

未受精卵および受精卵の
凍結保存に関する基礎的研究

(研究課題番号：01570912)



平成2年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成課報告書

平成3年3月

研究代表者 石川 睦 男
(旭川医科大学医学部助教授)

哺乳動物の胚凍結に関する研究の歴史は新しく、1971年 Whittingham により、マウス胚の凍結保存の可能性が示唆され、1972年にマウス凍結融解胚からの発育仔が報告された。この報告以来、ウシ・ウサギ・ラット・ヒツジでより確実な凍結保存法が、主に獣医畜産界を中心に進められてきた。しかし、未受精卵において簡易で再現性の高い凍結法ははまだ開発されていない。さらに、不妊症の治療として体外受精、胚移植がさかんになり、過排卵処置後のヒト卵子、胚の保存が問題となりつつある。

本研究において、未受精卵および受精卵の凍結融解法の安全性の確立を目指し、安全な凍結融解法の開発ならびに凍結・融解において細胞障害に関与する活性酸素代謝の最上流に位置する Superoxide dismutase の卵巣における意義ならびに卵の環境因子としての作用に関し基礎的に検討したので報告する。

研究組織

研究代表者：石川 陸 男 (旭川医科大学医学部産婦人科助教授)

研究分担者：千石 一 雄 (旭川医科大学医学部産婦人科講師)

玉手 健 一 (旭川医科大学医学部産婦人科助手)

研究経費

平成元年度： 900千円

平成2年度： 900千円

計 : 1,800千円

研究発表

イ. 学会誌等

- (1) Ishikawa, M., Yaginuma, Y., Hayashi, H., Shimizu, T., Endo, Y. and Taniguchi, N. Cancer Res. 第50巻 号 page 2538~2542 1990年 Reactivity of Monoclonal Antibody against Manganese Superoxide Dismutase with Human Ovarian Carcinoma.
- (2) Kawaguchi, T., Matsuda, S., Suzuki, K., Nishimura, T., Uda, T., Ono, M., Sekiya, C., Ishikawa, M., Iino, S., Endo, Y. and Taniguchi, J. Immunol. Methods. 第127巻 号 page 249~254 1990年 Serum Mn-superoxide dismutase: Normal values and increased levels in patients with acute myocardial infarction and several malignant diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay using a monoclonal antibody.

- (3) 石川睦男、柳沼裕二、日本産婦人科学会誌 第42巻 号 卵巣腫瘍におけるマンガ
林 博章、山下幸紀、 page 363~364 スーパーオキシドディ
遠藤康夫、谷口直之 平成2年 ムターゼ
- (4) 木村広幸、林 博章、エンドメトリオージ 第11巻 IL-2の不妊因子としての
安部政彦、玉手健一、 ス研究会会誌 意義
千石一雄、石川睦男、 平成2年
- (6) M. Ishikawa, A. Soma, International Journal 第3巻3号 Placental transfer of
H. Takada, T. Shimizu of Feto-Maternal page 151~157 imipenem/cilastatin sodium
Medicine 1990年 in late pregnancy
- (7) Go DAITA, Yukichi Neurologia medico 第29巻11号 Intracranial Malignant
YONEMASU, Mutsuo chirurgica page 1026~1029 Teratoma Diagnosed in a
ISHIKAWA, Tetsuya 1989年 Fetus — Case Report —
SHIMIZU and Hideta-
ka YAKURA
- (8) Naoyuki Taniguchi, Antioxidant En- 第9巻1号 HUMAN AND RAT Mn-
Keiichiro Suzuki, zymes page 135 SUPEROXIDE DISMUTASES:
Yukihiko Matsuda, 1990年 BIOCHEMICAL AND IM-
Harold F. Deutsch, MUNOCHEMICAL STU-
Mutuo Ishikawa and DIES.
Fumiharu Akai
- (9) Hideki Ohono, Osamu Antioxidant En- 第9巻1号 SERUM MANGANESE-SU-
Yahara, Mutuo Ishika- zymes page 137 PEROXIDE DISMUTASE
wa, Tetsuo Kawaguchi, 1990年 IN INDIVIDUALS WITH
Taizo Uda, Eikazu VARIOUS NEUROMUSCU-
Sakaguchi, Yoh-ichi LAR DISEASES
Kondo, and Naoyuki
Taniguchi
- (10) Mutuo Ishikawa, Antioxidant En- 第9巻1号 REACTIVITY OF A MONOC-
Toshiyuki Nakata, Tet- zymes page 171 LONAL ANTIBODY TO
suya Shimizu, Tetsuo 1990年 MANGANESE SUPEROXIDE
Kawaguchi, Taizo Uda, DISMUTASE WITH HUMAN
Yasuo Endo, Osamu OVARIAN
Yahara, Keiichiro
Suzuki and Naoyuki
Taniguchi

ロ. 口 頭 発 表

- | | | | | |
|--|-----------------------|----|------------------------|--|
| (1) 木村広幸、林 博章、
安部政彦、玉手健一、
千石一雄、石川睦男、
清水哲也 | 第11回エンドメト
リオージス研究会 | 東京 | '90年1月26日
(平成2年) | 各種サイトカインがマ
ウス卵の受精・発育に
及ぼす影響 |
| (2) 石川睦男、林 博章、
清水哲也、*山下幸紀、
遠藤康夫、*谷口直
之(*国立札幌・産婦、
東大・第1内、*大
阪大・生化) | 第6回産婦人科腫
瘍マーカー研究会 | 東京 | '90年2月2日
(平成2年) | 卵巣癌におけるマンガ
ン・スーパーオキシサイ
ドジスムターゼ (Mn-
SOD) 測定の意義 |
| (3) 玉手健一、千石一雄、
高田久士、菊川美一、
石川睦男、清水哲也 | 第8回日本受精着
床学会 | 千葉 | '90年2月13日
(平成2年) | IVF-ET スケジュール
簡素化の試み |
| (4) 千石一雄、玉手健一、
菊川美一、田熊直之、
石川睦男、清水哲也 | 第42回日本産婦人
科学会 | 東京 | '90年4月14~17日
(平成2年) | platelet activating fac-
tor のマウス精子先体
反応、受精能に及ぼす
影響 |
| (5) 木村広幸、林 博章、
安部政彦、玉手健一、
千石一雄、石川睦男、
清水哲也 | 同 上 | 同上 | 同 上 | 抗癌剤の Gonadotoxic-
ity に関する基礎的研
究 |
| (6) 安部政彦、林 博章、
木村広幸、中田俊之、
吉田俊明、柳沼裕二、
石川睦男、清水哲也 | 同 上 | 同上 | 同 上 | superoxide dismutase
(SOD) の局在からみ
た放射線感受性の検討 |
| (7) 菊川美一、石川睦男、
清水哲也 | 同 上 | 同上 | 同 上 | 妊娠中毒症患者血中
における superoxide dis-
mutase と prostanoids
の変動 |
| (8) 石川睦男、菊川美一、
林 博章、中田俊之、
清水哲也、山下幸紀 | 同 上 | 同上 | 同 上 | 卵巣腫瘍におけるマン
ガン・スーパーオキシ
トジスムターゼ (Mn-
SOD) 測定の意義 |

(9)	玉手健一、石川睦男、 千石一雄、安部政彦、 林 博章、清水哲也	同 上	同上	同 上	排卵周辺期における superoxide dismutase の作用と局在性に関する 検討
(10)	林 博章、安部政彦、 木村広幸、石川睦男、 清水哲也、山下幸紀	同 上	同上	同 上	P-glycoprotein の発現 からみた抗癌剤耐性
(11)	水上明保、田中邦雄、 石川睦男、清水哲也	同 上	同上	同 上	³¹ P-NMR を用いた排 卵周辺期の卵巣内リン エネルギー代謝動態に ついて
(12)	石川睦男、林 博章、 清水哲也、山下幸紀 ¹ 、 斎藤康子 ¹ 、兼元敏隆 ¹ 、 土門洋哉 ² 、神谷博文 ⁴ 、 遠藤康夫 ⁵ 、谷口直之 ³ (¹ 国立札幌・産婦、 ² 札幌厚生・産婦、 ⁴ 札 幌斗南・産婦、 ⁵ 東大・ 1内、 ³ 大阪大・生化)	第10回腫瘍マー カー研究会	札幌	'90年7月2日 (平成2年)	マンガン・スーパーオ キサイドジスムターゼ (Mn-SOD) の卵巣癌 診断における有用性
(13)	川口哲男 ¹ 、武 安明 ¹ 、 松延圭二 ¹ 、石沢 実 ^{1,2} 、 鈴木敬一郎 ³ 、石川睦男、 谷口直之 ³ (¹ 宇部興 産・宇部研、 ² バイオ研、 ³ 大阪大・生化)	第49回日本癌学会	札幌	'90年7月3日～5日 (平成2年) 7月3日 ポスター発表	ヒト培養細胞における Mn-SOD の TNF によ る誘導
(14)	石川睦男、清水哲也、 山下幸紀 ¹ 、遠藤康夫 ⁵ 、 谷口直之 ³ (¹ 国立札 幌・産科、 ⁵ 東大・1内、 ³ 大阪大・生化)	同 上	同上	同 上 7月3日一般講演	卵巣癌診断におけるマ ンガン・スーパーオキ サイドジスムターゼ (Mn-SOD) の腫瘍マー カーとしての有用性
(15)	¹ 谷口直之、石川睦男 (¹ 大阪大・生化)	同 上	同上	同 上 7月3日	癌化における Mn-SOD の発現
(16)	千石一雄、玉手健一、 石川睦男、清水哲也	第35回日本不妊学 会	幕張	'90年11月16・17日 (平成2年)	体外受精における多精 子(多卵核)受精卵の 検討

- (17) 石川雅嗣、石川陸男、 同 上 同 上 同 上 原因不明流産における血液凝固系の意義に関する検討
清水哲也

研究 成 果

1. 研究目的

哺乳動物の胚凍結に関する研究の歴史は新しく、1971年 Whittingham により、マウス胚の凍結保存の可能性が示唆され、1972年にマウス凍結融解胚からの発育仔が報告された。この報告以来、ウシ・ウサギ・ラット・ヒツジでより確実な凍結保存法が、主に獣医畜産界を中心に進められてきた。しかし、未受精卵において簡易で再現性の高い凍結法ははまだ開発されていない。さらに、不妊症の治療として体外受精、胚移植がさかんになり、過排卵処置後のヒト卵子、胚の保存が問題となりつつある。

本研究において、簡易で生存性の高い未受精卵の凍結保存法の開発と、未受精卵および受精卵の凍結融解法の安全性の確立を目指すものである。

2. 研究成績

(1) 未受精卵および凍結卵

未受精卵および受精卵の簡易で生存性の高い凍結融解法の研究開発と安全性の確立を目指して基礎的検討を行った。未受精卵、受精卵の各種凍結法後の発生学的ならびに形態学的な比較検討をマウスを用いて行った。未受精卵においては、凍結融解後の受精率を、受精卵においては、胚発生率を各種凍結融解法で比較した。その結果、未受精卵と受精卵では至適な凍結法、希釈法、融解法の条件が異なることが明らかになった。

(資料1)

(2) 卵の生存性に関与する活性酸素一抗酸化酵素系の意義

凍結融解後の細胞障害に関与する因子として、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシパーオキシド (H_2O_2) などの活性酸素が関与している。この活性酸素の卵巣内卵に対する影響を基礎的に検討するため、スーパーオキシドを分解する Superoxide Dismutase (SOD) に着目した。すなわち、過排卵処置ラットに Cu, Zn-SOD として、purified recombinant human SOD, Mn-SOD として Polyethylene glycol SOD の投与を行ったところ、排卵は有意に抑制された。そのためラットの Cu, Zn-SOD, Mn-SOD に対するポリクローナル抗体を作成し、卵巣における局在を各性周期において検討した。排卵周辺期において、Cu, Zn-SOD は顆粒膜細胞、特に卵子を中心とした卵丘細胞に局在が認められ、一方、Mn-SOD は外英膜細胞に認められた。ヒト Mn-SOD に対するモノクローナル抗体を作成し、ヒト卵巣組織における局在を免疫組織化学的に検討したところ、悪性上皮性卵巣腫瘍に局在を認めた。

以上の成績から、排卵、卵の生存性には活性酸素一抗酸化酵素系が精緻に作用しており、未

受精卵の凍結保存には、この系を破壊することのない凍結融解法の必要性を明らかにした。

(参考試料 2)

以上の成績の詳細は添付した以下の別刷を参照されたい。

- ◎ 石川睦男、他：卵巣腫瘍におけるマンガン、スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) の意義、日産婦誌、42、363-364、1990。

(参考資料 3)

- ◎ Ishikawa M., Yaginuma Y., Hayashi H., Shimizu T., Endo Y., Taniguchi N. : Reactivity of a monoclonal antibody to manganese superoxide dismutase with human ovarian carcinoma. *Cancer Research*. 50. 2538-2542. 1990.

(参考資料 4)

- ◎ Ishikawa M., Soma A., Shimizu T. : Placental transfer of imipenem/cilastatin sodium in late pregnancy. *Int. J. Feto-Maternal Medicine*. 3. 151-157. 1990.

(参考資料 5)

- ◎ 石川睦男、他：卵巣癌とマンガン、スーパーオキシドジスムターゼ (Mn-SOD) : 産婦人科実際、39、2035-2040、1990。

(参考資料 6)

ま と め

未受精卵および受精卵の簡易で生存性の高い凍結融解法の研究開発と安全性の確立を目指して基礎的検討を行った。1. 未受精卵、受精卵の各種凍結法後の発生学的ならびに形態学的な比較検討をマウスを用いて行った。未受精卵においては、凍結融解後の受精率を、受精卵においては、胚発生率を各種凍結融解法で比較した。その結果、未受精卵と受精卵では至適な凍結法、希釈法、融解法の条件が異なることが明らかになった。2. 凍結融解後の細胞障害に関与する因子として、スーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシパーオキシド (H_2O_2) などの活性酸素が関与している。この活性酸素の卵に卵巣内卵に対する影響を基礎的に検討するため、スーパーオキシドを分解する Superoxide Dismutase (SOD) に着目した。すなわち、過排卵処置ラットに Cu, Zn-SOD として、purified recombinant human SOD, Mn-SOD として Polyethylene glycol SOD の投与を行ったところ、排卵は有意に抑制された。そのためラットの Cu, Zn-SOD, Mn-SOD に対するポリクローナル抗体を作成し、卵巣における局在を各性周期において検討した。排卵周辺期において、Cu, Zn-SOD は顆粒膜細胞、特に卵子を中心とした卵丘細胞に局在が認められ、一方、Mn-SOD は外英膜細胞に認められた。ヒト Mn-SOD に対するモノクローナル抗体を作成し、ヒト卵巣組織における局在を免疫組織化学的に検討したところ、悪性上皮性卵巣腫瘍に局在を認めた。

以上の成績から、排卵、卵の生存性には活性酸素-抗酸化酵素系が精緻に作用しており、未受精卵の凍結保存には、この系を破壊することのない凍結融解法の必要性を明らかにした。

以上に記した研究成果から、所期の目的の基礎的な部分は達成されたと思われる。今後、これらの成績をふまえ、未受精卵ならびに受精卵の凍結保存に関する方法の確立は端緒にあり、今後さらに検討を加えてゆく必要がある。

[資料 1]

Effects of Cryoprotectants and Sucrose Dilution on the Survival of Unfertilized and Fertilized Mouse Eggs after Freezing and Thawing

Introduction

The cryopreservation of fertilized mammalian eggs has been applied to various species since Whittingham reported the high survival rate of frozen-thawed fertilized mouse eggs. While a great deal of information has been generated regarding factors affecting survival of frozen-thawed mouse embryos, relatively little is known about optimal freezing and thawing methods for unfertilized mouse eggs.

The objectives of this study were to examine the effects of (1) addition of cryoprotectant ((1)-a Glycerol of (1)-b DMSO) and (2) sucrose dilution ((2)-a one-step or (2)-b 5-step) on unfertilized and fertilized mouse eggs.

Material and method

Sources of ova

Female Slc: ICR mice, aged 6-8 weeks, were maintained on a 14h light: 10h dark cycle. Females were induced to superovulate with a modification of a protocol previously reported (Whittingham et al, 1972). Hyperstimulation of the ovaries was obtained by intraperitoneal injection of 5.0 to 7.5 I.U. of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (Serotropin, Teikokuzoki, Japan) followed 48 hours later by intraperitoneal injection of 5.0 to 7.5 I.U. of human chorionic gonadotropin (hCG) (HCG MOCHIDA, Mochida, Japan).

The unfertilized oocytes were collected by dissecting the oviducts on Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 5% fetal calf serum (PBS + 5% FCS) at room temperature, 14-16h after the hCG injection. They were then treated with hyaluronidase (Pharmsia Co.), 0.1mg/ml in PBS+5% FCS until the cumulus cells were removed and washed twice with fresh PBS + 5% FCS.

While, after the hCG injection, the other females were paired with males of a similar strain (approx. 8-15 weeks), and inspected the next day for copulation plugs.

Freezing

PBS + 5% FCS containing (1)-a 10% glycerol and 0.25M sucrose or (1)-b 1.5M dimethylsulphoxide (DMSO) and 0.25M sucrose was added concentration (5-minute interval) at room temperature. Eggs were pipetted into 0.25 ml plastic insemination straw (Fujihira Inc. Tokyo, Japan) which was heat-sealed.

The eggs were frozen with a computerized, staged freezing apparatus (CRYOEMBRYO-PSP-HOXAN, Japan). The temperature was reduced from 25°C to -5°C at the rate of 1°C/minute, and they were held at -5°C for 5 minutes to allow seeding to take place. After seeding, the samples were cooled to -35°C at the rate of 0.3°C/minute and held at -35°C for 5 minutes before being transferred into liquid nitrogen.

Tawing

The eggs were thawed in a 37°C water bath. Subsequently, PBS + 5% FCS equilibrated was added to dilute these cryoprotectants in 0.5M sucrose at (2)-a one-step or (2)-b 5-step interval. The first dilution method was 5-step dilution at 5 minutes in 0.5M sucrose, the other was one-step dilution in 0.5M sucrose. All eggs recovered after experimental treatments were cultured irrespective of assesment of egg viability.

The frozen-thawed unfertilized eggs were fertilized in vitro by the microdrop method in a modified Krebs-Ringer bicarbonate medium at 37°C under gas-phase of 5%CO₂ in air. Two-cell embryos were cleaved for 24 hr. While the frozen-thawed 8-or 16-cell embryos were cultured for 72 hr and development to the expanded blastocyst stage, used as the end point for each experiment, was assessed.

Statistical analysis

Comparisons between proportions were performed with the chi-square test.

Results

The frozen-thawed oocytes and control freshly collected oocytes (14-16h after hCG) were added directly to the sperm suspension after incubation for 5-6h in modified Krebs-Ringer bicarbonate (m-KRB) at 37°C in 5% CO₂ in air, the oocytes were recovered and washed in modified Whitten's medium. While the frozen-thawed 8-or 16-embryos and control freshly collected embryos (68-72h after mating) were recovered and washed in modified Whitten's medium at 37°C in 5% CO₂ in air.

The highest survival rate of unfertilized mouse eggs was obtained when the freezing medium contained 1.5M DMSO + 0.25M sucrose and 5-step sucrose dilution method was used. The survival rate by this method was significantly higher than the other three methods. The highest survival rate of frozen-thawed 8-cell embryos was obtained when the freezing medium contained. 10% glycerol + 0.25M sucrose and one-step sucrose dilution method was used. However, there was no significant difference in survival rate of fertilized embryos among the four methods.

Discussion

It is uncertain how survival is achieved by 5-step sucrose dilution method on unfertilized mouse eggs. The use of sucrose is relatively impermeable to unfertilized eggs of fertilized embryos and causes cellular dehydration as an extracellular solution. The exposure to DMSO necessary before freezing suggests that a combination of partial dehydration by sucrose and DMSO and partial penetration of the unfertilized eggs by DMSO enables the cells to slowcool to -196°C without the formation of lethal intracellular ice.

Cooling and thawing condition should be adapted to the stage of development of the embryos to obtain good survival.

The results demonstrated that the survival of slow frozed unfertilized oocytes are dependent on the dilution method of cryoprotectant. Osmotic, histochemical and cytogenetic studies are in progress to investigate this effect further.

[資料 2]

卵の生存性に関与する活性酸素—抗酸化酵素系の意義

緒 言

活性酸素は酸素を生化学的エネルギーとして利用する生物にとって避けられない毒性物質であり、その消去機構として Superoxide dismutase (以下 SOD と略) をはじめとする抗酸化酵素が広く生体内に分布している。最近、心筋梗塞などの虚血性疾患や悪性腫瘍をはじめとする種々の病態において活性酸素とその消去機構の関係が検討され、炎症においても活性酸素と SOD の反応が PGs を含む多くの mediator に先立って認められるとの報告もあり、興味深い。一方、排卵における卵胞破裂現象が Bjersing ら、Espey らの指摘するように炎症類似反応であれば活性酸素との関連が推測される。しかし排卵前後の卵子および受精卵は酸素毒によりその発達が著しく障害されることは以前よりよく知られている。従って排卵が活性酸素と密接に結びつくものであれば、その配偶子防御機構としての SOD をはじめとする抗酸化酵素が必要であると考えられる。今回、我々は排卵現象と活性酸素およびその消去機構との関連について、活性酸素の第一段階として最も多く生体内で産出される Superoxide radical とその Scavenger 酵素である SOD を中心に検討を試みたので報告する。

方 法

1. SOD の排卵および卵成熟におよぼす影響について検討した。6～8週令 ICR マウスを用い、PMSG 5 単位、その48時間後に hCG 5 単位腹腔内投与し過排卵処置を行なった。hCG 投与直後より1時間毎に Cu、Zn-SOD として Purified recombinant human SOD (日本化薬より提供：以下 r-h SOD と略) 1 mg、2 mg、4 mg、8 mg を 0.2ml の生理的食塩水にて溶解し、計4回腹腔内投与した。hCG 投与15時間後、卵管膨大部より卵子を採取、排卵卵子数を測定した。さらに r-h SOD 投与後の卵胞卵子の変性率、受精率および多精子受精率についても検討した。また Mn-SOD として Polyethylene glycol SOD (武田薬品より提供：以下 PEG-SOD と略) 2 μ g、20 μ g、200 μ g、2000 μ g を hCG 直後および3時間後の2回腹腔内投与し、r-h SOD 同様、排卵卵子数を測定した。なお対照群は生理的食塩水 0.2ml を同様に投与し測定、比較した。
2. 25～28日令 Wistar 系ラットについてマウス同様の実験系で排卵卵子数の測定を行なった。つまり PMSG 15 単位、48時間後 hCG 10 単位投与し過排卵処置後、PEG-SOD 0.1mg、0.2mg、1 mg および 2 mg を hCG 投与直後と3時間後腹腔内投与し、hCG 15 時間後排卵卵子数を測定した。
3. Wistar 系ラットを用い、過排卵処置ラット卵巣内における生理的 SOD 活性の組織化学的局在について、Beauchamp ら⁴⁾の NBT 法を応用し (以下 NBT 変法と略) 検討した。照射によりリボフラビンより産出される Superoxide radical によって NBT が還元され青色不溶性のジホルマゼンに変化する反応を利用したもので、SOD 活性の局在しない部位では深青色を呈する。コント

ロールとして SOD 活性阻害剤ジェチルジチオカルバン酸を添加し、比較検討した。

4. 3 同様の検体を用い、SOD の免疫組織学的局在について Avidin-Biotin-peroxidase-complex (ABC) 法にて検討した。なお、一次抗体は Rabbit IgG anti-Rat Mn SOD (血清、大阪大学 生化学教室、谷口博士より分与) および Rabbit IgG anti-Rat Cu, Zn SOD を使用、固定は 4 %パラホルムアルデヒドにて15分間行ない、Vectastain ABC KIT を用い発色時間は 3 ~ 5 分間であった。

成 績

1. 過排卵マウスに SOD を投与し、排卵が抑制された。r-h SOD 投与では、対照群が 52.3 ± 4.2 個に対し 1 mg 4 回投与群 59.7 ± 7.6 個、2 mg 4 回投与群 49.7 ± 4.3 個、4 mg 4 回投与群 29.4 ± 2.7 個、8 mg 4 回投与群 26.9 ± 2.6 個と 4 mg および 8 mg 4 回投与群で有意な排卵抑制を認めた。さらに 4 mg 4 回投与群より得られた 26 個の卵胞卵子において変性卵は 1 個 (変性率 3.6%) で受精卵 23 個 (受精率 82.1%) 多精子受精卵 2 個 (多精子受精率 7.1%) であり、8 mg 4 回投与群での卵胞卵 91 個では変性卵 4 個 (4.4%)、受精卵 79 個 (86.8%)、多精子受精卵 8 個 (8.8%) と対照群での排卵卵子 248 個での変性卵 13 個 (5.2%)、受精卵 202 個 (81.5%)、多精子受精卵 18 個 (7.3%) と比較し、同等の変性率、受精率および多精子受精率であり、r-h SOD による卵成熟に対する影響はなかった。また Mn-SOD である PEG-SOD では対照群 46.6 ± 7.1 個に対し、2 μ g 2 回投与群で 46.4 ± 3.8 個、20 μ g 2 回投与群で 47.4 ± 4.6 個と同等であったが、200 μ g および 2000 μ g 2 回投与群は各々 30.4 ± 6.2 個および 21.1 ± 2.1 個と有意に排卵が減少した。
2. 過排卵 Wistar 系ラットにおいて PEG-SOD 0.1mg、0.2mg、1 mg、および 2 mg 2 回投与した場合、排卵数は各々 42.6 ± 6.3 個、 34.7 ± 7.2 個、 34.0 ± 7.2 個および 16.9 ± 7.6 個であり、対照群の 52.9 ± 6.3 個と比較して 0.2mg、1 mg、2 mg 2 回投与群で有意に減少を認めた。
3. ラット卵巣において、NBT 変法を行ない成熟卵胞の顆粒膜細胞および外莢膜細胞に SOD 活性が強く認められた。また血管を中心とした間質部にも活性が認められたが、発育卵胞、二次卵胞には SOD 活性は認められなかった。また排卵直後の黄体では深青色の濃淡が各々の黄体で異なっており、弱い SOD 活性を有する黄体の存在することが推測された。
4. ABC 法による免疫組織学的検討では Mn-SOD は成熟卵胞の外莢膜細胞と間質部に局在したが顆粒膜細胞、発育細胞および黄体には局在を認めなかった。一方、Cu、Zn-SOD は成熟卵胞の顆粒膜細胞、特に卵子を中心とした卵丘細胞に局在が認められ、また排卵直後の黄体および血管内皮細胞を中心とした間質部にも局在した。さらに卵管上皮細胞において Mn および Cu、Zn-SOD いずれも存在することが同様の検討で認められた。

考 察

in vivo の系で活性酸素の発生を検討することは、現時点においては容易なことではない。これは生体内における活性酸素の寿命が非常に短いこと、種々の抗酸化酵素やその他の生体有機物質との反応によって速やかに消失することなどの理由が挙げられる。従って、活性酸素の生体内における動態についてはその消去機構の Glutathion Peroxidase、Catalase などの測定や活性酸素によって生成される過酸化脂質の測定による間接的な解析がすすめられ報告されている。殊に活性酸素消去機構の最上流に位置する SOD は生体内に広く分布し比較的安定しており、活性酸素を研究する上で重要な物質と考えられる。排卵と活性酸素および消去機構に対する検討は緒についたばかりであり、未だに大部分の機序は明らかにされていない。Laloraya らは各性周期ラット卵巣を用いスピントラッピング法により Superoxide radical を、さらにピログロール法により SOD 活性を測定し、Superoxide radical は排卵直前を最低として減少ついで増加し、逆に SOD 活性は排卵直前をピークとし増減すると報告している。また須戸らは過排卵ラット卵巣において過酸化脂質は hCG 投与 9 時間後に一過性のピークを示し SOD 活性は二峰性のピークを hCG 投与後 12 時間、48 時間に有する増加傾向を認め、さらに過排卵ラットに SOD 単独および SOD と Catalase 併用投与し、有意な排卵抑制が認められると報告している。今回我々はマウスにおいて r-h Cu, Zn-SOD および PEG Mn-SOD のいずれもが排卵抑制作用を有することを示した。またマウスにおいて r-h SOD 投与では、大量かつ 1 時間毎 4 回投与方法が排卵抑制に必要であり、最も高い抑制率を示すことが判明した。これはマウスにおいて r-h SOD の半減期が約 3.2 分間と短いことによると考えられた。PEG SOD は r-h SOD より半減期も長く、強力な作用を有しているが排卵抑制作用の発現には 2 回投与が必要であった。2 種の SOD いずれも排卵抑制作用を有することより、活性酸素は排卵に対し何らかの促進的な影響を有しその影響を非特異的に消去する酵素作用によって排卵抑制がおこる可能性が示唆された。また排卵抑制によって得られた卵胞卵子においてその変性率、受精率および多精子受精率が対照群のそれらの率と差を認めなかったこと、さらにいずれの SOD のも非常に毒性が低いことより大量投与自体による排卵抑制現象である可能性は低いと考えられた。ラットにおいては PEG-SOD を用い、マウスよりさらに有意な排卵抑制が認められたがこれが動物種による差なのかは不明である。また前実験として hCG 投与前にも SOD を投与したが有意な排卵抑制は認められなかった。さらに SOD 投与方法、投与量などを種々変えてみても完全な抑制は認められなかった。また PGs およびその合成阻害剤投与による排卵抑制実験と比較して抑制率が低い。しかし大柳らは PGs を含む mediator の trigger として活性酸素が重要な役割を果たすと述べており、今回の実験結果と矛盾する。これは複雑な活性酸素およびその消去機構の一部である superoxide radical と SOD のみの作用だけでは十分ではなく、その他の scavenger system が関与している可能性を意味しているのと同時に活性酸素の排卵時期における産生が大量かつ速やかなことによると推測される。排卵抑制の認められる SOD の投与時期が hCG 投与直後から 4 時間後でありかつ SOD の半減期が非常に短いことより、排卵現象において活性酸素およびその消去機構が卵胞破裂の極めて早期に関与していると考えられる。

一方、卵巣組織における SOD の分布に関しては Laloraya らによる NBT 法を応用した組織化学的検討が報告されており、成熟卵胞顆粒膜細胞に最も強い活性が認められると報告している。今回

我々も同様の方法に成熟卵胞顆粒膜細胞および外莢膜細胞に最も強い SOD 活性を認めた。しかしこの方法においては組織特異性が低く、必ずしも十分なものとは言えない。そこで、免疫組織学的検討をラット Cu、Zn-SOD に対する抗体を用いて検討したところ、各々の SOD の分布に差があることを明らかにした。つまり Mn-SOD は成熟卵胞外莢膜細胞および間質部に局在し、Cu、Zn-SOD は主に成熟卵胞顆粒膜細胞、特に卵丘細胞に分布することが判明した。一般に Cu、Zn-SOD は細胞質内に、Mn-SOD はミトコンドリアのマトリックス区分に存在するとされており生物種および個体における各組織内分布、濃度により異なるが、その生理的意義は充分に解明されていない。哺乳類では Cu、Zn-SOD は細胞質以外に膜間スペース、核、ライソゾームに存在するとされているとされてきたが Marklund らは細胞外液中にも分泌型の Cu、Zn-SOD の存在を報告している。配偶子を酸素毒より防御するためには卵胞卵子においてはまず顆粒膜細胞に分泌型の Cu、Zn-SOD が存在することは合目的とも言える。また排卵後、卵管上皮細胞由来の SOD についての検討では Mn および Cu、Zn-SOD いずれも存在しており排卵卵子、さらには受精卵を酸素毒より防御することに役立っていると推測される。過排卵処置におけるラット卵巣では NBT 変法において、排卵直後の黄体間に SOD 活性の強弱差が認められ、さらに ABC 法においても Cu、Zn-SOD で同様の染色性の強弱が認められた。非妊娠ラットにおいて排卵後の黄体では速やかにその機能は低下するため妊娠黄体における SOD の局在を検討する必要があるが、黄体機能と SOD の関与が推測される。以上より排卵周辺において活性酸素と SOD が生理的意義を有することが示唆され、かつ Mn-SOD と Cu、Zn-SOD では異なる意義を持つことが推察された。