

氏 名（本籍）	佐 藤 由 美
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 第 3 3 2 8 号
学位授与年月日	平成 15 年 9 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当
最終学 歴	平成 6 年 3 月 23 日 埼玉医科大学医学部
学位論文題目	免疫抑制マウスに移植したヒト卵巣皮質内の卵胞 発育に関する研究

(主 査)

論文審査委員	教授 岡 村 州 博	教授 荒 井 陽 一
	教授 笠 井 憲 雪	

# 論文内容要旨

## 目 的

ヒトの卵胞発育についてはまだ不明な点が多く、性周期における単一排卵機構も解明されていない。それは、卵胞発育を経時的にモニターすることが困難であり、*in vitro*の実験系においても卵巣皮質や卵胞の長期体外培養は限界があるためである。近年、免疫不全マウスにヒト卵巣皮質を移植し卵胞発育を観察した異種移植法が報告されている。しかし、今までの報告では成熟卵胞まで誘導できず、得られた発育卵胞も形態学的な評価に留まっているのが現状である。そこで、ヒト卵胞発育の *in vivo* モデルの作成を目指し、異種移植後ヒト発育卵胞を誘導する方法を確立し、得られた発育卵胞の機能について免疫組織学的に評価することを目的として以下の実験をおこなった。

## 方 法

全ての実験は「東北大学における動物実験に関する指針」に従い、ヒトの卵巣皮質を異種移植するという方法は本大学倫理委員会の承認（承認番号 2000-22, 2001-297）と患者のインフォームドコンセントを得たうえで行なった。同意が得られた患者より、婦人科手術の際卵巣皮質の一部を採取し、実験 1 は 8~10 週齢の non-obese diabetic severe combined immune deficient mice の卵巣を除去し、背部皮下にヒト卵巣皮質片の移植を行った。移植 10 週間後よりヒト絨毛性ゴナドトロピン (HMG : human menopausal gonadotropin) 5 IU/ML を 14 日間連日腹腔内投与施行した。マウスを安楽死させ、ヒト卵巣皮質片を摘出し、4%アルコールで固定後、免疫組織化学染色し、Ki 67, Cytochrome P 450 cholesterol side-chain cleavage (P 450 scc), Cytochrome P 450 17 $\alpha$  hydroxylase (P 450 c 17), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD), Cytochrome P 450 Aromatase (P 450 arom), Estrogen Receptor (ER) について検討した。実験 2 は NOD/Shi-scid, IL-2 Rg (KO) mice を使用し、背部皮下、腎皮膜下、マウス卵巣嚢内に同時にヒト卵巣皮質片を移植した。誘発法、免疫染色法は実験 1 と同様に行った。

## 結 果

移植 10 週間後より gonadotropin 投与を 14 日間施行したヒト卵巣皮質片において、実験 1 では早期胞状卵胞 (early antral follicle) が確認された。この発育卵胞はステロイド代謝酵素 P 450 scc, P 450 c 17, 3 $\beta$ -HSD は莢膜細胞の細胞質に陽性が確認された。Ad 4 BP は顆粒膜細胞、莢膜細胞のそれぞれの核に陽性が確認された。P 450 arom, ER は、顆粒膜細胞、莢膜細胞ともに陰性であった。実験 2 において、マウス卵巣嚢内に移植したヒト卵巣皮質片から直径 21

mm の成熟卵胞が認められ、ER が顆粒膜細胞に陽性を示した。他のマウスでは背部皮下に直径 7 mm の胞状卵胞が確認された。

## 結 論

異種移植後に gonadotropin 刺激をすることにより、成熟卵胞まで誘導することができた。マウスの免疫低下度が強い方が、卵胞発育は良い傾向にあった。移植部位においては卵巣嚢内移植後の卵胞発育が良く、移植部位として適していると思われた。異種移植後のヒト卵巣皮質における発育卵胞は、ヒト体内発育卵胞と同様のステロイド代謝酵素およびステロイド受容体の発現が証明された。すなわち本研究法を用いることにより、不明の多いヒト卵胞発育のメカニズムについて *in vivo* で評価できる可能性が示唆された。

以上より本法は、卵胞発育のメカニズム解明の手がかりを提供する有用な方法と考えられた。

## 審査結果の要旨

ヒト卵胞発育を観察する研究として免疫不全マウスにヒト卵巣皮質を移植する異種移植が報告されているが、成熟卵胞まで発育誘導できた例はなく、また得られた発育卵胞は形態学的にしか評価されておらず、確立されていないのが現状である。本研究は、異種移植後ヒト発育卵胞を誘導する方法を確立し、得られた発育卵胞を免疫組織学的に評価することを目的として行われた。

実験1は Non-obese diabetic severe combined immune deficient (以下 NOD-SCID) mice の卵巣を除去後、インフォームドコンセントが得られているヒト卵巣皮質の一部を背部皮下移植した。実験2は、ホストマウスとしてより重度の免疫不全状態にある NOD/Shi-scid, IL-2 Rg (KO) mice (NOG マウス) を使用し、適切な移植部位を検討するため移植場所は背部皮下、腎皮膜下、マウス卵巣嚢内の3ヶ所に同時に移植している。実験1, 2とも移植後10週間した後、ヒト絨毛性ゴナドトロピン5 IU/MLを14日間連日腹腔内投与を行った。その後組織を摘出し、ステロイド代謝酵素である P 450 cholesterol side chain cleavage (P 450 sc), Cytochrome P 450 17 $\alpha$  hydroxylase (P 450 c17), 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD), および Cytochrome P 450 aromatase (P 450 arom), またステロイド受容体である Estrogen receptor (ER) について検討している。ステロイド代謝酵素, およびステロイド受容体の発現を確認することにより、得られた発育卵胞の発育段階を評価することができるが、これらの発現を移植内卵巣において免疫組織学的に検討をすることは、移植内卵巣の卵胞が主席卵胞になりうるかどうか、その発育卵胞そのものの機能を評価することに繋がる。

実験1では、HE染色にて重層化した顆粒膜細胞と卵胞腔の形成を認め、さらに顆粒膜の外側に2層の莢膜細胞の形成が認められ、早期胞状卵胞 (early antral follicle) まで発育誘導できていることが確認された。この発育卵胞は Ki 67 染色の陽性を確認し、組織増殖能を持っていることを確認している。しかし、この発育卵胞では P 450 arom, ER は、顆粒膜細胞、莢膜細胞ともに陰性であり主席卵胞の性格は呈していない卵胞であることが証明された。実験2では、マウス卵巣嚢内に移植したヒト卵巣皮質切片から直径21mmの発育卵胞が認められ、ERが顆粒膜細胞に陽性を示し成熟卵胞であることが証明された。背部皮下においては、実験1とは異なり、肉眼的にも観察可能な7mmの発育卵胞が確認された。

実験2では卵巣嚢内移植後に、gonadotropin 刺激を施行することにより、成熟卵胞を誘導することができた。これは今までに報告がない初めての結果と云える。さらに免疫組織学染色にて、その発育卵胞は ER が陽性であり、排卵直前の Graaf 卵胞であることを証明している。また胞状卵胞以上の発育卵胞が観察されたマウスでは、同時に複数の卵胞が発育することはなく、各移植部位を合計しても1匹あたり1ヶの発育であった。すなわちヒト性周期と同様に1つの主席卵胞の発育が他の卵胞発育を抑制している可能性が示唆された。移植部位においては、卵巣嚢内がより良い卵胞発育の傾向にあるという結果であったが、その原因はまだ不明であり、今後のさらなる研究が必要である。また、背部皮下移植をした実験1, 2のそれぞれの発育卵胞を比較すると免疫抑制度の強いマウスを使用した方が、より良い発育卵胞が得られ、卵胞発育には血流量や局所因子の他にも NK 活性やサイトカイン等も関与している可能性が示唆される。

以上より今回の研究は、いまだ不明な点の多い卵胞発育のメカニズムや単一排卵機構のメカニズム解明のための基礎的研究法を確立したものであり、学位に充分値するものである。