりを興味深く示している。

アラキドン酸は生体内ではそのほとんどがリン脂質にエステル結合して存在するが、PGsへ合成されていくためには遊離型のアラキドン酸になる必要がある。従つて、リン脂質から遊離型のアラキドン酸を分離するphospholipaseの作用がPGs合成の第1段階といえる²³⁾。一般的に遊離のアラキドン酸を生成する酵素としてphospholipase A₂ (PLase A₂)とPLase Cとがあるが、今回、羊水中にPLase C活性を見出し測定したところ、妊娠経過とともにその活性が増加していることがわかった。しかし、基質としてL- α -phosphatidylcholine (β -[1-¹⁴C] arachidonyl, α' -stearoyl)を用いたPLase A₂ assayでは、羊水中にPLase A₂活性は見られなかった。

以上から、羊水中にはPLase A₂活性はないがPLase C活性があることがわかった。そして、そ

の活性は妊娠40週を仮に100%とすると妊娠19週では21.8%、32週では68.6%、36週では93.2%であり、妊娠36週頃までは活性が上昇していくが、それ以降は大きな変化がないものと考えられた。また、1例しか調べていないが、妊娠25週で分娩の進行を抑えきれずに早産に至った症例の羊水を用いてPLase C活性を測定したところ、正期羊水よりも高い活性が認められた。症例が1例とはいえ、興味深い結果であると思われる。

ここで基質—酵素—産生物といった系から見てみると、基質であるPIの減少が前述のように妊娠36週頃からおこり、酵素であるPLase Cの活性がやはりこの頃ですでに最大に近くなっている。また産生物であるPGsについては、Salmon et al.²²⁾やHibbard et al.¹¹⁾が妊娠経過における羊水中PGF_{2α}を測定した報告がある。これによると両者とも、妊娠36週以前では低値をとるが、妊娠36週を境に羊水中にPGF_{2α}が急増し、分娩第I期ではさらに増して、その増加は頸管の開大度に比例するとしている。このように、基質であるPIと酵素であるPLase Cと産生物質であるPGF_{2α}とが時期を同じくして妊娠36週頃の羊水の中で変化していることは非常に興味深いことである。実際、臨床的にも分娩には結びつかないまでも、妊婦が自覚する子宮収縮が出てくるのはこの時期であるということも密接な関係があると思われる。

なお、今回の実験では羊水そのものを基質に作用させ、pHやCaイオンの調整は行なわなかったが、これは操作を加えない状態の羊水で活性があるかどうかを見ようとしたものである。PLase Cの至適条件はpH 6.5~7.5²¹⁾、Caイオン要求濃度は0.5mM (しかし、アラキドン酸を添加すると10~50 μ MのCaイオンで十分活性を発揮できる⁴⁾)であり、実験系の条件はその至適範囲内であったと考えられる。

(3) 羊膜中PLase C活性について

Schwarz et al.²⁵⁾が卵膜にはアラキドン酸が豊富に含まれており、しかも陣痛開始後では開始前に比べてアラキドン酸含量が有意に減少すると報告してから、分娩発来に関する卵膜の役割が注目されている。そして岡崎²⁾はPGsを産生する組織

として卵膜組織に着目し、羊膜と絨毛膜のリン脂質中のアラキドン酸を測定したところ、PE (phosphatidylethanolamine) と PI の中に含まれるアラキドン酸のみが分娩開始により有意に減少したと報告した。さらに羊膜、絨毛膜、脱落膜には PLase C, PLase A₂ 活性が存在し、特に羊膜で高く絨毛膜や脱落膜に比べ 3～5 倍の高活性を有している²⁰⁾と述べている。また、PLase C 活性は PLase A₂ 活性よりはるかに高く、しかも羊膜中の活性のみが妊娠初期より末期で有意に高いことから、羊膜の中で PLase C を介したアラキドン酸遊離機構が妊娠末期に向かい、しだいにできあがっていくと考察している³⁾。

卵膜組織および子宮筋組織における PGs 合成能については Satoh et al.²⁴⁾ の報告があるが、PGE は主に羊膜で産生され、PGF は子宮筋組織で主に産生される。しかも、羊膜には絨毛膜や脱落膜に比べ 10 倍も高い PGE₂ 合成能が存在することが知られている¹⁵⁾。

以上のように、分娩の発来と羊膜との関りは密接であると考えられている。

その羊膜では PLase C 活性の 90% 以上が 105,000×g 上清分画にある⁷⁾ことから、今回、羊膜の 105,000×g 上清分画を enzyme source として PLase C 活性を測定した。その結果、羊膜中の活性は羊水中の活性の約 43 倍であつた。羊膜の PLase C 活性が cytosol 分画である 105,000×g 上清分画にあることなどを考えると、羊水中の PLase C 活性は羊膜組織から一部細胞膜を透過して流出してきているとも考えられた。

(4) 新生児尿中 PLase C 活性

従来から胎児は何らかの方法で陣痛発来に関与しているであろうと考えられている。

MacDonald et al.¹⁹⁾ は羊水、羊膜、絨毛膜、脱落膜が陣痛発来に対し活発に代謝を行なっていると述べており、また胎児も尿を介して何らかの情報を出しているのではないかと推測している。しかし、今までのところ胎児が尿を介して陣痛発来にどのように関与しているのかについては明確な報告がない。

今回、羊水中に妊娠経過とともに変化する

PLase C 活性を見出し、その起源として胎児尿を考え新生児尿を検索したところ、やはり尿中にも強い活性が認められた。その活性の強さは羊水に比べ約 58 倍であり、羊水中の PLase C 活性の起源として胎児尿が最も考えられた。成人についても同様に調べたが、成人尿中に PLase C 活性は見られなかつた。

PLase C を単一蛋白に精製した報告が Hakata et al.⁹⁾, Takenawa et al.²⁷⁾ によつてなされている。Hakata et al. は bovine platelet から精製した PLase C の分子量を 143,000 と報告し、また Takenawa et al. は rat liver から精製した PLase C の分子量を約 70,000 と報告している。今回、我々が新生児尿から部分精製した PLase C の分子量はおよそ 33,000 であつた。今回行なつた部分精製は硫酸アンモニウム 50% の沈渣を得て開始した。しかし、表 2 に示すように新生児尿の 900×g 上清から次の段階である硫酸アンモニウムの沈渣を得る段階ですでに回収率が極めて低く、今後は方法の改良が必要と考えられた。

Keirse et al.¹⁴⁾ の報告によると正期における分娩時の羊水中遊離アラキドン酸は約 2μg/ml で、MacDonald et al.¹⁸⁾ は頸管開大以前の陣痛のない状態では 100ng/ml 前後であると報告している。今回測定した正期羊水に含まれる PI が 0.015mM 前後であることから考えると、胎児の尿中に含まれる PLase C で十分なアラキドン酸が羊水中に産生される計算になり、胎児が羊水中に活性のある PLase C を放出することにより、陣痛発来の一部関与していることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師真木正博教授に深謝いたします。

文 献

1. 金井 泉, 金井正光: 臨床検査提要, VII-59, 金原出版株式会社, 東京, 1972.
2. 岡崎武志: ヒトにおける陣痛発来の基礎. 日産婦誌, 34: 108, 1982.
3. 岡崎武志, 東條伸平: 陣痛発来と prostaglandins. 産と婦, 50: 684, 1983.
4. 竹縄忠臣: ホルモン受容体とイノシトールリン脂質代謝亢進. 蛋白質・核酸・酵素, 27: 1291, 1982.
5. Alexandros, A.P., Richard, E.M. and Richard, H.G.: Improved one-dimensional thin-layer chromatography of phospholipids in amniotic fluid. Clin. Chem., 28: 209, 1982.

6. *Bradford, M.M.* : A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248, 1976.
7. *Di Renzo, G.C., Johnston, J.M., Okazaki, T., Okita, J.R., MacDonald, P.C. and Bleasdale, J. E.* : Phosphatidylinositol-specific phospholipase C in fetal membrane and uterine decidua. *J. Clin. Invest.*, 67 : 847, 1981.
8. *Giudicelli, Y., Pecquery, R., Magyer, C., Lacasa, M. and Nordmann, R.* : Studies on the phospholipids in tracheal aspirate from normal full term newborn infants. Comparison with amniotic fluid. *Clinica. Chimica. Acta*, 60 : 335, 1975.
9. *Hakata, H., Kambayashi, J. and Kōsaki, G.* : Purification and characterization of phosphatidylinositol specific phospholipase C from bovine platelets. *J. Biochem.*, 92 : 929, 1982.
10. *Hallman, M., Kulovich, M., Kirkpatrick, E., Sugarman, R.G. and Gluck, L.* : Phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol in amniotic fluid. Indices of lung maturity. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125 : 613, 1976.
11. *Hibbard, B.M., Sharma, S.C., Fitzpatrick, R.J. and Halmlett, J.D.* : Prostaglandin $F_{2\alpha}$ concentrations in amniotic fluid in late pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth.*, 81 : 35, 1974.
12. *Keirse, M.J.N.C. and Turnbull, A.C.* : E prostaglandins in amniotic fluid during late pregnancy and labor. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth.*, 80 : 970, 1973.
13. *Keirse, M.J.N.C., Flint, A.P.F. and Turnbull, A.C.* : F prostaglandins in amniotic fluid during pregnancy and labor. *J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth.*, 81 : 131, 1974.
14. *Keirse, M.J.N.C., Hicks, B.R., Mitchell, M.D. and Turnbull, A.C.* : Increase of the prostaglandin precursor, arachidonic acid, in amniotic fluid during spontaneous labor. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 84 : 937, 1977.
15. *Kinoshita, K. and Green, K.* : Bioconversion of arachidonic acid to prostaglandins and related compounds in human amnion. *Biochemical Medicine*, 23 : 185, 1980.
16. *Kulovich, M.V., Hallman, M.B. and Gluck, L.* : The lung profile, I. Normal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135 : 57, 1979.
17. *Kulovich, M.V. and Gluck, L.* : The lung profile. II. Complicated pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135 : 64, 1979.
18. *MacDonald, P.C., Schultz, F.M., Duenhoelter, J. H., Gant, N.F., Jimenez, J.M., Pritchard, J.A., Porter, J.C. and Johnston, J.M.* : Initiation of human parturition. I. Mechanism of action of arachidonic acid. *Obstet. Gynecol.*, 44 : 629, 1974.
19. *MacDonald, P.C., Porter, J.C., Schwarz, B.E. and Johnston, J.M.* : Initiation of parturition in the human female. *Semin. Perinatol.*, 2 : 273, 1978.
20. *Okazaki, T., Sagawa, N., Bleasdale, J.E., Okita, J.R., MacDonald, P.C. and Johnston, J.M.* : Initiation of human parturition. XIII. Phospholipase C, phospholipase A_2 and diacylglycerol lipase activities in fetal membranes and decidua vera tissue from early and late gestation. *Biol. Reprod.*, 25 : 103, 1981.
21. *Rittenhouse-Simmons, S.* : Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelet. *J. Clin. Invest.*, 63 : 580, 1979.
22. *Salmon, J.A. and Amy, J.J.* : Levels of prostaglandin $F_{2\alpha}$ in amniotic fluid during pregnancy and labor. *Prostaglandin*, 4 : 523, 1973.
23. *Satoh, K., Yasumizu, T., Fukuoka, H., Kinoshita, K., Kaneko, Y., Tsuchiya, M. and Sakamoto, S.* : Prostaglandin $F_{2\alpha}$ metabolite levels in plasma, amniotic fluid and urine during pregnancy and labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 133 : 886, 1979.
24. *Satoh, K., Yasumizu, T., Kawai, Y., Ozaki, A., Wu, T., Kinoshita, K. and Sakamoto, S.* : In vitro production of prostaglandin E, F, and 6-keto prostaglandin $F_{1\alpha}$ by human pregnant uterus, decidua and amnion. *Prostaglandins and Medicine*, 6 : 359, 1981.
25. *Schwarz, B.E., Schultz, F.M., MacDonald, P.C. and Johnstone, J.M.* : Initiation of human parturition. III. Fetal membrane content of prostaglandin E_2 and $F_{2\alpha}$ precursor. *Obstet. Gynecol.*, 46 : 564, 1975.
26. *Skjaeraasen, J. and Stray-Pedersen, S.* : Amniotic fluid phosphatidylinositol and phosphatidylglycerol. I. Normal pregnancies. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 58 : 225, 1979.
27. *Takenawa, T. and Nagai, Y.* : Purification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 256 : 6769, 1981.
28. *von Euler, U.S.* : Zur kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 175 : 78, 1934.

(No. 5731 昭60・4・17受付)