

生体酸化阻害剤ロテノンの家兎排卵および卵胞 cytochrome oxidase, 3β -hydroxysteroid dehydrogenase の組織化学的活性におよぼす効果

京都大学医学部婦人科学産科学教室

越田 光伸 岡村 均 森 崇英

滋賀医科大学産科学婦人科学教室

竹中 章

Effect of Rotenone on Rabbit Ovulation and Histochemical Activities of Cytochrome Oxidase and 3β -hydroxysteroid Dehydrogenase of the Follicle

Mitsunobu KOSHIDA, Hitoshi OKAMURA and Takahide MORI

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

Akira TAKENAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Shiga University of Medical Science, Shiga

概要 排卵過程におけるミトコンドリアの役割を検討するため、hCG にて排卵を誘発した成熟雌性家兎にミトコンドリアの respiratory chain 阻害剤であるロテノンを投与した。排卵への影響は、卵胞の排卵点を實體顕微鏡下に観察し、また卵巣の連続切片を作製して卵胞中に卵が残存していることを確認することにより検討し、卵胞における 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) および cytochrome oxidase (CYO) の両酵素活性に与える影響は、組織化学的方法を用いて経時的に検討した。

ロテノン投与により、排卵は用量反応的に抑制された。hCG 投与後特に顆粒膜細胞で急速に増大する 3β -HSD, および CYO の両酵素活性はロテノン投与により著明に抑制された。

以上の結果から hCG 投与後卵胞顆粒膜細胞において急速に増大する生体酸化能は、排卵期卵胞における steroid 産生酵素の誘導や排卵現象に重要な役割を果たしているものと考えられる。

Synopsis Various doses of rotenone, an inhibitor of respiratory chain, were administered to mature female rabbits concomitantly with an ovulatory dose of hCG. The effect of rotenone on ovulation was studied by counting the ovulated stigma under a dissecting microscope. Histochemical studies on the activities of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) and cytochrome oxidase (CYO) in follicles at various intervals after hCG-rotenone injections were also performed to investigate the role of mitochondrial oxidation in the ovulatory process.

Rotenone inhibited the hCG-induced ovulation in a dose respondent manner and reduced the sudden hCG-induced increase in the histochemical activities of 3β -HSD and CYO of granulosa cells.

It is suggested that the activation of mitochondrial oxidation in the ovulating follicle is mandatory for ovulation and the induction of steroidogenic enzymes in granulosa cells.

Key words: Ovulation • Rotenone • 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase • Cytochrome oxidase • Histochemistry

緒 言

LH-surge 以後の排卵期卵胞顆粒膜細胞において、超微形態学的にミトコンドリアが大型化し、cristae も層板状を呈していたものが小管状を呈するように形態変化することが観察されてお

り³⁾⁵⁾¹²⁾、組織化学的検討では家兎卵胞顆粒膜細胞において hCG 投与後 Krebs's cycle の marker enzyme である succinate dehydrogenase および respiratory chain の末端に位置する cytochrome oxidase の両酵素活性が急速に増大することが報

告されている¹⁾。また, PMS にて前処理し, hCG にて過排卵誘発を行つた雌性未熟ラットの卵巢中 cytochrome oxidase (CYO) 活性は, hCG 投与後有意に上昇することをわれわれは確認しており¹⁰⁾, 排卵期には卵巢, 特に顆粒膜細胞において生体酸化能が亢進していると推察される。

本報告では, ミトコンドリアの排卵期における役割を検討するため, respiratory chain の特異的阻害剤であるロテノンを, hCG にて排卵誘発をした成熟雌性家兎に投与し, 排卵におよぼす影響を検討するとともに, 卵胞における CYO および 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) 酵素活性におよぼす影響を組織化学的に検討した。

材料および方法

3.0kg 前後の成熟雌性家兎 (日本白色種) を, 26℃の空調飼育室にて, 14:10の light:dark cycle 環境下で, 固型飼料(オリエンタル酵母工業 KK)にて飼育し実験に供した。排卵誘発を目的として hCG 100iu を耳静脈より投与し, 同時にロテノン1~10mg/kg を ethanol 1ml にて溶解後 2%

gum acasia solution 10ml との懸濁液としたものを腹腔内に投与した。投与後 3, 6, 9, 12, 15, 18 時間目にネンブタール麻酔下を開腹し両側卵巢を摘出した。実体顕微鏡で排卵点の有無を確認後, ただちに一侧卵巢は cryo-M-bed で包埋, 凍結し, cryostat で16 μ m の新鮮凍結切片を作製した。既に報告した方法¹⁾を用いて CYO および 3 β -HSD の両酵素活性を組織化学的に検討した。もう一方の卵巢は, Bouin 固定を行つた後, 上昇アルコール系列にて脱水しパラフィンに包埋した。連続切片を作製し, ヘマトキシリン, エオジンにて染色後, 卵が卵胞内に残存しているか否かを光顕にて観察した。

結 果

i) hCG にて誘発した家兎排卵におよぼすロテノンの効果

hCG のみを投与した家兎では, 投与後12時間で100%排卵し, 平均排卵数は6.4であつた。hCG と同時にロテノンを投与した群の12時間後の排卵率は1mg/kg 投与群で60%, 2mg/kg 投与群で50%,

表1 Effect of rotenone on rabbit ovulation induced by hCG

dose of rotenone mg/kg	hours after hCG	No. of rabbits ovulated/ No. of rabbits treated (%)	No. of ovulated follicle	No. of ovulated follicle per ovulated rabbit
0	3	0/5 (0.0)	0	0
	6	0/5 (0.0)	0	0
	9	1/5 (20.0)	5	5
	12	5/5 (100.0)	32	6.4
1	3	0/3 (0.0)	0	0
	6	0/3 (0.0)	0	0
	9	0/3 (0.0)	0	0
	12	3/5 (60.0)	11	3.7
2	15	2/3 (66.7)	9	4.5
	3	0/4 (0.0)	0	0
	6	0/3 (0.0)	0	0
	9	0/3 (0.0)	0	0
4	12	2/4 (50.0)	5	2.5
	15	2/3 (66.7)	6	3.0
	3	0/3 (0.0)	0	0
	6	0/3 (0.0)	0	0
10	9	0/3 (0.0)	0	0
	12	1/5 (20.0)	2	2
	15	1/4 (25.0)	2	2
	18	0/4 (0.0)	0	0

4mg/kg 投与群で20%, 10mg/kg 投与群で0%となつた。排卵した家兎の12時間後における平均排卵数をみると1mg/kg 投与群で3.7, 2mg/kg 投与群で2.5, 4mg/kg 投与群で2, 10mg/kg 投与群では0となり, ロテノンはhCG投与後12時間の排卵率, および平均排卵数を用量反応的に抑制した。またロテノンを1mg~4mg/kg 投与した群のhCG投与後15時間の排卵率, 平均排卵数は12時間目よりやや上昇するが10mg/kg 投与群では18時間目でも排卵した家兎は認めなかつた(表1)。

卵が卵胞内に残存しているか否かを検討するために, 一部家兎を用いて, 摘出卵巣の連続切片を作製して光顕的観察を行った。写真1に示すごとく実体顕微鏡で排卵点の認められない卵胞では, 卵は卵胞内に残存し, 排卵は確かに阻害されていることが確認された。

ii) 組織化学的に検出されるCYO活性におよぼすロテノンの効果

顆粒膜細胞層においては, hCG投与前にはほとんど本酵素活性を認めないが, hCG投与3時間後には強い活性を認め, 6, 9, 12時間においても持続して強い活性を認める¹⁾。一方, 1mg/kgのロテノンを投与するとhCG投与3時間目の活性はやや低下し, 6, 9, 12, 15時間後でも同様の傾向が認められた。4mg/kgのロテノンを投与すると3時間目での活性はほとんど検出できず, 6, 9, 12, 15時間目でも同様に本酵素活性はほとんど検出できなかつた。内荏膜層においては, 本酵素はhCG投与前から活性を示し, hCG投与3, 6, 9時間で強い活性を示すが, 12時間ではやや低下する¹⁾。1mg/kgのロテノンを投与するとこれら活性は抑制され, 4mg/kgのロテノンを投与すると著明に低下した(写真2~5)。

iii) 組織化学的に検出される 3β -HSD活性におよぼすロテノンの効果

顆粒膜細胞層においては, hCG投与前には本酵素活性は認めないが, hCG投与3時間後には強い活性を認め, 6, 9, 12時間目でも強い活性は持続する¹⁾。1mg/kgのロテノン投与群では, hCG投与3時間後の本酵素活性はやや抑制され, この傾向は6, 9, 12, 15時間後でも認められた。4mg/kg

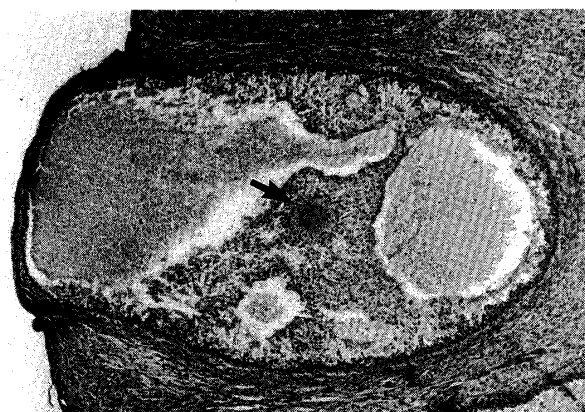


写真1 Light microscopic photograph of rabbit ovarian follicle 15 hours after hCG and rotenone. Note ovum (arrow) still retained in the unruptured follicle. $\times 40$

のロテノン投与群では, 投与後3時間での活性は検出できなくなり, 6, 9, 12, 15時間目でも本酵素活性は検出できなかつた。内荏膜層ではhCG投与前より本酵素活性を認め, 3, 6時間後には強くなり, 9, 12時間後ではやや低下するが¹⁾, 1mg/kgのロテノン投与によつて投与後3, 6, 9, 12, 15時間で本酵素活性への影響はほとんど認めない。4mg/kgのロテノンを投与すると, hCG投与3時間後で認められる活性増加は抑制されており, 同様の抑制は6, 9, 12, 15時間後でも認められた(写真6~9)。

考 察

本実験に用いたロテノンはミトコンドリアの生体酸化阻害剤として知られており, その作用部位はrespiratory chainの前半部分, すなわちdiphosphopyridine nucleotideとflavoproteinの電子伝達を阻害する点にあり, またin vitroで組織の酸素摂取や消費を減少させることが報告されている¹¹⁾¹³⁾。したがつて, in vivoにロテノンを投与することによりrespiratory chainを阻害することになり, エネルギー産生の減少と共に酸素消費の減少という現象が生じるものと考えられる。

家兎において, hCG投与後の排卵期に卵胞, 特に顆粒膜細胞において組織化学的に検出されるCYO活性, 3β -HSD活性は急速に増大するが¹⁾, これら酵素の活性化はロテノンを投与することにより抑制された。このことは, hCG刺激後の排卵

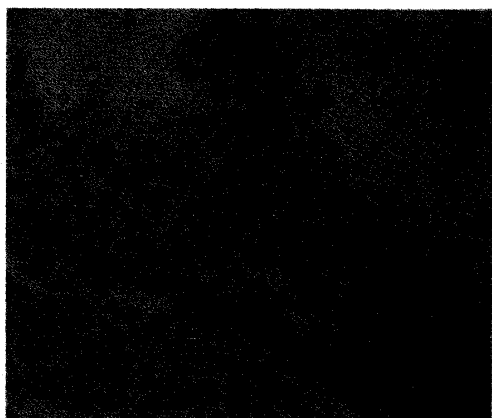


写真5



写真9

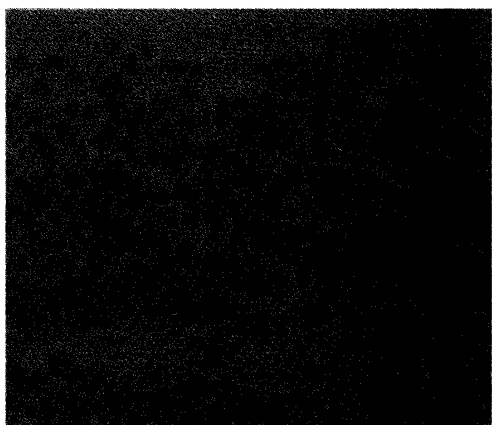


写真4



写真8

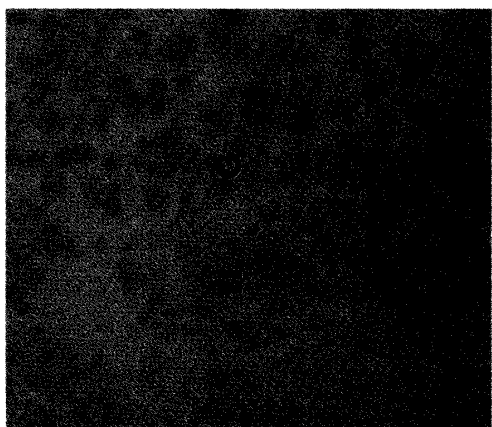


写真3



写真7

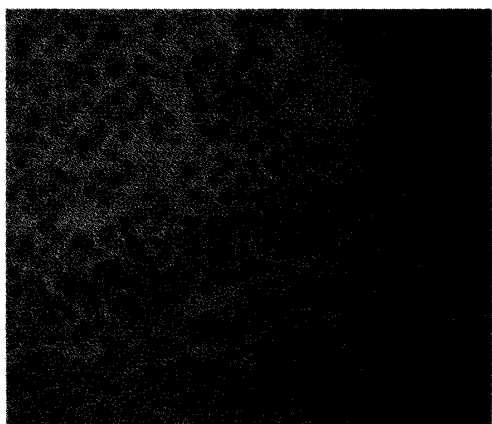


写真2

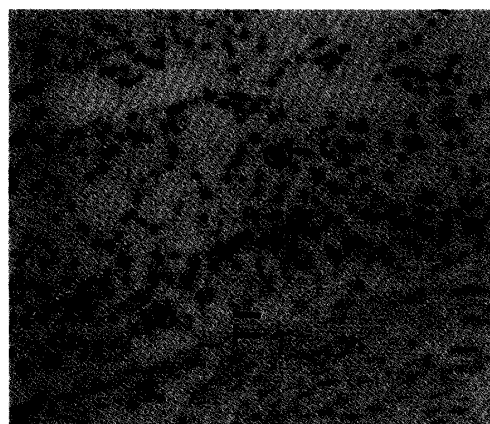


写真6

期顆粒膜細胞において急速に生じるステロイド産生酵素の誘導合成がロテノン投与による respiratory chain の抑制により阻害されたためと考えられ、ゴナドトロピン刺激による顆粒膜細胞の黄体化には大量のエネルギーを必要とする可能性が示唆される。PMS にて前処置をし、hCG にて過排卵誘発を行つた未熟ラットにおいてみられる hCG 投与後の卵巣中 CYO 活性および血中プロゲステロン値の有意の上昇は、ロテノンを hCG と同時に投与することにより有意に抑制され、また排卵もロテノンにより用量反応性に抑制されることを我々はすでに観察している¹⁰⁾。ステロイド生合成にはエネルギーが必要で、黄体組織ではコレステロールからプロゲステロンへの変換は NADPH 濃度に依存性であるが、好氣的解糖系で得られる大量の ATP および NADH を用いて、NADP⁺ の NADH による還元を触媒する ATP-dependent transhydrogenase が黄体組織に存在することが示唆されており¹⁵⁾、ロテノンによる排卵期でのプロゲステロン産生抑制は、生体酸化抑制による ATP, NADH 産生低下、すなわちステロイド生合成に必要なエネルギー産生低下によるものではないかと考えている。従つて、今回の家兎での観察結果を併せて考えると排卵刺激後に顆粒膜細胞が獲得するステロイド産生能は、ステロイド合成酵素の誘導およびステロイド生合成に直接必要なエネルギーに依存しており、このために生体酸化能が急速に活性化されるものと推論される。

排卵刺激後には卵巣血流量は増大する⁹⁾が、排卵直前には卵胞壁頂部の血流は血栓の形成²⁾等によりむしろ停滞することが家兎卵胞の血管鑄型を走査電顕で観察することにより示唆されており⁹⁾、排卵刺激後の卵胞においては生体酸化の亢進と相まって卵胞壁頂部における環境—CO₂濃度、pH 等—が著しく変化しこの部分の microenvironment が酸性に傾いている可能性が大いに推測される。これは排卵期卵胞において卵胞破裂に重要な要素であるコラーゲンの消失⁶⁾¹⁴⁾に好都合であると考えられる。なぜならコラーゲンの消失は中性域で活性をもつものと酸性域で活性をもつ collagenolytic enzyme の活性化によつて

生じ⁷⁾⁸⁾、コラーゲン線維はまず neutral collagenase により分解され、次いでこのコラーゲンの断片は酸性域で活性を示す collagenolytic cathepsin によつて消化される¹⁶⁾が、microenvironment の酸性化はこの cathepsin の活性化に役立つと考えられるからである。すなわち、排卵刺激後の顆粒膜細胞における生体酸化の亢進は、ステロイド産生酵素の誘導やステロイド産生に直接必要なエネルギー供給のために不可欠であるが、また一方では大量の酸素消費と共に二酸化炭素産生を伴っていると考えられ、卵胞壁頂部結合組織の環境を低酸素状態としその微少環境を酸性にして collagenolytic cathepsin の活性化にも寄与している可能性も考えられる。

今回家兎においてもロテノン投与により排卵が抑制されたが、これはステロイド産生の抑制による結果、あるいはこの collagenolytic cathepsin の活性化の抑制の結果、さらには collagenase そのものの誘導を抑制した結果などの可能性が考えられるが、その詳細は現在検討中である。

排卵刺激後に家兎卵胞顆粒膜細胞における生体酸化能の著明な活性化は、顆粒膜細胞のステロイド産生能獲得に必要なステップであると共に、排卵現象の完遂のため必要なステップであると考えられる。

写真説明

写真2 A light microscopic photograph of rabbit ovarian follicle demonstrating cytochrome oxidase (CYO) activities before administration of hCG. No activities are detectable on granulosa cell layer (G). Strong activities are observed on theca interna (TI). ×200

写真3 CYO activities 6 hours after hCG. Strong activities are detectable on both granulosa cell layer (G) and theca interna (TI). ×200

写真4 CYO activities 6 hours after hCG and 1mg/kg of rotenone. Slight activities are observed on granulosa cell layer (G). Moderate activities are observed on theca interna (TI). ×200

写真5 CYO activities 6 hours after hCG and 4mg/kg of rotenone. No activities are observed on granulosa cell layer (G). Slight activities are observed on theca interna (TI). ×200

写真6 A light microscopic photograph of rabbit ovarian follicle demonstrating 3β-hydroxysteroid

dehydrogenase (3β -HSD) activities before hCG. No activities are detectable on granulosa cell layer (G). Slight activities are observed on theca interna (TI). $\times 200$

写真7 3β -HSD activities 6 hours after hCG. Strong activities are detectable on both granulosa cell layer (G) and theca interna (TI). $\times 200$

写真8 3β -HSD activities 6 hours after hCG and 1mg/kg of rotenone. Slight activities are observed on granulosa cell layer (G). Strong activities are observed on theca interna (TI). $\times 200$

写真9 3β -HSD activities 6 hours after hCG and 4mg/kg of rotenone. No activities are detectable on granulosa cell layer (G). Slight activities are observed on theca interna (TI). $\times 200$

文 献

1. 越田光伸, 竹中 章, 神崎秀陽, 竹森和正, 岡村 均: 排卵期家兎卵胞における respiratory system の組織化学的研究. 日産婦誌, 36: 359, 1984.
2. 奥田雄二, 岡村 均, 神崎秀陽, 竹中 章, 森本幸己, 西村敏雄: 排卵過程における家兎卵胞壁毛細血管の超微形態学的研究. 日産婦誌, 32: 739, 1980.
3. 竹中 章, 岡村 均, 矢島康雄, 神崎秀陽, 西村敏雄: 排卵期ヒト卵胞顆粒膜細胞の微細構造. 日産婦誌, 32: 205, 1980.
4. Blasco, L., Wu, C.H., Flickinger, G.L., Pearlmutter, D. and Mikhail, G.: Cardiac output and genital blood flow distribution during the preovulatory period in rabbits. Biol. Reprod., 13: 581, 1975.
5. Bjersing, L. and Cajander, S.: Ovulation and the mechanism of follicle rupture. VI. Ultrastructure of membrane granulosa of rabbit graafian follicles prior to induced ovulation. Cell. Tiss. Res., 153: 1, 1974.
6. Espey, L.L.: Ultrastructure of the apex of the rabbit graafian follicle during the ovulatory process. Endocrinology, 81: 267, 1967.
7. Espey, L.L.: Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. Biol. Reprod., 10: 216, 1974.
8. Espey, L.L. and Coons, P.J.: Factors which influence ovulatory degradation of rabbit ovarian follicles. Biol. Reprod., 14: 233, 1976.
9. Kanzaki, H., Okamura, H., Okuda, Y., Takenaka, A., Morimoto, K. and Nishimura, T.: Scanning electron microscopic study of rabbit ovarian follicle microvasculature using resin injection-corrosion casts. J. Anat., 134: 697, 1982.
10. Koshida, M., Takenaka, A., Okamura, H. and Mori, T.: Inhibition of ovulation in PMSG/hCG-treated immature rats by rotenone, a specific inhibitor of mitochondrial oxidation. J. Reprod. Fert., in press.
11. Lindahl, P.E. and Öberg, K.E.: The effect of rotenone on respiration and its point of attack. Exptl. Cell Res., 23: 228, 1961.
12. Mori, T., Takenaka, A., Yoshida, Y., Suzuki, A., Fujita, Y. and Nishimura, T.: Preovulatory changes in morphology of rabbit ovarian follicles. Endocrinol. Japon, 26: 379, 1979.
13. Öberg, K.E.: The site of the action of rotenone in the respiratory chain. Exptl. Cell Res., 24: 163, 1961.
14. Okamura, H., Takenaka, A., Yajima, Y. and Nishimura, T.: Ovulatory changes in the wall at the apex of the human graafian follicle. J. Reprod. Fert., 58: 153, 1980.
15. Uzgiris, V.I., McIntosh, E.N., Alonso, C. and Salhanic, H.A.: Role of reversed electrone transport in bovine corpus luteum mitochondrial steroid synthesis. Biochem., 10: 2916, 1971.
16. Woessner, J.F. Jr.: Biological mechanisms of collagen resorption. In Treatise of Collagen. (eds. G.N. Ramachandran and B.S. Gould), vol. 2B: 253. Academic Press, New York, 1968.

(特別掲載 No. 5979 昭61・6・3受付)