

妊娠前半期ラットに対する clomiphene citrate の効果 —妊娠黄体中の steroidogenic enzymes の活性について—

Effect of Clomiphene Citrate on the Activities of Steroidogenic Enzymes in Corpora Lutea of Early Pregnant Rats

京都大学医学部婦人科学産科学教室 (主任: 西村敏雄教授)

岡崎 武志 Takeshi OKAZAKI 岡村 均 Hitoshi OKAMURA
本橋 亨 Toru MOTOHASHI

関西医科大学産科婦人科学教室

余 語 郁 夫 Ikuo Yogo

概要 妊娠前半期のラットに clomiphene citrate (clomid) を投与したところ、全例において妊娠が阻害され流産像が観察された。本報告では、abortifacient として 100% 有効であることが判明した clomid の妊娠黄体への作用を詳細に検索するため、steroids 代謝に関与している酵素を中心に黄体中の 7 種類の酵素活性を測定した。すなわち、steroidogenesis に関与している glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH), malic enzyme, ATP citrate lyase, Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD); 解糖系の key enzymes の 1 つである pyruvate kinase; および progesterone 分解の first step である 20α -hydroxysteroid dehydrogenase (20α -HSD) の 7 種類の酵素活性について黄体粗抽出液を用いて測定した。その結果、clomid 投与ラットの黄体では、G6PDH, malic enzyme, ATP citrate lyase などの steroidogenic enzymes に中等度の活性低下がみられたが、luteolysis とともに黄体中で特異的に活性化される 20α -HSD は殆ど活性の増加がみられなかった。これに対して、自然に luteolytic な変化を起していると考えられる産褥ラットの黄体では、steroidogenic enzymes のなかで malic enzyme および ATP citrate lyase は著しい活性低下がみられたが、G6PDH は逆に活性化されていて対照群よりも高い活性を示した。同時に 20α -HSD は顕著な活性の増加がみられた。

以上の結果から、clomid 投与ラットの黄体では 20α -HSD が活性化される以前に既に steroidogenic enzymes の活性が低下して luteolytic な変化が進行しつつあり、同時に妊卵の吸収が始まっていることを示していて、clomid が mild な luteolytic agent であることが明らかになった。

また、estradiol benzoate を妊娠前半期のラットに投与したところ全例で流産像がみられた。従って、clomid による luteolysis の作用機序としては、clomid 投与により血中に増加した estrogens を介しての間接的な効果が主たる要因として考えられる。

緒 言

Clomiphene citrate (clomid) は、臨床的には排卵誘発剤として使用されているが、本剤を妊娠ラットに投与すると、妊卵は吸収され、妊娠黄体の重量は有意に減少する (Chatterjee et al., 1974)。また、人の妊娠黄体の slice を用いた in vitro の実験系で incubation medium 中に clomid を大量

に添加すると、steroidogenesis が抑制されたという報告もあり (Hammerstein, 1973), clomid が妊娠黄体に対しては luteolytic に作用していることが考えられる。

妊娠前半期ラットに prostaglandin $F_{2\alpha}$ など abortifacient agent を投与すると、妊卵は吸収され、黄体細胞は微細構造上 luteolytic な所見が観

察される (Okamura et al., 1972). 20α -HSD は黄体細胞の微細構造上の変化によく対応して活性が変動し、黄体の機能を正確に反映する酵素であることが明らかにされている (Wiest et al., 1970; 岡崎他, 1974) が, aminoglutethimide を妊娠ラットに投与した場合, 20α -HSD の活性増加が著しくない時期に既に G 6 P D H および malic enzyme の活性の低下がみられた (岡崎他, 1975). 本論文では, abortifacient agent として 100% 有効であることが判明した clomid を, 妊娠前半期のラットに投与し, 妊娠黄体中の G 6 P D H, 6 P G D H, malic enzyme, ATP citrate lyase, 3β -HSD の 5 つの steroidogenic enzymes の活性を, pyruvate kinase, 20α -HSD とともに測定した結果, 20α -HSD 活性と同時に G 6 P D H, malic enzyme および ATP citrate lyase の活性を測定することによつて, luteolysis の程度を一層正確に知ることができたので報告する.

実験材料および方法

本実験には体重 240~270gm の Wistar 系妊娠ラットを使用した. 妊娠ラットは日本動物株式会社より購入し, 膣栓中に精子を確認した翌日を妊娠第 1 日とした. 妊娠 6 日目あるいは 7 日目から, 生理食塩水中に 3.0mg/ml の割合で溶解した clomid を, 体重 1 kg 当り 3 および 6 mg の量で 12 時間毎に連続 3 および 5 回筋注投与し, 最終投与後およそ 15 時間目および 63 時間目にエーテル麻酔下で開腹し, 妊卵の着床部位を観察し, 妊娠黄体を卵巣より核出した.

Enzyme preparations: 卵巣より 1 個ずつ核出した妊娠黄体を 0.25M sucrose 中で 10mg of wet weight/ml の割合で 0°C にて homogenize し, homogenate を Spinco model L preparative ultracentrifuge を用いて 105,000 g で 60 分間遠心したのち, 上清画分を G 6 P D H, 6 P G D H, malic enzyme, pyruvate kinase, ATP citrate lyase および 20α -HSD の酵素源として用いた. また, 沈澱部分に 0.25M sucrose を加えて, rehomogenize し, 2,000 g で 5 分間遠心した上清画分を 3β -HSD の酵素源として用いた.

Enzyme assays: 20α -HSD および 3β -HSD は, 既報と同様の方法で測定した (岡崎他, 1974). G 6 P D H および 6 P G D H は H-U. Bergmeyer の記載に従い (H-U. Bergmeyer, 1974), malic enzyme は Hsu & Lardy の方法 (Hsu & Lardy, 1969), ATP citrate lyase は Takeda らの方法 (Takeda et al., 1969), pyruvate kinase は Bücher & Pfeiderer の方法 (Bücher & Pfeiderer, 1955) に従つてそれぞれ酵素活性を測定した. 酵素活性の測定は D P N H あるいは T P N H の 334 μm における吸収の増加, または D P N H の吸収の減少を, Eppendorf spectrophotometer を用いて 37°C で経時的に記録した. 酵素活性の 1 単位は上記の条件下で 1 分間に变化する cofactor の μmole 数で表現した. 蛋白濃度は Lowry et al. の方法 (Lowry et al., 1951) に従つて, 牛血清アルブミンを標準蛋白として測定した. 酵素の比活性は酵素蛋白 1 mg 当りの単位数として表現した.

本実験に使用した clomiphene citrate (clomid) および estradiol benzoate (オパホルモンペンツァート) は, 夫々塩野義製薬株式会社および帝国臓器製薬株式会社より供与されたものである.

成績

表 1 に示すように, 妊娠 6 日目乃至 7 日目のラットに clomid を 3 mg/kg および 6 mg/kg の量で夫々 12 時間毎に連続 3 回および 5 回筋注投与し, 最終投与の約 15 時間後に開腹したところ, 全例妊娠は維持されていて着床部位の異常はみられなかった. しかし, clomid の投与量の増加とともに黄体中の G 6 P D H 活性の低下がみられた. Clomid を 6 mg/kg の量で連続 5 回投与した後およそ 63 時間経過して開腹すると全例において流産像が観察された. 同時に, 黄体中の G 6 P D H および malic enzyme 活性は生理食塩水のみを投与した対照群の 66~68% に低下していた. さらに, ATP citrate lyase は clomid 投与により活性が対照群の 72% に低下していた. 6 P G D H は clomid 投与による活性の変動はみられなかった. 3β -HSD および pyruvate kinase 活性も clomid 投与によつて変化がみられず, また 20α -HSD は 17 例中 10

表1 Effect of clomiphene citrate and estradiol on enzyme activities in corpora lutea of early pregnant rats.

Treatment	Saline	Clomiphene citrate			Estradiol
		0.75mg × 3	1.5mg × 5	1.5mg × 5	
No. of rats	(8)	(4)	(2)	(15)	(3)
Hrs. after last injection	ca. 15	ca. 15	ca. 15	ca. 63	ca. 15
Wet weight of corpora lutea	1.99±0.56mg	1.21±0.20	1.36±0.26	1.46±0.29	1.24±0.14
Effect on pregnancy	intact	intact	intact	aborted	aborted
Enzyme activities (mU/mg protein)					
G6PDH	298±32	237±55	191±20	197±31	351±45
Malic enzyme	413±136	—*	522±141	280±93	298±35
6PGDH	85.5±3.6	—*	—*	92.2±18.5	—*
ATP citrate lyase	11.3±2.1	—*	—*	8.2±1.5	—*
3β-HSD	35.2±8.6	24.4±1.5	21.8±4.0	32.2±8.4	31.9±6.2
Pyruvate kinase	1206±168	—*	—*	1486±209	—*
20α-HSD	0	1.40±0.86	0	(10): 0 (4): 2.7±0.8 (1): 11.2	**

* Enzyme activities were not determined.

** The specific activities of 20α-HSD of three rats tested were 2.4, 3.0, and 29.2

表2 Enzyme activities in corpora lutea of 1 day post partum and clomid treated rats

Condition	Saline	1 day post partum	Clomid
No. of rats	(8)	(6)	(2)
wet weight of corpora lutea	1.99±0.56mg	3.79±0.49	1.04, 1.29
Enzyme activities (mU/mg protein)			
G6PDH	298±32	517±28	693, 516
Malic enzyme	413±136	112±25	207, 68
6PGDH	85.5±3.6	80.1±1.4	—*, —*
ATP citrate lyase	11.3±2.1	undetectable	—*, —*
3β-HSD	35.2±8.6	19.9±3.8	25.5, 11.2
Pyruvate kinase	1206±168	1043±310	—*, —*
20α-HSD	0	46.1±9.0	58.5, 56.0

* Enzyme activities were not determined.

例は活性を検出できなかつた。活性の認められた7例のなかで、4例はごく軽度の活性を示すにすぎなかつた(2.7±0.8mU/mg)が、2例は著しい活性を示し(表2)、1例は中等度の活性化がみられた。従つて、20α-HSD活性は大部分の例で(82%)活性化が認められなかつたか、活性化されていてもきわめて低活性のままであつたが、活性化の認められた例ではごく軽度の活性から著しい高値を示すものまで種々の程度の活性値を示

していた。

表2には、産褥第1日のラットの黄体中の酵素活性を示している。この表から明らかかなように steroidogenic enzymesのうち、malic enzymeは対照群の29%という低値を示し、ATP citrate lyaseは活性をdetectできなかつた。しかし、6PGDH、pyruvate kinaseは殆ど活性の変動がみられなかつた。これに対してG6PDHは、対照群の170%以上という著しい活性を示し、

20 α -HSDも顕著に活性化されていた。表2には、clomid 投与によつて流産像のみられた17例のなかで、20 α -HSD が著しく活性化されていた2例についての酵素活性値をも併記した。産褥ラットの黄体と同様に、G 6 P D Hは著しく活性化されていて、malic enzyme 活性も低値を示していた。

Estradiol benzoate を妊娠7日目より、0.05mgの量で12時間毎に連続5回筋注投与し、最終投与後およそ15時間経過して開腹したところ、全例において妊娠は阻害され流産像がみられた。このestradiol 投与ラットの黄体では、表1に示すように、G 6 P D Hは既に活性化されていて対照群よりも高い活性がみられた。また、投与した3例は全て、20 α -HSD の活性化が認められたが、比活性は2.4, 3.0, 29.2mU/mg という軽度ないし中等度など、種々の活性を示していた(表1)。

考 察

20 α -hydroxysteroid dehydrogenase (20 α -HSD) は progesterone を黄体ホルモン活性に乏しい20 α -hydroxypregn-4-en-3-one へと転換する酵素であり、黄体機能が低下して luteolysis に特有の所見が観察されるとともに黄体中で活性化され、luteolytic な変化にきわめて特異的な酵素である (Wiest et al., 1970)。Clomid を妊娠前半期ラットに投与すると全例で流産像がみられたが、黄体中の20 α -HSD 活性は、17例中10例において活性を detect することができない程低値を示し、活性化のみられた7例のなかで、中等度の活性を示した1例、および顕著な活性化を示した2例を除くと、残り4例はごく軽度の活性を示したにすぎなかつた。これに対して、steroidogenic enzymes である G 6 P D Hおよび malic enzyme はともに活性が対照群の66~68%に低下していた。Steroids および fatty acids の de novo 合成の律速酵素である ATP citrate lyase は clomid 投与群では活性が、対照群の72%に低下していた。6 P G D H は、clomid 投与によつても活性の変化がみられなかつた。対照群ラットの黄体中の TPNH generating enzymes の比活性を比較すると(表1)、

6 P G D Hの比活性はG 6 P D Hおよび malic enzymeのそれの、夫々29%および20%にすぎず、黄体での steroidogenesis に必要な T P N Hの産生には、G 6 P D Hおよび malic enzyme が主として関与しているものと思われる。以上の結果は、clomid が abortifacient & luteolytic agent の1つであるが、黄体への作用が緩徐であり、20 α -HSDが活性化される以前の、ごく初期のluteolytic な変化を clomid 投与によつて観察できたことを示している。Aminoglutethimide を妊娠前半期のラットに投与した場合にも、20 α -HSD の活性が低値を示しているとき既に、G 6 P D Hおよび malic enzymeの活性の低下がみられた(岡崎他, 1975)。

産褥ラットの黄体では、malic enzyme は対照群の29%の活性を示すにすぎず、またATP citrate lyase は活性が低下して測定不能であつた(表2)。6 P G D Hには活性の変化はみられなかつたが、これらの酵素活性の変化から考察すると、産褥時の黄体では steroidogenesis が著しく低下しているものと思われる。しかし、G 6 P D Hは逆に対照群の170%以上に活性化されていた。Aminoglutethimide 投与時にも投与量を増加すると、20 α -HSD は中等度に活性化され、G 6 P D Hは対照群よりも高い活性を示した。Clomid 投与によつて流産した17例中、7例の黄体では20 α -HSD が1.5~58.5mU/mg という範囲で種々の比活性値を示したが、このことは、これら6例の黄体で、種々の程度に luteolysis が進行していることを示しているものと思われる。表2に示したように、20 α -HSD が著しく活性化されたときには、同時にG 6 P D Hも顕著に活性化されていた。このように、clomid や aminoglutethimide を投与して luteolysis の程度が進行すると、G 6 P D Hが活性化され、malic enzymeや ATP citrate lyase の活性が低下して、産褥ラットの黄体でみられる変化と、酵素活性型が一致していた。従つて、clomid を投与したラットの妊娠黄体では、20 α -HSD が活性化される以前に、steroidogenic enzymesの活性が低下してluteolyticな変化が進行

しつづつあるものと思われ、steroidogenic enzymes のなかで特に、G 6 P D H, malic enzyme, ATP citrate lyase の活性を測定することによつて、より一層早期に luteolysis の程度を知ることができるものと思われる。

Clomid による luteolysis の作用機序については、clomid を妊娠ラットに投与した場合、clomid は先ず hypothalamo-hypophyseal axis に作用して F S H の分泌を促進し、その結果卵巣において estrogens の合成が昂進し血中の estrogens 濃度が上昇していることが原因として考えられる。Estrogens が妊娠前半期のラットに luteolytic に作用していることは、妊娠ラットに直接 estrogens を投与し流産像がみられたことから明らかである(表1)。Estrogens の luteolytic な作用については妊娠ハムスターを用いた報告がある (Greenwald, 1965)。実際、clomid を投与した妊娠ラットの卵巣には、肉眼的にも poly-follicular な状態が観察され、組織学的にこれらの follicles では estrogens 産生細胞と目される内莖膜細胞の増殖がみとめられ、これらの細胞には酵素組織化学的に 3 β -HSD, G 6 P D H の活性が著しかつた。(岡村他, 未発表, 吉田他, 1975)。従つて clomid の投与によつて血中に増加した estrogens を介しての間接的効果により、clomid が luteolytic に作用しているものと思われる。このことは、clomid を投与した直後に開腹しても妊卵の着床部位には何ら異常がみられなかつたにも関わらず、その2日後には全例で流産像がみられた(表1)という効果の発現に要する時間経過からも支持されよう。

稿を終るに臨み御校閲いただきました西村敏雄教授に深謝いたします。

文 献

- 岡村 均, 岡崎武志, 余語郁夫: 未発表.
 岡崎武志, 岡村 均, 余語郁夫, 西村敏雄 (1974):
 日産婦誌, 26: 1342.
 岡崎武志, 岡村 均, 余語郁夫(1975): 日産婦誌,
 27: 569.
 吉田吉信, 岡村 均, 杉並 洋(1975): 日産婦誌,
 27: 725.
 Bergmeyer, H-U., Gawehn, K. and Grassl, M. (1974):
 In H-U. Bergmeyer (Editor), Methods of enzymatic analysis, Academic Press, New York, p. 458, 500.
 Bucher, T. and Pfeiderer, G. (1955): In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors), Methods in enzymology, Vol. 1, Academic Press, New York, p. 435.
 Chatterjee, A., Gupta, T. and Sengupta, K. (1974):
 Acta Endocr. (Kobenhavn), 75: 173.
 Greenwald, G.S. (1965): Endocrinology., 76: 1213.
 Hammerstein, J. (1973): In T. Hasegawa, M. Hayashi, F.J.G. Ebling and I.W. Henderson (Editors), Proceedings of the VII World Congress on Fertility and Sterility, Excerpta Medica, Amsterdam, p. 640.
 Hsu, R.Y. and Lardy, H.A. (1969): In S.P. Colowick, N.O. Kaplan and J.M. Lowenstein (Editors), Methods in enzymology, Vol. XIII, Academic Press, New York, p. 230.
 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.A. and Randall, R.J. (1951): J. Biol. Chem., 193: 265.
 Okamura, H., Yang, S., Wright, K.H. and Wallach, E.E. (1972): Fertil. Steril., 23: 475.
 Strauss, III, J.F. and Stambaugh, R.L. (1974): Prostaglandins., 5: 73.
 Takeda, Y., Suzuki, F. and Inoue, H. (1969): In S.P. Colowick, N.O. Kaplan, and J.M. Lowenstein (Editors), Methods in enzymology, Vol. XIII, Academic Press, New York New York, p. 153.
 Wiest, W.G. and Kidwell, W.R. (1970): In K. Mckerns (Editor), The Gonads, Appleton-century Crofts, New York, p. 295.
 (No. 2917 昭50・5・12受付)