ヒト月経黄体の prostaglandins 産生とその意義

札幌医科大学産婦人科学講座

(主任: 橋本正淑教授)

遠藤俊明, 山本弘, 田中昭一

Effect of Prostaglandins(PGs) on Progesterone Production by Human Cultured Luteal Cells and their Ability of PGs Production

Toshiaki ENDO, Hiroshi YAMAMOTO and Shoichi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology,

Sapporo Medical College

(Director: Prof. Masayoshi Hashimoto)

The present study was designed to investigate whether or not prostaglandins(PGs) were produced by human luteal cells(HLC) and their effects on the luteal cells by monolayer culture. The following results were obtained.

Cultured HLC secreted progesterone(P), prostaglandin F(PGF) and prostaglandin E(PGE) into a medium at concentrations of 276.6 ± 38.6 , 1.95 ± 0.36 , 2.44 ± 0.45 ng/ml/ 1×10^5 cells/day (mean $\pm$ SE), respectively. Cultured HLC was able to convert ^{14}C -arachidonic acid to ^{14}C -PGF $_{2\alpha}$, ^{14}C -PGE $_2$.

These two results indicated that HLC had the ability to produce PGF and PGE.

Cultures were carried out in the presence of indomethacin (Ind), PGF $_{2\alpha}$ and PGE $_2$ alone as well as in a combination.

P production by HLC was reduced in the presence of Ind. P production in the presence of Ind+PGE $_2$ was more than that in the presence of Ind alone. There was no significant difference in P production between the presence of Ind and Ind+PGF $_{2\alpha}$.

It was concluded that HLC had the ability to produce PGs and that PGE $_2$ significantly stimulated P production in as low concentrations as HLC could produce physiologically while PGF $_{2\alpha}$ did not.

緒 言

黄体の機能維持, 退縮には種々の因子が作用し, Prostaglandins (PGs) もその一つである。ヒトでは黄体機能に作用する PGs の由来は必ずしも明確ではない。また PGs の作用が luteotropic か luteolytic かについても一定した見解はない。PGs と黄体機能との関係は動物種によって異っており動物実験の成績が必ずしもヒトには当てはまらない。したがってヒト黄体機能に関する研究はヒト黄体細胞を用いた実験が望ましい。また従来ヒト黄体を用いた実験は黄体組織の short term incu-

bation が主体であった³⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²²⁾²⁴⁾。

今回, われわれはヒト月経黄体単層細胞培養法を用いて黄体自体の PGs 産生能の有無を検討し, また PGs の黄体の progesterone (P) 産生への影響を検討したので報告する。

研究材料ならびに方法

1. 対象

子宮筋腫, 上皮内癌等の卵巣疾患以外で子宮摘出術を施行した30才から42才までの正常月経周を有する婦人で, 同意の得られた30名より月経黄体を採取した。黄体の採取時期は最も steroidogenesis が盛んで多くの黄体細胞を得られやすい黄体期中期とし, それは月経歴, 基礎体温, 子宮内膜日付け診によった。

2. 実験試薬

実験に使用した試薬は以下の通りである。Eagle's MEM (ニッスイ), penicillin・streptomycin (GIBCO), fetal calf serum (FCS, GIBCO) HEPES (SIGMA), type I dispase (合同酒精), type I collagenase (SIGMA), indomethacin (SIGMA), [$1-^{14}\text{C}$] -arachidonic acid (AA) (55mCi/m mol, NEN), [$5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, -^3\text{H}$ (N)] -PGF $_2\alpha$ (150Ci/m mol, NEN), [$5, 6, 8, 11, 12, 14, 15-^3\text{H}$ (N)] -PGE $_2$ (100Ci/m mol, NEN) を使用した。PGF $_2\alpha$, PGE $_2$, thromboxane B $_2$ (Tx B $_2$), 6-keto-PGF $_1\alpha$ は小野薬品より, hCG, Dehydroepiandrosterone (DHEA) は帝国臓器より提供を受けた。

3. 培養液

培養液は Eagle's MEM に penicillin 100U/ml・streptomycin 100 μ g/ml と20%の濃度で FCS 添加し, HEPES と NaHCO $_3$, NaOH を併用し pH を7.2~7.4に調整した。FCS の濃度は樋口らの報告⁷⁾に従った。

4. 培養法

無菌的に, 出来る限り周辺組織が混入しないように採取した黄体を直ちに培養液中で約1mm³以下に細切した。それを dispase1000PU/ml と collagenase200IU/ml を含んだ培養液中で37°C, 40分間 incubate した。それを2枚重ねガーゼで汙過し, 組織片を除去した。汉過した細胞浮遊液を600rpm で3分間遠心し, 上清を除去後, 細胞沈渣に再び培養液を加えて pipetting した。出来る限り赤血球を除去し, 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) 活性陽性細胞を多く得るためこの操作を3~5回繰り返した。1 $\times 10^5$ cells/ml に調整した細胞浮遊液を35mm culture dish (Corning 社) に1.5ml づつ植えた。なお, 黄体期中期黄体1個から20~45dish 分の黄体細胞が得られた。培養条件は5%CO $_2$, 95%air, 37°Cで, 培養液は24時間毎に全量交換した (Fig. 1)。

5. 実験項目

培養黄体細胞が dish に付着した培養開始24時間目に培養液全量交換を行なった。その後試薬無添加の control の細胞, および各試薬の添加の細胞を24時間培養し以下の項目について検討した。

- ①培養液に分泌された PGF, PGE, P 濃度の測定
- ②培養細胞に ^{14}C -AA を添加した時の ^{14}C -PGs への転換率
- ③hCG1.0 IU/ml を培養細胞に添加した時の P 産生の増加率の検討, indomethacin100 μ g/ml (Ind) を培養細胞に加え PGs 産生を抑制した時の P 産生への影響
- ④黄体自身が産生する PGF, PGE の P 産生への各々の作用を検討するため Ind 添加時の P 産生量を control として Ind+PGF $_2\alpha$ 1 ng/ml, Ind+PGF $_2\alpha$ 10 ng/ml, Ind+PGE $_2$ 1 ng/ml, Ind+PGE $_2$ 10 ng/ml 添加時の P 産生量と比較した。なお, Ind, PGF $_2\alpha$, PGE $_2$ は ethanol

Fig. 1. Culture method of human luteal cells.

溶解後培養液に添加した。培養液の ethanol の濃度は各試薬とも0.1%以下であった。また、黄体によりホルモン産生量に差があるため各添加実験での control との比較は同一黄体より採取した細胞間で行った。また、 3β -HSD 活性、 ^{14}C -AA から ^{14}C -PGs への転換率をもとめる時の control の細胞として早川ら⁶⁾の樹立した卵巣ムチン性嚢胞腺癌の培養株である OMC-1 を用いた。

6. PGs の抽出、分離、測定

培養液から PGs の抽出は Auletta et al²⁾の方法により酢酸エチルで行った。PGs の分離は稲川ら⁹⁾の方法に準じて silica gel の thin layer chromatography (TLC, Kieselgel 60, Merck) にて行った。この時 TLC のプレートの両端には $\text{PGF}_2\alpha$, PGE_2 , 6-keto- $\text{PGF}_1\alpha$ の混合標品をスポットした。展開溶媒は酢酸エチル：2, 2, 4 トリメチルペンタン：酢酸：水=11：5：2：10 (V/V) の有機層を用いた¹⁹⁾。そして標品と同じ Rf 値の部位からゲルを掻きとった。ゲルから PGs の抽出は0.5%酢酸メタノールにて行った⁹⁾。抽出、分離までの回収率は ^3H - $\text{PGF}_2\alpha$, ^3H - PGE_2 を上記と同一の操作をして求めると、それぞれ $78.5 \pm 2.8\%$, $72.3 \pm 2.2\%$ であった。PGF, PGE の測定は日本トラベノール社の RIA kit を用いた。PGF, PGE の変動係数は intra-assay がそれぞれ10.3%, 11.4%で inter-assay がそれぞれ11.5%, 13.6%であった。

なお ^{14}C -AA から ^{14}C -PGs への転換率を求める実験において、培養液からの ^{14}C -PGs 抽出液は未代謝の ^{14}C -AA を多量に含んでいるため、Kort et al¹¹⁾の方法によりケイ酸カラムクロマトグラフィにより ^{14}C -AA を除去したものを TLC で分離した。また上記の展開溶媒系では厳密には PGE_2 と Tx B_2 を分離出来ないため Honda et al⁸⁾, 山本ら²⁰⁾の方法に準じてクロロホルム/メタノール酢酸/水=90：8：1：0.8 (V/V) でさらに二次元方向へ展開して分離した。そしてヨウ素蒸気で PGs 部位を発色させ、その部位のゲルを掻きとり放射活性を測定した。

7. P の測定

培養液中の P の測定は血清に対するのと同様の操作により第一ラジオアイソトープ社の RIA kit を用いて測定した。変動係数は intra-assay, inter-assay がそれぞれ5.8%, 7.2%であった。

8. 3β -HSD 活性の酸素組織化学による検討

乾燥した培養黄体細胞に DHEA を基質とした反応液¹⁰⁾¹³⁾を加えて2時間 incubate して 3β -HSD 活性を酵素組織化学的に検索した。培養開始1日, 2日, 6日経過した培養細胞について検索した。

結 果

1. 培養黄体細胞の増殖率, 生細胞率

培養黄体細胞の growth curve を Fig. 2. に示した。培養ヒト黄体細胞は培養開始6日まで経時的増加を示した。今回の各試薬添加例では無添加例と細胞増殖率に有意差はなかった。0.5% trypan blue 生体染色では常に95%以上の viable cell rate が保たれた。

Fig. 2. Growth curve of cultured human luteal cells.

2. 培養黄体細胞の形態学的所見

培養黄体細胞は、一部上皮細胞様の増殖形態を示したが大部分は線維芽細胞様の増殖形態を示した (Fig. 3-a.)。oil-red-o 染色では両増殖形態を示した細胞の細胞質に多数の脂肪顆粒が認められた (Fig. 3-b.)。また 3β -HSD 活性陽性細胞は培養開始24時間目から24時間は培養細胞の約40~50%に保たれた。この酵素活性陽性細胞の絶対数はやや増加する傾向にあったが培養細胞総数に対する比率は漸減し培養開始後6日目には20%以下になっていた。またこの酵素活性も線維芽細胞様細胞, 上皮細胞様細胞の両方の細胞に認められた (Fig. 3-c.)。control として DHEA を除いた反応液で同様の操作をしたが染色されなかった。また OMC-1 にはこの酵素活性は認められなかった。

なお, 各試薬添加例とも試薬無添加例と細胞の増殖形態, oil-red-O 染色, 3β -HSD 活性において差は無かった。

3. 培養液に分泌された PGF, PGE, P 濃度

培養細胞が分泌した PGF, PGE, P の培養液中濃度はそれぞれ 1.95 ± 0.36 , 2.44 ± 0.45 , 276.6 ± 38.6 ng/ml/ 1×10^5 cells/day であった (Table 1.)。なお, 今回使用した培養液中の PGF, PGE は50pg/ml 以下であり, P は40pg/ml 以下であった。

4. ^{14}C -AA の ^{14}C -PGs への転換率

ethanol に溶解した ^{14}C -AA $0.1 \mu\text{Ci}$ を培養細胞に添加し培養した。培養液中の ^{14}C -PGs は上記の方法で抽出, 分離した。添加した ^{14}C -AA に対して ^{14}C -PGF₂ α , ^{14}C -PGE₂ への転換率はそれぞれ

Fig. 3-a: Light microscopic findings of cultured human luteal cells (second day of the culture, $\times 40$).

3-b: Oil-red-O staining of cultured human luteal cells (second day of the culture, $\times 100$).

3-c: 3β -HSD activity of cultured human luteal cells (second day of the culture, $\times 100$).

Table 1. Prostaglandin F(PGF), prostaglandin E(PGE) and progesterone(P) production by cultured human luteal cells.

PGF	PGE	P
1.95 ± 0.36	2.44 ± 0.45	276.6 ± 38.6

(ng/ml/ 1×10^5 cells/day, mean $\pm$ SE, n = 15)

Table 2. Conversion rate of archidonic acid to prostaglandin(PG) by cultured human luteal cells.

	PGF $_2\alpha$	PGE $_2$
conversion rate	1.10 ± 0.11	1.21 ± 0.19

(%/ 1×10^5 cells/day, mean $\pm$ SE, n = 10)

れ 1.10 ± 0.11 , $1.21 \pm 0.19\%$ / 1×10^5 cells/dayであった (Table 2.)。control として OMC-1 でも同様の操作を行ったが、転換率は0.2%以下であった。

5. hCG, indomethacin 添加時の P 産生への影響

培養細胞に hCG を1.0 IU/ml 添加して培養すると P 産生量は無添加時, hCG1.0 IU/ml 添加時がそれぞれ 265.9 ± 38.9 , 551.9 ± 75.2 ng/ml/ 1×10^5 cells/day と有意に後者が多かった ($p < 0.01$)。また無添加時の P 産生量を control として%増加率で示すと hCG1.0 IU/ml 添加では control の $238.0 \pm 10.0\%$ と有意に増加した ($p < 0.01$)。同様に Ind を添加し培養すると, P 産生量は無添加時

が 299.7 ± 43.1 , 200.9 ± 33.4 ng/ml/ 1×10^6 cells/day と有意に減少した ($p < 0.01$)。これは control の P 産生量の $67.6 \pm 3.2\%$ に有意に抑制された事になる ($p < 0.01$) (Fig. 4.)。この時の PGF, PGE 産生量も control の 30% 以下に抑制されていた。

6. PGF, PGE の P 産生への作用

黄体自体が産生する濃度の PGF, PGE の個々の P 産生への作用を検討するため Ind 添加時の P 産生量を control として Ind+PGF $_2\alpha$ 1 ng/ml, Ind+PGF $_2\alpha$ 10 ng/ml を培養細胞に添加した。その結果それぞれ control, Ind+PGF $_2\alpha$ 1 ng/ml 添加時の P 産生量は 239.5 ± 38.7 , 254.7 ± 36.4 ng/ml/

Fig. 4. Effect of hCG or Indomethacin (Ind) on progesterone production by cultured human luteal cells.

Fig. 5. Effects of Prostaglandins (PGs) and Indomethacin 100 μ g/ml (Ind) on progesterone production by cultured human luteal cells.

1×10^5 cells/day と有意差はなく, %増加率でも control の $119.8 \pm 10.3\%$ と有意差はなかった。Ind+PGF $_2\alpha$ 10ng/ml 添加の場合 control が 251.5 ± 29.5 に対し 285.7 ± 23.9 ng/ml/ 1×10^5 cells/day であり, %増加率も control の $129.5 \pm 15.3\%$ とやや増加傾向はあるものの有意差はなかった (Fig. 5-a)。

一方 Ind+PGE $_2$ 1 ng/ml 添加の場合 control が 243.5 ± 29.2 に対し 343.5 ± 48.2 ng/ml/ 1×10^5 cells/day と有意の増加を示した ($p < 0.05$)。%増加率でも control の $148.8 \pm 17.9\%$ と有意の増加であった ($p < 0.05$)。Ind+PGE $_2$ 10ng/ml 添加の場合は, control が 241.3 ± 25.4 に対し 479.6 ± 53.7 ng/ml/ 1×10^5 cells/day と有意の増加を示した ($p < 0.01$)。また %増加率は control の $227.1 \pm 24.4\%$ と有意の増加であった ($p < 0.01$) (Fig. 5-b)。

考 察

従来の黄体の P 産生への PGs の作用を検討する in vivo の実験系としては PGs を静脈注射をする方法⁵⁾¹²⁾などがある。この場合黄体以外の組織に対する影響も含んだ実験結果になる欠点がある。また, in vitro の実験系としては黄体組織の short term incubation が主である³⁾⁴⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾²²⁾²⁴⁾。しかし, われわれは厳密に細胞総数, 生細胞の比率などについて各検体間の均一性を図り, また添加試薬の長時間の影響を観察する目的でヒト黄体の単層細胞培養を行った。

細胞分離には培養液に collagenase と dispase を溶解したものをを用いた。collagenase にわずかではあるが trypsin 活性が含まれており, trypsin による細胞膜の障害を抑えるため血清を含んだ培養液中で細胞分離した。また出来るだけ細胞障害を少なくし多くの細胞を得るための酵素作用時間は 40 分が最も適当であった。また 3 β -HSD 活性陽性細胞をより多く, 赤血球をより少なくする目的で 600rpm で 3 分間の遠心を 3~5 回くり返す方法をとった。この方法では viable cell rate は 95% 以上に保たれ 3 β -HSD 活性は約 40~50% の細胞に陽性であった。このような事により, この培養黄体細胞は従来の報告⁷⁾¹⁰⁾よりも高い P 産生能を保ち, さらに hCG 投与で P 産生が control の 238% に増加する点などわれわれのヒト黄体単層細胞培養法は内分泌学的に十分黄体機能を保持している実験系と考えられた。培養ヒト黄体細胞の増殖形態は主に線維芽細胞様であった。増殖形態は hCG 添加でも変化せず樋口⁷⁾, 亀井¹⁰⁾の一連の報告と一致した。また培養黄体細胞は細胞質内に oil-red-O 染色で多数の脂肪顆粒を認めた。3 β -HSD 活性は線維芽細胞様細胞, 上皮細胞様細胞の両方に認められた。しかしこの酵素活性を持たない細胞が約半数ありこれが間質由来の細胞なのか, この酵素活性を失った黄体細胞なのかは形態学的に区別する事は不可能であった。このため今回の実験は 3 β -HSD 活性が 40~50% とほぼ一定であった培養開始 24 時間から 24 時間に行った。

ヒト月経黄体に作用する PGs の産生部位については in vivo の報告として Aksel et al¹⁾は黄体側の卵巢静脈血中の PGF $_2\alpha$ 濃度が反対側の卵巢静脈血中濃度より高い事から黄体の PGF $_2\alpha$ 産生を示唆している。われわれも²³⁾末梢血中 PGF 濃度は卵胞期よりも黄体期に高い事を認めている。in vitro の報告としては Challis et al³⁾によればヒト黄体組織の short term incubation で培養液に PGF α , PGE が分泌され, また培養細胞に AA を添加した場合は PGE のみ分泌が増加し, PGF α 分泌には有意差はなかった。すなわち彼らの報告ではヒト黄体の PGs の分泌能の存在は示唆されるが, PGF α の産生能は明確にされていない。また, Thibier et al²⁴⁾も isolated human luteal cells を 1 時間 incubate し培養液中に PGF が増加する事からヒト月経黄体の PGF 分泌能の存在を示唆している。いずれにしてもこれらの報告からはヒト月経黄体の PGs 分泌能の存在は示唆されるものの PGs 産生能は明らかでない。

われわれは細胞が dish に付着した培養開始24時間後に培養液を全量交換し、その後24時間に明らかな PGF, PGE の分泌がある事を明確にした。さらにわれわれは黄体細胞が ^{14}C -AA を ^{14}C -PGs に転換する事も明らかにした。この場合転換率が1%前後と低いが、none specific な転換でない事は OMC-1 での転換率が0.2%以下である事からも明らかである。これらの結果によりヒト月経黄体には PGs 産生能が存在する事が明らかになった。

次に、ヒト月経黄体に対して PGs の作用が luteotropic か、luteolytic かに関して検討した。まず、われわれは cytolooxygenase 阻害剤である Ind を培養細胞に添加し黄体自身の PGs 産生を抑制する事によって P 産生は無添加の場合の67.6%に抑制される事を明らかにした。この結果により黄体自体が産生する PGs が P 産生に促進的に作用している事が示唆された。

PGF と黄体機能に関して、in vivo の実験としては Lehman et al ¹²⁾ は $\text{PGF}_2\alpha$ の静脈注射で血中 P 濃度が低下した事から $\text{PGF}_2\alpha$ は luteolytic に作用すると報告している。 PGF が luteolytic に作用するとすれば黄体組織中の PGF 濃度は黄体期後期に最も高くなると考えられる。Challis et al ³⁾, Patwardhan et al ¹⁶⁾, Shutt et al ¹⁸⁾, Swanston et al ²⁰⁾, Vijayakumar et al ²⁵⁾ や、われわれ ²³⁾ も黄体組織中の PGs 濃度を報告しているが月経周期により一定の傾向はみられなかった。この中で PGF が有意に黄体期後期に高くなっているのは Vijayakumar et al ²⁵⁾ だけである。しかし彼らの報告では PGs 濃度は他の報告者に比較して極端な高値でありその成績には疑問が残る。黄体の組織の incubation 実験として Dennefer et al ⁴⁾ は初期および後期黄体では $1\ \mu\text{g/ml}$ の $\text{PGF}_2\alpha$ は P 産生に影響を及ぼさないが黄体期中期では hCG の P 産生、c-AMP 合成促進作用を抑制するとしている。

また Patwardhan et al ¹⁵⁾ も $10\ \mu\text{g/ml}$ の $\text{PGF}_2\alpha$ は hCG の P 産生促進作用を抑制すると報告している。一方 Richardson et al ¹⁷⁾ は黄体期中期では $1\ \mu\text{mol/l}$ の濃度の $\text{PGF}_2\alpha$ は P 産生を促進させるが、黄体期後期では P 産生に影響しないとしている。またわれわれ ²²⁾ も同様に黄体組織の short term incubation 実験では $\text{PGF}_2\alpha$ が $10, 10^2, 10^4\text{ng/ml}$ の添加濃度では P 産生が増加するが、 1ng/ml では control よりも P 産生が減少した事を認めている。このように $\text{PGF}_2\alpha$ の黄体機能に対する作用には一定の見解はない。このような実験の場合投与する $\text{PGF}_2\alpha$ の濃度が生理的濃度か、否かが非常に重要となる。今回われわれはその点を考慮し、まず黄体の PGF 産生量を測定した。そして PGF の作用を検討するため Ind を添加し黄体の PGs 産生を抑制し、その時の P 産生量を control とした。そして黄体細胞自身の PGF 産生量が $1.95\text{ng/ml}/1 \times 10^5\text{cells/day}$ である事から Ind+ $\text{PGF}_2\alpha$ 1ng/ml , Ind+ $\text{PGF}_2\alpha$ 10ng/ml の2種類の濃度で添加した時の P 産生量と比較した。つまりこの事により PGE_2 の影響を極力抑えた状態での $\text{PGF}_2\alpha$ の作用を推測出来る事になる。その結果 $\text{PGF}_2\alpha$ は黄体期中期黄体では P 産生に有意の影響をしないことが示唆された。

PGE に関して、ヒト黄体組織中の PGE 濃度は、Patwardhan et al ¹⁶⁾ が黄体期中期に最も高いと報告している。また Vijayakumar et al ²⁵⁾ は PGE_2 濃度と P 濃度は相関するとしている。

ヒト黄体組織の incubation 実験としては Marsh et al ¹⁴⁾, Dennefer et al ⁴⁾ はヒト黄体においては $1 \sim 10\ \mu\text{g/ml}$ の PGE_2 添加は P ならびに c-AMP 産生促進作用がある事を報告している。われわれ ²²⁾ も $10^2, 10^3, 10^4, 10^5\text{ng/ml}$ の濃度で PGE_2 添加で P 産生が増加する事を認めている。しかし E l-Rahman et al ⁵⁾ は PGE_2 の静脈注射で一時的ではあるが血中 P 濃度の減少が認められ、 PGE_2 の luteolytic な作用の存在を示唆している。今回のわれわれの実験では黄体の PGE 産生量が $2.44\text{ng/ml}/1 \times 10^5\text{cells/day}$ である事から、Ind 添加時の P 産生量を control として、Ind+ PGE_2 1ng/ml と Ind+ PGE_2 10ng/ml の2種類の濃度で添加して P 産生量を比較した。その結果 PGE_2 には

黄体自体が産生する生理的濃度で P 産生促進作用のある事が明らかになった。しかし培養液中の P 濃度が増加した原因の一部には PGE_2 の P の代謝遅延作用が含まれている可能性も否定出来ないがこの実験系からは鑑別出来なかった。

一般的に PGs には intracellular signal transmitter, local hormone, さらに両方をかねている場合の 3 つの細胞内外での作用機序が考えられている²¹⁾。従来の黄体に対する PGs の添加実験はいわゆる local hormone としての作用を検討している傾向が強かった。しかも黄体自身が産生する生理的 PGs 量が不明であったため数種の内因性 PGs の存在下に添加 PGs を上乗せした事になり単に薬理作用を検索している可能性があった。

今回われわれは黄体期中期黄体を用いて黄体自身に PGs 産生能の有る事を明らかにした。さらに黄体に Ind を添加し黄体自身の PGs 産生を抑制する事によって P 産生が減少した事から PGs が P 産生に促進的に作用する事が示唆された。また生理的濃度の PGE_2 は単独で P 産生促進作用がある事が明らかになった。しかしこれが local hormone としての作用なのか, intracellular signal transmitter として作用しているのか未だ明確ではない。

また $\text{PGF}_2\alpha$ は単独では P 産生に明らかな作用を示さなかった。しかし他因子との組み合わせ, あるいは全く異なる機序で作用している可能性も残されており, 今後は更にその点に関して検索の必要があると思われる。

結 語

ヒト黄体機能における PGs の役割を解明し PGs の産生部位を明らかにするため, ヒト月経黄体細胞単層培養法を用いた実験を行った。

培養ヒト黄体細胞は培養液中に prostaglandin F (PGF), prostaglandin E (PGE), progesterone (P) をそれぞれ 1.95 ± 0.36 , 2.44 ± 0.45 , $276.6 \pm 38.6 \text{ ng/ml} / 1 \times 10^5 \text{ cells/day}$ を分泌した。また培養ヒト黄体細胞に ^{14}C -arachidonic acid (AA) を添加すると ^{14}C - $\text{PGF}_2\alpha$, ^{14}C - PGE_2 に転換した。以上によりヒト月経黄体細胞には P 産生能とともに PGF , PGE の産生能が存在することが明確となった。

また培養細胞に Indomethacin (Ind) を添加して黄体自体の PGs 産生を抑制した時の P 産生量を control とすると Ind+ $\text{PGF}_2\alpha$ 添加では control と P 産生量に有意差はなかった。一方 Ind+ PGE_2 添加では control と比べて有意に P 産生が増加した。これらは黄体自体が産生する濃度の $\text{PGF}_2\alpha$ は P 産生に影響を及ぼさないが PGE_2 は明らかに P 産生に促進的に作用する事を示している。

稿を終わるにあたり御指導御校閲下さいました橋本正淑教授, ならびに御校閲下さいました札幌医大第一生化学講座秋野豊明教授, また検体採取に御協力下さいました教室員, 同門の諸先生に感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第57回日本内分泌学会総会, 第38回日本産婦人科学会学術講演会で発表した。

文 献

- 1) Aksel, S., Schomberg, D.W. and Hammond, C.B.: Prostaglandin $\text{F}_2\alpha$ production by the human ovary. *Obstet. Gynecol.*, 50: 347–350, 1977.
- 2) Auletta, F.J., Zusman, R.M., Caldwell, B.V., Behrman, H.R., Kirton, K., Levitt, M.J. and Russell, P.T.: Develop-

- ment and standardization of radioimmunoassays for prostaglandins E, F and A. Clin. Chem., 20: 1580–1587, 1974.
- 3) Challis, J.R.G., Calder, A.A., Dilley, S., Forster, C.S., Hillier, K., Hunter, D.J.S., Mackenzie, I.Z. and Thorburn, G.D.: Production of prostaglandins E and F α by corpora lutea, corpora albicantes and stroma from the human ovary. J. Endocr., 68: 401–408, 1976.
- 4) Dennefors, B.L., Sjögren, A. and Hamberger, L.: Progesterone and adenosine 3',5'-monophosphate formation by isolated human corpora lutea of different ages: Influence of human chorionic gonadotropin and prostaglandins. J. Clin. Endocrinol. Metab., 55: 102–107, 1982.
- 5) El-Rahman, H.A., El-Sokkary, H.A., El-Abd, M.A., Shaala, S.A., Gaweesh, S.S. and Topozada, M.K.: Transient luteo-lytic effect of prostaglandin E $_2$ in humans. Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol., 8: 413–417, 1982.
- 6) 早川 修, 津村典利, 小泉基生, 遠藤俊明, 工藤隆一: ヒト卵巣ムチン性嚢胞腺癌培養細胞株 (OMC-1) の樹立とその性状. 札幌医誌. 55: 153–160, 1986.
- 7) 樋口泰彦: Low Density Lipoprotein の黄体細胞内 Cholesterol に対する影響と Progesterone 産生の動態について—ヒト黄体細胞単層培養法を用いて—. 日産婦誌. 38: 229–235, 1986.
- 8) Honda, A., Morrison, A.R., McCluskey, E.R. and Needleman, P.: Arachidonic acid metabolic pathways in the rabbit pericardium. Biochim. Biophys. Acta, 794: 403–410, 1984.
- 9) 稲川寿夫, 大木史郎, 沢田正文, 平田文雄: Radioimmunoassay 法による Prostaglandin の分離定量に関する検討. 薬誌. 92: 1187–1194, 1972.
- 10) 亀井 清: ヒト月経黄体の単層細胞培養による steroidogenesis の研究. 日産婦誌. 34: 261–269, 1982.
- 11) Korte, K., Macdonald, P.C., Johnston, J.M., Okita, J.R. and Casey, M.L.: Metabolism of arachidonic acid and prostanoids in human endometrial stromal cells in monolayer culture. Biochim. Biophys. Acta, 752: 423–433, 1983.
- 12) Lehman, F., Peters, F., Breckwoldt, M. and Bettendorf, G.: Plasma progesterone levels during infusion of prostaglandin F $_{2\alpha}$ in the human. Prostaglandins, 1: 269–277, 1972.
- 13) Levy, H., Deane, H.W. and Rubin, B.L.: Visualization of steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocr. Med., 65: 932–942, 1959.
- 14) Marsh, J.M. and LeMaire, W.: Cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in the human corpus luteum: Effect of gonadotropins and prostaglandins. J. Clin. Endocrinol. Metab., 38: 99–106, 1974.
- 15) Patwardhan, V.V. and Lanthier, A.: Effect of prostaglandin F $_{2\alpha}$ on the hCG-stimulated progesterone production by human corpora lutea. Prostaglandins, 27: 465–473, 1984.
- 16) Patwardhan, V.V. and Lanthier, A.: Luteal phase variations in endogenous concentrations of prostaglandins PGE and PGF and in the capacity for their in vitro formation in the human corpus luteum. Prostaglandins, 30: 91–98, 1985.
- 17) Richardson, M.C. and Masson, G.M.: Progesterone production by dispersed cells from human corpus luteum: Stimulation by gonadotrophins and prostaglandin F $_{2\alpha}$: Lack of response to adrenaline and isoprenaline. J. Endocr., 87: 247–254, 1980.
- 18) Shutt, D.A., Clarke, A.H., Fraser, I.S., Goh, P. and McMahon, G.R.: Changes in concentration of prostaglandin F and steroids in human corpora lutea in relation to growth of the corpus luteum and luteolysis. J. Endocr., 71: 453–454, 1976.
- 19) Sun, F.F., Chapman, J.P. and McGuire, J.C.: Metabolism of

- prostaglandin endoperoxide in animal tissues. Prostaglandins, 14: 1055–1074, 1977.
- 20) Swanston, I.A., McNatty, K.P. and Baird, D.T.: Concentration of prostaglandin $F_{2\alpha}$ and steroids in the human corpus luteum. J. Endocr., 73: 115–122, 1977.
- 21) 田村 泰, 平井愛山, 田原和夫, 西川哲男, 山田研一: アラキドン酸カスケードとホルモンの作用機序。ホと臨床。 32: 1135–1140, 1984. 22) 田中昭一, 下谷保治, 幡 洋, 遠藤俊明, 山本 弘, 浜松美穂, 橋本正淑: ヒト月経黄体のステロイド合成能に及ぼす Prostaglandin E_1 , E_2 および $F_{2\alpha}$ の作用。ホと臨床。 31: 473–478, 1983. 23) Tanaka, S., Hata, H., Shimoya, Y., Yamamoto, H. and Hashimoto, M.: Relationship between prostaglandin F and steroids in human peripheral venous plasma and concentration of prostaglandin in corpus luteum. Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol., 10: 367–373, 1984.
- 24) Thibier, M., Hassan, N.E., Clark, M.R., LeMaire, W.J. and Marsh, J.M.: Inhibition by estradiol of human chorionic gonadotropin-induced progesterone accumulation in isolated human luteal cells: Lack of mediation by prostaglandin F. J. Clin. Endocrinol. Metab., 50: 590–592, 1980. 25) Vijayakumar, R. and Walters, W.A.W.: Human luteal tissue prostaglandins, 17β -estradiol, and progesterone in relation to the growth and senescence of the corpus luteum. Fertil. Steril., 39: 298–302, 1983. 26) 山本 弘, 田中昭一, 林 秀紀: ラット黄体細胞のアラキドン酸遊離におけるホルボールエステルの影響。札幌医誌。 56: 755–770, 1987. (受付日: '87. 9. 4)